

뽕나무(*Morus alba* L.)의 RAPD 분석조건 최적화에 관한 연구

정대수 · 양보경 · 김나영 · 정순재 · 남재성 · 이영병 · 이재현 · 김경태 · 김도훈*

동아대학교 생명자원과학부

Received October 10, 2003 / Accepted December 20, 2003

Optimization of RAPD-PCR Conditions for *Morus alba* L. Dae-Soo Chung, Bo-Kyung Yang, Na-Young Kim, Soon-Jae Jeong, Jaesung Nam, Young-Byung Yi, Jai-Heon Lee, Gyung-Tae Kim and Doh-Hoon Kim*. *College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea* – The optimized RAPD-PCR conditions, that can be utilized as a basic information for analysis of the genetic characteristics were developed for genetic analysis of four mulberry varieties, named Milsung, Chungil, Suil, and Hansung using a primer, OPY15 (5'-AGTCGCCCTT-3') from Operon company. We tested several different factors for best PCR condition including concentrations of DNA, primer, MgCl₂, annealing temperature, number of PCR cycle, and presence/absence of pre-heating time at the beginning of PCR reaction in the 25 µl volume. The best RAPD profiles were obtained using 50 ng of DNA, 1 µM of primer, 1.5 mM of MgCl₂, 45°C of annealing temperature and an absence of pre-heating time. An establishment of the stable and reproducible RAPD-PCR conditions are expected to be useful for the subsequent RAPD-related investigation, such as genetic characterization of the mulberry varieties, re-establishment of phylogenetic relationships and development of new varieties.

Key words – RAPD, PCR, mulberry.

작물의 품종간 분류, 판별은 주로 형태적 형질 및 생리적 특성에 근거를 두어 왔으나 최근 분자 생물학적인 기법의 발달로 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Short Tandem Repeat (STR) 등의 방법이 다양한 종에 이용되고 있다[1,3,16].

RAPD법은 여러 개의 primer를 사용함으로써 DNA polymorphism을 보기가 용이하고 실험조작이 간편하다. 소량의 DNA만으로도 실험이 가능하고 빠른 시간 내에 대규모 집단 screening에 효과적인 방법으로써 유전적 변이의 감별, 유전자 지도의 작성, 모본의 확인 등 그 이용성이 다양하다[7,10,14]. 그러나 RAPD법은 재현성 부족 등의 한계점이 존재하므로 안정적인 PCR 조건의 확립이 우선되어야 한다. RAPD 분석에 크게 영향을 미치는 요인으로는 primer의 농도, template DNA의 농도, Taq polymerase의 농도, 마그네슘의 농도, annealing 온도, cycle 수 등이 있고, cold fusion 효과를 방지함으로써 RAPD 증폭양상을 개선할 수 있는 것으로 알려져 있다[2,13].

최근 우리나라를 비롯하여 일본과 중국에서 뽕잎에 대한 성분분석 결과 50여종의 각종 미네랄과 21종의 아미노산, 59종의 유기성분이 함유되어 있어 성인병의 예방과, 치료를 위해 매우 좋은 기능성 식품 재료임이 밝혀졌다. 이러한 기능성 물질의 품종 간 차이와 유전적 유연관계의 연구를 위해서는 RAPD 분석법이 효과적으로 이용될 수 있다.

따라서 본 연구는 뽕나무의 최적 RAPD 분석조건의 확립을 위해 template DNA 농도, primer 농도, 마그네슘 농도, PCR cycle 수, annealing 온도, pre-heating time의 유무 등의 변수하에서 적정조건의 규명을 위해 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에 사용된 뽕 품종은 '밀성뽕', '청일뽕', '수일뽕', '한성뽕' 등 4품종의 잎을 채취하였다.

Total DNA 추출 및 정제

DNA의 추출을 위해 뽕잎 0.2 g을 액체질소로 급냉시킨 후 유탕에 넣어 마쇄하였고, DNA extraction buffer (100 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM mercaptoethanol) 10 ml과 20% SDS 700 µl를 넣어 혼합한 다음, 65°C에서 10분간 방치하였다. 여기에 5 M potassium acetate 4 ml를 넣고, 0°C에 20분간 둔 다음 원심분리(10,000 rpm, 20분, 4°C)한 후 상등액을 취하였다. 이 상등액에 isopropanol 10 ml를 넣고 -20°C에 30분간 방치한 후 원심분리(10,000 rpm, 10분, 4°C)하여 상등액을 취하고, 50 mM Tris와 10 mM EDTA를 0.7 ml 넣고 10분간 원심분리하였다. 상등액에 3 M sodium acetate 75 µl와 isopropanol 500 µl를 넣고, 다시 원심분리(13,000 rpm, 10분, 4°C)하여 DNA를 회수하고 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨 후 멸균수(30~50 µl)에 녹였다. 추출된 DNA는 0.7% agarose gel에서 약 25분간 전기영동하여, genomic DNA를 관찰하였으며, 아올리 260 nm와

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7507, Fax : +82-051-200-6536

E-mail : dhkim@mail.donga.ac.kr

280 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 확인하였다.

PCR 반응조건

본 실험에서 사용한 여러 가지 PCR 변수는 Table 1에 나타내었다. Template DNA를 10~80 ng 범위에서 농도별로 각각 PCR한 후 agarose gel 상에서 전기영동하여 DNA 밴드 양상을 비교하였다. Random primer는 Operon Technology사 (U.S.A.)의 100개의 primer를 시험한 결과 가장 재현성이 좋은 OPY15(5'-AGTCGCCCTT-3')를 사용하였다. Random primer의 농도는 Primer 1, 5, 10 µM로 달리하였고, MgCl₂ 농도는 0, 1, 1.5, 2, 3 mM 등의 5가지 농도에서 PCR을 수행하였다. PCR의 횟수는 각각 30, 45, 50회로 달리 하였으며, Annealing temperature를 47, 45, 42 및 38℃로 달리하여 PCR을 수행하였고, Pre-heating time (94℃, 7분)의 조건 유무에 따라 각각 반응시킨 후 agarose gel상에서 전기영동하여 DNA 밴드 양상을 비교하였다.

PCR 반응용액 조성

PCR의 반응용액은 template DNA 50 ng, 10×buffer, dNTP 2.5 mM, Taq polymerase (TaKaRa사) 0.6 unit, primer 5 µM를 사용, 멸균수로 최종 25 µl로 반응용액을 만들어 사용함을 기준으로 하였다.

PCR 및 전기영동 조건

Thermal cycler의 program은 pre-heating time 없이 94℃에서 30초, 45℃에서 30초, 72℃에서 2분간, 45 cycle로 실시하였으며, 마지막으로 72℃에서 7분간 extension시켰다. PCR반응이 끝난 후에는 Etidium Bromide를 첨가한 1.4% agarose gel 상에서 50V로 130분간 전기영동한후 UV램프 아래에서 DNA 증폭양상을 관찰하였다. 전기영동 buffer로는 1×TAEuffer를 이용하였다.

결과 및 고찰

Template DNA 농도

RAPD 분석에 있어 DNA의 농도는 분석의 재현성과 정확

Table 1. The tested and optimum range of RAPD-PCR conditions in *Morus alba* L.

Designation	Unit	Condition	
		Tested	Optima
DNA	ng	10, 30, 50, 60, 80	50
Primer	µM	1, 5, 10	1
MgCl ₂	mM	0, 1.0, 1.5, 2, 3	1.5
PCR횟수	no.	30, 45, 55	45
Annealing temperature	℃	38, 42, 45, 47	45
Pre-heating time (94℃ 7min)		presence/absence	absence

성을 위하여 중요한 요인이다[16]. 여러 가지 template DNA의 농도 하에서 PCR을 실시한 결과는 Fig. 1과 같다. Primer OPY15의 경우, DNA농도가 10, 30, 50, 60 및 80 ng등 모든 농도에서 전체적으로 양호한 밴드 양상을 보였으나, 비교적 50 ng에서 다양성을 나타내었다.

이러한 현상은 포도에 있어서 template DNA 양이 25 ng부터 125 ng까지 변하여도 RAPD 표지의 증폭 양상에는 미미한 차이만 있었던 결과와 비슷하며[4], Koller 등[5]의 사과 의 RAPD에 대한 보고처럼 template DNA 양이 55 ng이 되어도 밴드양상은 달라지지 않는다는 내용과 비슷하였다. 그러나 Nam 등[8]은 고추에서는 DNA 농도가 40 ~10 ng으로 낮아짐에 따라 밴드의 smear한 현상이 줄어든다고 보고한 바 있어 DNA 농도가 높아질 수록 밴드의 양상이 양호하게 나타난 본 실험과 상반된 결과를 나타내었다. 이처럼 template DNA의 최적농도가 다른 것은 작물의 종류와 사용한 primer의 종류 등이 다르기 때문이라고 추측된다. 결론적으로, 뽕잎의 RAPD 분석에 있어 template DNA 농도는 30~50 ng template DNA 농도가 최적조건인 것으로 분석되었다.

Primer의 농도

Template DNA를 상기 적정농도로 고정한 후 primer OPY13과 OPY15의 농도를 1, 5, 10 µM로 처리하여 RAPD를 수행한 결과는 Fig. 2와 같다. Primer 농도의 경우, 5 µM 처리구에서는 밴드가 전체적으로 희미하게 나타났으며, 1 µM의 처리구에서는 4품종 모두 다양성있게 밴드가 나타났다. 10 µM의 처리구에서는 밴드의 양상이 비교적 진하고 뚜렷하게 나타났으며, 5 µM 처리구에 비해 짧은 밴드가 뚜렷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

Yae 등[13]은 primer농도가 0.1 µM에서 1.3 µM로 높아질 수록 작은 크기의 DNA가 뚜렷하게 나타나고 반대로 낮아질 수록 크기가 큰 DNA가 더 뚜렷하게 나타났다고 보고하였는데, 본 연구에서 얻은 결과와 일치하였으며, Kim 등[4]이 무에서 primer의 최적농도가 15 µM이라는 결과와는 상반되는 결과이다. 결론적으로, primer 농도에 따른 PCR 증폭양상 실

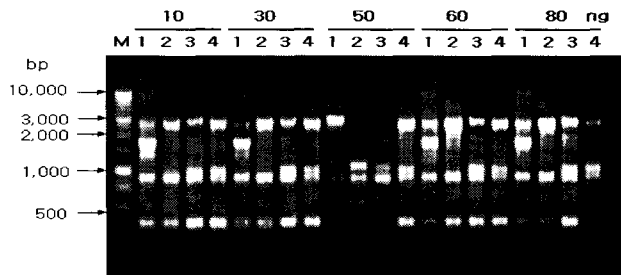


Fig. 1. Test of DNA concentration with four varieties of mulberry. The primer used for this test was OPY15 purchased from Operon. M, DNA size marker; 1, Milsung; 2, Chungil; 3, Suil; and 4, Hansung.

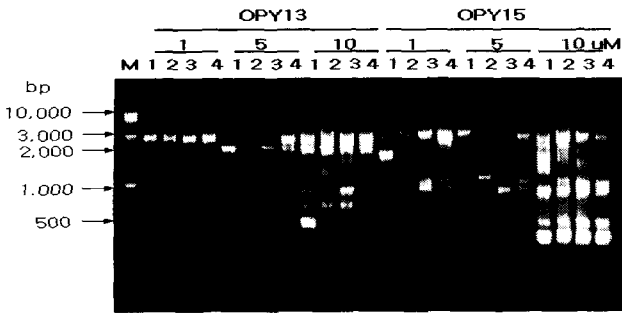


Fig. 2. Test of primer concentration with four varieties of mulberry. The primer used for this test were OPY13 and OPY15. M, DNA size marker; 1, Milsung; 2, Chungil; 3, Suil; and 4, Hansung.

험결과, 1 μM이 가장 적절한 것으로 판명되었다.

MgCl₂ 농도

상기 선정된 조건하에서 PCR 반응용액 내의 MgCl₂를 0~3 mM까지 농도별로 달리 첨가하여 PCR을 시행한 결과는 Fig. 3과 같다. Primer OPY15의 경우, MgCl₂ 농도가 0 mM, 1 mM의 경우에는 밴드가 나타나지 않았다. 그러나 농도가 1.5 mM일 때, 4품종 모두에서 밴드가 나타나 가장 적절한 농도임을 확인할 수 있었다. 반면, 2-3 mM의 고농도 MgCl₂ 처리구에서는 희미하게 밴드가 나왔으나 재현성이 부족하였다.

이러한 결과는 Park 등[9]이 고구마의 RAPD-PCR에서 MgCl₂의 최적화 조건이 1.5 mM 농도라는 결과[9]와는 일치하고, Yang 등[4]의 고추의 RAPD에서 MgCl₂의 적정농도가 3 mM이라는 결과와는 상반되는 결과이다. 결론적으로, 뽕나무에 있어서 MgCl₂의 적정농도는 1.5 mM 정도로 분석되었다.

PCR cycle 수

Template DNA, primer 및 MgCl₂의 적정농도를 결정한 후, 전체 PCR cycle수를 30, 45 및 55회의 3수준으로 달리 실시한 결과는 Fig. 4와 같다. Primer OPY15의 경우, PCR cycle 수를 30회로 하였을 때는 큰 크기의 밴드는 증폭하였으나 작은 크기의 밴드는 비교적 희미하게 증폭되어 다양성을 나타

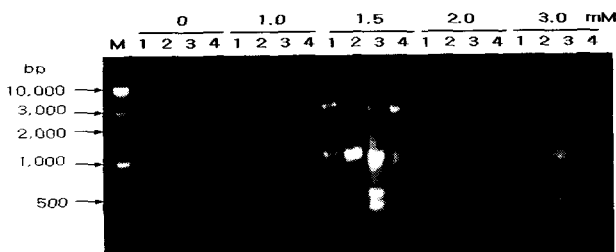


Fig. 3. Test of MgCl₂ concentration with four varieties of mulberry. The primer used for this test was OPY15. M, DNA size marker; 1, Milsung; 2, Chungil; 3, Suil; and 4, Hansung.

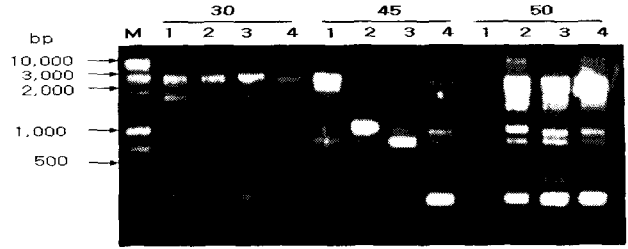


Fig. 4. Test of the effect of PCR cycles with four varieties of mulberry. The test was performed using primer OPY15. M, DNA size marker; 1, Milsung; 2, Chungil; 3, Suil; and 4, Hansung.

내지는 못하였다. 45 및 55회로 하였을 때는 4품종 모두에서 양호한 증폭양상을 나타냈다. 그리고 45회일 때 보다 55회일 때 더 많은 밴드를 얻을 수 있었으나 주요 밴드들의 선명도가 낮았고, 불특정한 산물이 생성되는 경향을 보여 뽕잎의 RAPD 분석의 경우 45회의 PCR cycle수가 적당한 것으로 분석되었다. 이러한 결과는 고추에 대한 RAPD-PCR 최적화 조건과 일치하는 결과이다[16].

Annealing temperature

Template DNA 50 ng, random primer 5 μM, MgCl₂ 1.5 mM, 그리고 PCR cycle수 45회의 적정조건을 결정한 후 38, 42, 45, 및 47°C의 annealing temperature에 대한 검정을 실시한 결과는 Fig. 5와 같다. Primer OPY15의 경우, 38°C와 47°C에서는 주 밴드의 선명도가 낮게 나타났으며, 42°C의 경우, 가장 많은 수의 밴드가 증폭되었으나 불특정 밴드들이 많이 나타나 최적조건은 아닌 것으로 판명되었다. 그러나 annealing temperature가 45°C인 경우, 4품종 모두에서 밴드가 나타났으며 특히 주요 밴드들의 선명도가 높은 경향을 보였다.

이러한 경향은 고추에서도 annealing temperature를 42°C까지 높일 경우 불특정 밴드의 수가 감소하고 주요 밴드들의 선명도가 높아진다는 보고[8, 15]와 일치하는 결과이고, 고구마에서 annealing temperature를 37°C로 하였을 때 최적화 조건을 나타내었다는 결과[9]와는 상이한 결과이다. 결론적

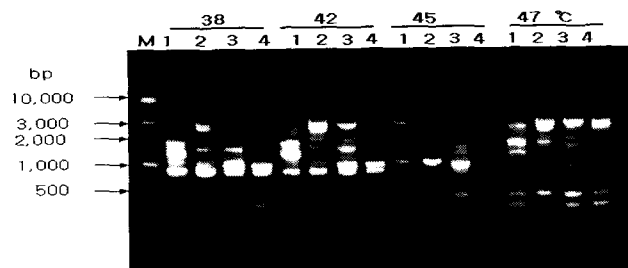


Fig. 5. Test of the effect of annealing temperature with four varieties of mulberry. The test was performed using primer OPY15. M, DNA size marker; 1, Milsung; 2, Chungil; 3, Suil; and 4, Hansung.

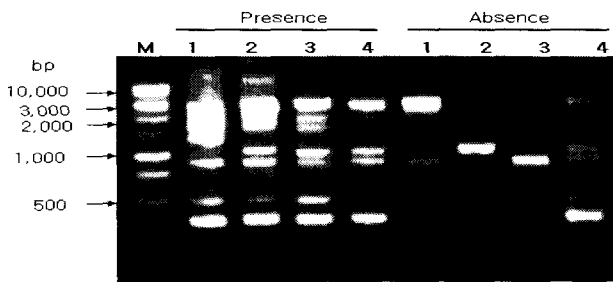


Fig. 6. Test of the effect of pre-heating time(94°C, 7min) with four varieties of mulberry. The test was performed using primer OPY15. M, DNA size marker; 1, Milsung; 2, Chungil; 3, Suil; and 4, Hansung.

으로, 뽕나무의 RAPD 분석에 있어 annealing temperature는 45°C가 적정조건으로 분석되었다.

Pre-heating time의 유무

상기 선정된 조건하에서, pre-heating time (94°C, 7분)의 유무를 비교한 결과는 Fig. 6과 같다. Primer OPY15에서는 pre-heating time의 유무에 관계없이 모든 품종에서 많은 밴드가 관찰되었다. 그러나 pre-heating time이 있는 경우가 pre-heating time이 없는 경우보다 많은 수의 밴드가 증폭되었으나 smear한 밴드들이 많이 나타났으며 일반적으로 pre-heating에 의한 denaturation과정은 PCR에 있어서 중요한 과정이며, *Allium fistulosum* [11]이나, 여러 가지 *Allium*속[6,12]에 속한 식물을 대상으로 한 RAPD 실험에서 pre-heating time의 실시가 보다 나은 RAPD-PCR결과를 나타낸다고 알려져 있다. 그러나 이러한 일반적인 견해와 달리 pre-heating time의 존재가 오히려 polymerase와 template DNA간의 비특이적인 작용시간을 불필요할 정도로 길게 제공하여 결론적으로 비특이적인 밴드의 증폭을 초래한다는 보고가 있는데[2], 본 실험결과 역시 pre-heating time이 없는 조건이 smear한 밴드의 제거에 도움을 준 것으로 여겨진다.

본 실험은 '밀성뽕'과 '청일뽕', '수일뽕', '한성뽕' 등 뽕나무의 4품종을 이용하여 template DNA농도, primer농도, MgCl₂ 농도, PCR 횟수, annealing temperature 및 pre-heating time 유무 등 RAPD 분석의 여러 가지 요인에 대한 최적 조건을 분석하였다(Table 1). 이러한 실험의 결과는 뽕나무의 유연관계 분석이나 DNA 표식인자의 개발을 위한 RAPD 분석시 유용한 기초 자료가 될 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 뽕나무 품종간의 유전적 특성 분석을 위한 기초 자료로서 최적의 RAPD-PCR 조건을 확립하기 위하여 수행하였다. 본 연구를 위해 '밀성뽕', '청일뽕', '수일뽕' 그리고 '한성뽕' 등의 4품종을 이용하여 Operon사의 OPY15 (5'-AG-

TCGCCCTT-3') primer를 사용, 여러 가지 PCR 조건하에서 실험하였다. DNA 농도, primer농도, MgCl₂ 농도, PCR 횟수, annealing temperature, pre-heating time의 조작유무 등 여러 가지 요인들을 대상으로 시험을 수행한 결과, 25 μ 반응용액을 기준으로 50 ng의 template DNA, 1 μM의 random primer, 1.5 mM의 MgCl₂, 45회의 PCR cycle, 45°C의 annealing temperature 그리고 pre-heating time이 없는 조건이 최적으로 나타났다. 이러한 RAPD-PCR법의 안정적인 조건의 확립은 후차적인 뽕나무 품종간의 유전적 특성의 규명, 계통간의 관련, 신품종 육성 등을 위한 중요한 기초 자료로 활용될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 1999년 동아대학교 학술연구 조성비의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Baek, I. Y., Y. H. Yoon, D. C. Shin, G. H. Park, Y. H. Hwang and D. U. Kim. 1997. Analysis of genetic Relationships among *Glycine* species using RAPDs. *Korean J. Breed.* **29(3)**, 308-317.
- Bielawski, J. P., K. Noack and D. E. Pumo. 1995. Reproducible amplification of RAPD markers from Vertebrate DNA. *BioTechnique.* **18(5)**, 856-860.
- Heo, N. K., D. H. Park, K. M. Shim, S. Y. Lee, K. S. Kim and N. S. Kim. 1995. Protein and Lipid contents of Kangwon local soybean and their RAPDs. *Korean J. Breed.* **27(3)**, 215-220.
- Kim, H. J, and Choi, G. W. 1994. Optimization of PCR conditions for RAPD analysis in Radish. *Kor. J. Hort. Sic. & Tech.* **12(2)**, 116-117.
- Koller, B. A., J. M. Lehmann and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **85**, 901-904.
- Kwon, Y. C., W. Y. Han, B. J. Kim, C. S. Jung and Y. H. Kwak. 1998. RAPD analysis in Korean native and introduced Chinese Chives (*Allium* spp.). *Korean J. Breed.* **30(3)**, 298-304.
- Mukai Y, Y Suyama, Y Tsumura, T Kawahara, H Yoshimaru, T Kondo, N Tomaru, S. H. Nam, G. W. Choi and I. Y. Yoo. 1998. Classification of *Capsicum annuum* germplasm using random amplified polymorphic DNA. *Kor. J. Hort. Sci. & Tech.* **16**, 503-507.
- Nam, S. H., G. W. Choi and I. W. Yoo. 1998. Classification of *Capsicum annuum* germplasm using random amplified polymorphic DNA. *Kor. Hort. Abst.* **16(4)**, 503-507.
- Park, K. W, Gung, P. L. and Mok P. 1996. Using RAPD for identification and classification of Sweet Potato. *Kor. J. Hort. Sic. & Tech.* **14(1)**, 110-111.
- Roy A., Frascaria, J. Mackay and J. Bousquet. 1992. Segre-

- gation random amplified polymorphics (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*, *Theor. Appl. Genet.* **85**:173-180.
11. Seo, B. B., G. S. Do and S. H. Lee. 1999. Identification of a tandemly repeated DNA sequence using combined RAPD and FISH in Welsh Onion (*Allium Fistulosum*). *Korean J. Biol. Sci.* **3**, 69-72.
 12. Wilkie, S. E., P. G. Isaac and R. J. Slater. 1999. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. genet.* **86**, 497-504.
 13. Yae, B. W., H. Y. Park, Y. U. Shin, D. K. Lee, J. H. Kim and K. C. Ko. 1998. Factor influencing RAPD band patterns in *Malus domestica*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **36(5)**, 649-654.
 14. Yang B. K., D. H. Kim, I Kim, Y. B. Yi, J. K. Suh, J Nam and S. J. Jeong 2001. Analysis of genetic diversity of onion germplasm using RAPD. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **42**, 5333-539.
 15. Yang T. J. and Park H. G. 1995. Genome mapping of hot pepper using Random Amplified Polymorphic DNAs. *Kor. J. Hort. Sic. & Tech.* **13(2)**, 378-379.
 16. Yang, T. J. and H. G. Park. 1998. Optimization of the random amplified polymorphic DNA analyses procedure in *Capsicum annuum* L. *Korean J. Breed.* **30(2)**, 204-211.