

## Denaturing gradient gel electrophoresis와 real time PCR 방법을 이용한 연어 유전자들의 DNA 이형 다양성 검색

함승협 · 이석근\* · 한현섭\*\* · 진덕희<sup>+</sup>

강릉대학교 해양생명공학부, \*강릉대학교 치의학과, \*\*국립수산진흥원 서해수산연구소

## DNA Heteropolymorphism of Chum Salmon Detected by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Real Time PCR

Seung Hyub HAM, \*Suk Keun LEE, \*\*Hyon-Sob HAN and Deuk-Hee JIN<sup>+</sup>

Department of Marine Bioscience and Technology, College of Life Science;

\*Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Kangnung National University, Kangnung, 210-702, Korea

\*\*West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Incheon, 400-201, Korea

In order to detect the DNA heteropolymorphism of chum salmon, selected essential genes were examined in different regional chum salmons, i.e., Korean, Japanese and American by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and real time PCR methods. From the promoter regions and introns of growth hormone, mtDNA ND1 region, D-loop region, IGF-I, histone H3 and MCH2 several representative primer pairs were obtained and employed for the DGGE with the PCR products from the genomic DNAs of the different regional chum salmons. mtDNA ND1, D-loop region and IGF-I genes showed marked heteropolymorphism between Korean and American chum salmons. Intron C of growth hormone also showed a heteropolymorphism between Korean and Japanese chum salmons. Whereas heteropolymorphism of histone H3 and MCH2 genes was detected among in Korean, Japanese and American chum salmons in the examined region. The real time PCR disclosed the characteristic incremental production of target DNAs dependent on the heteropolymorphic conditions of genomic DNAs of chum salmons, thus the different regional chum salmons could be grouped by the variable incremental curves. Although the DGGE and real time PCR did not produce the identical results in this study, we suggest that the DGGE and real time PCR could be used for the primary screening of the DNA heteropolymorphism of different animal genome.

Key words: Heteropolymorphism, DGGE, Real time PCR, mtDNA, Growth hormone, IGF-I, MCH2, Histone H3

### 서 론

연어류는 한국, 일본, 연해주, 캄차카, 알래스카, 캐나다, 쿠릴, 캘리포니아 등 북태평양 연안에 분포하고 있으며 연어 (*Oncorhynchus keta*)는 우리나라의 동해안 하천으로 모친 회귀하는 대표적인 어종이다. 지금까지는 연어의 다형성을 조사하기 위해서 RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Cronin et al., 1993), VNTR (variable number of tandem repeat) (Mary et al., 1996), microsatellite analysis (Nelson et al., 1998) 등이 사용되어 왔으며, 이를 토대로 밝혀진 염기서열을 이용하여 정확한 변이를 확인할 수 있었다. 또한 여러 가지 이론을 바탕으로 한 프로그램인 parsimony analysis, distance analysis, maximum-likelihood (Motto, 1980) 등의 방법을 이용하여 계통도를 확립한 보고도 있다. Michael 등 (1995)은 태평양에 서식하는 연어류의 mtDNA (mitochondrial DNA) 중의 하나인 ND3 (NADH dehydrogenase subunit 3)와 ATPase6 영역에 대한 염기서열의 비교 분석을 통해 결정하였으며, 또한 Eric 등 (1999)은 유럽지역에 서식하는 atlantic salmon의 mtDNA, ND1/16 srRNA의 RFLP 연구에서 각

지역마다의 차이를 결정하였다. 그러나 계통도를 확립하기까지의 과정은 많은 시간과 비용이 들 뿐만 아니라, 각각의 프로그램에 따라 다른 결과를 얻을 확률이 많고 동일한 프로그램이라도 입력변수 (parameter)에 따라 결과에 큰 차이가 있기 때문에 여러 가지 프로그램을 사용해야 하는 단점이 있다. 특히 본 연구에서는 동일 어종인 연어를 지역별로 분류하여 genomic DNA의 이형 다양성에 관한 정확한 결과를 산출하기 위하여 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)와 real time PCR 방법을 사용하였으며, 그 방법이 비교적 간단하므로 많은 시간과 비용을 절약할 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 이미 그 염기서열이 밝혀져 있는 chum salmon의 mtDNA ND1 (NADH dehydrogenase subunit 1) 영역 (Nilsson et al., 2001), D-loop (mtDNA Displacement-loop) 영역 (Lee et al., 1999), IGF-I (insulin-like growth factor-I) (Kavan et al., 1993; Kaval et al., 1994), MCH2 (melanin concentrating hormone2) (Takayama et al., 1989)의 유전자와 growth hormone의 intron C (Oakley et al., 1999), histone H3의 promotor sequence (Hanley et al., 1998)를 이용하여 새로운 primer를 제작하고 DGGE 방법을 이용하여 한국, 미국, 일본산 연어의 DNA 이형 다양성 (heteropolymorphism)을 조사하였다.

<sup>+</sup>Corresponding author: dhjin@kangnung.ac.kr

## 재료 및 방법

### 1. Genomic DNA 추출

본 연구에서는 한국, 미국, 일본산 연어를 사용하였는데, 한국산 연어는 1999년 국립수산물진흥원 양양내수면 연구소 채포장에서 채취한 시료를 사용하였으며, 미국산 연어는 1999년 알래스카 수산 과학 연구소 (AFSC) 워싱턴 소재 Quilence 국립부화장에서 채취한 연어를 사용하였다. 그리고 일본산 연어는 1998년 일본 수산청 홋카이도 지역의 Shokanbetsu 강에서 채취한 시료이며, 한국, 미국, 일본 지역에서 각각 3마리의 연어를 사용하였다. 연어의 간을 절취하여 -70°C 냉동고에서 보관하여 실험에 사용하였다. Genomic DNA는 DNA midi kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 추출하였으며, 1% agarose gel에서 전기영동하여 DNA 크기를 확인하였다.

### 2. PCR (polymerase chain reaction)

PCR을 하기 위한 primer 제작을 위하여 Genbank 검색을 통해 연어 mtDNA ND1 영역 (AF133701)과 D-loop 영역 (AF125518), growth hormone (AF005927), IGF-I (AF063216), histone H3 (AF063216), MCH2 (M27871)의 염기서열로부터 최적 primer 위치를 찾은 다음 DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems, Foster city, U.S.A)로 제작하였다 (Table 1).

PCR 반응은 여러번의 예비실험으로 얻어진 결과를 토대로, mtDNA D-loop 영역, MCH2, IGF-I, histone H3는 annealing 온도를 60°C로 설정하고, mtDNA ND1 영역과 growth hormone는 annealing 온도 55°C에 30초 조건으로 하였으며 denaturation 30초, extension 30초 과정을 35 cycle로 GeneAmp PCR system 9600 (Applied Biosystem, Foster city, U.S.A)을 이용하여 반응시켰다. 반응 후 증폭된 DNA를 확인하기 위하여 1% agarose gel 전기영동을 하였다. mtDNA ND1 영역은 9개 시료 중에서 6개의 시료 즉, Ks17, Ks24, As11, As14, Js13, Js15에서 431 bp의 증폭 DNA가

확인되었으며, mtDNA D-loop 영역, growth hormone, IGF-I, histone H3, MCH2는 각각 503, 349, 499, 523, 480 bp 크기로 PCR에서 증폭된 DNA가 확인되었다.

### 3. DGGE

단일개체내의 특정유전자에 대한 유전자 분석시에 사용되는 multiplex PCR을 하지 않고 여러 종류의 연어를 이용하여 특정 유전자에 대한 PCR을 동시에 진행하기 위하여 원래의 TDGS (two dimensional gel electrophoresis scanning)에서 사용하는 수평 전기영동을 생략하고 수직 전기영동만을 하기 위한 comb을 준비하였으며, 수직 전기영동 방법에 사용되는 graded denature gel를 만들기 위하여 90% urea-formamide (UF) solution (10% acrylamide/bis-acrylamide solution 37.5:1, 50×TAE buffer, 6.6 M urea, 36% deionized formamide)과 30% urea-formamide (UF) solution (25% acrylamide/bis-acrylamide solution, 50×TAE buffer, 2.2 M urea, 12% deionized formamide)을 만들었으며 오른쪽 chamber에는 90% UF solution 13 mL를 왼쪽 chamber에는 30% UF solution 13 mL를 넣고 펌프를 이용하여 미리 제작된 plate에서 약 40분 정도 굳힌다. Gel plate를 60°C의 1×TAE buffer가 들어있는 TDGS 장치에서 PCR 산물 15 µL을 넣은 후, 100 V로 약 18시간 동안 작동시키고, ethidium bromide 염색 후, Molecular Biology Lab system (Kaiser, Michigan, U.S.A)으로 관찰하였다.

### 4. Real time RCR

Real time PCR은 PCR 실험에서와 마찬가지로 mtDNA ND1 영역, D-loop 영역, growth hormone, IGF-I, histone H3, MCH2의 primer와 genomic DNA를 사용하여 DNA SYBR Green PCR Core Reagents (PE biosystems, Foster city, U.S.A)와 혼합한 후, GeneAmp 5700 sequence Detection Software (PE biosystems, Foster city, U.S.A)를 이용하였다.

Table 1. Genes and their primer sequences used in this study

Gene	GenBank accession no.	Primer	Sequence	Position
NADH dehydrogenase subunit 1	AF133701	forward	TCAGCCTGGACTAATCT	449-466
		reverse	GTTGGTCGTAGCGAAATC	880-853
Displacement loop	AF125518	forward	CCCGCACATTTGTAAATG	11-28
		reverse	TTGGTGGGTAACGAGCAA	514-497
Growth hormone	AF005927	forward	TATTGGGCAAGCAGACCA	181-198
		reverse	CCACCGATTAGACAGTGA	530-513
Insulin-like growth hormone	AF063216	forward	AGCAGGTAGATTTGCGTGCAT	962-982
		reverse	GCCTATCCAAACATGAGATGG	1461-1441
Histone H3	AF017147	forward	GCCGTCAAAGCCAAGTAAAT	7-27
		reverse	ACAGTCGGAGTATAGCCTCCA	487-467
Melanin concentration hormone 2	M27871	forward	ACAAGTAGCAGATGTAGCGGA	70-90
		reverse	ATACCGCTTGGACCTCCA	593-576

## 결 과

### 1. 분석

PCR의해 증폭된 DNA를 확인하기 위하여 1% agarose gel로 전기영동을 한 결과, mtDNA ND1 영역은 9개 시료 중에서 6개의 시료 즉, Ks17, Ks24, As11, As14, Js13, Js15에서 431 bp의 증폭 DNA가 확인되었으며, mtDNA D-loop 영역, growth hormone, IGF-I, histone H3, MCH2는 각각 503, 349, 499, 523, 480 bp의 PCR 산물이 확인되었다.

DGGE방법에 의하여 mtDNA ND1 영역 (AF133701, 449-880)을 비교한 결과, 한국, 미국, 일본산 연어에서 각각 전기영동 양상이 다른 DNA가 확인되었으며 Ks24, As11, As13, Js15는 서로 뚜렷한 이형다양성을 보였으며, 한국산 연어 Ks17과 일본산 연어 Js13은 한쌍으로만 분리되어 이형다양성이 관찰되지 않았다.

D-loop 영역 (AF125518, 11-514)을 비교한 결과 일본산 연어에서 denaturing gel 상에서 전기영동의 차이점이 발견되었고, Ks12, Ks17, Ks24, As11, As13, As14 Js15는 모두 같은 이형다양성으로 나타났으며, 다른 2개의 연어 즉, Js13과 Js18은 이형다양성이 관찰되지 않았다.

같은 방법으로 growth hormone의 intron C (AF005927, 181-530)를 비교하였을 때, 6개의 시료 즉 Ks17, Ks24, As11, As13, Js15, Js18은 유사한 DNA 전기영동 양상을 보임으로써 같은 계군으로 추측되며, Ks12, Js13은 다른 7개의 연어 즉, Ks17, Ks24, As11, As13, Js13, Js15, Js18과는 다르게 큰 두 개의 DNA band가 발견되어 이형다양성으로 나타났으며 차이가 있는 변이가 일어난 것으로 관찰되었다. 미국산 연어 As14는 upper band 부분에서 다른 8개의 연어 시료에서 공통으로 보여지고 있는 작은 크기의 DNA band가 관찰되지 않았으므로 다른 어종과 차이가 있는 변이가 있음을 알 수 있었다. 한국산 연어 중 Ks12 시료는 다른 한국산 연어 즉, Ks17, Ks24와는 다른 DNA band를 관찰할 수 있었으며, 일본산 연어 Js13은 다른 일본산 연어 즉 Js15, Js18과는 다른 DNA band가 나타났으며 이것은 오히려 Ks12, Js13 시료와 서로 유사한 것으로 관찰되었다.

IGF-I (AF063216, 962-1461)과 histone H3 (AF017147, 7-487)는 한국, 미국, 일본산 연어 모두 이형다양성으로 나타났으며, MCH2 (M27281, 70-593)는 한국, 미국, 일본산 모두 이형다양성이 관찰되지 않았다.

결과적으로 연어의 유전자 mtDNA ND1, mtDNA D-loop, growth hormone 등의 관찰 부위에서 DGGE 분석결과 특이한 SNP는 관찰되지 않았다 (Fig. 1).

### 2. Real time PCR 분석

본 연구는 여러 개체의 연어 유전자를 손쉽게 찾기 위해 real time PCR를 이용하여 DGGE와 각각의 시료별로 차이가 있는지를 관찰하였다 (Fig. 2). mtDNA ND1 영역 (AF133701, 449-880)에서 한국산 연어 Ks12는 PCR로 증폭된 DNA가 확인되지 않아서 DGGE 분석으로 변이를 관찰할 수 없었지만, real time PCR에서는 한국산 연어 Ks12와 일본산 연어 Js18 시료는 PCR에서는

증폭된 DNA가 확인되지 않았지만 real time PCR에서는 비슷한 DNA 생성 패턴을 보였으며, Ks17, Ks24, As11, As13, Js13, Js15는 불규칙한 DNA 생성 패턴을 보였으며, 미국산 연어 As14도 PCR 과정에서 증폭된 DNA 밴드가 확인되지 않았지만 real time PCR에서는 불규칙한 그래프 생성 패턴으로 나타났다.

D-loop 영역 (AF125518, 11-514)에서 한국산 연어 Ks12와 미국산 연어 As11은 서로 유사한 DNA 생성 패턴을 보였지만 다른 7개의 시료, 즉 Ks17, Ks24, As13, As14, Js13, Js15, Js18은 불규칙한 DNA 생성 패턴을 보였다.

Growth hormone (AF005927, 181-530)에서는 DGGE 분석에서 변이가 발견된 Ks12가 real time PCR 결과에서는 한국산 연어 Ks17과 미국산 연어 As13과 유사한 DNA 생성 패턴을 보였으며 Ks24, As11, As14, Js13, Js15, Js18는 Ks12, Ks17, As13과는 다른 불규칙한 DNA 생성 패턴을 보였다.

IGF-I (AF063216, 962-1461)에서는 DGGE 분석에서 한국, 미국, 일본산 연어는 모두 이형다양성으로 나타났지만, real time PCR에서는 Ks12, Ks17, Ks24, As11, As13은 유사한 DNA 생성 패턴을 보였다. 미국산 연어 As14와 일본산 연어 Js13, Js15, Js18은 불규칙한 DNA 생성 패턴을 보였다.

Histone H3 (AF017147, 7-487)에서는 DGGE 분석에서 모두 이형다양성으로 나타났지만 real time PCR에서는 한국산 연어 Ks12, Ks17, Ks24와 미국산 연어 As11, As13은 유사한 DNA 생성 패턴을 보였으며, 미국산 연어 As14와 일본산 연어 Js13, Js15, Js18은 불규칙한 DNA 생성 패턴을 보였다. MCH2 (M27281, 70-593)도 DGGE에서는 모두 이형다양성이 나타나지 않았지만, real time PCR에서는 Ks12, Ks17, Ks24, As11, As13은 서로 유사한 DNA 생성 패턴을 보였지만, 미국산 연어 As14와 일본산 연어 Js11, Js13, Js15는 불규칙한 DNA 생성 패턴을 보였다.

## 고 찰

일반적으로 TDGS 방법은 multiplex PCR을 통하여 커다란 유전자 DNA를 동시에 검색하기 위하여 5~10개 정도의 PCR 산물을 일차적으로 수평 방향의 전기영동을 통하여 DNA 크기별로 구분한 다음 2차적으로는 수직 방향으로 denaturing gel을 전기영동함으로써 각각의 단일가닥의 DNA (ssDNA)의 다양성을 판별하는 방법이다 (Nico et al., 2002). 본 연구에서는 TDGS 장치를 이용하여 특이적인 DNA 부분만을 관찰하고자 하기 때문에 수평 전기영동을 생략하고 수직 전기영동만을 이용한 DGGE 방법을 사용하였으며 적절한 comb을 제작하여 9개 연어들을 한꺼번에 실험하였기 때문에 연어에서 중요하게 사용되는 다수의 유전자를 매우 빠르고 쉽게 검색하여 연어 유전자에 존재하는 이형다양성을 관찰할 수 있었다. DGGE에서는 60°C의 항온조 내에서 urea와 deionided formamide가 포함되어 있는 acrylamide gel을 사용하므로 전기영동 중에 쉽게 DNA melting이 이루어지게 된다 (Kam et al., 2001). 이러한 DNA melting이 너무 신속하게 발생되면 gel 상에 그 차이가 쉽게 관찰되어지지 않으므로 PCR로 DNA를 증

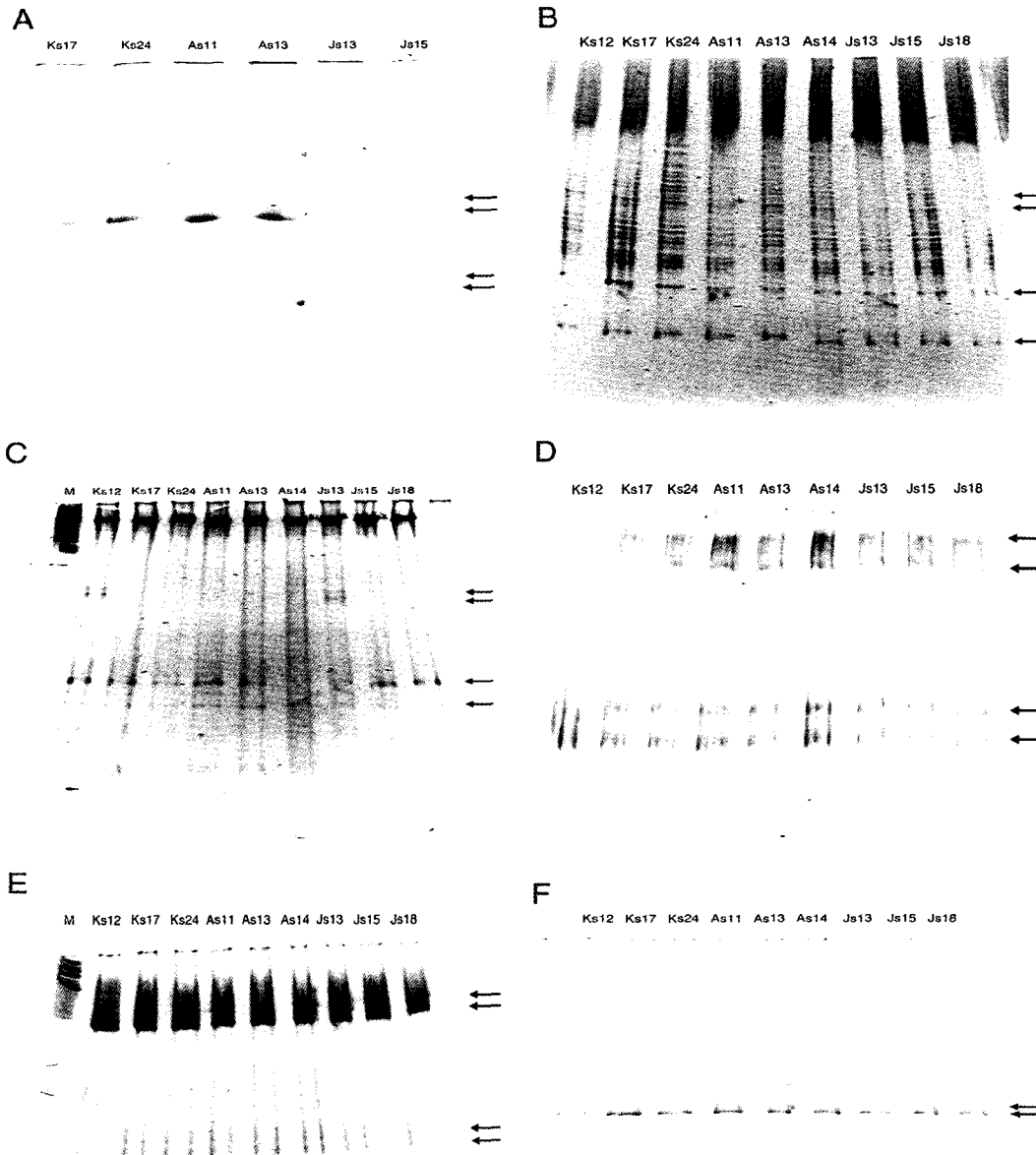


Fig. 1. DGGE results of mtDNA ND1 gene (A), D-loop gene (B), growth hormone intron C sequence (C), IGF-I gene (D), histone H3 promoter sequence (E) and MCH2 gene (F) obtained from different regional chum salmon (arrows; different alleles, heteropolymorphic case shows four arrows).

A: mtDNA ND1 gene (AF133701, 449-880); Ks24, As11, As13, Js15 show the migration pattern of heteropolymorphism, while Ks17, Js13 show only a pair of bands.

B: mtDNA D-loop gene (AF125518, 11-514); Ks12, Ks17, Ks24, As11, As13, As14 and Js15 show the migration pattern of heteropolymorphism, while Js13 and Js18 show only a pair of bands.

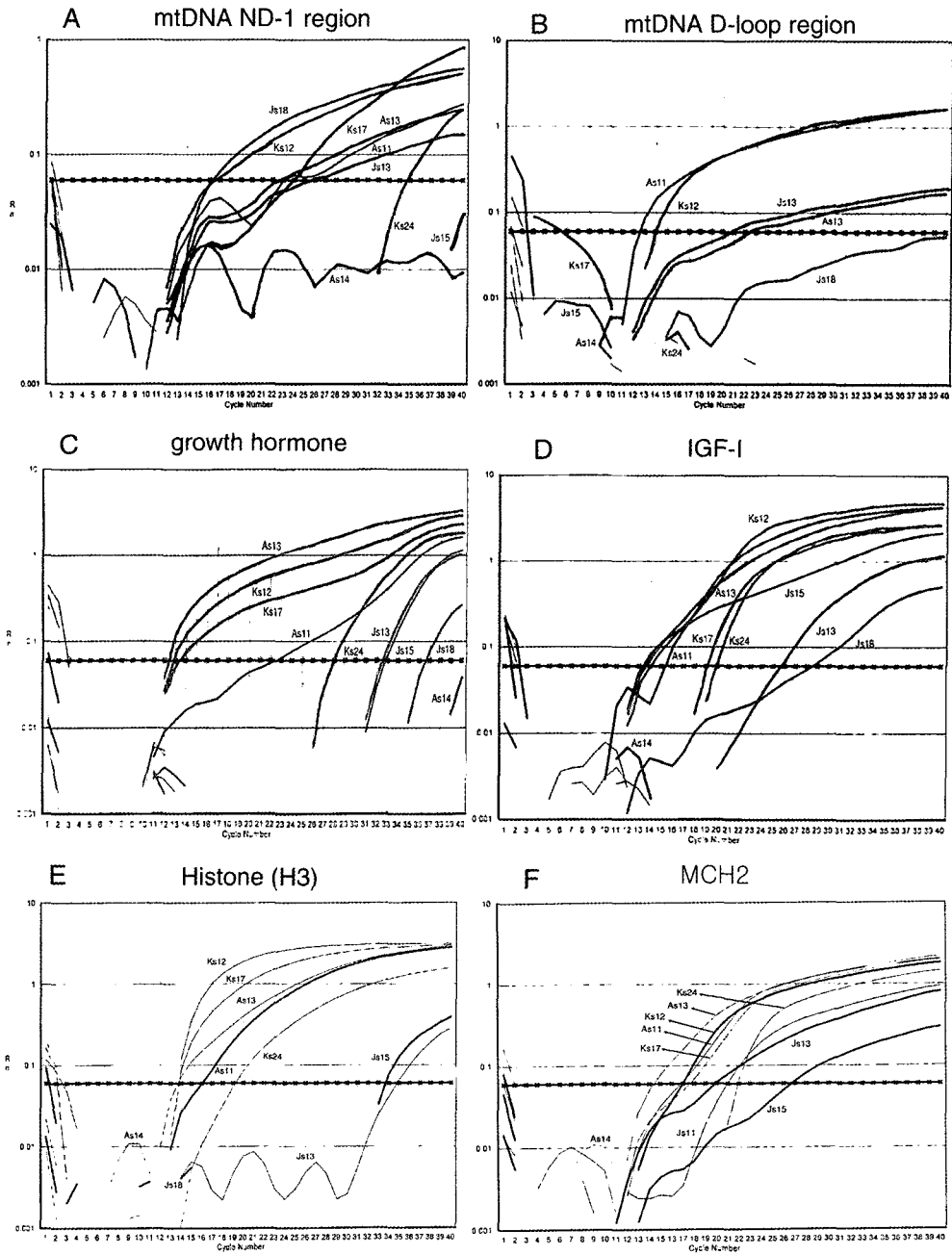
C: growth hormone intron C sequence (AF005927, 181-530); Ks12 and Js13 show the migration pattern of heteropolymorphism, while Ks17, Ks24, As11, Js15 and Js18 show only a pair of bands. As14 was absent of a lower band.

D: IGF-I gene (AF063216, 962-1461); Ks12, Ks17, Ks24, As11, As13, As14, Js13, Js15 and Js18 show the migration pattern of heteropolymorphism.

E: histone H3 promoter sequence (AF017147, 7-487); Ks12, Ks17, Ks24, As11, As13, As14, Js13, Js15 and Js18 show the migration pattern of heteropolymorphism.

F: MCH2 gene (M27871, 70-593); Ks12, Ks17, Ks24, As11, As13, As14, Js13, Js15 and Js18 show only a pair of bands. upper pair of arrows, and lower pair of arrows represent the melted sDNA from heterozygotic allele.

Ks: Korean salmon; As: American salmon; Js: Japan salmon.



**Fig. 2.** Histogram results of real time PCR for the various genes of different regional chum salmon.

**A:** mtDNA ND1 gene (AF133701, 449-880); Ks12 and Js18 showed standard exponential production of target DNA, while Ks17, Ks24, As11, As13, As14, Js13 and Js15 showed irregular production of the target DNA.

**B:** mtDNA D-loop gene (AF125518, 11-514); Ks12 and As11 showed standard exponential production of target DNA, while Ks17, Ks24, As13, As14, Js13, Js15 and Js18 showed irregular production of the target DNA.

**C:** growth hormone intron C sequence (AF005927, 181-530); Ks12, Ks17 and As13 showed standard exponential production of target DNA, while Ks24, As11, As14, Js13, Js15 and Js18 showed irregular production of the target DNA.

**D:** IGF-I gene (AF063216, 962-1461); Ks12, Ks17, Ks24, As11 and As13 showed standard exponential production of target DNA, while As14, Js13, Js15 and Js18 showed irregular production of the target DNA.

**E:** histone H3 promoter sequence (AF017147, 7-487); Ks12, Ks17, Ks24, As11 and As17 showed standard exponential production of target DNA, while As14, Js13, Js15 and Js18 showed irregular production of the target DNA.

**F:** MCH 2 gene (M27871, 70-593); Ks12, Ks17, Ks24, As11 and As13 showed standard exponential production of target DNA, while As14, Js13, Js15 and Js18 showed irregular production of the target DNA.

**Ks:** Korean salmon; **As:** American salmon; **Js:** Japan salmon.

폭할 때 사용하는 primer의 5' end 부위에 GGGGCCCC 등의 염기서열을 필요에 따라 첨가하여 제작함으로써 DNA melting 속도를 조절하였다. 결과적으로 단일한 dDNA에서 전이가 생긴 경우에는 DNA melting 후에 single strand conformation polymorphism에 의하여 다른 개체 (어류)의 DNA와 비교하여 gel 상에 이동하는 band의 크기 차이를 관찰하여 DNA의 변이 여부를 판별할 수 있다 (Mette et al., 2002). 한편, 개체내에 존재하는 1쌍의 dDNA에서 두 쪽의 DNA 염기서열이 서로 같아서 homozygote인 경우에는 DGGE 상에서 DNA melting 후에 2개의 대응 sDNA 가닥만이 이동하므로 오직 2개의 DNA band만이 관찰되지만 만약 한쪽 dDNA 가닥에 변이가 발생한 경우에는 DNA melting 후에 서로 다른 염기서열을 갖는 4개의 sDNA로 나누어지므로 DGGE 상에서 4개의 DNA bands가 보이게 된다. 이런 경우 실제로는 각각 인접하는 2쌍의 DNA bands가 관찰된다. 따라서 DGGE는 매우 효과적으로 genomic DNA의 이형다양성을 관찰할 수 있다고 생각된다. 본 실험을 통해서 관찰한 mtDNA ND1 영역, D-loop 영역, growth hormone, IGF-I에서 이형다양성이 비교적 뚜렷하게 나타나서 다른 개체의 유전자와 쉽게 비교 관찰할 수 있었다. 2차원적 전기영동에서도 동일개체에 heterozygotic 대립 유전자가 있는 경우도 쉽게 구분할 수 있었다.

Real time PCR 실험은 이중 가닥 DNA에 형광을 나타내는 시약이 결합하여 DNA가 복제될 때 활성이 되면서 매회마다 측정된 DNA 생성 양을 그래프로 확인할 수 있어서 PCR 합성량을 예측할 수 있으며, real time PCR에 표적 DNA 중 특별한 전위가 있는 염기서열이나 DNA 전사에 미치는 경우 생산된 전체 PCR 합성량을 매우 정확하게 예측할 수 있다 (Pusterla et al., 2000). 특히 PCR 증폭 과정 중에 elongation에서 DNA polymerase가 DNA 전사할 때 단일가닥의 sDNA template가 DNA 변이에 의하여 서로 다를 경우에 sDNA가 single strand conformation polymorphism에 의하여 특이한 DNA 구조를 이루기 때문에 DNA 변이가 없는 sDNA와는 차이가 있는 DNA 전사속도와 DNA 전사량을 real time PCR 결과로 비교 관찰할 수 있다 (Stephan, 2002). 한편 어류 세포내의 1쌍의 상동 DNA code 중에 한쪽 DNA code 변이에 의한 이형다양성인 경우에는 real time PCR에서 매우 복잡한 DNA 생산 증가 곡선을 보이게 되므로 이를 다른 개체의 real time PCR 결과와 비교하면 이형다양성의 여부를 판단하는데 도움이 될 것으로 생각된다. 비록 primer DNA에 전위가 없을 지라도 real time PCR에 표적 DNA 내부에 있는 변이 여부를 간접적으로 예측할 수 있는 방법이다. Real time PCR은 각각의 유전자에서 DNA 생성 패턴을 관찰하여 단시간에 시료간의 차이점을 알 수는 있지만 정확한 변이를 관찰할 수는 없다. 반면, DGGE는 각 시료 사이에서 변이를 real time PCR 보다 정확하게 확인할 수 있지만 장시간이 걸리는 단점이 있다. 또한 다양성을 연구하기 위해서 각 지역에서 여러 어류나 동물을 이용하여 하나하나를 실험하기에는 많은 시간과 비용이 들기 때문에 DNA 돌연변이를 확인할 수 있는 선택적 scanning 방법이 필요하다.

본 연구를 통하여 DGGE 방법을 DNA 고유의 melting 속도의 차이에 의하여 전기영동시에 나타나는 DNA band의 숫자와 위

치 이상을 관찰하는 방법과 real time PCR 이라는 최신의 DNA 전사 속도와 생산량을 측정하는 방법을 사용하였는데 DGGE의 결과와 real time PCR의 결과가 서로 완전히 일치하게 나타나지는 않았으나 대체로 real time PCR에서는 mtDNA ND1, growth hormone, IGF-I 등에서 보이는 것과 같이 지역의 연어들끼리 비슷한 DNA 전사 및 증폭양상을 보였으나 이들의 정확한 차이점을 구별하기 어려웠다. 이에 비하여 DGGE 방법은 비교적 이형다양성 구별이 가능한 결과로 나타내었다. 결과적으로, real time PCR은 그 방법이 매우 간단한 반면에 다양성 조사에는 부정확한 결과를 보였으나 DGGE는 비록 연구 방법이 어려운 면이 있지만 비교적 유전자의 다양성을 일차적으로 조사하는데 우수한 결과를 보였다.

앞으로 SNP 염기서열을 보다 쉽게 확인할 수 있도록 선택적 scanning 방법이 개발되어야 하며 또한 다량의 시료를 보다 쉽고 빠르게 연구할 수 있도록 더 많은 연구가 이루어져야 한다. 그리고 여기서 얻은 데이터를 이용하여 아주 정확한 염기서열 분석을 통해 얻은 각 개체 사이에 유전자 변이성은 환경의 변화나 생태계의 이상을 예견할 수 있을 뿐만 아니라, 종의 근원이나 개체의 발생과 진화 과정 등을 추정할 수 있어 원산지 판별법 등을 이용하여 수산물 제품에 질을 판단하는데도 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

한국, 미국, 일본지역에 서식하는 연어에서 추출한 genomic DNA를 이용하여 연어의 mtDNA ND1 영역, D-loop 영역, growth hormone, IGF-I, MCH2, histone H3의 염기서열을 분석하여, 최적의 primer를 제작하여 PCR을 실시한 결과, mtDNA ND1 영역은 Ks12, Ks24, As11, As14, Js13, Js15에서 증폭된 DNA를 확인하였으며, D-loop 영역, growth hormone, IGF-I, histone H3, MCH2에서는 모든 시료에서 증폭된 DNA를 확인하였다.

DGGE 분석의 결과, mtDNA ND1 영역 (AF133701, 449-880), D-loop 영역 (AF125518, 11-514)과 growth hormone (AF005927, 181-530)에서는 이형다양성을 확인하였으며, IGF-I (AF063216, 962-1461)과 MCH2 (M27281, 70-593)는 모두 이형다양성이 나타났으나, histone H3 (AF017147, 7-487)는 모두 이형다양성이 관찰되지 않았다. 그리고 real time PCR 관찰 결과는 DGGE의 결과와 유사한 점을 찾을 수 없었지만, real time PCR도 각각의 유전자에 따라 서로 다른 DNA 생성 패턴을 보여 DNA 변이를 쉽게 구별하는데 보조적인 도움이 되었다.

## 감사의 글

본 연구는 한국 과학재단 지정 강릉대학교 동해안 해양생물자원 연구센터 (EMBR)와 해양수산부의 Sea Grant 사업 (2001년도)의 연구비 지원으로 수행되었다.

## 참 고 문 헌

- Cronin, A.A., W.M. Spearman, R.L. Wilmot, J.C. Patton and J.W. Bickham. 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.
- Verspoor E., E.M. McCarthy and D. Knox. 1999. The phylogeography of European atlantic salmon (*Salmo salar* L.) based on RFLP analysis of the ND1/16sRNA region of the mtDNA. *Bio. J. of the L.S.*, 68, 129~146.
- Hanley, S., T.J. Smith, F. Muller, N. Maclean, S. Uzbekova, P. Prunet and B. Breton. 1998. Isolation and functional analysis of the histone H3 promoter from atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7, 165~172.
- Kam, L. and T. Edward. 2001. Bacterial community dynamics in liquid swine manure during storage; molecular analysis using DGGE/PCR of 16S rDNA. *FEMS Microbiol. Ecology.*, 38, 169~177.
- Kavan, V.M., A.P. Koval, V.A. Grebenjuk, S.J. Chan, D.F. Steiner, C. T. Robert Jr. and D. Leroith. 1993. Structure of the chum salmon insulin-like growth factor I gene. *DNA Cell Biol.*, 11, 729~737.
- Koval, A., V. Kulik, S. Duguay, E. Plisetskaya, M.L. Adamo, D.T. Rovers Jr., D. Leroith and V. Kavsan. 1994. Characterization of a salmon insulin-like growth factor I promoter. *DNA Cell Biol.*, 13, 1057~1062.
- Lee, H.J., W.J. Kim, J.H. Lee, K.H. Min, M.A. Yoo, W.H. Lee and J.Y. Park. 1999. Genetic relationships of six salmonids in Korean waters: direct sequence analysis of the mitochondrial DNA control region.
- Mary, V. John., Iqbal Parwez, V. Mylavaram, S. Sivaram, Shilpa Mehta, Nidhi Marwah and Sher Ali. 1996. Analysis of VNTR loci in fish genomes using synthetic oligodeoxyribonucleotide probes. *Gene.*, 172, 191~197.
- Mette, H.N. and B.R. Niels. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *J. Microbiol. Methods.*, 50, 189~203.
- Michael, J., Domanico Ruth and B. Phillips. 1995. Phylogenetic analysis of pacific salmon (Genus *Oncorhynchus*) based on mitochondrial DNA sequence data. *Mol. phylogenetics and evolution*, 4, 366~371.
- Motoo Kimura. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16, 111~120.
- Nelson, R.J., T.D. Beacham and M.P. Small. 1998. Microsatellite analysis of the population structure of a Vancouver island sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stock complex using non-denaturing gel electrophoresis. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7, 312~319.
- Nico, B., D.W. Wim, V. Willy and M.T. Eva. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiol. Ecology*, 39, 101~112.
- Nilsson, J., R. Gross, T. Asplund, O. Dove, H. Jansson, J. Kelloniemi, K. Kohlmann, A. Loytynoja, E.E. Nielsen, T. Paaver, C.R. Primmer, S. Titov, A. Vasemagi, A. Veselov, T. Ost and J. Lumme. 2001. Matrilinial phylogeography of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Europe and postglacial colonization of the Baltic Sea area. *Mol. Ecol.*, 10, 89~102.
- Oakley, T.H. and R.B. Phillips. 1999. Phylogeny of salmon fishes based on growth hormone introns: Atlantic (*Salmo*) and Pacific (*Oncorhynchus*) salmon are not sister taxa. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 11, 381~393.
- Pusterla, N., C.M. Leutenegger, B. Sgrist, J.-S. Chae, H. Lutz and J.E. Madigan. 2000. Detection and quantitation of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horses and snails by real-time PCR. *Veterinary Parasitology*, 90, 129~135.
- Stephan stubner. 2002. Enumeration of 16S rDNA *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen™ detection. *J. Microbiol. Methods*, 50, 155~164.
- Takayama, Y., C. Wada, H. Kawauchi and M. Ono. 1989. Structures of two genes coding for melanin-concentrating hormone of chum salmon. *Gene.*, 80, 65~73.

---

2002년 3월 29일 접수

2002년 8월 31일 수리