

PCR-DGGE 방법을 이용한 연어의 ND-3 유전자내의 DNA 다형성 분석

최윤실 · 최은주 · 이석근* · 진덕희

강릉대학교 해양생명공학부, *강릉대학교 치의학과

서론

북태평양 연안을 회유하는 연어는 분포범위가 넓은 어종으로 우리나라의 동해안 일대 연안으로 회귀하고 있다. 연어 자원은 분쟁의 가능성이 많은 종으로 연어 자원 분쟁에 대처하기 위하여 자원의 관리 단위인 계군 분석이 행해져야 한다.

본 연구에서는 보다 정확하면서도 간단한 계군 분석 방법을 개발하기 위하여 생물 집단간의 유전적 차이 규명에 효과적으로 이용되고 있는 미토콘드리아를 이용하였다 (McKay *et al.*, 1996; Verspoor *et al.*, 1999). 한국, 일본, 미국 연어의 미토콘드리아 ND-3 유전자를 염기서열을 행하고 SNP 위치로 관찰된 유전자 영역을 이용하여 새로운 primer를 제작하였다. 그리고 TDGS 방법을 변형하여, 전기영동시 DNA가 갖는 고유의 melting 속도의 차이에 의하여 분리되는 band 수와 위치상의 차이를 관찰함으로써 다형성을 쉽게 조사할 수 있는 DGGE 방법을 이용하여 한국, 일본, 미국산 연어를 쉽게 구별할 수 있는 genetic marker를 개발하고자 한다.

재료 및 방법

1. ND-3 유전자 영역의 염기서열 비교·분석

한국, 일본, 미국에서 채집된 연어의 간 조직으로부터 추출된 genomic DNA로부터 미토콘드리아 ND-3 영역만을 선택적으로 증폭시켰다 (Domanico, 1995). 증폭된 PCR 산물은 pCR2.1-Topo vector (Invitrogen, Netherlands)에 클로닝하여 ABI PRISM 377 DNA auto sequencer (PE Biosystem, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 세 집단간의 염기서열을 비교하여 유전적 변이가 일어나 SNP로서 가치가 있는 위치를 조사하였다.

2. Primer의 제작과 PCR

독특한 SNP 위치로 관찰된 염기가 포함된 200~400 bp 정도 크기의 PCR 산물이 생산되도록 primer sequence를 디자인한 뒤, DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 primer를 제작하고 PCR을 행하였다.

3. DGGE 분석

Graded denature gel을 제작하기 위하여 90% urea-formamide solution과 30%

urea-formamide solution에 각각 ammonium persulfate와 TEMED를 첨가하여 graded denature gel을 제작하였다. PCR 산물에 formamide-loading buffer를 첨가하여 변성시킨 다음, 적당량의 PCR 산물을 밤샘 전기영동시킴으로 변이가 나타나는지를 관찰하였다.

결과 및 요약

1) 미토콘드리아 ND3 유전자 영역의 염기서열 분석

한국, 일본, 미국에서 채집된 연어의 미토콘드리아 ND3 유전자를 선택적으로 증폭시켜 클로닝하고 염기서열을 결정한 결과, COIII와 ND4L의 일부가 포함된 약 750 bp 크기의 염기서열이 정렬되었다. 각 집단간의 유전적 변이는 모두 5군데에서 관찰되었으며, 일본과 미국 연어만의 뚜렷한 특징이 되는 염기의 위치가 있었다. 그러나 한국 연어는 일본 연어의 염기서열과 거의 비슷한 경향을 보여 한국연어만의 뚜렷한 SNP는 관찰되지 않았다.

2) DGES 방법을 이용한 DNA 이형다형성 확인

각 나라별 염기서열을 비교한 다음, 독특한 SNP가 발견된 염기영역과 아미노산 치환이 일어난 위치가 포함되도록 primer를 제작하였다. 본 실험을 통하여 제작된 각 primer를 이용하여 증폭된 PCR 산물을 이용한 DGGE 분석을 행한 결과, 일본과 미국산 연어에서 다른 시료들과 구별되는 이형 다형성의 밴드가 관찰되었으며 특히, 미국 연어 시료 전체에서 매우 뚜렷한 이형다형성의 밴드가 확인되었다.

그러므로 본 실험에서 제작된 primer를 이용한 DGGE 분석을 행하여 일본과 미국 연어를 간단하게 구별할 수 있는 유전 표지인자가 확인되었다.

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.
- McKay, S.J., R.H. Devlin and M.J. Smith. 1996. Phylogeny of Pacific salmon and trout based on growth hormone type-2 and mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 DNA sequences. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53, 1165-1176.
- Verspoor, E., E.M. McCarthy and D. Knox. 1999. The phylogeography of European Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) based on RFLP analysis of the ND1/16sRNA region of the mtDNA. *Bio. J. Lin. Soc.*, 68, 129-146.