

PCR에 의한 *Nocardia seriolae*의 검출

박명애 · 조미영 · 김명석 · 김재훈* · 이덕찬†
국립수산과학원 병리연구과, *국립수산물품질검사원 강릉지원

Identification of *Nocardia seriolae* by polymerase chain reaction

Myoung Ae Park, Mi Young Cho, Myoung Sug Kim, Jae Hoon Kim*
and Deok Chan Lee†

Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI), Busan 619-902, Korea
*Gangreung branch office, National Fisheries Products Inspection Service (NFIS), Gangreung, 210-800, Korea

A method for the identification of *Nocardia seriolae*, the causative agent of nocardiosis in cultured fishes, using PCR was developed in the study. A PCR primer set specific to *N. seriolae* was designed based on 16S-23S rRNA sequence of various *Nocardia* species accessed in GenBank. Designed PCR primer set, Nseri-F (5'-GCA AAC TCT TCG AAC AGT CG-3') and Nseri-R (5'-GGA TAT CAG GAC TTA CCG GC-3'), amplifies the target regions of *N. seriolae* only, but not 4 other *Nocardia* species, *N. asteroides*, *N. crassostreae*, *N. farcinica* and *N. salmonicida*.

Key words: *Nocardia seriolae*, Nocardiaceae, PCR, primer

*Nocardia*는 기중균사 (aerial hyphae)를 형성하는 간균 또는 구균상의 세균으로, Gram-positive, weakly acid-fast, aerobic, non-motile의 특징을 가진다 (Inglis *et al.*, 1993). *Nocardia* sp.는 인간, 개, 고양이, 소 및 염소 등에서 주로 분리되었고, 수생생물에서 *Nocardia* sp.에 의한 감염은 어류뿐만 아니라 굴 등의 무척추 동물과 고래류나 바다사자 등의 수산포유동물에서도 알려져 있다 (Beaman and Beaman, 1994; Lee *et al.*, 2007). 담수어에 *N. asteroides*와 *Nocardia* sp.가 주로 알려져 있으며, 최근 국내에서 *Nocardia* sp.가 보고되었다 (Park *et al.*, 2005). 뿐만 아니라 중국의 가물치 양어장으로부터 *N. seriolae*가 검출 (Wang *et al.*, 2007) 되었는데, 이러한 보고들을 종합하면 *Nocardia* sp.에 의한 질병이 담수어나 해수어 모두에서 일어날 수 있다는 것으로 판단된다.

Nocardiaceae에 포함된 세균 균은 성장이 느리며, 어류에서 그 증상이 육안적으로 확인되고 폐사가 발생할 때에는 이미 어류의 내부 장기에 상당수의 결절이 형성된 상황으로, 이 질병을 예방하고 대처하기 위하여 신속한 동정은 필수적이다. 그러나 *N. seriolae*의 특이 primer에 대한 보고는 없으며, 단지 방선균목 (Order Actinomycetales), 방선균과 (Family Actinomycetaceae)에 포함되는 *Mycobacterium* sp. 또는 인체 감염 가능성이 있는 세균 균과의 비교 분석을 위하여 인간 질병 중심의 연구가 있었을 뿐이다 (Laurent *et al.*, 1999; Kono *et al.*, 2002).

본 연구에서는 해산어 및 담수어에 나타날 수 있는 *N. seriolae*를 신속히 검출하기 위하여 GenBak Accession *N. seriolae*와 *Nocardia* spp.를 임의로 선택하여 16S-23S rRNA 영역을 비교분

†Corresponding Author : Deok Chan Lee, Tel : 051-720-2487
Fax : 051-720-2498, E-mail : chani-lee@nfrdi.go.kr

석하여 특이 primer를 제작하고, Family Nocardiaceae에서 *N. seriolae*의 검출능력을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 *N. seriolae* ATCC43993 (synonym *N. seriolae* JCM3307; yellow-tail, *Seriola quinqueradiata*에서 분리), *Nocardia asteroides* ATCC19247, *N. crasostreae* ATCC700418 (Pacific oyster, *Crassostrea gigas*에서 분리), *N. farcinica* ATCC3318 및 *N. salmonicida* ATCC27463 (blueback salmon, *Oncorhynchus nerca*에서 분리) 등의 5균주를 사용하였다.

Primers

본 실험에 사용한 primer와 PCR 조건은 Table 1에서와 같다. 각각의 참조 및 실험용 primer는 Bioneer (Korea)에 의뢰하였으며, *N. seriolae*를 특이적으로 검출하기 위한 primer는 GenBank에 등록된 *Nocardia* spp.의 16S-23S rRNA 부분을 비교분석하여 Nseri-F와 Nseri-R을 제작하였으며 그 크기는 258bp 이었다 (Fig. 1).

DNA 분리 및 PCR amplification

실험균주들을 BHIA에 접종하여 27°C에서 3-5일간 배양한 후 4°C, 10,000×g로 10분간 원심분리하여 균체를 획득하였다. 실험균주들의 genomic DNA 추출은 High pure PCR templet preparation kit (Roche, Germany) 를 사용하여 Jung *et al.* (2004)의 방법에 따라 분리한 후 100µl의 DNA elution buffer에 녹여 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다. PCR 반응은 Accupower PCR premix (Bioneer, Korea)를 사용하였고, PCR primer와 반응조건은 Table 1에서와 같았다. 본 연구의 test primer인 Nseri-F (5'-GCA AAC TCT TCG AAC AGT CG-3')과 Nseri-R (5'-GGA TAT CAG GAC

TTA CCG GC-3')의 반응 조건은 predenaturation (95°C, 5분)한 후 denaturation (95°C, 30초), annealing (60°C, 30초), extension (72°C, 40초)의 주기를 30 cycles로 반복하고 final extension (72°C, 7분)을 하였다. PCR은 PTC-220 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., USA)를 사용하여 행하였고, PCR 생성물은 0.5 µg/ml EtBr이 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동한 후 image system (GB/GeneGenius Super 12, SynGene)으로 최종생성물을 확인하였다.

결과 및 고찰

Nocardiaceae에 포함되는 균 균은 인간을 포함한 육상동물 뿐만 아니라 고래류나 바다사자류를 포함한 수생 포유류, 그리고 어류와 무척추동물에도 질병을 유발하며 그 종이 다양하다 (Lee *et al.*, 2007). 해산어 만이 대상 숙주인 것으로 보고되었던 *N. seriolae*가 담수 양식어류인 가물치에서도 보고되어 담수나 해산어를 대상으로 한 더욱 정밀한 조사법이 필요한 시점이다 (Wang *et al.*, 2007). 뿐만 아니라 국내 가물치에서 최초 보고된 *Nocardia* sp. (Park *et al.*, 2005)는 역학조사 결과, 생사료용 어류가 감염원일 가능성이 있는 것으로 파악되었으므로 예방적 차원에서 Nocardiaceae에서 종간 구분을 하는 것은 매우 중요하다.

NG1과 NG2는 *Nocardia* species의 종간 유사 유전자 영역을 나타내는 16S rRNA gene에 위치하고 있으므로 *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp., *Gordona* sp., *Tsakamurella* spp. 및 *Mycobacterium* spp. 등과 비교하여 *Nocardia* sp.를 특이적으로 검출할 수는 있으나 Family Nocariaceae에 포함되는 균종 간의 세부 동정은 어려우며 (Laurent *et al.*, 1999), Noca-f와 Naca-r primer에 의하여 *N. seriolae*를 특이적으로 검출할 수 있다고 하였으나, PCR에 의하여 *N. seriolae*와 비교한 대상 균주가 *Lactococcus garviae*, *Photobacterium damsela* 및 *Mycobacterium* sp. 이었으므로 특이

Table 1. Primers used in this study

Primer set	Sequence	Size (bp)	Position	PCR condition	References
NG1	5'-ACC GAC CAC AAG GGG G-3'	596	16S rRNA	94°C (1 min)-94°C (1 min)-	Laurent <i>et al.</i> , 1999
NG2	5'-GGT TGT AAC CTC TTC GA-3'			55°C (20sec)-72°C (1 min)- 72°C (10min), 30cycles	
Reference					
Noca-f	5'-GTT ATG TGT GAT AGA CCG CAG TC-3'	383	16S-23S	94°C (5min)-94°C (1min)-	Kono <i>et al.</i> , 2002
Noca-r	5'-TTC TTC AAA AGG CAC GCC ATC ACC-3'			55°C (2min)-74°C (4min)- 74°C (5min), 30cycles	
Test					
Nseri-F	5'-GCA AAC TCT TCG AAC AGT CG-3'	258	rRNA	95°C (5min)-95°C (30sec)-	
Nseri-R	5'-GGA TAT CAG GAC TTA CCG GC-3'			60°C (30sec)-72°C (40sec)- 72°C (7min), 30cycles	

Nseri-F

N. seriolae(AF536475)	AAGGGGCACCTTCTAAGCAA- ACTCTTCGAAACA ---GTCGAA-TGATGTTGCGTCAGAGAC	55
N. seriolae(AB060282)A.....	55
N. veterana(AF536490)A.....C.AACGCT.GTGC.AC.....GT.GT-GTCGAGGTT.G.....C.	54
N. vaccinii(AF536489)A.....T.....G.....G.....	54
N. uniformis(AF536488)A.....CG.....AC.....GT.....GAA.....	56
N. transvalensis(AF536486)A.....C.A.G---.G.CC...G---.GG-A.C...T.G.....	54
N. salmonicida(AF536473)A.....A.....C.AGCC--.AT.C.C...CAG.T.GT-GAG.G.-T.G.....	56
N. pseudobrasiliensis(AF536471)A.....G.A.TGCT.G..G..T.G---.TG-GCTGAGA.T.C.....C.	54
N. paucivorans(AF536470)A.....C..GTCGGGGT.C.....GG-GCCGCCGT.G.....	54
N. otitidiscaviarum(AF536469)A.....C.AGTGAG.GTC.....G-ATCGC..CT.G.....	55
N. nova(AF536464)A.....C.AGGC-.TG.CAAC.CAG---.T.G.-A.T...CT.G.....	55
N. globerula(AF536454)A.....C.TTTCGCT.G.CG.AC---.GT.TG-GTTGAGGAAAG...G.	54
N. flavorosea(AF536450)A.....C.ATGCCGGCT---.G---.GTACCG...T.G.....	53
N. cyriaciageorgica(AF536432)A.....G.A.TGCT.G.....G---.GCCGAGA.T.C.....C.	54
N. seriolae(AF536475)	CGTTTCGGACTCATACGTAGTCCGGCGGACGCTCATGGGTGGAAACTGACAACCT-TCA	114
N. seriolae(AB060282)GC..AT.TT.C.GA.T..G.AA.T.....G.....G..C.TC	113
N. veterana(AF536490)A.TC...C.T...GG.T...T.....G...G..G---	112
N. vaccinii(AF536489)A.TC...T...GG.T.....	114
N. uniformis(AF536488)A.G...T...CT.....A.....G...G..GGT...-	113
N. transvalensis(AF536486)A.....C...T...G.....T.GA.....G.....AT...T	115
N. salmonicida(AF536473)	GC..AT.TT.C.GA.T..G.AA.T.....G.....	111
N. pseudobrasiliensis(AF536471)	..AC.A..AG.C.GA.T..G..T...T..A.....G...G..TGTG-C-	112
N. paucivorans(AF536470)A.....C.T.....T..A.....G.....GT.....	114
N. otitidiscaviarum(AF536469)A.....C...C.T...G.....A.....TG.G-C-	113
N. nova(AF536464)A...TT.C.G..T..G.AA..T..TT.....G.....A...C	112
N. globerula(AF536454)A.....AG.GA.T..TT...AT..TT.....G...G...-C.	112
N. flavorosea(AF536450)	GC..AT.TT.C.GA.T..G.AA.T.....G.....GT...-	112
N. cyriaciageorgica(AF536432)GC..AT.TT.C.GA.T..G.AA.T.....G.....GT...-	112
N. seriolae(AF536475)	TCGCACTCGATCGGTACTC-AGTGACC-GGTCGGGTG---GATATA-CCGACACACTAT	168
N. seriolae(AB060282)TT.AACGCT...C...AGTG.CT--.C.G.AA--T.....G.	167
N. veterana(AF536490)TTCACGGTC.AGG..-TGTCTT-C.G.TGC.GT---T.....	166
N. vaccinii(AF536489)GAAAC.AG...GTCTT-.T..CGC.GT---T.....	167
N. uniformis(AF536488)TCATGGTTCGGGC.G...CCGG-.A.....T.....G.	168
N. transvalensis(AF536486)TCATGGT.TCGGCTC...CCGA-TA.....-T.....G.	170
N. salmonicida(AF536473)T.....C...GGTG.CT---T.....T.....G.	164
N. pseudobrasiliensis(AF536471)A.GT.TCGGTT.CT...G.TG.GGT-.C..GT.G...G..GT...G.	168
N. paucivorans(AF536470)TCATG.TC.GT.CTC..C.GT.-.AG---A...T.....G.	169
N. otitidiscaviarum(AF536469)ACGAT.CC...AG.C.G...CTT-C.GGTT.C.G---.G..AT.....G.	169
N. nova(AF536464)T.ACG..A.AT.A-TGAT--T.C..GC.A.TGCA...T...T...G.	168
N. globerula(AF536454)ATT.AT.GCT.AGG..T...TCT...T.T...T.A.....G.	167
N. flavorosea(AF536450)A...TCATGGTC.AGG.TG.TGTC.TC.....-A.....-T.....G.	168
N. cyriaciageorgica(AF536432)A...TCATGGTC.AGG.TG.TGTC.TC.....-A.....-T.....G.	168
N. seriolae(AF536475)	TGGGTCTGAAAGAACAGACGACAGTCTTTCTTCCAGGCAA-AAAA--CGATCTGCTC	224
N. seriolae(AB060282)GACG-----G.TA...CAA.G.T	218
N. veterana(AF536490)G.....CGA.A..	215
N. vaccinii(AF536489)CG...GG...TG.AT..TC..CAA...C...	227
N. uniformis(AF536488)CG..T-----T...A.TC.....C..C.	219
N. transvalensis(AF536486)CG..G---.G...TG.CA.G--.T...CT.C.	222
N. salmonicida(AF536473)CG...---.CT..CITTCCAGG--.G.AA..GATCTGC.	219
N. pseudobrasiliensis(AF536471)T-----GA..T.....C.-.	218
N. paucivorans(AF536470)T-----A.....	218
N. otitidiscaviarum(AF536469)T-----TA..CT...	220
N. nova(AF536464)G.....TG...GT..C.TC.AAGG--GTAA...CAACGCT	221
N. globerula(AF536454)G..T-----TA..C--T...C...G.	218
N. flavorosea(AF536450)GACG-----TA...C...	219
N. cyriaciageorgica(AF536432)GACG-----TA...C...	219
N. seriolae(AF536475)	GGATCTTCTGAG-AAACTG-CTGGCT-----G TGCCG-G---TAAG	259
N. seriolae(AB060282)TTC..CG.GTGT.C.T..C.-.G..A.T-----T.TTCCGGGTG.	257
N. veterana(AF536490)	TTC.TCG.G.TT-.T..C.-.A..GA-----T.C..TG---CTG.	251
N. vaccinii(AF536489)T..C.-.C.A.AACGGAAG-----T..T..A---TG.	269
N. uniformis(AF536488)C.A.T.-.T..C.-.G..AATTGAGTT-----TT.CGT---CTG.	260
N. transvalensis(AF536486)T..C.-.C.-.C.-.C.ACTTG-----T..A.....G.	260
N. salmonicida(AF536473)	C.GATCC..TG-.T..C...T.T-----T.CCAGT.CG.	255
N. pseudobrasiliensis(AF536471)CGGTG--.T..C.G.CTCGGTTCCICCCGT--GGGGAG.G.TT.G.GTGTG.	274
N. paucivorans(AF536470)G.CGA.T...C...C-----TT-----CT.CG...G.	252
N. otitidiscaviarum(AF536469)T-----T.....	255
N. nova(AF536464)AT-GTG.GTC.T..C.-.G.AG.TGCGATGGTTTCGATCATT..TTCTTCGGGTG.	279
N. globerula(AF536454)C.GTTC-.T..C.-.G..AGCTTCTTC-----GGGAGT...G---CTG.	265
N. flavorosea(AF536450)G.TTAGT..C.-.A.AGCT-----TGCTCTGGCCG.	257
N. cyriaciageorgica(AF536432)G.TTAGT..C.-.A.AGCT-----TGCTCTGGCCG.	257

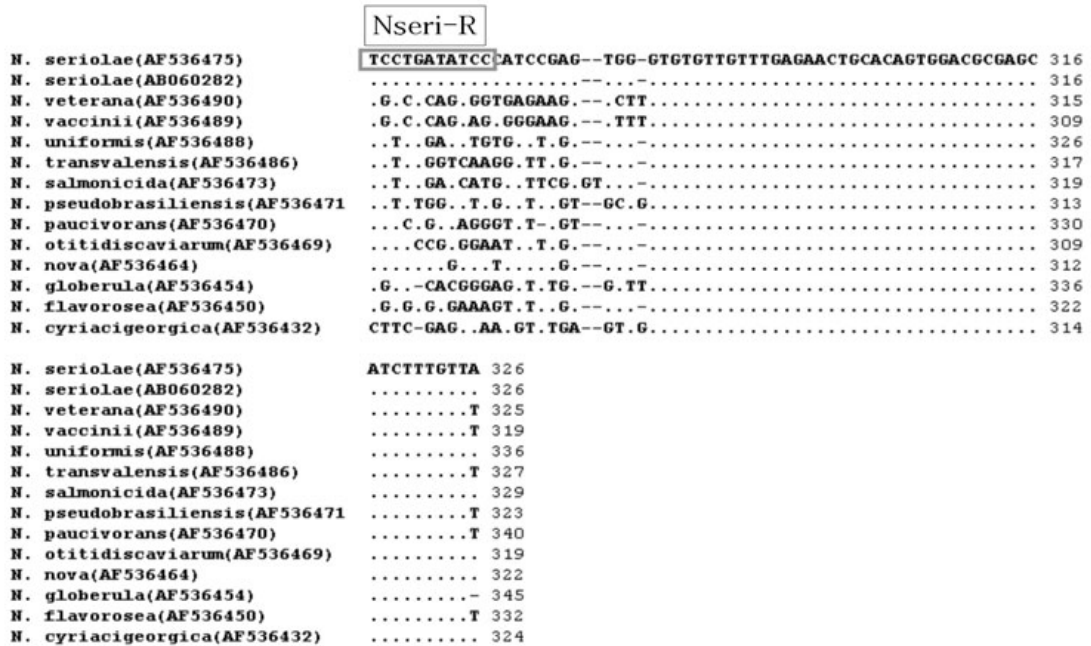


Fig. 1. Alignment of representative 16S-23S rRNA sequence of *Nocardia* species (with GenBank accession number). Forward and reverse primer used in the species-specific PCR detection are boxed.

성이 높지 않은 것으로 판단된다 (Kono *et al.*, 2002). 본 연구에서도 NG1과 NG2를 이용한 검출 실험에서 참조균주 5균주 모두에서 596bp 크기의 산물이 생성되었으며, Noca-f와 Noca-r을 이용한 검출 실험에서는 종에 따라 200~1,800bp 크기의 PCR 산물 band가 사다리형으로 분포하는 것이 확인되어 *N. seriolae*의 검출에는 적합하지 못하였다 (결과 나타내지 않음). 이러한 결과들에서 현재까지 알려진 *Nocardia* species와 관련하여 제작된 primers는 Laurent *et al.* (1999)의 경우처럼 방선균목 (Order Actinomycetales)이나 방선균과 (Family Actinomycetaceae)에 포함되는 균주와 이 group에 속하면서 형태학적으로 유사한 균종인 *Mycobacterium* sp.를 비교 검출하기 위한 실험이거나, Kono *et al.* (2002)의 경우에서와 같이 비교적 분자생물학적 유연성이면 균주를 대상으로 *Nocardia* sp.를 신속 진단하기 위한 것으로, 어류에 감염되는 특이 병원체의 검출에는 적합하지 않은 것으로 판단된다.

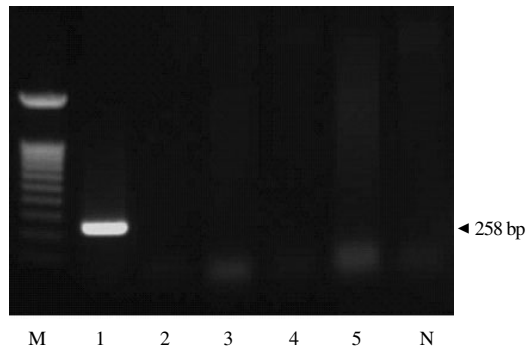


Fig. 2. PCR products of *Nocardia* spp. by using primers Nseri-F and Nseri-R. M, 100-bp DNA ladder (Bioneer); Lane: 1, *N. seriolae* ATCC43993; 2, *N. asteroides* ATCC19247; 3, *N. crassostreae* ATCC700418; 4, *N. farcinica* ATCC3318; 5, *N. salmonicida* ATCC27463; N, negative control. bp, base pairs.

본 연구에 사용한 Nseri-F와 Nseri-R primer는 *N. seriolae*의 16S-23S rRNA 부위에 위치한 영역으로 여러 종의 *Nocardia* spp.와 비교할 때 PCR 검출 특이성이 매우 높을 것으로 예상되었다. 실제로 이 primer를 이용하여 동물 (*N. asteroides*

와 *N. farcinica*), 어류 (*N. asteroides*, *N. salmonicida* 및 *N. seriolae*) 뿐만 아니라 무척추동물 (*N. crassostreae*) 등에 감염되는 원인체들에 대하여 실험한 결과 *N. seriolae*의 특이적 검출이 가능하였다 (Fig. 2).

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 (양식생물 질병 모니터링 및 역학 연구, RP-2009-AQ-012)의 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고 문헌

- Beaman, B. and L. Beaman: *Nocardia* species: Host-Parasite relationships. Clin. Microbiol. Rev., 7: 213-264, 1994.
- Inglis, V., R.J. Roberts and N.R. Bromage: Acid-fast pathogens (Part 7). In Bacterial diseases of fish. pp. 217-233. Blackwell Science Ltd., USA, 1993.
- Jung, Y.U., B.J. Kang, G.T. Park and M.S. Heo: Use of 16S-23S rRNA intergenic spacer region for identification in the fish pathogenic *Streptococcus iniae*. J. Fish Pathol., 17: 91-98, 2004 (In Korean with English abstract).
- Kono, T., T. Ooyama, S.C. Chen and M. Sakai: Sequencing of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer and its application in the identification of *Nocardia seriolae* by polymerase chain reaction. Aquaculture Res., 33: 1195-1197, 2002.
- Laurent, F.J., F. Provost and P. Boiron: Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. J. Clin. Microbiol., 37: 99-102, 1999.
- Lee, D.C., M.Y. Cho and S.I. Park: A review of nocardial infection in fishes. J. Fish Pathol., 20: 1-23, 2007 (In Korean with English abstract).
- Park, M.A., D.C. Lee, M.Y. Cho, H.J. Choi and J.W. Kim: Mass mortality caused by nocardial infection in cultured Snakehead, *Channa arga* in Korea. J. Fish Pathol., 18: 157-165, 2005 (In Korean with English abstract).
- Wang, G.L., Y.J. Xu, S. Jin, J.L. Zhu and S.P. Yuan: Nocardiosis in snakehead, *Ophiocephalus argus* Cantor. Aquaculture, 271: 54-60, 2007.

Manuscript Received : December 17, 2008

Revision Accepted : February 26, 2009

Responsible Editorial Member : Lee, Je-Hee
(JeJu National University)