

느타리버섯屬의 DNA 多型性分析에 影響을 미치는 PCR 條件

金範基 · 鄭美貞 · 李昌洙 · 李喜徹 · 劉英福 · 柳震彰

農業科學技術院 分子遺傳科

Parameters Affecting Polymerase Chain Reaction in RAPD Analysis of *Pleurotus* spp.

Beom-Gi Kim, Mi-Jeong Jeong, Chang-Soo Lee, Hee-Kyung Lee,
Young-Bok Yoo and Jin-Chang Ryu

Division of Molecular Genetics, National Agricultural Science and
Technology Institute, RDA, 441-707, Republic of Korea

ABSTRACT: This study describes the effects of several components on PCR amplification used for RAPD. We used different concentrations of reaction components to obtain discrete and reproducible PCR products from *Pleurotus cornucopiae*. The optimum concentrations of reaction components were found to be 80 ng of template DNA, 30 pmole of 10-mer primer, 200 μ M dNTP, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5 unit of Taq DNA polymerase (promega) in 50 μ l reaction volume. The optimum annealing temperature was 35°C. These results proved to be valuable for characterization of *Pleurotus* spp.

KEYWORDS: RAPD, PCR, *Pleurotus*, Basidiomycotina

느타리버섯은 현재 국내에서 가장 많이 재배되고 있는 버섯으로 옛부터 한국인의 기호에 알맞는 식용버섯으로 자생종을 널리 이용하여 왔으며 혈액순환을 촉진하고, 요통, 관절염, 수족마비 치료, 불안정한 혈압의 조정, 항암작용도 있는 것으로 알려져 있다(Ahn, 1992).

현재 느타리버섯속은 34~43종이 알려져 있으며 이들 느타리버섯의 분류는 다른 담자균과 마찬가지로 일차적으로 유성세대의 형태적 특징에 근거하여 이뤄져 왔고 만일 무성세대만 조사된 상태라면 그 종들을 분류하기란 매우 어려운 실정이다. 균에 있어서 종을 명확하게 동정하기 어려운 점 중에 하나는 환경에 따른 형태적 특징 즉 색깔, 모양, 크기의 변이성이다. 이들은 생식에 그다지 커다란 영향을 주지 않는 범위에서 변이가 발생하므로 균 분류학자들 사이에서는 이에 대한 견해가 다양하게 제기

되고 있다. 따라서 자실체 특성, 포자색, 포자크기, 교배실험, 생리적 특성 등을 통한 전통적인 방법과 함께 보조적으로 유전적, 생화학적 방법들에 의한 분류방법이 시도되고 있다(Kawamura and Goto, 1980). 특히 DNA에 기초한 분류체계는 환경적 요인을 배제할 수 있는 장점이 있어서 mitochondria DNA의 제한효소처리에 의한 다형성 분석, RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), ribosomal DNA 분석 등 다양한 실험 기술을 사용하여 계통 관계 분석에 이용하고 있다.

RAPD는 Williams(1990) 등이 random primer를 사용하여 PCR 증폭한 DNA 단편을 표지인자로 사용할 수 있다고 보고하면서 시작되어, random primer를 이용한 PCR genomic fingerprinting으로 strain 구분과 유전분석에 사용되고 있다(Deragon and Landry, 1992; Welsh and McClelland, 1990). RAPD 방법은 소량의 DNA만을 필요로 하고 시간과 경제

*Corresponding author

성에 있어서 RFLP에 비해 훨씬 뛰어나므로 대규모 집단의 연구에 특히 적합하다. 그러나 PCR은 종의 genome size, 증폭조건에 따라 변이가 있을 수 있으므로 PCR 조건에 따른 다형성결과의 차이를 없애고 실험의 재현성을 확립하기 위하여 PCR 조건의 검토가 필요하다(Yoon, 1992).

본 실험에서는 느타리 속의 RAPD 조건변화에 따른 다양성 변이를 관찰하고 재현성 있는 최적조건을 확립하여 느타리 속의 종간 RAPD 다양성을 보이는 primer를 선별하고 종간 RAPD 다형성 차이를 관찰하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 농업과학기술원 분자유전과에 보관중인 균주로서 Table 1과 같으며 RAPD 조건실험에는 *Pleurotus cornucopiae* MGL 2011를 사용하였다.

균주의 배양은 버섯완전배지(mushroom complete medium: MCM)를 사용하였으며 조성은 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, KH_2PO_4 0.46, K_2HPO_4 1.0, Peptone 2.0, Yeast extract 2.0, Glucose 20.0(g/l)이다.

Primer

Primer 합성은 Applied Biotechnology 사의 DNA 합성기를 이용하여 사용자 설명서에 따라서 합성하였다. 합성된 primer는 암모니아수로 CPG column 으로부터 DNA를 추출하여 50°C에서 12시간 반응시킨 후 phenol 추출과 ethanol 침전시켜 멸균수에

녹여 사용하였으며 primer의 염기배열은 PR2(GGG GGG AAG C), PR3(GCG GTT GAG G), PR4(CGC ACC GCA C), PR10(CAA TCG CCG T), PR11(CAG CAC CCA C), PR17(TAG GCG TAT CAG GAG GCC CT)로 6종류이다.

느타리버섯에서 genomic DNA 분리

Genomic DNA 분리에 사용한 균주는 MCM 액체배지에 접종 후 30°C에서 정치배양하여 균사체가 완전히 배지표면을 덮을 때까지 배양하였다. DNA 분리방법은 Lee(1988)등의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양한 균사체의 약 0.5 g을 액체질소로 동결시켜 유발로 갈아서 500 μ l의 lysis buffer(50 mM EDTA(pH 8.0), 3% SDS, 50 mM Tris-HCl(pH 7.2), 1% mercaptoethanol)에 녹인 후 65°C에서 1시간 동안 반응 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취해서 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 2회 처리한 후 상층액을 ethanol 침전시켜 genomic DNA를 분리하였다.

PCR 조건 및 전기영동

RAPD 반응용액은 1X Taq polymerase buffer (Promega), 2 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTP, 30 pmole primer, 1.5 unit Taq polymerase(Promega), 80 ng template DNA 농도로 하여 전체 반응용액은 50 μ l가 되게 하였고 조건변이 실험은 각 구성성분만을 변화시켰다. Thermocycler는 Perkin Elmer사의 제품을 사용하였으며 첫 cycle은 94°C 5분간 denaturation하고, 그 후 40 cycles 과정은 94°C 1분간 denaturation, 35°C 1분간 annealing, 72°C 2분 polymeri-

Table 1. List of *Pleurotus* spp. strains used.

Species	Korean name	Source	Origin
<i>P. cornucopiae</i>	노랑느타리	MGL 2024	Japan
<i>P. eryngii</i>	큰느타리	MGL 2152	U.S.A
<i>P. florida</i>	사철느타리	MGL 2029	Germany
<i>P. ostreatus</i>	느타리	MGL 2031	Korea
<i>P. sajor-caju</i>	여름느타리	MGL 2084	India
<i>P. salmoneostramineus</i>	분홍느타리	MGL 2120	Papua New Guinea
<i>P. sapidus</i>	맛느타리	MGL 2159	U.S.A
<i>P. cystidiosus</i>	전복느타리	MGL 2198	Taiwan

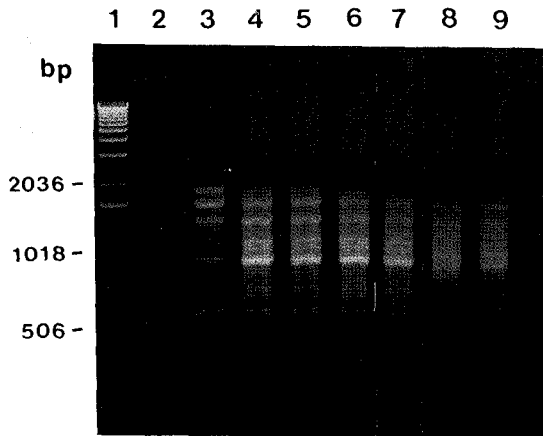


Fig. 1. RAPD patterns at various concentrations of $MgCl_2$.
Lane 1: 1 kb DNA ladder marker, Lane 2, 3: PCR products using 1 mM $MgCl_2$, Lane 4, 5: PCR products using 2 mM $MgCl_2$, Lane 6, 7: PCR products using 3 mM $MgCl_2$, Lane 8, 9: PCR products using 8 mM $MgCl_2$

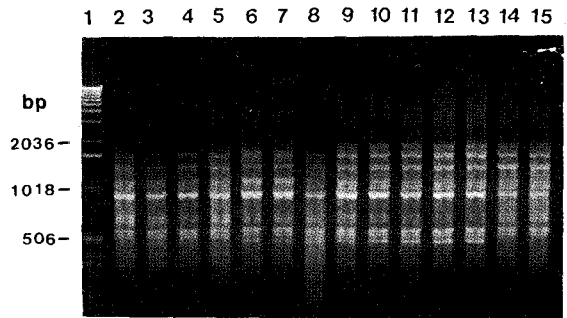


Fig. 2. RAPD patterns at various amounts of template DNA.
Lane 1: 1 kb DNA ladder marker, Lane 2, 3: PCR products using 0.5 ng template DNA, Lane 4, 5: PCR products of using 5 ng template DNA, Lane 6, 7: PCR products using 20 ng template DNA, Lane 8, 9: PCR products using 40 ng of template DNA, Lane 10, 11: PCR products using 100 ng template DNA, Lane 12, 13: PCR products using 200 ng template DNA, Lane 14, 15: PCR products using 1000 ng template DNA

zation 한 후 마지막 cycle은 72°C에서 5분간 증폭하였다. 증폭된 DNA는 1.2% agarose gel에서 TAE buffer를 사용하여 전기영동하였으며 PCR 조건 실험시 각 반복은 같은 PCR 반응에서 tube를 달리 하여 실험하였다.

결과 및 고찰

MgCl₂ 농도가 RAPD에 미치는 영향

Taq polymerase가 enzyme activity를 나타내기 위해서는 Mg^{2+} 를 필요로 하며 일반적으로 1.5 mM이 최적 농도로 알려져 있다. 실험결과 1 mM 농도에서는 밴드수와 증폭양도 적었고 2 mM의 농도에서 최상의 증폭을 보였으며 2 mM 농도 이상으로 증가할 수록 밴드수에는 거의 변화가 없으나 밴드가 선명치 못한 경향임을 알 수 있었다(Fig. 1).

이것은 일반적으로 Mg^{2+} 농도가 낮으면 template와 primer간 stringency를 높이고 Mg^{2+} 농도가 높을수록 stringency를 낮추는 경향을 가진다는 것과 일치하는 결과였다(Innis and Gelfard, 1990).

Template DNA 양이 RAPD에 미치는 영향

Genomic DNA의 양을 0.5 ng에서 1000 ng까지

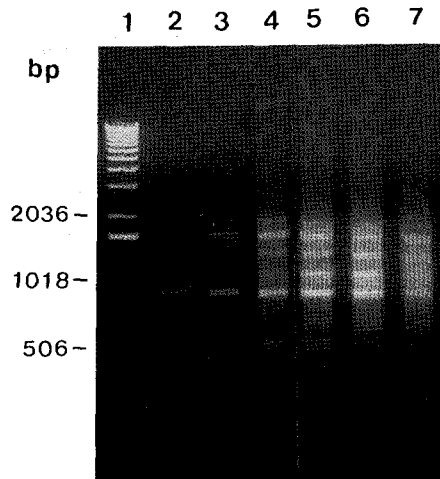


Fig. 3. RAPD patterns at various amounts of Taq DNA polymerase.
Lane 1: 1 kb DNA ladder marker, Lane 2: PCR products using 0.5 unit Taq polymerase, Lane 3: PCR products using 1 unit Taq polymerase, Lane 4: PCR products using 2 units Taq polymerase, Lane 5: PCR products using 3 units Taq polymerase, Lane 6: PCR products using 5 units Taq polymerase, Lane 7: PCR products using 10 units Taq polymerase

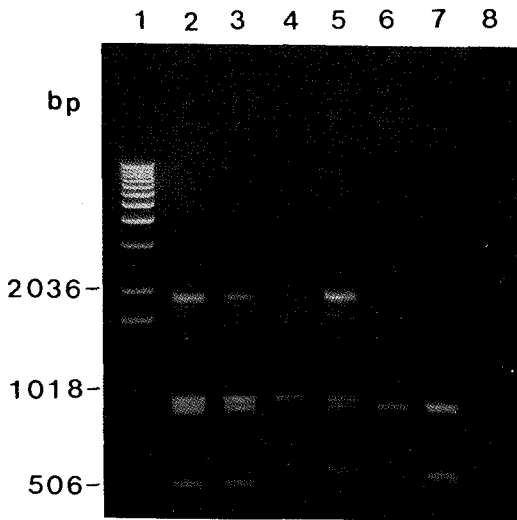


Fig. 4. RAPD patterns at various annealing temperatures.
 Lane 1: 1 kb DNA ladder marker, Lane 2: PCR products at 25°C annealing temperature, Lane 3: PCR products at 30°C annealing temperature, Lane 4: PCR products at 35°C annealing temperature, Lane 5: PCR products at 40°C annealing temperature, Lane 6: PCR products at 45°C annealing temperature, Lane 7: PCR products at 50°C annealing temperature, Lane 8: PCR products at 55°C annealing temperature

변화시켰지만 DNA 다형성에는 큰 변화가 없었다. 이것은 template DNA의 양이 PCR 증폭에 중요한 요인이라는 Yoon과는 다른 실험 결과였으며 실험해본 PCR 조건 중에서는 RAPD 다형성에 가장 영향이 적은 요인이었다(Yoon, 1992, Fig. 2).

Taq polymerase 양이 RAPD에 미치는 영향

Taq polymerase를 0.5에서 10 unit까지 변화시켰다. 0.5 unit에서도 증폭은 되나 1 kb 부근의 major 밴드만이 증폭되었고 Taq polymerase의 농도가 높아짐에 따라 2 kb와 0.5 kb 부근의 밴드들도 증폭이 되었다. 그러나 2 unit 이상의 농도에서는 더 많은 증폭은 없고 밴드의 선명성이 떨어지는 경향을 보였다(Fig. 4). Thermostable DNA polymerase는 제조회사에 따라서 제조방법과 균주가 다르므로 특성에 서로 차이가 있을 수 있다(Innis and Gelfard, 1990).

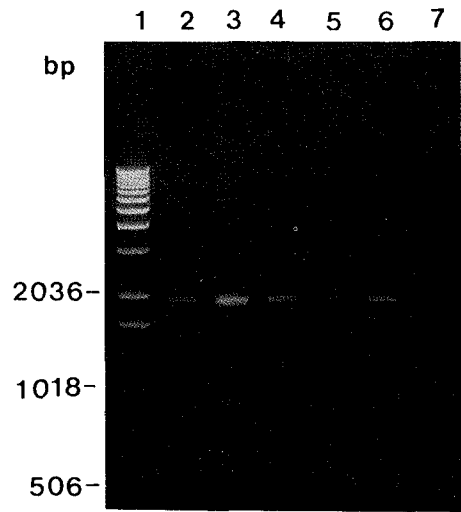


Fig. 5. RAPD patterns at various amounts of primer PR3.
 Lane 1: 1 kb ladder marker, Lane 2: PCR products using 15 pmole primer PR3, Lane 3: PCR products using 30 pmole primer PR3, Lane 4: PCR products using 60 pmole primer PR3, Lane 5: PCR products using 90 pmole primer PR3, Lane 6: PCR products using 120 pmole primer PR3, Lane 7: PCR products using 150 pmole primer PR3

Annealing 온도가 RAPD에 미치는 영향

일반적인 PCR 조건에서는 annealing 온도를 T_m 값에 따라서 결정하지만 RAPD의 경우 T_m 값 예측이 불가능하고 일반적으로 10-mer 정도의 작은 primer로서 비상동적인 결합에 의한 증폭도 관계없으므로 35~40°C 사이의 낮은 annealing 온도를 사용한다. 실험결과 55°C 이상에서는 밴드가 검출되지 않는 것으로 보아 primer와 template간에 mismatch에 의해서 RAPD polymorphism이 나타난다는 Williams 등의 주장을 뒷받침할 수 있다(Williams et al., 1990). 또한 온도가 높아질수록 큰 size의 밴드들부터 사라지기 시작하여 45°C 이상에서는 1 kb와 500 bp의 밴드만이 증폭됨을 알 수 있었다.

Primer 양이 RAPD에 미치는 영향

표준적인 반응조건 하에서 primer의 농도만 15 pmole에서 150 pmole까지 변화시켰다. primer의 양이 높아질수록 500 bp의 band가 뚜렷해지는 경향을 보였다(Fig. 5). primer의 양이 60 pmole 이상

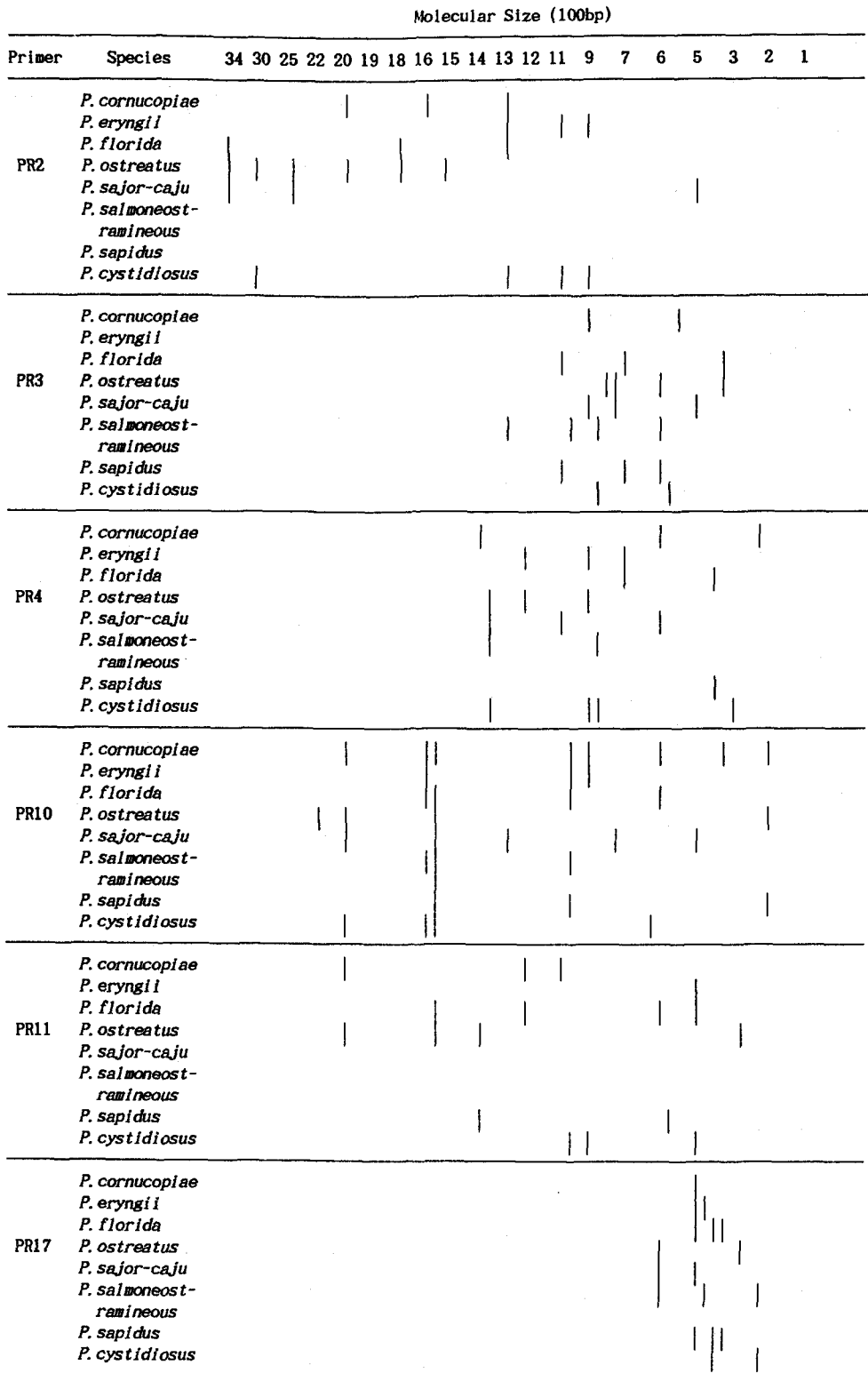


Fig. 6. RAPD patterns in interspecies of *Pleurotus* species.

에서는 500 bp 부근의 band들이 증폭이 되었으나 그 이하의 양에서는 증폭이 되지 않거나 희미하게 증폭되었다. 이상의 조건변화 실험을 보았을 때 MgCl₂나 Taq polymerase buffer의 경우 최적반응 조건이 이미 나와 있으므로 제품 설명서에 따르면 primer 양, annealing 온도, template DNA 양은 실험자가 결정하여야 하는데 이중에서도 primer 양과 annealing 온도는 RAPD에 큰 영향을 끼칠 수 있으므로 주밴드와 미소밴드의 취사선택이 중요한 유연관계 분석등의 실험에서는 동일한 조건에서 반복실험을 하여야 실험오차를 줄일 수 있을 것이다.

Primer에 따른 느타리 속 종간 RAPD 양상

6개의 primer를 사용하여 8개의 균주간 RAPD 밴드 다양성을 관찰하였는데 이들 primer들은 느타리버섯속내의 종간에 차이를 나타내며 이들을 이용하여 strain 구분과 종 구분에 사용할 수 있는 가능성을 보여주고 있다(Fig. 6).

Primer 2, 10은 DNA 크기가 크고 많은 종류의 밴드를 형성하였으나 primer 17은 이와는 반대현상을 나타내었는데 이들 모두 유용한 유전자 표지가 될 수 있을 것으로 사료된다.

또한 Chiu 등(1993)은 PCR 증폭산물이 안 생긴 경우에도 증폭용액을 다시 증폭함으로써 DNA 밴드가 생길 수 있음을 보고하고 있고 Williams 등(1990)은 이들 RAPD 밴드들을 gel에서 elution 하여 RFLP 분석에 marker로 이용할 수 있으며 이들 RAPD와 RFLP marker는 유전분석에 서로 보완적으로 사용되고 있다(Martin *et al.*, 1991; Michelmore *et al.*, 1991; Paran *et al.*, 1991).

적 요

본 실험결과 느타리버섯속에서의 재현성 있는 최적 RAPD 조건은 50 µl 반응액에서 80 ng template DNA, 30 pmole primer, 200 µM dNTP, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 0.1% Triton X-100, 1.5 unit Taq polymerase(promega)였다. 여섯 개의 primer가 *Pleurotus*속 8종의 균주에서 RAPD polymorphism을 보임을 알 수 있었으며, 이들의 염기배열은 PR2(GGG GGG AAG C), PR3(GCG GTT GAG G), PR4(CGC ACC GCA C),

PR10(CAA TCG CCG T), PR11(CAG CAC CCA C), PR17(TAG GCG TAT CAG GAG GCC CT)이었다.

參考文獻

- Ahn, D.K. 1992. Medicinal fungi in Korea. *Korean J. Mycology* **20**: 154-16.
- Chiu, C.W., Kwan, H.S. and Cheng, S.C. 1993. Application of arbitrarily-primed polymerase chain reaction in molecular studies of mushroom species with emphasis on *Lentinus edodes*. In *Genetic and breeding of edible mushrooms* pp. 265-284. Ed. S.T. Chang, J.A. Buswell and P.G. Miles. USA: Gordon and Breach Science Publishers.
- Deragon, J.M. and Landry, B.S. 1992. RAPD and other PCR-based analyses of plant genomes using DNA extracted from small leaf disks. *PCR Methods and Applications* **1**: 175-180.
- Innis, M.A. and Gelfard, D.H. 1990. Optimization of PCR. In *PCR protocols, A Guide to Methods and Applications* pp. 3-12. Ed. Innis, M.A. and D.H. Gelfard. Academic Press, INC.
- Kawamura, N. and Goto, M. 1980. Biochemical characteristics of the isolates of Shiitake mushroom. *Reports of the Tottori Mycological Institute* **18**: 217-224.
- Lee, S.B., Milgroom, M.G. and Taylor, J.W. 1988. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genetic Newsletter* **35**: 23-24.
- Martin, G.B., Williams, J.G.K. and Tansley, 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**: 2326-2340.
- Michelmore, R.W. and Kesseli, R.V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9828-9832.
- Paran, I., Kesseli, R. and Michelmore, R. 1991. Identification of RFLP and RAPD markers linked to mildew resistance genes in lettuce using near-isogenic lines. *Genome* **34**: 1021-1027.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* **19**: 303-306.
- Williams, J.G.K., Kubeik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms ampli-

fied by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.
Yoon, C.S. 1992. Examination of parameters affecting

polymerase chain reaction in studying RAPD. *Korean J. Mycol.* **20**(4): 312-323.