

잉어 β -globin 유전자의 염색체상에서의 다형해석

진덕희[†] · 青木宙*

강릉대학교 해양생명공학부
東京水産大學 遺傳生化學講座

Polymorphism of Carp β -globin Gene on Chromosome

Deuk-Hee Jin[†] and Takashi Aoki*

Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, Kangnung, Kangwondo 210-702, Korea
*Laboratory of Genetics and Biochemistry, Tokyo University of Fisheries, Konan 4-5-7, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

Abstract

Common DNA fragments of the β -globin gene were observed from six races of the adult common carp: Hybrid-Yamato, Japanese wild type, Mirror, Suwa-Yamato, Scale German, and Saku-Yamato. Chromosomal DNAs isolated from the above six races were digested with restriction endonucleases *EcoRI* and *PstI*.

The digested fragments were transferred onto nitrocellulose filter and hybridized with a probe of carp β -globin cDNA. Molecular sizes of the hybridized DNA fragments digested with *EcoRI* were 3.6Kb(Kilo base), 4.3Kb and 15 Kb in Hybrid-Yamato, Japanese wild type, Mirror, Scale German and Saku-Yamato carp DNAs. In Scale German and Saku-Yamato carp DNAs, two and one more hybridized DNA fragments were observed, respectively. Molecular sizes of the hybridized DNA fragments digested with *PstI* were 2.2Kb, 5.5Kb, 7.8Kb and 9.2Kb in Hybrid-Yamato, 2.2Kb, 6.5Kb and 9.2Kb in Japanese wild type, 2.2Kb, 6.5Kb, 7.8Kb and 13Kb in Mirror, 2.2Kb, 5.5Kb, 6.5Kb, 7.8Kb, 9.2Kb and 13Kb in Scale German, and 2.2Kb, 5.5Kb, 6.5Kb and 9.2Kb in Saku-Yamato carp DNA.

Therefore, depending on carps, three to six DNA fragments were hybridized with β -globin gene probe. Thus it indicated polymorphism in the globin gene family of carp.

Key words: β -globin, genomic DNA, cloning, hybrid, carp

서 론

적혈구에 있는 헤모글로빈은 산소와 강한 친화성을 가지며, 가역적으로 결합하여 호흡생리학상 극히 중요한 기능을 갖고 있다. 어류의 헤모글로빈은 고등동물의 헤모글로빈과 마찬가지로 약 68,000 dalton의 분자량으로 구성된 환상

의 단백질로서 한 개의 heme을 포함하는 2가닥의 α 사 globin과 2가닥의 β 사 globin으로 구성되어 있다.

Globin에 관한 연구는, 특히 고등한 척추동물에 있어서는 그 유전자 구조 및 유전자의 전사제어등의 분자생물학적인 연구가 행하여져 고등척추동물의 유전자 구조해석의 모델 유전자로서 잘 알려져 있다¹⁻⁴⁾. 그러나 어류의 globin에 관

[†] Corresponding author

해서는 현재까지 유전자 레벨에서의 연구가 매우 적으므로, globin 유전자에 관한 보다 많은 연구를 필요로 한다. 또한 어류에 있어서의 globin 유전자를 해명하는 것은 유전자 구조를 명확하게 할 뿐 아니라, 수중에서 생활하는 어류의 호흡생리학적인 연구에도 기여하며 어류의 진화에 관한 연구에도 유용하다고 생각되어진다.

이러한 어류의 globin 유전자에 대해서는, 잉어 α 및 β -globin cDNA의 cloning 및 구조해석⁵⁾, 잉어 α -globin 유전자의 cloning 및 구조해석⁶⁻⁸⁾, 대서양 연어 α 및 β -globin 유전자의 구조해석⁹⁾ 등이 보고되어 있다. 또한 최근에 본인 등이 잉어 β -globin 유전자의 cloning 및 구조해석¹⁰⁾, 잉어 염색체상에서의 α 와 β -globin 유전자의 위치관계¹¹⁾에 관하여 보고하였다. 이러한 잉어 α 와 β -globin 유전자는 양서류, 조류 및 포유류와 마찬가지로 3개의 exon과 2개의 intron으로 구성되어 있으며, 잉어 α -globin 유전자는 동일개체에서 7종류가 알려져 있고⁷⁾, 잉어 α -globin 유전자는 다형으로서 다른 고등 진핵 생물의 globin 유전자와 마찬가지로 family 구조를 형성하여 발육과 함께 발현하는 유전자가 다른 것으로 보고되어 있다^{6-8,12-13)}.

본 연구는 전세계에 분포하며 유용 담수 어종으로서 최근까지 유전학의 연구대상으로 자주 사용되어진 잉어 β -globin 염색체 DNA를 토대로 하여 잉어 계통간에 있어서의 β -globin 유전자의 다형성을 알아보기 위하여, 일본의 잡종 잉어, 야생 잉어, 거울 잉어, 수와야마토 잉어, 독일우로코 잉어 및 사쿠야마토 잉어의 염색체 DNA를 이용하여 조사하였다.

재료 및 방법

잉어의 혈액으로부터 염색체 DNA의 추출

잉어의 미병부로부터 헤파린을 처리한 주사기를 이용하여 채혈하고, 얻어진 혈액을 Ausubel(1987)등¹⁴⁾의 방법에 따라서 염색체 DNA를 추출하였다.

혈액 10ml에 대하여 4ml의 PBS용액(0.8% NaCl, 0.2% KCl, 1.15% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2% KH_2PO_4)을 가하여 잘 섞은 다음, 4°C에서 1,500rpm으로 5분간 원심분리하여 얻어진 세포에 1ml의 Digestion buffer(100mM NaCl, 10mM Tris · HCl, 25mM EDTA[pH 8.0], 0.5% sodium dodecyl sulfate, 0.1mg/ml proteinase K)를 가하

여 잘 섞은 후, 50°C의 항온수조속에서 18시간 반응시켜 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol용액(25 : 24 : 1)을 가하여 13,000rpm으로 5분동안 실온에서 원심분리하고, 상등액을 사용하여 재추출하였으며, RNase A(Sigma, 최종농도 10 μ g/ml)를 넣고 37°C에서 3시간동안 반응시켜 RNA를 제거한 후, phenol/chloroform/isoamylalcohol용액으로 2회 반복 추출하였다. 얻어진 용액을 TE완충용액(10mM Tris · HCl[pH 8.0], 1mM EDTA)으로 투석하여 isopropylalcohol용액으로 DNA를 침전시키고, ethanol용액으로 재침전한 후, 건조시켜 약 0.5 μ g/ml의 DNA농도가 되도록 멸균증류수로서 용해하여 염색체 DNA로서 사용하였다.

Southern blot hybridization법

각 종류의 잉어 염색체 DNA로부터 β -globin 유전자를 검출하기 위하여, 잉어 β -globin cDNA를 probe로 하여 southern blot hybridization 실험¹⁵⁾을 행하였다. 각 염색체 DNA 10 μ g을 제한효소 EcoRI과 PstI으로 분해시킨 다음, phenol/chloroform/isoamylalcohol용액 및 diethylether를 이용하여 정제하고, ethanol 침전을 행하여 제한효소로서 분해된 DNA 단편을 회수하여 20%의 TE완충용액으로 용해하고, 전기영동용 loading buffer(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol)를 가하여 0.6% agarose gel(Agarose I)상에서 전기영동을 행하였으며, 이 때의 DNA 분자 크기 marker로서는 HindIII로 소화시킨 λ phage DNA를 이용하였다. 20mM의 전류로서 약 18시간 전기영동시킨 다음, 1 μ g/ml의 ethidium bromide를 포함한 TBE완충용액(1.08% Tris, 0.037% EDTA, 0.55% boric acid)속에서 약 30분간 염색한 후, UV illuminator에서 DNA band를 확인하였다. 확인된 Agarose gel을 플라스틱 용기에 넣어 약 250ml의 0.5N HCl용액을 가하여 실온에서 15분간 둔 다음, gel을 증류수로 재차 세정하고 0.5N NaOH/1.5M NaCl 용액으로 알칼리 변성을 시킨 후, 증류수로 재차 세정하여 1M Tris · HCl[pH 7.6] 1.5M NaCl 용액으로 중화시켰다.

별도의 장치에서 20X SSC용액(150mM NaCl, 15mM sodium citrate, pH 7.0)으로 gel을 nitrocellulose filter(Schleicher and Schuell)에 8시간동안 transfer하고, filter를 실온에서 말린 다음, 80°C에서 2시간동안 건조시켜

DNA를 filter에 고정시켰다.

DNA probe로서는, 일본 잡종잉어 β -globin cDNA에 random한 hexanucleotide를 annealing시키고, random primer labelling kit(Takara)를 이용하여 ^{32}P 로 표식한 후, 95°C에서 3분간 가열처리하여 사용하였다. DNA를 고정시킨 filter를 seal pack속에 넣고 prehybridization 용액(25mM K_2HPO_4 , 5X SSC, 5X Denhardt's solution, 50 $\mu\text{g/ml}$ salmon sperm DNA, 50% formamide)을 가하여 37°C에서 2시간동안 prehybridization을 시킨 다음, hybridization 용액(prehybridization 용액에 10%가 되도록 dextran sulfate를 첨가한 것)과 ^{32}P 로 표식한 DNA probe를 가하여 42°C에서 서서히 진탕하면서 12시간동안 hybridization을 시켰다. Hybridization 후 filter를 2X SSC/0.1% SDS 용액, 1X SSC/0.1% SDS 용액, 0.5X SSC/0.1% SDS 용액, 0.1X SSC/1.0% SDS 용액으로 50°C에서 서서히 진탕하면서 각각 30분씩 세정한 다음, filter를 rap으로 싸서 X선 film(Fuji) 및 증감지와 함께 카세트에 넣고 -80°C에서 4일동안 감광시켜 autoradiography를 행하였다.

결론 및 고찰

잉어의 α -globin 유전자가 다형인 것은 이미 Shimma 등¹²⁾, Aoki 등¹³⁾, Nobuta와 Aoki⁶⁾ 및 Miyata 등⁷⁻⁸⁾의 보고에 의하여 일본의 잡종 잉어, 야생 잉어, 사쿠야마토 잉어, 거울 잉어 및 독일우로코 잉어에 있어서 다형인 것이 확인되어 있으며, 이것을 토대로 잉어의 α globin 유전자는 family 구조를 형성하여 발육과 함께 발현하는 유전자가 다른 것으로 추측되어 있다.

본 연구는 최근에 본인 등¹⁴⁾이 cloning한 잉어 β -globin 염색체 DNA를 토대로 잉어 계통간에 있어서의 β -globin 유전자의 다형성을 알아보기 위하여, 일본의 잡종 잉어, 야생 잉어, 거울 잉어, 수와야마토 잉어, 독일우로코 잉어 및 사쿠야마토 잉어의 염색체 DNA를 이용하여 조사하였다. 이들 각 염색체 DNA를 제한효소 *EcoRI* 및 *PstI*로 분해시킨 다음, 잉어의 β -globin cDNA를 probe로 하여 hybridization한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

제한효소 *EcoRI*로 분해시킨 경우, 일본의 잡종 잉어 (Hybrid-Yamato), 야생 잉어(Japanese wild type), 거울 잉어(Mirror), 독일우로코 잉어(Scale German) 및 사쿠야

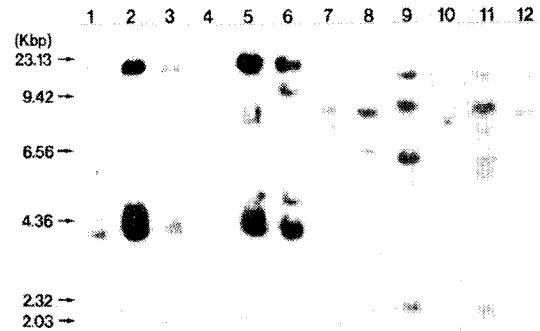


Fig. 1. Autoradiograph of *EcoRI* and *PstI* DNA fragments of chromosomal DNA from six races of carp hybridized with carp β -globin cDNA probe. Lanes 1 to 6 digested with *EcoRI*. Lanes 7 to 12 digested with *PstI*. Lanes 1 and 7, Hybrid-Yamato carp; Lanes 2 and 8, Japanese wild type carp; Lanes 3 and 9, Mirror carp; Lanes 4 and 10, Suwa-Yamato carp; Lanes 5 and 11, Scale German carp; Lanes 6 and 12, Saku-Yamato carp.

마토 잉어(Saku-Yamato)는 3.6Kb, 4.3Kb 및 15Kb의 DNA 단편에서 hybrid를 형성하였으며, 그 외에 독일우로코 잉어는 두군데 즉, 8.5Kb 및 9.2Kb의 DNA 단편에서 hybrid를 형성하였고, 사쿠야마토 잉어는 한군데 즉, 9.5Kb의 DNA 단편에서 추가로 hybrid를 형성하고 있었다. 그러나 수와야마토 잉어(Suwa-Yamato)는 특정의 *EcoRI* 단편들을 볼 수 없었다.

제한효소 *PstI*로 분해시킨 경우는, 일본의 잡종 잉어는 2.2Kb, 5.5Kb, 7.8Kb 및 9.2Kb의 DNA 단편에서, 야생 잉어는 2.2Kb, 6.5Kb 및 9.2Kb에서, 거울 잉어는 2.2Kb, 6.5Kb, 7.8Kb 및 13Kb에서, 독일우로코 잉어는 2.2Kb, 5.5Kb, 6.5Kb, 7.8Kb, 9.2Kb 및 13Kb에서, 사쿠야마토 잉어는 2.2Kb, 5.5Kb, 6.5Kb 및 9.2Kb의 DNA 단편에서 각각 hybrid를 형성하였다. 수와야마토 잉어의 경우는 *PstI* 단편에서도 β -globin cDNA probe와 결합하는 단편들을 볼 수 없었다.

이러한 결과로부터 일본의 잡종 잉어, 야생 잉어, 거울 잉어, 독일우로코 잉어 및 사쿠야마토 잉어의 β -globin 유전자는 Aoki 등¹³⁾이 보고한 α -globin 유전자와 마찬가지로

각각 3개에서 6개의 DNA 단편에서 hybrid를 형성하므로, 잉어의 각 계통간에 있어서 β -globin 유전자도 다형으로서 family구조를 하여 그 발육과 함께 발현하고 있는 유전자가 다르다는 것을 추측할 수 있었다.

요 약

잉어의 α 사 globin 유전자는 family를 형성하고 있으며, 그 유전자의 구조가 명확히 되어 있다. 또한 최근에 β 사 globin 유전자에 대해서도 클론화되어 그 구조가 해명되었으며, 염색체상에서의 α 사 및 β 사 globin 유전자의 위치관계도 밝혀졌다. 이러한 잉어의 β 사 globin 유전자의 종류에 따른 다형성을 조사하기 위하여, 일본 잡종 잉어, 야생 잉어, 거울 잉어, 수와야마토 잉어, 독일우로코 잉어 및 사쿠야마토 잉어의 염색체 DNA를 제한효소 *EcoRI* 및 *PstI*으로 분해시켜 잉어의 β -globin cDNA를 probe로 하여 hybridization한 결과, 일본 잡종 잉어, 야생 잉어, 거울 잉어, 독일우로코 잉어 및 사쿠야마토 잉어에 있어서의 β -globin 유전자는 각각 3개에서 6개의 DNA 단편에서 hybrid를 형성하고 있으므로 잉어의 β 사 Globin 유전자도 그 종류에 따라서 다형임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Fritsch, E. F., Lawn, R. M. and Maniatis, T. : Molecular cloning and characterization of the human like globin gene cluster, *Cell*, 19, 959-972(1980)
2. Proudfoot, N. J. and Maniatis, T. : The structure of a human α -globin pseudogene and its relationship to α -globin gene duplication, *Cell*, 21, 537-544(1980)
3. Goodman, M., Koop, B. F., Czelusniak, J. and Weiss, M. L. : The γ -globin gene ; Its long evolutionary history in the β -globin gene family of mammals, *J. Mol. Biol.*, 180, 803-823(1984)
4. Lin, H. J., Han, C. T. and Nienhuis, A. W. : Functional profile of the human fetal γ -globin gene upstream promoter region, *Am. J. Hum. Genet.*, 51, 363-370(1992)
5. Takeshita, S., Aoki, T., Fukumaki, Y. and Takagi, Y. : Cloning and sequence analysis of a cDNA for the α -globin mRNA of carp, *Cyprinus carpio*, *Biochim. Biophys. Acta*, 783, 265-271(1984)
6. Nobuta, K. and Aoki, T. : Cloning and complete nucleotide sequence of carp α -globin gene, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(1), 49-54(1992)
7. Miyata, M. and Aoki, T. : Complete nucleotide sequences of coding and non-coding regions of the carp α -globin gene No. 3, "Proceedings of the Third Asian Fisheries Forum"(ed. by V. P. E. Phang), Singapore(1992)
8. Miyata, M., Hirono, I. and Aoki, T. : Analysis of α -globin gene family of carp. I. α -globin gene structure of No. 3, No. 6 and No. 7, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 1077-1083(1993)
9. Wagner, A., Deryckere, F., McMorro, T. and Gannon, F. : Tail-to-tail orientation of the atlantic salmon alpha- and beta-globin genes, *J. Mol. Evol.*, 38, 28-35(1994)
10. Jin, D. H., Hirono, I. and Aoki, T. : Cloning and the nucleotide sequence of carp β -globin gene, *Fish. Sci.*, 60, 303-306(1994)
11. Jin, D. H., Hirono, I. and Aoki, T. : The symmetrical arrangement of carp α - and β -globin genes, *Fish. Sci.*, 61, 49-52(1995)
12. Shimma, H. and Sato, R. : Comparison of proximate composition among the five races of common carp, *Cyprinus carpio*, *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, 7, 37-43(1985)
13. Aoki, T., Nobuta, K., the late Nishikawa, Y. and Shimma, H. : DNA homology of α -globin gene among five races of carp, *Cyprinus carpio*, *J. Appl. Ichthyol.*, 4, 174-177(1988)
14. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. : *Current Protocols in Molecular Biology*. pp. 2.2.1.-2.2.3. John Wiley. New York(1987)
15. Southern, E. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517(1975)