

## 한국산 참굴 (*Crassostrea gigas*) 미토콘드리아 DNA의 유전적 분석

김상해 · 박미선\* · 김영훈 · 박두원\*\*

인제대학교 자연과학대학 생물학과 및 유전공학연구소,

\*국립수산진흥원 양식개발과, \*\*생물공학과

## Genetic Analysis of Mitochondrial DNA from Korean Oysters, *Crassostrea gigas*

Sang Hae KIM, Mi Seon PARK\*, Young Hun KIM and Doo Won PARK\*\*

Department of Biology and Institute of Genetic Engineering, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

\*Aquaculture Division, \*\*Biotechnology Division, National Fisheries Research and Development

Institute, Pusan 619-900, Korea

The genetic differentiation and characteristics of two oyster populations (*Crassostrea gigas*) in Korea were assessed based on the restriction fragment length polymorphisms (RFLP) analysis and the restriction patterns of subcloned mtDNA. The restriction fragments of twenty individuals in West Sea revealed an identical pattern, determined by 8 restriction enzymes. On the other hand, two haplotypes having variation at the HindIII site were shown in the specimens from South Sea; minor haplotypes (4 of 20) were similar to the results obtained from individuals in West Sea while major haplotypes were different from those in West Sea. It was suggested that oysters (*C. gigas*) of West Sea might have been introduced to South Sea.

Each mitochondrial DNA from two oyster populations in Korea and from one in Japan was divided to three parts and subcloned into pUC19 to use in genetic studies effectively. Restriction map was constructed based on the cleavage pattern by multiple restriction enzymes.

**Key words :** *Crassostrea gigas*, mitochondrial DNA, RFLPs, restriction map

### 서 론

굴은 연체동물의 부족강, 익각목 및 굴 상과에 속하며 2과 8속으로 분류되고 있으며 (Torigoe, 1981), 100종 이상인 것으로 알려져 있다 (今井, 1976). 그러나 종의 분류에 대해서는 이론이 많으며 아직 그 분류가 명확히 확립되어 있지 않다. 현재 우리 나라에 서식하는 것으로 알려진 굴류는 8종 정도이며 그 중에서도 양식산업에 중요한 참굴 (*Crassostrea gigas*)이 주로 남, 서해안에 걸쳐 가장 널리 분포되어 있다. 우리 나라에서의 굴 양식은 1907년에 한국어업법이 만들어짐으로써 본격화되었고 1930년대에 와서 수하식 양식이 보급되면서 각 지역의 특성에 맞는 양식법이 확립되어 왔다. 그러나 굴 양식에서의 문제점 중 하나는 매년 여러 가지 요인들에 의한 굴 채묘 부진을 들 수 있는데 여기에는 굴의 품종 혼합과 환경 적응도, 그리고 유전적 열성화 등이 원인이 될 수 있다. 굴 채묘가 부진할 때 이에 대한 대처로서 종패를 다른 지역에서 이식해와 양식하는 경우가 가끔 있으며 이는 결국 한 지역에서 여러 지역 품종의 혼합을 초래할 수 있다. 실제로 남해안에서는 일본산과 서해산 굴이 이식되어 양식된 적이 여러 번 있었다. 굴 양식업의 특성상 채묘는 천연채묘를 하기 때문에

사실상 종묘의 유전적 관리가 어려운 실정이며 한국산 참굴의 경우 품종 혼합 정도나 유전적인 특성 변화 등에 대하여 조사되어진 바는 없었다. 그러나 굴의 경우 산지에 따라 유전적 특성과 성장조건, 폐사율 등에 많은 차이를 보이기 때문에 지역별 굴의 유전적 특성을 조사하고 관리하는 일은 매우 중요하다고 할 수 있다.

최근에 계통분류학이나 집단유전학 등에서는 각종 생물들의 계통확립이나 분화정도를 조사하는데 분자생물학적 실험방법을 도입하고 있다. 그 중에서도 미토콘드리아 DNA (mtDNA)의 유전적 분석을 통한 연구가 활발하다 (Avisé, 1986; Kessler and Avisé, 1985; Spolsky and Uzzell, 1984). 미토콘드리아 DNA는 핵 DNA에 비하여 크기가 작아 조작이 용이하고 모계유전을 취하며 돌연변이율이 높고 (Brown et al., 1979) 재조합이 거의 없어 좋은 실험 재료가 된다 (Avisé and Lansman, 1983; McLean et al., 1983; Skibinski, 1985; Sounder et al., 1986).

본 연구에서는 한국의 지역별 참굴의 유전적 특성을 조사, 비교하기 위하여 남해안과 서해안산 참굴들의 mtDNA에 대해 RFLP 방법을 통하여 지역간 또는 개체간 분화를 조사하였으며 mtDNA를 *E. coli* HB101에서 클로닝시켜 제한효소지도도를 작성하였다.

재료 및 방법

1. 시료 및 시약

미토콘드리아 DNA 분석을 위한 굴 시료는 1996년 6~9월 굴 산란기에 현지어장에서 채취 사용하였다. 한국 남해안산 참굴은 부산 가덕 현지어장에서 1995년 8월 채묘한 後期産으로 1996년 4월 경남 거제군 오수 굴 양식어장에 垂下, 양성 중인 것을 同年 8월에 채취하여 사용하였으며 서해안산 참굴은 충남 보령군 천북면 장은리의 자연산 굴을, 일본산 참굴은 1996년 4월 히로시마로부터 수입한 雉貝를 남해안산 굴과 같은 양식어장에서 이식, 양성 중인 굴을 사용하였다. 기타 시약은 Sigma사 제품을 사용하였으며 제한효소는 Promega사로부터 구입하였다.

2. mtDNA 추출

굴 시료로부터 mtDNA 추출은 Birnboim과 Doly (1979) 방법을 개량한 Palva와 Palva (1985)의 방법을 사용하였다. 우선 각 굴 개체별 시료로부터 난소 또는 소화관 조직 10 g를 액체질소에서 분쇄시킨 후 TEK 완충용액 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1.5% KCl, pH 7.5)에 넣어 마쇄기로 균일하게 마쇄시켰다. 마쇄액을 15 ml 원심분리관에 분주한 후 동량의 15% sucrose-TEK용액을 튜브 바닥으로부터 천천히 첨가하여 밀도구배를 만들었다. 용액을 4°C, 4,000×g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 10,000×g에서 20분간 다시 원심분리시켰다. 침전물을 30 ml의 EST 용액 (100 mM EDTA, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0)으로 희석한 후 상기와 같이 원심분리하여 미토콘드리아 분획을 취하였다. 미토콘드리아 침전물에 조직 g당 200 µl의 용액I (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 넣어 용해하고 400 µl의 용액II (0.2 M NaOH, 1% SDS)를 첨가하여 잘 혼합한 뒤 300 µl의 용액III (3 M potassium acetate)를 첨가하여 혼합한 후 12,000×g에서 30분간 원심분리시켰다. 상층액에 동량의 페놀을 첨가하여 5,000×g에서 10분간 원심분리하고 상층액에 두배의 에탄올을 첨가하여 12,000×g에서 15분간 원심분리하여 mtDNA를 침전시켰다. 침전된 mtDNA는 20 µl의 TE 용액 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)으로 용해시켰다.

3. 제한효소 처리 및 Southern blot 분석

미토콘드리아 DNA절단에 사용한 제한효소는 여섯 염기쌍을 인식하는 효소들로서 BamHI, BglI, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, XbaI, 그리고 XhoI 등 8종류의 제한효소

를 이용하였으며 굴 시료 각 개체로부터 추출된 50 ng의 mtDNA를 각 효소반응에 사용하였다. 반응은 각 효소의 최적 반응온도에서 16시간 동안 수행하고 agarose gel에서 전기영동하였다. gel을 변성용액에서 변성시킨 후 vacuum blotter로 nylon membrane에 DNA를 옮긴 다음 굴의 mtDNA로 만든 probe를 이용하여 hybridization시켰다 (Maniatis et al., 1982). Probe DNA는 남해안산 참굴의 전체 mtDNA를 random primer extension 방법을 사용하여 biotin으로 표지하였으며 chemiluminescent 기질 (CSPD, Tropix 사)과 반응시켜, 기질이 분해되면서 방출하는 477 nm 파장의 빛에 의해 X-ray 필름을 감광시킴으로써 probe와 hybridize한 DNA를 검출하였다. DNA 클로닝과 제한효소지도 작성을 위한 효소반응들은 Sambrook 등의 (1989) 방법을 인용하였다.

결과 및 고찰

1. 한국산 참굴 mtDNA의 제한효소 절편분석

한국산 참굴을 지역별로 채취한 후 각 개체별로 mtDNA를 추출하고 제한효소들로 절단하여 DNA blotting을 통해 DNA 절편양상을 조사하고 각 지역별 mtDNA를 클로닝하여 제한효소 mapping을 한 결과들을 참조하여 자세한 절편양상을 분석하였다 (Table 1). 본 연구 결과는 이전 연구 (Park and Kim, 1995)의 남해안과 서해안산 참굴 mtDNA에 대한 제한효소 절편 분석 결과와 약간의 차이를 보이는데 그 이유는 이전 연구에서는 mtDNA를 제한효소로 절단한 후 전기영동하고 EtBr 염색을 통해 관찰하고자 하였기 때문에 충분한 양의 mtDNA가 필요하였다. 결국 분석용 mtDNA를 개체별로 사용하지 않고

Table 1. Size fractions (kb) of mtDNA fragments of the two populations digested with different restriction enzymes

BamHI	18.0	BglI	18.0	EcoRI	13.0
					3.1
					1.9
HindIII	4.0	HindIII	4.0	KpnI	13.5
(SS)	2.6	(WS)	2.6		2.5
	2.0		2.0		2.0
	1.5		1.8		0.4
	0.3		0.3		0.2
	0.2		0.1		
PstI	9.7	XbaI	10.7	XhoI	16.0
	7.6		7.3		2.0
	0.6				

SS: South Sea, WS: West Sea

여러 개체에서 추출된 mtDNA를 혼합하여 사용하였기 때문인 것으로 추측된다. 두 지역에서 각각 20개체에 대해 조사한 결과 HindIII를 제외한 다른 제한효소들의 절단양상에서는 지역간 또는 개체간 차이가 나타나지 않았다. 그러나 HindIII 절단에서 두 지역간 차이가 나타났는데 서해안산의 경우는 20개체 중 9개체에 대한 결과인 Fig. 1의 A에서처럼 모든 개체들이 한 종류의 동일한 절단양상을 보였으나 남해안산에서는 Fig. 1, B의 lane 1~6과 8 등 7개체에서 나타나는 양상과 lane 7과 9에서의 양상, 두 가지 절단양상이 나타났다. 그 중 후자의 양상은 서해안산 개체들에서 보였던 절편양상과 동일하였다. 남해안산 참굴에서 분석에 사용한 20개체 중 4개체가 서해안산의 절편양상과 같았다. 서해안산과 남해안의

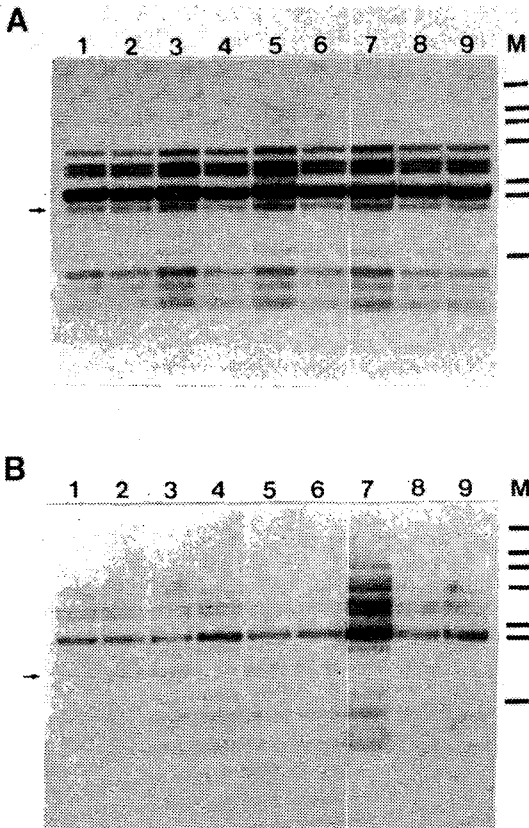
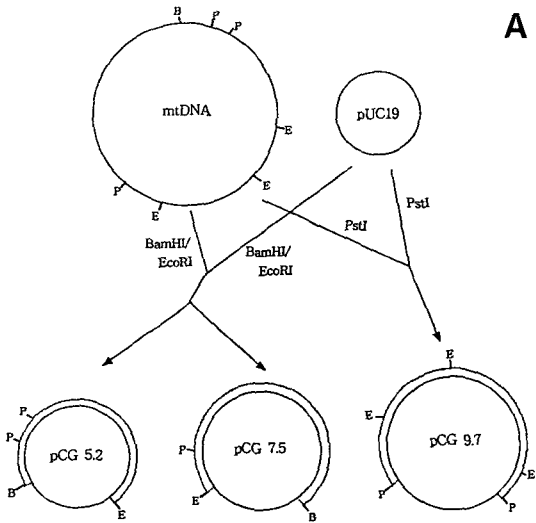


Fig. 1. HindIII-digested mtDNA fragments of two oyster populations in Korea: (A) individuals from West Sea (B) from South Sea of Korea. Lane M represents the DNA size marker ( $\lambda$ DNA/HindIII). Arrows indicate the mtDNA fragment bands (A; approximately 1.8 kb and B; 1.5 kb) specific for the oyster from West Sea and South Sea, respectively, by HindIII digestion.

다수 개체들 사이의 HindIII 절단양상에서의 차이점은 서해안산 개체들에서 나타나는 약 1.8 kb의 DNA 절편이 남해안산 다수 개체들에서는 나타나지 않고 대신 약 1.5 kb DNA 절편을 가지는 점이다. 이는 남해안산 다수 개체들에서는 1.8 kb DNA 절편 지역 내에 HindIII 자리가 더 존재하여 생성된 것으로 추측된다. 또한 HindIII 절편들 중 남해안과 서해안산의 공통절편인 약 2.0 kb의 DNA 절편이 타 절편들에 비해 양이 많게 보이는 것은 뒤에 한국산 참굴 mtDNA의 클로닝과 제한효소지도작성에서도 밝혀졌듯이 유사한 크기의 DNA 절편들이 중복되어진 결과이며 Fig. 1, A와 B에서 약 0.6 kb 크기의 희미하게 보이는 절편은 부분절단에 의한 것으로 추정되었다. 이상의 결과에서 서해안산 참굴은 한 종류, 그리고 남해안산에서는 두 종류의 haplotype이 나타났으나 실제 각 지역별 참굴 집단 내에 더 많은 mtDNA의 haplotype이 존재할 가능성은 배제할 수 없다. 그러나 본 연구 결과에서 서해안산 참굴이 남해안으로 유입되어 혼재하고 있을 가능성 또한 추정해 볼 수 있으며 남해안과 서해안 참굴의 유전적 차이를 어느 정도 구분할 수 있는 가능성을 보여 주었다. 앞으로 남해안의 더 많은 지역과 개체들을 대상으로 분석하여 한국산 참굴의 지역적 변이와 유전적 특성을 구분하는 것이 필요하다.

## 2. 한국산 참굴 mtDNA의 클로닝 및 제한효소지도 작성

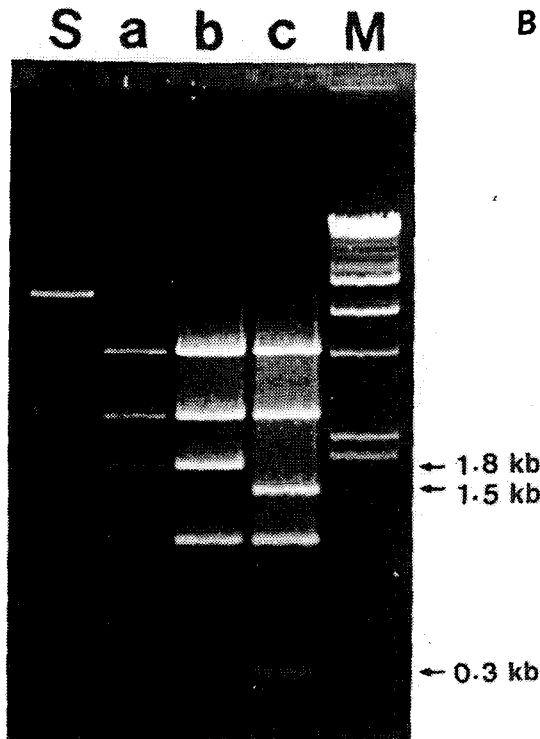
한국산 참굴의 mtDNA에 대한 유전적 연구를 다양하고 손쉽게 하기 위하여 지역별 참굴 mtDNA를 박테리아 유전자운반체인 pUC19에 클로닝하고 박테리아, *E. coli* HB 101에 형질전환시킨 다음 형질전환체로부터 mtDNA를 다량으로 얻을 수 있도록 하였다. mtDNA의 전체 크기가 너무 커서 한번에 클로닝하기가 어렵기 때문에 제한효소들로 절단하여 생긴 절편들을 subcloning하였다 (Fig. 2, A). 우선 BamHI과 EcoRI으로 굴 mtDNA를 절단하면 약 1.9, 3.1, 5.2, 7.5 kb의 네 종류 DNA 절편이 생기는데 이들을 pUC19의 BamHI과 EcoRI 자리에 클로닝시켰다. 형질전환체들을 조사한 결과 5.2 kb와 7.5 kb의 DNA 절편들이 각각 클로닝된 형질전환체들은 선별하였고 이들을 각각 pCG 5.2와 pCG 7.5로 명명하였다. 나머지 1.9와 3.1 kb DNA 절편들이 클로닝된 형질전환체는 선별하지 못하였다. 이는 1.9와 3.1 kb DNA 절편들의 양끝이 EcoRI 자리를 가지고 있기 때문에 클로닝되지 않은 것으로 추측되었다. 클로닝이 되지 않은 지역을 얻기 위하여 mtDNA를 PstI으로 절단하여 pUC19에 클로닝시킨 다음 앞서 클로닝되지 않았던 두 지역을 모두 포함하는 약



A

9.7 kb의 DNA 절편이 클로닝된 형질전환체를 확인하고 pCG 9.7로 명명하였다. 이로써 참굴 mtDNA의 모든 부분을 포함하는 재조합 DNA들을 제작할 수 있었다.

클로닝한 참굴 mtDNA 절편들을 제한효소들로 절단한 결과와 전체 mtDNA의 제한효소 절단양상을 기초로 제한효소지도도를 작성하였다 (Fig. 3). BamHI, BglII과 SmaI 제한효소 자리는 하나였으며 XhoI과 XbaI 자리는 두 개 그리고 EcoRI, PstI과 KpnI은 세 개였고 HindIII 자리는 대략 11개 정도를 가지고 있었다. 남해안과 서해안 그리고 일본산 세 지역 참굴 mtDNA의 7.5 kb DNA 절편이 클로닝된 pCG 7.5 DNA들을 HindIII로 절단하였을 때 일본산과 서해안 참굴에서는 4개의 DNA 절편이 동일하게 생겼고 남해안산에서는 5개가 나타났다 (Fig. 2, B). 남해안산의 DNA 절편들 중 1.5와 0.3 kb DNA 절편의 형성은 서해안산과 일본산에서 보인 1.8 kb DNA 절편 안에 HindIII 자리가 하나 더 존재하기 때문인 것으로 보인다. 이는 전체 mtDNA를 HindIII로 절단하였을 때 지역별로 나타났던 양상 (Fig. 1. A, B)과도 일치하였다. 이 결과는 Oohara와 Mori (1989)가 보고한 일본산 참굴의 mtDNA 제한효소지도도와 거의 일치하였으나 이들은 HindIII 절단양상에 대해서는 보고하지 않았다. 앞으로 이들 클로닝된 참굴의 mtDNA를 이용하면 굴류를 포함한 굴과 근연관계가 가까운 다른 연체동물들의 mtDNA 분석에 probe로 사용할 수 있으며 굴 mtDNA에 포함된 유전자들의 염기서열 분석에도 좋은 재료로 활용할 수 있어 정확한 유전적 구조와 정보를 얻을 수 있을 것이다.



B

Fig. 2 Construction of recombinant DNA containing the oyster mtDNA: (A) strategy for subcloning of oyster mtDNA. Abbreviations: B, BamHI; E, EcoRI; P, PstI (B) agarose gel showing the pattern of restriction fragments of the cloned oyster mtDNA digested with HindIII. Lane S, uncut pCG7.5 plasmid DNA; a, pCG7.5 from Japanese oyster mtDNA/HindIII; b, one from Korean West Sea/HindIII; c, one from South Sea/HindIII; M, DNA size marker ( $\lambda$ DNA/HindIII).

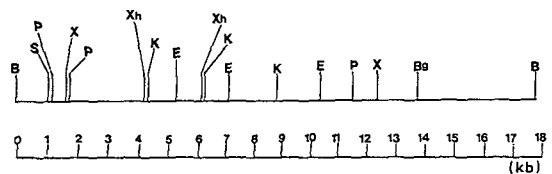


Fig. 3 Restriction map of *Crassostrea gigas* mtDNA. Abbreviations: B, BamHI; Bg, BglII; E, EcoRI; K, KpnI; P, PstI; S, SmaI; X, XbaI; Xh, XhoI.

요 약

한국산 참굴의 유전적 특성을 조사하기 위하여 한국의 지역별 참굴을 대상으로 mtDNA 제한효소 절편분석과 클로닝을 수행하였다. 지역별로 각각 20개체의 mtDNA에 대하여 8가지 제한효소를 사용하여 DNA 절편양상을 분석한 결과 서해안산 참굴에서는 개체간 차이가 없는 단일 양상이었으며 남해안산의 경우는 두 가지 양상을 보

였으며 차이는 HindIII 절단양상에서만 나타났다. 그 중 소수 개체들에서 나타난 양상은 서해안산 개체들에서의 양상과 동일하여 남해안에 서해안산 참굴이 유입되어 혼재하는 것으로 추정되었다. 한국산 참굴의 mtDNA를 대장균 *E. coli* HB101에서 클로닝하여 유전적 분석을 용이하도록 하였다. 전체 mtDNA를 제한효소를 사용하여 세 부분으로 나누어 pUC19 유전자운반체에 클로닝하였다. 클로닝된 재조합 DNA를 제한효소들로 절단하여 한국산 참굴 mtDNA의 제한효소지도도를 작성하였다. 남해안산과 서해안산 참굴 mtDNA에서 HindIII 절단 양상이 다르게 나타남을 확인하였고 이는 남해안산이나 서해안산에서 염기치환의 돌연변이에 의한 것으로 사료되었다.

### 감사의 글

이 논문은 1996년 농림부 현장애로기술개발사업 연구비의 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- Avise, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 312, 325~342.
- Avise, J.C. and R.A. Lansman. 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals, In: *Evolution of genes and proteins* (M. Nei and R. Koehn eds.). Sinauer Associates, Sunderland MA. pp. 147~164.
- Bimboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7, 1513~1523.
- Brown, W.M., M. George, Jr. and A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1976~1981.
- Kessler, L.G. and J.C. Avise. 1985. A comparative description of mitochondrial DNA differentiation in selected avian and other vertebrate genera. *Mol. Biol. Evol.*, 2, 109~125.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 387~389.
- McLean, M., C.K. Okubo and M.L. Tracey. 1983. Mitochondrial DNA heterogeneity in *Panulirus argus*. *Experientia*, 39, 536~538.
- Oohara, I. and K. Mori. 1989. Cloning and characterization of mitochondrial DNA from the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, 16, 89~99.
- Palva, T.K. and E.T. Palva. 1985. Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by alkaline extraction. *FEBS*, 192, 267~270.
- Park, M.S. and S.H. Kim, 1995. Mitochondrial DNA variation in oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg and *C. nippona* Seki) populations from Korea and Japan. *Korean J. Syst. Zool.*, 11, 235~242 (in Korean).
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning; A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY.
- Skibinski, D.O.F. 1985. Mitochondrial DNA variation in *Mytilus edulis* L. and the Padstow Mussel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 92, 251~258.
- Sounders, N.C., L.G. Kessler and J.C. Avise. 1986. Genetic variation and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Genetics*, 112, 613~627.
- Spolsky, C. and T. Uzzell. 1984. Natural transfer of mitochondrial DNA in amphibian. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5802~5805.
- Trigoe, K. 1981. Oyster in Japan. *Jour. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B, Div. 1 (Zoology)*, 29, 292~419.
- 今井丈夫. 1976. 浅海完全養殖, 浅海養殖の進歩. 恒星社厚生閣. 東京, 87~94.

1997년 4월 10일 접수

1997년 9월 4일 수리