

양파(*Allium cepa* L.)의 RAPD 분석조건 최적화에 관한 연구

정순재 · 양보경 · 김익수 · 박선희 · 서전규¹ · 남재성 · 김현경 · 김도훈*

동아대학교 생명자원과학부
¹경상남도 농업기술원 양파시험장

Optimization of RAPD-PCR Conditions for Onions, *Allium cepa* L.

Soon-Jae Jeong, Bo-Kyung Yang, Iksoo Kim, Sun-Hee Park, Jun-Kyu Suh¹,
Jae-Sung Nam, Hyeon-Kyeong Kim and Doh-Hoon Kim*

College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea and
¹Onion Experiment Station, Kyungnam A. R. E. S., Changryung, Kyungsangnamdo 635-820, Korea

Abstract

The optimized RAPD-PCR conditions, which can be utilized as a basic information for the analysis of the genetic characteristics were investigated with four onion varieties, named Changryungdaego, Yeoeuijuhwan, Yakwangju, and Dabonghwang using Operon primers, OPR01 (TGCGGGTCCT) and OPZ20 (ACTTTGGCGG). We tested several concentrations of DNA, primer, and MgCl₂, annealing temperature, number of PCR cycle, and presence/absence of pre-heating time at the beginning of PCR reaction in the 25 μ l volume. The best RAPD profiles were obtained using 50ng of DNA, 5mM of primer, 1.5mM of MgCl₂, 45 $^{\circ}$ 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 onion strains, re-establishment of phylogenetic relationships and development of new varieties.

Key words – RAPD, PCR, *Allium cepa*, onion

서 론

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), Ampli-

fied Fragment Length Polymorphism (AFLP), Short Tandem Repeat (STR) 등의 방법이 다양한 종에 이용되고 있다[1,3,18].

RAPD법은 여러 개의 primer를 사용함으로써 DNA polymorphism을 보기가 용이하고 실험조작이 간편하여 소량의 DNA만으로도 실험이 가능하고 빠른 시간 내에 대규모 집단 screening에 효과적인 방법으로 유전적 변이의 감별, 유전자 지도의 작성, 모본의 확인 등 그 이용성이 다양하다. *Allium*속 중 부추나 마늘은 수집종 및 도입종을 대상

*To whom all correspondence should be addressed
Tel: 051-200-7507, Fax: 051-206-4475
E-mail: dhkim@mail.donga.ac.kr

으로 RAPD법을 이용한 유연관계의 분석이 많이 이루어지고 있으나 양파를 대상으로 한 연구는 거의 없다. 그러나 RAPD법은 재현성 부족 등의 한계점이 존재하므로 안정적인 PCR 조건의 확립이 우선적이라 할 수 있다. 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[2,17].

따라서 본 연구는 양파의 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 양파 품종은 '창녕대고', '여의주황', '야광주', '다봉황' 등 4품종이며, 경상남도 농업기술원 양파 시험장에서 어린잎을 채취하여 사용하였다.

Total DNA 추출 및 정제

DNA의 추출을 위해 양파 잎 0.2g을 액체질소로 급냉시킨 후 유발에 넣어 마쇄하였고, DNA extraction buffer 10 ml과 20% SDS 700 μ l를 넣어 혼합한 다음, 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하였다. 여기에 5M potassium acetate 4ml를 넣고, 0 $^{\circ}$ C에 20분간 둔 다음 원심분리(10,000 rpm, 20분, 4 $^{\circ}$ C)한 후 상등액을 취하였다. 이 상등액에 isopropanol 10ml를 넣고 -20 $^{\circ}$ C에 30분간 방치한 후 원심분리(10,000 rpm, 10분,

4 $^{\circ}$ C)하여 상등액을 취하고, 50mM Tris와 10mM EDTA를 0.7ml 넣고 10분간 원심분리하였다. 상등액에 3M sodium acetate 75 μ l와 isopropanol 500 μ l를 넣고, 다시 원심분리(13,000 rpm, 10분, 4 $^{\circ}$ C)하여 DNA를 회수하고 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨 후 멸균수(30 μ l-50 μ l)에 녹였다. 추출된 DNA는 0.7% agarose gel에서 약 25분간 전기영동하여, genomic DNA를 관찰하였으며, 아울러 260nm와 280nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 확인하였다.

PCR 변수

본 실험에서 사용한 여러 가지 PCR 변수는 Table 1에 나타내었다. Template DNA 농도를 10, 30, 50, 60, 80ng으로 달리한 상태에서의 PCR 밴드양상을 비교하였으며, 이 때 primer는 Operon Technology사의 OPR01(TGCGGGTCCT)을 사용하였다. Primer 농도의 최적화 조건을 규명하기 위하여 primer OPR01(TGCGGGTCCT)과 OPZ20 (ACTTTG-GCGG)의 농도를 1, 5, 10 μ M로 달리한 상태에서의 PCR 밴드양상을 비교하였다. MgCl₂의 농도에 따른 PCR 밴드양상을 비교하기 위하여 0, 1.5, 2, 3mM등을 사용하였으며, 이 때 OPR01 primer를 사용하였다. PCR 횟수에 따른 PCR 밴드양상을 비교하기 위하여 각 30, 45, 55회로 달리한 상태에서의 반응을 비교하였으며 이 때, OPR01 primer를 사용하였다. Annealing temperature를 47, 45, 42 및 38 $^{\circ}$ C로 달리한 상태에서의 PCR 밴드양상을 비교하였으며 primer는 OPR01을 사용하였다. Pre-heating time(94 $^{\circ}$ C, 7분)의 유무하에서의 PCR 밴드양상을 비교하였으며, primer는 OPR01을 사용하였다. PCR 반응은 Takara사의 10 \times buffer와 dNTP, *Taq* polymerase를 이용하였다. 이 때 template DNA는 50ng, dNTP는 2.5mM, *Taq* polymerase는 0.6unit, prim-

Table 1. The tested and optimum range of RAPD-PCR conditions in *Allium*

Designation	Unit	Condition	
		Tested	Optima
DNA	ng	10, 30, 50, 60, 80	50
Primer	μ M	1, 5, 10	5
MgCl ₂	mM	0, 1.0, 1.5, 2, 3	1.5
PCR 횟수	no.	30, 45, 55	45
Annealing temperature	$^{\circ}$ C	47, 45, 42, 38	45
Pre-heating time(94 $^{\circ}$ C 7min)		presence/absence	absence

er는 5 μ M를 사용하였고, 전체 반응 용액량이 25 μ l가 되도록 멸균수로 조정하였다. Thermal cycler의 시간과 온도 중 변수로 사용되지 않은 denaturation 시간은 30초, 온도는 94 $^{\circ}$ C로 하였고, annealing 시간은 30초 및 extension 시간은 2분, 온도는 72 $^{\circ}$ C로 하여 실시하였다. PCR반응이 끝난 후, ethidium bromide를 첨가한 1.4% agarose gel 상에서 50V로 130분간 전기영동하여 UV램프 아래에서 DNA 증폭양상을 관찰하였다.

결과 및 고찰

Template DNA 농도

RAPD 분석에 있어 DNA의 농도는 분석의 재현성과 정확성을 위하여 중요한 요인이다[18]. PCR분석의 장점 중 하나는 비교적 순수하지 않은 DNA를 사용할 경우에도 일정한 결과를 얻을 수 있다고 알려져 있으나[18], RAPD 표지 인자를 이용한 유전자지도 작성 등을 위해서는 안정적이고 재현성 있는 결과가 필요하며, 이를 위해선 적절한 DNA 농도를 규명할 필요가 있다. 여러 가지 template DNA의 농도 하에서 PCR을 실시한 결과는 Fig. 1과 같다. Primer OPR01의 경우, 모두 9개의 밴드가 나타났다. DNA농도가 10, 30, 50, 60 및 80ng 등 모든 농도에서 전체적으로 양호한 밴드 양상을 보였으나, 농도가 높아질수록 다소 뚜렷해지는 경향이 있었다.

이러한 현상은 포도작물에 있어서 template DNA 양이 25ng부터 125ng까지 변하여도 RAPD 표지의 증폭 양상에

는 미미한 차이만 있었던 결과와 비슷하며[14], Koller et al.[7]의 사과와 RAPD에 대한 보고처럼 template DNA 양이 55ng이 되어도 밴드양상은 달라지지 않는다는 내용과 비슷하다. 그러나 Nam et al.[10]은 고추에서는 DNA 농도가 40ng~10ng으로 낮아짐에 따라 밴드의 smear한 현상이 줄어들었다고 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, 양파의 RAPD 분석에 있어 template DNA 농도가 높을수록 미세하게나마 밴드가 뚜렷하게 나타나는 경향이 있었으나 전반적으로 30~50ng의 template DNA 농도가 최적조건인 것으로 분석되었다.

Primer의 농도

Template DNA를 상기 적정농도로 고정된 후 primer OPR01과 primer OPZ20을 각각 1~10 μ M까지 처리하여 RAPD를 수행한 결과는 Fig. 2와 같다. Primer OPR01의 경우, 1 μ M 처리구에서는 밴드가 전혀 나타나지 않았고, 5 μ M의 처리구에서는 4품종 모두 약 13개씩의 밴드가 나타났다. 10 μ M의 처리구에서는 '야광주'와 '다봉황'의 두 품종에서만 밴드가 나타났는데, 5 μ M 처리구에 비해 짧은 밴드가 뚜렷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. Primer OPZ20의 경우, 1 μ M의 처리구에서는 primer OPR01과 마찬가지로 밴드가 나타나지 않았으며, 5 μ M의 처리구에서

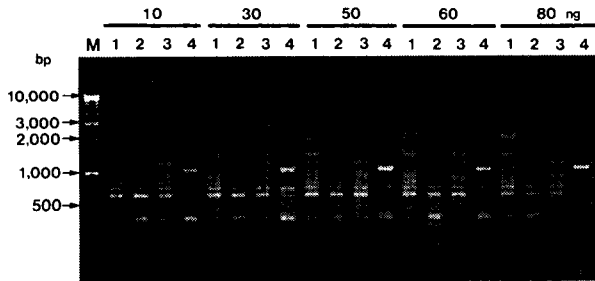


Fig. 1. Test of DNA concentration with four strains of onions. The primer used for this test was OPR01 purchased from Operon.

M, DNA size marker; 1, Changryungdaego; 2, Yeoejuhwang; 3, Yakwangju; and 4, Dabonghwang.

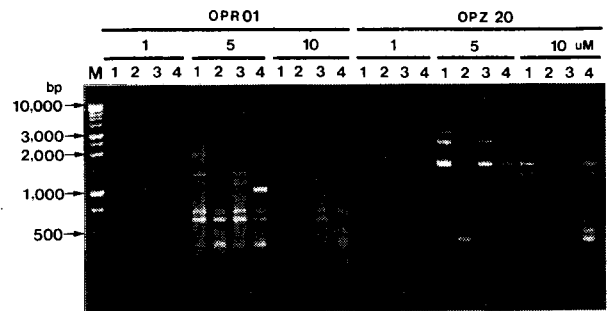


Fig. 2. Test of primer concentration with four strains of onions. The primer used for this test were OPR01 and OPZ20.

M, DNA size marker; 1, Changryungdaego; 2, Yeoejuhwang; 3, Yakwangju; and 4, Dabonghwang.

는 4품종 모두에서 총 6개의 밴드를 확인할 수 있었다. 10 μ M의 처리구에서는 '창녕대고'와 '다봉황' 두 품종에서만 밴드가 나타났고, 이 경우에도 5 μ M의 경우보다 작은 크기의 DNA가 더 뚜렷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

Yae et al.[17]은 primer농도가 0.1 μ M에서 1.3 μ M로 높아질수록 작은 크기의 DNA가 뚜렷하게 나타나고 반대로 낮아질수록 크기가 큰 DNA가 더 뚜렷하게 나타났다고 보고하였는데 본 연구에서 얻은 결과와도 일치하였다. 결론적으로, primer 농도에 따른 PCR 증폭양상 실험결과, 5 μ M가 가장 적절한 것으로 판명되었다.

MgCl₂ 농도

상기 선정된 조건하에서 PCR 반응용액 내의 MgCl₂를 0~3mM까지 농도별로 달리 첨가하여 PCR을 시행한 결과는 Fig. 3과 같다. Primer OPR01의 경우, MgCl₂ 농도가 0mM인 경우에는 밴드가 나타나지 않았고, 1mM의 처리구에서는 '창녕대고', '여의주황', '다봉황'의 3품종에서만 밴드가 나타나 재현성이 부족함을 알 수 있었다. 그러나 농도가 1.5mM일 때, 4품종 모두에서 밴드가 나타나 가장 적절한 농도임을 확인할 수 있었다. 반면, 2-3mM의 고농도 MgCl₂ 처리구에서는 반응산물이 없었다.

이러한 현상은 Weeden et al.[14]이 MgCl₂가 DNA증폭에 직접적인 영향을 미칠 수 있다고 보고한 결과와 고추에서 MgCl₂가 첨가되지 않았거나 1mM 이하의 저농도로 처리된 경우 반응산물을 얻을 수 없었다는 결과[10]와 유사하다. 결론적으로, 양파에 있어서 MgCl₂의 적정농도는 1.5 mM 정도로 분석되었다.

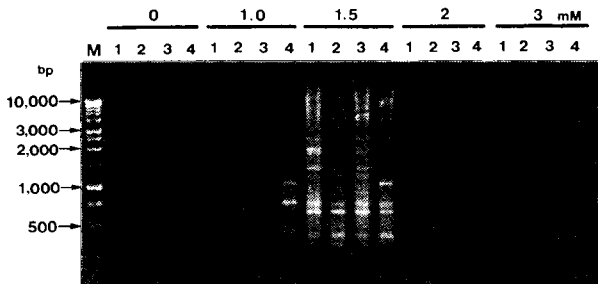


Fig. 3. Test of MgCl₂ concentration with four strains of onions. The primer used for this test was OPR01. M, DNA size marker; 1, Changryungdaego; 2, Yeoeujuhwang; 3, Yakwangju; and 4, Dabonghwang.

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 OPR01의 경우, PCR cycle수를 30회로 하였을 때는 반응산물을 얻을 수 없었으나, 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 양파 RAPD 분석의 경우 45회의 PCR cycle수가 적당한 것으로 분석되었다. 이러한 결과는 고추에 대한 RAPD-PCR 최적화 조건과 일치하는 결과이다[18].

Annealing temperature

Template DNA 50ng, random primer 5 μ M, MgCl₂ 1.5mM, 그리고 PCR cycle수 45회의 적정조건을 결정한 후 47, 45, 42 및 38 $^{\circ}$ C의 annealing temperature에 대한 검정을 실시한 결과는 Fig. 5와 같다. Primer OPR01의 경우, 47 $^{\circ}$ C와 38 $^{\circ}$ C에서는 주 밴드의 선명도가 낮게 나타났으며, 42 $^{\circ}$ C의 경우, 가장 많은 수의 밴드가 증폭되었으나 불특정 밴드들이 많이 나타나 최적조건은 아닌 것으로 판명되었다. 그러나 annealing temperature가 45 $^{\circ}$ C인 경우, 4품종 모두에서 밴드가 나타났으며 특히 주요 밴드들의 선명도가 높은 경향을 보였다.

이러한 경향은 고추에서도 annealing temperature를 42

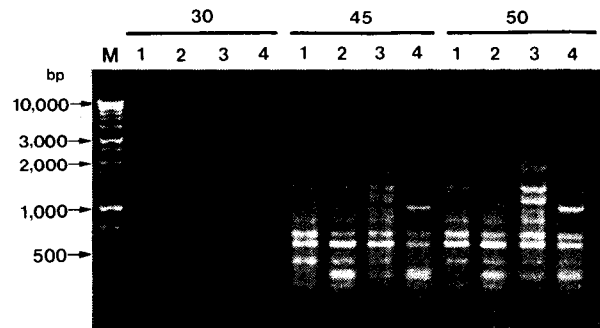


Fig. 4. Test of the effect of PCR cycles with four strains of onions. The test was performed using primer OPR01. M, DNA size marker; 1, Changryungdaego; 2, Yeoeujuhwang; 3, Yakwangju; and 4, Dabonghwang.

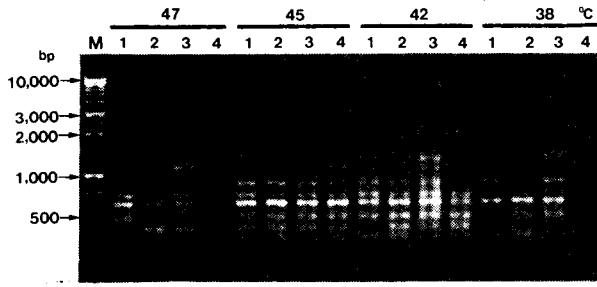


Fig. 5. Test of the effect of annealing temperature with four strains of onions. The test was performed using primer OPR01.

M, DNA size marker; 1, Changryungdaego; 2, Yeoejuhwang; 3, Yakwangju; and 4, Dabonghwang.

℃까지 높일 경우 불특정 밴드의 수가 감소하고 주요 밴드들의 선명도가 높아진다는 보고[10]와 일치하는 결과이다. 결론적으로, 양파의 RAPD 분석에 있어 annealing temperature는 45℃가 적정조건으로 분석되었다.

Pre-heating time의 유무

상기 선정된 조건하에서, pre-heating time(94℃, 7분)의 유무를 비교한 결과는 Fig. 6과 같다. Primer OPR01에서는 pre-heating time의 유무에 관계없이 모든 품종에서 많은 밴드가 관찰되었다. 그러나 pre-heating time이 있는 경우가 pre-heating time이 없는 경우보다 smear한 밴드들이 많이 나타났다. 일반적으로 pre-heating에 의한 denaturation과

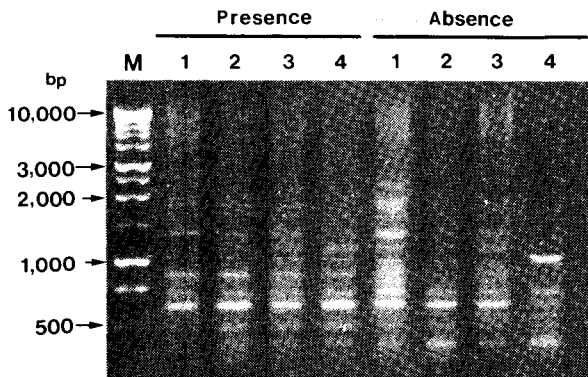


Fig. 6. Test of the effect of pre-heating time(94℃, 7min) with four strains of onions. The test was performed using primer OPR01.

M, DNA size marker; 1, Changryungdaego; 2, Yeoejuhwang; 3, Yakwangju; and 4, Dabonghwang.

정은 PCR에 있어서 중요한 과정이며, *Allium fistulosum*[11]이나, 여러 가지 *Allium*속[6,15]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 time의 부재가 smear한 밴드의 제거에 도움을 준 것으로 여겨진다.

본 실험은 ‘창녕대고’, ‘여의주황’, ‘야광주’, ‘다봉황’ 등 양파 4품종을 이용하여 template DNA농도, primer농도, MgCl₂ 농도, PCR 횟수, annealing temperature 및 pre-heating time 유무 등 양파 RAPD 분석에 필요한 여러 가지 요인에 대한 최적 조건을 분석, 결정하였다(Table 1). 이러한 실험의 결과는 양파의 유연관계 분석이나 DNA 표식인자의 개발을 위한 RAPD 분석시 유용한 기초자료가 될 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 양파 품종간의 유전적 특성 분석을 위한 기초 자료로써 최적의RAPD-PCR 조건을 확립하기 위하여 수행하였다. 본 연구를 위해 ‘창녕대고’, ‘여의주황’, ‘야광주’, ‘다봉황’ 등의 품종을 이용하여 Operon사의 OPR01(TGCCG-GTCCT)과 OPZ20(ACITTTGGCGG) 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, 25μl 반응용액을 기준으로 50ng의 template DNA, 5μM의 random primer, 1.5mM의 MgCl₂, 45회의 PCR cycle, 45℃의 annealing temperature 그리고 pre-heating time이 없는 조건이 최적으로 나타났다. 이러한 RAPD-PCR법의 안정적인 조건의 확립은 후차적인 양파 품종간의 유전적 특성의 규명, 계통간의 관련, 신품종 육성 등을 위한 중요한 기초자료로 사용될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 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.
2. Bielawski, J. P., K. Noack and D. E. Pumo. 1995. Reproducible amplification of RAPD markers from Vertebrate DNA. *BioTechnique.* **18**(5), 856-860.
 3. 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.
 4. Karibaloo, J. L., S. Brauner and L. D. Gottlieb. 1995. Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant *Solanum Melongena* L. (Solanaceae). *Theor. Appl. Genet.* **90**, 767-770.
 5. Kim, B. D., B. C. Kang and J. Y. Kim. 1995. Determination of the genetic purity of F1 Hybrid seed in Watermelon(*Citrullus vulgaris*) by using random amplified polymorphic DNA. *Agri. Inst. Cooperation.* **37**, 55-61.
 6. 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.
 7. Koller, B. A., J. M. Lehmann and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **85**, 901-904.
 8. Mo, S. Y., S. H. Im, G. D. Go, C. M. Chong and D. H. Kim. 1998. RAPD analysis for genetic diversity of Melon species. *Kor. J. Hort. Sci. & Tech.* **16**(1), 21-24.
 9. Munthali, M., B. V. Ford-Lloyd and H. J. Newbury. 1992. The random amplified polymorphic DNA for Fingerprinting Plants. *PCR methods and applications.* **1**, 274-276.
 10. Nam, S. H., G. W. Choi and I. W. Yoo. 1998. Classification of *Capsicum annumm* germplasm using random amplified polymorphic DNA. *Kor. Hort. Abst.* **16**(4), 503-507.
 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. Shin, J. S., S. J. Lee and K. W. Park. 1995. Genetic diversity in Watermelon(*Citrullus vulgaris* L.) germplasm through RAPD analysis. *Korean J. Breed.* **27**(1), 94-107.
 13. Stiles, J. I., C. Lemme, S. Sondur, M. B. Morshidi and R. Manshardt. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theor. Appl. Genet.* **85**, 697-701.
 14. Weeden, N. F., G. M. Timmerman, M. Hemmat, B. F. Kneen and M. A. Lodhi. 1992. Identification and reability of RAPD marker. *Joint Plant Breeding Symposia Series. Minnesota.* 12-17.
 15. 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.
 16. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6531-6535.
 17. 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.
 18. Yang, T. J. and H. G. Park. 1998. Optimization of the random amplified polymorphic DNA analyses procedure in *Capsicum annumm* L. *Korean J. Breed.* **30**(2), 204-211.