

16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region을 이용한 *Vibrio fluvialis*의 검출

강 현 실 · 허 문 수 · 이 제 희*

제주대학교 해양과학대학 해양생산과학부

Use of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region for Rapid Detection of *Vibrio fluvialis*

Hyun Sil Kang, Moon-Soo Heo and Jehee Lee*

Faculty of Applied Marine Sciences, Cheju National University,
Ara 1-Dong Jeju 690-756, Korea

Abstract - We have examined the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions (ISR) of *Vibrio fluvialis*. ISRs were PCR amplified, cloned into a plasmid vector and then sequenced. As results of ISR nucleotide sequence analysis, total of 6 clones were isolated depending on the size. The clones were different in both the number and the composition of the tRNA genes, and were designated ISR-A, ISR-E, ISR-E1, ISR-IA, ISR-EKV, ISR-EKAV. ISR-A contains tRNA^{Ala}; ISR-IA, tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala}; ISR-EKV, tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Val}; ISR-EKAV, tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Ala}-tRNA^{Val}; ISR-E and E1, tRNA^{Glu} clusters. ISR-EKV was shown to be a minor type out of the six ISR types and showed a very limited homology between ISR-EKV from *V. fluvialis* and ISRs from other *Vibrio* species. Therefore ISR-EKV sequence was used to design species-specific primers to detect *V. fluvialis* from other *Vibrio* species by PCR reaction. The specificity of the primers was examined using genomic DNA of other *Vibrios* as templates for PCR reaction. The result showed that PCR can be a useful method to detect *V. fluvialis* among *Vibrio* species in a single PCR reaction.

Key words : *Vibrio fluvialis*, intergenic spacer region, PCR

서 론

비브리오속의 호염성 그람음성균의 하나인 *Vibrio fluvialis*는 Group F *Vibrio* 또는 Group EF-6로 불리던 해양성 세균으로 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) agar에서 sucrose를 분해하여 황색 colony를 생성하며,

NaCl이 없는 조건하에서는 성장을 하지 않는 특징을 갖고 있다(Huq *et al.* 1980; Lee *et al.* 1981; 강 등 1991). 또한, *Aeromonas*와 유사한 생화학적 성상을 갖고 있어 NaCl, Vibriocidal agent O/129, G+C 함량을 이용하여 이들을 구분하고 있다(강 등 1991; 이 등 1998).

하천 및 연안의 갯벌, 플랑크톤, 어패류에 부착하여 생활하는 *V. fluvialis*는 오염된 어패류의 생식을 통한 급성 위장관염을 유발한다(이 등 1998). 감염증상은 콜레라와 유사하여 설사, 복통, 구토, 심한 탈수 증상 등이 나

* Corresponding author: Jehee Lee, Tel. 064-754-3472,
Fax. 064-756-3493, E-mail. jehee@cheju.ac.kr

타나며 환자의 대부분이 5세 이하의 소아에서 일어나고 있음이 특징적이다(Hickman-Brenner *et al.* 1984; Kolb *et al.* 1997). 위장관염이 일어나는 기작은 정확히 알려져 있지 않으나, 특정 세포 내에 이열성 독소, 독성인자(virulence factor), heat-labile enterotoxin과 cytotoxin 생성에 기인한 것으로 여겨진다(Lockwood *et al.* 1982; Nishibuchi and Seidler 1983; Wall *et al.* 1984; Rahim and Aziz 1996; Kim *et al.* 2001). 사람에게 질병 전파의 위험성을 갖고 있는 *V. fluvialis*를 자연 환경과 임상으로부터 빠른 검출과 동정을 위해 선택배지(Nishibuchi *et al.* 1983), lipopolysaccharide 조성에 따른 antigen을 이용하거나(Rahman *et al.* 1992; Kondo *et al.* 2000) API 20E와 같은 commercial kit을 사용하고 있다(Overman and Overley 1986). 그러나, 동정결과의 부정확성, 생화학적 다양성에 따른 단점이 보고되고 있어 최근에는 분자생물학적 기법을 이용한 연구가 이루어지고 있다. 위장관염을 일으키는 유전자인 hemolysin에 관련된 TDH (thermostable direct hemolysin)와 TRH (thermostable related hemolysin) gene을 증폭하여 유전자를 확인하거나(Bej *et al.* 1999), family, genera와 species의 계통분류를 위한 목적으로 16S rRNA gene을 증폭하여 분석하고 있다(Dorsch *et al.* 1992; Kita-Tsukamoto *et al.* 1993). 또한, 박테리아의 신속하고 빠른 동정을 위해 16S rRNA gene과 23S rRNA gene의 일부 서열을 hybridization을 위한 probe로 제작하거나 primer로 합성하여 PCR 반응에 의한 종 특이적 검출 방법들도 보고되었다(Rehnstam *et al.* 1989; Martinez-Picado *et al.* 1994; Aznar *et al.* 1994). 그러나, 이들 유전자 염기서열의 높은 보존성으로 인해 속 또는 종 이하의 분석에 한계가 발생하고 있어 현재는 16S와 23S rRNA gene 사이에 위치하고 있는 intergenic spacer region (ISR)이 미생물의 동정, 검출을 위한 방법으로 이용되고 있다.

ISR은 대부분 원핵생물의 ribosomal RNA (*rnn*) operon의 구성원인 16S rRNA gene과 23S rRNA gene 사이에 위치하며 non coding region과 tRNA coding gene을 포함하고 있다. 많은 박테리아에서 *rnn*의 수는 1개에서 11개까지 다양한데, 이는 *rnn* operon이 chromosome 내에 multiple copy로 존재하기 때문이다(Garcia-Martinez *et al.* 1999; Gurtler and Stanisich 1996). 최근 *Vibrio*에서는 *V. parahaemolyticus*에서 6개의 ISR type (Maeda *et al.* 2000), *V. cholerae*와 *V. mimicus*에서 4개의 ISR type을 확인하였다(Chun *et al.* 1999). 특히, *V. cholerae*에서 밝혀진 ISR 서열에 기초하여 제작한 primer를 detection PCR 반응에 이용한 결과 *V. cholerae*를 특이적으로 검출할 수 있었다.

본 연구는 사람에게 위장관염을 일으키는 *V. fluvialis*의 *rnn* operon 내 16S와 23S rRNA gene 사이에 위치하는 ISR을 증폭하여 염기서열을 분석하고, 이에 기초한 species-specific 검출을 위한 primer를 제작하여 자연환경과 임상에서 존재하는 *V. fluvialis*를 빠른 시간 내에 검출할 수 있는 방법을 개발하고자 시험하였다.

재료 및 방법

1. *V. fluvialis* (KCTC 2473)의 genomic DNA 분리

V. fluvialis (KCTC 2473)를 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받아 Marine Broth 2216 (Difco, USA)에 pellet을 접종하여 37°C, 250 rpm으로 12~15시간 배양하였다. 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 16,000 × g, 1분간 원심분리하여 bacterial pellet을 수집하고, 나머지는 40% glycerol을 첨가하여 -70°C에 보관하였다. 수집된 bacterial pellet은 QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 genomic DNA를 분리한 후, spectrophotometer로 농도를 측정하였다.

2. ISR 증폭을 위한 primer 제작 및 PCR 반응

V. fluvialis chromosome의 16S rRNA gene과 23S rRNA gene 사이에 위치하는 ISR 증폭을 위해 GenBank에 등록되어 있는 *Vibrio*의 16S rRNA gene과 23S rRNA gene을 이용하여 multiple alignment를 수행하여 가장 높게 보존된 16S rRNA 3' 말단과 23S rRNA 5' 말단의 서열을 PCR 반응에 이용하기 위한 primer Vibrio-16SF와 Vibrio-23SR을 디자인하여 제작하였고 그 서열은 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 bacterial genomic DNA 100 ng, 1 μM primer pairs (Vibrio-16SF, Vibrio-23SR), 200 μM dNTPs, 10 × cloned *pfu* buffer, 0.5 unit의 cloned *pfu* polymerase (Stratagene, USA) 혼합액에 멸균된 증류수를 첨가하여 최종 부피를 맞추고, DNA

Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Target site
Vibrio-16SF	CCGTCACACCATGGGAGTGG	16S rRNA 3' end
Vibrio-23SR	ACTGCCAAGGCATCCACCGTG	23S rRNA 5' end
FluF1	TCCTGCCACAGGAAATCAAA	ISR-EKV ^a
FluF2	TTCTTTTCGATAGAAAGTGGC	ISR-EKV
FluR1	GCCACTTCTATCGAAAGAA	ISR-EKV

^aISR-EKV contains tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Val}

minicycler (PTC-150; MJ Research)를 사용하여 PCR 증폭하였다. ISR 증폭 과정은 94°C에서 2분간 preincubation, 94°C에서 45초간 denaturation, 55°C에서 45초간 primer annealing, 72°C에서 45초간 DNA extension을 30회동안 수행하였고, 최종 72°C에서 10분간 extension 하였다. 증폭된 PCR 반응 산물은 100 bp DNA ladder (Gibco BRL, USA)를 marker로 사용하여 1.2% agarose gel 전기영동으로 크기를 확인하였다.

3. PCR 반응 산물의 cloning과 sequencing

PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Germany) protocol에 따라 증폭된 DNA를 분리하여 cloning을 위한 insert로 이용하였다. 이를 *Hinc*II로 잘린 pBluescript II SK(-) vector에 T4 DNA ligase (Takara, Japan)를 이용하여 15°C에서 하루동안 ligation 후, *E. coli* NovaBlue에 형질전환하여 α -complementaion 선택배지에 도말하고 배양하였다. 이 중 white colony를 선택하여 ampicillin이 첨가된 SOC medium에 접종하여 12~15시간 동안 배양 후, 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮겨 16,000×g, 1분간 원심분리하여 bacterial pellet을 수집하고 AccuPrep™ Plasmid Extraction kit (Bioneer, Korea)으로 plasmid DNA를 분리하였다. 삽입된 insert의 크기를 확인하기 위하여 *Kpn*I, *Hind*III (Amersham Pharmacia, United Kingdom)를 이용하여 double digestion 반응 후, 1.5% agarose gel 전기영동하여 그 크기를 확인하였다.

Sequencing은 (주)마이크로젠에 의뢰하였으며, DNA sequencing kit과 automated sequencer는 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit과 ABI 377 DNA sequencer를 사용하였다. Sequencing을 위한 primer는 pBluescript II SK(-) vector의 multiple cloning site의 5'과 3' 말단의 T7과 SK primer를 사용하였다.

4. Data analysis

ISR nucleotide sequences 분석을 위해 clustalW (version 1.71) program을 사용하여 multiple alignment를 하였으며, ISR의 유전적 구성은 tRNAscan-SE 1.21 program을 사용하여 확인하였다.

5. *V. fluvialis* 검출을 위한 primer 제작과 detection PCR 반응

*V. fluvialis*를 검출하기 위한 primer는 FluF1, FluF2와 FluR1을 제작하여 Table 1에 나타내었다. PCR 조건

은 45°C에서의 primer annealing 45초를 제외하고, ISR 증폭시 조건과 동일하게 수행하였다. Primer의 종 특이성을 확인하기 위해 유전자은행에서 Table 3에 정리된 19종의 비브리오 균주를 분양받아 위의 1 방법과 동일하게 genomic DNA를 분리하여 PCR 반응에 사용하였으며, 그 산물은 1.5% agarose gel 전기영동하여 확인하였다.

결과 및 고찰

1. *V. fluvialis* (KCTC 2473) 16S-23S rRNA ISR의 크기와 tRNA 조성 분석

V. fluvialis (KCTC 2473)의 16S-23S rRNA ISR 증폭을 위해 *Vibrio*-16SF와 *Vibrio*-23SR primer를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR에 의하여 증폭된 ISR amplicon은 agarose gel 전기영동을 통하여 증폭된 산물의 크기와 양을 확인하였다. 증폭된 ISR amplicon은 600, 650, 730 bp를 포함하는 3개의 major band와 약 850 bp의 크기를 갖는 minor band가 증폭되었다 (Fig. 1).

증폭된 ISR amplicon의 다양한 유전적 구성을 확인하기 위해 PCR 산물을 plasmid vector에 cloning하여 79

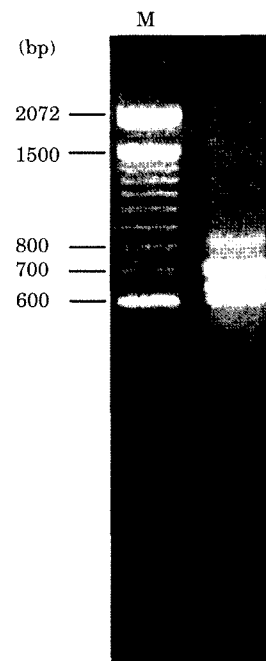


Fig. 1. Electrophoresis of the *V. fluvialis* (KCTC 2473) 16S-23S rRNA intergenic spacer region PCR product on 2% agarose gel. Lane M, molecular marker, 100 bp ladder.

Table 2. The size and tRNA composition of the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *V. fluvialis* (KCTC 2473)

Type	Size ISR/amplified fragment (bp)	Clones (n = 79)	tRNA gene (anticodon)
ISR-A	421/609	26	Ala (GGC)
ISR-E1	414/602	1	Glu (UUC)
ISR-E	469/657	21	Glu (UUC)
ISR-IA	544/732	26	Ile (GAU)Ala (UGC)
ISR-EKV	666/854	4	Glu (GAU)Lys (UUU)Val (UAC)
ISR-EKAV	697/885	1	Glu (GAU)Lys (UUU)Ala (UGC)Val (UAC)

개의 clone을 획득하였다. 이 clone들을 제한효소 *Kpn*I과 *Hind*III로 double digestion하고, agarose gel 전기영동을 통해 digestion된 insert의 크기에 따라 6개의 그룹으로 분류하였다. 분류된 각 그룹에서 1개 또는 3개의 clone을 선택하고 vector 내 SK, T7 primer를 이용하여 ISR nucleotide 분석을 수행하였다. 각 그룹에서 분석된 ISR clone은 동일 그룹에서 분류된 다른 clone의 염기서열과 일치하였으며, 분석된 ISR의 크기는 증폭된 16S rRNA 3' 말단과 23S rRNA 5' 말단 서열인 139 bp와 49 bp를 제외하여 계산하였다.

ISR의 tRNA gene 수와 형태, 염기서열 차이를 분석하고 tRNA gene 구성에 따라 각각을 ISR type으로 명명하여 Table 2에 나타내었다. *V. fluvialis* KCTC 2473에는 ISR-A, ISR-E, ISR-E1, ISR-IA, ISR-EKV, ISR-EKAV인 6개의 다른 ISR type이 확인되었다. ISR의 크기는 414 bp에서 697 bp까지 다양한 크기의 범위로 분포하고, 각 ISR에 있는 tRNA gene은 1개에서 4개까지 확인되었다. 가장 큰 ISR type은 697 bp의 ISR-EKAV로 4개의 tRNA gene인 glutamate, lysine, alanine, valine을 갖고 있으며, 3개의 tRNA gene인 glutamate, lysine, valine을 갖고 있는 666 bp의 ISR-EKV, 2개의 tRNA gene인 isoleucine과 valine을 갖고 있는 ISR-IA, 하나의 tRNA인 glutamate 또는 alanine을 각각 갖고 있는 ISR-E, ISR-E1, ISR-A를 확인하였다.

Table 2에 정리된 ISR type을 보면, 421, 544, 469 bp의 크기를 갖는 ISR-A, ISR-IA 및 ISR-E는 다른 ISR type보다 많은 clone에서 확인되었다. 이는 16S, 23S rRNA gene 서열을 이용하여 증폭된 Fig. 1의 ISR amplicon인 600, 650과 730 bp의 major band에 해당하며, chromosome에서 이들 ISR을 포함하고 있는 여러개의 *rrn* operon의 copy 수에 의하여 강하게 나타난 것으로 생각된다. 이와 같은 양상은 *Aeromonas* (Kong *et al.* 1999), *E. coli* (Garcia-Martinez *et al.* 1996; Anton *et al.* 1998)와 *Bacillus* (Vold 1985)에서 보고된 ISR-E, ISR-IA와 ISR-A type에서 설명되었다. 또한, 16S, 23S rRNA gene과 glutamate를 암호화하는 tRNA gene은 일치하지만, non

Table 3. Reference strains used in ISR-targetted PCR reaction

Strain number*	Species
KCTC 2473	<i>V. fluvialis</i>
KCTC 2714	<i>V. aestusrianae</i>
KCTC 2715	<i>V. cholerae</i>
KCTC 2716	<i>V. campbellii</i>
KCTC 2719	<i>V. gazogenes</i>
KCTC 2720	<i>V. harveyii</i>
KCTC 2721	<i>V. logei</i>
KCTC 2722	<i>V. nereis</i>
KCTC 2726	<i>V. salmonicida</i>
KCTC 2729	<i>V. parahaemolyticus</i>
KCTC 2730	<i>V. proteolyticus</i>
KCTC 2731	<i>V. furnissii</i>
KCTC 2733	<i>V. cincinnatiensis</i>
KCTC 2735	<i>V. mediterranei</i>
KCTC 2736	<i>V. metschnikovii</i>
KCTC 2737	<i>V. mimicus</i>
KCTC 2810	<i>V. cyclosites</i>
KCTC 2928	<i>V. alginolyticus</i>
KCTC 2954	<i>V. vulnificus</i>
KCTC 2962	<i>V. vulnificus</i>

*KCTC : Korean Collection for Type Cultures

coding region의 염기서열이 ISR-E type과 다른 ISR-E1 type을 *V. fluvialis*에서 확인하였다. 3개 이상의 tRNA gene을 갖는 ISR type은 현재까지 *V. cholerae*와 *V. mimicus* (Chun *et al.* 1999), *V. parahaemolyticus* (Maeda *et al.* 2000)에서 보고되었다. *V. fluvialis*에서도 3개의 다른 tRNA gene을 갖는 ISR type인 ISR-EKV와 ISR-EKAV를 확인하였으며, 이들은 *V. parahaemolyticus*의 ISR type과 동일한 구성을 하고 있다.

*V. fluvialis*에서 확인된 ISR type은 *rrn* operon의 copy 수에 따라 다양한 크기와 형태로 나타나고 있으며, 동일 tRNA gene을 갖는 ISR type과 3개 이상의 다른 tRNA gene을 갖는 ISR type이 확인됨으로써 본 종을 포함한 다른 *Vibrio*의 *rrn* operon에도 다양한 ISR type이 존재할 것으로 생각된다.

2. ISR 염기서열 분석

*V. fluvialis*에서 밝혀진 6개의 ISR sequence를 이용하여 multiple alignmnet를 수행하고 ISR에 존재하는 다양한 영역들을 확인하였다(Fig. 2). ISR-E1 type을 제외한 5개의 ISR type에서 ISR의 처음과 마지막 40 bp와 184 bp의 크기를 갖는 conserved region과 원핵생물의 *rrn* operon에서 rRNA 전사시 antitermination에 관여하는 Box A element를 확인하였다. Conserved region은 *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*와 *Aeromonas*에서 관찰되었으며, 이들이 나타내는 intra-specific sequence homology는 원핵생물의 rRNA processing을 위한 중요 영역으로 생각되고 있다(Srivastava and Schlessinger 1990). *V. fluvialis*에서 확인된 Box A는 모든 ISR type에서 마지막 tRNA gene과 23S rRNA gene 사이의 non coding region에 위치하며, *V. parahaemolyticus* (Maeda *et al.* 2000)에서 확인된 5'-AGCTCTTAACA-3'과 *E. coli* (Condon *et al.* 1995)에서 확인된 5'-TGCTCTTAACA-3'의 두 가지 형태의 Box A 서열이 확인되었다. 또한, 모든 ISR type의 중심부에 다양한 tRNA coding gene이 존재하고 있어 intra-specific sequence heterogeneity도 나타나고 있다.

각 ISR에 분포하고 있는 tRNA gene 염기서열 사이의 유사성을 비교하였다. ISR-E1의 tRNA^{Glu}(UUC)와 ISR-E, ISR-EKV와 ISR-EKAV에 존재하는 tRNA^{Glu}(UUC) 사이에서는 1개의 염기서열이 다른 98.6% 유사성을 보였으며, alanine을 갖고 있는 ISR-A의 tRNA^{Ala}(GGC)와 ISR-IA, ISR-EKAV의 tRNA^{Ala}(UGC) 사이에는 anticodon을 포함한 5개의 염기서열이 다른 93.4%의 유사성이 나타났다. ISR-EKV와 ISR-EKAV에 존재하는 tRNA^{Lys}과 tRNA^{Val}의 염기서열은 100% 일치하였다. 또한, 현재까지 보고된 *Vibrio*를 포함한 여러종의 ISR 내 tRNA gene과의 유사성도 확인하였다. tRNA^{Lys}과 tRNA^{Val}을 다른 *Vibrio*와 비교시 lysine은 89.4~100%, valine은 98.6%, tRNA^{Ile-Ala}는 92.1~96.1%, tRNA^{Glu}는 98.6~100%, tRNA^{Ala}는 94.7%, 이외에도 tRNA^{Ile-Ala}과 tRNA^{Glu}를 갖고 있는 *E. coli*와 *Aeromonas* 사이에서는 90% 이상의 유사성을 보였다.

*V. fluvialis*의 ISR type에 분포하는 tRNA gene을 여러 종과 비교시 높은 보존성을 보였으나, tRNA gene과 Box A element를 제외한 염기서열은 종마다 다양성이 높게 나타났다. 따라서, 종 특이적 동정과 검출을 위한 표적 부위는 tRNA gene을 제외한 non coding region의 서열이 유용할 것으로 생각되어 이 부분을 이용하였다.

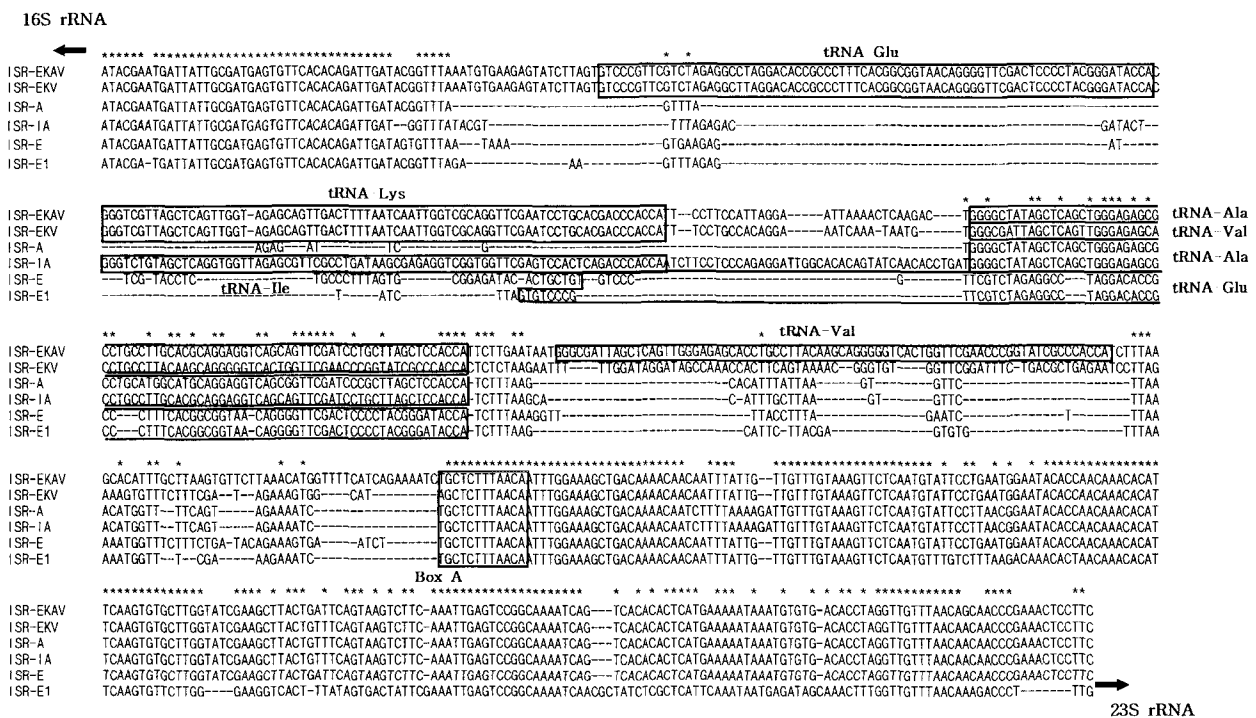


Fig. 2. Multiple alignment of the 16S-23S rRNA ISR sequences of *V. fluvialis*. The potential tRNA sequences for glutamate, lysine, alanine, valine, isoleucine and Box A element were shown as black and gray boxes, respectively. Identical nucleotide sequences are indicated as.*

3. *V. fluvialis*을 검출하기 위한 PCR 반응

Species-specific primer를 제작하기 위한 알맞은 표적 부위를 찾기 위하여 GenBank에 등록되어 있는 *V. cholerae* (accession number AF114721, AF114738, AF114743), *V. mimicus* (accession number AF114747)와 *V. parahaemolyticus* (accession number AB041849)의 ISR-EKV nucleotide 서열과 *V. fluvialis*에서 밝혀진 ISR-EKV 서열을 multiple alignment하여 Fig. 3에 나타내었다. *V. fluvialis*와 다른 *Vibrio*의 ISR-EKV에 존재하는 glutamate, lysine, valine을 위한 tRNA coding gene은 거의 일치하였으며, non coding region에서 다양성이 높은 3개의 가변부위 (VF1, VF2와 VF3)를 확인하였다. 이 부위를 표적으로 하여 *V. fluvialis*를 검출하기 위한 primer를 제작하였으며, 그 서열은 Fig. 3과 Table 1에 나타내었다. 제작된 primer는 두 개의 forward primer FluF1과 FluF2, reverse primer FluR1이며, GenBank의 BLAST program을 이용하여 nucleotide homology를 확인한 결과 이들 서열은 *V. fluvialis*에 특이적인 것으로 확인되었다.

제작된 primer의 종 특이성을 확인하기 위해 19종의

Vibrio 균주에서 genomic DNA를 분리하여 *V. fluvialis*를 검출하기 위한 PCR 반응에 사용하였으며, PCR 반응에 사용된 primer의 적절한 조합과 예상되는 종 특이적 산물의 크기는 다음과 같다. FluF1, FluF2와 Vibrio-23SR과의 조합에 의하여 증폭된 PCR 산물은 Fig. 4A와 4B의 lane 1에 나타난 바와 같이 *V. fluvialis*에서 약 300과 500 bp의 single band가 증폭되었다. 그러나, *V. mimicus* (Fig. 4A, lane 16), *V. nereis*와 *V. alginolyticus* (Fig. 4B, lane 8과 lane 18)에서 생성된 PCR 산물을 보면 예측 크기와 유사한 band를 포함하는 multiple band가 증폭되었다. 이러한 결과는 제작된 FluF1과 FluF2에 유사한 서열이 다른 *Vibrio*의 genome 내에 존재할 것으로 생각된다. 또한, 높은 보존성을 갖고 있는 23S rRNA gene의 5' 말단 서열에 기초하여 제작된 Vibrio-23SR을 *V. fluvialis*의 detection PCR 반응에 사용하여 민감성이 낮은 결과를 초래한 것으로 사료된다. 이에, *V. fluvialis* 검출을 위한 종 특이성을 높이기 위하여 ISR-EKV type 서열의 가변 부위에서 제작된 FluF2에 상보적인 FluR1을 제작하여 FluF1과 PCR 반응하였다. 그 결과, *V. fluvialis*에는 약 210 bp의 single band가 증폭되었으며 (Fig. 4C, lane 1), 다른 *Vibrio*에서는 band가 관찰되지 않거나

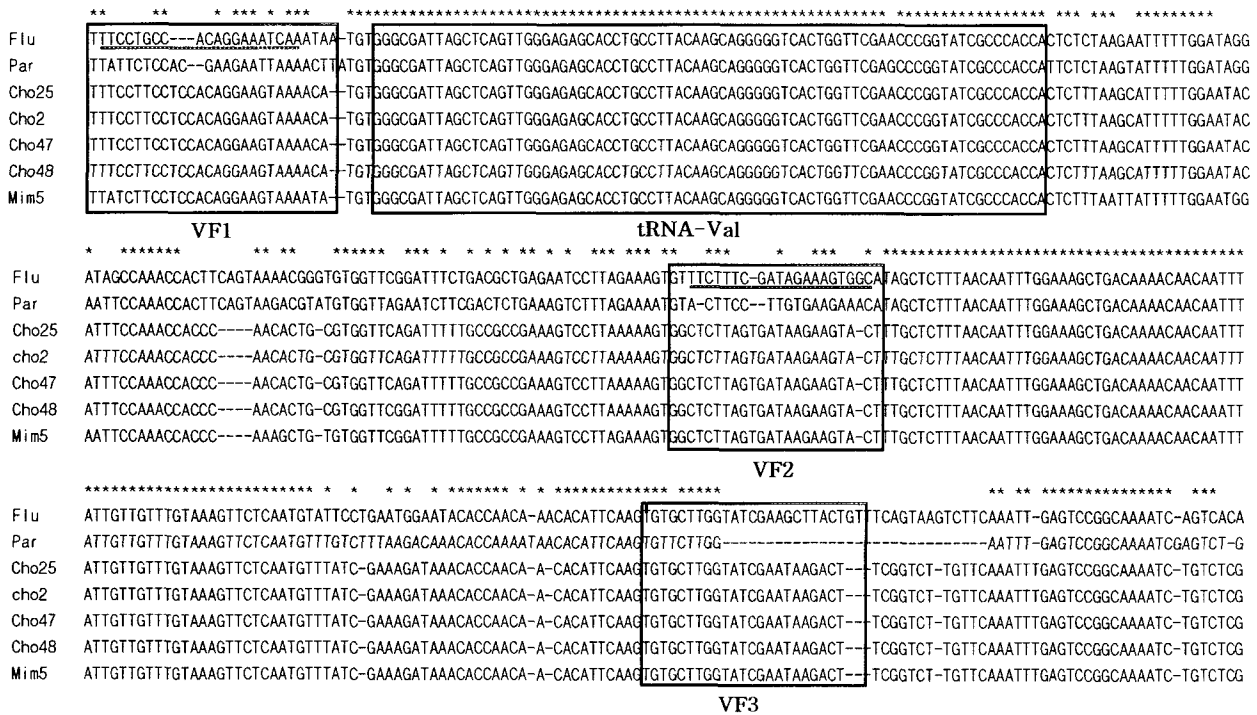


Fig. 3. Alignment of representative 16S-23S ISR sequences of *Vibrio* species. Flu, ISR-EKV of *V. fluvialis* KCTC 2473; Par, ISR-EKV of *V. parahaemolyticus* IFO 12711; Cho25, ISR-EKV of *V. cholerae* O1 E1 Tor; Cho2, ISR-EKV of *V. cholerae* O1 classical; Cho47, ISR-EKV of *V. cholerae* non-O1/non-O139; Cho48, ISR-EKV of *V. cholerae* O31; Mim5, ISR-EKV of *V. mimicus*. VF1, VF2 and VF3 indicate variable regions. Forward and reverse primer used in the species-specific PCR detection are underlined. * Indicates the identical nucleotide.

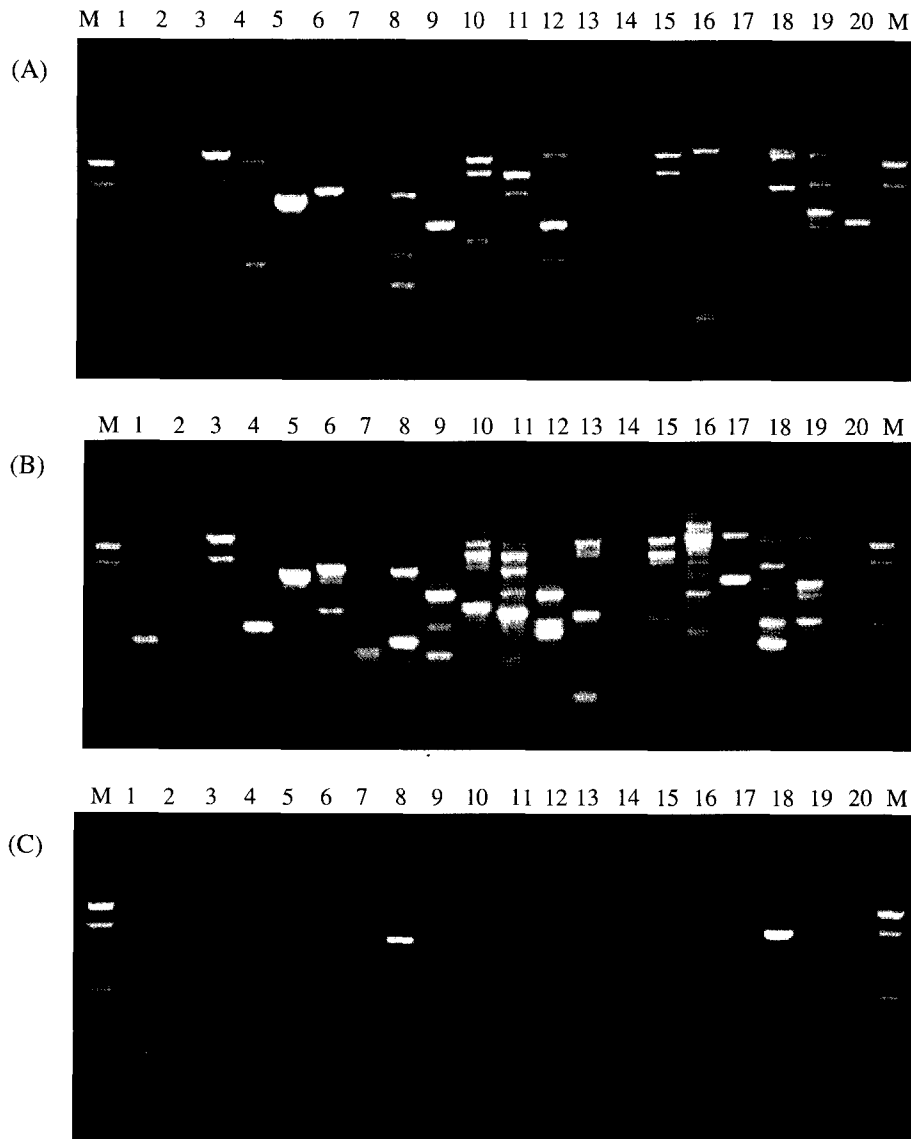


Fig. 4. PCR amplification of the rRNA of different *Vibrio* strains using ISR-targeted primers. (A) FluF1 and Vibrio-23SR (B) FluF2 and Vibrio-23SR (C) FluF1 and FluR1. Lanes M, 100 bp DNA ladder; 2, KCTC 2473; 3, KCTC 2714; 4, KCTC 2715; 5, KCTC 2719; 6, KCTC 2720; 7, KCTC 2721; 8, KCTC 2722; 9, KCTC 2726; 10, KCTC 2729; 11, KCTC 2730; 12, KCTC 2731; 13, KCTC 2733; 14, KCTC 2735; 15, KCTC 2736; 16, KCTC 2737; 17, KCTC 2810; 18, KCTC 2928; 19, KCTC 2954; 20, KCTC 2962.

다른 크기의 band가 관찰되었고 multiple band의 증폭은 이루어지지 않았다(Fig. 4C). 따라서, ISR-EKV type의 서열을 이용하여 제작한 primer는 *V. fluvialis*에 특이성을 갖고 있으며, 보존성이 높은 rRNA gene 서열을 이용한 방법보다는 ISR의 염기서열을 이용한 detection PCR이 더 효과적으로 *V. fluvialis*를 검출하는데 이용될 수 있다는 것을 확인하였다.

본 연구에서는 해양성 세균의 하나로 사람에게 위장관염을 일으키는 *V. fluvialis*의 신속한 진단, 동정과 검

출을 위한 방법을 개발하기 위하여 *V. fluvialis* (KCTC 2473)의 chromosome 내에 위치한 ISR을 16S와 23S rRNA gene 서열을 primer로 이용하여 증폭하고, 증폭된 ISR의 염기서열을 분석하여 *V. fluvialis*를 특이적으로 검출할 수 있는 primer를 제작하였으며, primer의 특이성을 PCR 반응으로 확인하였다. 그 결과, ISR에 기초하여 제작된 primer는 *V. fluvialis*에 종 특이성이 있으며, 기존의 16S ribosomal RNA에 의존한 *Vibrio* 검출방법보다 보존성이 낮은 ISR sequence를 이용함으로써 종 단

위에서 *Vibrio*를 빠른 시간 내에 신속하게 검출할 수 있는 방법을 제시하였다.

적 요

본 연구는 위장관염을 일으키는 *Vibrio fluvialis*의 16S-23S rRNA intergenic spacer region을 분석하였다. ISR을 PCR 증폭 후 plasmid vector에 클로닝하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과, ISR의 염기서열은 tRNA gene 조성과 크기에 따라 총 6개의 type으로 분류되었다. 각 type은 tRNA gene 조성과 수에 따라 ISR-A, ISR-E, ISR-E1, ISR-IA, ISR-EKV, ISR-EKAV로 명명하였으며, ISR-A는 tRNA^{Ala}; ISR-IA, tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala}; ISR-EKV, tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Val}; ISR-EKAV, tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Ala}-tRNA^{Val}; ISR-E와 E1은 tRNA^{Glu}를 갖고 있었다. 이 중 ISR-EKV type은 minor type으로 존재하고 있으며, 여러 *Vibrio*종의 ISR-EKV type과 비교시 변이성이 높은 부위를 확인하였다. 따라서, 이 ISR-EKV의 염기서열을 여러 *Vibrio*종에서 *V. fluvialis*를 검출하기 위한 species-specific primer 제작에 이용하였다. 제작된 primer의 특이성은 여러 *Vibrio*의 genomic DNA를 분리하여 PCR 반응으로 확인하였다. 그 결과, 제작된 primer는 *V. fluvialis*에 중 특이성이 있으며 여러 *Vibrio*종으로부터 빠른 검출이 가능함을 확인하였다.

사 사

이 논문은 2002년도 두뇌한국21사업에 의하여 지원되었음.

참 고 문 헌

- 강재승, 고광균, 국운호, 김각균, 김경호, 김경희. 1991. 의학 생물학. 대한미생물학회편 511-517.
- 이혜정, 이성욱, 배영진, 박진곤, 최필선, 조강일, 천종철, 문성채, 황은주. 1998. *Vibrio fluvialis*에 의한 위장관염 1예. 감염. 30:295-300.
- Anton AI, AJ Martinez-Murcia and F Rodriguez-Valera. 1998. Sequence diversity in the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons in representatives of the *Escherichia coli* ECOR collection. J. Mol. Evol. 47:62-72.
- Aznar R, W Ludwig, RI Amann and KH Schleifer. 1994. Sequence determination of rRNA genes of pathogenic *Vibrio* species and whole-cell identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA-targetted oligonucleotide probes. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:330-337.
- Bej AK, DP Patterson, CW Brasher, MC Vickery, DD Jones and CA Kaysner. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. J. Microbiol. Methods. 36:215-225.
- Condon C, C Squires and CL Squires. 1995. Control of rRNA transcription on *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 59:623-645.
- Chun J, A Huq and RR Colwell. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Appl. Environ. Microbiol. 65:2202-2208.
- Dorsch M, D Lane and E Stackebrandt. 1992. Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 42:58-63.
- Garcia-Martinez J, A Martinez-Murcia, AI Anton and F Rodriguez-Valera. 1996. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12. J. Bacteriol. 178:6374-6377.
- Garcia-Martinez J, SG Acinas, AI Anton and F Rodriguez-Valera. 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. J. Microbiol. Methods. 36:55-64.
- Gurtler V and VA Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiol. 142:3-16.
- Hickman-Brenner FW, DJ Brenner, AG Steigerwalt, M Schreiber and SD Holmberg, LM Baldy, CS Lewis, NM Pickens and JJ Farmer III. 1984. *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* isolated from a stool sample of one patient. J. Clin. Microbiol. 20:125-127.
- Huq MI, AK Alam, DJ Brenner and GK Morris. 1980. Isolation of *Vibrio* like-group, EF-6, from patients with diarrhea. J. Clin. Microbiol. 11:621-624.
- Kim YH, CR Jung, SK Kim, JY Yang and JH Cha. 2001. Distribution of extracellular proteases from various *Vibrio* species. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30:222-227.
- Kita-Tsakamoto K, H Oyaizu, K Nanba and U Simidu. 1993. Phylogenetic relationship of marine bacteria, mainly members of the family *Vibrionaceae*, determined on the basis of 16S rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 43:8-19.
- Kolb AK, SC Eppes and JD Klein. 1997. *Vibrio fluvialis*: an

- underrecognized enteric pathogen in infants? South. Med. J. 90:544-545.
- Kondo S, Y Haishima, K Ishida, Y Isshiki and K Hisatsune. 2000. The O-polysaccharide of lipopolysaccharide isolated from *Vibrio fluvialis* O19 is identical to that *Vibrio* bioserogroup 1875 variant. Microbiol. Immunol. 44: 941-944.
- Kong RYC, A Pelling, CL So and RSS Wu. 1999. Identification of oligonucleotide primers targeted at the 16S-23S rDNA intergenic spacers Genus- and species-specific detection of Aeromonads. Marine Pollution Bulletin. 38:802-808.
- Lee JV, P Shread, AL Furniss and TN Bryant. 1981. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (Synonym group F vibrios, Group EF6). J. Appl. Bacteriol. 50:73-94.
- Lockwood DE, AS Kreger and SH Richardson. 1982. Detection of toxins produced by *Vibrio fluvialis*. Infect. Immun. 35:702-708.
- Lowe TM and SR Eddy. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Res. 25:955-964.
- Maeda T, N Takada, M Furshita and T Shiba. 2000. Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiol. Lett. 192: 73-77.
- Martinez-Picado J, AR Blanch and J Jofre. 1994. Rapid detection and identification of *Vibrio anguillarum* by using a specific oligonucleotide probe complementary to 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 60:732-737.
- Nishibuchi M and RJ Seidler. 1983. Medium-dependent production of extracellular enterotoxins by non-o-1 *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio fluvialis*. Appl. Environ. Microbiol. 45:228-231.
- Nishibuchi M, NC Roberts, HB Jr Bradford and RJ Seidler. 1983. Broth medium for enrichment of *Vibrio fluvialis* from the environment. Appl. Environ. Microbiol. 46:425-429.
- Overman TL and JK Overley. 1986. Feasibility of same-day identification of members of the family *Vibrionaceae* by the API 20E system. J. Clin. Microbiol. 23:715-717.
- Rahim Z and KM Aziz. 1996. Factors affecting production of haemolysin by strains of *Vibrio fluvialis*. J. Diarrhoeal Dis. Res. 14:113-116.
- Rahman MM, F Qadri, MJ Albert, A Hossain and M Mosihuzzaman. 1992. Lipopolysaccharide composition and virulence properties of clinical and environmental strains of *Vibrio fluvialis* and *Vibrio mimicus*. Microbiol. Immunol. 36:327-338.
- Rehnstam AS, A Norqvist, H Wolf-Watz and A Hagstrom. 1989. Identification of *Vibrio anguillarum* in fish using the partial 16S rRNA sequences and specific 16S rRNA oligonucleotide probe. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1907-1910.
- Srivastava AK and D Schlessinger. 1990. Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. Ann. Rev. Microbiol. 44:105-129.
- Wall VW, AS Kreger and SH Richardson. 1984. Production and partial characterization of *Vibrio fluvialis* cytotoxin. Infect. Immun. 46:773-777.
- Vold BS. 1985. Structure and organization of genes for transfer ribonucleic acid in *Bacillus subtilis*. Microbiol. Rev. 49:71-80.

(Received 20 December 2002, accepted 20 February 2003)