

Vibrio tapetis의 검출을 위한 PCR specific primer의 제작김영진 · 이선이 · 조효진 · 유선녕 · 김철민¹ · 최용락² · 박병근³ · 안순철*

부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학 교실

¹부산대학교 의과대학 생화학 교실²동아대학교 생명자원과학대학 응용생명공학부³(재)바이오21센터

Received June 20, 2006 / Accepted August 20, 2006

PCR Specific Primer for the Detection of *Vibrio tapetis*. Yeong-Jin Kim, Sun-Yi Lee, Hyo-Jin Cho, Sun-Nyung You, Cheol-Min Kim¹, Yong-Lark Choi², Byoung-Keun Park³ and Soon-Cheol Ahn^{*}. Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University, Busan 602-739, Korea, ¹Department of Biochemistry, College of Medicine, Pusan National University, Busan 609-735, Korea, ²Division of Biotechnology, Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-a University, Busan 604-714, Korea ³Bio21 Center, 1033 Moonsan, Jinju 660-844 Korea - Brown Ring Disease (BRD) is a bacterial disease caused by *Vibrio tapetis* which affects cultured clam *Ruditapes philippinarum* and causes heavy economic losses on Atlantic coasts of France, Spain and England. In this study, to evaluate the effective detection of the pathogen, specific primer set based on 16S ribosomal RNA (rRNA) sequences designed for rapid detection of *V. tapetis*. Polymerase chain reaction (PCR) with this primer set produced the specific band for each *V. tapetis*. The length of PCR product using designed primer set of Vbts-F and Vbts-R was about 400 bp. Therefore, these primers will be provided with a basic tool for rapid detection of *V. tapetis* in the various cases such as examination of imported aquatic products, diagnosis of aquatic organisms, and etc.

Key words – BRD, *Vibrio tapetis*, 16S rRNA, PCR, specific primer

현재까지 식중독과 패혈증의 주요 원인균으로 인식되어온 *Vibrio* 속의 세균들은 그람 음성, 호염기성의 간균이며 해양 및汽水性 세균으로 약 40여종 정도 알려져 있다. 그동안 병원균으로 언급되는 것은 주로 *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* 등 3종이지만[4,15], 이외에도 *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. hollisae*, *V. ordalli* 등을 포함한 다양한 *Vibrio* 종이 어류, 패류 및 갑각류 등의 다양한 수산생물에 대한 병원균으로 이미 보고된 바 있으며[8,13,14], 이로 인한 양식 수산생물의 폐사로 인해 실제 양식 산업에 상당한 피해를 주고 있다. 특히, 굴, 바지락 등의 조개류는 중요한 단백질 공급원으로서 생식하는 경우가 많은데 이로 인한 비브리오 감염증의 위험이 보고되고 있으며, 더욱이 최근 해마다 신종 해양 비브리오균이 보고되고 있는 가운데 "brown ring disease (BRD)"의 원인체로 알려져 있는 *V. tapetis*와 같은 새로운 종이 수산물 수출입 관제로 인해 국내에서도 질병 발생 가능성이 있는 것으로 보고됨에 따라 그 위험성은 더욱 커져가고 있다[12]. *V. tapetis*는 1980년대부터 프랑스, 스페인, 포르투갈 등지에서 양식 바지락 *Ruditapes philippinarum*에 대해 외투막과 접해있는 패각 내부에 갈색의 병소를 형성하는 등 주로 바지락류의 패각과 내부

에 침입하여 폐사를 일으키는 것으로 알려져 있고, 해수 내 일반세균인 *V. splendidus*와 유사한 종으로 보고되고 있다 [2,3,7].

한편, *Vibrio* 균을 동정하는 방법으로는 그동안 주로 그람 염색에 의한 형태학적 동정과 API kit 등을 이용한 생화학적 동정, 그리고 항체를 이용한 다양한 면역학적 동정이 주로 사용되어 오다가 최근에는 16S rRNA와 16S rDNA, 그리고 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR) 등을 이용한 분자생물학적 동정법이 보편화되어 가는 추세이다.

따라서 본 연구에서는 최근 양식 바지락에 대해 병원성을 가진 것으로 보고되어 잠재적인 위험성을 내포하고 있는 *V. tapetis*에 대해 먼저 관련 유사종들과의 염기서열 분석을 통한 특이 서열의 확인과 함께 이를 토대로 제작된 PCR specific primer의 효용성을 확인하고 이를 신속진단법 개발을 위한 기초자료로 이용하고자 한다.

우선 본 연구에 사용된 *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. hollisae*, *V. parahaemolyticus*, *V. splendidus*, *V. tapetis* 등은 표준균주은행(American Type Culture Collection, ATCC)에서 구입하여 사용하였으며(Table 1), specific primer set의 제작을 위한 기초자료로 사용될 *Vibrio* 속 세균들의 16S rRNA에 대한 염기서열은 GenBank (NCBI, USA)에 등재된 자료를 이용하였고, 이를 Clustal W (EMBL-EBI, UK)를 이용한 multiple alignment를 통해 가장 변이가 많은 특

***Corresponding author**

Tel : +82-51-240-7735, Fax : +82-51-243-2259

E-mail : ahnsc@pusan.ac.kr

Table 1. List of *Vibrio* species used in this study

Species	Strains	GenBank accession no.*
<i>Vibrio tapetis</i>	NCIMB 13622	AY129278
<i>V. alginolyticus</i>	ATCC 17749	X56576
<i>V. anguillarum</i>	ATCC 12964	X16895
<i>V. harveyi</i>	ATCC 33843	DQ068936
<i>V. hollisae</i>	ATCC 33564	X56583
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	X56580
<i>V. splendidus</i>	ATCC 33789	AY129277

*These accession no. indicated 16S rRNA sequences of the each *Vibrio* strains.

이서열을 검색하였다. 그 결과, 본 연구에 사용된 *Vibrio* 속 세균들 상호간의 16S rRNA의 유전적 유사도는 모두 90~95% 정도였지만, 특이적으로 앞부분에 해당되는 1~90 bp와 450~470 bp 영역에서는 비교적 낮은 상동성을 나타내었다 (Fig. 1). 따라서 상기의 multiple alignment 자료를 토대로 Table 2와 같이 specific primer set를 디자인하여 (주)바이오

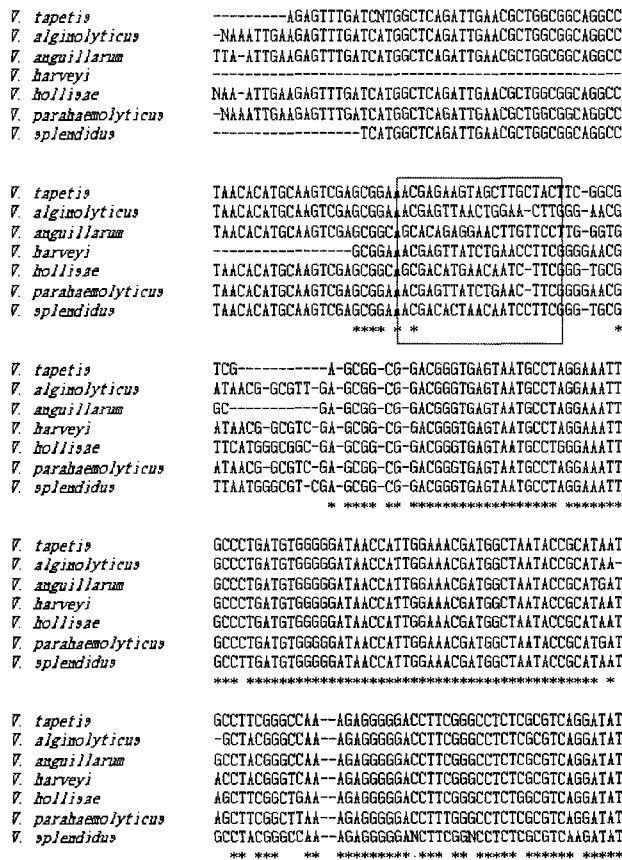


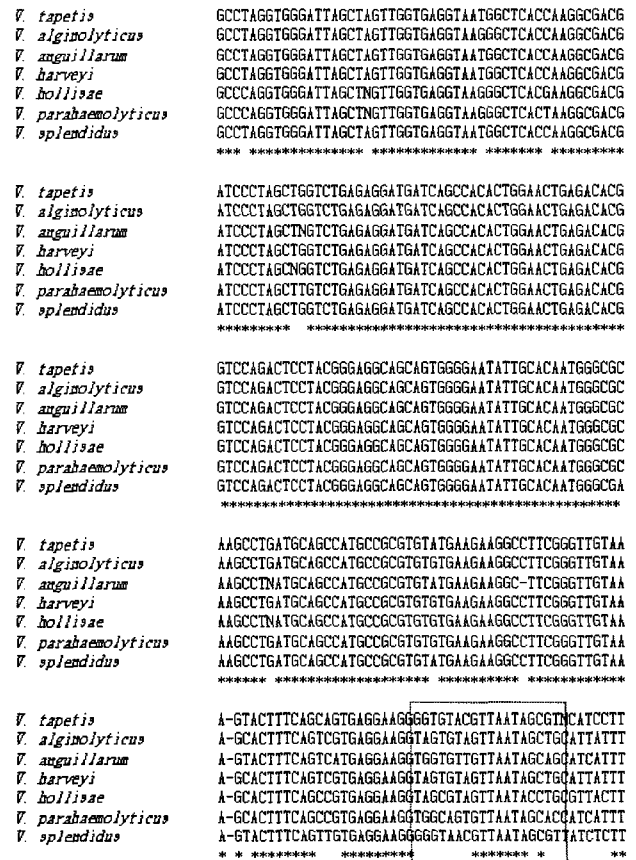
Fig. 1. Sequence alignment of *Vibrio* species 16S rRNA by Clustal W (EMBL-EBI, UK). Boxed regions show the forward and reverse primers. Asterisks indicate identical sequences. Dashed lines mean gaps. These nucleotides standardized with *V. tapetis* showed from 1st to 490th.

Table 2. Primer sequences used in this study

Primer	Sequence (5'→3')
Vbts-F	5'-aac-gag-aag-tag-ctt-gct-ac-3' (20 mer)
Vbts-R	5'-cac-gct-att-aac-gta-cac-c-3' (19 mer)

니아에 의뢰하여 제작하였고, PCR을 수행할 경우, 약 400 bp 크기의 PCR 산물이 나올 것으로 예상하였다(Fig. 2).

제작된 primer set를 이용하여 PCR을 수행하기 위해 우선 Marine broth 2216 (Difco, USA)에 접종하여 20℃에서 하룻 밤 배양한 균체를 모은 다음, Genomic DNA extraction kit (K-3032, Bioneer, Korea)를 이용하여 PCR에 사용될 template를 준비하였는데, 그 과정은 다음과 같다. 먼저 200 µl의 PBS로 균체를 현탁한 후, 단백질을 제거를 위해 20 µl의 proteinase K (25 mg/ml)와 200 µl의 binding buffer를 첨가하여 혼합한 반응액을 filter tube에 옮긴 다음, 원심분리 (12,000 rpm, 1 min.)를 이용하여 DNA를 filter에 흡착시켰다. 그런 다음, 70% EtOH를 넣어 원심분리 (12,000 rpm, 1 min.)하여 불순물을 제거하고, 최종 단계에서 멸균 증류수를 넣고 원심분리 (12,000 rpm, 2 min.)하여 DNA만을 회수하였다. 준비



된 DNA의 PCR 증폭반응을 위해 100 pM 의 각 primer, 0.2 mM dNTPs, 1 U *Taq* DNA polymerase, 2.5 mM MgCl₂가 포함된 혼합물에 template DNA 1 μl를 첨가한 총 20 μl의 PCR reaction mixture를 GeneAmp 2400 (Perkin Elmer co., USA)에 넣어 95°C에서 1분, 54°C에서 1분, 그리고 72°C에서 1분간 30 cycle을 반복하는 조건으로 증폭시켰고, 증폭된 PCR product들은 모두 1.5% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 확인하였다. 증폭된 PCR product들을 확인한 결과, *V. tapetis*에 대해서만 예상되었던 400 bp 크기의 특이 밴드가 검출되었을 뿐 다른 종들에 대해서는 전혀 다른 크기의 non-specific band가 생기거나 또는 product가 전혀 생성되지 않는 것으로 보아 본 연구를 통해 제작된 PCR primer의 특이성을 확인할 수 있었으며(Fig. 3), 증폭된 PCR product에 대해 염기서열분석을 실시한 결과, primer 제작 시 기초 자료로 이용한 *V. tapetis* 16S rRNA sequence (accession no. AY129278)와 100% 동일함을 확인하였다(data not shown).

또한 본 PCR primer의 재현성을 검증하기 위해 *V. tapetis*가 배양된 plate로부터 단일 colony를 따서 5 μl의 멸균 증류

수에 넣어 현탁하고 95°C에서 5분간 열처리한 다음, 상기의 PCR 증폭과 동일한 조건으로 colony PCR을 실시하였다. 증폭된 PCR product들에 대해 1.5% agarose gel 상에서 전기영동을 실시한 결과, 모두 400 bp 크기의 특이 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

현재 비브리오 속 세균은 약 45종 이상으로 구분되고 있지만[5], 같은 종이라 할지라도 표현형이나 유전형이 다양하게 나타날 뿐 아니라[1], 해마다 신종의 해양 비브리오균이 보고되고 있어 실제 분리세균에 대한 정확한 동정을 하기에는 현실적인 어려움이 많다. 특히, 본 연구의 재료로 사용된 *V. tapetis*의 경우에는 까다로운 배양조건과 함께 생화학적 특성에 있어서도 일반 해수세균인 *V. splendidus*와 유사한 점이 많아[7] 추후 수입 수산물의 검사나 양식 수산물의 질병 발생시, 많은 어려움이 예상된다.

따라서 본 연구에서는 최근 세균 동정에 가장 많이 활용되고 있는 기법 중 하나인 16S rRNA를 이용한 종 동정을 통해 그 특이성을 확인하였으므로 *V. tapetis*의 신속 진단에 활용할 수 있을 것으로 예상된다. 그러나 16S rRNA는 계통발

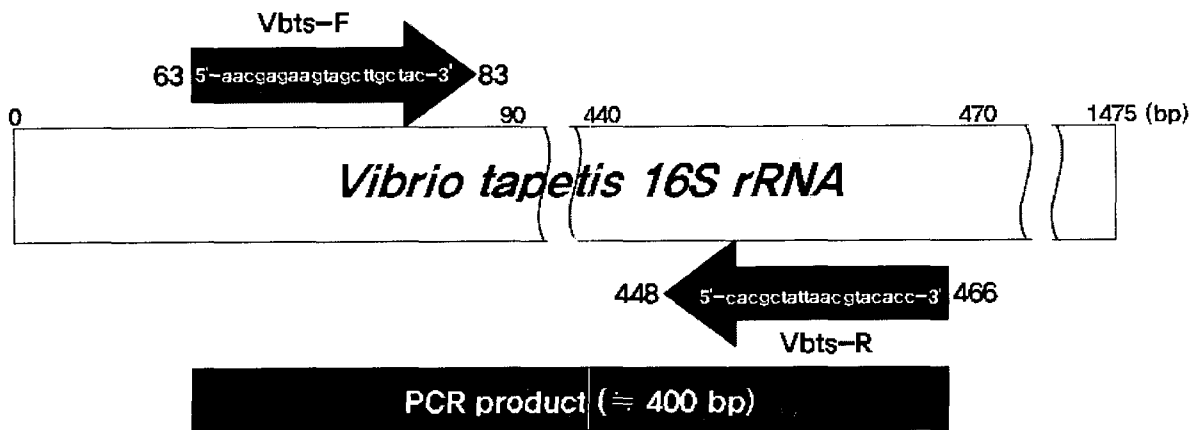


Fig. 2. Schematics of species-specific primer sites and the length of PCR product using the primer set about *Vibrio tapetis*.

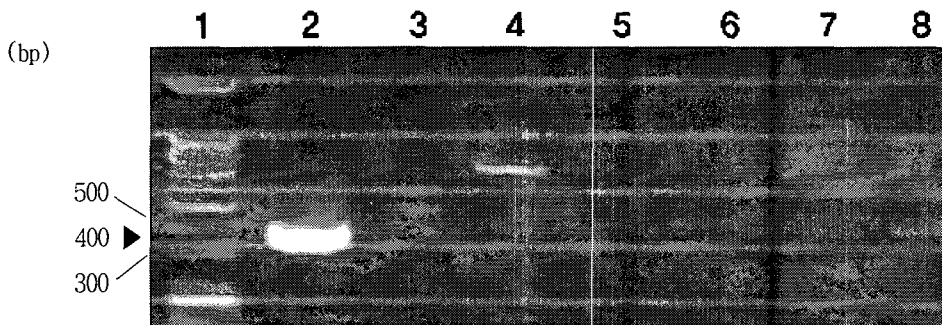


Fig. 3. PCR products of *Vibrio* species by specific primer set for detection of *V. tapetis*.

Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2: *V. tapetis*, Lane 3: *V. alginolyticus*, Lane 4: *V. anguillarum*, Lane 5: *V. harveyi*, Lane 6: *V. hollisae*, Lane 7: *V. parahaemolyticus*, Lane 8: *V. splendidus*.

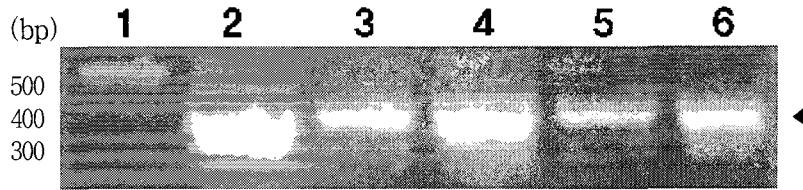


Fig. 4. PCR products of *V. tapetis* from a colony by specific primer set. Lane 1: 100 bp DNA ladder, Lane 2-6: each colonies.

생학적으로 근연한 종간에는 그 유전적 다양성이 부족하다고 알려져 있으며[9], 지속적인 신종 비브리오균의 추가로 인해 본 연구에서 개발된 primer의 특이성도 한계가 있을 것으로 판단되어 추후 연구를 통해 16S-23S rRNA ISR이나 다양한 tRNA[6], 그리고 *tet*[11]와 *aroA*[10] 같은 특이유전자 영역을 이용한 종 특이 marker의 개발이 계속되어야 할 것이다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단 특정기초연구사업 (R01-2005-000-11128-0)의 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Alasina, M. and A. R. Blanch. 1994. Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.*, **77**, 719-721.
- Allam, B., C. Paillard, and S. E. Ford. 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiologic agent brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Org.* **48**, 221-231.
- Castro, D., J. A. Santamaria, A. Luque, E. Marinez-Manzanares, and J. J. Borrego. 1996. Antigenic characterization of the etiological agent of the brown ring disease affecting manila clams. *Syst. Appl. Microbiol.*, **19**, 231-239.
- Elliot, E. L., C. A. Kaysner and M. L. Tamplin. 1992. *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. In Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 7th ed. AOAC International, Arlington. pp. 111-140.
- Euzeby, J. P. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet (URL: <http://www.bacterio.cict.fr/>). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 590-592.
- Gurtler, V. and V. A. Stanisich. 1996. New approach to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology.* **142**, 3-6.
- Jensen S., Ole B. Samuelsen, K. Andersen, L. Torkildsen, C. Lambert, G. Choquet, C. Paillard, and O. Bergh. 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Dis. Aquat. Org.* **53**, 25-31.
- Kim, J. H. and S. K. Chun. 1990. A Vibriosis occurring in cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *J. Fish Pathol.*, **3** (1), 1-9.
- Krawiec, S. and M. Riley. 1990. Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.* **54**, 502-539.
- Miranda, C. D., C. Kehrenberg, C. Ulep, S. Schwarz, and M. C. Roberts. 2003. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean Salmon farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **47**(3), 883-888.
- Parish, T. and N. G. Stoker. 2002. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* **148**, 3069-3077.
- Park, S. W. and K. H. Lee. 2005. Pathogenicity and PCR detection of *Vibrio tapetis* in Manila clams, *Ruditapes philippinarum*. *J. Fish Pathol.*, **18**(1), 39-48.
- Park, S. W., Y. G. Kim, and D. L. Choi. 1996. *Vibrio ordalii*, the causative agent of massive mortality in cultured rockfish (*Sebastes schlegeli*) larvae. *J. Fish Pathol.*, **9**(2), 137-145.
- Rheiheimer, G. 1992. Aquatic Microbiology. Wiley, London, U.K., pp. 364.
- Yang, H. C., S. S. Hong, K. H. Kim, S. H. Choi, and H. J. Chung. 1999. Distribution of *Vibrio vulnificus* in Chonnam coastal area. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**(1), 70-74.