

고추의 게놈 분석

安正善* · 金聖千 · 高世利

서울대학교 自然科學大學 生物學科

Thermal denaturation, reassociation kinetics 및 핵부피 측정 방법으로 고추 게놈의 염기 조성, kinetic component 및 게놈 크기를 조사하였다. 변성온도(T_m)에 근거한 고추 게놈의 염기 조성은 37% (G+C) 였으며, Cot 커브에 근거한 고추 게놈은 카피수가 10,754, 178 및 1이고 kinetic complexity가 5.6×10^5 bp, 1.9×10^6 bp 및 8.48×10^8 bp인 3개의 성분이 게놈의 4.2%, 26% 및 65%를 차지하고 있었다. 이로부터 계산한 고추 게놈의 크기는 1.25×10^9 bp/C인데, 이는 핵부피($62.4 \mu m^3/C$)로부터 계산한 4.053×10^9 bp/C의 약 33%에 해당한다.

주요어: 고추, (G+C)%, reassociation kinetics, 핵부피, 게놈 크기

고등 식물 게놈 크기는 가장 작은 애기장대의 경우 7×10^4 kb이고 가장 큰 백합의 일종인 *Fritillaria assyriaca*는 4×10^8 kb로 매우 다양하지만 대부분 $10^5 \sim 10^7$ kb 정도이며, 피자식물내에서는 약 2,500배 정도의 변이가 있다(Price *et al.*, 1973; Bennett and Smith, 1991).

담배, 목화 및 콩 등 식물의 게놈을 reassociation kinetics로 분석한 결과, 회문구조를 이루고 있는 fold-back DNA, highly-, middle- repetitive DNA 및 single copy DNA로 구성됨이 밝혀져 전형적인 진핵생물의 양상을 보여주고 있다. 그러나 게놈내에서 이들이 차지하는 비율은 서로 다르며, 특히 single copy 혹은 unique DNA의 비율이 broad bean인 경우는 20%에서 목화의 경우는 68%로 다양한데, 대부분의 식물에서는 동물과 달리 50% 이하이다(Walbot and Goldberg, 1979).

C-value paradox로 알려진 게놈 크기와 체제의 복잡성 혹은 진화정도와의 불일치는 아직 풀리지 않는 문제인데, 배수체화, 유전자의 수효 및 크기의 증가로 설명을 시도하기도 하지만 일반적으로 전체 게놈의 30~90%를 차지하는 암호화 능력이 없는 nongenic DNA의 증가로 설명하고 있다(Cavalier-Smith, 1985; Li and Grauer, 1991).

또한 게놈 분석은 게놈의 구조와 기능을 이해하기

위해서 필요한 정보를 제공할 뿐만 아니라 제한효소 분석, 게놈라이브러리 작성 및 유전자 발현조절 등 유전자를 이용한 다양한 연구를 효율적으로 수행하기 위해서 필요한 정보도 제공한다(Bennett and Smith, 1991).

최근까지 고추의 게놈 분석에 대한 연구는 flow cytometry 및 Fleugen 방법에 의해 게놈 크기가 4.0~5.4 pg임이 보고된 정도이다(Arunmuganathan and Earle, 1991). 따라서 본 연구에서는 식용 및 가공용으로 중요한 작물인 고추를 대상으로 게놈의 염기 조성 및 kinetic component의 구성을 조사하고 게놈 크기를 계산하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

고추(*Capsicum annuum* cv. Daepoong)와 담배(*Nicotiana tabacum*)를 growth chamber에서 온도 26°C, 광주기 16:8(주:야) 조건에서 재배하여 실험 재료로 사용하였다.

DNA 분리

고추와 담배의 잎을 액체질소를 이용하여 간 후 2× extraction buffer(2% Cetyltrimethylammonium bromide, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M

*교신저자: Fax (02) 704-3601
© 한국식물학회 [서울] 1996

NaCl, 2% β -mercaptoethanol)를 첨가하여 준 후 phenol:chloroform(1:1) 용액으로 단백질을 제거하였다. 상정액에 isopropanol을 처리하여 DNA를 침전시킨 후 Tris-EDTA(TE) buffer에 녹여 RNase를 처리하고 37°C에 30분간 방치하였다. Ammonium acetate를 최종농도 2.5 M되게 첨가한 후 에탄올 침전시켜 0.12 M phosphate buffer(PB)에 녹였다(Taylor *et al.*, 1993)

DNA의 thermal denaturation

고추 DNA(12.5 μ g/mL)를 Shimadzu double-beam spectrophotometer(UV-160A)의 jacketed cuvette에 넣고 45°C에서부터 95°C까지 1.5°C/min로 온도를 증가시켰다. 변성과정은 A_{260} 의 증가(hyperchromicity)로 측정하였고 대조구로는 담배 DNA를 사용하였다. DNA 변성이 50% 진행된 온도인 melting temperature(T_m)는 hyperchromicity(ΔA_{260})가 50%일 때의 온도이며, (G+C)%는 Felsenfold(1971)의 식 $(G+C)\% = 2.44(T_m - 69.35)$ 을 이용하여 계산하였다.

DNA reassociation

DNA reassociation 실험은 Britten 등(1974)의 방법에 따라 수행하였다. 고추 및 담배의 DNA를 [3 H]-deoxycytidine으로 nick-translation하여 tracer DNA를 준비하였고, unlabelled DNA와 1:2,500으로 혼합한 후 Virtis homogenizer 45 K에서 30분 동안 shearing하고 ethanol로 침전시켜 0.01 M PB에 녹였다. 이를 Sephadex G50-Chelex100 컬럼에 적재하고 0.12 M PB로 용출하여 mononucleotide와 이가 양이온을 제거하였고(Willard *et al.*, 1969), 2% 아가로스 겔에서 전기영동하여 DNA 절편의 크기를 확인하였다. Cot마다 약 2,500 count per minute에 해당되는 DNA 시료(약 100 μ g/mL 0.12 M PB)를 20~100 μ L의 모세관내에 밀봉한 후 5분 동안 100°C에서 가열하여 denaturation 시키고, 60°C 수조에서 Cot값이 0.002에서 10⁵까지 reassociation시켜 dry ice-ethanol에서 냉각하여 -20°C에 보관하였다.

보관 중인 시료를 50 μ g의 calf thymus DNA를 포함하는 1 mL의 0.12 M PB에 혼합한 후 water-jacketed 컬럼에 마련한 hydroxylapatite 컬럼(2 mL bed volume)에 적재한 후, 60°C에서 0.12 M PB로 1 mL씩 5번 세척하여 단일가닥 DNA를 분리하였고 이중가닥 DNA는 100°C에서 50% 질산용액 1 mL로 세척하였다.

DNA 농도(moles nucleotide per liter)와 반응시간(초)을 곱한 값인 Cot에서의 reassociation 정도는 단일가닥과 이중가닥 DNA의 방사능을 Beckman LS-250 scintillation counter로 측정하여 계산하였으며, 실험 결과는 $C/C_0 = 1/(1+kCot)$ 식을 이용하여 nonlinear-squares computer program(PRIZM)으로 분석하였다.

핵부피 측정

담배 및 고추의 꽃밥을 잘라서 얻은 소포자체를 95% ethanol:17.4 M 빙초산=3:1 용액에서 24시간 고정된 후 rehydration시켜 0.1% Triton X-100을 10분간 처리하였다. 이를 0.5 μ g/mL 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 염색하여 형광현미경으로 관찰한 후, Image Analyzer(ITIPC Vision Plus Grabber, resolution 512 \times 512 pixels)를 사용하여 형광 핵부피를 측정하고 그래프를 작성하여 세포내 핵부피(NV)를 결정하였다. DNA함량은 Baetcke 등(1967) 식 $\log DNA(\text{pg}/\text{cell}) = -1.497 + 1.22 \log NV(\mu\text{m}^3)$ 으로 전환하였다.

결과 및 고찰

고추 계놈의 염기 조성

고추 및 담배의 잎에서 분리한 DNA의 변성곡선은 Fig. 1과 같다. DNA의 변성에 의한 A_{260} 의 증가인 hyperchromicity는 각각 25%, 27%였으며 모두 10°C 범위에서 변성이 완결된 점은 DNA 시료에 RNA나 단백질이 오염되지 않았음을 보여주는 것이다. A_{260} 가 50%

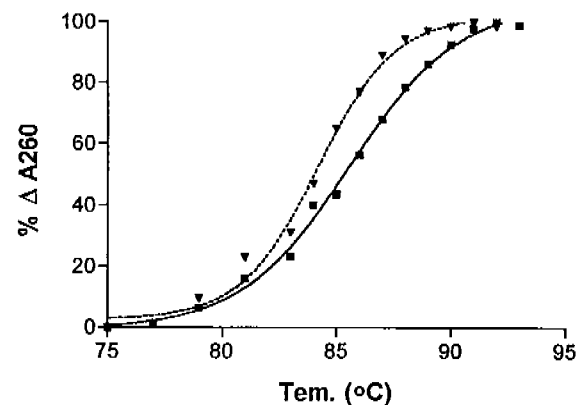


Fig. 1. Thermal denaturation curves of tobacco (dashed line) and red pepper (solid line) DNA.

인 온도인 변성온도(Tm)는 고추와 담배의 경우 각각 84.5°C와 85.7°C이고, 이로부터 계산한 고추와 담배 게놈 DNA의 (G+C) 함량은 각각 37%와 40%였으며, 담배의 경우는 보고된 40% (G+C) (Sapiro *et al.*, 1976)와 일치하였다. 피자식물의 (G+C) 함량이 35.6~49.1%이므로 고추 게놈의 (G+C)%는 매우 낮은 값에 속한다고 하겠다.

고추 게놈의 reassociation kinetics

단일가닥으로 변성시킨 약 300 nt의 고추 DNA 절편이 이중가닥 DNA를 형성하는 과정을 least square 방법으로 분석하여 서로 다른 이차반응 상수

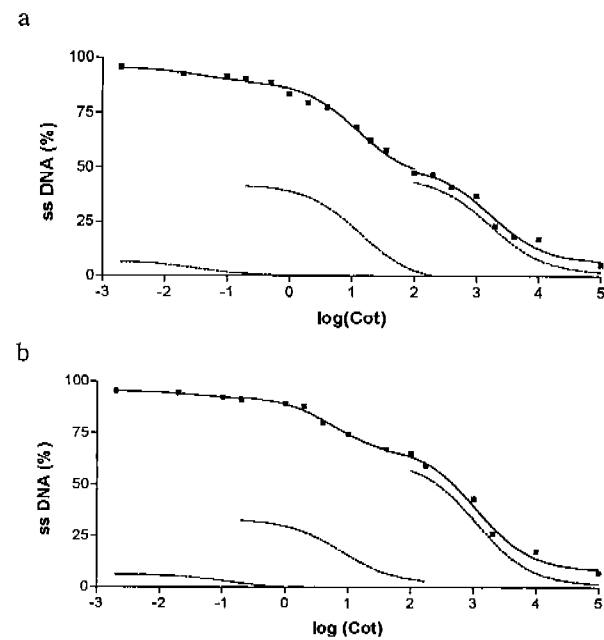


Fig. 2. Hydroxyapatite reassociation kinetics of tobacco (a) and red pepper (b) DNA. The solid curve portrays a least square solution of the reassociation data using three second-order components represented by the dashed curves.

를 갖는 세 개의 kinetic component로 구성된 Cot 커브(Fig. 2)를 얻었으며, 각 성분의 특성은 표 1과 같다.

대조구로 사용한 담배의 경우 Cot 100에서 fast와 intermediate 성분의 반응이 완료되었는데, 이는 본 실험과 동일한 조건(60°C, 0.12 M PB)에서 실험한 다른 식물의 경우와 동일하였다. 또한 Cot 커브의 정확도를 판단하는 RMS(root mean square) 값이 0.8~3.1%(자료 미제시)로 유사한 실험의 경우와 같이 매우 낮았으며, 게놈 크기는 1.59 pg으로 이미 보고된 1.6~1.65 pg (Walbot and Goldberg, 1979)과 유사하였다. 이러한 결과는 본 reassociation kinetics 실험이 수용할 수 있는 오차 범위내에서 정상적으로 수행되었음을 보여주는 것으로 판단된다.

고추의 경우도 Cot 100에서 반복서열인 fast와 intermediate 성분의 reassociation이 완성되었으며 RMS 값이 0.1~3.5%(자료 미제시)로 담배의 경우와 유사하였다. 그러나 반복서열의 비율은 약 30%로 담배의 경우보다 약 20%가 낮았으며, 대신 single copy 성분의 비율은 65%로 담배보다 약 18% 높았다. Reassociation kinetics 분석에 의한 고추의 게놈크기는 1.25×10^9 bp 혹은 1.3 pg으로 담배의 약 80%, 애기장대의 약 17배에 해당된다.

한편 담배의 경우 반복서열 성분이 차지하는 비율은 약 50%로 이미 보고된 약 70%보다 20% 낮았으며, 상대적으로 single copy 성분의 비율은 47%로 이미 보고된 약 23%보다 24% 정도 높았다(Zimmermann and Goldberg, 1977). 이러한 차이는 시료 DNA의 길이 혹은 reassociation과 HA chromatography의 stringency같은 실험조건의 차이에 의해서 특정 성분의 비율과 빈도의 차이가 나기 때문(Walbot, 1976)인 것으로 판단된다.

고추의 핵부피

Table 1. Kinetic analysis of tobacco and red pepper DNA (tobacco/red pepper)

Component	Fraction of Genome ^a	K _{pure} ^b	Cot _{1/2pure} ^c	No. of Copy ^d	Complexity ^e
Foldback	0.04/0.05				
Fast	0.05/0.04	500/166.7	0.002/0.006	51,342/10,754	$1.9 \times 10^3 / 5.6 \times 10^3$
Intermediate	0.44/0.26	0.17/0.49	6.03/2.05	123.7/177.7	$5.6 \times 10^6 / 1.9 \times 10^6$
Single copy	0.47/0.65	0.0013/0.0011	787.9/908.7	1/1	$7.35 \times 10^8 / 8.48 \times 10^8$

^aFraction of 300 nt DNA fragments containing sequences of each component, ^bK_{pure} = K_{observed} × fraction of genome, ^cCot_{1/2pure} = Cot_{1/2observed} × fraction of genome, ^dDerived by ratio of (K_{observed} repetitive)/(K_{observed} single copy), ^eCalculated by comparison of the rate of reassociation of each component to that of *E. coli* DNA (Cot_{1/2} = 4.5, Kinetic complexity = 4.2×10^6 bp).

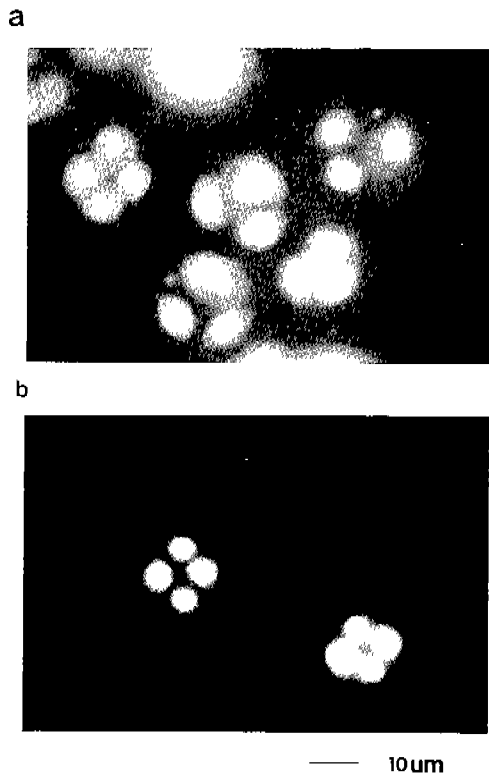


Fig. 3. Nuclei of tobacco (a) and red pepper (b) tetraspores stained with DAPI.

담배와 고추의 소포자체를 DAPI로 염색하여 형광 현미경으로 핵을 관찰하고(Fig. 3) Image analyzer를 이용하여 핵부피를 측정하고 핵부피 분포를 조사하였는데(Fig. 4), 첫번째 peak는 포자체의 핵부피로 1C에 해당하며 두번째 peak는 생식세포와 화분관세포로 분열하기 전에 복제된 핵부피로 2C에 해당한다. 담배의 핵 부피 $73.5 \text{ } \mu\text{m}^3/1\text{C}$ 는 $4.8 \text{ pg}/1\text{C}$ 에 해당되며 고추의 핵부피 $62.4 \text{ } \mu\text{m}^3/1\text{C}$ 는 $4.2 \text{ pg}/1\text{C}$ 에 해당되는데, 이는 유사한 방법으로 계산한 $4.4\sim 4.8 \text{ pg}$ 과 $4.0\sim 5.4 \text{ pg}$ 에 각각 유사하지만(Arumugenathan and Earle, 1991) reassociation kinetics로부터 계산한 $1.59 \text{ pg}/1\text{C}$ 및 $1.30 \text{ pg}/1\text{C}$ (Table 1)와 비교하면 각각 3.0배와 3.2배에 해당된다.

일반적으로 핵부피로 측정된 계놈 크기는 reassociation kinetics 분석에 의한 계놈 크기보다 약 2~3배 큰데(Arumugenathan and Earle, 1991), 담배는 사배체 이므로 양친인 이배체 계놈 사이에 매우 높은 유사성이 있다고 가정하면 reassociation kinetics 분석에서 각 성분의 빈도가 두 배가 되므로 이 차이를 설명할 수 있다(Walbot and Goldberg, 1979). 그러나 이배체인

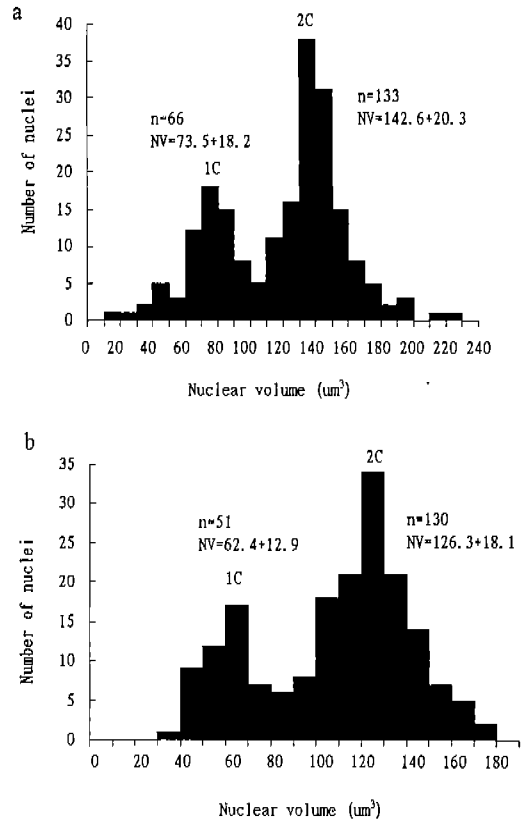


Fig. 4. Frequency distribution histogram for the tetraspore nuclear volume of tobacco (a) and red pepper (b).

애기장대(Arumugenathan and Earle, 1991)와 본 실험의 고추에서도 2~3배가 차이가 나는데, 이는 식물세포들은 G1기와 G2기가 혼재되어 있고 더욱이 endomitosis가 일어나 핵 DNA함량이 조직과 발달 단계에 따라 다양하다는 세포유전학적인 증거(Zimmerman and Goldberg, 1977)에 기인한 것으로 판단된다(Walbot, 1979; Arumugenathan and Earle, 1991).

사 사

본 연구는 교육부의 1994년도 기초과학연구소 학술연구 조성비의 지원에 의해 수행되었음.

인 용 문 헌

Arumugenathan, K. and E.D. Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208-218.
 Baetcke, K.P., A.H. Sparrow, C.H. Neuman and S.S. Schwemmer. 1967. The relationship of DNA content

- to nucleus and chromosome volumes and to radiosensitivity (LD_{50}). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **58**: 533-540.
- Bennett, M.D. and J.B. Smith.** 1991. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. **334**: 309-345.
- Britten, R.J., E. Graham and B.R. Neufeld.** 1974. Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. *Meth. Enzymol.* **29E**: 363-406.
- Cavalier-Smith, T.** 1985. Eukaryotic gene numbers, non-coding DNA and genome size. *In* The Evolution of Genome Size. T. Cavalier-Smith (ed.). John Wiley, Chichester, pp. 69-103.
- Li, W.H. and D. Grauer.** 1991. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 284 pp.
- Price, H.J., A.H. Sparrow and A.F. Nauman.** 1973. Evolution and developmental considerations of variability of nuclear parameters in higher plants. *Brookhaven Symposium in Biology* **25**: 390-421.
- Shapiro, H.S.** 1976. Distribution of purines and pyrimidines in deoxyribonucleic acids. *CRC Handbook Biochem. Mol. Biol. Nucl. Acids* **2**: 241-281.
- Taylor, B.H., J.R. Manhart and R.M. Amasino.** 1993. Isolation and characterization of plant DNAs. *In* Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. B.R. Glick and J.E. Thompson (eds.). CRC Press Inc., Boca Rata, pp. 37-48.
- Telsenfeld, G.** 1971. Analysis of temperature-dependent absorption spectra of nucleic acids. *In* Procedure in Nucleic Acid Research. Vol. 2. G.L. Cantoni and D.R. Davis (eds.). Harper and Row Publishers, New York, pp. 233-244.
- Walbot, V.** 1976. Genome organization in plants. *In* Molecular Biology of Plants. I. Rubenstein, R.L. Phillips, C.E. Green and B.G. Gengenbach (eds.). Academic press, New York, pp. 31-72.
- Walbot, V. and R.B. Goldberg.** 1979. Plant genome organization and its relationship to classical plant genetics. *In* Nucleic Acids in Plant. T.C. Hall and T.W. Davis (eds.). CRC Press Inc., Boca Rata, pp. 3-40.
- Willard, J.M., J.J. Davis, H.G. Wood.** 1969. Phosphoenol pyruvate carboxytransphosphorylase. IV. Requirement for metal ions. *Biochem.* **8**: 3137-3144.
- Zimmermann, J.L. and R.B. Goldberg.** 1977. DNA sequence organization in the genome of *Nicotiana tabacum*. *Chromosoma*. **59**: 227-252.

(1996. 3. 2 接受)

Analysis of Red Pepper (*Capsicum annuum*) Genome

An, Chung Sun*, Sung Cheon Kim and Se Li Go

Department of Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

The genome of red pepper was investigated by thermal denaturation, reassociation kinetics and measurement of nuclear volume for its base composition, spectrum of kinetic components and genome size. Base composition was estimated to be 37% (G+C) based on melting temperature. The reassociation of 300 nt fragments analyzed by hydroxyapatite chromatography revealed the presence of three kinetic components differing in fraction of genome, kinetic complexity and number of copies as follows; 4.8% (fast) with 5.6×10^4 bp and 10,754, 26% (intermediate) with 1.9×10^6 bp and 177, and 65% (slow) with 8.48×10^8 bp and 1. These measurements demonstrate that the genome of red pepper has a 1C DNA content of 1.25×10^9 bp, which is about 33% of 4.05×10^9 bp calculated from nuclear volume of $62.4 \mu\text{m}^3/1\text{C}$.

Keywords: red pepper, (G+C)%, reassociation kinetics, nuclear volume, genome size

*Corresponding author: Fax +82-02-872-6881