

Change of Sequences and Identification of *Chyseeobacterium indologenes* in Korea by 16S rRNAMan Kyu Huh^{1*}, So Hye Park¹ and Jong Hwa Yum²¹Department of Molecular Biology, Dongeui University, Busan 614-714, Korea²Department of Clinical Laboratory Science, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

Received February 8, 2011 / Accepted May 26, 2011

Accurate identification for pathogenic bacterium is an essential element in the clinical microbiology laboratory. We studied molecular analysis involving the identification of *Chyseeobacterium indologenes* and evaluated the seventeen isolates in Korea with the 16S rRNA gene of the ribosome to estimate phylogenetic relationships within the genus *Chyseeobacterium* in GenBank. The aligned data sets for *C. indologenes* were 1,176 nucleotides. Sequence variation within the *C. indologenes* was mostly due to nucleotide substitutions. Korean *C. indologenes* isolates were not strikingly different from the same species found in the other countries. However, the rates of base substitution in Korean *C. indologenes* isolates were higher than those of other *C. indologenes* isolates in GenBank. *C. indologenes* was placed as a sister species to *C. isbiliense*, *C. hominis*, *C. hispanicum*, *C. molle*, *C. hungaricum*, and *C. pallidum*.

Key words : *Chyseeobacterium indologenes*, 16S rRNA, phylogenetic relationship

서 론

*Chyseeobacterium*속은 *Chyseeobacterium gleum*, *Chyseeobacterium indologenes*, *Chyseeobacterium meningosepticum* 등이 있다. 이들 종은 비발효성 그람 음성 간균이다. 또한 이들은 호기성, oxidase 양성, 비운동성, indole 양성을 특성을 가지고 있다[1]. 이들이 발견되는 곳은 주거 환경, 식물체, 유제품, 토양, 민물과 해수 등 광범위하며 특히 주거 환경 내 욕조, 체내 유치도관, 소독약, 흡입치료제 등에서도 동정되기도 한다[16]. *C. indologenes*는 사람에서 병원성은 낮으나 면역력이 저하된 사람에서 패혈증, 균혈증, 신우신염, 뇌수막염, 담도 감염, 인공 호흡기 관련 폐렴 등을 유발할 수 있다[6].

정확한 원인균의 동정은 감염증 진단과 치료에 매우 중요한 사항이며 임상미생물검사실의 중요 업무 중 하나이다. 원인균의 동정은 순수 배양된 세균의 현미경상의 형태, 그람 염색성, 성장 촉진 및 성장 필수 요소, 당발효 또는 동화 등 생화학적 특성을 이용한 전통적인 방법으로 이루어져왔다. 그러나 표현형에 의존한 전통적인 동정법에서는 동일한 종 내 균주가 같은 표현형을 발현시키지 않을 수 있고, 여러 변이체가 발생하여 동정이 어려움이 야기되기도 한다.

항생제를 자주 사용하다 보면 병원균이 항생제에 스스로 저항할 수 있는 힘을 기르게 되어 점점 더 내성력이 강해지는 경우도 발생한다. 면역억제 환자의 증가로 진균에 의한 감염증이 늘어나고 과거에 빈도가 낮거나 거의 없던 세균이 갑자

기 증대하거나 약제에 의해 억제되었던 세균이 저항성으로 변형하여 창궐하기도 한다[3].

세균의 분자생물학적 분류에 사용되는 16S rRNA 유전자는 리보솜을 구성하는 두 개의 하부단위체(subunit) 중 소단위체 (small subunit, SSU)에 있는 유전자이다. tRNA^{Leu} 유전자의 UAA 안티코돈은 group I intron에서 두 종류(type)가 있다. Type I은 엽록체의 인트론을 함유하고 있고[8], type II는 진정 세균의 인트론을 가지고 있다[14]. 이런 특성으로 인해 잘 보존된 부위로 계통분류학적 연구에 이용되고 있다[4,10].

본 연구에서는 전통적인 생화학적 방법 또는 동정용 키트로도 명확하게 드러나지 않는 30검체를 분석하여 동일한 서열을 가진 같은 계보의 검체를 제외한 17균주와 GenBank에서 얻은 서열과 비교하였다. 또한 *Chyseeobacterium*속의 종이 β -lactamase를 생성하여 그람 음성균에 의한 감염의 치료로 사용되는 aminoglycosides계, β -lactam계 항생제, tetracyclines, chloramphenicol 등에 본질적으로 저항성을 지니며 약제 사용에 대한 저항성 균주의 발생을 야기할 수 있는 서열 치환, 삽입, 결실, 중복 등 돌연변이에 의한 염기 변화를 탐지하기 위한 검체들 내 서열 간 차이가 있는지 변이를 분석하였다.

재료 및 방법

세균과 DNA 추출

본 분석에 사용한 시료는 2007년부터 2009년까지 서울특별시 oo대학교 의료원에서 배양 의뢰한 임상검체에서 증식된 세균 중 전통적인 생화학적 방법 또는 동정용 키트(VITEK system, BIOMÉRIEUX, Marcy-l'Étoile, France)로 동정이 불명

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1529, Fax : +82-51-890-1521

E-mail : mkhuh@deu.ac.kr

확한 세균 30주를 대상으로 하였다.

대상 균주를 부유시킨 증류수 100 μ l를 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 중탕시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 10,000 \times g로 5분간 원심분리하여 불순물을 침전시켰다. DNA 추출은 상등액 10 μ l를 사용하였다. 각 균주로부터 DNA를 추출하기 위한 시약은 DNA Zol Reagent (Life Technologies Inc., Grand Island, New York, USA)를 사용하였다. 추출방법은 사용자의 지침서에 의거하여 추출하였다. 추출된 DNA는 진공 흡입기로 5분간 건조시킨 후 TE (10 mM Tris, pH 8.0 with HCl, 1 mM EDTA) 100 μ l에 용해하여 3일간 냉장 보관하였다. 용해된 시료는 DNA를 정량하였고, TE로 DNA 농도가 균질하게 조정하여 본 분석을 위해 사용하거나 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

16S rRNA 분석

*C. indologenes*의 16S 부위는 시발체(primer)로 PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 증폭시켰다. 시발체 서열은 5'-AAG GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'(순방향)과 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'(역방향)을 사용하였다.

PCR 반응을 위하여 추출한 각 분류군의 게놈 DNA 50 ng, 각 dNTPs, 100 μ M, 시발체 각 0.2 μ M, 1 \times enzyme buffer, Taq polymerase 2 unit를 넣고 증류수로 전체 50 μ l volume이 되도록 추가하였다. 증폭반응은 초기 94 $^{\circ}$ C에서 90 초 동안 변성한 후, 28 사이클로 94 $^{\circ}$ C에서 30 초, 42 $^{\circ}$ C에서 60 초, 72 $^{\circ}$ C에서 60 초 실시하였고, 추가로 72 $^{\circ}$ C에서 5분 연장하였다.

PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 분리하였는데 이때 절편들의 상대적 크기를 비교하기 위해 100 bp DNA ladder를 같이 loading시켰다. 전기영동 후 젤은 ethidium bromide로 염색하여 밴드를 현상하였다. 현상된 젤은 Alpha Image TM (Alpha Innotech Corporation, CA, USA)을 사용하여 밴드 양상을 조사하였다. 이후 젤에서 DNA를 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, ICI Americas Inc., USA)로 추출하였다. 추출된 DNA를 bluescript II SK(+) vector (Invitrogen, Life Technologies, USA)로 클로닝한 후 ABI Prism 377 Sequencer (Applied Biosystem, USA)로 염기서열을 분석하였다.

통계 분석

프로그램 PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony)에서 분류군간 핵산 차이에 의한 유의성 검증, 염기 빈도, 서열쌍 거리, uncorrected "p"에 의한 측정된 거리 등을 산출하였다[17]. 염기자리 당 서열 간 염기 조성 차이, 불일치 계수를 검증하였다[9].

염기 치환에 대한 가능성과 transition/transversion의 비는 Tamura 등[2004]의 방법으로 산출하였다. 서열 간 코돈의 중립성 검증은 갭(gap)과 결손 서열을 제외하고 1,000회 반복으

로 MEGA4로 실시하였다[11]. 다양도와 돌연변이 정도는 Tajima의 여러 통계 척도(M =number of sites, S =Number of segregating sites, $p_s=S/M$, and π =nucleotide diversity. D =Tajima test statistic)로 산출하였다[19].

유연관계 분석

각 검체의 증폭산물에서 얻은 크로마토그램(chromatogram)은 소프트웨어 Sequence Navigator 1.0.1 (Applied Biosystems Inc.)로 편집하였다. 이들 서열에서 결손 부위를 포함한 서열 배당은 MEGA version 4.1과 Clustal X program으로 분석하였다[20]. 배당된 서열에서 갭의 부위는 missing data로 처리하였다. 그러나 계통학적으로 정보적인 인델(indel)은 이진법 처리로 자료에 삽입하였다.

최절약법에 의한 tree (maximum parsimonious tree, MP)는 heuristic search, branch-swapping options, tree bisection-reconnection에 따랐다[17]. 최우법(maximum likelihood tree, ML), N-J법(neighbor-joining tree, NJ)으로 tree 작성을 실시하여 비교하였다. 계통분석의 분지는 PHYLIP version 3.57의 NEIGHBOR, neighbor-joining (NJ) 방법에 의해 구성하였다[5,15]. 분류군의 가치에 대한 Bootstrap 분석은 1,000회 반복법으로 실시하였다.

결 과

동정용 키트로도 명확하게 드러나지 않는 30검체를 분석하였다. 이 중 동일한 서열을 가진 같은 계보의 검체는 한 검체만 남기고 제외하여 총 17균주의 서열을 사용하였다. *C. indologenes*의 16S 부위의 profiles는 모두 약 1,176 nucleotides (bp)의 크기를 가지고 있었다. GenBank 등과 비교한 결과 같은 종 내 차이는 삽입과 결실보다는 염기 치환에 의한 것이었다.

A+T 함량은 48.4%였으며(Table 1), 분류군간 염기 차이는 5% 수준에서 유의성을 나타내지 않았다. 이들 염기에 대한 전체 빈도분포에서 그룹 간 유의한 차이를 나타내지 않았다(Table 2).

DNA 서열의 서열 배당은 많은 갭(gaps)이 존재하지 않았다. 전체 1176 특성(characters)에서 1144 특성은 균주 간 일정하였다. 29개 변이는 절약-비정보적이었고 단지 20개만 절약-정보적이었으며 indel의 수는 15개였다. 4번째 자리에서 5개 균주가 A대신 G였다. 124번에서 143번 자리 사이에서 CID16번과 CID22번 균주는 각각 7개 4개 transversion이 발견되었다. 621번째부터 CID27에서 많은 변이가 관찰되었다. 모든 균주 간 유전적 거리를 산출하였다(Table 3). CID11번과 CID22번 균주 간 가장 유전적으로 먼 유연관계를 나타내었다. 그 외 균주 간 유전적 거리 차이는 크지 않거나 거의 없었다.

DNA 서열에서 염기 치환이 같은 패턴으로 진화해왔다는

Table 1. Base frequencies across taxa of *Chysoebacterium indologenes* using 16S rRNA gene

Taxon	A	C	G	T	sites
CID09	0.2628	0.2211	0.2951	0.2211	1176
CID10	0.2628	0.2211	0.2951	0.2211	1176
CID11	0.2628	0.2219	0.2968	0.2185	1176
CID12	0.2628	0.2211	0.2951	0.2211	1176
CID13	0.2628	0.2211	0.2951	0.2211	1176
CID15	0.2619	0.2219	0.2951	0.2211	1176
CID16	0.2628	0.2228	0.2925	0.2219	1176
CID17	0.2628	0.2211	0.2951	0.2211	1176
CID18	0.2628	0.2211	0.2951	0.2211	1176
CID19	0.2628	0.2211	0.2951	0.2211	1176
CID20	0.2628	0.2211	0.2951	0.2211	1176
CID22	0.2628	0.2211	0.2942	0.2219	1176
CID23	0.2628	0.2219	0.2951	0.2202	1176
CID24	0.2619	0.2219	0.2951	0.2211	1176
CID25	0.2628	0.2211	0.2951	0.2211	1176
CID26	0.2619	0.2219	0.2951	0.2211	1176
CID27	0.2628	0.2211	0.2951	0.2211	1176
Mean	0.2626	0.2214	0.2951	0.2210	1176

Table 2. The chi-square test of homogeneity and base of *Chysoebacterium indologenes* using 16S rRNA gene

Taxa		A	χ^2	C	χ^2	G	χ^2	T	χ^2
CID09	Obs.	309	0.0001	260	0.0007	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID10	Obs.	309	0.0001	260	0.0007	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID11	Obs.	309	0.0001	261	0.0013	349	0.0129	257	0.0032
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID12	Obs.	309	0.0001	260	0.0007	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID13	Obs.	309	0.0001	260	0.0007	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID15	Obs.	308	0.0022	261	0.0013	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID16	Obs.	309	0.0001	262	0.0097	344	0.0241	261	0.0048
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID17	Obs.	309	0.0001	260	0.0007	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID18	Obs.	309	0.0001	260	0.0007	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID19	Obs.	309	0.0001	260	0.0007	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID20	Obs.	309	0.0001	260	0.0007	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID22	Obs.	309	0.0001	260	0.0007	346	0.0022	261	0.0048
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID23	Obs.	309	0.0001	261	0.0013	347	0.0004	259	0.0029
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID24	Obs.	308	0.0022	261	0.0013	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID25	Obs.	309	0.0001	260	0.0007	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID26	Obs.	308	0.0022	261	0.0013	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	
CID27	Obs.	309	0.0001	260	0.0007	347	0.0004	260	0.0006
	Exp.	308.82		260.41		346.88		259.88	

Table 3. The sequence pair distances of sites between two sequences in a multiple alignment among species of *Chysoebacterium indologenes* using 16S analysis

Taxon	CID09	CID10	CID11	CID12	CID13	CID15	CID16	CID17	CID18	CID19	CID20	CID22	CID23	CID24	CID25	CID26
CID09																
CID10	0.000															
CID11	0.006	0.006														
CID12	0.002	0.000	0.006													
CID13	0.000	0.000	0.006	0.000												
CID15	0.000	0.001	0.006	0.001	0.001											
CID16	0.001	0.006	0.018	0.000	0.006	0.005										
CID17	0.006	0.000	0.006	0.000	0.000	0.001	0.006									
CID18	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.001	0.006	0.000								
CID19	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.001	0.006	0.000	0.000							
CID20	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.001	0.006	0.000	0.000	0.000						
CID22	0.001	0.001	0.011	0.001	0.001	0.002	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001					
CID23	0.001	0.002	0.003	0.001	0.001	0.001	0.006	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003				
CID24	0.001	0.001	0.006	0.001	0.001	0.000	0.005	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001			
CID25	0.000	0.000	0.006	0.001	0.000	0.001	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001		
CID26	0.001	0.001	0.006	0.001	0.001	0.000	0.005	0.001	0.000	0.001	0.001	0.002	0.001	0.000	0.001	
CID27	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.001	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000

Table 3. Codon-based test of neutrality for analysis between sequences of *Chysoebacterium indologenes* using 16S analysis

Taxon	CID09	CID10	CID11	CID12	CID13	CID15	CID16	CID17	CID18	CID19	CID20	CID22	CID23	CID24	CID25	CID26	CID27
CID09		0.000	-0.678	0.000	0.000	1.098	-2.059	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.437	1.066	1.098	0.000	1.098	0.000
CID10	1.000		-0.678	0.000	0.000	1.098	-2.059	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.437	1.066	1.098	0.000	1.098	0.000
CID11	0.499	0.499		-0.678	-0.678	-0.346	-2.059	-0.678	-0.678	-0.678	-0.678	-0.714	-0.333	-0.346	-0.678	-0.346	-0.678
CID12	1.003	1.000	0.499		0.000	1.098	-2.059	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.437	1.066	1.098	0.000	1.098	0.000
CID13	1.000	1.000	0.499	1.000		1.098	-2.059	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.437	1.066	1.098	0.000	1.098	0.000
CID15	0.275	0.275	0.730	0.275	0.275		-2.192	1.098	1.098	1.098	1.098	-0.235	1.510	0.000	1.098	0.000	1.098
CID16	0.042	0.042	0.033	0.042	0.042	0.030		-2.059	-2.059	-2.059	-2.059	-2.496	-1.936	-2.192	-2.059	-2.192	-2.059
CID17	1.000	1.000	0.499	1.000	1.000	0.275	0.042		0.000	0.000	0.000	-0.437	1.066	1.098	0.000	1.098	0.000
CID18	1.000	1.000	0.499	1.000	1.000	0.275	0.042	1.000		0.000	0.000	-0.437	1.066	1.098	0.000	1.098	0.000
CID19	1.000	1.000	0.499	1.000	1.000	0.275	0.042	1.000	1.000		0.000	-0.437	1.066	1.098	0.000	1.098	0.000
CID20	1.000	1.000	0.499	1.000	1.000	0.275	0.042	1.000	1.000	1.000		-0.437	1.066	1.098	0.000	1.098	0.000
CID22	0.663	0.663	0.477	0.663	0.663	0.815	0.014	0.663	0.663	0.663	0.663		-0.232	-0.232	-0.437	-0.232	-0.437
CID23	0.288	0.288	0.740	0.288	0.288	0.134	0.055	0.288	0.288	0.288	0.288	0.817		1.510	1.066	1.510	1.066
CID24	0.275	0.275	0.730	0.275	0.275	1.000	0.030	0.275	0.275	0.275	0.275	0.815	0.134		1.098	0.000	1.098
CID25	1.000	1.000	0.499	1.000	1.000	0.275	0.042	1.000	1.000	1.000	1.000	0.663	0.288	0.275		1.098	0.000
CID26	0.275	0.275	0.730	0.275	0.275	1.000	0.030	0.275	0.275	0.275	0.275	0.815	0.134	1.000	0.275		1.098
CID27	1.000	1.000	0.499	1.000	1.000	0.275	0.042	1.000	1.000	1.000	1.000	0.663	0.288	0.275	1.000	0.275	

가설을 몬테-카를로 테스트(1000 반복)로 검증하였다(Table 3). 서열간 중립성 테스트에서 CID16 균주는 P값이 5% 유의수준에서 0.05보다 낮은 값을 나타내었다. 따라서 상동치환(dS)=비상동치환(dN)이라는 귀무가설을 수용하지 않았다. 비상동치환과 상동치환의 차이(dN-dS)가 전체 155 쌍 중 44 쌍이 음의 값을 나타내어 비상동치환이 상동치환보다 많았다.

한 염기가 다른 염기로 치환될 확률에서 퍼리미던 염기 간 C→T, T→C일 확률이 각각 15.37과 15.33으로 다른 염기로 치환될 확률보다 높았다(Table 4). 전체 transition/transversion의 값은 1.206이었다.

타지마(Tajima)의 중립성 검증에서 자리 수는 17 균주에 대해 다형현상을 나타내는 자리수는 32 자리였으며, 전체 자리 수는 1176이었고, 이들의 비는 0.027이었고, 다양도는 0.004로 낮았다(Table 5). 중립설의 검증 결과는 도태에 의한 중립가설보다는 삽입과 결실에 의한 결실돌연변이설로 설명된다(D=-2.259). GenBank에서 얻은 76균주에 대해 다형현상을 나타내는 자리수는 360 자리였으며, 전체 자리수는 947이었고, 이들의 비는 0.380이었고, 다양도는 0.117로 나타났다. 중립설의 검증 결과는 17균주와 유사하게 도태에 의한 중립가설보다는 삽입과 결실에 의한 결실돌연변이설로 설명되지만 17균주

분석에 사용한 결과 서열 일치도, 계통도의 같은 분지군에 배
 체 되는 등 정보의 신뢰가 매우 높았다. 16S rRNA 유전자 서열
 은 보통 1.5 kb 정도이나 본 연구에서 증폭 시킨 1차 결과는
 1,986 bp였다. 그런데 GenBank에 등록된 *Chysoebacterium*속의
 종 서열에는 짧은 것 등 다양하여 이들과 일치율을 위해 재정돈
 한 결과 1,176 bp로 분석하였다.

*Chysoebacterium*속의 종은 그람 음성균에 의한 감염의 치료
 로 사용되는 aminoglycosides계, β -lactam계 항생제, tetracy-
 clines, chloramphenicol 등에 저항성을 지니고 있다[23].
*Chysoebacterium*속의 종의 감염을 치료하기 위해 vancomycin
 이 사용되었으나, 근래에는 minocycline, rifampin, trimethox-
 azole-sulfamethoxazole, quinolones의 치료제 사용에서 더 좋
 은 결과를 나타내는 것으로 알려져 있다[1,7]. 이런 약제사용에
 대한 저항성 균주의 발생을 야기할 수 있는 서열 치환, 삽입,
 결실, 중복 등 돌연변이에 의한 염기 변화를 충분히 예측하기
 위한 검체들 내 서열 간 차이가 있는지 변이를 분석하는 것은
 향후 항생제 감시 프로그램을 위해 바람직한 연구가 될 수
 있을 것이다.

본 연구에서 서열 변화에 따른 다양도는 *Chysoebacterium*속

의 종 17균주에 대한 0.004로 전체 76균주의 다양도(0.117)에
 비해 높지 않았다(Table 5). 그런데 삽입과 결실에 의한 결실돌
 연변이(D=-2.259)는 76균주(D=-0.165)에 비해 높았다. 이는 중
 립설의 검증 결과 음의 값을 가짐으로 17균주 그룹과 76균주
 그룹 모두 도태에 의한 중립가설보다는 결실돌연변이에 의한
 것이고 우리나라 17균주가 더 높다는 것은 전체 서열이 약
 1902 bp 중 1176 bp로 배열정돈과정에서 결실부분이 많았다
 는 것을 보여준다. 리보솜 자체는 mRNA를 단백질로 번역
 하는데 중요한 기능을 수행하므로 오랜 시간에도 서열이 잘
 보존되고 그 구조를 유지하고 있지만 리보솜 접히는 과정에
 서 일부는 고리모양과 비결합부위(hypervariable regions)는
 돌연변이가 유발된다. 본 연구결과에서도 보존부위의 서열이
 거의 일정하지만 비 보존부위에서는 치환돌연변이가 일부 관
 찰되었다. 왜 우리나라에서 다양도는 낮고 결실돌연변이가 높
 은가는 아마 시료 채취과정과 시료의 수에 관련이 있을 것으
 로 판단된다. 즉, 검체의 수가 적어 염기 서열 분석의 경우가
 적었기 때문에 다양도는 낮게 나타났으며 특정 시기의 특정
 병원만 대상으로 유사한 검체에 따른 유사한 서열로 다양도가
 역시 높지 않았을 것이다. 결실돌연변이가 높은가는 서열 배

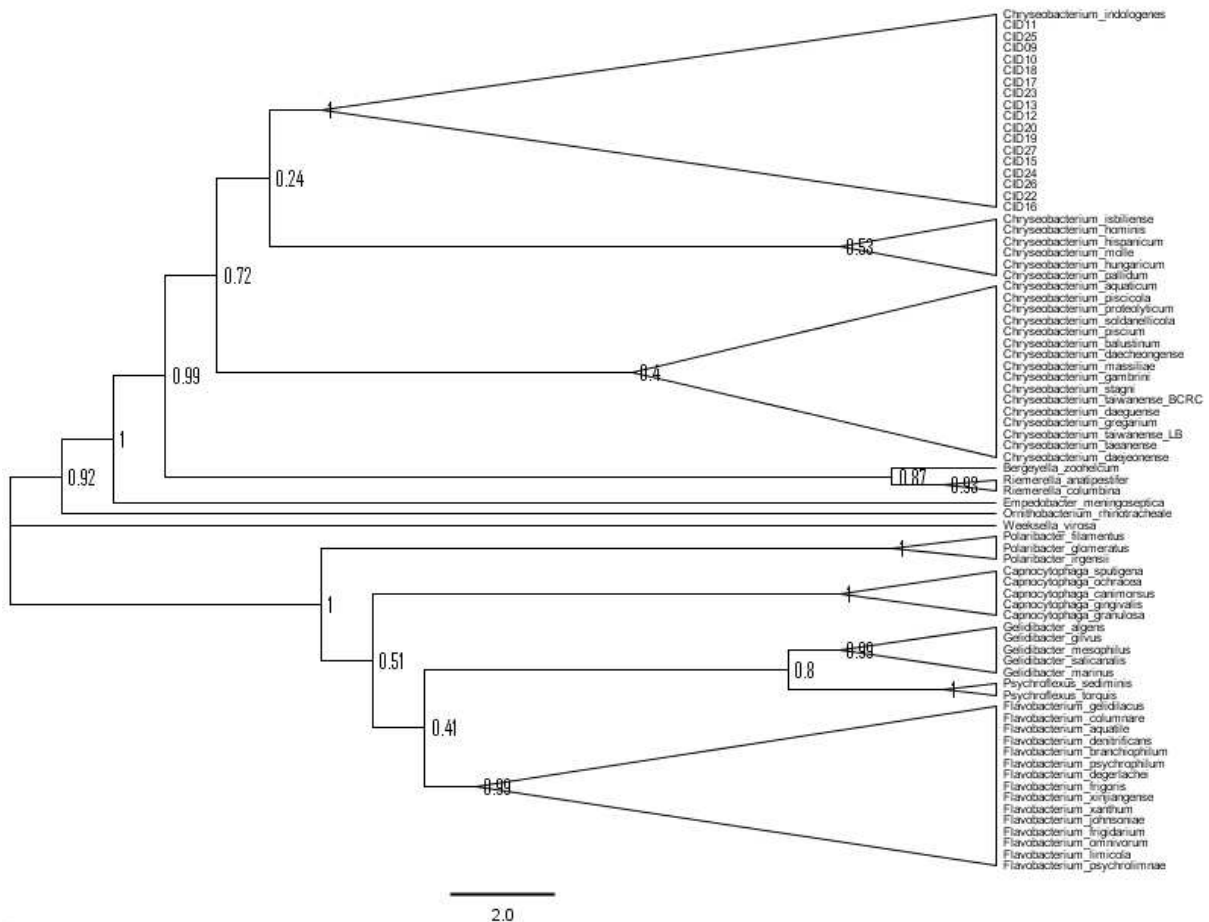


Fig. 2. The maximum likelihood tree for *Chysoebacterium indologenes* based on 16S analysis using MEGA 4x1.

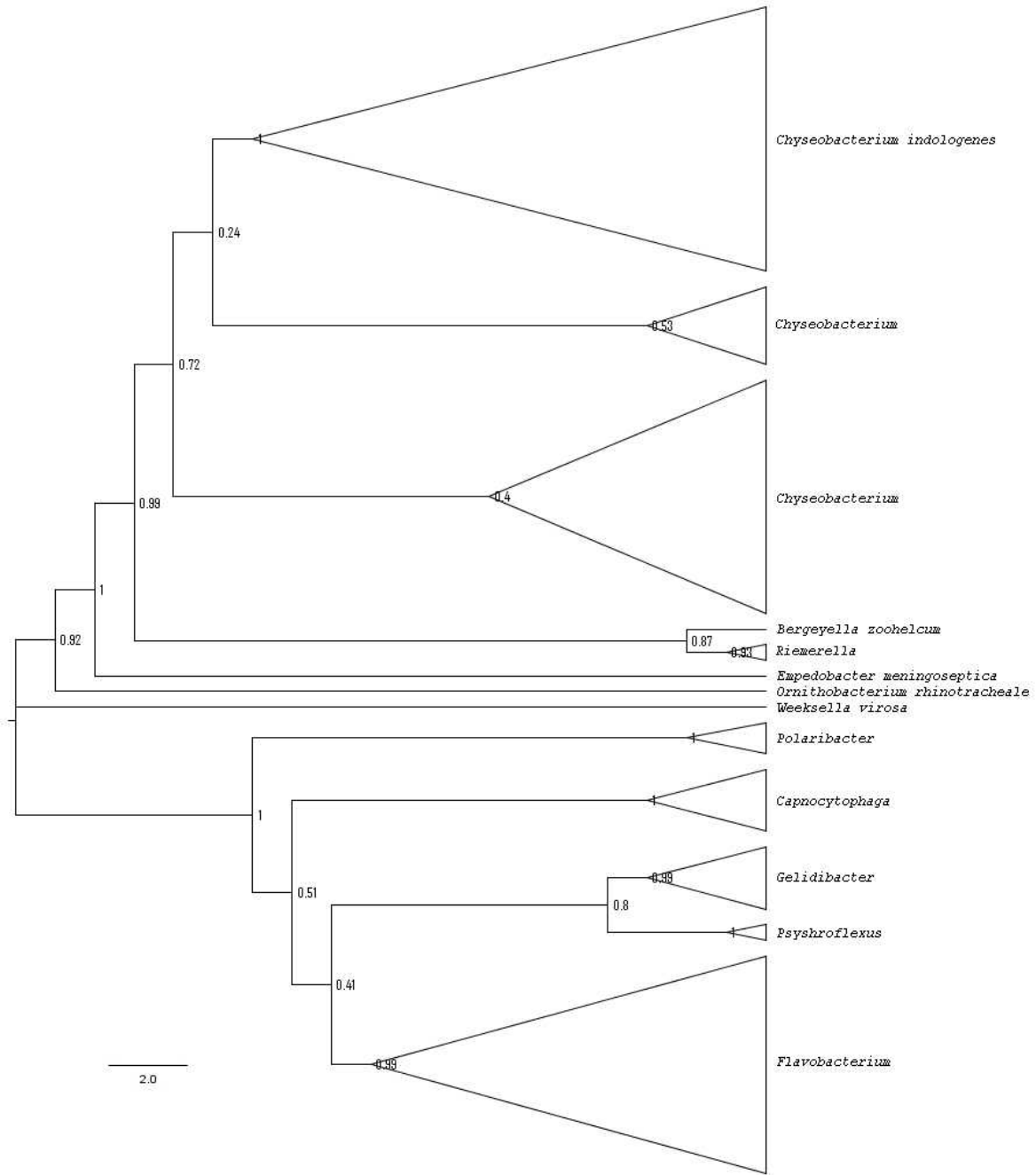


Fig. 3. The maximum likelihood tree for *Chyseobacterium indologenes* based on 16S analysis using MEGA 4x1.

당과정에서 과도한 정돈작업(trimming)과 결손서열을 어떻게 처리하는가에 따른 차이로 인해 발생한 것으로 판단된다.

치환된 염기의 분석에서 다른 염기로 치환 확률은 transition/transversion의 값은 전체 76균주는 0.945인 반면 우리나라의 17균주는 1.206로 높았다(Table 4). 특히 A↔T 또는 C↔G일 transition 확률은 낮으나 C↔T일 확률과 A↔G일 확률은 높았다. 따라서 우리나라 *C. indologenes* 균주에서 16S에서

염기 변화는 GenBank에 보고된 평균보다 염기 치환이 보다 높다고 볼 수 있다.

결론적으로 진균의 분자생물학적 동정에는 리보솜의 ITS 부위 등이 많이 쓰이나 *C. indologenes* 균주에서는 16S로 동정이 잘 될 수 있음이 입증되었으며 우리나라 *C. indologenes* 17균주는 GenBank에 보고된 *C. indologenes* 균주보다 염기 치환이 보다 높았다.

References

1. Bloch, K. C., R. Nadarajah, and R. Jacobs. 1997. *Chryseobacterium meningosepticum*: an emerging pathogen among immunocompromised adults. Report of 6 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)* **76**, 30-41.
2. Bosshard, P. P., R. Zbinden, S. Abels, B. Bödinghaus, M. Altwegg, and E. C. Böttger. 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1359-1366.
3. Bull, J. J. 1994. Virulence. *Evolution* **48**, 1423-1437.
4. Cech, T. R. 1988. Conserved sequences and structures of group I introns: building an active site for RNA catalysis - a review. *Gene* **73**, 259-271.
5. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5s, Distributed by the author. Department of Genetics, Univ. Washington, Seattle.
6. Hsueh, P. R., L. L. Teng, P. C. Yang, S. W. Ho, W. C. Hsieh, and K. T. Luh. 1997. Increasing incidence of nosocomial *Chryseobacterium indologenes* infections in Taiwan. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**, 568-574.
7. Kirby, J. T., H. S. Sadar, T. R. Walsh, and R. N. Jones. 2004. Antimicrobial susceptibility and epidemiology of a worldwide collection of *Chryseobacterium* spp. report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2001). *J. Clin. Microbiol.* **42**, 445-448.
8. Kuhsel, M. G., R. Strickland, and J. D. Palmer. 1990. An ancient group I intron shared by eubacteria and chloroplasts. *Science* **250**, 1570-1573.
9. Kumar, S. and S. R. Gadagkar. 2001. Disparity Index: A simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences. *Genetics* **158**, 1321-1327.
10. Michel, F. and B. Dujon. 1983. Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast- and nuclear-encoded members. *EMBO J.* **2**, 33-38.
11. Nei, M. and T. Gojobori. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* **3**, 418-426.
12. Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740.
13. Patel, J. B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol. Diagn.* **6**, 313-321.
14. Rudi, K. and K. S. Jacobsen. 1997. Complex evolutionary patterns of tRNA_{UAA}^{Leu} group I introns in cyanobacterial radiation. *J. Bacteriol.* **181**, 3445-3451.
15. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
16. Schreckenberger, P. C., M. I. Daneshshvan, R. S. Weyant, and D. G. Hollis. 2003. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods, pp. 749-779, In Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Tenover, J. H. Tenover, and R. H. Tenover (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
17. Swofford, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
18. Tajima, F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.
19. Tamura, K., M. Nei, and S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 11030-11035.
20. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596-1599.
21. Thorne, J. L., H. Kishino, and I. S. Painter. 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 1647-1657.
22. Tortoli, E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacterial of the 1990s. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 319-354.
23. Yannelli, B., I. G. Koj, and B. A. Cunha. 1999. *Chryseobacterium meningosepticum* bacteremia secondary to central intravenous line-related infection. *Am. J. Infet. Control* **27**, 533-535.

초록 : 16S rRNA에 의한 한국 내 *Chryseobacterium indologenes*과 염기 서열 변화

허만규^{1*} · 박소혜¹ · 염종화²

(¹동의대학교 분자생물학과 · ²동의대학교 임상병리학과)

병원균에 대한 정확한 동정은 임상 연구실에서 필수적인 요소의 하나이다. *Chryseobacterium indologenes*에 대한 동정을 포함한 분자생물학적 분석과 리보솜의 16S rRNA 유전자로 한국에서 추출한 17검체와 GenBank에서 *Chryseobacterium*속 검색을 통해 이들과 계통관계를 평가하였다. *C. indologenes*의 배당 서열은 1,176 nucleotides였다. *C. indologenes* 내의 서열 변이는 주로 염기 치환이었다. 한국의 *C. indologenes* 검체는 다른 나라의 동 종과 크게 다르지 않았다. 그런데 한국의 *C. indologenes*의 치환율은 GenBank에 있는 동종보다 높았다. *C. indologenes*는 *C. isbilense*, *C. hominis*, *C. hispanicum*, *C. molle*, *C. hungaricum*, and *C. pallidum*과 자매종을 형성하였다.