

Bacillus anthracis와 그 유연종의 rpoB 유전자 컴퓨터 분석을 통한 동정

김규광² · 김한복^{1*}

¹호서대학교 자연과학대 생명공학과 · 호서대 기초과학연구소, ²대일외국어고등학교

Bacillus anthracis, *B. cereus*, *B. thuringiensis*를 분류하기 위해 *rpoB* 유전자 배열을 이용한 컴퓨터 분석작업을 수행하였다. 17개의 *B. anthracis*, 9개의 *B. cereus*, 7개의 *B. thuringiensis*를 database에서 구하였다. *B. anthracis*는 *rpoB* 유전자의 *in silico* 제한효소 절단에 의해, *B. cereus*, *B. thuringiensis* 2 group과 구별되었다. 그러나 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*는 제한효소 절단에 의해 구분되지는 않고, 염기배열과 Blast 탐색의 도움으로 구분이 가능하였다. 본 연구를 통해 3종류의 *Bacillus* 종을 동정할 수 있는 알고리즘이 개발되었다.

Key words □ *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, identification, *rpoB*

Bacillus 속에는 약 100여 종의 호기성 혹은 통성 혐기성의 포자를 생성하는 그람양성 간균들이 포함되어 있다(5). 대부분의 *Bacillus* 속 세균들은 토양이나 주변환경에 흔히 존재하며 대다수의 이 세균들은 비병원성이다(5). 그러나 *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*는 병원성을 띤다.

B. anthracis, *B. cereus*, *B. thuringiensis*는 매우 유사한 종으로 *Bacillus* 속 세균들의 계통수 분석에서도 가까운 위치에 나타나지만, 각각 다른 virulence 특성을 갖는다(15). *B. anthracis*는 인수 공통전염병인 탄저병의 원인균이며 생물무기로서의 잠재적 사용가능성을 갖고 있다(4). *B. cereus*는 장독소를 생성하며 식중독의 원인균으로 작용하며 때때로 안구감염을 일으킨다(5). *B. thuringiensis*는 곤충에 대한 toxin을 생산하며(15), 인간에게는 특별한 해가 없다. *B. anthracis*와 *B. cereus*의 정확한 검출과 동정, 유사한 종인 *B. thuringiensis*와의 구별은 질병 발생의 예방 및 조절에 매우 중요하며 많은 방법들이 개발되어 사용되고 있다(5, 6, 9, 15).

전통적으로는 검체에서의 탄저균 배양검사, Gram-staining, API 50 CH 등이 사용되어 왔으며 동물접종실험이나 급성 혹은 말기 환자의 혈액에서의 PA, LF antigen에 대한 antibody를 이용한 검출법(5)이 사용되기도 한다. *B. cereus*의 검출 역시 오염 검체에서의 균 배양에 기초한 방법이 사용되어 왔다. 그러나 배양 검사는 그 특징상 시간이 오래 걸리고 배양된 병원균에 의한 검사자의 감염 우려가 있으며 배양 조건에 따른 차이로 인해 오판의 소지가 높다. 특히 *B. cereus*는 *B. anthracis*와는 달리 배양시 특별한 특징을 나타내지 않아 *B. thuringiensis* 및 기타 *Bacillus* 와 오판의 소지가 있다.

Gram-staining 등의 현미경 하에서의 검사와 생화학적 성상의

조사도 세 균주의 형태학적 유사성과 비슷한 생화학적 특징으로 (5) 인해 역시 오판의 소지를 갖고 있다. 대부분의 *B. anthracis* 감염은 폐 감염시 1~5일 정도이며(피부감염은 3~10일, 장 감염은 3~7일) 발병시 높은 사망률(폐 감염시 거의 100%)을 보인다. *B. cereus* 감염도 임상형에 따라 9시간 이내에 대부분 발병(5)하기 때문에 감염이 의심될 경우 빠르고 정확한 동정이 요구되나 배양검사 및 기존의 방법으로는 시간이 오래 걸리고 오판의 소지가 높다.

분자 유전학적인 방법은 특유의 정확성과 신속성으로 인해 많은 균의 동정에 사용되고 있으며(2, 3) 특히 느린 배양 속도를 가지거나 배양이 어려운 균주, 혹은 적은 수의 균을 검출할 때 사용되며 본 연구에서는 이 방법을 *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*의 동정에 적용하고자 하였다. 독소를 coding하는 plasmid를 검출하는 방법이 개발되었으나 *B. cereus*, *B. thuringiensis* 간의 conjugation을 통한 plasmid의 전파(12, 14) 및 pXO2의 자연적 소실(13)의 문제점이 있어, chromosomal marker를 사용할 필요성이 있다(7).

Chromosomal marker로는 보편적으로 16S rRNA가 이용되나 *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*는 거의 같은 16S rRNA sequence를 가지고 있어(1) 표적으로서의 문제점을 가지고 있다. 이를 해결하기 위해 DNA-dependent RNA polymerase의 beta-subunit을 coding하는 house-keeping 유전자인 *rpoB*의 사용이 제안되었으며(7, 8, 12) real-time PCR (9)과 Multiplex PCR (6)을 이용한 방법이 각각 개발되었다. 그러나 기존의 방법이 주로 *B. anthracis*의 검출에만 초점이 맞추어져 있으며 negative signal이 떠도 *B. anthracis*의 부재만을 증명할 뿐 *B. cereus*의 감염을 detection 할 수는 없다. 이에 본 연구에서는 세 종의 *rpoB* sequence를 분석, 분자 유전학적인 특성을 조사하고 PCR-RFLP와 sequencing method를 이용하여 *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*를 신속하고 빠르게 검출, 동정할 수 있는 방법을 개발하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-41-540-5624, Fax: 82-41-548-6231
E-mail: hbkim@hoseo.edu

Table 1. *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* strains used in study

<i>B. anthracis</i> str. Ames
<i>B. anthracis</i> strain Ba Vollum
<i>B. anthracis</i> strain Ba Ames
<i>B. anthracis</i> strain Ba delta Ames
<i>B. anthracis</i> strain Ba delta UM23-1-1
<i>B. anthracis</i> strain Ba Sterne
<i>B. anthracis</i> strain Ba Texas0077
<i>B. anthracis</i> strain Ba001
<i>B. anthracis</i> strain Ba002
<i>B. anthracis</i> strain Ba044
<i>B. anthracis</i> strain BaA58
<i>B. anthracis</i> strain BaA74
<i>B. anthracis</i> strain BaA7
<i>B. anthracis</i> strain BaAC1
<i>B. anthracis</i> strain Ba7193
<i>B. anthracis</i> strain Ba8403
<i>B. anthracis</i> strain BaRA3
<i>B. cereus</i> ATCC 14579
<i>B. cereus</i> ATCC 10987
<i>B. cereus</i> E33L
<i>B. cereus</i> strain Bc776
<i>B. cereus</i> strain Bc27877
<i>B. cereus</i> strain Bc229
<i>B. cereus</i> strain Bc23261
<i>B. cereus</i> strain Bc14579
<i>B. cereus</i> strain Bc49069
<i>B. thuringiensis</i> str. AlHakam
<i>B. thuringiensis</i> strain BtT07-005
<i>B. thuringiensis</i> strain BtT07-146
<i>B. thuringiensis</i> strain BtT07-202
<i>B. thuringiensis</i> strain Bt10
<i>B. thuringiensis</i> strain Bt35646
<i>B. thuringiensis</i> strain Bt8

재료 및 방법

rpoB sequence 자료

SRS (<http://srs.ebi.ac.uk/srsbin/cgi-bin/wgetz?-page+srsq2+-noSession>; EMBL database)에서, *Bacillus anthracis* strain의 *rpoB* partial sequence 20개, *B. thuringiensis* sequence 6개를 얻었으며, NCBI GenBank에서 *B. anthracis* *rpoB* sequence 1개, *B. cereus* sequence 9, *B. thuringiensis* sequence 1개를 얻었다. Sequence들은 FASTA format, txt file로 저장하여 분석에 사용하였다.

컴퓨터 분석

MEGA version 3.1 software package (<http://www.megasoftware.net>)를 이용하여 각 종별로 정렬 작업을 수행하였으며 너무 짧아 분석에 사용될 수 없는 sequence들은 삭제하였다. 최종적으로 모든 sequence 33개(Table 1)를 모아 정렬하였으며 777 bp의 공통부위를 정돈, 재정렬하여, phylogenetic tree 제작 및 *in silico* 제한효소 절단 작업에 사용하였다.

결과 및 고찰

rpoB sequence의 정렬

각 종의 sequence를 배열한 결과 모든 strain의 *rpoB* sequence의 413 bp~1192 bp 부근에서 777 bp의 공통 부위를 얻을 수 있었다(자료 미제시). *B. anthracis* strain 17개는 높은 상동성(99.5%)을 보였고 *B. cereus* 9개 strain에선 97.29%의 상동성을, *B. thuringiensis* 7개 strain에서는 98.07%의 상동성을 보였다. 전체 균주의 sequence를 모아 정렬한 결과 95.11%의 상동성을 나타내었다(자료 미제시). 정렬된 sequence들은 계통수 제작 및 기타 분석에 사용되었다.

Phylogenetic tree의 제조

MEGA version 3.1 software package를 사용하여 phylogenetic



Fig. 1. Phylogenetic tree based on partial *rpoB* sequences of the strains. Neighbor-joining method with K2P distance correction model was chosen. Bar represents 0.001% nucleotide sequence difference.

tree를 작성하였으며 neighbor-joining method와 K2P distance correction model을 사용하였고 bootstrap value를 고려하여 작성하였다(Fig. 1). *B. anthracis* strain들은 99%의 bootstrap value로 분리되었으며 *B. cereus*와 *B. thuringiensis* strain들은 상호간 구분되지 않았다.

In silico 제한효소에 의한 절단

정돈된 sequence에서 gap을 제거한 후 Web site program(<http://biotools.umassmed.edu/tacg/WWWtacg.php>)를 사용하여 제한효소 자리를 검색하였으며 *B. anthracis*에서는 19개, *B. cereus*에서는 22개, *B. thuringiensis*에서는 20개의 제한효소가 검색되었다(자료 미제시). 검색된 제한효소의 인식서열은 NEB 사 homepage (<http://www.neb.com/nebecomm/default.asp>)에서 조사하여 MEGA software의 'search motif' function으로 정확한 위치를 조사하여 유용한 효소를 선별하였다. 조사 결과 *B. thuringiensis*와 *B. cereus* sequence는 모두 *Bam*HI digestion (5'-GGATCC-3')으로 473 bp, 304 bp의 두 fragment로 나뉘었다. 그러나 *B. anthracis* sequence는 *Bam*HI 인식서열이 검색되지 않았다(Fig. 2). *B. thuringiensis*와 *B. cereus* sequence에서는 거의 같은 제한효소자리가 검색되어, 제한효소의 사용으로는 구별할 수 없었다.

BLAST 검색

검체에서 직접 DNA를 추출할 경우 주변 환경에 흔히 존재하는 세균에 의한 검체의 오염이 있을 수 있다. 이에 대한 false signal의 발생 가능성을 확인하기 위해 각 종별로 임의의 sequence를 선택, NCBI homepage의 BLAST를 사용하여 유사 sequence를 검색하였다. 검색 결과 신뢰할 만한 e-value와 예측된 strain들이 나타났으며 *B. subtilis* 등의 오염 가능 균주들은 검색되지 않았다(Table 2). 또한 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*가 구분되어 PCR 이후 sequencing을 통해 RFLP method로 동정되지 않는 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*를 동정할 수 있음을 보여 준다.

B. anthracis, *B. cereus*는 임상적으로 중요한 균종이며 유사균주인 *B. thuringiensis*와의 유사성으로 인해 이들 세 균종을 동정하는 문제는 오래 전부터 제기되어 왔으며 여러 방법이 개발되었으나 검출에 걸리는 시간, 정확성, 특정 균주만이 가능함 등 여러 문제점을 나타내었다. 이에 본 연구에서는 균의 분리배양 및 기존의 방법으로 생길 수 있는 각종 위험성 및 오류 발생 가능성을 피하기 위해 chromosomal marker로 *rpoB*를 이용한 분자 유전학적인 방법으로 세 균종을 신속하고 정확히 동정하고자 하였다(Fig. 3). PCR에 기초한 이 방법은 분리배양이 필요 없어 시간을 단축할 수 있고 적은 수의 spore 및 세균도 검출이 되며 specific region을 조사함으로써 false signal의 발생 가능성이 적

Table 2. List of detected strains after BLAST search

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<i>B. anthracis</i>						
AF205335.1	Bacillus anthracis strain Ba RA3 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	1435	1435	100%	0.0	100%
AF205334.1	Bacillus anthracis strain Ba 8403 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	1435	1435	100%	0.0	100%
AF205350.1	Bacillus sp. Ba813-9594/3 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	1430	1430	100%	0.0	99%
AF205329.1	Bacillus anthracis strain Ba A74 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	1430	1430	100%	0.0	99%
<i>B. cereus</i>						
AF205341.1	Bacillus cereus strain Bc 776 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	1435	1435	100%	0.0	100%
AF205338.1	Bacillus cereus strain Bc 27877 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	1435	1435	100%	0.0	100%
AF205352.1	Bacillus sp. Ba813-IB/A RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	1430	1430	100%	0.0	99%
AF205342.1	Bacillus cereus strain Bc 23261 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	1430	1430	100%	0.0	99%
<i>B. thuringiensis</i>						
AF205346.1	Bacillus thuringiensis strain Bt T07-202 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	1428	1428	100%	0.0	99%
AF205345.1	Bacillus thuringiensis strain Bt T07-146 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds	1428	1428	100%	0.0	99%

	TAG TAG ATC CAG AAA CTG GTG AAA TTT TAG CGG CAG AAG GAA CAA TCT TAG ATC GTC GTA
# <i>B._anthracis_str_Ames</i>	
# <i>B._anthracis_strain_Ba_Vollum</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_Ames</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_delta_Ames</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_delta_UM23-1-1</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_Sterne</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_Texas_0077</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_001</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_002</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_044</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_A58</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_A74</i>	...T...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_A7</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_AC1</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_7193</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_8403</i>	...
# <i>B._anthracis_strain_Ba_RA3</i>	...
# <i>B._cereus_ATCC_14579</i>	... <u>G</u> ...
# <i>B._cereus_ATCC_10987</i>	...G...
# <i>B._cereus_E33L</i>	...G...
# <i>B._cereus_strain_Bc_776</i>	...G...
# <i>B._cereus_strain_Bc_27877</i>	...G...
# <i>B._cereus_strain_Bc_229</i>	...G...
# <i>B._cereus_strain_Bc_23261</i>	...G...
# <i>B._cereus_strain_Bc_14579</i>	...G...
# <i>B._cereus_strain_Bc_49069</i>	...G...
# <i>B._thuringiensis_str_Al_Hakam</i>	...G...
# <i>B._thuringiensis_strain_Bt_T07-005</i>	...G...G...
# <i>B._thuringiensis_strain_Bt_T07-146</i>	...G...
# <i>B._thuringiensis_strain_Bt_T07-202</i>	...G...
# <i>B._thuringiensis_strain_Bt_10</i>	...G...
# <i>B._thuringiensis_strain_Bt_35646</i>	...G...
# <i>B._thuringiensis_strain_Bt_8</i>	...G...

*Bam*HI digestion

Fig. 2. Partial sequences of *rpoB* showing the restriction sites in *B. cereus* and *B. thuringiensis*. *Bam*HI site is underlined.

어 빠른 시간 안에 정확한 검사가 가능하며 이는 짧은 잠복기와 발병 시 높은 사망률을 보이는 *B. anthracis*의 동정에 대해 적합한 방법이다. 또한 주변에 상재해 배양 시 상호 오염 가능성이 있고 특별한 배양 특징을 나타내지 않으며 비슷한 생화학적 특성상을 가진 *B. cereus*와 *B. thuringiensis*의 검출 및 분리, 동정에도 유용하다.

임의의 검체에서 DNA를 준비하고 PCR-RFLP, sequencing까지는 사용하는 방법이나 장비로 인한 차이가 있지만 non-stop으로 진행시 최소 1일 이내에 sequence를 얻을 수 있으며 비감염, *B. anthracis* 감염, *B. cereus* 감염, *B. thuringiensis*의 검출이라는 4개의 가능한 결과가 모두 1일 안에 나올 수 있다. 다른 두 균주에 비해 특히 신속한 동정이 요구되는 *B. anthracis*의 경우 최소 5시간 30분이 예상되며(DNA 시료준비 1시간+PCR 2시간+RFLP

2시간+확인 30분) *B. anthracis* 감염시 최단 잠복기인 1일 이내에 *B. anthracis*의 감염 혹은 검체에서의 존재 여부를 알 수 있다. *B. cereus*와 *B. thuringiensis* 두 균주의 존재 여부도 5시간 30분 정도에 판명되며 두 균주의 정확한 동정은 sequencing 후인 약 1일 경과 후에 가능할 것으로 사료된다.

본 연구에서 개발된 방법은 *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* 세 유사균종의 신속하고 정확한 동시 동정이 가능하며 real-time PCR이나 기타 방법과의 결합을 통해 더 높은 정확도와 속도를 기대할 수 있다.

참고문헌

1. Ash, C., J.A.E. Farrow, M. Dorsch, E. Stackebrandt, and M.D.

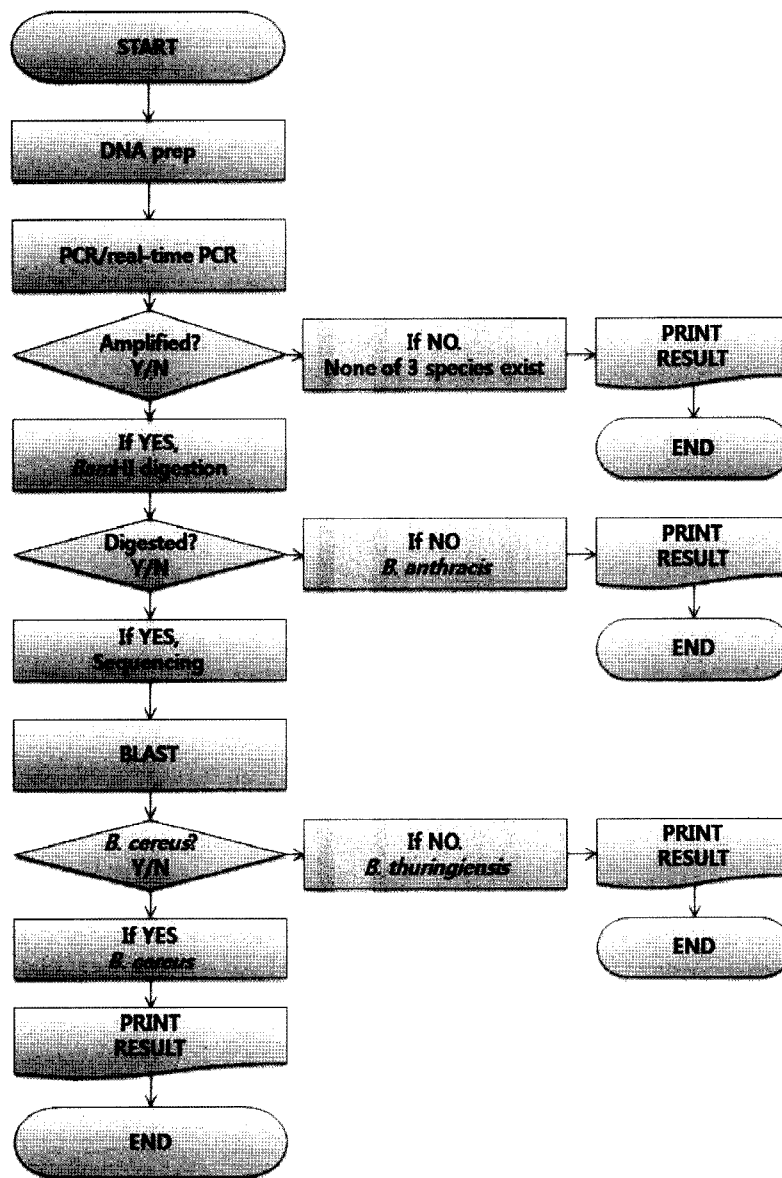


Fig. 3. Flow chart of developed identification method.

- Collins. 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 343-346.
- Drancourt, M., A. Carlioz, and D. Raoult. 2001. *rpoB* sequence analysis of cultured *Tropheryma whippelii*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2425-2430.
 - Drancourt, M. and D. Raoult. 2002. *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1333-1338.
 - Ingleby, T.V., T. O'Toole, D.A. Henderson, J.G. Barlett, M.S. Ascher, E. Eitzen, A.M. Friedlander, J. Gergerding, J. Hauer, J. McDade, M.T. Osterholm, G. Parker, T.M. Perl, P.K. Russel, and K. Tonat. 2002. Anthrax as a biological weapon, 2002. *JAMA* 287, 2236-2252.
 - Korea Society for Medical Microbiology. 2004. Medical Microbiology. 3rd ed.
 - Ko, K.S., J.M. Kim, B.Y. Jung, W. Kim, I.J. Kim, and Y.H. Kook. 2003. Identification of *Bacillus anthracis* by sequence analysis and multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2908-2914.
 - Lee, S.H., B.J. Kim, J.H. Kim, K.H. Park, S.J. Kim, and Y.H. Kook. 2000. Differentiation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato on the basis of RNA polymerase gene (*rpoB*) sequences. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2557-2562.
 - Mollet, C., M. Drancourt, and D. Raoult. 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* 26, 1005-1011.
 - Qi, Y., G. Patra, X. Liang, L.E. Williams, S. Rose, R.J. Redkar, and V.G. Del Vecchio. 2001. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3720-3727.
 - Rasko, D.A., M.R. Altherr, C.S. Han, and J. Ravel. 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 303-329.
 - Renesto, P., J. Gouvernet, M. Drancourt, V. Roux, and D. Raoult. 2001. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 39, 430-437.

12. Sabelnikov, A.G and L.V. Ulyashova. 1990. Plasmid transformation of *Bacillus cereus* on cellophane membrane. *FEMS Microbiol. Lett.* 72, 123-126.
13. Turnbull, P.C., R.A. Huston, M.J. Ward, M.N. Jones, C.P. Quinn, N.J. Finnie, C.J. Duggleby, J.M. Kramer, and J. Melling. 1992. *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 21-28.
14. Wicks, A., N. Jayaswal, D. Lereclus, and L. Andrup. 1998. Characterization of plasmid pAW63, a second self-transformable plasmid in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73. *Microbiology* 144, 1263-1270.
15. Zhong, W., Y. Shou, T.M. Yoshida, and B.L. Marrone. 2007. Differentiation of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* by using pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3446-3449.

(Received December 8, 2008/Accepted December 22, 2008)

ABSTRACT : Identification Based on Computational Analysis of *rpoB* Sequence of *Bacillus anthracis* and Closely Related Species

Kyu Kwang Kim² and Han Bok Kim^{1*} (¹Department of Biotechnology, The Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 336-795, Republic of Korea, ²Daeil Foreign High School, Seoul 136-100, Republic of Korea)

Computational analysis of partial *rpoB* gene sequence (777 bp) was done in this study to identify *B. anthracis* and its closely related species *B. cereus* and *B. thuringiensis*. Sequence data including 17 *B. anthracis* strains, 9 *B. cereus* strains, and 7 *B. thuringiensis* strains were obtained by searching databases. Those sequences were aligned and used for other computational analysis. *B. anthracis* strains were identified by *in silico* restriction enzyme digestion. *B. cereus* and *B. thuringiensis* were not segregated by this method. Those sequencing and BLAST search were required to distinguish the two. In actual identification tests, *B. anthracis* strains could be identified by PCR-RFLP, and *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains were distinguished by BLAST search with reliable e-value. In this study fast and accurate method for identifying three *Bacillus* species, and flow chart of identification were developed.