

<단 보>

Universal Rice Primer (URP)-RAPD 방법에 의한 어류 종 특이 marker의 동정

김우진* · 김경길¹ · 이정호 · 박두원

국립수산과학원 생명공학연구단, ¹국립수산과학원 거제수산시험장

Identification of Potential Species-Specific Marker in Several Fish Species by RAPD Using Universal Rice Primers

Woo-Jin KIM*, Kyung-Kil KIM¹, Jeong-Ho LEE and Doo-Won PARK

Biotechnology Research Center, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

¹Geoje Marine Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute, Geoje 656-842, Korea

Morphologically similar fish species were subjected to the random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis using universal rice primer (URP). The fish species tested were sea basses (*Lateolabrax japonicus* and *L. maculatus*), eels (*Anguilla japonica*, *A. bicolor bicolor*, *A. rostrata*, and *A. anguilla*), and flounders (*Limanda yokohamae* and *L. herzensteini*). Highly reproducible RAPD patterns were observed with several potential species-specific markers. The results indicate that RAPD technique using URP is useful for distinguishing fish species in a rapid manner.

Key words: RAPD, URP, Sea bass, Eel, Flounder

유전자 다형 분석인 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 방법은 실험조작이 간편하여 쉽게 DNA 다형성을 관찰할 수 있으며, 단 하나의 DNA 절편까지도 증폭되어 밴드로 나타낼 수 있을 정도로 그 감응도가 높기 때문에, 소량의 DNA만을 사용하여도 수행이 가능하므로 종 및 품종의 분자생물학적 분류 및 집단간 다양성 연구에 널리 이용되고 있다 (Williams et al., 1990, 1993). 그리고 이 방법은 대상생물의 자세한 유전정보가 알려져 있지 않아도 arbitrary primer 등을 사용하여 특정 유전자 부분의 증폭 및 증폭된 DNA 절편을 비교함으로써 쉽게 종간 혹은 개체간의 유전적 유사도를 구할 수 있다 (Patwary et al., 1994). 현재 많은 연구자들이 사용하고 있는 Operon primer (Operon Technologies, USA)는 10 mer로 구성되어 있으며, PCR 조건에서 annealing temperature가 36°C 전후로 낮아 비특이적인 반응으로 인해 실험의 재현성이 낮으며, 또한 많은 primer (수십개-수백개)들중 다형을 보이는 primer를 선정하는데 많은 시간과 노력이 소요된다. 이에 본 연구에서는 상기 문제점을 보완하기 위해 repetitive sequence로부터 제작된 (강 등, 1997) universal rice primer (URP)의 유용성을 평가하고자 하였다. 본 연구에 사용된 URP는 20 mer로 구성된 primer로 55°C 이상의 annealing temperature에서 PCR을 하기 때문에 실험의 재현성이 매우 높을 뿐만 아니라 다수의 밴드가 증폭되어 충분한 다형성을 확보하는데 유리하다. URP를 이용한 RAPD 분석은 농업, 식품 및 인체 등에 연관된 곰팡이, 버섯, 세균류 등 다양한 종들에서 종 및 종내

동정에 이용되고 있으며, 종 및 집단의 genotyping에 널리 이용되고 있다 (Kang et al., 1997).

본 연구에서는 실험장어 4종 (극동산 뱀장어, *Anguilla japonica*; 적도산 뱀장어, *A. bicolor bicolor*; 북미산 뱀장어, *A. rostrata*; 유럽산 뱀장어, *A. anguilla*), 농어 2종 (농어, *Lateolabrax japonicus*, 점농어, *L. maculatus*), 가자미 2종 (참가자미, *Limanda herzensteini*; 문치가자미, *L. yokohamae*) 등 형태학적 특징으로 구분이 어려운 종들을 대상으로 URP를 이용한 RAPD 방법으로 구분하고 특히 종 특이 marker를 탐색하고자 한다.

실험장어 4종은 국립수산과학원 진해내수면연구소에서, 점이 있는 농어는 국립수산과학원 거제수산시험장에서, 점이 없는 농어는 국립수산과학원 양식생물과에서, 점농어는 국립수산과학원 완도수산시험장에서, 그리고 문치가자미와 참가자미는 국립수산과학원 울진수산시험장에서 유지 또는 사육 중인 어체를 실험에 이용하였다. 근육의 genomic DNA를 Asahida et al. (1996)의 방법에 따라 분리하였으며, primer는 SRILS UniPrimer Kit (Seoulin Bioscience, Korea)를 사용하였다. PCR 반응은 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 50 ng genomic DNA, 200 μM dNTP, 10 μM primer, 1.0 u EX-Taq polymerase (Takara)가 포함된 총 20 μL 혼합액에서 수행하였다. PCR 조건은 처음 94°C에서 5분간 DNA를 변성한 다음, 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 elongation을 각각 35회 반복한 후, 최종 DNA 합성을 72°C에서 7분간 하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.8% agarose에서 전기영동한 후 ethidium bromide

*Corresponding author: wjkim@nfrdi.re.kr

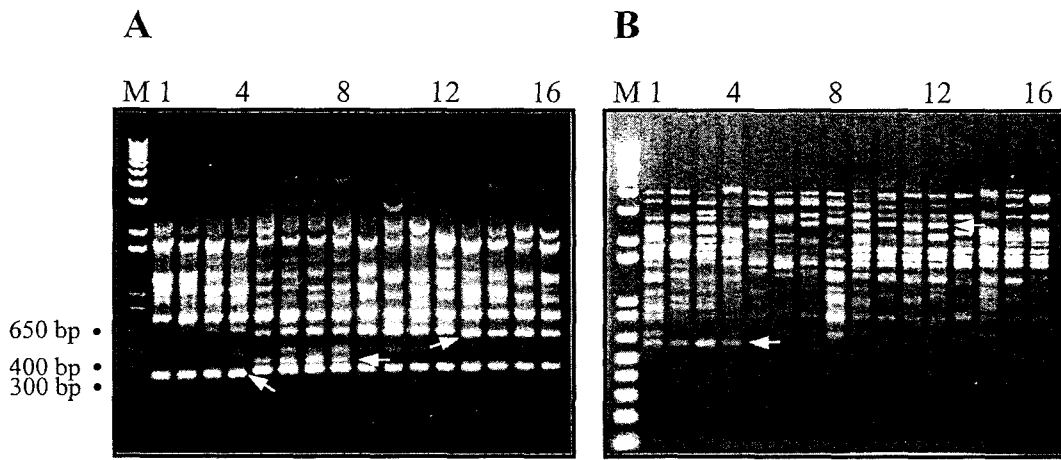


Fig. 1. The RAPD-PCR banding profiles of four eel species using two primers of arbitrary sequence, URP 4 (A) and 7 (B). A and B, lane M, 1 kb plus DNA ladder (Invitrogene). lane 1-4, *Anguilla japonica*; lane 5-8, *Anguilla bicolor bicolor*; lane 9-12, *Anguilla rostrata*; lane 13-16, *Anguilla anguilla*. Arrows indicate potential species-specific markers.

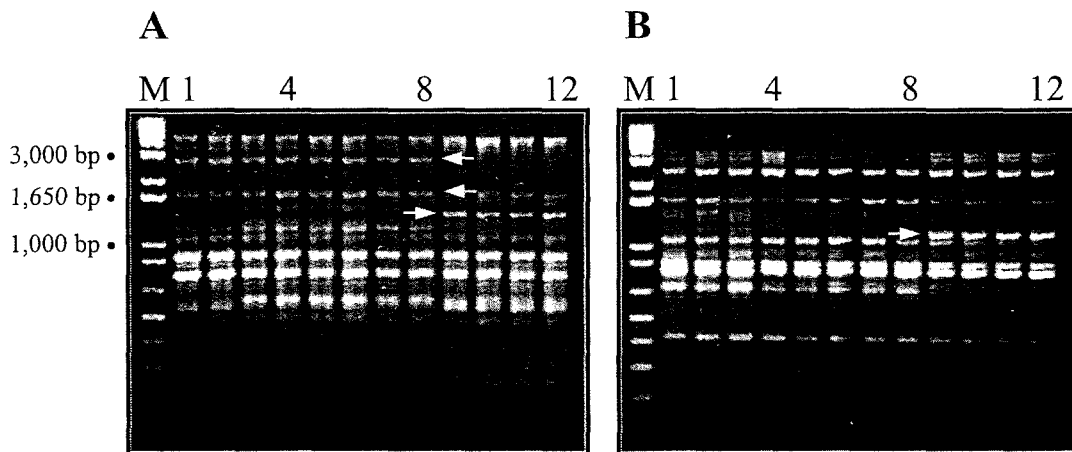


Fig. 2. The RAPD-PCR banding profiles of two sea bass species using two primers of arbitrary sequence, URP 3 (A) and 10 (B). A and B, lane M, 1 kb plus DNA ladder (Invitrogene). lane 1-4, *Lateolabrax japonicus* without black spots; lane 5-8, *Lateolabrax japonicus* with black spots; lane 9-12, *Lateolabrax maculatus*. Arrows indicate potential species-specific markers.

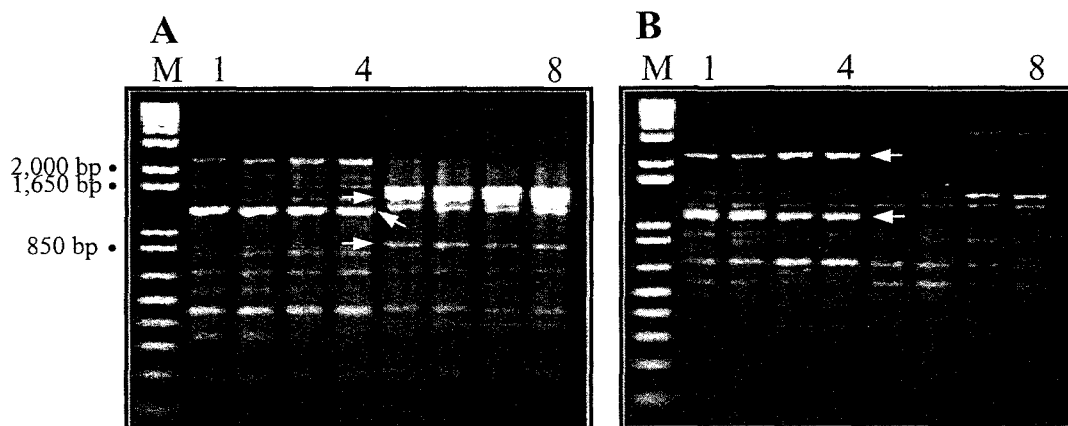


Fig. 3. The RAPD-PCR banding profiles of four eel species using two primers of arbitrary sequence, URP 2 (A) and 6 (B). A and B, lane M, 1 kb plus DNA ladder (Invitrogene). lane 1-4, *Limanda yokohamae*; lane 5-8, *Limanda herzensteini*. Arrows indicate potential species-specific markers.

용액에서 염색하여 UV lamp 하에서 DNA 밴드를 확인하였다. 그리고 종 특이 marker가 개체간 변이에 의해 나타난 결과가 아님을 나타내기 위하여 실험구당 각 종들을 4마리씩 분석하였다.

뱀장어류, 농어류, 가자미류에서 12개 URP에 의해 증폭된 DNA 절편의 크기는 200-4,000 bp로 매우 다양하였으며, 조사된 절편의 수는 primer, 종, 개체에 따라 다양하였다. 종 특이 marker를 탐색하기 위하여 실험장어 4종에서 RAPD-PCR에 의해 증폭된 절편들을 비교하였다. 사용된 12개 primer들중 URP 1, 4, 7, 8, 9, 10에서 중간 특이성을 보이는 절편 뿐만아니라 개체간에 다형이 관찰되었다. URP 4 (5'-AGGACTCGATAACAGGCTCC-3') 또는 7 (5'-GGTG-AACAGTGAGATGAACC-3')을 사용하여 증폭된 band pattern을 그림 1에 나타내었다. 그림 1A에서 보는 바와 같이 URP 4에 의해 증폭된 약 360 bp 절편은 *A. japonica*의 특이 band였고, 약 430 bp 절편은 *A. bicolor bicolor*의 특이 band였으며, 약 560 bp 절편은 *A. anguilla*의 특이 band로 관찰되었다. 또한 그림 1B에서 URP 7에 의해 증폭된 약 560 bp 절편은 *A. japonica*의 특이 band였으며, 약 2,700 bp 절편은 *A. rostrata*의 특이 band로 관찰되었다. *Anguilla* 속은 전세계적으로 19종이 알려져 있으며, 이들 종들은 몇몇 형태학적 특징으로 구분되고 있으나, 치어기에서는 형태학적 특징으로 구분하기는 매우 어려우며, 특히 *A. japonica*는 다른 종과 비교하여 뚜렷한 형태학적 특징을 가지고 있지 않다 (Tesch, 1999). Takagi and Taniguchi (1995)는 *A. japonica*, *A. bicolor bicolor*, *A. australis* 종을 대상으로 Operon primer를 이용하여 RAPD-PCR 방법으로 종 특이 marker를 조사하였다. *A. anguilla*와 *A. rostrata*는 형태학적으로 구분하기가 더욱 어려우며, 단지 척추골수에 의해서 통계학적으로 구분할 수 있다 (Schoth, 1982; Kang et al., 2000). *A. anguilla*는 척추골수를 111-118개 (평균 114.8)를 가지는 반면, *A. rostrata*는 척추골수를 105-108개 (평균 106.7)를 가진다. 그리고 Cytochrome b sequences와 16s rDNA sequence를 이용한 분자생물학적 비교에서도 이들은 매우 밀접한 관계를 가지고 있어, 이런 sequence를 이용하여 이들 종을 특이적으로 분류하기가 어렵다 (Aoyama and Watanabe, 2000). 그러나 본 연구에서는 URP 4와 URP 7을 이용한 RAPD-PCR 방법으로 *A. anguilla*와 *A. rostrata*를 구분할 수 있는 종 특이 marker를 확인할 수 있었다.

농어 2종 [농어, *L. japonicus* (점이 있는 농어 및 점이 없는 농어); 점농어, *L. maculatus*]에서는 URP 1, 3, 8, 10에서 중간 특이성을 보이는 절편뿐만아니라 개체간에 다형이 관찰되었다. URP 3 (5'-GTGTGCGATCAGTTGCTGGG-3') 또는 10 (5'-GATGTGTTCTTGAGCCTGT-3')을 사용하여 증폭된 band pattern을 그림 2에 나타내었다. 그림 2A에서 URP 3에 의해 증폭된 약 1,800 bp와 2,800 bp 절편이 *L. japonicus*의 특이 band로 관찰되었고, 약 1,300 bp 절편은 *L.*

*maculatus*의 특이 band로 관찰되었다. 그리고 그림 2B에서 URP 10에 의해 증폭된 약 1,200 bp 절편은 *L. maculatus*에서 만 특이적으로 관찰된 band 였다. 그러나 점이 있는 농어와 점이 없는 농어간의 차이를 보이는 특이 band는 관찰되지 않았다. Park (1996) 등은 allozyme 분석으로 점이 있는 농어와 점이 없는 농어가 유전적으로 다른 집단구조를 가진다고 보고한 바 있다. 이는 점이 없는 농어는 농어로, 점이 있는 농어는 점농어로 추정된다.

참가자미와 문치가자미는 지느러미 기부에 황색 무늬 무늬에 따라 서로 구분할 수 있지만 크기가 작은 경우에는 외관상으로 구분하기가 매우 어려우며, 또한 *Limanda* 속에 속하는 종들 중에서 형태학적으로 매우 유사한 종이다 (Kim and Youn, 1994). 참가자미와 문치가자미에서는 URP 2, 3, 4, 5, 6, 10에서 중간 특이성을 보이는 절편 뿐만아니라 개체간에 다형이 관찰되었다. URP 2 (5'-CCCAGCAACTGATCGCACAC-3') 또는 6 (5'-ATGTGTGCGATCAGTTGCTG-3')을 이용하여 증폭된 band pattern을 그림 3에 나타내었다. 그림 3A에서 URP 2에 의해 증폭된 약 1,200 bp 절편은 문치가자미의 특이 band로 관찰되었고, 900 bp와 1,400 bp는 참가자미의 특이 band로 관찰되었다. 그림 3B에서 URP 6에 의해 증폭된 1,200 bp와 2,200 bp는 문치가자미의 특이 band로 관찰되었다.

본 연구에서 URP에 의해 증폭된 종 특이 band는 5회 이상의 반복 반응에서 동일한 결과를 나타내었으며, 이러한 재현성은 58°C의 비교적 높은 annealing temperature에서 기인한 것으로 판단된다. 이는 Operon primer를 사용하여 생기는 낮은 재현성과는 대조적이었으며, 또한 적은 수의 primer (본 연구에서는 12개 primer)들을 이용하더라도 다형이 높은 primer들을 얻을 수 있었으며, 이로 인하여 실험에 소요되는 시간을 많이 단축할 수 있었다. URP를 이용한 RAPD-PCR 방법은 실험장어와 같이 형태학적으로 구분이 어려운 종들을 쉽고 정확하게 구분하는 데 유용하였으며, 또한 실험방법이 매우 간편하여 짧은 시간동안 많은 양의 시료를 분석할 수 있어 중간 구분 및 집단간 유전적 변이 조사 등 다양한 연구에 매우 효과적으로 이용될 것으로 판단된다.

사 사

본 연구에 사용된 실험장어와 점농어는 국립수산물과학원 진해내수면연구소와 완도수산시험장에서 각각 제공받았으며, 이를 제공해 주신 김이청 박사님, 강연중 박사님과 임상구 박사님께 감사드립니다. 또한 문치가자미와 참가자미를 제공해 주신 울진수산시험장의 이종관 장장님에게도 감사드립니다.

참 고 문 헌

Aoyama, J. and S. Watanabe. 2000. Discrimination of catadromous eels of genus *Anguilla* using polymerase

- chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the mitochondria 16S ribosomal RNA domain. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 129, 873-878.
- Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish. Sci.*, 62, 727-730.
- Kang, E.J., K.S. Kim, S.R. Park and S.G. Sohn. 2000. Species identification of Japanese, American, and European eel elvers, and changes in morphometric characters according to growth. *Kor. J. Ichthyol.*, 12, 244-249. (in Korean)
- Kang, H.W., Y.G. Cho and M.Y. Eun. 1997. DNA fingerprint of rice varieties (*Oryza sativa* L.) using primers designed from repetitive sequence of Korean red rice and its application to other organisms. 5th International Conference on Plant and Animal Genome. San Diego, CA, 81 pp.
- Kim, I.S. and C.H. Youn. 1994. Taxonomic revision of the flounders (Pisces: Pleuronectiformes) from Korea. *Kor. J. Ichthyol.*, 6, 99-131. (in Korean)
- Park, J.Y., K.K. Kim and Y. Kim. 1996. Genetic characterization of two types of sea bass, *Lateolabrax japonicus* in Korea by isozyme analysis. *J. Aquacult.*, 9, 437-444. (in Korean)
- Patwary, M.U. E.L. Kenchington, C.J. Bird and E. Zouros. 1994. The use of random amplified polymorphic DNA markers in genetic studies of the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). *J. Shellfish Res.*, 13, 547-553.
- Schoth, M. 1982. Taxonomic studies on the O-group eel larvae (*Anguilla* spec.) caught in the Sargasso Sea in 1979. *Helgolander Meeresunters* 35.
- Takagi, M and N. Taniguchi. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of three species of *Anguilla*: *A. japonica*, *A. australis* and *A. bicolor*. *Fish. Sci.*, 61, 884-885.
- Tesch, F.W. 1999. *Der Aal. Biologie und Fischerei*. Verlag Paul Parey, Hamburg.
- Williams, J.G.K., A.R. Kugelik, K.J. Livak, J.A. Rafolski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Acids Res.*, 18, 6351-6535.
- Williams, J.G.K., M.K. Hanafey, J.A. Rafolski and S.V. Tingey. 1993. Genetics analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.*, 218, 704-740.

2003년 1월 8일 접수
2003년 6월 7일 수리