

Streptococcus suis 신속동정을 위한 PCR 기법

정병열 · 정석찬 · 김종염 · 박용호* · 김봉환**

농림부 수의과학검역원 세균과
서울대학교 수의과대학* · 경북대학교 수의과대학**
(1998년 5월 19일 접수)

Polymerase chain reaction for a rapid and specific identification of *Streptococcus suis*

Byeong-yeal Jung, Suk-chan Jung, Jong-yeom Kim, Yong-ho Park*, Bong-hwan Kim**

Department of Bacteriology, National Veterinary Research and Quarantine Service, MAF, Anyang, 430-016, Korea
College of Veterinary Medicine, Seoul National University*
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University**

(Received May 19, 1998)

Abstract : Synthetic oligonucleotide primers of 20 and 21 bases, respectively, were used in the polymerase chain reaction (PCR) to amplify a sequence of the *mrp* gene, which encodes the muramidase released protein of *Streptococcus suis*. Amplification was not recorded when 5 other streptococcal species were tested or when 9 different nonstreptococcal species were tested. A DNA fragment of 517bp was amplified from the genomic DNA of *S suis*. The lower detection limit was 100pg of the genomic DNA. The primers recognized 34 serotypes of *S suis* reference strains and 9 isolates from pneumonic lung, brain, nasal discharge, tonsil. This results suggest that the amplification of the *mrp* gene by PCR method is potential for the identification of *S suis* isolates.

Key words : *Streptococcus suis*, *mrp*, PCR.

서론

Streptococcus suis 는 주로 돼지에서 뇌막염, 패혈증, 기관지 폐렴, 관절염 등을 유발하며 전세계적으로 양돈

산업에 큰 피해를 끼치는 병원체중 하나이다¹. *S suis* 는 1부터 34까지와 1/2 등 총35종의 협막형질형이 보고되어 있으며 이중에서 혈청형 2가 뇌막염, 폐렴병소에서 가장 많이 분리되고 있다^{2,3}.

S suis 의 병원성 인자로는 균체벽에 부착된 136kDa의

Address reprint requests to Dr. Byeong-yeal Jung, National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang, 430-016, Republic of Korea.

muramidase released protein(MRP)과 균체밖으로 유리되는 110kDa의 extracellular factor(EF)⁴, hemolysin(suilysin)⁵, capsule⁶ 등이 알려져 있다. 특히 Vecht *et al*^{4,7}은 *S suis* 혈청형 2 중에서 MRP와 EF를 산생(MRP+, EF+)하는 균주는 환돈에서 많이 분리되며 대식세포와 단핵구의 탐식에 저항하여 병원성도 강한 반면, 건강돈에서는 MRP-, EF-균주가 많이 분리되며 병원성도 약하여 MRP와 EF는 좋은 병원성 지표라고 주장하였다. *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Listeria monocytogenes* 등에서 처럼 hemolysin은 세균의 중요한 병원성 인자로 지목되며, *S suis*의 hemolysin은 혈청형간 교차방어능이 인정되는 등 연구가 활발히 진행되고 있다^{5,8}. 한편 병원성 균주와 비병원성 균주를 구분하기 위하여 DNA fingerprinting⁹, ribotyping¹⁰, multilocus enzyme electrophoresis¹¹ 등도 이용되고 있다.

Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)를 이용한 혈청형 동정이나 항체가 측정^{12,13} 등이 보고되어 있으나 모든 혈청형에 적용할 수는 없다. 혈청형 동정에는 slide agglutination test, immunodiffusion test가 있으나 특이성이 떨어지며^{14,15}, coagglutination reagent를 이용하기도 하나¹⁶ 혈청형이 35종 밝혀져 있을 뿐만 아니라 기존의 항혈청에 반응하지 않는 균들도 많아서 항혈청을 이용하여 동정하기에는 한계가 있다. 유용한 생화학적인 정상검사법이 있으나¹⁷ 분리장기 및 축종별로 생화학 성상이 다양하므로^{18,19} *S suis*를 동정하는데 생화학적인 정상만에 의존한다면 정확히 동정할 수가 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 돼지 질병의 주요 원인체로 알려진 *S suis*를 신속히 동정하기 위한 PCR primer를 작성하여 특이성과 민감성을 확인함과 아울러 야외분리주에 적용시험 등을 실시하였다.

재료 및 방법

시험균주 : Dr. Gottschalk(University of Montreal, Canada)로부터 분양받은 *S suis* 혈청형 1부터 34까지의 표준균주와 국내 돼지에서 분리한 *S suis* 9주를 사용하였다. 특이성 검사에는 *S agalactiae* (ATCC 13813), *S uberis* (ATCC 27958), *S pyogenes* (ATCC 21059), *S dysgalactiae* (ATCC 27957), *Aerococcus* spp(isolate), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (isolate), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (isolate), *Pasteurella multocida* (ATCC 43019), *Mycoplasma hyopneumoniae* (ATCC 25095), *Haemophilus parasuis* (SW 114),

Bordetella bronchiseptica (ATCC 19395), *Klebsiella pneumoniae* (isolate), *Proteus vulgaris* (isolate) 등을 사용하였다.

Genomic DNA의 분리 : PCR을 위한 genomic DNA 추출은 Murray와 Thompson²⁰의 방법에 준하여 실시하였다. 간략히 기술하면 일야배양균액을 원심수거하여 TE buffer(10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 7.4) 567 μ l, 10%(w/v) sodium dodecyl sulfate 30 μ l, proteinase K(20mg/ μ l) 3 μ l에 부유시켜 37 $^{\circ}$ C, 1시간 반응시켰다. 5M NaCl 100 μ l와 CTAB/NaCl 용액(10% cetyl trimethyl ammonium bromide/0.7M NaCl) 80 μ l를 첨가하여 65 $^{\circ}$ C, 10분 반응시켰다. 동량의 chloroform/isoamylalcohol(24 : 1)을 혼합하여 12,000 rpm, 3분 원심한 뒤 상층액에 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25 : 24 : 1)을 혼합하여 12,000rpm, 3분 원심하여 상층액에 동량의 chloroform을 혼합한 뒤 12,000rpm, 3분 원심했다. 다시 상층액에 0.6vol의 absolute ethanol을 혼합하여 -20 $^{\circ}$ C, 30분 방치한 뒤 12,000rpm, 3분 원심하여 DNA를 침전시켰다. 70% ethanol로 DNA pellet을 원심수세하여 건조한 후 RNase 용액(20 μ g/ml)에 부유시켰다. 최종 DNA 농도와 순수도는 DNA calculator(Pharmacia Gene Quant)를 사용하여 측정하였으며 사용시까지 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

Primer 제작과 PCR 조건 : 특이 primer는 Smith *et al*²¹이 보고한 염기서열을 기초로 하여 DNA synthesizer (Applied Biosystems 392)로 작성하였으며 Table 1에 나타난 바와 같다. PCR은 Gene ATAQ controller(Pharmacia Biotech, LKB)를 사용하였다. 10 \times PCR buffer(GibcoBRL) 5 μ l, 50mM MgCl₂ 2 μ l, 10mM deoxynucleotide triphosphates 1 μ l, 100pmole의 forward와 reverse primers, 100ng의 template DNA, 1 unit의 *Taq* polymerase(GibcoBRL)를 첨가하고 최종량이 50 μ l 되도록 증류수를 넣었다. 혼합액의 증발을 막기 위하여 mineral oil(Sigma)을 한방울 적하하였으며, denaturation은 95 $^{\circ}$ C에서 30초, annealing은 64 $^{\circ}$ C에

Table 1. Nucleotide sequences of PCR primers for the amplification of the *mrp* gene

Primer	Nucleotide sequence	Location (bp)
Forward	5'-ACCGTAGACCAGCCAGCTTG-3'	1913-1932
Reverse	5'-GGTGCATCAGACACATCCGTT-3'	2409-2429

서 1분, extension은 72℃에서 1분으로 하여 30회 반복하였으며 최종 extension은 72℃, 5분간 실시하였다. PCR 증폭산물을 1% agarose gel에 전기영동한 뒤 ethidium bromide로 염색하여 자외선 조사기로 *mrp* 유전자 증폭 산물을 확인하고 사진촬영을 하였다.

특이성 및 민감성 검사 : PCR 조건이 *S suis*에 특이적인지를 알아보기 위하여 *S agalactiae* 등 총14주를 대상으로 상기의 PCR을 적용하였으며, 민감성 검사는 *S suis*의 genomic DNA를 DNA calculator(Pharmacia Gene Quant)에서 농도를 측정하여 1µg/µl 되도록 정량한 후 1ag/µl까지 10진 희석하여 PCR을 실시하여 *mrp* 유전자 특이증폭 산물을 확인하였다.

***S suis* 표준균주 및 분리주에 PCR 적용 :** 확립된 PCR 조건을 *S suis* 34종의 혈청형과 건강돈의 비점액과 편도 그리고 환돈의 뇌, 병변폐에서 유래된 *S suis*에 적용하였다.

PCR 증폭산물의 제한효소부위 분석 : PCR 증폭산물이 정확한 부위에서 증폭되었는가를 확인하기 위해 GenBank(X64450)를 통해 *mrp* 유전자내의 제한효소 절단 부위를 찾아낸 후, 30 unit의 *Hinc* II (GibcoBRL), *Mbo* I (GibcoBRL), *Hinf* I (GibcoBRL) react buffer 등을 PCR 증폭산물과 혼합하여 37℃에서 18~24시간 반응시켰다. 10% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 GenBank에서 얻어진 예상절편치와 PCR 증폭산물의 제한효소절편치를 비교하였다.

결 과

작성한 *mrp* 유전자에 대한 primer를 이용한 PCR 기법의 특이성 검사를 위해 *S agalactiae* 등 총14주로 확인한 결과 *S suis*에서만 517bp의 특이적인 증폭산물을 확인할 수 있었으며, 다른 *Streptococcus spp*나 그람 양성균 및 그람 음성균 등에 대해서는 전혀 증폭산물이 나타나지 않아 제작된 primer의 특이성이 확인되었다(Fig 1).

PCR 기법의 민감성 검사는 DNA calculator로 *S suis*의 genomic DNA양을 측정하여 1µg/µl 되도록 정량한 후 이를 1ag/µl까지 10진 희석하여 PCR을 실시하여 증폭산물을 확인한 결과 100pg/µl의 농도까지 검출이 가능하였다(Fig 2).

S suis 표준균주 34종을 대상으로 PCR 적용한 결과, Fig 3에서와 같이 34종의 모든 혈청형에서 517bp의 특이

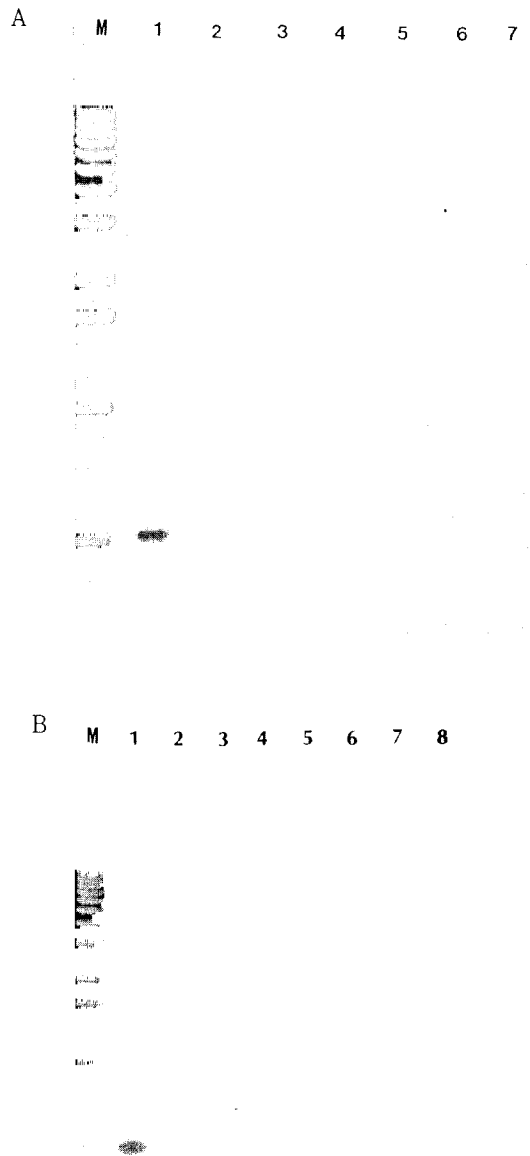


Fig 1. Specific amplification of *S suis* *mrp* gene by the PCR. Amplified PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel. (A) M, DNA size marker(1kb ladder); lane 1, *S suis*; lane 2, *S agalactiae*; lane 3, *S uberis*; lane 4, *S pyogenes*; lane 5, *S dysgalactiae*; lane 6, *Aerococcus spp*; lane 7, *Ery rhusiopathiae*. (B) M, DNA size marker(1kb ladder); lane 1, *S suis*; lane 2, *A pleuropneumoniae*; lane 3, *P multocida*; lane 4, *M hyopneumoniae*; lane 5, *H parasuis*; lane 6, *B bronchiseptica*; lane 7, *K pneumoniae*; lane 8, *P vulgaris*.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

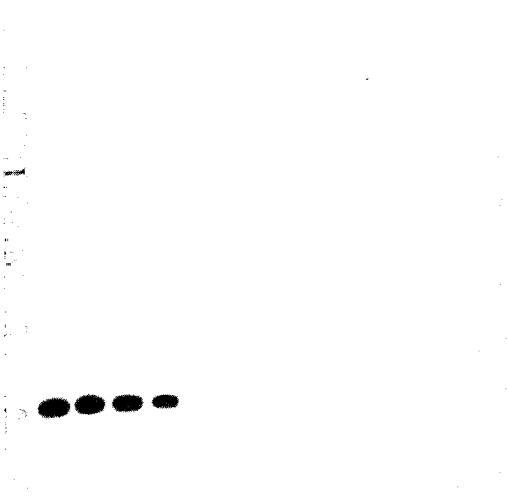


Fig 2. Sensitivity of the PCR for the detection of *S suis mrp* gene. Genomic DNA was isolated from *S suis* serotype 2 and the DNA was diluted 10 fold. The diluted DNA was used as template DNA. M, DNA size marker(1kb ladder); lanes 1 to 13, 10 fold serial dilutions of genomic DNA from 1µg to 10⁻¹⁰µg.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

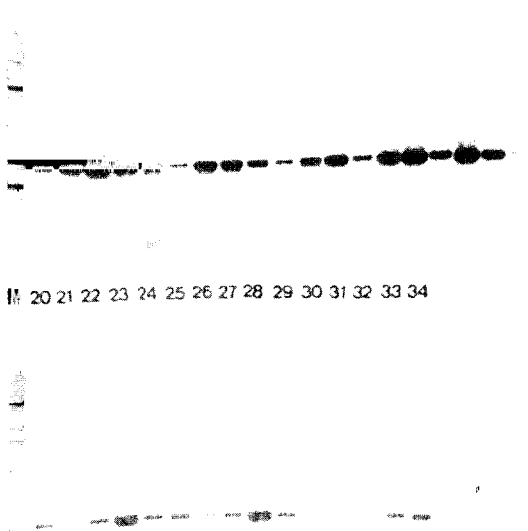


Fig 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products generated by reference strains of *S suis*. M, DNA size marker(1kb ladder); lanes 1 to 34, *S suis* serotype 1 to 34.

적인 유전자 증폭산물을 확인할 수 있어, 이 PCR 기법은 혈청형에 상관없이 모든 *S suis* 에 적용가능함을 알 수 있었다.

S suis 국내 분리균들을 대상으로 PCR을 적용한 바 환돈의 병변폐, 뇌막분리주 뿐만 아니라 건강돈의 비강, 편도분리주 등 분리장기에 상관없이 *S suis*는 *mrp* 유전자를 가지고 있음을 알 수 있었다(Fig 4).

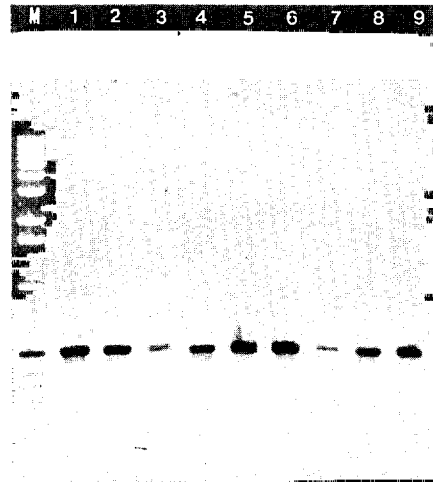


Fig 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products generated by isolates of *S suis*. M, DNA size marker(1kb ladder); lanes 1 to 5, lung; lanes 6, nasal cavity; lanes 7 to 8, brain; lane 9, tonsil.

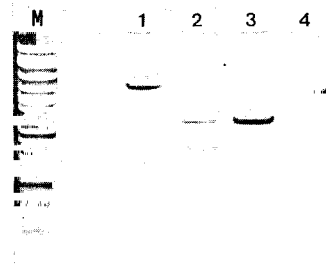


Fig 5. Electrophoretic pattern of *S suis* PCR products digested with restriction enzyme on 10% polyacrylamide gel. M; DNA size marker(pGEM), lane 1; PCR products, lane 2; PCR products digested with *Hinc* II, lane 3; PCR products digested with *Mbo* I, lane 4; PCR products digested with *Hinf* I.

PCR 증폭산물이 *mrp* 유전자내의 정확한 부위에서 증

폭된 것인지를 알아보기 위하여 GenBank(X64450)를 통하여 *mrp* 유전자내에 존재하는 제한효소 절단부위를 찾아내어 적절한 크기로 자르는 제한효소를 선발하여 반응시킨 후 10% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 절단된 DNA 크기를 관찰하였다. GenBank(X64450)에 등록된 결과에 따르면 증폭된 517bp의 PCR 증폭산물은 *Hinc* II에 의해 246bp, 147bp, 115bp, 9bp 등으로, *Mbo* I에 의해 249bp, 240bp, 28bp 등으로, *Hinf* I에 의해 451bp, 66bp로 절단되는데 Fig 5에서 나타난 바와 같이 9bp를 제외한 나머지 절편들의 크기로 보아 이 PCR 증폭산물은 *mrp* 유전자내 정확한 부위에서 증폭되었음을 알 수가 있었다.

고 찰

PCR 기법으로 *S suis*의 *mrp* 유전자를 확인하여 신속하고 정확하게 균을 동정할 수 있다. 균 동정을 위해 항혈청을 이용하기도 하나¹⁴⁻¹⁶ *S suis* 처럼 혈청형이 많은 균주에 적용하기에는 시간과 노력이 많이 소요될 뿐만 아니라 혈청형 미동정균들이 계속 보고됨에 따라³ 항혈청 이용에 많은 제약이 따른다. 진분 분해능, VP시험, 6.5% NaCl 발육능시험, salicin 및 trehalose 분해능 등 *S suis*를 동정하는데 많이 이용되는 생화학적 검사가 있으나 균이 분리된 축종이나 장기에 따라 분리균주의 생화학적 성상이 다양하여^{18,19} 이를 이용한 균동정에도 한계가 있다.

지금까지의 *S suis*에 대한 연구는 주로 혈청형 2에 집중되었다. 비록 혈청형 2가 대부분의 국가에서 가장 우세한 혈청형이고, 건강돈과 환돈의 유행 혈청형에 차이가 있다하더라도³ 동일한 혈청형내에서도 병원성 균주와 비병원성 균주가 존재하므로 혈청형 동정만으로 병원성 유무를 판단할 수는 없다²². MRP와 EF가 병원성 지표라는 주장도 있으나^{4,7} MRP는 비병원성 균주 뿐만 아니라 혈청형 2 이외에서도 존재하며, 환돈 분리주에서 MRP-, EF- 균주들도 많이 출현하여^{23,24} MRP, EF는 발병의 필요충분조건은 아니라고 생각된다.

*S suis*는 혈청형이 다양하여 모든 혈청형에 적용할 만한 유용한 동정법은 아직 없다. 특히 전세계적으로 *S suis*에 대한 PCR 진단법이 개발되어 있지 않아 본 실험에서는 PCR primer를 이용하여 MRP의 유전자를 검출하고자 한 바 *S suis* 34종의 모든 혈청형에 *mrp* 유전자가

존재하여 혈청형에 상관없이 신속한 동정이 가능하였고, 다른 균종에서는 검출되지 않아 특이성이 인정되었으며, 다양한 분리장기에 따라라도 동일한 결과를 보여, 본 PCR 진단법이 *S suis*를 확인하는 유효한 방법으로 사료된다.

앞으로 *S suis* 병원성 균주와 비병원성 균주를 구별할 만한 유효한 시험법의 개발이나 병원성 인자에 대한 정확한 규명이 진행되어야 할 부분이라고 생각한다.

결 론

*Streptococcus suis*의 신속한 동정을 위하여 PCR 진단 기법을 확립하여, 이 PCR 기법의 민감성 및 특이성을 조사하였으며 *S suis* 혈청형 34종 및 국내 분리균주에의 적용 가능성 등에 대해 조사하였다.

1. *S suis*의 *mrp* 유전자에 대한 primer를 작성하여 PCR 기법을 실시한 결과 *S suis*에서만 517bp의 증폭산물이 확인되어 다른 세균에서는 확인할 수 없는 특이성이 인정되었으며, 이들 primer의 민감성은 template DNA 100pg까지 검색이 가능하였다.

2. *S suis* 혈청형 34종에 대해 PCR을 실시한 결과 모든 혈청형에서 517bp의 특이적인 증폭산물을 확인할 수 있어 *mrp* 유전자는 *S suis*의 공통 유전자임을 알 수 있었다.

3. 국내 건강돈의 비강, 편도분리주 및 환돈의 뇌막, 병변폐 분리주를 대상으로 PCR을 실시한 결과 모든 분리주에서 특이증폭산물을 확인하여 균분리 장기에 상관없이 *S suis*를 정확히 동정할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Higgins R, Gottschalk M, Mittal KR, et al. *Streptococcus suis* infection in swine. A sixteen month study. *Can J Vet Res*, 54:170-173, 1990.
- Higgins R, Gottschalk M, Lebrun M, et al. Description of six new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest*, 7:405-406, 1995.
- 정병열, 정석찬, 김봉환 등. 국내 돼지 *Streptococcus suis* 감염을 조사 및 혈청형 동정. 대한수의학회지, 37:577-582, 1997.
- Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, et al. Iden-

- tification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* , 59:3156-3162, 1991.
5. Gottschalk MG, Lacouture S, Dubreuil JD. Characterization of *Streptococcus suis* capsular type 2 haemolysin. *Microbiol* , 141:189-195, 1995.
 6. Gottschalk M, Petitbois S, Higgins R, et al. Adherence of *Streptococcus suis* capsular type 2 to porcine lung sections. *Can J Vet Res* , 55:302-304, 1991.
 7. Vecht U, Wisselink HJ, van Dijk JE, et al. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germ-free pigs depends on phenotype. *Infect Immun* , 60: 550-556, 1992.
 8. Sala V, Antonini M, Vischi O, et al. Distribution of capsular types and hemolysin production of *Streptococcus suis* isolates in northern Italy. 14th IPVS, p 307, 1996.
 9. Mogollon JD, Pijoan C, Murtaugh MP, et al. Identification of epidemic strains of *Streptococcus suis* by genomic fingerprinting. *J Clin Microbiol* , 29:782-787, 1991.
 10. Smith HE, Rijnsburger M, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Virulent stains of *Streptococcus suis* serotype 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* serotype 1 can be recognized by a unique ribotype profile. *J Clin Microbiol* , 35:1049-1053, 1997.
 11. Hampson DJ, Trott DJ, Clarke IL, et al. Population structure of Australian isolates of *Streptococcus suis* . *J Clin Microbiol* , 31:2895-2900, 1993.
 12. Serhir B, Higgins R, Dubreuil D, et al. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Streptococcus suis* . *Can J Vet Res* , 57:19-24 1993.
 13. Kataoka Y, Yamashita T, Sunaga S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for detection of antibody against *Streptococcus suis* type 2 in infected pigs. *J Vet Med Sci* , 58:369-372, 1996.
 14. Hommez J, Devriese LA, Henrichsen J, et al. Identification and characterization of *Streptococcus suis* . *Vet Microbiol* , 16:349-355, 1986.
 15. Rosendal S, Breton J, Henrichsen J, et al. Isolation of *Streptococcus suis* using a selective medium. *Can J Vet Res* , 50:537-539, 1986.
 16. Gottschalk M, Higgins R, Boudreau M. Use of polyvalent coagglutination reagents for serotyping of *Streptococcus suis* . *J Clin Microbiol* , 31:2192-2194, 1993.
 17. Tarradas C, Arenas A, Maldonado A, et al. Identification of *Streptococcus suis* isolated from swine : proposal for biochemical parameters. *J Clin Microbiol* , 32: 578-580, 1994.
 18. Devriese LA, Ceyskens K, Hommez J, et al. Characteristics of different *Streptococcus suis* ecovars and description of a simplified identification method. *Vet Microbiol* , 26:141-150, 1991.
 19. Prieto C, Garcia FJ, Suarez P, et al. Biochemical traits and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from slaughtered pigs. *J Vet Med* , 41:608-617, 1994.
 20. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* , 8:4321-4325, 1980.
 21. Smith HE, Vecht U, Gielkens ALJ, et al. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136 kilodalton surface protein(muramidase-released protein) of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun* , 60:2361-2367, 1992.
 22. Vecht U, Wisselink HJ, Reek FH, et al. Diagnosis of several capsular serotypes of *Streptococcus suis* by phenotype and PCR and the relation with virulence for pigs. 14th IPVS, P298, 1996.
 23. Salasia SIO, Lammler C. Distribution of serotype, virulence markers and further characteristics of *Streptococcus suis* isolates from pigs. *J Vet Med* , 42:78-83, 1995.
 24. Gottschalk M, Lebrun A, Wisselink H, et al. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* , 62:75-79, 1998.