

디지털 PCR을 응용한 특정 *amoA* 유전자를 가진 질산화 Archaea 동정

박병준 · 박수제 · 이성근*

충북대학교 생명과학부

해양 및 토양에서의 암모니아 산화는 세균에 비해 *Crenarchaeota* 그룹의 archaea에 의해 우세하게 일어나고 있음이 알려졌다. 서해 갯벌에서, 배양에 의존하지 않고, 특정 암모니아 산화 유전자(*amoA*)를 가진 archaea를 동정하고자 디지털 PCR법을 응용한 nested PCR법을 개발하였다. *amoA*와 16S rRNA 유전자가 동시에 증폭된 샘플의 분석결과, 16S rRNA 유전자에 비해 *amoA* 유전자의 다양성이 높았으며, I.1a 그룹의 crenarchaea가 I.1b 그룹의 crenarchaea보다 갯벌지역에서 암모니아 산화에 우점적으로 기여하고 있음을 알 수 있었다. 본 연구에서 시도된, 디지털 PCR과 multiplex-nested PCR을 접목한 접근법을 이용하면 특정 기능유전자를 가진 미생물을 환경에서 검출하는데 응용할 수 있을 것이다.

Key words □ *amoA*, digital PCR, diversity, nitrifying archaea, tidal flat, 16S rRNA gene

환경에 존재하는 다양한 미생물 중에서 실험실의 인공배지에서 배양이 가능한 미생물은 일반적으로 1%이하라고 알려져 있으며, 또한 환경에 따라 다른 배양성을 보이고 해양생태계의 경우 훨씬 낮은 배양성을 보인다(7, 9). 기존의 방법으로 배양이 불가능하였던 미생물의 존재를 알게 된 것은 각종 첨단 분자생태학 기술이 개발되면서 부터이며, 이러한 기술은, 배양을 통하지 않고 환경으로부터 직접 추출한 환경 지놈 DNA를 이용하여 16S rRNA 유전자와 같은 계통진화 관련 유전자를 PCR 증폭하여 라이브러리를 제조하고 염기서열을 분석하는 것으로 이루어져 있다(6, 17, 21). 실제로, 다양한 환경에서 16S rRNA 유전자 라이브러리 제조 및 염기서열 분석을 통하여, 지금까지 배양하지 못한 수많은 다양한 미생물들이 존재함을 알게 되었다(2, 8, 16, 20).

현재 환경미생물의 지표가 되는 다양한 기능 유전자(functional gene) 및 계통발생유전자(phylogenetic gene)가 발굴되고 있으며, 이들의 다양성을 분석하는 연구가 환경미생물 및 생태 분야의 프로젝트에서 활발히 진행되고 있다(4, 15). 하지만, 이러한 유전자의 PCR 증폭을 통한 다양성 분석은 근본적인 한계들을 가지고 있다. 극복해야 할 중요한 문제점은 대부분의 경우 지놈상에서 지표가 되는 계통발생유전자와 기능 유전자가 멀리 떨어져 있기 때문에 이들의 계통발생학상의 phylogroup을 확인할 수 없다는 것이다(13). 이러한 한계를 극복하고자 최근 나온 방법으로 희석-소멸(dilution-extinction)법을 응용한 microfluidic digital PCR법(13)과 multiple displacement amplification (MDA)-PCR법(14)이 제안되었다. 이를 통하여 특정 proteorhodopsin이나 formyl-THF 합성유전자를 가진 배양이 불가능한 미생물의 계통

형(phylogroup)을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 방법들은 첨단 기기의 이용이 필요하고 상대적으로 비용이 많이 들어 일반적으로 사용하기 힘든 경우라 할 수 있다. 본 연구에서는 희석-소멸법을 응용한 digital PCR과 nested PCR을 접목하여 해양 퇴적물 시료에서 특정 archaeal *amoA* 유전자를 가진 archaeal phylogroup을 동정하고자 하였다.

극한환경에서 주로 발견되어 왔던 *Archaea*가 일반 환경에 널리 존재하고 있음이 분자생태기술을 통하여 밝혀졌다(5). 또한, 최근 연구에 의하면, 해양 및 토양의 암모니아 산화는 양적으로 기존에 알려진 암모니아 산화세균(ammonia-oxidizing bacteria)이 아닌 *Archaea*에 의해 대부분 일어나고 있음이 알려지고 있다(12). 갯벌에 존재하는 생지화학적 순환 관련 미생물은 서해 연안 환경정화에 매우 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다(10). 이에 본 연구를 통하여 서해 갯벌에서의 암모니아 산화 활성과 관련된 *amoA* 유전자와 그 유전자를 가진 archaeal phylogroup의 관계를 규명하고자 하였다.

서해 무창포 지역의 갯벌(36°18'N 126°30'E)에서 표층 0-1 cm 퇴적층시료를 채취하였다. 채취된 샘플 10 g을 인공해수(1) 100 ml에 현탁하여 10°C에서 1시간 동안 진탕배양을 하여 미생물세포와 침전물과의 분리를 시도하였다. 현탁액은 500×g에서 30분 원심분리 하여 침전물을 회수하여 인공해수에 재현탁 하였다. 이 현탁액을 인공해수를 이용하여 시험관에서 10배수 연속 희석을 실시하였다. 이 희석액을 PCR 주형으로 archaeal 16S rRNA 유전자 PCR primer 쌍을 이용한 nested PCR을 통하여 최적확수(most probable number)를 계산하였다. 최적확수 계산을 위한 세부적인 PCR 방법은 다음과 같다. 시험관 희석 현탁액 1 µl와 10 pmol의 archaeal 16S rRNA gene primer 쌍인 arch20F(5'-TTCCGGTTGATCCYGCRG-3')과 arch958R(5'-TCCGGCGTTGAMTCCAATT-3')(5)를 각각 1 µl를 넣고 0.1 µl *EF*-Taq polymerase (5

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-43-261-2300, Fax: 82-43-264-9600
E-mail: rhees@chungbuk.ac.kr

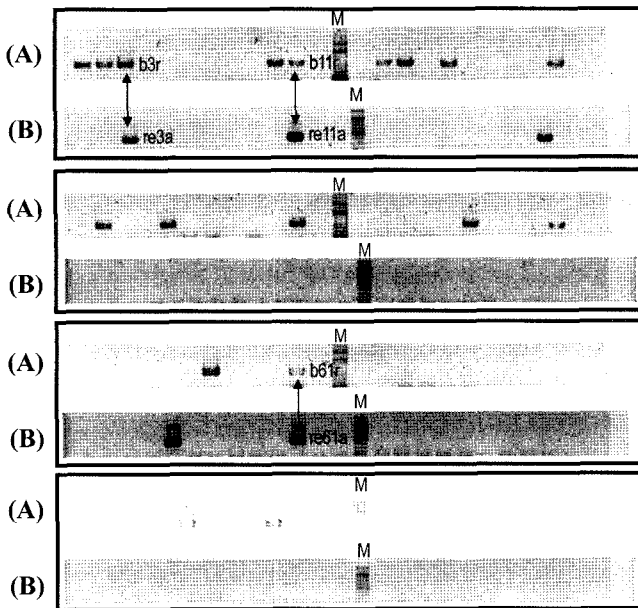


Fig. 1. Gel electrophoresis showing amplification products of archaeal 16S rRNA and *amoA* genes following multiplex-nested PCR in 96 well plate. PCR amplification products of 16S rRNA (A) and *amoA* genes (B) were sequentially aligned in the same order. The length of 16S rRNA gene and *amoA* PCR products were 590 bp, and 420 bp, respectively. Arrows indicate the samples showing amplification of both *amoA* and 16S rRNA gene. Name of sequence was also described beside each sample. M denotes 100 bp size

unit/ μ l, solgent, Korea), 2 μ l 10X PCR buffer, 1 μ l dNTP을 넣고 최종 20 μ l 반응 혼합물을 만들어지도록 멸균증류수로 채웠고 이를 통해 일차 PCR 증폭을 실시하였다: 94°C 5분간 predenaturation 과정을 거친 후 denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 30초, extension 72°C 45초를 30 cycles 동안 수행하였고 last extension을 5분간 수행하였다. PCR 증폭액을 1/10 희석한 후 1 μ l를 arch34XF(5'-TAYGGGCGCAGCAGKCG MG-3')과 arch91XR(5'-GTGGTGCTCCCCGCCAATT-3')(20) archaeal 16S rRNA gene primer 쌍을 이용하여 이차 PCR을 실시하였다. 94°C 5분간 predenaturation, 과정을 거친 후 denaturation 94°C 30초, annealing 65°C 30초, extension 72°C 30초를 30 cycles 동안 수행하였고 last extension을 5분간 수행하였다. 이차 PCR후 전기영동을 통하여 PCR 증폭 산물의 존재유무를 확인한 후 계수에 이용하였다. 이를 5번 반복하여 최적확수 계산을 통해 현탁액 내의 archaea 세포의 양을 계산하였다. 계산 결과 약 1.5×10^7 cells/g의 archaea 세포가 존재하고 있음을 알 수 있었다. 이는 해양 퇴적층과 토양에서 전체 약 10^6 개의 세포 중 archaea 세포가 약 1-10% 정도로 추정되는 것과 맥락을 같이한다고 볼 수 있다(11).

현탁액의 archaea 세포수의 계산결과를 이용하여, 약 30%이하의 확률(13)로 한 개의 archaea 세포가 한 개의 반응에서 nested PCR을 통하여 16S rRNA 유전자의 증폭이 일어날 수 있도록

하였다. 이 때 96 well plate 상에서 nested PCR을 실시하였다. 이 조건에서 확률 상 증폭이 일어난 well은 한 개의 세포가 들어있을 것으로 추정 할 수 있다(13). 또한, 한 세포로부터 기능유전자와 계통발생유전자를 동시에 검출하기 위하여 multiplex-nested PCR을 실시하였으며, archaeal *amoA* primer 쌍 (*amoAF*, 5'-STAATGGTCTGGCTTAGACG-3'; *amoAR*, 5'-GCGGCCATC CATCTGTATGT-3')(3)과 Archaea 세포수 계수에 사용한 archaeal 16S rRNA 유전자 primer (*arch20F*, *arch958R*)쌍(5)을 동시에 사용하여 일차 PCR을 하였다: 94°C 5분간 predenaturation, 과정을 거친 후 denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 30초, extension 72°C 45초를 30 cycles 동안 수행하였고 last extension을 5분간 수행하였다. 여기서 얻은 PCR 증폭액을 1/10 희석한 후 1 μ l를 이용하여 *amoA*와 16S rRNA 유전자 증폭을 각각 실시하였다. 16S rRNA 유전자의 2차 증폭은 위에 언급한 바와 같이 arch34XF와 arch91XR primer 쌍(20)을 이용하여 PCR을 실시하였다. 이차 *amoA* 유전자 PCR을 위하여 두 번째 archaeal *amoA* primer 쌍(*amoA26F*, 5'-GACTACATMTTCTAYACWGAY TGGGC-3'; *amoA462R*, 5'-GGTCKWGGATAYTTGAAGCC-3')(19)을 사용하였다. 94°C 5분간 predenaturation 과정을 거친 후 denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 30초, extension 72°C 30초를 30 cycles 동안 수행하였고 last extension을 5분간 수행하였다. 모든 PCR 조건에서 *EF*-Taq과 제공되는 10X *EF*-Taq buffer를 (solgent, Korea) 사용하였으며, PCR 산물의 정제는 PCR purification kit (solgent, Korea)을 이용하였다. 실험결과, 96 well plate에서 archaeal 16S rRNA 유전자 증폭된 well은 18개, archaeal *amoA* 유전자가 증폭된 well은 5개로 각각 19% 및 5%로 나타났다(Fig. 1). PCR 증폭 산물의 염기서열 분석을 실시한 결과 모든 증폭 산물이 각각 archaeal 16S rRNA 유전자와 archaeal *amoA* 유전자임을 알 수 있었으며 이중 archaeal 16S rRNA 유전자와 *amoA* 유전자가 동시에 증폭이 된 경우는 3개에 해당하였다. *amoA* 유전자만 증폭된 2개의 샘플이 archaea가 아닌 세균에서 유래했다고도 생각할 수 있으나, Ottesen 등(13)의 논문에서도 약 25%의 동시 증폭이 나타내는 것으로 미루어 보아 이는 기술적 요인으로 추론된다. 또한 *amoA* 유전자 염기서열 자체가 알려진 I.1a 그룹 crenarchaea와 매우 근접하여 세균유래가 아님을 추정할 수 있었다 (Fig. 2).

증폭된 *amoA*와 16S rRNA 유전자의 phylogeny를 분석한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 각 유전자의 서열은 CLUSTAL X로 배열하였으며(18), MEGA를 이용한 Minimum Evolution의 Tamura-Nei option을 이용하여 계통수를 작성하였다 *amoA* 유전자는 nucleotide의 서열을 이용하여 분석하였다. re55a (I.1b 그룹의 crenarchaea)를 제외한 모든 *amoA* 유전자는 I.1a 그룹 crenarchaea와 근연관계가 있음을 알 수 있었다(re55a의 경우 54d9과 94% 핵산 염기서열 상동성). re3a, re22a, re11a의 경우 *candidatus Nitrosopumilus maritimus*와 매우 가까운 관계(>90% 핵산 염기서열 상동성)에 있다는 것을 알 수 있었다. re61a의 경우 다른 샘플에 비해 상대적으로 먼 80%정도의 상동성을 보였다. 16S rRNA gene의 계통수 분석 결과 18개의 PCR 증폭산물

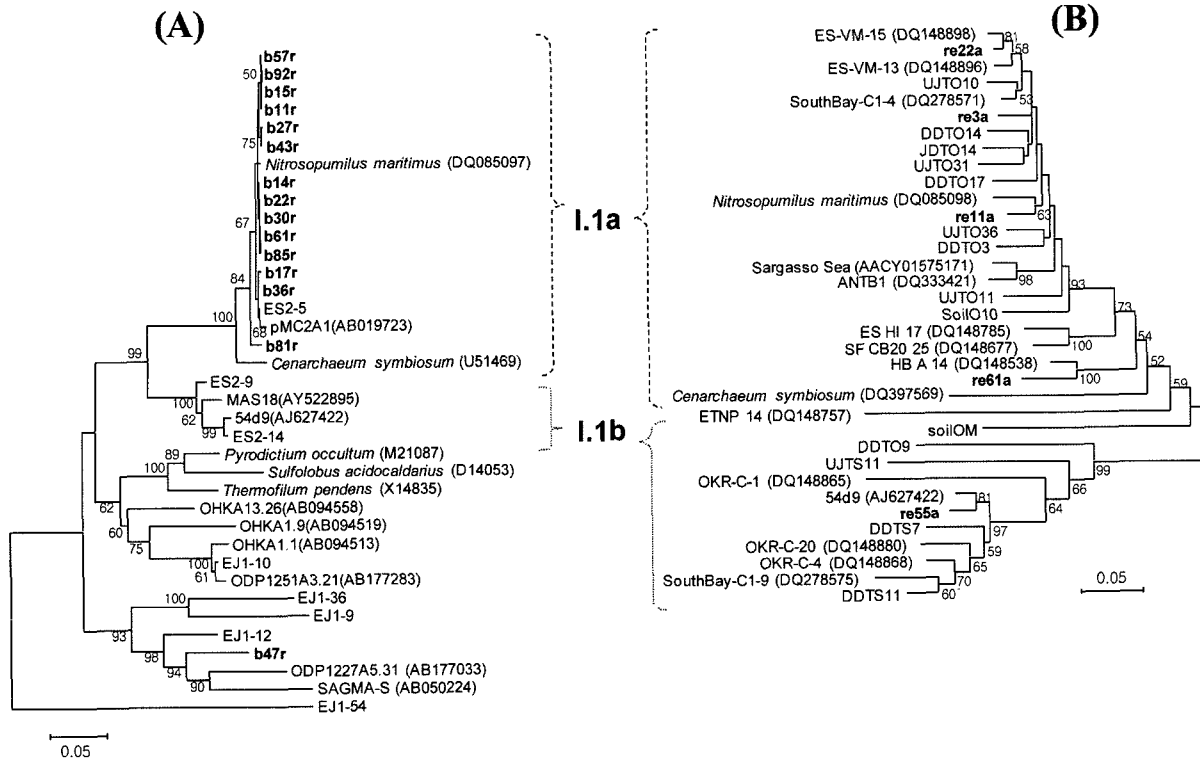


Fig. 2. Phylogenetic tree of archaeal 16S rRNA and archaeal *amoA* genes retrieved in this study. (A) Phylogenetic tree of archaeal 16S rRNA gene and reference sequences. (B) Phylogenetic tree of archaeal *amoA* gene and reference sequences. The sequences obtained in this study are indicated by boldface type. For relative comparison, two nitrifying archaeal groups (I.1a and I.1b) were indicated. Number in parentheses following clone names show GenBank accession number. Number within the dendrogram indicates the occurrence (%) of the branching order in 1,000 bootstrapped trees and only values in excess of 50% are shown. The scale bar represents nucleotide substitutions per 100 nucleotide positions.

이 3개의 그룹으로 나타남을 알 수 있었으며 *b47r* (methanogenic euryarchaeota)을 제외하면 모두 *Crenarchaeota*로 나타나며, 두 그룹은 각각 candidatus *Nitrosomumilus maritimus*와 98% (*b11r*, *14r*, *81r*, *22r*, *27r*, 등), 90% (*b36r* 과 *b17r*)이상의 상동성을 보임을 알 수 있었다. *amoA*와 16S rRNA 유전자의 계통수를 비교한 결과 *amoA*와 16S rRNA 유전자를 동시에 증폭된 샘플의 경우, 16S rRNA 유전자의 염기서열은 동일하나 *amoA* 유전자인 *re11a*, *re22a*, *re61a*의 유전자는 >80%이상의 상동성을 보여 기능유전자의 다양성(진화속도)이 상대적으로 매우 높음을 알 수 있었다. 육지 혹은 담수 환경에서 주로 검출되는 I.1b그룹 *crenarchaeotic*의 16S rRNA 유전자는 이 실험에서는 검출되지 않아 *re55a*에 해당하는 *Crenarchaeota*는 확인할 수 없었으며, 이 그룹이 상대적으로 토양환경에 비해 적게 존재함을 알 수 있다. 총 11개의 16S rRNA 유전자의 염기서열이 동일하나 이중 3개의 샘플만이 *amoA* 유전자가 검출된 것은 위에서 언급한 바와 같이 PCR 증폭 성공률이 100%에 못 미치기 때문으로 해석되며 특히 *amoA* 유전자의 증폭 성공률이 낮게 나타남을 알 수 있다.

본 연구에서 digital PCR의 원리를 도입한 multiplex-nested PCR을 통하여, 갯벌환경으로부터 *amoA* 유전자를 가진 archaea을 동정(검증)하였다. 본 연구에서 제시한 방법을 통하여, PCR증

폭을 통한 클론 라이브러리 분석에 비해, 1) PCR 편견을 제거한 군집의 분포에 대한 정보를 알 수 있었으며, 나아가, 2) 미생물의 생태연구에 필수적인 기능(functional gene)과 구조(phylogenetic gene)를 연결시킬 수 있었다. 본 실험을 통하여 갯벌에서는 I.1a 그룹 *crenarchaeotic*의 암모니아 산화 archaea가 우점하고 있음을 알 수 있었다. 이 방법을 이용하면 배양에 의존하지 않고, 특정 기능유전자를 가진 난 배양 미생물을 환경에서 직접 동정(검증)하는데 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 말

본 논문은 2006년도 충북대학교 교내 연구비에 의해 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ahn, Y.B., S.K. Rhee, D.E. Fennell, L.J. Kerkhof, U. Hentschel, and M.M. Hggblom. 2003. Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4159-4166.
- Amann, R. 2000. Who is out there? Microbial aspects of biodiver-

- sity. *Sys. Appl. Microbiol.* 23, 1-8.
3. Beman, J.M. and C.A. Francis. 2006. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediment of a hypernutrified subtropical estuary Bahia del Tobari, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7767-7777.
 4. Brümmer, I.H.M., A. Felske, and I. Wagner-Döbler. 2003. Diversity and seasonal variability of β -Proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4463-4473.
 5. De Long, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 5685-5689.
 6. Di Pinto, A., F. VitoTony, M.C. Guastadisegni, C. Martino, F.P. Schena, and G. Tantillo. 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control.* 18, 76-80.
 7. Greene, K. 2002. New method for culturing bacteria. *Science* 296, 1000.
 8. Inagaki, F., M. Suzuki, K. Takai, H. Oida, T. Sakamoto, K. Aoki, K.H. Nealson, and K. Horikoshi. 2003. Microbial communities associated with geological horizons in coastal seafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7224-7235.
 9. Kaerberlein, T., K. Lewis, and S.S. Epstein. 2002. Isolating "Uncultivable" microorganism in pure culture in a simulated natural environment. *Science* 296, 1127-1129.
 10. Kim, B.S., H.M. Oh, H. Kang, and J. Chun. 2005. Archaeal diversity in tidal and sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J. Microbiol.* 43, 144-151.
 11. Kemnitz, D., S. Kolb, and R. Conrad. 2007. High abundance of *Crenarchaeota* in a temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 442.
 12. Leinger, S., T. Urich, M. Schloter, L. Schwark, J. Qi, G.W. Nicol, J.I. Prosser, S.C. Schuster, and C. Schleper. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442, 806-809.
 13. Ottesen, E.A., J. Hong, S.R. Quake, and J.R. Leadbetter. 2006. PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria. *Science* 314, 1464-1467.
 14. Stepanauskas, R. and M.E. Sieracki. 2007. Matching phylogeny and metabolism in the uncultured marine bacteria, one cell at a time. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104, 9052-9057.
 15. Sebat, J.L., F.S. Colwell, and R.L. Crawford. 2003. Metagenomic profiling: Microarray analysis of an environmental genomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4927-4934.
 16. Stackebrandt, E., W. Liesack, and B.M. Goebel. 1993. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J.* 7, 232-236.
 17. Tsai, Y.L. and B.H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1070-1074.
 18. Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W; Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
 19. Park, S.J., B.J. Park, M.S. Kim, and S.K. Rhee. 2007. Abundance and diversity of ammonia-oxidizing Archaea in marine sediments characterized by comparative analysis of archaeal 16S rRNA and *amoA* genes. Submitted.
 20. Park, S.J., C.H. Kang, and S.K. Rhee. 2006. Characterization of the microbial diversity in a Korean solar saltern by 16S rRNA gene analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 1640-1645.
 21. Whitehouse, C.A. and H.E. Hottel. 2007. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Mol. Cell. Probes.* 21, 92-96.

(Received September 1, 2007/Accepted September 21, 2007)

ABSTRACT: Identification of the Nitrifying Archaeal Phylotype Carrying Specific *amoA* Gene by Applying Digital PCR

Byoung-Jun Park, Soo-Je Park, and Sung-Keun Rhee*(Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Mesophilic *Crenarchaeota* have been known to be predominant among ammonia-oxidizing microorganisms in terrestrial and marine environments. In this study, we determined the archaeal phylotypes carrying specific *amoA* by combining digital PCR and multiplex-nested PCR. Analysis of samples in which *amoA* and 16S rRNA gene were amplified showed that *amoA* gene diversity was relatively higher than that of 16S rRNA gene. Nitrifying archaeal group I.1a was dominant over I.1b group of crenarchaeota and euryarchaeota. This approach could be applied for interrelating a functional gene to a specific phylotype in natural environments.