

AFLP 기술의 Silver-stain된 PAG로 부터 벼 품종 특이 DNA band의 클로닝과 지도작성

농업과학기술원 조용구, 코넬대 MW Blair, SR McCouch

Cloning and Mapping of Rice Variety-specific DNA : Amplified Fragment Length Polymorphism by Silver-stained Gel

Agricultural Science and Technology Institute Yong Gu Cho

Cornell University

MW Blair, SR McCouch

실험목적

특정 형질과 연관된 DNA 마커의 개발이나 다수의 DNA 마커의 유전자지도 작성을 위하여 AFLP 기술을 확립하고 band의 해상력과 실험의 용이성을 확보하기 위하여 32P 방사능 이용 방법을 silver-stain 법으로 대체하고 이때 DNA band의 클로닝과 그의 mapping 가능성을 검토하고자 수행하였다.

재료 및 방법

- 공시재료 : Taichung 65, Taichung 65(sd-1), IR24
- DNA 추출 : Megabase DNA 추출법 (Zhang et. al. 1994)
- AFLP 분석법 : Marc Zabeau and Peter Vos 1993
- DNA cloning : TA cloning kit 이용
- 유전자지도작성 : Mapmaker v2.0 (Lander 등 1987)

결과요약

AFLP 마커의 PCR 증폭 후 denaturing polyacrylamide gel에서 silver-stain에 의하여 밝혀진 다형성 DNA 밴드를 클로닝하기 위한 효과적인 방법이 개발되었다. 이 방법은 32P-labelled 방법에서 DNA 밴드를 클로닝할 때와 동일하고 신뢰성 있게 클로닝이 가능한 방법이다.

두 가지 방법으로 분리된 다형성 DNA 밴드는 PAG로 부터 잘라낸 DNA를 포함하는 겔 조각을 PCR 반응액에 넣고 일회의 PCR 증폭에 의하여 확보된 다량의 DNA를 가지고 클로닝을 하였으며 이들 클론들의 염기서열을 결정하여 32P-labelled 방법과 silver staining 방법으로 비교하여 본 결과 두 방법간에 동일한 염기서열을 확인할 수 있었다. 따라서 silver staining 방법에 의하여 밝혀진 다형성 DNA 밴드를 32P-labelled 방법에서와 동일하게 높은 신뢰도를 가지고 클로닝할 수 있음을 확인하였다. 또한 클로닝된 두 개의 AFLP 밴드들의 유전 및 지도작성 가능성을 검토하고자 SL mapping 집단을 이용하여 분석한 결과 이들 두 클론들은 single copy DNA들로 밝혀졌으며 벼의 1번과 9번 염색체에 각각 위치하였다. 따라서 silver staining 방법으로 부터 클로닝된 클론들을 분자 유전자지도 작성에 표지인자로서 효율적으로 이용할 수 있을 것이다.

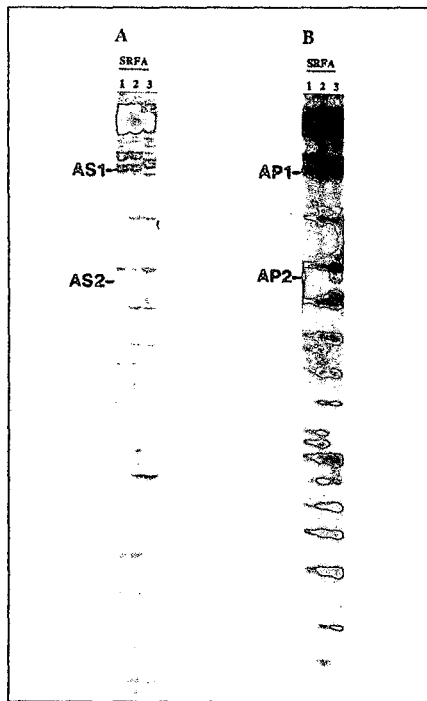


Fig. 1. Detection of AFLP on 5% denaturing polyacrylamide gels using silver-staining (A) and ^{32}P -labelling

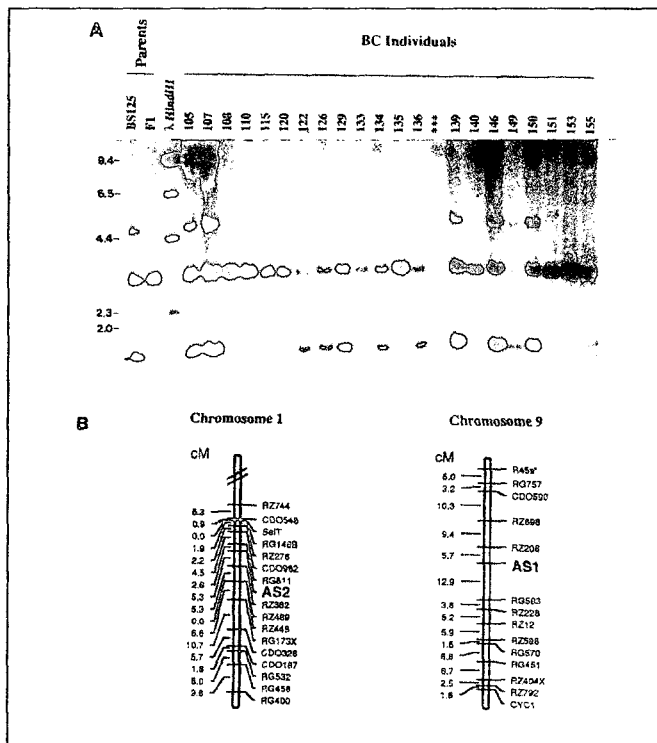


Fig. 2. A) Southern analysis of the cloned AFLP band AS1 on a *Xba*I mapping filter of the interspecific backcross population. B) Molecular map of rice chromosome 1 and 9 showing the positions of AS1 and AS2.