

## 고추엽록체 *ycf2(ycf2')* 유전자의 동정

김동선, 리영철, 장성훈

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《생물공학부문에서는 세포공학과 유전자공학, 미생물공학을 비롯한 현대생물학의 발전에 큰 힘을 넣으며 현대생물학의 성과를 농업과 축산업, 의학과 식료공업에 널리 받아들여 생산성이 높은 농작물과 집짐승의 새 품종을 만들어내며 질 좋은 여러가지 의약품과 식료품을 많이 생산할수 있도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 487~488페이지)

최근 엽록체계놈전이기술을 리용한 엽록체전이식물은 지난 시기 핵계놈전이기술과 핵계놈전이식물이 가지고있던 결함들을 극복하고 여러가지 우점을 가지고있는것으로 하여 많이 주목되고있다.[4, 5]

엽록체공학을 위한 운반체를 설계하는데서 상동재조합을 진행할수 있는 경계배열을 찾아내는것이 아주 중요하다.[7]

보편적인 엽록체형질전환운반체를 만들기 위하여서는 그 경계배열이 모든 식물에서 고도로 보존된 배열이어야 한다.

우리는 보존성이 높고 상동경계배열로 될수 있는 엽록체유전자토막을 동정하기 위한 기초연구를 하였다.

### 재료와 방법

균주로는 *Escherichia coli* DH5α (pCB90보유균주)를 리용하였다.

제한효소로는 *EcoR* I, *BamH* I을 리용하였다.

상동성분석을 위한 프로그램으로서는 핵산, 단백질상동성해석프로그램인 《BLAST》(Basic Local Alignment Search Tool)와 《DNA Star》를 리용하였다.

계능자료로는 NCBI의 ftp사이트에서 2008년 12월 15일에 제공한 GenBank Release139.0의 식물유전자염기배열자료인 gbpln1.seq-gbpln10.seq를 리용하였다.

재조합플라스미드 pCB90의 분리는 알카리변성법으로 진행하였는데 아가로즈겔전기영동에 의하여 재조합플라스미드 pCB90을 확인하였다.[1]

재조합플라스미드 pCB90에 삽입된 고추엽록체클론의 크기를 결정하기 위하여 pCB90을 *BamH* I로, pUC19를 *EcoR* I로 37°C에서 1h동안 각각 물작용분해시키고 1.2% 아가로즈겔에서 전기영동(80V, 2h)하였다.[2]

### 결과 및 논의

재조합플라스미드 pCB90의 분리 및 확인 알카리변성법[3]으로 분리한 플라스미드 pCB90(pCB90, pUC19)의 전기영동상은 그림 1, 2와 같다.

pCB90에 삽입된 토막의 염기배열분석  
배열분석을 위한 프라이머는 다음과 같  
이 설계하였다.

정방향프라이머(zcx-pcb-1f)

5'-CAAGACAATTGGCTGAATCC-3'

역방향프라이머(zcx-pcb-1r)

5'-GTCTGATAATGAGCAAGGAATA-3'

이 프라이머를 리용하여 pCB90에  
삽입된 고추염록체토막의 배열분석을  
진행하였다.

GenBank자료기지와 BLAST검색 배  
열분석자료에 기초하여 계통자료기지인

GeneBank의 염록체자료기지와 상동성검색을 진행한 결과는 표 1과 같다.

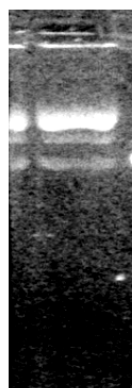


그림 1. pCB90의  
전기영동상

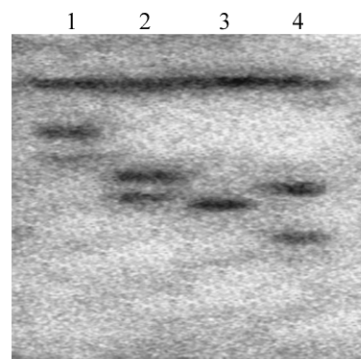


그림 2. pCB계 몇가지 재조합  
플라스미드의 전기영동상  
1-pCB90/-, 2-pCB90/BamH I,  
3-pUC19/EcoR I, 4-pUC19/-

표 1. 상동성검색결과

자료기지번호	식물	총점	상동성/%
AB237912.1	<i>Nicotiana glauca</i> , 엽록체게놈DNA, 완전배열(담배)	1.031·10 <sup>4</sup>	98
Z00044.2	<i>Nicotiana glauca</i> , 엽록체게놈DNA(담배)	1.031·10 <sup>4</sup>	"
DQ386163.1	<i>Solanum tuberosum</i> cultivar Desiree, 엽록체게놈DNA, 완전배열(감자)	1.030·10 <sup>4</sup>	"
DQ347958.1	<i>Solanum tuberosum</i> cultivar PT29, 엽록체게놈, 완전배열(감자)	1.030·10 <sup>4</sup>	"
AB240139.1	<i>Nicotiana glauca</i> , 엽록체게놈DNA, 완전배열(담배)	1.029·10 <sup>4</sup>	"
AM087200.3	<i>Solanum tuberosum</i> cultivar IPA-6, 엽록체게놈DNA(감자)	1.029·10 <sup>4</sup>	"

담배엽록체게놈을 비롯한 몇가지 식물엽록체게놈과 pCB90에 삽입된 클론의 배열과의  
상동성은 98%였다. 담배엽록체게놈자료[6]와 대비해볼 때 배열분석토막의 81-2990bp에서  
와 담배엽록체게놈의 91295-92450bp, 151335-148380bp에서 상동이였다.

이에 해당한 배열토막을 담배엽록체DNA의 유전자목록과 비교해볼 때 그 배열이 *ycf2*  
유전자의 일부 배열이라는것을 확인할수 있었다.(표 2) 아래에 담배엽록체게놈의 구조를 보  
여주었다.

여기에서 일부 구역의 유전자에 대한 목록자료를 보면 표 2와 같다.

표 2. 담배엽록체DNA의 유전자목록

유전자	발현산물	사슬	시작염기배열번호	마감염기배열번호
거꾸반복배열 B(IRB)	25 341bp		86687	112027
<i>rpl2</i>	리보솜단백질 L2 3'엑손	B	87176	87843
<i>rpl23</i>	리보솜단백질 L2 3'엑손	B	88533	88252
<i>trnI</i>	tRNA-Ile(CAU)	B	88772	88699
<i>ycf2</i>	ORF2280	A	88885	95727
<i>ycf15</i>	ORF87	A	95818	96081

고추엽록체 *ycf2(ycf2')* 유전자의 동정

유전자	발현산물	사슬	시작염기배열번호	마감염기배열번호
거꿀반복배열 A(IRA)	25 341bp		130599	155939
<i>oriB</i>	복제시작점		130606	130848
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
<i>trnI</i>	tRNA-Leu(CAA)	A	146116	146196
<i>orf115</i>		A	146219	146566
<i>orf92</i>		B	146507	146229
<i>ycf15</i>	ORF87	B	146808	146545
<i>ycf2</i>	ORF2280	B	153741	146899
<i>trnI</i>	tRNA-Ile(CAU)	A	153854	153927
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

pCB90에 삽입된 엽록체클론의 제한효소인식부위 동정 제한효소인식부위의 동정은 프로그램 《DNA Star》의 《map draw》를 리용하여 진행하였다.

pCB90에 삽입된 클론에 대한 제한지도는 그림 3과 같다.

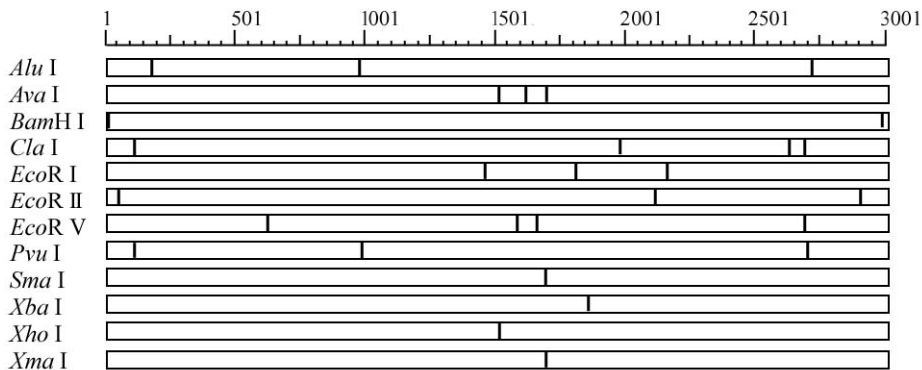


그림 3. pCB90에 삽입된 엽록체DNA토막의 제한지도

pCB90에 삽입된 클론에 대한 제한효소인식부위와 그 절단위치, 수는 표 3과 같다.

pCB90에 삽입된 고추엽록체DNA토막은 pBR322를 *BamH* I로 처리하여 삽입된것으로서 그 토막의 크기는 *BamH* I절단점사이의 거리로 된다. 따라서 토막의 크기는 2 973bp이다.

표 4에서 보다싶이 대표적으로 *BamH* I절단위치는 2개, *Cla* I절단위치는 4개, *EcoR* I절단위치는 3개, *Sma* I절단위치는 1개이다.

표 3. pCB90에 삽입된 엽록체DNA토막의 제한효소절단수, 절단위치

No.	제한효소이름	절단위치	절단수/개	위치
1	<i>Alu</i> I	AG <sup>^</sup> CT	3	177, 973 2742
2	<i>Ava</i> I	C <sup>^</sup> YCGRG	3	1515, 1613, 1691
3	<i>BamH</i> I	G <sup>^</sup> GATCC	2	3, 2976
4	<i>Cla</i> I	AT <sup>^</sup> CGAT	4	111, 1973, 2630, 2690
5	<i>EcoR</i> I	G <sup>^</sup> AATTC	3	1463, 1803, 2155
6	<i>EcoR</i> II	<sup>^</sup> CCWGG	3	50, 2113, 2905
7	<i>EcoR</i> V	GAT <sup>^</sup> ATC	4	626, 1586, 1660, 2688
8	<i>Pvu</i> I	CGAT <sup>^</sup> CG	3	111, 986, 2694
9	<i>Sma</i> I	CCC <sup>^</sup> GGG	1	1693
10	<i>Xba</i> I	T <sup>^</sup> CTAGA	1	1860
11	<i>Xho</i> I	C <sup>^</sup> TCGAG	1	1515
12	<i>Xma</i> I	C <sup>^</sup> CCGGG	1	1691

## 맺는 말

1) 재조합플라스미드 pCB90의 삽입DNA토막에 대한 배열분석자료에 기초하여 유전자 자료기지인 NCBI GenBank와 상동성비교를 진행하였다.

7개 식물엽록체게놈과의 상동성검색을 진행한 결과 삽입토막인 고추엽록체게놈은 7개의 식물엽록체게놈과 모두 98%정도 상동이였다. 또한 상동인 부분의 유전자를 담배엽록체 게놈목록자료와 비교해볼 때 이 상동유전자는 담배엽록체의 양쪽 반복배열에 존재하는 *ycf2(ycf2')* 유전자였다.

2) 위의 배열분석자료에 기초하여 pCB90에 삽입된 고추엽록체토막의 물리지도를 작성하였다.

삽입된 DNA의 크기는 2 973bp이며 대표적인 제한효소인식부위와 절단점수는 *BamH I* 인 경우 2개, *Cla I* 인 경우 4개, *EcoR I* 인 경우 3개, *Sma I* 인 경우 1개이다.

## 참고 문헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학편), 1, 100, 1986.
- [2] 김일성종합대학학보(자연과학편), 3, 109, 1986.
- [3] 김일성종합대학학보(자연과학), 52, 9, 131, 주체95(2006).
- [4] 리영철; 핵바깥유전자와 그 기능, 김일성종합대학출판사, 3~239, 주체96(2007).
- [5] L. Bogorad; Trends Biotechnol., 18, 257, 2000.
- [6] H. Daniell et al.; Mol. Biol., 311, 1001, 2001.
- [7] E. Lepage; Plant Physiology, 163, 10, 867, 2013.

주체103(2014)년 12월 5일 원고접수

## Identification of Paprika Chloroplast Gene *ycf2(ycf2')*

Ri Yong Chol, Kim Tong Son and Jang Song Hun

In designing of vector for chloroplast genetic engineering, it is very important to find border region for the homologous recombination.

The DNA fragment inserted in recombinant plasmid pCB90 was sure to be paprika chloroplast gene, *ycf2* by sequencing. Then the homology of paprika chloroplast gene, *ycf2* was approximately 98% as compared with chloroplasts of seven plants. We have made physical restriction map for the fragment of paprika chloroplast inserted in pCB90.

Key words: paprika, *Capsicum annuum*, chloroplast, pCB90, *ycf2*, *ycf2'*