

Phycocyanin locus내의 DNA Polymorphism에 의한 한국산 Cyanobacteria의 유전적 다양성

박진숙* · 권주리 · 유순애¹

*한남대학교 미생물학과, ¹배재대학교 생물학과

Cyanobacteria의 광합성 보조색소인 phycocyanin의 PC operon(*cpc* gene)을 PCR로 증폭하고, 제한효소로 처리하여 RFLP pattern을 비교하였다. Intergenic spacer sequence를 포함한 *cpc* gene은 실험에 사용한 cyanobacteria 균주 모두에서 증폭되었으며, 산물의 size는 약 700 bp였다. PCR산물을 5종의 제한효소로 처리한 결과 *AluI*, *MspI*, *HaeIII*는 같은 속내의 균주간에 동일한 pattern을 나타내어 속 구분이 가능하였으며 *CfoI*은 *Anabeana*와 *Synechocystis*속의 균주간에 구별되는 양상을 나타내어 속내 균주 구별에 유용하였다. Restriction enzyme profile에 의한 phenogram에서 *Anabeana*, *Chlorogloea*, *Synechocystis*는 각각 하나의 cluster를 형성하여 cyanobacteria의 분류에 PC-IGS의 RFLP pattern이 유용함을 알 수 있었다.

Key words □ cyanobacteria, PC-IGS, phycocyanin gene, PCR-RFLP

Cyanobacteria는 담수, 해수, 온천, 극지, 사막, 토양 등에 널리 분포하며(8), 산소발생형 광합성을 수행하는 매우 다양한 세균 그룹으로 1000종 이상이 알려져 있다(6). 전통적인 cyanobacteria의 분류는 형태적 특징에 의존해 왔으며 형태적 특징은 환경 조건에 많은 영향을 받는다. 이러한 한계성을 극복하기 위하여 광합성색소 및 isozyme등과 같은 macromolecule을 이용하는 분류 방법이 개발되어 왔으나 이러한 단백질의 발현 역시 이 환경 조건에 따라 영향을 받아(1,2) 재현성이 적다. 따라서 직접적으로 유전적 유연관계를 나타내는 염색체 DNA의 염기조성, DNA-RNA relatedness, RAPD(4), 특정유전자의 염기서열(9,10)등의 유전학적 특징들이 많이 이용되고 있다. 이중 16S rRNA의 염기서열에 의한 cyanobacteria의 분류는 계통진화학적으로 가장 유용한 방법중의 하나이다(11). 그러나 대부분의 경우 cyanobacteria는 순수배양이 어려워 이러한 분자유전학적 방법의 적용에는 어려움이 있다. Cyanobacteria 배양의 주 오염원인 종속영양세균과 달리 cyanobacteria는 산소발생형 광합성능을 갖으며, 광합성색소로 Chlorophyll a 외에 phycocyanin(PC), allophycocyanin, phycoerythrin 등의 보조 색소를 갖는다. 따라서 이들 보조 광합성 색소를 이용하는 것은 담수 cyanobacteria의 분류에 유용할 것이다. Phycocyanin은 두개의 bilin subunit와 3개의 linker polypeptides로 구성되어 있으며 PC operon(*cpc* gene) 상에 bilin subunit gene사이의 intergenic spacer(IGS)영역은 매우 가변적 영역이므로(3), cyanobacteria의 분류에 유용할 것이다.

본 연구에서는 PC-IGS 유전자를 PCR기법으로 증폭하고 그 산물을 4-base 인식 제한효소를 처리하여 생성된 restriction

fragment length polymorphism(RFLP) profile을 cyanobacteria의 분류에 적용하였다.

재료 및 방법

세균의 배양

이 실험에 사용한 균주는 Table 1에 나타내었다. 총 17균주 중 11균주는 대전근교의 하천과 온천에서 분리하였으며 나머지 6균주는 PCC, ATCC, IAM, CCAP 등의 균주 보존기관에서 분양 받아 사용하였다. 모든 균주는 BG-11배지에서 30°C, 3~5일간 배양하였다.

DNA의 추출 및 정제

분리 균주들을 5 ml의 BG-11 배지에서 배양하여 세포를 고속 원심분리로 수확하였다. 이 세균 세포 침전물을 0.1 M saline-EDTA(0.15 M NaCl, 0.1 M ethylene diamino tetraacetate pH 8.0)로 세척한 후 5 mg의 lysozyme(Sigma, USA)을 넣어 37°C에서 1시간 처리하여 세포의 벽을 용해하고, 10% SDS를 1/10(v/v)을 넣어 60°C에서 10분간 처리하여 단백질 및 세포의 파편들을 침전시켰다. 여기에 동량의 phenol:chloroform(1:1)을 넣고 현탁시킨 다음, 원심 분리(10,000 rpm, 15 min, 4°C)하여 상등액을 취하고, 이 상등액 부피의 2배에 해당하는 냉 ethanol을 넣어서 원심분리하여 얻은 침전물을 70%, 80%, 90%, 99%의 ethanol로 연속 세척하고 건조시켜서, 100 μ l의 0.1×SSC(0.15M NaCl, 0.015 M trisodium citrate, pH 7.0)에 용해하여 crude DNA용액을 얻었다. 이 crude DNA용액에 10 μ l의 RNase(Sigma, USA, 10 mg/ml)를 넣고 37°C에서 30분간 처리하여 RNA를 가수분해시킨 후, 동량의 phenol:chloroform(1:1)을 2회 처리하여 순수한

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-629-7498, Fax: 042-629-7498
E-mail: jspark@mail.hannam.ac.kr

Table 1. Cyanobacterial strains used in this study

Strain number	Genus/Species	Source/Origin
S1	<i>Synechocystis pevalekii</i>	National cemetery, Daejeon
S2	<i>Synechocystis</i> sp.	Yuseung Stream, Daejeon
S3	<i>Synechocystis</i> sp.	PCC 6803
S5	<i>Synechocystis</i> sp.	ATCC 27184(=PCC 6803)
S6	<i>Synechocystis</i> sp.	Tsukuba, Japan
SC4	<i>Synechococcus lepoliensis</i>	IAM 6
MY7	<i>Microcystis</i> sp.	Daechong Lake
C10	<i>Chlorogloea</i> sp.	Hannam University
C11	<i>Chlorogloea fritshii</i>	CCAP 1411/1A
C12	<i>Chlorogloea</i> sp.	unknown
A13	<i>Anabeana</i> sp.	unknown
A16	<i>Anabeana</i> sp.	Kapsa Temple
L14	<i>Lynghya</i> sp.	Daechong Lake
N15	<i>Nostoc carneum</i>	IAM 35
A16	Oscillatoria	National cemetery, Daejeon
O22	<i>Anabeana</i> sp.	National cemetery, Daejeon
A17	<i>Rivularia</i> sp.	Sura jeng, Daejeon
ML19	<i>Microcoleus</i> sp.	National cemetery, Daejeon

PCC, Pasteur Culture Collection, Paris, France; IAM, Institute of Applied Microbiology, Tokyo, Japan; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md.; CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa, Ambleside, United Kingdom.

DNA를 얻었으며, 정제한 DNA는 멸균된 3차 증류수 50 μ l에 녹여 -20°C에서 보관하였다.

PC-IGS 유전자의 PCR 증폭

PC-IGS 유전자 증폭을 위한 primer(Fig. 1)는 forward PC β F(5'-GGCTGCTTGTTTACGCGACA-3')와 revers primer PC α R(5'-CCAGTACCACCAGCAACTAA-3')를 사용하였다(5). PCR reaction mixture는 AccuPower PCR Premix(Taq DNA polymerase 1 unit; dNTP, each 250 μ mol; Tris-HCl(pH8.0) 10 mM; KCl 40 mM; MgCl₂ 1.5 mM, Bioneer, Korea)를 사용하였다. primer는 각각 20 pmol, Template는 0.1 μ l 그리고 멸균된 3차 증류수 16 μ l 첨가하여 총 반응량 20 μ l이 되게 하였다.

PCR 운행조건은 94°C에서 5분간 denaturation한 후 94°C에서 30초간 denaturation, 53°C에서 30초간 primer annealing, 72°C에서 60초간 chain extension시켰으며, 35cycle 후 최종적으로 72°C에서 5분간 chain extension을 하였다. 증폭된 DNA의 확인을 위해서 PCR 반응액의 1 μ l를 취하여 1.2%의 agarose gel을 이용하여 100 V, TBE buffer에서 30분 전기영동 후 ethidium bromide 용액으로 염색하여 UV하에서 관찰하고 polaroid film으로 촬영하였다. 증폭된 DNA의 크기를 측정하기 위한 marker로는 1 Kb ladder(GibcoBRL, USA)를 사용하였다.

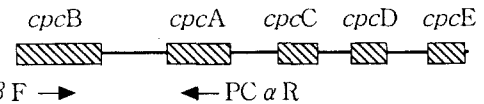


Fig. 1. Schematic representation of the PC operon. The solid line regions indicate IGS sequences.

RFLP 및 Data 분석

PCR 산물의 restriction enzyme digested-pattern을 분석하기 위하여, *AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *MspI*, *RsaI*, 5종의 제한 효소를 이용하여 각 균주에 대해 RFLP pattern을 분석하였다. 제한효소의 처리는 PCR 산물 100 ng, 제한효소 5 unit, 10 \times reaction buffer 1 μ l를 첨가하여 최종 20 μ l로 하여 37°C에서 over night 반응시킨 다음 6 \times tracking dye와 혼합하여 10 μ l를 2.5% nusieve agarose에 loading 하여 0.5 \times TBE buffer에서 50 V로 1시간 전기영동한 뒤 ethidium bromide 용액으로 염색하여 UV-transilluminator 상에서 각 균주의 band pattern을 관찰하고, polaroid film으로 촬영하였다. 각 restriction enzyme에 의해 생성된 RFLP data를 통계처리 program인 MVSP(plus Ver 3.0)를 이용하여 UPGMA방법으로 simple matching coefficient와 percent similarity를 이용하여 각 세균들간의 restriction pattern에 의한 phenogram을 작성하였다.

결과 및 고찰

PC-IGS의 증폭

PC-IGS를 증폭하기 위한 primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과 실험 균주 모두에서 약 700 bp위치에 band를 형성하였다(Fig. 2). 대조 균주로 사용된 *E. coli*에서는 증폭되지 않았다. Cyanobacteria 외에 *cpc* gene을 갖고 있는 홍조류의 경우, PCR조건에 의해 이 실험에 사용된 primer에 의해 증폭되지 않으며 은편모조류(cryptophyte)의 경우 여러개의 PCR 산물을 생성하는 것으로 알려져(5), cyanobacteria에 특이적 PC-primer라 할 수 있다.

제한효소 절단 분석

Restriction pattern 분석을 위해 4 base를 인식하는 *AluI*, *CfoI*,

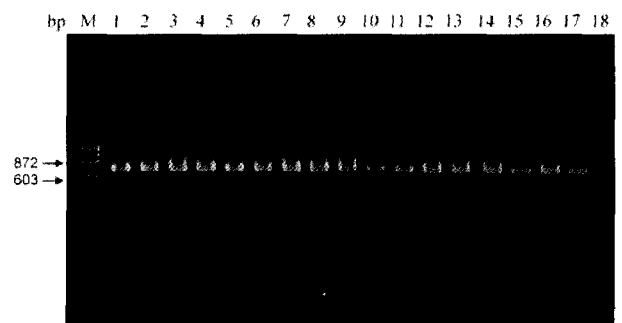


Fig. 2. Amplification products of cyanobacterial strains electrophoresed on a 1.2% agarose gel in TBE buffer. Lanes: M, marker; Lanes 1-18, S1, S2, S3, SC4, S5, S6, MY7, A13, A16, C10, C11, C12, N15, O22, R17, L14, ML19, *E. coli* KCTC 1039; KCTC, Korean Collection for Type Cultures, Korea.

Table 2. PC-RFLP profile types of cyanobacterial strains

Strain	Restriction Enzyme Type ^a				
	<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>RsaI</i>	<i>CfoI</i>	<i>AluI</i>
S1	a	b	b	a	a
S2	a	b	b	a	a
S3	a	b	b	c	a
S5	a	b	b	c	a
S6	a	b	b	a	a
SC4	a	b	b	ND	d
MY7	ND	b	b	c	e
C10	c	a	c	d	c
C11	c	a	c	d	c
C12	c	a	c	d	c
A13	b	c	b	e	c
A16	b	c	c	f	c
N15	c	b	a	g	f
O22	c	c	b	ND	g
R17	d	b	b	a	h
L14	b	d	d	ND	i
ML19	e	e	ND	h	j

^aThe different restriction types detected with each enzyme among the 17 strains analyzed are designated by lowercase letters. ND, not determined.

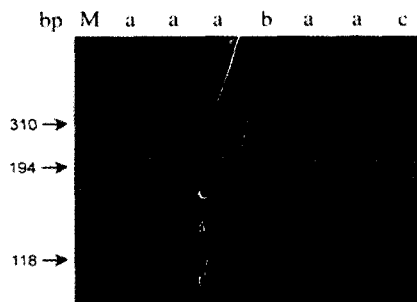


Fig. 3. Restriction digests of the PC-IGS PCR product of cyanobacteria. Three of the nine potential genotypes(a to i) generated by *AluI* for the 17 strains studied are shown. Lanes: M, marker; Lane, from left to right, S1, S2, S3, SC4, S5, S6, MY7.

HaeIII, *MspI*, *RsaI* 등의 5종류의 제한효소를 사용하였으며, 사용한 제한 효소는 5종 모두 polymorphic pattern을 형성하였으며 (Table 2.), 제한효소 *RsaI*은 4 pattern(a-d), *MspI*과 *HaeIII*는 5 pattern, *CfoI*은 7 pattern, *AluI*은 9 pattern을 나타내어 총 17균주에 대하여 30종의 제한효소 절편 양상을 나타내었다. *AluI*의 경우 *Synechocystis*는 a type, *Chlorogloea*와 *Anabaena*는 c type을 나타냈으며(Fig. 3), 나머지 다른 속의 균주들은 각각 다른 pattern을 나타내었다. *MspI*(Fig. 4, A)과 *HaeIII*의 경우 *Synechocystis*, *Chlorogloea*, *Anabaena*속 균주들은 각각 b, a, c type을 나타내어 속내 균주간에 동일한 pattern을 나타내었다.

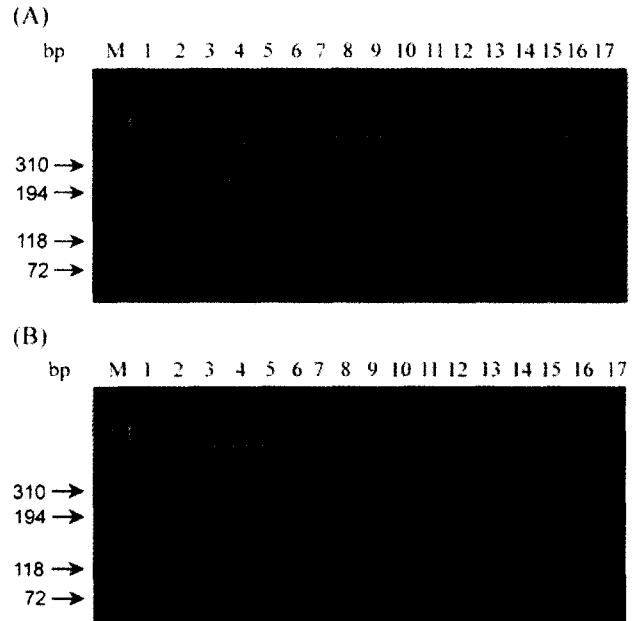


Fig. 4. RFLP of the PC-IGS of cyanobacterial strains run on 2.5% agarose gel in TBE buffer. The restriction enzymes used were *MspI* (A) and *CfoI*(B). Lanes: M, marker; Lane 1-17, S1, S2, S3, SC4, S5, S6, MY7, A13, A16, C10, C11, C12, N15, O22, R17, L14, ML19.

*MspI*에서는 *Synechocystis*가 a type, *Chlorogloea*, c type, *Anabaena*는 b type을 나타내었으며, *AluI*, *MspI*, *HaeIII*의 경우 동일한 속내의 여러 균주간에 동일한 pattern을 나타내어 속 구별에 유용하였다. *RsaI*의 경우, *Nostoc*(N15) 균주가 a type, *Lyngbya*(L14) 균주가 d type인것을 제외한 나머지 속의 모든 균주가 b와 c type이었다. *CfoI*의 경우 *Synechocystis*속 균주들이 a와 c type, *Anabaena*속 균주들이 각각 e와 f type으로 동일 속의 균주 구별에 유용하였다(Fig. 4, B).

RFLP의 군집 분석

5종의 제한효소를 이용하여 얻어진 RFLP data를 통계처리 program인 MVSP(3.0 V)를 이용하여 percent similarity와 simple matching coefficient를 이용하여 UPGMA 군집분석을 실시해 dendrogram을 작성한 결과(Fig. 5), *Synechocystis*, *Chlorogloea*, *Anabaena*가 각각 하나의 cluster를 형성하였다. 대부분 순수배양이 어려운 cyanobacteria에 있어 순수배양에 의존하지 않는, 종 특이적 PCR방법의 개발(9)이나 cyanobacteria의 16S rRNA gene의 특이적 증폭을 위한 primer의 개발(12) 등이 이루어지고 있으나, 종 특이적 primer의 경우 특정 종의 cyanobacteria의 검출에 한정되며, cyanobacteria 특이적 16S rRNA gene의 경우 산소발생형 광합성미생물의 경우 모두 검출되는 등의 문제가 있다.

Phycocyanin 유전자의 경우 cyanobacteria외에 홍조식물이나 은편모조류(cryptophytes)의 광합성 보조색소를 구성한다(7). 그러나 이들 중 담수 환경에서 우점종은 cyanobacteria이며, 배양의 주요 오염원이 종속영양세균인 점을 감안한다면 phycocyanin 유전자는 cyanobacterium-specific PCR로 사용하여 cyanobacteria의 분

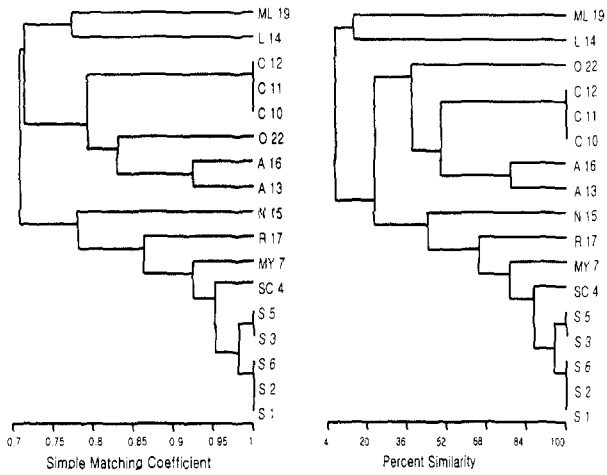


Fig. 5. Phenogram resulting from analysis of PC-RFLP of the cyanobacterial strains.

류에 이용할 수 있다. PCR-RFLP 방법에 의한 phycocyanin 유전자를 이용한 제한효소 분석은 유용한 phycocyanin genotype을 생성하며, 비교적 쉽고 빠르게 cyanobacteria의 분류에 적용할 수 있다. 특히, 자연계의 시료로부터 순수배양을 거치지 않고 직접 cyanobacteria를 동정할 수 있어 생태학적으로도 유용하다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단 연구비(BSRI-96-4444)의 지원에 의해 수행된 것입니다.

참고문헌

1. 박영식, 이기성, 최영길. 1993. *Chlorogloea fritschii*에 있어서 phosphate response와 광주 기에 따른 phycobilisome 색소의 변화. 한국미생물학회지 31, 425-430

2. 박영식, 이기성, 김영호, 최영길. 1993. *Chlorogloea fritschii*에 있어서 isozyme pattern에 미치는 phosphate의 영향. 한국미생물학회지 31, 431-435

3. Belknap W. R., and R. Hazelkorn. 1987. Cloning and light regulation of expression of the phycocyanin operon of the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO*. 6, 871-844

4. Brett A. N. 1995. Identification and phylogenetic analysis of toxic cyanobacteria by multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2286-2291

5. Brett A. N., D. Jacobs, and A. E. Goodman. 1995. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3875-3883

6. Castenholz R. W. and J. B. Waterbury. 1989. Oxygenic photosynthetic bacteria. Group I. Cyanobacteria, in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1710-1728.

7. Glazer A. N., 1984. Light guided directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J. Biol. Chem.* 264, 1-4

8. Lyra C., J. Hantula, E. Vainio, J. Rapala, L. Rouhiainen, and K. Sivonen, 1997. Characterization of cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene. *Arch. Microbiol.* 168, 176-184.

9. Nubel U., G. P. Ferran, and M. Gerard. 1997. PCR primer to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3327-3332

10. Rasmussen U. and M. S. Mette. 1998. Fingerprinting of cyanobacteria based on PCR with primers derived from short and long tandemly repeated repetitive sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 265-272

11. Wilmotte A. 1994. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria, 1-25. in *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic publisher, Dordrecht, The Netherlands.

12. Wilson K. M., A. S. Mark, D. B. Peter, and P. S. Christopher. 2000. Molecular characterization of the toxic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and design of a species-specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 332-338

(Received December 7, 2000/Accepted December 15, 2000)

ABSTRACT: Genetic Diversity of Korean Cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the Phycocyanin Locus

Jin-Sook Park,* Ju-Lee Kwon, and Soon-Ae Yoo¹(Department of Microbiology, Hannam University, Daejeon 306-791, Dept. of Biology, ¹Paichi University, Daejeon 302-735, Korea)

The genetic diversity among Korean cyanobacteria was assessed by restriction fragment length polymorphism(RFLP) analysis of PCR products from the phycocyanin locus. Strains of all of the genera tested were successfully amplified, and the size of amplified fragments was approximately 700bp. The restriction patterns generated by *AluI*, *MspI*, and *HaeIII* were conserved for strains within each of genera studied and were specific to the genus level. Intrageneric delineation of strains was revealed by the enzyme, *CfoI* for members of genera *Anabeana* and *Synechocystis*. Phenogram derived from the different RFLP patterns revealed a coherent cluster among *Anabeana*, *Chlorogloea*, and *Synechocystis* strains. PC-RFLP methods provided useful tools for classification of cyanobacteria.