

딸기의 RAPD를 위한 PCR의 최적조건

양덕춘 . 최성민¹⁾ . 강태진 . 이미애²⁾ . 송남현²⁾ . 민병훈¹⁾
한국인삼연초연구원, ¹⁾배재대학교 원예조경학과, ²⁾충남농업기술원

Optimum Condition of Polymerase Chain Reaction Techniques for Randomly Amplified Polymorphic DNA of Strawberry

Deok-Chun Yang, Sung-Min Choi¹⁾, Tae-Jin Kwang, Mi-Ee Lee²⁾, Nam-Hyun Song²⁾ and Byung-Hoon Min¹⁾
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, KOREA
¹⁾College of Natural Science, Pai Chai University, Taejon 302-735, KOREA
²⁾Chungchong Nam-do Agricultural Research & Extension Services, Taejon, 305-313, KOREA

ABSTRACT

This study was performed to select marker which can identify genetic variation between mother plant and in vitro cultured plantlets of strawberry by PCR using random primer. When 'Yeobong' DNA extracted was treated with proteinase-K and RNase-H, clear DNA bands were shown. The optimal condition for RAPD in strawberry was to use 50ng of template DNA, 10pmol of primer, 37°C of annealing temperature, and 45 cycles of PCR. After establishing above PCR optimal condition, RAPD pattern was investigated by using UBC primers. PCR was performed, and 46 of 90 primers produced PCR product showing 158 total bands. GC content was compared between the primers forming bands and no bands. The GC content showing bands was average 67.4%, whereas primers showing no bands 58%.

Key words : annealing temperature, PCR, primer, RAPD

서론

식물의 유전, 육종 분야에 있어 개체 또는 집단의 유전변이에 대한 연구는 Mendel 이후 주로 표현형에 의존한 분석법과 동위효소 분석법이 보편적으로 사용되어 왔다. 식물개체의 표현형은 단순히 개체의

유전적 요인에 의한 것뿐만 아니라 환경요인에 의해서도 지배를 받고 있다. 이러한 환경적 요인의 영향을 최소화시키기 위해서는 복잡한 통계적 처리를 필요로 하기 때문에 표현형에 의한 유전 변이분석은 대단히 어렵고 연구결과에 대한 신뢰도도 낮을 수밖에 없다. 또한 이러한 분류 방법들은 제반 형질의 조사 또는 수치화에 있어서 객관성이 부족하고 정확도

Corresponding author: 양 덕 춘, 우 305-345, 대전시 유성구 신성동 302번지 한국인삼연초연구원
E-mail: dcyang@gtr.kgtri.re.kr

도 다소 낮을 수 있다. 동위효소의 경우에도 시기별로 또는 같은 품종이라도 생육상태에 따라 band 양상이 달라질 수 있는 등 방법상의 제약점이 많다. 또한 품종 구분이나 특수 유전형질의 유무에 따른 개체간의 구분에는 그 적용성이 높지 못한 결함이 있다.

1980년에 Kary Mullis에 의하여 창안된 Polymerase Chain Reaction(PCR) 방법에 의한 유전자의 증폭기술의 발달로 DNA를 쉽게 분석할 수 있는 조건을 마련한 Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) 기술은 식물계통간의 polymorphism 분석을 가능하게 하여 환경변이가 아닌 유전적인 변이를 확인할 수 있게 할뿐만 아니라 유전자 지도 작성, 모본의 확인 등 그 이용성이 다양하며 옥수수, 밀, 콩, 사람, *Neurospora crassa* 및 다수의 박테리아 계통에서 polymorphism이 확인되었다(Koebner, 1995). 이러한 RAPD를 이용하여 Martin 등(1991)은 토마토의 near-isogenic line 분석, Carsol 등(1991)은 침엽수의 종간 차이 분석 등에 이용하였으며, Orozco-castillo 등(1994)은 Coffee속 식물의 유전적 다변성 분석에서 교잡종의 형질전이 정도와 유용한 인자의 선발에 이용될 수 있음을 보여주었다.

우리 나라에서의 RAPD 분석은 주로 벼(김, 1997), 구기자(朴 등, 1996), 인삼(지, 1997), 콩(백 등, 1997), 토란, 토마토 등의 여러 작물을 대상으로 하여 근연관계 분석이나 바이러스에 대한 검증에 많이 활용하고 있다. 박 등(1995)은 RAPD를 이용하여 한국 재래종 및 도입종 수박(*Citrullus vulgaris* L.) 유전자원 30계통과 현재 상품화되어 있는 보급 종들의 DNA polymorphism을 조사하여 소집단화 하였다고 하였다. 그리고 金(1997)은 RAPD 표지인자를 이용하여 벼 품종간의 유전적 변이를 조사한 바 벼의 인디카인 Dular는 자포니카 품종들과 원연관계가 있었다고 하였다.

그러므로 계통분석에 있어 RAPD의 활용가치가 높으나 식물의 DNA 상태에 따라 PCR 과정에서의 적절한 primer의 선정 및 PCR 조건을 찾는 것이 RAPD의 핵심이라 할 수 있다. 딸기는 순수한 DNA 추출이 다른 작물에 비하여 어려워져서 PCR을 수행하

는 데에 있어서 문제점이 많아서 본 실험에서는 RAPD를 위한 PCR을 수행하는 데에 있어서의 최적 조건을 구명하여 RAPD 뿐만이 아니고 딸기 DNA를 재료로 하여 PCR을 수행하는 다른 실험에서도 도움이 되고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 딸기의 Genomic DNA 추출

딸기의 품종인 “여봉”의 DNA 추출은 Dellaporta (1983)의 방법을 변형하여 DNA 추출을 하였다. 어린 식물체 조직의 디스크 절편직경이 0.5 cm (무게 300mg)가 되게 채취하여 액체질소를 가하여 엽조직을 급동결 시켜 미세한 가루가 될 때까지 마쇄하였다. 마쇄가 끝난후 1.5ml microcentrifuge tube에 시료를 넣고 얼음 위에 5분동안 방치한 다음 DNA extraction buffer (100mM Tris base pH 8.0, 50mM EDTA pH 8.0 500mM NaCl, 10mM mercapto EtOH)를 300 μ l 첨가하였다. 이를 65 $^{\circ}$ C의 water bath에서 10분간 방치하고, 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 하였다. 새로운 1.5ml microcentrifuge tube에 상등액을 600 μ l 취한 후 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1)을 넣고 1분동안 tube를 흔들어 준 다음 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 5분간 원심분리를 실시하였다. 다시 새로운 1.5ml microcentrifuge tube에 상등액 550 μ l를 취한 후 동량의 chloroform : isoamyl alcohol(24:1)와 10% SDS 50 μ l를 넣고 흔들어 주었다. 이를 12,000rpm의 속도로 4 $^{\circ}$ C에서 5분동안 원심분리를 한 다음 500 μ l의 상등액에 300 μ l의 isopropanol을 넣고 혼합한 후 원심분리를 하였다. 원심분리 후 70% EtOH에 세척한 pellet을 TE buffer에 용해하여 RNase와 Proteinase로 처리한 다음 -20 $^{\circ}$ C에 보관하여 사용하였다.

2. RAPD를 위한 PCR 조건

딸기 ‘여봉’ genomic DNA를 이용한 polymerase chain reaction(PCR)의 조건을 찾기 위해 PCR을 행하였다. PCR을 위한 딸기 genomic DNA의 최적농도 조건을 구명하기 위해 genomic DNA를 1ng, 10ng,

50ng, 100ng, 1000ng의 조건으로 PCR을 행하였으며 primer의 최적농도를 구명하기 위해서 캐나다 콜롬비아 대학에서 제작한 UBC primer 300번대와 800번대를 각각 100개씩 선정하여 primer의 농도를 1pmol, 1.6pmol, 5pmol, 10pmol로 하였다. PCR의 최적 Annealing 온도를 구명하기 위하여 37℃, 45℃, 55℃로 달리하여 PCR을 실시하였다. PCR을 행하기 위한 총량은 20μl로 Perkin-Elmer DNA recovery(Sereal No. P 17806)를 사용하여 DNA fragment를 증폭하였다.

결과 및 고찰

1. RAPD를 위한 딸기의 genomic DNA의 추출

기내배양에 의해서 생산된 딸기의 유묘와 모본과의 유전적인 동일성 여부를 RAPD 방법으로 확인하고자 하였다. 따라서 효율적인 RAPD를 위해 우선 포장과 기내에서 생육중인 딸기의 엽과 뿌리 그리고 런너에서 채취한 조직으로부터 total genomic DNA를 분리하였다. 분리방법은 Dellaporta(1983) 방법을 약간 변형하여 수행하였던 바, CTAB을 사용하는 방법에 비해 매우 간편하면서도 빨리 DNA를 분리할 수 있었다(Fig. 1). 즉, 추출한 DNA를 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator 상에서 DNA band를 관찰한 결과 30-40Kb의 genomic DNA가 단일밴드로 나타났다(Fig. 1-B). 그러나 이 경우에는 추출한 DNA로부터 단백질이나 RNA에 의하여 오염이 되었기 때문에 추출한 DNA를 다시 RNase와 proteinase-K로 처리하였던 바, 매우 깨끗하고 순수한 DNA band를 확인할 수 있었다(Fig. 1-A). 사과와 딸기의 경우에도 DNA로부터 단백질이나 RNA를 제거하지 않아 RNA가 상당히 많았고 nonspecific background가 나와 사과의 genomic DNA에 proteinase와 RNase를 처리하였을 때 깨끗한 DNA band가 23Kb 부근에서 나왔다고(예, 1994)하여 본 실험에서의 결과와도 일치하였다.

2. PCR을 위한 딸기의 genomic DNA 함량의 영향

가장 효과적인 PCR조건을 구명하기 위해서 우선

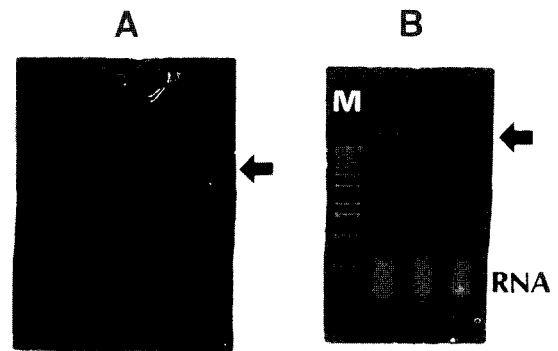


Fig. 1. Gel electrophoresis of strawberry genomic DNA treated (A) and (B) RNase and proteinase K.

추출한 DNA의 함량별로 PCR조건을 조사하였다. 1ng의 genomic DNA를 이용하여 PCR을 행한 결과에서는 증폭된 DNA band를 볼 수가 없었으나, 10ng 이상에서부터는 DNA band를 확인할 수 있었다(Fig. 2-A). 또한 DNA의 함량이 10ng 보다 많을수록 PCR product가 선명히 나타나 50ng에서는 DNA band가 비교적 선명하였으나 100ng에서 가장 선명하였다. 그러나 100ng에서는 희미한 가짜 band들이 많이 출현되어 효율적인 PCR을 위해서는 DNA의 함량을 50ng으로 하는 것이 좋은 것으로 판단되었다. 수도의 genome 분석에서 金(1997)도 micro-satellite primer를 이용하여 PCR을 행할 때 50ng이상이면 1Kb 이하의 거의 증폭이 되지 않아 전기영동시 좋은 결과를 얻을 수가 없어서 50ng이 가장 적당하였다고 하여 본 실험의 결과와도 일치하였다.

3. 딸기 PCR을 위한 primer의 최적 농도조건 구명

딸기 genomic DNA의 증폭에 있어서 primer의 농도를 1pmol, 1.6mol, 5pmol, 10pmol로 달리하여 RAPD 양상을 조사하였다. 10pmol의 농도에서 DNA band가 선명하였고(Fig. 2-B), 이 보다 낮은 농도에서는 거의 band를 관찰할 수 없었다. 따라서 딸기의 PCR을 위해서 primer농도는 10pmol을 사용하는 것이 효과적인 것으로 생각되었으나 이 보다 높은 농도에서도 좀 더 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

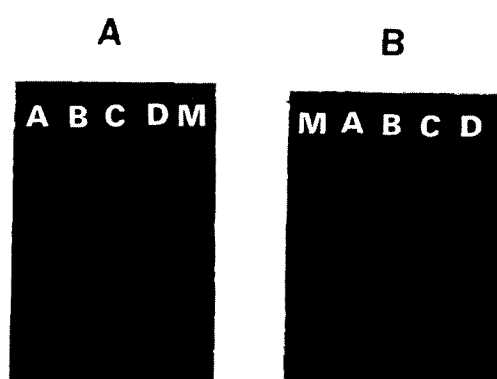


Fig. 2. Optimal PCR condition at different template DNA concentration(A) and primer amount(B). (A) A, 1ng; B, 10ng; C, 50ng; D, 100ng; (B) A, 1pmol; B, 1.6pmol; C, 5pmol; D, 10pmol. M; marker.

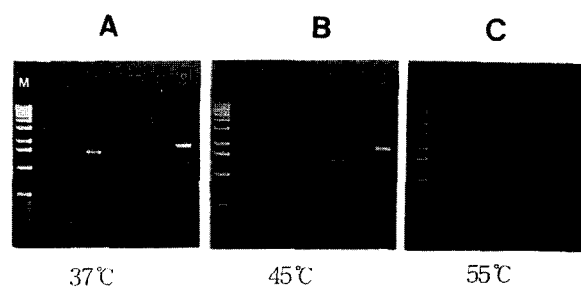


Fig. 3. RAPD pattern of strawberry DNA amplified at different annealing temperature (A, 37°C; B, 45°C; C, 55°C) and primers (a, UBC primer 308; b, UBC primer 332; c, UBC primer 345; d, UBC primer 358; e, UBC primer 364; f, UBC primer 375; g, UBC primer 389).

Table 1. Number of PCR products obtained from genomic DNA of strawberry 'Yeobong' using 300s of UBC primers.

No. of UBC primer	GC content (%)	No. of band	No. of UBC primer	GC content (%)	No. of band
301	70	3	345	80	7
302	80	2	348	80	5
303	80	6	349	70	7
304	70	5	350	70	3
305	70	4	351	80	4
308	70	1	352	60	3
312	70	2	353	70	2
313	70	7	356	80	3
318	70	4	358	80	2
319	90	4	359	70	3
320	60	3	360	70	5
322	60	5	361	70	4
323	60	1	362	60	2
327	50	6	364	80	1
329	70	4	368	60	2
330	60	3	369	60	2
331	60	2	370	70	3
332	50	1	372	70	3
333	60	6	373	50	1
335	70	4	374	60	1
336	70	4	375	70	5
337	70	1	388	80	6
338	60	2	389	80	4
GC content of selected primers(46)				67.4	
GC content of non selected primers(44)				58.0	
GC content of total primers(90)				66.9	

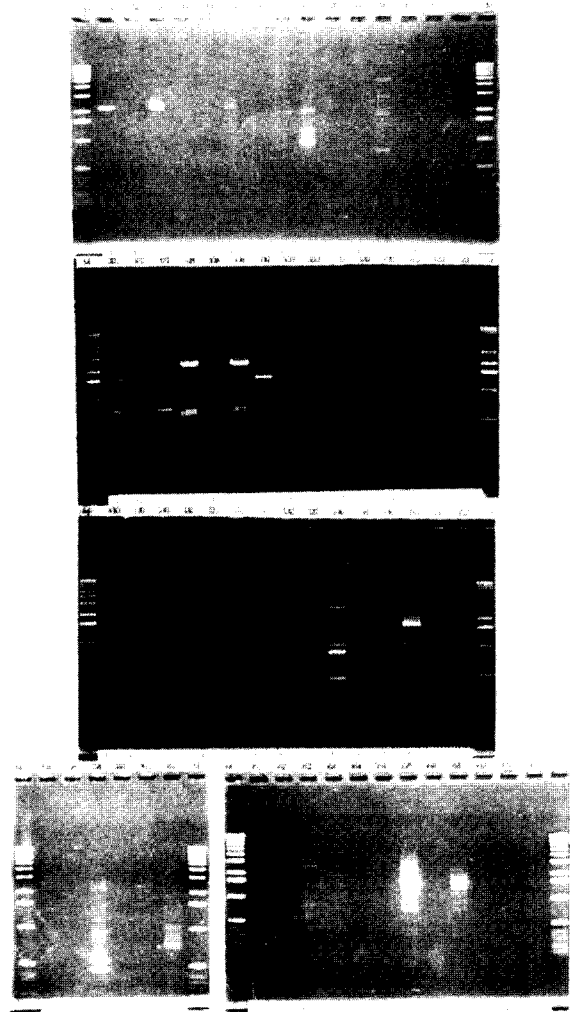


Fig. 4. RAPD band pattern amplified from strawberry genomic DNA by using selected UBC primers(No. 30, 31, 50, 302, 308, 309, 346, 352, 358, 361, 362 and 368) and by using three different cultivars (A, Bokyo; B, Suhong; C, Yeobong). M:marker.

4. 딸기 PCR을 위한 annealing 온도의 영향

PCR에 있어서 annealing 온도는 매우 중요하며, 일반적으로 primer의 길이와 nucleotide의 종류에 따라 그 온도가 달라진다. 본 실험에서는 10 mer의 RAPD primer를 사용하여 annealing 온도를 37℃, 45℃, 55℃로 달리하여 PCR을 실시하였던 바, 55℃ 이상에서는 전혀 band가 형성되지 않았으나(Fig. 3-C), 37℃와 45℃에서는 band를 확인 할 수 있었다(Fig. 3-A and B).

일반적으로 primer의 A/T 및 G/C 함량에 따른 annealing 온도를 계산하여 각각의 primer에 맞는 적정온도를 계산하면 10mer의 경우 대개 30~40℃ 정도이다. 온도가 높은 경우(55℃ 경우)에는 본 실험에서와 같이 band가 전혀 형성되지 않고 반대로 annealing 온도가 너무 낮으면 재현성이 없는 band가 많이 나오기 때문에 온도를 높이는 것이 specific한 band를 획득하는데 유리하다. 그러나 본 실험에서는 오히려 45℃ 보다 37℃에서 더 양호한 band가 형성되어 딸기 DNA의 경우에는 37℃가 좋은 것으로 사료되었다. 즉, template DNA의 함량이 50ng, primer 농도는 10pmol, annealing 온도는 37℃, 증폭회수는 45회로 하여 PCR을 수행하였을 때 가장 양호한 결과를 나타내었다(Fig. 4).

5. Primer의 종류에 따른 딸기의 RAPD 양상

상기 실험결과 template DNA 50ng과 primer농도 10pmol, annealing 온도 37℃, 증폭횟수는 45cycle로 RAPD 적정조건을 확립한 후, UBC primer 300번대를 대상으로 딸기 여봉 DNA에서 PCR을 수행하여 RAPD의 양상을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 총 90개의 primer 중에서 딸기 genomic DNA에서 PCR product를 형성한 것은 46개의 primer였으며, 총 형성된 band의 수는 158개로 나타났다(Table 1). Band를 형성한 primer와 band를 형성하지 않은 primer간의 GC content를 비교하면 band를 형성한 primer의 경우 GC content는 평균 67.4%이었다. 그러나 band를 형성하지 못한 primer의 경우에는 GC content가 평균 58%이었다. 이런 결과는 인삼에서 band를 형성한 primer의 GC content 74%인데 비해 다소 낮지만 band를 형성하지 못한 primer에 비해 GC 함량이 높은 것은 같은 경향을 보여(지, 1998), 식물에서 GC content가 높을수록 band가 더 잘 형성된 것으로 생각된다.

적요

본 연구는 random primer를 이용하여 PCR을 수행하기 위한 딸기 DNA 증폭의 최적조건을 구명하여 조직배양된 딸기 배양묘와 모본과의 유전적인 동일

성의 여부 및 품종을 판별할 수 있는 marker를 개발하기 위하여 수행하였다. 추출한 딸기 커(♂)자 DNA를 proteinase-K나 RNase-H를 처리하였을 때 깨끗하고 순수한 DNA band를 확인할 수 있었으며, 50ng의 template DNA, 10pmol의 primer, 37°C annealing 온도로 45 cycle로서 PCR을 행하는 것이 가장 효율적이었다. 상기 실험결과로서 PCR 적정조건을 확립한 후, UBC primer를 대상으로 딸기 여봉 DNA에서 PCR를 수행하여 RAPD의 양상을 조사한 결과 총 90개의 primer 중에서 딸기 genomic DNA에서 PCR product를 형성한 것은 46개였으며, 총 형성된 band의 수는 158개로 나타났다. Band를 형성한 primer와 band를 형성하지 않은 primer간의 GC content를 비교하면 band를 형성한 primer의 경우 GC content는 평균 67.4%이었다. 그러나 band를 형성하지 못한 primer의 경우에는 GC 함량이 평균 58%이었다.

사사

본 연구는 농촌진흥청의 농업특정 과제의 연구비 지원으로 수행되었음을 밝히며 이에 감사드립니다.

인용문헌

백인울, 윤용희, 신두철, 박규환, 황용훈, 김달웅. 1997. RAPD 방법에 의한 콩속의 중간 유연관계 분석. 한국육종학회지. 29(3):308-317.

Carsoln J. E., Tulsieram, L. K., Glaubitz, J. C., Kauffeldt, C. and Rutledge, R. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of polyphemic. Nucl. Acids Res. 21:3328.

Dellaporta. 1983. Short protocols in molecular Biology, 2nd edition.

김선형. 1997. 수도의 게놈분석을 위한 PCR기법

(RAPD, RAMP, AFLP)의 최적화 규명 및 도열병 저항성 마커의 선발. 강원대학교. 농학석사학위논문.

김경민. 1997. RAPD 방법을 이용한 벼의 유연관계 분석. 한국육종학회지. 29(3):327-332.

Koebner R. M. D. 1995. Predigestion of DNA template improves the level of polymorphism of random amplified DNAs in wheat. Genetic analysis : Biomol. Eng. 2 : 63-67.

지성훈. 1997. RAPDs 및 PCR-aided RFLP기술을 이용한 인삼의 DNA 분석. 배재대학교 석사학위 논문.

Martin G. B., Williams, J. G. K. and Tanksley, S. D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 2336-2340.

Orozco-Castillo C., Chalmers, R. J. and Powell, W. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87:934-940.

박권우, 이송재, 신정섭. 1995. RAPD법을 이용한 수박의 유전변이 탐색. 한국육종학회지. 27(1):94-107.

박상용, 김혁, 이봉춘, 성창근, 임용표. 1996. RAPD 방법을 이용한 구기자자의 분류 및 동정. 한국육종학회지. 28(3):221-226

Tao Y., Manners, J. M., Ludlow, M. M. and Henzell, R. G. 1993. DNA polymorphisms in grain sorghum(*Sorghum bicolor* L. Moench). Theor. Appl. Genet. 86 : 679-688.

예병우. 1994. RAPD를 이용한 사과품종의 분류와 품종판별 표지의 선발. 서울대학교 박사학위논문.

(접수일 2000. 9. 18)
(수리일 2000. 10. 2)