

소 유방염 유래 *Staphylococcus aureus*의 AFLP 지문분석

김연수 · 김상균 · 황의경

상지대학교 생명자원과학대학 응용동물과학부
(2001년 3월 21일 게재승인)

Amplified fragment length polymorphism fingerprinting analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk

Yeon-soo Kim, Sang-kyun Kim, Eui-kyung Hwang

Division of Applied Animal Sciences, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University,
Wonju 220-702, Korea

(Accepted by March 21, 2001)

Abstract : Amplified fragment length polymorphism(AFLP) technique is based on the polymorphism detection through selective PCR amplification of restriction fragments from digested genomic DNA and thus includes the procedures of the total DNA digestion by endonucleases, ligation of adapters to the ends of the fragments, and following the selective amplification of the restricted DNA fragments. This study were aimed to : (1) determine the genetic variability of *S aureus* strains, (2) estimate genetic diversity within and among these strains, (3) compare phylogenetic relationships among these strains as genetic markers using AFLP techniques. Genomic DNA was digested with a particular combination of three restriction enzymes with specific recognition sites and the DNA fragments were ligated to restriction specific adapters and amplified using the selective primer combinations. In the *S aureus* strain, the number of scorable AFLP bands detected per each primer combination varied from 29 to 102, with an average of 61.59 using 27 primer combinations. A total of 1,663 markers were generated, 904 bands of which were polymorphic, showing a 33.48% level of polymorphism with these primer combinations. Among the primer combinations, E02/T02, E02/T03, E04/H02, E02/T01 and E04/H03 primer combinations showed a high level of polymorphism with 0.78, 0.76, 0.74, 0.71 and 0.70, respectively. But T03/H01, E01/T02 and E01/T03 primer combinations showed a low level of polymorphism with 0.38, 0.37 and 0.15, respectively. Therefore, the former primer combinations will be the most effective for AFLP analysis of *S aureus*. In SA1 sub-types the level of polymorphism of *S aureus* KCTC 1927 was similar to that of *S aureus* CU 01(0.825) and higher than those of other strains such as *S aureus* CU 02 (0.715), *S aureus* KCTC 2199(0.625), *S aureus* KCTC 1916(0.607) and *S aureus* KCTC 1621 (0.553). In SA2 sub-types the level of polymorphism of *S aureus* CU 07 was similar to that of *S aureus* CU 08(0.935) and higher than those of both *S aureus* CU 04(0.883) and *S aureus* CU 05(0.883) and lower than those of *S aureus* CU 03(0.583). In SA3 sub-types the level of polymorphism of *S aureus* CU 11 was similar to that of *S aureus* CU 12(0.913) and lower than that of *S aureus* CU 15(0.623). The results proved that AFLP marker analysis of *S aureus* strain could be used to study the epidemiology of mastitis and in addition, common genotype in geographic region could be useful for the development of an effective vaccine or DNA marker for easy diagnosis of mastitis caused by *S aureus* infection.

Key words : AFLP marker, *S aureus*, genetic variability, DNA fingerprinting, Bovine, Mastitis

서 론

유방염은 세계적으로 우유 생산농가의 생산효율을 감소시킬 뿐만 아니라 낙농가들에게 막대한 경제적 손실을 야기하는 주요 질병으로서 이 질병의 조기진단, 역학조사, 병원균의 분리 동정 및 병원균의 치료방법 등에 관한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다^{1,2}.

유방염의 원인균은 약 95% 이상이 포도상구균속에 속하는 *S aureus* 및 *S epidermidis* 등과 연쇄상구균속에 속하는 *Streptococcus agalactiae*, *Str dysgalactiae* 및 *Str uberis* 등이 대표적인 것으로 보고되고 있다^{3,4,5}. 유방염은 크게 전염성과 환경형 유방염으로 대별되는데, 전염성 유방염의 원인균은 우유의 유선에서 성장과 증식이 가능한 것으로 착유과정에서 유우간에 확산 가능한 세균을 지칭하는 반면 환경형 유방염의 원인균은 우유 축사의 환경중에 살아 있는 세균을 지칭한다⁶. 또한, 유방염은 임상적 및 병리적 관점으로 나누어 살펴볼 수 있는데, 임상적 관점에서의 유방염은 유즙 성분의 변화 및 유방의 염증과 부종 이외에 체온상승, 식욕전폐, 오한, 체중감소 등의 증상을 나타내는 심급성 유방염과 유방이 붓고 유즙에 섬유소, 유즙응괴, 고름, 혈청 성분 등이 많이 섞여 있어 감염 초기에 가벼운 신열과 식욕부진 증상을 나타내는 급성 유방염 및 만성 유방염으로 분류되며, 병리적 관점에 의하면 삼출성 유방염, 간질성 유방염, 괴사성 유방염, 괴저성 유방염, 화농성 유방염 및 섬유소성 유방염으로 분류된다.

그 동안, 유방염의 원인균인 *S aureus*의 질병학적 및 역학적인 연구에 있어서 생화학적 및 분자 유전학적 동정은 bacteriophage typing, antibiotic sensitivity testing, biotyping과 더불어 genomic DNA의 특성을 분석하여 균주를 동정하고 genotype을 결정하기 위한 도구로서 pulsed field gel electrophoresis(PFGE) 방법이 비교적 광범위하게 수행되어져 왔는데, 이는 균주의 분별력이 매우 높고 재현성이 높아 질병을 야기하는 균주의 분류 및 동정에 탁월한 결과를 제시해 주는 방법으로 인정되어 왔기 때문이다^{7,8,9}. 하지만, 기존의 분석 방법들이 각각 장단점을 내포하고 있으므로 그 이용성에 많은 한계를 드러내고 있다. 그러나, 최근 의학적으로 중요한 미생물들의 genetic typing을 위한 PCR 기술의 이용이 많이 보고되고 있는데, PCR에 기초한 방법으로서 특정 유전자 염기서열을 short oligonucleotide primer(6~10 bp)를 이용하여 증폭한 뒤 증폭 단편을 전기영동한 후 ethidium bromide 또는 silver staining을 통하여 다형성을 관찰하는 방법으로서 random amplified polymorphic DNA (RAPD), DNA amplification fingerprinting(DAF) 및 arbitrarily primed PCR(AP-PCR) 등이 있는데, 실험 절차

의 간소화 및 분석 시간의 최소화를 통하여 짧은 시간에 많은 시료를 분석할 수 있다는 장점을 지니고 있는 반면 짧은 임의 primer를 이용하기 때문에 실험의 재현성이 떨어지고 신뢰도가 낮은 단점이 있다.

AFLP 법은 최근들어 새롭게 대두되기 시작한 DNA fingerprinting 기법으로서 RFLP와 RAPD의 유용한 특성들만을 간추려 설계된 새로운 분석 방법으로서 1995년 Vos *et al.*에 의하여 개발되었다. AFLP는 염기서열에 대한 사전정보 없이도 한번의 PCR 증폭으로 50~100개의 매우 많은 DNA 단편을 생성하므로 DNA 지문분석에 강력한 수단으로 인정되고 있다¹⁰. AFLP 기술은 고도의 재현성 및 확실성을 갖춘 강력한 분석기술로서, 제한효소 및 primer의 다양한 조합으로 고도의 다형성과 다수의 polymorphic DNA marker를 신속하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라 고도의 재현성 및 확실성을 갖춘 molecular typing 기법으로서 식물과 미생물의 typing을 위한 새로운 기법으로서 유용하게 이용되고 있다^{11,12}.

따라서, 본 연구에서는 AFLP 기법을 이용하여 *S aureus*의 유전자 지문을 분석하고 *S aureus* 동종내 유전적 변이성 및 유전적 근연 관계를 분석하고자 수행하였다.

재료 및 방법

Staphylococcus aureus strains과 DNA의 분리 및 정제

본 실험에 사용한 균주 중 5균주는 생명공학연구소 유전자 은행으로부터 구입하였으며(Table 1), 나머지는 강원지역 일원 5개 목장에서 사육중인 우유에서 채취한 우유시료로부터 분리 동정하였다.

PCR에 필요한 *S aureus*의 DNA를 분리하기 위하여, LB 배양액(ampicillin 60 mg/ml 첨가) 3ml에 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 peller에 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 ml 씩 첨가하고 혼합한 후 실온에서 10분간 방치한 뒤, 여기에 용액 III(5M potassium acetate 60 ml, acetic acid 11.5 ml, DW 28.5 ml)를 200 ml 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.

Table 1. Strains of *Staphylococcus aureus* used in the experiment

<i>Staphylococcus aureus</i>	Sources
<i>S aureus</i> KCTC 1928	Reference strains
<i>S aureus</i> KCTC 1621	
<i>S aureus</i> KCTC 1916	
<i>S aureus</i> KCTC 2199	
<i>S aureus</i> KCTC 1927	
<i>S aureus</i> CU 01	
<i>S aureus</i> CU 02	
<i>S aureus</i> CU 03	
<i>S aureus</i> CU 04	
<i>S aureus</i> CU 05	
<i>S aureus</i> CU 06	
<i>S aureus</i> CU 07	
<i>S aureus</i> CU 08	
<i>S aureus</i> CU 09	
<i>S aureus</i> CU 10	
<i>S aureus</i> CU 11	
<i>S aureus</i> CU 12	
<i>S aureus</i> CU 13	
<i>S aureus</i> CU 14	
<i>S aureus</i> CU 15	

AFLP 분석

DNA 500 ng을 세 종류의 제한 효소(*EcoR I*, *Taq I* 및 *Hind III*)를 이용하여 각각 *EcoR I/Hind III*, *Taq I/Hind III* 및 *EcoR I/Taq I*으로 조합하여 5 units 씩 첨가한 뒤 최종 volume이 25 µl가 되도록 한 후 37°C와 65°C에서

각각 3시간 반응시켜 절단한 후 절단된 반응액에서 10 µl를 취하여 각 제한효소 절단부위별 양쪽 말단에 각각 5-50 pmol의 adapter와 1 mM ATP 및 1 unit T4 DNA ligase를 첨가하여 최종 부피가 50 µl가 되도록 조정 후 37°C에서 3시간 ligation 시킨 후 TE buffer로 10:1의 비율로 희석하여 사용하였다.

PCR 증폭 반응은 DNA thermal cycler(Perkin-Elmer Cetus, USA)를 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 반응액은 희석된 DNA 5 µl, *EcoR I/Hind III*, *EcoR I/Taq I* 및 *Taq I/Hind III* one selective primer 각각 50 ng(Table 1), 1X PCR buffer(50 mM KCl, 10 mM tris-HCl, pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, gelatin 0.001%), dNTPs 200 µM 및 Taq DNA polymerase 0.5 unit를 첨가하여 최종 반응액을 20 µl로 조정하였다. 1차 PCR cycle은 최초 94°C에서 5분간 pre-denaturation을 실시한 다음 denaturation(94°C에서 1분), annealing(56°C에서 1분) 및 extension(72°C에서 1분)의 cycle을 총 35회 실시하고 마지막으로 72°C에서 5분간 extension 시킴으로써 DNA 증폭을 종료하고, agarose gel을 이용하여 증폭 여부를 확인한 뒤, 증폭산물을 TE buffer로 100배 희석하여 2차 PCR 수행을 위한 template로 활용하였다. 희석된 1차 PCR 산물에 two selective primer를 각각 20 ng 첨가하고 위와 동일하게 반응액을 조성하였다. 반응조건은 touchdown PCR을 이용하여 denaturation 94°C에서 1분, annealing 65°C-56°C(회당 1°C 씩 감소)에서 1분, 72°C에서 1분간 12회 실시 후 annealing 온도를 56°C에서 1분으로 고정하고 총 24회 반복 수행하였다. PCR 증폭산물은 6-8%의 denaturing polyacrylamide gel(49:1) 전

Table 2. Adaptors and selective primer sequences (5' to 3') used in this experiment

Adaptors	Primer sequences(5' to 3')
<i>EcoR I</i> - adapter CTCGTAGACTGCGTACC CTGACGCATGGTTAA	E + 00 : GAC TGC GTA CCA ATT C + 0
	E + 01 : GAC TGC GTA CCA ATT C + AA
	E + 02 : GAC TGC GTA CCA ATT C + CG
	E + 04 : GAC TGC GTA CCA ATT C + TC
<i>Taq I</i> - adapter GACGATGAGTCCTGAC-3' CTCAGGACTGATCCG-5'	T + 00 : GAT GAG TCC TGA CCG AA + 0
	T + 01 : GAT GAG TCC TGA CCG AA + TG
	T + 02 : GAT GAG TCC TGA CCG AA + AC
	T + 03 : GAT GAG TCC TGA CCG AA + CA
<i>Hind III</i> - adapter GACGATGAGTCCTGAC CTCAGGACTGTCGAC-5'	H + 00 : GAC TGC GTA CCA GCT TT + 0
	H + 01 : GAC TGC GTA CCA GCT TT + AC
	H + 02 : GAC TGC GTA CCA GCT TT + AG
	H + 03 : GAC TGC GTA CCA GCT TT + GT

Primer combinations analyzed in this experiment

E01/T01, E01/T02, E01/T03, E02/T01, E02/T02, E02/T03, E04/T01, E04/T02, E04/T03, T01/H01, T01/H02, T01/H03, T02/H01, T02/H02, T02/H03, T03/H01, T03/H02, T03/H03, E01/H01, E01/H02, E01/H03, E02/H01, E02/H02, E02/H03, E04/H01, E04/H02, E04/H03

기영동법으로 2시간 전기영동하여 DNA 단편을 분리한 다음 silver 염색하여 검출된 DNA band를 확인하였다.

자료분석

*Staphylococcus aureus*의 유전자 변이성과 다형성 정도의 추정에는 Bio-profil software package가 내장된 image analyzer(Perkin Elmer, USA)를 사용하여 PCR 증폭산물의 band의 존재여부와 *S aureus*의 유전자형 양상을 분석하였으며, UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성하였다.

결 과

AFLP 기술을 이용한 *Staphylococcus aureus*의 유전적 특성 분석

유전자 지문과 더불어 AFLP는 가장 최근에 개발된 DNA 지문분석 기법의 일종으로서 각종 동식물 및 미생물에서 genome 분석 및 다형적 DNA marker 검색에 획기적인 전환점을 마련해 주었다¹³. AFLP 기법의 원리는 두 개의 제한효소를 이용하여 genomic DNA를 이중 절단한 뒤, 절단된 DNA 단편들 말단에 제한효소 특이적인 oligonucleotide adapter를 붙인 다음, adapter와 인접한 제한효소 인지 부위를 포함하는 AFLP primer(3'- 말

단에 1~3 bp의 선택적 염기서열이 존재)를 작성하여 특정 제한효소 단편을 증폭시킨 후, 전기영동하여 DNA band를 분리함으로써 제한효소와 primer의 조합에 따라 발현되는 band 차이에 의하여 고도의 유전적 다형성 및 변이성을 검출할 수 있다. 이러한, AFLP는 염기서열에 대한 사전 정보 없이도 primer 염기서열 중에서 변이 부위 염기서열의 bp 수에 영향을 받는데, 한번의 PCR 증폭으로 50~100개의 상당히 많은 DNA 단편을 생성하기 때문에 DNA 지문분석에 가장 강력한 수단으로 인정되고 있다.

본 연구에서는 각각 4 bp와 6 bp의 인지부위를 갖는 *EcoR I*, *Hind III* 그리고 *Taq I* 3종류의 제한효소를 사용하여 이들 제한효소와 primer 조합형에 따른 AFLP 밴드의 출현양상을 분석하였는데, 모든 primer 조합형에서 종내 및 종간 분별이 가능한 증폭 양상을 나타내었다. 증폭된 PCR 증폭산물의 분자량 범위는 100 bp에서 1,800 bp 사이의 DNA 단편으로서 band의 수가 적은 경우, 29개(T02/H01)에서 많은 경우 102개(E02/T01)의 DNA 단편을 검출할 수 있었으며, primer 조합형 당 평균 61.59개의 band를 관찰할 수 있었다. polymorphic band의 수준은 15%에서 78%의 비율을 나타내었고, 27개의 primer 조합형을 이용하여 평균 33.48개의 polymorphic band와 평균 10.93개의 monomorphic band



Fig 1. AFLP patterns obtained from the genomic DNA of twenty strains of *Staphylococcus aureus*. AFLP reactions performed on *EcoR I*/*Taq I* templates using the primer sets E02/T02, E02/T03 and E02/T01, respectively. Lane 1 : *S aureus* 1621, Lane 2 : *S aureus* 1928, Lane 3 : *S aureus* 2199, Lane 4 : *S aureus* 1916, Lane 5 : *S aureus* 1927, Lane 6 : *S aureus* CU 01, Lane 7 : *S aureus* CU 02, Lane 8 : *S aureus* CU 03, Lane 9 : *S aureus* CU 04, Lane 10 : *S aureus* CU 05, Lane 11 : *S aureus* CU 06, Lane 12 : *S aureus* CU 07, Lane 13 : *S aureus* CU 08, Lane 14 : *S aureus* CU 09, Lane 15 : *S aureus* CU 10, Lane 16 : *S aureus* CU 11, Lane 17 : *S aureus* CU 12, Lane 18 : *S aureus* CU 13, Lane 19 : *S aureus* CU 14, Lane 20 : *S aureus* CU 15.

를 합한 44개의 AFLP band를 검출할 수 있었다. Fig 1에서 보는 바와 같이 *S aureus* genome을 각종 제한효소와 primer 조합형 가운데 *EcoR I* 및 *Taq I* 제한효소로 절단한 다음 E02/T02, E02/T03 및 E02/T01 selective primer 조합을 이용하여 증폭한 후 전기영동하여 얻은 결과로서 약 100~1,800 bp 범위에서 균주간에 서로 현저한 차이를 보이는 90개, 82개 및 102개의 DNA band가 검출되었으며, 이 중에서 70개, 62개 및 72개의 AFLP marker가 검출되어 약 78%, 76% 및 72%의 매우 높은 AFLP 다형성을 보여주었다. 즉, 균주 특이성을 보여주는 AFLP marker 들이 검출되었음을 시사해 주고 있다. 또한, Fig 2는 *Hind III* 및 *EcoR I* 제한효소를 이용하여 절단한 뒤 E02/H01, E04/H02 및 E04/H03의 selected primer 조합형을 이용하여 각각 증폭한 결과로서 보는 바와 같이 band의 크기는 대체적으로 200 bp에서 1,500 bp로 넓은 범위내에서 균주간에 현저한 차이를 보이는 AFLP 표지인자의 다양성이 확인되었으며, 이 밖에 *S aureus* 아종들간에 공통으로 존재하는 소수 band 들도 또한 관찰되었다. 관찰된 총 band의 수는 48개, 38개 및 46개로서 균주내에 현저한 차이를 보이는 다형성 band 들은 20개, 28개 및 32개가 관찰되어 약 42%, 74% 및 70%의 다형성을 나타내어 Fig 1의 결과와 유사한 경향을 나타내었으나, Fig 1 보다는 비교적 DNA band의 출현이 고르게 분포되어 있음을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 제한효소 및 primer 조합형과 비교하면 균

주간에 공통으로 나타나는 band의 출현으로 그만큼 polymorphic 한 band 들의 출현은 상대적으로 감소한 경향을 나타내고 있다고 할 수 있다. 이처럼 AFLP band의 수와 다형성 수준은 본 연구에 사용된 제한효소의 인지부위와 3' 말단부위에 첨가된 selective nucleotide의 GC 함량 및 primer의 조합형과 touchdown PCR의 annealing 온도 등에 크게 영향을 받기 때문에 genome의 크기에 따라 30~140개의 AFLP band가 생성되는 것으로 보고되어져 왔는데¹³, 이 중에서 약 50-60% 이상의 유효한 polymorphic band를 검출하기 위해서는 사용된 primer의 GC 함량 및 제한효소의 최적 조건을 확립하는 것이 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다¹⁴.

이상과 같이 *S aureus* 균주의 AFLP 분석 결과 및 제한효소와 primer 조합형에 따른 AFLP marker와 각 균주간의 유전적 변이성은 Table 3에서 보는 바와 같이 3종류의 제한효소와 27종류의 primer 조합형에서 총 1,633개의 AFLP band가 검출되었으며, 각 primer 조합형 당 평균 61.59개의 polymorphic band가 검출되었고 이 가운데 E02/T02 조합형에서 90개의 band 중 70개의 polymorphic DNA band가 검출되어 약 78%의 매우 높은 수준의 다형성을 보인 반면, E01/T03 조합형에서는 78개의 AFLP band가 확인되었고 이 가운데 polymorphic DNA band의 수는 12개로 평균 15%의 매우 낮은 DNA 다형성을 보여주었다. 이러한 결과는 사용된 제한효소와 primer 조합형에 의해서 확인되었다. 관찰된 총 band

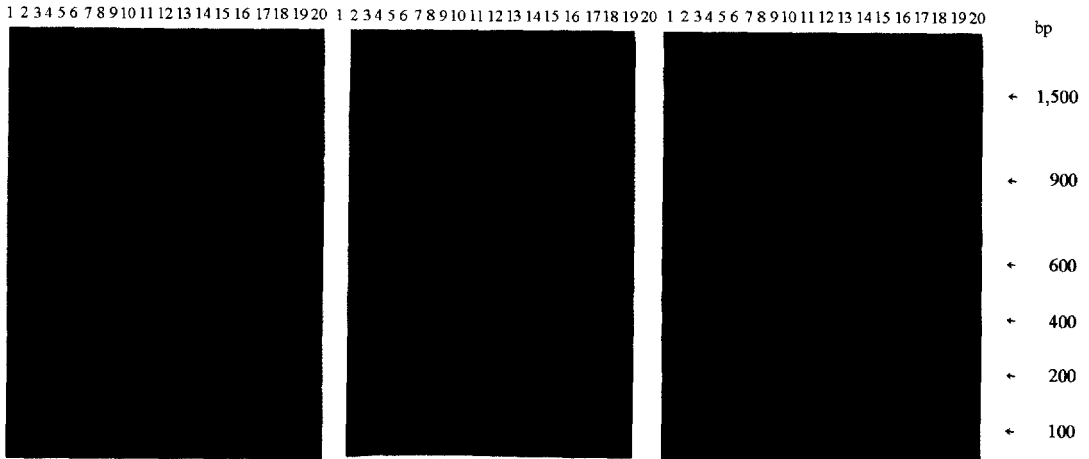


Fig 2. AFLP patterns obtained from the genomic DNA of twenty strains of *Staphylococcus aureus*. AFLP reactions performed on *EcoR I*/*Hind III* templates using the primer sets E02/H01, E04/H02 and E04/H03, respectively. Lane 1 : *S aureus* 1621, Lane 2 : *S aureus* 1928, Lane 3 : *S aureus* 2199, Lane 4 : *S aureus* 1916, Lane 5 : *S aureus* 1927, Lane 6 : *S aureus* CU 01, Lane 7 : *S aureus* CU 02, Lane 8 : *S aureus* CU 03, Lane 9 : *S aureus* CU 04, Lane 10 : *S aureus* CU 05, Lane 11 : *S aureus* CU 06, Lane 12 : *S aureus* CU 07, Lane 13 : *S aureus* CU 08, Lane 14 : *S aureus* CU 09, Lane 15 : *S aureus* CU 10, Lane 16 : *S aureus* CU 11, Lane 17 : *S aureus* CU 12, Lane 18 : *S aureus* CU 13, Lane 19 : *S aureus* CU 14, Lane 20 : *S aureus* CU 15.

Table 3. Level of polymorphism and fingerprinting patterns of AFLP markers.

Primer combination	No of scorable bands	No of polymorphic bands	Percentage of polymorphic bands	No of unique bands
E01×T01	80	36	45	17
E01×T02	95	35	37	9
E01×T03	78	12	15	6
E02×T01	102	72	71	18
E02×T02	90	70	78	25
E02×T03	82	62	76	16
E04×T01	78	36	46	5
E04×T02	71	24	34	8
E04×T03	65	36	55	12
T01×H01	48	29	60	13
T01×H02	56	36	64	16
T01×H03	35	20	57	12
T02×H01	29	17	59	5
T02×H02	67	40	60	9
T02×H03	71	30	42	10
T03×H01	53	20	38	7
T03×H02	48	28	58	15
T03×H03	32	21	66	11
E01×H01	56	35	63	9
E01×H02	67	39	58	15
E01×H03	39	21	54	12
E02×H01	48	20	42	8
E02×H02	72	41	57	5
E02×H03	55	36	65	6
E04×H01	62	28	45	7
E04×H02	38	28	74	9
E04×H03	46	32	70	10
Total	1,663	904		295
Mean	61.59	33.48	55	

중에서 다형성을 보이는 band의 비율을 알 수 있는 다형성 band의 수준은 E02/T02, E02/T03, E04/H02, E02/T01 및 E04/H03 primer 조합형에서 각각 78%, 76%, 74%, 71% 및 70%로 상당히 높은 경향을 나타내었으며, T03/H01, E01/T02와 E01/T03 primer 조합형은 각각 38%, 37%와 15%로 다형 수준이 매우 낮은 조합형임을 확인할 수 있었다. 또한 나머지 primer 조합형에서는 42~66% 범위의 다형 수준을 보여주었다.

Staphylococcus aureus strains의 genetic similarity (GS) 분석

증폭된 27종류의 selective primer 조합형을 이용하여 수행된 AFLP 분석을 통하여 검출된 DNA band 중에서 295개의 monomorphic band를 제외한 904개의

polymorphic band를 이용하여 유방염 원인균인 16종의 *S aureus* 간의 GS 분석을 통한 genetic distance(GD) 분석을 수행한 결과를 살펴보면 약 60% 수준에서 3개의 아형으로 나뉘는 것을 관찰할 수 있었으며, 한 우군에서 대다수를 차지하는 것으로 나타났다. 또한, 주요 아형과 소수 아형이 분명히 구별되었다. 이것은 다른 연구자 및 유방염의 원인균 아형에 관한 연구에서 보고한 성적과 동일한 결과를 나타내었다^{15,16,17}. SA1 아형에서 *S aureus* KCTC 1927의 다형성 수준은 0.825로 *S aureus* CU 01과 가장 유사한 관계를 나타내었으며, 다음이 *S aureus* CU 02로서 0.715, 그리고, *S aureus* KCTC 2199가 0.625, *S aureus* KCTC 1916이 0.607, *S aureus* KCTC 1621이 0.553의 유연관계를 나타내었으며, 마지막으로 *S aureus* KCTC 1928로 0.500의 유연관계를 나타내었다. 또한,

SA2 아형의 다형성 수준은 *S aureus* CU 07과 *S aureus* CU 08이 가장 높은 0.935의 유사성을 나타내었으며, *S aureus* CU 04와 *S aureus* CU 05도 0.883의 높은 유연관계를 보여주었고 *S aureus* CU 03이 SA2 아형에서 0.538로서 가장 유연관계가 먼 것으로 나타났다. 또한, SA3 아형에서는 *S aureus* CU 11과 *S aureus* CU 12와의 다형성 수준을 검출한 결과 0.913의 높은 유전적 유사성을 나타내었으며, *S aureus* CU 15와는 0.623의 유연관계를 나타내어 타 균주와는 비교적 유전적 유사성이 떨어진다는 것을 알 수 있었다.

고 찰

AFLP 기법은 PCR을 이용한 다른 어떤 유전자 지문 분석방법 보다도 비교적 신속하고도 경제적으로 가장 많은 수의 다형적 DNA marker와 다수의 다형적 좌위를 동시에 검출할 수 있는 기술로서, 유전자 지도작성, 생물다양성 분석 및 식물과 미생물에서 유전적 변이성 및 근연관계 추정에 적합한 기술이다^{13,18}. AFLP marker는 PCR을 이용하여 유전자 지문을 검출하는 그 어떤 방법에 비해 다수의 좌위에서 고도의 다형성 및 변이성을 검출할 수 있기 때문에 각종 동식물의 종 또는 품종간의 유전적 근연관계 분석에 매우 효과적으로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 보다 정확한 유전정보를 제공해 줄 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 AFLP 기법을 이용한 본 연구결과도 최근 수행된 AP-PCR 또는 PFGE를 이용한 방법보다 재현성이 높았으며 각 반응마다 생성되는 단편들의 수는 50~100개로 개체 변이가 아주 심하여 AFLP marker 개발에 매우 유용할 것으로 사료된다.

Aarts et al¹⁴은 62종류의 *Salmonella* strains 아종을 대상으로 *EcoR I/Mse I* 제한효소와 primer 조합형을 이용하여 총 200개의 AFLP band를 검출하였으며 이 가운데 다형적 band는 50개로 약 25%의 다형성을 보고하였으며, 또한, Miguel et al¹⁹은 68종류의 yeast 종을 대상으로 *EcoR I/Mse I* primer 조합형에서 다형성을 분석한 결과 약 54%의 비교적 높은 유전적 다형성을 보고한 바 있다. 한편, 최혜선 등²⁰은 *EcoR I/Mse I* primer 조합형을 이용하여 AFLP 분석을 수행한 결과 토양식물 병원균인 *Rhizoctonia solani* 균주들의 분자계통학적 특성을 규명하였는데, 9개의 primer 조합에서 조합당 평균 70개의 AFLP band가 증폭되었으며 약 300~1,000 bp 사이에 위치하였으며, 유전적 유사도를 측정된 결과 상당히 높은 근연관계를 나타내었다고 보고하였다. 이밖에 Zhang et al²¹은 27종의 bermudagrass(*Cynodon* spp.)를 대상으로 *EcoR I/Mse I* primer 조합형을 이용하여 AFLP 분석을 수행한 결과 30~600 bp에서 평균 48~74개의

AFLP band를 검출하였다고 보고하였다. 조용찬 등²²은 48종의 rice accessions(*Oryza sativa* L.)에서 *EcoR I/Mse I* primer 조합형을 이용하여 DNA 지문분석을 수행한 결과 총 928개의 AFLP band를 검출하였으며 이 중에서 다형성 band는 327개로 약 35.2%의 다형성을 보고하였고, 22개의 random primer를 이용하여 분석한 결과 145개의 band 중에서 121개의 다형성 band가 검출되어 약 83.5%의 높은 다형성을 보고하였다. 그리고, Ayele et al²³은 두 종류의 *Eragrostis* species를 대상으로 AFLP 분석을 수행한 결과 11종류의 *EcoR I/Mse I* primer 조합형에서 총 897개의 band를 검출하였으며 이 중에서 395개의 다형성 band가 검출되어 약 44%의 다형성을 나타내고 있음을 보고하였다. 또한, Janssen et al²⁴은 bacteria에서 *Apa I*, *EcoR I*, *Hind III*, *Taq I* 및 *Mse I*의 5종류의 제한효소와 primer 조합형을 이용하여 AFLP 지문 분석을 수행한 결과 *EcoR I/Mse I* 제한효소 조합형이 AFLP 지문분석에 있어서 더 많은 band pattern의 다양성을 보여주고 있다고 보고하였다. 그러나 *S aureus*에서 총 AFLP band 수는 *Taq I/Hind III* 제한효소 조합형에서 가장 많았으며, polymorphic band의 비율은 *EcoR I/Hind III* 제한효소 조합형에서 65~72%로 높은 다형성을 보인 반면 *EcoR I/Taq I* 제한효소 조합형에서는 35~45%의 다형성 수준이 확인되었다는 보고와 일치하였다²⁴. 또한, Matthews et al²⁵은 젖소 유래의 *S aureus*의 PCR 산물의 분석에서 PCR 증폭산물은 157 bp에서 1,760 bp의 분자량 범위이었고 465 bp, 1,100 bp와 1,760 bp band가 전형적으로 관찰되었으며, 그리고 1,100 bp의 band는 조사한 *S aureus*의 99%에서 관찰되었고 465 bp와 1,760 bp는 86% 이상에서 관찰되었다고 보고하였다. 또한, 김 등²⁶은 506 bp, 770 bp, 784 bp와 2,479 bp의 band가 다수의 유전자형에서 관찰되었고 2,479 bp의 band는 조사한 균주의 85.4%에서 관찰되었으며, 506 bp, 770 bp와 784 bp의 band는 각각 55.5%, 84.7%와 62.8%의 *S. aureus*에서 관찰되었다고 보고하였다.

이상에서 살펴 본 바와 같이 AFLP marker 다형성은 각종 제한효소 및 selective primer의 조합에 따라 크게 좌우되는데, 이는 유전자 지문과 AFLP 기술 등 여러 다른 기술에 의해 분석되는 대상 계층 부위에 있어서 차이가 존재할 수 있기 때문으로 해석할 수 있다. 즉 유전적 형질 발현과는 거리가 있는 minisatellite 영역 또는 VNTR(variable number of tandem repeats)로 이루어진 좌위의 유전적 반복 구조의 특성에 의한 것이고 AFLP의 경우는 임의의 계층 부위를 대상으로 선택적으로 증폭하기 때문에 분석되는 부위가 동일하지 않으므로 두 가지 실험에 의한 결과를 비교함에 있어서 차이를 나타내는 것으로 판단된다^{5,11,13,15,18}. 또한, 이용된 다형 AFLP

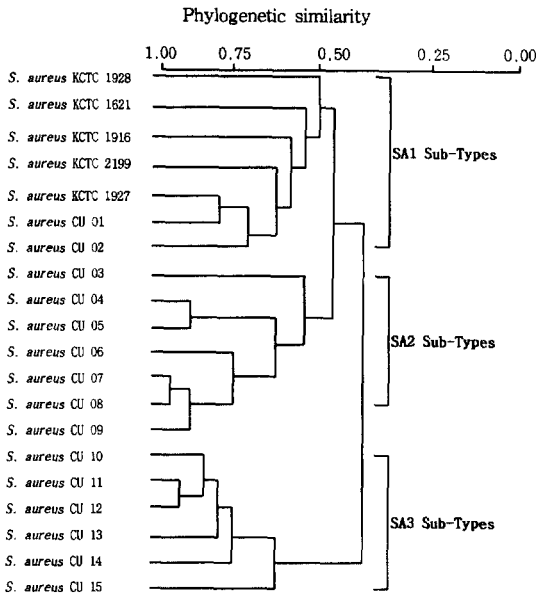


Fig 3. UPGMA dendrogram among the twenty strains of *Staphylococcus aureus* isolated based on the bands indicated from the AFLP analysis.

primer 조합형들은 *S aureus* 들을 분리 동정하기 위한 목적으로 선발하였기에 균주간의 유전적 특성에 있어서 상당히 큰 유전적 차이를 나타내는 것으로 사료된다. 또한, GS 분석 결과는 종래의 분석방법으로 분류하기 어려웠던 *S aureus* 균주내의 차이를 AFLP 기법을 이용하므로서 보다 손쉽게 구분할 수 있음을 시사해 주고 있다^{9,15,25,26}. 특히, *S aureus* 균주내에서 매우 밀접한 근연관계를 보여주고 있는 균주들은 그 기원을 같이하고 유전적 배경과 유전자 구성이 서로 유사하다는 것을 반영해 주는 결과라고 해석할 수 있다.

따라서, 본 연구에서 검출한 *S aureus*의 다형적 AFLP marker는 유방염 원인균의 신속 정확한 분리 및 동정으로 유방염의 조기 진단은 물론 질병저항성 유전자 등의 mapping 등에 유용한 DNA marker로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

AFLP 기술은 절단된 genomic DNA의 제한단편의 선택적 PCR 증폭을 통한 다형성을 진단하는데 기초하고 있다. 즉, total DNA를 제한효소를 이용하여 절단하고, 절단된 DNA 단편 말단부에 adapter를 연결한 뒤, 절단된 DNA 단편들을 선택적으로 증폭하는 것을 포함한다.

따라서, 본 연구는 AFLP 기술을 이용한 *S aureus*

strains의 유전적 다양성과 균주들내의 유전자 거리 추정 및 유전 표지인자를 이용하여 *S aureus* 균주들간의 근연관계를 비교하고자 수행하였다.

Genomic DNA를 인지부위가 존재하는 3종류의 제한효소 조합에 의하여 절단한 뒤 제한효소 특이적인 adapters를 연결한 뒤 선택적 primer 조합을 이용하여 증폭하였다. *S aureus* 균주는 27종류의 primer 조합형을 이용하여 검출한 결과 총 AFLP 단편의 수는 29~102개의 범위였으며 평균 61.59개가 검출되었다. 총 1,663개의 표지인자들 가운데, 다형성을 나타내는 단편들은 904개로서 33.48%의 다형성 수준을 보여주었다.

한편, E02/T02, E02/T03, E04/H02, E02/T01 및 E04/H03 primer 조합형에서 각각 0.78, 0.76, 0.74, 0.71 및 0.70의 높은 다형 수준을 보여주었으며, T03/H01, E01/T02와 E01/T03 primer 조합형에서는 0.38, 0.37 및 0.15의 매우 낮은 DNA 다형 수준을 나타냄으로써 그 만큼 상동성 비율이 높음을 시사해 주고 있다. 따라서, 이들 primer 조합형들은 *S aureus* 균주들의 AFLP 분석에 대단히 효율적임을 확인할 수 있었다.

SA1 아형에서 *S aureus* KCTC 1927의 다형성 수준은 82.5%로 *S aureus* CU 01과 가장 유사한 관계를 나타내었으며, 다음이 *S aureus* CU 02로 71.5%, 그리고, *S aureus* KCTC 2199가 62.5%, *S aureus* KCTC 1916이 60.7%, *S aureus* KCTC 1621이 55.3%의 유연관계를 나타내었으며, 마지막으로 *S aureus* KCTC 1928로 50.0%의 유전적 유사도를 나타내었다. 또한, SA2 아형의 다형성 수준은 *S aureus* CU 07과 *S aureus* CU 08이 가장 높은 93.5%의 유사성을 나타내었으며, *S aureus* CU 04와 *S aureus* CU 05도 88.3%의 높은 유연관계를 보여주었고 *S aureus* CU 03이 SA2 아형에서 53.8%로서 가장 유연관계가 먼 것으로 나타났다. 또한, SA3 아형에서는 *S aureus* CU 11과 *S aureus* CU 12와의 다형성 수준을 검출한 결과 91.3%의 높은 유전적 유사성을 나타내었으며, *S aureus* CU 15와는 62.3%의 유연관계를 나타내어 타 균주와는 비교적 유전적 유사성이 떨어진다는 것을 알 수 있었다. 따라서, AFLP marker 분석에 의한 본 연구결과는 *S aureus* 균주내 유전적 변이성 및 타 균주와의 근연관계 분석을 통한 유방염의 조기 진단을 위한 DNA marker로 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Sischo WM, Heider LE, Miller GY, et al. Prevalence of contagious pathogens of bovine mastitis and use of mastitis control practices. *J Am Vet Med Assoc*, 202:595-600, 1993.
2. Sutra L, Poutrel B. Virulence factors involved in the

- pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, 40:79-89, 1994.
3. Batish VK, Harish C. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and Their Preformed Enterotoxins in Frozen Dairy Products. *Australian J of Dairy Technology*, 22-24, 1987.
 4. Davis WC, Hamilton M, Ferens W, et al. Role of *Staphylococcal* Enterotoxin C in the Pathogenesis of Mastitis. *Kor J Vet Publ Hlth*, 4:299-309, 1996.
 5. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, et al. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: to wards DNA fingerprinting of single cells. *Nucl Acids Res*, 16:10953-10971, 1988.
 6. Oliver SP, Mitchell BA. Susceptibility of Bovine Mammary gland to infections During the Dry Period. *J Dairy Sci*, 66:1162-1166, 1983.
 7. Bourgeois PL, Lautier M, Ritzenthaler P. Chromosome mapping in lactic acid bacteria. *Fems Microbiol Rev*, 12:109-124, 1993.
 8. Cassandra LS, Condemine G. New approaches for physical mapping of small genomes. *J Bacteriol*, 172:1167-1172, 1990.
 9. Charles RC, Cassandra LS, Mathew KM. Pulse-Field Gel Electrophoresis of very large DNA Molecules. *Ann Rev Biophys Chem*, 17:287-304, 1988.
 10. Qi X, Lindhout P. Development of AFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*, 254:330-336, 1997.
 11. Lin JJ, Kuo J, Ma J. A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucl Acids Res*, 24:3649-3650, 1999.
 12. Van Lith LAJT, Aarts HJM. Polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. *Letters in Appl Microbiol*, 19:273-276, 1994.
 13. Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP : a new concept for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res*, 23:4407-4414, 1995.
 14. Aarts HJ, van Lith LA, Keijer J. High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Lett Appl Microbiol*, 26:131-135, 1998.
 15. Aarestrup FM, Scott NL, Sordillo LM. Ability of *Staphylococcus aureus* coagulase genotypes to resist neutrophil bactericidal activity and phagocytosis. *Infect Immun*, 62:5679-5682, 1994.
 16. Kapur V, Sisco WM, Greer RS, et al. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J Clin Microbiol*, 33:376-380, 1995.
 17. Piccinini R, Bronzo V, Moroni P, et al. Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *J Dairy Res*, 66:501-510, 1999.
 18. Knorr C, Cheng HH, Dodgson JB. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. *Anim Genet*, 30:28-35, 1999.
 19. Miguel DBL, Sandra R, Paul AH, et al. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *International J of Sys Bacteriol*, 49:915-924, 1999.
 20. 최혜선, 김경수, 김희중 등. AFLP를 이용한 *Rhizoctonia solaniolani* 주들의 분자계통학적 특성규명. *미생물학회지*, 36:40-45, 2000.
 21. Zhang HL, Ozias-Akins P, Kochert G, et al. Differentiation of bermudagrass(*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analysis. *Theor Appl Genet*, 98:895-902, 1999.
 22. Cho YC, Shin YS, Ahn SN, et al. DNA fingerprinting of Rice cultivars using AFLP and RAPD markers. *Korean J Crop Sci*, 44:26-31, 1999.
 23. Ayele M, Tefera H, Assefa K, et al. Genetic characterization of two eragrostis species using AFLP and morphological traits. *Hereditas*, 130:33-40, 1999.
 24. Janssen P, Coopman R, Huys G, et al. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*, 142:1881-1893, 1996.
 25. Matthews KR, Kumar SJ, O'Conner SA, et al. Genomic fingerprinting of *staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Epidemiol infect*, 112:177-186, 1994.
 26. 김 두, 권순탁, 안소지. 젖소 유방염 유래 *Staphylococcus aureus*의 PCR을 이용한 genomic fingerprinting. *한국임상수의학회지*, 16:19-25, 1999.