

碩士學位論文

*Vibrio vulnificus*의 16S-23S rRNA  
Intergenic Saper Region의 분석



海洋生物工學科

朴映美

2002年 12月

# *Vibrio vulnificus*의 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region의 분석

指導教授 李 濟 熙

朴 映 美

이 論文을 理學碩士 論文으로 提出함



朴映美의 理學碩士 論文을 認准함

審査委員長 송 춘 복 (인)

委 員 허 문 수 (인)

委 員 이 제 희 (인)

濟州大學校 大學院

2002年 12月

Analysis of *Vibrio vulnificus* 16S-23S rRNA  
Intergenic Spacer Region

Young-Mi Park  
(Supervised by professor Jehee Lee)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE

Department of Marine Biotechnology  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2002. 12.

# 목 차

Abstract .....	i
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	5
1. <i>V. vulnificus</i> KCTC 2959의 genomic DNA 분리 .....	5
2. ISR 증폭을 위한 primer 제작 .....	5
3. ISR 증폭을 위한 PCR reaction .....	6
4. <i>V. vulnificus</i> KCTC 2959 ISR의 Cloning .....	6
5. ISR의 염기서열 및 tRNA gene 분석 .....	7
6. <i>V. vulnificus</i> KCTC 2959에 특이적인 primer 제작 및 PCR .....	8
III. 결 과 .....	9
1. <i>V. vulnificus</i> ISR의 크기 및 tRNA 조성 분석 .....	9
2. ISR의 nucleotide sequence 및 tRNA gene sequence 비교 .....	12
3. <i>V. vulnificus</i> 의 신속한 진단을 위한 primer 제작 및 PCR reaction .....	19
IV. 고 찰 .....	22
V. 요 약 .....	27
VI. 참 고 문 헌 .....	28
감사의 글 .....	33

## Abstract

*Vibrio vulnificus* is a gram-negative rod bacterium that can cause septicaemia and skin lesions. Since *V. vulnificus* has become a public health problem, a rapid and effective detection method is needed.

In an attempt to develop rapid PCR detection method for *V. vulnificus*, we have examined the 16S-23S rRNA intergenic spacere (ISR) of *V. vulnificus* and developed species-specific primer for *V. vulnificus* KCTC 2959. The intergenic spacers were amplified by primers complementary to conserved regions of 16S and 23S rRNA genes. The ISR amplicons were cloned into plasmid vectors and sequenced. Analysis of the ISR sequences showed that *V. vulnificus* KCTC 2959 contains five types of polymorphic ISRs. The size of ISRs ranged from 424 to 741 bp in length and the number of tRNA genes ranged from one to four. The ISRs were designated ISR-E, ISR-IA, ISR-EKV, ISR-IAV, ISR-EKAV. ISR-E included the tRNA<sup>Glu</sup>; ISR-IA, tRNA<sup>Ile</sup> and tRNA<sup>Ala</sup>; ISR-EKV, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Val</sup>; ISR-IAV, tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Val</sup>; ISR-EKAV, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Val</sup>.

Multiple alignment of representative sequences from different *Vibrio* species revealed several domains of high sequence variability, which were used to design species-specific primer for detection PCR. The specificity of the primer was examined using genomic DNA prepared from 18 different *Vibrio* species. The species-specific primer distinguished *V. vulnificus* from the other *Vibrio* species. The results showed that the PCR reaction using species-specific primer designed in this study can be used to detect *V. vulnificus*.

## I. 서론

1979년 전남 해안지방에서 일어난 갑작스런 피부 괴저와 쇼크로 사망한 예를 최초로 매년 5월에서 10월 사이 그 중에서도 특히 7월에서 9월 사이에 *Vibrio vulnificus*에 의한 피해사례들이 많이 보고되었다 (박경수 등, 1993; 신성욱과 박석돈, 1998; 주진우 등, 1998). 패혈증의 원인균으로 잘 알려져 있는 호염성, 그람 음성 간균인 *V. vulnificus*는 해수, 갯벌, 어패류에서 주로 분리되며 어패류를 생식하는 식습관을 갖는 우리들에게는 위협적인 존재라 할 수 있다 (박경수 등, 1993; 신성욱과 박석돈, 1998). 이 균에 오염된 해산물을 생식하여 *V. vulnificus*에 감염되면 오한, 발열, 복통, 구토, 설사 등의 증상이 나타나고 피부에 수포, 부종 등이 발생하는 패혈성 쇼크를 일으켜 심한 경우 생명을 잃을 수 있다. 또한, 상처부위가 이 균에 오염된 해수나 어패류에 노출되면 심한 경우에는 외과적인 수술로 조직을 제거해야 할 정도의 괴사가 발생하기도 한다 (Blake *et al.*, 1979). 그리고 *V. vulnificus*가 인체에 침입하게 되면 매우 빠르게 증식하여 급격히 질병이 악화되어 감염 환자의 대부분이 이 균에 오염된 음식을 섭취한 후 2일 이내에 질병 증상이 나타나게 되며 (Park *et al.*, 1991; 정기용과 고광균, 1995) 감염 환자의 사망률은 60% 이상으로 매우 높은 것으로 보고되었다 (Oliver *et al.*, 1992; 박경수 등, 1993; 주진우 등, 2000). 따라서 *V. vulnificus*에 의한 피해를 최소한으로 줄이기 위해서는 이 균이 서식하기 좋은 것으로 알려진 환경이나 개체에 대한 사전 조사를 실시하여 감염 자체를 예방해야 하는 것은 물론 앞에서 설명한 *V. vulnificus* 감염 증상과 유사한 증상을 보여 이 균에 의해 감염된 것으로 추정되는 환자가 생기면 질병이 급속히 악화되어 최악의 결과를 초래하기 전에 신속하고 정확하게 균을 동정하고 검출하여 적절한 치료를 해야 할 것이다.

*V. vulnificus*는 자연환경에서 여러 다른 세균들과 함께 존재하며 감염 환자의 혈액이나 병변에도 매우 적은 균이 존재하므로 정확하게 이 균을 분리하고 동정하기 위해서는 먼저 1% NaCl이 포함된 APW (alkaline peptone water)에서 피검물을 증균 배양하여 검사에 충분할 정도로 *V. vulnificus*의 균수를 늘려야 한다 (Tamplin *et al.*, 1991). 그 후 TCBS (thiosulfate-citrate bile salts sucrose) agar (Oliver *et al.*, 1992),

VV agar (Brayton *et al.*, 1983), SPS (sodium dodecyl sulfate-polymyxin B-sucrose) agar (Bryant *et al.*, 1987; 정윤섭 등, 1987), CPC (cellobiose-polymyxin B-colistin) agar (Massad and Oliver, 1987; Hoi *et al.*, 1998), mCPC (modified CPC) agar (Tamplin *et al.*, 1991), CC (cellobiose-colistin) agar (Hoi *et al.*, 1998), VVA (*V. vulnificus* agar) (Wright *et al.*, 1993), VVE (*V. vulnificus* enrichment agar) (Wright *et al.*, 1993; Miceli *et al.*, 1993) 등의 선택배지에서 균의 증식 여부와 colony의 색깔을 관찰하여 다른 균과 *V. vulnificus*를 구별하게 된다. 위의 배지에서 선택한 *V. vulnificus*로 의심되는 colony를 보다 정확하게 검사하기 위해 탄소원으로서의 구연산 이용능, SIM (sulfate indole motility) 배지에서의 운동성, indole 생성능, salicine, cellobiose, lactose 등의 각종 당을 첨가한 phenol red 액체배지에서의 당 분해성, NaCl를 각각 다른 비율로 첨가한 BHI (brain heart infusion) 액체배지에서의 증균여부 등을 관찰하거나 API 20E kit을 이용한 생화학적 성상으로 균을 동정한다 (박경수 등, 1993; 주진우 등, 1998; 주진우 등, 2000).

그러나 증균배양으로 인해 *V. vulnificus*가 아닌 다른 균들이 더욱 더 증식하게 되어 이 균의 분리가 어려워지게 되거나 (Tamplin *et al.*, 1991) 다른 균들의 증식을 억제하기 위해 선택배지에 첨가한 oxgall이나 colistin, polymyxin B로 인해 오히려 *V. vulnificus*의 증식이 억제되거나 심할 경우 cell들이 성장할 수 없게 되기도 한다 (Miceli *et al.*, 1993; 정기용과 고광균, 1995; Hoi *et al.*, 1998). 또한 TCBS 배지에서 sucrose 비분해성 녹색 colony를 형성하는 것으로 알려진 *V. vulnificus* 일부 strain은 sucrose를 분해하는 것으로 보고되었으며 (Tamplin *et al.*, 1991), 선택배지에서 *V. vulnificus*의 성상을 갖는 colony를 API 20E kit으로 분석한 결과 다른 *Vibrio* 균으로 동정되었다 (Massad and Oliver, 1987; 신성욱과 박석돈, 1998). 보다 정확한 결과를 얻기 위한 생화학적인 시험 결과도 실험 균주들의 생화학적 성상이 자주 변하여 확실한 결과를 얻기까지 상당한 시간이 소모되거나 (주진우 등, 1998) 표준균주와는 다른 성상을 나타내어 혼란이 발생하기도 한다 (주진우 등, 2000). 또한 *V. vulnificus*는 낮은 온도나 염분 증가 등의 환경적인 stress에 의해 일반적인 배지에서는 배양할 수 없어 기존의 방법으로는 검출하기 어려운 VBNC (viable but nonculturable) state의 cell을 형성하는 것으로 보고되고 있으며, 이들은 온도가 다시 올라가면 소생하여 질병을 일으킬 위험이 있는 것으로 보고되었다 (Nilsson *et al.*, 1991; Oliver, 1995;

Oliver and Bockian, 1995). 그러므로 균을 동정하기 위해 배양을 해야하는 통상적인 방법은 정확한 결과를 얻기에는 한계가 있다. 게다가 병의 상태가 급속도로 악화되어 심각한 결과를 초래하는 *V. vulnificus*를 신속하게 분리하고 동정하기에는 많은 시간과 노동력이 요구되며 민감도와 정확성이 낮은 기존의 방법으로는 감염에 의한 피해를 줄이기에는 역부족이므로 최근에는 분자생물학적인 기법을 이용하여 정확하고 신속, 간편하게 *V. vulnificus*를 분리하려는 연구가 진행되고 있다. 면역학적 방법으로 감도가 높은 monoclonal antibody를 이용하거나 (Tamplin *et al.*, 1991; Parker and Lewis, 1995) *V. vulnificus*에 특이적인 유전자로 알려져 있는 cytotoxin-hemolysin gene에 방사성 동위원소나 alkaline phosphatase로 표지하여 probe로서 이용하기도 한다 (Morris *et al.*, 1987; Wright *et al.*, 1993; Dalsgaard *et al.*, 1996). 또한 cytotoxin-hemolysin gene를 primer로 사용한 PCR 반응으로 다른 균들과 함께 혼합된 상태에서는 물론 nonculturable cell도 확인할 수 있었다 (Brauns *et al.*, 1991; Coleman and Oliver, 1996). 그리고 cytotoxin-hemolysin gene에 비해 rearrangement의 가능성이 (DePaola *et al.*, 1997) 적은 housekeeping gene인 16S rDNA (16S rRNA gene) 서열의 일부를 probe (V3VV)로 이용하여 동정하거나 (Cerda-Cuellar *et al.*, 2000) 23S rDNA (23S rRNA gene)의 일부 서열을 primer로 제작하여 PCR을 반응하여 빠른 시간 내에 정확하게 *V. vulnificus*를 동정할 수 있는 방법들이 보고되었다 (Arias *et al.*, 1995). 그러나 이들 유전자의 염기서열 변이도가 그리 높지 않아 종 미관에서 동정하거나 서열을 분석하여 종 분류를 하는 것은 그다지 효과적이지 못하다는 문제점이 제시되면서 근래에는 16S rDNA와 23S rDNA 사이에 존재하는 intergenic spacer region (이하 ISR)을 이용하여 미생물을 분류하거나 동정하는데 이용하려는 연구들이 진행되고 있다.

16S, 23S rDNA 사이에 존재하는 ISR은 tRNA genes과 non-coding region으로 구성되어 있으며, tRNA gene의 종류 및 구성에 따라 다른 종끼리는 물론 multiple operon을 갖는 개체의 경우 하나의 세포에서도 operon간에 ISR의 크기와 서열이 매우 다양하다 (Condon *et al.*, 1995; Gurtler and Stanisich, 1996; Maeda *et al.*, 2000). 이 점에 착안하여 *V. mimicus*와 *V. cholerae*의 ISR 서열을 분석하고, *V. cholerae*만을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer를 제작하여 PCR하고, 그 PCR product를 전기영동한 band의 양상으로 *V. cholerae*를 특이적으로 구별할 수 있었다 (Chun *et al.*,



1999). 그 외에도 *V. costicola*, *V. diazotrophicus*, *V. fluvialis*, *V. nigripulchritudo*, *V. proteolyticus*, *V. salmonicida*, *V. splendidus*, *V. tubiashii*의 ISR 서열을 분석하여 각 species에 특이적인 primer를 제작할 수 있었다 (Lee *et al.*, 2002).

이 논문에서는 패혈증의 원인균인 *V. vulnificus*의 잘 보존된 16S rDNA와 23S rDNA의 서열을 primer로 이용하여 ISR 서열을 증폭시켜 *V. vulnificus* ISR의 염기서열과 종류를 분석하고 다른 *Vibrio*의 ISR 서열과 비교하여 이 균만을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer를 제작하였다. 이렇게 제작한 species-specific primer를 이용하여 PCR한 후 agarose gel에서 PCR product를 전기영동하여 band pattern을 비교하여 *V. vulnificus*를 빠른 시간 내에 정확히 동정할 수 있는 방법을 개발하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. *V. vulnificus* KCTC 2959의 genomic DNA 분리

유전자은행 (Korean Collection for Type Cultures)에서 *V. vulnificus* KCTC 2959 균주를 분양받아 2.5% NaCl이 첨가된 LB (Luria-Bertani) broth 4 ml에 접종하여 35℃에서 배양하였다. 밤새 배양한 배양액을 microcentrifuge tube에 넣어 15000 rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet을 수집하고 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 genomic DNA의 농도는 Unicam UV/VIS Spectrometer (HeXios β, Unicam Ltd, UK)를 이용하여 260 nm에서 optical density를 측정하여 계산하였다.



### 2. ISR 증폭을 위한 primer 제작

*V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR를 증폭하기 위한 oligonucleotide primer는 현재까지 보고된 *Vibrio*의 16S rDNA의 3'-end 부분과 23S rDNA의 5'-end 부분을 각각 multiple alignment하여 제작하였다. Forward primer인 16S-VF (5'- CCGTCACAC CATGGGAGTGG -3')는 *V. vulnificus* ATCC 27562의 16S rDNA 서열의 1396 bp에서 1415 bp에 해당하고, reverse primer인 23S-VR (5'- ACTGCCAAGGCATCCA CCGTG -3')는 *V. vulnificus* ATCC 27562의 23S rDNA의 20 bp에서 40 bp에 해당되며 이 primers는 (주)바이오니아에 의뢰하여 합성하였다.

### 3. ISR 증폭을 위한 PCR reaction

*V. vulnificus*의 ISR을 증폭하기 위한 PCR의 total reaction volume은 100  $\mu$ l로 하였으며 약 100 ng의 genomic DNA를 template로 하여 16S-F, 23S-R primer를 각각 1  $\mu$ M되게 첨가하고 200  $\mu$ M의 dNTP와 10  $\times$  PCR buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 5 Units *Taq* polymerase (TAKARA)을 혼합하고 mineral oil로 PCR reaction solution 위에 얇은 층을 만들어 증발을 방지하였다. PCR reaction은 PTC-150 Minicycler (MJ Research)를 이용하였고, 반응 조건은 최초 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 2분, denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 45초, annealing 45 $^{\circ}$ C에서 45초, extension 72 $^{\circ}$ C에서 1분간을 30회 반복하였고, 마지막 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다.

### 4. *V. vulnificus* KCTC 2959 ISR의 Cloning

QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)을 이용하여 PCR product에 남아 있는 primers, nucleotides, polymerase, salts를 제거하고, 50  $\mu$ l의 elution buffer (10 mM Tris  $\cdot$  Cl, pH 8.5)에 DNA를 elution하였다. 정제한 PCR product는 *Taq* polymerase에 의해 합성된 3'의 A를 제거하기 위해 3'  $\rightarrow$  5' exonuclease activity를 갖고 있는 *Pfu* polymerase (Stratagene)을 이용하여 polishing하였다. Polishing은 purification kit으로 정제한 PCR products 30  $\mu$ l에 1  $\mu$ l의 10 mM dNTP와 10 X cloned *pfu* buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.8, 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 1 mg/ml nuclease-free bovine serum albumin)와 2.5 Units의 *Pfu* polymerase를 혼합하여 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 incubation하여 실시하였다. 이 blunting product는 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)을 이용하여 정제하였고, DNA의 농도를 측정하기 위해 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다.

*V. vulnificus*의 ISR fragment는 *HincII*로 절단된 pBluescript II SK(-) vector

(Stratagene)에 ligation하였다. pBluescript II SK(-) vector 100 ng에 1  $\mu$ l의 10 X T4 DNA ligase buffer (660 mM Tris-HCl pH 7.6, 66mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 1 mM ATP), 4  $\mu$ l의 insert DNA, 0.5  $\mu$ l의 T4 DNA ligase (TAKARA)를 넣고 전체 volume이 10  $\mu$ l가 되게 한 다음 15°C에서 16시간 동안 ligation하였다. Ligation 산물은 *E. coli* Nova-Blue에 transformation하였다. Transformation은 5  $\mu$ l의 ligation 산물을 *E. coli* Nova-Blue competent cell 70  $\mu$ l에 첨가하고 얼음에서 40분간 배양한 뒤 42°C에서 90초간 heat-shock을 시키고, LB broth 100  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한 뒤 80  $\mu$ l을 ampicillin, IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactopyranoside)이 포함된 LB plate에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 하루 배양한 colony 중 white colony만을 82개 선택하여 ampicillin이 첨가된 LB broth에 접종하여 37°C에서 밤새 배양하였다. Overnight culture를 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 15000 rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet을 수집하고 AccuPrep™ plasmid extraction kit (Bioneer)를 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 분리한 plasmid DNA는 *Hind*III, *Kpn*I (Amersham Pharmacia Biotech)으로 37°C에서 double digestion하여 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 digestion product의 크기에 따라 group으로 나누었다.

## 5. ISR의 염기서열 및 tRNA gene 분석

Digestion product의 크기에 따라 분류한 5개의 group을 토대로 각 group에서 1-2개의 clone을 임의로 선택하여 그 clone에 해당하는 plasmid를 (주)Macrogen에 의뢰하여 ABI 3700 (Applied Biosystems)을 이용하여 sequencing하였다. 분석된 *V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR 염기 서열은 tRNAscan-SE 1.21을 이용하여 ISR 내의 tRNA gene을 분석하였다.

## 6. *V. vulnificus* KCTC 2959에 특이적인 primer 제작 및 PCR

*V. vulnificus* ISR의 염기서열을 Clustal W을 이용하여 이미 밝혀진 13종의 다른 *Vibrio* ISR와 multiple alignment하여 species-specific detection primer인 Vul-DF를 제작하였다. *V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR-IAV의 349 bp에서 367 bp 사이의 서열 이면서 ISR-EKAV의 435 bp에서 453 bp 사이에 존재하는 서열인 5' - ACCACC TTCTTTATGTCTG - 3'을 *V. vulnificus*을 detection하기 위한 forward primer인 Vul-DF로 이용하였고 reverse primer는 23S-VR을 이용하였다. Vul-DF primer의 특이성을 확인하기 위해 *V. vulnificus* KCTC 2959 이외에 18개의 다른 *Vibrio* strain의 genomic DNA를 추출하여 *V. vulnificus* KCTC 2959와 동일한 조건에서 PCR을 실시하였다. PCR reaction이 문제없이 실시되었는지 확인하기 위해 positive control로서 1  $\mu$ M의 16S-VF와 23S-VR primer와 *V. vulnificus* KCTC 2959의 genomic DNA를 이용하여 증폭하였다. 반응은 전체 volume 25  $\mu$ l에 1  $\mu$ M의 Vul-DF primer, 23S-R primer와 30 ng의 genomic DNA를 혼합하였다. 반응 조건은 최초 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 2분, denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 45초, annealing 43 $^{\circ}$ C에서 45초, extension 72 $^{\circ}$ C에서 10분간을 30회 반복하였고, 마지막 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응하였다. PCR reaction 후 PCR product를 1.5% agarose gel에 전기영동하여 각 strain의 band pattern을 관찰하였다.

### III. 결과

#### 1. *V. vulnificus* ISR의 크기 및 tRNA 조성 분석

*V. vulnificus* KCTC 2959의 genomic DNA를 주형으로 16S rDNA와 23S rDNA의 일부 서열인 16S-VF와 23S-VR primer를 이용하여 ISR을 PCR하여 증폭하였다. 증폭된 ISR fragment를 1.5% agarose gel에 전기영동한 사진은 Fig. 1에 나타냈다. 약 600 bp와 900 bp 사이에 존재하는 다양한 크기와 세기의 여러 band를 관찰 할 수 있었다.

PCR로 증폭한 *V. vulnificus*의 ISR을 *HincII*로 digestion한 pBluescript II SK (-) vector에 cloning하여 82개의 clone를 얻었다. 크기와 서열이 다양한 ISR을 찾아내기 위해 82개의 모든 clone을 제한효소 *HindIII*와 *KpnI*으로 double digestion하고, 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 digestion product의 크기에 따라 5개의 A, B, C, D, E group으로 분류하였다. 각 group에서 1-2개의 clone을 임의로 선택하여 염기서열을 분석한 결과, 같은 group에 속해있는 2개의 다른 clone의 염기서열은 서로 일치하였다. ISR의 실제 크기는 16S-VF와 23S-VR primer에 의해 증폭된 139 bp의 16S rDNA와 40 bp의 23S rDNA 부분을 제외하여 계산하였고, 각 group에서 확인된 ISR의 염기 서열을 토대로 tRNAscan-SE 1.21을 이용하여 그 안에 존재하는 tRNA gene를 분석하고 그 종류에 따라 ISR를 명명하여 Table 1에 정리하였다. *V. vulnificus* KCTC 2959에는 ISR-E, ISR-IA, ISR-EKV, ISR-IAV, ISR-EKAV 5종류의 ISR type이 존재하는 것으로 확인되었고, 그 크기는 각각 424 bp, 507 bp, 608 bp, 655 bp, 741 bp 였다. ISR-E는 glutamate에 대한 tRNA gene이 들어 있는 ISR type를 의미하며, ISR-IA는 isoleucine과 alanine에 대한 tRNA genes, ISR-EKV는 glutamate, lysine, valine에 대한 tRNA genes, ISR-IAV는 isoleucine, alanine, valine에 대한 tRNA genes, ISR-EKAV는 glutamate, lysine, alanine, valine에 대한 tRNA genes이 들어 있는 ISR type를 의미한다.

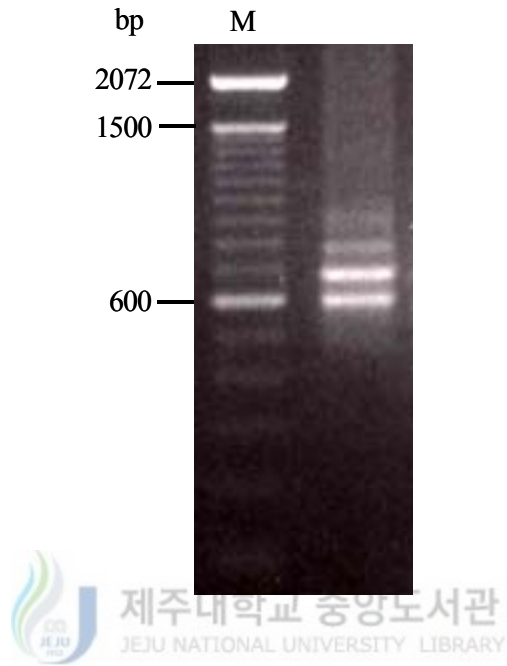


Fig. 1. Electrophoresis of PCR-amplified 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *V. vulnificus* KCTC 2959 on 1.5% agarose gel. Left lane is molecular weight marker (100 bp ladder). Right lane is the PCR-amplified 16S-23S rRNA intergenic spacers of *V. vulnificus* KCTC 2959.

group <sup>a</sup>	type of ISR	tRNA gene <sup>b</sup>	Size of		Number of clones
			ISR (bp)	amplified fragments	
A	ISR-E	Glu <sup>(UUC)</sup>	424	603	36
B	ISR-IA	Ile <sup>(GAU)</sup> , Ala <sup>(UGC)</sup>	507	686	29
C	ISR-EKV	Glu <sup>(UUC)</sup> , Lys <sup>(UUU)</sup> , Val <sup>(UAC)</sup>	608	787	10
D	ISR-IAV	Ile <sup>(GAU)</sup> , Ala <sup>(UGC)</sup> , Val <sup>(UAC)</sup>	655	834	1
E	ISR-EKAV	Glu <sup>(UUC)</sup> , Lys <sup>(UUU)</sup> , Ala <sup>(UGC)</sup> , Val <sup>(UAC)</sup>	741	920	6

**Table 1. The size and tRNA composition of the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *V. vulnificus* KCTC 2959.**

<sup>a</sup> : The groups were classified into five size groups.

<sup>b</sup> : Anticodons are indicated in parentheses.

The number of total clones is 82.



지금까지 *Vibrio*의 ISR에 관한 연구는 장염을 일으키는 *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, 콜레라의 원인균인 *V. cholerae*를 포함한 13종의 *Vibrio*를 대상으로 실시되었다 (Chun *et al.*, 1999; Maeda *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002). Table 2에 이 논문에서 분석한 *V. vulnificus*의 ISR type과 현재까지 보고된 13종의 *Vibrio* ISR type을 종합하여 정리하였다. ISR에 존재하는 tRNA를 coding하는 gene의 조합에 따라 현재까지 보고된 모든 *Vibrio*의 ISR type을 분석한 결과 ISR-no (tRNA gene을 coding하지 않는 ISR), ISR-A, ISR-E, ISR-AE, ISR-EV, ISR-IA, ISR-EAV, ISR-EKV, ISR-IAV, ISR-EKAV 이렇게 10 종류의 ISR를 확인할 수 있었다. 14종의 *Vibrio*의 ISR에 존재하는 tRNA gene의 종류를 분석한 결과 9종의 *Vibrio*에서 ISR-E가 확인되었고, 12종에서 ISR-IA가 확인되었다. 따라서 ISR-E와 ISR-IA가 *Vibrio*의 가장 일반적인 ISR type이라는 것을 확인할 수 있었다. 이와는 반대로 ISR-IAV는 *V. proteolyticus*와 *V. vulnificus*에만 존재하는 것으로 나타났으며, ISR-EKAV는 *V. parahaemolyticus*와 *V. vulnificus*에서만 확인할 수 있었다. 특이하게도 ISR-AE는 *V. parahaemolyticus*에만 존재하는 것으로 확인되었다.



## 2. ISR의 nucleotide sequence 및 tRNA gene sequence 비교

*V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR에 존재하는 functional unit을 분석한 자료를 토대로 *V. vulnificus* KCTC 2959 ISR의 모식도를 작성하여 Fig. 2에 정리하고, Clustal W를 이용하여 *V. vulnificus*의 ISR sequence를 multiple alignment한 결과를 Fig. 3에 정리하였다. 두 그림을 보면 16S rDNA에 근접해 있는 앞 부분의 49개의 nucleotide와 23S rDNA 부근의 ISR 뒷 부분의 217개의 nucleotide는 5종류의 모든 ISR에서 일치한다는 것을 확인할 수 있다. 그러나 ISR의 중앙부위에는 이러한 intra-specific sequence homology를 확인할 수 없었다. rRNA transcription의 anti-termination에 관여하는 Box A element는 Fig. 2에 표시된 것처럼 모든 ISR의 마지막 tRNA gene의 뒷 부분과 23S rDNA 사이에 존재하고 있었으며, 그 서열은 Fig. 3에서 나타난 것처럼 TGCTCTTTAACA로 확인되었고, 5종류의 ISR 모두에 동일한 서열을 갖는 것으로 확인되었다. Mature

rRNA를 만드는 과정에서 RNase III에 의해 절단되는 putative rRNA processing site도 확인되었는데, 16S rDNA 3'-end에서 32 bp 떨어진 곳에서 *Aeromonas hydrophila*와 일치하는 서열인 GUUCACACA이 확인되었고, 23S rDNA의 up-stream에서 *A. hydrophila*와 서열이 유사한 CUUUGGGGUUGU가 확인되었다.

*V. vulnificus*의 각 ISR에 존재하는 동일한 tRNA gene의 염기서열의 유사성을 BCM Search Launcher를 이용하여 분석하였다. ISR-E, ISR-EKV, ISR-EKAV에 존재하는 glutamate에 대한 tRNA gene의 서열은 100% 일치하였고 ISR-IA, ISR-IAV에 포함된 isoleucine에 대한 tRNA gene의 서열 역시 100% 일치하였다. ISR-EKV, ISR-IAV, ISR-EKAV의 valine에 대한 tRNA gene도 100% 일치하였다. ISR-EKV와 ISR-EKAV의 lysine에 대한 tRNA gene는 하나의 염기서열이 차이로 인해 98.6%의 유사성을 보였다. ISR-IA와 ISR-IAV의 alanine에 대한 tRNA gene의 서열은 100% 일치하였지만, 이들의 tRNA<sup>Ala</sup>과 ISR-EKAV에 포함되어 있는 tRNA<sup>Ala</sup> gene과는 염기서열 하나의 차이로 유사성은 98.6%였다.

지금까지 보고된 다른 *Vibrio*의 ISR에 존재하는 tRNA gene과의 유사성도 비교하였다. tRNA<sup>Glu</sup>는 97.2-100%의 유사성을 보였고, tRNA<sup>Ile</sup>는 90.5-100%의 유사성을 나타냈고, tRNA<sup>Val</sup>는 95.9-100%가 일치하였다. tRNA<sup>Ala</sup>도 *V. nigripulchritudo*의 ISR-A와 *V. parahaemolyticus*의 ISR-AE에 존재하는 tRNA<sup>Ala</sup>와의 유사성을 제외하면 다른 *Vibrio*와는 90% 이상의 유사성을 보였다.

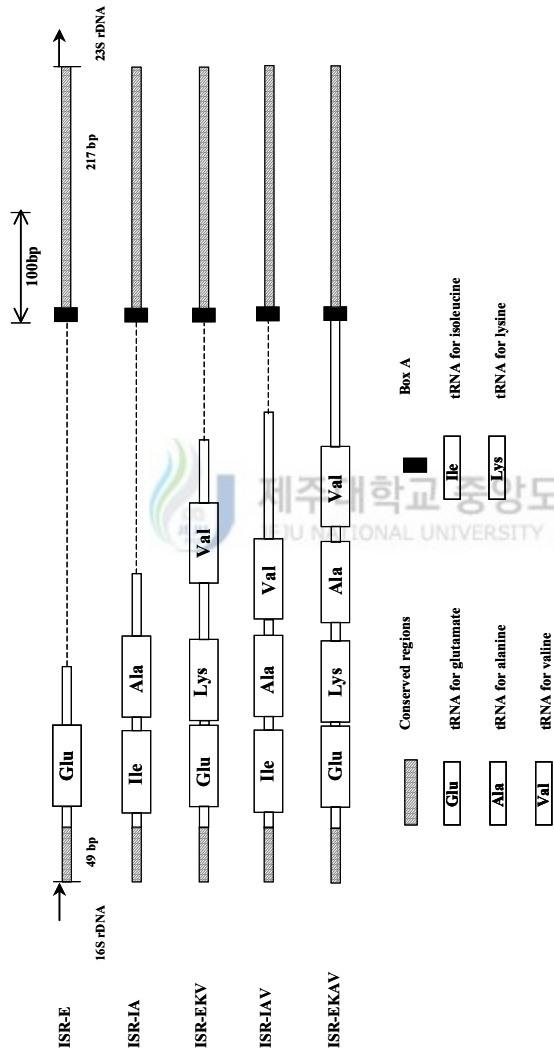
*V. vulnificus*와 다른 *Vibrio*의 tRNA gene의 서열이 유사한 것과는 달리 ISR의 전체 서열은 tRNA gene과 Box A element 서열을 제외하고는 각 species마다 매우 다양하였다. *Vibrio*의 일반적인 ISR type으로 확인된 ISR-E와 ISR-IA의 서열을 ISR이 밝혀진 *Vibrio*를 대상으로 alignment한 결과 base substitution, nucleotide block의 deletion 혹은 insertion으로 인한 여러 variable region이 확인되었다 (data는 나타내지 않음).

*A. caviae*의 여러 strain과 *V. vulnificus*의 tRNA gene의 유사성을 비교한 결과 glutamate에 대한 tRNA gene은 92.1-93.4%, isoleucine에 대한 tRNA gene은 94.7-96.0%, alanine에 대한 tRNA gene은 97.3-98.6%의 유사성을 보였다. 그러나 ISR의 전체 서열을 비교한 결과 tRNA gene의 서열을 제외한 다른 ISR의 서열은 상이하였다 (Kang and Lee, Unpublished).

**Table 2. Summary of 16S-23S rRNA intergenic spacer types of *Vibrio* sp.**

Strain		ISR type
<i>V. aestuarianus</i>	ATCC 35048	A, E, EV, IA-1, IA-2
<i>V. campbellii</i>	ATCC 25920	no <sup>a</sup> -1, no-2, IA
<i>V. cholerae</i>	RC2	A, E, IA, EKV
	RC4	E, IA
	RC25	A, E, IA, EKV
	RC42	E, IA
	RC44	A, E, IA
	RC45	E, IA
	RC47	E, IA, EKV
	RC48	E, IA, EKV
<i>V. costicola</i>	ATCC 3508	no-1, no-2, E-1, E-2, IA
<i>V. diazotrophicus</i>	ATCC 33466	E, IA
<i>V. fluvialis</i>	ATCC 33809	E, EV, IA, EAV
<i>V. mimicus</i>	RC5	A, E, IA, EKV
	RC55	A, IA
<i>V. nigripulchritudo</i>	ATCC 27043	A-1, A-2, E, EV-1, EV-2, IA, EAV
<i>V. parahaemolyticus</i>	IFO 12711 T	no, E, AE, IA, EKV, EKAV
<i>V. proteolyticus</i>	ATCC 15338	EV, IA, IAV
<i>V. salmonicida</i>	ATCC 43839	no, EV
<i>V. splendidus</i>	ATCC 33125	no-1, no-2, no-3, no-4
<i>V. vulnificus</i>	KCTC 2959	E, IA, EKV, IAV, EKAV
<i>V. tubiashi</i>	ATCC 19105	IA-1, IA-2

<sup>a</sup> : no tRNA gene



**Fig. 2. The schematic structure of the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *V. vulnificus* KCTC 2959.** The genes encoding tRNA are indicated by open boxes. Conserved regions flanking 16S or 23S rDNA are indicated by diagonal lines. Box A elements are indicated by close boxes. The broken lines are gaps for the alignment.

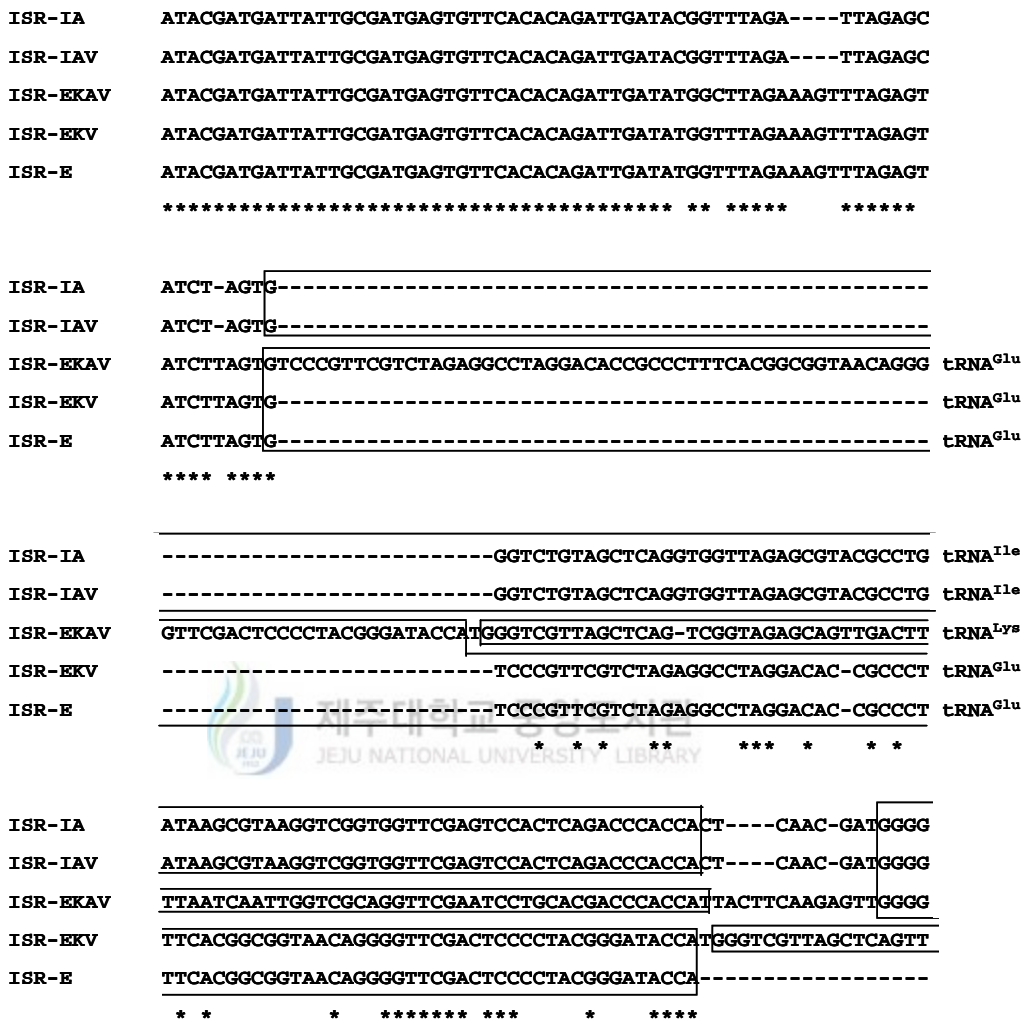


Fig. 3. Alignment of 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences of *V. vulnificus* KCTC 2959. The sequences of tRNA genes are enclosed in open boxes. The Box A sequences are enclosed in open boxes and labeled with Box A. The species-specific detection primers are indicated by single underline. Gaps introduced to obtain optimal sequence alignment are indicated by dashes(--).

```

ISR-IA      TTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCTGCGGTTTCGATCCCGC
ISR-IAV     TTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCTGCGGTTTCGATCCCGC
ISR-EKAV    CTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGCACGCAGGAGGTCTGCGGTTTCGATCCCGC
ISR-EKV     GGTAGAGCAGTTGACTTTTAATCAATTGGTCGCAGGTTTGAATCCTGCACGACCCACCAT
ISR-E       -----T-----

ISR-IA      ATAGCTCCACCAT-----
ISR-IAV     ATAGCTCCACCATTTCTTAAACGCAATGGGCGATTAGCTCAGTTGGGAGAGCACCTGCCTT
ISR-EKAV    ATAGCTCCACCATTTCTTGAACGCAATGGGCGATTAGCTCAGTTGGGAGAGCACCTGCCTT
ISR-EKV     TTCCTTCCACGGGAAAACAAATAATGTGGGCGATTAGCTCAGTTGGGAGAGCACCTGCCT
ISR-E       -----

ISR-IA      -----CTTAAAGGTTTTTC-
ISR-IAV     ACAAGCAGGGGGTCACTGGTTCGAACCCGGTATCGCCACCACTCTTTAAGTATTTTTAG
ISR-EKAV    ACAAGCAGGGGGTCACTGGTTCGAACCCGGTATCGCCACCACTCTTTAAATATTTTTAG
ISR-EKV     TACAAGCAGGGGGTCACTGGTTCGAACCCGGTATCGCCACCACTCTTAAAGGTTTTTC-
ISR-E       -----CTTAAAGCATTTCTTA-
                                     *****  ** **

ISR-IA      ---CTTAA-GAA-----TC
ISR-IAV     TGTTTCTTAATGAAAACCACCTTCTTTATGTCTGTGTTGATTTTTTCGACGCTGAAAGTC
ISR-EKAV    TGTTTCTTAATGAAAACCACCTTCTTTATGTCTGTGTTGATTTTTTCGACGCTGAAAGTC
ISR-EKV     ---CTT---AAG-----A-----ATC
ISR-E       ---C---GAG-----T-----GTG
                *      *          Vul-DF primer          *

```

Fig. 3. Continued

```

ISR-IA      TTTAAAAATGGTTTTCAT--TAGAAAATC---TGCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGAC
ISR-IAV     TTTAAAAAGTGTGTTTCTCATAGAGAATTGCATTGCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGAC
ISR-EKAV    TTTAAAAAGTGTGTTTCTCATAGAGAATTGCATTGCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGAC
ISR-EKV     TTTAAAAATGGTTTTCAT--TAGAAAATCTT---GCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGAC
ISR-E       TTTAAACATGGTTTTCAT--TAGAAAATCT---GCTCTTTAACAATTTGGAAAGCTGAC
          ***** * ** * * * ***** *****
                                   Box A

ISR-IA      AAAACAACAATTTATTGTTGTTTGTAAGTTCTCAATGTTTGTCTTTAAGCAAACACCA
ISR-IAV     AAAACAACAATTTATTGTTGTTTGTAAGTTCTCAATGTTTGTCTTTAAGCAAACACCA
ISR-EKAV    AAAACAACAATTTATTGTTGTTTGTAAGTTCTCAATGTTTGTCTTTAAGCAAACACCA
ISR-EKV     AAAACAACAATTTATTGTTGTTTGTAAGTTCTCAATGTTTGTCTTTAAGCAAACACCA
ISR-E       AAAACAACAATTTATTGTTGTTTGTAAGTTCTCAATGTTTGTCTTTAAGCAAACACCA
          *****

ISR-IA      ACAAACACATTCAAGTGTCTTGGGAATGTCACCTTTAAGTGACTATTCGAAATTGAGTC
ISR-IAV     ACAAACACATTCAAGTGTCTTGGGAATGTCACCTGTTAAGTGACTATTCGAAATTGAGTC
ISR-EKAV    ACAAACACATTCAAGTGTCTTGGGAATGTCACCTGTTAAGTGACTATTCGAAATTGAGTC
ISR-EKV     ACAAACACATTCAAGTGTCTTGGGAATGTCACCTGTTAAGTGACTATTCGAAATTGAGTC
ISR-E       ACAAACACATTCAAGTGTCTTGGGAATGTCACCTTTAAGTGACTATTCGAAATTGAGTC
          *****

ISR-IA      CGGCAAAATCAACGCTATCTCGCTCATTCAAATAATGAGATAGCAACTTTGGTTGTTTAA
ISR-IAV     CGGCAAAATCAACGCTATCTCGCTCATTCAAATAATGAGATAGCAACTTTGGTTGTTTAA
ISR-EKAV    CGGCAAAATCAACGCTATCTCGCTCATTCAAATAATGAGATAGCAACTTTGGTTGTTTAA
ISR-EKV     CGGCAAAATCAACGCTATCTCGCTCATTCAAATAATGAGATAGCAACTTTGGTTGTTTAA
ISR-E       CGGCAAAATCAACGCTATCTCGCTCATTCAAATAATGAGATAGCAACTTTGGTTGTTTAA
          *****

ISR-IA      CAAAGACCCTTTGGGGTTGTAT
ISR-IAV     CAAAGACCCTTTGGGGTTGTAT
ISR-EKAV    CAAAGACCCTTTGGGGTTGTAT
ISR-EKV     CAAAGACCCTTTGGGGTTGTAT
ISR-E       CAAAGACCCTTTGGGGTTGTAT
          *****

```

Fig. 3. Continued.

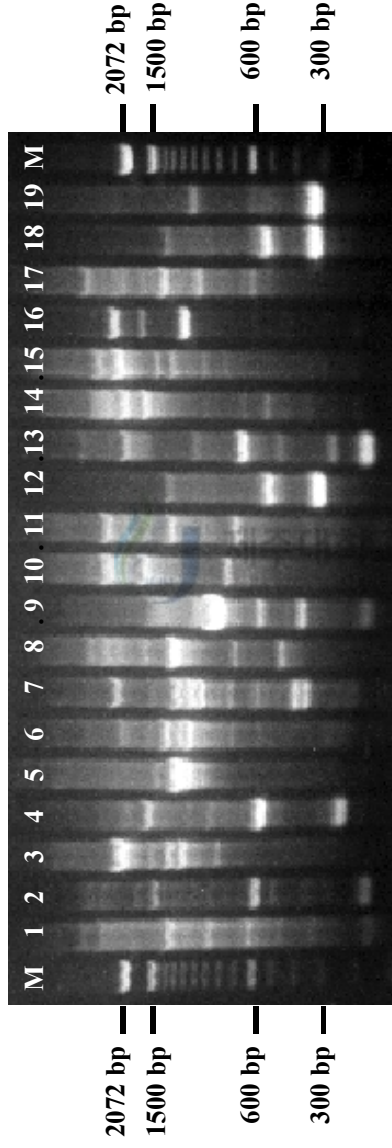
### 3. *V. vulnificus*의 신속한 진단을 위한 primer 제작 및 PCR reaction

*V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR와 다른 13종의 *Vibrio* ISR 서열을 Clustal W을 이용하여 비교한 결과 Box A element와 동일한 tRNA gene에 대해서는 유사성이 높게 나타난 반면 그 외의 non-coding 부분에서는 그다지 높은 유사성은 확인되지 않았다. 따라서 Box A와 tRNA gene 부분을 제외한 나머지의 염기서열을 *V. vulnificus*의 신속하고 정확한 진단을 위한 species-specific primer로 이용하기로 하였다. BLAST를 이용하여 *V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR-IAV와 ISR-EKAV의 sequence 중에서 ISR의 3'-end에 가장 근접한 valine에 대한 tRNA gene 뒷부분의 sequence를 database에 등록된 다른 sequence들과 비교하여 특이적인 부분을 찾아냈다. Species-specific primer인 Vul-DF의 서열은 5'-ACCACCTTCTTTATGTCTG-3'이며 (주)바이오넥스에 의뢰하여 제작하였다. 이 primer의 특이성을 확인하기 위해 Table 3에 정리한 18개의 다른 *Vibrio*의 genomic DNA를 추출하여 detection PCR의 template로 이용하였다. Positive control로서는 *V. vulnificus* 2959의 genomic DNA에 16S-VF와 23S-VR primer를 첨가하여 다른 *Vibrio*와 동일한 조건에서 합성한 결과 정상적으로 PCR 반응이 이루어졌음을 확인할 수 있었다 (data는 나타내지 않음). Fig. 4에서 볼 수 있듯이 각 strain에 특이적인 band pattern이 생성되어 다른 18개의 *Vibrio* strains과 *V. vulnificus* KCTC 2959를 agarose gel에서 전기영동하여 쉽게 구별할 수 있었다. Vul-DF와 23S-VR에 의한 ISR-IAV와 ISR-EKAV의 예상 증폭 산물의 크기는 347 bp인데 Fig. 3에 나타난 *V. vulnificus* KCTC 2959의 증폭 산물을 보면 약 350 bp에 해당하는 major band를 관찰할 수 있었다. 흥미롭게도 *V. vulnificus* KCTC 2962의 경우는 약 350 bp와 550 bp에 해당하는 두 개의 major bands가 생성된 것을 확인할 수 있었다.



Table 3. Bacterial strains used in detection PCR.

Strain no.	Species
KCTC 2473	<i>V. fluvialis</i>
KCTC 2714	<i>V. aestuarianus</i>
KCTC 2715	<i>V. cholerae</i>
KCTC 2716	<i>V. campbellii</i>
KCTC 2719	<i>V. gazogenes</i>
KCTC 2720	<i>V. harveyi</i>
KCTC 2721	<i>V. logei</i>
KCTC 2722	<i>V. nereis</i>
KCTC 2726	<i>V. salmonicida</i>
KCTC 2729	<i>V. parahaemolyticus</i>
KCTC 2730	<i>V. proteolyticus</i>
KCTC 2731	<i>V. furnissii</i>
KCTC 2733	<i>V. cincinnatiensis</i>
KCTC 2736	<i>V. metschnikovii</i>
KCTC 2737	<i>V. mimicus</i>
KCTC 2810	<i>V. cyclosites</i>
KCTC 2928	<i>V. alginolyticus</i>
KCTC 2962	<i>V. vulnificus</i>



**Fig. 4. Electrophoresis of the PCR-amplified 16S-23S rRNA spacers in *Vibrio* species.**

Lanes : M, molecular weight marker (100-bp ladder); 1, *V. fluvialis* KCTC 2473; 2, *V. aestuarianus* 2714; 3, *V. cholerae* KCTC 2715; 4, *V. campbellii* KCTC 2716; 5, *V. gazogenes* KCTC 2719; 6, *V. harveyi* KCTC 2720; 7, *V. logei* KCTC 2721; 8, *V. nereis* KCTC 2722; 9, *V. salmonicida* KCTC 2726; 10, *V. parahaemolyticus* KCTC 2729; 11, *V. proteolyticus* KCTC 2730; 12, *V. furnissii* KCTC 2731; 13, *V. cincinnatiensis* KCTC 2733; 14, *V. metschnikovii* KCTC 2736; 15, *V. mimicus* KCTC 2737; 16, *V. cyclospites* KCTC 2810; 17, *V. alginolyticus* KCTC 2928; 18, *V. vulnificus* KCTC 2962; 19, *V. vulnificus* KCTC 2954; M, molecular weight marker(100 bp ladder)

## IV. 고찰

16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR)은 species간은 물론 strain간에도 그 크기와 서열이 매우 다양하고, multiple copy의 *rrn* operon를 갖는 경우에는 하나의 cell에서도 operon마다 그 서열과 크기가 다양하여 bacteria의 typing이나 identification에 많이 이용되고 있다 (Gurtler and Stanisich, 1996). 그러므로 이 논문에서는 *V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR을 분석하여 이 균만을 특이적으로 증폭시킬 수 있는 species-specific primer를 제작하고 PCR이라는 분자생물학적인 기법에 이용하여 빠른 시간내에 정확하게 *V. vulnificus*을 검출하기 위해 16S rDNA와 23S rDNA의 서열을 primer로 이용하여 ISR를 증폭시키고, 염기 서열을 분석하여 detection primer를 제작하였다.

*V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR 증폭 산물을 전기영동한 Fig. 1을 보면 하나의 band가 아닌 다양한 크기와 세기의 여러 band가 증폭된 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 다양한 band로 미루어 보아 다른 bacteria와 유사하게 *V. vulnificus*의 genome에도 여러 개의 *rrn* operon이 존재할 것으로 추정되었다. 정확한 *rrn* operon의 수는 16S rDNA나 23S rDNA는 절단하지 않는 제한효소로 genomic DNA를 절단하여 16S rDNA나 23S rDNA의 일부 서열에 해당하는 probe를 이용한 southern hybridization 분석으로 확인될 수 있을 것이다. 그러나 ISR을 분석한 Table 1을 참고하면 *V. vulnificus* KCTC 2959에서 tRNA gene의 종류와 크기가 다른 5종류의 ISR가 확인된 것으로 보아 적어도 5개 이상의 *rrn* operon이 존재하고 있을 것으로 생각된다. 6종류의 ISR가 확인된 *V. parahaemolyticus*에는 최소 9개의 *rrn* operon이 존재하고 있을 것으로 확인되었으며 (Maeda *et al.*, 2000), Aeromonads도 6-8개의 *rrn* operon을 가지고 있을 것으로 확인되고 있다 (Martinetti and Altwegg, 1992). *E. coli*에서는 glutamate에 대한 tRNA gene를 갖는 *rrnC*, *B*, *G*, *E* operon과 isoleucine과 alanine에 대한 tRNA gene를 갖는 *rrnA*, *D*, *H* operon이 확인되었다 (Condon *et al.*, 1995). *Salmonella enterica* LT2에서도 isoleucine과 alanine에 대한 tRNA gene를 갖는 ISR가 확인된 *rrnA*, *D*, *B* operon과 glutamate를 coding하는 tRNA gene를 갖는 ISR가 확인된 *rrnC*, *E*, *G*,

*H* operon이 확인되었다 (Perez Luz *et al.*, 1998).

Table 1을 보면 digestion product의 크기를 기준으로 분류한 5개의 group 중에서 A와 B에 해당하는 clone의 수가 전체 82개의 clone 중에 각각 36개와 29개로 다른 group에 비해 훨씬 많다는 것을 알 수 있다. Group A에 해당하는 clone의 ISR sequence를 분석한 결과 ISR-E로 확인되었고, group B의 clone는 ISR-IA로 확인되었다. 각 ISR의 크기는 424 bp와 507 bp인데 16S-VF와 23S-VR에 의해 증폭된 139 bp의 16S rDNA와 40 bp의 23S rDNA 부분을 합하면 603 bp와 686 bp로 Fig. 1에서 약 600 bp와 700 bp에 해당하는 band가 다른 것에 비해 강하게 나타난 것과 일치한다. 이런 결과는 16S rDNA와 23S rDNA 사이에 glutamate에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR와 isoleucine과 alanine에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR가 들어 있는 *rrn* operon이 chromosome 내에 여러 copy로 존재하기 때문인 것으로 생각된다.

현재까지 bacteria의 ISR에서 확인된 tRNA gene의 수와 구성은 매우 다양하다. *E. coli*와 *A. hydrophilia* ATCC 7966는 glutamate을 coding하는 tRNA gene이 들어 있는 ISR-E와 isoleucine과 alanine에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR-IA를 갖는 것으로 확인되었다 (East and Collins, 1993; Condon *et al.*, 1995). RISSC (Ribosomal Intergenic Spacer Sequence Collection) database의 *Crenarchaeota*에서는 ISR-no, *Euryarchaeota*에서는 ISR-no와 ISR-A, *Chloroplasts*에서는 ISR-no, ISR-I, ISR-IA, *Cyanobacteria*에서는 ISR-I, ISR-IA가 보고되고 있다 (Garcia-Martinez *et al.*, 2001). *Vibrio*의 ISR type을 정리한 Table 2를 보면 동일한 *Vibrio* 속에 속하는 species간에도 4개의 tRNA gene을 갖는 ISR-EKAV가 확인된 *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*에서부터 ISR-no, ISR-IA를 갖는 *V. campbellii* 까지 ISR type이 다양하다는 것을 확인할 수 있다. *Vibrio*의 일반적인 ISR type으로 확인된 ISR-E의 크기도 430 bp에서 559 bp까지 다양하며, ISR-IA의 크기도 507 bp에서 707 bp까지 매우 다양하다 (Chun *et al.*, 1999; Maeda *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002). 또한 동일한 species일지라도 각 strain마다 tRNA gene의 구성이 다양하다는 것을 확인할 수 있는데, *V. cholerae* RC 4, RC 42, RC 45에서는 ISR-E와 ISR-IA만이 확인된 반면에 *V. cholerae* RC 2, RC 25에서는 ISR-A, ISR-E, ISR-IA, ISR-EKV가 확인된다. ISR 서열의 다양성은 inter-strain 뿐만 아니라 inter-cistronic에서도 확인되는데, *A. hydrophilia* ATCC 7966에서는 동일한 tRNA gene을 갖고 있지만 down-stream과 up-stream의 서열이 다른 ISR-E1과

ISR-E2가 확인되었고 (East and Collins, 1993), *Vibrio*의 ISR type를 정리한 Table 2에서도 이러한 다양성이 확인되었다.

Fig. 2와 Fig. 3을 보면 16S rDNA와 23S rDNA 부근의 nucleotide 서열이 5종류의 모든 ISR에서 일치하는 것을 확인할 수 있다. 이러한 유사성은 *V. parahaemolyticus*에서도 확인되었는데 16S rDNA와 23S rDNA의 부근의 40 bp와 209 bp가 6종류의 ISR에서 모두 일치하였으며 (Maeda *et al.*, 2000), *Aeromonas* sp. 에서 확인된 ISR-E와 ISR-A의 서열을 alignment한 결과 각 species의 두 type의 spacer는 처음 부분의 50 bp와 마지막 부분의 150 bp가 거의 일치하였다 (Kong *et al.*, 1999). 아마도 이러한 intra-specific sequence homology가 나타난 부분들은 prokaryote의 16S, 23S rRNA processing에 중요한 역할을 하는 부분이라 생각된다 (Srivastava and Schlessinger, 1990; Naimi *et al.*, 1997). *E. coli*의 rRNA maturation process에 관한 연구에 따르면 16S-23S rDNA spacer region과 23S-5S rDNA spacer region은 pre-rRNA의 maturation에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되는데, 16S rRNA의 upstream leader region과 16S-23S rRNA intergenic spacer region, 16S-23S rRNA intergenic spacer region과 23S-5S rRNA intergenic spacer region에 의해 형성된 base-pair는 RNase III에 의해 절단되는 두 primary double-stranded processing site를 생성한다고 한다 (Apirion *et al.*, 1993). *E. coli*에서는 16S rDNA의 3'-end에서 33번째 nucleotide인 GCUCACACA 서열 다음과 23S rDNA의 up-stream인 UCUUCG GGUUGU에서 RNase III에 의한 processing이 일어나는 것으로 보고되었다 (Young *et al.* 1979). *A. hydrophila*의 ISR에서는 *E. coli*에서 발견된 위치보다 하나의 nucleotide 뒤에서 GUUCACACA가 확인되었고, 23S rDNA up-stream의 같은 위치에 동일한 서열의 nucleotide가 확인되었다 (East and Collins, 1993). *V. vulnificus*에서는 *A. hydrophila*와 일치하는 서열이 16S rDNA down-stream에서 확인되었고, 23S rDNA의 up-stream에서는 유사한 서열인 CUUUGGGGUUGU가 확인되었다.

ISR의 양쪽 말단에서는 conserve된 region이 확인된 반면에 ISR의 중앙에서는 확인할 수 없었다. 이는 각각의 ISR에 포함되어 있는 tRNA gene의 종류와 수에 따라 ISR마다 서열이 다르기 때문인 것으로 생각된다.

Fig. 3을 보면 각 ISR에 존재하는 마지막 tRNA gene과 23S rDNA 사이에서 rRNA transcription의 antitermination에 관여하는 Box A element를 확인할 수 있다.

*E. coli*의 Box A element의 서열은 TGCTCTTTAACA로 알려져 있으며 (Condon *et al.*, 1995), *V. parahaemolyticus* IFO 12711에서는 염기서열이 하나가 다른 AGCTCTTTAACA가 확인되었는데 (Maeda *et al.*, 2000), *V. vulnificus* KCTC 2959에서는 TGCTCTTTAACA로 확인되었다.

*V. vulnificus*의 모든 ISR에서 확인된 tRNA gene의 서열은 lysine과 alanine에 대한 tRNA gene을 제외하고는 100% 일치하였다. 다른 *Vibrio*의 ISR에 존재하는 tRNA gene과의 유사성을 분석한 결과 대부분 90% 이상의 유사성을 보였지만, ISR 서열 전체의 유사성은 그리 높지 않았다. 따라서 Box A element와 tRNA gene을 제외한 부분의 서열을 *V. vulnificus*의 신속한 검출을 위한 species-specific primer로 이용하는 것이 바람직하다고 생각하였다.

*V. vulnificus* KCTC 2959 ISR의 특이적인 서열을 이용하여 제작한 primer와 23S rDNA의 일부 서열에 해당하는 primer로 여러 *Vibrio*의 genomic DNA를 PCR한 산물을 전기영동한 Fig. 4를 보면 각 strain마다 multiple band가 생성된 것을 확인할 수 있다. 이러한 multiple band는 Vul-DF의 비특이적인 결합과 23S rDNA 서열을 이용한 23S-VR primer에 의해 생성된 것으로 생각된다. 모든 strain에서 multiple bands가 확인되지만 *V. vulnificus* KCTC 2959만의 특이적인 band pattern이 생성되어 뚜렷하게 이 균을 구별할 수 있었다. 특히 *V. vulnificus*와 생화학적 성상이 비슷한 것으로 보고되는 *V. parahaemolyticus*와 (주진우 등, 1998) 매우 다른 band pattern이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 *V. vulnificus* KCTC 2959 ISR의 서열로 제작한 primer를 이 균의 검출과 동정을 위한 molecular marker로서 이용할 수 있을 것이다. *V. cholerae*, *V. mimicus*의 각 strain마다 다양한 ISR type이 존재하는 것처럼 (Table 2 참고) *V. vulnificus* KCTC 2959와 KCTC 2962의 ISR도 서로 차이가 있다는 것을 Fig. 4의 두 strain의 band pattern을 비교하면 추측할 수 있다. 물론 두 strain의 ISR 서열과 type이 다를 것이라는 것은 직접 *V. vulnificus* KCTC 2962의 ISR의 염기서열을 분석해야 확인할 수 있겠지만, 두 strain 모두에서 약 350 bp의 major band가 생성된 것과는 달리 여러 minor band의 pattern이 다르다는 것은 두 strain의 ISR의 염기서열에 차이가 있다는 것을 간접적으로 제시해준다고 생각한다. 또한 *V. fluvialis*에서도 약 350 bp의 major band가 증폭되었는데, 이것 역시 직접 ISR의 염기서열을 분석해야 확인할 수 있겠지만 두 species의 ISR 서열은 매우 유사

할 것으로 생각된다.

이 논문에서는 ISR의 특이적인 서열을 primer로 제작하여 균을 동정하는데 이용하였지만, *V. cholerae*의 경우 ISR 서열을 이용하여 제작한 probe로 colony hybridization하여 collection strain은 물론 environmental isolate과 clinical isolate까지도 검출할 수 있었고, 여러 microorganism이 혼합되어 있는 해수에서도 *V. cholerae*만을 특이적으로 검출할 수 있었다 (Robert-Pillot *et al.*, 2002). 따라서 이 서열은 primer뿐만 아니라 probe로 이용하여 균의 동정과 검출에도 이용할 수 있을 것으로 생각된다.



## V. 요약

*Vibrio vulnificus*는 패혈증과 피부 질병의 원인균으로서 감염 환자의 사망률은 매우 높게 보고되고 있다. 따라서 신속하고 정확한 동정, 검출이 요구된다.

*V. vulnificus*를 동정하기 위한 기존의 방법은 시간과 노력이 많이 소비될 뿐 아니라 그 결과도 부정확하므로 본 연구에서는 PCR이라는 분자생물학적인 기법을 이용하여 species뿐만 아니라 strain간에도 그 서열이 매우 다양한 16S-23S intergenic spacer region을 증폭시켜 염기 서열을 분석하고 *V. vulnificus*만을 특이적으로 증폭시킬 수 있는 primer를 제작하였다.

*V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR 염기 서열을 분석하여 그 안에 포함된 tRNA gene의 수와 구성에 따라 ISR을 ISR-E, ISR-IA, ISR-EKV, ISR-IAV, ISR-EKAV로 나누었다. ISR-E는 glutamine에 대한 tRNA gene을 포함하고 있었고, ISR-IA는 isoleucine과 alanine에 대한 tRNA genes, ISR-EKV는 glutamine과 lysine, valine에 대한 tRNA genes, ISR-EKAV는 glutamine, lysine, alanine과 valine에 대한 tRNA genes을 포함하고 있었다.

*V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR 서열을 토대로 하여 다른 *Vibrio*와 이 균을 구별할 수 있는 species-specific primer를 제작하여 진단 PCR을 실시한 결과 전기영동의 양상을 보고 다른 18개의 *Vibrio* strain과 *V. vulnificus* KCTC 2959를 구별할 수 있었다. 따라서 ISR 서열에 기초하여 제작한 primer를 이용한 PCR 반응으로 패혈증을 일으키는 *V. vulnificus*을 신속하고 정확하게 동정, 검출하기 위한 방법으로 이용할 수 있을 것이다.



## VI. 참고문헌

- 박경수, 한철, 석근영, 정해창, 김영휘, 김천규. 1993. 전남 해안지역의 해수, 개펄, 수족관내 어패류 및 주방환경에서 장염 패혈증균 (*Vibrio vulnificus*)의 분리와 미생물학적 연구. 한국식품과학회지, 25: 449-455.
- 신성욱, 박석돈. 1998. 한국 서해안에서 해수의 환경 조건이 *Vibrio vulnificus* 분리에 미치는 영향. 대한피부과학회지, 36: 391-398.
- 주진우, 김경숙, 박수정, 윤선옥, 정초록. 1998. API 20E Kit를 이용한 1996년 부산 및 한국 남해안 일대의 *Vibrio vulnificus*의 동정. 대한미생물학회지, 33: 187-194.
- 주진우, 박민정, 허문수, 정초록. 2000. 부산과 대천 해안에서 *Vibrio vulnificus*와 *Vibrio parahaemolyticus*의 분리 및 동정. 대한미생물학회지, 25: 309-316.
- 정기용, 고광균. 1995. *Vibrio* 균 증식에 있어서 Ox-Bile의 영향. 대한미생물학회지, 30: 263-271.
- 정운섭, 이삼열, 김신무. 1987. *Vibrio vulnificus* 분리율에 대한 SPS Agar와 SGP Broth의 사용 및 검체 저장의 영향. 대한미생물학회지, 22: 103-108.
- Apirion, D. and A. Miczak. 1993. RNA processing in prokaryotic cells. *BioEssays*, 15: 113-120.
- Arias, C. R., E. Garay and R. Aznar. 1995. Nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments, and water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3476-3478.
- Blake, P. A., M. H. Merson, R. E. Weaver, D. G. Hollis and D. C. Heublein. 1979. Disease caused by marine *Vibrio*. Clinical Characteristics and Epidemiology. *N. Engl. J. Med.*, 300: 1-5.
- Brauns, L. A., M. C. Hudson and J. D. Oliver. 1991. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2651-2655.
- Brayton, P. R., P. A. West, E. Russek and R. R. Colwell. 1983. New selective plating medium for isolation of *Vibrio vulnificus* biogroup 1. *J. Clin. Microbiol.*, 17:

1039-1044.

- Bryant, R. G., J. Jarvis and J. M. Janda. 1987. Use of sodium dodecyl sulfate-polymyxin B-sucrose medium for isolation of *Vibrio vulnificus* from shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 1556-1559.
- Cerda-Cuellar, M., J. Jofre and A. R. Blanch. 2000. A selective medium and a specific probe for detection of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 855-859.
- Chun, J., A. Huq and R. R. Colwell. 1999. Analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio Cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2202-2208.
- Coleman, S. S. and J. D. Oliver. 1996. Optimization of conditions for the polymerase chain reaction amplification of DNA from culturable and nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 19(2):127-132.
- Condon, C., C. Squires and C. L. Squires. 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 59: 623-645.
- Dalsgaard, A., I. Dalsgaard, L. Hoi and J. L. Larsen. 1996. Comparison of a commercial biochemical kit and an oligonucleotide probe for identification of environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22: 184-188.
- DePaola, A., M. L. Motes, D. W. Cook, J. Veazey, W. E. Garthright and R. Blodgett. 1997. Evaluation of an alkaline phosphatase-labeled DNA probe for enumeration of *Vibrio vulnificus* in Gulf Coast oysters. *J. Microbiol. Methods*, 29: 115-120.
- East, A. K and M. D. Collins. 1993. Molecular characterization of DNA encoding 23S rRNA and 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 106: 129-134.
- Garcia-Martinez, J., I. Besco, J. J. Rodriguez-Sala and F. Rodriguez-Valera. 2001. RISSC: a novel database for ribosomal 16S-23S RNA genes spacer regions. *Nucleic Acids Res.*, 29: 178-180.

- Gurtler, V. and V. A. Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142: 3-16.
- Hoi, L., I. Dalsgaard and A. Dalsgaard. 1998. Improved isolation of *Vibrio vulnificus* from seawater and sediment with cellobiose-colistin agar. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 1721-1724.
- Kang, D. L. and H. K. Lee. Unpublished. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Aeromonas caviae*.
- Kong, R. Y. C., A. Pelling, C. L. So and R. S. S. Wu. 1999. Identification of oligonucleotide primers targeted at the 16S-23S rDNA intergenic spacers for genus- and species-specific detection of *Aeromonads*. *Mar. Pollut. Bull.*, 38: 802-808.
- Lee, S. K., H. Z. Wang, S. H. Law, R. S. Wu and R. Y. Kong. 2002. Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. *Mar. Pollut. Bull.*, 44: 410-420.
- Maeda, T., N. Takada, M. Furushita and T. Shiba. 2000. Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 192: 73-77.
- Martinetti Lucchini, G. and M. Altwegg. 1992. rRNA gene restriction patterns as taxonomic tools for the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 384-389.
- Massad, G. and J. D. Oliver. 1987. New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2262-2264.
- Miceli, G. A., W. D. Watkins and S. R. Rippey. 1993. Direct plating procedure for enumerating *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3519-3524.
- Morris, J. G. Jr, A. C. Wright, D. M. Roberts, P. K. Wood, L. M. Simpson and J. D. Oliver. 1987. Identification of environmental *Vibrio vulnificus* isolates with a DNA probe for the cytotoxin-hemolysin gene. *Appl. Environ. Microbiol.*,

53: 193-195.

- Naimi, A., G. Beck and C. Branlant. 1997. Primary and secondary structures of rRNA spacer regions in enterococci. *Microbiology*, 143: 823-834.
- Nilsson, L., J. D. Oliver and S. Kjelleberg. 1991. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.*, 173: 5054-5059.
- Oliver, J. D., K. Guthrie, J. Preyer, A. Wright, L. M. Simpson, R. Siebeling and J. G. Jr Morris. 1992. Use of colistin-polymyxin B-cellobiose agar for isolation of *Vibrio vulnificus* from the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 737-739.
- Oliver, J. D. and R. Bockian. 1995. In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2620-2623.
- Oliver, J. D. 1995. The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 133: 203-208.
- Park, S. D., H. S. Shon and N. J. Joh. 1991. *Vibrio vulnificus* septicemia in Korea: clinical and epidemiologic findings in seventy patients. *J. AM. Acad. Dermatol.*, 24: 397-403.
- Parker, R. W. and D. H. Lewis. 1995. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio vulnificus* hemolysin to detect *V. vulnificus* in environmental specimens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 476-480.
- Perez Luz, S., F. Rodriguez-Valera, R. Lan and P. R. Reeves. 1998. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. *J. Bacteriol.*, 180: 2144-2151.
- Robert-Pillot, A., S. Baron, J. Lesne, J. M. Fournier and M. L. Quilici. 2002. Improved specific detection of *Vibrio cholerae* in environmental water samples by culture on selective medium and colony hybridization assay with an oligonucleotide probe. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 40: 39-46.
- Srivastava, A. K. and D. Schlessinger. 1990. Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Annu. Rev. Microbiol.*, 44: 105-129.

- Tamplin, M. L., A. L. Martin, A. D. Ruple, D. W. Cook and C. W. Kaspar. 1991. Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediment, and oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1235-1240.
- Wright, A. C., G. A. Miceli, W. L. Landry, J. B. Christy, W. D. Watkins and J. G. Jr. Morris. 1993. Rapid identification of *Vibrio vulnificus* on nonselective media with an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 541-546.
- Young, R. A., R. Macklis and J. A. Steitz. 1979. Sequence of the 16S-23S spacer region in two ribosomal RNA operons of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 254:3264-3271.



## 감사의 글

실험실 생활 내내 실수도 많고, 부족한 면이 많은 저에게 아낌없는 격려와 지도를 해주신 이제희 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 그리고 바쁘신 중에도 미흡한 제 논문을 자상하게 심사해주신 송춘복 교수님, 허문수 교수님, 전유진 교수님, 여인규 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

이 논문이 완성되기까지 많은 도움을 준 분자 유전학 실험실 식구들 오철홍, 강현실, 고순미, 조봉룡, 김형건, 박호진, 강경임, 김상봉, 문영주, Helani에게도 고마움을 전합니다. 그리고 학위 과정동안 많은 조언을 주신 진창남 선생님, 강거영 선배님, 양병규 선배님에게도 감사 드리며, 항상 옆에서 내 이야기에 귀 기울여 주고 지켜봐 주는 범석 오빠에게도 고마움을 전합니다. 자주 만나지도 못하고 생활하는 곳도 다르지만 언제나 나를 응원해주는 친구들에게도 고마움을 전합니다.

마지막으로 끝없는 희생과 사랑으로 저희 형제를 보살펴 주시는 부모님께 자그마한 선물이지만 이 논문을 드립니다.