

식물의 초경량 조직을 이용한 미토콘드리아의 DNA와 RNA 정제

김경민* · 임용숙¹ · 신동일² · 설일환¹

상주대학교 생명자원과학대학 환경원예학과, ¹대구외국어대학교 생명공학부, ²대구가톨릭대학교 자연대학 생명자원학부

Received December 26, 2005 / Accepted February 1, 2006

Development of a Highly Efficient Isolation Protocol for Mitochondrial DNA and RNA Using Small Scale Plant Tissues. Kyung-Min Kim*, Yong Suk Lim¹, Dong Ill Shin² and Ill Whan Sul¹. Department of Environmental Horticulture, Sangju National University, Sangju, Kyungbuk, 742-711, Korea, ¹Department of Biotechnology, Daegu University of Foreign Studies, Kyungsan, Kyungbuk, 712-881, Korea, ²Department of Plant Genetic Engineering, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, 712-702, Korea – We present a fast and simple protocol for purification of mitochondria, mitochondrial DNA, and RNA from small amounts of tomato leaves. This method uses a high ionic strength medium to isolate mitochondria and extract mitochondrial DNA and RNA from a single preparation and is easily adaptable to other plant species. Mitochondria was confirmed by MitoTracker. The mitochondrial DNA was not contaminated by plastid DNA, was successfully used for PCR. Similarly, the isolated mitochondrial RNA was not contaminated only slightly contaminated (leaves) by plastid RNA. RNA prepared according to our method was acceptable for RT-PCR analysis

Key words – Tomato, mitochondria, mitochondrial DNA, mitochondrial RNA, MitoTracker

식물의 분자생물학 영역에서 mitochondrial DNA (mtDNA) 와 mitochondrial RNA (mtRNA) 효과적인 추출은 식물의 다양한 세포질적 연구에 매우 중요하다. 지금까지 많은 mtDNA 추출과정이 여러 연구자에 의해 발표 되고 있으나 이들 모두 mtDNA의 추출이 효과적이지 못한 실정이다 [3,5,7,8,10,11]. 식물의 미토콘드리아(mt) 추출 초기단계에서 mt를 추출했다라도 세포생물학적인 검정 방법을 이용하지 않았기 때문이다. 따라서 세포생물학적인 검정이 없다면 초기에 mt를 분리하여 mtDNA를 추출하더라도 핵 DNA와 혼재해 있을 가능성이 상당히 높다고 알려져 mt를 이용한 분자생물학적인 연구가 그다지 효과적이지 못하다 [1]. 더욱이 mtRNA의 추출은 효과적이지 못하다. 최근에 Scotti 등[9]이 감자의 조직을 이용하여 식물의 mtDNA 뿐만 아니라 mtRNA를 추출한 한바 있으나, 재료로 사용하는 양이 많아 기내 또는 1g 이하의 재료일 경우 효과적이지 못한 실정이다. 따라서 본 실험에서는 토마토의 종자를 기내 배양하여 얻어진 무균 잎조직 1g 이하의 양을 이용하여, mt 추출과정을 확인하는 방법과 mtDNA와 mtRNA 추출의 과정을 제시하고자 한다. 또한 지금까지 식물의 mt에 대한 분자생물학 연구의 기초 자료로 제시하고자 한다.

재료 및 방법

식물의 재료는 원예시험장에서 분주 받은 토마토의 종자

를 이용하였다. 무균의 잎을 얻기 위하여 각각의 종자를 1% NaOCl에 30분 과 70% 알콜에 30초로 소독한 다음 멸균수로 3회 수선하여, 토마토는 MS 기본배지[6]에 0.1 mg/L BA와 0.35 mg/L IAA 그리고 30 g/L sucrose, 8 g/L agar를 넣어 만든 배지를 30ml씩 배양병 (Φ 15 cm)에 넣고 26±1℃에서 30일간 배양하였다.

각각의 어린잎을 채취하여 mitochondria (mt) 분리과 mtDNA 추출은 Scotti 등 [9] 방법을 응용하였고, mtRNA의 추출은 Chomeczynski 와 Sacchi [2]의 방법을 응용하여 아래와 같이 수행하였다. Homogenization buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.3 M NaCl, 25 mM EDTA (pH 8.0), 0.2% BSA, 0.05% cysteine 과 56 mM β-mercaptoethanol)와 Homogenization buffer B (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.6 M NaCl, 50 mM EDTA (pH 8.0), 0.4% BSA, 0.1% cysteine 과 56 mM β-mercaptoethanol)를 신선한 잎을 채취하여 호모게나제이션 할 때 이용하였다. Lysis buffer (25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS), 10 mg/mL Proteinase K, 2 M Ammonium acetate, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, TE-saturated phenol/chloroform (50:50), Water-saturated phenol/chloroform/isoamyl alcohol (50:49:1), 10 mg/mL RNase A, RNA extraction buffer (4 M Guanidine thiocyanate, 25 mM Sodium citrate (pH 7.0), 0.5% sarcosyl, 0.1% β-mercaptoethanol), 4 M LiCl등의 시약을 만들어 이용하였다.

토마토의 잎에서 분리 정제한 mt임을 확인하기 위하여 mt를 염색하는 MitoTracker (Molecular Probes)를 이용하였다. 추출한 mtDNA는 mt와 관련된 유전자의 PCR primer를

*Corresponding author

Tel : +82-54-530-5233, Fax : +82-54-530-5239
E-mail : kkm@sangju.ac.kr

만들어 PCR을 수행하여 mtDNA임을 확인하였다.

추출한 mtRNA는 mtDNA에서 PCR을 수행한 결과 중 가장 band가 확실한 것을 이용하여 RT-PCR (AccessQuick™ RT-PCR System, Promega)을 수행하여 mtRNA임을 확인하였다. RT-PCR의 PCR 조건은 94°C에 2분간 pre-denaturation을 하였고, denaturation은 95°C에 5초간, annealing은 55°C에 20초간 polymerization은 72°C에서 10초간 30회 실시하고 final extension은 72°C 7분간 수행 후 0.5% 아크릴아마이드에 전기영동 후 silver staining하여 유전자발현 정도를 확인하였다. PCR에 사용한 기종은 PCR system 2,700 (Biometra, USA) 이었다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 토마토의 무균 잎을 900~300 mg을 5 mL 호모게나이저 A 버퍼에 넣어 16,200 rpm으로 20초 호모게나이저한 다음 동량의 차가운 호모모게나이저 B 버퍼를 넣어 100 µl 메시를 이용하여 찌꺼기를 거른다. 2,600 rpm으로 10분간 원심한 후 상등액을 새로운 튜브로 이동한 다음, 3,900 rpm으로 10분간 2회 반복한다. 상등액을 새로운 튜브로 옮긴 다음 12,700 rpm으로 5분간 원심한 후, 1mL의 호모게나이저 A 버퍼로 넣는다. 12,700 rpm으로 15분간 원심한 후 상등액을 버린다. 이때 튜브 바닥에 있는 것이 mt이다. 바로 mtDNA와 mtRNA를 추출할 경우 곧 바로 사용하지만, 오랫동안 보존할 경우에는 -80°C에 저장한다.

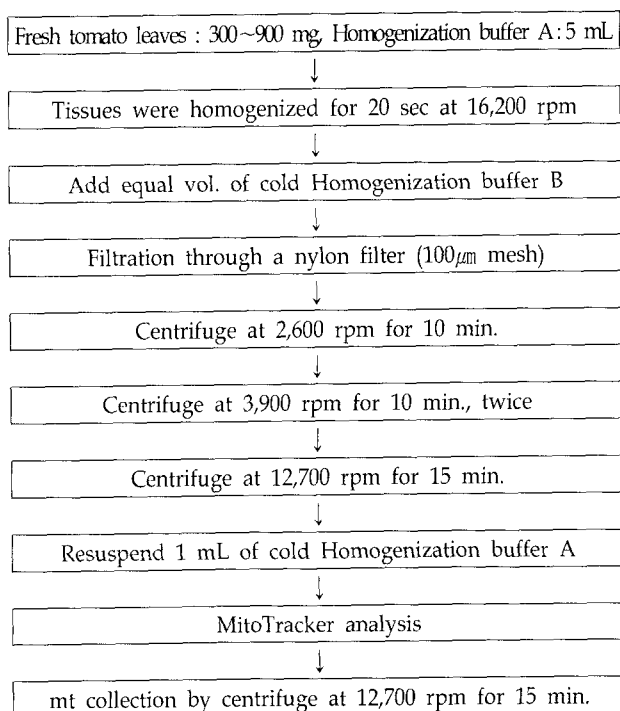


Fig. 1. Preparation of intact mitochondria in plant tissues.

토마토의 무균배양한 잎으로부터 분리한 미토콘드리아에 아세토카민과 MitoTracker®로 염색한 결과(Fig. 2), 600 mg과 900mg의 토마토의 잎으로부터 추출한 mt가 든 16ml 튜브를 3 등분하여 아세토카민과 MitoTracker®를 염색한바, 분리한 mt는 90%이상 (아세토카민염색과 MitoTracker® 염색 세포수와 차이) 세포가 건전한 mt로 추출할 수가 있었으며, 또한 튜브내에 전층이 mt가 존재해 있음을 확인하였다. 따라서 본 실험의 protocol 중 10분간 3,900 rpm에서 2 번하여 상등액을 모두 모아서, 15분간 12,000 rpm 원심한 튜브내의 하층부위는 모두 mt임을 추정할 수 있다. 이는 Scotti 등 [9]이 이용하여 얻어진 mt의 확인방법을 mtDNA와 mtRNA에서 확인한 것 보다 MitoTracker®로 염색함으로써 그 다음 단계인 mtDNA 추출 과정을 보다 확신을 가져줌으로써 mt에 관한 실험의 효율을 향상 시킬 수가 있다고 생각된다.

토마토의 무균배양된 잎 조직으로부터 분리 정제된 mt로부터 mtDNA 추출(Fig. 3)은 다음과 같다. 분리된 mt를 200 µl lysis 버퍼에 녹인 다음, 50 µg/mL proteinase K를 넣고 37°C에 1시간 인큐베이션 한다. 0.1배 볼륨의 2 M ammonium acetate와 동량의 TE-saturated phenol/chloroform (50:50)를 넣고, 2배 볼륨의 100% 에탄올을 넣은 다음 -20°C에서 하룻밤을 방치한다. 16,000 rpm으로 20분 처리하고 상등액을 버린다. 20 µl의 멸균수를 넣고 0.8% 아가로즈젤에 전기영동하여 mtDNA임을 확인하였다. Fig. 4A는 3종의 제한 효소를 이용하여 mtDNA를 절단하여 전기영동한 양상으로 모두 mtDNA의 양상임을 확인할 수 있었다. Table 1과 같이 mt에 연관 있는 유전자를 이용하여 6 set의 PCR primer를 제작하여 Fig. 4B와 같이 1, 2, 4, 5, 6번의 PCR primer 조합

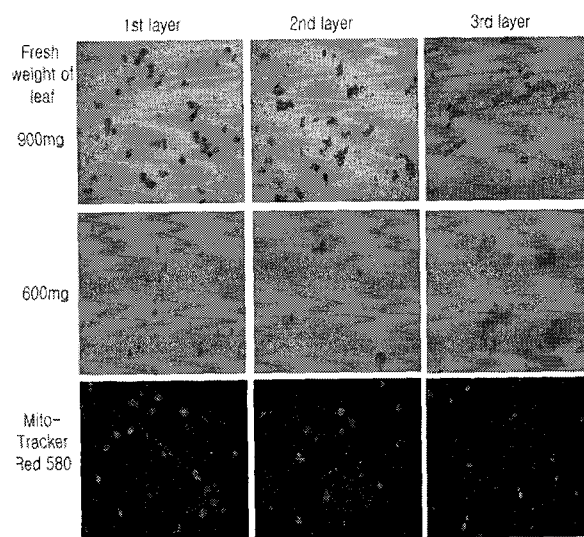


Fig. 2. Mitochondria pellet stained with MitoTracker® isolate from tomato fresh-leaf tissue. 1st, 2nd and 3rd layer: 1/3, 2/3 and 3/3 portion of supernatant in 16 ml falcon tube, respectively.

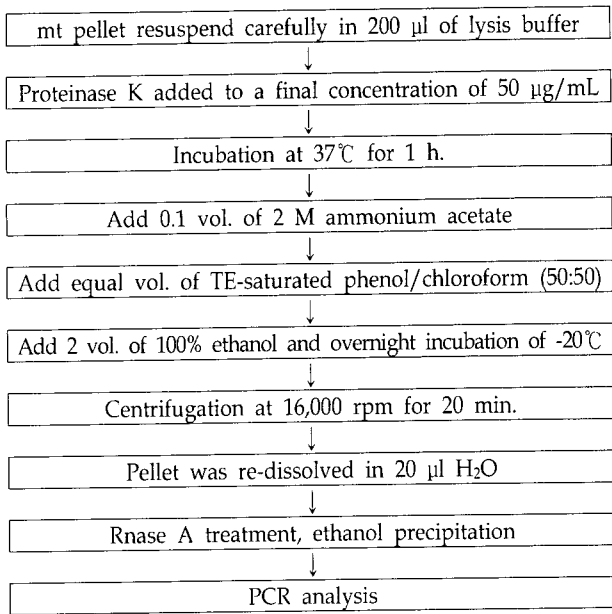


Fig. 3. Isolation of mitochondrial DNA.

에서 증폭된 밴드를 확인 할 수 있었으며, 특히 2, 4, 5번은 밴드 증폭 양상이 아주 깨끗하였다. Bookjans 등[1]이 보고한 고이온성배지에서 분리한 mtDNA와 Pérez 등[8]이 발표한 해바라기 및 Hsu와 Mullin[4]이 보고한 목화유묘기의 mtDNA 추출에 이용된 많은 양의 시료를 이용하여 Southern 분석으로 mtDNA임을 확인하였는데, 본 실험에서는 PCR에 의하여 mtDNA임을 확인하여 Southern 분석에 의한 실험 절차의 복잡함을 간소화 할 수 있었다.

식물의 잎으로부터 분리한 mt로부터 mtRNA 추출방법은 Fig. 5와 같다. mt가 든 튜브에 200 µl RNA extraction 버퍼를 넣고 65°C의 2분간 인큐베이션하고, 0.1 볼륨의 2 M sodium acetate (pH 4.0), 동량의 water-saturated phenol/chloroform/isoamyl alcohol (50:49:1), 1배 볼륨의 iso-propanol을 차례대로 넣은 다음 -20°C에 1시간 방치한다. 16,000 rpm, 20분간 원심한 후 상등액은 제거하고, 200 µl 4 M LiCl을 넣고 녹인다. 그리고 16,000 rpm, 20분간 원심하고 상등액은 제거하고 300 µl RNA extraction 버퍼를 넣고 65°C

Table 1. List of primers for PCR and RT-PCR

No. of primers	Sequence of primers	Specification	Estimated band (bp)
1	5'- ATCCGTTGCTCAAACCGAAT 3'-TCCATATTGATGCAATGCGG	ath; cob apocytochrome B	600
2	5'-TGAGATCGTTGTCCGATCTT 3'-TCCAATACCGATAGCAGCTC	AY305268; ATP synthesase subunit 9	700
3	5'-TCCAAGTTCGTTAGTAATCG 3'-TTCTACGCCATCAAAGAAA	AY305268; ATP synthesase subunit 9	700
4	5'-CGTTGTCCGATCTTTATCGT 3'-TCCAATACCGATAGCAGCTC	AY305268; ATP synthesase subunit 9	700
5	5'-GCCCCCTTTTTTGGGAAAG 3'-TTCTAAAAGACAGGGAGGAT	AT3G14840: ATP binding protein	500
6	5'-CGGTCAGTGGCAGTGAA 3'-TCATTGTTGCCTCCCTGCT	AT1G61140; ATP-dependent DNAhelicase	800

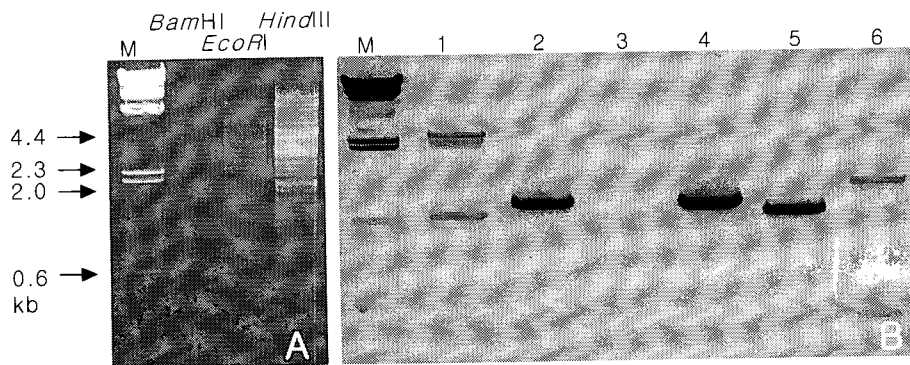


Fig. 4. PCR analysis of mtDNA by PCR primers. A: mtDNA digested with BamHI, EcoRI, and HindIII. B: PCR analysis of mtDNA in 0.8% agarose. M: λ/Hind III. 1~6: no. of primers.

에서 2분간 녹인 후, 1배 볼륨의 isopropanol을 넣고 -20℃에서 1시간 방치한 다음 16,000 rpm 20분간 원심한 후 상등액은 버리고 mtRNA를 75% ethanol로 2번 세정하고 대기 상태에서 건조시킨다. mtRNA 확인은 Fig. 6에서 PCR primer 2번으로 RT-PCR 하여 얻어진 band로 하였다. 본 실험에서 추출된 mtRNA의 검정방법을 RT-PCR에 의하여 수행하여 얻어진 결과는, Scotti 등 [9]에 의하여 mtRNA 검정 방법을 Northern 분석으로 수행한 결과와 동일하게 mtRNA임을 확인 할 수 있었다.

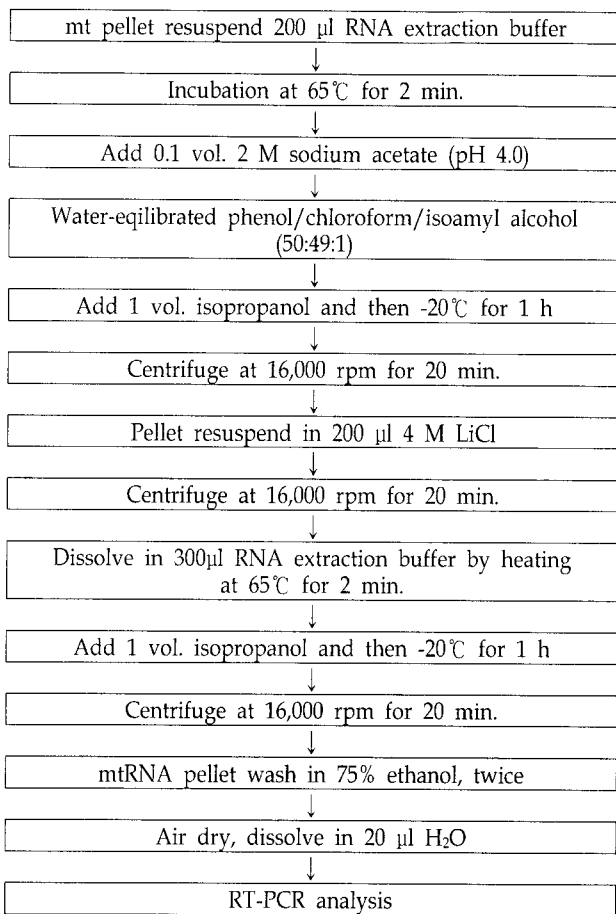


Fig. 5. Isolation of mitochondrial RNA.

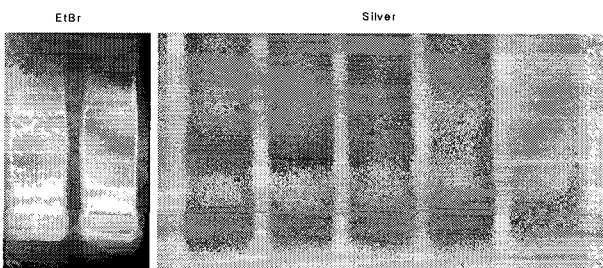


Fig. 6. Analysis of mtRNA by RT-PCR. EtBR stained (left), silver stained (right).

요 약

본 실험에서는 토마토의 종자를 기내 배양하여 얻어진 1 g 이하의 무균 잎 조직을 이용하여 미토콘드리아를 분리 정제하여 MitoTracker를 이용하여 세포생물학적으로 확인하였고, 이들의 mt를 이용하여 미토콘드리아 DNA와 RNA를 추출과 검정을 하였다. 또한 고농도의 이온성을 이용하여 미토콘드리아와 mtDNA 및 mtRNA를 추출할 수 있었으며, 식물의 여러 종류에도 사용되어질 수 있을 것이다. mtDNA는 PCR 분석에 의하여 plastid DNA와 혼재되어 있지 않음을 확인하였다. mtRNA는 RT-PCR 분석을 통하여 plastid RNA와 혼재되어 있지 않음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업 (과제번호: 20050301-034-482-046-02-00)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참 고 문 헌

- Bookjans, G., B. M. Stummann and K. W. Henningsen. 1984. Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic strength. *Anal. Biochem.* **141**, 244-247.
- Chomeczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Douce, R., J. Bourguignon, R. Brouquisse and M. Neuburger. 1987. Isolation of plant mitochondria: general principles and criteria of integrity. *Meth. Enzymol.* **148**, 403-415.
- Hsu, C. I. and B. C. Mullin. 1988. A new protocol for isolated of mitochondria DNA from cotton seedlings. *Plant Cell Reports* **7**, 356-360.
- Kemble, R. J. 1987. A rapid single leaf, nucleic acid and assay for determining the cytoplasmic organelle complement of rapeseed and related *Brassica* species. *Theor. Appl. Genet.* **73**, 451-458.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**, 473-497.
- Pehu, E. 1991. RFLP analysis of organellar genomes in somatic hybrids. In: *Plant Tissue Culture Manual D6*, pp. 1-8, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Pérez, C., J. F. Bonavent and A. Bervillé. 1990. Preparation of mitochondrial DNAs from sunflowers (*Helianthus annuus* L.) using a medium with high ionic strength. *Plant Mol. Biol. Repr.* **8**, 104-113.
- Scotti, N., T. Cardi and L. Marechal-Drouard. 2001. Mitochondrial DNA and RNA isolation from small amounts of potato tissue. *Plant Molecular Biology Reports*

- 19, 67a-67h.
10. Triboush, S., N. G. Danilenko and O. G. Davydenko. 1998. A method for isolation of chloroplast DNA and mitochondrial DNA from sunflower. *Plant Mol. Biol. Repr.* **16**, 183-189.
11. Wilson, A. J. and P. S. Chourey. 1984. A rapid inexpensive method for the isolation of restrictable mitochondrial DNA from various plant sources. *Plant Cell Rep.* **3**, 237-242.