

한국산 참김 (*Porphyra tenera*)의 핵 18S rDNA 염기서열 분석

Long-Guo JIN · 김명숙 · 최재석 · 조지영 · 진덕희* · 홍용기[†]
부경대학교 생물공학과, *강릉대학교 해양생물공학과

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

Long-Guo JIN, Myung-Sook KIM, Jae-Suk CHOI, Ji-Young CHO
Duck-Hee JIN* and Yong-Ki HONG[†]

Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
*Faculty of Marine Biotechnology, Kangnung National University,
Kangnung 210-702, Korea

Nuclear 18S ribosomal RNA gene (18S rDNA) from the aquaculturable seaweed *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta) was amplified using the polymerase chain reaction and its sequence was analysed. Complete 18S rDNA has an 1,822 bp exon and a 510 bp intron. The G+C contents of exon and intron were 48.68% and 54.90%, respectively. The exon sequence showed 99.6% homology to the GenBank accession number AB029880 of the Japanese *P. tenera*. The intron region that is inserted upstream between 568 and 1,079 showed 43.6% homology to the AB029880.

Key words: 18S rDNA, DNA sequence, Exon, Intron, *Porphyra tenera*, Seaweed

서 론

홍조류에 속하는 참김 (*Porphyra tenera*)은 방사무늬김 (*P. yezoensis*)과 더불어 양식방법으로 대량 생산되어온 산업적으로 매우 높은 가치를 가지고 있는 종이다. 우리나라에서 김의 생산량은 친해양식 총 생산량의 약 26%, 그리고 해조류 총 생산량의 약 30%에 달하는 풍부한 식량자원이다 (Ministry of Marine Affairs and Fisheries, 2000). 김속 (*Porphyra*)은 홍조식물문의 원시홍조강, 김파래과에 속하는 분류군으로 현재까지 70여종이 알려졌으며, 한국에서 14종이 보고되어 있다 (Lee and Kang, 1986; Hwang and Lee, 2001). 이같이 많은 종류들을 기존의 형태 및 생태적인 특성으로만 분류 혹은 구별한다는 것은 매우 힘들다. 따라서 최근에 분자생물학적 기법을 도입하여 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 방법에 의한 동정 (Stiller and Waaland, 1993), Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) 방법에 의한 동정 (Dutcher and Kapraun, 1994), Rubisco spacer 염기서열에 의한 분류 (Brodie et al., 1998), isozyme에 의한 종의 구별 (Hwang et al., 1998), 18S rDNA 염기서열에 의한 분류 (Yamazaki et al., 1996) 등의 방법들이 쓰이고 있다. 그중 특히 세포 핵 내에 존재하는 ribosomal RNA 지령의 유전자 (rDNA) 중에서 18S rDNA는 진화 속도가 매우 느리고 특정부분은 많은 생물체에 공통적으로 보존된 염기서열도 갖고 있으므로 종의 구별 등 분류학적 연구에 많이 쓰이고 있다 (Hillis and Dixon, 1991). 그러므로 본 연구에서는 한국산의 대표적인 양식 김 중의 하나인 참김을 대상으로 한 18S rDNA 유전자의 염기서열분석을 수행하여 한국산 해조류의 유전자 database 자료를 집적 화하며 또한 이를 기

준으로 하여 외국 종과의 유전자원을 비교 분석함으로써 유전자원으로서의 보존활용, 종묘 및 개체 수준에서의 종 보존 및 품종 확인 등의 기초자료로서 제공되는 것을 목적으로 한다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 참김 (*P. tenera* Kjellman)은 전라남도 완도군 당인리 해안 암반지역에서 전형적인 참김 형태의 엽체들을 채집하였다. 부착생물의 오염을 제거하기 위하여 엽체는 초음파세척기로 1분씩 2번 처리한 후 1% Betadine 용액에 1분간 담구었다가 멸균해수로 세척을 3회 반복하였다. 실온에서 4시간 동안 건조시킨 다음 실험에 사용될 때까지 -20°C에서 냉동보관 하였다 (Park et al., 1998). 건조보관 된 김 조직으로부터 DNA의 추출은 LiCl 방법 (Hong et al., 1995)에 따라 추출하였다. 이를 70% ethanol로 세척한 후 건조한 다음 300 µL의 증류수에 녹였다. 추출한 DNA는 Mini Fluorometer (Hofer, Model TKO 100)로 정량하였으며, PCR의 주형으로 사용하기 위하여 TE 완충용액으로 최종농도가 3 ng/µL되게 조정하였다. 유전자증폭반응 (PCR)은 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Co.)를 사용하여 수행하였다. 전체 18S rDNA 영역을 증폭하기 위하여 10가지 primer들을 6조합으로 사용하였다 (Table 1). 그중 일부는 Kunimoto et al. (1999)의 염기서열들을 바탕으로 18S rDNA의 intron 부분을 증폭시키기 위하여 알려진 exon 부분에서 비교적 보존적인 것으로 여겨지는 염기서열들을 선택하여 primer로 사용하였다. PCR 반응액은 25 µL당 1 µL의 template 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 완충용액, 1 µL의 12.5% Tween 20, 0.3 µL의 Taq DNA polymerase (5 u/µL) (Promega)를 첨가하였다. PCR 반응조건은 초기반

[†]Corresponding author: ykhong@pknu.ac.kr

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

Primer	Sequence	Reference
5'SSU	5'-CAACCTGGTTGATCCTGCCAG-3'	Stiller and Waaland, 1993
NS2'	5'-CACCAGACTGCCCTCCAATG-3'	In this study
F397	5'-CTGAGAAACGGCTACACAT-3'	Kunimoto et al, 1999
R1132	5'-GTCCGACTACGAGCGTTTTAACTG-3'	Kunimoto et al, 1999
NS3a	5'-CGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCA-3'	In this study
NS4	5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3'	White et al, 1990
NS5	5'-AACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3'	White et al, 1990
NS6	5'-GCATCACAGACCTGTTAATGCCTC-3'	White et al, 1990
NS7	5'-GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC-3'	White et al, 1990
3'SSU	5'-TGATCCTTCTGCGAGGTTACCTAC-3'	Stiller and Waaland, 1993

응을 94°C에서 5분간 시킨 다음, 94°C에서 1분간 DNA denaturation, 45°C에서 1분간 primer annealing, 72°C에서 2분간 DNA extension의 cycle로 35회 반응시키고 나서, 마지막으로 72°C에서 10분간 PCR 생성물들을 충분히 extension시켰다. 그 결과 PCR 생성물의 10 µL는 0.5 µg/mL의 EtBr가 포함된 2% agarose gel 상에서 0.5×TAE 완충용액 (20 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)으로서 100 V 전압으로 30분간 전기영동하였다. 전기영동을 한 다음, 원하는 DNA band만을 agarose gel에서 오려내어 DNA extraction kit (Boehringer Mannheim Co.)로서 DNA를 회수하였다. DNA ligation과 형질전환은 Invitrogen사의 Topo TA cloning kit의 방법에 따라 수행하였다. Plasmid 추출은 High Pure Plasmid Isolation Kit (Boehringer Mannheim Co.)에 따라 추출하였다. Plasmid를 추출한 다음, 원하는 PCR 생성물이 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 EcoR I 제한효소로 분해하여 DNA 삽입을 확인하였다. DNA 염기서열은 DNA Auto Sequencer (ABI PRISM 377, Perkin Elmer Co.)로 분석하였으며, 염기 상동성은 NCBI의 BLAST search 프로그램을 이용하여 비교하였다. Intron 영역은 알려진 홍조류들의 18S rDNA 염기서열들을 비교하여 추정적으로 동정하였다 (Hendriks et al., 1991). 전체 18S rDNA의 exon 및 intron 염기서열은 기존의 NCBI에 등록된 *P. tenera* AB 029880 품종을 대상으로 ClustalX 1.81 프로그램을 이용하여 정렬시켰고, alignment view는 Genedoc 프로그램을 사용하였다.

결과 및 고찰

본 식물체는 채집 해안 조간대 상부 또는 중부에 생육하고 있었고 그 체장은 5~13 cm 범위내였다. 식물체의 형태는 주로 장타원형이며 엽체의 가장자리에 파상무늬가 있고 거치상 돌기는 없다. 영양세포는 주로 불규칙하게 배열하고 표면에서 모나지 않은 사각형이다. 표면에서 본 가근세포는 타원형이다. 식물체의 암수 생식기관은 자동동주이며 정자낭반은 엽체 가장자리에서 먼저 나타나고 점차 엽체 내부로 발달한다. 과포자낭은 엽체 상부에 퍼져 있다. 따라서 이같은 기본 형태적인 특징으로 보아 본 식물체는 참김으로 우선 분류하였다. 본 참김의 18S rDNA 전체 염기서열을

증폭하고자 6 조합의 primer들을 사용하여 각각을 PCR반응시켰다. 그 결과 primer 5'SSU-NS2'조를 사용한 경우 568 bp 크기의 생성물이 증폭되었다. 그리고 primer F397-R1132조를 사용한 경우 753 bp 크기의 생성물, NS3a-NS4조를 사용한 경우 596 bp 크기의 생성물, NS5-NS6조를 사용한 경우 311 bp 크기의 생성물, NS7-3'SSU조를 사용한 경우 385 bp 크기의 생성물, NS5-3'SSU조를 사용한 경우 672 bp 크기의 생성물들이 각각 증폭되었다 (미발표자료). 이들 6가지 PCR 생성물들을 TA cloning vector인 pCR 2.1에 삽입하여 *E. coli* INVαF'으로 형질전환시켰다. 형질전환된 각 집락으로부터 plasmid를 추출한 후 제한효소 EcoR I으로 분해하여 PCR 생성물이 정확히 삽입된 것인지를 확인한 후 균체를 3 mL 배양하였으며 이들 재조합된 plasmid를 분리하여 DNA 염기서열을 분석하였다. 참김에 대한 18S rDNA 영역의 PCR 생성물들을 대상으로 한 전체 염기서열은 NCBI의 BLAST program을 통하여 비교하였다. 또한 intron 영역은 알려진 홍조류들의 염기서열과 비교하여 동정한 후 각각의 exon 및 intron 염기서열은 ClustalX 1.81 프로그램을 사용하여 정렬시켰다. 그 결과 Fig. 1과 같이 본 참김은 일본산 참김 (NCBI accession number AB029880) 과 전체 18S rDNA의 exon 영역에서 염기 8개의 차이를 가지고 있었으며 homology가 99.6%에 도달하였다. Treecon W 프로그램으로 작성한 phylogenetic tree 상에서도 본 참김은 다른 김 그룹과는 거리가 멀며 일본산 참김과는 bootstrap analysis를 1000번 반복하였을 때도 100% 가능성으로 동일하게 나타났다 (미발표자료). 이들 exon 영역의 G+C 함량은 한국산 48.68%, 일본산 48.52%로서 약간의 차이를 가지고 있으며 frameshift 변이나 염기결손 변이가 없이 전체 염기 크기는 1,822개로서 동일하였다. 염기차이는 transition 변이가 2곳, transversion 변이가 6곳에서 일어나 있다. 또한 일본산 참김과 비교할 때 본 연구에서 사용한 한국산 참김은 단지 upstream 부분에 exon 염기서열 568번과 1079번 사이 즉 GTCTGGTG-CCAGCAGCC 사이에 5'AAC로 시작하여 AATGG3'로 끝나는 510 bp의 intron만을 가지고 있다. 반면에 일본산 참김 (AB029880)은 972 bp의 intron을 가지고 있었으며 homology도 43.6% 밖에 되지 않았다 (Fig. 2). 또한 일본산 참김은 downstream부분에 exon 염기서열 2776번과 3560번 사이 즉 CAA-GGT-TTCCGT 사이에 5'TTCCGTA로 시작하여 ACG3'로 끝나는 783 bp의 intron이 하나 더 삽입되어 있다. 같은 종이라 할지라도 지역에 따라 흔히 intron의 개수나 염기서열이 다른 것을 종종 발견할 수가 있으므로 (Kunimoto et al., 1999) intron의 비교로는 김 종들을 비교분류하는 것은 불충분하다. 그러나 이러한 intron의 차이는 cultivar line을 추적하는데는 유용하게 쓰일 수 있을 것 같다. 그리고 참김은 방사무늬김과 함께 대량 양식이 이루어지며 유전적으로도 거리가 가까운 것으로 알려져 있으므로 장차 다양한 지역과 시기별로 다수의 개체를 대상으로한 유전분석이 필요할 것으로 사료된다. 이러한 18S rDNA 전체 염기서열들이 확보되면 앞으로 한국산 김의 유전자은행을 확립하여 유전자원으로서의 보존활용, 종묘 및 개체 수준에서의 종보존 체계를 확립하는 데에도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 여겨진다.



Fig. 1. Alignment of 18S rDNA exon sequences from the *P. tenera*. The sample was collected at rocky shore in Wando, Chulanamdo, Korea. The AB029880 indicates the *P. tenera* in GenBank (NCBI accession number AB029880). Numbers refer to nucleotide positions. Dots represent identity with the sequences. Dashes denote alignment gaps.

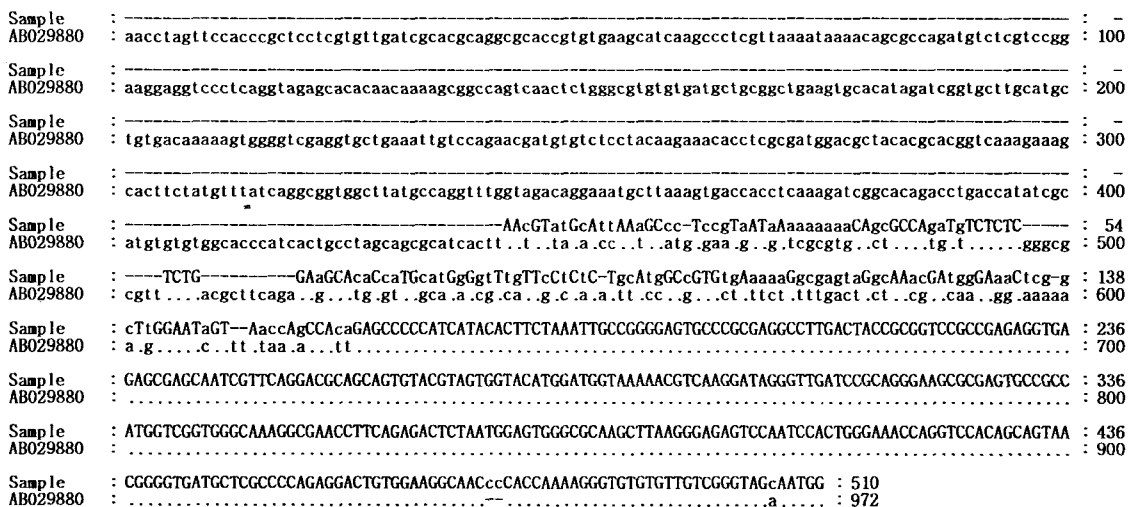


Fig. 2. Alignment of 18S rDNA intron sequences from the *P. tenera*. The sample and the AB029880 are described in Fig. 1. Numbers refer to nucleotide positions. Dots represent identity with the sequences. Dashes denote alignment gaps.

감사의 글

이 논문은 2002년도 1학기 부경대학교 연구년 교수 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- Brodie, J., P.K. Hayes, G.L. Barker, L.M. Irvine and I. Bartsch. 1998. A reappraisal of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiothales, Rhodophyta) in the northeast Atlantic based on the *rbcL-rbcS* intergenic spacer. *J. Phycol.*, 34, 1069~1074.
- Dutcher, J.A. and D.F. Kapraun. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, 6, 267~273.
- Hendriks, L., R. De Baere, Y. van De Peer, J. Neefs, A. Goris and R. Dewachter. 1991. The evolutionary position of the Rhodophyte *Porphyra umbilicalis* and the Basidiomycete *Leucosporidium scottii* among other eukaryotes as deduced from complete sequences of small ribosomal subunit RNA. *J. Mol. Evol.*, 32, 167~177.
- Hillis, D.M. and M.T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quart. Rev. Biol.*, 66, 411~453.
- Hong, Y.K., S.D. Kim, M. Polne-Fuller and A. Gibor. 1995. DNA extraction conditions from *Porphyrta perforata* using LiCl. *J. Appl. Phycol.*, 7, 101~107.
- Hwang, M.S., M.H. Han and I.K. Lee. 1998. Allozyme variation and species relationships in the genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Korea. *Algae*, 13, 447~459.
- Hwang, M.S. and I.K. Lee. 2001. Taxonomy of the Genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Korea. *Algae*, 16, 233~273.
- Kunimoto, M., H. Kito, Y. Kaminishi, Y. Mizukami and N. Murase. 1999. Molecular divergence of the *ssu rRNA* gene and internal transcribed spacer 1 in *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, 11, 211~216.
- Lee, I.K. and J.W. Kang. 1986. A check list of marine algae in Korea. *Kor. J. Phycol.*, 1, 311~325.
- Ministry of Marine Affairs and Fisheries. 1997~2000. Statistical Yearbook of Marine Affairs and Fisheries. Republic of Korea, pp. 1~1132, Cheongwoo Moonwhasa, Seoul (In Korean).
- 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.
- Stiller, J.W. and J.R. Waaland. 1993. Molecular analysis reveals cryptic diversity in *Porphyra* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 29, 506~517.
- 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., J. Gelfand, J. Sninsky and T. White eds., Academic Press, Florida, 315~322.
- Yamazaki, S., Y. Kitade, T. Maruyama and N. Saga. 1996. Phylogenetic position of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) based on the 18S rDNA sequence. *J. Mar. Biotechnol.*, 4, 230~232.

2002년 10월 15일 접수

2003년 1월 20일 수리