

넙치의 우량혈통 선발육종 기술개발 V. Marker assisted selection을 위한 AFLP marker 개발

방인철, 이윤아, 박상용
순천향대학교 생명과학부

서론

최근 분자생물학의 급속한 발달과 유전공학적 기법에 의해 새로운 분자유종학인 genomics가 대두되고 있으며 선발육종과 결부하여 marker assisted selection (MAS) 분야가 관심의 대상이 되고 있다. 이는 유용형질과 관련된 유전자 표지를 개발하고 이 표지에 의해 선발을 하는 방법으로서 이를 이용하여 선발을 하게 되면 첫째, 빠른 세대 내에 원하는 개체들을 얻을 수 있어 조사하는데 드는 많은 시간과 비용을 절약할 수 있고, 둘째, 생육후기에 발현되는 형질들에 있어 선발효과가 높으며 셋째, 환경의 영향을 받지 않고, 넷째, 형태적인 marker에 비해 그 수에 제한이 없다는 점 등 여러 가지 장점으로 종래 선발육종이 갖고 있는 단점을 상당히 보완할 수 있게 된다.

DNA marker 탐색 기술들에는 mitochondrial DNA의 RFLP, RAPD, AFLP, microsatellite-SSR 등이 있다. 이 기술들은 PCR을 이용한 marker 탐색 방법으로 모두 1990년대 이후 개발된 방법들이다. 이들 중 최근에 개발된 AFLP는 RAPD의 간편성과 RFLP의 재현성 등 장점만을 조합한 방법으로서 분석방법이 월등하게 간편하고 재현성이 높아 최근 각광받고 있는 기술이다(Lin and Kuo, 1995; Mackill et al., 1996).

따라서 본 연구에서는 우리나라의 중요 양식어종인 넙치의 육종에 MAS를 이용하기 위한 기초 연구를 수행하였다. 성장에 차이가 있는 넙치의 DNA를 확보하여 AFLP 분석에 의해 성장 특이적인 marker를 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

1. Genomic DNA sampling

넙치의 집단 선발시 나누어 놓은 대, 중, 소 크기별 집단에서 각각 20마리씩 sampling 하여 혈액을 채취하였다. 사용된 대집단의 평균크기는 11.43 ± 1.12 mm 였고, 중집단은 8.82 ± 0.81 mm, 소집단은 6.72 ± 0.30 mm였다. 채취한 혈액에서의 DNA 분리 방법은 남 (1995)의 방법을 수정 보완하여 획득하였고, TE buffer에 용해하여 AFLP 분석 재료로 사용하였다.

2. AFLP 분석

Genomic DNA를 EcoR I 제한효소로 절단한 후 다시 Mse I 제한효소로 이중절단하고, 절단된 DNA 절편에 T4 DNA ligase와 adapter를 첨가하여 ligation시켰다. Ligation된 DNA는 94°C에서 30초, 56°C에서 60초, 72°C에서 60초간 20회 PCR 반응시켜 preamplification하였다. 반응액을 50배 희석하여 E/ACT-M/CTG 조합으로 2차 PCR을 한후 최종 반응액을 5% polyacrylamide sequencing gel에 1500 V로 전기영동하였다. 전기영동이 끝나면 gel을 조심히 떼어내고 silver staining (Promega, USA)으로 염색한 후 gel 상에 나타낸 각 분자 마카들의 유무에 따라 1또는 0으로 표시하고 band의 변이로 마커를 탐색하였다.

결과 및 요약

넙치 대, 중, 소집단의 총 band의 수는 각각 28개, 31개, 32개로 나타났으며 그 중 polymorphic band의 수는 각각 10개, 11개, 13개였다. 따라서 다형성 수준은 0.36, 0.35, 0.41로 소집단이 가장 높았으나 큰 차이는 없었다. 그리고 대, 중, 소집단을 표지할 수 있는 marker가 각각 0.65kb, 0.8kb, 0.9kb 위치에서 한 개씩 나타났다. 그 중 대 집단과 소집단에 나타난 표지의 경우 그 비율이 80%로 높아 대집단과 소집단을 뚜렷이 구분지어 주었다. 그러나 AFLP 분석의 특성상 나머지 20%가 변수로 작용할 수 있을 가능성을 배제할 수 없어 반복 실험에 의한 확인작업과 100%의 확률을 가진 marker를 찾아야 할 것이다. 또한 이것은 primer 조합을 단지 E/ACT-M/CTG 한가지 조합만을 사용하여 분석한 결과로서, 앞으로 더 많은 primer 조합을 사용하여 실험을 함으로써 성장 차이에 따른 유전적 변이를 구명할 수 있는 표지를 찾아야 할 것으로 사료되었다.

참고문헌

- Knorr, C., H. H. Cheng and J. B. Dodgson, 1999. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. *Anim. Genet.* 30: 28-35.
- Lin, J. J. and J. Kuo, 1995. AFLP: A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *FOCUS* 17: 66-70.
- Mackill, D. J., Z. Zhang, E. D. Renona and P. M. Colowit, 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39: 969-977.
- 남윤권, 1995. 어류의 혈구세포 및 정자로부터 새로운 DNA 추출 방법 개발에 관한 연구. 부산수산대학교 대학원 석사학위논문. 40 pp.