

송어(Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) 간조직에서의 Genomic DNA 분리

정의영 · 이근광*

군산대학교 해양개발학과 · *건국대학교 유전공학 연구소

송어(Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*)의 간조직에서 genomic DNA를 분리하였고, agarose gel 전기영동을 실시하였다.

서 론

송어(rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*)는 연어과 송어속에 속하고, 신선한 냉수성 담수어종으로 국민의 식량자원과 동물성 단백질의 공급원으로 중요한 위치를 차지하고 있으며, 새로운 품종개발은 물론 그에 따른 기초연구는 중요한 과제라고 할 수 있다. 그러나 몇몇 학자들에 의해 일조에 따른 성선 제제 호르몬의 변화(Follet 등, 1967), 난소 발달에 따른 혈청성분 calcium 및 phosphorus의 변화(Bromage 등, 1982), 성선 발달에 따른 조직학적 연구(Lam, 1982)와 송어의 혈청을 분리하여 대립 유전자 유전자형 및 유전자의 빈도를 추정 보고(Morrison, 1970; Utter 등, 1972; Diebig 등, 1979)한바 있으며, 국내에서는 Kim(1990)에 의하여 무지개 송어의 혈청중 호르몬 농도, 혈청성분 수준, 유전자형의 빈도 및 조직학적 변화에 관한 연구가 이루어졌을 뿐이며, 분자 생물학적, 생화학적, 또한 유전학적 측면에서의 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 무지개 송어의 분자 생물학적 연구의 기초 자료를 삼고자 간조직에서 genomic DNA를 분리하였다.

재료 및 방법

1. 실험 생물

본 연구에 사용된 무지개 송어는 체중이 700-1000g인 성체를 사용하였다.

2. Genomic DNA 분리

간조직(2-3g)과 인산완충용액(pH 7.0) 2-3 ml를 혼합하여 유리 균질기에 넣고 조직을 완전히 균질화 한후 균질액을 원심 분리용 튜브에 넣고 1000xg로 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전물을 0.5 ml의 TE 완충액(10mM Tris-Cl pH 7.6, 10mM EDTA)을 넣고 침전물을 부유시킨 후 최종 농도가 200 µg 되게 proteinase K를 넣고 잘 혼합한 후 다시 여기에 최종 농도가 0.5% 되게 SDS(Sodium dodesyl sulfate) 용액을 넣어 잘 혼합한 후 37°C에서 1-2시간 정치시킨 다음 2500xg로 원심분리하여 침전물을 버리고 상등액은 다시 새 튜브에 옮기고 정제된 phenol을 동량 첨가하여 두 용액이 혼합되도록 조심스럽게 흔들어준 후 12000xg로 10분간 원심분리하여 상등액을 새 튜브에

옮기고 2-3회 같은 방법으로 phenol을 처리하였다. 이 용액에 다시 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)을 동량 처리하여 12000xg로 10분간 원심분리하여 그 상등액을 새 튜브에 옮겨 최종농도가 0.1M 되게 Na-acetate를 넣고 2.5배의 ethanol을 섞은 다음 -20°C에서 24시간 정치하였다. 상기 용액을 4°C에서 12000xg로 10분간 원심분리하고 침전된 DNA를 진공 건조시킨 다음 100 μ l의 TE 완충액 DAN를 용해시켜 4°C에 보관하면서 사용하였다.

Genomic DNA의 전기영동은 agarose(type II, Sigma)를 1x TBE 완충액 (89mM Tris-base, 89mM boric acid, 2.5mM EDTA, pH8.0)으로 용해하여 수평 tray에서 굳혀 만든 0.9% agarose gel을 사용하여 40V로 12시간 전개시킨 후 ethidium bromide 수용액 (0.5 μ g/ml)에서 30분간 염색시켜 단파장 자외선등(Ultraviolet products, Inc., USA) 위에서 관찰하고 폴라로이드 (UV 55mm universal Mamina) 사진기에 적색 필터를 부착하여 촬영하였고 분자량 계산은 Hansen과 Olsen(1978), Ito 등(1976), Southern(1979), Stullwagen(1983)의 방법을 이용하여 표준 곡선을 작성하여 측정하였다.

결과 및 고찰

무지개 송어의 간 조직에서 분리한 genomic DNA를 agarose gel 전기영동을 실시하여 (Fig. 1), 분자량을 산출한 결과 약 21.3 kb로 측정되었으며, DNA는 파장 260 nm에서의 흡광도를 측정하였다 (Fig. 2). 최근에 척추동물의 세포질내에 존재하는 mtDNA의 염기배열 순위에 따라 종내 또는

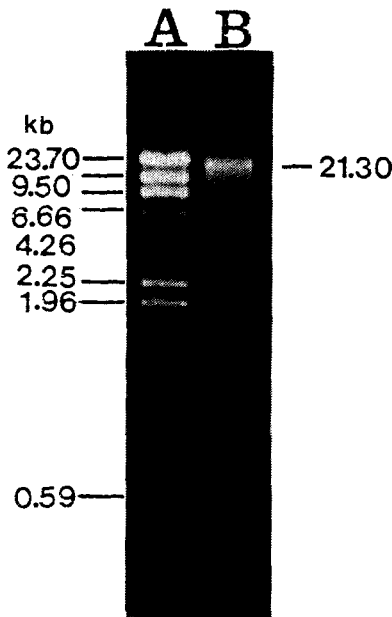


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis patterns of genomic DNA from liver tissue of rainbow trout.
A: λ /Hind III
B: genomic DNA

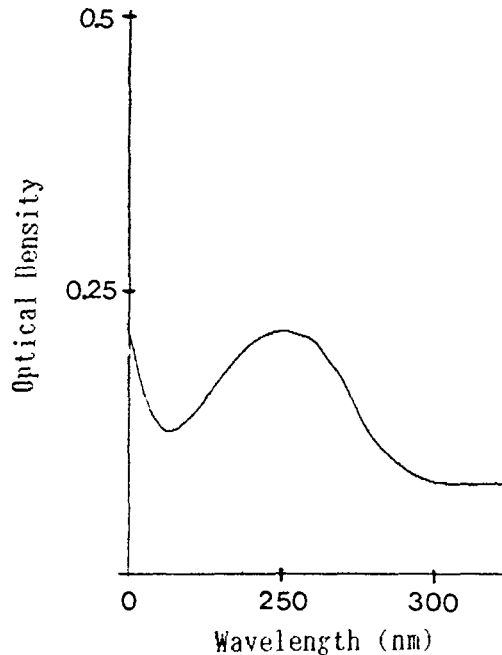


Fig. 2. UV spectrogram of genomic DNA from liver tissue of rainbow trout.

중간 근연관계를 밝힘으로서 종의 분화과정을 유추할 수 있기 때문에 많은 연구자들의 관심사가 되었다(Ferris, 1980; Avise 등, 1987). mtDNA는 핵 DNA에 비해 작으며, 환상 2중 나선 구조로 되어있고 모계유전 물질로 알려져 있다. 또한 세포 내외 환경 변화에 따라 핵 DNA 보다 염기 치환 속도가 매우 빠른 특징을 근거로 환경 적응 문제와 연관하여 근연 중간 또는 자매종 및 잡종에 대한 연구에 많이 이용되고 있다(Ferris 등, 1981, 1983; Lansman 등, 1981; Chapman 등, 1982; Avise와 Saunders 1984; Lamb와 Avise, 1987). mtDNA 연구는 사람 (Brown, 1980; Somouse와 Li, 1987) 및 포유동물(Bush 등 1977; Avise 등, 1979; Chapman 등 1982) 파충류 (Wright 등, 1983), 양서류(Spolsky와 Uzzell, 1984; Carr 등, 1987) 뿐만 아니라 어류(Avise와 Saunders, 1984; Bermingham과 Avise, 1986; Gonzales-Villasenor 등, 1986; Dowling 등 1989; Chapman, 1990)에 이르기까지 다양하게 연구되어지고 있으며, 앞으로 이 분야에 대한 연구가 필요하며, 종내 종간의 근연 관계를 분석하고 종내 유전자 변이정도 등의 상호 관계를 규명하는데 중요하리라고 생각된다.

인 용 문 헌

- Avise, J. C., and N. C. Saunders. 1984. Hybridization and introgression among species of sunfish(Lepomis): Analysis by mitochondrial DNA and alloenzyme markers. *Genetics*. 108: 237-255.
- Avise, J. C., C. A. Reeb., and N. C. Saunders. 1987. Geographic population structure and speices differences in mitochondrial DNA of mouthbrooding marine catfishes(Ariidae) and demersal spawning toadfishes. *Evolution*. 41: 991-1002.
- Avise, J. C., C. Giblin-Deavidson., J. Laerm., J. C. Patton., and R. A. Lansman. 1979. Mitochondrial clones and matremal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 6694-6698.
- Bermingham, E., and J. C. Avise. 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeaster United states. *Genetics*. 113: 939-965.
- Brown, W. W. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 3605-3609.
- Carr, S. M., and A. C. Wilson. 1987. Evolutionary inferences from restriction maps of mitochondrial DNA from nine taxa of *Xenopus* frogs. *Evolution*. 41: 176-188.
- Chapman, R. M., J. C. Stepens., R.A. lansman., and J.C. Avise. 1982. Models of mitochondrial DNA transmission genetics and evolution in higher eucaryotes. *Genet. Res. Camb*. 40: 41-57.
- Chapman, R. W. 1990. Mitochondrial DNA analysis of striped bass populations in chesapeake bay. *Copeia*. 2: 355-366.
- Diebig, E., Meyer, J. N., and P. Glodek, 1979. Biochemical polymorphisms in muscle and liver extracts and in the serum of the rainbow trout, *Salmo gairdenri*. *Anim. Blood Grpe Biochem. Genet*. 10: 165-174.
- Dowling T. E., G. R. smith and W.M. Brown. 1989. Reproductivie isolation and introgression between *Notropis cornutus* and *Wotropis chrysocephalus*(Family Cyprinidae): Comparison of mophology Allozymes and mitochondrial DNA. *Evolution*. 43(3): 620-634.
- Ferris, S. D., A. C. Wilson, , and W. M. Brown, 1981. Evolutionary tree for apes and humans based on cleavage maps of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 2432-2436.

- Follett, B. K., Farner, D. S., and M. L. Morton 1967. The effects of alternating and short daily photoperiod on gonadal growth and pituitary gonadotropins in the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii*. Biol. Bull. Biol Lab. Woods Hole. 133: 330-342.
- Genzales-Villasenor, L. I., A. M. Burkhoff., V. Corces., and D. A. Powers. 1986. Characterization of cloned mitochondrial DNA from the teleost *Fundulus heteroclitus* and its usefulness as an interspecies hybridization probe. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 43: 1866-1872.
- Hansen, J. B., and Olsen. 1978. Isolation of large bacterial plasmid and characterization of the p₂ incompatibility group plasmids pGMI and pGM 5. J. of Bacteriology. 135: 227-238.
- Ito, J., F. Kawamura., and S. Yanofsky. 1976. Analysis of ϕ 29 and ϕ 15 genomes by bacterial restriction endonucleases. EcoRI and HpaI. Virology. 70: 37-51.
- Kim, G. W. 1991. Studies on serum hormone, serum components levels, genotype frequency and histological in reproductive cycles of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Kon-kuk University, Ph. D. thesis.
- Lam, T. J. 1982. Applications of endocrinology to fish culture. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39: 111-137.
- Lansman, R. A., R. O. Shade., J. F. Shapira., and J. C. Avise. 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. J. Mol. Evol. 17: 214-226.
- Llamb, T., and J. C. Avise. 1987. Morphological variability in genetically defined Categories of anuran hybrids. Evolution. 41(1): 157-165
- Smouse, P. E., and W. H. Li. 1987. Likelihood analysis of mitochondrial restriction-cleavage patterns for the human-chimpanzee-gorilla trichotomy. Evolution. 41: 1162-1176.
- Sorthern, E. 1979. Gel electrophoresis of restriction fragments. Methods in Enzymology. 68: 152-176.
- Spolsky, C., and T. Uzzell. 1984. Natural interspecies transfer of mitochondrial DNA in amphibians. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 5802-5805.
- Stellwagen, N. C. 1983. Accurate molecular weight determinations of deoxyribonucleic acids restriction fragments on agarose gels. Biochemistry. 22: 6180-6185.
- Utter, F. M., and H. O. Hodgins. 1972. Biochemical genetic variation at six loci in four stocks of rainbow trout, Trans. Amer. Fish. Soc. 3: 494-502.
- Wright, J. W., C. Spolsky., and W. M. Brown. 1983. The origin of the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus laredonesis* inferred from mitochondrial DNA analysis. Herpetologica. 39: 410-416.

**Isolation of Genomic DNA from Liver Tissue of
Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)**

Ee-Yung Chung, and Keun-Kwang Lee*

Department of Marine development, Kunsan National University, Kunsan 573-360 Korea

* Institute for Genetic Engineering and Department of Biology, Konkuk University,
Seoul 133-701, Korea

The genomic DNA from liver tissue of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) was analyzed by agarose gel electrophoresis. The molecular weight of *Oncorhynchus mykiss* genomic DNA was about 21.3 kilobase pairs.