

유전 마커를 이용한 북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 3배체 판별방법

김혜진, 박철지

국립수산과학원 수산종자육종연구소

Verification method of triploid abalone, *Haliotis discus hannai* using genetic marker

Hyejin Kim and Choul-Ji Park

Fisheries Seed and Breeding Research Institute, NIFS, Haenam, 59002, Korea

ABSTRACT

The method for ploidy verifications is necessary for efficient research and development of triploid abalone, *Haliotis discus hannai*. The various methods such as flow cytometry, karyotyping, and particle size analysis have been used to confirm ploidy. However, this method provides only an approximate estimation of the ploidy level and measuring cellular DNA content is not only time consuming, but also costly and labor intensive. In this study, a quick and accurate method for ploidy verification of triploid and diploid abalone, *H. discus hannai*, was developed using multiplex polymerase chain reaction (PCR) system for molecular microsatellite markers. The multiplex PCR system including five microsatellites markers from Pacific abalone, *H. discus hannai*, consisting of di, tri, tetra and pentanucleotide repeat units, is developed. The multiplex PCR was able to verify the ploidy of 14 triploid abalone with 100% accuracy. In this results suggest that multiplex PCR system may be a useful tool in verification of triploid abalone.

Keywords: Abalone, Triploid Verification, Microsatellite, Multiplex PCR

서론

우리나라 전복 생산량의 대부분을 차지하는 북방전복 (*Haliotis discus hannai*) 은 한류계 전복으로 성장이 느려 상품크기까지 약 3-5년을 필요로 한다. 이에 전복 양식 생산성 향상을 위해 선발 육종연구를 위시하여 여러 육종 연구들이 추진되고 있고, 그 일환으로서 염색체 공학을 이용한 3배체 (triploidy) 전복의 개발과 경제형질의 평가 등의 연구가 진행되고 있다 (Park *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019).

3배체는 산란자극을 통해 얻은 정자와 난을 인공수정하고

그 수정란에 물리적 또는 화학적 자극을 주어 제1극체 또는 제2극체의 방출을 억제하여 생산할 수 있다. 염색체 공학을 이용하여 생산된 3배체는 3개의 상동 염색체를 갖기 때문에 감수분열 중기에서 상동염색체 간 짝짓기 (pairing) 및 등분리 (equivalent segregation) 가 원활하게 일어나지 못해 불임성이 나타나며, 불임성을 가진 3배체는 정 성숙에 사용할 에너지를 체성장으로 전환하여 사용함에 따라 2배체 (diploidy) 보다 성장 속도가 빠른 장점을 가지고 있다. 이러한 장점을 가진 3배체 패류는 버지니아굴, *Crassostrea virginica* (Stanly *et al.*, 1981) 과 가리비, *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984) 등이 있으며, 2배체 보다 높은 육중량, 양질의 육질 등의 특징을 가지고 있다고 보고하였다.

인위적으로 유도된 3배체의 배수성 판정을 위해서는 적혈구 세포 및 핵의 크기를 측정하는 방법, 염색체 수를 검사하는 방법, 핵형을 분석하는 방법 그리고 DNA 함량을 측정하는 방법 등이 있다 (Chevassus, 1983). 그러나 이와 같은 방법으로 배수성을 평가하는 것은 대략적인 예측 수준이며, 종자나 유생단계의 적은 시료에서는 분석이 어려울 뿐만 아니라 많은 시간과

Received: December 13, 2021; Revised: December 21, 2021;
Accepted: December 31, 2021

Corresponding author: Choul Ji Park

Tel: +82 (61) 530-3930, e-mail: choulji@korea.kr
1225-3480/24802

This is an Open Access Article Distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. 5 microsatellite markers for multiplex design

Locus	Repeat type	Primer sequences (5'-3')
<i>HDSC8054</i>	ATC	F: CGGTCGCAGTCAGCAATTTT R: AATAGCACCACTGCCAACCT
<i>HDSC0615</i>	GT	F: ACACTTTTCGCCTTTGTCCAC R: TGGGGACTTTTCGGAACAGA
<i>EAngs4-14</i>	TAGA	F: ATTAGGGGTGGATGGATAGAGG R: TTGACGAACAGTCATTTTACGG
<i>EAngs5-70</i>	GTGAG	F: AGAGCATCAATCAGTTGCTGTG R: TGACTTGATTACGTATGGGCAG
<i>Hd601</i>	CGCA/CA	F: ACATGGAACTGCGAGTCCTAGAAGC R: TGATTATTTTCAGATCGCCGTCATA

노동력을 필요로 한다 (Slabbert R. *et al.*, 2010). 따라서 인위적으로 배수성을 유도하여 양식 산업에 적용하기 위해서는 인공수정을 하여 배수체 처리 직후 발생단계 초기에 배수성을 신속하고 정확하게 판별할 수 있는 기술개발이 필요하다.

본 연구는 생산성 및 수익성이 기대되는 배수체 전복의 양식 현장 적용을 위해 반복 염기서열을 가진 microsatellite 마커에 대한 다중 분석을 가능하게 하는 multiplex PCR을 이용하여 발생단계 초기에 배수성을 신속하게 판정할 수 있는 기법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 Genomic DNA 추출

실험에 사용한 2배체 북방전복, *Haliotis discus hannai*는 경상남도 거제지역에서 해녀가 채집한 자연산 전복 48개체이며, 3배체 북방전복은 국립수산물과학원 수산종자육종연구소에서 GSP (Golden Seed Project) 과제 수행으로 생산된 14개체이다. 모든 시료의 total genomic DNA는 전복 외투막의 근육조직 일부를 절제하여 킬레이팅 수지법 (chelating resin method; Walsh *et al.*, 1991; Suenaga and Nakamura, 2005) 을 이용하여 추출하였다.

2. Microsatellite locus의 증폭범위

Multiplex PCR 디자인을 위하여 Table 1에 나타난 5개의 microsatellite locus (Hara and Sekino, 2005; Sekino *et al.*, 2012) 를 선택하였다. 5개의 microsatellite locus에 대한 PCR 증폭은 킬레이팅 수지법으로 얻어진 2배체 및 3배체 각각의 DNA 시료 10 ng, 10 mM Tris-Hcl (pH 8.8), 0.1% Triton X-100, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 U *f-Taq* DNA polymerase (Solgent), 0.5 pmol microsatellite primer pairs를 혼합하여 사용하였으

며, PTC-200 Thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) 를 이용하여 95°C에서 10분간 개시변성 (initial denaturation) 시킨 후, 95°C에 20초, 55°C에 40초, 72°C에 1분으로 35회 반복하여 반응시킨 다음 72°C에 30분간 최종연장 (final extension) 시켜 PCR 반응을 하였다.

PCR에 의해 증폭된 microsatellite DNA 단편은 표준크기 (size standard) 마커로 GeneScan 400HD ROX (ABI, USA), HiDi formamide와 혼합한 후 유전자형 분석기 (3100 genetic analyzer; ABI, USA) 를 이용하여 분석하였다. 분석 후에 나타난 피크 정보는 GeneMapper v3.7 software를 이용하여 유전자형을 분석하고 각 microsatellite locus의 증폭범위를 확인하였다.

3. Multiplex design

5개의 microsatellite locus의 증폭범위를 확인하고 증폭범위의 중복유무에 따라 Applied Biosystems (ABI) 의 4가지 형광표식 (6-FAM, PET, NED and VIC) 을 붙였다. Multiplex design을 위하여 기본적으로 증폭범위가 중복되지 않은 locus는 같은 형광표식 (fluorescent dye) 을 사용하였으며, 반면에 같은 증폭범위를 나타낸 locus는 서로 다른 형광표식을 사용하여 실험하였다.

4. Multiplex PCR을 이용한 2배체와 3배체의 판별

2배체 (diploid) 의 경우, microsatellite 마커는 공우성 (co-dominant) 마커로서 멘델의 유전방식을 따르고 있으며, 2개의 대립유전자를 가지고 있어 대립유전자가 같을 경우 1개이며, 서로 다른 대립유전자를 가지고 있으면 2개의 피크를 나타낼 수 있다. 반면 3배체 (triploid) 의 경우 2배체보다 1개의 반수체 염색체조를 부가적으로 가지고 있어 3개의 대립유전자로 1개, 2개, 3개의 피크를 나타낼 수 있다.

이러한 각 microsatellite locus에 대한 대립유전자 수를 기

Table 2. Allele size range and dye label of 5 microsatellite markers

Locus	Allele Size Range (bp)	Number of alleles	Dye label	Primer concentration (pmol/ul)
<i>HDSC8054</i>	257 - 299	9	PET	0.50
<i>HDSC0615</i>	145 - 163	8	6-FAM	0.30
<i>EAngs4-14</i>	221 - 269	5	6-FAM	0.30
<i>EAngs5-70</i>	282 - 342	7	NED	0.40
<i>Hd601</i>	152 - 196	6	VIC	0.30

반으로 5개의 마커에 대한 다형분석을 통해 3배체와 2배체를 판별하였다.

결 과

1. Multiplex design

Multiplex PCR의 최적 조건을 확인하기 위하여 2배체 자연산 전복 48개체를 이용하여 Table 1의 5개 microsatellite locus에 대한 각각의 PCR 증폭범위를 확인하였다. 그 결과 Table 2에 나타난 것과 같이 HDSC8054는 257-299 bp, HDSC0165는 145-163 bp, EAngs4-14는 221-269 bp, EAngs5-70은 282-342 bp 그리고 HD601은 152-196 bp로 나타났다.

5개의 각 microsatellite locus 증폭범위의 중복을 확인하고 정방향 프라이머에 각각 다른 형광라벨을 이용하여 표지하였다. HDSC8054는 PET, HDSC0165 및 EAngs4-14는 증폭범위가 없어 같은 6-FAM으로 표지하였으며, EAngs5-70은 NED, HD601은 VIC으로 표지하였다. PCR 증폭온도는 5

5°C로 하였으며, 프라이머 농도는 0.5 pmol를 기준으로 하여 각 프라이머 세트의 피크가 증폭 시 비슷한 수준으로 나타나도록 농도를 조절하여 PCR 조건을 최적화하였다.

Multiplex PCR 증폭은 각 microsatellite locus 증폭범위 확인을 위한 조건과 동일하게 수행하였으며, 최적의 프라이머 농도는 Table 2에 나타난 것과 같이 5개를 혼합하여 사용하였다.

그 결과 Fig 1에 나타난 것과 같이 1회의 PCR을 통하여 5개의 microsatellite locus를 분석할 수 있었다. 이는 경제적 효율성이 매우 높은 방법으로 1회의 PCR 증폭에 필요한 작업 및 고가의 시약에 대한 경제적 비용으로 5회의 PCR 결과를 얻을 수 있는 방법이다.

2. Multiplex PCR을 이용한 배수성 판별

배수체 전복 14개체에 대하여 위의 multiplex PCR 방법을 이용하여 배수체 여부를 판별하였다. 배수체 개체에 대한 유전자형 판별 전기영동분석 결과를 Fig. 1 및 Table 3에 나타내었다.

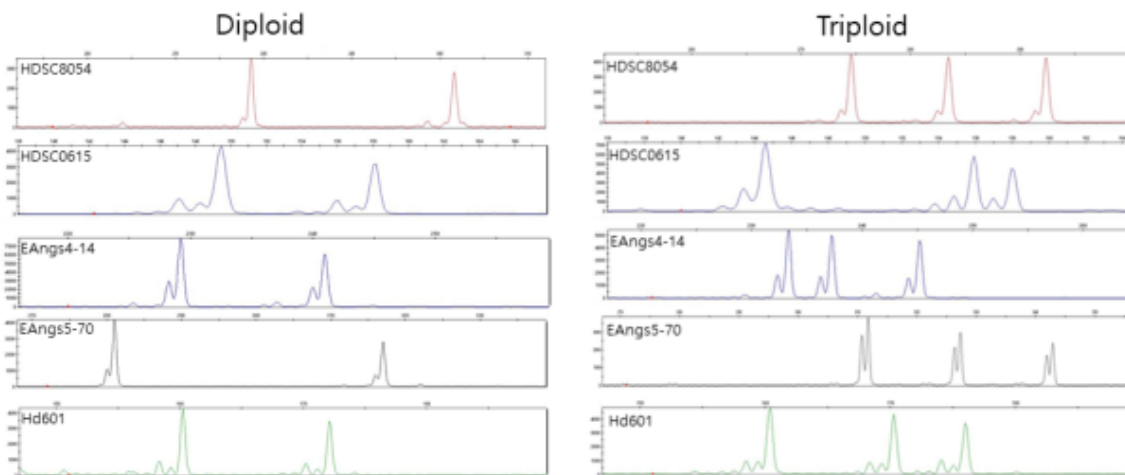


Fig. 1. Electropherograms showing the alleles of each of the five microsatellite loci used for triploid verification for a diploid and triploid individual.

Table 3. Genotype of triploid abalone by 5 microsatellite markers

Individual No.	Locus				
	<i>HDSC8054</i>	<i>HDSC0615</i>	<i>EAngs4-14</i>	<i>EAngs5-70</i>	<i>Hd601</i>
Triploid-1	279/290/299	145/147/153	233/237/245	307/327	152/170
Triploid-2	284/296	145/149/163	233/237	312/337/342	160/170/176
Triploid-3	275/284/293	145/147/163	221/233/237	312/327/342	160/170
Triploid-4	275/299	147/155/157	221/233/237	317/327	152/170
Triploid-5	275/279/299	147/157	221/233/245	307/317/327	152/170
Triploid-6	284/293/296	155/163	233/241	312/337/342	160/170/176
Triploid-7	269/290/299	145/147/153	233/237/245	307/327	152/170
Triploid-8	284/293/296	155/155	221/233/241	312/337/342	160/176
Triploid-9	275/293	149/155	221/233/245	322/337/342	160/172/176
Triploid-10	257/275/284	155/159/163	221/237	312/327	170/176
Triploid-11	269/275/299	147/157	221/245	317/327	152/170
Triploid-12	257/275/284	155/159/163	221/237	312/327	170/176
Triploid-13	275/284/293	147/155	221/233	312/327/342	174/176
Triploid-14	257/284/296	155/159	233/237	312/327/337	170/176

그 결과 분석한 모든 개체가 3배체 전복임을 확인할 수 있었다 ($n = 14$). 3개의 대립유전자를 가지고 있는 하나의 microsatellite locus만으로도 다형성을 충분히 판별할 수 있었다. 단일 microsatellite locus로 분석할 경우 HDSC8054는 78.6%, HDSC0615 및 EAngs4-14는 50.0%, EAngs5-70은 57.1%, HD601은 21.4% 판별율로 배수체를 확인할 수 있으나, 5개의 microsatellite locus를 조합하여 분석할 경우 100%의 확률로 배수체 판별이 가능하였다.

고 찰

배수성 판정을 위해서는 적혈구 세포 및 핵의 크기를 측정하는 방법, 염색체 수를 검사하는 방법, 핵형을 분석하는 방법 그리고 flow cytometry를 이용하여 DNA 함량을 측정하는 방법 등이 있다 (Chevassus, 1983).

어류는 적혈구 세포 및 핵의 크기로 배수체 판정이 가능하다 (Benfey and Sutterlin, 1984; Wolters *et al.*, 1982). 하지만 전복과 같은 패류는 적혈구 대신 hemolymph cell이 존재하고 있으며, 모양이 일정하지 않고 크기도 다양하여 배수성 판정에는 적합하지 않다고 보고되어 있다 (Chang, 1993).

염색체 수 및 핵형 조사에 의한 배수체의 유전자 분석은 특별한 기기 및 고가의 분석 비용도 들지 않는 방법으로 배수성을 구별하는 가장 확실한 방법이다. 즉 2조의 모계 반수체 유전자와 1조의 부계 반수체 유전자로 구성되어 있는지를 확인할 수 있는 방법이다. 하지만 이 방법은 세포의 분열 증식이 활

발한 시기 외에는 세포배양을 하여 염색체 표본을 얻어야 하는 단점이 있다 (Thorgaard *et al.*, 1982).

최근 flow cytometry 기기를 이용하여 배수체를 판정하는 방법을 많이 사용하고 있는데 이 방법은 혈구 등의 DNA 함량을 측정하는 방법으로 단시간에 다량의 시료를 분석할 수 있으며, 실험동물을 죽이지 않고 분석이 가능하다. 하지만 이 분석을 위해서는 고가의 flow cytometry 기기 및 시약 등을 구매하여 실험을 진행해야 하는 단점을 가지고 있다.

본 연구에서는 microsatellite 마커를 이용하여 1회의 multiplex PCR 반응으로 다량의 배수체 시료의 판별이 가능한 방법을 개발하였다. 유전자 기반의 분석기술의 핵심인 DNA 마커는 생물 종에 대한 유전적인 특성을 분석할 수 있는 기술로 유전자원 보존을 위한 평가 연구 등에 활용되고 있다. 초기의 DNA 마커는 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), ISSR (inter-simple sequence repeat) 등의 우성마커 (dominant marker) 가 주로 이용되었다. 그러나 RAPD 및 ISSR의 경우 재현성이 떨어질 뿐만 아니라 우성마커의 특성상 2배체에서 우성 동형접합체 (homozygote) 와 이형접합체 (heterozygote) 유전자형의 구분이 불가능한 단점이 있다. 최근에는 이러한 단점을 극복할 수 있는 생물체 게놈 (genome) 상에 존재하는 2-8bp의 염기 서열이 반복되는 구조로 염기서열의 반복 횟수의 차이로 인해 다형성 (polymorphism) 이 나타나는 SSR (simple sequence repeat) 부분을 이용하는 microsatellite 부분을 유전자 마커로 활용하여 생물종의 유전적 다양성, 유연관계 분석, 친자확

인 등에 활용하고 있다. 또한 microsatellite 마커는 공우성 (co-dominant) 마커로서 멘델의 유전방식을 따르고 있으며, 대립유전자의 다양성, 전체 계층상에 균등한 분포, 작은 microsatellite locus 크기, 그리고 높은 다형성을 가지고 있다. 또한 3배체 판별에 있어 microsatellite 마커의 유용성은 극체 방출 억제에 의해 1개의 암컷 염색체조가 더 많아 암컷 내에 존재하는 이형접합성 유전자 좌위 및 2개의 암컷 대립유전자와 크기가 다른 수컷으로부터 유전되는 유전자 좌위로 분석이 가능하다. 이러한 다양한 수의 유전자 좌위는 개체의 3배체 특성을 판별하는데 더욱 유용하게 적용될 수 있다.

본 연구에서는 생산성 및 수익성이 기대되는 배수체 전복의 양식현장 적용을 위해서 배수성을 발생단계 초기에 신속하게 판정할 수 있는 기술개발과 그 유용성을 검토하였다. 그 결과 5개의 microsatellite locus를 이용하여 multiplex PCR로 확인했을 때 100% 3배체의 배수성을 확인할 수 있었다. 각각의 microsatellite locus로 확인한 3배체 판별율은 HDSC8054는 78.6%, HDSC0165 및 EAngs4-14는 50.0%, EAngs5-70은 57.1%, HD601는 21.4%로 나타났지만 5개의 microsatellite locus를 조합하여 분석할 경우 100%의 비율로 배수체 판별이 가능하였다. 또한 본 연구를 통해 개발된 3배체 판별을 위한 multiplex PCR 기술은 시간 및 비용이 절약되어 대량의 샘플의 배수성 판별을 신속 정확하게 판별할 수 있을 것이라 생각된다.

요 약

생산성 및 수익성이 기대되는 배수체 전복의 양식현장 적용을 위해서 배수성을 발생단계 초기에 신속 정확하게 판정하기 위하여 microsatellite 마커를 이용한 multiplex PCR 기술을 개발하였다. 개발한 5개의 microsatellite locus를 이용한 multiplex PCR 기술은 2배체 및 3배체 실험전복의 배수성을 100% 정확하게 판별하였다. 단일 microsatellite locus를 분석에 사용할 경우 판별율이 21.4%-78.6%지만 5개의 microsatellite locus를 조합하여 분석할 경우 100%의 높은 비율로 배수성 판별이 가능하다. 따라서 본 연구에서 개발한 3배체 판별을 위한 multiplex PCR 기술은 시간 절약 및 비용 절감 면에 있어서 매우 유용하게 사용할 수 있을 것이라 생각된다.

사 사

이 연구는 2021년도 국립수산물연구원 시험연구사업 양식생물 육종품종 개발 및 산업화 과제 (R2021001) 의 지원으로 수행된 연구입니다.

REFERENCES

- Benfey, T.J. and Sutterlin, A.M. (1984) Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **36**: 359-367.
- Chang, Y.J. (1993) Identification of blood cells and their physiological functions in the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Aquaculture*, **6**: 1-12.
- Chevassus, B. (1983) Hybridization in fish. *Aquaculture*, **33**: 245-262.
- Hara, M. and Sekino, M. (2005) Genetic difference between Ezo-awabi *Haliotis discus hannai* and Kuro-awabi *Haliotis discus discus* population: microsatellite-based population analysis in Japanese abalone. *Fisheries Science*, **71**: 754-766.
- Kim, E.J., Kim, S.J., Park C.J. and Nam Y.K. (2019) Characterization of testis-specific serine/threonine kinase 1-like (TSSK1-like) gene and expression patterns in diploid and triploid Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *PLoS One* 14(12): e0226022.
- Park, C.J., Kwon, M.S., Kim E.J. and Nam Y.K. (2018) Improvement of cold-shock treatment conditions for triploidy induction in Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *The Korean Journal Malacology*, **34**(4): 191-200.
- Sekino, M., Shigenobu, Y., Nakamura, Y., Sugaya, T. and Hara, M. (2012) Application of massively parallel pyrosequencing to the discovery of non-dinucleotide microsatellite: tetra- and pentanucleotide repeat markers for the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Conservation Genet Resour*, **4**: 939-941.
- Slabbert, R., Prins N. and Brink D. (2010) A microsatellite panel for triploid verification in the abalone *Haliotis midae*. *African Journal of Marine Science*, **32**(2): 259-264.
- Stanley, J. G., Allen, S. K. Jr., and Hidu, H. (1981) Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, **23**: 1-10.
- Suenaga, E. and Nakamura, H. (2005) Evolution of tree methods for effective extraction of DNA from human hair. *Journal of chromatography B*, **820**: 137-141.
- Tabarini, C. L., (1984) Induced Triploidy in the bay Scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, **42**: 151-160.
- Thorgaard G.H., Rabinovitch, P.S., Shen, M.W., Gall, G.A.E., Propp, J. and Utter, F.M. (1982) Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture*, **35**: 125-135.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, **10**: 506-513.
- Wolters, W.R., Chrisman C.L. and Libey, G.S. (1982) Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Biology*, **20**: 253-258.

