

Tributyltin chloride(TBTC)와 Triphenyltin chloride (TPTC)에 노출된 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 치어에 있어서의 RT-PCR에 의한 유전자 증폭반응

최윤실, 함승협, 진덕희, 전중균
강릉대학교 해양생명공학부

서론

Tributyltin(TBT)과 Triphenyltin(TPT) 같은 유기주석화합물은 선박, 어망, 어구등 방오도료의 소재로 사용되어 왔으나 최근 해양생물에게 미치는 독성 때문에 세계 각국에서도 그 사용을 금지하고 있다. 우리 나라의 경우, 한국 해양연구소가 내분비 교란물질(환경호르몬)의 농도를 조사한 결과 다른 지역에 비해 내만 지역에서의 오염도가 다소 높다고 보고되어 있다. 내만 지역의 경우는 파도가 약하여 양식장이 많으므로 양식어류가 TBT와 같은 유기주석 화합물에 노출될 가능성은 매우 높다. 그러한 예로서, 복족류에서는 임포섹스(imposex)현상이 나타나고 어류에 있어서는 자성화 현상이 나타나고 있음이 보고되고 있으며, 어류의 생리 및 생식에 크나큰 영향을 주고있는 TBT와 같은 유기주석화합물에 대한 연구는 세계각국에서도 활발히 진행되고 있다.

어류에 있어서의 TBTC와 TPTC에 의한 영향은 노출된 어류가 보유하고 있는 유전자의 차이와 밀접한 관련이 있으므로, 본 연구에서는 넙치 치어를 Tributyltin chloride(TBTC)와 Triphenyltin chloride (TPTC)에 각 농도별로 노출시킨 다음 TBT와 TPTC가 넙치 치어에 미치는 영향을 유전자 수준에서 알아보기 위해 RT-PCR방법으로 증폭된 PCR product를 비교하여 보았다.

재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 넙치 치어는 1999년 봄철에 강원도립 수산 배양장에서 사육중인 넙치 친어의 알을 부화시켜 사용하였으며, 알에서 부화한 넙치를 300 l의 수조에 넣은 뒤, 에탄올(EtOH)에 녹인 TBTC와 TPTC를 각각 처리하였다. TBTC의 노출 농도 각각 0.1, 1, 10ppb로 하였고, TPTC의 노출 농도는 0.01, 1, 10ppb로 각각 노출시켰으며, TBTC와 TPTC를 혼합한 것에도 노출시켰다. 그리고 각 실험군과 비교하기 위해 대조구를 두고 실험하였다.

2. 방법

넙치 치어 중의 total RNA는 guanidinium 방법으로 추출하여 fluorometer로 정량하였으며, AccuPower™ RT Premix를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 AccuPower™ PCR Premix를 이용한 random priming 방법으로 Minicycler™을 사용하여 95℃에 5분간 전처리한 후, 94℃에서 1분, 45℃에서 2분, 72℃에서 2분간의 cycle로 35회 반응시켜 DNA를 증폭시켰다. 증폭된 DNA는 1% agarose gel로 100V에서 45분간 전기영동하였으며, 전기영동 후의 gel은 Image Analysis System으로 분석하였다. PCR 후 band가 나타나지 않은 primer는 2~3회 반복 실험으로 재확인하였다.

결과 및 요약

Tributyltin(TBT)와 Triphenyltin(TPT)과 같은 유기주석화합물이 넙치 치어에 미치는 영향을 유전자 수준에서 살펴보고자 TBTC와 TPTC에 노출된 넙치 치어의 cDNA를 RT-PCR기법으로 oligonucleotide dT/A, Arbitrary primer 1~8을 사용하여 증폭시켜 전기영동한 결과, Arbitrary primer(Ap) 1을 사용하였을 때 TBTC0.1, TBTC TBTC10(ppb)에서는 대조구와 유사한 pattern 양상으로 band가 관찰되었으며 TPTC0.01, TPTC1, TPTC10에서는 대조구와 비교하였을 때 훨씬 많은 band를 표시하였고 특히 TPTC10에서는 대조구와 다른 시료에서 보이는 500bp보다 작은 크기의 band들은 나타나지 않았다. 이러한 현상은 AP2 ~ AP8 primer를 사용하였을 때도 마찬가지였다. 그리고 TBTC와 TPTC를 Mix하여 노출한 시료에서는 2~3회 반복 실험을 하였는데도 band가 확인되지 않는 것으로 보아 primer보다는 시료자체에 문제가 있는 것으로 생각된다. 또한 실험에서 각각의 primer를 이용하여 생성된 PCR 생성물은 시료마다 primer에 대하여 다형화 band를 보여주었지만 그 차이는 크지 않았다.

본 실험을 통하여 TBTC와 TPTC에 노출된 넙치 치어에 있어서의 PCR product의 band pattern은 사용농도에 따라 약간의 차이가 있었지만 기본적인 유전자 pattern은 거의 같으나 TPTC 10에서는 작은 분자량을 가진 band들이 보이지 않았다. 유기주석 화합물에 노출된 넙치 치어에 있어서의 유전자 수준에서의 차이가 적은 것은 TBTC와 TPTC가 넙치 치어에 노출되어 짧은 시간내에 유전적 변화가 일어나기전에 개체가 사망하기때문이 아닌가 하고 사료된다.

참고문헌

한국해양연구소. "유류 및 유독물질 오염이 수산자원에 미치는 영향에 관한 연구 (I, II)", 한국해양연구소보고서 BSPN 00324-983-4. 1996 pp316.

Chomczynski P and Sacchi N. 1987. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 56-159