

PCR-DGGE를 이용한 해양미생물의 다양성 조사

김영진 · 조효진 · 유선녕 · 김광연 · 김형락¹ · 안순철*

부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학 교실

¹부경대학교 수산과학대학 식품생명과학부

Diversity of Marine Microbes by PCR-DGGE

Yeong Jin KIM, Hyo Jin CHO, Sun Nyoung YU, Kwang Youn KIM,
Hyeung Rak KIM¹ and Soon Cheol AHN*

Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University,
Busan 602-739, Korea

¹Division of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Recently, the development of various culture-independent identification techniques for environmental microbes has greatly enhanced our knowledge of microbial diversity. In particular, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA fragments, generated using the polymerase chain reaction (PCR) is frequently used to examine the diversity of environmental bacterial populations. This method consists of direct extraction of the environmental DNA, amplification of the 200-600 bp 16S rDNA fragments with universal primers, and separation of the fragments according to their melting point on a denaturing gradient gel. In this study, we investigated the seaside microbial community in coastal areas of Busan, Korea, using culture-independent techniques. First, marine genomic DNA was extracted from seawater samples collected at Songjeong, Gwangahn, and Songdo Beaches. Then, PCR was used to amplify the bacterial 16S rDNA using universal primers, and DGGE was used to separate the amplified 500 bp 16S rDNA fragments. Finally, the tested 16S rDNA genes were further analyzed by sequencing. Based on these experiments, we found that DGGE analysis clearly showed variation among the regional groups. It can be used to monitor rapid changes in the bacterial diversity of various environments. In addition, the sequence analysis indicated the existence of many unculturable bacteria, in addition to *Arcobacter*, *Pseudoaltermonas*, and *Vibrio* species.

Key words: Culture-independent, 16S rDNA, PCR, DGGE

서 론

바다는 지구 표면적의 70%를 덮고 있어 육지보다 넓은 면적을 생물에게 제공하고 있으며, 이러한 해양생태계에서 미생물은 유기물의 분해 및 재합성을 수행하여 물질순환에 관여할 뿐만 아니라 용존된 영양물질을 생체 내에 흡수하여 고등생물들에게 에너지를 공급하는 중요한 역할을 담당한다(Reinheimer, 1985). 해수에 존재하는 대표적 세균은 *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Spirillum*, *Alcaligenes*, *Hypermicrobium*, *Cytophaga* 등이 있는데, 이러한 미생물의 종류, 군집의 크기 및 분포 등은 다양한 물리, 화학적 환경에 영향을 받기 때문에 해양 미생물총에 대한 연구의 중요성이 강조되고 있다(Novitsky, 1983; Wimpenny et al., 1983). 그러나 해양의 다양한 환경과 함께, 최근까지 토양, 해수, 갯벌, 하천, 대기 그리고 가축의 대장 등 다양한 환경으로부터 배양을 통해 존재가 확인된 미생물의 수는 아직까지 그 기술적 한계로 인해 생태계에 존재할 것으로 예상되는 전체 미생물의 0.1-1%에 불과하므로 자연계 속에 존재하는 이들 미발견 미생물들은 대부분 실험실에서 분리, 배양하기가 어

려운 난 배양성 미생물이지만 최근 분자생물학적인 기술들의 개발로 그 존재가 일부 확인되고 있다(Rodriguez-Valera, 2002; Rondon et al., 2000). 그 중 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE), Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD), 그리고 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 등은 미생물 군집 및 종 분석에 많이 활용되고 있는데, 특히 DGGE는 적은 양의 DNA를 PCR로 증폭하고 증폭된 DNA를 이용함으로써 종 다양성을 더 정밀하게 확인할 수 있는 방법으로 알려져 있다(Farmitner et al., 2004). 이 방법은 우선 세균 동정의 지표로 사용되고 있는 16S rDNA 영역을 universal primer set로 증폭한 다음, 고온(65°C)과 함께 urea나 formamide와 같은 변성제를 함께 처리함으로써 DNA 단편의 염기조성에 따른 Tm 값(melting point)의 구분에 의해 단 한 개의 염기 차이까지도 분리가 가능한 DGGE 용 gel의 특성을 이용하여 분리된 band의 수에 따라 시료 내에 포함된 종 혹은 개체군의 다양성을 확인할 수 있으며, 각 시료 간의 DGGE band를 비교할 경우, 우점종과 특이종의 구별이 가능하다(Muyzer et al., 1993; Nakgawa et al., 2002; Watanabe et al., 2001).

*Corresponding author: ahnsc@pusan.ac.kr

따라서 본 연구에서는 해수 내 미생물을 조사함에 있어 PCR-DGGE를 적용함으로써 기존의 조사법을 보완할 수 있는 새로운 신속 동정법 개발에 대한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 채취

해수로부터 genomic DNA를 분리하기 위하여 2006년 3월과 6월에 부산 지역 내 송도, 광안리, 송정 등의 해변으로부터 표층수를 1회 각 2 L씩 채취하였다.

해수로 부터의 genomic DNA 추출

채취한 해수 2 L는 감압 플라스크를 이용하여 0.22 μ m pore size의 membrane filter (Millipore, Ireland)로 여과시킨 후, membrane을 잘게 잘라서 DNA extraction buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM sodium EDTA [pH 8.0], 100 mM sodium phosphate, 1.5 M NaCl, 1% CTAB)를 첨가하여 하룻밤 동안 두었다. 50 μ L proteinase K (20 mg/mL)를 처리하여 225 rpm, 37°C의 교반기에서 30분간 반응하고, 10% SDS 3 mL을 첨가하여 65°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음에 10,000 rpm, 10분간 원심분리 하여 상층액을 수거하였다. 그 후 동량의 24:1 비율의 chloroform과 isoamyl alcohol 혼합물을 넣고 4,000 rpm, 10분 동안 원심분리한 다음, 상층액에 0.7 volumes의 isopropanol을 넣고 4,000 rpm, 10분 동안 다시 원심분리 하여 상층액을 따라 버린다. 최종적으로 70% ethanol로 수세하고 같은 조건으로 원심분리 하여 상층액을 따라 버린 후, 남은 침전물을 공기 중에서 건조시켜 500 μ L 증류수에 녹여서 4°C에 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

해수로부터 분리하여 얻은 marine DNA 시료를 template로 하고 bacterial universal primer set인 bact-0008-f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 bact-0536-r (5'-GWATTACCGCG-3') primer (Wimpenny et al., 1983)를 이용하여 다음과 같은 조건에서 PCR을 수행하였다. 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation 한 후, 95°C에서 denaturation 1분, 65°C에서 annealing 1분, 72°C에서 extension 1분 과정을 20 cycle 반복하는데 이 때, annealing 온도는 1 cycle마다 0.5°C씩 감소하여 최종 55°C까지 touch down하였으며, 계속해서 95°C에서 denaturation 1분, 55°C에서 annealing 1분, 72°C에서 extension 1분 과정을 15 cycle 더 반복한 후, 72°C에서 5분 동안 post-extension 하였다. DGGE를 진행하기 위해서는 GC clamp가 포함된 PCR products가 요구되므로 확보된 첫 번째 PCR product를 template로 하여 bacterial universal primer bact-0008-f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 GC clamp가 붙은 bact-0536GC-r (5'-CGCCCCCGCGCGGGCGGGCGGGGWATTACCGCG-3') primer를 이용하여 두 번째 PCR을 수행하였다. 두 번째 PCR 조건은 95°C에서 5분

동안 pre-denaturation 한 후, 95°C에서 denaturation 40초, 62°C에서 annealing 40초, 72°C에서 extension 40초 과정을 30 cycle 반복한 후, 72°C에서 5분 동안 post-extension 하였다. 증폭된 PCR products는 1.5% agrose gel 상에서 전기영동을 실시하여 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 확인하였다.

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

상기의 PCR products에 대해 Dcode™ system (Bio-Rad, USA)을 이용하여 DGGE 분석을 실시하였다 (Muyzer et al., 1993). Denature gradient는 20-60%의 농도변화를 갖는 8% (w/v) polyacrylamide gel (37.5:1)에 시료를 loading 하였으며 65°C, 60V 조건에서 16시간 전기영동 하였다. 전기영동한 gel은 EtBr로 염색한 후, UV 상에서 각각의 band를 확인하였다. 분리된 각각의 band는 gel에서 잘라내어 eppendorf tube에 넣고 gel extraction kit (Qiagen)를 이용하여 DNA를 회수하였다. 염기서열분석을 위하여 band로부터 회수된 DNA를 template로 사용하여 bacterial primer bact-0008-f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 bact-0536-r (5'-GWATTACCGCG-3') primer를 이용하여 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation 한 후, 95°C에서 denaturation 40초, 62°C에서 annealing 40초, 72°C에서 extension 40초 과정을 30 cycle 반복한 후, 72°C에서 5분 동안 post-extension하였다. 증폭된 PCR product는 gel extraction kit (Qiagen)를 이용하여 정제하였으며, 증폭된 DNA는 Genotech Co. (Korea)에 sequencing을 의뢰하였다.

염기서열 분석

확보된 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (Blast, Altschul et al., 1997)와 Ribosomal Database Project II tool (RDP, Cole et al., 2003)에 등록되어 있는 database를 사용하여 검색하였으며, 높은 유사성을 가지는 염기서열을 기초로 하여 group별로 정리한 후, Clustal W (EBI, UK)를 이용한 multiple alignment를 통해 sequence data들을 비교하였다 (Thompson et al., 1994).

결과 및 고찰

해수로부터의 genomic DNA의 분리 및 PCR 증폭

각 지역별 2 L의 해수로부터 4-5개씩의 membrane을 얻었으며, 이로부터 본 연구과정을 통해 최적화된 방법으로 고농도의 순수한 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 다양성을 분석하기 위한 PCR의 주형으로 사용하였으며 bacterial universal primer set를 이용하여 touch-down 방식으로 PCR을 수행하여 약 500 bps의 PCR products를 얻었다 (Fig. 1). 이 때 PCR 증폭에 사용된 10개의 시료 중 8개만이 16S rDNA 영역에 대한 DNA 단편이 증폭되었다. 한편 DGGE를 수행하기 위해서는 GC clamp가 포함된 시료를 확보해야 하므로 이를 위해 1차 증폭된 PCR product를 주형으로 하여 수행한 두 번째 PCR을 통해 GC clamp가 포함된 크기인 약 550 bps의

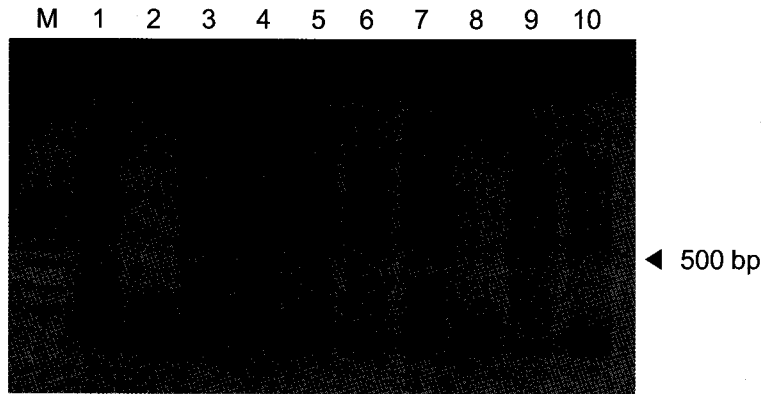


Fig. 1. PCR amplification of marine genomic DNA from the seawater samples in seashores of Busan. Lane M, 100 bp DNA ladder; Lanes 1-4, seawater samples from Songjeong beach; Lanes 5-7, Gwangan beach; Lanes 8-10, Songdo beach.

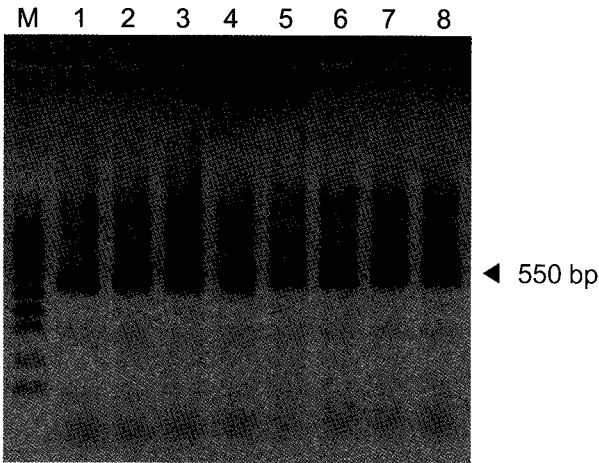


Fig. 2. Amplification of GC clamp contained PCR products from 1st PCR products. Lane M, 100 bp DNA ladder; Lanes 1-3, seawater samples from Songjeong beach; Lanes 4-6, Gwangan beach; Lanes 7-8, Songdo beach.

PCR products를 확보하였다 (Fig. 2).

DGGE와 염기서열분석에 의한 해수 내 세균 조성 분석

최종 확보된 PCR product는 DCode system을 이용하여 전기영동을 실시하였고, EtBr 염색 후 gel 상에서 약 10여개의 특이적인 band를 확인하였으며 (Fig. 3), 이후 반복실험을 통하여 sampling된 전체 시료로부터 총 24개의 DGGE band를 확보하였다. 각 band로부터 정제된 PCR product에 대해서는 염기서열의 확인을 통해 세균 동정과 함께 해수 내 미생물의 다양성을 조사하였다. 이 때, 확인된 염기서열은 NCBI의 Blast search를 통하여 유사도가 높은 gene을 검색하였으며 계통발생학적 분석을 위하여 Clustal W를 이용하여 multiple alignment와 함께 phylogenetic tree를 작성하여 미생물 다양성을 확인하였다 (Fig. 4). 확인 결과, sampling 지역에 따른 차이는 없는 것으로 보이며, *Pseudoaltermonas arctica*, *P. tetraodonis*, *Vibrio campbellii*, *V. cyclitrophicus*, *V. splendidus* 등 18 종의 해양세균과 6 종의 미동정 혹은 배양이 불가능한

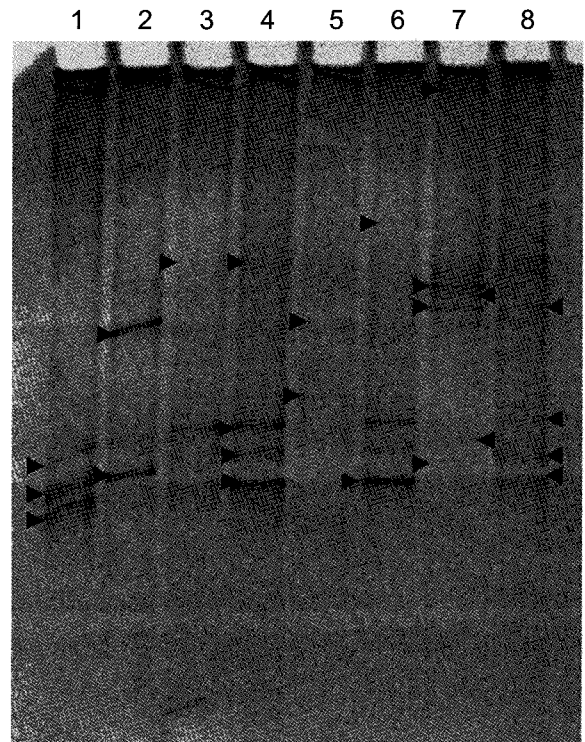


Fig. 3. Patterns of DNA bands from the seawater samples by PCR-DGGE. Lanes 1-3, DNAs from Songjeong beach; Lanes 4-6, DNAs from Kwangan beach; Lanes 7-8, Songdo beach. Arrows head indicates the different bands representing the different species.

종을 포함하여 총 24종의 해양 세균들을 확인할 수 있었다 (Table 1). 본 연구를 통해 확인된 해양 세균의 분포를 살펴 보면, 총 24종 중 14종이 *Vibrio* 속 세균으로 가장 많이 검출되었으며, 그 외에 *Pseudoaltermonas* 속 2종, *Arcobacter* 속 1종 및 미동정 혹은 배양이 불가능한 세균 7종이 각각 검출되었다. 특히, *Vibrio* 속 세균 중에는 해수 내에 상존하는 일반세균인 *V. splendidus*를 비롯하여 병원성과 관련하여 abalone, algae, clam, oyster, turbot 등의 해양 생물에서 분리

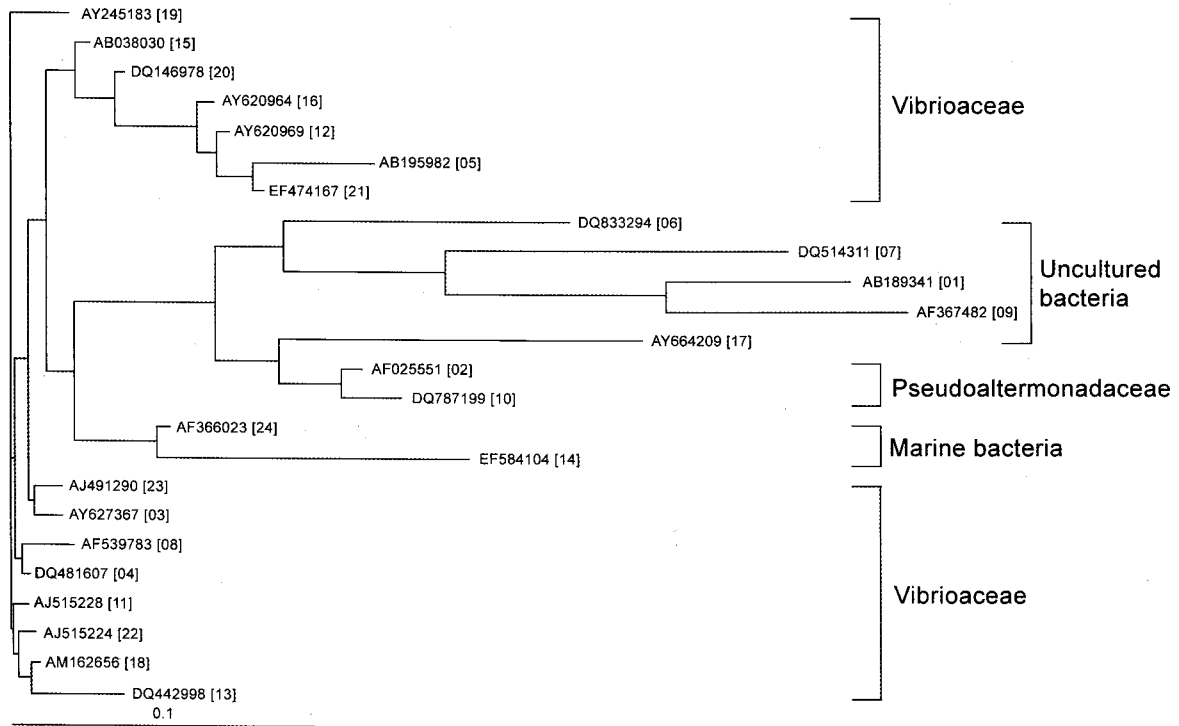


Fig. 4. A neighbor-joining tree of 16S rDNA sequences recovered from DGGE bands of the seawater samples in seascides of Busan. Scale bar represents 10% estimated change.

Table 1. Identification of marine microbes in the seawater samples in seascides of Busan by PCR-DGGE

| No. | Nearest neighbor strain | Similarity (%) | Accession number |
|-----|---|----------------|------------------|
| 1 | Uncultured epsilon proteobacterium | 85 | AB189341 |
| 2 | <i>Pseudoaltermonas tetraodonis</i> MED8 | 99 | AF025551 |
| 3 | Uncultured Vibrionaceae bacterium EF100-91D09 | 97 | AY627367 |
| 4 | <i>Vibrio cyclitrophicus</i> LMG23439 | 96 | DQ481607 |
| 5 | <i>Vibrio campbellii</i> Dec1 | 92 | AB195982 |
| 6 | Uncultured bacterium PMVC23 | 84 | DQ833294 |
| 7 | <i>Arcobacter</i> sp. BSs20195 | 87 | DQ514311 |
| 8 | <i>Vibrio</i> sp. RE2-8 | 88 | AF539783 |
| 9 | Uncultured epsilon proteobacterium VC1.2-cl02 | 89 | AF367482 |
| 10 | <i>Pseudoaltermonas arctica</i> A 37-1-2 | 94 | DQ787199 |
| 11 | <i>Vibrio splendidus</i> VS6turb | 91 | AJ515228 |
| 12 | <i>Vibrio tasmaniensis</i> 236.10 | 92 | AY620969 |
| 13 | <i>Listonella anguillarum</i> TL01 | 96 | DQ442998 |
| 14 | Marine bacterium WEED4 | 92 | EF584104 |
| 15 | <i>Vibrio splendidus</i> ATCC33789 | 95 | AB038030 |
| 16 | <i>Vibrio tasmaniensis</i> 562 | 93 | AY620964 |
| 17 | Uncultured Alteromonas sp. JL-ESNP-125 | 87 | AY664209 |
| 18 | <i>Vibrio cyclitrophicus</i> LMG 21359 | 97 | AM162656 |
| 19 | <i>Vibrio</i> sp. 6 | 96 | AY245183 |
| 20 | <i>Vibrio</i> sp. V140 | 91 | DQ146978 |
| 21 | <i>Vibrio</i> sp. A4 isolate-5 | 92 | EF474167 |
| 22 | <i>Vibrio splendidus</i> PMV18 | 95 | AJ515224 |
| 23 | <i>Vibrio pomeroyi</i> LMG 20537 | 94 | AJ491290 |
| 24 | Marine gamma proteobacterium SWAT8 | 98 | AF366023 |

되는 *V. cyclitrophicus*, *V. tasmaniensis*, *Listonella (Vibrio) anguillarum* 등이 다양하게 검출되었다. 일반적으로 비슷한 크기를 가지는 PCR 산물은 conventional agarose gel electrophoresis로 전개할 경우 하나의 DNA band로만 나타난다. 그러나 본 연구에 사용된 DGGE는 전기영동을 수행하는 동안,

PCR products가 polyacrylamide gel을 통과하면서 점점 증가하는 다양한 chemical denaturants (urea, formamide)의 농도에 부딪치게 된다. 이 때 weaker melting domain을 가지는 double-stranded PCR product일수록 먼저 denaturation되기 시작하고 그에 따라 이동속도가 크게 느려지게 된다. 따라서 single base

difference일지라도 다른 band로 나타나는 뛰어난 분리능을 보이게 된다(Muyzer et al., 1993; 1998) 본 연구에서는 이러한 점을 감안하여 서로 다른 bacteria로부터 유래된 DNA sequence의 경우에도 다른 denatruant concentration에서 denaturation 될 때 분리된 각각의 band는 이론적으로 community 내의 서로 다른 bacterial population으로부터 분리될 것으로 생각하였으며 전개상의 band 수를 보고 그 community내의 확보된 우점종을 찾아낼 수 있을 것으로 판단하였다. 그러나 낮은 분포를 보이는 community의 band의 경우 증폭된 PCR product가 적기 때문에 EtBr에 의한 염색이 되지 않을 수도 있고 GC clamp를 가지는 primer를 합성하여 증폭해야 하며, GC clamp에 의한 mismatch의 가능성과 DNA 증폭 과정 혹은 분석 과정에서 합성될 수 있는 heteroduplex에 의한 오류도 내포하고 있다(Muyzer, 1999). 그러나 이러한 점을 감안하더라도 DGGE는 기존의 배양법에 비해 환경 내 미생물의 군집 및 종 다양성을 동정함에 있어 신속성과 함께 unculturable bacteria까지 확인할 수 있다는 것이 가장 큰 장점으로 부각될 수 있으며, 본 연구를 통해 PCR generated DNA products를 분리하기 위해 사용되는 genetic fingerprinting 기술의 하나인 DGGE는 난배양성의 다양한 생물종을 함유하고 있는 해수와 같은 환경으로부터의 생물종의 다양성과 분포를 분석하기에 적합한 기술로 사료되어진다. 따라서 추후 연구를 통해 주요 지표종 및 표준 균주에 대한 standard marker 개발이 필요할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구는 해양수산부 수산특정연구개발사업 (과제번호: 20050076)의 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, 25, 3398-3402.
- Cole, J.R., B. Chai, T.L. Marsh, R.J. Farris, Q. Wang, S.A. Kulam, S. Chandra, D.M. McGarrell, T.M. Schmidt, G.M. Garrity and J.M. Tiedje. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): preview a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucl. Acids Res.*, 31, 442-443.
- Farnteitner, A.H., F. Zibuschka, M.M. Burtscher, G. Lindner, G. Reischer and R.L. Mach. 2004. Eubacterial 16S-rDNA amplicon profiling: a rapid technique for comparison and differentiation of heterotrophic plate count communities from drinking water. *Int. J. Food Microbiol.*, 92, 333-375.
- Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. in Microbiol.*, 2, 317-322.
- Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer and C. Wawer. 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*, Vol. 3.4.4. Akkermans, A.D.L., J.D. van Elsas and F.J. de Bruijn, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1-27.
- Muyzer, G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700.
- Nakagawa, T., S. Sato, Y. Yamamoto and M. Fukui. 2002. Successive changes in community structure of an ethylbenzene-degrading sulfate-reducing consortium. *Water Res.*, 36, 2813-2823.
- Novitsky, J.A. 1983. Starvation-survival of heterotrophs in the marine environments. *Adv. Microbiol. Ecol.*, 6, 171-198.
- Reinheimer, G. 1985. *Aquatic Microbiology*, 3rd ed., Wiley and Sons. London, UK, 158-159.
- Rodriguez-Valera, F. 2002. Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Environ. Microbiol.*, 4, 628-633.
- Rondon, M.R., P.R. August, A.D. Bettermann, S.F. Brady, T.H. Grossman, M.R. Liles, K.A. Loiacono, B.A. Lynch, I.A. MacNeil, C. Minor, C.L. Tiong, M. Gilman, M.S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman and R.M. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2541-2547.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22, 4673-4680.
- Watanabe, K., Y. Kodama and S. Harayama. 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J. Microbiol. Meth.*, 44, 253-262.
- Wimpenny, J.W.T., W.L. Robert and C. Philip. 1983. Laboratory model systems for the investigation of specialty and temporally organized microbial eco-

systems. In: *Microbes in Their Natural Environments*,
Society for General Microbiology, ed. Cambridge
University Press, New York, USA, 67-117.

2007년 9월 18일 접수
2007년 11월 20일 수리