

Vibrio 4종의 16s-23s ribosomal DNA Intergenic Spacer region의 유전학적 분석

장인권 · 이실한* · 이승환** · 최응석 · 임현정 · 송재희

국립수산진흥원 서해수산연구소 · * 인천대학교 생물학과 · ** 건국대학교 생화학과

서론

*Vibrio*는 새우양식장 및 종묘배양장의 사육수에서 가장 *qlsqjsgkrp* 출현하며 양식새우의 질병과 직간접적으로 관련을 갖고 있는 주요 병원성 세균류로서 이들 종의 신속한 동정은 질병의 조기진단 및 대책을 위하여 매우 중요하기 때문에 이에 대한 연구가 많이 이루어져 왔으나 일부 *Vibrio* 종들간의 생리, 화학적 특성이 너무도 유사하여 동정에 많은 어려움을 겪고 있다. 따라서, 최근에는 각 종들의 특이 DNA 염기서열을 구분할 수 있는 PCR을 이용한 동정법이 많이 연구되고 있다. 특히 16s ribosomal DNA와 같은 부위를 증폭하여 다양한 제한효소로 절단된 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) pattern을 비교하는 방법 및 16s ribosomal DNA의 특이 염기서열을 이용한 PCR 방법이 유용하게 이용되고 있다. *Vibrio*의 16s, 23s ribosomal DNA는 종간 특이적인 염기서열이 있으며 종내 변이가 없기 때문에 이러한 방법으로 구분이 가능하지만 *V. fluvialis*와 *V. proteolyticus*, *V. alginolyticus*와 *V. proteolyticus* 간에는 94% 이상의 유사성을 갖고 있어 ribosomal DNA 부위의 RFLP나 PCR에 의한 동정이 매우 어렵다.

본 연구는 양식새우에서 자주 검출되며 종간 유전적 유사성이 매우 높은 *V. alginolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. fluvialis* 및 *V. harveyi* 의 4종을 구분할 수 있는 분자생물학적 방법을 개발하는 것이다.

재료 및 방법

새우, 어류 및 해수 등에서 분리된 *Vibrio* 4종 50개 strain을 5 ml LB broth에 접종 후 37°C, 250 rpm으로 overnight 진탕 배양한다. 배양액을 1.5ml microtube에 넣고 7,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 bacterial pellet을 수집, 567 μ l TE

buffer에 녹인 후 10% SDS 30 μ l, 3 μ l proteinase K (10 mg/mL)를 넣고 37 °C에서 2시간 반응시킨다. 100 μ l의 5M NaCl, 80 μ l의 CTAB/NaCl solution 첨가 후 65°C 10분 반응시킨다. 얻어진 용액을 phenol extraction 및 isopropanol 처리, ethanol 세척하여 pellet을 얻은 후 TE buffer (pH 8.0)에 용해하고 spectrophotometer에 의해 농도를 측정하였다.

16s와 23s ribosomal DNA를 연결하는 ISR (Intergenic Spacer Region)을 증폭하기 위하여, 각 16s rDNA의 말단부와 23s rDNA의 전단부로부터 21 bp의 primer (fV2, rV2)를 제작하여 PCR 반응을 한 후, 2.0% agarose gel에 전기영동하여 PCR 산물을 확인하였다. ITS-PCR 산물은 430, 500, 680bp의 3가지 크기로 나타나며, 이중 680 bp의 band를 분리, elution한 후 DNA sequencing을 실시하여 각 종 및 strains의 ITS 부위의 염기배열을 비교 분석하였다.

결론 및 요약

ISR에서 *V. alginolyticus*, *V. proteolyticus*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*의 4종은 70% 이상의 유사성을 보였다. 이중 서로 유사성이 없는 30%의 염기서열 부위에서 *V. alginolyticus*에 특이적인 primer VAF1과 VAr1을 제작하고, *V. proteolyticus*에 특이적인 primer VPF2, VPr2를 제작, *V. fluvialis*에 특이적 primer VFF3, VFr3를 제작, *V. harveyi*에만 특이적인 primer VHF4, VHr4를 제작하여 동종 및 *Vibrio*의 다른 종들을 template로 하여 PCR 반응을 수행한 결과, 이들 특이 primer를 이용한 PCR 방법은 *Vibrio* 종들의 구분에 유용하였으며 기존의 방법으로 동정하기 어려운 종들의 동정에도 효과적인 것으로 사료되었다. 또한, 이 방법을 활용할 경우 양식새우에 발생하는 *Vibrio* 질병의 신속동정이 가능하여 질병의 조기진단에도 많은 도움이 될 것으로 기대된다.

참고문헌

- Chun, J., A. Huq and R. R. Colwell. 1999. Analysis of 16s-23s rRNA Intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Applied and Environmental Microbiology. 65(5): 2202-2208
- Vandenberghe, J., Y. Li, L. Verdonck, J. Li, P. Sorgeloos, H. S. Xu and J. Swings. 1998. Vibrios associated with *Penaeus chinensis* (Crustacea: Decapoda) larvae in Chinese shrimp hatcheries. Aquaculture. 169: 121-132