

## E-7

# Sequence diversity of 16S-23S rRNA intergenic spacer region in *V. fluvialis*

강현실 · 이제희 · 박영미  
제주대학교 해양생물공학과

## 서론

*V. fluvialis*는 비브리오속의 호염성 그람음성균으로 Group F Vibrio 또는 Group EF-6로 불리던 세균이다. 주로 하천 및 연안의 갯벌, 플랑크톤, 어패류에 부착하여 생활하며 오염된 어패류 등의 생식을 통하여 위장관염을 일으키고 있어 주목을 끌고 있다. 감염시 증상은 콜레라 증상과 유사한 설사, 구토, 복통 등이 보이며, 대부분의 환자가 5세이하의 소아에서 일어나고 있음이 특이적이다.

*V. fluvialis*의 위장관염이 일어나는 정확한 기작은 알려져 있지 않으나, heat labile 과 heat-stable enterotoxin 생성을 확인하였고, *V. fluvialis*을 동정하기 위하여 lipopolysaccharide antigen과 선택배지를 개발하여 이용하고 있다. 그러나, 위의 대부분의 방법은 생화학적 방법들로 한계점이 발생하고 있어 현재는 중합효소 연쇄반응을 이용하고 있다.

Intergenic spacer region (ISR)은 16S rRNA 와 23S rRNA 사이에 존재하여 특정 단백질을 암호화하지 않는 non coding region과 tRNA coding region으로 구성되어 있다. 16S RNA는 phylogeny와 원핵생물의 동정에 이용되고 있으나, genus상 염색체내 변이가 적은 반면 ISR 서열은 크기가 다양하여, PCR 반응에 의한 product을 전기영동에 의한 크기로 분리하고 있다. *vibrio cholerae*, *vibrio mimicus* 및 *vibrio parahaemolyticus*의 intergenic spacer region 분석이 이루어졌으며, 본 연구에서는 *V. fluvialis*의 intergenic spacer region의 구성을 확인하고, species-specific 검출을 위한 oligonucleotide을 제작하여 molecular marker로 이용하고자 한다.

## 재료 및 방법

유전자 은행에서 *V. fluvialis* (KCTC 2473)을 분양받아 Marine broth 2216에 bacteria pellets을 접종하여 30°C, 250rpm으로 밤새 배양하였다. 배양액을 1.5ml microcentrifuge tube에 수집후, QIAmp mini kit을 이용하여 genomic DNA을 분리하고 spectrophotometer을 사용하여 농도를 측정하였다.

16S와 23S intergenic spacer region을 증폭하기 위하여 16S rRNA와 23S rRNA을

align하여 conserved region을 각각 vibrio 16S F와 vibrio 23S R의 oligonucleotide을 제작하여 PCR 반응을 수행후, 1% agarose gel에 전기영동하여 PCR 산물을 확인하였다.

PCR product는 600~850bp의 4개의 band로 나타났으며, *V. fluvialis*의 ISR 구성을 확인하기 위하여 *E.coli* NovaBlue에 transformation하였다. transformed cell을 SOC medium에서 밤새 배양후, QIAprep miniprep kit을 이용하여 Plasmid DNA을 분리하였다. 분리된 DNA을 제한효소 KpnI과 HindIII로 처리하여 insert의 크기에 따라 6개의 그룹으로 분류하였다. 각 그룹에서 1개 또는 3개의 clones을 선택하여 DNA sequencing을 ISR(intergenic spacer region) 염기 서열을 확인 및 비교 분석하였다.

## 결과 및 요약

*V. fluvialis*의 PCR product 전기영동 결과, 3개의 major band와 1개의 minor band가 증폭되었다. 이를 ISR 서열의 다양한 구성을 확인하기 위하여 6개의 그룹에서 nucleotide 분석결과 spacer region의 크기는 423에서 706bp로 분포하고 tRNA coding gene의 수는 1개에서 4개가 존재하고 있는 ISR-EKAV, ISR-EKV, ISR-IA, ISR-E, ISR-A가 확인되었다.

각 ISR type에는 16S와 23S rRNA가 양 말단에 conserved sequence와 rRNA 전사에 관여하는 antitermination sequence인 boxA elements가 존재하고 있다. *V. fluvialis* 검출을 위한 ISR-EKV의 non-coding region의 특이적 서열을 FluF, FluF1, FluR1 primer을 제작후 20종의 비브리오을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 그 결과, FluF과 FluR1 primer을 이용한 결과, 비브리오종내 *V. fluvialis* 검출 민감도가 높아졌다.

## 참고문헌

- Chun J., A. Hug 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
- Maeda T., Takada N., Furushita M., Shiba T. 2000. Sturctural variation in the 16s-23s rRNA intergenic spacers of *vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiology Letters 192 : 73-77