

넙치와 조기의 원산지 판별을 위한 random amplified polymorphic DNA 패턴 연구

강덕진 · 이석근¹ · 진덕희² · 최석정*

강릉대학교 화학과, ¹강릉대학교 치의학과, ²강릉대학교 해양생명공학부

Received November 8, 2005 / Accepted January 16, 2006

Random Amplified Polymorphic DNA Analysis for Origin Identification of Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) and Redlip Croaker (*Pseudosciaena polyactis*). Duk-Jin Kang, Suk-Keun Lee¹, Deuk-Hee Jin² and Suk-Jung Choi*. Department of Chemistry and East Coastal Marine Bioresources Research Center; ¹Department of Oral Pathology; ²Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, Gangneung 210-702, Korea – The random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was investigated as a potential tool for the origin identification of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and redlip croaker (*Pseudosciaena polyactis*). Olive flounder specimens were collected from North Korea and several locations of South Korea (Jumunjin, Tongyoung and Geoje). Fishes obtained from Tongyeong and Geoje were cultured products. Redlip croaker specimens were collected from South Korea and China. Consistent and distinct diagnostic bands were easily identified in the RAPD patterns of the olive flounder specimens. Although consistent diagnostic bands rarely appeared in the RAPD pattern of redlip croaker specimens because of their genetic heterogeneity, we were able to find potential diagnostic bands in the average RAPD pattern of each origin.

Key words – Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), redlip croaker (*Pseudosciaena polyactis*), (random amplified polymorphic DNA) RAPD, origin identification

광어라고도 불리는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 가자미목 넙치과에 속하며 한국과 일본 연근해, 발해만, 동중국해 등에 서식한다. 한국 서해안에서는 겨울철에 흑산도 근처에 서식하다가 봄이 되면 북쪽으로 이동하는 남북회유를 한다. 최근에는 양식 기술의 발달로 많은 양의 양식 넙치가 공급되고 있으며 북한에서도 자연산 넙치가 수입되고 있어 한국산과 북한산, 그리고 양식산과 자연산을 구분할 수 있는 방법이 요구되고 있다. 또한 조기(*Pseudosciaena polyactis*) 역시 중국으로부터 많은 양이 수입되고 있기 때문에 원산지 판별의 중요성이 높아지고 있다. 그러나 이들은 대개 외형이 매우 유사하여 형태적으로 이들을 구분하는 것은 어려운 일이며 따라서 분자 수준에서 정확하게 판정할 수 있는 방법을 개발하는 것이 중요하다.

전통적으로는 생물 종 사이의 분자적인 차이를 분석하기 위해 폴리아크릴아마이드 전기영동(SDS-PAGE)이나 등전 초점법(isoelectric focusing, IEF) 등으로 단백질을 분석하는 방법이 사용되었다[16]. 그러나 단백질은 변성이 잘 되는 단점이 있고 서로 다른 조직에서 발현되는 단백질이 다르기 때문에 한 개체 내에서도 조직에 따라 단백질 프로파일 달라질 수 있다. 뿐만 아니라 단백질로 표현되지 않는 유전적인 차이는 전혀 검출할 수 없는 단점이 있다. 최근에는 DNA 기술이 발달하면서 DNA 차이를 이용한 분석방법들이 많이 이용

되고 있다. DNA는 단백질에 비해 더욱 안정하고 모든 조직에서 동일하며 단백질보다 더 풍부한 변이를 가지고 있다.

DNA를 분석하는 방법으로는 DNA 특정 부위를 제한효소로 자른 조각 길이의 다형성을 이용하는 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 방법이나[14], PCR (polymerase chain reaction) 후 염기서열을 직접 분석하는 방법[3], 그리고 random primer로 증폭된 DNA의 다형성을 이용하는 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 방법[19, 21]이 많이 사용되고 있다. 그 가운데 RAPD는 8~10 염기쌍 길이의 무작위 염기서열을 갖는 한 가지 시발물질을 이용하여 DNA 가운데 임의의 염기서열을 증폭하는 기술이다. 이 방법에서는 primer의 길이가 짧은 반면에 36~40℃의 낮은 annealing 온도를 사용하기 때문에 대개 서로 다른 유전자좌에서 유래된 여러 개의 DNA 조각이 얻어진다. 여기에서 서로 다른 DNA 시료들의 primer 결합 자리에 단일 염기 치환이나 결실 또는 삽입 등의 변이가 있으면 RAPD 다형성을 관찰할 수 있게 된다. 이형 집합체의 경우 동형 집합체에 비해 RAPD 띠의 강도가 약해지지만 띠의 강도는 PCR 과정의 효율성에 의해서도 달라질 수 있기 때문에 띠의 강도로부터 정보를 얻는 것은 어렵고 대개 띠의 유무를 통해 다형성을 평가한다.

RAPD는 RFLP나 염기서열 결정법 등과 달리 유전자 염기서열에 대한 사전정보가 없는 생물체에도 사용할 수 있으며 간단하고 비용도 저렴하기 때문에 최근에 수산물 종의 판별과 확인에 응용하기 위한 연구가 점점 더 활발해지고 있다 [1,4,6-7,9,11,13,15,20]. 그러나 축산물이나 식물자원에 비해 어류의 경우에는 RAPD 분석을 통해 원산지를 판별하는 방

*Corresponding author

Tel : +82-33-640-2306, Fax : +82-33-647-1183

E-mail : sjchoi@kangnung.ac.kr

법이 제대로 확립되어 있지 않으며 넘치나 조기의 원산지 판별법 역시 아직 보고된 적이 없다. 본 연구는 RAPD를 이용하여 넘치와 조기의 원산지를 구별할 수 있는 방법을 개발하기 위한 목표를 가지고 수행되었다. 그 결과 RAPD 분석을 위한 PCR 조건을 확립하였으며 random primer들 가운데 원산지 판정용 띠를 생성하는 적합한 primer들을 찾는데 성공하였다.

재료 및 방법

표본 및 재료

본 연구에 사용한 넘치는 강원도 주문진 근해의 자연산(J)과 북한 서해 자연산(N), 그리고 경상남도 통영 양식산(T)과 거제 양식산(G)을 사용하였다. 조기는 한국산(K)과 중국산(C)을 사용하였다. 각 시료로부터 채취된 간은 -80°C 에 냉동보관하였다. RAPD를 위한 random primer는 Operon 10-mer kit A (Operon Technologies, Alameda, USA)를 사용하였다. 이 키트는 OPA-01부터 OPA-20까지 20종류의 random primer를 포함하고 있다. *Taq* DNA polymerase와 네 종류의 deoxyribonucleotide (dNTP) 그리고 DNA size marker로 사용된 1 kb DNA ladder와 100 bp DNA ladder는 Bioneer(청주, 한국)에서 구입하였으며 아가로스 Promega (Madison, USA)에서 구입하였다. 전기영동에 사용하는 완충용액 시약들은 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 간에서 DNA를 추출하여 정제하기 위해 Blood & Cell Culture DNA Midi Kit (Qiagen, Valencia, USA)를 사용하였다.

전체 DNA의 추출

전체 DNA를 추출하기 위하여 각 샘플의 간을 약 70 mg 취하여 잘게 자른 후, 완충용액 L (800 mM guanidine HCl; 30 mM Tris · Cl, pH 8.0; 30 mM EDTA, pH 8.0; 5% Tween-20; 0.5% Triton X-100) 9.5 ml와 100 mg/ml RNase 19 μl 를 넣어 간과 함께 균질화 하였다. 균질화 된 시료에 proteinase K (20 mg/ml) 0.5 ml를 첨가하여 잘 혼합한 후, 50°C 에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응물을 Blood & Cell Culture DNA Midi Kit의 실험방법에 따라 Genomic-tip 100/G에 수차례 여과시킴으로써 DNA를 회수하였다. 회수된 용액에 0.7 배의 이소프로필알코올(3.5 ml)을 첨가하여 DNA를 침전시키고 상층액을 제거한 후 75% 에탄올 2 ml로 다시 한 번 씻어 주었다. 공기 중에서 건조시킨 DNA를 적당한량의 완충용액 TE (10 mM Tris · Cl, pH 8.5; 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹이고 파장 260 nm와 280 nm에서의 흡광도 측정과 전기영동으로 농도와 순도를 확인하였다.

PCR 조건

이 실험에서 사용한 RAPD PCR 표준 조건에서 반응 혼합

물의 부피는 25 μl 로 하였으며 25 ng/ μl 의 주형 DNA 1 μl , 1 pmole/ μl 의 primer 5 μl , 각 dNTP의 농도가 10 mM로 조정된 네 가지 dNTP의 혼합물 0.25 μl , 0.5 unit/ μl 농도의 *Taq* DNA polymerase 2 μl 를 deionized water 16.75 μl 와 섞어 만들었다. 결과적으로 각 반응 혼합물은 25 ng의 주형 DNA, 5 pmole의 primer, 1 unit의 *Taq* DNA polymerase를 포함하게 되었으며 네 가지 dNTP와 MgCl_2 의 최종농도는 각각 0.1 mM과 4 mM이 되었다. 반응물의 증발을 막기 위해 반응물 위에 mineral oil을 한 방울 떨어뜨렸다. 반응 온도는 먼저 94°C 에서 5 분간 반응시키고, 94°C 에서 1 분, 34°C 에서 1 분, 72°C 에서 2 분간 반응시키는 주기를 45 회 반복한 후, 마지막으로 72°C 에서 15 분간 반응시킴으로써 마무리하였다. 이 실험에서 사용한 thermal cycler는 Progene (Techne, Cambridge, UK)이었다.

전기영동과 분석

PCR로 증폭한 DNA를 DNA size marker와 함께 1.5% 또는 2% 아가로스 겔에서 100 V 전압으로 전기영동 하였다. 전기영동용 완충용액은 $0.5\times\text{TBE}$ (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)를 사용하였으며 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 브롬화 에티듐 시약으로 DNA를 염색하였다. UV illuminator로 DNA 띠를 볼 수 있도록 한 상태에서 폴라로이드 카메라로 사진을 찍었다. 조기의 원산지별 평균 RAPD 패턴을 얻기 위해 ImageCalc 프로그램 이용하여 각 lane의 band intensity를 vertical scan 방식으로 측정하였다[18]. 이 방식에서는 이동 거리에 따른 띠의 세기를 측정하여 각 lane의 intensity profile을 보여준다. 마지막으로 원산지별로 10개 시료에 대한 intensity profile의 평균값을 계산하여 각 원산지의 평균 RAPD 패턴을 얻었다.

결과 및 고찰

PCR 최적 조건 탐색

PCR 최적조건을 확립하기 위해 PCR의 온도주기와 시간 그리고 반응 혼합물의 농도 등을 다양하게 변화시켜 보았다. 먼저 초기조건으로 25 μl 부피의 반응 혼합물에 25 ng의 주형 DNA, 5 pmole의 primer, 각각 0.1 mM 농도의 네 가지 dNTP, 4 mM MgCl_2 , 1 unit *Taq* DNA polymerase를 포함하도록 만들어 PCR을 시행하였다. 시료는 넘치 DNA를 사용하였으며 반응온도는 다음과 같이 RAPD 실험에서 일반적으로 사용하는 조건을 따랐다. 처음에 94°C 에서 5 분간 반응시켜 주형 가닥을 분리하고, 다음으로 94°C 에서 1 분, 36°C 에서 1 분, 72°C 에서 5 분간 반응시키는 주기를 45 회 반복하여 DNA를 증폭하였다. 그리고 마지막으로 72°C 에서 15분간 반응시켜 이중가닥을 완결시켰다. 그러나 길게 퍼진 희미한 띠만 나타났으며 구별이 가능한 DNA 띠는 증폭되지 않았다 (data not shown).

최근에 RAPD 조건을 최적화 한 연구결과에 의하면 주형 DNA 양을 늘릴 때 더 긴 DNA가 증폭되는 경향이 있고 primer의 농도 역시 띠의 선명도에 영향을 미치는 것으로 보고되었다[8]. 따라서 온도주기는 그대로 유지하고 주형 DNA, primer, Taq DNA polymerase 등 반응물의 농도를 변화시켜 구별이 가능한 DNA 띠가 증폭되는지 실험해 보았다. 그러나 여전히 길게 퍼진 형태의 띠만 나타나 반응물 농도의 변화는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 확인되었다(data not shown).

PCR에서 DNA 증폭에 영향을 미치는 또 하나의 중요한 요인은 denaturation, annealing, synthesis의 세 가지 온도 가운데 annealing 온도이다. 10-mer random primer를 이용한 RAPD PCR에서 가장 일반적인 annealing 온도는 35~36°C 이지만 온도가 낮을 때 더 많은 DNA 띠가 생성될 것으로 기대할 수 있기 때문에 반응 혼합물의 농도는 처음과 같이 유지하고 annealing 온도를 34°C로 낮춰 다시 PCR을 시도하였다. 그 결과 뚜렷한 DNA 띠를 얻을 수 있었다. 따라서 이 조건을 표준조건으로 하여 이후의 모든 실험에 적용하였다.

RAPD 실험에는 10-mer random primer가 많이 사용되며 이 때 annealing 온도는 36°C, annealing 시간은 0.5~2 분의 조건이 주로 사용된다[2, 5-8, 17]. 그러나 이번 실험에서 처음에 36°C에서 1 분간 annealing하는 조건을 사용하였지만 DNA 띠가 제대로 증폭되지 않았다. 다른 연구자들이 annealing 온도를 35°C로 낮추거나[10, 13] 심지어는 30°C까지 낮춘 결과[12]를 보고하였지만 annealing 온도를 낮춘 이유에 대한 언급이 없기 때문에 다른 연구에서도 36°C의 annealing 온도가 부정적인 결과를 가져왔는지는 알 수 없다. 우리의 실험에서 다른 연구결과들과 달리 36°C에서 뚜렷한 DNA 띠를 얻을 수 없었던 이유는 분명하지 않지만 아마도 thermal cycler의 온도에 편차가 있을 가능성과 시료의 염기 서열 차이가 증폭 효율에 영향을 미칠 가능성을 생각할 수 있다. 이와 같은 결과를 고려하면 다른 종류의 시료나 thermal cycler를 사용하여 RAPD 실험을 시작할 때는 최적의 annealing 온도를 찾는 것이 필요한 것으로 판단된다.

넙치용 진단용 띠의 확인

20 종류의 random primer 가운데 넙치의 원산지 판별에 사용할 가능성이 있는 primer를 찾기 위해 주문진 자연산 시료 한 가지와 통영 양식산 시료 한 가지씩만 대상으로 하여 표준조건으로 RAPD 실험을 시행하였다. 그 결과 OPA-07, 08, 11, 12, 15, 19, 20을 사용하였을 때 뚜렷하게 구별할 수 있는 띠를 만드는 것을 확인할 수 있었다(data not shown). 나머지 primer를 이용한 실험에서는 두 시료에서 거의 동일한 띠를 생성하거나 뚜렷한 DNA 띠가 형성되지 않았다.

위에서 선별된 일곱 개의 primer들을 대상으로 진단용 띠를 찾기 위해 각 원산지별로 세 개의 시료를 이용하여 동시

에 PCR을 시행하였다. 그 가운데 긍정적인 결과를 보여준 다섯 개의 primer에 대한 실험결과를 Fig. 1에서 볼 수 있다. 먼저 primer OPA-07은 전체 시료를 주문진산과 나머지의 두 그룹으로 나누는 패턴을 보여주었다(Fig. 1A). 즉 주문진산에서는 다른 시료에 없는 1.15 kb 크기의 띠와 0.3 kb 크기의 띠를 관찰할 수 있었다. 반면에 주문진산에는 다른 세 종류의 시료에 있는 1 kb 띠가 없었다. Primer OPA-08은 북한 자연산을 구별할 수 있는 특징적인 띠들을 보여준다(Fig. 1B). 이 primer는 북한 자연산 시료에서는 1.5, 0.8, 0.5, 0.45 kb의 네 띠를 동시에 만들지만 다른 시료에서는 그 가운데 두 개 또는 세 개의 띠만 만든다. OPA-15는 통영산 시료를 나머지 자연산과 구분하는 패턴을 보여준다(Fig. 1C). 주문진산과 북한산에서는 북한산의 한 시료를 제외하고는 모두 1 kb와 0.5 kb에 있는 두 띠를 관찰할 수 있다. 그러나 통영 양식산은 그 두 개의 띠 대신에 이들 자연산에서는 거의 관찰되지 않는 0.95, 0.6, 0.45 kb의 띠들을 가지고 있다. 한 개의 북한산이 0.6 kb와 0.45 kb 띠를 가지고 있지만 이 시료도 0.95 kb 띠는 없고 대신 1 kb 띠를 가지고 있다. 거제산은 DNA 띠가 뚜렷하게 증폭되지 않았다. Primer OPA-19의 경우 주문진산에서만 0.5 kb 근처에서 매우 근접한 세 개의 연속 띠를 만들어 다른 시료들과 구별이 가능하였다(Fig. 1D). 다른 시료들도 이 세 개의 띠 가운데 1-2개의 띠를 갖는 경우가 있지만 세 개의 띠를 모두 가지고 있는 시료는 주문진산으로 국한되어 있다. 또한 이 primer는 거의 모든 시료에서 1.9 kb와 0.45 kb 띠를 만들지만 띠의 강도는 서로 다르게 나타났다. 즉 거제산은 0.45 kb 띠가 강하고 1.9 kb 띠가 약한 반면 나머지 세 원산지의 시료들은 1.9 kb 띠가 강하고 0.45 kb 띠는 약한 패턴을 보여주었다. 그러나 띠의 강도는 실험의 여러 조건에 의해 영향을 받기 때문에 진단을 위한 정보로 사용하는 것은 어렵다. 마지막으로 OPA-20은 양식산인 통영산과 거제산에서만 0.8 kb와 0.54 kb 띠를 만들어 네 종류의 시료를 두 그룹으로 나누는 패턴을 보여주었다(Fig. 1E).

위에서 언급된 진단용 띠들을 Table 1에 정리하였다. 여기에서 각 원산지를 구별하는데 사용될 수 있는 진단용 띠를 포함하는 칸은 회색으로 표시하였다. 즉 주문진 자연산의 경우에는 primer OPA-07이나 OPA-19가 다른 원산지의 시료와 뚜렷하게 구별되는 진단용 띠를 만드는 것을 볼 수 있다. 다른 primer도 원산지에 따른 증폭 패턴의 차이를 보여주는 하지만 주로 특정 띠의 존재보다는 특정 띠가 없는 것으로 구별되기 때문에 분명한 증거로 사용하는 것이 어렵다. 통영산은 OPA-15에 의해 만들어지는 0.95 kb 띠가 가장 뚜렷한 진단용 띠로 사용될 수 있지만 0.95, 0.6, 0.45 kb의 세 띠가 동시에 만들어지는 패턴 역시 통영산에서만 관찰된다. 거제산만의 독특한 진단용 띠는 발견되지 않았다. 따라서 거제산의 판별을 위해서는 먼저 OPA-20을 이용하여 양식산(통영산과 거제산)과 자연산(주문진산과 북한산)을 먼저 구분하고

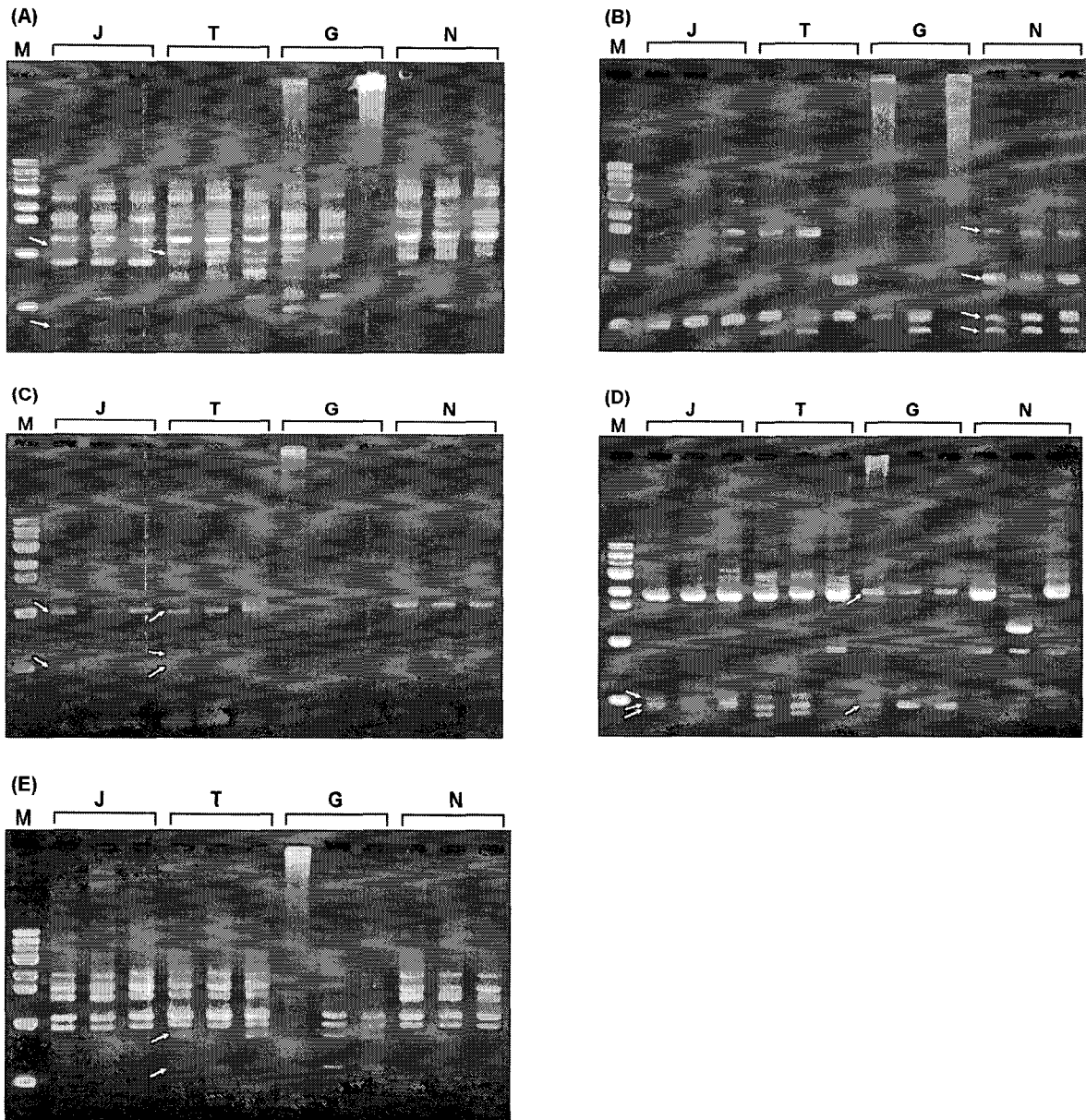


Fig. 1. RAPD patterns showing diagnostic bands for the origin identification of olive flounder. The abbreviations J, T, G and N are used to denote the place origins - Jumunjin, Tongyeong, Geoje and North Korea respectively. Three specimens were obtained from each origin and subjected to analysis by the standard RAPD protocol with OPA-07 (A), OPA-08 (B), OPA-15 (C), OPA-19 (D) and OPA-20 (E). The amplified DNA was analyzed on a 2% agarose gel. The 1kb DNA ladder was used as a size marker (lane M). The size of the DNA marker are 10.2, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1.6, 1 and 0.5 kb from the top. (The third thick band from the top contains 6 and 5 kb DNA.) Diagnostic bands are indicated by arrows.

다음으로 OPA-15를 이용하여 통영산과 거제산을 구분해야 할 것으로 보인다. 북한 자연산은 OPA-08에 의해 생성되는 1.5, 0.8, 0.5, 0.45 kb의 네 띠를 이용하면 판별이 가능할 것으로 보인다. 다른 원산지의 시료들은 이 띠들 가운데 두 개 또는 세 개의 띠만 만들기 때문에 네 가지 띠가 모두 증폭되는 북한산과 뚜렷하게 구별된다. 이와 같이 넘치의 경우에는 각 원산지 내의 유전적인 균일성이 높고 또 원산지 사이에 유전

적인 차이가 뚜렷하여 RAPD 방법을 통해 원산지를 구별하는 것이 가능할 것으로 보인다.

조기용 진단용 띠의 확인

조기도 처음에 가능성이 있는 primer를 찾기 위해 한국산과 중국산 시료 가운데 하나씩만 임의로 선택하여 20 종류의 random primer로 RAPD 실험을 시행하였다. 그 결과 OPA-07,

Table 1. Summary of diagnostic bands for the origin identification of olive flounder.

origin primer	J			T			G			N		
OPA-07	1.15	1.15	1.15	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	0.3	0.3	0.3									
OPA-08	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	0.8	1.5	1.5	1.5	1.5		
	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5		0.8	0.8	0.8		
				0.45	0.45	0.5		0.5	0.5			
OPA-15	1.0	1.0	1.0	0.95	0.95	0.95	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
OPA-19	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5				0.5	0.5	
	0.47	0.47	0.47	0.45	0.45	0.47				0.45	0.45	0.45
OPA-20	0.45	0.45	0.45	0.41	0.41	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	
				0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8			
				0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54			

The diagnostic bands indicated by arrows in Fig. 1 are listed. The shaded boxes contain distinct RAPD patterns suitable for the identification of each origin.

10, 12, 16, 17, 18을 이용하였을 때 원산지에 따라 차이를 보여주는 RAPD 패턴이 나타나 이 primer들을 이후의 실험에 사용하였다(data not shown). 그러나 이 여섯 개의 primer를 이용하여 원산지별로 세 개의 시료에 대해 실험을 한 결과 한 원산지 내에서도 서로 다른 패턴이 관찰되어 일관성이 있는 진단용 띠를 발견할 수 없었다.

따라서 통계적인 접근방법을 사용하기 위해 개체의 수를 더욱 확대하여 원산지별로 열 개의 시료에 대해 실험을 반복하였다. 그 가운데 한국산과 중국산의 패턴이 비교적 다르게 나타난 primer OPA-10과 OPA-12를 이용한 실험 결과를

Fig. 2에 제시하였다. 이 결과를 보면 조기의 경우 한국산과 중국산이 유전적으로 혼합되어 있으면서 다양성이 높은 것을 알 수 있다. 즉 두 개의 primer에서 증폭되는 띠들은 거의 대부분이 두 원산지에서 동시에 발견된다. 그러나 한 원산지 내에서 보면 증폭이 되지 않는 개체도 있고 증폭이 되는 경우에도 그 강도가 다양하게 나타난다. 예를 들어 OPA-10에 의해 증폭되는 0.95 kb 띠는 중국산과 한국산 시료에서 대부분 나타나지만 그 강도가 매우 다양하다(Fig. 2A). 또 OPA-12에 의해 증폭되는 1.3 kb 띠는 한국산에서만 나타나기는 하지만 모든 시료에서 관찰되지 않고 열 개의 시료 가운데 단

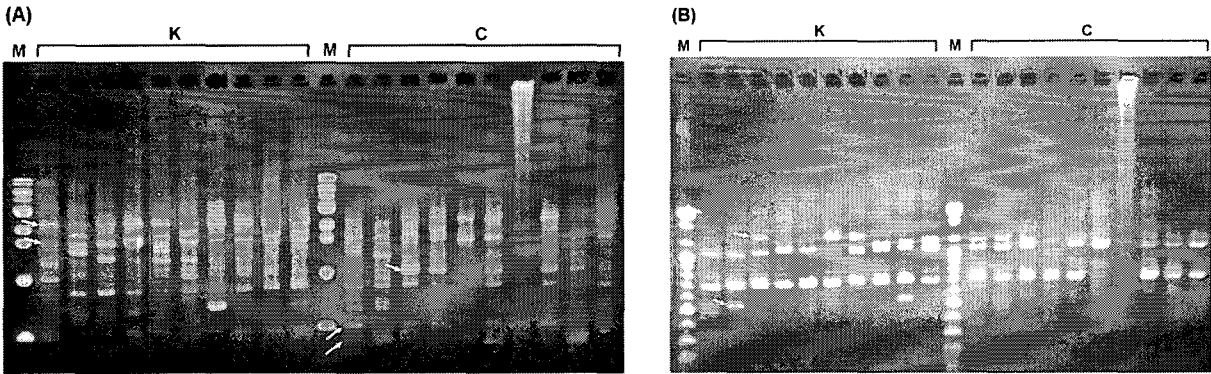


Fig. 2. RAPD patterns showing diagnostic bands for the origin identification of redlip croaker. Ten specimens were obtained from Korea (K) and China (C) and analyzed by the standard RAPD protocol with OPA-10 (A) and OPA-12 (B). Electrophoresis was performed on a 1.5% agarose gel. The lane M contains 1 kb ladder (A) or 100 bp ladder (B) as a DNA size marker. The sizes of the 100 bp ladder are 2, 1.6, 1.2, 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3 and 0.2 kb from the top. Diagnostic bands are indicated by arrows.

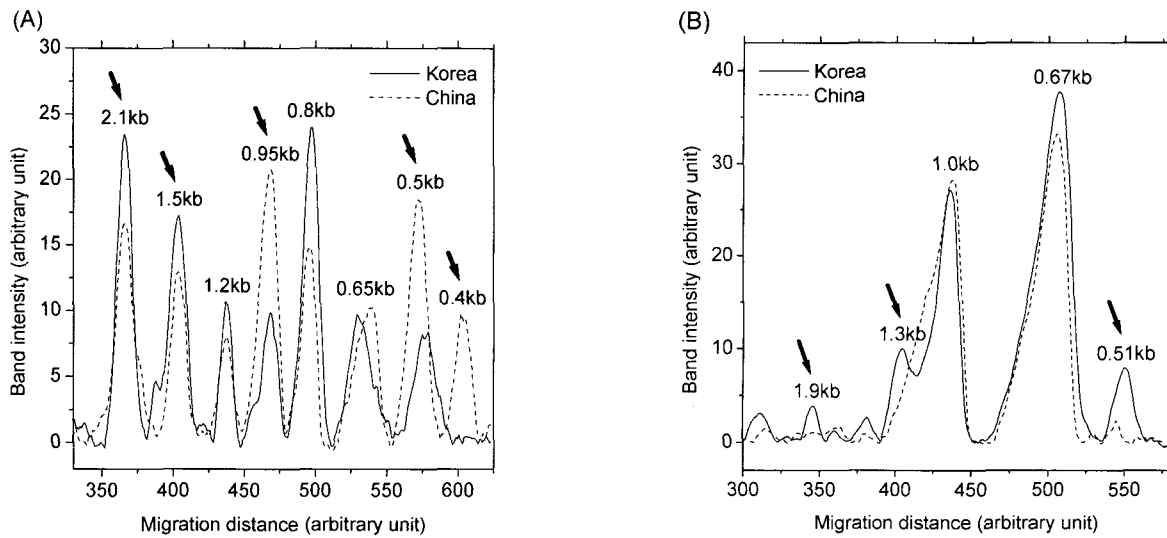


Fig. 3. Average RAPD pattern of redlip croaker obtained with OPA-10 (A) and OPA-12 (B). Intensity profile of each lane in Fig. 2 was prepared with ImageCalc programme. The measured intensity was averaged within each origin and plotted against migration distance. The diagnostic bands are indicated by arrows.

세 개의 시료에서만 관찰되었다(Fig. 2B).

이와 같이 개별적인 RAPD 패턴에서는 진단용 띠를 찾는 것이 어려웠기 때문에 데이터의 통계적인 처리를 통해 평균 RAPD 패턴을 구하는 방법을 시도하였다. 재료 및 방법에 설명한 방법을 따라 원산지별로 10개의 시료에 대해 migration distance에 따른 band intensity의 평균값을 구한 후 이 평균 RAPD 패턴을 그래프로 나타내었다(Fig. 3). Primer OPA-10 으로부터 얻어진 평균 RAPD 패턴에서는 0.4 kb 띠가 중국산에서만 독특하게 나타나 중국산을 확인할 수 있는 진단용 띠로 사용될 수 있을 것으로 보인다(Fig. 3A). 이 띠는 중국산 10개의 시료 가운데 네 개에서는 비교적 뚜렷하게 나타나고 두 개에서는 희미하게 나타나며 나머지 네 개에서는 나타나지 않기 때문에 개별적인 RAPD 결과에서는 진단용 띠로 사용할 수 없었다. 다른 띠들은 한국산과 중국산에 모두 나타나기는 하지만 intensity에서 차이를 보여주었다. 즉 2.1, 1.5, 0.8 kb 띠는 한국산이 강한 반면 0.95와 0.5 kb 띠는 중국산이 강하였다. primer OPA-12로부터 얻어진 평균 RAPD 패턴에서는 1.9, 1.3, 0.5 kb 크기의 세 개의 진단용 띠를 이용하여 한국산을 확인할 수 있었다. 이들 띠 역시 개별 RAPD 패턴에서는 다양한 양상으로 나타나기 때문에 진단용으로 사용할 수 없었다. 이와 같이 개체들의 개별적인 RAPD 패턴에서 진단용 띠를 찾을 수 없을 경우에는 평균 RAPD 패턴을 분석하는 것이 하나의 대안이 될 수 있을 것으로 보인다.

이상의 실험을 통해 수산물 원산지 판정을 위한 RAPD PCR 조건이 확립되었으며 넙치와 조기의 원산지를 판정하는데 사용될 가능성이 있는 시발물질들이 발견되었다. 따라서 앞으로 더 많은 시료를 대상으로 한 실험을 통해 넙치와 조기 원산지 판정용 RAPD 실험 키트의 개발이 가능할 것으

로 보인다.

요 약

본 연구에서 넙치와 조기의 원산지를 판별하기 위한 도구로 RAPD PCR 방법의 가능성을 확인하였다. 넙치는 한국의 주문진 자연산, 통영 양식산, 거제 양식산 그리고 북한 자연산을 실험에 사용하였다. 조기는 한국산과 중국산을 사용하였다. 넙치의 RAPD 패턴에서는 뚜렷하고 일관성이 있는 진단용 띠들을 쉽게 찾을 수 있었다. 조기의 경우에는 유전적인 이질성으로 인하여 각 개체의 RAPD 패턴에서는 일관성이 있는 진단용 띠를 찾기 어려웠지만 각 원산지별로 얻은 RAPD 패턴에서는 가능성이 있는 진단용 띠들을 찾을 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 해양수산부의 Sea Grant 사업 (2001년도)과 한국과학재단 지정 강릉대학교 동해안 해양생물자원연구센터(EMBRC)의 연구비 지원으로 수행되었다.

참고 문헌

- Bardakci, F. and D. O. F. Skibinski. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: Species and subspecies identification. *Heredity* 73, 117-123.
- Barman, H. K., A. Barat, B. M. Yadav, S. Banerjee, P. K. Meher, P. V. G. K. Reddy and R. K. Jana. 2003. Genetic variation between four species of Indian major carps as re-

- vealed by random amplified polymorphic DNA assay. *Aquaculture* **217**, 115-123.
3. Bartlett, S. E. and W. S. Davidson. 1991. Identification of *Thunnus tuna* species by polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 309-317.
 4. Bielawski, J. P. and D. E. Pumo. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. *Heredity* **78**, 32-40.
 5. Cadez, N., P. Raspor, A. W. de Cock, T. Boekhout and M. T. Smith. 2002. Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. *FEMS Yeast Res.* **1**, 279-289.
 6. Callejas, C. and M. D. Ochando. 1998. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *J. Fish Biol.* **53**, 208-215.
 7. Callejas, C. and M. D. Ochando. 2001. Molecular identification (RAPD) of the eight species of the genus *Barbus* (Cyprinidae) in the Iberian Peninsula. *J. Fish Biol.* **59**, 1589-1599.
 8. Diakou, A. and C. I. Dovas. 2001. Optimization of random-amplified polymorphic DNA producing amplicons up to 8500 bp and revealing intraspecies polymorphism in *Leishmania infantum* isolates. *Anal. Biochem.* **288**, 195-200.
 9. Dinesh, K. R., T. M. Lim, K. L. Chua, W. K. Chan and V. P. E. Phang. 1993. RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprinting in fishes. *Zoolog. Sci.* **10**, 849-854.
 10. Fraga, J., L. Rojas, I. Sariago and C. A. Sarria. 2002. Optimization of random amplified polymorphic DNA techniques for its use in genetic studies of *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infect. Genet. Evol.* **2**, 73-75.
 11. Gomes, C., R. B. Dales and H. A. Oxendorf. 1998. The amplification of RAPD markers in stock discrimination of the four-wing flyingfish, *Hirundichthys affinis* in the central western Atlantic. *Mol. Ecol.* **7**, 1029-1039.
 12. Krawczyk, B., L. Naumiuk, K. Lewandowski, A. Baraniak, M. Gniadkowski, A. Samet and J. Kur. 2003. Evaluation and comparison of random amplification of polymorphic DNA, pulsed-field gel electrophoresis and ADSRRS-fingerprinting for typing *Serratia marcescens* outbreaks. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **38**, 241-248.
 13. Martinez, I. and L. A. Pastene. 1999. RAPD-typing of central and eastern north Atlantic and western north Pacific minke whales, *Balaenoptera acutorostrata*. *ICES J. Marine Sciences* **56**, 640-651.
 14. Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J. and Candrian, U. 1995. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J. AOAC Int.* **78**, 1542-1551.
 15. Naish, K. A., M. Warren, F. Bardakci, D. O. F. Skibinski, G. R. Carvalho and G. C. Mair. 1995. Multilocus DNA fingerprinting and RAPD reveal similar genetic relationships between strains of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Mol. Ecol.* **4**, 271-274.
 16. Patterson, R. L. S. and S. J. Jones. 1990. Review of current techniques for the verification of the species origin of meat. *Analyst* **115**, 501-506.
 17. Toledo, A., J. Martin-Sanchez, B. Pesson, C. Sanchiz-Marin and F. Morillas-Marquez. 2002. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Mol. Biochem. Parasitol.* **119**, 257-264.
 18. van de Lest, C. H. A., J. H. Veerkamp and T. H. van Kuppevelt. 1995. ImageCalc: a Microsoft Windows application for quantitative image analysis and comparison. *Biotechniques* **18**, 1050-1055.
 19. Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213-7218.
 20. Williams, D. J., S. Kazianis and R. B. Walter. 1998. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of largemouth bass subspecies and their intergrades. *Transactions of the American Fisheries Society* **127**, 825-832.
 21. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.