

# RAPD를 이용한 바나나 품종 분류 및 PCR 조건의 최적화

이영일, 신인철, \*이인석

한국원자력연구소

## Classification of Banana by RAPD Analysis and Optimization of PCR Factors

Y. I. Lee, I. C. Shin, I. S. Lee

Korea Atomic Energy Research Institute

### 연구목적

본 실험은 바나나의 polymorphism을 PCR을 통한 RAPD marker들을 사용하여 연구하였다. 먼저 RAPD marker를 선별하기 위해 RAPD 최소조건을 규명하였고, 바나나 품종들 사이의 polymorphism에 대한 근거로 근연관계를 확립하고, 유전자원으로서의 marker들을 선별함으로써 바나나를 육종하는 데 도움을 줄 것이다.

### 재료 및 방법

RAPD 적용을 위한 PCR 조건의 최적화 실험을 위한 공시 재료는 본 연구소에 소재하고 있는 Intan, Ambon Kuning, Monkey banana, GIA, Grand nine의 잎을 사용하였다.

Genomic DNA분리는 CTAB 방법을 이용하였고, PCR 반응의 최적화를 위해 달리한 반응 조건은 template DNA를 4가지 수준으로, MgCl<sub>2</sub> 농도를 4가지, dNTP 수준을 4가지, DNA polymerase를 4가지, 사용한 primer는 표 1과 같고 primer의 수준은 1가지로 하였다.

DNA 증폭은 Perkin Elmer Thermocycler 2400을 이용하였으면 증폭조건은 초기에 94°C에서 5분 동안 denaturation을 시킨 후 94°C (denaturation time) 30초, 36°C (annealing time) 30초, 62°C (extension time) 1분의 반응에 시간을 주어 총 45cycles를 수행한 후 마지막으로 62°C에서 5분 동안 반응시켰다.

총 반응 용액은 25 $\mu$ l로 하였으며 반응 용액은 원심 분리하여 섞어주었다. 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에 100V 3시간동안 전기영동하여 ethidium bromide(EtBr)로 염색 후 UV transilluminator에서 확인하였다.

### 결과 및 고찰

바나나 RAPD 적용을 위한 PCR 조건의 최적화 실험에서 PCR 반응 용액을 25 $\mu$ l를 기준으로 했을 때 template DNA 농도를 높게 하거나 적게 했을 때 변화가 없었고 MgCl<sub>2</sub> 농도는 3mM인 것으로 나타났다. dNTP농도는 200 $\mu$ M, DNA polymerase (Promega)는 1 units/ $\mu$ l인 것으로 확인되었다(표 2).

이 결과는 primer를 0.2 $\mu$ M, annealing 온도를 36°C에서 30초간 수행한 것으로 primer 농도와 annealing의 온도와 시간을 변화시키면 최적의 조건이 달라질 수 있다. 11개의 random primer를 통해 얻어진 총 밴드 수는 350개로 각 primer에서 증폭된 band 수는 1개에서 15개로 다양하게 나타났다.

Grand nine, Intan, Ambon kuning, Monkey banana, GIA 등의 구분에 유용한 63개의 specific band가 관찰되었다. UPGMA 분석결과 GIA, Grand nine에 Ambon Kuning이 1 군에 속하고 Intan은 이들 군과는 상당히 떨어져 있으며 Monkey bananan은 아주 원연간임을 나타내주고 있다(그림 1, 2).

본 결과로 품종간 구별을 할 수 있는 primer들의 선정이 가능하였고, 이후의 실험에서 specific band의 sequencing을 통해 확실한 품종 특이적 primer를 개발할 것이다.

Tabel 1. The primer codes and sequences tested in this study

No.	Sequence	No.	Sequence
A	5'-ACCGCGAAGG-3'	G	5'-GTGTGCCCA-3'
B	5'-GGACCCAACC-3'	H	5'-CTCTGGAGAC-3'
C	5'-GTCGCCGTCA-3'	I	5'-GGTCTACACC-3'
D	5'-TCTGGTGAGG-3'	J	5'-AGCGCCATTG-3'
E	5'-TGAGCGGACA-3'	K	5'-CACCGTATCC-3'
F	5'-TTGGCACGGG-3'		

Tabel 2. Optimum concentrations and conditions of RAPD protocol for banana

Component	concentrations and conditions	
	Evaluated	Optimum
Template DNA	10, 20, 40, 80ng/ $\mu$ l	10ng/ $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1, 2, 3, 4mM	3mM
dTNP(dATP, dCTP, dGTP AND dTTP)	100, 200, 300, 400 $\mu$ M	200 $\mu$ M
DNA polymerase	0.5, 1, 1.5, 2units/ $\mu$ l	1units/ $\mu$ l

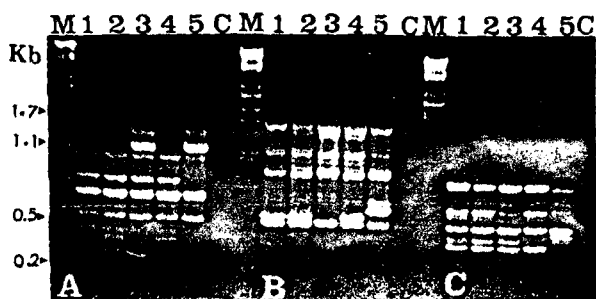


Fig. 1. DNA profiles generated by RAPD of banana.

M : DNA size marker (Lamda DNA+Pst I +HindIII)

C : Control (No genomic DNA). Lane : 1-5 : banana varieties.

1) GIA 2) Grand nine 3) Intan 4) Ambon kuning 5) Monkey banana.

A : Primer was used 5'-TCT GGT GAG G-3'.

B : Primer was used 5'-TGA GCG GAC G-3'.

C : Primer was used 5'-TTG GCA CGG G-3'.

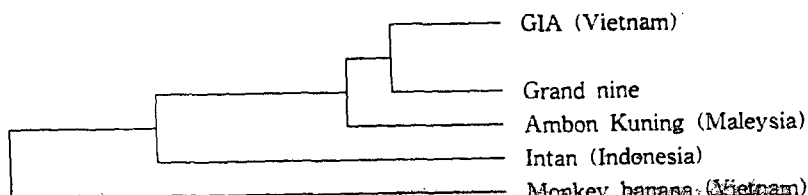


Fig. 2. Dendrogram obtained from the UPGMA cluster analysis based on genetic similarity estimated by using 63 RAPD bands for 5 banana accessions.