

피조개, *Scapharca broughtonii* Schrenck RFLP 마커 개발

조은섭* · 정춘구 · 김철원 · 손상규

국립수산과학원 남해수산연구소

Received October 11, 2005 / Accepted November 14, 2005

Development of Molecular Detection Marks Using PCR-RFLP Technique for Arkshell (*Scapharca broughtonii* Schrenck). Eun Seob Cho*, Choon Goo Jung, Chul Won Kim and Sang Gyu Sohn. *South Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, Yeosu 556-823, South Korea* – This study was differentiated between Korea and China arkshells using PCR-aided RFLP method which could identify the variation for inter-and intra-species of arkshell (*Scapharca broughtonii* Schrenck) at the level of DNA. The DNA fragment patterns were compared after digesting gene of mitochondrial 16S rDNA with 8 kinds of restriction enzymes. A 720 bp DNA fragment corresponding to 16S rDNA gene was amplified by PCR with primers ArkF-3 and ArkR-3. PCR products were cut by restriction enzymes (*PvuII*, *BamHI*, *HinfI*, *HaeIII*, *EcoRI*, *RsaI*, *Ksp221*, and *BstX21*), and RFLP pattern was studied. A unique 275 bp DNA band was observed in the samples from Dukyang, Gamak, Namhae, Jinhae, and Taean in Korea when treated by *HinfI*, but Chinese arkshell did not show. Treatment of *HaeIII* could discriminate the sample of Namhae and Jinhae from Dukyang/Gamak/Taeon, as well as Korean and Chinese arkshell based on a 700 bp. However, *PvuII*, *BamHI*, *EcoRI*, *RsaI*, *Ksp221*, and *BstX21* showed the same of 700 bp band in Korean and Chinese arkshell. The phylogenetic tree inferred from PCR-RFLP pattern comparison in Korean arkshell was different that the distance between Dukyang/Gamak/Taeon and Namhae/Jinhae was approximately 7. In particular, the distance between Korean and Chinese arkshell was 25. Consequently, *HinfI* and *HaeIII* played an important role in a reliable molecular tool for rapid discriminating Korean and Chinese arkshell, as well as a intra-species in Korea.

Key words – arkshell, molecular tool, PCR-RFLP, restriction enzyme

피조개, *Scapharca broughtonii* Schrenck는 돌조개과(Arcidae)에 속하며 한국뿐만 아니라 중국, 일본 내만에 주로 서식하는 종으로[5], 우리나라 조개류 양식산업 중 굴과 더불어 매우 중요한 유용수산생물이며 오랜 양식역사를 가지고 있다. 그러나 인구증가와 산업화의 발달로 피조개 양식어장이 오염되고 연작으로 인한 생산량 감소로 많은 어려움에 당면해 있다. 더욱 큰 문제는 피조개 인공종묘생산 기술개발로 경제적으로 대량생산을 할 수 있으나, 유전학적으로 보면 동일한 모태 유전자형의 유입으로 집단내의 유전자 다양도가 떨어지고 점차 유전적 열성화로 진행 될 수 있다. 그러나 여기에 관한 기초 유전학적 연구는 양식기술 연구에 비하여 많이 미약하다. 최근, 국내산 피조개의 유전자 다양도 지수가 중국산에 비하여 떨어지는 이유를 인공양식에 의한 inbreeding으로 설명하고 있다[6]. 앞으로 우리나라 연안에 서식하고 있는 피조개의 유전적 양상은 지리적 격리에도 불구하고 natural hybridization보다 artificial hybridization으로 집단내의 유전자 다양도가 떨어지고, 집단과 집단간의 유전자 거리도 낮아질 가능성도 많다. 따라서 피조개의 제반형질에 관한 유전형상 규명과 유전자원의 수집, 분류 및 평가의 중요성이 대두

될 수 있고, 품종육성을 위한 중요형질의 선발 기술에 대한 사항도 주요 관심사항으로 떠오를 수 있다. 가장 기본적인 사항으로 분류의 객관성과 정확성을 기하기 위하여 이 분야의 새로운 방법을 개발 이용하는 것이 중요한 사항이다.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)는 제한효소로 절단 부위의 위치를 변화시켜 유전자의 삽입, 결실, 재배열 등의 변화를 알 수 있기 때문에 동물이나 식물 유전학에 유용한 정보를 제공하고 있다. 또한 유전자의 발현부분(exon) 뿐만 아니라 비발현 부위(intron)와 근접부위(flanking region)의 변화를 알 수 있다. 특히 DNA 염기서열상 자연 돌연변이에 의한 염기 하나의 차이로도 유전자 변이를 식별할 수 있다. 이러한 RFLP 장점을 이용하여 부패균의 신속한 확인[4], 누에 마커 개발[3], 한우의 유전자형 변이[7,9], 인삼 DNA 분석[11] 등 다양한 분야에 적용하고 있다. Lee et al. [6]은 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)에 의한 DNA 절편으로 중국산과 한국산과의 유전적 차이점을 조사한 바 있고, Lee and Kim [8]도 미토콘드리아의 cytochrome c oxidase subunit I (COI) 부위를 증폭시켜 RFLP로 *S. broughtonii*와 형태적으로 매우 유사한 *S. satowi* Dunker, *S. subcrenata* Lische 종 구분에 매우 유용한 도구라고 언급한 바 있다.

RFLP 분석 시 probe 선발이 선행되어야 하는 제한 때문에 최근에는 특정부위를 증폭시켜 제한효소를 이용하여 DNA

*Corresponding author

Tel : +82-61-690-8959, Fax : +82-61-686-1588

E-mail : eun-5657@hanmail.net

단편 양상을 조사하고 있다. 미토콘드리아 DNA (mtDNA)는 핵 DNA 보다 진화속도가 빠르고 모계유전 특성 때문에 유전학적 계통연구에 많이 사용되고 있는 관계로[2,10], 이 실험에서도 mtDNA의 16S rRNA gene을 여러 제한효소로 절단하여 그 양상을 조사하여 한국산과 중국산 피조개의 species-specific molecular marker을 개발하는 것이다. 피조개의 종내(intra-species)와 종간(inter-species)의 mtDNA 다형현상 분석을 통한 계통유전학적 유연관계를 분석하고, 차후 유전적 열성화를 대비한 품종개량을 위한 열성 유전자를 분리 및 품종 다양성을 검토하기 위한 기초연구의 일환으로 genome DNA의 특성을 조사 할 수 있는 marker 개발이 필수적이므로 이에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

피조개

피조개 mtDNA sample은 득량만(St. 1), 가막만(St. 2), 남해(St. 3), 진해(St. 4), 태안(St. 5) 및 중국 산둥반도(St. 6)에서 채집한 것을 대상으로 하였다(Fig. 1). Sample 구입은 가막만, 태안, 남해는 2004년 12월에, 득량만과 중국산은 2005년 1월, 진해는 2005년 3월에 각각 양식 현장에서 직접 구입하였다.

Genomic DNA 분리 및 정제

피조개의 total DNA의 분리 및 정제는 Asahida et al. [1]의 방법을 따랐다. 피조개 혈액 100 ml에 TNEs-Urea buffer (8 M urea, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS)에 완전히 용해시켜 proteinase K (20 mg l⁻¹) 3 µl 첨가하여 37°C에서 overnight incubation 시켰다. phenol:chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) 추출방법으로 DNA를 정제하였다. 에탄올 처리 후 DNA pellet를 멸균 처리된 증류

수에 녹여 PCR에 이용하였다.

PCR에 의한 mtDNA 증폭

피조개 mt16S ribosomal DNA gene 증폭을 위하여 forward로는 GenBank AF305058의 1-14번 부위와 reverse로는 751-764번 부위를 선택하여 primer design program (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi/primer>)과 같이 이용하였다. 그 염기서열은 다음과 같다.

Forward primer (ArkF-3): 5'-CGCCTGTTTATCAAA-3'
Reverse primer (ArkR-3): 5'-CTGGGGCTGAAGTCG-3'

PCR 반응액은 20-60 ng의 template DNA, primer 각 20 pmol, dNTPs 0.5 mM, 1.25 unit Taq DNA polymerase (FastStar Taq DNA polymerase, Rhoche Co.)와 10 × PCR reaction buffer (Rhoche Co.)를 혼합하여 최종 25 µl가 되도록 하여 Thermal cycler (iCycler, Bio-Rad)에서 반응시켰다. PCR은 95°C에서 5분간 denaturation을 실시하고, 95°C 1분, 55°C 30초, 72°C 2분씩 35 cycles를 수행하였고 그 후 72°C에서 7분간 extension을 실시한 후 종료하였다.

RFLP 분석

8 종류의 제한효소(*PvuII*, *BamHI*, *HinfI*, *HaeIII*, *EcoRI*, *RsaI*, *Ksp22*, *BstX21*)가 16S rRNA RFLP 분석에 이용되었다. PCR product 2.5-3.0 µl에 각각의 제한효소 5-10 unit와 reaction buffer를 첨가하여 최종 volume이 5 µl 되도록 하여 24시간 37°C에서 배양하였다. 제한효소로 절단된 DNA 단편을 2.0% agarose gel에 전기영동하여 분리한 후 pattern을 분석하였다.

Similarity 분석

PCR-RFLP 분석 data를 이용하여 우리나라산과 중국산 피조개간의 유전적 관계를 SPSS ver.10.0 program을 사용하여 Euclidean distance method로 분석하였다.

결과 및 고찰

Fig. 2는 mtDNA의 16S rRNA region을 PCR한 결과를 확인한 것으로, 득량, 가막, 남해, 진해, 태안 및 중국 산둥반도에서 양식되는 피조개 모두가 거의 비슷한 720 bp 단일한 band를 보였다. PCR product를 *HaeIII* 처리시 득량, 가막, 태안산에서는 모두 restriction site를 갖지 않고 700 bp에서 유사한 1개의 band가 나타났으나, 남해와 진해산의 절단 pattern은 700 bp의 위치에서 다소 희미하지만, 득량, 가막, 태안과는 상이한 fragment가 보였다(Fig. 3a). 또한 중국산도 700 bp 위치에선 한국산과는 구별이 식별될 수 있는 위치에서 절단이 나타났다. *HinfI*는 다른 제한효소와 달리 1개의 절단부위를 인식하여 한국산에서는 모두 275 bp 단편이 보였으나,

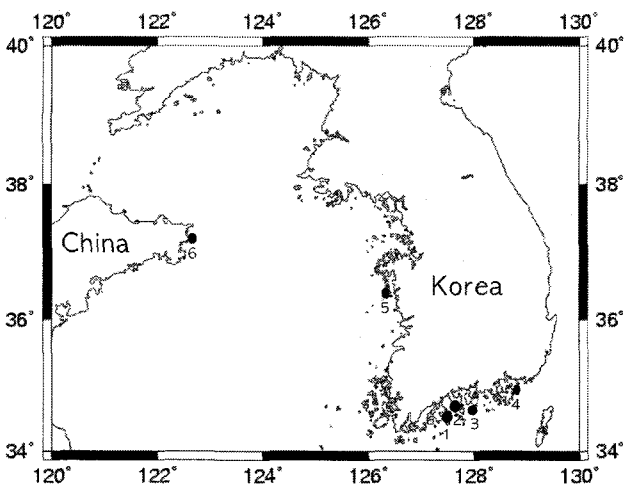


Fig. 1. Map of sampling sites for arkshell. 1: Dukyang; 2: Gamak; 3: Namhae; 4: Jinhae; 5: Taean; 6: Sangdong.

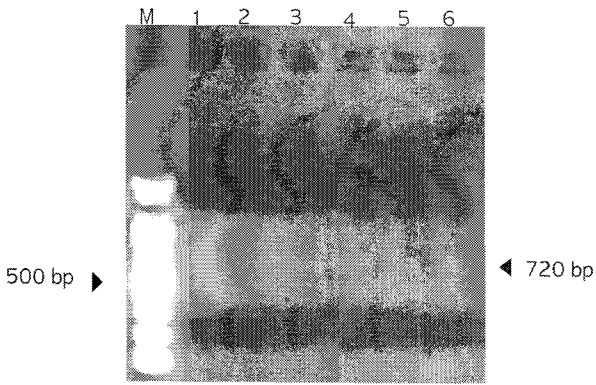


Fig. 2. Separation results by agarose gel electrophoresis of the PCR products obtained from the 16S ribosomal RNA gene in mitochondria of arkshell. Lane: M, 100 bp size marker; 1, Dukyang; 2, Gamak; 3, Namhae; 4, Jinhae; 5, Taean; 6, Sandong.

중국산은 700 bp 단일 band만 나타났다(Fig. 3b). SPSS program을 이용하여 restriction type에 의해 작성된 한국산과 중국산의 유연관계는 거리가 25로 나타났고, 한국산 내에서도 득량, 가막, 태안은 남해과 진해와의 거리가 7 정도로 나타났다(Fig. 4).

일반적으로 mtDNA에 대한 PCR-RFLP는 많은 개체를 빠른 시간에 수행할 수 있어 계통유전학적 연구에 있어서 어느 정도 유용한 방법으로 생각되나 polymorphism의 탐색에는 한계가 있는 것으로 판단된다. 그러나 좋은 molecular marker 만 있으면 종간 혹은 종내의 구분을 아주 손쉽고 간편하게 처리할 수 있다. 이 실험에서 보여준 피조개 mtDNA의 16S rRNA gene에 대한 *HinfI* 처리는 형태학적으로 거의 유사한 중국산과 한국산을 신속하게 동정할 수 있을 것으로 보여, 앞으로 DNA 염기서열을 분석·비교하는 방법을 대신할 수

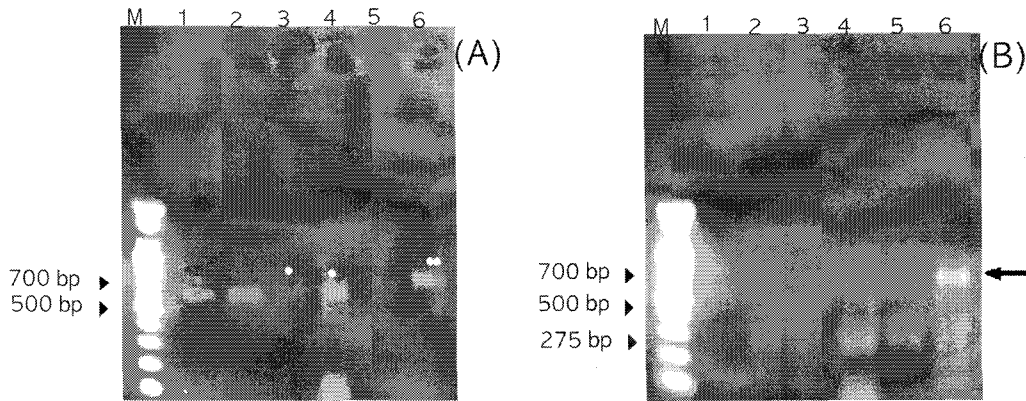


Fig. 3. Analysis of restriction fragment patterns of PCR products obtained from the 16S ribosomal RNA gene in mitochondria of arkshell using *HaeIII* (A) and *HinfI* (B) restriction enzyme. Lane: M, 100 bp size marker; 1, Dukyang; 2, Gamak; 3, Namhae; 4, Jinhae; 5, Taean; 6, Sandong. All the PCR products didn't be digested by *PvuII*, *BamHI*, *EcoRI*, *RsaI*, *Ksp221*, and *BstX21*. Single asteroid means a species-specific DNA fragment exhibited by Dukyang/Gamak/Taeon and Namhae/Jinhae arkshell. Arrow and double asteroid indicate a species-specific DNA fragment which was shown by Korean and Chinese arkshells.

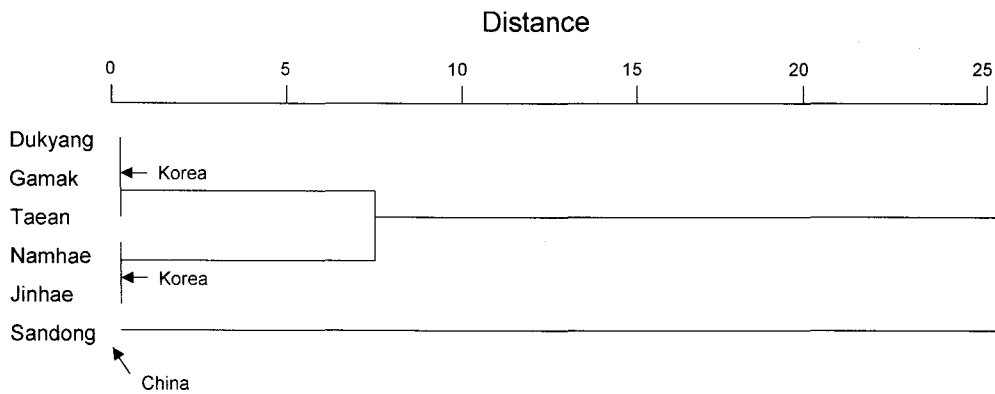


Fig. 4. Hierarchical cluster analysis of Korean and Chinese arkshell based on restriction fragment patterns using *PvuII*, *BamHI*, *HinfI*, *HaeIII*, *EcoRI*, *RsaI*, *Ksp221*, and *BstX21* restriction enzyme. The tree was inferred from a distance matrix based on Euclidean method.

있을 것으로 기대된다. 문제점은 16S rRNA region은 8종류의 제한효소를 사용해도 인식부위가 예상보다 매우 적어서 유전자 및 유전자형 빈도 양상이 거의 monomorphism에 가깝기 때문에 4 mer 인식 제한효소 뿐만 아니라 사용 폭을 넓혀 6 mer 제한효소 등 여러 종류의 제한효소가 필요하다. 또한 target gene을 cytochrome oxidase subunit complex (COI, II, III) 및 control region 등에 대해서도 시도하면 좀 더 좋은 결과가 있을 것으로 보인다.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 방법에 사용된 primer는 10 mer 이하일 뿐 만 아니라 PCR시 annealing temperature가 매우 낮아서 재현성에 문제가 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 단점에도 불구하고 한국산과 중국산 피조개에 대한 RAPD[5]와 이 실험에서 사용된 PCR-RFLP 결과는 거의 유사하게 나타났다. 즉 한국산과 중국산 피조개는 형태적으로 거의 유사하지만, 유전적으로 구분되는 점에서 RAPD나 RFLP 방법 모두 피조개 집단 구분에 좋은 tool로 판단된다. 이러한 유전적 차이를 지리적인 격리에 의한 고유의 지역개체군 형성으로 설명하고 있다[6]. 이 실험을 통하여 중간 구분은 가능할지 몰라도, 종내의 차이를 밝히기 위해서는 PCR-RFLP 방법에 의한 제한효소로서는 어려움이 있는 것으로 판단되어, polymorphism을 밝히기 위해서는 DNA 염기서열에 의한 정밀 분석이 되어야 될 것 같다. 따라서 앞으로 지리적으로 격리된 피조개의 haplotype 빈도, 유전자 다양도, 유전자 거리, 유전자 이입 등을 조사하면 우리나라에 서식하는 피조개의 유전자 특성을 제시함으로써 양식에 따른 gene flow를 설명할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

한국산과 중국산 피조개의 신속 진단, 유전적 특성 및 유연관계를 분석하기 위하여 DNA 수준에서 확인 할 수 있는 PCR-aided RFLP를 사용하였다. 피조개 mtDNA 16S rDNA gene를 제한효소로 처리하여 그 band 양상을 조사하고자 하였다. 16S rDNA gene를 분리하기 위하여 ArkF-3, ArkR-3 primer를 사용한 결과 한국산과 중국산 피조개 모두 분자량이 720 bp band가 나타났다. PCR에 의하여 증폭된 16S rRNA gene를 총 8종류의 제한효소(*PvuII*, *BamHI*, *HinfI*, *HaeIII*, *EcoRI*, *RsaI*, *Ksp221*, *BstX21*)로 절단하여 RFLP 양상을 보았다. *HinfI*의 제한효소 처리 시 득량, 가막, 남해, 진해, 태안산 피조개 모두 275 bp band절편이 관찰되었으나, 중국산은 나타나지 않았다. *HinfI*를 제외한 나머지 제한효소는 다형형이 관찰되지 않았고 한국산과 중국산 모두 700 bp의 동일한 band를 보였다. *HaeIII*에서도 득량, 가막, 태안과 남해와 진해산 PCR product가 700 bp 위치에서 상이하게 보였다. 또한 한국산과 중국산 절편이 다르게 나타났다. 한국산

피조개 종내 restriction type에 의해 유연관계의 결과에 의한 득량, 가막, 태안은 동일한 유사도를 보였고, 남해와 진해와는 거리가 7 정도로 나타났다. 특히 한국산과 중국산 거리는 25로 나타났다. 이상의 결과를 보아서, *HinfI* 제한효소는 한국산과 중국산을 구별하는데 매우 유용한 molecular marker가 될 수 있을 것으로 판단되며, 유전적으로 거리가 먼 것으로 보인다. 또한 *HaeIII*은 한국산 종내 구분 및 중국산 신속 동정에 좋은 molecular tool로 사용될 것으로 예상된다.

감사의 글

이 연구는 국립수산물과학원(피조개 양식산업 복원화 연구, RP 2005-BT-010)의 지원에 의해 운영되었습니다. 논문을 면밀하게 검토해 주신 익명의 심사위원 교수님에게 진심으로 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Asahida, T., T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama. 1996. Tissue preservation and total DNA extracton from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish. Sci.* **62**, 727-730.
- Brown, W. M., M. George and A. C. Willson. 1979. Rapid evolution of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. USA* **76**, 1967-1971.
- Go, S. J., T. S. Kim, Y. S. Lee, J. S. Hwang and S. M. Lee. 1997. Development of restriction fragment length polymorphism(RFLP) markers in silksorm, *Bombyx mori*. *Kor. J. Appl. Entomol.* **36**, 96-104.
- Kim, J. H. and H. Y. Jang. 2004. 16S rDNA-PCR and RFLP analysis for rapid identification of spoilage bacteria from low salt cucumber brine. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 72-77.
- Kuroda, T. and T. Habe. 1981. A catalogue of molluscs of Wakayama Prefecture, the Province of KII. I. *Bivalvia Scaphopoda and Cephalopoda*. Nakanishi Printing Co., Ltd. Kyoto, Japan. p 36.
- Lee, J. M., J. W. Park, M. S. Yoo and Y. K. Hong. 1997. Morphological characteristics and genetic diversity using the RAPD technique in the arkshell, *Scapharca broughtonii* (Schrenck) from Korea and China. *J. Kor. Fish. Soc.* **30**, 297-304.
- Lee, S. S., S. B. Ko, W. Y. Oh, Y. H. Yang, K. I. Kim and B. W. Cho. 1998. Determination of phylogenetic relationships of Korean native and Cheju native cattle to other breeds using PCR-RFLP of mtDNA D-loop region. *Kor. J. Anim. Sci.* **40**, 335-344.
- Lee, S. Y. and S. H. Kim. 2003. Genetic variation and discrimination of Korean arkshell *Scapharca* species (Bivalvia, Arcoida) based on mitochondrial COI gene sequences and PCR-RFLP. *Kor. J. Genetics* **25**, 309-315.
- Lim, H. Y., J. D. Oh, H. S. Kong, G. J. Jeon, H. K. Lee, S.

- S. Lee, D. H. Yoon, C. D. Kim and B. W. Cho. 2004. Association of genetic missense mutation and economic traits of leptin gene using PCR-RFLP in Korea cattle(Han-Woo). *J. Anim. Sci. & Technol.* **46**, 295-300.
10. Simon, C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a composition of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**, 651-701.
11. Yang, D. C. and M. S. Kim. 2003. DNA analysis of Ginseung using PCR-aided RFLP technology. *J. Ginseung Res.* **27**, 146-150.