

느티나무(*Zelkova serrata*) 단풍의 유전적 특성분석을 위한  
RAPD 적정 조건 구명에 관한 연구  
최병곤<sup>1)</sup> · 방광자<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 상명대학교 환경자원학과

A Study of Optimum Condition of RAPD for the Analysis of  
Genetic Characteristics by Autumn Leaf Color of *Zelkova serrata*

Byoung Kon Choi<sup>1)</sup> and Kwang Ja Bang<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Environmental Resources, Sang Myung Univ., Seoul, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to find out what is the optimum conditions for RAPD of *Zelkova serrata*. We changes the factors what affect to PCR band patterns, as a result, we established the optimum conditions as follows; template DNA 100ng, primer 0.25uM, dNTP 100mM, Taq polymerase 1.0u, and total reaction volume was filled up to 10uL with distilled water. As the amount of primers went higher, PCR reaction rates were lowered. This reason was cause by exhaustion of primers during initial reaction. The amount of dNTP didn't showed noticable differtations between the range, but the optimum amount was 100mM for efficiency. Taq polymerase 1.0 unit was the best in the range. As the concentration of polymerase were increased, many non-specific bands were appeared. In primer selection, most Openron Random Primers are amplified in this experiment. The primers GC contents were 60, and set A, B, C, D, E, X were tested.

Thermal cycler(ASTEC PC808, Japan) condition was, 95℃, 5min, initial denaturation, 94℃, 20sec, denaturation, 37℃, 40sec, annealing, 72℃, 1min, extention, 45cycle repeated and final extention 72℃, 10min.

Key words : *Zelkova*, PCR condition, primer selection

I. 서 론

식물소재는 그들 스스로가 지니고 있는 기능과 아름다움을 최대한으로 살리려면 하나의 통

일된 아름다운 경관을 조성할 수 있도록 계획, 설계, 시공되어야만 식재의 의의를 찾을 수 있는 것이므로 조경의 성격에 따라 수종의 선택도 달라져야 한다(방광자, 1995). 그러나 지금까지

조경수목은 대부분 실생으로 번식되어왔기 때문에 종간 변이가 다양하여 균일한 수형이나 특성을 갖는 개체를 생산할 수 없었다(심경구, 1999). 현재 공원수나 가로수로 이용되고 있는 느티나무나 홍단풍 등은 실생번식으로 생산된 수목으로서 개체마다 수형, 나무 잎 모양, 단풍색이 일정하지 않아 가로수의 중요 요건인 통일성이 없어졌기 때문에 식재시 제한이 따랐다. 그러므로 앞으로는 실생 번식으로 생산된 수종 대신에 모본의 유전 형질이 그대로 전해지는 접목방법등을 이용하여 조경수를 생산할 수 있도록 해야 할 것이다(이근창, 1991). 이러하기 위해서는 각 식물 소재에 대한 유전자적 분류가 선행되어야 할 것이다. 조경수목 중에서도 대표적 내공해성 수종인 느티나무의 분류와 판별을 위해 여러가지 연구가 진행 되었는데, 꽃가루의 형태적 특징에 의한 분류(Nakagawa *et al*, 1998), 잎의 구조적 특징 및 표피 세포의 특성에 관한 연구(Wang *et al*, 2001), ITS염기서열 분석(Fineschi, 2002)등이 이루어졌다. 최근 분자생물학은 거의 모든 생물학에 영향을 미치고 있다고 해도 과언이 아니라고 하겠다. 그 중에서도 가장 보편적으로 많이 쓰이는 기술 중의 하나가 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA)이다. RAPD는 DNA polymorphism을 보기가 용이하고 실험 조작이 간편하고 빠르며 단 하나의 DNA 절편 까지도 증폭되어 band로 나타날 수 있을 정도로

그 감응도가 높고 소량의 DNA만으로도 수행이 가능하며, 시험 과정이 빠르고 안전하여 대규모 집단의 screening에 효과적인 방법으로서 유전적 변이의 감별, 유전자 지도 작성, 종간의 유전자 흐름의 수준 판정, 모본의 확인 등 이용성이 다양하다(예병우 외, 1995). 이에 본 실험은 RAPD 분석에 있어서의 primer의 염기서열 및 농도, DNA polymerase의 농도, template DNA의 적정 양등 PCR(polymerase chain reaction)을 수행함에 있어 결정적인 영향을 미치는 주요 요인들의 최적 조건을 구명하고자 하였다.

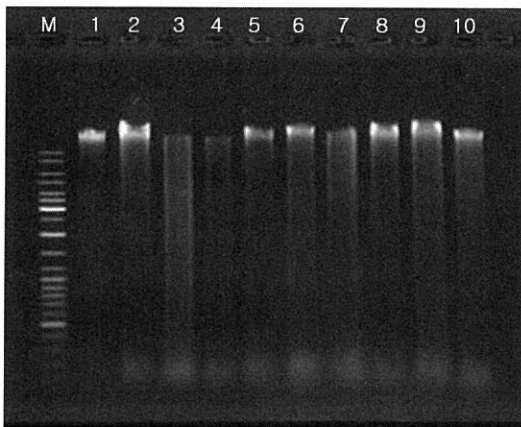
## II. 재료 및 방법

### 1. 공시재료

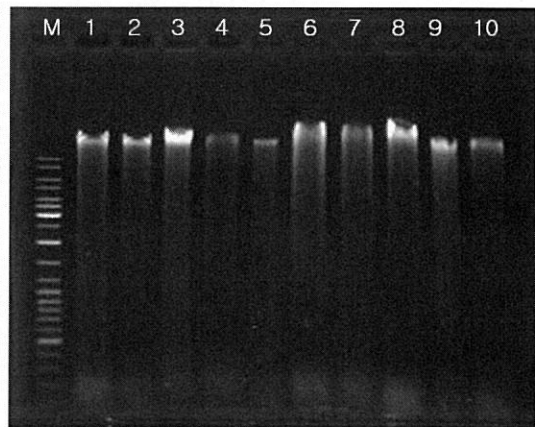
본 실험에서는 경기도 광명시 하안동 소재 느티나무 가로수(Y1-Y10, R1-R3, R5-R10) 및 서울 성북구 안암동 소재 느티나무 가로수(R4) 에서 수집하였다. 대부분 어리고 외상이 없는 잎을 선택하였으며, 70% 알코올로 시료를 잘 닦아 플라스틱 봉지에 밀폐하여 사용시까지 냉장 보관하였다.

### 2. Genomic DNA 분리 및 정제

식물재료 약 2g을 70% 알코올로 잘 닦은 후 유발에 넣고 액체 질소를 적당량 부어 급속냉각 후 아주 곱게 마쇄하였다. 1.5mL 튜브에 적당량



genomic DNA from R01-R10



genomic DNA from Y01-Y10

Figure 1. genomic DNA from R01-R10 genomic DNA from Y01-Y10

**Table 1.** Optical density of genomic DNA from *zilkova serrata*.

품종	A260		A280		순도	dsDNA양 (ng/ul)
R01	0.0517	0.0516	0.0302	0.0297	1.7	258
R02	0.0985	0.0991	0.0598	0.0604	1.6	494
R03	0.2022	0.2004	0.1234	0.1218	1.6	1007
R04	0.2802	0.2825	0.2143	0.2164	1.3	1407
R05	0.1121	0.1128	0.0772	0.0768	1.5	562
R06	0.1737	0.1666	0.1289	0.1206	1.4	851
R07	0.1259	0.1239	0.0789	0.0775	1.6	625
R08	0.1385	0.1374	0.0929	0.0925	1.5	690
R09	0.1796	0.1721	0.1292	0.1252	1.4	879
R10	0.3164	0.3141	0.2213	0.2205	1.4	1576
Y01	0.0905	0.0911	0.0574	0.0587	1.6	454
Y02	0.0803	0.0799	0.0496	0.0494	1.6	401
Y03	0.0362	0.0448	0.0218	0.0272	1.7	203
Y04	0.0722	0.0739	0.0483	0.0487	1.5	365
Y05	0.0893	0.0919	0.0572	0.059	1.6	453
Y06	0.0301	0.0294	0.0199	0.0189	1.5	149
Y07	0.0897	0.0871	0.0553	0.0538	1.6	442
Y08	0.1876	0.1847	0.1163	0.1137	1.6	931
Y09	0.146	0.1462	0.0816	0.0807	1.8	731
Y10	0.0916	0.092	0.0523	0.051	1.8	459

(약 500mg) 시료를 넣고 2-mercaptoethanol을 10uL 첨가한다음 Autoclave된 Extraction buffer (500mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 50mM EDTA) 400uL를 넣고 65°C, 10분간 shaking water bath에 놓아 두었다가, 꺼내어 PVP(polyvinylpyrrolidone) 123uL를 넣고 inverting하여 상온에 15분간 그 후 SDS 82uL를 넣고 65°C shaking water bath에서 15분간 반응시켰다. 반응후 5M potassium acetate 61.5uL를 넣고 4°C에서 30분간 보관하였다. 4°C, 15,000rpm 에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 같은 양의 isopropyl alcohol을 넣어 잘 섞은 후 냉동실에 2시간 보관한 후에 다시 같은 방법으로 원심분리를 하고 상층액은 버리고 pellet은 진공건조를 20분간 시행후 1x TE buffer(10mM Tris-HCl,1mM EDTA) 500uL를 넣고 4°C 10분간 방치 후 PCI (phenol:chloroform:isoamyl alcohol을 25:24:1의 비율로 혼합)500uL 를 첨가하여 4°C, 15,000rpm, 10분간

원심분리하였다. 다시 상층액을 새로운 튜브로 옮겨서 동량의 isopropyl alcohol과 3M sodium acetate 75uL를 넣고 -20°C에서 overnight 시켰다. 그 후 같은 조건으로 원심분리하여 상층액은 버리고 pellet을 진공건조하여 30uL 3차 증류수로 녹인다음 Rnase 2uL를 37°C, 4시간 처리하였다. 다시 1x TE buffer 500uL를 첨가하고 동량의 CI (chloroform:isoamyl alcohol을 24:1의 비율로 혼합)를 넣고 다시 같은 조건으로 원심분리한 다음 상층액을 새로운 튜브로 옮겨 같은 양의 isopropanol을 첨가하여 1시간 동안 -20°C에 보관한 후 4°C, 15,000rpm, 10분간 원심분리하였다. 다시 상층액은 버리고 pellet을 진공건조하여 다시 30uL의 3차 증류수로 녹여 4°C에 보관하였다.

최종적으로 얻어진 genomic DNA는 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며(fig. 1), DNA의 양 및 순도는 spectrophotometer

(Beckman DU650, USA)로 측정하였다(table 1.)

### 3. Template DNA의 농도

Template DNA를 50~200ng 범위에서 50, 100, 150, 200ng으로 각각 PCR한 후 0.8% agarose gel에서 확인하였다.

### 4. Primer의 농도

Random primers는 Operon Technology사의 X kit 중에서 X05(5'-CCTTTCCTC-3')

와 X08 (5'-CAGGGGTGGA-3') 을 사용하여 0.125uM, 0.25uM, 0.5uM, 0.75uM의 농도로 사용하였고 마찬가지로 0.8% agarose gel에서 확인하였다.

### 5. dNTP의 농도

dNTP의 농도는 100uM 에서 300uM 까지 50uM 간격으로 PCR하였으며, 0.8% agarose gel에서 확인하였다.

### 6. Taq polymerase의 농도

Taq polymerase의 농도를 0.5u 에서 2.0u 의 범위까지 0.5, 1.0, 1.5, 2.0u 으로 각각 PCR을 수행하였다.

### 7. PCR 반응용액 조성

위 과정들을 수행함에 있어서 template DNA 100ng, primer 0.125uM, dNTP 100uM, 10x reaction buffer 2uL, Taq polymerase 1u 으로 총 반응용액 10uL을 기준으로 하였다.

### 8. PCR 조건

Thermal cycler 로는 ASTEC PC808(Japan)으로 수행하였으며, 95℃, 5분에서 initial denaturation, 다음 45반복으로 94℃, 20초, denaturation, 37℃, 40초, annealing, 72℃, 1분, extension, 로 하였고 final extension 으로 72℃, 10분간 수행하였다.

### 9. 전기영동

0.8% agarose gel에서 100v, 1x TAE buffer에서 25분간 전기영동한 후, ethidium bromide로

염색한후 UV로 확인하였다.

### 10. Primer 선별

Primer는 적정 조건이라고 판별되는 PCR조건 하에서 Operon Technology사의 10mer primer Kit A, B, C, D, E, X 에서 선별하였으며, 목표 DNA 는 Y01, Y02, Y03에 적용하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. PCR에 있어서의 적정 조건

#### 1) Template DNA의 농도

50ng~200ng 범위 중 100ng이 가장 밴드가 선명했다. 200ng이 선명하게 되지 않은 이유는 처음 DNA양이 너무 많아서 그 후 반복 PCR시에 소비되는 Primer의 양을 급격히 감소 시켰기 때문이라고 보여지며(Williams, 1990), template DNA의 양과 밴드패턴(band pattern)의 양상이 크게 다르지는 않았다.

#### 2) Primer의 농도

0.125uM 첨가시에는 밴드패턴이 선명하게 보이지는 않으나 polymorphism을 뚜렷이 나타났고, 0.25uM 적용시에는 거의 선명한 양상을 보이며, 더욱 그 양이 증폭될 때는 0.25uM과 차이는 없었으나, 거짓(false) 밴드들이 드문드문 생겨나는 형태를 띠었다. 그러므로 0.25uM 이 가장 최적으로 고려된다.

#### 3) dNTP의 농도

200mM첨가시 가장 기본 PCR 조성과 조합이 좋았으며, 뚜렷한 밴드패턴을 나타내었다. 100mM은 밴드패턴이 희미하게 나타나는 수준이었다. 이는 Ozaki등이 연구한 매질의 RAPD 최적농도와 거의 비슷한 양이었다(1995).

#### 4) Taq polymerase의 농도

Taq polymerase의 농도는 설정 범위 모두에서 다양히 증폭되었다. 하지만 그 효율은 1.0u에서 가장 효과적이었는데, 중합효소의 농도가 높을

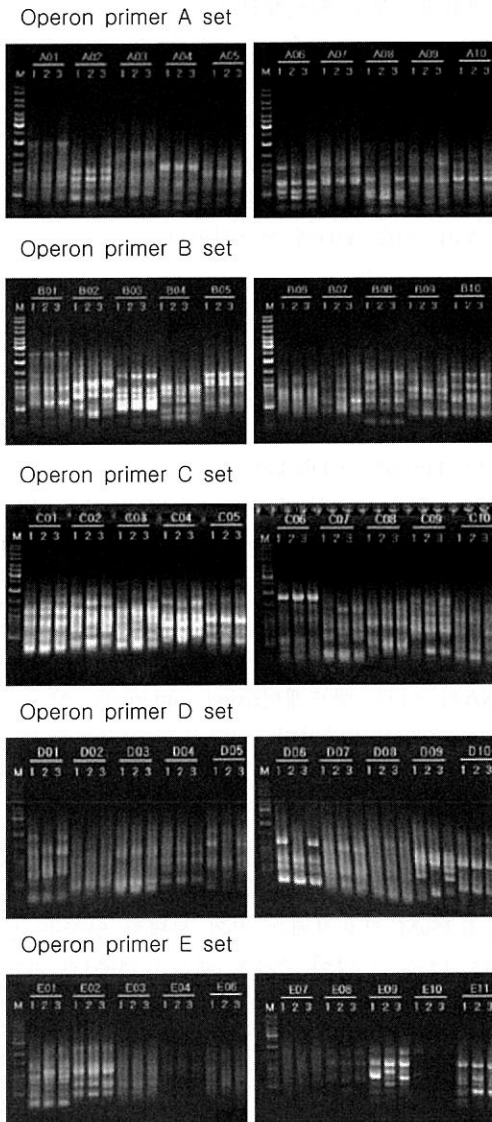


Figure 2. Primer selection by operon 10mer primer kit.

수록 밴드패턴은 다양해졌지만 1.0u이후의 농도에서는 의미없는 밴드들이 계속늘어나서 증폭에 의한 polymorphism 관찰에 적절하지 않은 밴드가 증폭되는 경향을 보였다.

## 2. Primer의 선별

최적 Primer의 선별은 Operon Technology사의 Primer Kit A, B, C, D, E, X set으로 선별 하였으며, 모든 primer에서 무리없이 증폭이 되었다.

그렇지만 template DNA의 종류에 따라 증폭양상이 잘 되지 않는 것들도 있었다(Figure 2), 적용대상 template DNA는 Y01, Y02, Y03 이었다.

## IV. 결 론

본 실험에서 *Zelkova serata*의 PCR 수행시 적정 조건은 template DNA 100ng, primer 0.25uM, dNTP 100mM, Taq polymerase 1.0u으로 나타났으나, template DNA의 양이 100ng 이상일 경우에는 초기 Primer손실에 의해 증폭이 잘 안되는 경향을 보였으며, primer는 0.125uM에서는 증폭은 잘 되었으나 0.25uM에서 가장 확실한 밴드패턴을 보여 주었으며, 더욱 농도가 증가할 시에는 의미 없는 밴드의 증폭이 심화되었다. dNTP의 경우 200mM에서도 결과는 100mM과 차이가 심하지 않았으나, 효율성을 위해서 100mM이 적합한것으로 사료되었다. Taq polymerase는 농도가 증가할수록 다양한 밴드패턴이 나왔으나, 또한 의미없는 밴드의 수만 양적으로 증가하였다(정광선, 2001). Primer는 Operon Random Primer A, B, C, D, E, X Kit에서 무리 없이 Y01, Y02, Y03 template DNA를 증폭 하였으며, GC content 60에서 비교적 효율이 좋은 것으로 판별되었다. 이는 느티나무에 있어 좀 더 과학적이고 체계적인 특성분류를 할 수 있으리라 보며, 다른 조경수에도 적합하게 적용할수 있는 RAPD의 조건을 찾아내는데 기초 자료가 되리라 사료된다.

주요어 : 느티나무, PCR 조건, Primer 선별

## V. 인 용 문 헌

- 방광자, 이종석. 1995. 우리나라 조경 수목의 식재 분포에 관한 연구. 한국조경학회지 23(1):66-94.
- 심경구, 하유미, 박형순, 이정호. 1999. 가로수용 적색 단풍 느티나무(*Zelkova serrata Makino*) 신품종 선별. 한국조경학회지 27(2):1-8.
- 예병우, 박한용, 신용역, 이돈균, 김정호, 고광출.

1995. 사과나무의 RAPD 적정 조건 구명. 한국원예학회지 36(5):649-654.
- 이근창. 1991. 우리나라 조경공사용 수종 다양화 방안에 관한 연구. 서울대학교 대학원 석사학위논문. p105.
- 정광선, 2001. RAPD를 이용한 매실 품종의 분류. 고려대학교 대학원 석사학위논문.p35.
- S. Fineschi, M. Anzidei, D. Cafasso, S. Cozzolino, G. Garfi, R. Pastorelli, D. Salvini, D. Turchini and G. G. Vendramin, 2002, Molecular markers reveal a strong genetic differentiation between two european relic tree species: *Zelkova abelicea* (Lam.) Boissier and *Z. sicula* Di Pasquale, Garfi & Quezel (Ulmaceae). Conservation Genetics 3:145-153.
- Takeshi Nakagawa, Giuseppe Garfi, Maurice Reille, Regine Verlaque. 1998. Pollen morphology of *Zelkova sicula*(Ulmaceae), a recently discovered relic species of the European Tertiary flora: description, chromosomal relevance, and palaeobotanical significance. Review of Palaeobotany and Palynology 100:27-37.
- Yu-Fei Wang, David K. Ferguson, Reinhard Zetter, Thomas Denk and Giuseppe Garfi. 2001. Leaf architecture and epidermal characters in *Zelkova*, Ulmaceae Botanical Journal of the Linnean Society 136:255-265.

接受 2004年 9月 9日