



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0043743
(43) 공개일자 2010년04월29일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0102919

(22) 출원일자 2008년10월21일

심사청구일자 2008년10월21일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

민기식

인천광역시 연수구 동춘동 923번지 금호아파트
102동 902호

김세주

인천광역시 남구 용현4동 81-13 인하마을 A동 B0
2호

(74) 대리인

특허법인태백

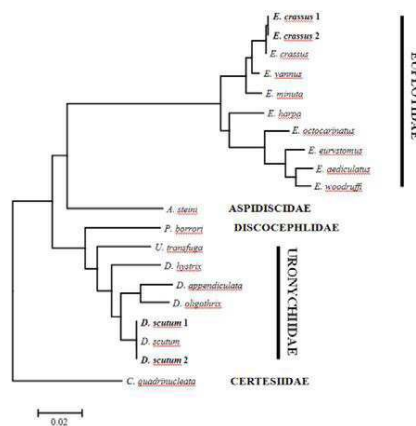
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 프로타골로 염색된 비배양 섬모충류 중동정 분석방법

(57) 요약

본 발명은 프로타골 염색을 이용한 비배양 섬모충류 중동정 분석방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 섬모충류가 함유된 시료를 프로타골로 염색하여 형태분석하는 단계; 염색된 시료로부터 DNA를 추출하고 증폭하여 염기서열을 분석하는 단계; 및 형태분석 및 염기서열분석 결과를 종합하여 종을 식별하는 단계를 포함하여 구성되는 비배양 섬모충류 중동정 분석방법을 이용함으로써 배양을 통하지 않고 서식지에서 직접 채취한 현장시료 내 섬모충류 단일 개체만으로도 형태분석 및 염기서열분석을 수행할 수 있어 정확하게 종을 동정할 수 있다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 인하대 37890

부처명 환경부

연구사업명 차세대 핵심환경기술개발사업

연구과제명 한국 주요 무척추동물에 대한 DNA 바코드 개발과 활용

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2006년 04월 01일 ~ 2009년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

섬모충류가 함유된 시료를 프로타골로 염색하여 형태분석하는 단계;
염색된 시료로부터 DNA를 추출하고 증폭하여 염기서열을 분석하는 단계; 및
형태분석 및 염기서열분석 결과를 종합하여 종을 식별하는 단계
를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 비배양 섬모충류 종동정 분석방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 종동정 분석은 섬모충류가 함유된 시료에서 개체를 분리하는 단계; 분리한 개체를 $HgCl_2$ 로 고정하는 단계; 증류수 세정 후, 프로타골액을 처리하는 단계; 현색액을 처리하는 단계; 염색 고정액을 처리하는 단계; 염색된 개체를 현미경으로 관찰하는 단계; 염색 후 관찰에 이용된 동일 개체에서 DNA를 추출하는 단계; 종식별에 용이한 유전자 부위의 염기서열을 획득하는 단계; 및 형태분석 및 염기서열분석을 종합하여 최종 종을 동정하는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 비배양 섬모충류 종동정 분석방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 종동정 분석은 섬모충류가 함유된 시료에서 개체를 분리하는 단계; 분리한 개체를 $HgCl_2$ 로 고정하는 단계; 증류수 세정 후, 탈색시약을 처리하는 단계; 증류수 세정 후, 프로타골액을 처리하는 단계; 현색액을 처리하는 단계; 염색 고정액을 처리하는 단계; 염색된 개체를 현미경으로 관찰하는 단계; 염색 후 관찰에 이용된 동일 개체에서 DNA를 추출하는 단계; 종식별에 용이한 유전자 부위의 염기서열을 획득하는 단계; 및 형태분석 및 염기서열분석을 종합하여 최종 종을 동정하는 단계로 구성되되, 상기 탈색시약은 1 내지 3분 동안 처리하는 것을 특징으로 하는 비배양 섬모충류 종동정 분석방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 배양을 통하지 않고 서식지에서 직접 채취한 현장시료 내 섬모충류 단일 개체만으로도 형태분석 및 유전자분석을 수행할 수 있어 정확하게 종을 동정할 수 있는 프로타골 염색을 이용한 비배양 섬모충류 종동정 분석방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 섬모충류는 생태계에서 생산자와 소비자 사이에 에너지 흐름을 연결시켜주는 중요한 역할을 하는 미소생물로서, 종 다양성이 높고 생물량이 많으며 환경 변화에 민감하게 반응하여 중요한 생물 지표종으로 인식되어 왔으나 종 분류에 많은 시간이 소요되고 어려움도 많아 유용성에 비해 널리 활용되지 못하고 있는 실정이다.

[0003] 섬모충류의 분류학적 연구를 위해서 염색은 절대적으로 필수한 과정이다. 다양한 염색방법 중에서 가장 널리 이용되는 현대적인 염색방법인 프로타골 염색법(Wilbert, 1975)은 섬모충류의 기저 부분, 섬모, 섬모근 조직, 핵과 같은 피층과 내부 조직 등을 확인할 수 있다. 이러한 프로타골 염색은 크게 4단계로 구성된다. 즉, 시료 고정, 염색, 탈색, 현색 과정이다.

[0004] 고정 과정은 배양된 섬모충류나 현장에서 채집된 섬모충류를 포르말린이 포함된 보잉 용액(Bouin's solution)으로 고정시키고, 고정시료를 프로타골 염색을 한 후 탈색액(bleach)으로 탈색을 하고 마지막으로 현색(development) 과정을 거친다.

[0005] 고정액인 보잉 용액과 탈색액에는 DNA를 파괴하는 성분이 포함되어 있어서 염색된 시료에서 DNA를 추출하는 것

이 불가능하였으므로 기존 연구에서는 염색된 시료를 유전자 분석에 이용할 수 없었다.

[0006] 따라서 기존에는 형태분석을 위한 염색과 염기서열 분석에 서로 다른 개체를 사용할 수밖에 없었다. 형태 분석과 염기서열 분석에 각기 다른 개체를 사용하게 되면 분류학적 오류가 일어날 수 있다. 왜냐하면 섬모충류에는 형태적으로는 유사하나 실제 다른 종 흔히 자매종(sibling species)이 다수 존재할 수 있기 때문이다.

[0007] 따라서 배양이 가능하지 않는 종에 대해서 분류학적 오류 없이 염기서열분석과 형태분석을 동시에 적용하기 위해서는 동일 시료를 이용하는 기술 개발이 필요할 것이다.

[0008] 또, 단세포 원생동물인 섬모충류의 경우, 현재까지는 단배양 가능 종에 한하여 분류학적 연구와 분자생물학적 연구가 동시에 이루어질 수 있었다. 다세포 생물이 아닌 원생동물의 특성상 배양이 불가능한 다수의 섬모충류 종들의 경우는 분류와 분자 실험을 함께 실시할 수 없는 것이 원생동물의 한계였다.

[0009] 한편, 단세포 원생생물의 단개체에서 게놈 DNA를 추출하는 기법에 관한 연구는 다수 소개된 적이 있으나, 기존의 연구들은 게놈 DNA의 추출에서 PCR에 이르는 단계가 순차적으로 하나의 PCR 튜브에서 이루어진다. 그 결과 단 한번의 PCR 증폭만이 가능하여 다양한 유전자의 연구를 위한 반복적인 PCR 증폭이 불가능한 한계를 가지고 있다.

[0010] 그리고 Ki 외 다수(2005)에 의한 연구에서는 한 개 이상의 유전자를 증폭하였지만 이 연구 또한 멀티플렉스(multiplex)라는 PCR 기법을 이용하여 두 개의 유전자를 한번의 PCR로 획득한 것이다.

[0011] 즉 기존의 기술에서는 단개체 원생생물에서 얻은 게놈 DNA를 이용하여 반복적인 PCR 증폭을 한 예가 없다.

[0012]

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0013] 상기 종래기술의 문제점을 극복하기 위하여, 본 발명자는 프로타골 염색법으로 염색한 개체의 형태분류학적 정보를 사진으로 기록하고 동개체를 이용하여 분자생물학적 연구를 수행하는 것을 가능케 함으로써 원생동물 연구의 한계를 극복하고자 하였다.

[0014] 이에, 본 발명의 목적은 섬모충류 단일 개체를 이용하여 염색을 통한 형태 분류를 수행하고 동일 개체에서 DNA를 추출하여 염기서열 분석까지 수행할 수 있는 기술을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 섬모충류가 함유된 시료를 프로타골로 염색하여 형태분석하는 단계; 염색된 시료로부터 DNA를 추출하고 증폭하여 염기서열을 분석하는 단계; 및 형태분석 및 염기서열분석 결과를 종합하여 종을 식별하는 단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 비배양 섬모충류 종동정 분석방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명에 따른 상기 종동정 분석은 섬모충류가 함유된 시료에서 개체를 분리하는 단계; 분리한 개체를 HgCl₂로 고정하는 단계; 증류수 세정 후, 프로타골액을 처리하는 단계; 현색액을 처리하는 단계; 염색 고정액을 처리하는 단계; 염색된 개체를 현미경으로 관찰하는 단계; 염색 후 관찰에 이용된 동일 개체에서 DNA를 추출하는 단계; 종식별에 용이한 유전자 부위의 염기서열을 획득하는 단계; 및 형태분석 및 염기서열분석을 종합하여 최종 종을 동정하는 단계로 구성될 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명에 따른 종동정 분석은 섬모충류가 함유된 시료에서 개체를 분리하는 단계; 분리한 개체를 HgCl₂로 고정하는 단계; 증류수 세정 후, 탈색시약을 처리하는 단계; 증류수 세정 후, 프로타골액을 처리하는 단계; 현색액을 처리하는 단계; 염색 고정액을 처리하는 단계; 염색된 개체를 현미경으로 관찰하는 단계; 염색 후 관찰에 이용된 동일 개체에서 DNA를 추출하는 단계; 종식별에 용이한 유전자 부위의 염기서열을 획득하는 단계; 및 형태분석 및 염기서열분석을 종합하여 최종 종을 동정하는 단계로 구성되되, 상기 탈색시약은 1 내지 3분 동안 처리할 수 있다.

[0018] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

- [0019] 본 발명에서는 상기 목적을 달성하기 위하여 예의 연구를 거듭한 결과, 섬모충류 중 동정을 위하여 기본적인 필수적인 프로타골 염색법을 선택하되, 프로타골 염색 단계 중 게놈 DNA에 손상을 주는 단계가 보잉용액으로 고정시키는 단계, 탈색 단계임을 확인하고 이러한 탈색 단계의 시간을 조절하거나, DNA 파괴를 일으키지 않는 대체물로 보존용액과 탈색시약을 치환함으로써 게놈 DNA의 변성에 미치는 영향을 최소화하면서 현미경 아래에서 중 동정이 가능하도록 하였다.
- [0020] 본 발명의 형태분석은 섬모충류가 함유된 시료에서 개체를 분리하는 단계; 분리한 개체를 $HgCl_2$ 로 고정하는 단계; 증류수 세정 후, 프로타골액을 처리하는 단계; 현색액을 처리하는 단계; 및 염색 고정액을 처리하는 단계로 구성될 수 있다.
- [0021] 또한, 상기 형태분석은 섬모충류가 함유된 시료에서 개체를 분리하는 단계; 분리한 개체를 $HgCl_2$ 로 고정하는 단계; 증류수 세정 후, 탈색시약을 처리하는 단계; 증류수 세정 후, 프로타골액을 처리하는 단계; 현색액을 처리하는 단계; 및 염색 고정액을 처리하는 단계로 구성될 수 있고, 이때 상기 탈색시약은 1 내지 3분 동안 처리하는 것이 바람직하다.
- [0022] 만약, 탈색시약을 상기 시간조건보다 오랜 시간 처리하게 되면 탈색시약에 노출된 개체의 DNA가 파괴되어 PCR 산물이 증폭되지 않아 섬모충류를 분석할 수 없다.
- [0023] 본 발명에 따른 프로타골 염색의 단계는 다음과 같다.
- [0024] 먼저, 현장시료로부터 섬모충류 개체를 분리하고, 분리한 개체를 $HgCl_2$ 로 고정한다. 증류수, 바람직하게는 3차 증류수로 3회 세척한 후, 고정한 시료에 탈색시약(bleach solution, 0.1% NaClO)을 처리한다. 또, 증류수, 바람직하게는 3차 증류수로 3회 세척한 후, 탈색 처리한 시료에 프로타골액(protargol solution, 1% 프로타골)을 처리한다.
- [0025] 프로타골 염색한 시료에 현색액(development solution, 1% Na_2SO_3 과 0.2% hydroquione)을 처리한다. 현색액을 처리한 시료에 염색 고정액(fixation solution, 5% $Na_2S_2O_3$)을 처리한다. 증류수, 바람직하게는 3차 증류수로 3회 세척한 후, 달걀 알부민을 이용하여 슬라이드에 염색한 개체를 고정시킨 후 건조시켜 커버글라스 마운팅한다.
- [0026] 상기와 같이 염색된 섬모충류 개체로부터의 게놈 DNA 추출은 한 개체씩 1.5ml 마이크로센트리퓨즈 튜브(microcentrifuge tube)로 옮긴 후 얼림-녹임($-20^{\circ}C$ - $20^{\circ}C$)을 3회 반복한다. 이렇게 용해된 개체를 이용하여 RED Extract-N-AmpTM PCR kit(Sigma)의 모든 시약을 제조사 방법의 권장 시약 부피의 1/5을 사용하여 DNA를 추출한다.
- [0027] 단개체에서 추출한 게놈 DNA 상태를 소단위체 리보솜 유전자(Small Subunit ribosomal gene; 18S rRNA) 영역의 450bp를 증폭하여 확인한다. 주형 DNA(template DNA) 1 μ l, dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 최종 농도 200 μ M, 20pmol 프라이머들을 0.5 μ l, 1X 반응완충액($MgCl_2$ 포함, Promega, Madison, Wis.) 그리고 2.5 U Taq DNA 폴리머레이즈가 포함되도록 30 μ l의 PCR 혼합물을 준비하였다.
- [0028] 450bp의 18S rRNA 부분을 증폭하기 위한 최적 PCR 조건은 프라이머 18S+1370과 18S-1770을 이용하여 첫 번째 DNA 변성(DNA denaturation, $94^{\circ}C$, 15초), 프라이머 어닐링(primer annealing, $55^{\circ}C$, 30초), DNA 증폭(DNA extension, $72^{\circ}C$, 30초)의 3단계 과정을 35회 반복한다.

효 과

- [0029] 본 발명에 따른 섬모충류 중동정 분석방법을 이용하면 배양을 통하지 않고 서식지에서 직접 채취한 현장시료 내 섬모충류 단일 개체만으로도 형태분석 및 염기서열분석을 수행할 수 있어 정확하게 종을 동정할 수 있고, 특히 종다양성연구, 환경생태연구 등에 활용될 수 있으며, 원생생물 외 무척추동물 예를들어 플랑크톤 등에도 확대 적용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

- [0031] <실시예 1> 프로타골 염색 시약에 따른 게놈 DNA의 영향 검토
- [0032] 프로타골 염색에 사용되는 네가지 시약들이 게놈 DNA에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 섬모충류인 *E. crassus* 20개체를 포함하는 4개의 그룹을 준비하였다. $HgCl_2$ 로 고정 한 후, 그룹별로 각각의 시약을 10분씩 처리한 후, 3차 증류수로 3회 세척하였다. 각 그룹별로 5개체에서 게놈 DNA를 추출하고, PCR을 수행하였다.
- [0033] 이때, 제1군은 20개체에 $20\mu l$ 탈색액(0.1% $NaClO$)을 처리한 것이고, 제2군은 20개체에 $500\mu l$ 프로타골액(1% protargol)을 처리한 것이고, 제3군은 20개체에 $20\mu l$ 현색액(1% Na_2SO_3 and 0.2% Hydroquinone)을 처리한 것이고, 제4군은 20개체에 $20\mu l$ 염색 고정액(5% $Na_2S_2O_3$)을 처리한 것이다.
- [0034] 그 결과, 도 1에 도시된 바와 같이 탈색액에 노출시켰을 때를 제외하고 프로타골액, 현색액, 염색 고정액에 노출시킨 개체로부터 얻은 게놈 DNA로부터 깨끗하고 선명한 PCR 산물을 얻었다.
- [0035] <실시예 2> 프로타골 염색과정에 따른 게놈 DNA의 영향 검토
- [0036] 프로타골 염색과정(Wilbert, 1975)에서 각 단계를 한 단계씩 제거했을 때의 영향을 알아보기 위하여 *E. crassus* 20개체를 포함하는 4개의 그룹을 준비하였다. $HgCl_2$ 고정 후, 제1군은 탈색(bleaching) 과정, 제2군은 프로타골 염색(protargol staining) 과정, 제3군은 현색(development) 과정, 제4군은 염색 고정(fixation) 과정을 제거하고 염색하였다. PCR을 하기 위하여 각 그룹별로 5개체에서 게놈 DNA를 추출하여 PCR을 수행하였다.
- [0037] 그 결과, 도 2에 도시된 바와 같이 탈색과정을 제거한 그룹만 PCR 산물을 얻었고, 나머지 단계 즉, 프로타골 염색, 현색, 염색 고정 공정을 제거한 그룹들에서는 PCR 산물을 얻을 수 없었다.
- [0038] <실시예 3> 프로타골 염색과정 중 탈색시간에 따른 게놈 DNA의 영향 검토
- [0039] 탈색과정의 시간이 게놈 DNA와 분류 형질에 미치는 영향을 알아보기 위하여, *E. crassus* 20개체씩 4개의 그룹을 준비하였다. $HgCl_2$ 고정 후, 각 그룹은 $20\mu l$ 탈색액(0.1% $NaClO$)에 1, 3, 5, 10분씩 노출시킨 후 프로타골 염색의 다음 과정을 수행하며 탈색과정을 제외한 모든 과정의 조건은 동일하였다.
- [0040] PCR을 하기 위하여 각 그룹별로 5개체에서 게놈 DNA를 추출하였다. 그리고 DNA 추출에 이용하고 남은 15개의 개체들은 영구 슬라이드를 만들어 광학 현미경을 통하여 관찰 및 사진 촬영을 하였다.
- [0041] 그 결과, 도 3에 도시된 바와 같이 탈색액에 1분 및 3분 노출시켰을 때는 안정적으로 PCR 산물을 얻을 수 있었지만 탈색액에 5분 및 10분을 노출시킨 개체들로부터는 PCR 산물이 증폭되지 않았다.
- [0042] 또한, 도 4에 도시된 바와 같이, 영구 슬라이드들의 개체들로부터 탈색시간에 따라 대핵의 염색 감도에 차이가 나는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, 탈색액의 처리시간이 길어질수록 대핵의 염색 강도가 약해졌다. 이로부터 탈색액이 핵을 손상시켜 PCR 산물이 증폭되는 것을 방해하는 것을 예측할 수 있다.
- [0043] 그 이외의 섬모위치, 섬모수, 몸크기, 세포입 크기, 입섬모수, 섬모근열수와 같은 주요 분류형질 등이 감도에는 차이가 나지만 탈색액을 1분과 3분 처리한 경우는 모두 관찰가능 하였다.
- [0044] <실시예 4> 현장시료에서 분리한 종의 적용
- [0045] 인천관공선 부두에서 채집한 시료에서 Genus *Euplotes*와 Genus *Diophrys*에 속하는 종을 각 1종씩 총 2종을 분리하였다. 프로타골 염색법으로 염색하여 도 5와 같이 중요 분류키를 광학현미경 아래(X400)에서 사진을 찍어 그 기록을 남겼다.
- [0046] 사진을 찍은 후 동 개체에서 게놈 DNA를 추출하여 18S rDNA를 증폭하여 염기서열을 얻었다. 즉, 게놈 DNA 추출은 한 개체씩 $1.5ml$ 마이크로센트리퓨즈 튜브(microcentrifuge tube)로 옮긴 후 얼림-녹임($-20^\circ C$ - $20^\circ C$)을 3회 반복하였다. 이렇게 용해된 개체를 이용하여 RED Extract-N-AmpTM PCR kit(Sigma)의 모든 시약을 제조사 방법의 권장 시약 부피의 1/5을 사용하여 DNA를 추출하였다.
- [0047] 단개체에서 추출한 게놈 DNA 상태를 소단위체 리보솜 유전자(Small Subunit ribosomal gene; 18S rRNA) 영역의 450bp를 증폭하여 확인하였다. 주형 DNA(template DNA) $1\mu l$, dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 최종 농도 $200\mu M$, 20pmol 프라이머들을 $0.5\mu l$, 1X 반응완충액($MgCl_2$ 포함, Promega, Madison, Wis.) 그리고 2.5 U Taq DNA 폴리머레이즈가 포함되도록 $30\mu l$ 의 PCR 혼합물을 준비하였다.
- [0048] 450bp의 18S rRNA 부분을 증폭하기 위한 최적 PCR 조건은 프라이머 18S+1370(5' -TGG TGC ATG GCC GTT

CTT-3' ; 서열번호 1)과 18S-1770 (5' -CGA CGG GCG GTG TGT ACA-3' ; 서열번호 2)을 이용하여 첫 번째 DNA 변성(DNA denaturation, 94℃, 15초), 프라이머 어닐링(primer annealing, 55℃, 30초), DNA 증폭(DNA extension, 72℃, 30초)의 3단계 과정을 35회 반복하였다.

[0049] 도 6에 도시된 바와 같이, 이렇게 얻은 SSU rDNA 염기서열(굵은글씨)은 GenBank에서 제공받은 염기서열들과 함께 Euplotida에 속하는 섬모충류 종들의 계통도를 작성하였다. 형태분류학적 자료와 분자생물학적 자료를 바탕으로 각 종은 *E. crassus*와 *D. scutum*로 동정되었다.

[0050] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백한 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 프로타골 염색에 사용되는 시약이 게놈 DNA의 질에 미치는 영향을 알아본 PCR 산물의 전기영동 사진이고(레인 1-5: 10분간 탈색액 처리; 레인 6-10: 10분간 프로타골 용액 처리; 레인 11-15: 10분간 현색액 처리; 레인 16-20: 10분간 염색 고정액 처리; M, 100bp ladder size marker),

[0052] 도 2는 프로타골 염색과정 중 한 단계씩 제거했을 때 게놈 DNA에 미치는 영향을 알아본 PCR 산물의 전기영동 사진이고(레인 1-5: 탈색액 제거; 레인 6-10: 프로타골 용액 제거; 레인 11-15: 현색액 제거; 레인 16-20: 염색 고정액 제거; M, 100bp ladder size marker),

[0053] 도 3은 프로타골 염색과정 중 탈색 시간이 게놈 DNA에 미치는 영향을 알아본 PCR 산물의 전기영동 사진이고(레인 1-5: 1분간 탈색액 처리; 레인 6-10: 3분간 탈색액 처리; 레인 11-15: 5분간 탈색액 처리; 레인 16-20: 10분간 탈색액 처리; M, 100bp ladder size marker),

[0054] 도 4는 탈색 시간을 달리하여 프로타골 염색 한 개체들의 사진(X630)이고(A: 1분간 탈색액 처리하여 염색한 개체; B: 3분간 탈색액 처리하여 염색한 개체; C: 5분간 탈색액 처리하여 염색한 개체; D: 10분간 탈색액 처리하여 염색한 개체),

[0055] 도 5는 현장 시료에서 분리하여 프로타골 염색한 *E. crassus* 1과 2(A, B)와 *D. scutum* 1과 2(C, D)의 사진(Scale bar = 50 μm)이고(A. *E. crassus* 1; B. *E. crassus* 2; C. *D. scutum* 1; D. *D. scutum* 2. Scale bars = 50μm),

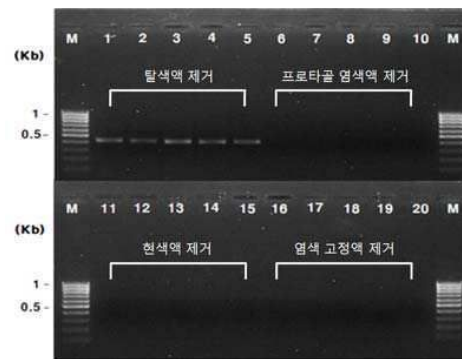
[0056] 도 6은 도 5의 개체로부터 얻은 게놈 DNA로 증폭한 SSU rDNA를 이용하여 만든 계통도이다.

도면

도면1



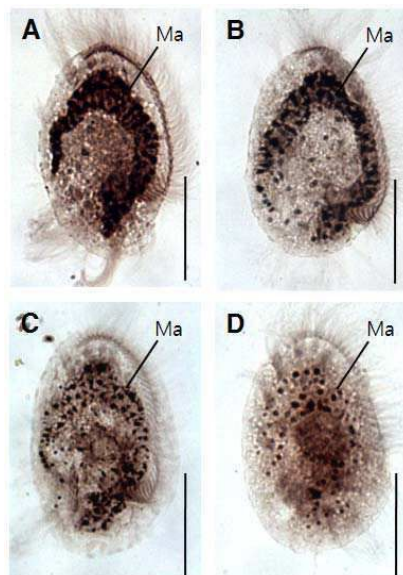
도면2



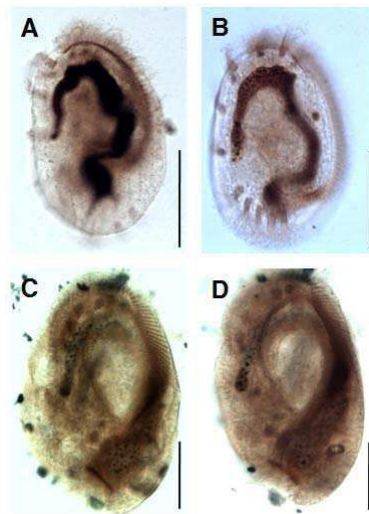
도면3



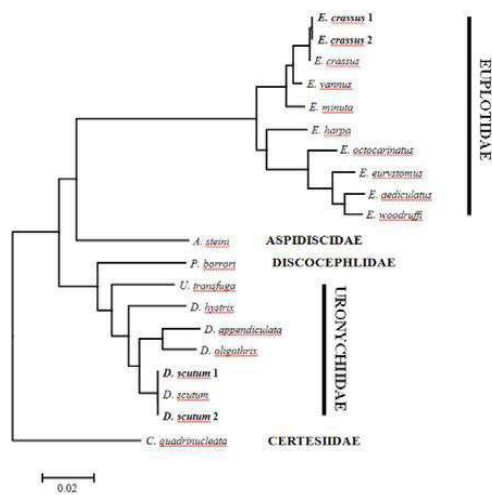
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> INHA Industry Partnership Institute
- <120> Detecting method of uncultured ciliate specimen using Protogol staining
- <130> sp-2008-0074
- <160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 18S+1370 primer

<400> 1

tggatgcatgg ccgttctt

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 18S-1770 primer

<400> 2

cgacgggcgg tgtgtaca

18