

몇가지 누른갓(*Brassica napus* L.)품종들의 씨앗에서 기름산합성에 관계하는 유전자들의 전사수준에서 발현분석

박 학 성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《현시대는 과학과 기술의 시대입니다. 과학과 기술은 매우 높은 속도로 발전하고있으며 상상하기 어려운 경지에 올라서고있습니다.》(《김정일선집》 증보판 제20권 178페이지)

유채는 세계적으로 4대주요기름작물에 속하는데 현재 여러가지 육종방법을 리용하여 총기름함량뿐만아니라 기름산조성, 기름의 질을 높이기 위한 연구가 광범히 진행되고있다.[1, 2, 4] 기름함량이 높고 기름산조성이 사람들의 흡수에 좋은 기름산을 가진 유채품종들을 육종하려면 기름산합성과정에 대한 분자유전학적물림새를 잘 연구하고 그에 기초하여 육종사업을 진행하여야 한다.

본문에서는 유채의 일종인 몇가지 누른갓품종들에서 총기름함량과 기름산성분을 분석한데 기초하여[1] 역PCR(RT-PCR)방법으로 기름산합성에 관계하는 몇가지 유전자들의 발현정도를 분석한 연구결과에 대하여 논의하였다.

재료와 방법

재료로는 몇가지 누른갓(*Brassica napus* L.)품종 《웅진 1》호, 《웅진 7》호와 계통 <4-17>과 <253>을 리용하였다.

실험재료 누른갓식물체에서 종자의 기름함량이 제일 높아지는 시기인 꽃가루받이후 16일(이하 16DAP로 표기, DAP는 Days After Pollination의 약어)의 미성숙씨앗과 40DAP성숙종자를 취하여 -70℃냉동기(《Haier》)에 보관하였다.

RNA분리와 cDNA합성 -70℃에서 얼은 씨앗시료들을 리용하여 티엠티디(트리졸)법으로 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA의 순도와 농도는 자외선분광광도계(《UV-2450 Shimidin》)를 리용하여 흡수과장 260, 280nm에서 측정하여 결정하였다. 또한 아가로즈겔전기영동을 진행하여 RNA의 순도를 평가하였다. 두오리 cDNA들은 cDNA합성시약키트(M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit, 《Takara》)를 리용하여 합성하였다.

기름산합성에 관계하는 유전자들의 프라이머설계 대조유전자로서 식물체의 모든 조직에서 같은 양으로 발현되는 *BnACTIN7*을 리용하였다. 대조유전자 *BnACTIN7*을 포함하여 기름산합성과 분해에 관계하는 유전자들의 염기배열은 유채게놈자료기지(*Brassica* Genome Gateway: BGG, <http://www.brassica.bbsrc.ac.uk/>), GENOSCOPE(<http://www.genoscope.cns.fr/colza-ggb/cgi-bin/geneView>)들에서 검색하였다. 실험에서 리용한 누른갓의 기름산합성유전자들의 프라이머는 프라이머설계프로그램 Primer Preimer5를 리용하여 설계하였다.

기름산합성유전자무리들의 유전자발현검증에 리용된 프라이머배열과 PCR조건은 표와 같다.

표. 기름산생합성에 관계하는 유전자발현검증에 리용된 프라이머배열과 PCR조건

누른갯유전자 (EST*)	프라이머 이름	프라이머배열(5'—3')	PCR산물의 크기/bp	PCR조건(아닐링 온도, 순환수)
<i>BnACTIN7</i> (AF111812)	BnACTIN7-1 BnACTIN7-2	TGGTTGGGATGGGTCAAAAAGA CGGAGGATAGCGTGAGGAAGAG	400	55℃, 30
<i>BnFAE1</i> (AF129511)	BnFAE1-1 BnFAE1-2	AGAAGCAAAAGGAAGGATGA CCCAAACGCACTGTTACAC	86	55℃, 28
<i>BnFAE2</i> (AF275254)	BnFAE2-1 BnFAE2-2	AGAAGCAAAAGGAAGGATGA CCCAAACGCACTGTTACAC	246	50℃, 28
<i>BnFAD3</i> (L22962)	BnFAD3-1 BnFAD3-2	CTGTTCTGGGCTATCTTCG ATGGTCTGGTGGTGTGTC	159	50℃, 28
<i>BnFAD7</i> (KBrB068B07)	BnFAD7-1 BnFAD7-2	AAGAACCCATGGAAGTCC ACAAAGAGAGCCCAGAAC	449	50℃, 28
<i>BnFAD2</i> (AF243045)	BnFAD2-1 BnFAD2-2	CGCATCCTTCCCTGCCTCACT TCCTTCGCCTCCCTCCACATC	259	55℃, 27
<i>BnDGAT</i> (AF251794)	BnDGAT-1 BnDGAT-2	ATACCGAAAGTACCCGCTA CCTGAAACATAATCCCCAA	121	52℃, 30
<i>BnDGAT1</i> (AF164434)	BnDGAT1-1 BnDGAT1-2	CGCTTTTCATGTGTTGTCT CCAGGGTCTTATGTCGTA	267	51℃, 28
<i>BnDGAT2</i> (AF155224)	BnDGAT2-1 BnDGAT2-2	CTACTGCTTCTTCCACCT GGCATATTCCACATTCTC	126	48℃, 30

* 괄호안의 수자는 국제유전자은행번호임

RT-PCR분석 선행방법[3]에 기초하여 RT-PCR산물은 1.2% 아가로즈겔전기영동을 진행하여 비교하였다.

결과 및 논의

1) 누른갯품종들의 씨앗에서 RNA분리

리용한 누른갯품종들의 씨앗에서 분리한 RNA는 $A_{260/280}$ 값이 1.79~2.10사이에 있었으며 전기영동 결과 28S, 18S띠가 명백하므로 비교적 순도가 높다는 것을 알 수 있다.

2) 설계된 기름질합성유전자들에서 DNA단편크기확인

누른갯품종들에서 기름산합성과정에 참가하는 몇 가지 유전자들 즉 *BnFAE*족, *BnFAD*족과 *BnDAGT*족 유전자들의 염기배열을 찾은 후 RT-PCR를 위한 프라이머를 설계하였다.(표) 프라이머를 설계한 데 기초하여 누른갯품종 《웅진 1》호의 40DAP씨앗시료를 리용하여 PCR를 진행하여 설계한 프라이머의 정확성을 확인하였다.(그림 1)

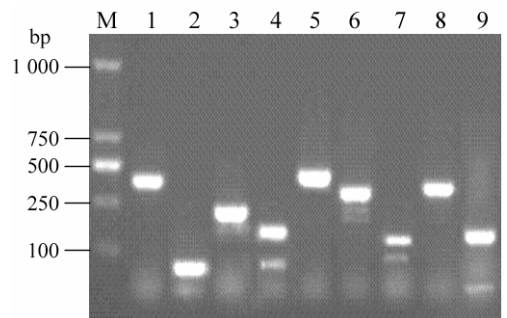


그림 1. PCR에 의한 목적DNA단편 전기영동상

M은 100bp DNA분자크기표식자(《TAKARA》),
1—*BnACTIN7*(400bp), 2—*BnFAE1*(86bp),
3—*BnFAE2*(246bp), 4—*BnFAD3*(159bp),
5—*BnFAD7*(449bp), 6—*BnFAD2*(259bp),
7—*BnDGAT*(121bp), 8—*BnDGAT1*(267bp),
9—*BnDGAT2*(126bp)

그림 1에서 보는바와 같이 누른갯품종 《웅진 1》호의 씨앗에서 분리한 RNA를 리용하여 프라이머의 분자크기를 확인한 결과 대조유전자 *BnACTIN7*은 400bp, *BnFAE1*은 86bp, *BnFAE2*는 246bp, *BnFAD3*은 159bp, *BnFAD7*은 449bp, *BnFAD2*는 259bp, *BnDGAT1*은 267bp, *BnDGAT2*는 126bp였다. 이러한 연구결과는 기름산합성에 참가하는 유전자들의 프라이머가 정확히 설계되었다는것을 보여준다.

3) 기름산생합성에 관계하는 유전자무리들의 RT-PCR

연구에 리용한 누른갯품종들가운데서 올레인산함량이 높고 에르카산함량이 낮은 계통(<4-17>, <253>)과 올레인산함량이 낮고 에르카산함량이 높은 품종(《웅진 1》호, 《웅진 7》호)[1]에서 분리한 RNA를 리용하여 두오리cDNAs를 합성하고 씨앗에서 *BnFAE*족, *BnFAD*족과 *BnDAGT*족 유전자들에 대한 RT-PCR를 진행하여 전기영동적으로 확인하였다.

먼저 올레인산함량이 높고 에르카산함량이 낮은 계통(<4-17>, <253>)과 올레인산함량이 낮고 에르카산함량이 높은 품종(《웅진 1》호, 《웅진 7》호)에서 *BnFAE*족, *BnFAD*족 유전자들의 발현을 보았다.(그림 2)

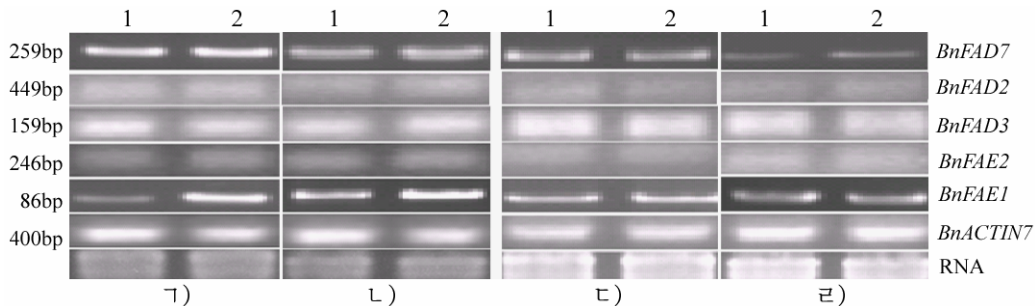


그림 2. 몇가지 누른갯품종의 씨앗에서 *BnACTIN7*(대조), *BnFAE*족, *BnFAD*족 유전자들의 RT-PCR전기영동상

㉠) 《웅진 1》호, ㉡) 《웅진 7》호, ㉢) <4-17>, ㉣) <253>; 1-16DAP, 2-40DAP

그림 2에서 보는바와 같이 올레인산함량이 낮고 에르카산함량이 높은 품종들인 《웅진 1》호, 《웅진 7》호에서 *BnFAE*족의 *BnFAE1*은 16DAP에 비하여 40DAP의 씨앗에서 유전자발현이 높아졌고 다른 *BnFAE*족과 *BnFAD*족 유전자들의 발현은 16DAP과 40DAP씨앗에서 차이나지 않았다.

또한 올레인산함량이 높고 에르카산함량이 낮은 계통들인 <4-17>, <253>의 *BnFAE*족, *BnFAD*족 유전자들의 발현은 16DAP과 40DAP씨앗에서 차이없었다. 특히 *BnFAE1*의 발현이 에르카산함량이 높은 품종들(《웅진 1》호, 《웅진 7》호)에서만 16DAP씨앗에 비하여 40DAP의 씨앗에서 높아진것은 *BnFAE1*이 올레인산으로부터 에르카산으로의 전환에 관계하는 유전자로서 긴사슬방향기름산합성과정에서 중요한 작용을 하며 종자성숙의 이른 시기(16DAP)부터 종자성숙의 마감시기까지 오랜 기간 그 발현이 높아지는 유전자라는것을 보여준다. 올레인산으로부터 리놀렌산전환에 관계하는 *BnFAD*족 유전자들의 발현은 누른갯품종의 유전자형에는 관계없이 16DAP과 40DAP씨앗에서 차이없었다.

다음으로 기름함량이 높거나(<4-17>, <253>) 낮은(《웅진 1》호, 《웅진 7》호) 누른갯품종들의 16DAP와 40DAP씨앗에서 *BnACTIN7*, *BnDGAT*족 유전자들에 대한 RT-PCR를 진행하였다.(그림 3)

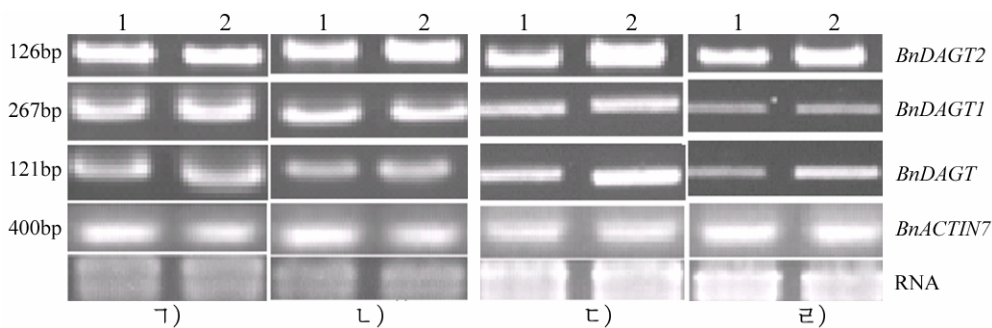


그림 3. 몇 가지 누른갯품종의 씨앗에서 *BnACTIN7*, *BnDAGT*속 유전자들의 RT-PCR전기영동상

1) 《웅진 1》호, 2) 《웅진 7》호, 3) <4-17>, 4) <253>; 1-16DAP, 2-40DAP

그림 3에서 보는바와 같이 기름함량이 높거나 낮은 누른갯품종들에서 *BnDAGT*유전자 속 *BnDAGT*와 *BnDAGT2*의 발현은 16DAP와 40DAP의 씨앗에서 차이난다. 기름함량이 높은 누른갯계통 <4-17>, <253>에서만 16DAP씨앗에 비하여 40DAP씨앗에서 *BnDAGT*의 발현이 높아졌고 기름함량이 낮은 누른갯품종(《웅진 1》호, 《웅진 7》호)에서는 16DAP와 40DAP의 씨앗에서 *BnDAGT*의 발현이 차이나지 않았다.

또한 *BnDAGT2*의 발현은 기름함량이 높거나 낮은 누른갯품종들에서 16DAP씨앗에 비하여 40DAP씨앗에서 모두 높아졌다. 특히 기름함량이 높은 누른갯계통(<4-17>, <253>)에서 기름함량이 낮은 누른갯품종들(《웅진 1》호, 《웅진 7》호)보다 이 유전자발현차이가 명백하게 나타났다. 이밖에 연구에 리용한 누른갯품종들에서 *BnDAGT1*의 발현은 16DAP와 40DAP 씨앗에서 차이없었다. *DAGT*속 유전자들은 합성된 여러가지 기름산으로부터 TAG합성에 관계하는 유전자들이다.

*BnDAGT*가 기름함량이 높은 누른갯계통(<4-17>, <253>)에서만 많이 발현된다는것은 이 유전자가 종자성숙의 이른 시기부터 종자성숙의 마감시기까지 오랜 기간 발현되며 특히 종자성숙마감시기에 유전자발현이 높아진것은 종자저장기름질축적에 중요하게 관계하는 유전자라는것을 보여준다. 역시 *BnDAGT2*도 누른갯종자의 성숙시기에 총기름질축적에서 중요한 유전자이다. 기름산생합성과 합성된 기름산으로부터 TAG합성에 관계하는 *BnFAE1*속, *BnFAD*속과 *BnDAGT*속 유전자들의 발현에 대한 연구결과는 앞으로 총기름함량이 높으면 서도 사람들의 수요에 따르는 기름산성분이 개량된 누른갯품종을 육종하기 위한 중요한 기초자료로 된다.

맺 는 말

1) 올레인산함량이 낮고 에르카산함량이 높은 품종 《웅진 1》호, 《웅진 7》호에서 *BnFAE1*의 발현은 16DAP씨앗에 비하여 40DAP씨앗에서 높아졌다. 올레인산함량이 높고 에르카산함량이 낮은 계통 <4-17>, <253>들에서 각이한 시기의 유전자발현에서는 차이가 없었다.

2) 기름함량이 높은 누른갯계통 <4-17>, <253>에서만 16DAP씨앗에 비하여 40DAP씨앗에서 *BnDAGT*발현이 높아졌고 *BnDAGT2*발현은 누른갯품종들에서 16DAP씨앗에 비하여 40DAP씨앗에서 모두 높아졌다.

참 고 문 헌

- [1] 리금실; 농업연구원학보, 3, 21, 주체107(2018).
- [2] N. Hussain et al.; J. Zhejiang Univ. Sci., B 15, 181, 2014.
- [3] LEE et al.; WO98/44161, 1998.
- [4] N. X. Chen et al.; Plant Cell and Environment, 35, 2155, 2012.

주체108(2019)년 1월 5일 원고접수

Expression Analysis in Transcription Level of Genes concerned in Fatty Acid Synthesis in Seeds of Some Varieties of *Brassica napus*

Pak Hak Song

The result shows, *BnFAE1* in *BnFAE* gene family, *BnDGAT2* and *BnDGAT* in *BnDGAT* gene family play the important role in increasing the total seed oil content and changing the fatty acid composition.

In the oilseed rape varieties “Ongjin No. 1” and “Ongjin No. 7” in which the oleic acid content is low and erucic acid is high, *BnFAE1* gene expression in *BnFAE* gene family is up-regulated in 40DAP seeds than in 16DAP one.

In the oilseed rape lines ‘4-17’ and ‘253’ that the total seed oil content is high, the gene expression of *BnDGAT* and *BnDGAT2* in *BnDGAT* gene family is up-regulated in 40DAP seeds than in 16DAP one.

Key words: *Brassica napus*, transcriptional level, RT-PCR, FAS