

PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism 방법에 의한 *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato의 분류

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과

송혜원 · 박성언 · 박상욱 · 김근희 · 김 홍 · 엄용빈 · 김증배[†]

국문초록: 라임병의 원인균인 *Borrelia burgdorferi*에 대하여 각 균종의 표준균주와 진드기에서 추출한 DNA를 template로 PCR을 실시한 후 그 증폭산물을 *Alu I*으로 처리한 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 방법으로 각 균종의 연관성을 조사하고자 하였다. 표준균주로 RFLP를 실시한 결과 *B. burgdorferi* sensu stricto와 *B. garinii*의 RFLP 형태 (50 bp, 70 bp, 150 bp)가 유사하였으며 *B. afzelii*에서는 다른 RFLP 형태 (50 bp, 110 bp, 150 bp)를 관찰하였다. 그 중 *B. afzelii* KK-1과 *B. garinii* HP1은 새로운 RFLP 형태를 보여 *B. afzelii*와 *B. garinii*는 각각 2 types의 subgroup으로 분류할 수 있었다. 진드기 DNA에서는 *B. afzelii*를 포함한 각 균종에 대하여 모두 유사한 RFLP 형태를 보였는데, 진드기 DNA에서 확인된 *B. afzelii*는 KK-1과 같은 군에 속하는 것으로 사료되었다.

Lyme borreliosis는 절지동물의 매개성 열성질환으로 1975년 미국 Connecticut주의 라임지방에서 환자가 다수 발생한 것이 보고¹⁾된 이후 알려진 질병으로 1984년 Burgdorfer에 의해 진드기로부터 원인균이 분리되었다⁴⁾. 라임병균은 지역적으로 다르게 분포한다고 보고되고 있으며 국내에서는 수집한 진드기 *Ixodes persulcatus*와 *I. nipponensis*에서 처음으로 라임병균을 분리하였고 그것이 *Borrelia afzelii*, *B. garinii*에 속하는 것으로 보고된 바 있다^{7,8)}. 그 이후 RFLP 방법을 이용하여 *B. burgdorferi*를 분류하고자 하는 많은 연구들이 진행되어 오고 있다. 박경희 등²⁾은 23S rRNA를 탐식자로 사용한 RFLP와 5S-23S intergenic spacer amplicon을 이용한 RFLP 방법으로 11주의 국내 분리균주를 분류하였다. Li 등⁵⁾은 *B. burgdorferi* sensu lato에 대한 5S-23S rRNA를 이용한 RFLP 방법으로 진드기와 설치류에서 분리된 59주의 균주에서 50.8%의 *B. garinii*, 28.8% *B. afzelii*를 분류하였고 Fukunaga 등³⁾은 23S rRNA를 이용한 RFLP 방법으로 *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* 외에 1개의 균을 더 포함시킨 4개의 *genos-*

*pecies*로 분류할 수 있다고 보고하였다. 이에 본 실험에서는 16S rRNA를 이용한 RFLP 방법으로 *B. burgdorferi* sensu lato의 각 표준균주에 대하여 RFLP를 분석하고 국내에서 채집한 진드기로부터 DNA를 추출, PCR를 시행한 후 RFLP 방법으로 각 균종의 연관성을 알아보려고 하였다.

본 실험에 사용한 라임병균의 표준균주로 *B. burgdorferi* sensu stricto의 경우 B31 (ATCC35210), 297, *B. afzelii*의 경우 934U, KK-1, KM-10, Y18, S13, Y7, 10MT, Y5, *B. garinii*로는 935T, KW-1, HP1, KK-3을 사용하였다. 본 연구에 사용한 진드기는 강원도 고지대 (청태산, 치악산 및 원주시 매지리 일원)에서 채집하여 DNA를 추출하였다.

중합효소 연쇄반응은 각각 추출한 DNA 2 µl에 2.5 mM dNTP를 2 µl 넣은 후 10X buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂) 2.5 µl, primer set (20 pmol/µl)를 각각 2.5 µl, *Taq* DNA polymerase 0.3 U를 첨가하고 최종 반응하는 양이 25 µl이 되도록 한 후 thermal cycler (Hybaid Limited, U. K.)에서 표적 DNA 증폭을 시도하였다. 중합효소 연쇄반응에는 *B. burgdorferi* sensu stricto 및 sensu lato 모든 균종의 16S rRNA에 특이하도록 제작한 BB uni primer set¹⁾을 사용하였다. PCR 반응은 총 35 cycles을 시행하였으며 첫 cycle이 시작하기 전

* 논문접수: 1999년 7월 16일

수정재접수: 1999년 9월 24일

[†]별책 요청 저자

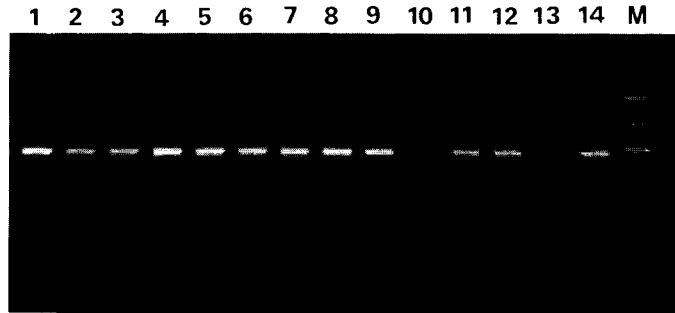


Fig. 1. PCR amplification products with DNAs extracted from reference with BB uni primer set.

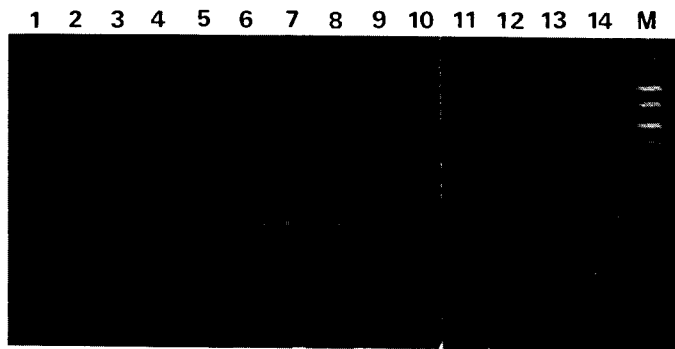


Fig. 2. RFLP analysis of *Borrelia burgdorferi* reference strains. Amplified products using BB uni primer set were digested with *Alu* I (1 U). Lane M, pBH20 marker; Lane 1, *B. burgdorferi* B31; Lane 2, *B. burgdorferi* 297; Lane 3, *B. afzelii* 934U; Lane 4, *B. afzelii* KK-1; Lane 5, *B. afzelii* KM-10; Lane 6, *B. afzelii* Y18; Lane 7, *B. afzelii* S13; Lane 8, *B. afzelii* Y7; Lane 9, *B. afzelii* 10MT; Lane 10, *B. afzelii* Y5; Lane 11, *B. garinii* 935T; Lane 12, *B. garinii* KW-1; Lane 13, *B. garinii* HP1; Lane 14, *B. garinii* KK-3.

에 94℃에서 2분 30초간 가온한 후 매 cycle 당 94℃에서 45초 동안 denaturation, primer set 종류에 따라 47℃에서 45초 동안 annealing, 72℃에서 1분 30초 동안 extension 반응을 시행하였다. 반응 종료 후 1.5% agarose gel을 이용한 전기영동으로 target sequence의 증폭여부를 확인하였다. PCR-RFLP를 실시하기 위하여 *B. burgdorferi* sensu lato에 특이한 primer set으로 PCR을 시행한 결과 470 bp의 DNA가 증폭되었다 (Fig. 1).

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 방법으로 각 균종간의 RFLP pattern을 조사하기 위하여 *B. burgdorferi* sensu lato 특이 primer를 사용하여 증폭된 DNA 양성산물에 10X buffer 1 µl, *Alu* I 제한효소 1 U를 넣고 멸균 증류수로 최종 반응하는 양이 10 µl가 되도록 한 후 37℃ 항온 수조에서 하룻밤 반응 후 3% Metaphore® agarose gel (1X TBE)에서 전기영동하였다. 표준균주로

RFLP를 실시한 결과 *B. burgdorferi* sensu stricto와 *B. garinii*의 RFLP 형태가 유사한 형태로 약 50 bp, 70 bp, 150 bp로 나타났으며 *B. afzelii*는 약 50 bp, 110 bp, 150 bp로 관찰되었다 (Fig. 2). Nakao 등⁶⁾은 라임병 환자, 진드기, 설치류로부터 분리된 group III (*B. afzelii*)를 RFLP 방법을 이용하여 subgroup IIIa, IIIb, IIIc로 분류하였다. 국내에서는 이전에 박경희 등^{2,7)}에 의해 RFLP 방법으로 국내 분리 라임병균을 분류하였는데 *B. afzelii* KK-1은 기존의 알려진 균종과 일치한 양상을 보였으나 10주에서는 기존의 알려진 종과는 다른 새로운 분리 균주일 것이라고 보고한 바 있다. 그러나 본 실험에서는 *B. afzelii* KK-1의 RFLP pattern (lane 4, Fig. 2)이 다른 *B. afzelii* 균주와는 다른 형태를 보여 박경희 등^{2,7)}의 결과와는 차이가 있었다. 또한 *B. garinii* 중 HP1 (lane 13, Fig. 2)은 *B. garinii*의 RFLP 형태와는 약간 다른 특이한 band (50 bp, 70

bp, 190 bp)를 나타내었다 (Fig. 2). 진드기 DNA에서는 *B. afzelii*를 포함한 각 균종에 대하여 모두 유사한 RFLP 형태를 보였는데, 진드기 DNA에서 확인된 *B. afzelii*는 KK-1과 같은 군에 속하는 것도 확인되었다. 본 실험을 통하여 *B. burgdorferi sensu stricto*와 *B. garinii*는 유사한 RFLP를 나타내었으며, *B. afzelii*와 *B. garinii*는 각각 2 type의 subgroup으로 분류되었다.

참 고 문 헌

- 1) 김종배, 송혜원, 박성언, 박상욱, 안준환, 엄용빈, 김영미 (1998): 국내에서 채집한 진드기에서 중합효소 연쇄반응을 이용한 라임병균 및 Ehrlichiosis 원인체의 검출. 대한의생명과학회지, **4(2)**: 113-120.
- 2) 박경희, 김중현, 한명준, 이승현 (1998): RFLP 방법에 의한 국내분리 라임병균, *Borrelia burgdorferi sensu lato*의 분류. 대한미생물학회지, **33(2)**: 119-128.
- 3) Fukunaga M, Sohnaka M, Nakao M and Miyamoto K (1993): Evaluation of genetic divergence of borrelia isolates from lyme disease patients in Hokkaido, Japan, by rRNA gene proteins. *J Clin Microbiol*, **31**: 2044-2048.
- 4) Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG and Brenner DJ (1984): *Borrelia burgdorferi* sp. nov.; etiological agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol*, **34**: 494-497.
- 5) Li M, Masuzawa T, Takada N, Ishiguro F, Fujita H, Iwaki A, Wang H, Wang J, Kawabata M and Yanagihara Y (1998): Lyme disease *Borrelia* species in Northeastern China resemble those isolated from Far Eastern Russia and Japan. *Appl Environ Microbiol*, **64(7)**: 2705-2709.
- 6) Nakao M, Miyamoto K, Fukunaga M, Hashimoto Y and Takahashi H (1994): Comparative studies on *Borrelia afzelii* isolated from a patients of lyme disease, *Ixodes persulcatus* ticks, and *Apodemus speciosus* rodents in Japan. *Microbiol Immunol*, **38(6)**: 413-420.
- 7) Park KH, Chang WH, Schwan TG, Reed KD Jr, Dumler JS, Bakken JS, Telford SRIII and Persing DH (1993): Identification and characterization of Lyme disease spirochetes, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, isolated in Korea. *J Clin Microbiol*, **31(7)**: 1831-1837.
- 8) Park KH, Lee SH, Won WJ, Jang WJ and Chang WH (1992): Isolation of *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of Lyme disease from *Ixodes* ticks in Korea. *J Kor Microbiol*, **27**: 307-312.
- 9) Steere AC (1989): Lyme disease. *N Engl J Med*, **321**: 586-596.

=Abstract=

**Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato by PCR -
Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis**

**Hye-Wone Song, Sung-Un Park, Sang-Wook Park, Geun-Hee Kim,
Hong Kim, Yong-Bin Eom and Jong-Bae Kim[†]**

*Department of Medical Technology, College of Health Science,
Yonsei University, Wonju, 220-710, Republic of Korea*

For the classification of *B. burgdorferi* sensu lato strains, PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was performed. PCR was carried out with *B. burgdorferi* sensu lato specific primer set (BB uni set), and amplicons of 470-bp DNA were digested with *Alu* I. The *Alu* I restriction polymorphism of the amplicons provided a useful tool for identifying *B. burgdorferi* sensu lato strains. Both amplicons from *B. burgdorferi* sensu stricto and *B. garinii* except HP1 strain showed identical RFLP pattern (50 bp, 70 bp, and 150 bp), but amplicons from *B. afzelii* and *B. garinii* showed two types of subgroups, respectively. The result of PCR-RFLP using extracted DNAs from ticks was similar to those patterns of *B. burgdorferi* species including *B. afzelii*.

Key Words: *Borrelia burgdorferi*, Lyme disease, PCR-RFLP

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 5(2): 209-212, December, 1999]

[†] Corresponding author