

Two dimensional gel electrophoresis scanning 기법을 이용한 연어 유전자들의 DNA 다양성 조사

함승협 · 오흥열 · 이석근* · 진덕희

강릉대학교 해양생명공학부, *강릉대학교 치의학과

서론

연어류는 한국, 일본, 연해주, 캄차카, 알래스카, 캐나다, 쿠릴, 캘리포니아등 북태평양 연안에 분포하고 있으며 chum salmon (*Oncorhynchus keta*)은 우리나라의 동해안 하천으로 모천회귀하는 대표적인 어종이다.

지금까지는 연어의 다형성을 조사하기 위해서 RFLP(restriction fragment length polymorphism) (Cronin *et al.*, 1993), VNTR(variable number of tandem repeat), microsatellite analysis 방법 등이 사용되어 왔으며, 이를 토대로 밝혀진 염기서열을 이용하여 정확한 변이를 확인할 수 있었지만, 많은 시간과 비용이 드는 단점이 있었다. 하지만 two dimensional gel electrophoresis scanning (TDGS)방법 (Vijg *et al.*, 1999)을 이용하면 쉽게 변이를 확인할 수 있을 뿐만 아니라 많은 시간과 비용을 절약할 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 이미 그 염기서열이 밝혀져 있는 chum salmon의 mtDNA NADH dehydrogenase subunit 1(ND1) 영역, mtDNA Displacement-loop (D-loop) 영역, insulin-like growth factor-I (IGF-I), melanin-concentrating hormone² (MCH²)의 유전자와 growth hormone의 intron C, histone (H3)의 promotor sequence를 이용하여 새로운 primer를 제작하고 TDGS 방법을 변형시켜 한국, 미국, 일본 연어의 다형성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. Genomic DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR)

Genomic DNA는 한국, 미국, 일본에서 채취한 연어를 이용하여 DNA midi kit (Qiagen, USA)를 이용하여 추출하였으며, Genbank에서 최적의 primer 위치를 파악한 후 DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 primer를 제작하여 각각의 annealing 온도에 맞게 PCR를 실시하였다.

2. Modified TDGS and real time PCR

Multiplex PCR을 하지 않고 여러 종류의 연어를 이용하여 특정 유전자에 대한 PCR을 동시에 진행하기 위하여 원래의 TDGS에서 사용하는 수평 전기영동을 생략하고 수직 전기영동만을 하기 위한 comb을 준비하였으며, 수직 전기영동 방법에 사용되는 graded denature gel를 만들기 위해 90% urea-formamide (UF) solution과 30% urea-formamide solution을 이용하여 graded denature gel을 제작하였으며, PCR product을 이용하여 TDGS 장치에서 전기영동을 실시하였다.

Real time PCR은 각각의 genomic DNA와 primer를 이용하여 DNA SYBR[®] Green PCR Core Reagents (PE biosystems, united Kingdom)와 혼합한 후, GeneAmp[®] 5700 sequence Detection Software (PE biosystems, united Kingdom)를 이용하였다

결과 및 요약

mtDNA ND1 영역은 Ks12, Ks24, As11, As14, Js13, Js15에서만 증폭된 DNA를 확인하였으며, D-loop 영역, growth hormone, IGF-I, MCH2에서는 모든 시료에서 증폭된 DNA를 확인하였다.

Modified TDGS 분석의 결과, mtDNA ND1 영역, D-loop 영역, growth hormone, IGF-I에서는 변이가 다수 일어났으나, MCH2, histone (H3)에서는 변이가 없었다. 그리고 real time PCR로 관찰한 결과 mtDNA ND1 영역, mtDNA D-loop 영역, growth hormone, IGF-I는 modified TDGS의 결과와 유사하게 지역별 연어 그룹간의 DNA 합성량의 차이를 보였으나 histone (H3), MCH2에서는 지역별 연어 그룹간의 DNA 합성량의 차이가 미약하였다.

위 결과를 통하여 modified TDGS와 real time PCR 방법으로 지역별 연어 그룹간의 genomic DNA의 변이를 쉽게 추정할 수 있었다.

참고문헌

- Vijg, J., and Van Orsouw. N.J. 1999. Two-dimensional gene scanning : exploring human genetic variability. *Electrophoresis*. 20(6), 1239~1249
- Cronin, A.A., Spearman, W.M., Wilmot, R.L., Patton, J.C and Bickham, J.W. 1993. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O.keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction products. *Can J Fish Aquat sci* 50:708~715.