

잉어류에서 사립체 Cytb, COI유전자단편의 분리와 배렬특성

김효성, 주창성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《선진과학기술을 받아들이는것은 나라의 과학기술을 빨리 발전시키기 위한 중요한 방도의 하나로 됩니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 500페이지)

우리는 분자계통발육연구와 종검정에서 많이 리용되고있는 물고기사립체의 Cytb, COI 유전자단편을 분리하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

평양시 대동강지류와 함경북도 경성군 온포천에서 잡은 붕어(*Carassius auratus*), 모래마자(*Abbottina rivularis*), 행베리(*Zacco platypus*), 종개(*Nemachilus toni*), 미꾸라지(*Misgurnus anguillicaudatus*), 서선미꾸라지(*Misgurnus mizolepsis*)를 선행연구자료[1]에 준하여 종검색을 진행하고 지느러미들을 잘라내어 게놈DNA를 추출[2]하였다.

유전자증폭을 위한 축퇴프라이머는 다음의 방법으로 작성하였다. NCBI의 BLAST기능을 리용하여 얻은 잉어류유전자(이미 알려진 잉어의 Cytb, COI유전자의 염기배열과 상동성이 높다.)의 아미노산배열을 내리적재하고 MEGA 6.0에서 다중정렬을 진행하였으며 진화적으로 보존된 구역을 찾은 다음 Primer primer 5.0을 리용하여 축퇴프라이머를 작성하였다.

PCR증폭된 단편을 겔회수키트(《OMEGA》)로 회수한 다음 감수성대장균 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 얻어진 형질전환단클론을 주형으로 하여 균액PCR를 진행하고 얻으려는 염기배열크기와 비슷하고 전기영동상이 뚜렷한 균액을 전문배열분석기관에 의뢰하여 분석하였다.

결과 및 논의

1) 게놈DNA의 추출결과

게놈DNA의 아가로스겔전기영동상을 그림 1에 보여주었다.

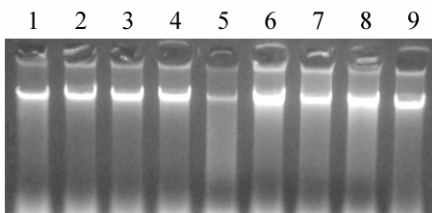


그림 1. 게놈DNA의 아가로스겔 전기영동상
1-9는 시료번호

그림 1에서 보는바와 같이 모든 시료의 DNA는 분자량이 비교적 큰 구역에 균일하게 집중되어있었으며 DNA분해현상이 나타나지 않았다.

초미량분광광도계(《nanodrop2000》)로 측정 한 결과 DNA용액의 농도는 343.2~840.2ng/μL였고 OD₂₆₀/OD₂₈₀값은 1.81~2.07, OD₂₆₀/OD₂₃₀값은 2.10~2.28이었다.

2) 축퇴프라이머의 설계 및 PCR증폭

GenBank로부터 내리적재한 잉어류사립체DNA의 유전자배열에 기초하여 축퇴프라이머를 설계한 결과는 표 1과 같다.

표 1. 설계된 축퇴프라이머염기배열과 특징

프라이머이름	염기배열	배열크기/bp	$T_m/^\circ\text{C}$	증폭단편이름	예견 증폭크기/bp
L14724	GACTTGAAAAACCACCGTTG	20	53.4	Cytb	1 200
H15915	CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC	23	59.6		
L5956	CACAAAGACATTGGCACCCCT	20	55.4		
H6855	AGTCAGCTGAAKACTTTTAC	20	57.4	COI	652~935

우리는 설계된 프라이머쌍에 의하여 유전자배열단편을 얻기 위한 PCR증폭을 진행하였다. 반응액총체적은 $25\mu\text{L}$ 로 하였으며 시약량은 $2.5\text{U}/\mu\text{L}$ 의 *Taq* DNA폴리메라제(《Tiangen》) $1\mu\text{L}$, $10\times\text{DNA}$ 완충액(Mg^{2+} 없음)(《Tiangen》) $2.5\mu\text{L}$, 10mmol/L 의 dNTP(《Tiangen》) $2\mu\text{L}$, 15mmol/L 의 MgCl_2 (《Tiangen》) $1.5\mu\text{L}$, 상하류프라이머 각각 $1\mu\text{L}$, $100\sim 300\text{ng}/\mu\text{L}$ 의 주형DNA $1\mu\text{L}$, ddH₂O $15\mu\text{L}$ 로 하였다.

PCR조건은 예비변성 94°C 3min→변성 94°C 30s, 아닐링 $54\sim 58^\circ\text{C}$ 30s, 연장 72°C 2min, 순환 30~35회→최종연장 72°C 5min이다.

여러가지 종류의 물고기들을 대상으로 한 PCR증폭결과를 그림 2와 3에 보여주었다.

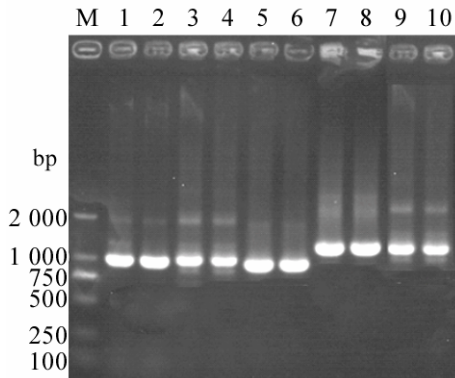


그림 2. 붕어, 미꾸라지, 서선미꾸라지에 대한 PCR증폭결과

1과 2-붕어(COI), 3과 4-미꾸라지(COI), 5과 6-서선미꾸라지(COI), 7-붕어(Cytb), 8-미꾸라지(Cytb), 9와 10-서선미꾸라지(Cytb), M-DNA분자량표식자

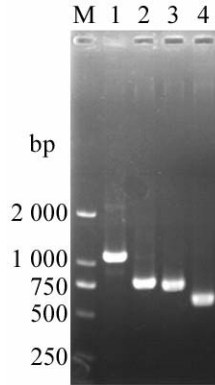


그림 3. 모래마자, 종개, 행베리에 대한 PCR증폭결과

1-행베리(Cytb), 2-행베리(COI), 3-종개(COI), 4-모래마자(COI), M-DNA분자량표식자

그림 2와 3에서 보는바와 같이 PCR증폭결과 1 200bp(Cytb)와 652~935bp(COI)의 위치에 뚜렷한 띠가 나타났다. 이것은 우리가 설계한 프라이머가 사립체DNA의 Cytb, COI유전자부위를 정확히 증폭하였다는것을 보여준다.

3) 분리한 Cytb, COI유전자의 배열분석

유전자염기배열을 Vector NTI 11.0프로그램으로 조립하고 NCBI의 BLAST기능을 리용하여 유전자배열의 정확성여부를 확인하였으며 Expasy의 온라인기능을 리용하여 염기배열의 아미노산번역정확성을 확인한 다음 국제유전자은행(GenBank)에 등록하였다.(표 2)

표 2. 국제유전자은행에 등록된 유전자배열과 등록번호

No.	종이름	등록번호	배열이름	배열길이/bp
1	붕어(<i>Carassius auratus</i>)	KM261767.1	COI	938
2	붕어(<i>Carassius auratus</i>)	KM261774.1	CYTB	1 141
3	모래마자(<i>Abbottina rivularis</i>)	KM261766.1	COI	652

표제 속				
No.	종이름	등록번호	배렬이름	배렬길이/bp
4	모래마자(<i>Abbottina rivularis</i>)	KM261773.1	CYTB	1 140
5	행베리(<i>Zacco platypus</i>)	KM261770.1	COI	748
6	행베리(<i>Zacco platypus</i>)	KM261776.1	CYTB	1 140
7	종개(<i>Nemachilus toni</i>)	KM261769.1	COI	733
8	종개(<i>Nemachilus toni</i>)	KM261775.1	CYTB	1 141
9	미꾸라지(<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	KF732665.1	COI	938
10	미꾸라지(<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	KF736233.1	CYTB	1 141
11	서선미꾸라지(<i>Misgurnus mizolepsis</i>)	KF732664.1	COI	938
12	서선미꾸라지(<i>Misgurnus mizolepsis</i>)	KF732663.1	CYTB	1 141

4) 잉어류 Cytb, COI유전자단편의 염기배렬특징

우리가 클론화한 Cytb유전자단편의 염기배렬은 시작코돈 ATG를 포함한 1 140bp로서 380개의 아미노산배렬을 암호화하고있으며 분자계통발생연구에 널리 이용되고있는 배렬크기[4]와 비교하는 방식으로 분자계통발생연구에 이용될수 있다. 또한 TMHMM프로그램으로 분석하여보면 이 배렬은 인트론을 포함하지 않은 하나의 엑손구조로 되어있다.

또한 COI유전자단편의 염기배렬은 물고기종마다 그 크기에서 차이가 있으며 모두 5' 말단쪽의 652~938bp로 되어있다. DNA단편에 의한 동물종감별에서 이용되고있는 COI유전자배렬단편의 크기가 650bp정도라고 한 선행연구자료[3]에 비추어볼 때 우리가 밝혀낸 이 유전자단편의 염기배렬을 동물종검정에 효과적으로 이용할수 있다.

맺 는 말

우리 나라에 분포되어있는 잉어류 6종에 대한 Cytb, COI유전자단편을 분리하고 염기배렬을 분석하였다. 클론화한 Cytb, COI유전자단편의 염기배렬은 각각 분자계통발생학적인구와 DNA단편에 의한 물고기종검정에 이용할수 있다.

참 고 문 헌

- [1] 김리태 등; 조선동물지(어류편 1), 과학기술출판사, 160~232, 주체95(2006).
- [2] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 261~262, 1989.
- [3] W. J. Kress et al.; DNA Barcodes Methods and Protocols, Humana Press, 6, 2012.
- [4] V. S. Lechtova et al.; Molecular Phylogenetics and Evolution, 47, 812, 2008.

주체106(2017)년 8월 5일 원고접수

Cloning Mitochondrion Cytb, COI Gene Fragments for Cyprinidae

Kim Hyo Song, Ju Chang Song

Cytb(1 140bp), COI(652~938bp) gene fragments of *Carassius auratus*, *Abbottina rivularis*, *Zacco platypus*, *Nemachilus toni*, *Misgurnus anguillicaudatus*, *Misgurnus mizolepsis* in our country were cloned.

Key words: Cyprinidae, classification, gene fragment