

## 16S ribosomal gene의 분석에 의한 한국산 잉어과 어류의 계통분석

박갑만, 송호복  
관동대학교, 강원대학교

### 서론

동물 계통학의 연구에 있어서 DNA의 비교 분석이 동물의 형태 비교에 대하여 지니는 장점은 우선 직접적으로 유전물질 자체를 비교분석한다는데 있다. 동물체가 나타내는 형태는 복합적 대사경로의 최종산물로서 유전적으로 독립된 다른 변화가 유사한 형태의 변화를 초래할 수 있기 때문에 직접적인 유전물질의 비교 분석은 형태적 조사에서 간과되어 숨어있는 유전적 차이를 훨씬 정확하게 파악할 수 있다. 전 세계적으로 잉어과 어류는 210속 2010종이 포함되어 있고 담수어류 중 가장 큰 분류군이다 (Nelson, 1994). 우리나라의 잉어과 어류는 지금까지 73종이 알려져 있다(김과 박, 2002). 담수어류 중 잉어과내의 계통관계는 아직 정확히 규명되어 있지 못한 실정이다. 80년대 후반에 들면서 급증하고 있는 DNA를 이용한 동물 계통학 연구들은 DNA가 계통학 연구에 있어서 매우 중요한 도구로서 사용될 수 있는 커다란 잠재력과 실용성을 입증하게 되었다(Gasser, 2001). 분류 및 계통을 추적하기 위한 여러 가지 분자생물학적 접근방법 중 세포질 내 유전물질인 미토콘드리아 DNA와 nuclear DNA (예, rRNA)를 이용한 진화 경향 및 계통 추적이 최근 널리 이용되고 있다. 미토콘드리아 DNA는 약 16~18kb의 genome으로 미토콘드리아 DNA를 구성하는 대부분의 유전자의 위치나 순서가 진화상으로 잘 보존되어 있지만, 환경변화에 민감하게 반응하여 nuclear DNA보다 빠른 속도로 변화하기 때문에 분류군간에 염기의 첨가(insertion), 결실(deletion), 치환(substitution)등이 돌연변이의 종간 또는 종내 집단간 유연관계를 연구하기에 매우 유용한 것으로 알려져 있다(Howes, 1991). 본 연구에서는 한국산 잉어과 어류를 대상으로 16S ribosomal gene의 염기서열을 통해 종간의 진화경향을 알아보고자 실시하였다.

### 재료 및 방법

본 연구에서는 잉어과 어류 13종을 대상으로 한 종당 3개체씩을 이용한 유전자변이와 유전적 다형현상을 밝히기 위해 mitochondrial 16S gene 유전자의 염기서열을 분석하였다. 또한 GeneBank에 등록된 일부 잉어과 종을 비교분석하였다. 실험재료는 살아있는 물고기를 대상으로 근육 0.5-1.0g 정도를 떼어 막자사발에 넣고 액화질소가스(-196°C)로 충분히 냉각시킨 다음 분쇄하여 DNeasy Tissue Kit를 이용하여 DNA를 분리하였으며, DNA 농도는 TE buffer (10mM Tris-Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)에 DNA를 녹여서 260nm, 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 유전자 증폭을 위한 primer는 먼저 16 N-984 (5'-cgctgtttaccaaacaacatcg-3') (forward)와 3259 (5'-ccgctttgagctcagatca-3') (reverse)를 사용하여 증폭하였다 (Kocher et al., 1989; Chang et al., 1994). PCR 반응은 GeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer)을 사용하여 추출한 DNA를 주형(template)으로 TakaRa Kit를 사용하여 93°C/1분 (1 cycle); 93°C/15초, 72°C/2분 30초 (5 cycles); 93°C/15초, 55°C/45초, 72°C/2분 30초 (30 cycles); 72°C/7분 (1 cycle)로 처리하였다. 재조합 DNA는 pGem T-Easy Vector System II를 사용하였다. 염기서열은 ABI automated DNA sequencer로 SP6와 T7를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 결정한 후 Clustal X 프로그램을 사용하여 염기서열을 배열하였다. 계통분석은 Kimura-2-Parameters Distance에 사용되는 distance method는 MEGA v1.01 program(Kumor et al., 1993)을 사용하여 Neighbor-Joining tree를 만들었다.

## 결과

한국산 13종 (*Pungtungia herzi*, *Pseudopungtungia nigra*, *P. tenuicorpa*, *Coreoleuciscus splendidus*, *Sarcocheilichthys variegatus wakiyae*, *Gobiobotia macrocephala*, *G. breviparba*, *G. nakdongensis*, *Phoxinus phoxinus*, *Rhynchocypris oxycephalus*, *R. steindachneri*, *R. kumgangensis*, *R. semotilus*)과 유전자은행에서 얻은 15종(*Pogonichthys macrolepidotus* (AF081860), *Rhinichthys atratulus* (AF038495), *R. osculus* (AF081863), *Leuciscus rutilus* (AF038484), *Hemibarbus labeo* (DQ347953.1), *H. mylodon* (DQ345787.1), *Sarcocheilichthys variegatus* (AB054124.1), *Pseudorasbora pumila* (AB025212.1), *P. parva* (AB025210.1), *Hemibarbus longirostris* (DQ347952.1), *Tribolodon hakonensis* (AB162635.1), *T. ezoe* (AB162633.1), *Phoxinus lagowskii steindachneri* (AB162639.1), *Clinostomus elongatus* (AF081840), *C. funduloides* (AF081842), *Gila cypha* (AF038477), *G. atraria* (AF038472), *G. coerulea* (AF038473))에 대한 578 base pair의 염기서열을 얻어 비교.분석하였다. 본 연구에서 16S gene에 근거한 잉어과 어류의 분자계통수는 크게 두 그룹(*P. herzi*, *P. nigra*, *P. tenuicorpa*, *G. macrocephala*, *G. breviparba*, *P. pumila*, *C. splendidus*, *H. labeo*, *H. mylodon*, *H. longirostris*, *S. variegatus wakiyae*와 *G. nakdongensis*, *P. phoxinus*, *R.*

*oxycephalus*, *R. steindachneri*, *R. kumgangensis*, *R. semotilus*, *P. macrolepidotus*, *R. atratulus*, *R. osculus*, *L. rutilus*, *S. variegatus*, *P. parva*, *T. hakonensis*, *T. ezoe*, *P. lagowskii steindachneri*, *C. elongatus*, *C. funduloides*, *G. cypha*, *G. atraria*, *G. coerulea*)  
으로 분리되었다. 특히 *G. nakdongensis*와 *P. phoxinus*가 monophyletic group로 형성되어 앞으로 다른 유전자를 통한 정밀한 분석이 필요할 것으로 사료된다.

## References

- Chang, Y., Huang, F. & Lo, T. 1994. The complete nucleotide sequence and gene organisation of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* 38:138-155.
- Howes, G. 1991. Systematics and biogeography: an overview. In "Cyprinid Fishes: Systematic biology and exploitation" (I. Winfield and J. Nelson, Eds.). pp. 54. Chapman & Hall, New York.
- Kim, IS. & Park, JS. 2002. Freshwater fisheries of Korea. Kyo-hak Publishing.
- Kocher, T., Thomas, W., Meyer, A., et al. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA.* 86: 6196-6200.
- Kumar, S, Tamura, K. & Nei, K. 1993. MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 1.01. Institute of Molecular Evolutionary Genetics. The Pennsylvania State University. University Park, PA.