

## 독소 생성 *Microcystis* 검출을 위한 PCR primer의 평가

이현경 · 김준호 · 유순애<sup>1</sup> · 안태석<sup>2</sup> · 김치경 · 이동훈\*

충북대학교 미생물학과 및 바이오연구소, <sup>1</sup>배재대학교 생물학과, <sup>2</sup>강원대학교 환경학과

*Microcystin*은 부영양화된 하천과 호수에서 cyanobacteria에 의해 생성되며 인간과 야생 동물에게 독성 물질로 작용하여 심각한 환경문제를 일으킨다. *Microcystin*은 *mcy* 유전자에 의해 암호화되는 *microcystin synthetase*로 알려진 multi-functional enzyme complex에 의해 리보솜의 관여 없이 합성된다. 따라서 *mcy* 유전자의 PCR 증폭을 통해 독소를 생성하는 *Microcystis*를 효과적으로 검출할 수 있다. 본 연구에서는 *microcystin*을 생성하는 균주를 구별하기 위해 설계된 7종의 primer쌍의 유용성을 검증하기 위하여, 17주의 cyanobacteria와 국내 호수 시료에서 추출된 핵산을 대상으로 PCR 증폭을 하였다. TOX4F-TOX4R, FAA-RAA, FP-RP primer쌍에 의해서는 독소를 생성하는 *Microcystis* 균주 중 일부가 검출되지 않았다. NSZW2-NSZW1 primer쌍을 사용한 PCR의 경우 *microcystin*을 생성하는 국내 균주에서 예상하지 못한 크기의 산물이 관찰되었다. TOX1P-TOX1F primer쌍으로 PCR을 한 결과, 증폭된 산물을 관찰할 수 없었다. MSF-MSR과 TOX2P-TOX2F primer쌍만이 독소를 생성하는 11주의 *Microcystis*로부터 *mcy* 유전자의 증폭을 성공하였다. 20개의 국내호수 시료에 각 primer쌍에 의한 증폭 여부를 확인한 결과, TOX2P-TOX2F primer쌍을 사용한 경우에만 모든 호수 시료에서 증폭된 산물을 관찰할 수 있었다. 본 연구 결과 TOX2P-TOX2F primer쌍이 국내 환경에서 독소를 생산하는 *Microcystis*를 검출하는데 가장 우수한 primer임을 확인할 수 있었다. 또한 *Microcystis aeruginosa* NIER10010의 *mcy* 유전자의 염기서열 분석을 통해 국내 분리 균주의 유전적 다양성을 확인할 수 있었다.

**Key words** □ cyanobacteria, *mcy* gene, *microcystin*, *Microcystis*, PCR

국내 대형 인공호를 비롯한 상수원 저수지에서는 부영양화에 따른 피해가 심각해지고 있다. 호수의 부영양화로 인해 cyanobacteria가 대량증식하는 현상을 녹조(綠潮)현상이라 한다. 대청호와 낙동강에서는 녹조현상이 심해져서, 사회문제까지 확대되고 있다. 녹조현상이 일어난 호수에서 가장 흔히 출현하는 cyanobacteria는 *Microcystis*와 *Anabaena*로 알려져 있고, 특히 국내 대부분의 호수에서는 *Microcystis* 속의 종들이 우점한다고 알려져 있다(1).

Cyanobacteria는 alkaloids, polypeptides, nonribosomal peptides 등과 같은 여러 종류의 이차대사산물을 생산하는데, 그 중 일부는 고등동물에게 독소로 작용하기도 한다. 특히 *Microcystis* 등과 같은 cyanobacteria는 먹물의 위생안전성을 위협하는 독소를 생산하는데, *microcystin*, *nodularin*, *saxitoxin*, *anatoxin*, *cylindrospermopsin* 등은 구조적으로 다양하며 간과 신경계에 영향을 끼친다(38).

Cyanobacteria는 동물성 플랑크톤에게 포식 당하지 않기 위하여 독소를 분비하는 것으로 알려져 있다(6). 국내에서도 소양호에서 *Anabaena*가 우점할 때, 동물플랑크톤의 섭식이 조류를 먹는 algaevore에서 세균을 먹는 bacteriovore로 섭식 형태가 바뀌는 것이 확인되었고, 최근 연구에서는 *Microcystis*의 배양액을 넣

어준 수조에서, 동물플랑크톤의 여과 섭식 속도가 현격히 떨어지는 것을 확인하였다(30). Cyanobacteria에 의해 생산되는 독소의 역할은 동물성 플랑크톤의 섭식 작용에 대해 방어하기 위한 것이라는 견해 뿐만 아니라(6), 인체 내에서 수많은 protein kinase와 상호 작용하는 protein phosphatase의 활성을 억제함으로써 질병을 야기하는 것으로도 알려져 있다(7). 또한 간에서 활성산소종을 생성하는 것이 독성효과와 관련이 있다는 보고도 있다(8).

최근까지도 세계 각국의 많은 호수에서 cyanobacteria에 의한 독성피해가 보고되고 있다. 1995년 벨기에에서는 *Microcystis aeruginosa*가 우점하는 지역에서 *microcystin*이 검출되었으며 야생 조류의 죽음을 초래하였다(37). 일본에서도 1995년 여름에 *M. aeruginosa*의 bloom이 발생한 연못에서 많은 야생조류가 *microcystin* 때문에 갑자기 폐죽음을 당한 사례가 보고되었다(14). 호주의 Darling River는 유속이 느린 부영양 상태의 하천으로서 많은 cyanobacteria가 발생하고, 이 물을 마신 가축이 1,600마리나 죽은 사례도 있다. 포르투갈에서도 1990년도부터 음용수로 이용되는 수자원에서 *microcystin* 등의 cyanobacteria 독소에 의한 오염이 관측되었으며, 수생 생물의 먹이사슬을 통하여 생물학적 농축이 진행되며 인간에게까지 위협적인 영향을 줄 수 있다고 보고되었다(36). 특히 1996년에 브라질의 Caruaru 지방에서는 cyanobacteria가 번성한 물을 공급받은 병원에서 이 물을 신장투석에 사용함으로써 55명의 환자가 사망하는 사고가 발생한 바 있다(31).

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: (043) 261-3261, Fax: (043) 264-9600  
E-mail: donghun@chungbuk.ac.kr

국내에서도 김 등에 의해서 1996년과 1997년에 전국 주요 호수의 microcystin 함량이 조사되었다(1). HPLC와 bioassay를 이용하여 조사한 결과, microcystin-RR 함량이 0.3~13.3 µg/L, microcystin-YR 함량이 0.03~1.3 µg/L, microcystin-LR 함량이 0.1~11.9 µg/L으로 나타났으며, 조사호수에서 대부분 microcystin이 검출되었다. 세계보건기구(WHO)에서는 최근에 음용수에서 microcystin-LR의 허용농도 가이드라인으로 1 µg/L(ppb)를 제시한 바 있다(38).

Cyanobacteria에 의한 독성물질의 확인에는 HPLC를 이용한 화학적 분석방법(11)과 ELISA와 같은 면역학적 방법(2, 15, 16), 그리고 쥐를 이용한 독성검사 방법(10) 등이 많이 사용되고 있다. 그러나 쥐를 이용한 독성검사 방법은 시간과 경제적인 측면에서 문제점이 많기 때문에 쥐 대신에 아프리카 매뚜기를 이용한 독성검사 방법이 제시되기도 하였다(12). 또한 최근에는 microcystin을 검출하기 위해 protein phosphatase inhibition assay 방법이 도입되고 있다(2, 25).

그러나 분자생물학적인 방법을 이용하면 더욱 빠르고 효율적이며 정확한 검사가 가능하다. 초기 분자생물학적 접근은 16S rRNA 유전자(18, 27), 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region(19, 26), phycocyanin intergenic spacer region(21), random amplified polymorphic DNA(20, 22), repetitive DNA elements(3, 33) 등을 분석하였다. 하지만, 이러한 분석들은 *Microcystis*의 계통분류학적 정보만을 제공할 뿐, 독소 생성 능력에 따른 균주의 구별은 불가능하다. 하나의 속 또는 종이 독소를 생성하는 균주와 생성하지 못하는 균주를 모두 포함하고 있기 때문이다(4, 34).

최근 microcystin synthetase 유전자에 대한 PCR 및 염기서열 분석을 통한 연구에서 독소를 생성하는 *Microcystis* 균주는 *mcy* 유전자를 갖고 있음이 보고되었다(23, 24). *mcy* gene cluster는 두 개의 operon (*mcyABC*와 *mcyDEFGHIJ*)에 10개의 open reading frame을 암호화하는 55 Kb의 유전자로 구성되어 있다(35).

Nishizawa 등은 *M. aeruginosa* K139의 *mcyABC* 유전자 염기서열을 분석하였다(24). *mcyABC* 유전자는 activation, thiolation, modification, condensation에 관련된 module로 구성되어 있다. *mcyA* 유전자는 *N*-methylation domain과 epimerization domain을 포함하는 두 개의 module로 구성되어 있고, *mcyB* 유전자와 *mcyC* 유전자는 각각 두 개의 module과 하나의 module로 구성되어 있음이 밝혀졌다. 따라서, *mcy* 유전자를 선택적으로 증폭함으로써 특정 시료 내에 독성물질을 생산하는 *Microcystis*의 존재 유무를 확인할 수 있다.

본 연구에서는 *mcyABC* 유전자를 특이적으로 증폭한다고 이미 보고된 7종의 primer쌍(Table 1)을 대상으로, 국내 호수에서 독소를 생산하는 *Microcystis*를 검출하는데 가장 유용한 primer쌍을 평가하기 위한 실험을 하였다. 이들 primer는 5'-비번역 부위와 *mcyA* 유전자의 일부분을 증폭시키는 NSZW2-NSZW1 primer쌍(24)과 *N*-methylation domain을 증폭시키는 MSF-MSR primer쌍(34), *mcyB* 유전자의 adenylation domain을 증폭시키는 4종의 primer쌍(9, 13, 17), 그리고 *mcyC* 유전자의 adenylation domain을 증폭시키는 FP-RP primer쌍(24)을 포함하고 있다. 본 연구의 의의는 다음과 같다. 첫째, *mcyABC* 유전자에 특이적인 다수의 primer쌍들이 개발되었으나, 아직까지 이들 primer쌍 중 어떠한 것이 독소를 생산하는 *Microcystis*를 검출하는데 가장 우수한지 비교, 평가된 바가 없다. 둘째, 이미 보고된 primer쌍들은 국외 균주를 대상으로 하였기 때문에 지리적으로 매우 다른 곳에 위치하는 국내 호수의 균주들에서도 동일한 효과를 보일 것인지 검토가 필요하다. 셋째, 국내 호수에서 독소를 생산하는 *Microcystis*를 검출하는데 우수한 primer쌍이 확인된다면, 이 primer쌍을 이용한 분자생물학적 방법을 통해 국내 호수의 microcystin 오염을 방지하기 위한 연구에 활용될 것으로 생각한다.

**Table 1.** List of PCR primers for *mcyABC* gene amplification

Primer		Product (bp)	Sequence (5' → 3')	Annealing Temp.	References
Name	Direction				
NSZW2	F	202	GTCGGGTTTCCTGTAGTTC	55°C	Nishizawa <i>et al.</i> , 1999
NSZW1	R		CTTGAAGTTGCCGAATTTGG		
MSF	F	1,369	ATCCAGCAGTTGAGCAAGC	60°C	Tillett <i>et al.</i> , 2001
MSR	R		TGCAGATAACTCCGCAGTTG		
TOX1P	F	1,500	GATTGTTACTGATACTCGCC	61°C	Dittmann <i>et al.</i> , 1999
TOX1F	R		TAAGCGGGCAGTTGCTGC		
TOX2P	F	355	GGAACAAGTTGCACAGAATCCGC	66°C	Dittmann <i>et al.</i> , 1999
TOX2F	R		CCAATCCCTACTAAACACAGTAACTCGG		
TOX4F	F	1,313	GGATATCCTCTCAGATTCGG	50°C	Kurmayer <i>et al.</i> , 2002
TOX4R	R		CACTAACCCCTATTTTGGATACC		
FAA	F	759	CTATGTTATTTATACATCAGG	50°C	Neilan <i>et al.</i> , 1999
RAA	R		CTCAGCTTAACCTGATTATC		
FP	F	693	CAGTCTGAAGGCGATGCG	58°C	Nishizawa <i>et al.</i> , 1999
RP	R		CTGTAGGGTAAGAGGGGGT		

## 재료 및 방법

### 표준 균주

국내와 일본에서 분리되어 microcystin 생성 균주로 알려진 *Microcystis* 속 11 균주와 microcystin을 생성하지 않는 *Microcystis* 속 5 균주, 그리고 *Anabaena mactospora* NIER10016을 대상으로 실험하였다(Table 2). 표준 균주는 BG-11 배지(Blue-green medium)에서 2,000 lux 광량의 조건으로 25°C에서 일주일 이상 배양한 후 핵산을 추출하였다.

### 국내 호수 시료 채취

2001년 7-9월과 2002년 10월 세 번에 걸쳐 녹조 현상이 발생한 전국 18곳의 호수를 실험 지역으로 선정하여 phytoplankton net (35 µm mesh size)를 이용하여 20개의 시료를 채취하였다(Table 3). 녹조가 심한 각 호수의 표층(0-30 cm)에서 각 조사구 내의 3개 지점을 무작위로 채집하여 실험실에 냉장 상태로 운반하였다.

### 핵산 추출

표준 균주 및 호수 시료로부터 핵산을 추출하기 위하여 Rochelle 등(32)의 방법을 변형하여 이용하였다. 현장 시료는 직접 DNA를 추출하기 위하여 고속원심분리기(14,000×g) 또는 Sterivex-GV filter (Millipore, Billerica, USA)를 사용하여 농축하였다. 농축된 균이 들어있는 tube에 lysozyme buffer (150 mM NaCl, 100 mM EDTA, 15 mg/ml lysozyme, pH 8.0) 0.3 ml를 넣고, 37°C 항온 중탕기 속에서 1시간 동안 반응시켰으며 15분 간격으로 흔들어 침전된 시료를 용액과 섞어주었다. SDS solution (100 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl, pH 8.0, SDS 4%) 0.3 ml를 첨가하여 65°C에서 15분 동안 반응시킨 후, -70°C에서 얼리고, 65°C에서 녹이는 과정을 3회 반복하였다. 동량의 phenol (Tris-buffered, pH 8.0)을 처리한 후, phenol: chloroform: isoamylalcohol(25:24:1), chloroform: isoamylalcohol(24:1)을 순서대로 각 1회 처리하였다. 상층액을 취하여 동량의 냉 isopropanol 과 sodium acetate(최종 농도 0.3 M)를 첨가하고 -20°C에서 12시간 이상 방치하여 핵산을 침전시켰다. 원심분리(14,000×g, 15 min)한 후, 에탄올로 세척하고, 건조시켜 DNA pellet을 얻었다. 호수 시료와 표준 균주로부터 추출된 핵산은 UltraClean™ DNA Purification kit (Mo Bio, Solana Beach, USA)로 정제하였다. 정제된 핵산은 TE 완충용액(100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)으로 녹인 후, 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였으며 -20°C에서 보관하였다.

### mcycABC 유전자의 PCR 증폭 및 염기서열 분석

문헌조사를 통해서 확인된 7종의 primer쌍(Fig. 1)으로 표준 균주와 호수 시료에서 추출된 핵산을 각각의 PCR 반응 조건(Table 1)에 따라 mcycABC 유전자 부분을 증폭하였다. 7종의 primer쌍 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BLAST search program을 이용하여 GenBank database와 비

교하여 *Microcystis*의 mcycABC 유전자만을 특이적으로 증폭할 수 있는지 확인하였다.

PCR 반응물의 조성은 1× 반응용액(100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 µg/ml BSA, pH 8.3), 200 µM dNTPs, 0.1 µM primer, 정제된 주형 DNA(10~100 ng/µl)와 1.5 unit의 Taq polymerase를 첨가하여 총 50 µl의 혼합물을 만들었다. PCR 반응조건은 95°C에서 3분간 초기 열 처리한 후, 95°C에서 30초, 각 primer쌍의 결합 온도에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

염기서열을 분석하기 위해 NSZW2-NSZW1과 TOX2P-TOX1F primer쌍으로 증폭된 각각의 *M. aeruginosa* NIER10010 PCR 산물을 pGEM-T vector (Promega, Madison, USA)에 ligation 한 후 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켜, ampicillin (50 µg/ml)이 포함된 LB agar plate에서 blue-white colony 선별법에 의해 recombinant 클론을 선별한 후, BaseStation™ DNA Fragment Analyzers (MJ Research, Waltham, USA)로 염기서열을 분석하였다. NCBI의 BLAST search program을 이용하여 DNA database와 유사한 서열을 비교하였다.

### Microcystin 검출

High-pressure liquid chromatography (HPLC)와 indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 사용하여 국내 호수의 microcystin을 검출하였다.

HPLC를 이용한 분석을 위해, 채취된 시료를 동결 건조 병에 옮겨 냉동시킨 후 동결건조기(Freeze Dryer, 일신엔지니어링, 서울, 한국)를 이용하여 냉동온도 -40°C 이하, 진공압력 50 µmHg 이하 상태에서 시료가 완전히 동결건조 될 때까지 건조한 후 각 시료의 양을 정확히 측정하여 10% acetic acid 15 ml에 현탁하여 추출하였다. 추출과정을 2회 반복하여 얻어진 상등액을 methanol 과 증류수로 세정 처리한 C<sub>18</sub> Sep-pak cartridge에 통과시켜 microcystin을 흡착시킨 후 100% methanol로 고상추출하였다. 회수된 methanol을 회전증발기로 완전히 증발시킨 후 용기에 부착된 물질을 methanol 2 ml에 용해한 후, 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다. HPLC는 LC-10A system model (Simadzu, Kyoto, Japan)을 사용하였고, column은 Shim-park CLS-ODS (6.0×15 cm)에 연결하여 20 µl씩 시료를 주입하였다. Mobile phase로 methanol: 0.05 M phosphate buffer (58:42)에 혼합하여 사용하였다. Flow rate는 1.0 ml/min로 하였고, UV detector를 이용하여 238 nm에서 측정하였다.

Indirect competitive ELISA 방법을 사용하여 microcystin을 검출하기 위해 Imjet® PharmaLink Immunogen Kit (Pierce, Rockford, USA)를 사용하여 Microcystin-LR (MCLR)과 BSA (Bovine Serum Albumin)를 결합시켰다. Microtiter plate에 MCLR-BSA를 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 희석하여 50 µl씩 넣고, 37°C incubator에서 두 시간 동안 방치하여 코팅한 후 washing buffer (0.5% Tween20)로 세척하였다. Anti-MCLR

항체와 MCLR의 혼합액을 넣고, 37°C에서 한 시간 동안 방치한 후 세척하였다. Alkaline phosphatase로 표지된 Goat Anti-Mouse IgG (2차 항체)를 넣고, 37°C에서 한 시간 동안 방치한 후 세척하였다. 1.0 mg/ml의 p-NPP (para-Nitrophenylphosphate)를 100 µl씩 넣고 실온에서 방치하여 30분 후에 microplate reader (Benchmark, Bio-Rad, Hercules, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**표준 균주를 이용한 primer 평가**

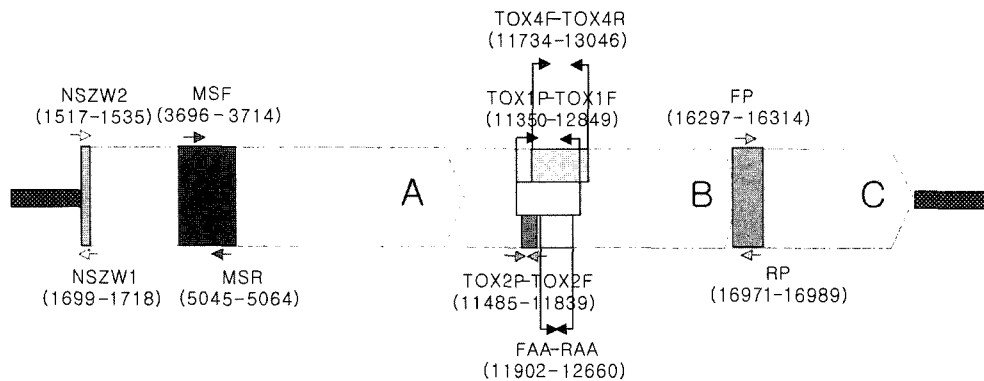
Polymerase chain reaction (PCR)에 기초한 방법은 독소를 생

산하는 cyanobacteria를 분석하는데, 현미경을 통한 관찰이나 mouse bioassay와 같은 방법들보다 간단하고, 효과적이다(5, 28). 본 연구에서는 PCR을 수행하여 국내 호수 내에 microcystin을 생성하는 *Microcystis*의 존재 유무를 알아보기 위해, 이미 보고된 *mcvABC* 유전자를 특이적으로 증폭시키는 7종의 primer쌍을 평가하였다(Table 1). 이들 primer는 *mcvA* 유전자의 일부분을 증폭시키는 2종의 primer쌍과 *mcvB* 유전자의 일부분을 증폭시키는 4종의 primer쌍, 그리고 *mcvC* 유전자의 일부분을 증폭시키는 1종의 primer쌍을 포함하고 있다(Fig. 1). 모든 primer쌍의 염기서열은 NCBI의 BLAST search program을 이용하여 GenBank database와 비교, 검색하였다. 그 결과 7종의 primer쌍 모두 micro-

**Table 2.** PCR results of 17 cyanobacterial strains amplified with 7 primer sets

Strain	Origin	PCR products amplified with primers							MC <sup>1</sup>
		<i>mcvA</i>		<i>mcvB</i>				<i>mcvC</i>	
		NSZW2 NSZW1	MSF MSR	TOX1P TOX1F	TOX2P TOX2F	TOX4F TOX4R	FAA RAA	FP RP	
<i>M.aeruginosa</i> KNU	Korea	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>M.aeruginosa</i> NIER10001	Korea	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>M.aeruginosa</i> NIER10010	Korea	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>M.aeruginosa</i> NIER10038	Korea	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>M.aeruginosa</i> NIER10039	Korea	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>M.aeruginosa</i> PUCC1117	Korea	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>M.aeruginosa</i> TAC12	Japan	ND	+	-	+	ND	+	+	+
<i>M.aeruginosa</i> PAC17	Japan	ND	+	-	+	ND	+	+	+
<i>M.aeruginosa</i> PAC18	Japan	ND	+	-	+	ND	+	+	+
<i>M.viridis</i> TAC17	Japan	ND	+	-	+	ND	-	+	+
<i>M.viridis</i> TAC18	Japan	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>A.mactospora</i> NIER10016	Korea	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M.ichthyoblabe</i> NIER10045	Korea	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M.ichthyoblabe</i> TAC125	Japan	ND	-	-	-	ND	-	-	-
<i>M.nocacekii</i> NIER10029	Korea	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M.viridis</i> PUCC1002	Korea	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M.weseribergii</i> PUCC1113	Korea	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup>MC, Production of microcystin as determined by ELISA and HPLC test.  
+, positive; -, negative; ND, not determined.



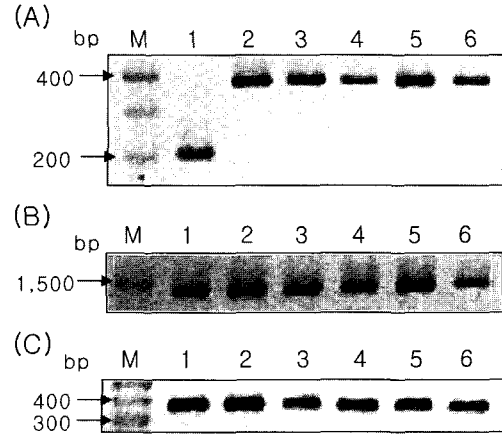
**Fig. 1.** Locations of 7 primer sets for *mcvABC* gene amplification. The number is based on the sequence of *M. aeruginosa*, GenBank Accession No. AB019578.

cystin을 생산하면서 이미 염기서열이 밝혀져 있는 *Microcystis*의 *mcyABC* 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있음을 알 수 있었다.

NSZW2-NSZW1 primer쌍은 5'-비번역 부위와 58 bp의 *mcyA* 유전자를 증폭하는 primer쌍으로, Nishizawa 등은 NSZW1과 NSZW2 각각의 primer를 사용하여 primer extension 분석을 한 결과, *mcy* 유전자의 발현이 빛에 의존한다는 것을 규명하였다(24). 그러나, 이전의 연구들에서는 microcystin을 생성하는 균주를 검출하기 위한 목적으로 이 primer쌍을 사용한 PCR을 수행한 바가 없다. 본 연구에서는 NSZW2-NSZW1 primer쌍에 의한 표준 균주의 *mcyA* 유전자를 증폭하였고, 그 결과 microcystin을 생성하는 *Microcystis*만이 특이적으로 증폭되는 것을 관찰할 수 있었다(Table 2). 그러나, *M. aeruginosa* KNU 균주와 일본 균주인 *M. viridis* TAC18만이 예상 크기의 PCR 산물을 형성하였고, 나머지 국내의 5 균주에서는 PCR 증폭 산물의 예상 크기보다 200 bp 가량이 더 큰 PCR 산물을 형성하였다(Fig. 2). 국내 균주 중 *M. aeruginosa* NIER10010의 염기서열을 분석한 결과(Fig. 3), 이전의 연구(24)에서 Shine-Dalgarno (SD) 서열이라 예상하였던 부위와 개시코돈의 사이에 178 bp 크기의 서열이 삽입되어 있었다. 따라서 국내 호수에 존재하는 microcystin 생성 균주의 외국에서 보고된 균주와 다름을 확인할 수 있었다. 삽입 서열에 새로운 프로모터 또는 리보솜 부착서열 등이 위치할 가능성이 있으나, 개시코돈의 88 bp 앞에서 SD 서열과 유사한 부위만을 확인할 수 있었다. 국내 균주에서 발견된 삽입서열과 *mcyA* 유전

자의 발현 및 microcystin의 독성에 대한 상호관계에 대하여 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Tillett 등은 *mcyA* 유전자의 *N*-methyltransferase domain을 사용하여 MSF-MSR primer쌍을 개발하였고, 독소를 생성하는 *Microcystis*를 검출하는데 좋은 탐침임을 증명한 바 있다(34). 본

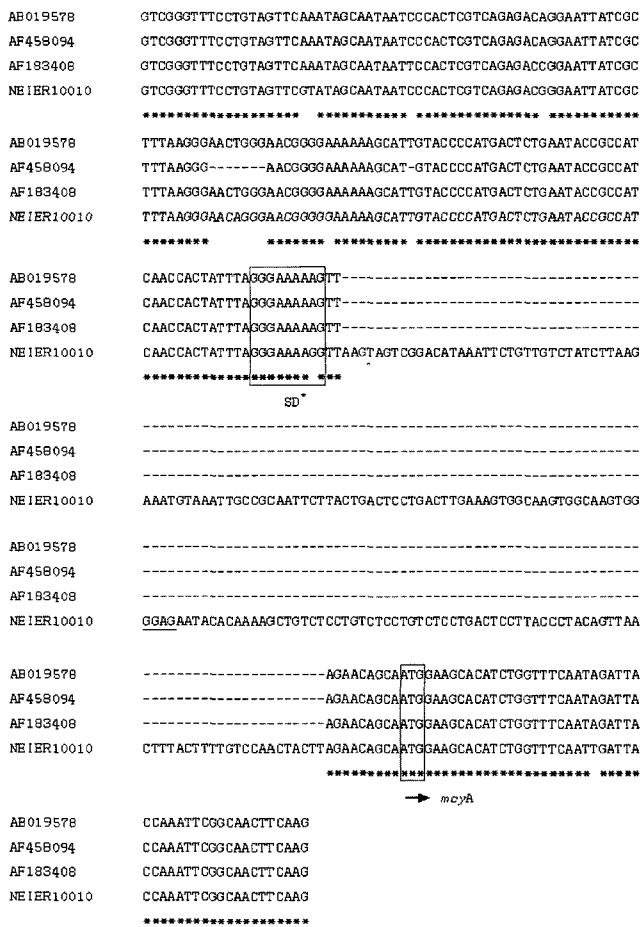


**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis of the *mcy* gene fragments amplified with (A) NSZW2-NSZW1, (B) MSF-MSR, (C) TOX2P-TOX2F primers from cyanobacterial strains. Lane: M, 100 bp ladder; 1, *M. aeruginosa* KNU; 2, *M. aeruginosa* NIER10001; 3, *M. aeruginosa* NIER10010; 4, *M. aeruginosa* NIER10038; 5, *M. aeruginosa* NIER10039; 6, *M. aeruginosa* PUCC1117.

**Table 3.** PCR results of 20 environmental samples amplified with 7 primer sets

Lake	Date	PCR products amplified with primers							MC <sup>1</sup>
		<i>mcyA</i>		<i>mcyB</i>				<i>mcyC</i>	
		NSZW2 NSZW1	MSF MSR	TOX1P TOX1F	TOX2P TOX2F	TOX4F TOX4R	FAA RAA	FP RP	
Keumma (Iksan)	01/07	ND	+	-	+	ND	+	-	+
Namil (Jeonju)	01/07	ND	+	-	+	ND	+	+	+
Dunpo (Asan)	01/07	+	+	-	+	+	+	+	-
Daechong (Cheongwon)	01/07	ND	+	-	+	ND	+	+	+
Baegkok (Jincheon)	01/07	ND	+	-	+	ND	+	+	ND
Cheongyang (Cheongyang)	01/07	ND	+	-	+	ND	+	+	-
Chungju (Chungju)	01/09	ND	+	-	+	ND	+	+	+
Paro (Hwacheon)	01/08	ND	+	-	+	ND	+	+	+
Paldang (Namyangju)	01/07	ND	+	-	+	ND	+	+	ND
Yanggu (Yanggu)	01/08	ND	+	-	+	ND	-	+	+
Kyungcheon (Mungyeong)	02/10	+	-	-	+	-	+	+	+
Daechong (Cheongwon)	02/10	+	-	-	+	-	-	+	+
Shingal (Yongin)	02/10	-	-	-	+	-	-	+	ND
Asan (Asan)	02/10	+	-	-	+	-	+	+	+
Andong (Andong)	02/10	+	-	-	+	-	-	+	+
Wanggung (Iksan)	02/10	+	-	-	+	-	+	+	+
Yongdam (Yongin)	02/10	+	-	-	+	-	-	-	+
Kongi (Chuncheon)	02/10	-	-	-	+	-	-	-	+
Chungju (Chungju)	02/10	+	-	-	+	-	-	-	+
Hoengseong (Hoengseong)	02/10	-	-	-	+	-	-	-	+

<sup>1</sup>MC, Detection of microcystin as determined by ELISA and HPLC test. +, positive; -, negative; ND, not determined.



**Fig. 3.** Alignment of *mcvA* gene sequences amplified with NSZW2-NSZW1 primers from *M. aeruginosa* NIER10010 and homologous sequences of other strains. AB019578, *M. aeruginosa* (Japan); AF458094, *M. aeruginosa* (USA); AF183408, *M. aeruginosa* (Australia); NIER10010, *M. aeruginosa* (Korea). Putative Shine-Dalgarno sequence and start codon are indicated under the nucleotide sequence (Nishizawa *et al.*, 1999, *J. Biochem.*, 126, 520-529).

연구에서도 MSF-MSR primer쌍을 이용하여 표준 균주를 PCR한 결과, 독소를 생성하는 *Microcystis*에서만 1,369 bp의 PCR 산물을 형성하여 좋은 primer쌍임을 보여주었다(Fig. 2).

Dittmann 등은 *mcvB* 유전자의 adenylation domain을 특이적으로 증폭시키는 TOX1P-TOX1F와 TOX2P-TOX2F primer쌍을 개발하였고, microcystin의 생산과 *mcvB* 유전자 존재사이의 연관성을 보여주었다(9). Pan 등은 TOX1P-TOX1F와 TOX2P-TOX2F primer쌍 모두 *Microcystis* 중 독소를 생성하는 균주와 그렇지 않은 균주를 구별하기 위한 매우 좋은 primer쌍임을 밝힌 바 있고(29), 이 primer쌍을 사용하여 환경시료로부터 독소를 생성하는 균주를 빠르고, 효과적으로 검출할 수 있다고 보고하였다(28). 그러나, 본 연구에서 TOX1P-TOX1F primer쌍을 이용해 표준 균주를 PCR한 결과, 모든 *Microcystis*에서 1.5 Kb의 PCR 산물을 관찰할 수 없었다(Table 2). BLAST search 결과 primer의 염기서열에는 문제가 없었기 때문에, 이는 실험조건의 최적화 문제 또

는 국내와 일본 균주가 외국의 균주와 다른 염기서열을 갖기 때문으로 생각된다. 그러나, microcystin을 생성하지 못하는 *A. mactospora* NIER10016에서 700 bp 정도의 band가 나타났기 때문에, PCR 조건을 알맞게 조정한다 하여도 TOX1P-TOX1F primer쌍은 국내 균주에는 적합하지 않다고 생각된다.

반면, TOX2P-TOX2F primer 쌍을 이용하였을 경우는 선행의 연구에서처럼 microcystin 생성 균주에서만 355 bp의 PCR 산물이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). Pan 등의 연구에서도 TOX1P-TOX1F primer쌍보다 TOX2P-TOX2F primer쌍이 독소 생성 균주를 검출하는데 더 효과적임을 설명하였다(28).

Kurmayer 등은 현장 시료에서 microcystin을 생산하는 *Microcystis*만을 분리하기 위해 *mcvB* 유전자의 adenylation domain을 특이적으로 증폭하는 primer쌍을 개발하였다(13). 이 TOX4F-TOX4R primer쌍을 이용하여 표준 균주의 PCR 증폭결과, *M. aeruginosa* NIER10010을 제외한 모든 독소를 생성하는 *Microcystis*에서 1.3 Kb의 PCR 산물을 관찰할 수 있었다(Table 2). *M. aeruginosa* NIER10010의 *mcvB* 유전자 일부분의 염기 서열을 분석한 결과 TOX4F primer 부위는 100% 서열이 일치함을 확인할 수 있었고, 이 균주가 TOX4F-TOX4R primer쌍에 의해서 증폭되지 않은 이유는 TOX4R primer 부위의 불일치에 있었다고 생각된다.

Neilan 등이 보고한 연구결과에 의하면 FAA-RAA primer쌍은 독성물질 생산하는 넓은 범위의 cyanobacteria를 검출하는데 매우 유용하다고 한다(17). BLAST search program을 사용한 primer의 평가 결과도, 이 primer쌍에 의해 microcystin을 생성하는 다양한 cyanobacteria 속들이 검출되는 것을 볼 수 있었다. 그러나, 국내 호수에서 microcystin을 생성하는 주요 균주는 *Microcystis*이기 때문에(1), RAA primer의 중간에 하나의 염기(T)를 다른 염기(C)로 바꾸어서 *Microcystis*만이 증폭되도록 수정하였다. RAA primer를 수정하지 않는다면 microcystin을 생성하는 다양한 cyanobacteria의 검출은 가능하나, *Microcystis*만을 증폭하지는 못하고, 독소를 생성하지 않는 다른 균주에서도 증폭산물이 관찰된다는 단점이 있다(17, 34). 그러나, 독성 *Microcystis*만을 검출하기 위해 RAA primer를 수정한 본 연구의 결과, 선행의 연구와는 달리 microcystin을 생성하지 못하는 균주에서는 PCR 산물을 형성하지 않았다. 반면, 국내 균주 중에서 microcystin을 생성하는 균주인 *M. aeruginosa* NIER10010와 일본 균주인 *M. viridis* TAC17의 경우 FAA-RAA primer쌍을 사용한 *mcvB* 유전자 증폭을 실패하였다(Table 2). *M. aeruginosa* NIER10010의 *mcvB* 유전자의 일부를 서열 분석한 결과 FAA primer 부위는 100% 일치하였던 반면, RAA primer 부위는 수정한 부위를 포함하여 중간에 2 bp 정도 서열이 불일치를 볼 수 있었다. 그러므로, 국내와 일본의 일부 균주에서 FAA-RAA primer쌍을 사용한 PCR 증폭이 실패한 것은 RAA primer 부위 서열의 다양성 때문이라고 생각된다.

FP-RP primer쌍은 *mcvB* 유전자의 3'-말단과 *mcvC* 유전자의 5'-말단을 포함하는 693 bp의 절편을 증폭한다. Nishizawa 등은 *mcvB*와 *mcvC* 유전자 사이에 overlapping 되어있는 이 부위가

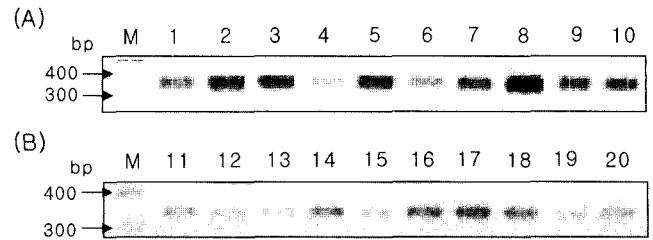
*M. aeruginosa* 균주들 사이에서 매우 잘 보존되어 있다고 보고하였다(24). 본 연구에서 FP-RP primer쌍을 사용하여 표준 균주를 PCR 증폭한 결과, FAA-RAA primer쌍과 마찬가지로 microcystin 생산하는 일부 균주(*M. aeruginosa* NIER10039)의 *mcy* 유전자를 증폭하지 못했다(Table 2). 또한, microcystin을 생산하지 못하는 cyanobacteria에서 다양한 크기의 PCR 산물들이 증폭되는 것을 볼 수 있었다. 이는 FP-RP primer쌍이 *mcyC* 유전자에만 특이적으로 결합하지는 않는다는 것을 보여준다. Tillett 등도 이 부위는 독소를 생성하지 못하는 균주에서 자주 나타나기 때문에 이들 primer의 사용은 일부 독소를 생성하지 않는 균주에서 비선택적인 증폭을 유도한다고 보고하였다(34).

17주의 표준 균주를 사용해 *mcyABC* 유전자에 특이적인 7종의 primer쌍을 평가한 결과, *mcyA* 유전자의 *N*-methyltransferase domain을 증폭시키는 MSF-MSR primer쌍과 *mcyB* 유전자의 adenylation domain을 증폭시키는 TOX2P-TOX2F primer쌍만이 microcystin을 생성하는 *Microcystis* 유전자를 선택적으로 증폭하는데 성공하였고, 이들 primer쌍이 *mcy* 유전자를 증폭하는데 가장 우수한 primer쌍임을 확인할 수 있었다(Table 2). 또한 국내 균주인 *M. aeruginosa* NIER10010의 염기서열 분석 결과, NSZW2와 NSZW1 primer쌍에 의해 증폭되는 부위와 TOX1P, TOX4R, RAA primer 부위의 염기서열이 국외균주와 다름을 확인할 수 있었고, 이러한 결과는 60종 이상의 microcystin이 존재하는 것만큼 *mcy* 유전자의 염기서열에서도 다양성이 존재한다는 것을 뒷받침해주고 있다.

#### 호수 시료를 이용한 primer 평가

호수 시료에 PCR 방법을 적용하여 각 primer쌍에 의한 증폭 여부를 확인하였다(Table 3). 그 결과, 2001년 7~9월에 채집한 호수시료의 경우, MSF-MSR과 TOX2P-TOX2F primer쌍을 사용하였을 때, 모든 호수시료에서 증폭된 산물을 관찰할 수 있었다. 그러나, 2002년 10월에 채집한 시료의 경우, TOX2P-TOX2F primer쌍에 의해서만 모든 시료에서 증폭된 산물을 관찰할 수 있었다. 표준 균주로 실험하였을 때, 가장 우수하게 평가되었고, 2001년 7~9월에 채집한 호수 시료로 실험하였을 때, 모든 호수 시료에서 PCR 산물의 형성을 유도했던 MSF-MSR primer쌍의 경우 2002년 10월 시료를 대상으로 했을 때, PCR 산물을 하나도 형성하지 않았다. TOX1P-TOX1F primer쌍과 TOX4F-TOX4R primer쌍에 의해서도 역시 PCR 증폭을 실패하였다. NSZW2-NSZW1와 FAA-RAA, 그리고 FP-RP primer쌍은 호수 시료를 주형으로 PCR 반응을 실시하였을 때, 일부 시료에서 PCR 산물을 얻을 수 없었다. 일부 시료에서 증폭이 안 되었다는 것은 이들 시료의 cyanobacteria 군집이 양성 결과를 나타낸 다른 국내 호수 시료들과 차이가 있으며, 표준 균주로 primer의 평가시 일부 primer를 이용한 PCR에서 생성물이 검출되지 않았던, *M. aeruginosa* NIER10010과 *M. aeruginosa* NIER10039와 유사한 *mcy* 유전자를 포함하고 있는 cyanobacteria가 우점할 가능성이 있다.

호수 시료의 PCR 결과 시료 채취시기에 따라 다른 증폭 양상을 보였다. 녹조현상이 심하게 일어나는 7~9월에 채집한 시료의



**Fig. 4.** Agarose gel electrophoresis of the *mcyB* gene fragments amplified with TOX2P-TOX2F primers from the environmental samples. Lane: M, 100 bp ladder; 1, Keumma; 2, Namil; 3, Dunpo; 4, Daecheong; 5, Baegkok; 6, Cheongyang; 7, Chungju; 8, Paro; 9, Paldang; 10, Yanggu; 11, Kyungcheon; 12, Daecheong; 13, Shingal; 14, Asan; 15, Andong; 16, Wanggung; 17, Yongdam; 18, Kongji; 19, Chungju; 20, Hoengseong. (A) Sampling date is Jun.-Sep., 2001; (B) Sampling date is Oct., 2002.

경우는 표준 균주 PCR시 증폭을 실패한 TOX1P-TOX1F primer쌍을 제외한 6종의 primer쌍에 의해 거의 모든 시료에서 PCR 증폭이 성공하였다. 반면, 물론 시료 채취 년도의 차이가 있으나, 녹조현상이 줄어드는 시기인 10월에 채집한 시료의 경우는 TOX2P-TOX2F primer쌍을 사용한 경우를 제외하고는 거의 모든 시료에서 PCR 증폭을 실패하였다. Baker 등(4)은 분자생물학적 방법으로 cyanobacterial bloom의 독성변화를 모니터링한 결과, 녹조 현상이 진행되는 동안에 cyanobacteria의 세포유형과 독성이 변함을 보고한 바 있다. 또한, Oh 등(25)은 대청호의 계절에 따른 microcystin 농도 변화를 측정된 결과, 8월부터 10월 초까지 매우 크게 증가하였다가 그 이후로 크게 감소하는 경향을 보였다고 보고하였다. 이와 같이 10월 시료의 PCR 증폭을 실패한 이유는 7~9월에 비해 10월경에는 *Microcystis*의 수가 많이 줄어들었고, 호수 시료 안에 cyanobacteria 군집이 변화하였기 때문이라 보여진다. 실제 microcystin 측정에서도 10월 시료의 경우 microcystin 함량이 7~9월 시료에 비해 많이 줄어들었다(자료 미 제시).

HPLC와 ELISA 분석 결과와 PCR 결과를 비교하면, TOX2P-TOX2F primer쌍이 국내 호수의 microcystin 존재 유무를 판별하는데 가장 우수한 primer쌍임을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 둔포와 청양시료의 경우 HPLC와 ELISA 분석을 통해서도 microcystin을 검출할 수 없었던 반면, PCR을 통해서도 microcystin을 검출할 수 있었던 것은 PCR 방법이 매우 민감한 방법이기 때문이라고 생각된다(Table 3).

국내에서 분리 배양된 표준 균주인 *M. aeruginosa* NIER10010, *M. aeruginosa* NIER10039 등의 PCR 결과와 *M. aeruginosa* NIER10010의 염기서열 분석결과를 통해 국내 호수에 서식하는 microcystin 생산 능력이 있는 *Microcystis* 군집은 외국의 균주들과 다른 *mcy* 유전자를 갖고 있음을 알 수 있었다. 또한 외국 균주를 이용하여 개발된 다양한 primer쌍이 국내 호수 환경에 적용하기에는 부적절하다는 것도 알 수 있었다. 따라서 국내 호수를 대상으로 microcystin 생성 균주의 분포를 조사하기 위해서는 *mcy* 유전자의 유전적 다양성에 대한 더 많은 연구가 필요하며,

이를 바탕으로 새로운 primer를 설계한다면 다양한 *mcy* 유전자의 검출이 가능할 것으로 예상된다.

### 감사의 말

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(과제번호: R01-2000-000-00065-0) 지원에 의하여 수행되었습니다. 또, cyanobacteria 균주를 제공하여준 국립환경연구원 관계자와 일본 신슈대학 관계자에게 감사의 뜻을 표합니다.

### 참고문헌

1. 김범철, 김호섭, 박호동, 최광순, 박종근. 1999. 국내 호수에서 발생한 남조류의 microcystin 함량과 독성평가. 한국육수학회지 32, 288-294.
2. An, J. and W.W. Carmichael. 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. *Toxicon* 32, 1495-1507.
3. Asayama, M., M. Kabasawa, I. Takahashi, T. Aida, and M. Shirai. 1996. Highly repetitive sequences and characteristics of genomic DNA in unicellular cyanobacterial strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 137, 175-181.
4. Baker, J.A., B. Entsch, B.A. Neilan, and D.B. McKay. 2002. Monitoring changing toxigenicity of a cyanobacterial bloom by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6070-6076.
5. Baker, J.A., B.A. Neilan, B. Entsch, and D.B. McKay. 2001. Identification of cyanobacteria and their toxigenicity in environmental samples by rapid molecular analysis. *Environ. Toxicol.* 16, 472-482.
6. Falconer, I.R. 1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures, p. 187-209. In *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London.
7. Dawson, J.F. and C.F. Holmes. 1999. Molecular mechanisms underlying inhibition of protein phosphatases by marine toxins. *Front Biosci.* 4, 646-58.
8. Ding, W.X., H.M. Shen, Y. Shen, H.G. Zhu, and C.N. Ong. 1998. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. *Environ. Health Perspect.* 106, 409-413.
9. Dittmann, E., B.A. Neilan, and T. Borner. 1999. Peptide synthetase genes occur in various species of cyanobacteria, p. 615-621. In G.A. Pescheck, W. Loeffelhardt, and G. Schemetterer (ed.), *The Phototrophic Prokaryotes*. Kluwer Academic/Plenum, New York.
10. Falconer, I.R. 1993. Mechanisms of toxicity of cyclic peptide toxins from blue-green algae, p. 177-186. In *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press, London.
11. Harada, K.I., K. Matsuura, M. Suzuki, H. Oka, M.F. Watanabe, S. Oishi, A.M. Dahelm, V.R. Beasley, and W.W. Carmichael. 1998. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 448, 275-283.
12. Hiripi, L., L. Nagy, T. Kalmar, A. Kovacs, L. Voros. 1998. Insect (*Locusta migratoria migratorioides*) test monitoring the toxicity of cyanobacteria. *Neurotoxicology* 19, 605-608.
13. Kurmayer, R., E. Dittmann, J. Fastner, and I. Chorus. 2002. Diversity of microcystin genes within a population of toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in lake Wannsee (Berlin, Germany). *Microb. Ecol.* 43, 107-118.
14. Matsunaga, H., K.I. Harada, M. Senma, Y. Ito, N. Yasuda, S. Ushida, and Y. Kimura. 1999. Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinomiya, Japan: sudden appearance of toxic cyanobacteria. *Nat. Toxins* 7, 81-84.
15. Nagata, S., T. Tsutsumi, F. Yoshida, and Y. Ueno. 1999. A new type sandwich immunoassay for microcystin; production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an anti-microcystin monoclonal antibody. *Nat. Toxins* 7, 49-55.
16. Nagata, S., T. Tsutsumi, A. Hasegawa, F. Yoshida, Y. Ueno, and M. Watanabe. 1997. Enzyme immunoassay for direct detection of microcystins in environmental water. *J. AOAC Int.* 80, 408-415.
17. Neilan, B.A., E. Dittmann, L. Rouhianen, B.R. Amanda, V. Schaub, K. Sivonen, and T. Borner. 1999. Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 181, 4089-4097.
18. Neilan, B.A., D. Jacobs, T.D. Dot, L.L. Blackall, P.R. Hawkins, P.T. Cox, and A.E. Goodman. 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *J. Syst. Bacteriol.* 47, 693-697.
19. Neilan, B.A., J.L. Stuart, A.E. Goodman, P.T. Cox, and P.R. Hawkins. 1997. Specific amplification and restriction polymorphisms of the cyanobacterial rRNA operon spacer region. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 612-621.
20. Neilan, B.A. 1995. Identification and phylogenetic analysis of toxigenic cyanobacteria using a multiplex randomly amplified polymorphic DNA PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2286-2291.
21. Neilan, B.A., 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.
22. Nishihara, H., H. Miwa, M. Watanabe, M. Nagashima, O. Yagi, and Y. Takamura. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses for discriminating genotypes of *Microcystis* cyanobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1067-1072.
23. Nishizawa, T., A. Ueda, M. Asayama, K. Fujii, K. Harada, K. Ochi, M. Shirai. 2000. Polypeptide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. *J. Biochem. (Tokyo)* 127, 779-789.
24. Nishizawa, T., M. Asayama, K. Fujii, K. Harada, and M. Shirai. 1999. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem.* 126, 520-529.
25. Oh, H.M., S.J. Lee, J.H. Kim, H.S. Kim, and B.D. Yoon. 2001. Seasonal variation and indirect monitoring of microcystin concentrations in Daechung reservoir, Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1484-1489.
26. Otsuka, S., S. Suda, R. Ki, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto, and M.M. Watanabe. 1999. Phylogenetic relationship between toxic and nontoxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* 172, 15-21.
27. Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto, and M.M. Watanabe. 1998. 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiol. Lett.* 164, 119-124.
28. Pan, H., L. Song, Y. Liu, and T. Boner. 2002. Detection of hepato-



- toxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. *Arch. Microbiol.* 178, 421-427.
29. Pan, H., L. Song, Y. Liu, Y. Zhu, and L. Lei. 2000. Investigation of target genes by PCR from intact cyanobacteria cells. p. 59-66. *In* Ecotechnology in environmental protection & fresh water lake management. Research Institute of Natural Sciences, PaiChai University.
  30. Park, H.D., B. Kim, E. Kim, and T. Okino. 1998. Hepatotoxic microcystins and neurotoxic anatoxin-a in cyanobacterial blooms from Korean Lakes. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.* 13, 225-234.
  31. Pouria, S., A. Deandrade, J. Barbosa, R.L. Carvalcanti, V.T.S. Barreto, C.J. Ward, W. Preiser, G.K. Poon, G.H. Neild, and G.A. Codd. 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352, 21-26.
  32. Rochelle, P.A., J.C. Fry, R.J. Parkes, and A.J. Weightman. 1992. DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. *FEMS Microbiol. Lett.* 79, 59-65.
  33. Rouhianen, L., K. Sivonen, W.J. Buikema, and R. Haselkorn. 1995. Characterization of toxin-producing cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer. *J. Bacteriol.* 177, 6021-6026.
  34. Tillett, D., D.L. Parker, and B.A. Neilan. 2001. Detection for toxicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: Comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2810-2818.
  35. Tillett, D., E. Dittmann, M. Erhard, H. von Dohren, T. Borner, and B.A. Neilan. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* 7, 753-764.
  36. Vasconcelos, V.M., and E. Pereira. 2001. Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). *Water Res.* 35, 1354-1357.
  37. Wirsing, B., L. Hoffmann, R. Heinze, D. Klein, D. Daloz, J.C. Braekman, and J. Weckesser. 1998. First report on the identification of microcystin in a water bloom collected in Belgium. *Syst. Appl. Microbiol.* 21, 23-27.
  38. WHO. 1998. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed., Addendum to Volume 1. Recommendations. p. 13-14. World Health Organization, Geneva.

(Received July 28, 2003/Accepted September 4, 2003)

#### ABSTRACT : Primer Evaluation for the Detection of Toxigenic *Microcystis* by PCR

Hyun-Kyung Lee, Jun-Ho Kim, Soon-Ae Yoo<sup>1</sup>, Tae-Seok Ahn<sup>2</sup>, Chi-Kyung Kim, and Dong-Hun Lee\* (Department of Microbiology and Biotechnology Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, <sup>1</sup>Department of Biology, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea and <sup>2</sup>Department of Environmental Sciences, Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Korea)

Microcystin produced by cyanobacteria in surface waters, such as eutrophic lake and river, is a kind of serious environmental problems due to its toxicity to human and wild animals. Microcystin is synthesized non-ribosomally by the large modular multi-functional enzyme complex known as microcystin synthetase encoded by the *mcy* gene cluster. Amplification of *mcy* genes by PCR from cultures and environmental samples is a simple and efficient method to detect the toxigenic *Microcystis*. In order to evaluate primers designed to detect toxic microcystin-producing strains, 17 cyanobacterial strains and 20 environmental samples were examined by PCR with 7 pairs of primers. Some microcystin-producing cyanobacteria were not detected with FAA-RAA, TOX4F-TOX4R and FP-RP primers. The fragment of unexpected size was amplified with NSZW2-NSZW1 primers in *Microcystis* strains isolated from the lakes in Korea. TOX1P-TOX1F primers failed in amplification of toxin-producing strains. Only MSF-MSR and TOX2P-TOX2F primers amplified the fragments of *mcy* genes from 11 strains of microcystin-producing *Microcystis*. The water samples taken from 20 lakes in Korea were analyzed by PCR using each of the primers. In all the water samples, cyanobacteria capable of producing microcystin were detected by the PCR with TOX2P-TOX2F primers. These results indicate that TOX2P-TOX2F primers are better than the other primers for detection of microcystin-producing *Microcystis* strains in Korea. The nucleotide sequences of *mcy* gene in *Microcystis aeruginosa* NIER10010 suggest genetic diversity of Korean isolates.