

해수에서 urease 양성 *Photobacterium* sp. Strain HA-2의 분리 및 동정

김강진·노아름·박권삼*

군산대학교 식품생명공학과

Isolation and Identification of Urease-Positive *Photobacterium* sp. Strain HA-2 from Sea Water

Kang-Jin Kim, A-Reum No and Kwon-Sam Park*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University,
Kunsan 573-701, Korea

A urease-positive bacterium isolated from sea water was identified as *Photobacterium* sp. by morphological, biochemical, and 16s rRNA gene analyses and named *Photobacterium* sp. strain HA-2. 2.0-fold increase enzyme activity was observed in LB medium containing 3% NaCl and 0.1% urea or not and the enzyme activity was 16.0-fold lower compared to urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* AQ4673 strain when grown in the LB medium containing 3% NaCl with 0.1% urea. The cloning and sequencing of *Photobacterium* sp. strain HA-2 urease gene cluster is currently being analyzed in our laboratory.

Key words: *Photobacterium* sp., Urease, *ureC* gene, Cloning

서 론

Urease (EC 3.5.1.5)는 요소를 암모니아와 이산화탄소로 분해하는 효소로 식물, 세균, 진균 및 조류 등에 존재 한다고 보고되어 있다 (Mobley et al., 1995). 세균에서 urease 유전자의 염기서열은 1989년 요로감염의 원인세균인 *Proteus mirabilis* (Jones and Mobley, 1989)에서 처음으로 밝혀진 이래 *Klebsiella aerogenes* (Mulrooney and Hausinger, 1990), *Helicobacter pylori* (Labigne et al., 1991), *Yersinia enterocolitica* (De Koning-Ward et al., 1994), *Streptococcus salivarius* (Chen et al., 1996), *Vibrio parahaemolyticus* (Park et al., 2000) 등 다수의 세균에서 보고되었다. 세균에서 보고된 urease 유전자는 보통 7개 이상의 유전자로 구성되어 있으나 유전자의 구조적 배열은 매우 유사한 형태이다 (Mobley et al., 1995). Urease는 효소 활성에 중심 역할을 담당하는 구조단백질 (UreA, UreB 및 UreC)과 구조단백질에 Ni^{2+} 를 운반 및 조합을 담당하는 보조단백질 (UreD, UreE, UreF 및 UreG)로 나뉜다. 일부 세균에서는 특이적으로 urease 유전자의 전사를 조절하는 전사조절단백질인 UreR (Nicholson et al., 1993; Park et al., 2000) 및 세포내로 Ni^{2+} 를 운반하는 NixA과 UreH 등의 보조단백질도 보고되어 있다 (Mobley et al., 1995; Maeda et al., 1994). Urease 유전자의 발현에는 몇가지 메커니즘이 보고되어 있다. 예를 들어, *K. aerogenes*는 질소원이 제한된 조건에서 발현되며 (Macaluso et al., 1990), *P. mirabilis*와 *V. parahaemolyticus*는 기질인 urea가 존재하는 조건에서 발현이 유도되며 (Nicholson et al., 1993; Park et al., 2000), *S. salivarius*는 pH에 의해 발현이

조절된다 (Sissons et al., 1990). 일반적으로 세균 유래의 urease는 병원성에 직, 간접적으로 관여한다 (Mobley et al., 1995). Urease 양성의 해양세균에는 *V. parahaemolyticus*와 *V. fischeri*가 보고되어 있다. *V. parahaemolyticus*의 urease gene cluster는 8개의 유전자로 작은 염색체에 존재하며 (Park et al., 2000), TRH (TDH-related hemolysin, 내열성용혈독관련용혈독) 유전자를 보유하는 *V. parahaemolyticus*에만 urease 유전자가 존재하는 특징 때문에 *V. parahaemolyticus*의 분리 및 동정을 위한 중요한 marker로 이용될 수 있다 (Suthienkul et al., 1995). 또한 urease와 TRH 유전자가 공존하는 이유는 이들 유전자는 과거의 어느 시점에 하나의 세트에 이 세균에 삽입되었을 가능성을 시사하고 있다 (Park et al., 2000). 최근 genome sequence가 완료된 *V. fischeri*에서도 urease 유전자의 존재가 밝혀졌다 (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>). *V. fischeri*의 urease 유전자는 *V. parahaemolyticus*와는 달리 큰 염색체에 7개의 유전자로 구성되어 있으나 해석에 관한 연구보고는 아직 없다.

본 연구는 해수로부터 urease 양성균주를 분리하여 동정한 결과 *Photobacterium* sp.에 속하는 균으로 밝혀졌으며, urease 활성은 해양세균인 *V. parahaemolyticus*에 비해 현저히 낮았다. 이 세균은 어류 및 포유류의 병원성 원인균으로 보고되어 있으나 병원성 인자에 관한 연구보고는 적은 편이다. 따라서 병원성 관련 유전자로 알려져 있는 urease 유전자의 클로닝, 염기서열 결정 및 해석을 위한 기초 자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

Urease 양성균주의 분리

전복 부안균 곰소만의 표층 해수를 Alkaline Peptone Water

*Corresponding author: parkks@kunsan.ac.kr

(APW)에 접종하여 35°C에서 하룻밤 증균 후 *Vibrio* 선택배지인 TCBS agar (Difco, USA) 평판배지에 도말하여 35°C에서 배양하여 얻은 다양한 집락을 멸균된 이썬시개를 사용하여 urease 측정용 배지 (BBL, USA)에 접종하여 urease 생산에 의해 집락 주위의 pH가 알칼리로 변하여 분홍색을 띠는 집락을 순수 분리하여 15% (v/v) glycerol을 첨가하여 -80°C에 보존하면서 본 실험에 사용하였다.

분리균주의 동정

분리균주는 API 20E kit (Biomérieux, France) 및 16S rRNA 유전자의 염기서열 결정을 통하여 동정하였다. 염색체 DNA의 정제는 3% NaCl이 첨가된 LB broth에서 증균 후 Wilson (Wilson, 1987)이 제안한 방법으로 정제하였으며, 16S rRNA 증폭용 primer는 27F primer (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')와 1492R primer (5'-TACCTTGTACGACTT-3')를 사용하였다 (Dunbar et al., 2000). 모든 PCR 반응에는 Takara (Japan)의 kit를 사용하였다. PCR 반응은 아래의 반응액을 혼합한 후 95°C에서 3분간 열처리로 DNA를 변성하였다. 0.5 µL (2.5 U) Taq polymerase, 5.0 µL Taq polymerase buffer (x10), 4.0 µL 2.5 mM dNTP, 35.5 µL dH₂O에 20 pmol의 각 primer 2.0 µL와 1.0 µL의 주형 DNA를 첨가하였다. DNA 증폭은 95°C 30초, 55°C 30초 및 72°C에서 2분을 30회 반복하였다. PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel (Sigma, USA)을 사용한 전기영동으로 확인하였으며 목적 DNA는 QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)으로 정제하여 sequence를 위한 주형으로 사용하였다. DNA sequence는 ABI310 sequencers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 결정하였으며, 염기서열의 상동성 검색은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 통하여 실시하였다.

Urease 활성측정

균은 식염이 3% 첨가된 LB broth 100 mL에 기질인 urea를 여과 멸균하여 0.1% 첨가 및 무첨가한 배지에 전배양한 균을 접종하여 30°C에서 16시간 진탕 배양하였다. 균체는 원심 분리 (8,000 rpm, 20분, Supra 30K plus, Hanil Scientific Co., Daejeon, Korea)하여 얻었으며, wash buffer (20 mM sodium phosphate (pH 7.0)-5 mM dithiothreitol-1 mM EDTA)로 2회 세정한 후 sonicator (Sonic Dismembrator Model-100, Fisher Scientific, USA)로 균체를 파괴한 후 10,000 rpm에서 20분 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 이 상층액을 urease 측정용 조효소액으로 사용하였으며, 단백질량은 Bio-Rad DC protein kit (Bio-Rad, USA)로 측정하였다. Urease 활성은 ammonia-test kit (Wako pure chemical industries Ltd., Japan)를 사용하여 ammonia의 생성량을 측정하였다. Urease 활성은 조효소액 중의 단백질 1 mg이 분당 urea를 분해하여 생성하는 암모니아 양을 µmol로 표시하였다.

DIG-labeling probe 작성

분리균주의 urease 유전자 cloning을 위한 probe은 기존에 염기서열이 보고되어 있는 균들의 *ureC* 유전자를 Clustal W

program을 이용하여 alignment하여 상동성이 가장 높은 영역에 대한 primer를 Bioneer사 (Korea)에 의뢰하여 합성하였다. DNA oligonucleotide는 다음과 같다: PKJ-C1 (5'-GAAGGGGCTGGCGGGTCATGCGCCTGAT-3')와 PKJ-C2 (5'-TTCCCCGACACGGCCCATGGCTTGCAGATC-3'). PCR 반응은 95°C에서 3분간 열변성한 후 95°C 30초, 48°C 30초, 72°C 30초를 30회 반복하여 DNA를 증폭하였으며, 증폭된 DNA 산물은 정제하여 pT7 Blue-T vector에 ligation하여 *E. coli* DH5 α에 형질 전환하였다. 3개의 clone를 정제하여 염기서열을 결정하였으며 얻어진 염기서열로부터 probe용 primer는 아래와 같이 합성하였다: PUC-1 (5'-ATGACATCAC TGA AATTGCAC-3')와 PUC-2 (5'-TGATCAAATCGGTGGG TGAACATA-3'). PCR 반응은 95°C에서 3분간 열변성한 후 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초를 30회 반복하여 DNA를 증폭하고 정제한 다음 DIG-labeling kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 상기의 PCR 조건 중 annealing 온도만 5°C 낮은 50°C에서 PCR 반응을 실시하여 DIG-labeling probe를 작성하였다.

Southern hybridization

11종의 제한효소로 처리한 분리균주의 염색체 DNA는 0.8% agarose gel에 apply하여 1X TBE buffer [0.09 M Tris-borate, 2 mM EDTA (pH 8.0)]를 사용하여 전기 영동한 후 nylon membrane (GeneScreen Plus, Dupont)에 전이하였다. DNA는 GS Gene Linker UV chamber (Bio-Rad, USA)로 고정하였으며, hybridization은 42°C의 수조에서 하룻밤 실시하여 phosphatase-labeled anti-DIG monoclonal 항체(Boehringer Mannheim, Germany)로 검출하였다. 필름은 TQX-120 Automatic Film Processor [(주) 동양 메디칼 시스템]으로 현상하였다.

결과 및 고찰

Urease 양성 균주의 분리 및 동정

2008년 8월과 9월 사이에 전북 부안군 곰소만에서 채취한 표층해수로부터 urease 양성을 나타내는 균주를 분리하기 위하여 해수를 Alkaline Peptone Water에서 증균 후 *Vibrio* 선택배지인 TCBS에 접종 배양하여 나타난 집락을 무작위로 urease 측정용 배지에 접종하였다. 279개의 집락 중 1개의 집락에서 urease의 작용으로 기질인 urea가 분해되어 암모니아 생성으로 배지의 pH가 alkali로 변해 집락주위가 분홍색으로 바뀐 colony를 순수 분리하였다. 순수 분리한 균을 다시 TCBS에 접종하여 배양한 결과 녹색의 집락을 형성하였기 때문에 *V. parahaemolyticus*일 가능성이 높아 TRH 유전자 존재를 PCR로 확인하였으나 증폭은 되지 않았다 (data not shown). TRH 유전자 존재를 확인한 이유는 urease 양성의 *V. parahaemolyticus*는 TRH 유전자 보유성과 일치하기 때문이다 (Suthienkul et al., 1995). 따라서 분리균주에서 TRH 유전자의 부재는 *V. parahaemolyticus* 이외의 세균일 가능성이 높은 것으로 사료되었다. 이 균주의 정확한 동정을 위하여 광학현미경을 이용한 형태학적 검토 및 API 20E kit을 사용하여 생화학적 특성을

조사하였으며 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 분리균주는 그람음성 간균으로 운동성, oxidase, citrate 이용능, gelatinase, arginine dehydrolase, acetoin 생산 등은 양성이지만 glucose 이외의 당은 거의 이용하지 못하는 특성을 나타내었다.

Table 1에 나타낸 API 20E kit에 의한 생화학적 결과는 *Chromobacterium violaceum*이 1순위로, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*이 2순위로 동정되었다. *C. violaceum*은 그람음성, 통성혐기성, 단간균으로 열대 및 아열대 지방의 물 또는 토양에 흔히 존재하는 상재세균으로 알려져 있다. 사람에게 감염되는 경우는 적으나 감염되면 피부손상, 패혈증, 간 종양을 유발하여 사망하는 예도 보고되어 있다 (Midani and Rathore, 1998; Baker et al., 2008). 이 세균의 genome sequence는 2003년에 완성되었으며 (Brazilian National Genome Project Consortium, 2003), 지금까지의 연구 보고에 의하면 이 세균에서 urease 유전자의 보유성에 관한 결과는 아직 보고된 예가 없다. *P. damsela* subsp. *damsela*은 자리돔의 병원균으로 보고되어 처음에는 *Vibrio damsela*로 명명되었으나 (Love et al., 1981), *Listonella*로 속명이 바뀌었다가 (MacDonell and Colwell, 1985), 최종적으로 *P. damsela* subsp.

damsela (Trüper and De'Clari, 1997)로 명명이 수정되었다. *P. damsela* subsp. *damsela*은 양식어류 (방어류, 가자미류, 무지개 송어, 도미류, 해산베스), 어류 (상어) 및 포유류 (돌고래, 사람) 등에 질병을 유발하는 병원성 세균으로 알려져 있다 (Botella et al., 2002). 최근 Pedersen et al. (2009)의 연구결과에 의하면 무지개송어 양식장에서 분리한 *P. damsela* subsp. *damsela* 16개 균주 중 15개 균주는 urease 양성으로 나타났다. 또한 Botella et al. (2002)의 보고에 의하면 어류 양식장에서 분리한 *P. damsela* subsp. *damsela* 71개 균주 중 45%는 urease 양성균주로 판명되었다는 보고도 있다. 따라서 곰소만에서 분리한 urease 양성균은 *C. violaceum* 보다는 *P. damsela* subsp. *damsela* 가능성이 높다고 사료된다.

분리균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열 결과는 Table 2에 나타내었다. 1,510 bp의 염기서열을 blast를 통하여 상동성을 검색한 결과 *P. damsela* strain UCP4, *P. damsela* subsp. *damsela* strain CCRC15428, *P. damsela* subsp. *piscicida* strain PN510 등의 16S rRNA 유전자와 99%의 상동성을 나타내었다 (Table 2). 형태학적, 생화학적 특성 및 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석 결과를 종합해 보면 곰소만 해수로부터 분리한 urease 양성 균주는 *Photobacterium* sp.에 속하는 균으로 동정되어 *Photobacterium* sp. strain HA-2로 명명하였다.

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of *Photobacterium* sp. strain HA-2 using API 20E kit

Characteristics	Results
Gram stain	-
Morphology	Rod
Motility	+
Oxidase	+
O/F test	+/-
NO ₂ production	+
N ₂ production	-
β-galactosidase	-
Arginine dehydrolase	+
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	+
H ₂ S production	-
Urease production	+
Tryptophane desaminase	-
Indole production	-
Acetoin production	+
Gelatinase	+
Fermentation of glucose	+
Mannitol	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnose	-
Sucrose	-
Melibiose	-
Amygdaline	-
Arabinose	-

+, positive result or growth: -, negative result or no growth

Table 2. 16S rRNA sequence (1,510 bp) of *Photobacterium* sp. strain HA-2. The homology search of sequence data was performed with the web-based program BLAST available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

1	AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG ATTGAACCGT GCGGCCAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGC
61	GCGAGCGACT TAACTGAACC TTCGGGGGAC GTTAAGGGCG GCGAGCGGGG GACGGGTGAG
121	TAAATGCCTGG GAATATGCCG TGATGTGGGG GATAACTATT GGAAACGATA GCTAATACCG
181	CATAATCTCT TCGGAGCAAA GAGGGGACC TTCGGGCCCT TCGCGTCAGG ATTAGCCAG
241	GTGGGATTAG CTTGTGGTGG AGGTAATGGC TCACCAGGC AACGATCCCT AGCTGTCTTG
301	AGAGGATGAT CAGCCACACT GGAAGTGA CACGGTCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG
361	TGGGGAATAT TGCACAATGG GGGAAACCCCT GATGCAGCCA TGCCCGGTGT GTGAAGAAGG
421	CCTTCGGGTT GTAAGCACT TTCAGTAGGG AGGAAGGTAG TGTAGTTAAC ACCTGCACTA
481	TTTGACGTTA CCTACAGAAG AAGCACCGGC TAACTCCGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG
541	GAGGTGCGA GCGTTAATCG GAATTACTGG CGGTAAGCG CATGCAGGGC GCCTGTTAAG
601	TCAGATGTGA AAGCCCGGGG CTTAACCTCG GAATTGCAAT TGAACATGGC AGGCTAGAGT
661	CTTGTAGAGG GGGGTAGAAT TTCAGGTGTA GCGGTGAAGT GCGTAGAGAT CTGAAGGAAT
721	ACCAAGTGGC AAGGCGGCC CCTGGACAAA GACTGACGCT CAGATGCGAA AGCGTGGGGA
781	GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCGTAAC GATGTCTACT TGGAGTTGT
841	GGCCTTGAGC CGTGGGCTTC GGAGCTAACG CGTTAAGTAG ACCGCTGGG GAGTACGGTC
901	GCAAGATTAA AACTCAAATG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT
961	AATTGATGTC AACCGGAAGA ACCTTACCTA CTCTTGACAT CCAGAGAAGC TTGAAGAGAT
1021	TCGAGTGTGC CTTGGGAAAC TCTGAGACAG GTGCTGCATG GCTGTGCTCA GCTCGTGTG
1081	TGAAATGTTG GGTAAAGTCC CGCAACGAGC GCAACCCCTA TCCTTGTGTTG CCAGCACTTC
1141	GGTGGGAAAC TCCAGGGAGA CTGCCGTTGA TAAACCGGAG GAAGTGGGG ACAGCGTCAA
1201	GTCATCATGG CCCTTACGAG TAGGGTACA CACGTGCTAC AATGGCATAT ACAGAGGGCA
1261	GCAAGACCGC GAGGTGGAGC GAATCCAGA AAGTATGTCG TAGTCCGGAT CGGAGTCTGC
1321	AATCGACTC CGTGAAGTGC GAATCGTAGT TAATCGTGA TCAGAATGCC ACGGTGAATA
1381	CGTTCGGGG CCTTGTACAC ACCGCGGCTC ACACCATGGG AGTGGGCTGC ACCAGAAGTA
1441	GATAGCTTAA CCTTCGGGAG GCGGTTTACC ACCGTTGGT TCATGACTGG GGTGAAGTGC
1501	TAAACAAGTA
	Reference (accession no.) Identity (%)
	<i>Photobacterium damsela</i> strain UCP4 (DQ530294) 99
	<i>Photobacterium damsela</i> sp. <i>damsela</i> strain CCRC15428 (AY147861) 99
	<i>Photobacterium damsela</i> sp. <i>piscicida</i> strain PN510 (AY147860) 99
	<i>Photobacterium damsela</i> sp. <i>piscicida</i> strain I736 (AY147859) 99

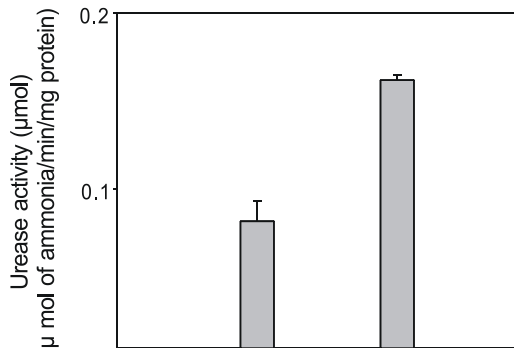


Fig. 1. Urease activity in *Photobacterium* sp. strain HA-2. Bacteria were grown for 16 h at 30°C with shaking in LB medium containing 3% NaCl and 0.1% urea or not. The data shown are the average of three independent experiments. Error bars represent standard deviations.

Photobacterium sp. strain HA-2의 urease 활성 측정

*V. parahaemolyticus*와 *Proteus mirabilis*는 UreR이라는 전사 조절 단백질에 의해 urease 유전자의 전사가 조절되며, 기질인 urea가 배지에 존재하였을 때 urease 활성은 유도 된다 (Park et al., 2000; Nicholson et al., 1993). *Photobacterium* sp. strain HA-2의 경우 UreR 유전자의 존재유무가 확인되어 있지 않기 때문에 LB배지에 기질인 urea를 여과 멸균하여 최종농도 0.1% 첨가 및 무첨가하여 urease 활성을 측정하였다. 기질을 첨가한 배지에서의 *Photobacterium* sp. strain HA-2의 urease 활성은 양성 대조균으로 사용한 *V. parahaemolyticus* AQ4673 균주 (Yamaichi et al., 1999)에 비해 약 16배 (0.1620 vs 2.590 μmol of NH₃/min/mg of protein) 낮았으며, 기질이 존재하지 않은 배지에서 배양한 *Photobacterium* sp. strain HA-2의 urease 활성은 기질이 첨가된 배지에서 배양한 균에 비해 약 절반 (0.0820 vs 0.1620 μmol of NH₃/min/mg of protein) 정도의 활성을 나타내었다 (Fig. 1). *V. parahaemolyticus*의 경우, 기질유무에 의해 urease 활성은 약 100배 정도 차이가 나며 (Park et al., 2000), *P. mirabilis*의 경우는 약 4.2배 정도 차이가 난다는 보고가 있다 (Nicholson et al., 1993). 따라서 기질유무에 따른 urease 활성차가 약 2배인 *Photobacterium* sp. strain HA-2의 경우, 전사조절 유전자 *ureR*의 존재여부는 유전자의 클로닝 및 염기서열을 결정하기 전까지는 확실한 결론을 도출하기는 어렵다고 판단된다. 또한 다른 형태의 urease 발현기작에 대한 연구도 필요하다고 사료된다.

Photobacterium sp. strain HA-2의 ureC 유전자 일부의 증폭 및 염기서열 결정

Clustal W program을 이용하여 GenBank에 등록되어 있는 *V. parahaemolyticus*, *P. mirabilis*, *Klebsiella aerogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus* sp. strain TB-90 및 *Helicobacter pylori*의 *ureC* 유전자의 alignment를 검토하였다 (data not shown). 상동성이 높은 부위를 대상으로 증폭용 primer를 제작하여 *Photobacterium* sp. strain HA-2의

genomic DNA를 template로 사용하여 PCR 반응으로 DNA를 증폭하였다. 약 280 bp 크기의 단일밴드가 증폭되었으며 (Fig. 2), DNA의 염기서열을 결정하였다 (Table 3). DNA 염기서열은 GenBank에 등록되어 있는 *V. fischeri* ES114, *V. fischeri* MJ11, *P. mirabilis*, 및 *V. parahaemolyticus*의 *ureC* 유전자 일부와 85%, 84%, 83% 및 82%의 높은 상동성을 나타내었으며, 이 결과는 염기서열을 결정한 DNA는 *Photobacterium* sp. strain HA-2 균주 *ureC* 유전자의 일부 영역이라고 사료된다.

Urease 유전자 클로닝을 위한 southern blot 해석

Photobacterium sp. strain HA-2 균주의 urease 유전자 클로닝을 위하여 genomic DNA를 11종의 제한효소로 각각 처리하여 Table 3에서 얻어진 염기서열에 대한 probe로 southern blot를 행하였다 (Fig. 3). *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, *Sac*I, *Sal*I, *Xho*I으로

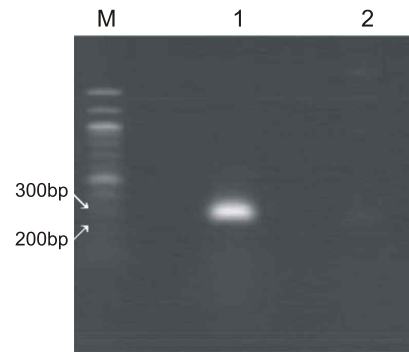


Fig. 2. PCR for the *Photobacterium* sp. strain HA-2 *ureC* gene. M, molecular size markers; 100 bp DNA ladder (BioLabs); Lane 1, *Photobacterium* sp. strain HA-2; Lane 2, *E. coli* HB101.

Table 3. The *ureC* gene partial sequence (288 bp) of *Photobacterium* sp. strain HA-2. The homology search of sequence data was performed with the web-based program BLAST available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

1	GAAGGGGGCTG GCGGCGGTCA TCGCCTGAT GTGATCAAT CGGTGGGTGA ACATAATATC
61	TTACCGGCAT CAACAAACCC AACATGCCT TACACCATCA ATACTGTGCGA TGAGCATTTA
121	GATATGTTGA TGTTTGTCA TCATTTGGCC CCATCAATAC CAGAAGATGT AGCTTTTGGT
181	GAATCTCGTA TTCGTAGAGA AACCATTTGCA GCTGAAGATA TTCTTCATGA TCTTGGTGCA
241	ATTTCACTGA TGTCAATCAGA CTCGCAAGCC ATGGGCGGTG TCGGGGAA
Reference (accession no.)	Identity (%)
<i>Vibrio fischeri</i> ES114 (CP000020)	85
<i>Vibrio fischeri</i> MJ11 (CP001139)	84
<i>Proteus mirabilis</i> strain HI4320 (AM942759)	83
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (AB038238)	82
<i>Proteus vulgaris</i> (X51816)	81
<i>Shewanella halifaxensis</i> HAW-EB4 (CP000931)	80
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5 (CP000323)	77

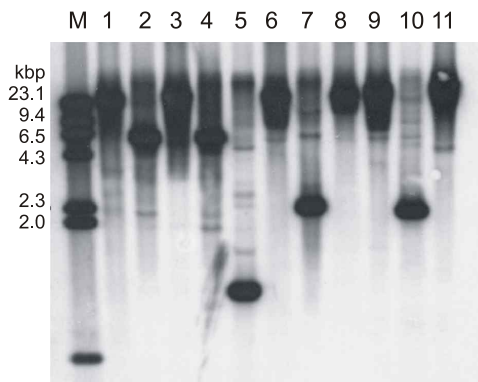


Fig. 3. Southern hybridization with a *ureC* probe of *Photobacterium* sp. strain HA-2. Hybridization was performed at 42°C as described in the materials and methods section. Genomic DNA of *Photobacterium* sp. strain HA-2 was digested with *Bam*HI (lane 1), *Bg*III (lane 2), *Eco*RI (lane 3), *Hinc*II (lane 4), *Hind*III (lane 5), *Kpn*I (lane 6), *Pst*I (lane 7), *Sac*I (lane 8), *Sal*I (lane 9), *Xba*I (lane 10) and *Xho*I (lane 11). M, Lambda DNA/*Hind*III marker.

처리한 DNA는 약 20 kb 전후의 단편과, *Bg*III, *Hinc*II로 처리한 단편에서는 약 6.0 kb의 단편과 probe가 반응하였다. 또한, *Hind*III, *Pst*I, *Xba*I으로 처리하였을 경우에는 약 1.0, 2.3, 2.2 kb의 단편과 probe가 반응하였다. 지금까지 보고된 urease 양성 세균의 urease gene cluster의 DNA 단편 크기는 5.0 kb 이상 이므로 *Bg*III 및 *Hinc*II 이외의 효소로 절단한 DNA 단편들은 전 urease gene cluster를 클로닝 하기에는 DNA 단편이 너무 크거나 작아 *Bg*III 및 *Hinc*II 제한효소로 절단한 단편을 대상으로 현재 클로닝을 진행 중이다.

Cloning 및 sequence가 완료되면 *Photobacterium* sp. strain HA-2가 보유하고 있는 urease 유전자의 구조, 유전학적 특징 및 *V. parahaemolyticus*에 비해 urease 활성이 낮은 이유 등에 관한 정확한 해석이 가능하리라 사료된다.

사 사

본 연구는 2008년도 군산대학교 수산과학연구소의 학술연구보조비에 의하여 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

Baker S, Campbell JI, Stabler R, Nguyen HVM, To DS, Nguyen DV and Farrar J. 2008. Fatal wound infection caused by *Chromobacterium violaceum* in HoChi Minh city, Vietnam. *J Clin Microbiol* 46, 3853-3855.
 Botella S, Pujalte MJ, Macian MC, Ferrus MA, Hernandez J and Garay E. 2002. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and biochemical typing of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *J Appl Microbiol* 93, 681-688.

Brazilian National Genome Project Consortium. 2003. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11660-11665.
 Chen YY, Clancy KA and Burne RA. 1996. *Streptococcus salivarius* urease: genetic and biochemical characterization and expression in a dental plaque *Streptococcus*. *Infect Immun* 64, 585-592.
 De Koning-Ward TF, Ward AC and Robins-Browne RM. 1994. Characterization of the urease-encoding gene complex of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 145, 25-32.
 Dunbar J, Ticknor LO and Kuske CR. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl Environ Microbiol* 66, 2943-2950.
 Jones BD and Mobley HL. 1989. *Proteus mirabilis* urease: nucleotide sequence determination and comparison with Jack bean urease. *J Bacteriol* 171, 6414-6422.
 Labigne A, Cussac V and Courcoux P. 1991. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol* 173, 1920-1931.
 Love M, Teebken-Fisher D, Hose JE, Farmer JJIII, Hickman FW and Fanning GR. 1981. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science* 214, 1139-1140.
 Macaluso A, Best EA and Bender RA. 1990. Role of the *nac* gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 172, 7249-7255.
 MacDonell MT and Colwell RR. 1985. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation of two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiol* 6, 171-182.
 Maeda M, Hidaka M, Nakamura A, Masaki H and Uozumi T. 1994. Cloning, sequencing, and expression of thermophilic *Bacillus* sp. strain TB-90 urease gene complex in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176, 432-442.
 Midani S and Rathore M. 1998. *Chromobacterium violaceum* Infection. *South Med J* 91, 464-466.
 Mobley HLT, Garner RM and Bauerfeld P. 1995. *Helicobacter pylori* nickel-transport gene *nixA*: synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. *Mol Microbiol*

- 16, 97-109.
- Mobley HLT and Hausinger RP. 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Rev* 53, 85-108.
- Mobley HLT, Island MD and Hausinger RP. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 59, 451-480.
- Mulrooney SB and Hausinger RP. 1990. Sequence of the *Klebsiella aerogenes* urease genes and evidence for accessory proteins facilitating nickel incorporation. *J Bacteriol* 172, 5837-5843.
- Nicholson EB, Concaugh EA, Foxall PA, Island MD and Mobley HL. 1993. *Proteus mirabilis* urease: transcriptional regulation by UreR. *J Bacteriol* 175, 465-473.
- Park KS, Iida T, Yamaichi Y, Oyagi T, Yamamoto K and Honda T. 2000. Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 68, 5742-5748.
- Pedersen K, Skall HF, Lassen-Nielsen AM, Bjerrum L and Olesen NJ. 2009. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging pathogen in danish rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), mariculture. *J Fish Diseases* 32, 465-472.
- Sissons CH, Perinpanayagam HER, Hancock EM and Cutress TW. 1990. pH regulation of urease levels in *Streptococcus salivarius*. *J Dent Res* 69, 1131-1137.
- Suthienkul O, Ishibashi M, Iida T, Nettip N, Supavej S, Eampokalap B, Makino M and Honda T. 1995. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. *J Infect Dis* 172, 1405-1408.
- Trüper HG and De'Clari L. 1997. Necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". *Int J Syst Bacteriol* 47, 908-909.
- Wilson K. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria, p. 241-242. In: *Current protocols in molecular biology*, vol. 1. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. (eds). John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Yamaichi Y, Iida T, Park KS, Yamamoto K and Honda T. 1999. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio arahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol Microbiol* 31, 1513-1521.

2009년 9월 4일 접수

2009년 9월 21일 수정

2009년 12월 1일 수리