

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

최운실, 최은주, 이운호, 진덕희

강릉대학교 해양생명공학부

서론

수산자원의 유지관리와 생산의 확보에 관한 기초적인 정보를 제공하는 집단 유전학적 연구는 지금까지 isozyme 다형에 의한 분석방법을 많이 이용하여 왔으나, 변이성이 약간 떨어져 짧은 시간에 변이가 일어난 집단간의 차이를 밝히는데 한계가 있음이 보고되고 있다(어류의 DNA, 2000). 그리하여 isozyme 보다 한층 감도가 높은 유전표지인자로서 높은 변이 영역을 포함하고 있는 미토콘드리아 DNA를 이용한 DNA marker 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 미국 알래스카 연안의 수산과학 연구소로 소장하는 연어를 대상으로 염기서열이 많이 보존되어 있는 미토콘드리아의 영역중 NADH dehydrogenase subunit 3(ND3) 유전자를 cloning하고, 그 염기서열을 결정하여 비교, 분석하였다.

재료 및 방법

1. 시료채취

실험에 이용한 연어는 1999년 알래스카 수산과학 연구소(AFSC) 워싱턴 소재 Quilence 국립부화장에서 채집한 연어(chum salmon, *Oncorhynchus keta*)의 간을 채취하여 -80°C에 보관하면서 실험에 이용하였다.

2. DNA 추출 및 정량

연어의 genomic DNA는 Qiagen사의 Blood & Cell Culture DNA Midi Kit의 protocol에 따라 간에서 추출하였으며, 추출된 DNA는 spectrophotometer(Shimadzu, Japan)를 이용하여 정량하였다.

3. ND3 유전자 영역의 증폭

미토콘드리아 ND3 영역만을 선택적으로 증폭시키기 위하여 specific primer인 cytochrome oxidase III gene(COIII)과 NADH dehydrogenase subunit 4L gene(ND4L)을 사용하여 증폭시켰다(Domanico, 1995). 이와 같은 PCR 반응은 MiniCycler TM(MJ research, USA)을 사용하여 수행하였으며, 증폭된 PCR 산물은 0.8% agarose gel 상에서 전기영동한 다음, ethidium bromide(0.5 μ g/ml)에 염색하여 증폭된

산물을 확인하였다(Sambrook *et al.*, 1989).

4. Cloning 및 plasmid DNA 추출

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

5. DNA 염기서열과 아미노산서열 분석

DNA 염기서열은 ABI PRISM 377 DNA auto sequencer(PE Biosystem, USA)를 이용하여 염기서열을 정렬시켜 조사하였다. 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

미국산 연어(chum salmon)의 간으로부터 농도와 순도가 모두 높은 genomic DNA가 추출되었으며, ND3 유전자 영역만을 선택적으로 증폭시킨 결과, 약 750 bp의 PCR 산물이 얻어졌다. 또한 증폭된 PCR 산물을 pCR2.1-Topo vector에 연결시키고 Top10 competent cell에 클로닝하여 형질전환시킨 결과, 약 1,000 bp 크기의 삽입 DNA를 얻을 수 있었다. 3개체의 미국산 연어에 대한 ND3 영역의 염기서열은 COIII와 ND4L의 일부가 포함된 752 bp의 염기서열이 정렬되었다. 본 연구에 이용된 미국산 연어 개체간의 유전적 변이는 염기치환에 의해 일어났으며, 염기간의 삽입이나 결실은 관찰되지 않았다. 개체간의 유전적 차이는 비교적 적게 나타났으며(563, 663, 740 bp 위치), GenBank에 등록된 연어의 염기서열과 비교해 본 결과, 전체 시료에서 염기치환이 나타난 311 bp와 541 bp 위치를 관찰할 수 있었다. 이 2 위치는 미국산 연어와 타국가의 연어 자원을 구별할 수 있는 single nucleotide polymorphism(SNP)로서의 가치가 있는 위치라 사료된다. 그리고 ND3 영역에 속하는 282~632 bp만을 선택하여 아미노산 서열로 정렬시킨 결과, 116개의 아미노산으로 정렬되었으며 개체간의 아미노산 치환은 관찰되지 않았다.

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.
- 진덕희, 한현섭, 김은희, 방인철, 여인규. 2001. 어류의 DNA. *진술서적*. p112-131.