

Aeromonas veronii biogroup *sobria*와 *Aeromonas caviae*의 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions 분석

강동을 · 이훈구*

부경대학교 미생물학과 병원미생물 실험실

부산의 가물치 양식장으로부터 분리된 *A. veronii* bv. *sobria*와 *A. caviae*를 대상으로 16S-23S rRNA intergenic spacer region을 cloning하여 염기서열을 분석하였다. *A. veronii* bv. *sobria*는 4그룹의 band pattern이 형성되었고 *A. caviae*는 1그룹만이 존재하였다. *A. veronii* bv. *sobria*의 4그룹에 대한 band 수는 2~4 개까지 다양하게 나타났으며, 479~481 bp (ISR-1), 513~524 bp (ISR-2), 537~539 bp (ISR-3)의 염기서열을 밝혀냈다. *A. caviae*는 3개의 band가 형성되었고, 470~480 bp (ISR-1), 521~525 bp (ISR-2), 568~602 bp (ISR-4)의 염기서열을 가지고 있었다. 그리고 이들에 대한 tRNA를 분석한 결과 ISR-1은 tRNA^{Leu} (GAT), tRNA^{Ala} (TGC)를 가지고 있고, ISR-2, 3, 4는 tRNA^{Glu}(TTC)를 가지고 있었다. *A. caviae*는 ISR-4의 151~281 bp에서 *A. veronii* bv. *sobria*가 가지고 있지 않은 보존적인 염기서열을 가지고 있었다. 그중 *A. caviae*의 178~197 bp 염기서열을 primer로 design하여 PCR을 실시한 결과 *A. caviae* 균주에서만 종특이적으로 생성되는 450 bp 정도의 밴드를 얻을 수 있었다.

Key words □ *Aeromonas veronii* bv. *sobria*, *Aeromonas caviae*, 16S-23S rRNA intergenic spacer region, ISR-PCR, tRNA, species-specific primer

*Aeromonas*속은 Cowell 등(19)에 의해 *Vibrio*과에서 분리되어 *Aeromonas*과로 승격되었다. 생화학적 성상을 기초로 한 *Aeromonas*속의 분류는 과거 많은 혼란을 겪었지만, 1980년대 이후 DNA-DNA hybridization, 16S rRNA 염기서열의 비교분석 등 분자분류학적 연구가 활발히 진행되어 종들 사이의 상호 유전 관계를 규명하고자 시도되고 있다(4,10). 그 결과 기준주인 *A. hydrophila*를 포함하여 17종이 보고되고 있다(6,7). 그러나 세균의 계통분류에서 표현형에 바탕을 둔 인위분류와 DNA homology group (DHGs) 사이에 불일치가 보고되고 있고(17), 종간 염기서열의 유사성이 매우 높아 chemotaxonomic marker (17,20)들과 genomic DNA ribotyping 등(22)의 자료만 가지고는 종들 사이에 명확한 구분은 어렵다.

최근 분자분류학적 연구의 재료로서 많이 이용되는 16S-23S spacer region은 internal spacer region (ISR) 이라고도 불린다. 그람 음성세균의 rRNA gene cluster의 배열순서는 5'-16S-23S-5S-3'로 되어있고(14,23) 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region (ISR)의 길이는 200-1500 bp로 다양하고 tRNA-encoding gene들을 가지고 있다(15,27). 세균의 ribosomal RNA operon (rrn)의 16S-23S rRNA intergenic spacer는 non-functional minimal selective pressure로 생각되고 있으며(13), 진화율(evolutionary rate)이 16S rRNA보다 10배 빠르기 때문에(21) 이 부분의 서열 분석은 종의 계통분류에 매우 유용하게 사용될

수 있다(8,9,13).

현재까지 *Aeromonas*속은 *A. hydrophila*와 *A. salmonicida* 두 종만이 16S-23S rRNA intergenic spacer region에 대한 연구가 이루어져 있다(11,12). 또한 현재 국내에서는 *Aeromonas*에 대한 연구가 거의 전무한 상태로 환자로부터 분리된 *Aeromonas*종의 몇가지 환례와 자연환경으로부터 분리된 소수의 보고(1-3)가 있을 뿐이며, 이 균에 대한 유전자 분석을 통한 분류학적인 연구는 보고된 바가 없다

본 연구자들은 가물치 양식장을 비롯한 몇 개의 담수어 양식장, 오수처리장등 자연환경으로부터 *A. sobria*와 *A. caviae*를 우점종으로 분리하였고(1), 이들의 16S-23S rRNA intergenic spacer sequence를 조사하여 종간과 종내의 차이와, tRNA-encoding gene을 파악하여 기존에 보고된 *A. hydrophila*와 *A. salmonicida*의 spacer region sequence의 비교, 및 *A. sobria*와 *A. caviae*를 보다 빠르고 정확하게 동정하기 위한 species-specific oligonucleotide primer를 찾아내기 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주

가물치 양식장등 자연환경에서 우점종으로 분리된 *Aeromonas veronii* bv. *sobria* 9균주와 *A. caviae* 3균주였다. 참조균주는 국립보건원으로부터 분양받았다(Table 1). 대조 균주는 국립보건원과 KCTC로부터 분양받았다(Table 2).

세균 염색체 DNA 분리

*To whom correspondence should be addressed
Tel.: 051-620-6363, Fax: 051-611-6358
E-mail. hunku@pknu.ac.kr

Table 1. Test strains used in this study

Strain. no	Species	Source
AV	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> ATCC 9071	KNIH
ACS1	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	Cultured Snakehead ('98.4)
AN4	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	Nakdong River ('98.7)
AN6	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	Nakdong River ('98.8)
AN9	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	Nakdong River ('98.8)
ACW1	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	Cultured-pond Water ('98.7)
ACW3	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	Cultured-pond Water ('98.8)
ACW7	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	Cultured-pond Water ('98.7)
ACW8	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	Cultured-pond Water ('98.8)
ACW11	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	Cultured-pond Water ('98.8)
AC	<i>A. caviae</i> ATCC 15468	KNIH
AS2	<i>A. caviae</i>	Scawater (in Kwanganri, Pusan) ('98.10)
ACW16	<i>A. caviae</i>	Cultured-pond Water ('98.10)
AN10	<i>A. caviae</i>	Nakdong River ('98.9)

염색체 DNA 분리과정은 Marmur의 방법을 따랐다(24). 추출한 DNA는 0.7% agarose gel상에서 100 V, 42 mA로 30분간 전기영동하여 밴드를 확인한 후, spectrophotometer (UNIKON 922< KFX) 를 이용하여 260 nm/280 nm값이 1.8이상 이 되도록 DNA를 정제하였다.

16S-23S rRNA ISR 증폭을 위한 PCR primer 제작

ISR을 증폭시키기 위해서 사용한 primer는 5'-GGCTTGG-ATCACCTCCTT-3' (*E. coli* 16S rRNA 부분의 1535-1541bp)과 5'-TGCCAAGGCATCCACCAT-3' (*A. hydrophila* 23S rRNA 부분의 21-38bp) 였고(15), 게노텍사로부터 합성시켰다.

16S-23S rRNA ISR의 PCR 증폭

PCR은 다음 조건에 따라 이루어졌다. 94°C 5분간 반응한 다음 94°C denaturation 1분, 56°C annealing 30초, 72°C extention 45초를 25회 반복하고, 72°C에서 5분간 final extention을 실시하였다. Mixed buffer는 MgCl₂ 25 mM, dNTP 2.5 mM, Taq polymerase (Promega) 1.5 umt, 10×reaction buffer, primer (30 pmol/ul)에 D.D.W.로 50 ul를 맞추어 0.2 ml thin well tube에 넣었다. Thermal cycler는 Perkin Elmer (GeneAmp PCR system 2400)를 이용하였다. 생성물은 1% agarose gel, 0.5×TBE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001M EDTA)에서 100 V, 25 mA로 30분 전기영동하여 EtBr (ethidium bromide)에 15분간 염색하여 UV하에서 확인하였다.

PCR 생성물의 pGEM®-T vector ligation

PCR 생성물을 cloning하기 위하여 Promega사의 pGEM®-T vector System을 이용하였다. T vector에 cloning하기 위하여

Table 2. Reference strains used in this study

Species	Strains	Source
<i>A. hydrophila</i>	ATCC 7966 ^T	KNIH
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 17802 ^T	KNIH
<i>V. harveyi</i>	ATCC 14126 ¹	KNIH
<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33814	KNIH
	ATCC 33815	KNIH
	ATCC 33149	KNIH
<i>V. proteolyticus</i>	ATCC 15338 ^T	KNIH
<i>V. mimicus</i>	ATCC 33653 ^T	KNIH
<i>V. furnissi</i>	ATCC 35016 ^T	KNIH
<i>V. fluvialis</i>	KCTC 2473	KCTC
<i>V. alginolyticus</i>	local strain (9704)	<i>Soletellina olivacea</i> (Dadaepo, 97')
<i>V. damsela</i>	local strain (9080)	<i>Crangon affinis</i> (Dadaepo, 96')
<i>V. cholerae</i>	local strain (9707)	<i>Sterna albifrons</i> (Nakdong River, 97')
<i>V. splendidus</i> biogroup I	local strain (9701)	<i>Soletellina olivacea</i> (Dadaepo, 97')
<i>V. splendidus</i> biogroup II	local strain (9603)	Seawater (96')
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11775 ^T	KNIH
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13882	KNIH
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 6750	KNIH

ATCC: American Type Culture Collection
KCTC: Korean Collection for Type Cultures
KNIH: Korean National Institutes of Health

PCR 생성물을 다음과 같은 방법으로 elution을 실시하였다(28). PCR 반응물을 10% Sea plaque (FMC®) low melting temperature agarose gel 상에서 전기영동하였다. Gel 상에 크기 별로 분리된 DNA 단편들 중에서 원하는 band를 잘라낸 agarose gel을 microcentrifuge tube에 옮기고 동일량(w/v)의 TE buffer를 첨가하여 65°C에서 5분간 처리하여 gel이 완전히 녹은 것을 확인한 뒤 2 volume의 TE buffer saturated-phenol을 첨가하고 vortexing하였다 이를 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 새 tube에 옮기고 여기에 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)을 동일량 첨가하여 vortexing하였다. 이를 다시 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻어 새 tube에 옮기고 1/10 volume의 3M sodium acetate (pH 5.2)와 2.5 volume의 95% ethanol을 첨가하고 -70°C에서 30분간 처리후 원심분리하였다. 이를 70% ethanol로 세척한 뒤 진공상태에서 건조시키고 적당량의 멸균 증류수에 녹인 다음 전기영동하여 확인하였다. 이렇게 준비된 PCR 생성물을 T vector protocol에 따라 ligation reaction [T4 DNA Ligase 10×buffer 1 μl, pGEM®-T vector (50ng), PCR 생성물 xμl, T4 DNA ligase (3 Weiss units/μl) 1 μl, deionized water를 첨가하여 최종 10 μl]을 준비하여 18°C에서 12시간 ligation을 실시하였다.

형질전환 및 Plasmid의 분리

Plasmid를 형질전환하기 위해서 competent cell의 준비는 Inoue 등의 방법에 따랐다(18). Plasmid DNA 분리는 Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit (Promega)를 이용하여 Manual에 따라 실시하였다.

염기서열 분석

ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer)를 이용하여 염기서열을 분석하기 위하여 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer)를 이용하여 염기서열분석을 실시하였다. PCR mixture는 protocol에 따라 terminator ready reaction mix 8 μ l, double-stranded DNA (0.2 μ g/ μ l) 1.5~2.5 μ l, primer 3.2 pmole 그리고 멸균된 증류수를 전체량 20 μ l에 맞추어 첨가하여 준비하였다. 이를 thermal cycler에 넣고 PCR 반응을 하였고, 반응조건은 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분씩 25 cycle을 실시한 뒤 4°C로 유지시켰다. PCR이 끝난 뒤 반응이 되지 못한 dye terminator등을 제거하기 위하여 ethanol 침전을 다음과 같이 실시하였다. 3M sodium acetate (pH 4.6) 2 μ l, 95% ethanol 50 μ l를 PCR 반응물 20 μ l에 첨가하고 -70°C에서 30분간 방치시킨 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 70% ethanol 250 μ l로 세척후 진공원심분리기에서 건조시켰다. 여기에 25 μ l의 template suppression reagent를 첨가하고 vortexing하여 잘 녹인 뒤 95°C에서 2분간 가열하여 denaturation시키고 열음에 급냉시켜 사용할 때 까지 4°C에 보관하였다. 염기서열 분석 과정은 Perkin Elmer사의 manual에 따라서 실시하였다.

자료 분석

염기서열을 분석하여 얻어진 clone의 염기서열을 이용하여 염기서열의 homology를 EMBL nucleotide database에서 조사하였다. 각각의 염기서열과의 alignment는 nucleotide analysis program (GENETYX software)을 이용하였다.

A. caviae를 동정하기 위한 PCR

PrAC-F로 명명한 primer (5'-TTAGCGATAACAGCGAACAG-3'; positions 177-196, *A. caviae* ATCC 15468 ISR-3)와 prAH-R로 명명한 primer (5'-THC-CAAGGCATCCACCAT-3'; positions 21-38, 23S rDNA, *A. hydrophila*)를 합성하였다. 이렇게 합성된 primer를 이용하여 *A. caviae*-specific PCR을 실시하였다. PCR 조건은 ISR 증폭과정을 위한 방법과 동일하였다. 16S-23S rRNA ISR의 PCR 증폭은 94°C 5분간 반응한 다음 94°C denaturation 1분, 56°C annealing 30초, 72°C extension 45초를 25회 반복하고, 72°C에서 5분간 final extension을 실시하였다. Mixed buffer는 MgCl₂ 25 mM, dNTP 2.5 mM, Taq polymerase (Promega) 1.5 unit, 10 reaction buffer, primer (30 pmol/ μ l)에 D.D.W.로 50 μ l를 맞추어 0.2 ml thin well tube에 넣었다. PCR product를 cloning하기 위하여 Promega사의 pGEM-T vector System을 이용하였다. Plasmid를 형질전환을 하기 위해서 competent cell의 준비는 Inoue 등(18)의 방법에 따랐다.

Transformant로부터 plasmid 분리는 Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit (Promega)를 이용하였다. 염기서열 분석은 ABI 310 Genetic Analyzer를 이용하였다. *A. caviae*를 동정하기 위한 PCR 조작은 다음과 같았다. PrAC-F로 명명한 primer (5'-TTAGC GATAACAGCGAACAG-3'; positions 177-196 *A. caviae* ATCC 15468 ISR-3)와 prAH-R로 명명된 primer (5'-TGCCAAGGCATCCACCAT-3'; positions 21-38, 23S rDNA, *A. hydrophila*)를 합성하였다. 이렇게 합성된 primer를 이용하여 *A. caviae*-specific band를 조사하였다. PCR 조건은 ISR 증폭을 위한 방법과 동일하였다.

결 과

Internal Spacer region (ISR)의 PCR

우점종으로 분리된 *A. veronii* bv. *sobria* 9균주, *A. caviae* 3균주, 네조균으로 *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071, 및 *A. caviae* ATCC 15468을 선택하여 염색체 DNA를 분리하였다 (Table 1).

16S rRNA부분과 23S rRNA부분의 보존적인 염기서열을 primer로 사용하여 PCR을 실시한 결과 *A. veronii* bv. *sobria*는 4 그룹의 band pattern이 형성되었고, *A. caviae*는 1그룹의 band pattern이 형성되었다(Fig. 1). *A. veronii* bv. *sobria* 4그룹의 band pattern을 살펴보면 A와B 그룹은 2개, C그룹은 3개, D그룹은 4개의 band를 생성하였으며, *A. caviae*는 3개의 band를 생성하였다(Fig. 1, Table 3). *A. caviae* 4균주가 생성한 각각의 band pattern은 제일 작은 크기의 band가 470~480 bp였고, 중간크기 band가 521~525 bp, 제일 큰 band는 568~592 bp였다(Fig. 1, Table 3).

ISR의 염기서열 분석

14균주의 *Aeromonas* ISR-1, 2, 3, 4에 대한 염기서열을 분석하였다. *A. veronii* bv. *sobria*와 *A. caviae* 14균주의 제일 작은



Fig. 1. Electrophoresis with 2% agarose gel of PCR-amplified 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *A. veronii* bv. *sobria* and *A. caviae*. Lanes: M, molecular weight marker(100-bp ladder); 1, *A. veronii* bv. *sobria* ATCC9701; 2, *A. veronii* bv. *sobria* ACS1; 3, *A. veronii* bv. *sobria* ACW11; 4, *A. veronii* bv. *sobria* AN6; 5, *A. veronii* bv. *sobria* AN4; 6, *A. veronii* bv. *sobria* AN9; 7, *A. veronii* bv. *sobria* ACW7; 8, *A. veronii* bv. *sobria* ACW8; 9, *A. veronii* bv. *sobria* ACW3; 10, *A. veronii* bv. *sobria* ACW1; 11, *A. caviae* 15468; 12, *A. caviae* AS2; 13, *A. caviae* ACW16; 14, *A. caviae* AN10.

크기를 ISR-1이라고 명명하였고, tRNA^{Ala(GAT)}와 tRNA^{Ala(TGC)}, 두 개의 tRNA gene들을 coding하였으며 염기서열의 유사성을 비교한 결과는 Table 4에 나타내었다. *Aeromonas veroni* bv. *sobria*의 4개 그룹중 기준주 ATCC 9071 (AV)이 포함된 A그룹의 일 부균주와 C그룹의 염기서열이 완전히 일치하였다. *A. veronii* bv. *sobria* 종내의 유사성은 96.2~100%, *A. caviae* 종내의 유사성은

94.7-100%로 나타났으며, *A. veronii* bv. *sobria*와 *A. caviae* ISR-1의 유사성은 94.2~99%로 나타났다.

A. veronii bv. *sobria*와 *A. caviae*의 513~525 bp사이의 크기를 ISR-2이라고 명명하였고, tRNA^{Glu(TTC)} 하나의 tRNA gene을 coding하고 있었다. 그들 염기서열의 유사성을 비교한 결과는 Table 5에 나타내었다. *A. veroni* bv. *sobria* 종내의 유사성은 89.9~100%, *A. caviae* 종내의 유사성은 95.4~100%로 나타났으며, *A. veronii* bv. *sobria*와 *A. caviae* 두 종간의 ISR-2에 대한 유사성은 88.3%~98.7%로 나타났다.

A. veronii bv. *sobria*의 537~539 bp 사이의 크기를 ISR-3이라고 명명하였고, *A. caviae*의 568~602 bp 사이의 크기를 ISR-4라고 명명하였으며, tRNA^{Glu(TTC)} 하나의 tRNA gene을 coding하고 있다. 그들 염기서열을 분석한 결과는 Table 6에 나타내었다. ISR-3의 유사성은 96.7~100%, ISR-4의 유사성은 89.1~94.1%로 나타났다. ISR-3과 ISR-4의 유사성은 80.8%~84.6%였다.

Table 3. Band type of ISRs

Species	Group	Strain Number	Band size			
			ISR-1	ISR-2	ISR-3	ISR-4
<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	A group (2 band)	AV	481bp	523bp		
		ACS1	481bp	523bp		
		ACW11	479bp	515bp		
		AN6	479bp	524bp		
	B group (2 band)	AN4	481bp	539bp		
		AN9	481bp	537bp		
	C group (3 band)	ACW7	481bp	523bp	537bp	
		ACW8	481bp	523bp	537bp	
	D group (4 band)	ACW3	481bp	513bp 522bp	539bp	
		ACW1	482bp	513bp 520bp	539bp	
	<i>A. caviae</i>	AC	476bp	521bp		592bp
		AS2	470bp	522bp		568bp
ACW16		480bp	521bp		602bp	
AN10		476bp	524bp		589bp	

ISR의 계통학적 분석

ISR-1, ISR-2, ISR-3과 ISR-4의 계통도를 Fig. 2에 나타내었다. ISR-1의 경우, *A. veroni* bv. *sobria*와 *A. caviae*는 두 그룹으로 나누어졌다(Fig 2a) 그러나 *A. caviae* ACW 16은 계통학적 분석결과 *A. veronii* bv. *sobria*의 그룹에 포함되었다. ISR-2의 경우, ISR-1과는 상이한 결과를 나타냈는데 *A. veronii* bv. *sobria* ACW 3, ACW 1, ACW1-1, ACW 11은 하나의 독립된 그룹을 형성하였고. *A. veronii* bv. *sobria* AV, ACS 1, AN 6, ACW 7, ACW 8, ACW 3-1과 *A. caviae* AS 2, AN 10, AC, ACW 16가 또다른 하나의 그룹을 형성하였다(Fig. 2b). ISR-3과 ISR-4의 경우, *A. veronii* bv. *sobria*와 *A. caviae*의 두 그룹으로 분리되었다 (Fig. 2c).

Table 4. ISR-1 sequence similarity values among *A. veronii* bv. *sobria* and *A. caviae* strains

Strain	Size (bp)	Sequence similarity values ^a													
		AV	ACS1	ACW11	AN6	AN4	AN9	ACW7	ACW8	ACW3	ACW1	AC	AS2	ACW16	AN10
AV	481														
ACS1	481	100													
ACW11	479	96.3	96.3												
AN6	479	96.3	96.3	100											
AN4	481	100	100	96.2	96.2										
AN9	481	100	100	96.2	96.2	100									
ACW7	481	100	100	96.2	96.2	100	100								
ACW8	481	100	100	96.2	96.2	100	100	100							
ACW3	481	100	100	96.2	96.2	100	100	100	100						
ACW1	482	99	99	98.1	98.1	99	99	99	99	99					
AC	476	95	95	94.2	94.2	95	95	95	95	95	95.2				
AS2	470	96	96	95.4	95.4	96	96	96	96	96	96.3	98.1			
ACW16	480	99	99	97.7	97.7	99	99	99	99	99	99.2	94.7	96.2		
AN10	476	95	94.2	94.2	95	95	95	95	95	95	95.2	100	98.1	95.2	

^aThe values in the upper-right triangle indicate nucleotide differences/total number compared. The values in the lower-left triangle indicate the % similarity values

Table 5. ISR-2 sequence similarity values among *A. veronii* bv. *sobria* and *A. caviae* strains

Strain	Size (bp)	Sequence similarity values ^a													
		AV	ACS1	ACW11	AN6	ACW7	ACW8	ACW3	ACW3	ACW1	ACW1	AC	AS2	ACW16	AN10
AV	523		0/523	48/523	7/523	12/523	12/523	37/523	11/523	37	523	43/523	14/523	7/523	14/523
ACS1	523	100		48/523	7/523	12/523	12/523	37/523	11/523	37/523	43/523	14/523	7/523	14/523	13/523
ACW11	515	90.8	90.8		52/515	52/515	52/515	32/515	47/515	32/515	28/515	58/515	44/515	58/515	60/515
AN6	524	98.7	98.7	89.9		17/524	17/524	41/524	16/524	41/524	46/524	16/524	12/524	16/524	15/524
ACW7	523	97.7	97.7	89.9	96.8		0/523	46/523	3/523	46/523	49/523	21/523	7/523	21/523	17/523
ACW8	523	97.7	97.7	89.9	96.8	100		46/523	3/523	46/523	49/523	21/523	7/523	21/523	17/523
ACW3	513	92.9	92.9	93.8	92.2	91.2	91.2		52/513	0/513	9/513	56/513	49/513	56/513	56/513
ACW3	522	97.9	97.9	90.9	96.9	99.4	99.4	90		45/522	45/522	20/522	6/522	20/522	14/522
ACW1	513	92.9	92.9	93.8	92.2	91.2	91.2	100	91.4		9/513	51/513	52/513	51/513	57/513
ACW1	520	91.7	91.7	94.6	91.2	90.6	90.6	98.2	91.4	98.2		54/520	54/520	54/520	55/520
AC	521	97.3	97.3	88.7	96.8	96	96	89.1	96.2	90	89.6		21/521	0/521	21/51
AS2	522	98.7	98.7	91.5	97.7	98.7	98.7	90.4	98.9	89.9	89.6	96		21/522	24/522
ACW16	521	97.3	97.3	88.7	96.9	96	96	89.1	96.2	90	89.6	100	95.6		7/521
AN10	524	97.5	97.5	88.3	97.1	96.7	96.7	89.1	97.3	88.9	89.4	96	95.4	98.7	

^aSee Table 1, footnote a.

Table 6. ISR-3 and ISR-4 sequence similarity values among *A. veronii* bv. *sobria* and *A. caviae* strains

Strain	Size (bp)	Sequence similarity values ^a									
		AN4	AN9	ACW7	ACW8	ACW3	ACW1	AC	AS2	ACW16	AN10
AV	539		10/539	18/539	18/539	6/539	6/539	83/539	95/539	89/539	88/539
AN9	537	98.1		18/537	18/537	6/537	6/537	85/537	92/537	87/537	78/537
ACW7	537	96.7	96.7		0/537	12/537	12/537	93/537	85/537	103/537	92/537
ACW8	537	96.7	96.7	100		12/537	12/537	93/537	85/537	103/537	92/537
ACW3	539	98.9	98.9	97.8	97.8		0/539	89/539	91/539	95/539	85/539
ACW1	539	98.9	98.9	97.8	97.8	100		89/539	91/539	95/539	85/539
AC	592	84.6	84.6	82.7	82.7	83.5	83.5		56/592	41/592	35/592
AS2	568	82.4	82.4	84.2	84.2	83.1	83.1	90.5		62/568	39/568
ACW16	602	83.5	83.5	80.8	80.8	82.4	82.4	93	89.1		37/602
AN10	589	83.7	83.7	82.7	82.7	84.2	84.2	94.1	93.1	93.9	

^aSee Table 1 footnote a.

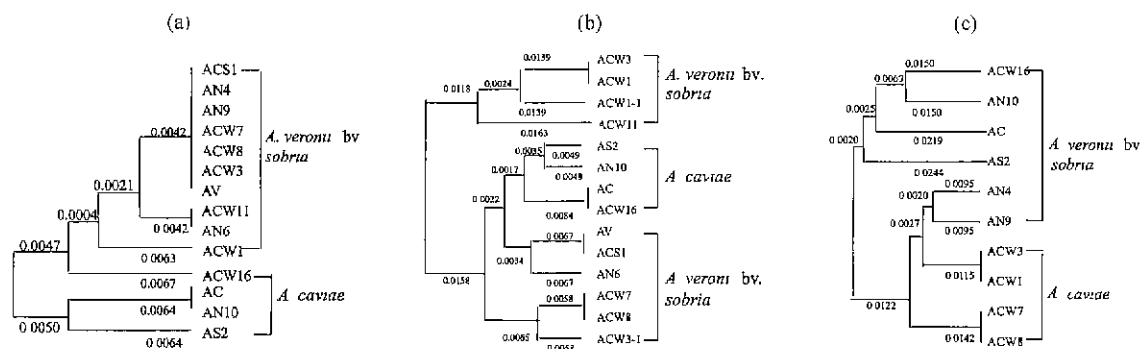


Fig. 2. Phylogenies of *A. veronii* bv. *sobria* and *A. caviae* strains based on ISR-1 (a), ISR-1 (b), and ISR-3 and ISR-4 (c) sequences. The unrooted evolutionary trees were inferred by using the neighbor-joining method.

Table 7. Sequence similarity of tDNAs found in 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *A. veronii* bv. *sobria* and *A. caviae*

ISR and tDNA	Matching organism(s)	% similarity
ISR-1	<i>Salmonella enterica</i>	100 (80/80)
tDNA ^{Ala} (GAT)	<i>Salmonella enteritidis</i>	100 (79/79)
	<i>Prevotella rummicola</i>	100 (79/79)
tDNA ^{Ala} (TGC)	<i>Salmonella enterica</i>	98 (63/64)
	<i>Salmonella enteritidis</i>	96 (62/64)
	<i>Prevotella rummicola</i>	98 (63/64)
ISR-2,3,4	<i>Salmonella enterica</i>	98 (78/79)
tDNA ^{Glu} (TTC)	<i>E. coli</i>	98 (78/79)
	<i>E. fergusonii</i>	98 (78/79)

^aNumbers of different nucleotides/total nucleotides compared are given in parentheses.

ISR의 tRNA 분석

ISR-1에서 tRNA^{Ala}(GAT), tRNA^{Ala}(TGC) 등 2개의 tRNA와, ISR-2, ISR-3과 ISR-4에서 tRNA^{Glu}(TTC)를 가지고 있어 총 3개의 tRNA가 존재하였다. tRNA들의 BLAST Search를 통하여 분석한 결과는 Table 7에 나타내었다.

*A. caviae*의 종특이 PCR-생성물

A. veronii bv. *sobria*와 *A. caviae* 두 종간의 16S-23S spacer region의 염기서열을 비교해 본 결과 매우 유사하였다. 그러나 ISR-4의 151bp~281 bp에서 *A. veronii* bv. *sobria*는 가지고 있지 않고 *A. caviae*에서만 보존적으로 존재하는 특이 염기서열이 있었다. AC의 177bp~196 bp 염기서열을 primer로 design하였고, reverse primer는 *A. hydrophila* 23S rRNA 부분의 21~38 bp를 이용하였다. ISR 염기서열 분석에 바탕을 둔 PCR의 결과는 Fig. 3에 나타내었다. *A. caviae* 균주들과 *A. veronii* bv. *sobria* 균주들을 대상으로 PCR을 실시한 결과 *A. caviae* 균주들에서 예상되었던 450 bp 정도의 크기의 특이 band가 생성되었다. *A. caviae*와 유연관계가 깊은 균들과 차이를 확인하기 위하여 특정한 primer를 이용하여 *A. hydrophila* ATCC 7966, *Vibrio*속 14균주, 장내 세균속 3균주를 대상으로 PCR을 실시하여 band형성 유무를 확인한 결과 *A. caviae* 이외의 균들에서는 생성물이 확인되지 않았다. 따라서 이 primer가 *A. caviae*를 동정할 수 있는 종특이 primer임을 알 수 있었다.

고 찰

*Aeromonas*는 자연의 수계환경에 널리 분포하면서, 개구리나 어류의 출혈성폐양 원인균이며 최근 인간에게도 여러 종류의 질병을 유발시키는 중요 기회감염균이다(25,26). 국내에서 *Aeromonas* 연구는 활발한 편은 아니며 *A. hydrophila*가 병원과 환경으로부터 몇례가 보고되었다(1-3). 본 연구 결과 환경으로부터 분리된 *A. veronii* bv. *sobria*가 가장 많이 분리되었고 두 번째로 *A. caviae*가 많이 분리되었다. 그밖에도 여러 생화학적인

결과들을 고려할 때 분명히 *Aeromonas*속으로 추정되었지만 종수 준까지는 명확하게 동정될수 없는 균주도 11균주가 분리되었다(1). 본 연구에서 주안점은 생화학적 방법을 통하여 가장 우점종으로 동정된 *A. veronii* bv. *sobria*와 *A. caviae*의 16S-23S rRNA spacer region 염기서열을 조사함으로써, 종내의 염기서열과 종간의 염기서열의 차이를 규명하고자 하였다. *A. veronii* bv. *sobria*와 *A. caviae*의 ISR PCR을 실시한 결과는 다음과 같았다. Band pattern은 *A. veronii* bv. *sobria*가 *A. caviae*보다 다양하였지만(Fig. 1), 두균주 모두 종내에서 소그룹 사이의 형성된 염기의 크기가 비슷하면 그 서열의 유사성이 매우 높게 나타나는 것이 관찰되었다(Table 3, 4, 5, 6, Fig. 1). 그러나 같은 종내에서 다른 크기의 형성물들 사이에는 염기서열의 변이가 상당히 일어나는 것이 관찰되었다. 본 연구에서 얻어진 이와같은 결과는, 세균내에서 다양한 tRNA가 변이에 영향을 미친다는 다른 보고들과도 일치되었다(5,13,16,23). 특히 *A. veronii* bv. *sobria*의 경우, 본 실험의 대조균주로 사용한 기준주 *A. veronii* bv. *sobria* ATCC

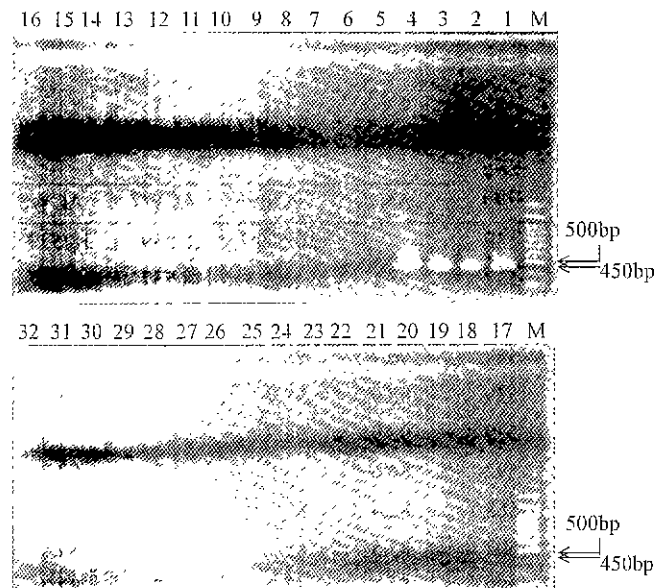


Fig. 3. Identification of *A. caviae* by using PCR based on the 16S-23S rRNA ISR. M molecular weight marker (100-bp ladder); 1, *A. caviae* ATCC 15468; 2, *A. caviae* AS2; 3, *A. caviae* ACW16; 4, *A. caviae* AN10; 5, *A. veronii* bv. *sobria* ATCC 9071; 6, *A. veronii* bv. *sobria* ACS1; 7, *A. veronii* bv. *sobria* ACW11; 8, *A. veronii* bv. *sobria* AN6; 9, *A. veronii* bv. *sobria* AN4; 10, *A. veronii* bv. *sobria* AN9; 11, *A. veronii* bv. *sobria* ACW7; 12, *A. veronii* bv. *sobria* ACW8; 13, *A. veronii* bv. *sobria* ACW3; 14, *A. veronii* bv. *sobria* ACW1; 15, *A. hydrophila* ATCC 7966; 16, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; 17, *V. harvei* ATCC 14126; 18, *V. vulnificus* ATCC 33814; 19, *V. vulnificus* ATCC 33815; 20, *V. vulnificus* ATCC 33149; 21, *V. proteolyticus* ATCC 15338; 22, *V. mimicus* ATCC 33653; 23, *V. furnissii* ATCC 35016; 24, *V. fluvialis* KCTC 2473; 25, *V. alginolyticus* local strain; 26, *V. damsela* local strain; 27, *V. cholerae* local strain; 28, *V. splendidus* biogroup I local strain; 29, *V. splendidus* biogroup II local strain; 30, *Escherichia coli* ATCC 11775; 31, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13882; 32, *Citrobacter freundii* ATCC 6750

9071(AV)은 A 그룹에 속하였으며, 실험균주중 ACSI은 기준주와 염기서열이 완전히 일치되었고 이 그룹에 속한 다른 균주들도 기준주와 유사한 크기의 염기서열을 가진 균주들은 그 서열이 기준주와 유사성이 매우 높게 나타났다. ISR-1, 2는 *A. veronii* bv. *sobria*와 *A. caviae*에서 크기와 염기서열 모두 높은 유사성을 나타내었지만 ISR-3은 *A. veronii* bv. *sobria*에서만 나타났고, ISR-4는 *A. caviae*에서만 형성되었다(Table 3). 이 결과를 바탕으로 ISR-3과 ISR-4의 염기서열을 비교하여 두 종간의 차이점을 분석한 결과, 151bp-281 bp 생성물은 *A. veronii* bv. *sobria*에서는 관찰되지 않고 오로지 *A. caviae*에서만 보존적이었기 때문에 이 염기서열이 *A. caviae*에서만 특이적으로 나타나는 것임을 확인할 수 있었다. 계통도 분석에서 ISR-1과 ISR-2는 *A. veronii* bv. *sobria*와 *A. caviae* 균주들을 유의성 있는 독립된 그룹으로 나누지 못하였다. 하지만 ISR-3과 ISR-4에서 두종이 서로 독립된 그룹을 형성하는 것을 확인할 수 있어서 ISR-1과 ISR-2는 속(屬)을 구분짓는 보존적인 염기서열임을 알수 있었고, ISR-3과 ISR-4가 두 종(種)을 구분짓는 형성물들임을 알수 있었다(Fig. 3). tRNA gene들은 세균의 16S-23S rRNA ISR에서 여러 종류가 발견되었다. *A. hydrophila*와 *E. coli*는 tDNA^{Glu(UUC)}와 tDNA^{Ile(GAU)}-tDNA^{Ala(UGC)}의 두가지 ISR 형태를 가지고 있지만 균종에 따라 다소 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(9,12). 본 연구에서 얻어진 tDNA는 두가지 형태를 가지고 있고, 그 중 하나가 tDNA^{Glu(TTC)}이며, 나머지 하나는 tDNA^{Ile(GAT)}-tDNA^{Ala(TGC)}이었다. ISR-1의 tDNA^{Ile(GAT)}는 *Salmonella enterica*의 tDNA^{Ile(GAT)}와 100% 일치하였고, tDNA^{Ala(TGC)}는 *Salmonella enterica*와 98% 일치하였다. ISR-2, 3, 4의 tDNA^{Glu(TTC)}는 *Salmonella enterica*, *E. coli*, *E. fergusonii*와 98%의 homology를 나타내었다(Table 7). 하지만 같은 *Aeromonas*속의 *A. hydrophila*와는 높은 homology가 나타나지 않았는데 이것은 *A. hydrophila*와 다른 형태의 tDNA를 가지고 있기 때문이었다(12). ISR 서열의 homology는 *A. salmonicida*와 가장 높게 나타났고, 특히 16S rRNA, 23S rRNA와 근접하게 연결된 부분은 상당히 높은 homology를 나타내었다. 따라서 ISR 서열 중에서 가장 변이가 많은 곳은 첫 번째가 tDNA존재 유무와 어떤 종류의 tDNA를 가지고 있는나이며, 두 번째는 tDNA가 위치한 양쪽 측면의 서열 부분이다. ISR PCR 생성물의 염기서열을 통하여 얻어진 결과들을 이용하여 *A. caviae*에서만 특이적으로 나타나는 염기서열 중에서 primer를 선택하여 PCR을 실시하여 *A. caviae*에서만 특이적으로 나타나는 밴드가 생성됨이 관찰되었다(Fig. 3). 이 밴드들은 *A. veronii* bv. *sobria*는 물론, 기타 *A. hydrophila*나 근연속인 *Vibrio*속, 장내세균속에서도 전혀 형성되지 않았다. 따라서 이 primer가 *A. caviae*를 신속, 정확하게 동정할 수 있는 종특이 primer임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- 강동률, 이훈구. 1999. 담수어 양식장 및 해수로부터 *Aeromonas*屬의 동정 및 항균제 내성에 관한 연구. 대한미생물학회지 34, 393-400.
- 곽창길, 정윤섭, 이삼열. 1987. 환자와 자연환경에서 분리된 *Aeromonas*의 균종 및 항균제 감수성. 감염. 19, 167-177.
- 이훈구. 1992. 양식 가물치 켈양병의 병리 연구. 한국미생물학회지. 30, 164-170.
- Borrell, N., S. G. Acinas, M. J. Figueras, and A. J. Martinez-Murcia. 1997. Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1671-1674.
- Bourque, S. N., J. R. Valero, M. C. Lavoie, and R. C. Levesque. 1995. Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thuringiensis* strains and subspecies and of closely related species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1623-1626.
- Carnahan, A. M., S. Behram, and S. W. Joseph. 1991. Aerokey II: A flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2843-2849.
- Carnahan, A. M., T. Chakraborty, G. R. Fanning, D. Verma, A. Ali, J. M. Janda, and S. W. Joseph. 1991. *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1206-1210.
- Christensen, H., K. Jorgensen, and E. O. John. 1999. Differentiation of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* by length and DNA sequence of the 16S-23S rRNA internal spacer region. *Microbiol-ogy*: 145, 99-105.
- Chun, J., A. Huq, and R. C. Rita. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2202-2208.
- Collins, M. D., A. J. Martinez-Murcia, and J. Cai. 1993. *Aeromonas enteropelegenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 855-856.
- Dorsch, M., N. J. Ashbolt, P. T. Cox, and A. E. Goodman. 1994. Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 722-726.
- 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.
- Forsman, P., A. Tilsala-Timisjarvi, and T. Alatossava. 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology*: 143, 3491-3500.
- Garcia-Martinez, J., A. Martinez-Murcia, A. L. Anton, and R.V. Francisco. 1996. Comparison of the small 16S to 23S Intergenic Spacer Region (ISR) of the rRNA operons of some *Escherichia coli* Strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12. *J. Bacteriol.* 178, 6374-6377.
- Gurtler, V. and A. S. Vilma. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*: 142, 3-16.
- Gurtler, V. and B. Helen. 1995. Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S rDNA spacer regions: characterization of spacer sequences. *Microbiol-ogy*: 141, 1255-1265.
- Huys, G., M. Vancanneyt, R. Coopman, P. Janssen, E. Falsen, M. Altwegg, and K. Kersters. 1994. Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst.*

- Bacteriol.* 44, 651-658.
18. Inoue H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
 19. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the taxonomy of *Vibrionaceae* 1992. Minutes of the meetings, 18 and 20 September 1990, Osaka, Japan, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 199-201.
 20. Kampfer, P. K. Blaszczyk, and G. Auling 1994. Characterization of *Aeromonas* genomic species by using quinone, polyamine, and fatty acid patterns. *Can. J. Microbiol.* 40, 844-850.
 21. Leblond-Bourgct, N., H. Philippe, I. Mangin, and D. Bernard. 1996. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter and intraspecific *Bifidobacterium* Phylogeny. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 102-111.
 22. Lucchini, M. G. and M. Altwegg. 1992. rRNA gene restriction patterns as taxonomic tools for the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 384-389.
 23. Luz, S. P., F. Rodriguez-Valera, R. Lan, and P. R. Recves. 1998. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. *J. Bacteriol.* 180, 2144-2151.
 24. Marmur. J. 1961. A Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218.
 25. Michael J. and L. A. Sharon 1998. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*. an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect. Dis.* 27, 332-344.
 26. Namdari H. and J. B. Edward. 1990. Microbiologic and clinical evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen. *J. Clin Microbiol.* 28, 837-840.
 27. Nakagawa, T., T. Uemori, K. Asada, I. Kato, and H. Ryo. 1992. *Acholeplasma laidlawii* has tRNA genes in the 16S-23S spacer of the rRNA operon. *J. Bacteriol.* 174, 8163-8165
 28. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

(Received July 26, 2000/Accepted August 28, 2000)

ABSTRACT: Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Aeromonas veronii* biogroup *sobria* and *A. caviae*

Dong-Lyul Kang and Hun Ku Lee*(Department of Microbiology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea)

The internal spacer regions (ISR) between the 16S and 23S rRNA genes of *Aeromonas veronii* biogroup *sobria* and *A. caviae* were investigated by PCR fragment length typing and DNA sequencing. *A. veronii* bv. *sobria* has a specific 16S-23S pattern of 2-4 fragments ranging from 479-539 bp, with the exception of the species *Aeromonas caviae*, which has 3 fragments ranging from 470-602 bp. In all of the *A. veronii* bv. *sobria* and *A. caviae* strains examined in this study, the 470-481bp fragment, designated ISR-1, invariably contained tDNA^{Ile(GAT)} and tDNA^{Ala(TGC)}, in contrast to ISR-2 (513-525 bp), ISR-3 (537-539 bp) and ISR-4 (568-602 bp) containing tDNA^{Glu(UTC)}. A stretch of 20 nucleotides (178-197 bp) in the ISR-4 was conserved only within *A. caviae*, from which the *A. caviae* specific primer, named prAC-F, was designed and used for PCR with a *A. caviae* common reverse primer. A PCR product of 450 bp was apparent among *A. caviae* strains, but not in *A. veronii* bv. *sobria* strains. The PCR product was not detected from strains belonging to *A. hydrophila*, *Vibrio*, and the family *Enterobacteriaceae*. This study provides the first molecular tool for identifying the species *A. caviae*.