

RAPD 분석법에 의한 한국형 대장균파아지와 미국형 대장균파아지의 분자적 계통분류

계명대학교 응용과학부 미생물학과*

권 오 식†

국문초록: 분리한 한국형 대장균파아지군 (Φ C1, Φ C2, Φ C3 및 Φ C4)과 잘 알려진 미국형 대장균 파아지군 (Φ T2, Φ T4, Φ T5, Φ T7 및 Φ λ)의 유전적 유연관계를 조사하기 위하여 분자적 계통분류를 위한 방법인 RAPD-PCR을 실시하고 컴퓨터분석을 하였다. 그 결과, 9개의 대장균파아지들은 5개의 그룹으로 나뉘어지면서 한국형 대장균파아지들만이 그들간의 유전적 유사도가 매우 높으면서 하나의 클러스터를 형성하였다. 반면 미국형 대장균파아지들은 오직 하나의 서브클러스터를 가지며 나누어졌다. 즉, 미국형 대장균파아지 중 Φ T2와 Φ T4 (T_{even} 파아지)만이 하나의 서브클러스터를 형성하면서 Φ T5, Φ T7 및 Φ λ 들과 뚜렷히 구분되고 있었다. 그리고 한국형 대장균파아지들은 미국형 대장균파아지 중 오직 Φ λ 와 유전적 유연관계를 갖고 있음을 확인하였다. 한편 한국형 대장균파아지의 게놈의 크기는 25,000 bp~35,000 bp 정도였으며, 이 중 Φ C2가 그 크기가 가장 작고 Φ C1이 가장 컸다. 그리고 Φ C3과 Φ C4의 게놈은 중간 크기로 비슷하였다.

서 론

대장균을 숙주로 하는 대장균파아지 (coliphage)는 박테리오파아지 (bacteriophage 혹은 phage)의 일종으로 순수 기생성 바이러스이며 그 크기가 30~200 nm로 매우 작다. 또한 많은 수의 대장균 파아지는 기생 후 숙주를 용균시키기 때문에 대장균의 개체군에 주요한 인자로서 세균의 활동과 생존에 직접적으로 영향을 주고 있다¹⁾. 한편 대장균파아지는 이들의 특징인 구조적 및 유전적 단순성 때문에 생물의 유전 원리를 이해하는데 기초적인 재료로 인식되었으며 분자생물학 연구에 필수적인 바이러스가 되었다²⁾. 특히 많이 이용되는 대장균파아지는 박테리오파아지 T2와 T4 (T_{even} phages), T5와 T7 (T_{odd} phages), λ (λ), Φ X174 및 박테리오파아지 M13 등 그 종류가 다양하며 새로운 대장균파아지의 발견은 여러 가지

이유에서 꾸준히 지속되고 있다^{3,4,5)}.

하지만 이렇게 수적으로 우세한 대장균파아지를 분리하거나 동정하는데 있어서, 기존의 연구 방법으로는 같은 종 (혹은 개체)을 숙주로 하면서 유전적 조성이 매우 유사한 그들간의 차이를 알아내기는 쉽지 않다. 그리고 이들은 바이러스인 관계로 돌연변이가 빠르게 진행되고 있기 때문에^{2,6)} 유사종 간의 파아지의 구분은 게놈 수준에서 좀 더 빠르게 그리고 특이적으로 할 필요가 있다. 이에 많은 종류가 존재하는 개체의 구분 및 유전적 분류를 위해 Welsh¹¹⁾와 Williams 등¹²⁾에 의해서 고안된 random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR이 이용되고 있다. 이 방법은 비교적 짧은 염기서열 (통상 10 nucleotides)로 만들어진 다수의 random primers를 이용하는 PCR 방법 (RAPD-PCR)으로 DNA 증폭 후 기존의 PCR 결과와 달리 비특이적인 다수의 DNA 밴드를 한천 겔 상에서 나타낸다. 이 결과를 이용하면 빠르게 비교하고자 하는 개체간의 유전적 유사성과 상이성을 알 수 있으며 이는 특히 많은 종이 존재하는 곰팡이^{9,13)}, 세균^{7,11)} 및 바이러스⁵⁾의 동정 및 분류에 효과적이다.

* 논문 접수: 2000년 5월 8일

수정재접수: 2000년 6월 19일

† 별책 요청 저자: 권오식, Tel: 053-580-5539

Fax: 053-585-6949, E-mail: biv@kmucc.keimyung.ac.kr

따라서 유용성과 다양성에도 불구하고 그 크기가 작아 현재까지 분류의 기준이 명확치 않은 대장균과아지의 체계적인 분류를 위하여 본 연구에서는 RAPD 분석법으로 계층 수준에서 분자적 계통분류를 시도하였다. 이를 위해 본 실험실에서 분리한 한국형 대장균과아지 (Φ C1~ Φ C4)와 기존의 상용되고 있는 미국형 대장균과아지 (Φ T2, Φ T4, Φ T5, Φ T7 및 Φ λ)의 DNA를 이용해 RAPD-PCR을 수행한 후 그 결과를 NTSYS-PC 소프트웨어의 UPGMA 방법을 이용해 이들간의 유전적 유연관계를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 대장균과아지 DNA

대장균과아지 중 Φ C1~ Φ C4는 본인의 실험실에서 순수분리하고 동정한 파아지⁵⁾를 사용하였으며 Φ T2, Φ T4, Φ T5, Φ T7 및 Φ λ 의 DNA는 Sigma Chemical Co. (미국)에서 구입하여 다시 정제하여 사용하였다.

2. 효소처리에 의한 대장균과아지 DNA 추출

대장균과아지 Φ C1, Φ C2, Φ C3 및 Φ C4의 DNA는 권 등⁷⁾에 의해 보고된 방법으로 추출하였다. 즉, 대장균과아지에 의해 완전히 용균된 세포 파쇄물을 모아 10 ml의 TEM 용액 (10 mM Tris-HCl [pH 7.6]; 1 mM EDTA; 10 mM MgCl₂)이 든 15 ml 원심튜브 (Corning)에 잘 현탁시킨 후, 2,500 xg로 15분간 냉장 원심분리하였다. 그리고 얻어진 상청액은 소형 고속원심분리기 (Vision VS-15000)를 이용해 12,000 xg에서 10분간 2차 원심분리하여 순수한 파아지 상청액으로 만들었다. *E. coli*의 DNA와 RNA를 제거하기 위하여 파아지 상청액 1 ml 당 RNase (10 mg/ml)를 10 μ l, DNase I (5 mg/ml)을 2.5 μ l씩 처리해 37°C의 heat block에서 3시간 배양하였다. 그리고 이 혼합액에 proteinase K (20 mg/ml)를 10 μ l를 첨가하고 37°C의 heat block에서 12시간 배양하였다. 다음날 이 용액은 15 ml 튜브에 모아 동량의 phenol: chloroform (50:50)으로 2회 처리하였으며, DNA 침강을 위하여 얻어진 상청액은 250 mM의 NaCl 용액으로 만들어 100% ethanol을 첨가한 후 -70°C 냉동고에서 3시간 보관하였다. 가라앉은 DNA는 1.5 ml 용 에펜도르프 튜브에 모아 12,000 xg에서 30분간 냉장 원심분리하였고, 70% ethanol로 수세하였다.

이를 공기건조한 후 50 μ l의 T₁₀E₁ (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 버퍼에 녹여 냉동 보관하면서 사용하였다. 한편 구입한 Φ T2, Φ T4, Φ T5, Φ T7 및 Φ λ 의 DNA는 순도를 높이기 위하여 RNase를 처리한 후 상기한 방법으로 다시 정제하였다.

3. RAPD-PCR

이 실험에 사용된 random primers (Table 1)는 100개의 서로 다른 염기서열을 가진 oligonucleotide로 Biotechnology Lab. (University of British Columbia, Canada)에서 구입하였다 (Set# 100/2). PCR 증폭반응¹⁰⁾은 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 3.0 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 각 2.0 mM의 dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 100 pmol primer, 100 ng 대장균과아지 DNA 그리고 1.0 unit *Taq* DNA 중합효소 등을 섞어 총 볼륨이 50 μ l 되게 만들고, 10 μ l의 mineral oil을 떨어뜨린 후 계획된 thermocycling 온도에 맞춰 실행하였다. 이 때 실행된 온도와 시간은 사용된 random primer의 조건에 따라 결정하였으나 cycling 수는 40 cycles로 고정하였다. PCR 반응이 끝나면 10 μ l의 반응액에 2 μ l의 loading buffer (40% sucrose, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol)를 섞어 2.0% 한천 젤에 전기영동을 하였다. PCR 결과는 UV transilluminator (Vilber Lourmat)를 이용해 확인하였다.

4. RAPD-PCR Data 분석

100개의 random primers를 적용하여 RAPD-PCR을 한 후, 얻어지는 polymorphic DNA 밴드 패턴은 일차적으로 UV 필름 (Polaroid 667)으로 촬영하였다. 그리고 사진에 나타나는 polymorphic DNA 밴드 패턴은 특정한 위치에 나타나는 밴드의 유무에 따라 '1' (밴드 있음)과 '0' (밴드 없음)으로 표시한 후 이항행렬부호를 작성하였다. 이를 근거로 각 대장균과아지의 유전적 연관성을 조사하기 위해 NTSYS-PC (Numerical Taxonomy Analysis Program Package, Exeter Software)를 이용하였으며 각 대장균과아지 사이에 존재하는 분류학적 유연관계는 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method by Arithmetic Average) 분석법을 실행하여 phenogram과 유전적 유사도를 구하였다.

Table 1. List of primers and their nucleotide sequences used in this study

Primers	Nucleotide sequences	Primers	Nucleotide sequences
CPP01	GCGGCTGGAG	CPP35	AAGCTGCGAG
CPP02	GGTGGGGACT	CPP36	TACGTCTTGC
CPP08	GTATTGCCCT	CPP38	GCTTCCCCTT
CPP09	TGTACGTGAC	CPP39	CCCAATCTTC
CPP11	AGTAGACGGG	CPP44	AGAGGGTTCT
CPP12	GCTTGTGAAC	CPP45	TGTTCGGTTGC
CPP13	ATCCAAGAG	CPP46	ATGTGTTGCG
CPP14	TGACCGAGAC	CPP47	GTGCGTCTC
CPP15	TTCCGCGGGC	CPP49	AGCAGCGTGG
CPP16	TACGATGACG	CPP50	GAAGGCTCTG
CPP17	TTAGCGGTCT	CPP51	GCTGTAGTGT
CPP25	GCGGTTGAGG	CPP55	CTGGCGGCTG
CPP26	CTTTCGTGCT	CPP56	GCCTGGTTGC
CPP27	ATCTGGCAGC	CPP57	CGTGGGCAGG
CPP28	GCATATTCCG	CPP71	TGACCCCTCC
CPP29	GCGGTATAGT	CPP73	CAGGCGGCGT
CPP30	GGTTATCCTC	CPP74	AACGGGCAGC
CPP31	GAAACAGCGT	CPP80	GGGCCACGCT
CPP32	AGGGATCTCC	CPP94	AGGACGTGCC
CPP33	GGAAACCTCT	CPP96	CTCCTCCCCC
CPP34	AACACACGAG	CPP99	GCTCCCCCAC

결 과

1. 한국형 대장균파아지의 게놈 크기 조사

한국형 대장균파아지와 미국형 대장균파아지의 유전적 유연관계를 조사하기 앞서 본 실험실에서 분리 및 동정된 대장균파아지 (Φ C1, Φ C2, Φ C3 및 Φ C4)의 게놈 크기를 이미 게놈의 크기가 알려진 미국형 대장균파아지 Φ T2 (164.0 Kb), Φ T4 (166.0 Kb), Φ T5 (103.0 Kb), Φ T7 (37.9 Kb) 및 Φ λ (48.5 Kb) 등과 비교하였다. Fig. 1에서 보는 바 같이 한국형 대장균파아지 Φ C1 (lane 1), Φ C2 (lane 2), Φ C3 (lane 3) 및 Φ C4 (lane 4)의 게놈들은 그들 사이에 크기의 차이는 있었으나 대체로 미국형 대장균파아지의 게놈보다 작았다. 이 중 Φ C2의 게놈이 가장 작은 것으로 나타났고,

Φ C3과 Φ C4는 중간 크기이었으며 Φ C1의 게놈이 가장 컸다. 한편 이들 게놈의 크기가 미국형 대장균파아지 중 게놈의 크기가 가장 작은 Φ T7 (37.9 Kb, lane 8)과 DNA marker로 사용된 제한효소 *HindIII*로 처리된 Φ λ DNA 중 가장 큰 크기를 갖는 DNA 밴드 (23.1 Kb, lane M)의 사이에 존재하는 것으로 보아서 Φ C1, Φ C2, Φ C3 및 Φ C4의 게놈은 25 Kb~35 Kb 크기를 갖는다고 사료되었다.

2. 대장균파아지의 RAPD-PCR 결과 분석

RAPD-PCR할 때 사용한 random primers는 100개로, 이 중 결과가 확실히 나온 primer의 수는 42개 (Table 1)이었으며 이들로부터 총 361개의 polymorphic DNA 밴드 (혹은 marker)를 얻을 수 있었다. 전반적으로 RAPD-PCR 결과는 사용한 random

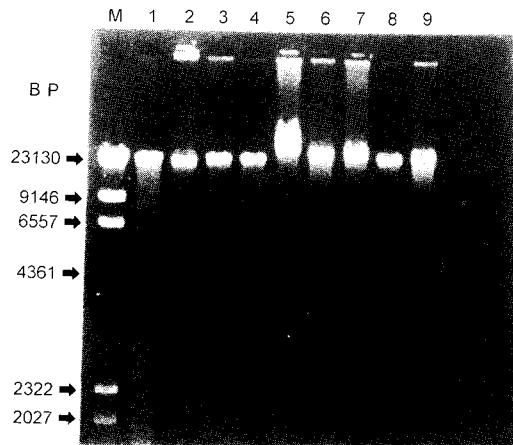


Fig. 1. The Comparison of genome size among 9 coliphages used in this study. Lane descriptions: M (DNA marker; $\Phi\lambda$ *Hind*III digested), 1 (Φ C1), 2 (Φ C2), 3 (Φ C3), 4 (Φ C4), 5 (Φ T2; 164,000 bp), 6 (Φ T4; 166,000 bp), 7 (Φ T5; 103,000 bp), 8 (Φ T7; 37,900 bp), 9 ($\Phi\lambda$; 48,502 bp).

primer의 G/C 함량이 높았을 때 (60%~80%) polymorphic DNA 밴드가 잘 나타났으나 G/C 함량이 50% 이하인 primers (CPP30-CPP36)를 사용했을 때는 거의 DNA band를 얻을 수 없었다.

한편 G/C 함량이 80%인 primers (CPP73, 왼쪽; CPP80, 오른쪽)는 Fig. 2에서 보는 것처럼 특징적인 많은 수의 polymorphic DNA 밴드들을 만들었다. 하나의 예로 Fig. 2에서 제시된 이 primers들은 한국형 대장균파아지의 polymorphic DNA 밴드 패턴과 미국형 대장균파아지의 polymorphic DNA 밴드 패턴을 놀라우리만큼 뚜렷이 구별시켜 주고 있었다. 먼저 primer CPP73의 경우 한국형 대장균파아지들 간의 결과를 비교해 본다면, 계놈의 크기가 비교적 큰 Φ C1 (Fig. 2, lane 1)에서 크기가 큰 polymorphic DNA band를 많이 만들어 내고 있음을 볼 수 있다 (Fig. 2, 화살표 1, 2). 또한 이러한 결과는 미국형 대장균파아지 중 계놈이 매우 큰 Φ T2 (Fig. 2, lane 5)와 Φ T4 (Fig. 2, lane 6)에서도 마찬가지였다. 화살표 (→) 3과 화살표 (←) 4는 한국형 대장균파아지들의 상이성 (Fig. 2, 화살표 3)과 유사성 (Fig. 2, 화살표 4)을 잘 보여주고 있다. 하지만 primer CPP80의 경우, 계놈의 크기가 작은 한국형 대장균파아지들이 오히려 계놈의 크기가 큰 미국형 대장균파아지보다 더 많은 수의 polymorphic DNA 밴드를 보여주었다. 마지막 특이한

결과로 Φ T2 (Fig. 2, lane 5)와 Φ T4 (Fig. 2, lane 6)에서 유난히 작은 polymorphic DNA 밴드 (Fig. 2, 작은 화살표)가 나타나고 있음을 들 수 있다.

3. 한국형 대장균파아지의 계통수 작성

100개의 random primers를 사용하여 RAPD-PCR 결과로 특징한 위치에서 나타나는 비특이적 polymorphic DNA 밴드 (42개의 primers에서 361개의 밴드를 얻음)의 유무를 1 (밴드 있음)과 0 (밴드 없음)으로 표시하였고 이를 이항행렬부호로 작성하였다. 이 데이터를 이용해 우리는 한국형 대장균파아지와 미국형 대장균파아지의 유전적 연관성 (계통수)을 조사하기 위해 NTSYS-PC software package의 UPGMA 분석법을 실행하여 각 대장균파아지 사이에 존재하는 분류학적 유연관계를 phenogram (Fig. 3)으로 작성하였다. 또한 사용한 대장균파아지 9종의 유사성 (Table 2)은 Dice coefficient [$2a/(2a + b + c)$]에 근거해 유전적 유사도로 확인하여 보았다.

그 결과 우리가 분리한 한국형 대장균파아지 간의 유전적 유연관계는 아주 가까운 것으로 나타났으며 이들은 미국형 대장균파아지들과 유전적으로 매우 멀다는 것을 발견할 수 있었다. 특히 한국형 대장균파아지에 있어서 Φ C2와 Φ C3은 유사도가 0.729로 가장 가깝게 묶였으며 이들은 서브클러스터를 이루며 Φ C1 보다도 Φ C4에 더 가까웠다. 한편 Φ C1은 발견된 다른 3종의 대장균파아지와 상대적으로 유연관계가 멀었다. 이 중 Φ C1은 유전적 유사도가 0.514인 Φ C4와 가장 먼 유연관계를 보이는 것으로 판명되었다. 특이한 것은 이들이 미국형 대장균파아지 중 $\Phi\lambda$ 와 같은 클러스터를 형성함으로써, 우리가 발견한 한국형 대장균파아지가 $\Phi\lambda$ 계열에 속하고 있음을 알려주었다. 즉 $\Phi\lambda$ 와 한국형 대장균파아지의 유연관계는 유사도가 0.230에서 0.247로써 다른 미국형 대장균파아지인 T 파아지들 (유사도 0.069~0.121)과 확실히 구별되고 있었다.

4. 미국형 대장균파아지의 계통수 작성

조사된 미국형 대장균파아지는 5종 (Φ T2, Φ T4, Φ T5, Φ T7 및 $\Phi\lambda$)으로 Fig. 3에서 보는 바처럼 크게 네 그룹으로 나뉘고 있었다. 즉 Φ T2와 Φ T4가 같은 서브클러스터를 이루고 있는데 반해 Φ T5, Φ T7 및 $\Phi\lambda$ 는 각각 독립된 가치를 형성하였다. 이들의 유전적 유사도를 조사해 보면 (Table 2),

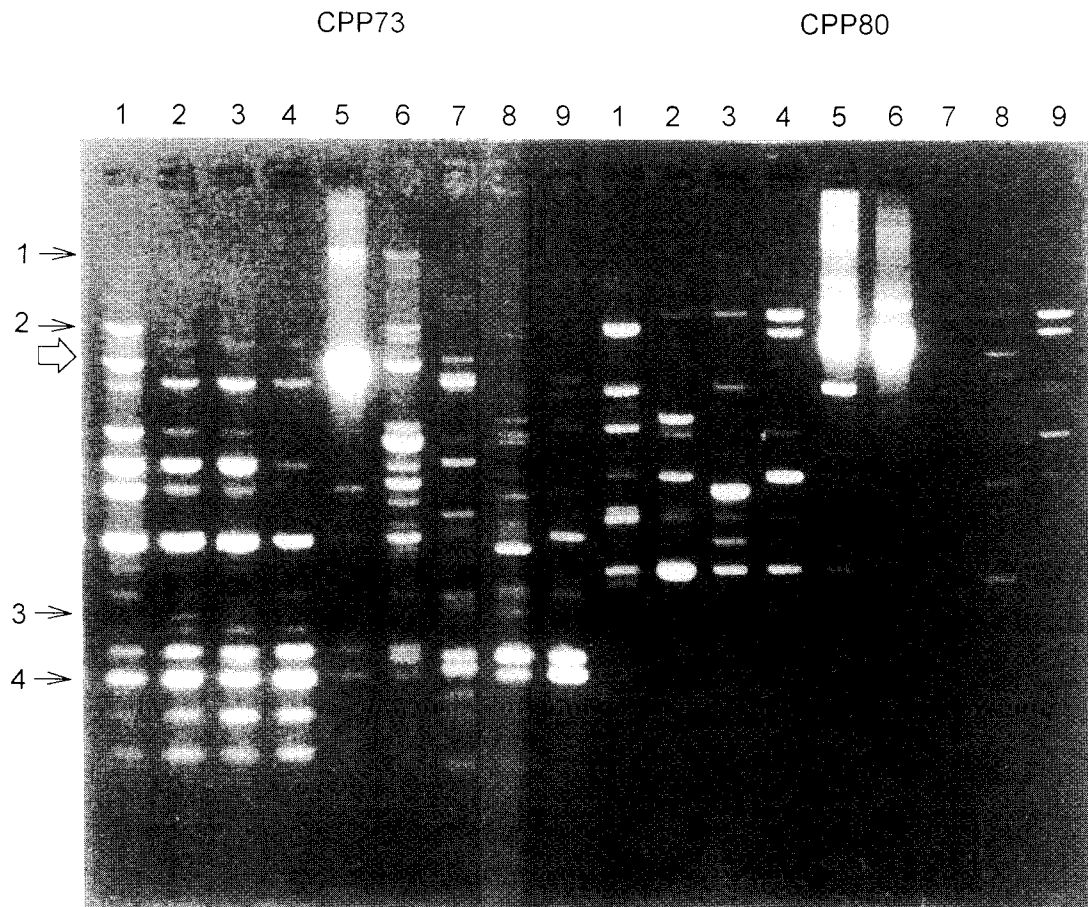


Fig. 2. Typical polymorphic DNA band patterns of 9 coliphages made by RAPD-PCR. Used random primers were CPP73 (5'-CAGGCGGCGT-3', left) and CPP80 (5'-GGGCCACGCT-3', right). Lane descriptions: 1 (Φ C1), 2 (Φ C2), 3 (Φ C3), 4 (Φ C4), 5 (Φ T2), 6 (Φ T4), 7 (Φ T5), 8 (Φ T7), 9 (Φ λ).

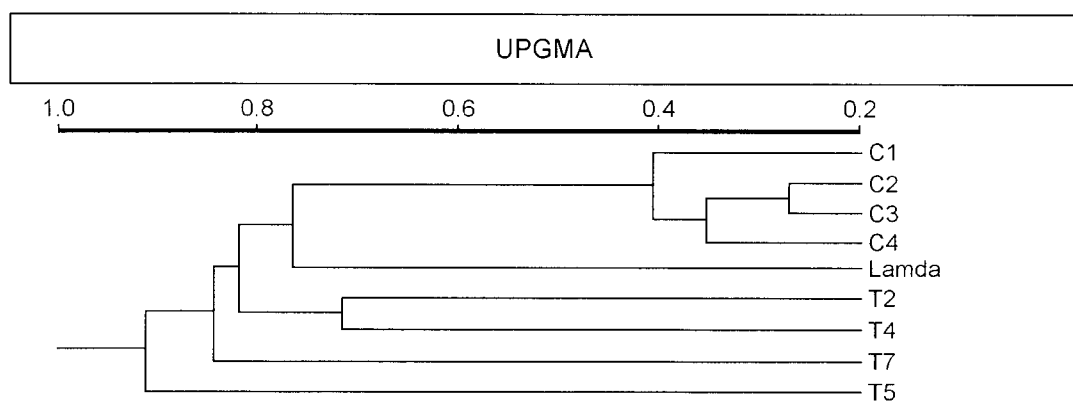


Fig. 3. A genetic phenogram of 9 coliphages. The phenogram was constructed from similarity values using an UPGMA program in the NTSYS-PC software package.

Table 2. Genetic similarity values among 9 individuals of coliphages

Phages	Φ C1	Φ C2	Φ C3	Φ C4	Φ T2	Φ T4	Φ T5	Φ T7	Φ λ
Φ C1	1.000								
Φ C2	0.651	1.000							
Φ C3	0.611	0.729	1.000						
Φ C4	0.514	0.634	0.658	1.000					
Φ T2	0.239	0.197	0.204	0.216	1.000				
Φ T4	0.215	0.175	0.170	0.213	0.284	1.000			
Φ T5	0.081	0.087	0.090	0.094	0.118	0.089	1.000		
Φ T7	0.199	0.238	0.182	0.175	0.104	0.090	0.081	1.000	
Φ λ	0.230	0.247	0.230	0.233	0.093	0.107	0.068	0.121	1.000

T_{even} 파아지로 분류되는 ΦT2와 ΦT4가 0.284로 가장 높았으며 T_{odd} 파아지로 분류되는 ΦT5와 ΦT7은 0.081로 그 수치가 가장 작았다. 이는 기존의 분류체계처럼 ΦT5와 ΦT7이 같은 그룹의 대장균파아지가 아니라 유전적 유연관계가 거의 없는 전혀 별개의 대장균파아지들임을 알려주는 것이다. 또한 다른 그룹으로 분류되는 Φλ는 미국형 대장균파아지인 T_{even} 파아지와 T_{odd} 파아지들과는 별개의 가치를 형성하면서 우리가 발견한 한국형 대장균파아지들과 더욱 가까웠다. 즉 Φλ를 기준으로 하여 이들의 유사도를 비교해 보면 Φλ와 한국형 대장균파아지는 0.230에서 0.247로 나타났으며, Φλ와 미국형 대장균파아지인 ΦT2, ΦT4 (T_{even} 파아지)와 ΦT5, ΦT7 (T_{odd} 파아지)들은 0.068에서 0.121로 그 수치가 크게 차이가 나고 있다. 한편 조사된 미국형 대장균파아지들 중 가장 유전적 유연관계가 먼 것은 ΦT5와 Φλ로 그 수치는 0.068이었다. 결국 RAPD 분석법에 의한 미국형 대장균파아지의 계통분류는 ΦT2와 ΦT4가 같은 그룹에 속하는 대장균파아지로 판명되었다. 이에 대한 또 다른 증거로 Fig. 2에서 보는 바 같이, RAPD-PCR 결과 ΦT2 & ΦT4에서 특히 두꺼운 밴드가 높은 위치 (Fig. 2, 굵은 화살표; Primer CPP80)에서 동시에 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 이들은 ΦT5, ΦT7 그리고 Φλ와는 별개인 것으로 판명되었다.

고찰

비록 대장균파아지의 분자적 계통분류를 위하

여 RAPD 분석법만을 했지만 파아지의 게놈 크기를 다른 개체들과 비교했을 때 이들의 게놈 크기가 매우 적기 때문에, 개체의 종·아종 간의 분자적 계통분류를 위해 자주 이용되는 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 분석이나 ribosomal RNA (rRNA) 염기서열 조사도 어렵다. 왜냐하면 대장균파아지는 그들의 게놈에서 발견될 수 있는 restriction site의 수도 적고 리보솜도 없기 때문이다. 따라서 RAPD 분석법만이 대장균파아지를 포함하는 여타 다른 바이러스의 유전적 유연관계 조사시 좋은 대안이 될 것이다.

한편 하나의 예로 Fig. 2에서 제시된 random primers (CPP73; CPP80)들은 한국형 대장균파아지의 polymorphic DNA 밴드 패턴과 미국형 대장균파아지의 polymorphic DNA 밴드 패턴을 놀라우리만큼 뚜렷이 구별시켜 주고 있었다. 이러한 RAPD-PCR 결과는 한국형 대장균파아지의 게놈의 유전적 조성이 미국형 대장균파아지의 그것과 매우 상이함을 알려준과 동시에 RAPD-PCR이 유사종의 개체간의 구분에 있어서 정확도가 매우 높다는 것을 말해주고 있다. 즉 이러한 결과는 동일한 대장균을 숙주로 하는 파아지들이 여러 가지 서로 다른 유전적 특성을 갖고 있다는 것으로 해석되며 파아지들의 게놈의 크기를 비교해 봤을 때 (Fig. 1)에도 그러하다고 사료된다. 특히 primer CPP80를 사용한 RAPD-PCR에서 ΦT2 (Fig. 2, lane 5) 및 ΦT4 (Fig. 2, lane 6)에서 유난히 굵은 polymorphic DNA 밴드가 나타났는데, 이 굵은 polymorphic DNA 밴드들이 생성되는 이유를 들어 보면 첫째, 사용한 primer의 염기서열이 ΦT2와

ΦT4의 계놈에 매우 적합하거나 둘째, 이 primer의 염기서열이 ΦT2와 ΦT4의 계놈에 아주 많이 편재하고 있을 확률이 높았기 때문일 것이다.

분리된 한국형 대장균파아지의 유전적 유연관계를 알기 위하여 RAPD-PCR한 결과를 컴퓨터로 분석해 보았다. 한국형 대장균파아지들은 그들간에 유전적 유사성이 상당히 높은 것으로 판명되었으며 (유전적 유사도 0.514~0.729), 이러한 결과는 이미 보고된 이들의 기본적인 물리·생화학적 특성과 잘 일치하고 있었다. 즉 CaCl₂의 농도의 차이에 따른 흡착율 조사에서 ΦC2와 ΦC3은 초기 흡착율이 90%~95%로 매우 높았던 반면 ΦC1과 ΦC4는 각각 75%와 85%로 현저하게 낮았다⁹⁾. 그리고 숙주역 조사에서 이들은 (ΦC2와 ΦC3) 오직 *E. coli* C1과 *E. coli* JM83에만 감염되면서 조그만 용균반점을 보이나 ΦC1과 ΦC4는 다양한 숙주역을 보이며 큰 용균반점을 보인 바 있다⁶⁾. 또한 본 연구에서 그들의 계놈이 조금씩이나마 그 크기를 달리하고 있음 (25 Kb~35 Kb)을 확인하였는데 이들의 정확한 계놈 크기는 추후 계속되는 연구로 확인될 수 있을 것이다.

분리된 대장균파아지의 계통분류를 위하여 미국의 대장균파아지와 비교분석한 결과, Fig. 3과 Table 2에 나타난 바와 같이 한국형 대장균파아지는 미국형 대장균파아지와 전혀 다른 계통분류를 보이고 있다. 이는 비교 조사된 두 그룹의 대장균파아지 (ΦC1, ΦC2, ΦC3 & ΦC4 vs. ΦT2, ΦT4, ΦT5, ΦT7 & Φλ)가 두 나라 (한국과 미국)간의 지리적 차이에 의한 2개의 클러스터를 형성하고 있는 것이 아니라 5개의 그룹으로 나뉘어 지고 있음을 보여주고 있다. 즉 한국형 대장균파아지들은 한 개의 계통수로 존재하면서 아주 가까운 거리에서 하나로 묶여 서로간의 밀접한 유전적 유연관계를 보이는 반면 미국형 대장균파아지는 서로의 유연관계가 매우 희박하면서 4개의 그룹을 형성하고 있다. 이는 우리가 발견한 대장균파아지들 (ΦC1, ΦC2, ΦC3 및 ΦC4)이 비교적 가까운 장소에서 존재했기 때문으로 사료되었다. 그리고 RAPD 분석법에 의해 확인된 미국형 대장균파아지의 계통분류는 다음과 같이 결론지을 수 있었다. 첫째, ΦT2와 ΦT4는 같은 그룹에 속하는 대장균파아지이며 동시에 이들은 ΦT5, ΦT7 및 Φλ와는 별개인 것이다. 둘째, ΦT5와 ΦT7은 비록 이들의 이름이 T_{odd} 파아지로서 같은 그룹의 대장균파아지인 것처럼 여겨지고 있으나, 이들

은 그 유전적 유연관계가 거의 없는 별개의 대장균파아지임을 알 수 있었다. 셋째, 오직 Φλ만이 한국형 대장균파아지 ΦC1, ΦC2, ΦC3 및 ΦC4와 밀접한 유전적 유연관계가 있음이 확인되었다.

참 고 문 헌

- 1) Atlas RM and Bartha R (1998): Microbial ecology. Benjamin/Cummings Science, Melano Park pp85-88.
- 2) Forsman P and Alatosava T (1991): Genetic variation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis bacteriophages isolated from cheese processing plants in Finland. *Appl Environ Microbiol*, **57**: 1805-1812.
- 3) Hong SH, Cho HM and Jeong G (1994): Isolation and partial characterization of a new *Escherichia coli* bacteriophage E3. *Kor J Microbiol*, **32**: 464-470.
- 4) Kikuchi A, Elseriers D and Penido EGC (1975): Isolation and characterization of Lamda transducing bacteriophages for *argF*, *argI* and adjacent genes. *J Bacteriol*, **122**: 727-742.
- 5) Kwon OS (1994): Isolation of coliphages from soil and identification by RAPD analysis. *J Inst Nat Sci*, **13**: 89-97.
- 6) Kwon OS and Lee JY (1996): Fast genetic variation among coliphage quasispecies revealed by a random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Jour Microbiol*, **34**: 166-171.
- 7) Kwon OS, Yoo M and Lee SP (1998): A parametric study of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis: A *Lactobacillus Model*. *Kor J Microbiol*, **34**: 51-57.
- 8) Mathews CK (1994): An overview of the T4 developmental program. In: J. D. Karam ed. Molecular biology of bacteriophage T4. ASM, Washington, D.C. pp.1-10.
- 9) Melo AS, de Almeida LP, Colombo AL and Briones MR (1998): Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Mycopathologia*, **142**: 57-66.
- 10) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA

- (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
- 11) Welsh J and McClelland M (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, **18**: 7213-7219.
- 12) Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA and Tingey SV (1993): Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol*, **218**: 704-740.
- 13) Yoon CS and Bae KS (1995): Genetic relationships among *Penicillium* species by characterizing RAPD markers. *Jour Microbiol*, **33**: 171-177.

=Abstract=

Molecular Phylogeny of Korean-type Coliphages and American-type Coliphages Determined by a RAPD Analysis

Oh-Sik Kwon[†]

**Department of Microbiology, Division of Applied Science,
Keimyung University, Daegu 704-701, Korea*

RAPD-PCR was applied to identify the phylogenetic relationship between isolated Korean-type coliphages (Φ C1, Φ C2, Φ C3 and Φ C4) and well-known American coliphages (Φ T2, Φ T4, Φ T5, Φ T7 and Φ λ). Subsequently, a computer analysis was carried out with the results of RAPD-PCR. As a result, 9 individuals were divided into five groups. The Korean-type coliphages formed a single cluster which showed very high genetic similarity but the American-type coliphages revealed very low genetic similarity among them. In particular, the Φ T2 and Φ T4 (T_{even} phages) made one sub-cluster among American coliphages, and they were very distant from Φ T5, Φ T7 and Φ λ . However, Φ λ made a cluster with the Korean-type coliphages that we isolated. The genome size of Korean-type coliphages was ranged from 25,000 bp to 35,000 bp. Among them, the genome of Φ C2 was the smallest and that of Φ C1 was the biggest, while others were in the middle of the size.

Key Words: Coliphage, Phylogeny, RAPD, T_{odd} phages, T_{even} phages, Φ λ

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(2): 131-139, June, 2000]

[†] Corresponding author