

## 중복PCR에 의한 송이버섯균의 소나무뿌리감염확인방법

김은혁, 남걸, 조수경

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《축산을 적극 발전시키고 온실남새와 버섯재배를 대대적으로 하여 더 많은 고기와 남새, 버섯이 인민들에게 차례지도록 하여야 합니다.》

인민들에게 여러가지 버섯을 정상적으로 공급하자면 그 재배를 공업화하여야 한다.

송이버섯균을 소나무뿌리에 감염시켜서 키울 때 그 감염정확성을 명확히 확인하는것은 송이버섯을 인공적으로 재배하는데서 나서는 중요한 문제이다.

야생소나무의 새 뿌리에 송이버섯종균을 감염시키면 결보기에는 감염되었다고 보는 2분가지상이 생겨나지만 이것이 송이버섯균에 의한 감염인지 아니면 토양의 다른 균뿌리균에 의한 감염인지를 정확히 알수 없다.[1]

버섯일반프라이머와 송이버섯특이프라이머를 리용하면 중복PCR(Nested-PCR)법으로 균뿌리시료에서 송이버섯균을 확인할수 있다.[3, 5]

이로부터 우리는 송이버섯특이프라이머를 리용하여 중복PCR로 송이버섯균의 소나무뿌리감염을 확인하기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

재료로는 자연송이버섯활성균권뿌리, 송이버섯종균을 감염시킨 인공감염뿌리를 썼다.

시약으로는 페놀, 클로로포름, 이소프로파놀, 에타놀,  $\beta$ -메르캅토에타놀, BSA, PVP, dNTPs(dATP, dTTP, dCTP, dGTP), *Taq* DNA폴리메라제, 25mmol/L  $MgCl_2$ , DNA분자크기표식자(DL 2000), 아가로즈, Tris-HCl, 빙초산, CTAB, EtBr(에티디움브로미드), EDTA, TE용액(2mol/L Tris-HCl(pH 7.5) 2.5mL, 0.5mol/L EDTA(pH 8.0) 1mL, 증류수로 500mL 되게 맞춘것.), TAE완충액(Tris-HCl 96g,  $CH_3COONa \cdot 3H_2O$  32.8g, EDTA 12.3g을 증류수에 풀고 1L 되게 맞춘것, pH 7.8), NaOH, 사탕, 브롬페놀청, 멸균재증류수를 썼다.

기구로는 함식저온원심분리기(《HERMLE2383》), PCR장치(《DB80240-33》), UV검출기(《GDS-8000》), 전기영동장치(《DYY-III》)를 리용하였다.

#### 1) 소나무뿌리시료에서 염색체DNA추출

CTAB법[2, 4]을 편리상 조금 수정하여 리용하였다.

결보기에 균뿌리균이 감염되었다고 볼수 있는 2분가지상의 뿌리로부터 15mg정도의 시료(2분가지상만)를 떼내어 멸균한 증류수로 3번 세척하고 물기를 깨끗이 없앤 다음 극동시켰다가 균마하였다. 여기에 400 $\mu$ L의 추출액(2% CTAB, 100mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 20mmol/L EDTA(pH 8.0), 1.4mol/L NaCl, 2%  $\beta$ -메르캅토에타놀, 1% PVP)을 첨가하였다. 65°C의 수욕조에서 45min동안 가열하고 포화페놀 및 클로로포름/이소프로파놀(24:1)로 두번 추출하였다. 다음 같은 체적의 미리 팽각시킨 이소프로파놀을 첨가하고 -20°C에서 DNA를 침전시켰다. 12 000r/min에서 15min동안 원심분리하여 DNA침전물을 수집하고 자연상태에서 건조시켰다. 100 $\mu$ L의 TE용액에 DNA를 용해시켰다. 1U의 RNase를 첨가하고 37°C에서 45min동안 반응시킨 다음 클

로로포름으로 1~2번 추출하였다. 260 및 280nm에서 흡광도를 측정하여 DNA농도와 순도를 결정한 다음 전기영동상에서 DNA분획유무를 검사하고  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하고 리용하였다.

## 2) 버섯일반프라이머를 리용한 1차PCR

시료핵산속에 있는 PCR방해물질들을 효과적으로 억제하기 위하여 1% BSA용액의 첨가량을 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8  $1.0\mu\text{L}$ 로 하고 재증류수로 총체적을 같이 맞춘 다음 영동효과가 가장 좋은 첨가량을 결정하였다.

버섯일반프라이머(PF, PR)를 다음과 같이 설계 및 합성하여 리용하였다.

PF: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

PR: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

버섯일반프라이머를 리용한 PCR는 유전자증폭장치(《C1000 Touch<sup>TM</sup> Thermal Cycler》)를 리용하여 다음의 조건에서 진행하였다.

예비변성  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 10min→변성  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 40s, 아닐링  $55^{\circ}\text{C}$ 에서 40s,

연장  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 1min, 순환 35회→최종연장  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 10min.

PCR산물을 TAE완충액, 50V, 0.8% 아가로스겔에서 60min동안 전기영동하고 EtBr로 염색한 다음 UV검출기에서 확인하였다.

## 3) 송이버섯특이프라이머를 리용한 2차PCR

송이버섯특이프라이머(TmF, TmR)는 다음과 같이 설계 및 합성하여 리용하였다.

TmF: 5'-CATTTTATTATACACTCGGT-3'

TmR: 5'-GACGATTAGAAGCCGACCTA-3'

송이버섯특이프라이머를 리용한 PCR는 유전자증폭장치(《C1000 Touch<sup>TM</sup> Thermal Cycler》)를 리용하여 다음의 조건에서 진행하였다.

예비변성  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 10min→변성  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 40s, 아닐링  $55^{\circ}\text{C}$ 에서 40s,

연장  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 1min, 순환 35회,→최종연장  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 10min.

PCR산물을 TAE완충액, 50V, 0.8% 아가로스겔에서 60min동안 전기영동하고 EtBr로 염색하고 UV검출기에서 확인하였다.

## 결과 및 논의

### 1) PCR방법에 따르는 송이버섯염색체DNA의 검출효과

균뿌리시료에서 송이버섯균의 유무를 확인하기 위하여 CTAB법으로 분리한 핵산을 송이버섯특이프라이머를 리용한 PCR와 버섯일반프라이머와 송이버섯특이프라이머를 리용한 중복PCR를 진행한 다음 1% 아가로스겔에서 전기영동하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 송이버섯원균은 PCR와 중복PCR에서 모두 특이띠가 나타났지만 송이버섯자연균권 시료는 중복PCR에서만 특이띠가 나타났다. 이로부터 감염된 뿌리에서 송이버섯균의 유무를 확정하기 위하여서는 중복PCR법을 리용하여야 한다는것을 알수 있다.

### 2) 시료량에 따르는 송이버섯염색체DNA의 검출효과

10, 15, 20, 25mg의 각이한 시료를 CTAB법으로 핵산

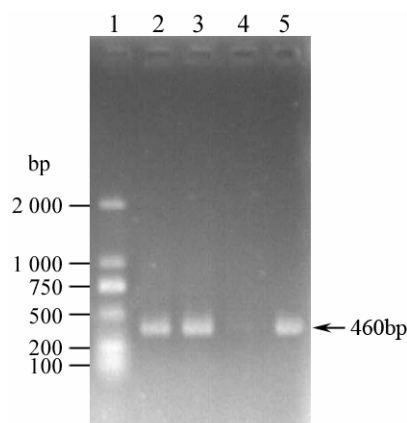


그림 1. PCR방법에 따르는 송이버섯염색체DNA증폭산물의 전기영동상

1-DNA분자크기표식자(DL 2000),  
2-송이버섯원균PCR산물, 3-송이버섯원균중복PCR산물, 4-자연균권PCR산물, 5-자연균권중복PCR산물

을 추출하여 중복PCR를 진행한 다음 1% 아가로스겔에서 전기영동하여 확인한 결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 시료량을 15mg이상으로 할 때 분리된 핵산의 중복PCR산물에서 송이버섯특이띠가 확인되었다.

### 3) BSA첨가량에 따르는 PCR증폭효과

PCR에 영향을 주는 방해물질들을 억제하기 위하여 BSA첨가량에 따르는 PCR증폭효과를 보았다. 1% BSA용액의 첨가량을 변화시키면서 버섯일반프라이머를 리용하여 PCR를 진행한 다음 1% 아가로스겔에서 전기영동한 결과는 그림 3과 같다.

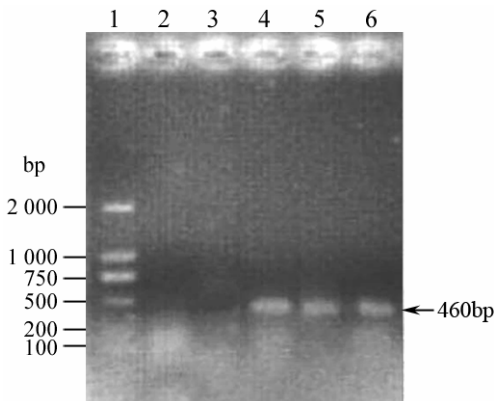


그림 2. 시료량에 따르는 송이버섯염색체 DNA 증폭산물의 전기영동상

1-DNA분자크기표식자(DL 2000), 2-6은 시료량이 각각 0, 10, 15, 20, 25mg일 때의 PCR산물

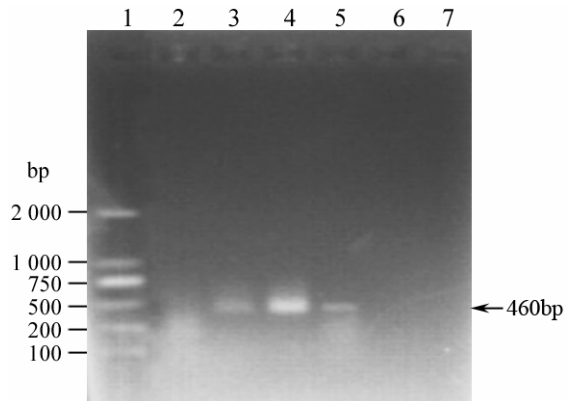


그림 3. BSA첨가량에 따르는 PCR증폭산물의 전기영동상

1-DNA분자크기표식자(DL 2000), 2-7은 1% BSA용액의 첨가량이 각각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0μL일 때의 PCR산물

그림 3에서 보는바와 같이 0.2, 0.4, 0.6μL의 1% BSA용액을 첨가한 구들에서 버섯프라이머에 해당되는 증폭띠가 관찰되었다. 그가운데서 0.2, 0.6μL의 1% BSA용액을 첨가한 구에서는 증폭띠가 거의나 알아보기 힘들 정도로 매우 약하게 나타났으나 0.4μL의 1% BSA용액을 첨가한 구에서는 증폭띠가 뚜렷하게 나타났다. 이것은 1% BSA의 첨가량을 0.4μL로 할 때 PCR방해물질들이 효과적으로 억제되어 DNA증폭에 적합하다는것을 보여준다.

### 4) 1차PCR산물농도에 따르는 송이버섯염색체DNA의 검출효과

최종적으로 송이버섯균확인을 위하여 버섯일반프라이머를 리용하여 증폭한 1차PCR산물을 각이한 농도로 희석한 다음 송이버섯특이프라이머로 2차PCR를 진행하였는데 그 결과는 그림 4와 같다.

그림 4에서 보는바와 같이 1차PCR산물을 20배 희석하여도 증폭효율은 달라지지 않는다는것을 알수 있다.

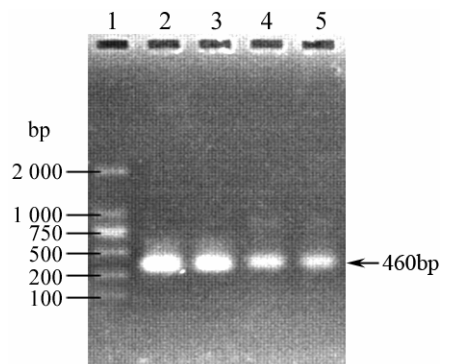


그림 4. 1차PCR산물농도에 따르는 송이버섯염색체DNA 증폭산물의 전기영동상

1-DNA분자크기표식자(DL 2000), 2-5는 1차PCR산물을 각각 1, 10, 20, 30배로 희석하였을 때(분석시료량 1μL)의 PCR산물

### 5) 중복PCR에 의한 인공감염뿌리에서 송이버섯균확인

자연균뿌리와 인공감염뿌리에서 송이버섯균의 감염을 확인하기 위하여 CTAB법으로 분리한 핵산을 가

지고 버섯일반프라이머와 송이버섯특이프라이머를 리용한 중복PCR를 진행한 다음 1% 아가로즈겔에서 전기영동하였다.(그림 5)

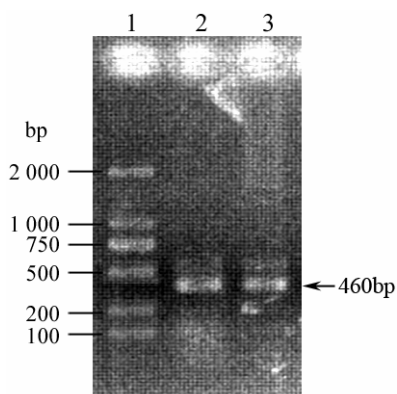


그림 5. 송이버섯균의 확인을 위한 중복PCR산물의 전기영동상

1—DNA분자크기표식자(DL 2000),  
2—자연균권뿌리시료의 중복PCR  
산물, 3—인공감염균권뿌리  
시료의 중복PCR산물

그림 5에서 보는바와 같이 송이버섯종균을 소나무의 새 뿌리에 인공적으로 감염시킨 실험구에서 중복PCR를 진행한 결과 자연균권뿌리실험구에서와 마찬가지로 증폭띠가 나타났다.

## 맺 는 말

1) 균뿌리시료에서 버섯일반프라이머와 송이버섯특이프라이머를 리용한 중복PCR법으로 송이버섯균을 확인할 수 있는데 이때 시료량이 15mg이상 되어야 한다. 그리고 버섯일반프라이머를 리용한 1차PCR에서 PCR반응물질들을 억제하기 위하여 0.4μL의 1% BSA용액을 첨가하는 것이 가장 좋았다.

2) 송이버섯특이프라이머를 리용한 2차PCR는 1차PCR산물을 그대로 주형으로 리용하는 것이 좋았다.

이와 같은 방법으로 송이버섯종균을 인공적으로 감염시킨 소나무뿌리시료와 송이버섯활성균권속의 소나무뿌리에서 송이버섯균이 각각 검출되었다.

## 참 고 문 헌

- [1] I. H. Chapela et al.; Mycologia, 96, 730, 2004.
- [2] Daniel Janowski et al.; Forests, 10, 218, 1, 2019.
- [3] Elizabeth Bent et al.; Journal of Microbiological Methods, 80, 206, 2010.
- [4] K. Kikuch et al.; Mycol. Res., 104, 1427, 2000.
- [5] J. S. Lee et al.; J. Kor. For. Soc., 93, 121, 2004.

주체110(2021)년 1월 5일 원고접수

## Confirmation Method of Roots of Pine Infected with *Tricholoma matsutake* Using Nested-PCR

Kim Un Hyok, Nam Kol and Jo Su Gyong

When the newly-generated roots of pine are inoculated with *T. matsutake* spawn in field condition, it seems to be infected due to dichotomous root tips. However, it is not clear whether it is from *T. matsutake* or soil mycorrhizal fungi. We developed the nested-PCR method for detection of *T. matsutake* from its mycorrhizal sample with mushroom-universal primers and *T. matsutake*-specific primers.

Keywords: *T. matsutake*, artificial culture, pine, *Pinus densiflora*