

Vibrio vulnificus 검출을 위한 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region의 분석

박영미 · 강경임 · 이제희
제주대학교 해양생물공학과

서론

*Vibrio vulnificus*는 해수, 갯벌, 어패류 등에서 주로 분리되며, 1979년 전남 지방에서 일어난 사례를 최초로 특히 매년 여름이면 이 균에 의한 피해사례들이 보고되고 있다 (Park et al. 1993; Ju et al., 1998; Sin and Park, 1998). 본 연구에서는 *V. vulnificus*의 16S rDNA와 23S rDNA 사이에 존재하는 intergenic spacer region (ISR)의 염기서열을 분석하였다. ISR의 다양성이 높은 부위의 서열을 이용하여 *V. vulnificus* 검출을 위한 primer로 제작하였다. 이 primer의 특이성을 확인하기 위해 18종의 *Vibrio*를 대상으로 detection PCR을 수행하고, 그 산물을 agarose gel에서 분석하여 ISR 서열을 이용한 primer의 species-specific 검출을 위한 가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

1. *Vibrio vulnificus* KCTC 2959의 ISR cloning 및 염기서열 분석

유전자은행에서 *V. vulnificus* KCTC2959 균주를 분양받아 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany)으로 genomic DNA를 분리하였다. Database에 등록된 *Vibrio*의 16S rDNA와 23S rDNA의 잘 보존된 염기서열을 ISR 증폭을 위한 16S-VF, 23S-VR primer로 제작하고, Taq polymerase (Takara, Japan)으로 PCR한 후, pBluescript SK(-) vector (Stratagene, USA)에 cloning하여 ISR의 크기에 따라 group으로 분류하고, 각 group당 1-2개의 colony를 선택하여 (주)마크로젠에 의뢰하여 염기서열을 분석하고, tRNAscan-SE 1.21을 이용하여 ISR 내의 tRNA gene을 분석하였다.

2. ISR 서열을 이용하여 제작한 primer의 특이성 확인

Clustal W로 13종의 다른 *Vibrio*의 ISR 염기서열과 비교하여 *V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR 서열에 특이적인 Vul-DF primer를 제작하였다. *V. vulnificus* KCTC 2959와 18개의 *Vibrio*의 genomic DNA를 추출하고 Vul-DF와 23S-VR primer로 PCR한 후, 증폭산물을 1.5% agarose gel에 전기영동하여 각 strain의 band pattern을 관찰하였

다.

결과 및 요약

ISR 내에 포함되어 있는 tRNA gene의 종류에 따라 *V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR을 분류하였다. Glutamate에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR-E, isoleucine과 alanine에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR-IA, glutamate, lysine, valine에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR-EKV, isoleucine, alanine, valine에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR-IAV, glutamate, lysine, alanine, valine에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR-EKAV가 확인되었다. ISR의 크기는 각각 424, 507, 608, 655, 741 bp로 확인되었다.

토대로 제작한 Vul-DF primer로 PCR한 결과 *V. vulnificus* KCTC 2959의 증폭산물은 18개의 *Vibrio*와는 다른 band pattern을 나타내었고, 특히 이 균과 생화학적 성상이 유사한 *V. parahaemolyticus*와 매우 다른 band pattern을 갖는 것을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- Park, K.S., C. Han, K.Y. Suk, H.C. Jung, Y.H. Kim and C.K. Kim. 1993. Microbiological study and isolation of the *Vibrio vulnificus* in the sea water, sediment, fish and shellfish, kitchen environment of Chunnam Coastal Area. Kor. J. Food Sci. Technol., 25, 449-455. (in Korean)
- Sin, S.W. and S.D. Park. 1998. Effects of environmental sea water factors on the isolation of *Vibrio vulnificus* in the western coastal area of Korea. Kor. J. Dermatol. 36, 391-398. (in Korean)
- Ju, J.W., K.S. Kim, S.J. Park, S.O. Yoon and C.R. Jung. 1998. Identification of *Vibrio vulnificus* in Pusan and Southern sea of Korea in 1996 using API 20E Kit. J. Korean Soc. Microbiol., 33, 187-188. (in Korean)