

살모넬라 C1 serogroup 특이 *rfbM* 유전자 증폭과 염기서열 분석

이성일 · 정석찬* · 문진산* · 박용호** · 이존화 · 김병수*** · 백병걸

전북대학교 생체안전성연구소 · 농촌진흥청 수의과학연구소*
서울대학교 수의과대학** · 군산전문대***

(1995년 9월 14일 접수)

DNA Sequence analysis and *rfbM* gene amplification using PCR for detect *salmonella* C1 serogroup

Sung-il Lee, Suk-chan Jung*, Jin-san Moon*,
Yong-ho Park**, John-wha Lee, Byeong-su Kim***, Byeong-kirl Baek

Bio-safety Research Institute, Chonbuk National University, Chonju, Korea

National Veterinary Research Institute, RDA, Anyang, Korea*

College of Veterinary medicine, Seoul National University, Suwon, Korea**

Department of Clinical Pathology, Kumsan Junior College***

(Received Sep 14, 1995)

Abstract : The *Salmonella rfb* gene encoding for the biosynthesis of the oligosaccharide-repeating units of the O-antigenic determinants was cloned and sequenced. A set of nucleotide primers(a forward and reverse) was selected to target a defined region of the guanosine diphospho-mannose(GDP-Man) pyrophosphorylase synthase gene : *rfbM* of *Salmonella* C serogroup. The primer set was used to develop a PCR-based rapid and specific detection system for *Salmonella* C1 serogroup.

Amplification bands of predicted size(1,422bp) were generated from 11 different *Salmonella* C1 isolates. The bands were verified to be specific for the C1 serogroup by Southern blot analysis using reference homologous DNA specificity was further confirmed by the lack of reactivity with heterologous DNA derived from non-salmonella members of the family enterobacteriaceae. A specificity of 100% was deduced along with a very high sensitivity shown by a detection limit of 1fg of a purified DNA template. The isolated DNA sequence was found to be 99.8% homologous to *S. montevideo* but the related primers amplified with the predicted band sizes with all the *Salmonella* C1 serogroups tested.

It is concluded that the PCR protocol based on the *rfbM* gene from *S. choleraesuis* is optimal fast and specific for the detection of *Salmonella* C1 serogroup and also the corresponding probe is suitable for rapid detection of all *Salmonella* C1 serogroup DNA tested. This technology should facilitate the identification of contaminated pig products and for any other products contaminated with the *Salmonella* C1 serogroup. The immediate impact of this developed method will be in the area of food safety of pig products with the potential prospect for adaptation to other food inspection technologies.

Key words : *Salmonella* C1 serogroup, *Salmonella choleraesuis*, PCR, *rfbM* gene, southern blot.

Address reprint requests to Dr. Byeong-kirl Baek, Bio-safety Research Institute, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Republic of Korea.

서론

Salmonella 속균은 Salmon(1886) 등이 *S. choleraesuis*를 처음 분리 보고한 이래, 사람을 포함한 포유동물에서 패혈증, 설사, 폐렴 등을 야기시키며¹, 식육이나 오염된 환경을 통하여 전염된다. 또한 항생제 오용과 남용에 따른 내성균의 출현이 공중보건상 중요하다². *Salmonella* C1 serogroup에 속하는 *S. choleraesuis*는 6개월령이하의 돼지에서 paratyphoid를 일으키며, 급성패혈증으로 인한 높은 폐사율을 가져온다³.

Salmonella 속균의 outer membrane lipopolysaccharide(이하 LPS라 칭함)의 숙주 방어기전에 대한 회피능과 항원성에 관한 연구가 이루어져 있다^{4,7}. LPS의 O-polysaccharide의 합성에 관여하는 유전자와 O-항원의 결합과 전환에 관계하는 당전이효소의 유전자를 포함하는 *rfb* gene cluster는 *Salmonella enterica* chromosome의 42min에 존재하고, 이미 O-polysaccharide 합성에 관여하는 *rfb* gene과 *rfi* gene 그리고 *rfe* gene를 규명하여 *Salmonella* serogroup의 감별에 활용하고 있다⁸⁻¹¹.

Salmonella 균의 분리 동정은 생화학 및 혈청학적 검사로 타 장내세균과 감별 동정되지만, 정확성이 낮고, 소요시간이 긴 단점이 있다^{12,13}. *Salmonella* 감염증의 용이한 진단을 위해 LPS의 O-항원에 대한 ELISA^{14,15}, monoclonal antibody¹⁶⁻¹⁸, plasmid profile¹⁹, 전달성 R-plasmid의 비적합성에 의한 분류²⁰, genomic DNA의 finger printing, fimbriac 유전자(*fimA*, *sefA*)²¹와 *invA*, -B, -C, -D DNA probe²²에 의한 DNA hybridization 등이 보고되었다. 특히 *rfb* 유전자에 대한 PCR기법으로 O-항원의 다양한 표면노출 당구조 유전자에 따른 *Salmonella* A, B, C2, D serogroups을

구분하는 연구가 보고되어, *Salmonella* serogroup 구분에 있어서 유용한 지표가 되고있다¹⁰. *Salmonella* C1 serogroup의 O-항원의 독특한 항원결정기^{23,24}는 진단에 유용할 것으로 생각되어, *Salmonella* C1 serogroup을 검출하고자 C1 serogroup의 guanosine diphospho mannose pyrophosphorylase(*rfbM*) 유전자부위에 특이하게 결합하는 primer를 이용, *Salmonella* 균을 신속하게 검출하기 위한 PCR기법을 확립하고자 시도하였으며 크로닝한 *rfbM* 유전자 염기서열분석으로 이미 보고된 C1 serogroup 혈청형의 *rfbM* 유전자와 타 장내세균과의 상관성을 비교하여 C1 serogroup의 진단에 유용한 자료를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용 균주 : PCR 및 DNA probe 기법 개발을 위해 사용한 균주는 Table 1에서의 *Salmonella* 19종과 *Salmonella* 속균이외 장내세균 11종 등을 수의과학연구소로부터 분양받아 Luria Bertani(LB; Bacto tryptone 10g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 10g, per liter, pH 7.5) 배지에서 배양한 후 genomic DNA 분리에 사용하였다.

Genomic DNA와 plasmid 추출 : *Salmonella* genomic DNA는 CTAB(10% cetyltrimethyl ammonium bromide in 0.7M NaCl)-DNA precipitation 방법²⁵으로 분리하였다.

Plasmid는 alkaline lysis 방법으로 추출하였다²⁶. 즉, PCR 산물이 cloning된 재조합 균주를 진탕배양한 후 원심침전시킨 균체를 Solution I (50mM glucose, 25mM Tris-Cl, 10mM EDTA, pH 8.0), Solution II (0.2N NaOH, 1% SDS), 3M sodium acetate 용액(pH

Table 1. *Salmonella* strains and microorganisms used in this study*

<i>Salmonella</i> spp and microorganisms	serogroups
<i>S. paratyphi</i> A	A
<i>S. typhimurium</i> ATCC 13076	B
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 1348, <i>S. paratyphi</i> C, <i>S. montevideo</i> , <i>S. oranienberg</i> , <i>S. thompson</i> , <i>S. virchow</i> , <i>S. bareilly</i> , <i>S. mikawasi-ma</i> , <i>S. temesse</i> , <i>S. lille</i> , <i>S. mbandaka</i>	C1
<i>S. newport</i>	C2
<i>S. virginia</i>	C3
<i>S. enteritidis</i> ATCC 14028 <i>S. pullorum</i>	D1
<i>S. anatum</i>	E1
<i>S. newington</i>	E2
<i>E. coli</i> DH5, K88, K99, STb, STab, LT, SLT I, SLT II, <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	

* All strains were originated from Veterinary Research Institute Korea.

S : *Salmonella* E coli : *Escherichia coli*

5.2)으로 반응시키고, isopropanol로 원심침전시켰으며, 0.1M ammonium acetate(pH 6.0)와 무수 ethanol을 가하여 원심침전 및 건조시킨 후, TE buffer로 부유, RNase 처리후 *Hind* III 및 *EcoR* I으로 37°C에서 1시간 plasmid DNA를 절단한 다음, 0.7% agarose 겔(0.5g EtBr/ml)에서 100V/1시간 전기영동후 transilluminator에서 삽입된 DNA를 확인하였다.

Oligonucleotide primer 제조 : *Salmonella montevideo rfb* gene 염기서열²⁹⁾을 바탕으로 *rfbM* forward primer; 5'-CAG GAA AAT GAT TAC ACC AAT-3'(21mer; 8354-8374 base position)와 reverse primer; 5'-TAA TTA CGA CCA TAC TTA TCT G-3'(22mer; 9775-9754 base position)의 위치를 결정, DNA 합성기(Applied Biosystems, model 392)로 제조하였다. 합성한 oligonucleotide는 55°C에서 1시간 방치후 진공건조, 증류수 500 μ l에 부유시켜 DNA calculator (Pharmacia, LKB)로 DNA양을 측정하였다.

PCR 기법 : PCR은 50mM KCl, 10mM Tris, 1.5mM MgCl₂, 100nM primers(forward 및 reverse), 200 μ M deoxynucleotide triphosphates, *Taq* DNA polymerase 2.5 units와 균체 template DNA 100ng이 함유된 반응혼합액 100 μ l를 denaturation 94°C/15초, annealing 57°C/20초, extension 72°C/1분의 조건으로 DNA Gene ATAQ controller(Pharmacia, LKB)에서 30회 반복하였으며, 최종 extension은 3분으로 하였다.³⁰⁾ 각 PCR산물 10 μ l를 ethidium bromide가 함유된 1.0% agarose 겔에 loading한 후, 0.5×TBE buffer(45mM Tris-borate, 1mM EDTA, pH 8.0)에서 전기영동 후, 증폭을 확인하였다.

PCR산물의 cloning : PCR기법으로 증폭된 DNA의 cloning은 TA cloning kit(Invitrogen Co.)을 사용하였으며, *Taq* DNA polymerase를 이용하여 PCR을 수행하여 얻은 증폭산물은 3' A-overhang되어 있고, vector는 17개의 제한효소 절단부위를 가진 multiple cloning site와 M 13 sequencing primer site가 있으며, ampicillin과 kanamycin resistance marker와 3' T-overhang되어 직접 cloning할 수 있는 pCR I vector에 PCR 산물 DNA를 삽입하였다. Ligation은 pCR II vector(25ng/ml) 2 μ l, 희석한 PCR 산물 10ng, T-DNA ligase 1 μ l(10units), 10× ligation buffer 1 μ l 및 증류수 6 μ l를 혼합하여 12°C에서 18시간 반응하였다.³¹⁾ Transformation은 Hanahan(1983)의 방법으로 제조한 competent *E coli*(DH5 α)와 ligation mixture을 heat shocking방법으로 실시하고, screening은 X-gal, IPTG 및 ampicillin이 함유된 LB평판배지에 도말 배양 후 각 평판당 무색의 집락 10개씩을 선택하여³²⁾, alkaline lysis방법으로 plasmid를 추출하고³³⁾, *EcoR* I

으로 절단한 후, 0.7% agarose 겔에서 전기영동하여 DNA삽입을 확인하였다.

염기서열분석을 위한 subcloning은 증폭산물의 *Hind* III 부위와 pCR II vector의 *EcoR* I 부위를 절단하여 실시하였다. 즉, *EcoR* I, *Hind* III로 절단한 pUC19 vector와 *EcoR* I, *Hind* III 처리한 cloned DNA를 T₄ DNA ligase로 ligation하였다.

DNA 염기서열 분석 : Cloning된 PCR 산물의 염기서열분석은 dideoxy chain termination method로 실시하였다.³⁴⁾ 즉, subcloning된 plasmid에 0.2M NaOH 및 0.2M EDTA 용액으로 denature시키고, 95% ethanol을 2배량 가하여 원심침전, 건조시켜 사용하였다. M 13 reverse sequencing primer(5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') 또는 M 13 forward sequencing primer(5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3')와 반응시킨 후, 이를 sequencing gel(6% acrylamide)에서 40W로 약 4~5시간 전기영동 후, X-ray film에 하룻밤 노출시켜 현상하였다. *S choleraesuis rfbM* gene의 염기서열분석은 DNAsis sequence analysis computer program(Hitachi America Ltd.)을 사용하였고, Genbank로 다른 장내세균의 *rfbM* 유전자 염기서열과 비교하였다.

Southern blot : cloning한 DNA단편을 probe로 이용하여 각 세균의 PCR증폭 산물에 대한 민감성을 높이고, *Salmonella* C1 serogroup의 각 혈청형과의 유전자적 상동성을 확인하였다.

1) Probe DNA의 표지 : DNA probe의 제작은 크로닝된 *S choleraesuis rfbM* 유전자의 random primer labeling법으로 수행하였다. 즉, 크로닝된 *S choleraesuis rfbM* 유전자를 분리하여, hexanucleotide mixture, digoxigenin(Dig)-7-dUTP 그리고 Klenow enzyme를 이용, 표지시켰다. Hybridization 및 직접검출법으로 표지된 control DNA와 비교하여 농도를 측정하였다.³⁵⁾

2) Capillary transfer와 hybridization : *Salmonella* 및 장내세균의 PCR 증폭산물을 전기영동한 gel을 depurination용액(0.25M HCl), denaturation용액(1.5M NaCl, 0.5M NaOH) 그리고 neutralization용액(1.5M NaCl, 1M Tris-HCl)으로 처리하였다. Hybond-Nylon membrane(Amersham, U.K.)을 gel위에 얹어 10× SSC용액으로 DNA를 membrane에 capillary blotting으로 이동시킨 후 80°C의 vacuum oven에서 비등화한 후 *S choleraesuis*의 digoxigenin이 표지된 *rfbM* gene DNA probe을 이용하여 hybridization을 실시하였다. 즉, Hybaid™ minioven bottle(Hybaid, USA)에 membrane과 hybridization solution(5× SSC, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 1% blocking reagent) 5ml

을 넣고 65°C에서 prehybridization한 다음, hybridization buffer에 denature시킨 labeled probe DNA를 25ng/ml농도로 섞여 65°C에서 12시간이상 hybridization하였다. 반응이 끝난 blot은 Dig-DNA labeling and detection kit(Boehringer Mannheim Co.)을 이용하여 발색시켰다^{23,33}.

결 과

Salmonella genomic DNA의 PCR 적정조건 : 최적 온도, 시간은 denaturation 94°C/15초, annealing 57°C/20초, extension 72°C/60초이었고, Mg⁺⁺은 1.5mM의 농도가 최적조건이었다.

PCR에서의 primer의 특이성 : *rfbM* forward 및 reverse primer의 *Salmonella* C1 serogroup에 대한 특이성을 확인코자 *S. choleraesuis*와 *Salmonella* 속균외의 장내세균 11종으로부터 추출한 각 genomic DNA 100ng을 사용하여 PCR 증폭시켰다. 이때 *S. choleraesuis*에서만 1422bp위치에서 증폭산물을 나타내었으며 다른 균종에서는 나타나지 않았다(Fig 1). 또한 *Salmonella* 속균의 PCR에서도 *Salmonella* C1 serogroup인 *S. choleraesuis*에서만 민감한 반응을 보였다(Fig 2). *Salmonella* 속균의 genomic DNA를 이용한 PCR에서

Salmonella C1 serogroup의 *rfbM* gene과의 유전자 상동성을 지닌 증폭산물의 유무를 확인하고자 southern blot을 실시하였던 바 *S. choleraesuis*외의 다른 serogroup 모두는 음성이었다(Fig 3).

Salmonella C1 serogroup의 *rfbM* gene 검출 : *Salmonella* C1 serogroup 11종의 genomic DNA를 순수 분리하여 정량 후, PCR의 template로 100ng씩 넣어 증폭시킨 산물을 1.0% agarose gel에서 전기영동한 바, 모든 *Salmonella* C1 serogroup에서 1,422bp크기의 증폭산물이 관찰되었다(Fig 4). *Salmonella* C1 serogroup 11종의 *rfbM* gene의 유전자 상동성을 확인하여 *Salmonella* C1 serogroup을 동정하고자 *rfbM* gene probe으로 southern blot하였을 때 *Salmonella* C1 serogroup 11종 모두 특이반응하였다(Fig 5).

PCR의 민감성 : PCR로 검출가능한 DNA의 최소량을 알아보기 위하여 *S. choleraesuis*의 genomic DNA를 각각 1μg, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg, 1fg, 100ag으로 단계희석한 후 PCR의 template로 적용한 바, 육안으로 검출가능한 DNA의 최소량은 10pg이었다(Fig 6). *S. choleraesuis* 유래의 *rfbM* gene probe을 이용한 PCR산물에 대한 southern blot에서는 1fg까지 반응하여 최소 1,000배이상 민감하였다(Fig 7).

PCR products의 cloning : PCR 증폭한 *S. choleraesuis*

SEQUENCE : 1423BP; 444 A; 229 C; 327 G; 423 T.

rfbM start

```

5' CAGGAAAATG ATTACACCAA TAATTATGGC TGGGGGAAAT GGAAGTCGGT TATGGCCACT TTCTCCAACG 70
TTATATCCTA AACAGTTTTT ATGTTTAGAT GGCTCTCAAA GTATGCTTCA GACCACAATA ACGCGAATTA 140
ATAATTTGAA TGCTTCAGAT CCTATTGTTA TTTCYAATGA GCAGCACAGG TTTATGTGTG CAGACAGACT 210
TAAAGAATTA TCTAAATCAT CTGGCGATAT AATTTTAGAA CCTGTTGGAC TAACAGAGCC CCCTGCAGTA 280
GCCTTGGCAG CTTTAAAATG CCTTAAGAAA AACGCTTTAC TGTTAGTATT GGCTGCTGAC CATATAATTA 350
AGGACGAAGA AACGTTTTGT AAGACTATAC AAGACGCTAG AAAATATGCC GAAGCAGGAA AATTAGTTAC 420
GTTTCGTATT GTACCTACCA TGCCAGAGAC AGGTTATGGT TATATACGGC GTGGGAAGC TCTTTTCTCT 490
GCAGAAAATG ATTGTTCTTT GGCGTTTAGG GTGGCTGAAT TTGTCGAAAA ACCCAATCTA GAAACGGCTC 560
AGAGTTATCT TGATTCTGGT GAGTATTACT GGAGCAGCGG TATGTTTTTA TTAGGGGAG ATCGATATAT 630
TGAAGAGTTA AAAATTCGCC CTGATATTTA TAAAGCTTGC TCATTAGCGA TGGAAATCTGC TGTTACGGAT 700
                                     HindIII
CTCGATTTTA TTTCGAGTGA TGAAGATTCA TTTTGCCTT GCCCGGATGA ATCAATTGAT TATGCAGTGA 770
TGGAAAAGAC GAATGACGCG GTTGTCTGAC CTTTAAATGC GGGTTGGAGT GATGTCGGTT CGTGGTCTTC 840
TCTTTGGGAG ATAAGTGATA AAGATAGTAA TGGTAATGTG ACTAAGGCGC ATGTATTAAG CCACAATGCA 910
GATAATTGCT ATCTCCATGC AGAAACGGGT TTGGTAACCG CTGTTGGTGT CAAAGATCTT ATAGTCTGTC 980
AAACGAAAGA TGCCGTTTTA GTTGCAAACC CAACTGTGT TCAAGATGTA AAGAAAATTT TTGACAAAAT 1050
TAAATTAGAA AATCGTCATG AGCATATAAC TCATCGGGAA GTTTATAGAC CATGGGGTAA ATACGATTCA 1120
ATCGATTTCC GTGAGCGTTA TCAGGTAAAG AGAATCACTG TAAAACCCGG AGAAGGAATT TCAGAGCAGC 1190
AACATTATCA TCGCGCGGAA CAGTGGATTA TCGTTGCAGG TACCGCAAAA ATAACCATAA AAGGTGAAGT 1260
GAAAATTTTA ACTGAAAATG AATCCGTATA TATTCCTGTC GGTGTTAAGC ACTGCCTTGA AAACCCAGGG 1330
AAAATTGCAC TTGAACCTAT TGAAGTAAGA TCCGGCGCAT ATTTAGGGGA GGATGATATT GTTCGTTTTT 1400
                                     stop
CAGATAAGTA TGGTCGTAAT TAA 3' 1423

```

Fig 9. DNA sequence of cloned *rfbM* gene of *S. choleraesuis*. Underlines indicated forward and reverse primers, respectively.

```

S. cho. rfbM. SEQ CAGGAAAATGATTACACCAATAATTATGGCTGGGGAAATGGAAGTCGGTTATGGCCACT 60
X::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
S. mon. rfbM. SEQ CAGGAAAATGATTACACCAATAATTATGGCTGGGGAAATGGAAGTCGGTTATGGCCACT

ACCCAATCTAGAAACGGCTCAGAGTTATCTTGATTCTGGTGAGTATTACTGGAGCAGCGG 600
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::*::::::::::
ACCCAATCTAGAAACGGCTCAGAGTTATCTTGATTCTGGTGAGTATTACTGGAACAGCGG

TAAAGCTTGCTCATTAGCGATGGAATCTGCTGTTACGGATCTCGATTTTATTTCGAGTGGA 720
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::*::::::::::
TAAAGCTTGCTCATTAGCGATGGAATCTGCTGTTACGGATCTCGATTTTATTTCGAGTGGA

CAAAGATCTTATAGTCGTGCAAAACGAAAGATGCCGTTTTAGTTGCAAAACCCAAACTGTGT 1020
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::*::::::::::
CAAAGATCTTATAGTCGTGCAAAACGAAAGATGCCGTTTTAGTTGCAAAACACAAACTGTGT

GGATGATAATTGTTTCGTTTTTCAGATAAGTATGGTCGTAATTAA 1423
::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::X
GGATGATAATTGTTTCGTTTTTCAGATAAGTATGGTCGTAATTAA

```

Fig 10. Alignments of the *rfbM* genes within *S. choleraesuis* and *S. monteideo*. *S.cho.rfbM.SEQ* ; DNA sequence of *Salmonella choleraesuis rfbM* gene *S. mon rfbMSEQ* ; DNA sequence of *Salmonella monteideo rfbM* gene.

의 *rfbM* gene을 pCR I vector내 *EcoR* I 위치에 cloning하고, *EcoR* I으로 절단하여 1,422bp정도 크기의 clone 2개를 확인하였으며, 이들중 1개의 clone을 염기서열분석에 이용하기 위해 pUC19 vector에 *EcoR* I과 *Hind* III를 이용하여 subcloning한 후 전기영동에서 750bp, 670bp 정도의 band가 각각 관찰되었다(Fig 8).

염기서열분석 : *S. choleraesuis*로부터 유래한 *rfbM* 유전자의 PCR products의 재조합 clone으로부터 pUC/M13 forward 또는 reverse primer를 이용하여 염기서열을 분석하고(Fig 9), *S. monteideo*의 *rfbM* 유전자의 염기서열과 비교하였을 때, 염기삽입과 염기결실 없이 1,423bp중 594번째 염기위치에 A-C, 709번째 염기위치에 C-T, 1,010번째 염기위치에 A-C로 3곳만이 point mutation을 일으켰이 확인되어, 99.8%의 높은 유전자 상동성을 나타내었다(Fig 10). Amino acid 상동성은 471 amino acid 서열중 196번째, 335번째 amino acid가 각각 Asn-Ser, Thr-Pro로 치환됨으로써 469 amino acid가 동일하여 99.6%의 높은 상동성을 확인하였다.

고 찰

국내 육류소비량은 매년 증가하여 93년기준 일인당 24.7Kg이고 식육중 돼지고기는 일인당 13.9Kg으로서 높은 비중을 차지하고 있다. 우리나라 축사환

경의 여건 때문에 소화기계질환 특히 *Salmonella*군속에 의한 발병에는 계속 보고되고 있어, 식육위생상 문제로 부각되고 있다. *Salmonella* C1 serogroup의 *S. choleraesuis*는 6개월령미만의 돼지에서 소화기 및 호흡기증상을 보이고, 급성열성패혈증에 의한 폐사* 그리고 높은 감염율*을 나타내는 돼지 salmonellosis의 대표적인 혈청형으로 알려져 있다. 또한 C1 serogroup은 사람*, 송아지* 그리고 돼지 분변과 환경요인(흙, 오수, 사료, 퇴비, 쥐 등)에서도 분리 보고되고 있다*. 특히 설사사돈에서 분리한 *Salmonella* 속군중에서 22.2%*가 *Salmonella* C1 serogroup으로 동정되어 이에 대한 정확한 진단의 필요성이 커지고 있다.

Salmonella spp의 동정을 위한 생화학 및 혈청학적 검사방법은 많은 시간과 노력이 필요하며, 일반적으로 위양성, 위음성 등을 완전 배제할 수 없어, 동정 및 진단을 위해 DNA나 RNA 유전자를 이용한 방법이 최근 활용되고 특히 만성질병이나 보균상태의 진단에서 민감도 및 정확도가 높은 PCR기법과 hybridization기법은 그 가치를 인정받고 있어 *Salmonella* C1 serogroup의 진단에 유용하다고 생각된다.

일반적인 DNA증폭을 위한 PCR기법의 조건이 denaturation 94°C/1분, annealing 55°C/2분, extension 72°C/3분 정도로* 전체적인 반응시간이 길어 신속한 진단이 어렵고, PCR기법의 시간과 온도에 관한 최적조건을 결정하는 연구에서 denaturation 92-94°C/1초이하, annealing 54-56°C/1초이하, extension 75-79°C/10초의 조건으로 비특이적인 반응도 줄이고 PCR산물 산생도 큰 차이가 없음이 보고되어*, 본

연구의 예비실험으로 denaturation 94°C/1초, annealing 57°C/1초 및 Taq polymerase의 최소활성역가 35-100bp/sec의 polymerization 능력으로 PCR산물의 예상크기 1,500bp을 나누어 결정한 DNA extension 77°C/40초의 조건으로 PCR을 수행하였을 때 증폭산물을 확인할 수 있었다. 본 실험은 Taq polymerase의 활성역가를 감안한 denaturation과 annealing의 시간을 줄여 비특이적인 반응을 줄일 수 있었던 것으로 생각된다.

Salmonella 속균의 O-항원 전환유전자인 *rfbM* gene을 이용하여 PCR기법을 수행하였던 바, Fig 4에서와 같이 *Salmonella* C1 serogroup에서는 1422bp의 DNA 증폭을 확인할 수 있었으며 타 장내세균에서는 전혀 증폭하지 않았다(Fig 1). 또한 그 민감도를 측정하기 위하여 *S. choleraesuis*의 DNA량을 다단계로 희석하여 PCR과 southern blotting을 병행하여 수행하였던 바 1fg까지 검출할 수 있었다(Fig 6 및 7). 이는 박 등⁴²의 *Salmonella* 속균의 검출에서의 PCR증폭 후 검출 가능한 DNA의 양이 1fg이었다는 점과 비교하였을 때 PCR증폭 cycle의 횟수, 산물의 크기, 전체 PCR 반응시간을 감안하면 더욱 민감한 결과를 얻었다고 생각된다.

한편 질병진단을 위한 DNA probe의 표지에 있어서 ³²P-dCTP등의 방사선 동위원소의 문제점이 제기되어⁴³⁻⁴⁵, 최근에는 비동위원소성 표식효소물질인 digoxigenin(DIG)-dUTP, biotin-dATP, biotin-dUTP 등이 크게 활용되고 있다^{46,47}. 본 실험에서도 *Salmonella* C1 serogroup의 *rfbM* gene을 검출하기 위한 digoxigenin효소의 이용은 짧은 작업시간, 기술의 간편, 높은 민감성과 특이성이 나타난 바와 같이(Figs 3,5,7), 앞으로 야외 가검물에서의 *Salmonella* 검출에 손쉽게 이용될 수 있을 것이다.

일찌기 *Salmonella* 속균의 *rfb* gene cluster는 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, P, S 등으로 분류되고 있으며^{3,5,48}, C1 serogroup에 속하는 *S. montevideo*의 *rfbM*, *rfbK* 유전자의 염기서열이 밝혀진 바 있고 또한 *rfbM*(B serogroup), *cpsB*(B serogroup) 그리고 *rfbM*(C2 serogroup) mannose 생합성경로와 *rfbM* 유전자와의 amino acid 서열의 상동성은 각각 58%, 63.3% 그리고 58.7%이었고, *rfbK* 유전자와 *rfbK*(B serogroup), *cpsG*(B serogroup) 그리고 *rfbK*(C2 serogroup)의 amino acid 서열의 상동성은 각각 23.7%, 96.9% 그리고 22.2%로서⁴⁹, C1 serogroup의 *rfbM* 유전자는 Southern blot에 의해 B serogroup의 *rfbM* 및 *cpsB* 유전자와 hybridization이 일어나지 않으며, 이에 반해 *rfbK* 유전자는 B serogroup의 *cpsG* 유전자와 96.9%의 상동성을 보여 B 및 C1 serogroups의 분자

생물학적 구분이 용이하지 않은 것으로 알려져 있다.

*Salmonella choleraesuis*의 *rfbM* 유전자의 염기서열을 GenBank 자료를 이용하여 *Vibrio cholera*의 *rfbA*-T 유전자 및 *Escherichia coli*의 GDP-Man pyrophosphorylase 발현 유전자와 비교 분석한 결과 상동성은 각각 48% 및 62%로 유전적 차이를 나타내었고, *Salmonella* C1 serogroup의 *S. choleraesuis*와 *S. montevideo*의 *rfbM* 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 단지 3곳의 염기 치환이 인정되었고, *Salmonella* C1 serogroup의 혈청형간에 염기서열과 amino acid의 높은 상동성을 확인하여 *Salmonella* C1 serogroup의 *rfbM* 유전자는 C1 serogroup의 검색에 유용할 것으로 사료된다.

앞으로 *Salmonella* C1 serogroup의 PCR에 의한 검출을 실제 야외에서 응용하기 위해서는 가검물에 대한 PCR반응의 특이성 부여를 위한 연구가 있어야 할 것이며, 아울러 *rfbM* 유전자의 특성을 이용하여 유전자적 발현기술을 이용한 항원성에 관한 연구와 더많은 C1 serogroup의 *rfbM* 유전자의 염기서열분석으로 *Salmonella* C1 serogroup의 혈청형간의 구분에 *rfbM* 유전자에 대한 PCR기법과 RFLP(restriction fragment length polymorphism)를 병용하여 효율적으로 구분하는 방법에 관한 연구가 더 이루어져야 할 것이다.

결론

돼지 *Salmonella* 감염증을 일으키는 주요 병원체로서 알려진 *Salmonella* C1 serogroup을 신속 정확하게 검색하기 위한 *rfbM* gene에 대한 특이적인 PCR기법을 개발하고자 *rfbM* forward 및 reverse primer를 제조하여 DNA단편을 증폭하고 특이성 증명과 염기서열 비교분석 등을 수행하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PCR에 사용한 *rfbM* forward 및 reverse primer는 *Salmonella* C1 serogroup 11종에 대하여 특이적인 1,422bp의 증폭산물을 생성하였으며, 다른 *Salmonella* serogroups에 속하는 8종 및 기타 장내 세균 11종의 PCR에서는 산물을 전혀 관찰할 수 없었다.

2. *Salmonella choleraesuis*의 genomic DNA를 이용하여 PCR기법으로 검출가능한 최소한의 DNA량은 10pg이었고, Southern blot을 병행 했을 때의 DNA량은 1fg이었다.

3. *Salmonella choleraesuis*의 *rfbM* gene을 증폭하여 cloning하고 염기서열을 분석하여 *S. montevideo*의 염기서열과 비교한 바, 다른 *Salmonella* serogroups과 달

리 99.8%의 높은 유전자 상동성을 나타내어 *Salmonella* C1 serogroup의 특이적인 *rfbM* gene clone임

을 알 수 있어 돼지의 salmonellosis 진단과 식육위생에서도 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

Legends for figures

Fig 1. Specificity of the PCR assay for *Salmonella choleraesuis* detection using *rfbM* primers.

A; λ /Hind III marker, B; *E coli* K88, C; *E coli* K99, D; *E coli* STb, E; *E coli* STab, F; *E coli* LT, G; *E coli* SLT I, H; *E coli* SLT II, I; *Pseudomonas fluorescens*, J; *Pasteurella multocida*, K; *Proteus vulgaris*, L; *Klebsiella pneumoniae*, M; *S choleraesuis* ATCC 1348, N; Negative control. Arrow indicated 1,422bp size band specific to *S choleraesuis* (C1 serogroup).

Fig 2. Specificity of the PCR assay for *Salmonella* C1 serogroup detection using *rfbM* primers.

A; λ /Hind III marker, B; *S paratyphi* A, C; *S typhimurium* ATCC 13076, D; *S choleraesuis* ATCC 1348, E; *S newport*, F; *S virginia*, G; *S enteritidis* ATCC 14208, H; *S pullorum*, I; *S anatum*, J; *S newington*, K; Negative control, L; 1Kb ladder marker. Arrow indicated specific PCR to *S choleraesuis* (C1 serogroup).

Fig 3. Southern blot analysis of PCR-amplified products from various *Salmonella* serogroups using dig-labelled *rfbM* gene probe.

A; *S paratyphi* A, B; *S typhimurium* ATCC 13076, C; *S choleraesuis* ATCC 1348, D; *S newport*, E; *S virginia*, F; *S enteritidis* ATCC 14208, G; *S pullorum*, H; *S anatum*, I; *S newington*, J; Negative control.

Fig 4. Agarose gel electrophoretic analysis of PCR-amplified products from various *Salmonella* C1 serogroup.

A; λ /Hind III marker, B; *S choleraesuis* ATCC 1348, C; *S paratyphi* C, D; *S montevideo*, E; *S oranienberg*, F; *S thompson*, G; *S virchow*, H; *S bareilly*, I; *S mikawasima*, J; *S tennessee*, K; *S lille*, L; *S mbandaka*, M; 1Kb ladder marker. Arrow shows the 1422bp sized single band specific to *Salmonella* C1 serogroup.

Fig 5. Southern blot analysis of *rfbM* gene from *Salmonella* C1 serogroup using dig-labelled DNA probe.

A; *S choleraesuis* ATCC 1348, B; *S paratyphi* C, C; *S montevideo*, D; *S oranienberg*, E; *S thompson*, F; *S virchow*, G; *S bareilly*, H; *S mikawasima*, I; *S tennessee*, J; *S lille*, K; *S mbandaka*.

Fig 6. Sensitivity of the PCR assay in detecting DNA from *Salmonella choleraesuis* using *rfbM* primers.

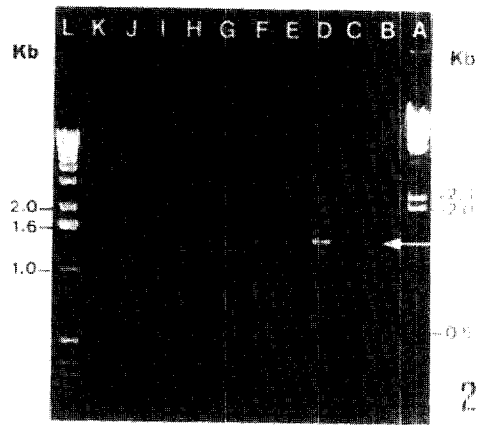
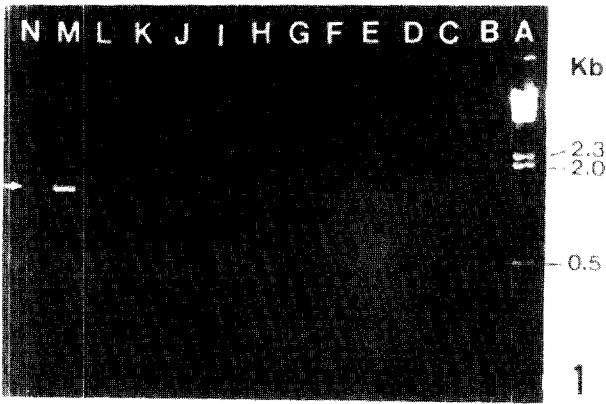
A; 1Kb ladder marker, B-L, Serially 10-fold diluted *S choleraesuis* DNA, concentration of 1 g, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg, 1fg and 100ag, respectively. M, Negative control. Arrow indicated the specificity of PCR which could detect to 10pg concentration of genomic DNA.

Fig 7. Sensitivity of the Southern blot analysis of PCR products with dig-labeled *S choleraesuis rfbM* gene probe.

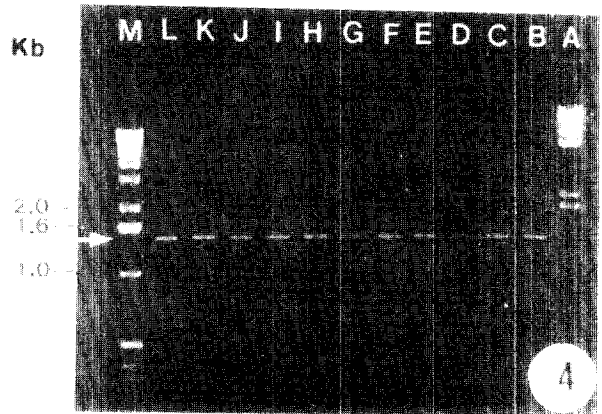
A-K; Serially 10-fold diluted *S choleraesuis* DNA, concentration of 1 μ g, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg, 1fg and 100ag, respectively., L; Negative control.

Fig 8. Cleavage pattern of the cloning vector containing the *rfbM* gene of *S choleraesuis*.

A; 1 kb ladder marker, B; PCR products, C; PCR products/Hind III, D; pCRSM1/EcoR I, E; pCRSM2/EcoR I, F; pCRSM1/EcoR I, Hind III, G; pCRSM2/EcoR I, Hind III, H; pUCSM1/EcoR I, Hind III, I; pUCSM2/EcoR I, Hind III. Arrows indicated 1,422, 750 and 670bp sized bands of cloned *rfbM* gene, respectively.



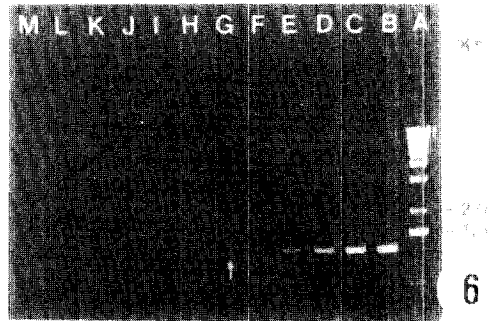
A B C D E F G H I J



A B C D E F G H I J K

A B C D E F G H I J K L

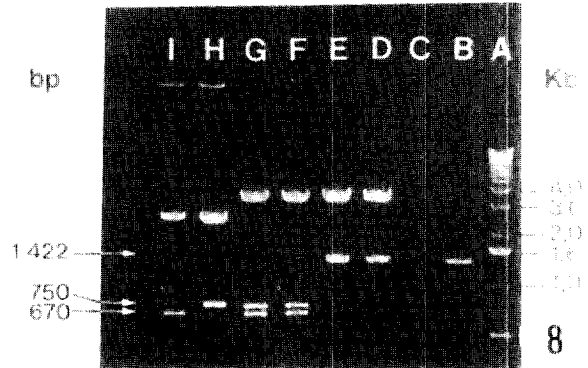
5



A B C D E F G H I J K L

A B C D E F G H I J K L

7



참고 문헌

1. Salmon DE, Smith T. The bacterium of swine plague. *Am Mon Microbiol J* 1886; 7: 204.
2. Linton AH. Guidelines on prevention and control of salmonellosis. WHO, Geneva. 1983;10-128.
3. Sato G, Kodama H. Appearance of R-factor mediated drug resistance in *Salmonella typhimurium* excreted by carried calves on a feedlot. *Jpn J Vet Res* 1974; 22: 72-79.
4. Terakado N, Ohya T, Ueda H, et al. A survey on drug resistance and R plasmids in *Salmonella* isolated from domestic animals in Japan. *Jpn J Vet Sci* 1980; 42: 543-550.
5. Tayler DJ, Leman AD, Straw BE, et al. Salmonellosis 570-583pp, Disease of swine. Iowa State University press, Ames, Iowa USA 1992.
6. Lindberg AA. Bacterial virulence factor with particular reference to *Salmonella* bacteria. *Scand J Inf Dis Suppl* 1980; 24: 86-99.
7. John MCL, Lindberg AA. Anti-*Salmonella* lipopolysaccharide monoclonal antibody characterization of *Salmonella* BO-, CO-, DO-, and EO- specific clones and their diagnostic usefulness. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2424-2433.
8. Sanderson KE, Roth JR. Linkage map of *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Reviews* 1989; 52: 485-532.
9. Nikaido H, NiKaido K, Makela PH. Genetic determination of enzymes synthesizing O-specific sugars of *Salmonella* lipopolysaccharides. *J Bacteriol* 1966; 91: 1126-1135.
10. John MCL, Urrat K, Reeves PR, et al. Selective amplification of abequose and paratose synthase genes(*rfb*) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups(A,B,C2, and D). *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2118-2123.
11. Tsuyoshi S, Nobuo K, Takayuki K, et al. Genetic analysis of *Escherichia coli* O9 ϕ *rfb*: Identification and DNA sequence of phosphomannomutase and GD-P-mannose pyrophosphorylase genes. *Microbiol* 1994; 140: 59-71.
12. 국립보건원. 살모넬라 및 쉬겔라. 병원미생물 검사 기준. 서울인쇄공업협동조합 1988.
13. Ewing WH. The Genus *Salmonella*. identification of *Enterobacteriaceae*. Elsevier Science Publisher Ind NY. 1986:181-245.
14. 계기식, 김예흠, 최강원 등. 장티푸스의 혈청학적진단에 효소면역측정법(enzyme linked immunosorbent assay)의 적용시험. *대한미생물학회지* 1983; 18: 73-85.
15. 김윤원, 황응수, 국윤희 등. 효소면역측정법을 위한 장티푸스균체항원의 부차방법. *대한미생물학회지* 1985; 20: 91-102.
16. 국윤희, 박정규, 김홍주 등. 단세포균 항체를 이용한 *Salmonella* group typing serum의 개발. *대한미생물학회지* 1991; 26(5): 395-402.
17. 김영중, 조명재, 이우곤 등. *Salmonella typhi* O형원에 특이한 단세포균항체의 생산 및 그 특성에 관한 연구. *대한미생물학회지* 1988; 23: 319-330.
18. Lim PL, Fok YP. Detection of group D *Salmonellae* in blood culture broth and of soluble antigen by tube agglutination using an O-9 monoclonal antibody latex conjugate. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1165-1168.
19. Helmuth R, Stephan R, Hoog BB, et al. Epidemiology of virulence-associated plasmids and other membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infect Immun* 1985; 48: 175-182.
20. 최원필, 이희석, 여상건 등. 우,돈에서 분리한 *Salmonella*유래 R plasmid의 유전학적 분자생물학적 성상에 관한 연구. II, R plasmid의 비적합성 및 plasmid profile. *대한수의학회지* 1989; 29: 59-67.
21. Claude T, Martin JW. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene encoding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis*. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 1477-1485.
22. Jorge EG, Roy C III. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovar; *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect Immun* 1991; 59: 2901-2908.
23. Brown PK, Romana LK, Reeves PR. Cloning of the *rfb* gene cluster of a group C2 *Salmonella*: comparison with the *rfb* regions of group B and D. *Mol Microbiol* 1991; 5: 1873-1881.
24. Liu D, Verma NK, Romana LK, et al. Relationship among the antigenic specificity of group A and group D *Salmonellae*. *J Bacteriol* 1991; 171: 5694-5701.
25. Wang L, Romana LK, Reeves PR. Molecular analysis of a *Salmonella enterica* group E1 *rfb* gene cluster: O antigen and the genetic basis of the major polymorphism. *Genetics* 1992; 130: 429-443.
26. Wyk P, Reeves P. Identification and sequence of the gene for abequose synthase, which confers antigenic

- specificity on group B *Salmonellae*: Homology with galactose epimerase. *J Bacteriol* 1989; 171: 5687-5693.
27. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* 1980; 8: 4321-4325.
 28. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 1979; 7: 1513-1523.
 29. Lee SJ, Romana LK, Reeves PR. Sequence and structural analysis of the *rfb*(O-antigen) gene cluster from a group C1 *Salmonella enterica* strain. *J General Microbiol* 1992a; 138: 1843-1855.
 30. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory 1989.
 31. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166: 557-580.
 32. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
 33. Keller GH, Manak MM. DNA probe. Macmillan publishers Ltd, USA 1993; 173-198.
 34. 축산자료. 농림수산부 축산국 1994.
 35. Ghosh SS, Bujarbaruah KM, Anubrata D. *Salmonella choleraesuis* 6,7(c): 1,5 infection in pigs in Meghalaya. *Ind J Hill Farming* 1992; 5: 135-136.
 36. Schwartz K. Salmonellosis in midwestern swine. Proc 94th Annu Meet US, Anim Health Asso, Denver Colo 1990.
 37. 정태화, 이연태, 이명원 등. 한국에서 분리된 장내세균(*Salmonella*, *Shigella*, *E coli*군속)의 병원적 역할에 대한 연구. 국립보건원보 1986; 23: 73-95.
 38. 정석찬, 최원필. 소 유래의 *Salmonella*속균에 대하여. 대한수의학회지 1986; 26: 79-85.
 39. 최원필, 이희석, 여상건 등. 양돈장에 있어서 *Salmonella*감염증의 역학적 연구: I. 발생 및 오염상황, 혈청형과 *Salmonella typhimurium*의 생물형. 대한수의학회지 1986; 26: 49-59.
 40. 이주홍, 조희택, 김용환 등. 설사사돈으로부터 병원성대장균, 캄필로박터속균 및 살모넬라속균의 분리 동정. 대한수의학회지 1988; 28: 67-73.
 41. Wittwer CT, Garling DJ. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques* 1991; 10: 76-83
 42. 박두희, 김원용, 김철중 등. Polymerase chain reaction에 의한 *Salmonella*속균의 검출. 대한수의학회지 1994; 34: 115-125.
 43. Riley LK, Caffrey CJ. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization with non-radioactive digoxigenin-labeled DNA probes. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1465-1468.
 44. Whetsell AJ, Drew JB, Milman G, et al. Comparison of three nonradioisotopic polymerase chain reaction based methods for detection of human immunodeficiency virus type I. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 845-853.
 45. 김수희, 백원기, 서민호 등. Digoxigenin 탐식자를 이용한 혈청내 B형간염 바이러스 DNA의 검출. 대한미생물학회지 1993; 28: 303-310.
 46. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 132: 6-13.
 47. Kessler C, Holtke HJ, Seibl R, et al. Nonradioactive labeling and detection of nucleic acids: I. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: antidigoxigenin ELISA principle (digoxigenin system). *Mol Gen Hoppe-Seyler* 1990; 371: 917-927.
 48. Brahmabhatt HN, Wyk P, Quigley NB, et al. Complete physical map of the *rfb* gene cluster encoding biosynthetic enzymes for the O antigen of *Salmonella typhimurium* LT2. *J Bacteriol* 1988; 170: 98-102.
 49. Lee SJ, Romana LK, Reeves PR. Cloning and structure of the group C1 O antigen(*rfb* gene cluster) from *Salmonella enterica* serovar *montevideo*. *J General Microbiol* 1992b; 138: 305-312.