

한국산 잇바디돌김 (*Porphyra dentata*)의 핵 18S rDNA 염기서열 분석

Long-Guo Jin · 김명숙 · 조지영 · 진형주 · 홍용기*

부경대학교 생물공학과

Sequence Analysis of Nuclear 18S rDNA from *Porphyra dentata* (Rhodophyta) in Korea

Long-Guo Jin, Myung-Sook Kim, Ji-Young Cho, Hyung-Joo Jin,
and Yong-Ki Hong*

Department of Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

Nuclear 18S ribosomal RNA gene (18S rDNA or SSU rDNA) from the *Porphyra dentata* tissue was amplified and sequenced. Complete 18S rDNA has an 1822 bp exon and a 512 bp intron. The G+C contents of exon and intron were 49% and 55%, respectively. The exon sequence showed 97.1% homology to the GenBank accession number AB013183 of the Japanese *P. dentata*. The intron region that is inserted in upstream between 568 and 569 showed 52.1% homology to the AB013183.

Key words – 18S rDNA, *Porphyra dentata*, seaweed, sequence analysis

서 론

해조류 김(*Porphyra* species)은 일반적으로 단층세포 혹은 복층세포로 이루어진 엽체로서 조간대의 암반에 주로 많이 서식하고 있다(Bold and Wynne 1978[3]). 그 중 방사무늬김(*P. yezoensis*) 및 참김(*P. tenera*) 등은 양식에 의하여 우리나라(Korea Fisheries Association 1997[7])를 비롯하여 일본, 중국 등지에서 대량 생산되고 있다. 최근 일본에서 선발된 다수확 품종들이 대량으로 도입되어지고 또한 양식 기술의 진보로 인하여 생산량이 급격히 증가하고 있다. 이에 반하여 품질 면에서는 열성화 현상이 일어나고 있다.

따라서 우리나라 고유의 맛과 향을 지니면서 지역 특성에 적합한 한국 고유종의 개발과 품종개량이 절실히 요구된다. 본 연구에서는 우리나라에서 대량 양식이 가능할 것으로 추정되는 잇바디돌김(*P. dentata*)을 대상으로 그 형태적인 특성을 확인한 후 핵의 18S ribosomal RNA를 지령하는 유전자 즉 18S rDNA 유전자의 염기서열분석을 수행하여 data base화 함으로써 유용 해조류의 종보존 사업 및 양식이 가능한 고유종의 품종 확인 등에 이용하고자 한다.

재료 및 방법

시료채취 및 전처리

본 연구에 사용된 잇바디돌김(*P. dentata*)은 전라남도 완도지역에서 1997년 1월 9일에 채집하였으며, 부착생물의 오염을 제거하기 위하여 엽체는 초음파세척기로 1분씩 2번

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-620-6182, Fax : 051-620-6180
E-mail : ykhong@pknu.ac.kr

처리하였으며 0.6 g의 엽체를 1% Betadine 용액에 1분간 담근 후 멸균해수로 충분히 세척하였다. 엽체는 실온에서 4시간 동안 건조시킨 다음 -20℃에 냉동보관하면서 실험에 사용하였다(Park *et al.* 1998[10]).

DNA 추출

채집한 김 엽체 조직으로부터 총 DNA의 추출은 LiCl방법(Hong *et al.* 1995[4])에 따라 추출하였다. 이때 시료는 0.1 g을 약 0.2 cm씩 자른 후 15 ml 플라스틱 원심분리관에 넣고 4 ml의 추출용액(0.8 M LiCl, 10 mM EDTA, 0.6% Sarcosyl, 0.2% PVPP, 5% β-mercaptoethanol, pH 9.0)으로 55℃에서 10분간 열처리한 다음 4℃에서 1시간 동안 진탕하였다. 그리고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액에 0.1배의 3M sodium acetate (pH 5.4)와 2배의 에탄올을 넣어 -20℃에서 1시간 동안 놓아두면서 침전이 잘 이루어지게 한 다음 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 DNA를 회수하였다. 마지막으로 70% 에탄올로 세척한 후 건조한 다음 300 μl의 증류수에 녹였다.

DNA 정량

추출한 DNA는 mini fluorometer (Hoefer, Model TKO 100)로 정량하였으며, 유전자 증폭반응(PCR)의 주형으로 사용하기 위하여 TE 완충용액으로 최종농도를 3 ng/μl되게 조정하였다.

유전자 증폭반응

유전자 증폭반응은 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer)를 사용하여 수행하였다. 전체 18S rDNA 영역을 증폭하기 위하여는 적합한 primer set 들을 조합으로 사용하였다.

(Table 1). 그중 일부는 Kunimoto *et al.* (1999[8])의 염기서열들을 바탕으로하여 18S rDNA의 intron 부분을 증폭시키기 위하여 알려진 exon 부분에서 비교적 보존적인 것으로 여겨지는 염기서열들을 선택하여 primer로서도 사용하였다. 유전자 증폭반응액은 25 μl 당 1 μl의 주형 DNA (3 ng/μl), 1 μl의 각 primer (50 pmol/μl), 1 μl의 2.5 mM dNTPs, 2 μl의 25 mM MgCl₂, 2.5 μl의 10 ×PCR buffer, 1 μl의 12.5% Tween 20, 0.3 μl의 Taq DNA polymerase (5 u/μl) (Promega)를 첨가하였다. 유전자 증폭반응조건은 초기반응을 94℃에서 5분간 시킨 다음, 94℃에서 1분간 DNA denaturation, 45℃에서 1분간 primer annealing, 72℃에서 2분간 DNA extension의 순서로 35회 반응시키고 나서, 마지막으로 72℃에서 10분간 생성물들을 충분히 확장 합성시켰다.

Agarose gel 전기영동 및 DNA 회수

10 μl의 유전자 증폭생성물은 0.5 μg/ml의 EtBr가 포함된 2% agarose gel 상에서 0.5×TAE buffer (20 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)로서 100 V 전압으로 30분간 전기영동하였다(Sambrook *et al.* 1989[11]). 전기영동을 한 다음, 원하는 DNA 부분만을 agarose gel에서 분리하여 DNA extraction kit (Boehringer Mannheim)의 방법에 따라 DNA를 회수하였다.

DNA 삽입 및 형질전환

DNA 삽입과 형질전환은 Invitrogen사의 Topo TA cloning kit를 사용하여 수행하였다.

Plasmid 추출 및 제한효소 처리

Plasmid 추출은 High Pure Plasmid Isolation Kit

Table 1. Primer list for amplification of 18S rDNA sequence used in this work.

Primer	Sequence	Reference
5'SSU	5'-CAACCTGGTTGATCCTGCCAG-3'	Stiller & Waaland 1993 [12]
3'SSU	5'-TGATCCTTCTGGCAGGTTACCTAC-3'	Stiller & Waaland 1993 [12]
R1132	5'-GTCCGACTACGAGCGTTTAACTGC-3'	Kunimoto <i>et al.</i> 1999 [8]
NS 2'	5'-CACCAGACTTGCCCTCCAATG-3'	In this study
NS 3'	5'-CATGGAGGGCAAGTCTGGTG-3'	In this study
NS3a	5'-CGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCA-3'	In this study
NS 4	5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3'	White <i>et al.</i> 1990 [13]
NS 5	5'-AACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3'	White <i>et al.</i> 1990 [13]
NS 6	5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3'	White <i>et al.</i> 1990 [13]
NS 7	5'-GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC-3'	White <i>et al.</i> 1990 [13]

(Boehringer Mannheim)를 사용하여 추출하였다. Plasmid를 추출한 다음, 원하는 증폭 생성물이 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 *Eco* RI 제한효소로 분해하여 DNA 삽입을 확인하였다.

DNA 염기서열 분석

DNA 염기서열은 DNA Auto Sequencer (ABI PRISM 377, Perkin Elmer)로 분석하였으며, 염기 상동성은 NCBI의 BLAST search (Altschul *et al.* 1990, 1997[1,2]) 프로그램을 이용하여 비교하였다. 전체 18S rDNA의 exon 및 intron 염기서열은 기존의 NCBI에 등록된 일본산 *P. dentata* (AB013183)를 대상으로 ClustalX 1.81 프로그램 (Jeannmougin *et al.* 1998[6])을 이용하여 정렬시켰고, 정렬된 상태 확인은 Genedoc 프로그램 (Nicholas *et al.* 1997[9])을 사용하였다.

결 과

형태적 분석

본 식물체는 남해안에 위치하고 있는 완도 지역에서 채집하였으며, 그 체장은 5~10 cm이다. 식물체의 형태는 주로 피침형이었고(Fig. 1A), 염체 가장자리에는 거치상 돌기가 뚜렷하다(Fig. 1C, E). 영양세포는 불규칙하게 배열하고 세포당 한 개의 엽록체가 있으며 표면에서 모나지 않은 사각형이다(Fig. 1B). 가근세포는 타원형이며, 길이가 15~30 μ m 정도이다(Fig. 1D, F). 식물체는 1월초에 채집하였으므로 시기적으로 생식기관이 형성되기 전이어서 암·수배우체를 관찰할 수 없었다.

18S rDNA 증폭

잇바디돌김의 18S rDNA 전체 염기서열을 증폭하고자 6조의 primer들을 사용하여 각각을 유전자 증폭반응을 시켰다. 그 결과 그림 2에서 보는 바와 같이 primer set 5'SSU-NS2'를 사용한 경우 568bp 크기의 유전자 생성물이 증폭되었다. 그리고 primer set NS3'-R1132를 사용한 경우 605 bp, primer set NS3a-NS4를 사용한 경우 596 bp, primer set NS5-NS6을 사용한 경우 311 bp, primer set NS7-3'SSU를 사용한 경우 385 bp, primer set NS5-3'SSU를 사용한 경우 672 bp 크기의 생성물들이 각각 증폭되었다. 이들 6

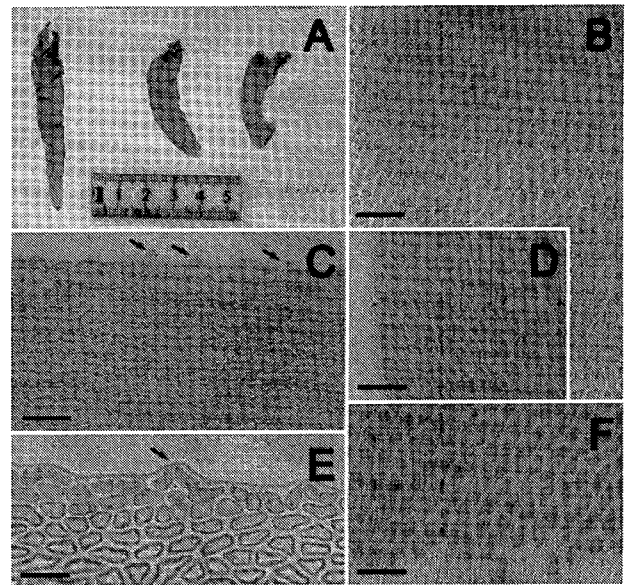


Fig. 1. The Rhodophyta *Porphyra dentata* Kjellman collected from Wando, Chollanamdo.

A, Vegetative plants. B, Vegetative cells in surface view. C, Thallus margin with spinulate processes (arrows). D and F, Rhizoidal cells in surface view. E, Magnification of the margin with spinulate process (arrow). Scale bars: B, D, F=40 μ m, C=80 μ m, E=20 μ m.

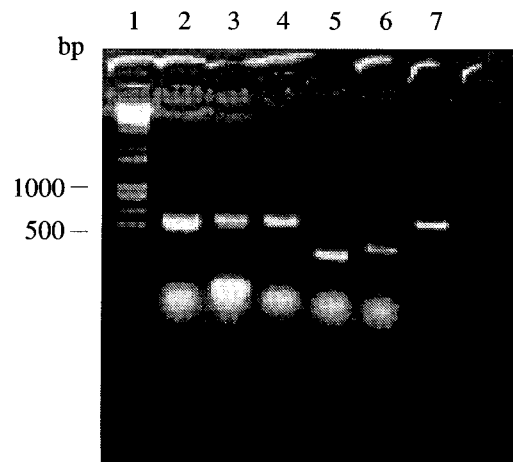


Fig. 2. Partial fragments of 18S rDNA amplified with primer sets:

Lane 1, DNA size marker of 1Kb DNA ladder (BRL/Gibco). Lane 2, PCR product with a primer set 5'SSU-NS2'. Lane 3, PCR product with a primer set NS3'-R1132. Lane 4, PCR product with a primer set NS3a-NS4. Lane 5, PCR product with a primer set NS5-NS6. Lane 6, PCR product with a primer set NS7-3'SSU. Lane 7, PCR product with a primer set NS5-3'SSU.

가지 유전자증폭 생성물들을 TA cloning vector인 pCR2.1에 삽입하여 *E. coli* INV αF'에 호형질전환시켰다. 이때 유전자증폭 생성물이 정확히 삽입된 plasmid인지의 여부를 확인하기 위하여, 형질전환된 각 집락으로부터 vector plasmid를 추출한 후, 제한효소 *Eco* RI으로 분해하였다(미발표 자료). 그 결과 18S rDNA의 부분적인 증폭이 이루어진 568 bp, 605 bp, 596 bp, 311 bp, 385bp, 672bp 크기의 유전자 마디가 *Eco* RI에 의하여 분명하게 절단되었다. 이 형질전환 집락으로부터 3 ml의 균체를 배양하여 재조합된 plasmid를 plasmid isolation kit로서 분리하여 DNA 염기서열 조사를 행하였다.

18S rDNA 염기서열 비교

본 연구에서 사용된 잇바디돌김에 대한 18S rDNA 영역의 유전자증폭 생성물을 대상으로 한 전체 염기서열은 NCBI의 blast 프로그램을 통하여 비교 분석하였다. ClustalX

1.81 프로그램을 사용하여 정렬시킨 결과 그림 3과 같이 잇바디돌김은 일본산 잇바디돌김(GenBank accession number: AB013183)과 전체 18S rDNA의 exon 영역에서 염기 50개의 차이를 가지고 있었으며 상동성이 97.1%에 도달하였다. 이들 exon 영역의 G+C 함량은 모두 49%와 48%씩 나타내었다. 그리고 exon 염기의 1735번째 adenine 및 1807번째 thymine 염기가 결손되어 있으므로 전체 1822개의 염기로서 일본산보다 두 개 염기가 적다. 또한 일본산 잇바디돌김과 비교할 때 본 연구에서 사용한 한국산 잇바디돌김은 단지 upstream 568-569 염기사이 부분에 즉 5'GTCTGGTG-CCAGCAGCCG3' 사이에 5'AACC로 시작하여 ATGG3'로 끝나는 512 bp의 intron을 가지고 있다. 일본산 잇바디돌김(AB013183)은 630 bp의 intron을 가지고 있었으며 homology는 52.1%에 달하였다. 이들 intron 부위의 G+C 함량은 55%로 동일하였다.

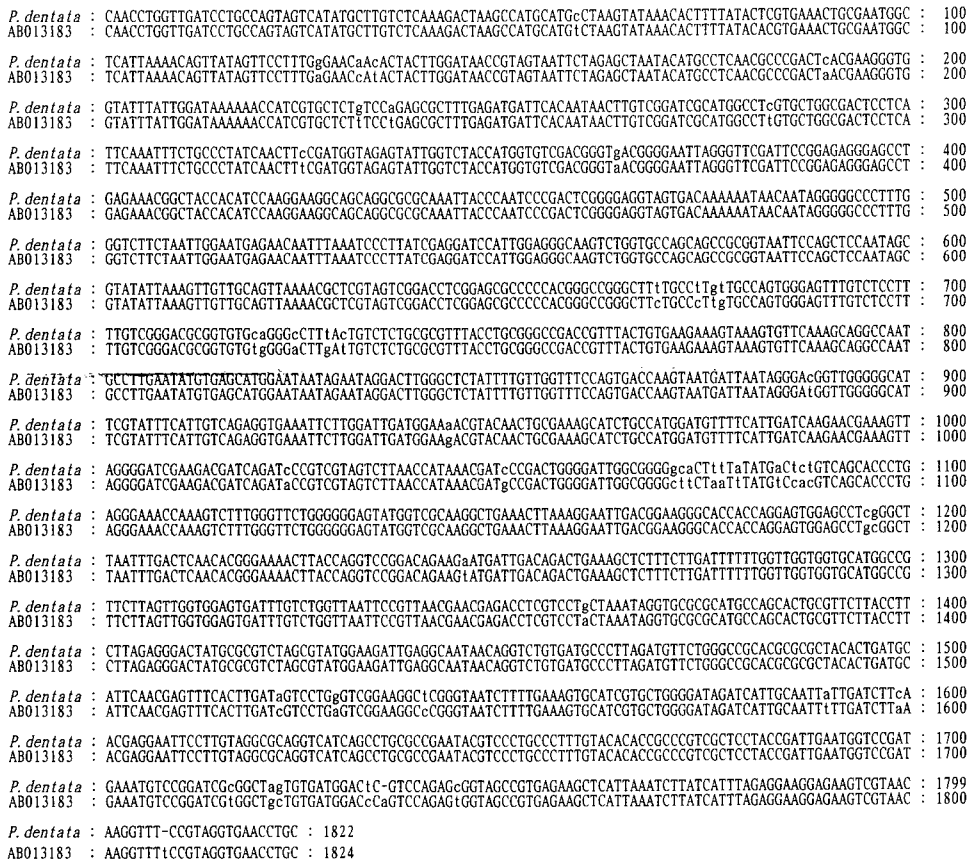


Fig. 3. Alignment of 18S rDNA exon sequence from *P. dentata* using clustal X program.

The *P. dentata* was collected at Wando, Chulanamdo, Korea. The AB013183 indicates the *P. dentata* in GenBank (NCBI accession number: AB013183). Numbers refer to nucleotide positions. Dots represent identity with the sequences. Dashes denote alignment gaps.

한국산 잇바디돌김 (*Porphyra dentata*)의 핵 18S rDNA 염기서열 분석

```

P. dentata : -----AaCGtaTgcAtTA--AAGCCCTCgtaaTAAAAaAAAAACAGCCGAGATG : 48
AB013183 : aacclagttccactcgtttctcgcctcgtctcgtgatgcgatgcaggcgcAcCGcTgGAgcAtcAAGCCCTC---gtTAAAA1AAAAACAGCCGAGATG : 97

P. dentata : TCTCTcTcTgGAA-----AGCACACcAtgcatGgGtTtGt--TcTCTcTgCaTgGcCGTgT-----GaaaaAggCgagTaGcCaa : 122
AB013183 : TCTCTcTcGgAaAgcaggTccggcaggtagAGCACACaAaagaGcGGcCaGcaTcTCTggGcTgTCCGcaTtTgcegccGtgetAttCtGtTtGcCtt : 197

P. dentata : acGatGgGaaAcCcGGCttggaAtaGtAACCag----CcacaGAGCCCCATCATAcACTTCTAAATTGcCGGGAGTGCcCGcGAGGCCTT-GACTACC : 217
AB013183 : gtGgaaCGcTAgCaGGCaagaATgGgAACcgttttCttttGAGCCCCATCATAcACTTCTAAATTGtCGGGAGTGCcCGcGAGGCCTTtGACTACC : 297

P. dentata : GCGGTCCCGCAGAGGTGAGaGCGAGCAATCGtTCAGGACGcAGCAGTGTACGTAgTGGTACATGGATGGTAAAAACGTCAAGGATAGGGTTGATCCGCA : 317
AB013183 : GCGGTCCCGCAGAGGTGAGgGCGAGCAATCGcTCAGGACGcAGCAGTGTACGTAAcGGTACATGGATGGTAAAAACGTCAAGGATAGGGTTGATCCGCA : 397

P. dentata : GGGAGCGCGAGTCCGCC----ATGgtCGTGGGCA-----AAGCGGAACCTTCAGAGACTCTAATGGAGTGGCGCGCAAGCTTAAGGG : 397
AB013183 : GGGAGCGCGGAATGCCGCCcaccATGtCGtTGGGCAAttgggggagggggcaAAGCGGAACCTTCAGAGACTCTAATGGAGTGGCGCGCAAGCTTAAGGG : 497

P. dentata : AGAGTCCAATCCAATGGAAACAGGTCCACAGcAGTAACGGGGtGaTGCTCCGCCAGAGGACTGTGGAAGGCAAcceccAccAAAaG----- : 485
AB013183 : AGAGTCCAATCCAATGGAAACAGGTCCACAGtAGTAACGGGGaGtTGCTCCGCCAGAGGACTGTGGAAGGCGAtaaAaaAAAaanaaggaccct : 597

P. dentata : -----GGTGTgtGTtGTtGTCCGGTAgcaATGG : 512
AB013183 : acgccaGGgTcctTGTcGTCCGGTAgcaATGG : 630
    
```

Fig. 4. Alignment of 18S rDNA intron sequences from *P. dentata* using clustal X program.

The *P. dentata* and the AB013183 are described in Fig. 3. Numbers refer to nucleotide positions. Dots represent identity with the sequences. Dashes denote alignment gaps.

고 찰

잇바디돌김은 우리나라 남, 서해안 및 제주도에서 조간대 상부 암반에 착생하여 생육한다. 본 종의 출현시기를 볼 때 12월에 나타나 이듬해 1월부터 생식세포를 형성하였으며 3, 4월에는 쇠퇴하여 비교적 짧은 기간동안 생육한다 (Hwang and Lee 2001[5]). 본 연구에서는 식물체의 채집시기가 너무 일러서 생식기관이 형성된 개체가 없었다. 그러나 본 종의 가장 큰 특징 중의 하나인 거치상 돌기가 어린엽체의 가장자리에 뚜렷하게 잘 발달되어 있었다.

우리나라 완도 지역산 잇바디돌김의 염기서열을 분석한 결과 18S rDNA의 exon 영역 크기는 1822 bp, intron 영역의 크기는 512 bp였다. 한국산 잇바디돌김과 일본산 잇바디돌김의 18S rDNA 염기서열을 비교할 때 exon 영역에서는 97.1%가 일치하였으나, intron 영역에서는 52.1%만이 일치하여 많은 차이를 보였다. 그리고 이 intron은 568번과 569번 염기사이의 upstream에 위치하며, 5'GTCCTGGTCCAGCAGCCG3'의 exon nucleotide splicing site에 intron 시작부위는 5'AAC 염기서열로서 알려진 다른 김 속들과 모두 동일하게 삽입되어져 있다(Kunimoto *et al.* 1999 [8]). 일본산 잇바디돌김에서는 downstream부분에 5'CAAGGT-TTCCGTA3' 사이에 5'-TTCCGTA로 시작하여 ACG3'로 끝나는 572 bp의 intron이 하나 더 삽입되어 있다. 따라서 intron의 경우는 같은 종이라 할지라도 지역에 따라 흔히 intron의 개수나 염기서열이 다른 것을 종종 발견할 수가 있으므로 (Kunimoto *et al.* 1999 [8]) 이같은 intron의 비교로는 김 종들을 비교하는 것은 불충분하다. 그러나 이러한

intron의 차이는 cultivar line을 추적하는데 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 판단된다. 이러한 18S rDNA 염기서열들은 앞으로 한국산 김의 유전자은행을 확립하여 유전자원으로서의 보존활용, 종묘 및 개체 수준에서의 종보존 체계를 확립하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

잇바디돌김(*Porphyra dentata*)을 대상으로 핵의 18S ribosomal RNA를 지령하는 유전자 즉 18S rDNA 유전자를 증폭하고, 염기서열분석을 수행하였다. 전체 18S rDNA의 exon 영역 크기는 1822 bp, intron 영역의 크기는 512 bp였다. 이들 exon과 intron 영역의 G+C 함량은 각각 49%와 55%씩 나타내었다. 일본산 잇바디돌김(GenBank accession number: AB013183)의 exon 영역과의 비교에서 상동성이 97.1%에 도달하였다. 568번과 569번 염기사이의 upstream에 위치하는 intron 영역에서는 AB013183과 52.1%의 상동성을 보였다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 1학기 부경대학교 연구년교수 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

2. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res. Inc.*, **25**, 3389-3402.
3. Bold, H. C. and M. J. Wynne. 1978. Introduction to the Algae. pp. 454, Prentice-Hall. Inc., New Jersey.
4. 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.
5. Hwang, M. S. and I. K. Lee. 2001. Taxonomy of the genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Korea. *Algae* **16**, 233-273.
6. Jeannmougin, F., J. D. Thompson, M. Gouy, D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci.* **23**, 403-405.
7. Korea Fisheries Association. 1997. Korean Fisheries Yearbook. pp. 583, Dong Yang Moon Hwa Press, Seoul.
8. Kunimoto, M., H. Kito, Y. Yamamoto, D. P. Cheney, Y. Kaminishi and Y. Mizukami. 1999. Discrimination of *Porphyra* species based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. *J. Appl. Phycol.* **11**, 203-209.
9. Nicholas, K. B., H. B. Nicholas Jr. and D. W. Deerfield. 1997. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW News* **4**, 14.
10. Park, J. W., Y. C. Cho, B. H. Nam, H. J. Jin, C. H. Sohn and Y. K. Hong. 1998. RAPD identification of genetic variation in the seaweed *Hizikia fusiformis*. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 62-64.
11. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. pp. 18-88, 2nd eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
12. Stiller, J. W. and J. R. Waaland. 1993. Molecular analysis reveals cryptic diversity in *Porphyra* (Rhodophyta). *J. Phycol.* **29**, 506-517.
13. White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322, In: Innis, M., J. Gelfand, J. Sninsky and T. White (eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Florida.

(Received May 24, 2002; Accepted August 9, 2002)