

해조류 김 *Porphyra yezoensis* 엽체로부터 산에 민감한 유전자의 분리

진 형 주 · 박 선 미 · Long-Guo Kim · 진 덕 희 · 공 인 수 · 홍 용 기
부경대학교 생물공학과 · ¹강릉대학교 해양생명공학부
(접수 : 1999. 12. 2., 게재승인 : 1999. 12. 15.)

Isolation of an Acid-Labile Gene from the Seaweed *Porphyra yezoensis* Tissue

Hyung-Joo Jin, Sun-Mee Park, Long-Guo Kim, Deuk-Hee Jin¹, In-Soo Kong, and Yong-Ki Hong[†]
Department of Biotechnology, Pukyong National University, Namku, Pusan 608-737, Korea

¹Faculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

(Received : 1999. 12. 2., Accepted : 1999. 12. 15.)

The genetic responses of aquaculturable seaweed *Porphyra yezoensis* tissue by acid shock have been compared using differential display technique. The tissue has been challenged in seawater containing 0.05% hydrogen chloride (pH 3.0) for 5 min, then rehabilitated in normal seawater for 10 min, 30 min, 60 min and 4 hrs, respectively. Total RNA was extracted by LiCl-guanidinium method. The cDNA was synthesized by reverse transcription with random hexamers and amplified by PCR with arbitrary primers. The genetic fragment disappeared by acid shock was selectively isolated from agarose gel and sequenced with a DNA auto sequencer. One of the acid-labile gene (605 bp) was identified as a dethiobiotin synthetase gene according to sequence alignment analysis by the NCBI BLAST search program.

Key Words : acid-labile gene, acid shock, differential display, *Porphyra yezoensis*, seaweed

서 론

일반적으로 해양생물은 해양환경에서의 막대한 생태적 역할과 무한한 산업적 활용 가능성으로 인하여 많은 관심을 받고 있다. 그 중에서 해조류는 광합성 능력으로서 지구 환경정화에 미치는 영향과 고착생물로서 다양한 외부 환경에 대응하여야만 하므로 다양한 생리활성물질의 생산 등으로서 많은 연구 대상이 되어왔다. 특히 우리나라를 비롯한 일본 중국 등에서는 식용으로서의 해조류 양식 및 동남아 등지에서는 유용 다당류의 생산 목적으로 대량 양식기술을 통한 생산을 행하고 있다(1). 해조류 중 특히 방사무늬 김(*Porphyra yezoensis*)의 양식기술은 인공채묘 기술이 개발된 이래 양식 및 가공분야의 많은 기술적 진보를 거듭해 오고있으며(2), 1996년도의 경우 우리나라 전체 양식 수산물 생산고의 26%로서 단위 생물종 당 생산단가가 가장 높은 품종이다(3). 대부분의 김 양식장은 천해 해역으로 하천수의 유입으로 인한 풍부한 영양염류의 공급을 받고있는 지역에 있다. 이러한 영양염류는 김의 성장촉진에 도움을 주는 반면에 여러 가지 미생물, 미세조류, 부착조류 등의 증식도 함께 촉진하여 결과적으

로 김 성장에 대한 영양분의 경쟁관계, 질병유발, 김 양식의 생산력 저하 등의 문제점들을 동시에 유발하고 있다. 따라서 최근에는 김을 양식하는 과정에서 각종 병해와 여러 가지 부착생물의 제거를 위하여 유기산 제제 혹은 염산을 직접 사용하기도 한다. 이로써 이들 산 처리제들의 김에 대한 안정성, 이차적인 해양오염 및 인체 유해성 등 사회적 논란의 대상이 되어 왔다. 이들 산 처리시의 부착생물에 대한 제거 효능에 대해서는 국내에서도 일부 연구가 발표되어있다(4-7). 그러나 김 엽체 자체의 산 처리시에 받는 생리적 영향 및 유전자 수준에서의 형질표현의 변화 등 분자생물학적 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 유전자 형질표현의 differential display 기법 즉 DDRT-PCR 기법(8,9)을 이용하여 김 엽체에 대한 산 스트레스를 일시적으로 가한 후 이때 특이적으로 유도 반응하는 유전자를 분리하여 그 구조를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

해조체 시료

실험에 사용한 양식용 김은 김 망에 부착된 상태의 냉동 김 발 상태의 방사무늬 김(*Porphyra yezoensis*) 엽체로서 수분함량이 약 30% 정도로 건조된 상태에서 -70°C에 보관하면서 사용하였다. 필요할 경우 냉동 김발 일부를 PES 배지(10)에 하루동

[†] Corresponding Author : Department of Biotechnology, Pukyong National University, Namku, Pusan 608-737, Korea
Tel : 051-620-6182, Fax : 051-620-6180
E-mail : ykhong@dolphin.pknu.ac.kr

안 10°C에서 정치 배양한 후, 건강한 엽체만을 대상으로 초음파, Betadine 등으로 무균 처리하였다(11). 다음 약 0.2 cm 크기로 자른 엽체들을 15 mL cap tube에 넣은 후 바늘구멍이 뚫린 뚜껑을 달고 50 mL tube에 거꾸로 넣어서 1000 rpm에서 1분간 원심분리시켜 탈수한 후 조직을 얻고, 이 조직들의 습중량 무게를 측정하였다.

산 처리 조건

김의 양식 과정에서 부착생물의 오염을 제거하기 위하여 사용하고 있는 산 처리제는 구연산이 주종을 이루고 있지만, 공 등(6)에 의한 각종 산 처리제의 효과를 보면 산의 종류에 관계없이 동일 pH에서는 거의 동일하게 부착생물을 제거하였다. 따라서 본 실험에서는 산 처리제로 염산을 사용하여 0.05% 염산이 첨가된 해수 즉 pH 3.0의 해수에서 5분간 처리하여 산 충격을 가한 후, 정상 평균 해수 내에서 정치 배양시킨 후(10분, 30분, 60분, 4시간) 각각의 total RNA를 추출하였다. 대조군으로써는 동일 조건하에서 산 처리하지 않은 김 엽체로부터 RNA를 추출하였다.

RNA 추출

산 충격에 의하여 특이적으로 유도 반응하는 유전자 분리를 위하여 total RNA를 LiCl-guanidinium 방법(9,12)으로 추출하였다. 즉 김 엽체 600 mg(습중량)을 액체질소로 급랭시켜 미세하게 파쇄한후, RNA 추출용액(0.8 mM LiCl, 0.6% Sarcosyl, 10 mM EDTA, 0.2% PVPP, 5% 2-mercaptoethanol, 4M Guanidinium thiocyanate, pH 9.0) 2 mL를 첨가하여 55°C에서 10분간 가열한 다음, 4°C에서 1시간동안 서서히 흔들어준다. 엽체를 제거한 상층액에 phenol/chloroform을 2회 처리한 후, 이 상층 수용액에 0.1배의 3M sodium acetate, pH 5.4 및 2.5배량의 100% isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 1시간 방치한 다음, 원심분리(1.5×10^4 rpm, 10분, 4°C)하여 핵산 분획을 침전시켰다. 이 침전된 핵산을 DEPC-H₂O 200 μ L에 녹인 후 동량의 4M LiCl를 첨가하여 4°C에서 1시간 처리후 재차 원심분리하여 핵산 침전을 회수하였다.

DNase 처리

침전된 핵산에 RNasin(1 unit/ μ L) 600 μ L를 첨가하여 용해시킨 후, DNA를 제거시키기 위하여 RNase-free DNase I(1 unit/ μ L) 4 μ L, 10-fold DNase I buffer(500 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol) 20 μ L, RNasin(1 unit/ μ L) 10 μ L, DEPC-H₂O 66 μ L를 첨가하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다(13). 다음 0.1 M EDTA 20 μ L 및 2% SDS 20 μ L를 첨가하여 반응을 중지시키고, DNase를 제거시키기 위해서는 phenol/chloroform 처리하였다. 그리고 남은 RNA를 회수하기 위하여 0.1배의 3M sodium acetate, pH 5.4 및 3배량의 100% ethanol(-20°C)을 첨가하여 원심분리시켰으며, 재차 100% ethanol(-20°C)로 조심스럽게 세척한 후 RNA량을 측정하기 위하여 100 μ L TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6)에 녹였다.

RNA 정량

Total RNA를 정량하기 위하여 RNA를 TE buffer에 100배 희석한 후 GeneQuant(Pharmacia Biotech Co.)를 이용하여 측정하였다. 그리고 다음 cDNA 합성을 위하여 total RNA 농도를 0.5 μ g/

μ L되게 RNasin(0.5 unit/ μ L) 함유 DEPC-H₂O로 조정하였다.

cDNA 합성

Total RNA 2.5 μ g을 cDNA 합성 protocol(Invitrogen Co.)에 따라 20 μ L의 반응혼합액에 사용하였다. 우선 total RNA 5 μ L에 DEPC-H₂O 3 μ L를 넣은 다음, 100 mM methyl mercury hydroxide 2 μ L를 첨가하여 mRNA의 2차구조가 변성되도록 5분 동안 실온에 두었다(14). 다음 0.7 M 2-mercaptoethanol 2.5 μ L를 첨가하여 mRNA로부터 methyl mercury hydroxide를 분리시켰다. 이 total RNA에 random hexamer(1 μ g/ μ L) 1 μ L를 가하여 65°C서 5분간 둔후 얼음위에 10분간 둬으로서 상보적인 위치에 수소결합되게 만들었다. 그리고 cDNA 합성은 placental RNA inhibitor(20 unit/ μ L) 1 μ L, 5-fold RT buffer(250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 700 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol) 4 μ L, 25 mM dNTPs 1 μ L, avian reverse transcriptase(10 unit/ μ L) 0.5 μ L를 첨가하여 42°C에서 1시간동안 반응을 시켰다. 그리고 반응을 충분히 시키기 위하여 한번 더 avian reverse transcriptase 0.5 μ L를 가하여 42°C에서 1시간 더 반응을 시켰다. 이 cDNA 합성을 종결시키기 위하여는 95°C에서 3분간 가열 처리하였다.

PCR 증폭반응

PCR 증폭반응은 DNA thermal cycler(Perkin-Elmer Cetus Co.)를 이용하여 10-base oligonucleotide인 arbitrary primer들(Operon Technology Co.)을 구입하여 사용하였다. PCR 반응 혼합물(25 μ L)는 cDNA 용액 1 μ L, arbitrary primer 5 pM, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.5% Tween 20, 0.1 mM dNTP(United States Biochemical Co.), 그리고 Taq DNA polymerase(Promega) 1 unit로 구성되었다. PCR 반응 조건은 먼저 95°C에서 5분간 둔 다음, 95°C에서 5초, 36°C에서 1분, 72°C에서 2분간씩으로 45회 반복 반응을 시켰다(15).

Agarose gel 전기영동

PCR 생성물 10 μ L를 loading dye(20% Ficoll 400, 0.025% bromophenol blue) 1 μ L와 섞은 후, ethidium bromide(0.5 μ g/mL)가 포함된 3% agarose gel에 주입하여 TAE buffer(20 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) 하에서 50 volt 전압으로 1시간 반 동안 분리하였다(16).

DDRT-PCR 생성물의 cloning

산 처리된 엽체에서 특이적으로 생기거나 없어진 cDNA의 DDRT-PCR 생성물을 agarose gel 전기영동상에서 분리한 후, 해당 DNA fragment band 만을 오려내어 DNA Exelutor(Fine PCR Precision Ind.)로서 DNA만을 추출하였다. 이 DNA fragment는 TA cloning vector인 pCR 2.1 vector(Invitrogen Co.)에 삽입하여 *E. coli* INVaF⁺ 숙주 대장균에서 대량 증폭한 후 추출 정제한 다음 삽입된 유전자의 염기서열을 조사하였다.

염기서열 조사

염기서열은 DNA Auto Sequencer(ABI PRISM 377, Perkin Elmer Co.)로 분석하였으며, 염기 상동성은 NCBI의 BLAST search 프로그램을 이용하여 비교하였다.

결과 및 고찰

산 처리 조건

해조류 김의 양식과정 중 여러 가지 부착생물 및 잡균의 오염을 제거하기 위하여 사용하고 있는 산 처리제는 크게 주성분이 유기산인 구연산을 사용하는 경우와 무기산인 염산을 사용하는 경우로 나눌 수 있다. 구연산을 주성분으로 사용하는 경우에도 각종 영양성분들의 첨가 정도에 따라 여러 종류의 제품들이 나와 있다. 염산을 주성분으로 사용하는 경우에는 가격이 저렴하고 강산이므로 김 양식장에서 많이 이용되어져 왔으나, 공업용 염산의 남용으로 불순물에 의한 2차적인 해양오염 및 인체유해성 등 사회적 논란의 대상이 되고 있으며 현재는 규제 중에 있다. 공 등(6)에 의하면, 각종 산 처리제의 효과를 조사한 결과, 산의 종류에 관계없이 동일 pH에서는 거의 동일하게 부착생물을 제거하였다. 즉 김의 사멸 세포율은 pH 3.0에서 5분 처리 경우 13%에 불과한데 비해, 규조류의 경우 pH 3.0에서 90% 이상이 탈락하였으며, 파래의 사멸 세포율 또한 90% 이상이었다. 따라서 산처리제로서 유기산인 구연산과 무기산인 염산 등이 사용될 수 있으나 본 연구에서는 실험 편이상 시약용 순수 염산을 사용하여 산 처리 조건을 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride를 이용한 활력 측정방법(17)으로 확인하여 보았다. 그 결과 0.05% 염산을 첨가한 해수 즉 pH 3.0에서 5분간 처리시 김의 활력 측정 결과는 산 처리를 하지 않은 김과 비교할 때 90% 이상 활력이 유지되었다(Table 1). 또한 규조와 파래 등 대부분의 부착생물들을 김으로부터 제거할 수 있는 pH 1.0으로 산의 농도를 높여 10초 동안 처리하였을 경우 김의 사멸세포율은 10~20% 정도였다(6). 그러나 이때 실제 산 처리 시간은 10초로 고정하였지만 완전히 산 용액을 세척하기까지 40초 정도 소요되는 등 실험상 고농도에서의 산 처리기준을 일정하게 하기에는 어려운 상태였다. 따라서 본 실험에서의 산 처리조건은 0.05% 염산을 첨가한 해수 즉 pH 3.0에서 5분간 산 충격을 가하였을 때 이에 반응하는 유전자를 분리하고자 하였다.

Table 1. Comparison of viability in acid-shocked and healthy thalli of *Porphyra yezoensis*. Acid-shocked tissues were prepared by dipping in seawater(pH 3.0) containing HCl for 5 min. Dead tissues were prepared in seawater containing 1% formaldehyde for 2 days. Viability was measured by spectrophotometric quantification method using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC). Relative viability was estimated as the percentage of TTC absorbances of(sample - dead tissue) divided by(fresh tissue - dead tissue).

Tissues	Absorbance by TTC assay	Relative viability(%)
Acid-shocked tissue	0.63	90
Fresh tissue	0.69	100
Dead tissue	0.08	0

RNA 추출

산 충격에 의하여 특이적으로 유도 발현되는 유전자의 분리를 위하여 우선 total RNA는 LiCl-guanidinium 방법(9,12)으로 추출하였다. 위에서 설정한 산처리 조건하에서 즉 김 엽체를 pH 3.0의 해수에서 5분간 처리한 후, 일반의 멸균 해수 내에서 10분, 30분, 60분, 4시간 동안 정치 배양시키면서 산 충격에 의한 유전 형질의 표현 변화를 비교하기 위하여 RNA 생성 pattern을 비교하였다. 대조구로서는 동일 조건하에서 산 처리하지 않은

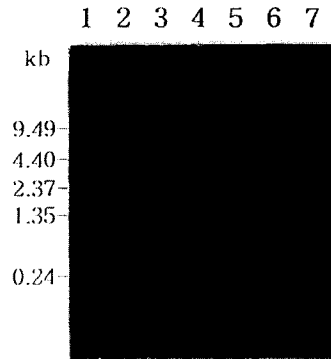


Figure 1. Electrophoresis of total RNA from the acid-shocked and rehabilitated tissues of *Porphyra yezoensis* on formaldehyde agarose gel. The tissue has been shocked in seawater of pH 3.0 for 5 min, and rehabilitated in normal seawater for 10 min(lane 3), 30 min(lane 4), 60 min(lane 5) and 4 hrs(lane 6), respectively. Control tissue was used without acid shock at the same conditions(lane 2). The total RNA was extracted by the LiCl-guanidinium method. The molecular size marker is the 0.24-9.5 kb RNA ladder from BRL/Gibco(lanes 1 and 7).

김 엽체로부터 RNA를 추출하였다. 각각의 total RNA를 formaldehyde agarose gel 상에서 5 µg씩 주입하여 전기영동한 결과는 Figure 1과 같다. 그 결과 LiCl-guanidinium 방법으로 추출한 total RNA들은 large subunit의 26S-ribosomal RNA 및 small subunit의 18S-rRNA, chloroplast의 large rRNA, chloroplast의 small rRNA 등 4개 band들이 분해되지 않은 상태로 선명하게 추출되어져 나왔다. 이로 미루어볼 때 추출된 total RNA중의 형질표현 mRNA도 간접적으로나마 크게 분해가 되지 않은 것으로 판단하여 다음 단계의 cDNA 합성주형으로서 사용하였다.

cDNA 합성 및 differential display

Total RNA 2.5 µg에 random primer를 1 µL 넣고 cDNA 합성을 한 후, arbitrary primer들을 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 그 결과 OPA 20 종류의 arbitrary primer들 중 OPA 1(CAGGCCCTTC)을 primer로 사용한 경우, 산 처리 후 김 엽체를 멸균 해수 내에서 30분간 정치 배양하면서 유전 형질 표현을 유도한 결과 산 충격에 의하여 약 600 bp 크기의 한 유전자의 RNA 표현 즉 RNA 합성이 소실되어진 것을 볼 수 있었으며, 1 시간 후에는 조금 RNA 표현이 회복되었으며, 4시간 후에는 대조구와 같은 수준으로 정상적으로 RNA 합성이 회복되었다(Figure 2). 따라서 김 엽체로부터 외부 충격에 의한 유전 형질의 변화를 조사하기 위하여는 위와 같은 조건하에서 30분 동안의 형질표현 즉 RNA 합성에 소요되는 시간이 지난 후에 그 유전자의 differential display를 조사하면 충분할 것이다.

Differential display 생성물의 cloning

산 충격에 의하여 소실되어진 약 600 bp의 DDRT-PCR product의 유전자 구조를 알기 위하여, 이 600 bp의 acid-labile gene을 TA cloning vector인 pCR 2.1에 cloning한 후, *E. coli* INVaF' 숙주 균주에 형질전환시켰다. 이들 형질전환된 집락들중에서 600 bp 크기의 외부 유전자가 삽입되어 있는 집락을 선별하기 위하여, 각 집락들로부터 alkaline lysis법(16)으로 vector plasmid를 추출한 후, 제한효소 Eco RI으로 분해시켜서 확인하

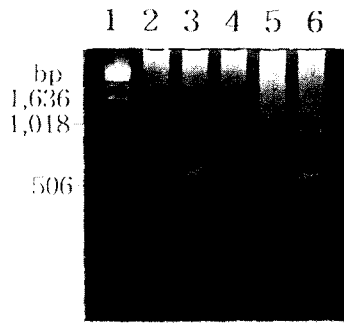


Figure 2. Differential display pattern detected in cDNAs from acid-shocked tissues of *Porphyra yezoensis*. Reversed transcribed cDNAs from the tissues, shocked in seawater of pH 3.0 for 5 min and rehabilitated in normal seawater for 10 min(lane 3), 30 min(lane 4), 60 min(lane 5) and 4 hrs(lane 6), were amplified using the arbitrary primer OPA 1(CAGGCCCTTC). Control reaction with tissue, followed the same procedure without acid shock, produced an approximately 600 bp PCR product(lane 2). The molecular size marker is the 1 kb DNA ladder from BRL/Gibco(lane 1).

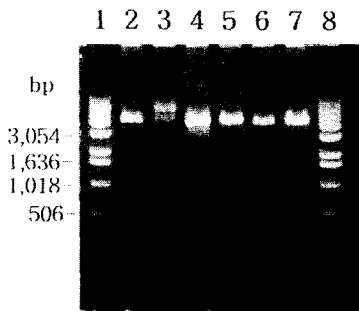


Figure 3. Cloning of DDRT-PCR product using TA cloning vector. The DDRT-PCR product was ligated in the TA cloning vector of pCR 2.1 and transformed to *E. coli* INVaF' host cell. The recombinant plasmid was extracted by alkaline lysis and digested with the restriction enzyme *Eco* RI. Lanes 1 and 8 are the molecular size marker of 1 kb DNA ladder from BRL/Gibco. Lanes 2 - 7 are the *Eco* RI digested-plasmids from different transformants.

```

1  CAGGCCCTTC TACCACGACA TGATCGACTT TTTCGGTCAG GTTTGQCAGG 50
51 CCGTITGAAA TGAGGGTGTG ATTGATTGGG CAACTGTGCG CCAAGCTACT 100
101 TTCTTCTTCG CTTAACGCGA TAGGATTAAC TGCTTCATAA GGCAGITCGA 150
151 TGGTITGAAAC ACTCTGCAAC ACCAGGGCAT CTTTATTACG CAGCCCTTCG 200
201 GGAGTCTCTT TGCCTCCCTT CGCTACGGGT TTATATCCCG CAACCGTTTT 250
251 TCCCTGGGAG GCTAACGCTT GTAGCAATGC GCGGGAAACC ACGGTTTTCC 300
301 CTACAGAAGT GTCGTGACCG GTAATAAAGA AACGCTTCAG CATCACTAAC 350
351 TGCACCTAAA TGCTTCACAA ATATAAACA GGAAATAAT TAACCTTGAA 400
401 AGTCTAAGTT ATGCTTTCCT GGCCTAAATG GAGATAGCGC AAATTTGGT 450
451 AGAAGAGTTA GAAATATTA ACCCTGCAAC AGACGAATCA ACAAGAACC 500
501 GTTATACATC GCGTCTTTTA CCAAGTGCAGC GCCTGCCATC GTGCCCTGGT 550
551 TAGAAAACGT AGTACTCTCA ACGCTGATGT GCTGACTATA CGCAGGAAAG 600
601 GGCTG-3' 650
    
```

Figure 4. Nucleotide sequence of the cloned acid-labile gene fragment(605 bp). The gene expression was transiently repressed in the *Porphyra yezoensis* tissue by acid shock treatment at pH 3.0 for 5 min.

였다(Figure 3). 그 결과 lane 6의 형질전환 집락에서 600 bp 크기의 외부 유전자가 삽입되어 존재하는 것을 확인할 수 있었으

며, 이 집락으로부터 약 3 mL의 균체를 배양하여 재조합된 plasmid를 alkaline lysis법으로 추출한 후, High Pure Plasmid Isolation Kit(Boehringer Mannheim Co.)로서 plasmid를 정제하여 DNA 염기배열 조사를 행하였다.

염기서열 비교

TA cloning vector에 삽입된 acid-labile gene에 대한 구조를 알기 위하여, DNA Auto Sequencer(ABI PRISM 377, Perkin Elmer Co.)를 이용하여 그 염기서열을 조사한 바 Figure 4와 같이 605개의 염기로 구성되어져 있는 것으로 나타났으며, G+C의 함량은 46.4% 정도 차지하였다. 이 유전자의 염기서열을 NCBI BLAST search 프로그램을 이용하여 알려진 유전자들과 유사성 검색을 실시하여 이 유전자의 기능을 조사한 결과, 대장균의 dethiobiotin synthetase(E.C. 6.3.3.3) 유전자와 93%의 높은 상동성을 나타내었다.

지금까지 방사무늬 김의 cDNA library(18)에서 각 유전자들의 염기서열을 NCBI의 BLAST search 프로그램을 이용하여 알려진 유전자들과 유사성 검색 즉 Expressed Sequence Tags(ESTs) 분석을 실시하여 이들 유전자들의 기능을 조사한 결과, 190개의 유전자 clone들 중에서 81 ESTs를 각 기능적 범주로 분류하면 스트레스 관련 유전자와 신호전달 기작에 관련되어지는 유전자들이 가장 많았으며 그 다음으로 에너지 대사에 관련하는 유전자 순이었다(19). 김의 스트레스 관련 유전자들 중에서 산화 환원력을 조절함으로써 스트레스에 방어하는 것으로 알려진 thioredoxin을 EST 분석 결과를 통해 밝히기도 하였다. 따라서 acid-labile gene으로서의 dethiobiotin synthetase 유전자도 산 스트레스와 관련되어 지므로 앞으로 김의 엽록체 및 미토콘드리아로부터도 보다 많은 ESTs 분석을 통하여 재확인해볼 필요가 있다. 그리고 계속하여 염산 및 구연산에 대한 acid-responding gene들을 보다 많이 분리하여 비교하고자 하며, 현재까지 10개 이상의 산 내성 관련 유전자들을 분리하여 확인 중에 있다.

요 약

대표적인 양식 해조류인 방사무늬 김 엽체를 대상으로 하여 산 처리에 의한 유전형질의 표현 변화를 differential display 기법으로 비교하여 보았다. 방사무늬 김 엽체를 0.05% HCl을 첨가한 해수(pH 3.0)에서 5분간 처리한 후 각각 10분, 30분, 60분 그리고 4시간동안 멸균 해수에서 정지 배양시키면서, RNA를 추출하여 cDNA 합성, PCR 증폭, agarose gel 전기영동 및 DNA 염기배열을 조사하였다. 그 결과 arbitrary primer OPA 1(CAGGCCCTTC)을 사용하여 differential display한 경우, 산 처리 후 30분간 멸균 해수에서 정지 배양한 엽체에서 특이적으로 RNA 합성이 일어나지 않은 유전자를 분리할 수 있었으며, 그 염기서열을 비교한바 이 유전자 fragment(605 bp)는 dethiobiotin synthetase 유전자와 93%의 높은 상동성을 가진 것으로 나타났다.

감 사

본 논문은 해양수산부에서 시행한 수산특정연구사업으로 수행된 결과입니다. 박선미는 한국과학재단 지원 Post-Doc 연구자임.

REFERENCES

1. Critchley, A. T. and M. Ohno (1998), Seaweed Resources of the World, p431, Japan International Cooperation Agency, Japan.
2. Kang, J. W. and N. P. Ko (1997), Seaweed Aquaculture. Taewha Publication, Pusan. pp294.
3. Korea Fisheries Association (1997), Korean Fisheries yearbook, 29, Dong Yang moon haw co., Seoul. pp583.
4. Jeong, Y. K., S. K. Cho, K. J. Kim (1989), The extermination studies of the diatom attached Larver, *Porphyra* sp., NFRDI REPORT, **73**, 180-195.
5. Park, Y. J., S. K. Kim, K. J. Kim, S. K. Cho (1990), The studies for *Ulva*(*Enteromorpha linza*) of culture net of *Porphyra* community in culture ground, studied reports of NFRDI, **44**, 77-85.
6. Kong, Y. K., S. C. Jeong, D. Y. Lee, S. Y. Kim, J. Y. Jang, Y. K. Jeong, J. Y. Choi, H. K. Kim, J. K. Lee, (1992), NFRDI REPORT, **96**, 178-191.
7. Jeong, Y. K., J. Y. Choi, K. J. Kim, (1992), The extermination studies of the epiphytes and larver disease of *Porphyra* sp. NFRDI REPORT, **96**, 215-226.
8. Liang, P. and A. B. Pardee (1992), Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science*(Washington D. C.), **257**, 967-971.
9. Hong, Y. K., C. H. Sohn, M. Polne-Fuller, and A. Gibor (1995), Differential display of tissue-specific messenger RNAs in *Porphyra perforata*(Rhodophyta) thallus, *J. Phycol.*, **31**, 640-643.
10. Provasoli, L (1968), Media and prospects for cultivation of marine algae. In *Cultures and Collections of Algae*, A. Watanabe and A. Hattori, Eds, pp.63-75, Jap. Soc. Plant Physiol., Japan.
11. Park, J. W., Y. C. Cho, B. H. Nam, H. J. Jin, C. H. Sohn, and Y. K. Hong (1998), RAPD identification of genetic variation in the seaweed *Hizikia fusiformis*(Fucales, Phaeophyta). *J. Mar. Biotechnol.*, **6**, 62-64.
12. Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987), Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156.
13. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Strhl (1987), Current Protocols in Molecular Biology, pp414-416, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
14. Payvar, F. and R. T. Schimke (1979), Methylmercury hydroxide enhancement of translation and transcription of ovalbumin and conalbumin mRNAs. *J. Biol. Chem.*, **254**, 7636-7642.
15. Yu, K. and K. P. Pauls (1992), Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl. Acids Res.*, **20**, 2606.
16. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. p18.88, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
17. Nam, B. H., H. J. Jin, S. K. Kim, and Y. K. Hong (1998), Quantitative viability of seaweed tissues assessed with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, *J. Appl. Phycol.*, **10**, 31-36.
18. Seo, B. S., E. K. Lee, and Y. J. Kim (1999), Construction and analysis of cDNA library from *Porphyra yezoensis*, *Kor. J. Life Sci.*, In press.
19. Lee, E. K., S. B. Seo, T. H. Kim, S. K. Sung, G. An, C. H. Lee, and Y. J. Kim (1999), Analysis of expressed sequence tags of *Porphyra yezoensis* and expression of a thioredoxin-like protein under drought and salt stress, *Mol. Cells*, In press.