

G-2

한국산 연어의 미토콘드리아 NADH dehydrogenase subunit 3 영역의 클로닝 및 DNA 염기서열 분석

최운실, 이운호*, 진덕희

강릉대학교 해양생명공학부, *한국해양연구원 극지연구본부

서론

냉수성 고급어종인 연어는 자원관리와 어획 가능한 자원량의 확대가 쉬우므로 중요 수산자원으로 주목받고 있다. 수산 선진국인 미국, 일본, 캐나다 및 러시아등 북태평양 연안국들은 자국의 연어 자원을 보호하고자 1993년 2월 북태평양 소하성 어류위원회를 만들었다. 북태평양 연안국 가운데서도 연어 회귀량이 가장 적은 우리나라는 연어 자원에 대하여 어떠한 주장도 할 수 없는 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 최근 세계 각국에서 수산생물 자원을 효과적으로 관리하고 보존하기 위하여 활발히 연구가 행해지고 있는 분자생물학적 방법을 이용하여 한국산 연어의 미토콘드리아 NADH dehydrogenase subunit 3영역을 cloning하고 그 DNA 염기서열을 비교, 분석하였다.

재료 및 방법

1. 시료채취

연어(chum salmon, *Oncorhynchus keta*)는 1999년 우리나라 동해안으로 회귀한 연어를 국립수산진흥원 양양 내수면 연구소 체포장에서 채취한 즉시 간을 떼어내어 급냉시켜 얼린 다음, -80℃에 보관하면서 실험에 이용하였다.

2. DNA 추출 및 정량

연어의 genomic DNA 추출은 동결보존된 간 약 70mg을 취하여 세절한 뒤, Qiagen Blood & Cell Culture DNA Midi Kit(Qiagen, Germany)의 protocol에 따라 추출하였으며, 추출된 DNA는 spectrophotometer(Shimadzu, Japan)로 정량하였다.

3. ND3 유전자 영역의 증폭

추출된 genomic DNA로부터 미토콘드리아 ND3 영역만을 선택적으로 증폭시키기 위한 primer로 cytochrome oxidase III gene(COIII)과 NADH dehydrogenase subunit 4L gene (ND4L)을 이용하여 증폭시켰으며(Domanico, 1995), 이와 같은 PCR 반응은 MiniCycler TM (MJ research, USA)을 이용하였다. 증폭된 PCR 산물은 0.8% agarose gel 상에서 전기영동한 다음, ethidium bromide(0.5µg/ml)에 염색하여 확인하

였다(Sambrook *et al.*, 1989).

4. Cloning 및 plasmid DNA 추출

증폭된 PCR 산물은 TOPO TA cloning kit(Invitrogen, Netherlands)를 이용하여 cloning 하였으며, 플라스미드 DNA 추출은 QIAprep spin miniprep kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 추출하였다.

5. DNA 염기서열과 아미노산서열 분석

DNA 염기서열은 ABI PRISM 377 DNA auto sequencer(PE Biosystem, USA)를 이용하여 forward와 reverse primer에 대한 각 염기서열을 정렬시켜 양방향에 대한 염기서열을 비교·분석하였으며, 염기간의 상동성은 NCBI의 BLAST를 이용하여 조사하였고 GenBank에 등록된 data와 비교·분석하였다. 또한 염기서열 중 ND3 영역만을 취하여 ExPasy에서 아미노산서열로 정렬시켜, GenPept에 등록된 ND3의 아미노산서열과 비교·분석하였다.

결과 및 요약

우리나라로 회귀한 연어(chum salmon)의 정확한 계군을 분석하여 자원량의 추정과 보존의 기초자료로 활용하기 위해 미토콘드리아 NADH dehydrogenase subunit 3(ND3) 유전자 영역의 염기서열을 결정하고 유전적 변이를 비교·조사하였다. Genomic DNA로부터 미토콘드리아 ND3영역을 선택적으로 증폭시킨 결과, 약 750 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있었다. 또한 증폭된 DNA를 cloning하여 약 1,000 bp 크기의 삽입 DNA를 얻었으며, COIII와 ND4L의 일부가 포함된 ND3 영역에 대한 752 bp의 염기서열을 결정하였다. 본 연구에 사용한 한국 연어 개체간에 있어서는 염기의 삽입이나 결실은 관찰되지 않았으며, 염기치환에 의한 유전적 변이가 관찰되어 개체간의 유전적 차이가 있음이 관찰되었다. 그리고 한국 연어의 single nucleotide polymorphism(SNP)으로서의 가치가 있는 5위치(65, 315, 541, 542, 599 bp)를 발견할 수 있었다. 개체간의 유전적 변이는 전체적으로 전이(transition)에 의한 염기치환이 전환(transversion)에 의한 염기치환보다 높게 나타났다. 정렬된 염기서열 중 ND3 영역에 속하는 282~632 bp만을 선택하여 아미노산 서열로 정렬시킨 결과, 116개의 아미노산으로 정렬되었고 아미노산 치환도 3곳에서 관찰되었다.

참고문헌

- Domanico, M. J. and Phillips, R. B. 1995. Phylogenetic Analysis of Pacific Salmon (*Genus Oncorhynchus*) Based on Mitochondrial DNA Sequence Data. *Mol. Phylo. Evol.*, 4: 366-371.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 18.88pp.