

해조류 김 *Porphyra yezoensis* 엽체로 부터 산에 내성을 가지는 유전자의 분리

Long-Guo JIN · 홍용기
부경대학교 생물공학과

서론

해조류중 특히 방사무늬 김 (*Porphyra yezoensis*)의 양식기술은 인공채묘기술이 개발된 이래 양식 및 가공분야의 많은 기술적 진보를 거듭해 오고있으며 양식장은 천해 해역으로 하천수의 유입으로 인한 풍부한 영양염류의 공급을 받고있는 지역에 있다. 이러한 영양염류는 김의 성장촉진에 도움을 주는 반면에 여러 가지 미생물, 미세조류, 부착조류등의 증식도 함께 촉진하여 결과적으로 김 성장에 대한 영양분의 경쟁관계, 질병유발, 김 양식의 생산력 저하등의 문제점들을 동시에 유발하고 있다. 따라서 최근에는 김을 양식하는 과정에서 각종 병해와 여러가지 부착생물의 제거를 위하여 유기산 제제 혹은 염산을 직접 사용하기도 한다. 이로서 이들 산 처리체들의 김에 대한 안정성, 이차적인 해양오염 및 인체 유해성등 사회적 논란의 대상이 되어 왔다. 이들 산 처리시의 부착생물에 대한 제거 효능에 대해서는 국내에서도 일부 연구가 발표되어있다. 그러나 김 엽체 자체의 산 처리시에 받는 생리적 영향 및 유전자 수준에서의 형질표현의 변화등 분자생물학적 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 유전자 형질표현의 differential display 기법 즉 DDRT-PCR 기법 (Liang and Pardee, 1992)을 이용하여 김 엽체에 대한 산 스트레스를 일시적으로 가한후 이때 특이적으로 유도 반응하는 유전자를 분리하여 그 구조를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 양식용 김은 김 망에 부착된 상태의 냉동 김발 상태의 방사무늬 김 (*Porphyra yezoensis*)의 건강한 엽체만을 골라서 초음파처리, Betadine 처리 등으로 무균처리를 행하였다. 0.3% 구연산이 첨가된 해수에서 5분간 산처리하여 산 충격을 가한 후, 정상 멸균 해수내에서 정치배양시킨 후 (10분, 30분, 60분, 4시간) 각각의 total RNA를 추출하였다. 대조구로써는 동일조건하에서 산처리하지 않은 김 엽체로부터 RNA를 추출하였다. 산 충격에 의하여 특이적으로 유도 반응하는 유전자의 분

리를 위하여 우선 total RNA는 LiCl-guanidinium 방법 (Chomczynski and Sacchi, 1987)으로 추출한다음 cDNA 합성 protocol (Invitrogen Co.)에 따라 cDNA를 합성하고 내성유전자를 찾기위하여 PCR반응을 하였다. 산 처리된 엽체에서 특이적으로 생기는 cDNA의 DDRT-PCR의 생성물을 TA cloning vector를 사용하여 clonig하고 염기서열은 DNA Auto Sequencer (ABI PRISM 377, Perkin Elmer Co.)로 분석하였으며, 염기 상동성은 NCBI의 BLAST search 프로그램을 이용하여 비교하였다.

결과 및 요약

산 충격에 의하여 특이적으로 유도 발현되는 유전자의 분리를 위하여 우선 total RNA는 LiCl-guanidinium 방법으로 추출하였다. 위에서 설정한 산처리 조건하에서 김 엽체를 0.3%구연산으로 5분간 처리한후, 일반의 멸균 해수내에서 10분, 30분, 1시간, 4시간 동안 정치배양시키면서 산 충격에 의한 유전 형질의 표현 변화를 비교하기 위하여 RNA 생성 patten을 비교하였다. Total RNA 2.5 μ g에 random primer를 1 μ l 넣고 cDNA 합성을 한 후, arbitrary primer들을 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 그 결과 OPA, OPB, OPC 총 60 종류의 arbitrary primer들 중 OPA 5 primer로 사용한 경우, 산 처리 후 김 엽체를 멸균 해수내에서 30분간 정치 배양하면서 유전 형질 표현을 유도한 결과 산 충격에 의하여 약 1200 bp 크기의 산에 내성을 가지는 유전자가 만들어 지는것을 볼수있었으며, 1시간, 4시간 후에도 계속유지되는 것을 볼수있었다. 산 충격에 의하여 만들어지는 약 1200 bp의 DDRT-PCR product의 유전자를 pCR 2.1 (Invitrogen Co.)TA cloning vector에 삽입하고 이 acid-resistance gene에 대한 기능을 알기위하여 DNA sequencing을 하고 유전자의 염기서열을 NCBI BLAST search 프로그램을 이용하여 알려진 유전자들과 유사성 검색을 실시한 결과 *Arabidopsis thaliana* 라고 하는 십자화과의 일년생 초본식물의 DNA chromosome 4, BAC clone F1C12에서 55872-55896염기서열과 96% 유사성을 나타내었으나 이것이 내성유전자에서 차지하는 비율이 2%밖에 차지하지 않아서 어떠한 유전자와 유사하다고 현재로선 결론을 내릴수 없다. 따라서 앞으로 이유전자의 기능을 알기위한 연구가 진행되어야할 과제이다.

참고 및 문헌

Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156.

Liang, P. and A.B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science (Washington D. C.)*, 257, 967-971.