

녹조류 *Chlamydomonas reinhardtii*의 (CA/GT)_n Simple Sequence Repeat DNA 다형현상

강태진* · 양덕춘¹ · Marvin W · FAWLEY²

충남농촌진흥원 원예과, ¹한국인삼연초연구원 유전생리부, ²노스다코타 주립대학교 식물학과

(CA/GT)_n Simple Sequence Repeat DNA Polymorphism in *Chlamydomonas reinhardtii*

KANG, Tae-Jin* · YANG, Deok Chun¹ · FAWLEY Marvin W²

Division of Horticulture, Chungnam Provincial RDA, Taejon, 305-313, Korea; ¹Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taedok Science Town, Taejon, 305-345, Korea; and ²Department of Botany, North Dakota State University, Fargo, ND 58105-5517, USA. *Corresponding author.

Simple sequence repeats (SSR) are widely dispersed throughout eukaryotic genomes, highly polymorphic, and easily typed using polymerase chain reaction (PCR). The objective of this study was to determine the polymorphism of different *Chlamydomonas reinhardtii* strains and to determine the mode of inheritance of the SSR locus in *Chlamydomonas*. A genomic DNA library of *C. reinhardtii* was constructed and screened with a radiolabeled (AC)_n probe for the selection of (CA/GT)_n repeat clone. Selected clone was sequenced, and PCR primer set flanking (CA/GT)_n sequence was constructed. PCR was used to specifically amplify the SSR locus from multiple isolates of *C. reinhardtii*. The locus was polymorphic in some of the *C. reinhardtii* isolates. However, the locus was amplified only 4 of 6 isolates of *C. reinhardtii*, not in other 2 isolates of *C. reinhardtii*, suggesting that this locus is not extensively conserved. A simple Mendelian inheritance pattern was found, which showed 2:2 segregation in the tetrads resulting from a cross between *C. reinhardtii* and *C. smithii*. Our results suggest that this simple sequence repeat DNA polymorphism will be useful for identity testing, population studies, linkage analysis, and genome mapping in *Chlamydomonas*.

Keywords: inheritance pattern, locus, polymerase chain reaction

(CA/GT)_n과 같이 n이 10-60개로 짧게 나란히 반복되는 염기 서열이 있는 좌위를 short tandem repeat (Edwards et al., 1991), microsatellite (Litt and Luty, 1989), 또는 simple sequence repeat (SSR) (Jacob et al., 1991)라고 한다. 일반적으로 SSR은 진핵세포 게놈에 폭넓게 산재 되어 있으며 (Stallings et al., 1991), 큰 다형성을 나타내고 (Weber and May, 1989), polymerase chain reaction (PCR)에 의해서 쉽게 증폭할 수 있다.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)에 비해 SSR은 전형적으로 더 많은 대립 인자 (Allele)를 가지고 있다. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)의 다형 현상은 우성 유전자 표지이기 때문에 이형접합체는 동형접합체로부터 구분되어지지 않는다. 반면에 SSR은 공동우성

이어서 이형 접합체와 동형접합체의 구분이 가능하여 더 많은 다형 현상을 확인할 수 있다.

식물에서는 최근 콩(Akkaya et al., 1992; Rongwen et al., 1995), 토마토(Arens et al., 1995), 밀(Roder et al., 1995), 그리고 쌀(Zhao and Kochert, 1993)등에서 SSR이 보고되었다. 그러나 조류에 관한 SSR의 다형 현상에 관해서는 아직 보고된 바가 없다. *Chlamydomonas reinhardtii*의 유전형상이 어느 다른 조류보다 더 잘 연구되었기 때문에 SSR DNA 염기 서열의 존재 여부를 조사하는 데에 유용하다. Morris et al. (1986)은 *C. reinhardtii*뿐만 아니라 다른 원핵과 진핵 생물의 (CA/GT)_n을 분석하였다. Southern blotting으로 그들은 *C. reinhardtii*가 다른 어느 생물체보다 더 많은 (CA/GT)_n 반복 서열을 함유한다는 것을 발견하였다.

따라서 본 논문은 (1) *C. reinhardtii*에서의 (CA/GT)_n 존재 여부, (2) SSR 좌위(locus)를 증폭하기 위한 PCR primer의 제조, (3) 서로 다른 *C. reinhardtii* 계통에서 이들 좌위의 다형 현상, (4) *Chlamydomonas*에서 그 SSR 좌위의 유전 양상을 조사하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

조류 재료

서로 다른 장소에서 분리된 *C. reinhardtii* 계통 (UTEX-89, CC-125, CC-1418, CC-2342, CC-2344, CC-2331)과 유전 실험에서 사용된 계통 (CC-29와 CC-1373과의 교배에서 생성된 progeny)들은 Chlamydomonas Genetics Center (Department of Botany, Duke University, Durham, NC 2770)으로부터 제공받았다(Table 1).

Table 1. List of *Chlamydomonas* species and isolates used in this study.

Species	Group	Source ^a
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard	Euchlamydomonas	UTEX 89
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard	Euchlamydomonas	CC-125
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard	Euchlamydomonas	CC-1418
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard	Euchlamydomonas	CC-2331
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Jarvik	Euchlamydomonas	CC-2342
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Jarvik	Euchlamydomonas	CC-2344
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Dangeard	Euchlamydomonas	CC-29
<i>Chlamydomonas smithii</i> Hoshaw & Ettl	Euchlamydomonas	CC-1373

^aCC: *Chlamydomonas* Genetics Center, UTEX: University of Texas Algal Collection.

증식 세포는 변형된 Woods Hole (WH+) 배지(Fawley et al., 1990)에서 배양하였다. *C. reinhardtii*와 *C. smithii* 교배의 progeny는 2 µg/mL nicotinamide를 포함하는 액체 tris-acetate-phosphate (TAP) 배지 (Gorman and Levine, 1965)에서 19°C의 지속적인 광조건으로 배양하였다.

Genomic DNA 추출

Chlamydomonas 배양액 20 mL를 원심 분리 (5000 xg, 5 분)하여 0.5 mL의 추출 완충액 (100 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, pH 7.5)에 현탁하였다. 현탁액에 45 µL의 20% SDS를 첨가하여 65°C에서 10분간 처리한 다음 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)을 처리하여 정제하였다. 상층의 액체상은 새 튜브로 옮겨 isopropanol을 첨가한 후 원심 분리하여 형성된 DNA pellet을 70% 알코올로 세척한 다음 말려서 증류수로 녹였다.

Library 제조, colony screening과 DNA sequencing

C. reinhardtii DNA를 제한 효소 *Pst*I으로 절단하여 2% agarose 겔상에서 300-500bp의 절편을 MERmaid kit (BIO 101, LaJolla, CA)로 DNA를 추출하였고, 이 DNA는 동일한 제한 효소로 절단된 pUC19으로 접합하여 XL1-Blue (Stratagene, San Diego, CA)에 형질 전환시켰다.

형질 전환된 XL1-blue 각 세포의 흰색 colony를 2YT 배지가 담긴 96 well microtiter plate로 옮겨 37°C에서 밤새 배양하여 각 well에 있는 5 µL의 배양액을 Nytran membrane (Schleicher & Schuell, Inc., Keene, NH)으로 옮겼다. 그 membrane을 1) 0.2 M NaOH, 1.5 M NaCl, 2) 2X SSC, 0.4M Tris, pH 7.4, 3) 2X SSC에서 각각 30초간 담근 다음 80°C에서 1시간 동안 membrane을 baking한 후 3P로 5' 말단 라벨링을 한 (AC)_n probe와 hybridization solution (6X SSPE, 0.5% SDS, 5X Denhardt's solution)에서 hybridization 하였다. Membrane은 2X SSPE, 0.2% SDS로 실온에서 20분간 세척하였고, 50°C에서 20분간 2회, 0.2X SSPE, 0.2% SDS로 50°C에서 30분간 세척하였다. 세척된 membrane은 X-ray film에 밤새 노출하여 현상하였다.

선택된 clone의 DNA는 Sambrook et al. (1989)에서 기술된 방법으로 추출한 다음 Sequenase Version 2.0 (Amersham, Arlington, Heights, IL)을 사용하여 DNA sequencing하였다.

Primer, PCR 조건과 분석

선택된 clone의 sequence 자료는 PRIMER Version 0.5 (The Whitehead Institute for Biomedical Research, 9 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142)를 사용하여 분석하여 DNA International (Lake Oswego, OR)에서 PCR primer를 구입하였다. 25 µL의 PCR 반응액은 1X PCR buffer (5 M Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5% glycerol, 0.1% Triton X-100), 20 ng template DNA, 7.5 pmol oligonucleotide primer, 30 µM의 각 dNTP, 2 mM MgCl₂, 그리고 0.7 unit의 Taq DNA polymerase (Promega Corp., Madison, WI)를 함유하였다. PCR 반응은 최초 94°C에서 2분간 denaturation시켰고, 94°C에서 45초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초간 35 cycle 수행한 다음 최종적으로 72°C에서 5분간 Perkin-Elmer Cetus thermocycler를 이용하여 증폭한 다음 2% agarose 겔에서 전기영동하였다.

결과 및 고찰

*C. reinhardtii*의 (CA/GT)_n 반복서열 식별

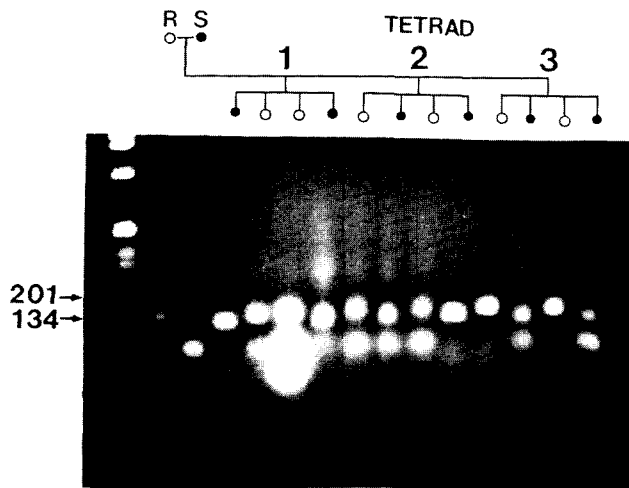


Figure 3. PCR amplification products of DNA isolated from 3 different F₁ tetrads of a cross between *C. reinhardtii* mt⁻ and *C. smithii* mt⁺. R, *C. reinhardtii* mt⁻; S, *C. smithii* mt⁺; ○, progeny containing *C. reinhardtii* allele; ●, progeny containing *C. smithii* allele.

생성된 3쌍의 4분체 progeny의 유전 양상을 결정하기 위하여 이들을 조사하였다. 이 좌위에서 4분체중 둘은 *C. reinhardtii*의 대립인자를 소유하였으며, 다른 둘은 *C. smithii*의 대립인자를 소유하여서 2:2의 분리비인 멘델의 유전양상을 보였다(Figure 3).

*C. reinhardtii*의 생활사에서 접합체의 감수분열이 반수체 세포의 4분체(tetrad)를 생산한다. 이 세포들은 분리되어 증식적으로 자라난다. *C. reinhardtii*와 *C. smithii*는 실험실에서 폭넓게 연구되는 종으로서 자웅이체이고 동형융합이어서 교미형(mt⁺ 또는 mt⁻)이 한 세포주에서 영구히 결정된다. *Chlamydomonas*는 엽록체 계능을 mt⁺로부터 그리고 미토콘드리아 계능을 mt⁻로부터 그들의 감수분열 자손으로 전하는데 (Boynton et al., 1987; Spanier et al., 1992), 이것은 핵 계능과 다르다. 핵 계능은 2:2의 멘델 양상으로 유전된다.

4배체 분석으로 재조합의 빈도를 결정할 수 있어서 marker와 동원체 사이의 거리를 결정할 수 있어서 유전자 지도를 작성할 수 있다. 쌀(Zhao and Kochert, 1993), 토마토(Arens et al., 1995), 그리고 인간(Bowcock et al., 1993)을 포함한 많은 개체에서 SSR을 이용한 유전자 지도가 작성되었다. *Chlamydomonas*의 유전자 지도를 작성하므로써 그 계능의 배열에 관한 근본적인 정보를 얻을 수 있게 된다.

위와 같은 *C. reinhardtii*의 (CA/GT)_n 반복 서열 다형현상때문에 (CA/GT)_n SSR 좌위는 개체군, parentage, 그리고 유전자 지도를 연구하는데 있어서 훌륭한 유전자 표지가 될 것으로 기대된다.

Simple sequence repeats (SSR)는 진핵생물체에 널리 산재되어 있으며, 큰 다형현상을 나타내고, polymerase chain reaction (PCR)으로 쉽게 분석된다. 이 연구의 목적은 서로 다른 *Chlamydomonas reinhardtii* 계통간의 다형현상과 *Chlamydomonas*의 SSR 좌위에서의 유전양상을 결정하는데 있었다. *C. reinhardtii*의 genomic DNA library를 만들어 ³²P로 라벨링한 (AC)₁₁ probe를 이용하여 (CA/GT)_n 반복서열을 가지는 clone을 선택하기위해 screen하였다. 선택된 clone을 sequencing하여 (CA/GT)_n sequence에 인접한 PCR primer set를 제조하였다. PCR은 여러 *C. reinhardtii* 계통의 SSR 좌위를 증폭하기 위하여 사용하였다. 그 좌위는 몇몇 *C. reinhardtii*계통에서 다형현상을 보였다. 그러나 그 좌위에서 *C. reinhardtii*의 6계통중 4계통만 DNA가 PCR 증폭을 하였고 2계통은 증폭을 하지 않았다. *C. reinhardtii*와 *C. smithii*의 교배로 생긴 4배체에서 2:2의 분리비를 보여주었는데, 이는 단순한 멘델의 유전양상을 나타낸다. 이러한 결과로 미루어 SSR 다형현상은 *Chlamydomonas*의 개체 식별, 개체군 연구, 연쇄 분석, 그리고 유전자 지도 작성을 하는데 유용할 것이다.

사사 - 이 연구를 위하여 *C. reinhardtii*계통을 제공한 North Carolina주의 Chlamydomonas Genetics Center의 EH Harris 박사님에게 감사드린다. 그리고 이 연구는 NSF OCE 9202732와 North Dakota State University에서 수여한 대학원 연구상에 의해 가능하였다.

인용문헌

Akkaya MS, Bhagwat AA, Cregan PB (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 133: 1131-1139

Arens P, Odinet P, Heusden AW, Lindhout P, Vosman B (1995) GATA- and GACA-repeats are not evenly distributed throughout the tomato genome. *Genome* 38: 84-90

Bowcock A, Osborne-Lawrence S, Barnes R, Chakravarti A, Washington S, Dunn C (1993) Microsatellite polymorphism linkage map of human chromosome 13q. *Genomics* 15: 376-386

Boynton JE, Harris EH, Burkhart BD, Lamerson PM, Gillham NW (1987) Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of *Chlamydomonas*. *Proc Nat Acad Sci USA* 84: 2391-2395

Braaten DC, Thomas JR, Little RD, Dickson KR, Goldberg I, Schlessinger D, Schlessinger D, Ciccociocola A, D'Urso M (1988) Locations and contents of sequences that hybridize to poly (dG-dT), (dC-dA) in mammalian ribosomal DNAs and two X-linked genes. *Nucleic Acids Res* 16: 865-881

Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats.

- Am J Hum Genet 49: 746-756
- Fawley MW, Douglas CA, Stewart KD, Mattox KR** (1990) Light-harvesting pigment-protein complexes of the Ulvophyceae (Chlorophyta): Characterization and phylogenetic significance. J Phycol 26: 186-195
- Gorman DS, Levine RP** (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci USA 54: 1665-1669
- Harris EH** (1989) The *Chlamydomonas* source book. Academic Press, San Diego
- Jacob HJ, Lindpaintner K, Lincoln SE, Kusumi K, Bunder RK, Mar Yi-Pei, Ganten D, Dzau VJ, Lander ES** (1991) Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone hypertensive rat. Cell 67: 213-224
- Kang TJ, Fawley MW** (1997) Variable Simple Sequence Repeat DNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. (Submitted to Plant Mol Biol)
- Litt M, Luty JA** (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am J Hum Genet 44: 397-401
- Morris J, Kushner SR, Ivarie R** (1986) The simple repeat poly(dT-dG).poly(dC-dA) common to eukaryotes is absent from eubacteria and archaeobacteria and rare in protozoans. Mol Biol Evol 3: 343-355
- Pardue ML, Lowenhaupt K, Rich A, Nordheim A** (1987) Poly-(dC-dA).poly-(dG-dT) sequences have evolutionarily conserved chromosomal locations in *Drosophila* with implications for roles in chromosome structure and function. EMBO J 6: 1781-1789
- Roder MS, Plaschke J, Konig SU, Borner A, Sorrells ME, Tanksley SD, Ganai MW** (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Mol Gen Genet 246: 327-333
- Rongwen J, Akkaya MS, Bhagwat AA, Lavi U, Cregan PB** (1995) The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. Theor Appl Genet 90: 43-48
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York
- Spanier JG, Graham JE, Jarvik JW** (1992) Isolation and preliminary characterization of three *Chlamydomonas* strains interfertile with *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). J Phycol 28: 822-828
- Stallings RL, Ford AF, Nelson D, Torney DC, Hildebrand CE, Moyzis RK** (1991) Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. Genomics 10: 807-815
- Weber JL, May PE** (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am J Hum Genet 44: 388-396
- Zhao X, Kochert G** (1993) Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)_n microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). Plant Mol Biol 21: 607-614

(1997년 2월 3일 접수)