

## 분자 생물학적 기법을 이용한 가리비의 18S rDNA의 부분적인 염기서열 분석

김미정 · Long-Guo JIN · 박중연\* · 홍용기  
부경대학교 생물공학과 \*국립수산진흥원 생물공학과

### 서론

조개류중 가리비는 품질면에서 경제적 가치가 우수한 종으로서 어류나 갑각류 양식에 비해 조개류 양식은 동물성 단백질 생산에 있어 가장 합리적인 방법 중의 하나로 우리나라에서도 이미 양식을 하고 있거나 추진 중에 있다. 가리비 종류는 전세계적으로 360여종이 있으며, 우리나라에는 참가리비, 비단가리비, 해가리비, 국자가리비 등 6종이 보고되고 있다. 가리비는 폐각의 형태로 구분을 하는 데 이것만으로는 가리비속을 다 분류하기란 힘이든다. 최근의 분자생물학적 연구에서는 가리비종들의 구별을 위하여 allozyme electrophoresis, DNA sequencing, DNA restriction fragment polymorphism(E. Kenchington et al., 1993)등의 방법들이 쓰여지고 있다. 그중 특히 18S rDNA gene은 염기서열이 많이 보존되어있어서 종의 구별 등 분류학적 연구에 많이 쓰여지고 있다.

본 연구에서는 이러한 종구별의 목적으로 18S rDNA유전자의 염기서열분석을 바탕으로하여 우리나라에 서식하는 가리비들간의 종간, 우리 나라 주변 국가 해역에 서식하는 가리비들간의 유전자 유연 관계를 비교해 보았다.

### 재료 및 방법

#### 1. 시료 및 전처리

국내외 존재하는 가리비 종 별로 구하여, 살아있을 때 부위별로 잘라 냉동 보존 하면서 DNA를 추출하였다.

#### 2. DNA 추출 및 정량

DNA 추출은 Patwaet et al.의 방법을 변형하여 수행하였다(Mohsin U. Patwary et al., 1994). 본 연구에서는 폐각근을 이용하여 DNA 추출을 하였고, 추출한 DNA는 Mini Fluorometer (Hoefler, Model TKO 100)로 정량하여, PCR의 주형으로 사용했다.

#### 3. PCR 증폭 및 Agarose gel 전기영동

PCR 증폭은 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus)를 사용하여 수행하였다. 부분적인 18S-rDNA 영역을 증폭하기 위하여 specific한 primer인 NS5 와 NS8을 사용하였다 (White et al., 1990). PCR product는 0.5  $\mu$ g/ml의 EtBr가 포함된 1% agarose gel 상에서 TAE buffer로서 100 V 전압으로 30분간 행하였다(Sambrook et al., 1989).

#### 4. DNA ligation, 형질전환, Plasmid 추출, 제한효소 처리, DNA 염기서열 분석

DNA ligation과 형질전환은 Invitrogen사의 Topo TA cloning kit의 protocol에 따라 진행하였다. Plasmid 추출은 Boehringer Mannheim사의 plasmid isolation kit의 protocol에 따라 추출하였다. 제한효소 처리는 plasmid를 추출한 다음 *EcoRI* 제한효소로 분해하여 DNA 삽입을 확인하였다. DNA 염기서열은 DNA Auto Sequencer (ABI PRISM 377, Perkin Elmer Co.)로 분석하였으며, 염기 상동성은 NCBI의 BLAS search 프로그램을 이용하여 비교하였다.

## 결과 및 요약

본 연구에서는 우리 나라 동해안(강원도, 포항, 일반 시장)에 분포하는 한해성인 참가리비(*Patinopecten yessonesis*)와 전 연안(주문진, 백령도, 흑산도)에 분포하는 비단리비(*Chlamys farreri farreri*), 제주도 연안(제주도)에 서식하는 해가리비(*Amusi japonicum japonicum*)와 중국산 비단가리비, 중국산 해만가리비(*Agropecten irradians concentricus*), 일본산 가리비의 18S rDNA유전자의 염기서열을 비교하였다. 그 결과 같은 종간에서 유사도가 높은 결과가 나왔으나, 몇몇 종에서는 유사도가 그리 높지 않고, 다른 종끼리도 유사도가 높은 결과가 나왔다. 이것은 18S rDNA의 일부만을 비교함으로써, 또 18S rDNA가 평장이 conserved되었기 때문으로 기인된다. 또한 지리적 위치와 유사도가 어느정도 관계가 있는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Mohsin U. Patwary, Ellen L. Kenchington, Carolyn J. Bird, and Eleutherios Zouros .The Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers In Genetic Studies of the Sea Scallop *Placopecten Magellanicus*(GMELIN,1971). J. Selfisf Research Vol. 13, N 547-553, 1994
- E. Kenchington, K. S. Naidu, D. L. Roddick, ,D. I. Cook, and E.. Zouros. Use of Biochemical Genetic Marker to Discriminate between Adductor Muscles of the Sea Scallop (*Placopecten Magellanicus*) and the Iceland Scallop (*Chlamys islandica*). C Fish. Aquat. Sci., Vol. 50, 1993
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laborator Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 18.88pp.