

넙치의 원산지 판별을 위한 ND-4 유전자의 다양성 분석

송인선¹ · 진덕희² · 최석정³ · 이석근*

강릉대학교 치과대학 구강병리과, ¹강릉대학교 동해안생명과학연구소, ²강릉대학교 생명대학 해양생명공학부, ³강릉대학교 자연대학 화학과

Received March 30, 2004 / Accepted August 8, 2004

Polymorphism Analysis of the ND-4 Gene for the Origin Determination of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. In Sun Song¹, Deuk-Hee Jin², Suk Jung Choi³ and Suk Keun Lee*. Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Kangnung National University, Gangneung, 210-702, Korea, ¹East Coastal Life Science Institute, ²Department of Marine Bioscience and Technology, College of Life Science, ³Department of Chemistry, College of Natural Science – In order to distinguish the genetic polymorphism among the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) obtained from East sea of Juminjin, aquaculture of Tongyoung and Geoje, and East sea of North Korea, the ND-4 and cytochrome b genes of olive flounder were divided into 5 regions. Each region was analyzed by degenerating gel electrophoresis scanning (DGES), and by subsequent DNA sequencing. The DGES disclosed characteristic DNA polymorphisms in ND-4-2 and ND-4-3 regions of olive flounder, which were also confirmed by the DNA sequencing. The olive flounders obtained from the different marine areas showed DNA mutations in ND-4-2 region (G390A, C402T, and A411G; GenBank: AB028664), and also showed frequent DNA mutations in ND-4-3 region (C515G, C537T, C538T, A567G, G714A, C736T, G756A, A759T, T817C, and T829G), while the cytochrome b gene showed no DNA mutation both in the DGES and DNA sequencing. These data suggest that the ND-4-2 and ND-4-3 regions are candidate loci to distinguish the origin of olive flounder, and that the DGES used in this study provided fast and reliable informations for the genetic polymorphism.

Key words – *Paralichthys olivaceus*, origin determination, DGES, sequencing

1995년 WTO (World Trade Organization) 체제로 전환되어 넙치를 비롯한 몇몇 유용 어종들이 보다 자유롭게 수입되고 유통됨에 따라 원산지 판별이 필요하게 되었다. 원산지는 통상적으로 외형적인 특징으로 판별하였으나, 수산물의 종류가 매우 다양할 뿐만 아니라 몇몇 종에서는 변형과 변색이 빈번해서 외형적인 특징만으로 판별하기 어려운 형편이다. 따라서 본 연구에서는 유용한 어종으로 잘 알려진 넙치를 선택하여 보다 근본적인 방법으로 이러한 원산지를 판별하기 위하여, 최근에 유전자의 다양성을 판별하기 위해 개발된 degenerating gel electrophoresis scanning (DGES) 방법을 사용하였다[4]. 넙치는 식용으로 많이 사용되므로 양식 산업이 잘 발달되어 있고, 넙치의 전체 mtDNA 염기서열이 GenBank에 이미 기록되어 있으며 넙치의 계통발생학적 연구가 활발히 진행되고 있으므로 본 연구를 보다 효과적으로 수행할 수 있었다.

DGES방법은 DNA 고유의 melting 속도의 차이를 이용하여 전기 영동시에 나타나는 degenerating DNA 밴드의 숫자와 이동 위치 이상을 관찰하는 방법이다. DNA 다양성을 알기 위하여 real time PCR (polymerase chain reaction)이 사

용되기도 하는데 real time PCR은 비록 그 방법이 매우 간단하고 정량적인 분석이 가능하지만 염기서열의 다양성 검색보다는 비교적 부정확한 결과를 보인다. 이에 비하여 DGES는 시험 방법이 다소 어렵지만 넓은 범위의 유전자를 동시에 검사할 수 있고 특정 유전자의 다양성을 일차적으로 조사하는데 효과적인 결과를 보인다[9]. 최근 들어, DGES 방법과 유사한 PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) 방법과 RFLP (restriction fragment length polymorphism)를 병행하여 세균의 군집생태에 대한 연구를 보고하였다[4]. RAPD (random amplified polymorphic DNA)는 DNA 다양성을 쉽게 검색할 수 있는 방법이지만[7,8] random 프라이머를 사용하는 만큼 PCR 생산 DNA의 특이성이 낮아서 유전자 염기서열의 변형을 정확하게 예측하기는 어렵다[5,6,10]. 그러나 RAPD는 짧은 시간과 적은 비용으로 다수의 유전자 DNA를 검색하기 위하여 간편하게 사용되기도 하였다[2,3,11].

본 연구에서는 해양생물의 원산지 판정법을 개발하기 위하여 염기서열이 잘 알려져 있는 넙치의 mtDNA에서 ND-4와 cytochrome b 유전자를 검색하였는데, 편의상 우리나라 동해안, 통영, 거제, 북한 등 4개 지역에서 얻은 넙치의 mitochondria DNA를 사용하였다. 이들의 DNA polymorphism을 관찰하기 위하여 DGES 방법을 이용하였으며, 보다 명확한 검증을 위하여 DGES에 사용된 PCR 생산 DNA를 사용하

*Corresponding author

Tel : +82-33-640-2228, Fax : +82-33-640-2079

*E-mail : sklee@kangnung.ac.kr

여 DNA 염기서열 분석을 병행하여, 넙치 원산지 판별을 위한 유의성 있는 기초 자료를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

넙치 표본 채취

본 연구에서는 주문진 근처 동해산 넙치와 북한 해역의 넙치 그리고 경상남도 통영과 거제에서 양식된 넙치를 사용하였는데 각각의 신선한 시료의 간장을 채취하여 -80℃에 냉동보관하였으며, 필요에 따라 일부를 적출하여 연구에 사용하였다.

Mitochondria DNA의 추출

각각 냉동 보관된 넙치의 간장에서 mitochondria DNA를 얻기 위하여 일반적인 세포 DNA 추출 방법을 사용하였다 (Qiagen, Germany). 약 70 mg의 간조직을 세절한 뒤, lysis 완충액 9.5 ml (800 mM guanidine HCl; 30 mM Tris-HCl, pH 8.0; 30 mM EDTA, pH 8.0; 5% Tween-20; 0.5% Triton X-100)와 RNase (100 mg/ml) 19 µl을 넣어 homogenize한 다음, 50 ml tube에 옮기고 proteinase K (20 mg/ml) 0.5 ml

를 첨가하여 잘 혼합한 후, 50℃에서 2시간 동안 용해시켰으며 Genomic-tip 100/G에 여러 번 여과시킴으로써 mitochondria DNA를 추출하였다(Blood & Cell Culture DNA Midi Kit, Qiagen, Germany). 추출된 DNA 용액에 0.7배의 isopropanol (3.5 ml)을 넣어 DNA를 침전시킨 다음, 75%에탄올 2 ml를 첨가하여 다시 한번 원심분리(5,000 g, 10분, 4℃)하였다. 원심분리 후, 침전물은 공기 중에서 건조시키고 적당량의 TE 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 1 mM EDTA, pH 8.0)을 첨가하여 DNA를 용해시켰다. 추출된 DNA는 파장 260 nM와 280 nM에서의 흡광도를 측정하여 농도와 순도를 확인하였으며, 정량된 DNA는 PCR의 주형 DNA로 이용하였다.

넙치의 ND-4와 cytochrome b 유전자 검색 및 프라이머 제작

Genbank 검색을 통하여 NADH dehydrogenase subunit 4 (ND-4, AB028664)와 cytochrome b (AF370628) 유전자에 대한 염기서열을 확인하고 약 250 bp 내외의 PCR 산물이 얻어지도록 프라이머 set를 고안하였다(Table 1 and 2). 충분한 양의 DNA를 얻기 위하여 여러 부위에서 프라이머 set를 고안하였으며, DGES 전기영동에서 DNA melting이 적당한 속

Table 1. PCR primer sequences for NADH dehydrogenase subunit 4 (ND-4)*

	primer	sequence	position
ND4-1	forward	CAACAGCCTGGCTGGTCAAA	38~57
	reverse	TGGCGGTTGATGGGTTCTGA	279~260
ND4-2	forward	TCAGAACCCATCAACCGCCA	260~279
	reverse	AAGCAATAGTAGGGCGACGA	505~488
ND4-3	forward	TCGTCGCCTACTATTGCTT	488~505
	reverse	CGTAGACAAATCGAGCCAGT	836~817
ND4-4	forward	ACTGGCTCGATTTGTCTACG	817~836
	reverse	TAGGTTGGCTAAGCTGGCAA	1105~1085
ND4-5	forward	TTGCCAGCTTAGCCAACCTA	1085~1105
	reverse	GCCTCAAATTAGCTCGGGTT	1371~1352

*: (GenBank accession: AB028664).

Table 2. PCR primer sequences of cytochrome b (cyto b)*

	primer	sequence	position
cyto b-1	forward	TTAGCCATACACTACACCTCA	14558~14578
	reverse	GTCCTCAGGGAAGGACGTAAC	14816~14796
cyto b-2	forward	GTTACGTCCTTCCCTGAGGAC	14796~14816
	reverse	TGCTGAGTCTGAATTC AATC	15056~15036
cyto b-3	forward	GATTGAATTCAGACTCAGACA	15036~15056
	reverse	TATCACTCGGGCTTGATATCC	15225~15205
cyto b-4	forward	CCATATCAAGCCCGAGTGATA	15205~15225
	reverse	GGAATGAAGCAACTTGTACCA	15478~15458
cyto b-5	forward	TGGTACAAGTTGCTTCATTCC	15458~15478
	reverse	GTTTAACGCTAGAATCCTAGC	15661~15681

*: (GenBank accession: NC_002386).

도로 지연되게 하기 위하여 각각의 sense 프라이머의 5' 말단 부위에 CCCGGG 염기서열을 부착시켰다. PCR 프라이머로 고안된 염기서열은 DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystem, USA)를 이용하여 제작한 다음, 에탄올과 3 M sodium acetate로 침전시켜 최종적으로 30 pM 농도로 만들어 사용하였다.

PCR을 이용한 유전자의 증폭

각각의 넙치 시료의 mitochondria DNA를 사용하여 PCR 방법으로 ND-4와 cytochrome b 유전자를 증폭시켰다[17]. PCR 반응액은 0.1 µg의 template DNA와 1× PCR 완충액 (100 mM Tris-HCl; pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% gelatin), 1 unit/µl *pfu* DNA polymerase (Qiagen, Germany), 200 mM dNTP와 100 pM의 각 프라이머를 섞은 반응총액 50 µl를 반응시켰다.

PCR 반응 조건은 94°C에서 5분 동안 초기 반응 후(initial-activation), 94°C에서 30초(denaturation), 60°C에서 30초(annealing) 그리고 72°C에서 30초(extension)의 3단계를 35회 반복하고 난 다음, 마지막 과정으로 72°C에서 10분(final-extension) 동안 반응시켰다(GeneAmp PCR System 6500, PE Biosystem, USA). 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 상에서 100 V로 40분간 전기영동한 다음, ethidium bromide (0.5 µg/ml)에 염색하여 Image Pro-4.0 (Media Cybernetics, MA, USA) analysis system으로 분석하였다.

Degenerating Gel Electrophoresis Scanning

본 연구에서 이용된 DGES는 two dimensional gel electrophoresis (TDGS; C.B.S Scientific, USA) 장치를 응용하였는데 multiplex PCR 대신 여러 종류의 어류에 대한 PCR DNA를 동시에 진행하기 위하여 원래의 TDGS에서 사용하는 수평 전기영동을 생략하고 수직 전기영동만을 하기 위한 comb을 제작하여 이용하였으며, 수직 전기영동을 위한 gradient denature gel을 만들었다. Gradient gel 조성은 90% urea-formamide (UF) solution (10% acrylamide/bis-acrylamide solution 37.5:1, 50× TAE buffer, 6.6 M urea, 36% deionized formamide: ddH₂O를 첨가하여 1 l를 만든다)과 30% UF solution (25% acrylamide/bis-acrylamide solution, 50x TAE buffer, 2.2 M urea, 12% deionized formamide: ddH₂O를 첨가하여 1 l를 만든다)으로 만들었으며, 각각을 오른쪽 chamber에는 90% UF solution 13 ml을, 왼쪽 chamber에는 30% UF solution 13 ml을 넣어 두 용액이 점차로 섞이면서 plate에 들어가도록 펌프를 이용하여 미리 제작된 plate에 넣고 acrylamide gel을 제작하였다.

Gel plate를 1× TAE 완충액이 들어있는 DGES 장치에 각각의 PCR 산물을 적당량(12 µl) 넣은 후 60°C 상에서 90 V로 약 15시간 동안 전기영동을 실시하였는데 PCR 산물 DNA는 전기영동 중에 충분히 변성되면서 이동하였다. 전기영동이

끝난 후, gel을 ethidium bromide (0.5 µg/ml)로 염색한 후 자외선 검출기와 Image Pro-4.0 (Media Cybernetics, MA, USA) analysis system으로 분석하였다.

DNA sequencing

각각의 넙치 mitochondria DNA를 이용한 DGES의 결과와 비교분석하기 위하여 DGES에 사용된 PCR 생산 DNA를 순수 분리하여, DNA를 0.5~1 µg/µl로 농축시킨 후에, 염기서열 검색을 시행하였다(ABI 3730XI, Macrogen Co. Seoul, Korea).

결 과

넙치 ND-4 유전자 DGES 분석

각각의 지역에서 얻은 넙치의 ND-4 유전자 변이가 있는지를 검색하기 위하여 ND-4 유전자를 5구역으로 나누어 DGES를 실시해서 degenerating DNA 밴드의 변화를 관찰하였다(Fig. 1A). ND-4의 첫째 구역(AB028664, 38-279)에서는 degenerating DNA의 다양성이 관찰되지 않았으며(Fig. 1A-R1), ND-4의 둘째 구역은 주문진 근해 동해산 넙치에서는 degenerating DNA의 다양성이 드물게 보이고(Fig. 1A-R2-1,2,3 lanes), 통영 양식산 넙치(Fig. 1A-R2-4,5,6 lanes)와 북한 해역 동해산 넙치에서(Fig. 1A-R2-10,11,12 lanes) degenerating DNA에서 다수의 다양성이 관찰되었다.

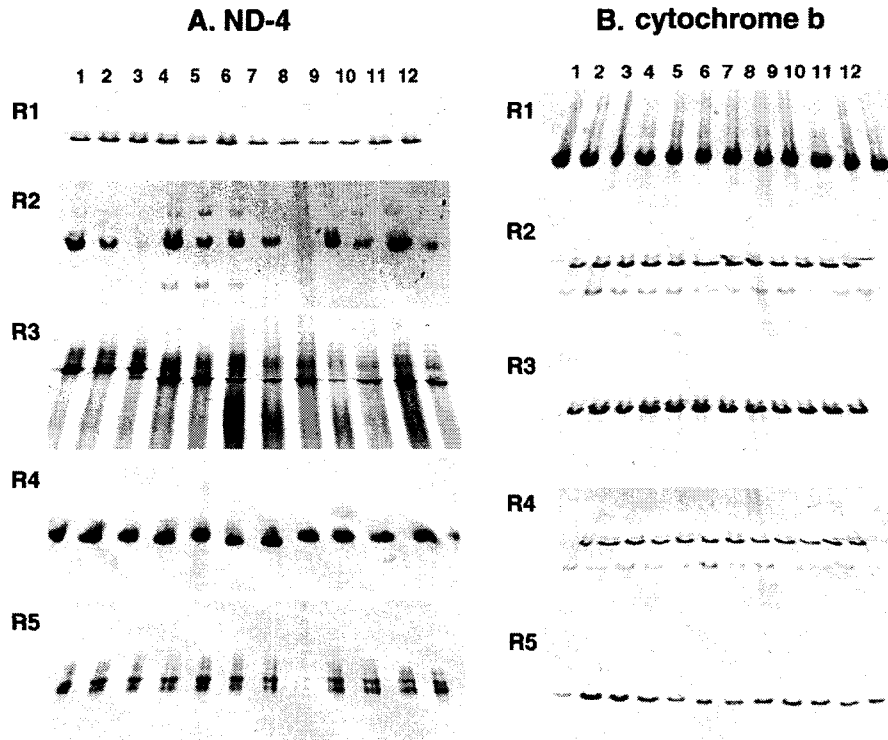
넙치 cytochrome b 유전자 DGES 분석

Cytochrome b 영역(NC_002386, 14408-15548)에서는 5개의 영역으로 나뉘어 PCR을 실시하였으며, 이를 바탕으로 DGES를 실시하였는데 5개의 영역에서 모두 동일한 밴드 분포를 관찰하였다(Fig. 1B, Fig. 5).

넙치의 ND-4 유전자의 DNA 염기서열 분석

넙치 ND-4 유전자의 DGES관찰에서 보이는 DNA 다양성을 확인하기 위하여 각 지역별로 대표되는 넙치의 mitochondria DNA를 사용하여 얻은 각각의 PCR 산물 DNA를 염기서열 분석하였다(Table 3). 그결과 ND-4-1 영역은 주문진 부근의 동해산 넙치, 통영 및 거제의 양식 넙치, 그리고 북한 해역 동해산 넙치의 ND-4-1 염기서열이 GenBank의 ND-4 (AB028664)의 일부영역에서 일치하는 염기서열을 보였다(Data not shown).

ND-4-2 영역에서는 GenBank의 넙치 ND-4 염기서열과 비교한 결과 거제의 양식산 넙치는 Genbank 기록과 일치하였으나 주문진 근해의 동해산 넙치와 통영 양식산 넙치들은 G390A와 C402T의 DNA 변이가 관찰되고 북한 해역의 동해산 넙치는 G390A, C402T 그리고 A411G의 DNA 변이가 확인되었다. 따라서 ND-4-2 영역에서는 ND-4 염기서열의 380-420 사이에만 DNA 변이가 나타났다(Fig. 2, Fig. 4A).



Lane 1, 2, 3; from East sea around Jumunjin, lane 4, 5, 6; from Tongyoung aquaculture
lane 7, 8, 9; from Geoje aquaculture, lane 10, 11, 12; from East sea of North Korea

Fig. 1. A. DGES for olive flounder mtDNA ND-4 and cytochrome b (cyto-b) genes. R1: ND-4-1 or cyto-b-1 region, R2: ND-4-2 or cyto-b-2 region, R3: ND-4-3 or cyto-b-3 region, R4: ND-4-4 or cyto-b-4 region, R5: ND-4-5 or cyto-b-5 region, lane 1-3: from East sea around Jumunjin, lane 4-6: Tongyoung aquaculture, lane 7-9: Geoje aquaculture, lane 10-12: East sea of North Korea.

Table 3. ND-4 gene* mutation of olive flounder obtained from different marine areas

marine area	ND-4-2 region	ND-4-3 region
East sea around Jumunjin	G390A, C402T	C515G, C538T, G714A, C736T, G756A, A759T, T817C
Tongyoung (aquaculture)	G390A, C402T	C515G, A567G, G756A, T817C, T829G
Geoje (aquaculture)		C515del, C537T, C538T, T829G
East sea of North Korea	G390A, C402T, A411G	C515G, C538T, G756A, T817C

*: (GenBank accession: AB028664).

ND-4-3 영역에서는 GenBank 의 넙치 ND-4 염기서열과 비교한 결과 주문진 근해의 동해산 넙치, 통영 및 거제의 양식산 넙치, 그리고 북한 해역의 동해산 넙치 모두 특징적인 DNA 변이가 발견되었다. 주문진 근해의 동해산 넙치는 C515G, C538T, G714A, C736T, G756A, A759T, 그리고 T817C의 DNA 변이가 있었으며, 통영의 양식산 넙치는 C515G, A567G, G756A, T817C, 그리고 T829G의 DNA 변이가 있었고, 거제의 양식산 넙치는 C515del, C537T, C538T, 그리고 T829G의 DNA 변이가 있었다. 한편, 북한 해역의 동해산 넙치에서는 C515G, C538T, G756A, 그리고 T817C의 DNA 변이가 있었다. 따라서 넙치의 ND-4-3 영역에서는 ND-4 염기서열 510-550 그리고 740-840 사이에 DNA 변이가

집중되어 나타났다(Fig. 3, Fig. 4B).

ND-4-4 영역에서는 주문진 근해의 동해산 넙치, 통영 및 거제의 양식 넙치, 그리고 북한 해역 동해산 넙치의 ND-4-4 염기서열이 GenBank의 ND-4 (AB028664)와 일치하는 염기서열을 보였다(Data not shown). 그리고 ND-4-5 영역에서는 주문진 근해의 동해산 넙치, 통영 및 거제의 양식 넙치, 그리고 북한 해역 동해산 넙치의 ND-4-5 염기서열이 GenBank의 ND-4 (AB028664)와 일치하는 염기서열을 보였다(Data not shown).

넙치 cytochrome b (cyt b) 유전자의 DNA 염기서열 분석
주문진 근해의 동해산 넙치, 통영 및 거제의 양식 넙치, 그

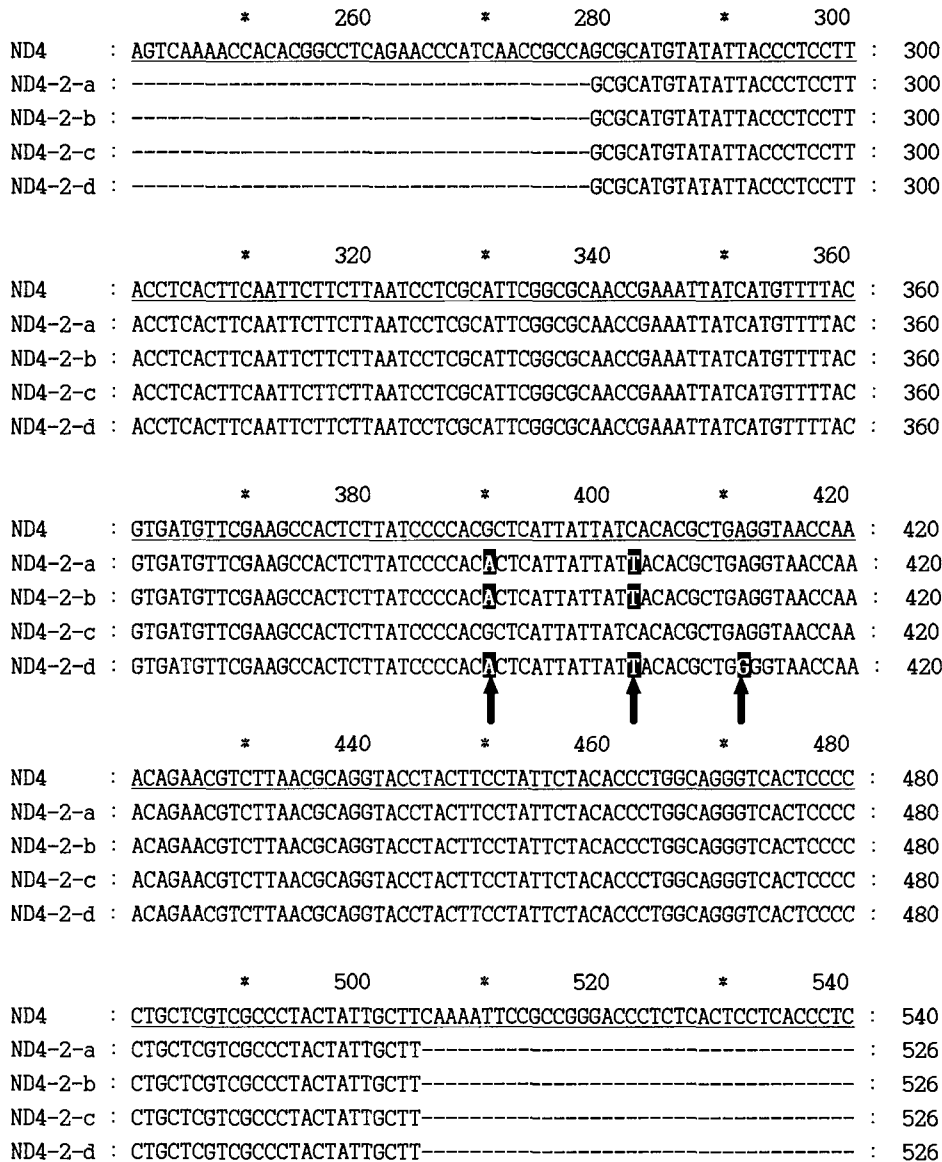


Fig. 2. Comparison of DNA sequences in ND4-2 region. a: from East sea around Jumunjin, b: Tongyoung aquaculture, c: Geoje aquaculture, d: East sea of North Korea.

리고 북한 해역 동해산 넙치의 Cyt b-1, 2, 3, 4, 5 영역의 PCR 생산 DNA를 염기서열 분석한 결과 GenBank에 기록된 cytochrome b (AF370628) 유전자의 염기서열과 동일한 염기서열을 보였다(Data not shown).

고 찰

DGES는 DNA 다양성의 특징을 이용하여 유전자 변이를 비교적 빠른 검색으로 쉽게 판별하는 방법으로 알려져 있는데[8], 그밖에 RAPD, RFLP 방법과 함께 이용될 수도 있다[18]. RFLP는 DNA 제한효소 염기서열에 변이가 생겼을 때 효과적으로 사용할 수 있지만, DGES는 모든 염기서열의 변이에 대해 광범위한 loci를 동시에 검색할 수 있다[1,16]. 한

편, RAPD는 개체의 염기서열이 알려져 있지 않더라도 특정 유전자에 한정하지 않고 간단히 random 프라이머를 이용한 PCR 산물의 변화를 관찰함으로써 유전자 다양성을 예측한다[12,18]. 특히 DEGS는 RAPD보다 재연성이 높은 특이한 degenerating DNA밴드를 얻을 수 있으므로 보다 적은 비용과 시간으로 정확한 DNA 다양성을 관찰할 수 있다[8].

본 실험에서 이용한 DGES 방법은 TDGS 방법을 응용한 것으로, 여러쌍의 프라이머들을 이용하여 multiplex PCR을 하는데 mitochondria DNA와 같은 커다란 유전자를 동시에 검색할 수 있다. 일반적으로 TDGS는 5~10개 정도의 multiplex PCR 산물을 수평 방향으로 전기영동을 실시한 다음 다시 DNA 크기별로 구분하기 위해 2차 수직 방향의 denature and gradient gel을 전기영동하여 각각의 단일 가닥의

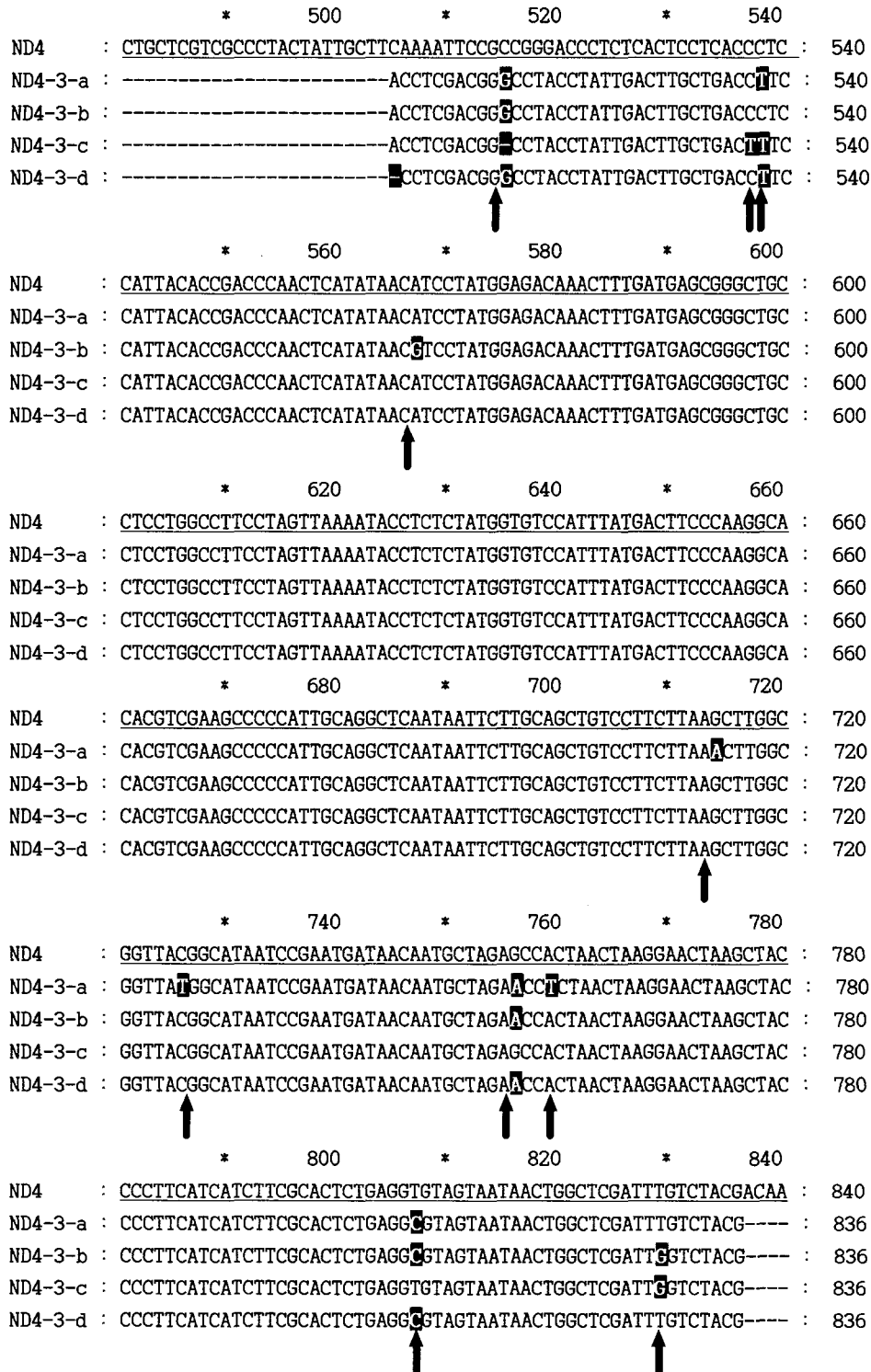


Fig. 3. Comparison of DNA sequences in ND-4-3 region. a: from East sea around Jumunjin, b: Tongyoung aquaculture, c: Geoje aquaculture, d: East sea of North Korea.

DNA (ssDNA)의 다양성을 구별할 수 있는 방법이다[9,15]. 본 연구에서는 Ham 등(2002)이 이용한 방법으로 TDGS 장치에서 특이적 DNA 다양성을 관찰하기 위한 것으로 4개 지역의 3개 샘플로 총 12개의 샘플을 하나의 gel에 동시에 진

행시켜 넘치 유전자에 존재하는 이형다양성을 관찰하였다. 본 실험도 60°C의 TEA 완충액 내에서 deionided formamide가 포함되어 있는 acrylamide gel을 이용하여 DNA melting과 denature가 이루어지게 되는데[13], 이를 효과적으로 실

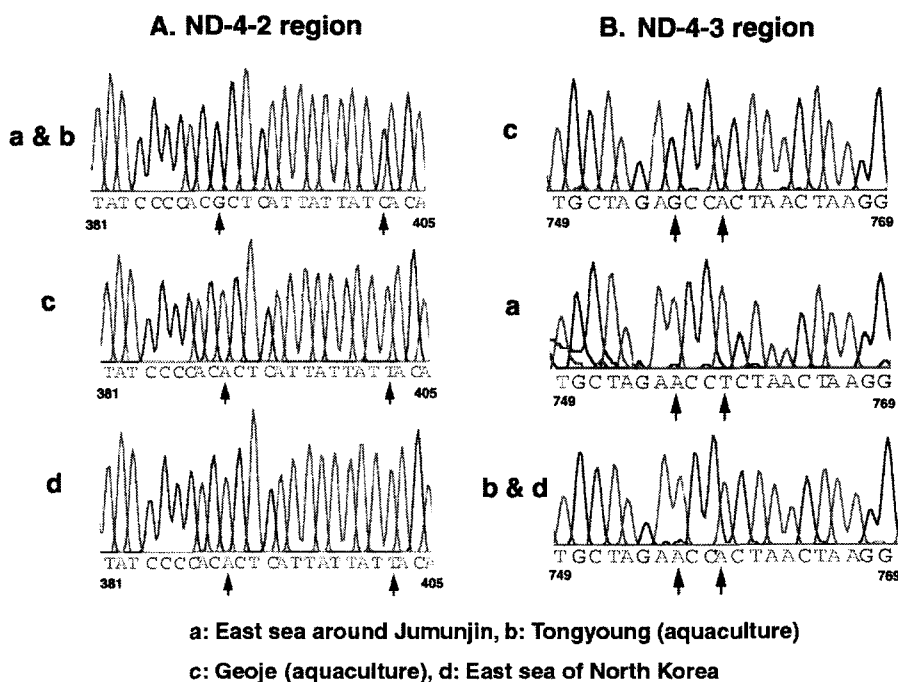


Fig. 4. DNA mutations in ND-4-2 and ND-4-3 regions. a: from East sea around Jumunjin, b: Tongyoung aquaculture, c: Geoje aquaculture, d: East sea of North Korea.

행하기 위하여, PCR에 사용되는 프라이머 5' 쪽에 GGGCCC의 염기를 첨가하여 DNA melting 속도를 조절하여 단일한 ssDNA에서 전이가 생긴 경우에 DNA melting 후, single strand conformation polymorphism으로 다른 지역의 샘플과 DNA 변이가 나타나므로 그 변이를 관찰할 수 있었다[9, 14]. 우선 각각의 DNA 영역을 개별적으로 PCR 한 후, 그 산물로 각각 DGES를 실시하였으나, 이 경우 이형다양성으로 판별하기 위해서 보다 많은 시간이 소요될 수 있으므로 본 실험에서는 우선 넙치의 ND-4와 cytochrome b 염기서열에서(AB028664, 38-1371) 5개 영역(ND4-1, 2, 3) PCR 산물을 한번에 DGES를 실시하여 밴드의 차이가 있는지를 먼저 알아보았으며(Fig. 1), 연이어서 DNA 염기서열을 확인함으로써 정확한 DNA 다양성을 판별할 수 있었다. 결과적으로 지역간 개체의 유전자 변이가 넙치의 ND-4 유전자에서는 ND-4-2와 ND-4-3 영역에서 집중적으로 관찰되었으며, 넙치의 cytochrome b 유전자에서는 지역간 개체의 유전자 변이가 발견되지 않았다.

넙치의 ND-4-2 영역의 유전자 변이는 먼저 DGES 검색으로 파악되었는데 거체의 양식산 넙치의 ND-4-2 DNA는 degenerating gel에서 전기영동의 이동 거리 변화를 보이지 않았으나 주문진 근해의 동해산 넙치, 통영의 양식산 넙치, 그리고 북한 해역의 동해산 넙치들에서는 모두 특이한 degenerating DNA band를 보였으며, 이들 DNA를 염기서열 분석한 결과 G390A, C402T, 그리고 A411G의 유전자 변이를 확인하였다. 특히 넙치의 ND-4-3에서는 매우 빈번한 유전자

변이가 발견되었는데, 우선 DGES 검색에서 매우 다양한 크기의 degenerating DNA band가 관찰되었고 이들 DNA들을 각각 염기서열 분석한 결과 ND-4-3 DNA 영역에서 C515G, C537T, C538T, A567G, G714A, C736T, G756A, A759T, T817C, 그리고 T829G 등의 빈번한 DNA 변이가 확인되었다. 반면에 본 연구에서 조사한 4 군데의 지역에서 얻은 넙치들은 ND-4-1, ND-4-4, 그리고 ND-4-5 영역에서 DNA 변이가 발견되지 않았으며, 넙치의 cytochrome b 유전자를 5 영역으로 나누어 조사하였으나 DGES와 DNA 염기서열 분석에서 모두 DNA 변이가 발견되지 않았다. 따라서 넙치의 유전자 다양성을 이용하여 넙치 원산지를 판정하기 위해서는 ND-4-2와 ND-4-3 영역을 검사하는 것이 적절하며, 본 연구에 사용된 넙치는 우리나라 해안의 4군데(주문진 해역, 통영과 거체의 양식장, 북한의 동해안)에서 얻어진 넙치로서 ND-4-2와 ND-4-3를 제외한 유전자 영역에서는 모두 일치되는 염기서열을 보였으므로 개체간 연관성이 매우 높은 것으로 추정된다. 결과적으로 넙치의 ND-4-2와 ND-4-3 영역은 유전적으로 개체간 유전자 변이가 쉽게 발생되어 질 수 있는 영역으로 추측된다.

유전자 변이를 검색하는 방법으로 결국에는 DNA 염기서열 분석을 통하여 확인하는 것이 가장 정확하고 확실한 방법이지만 염기서열 분석을 위한 시간과 경비가 많이 소요되어서 특정한 유전자의 위치(loci)를 모르는 경우에는 염기서열 분석을 시도하기 어려운 실정이다. 따라서 여러 종류의 유전자와 커다란 유전자를 신속하게 검색하기 위해서는

DGES와 같은 방법이 유용한데, 본 연구에서 얻은 결과를 자세히 분석하자면 DGES가 DNA 변이의 가능성을 예측할 수는 있지만 아직도 DGES의 degenerating DNA band 변화만을 보고 DNA 변이가 발생하였는가 정확하게 판정하기는 어려우며, 특히 여러 개의 DNA 변이가 생겼을 때는 몇 개의 DNA 변이가 발생하였는지를 예측할 수가 없다. 그러므로 DGES 방법은 유전자 변이를 쉽게 예측하는 방편으로 사용될 수 있으나 유전자 변이를 확인하기 위해서는 반드시 DNA 염기서열을 확인해야 할 것이다.

본 연구에서 사용된 DGES 방법은 비록 원래의 TDGS (two dimensional gel electrophoresis scanning) 방법을 개체간 DNA 검색에 맞게 고안한 것이며 DGES를 위하여 urea, formamide 등의 농도와 gradient gel의 농도, 그리고 PCR 프라이머 DNA의 고안 등에 대한 조건을 맞추기 위하여 반복적인 연구를 수행하여 최적의 상태를 얻었으나 아직도 degenerating DNA melting이 동일한 재연성으로 완전하게 구별되는 DNA band를 확인하기 위하여는 향후 보다 심도 있는 연구가 더 필요할 것으로 여겨진다. 아울러 이러한 연구기법의 개선은 해양생물은 물론 다른 종류의 개체들에서 genomic 또는 mitochondria DNA를 사용하여 각각의 원산지 판정하는 방법을 개발하는데 중요한 도움이 될 것이다.

요 약

주문진 근해의 동해산 넙치, 통영과 거제의 양식산 넙치, 그리고 북한 해역의 동해산 넙치를 이용하여 넙치 ND-4와 cytochrome b 유전자의 다양성을 관찰하기 위하여 DGES와 DNA 염기서열 검색을 병행하였는데, 각각의 다른 지역에서 얻은 넙치들은 ND-4-2와 ND-4-3 영역에서 특징적인 DNA 다양성이 있었으나 넙치의 cytochrome b 유전자에서는 지역간의 차이를 보이는 유전자 변이가 발견되지 않았다. 따라서 본 연구에서 넙치의 지역별 차이를 구별하는 원산지 판별에는 사용된 DGES와 DNA 염기서열 검색 방법이 효과적이었으며, 넙치의 유전자에서는 개체간의 변이가 ND-4-2와 ND-4-3 영역에서 구별되는 유전자 다양성이 관찰되었으므로, 넙치의 원산지 판정을 위한 유전자 검사에는 ND-4-2와 ND-4-3 영역의 검색이 필요하다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부의 Sea Grant 사업(2001년도)과 한국 과학재단 지정 강릉대학교 동해안 해양생물자원 연구센터(EMBR)의 연구비 지원(2002년)으로 수행되었다.

참 고 문 헌

1. Dollhopf, S. L., S. A. Hashsham and J. M. Tiedje. 2001.

Interpreting 16S rDNA T-RFLP data: application of self-organizing maps and principal component analysis to describe community dynamics and convergence. *Microb. Ecol.* **42(4)**, 495-505.

2. Gandrille, S., M. Goossens and M. Aiach. 1994. Scanning method to establish the molecular basis of protein C. deficiencies. *Hum. Mutat.* **4(1)**, 20-30.

3. Gao, Y. Q., M. Danciger, N. B. Akhmedov, D. Y. Zhao, J. R. Heckenlively, G. A. Fishman, R. G. Weleber, S. G. Jacobson and D. B. Farber. 1998. Exon screening of the genes encoding the beta- and gamma-subunits of cone transducin in patients with inherited retinal disease. *Mol. Vis.* **4**, 16-20.

4. Garbeva, P., L. S. Overbeek, J. W. Vuurde and J. D. Elsas. 2001. Analysis of edaphytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microb. Ecol.* **41(4)**, 369-383.

5. Ge, W., M. E. Davis, H. C. Hines and K. M. Irvin. 1999. Polymorphism in exon 10 of the bovine GHR gene detected by PCR-DGGE. *Anim. Genet.* **30(2)**, 167-168.

6. Gelfi, C., S. C. Righetti, F. Zunino, G. Della Torre, M. A. Pierotti and P. G. Righetti. 1997. Detection of p53 point mutations by double-gradient, denaturing gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* **18(15)**, 2921-2927.

7. Ghanem, N., E. Girodon, M. Vidaud, J. Martin, P. Fanen, F. Plassa and M. Goossens. 1992. A comprehensive scanning method for rapid detection of beta-globin gene mutations and polymorphisms. *Hum. Mutat.* **1(3)**, 229-239.

8. Gottardi, E., M. Losekoot, R. Fodde, G. Saglio, C. Camaschella and L. F. Bernini. 1992. Rapid identification by denaturing gradient gel electrophoresis of mutations in the gamma-globin gene promoters in non-deletion type HPFH. *Br. J. Haematol.* **80(4)**, 533-538.

9. Ham, S. Y., S. K. Lee, H. S. Han and D. H. Jin. 2002. DNA heteropolymorphism of Chum Salmon detected by denaturing gradient gel electrophoresis and real time PCR. *J. Korean Fish Soc.* **35**, 490-496.

10. Hamelin, R., N. Jago, P. Laurent-Puig, M. Vidaud, and G. Thomas. 1993. Efficient screening of p53 mutations by denaturing gradient gel electrophoresis in colorectal tumors. *Oncogene* **8(8)**, 2213-2220.

11. Hanekamp, J. S., W. G. Thilly and M. A. Chaudhry. 1996. Screening for human mitochondrial DNA polymorphisms with denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum. Genet.* **98(2)**, 243-245.

12. Johnston, D. A. and M. A. Fernando. 1995. Eimeria spp. of the domestic fowl: analysis of genetic variability between species and strains using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and denaturing gradient-gel electrophoresis. *Parasitol. Res.* **81(2)**, 91-97.

13. Kam, L. and T. Edward. 2001. Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage; molecular analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA. *FEMS Microbiol. Ecology* **38**, 169-177.

14. Mette, H. N. and B. R. Niels. 2002. Denaturing gradient

- gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Methods* **50**, 189-203.
15. Nico B, D. W. Wim, V. Villy and M. T. Eva. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecology* **39**, 101-112.
 16. Popescu, T., M. Blazkova, L. Kozak, G. Jebeleanu, A. Popescu. 1998. Mutation spectrum and phenylalanine hydroxylase RFLP/VNTR background in 44 Romanian phenylketonuric alleles. *Hum. Mutat.* **12(5)**, 314-319.
 17. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239(4839)**, 487-491.
 18. Theelen, B., M. Silvestri, E. Gueho, A. van Belkum and T. Boekhout. 2001. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEM Yeast Res.* **1(2)**, 79-86.