

천년초 선인장의 Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large Subunit (*rbcL*) 유전자 분석

(주)바이오피아, ¹충남농업기술원, ²경북대학교, ³경희대학교
이범수, 인준교, 한승호¹, 신철우¹, 김길수², 양덕춘³*

A Comparative Study of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large Subunit (*rbcL*) Gene in Chuncheoncho Opuntia

BioPia Co., Ltd, ¹Chungnam A.R.E.S., ²KyungPook National University, ³KyungHee University
Bum-Soo Lee, Jun-Gyo In, Seung-Ho Han¹, Cheol-Woo Shin¹, Gil-Soo Kim², and
Deok-Chun Yang³*

연구목적

북제주도에서 군락을 형성하여 자생하는 손바닥 선인장은 월동이 불가능하며 천년초 선인장과 같이 월동이 가능한 선인장이 전라도 등에서 발견되고 있으나, 생존률은 천년초에 비해서 떨어진 다. 손바닥 선인장은 식물도감에 의하면 기관지, 천식, 기침, 폐질환, 고혈압, 당뇨, 심장병 등에 효 능에 대한 연구가 진행되어 식품원료와 화장품원료로서 수요가 점차 증대하고 있어 중요한 농가소 득 작물로서 자리잡아가고 있다. 손바닥 선인장의 소비시장이 확대됨에 따라 명확한 기원 규명의 필요성이 대두되고 있으나, 부채선인장과 *Opuntia humifusa*와 유사한 형태를 가진 천년초 선인 장의 유전학적인 기초자료는 매우 부족한 실정이다. Opuntia 속 선인장의 유전적 다양성과 유연관 계에 대한 평가를 목적으로 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*)를 분리하고 염기서열분석을 통하여 천년초 선인장의 계통학적 유연관계를 밝히고자 본 연 구를 수행 하였다.

재료 및 방법

- 식물재료 : Opuntia속의 선인장은 미국에서 수입하였으며, 국내에서 자생하는 천년초, 백년초, 전라도 선인장은 충남 아산시 소재 (주)여러분의 천년초 농장에서 분양 받아 사용하였다. 시 료로 사용할 선인장의 줄기는 액체질소로 급냉하여 -80℃에 보관하였다.
- Genomic DNA extraction : 선인장들의 줄기 0.5 g을 채취한 즉시 액체 질소를 이용하여 급 속 동결후 막자사발을 이용하여 완전히 마쇄한 후 추출버퍼에 용해시키고 GENE/ALLTM SV column (Generalbiosystem, Korea)으로 정제하였다. 추출된 DNA는 spectrophotometer (Amersham Biosciences, USA)를 사용하여 정량 한 후 0.8% agarose gel에 전기영동하여 확 인하였고, 50 ng/ul로 희석한 후 소량씩 분주하여 -20℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였다.
- *rbcL* 유전자 cloning 및 sequence 분석 : 식물 *rbcL* primer(rev-GACTTATTAT- ACTCCCGAATATCAACCCCA, for-CAATTAAGGGATTTAAGTACTTAGCCT AGAGTTA)를 사용하여 PCR증폭(95℃ 30 sec, 55℃ 30 sec, 72℃ 1 min) 30회 실시하여 *rbcL* 영역을 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 cloning하여 염기서열분석을 실시하였다. Bioedit 프로그램(Tom hall)을 사용하여 벡터영역을 제거한 후 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 blast algorithm에 따라서 상동성 검색 을 실시하였고, Clustal W (1.83)로 유연관계를 조사하였다.

*주저자 연락처(Corresponding author) : 양덕춘 E-mail : dcyang@khu.ac.kr Tel : 031-201-2688

결과 및 고찰

국내에서 자생하며 월동이 가능한 천년초 선인장의 기원 규명을 목적으로 전라도 선인장, 백년초와 더불어 외국산 *Opuntia*속 선인장 22종을 수집하고 이들로부터 DNA를 추출하여 *rbcl* 유전자의 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 증폭 산물을 전기영동하여 확인한 후 agarose gel로부터 정제하였고, pGEM-T easy 벡터에 cloning하였다. rDNA 영역의 cloning 여부를 확인하고자 *Eco* RI 제한효소를 처리한 후 전기영동하여 insert 유무를 확인여 염기서열분석을 실시하였다. 그 결과 천년초 선인장으로 부터는 1,426 bp의 *rbcl* clone을 얻었다(Fig. 1). 천년초 선인장의 기원을 명확히 하기 위해서는 유연관계가 가까운 *Opuntia*속 선인장들의 *rbcl* 유전자를 cloning하여 염기서열을 비교할 필요성이 있다. 미국에서 수집한 *Opuntia*속 선인장 *O. humifusa*, *O. rufida*, *O. marmae*, *O. violacea* v. Sauta Rita, *O. stuopctala* 5종과 국내에 자생하는 천년초, 백년초, 전라도 선인장의 *rbcl* 영역을 cloning하여 염기서열을 분석하여 비교하였다. 그 결과 천년초 선인장은 *Opuntia humifusa*와 99%의 매우 높은 유사도를 나타냈으며, 국내 자생종인 전라도 선인장, 백년초 선인장과 99%의 높은 유사도를 나타내었다(Fig. 2).

국내 자생종인 천년초 선인장과 백년초 선인장은 99% 이상의 매우 높은 유사도를 보였으며, 전라도 선인장은 *Opuntia humifusa*와 99%의 매우 높은 유사도를 내었고, 미국에서 수집한 *Opuntia rufida* 등과도 마찬가지로 99%의 높은 유사도를 보였다(Fig. 3).

rbcl-for

GACTTATTAT **ACTCCGAAT** ATCAACCCCA GGATACCGAT ATCTTGGCAG CATTCCGAGT 60
 AACCCCTCAA CCTGGAGTTC CGTCAGAAGA AGCAGGAGCC GCAGTAGCTG CCGAATCTTC 120
 TACTGGTACA TGGACAAC TG TATGGACCGA CGGACTTACC AGTCTTGATC GTTACAAAGG 180
 ACGATGCTAC CACATCGATG CCGTTCCTGG AGAAGACAAT CAATATATTT GTTATGTAGC 240
 TTACCCATTA GACCTTTTGG AAGAAGGTTT TGTACTAAT ATGTTTACTT CCATTGTGGG 300
 TAATGTATTT GGGTTCAAGG CCTGCGTGC TCTACGTTTG GAGGATTTGC GAATCCCTGT 360
 TGCTTATAATA AAAACTTTCC AAGGCCCGCC CCACGGTATC CAAGTTGAGA GAGATAAATT 420
 GAACAAGTAT GGCCGTCCTC TACTGGGATG CACTATTAAG CCGAAATTGG GGTATCCCGC 480
 TAAAACTAT GGTGAGCAG TTTATGAATG TCTTCGCGGT GGACTTGATT TTACCAAAGA 540
 TGACGAAAAC GTGAACCTCC AGCCATTTAT GCGTTGGAGA GACCGTTTCT TATTTTGTGC 600
 CGAAGCAATT TATAAGCAC AGGACGAAAC AGGTGAAATC AAAGGGCATT ACTTGAATGC 660
 TACCGCAGGT ACATGCGAAG AAATGATAAA AAGGGCTGTA TTTGCCAGAG AATTGGGTGT 720
 TCCTATCGTA ATGCATGACT ACTTAACAGG TGGATTCACT GCAAATACTA GCTTGGCTCA 780
 TTATTGCCGA GATAACGGTC TACTCCTTCA CATCCATCGT GCAATGCACG CAGTATTGA 840
 TAGACAGAAG AATCATGGTA TGCACTTCCG TGTAAGCTAGCT AAAGCGTTAC GTCTGTCTGG 900
 TGGAGATCAT ATTCATGCTG GTACCGTAGT AGGTAAGCTT GAAGGGGAAA GAGATATCAC 960
 TTTAGGCTTT GTTGATTTAC TACGTGATGA TTATACTGAA ATAGACGCAA ATCGCGGTAT 1020
 TTATTTCACT CAATCTTGGG TTTCCACACC AGGTGTTCTG CCCGTTGCTT CGGGAGGTAT 1080
 TCACGTTTGG CATATGCCCG CTCTAACCGA GATCTTTGGG GATGATTCCG TACTACAGTT 1140
 CGGTGGAGGA ACTTTAGGGC ACCCTTGGGG GAATGCACCG GGTGCTGTAG CGAATCGAGT 1200
 AGCTCTAGAA GCATGTGTAC AAGCTCGTAA TGAGGGACGT GATCTTGCTC GCGAAGGTGC 1260
 TACAATTATT CGCGATGCTA GCAAATGGAG TCCTGAACCTA GCCGCTGCTT GTGAGGTATG 1320
 GAAAGAAATA AAATTTGAGT TCCCGGCGAGT GGATACTTTG GATAAAAAGA AAGGATAAAA 1380
 AGAAAATAGG **ATAACTCTAG** GCTAAGTACT TAAATCCCTT AATTGA 1426

rbcl-rev

Fig. 1. Schematic diagram of chunnyeoncho rDNA region and nucleotide sequence. A pair of *rbcl* primers are represented with boldic.

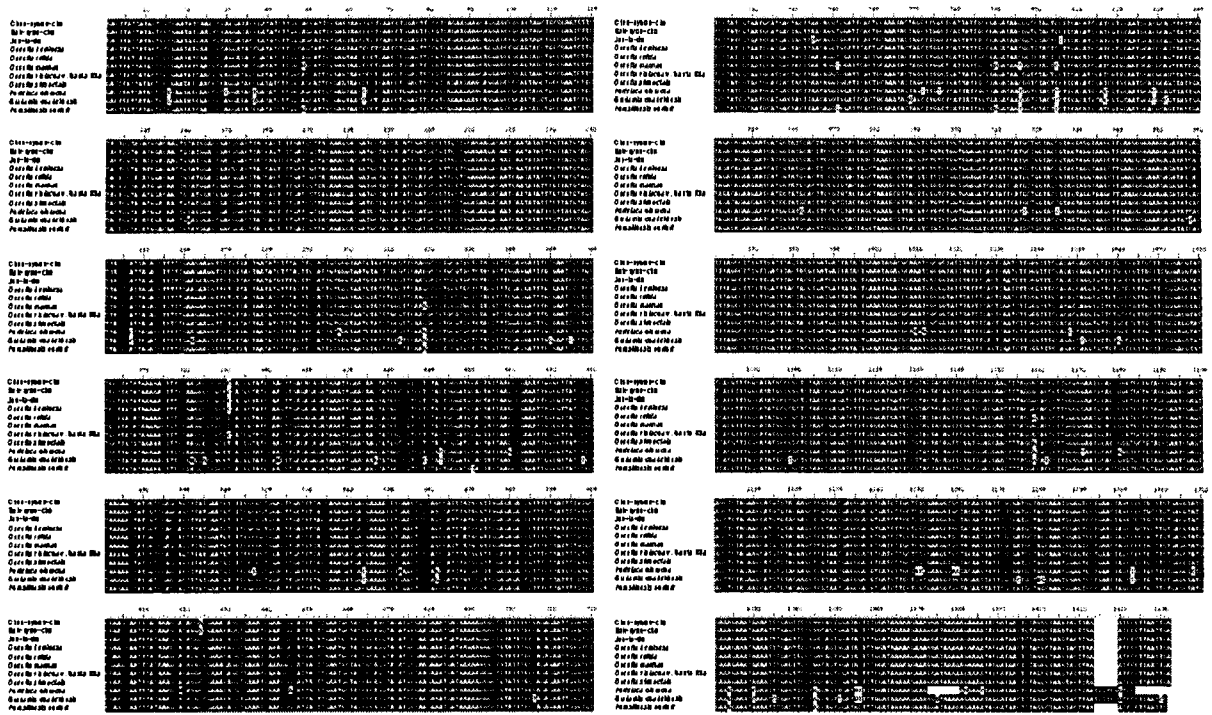


Fig. 2. Multiple alignment of the *rbcL* sequence among Cheonnyeoncho, Baknyoncho, Junlado, *O. humifusa*, *O. rufida*, *O. marmae*, *O. violacea* v. Sauta Rita, *O. stuopctala*, *P. oleracea*, *G. coahuilensis* and *P. porteri* plants. Sequence datas were aligned using ClustalW (1.83).

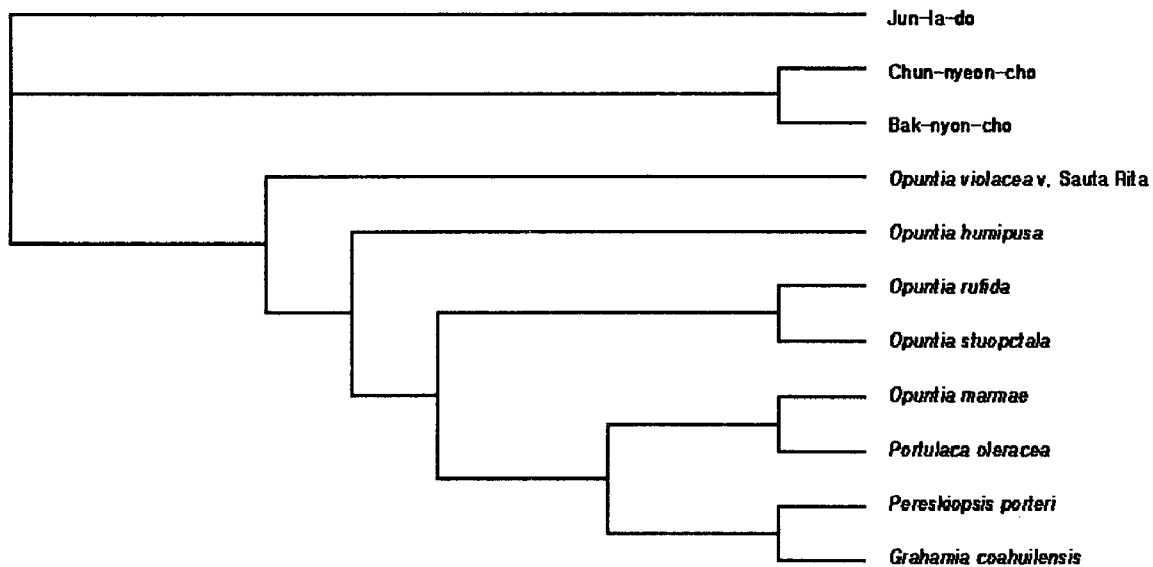


Fig. 3. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences among *Opuntia rbcL* gene.