

중형저서동물에서 효율적인 DNA 추출 방법 비교 연구

이 승 한 · 백 진 옥 · 이 원 철*

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Comparative Study of DNA Extraction Method in Meiofauna

Seunghan Lee, Jinwook Back and Wonchoel Lee*

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University,
Seoul 133-791, Korea

Abstract – The efficiency of mtCOI amplication after DNA extraction of benthic harpacticoid *Tigriopus japonicus* s.l. was tested under different conditions depending on fixative (99% Ethanol, or 4% Formalin) and additional chemicals (Ludox or Rose Bengal). Each experimental group by the fixative was subdivided into four groups, respectively: 1) Control (fixative only), 2) processed with Ludox HS40, 3) processed with Rose Bengal, and 4) processed with both Ludox HS40 and Rose Bengal. For the 99% ethanol-fixed sample, overall success rate of amplification by PCR was 96% or above, while for the 4% formalin-fixed one, success rate was much lower than those of ethanol-fixed: 1) Control: 27%, 2) Ludox HS40: 3%, 3) Rose Bengal: 7%, and 4) Ludox HS40 and Rose Bengal: 3%. As a result present study verify that 99% ethanol is a proper fixative for DNA extraction in meiofauna organisms.

Key words : meiofauna, DNA extraction, mtCOI, Ludox, Rose Bengal

서 론

중형저서동물은 1 mm의 체를 통과하고 38 μ m의 체에 남는 크기를 갖는 저서동물을 말한다. 중형저서동물에 대한 연구는 아직도 많은 어려움이 있으며, 이는 중형저서동물의 크기가 작고 이것들을 저질로부터 추출하기가 어려운데 기인 한다(Higgins and Thiel 1988). 실제 중형저서동물을 대상으로 연구를 진행하기 위해서는 채집된 퇴적물에서 생물만을 분리하는 과정이 필수적이다(Burgess 2001).

중형저서동물의 경우 시료로부터 추출된 생물을 동정

하고 분류하는데 일차적으로 형태학적인 특징이 매우 중요하게 작용하나, 추출과정에서 손상된 시료나, 그 크기가 작은 시료, 또한 형태분류의 비전문가의 경우에는 유전학적 정보를 이용하는 것이 매우 유용하며, 다양한 유전자를 대상으로 연구가 진행되고 있다(Floyd *et al.* 2002; Herbert *et al.* 2003; De Ley *et al.* 2005). 그 중에서도 미토콘드리아 DNA (mtDNA)를 이용한 연구가 상대적으로 활발하다고 할 수 있는데, 이는 미토콘드리아 DNA가 모계로만 유전되어 재조합이 거의 없다는 것 뿐 아니라, 형태적으로 구분이 어려운 종을 정확하게 분류할 수 있다는 장점이 있기 때문이다(Avise 1986). 이러한 이유로 미토콘드리아 DNA를 이용하여 생물의 유전학적 정보를 구축하고 이를 활용하여 생물의 분류계통학적 연구를 진행하고자 DNA barcoding 작업이 활발히 진행되고

* Corresponding author: Wonchoel Lee, Tel. 02-2220-0951,
Fax. 02-2296-7158, E-mail. wlee@hanyang.ac.kr

있다 (Blaxter *et al.* 2005; Ratnasingham and Herbert 2007; Bradford *et al.* 2010).

유전학적 지표를 이용하여 특정 종을 분류하고 연구하는 방법은 박테리아와 같은 형태적으로 단순한 생물로부터 시작되었으며 (Pace 1997; Allander *et al.* 2001; Hamels *et al.* 2001), 이후 이러한 연구는 범위가 확장되어 현재는 분류학적으로 보다 상위단계에 있는 생물까지 폭넓게 적용되고 있다 (Bucklin *et al.* 1999; Trewick 2000; Eyun *et al.* 2007; Bradford *et al.* 2010). 또한 유전정보는 생물의 분자적지표 (Barcode)로서 근연종과의 형태적 구분이 명확하지 않은 종을 대상으로 분류계통학적 연구를 진행하고 (Floyd *et al.* 2002; Hebert *et al.* 2003; Guidetti *et al.* 2005; Bhadury *et al.* 2006), 특정 종의 분포에 관한 생물지리학적 연구를 위해서도 활용이 가능하다 (Garrick *et al.* 2004).

저서생물은 현장에서 생물을 채집하고 이들을 분석하기 위해 고정액을 사용하며 이때 사용하는 고정액은 중성 포르말린이 일반적이다 (Boufahja *et al.* 2011; Brinke *et al.* 2011; Liu *et al.* 2011). 그러나 포르말린으로 생물을 고정할 경우 생물 조직의 DNA가 시간이 지남에 따라 분해 (degradation)된다고 알려져 있기 때문에 (Hamazaki *et al.* 1993; Miething *et al.* 2006), 포르말린으로 고정된 생물조직에서 DNA를 추출하고, 이를 이용하여 계통학적 연구를 하는 것은 적합하지 않은 방법이라 할 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 시료 고정 및 DNA 추출에 있어 다양한 방법이 제안되어 활용되고 있는데, Fukatsu (1999)는 고정액으로 아세트산을 사용하여 생물을 고정한 뒤 DNA를 추출하는 방법을 제안하기도 하였다. 이 밖에도 일단 고정액에 의해 보존된 시료에 열을 가한 뒤에 DNA를 추출하는 방법이 개발되어 적용되었고 (Truett 2000; Shi *et al.* 2002; Alasaad *et al.* 2008), 특정 시약을 이용하여 고정된 생물의 조직을 녹여 DNA를 추출하는 방법 (Walsh *et al.* 1991; Höss and Pääbo 1993; Schander and Halanych 2003)과 고정용액과 특정 완충용액을 혼합한 뒤 이를 이용해 시료를 고정하는 방법 등이 개발되었다 (Teske *et al.* 2008).

이번 연구에 사용된 Ludox와 Rose Bengal은 중형저서동물의 생태학적 연구에서 많이 사용된 물질이다. Ludox 추출법은 1977년에 De Jonge와 Bouwman에 의해 개발된 방법으로 작은 실리카 입자로 된 수용성 콜로이드인 실리카인 Ludox를 일종의 완충용액으로 사용하고 비중차이를 이용해 퇴적물에서 생물을 추출하는 방법이다. 이러한 방법은 지금까지 다양한 방법으로 개선되어 현재 중형저서동물의 연구를 위해 기본적으로 사용되고 있다 (Burgess 2001). Rose Bengal은 염색시약의 일종으

로 화학 및 생물학 연구에 다양하게 사용되는 물질이다. Ludox를 이용하여 퇴적물을 분리한 이후 Rose Bengal로 염색하면 생물과 무생물을 구분할 수 있기 때문에, 중형저서동물 시료의 정량분석을 보다 손쉽게 할 수 있다는 장점이 있다 (Mason and Yevich 1967).

현재 중형저서동물을 대상으로 한 DNA 추출 및 계통학적 연구가 일부 연구자에 의해 진행되었기는 하지만 이는 소수의 특정 분류군에 집중된 연구가 대부분이고, 그 밖에도 실제 연구에 사용되었던 실험방법에 관한 적합성 여부는 제시되지 않았다 (Thomas *et al.* 1997; Floyd *et al.* 2002; De Ley *et al.* 2005; Bhadury *et al.* 2006; Sands *et al.* 2008). 이에 이번 연구에서는 중형저서동물의 생태학적 연구에서 시료의 고정을 위해 일반적으로 사용되어 온 99% 에탄올 또는 4% 포르말린에 시료를 고정한 뒤, 중형저서동물의 추출을 위한 전처리 과정에서 사용하는 Ludox와 Rose Bengal을 처리하고 미토콘드리아 유전자의 하나인 cytochrome c oxidase subunit I (COI)를 추출하여 고정방법에 따른 DNA 추출 효율을 정량적으로 비교하고자 한다. 또한 상기 실험을 통해 Ludox와 Rose Bengal의 사용에 따른 DNA 추출율을 비교하고 이렇게 얻어진 결과를 통해 중형저서동물을 대상으로 한 실제 연구에 적용 가능한 방법을 제안하는 데 목적이 있다.

재료 및 방법

1. 시료채집 및 동정

저서성 요각류 중 우리나라 연안에서 우점하여 분포하는 *Tigriopus japonicus* s.l.을 실험생물로 선정하고 2010년 1월 15일 전라남도 여수시 만성리 해수욕장 부근의 조수 웅덩이 (북위 34°46'51", 동경 127°44'51")에서 소형 핸드넷 (망목 63 μm)을 이용하여 시료를 채집하였다. 현장에서 해수와 함께 채집한 시료는 살아있는 상태로 연구실로 옮긴 뒤 해부현미경 (Olympus SZX12) 및 광학현미경 (Olympus BX51)을 통해 실험생물의 추출 및 동정을 진행하였다.

2. 시료의 고정 및 전처리

GF/F 필터 (47 mm φ)를 이용하여 해수를 완전히 거른 뒤 99% 에탄올 또는 4% 중성 포르말린으로 구분하여 고정하였으며 50일이 지난 뒤, 설계된 실험조건에 따라 다음과 같이 시료의 전처리 과정을 거쳤다.

1) 에탄올 고정 실험군

실험군과의 결과 비교를 위해 최초 시료를 99% 에탄

올로 고정된 뒤 아무런 물질을 처리하지 않은 것은 대조구로 설정하였으며, Ludox HS40의 영향을 알아보기 위해서 Burgess (2001)의 방법에 따라 Ludox HS40을 에탄올에 고정된 시료와 20분간 반응시켰다. Rose Bengal의 영향 여부는 시료와 Rose Bengal을 24시간 동안 반응시켰으며 마지막으로 Ludox HS40과 Rose Bengal 모두를 시료와 동일한 조건으로 반응시켰다.

2) 포르말린 고정 실험군

Ludox HS40의 영향을 확인하기 위해 4% 중성 포르말린에 고정된 시료를 Ludox HS40과 20분간 반응시켰으며, Rose Bengal의 영향 여부는 고정된 시료를 24시간 동안 Rose Bengal에 반응시켜 염색이 충분히 되도록 하였다. 그리고 4% 중성 포르말린에 고정한 후 아무런 물질을 처리하지 않은 개체는 대조구로 삼아 실험군의 결과와 비교하고자 하였다.

3. DNA 추출 및 증폭

각 실험조건에 따라 준비된 시료는 멸균증류수로 고정액을 세척한 뒤, 1.5 mL 튜브에 한 개체의 시료를 넣고 Micro homogenizer를 이용하여 시료를 분쇄하였다. 이후 PCR premix (AccuPower™ PCR PREMIX, BIONEER CO.)와 혼합하여 PCR을 진행하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 initial denaturation를 진행한 뒤, 94°C에서 1분간 denaturation, 46°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 3분간 extension을 40회 반복한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 final extension을 진행하였다. 이때, 사용된 primer는 기존 연구를 통해 갑각류의 mtCOI 유전자 증폭에 효과적으로 알려진 LCO-1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3')과 HCO-2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (Folmer *et al.* 1994)을 사용하였으며 PCR과정을 거쳐 증폭된 산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 mtCOI 유전자의 추출 및 증폭여부를 확인하였다. 이때, 모든 실험군은 정량적 비교를 위해 30회 반복하여 실험군 간 결과를 비교하였다.

4. 실험방법의 재검증

앞에서 진행한 다양한 실험 중 가장 효율이 높은 전처리방법을 선택한 뒤 이를 현장에서 사용이 가능한지의 여부를 다시 한 번 재검증하기 위하여 2010년 5월 14일 충청남도 태안군 천리포 해수욕장(북위 36° 48' 10'', 동경 128° 08' 56'')에서 중형저서동물물을 채집하고 해부현미경(Olympus SZX12)에서 대분류군 수준에서 분류한

뒤, 앞선 실험과 같은 조건으로 PCR을 진행하고 그 산물을 전기영동하여 mtCOI 유전자의 증폭여부를 확인하였다.

결과 및 고찰

실험 대상 생물인 *Tigriopus japonicus* s.l.를 99% 에탄올로 고정된 경우, 시료 고정 이후에 어떤 시약도 처리하지 않은 대조구에서는 30회의 반복실험 모두 DNA가 추출되었다. 또한 99% 에탄올로 고정된 뒤, Ludox HS40에 20분간 반응시킨 경우에도 30회의 실험 모두 DNA가 추출되었다. 그리고 99% 에탄올로 고정하고 이후 Rose Bengal으로 시료를 염색시키고 PCR을 진행하였을 때에는 30회 반복실험 중 총 29회의 실험에서 DNA가 추출되어 $96.7 \pm 3.3\%$ 의 추출율을 보였으며, 마지막으로 Ludox HS40에 20분간 반응시킨 뒤, Rose Bengal에 24시간 동안 염색시킨 이후에 PCR을 진행한 경우, 총 30회의 반복실험 중 30회 모두 DNA가 추출되어 100%의 추출율을 나타냈다(Fig. 1).

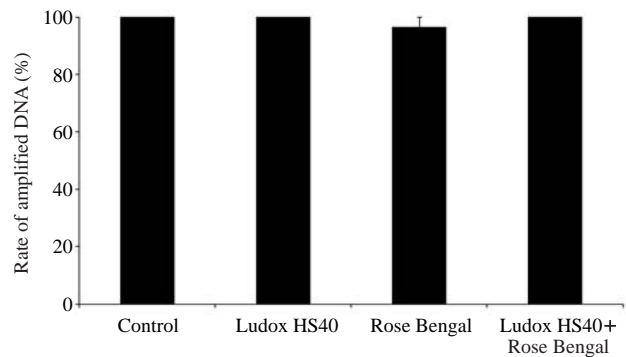


Fig. 1. The rates of amplified DNA at each experimental group after 99% Ethanol fixation.

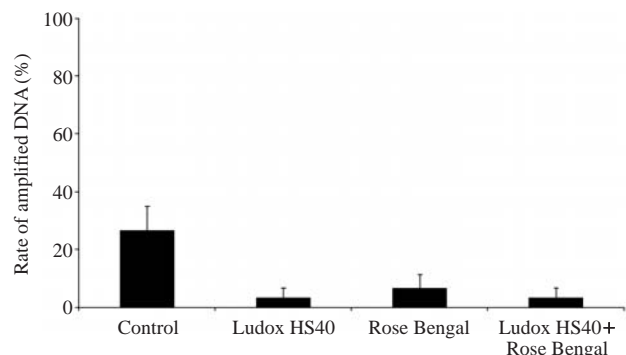


Fig. 2. The rates of amplified DNA at each experimental group after 4% Formalin fixation.

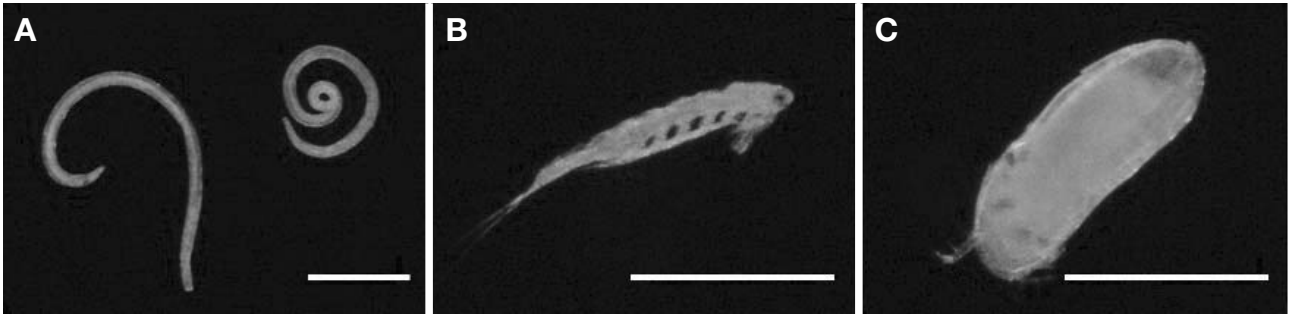


Fig. 3. Meiofaunal Organisms under Stereo Microscope. A: Nematoda; B: Harpacticoida; C: Ostracoda. Scale bar=300 μ m.

그러나 시료를 4% 포르말린으로 고정한 경우에는 어떤 시약도 처리하지 않은 대조구에서 총 30회의 실험 중 8회만 DNA가 추출되어 약 $26.7 \pm 8.2\%$ 의 추출율을 나타냈다. 그리고 4% 포르말린으로 고정하고 Ludox HS40에 20분간 반응시킨 후 시행한 총 30회의 실험 중 단 1회의 실험에서만 DNA가 추출되어 $3.0 \pm 3.0\%$ 의 추출율을 보였다. 4% 포르말린으로 고정된 시료를 Rose Bengal에 24시간 반응시킨 후의 DNA 증폭실험을 진행한 결과 총 30회 실험 중 2번의 실험에서만 DNA가 추출되어 $6.6 \pm 4.6\%$ 의 추출율을 보였으며, Ludox HS40에 20분간 반응시킨 뒤, Rose Bengal에 24시간 반응시킨 후 실험을 한 결과 총 30회의 실험 중 단 1회만 DNA가 추출되어 $3.0 \pm 3.0\%$ 의 추출율을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

이러한 결과를 종합하면, 4% 포르말린을 사용한 실험군에 비하여 99% 에탄올을 이용하여 시료를 고정한 실험군에서 높은 DNA 추출율을 보이는 것을 알 수 있다. 또한 4% 포르말린으로 시료를 고정한 후, Ludox HS40과 Rose Bengal을 처리한 실험군에서의 DNA 추출율은 포르말린만을 사용한 대조구에 비하여 낮은 효율로 DNA가 증폭된 것에 비하여 99% 에탄올로 고정하였을 때에는 Ludox HS40과 Rose Bengal을 사용한 실험군 모두 높은 DNA 추출율을 보였으며 대조구와 비교하였을 때 별다른 차이를 보이지 않아 시료의 DNA에 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있다. 그러므로 시료에서 DNA를 추출하고자 할 때에는 99% 에탄올이 4% 포르말린에 비하여 고정액으로 적합하며, 99% 에탄올로 시료를 고정한 후에는 Ludox HS40과 Rose Bengal을 사용하여도 DNA 추출에 영향이 없는 것으로 나타나 추후 시료의 전처리 과정에서 충분한 활용이 가능하다.

이처럼 가장 효율이 높은 방법을 사용하여 실제 현장에서 연구방법에 적용하고 그 결과를 재검증하기 위해 중형저서동물들을 대상으로 한 연구에 활용하기 위하여 퇴적물 시료를 채집한 뒤, 99% 에탄올로 즉시 고정하였

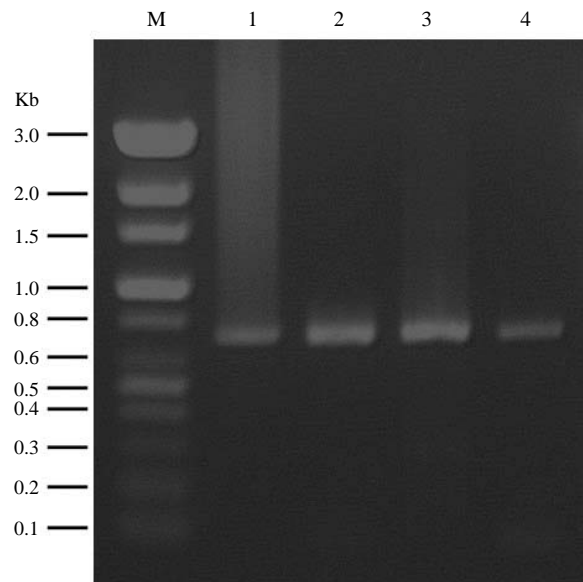


Fig. 4. Photograph of PCR amplified band on 1% agarose gel electrophoresis of Mitochondrial COI genes of Meiofauna. Lane M: 100 bp DNA ladder; lane 1, 2: Nematoda; lane 3: Harpacticoida; lane 4: Ostracoda.

다. 이후 Burgess (2001)의 방법에 따라 Ludox HS40을 이용하여 퇴적물에서 생물만을 분리해 낸 뒤, Rose Bengal로 염색하여 해부현미경 (Olympus SZX12)을 이용하여 분류하여 선충류 (Nematoda)와 저서성 요각류 (Harpacticoida), 그리고 패충류 (Ostracoda)가 출현하였음을 확인하였다 (Fig. 3). 그리고 이 분류군들을 대상으로 PCR을 진행하여 mtCOI 유전자를 추출한 결과, 모든 분류군에서 mtCOI DNA가 추출된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

이번 연구를 통해 기존에 활용하고 있던 연구방법을 이용하여 중형저서동물을 대상으로 유전학적 정보를 확인할 수 있고 이러한 유전정보는 기존의 분류체계를 대신하는 것이 아닌 형태적 정보 및 생태적 정보와 함께 이용함으로써 보다 정확한 종 분류가 가능할 것 (Costa

et al. 2007)이라 생각되기 때문에 향후 진행될 중형저서동물의 분류학적 연구에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 기존의 중형저서동물의 연구에서 채집된 시료는 보편적으로 포르말린에 고정되어 왔는데, 이렇게 고정된 시료에서는 DNA의 추출이 어렵고 99% 에탄올에 고정된 시료에서의 추출효율이 현저하게 높았다는 결과가 제시되었다. 이는 향후 중형저서동물에서 DNA 정보의 비교를 통한 연구일 경우에는 반드시 99% 에탄올에 고정하여야 함을 명확히 해주었다. 과거에 포르말린으로 고정되어 보관되어 오던 시료들도 Ludox나 Rose Bengal을 사용하지 않은 경우는 99% 에탄올 고정시료에 비해서는 비록 효율이 떨어지나, 에탄올 고정시료가 없는 경우에는 차선책으로 시도가 가능함도 제시되었다. 본 연구에서 제시된 DNA 추출의 효율성 자료는 특히 대량의 저서생물시료에서 DNA를 추출하는 연구를 시도할 때 크게 참고가 되리라고 생각된다.

적 요

이번 연구에서는 중형저서동물의 생태학적 연구에 사용하는 Ludox와 Rose Bengal을 처리하였을 때, 고정액의 종류에 따른 DNA (mtCOI)의 추출 효율을 비교하고자 하였다. 실험을 위해 저서성 요각류 *Tigriopus japonicus* s.l.를 실험동물로 사용하였으며, 99% 에탄올과 4% 포르말린의 두 종류의 고정액을 사용한 뒤 이들을 각각 대조구로 삼았다. 그리고 (1) Ludox HS40, (2) Rose Bengal, (3) Ludox HS40+Rose Bengal을 각각 시료와 반응시킨 뒤, mtCOI 유전자를 추출하였다. 이후 PCR을 진행하고 산물을 전기영동하여 유전자의 증폭여부를 확인하였다. 또한 모든 실험은 30회 반복하여 실험간의 결과를 비교하였다. 그 결과, 에탄올의 경우에는 대조구를 포함한 (1), (2), (3)의 실험 모두에서 96% 이상의 효율을 보였지만, 포르말린의 경우에는 대조구에서 27% 증폭되었으며, (1)과 (3)에서 약 3%, (2)에서 약 7%만 증폭되어 두 고정액에 따른 차이가 뚜렷하게 나타났다. 결과적으로 현재의 연구를 통해서 99% 에탄올이 중형저서동물에서 DNA를 추출하는 데 적합한 고정액임을 확인하였다.

사 사

본 연구는 국토해양부의 발주로 국립수산과학원에서 주관하고 있는 해양생태계 조사사업의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Alasaad S, L Rossi, S Maione, S Sartore, RC Soriguer, JM Pérez, R Rasero, XQ Zhu and D Sogila. 2008. HotSHOT Plus ThermalSHOCK, a new and efficient technique for preparation of PCR-quality mite genomic DNA. *Parasitol. Resea.* 103:1455-1457.
- Allander T, SU Emerson, RE Engle, RH Purcell and J Bukh. 2001. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98:609-611.
- Avisé JC. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Transac. Royal Soc. London B.* 312:325-342.
- Bhadury P, MC Austen, DT Bilton, PJD Lamshead, AD Rogers and GR Smerdon. 2006. Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 320:1-9.
- Blaxter M, J Mann, T Chapman, F Thomas, C Whitton, R Floyd and E Abebe. 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Phil. Transac. Royal Soc. London B.* 360:1935-1943.
- Boufahja F, A Hedfi, J Amorri, P Aïssa, E Mahmoudi and H Beyrem. 2011. Experimental validation of the "relative volume of the pharyngeal lumen (RVPL)" of free-living nematodes as a biomonitoring index using sediment-associated metal and/or Diesel Fuel in microcosm. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 399:142-150.
- Bradford T, M Adams, F Humphreys, AD Austin and SJB Cooper. 2010. DNA barcoding of stygofauna uncovers cryptic amphipod diversity in a calcrete aquifer in Western Australia's arid zone. *Mol. Ecol. Resour.* 10:41-50.
- Brinke M, K Ristau, M Bergtold, S Höss, E Claus, P Heininger and W Traunspurger. 2011. Using meiofauna to assess pollutants in freshwater sediments: a microcosm study with cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 30:427-438.
- Bucklin A, M Guarnieri, RS Hill, AM Bently and S Kaartvedt. 1999. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. *Hydrobiologia.* 401:239-254.
- Burgess R. 2001. An improved protocol for separating meiofauna from sediments using colloidal silica sols. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 214:161-165.
- Costa FO, JR deWaard, J Bouthillier, S Ratnasingham, RT Dooh, M Hajibabaei and PDN Hebert. 2007. Biological identification through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 64:272-295.
- De Jonge VN and LA Bouwman. 1977. A Simple Density Sepa-

- ration Technique for Quantitative Isolation of Meiobenthos Using the Colloidal Silica Ludox-TM. *Mar. Biol.* 42:143-148.
- De Ley P, IT De Ley, K Morris, E Abebe, M Mundo-Ocampo, M Yoder, J Heras, D Waumann, A Rocha-Olivares, AHJ Burr, JG Baldwin and WK Thomas. 2005. An integrated approach to fast and informative morphological vouchering of nematodes for applications in molecular barcoding. *Phil. Transac. Royal Soc. London B.* 360:1945-1958.
- Eyun S, Y Lee, H Suh, S Kim and HY Soh. 2007. Genetic identification and molecular phylogeny of *Pseudodiaptomus* species (Calanoida, Pseudodiaptomidae) in Korean Waters. *Zool. Sci.* 24:265-271.
- Floyd R, E Abebe, A Papert and M Blaxter. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol. Ecol.* 11: 839-850.
- Folmer O, M Black, W Hoen, R Lutz and R Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3:294-299.
- Fukatsu T. 1999. Acetone preservation: a practical technique for molecular analysis. *Mol. Ecol.* 8:1935-1945.
- Garrick RC, CJ Sands, DM Rowell, NN Tait, P Greenslade and P Sunnucks. 2004. Phylogeography recapitulates topography: very fine-scale local endemism of a saproxylic 'giant' springrail at Tallaganda in the Great Dividing Range of south-east Australia. *Mol. Ecol.* 13:3315-3330.
- Guidetti R, A Gandolfi, V Rossi and R Bertolani. 2005. Phylogenetic analysis of Macrobiotidae (Eutardigrada, Parachela): a combined morphological and molecular approach. *Zool. Script.* 34:235-244.
- Hamazaki S, M Koshihara, T Habuchi, R Takahashi and T Sugiyama. 1993. The effect of formalin fixation on restriction endonuclease digestion of DNA and PCR amplification. *Pathol. Res. Pract.* 189:553-557.
- Hamels J, L Gala, S Dufour, P Vannuffel, N Zammattéo and J Remacle. 2001. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. *BioTechniques.* 31:1364-1372.
- Hebert PDN, A Cywinska, SL Ball and JR deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Royal Soc. B.* 270:313-321.
- Higgins RP and H Thiel. 1988. Introduction to the Study of Meiofauna. Smithsonian Institution Press. Washington D.C. 488pp.
- Höss M and S Pääbo. 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acid. Res.* 21:3913-3914.
- Liu XS, WZ Xu, SG Cheung and PKS Shin. 2011. Marine meiobenthic and nematode community structure in Victoria Harbour, Hong Kong upon recovery from sewage pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 63:318-325.
- Mason WT Jr. and PP Yevich. 1967. The Use of Phloxine B and Rose Bengal Stains to Facilitate Sorting Benthic Samples. *Trans. Amer. Microscop. Soc.* 86:221-223.
- Miething F, S Hering, B Hanschke and J Dressler. 2006. Effect of Fixation to the Degradation of Nuclear and Mitochondrial DNA in Different Tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 54: 371-374.
- Pace NR. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734-740.
- Ratnasingham S and PDN Herbert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Note.* 7:355-364.
- Sands CJ, P Convey, K Linse and SJ McInnes. 2008. Assessing meiofaunal variation among individuals utilizing morphological and molecular approaches: an example using the Tardigrada. *BMC Ecol.* 8:7.
- Schander C and KM Halanych. 2003. DNA, PCR and formalinized animal tissue—a short review and protocols. *Org. Divers. Evol.* 3:195-205.
- Shi SR, RJ Cote, L Wu, C Liu, R Datar, Y Shi, D Liu, H Lim and CR Taylor. 2002. DNA Extraction from Archival Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections Based on the Antigen Retrieval Principle: Heating Under the Influence of pH. *J. Histochem. Cytochem.* 50:1005-1011.
- Thomas WK, JT Vida, LM Frisse, M Mundo and JG Baldwin. 1997. DNA Sequence from Formalin-Fixed Nematodes: Integrating Molecular and Morphological Approaches to Taxonomy. *Jour. Nematol.* 29:250-254.
- Teske PR, I Papadopoulos, BK Newman, PC Dworschak, CD McQuaid and NP Barker. 2008. Oceanic dispersal barriers, adaptation and larval retention: an interdisciplinary assessment of potential factors maintaining a phylogeographic break between sister lineages of an African prawn. *BMC Evol. Biol.* 8:341.
- Trewick SA. 2000. Mitochondrial DNA sequences support allozyme evidence for cryptic radiation of New Zealand *Peripatoides* (Onychophora). *Mol. Ecol.* 9:269-281.
- Truett GE. 2000. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques.* 29:52-54.
- Walsh PS, DA Metzger and RG Higuchi. 1991. Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques.* 10:506-513.