

RAPD 표지자 분석에 의한 가시아메바속 한국분리주의 유전적 지위

홍용표^{1)*}, 오승환²⁾, 라미숙¹⁾, 임경일¹⁾

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소¹⁾, 소아과학교실²⁾

국문초록: 가시아메바 속(*Acanthamoeba* spp.)의 DNA 염기 구성 정보와 관계없이 임의의 10개의 염기로 구성된 프라이머를 사용하여 random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction(RAPD-PCR)에 의해 게놈 상의 DNA를 무작위로 증폭하여 확인된 표지자로서 한국 분리주 및 외국 분리주와 기존의 알려진 4개 가시아메바 종간의 유전적 근연관계 분석을 통해서 4개 한국 분리주의 분류상의 성상을 규명하였다. 본 연구에서 *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. polyphaga*와 한국 분리주인 YM-2, YM-3, YM-4, YM-5, 그리고 외국 분리주인 HOV의 게놈 DNA는 18 종류의 프라이머에 의하여 다양한 양상의 증폭산물을 보였으며, 그 중 9개 프라이머는 한국 분리주간에도 특이성을 보이는 RAPD 표지자를 제공하였다. 총 18개의 프라이머에 대한 증폭 산물을 대상으로 각 시료의 유사도를 조사한 결과, *A. culbertsoni*는 *A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. polyphaga*와 유사도가 각각 0.300, 0.308, 0.313이었고, *A. hatchetti*와 *A. triangularis*간의 유사도는 0.838이었다. 한국 분리주 YM-2, -3, -4 간의 평균 유사도는 0.959이었고, YM-2, -3, -4와 *A. hatchetti*, *A. triangularis* 간의 평균 유사도는 0.832이었다. 한국 분리주 YM-5는 YM-2, -3, -4 간의 비교에서 평균 0.237의 유사도를 보인 반면, *A. culbertsoni*와 유사도 0.857을 보여, 다른 한국 분리주보다 *A. culbertsoni*와 유전적으로 유사함을 알 수 있었다. UPGMA법에 의한 유전적 근연관계 분석 결과 phenogram 상에 두개의 분지군이 존재하는데, *A. hatchetti*, *A. triangularis* 및 3개 한국 분리주(YM-2, -3, -4)가 하나의 분지군을, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, HOV주, 및 YM-5가 다른 분지군을 형성하는 것으로 나타났다. 게놈 DNA 상의 변이에 근거하여 볼 때, YM-5주는 유전적으로 *A. culbertsoni*와 거의 유사한 분리주이며 한국 분리주는 최소 2종 이상의 가시아메바로 분류할 수 있다고 사료된다.

서 론

가시아메바는 토양이나 하천, 호수 등 여러 환경에서 서식하며 종에 따라서 육아종성 아메바성 수막뇌염(granulomatous amoebic encephalitis; GAE)을 일으키거나(Martinez, 1991), 심각한 시력 장애를 유발하는 각막염(Stehr-Green, 1989)을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 가시아메바는 인체 면역 결핍 바이러스(human immunodeficiency virus)의 감염 시와 같은 면역 결핍 상태에서

치명적인 전신성 감염(Friedland et al., 1992)이나 호흡기 감염(Newsome et al., 1992) 등의 발생 시에도 발견되었다. 1989년까지 미국에서만 200예의 인체 발병이 보고되었고(Visvesvara and Stehr-Green, 1990), 우리 나라에서는 1976년에 5세 어린이에서 가시아메바에 의한 것으로 의심되는 수막뇌염이 보고되었고(Ringsted et al., 1976) 가시아메바성 각막염(Cho et al., 1992)이 보고되고 있기에 이 원충의 정확한 동정은 아메바성 질환으로 의심되는 환자의 진단과 치료에 필수적이라 하겠다.

자유생활아메바의 기존 분류 및 동정은 형태학적, 생리학적, 생화학적 및 면역학적 특성에 의해 행해졌으나(Pussard and Pons, 1977; Costas and Griffiths, 1985 & 1986; Moura et al., 1992), 아메바의 종 또는 분리주 특이성(species or strain specific)을 보이는 표지자를 설정하는 것이 용이하지 않았다. 최근의 분자유전학적 분석법은 기생충성

* 논문접수 1995년 8월 7일, 수정 후 게재확정 11월 10일.

• 이 논문은 1994학년도 연세대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음.

* 별책요청 저자

원충류의 동정 및 분류에 다양하게 응용되고 있으며(Riley, 1991) 가시아메바에 대해서 주로 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 또는 PCR 표지자에 의한 분류가 시도되고 있다(Yagita, 1993; Vodkin *et al.*, 1992). 그러나 국내에서는 아직까지 분자유전학적 표지자(molecular genetic markers) 분석에 의한 가시아메바의 분류는 시도되지 않았기에 본 연구에서는 RAPD 분석법(Williams *et al.*, 1990)을 이용하여 가시아메바 한국 분리주의 분류를 시도하였다. RAPD 분석법은 임의로 선정된 10개의 염기로 구성된 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응법에 의해 게놈 상의 DNA를 무작위로 증폭하여 전기영동에 의해 분획한 후 증폭산물의 크기에 따른 다형성(amplification fragment length polymorphisms)을 분석하는 방법이다. 이 방법은 현재까지 다양한 생명체의 DNA 분석에 성공적으로 이용되었으며, 종 또는 분리주 특이성을 보이는 표지자의 분획양상을 관찰하여 분류에 성공적으로 응용되고 있다(Caetano-Anolles *et al.*, 1991).

본 연구는 가시아메바의 분류에 이용될 수 있는 분자유전학적 표지자를 제공하고자 수행되었으며, 또한 아직 동정되지 않은 한국에서 분리된 가시아메바 분리주들을 기존의 확정된 종들과의 유전적 근연관계를 비교해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 가시아메바의 배양

가시아메바는 연세대학교 의과대학 기생충학교실에서 수년간 무균적으로 계대 배양해 온 것으로(Table 1). 본 실험에서는 35°C 항온기 내에서 세 포배양용기(Falcon)를 사용해서 CGV 배지(Willaert, 1975)에서 무균 배양하여 실험에 사용하였다.

2. DNA 추출

가시아메바의 게놈 DNA 분리 방법은 De Jonckheere(1987)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 배양된 아메바의 영양형 0.5×10^7 개를 모아서 150 μ l 추출 용액(50 mM Tris-HCl: pH 8.0, 62.5 mM EDTA: pH 9.0, 4% Triton X-100, 2.5 M LiCl)에 부유시킨 다음 실온에서 10분간 방치한 후 동량의 phenol:chloroform(25:24)을 첨가하고 부유액을 만들어 4°C에서 5분간 10,000 rpm으로 원심 분리시켰다. 상층액에 2배 부피의 100% 에탄올을 첨가하여 -70°C에 30분간 방치하고, 4°C에서 10분간 10,000 rpm에서 DNA를 침전시킨 다음 진공 건조시켰다. DNA 침전물을 T.E. 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0: 1 mM EDTA)에 녹인 다음 20 μ g RNase A를 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 얼음 위에 올려놓아 반응을 정지시키고 phenol 추출법을 재 시행하였다. 최종 DNA 침전물을 200 μ l T.E.완충액에 충분히 녹인 후 자외선 흡광광도계(Beckman)를 이용하여 정량하였다. 0.4 ng/ μ l의 농도로 희석하여 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

3. 중합효소 연쇄반응법

500 μ l 중합효소 연쇄 반응관에 20 μ l의 중합효소 연쇄반응 혼합액(200 μ M dNTPs, 4.6 mM MgCl₂, 10 \times 중합효소 연쇄반응 완충액, H₂O, 5 μ M primer), Taq polymerase(0.7 units/ μ l, Perkin-Elmer)와 5 μ l DNA(0.4 ng/ μ l)를 넣고, 반응액의 증발을 막기 위해 50 μ l mineral oil을 첨가한 후, Minicycler(BioRad)를 사용하여 아래의 조건으로 반응시켰다. 94°C에서 1분간 DNA 변성, 36°C에서 1분간 프라이머와 주형 DNA의 결합, 그리고 72°C에서 2분간 DNA 합성을 1회로 하는 온도 순환을 45회 반복하였다. 45회 온도 순환이 완료된 후, 72°C에서 10분간 유지하여 미완성된 잔

Table 1. List of the *Acanthamoeba* spp. tested

| Name | Strain | Isolated from | Reference | Cultured since |
|------------------------------------|--------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------|
| <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> | — | — | Jadin, J.B. ^{a)} | October, 1984 |
| <i>Acanthamoeba hatchetti</i> | — | brackish water | Visvesvara, G.S. & Sawyer, T.K. | 1978 |
| <i>Acanthamoeba triangularis</i> , | SH 621 | human feces | Molet, B. ^{a)} | 1978 |
| <i>Acanthamoeba polyphaga</i> , | Ap | eye infection | Schuster, F.L. | September, 1984 |
| <i>Acanthamoeba</i> sp. | HOV ^{b)} | — | Schuster, F.L. | September, 1984 |
| | YM-2 ^{c)} | water puddle | — | 1976 |
| | YM-3 ^{c)} | storing reservoir | — | 1976 |
| | YM-4 ^{c)} | gills of freshwater fish | — | June, 1984 |
| | YM-5 ^{c)} | sewage | — | July, 1993 |

^{a)}Donors of each *Acanthamoeba* sp.; ^{b)}American isolate; ^{c)}Korean isolates

여 DNA의 증폭을 마무리한 다음 4°C에서 보관하였다. 실험에 사용된 프라이머는 캐나다의 British Columbia 대학의 생명공학연구소의 John B. Hobbs 박사로부터 구입하였으며, 임의로 선택한 10개의 염기로 구성된 60개의 프라이머를 실험에 사용하였다. 총 60개의 프라이머를 이용한 예비 실험에서, DNA의 증폭산물의 차이가 뚜렷하여 분석이 용이한 38개의 프라이머를 선택하여 종합효소 연쇄반응을 수행한 후 그 증폭산물의 분획양상을 비교 관찰하였다. 증폭산물이 합성되지 않거나, 소수의 증폭산물만이 합성된 나머지 프라이머 22개는 실험에서 제외시켰다.

결 과

1. RAPD 증폭산물의 분획양상

본 실험에서 사용한 총 38개의 프라이머 중 18개 프라이머(UBC primer 211, 212, 220, 702, 703, 704, 706, 708, 716, 718, 723, 725, 726, 727, 730, 732, 733, 734)에 의한 증폭산물은 가시아메바 속의 종간(*A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. polyphaga*)의 다양한 양상을 보였으며, 그 중 9개의 프라이머(UBC primer 703, 704, 706, 708, 718, 725, 726, 730, 733)에 의한 증폭산물은 4종 뿐만 아니라 분리주간(YM-2, -3, -4, -5, HOV)에도 증폭산물의 차이가 관찰되었다. 대체적으로 각 프라이머에 의한 100에서 2200 base pair(bp) 사이에서 3-20개의 증폭산물이 관찰되었으며, 각 시료에 대하여 평균 10.3개의 증폭산물이 분석에 이용되었다(Fig. 1 및 Table 2). 각 시료에서 18개 프라이머에 의한 증폭산물중 분석에 사용된 총 RAPD 표지자의 수는 시료 당 159-198개였고, 9개 시료에서 평균 185.1개의 표지자가 분석에 사용되었다(Table 3). 순차적으로 비교된 시료간에 공유하는 표지자의 수는 YM-3과 YM-4 사이에 190개로 가장 많았고, *A. polyphaga*와 *A.*

4. Agarose 겔 전기영동법에 의한 종합효소 연쇄반응 증폭산물의 분석

종합효소 연쇄반응 증폭산물을 loading buffer와 혼합하여 2% agarose gel(SeaKem)에 TBE 완충액(100 mM Tris-HCl, 83 mM boric acid, 1 mM EDTA; pH 8.3)을 사용하여 100 base-pair DNA ladder(GIBCO BRL)와 함께 150 volts로 5시간 전기영동시키고, ethidium bromide로 정색하여 자외선 투조기 상에서 Polaroid film(No. 667)으로 사진을 찍어 관찰하였다. 증폭산물의 크기는 computer program인 GelMetric을 이용해서 계산하였다.

5. 유사도 및 유전적 근연관계 분석

RAPD 증폭산물의 다형성은 전기영동 후 gel 상에서 비교되는 시료간에 동일한 크기의 증폭산물의 유무의 형태로 관찰되는데, 각 시료에 대한 증폭산물의 수를 세어 시료간에 공유하는 동일한 크기의 증폭산물의 수에 따라 유전적 유사도를 기준에 알려진 Nei and Li(1979)의 방법에 의해 다음과 같이 계산하였다.

$$F = \frac{2M_{xy}}{(M_x + M_y)}$$

F: 유사도 — 비교되는 시료간에 공유하는 증폭산물의 비율

M_{xy}: 비교되는 시료간 공유하는 증폭산물의 수

M_x, M_y: 비교되는 각각의 시료에서 관찰된 총 증폭산물 수

위의 공식에 의해서 계산된 유사도를 이용해서 dissimilarity 값(1-F)을 계산한 후, 컴퓨터 프로그램 PHYLIP(Felsenstein, 1993)을 이용해서 Sokal and Michener(1958)의 unweighted pair-group method with arithmetic mean(UPGMA) 방법에 의해 아메바 시료간의 유전적 유전관계를 나타내는 phenogram을 작성하였다.

Table 2. Arbitrary primers selected for full scale survey by RAPD-PCR analysis

| Primers accession No. ^{a)} | Primer sequences | Average number of amplification fragments |
|-------------------------------------|---------------------|---|
| 208 | 5'-ACG GCC GAC C-3' | 11.1 |
| 211 | 5'-GAA GCG CGA T-3' | 9.9 |
| 220 | 5'-GTC GAT GTC G-3' | 9.8 |
| 702 | 5'-GGG AGA AGG G-3' | 12.8 |
| 703 | 5'-CCA ACC ACC C-3' | 8.6 |
| 704 | 5'-GGA AGG AGG G-3' | 9.0 |
| 706 | 5'-GGT GGT TGG G-3' | 14.8 |
| 708 | 5'-GGG TTG TGG G-3' | 5.7 |
| 716 | 5'-GGA GGA GGG A-3' | 10.9 |
| 718 | 5'-GGG AGA GGG A-3' | 13.6 |
| 720 | 5'-GGG AGG GAG A-3' | 10.7 |
| 723 | 5'-CCC TCT CCT C-3' | 5.2 |
| 725 | 5'-GGG TTG GGT G-3' | 10.9 |
| 726 | 5'-GGT GTG GGT G-3' | 10.7 |
| 730 | 5'-CCA CAC CCA C-3' | 8.8 |
| 732 | 5'-CAC CCA CCA C-3' | 9.3 |
| 733 | 5'-GGG AAG GCA G-3' | 12.2 |
| 734 | 5'-GGA GAG GGA G-3' | 11.2 |

^{a)}Accession number of University of British Columbia in Canada

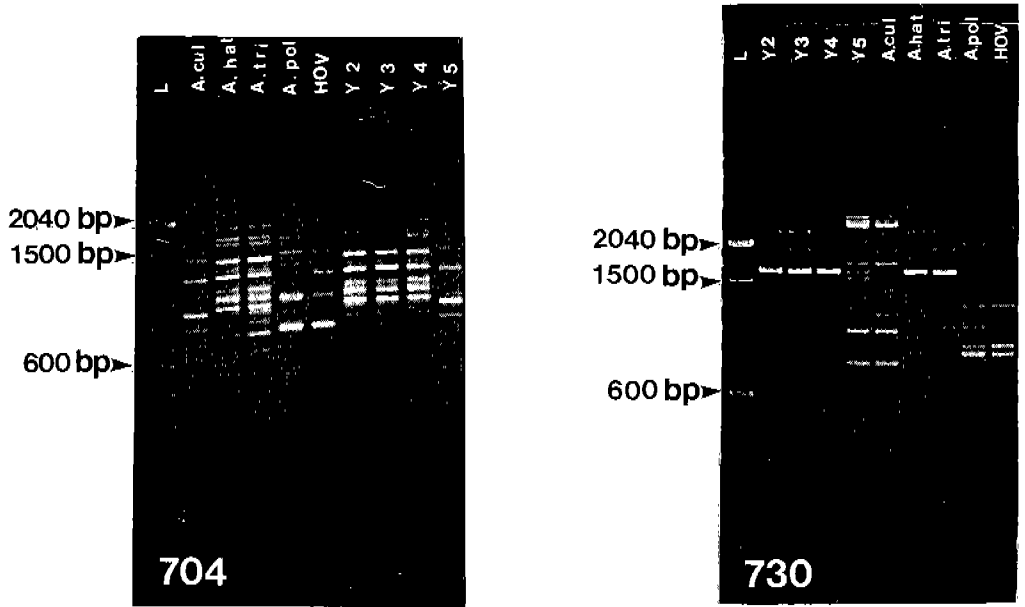


Fig. 1. Amplified DNA profiles of *Acanthamoeba* spp. using primers of 704 and 730. *A. cul* denotes *A. culbertsoni*, *A. hat* denotes *A. hatchetti*, *A. tri* denotes *A. triangularis*, *A. pol* denotes *A. polyphaga*, HOV denotes foreign isolate of HOV, Y2 denotes Korean isolate of YM-2, Y3 denotes Korean isolate of YM-3, Y4 denotes Korean isolate of YM-4, Y5 denotes Korean isolate of YM-5. L denotes DNA size marker of 100 base-pair ladder.

Table 3. Pairwise dissimilarity estimates based on the RAPD markers generated by 18 arbitrary primers

| | YM-2 ^{a)} | YM-3 | YM-4 | YM-5 | <i>A. cul</i> | <i>A. hat</i> | <i>A. tri</i> | <i>A. pol</i> | HOV |
|---------------|---------------------|-------|-------|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------|
| YM-2 | (198) ^{b)} | 0.959 | 0.949 | 0.226 | 0.253 | 0.810 | 0.876 | 0.269 | 0.316 |
| YM-3 | 188 | (194) | 0.969 | 0.243 | 0.256 | 0.797 | 0.854 | 0.266 | 0.314 |
| YM-4 | 188 | 190 | (198) | 0.242 | 0.253 | 0.792 | 0.861 | 0.280 | 0.310 |
| YM-5 | 44 | 47 | 47 | (191) | 0.857 | 0.253 | 0.278 | 0.331 | 0.322 |
| <i>A. cul</i> | 47 | 47 | 47 | 156 | (173) | 0.300 | 0.308 | 0.313 | 0.309 |
| <i>A. hat</i> | 153 | 149 | 150 | 47 | 53 | (180) | 0.838 | 0.254 | 0.337 |
| <i>A. tri</i> | 173 | 167 | 170 | 54 | 57 | 158 | (197) | 0.253 | 0.284 |
| <i>A. pol</i> | 48 | 47 | 50 | 58 | 52 | 43 | 45 | (159) | 0.806 |
| HOV | 59 | 58 | 58 | 59 | 54 | 60 | 53 | 135 | (176) |

^{a)}*A. cul*: *Acanthamoeba culbertsoni*; *A. hat*: *Acanthamoeba hatchetti*; *A. tri*: *Acanthamoeba triangularis*; *A. pol*: *Acanthamoeba polyphaga*; HOV: *Acanthamoeba* sp. HOV American isolate; YM-2: *Acanthamoeba* sp. Korean isolate; YM-3: *Acanthamoeba* sp. Korean isolate; YM-4: *Acanthamoeba* sp. Korean isolate; YM-5: *Acanthamoeba* sp. Korean isolate. ^{b)}Parthenesized figures on the diagonal denoted total number of RAPD markers in each sample, figures above the diagonal denoted dissimilarity estimates, and figures below the diagonal denoted the number of shared RAPD markers between compared samples.

hatchetti 사이에서 43개로 가장 적었다. 총 36개의 비교 쌍 중에서 24개 쌍이 60개 이하의 표지자를 공유하는 것으로 관찰되었고, 나머지 12개 쌍은 135-190개로 평균 164.8개의 표지자를 공유하는 것이 관찰되었다.

2. 유사도 및 유전적 근연관계

시료 종간의 특이적인 표지자로 관찰된 18개의 UBC 프라이머에 의한 증폭산물의 분획양상을 종합하여 기존의 유사도 공식(Nei and Li, 1979)에 의

해 수치를 계산한 결과, *A. culbertsoni*와 나머지 3개 가시아메바 종들(*A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. polyphaga*) 간에는 공유하는 표지자의 수가 적으며 그 유사도는 각각 0.300, 0.308, 0.313으로 타 비교 분류군들의 유사도와 비교하여 상대적으로 낮은 값을 보였다(Table 3). 그러나 분획양상에 있어서 차이가 적은 *A. hatchetti*와 *A. triangularis*는 0.838로 유사도가 비교적 높았다. 한국 분리주인 YM-2와 YM-3, -4간에는 유사도가 각각 0.959, 0.949였으며, YM-3과 YM-4는 유사도가 0.969로 증폭산물의 차이가 매우 적음을 알 수 있었다. 이들 YM-2, -3, -4간의 유사도의 평균은 0.959이었다. 그러나 같은 한국 분리주임에도 불구하고 YM-5는 나머지 3개 한국 분리주인 YM-2, -3, -4와 증폭산물의 분획양상에 뚜렷한 차이가 있었으며, 각각 0.226, 0.243, 0.242(평균 0.237)로 낮은 유사도를 보였다. YM-5와 기존의 알려진 가시아메바인 *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. polyphaga*, 외국 분리주인 HOV와의 유사도를 살펴보면 각각 0.87, 0.253, 0.286, 0.331, 0.322로써 YM-5는 *A. culbertsoni*와 유전적으로 밀접한 분리주인 것으로 나타났고, *A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. polyphaga*, HOV주와는 유전학적으로 비교적 다른 것으로 나타났다. 매우 밀접한 유전적 관계를 보인 YM-2, -3, -4를 *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. polyphaga*와의 유사도를 살펴보면 각각 0.254, 0.800, 0.864, 0.272로써 YM-2, -3, -4는 유전적으로 *A. culbertsoni*나 *A. polyphaga* 보다는 *A. hatchetti*, *A. triangularis*와 유사한 것으로 나타났다. 유사도에 근거해서 이들 간의 유전적 근연관계를 UPGMA법에 의해 분석한 결과 phenogram 상에 두개의 분리군이 존재함이 밝혀졌는데, *A. hatchetti*, *A. triangularis* 및 3개 한국 분리주인 YM-2, -3, -4가 하나의 분리군을, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, HOV주, 및 YM-5가 다른 분리군을 형성하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 특히, 한국 분리주 YM-5는 나머지 3개 한국 분리주와는 별개의 분리군에 속하여 이들이 유전적으로 상당히 먼 관계에 있는 아메바임이 확인되었다.

고 찰

자유생활아메바의 동정 및 분류에는 주로 형태학적, 생화학적 및 면역학적 특성 분석에 의한 방법들이 이용되어 왔다. 그러나 자유생활아메바는 여러 환경 속에서 분리되고 종 또는 분리주의 분화가 다양함이 밝혀지면서 위의 방법들에 의해 아메바 종 또는 분리주 특이성을 보이는 표지자를 설정하는 것은 용이하지 않고, 동정 및 분류에 있어서 일관되지 않은 결과를 종종 초래하기 때문에 보다 보편타당한 분류를 위하여 최근에는 분자유전학적 분

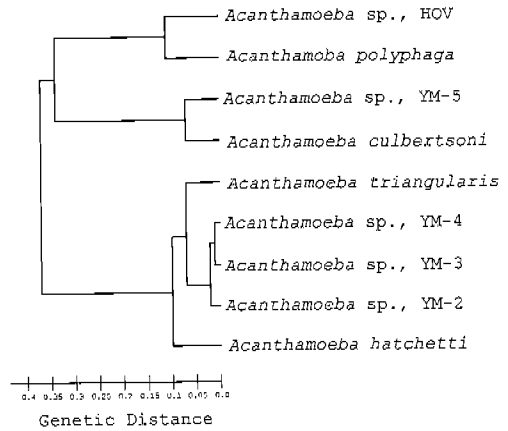


Fig. 2. Phenogram of *Acanthamoeba* spp. and isolates based on the dissimilarity estimates. Genetic distances were recalculated by UPGMA methods. Only the length of horizontal line, not vertical line, is meaningful for the genetic relationships among the operational taxonomic units.

석법들을 응용한 분류학적 연구가 시도되고 있다.

분자유전학적 표지자에 의한 가시아메바의 분류에는 미토콘드리아 DNA에 대한 제한 효소의 처리로써 그 단편의 다형성(RFLP) 분석법을 이용하였는데(Yagita, 1993; Yagita and Endo, 1990), 이들은 분석에 상대적으로 대량의 DNA가 필요하고 분획 결과에서 다른 종간에 동일한 RFLP를 보이거나, 동일 종 내의 여러 분리주에서 다른 RFLP가 관찰되는 경우가 있어 일관성 있는 분류의 표지자로 이용하는데 한계가 있다. 한편 De Jonkheere (1994)는 자유생활아메바인 *Naegleria* spp.의 ribosomal DNA를 특이적인 프라이머를 이용해서 PCR법에 의해 증폭한 다음 제한 효소로써 그 RFLP를 획득하여 분류학적 관계 규명을 시도한 바 있다. 분자유전학적 분석 방법 중 가장 정확한 정보를 얻을 수 있는 염기서열 분석법(sequencing)에 의해 ribosomal RNA를 분석하여 관찰된 염기 변이에 의해 가시아메바의 분류 및 진화적 유연관계를 규명한 연구가 보고된 바 있다(MacKay and Doolittle 1981; Johnson *et al.*, 1990). 그런데 염기서열 분석법은 고도의 분자유전학적 기술을 필요로 하며, 많은 시간과 경제적 비용이 소요되는 단점이 있어 임상에서 빠른 분류와 동정을 하기에 적합하지 않다.

기존의 증함효소 연쇄반응법은 template인 두 가닥의 상보적인 DNA 선상(complementary DNA strands)에 대하여 두개의 이미 알고 있는 특정 부위의 염기서열의 프라이머를 첨가해 주어야만 그 사이에 위치한 DNA를 증폭할 수 있는데, 이들 프라

이머를 합성하기위해 필요한 아메바 계놈의 염기서열의 정보가 극히 제한되어 ribosomal RNA나 미토콘드리아 DNA의 부분적 연구가 보고된 바 있다 (Vodkin, 1992). 이와 같은 종합효소 연쇄반응법의 제한점을 극복할 수 있는 RAPD 분석이 Williams et al.(1990)에 의해 개발되었는데, 임의의 10개의 염기로 구성된 하나의 프라이머를 합성한 후 종합효소 연쇄반응법에 의해 전체 계놈 상의 DNA를 무작위로 증폭하여 그 증폭산물의 다형성에 의해 유전 변이를 관찰할 수 있었다. RAPD 분석에 사용하기 위해 합성할 수 있는 프라이머의 수는 이론적으로 4⁹(약 26만)개이며, 그 중에서 guanine 과 cytosine 함유량이 60% 이상인 프라이머를 사용할 수 있으며, 캐나다의 British Columbia 대학의 생명공학연구소에서 이미 800개의 프라이머를 합성해서 분자유전학 연구에 사용하고 있는데, 이들 프라이머는 모든 생명체의 DNA 분석에 공통적으로 사용될 수 있다는 장점이 있기 때문에 이들 표지자들은 유전자 동정, 개체 동정, 유전자 지도 작성 (genome mapping), 진화적 근연관계 규명 및 집단유전학 연구 등 다방면에 응용되어 왔다. 또한 RAPD 분석은 환경에서 분리된 여러 기생충의 동정에 많이 이용되고 있으며 (Carson et al., 1994; Dupouy-Camet et al., 1995), 이질아메바의 경우 병원성 여부에 따르는 분리주 내의 다형성을 보여 그 유용성을 입증하였다 (Mackenstedt and Johnson, 1995).

본 연구에서는 분석에 사용된 60개의 프라이머 중 18개의 프라이머에 의한 증폭산물의 분획양상이 중 또는 분리주 특이적인 분획양상을 보여 본 연구에서 분석된 가시아메바 속의 동정에 이용될 수 있는 표지자임을 확인하였으며, 그 중 9개의 프라이머에 의해 합성된 증폭산물들은 한국 분리주간에서도 변이를 보여 분리주를 구별할 수 있는 표지자로 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다. 유사도의 결과를 보면 *A. culbertsoni*는 *A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. polyphaga*와 증폭산물의 차이가 많아서 유사도가 각각 0.300, 0.317, 0.313으로 낮은 값을 보여 이들은 기존의 형태학적 형질에 의한 분류와 마찬가지로 DNA 구성상에서도 유사하지 않은 것으로 사료된다. *A. hatchetti*와 *A. triangularis* 간에는 비교적 높은 유사도(0.838)를 보여 DNA 구성상 유사한 부위가 많다는 것을 알 수 있었다. 한국 분리주인 YM-2, -3, -4내에서는 증폭산물의 차이가 거의 없어 평균 유사도가 0.959로 1에 근접하기 때문에 유전적으로 매우 밀접한 관계임을 알 수 있었다. 이런 결과로써 유사도의 이용이 유전적 근연관계를 규명하는데 도움이 되는 것으로 보여진다. 이들 한국 분리주간의 유사한 증폭산물 분획양상은 이들의 계놈 상에 진화적으로 매우 안정된 반복 염기가 존재함을 시사하는데 (Yu et al., 1993). 그럼

에도 불구하고 본 연구에서 관찰된 몇몇 증폭산물들은 분리주간의 구별이 가능한 변이를 보여 분리주 동정 표지자로 이용이 가능함을 관찰할 수 있었다. 실제적으로 본 연구와 같은 실험 결과의 발표가 부족하여 두 분류군을 동종 또는 타종으로 분류할 수 있는 유사도 기준이 설정되어 있지 않으나, 본 연구 결과를 토대로 볼 때 중간 구별이 확인된 시료간의 유사도는 0.838 이하인 점과 확률 통계학적인 추정치 95%를 감안한다면 유사도 0.95를 기준으로 할 수도 있다고 사료된다. YM-5는 *A. culbertsoni*와의 유사도가 0.857이고, YM-2, 3, 4의 경우 *A. triangularis*와 평균 0.864의 값을 보여 매우 근연 관계가 높음을 나타내었다. 또한 한국 분리주인 YM-2, -3, -4와 YM-5간의 평균 유사도는 0.237로 뚜렷한 차이를 보여, 계놈 DNA 상의 변이에만 근거하여 판단할 경우, 한국 분리주는 최소한 2종 이상의 다른 가시아메바 종으로 분류됨을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 기존의 자유생활아메바의 분류 방법의 단점을 극복하고자 계놈 DNA 상의 변이 분석을 시도하여 시료간에 특이적인 분자유전학적 표지자를 얻어 동정 및 분류에 이용 가능성을 확인하였으나, 아직 한국 분리주의 확실한 성상이 밝혀져 있지 않고 있으므로 본 연구에서 관찰된 분리주 특이적인 표지자에 대한 의의는 확실히 평가할 수 없었다. 차후에 보다 많은 프라이머뿐만 아니라 가시아메바에 속하는 모든 종 및 분리주를 포함하는 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

REFERENCES

Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM (1991) DNA amplification finger-printing using very short arbitrary oligonucleotide primer. *Bio/technology* **8**: 553-557.

Carson CA, Brandt HM, Jensen JB, Bailey CW, Allen GK (1994) Use of random amplified polymorphic DNA analysis to compare *Babesia bovis* and *B. bigemina* isolates. *Parasitol Res* **80**: 312-315.

Cho HK, Moon YS, Lee HK, Park AJ, Cho SI (1992) *Acanthamoeba keratitis* (Case report). *J Korean Ophthalmol Soc* **33**(5): 538-543.

Costas M, Griffiths AJ (1985) Enzymem composition and the taxonomy of *Acanthamoeba*. *J Protozool* **32**(4): 604-607.

Costas M, Griffiths AJ (1986) Physiological characterizations of *Acanthamoeba*. strains. *J Protozool* **33**(4): 304-309.

De Jonckheere JF (1987) Characterization of *Naegleria* species by restriction endonuclease

- digestion of whole cell DNA. *Mol Biochem Parasit* **24**: 55-66.
- De Jonckheere JF (1994) Riboprinting of *Naegleria* spp.: small-subunit versus large-subunit rDNA. *Parasitol Res* **80**: 230-234.
- Dupouy-Camet J, Robert F, Guillou JP, Vallet C, Perret C, Soule (1994) Identification of *Trichinella* isolates with random amplified polymorphic DNA markers. *Parasitol Res* **80**: 358-360.
- Felsenstein J (1993) PHYLIP-Phylogeny Inference Package. Dept. of Genetics, Univ. of Washington, Seattle.
- Friedland LR, Rapahaell SA, Deutsch ES, et al. (1992) Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Ped Infect J* **11**: 404-407.
- Johnson AM, Fielke R, Christy PE, Robinson B, Baverstock PR (1990) Small subunit ribosomal RNA evolution in the genus *Acanthamoeba*. *J Gen Microbiol* **136**: 1689-1698.
- MacKay RM, Doolittle WF (1981) Nucleotide sequence of *Acanthamoeba castellanii* 5S and 5.8S ribosomal ribonucleic acids: phylogenetic and comparative structural analyses. *Nucleic Acids Res* **9**: 3321-3334.
- Mackenstedt U and Johnson AM (1995) Genetic differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Parasitol Res* **81**: 217-221.
- Martinez AJ (1991) Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* **13**(Suppl 5): S399-402.
- Moura H, Wallace S, Visvesvara GS (1992) *Acanthamoeba healyi* N. Sp. and the isoenzyme and immunoblot profiles of *Acanthamoeba* spp., groups 1 and 3. *J Protozool* **39**(5): 573-583.
- Nei M, Li W (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 5269-5273.
- Newsome AL, Curtis FT, Culbertson CG, Allen SD (1992) Identification of *Acanthamoeba* in bronchoalveolar lavage specimens. *Diagnostic Cytopathol* **8**: 231-234.
- Pussard M and Pons R (1977) Morphologie de la paroi kytique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Ameobida) *Protistologica* **13**: 557-598.
- Riley DE, Samadpour M, Krieger JN (1991) Detection of variable DNA repeats in diverse eukaryotic microorganisms by a single set of polymerase chain reaction probes. *J Clin Microbiol* **29**(12): 2746-2751.
- Ringsted J, Jager BV, Suk DS, Visvesvara GS (1976) Probable *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a Korean child. *Am J Clin Pathol* **66**: 723-730.
- Stehr-Green JK, Bailey TM, Visvesvara GA (1989) The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am J Ophthalmol* **107**: 331-336.
- Sokal RR, Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Sci Bull* **28**: 1409-1438.
- Visvesvara GS, Stehr-Green JK (1990) Epidemiology of free-living amoeba infections. *J Protozool* **37**(suppl): 25-33.
- Vodkin MH, Howe DK, Visvesvara GS, McLaughlin GL (1992) Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. *J Protozool* **39**(3): 378-385.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Ragalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**: 6531-6535.
- Willaert E (1975) Recherches immunotaxonomiques comparees sur les amibes du groupe "Limax". *Acad R Sc Outre-Mer Mem Class Sc Nat Med*.
- Yagita K (1993) Characterization of *Acanthamoeba* isolates from eye infections and the environment by restriction endonuclease digestion of mitochondrial DNA. *Jpn J Parasitol* **42**: 468-478.
- Yagita K, Endo T (1990) Restriction enzym analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. *J Protozool* **37**(6): 570-575.
- Yu KF, Deynze AV, Pauls KP (1993) Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. p287-301 Glick & Thompson, London.

=Abstract=

Genetic status of *Acanthamoeba* spp. Korean isolates on the basis of RAPD markers

Yong-Pyo HONG^{1)*}, Seung-Hwan OH²⁾, Mi-Sook LA¹⁾ and Kyung-il IM¹⁾

Department of Parasitology and Institute of Tropical Medicine¹⁾, Department of Pediatrics²⁾, Yonsei University College of Medicine, Seoul, 120-752, Korea

Genetic status of *Acanthamoeba* spp. were tested on the basis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker analysis. Four previously established *Acanthamoeba* species, 4 Korean isolates of *Acanthamoeba* sp., and one American isolate of *Acanthamoeba* sp. were analyzed by RAPD-PCR using an arbitrary decamer primers. Amplification products were fractionated by agarose gel electrophoresis and stained by ethidium bromide. Eighteen primers produced DNA amplification profiles revealing clear differences among 4 species. Nine of them also produced DNA amplification profiles which included some isolate-specific amplification products. On the basis of amplified fragments by 18 primers, the pairwise similarity indices between *A. culbertsoni* and other species (i.e., *A. hatchetti*, *A. triangularis*, *A. polyphaga*) were 0.300, 0.308, and 0.313, respectively. Similarity index between *A. hatchetti* and *A. triangularis* was 0.833. The mean similarity index among the 3 Korean isolates (YM-2, -3, -4) was 0.959 and 0.832 among them and 2 other species (*A. hatchetti* and *A. triangularis*). The mean similarity index among YM-5 and other Korean isolates (YM-2, -3, -4) was 0.237. However, the similarity index between YM-5 and *A. culbertsoni* was 0.857, which suggests that YM-5 is genetically more similar to *A. culbertsoni* than other Korean isolates. Phenogram reconstructed by UPGMA method revealed that there are two groups: one group consists of *A. hatchetti*, *A. triangularis*, and 3 Korean isolates (YM-2, -3, -4), and the other group consists of *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, HOV, and YM-5.

Key words: *Acanthamoeba*, polymerase chain reaction, RAPD marker, similarity index, phenogram

[Korean J. Parasitol. 33(4): 341-348, December 1995]

*Corresponding author