

종 식별 분자 마커 개발을 위한 섬모충류 *Euplotes*의 small subunit ribosomal RNA 변이성 분석

김선영[†] · 김세주^{1,†} · 민기식¹ · 양은진² · 유만호 · 최중기*

인하대학교 해양학과, ¹인하대학교 생명과학과,
²한국해양연구원 해양환경 연구본부

Analysis of Genetic Variation in the Small Subunit Ribosomal RNA Gene of *Euplotes* Ciliates for Developing Species Diagnostic Molecular Marker

SUN YOUNG KIM[†], SE-JOO KIM^{1,†}, GI-SIK MIN¹, EUN JIN YANG², MAN HO YOO AND JOONG KI CHOI*

Department of Oceanography, Inha University, Incheon 402-751, Korea

¹Department of Biological Sciences, Inha University, Incheon 402-751, Korea

²Marine Environment Research Department, KORDI, Ansan P.O. Box 29, Korea

Small subunit ribosomal RNA (18S rRNA)의 loop 부위들의 변이를 분석하여 해양 섬모충류의 종 특이 유전적 마커로써 이용 가능성을 확인하고자 9종의 *Euplotes* (Hypotrichia : Ciliophora)에 대하여 18S rRNA 유전자의 염기서열 변이성을 조사하였다. 연구 결과에 의하면 V1, V3 그리고 V5 부위는 중간 변이가 없었고, V7과 V8은 중간 변이는 높으나 염기서열의 길이가 각각 44 bp와 79 bp로 길이가 짧아서 충분한 유전 정보를 가지기 어렵기 때문에 이 부위들은 종특이 분자마커로 적합하지 않았다. 그러나 V2와 V4부위는 1.75~20.61%로 높은 변이성을 보여주었고 중간 계통 관계도 잘 나타내었다. 또한 염기서열의 길이도 각각 123 bp와 306 bp로 마커 개발에 충분한 길이를 가지고 있었다. 따라서 18S rRNA의 V2와 V4부위는 섬모충류의 종 특이 분자 마커 개발에 가장 적합한 부위라는 결론을 얻었다.

To verify which loop regions of 18S rRNA gene are suitable as species-specific genetic markers in ciliates, we analyzed the genetic variation of 18S rRNA gene among 9 *Euplotes* species (Hypotrichia : Ciliophora). In our result, no inter-specific variation was detected from V1, V3 and V5 regions, and the length of V7 and V8 are 44 bp and 79 bp, respectively, which are too short to make genetic marker. In contrast, V2 and V4 may be good candidate segments of species-specific diagnostic molecular markers because these two regions are most variable (1.75~20.61%) and showed good inter-specific phylogeny. Furthermore, the sequences of V2 and V4 are 123 bp and 306 bp, respectively in length which are enough to make species-specific marker.

Keywords: *Euplotes*, molecular marker, small subunit ribosomal RNA (18S rRNA), variable region, V2, V4

서 론

원생동물에 속하는 섬모충류는 수생부유생태계에서 종 다양성이 높고 생물량이 많을 뿐 아니라 상위단계로의 에너지 전달자로서 중요한 역할을 하고 있기 때문에 생태 및 분류학적으로 매우 중요한 분류군이라 할 수 있다(James and Hall, 1995; Montagnes and Lynn, 1991; Sherr and Sherr, 1988). 그러나 그 중요성에 비해서 섬모충류에 대한 분류학적 연구에 많은 논란이 있으며(Montagnes and Lynn, 1991), 이와 같이 전통 섬모충류 분류의 장애요인은 아래와 같다. (1) 단세포 생물로 개체의 크기가 매우 미소하다(주로 200 μ m 이하). (2) 많은 종에 있어서는 성장 단계, 영

양상태 등에 따른 심한 형태변이가 나타나 분류에 큰 혼란이 야기되고 있다. 한편 형태 변이를 관찰하기 위해서는 순배양(pure culture)이 필요하지만 섬모충류의 실험실 순배양은 배양조건이 까다로워서 많은 어려움이 따르고 있다(Gifford, 1985). (3) 분류에 이용되는 주요 식별형질(key character)을 관찰하기 위해서는 protargol staining 또는 silver staining 등 복잡한 염색 과정이 필요하지만 대부분의 섬모충류는 개체 크기가 작고 세포질이 약하여 염색 기술을 적용하는데 많은 시간이 요구되고 기술적 어려움도 많다.

최근에 들어서 분자생물학의 발달과 더불어 생물의 유전자 염기서열을 밝히는 일이 용이하게 되면서 다양한 생물종으로부터 얻어진 염기서열 데이터베이스가 매우 빠른 속도로 축적되어가고 있다. 한편 염기서열 비교를 통해 종 식별이 가능하다는 것이 확인

[†]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: jkchoi@inha.ac.kr

되면서 DNA 분류(DNA taxonomy)라는 새로운 분류방법이 출현하게 되었으며(Tautz *et al.*, 2003), 더 나아가 지구상의 모든 생물을 염기서열 비교만으로 손쉽게 분류 동정할 수 있는 기반을 마련하자는 DNA 바코드 개념까지 출현하여 활발한 연구가 진행되고 있다(Hebert *et al.*, 2003). 특히 섬모충류는 타 분류군에 비해 형태 위주의 정통 분류에 어려움이 큰 것으로 알려져 있으므로 전문 분류학자가 아니라도 분류가 가능한 DNA 분류와 같은 새로운 분류 방법의 적용이 시급히 요구된다고 할 수 있다.

유전자 염기서열 분석을 통한 섬모충류 연구는 1980년대 후반부터 시작되어 계통에 관한 새로운 사실들이 많이 밝혀지게 되었는데 주로 small subunit ribosomal RNA (18S rRNA)를 이용하여 상위 분류군의 계통연구가 많이 이루어져 왔다(Elwood *et al.*, 1985; Sogin *et al.*, 1986; Schlegel *et al.*, 1991; Orias *et al.*, 1991; Greenwood *et al.*, 1991; Jerome and Lynn, 1996; Kusch and Heckmann, 1996; Lynn *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 2000). 최근에는 18S rRNA의 2차 구조가 stem부위와 loop부위로 구성되었고, stem부위는 보존성이 높아서 상위 분류군의 계통분석에 유용하며, loop부위는 변이가 심하여 중간 관계와 같은 하위 분류군의 계통 연구에 유용하다고 알려져 상위분류군 계통 연구뿐만 아니라 하위 분류군의 계통 연구(Petroni *et al.*, 2002)와 종 식별 연구(Moonvan der Staay *et al.*, 2002)에 활발히 이용되고 있으며 현재 1,000여 개의 섬모충류 18S rRNA 전체(complete) 염기서열이 GenBank에 등록되어 있다.

미토콘드리아 CO1(cytochrome c oxidase subunit 1) 유전자의 전체 길이는 1,500 bp 내외이지만 동물계의 DNA 바코드에는 이중 한번의 염기서열결정 실험으로 얻을 수 있고 충분한 종 식별 해상력을 갖고 있는 600 bp 내외만을 이용하는데(Hebert *et al.*, 2004b), 이는 다양한 시료를 분석해야 하는 종 식별 연구에서 비용과 시간을 줄일 수 있는 매우 효과적인 전략이라 할 수 있다. 진핵 생물의 18S rRNA는 대부분 1,800 bp 내외의 염기 길이를 가지고 있어 전체 염기서열을 종 식별에 활용하기에는 길이가 다소 길다고 할 수 있다. 따라서 18S rRNA를 종 식별에 효율적으로 활용하기 위해서는 이 유전자의 구조적 특성에 대한 연구를 통해서 종 식별 해상력이 높으면서도 한번의 염기서열 결정 실험으로 확인할 수 있는 부위의 선정이 필요하다. 하지만 섬모충류의 염기서열 특성에 관한 기존 연구가 부족하기 때문에 표준화된 부위가 결정되어 있지 않아 연구자에 따라 임의로 부위를 선정해 사용하고 있다.

본 연구에서는 섬모충류 그룹 내에서 담수, 기수, 해양 등에 광범위하게 분포하며 형태 및 분자적 연구가 비교적 잘 이루어진 *Euplotes*(Hypotrichia: Ciliophora) 속을 대상으로 18S rRNA의 부위별 염기서열 변이성 연구를 통해 종 식별에 보다 적합한 18S rRNA의 염기서열 부위를 선별하고자 한다.

재료 및 방법

섬모충류 채집 및 동정

인천 연안수에서 채집한 *Euplotes* 2종을 수온 20°C, 염분 31 psu, 광주기 12:12h(명:암)의 조건하에서 순배양 하였으며 배양된 시료를 Quantitative Protargol Staining(QPS: Montagnes and Lynn,

1987) 방법을 이용하여 동정하였다.

DNA 추출, 중합효소연쇄반응(PCR) 및 염기서열 결정

배양된 생시료를 해부현미경 하에서 마이크로 피펫으로 50개체 이상을 추출하여 1.5 ml microcentrifuge tube에 넣어 해수를 제거한 후 DNeasy Tissue kit(Qiagen)으로 제조사의 프로토콜에 의거하여 게놈 DNA를 추출하였다. 18S rRNA 증폭을 위해 50 ng의 게놈 DNA, 5 unit의 *Taq* polymerase(Takara), 5 µl의 X10 buffer(Promega), 5 µl의 25 mM MgCl₂(Promega), 18S rRNA의 범용 프라이머를 사용하여(Medlin *et al.*, 1988; forward primer, EuKA: 5'-CTG GTT GAT CCT GCC AG-3'; reverse primer, EuKB: 5'-TGA TCC TTC YGC AGG TTC-3') forward primer 와 reverse primer를 각각 5 pmole 첨가 한 후, 반응 부피를 50 µl로 맞추었다. 중합효소연쇄반응은 핵산증폭기 모델 2400(PE Applied Biosystems)을 이용하여 94°C 2분 처리 후 95°C 15초, 55°C 30초, 72°C 3분 과정을 35회 반복하고 마지막으로 72°C 5분 처리하는 조건으로 수행하였다.

반응 후 PCR 산물을 AccuPrep®PCR Purification kit (Bioneer)를 이용하여 정제 한 후, 증폭된 산물을 pGEM-T Easy vector (Promega)에 제품에서 제시한 방법을 따라 접합(ligation)하였다. 이를 *E. coli*에 형질 전환시켜 ampicillin (50 µg/µl)이 포함된 LB 평판배지에서 청색-백색(blue-white) 클론 선별법으로 선별하였다. 선별된 클론들을 벡터 및 18S rRNA 유전자 범용 프라이머를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정은 ABI 3100 자동 염기서열 결정 장치(Applied Biosystems)를 이용하였다.

염기서열 분석

변이성 분석을 위해 본 연구에서 확인된 *Euplotes* 2종의 18S rRNA와 GenBank에서 추출한 7종 11개 염기서열을 사용하여 총 9종 13개 염기서열을 ClustalX (Thompson *et al.*, 1997)로 정렬하였다. *E. aediculatus* 염기서열 5개는 종내 변이성 분석에 이용되었으며, 이 중 Eaed1 (AF508756)을 중간 변이성 분석에 이용하여 총 9종 9개 염기서열이 중간 변이성 분석에 사용되었다(Table 1). 유전자 변이성 분석에 사용된 *Euplotes*의 변이부위 선정은 18S rRNA

Table 1. List of *Euplotes* species used in this study.

Species name	Symbol	Accession No.	GC content (%)
<i>Euplotes aediculatus</i>	Eaed1	AF508756	45.5
<i>E. aediculatus</i>	Eaed2	AJ305253	44.3
<i>E. aediculatus</i>	Eaed3	AF164136	44.4
<i>E. aediculatus</i>	Eaed4	X03949	44.4
<i>E. aediculatus</i>	Eaed5	M14590	44.4
<i>E. charon</i>	Echa	AJ305249	44.7
<i>E. eurytomus</i>	Eeur	AJ310491	43.9
<i>E. harpa</i>	Ehar	AJ305252	42.5
<i>E. minuta</i>	Emin	AJ305246	43.4
<i>E. octocarinatus</i>	Eoct	AJ310489	43.0
<i>E. raikovi</i>	iERK1	This study	45.8
<i>E. vammus</i>	iEVK1	This study	44.2
<i>E. woodruffi</i>	Ewoo	AF452710	44.7

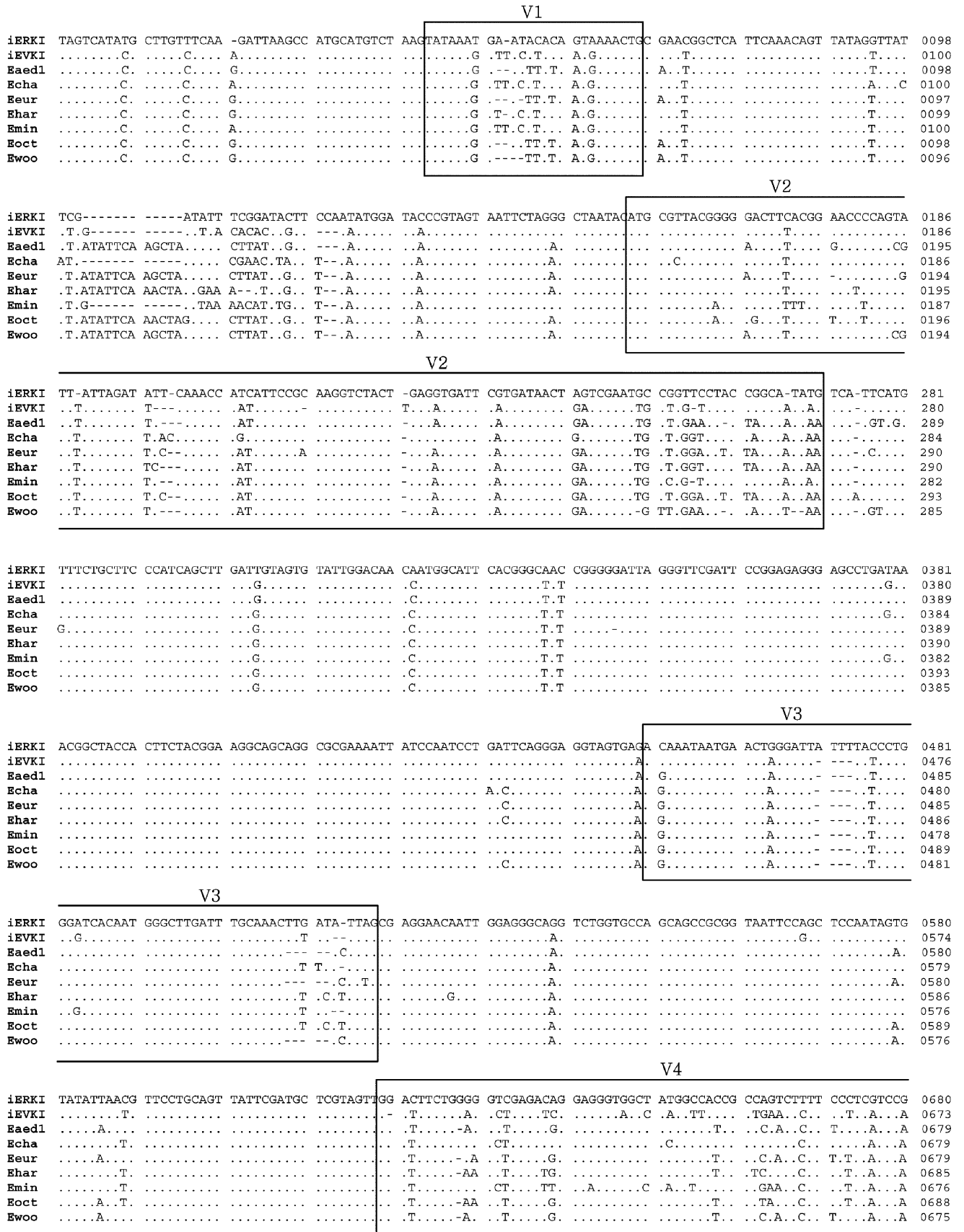


Fig. 1. The nucleotide sequences alignment among nine *Euplotes* species. Eight variable regions were indicated as boxes.

V4												
iERKI	CCTGTAAACG	GTGATCGAGA	TTGAGTTCTC	GACATCGGGC	TCAGGCACCT	TGA-----	-----	-----	-----	TTC	ATTTCTC---	0743
iEVKIT..TC..G..	..CGT.....	.G.T.....TA	-ACTTTACC	CTTTTTT---	-----	-----	-----	-C..AT	...A.TGT-	0752
Eaed1TG..	AA.TC..G..T.....	.G.T.....	G...T-.TC.	.ACCATTTC	ATATTTC---	-----	-----	-GTAGTC...	..CGA.TATG	0763
EchaTC.TC..G..C.T.....	.G.T.....T...	.ACCCTTTAT	CGCCCCG---	-----	-----	-----	-ACCG.	GGG.AA---	0758
EeurTG..	AATCC..G..T.....	.GTT.....	G...T.TC.	.ACTATTTC	ATATTTT---	-----	-----	-GTAATC...	..CGA.TATG	0765
EharG..	AATCC..G..C.C.....	.GTT.....T...	.ACCATTTTT	ATATACCTAT	ATTTATATCC	TGTAGTC..T	..CGA.TATG	0785	
EminT..TC..G..	..TGT.....	.G.T..A...T.T..	.ACCCTTCT	ATATATT---	-----	-----	-----	-CA..T	...A..TTC	0758
EoctG..	AATCC..G..T.....	.GTT.....T.TC.	.CCCATTTC	TATATTT---	-----	-----	-GCAATC...	..CGA.TATG	0774
EwooTG..	AATCC..G..T.....	.GTT.....	G...-.TC.	.ACCATTTC	TATTGC---	-----	-----	-GTAGTC...	..CGA.TATG	0759

V4												
iERKI	-----	---TTGAGC	AAATTATAGT	GTTTCAGGCA	GGCGTGCGCC	GGAATACATT	AGCATGGGAT	AATCTTAC-G	GTCGCTGTGT	GGGTCGCGCC	0828	
iEVKI	-----	---T.....TC.....T..A..GA.TT.	.A.....A.	TCT.A--TTG	0837		
Eaed1	T-----	TGT TTCT.....T..A.GA.TT.	.A.....C	CC..AACTGG	0857			
Echa	-----	-----A..GA..	-----	-CT.A--TAG	0828			
Eeur	TA----	TGT TTCT.....T..A.GA.TT.	.A.....C	CT..AACAGG	0860			
Ehar	TGTTAT-TTC	TTCT.....T..GA.TT.	.A.....A.	CCA.TATTTG	0884			
Emin	T-----	--TT.....TT..A..GA.TT.	.A.....A.	TCT.A--TAG	0845		
Eoct	CATTATTTTT	TTCT.....T..A.GA.TT.	.A.....A.	TCA.TATTTG	0874			
Ewoo	T-----	TGT TTCT.....G..T..A.GA.TT.	.A.....C	CC..AACTGG	0853		

V4												
iERKI	GCATC-TCCT	TATTTGTTGG	TTTCATAAGG	ACACGGAA-T	GATTAATAGG	GATAGTTGAG	AGTTTTATAT	CTCACCAGGG	GAGGCATTAG	TATTTAATTT	0926	
iEVKI	AAT..T....	---C.G..A..	.G.....TAT.	---T....	0925	
Eaed1	..T.....	-----	---G.....A..	.G.....	..C..C---	---AT.T-	---ACAA.	0943	
Echa	AAGCAT.T.C	.T.....	..A-.G.A	.TG.TTT.-	.G.....	-----	-A.....	-----	0911	
Eeur	..T.T....	-----	---G.....A..	.G.....	..C..A---	-A..AT.T-	---AG.....	..C.....	0947	
Ehar	.AT..C....	-----	---A.....A..	.G.....	-----	-A..A..C-	---A.....	0971	
Emin	AAT..T....	-----	---C.....A..	.G.....	-----	-----	---A.....	0929	
Eoct	AAT.T....	-----	---G.....A..	.G.....	..C..A---	-A..AT.T-	---AG.....	0961	
Ewoo	..T.....	-----	---G.....A..	.G.....	..C..A---	-A..AT.-	---AG.....	0938	

iERKI	CCAGAGGTGA	AATCTTTGA	AATTTTAAAG	ACTAACTTAT	GCGAAAGCAT	TTTTC--TGC	CAAGAATGTT	TTATCTTATC	GAACAGAACG	AAAGTTAGGG	1024
iEVKIC.....A..A..A..AT..T.....CAT.A..	---TT.....	1023
Eaed1A..A..	CG--T-T..TG.....CAT.A..	---TT.....	1038
EchaA..A..A.T-T.....CAT.A..	---TT.....	1007
EeurA..A..	---A-T..TG.....CAT.A..	---TT.....	1042
EharA..A..A.T-T..T.....CAT.A..	---TT.....	1068
EminA..A..A.T-T..T.....CAT.A..	---TT.....	1026
EoctA..A..A-T-T..TG.....CAT.A..	---TT.....	1057
EwooA..A..A..C--T-T..TG.....CAT.A..	---TT.....	1033

V5												
iERKI	GATCAAAGAC	GATCAGATAC	CGTCCTAGTC	TTAACCATAA	ACTTTGCCGA	CTAGGGATCG	GAGGGCGTGC	ACATTCGCC	TTCGGCACCT	TACGAGAAAT	1124	
iEVKIG.....	1123	
Eaed1G.....A.....	1138	
EchaG.....	1107	
EeurG.....	1142	
EharG.....	1168	
EminG.....	1126	
EoctG.....	1157	
EwooG.....	1133	

iERKI	CATAAGTATT	TTGGTTCTG	GGGGTAGTAT	GGTCGCAAGG	CTGAAACTTA	AAGGAATTGA	CGGAAGGGCA	CCACCAGGAG	TGGAGCTTGC	GGCTCAATTT	1224
iEVKIC.....G.....	1222
Eaed1C.....	T.....	1237
Echa	..-T.AGT..	1206
EeurC.....	T.....	1241
EharC.....	T.....A	1267
EminC.....	1225
EoctC.....	T.....	1256
EwooC.....	T.....	1232

iERKI	GACTCAACAC	GGGAAATCTT	ACCAGGTCCA	GACATAGGAA	GGAAATTGAC	AGATTGATAG	CTCTTCTTG	ATTCTATGGG	TTGAT----	-----TCGGT	1314
iEVKICG..	-----ATT.TATAT	ATATT.T...	1320
Eaed1CG..	-----ATT.-----	-----T...	1324
EchaCG..	-----ATT.-----	TTATT.T...	1299
EeurCG..	-----ATT.-----	-----T...	1328
EharCG..	-----ATT.-----	-----T...	1355
EminCG..	-----ATT.-ATTT	TAATT.T...	1322
EoctCG..	-----ATT.-----	-----T...	1343
EwooG..CG..	-----ATT.-----	-----T...	1319

Fig. 1. (Continued)

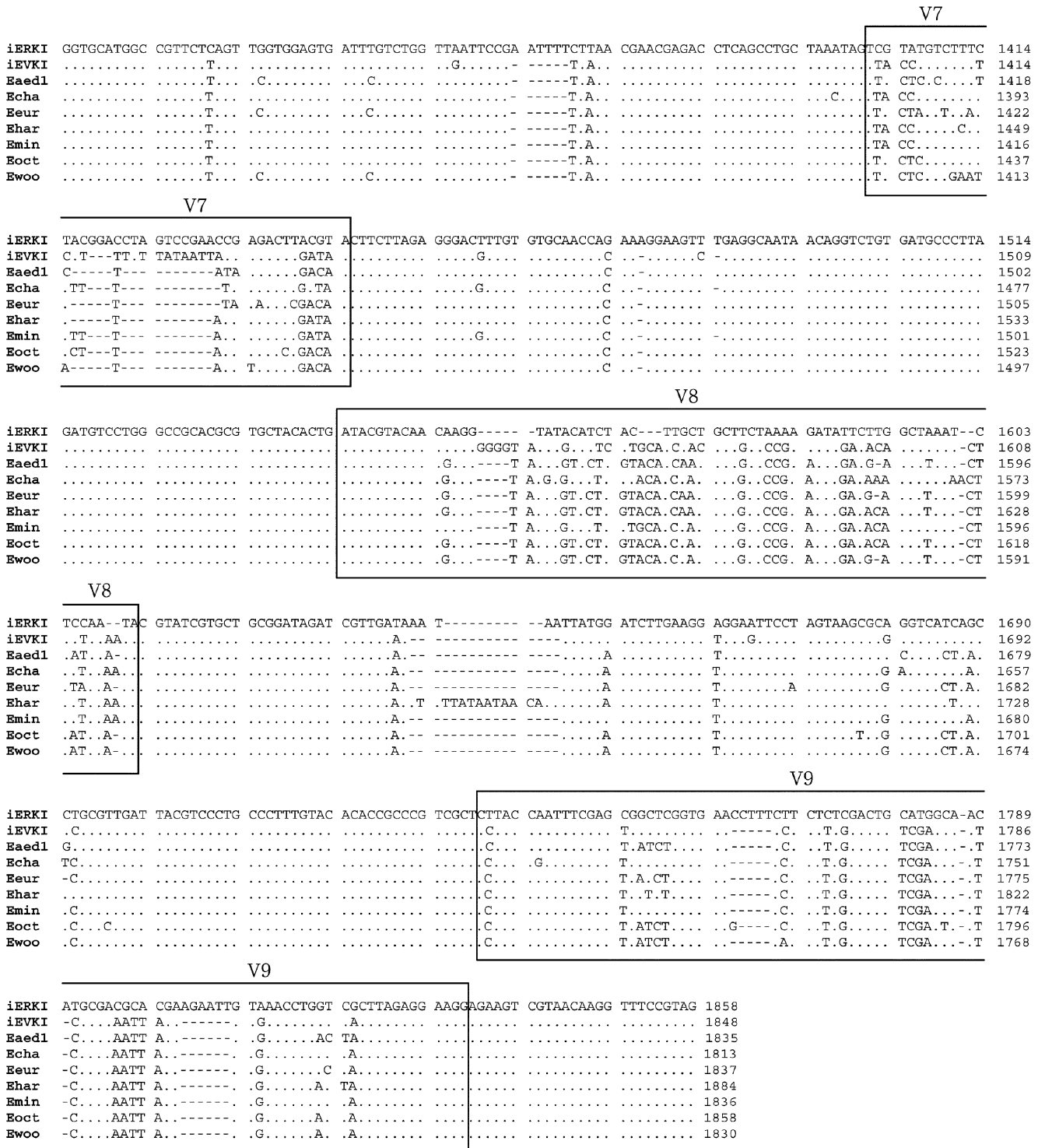


Fig. 1. (Continued)

의 2차 구조가 밝혀져 있는 *Tetrahymena canadensis*에 의거하여 진핵 생물에는 나타나지 않는 V6 부위를 제외한 8개 변이부위 (variable region; V1, V2, V3, V4, V5, V7, V8, V9)를 선정하였다(Fig. 1). 변이성 분석은 Mega 3.1 (Kumar et al., 2004)을 이용

하여 p-distance 값을 사용하여 종내(intra-specific) 및 종간(inter-specific) 변이성을 구하였다. 계통수는 Mega 3.1의 neighbor-joining (NJ) 방법으로 구하였는데 Kimura 2-parameter를 거리계수 선택 (distance option)으로 사용하였다.

결 과

인천연안에서 채집된 *Euplotes*는 형태 분류를 통해서 *E. vannus*와 *E. raikovi*로 동정되었다. 두 종에 대한 18S rRNA의 전체(complete) 염기서열 길이는 *E. raikovi*는 1,858 bp, *E. vannus*는 1,848 bp이며 염기서열 내 GC 비율은 각각 45.8%와 44.2%였다(Table 1).

인천에서 채집된 *Euplotes* 두 종과 GenBank에서 추출한 7종의 종간분석에 사용된 염기서열의 정렬길이는 1,966 bp이었고(Fig. 1) 9종의 18S rRNA 전체 염기서열의 종간 pairwise *p*-distance 값은 최소 1.84%, 최대 11.50%, 평균 5.99%이었다.

9종의 염기서열의 부위별 변이성을 분석하기 위하여 18S rRNA 전체를 변이부위와 보존부위(conserved region: 변이부위를 제외한 부위)로 나누어서 *p*-distance로 분석하였다. 그 결과 변이부위를 모두 제외한 보존부위의 종간 변이성은 0.81-5.87%(평균 2.95%)로 변이부위가 포함된 전체 염기서열의 종간 변이성(평균 5.99%)보다 2배 낮게 나타났다(Table 2). V1에서 V9까지 변이부위에 따른 평균 종간 *p*-distance 결과는 0.62-28.81%로 나타났고 8개 변이부위에 대한 각각의 분석결과 9종의 정렬된 염기서열의 길이는 V1의 길이가 26 bp로 가장 짧았고, V4가 306 bp로 가장 길었다(Table 2).

변이부위 V1, V3, V5, V7, V8, V9의 길이는 100 bp 이하로, 단일 부위로 종 식별에 활용하기에는 부족한 길이를 보였다. 또한 V1, V3, V5, V9의 변이 부위에서 종간변이의 최소값이 0.00%

값을 나타냈다. 따라서 100 bp 이상의 길이를 갖는 V2 및 V4부위에 대한 종간 *p*-distance 값을 구하면, V2 부위의 종간 최소 변이성은 1.83% (*Euplotes aediculatus*와 *E. eurystomus* 및 *E. woodruffi* 사이)이고 최대 변이성은 17.43% (*E. raikovi*와 *E. aediculatus*, *E. octocaratus* 및 *E. woodruffi* 사이)를 보였고, V4부위는 *E. eurystomus*와 *E. woodruffi* 간에 1.75%로 최소 변이성을 보였고, *E. chron*과 *E. eurystomus* 및 *E. woodruffi* 사이, 그리고 *E. raikovi*와 *E. vannus* 사이에서 동일하게 20.61%의 최대 변이성을 보였다(Table 3). *Euplotes* 종간 계통 유연관계를 보고자 9종에 대한 NJ tree를 구성하였다. 전체 18S rRNA를 이용한 경우(Fig. 2A)와 V2(Fig. 2B) 및 V4(Fig. 2C) 부위만을 사용하여 만든 계통수 간에는 차이가 나타나지 않았으며, 동일한 계통 수지상(topology)을 보여 주었다. 염기서열의 보존부위와 변이부위에서의 종내 변이성을 분석한 결과 *Euplotes aediculatus* 5개 염기서열간에는 변이성이 나타나지 않았다(0.00%).

Euplotes 종간 계통 유연관계를 보고자 9종에 대한 NJ tree를 구성하였다. 전체 18S rRNA를 이용한 경우(Fig. 2A)와 V2(Fig. 2B) 및 V4(Fig. 2C) 부위만을 사용하여 만든 계통수 간에는 차이가 나타나지 않았으며, 동일한 계통 수지상(topology)을 보여 주었다.

염기서열의 보존부위와 변이부위에서의 종내 변이성을 분석한 결과 *Euplotes aediculatus* 5개 염기서열간에는 변이성이 나타나지 않았다(0.00%).

Table 2. Inter-specific variation among 18S rRNA gene sequences of nine *Euplotes* species.

Region	Variation (%)				Lengths of sequence (bp)
	Min	Max	Mean	STD	
Complete 18S rRNA	1.84	11.50	5.99	2.95	1966
Conserved regions only (variable regions removed)	0.81	5.87	2.95	1.47	1188
From 5'-end to before V4 starting position	0.68	8.83	4.42	2.36	637
V1	0.00	27.27	9.09	8.69	26
V2	1.83	17.43	8.82	4.50	123
V3	0.00	6.90	2.49	2.16	69
V4	1.75	20.61	13.49	5.86	306
V5	0.00	2.78	0.62	1.17	36
V7	3.70	55.56	28.81	12.80	44
V8	1.54	35.38	14.23	10.58	79
V9	0.00	29.07	9.53	8.68	98

Min, minimum distance value; Max, maximum distance value; STD, standard deviation.

Table 3. Uncorrected *p*-distance matrix of V2 and V4 regions among nine *Euplotes* species. Symbols are listed in Table 1. Upper right is for V2 region and lower left for V4.

	iERKI	iEVKI	Eaed1	Echa	Eeur	Ehar	Emin	Eoct	Ewoo
iERKI	-	0.1193	0.1743	0.1193	0.1651	0.1560	0.1560	0.1743	0.1743
iEVKI	0.2061	-	0.0734	0.0642	0.0550	0.0367	0.0459	0.0642	0.0734
Eaed1	0.1711	0.1667	-	0.1009	0.0183	0.0550	0.1193	0.0642	0.0183
Echa	0.1886	0.1798	0.1930	-	0.0826	0.0642	0.1101	0.0917	0.1009
Eeur	0.1798	0.1623	0.0307	0.2061	-	0.0367	0.1009	0.0459	0.0367
Ehar	0.1711	0.1360	0.0921	0.1754	0.0702	-	0.0826	0.0459	0.0734
Emin	0.1798	0.0526	0.1447	0.1667	0.1491	0.1316	-	0.0734	0.1193
Eoct	0.1711	0.1447	0.0702	0.1886	0.0482	0.0570	0.1316	-	0.0826
Ewoo	0.1798	0.1754	0.0219	0.2061	0.0175	0.0789	0.1535	0.0570	-

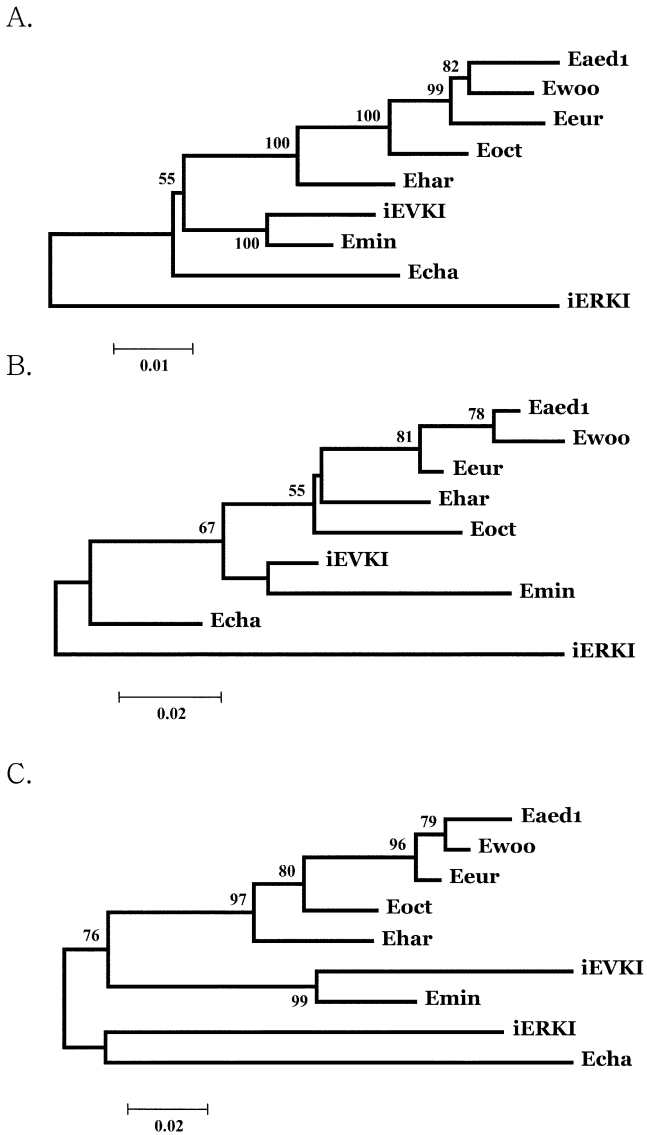


Fig. 2. Unrooted neighbor-joining trees for nine *Euplotes* species based on the sequences of (A) complete 18S rRNA gene, (B) V2 and (C) V4 regions. The significance of each branch is indicated by bootstrap values with 1,000 replications. Symbols are shown in Table 1.

고찰

유전적 특성에 의해 다양한 종을 혼선 없이 명확히 식별하기 위해서는 종 동정에 활용되는 유전자의 종내 변이성이 종간 변이성에 비해 훨씬 낮은 특성을 가져야 한다(Hebert *et al.*, 2003). 후생동물(Metazoa)의 미토콘드리아 CO1 유전자는 이러한 특성을 잘 보여주고 있어서 종 식별에 유용하게 이용되고 있다(Hebert *et al.*, 2003, 2004a, 2004b; Witt, 2006). 하지만 고등식물의 경우에는 미토콘드리아의 길이가 150kb 이상으로 매우 길고 CO1을 비롯한 대부분의 단백질 합성(coding) 유전자의 종간 변이성이 거의 없어 종 식별에 이용할 수 없는 것으로 보고되었다(Chase *et al.*, 2005). 후생동물 중에서도 해면동물과 자포동물과 같은 이배엽성 동물

(diploblastic animal)이나 일부 삼배엽성 동물(triploblastic animal: 예, 곤충류인 모기류)의 CO1 유전자는 종간 변이성이 매우 낮아 CO1 유전자가 DNA 바코드에 적합하지 않다(Hebert *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003). 이처럼 종 식별에 가장 유용하다고 알려져 있는 CO1 유전자조차도 분류군에 따라서는 종 식별에 적합하지 않을 수 있다.

후생동물의 미토콘드리아는 원형이고 길이는 16 kb 내외로 거의 모든 분류군에서 비슷한 특성을 보여주고 있는데 반하여 *Tetrahymena*와 같은 섬모충류의 미토콘드리아는 선형이며 길어도 50 kb 이상으로 매우 긴 것으로 알려져 있다. 현재까지 보고된 여러 연구 결과를 바탕으로 섬모충류의 CO1 유전자는 후생동물의 CO1 유전자와는 매우 다른 특성을 가지고 있을 가능성이 높다(Suyama and Miura, 1968). 따라서 섬모충류가 매우 분화된 분류군이라는 점을 감안하면 CO1 유전자가 모든 섬모충류 분류군에 적용되기에는 쉽지 않을 것으로 예상된다. 반면에 진핵 생물의 18S rRNA는 염기서열의 보존성이 높아 모든 진핵 생물이 유사한 특성을 보여주고 있고, 범용 프라이머(universal primer)도 쉽게 제작할 수 있으며, 또한 이미 많은 분류군에서 연구 성과가 축적되어 있어서 18S rRNA가 종 식별에 적합하다는 것이 확인될 수 있다면 연구가 미진한 다른 어떤 유전자를 이용하는 것보다 훨씬 효과적으로 광범위한 분류군의 종 식별에 활용될 수 있을 것이다.

18S rRNA는 단백질 합성에 관여하는 리보솜의 구성성분으로 생체 내에서 기능을 발휘하기 위해서는 자기 접합(self pairing)에 의한 2차 구조를 형성한다(Neefs *et al.*, 1993). 2차 구조는 stem과 loop를 갖는데 일반적으로 stem부위는 염기서열의 보존성이 높고 loop부위는 보존성이 낮다(Swann and Taylor, 1993; Wilmotte *et al.*, 1993; Crease and Taylor, 1998; Choe *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2002).

9종의 *Euplotes* 18S rRNA 전체 염기서열을 사용한 분석에서 근연 종간의 종간 변이성이 평균 5.99%로 나타났다. 최근 DNA 분류에 많이 활용되고 있는 부위(Floyd *et al.*, 2002; Blaxter, 2004; Blaxter *et al.*, 2005)는 18S rRNA의 5'-end에서 V4부위 직전 부위로 약 600-700 bp를 포함하는 부위인데 이 부위의 평균 종간 변이성은 4.42%로 오히려 전체 18S rRNA의 변이성보다도 낮았다. 반면 변이부위 길이가 100 bp 이상으로 충분한 정보를 가지고 있을 것으로 예상되는 V2와 V4부위의 평균 종간 변이성은 각각 8.82% 및 13.49%로 전체 염기서열에 비해 V2는 1.47배, V4는 2.25배로 전체 18S rRNA 염기서열을 이용할 때 보다 변이성이 2배 이상 높게 나왔다(Table 2). 한편 전체 18S rRNA 염기서열을 사용해 만든 NJ tree(Fig. 2A)와 V2 및 V4부위만을 각각 따로 사용한 NJ tree(Fig. 2B와 Fig. 2C)가 동일한 계통 수지상(topology)을 보여주었다. 이러한 결과는 전체 18S rRNA 염기서열과 마찬가지로 개별 변이부위(V2 및 V4)도 계통적(phylogenetic) 시그널을 포함하고 있음을 보여주는 것으로 V2 및 V4부위가 개별적으로도 종 식별에 활용될 수 있음을 시사 하였다. 한편 변이부위가 대상 생물의 계통 관계를 잘 보여 주고 있음은 초파리를 비롯하여 다양한 진핵 생물을 대상으로 한 하위단계 계통 관계 연구에서도 확인된 바 있어 본 연구 결과를 지지한다고 할 수 있다(Crease and Taylor, 1998; Wuyts *et al.*, 2000; Petroni *et al.*, 2002).

본 연구 결과에 의하면 *Euplotes*의 정렬간격(gap)을 포함한 V2

와 V4부위의 정렬된 염기서열 길이는 188 bp와 315 bp로써 한번의 염기서열결정(sequencing)으로 얻을 수 있는 적당한 길이를 가지고 있다. 또한 V2와 V4부위 앞, 뒤에 존재하는 stem부위는 염기서열의 보존성이 매우 높아 진핵 생물 전체를 통해 사용될 수 있는 범용 프라이머를 만들 수 있는 부위가 존재하고 있어 실험의 용이성도 높은 유전자 부위라 말할 수 있다.

18S rRNA는 진핵 생물 전체에서 적용될 수 있는 다수의 범용 프라이머 제작 부위를 가지고 있다는 점은 V2 및 V4와 같은 변이부위가 섬모충류는 물론 다양한 다른 분류군의 종 식별에도 확대 적용될 가능성이 있음을 시사 하고 있다. 그러나 많은 연구에서 유전자의 변이성이 분류군에 따라 큰 차이가 있다고 보고된 바 있으며 18S rRNA에 대한 연구 또한 상위 분류군 연구에 치우쳐 진행되어 온 관계로 근연 분류군간의 계통 관계에 대한 연구는 의외로 부족하다. 따라서 다양한 분류군의 종 식별에 유전자의 변이성을 이용하는 것이 적합하다는 판단을 하기에 충분한 연구 결과가 축적되어 있지 않으며 이와 같은 이유로 18S rRNA의 변이부위를 다양한 진핵 생물의 종 식별에 활용하기 위해서는 변이부위의 유전자 내(intragenomic), 종내 및 종간 변이성에 대한 면밀한 조사가 먼저 선행될 필요성이 있다.

사 사

본 연구는 인하대학교 교내연구비 (J.K. Choi-2006)의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

- Blaxter, M.L., 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **359**: 669–679.
- Blaxter, M., J. Mann, T. Chapman, F. Thomas, C. Whitton, R. Floyd and E. Abebe, 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **360**: 1935–1943.
- Chase, M.W., N. Salamin, M. Wilkinson, J.M. Dunwell, R.P. Kesanakurthi, N. Haidar and V. Savolainen, 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **360**: 1889–1895.
- Choe, C.P., J.M. Hancock, U.W. Hwang and W. Kim, 1999. Analysis of the primary sequences and secondary structure of the unusually long SSU rDNA of the soil bugs. *Armadillidium vulgare*. *J. Mol. Evol.*, **49**: 798–805.
- Crease, T.J. and D. J. Taylor, 1998. The origin and evolution of variable-region helices in V4 and V7 of the small-subunit ribosomal RNA of branchiopod Crustaceans. *Mol. Biol. Evol.*, **15**: 1430–1446.
- Elwood, H.J., G.J. Olsen and M.L. Sogin, 1985. The small subunit ribosomal RNA sequences from the hypotrichous ciliates *Oxytricha nova* and *Stylonychia pustulata*. *Mol. Biol. Evol.*, **2**: 399–410.
- Floyd, R., E. Abebe, A. Papert and M. Blaxter, 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol. Ecol.*, **11**: 839–850.
- Gifford, D.J., 1985. Laboratory culture of marine planktonic oligotrichs (Ciliophora, Oligotrichida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **23**: 257–267.
- Greenwood, S.J., M. Schlegel, M.L. Sogin and D.H. Lynn, 1991. Phylogenetic relationships of *Blepharisma americanum* and *Colpoda inflata* within the phylum Ciliophora inferred from complete small subunit rRNA sequences. *J. Protozool.*, **38**: 1–6.
- Hebert, P.D.N., S. Ratnasingham and J.R. De Waard, 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B. Suppl.*, **270**: 96–99.
- Hebert, P.D.N., E.H. Penton, J.M. Burns, D.H. Janzen and W. Hallwachs, 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 14812–14817.
- Hebert, P.D.N., M.Y. Stoeckle, T.S. Zemplak and C.M. Francis, 2004b. Identification of birds through DNA Barcodes. *PLOS Biology*, **2**: e312.
- Hong, S.G., W. Jeong and H.S. Jung, 2002. Amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of polypores and its potential for phylogenetic analysis. *Mycologia*, **94**: 823–833.
- James, M.R. and J.A. Hall, 1995. Planktonic ciliated protozoa: their distribution and relationship to environmental variables in a marine coastal ecosystem. *J. Plank. Res.*, **17**: 659–683.
- Jerome, C.A. and D.H. Lynn, 1996. Identifying and distinguishing sibling species in the *Tetrahymena pyriformis* complex (Ciliophora, Oligohymenophorea) using PCR/RFLP analysis of nuclear ribosomal DNA. *J. Euk. Microbiol.*, **43**: 492–497.
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.*, **5**: 150–163.
- Kusch J. and K. Heckmann, 1996. Population structure of *Euplotes* ciliates revealed by RAPD fingerprinting. *Ecoscience*, **3**: 378–384.
- Lynn, D.H., A-D.G. Wright, M. Schlegel and W. Foissner, 1999. Phylogenetic relationships of orders within the class Colpodea (Phylum Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. *J. Mol. Evol.*, **48**: 605–614.
- Montagnes, D.J.S. and D.H. Lynn, 1987. A quantitative protargol stain (QPS) for Ciliates: method description and test of its quantitative nature. *Mar. Microb. Food Webs*, **2**: 83–93.
- Montagnes, D.J.S. and D.H. Lynn, 1991. Taxonomy of choreotrichs, the major marine planktonic ciliates, with emphasis on the aloricate forms. *Mar. Microb. Food Webs*, **5**: 59–74.
- Moon-van der Staay, S.Y., G.W.M. van der Staay and P. Javorsky, 2002. Diversity of rumen ciliates revealed by 18S ribosomal DNA analysis. *Reprod. Nutr. Dev.*, **42**: 76.
- Neefs, J.-M., Y. Van de Peer, P. De Rijk, S. Chapelle and R. De Wachter, 1993. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Res.*, **21**: 3025–3049.
- Orias, E., N. Hashimoto, M-F. Chau and T. Higashinakagawa, 1991. PCR amplification of *Tetrahymena* rDNA segments starting with individual cells. *J. Protozool.*, **38**: 306–311.
- Park, S.J., W. Choochote, A. Jitpakdi, A. Junkum, S.J. Kim, N. Jariyapan, J.W. Park and G.S. Min, 2003. Evidence supports conspecific relationship between morphologically and cytologically different two forms of Korean *Anopheles pullus* mosquitoes. *Mol. Cells*, **16**: 354–360.
- Petroni, G., F. Dini, F. Verni and G. Rosati, 2002. A molecular approach to the tangled intragenetic relationships underlying phy-

- logeny in *Euplotes* (Ciliophora, Spirotrichea). *Mol. Phylogenet. Evol.*, **22**: 118–130.
- Schlegel, M., H.J. Elwood and M.L. Sogin, 1991. Molecular evolution in hypotrichous ciliates: sequence of the small subunit ribosomal RNA genes from *Onychodromus quadricornutus* and *Oxytricha granulifera* (Oxytrichidae, Hypotrichida, Ciliophora). *J. Mol. Evol.*, **32**: 64–69.
- Sherr, E.C. and F.B. Sherr, 1988. Role of microbes in pelagic food webs : A revised concept. *Limnol. oceanogr.*, **33**: 1225–1227.
- Shin, M.K., U.W. Hwang, W. Kim, A.-D.G. Wright, C. Krawczyk and D.H. Lynn, 2000. Phylogenetic position of the ciliates *Phacodinium* (order Phacodiniida) and *Protocruzia* (subclass Protocruziida) and systematics of the spirotrich ciliates examined by small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Europ. J. Protistol.*, **36**: 293–302.
- Sogin, M.L., A. Ingold, M. Karlok, H. Nielsen and J. Engberg, 1986. Phylogenetic evidence for the acquisition of ribosomal RNA introns subsequent to the divergence of some of the major *Tetrahymena* groups. *EMBO J.*, **5**: 3625–3630.
- Suyama, Y. and K. Miura, 1968. Size and structural variations of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **60**: 235–242.
- Swann, E.C. and J.W. Taylor, 1993. Higher taxa of basidiomycetes: an 18S rDNA gene perspective. *Mycologia*, **85**: 923–936.
- Tautz, D., P. Arctander, A. Minelli, R.H. Thomas and A.P. Vogler, 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.*, **18**: 70–74.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins, 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **24**: 4876–4882.
- Wilmotte, A., Y. van de Peer, A. Goris, S. Chapelle, R. de Baere, B. Nelissen, J.M. Neefs, G.L. Hennebert and R. de Wachter, 1993. Evolutionary relationships among higher fungi inferred from small ribosomal subunit RNA sequence analysis. *Syst. Appl. Microbiol.*, **16**: 436–444.
- Witt, J.D., D.L. Threlloff and P.D.N. Hebert, 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Mol. Ecol.*, **15**: 3073–3082.
- Wuyts, J., P. De Rijk, Y. Van de Peer, G. Pison, P. Rousseeuw and R. De Wachter, 2000. Comparative analysis of more than 3000 sequences reveals the existence of two pseudoknots in area V4 of eukaryotic small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.*, **28**: 4698–4708.

2007년 3월 12일 원고접수

2007년 8월 21일 수정본 채택

담당편집위원: 한정호