

## 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large Subunit(rbcL) Gene의 Cloning

이정현 · 임용표<sup>1</sup> · 박지창 · 최광태

한국인삼연구소연구원 유전생리부, <sup>1</sup>충남대학교 농과대학 원예학과  
(1994년 9월 27일 접수)

### Cloning of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Large Subunit(rbcL) Gene from Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)

Jeong Heon Lee, Yong Pyo Lim<sup>1</sup>, Ji Chang Park and Kwang-Tae Choi

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Science Town, Taejon 305-345, Korea

<sup>1</sup>Department of Horticulture, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

(Received September 27, 1994)

**Abstract** The DNA fragment containing ginseng ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit(rbcL) gene was cloned from the ginseng chloroplast *Eco*RI library by colony lift hybridization with tobacco rbcL gene probe. From the screened clone, the DNA fragment containing ginseng rbcL gene was digested with several restriction enzyme and analyzed by Southern blot hybridization for the construction of restriction map. The ginseng rbcL gene fragment was subcloned in pBluescript II SK+ vector and sequence analysis was performed. The nucleotide sequence of ginseng rbcL gene was compared with those of petunia, tobacco, alfalfa, rice and barley, which showed a homology of 93.1%, 95.2%, 90.5%, 85.5% and 84.3%, respectively.

**Key words** |ginseng, chloroplast, rubisco.

## 서 론

광합성은 생물계에 에너지를 공급하는 근원적 mechanism으로 광합성에 대한 이해는 학문적 가치 이외에도 식량자원 및 기타 농업 생산성 증대 등 그 가치가 매우 크므로 광합성과 관련된 많은 연구가 이루어져 왔다. 특히 최근에는 식량문제가 심각해지고 식물자원의 경제적 가치가 더욱 중요해지고 있으며, 생화학 및 분자생물학 등의 연구방법이 발달함에 따라 광합성에 관한 연구가 더욱 활발해지고 있다.

엽록체는 식물체에서 광합성을 수행하는 세포내 소기관으로서 광합성을 이해하는데 매우 중요하므로 생리학<sup>1,2)</sup> 혹은 유전학<sup>3)</sup> 그 측면에서 많은 연구가

수행되어 왔다. 또한 엽록체가 별도의 유전자를 갖는다는 것이 밝혀진 이래<sup>4)</sup> 엽록체에 대한 분자생물학적 접근이 이루어져 pea,<sup>5,10)</sup> tobacco,<sup>11)</sup> *Euglena*,<sup>12)</sup> *Chlamydomonas*<sup>13)</sup> 등에서 생리학적, 분자생물학적 구조와 특성이 연구되었으며, 엽록체 DNA는 대개 120~160 kbp 크기의 환형구조를 가지고 있고, 특징적으로 inverted repeated sequence를 가지고 있음이 밝혀졌다.<sup>8)</sup> 특히 *Marchantia polymorpha*,<sup>14)</sup> tobacco<sup>15)</sup> 등에서는 엽록체 DNA 전체의 염기서열이 밝혀지는 등 최근 광범한 연구성과를 거두고 있다.

고려인삼의 경우에 최근들이 사구에서도 그 효능을 인정받는 등 수요가 급증하고 있으나 재배시 직사광선에 약하여 차광시설을 설치해야 하는 등 경제적

문제점이 있으므로 인삼의 광합성에 대한 이해가 매우 중요시되고 있다. 그러나 이러한 중요성에도 불구하고 생리학적 접근<sup>1,3)</sup>이 부분적으로 이루어지고 있을 뿐, 인삼 광합성에 대한 분자생물학적 연구는 거의 전무한 실정이다.

따라서 본 연구자들은 인삼 광합성 연구의 일환으로 인삼 엽록체에 대한 분자생물학적 접근을 수행하여 엽록체 DNA 분리방법 및 엽록체 DNA 특성에 관한 보고를 한 바 있으며,<sup>16)</sup> 본 연구에서는 인삼 엽록체 DNA의 유전자은행을 작성한 후 광합성의 암반응에서 CO<sub>2</sub>의 고정과 연관되어 있는 유전자인 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene을 cloning하고 부분적으로 염기서열을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 잎을 수확하여 -70°C에서 보관하였다가 엽록체 DNA의 분리에 사용하였다. 유전자은행 작성 및 cloning 등에서 vector는 Stratagene사의 pBluescript+ 혹은 pBluescript II SK+를 사용하였으며 host는 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 를 사용하였다.

모든 시약은 Sigma, Aldrich 및 Boehringer Mannheim에서 molecular grade 이상의 것을 구입하여 사용하였다.

### 2. 인삼 엽록체 DNA의 분리 및 정제

인삼 엽록체 DNA의 분리를 위하여는 -70°C에서 보관한 인삼잎 약 15 g를 사용하였으며, Lee 등의 방법<sup>16)</sup>을 사용하였다.

### 3. 인삼 엽록체 유전자은행의 작성

인삼의 엽록체 DNA 유전자은행의 작성을 위하여 pBluescript+ vector를 사용하였으며 host로는 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 를 사용하였다. 유전자은행 작성은 Sambrook 등의 방법<sup>17)</sup>을 기본으로 하였으며, *EcoRI*으로 절단한 엽록체 DNA를 vector와 ligation한 후 CaCl<sub>2</sub>를 이용한 방법으로 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 transformation하였다.

### 4. 인삼 엽록체 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit(rbcL)의 cloning

인삼 엽록체 DNA 유전자은행으로부터 ribulose-1,

5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)의 gene을 cloning하기 위하여 colony lift hybridization 및 Southern hybridization을 실시하였으며, 담배 BY4의 rbcL gene을 Dr. Sugiura(center for gene research, Nagoya University)로부터 분양받아 probe로 사용하였다. Probe의 제조에는 random labeling 방법을 사용하여 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP로 labeling하였다.

### 5. 인삼 엽록체 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit(rbcL)의 부분적 염기서열 분석

담배의 rbcL gene을 probe로 colony lift hybridization을 실시하여 양성반응을 보이는 4개의 clone을 얻었으며, 이 중 10번 colony에 대하여 제한효소지도를 작성하였다. 제한효소지도 상에서 rbcL gene의 위치를 확인하기 위하여 같은 probe를 사용하여 Southern hybridization을 실시하였다.

제한효소지도 및 Southern hybridization의 결과물을 토대로 염기서열을 분석하기에 적합하도록 subcloning을 실시하였으며 이때 vector는 pBluescript+ 혹은 pBluescript II SK+, host는 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 사용하였다. Subcloning된 clone 중 일부에 대하여 염기서열을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 인삼 엽록체 유전자은행의 작성

인삼 엽록체 DNA를 제한효소 *EcoRI*으로 완전 절단한 후에, *EcoRI* 절단 및 CIP 처리를 한 pBluescript+ vector에 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation하였다. 재조합된 DNA는 CaCl<sub>2</sub> 방법을 이용하여 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 transformation하였으며, X-gal 및 IPTG를 이용하여 recombinant DNA를 포함한 colony 325개를 선발하였다.

선발된 colony의 일부로부터 DNA를 추출한 후 제한효소 *EcoRI*으로 절단하여 3.2 kbp의 vector DNA에 다양한 크기의 insert DNA가 삽입되어 있음을 확인하였다(Fig. 1).

### 2. 인삼 엽록체 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit(rbcL)의 cloning

Dr. Sugiura로부터 분양받은 담배 BY4의 엽록체 DNA중 rbcL gene을 포함한 부분을 probe로 사용하였으며, Fig. 2와 같이 제한효소 *BamHI*로 절단한 후

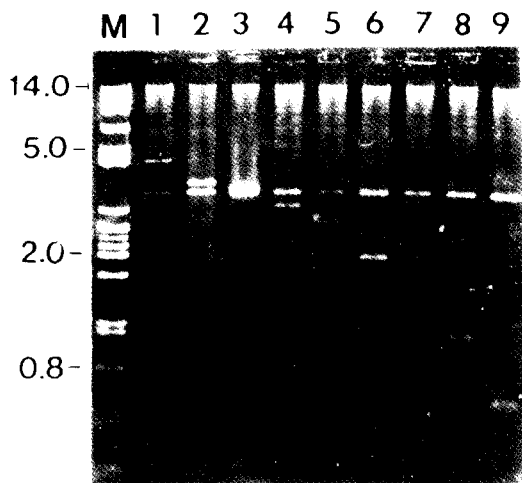


Fig. 1. Agarose gel electrophoretic patterns of *Eco*RI digested ctDNA genomic library of Korean ginseng (Lane M: Lambda DNA digested with *Hind*III and *Pst*I; Lane 1~9: Various DNA fragments which were inserted in vector DNA).

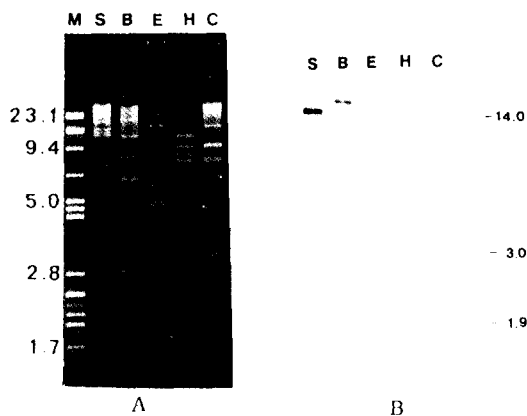


Fig. 3. Restriction enzyme digestion (panel A) and Southern blot analysis (panel B) pattern of Korean ginseng chloroplast DNA (M: Lambda DNA digested with *Hind*III and *Pst*I, S: *Sal*I, B: *Bam*HI, E: *Eco*RI, H: *Hind*III and C: *Cla*I, probed with tobacco probe P2).



Fig. 2. Diagram of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene probe from tobacco.

두개의 DNA 분획을 각각 P1 및 P2로 명명하여 사용하였다. Probe P1은 2,126 bp로서 이 중 rbcL gene 5'의 416 bp 영역을 포함하고 있으며, probe P2는 1,238 bp로서 rbcL gene 3'의 973 bp의 부분을 포함하고 있다.

제한효소 *Sal*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI 및 *Cla*I으로 절단한 후 전기영동한 인삼의 엽록체 DNA에 probe P2를 이용한 Southern hybridization을 실시한 결과 *Sal*I 절단 분획에서 약 20 kbp, *Bam*HI 절단 분획에서 약 20 kbp, *Eco*RI 절단 분획에서 3.2 kbp 및 2.9 kbp, *Hind*III 절단 분획에서 13 kbp, *Cla*I 절단 분획에서 1.9 kbp의 band가 나타나 인삼 엽록체 DNA내 rbcL gene의 존재를 확인(Fig. 3)하였으며, 인삼의 엽록체 DNA 유전자은행으로부터 325개의 colony를 배지에 spotting한 후 mitocellulose paper에 transfer하고,

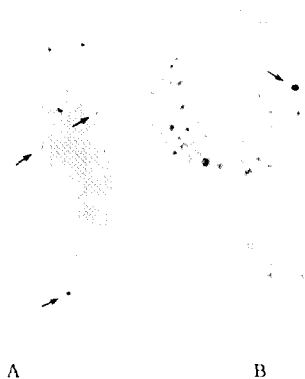


Fig. 4. Colony lift hybridization patterns of Korean ginseng ctDNA library probed with P1 (panel A) and P2 (panel B). Arrows indicate the positive colonies.

probe P1 및 probe P2를 이용한 hybridization analysis를 실시한 결과 probe P1으로부터 3개, probe P2로부터 1개의 positive colony를 선발하였다(Fig. 4).

### 3. 인삼 엽록체 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit(rbcL) 유전자의 제한효소 지도 및 염기서열 분석

Colony lift hybridization에 의해 선발된 colony 중 10번째 colony로부터 DNA를 추출하여 Fig. 5A와 같이 여러 종류의 제한효소로 절단 후 전기영동하여 제한



phosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene을 probe로 colony lift hybridization을 실시하여 인삼 rbcL 유전자를 포함하는 DNA 절편을 얻었다.

Cloning된 인삼 rbcL 유전자 포함 DNA 절편에 대한 제한효소지도도를 작성하였으며 연초의 rbcL 유전자를 probe로 Southern blot analysis를 실시하여 제한효소상의 rbcL gene의 위치를 확인하였다. 인삼 rbcL gene을 포함하는 DNA 절편을 subcloning한 후 rbcL gene의 일부분에 대한 염기서열을 분석하였으며 petunia, tobacco, alfalfa, rice 및 barley의 동 위치의 염기서열과 비교하였다. 분석된 염기서열은 각각 93.1%, 95.2%, 90.5%, 85.5%, 84.3%의 homology를 가지고 있음이 밝혀졌다.

#### 인 용 문 헌

1. Lee, C. H. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **12**, 11 (1988).
2. Park, H. : *Proc. 3rd Intl. Ginseng Sym.*, p. 151 (1980).
3. Kim, K. S., Son, J. H. and Choi, K. T. : *Korean J. Bot.*, **33**(2), 111 (1990).
4. In, T. A., Baker, N. R. and Barber, J. : *Chloroplast Biogenesis*, Elsevier, Amsterdam, p. 23 (1984).
5. Ellis, R. J. : *Chloroplast Biogenesis*, Cambridge University Press, Cambridge, p. 83 (1984).
6. van Vloten-Doting, L., Groot, G. S. P. and Hall, T. C. : *Molecular form and Function of the Plant Genome*, Plenum Press, New York, p. 175 (1985).
7. Hsu, C. L. and Mullin, B. C. : *Plant Cell Reports* **7**, 356 (1988).
8. Palmer, J. D. : *Annu. Rev. Genet.*, **19**, 325 (1985).
9. Bergmann, P., Schneider, M., Burkard, G., Weil, J. and Rochaix, J. D. : *Plant Sci.*, **39**, 133 (1985).
10. Cozens, A. L. and Walker, J. E. : *Biochem. J.*, **236**, 453 (1986).
11. Sugiura, M. : *Bot. Mag.*, **100**, 407 (1987).
12. Gray, P. W. and Hallick, R. B. : *Biochemistry* **17**, 284 (1978).
13. Dron, M., Rahire, M. and Rochaix, J. D. : *J. Mol. Biol.*, **162**, 775 (1982).
14. Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T. S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. and Ozeki, H. : *Nature* (London) **322**, 572 (1986).
15. Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubauashi, T., Zaita, N., Chunwonse, J., Obokata, J., Yamaguchi Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B. Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M. : *EMBO J.*, **5**, 2043 (1986).
16. Lee, J. H., Lim, Y. P. and Choi, K. T. : *Korean J. Ginseng Sci.*, **17**(1), 39 (1993).
17. Sambrook, J., Ritsch, E. F. and Maniatis, T. : *Molecular Cloning : Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).