

유전자증폭반응 기법을 이용한 홍조류 잔금분홍잎 및 누은분홍잎의 구별

김용국 · 진형주 · 김영식* · 박중연** · 남기원* · 홍용기
부경대학교 생물공학과, *해양생물학과, **수산진흥원 증식부 생물공학과

Discrimination of Two Red Algae *Acrosorium polyneurum* and *A. yendoii* Using Polymerase Chain Reaction Technique

Long-Guo KIM, Hyung-Joo JIN, Young-Sik KIM*, Jung-Youn PARK**
Ki-Wan NAM* and Yong-Ki HONG

Dept. of Biotechnology, *Dept. of Marine Biology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

**Biotechnology Division, Aquaculture Department, National Fisheries Research and
Development Agency, Pusan 619-900, Korea

The polymerase chain reaction (PCR) technique was used to distinguish from two morphologically similar red algal species; *Acrosorium polyneurum* and *A. yendoii*. Total DNA was extracted by the LiCl method. The extracted DNA (15 ng) in a 25 μ l reaction volume was amplified by the PCR technique using primers covering with mitochondrial D-loop gene, nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS), and nuclear rDNA external transcribed spacer. *A. yendoii* could be distinguished from *A. polyneurum* on the producible basis of amplified ITS fragment of 650 bp.

Key words : *Acrosorium polyneurum*, *Acrosorium yendoii*, ITS, PCR, red algae

서 론

해조류중 분홍잎 (*Acrosorium*)속은 엷은 막상의 홍조류로서 전세계적으로는 열대에서부터 온대지역에 걸쳐서 광범위하게 분포하며 (Wynne, 1989; Maggs and Hommersand, 1993), 한국에서는 동, 서, 남해안의 조해대에서 쉽게 관찰된다 (Kang, 1968). 본 속의 해조에 대한 연구로는 여러 종에대한 형태, 해부, 분류학적 연구들 (Kylin, 1924; Yamada, 1930; Okamura, 1936; Papenfuss, 1939; Mikami, 1970, 1974, 1980, 1988)을 들수있으나, 한국산 분홍잎속은 잔금분홍잎 (*Acrosorium polyneurum* Okamura), 누은분홍잎 (*A. yendoii* Yamada), 부채분홍잎 (*A. stellatum* Yamada), 갈고리분홍잎 (*A. uncinatum* (Turner) Kylin)의 총 4종이 보고되어있다 (Lee and Kang, 1986). 이중에서 잔금분홍잎과 누은분홍잎은 연중 가장 흔히 발견되는 종으로서, 기본적인 차상분지의 외형적 특징과 함께 갈고리형태의 돌기 및 부채꼴 형태를 가지는 나머지 두종과는 쉽게 구별된다. 그러나 이들 잔금분홍잎과 누은분홍잎의 두종사이에는 조체의 크기 및 가지 끝의 분지 유형에 대한 약간의 차이점을 제외하고는 그 식별이 용이하지 않으며 (Kim, 1994), 또한 그 식별형질도 종종 서식환경에 따라서 중첩된 변이의 폭을 가진다. 따라서 본 연구에서는 polymerase chain reaction (PCR) 기

법 (Mullis and Faloona, 1987)을 이용하여 두 종간의 유전적 차이점을 밝혀 유전자표식자로 개발하고자 한다. 이를 위하여 미토콘드리아의 D-loop gene, 핵의 5.8S-ribosomal DNA (rDNA) 전후의 internal transcribed spacer (ITS) (Steane et al., 1991), 그리고 핵의 18S-rDNA의 external transcribed spacer (ETS) (Tan and Druehl, 1996)에 대한 유전자 증폭과 이의 restriction fragment length polymorphism (RFLP)의 차이를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

시료채집처리

조간대 하부에 서식하는 잔금분홍잎과 누은분홍잎 (Fig. 1)을 부산시 용호동 백운포에서 1996년 6월 9일 채집하였다. 이들은 실험실에 옮긴 직후 초음파 및 beta-dine처리등의 무균화처리를 행하였다 (Park et al., 1997).

DNA추출

해조 조직으로부터 total DNA의 추출은 LiCl방법 (Hong et al., 1995)에 따라 추출하였다. 이때 시료는 0.1 g을 약 0.2 cm 씩 자른후 4ml의 lysis용액에 넣어 55°C에서 10분간 열처리하여 DNA를 추출하였다.

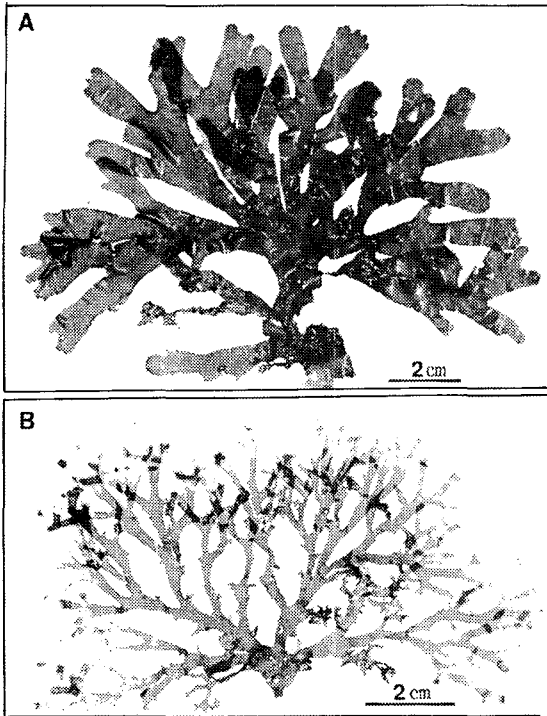


Fig. 1. Typical habit of *Acrosorium polyneurum* Okamura (A) and *A. yendoii* Yamada (B).

DNA정량

추출된 DNA는 Minifluorometer (Hoefler)로 정량하였으며, PCR의 template DNA로 사용하기 위하여 최종농도를 15 ng/μl로 맞추었다.

PCR증폭

PCR증폭은 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus)를 사용하여 수행하였다. 미토콘드리아의 D-loop 부위의 gene에 대한 primer는 tTD-2 (TACACCAGTC-TTGTA AAC)과 Phe-H (TCTTCTAGGCATTTTCAGTC)를 사용하였다 (Dr. K. Kobayashi, pers. commun.). 핵의 5.8S-rDNA의 ITS에 대한 primer는 ITS-1 (TCCGTAG-GTGAACCTGCGG)과 ITS-4 (TCCTCCGCTATTGATATGC)를 사용하였다 (White et al., 1990). 핵의 18S-rDNA의 ETS 부위에 대한 primer는 N (GTAGTCATAT-GCTTGTCTC)과 NS-8 (TCCGCGAGGTTACCTACGGA)을 사용하였다 (White et al., 1990). PCR반응액 25μl당 template DNA (15 ng/μl) 1μl, 각 primer (100 pM/μl) 1 μl, dNTP (2.5 mM) 1μl, PCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HC l, pH 8.3) 2.5μl, MgCl₂ (25 mM) 2μl, Tween 20 (12.5%) 1μl, Taq DNA polymerase (5 u/μl) 0.3μl를 첨가하였다. 반응조건은 초기반응을 94°C에서 3

분간 시킨 다음, 94°C에서 1분간, 50°C에서 1분간, 72°C에서 2분간의 cycle로 35회 반응시키고, 마지막으로 72°C에서 10분간 PCR생성물들을 충분히 extension시켰다.

RFLP

약 540 bp크기의 PCR반응 생성물이 생긴 미토콘드리아 D-loop gene에 대한 RFLP차이를 조사하기 위하여 각종 제한효소로 37°C에서 2시간동안 처리하였다.

전기영동

증폭된 DNA와 제한효소로 분해된 DNA마디들은 0.5 μg/ml의 EtBr가 포함된 2% agarose gel 상에서 0.5배의 TAE buffer (20 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) 하에서 50V 전압으로 1시간동안 전기영동하였다 (Sambrook et al., 1989).

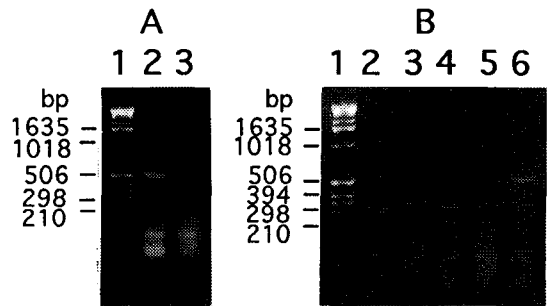


Fig. 2. PCR-RFLP analysis of mitochondrial D-loop gene fragment. (A). PCR amplified product using mitochondrial D-loop primer set of tTD-2 and Phe-H. Lane 1, molecular size marker of 1kb DNA ladder (BRL/Gibco). Lane 2, *A. polyneurum*. Lane 3, *A. yendoii*. (B). Restriction pattern of PCR amplified DNA fragment. Lane 1, molecular size marker of 1kb DNA ladder (BRL/Gibco). Lane 2, *A. polyneurum* digested by *Bgl* II. Lane 3, *A. yendoii* digested by *Bgl* II. Lane 4, *A. polyneurum* digested by *Taq* I, Lane 5, *A. yendoii* digested by *Taq* I. Lane 6, Undigested PCR amplified DNA fragment of *A. polyneurum*.

결과 및 고찰

미토콘드리아의 D-loop부위는 염기 치환율이 핵 DNA에 비하여 4~8배 빠른 영역이므로 생물집단의 유전적 판별에 유효하게 이용될수있다. 이의 D-loop gene을 증폭하기 위하여 primer tTD-2와 Phe-H를 사용하였을 경우 약 540 bp크기의 PCR product가 증폭되었다 (Fig. 2A).

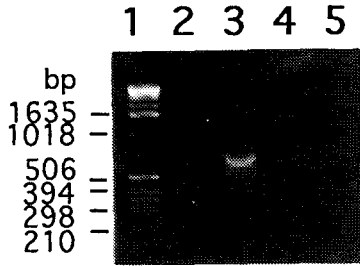


Fig. 3. PCR amplified product using nuclear rDNA ITS primer set of ITS-1 and ITS-4. Lane 1, molecular size marker of 1 kb DNA ladder (BRL/Gibco). Lane 2, PCR product from template DNA (1.5ng) of *A. yendoi*. Lane 3, PCR product from template DNA (15 ng) of *A. yendoi*. Lane 4, PCR product from template DNA (1.5 ng) of *A. polyneurum*. Lane 5, PCR product from template DNA (15ng) of *A. polyneurum*.

이 증폭된 540 bp에 대한 RFLP를 조사하기 위하여 각종 제한 효소 즉 염기 4개 단위를 인식하는 *Cfo* I, *Dpn* I, *Hae* III, *Hpa* II, *Hsp* 92II, *Mae* II, *Msp* II, *Rsa* I, *Taq* I, *Tru* 9I 등의 제한효소와, 염기 6개 단위를 인식하는 *Apa* I, *Ava* I, *Bam* HI, *Bgl* II, *Dra* I, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III, *Kpn* I, *Mlu* I, *Mun* I, *Nde* I, *Pvu* II, *Pst* I, *Sac* I, *Sca* I, *Sma* I, *Sph* I, *Xba* I 및 7개 단위를 인식하는 *Bst* EII 등 모두 30종의 제한효소를 처리하여도 두종간의 차이점을 볼수 없었다. 그중 대표적으로 4개의 염기를 인식하는 *Taq* I 과 염기 6개를 인식하는 *Bgl* II의 제한효소 처리결과 나타난 pattern은 Fig. 2B와 같이 *Taq* I의 경우 310 bp와 230 bp의 유전자 절편을, 그리고 *Bgl* II의 경우 270 bp 크기의 2개의 절편이 잔금분홍잎 및 누은분홍잎 모두 동일하게 나타났다. 이와같이 잔금분홍잎과 누은분홍잎과의 미토콘드리아 D-loop의 유전적 유사도가 매우 높아서 이의 PCR-RFLP방법으로는 구별지을 수 있는 유전자 표식을 발견할수가 없었다.

그리고 종 단위 이하의 개체간 유전자 차이를 비교하는데 주로 많이 사용되는 핵의 5.8S-ribosomal RNA gene을 포함하는 ITS의 유전자 증폭을 위하여 primer ITS-1과 ITS-4의 primer set를 사용하였을 경우 잔금분홍잎의 경우는 유전자의 증폭이 일어나지 않았으나, 누은분홍잎의 경우 650 bp크기의 유전자증폭이 일어났다 (Fig. 3). 이는 primer set의 구조가 잔금분홍잎의 DNA에 complementary sequence가 적다던지 혹은 잔금분홍잎의 경우 주형 DNA추출물에 *Taq* DNA polymerase의 저해물질이 공존하여 PCR증폭반응이 일어나지 않은 것으로 여

겨진다. PCR 반응조건중 annealing 온도는 40°C에서 68°C 까지 변화를 달리하여 조사한 바 비슷한 결과를 보였지만 50°C에서 누은분홍잎의 경우 유전자의 증폭이 비교적 우수하여 유전자의 증폭이 일어나지 않는 잔금분홍잎과의 구별이 더욱 선명하였다. 본 연구를 위하여 주로 채집한 부산지역 이외의 전남 여수지역의 두 종간 및 시기별로 1996년 5월에서 9월 사이에 채집된 두 종간의 개체들에서도 동일한 결과를 보여주었다. 이와같은 PCR의 반응조건에서 두 종간의 구별은 PCR반응물의 생성 유무로 쉽게 확인할 수 있었다. 그리고 primer ITS-1 과 ITS 유전자중 28S rDNA의 5'방향쪽에 homology가 높은 primer로서 홍조류에 사용되었던 primer AB-28 (ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT) (Steane et al., 1991)과의 set를 사용하였을 경우에는 두종 모두에서 유전자의 증폭이 일어나지 않았다 (data not shown).

또 종단위 이상의 종간 비교등에 많이 이용되는 핵의 18S-ribosomal RNA gene을 포함하는 ETS 부위유전자 증폭을 위하여 primer N과 primer NS-8의 primer set를 사용하였을 경우는 잔금분홍잎과 누은분홍잎 모두 유전자의 증폭이 일어나지 않았다.

따라서 장차 유전자의 차이를 민감하게 grouping하고 개체특이적인 유전자를 분리하는 목적으로는 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs) (Silva et al., 1995) 방법을 사용하면 두 종을 구별짓는 유전자표식자를 보다 용이하게 발견할 수도 있을 것으로 여겨진다.

사 사

본 연구는 부경대학교 기초과학 연구소 학술조성연구비 및 전남대학교 기초과학연구소 학술조성연구비 (BSRI-96-5416)의 지원에 의하여 수행되었다.

참 고 문 헌

Hong, Y.K, S.D. Kim, M. Polne-Fuller, and A. Gibor. 1995. DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using LiCl. *J. Appl. Phycol.*, 7, 101~107.
 Kang, J.W. 1968. *Illustrated Encyclopedia of Fauna and Flora of Korea*. Vol.8. Marine Algae. Samwha Press, Seoul, 465 pp (in Korean).
 Kim, Y.S. 1994. *Anatomy and taxonomy of three Delesseriaceae genera (Ceramiales, Rhodophyta) in Korea*. Master thesis. National Fisheries University of Pusan, Korea, 54 pp.
 Kylin, H. 1924. *Studien uber die Delesseriaceen*. Lunds

- Univ. Arsskr. N. F. Avd., 2, 1~111 (in German).
- Lee, I.K. and J.W. Kang. 1986. A check list of marine algae in Korea. *Kor. J. Phycol.*, 1, 311~325.
- Maggs, C.A. and M.H. Hommersand. 1993. Seaweeds of the British Isles. Vol. 1. Rhodophyta, Part 3A, Ceramiales. London, 444 pp.
- Mikami, H. 1974. On the reproductive organs in *Acrosorium yendoi* Yamada. *Bull. Jap. Soc. Phycol.*, 18, 60~66.
- Mikami, H. 1974. On the character of *Acrosorium polyneurum* Okamura. *Bull. Jap. Soc. Phycol.*, 22, 149~155.
- Mikami, H. 1980. On *Acrosorium uncinatum* (Turner) Kylin (Rhodophyceae, Delesseriaceae) from Japan. *Jap. J. Phycol.*, 28, 113~116.
- Mikami, H. 1988. Studies on *Acrosorium flabellatum* Yamada (Delesseriaceae, Rhodophyta). *Jap. J. Phycol.*, 6, 3~47.
- Mullis, K.B. and F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalized chain reaction. In *Method in Enzymology*. Vol. 155, Wu, R., ed. Academic Press, New York, pp. 335~350.
- Okamura, K. 1936. Nippon Kaisho-shi. Kazamashobo, Tokyo, 964 pp. (in Japanese).
- Papenfuss, G.F. 1939. The development of the reproductive organs in *Acrosorium acrospermum*. *Bot. Notiser.*, 19 39, 11~20.
- Park, J.W., Y.C. Cho, B.H. Nam, H.J. Jin, C.H. Sohn, and Y.K. Hong. 1997. RAPD identification of genetic variation in the seaweed *Hizikia fusiformis* (Fucales, Phaeophyta). *J. Mar. Biotechnol.* 5. In press.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 18.88 pp.
- Silva, W.P.K., D.S. Multani, B.J. Deverall, and B.R. Lyon. 1995. RFLP and RAPD analysis in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. *Aust. J. Bot.*, 43, 609~618.
- Steane, D.A., B.A. McClure, A.E. Clarke, and G.T. Kraft. 1991. Amplification of the polymorphic 5.8S rRNA gene from selected Australian Gigartinean species (Rhodophyta) by polymerase chain reaction. *J. Phycol.*, 27, 758~762.
- Tan, I.H. and L.D. Druehl. 1996. A ribosomal DNA phylogeny supports the close evolutionary relationships among the Sporochneales, Desmarestiales, and Laminales (Phaeophyceae). *J. Phycol.*, 32, 112~118.
- White T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White, eds. Academic Press, San Diego, pp. 315~322
- Wynne, M.J. 1989. Towards the resolution of taxonomic and nomenclatural problems concerning the typification of *Acrosorium uncinatum* (Delesseriaceae: Rhodophyta). *Bri. Phycol. J.*, 24, 245~252.
- Yamada, Y. 1930. Notes on some Japanese algae. *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ.*, 1, 35~36.

1997년 4월 22일 접수

1997년 6월 30일 수리