

## RAPD기법을 이용한 갈파래목 해조류의 유전 변이 분석

조용철\* · 박지원 · 진형주 · 남보혜 · 손철현\*\* · 홍용기  
부경대학교 생물공학과 · \*\*양식학과 · 수산진흥원 남해수산연구소 증식과

## RAPD Identification of Genetic Variation in Ulvales Seaweed

Yong-Chul CHO\*, Ji Won PARK, Hyung-Joo JIN, Bo-Hye NAM,  
Chul Hyun SOHN\*\* and Yong-Ki HONG

Department of Biotechnology, \*\*Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

\*Department of Aquaculture, South Sea Fisheries Institute, National Fisheries Research  
and Development Agency, Yosu 550-120, Korea

The random amplified polymorphic DNAs (RAPD) technique was used to characterize seven isolates of the green seaweed Ulvales collected from Songjeong, Haeundae, Jumunjin, Dadaepo and Wando in Korea. Total DNA was extracted by the LiCl extraction method from thalli of green seaweed. The extracted DNA (3 ng) in 25  $\mu$ l reaction volume was amplified by 45 cycles of the polymerase chain reaction with arbitrary primers. Thirty-four primers resulted in 1227 PCR products ranged 240 bp to 1.5 kb of both conserved and polymorphic bands. Genetic similarities of the seven isolates calculated by Jaccard's equation were ranged from 7% to 36%. *Monostroma nitidum* (Wando) was shown to be most distantly related with the others based on genetic similarity and did not produce the amplified band of 630 bp, common in Ulvales using primer OPB-01 (CATCCCCCTG).

**Key words** : genetic similarity, PCR, polymorphic pattern, RAPD, seaweed, Ulvales

### 서 론

우리 나라의 해조류 양식은 김, 미역으로 편중되어 과잉생산과 소비감소 등 많은 문제점이 대두되고 있어 다양한 양식품종의 개발과 고유종의 보존을 위한 기술개발이 필요한 실정이다. 해조류중 양식 가능품종으로 유망한 참홀파래는 과거부터 식용으로 이용되어 왔으며, 일본에서는 김조림의 원료로 사용되고 있다. 참홀파래에는 단백질, 섬유소, 지방, 칼슘, 철분, 비타민C 등이 많이 들어 있어 영양적으로도 우수한 해조이다 (Kang and Ko, 1977). 또한 쥐의 먹이첨가 실험에서 고혈압 및 고 콜레스테롤증에도 현저한 감소효과를 나타내었다 (Ren et al., 1994). 이러한 참홀파래의 대량생산을 위하여 그 성장발생요인이 규명되어 인공종묘생산과 양식기술 및 양산체제 개발뿐 아니라 앞으로 우량종묘의 선발과 우수종보존에 대한 연구가 병행되어야만 할것이다. 따라서 본 연구에서는 양식가능한 참홀파래의 유전자표지 (genetic marker) (Patwary et al., 1993)를 확보함으로써 장차 우수종의 선발과 보존에 필요한 기초자료를 제공하고자 우리나라 전연안에 가장 흔히 서식하는 각종 파래에 대한 유전형질을 비교 검토함으로써 우선 우리나라 파래의 종에 따른 유전적 다양성을 파악하고자한다. 이를 위한 유

전자 분석은 arbitrary primer를 이용한 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs)분석방법 (Welsh and McClelland, 1990; Williams et al., 1990; Caetano-Anolles et al., 1991)을 통하여 유전자 수준에서의 종간의 유사도를 검정하며, 앞으로 양식장에서 나타날수 있는 유사종 혹은 변종의 종묘를 유전자 수준에서 구별하는 유전자 지표를 찾아 종간의 교잡개체를 동정하는데도 이용하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 시료의 수집 및 보관

실험에 사용된 파래들은 우리나라 전연안에 가장 흔히 분포되어있는 갈파래목 (Ulvales order) 녹조류 종들을 대상으로 하였으며 Table 1에서와 같이 남해안 및 동해안의 5개 지역, 즉 송정에서 구멍갈파래, 해운대에서 실패, 다대포에서 가시파래, 참갈파래, 일파래, 주문진에서 구멍갈파래, 완도에서 참홀파래등 7종을 94년 12월부터 96년 3월에 걸쳐서 채집하여 실험실에 옮긴 직후 초음파처리 및 betadine처리 등의 무균화처리를 행하였다 (Park et al., 1996). 실험편의상 시료들을 2시간정도 건조시켜 -20℃에서 냉동보관한후 동시에 실험재료로 사용하였다.

Table 1. List of species and collection sites

No.	Species	Korean name	Collection sites	Habitat
G1	<i>Ulva pertusa</i> Kjellman	구멍갈파래	Songjung, Pusan	rocks
G2	<i>Enteromorpha crinita</i> J. Agardh	실파래	Haeundae, Pusan	rocks
G3	<i>Enteromorpha prolifera</i> J. Agardh	가시파래	Dadaepo, Pusan	rocks
G4	<i>Ulva lactuca</i> Linne	참갈파래	Dadaepo, Pusan	rocks
G5	<i>Enteromorpha linza</i> J. Agardh	잎파래	Dadaepo, Pusan	rocks
G6	<i>Ulva pertusa</i> Kjellman	구멍갈파래	Jumunjin, Kangwondo	rocks
G7	<i>Monostroma nitidum</i> Wittrock	참홀파래	Wando, Julianamdo	net

Table 2. Extraction yield and purity of DNA using LiCl from Ulvales seaweeds

Species	DNA (ug/g-tissue) <sup>1</sup>	A <sub>260/280</sub> <sup>2</sup>
<i>U. pertusa</i> (Songjung)	129	1.12
<i>E. crinita</i> (Haeundae)	99	1.23
<i>E. prolifera</i> (Dadaepo)	150	1.14
<i>U. lactuca</i> (Dadaepo)	46	1.10
<i>E. linza</i> (Dadaepo)	29	1.14
<i>U. pertusa</i> (Jumunjin)	48	1.04
<i>M. nitidum</i> (Wando)	51	1.07

<sup>1</sup> Amount of DNA was calculated against 1 g of partially dried tissue for 2 hrs at room temperature.

<sup>2</sup> The ratio between readings at 260 nm and 280 nm represents protein impurities.

#### DNA의 추출

건조 시료 0.1 g을 약 2 mm크기로 자른 후 15 ml 원심 분리관에 넣어 LiCl 추출방법 (Hong et al., 1995a)에 따라 4 ml의 DNA추출용액 (0.8 M LiCl, 10 mM EDTA, 0.6% Sarcosyl, 0.2% PVPP, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, pH 9.0)을 첨가하여 잘 섞었다. 55°C에서 10분간 열처리한 후 4°C에서 1시간동안 천천히 흔들어준 다음 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액만을 회수하였다. 4 ml의 상등액에 0.4 ml의 3 M NaAc (pH 5.2)와 -20°C에서 보관한 10 ml의 EtOH을 첨가한 후 잘 섞어 3,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 total DNA는 10분간 진공 건조시킨 후 0.3 ml의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹인 후 정량하였다.

#### DNA의 정량

TE buffer에 녹인 DNA는 Hoefer사의 Mini-Fluorometer (Model TKO 100)로 DNA량을 정량하였다. 이렇게 정량된 DNA는 3 ng/ $\mu$ l 정도되게 희석한 후 polymerase chain reaction (PCR)의 주형 DNA로 사용하였다.

#### PCR 반응 조건

RAPD-PCR반응의 primer는 10개 염기들로 이뤄진 Operon사 (Alameda, CA) 제품의 primer kit A와 kit B를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이 primer들은 arbitrary primer들로서 40가지의 단일 primer와 또 이들 primer

들을 조합하여 만든 20가지의 primer쌍들을 사용하였다. 25  $\mu$ l의 PCR 반응 용액은 1  $\mu$ l의 2.5 mM dNTPs, 2.5  $\mu$ l가 PCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3), 2  $\mu$ l의 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ l의 12.5% Tween 20, 0.2  $\mu$ l의 Taq DNA polymerase (5 u/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l의 template DNA (3 ng/ $\mu$ l), 그리고 1  $\mu$ l의 primer (5 pM/ $\mu$ l)로 구성되어졌으며, Perkin Elmer Cetus사 (Norwalk, CT)의 Thermal cycler를 사용하여 94°C에서 5분간 1회 반응 후, 94°C에서 5초, 36°C에서 2분, 72°C에서 2분간의 반응을 45회 반복 실시한 후 72°C에서 10분간 마지막 반응을 시켰다 (Yu and Pauls, 1992).

#### Agarose gel 전기영동

PCR반응의 생성물 확인은 10  $\mu$ l를 0.1배량의 gel loading buffer (0.4% BPB, 0.4% xylene cyanol, 10% glycerol)와 섞은 후 이를 2%의 agarose gel에 loading하여 0.5X TAE buffer (20 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) (Sambrook et al., 1989)에서 100V의 전압으로 1시간동안 전기 영동을 실시한 후 자외선하에서 PCR반응 생성물들을 확인하였다.

#### 유사도 측정

각 지역 개체간의 RAPD 생성물들의 유사도는 predominant band가 각 개체에 대하여 동일하게 생성되는지의 여부에 따라 구해졌다. 유사도값은 Jaccard의 식에 따라

$J_{ij} = C_{ij} / (n_i + n_j - C_{ij})$ 로 계산하였으며 여기서  $C_{ij}$ 는 비교되는 두 개체 모두에서 나타나는 공통된 band들의 수이고,  $n_i$ 와  $n_j$ 는 비교되는 두 개체 각각에서 나타나는 총 band들의 수이다 (Sneath and Sokal, 1973).

**결과 및 고찰**

**DNA 추출**

해조류중 우리 나라 전연안에 가장 흔히 서식하는 갈파래목 녹조류인 참홀파래와, 구멍갈파래, 참갈파래, 잎파래, 실파래, 가시파래등을 대상으로하여 이들의 유전자를 LiCl방법 (Hong et al. 1995a)으로, 2시간정도 실온에서 건조시킨 시료 1g당 29~150 ug정도 추출할수 있었다 (Table 2). LiCl방법으로 추출된 DNA를 0.5% agarose gel상에서 전기영동한 결과 모든 시료에서 분자량이 50 kb이상의 DNA와 다량의 RNA가 함께 추출되었다. DNA 추출량을 볼때 가시파래에서 가장 많은 DNA 추출량을

보였다. 그리고 추출된 모든 DNA에서 단백질의 혼입정도를 측정하는  $A_{260/280}$ 율은 1.07에서 1.23의 범위에 걸쳐 많은 단백질의 혼입을 나타냈다. 그러나 PCR반응은 극소량의 DNA만으로도 가능하므로 추출된 DNA를 희석함으로써 단백질 불순물들도 희석되며 또한 94°C온도에서 변성도 일어나므로 이 정도의 단백질 혼입은 PCR증폭작용에 전연 문제가 되지 않았다 (Hong et al., 1996). 이 방법은 기존의 해조류들로부터의 유전자 추출 방법들 (Fain et al., 1988; Stam et al., 1988; Mayes et al., 1992)에 비하여 간단하면서도 2시간 정도의 짧은 추출 시간으로 DNA의 분자량도 50 kb이상의 큰 유전자들을 획득할수 있으므로 PCR반응의 주형으로 사용하기에 충분한 크기이다 (Sogin, 1990). 그리고 동시에 많은 양의 RNA도 함께 추출되어 나오므로 앞으로 RT-PCR의 주형으로도 충분히 이용되어질수 있으리라 여겨진다 (Hong et al., 1995b).

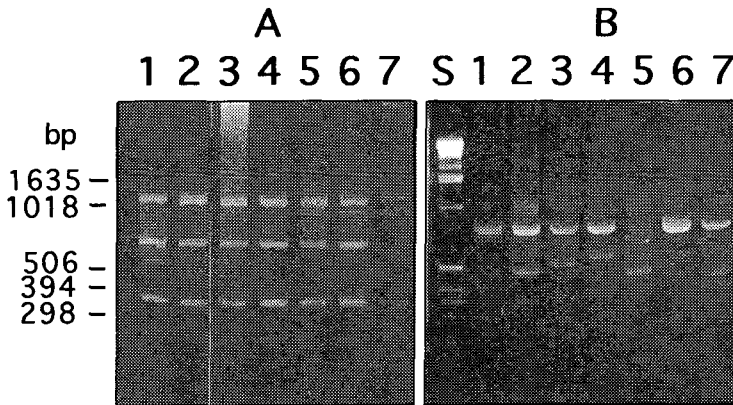


Fig. 1. Random amplified polymorphic DNAs using arbitrary primers. (A). Amplified fragments produced by primer OPB-01 (CATCCCCCTG). (B). Amplified fragments produced by primer OPA-14 (TCTGTGC-TGG). Lane S, molecular weight standard of the 1 kb DNA ladder from BRL/Gibco. Lane 1, *U. pertusa* (Songjung). Lane 2, *E. crinita*. Lane 3, *E. prolifera*. Lane 4, *U. lactuca*. Lane 5, *E. linza*. Lane 6, *U. pertusa* (Jumunjin). Lane 7, *M. nitidum*.

Table 3. Similarity matrix based on Jaccard's equation

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
G1	211						
G2	0.19	186					
G3	0.14	0.36	149				
G4	0.18	0.19	0.17	233			
G5	0.19	0.20	0.15	0.24	211		
G6	0.14	0.15	0.16	0.21	0.19	177	
G7	0.06	0.07	0.07	0.07	0.08	0.11	60

The total number of amplified products revealed in each seaweed is shown in the diagonal. Letters of G1 to G7 as represented as *U. pertusa* (Songjung), *E. crinita*, *E. prolifera*, *U. lactuca*, *E. linza*, *U. pertusa* (Jumunjin), and *M. nitidum*.

### 개체별 polymorphic DNAs

대상 생물의 유전 정보가 알려져있지 않고 유전자 수준에서 종간 혹은 개체간의 유사도를 비교하고자 할 때 arbitrary primer들을 사용하여 특정 유전자 부분들을 대량 증폭하고 이들 증폭된 DNA fragment들을 서로 비교함으로써 쉽게 유전적 유사도를 구할 수 있다 (Goodwin and Annis, 1991; Fekete et al., 1992; Patwary et al., 1993; Dutcher and Kapraun, 1994; Ho et al., 1995). 10개 염기로 구성된 arbitrary primer를 단일로 사용한 40종류와 두개씩 짝으로한 20종류를 PCR반응 실험에 사용한 결과 그중에서 34가지 종류의 primer들로부터 증폭이 일어났다. 단일 primer를 사용한 경우에는 대표적으로 primer OPA-14 (TCTGTGCTGG), OPB-01 (CATCCCCCTG)등에서 완도산 참홀파래의 경우 Fig. 1과 같이 각각 5개와 2개의 생성물이 만들어졌다. 그중에서 OPA-14를 사용한 증폭에서는 모든 개체에서 차이가 나타나는 polymorphic pattern을 나타내었다. OPB-1을 사용한 증폭에서는 대부분 동일한 pattern을 볼수있었으나 참홀파래의 경우 다른 갈파래과 (Ulvaceae family)의 파래들에서 공통적으로 나타나는 630 bp크기의 생성물을 만들지 못하는 특징을 보여 창작 유전자표지로서도 이용가능하리라 여겨진다. 2개의 primer들을 동시에 짝으로 사용한 경우에는 대표적으로 OPB-01과 OPB-07 (GGTGACGCAG), OPB-01과 OPB-13 (TTCCCCGCT), OPB-01과 OPB-18 (CCACAGCAGT)등에서 9개의 생성물들을 만들었다. 전반적으로 primer의 종류에 따라 1개에서 11개의 생성물들을 증폭시켰으며, 분자량 크기는 240 bp서 1.5 kb정도 크기였다. 개체별로는 구멍갈파래 (송정), 실파래, 가시파래, 참갈파래, 잎파래, 구멍갈파래 (주문진), 그리고 참홀파래등으로부터 각각 211개, 186개, 149개, 233개, 211개, 177개 및 60개의 증폭 band를 얻을수 있었다.

### 지역 개체간 유사도

우리나라 전연안에 가장 보편적인 해조류이지만 영양체의 형태변이가 심한 파래들에대한 유전자 수준에서의 개체 유사도는 RAPD-PCR를 통한 band들을 비교함으로써 종에 따른 각 개체간 genetic diversity가 존재함을 보여주었다. 이같은 polymorphic DNA pattern들을 Jaccard 식을 통해 서로간의 유사도를 비교하면 Table 3과 같이 유사도 상수값 1과 0을 각각 완전 일치하는 경우와 완전 불일치 경우로 계산하여 각각 개체 서로간의 유사정도를 조사한 결과, 해운대에서 채취한 실파래와 다대포에서 채취한 가시파래간에서 가장 높은 유사도를 발견할수 있었으며, 완도산의 참홀파래가 나머지 6종의 다른 갈파래

과에 속하는 파래류와 가장 낮은 유사도를 가짐을 알수 있었다. 이것으로 미루어 볼때 참홀파래는 분류학적으로도 홀파래과 (Monostromataceae family)에 속하며 그외의 파래들은 갈파래과에 속하므로 유전자 수준에서도 다른 갈파래과와도 유연관계가 가장 먼것을 알수 있다. 그리고 형태적으로 유사한 실파래와 가시파래의 경우 가장 높은 0.36의 유사도를 보여 형태학적인 분류와 유전적 유연관계가 어느정도 연관이 있는것을 알수 있었다. 이와같이 PCR을 통한 각 파래의 종에 따른 공통적이거나 또는 특징적인 genomic DNA편들을 증폭할수 있었으며 또한 간단히 증폭된 다형상들을 유용한 유전자 표지로서도 이용될수 있음을 알수 있었다.

## 요 약

해조류중 우리나라 전연안에 가장 흔히 분포하는 갈파래목 녹조류인 참홀파래와 구멍갈파래, 참갈파래, 잎파래, 실파래, 가시파래등을 대상으로 RAPD방법을 이용한 각 지역 개체간의 유전적 유사도를 조사하였다. Total DNA는 염체로부터 LiCl를 사용한 DNA추출방법으로 분리하였으며, 추출된 DNA는 3ng/μl되게 희석한후 in vitro에서 arbitrary primer와 함께 45회 PCR amplification시켰다. 그 결과 34종류 primer들로부터 240 bp에서 1.5 kb의 다양한 크기로 증폭된 1227개의 전기영동상의 band를 볼수있었으며, Jaccard공식에 따라 그 유사도를 구하였다. 파래목의 유전적 유사도는 7%에서 36%범위의 유사도를 보였다. 그중 참홀파래가 다른 갈파래과들로부터 가장 낮은 유사도값을 보여주었으며, 또한 primer OPB-01 (CATCCCCCTG)을 사용하였을때 갈파래과에서 공통적인 630 bp크기의 생성물을 생산하지않는 특징을 나타내었다.

## 사 사

본 논문은 수산청에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구결과 일부입니다.

## 참 고 문 헌

- Caetano-Anolles, G., B.J. Bassam and P.M. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technol.* 9, 553~557.  
Dutcher, J.A. and D.F. Kapraun. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic

- variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, 6, 267~273.
- Fain, S.R., L.D. Druehl and D.L. Baillie. 1988. Repeat and single copy sequences are differentially conserved in the evaluation of kelp chloroplast DNA. *J. Phycol.*, 24, 292~302.
- Fekete, A., J.A. Bantle, S.M. Halling and R.W. Stich. 1992. Amplification fragment length polymorphism in *Bruceella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.*, 174, 7778~7783.
- Goodwin, P.H. and S.L. Annis. 1991. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymeric DNA assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2482~2486.
- Ho, C.L., S.M. Phang and T. Pang. 1995. Molecular characterization of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. *J. Appl. Phycol.*, 7, 33~42.
- Hong, Y.K., S.D. Kim, M. Polne-Fuller and A. Gibor. 1995a. DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using LiCl. *J. Appl. Phycol.*, 7, 101~107.
- Hong, Y.K., C.H. Sohn, M. Polne-Fuller and A. Gibor. 1995 b. Differential display of tissue-specific messenger RNAs in *Porphyra perforata* (Rhodophyta) thallus. *J. Phycol.*, 31, 640~643.
- Hong, Y.K., C.H. Sohn, K.W. Lee and H.G. Kim. 1997. Nucleic acid extraction from seaweed tissues for polymerase chain reaction. *J. Mar. Biotechnol.* 5. In press.
- Kang, J.W. and N.P. Ko. 1977. Aquaculture of seaweed. Taehwa Press, Seoul, 274pp (in Korean).
- Mayes, C., G.W. Saunders, I.H. Tan and L.D. Druehl. 1992. DNA extraction methods for kelp (Laminariales) tissue. *J. Phycol.*, 28, 714~716.
- Park, J.W., Y.C. Cho, B.H. Nam, H.J. Jin, C.H. Sohn and Y.K. Hong. 1997. RAPD identification of genetic variation in the seaweed *Hizikia fusiformis* (Fucales, Phaeophyta). *J. Mar. Biotechnol.*, 5. In press.
- Patway, M.U., R.M. MacKay and J.P. van der Meer. 1993. Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *J. Phycol.*, 29, 216~222.
- Ren, D., H. Noda, H. Amano, T. Nishino and K. Nishizawa. 1994. Study on antihypertensive and antihyperlipidemic effects of marine algae. *Fish. Sci.*, 60, 83~88.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, E.3pp.
- Sneath, P.H. and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco, 635pp.
- Sogin, M.L. 1990. Amplification of ribosomal RNA genes for molecular revolution studies. In Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White. [Eds] PCR protocols: A guide to methods and applications, Academic Press, New York, 307~314pp.
- Stam, W.T., S.A. Boele-Bod and C. van den Hoek. 1988. Single-copy DNA-DNA hybridizations among five species of *Laminaria* (Phaeophyceae): Phylogenetic and biogeographic implications. *Helgol. Meeresunters.*, 42, 251~267.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, 18, 7213~7218.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18, 6531~6535.
- Yu, K. and K.P. Pauls. 1992. Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl. Acids Res.*, 20, 2606.

---

1996년 12월 11일 접수

1997년 5월 7일 수리