한국건강관리협회지 제4권 제1호 2006년 6월
J. of KAHP 2006 ; 4 : 68 - 74

학술논문

PCR을 이용한 우리나라에서 발견되는 얼룩날개모기속 모기의 종 동정

용태순†, 이한일†, 이인용†, 이종원†, 황의욱‡

연세의대 기생충학교실 및 열대의학연구소†, 경북대 사대 생물학과‡

Species identification of the Anopheles hyrcanus complex found in Korea using PCR

Tai Soon Yong, M.D.†, Han Il Ree†, M.D., In Yong Lee†,
Jong weon Lee†, Ui Wook Hwang‡

Department of Parasitology & Institute of Tropical Medicine, Yonsei University College of Medicine, seoul 120-752, Korea†
Department of Biology, Teachers College Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea‡

Summary

For identification of four sibling species of the Anopheles hyrcanus complex found in Korea, the 5.8 rDNA-ITS2-28S rDNA region of each species was sequenced and the species-specific primers were designed. The amplified PCR products obtained from each species were analyzed by agarose gel electrophoresis. The result showed a single species- specific band, i.e. 559bp, 432bp, 322bp and 192bp for An. sinensis, An. sp., An. lesteri and An. pullus, respectively. In conclusion, the species-specific PCR primers designed from ITS2 variable regions functioned successfully and specifically, and can be applied as a useful tool for identifying species of the Anopheles hyrcanus complex found in Korea.

교신저자 : 용 태 순

우 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 기생충학교실
전화 : 02-2228-1841, Fax : 02-363-8676
E-mail : tsyong212@yumc.yonsei.ac.kr

1. 초 록

우리나라에 분포하는 얼룩날개모기속(genus *Anopheles*) 모기 중 형태가 유사한 4가지 종(species)을 정확히 동정하기 위하여, 각 종의 유전자 중 rDNA-ITS2-28 rDNA 부위의 염기서열을 분석한 후 이를 근거로 종 특이 primer를 제작하였다. 각 종으로부터 유전물질을 추출한 후, PCR 증폭을 통해 얻어진 산물을 2% agarose gel 전기영동에 의해 분석하였다. *An. sinensis, An. sp., An. lesteri, An. pullus* 4종에 대한 PCR 결과 559 bp, 432 bp, 322 bp, 192 bp의 종 특이 단일밴드를 각각 확인할 수 있었다. 결론적으로 변이가 많은 ITS2 유전자의 일정 부위에 대한 종 특이 primer를 고안하였는데, 이는 우리나라에서 발견되는 얼룩날개모기속 모기의 종을 동정하는데 있어서 유용한 기법으로서 사용될 수 있을 것이다.

2. 서 론

삼일열말라리아는 대략 1979년 우리나라에서 박멸되었다고 간주되어왔다. 그러나 경기도와 강원도 북부 지역에서 1993년 다시 1명의 환자가 발생하였고, 그 후로 1994년 20명, 1995년 107명, 1996년 356명, 1997년 1,724명, 1998년 3,932명 1999년 3,621명, 2,000년도 4,142명, 2001년 2,556명, 2002년 1,799명, 그리고 2003년 1,170명이 발생하였다.(Ree, 2000; Ministry of Health and Welfare, 2004). 한 편, 북한의 말라리아 환자는 2000년 204,428명, 2001년 300,000명, 2002년 241,190명 그리고 2003년 46,251명이 보고되었다. 이러한 배경에서 우리나라에서 발생하는 삼일열말라리아의 역학적 특성을 이해하기 위하여 매개종인 얼룩날개모기속 모기에 대한 분류 연구와 정확한 종의 동정은 시급히 필요하다.

얼룩날개모기속(genus *Anopheles*)의 Hyrcanus 그룹은 모두 18종의 관련된 종들로 구성되어 있고 (Harrison, 1972; Xu and Feng, 1975), 이 중 다섯 종, 즉 *An. sinensis, An. lesteri, An. pullus, An. yatsushiroensis, An. sineroides* 가 우리나라에서 발견된다 (Kim et al., 2000; Ree, 2003). 중국얼룩날개모기(*An. sinensis*)는 우리 나라에서 열원충의 가장 중요한 매개종으로 알려져 왔으나(Ree et al., 1967; Lee et al., 2000; Strickman et al., 2001), *An. yatsushiroensis* 에 의한 열원충의 자연감염이 보고된 바도 있다(Hong, 1977). 최근 연구에 의해 *An. yatsushiroensis* Miyazaki, 1951가 *An. pullus* Yamada, 1937와 같은 종으로 밝혀졌으며(Shin and Hong, 2001; Hwang et al., 2004), 중국의 *An. anthropophagus* 와 일본의 *An. lesteri* 가 동일 종임이 인정되고 있다(Hwang et al., 미발표 결과). 나아가 이미 밝혀진 rDNA ITS2 염기서열과 새로 밝혀진 염기서열들을 종합하여 남한과 필리핀의 *An. lesteri*와 중국의 *An. anthropophagus*가 모두 같은 종임이 확인되었다. 중국 중남부지방의 *An. anthropophagus* 는 삼일열말라리아의 중요한 매개체로 잘 알려져 있다. 그러므로, 우리나라에서도 *An. lesteri*가 malaria 전파에 있어서 매우 중요한 역할을 할 개연성이 있다.

Tanaka et al.(1979)은 일본에서 *An.*

*lesteri*가 *An. sinensis*보다 말라리아의 중요한 매개체일 것이라고 언급한 바 있다. 한반도와 일본의 *An. lesteri*에 대한 연구는 *An. sinensis*와 *An. lesteri*의 형태가 아주 유사하여 별로 진행되지 못 하였다. 얼룩날개모기속 Hyrcanus group의 종들은 형태가 매우 유사하기 때문에 종의 구분이 아주 어렵거나 불가능하다. 그러므로 이 종을 정확히 동정하고 확인하는 것은 말라리아를 매개하는 종과 그들의 매개능력 등 역학적인 상황을 밝혀내는데 절대적으로 중요하다.

본 실험에서는 Hyrcanus그룹에 속하는 이들 4가지 모기에 대한 종 특이 primer를 제작하고 이를 사용한 PCR을 통하여 이러한 종들을 정확하게 밝혀내고자 하였다. *An. sineroides* 에 대한 primer는 제작하지 않았다. 왜냐하면 이 종의 형태는 뚜렷한 특징이 있어 분류가 쉽게 이루어질 수 있기 때문이다.

3. 재료 및 방법

Total DNA는 DNeasy tissue kit(Qiagen Co.)을 사용하여 각 종의 충체로부터 추출하였다. Hyrcanus 그룹의 유전자 중 많은 변동성을 가진 5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA 부분을 primer 687(5'-ACCCTGGACGGTGG ATCACTYGG-3')과 CS250(5'-GTTAGTT TCTTTTCCTC-3')를 사용하여 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 PCR product purification system(Qiagen Co.)을 사용하여 분리하고, pGEM-T easy vector system(Promega Co.)에 클로닝하고 *Escherichia coli* XL1에 형질전환하였다. 클론의 선별은 X-gal과 IPTG를 이용하여 blue/white 선별하였다. Plasmid DNA는 Qiaprep spin miniprep purification kit(Qiagen Co.)을 사용하여 분리하였고, 염기서열 확인은 Perkin Elmer 9600 PCR machine을 사용하였다. 최종 얻어진 염기서열의 분석은 Gene Jockey II (BIOSOFT Co.)를 사용하여 정렬하고 비교하였다. 다중염기서열정렬를 위하여 Clustal X^{8}를 사용하였고, 염기서열정렬과 조작을 위하여 MacClade ver 3.0을 사용하였다 (Thompson et al., 1997). Hyrcanus 그룹에 속하는 모기들을 구분하기 위해 종간에 존재하는 상이한 염기서열을 기초로 종 특이 PCR primer를 고안하였다.

4. 결과 및 고찰

5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA 부위의염기서열을 밝히고 비교하였다.(Fig. 1) 우리나라에서 발견되는 Hyrcanus그룹에 속하는 4가지 종을 동정하기 위하여, Hyrcanus 그룹 중 제일 많은 변동성을 가진 염기서열을 기초로 687와 Sin-S(*An. sinensis*), Ant-S와 CS250(*An. lesteri*), 689와 Pul-S (*An. pullus*), 688와 Asp-S(*Anopheles* sp.)와 같이 종 특이 PCR primer들을 고안하였다.(Table 1) Primer의 위치와 방향은 Fig. 1에 기재하였다. PCR 산물의 크기는 *An. sinensis* 는 559 bp, *An. lesteri*는 322 bp, *An. pullus* 및 *yatsushiroensis*는 192 bp, *Anopheles* sp.는 432bp로 각각 다르게나타났으며, 이들은 모두 2% agarose gel에서 영동하여 분석되었다.(Fig. 2) 또한

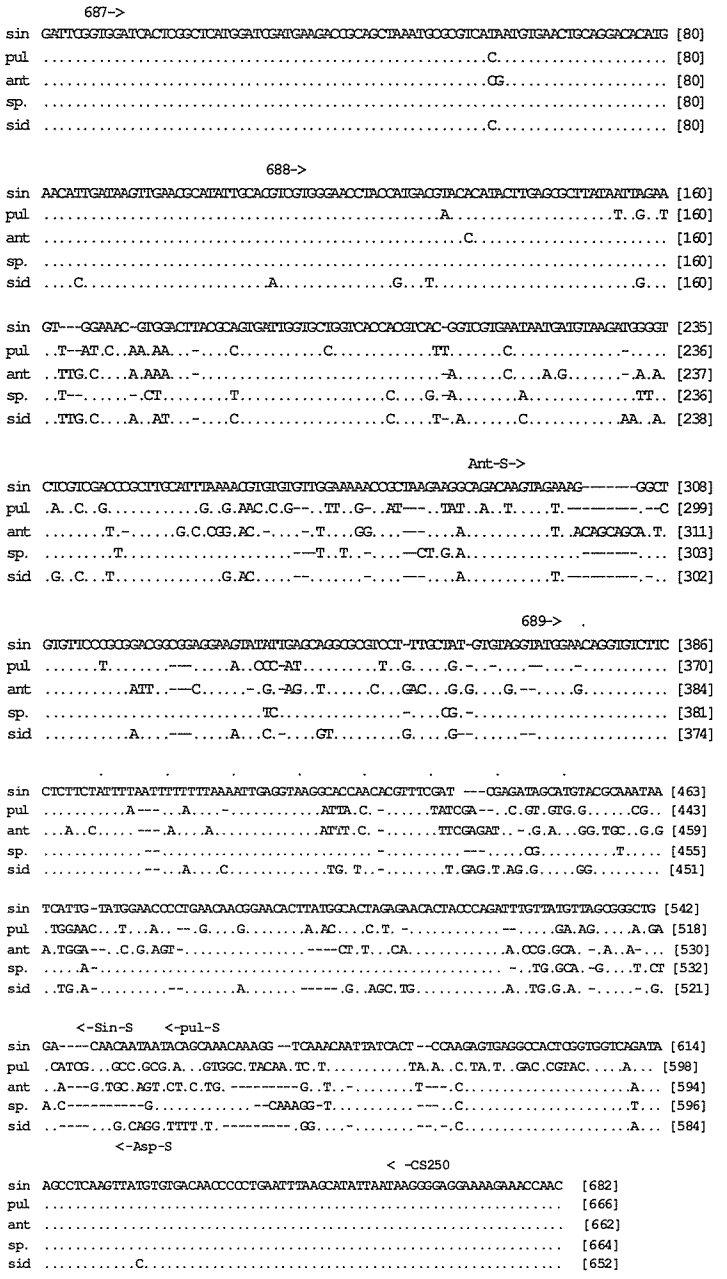

Fig. 1. Anopheles sinensis(sin), An. anthropophagusllesteri(ant), An. sp.(SP.), An. sineroides(sid) 모기의 5.8Sr DNA-ITS2-28SrDNA 염기서열배열.-, aligrment gap; O, 첫 번째줄과 같은 염기서열.

Table 1. 우리 나라에 분포하는 4가지 Hyrcanus 그룹 모기의 구분을 위하여 고안된 종 특이 PCR primers.

	Primer code	Primer nucleotide sequences (5'?3')
687	(+)	ACC CTG GAC GGT GGA TCA CTY GG
CS250	(−)	GTT AGT TTC TTT TCC TC
688	(+)	GGG AAC CTA CCA TGA CGW A
689	(+)	CAG GTG TCT TCC TCW TCY A
Ant-S	(+)	AAG TAG TAA ACA GCA GCA G
Sin-S	(−)	GCT GTA TTA TTG TTG TCC A
Pul-S	(−)	ATT GTA TGC CAC GCT TTC G
Asp-S	(−)	TTT GCT GTA TCG TTA GGA CC

Fig. 2. 4가지 Anopheles종 특이(species specific primers)를 사용한 POR 산물; M:100bp ladder, A: sinensis; B:An. sp.; An. lesteri; D: An. pullus.

각기 PCR로 생성된 종 특이 밴드는 특이하여 다른 종의 primer로는 결코 PCR산물이 생성되지 않았다.

5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA의 염기서열 비교를 통해 이제까지 알려지지 않은 한 개의 뚜렷이 다른 종이 Hyrcanus그룹 중에 존재함을 알 수 있었다. 유전자의 차이는 *An. sinensis*와 *Anopheles* sp.(미기록종)에서 67 bp, *An. lesteri* 과 *An.* sp.에서 132 bp, *An. pullus*과 *An.* sp.에서 143 bp를 나타내었다. *Anopheles* sp.의 PCR산물은 agarose gel 상에서 432 bp로 나타났다. 이 조사 연구에서 *An. sinensis* 라고 동정된 개체 중에서 비교적 많은 수의 *Anopheles.* sp.가 발견되었는데 형태로는 거의 구분이 되지 않았다(unpublished). 잘 알려지지 않은 모기 종의 분류 연구뿐 아니라 이들의 생물학적 행태 및 말라리아 매개종의 효율에 대한 연구가 향후 필요하다.

5. 참고문헌

1. Harrison, B.A. 1972. A new interpretation of affinities within the *Anopheles hyrcanus* complex in South East Asia. Mosq. Syst., 4: 73-83.
2. Hong, H.K. 1977. Ecological studies on Korean mosquitoes mainly found in the human habitation [Ph.D. dissertation]. Tankook University, Seoul. p 57
3. Hwang, U.I., Yong, T.S. and Ree, H.I. 2004. Molecular evidence for synonymy of *Anopheles yatsushiroensis* and *An. pullus*. J. Am. Mosq. Cont. Assoc., 20: 99-104.
4. Kim, H.C., Lee, K.W., Klein, T.A. and Strickman, D.A. 2000. Seasonal prevalence of mosquitoes collected from light trap in Korea (1995-1996). Korean J. Entomol., 29: 181-187.
5. Lee, J.S., Lee, W.J., Cho, S.H., Ree, H.I. 2002. Outbreak of *vivax* malaria in areas adjacent to the demilitarized zone, South Korea, 1998. Am. J. Trop. Med. Hyg., 66: 13-17.
6. Lee, W.J., Lee, H.W., Shin, E.H., Yang, Y.C., Kim, N.R., Hong, S.T. and Lee, J.S. 2000. Vector determination of tertian malaria *Plasmodium vivax* by polymerase chain reaction. Korean J. Entomol., 30: 77-83.
7. Ministry of Health and Welfare. 2004. Epidemiology of malaria in Korea, 2003. Communic. Dis. Monthly Rep., 15: 85-91.
8. Ree, H.I. 2000. Unstable *vivax* malaria in Korea. Korean J. Parasitol., 38: 119-138.
9. Ree, H.I. 2003. Taxonomic review and revised keys of the Korean mosquitoes (Diptera: Culicidae). Korean J. Entomol., 33: 39-52.
10. Ree, H.I., Hong, H.K. and Paik, Y.H. 1967. Study on natural infection of *P. vivax* in *Anopheles sinensis* in Korea. Korean J. Parasitol., 5: 3-4.
11. Shin, E.H. and Hong, H.K. 2001. A new synonym of *Anopheles*(*Anopheles*) *pullus* Yamada, 1937 *A.* (*A.*) *yatsushiroensis* Miyazaki, 1951. Korean J. Entomol., 31: 1-5.
12. Strickman, D.A., Miller, M.E., Lee, K.W., Kim, H.C., Wirtz, R.A., Perich, M., Novakoski, W.L., Feigner, B.H. and Roh, C.S. 2001. Successful entomological intervention against *Anopheles sinensis*, limiting transmission of *Plasmodium vivax* to American soldiers in the Republic of Korea. Korean J. Entomol., 31: 189-195.
13. Tanaka, K., Mizusawa, K., Sangstad, E.S. 1979. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawa Islands) and Korea (Diptera: Culicidae). Contrib. Am. Entomol. Instit., 16: 1-987.
14. Tompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Higgins, D.G., 1997. The clustal X windows interface flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res., 25: 4876-4882.

15. Wilkerson, R.C., Li, C., Rueda, L.M., Kim, H.C., Klein, T.A., Song, G.H. and Strickman, D. 2003. Molecular confirmation of *Anopheles*(*Anopheles*) *lesteri* from the Republic of South Korea and its genetic identity with *An.* (*An.*) *anthropophagus* from China (Diptera: Culicidae). Zootaxa, 378: 1-14.
16. Xu, J.J., Feng, L.C. 1975. Studies on *Anopheles hyrcanus* group of mosquitoes in China. Acta Entomol. Sin., 18: 77-104 (In Chinese).