

일본산 연어의 클로닝 및 미토콘드리아 NADH dehydrogenase subunit 3 영역의 DNA 염기서열 분석

최운실, 최은주, 이운호, 진덕희

강릉대학교 해양생명공학부

서론

연어 자원을 보호하기 위하여 일본은 미국, 캐나다 및 러시아 등 북태평양 연안국들과 함께 북태평양 소하성 어류위원회(North Pacific Anadromous Fish Commission; NPAFC, 1993)를 만들어 협약 수역내의 연어 포획을 금지시키거나 감시하고 모천국 외에는 어느 나라도 이 바다에서 연어를 잡을 수 없도록 정하고 있다. 북태평양 연안국 가운데서도 연어 회귀량이 적은 우리나라는 어떠한 주장도 할 수 없는 실정이지만, 우리나라에서 표지 방류된 연어가 서태평양에서 일본 시험선에 의해 포획된 것이 1996년 6월 북태평양 소하성 어족위원회 제1차 회의에서 일본에 의해 발표되었으며, 일본에서 표지 방류한 것이 양양 남대천에서 포획되기도 하였다. 그러므로 본 연구에서는 일본으로 회귀하는 연어(chum salmon) 자원의 정확한 과학적인 기초자료를 얻기 위하여 미토콘드리아 NADH dehydrogenase subunit 3(ND3) 유전자 영역의 염기서열을 결정하여 유전적 변이를 조사하였으며, 우리나라 연어자원과 구별되는 일본 연어만의 single nucleotide polymorphism(SNP)이 관찰되는지를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료채취

본 연구에 사용된 연어는 1998년 일본 수산청 홋카이도 지역의 Shokanbetsu 강과 2000년 쓰가루 해협 주변의 하코다테에서 포획된 연어 시료의 간을 떼어내어 즉시 얼린 다음, -80°C 에 보관하면서 실험에 이용하였다.

2. DNA 추출 및 정량

연어의 genomic DNA 추출은 Qiagen사의 DNA 추출용 kit의 protocol에 따라 동결 보존된 간 약 70mg에서 추출하였다. 추출된 DNA는 spectrophotometer(Shimadzu, Japan)로 정량하였다.

3. ND3 유전자 영역의 증폭

PCR 증폭은 Domanico et al.(1995)이 보고한 cytochrome oxidase III gene(COIII)과 NADH dehydrogenase subunit 4L gene (ND4L)을 primer로 이용하여 ND3 영역

만을 선택적으로 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물은 0.8% agarose gel 상에서 전기영동한 다음, ethidium bromide(0.5 μ g/ml)에 염색하여 확인하였다(Sambrook *et al.*, 1989).

4. Cloning 및 plasmid DNA 추출

증폭된 PCR 산물은 TOPO TA cloning kit(Invitrogen, Netherlands)를 이용하여 cloning 하였으며, 플라스미드 DNA 추출은 QIAprep spin miniprep kit(Qiagen, Germany)의 protocol에 따라 추출하였다.

5. DNA 염기서열과 아미노산서열 분석

DNA 염기서열은 forward와 reverse primer에 대한 각 염기서열을 정렬시키기 위하여 Perkin-Elmer 사의 ABI PRISM 377 DNA auto sequencer를 이용하여 비교·분석하였으며, 염기간의 상동성은 NCBI의 BLAST를 이용하여 조사하였다. 그리고 ND3 영역에 대한 아미노산서열은 ExPasy를 이용하여 분석하였다.

결과 및 요약

일본으로 회귀하는 연어(chum salmon) 자원에 대한 분자생물학적 기초자료를 얻기 위하여 미토콘드리아 NADH dehydrogenase subunit 3(ND3) 유전자 영역의 염기서열을 결정하고 유전적 변이를 조사하였다. 간에서 추출된 genomic DNA로부터 미토콘드리아 ND3영역만을 선택적으로 증폭시킨 결과, 약 750 bp의 PCR 산물을 얻을 수 있었으며, 약 1,000 bp 크기의 삽입 DNA는 cloning을 통하여 얻어졌다. 또한 ND3 영역에 대한 염기서열은 COIII와 ND4L의 일부가 포함된 752 bp의 염기서열로 정렬되었다. 본 연구에 사용된 일본 연어의 개체간 유전적 변이는 염기치환에 의한 변이가 관찰되었고 전체적으로 전이(transition)에 의한 염기치환이 약 71%, 전환(transversion)에 의한 염기치환이 약 29%로 나타나 전이에 의한 유전적 변이가 더 높게 관찰됨을 확인할 수 있었다. 일본산 연어와 GenBank에 등록된 연어의 염기서열과 비교하여 single nucleotide polymorphism(SNP)으로서의 가치가 있는 5위치(65, 401, 541, 542, 599 bp)를 발견할 수 있었다. 염기서열 중 ND3 영역에 속하는 282~632 bp만을 선택하여 아미노산 서열로 정렬시킨 결과, 116개의 아미노산으로 정렬되었으며, 아미노산간의 치환도 관찰되었다.

참고문헌

- Domanico, M. J. and Phillips, R. B. 1995. Phylogenetic Analysis of Pacific Salmon (*Genus Oncorhynchus*) Based on Mitochondrial DNA Sequence Data. *Mol. Phylo. Evol.*, 4: 366-371.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 18.88pp.