

PCR-RFLP 분석에 의한 뱀장어의 구별

김우진 · 이정호 · 김경길
국립수산물과학원 생명공학연구단

서론

최근 수산물 수입자유화로 인해 냉동 수산물뿐만 아니라 활어 상태의 수산물이 대량으로 외국으로부터 수입되고 있어 국내 양식업이 상당한 어려움에 처해 있다. 특히 국내 뱀장어는 양식에 필요한 종묘의 공급이 매우 어려워 수입업자들은 외국으로부터 다양한 종의 실뱀장어 종묘를 대량으로 수입하고 있다. 국내산 뱀장어는 이식되는 다른 뱀장어에 비해 국민의 선호도가 높을 뿐만 아니라 높은 가격으로 거래되고 있어 외국산 뱀장어가 국내산으로 둔갑되어 거래될 수 있다. 국내산 뱀장어와 수입산 뱀장어의 정확한 판별은 국내 뱀장어 시장의 유통질서 확립에 매우 필요하다. 그러나 수입되는 실뱀장어는 형태학적인 특징으로 국내산 뱀장어와 구분하기는 매우 어려울 뿐만 아니라 allozyme 및 mtDNA 분석으로도 (특히 *Anguilla anguilla*와 *A. rostrata*) 구분이 매우 어렵다 (Tesch 1999; Bastrop et al., 2000). 본 연구에서는 국내산 뱀장어 (*A. japonica*), 적도산 뱀장어 (*A. bicolor bicolor*), 북미산 뱀장어 (*A. rostrata*), 유럽산 뱀장어 (*A. anguilla*)를 PCR-RFLP technique으로 정확하게 구분하고자 한다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 뱀장어속의 4종 (*A. japonica*, *A. bicolor bicolor*, *A. rostrata*, *A. anguilla*)은 국립수산물과학원 진해내수면연구소에서 구하였다. Genomic DNA는 Asahida et al. (1996)의 방법에 따라 근육조직에서 분리하였다. RAPD-PCR에서 증폭된 절편중에서 중간 차이를 보이는 약 360bp 부분을 각 뱀장어에서 분리하여 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열을 중간 비교하여 제한효소가 생기거나 없어진 부분을 RFLP-PCR을 위해 선별하였다. 염기서열에서 특정 primer sets를 제작하여 PCR로 증폭하여 분리하고 제한효소 (Taq I, Mae I, Tru9 I)로 절편을 절단한 후 agarose 및 metaphor agarose 전기영동한 후 ethidium bromide용액에서 염색하여 UV lamp하에서 DNA 밴드를 확인하였다.

결과 및 요약

RAPD-PCR technique은 대상생물의 유전정보가 알려져 있지 않아도 arbitrary primer 등을 사용하여 증폭된 DNA 절편들을 비교하여 종간 구분 및 집단 유전학적 연구 등을 분석하는 유전자 다형 분석법이다 (Williams et al., 1990). 본 연구에서는 *Anguilla*속의 4종 (국내

산 뱀장어, *Anguilla japonica*; 적도산 뱀장어, *A. bicolor bicolor*; 북미산 뱀장어, *A. rostrata*; 유럽산 뱀장어, *A. anguilla*)을 RAPD-PCR에 의해 증폭된 국내산 뱀장어 362bp 절편과 적도산, 북미산, 유럽산 뱀장어 376bp 절편을 분리하여 염기서열을 비교 조사하였다. 국내산 뱀장어를 기준으로 다른 종과 비교한 결과 24bp (6.4%)가 달랐으며, 이중 유럽산은 염기전환 (transition)이 7개, 염기치환 (transversion) 2개, 염기결실이 1개, 염기삽입이 14개가 관찰되었고, 북미산은 각각 7개, 3개, 0개, 14개, 적도산은 8개, 2개, 0개, 14개가 관찰되었다. 이중 특이한 점은 국내산 뱀장어는 다른 종과는 달리 114부터 126bp까지 13bp가 결실되어 있었다. 이것은 특정 primer set (forward primer : A1F, A2F; reverse primer : A1R, A2R)을 제작하여 PCR로 확인하였다. 그리고 염기변화가 있는 곳에 제한효소가 생기거나 없어진 곳을 탐색하여 이중 3곳의 제한효소 (Taq I, Mae I, Tru9 I) site을 선별하였고, 이를 확인하기 위해 특정 primer set (forward primer : A1F, A3F; reverse primer : A1R, A3R)을 제작하여 PCR-RFLP을 실시하였다. A1F와 A1R을 사용하여 PCR에 의해 증폭된 절편을 Taq I 으로 절단한 결과 국내산은 절단되지 않은 290 bp로 관찰되었고, 적도, 북미 및 유럽산은 절단된 172bp와 131bp로 관찰되었다. Mae I 으로 절단한 결과 국내산과 유럽산은 각각 절단되지 않은 290bp와 303bp, 적도산은 절단된 274bp와 29bp로 관찰되었다. A3F와 A3R을 사용하여 PCR에 의해 증폭된 절편을 Tru9 I으로 절단한 결과 국내, 적도 및 유럽산은 96bp와 34bp로, 북미산은 71bp, 34bp, 25bp로 절단되었다. 이런 결과들은 RAPD-PCR 증폭산물이 형태학적으로 구분이 어려운 뱀장어를 구분할 수 있는 유전자 marker로 이용될 수 있음을 보여준다.

참고문헌

- Asahida T., T. Kobayashi, K. Saitoh and I. Nakayama. 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Sci.*, 62: 727-730.
- Bastrop R., B. Strehlow, K. Jürss and C. Sturmhuber. 2000. A new molecular phylogenetic hypothesis for the evolution of freshwater eels. *Molec. phylogenetics Evolut.*, in press.
- Tesch F.W. 1999. *Der Aal. Biologie und Fischerei.* Verlag Paul Parey, Hamburg.
- Williams, J.G.K., A.R. Kugelik, K.J. Livak, J.A. Rafolski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6351-6535.