

*Streptococcus iniae*의 유전학적 다양성과 RAPD fingerprint profile의 비교

정용욱 · 허문수*

제주대학교 해양과학부

Received February 28, 2006 / Accepted April 4, 2006

Phylogenetic Diversity and Comparison of RAPD Fingerprint Profile of *Streptococcus iniae*. Yong-Uk Jeong and Moon-Soo Heo*. Faculty of marine science, Cheju National University, Jeju 690-756 – *Streptococcus* sp. were isolated from cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*) having Streptococcosis during 2004 to 2005 in Jeju Island. Ninety four *Streptococcus iniae* strains were isolated using biochemical test and multiplex PCR assay. Three genotypes (A, B, C-type) of *S. iniae* were appeared in the RAPD analysis and they showed international or local genetic polymorphism. Presently, *S. iniae* having A-type is a dominant *S. iniae* genotype in Jeju and showed band patterns at about 550, 850, 1000, 1300 and 2000 base pares. In this study, the reported P14 random primer, that used to distinguish serotypes of *S. iniae* could not be applied to distinguish Jeju island *S. iniae*'s genetic polymorphism.

Key words – *Streptococcus iniae*, genotype, serotypes, genetic polymorphism

서 론

*Streptococcus iniae*는 일반적으로 전 세계 다양한 양식어종에 연쇄구균증을 유발하며, 병원성도 비교적 강하여 경제적 손실률이 높은 병원체로 알려져 있다. 또한 근래에 들어 미약하기는 하나 인간에게도 병원성이 있는 것으로 보고되고 있어, 본 병원체에 대한 연구적 관심이 높아지고 있는 병원체이다[11,13].

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 분석기법은 PCR (Polymerase Chain Reaction) 기법을 기반으로 하여 DNA fingerprint profile을 얻어내고 유연관계를 분석하여 종간, 종내 유전학적 다양성을 비교적 용이하게 분석할 수 있는 방법이다[2]. 근래에 들어 이러한 기법을 이용하여 여러 연구자들이 어류의 병원성 세균에 대해 유전학적 다양성을 연구하였고, 국가별 혹은 지역별 DNA fingerprint profile들을 구축하여 전염병학적 연구에 기초 자료로 활용하고자 하고 있다[1,2,6,12,14].

이러한 가운데 국내에서는 주로 어류병원체로서의 특성 등에만 국한되어 이루어졌고 세부적으로 *S. iniae*의 혈청형 분류 연구나 계통유전학적 연구보고는 미약한 실정이다. 따라서 국내에 존재하는 *S. iniae*의 계통유전학적 분류 형질을 파악하고 자료화가 필요한 실정이다.

한편, Bachrach[1]은 *S. iniae*의 각 serotype이 가지는 RAPD fingerprint profile에 대해 연구 보고하였는데, serotype I 과 serotype II의 RAPD fingerprint profile이 다른 것으로 보고하였고, Zlotkin[16]은 serotype II가 항포식작용

(antiphagocytic activity)이 높고, 대식세포의 세포사(apoptosis)를 유도하는 능력을 가져 병원성이 더욱 강력한 것으로 보고하였다. 따라서 Bachrach[1]이 *S. iniae*의 각 serotype을 RAPD fingerprinting 기법으로 분류하였던 RAPD primer를 이용하여 국내 균주에 대한 혈청형의 분류에 적용해보거나 또는 계통유전학적 분류 연구를 수행해 볼 필요성이 있는 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 우리나라의 대표적 양식넙치(*Paralichthys olivaceus*) 생산지이고, 지리적으로 격리되어 국지적 또는 국제적인 병원체의 유입이 제한적인 제주도 *S. iniae*의 DNA fingerprint profile을 확립하고 이와 함께 계통유전학적 다양성을 연구하여 국내에 존재하는 *S. iniae*의 계통유전학적 분류 형질을 파악하는데 기초적 연구 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

연쇄구균의 배양

2004년부터 2005년까지 제주도 양식장 전역에서 전형적인 연쇄구균증을 나타내는 양식넙치를 대상으로 신장, 뇌, 안구 등에서 1.5% NaCl 첨가 BHIA (Brain Heart Infusion Agar) 와 혈액배지에 22℃, 24-48시간 배양하고 간이 동정을 실시하여 순수 분리를 하였다. 또한 공시균주인 *S. iniae* KCTC-3657, *S. parauberis* KCTC-3651, *S. pyogenes* KCTC-3096 *Lactococcus garveiae* KCTC-3772를 한국 세포주 은행에서 분양 받아 본 연구에 사용하였다.

Genomic DNA의 분리

순수배양 된 *Streptococcus* sp.들을 lysozyme (10 mg/ml) 60 μ l씩 넣고 37℃, 2시간 처리한 후 Bioneer사의 Genomic

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3473, Fax : +82-64-754-3493

E-mail : msheo@cheju.ac.kr

DNA extraction kit manual에 따라 분리하였다. 분리 후에 1% agarose gel 상에서 100 V, 25분간 수평 전기영동하여 단일 밴드로 나타나는 것을 확인하였다. 분리된 genomic DNA는 UV/VIS spectrophotometer로 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량을 하였다.

Multiplex-PCR에 의한 종 동정

Mata[7]의 방법을 응용하여 *S. parauberis*, *S. iniae*, *L. garvieae* 각 3 종에 대해 동시에 종 동정이 가능한 3 종의 primer set (Spa-2152, Spa-2870, LOX-1, LOX-2, pLG-1, pLG-2)을 이용하여 multiplex PCR assay를 실시하였고, 1.2% agarose gel에서 수평 전기영동하여 *S. iniae*를 종 동정하였다. Primer sequence들과 목적하는 증폭크기는 Table 1에 나타내었다.

생화학적 성상을 이용한 *S. iniae*의 동정

생화학적 성상을 이용한 종 동정을 하기위해 API 20 Strep kit (bioMerieux, France)를 이용하여 제조회사의 manual에 따라 접종하여 4, 24시간대의 성상을 기록하였다. 이와 함께 균주들의 용혈성은 5% Sheep Blood Agar Plate (KOMED co., Korea)에 접종하고 5% CO₂, 36°C의 조건에서 배양하여 24-48시간대의 용혈성을 판정하였다. 이러한 결과를 APILAB identification system (APILAB PLUS, V 3-3-3, bioMerieux, France)으로 분석하여 종 동정을 실시하였다.

Random primer의 예비검정

본 연구에 사용된 random primer는 그룹 A 연쇄상구균의 분류 marker로 사용되었고, *S. iniae* 각 serotype의 식별 marker로 사용된 P14와 어류 연쇄상구균증 병원체로 보고된 *S. parauberis*와 *L. garvieae*의 계통 유연관계를 분석하기 위해 사용된 random primer P1, P2, P3, P4, P5, P6 모두를 동일 조건하에 PCR 반응을 실시하였고 예비검정에 사용하였다 [1,9,10,12]. 본 연구에 사용된 RAPD primer sequence들은

Table 1에 나타내었다.

PCR-RAPD 반응용액은 각각 genomic DNA 20 ng, primer 20 pmol (0.75 μl), 10×Taq polymerase reaction buffer (100 mM Tris pH 8.3, 400 mM KCl, 15 mM MgCl₂ 10 mM DTT, 500 μl/ml BSA) 2.5 μl, 2.5 mM dNTP 4 μl, Taq polymerase 1.5 U를 넣고 증류수를 첨가하여 최종 volume을 25 μl가 되게 하였다. DNA 증폭은 94°C에서 2 분간 pre-denature 시킨 후 94°C에서 denature 30 초, 37°C에서 2 분간 annealing 시켰으며 extension은 72°C에서 90 초간 실시하여 총 35회 PCR 반응을 실시하였다.

Random primer의 예비검정을 위해 1.5% agarose gel상에서 수평전기영동을 실시하였고 각 random primer에 의한 증폭양상을 관찰하였다. 그 중에서 polymorphic band 빈도가 많아 본 실험에서 사용이 가능한 primer를 선발하였다.

RAPD fingerprints의 수집과 유연관계 분석

Random primer 예비검정 시험에서 선발된 primer를 이용하여 제주도에서 분리된 *S. iniae* 94 균주에 대해 PCR을 실시한 후 RAPD fingerprints를 얻어내었다. 또한 재현성을 판별하기 위해 각각의 대표적 genotype에 대해 5회 반복 실시하였다. *S. iniae*의 유연관계 분석은 2개체 간에 검출된 총 증폭단편 중 공유하지 않는 증폭단편의 비율로 나타내는 비유사도 지수(Dissimilarity index=D)를 이용하였다[11]. 비유사도는 다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{비유사도}(D) = N_{ab} / (N_a + N_b)$$

N_{ab} = 개체 a와 b의 공유하지 않는 단편 수.

$N_a + N_b$ = 개체 a와 개체 b에 나타난 총 단편 수의 합.

유전적 비유사도의 계산처리는 밴드의 유무에 따라 1과 0으로 수치화하여 산출하였으며, 유전적 유연관계는 이 값을 근거로 neighbor-joining법을 이용하여 유전적 유연도로 나타내어 분석하였다.

Table 1. Primer sequences used for species specific PCR assay and RAPD analysis of *Streptococcus iniae*

Primer	Sequences(5' to 3')	Target gene	PCR ampli-con size(bp)	Pathogen
Spa-2152	TTTCGTCTGAGGCAATGTTG	23S rRNA	718	<i>S. parauberis</i>
Spa-2870	GCTTCATATATCGCTATACT			
LOX-1	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC	Lactate oxidase (<i>lctO</i>)	870	<i>S. iniae</i>
LOX-2	ATATCTGATTGGGCCGTCTAA			
pLG-1	CATAACAATGAGAATCGC	16S rRNA	1,100	<i>L. garvieae</i>
pLG-2	GCACCCTCGCGGTTG			
P14	GATCAAGTCC	Randomly amplification		<i>S. iniae</i>
P1	GGTGC GGAA	"		"
P2	GTTTCGCTCC	"		"
P3	GTAGACCCGT	"		"
P4	AAGAGCCCGT	"		"
P5	AACGCGCAAC	"		"
P6	CCCCTCAGCA	"		"

결과 및 고찰

*S. iniae*의 분리 배양 및 간이동정

2004년부터 2005년까지 2년간 제주도 전 연안에 분포하는 대표적 넙치 양식장 11 곳을 선정하여 어류 병원성 *S. iniae* 분리를 시도하였다(Table 4). 검체는 전형적인 연쇄구균증 증상을 보이는 양식넙치 병어 각각을 대상으로 하였고, 1.5% NaCl이 첨가된 BHIA에서 우유빛 작은 집락의 *Streptococcus* sp. 186 균주를 순수 분리하였다. 순수 분리된 균주의 간이동정 결과 모두 Gram 양성 구균, catalase 음성, cytochrome oxidase 음성이었다.

Multiplex PCR법을 이용한 *S. iniae*의 동정 및 병리 생태학적 특성

분리균주 186 균주에 대해 multiplex PCR detection assay 동정법을 이용하여 *S. iniae* 94 균주와 *S. parauberis* 92 균주를 동정하였다. *S. iniae*로 동정된 균주들의 multiplex PCR 반응 산물은 모두 목적하는 증폭 크기인 870 bp와 일치하였으며, 비특이적인 반응은 관찰되지 않았다. 또한 *S. parauberis*로 동정된 균주들도 목적하는 증폭 크기인 718 bp와 일치하였으며, 비특이적인 반응은 관찰되지 않았다(Fig. 1). 한편, 이들 이외에 어류의 연쇄구균증 병원체로 알려진 *L. garvieae*는 검출되지 않았다.

*S. iniae*의 검출 양상은 지리적으로 전 연안에서 검출되었고(Table 4), 월별로는 모든 월에 걸쳐 검출되어, 고수온기인 8월, 9월, 10월에 비교적 높게 검출되었고 일부는 육지부와는 달리 지하해수를 사용하는 등의 이유로 상대적으로 저수온기 수온이 15℃ 이상으로 유지되어 저수온기에도 검출되는 양상을 보였다.

생화학적 성상을 이용한 *S. iniae*의 동정

API 20 strep system에 의한 생화학적 성상을 판독해 본 결과, 분리균주와 공시균주 *S. iniae* KCTC-3657 모두 양성반응을 보인 각 기질에 대해 안정적으로 동일한 양성반응을 보

였다. API strep 20 system을 이용하여 종 동정을 실시해본 결과, 동정 system이 보유한 data profile에 *S. iniae*의 부재로 종 동정은 이루어지지 않았다. 그러나 Colorni[3]와 Eldar[4]가 어류의 연쇄구균증 병원체로 보고된 *S. iniae*와 매우 높은 유사성을 보였고, 차이점은 arginine dihydrolase 반응에 대해 Colorni[3]는 가변적인 반응을 보인다고 보고하였으나 본 연구에서는 표준균주와 시험균주 모두 양성 반응을 보였고, 면양 적혈구(Goat RBC)에 대해 집락 주위로 작은 β-용혈성을 나타내었다(Table 2).

Random primer의 예비검정

*S. iniae*에 대하여 그룹 A 연쇄상구균의 분류 marker로 사용되었고, *S. iniae* 각 serotype의 식별 marker로 사용된 P14 primer와 어류 연쇄구균증 병원체 *S. parauberis*와 *L. garvieae*의 계통 유연관계를 분석하기 위해 사용된 P1, P2, P3, P4, P5, P6 primer 모두를 동일 조건하에 PCR 반응을 실시한 결과 polymorphic band 빈도수가 많고 각 균주간의 유전학적 다양성을 구별하기에 적합한 random primer는 P14 primer였다(Fig. 2). 이러한 결과는 Bachrach[1]와 Colorni[3] 그리고 Kvitt[7]가 어류 병원성 *S. iniae*의 RAPD fingerprinting 및 유연관계 분석에 P14 primer 사용이 적합하다는 연구보고와 일치하는 특성을 보였다.

제주도에서 분리된 *S. iniae*의 RAPD fingerprinting genotype의 양상과 생태학적 분포 특성

제주도 양식넙치에서 분리된 어류 병원성 *S. iniae*에 대해 P14 random primer를 이용하여 RAPD fingerprint profile들을 분석해본 결과, 세 가지의 RAPD fingerprinting genotype을 나타내었는데, 균주 번호 St-21, St-29, St-31, St-112, St-116이 A-type에 해당되었고, St-24가 B-type, St-85가 C-type에 각각 해당되었다(Fig. 3). A-type의 경우 약 2,000 bp, 1,300 bp, 1,000 bp, 850 bp, 550 bp의 RAPD fingerprint가 관찰되었다. B-type의 경우 A-type의 RAPD fingerprint 이외에 약 1,500 bp의 밴드가 추가로 관찰되었고, C-type의 경우 A-type의

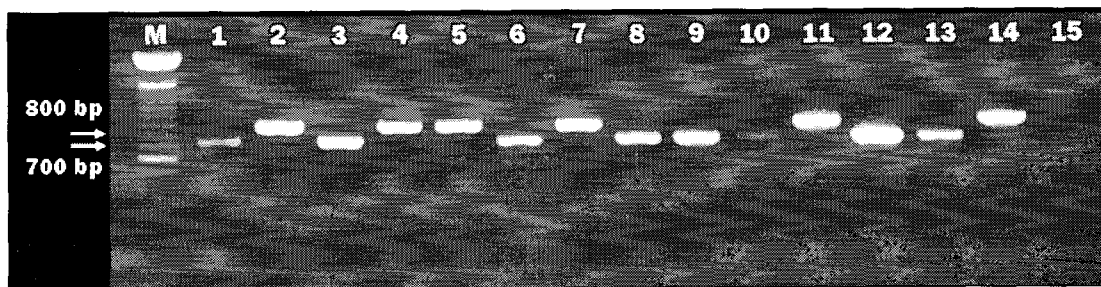


Fig. 1. Multiplex PCR assay for detection of *Streptococcus iniae* (870 bp), *Streptococcus parauberis* (718 bp), *Lactococcus garvieae* (1,100 bp). M, 100bp DNA ladder (Invitrogen, USA); lane 1-12, isolated strains; lane 13, *S. parauberis* KCTC-3651; lane 14, *S. iniae* KCTC-3657; lane 15, *L. garvieae* KCTC-3772; Lane 2, 4, 5, 7, 11 were identified as *S. iniae* from other streptococcosis flounders.

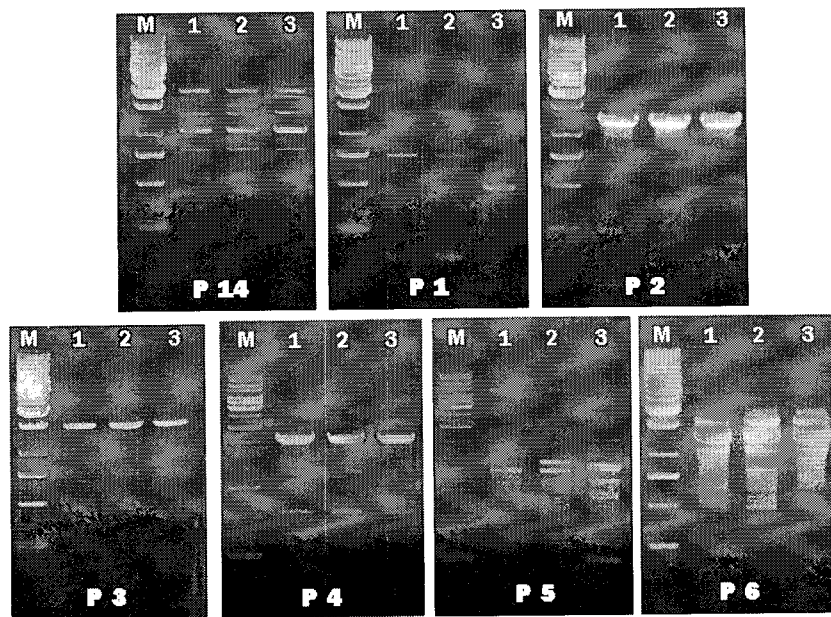


Fig. 2. RAPD band patterns obtained for the *Streptococcus iniae* strains with 7 kind of random primer, from P14 and P1 to P6. M, GeneGular™ 1 kb DNA Ladder ; lane 1, St-21 ; lane 2, St-24 ; lane 3, St-85.

RAPD fingerprint 이외에 약 1,900 bp의 밴드가 추가로 관찰되었다(Table 3).

2004년에서 2005년까지 2년간 수집한 *S. iniae* 94 균주 중 대부분인 89 균주가 A-type의 RAPD fingerprint profile을

나타내었으며, 제주도 전 연안에서 관찰되었다. B-type의 경우 두 균주가 관찰되었고 C-type의 경우 세 균주가 관찰되었다. 비록 상대적으로 매우 적은 수가 관찰되기는 하였으나, 이 두 genotype은 주로 제주도 양식넙치의 주 사육지이고 밀

Table 2. Biochemical profile of KCTC strains and isolated strains isolated from streptococcosis flounder in the Jeju island

API 20 strep system	<i>S. pyogenes</i> KCTC-3096	<i>L. garvieae</i> KCTC-3772	<i>S. iniae</i> KCTC-3657	<i>S. iniae</i> *	Isolated strains
VP (acetoin prod.)	-	+	-	-	-
Hippurate hydrol.	-	-	-	-	-
Esculin (β-glucosidase)	+	-	+	+	+
PYRA (pyrrolidonyl arylamidase)	-	V	+	+	+
α-GAL (α-galactosidase)	-	-	-	-	-
β-GUR (β-glucuronidase)	+	-	+	+	+
β-GAL (β-galactosidase)	-	-	-	-	-
PAL (alkaline phosphatase)	+	-	+	+	+
LAP (L-leucine arylamidase)	+	+	+	+	+
ADH (arginine dihydrolase)	+	+	+	V	+
RIB (ribose acidif.)	+	+	+	+	+
ARA (L-arabinose acidif.)	-	-	-	-	-
MAN (mannitol acidif.)	-	-	+	+	+
SOR (sorbitol acidif.)	-	-	-	-	-
LAC (lactose acidif.)	+	-	-	-	-
TRE (trehalose acidif.)	+	+	+	+	+
INU (inulin acidif.)	-	-	-	-	-
RAF (raffinose acidif.)	-	-	-	-	-
AMD (starch acidif.)	+	-	+	+	+
GLYG (glycogen acidif.)	-	-	+	+	+
Hemolysis (goat RBC)	β	α	β	α	β

*S. iniae** : Biochemical profile of isolated strains from streptococcosis fish in the red sea fish[3].

Biochemical +: positive reaction; -: no reaction; V: variable

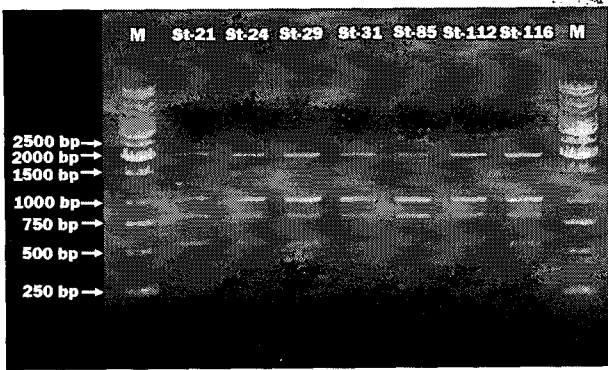


Fig. 3. RAPD fingerprints of *Streptococcus iniae* employing the primer P14. All isolates were collected in Jeju Island from 2004 to 2005. M: GeneGular™ 1 kb DNA Ladder; Other lanes were wild type *S. iniae* strains.

Table 3. RAPD fingerprint profile of *Streptococcus iniae*

Representing amplicon size (≅)	A-type	B-type	C-type	<i>S. iniae</i> [*] genotype I
2,500 bp	0	0	0	1
2,000 bp	1	1	1	1
1,900 bp	0	0	1	0
1,500 bp	0	1	0	0
1,400 bp	0	0	0	1
1,300 bp	1	1	1	0
1,100 bp	0	0	0	1
1,000 bp	1	1	1	0
850 bp	1	1	1	1
550 bp	1	1	1	0
Total	5	6	6	5

^{*}Reference genotype using RAPD analysis for *S. iniae* [3].

집된 제주 동부 연안에서 관찰되었다. 이 이외에는 C-type 1 균주가 제주서부에서 관찰되었다. 따라서 제주도내에서 지리적 구별성이 있는 genotype은 없는 것으로 보이며, 최근 제주도에 우점하는 어류 병원성 *S. iniae*의 RAPD fingerprinting genotype은 A-type인 것으로 사료된다(Table 4).

***S. iniae*의 RAPD 분석에 의한 계통 유연관계**

제주도에서 분리된 *S. iniae*의 RAPD fingerprinting genotype에 대해 비유사도 지수 계산법과 이를 근거로 neighbor-joining법을 이용하여 유전적 유연관계를 분석해 보면 B-type과 C-type가 가장 가까운 유연관계를 나타내고 있으며, 둘 다 우점형인 A-type과 상대적으로 먼 유연관계를 나타내고 있다. Colomi[3]의 보고에 의하면 홍해에서 서식하는 어류에서 분리된 *S. iniae*에 대해 본 실험과 동일한 P14 random primer를 이용하여 작성한 결과, 약 2,500 bp, 2,000 bp, 1,400 bp, 1,100 bp, 850 bp의 RAPD fingerprint를 보고하였다(Table 3). 이러한 연구 보고는 본 연구 결과와는 다른

Table 4. Distribution of RAPD fingerprinting genotypes of *Streptococcus iniae* isolated in Jeju Island from 2004 to 2005

Origin	Date	Genotypes of <i>S. iniae</i>		
		A-type	B-type	C-type
Hamdeok	2004	St-1, St-2, St-94		
	2005	St-126		
Gimnyeong	2004	St-4, St-7, St-8, St-9		
	2005	St-114, St-115, St-116, St-135		
Sehwa	2004	St-10, St-15, St-16, St-22, St-23, St-25	St-24	
	2005	St-104, St-119, St-154, St-155		
Ojo	2004	St-14, St-19, St-21, St-27		
	2005	St-108, St-109, St-112, St-141, St-143, St-144, St-152		St-145
Seongsan	2004	St-26, St-34, St-45, St-46, St-88, St-97		
	2005	St-120, St-122, St-124, St-125, St-161		
Shinyang	2004	St-28, St-36, St-37, St-43, St-76, St-77, St-82, St-84		
	2005	St-136, St-137, St-167, St-169		
Onpyeong	2004	St-29, St-30, St-48, St-49, St-63, St-65		St-85
	2005	St-131, St-133, St-134		
Pyoseon	2004	St-31, St-32, St-41, St-66, St-91	St-89	
	2005	St-147		
Namwon	2004	St-52, St-61, St-78, St-79		
	2005	St-175, St-177, St-178		
Gosan	2004	St-51, St-55		
	2005	St-112		St-162
Aeweol	2004	St-42, St-60, St-73,		
	2005	St-139, St-179, St-180, St-184		
Total		89	2	3

RAPD fingerprinting genotype으로서 유전적 유연관계를 분석해 보면 상대적으로 제주도에서 분리된 genotype A, B, C는 서로 가까운 유연관계를 보이고 있으나 홍해에서 분리된 *S. iniae* genotype I이 가장 먼 유연관계를 나타내고 있다(Fig. 4).

또한 Kvitt[7]가 동일한 실험방법을 이용하여 보고한 RAPD fingerprint profile에 의하면 약 2,500 bp, 1,200 bp의 RAPD fingerprinting genotype을 가지거나 추가로 약 900 bp의 밴드를 가지는 genotype을 보고하였다. 이런 연구 결과는 본 연구에서 분석한 연구 결과와는 다른 RAPD fingerprinting genotype이다. 이를 종합해 본다면 국내외의 존재하는 어류 병원성 *S. iniae*의 유전자 지문이 충분히 다를 수 있는 가능성을 보여주고 있고 국내에 존재하는 어류 병원성 *S. iniae*의 DNA fingerprint profile에 대한 폭 넓은 연구가 수행되어진다면 외국에서 유입되는 *S. iniae*의 분류가 가능할 것으로 사료된다.

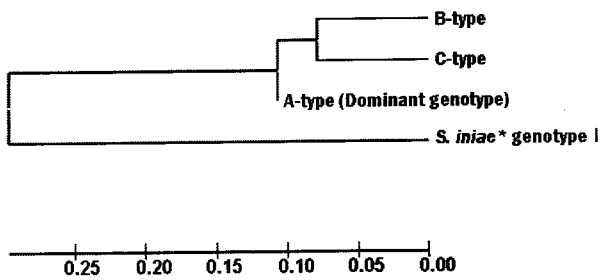


Fig. 4. RAPD derived from neighbor-joining cluster analysis. A to C-type were *S. iniae* from Jeju island. *reference genotype using RAPD analysis for *S. iniae* from the red sea[3].

한편, 최근의 연구 보고에 의하면 *S. iniae*에서 두 개의 serotype이 분리되어 보고되었는데, serotype II가 항포식작용 (antiphagocytic activity)이 높고 대식세포의 세포사 (apoptosis)를 유도하는 능력을 가져 병원성이 더욱 강력한 것으로 보고되었고, RAPD fingerprints profile에서 serotype I 이 가지는 약 750 bp를 가지지 않아 genotype이 구분되는 것으로 보고되었다[1,16]. 그러나 serotype I 과 serotype II을 구별할 수 있는 것으로 알려진 750 bp의 밴드는 동일한 실험 조건에서 실시한 본 연구에서 94 균주 모두 관찰할 수 없었고, 고유한 850 bp, 550 bp 등의 밴드만이 관찰되었다. 따라서 이러한 RAPD fingerprinting 기법에 의한 serotype의 분류는 제주도에서 분리된 *S. iniae*의 serotype 동정에 적합하지 않을 가능성이 높고, 나아가 국내에서 분리되는 *S. iniae*의 serotype 동정에 대변성을 부여할 수 없을 것으로 사료되어진다. 그러므로 국내에 존재하는 어류 병원성 *S. iniae*에 적용이 가능한 혈청형의 분류법과 간편하고 신속하게 혈청형의 구분이 가능한 DNA fingerprints의 연구개발과 같은 폭넓은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

2004년부터 2005년까지 제주도에서 전형적인 연쇄구균증상을 나타내는 양식업치로부터 *Streptococcus* sp.를 분리하였다. 생화학적 성상 조사와 multiplex PCR assay법을 통해 *S. iniae* 94 균주를 동정하였다. RAPD fingerprint profile을 조사해 본 결과 A, B, C-type 총 3가지의 genotype을 확인하였으며, 동일종에 대해 외국에서 보고된 선행 연구결과와 비교하였을 경우, 지리적으로 다른 유전적 다형현상을 나타내는 것으로 추정되었다. 근래에 제주도에 우점하는 genotype은 A-type이었고, RAPD fingerprint profile은 약 2,000 bp, 1,300 bp, 1,000 bp, 850 bp, 550 bp의 밴드 양상을 나타내었다. *S. iniae*의 serotype 동정에 유효한 것으로 보고되어진 P14 random primer는 유전적 다형현상에 의해 제주도에서 분리된 *S. iniae*의 serotype 동정에 적합하지 않은 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 논문은 두뇌한국 21(BK 21)의 지원에 의해 수행되어진 연구 결과이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Bachrach, G., A. Zlotkin, A. Hurvitz, D. L. Evans, and A. Eldar, 2001. Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a *Streptococcus* vaccine. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3756-3758.
2. Carmen R., B. Magariños, S. López-Romalde, A. E. Toranzo, and J. L. Romalde, 2003. Molecular Fingerprinting of Fish-Pathogenic *Lactococcus garvieae* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 751-756.
3. Colorni, A., A. Diamant, A. Eldar, H. Kvitt, A. Zlotkin, 2002. *Streptococcus iniae* infections in Red Sea Cage-cultured and wild fishes. *Dis. Aquat. Org.* **49**, 165-170.
4. Eldar, A., P. F. Frelier, L. Assenta, P. W. Varner, S. Lawhon, H. Bercovier. 1995. *Streptococcus shiloi*, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of *Streptococcus iniae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 840-842.
5. Gilbert, D. A., N. Lehman, S. J. O. Brien and R. K. Wayne, 1990. Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel Island fox. *Nature* **344**, 764-767.
6. Inglis, V., D. Colquhoun, M. D. Pearson, M. Miyata, and T. Aoki, 1996. Analysis of DNA relationships among *Aeromonas* species by RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) typing. *Aquaculture Int.* **4**, 43-53.
7. Kvitt, H., A. Colorni, 2004. Strain variation and geographic endemism in *Streptococcus iniae*. *Dis. Aquat. Org.* **61**, 67-73.
8. Mata, A. I., A. Gibello, A. Casamayor, M. M. Blanco, L. Dominguez, and J. F. Fernandez-Garayzabal, 2004. Multiplex PCR Assay for Detection of Bacterial Pathogens Associated with Warm-Water Streptococcosis in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2004.
9. Neeman, R., N. Keller, A. Barzilai, Z. Korenman, S. Sela, 1998. Prevalence of internalisation-associated gene, prtF1, among persisting group-A streptococcus strains isolated from asymptomatic carriers. *Lancet* **352**, 1974-1977.
10. Ravelo, C., B. Magariños, S. López-Romalde, A. E. Toranzo, J. L. Romalde, 2003. Molecular Fingerprinting of Fish-Pathogenic *Lactococcus garvieae* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *J. Clin. Microbiol.* **41(2)**, 751 - 756.
11. Richard, F., J. Elliott, L. Shewmaker, and A. Reingold, 2005. Identification and Characterization of Sporadic Isolates of *Streptococcus iniae* Isolated from Humans Isolated from Humans. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 933-937.
12. Romalde, J. L., B. Magarinos, C. Viller, J. L. Barja, A. E.

- Toranzo, 1999. Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **15**, 179(2).
13. Susanna, K. P., L. Patrick, C. Y. Woo, Herman Tse, Kit-Wah Leung, Samson S. Y. Wong, and Kwok-Yung Yuen, 2003. Invasive *Streptococcus iniae* Infections Outside North America. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1004-1009.
 14. Warner, J. M., and J. D. Oliver, 1999. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1141-1144.
 15. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.
 16. Zlotkin, A., S. Chilmonczyk., M. Eyngor, A. Hurvitz, C. Ghittino, A. Eldar, 2003. Trojan Horse Effect: Phagocyte-Mediated *Streptococcus iniae* Infection of Fish. *Infection and Immunity* **71(5)**, May.