

DNA Amplified Fingerprinting 기법을 이용한 *Salmonella pullorum*과 *Salmonella gallinarum*의 다형성 비교 분석

김연수 · 김상균 · 송원철 · 황의경

상지대학교 생명자원과학대학 응용동물과학부
(2001년 8월 27일 게재승인)

Comparison of Polymorphisms of *Salmonella pullorum* and *Salmonella gallinarum* Using DNA Amplified Fingerprinting

Yeon-Soo Kim, Sang-Kyun Kim, Won-Chul Song, Eui-Kyung Hwang

Division of Applied Animal Science, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University
(Accepted by August 27, 2001)

Abstract : This study was performed to detect the *Salmonella* genus-specific DNA marker for comparing of polymorphisms between *S pullorum* and *S gallinarum* by using PCR amplified techniques. A total of ten primers were used to detect DNA polymorphisms from *S pullorum* and *S gallinarum*. The number of DAF bands detected per each primer varied from 26 to 45, with an average of 32.7 using 10 primers. A total of 327 DAF bands were generated and among them 123 bands were polymorphic(37.6%). These DNA amplified fingerprinting(DAF) specific bands for *S pullorum* and *S gallinarum* were observed from all primers. For *S pullorum*, GEN 60-04, GEN 70-04 and GEN 70-03 primers showed a high level of polymorphism with 0.79, 0.70 and 0.57, respectively, But GEN 60-05 primer did not show a level of polymorphism. For *S gallinarum*, GEN 70-03, 60-04, 60-07, 70-05 and 70-04 primers showed a higher level of polymorphism from 0.40 to 0.67. but GEN 70-08, 70-02, 60-09, 60-04 and 60-03 primers showed a low level of polymorphism from 0.16 to 0.28. Each five strains of *S pullorum* and *S gallinarum* were isolated from chickens showed typical clinical signs related with infection of pullorum disease or fowl typhoid at commercial chicken farms. DNA markers of these strains produced by GEN 70-04, GEN 70-05 and GEN 70-08 showed significant difference of band patterns between *S pullorum* and *S gallinarum*. These DNA markers could be used for comparison of DNA marker polymorphism between *S pullorum* and *S gallinarum* as well as rapid diagnosis of fowl typhoid and pullorum disease of domestic fowls.

Key words : DAF, *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, PCR, primer

서 론

추백리(pullorum disease; PD)는 1899년 처음 알려진 질병으로서 우리 나라에서는 최초로 1924년 일본 나고야 지방으로부터 수입한 초생추 중 설사를 일으키는 병계에서 분리한 병원체가 이 질병의 원인균이라고 보고되었다^{1,2}. PD는 닭 및 칠면조 등의 조류에서 주로 발생하는 질병으로서 원인균은 *Salmonella pullorum*이며, 난계대전염과 감염계와 접촉에 의한 수직 또는 수평감염

및 오염된 사료나 양계 기구 및 사람 등에 의한 기계적인 전파에 의해 전염이 이루어진다. 또한, 감염된 종계는 회복 후 체내 간장이나 생식기인 난소 등에 이 병의 원인균을 거의 영구적으로 보유하는 보균계가 되며 난계대전염이 되기 때문에 이들 종란으로부터 부화한 병아리 역시 감염되어 있으므로, 생후 1주일 이내의 어린 나이에서 전신 패혈증으로 인한 발병을 하게 되며, 감염율에 따라 1~2주일 사이에 많은 폐사가 있고 생존한 닭의 경우 수양성 흰색 설사 및 성장 지연 등을 나타내며

분변을 통해 인접한 다른 건강계로 수평전파를 일으킨다³.

가금티푸스(fowl typhoid; FT)는 1898년 Klein에 의해 종계균으로부터 전염성 장염이라는 병명으로 처음 보고되었고, 1902년 Curtice에 의해 가금티푸스로 명명되었으며, 현재는 전세계적으로 발병되고 있는 질병으로서, 주로 닭 및 칠면조 등의 가금에서 발생하는 급·만성의 전염병이지만 드물게는 꿩, 공작, 백조, 참새 및 타조 등도 감염되며, 푸른색 또는 황갈색 설사와 빈혈 및 일령에 관계없이 나타나는 패혈증으로 인한 높은 폐사율이 특징이다^{4,5}. 가금티푸스 원인균인 *Salmonella gallinarum*은 세포내 기생세균으로서 면역세포나 항체 또는 일반적인 항생제가 세균에 직접 작용하지 못하는 세포속으로 침투하므로 치료 효과도 낮고 면역형성이 잘 안되기 때문에 재발을 또한 높다. 가금티푸스는 추백리에서와 같이 감염된 모계의 종란을 통한 난계대전염(transovarian transmission)과 감염계와 접촉에 의한 수평 감염 및 오염된 사료나 양계 기구 및 야조, 쥐, 사람 등에 의한 기계적인 전파(mechanical transmission)에 의해 전염된다^{6,7,8}.

이처럼 PD와 FT의 원인체인 살모넬라균은 항생제나 항체(抗體)의 공격을 받아 균자체가 불리한 환경에 처할 경우 이들 공격의 대상을 피하여 세포내로 숨을 수 있는 능력을 가지고 있다. 따라서, 이들 질병에 대하여는 다른 질병들과 동일한 방법으로 치료를 하거나 방제대책을 세워서는 근원적인 치료가 되지 않을 뿐만 아니라 근절하는데 있어서도 많은 난관에 봉착하게 되었다.

그 동안 세균을 분류 혹은 typing 함에 있어서 가장 그 분별능력이 민감하고 재현성이 높은 방법은 PFGE(pulsed field gel electrophoresis) 방법인 것으로 알려져 있다. 그러나 PFGE 방법은 경비가 많이 소요되며 실험방법도 복잡한 절차를 거치므로 오랜 시간이 소요되는 단점을 가지고 있다^{9,10,11}. 그러나 최근들어 소량의 시료로부터 특정 염기서열 부위의 유전자를 특이적으로 대량 증폭시킬 수 있는 PCR 기술이 급속히 발전하여 극소량의 DNA 시료로부터 목적으로 하는 염기서열 영역을 in vitro 내에서 특이적으로 증폭하여 검정할 수 있을 뿐만 아니라 실험조작이 단순하고 단시간 내 신속하게 결과를 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다. 특히, PCR 기술을 이용하여 DNA 다형 현상을 검출하는 방법으로서 RAPD(random amplified polymorphic DNA)의 일종인 DAF(DNA amplified fingerprinting) 기법은 임의의 DNA 단편을 PCR 법으로 증폭하여 다형현상을 검출하여 유전적 표지인자를 찾는 방법으로서, 표적 유전자의 특정 염기서열에 대한 사전 정보없이도 임의의 염기서열을 갖는 primer를 이용하여 genomic DNA를 증폭

하여 다형성을 검출하므로 무한정한 primer의 제작과 이용이 가능하며 고도의 다형성 검출에 효과적으로 활용할 수 있다^{12,13,14,15,16,17}. 따라서 이 실험은 DAF 표지인자를 이용하여 *S pullorum*과 *S gallinarum*에 대하여 균주 내 또는 균주간 유전적 변이성과 유전적 특성 규명과 함께 질병진단을 위한 기초자료를 얻고자 실시하였다.

재료 및 방법

*S pullorum*과 *S gallinarum* 균주의 DNA 분리 및 정제

S pullorum(serogroup D1)과 *S gallinarum*(serogroup D1) 균주를 국립수의과학검역원으로부터 분양받아 본 실험의 표본균주로 이용하였다. 두 균주를 MacConkey broth에서 배양한 후, 배양액(ampicillin 60 mg/ml 첨가) 3 ml에 박테리아 colony를 접종하여 37°C 배양기에서 overnight 시킨 후 배양액을 effendorf tube에 1.5 ml 씩 분주하고 13,000 rpm으로 1분간 원심 침전시킨 후 침전된 pellet에 용액 I(50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)과 용액 II(0.2N NaOH, 1% SDS)를 각각 200 µl 씩 첨가하고 혼합한 후 실온에서 10분간 방치한 뒤, 여기에 용액 III(5M potassium acetate 60 µl, acetic acid 11.5 µl, DW 28.5 µl)를 200 µl 첨가하고 조심스럽게 혼합한 후 tube를 얼음속에 담가 10분간 보관한 뒤, 13,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액을 새 tube에 넣고 2-3배의 isopropanol을 첨가하여 혼합하고 상온에서 20분 정도 방치한 뒤, 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 완전히 제거한 다음, TE buffer(pH 8.0)를 20 ml 첨가하여 pellet을 용해시킨 후 냉동보관하였다.

DAF marker 분석

DAF 분석에 사용된 arbitrary primer는 Genosys Biotechnologies(Chem-Bio Service, Europe)에서 구입하였으며, GC 함량이 60~70% 인 11종류의 primer를 PCR 증폭에 이용하였다(Table 1). DAF 분석을 위한 PCR 반응은 GeneAmp PCR System 9700(Perkin-Elmer Cetus, Foster, California, USA)을 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 반응액은 0.5 ml tube에 template DNA 50 ng, primer 각 0.5 µM, dNTP 각 200 µM, 10× PCR buffer 및 Taq DNA polymerase 1 unit를 첨가하여 PCR 반응액을 총 20 µl로 조정하였다. PCR cycle은 최초 94°C에서 5분간 예비 가열 후 94°C에서 1분, 40°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분간의 cycle을 총 40회 반복한 다음 마지막으로 72°C에서 5분간 실시하여 DNA 증폭과정을 종료했다. PCR 종료 후 증폭산물은 TBE

Table 1. Sequences of arbitrary primers used for DAF analysis

| Primer No. | Primer sequences(5' to 3') |
|-------------|----------------------------|
| GEN 60* - 3 | GTGACGTAGG |
| GEN 60 - 4 | CAATCGCCGT |
| GEN 60 - 5 | GTTTCGCTCC |
| GEN 60 - 7 | GTTTCGCTCC |
| GEN 60 - 9 | CAATCGCCGT |
| GEN 70* - 2 | TGCGCCCTTC |
| GEN 70 - 3 | TTCCCCGCT |
| GEN 70 - 4 | ACCCCCGAAG |
| GEN 70 - 5 | GGTGACGCAG |
| GEN 70 - 8 | GTCCACACGG |

*G + C content

buffer(90 mM tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.0)가 함유된 6% polyacrylamide gel(49:1)을 이용하여 200 V 정전압으로 약 4시간 이상 전기영동한 후 silver 염색하여 DNA band를 검출하였다.

*S pullorum*과 *S gallinarum* 아외분리주에 대한 DAF marker 분석

강원도 원주 소재 양계장에서 빈혈, 패혈증, 황갈색 설사 및 성장 지연 등 임상증상을 나타내어 추백리 또는 닭티푸스의 감염이 의심되는 병계의 간장을 채취하여 MacConkey agar medium에 접종하였다. 배지에 배양된 균에 대하여는 집락의 형태와 색, 균의 그람염색성 및 살모넬라 그룹 혈청 진단액(국립수의과학검역원 제조) 및 당분해성 등 생화학적 검사를 통하여 동정하였

다. 동정된 균에 대한 DNA 분리 및 정제와 DAF marker 분석은 위와 같은 방법으로 실시하였다.

통계분석

*S pullorum*과 *S gallinarum* 균주의 유전자 변이성과 다형성 정도의 추정은 Bio-profil software package가 내장된 image analyzer(Perkin Elmer)를 사용하여 PCR 증폭산물의 band의 존재여부와 유전자형 양상을 분석하였다.

결 과

*S pullorum*과 *S gallinarum* 균주에 대한 DAF 지문 분석

DAF 기법으로 *S pullorum*과 *S gallinarum* 표본균주를 대상으로 두 균주간 유전적 변이성을 확인하고자 DNA band의 출현양상을 검색한 결과 균주간에 DNA 다형성을 나타내는 10종류의 primer를 선정하여 분석하였다. PCR 증폭산물의 분자량 범위는 200 bp에서 1,800 bp 사이였으며, primer 당 증폭된 DNA band의 수는 25~46개가 확인되었으며, primer 당 평균 32.7개의 band를 관찰할 수 있었다. 확인된 총 DNA 밴드들은 327개였으며, 이 중에서 다형성을 보인 DNA 밴드들은 123개로 37.6%의 다형성 수준이 인정되었다.

*S pullorum*과 *S gallinarum* 균주의 DAF 지문분석 결과에 기초한 DAF 밴드의 출현율과 다형성 수준을 비교한 결과 *S pullorum*은 GEN 60-03 primer에서 가장 많은 20개의 밴드가 확인된 반면 GEN 70-04 primer에서 가장 적은 10개의 밴드가 확인되었다. 한편, *S gallinarum*도 GEN 60-03 primer에서 가장 많은 25개의 밴드가 확

Table 2. Polymorphisms of DAF markers in *S pullorum* and *S gallinarum*

| Primer | No of total bands | | No of polymorphic markers | | Rate of polymorphisms | |
|----------|-------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| | <i>S pullorum</i> | <i>S gallinarum</i> | <i>S pullorum</i> | <i>S gallinarum</i> | <i>S pullorum</i> | <i>S gallinarum</i> |
| GEN 60-3 | 20 | 25 | 10 | 4 | 0.50 | 0.16 |
| GEN 60-4 | 14 | 19 | 11 | 9 | 0.79 | 0.47 |
| GEN 60-5 | 19 | 15 | - | 4 | 0.00 | 0.27 |
| GEN 60-7 | 12 | 17 | 5 | 7 | 0.42 | 0.41 |
| GEN 60-9 | 19 | 15 | 6 | 4 | 0.32 | 0.27 |
| GEN 70-2 | 14 | 15 | 6 | 4 | 0.43 | 0.27 |
| GEN 70-3 | 14 | 12 | 8 | 8 | 0.57 | 0.67 |
| GEN 70-4 | 10 | 20 | 7 | 5 | 0.70 | 0.40 |
| GEN 70-5 | 15 | 17 | 6 | 7 | 0.40 | 0.41 |
| GEN 70-8 | 17 | 18 | 7 | 5 | 0.41 | 0.28 |
| Total | 154 | 173 | 66 | 57 | 4.54 | 3.61 |
| Mean | 15.4 | 17.3 | 6.6 | 5.7 | 0.45 | 0.36 |

The rate of polymorphism was derived from dividing the number of polymorphic bands by total bands

인된 반면 GEN 70-03 primer에서 가장 적은 12개의 밴드가 확인되어 primer 간에 0.41%의 다형성 수준이 인정되었다. 또한, 중폭된 총 밴드 가운데 다형성 밴드의 비율을 나타내는 다형성 수준을 살펴보면, *S pullorum*에서는 GEN 60-04, 70-04, 70-03, 60-03 primer에서 각각 0.79, 0.70, 0.57 및 0.50으로 다형성 수준이 높았으며, GEN 70-02, 60-07, 70-08, 70-05 및 60-09에서는 0.32~0.43 범위에서 다형성 수준이 확인되었고, GEN 60-05 primer에서는 다형성 수준이 확인되지 않았다. 한편, *S gallinarum*에서는 GEN 70-03, 60-04, 60-07, 70-05 및 70-04 primer에서 다형성 수준이 0.67, 0.47, 0.41, 0.41 및 0.40으로 높았으나, GEN 60-03 primer에서는 0.16으로 다형성 수준이 가장 낮았으며, 나머지 primer에서는 0.27~0.28 범위에서 다형성 수준이 확인되었다 (Table 2).

*S pullorum*과 *S gallinarum* 균주 특이적 DAF 밴드 확인

*S pullorum*과 *S gallinarum* 균주 특이적 DAF 밴드를 확인하고자 총 10종류의 primer를 이용하여 DAF 밴드를 비교한 바 모든 primer에서 균주간에 명확한 차이를 형성한 DAF 밴드들을 인정할 수 있었다. GEN 60-03 primer에서 *S pullorum*은 1.50 Kb, 1.28 Kb, 1.26 Kb, 0.85 Kb, 0.70 Kb, 0.65 Kb, 0.55 Kb, 0.45 Kb, 0.41 Kb와

0.38 Kb가 *S gallinarum*은 1.30 Kb, 0.53 Kb, 0.46 Kb 및 0.33 Kb가 DAF 밴드들로 확인되었다. GEN 60-04 primer에서도 균주 특이적 밴드들이 형성되었는데, *S pullorum*에서는 1.28 Kb, 1.22 Kb, 0.91 Kb, 0.82 Kb, 0.79 Kb, 0.69 Kb, 0.52 Kb, 0.45 Kb, 0.44 Kb, 0.40 Kb 및 0.36 Kb가 *S gallinarum*에서는 1.40 Kb, 1.30 Kb, 1.23 Kb, 0.96 Kb, 0.90 Kb, 0.60 Kb, 0.58 Kb, 0.56 Kb 및 0.46 Kb가 DAF 밴드들로 확인되었다. GEN 60-05 primer에서는 다른 primer 보다 두 균주간에 유전적 동질성이 상당히 높았고, *S gallinarum*에서만 형성된 1.30 Kb, 0.62 Kb, 0.49 Kb 및 0.35 Kb가 *S gallinarum* 특이적 DAF 밴드들로 확인되었다. 한편, GEN 60-07 primer에서 *S pullorum*은 1.10 Kb, 0.96 Kb, 0.88 Kb, 0.60 Kb 및 0.43 Kb가 *S gallinarum*은 0.94 Kb, 0.90 Kb, 0.80 Kb, 0.75 Kb, 0.70 Kb, 0.58 Kb 및 0.50 Kb가 DAF 밴드들로 확인되었다. 또한, GEN 60-09 primer에서도 균주 특이적 DAF 밴드들이 형성되었는데, *S pullorum*은 1.40 Kb, 1.30 Kb, 0.70 Kb, 0.60 Kb, 0.51 Kb 및 0.42 Kb가 *S gallinarum*은 0.93 Kb, 0.85 Kb, 0.65 Kb, 0.46 Kb 및 0.35 Kb가 DAF 밴드들로 확인되었다. GEN 70-02 primer에서 *S pullorum*은 1.30 Kb, 1.00 Kb, 0.91 Kb, 0.81 Kb, 0.70 Kb 및 0.35 Kb가 *S gallinarum*은 1.20 Kb, 0.98 Kb, 0.96 Kb 및 0.48 Kb가 DAF 밴드들로 확인되었다. GEN 70-03 primer에서도 *S pullorum*과 *S gallinarum* 특이적 DAF 밴드들이 형성되었는데, 각각

Table 3. Size of strains specific DAF bands of *S pullorum* and *S gallinarum*

| Primer | Strains | Specific DNA band size(Kb) |
|----------|---------------------|---|
| GEN 60-3 | <i>S pullorum</i> | 1,50, 1.28, 1.26, 0.85, 0.70, 0.65, 0.55, 0.45, 0.41, 0.38 |
| | <i>S gallinarum</i> | 1,30, 0.53, 0.46, 0.33 |
| GEN 60-4 | <i>S pullorum</i> | 1.28, 1.22, 0.91, 0.82, 0.79, 0.69, 0.52, 0.45, 0.44, 0.40 0.36 |
| | <i>S gallinarum</i> | 1.40, 1.30, 1.23, 0.96, 0.90, 0.60, 0.58, 0.56, 0.46 |
| GEN 60-5 | <i>S pullorum</i> | - |
| | <i>S gallinarum</i> | 1.30, 0.62, 0.49, 0.35 |
| GEN 60-7 | <i>S pullorum</i> | 1.10, 0.96, 0.88, 0.60, 0.43 |
| | <i>S gallinarum</i> | 0.94, 0.90, 0.80, 0.75, 0.70, 0.58, 0.50 |
| GEN 60-9 | <i>S pullorum</i> | 1.40, 1.30, 0.70, 0.60, 0.51, 0.42 |
| | <i>S gallinarum</i> | 0.93, 0.85, 0.65, 0.46, 0.35 |
| GEN 70-2 | <i>S pullorum</i> | 1.30, 1.00, 0.91, 0.81, 0.70, 0.35 |
| | <i>S gallinarum</i> | 1.20, 0.98, 0.96, 0.48 |
| GEN 70-3 | <i>S pullorum</i> | 1.50, 1.30, 1.00, 0.94, 0.70, 0.54, 0.50, 0.35 |
| | <i>S gallinarum</i> | 1.10, 1.05, 0.82, 0.78, 0.52, 0.48, 0.44, 0.39 |
| GEN 70-4 | <i>S pullorum</i> | 1.20, 1.10, 0.96, 0.90, 0.60, 0.52, 0.39 |
| | <i>S gallinarum</i> | 1.50, 1.05, 0.98, 0.50, 0.37 |
| GEN 70-5 | <i>S pullorum</i> | 1.30, 1.10, 0.96, 0.81, 0.55, 0.40 |
| | <i>S gallinarum</i> | 1.05, 0.90, 0.80, 0.70, 0.52, 0.50, 0.46 |
| GEN 70-8 | <i>S pullorum</i> | 1.20, 0.98, 0.90, 0.81, 0.80, 0.69, 0.54 |
| | <i>S gallinarum</i> | 1.25, 0.98, 0.64, 0.48, 0.33 |

1.50 Kb, 1.30 Kb, 1.00 Kb, 0.94 Kb, 0.70 Kb, 0.54 Kb, 0.50 Kb 및 0.35 Kb와 1.10 Kb, 1.05 Kb, 0.82 Kb, 0.78 Kb, 0.52 Kb, 0.48 Kb, 0.44 Kb 및 0.39 Kb가 DAF 밴드들로 확인되었고, GEN 70-04 primer에서도 1.20 Kb, 1.10 Kb, 0.96 Kb, 0.90 Kb, 0.60 Kb, 0.52 Kb 및 0.39 Kb와 1.50 Kb, 1.05 Kb, 0.98 Kb, 0.50 Kb 및 0.37 Kb가 각각 *S pullorum*과 *S gallinarum* 특이적 DAF 밴드들로 확인되었다. GEN 70-05 primer에서는 1.30 Kb, 1.10 Kb, 0.96 Kb, 0.81 Kb, 0.55 Kb 및 0.40 Kb와 1.05 Kb, 0.90 Kb, 0.80 Kb, 0.70 Kb, 0.52 Kb, 0.50 Kb 및 0.46 Kb가 각각 *S pullorum*과 *S gallinarum* 특이적 DAF 밴드들로 확인되었다. 또한, GEN 70-08 primer에서도 *S pullorum*과 *S gallinarum* 특이적 DAF 밴드들이 형성되었는데, *S pullorum*에서는 1.20 Kb, 0.98 Kb, 0.90 Kb, 0.81 Kb, 0.80 Kb, 0.69 Kb 및 0.54 Kb가 *S gallinarum*에서는 1.25 Kb, 0.98 Kb, 0.64 Kb, 0.48 Kb 및 0.33 Kb가 DAF 밴드들로 확인되었다(Table 3).

따라서, *S pullorum*과 *S gallinarum*에서 검출된 DAF 밴드들은 두 균주간의 판별에 유용한 DNA marker로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

***S pullorum*과 *S gallinarum* 아외분리주에 대한 DAF marker 분석**

추백리 또는 닭티푸스에 감염된 것으로 의심되는

병계들로부터 각각 5주의 *S pullorum*과 *S gallinarum*을 분리 동정하였다. 분리 동정한 균주에서 genomic DNA를 분리하여 두 균주의 DAF 밴드양상을 비교하기 위하여 GEN 70-04, GEN 70-05 및 GEN 70-08 primer를 선정하여 증폭한 후 생성된 반응산물을 전기영동하여 DAF 밴드를 비교하였다(Fig 2). Fig 2에서 보는 바와 같이 GEN 70-04 primer에서 균주간 차이를 명확히 나타내는 DAF 밴드가 검출되었다. 1.20 Kb, 0.96 Kb 및 0.39 Kb 크기의 밴드는 *S gallinarum* 균주에서는 검출되지 않아 *S pullorum* 특이적인 밴드로 확인된 반면, 1.50 Kb, 0.75 Kb 및 0.50 Kb 크기의 band는 *S gallinarum* 특이적인 밴드로 확인되었다. 또한, GEN 70-05 primer에서도 0.96 Kb와 0.40 Kb가 *S gallinarum* 균주에서는 검출되지 않아 *S pullorum* 균주 특이적 밴드로 확인된 반면, 1.05 Kb와 0.52 Kb는 *S pullorum* 균주에서는 검출되지 않아 *S gallinarum* 균주 특이적 밴드로 확인되었다. 한편, GEN 70-08 primer에서도 *S pullorum*에서는 0.80 Kb, 0.69 Kb 및 0.54 Kb가 균주 특이적 밴드로 확인된 반면, *S gallinarum*에서도 1.25 Kb와 0.98 Kb가 균주 특이적 밴드로 확인되었다. 따라서 *S pullorum*과 *S gallinarum* 아외분리주에 대해 이들 primer를 이용한 DAF marker 분석을 통하여 두 균에 대한 감별진단이 가능하였다.

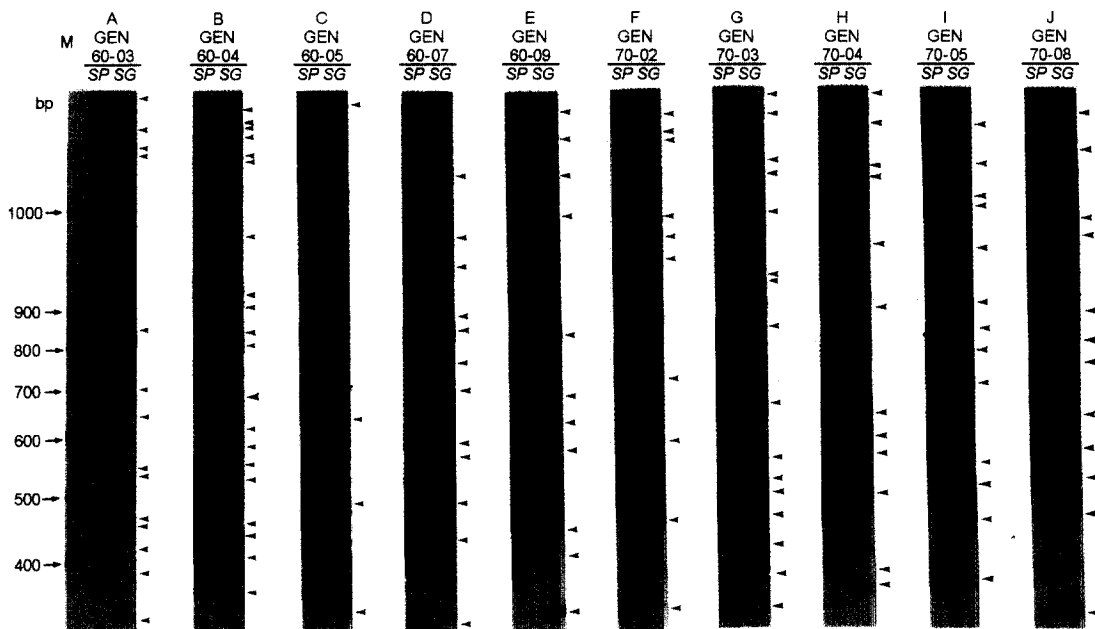


Fig 1. Identification of *S pullorum* and *S gallinarum* strain-specific DAF markers formed by each primer. The arrow heads indicate the strain-specific markers

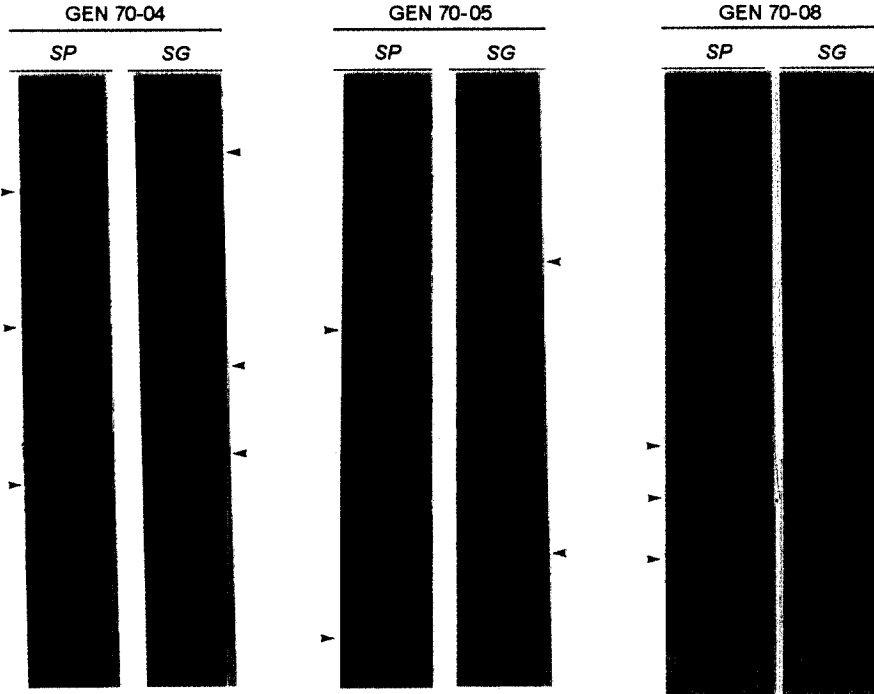


Fig 2. Identification of strain-specific DAF markers on field-isolated *S pullorum* and *S gallinarum* using three primers. The arrow heads indicate the strain-specific markers

고 찰

PCR의 유전자 분석기술을 이용하는 DNA 다형 분석 가운데 DAF 기법은 8~10 bp의 길이의 짧은 primer를 사용하여 genome 내 DNA 염기서열 부위를 임의로 증폭시켜 polyacrylamide gel 전기영동법으로 분리한 후 silver 염색법으로 DNA 표지인자를 찾는 검출기법이다¹⁶. DAF 분석기술은 기존의 RAPD 방법과 마찬가지로 표적 유전자의 특정 염기서열에 대한 사전 정보없이도 임의의 oligonucleotide primer를 이용하여 동시에 증폭하여 DNA 다형성을 검출할 수 있고 무한정한 primer의 제작과 이용이 가능하나 DAF 기법은 RAPD의 단점을 보완 발전시킨 분석기술로 primer의 길이, 증폭 조건 및 검출능력에 따라 고도의 유전적 다형성 및 변이성을 검출할 수 있다는 장점 때문에 각종 균주의 유전자 지문 분석에 폭넓게 응용되어 왔다^{13,17,18,19}.

균주 특이적 DAF marker에 관한 연구는 지금까지 주로 전통적인 방법으로서 Southern blot를 이용한 유전자 지문분석과 PCR 기법을 이용한 RAPD 또는 SCAR (sequence characterized amplified regions) 기법을 이용하여 분석되어져 왔다^{18,19}. 그러나 DAF 기법은 임의의 DNA 단편을 PCR 법으로 증폭하여 다형현상을 검출하여 유

전적 표지인자를 찾는 방법으로서, 유전적 유사도가 가까운 종이나 품종간에도 고도의 유전적 변이와 다형성을 나타내기 때문에 균주내 또는 균주간 특이적인 DNA marker 검출에 매우 효과적인 것으로 알려져 있다^{20,21,22}.

이처럼 DAF band의 수와 다형성 수준은 본 연구에 사용된 random primer의 GC 함량 및 annealing 온도 등에 크게 영향을 받기 때문에 genome의 크기에 따라 5~18 개의 DAF band가 생성되는 것으로 보고되어져 왔는데, 이 중에서 약 60~70% 이상의 유효한 polymorphic band를 검출하기 위해서는 사용된 primer의 GC 함량 및 annealing 온도의 최적 조건을 확립하는 것이 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다^{13,16,17}.

최근에 분자유전 기법의 하나인 PCR의 개발로 in vitro 내에서 소량의 DNA 시료와 특정한 sequence를 함유한 primer에 의해 염기배열을 특이적으로 증폭시킬 수 있는 방법이 개발됨에 따라 분자 생물학 뿐만 아니라 생물학 전 분야로 확대되어졌고 필요에 따라 기술을 보완하여 특이한 DNA를 분석할 수 있게 되었다. PCR 기법을 이용한 DNA 다형성 검출법은 각종 제한효소를 이용하여 절단 형태에 따른 DNA 단편을 분리하는 방법인 RFLP, random primer를 이용하여 genome 내 특정 염기서열 부위를 임의로 증폭시켜 유전적 다형성을 찾는 RAPD 및

고도의 반복배열수에 따른 변이를 검출하는 VNTR (variable number of tandem repeat), DAF 등으로 구분할 수 있다^{30,31}. 이러한 PCR 기법을 활용하여 DNA 수준에서 질병관련 유전자의 탐색, 증폭 DNA로부터 직접 염기서열 결정, 유전자지도 작성, site-directed mutagenesis 등 생명과학 분야에 널리 응용되고 있으며, PCR 기법을 이용하여 β -globin gene에 있어서 sickle cell 과 β -thalassemia 돌연변이의 진단에 관한 연구가 최초로 보고되었으며, 이 기술은 전통적인 Southern blot 분석 방법에 비하여 민감성 및 분석의 신속성과 간편성 등의 매우 큰 장점 때문에 분자 생물학을 근간으로 하는 생명과학의 기초 분야는 물론이고 모든 분야에서 크게 각광을 받고 있다. DAF 분석을 통한 다양한 생물종들의 다형현상에 관한 연구는 Caetano-Anolles *et al*¹⁶이 처음으로 보고하였는데 다양한 생물종을 대상으로 증폭산물의 수를 관찰한 바에 의하면 박테리아 DNA는 1~19개, 대두는 2~49개 그리고 인간에서는 0~60개의 DNA band가 관찰되어 genome 크기에 따라 상당한 차이가 있음을 보고하였다^{18,19}.

최근들어 *Salmonella* spp에 관한 연구 결과들이 속속 발표되고 있는데, Silva *et al*³²은 가금에서 *S. gallinarum*의 9R 균주를 이용하여 백신을 개발하기 위한 연구를 수행하여, *S. pullorum*과 *S. gallinarum*에 효과적인 백신을 개발하는데 많은 도움을 주었으며, Barrow *et al*³³도, *Salmonella*와 기타 박테리아의 면역성에 관하여 연구를 수행하여, 질병에 저항성을 갖은 개체의 생산 가능성을 제시하였고, Cohen *et al*³⁵은 PCR 기법을 이용하여 *Salmonella* strains 특이적 DNA marker 탐색을 위하여 *fimA* gene 증폭을 위한 연구를 수행하였는데, *Salmonella*에 고도의 특이성을 나타내는 primer를 합성하여 인간과 동물로부터 분리한 376 균주 및 80개의 이종을 분리하여 이용한 바 *Salmonella* 특이적 DNA band가 85bp에서 증폭된 것을 볼 수 있었으며, 모든 *Salmonella* 균주들이 PCR 반응에서 양성반응을 보였다³⁵. 따라서 이러한 PCR 기법은 식품내 함유하고 있는 *Salmonella*의 진단에도 많은 도움을 줄 것으로 기대하고 있다고 보고하였다. 이와 더불어, Tuchili *et al*^{5,6}에 의하면, *S. gallinarum*과 *S. typhimurium* 간의 *InvA* gene을 진단하기 위하여 PCR을 수행한 결과 284 bp에서 두 계통간의 *InvA* 유전자를 진단하였다고 보고하였다. 한편, 김원용 등³⁵은 Polymerase Chain reaction을 이용한 *Salmonella* 속균의 진단법 개발에 관한 연구에서 PhoE 유전자를 표적염기서열로 하는 primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과 DNA 10 fg 까지 PCR의 민감성을 확인할 수 있었으며, 감염된 돼지의 장기로부터 total RNA를 분리한 결과 간장, 대장, 수란관, 장관 및 분변시료에서 *Salmonella* 속균을

특이적으로 검출하여, PhoE 유전자를 표적염기서열로 하는 PCR은 *Salmonella* 속균에 특이적이고 신속한 검출에 이용될 수 있음을 보고하였다. 그리고, 전무형 등³⁶은 가금 Salmonellosis의 주요 원인체로 알려진 *Salmonella* serogroup D1에 속하는 *S. gallinarum* *S. pullorum* 및 *S. enteritidis*를 신속하고 특이적으로 검출하기 위해 *sdfA* 유전자를 증폭하는 PCR 기법을 수행한 결과 *SefA* 유전자 증폭을 위해 합성한 *Sef I*과 *Sef II* primers를 이용한 PCR에서 513 bp 및 488 bp 크기의 DNA 분절이 각각 관찰되었고 그 특이성은 *Sef II* 보다 *Sef I* primer가 보다 높게 나타났으며, *Salmonella* 표준균주 및 야외분리균주, *E. coli*, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, 등 모두 28균종의 73균주에 대해 시험한 바 본 PCR 법은 *Salmonella* serogroup D1에 대해 특이하게 양성반응을 나타내었다고 보고하였다. 아울러, 박용호 등³⁷은 *Salmonella* A 및 D group을 특이적이고 신속하게 검색하기 위하여 PCR을 이용하여 *rfbS* 유전자를 증폭하고 이를 cloning 염기서열 분석을 실시한 결과 *Salmonella* 속균 중 A 및 D group에서 약 720 bp의 특이적인 증폭산물을 나타내었으나 *Salmonella* A 및 D group 이외의 세균에서는 증폭산물을 나타내지 않았으며 PCR 기법으로 증폭한 다음 전기영동하여 육안 관측이 가능한 genomic DNA의 양은 100 pg 이었다. 또한, *Salmonella* A 및 D group의 *rfbS* 유전자 염기서열을 비교한 결과 98% 이상의 높은 유전자 동질성을 나타내었다고 보고하였다. 앞으로 이러한 PCR 기법을 이용하여 양계산업에 있어서 막대한 경제적 손실을 야기하고 있는 PD와 FT를 조기에 감별할 수 있을 뿐만 아니라 향후 이들 질병에 대한 저항성 인자를 개발하기 위한 기초 자료로서 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

PCR 기법을 이용하여 *S. pullorum*과 *S. gallinarum* 간의 다형성을 분석하였으며, 향후 *Salmonella* genus 특이적 DNA marker를 개발하기 위하여 수행하였다.

총 10개의 random primer를 이용하여 PCR 증폭한 결과 *S. pullorum*과 *S. gallinarum* 간의 균주 특이적 DAF 밴드 양상이 검출되었다. 총 10개의 primer를 이용하여 분석한 결과 primer 당 검출된 총 DAF 밴드의 수는 26~45개의 범위로 평균 32.7개였다. 총 327개의 밴드 가운데 다형성 밴드가 123개로서 다형성 수준은 약 37.6%였다. primer 가운데 *S. pullorum*에서는 GEN 60-04, GEN 70-04 및 GEN 70-03 primer에서 각각 0.79, 0.70 및 0.57의 높은 다형성을 나타내어 *S. pullorum*과 *S. gallinarum*의 다형성 분석에 유효한 primer로 확인되었으며, GEN

60-05 primer에서는 다형성 수준이 인정되지 않았다. 한편, *S. gallinarum*에서는 GEN 70-03, 60-04, 60-07, 70-05 및 70-04 primer에서 0.40~0.67 범위에서 비교적 높은 다형성이 인정된 반면, GEN 70-08, 70-02, 60-09, 60-04 및 60-03 primer에서는 0.16~0.28 범위에서 낮은 다형성 수준을 나타내었다.

양계장에서 추백리 혹은 닭티푸스 감염과 관련된 전형적인 임상 증상을 보이는 닭들로부터 *S. pullorum*과 *S. gallinarum* 각각 5균주를 분리하였다. GEN 70-04, GEN 70-05 및 GEN 70-08 primer에서 나타난 DNA marker 들은 *S. pullorum*과 *S. gallinarum* 간에 중요한 차이를 보이는 DNA 밴드 양상으로 확인되었다.

따라서, 이러한 PCR 기법을 이용한 DNA marker는 가금에서 PD와 FT의 원인균에 대한 신속한 DAF 지문 분석이 가능할 수 있을 뿐만 아니라 두 질병을 신속 정확하게 감별 진단하는데도 이용가능할 것으로 여겨진다.

참고문헌

- 우용구, 김봉환. 우리나라의 닭에서 분리한 *Salmonella pullorum*과 *Salmonella gallinarum*의 항원형. 대한수의학회지, 38:777-783, 1998.
- 최재윤, 이시영, 이창구. 닭의 추백리병에 관한 연구. 1. 추백리 진단에 있어서 혈청응집과 Agar-gel 침강 반응과의 비교 시험. 대한수의학회지, 10:2001-2005, 1970.
- 이창구, 최재윤, 이시영. 닭의 추백리병에 관한 연구; 닭의 추백리 진단에 관한 연구. 가축위생시험연구보고서, 149-163, 1967.
- Garcia GM, Stalker HK, Shroeder E *et al.* Identification of RAPD, SCAR and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *archis cardenasii* into *archis hypogaea*. Genome, 39:836-845, 1996.
- Tuchili LM, Kodama H, Izumoto Y *et al.* Detection of *S. gallinarum* and *S. typhimurium* DNA in experimentally infected chicks by polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci*, 57(1):59-63, 1995.
- Tuchili LM, Kodama H, Sharma RN *et al.* Detection of *salmonella* DNA in chicken embryos and environmental samples by polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci*, 58(9):881-884, 1996.
- Kwang J, Littledike ET, Keen JE. Use of the polymerase chain reaction for *salmonella* detection. *Lett Appl Microbiol*, 22(1):46-51, 1996.
- Smith NH, Selander RK. Sequence invariance of the antigen-coding central region of the phase I flagellar filament gene (*flaC*) among strains of *S. typhimurium*. *J Bacteriology* 172:603-609, 1990.
- Cohen HJ, Mechanda SM, Lin W. PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *S. typhimurium* a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Appl Environ Microbiol*, 62(12):4303-4308, 1996.
- Cohen ND, Wallis DE, Neibergs HL, *et al.* Comparison of the polymerase chain reaction using genus-specific oligonucleotide primers and microbiologic culture for the detection of *Salmonella* in drag-swabs from poultry houses. *Poult Sci*, 73(8):1276-1281, 1994.
- Cohen ND, McGruder ED, Neibergs HL, *et al.* Detection of *S. enteritidis* in feces from poultry using booster polymerase chain reaction and oligonucleotide primers specific for all members of the genus *Salmonella*. *Poult Sci*, 73(2):354-357, 1994.
- Welsh J, McClland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res*, 18:7213-7219, 1990.
- Williams JGK, Kubelik AR, Licak VJ, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*, 18:6531-6535, 1990.
- Kilger G, Grimont PA. Differentiation of *Salmonella* phase 1 flagellar antigen types by restriction of the amplified *flaC* gene. *J Clin Microbiol*, 31(5):1108-1110, 1993.
- Way JS, Josephson KL, Pillai SD, *et al.* Specific detection of *Salmonella* spp by multiplex polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 59(5):1473-1479, 1993.
- Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology*, 9:553-557, 1991.
- Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoff PM. Enhanced detection of polymorphic DNA by multiple arbitrary profiling of endonuclease digested DNA: identification of markers linked to the supernodulation locus in soybean. *Mol Genet*, 241:257-263, 1993.
- Fadl AA, Khan MI. Genotypic evaluation of *S. enteritidis* isolates of known phage types by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Avian Disease*, 41(3):732-737, 1997.
- Fadl AA, Nguyen AV, Khan MI. analysis of *S. enteritidis* isolates by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol*, 33(4):987-989, 1995.
- Tuchili LM, Kodama H, Izumoto Y, *et al.* Detection of *S. gallinarum* and *S. typhimurium* DNA in experimentally infected chicks by polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci*, 57(1):59-63, 1995.
- Kwang J, Littledike ET, Keen JE. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Lett Appl Microbiol*, 22(1):46-51, 1996.
- Way JS, Josephson KL, Pillai SD, *et al.* Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 59(5):1473-1479, 1993.
- Smith EJ, Jones CP, Bartlett J, *et al.* Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and

- turkeys. *Poultry Sci*, 75:579-584, 1996.
24. Jeffery AJ, Morton DB. DNA fingerprinting of dogs and cats. *Anim Genet*, 18:1-6, 1987.
 25. Lin CK, Tsen HY. Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. *J Appl Bacteriol*, 80(6):659-666, 1996.
 26. Itoh Y, Hirose K, Miyake M, et al. Amplification of rfbE and fliC genes by polymerase chain reaction for identification and detection of *Salmonella* serovar enteritidis, dublin and gallinarum-pullorum. *Microbiol Immunol*, 41(10):791-794, 1997.
 27. Andrews WH, Poelma PL, Wilson CR, et al. Isolation and identification of *Salmonella*. Bacteriological Analytical Manual, 5th ed. 1-29, 1978.
 28. Gouws PA, Visser M, Brozel VS. A polymerase chain reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp within 24 hours. *J Food Prot*, 61(8):1039-1042, 1998.
 29. Mahon J, Lax AJ. A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian faeces of *Salmonella* carrying the spvR gene. *Epidemiol Infect*, 111(3):455-464, 1993.
 30. Soller M. Marker assisted selection an overview. *Anim Biotech*, 5:193-198, 1994.
 31. Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32:182-186, 1990.
 32. Silva EN. The *S gallinarum* problem in Central and South America. In Snaeyenbos GH ed. Proc Int Symp *Salmonella* Am Assoc Avian Pathol Kennett Square PA, 150-156, 1984.
 33. Barrow PA, Simpson JM, Lovell MA, et al. Contribution of *S gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infection and Immunity*, 55:388-392, 1987.
 34. Cohen ND, Wallis DE, Neibergs HL, et al. Detection of *S enteritidis* in equine feces using the polymerase chain reaction and genus-specific oligonucleotide primers. *J Vet Diagn Invest*, 7(2):219-222, 1995.
 35. 김원용, 박두희, 권혁준 등. Polymerase Chain Reaction 을 이용한 *Salmonella* 속균의 진단법 개발. 94년도 춘계 학술발표대회 프로그램, N/A Vol 0, 228-228, 1994.
 36. 전무형, 김태중, 장경수 등. SefA 유전자 PCR에 의한 *Salmonella* serogroup D1의 특이적 검출. *대한수의학회지*, 39:523-530, 1999.
 37. 박용호, 정석찬, 이상운 등. *Salmonella* A 및 D Group 의 특이적 검색을 위한 rfbS 염기서열 분석에 기초한 PCR 기법의 적용. *대한미생물학회지*, 31:155-164, 1996.