

NADH oxidase(*nox*) 유전자의 PCR-RFLP를 이용한 돼지 intestinal spirochetes 국내분리주의 동정

김태중 · 김명희 · 나영란 · 정석찬¹ · 이재일*

전남대학교 수의과대학

¹국립수의과학검역원

(계재승인: 2004년 10월 22일)

Identification of porcine intestinal spirochetes isolated from Korea by NADH oxidase gene(*nox*) PCR-RFLP

Tae-Jung Kim, Myoung-Hee Kim, Young-Ran Na, Suk-Chan Jung¹ and Jae-II Lee*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

¹National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-826, Korea

(Accepted: October 22, 2004)

Abstract : In this study, we performed a PCR-RFLP analysis of NADH oxidase gene(*nox*) for the characterization of porcine intestinal spirochetes isolated from Korea by the comparison with *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* reference strains. Eleven strains including four reference strains, *B. hyodysenteriae* B204, B234, B169, *B. pilosicoli* P43/6/78 and seven Korean isolates were used. PCR products of 939 bp were amplified using *nox*-specific primers and digested with two restriction enzymes, *Bfm* I and *Dpn* II. In study using *Bfm* I, both strains showed no difference in fragmented size(197 and 741 bp). When use *Dpn* II, *B. hyodysenteriae* showed two bands(209 and 684 bp), however *B. pilosicoli* showed a single band of 896 bp. Our results indicate that *nox*-specific PCR-RFLP could be used as a typing method of *Brachyspira* species and as an epidemiological method for identifying spirochetes isolated from swine.

Key words : *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, PCR-RFLP, *nox*

서 론

돼지의 *Brachyspira* species는 주로 돼지의 장내에 존재하는 혐기성 spirochetes로 현재까지 5종이 알려져 있다 [9]. 이 중 *B. hyodysenteriae*는 돈적리(swine dysentery)의 원인체로, 돼지의 맹장과 결장 점막 상피에 침입하여 심각한 점액·출혈성 설사를 일으킨다 [10]. 돈적리는 특히 육성·비육돈에서 전염성이 높고, 감염되면 상재화하는 경향이 있고 발육지연, 사료 효율 저하 등의 생산성 저하를 일으킨다 [9]. *B. pilosicoli*는 돼지의 장내 spirochetosis의 원인체이고, 가금류와 개에 감염되어 대장염을 일으키며 [5], 최근에 이균은 사람에도 감염되어 궤양을 일으키는 것으로 알려져 공중보건학상의 중요성

을 가진다 [3, 9]. 이 외에, 매우 가벼운 맹장/결장염을 일으키는 *B. intermedia*와 해가 없는 *B. innocens*, *B. murdochii*가 있다 [9].

이들은 돼지나 사람에서 병원성의 차이로 인한 오진 및 *B. pilosicoli*의 공중보건학적 위험성 때문에 빠르고 간편한 감별법이 필요하다. 예전에는 *Brachyspira* species 분리 동정은 배양 후에 용혈 유무, indole 형성, hippurate hydrolysis 등의 생화학적 특성으로 구분하였지만, 여기에는 까다로운 배양조건, 성장이 느린 특징, 몇몇 좋은 생화학적 특성만으로는 구분이 어려운 문제점 등이 존재했다. 이런 단점들을 극복하기 위해 균의 특정 DNA를 증폭하여 진단하는 polymerase chain reaction(PCR) 같은 분자생물학적 방법이 이용되고 있다 [1, 6, 7, 11].

*Corresponding author: Jae-II Lee

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[Tel: +82-62-530-2854, Fax: +82-62-530-2857, E-mail: jaeil@chonnam.ac.kr]

이 방법은 배양 과정 없이 바로 sample에서 분리 동정할 수 있는 장점이 있으나, 신뢰도가 낮은 단점이 있다. 또한 16S rRNA, 23S rRNA, *nox* 유전자의 염기서열 분석을 통한 분석법은 *Brachyspira* species 사이의 구별이 가능하나 진단이 오래 걸리고, 방법이 어려운 단점이 있다 [13, 16]. 다른 방법으로 RAPD(random amplification of polymorphic DNA)와 Southern blotting 법도 사용되어지고 있다 [4, 8]. RAPD는 target DNA에 대한 사전 지식 없이 이용할 수 있는 장점이 있는 반면, 실험의 재현성이 낮고 해석이 어려운 단점이 있다. *fla A1* 유전자를 이용한 Southern blotting은 균주간 분류가 가능하지만, 다소 복잡한 준비 및 실험과정으로 인해 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 최근에는 이런 단점을 극복한 특이 유전자에 맞는 primer pair를 이용, 증폭시킨 후 제한 효소로 절단하여 분석하는 restriction fragment length polymorphism(RFLP) 방법이 사용되고 있다 [2, 13, 14]. 이 PCR-RFLP 방법은 균의 신속한 동정과 더불어 분리 균주 간의 감별이 용이하다.

nox(NADH oxidase) 유전자는 혐기성인 *Brachyspira* species의 총 산소 소비(약 1%)에 관여하는 유일한 효소이다. *Brachyspira* species에서 이 유전자는 최소 86.3%의 동일성을 나타낸다 [15]. 대조적으로 16S rRNA, 23S rRNA는 유전자 배열의 차이가 최고 2-3% 정도이다 [12]. 즉 *nox* 유전자는 균주 간에 차이가 존재하여, 가까운 species끼리 같은 유형을 나타내므로 species를 감별하는 데 다른 유전자보다 더 적당하다. 이에 본 실험에서는 *nox* gene에 대한 PCR-RFLP를 통해 *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* 표준 균주 간의 차이를 확인하고 국내에서 분리된 야외 균주의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

이 실험에서는 표준 균주인 *B. hyodysenteriae* B204, B234, B169와 *B. pilosicoli* P43/6/78 (Table 1) 및 국내에

Table 1. GenBank accession numbers and encompassing positions of *nox* gene sequences of *Brachyspira* spp.

Species	Strain	<i>nox</i> gene	
		GenBank accession number	Encompassing positions
<i>B. hyodysenteriae</i>	B204	U19610	345-1283
	B234	AF060800	91-1029
	B169	AF060801	89-1027
<i>B. pilosicoli</i>	P43/6/78	AF060807	83-1021

Table 2. Primer sequences used for the amplification of *nox* gene

Primer	F/R ^a	Primer sequence (5'→3')	Size (mer)
<i>nox</i> -f1	Forward	TAGCCTGCGGTATCGCACTTTGG	23
<i>nox</i> -f2	Forward	TAGCTTGCGGTATTGCTCTTTGG	23
<i>nox</i> -r	Reverse	CTTCAGACCAACCAGTAGAAGCC	23

^aForward or reverse primer

서 분리된 *B. hyodysenteriae* 7균주를 사용하였다. 4개의 표준균주는 호주 Murdoch 대학교 수의·생의학과학 대학의 Dr. D.J. Hampson 교수로부터 분양받아 사용하였으며, 국내 분리주는 본 실험 실시전에 생화학 test를 실시하여 종을 분류하였다. 분리주들은 모두 강한 beta-hemolysis를 일으키며 indole을 생산하고 fructose를 발효하지 않는 등 *B. hyodysenteriae*의 특징만을 나타내었다. 이들 균주로부터 QIAamp[®] Kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 분리하여 사용하였으며, 추출한 DNA는 실험에 사용하기 전에 50 µg/ml 농도에 녹여 준비하였다.

Primers

Primer는 Rohde 등(2002)의 방법에 준하여 합성하였고 정제된 DNA의 증폭에 이용하였다. *B. hyodysenteriae*는 primer로 *nox*-f1, *nox*-r를 이용하였고, *B. pilosicoli*는 *nox*-f2, *nox*-r를 primer로 이용하였다(Table 2).

PCR에 의한 *nox* 유전자의 증폭 및 전기영동

nox 유전자의 PCR 증폭을 위한 반응조건은 thermal cycler(PTC-100TM, MJ Research Co., MA, USA)를 이용하여 Rohde 등(2002)의 방법과 같은 조건하에 실시하였다. 반응액은 template DNA 2 µl, 각 primer 1 µl(0.5 uM), MgCl₂ free 10X buffer 5 µl(1.5 mM), MgCl₂ 5 µl(1.5 mM), 2.5 mM dNTP 5 µl(0.2 mM), 5 U *Taq* polymerase (PromegaTM, USA) 1 µl에 멸균 증류수를 첨가하여 총 50 µl로 조정하였다. 반응조건은 94°C에서 3분간 predenaturation 시킨 다음, denaturation(94°C, 30초), annealing(59°C, 40초) 및 extension(72°C, 54초)을 30 cycle 수행하고, postextension을 72°C에서 10분간 실시하였다. 증폭된 DNA의 확인은 1.0% agarose gel에서 939 bp의 band 유무를 확인하였다.

Gel elution 및 제한효소 처리

전기영동으로 확인된 *nox* gene은 GeneClean II kit (QbiogeneTM, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라

gel elution을 수행하였다. *nox* 유전자의 제한효소 처리는 10 µl의 eluted DNA에 각 enzyme 1 µl(1.5-3 U), 10X buffer 2 µl(10 mM), Bovine serum albumin 0.5 µl(1 mg/ml) 그리고 멸균 증류수 6.5 µl를 첨가하여 총 20 µl로 조정하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켜 절단하였다. 절단된 DNA의 확인은 2.0% agarose gel을 사용하여 크기를 확인하였다.

결 과

PCR에 의한 *nox* 유전자의 확인

표준균주인 *B. hyodysenteriae*와 *B. pilosicoli* 뿐만 아니라 국내에서 분리된 7개 균주 모두에서 공통적으로 939 bp 크기의 PCR 산물을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

RFLP에 의한 *Brachyspira species*의 구분

*Brachyspira*의 *nox* 유전자 배열은 GenBank와 제한 효소 *Bfm* I, *Dpn* II를 통해 5개의 pattern이 나타날 것을 예상할 수 있었다(Table 3). 제한 효소 *Bfm* I과 *Dpn* II를 이용한 RFLP pattern은 *B. hyodysenteriae*와 *B. pilosicoli*의 구분을 가능케 해주었는데, 제한 효소 *Bfm* I로 처리한 결과 *B. hyodysenteriae*와 *B. pilosicoli* 표준균주들과

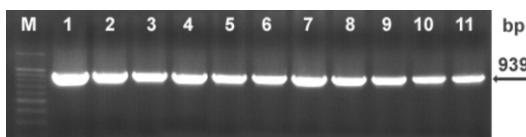


Fig. 1. *nox*-specific PCR analysis of the *Brachyspira* species. Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane 1: *B. hyodysenteriae* B204; Lane 2: *B. hyodysenteriae* B234; Lane 3: *B. hyodysenteriae* B169; Lane 4: *B. pilosicoli* P43/6/78; Lane 5 to 11: *B. hyodysenteriae* field isolates.

Table 3. Predicted restriction fragments of PCR products (939 bp) using restriction endonucleases, *Bfm* I and *Dpn* II

Species	Predicted restriction fragments(bp)	
	<i>Bfm</i> I	<i>Dpn</i> II
<i>B. hyodysenteriae</i>	741, 197	684, 209, 24
<i>B. pilosicoli</i>	741, 197	896, 24
<i>B. intermedia</i>	504, 238, 197	684, 209, 24
<i>B. innocens</i>	504, 210, 197, 25	684, 209, 24
<i>B. murdochii</i>	504, 210, 197, 25	684, 157, 24

Values in bold are fragments not visualized on ethidium bromide-stained agarose gels

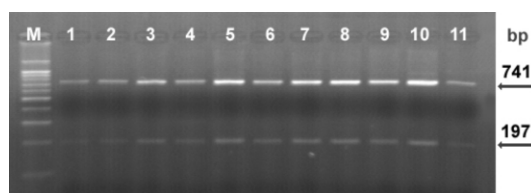


Fig. 2. PCR-RFLP types of *nox* gene digested with *Bfm* I in 2% agarose gel electrophoresis. Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane 1: *B. hyodysenteriae* B204; Lane 2: *B. hyodysenteriae* B234; Lane 3: *B. hyodysenteriae* B169; Lane 4: *B. pilosicoli* P43/6/78; Lane 5 to 11: *B. hyodysenteriae* field isolates.

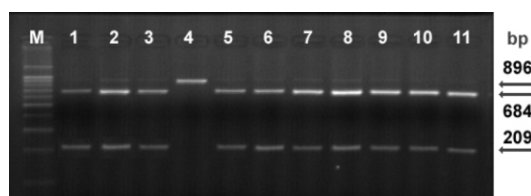


Fig. 3. PCR-RFLP types of *nox* gene digested with *Dpn* II in 2% agarose gel electrophoresis. Lane M: 100 bp DNA ladder; Lane 1: *B. hyodysenteriae* B204; Lane 2: *B. hyodysenteriae* B234; Lane 3: *B. hyodysenteriae* B169; Lane 4: *B. pilosicoli* P43/6/78; Lane 5 to 11: *B. hyodysenteriae* field isolates.

국내분리주들은 모두 741, 197 bp band를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). Rohde 등 [14]에 의하면 *B. hyodysenteriae*와 *B. pilosicoli* 만이 2개의 band가 나타나고 *B. intermedia*, *B. innocens*, 그리고 *B. murdochii*는 3개 이상의 band가 나타난다고 하였는데 본 결과를 통해 분리주들은 *B. intermedia*, *B. innocens*, 그리고 *B. murdochii*가 아님을 1차적으로 알 수 있었다. 한편, 제한 효소 *Dpn* II로 처리한 결과, *B. hyodysenteriae*는 684, 209 bp band를 관찰할 수 있었고, *B. pilosicoli*에서는 896 bp band를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 국내분리주들은 2개의 band를 보임으로써 모두 *B. hyodysenteriae*임을 확인해 주었다. 이를 통해 *Dpn* II를 이용한 RFLP는 두 균주를 감별하는 데 더 효과적임을 알 수 있었다.

고 찰

돼지의 *Brachyspira species*는 현재 5종으로 분류되고, 이들은 병원성 균종(*B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*)과 병원성이 약하거나 무해한 균종(*B. intermedia*, *B. innocens*, *B. murdochii*)으로 나뉜다. 둔적리의 원인체인 *B. hyodysenteriae*는 돼지의 대장에서 증식하여 심각한 설사를 야기, 큰 경제적 손실을 일으키며 *B. pilosicoli*는

개, 가금류, 사람에서 장질환을 일으키는 세균으로 인수 공통질병의 위험성을 가지고 있는데 [3, 9] 이 두 균들에 대한 빠르고 쉬운 감별법이 필요한 실정이다.

예전에 균주간의 구분은 배양한 후 생화학적 특성으로 구별했으나, 이는 시간도 오래 걸리고 정확하게 감별이 되지 않는 단점이 존재했다. 다른 분류 방법으로 RAPD(random amplification of polymorphic DNA), Southern blotting도 사용되고 있다. RAPD는 primer를 이용하여 특정 DNA를 증폭시킨 후 다르게 증폭된 DNA를 전기영동으로 비교, 분석하는 것이다. 이는 비교적 간단한 방법으로 빠르게 구분할 수 있는 장점은 있으나, 실험의 재현성이 낮고 적절한 primer를 선택, 이용해야 하는 어려움이 있다 [4]. 최근의 감별법으로는 16S, 23S rRNA, *nox* 유전자를 이용한 PCR-RFLP 분석이 보고되고 있다 [2, 13, 14]. *nox* 유전자는 다른 유전자에 비해 *Brachyspira* species 사이에서 동일한 species에서만 같은 유형을 나타내는 유전자이므로 [15] species를 감별하는데 더 효과적이라고 생각되어 본 실험에 사용하였다.

본 실험에서는 표준균주 4종과 야외균주 7종의 *nox* 유전자를 증폭, 제한 효소로 처리한 후에 전기영동시켜 나온 banding pattern을 보고 *Brachyspira* species를 구분해 보았다. *nox* 유전자 PCR-RFLP는 같은 species인 경우, 야외균주에서도 같은 RFLP pattern이 나타나서 특이도가 높은 것으로 나타났다. *B. hyodysenteriae*와 *B. pilosicoli*에 제한 효소 *Bfm* I, *Dpn* II를 이용한 PCR-RFLP pattern은 *Bfm* I 제한 효소로 처리한 결과, *B. hyodysenteriae*와 *B. pilosicoli*에서 동일한 pattern(741, 197 bp)이 나타나서 두 균주 간의 구분은 할 수 없었다 (Fig. 2). *nox* 유전자를 *Dpn* II 제한 효소로 처리한 결과, *B. hyodysenteriae*는 684, 209 bp의 band가 나타났고 *B. pilosicoli*에서는 896 bp band가 나타났다(Fig. 3). 즉, *Dpn* II를 이용한 PCR-RFLP에서 *B. hyodysenteriae*와 *B. pilosicoli*가 다른 banding pattern이 보여 간편하고 신속하게 균주간의 확인이 가능하였다.

그래서 돼지나 사람에서 배양이 까다로운 세균인 *Brachyspira* species의 감별 진단은 sequencing이나 hybridization 등의 기술이 없이도 이 *nox*-specific PCR-RFLP 방법을 이용하면 *B. hyodysenteriae*와 *B. pilosicoli*를 보다 쉽게 감별할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

돼지에서 장내 병원성을 나타내는 *Brachyspira* species인 *Brachyspira hyodysenteriae*와 *Brachyspira pilosicoli*를 쉽고 빠르게 감별하는 방법으로 NADH oxidase gene (*nox*)을 이용하여 PCR-RFLP를 실시하였다.

국내에서 분리된 *Brachyspira hyodysenteriae* 7균주와 표준균주로 *Brachyspira hyodysenteriae* B204, B234, B169와 *Brachyspira pilosicoli* P43/6/78를 이용하여 *nox*-specific PCR-RFLP를 수행하였다. *Brachyspira* species의 *nox* 유전자에 대하여 GenBank 자료에 기초하여 primer를 제작, PCR을 수행하여 939 bp band를 확인할 수 있었다. 증폭된 PCR 산물을 제한 효소 *Bfm* I과 *Dpn* II를 사용하여 처리한 결과, *Bfm* I을 이용한 경우, *B. hyodysenteriae*와 *B. pilosicoli*가 197, 741 bp의 band로 나타나 차이가 없었다. 그러나 *Dpn* II를 이용한 경우, *B. hyodysenteriae*는 209, 684 bp로 나타났지만 *B. pilosicoli*는 896 bp의 단일 band로 나타났다. 이로써 *Dpn* II를 이용한 *nox*-specific PCR-RFLP에서 국내분리주들은 모두 *B. hyodysenteriae*임을 확인할 수 있었고 *B. hyodysenteriae*와 *B. pilosicoli*에서 특이한 banding pattern이 나타나 병원성 돼지 intestinal spirochetes에 대해 신속하고 특이적으로 구분할 수 있는 유전자 감별법임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Atyeo, R. F., Stanton, T. B., Jensen, N. S., Suriyaarachichi, D. S. and Hampson, D. J. Differentiation of *Serpulina* species by NADH oxidase gene (*nox*) sequence comparisons and *nox*-based polymerase chain reaction tests. *Vet. Microbiol.* 1999, **67**, 47-60.
2. Barcellos, D. E. S. N., de Uzeda, M., Ikuta, N., Lunge, V. R., Fonseca, A. S., Kader, I. I. T. A. and Duhamel, G. E. Identification of porcine intestinal spirochetes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal DNA encoding 23S rRNA. *Vet. Microbiol.* 2000, **75**, 189-198.
3. de Smet, K. A., Worth, D. E. and Barrett, S. P. Variation amongst human isolates of *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* based on biochemical characterization and 16S rRNA gene sequencing. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998, **48**, 1275-1263.
4. Dugourd, D., Jacques, M., Bigras-Poulin, M. and Harel, J. Characterization of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serotypes 8 and 9 by random amplification of polymorphic DNA analysis. *Vet. Microbiol.* 1996, **48**, 305-314.
5. Duhamel, G. E. Colonic spirochetosis caused by *Serpulina pilosicoli*. *Large Anim. Pract.* 1998, **19**, 14-2.
6. Elder, R. O., Duhamel, G. E., Schafer, R. W., Mathiesen, M. R. and Ramanathan, M. Rapid detection of *Serpulina hyodysenteriae* in diagnostic

- specimens by PCR. J. Clin. Microbiol. 1994, **32**, 1497-1502.
7. **Fellstrom, C., Pettersson, B., Thomson, J., Gunnarsson, A., Persson, M. and Johansson, K. E.** Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. J. Clin. Microbiol. 1997, **35**, 462-467.
 8. **Fisher, L. N., Mathiesen, M. R. and Duhamel, G. E.** Restriction fragment length polymorphism of the periplasmic flagellar *flaA1* gene of *Serpulina* species. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1997, **4**, 681-686.
 9. **Hampson, D. J.** The *Serpulina* story, pp. 1-5. In C. Cargill and S. McOrist(ed.). Proceedings of the 16th IPVS Congress. Causal Productions Pty Ltd. Rundle Mall, 2000.
 10. **Kennedy, M. J., Rosnick, D. K., Ulrich, R. G. and Yancey, R. J.** Association of *Treponema hyodysenteriae* with porcine intestinal mucosa. J. Gen. Microbiol. 1988, **134**, 1565-1576.
 11. **La, T., Nyree, D. P. and Hampson, D. J.** Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. J. Clin. Microbiol. 2003, **41**, 3372-3375.
 12. **Leser, T. D., Moller, K., Jensen, T. K. and Jorsal, S. E.** Specific detection of *Serpulina hyodysenteriae* and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. Mol. Cell. Probes. 1997, **11**, 363-372.
 13. **Pettersson, B., Fellstrom, C., Andersson, A., Uhlen, M., Gunarsson, A. and Johansson, K. E.** The phylogeny of intestinal porcine spirochetes (*Serpulina* species) based on sequence analysis of the 16S rRNA gene. J. Bacteriol. 1996, **178**, 4189-4199.
 14. **Rohde, J., Rothkamp, A. and Gerlach, G. F.** Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel *nox* PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 2002, **40**, 2598-2600.
 15. **Stanton, T. B. and Jensen, N. S.** Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina hyodysenteriae*. J. Bacteriol. 1993, **175**, 2980-2987.
 16. **Stanton, T. B., Trott, D. J., Lee, J. I., McLaren, A. J., Hampson, D. J., Paster, B. J. and Jensen, N. S.** Differentiation of intestinal spirochaetes by multilocus enzyme electrophoresis analysis and 16S rRNA sequence comparisons. FEMS. Microbiol. Lett. 1996, **136**, 181-186.