

제주마 고환내 세균의 16S rRNA 염기서열 분석을 이용한 동정

박용상* · 김남영[†] · 한상현** · 박남건* · 고문석* · 조원모* · 채현석* · 조인철* · 조상래* · 우제훈* · 강태영¹
제주대학교 수의과대학, *농촌진흥청 국립축산과학원, **제주대학교 교육과학연구소

(게재승인: 2014년 1월 25일)

Identification of Bacteria by Sequence Analysis of 16S rRNA in Testes of Jeju Horses

Yong-Sang Park*, Nam-Young Kim[†], Sang-Hyun Han**, Nam-Geon Park*, Moon-Suck Ko*, Won-Mo Cho*,
Hyun-Seok Chae*, In-Chul Cho*, Sang-Rae Cho*, Jae-Hoon Woo* and Tae-Young Kang¹

College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

*National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea

**Educational Science Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract : Many bacteria colonized in the horse semen affect quality of the sperm and some may cause infection in the mare reproductive tract and infertility of susceptible mare. This study was initiated to determine the prevalence of bacteria in testes of Jeju horses by determining rRNA sequence. The samples were swabbed from the testes of nine Jeju horses (aged from 8 to 12 months after birth). Bacteria isolated from testes were identified by 16S rDNA sequencing. 1.6-kbp PCR products for 16S rRNA coding region were obtained using the universal primers. The PCR products were further purified and sequenced. Maximum similar species were found by BLAST search in the GenBank DNA database. BLAST results showed that the sequences were similar to those of *Acinetobacter sp.* (*A. schindleri*, *A. ursingii*), *Bacillus cereus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Gamma proteobacterium*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas mendocina*, *Shigella sonnei*, *Sphingomonas sp.*, *Staphylococcus sp.* (*S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*), and *Stenotrophomonas maltophilia*. DNA sequences for 16S rRNA is provided useful informations for species identification of pathogenic microorganisms for the reproductive organs in horses.

Key words : Bacterial contamination, Jeju horse, 16S rRNA sequencing.

서 론

말 동결정액은 인공수정을 통한 승용마의 생산, 유전자원 보존을 위하여 활용이 증가하고 있는 추세이며, 국내에서는 활용도가 낮지만 최근 동결정액을 이용한 자마의 생산 등 연구가 활발히 진행되고 있다(10,12). 반면 동결정액의 국제교역이 증가함에 따라, 정액을 통해 감염 될 수 있는 여러 질병 원인체 또한 늘어나고 있는 실정이다(8,15). 질병들은 크게 세균성, 바이러스성, 원충성으로 나눌 수 있으며, 씨숫말 생식기 주변에 분포하는 공생 세균들은 대부분 병원성이 없으나, 외음부주변에 정상세균총의 변화는 *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus zooepidemicus* 등과 같은 기회감염 세균의 증식을 일으킬 수 있으며, 암컷의 수정률에 영향을 준다(7).

장내 세균 등은 임상검체에서 가장 흔히 분리되는 균종으로서 임상검사실에서 정확한 균 동정이 필요하다. 세균동정 방법으로는 전통적인 tube를 이용한 동정방법이 있으며, API 20E (bioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo., USA), micro-ID (Remel, Lenexa KS, USA), Crystal Enteric kit/Non-fermenter (E/NF) system (Becton Dickenson, Inc., Cockeysville, Md., USA) 등과 같이 상품화된 동정키트로 보다 신속하고 간단하게 동정하는 방법이 있다. VITEK Automicroboc system (VITEK AMS, biomerieux VITEK, USA)은 자동화된 장비를 이용하여 보다 빠르게 동정을 가능하게 되었다. 하지만 이러한 동정은 증식이 어렵거나 배양시간이 오래 걸리는 세균, 균 속간의 생화학 성상이 유사하여 감별이 어렵거나 불가능한 세균 또는 새로이 명명된 균종 등의 동정에는 부적합하며, 이럴 경우에 분자유전학적 동정 방법을 적용하여야 한다(4).

세균의 16S rRNA는 몇 가지 기능이 다른 성분으로 구성되어 있으며, 이 중 일부는 균종별로 보존되어 있으나 다른 부분은 균종별로 염기서열이 다르기 때문에 세균의 16S

[†]Both authors contributed equally to this work

¹Corresponding author.

E-mail : tykang87@jejunu.ac.kr

rRNA를 검사하는 방법은 다소 번거롭고 대량의 검체를 동시에 시행할 수 없는 단점이 있다. 그러나 고환 및 자궁에서 적은수로 존재하는 세균과 일반배지에서 증식이 어려운 *Leptospira*, *Richetia*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Brucella*, 영양의존성 연쇄구균, 세포벽 결함이 있는 세균 등에 의한 감염증이 있을 때도 검출이 가능하므로 감염성 질병 진단에 이용될 수 있다. 또한 그람양성세균과 음성세균에 특이 16S rRNA 유전자 염기서열의 primer를 이용하면 그람양성과 그람음성 세균을 구분하여 동정할 수 있으며, 더 나아가 균속 또는 균종에 특이적인 16S rRNA 염기서열에 대한 primer를 이용하여 PCR을 시행하면 균 동정을 시행할 수 있다. 또한 검체에서 DNA 또는 RNA를 추출한 후 세균에 공통적인 16S rRNA나 23S rRNA 또는 16S rRNA와 23S rRNA 사이의 interspace sequence를 PCR로 증폭한 후 fluorescence terminator sequencing을 시행한 다음 sequence gel에서 전기영동으로 DNA를 분리한 다음 automated sequencer를 이용하여 염기서열의 nucleotide 성분을 결정하고 그 염기서열 결과를 컴퓨터에 입력하고 computer에 내장된 균종별 DNA 염기서열과 비교하여 균종을 동정하는 방법이 있다(6,9).

본 실험에서는 당세마(1년 미만) 고환 내 상재되어있는 세균을 자동화기와 염기서열 분석을 통하여 동정하고, 말 정액 내 오염될 수 있는 상재세균에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

공시동물 및 DNA 추출

연구시료는 농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장에서 사육중인 제주마(8~12개월령) 9두의 고환을 멸균적으로 제거하였다. 제거된 고환 및 부고환은 멸균 면봉으로 swab하여 transport medium (Micromedia Co. Ltd, Korea)에 넣은 후 실험실로 신속히 이동하여 5% 혈액천배지와 1.5% nutrient agar 및 Mac conkey agar에서 37°C 호기성 조건에서 18~24시간 배양하였다. 배양된 균의 단독 colony는 색상과 형태에 따라 분류하고 선택하여 순수 분리하였다.

자동화기를 이용한 세균동정

순수 분리된 균은 그람염색, oxidase test, catalase test를 이용하여 동정하였다. 세균동정키트에 충전하기 전에 분리된 균을 0.45~0.5% 식염수에 부유하고 표준탁도계를 이용하여 그람양성균은 80~87T%, 그람음성균은 66~76T% 농도를 조절하였다. 그람양성균은 GPI (gram positive identification) 카드, 그람음성균은 GNI (gram negative identifications) 카드를 사용하였고, 카드에 catalase test와 oxidase test 결과를 입력하였다. 준비된 균 부유액을 카드에 각각 충전하여 VITEK system (bioMerieux, France) Reader/Incubator에 넣고 18시간 배양하여 동정하였다.

16S rRNA 염기서열 분석 및 동정

세균의 16S rRNA를 증폭하기 위하여 세균의 공통

primer인 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')를 forward primer로 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하여 reverse primer로 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭조건은 95°C에서 3분간 열 변성 후, 95°C 30초, 53°C 30초, 72°C 1분의 과정을 35회 반복 후, 72°C에서 7분간 연장반응을 실시하였다. 증폭된 DNA는 전기영동을 통해 band를 확인한 후 QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 증폭산물을 정제하였다. 정제된 DNA는 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하여 양방향으로 염기서열을 분석하였다.

16S rRNA 유전자의 염기서열을 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)자료와 비교하였다. 세균은 참고 염기서열과 99% 및 95% 이상의 일치율을 보일 때 특정 종 및 속으로 동정하였다.

결과 및 고찰

세균의 16S rRNA를 검사하는 방법은 다소 번거롭고 대량의 검체를 동시에 시행할 수 없는 단점이 있으나, 고환 및 자궁에서 적은수로 존재하는 세균과 일반배지에서 증식이 어려운 세균 등에 의한 감염증이 있을 때도 검출이 가능하므로 감염성 질병 진단에 이용될 수 있다. 본 연구에서는 5% 혈액천배지와 1.5% nutrient agar 및 Mac conkey agar를 이용하여 균의 단독 colony를 색상과 형태에 따라 분류하고, 선택하여 순수 분리하였다. 혈액배지의 순수 분리된 균은 그람음성균의 양상을 나타내었으나, VITEK system를 이용한 검사 결과 시 균동정을 하지 못하였다.

본 연구에서는 제주마의 고환 및 부고환 내 상재하는 세균을 자동화기 및 16S rRNA의 염기서열 분석을 통하여 세균을 동정한 결과, *Acinetobacter sp* (*A. schindleri*, *A. ursingii*), *Bacillus cereus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Gamma proteobacterium*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas mendocina*, *Shigella sonnei*, *Sphingomonas sp.*, *Staphylococcus sp* (*S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. xylosum*), 그리고 *Stenotrophomonas maltophilia*로 나타났다(Table 1). *Staphylococcus sp*와 *Stenotrophomonas maltophilia*는 각각 6개와 5개의 샘플에서 분리 동정되었으며, 나머지 세균들은 1-2개 정도의 샘플에서 분리 동정되었다. 그리고 세균성 적리의 원인체로 알려진 *Shigella sonnei*등의 세균이 검출되었다. 이들 균종은 기회감염 균종으로 알려져 있기에 여기에 대한 균종은 보다 더 연구 되어져야 할 것으로 사료된다.

유전자 염기서열 분석과 같은 분자유전학적 방법은 흔히 분리되지 않거나 표현형에 대한 자료가 부족한 미생물, 균주에 따라 다양한 생화학적 성상을 나타낼 수 있는 미생물의 동정에 유용할 뿐 아니라, 그동안 밝혀지지 않았던 새로운 병원균을 찾을 수 있는 장점이 있다(1,2). 세균의 분자유전학적 동정에서 초기에는 5S, 16S 및 23S rRNA 유전자와 이들 사이에 위치한 유전자가 대상으로 사용되었으며, 현재는 16S

Table 1. Distribution of bacteria in testes of Jeju horses

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
<i>Acinetobacter sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter schindleri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter ursingii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gamma proteobacterium</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas mendocina</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sphingomonas sp.</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus sp.</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus cohnii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus xylosus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+

rRNA 유전자가 세균의 분류에서 가장 흔히 사용되고 있다 (13). 16S rRNA 유전자의 염기서열은 약 1,550의 길이를 가지며 보존서열과 다형성을 보이는 서열부위로 구성되어 있어서 염기서열을 이용한 세균의 동정에 유용하다. 그 이유는 16S rRNA 유전자가 세포의 구조 형성에 필수적인 역할을 하지 않으므로 세균마다 차이를 보일 수 있는 변이 발생이 용인되기 때문이다(11,14). 16S rRNA의 염기서열은 많은 균주에서 밝혀져 있는데, 가장 흔히 이용할 수 있는 GenBank에는 90,000가지 이상의 16S rRNA 유전자 염기서열 정보가 저장되어 있어 비교를 통한 세균의 동정이 가능하다. 또한 16S rRNA는 모든 세균에 존재하므로, 이 유전자를 이용한 동정법은 거의 모든 세균에 적용할 수 있다.

세균은 정액과 수정란에 나쁜 영향을 미치며, 세균의 대사 산물 중 endotoxin과 같은 물질은 정자의 운동성과 생존성에 영향을 미치게 된다. 세균이 수태울에 미치는 영향은 잘 알려지지 않았으며, 오염된 정액 유래 세균이 수정 부위인 난관에 도착하는 것은 극소수로 수정부위에 도달하는 정자의 수를 감소시킬 수 있다. 향후, 제주마의 고환 내 상재세균에 대한 지속적인 모니터링과 약제 감수성의 양상을 파악한다면 적절한 항균제의 선택을 통한 생식기 질병의 조기치료를 하여 항균제의 내성을 줄이고 오남용도 방지할 수 있을 것이라 생각한다. 또한 인공수정 시 사용하는 말 액상정액에 항생제의 첨가는 항생제 감수성 실험결과를 토대로 결정할 다음 사용하면 번식률을 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 제주마의 고환 내 상재하는 세균을 자동화 기기와 염기서열 분석으로 분리 동정하고자 하였다. 9마리 제주마의 고환에서 분리 동정된 세균은 *Acinetobacter sp.* (*A.*

schindleri, *A. ursingii*), *Bacillus cereus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Gamma proteobacterium*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas mendocina*, *Shigella sonnei*, *Sphingomonas sp.*, *Staphylococcus sp.* (*S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*), 그리고 *Stenotrophomonas maltophilia*였다. 16S rRNA 유전자 염기서열은 제주마의 고환 내 상재하는 세균의 분리동정 및 차후 생식기질병의 조기치료에도 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(과제번호:PJ0086402013)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참 고 문 헌

1. Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, Boddingtonhaus B, Altwegg M and Bottger EC. 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 2006; 44: 1359-1366.
2. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 840-862.
3. Hiraishi A. Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. Lett Appl Microbiol 1992; 15: 210-213.
4. Klausegger A, Hell M, Berger A, Zinober K, Baier S, Jones N, W and Kofler B. Gram type-specific broad-range PCR amplification for rapid detection of 62 pathogenic bacteria. J Clin Microbiol 1999; 37: 464-466.
5. Loomis PR. The equine frozen semen industry. Anim Reprod

- Sci 2001; 68: 191-200.
6. Ludwig W and Schleifer. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. FEMS Microbiol Rev 1994; 15: 155-173.
 7. Maxam AM and Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci 1997; 74: 560-564.
 8. Metcalf ES. The role of international transport of equine semen on disease transmission. Anim Reprod Sci 2001; 68: 229-237.
 9. Mollet C, Drancourt M, and Raoult D. Sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. Mol Microbiol 1997; 26: 1005-1011.
 10. Muller Z. Fertility of frozen equine semen. J Reprod Fertil Suppl. 1982; 32: 47-51.
 11. Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science 1997; 276: 734-740.
 12. Park YS and Cho GJ. Factors affecting on the motility of semen and the pregnancy rate of artificial insemination in equine. J Emb Trans 2011; 26: 13-17.
 13. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Mol Diagn 2001; 6: 313-321.
 14. Thorne JL, Kishino H, and Painter IS. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. Mol Biol Evol 1998; 15: 1647-1657.
 15. Timoney PJ. The increasing significance of international trade in equids and its influence on the spread of infectious diseases. Ann N Y Acad Sci 2000; 916:55-60.