

제주도 양식장에서 분리된 *Vibrio* 세균성 질병의 신속진단 kit 개발

조미란 · 김맹진 · 송춘복
제주대학교 해양과학부

서 론

Vibrio 속 세균은 Gram 음성, 호염기성의 간균 형태로 해수, 기수 담수 지역에 널리 분포하고 최근까지 전 세계적으로 약 65종이 분리되어 있으며 계속적으로 증가하는 추세이다(Thompson *et al.*, 2004). 현재 *Vibrio*의 동정은 형태, 혈청학적 방법, 생화학적 방법, DNA 분석법 등을 통해 이루어지고 있다. 특히 DNA 분석법에서 16S rRNA와 16S-23S rRNA ISR부위가 이용되고 있지만 유전적인 다형성이 낮아 (Krawiec and Riley, 1990) 종 동정을 위한 신속진단 도구로 사용하기는 어려운 점이 있다. 이 연구에서는 *Vibrio* 속 세균의 동정을 위해 *aroA* 유전자를 이용한 DNA 분석법을 사용하고 있다. *aroA* 유전자는 aromatic amino acid의 생합성 과정에서 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase를 암호화하는 유전자로 세포벽 형성에 관여하는 유전자로 알려져 있다(Parish *et al.*, 2002). 최근 들어 *aroA* 유전자를 이용한 *Aeromonas* 속 균의 동정 및 분류가 가능하다고 보고되고 있다 (Soriaro *et al.*, 1997). 따라서 이 연구에서는 *aroA* 유전자를 이용한 *Vibrio*의 분자계통학적 관계성을 바탕으로 제주도 양식장에 발생하는 *Vibrio* 균의 월별 종류와 비율을 조사하였고 이를 바탕으로 신속한 종 동정을 위해 진단법을 개발하는데 목적을 두었다.

재료 및 방법

1. 시험균주의 분리 및 분리된 균주의 배양

표준균주는 KCCM, KCTC, CECT에서 분양 받아 이 연구에 이용하였다. 그리고 양식장 분리 균주는 2005년 3월에서 2006년 2월까지 제주도 내 양식장에서 분리하였다. 각 균주는 고체 배지 (TCBS, TSA, BHIA, Marine agar)에 도말하여 단일 colony를 선택하여 1.5% BHI broth에 접종한 후 각 균주의 최적 성장 온도에서 배양하였다.

2. PCR 및 cloning

배양한 균에서 Total DNA를 분리한 후 *aroA* 유전자 증폭을 위해 제작된 primer로 PCR 하여 증폭된 DNA 단편을 cloning 하였다.

3. 염기 서열 결정 및 자료 분석

Cloning을 통해 얻어진 재조합 plasmid DNA를 sequencing한 후 DNAssist (version 2.2)와 MEGA 3.0 프로그램을 이용하여 분석하였다.

4. 제주도 양식장에서 분리된 *Vibrio* 속의 동정

표준균주와 양식장 분리균주의 *aroA* 유전자를 다중 정렬한 결과를 통한 *V. scophthalmi*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*의 특이적인 서열을 이용하여 detection primer를 제작한 후 PCR 반응을 통해 얻어진 증폭된 밴드 사이즈로 동정하였다.

결과 및 토의

표준균주의 *aroA* 유전자의 염기 서열 분석 결과 *Vibrio* 대부분 균주가 883bp의 염기를 지녔으나 118bp-119bp 사이에 *V. ichthyenteri*, *V. tubiashi*가 30bp, *V. scophthalmi*가 15bp의 삽입염기를 지닌 것을 확인할 수 있었다.

aroA 유전자를 이용한 *Vibrio* 속 균주의 계통학적 분석을 한 결과 outgroup을 제외한 *Vibrio* 속과 *Photobacterium* 속에서 p-distance를 확인한 결과 *Vibrio mediterranei*와 *Vibrio holisae* 사이가 41.9%로 가장 큰 거리차를 보였으며 *V. alginolyticus* - *V. parahaemolyticus* - *V. harveyi* - *V. cambellii*가, *fluviialis* - *V. furnissii*가, *V. cholerae* - *V. mimicus*가, *V. tubiashii* - *V. ichthyenteri* - *V. scophthalmi*가, *V. anguillarum* - *V. scophthalmi*가, *V. fischeri* - *Photobacterium* 속이 계통 진화적으로 가깝게 묶임을 확인할 수 있었다.

제주도 양식장에서 분리된 *Vibrio*의 detection 결과는 *V. scophthalmi*가 60.61%, *V. harveyi*가 20.73%, *V. anguillarum*가 4.15%, *V. fischeri*가 2.59% *V. alginolyticus*, *P. damsela*가 각각 0.52%로 나타났으며 전체 193개체 중 172개체로 89.12%가 동정되었다.

참고 문헌

- Krawiec, S., and M. Riley. 1990. Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.*, 54: 502-539.
- Parish, T. and N.G. Stoker. 2002. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 148: 3069-3077.
- Soriano, A.C., S.J. Anguita, C.H. Moral, M.S. Salazar, J.Y. Marcos, and G.N. Carrasco. 1997. RFLP-PCR analysis of the *aroA* gene as a taxonomic tool for the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbio. Lett.* 156: 199-204.
- Thompson, F.L., T. Iida. and J. Swings. 2004. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3): 403-431.