

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

박영미 · 이제희*
제주대학교 해양과학대학 해양과학부

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

Young Mi PARK and Jehee LEE*
Department of Marine Biotechnology, Cheju University, Jeju 690-756, Korea

We have examined the 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR) of *Vibrio vulnificus* KCTC 2959. ISRs were amplified by primers complementary to conserved regions of 16S and 23S rRNA genes. ISR amplicons were cloned and sequenced. Analysis of the ISR sequences showed that *V. vulnificus* KCTC 2959 contains five types of polymorphic ISRs. 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 as ISR-E (tRNA^{Glu}), ISR-IA (tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala}), ISR-EKV (tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Val}), ISR-IAV (tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala}-tRNA^{Val}) and ISR-EKAV (tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Ala}-tRNA^{Val}) based on their tRNA genes. Multiple alignment of representative sequences from different *Vibrio* species revealed several domains of high sequence variability. We used the sequences of variable domains to design species-specific primer for detection PCR. Specificity of the primers was examined using genomic DNA prepared from 18 different *Vibrio* species. The results showed that the PCR using primers designed in this study can be used to detect *V. vulnificus* from other *Vibrio* species.

Key words: *Vibrio vulnificus*, 16S-23S rRNA, Intergenic spacer region (ISR), PCR, tRNA

서 론

*Vibrio vulnificus*는 해수, 갯벌, 어패류 등에서 주로 분리되며, 1979년 전남 지방에서 일어난 사례를 최초로 특히 매년 여름이면 *V. vulnificus*에 의한 피해사례들이 보고되고 있다 (Park et al., 1993; Sin and Park, 1998; Ju et al., 1998). 피부의 상처 부위가 *V. vulnificus*에 오염된 해수와 접촉하거나 이 균에 오염된 해산물을 생식하여 감염되면 외과적인 수술로 조직을 제거해야 할 정도의 심한 피사가 나타나거나 패혈성 쇼크로 사망할 수 있다 (Blake et al., 1979). *V. vulnificus* 감염환자를 대상으로 작성한 보고를 참고하면, 이 균에 오염된 음식을 섭취한 후 2일 이내에 질병 증상이 나타나며, 사망률은 60% 이상으로 매우 높다고 한다 (Park et al., 1991; Oliver et al., 1992; Park et al., 1993; Jung and Ko, 1995; Ju et al., 2000). 따라서 이 균이 서식하기 좋은 환경이나 개체에 대한 사전 조사를 실시하여 감염을 예방해야 하는 것은 물론 *V. vulnificus*에 의한 감염으로 의심되는 환자가 발생하면 신속하고 정확하게 균을 검출하고 동정하여 적절한 치료를 실시해야 한다.

*V. vulnificus*를 동정하기 위해 실시되는 일반적인 실험방법들을 살펴보면, 검사에 충분할 정도로 균 수를 증가시키기 위해 1% NaCl이 포함된 APW (alkaline peptone water)에서 피검물을 배양한다 (Tamplin et al., 1991). 그 후 TCBS

(thiosulfate-citrate bile salts sucrose) agar (Oliver et al., 1992) 혹은 CPC (cellobiose-polymyxin B-colistin) agar (Massad and Oliver, 1987; Hoi et al., 1998) 등의 선택배지에서 균의 증식 여부와 colony의 성상을 관찰하여 *V. vulnificus*로 의심되는 colony를 선택하고, 보다 정확한 검사를 위해 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 (Park et al., 1993; Ju et al., 1998; Ju et al., 2000).

그러나 증균배양으로 인해 *V. vulnificus*에 비해 다른 균들의 증식이 더욱 더 촉진되거나 (Tamplin et al., 1991) *V. vulnificus*의 분리에 유리한 조건을 만들기 위해 선택배지에 첨가한 화합물이 오히려 역효과를 나타내는 경우도 있다 (Miceli et al., 1993; Jung and Ko, 1995; Hoi et al., 1998). 또한 *V. vulnificus* 일부 strain은 sucrose를 분해할 수 있는 것으로 보고되었으며 (Tamplin et al., 1991), 실험 균주들의 생화학적 성상의 변화나 표준균주와는 다른 생화학 시험 결과로 인해 혼란이 발생하여 정확한 결과를 얻기에 상당한 시간이 소모되기도 한다 (Ju et al., 1998; Ju et al., 2000). 이와 더불어 *V. vulnificus*는 낮은 온도나 염분 증가 등의 환

*Corresponding author: jehee@cheju.ac.kr

경적인 stress를 받게 되면 일반적인 배지에서는 배양할 수 없어 기존의 방법으로 검출하기에는 한계가 있는 VBNC (viable but nonculturable) state의 cell을 형성하게 되는데, 이들은 온도가 다시 올라가면 소생하여 질병을 일으킬 가능성이 있는 것으로 보고되었다 (Nilsson et al., 1991; Oliver and Bockian, 1995; Oliver, 1995).

이러한 문제점들을 극복하기 위해 monoclonal antibody를 이용하거나 (Tamplin et al., 1991; Parker and Lewis, 1995) *V. vulnificus*의 특이적인 유전자로 알려져 있는 cytotoxin-hemolysin gene에 방사성 동위원소나 alkaline phosphatase로 표지하여 probe로서 이용하여 검출하려는 연구들이 보고되었다 (Morris et al., 1987; Wright et al., 1993; Dalsgaard et al., 1996). 또한 그 유전자의 일부 염기서열을 primer로 이용하여 다른 균들과 혼합된 상태에서는 물론 nonculturable cell도 확인할 수 있었다 (Brauns et al., 1991; Coleman and Oliver, 1996). 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 (Cerdeña-Cuellar et al., 2000) 23S rDNA (23S rRNA gene)의 일부 서열을 primer로 PCR을 수행하여 빠른 시간 내에 정확하게 동정할 수 있는 방법들이 (Arias et al., 1995) 보고되었다.

최근에는 16S rDNA의 염기서열 변이도가 낮아 미생물의 동정이나 분류에 그다지 효과적이지 못하다는 문제점이 제시되면서 다른 종끼리는 물론 multiple *rrn* operon을 갖는 개체의 경우 하나의 세포에서도 operon간의 크기와 서열이 매우 다양한 것으로 보고되는 16S rDNA와 23S rDNA 사이에 존재하는 intergenic spacer region (ISR)을 이용하려는 연구들이 진행되고 있다 (Condon et al., 1995; Gurtler and Stanisich, 1996; Maeda et al., 2000). 콜레라 독소 유전자 (ctxAB)를 이용하여 *V. mimicus*와 *V. cholerae*를 구별하는데 한계가 있었지만, 이들의 ISR 서열을 분석하여 제작한 primer를 이용한 PCR 증폭산물의 전기영동 band pattern으로 *V. cholerae*를 진단할 수 있었고 (Chun et al., 1999), Lee et al. (2002)은 *V. costicola*, *V. diazotrophicus*, *V. fluvialis*, *V. nigripulchritudo*, *V. proteolyticus*, *V. salmonicida*, *V. splendidus*, *V. tubiashii*의 ISR 서열을 분석하여 각 species에 특이적인 primer를 제작하여 각각의 *Vibrio* species를 검출하는데 이용하였다.

본 연구에서는 패혈증의 원인균인 *V. vulnificus*의 ISR 염기서열을 분석하여 여러 종류의 *rrn* operon을 확인하였으며, ISR의 다양성이 높은 부위의 sequence를 이용하여 *V. vulnificus* 검출을 위한 primer를 제작하였다. 이 primer의 species 특이성을 확인하기 위해 18종의 *Vibrio*를 대상으로 detection PCR을 수행하고 그 산물을 분석하여 species-specific 검출을 위한 가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

Vibrio vulnificus KCTC 2959의 genomic DNA 분리

유전자은행에서 *V. vulnificus* KCTC 2959 균주를 분양받아 2.5% NaCl가 첨가된 LB (Luria-Bertani) broth에 접종하여 35°C에서 16시간 배양하였다. 하룻밤 배양한 배양액을 microcentrifuge tube에 옮겨 원심분리하여 pellet을 수집하고 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 genomic DNA의 농도는 Unicam UV/VIS Spectrometer (Helios β , Unicam Ltd, UK)를 이용하여 260 nm에서 optical density를 측정하여 계산하였다.

ISR 증폭을 위한 primer 제작

V. vulnificus KCTC 2959의 ISR을 증폭하기 위해 현재까지 보고된 *Vibrio*의 16S rDNA의 3' end 부분과 23S rDNA의 5' end 부분을 각각 분석하여 제작하였다. Forward primer인 16S-VF (5'-CCGTCACACCATGGGAGTGG-3')는 *V. vulnificus* ATCC 27562의 16S rDNA 서열의 1396 bp에서 1415 bp에 해당하고, reverse primer인 23S-VR (5'-ACTGC-CAAGGCATCCACCGTG-3')은 *V. vulnificus* ATCC 27562의 23S rDNA의 20 bp에서 40 bp에 해당되며 이 primer는 (주)바이오니아에 의뢰하여 합성하였다.

ISR 증폭을 위한 PCR

PCR의 전체 부피는 100 μ L로 약 100 ng의 genomic DNA에 각각 1 μ M의 16S-VF, 23S-VR primer와 200 μ M의 dNTP, 10 \times PCR buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 5 units Taq polymerase (Takara, Japan)를 첨가하여 PTC-150 Minicycler (MJ Research)로 PCR을 실시하였다. 반응 조건은 최초 denaturation 94°C에서 2분, denaturation 94°C에서 45초, annealing 45°C에서 45초, extension 72°C에서 1분간을 30회 반복하였고, 마지막 extension은 72°C에서 10분간 반응하였다.

V. vulnificus KCTC 2959 ISR의 Cloning

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 정제한 PCR product에 *Pfu* polymerase (Stratagene, USA)를 처리하여 polishing하고, T4 DNA ligase (Takara, Japan)를 사용하여 *Hind*III로 절단된 pBluescript II SK(-) vector (Stratagene, USA)와 15°C에서 16시간 동안 ligation하였다. Ligation 산물은 *E. coli* Nova-Blue에 형질전환하여 ampicillin, IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside)이 포함된 LB plate에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 하루 배양한 colony 중 white colony만을 82개 선택하여 ampicillin이 첨가된 LB broth에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 배양한 배양액을 1.5 mL microcentrifuge tube에 옮겨 15000 rpm에서 2분간 원심분리하여 pellet을 수집하고 AccuPrep™ plasmid extraction kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 plasmid

DNA를 분리하였다. 분리한 plasmid DNA는 *Hind*II, *Kpn*I (Amersham Biosciences, UK)으로 37°C에서 double digestion 하여 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 digestion product의 크기에 따라 group으로 나누었다.

ISR의 염기서열 및 tRNA gene 분석

Digestion product의 size에 따라 분류한 5개의 group을 토대로 각 group에서 1-2개의 clone을 임의로 선택하여 그 clone에 해당하는 plasmid를 (주)마크로젠에 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.

ISR 서열을 바탕으로 제작한 primer의 특이성 확인

Clustal W를 이용하여 *V. vulnificus*와 이미 밝혀진 13종의 다른 *Vibrio*의 ISR 염기서열을 분석하여 species-specific detection primer인 Vul-DF를 제작하였다. *V. vulnificus* KCTC 2959의 ISR-IAV의 349 bp에서 367 bp 사이의 서열이면서 ISR-EKAV의 435 bp에서 453 bp 사이에 존재하는 서열인 5'-ACCACCTTCTTTATGTCTG-3'을 *V. vulnificus*를 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. Positive control로서 1 μM의 16S-VF, 23S-VR primer와 *V. vulnificus* KCTC 2959의 genomic DNA를 이용하여 증폭하였다. 반응은 전체 volume 25 μL에 1 μM의 Vul-DF primer, 23S-VR primer와 30 ng의 genomic DNA를 혼합하였다. 반응 조건은 최초 denaturation 94°C에서 2분, denaturation 94°C에서 45초, annealing 43°C에서 45초, extension 72°C에서 10분간을 30회 반복하였고, 마지막 extension은 72°C에서 10분간 반응하였다. PCR reaction 후 증폭산물을 1.5% agarose gel에 전기영동하여 각 strain의 band pattern을 관찰하였다.

결 과

Vibrio vulnificus KCTC 2959의 ISR 증폭 및 염기서열 분석

V. vulnificus KCTC 2959의 genomic DNA를 16S-VF와 23S-VR primer로 증폭시킨 산물을 agarose gel에 전기영동하여 Fig. 1에 나타내었다. 약 600 bp에서 900 bp까지 다양한 크기와 세기의 여러 band를 관찰할 수 있었다.

다양한 크기와 서열을 갖는 ISR을 찾기 위해 위의 PCR 산물을 vector에 cloning하여 82개의 clone에서 plasmid DNA를 분리한 후, 제한효소 *Hind*II와 *Kpn*I으로 double digestion 하고 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 digestion product의

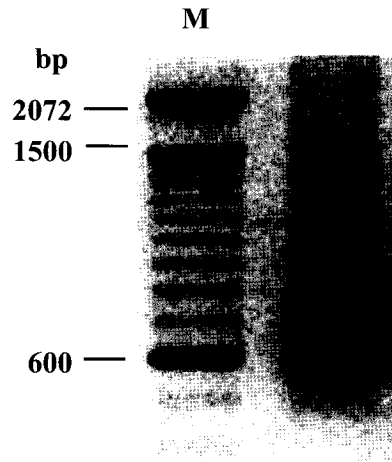


Fig. 1. Electrophoresis of PCR-amplified 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *V. vulnificus* KCTC 2959 on 1.5% agarose gel. Left lane is molecular weight marker(100 bp ladder). Right lane is the PCR-amplified 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *V. vulnificus* KCTC 2959.

크기에 따라 5개의 A, B, C, D, E group으로 분류하였다. 각 group에서 1-2개의 clone을 임의로 선택하여 ISR의 염기서열을 분석한 결과 같은 group에 속해있는 2개의 다른 clone의 염기서열은 서로 일치하였다. *V. vulnificus* KCTC 2959 ISR의 실제 크기는 증폭된 fragment에서 139 bp의 16S rDNA와 40 bp의 23S rDNA 부분을 제외하여 계산하였고, tRNAscan-SE 1.21을 이용하여 ISR 내에 존재하는 tRNA gene을 분석하고, 그 종류에 따라 ISR type을 명명하여 Table 1에 정리하였다. Glutamate에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR-E, isoleucine과 alanine에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR-IA, glutamate, lysine, valine에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR-EKV, isoleucine, alanine, valine에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR-IAV, glutamate, lysine, alanine, valine에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR-EKAV가 확인되었으며, 크기는 각각 424, 507, 608, 655, 741 bp로 확인되었다.

ISR의 nucleotide sequence 및 tRNA gene sequence 비교

V. vulnificus KCTC 2959에서 확인된 5종류의 ISR sequence를 multiple alignment한 결과 (Fig. 2) 16S rDNA에 근접해 있는 ISR 앞 부분의 49개의 nucleotide와 23S rDNA에 근접해 있는 ISR 뒷 부분의 217개의 nucleotide는 모든 ISR에서 일치하였다. 하지만 ISR의 중앙에서는 이러한 상동성을 확인할 수 없었다. 모든 ISR의 마지막 tRNA gene의 뒷 부분과 23S rDNA 사이에서 rRNA transcription의 anti-termination에 관여하는 Box A element를 확인할 수 있었고, 그 서열은 5종류의 ISR 모두에서 TGCTCTTTAACA로 확인되었다. Mature rRNA를 만드는 과정에서 RNase III에 의해 절단되는

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

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

a) Anticodons are indicated in parentheses.
The number of total clone is 82.

putative rRNA processing site는 16S rDNA 3' end에서 32 bp 떨어진 곳에서 *Aeromonas hydrophila*와 일치하는 서열인 GUUCACACA이 확인되었고, 23S rDNA의 up-stream에서 *A. hydrophila*와 유사한 서열인 CUUUGGGUUGU가 확인되었다.

BCM Search Launcher를 이용하여 *V. vulnificus*의 ISR에 존재하는 동일한 tRNA gene간의 염기서열 유사성을 분석하였다. 각 tRNA gene의 유사성은 tRNA^{Glu}, tRNA^{Ile}, tRNA^{Val}은 100%, tRNA^{Lys}과 tRNA^{Ala}은 염기서열 하나의 차이로 98.6%로 확인되었다. 다른 *Vibrio*의 ISR에 존재하는 tRNA gene과의 유사성을 분석한 결과 tRNA^{Glu}는 97.2-100%, tRNA^{Ile}는 90.5-100%, tRNA^{Val}는 95.9-100%, tRNA^{Lys}는 89-100%의 유사성을 보였으며, tRNA^{Ala}도 *V. nigrispulchritudo*의 ISR-A와 *V. parahaemolyticus*의 ISR-AE에 존재하는 tRNA^{Ala}와의 유사성을 제외하면 다른 *Vibrio*와는 90% 이상의 유사성을 보였다.

ISR 서열을 바탕으로 제작한 primer의 이용 가능성 확인

*V. vulnificus*를 검출하기 위한 PCR에 ISR 염기서열을 토대

로 제작한 primer를 이용할 수 있는지를 확인하기 위해 다른 *Vibrio*와 *V. vulnificus*의 ISR 염기서열을 비교하였다. tRNA gene과 Box A element의 염기서열의 상동성이 높은 반면 그 외의 non-coding 부분에서는 높은 유사성을 보이지 않았다. 따라서 non-coding 부분의 염기서열을 primer (Vul-DF)로 제작하고, 18개의 다른 *Vibrio*의 genomic DNA를 추출하여 Vul-DF와 23S-VR primer로 동일한 조건에서 PCR을 실시하여 그 산물을 전기영동하여 Fig. 3에 나타내었다. Vul-DF와 23S-VR에 의한 *V. vulnificus* KCTC 2959의 PCR product의 예상 size는 347 bp로서 Fig. 3을 보면 약 350 bp에 해당하는 major band를 관찰할 수 있었다. Positive control로서 *V. vulnificus* KCTC 2959의 genomic DNA를 주형으로 16S-VF와 23S-VR primer로 증폭한 결과 정상적으로 PCR 반응이 이루어졌음을 확인할 수 있었다 (data는 나타내지 않음).

고 찰

16S rDNA와 23S rDNA 사이에 존재하는 ISR (16S-23S rRNA intergenic spacer region)은 species간은 물론 strain간에도 그 크기와 서열이 매우 다양하며, multiple copy의 *rrn*

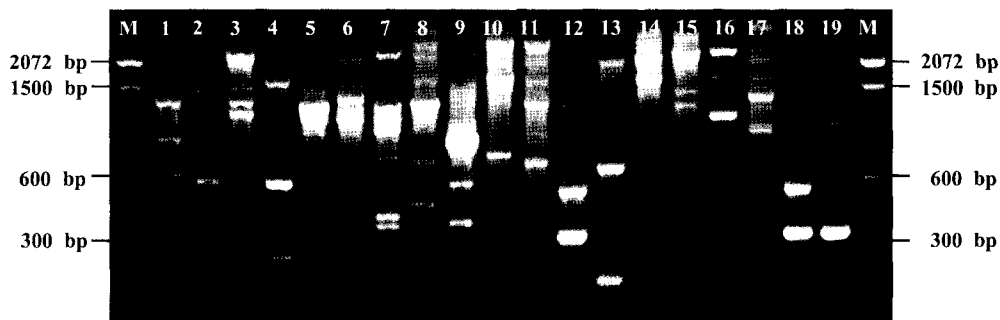


Fig. 3. Electrophoresis of the PCR-amplified ISR using primers designed in this study in *Vibrio* species. Lanes M, molecular weight marker (100 bp ladder); 1, *V. fluvialis* KCTC 2473; 2, *V. aestuarianus* 2714; 3, *V. cholerae* KCTC 2715; 4, *V. campbellii* KCTC 2716; 5, *V. gazogenes* KCTC 2719; 6, *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. cyclosites* KCTC 2810; 17, *V. alginolyticus* KCTC 2928; 18, *V. vulnificus* KCTC 2962; 19, *V. vulnificus* KCTC 2959; M, molecular weight marker (100 bp ladder).

operon을 갖는 경우 하나의 cell에서도 operon마다 그 서열과 크기가 다양하여 bacteria의 typing이나 identification을 위한 도구로서 많이 이용되고 있다 (Gurtler and Stanisich, 1996).

Aeromonads는 6-8개의 *rrn* operon이 존재하는 것으로 확인되었고 (Martinetti Lucchini and Altwegg, 1992), *E. coli*와 *Salmonella enterica* LT2에서는 7개의 *rrn* operon이 확인되었다 (Condon et al., 1995; Perez Luz et al., 1998). 6종류의 ISR가 확인된 *V. parahaemolyticus*는 16S rDNA 서열을 probe로 이용하여 genomic DNA와 southern blotting을 실시한 결과 최소 9개의 *rrn* operon이 존재하고 있을 것으로 확인되었다 (Maeda et al., 2000). *V. vulnificus* ISR의 증폭산물을 전기영동한 Fig. 1에서 다양한 크기와 세기의 band가 확인된 것으로 미루어 보아 이 genome내에도 여러 개의 *rrn* operon이 존재할 것으로 추측되며, ISR type을 분석한 결과 (Table 1) 크기와 서열이 다른 5종류의 ISR가 확인된 것을 보면 적어도 5개 이상의 *rrn* operon이 존재할 것으로 예상된다. Table 1을 보면 전체 82개의 clone에서 group A와 B에 해당하는 clone은 각각 36개와 29개로 다른 group에 비해 훨씬 많은 clone이 확인되었고, 이 두 group에 해당하는 clone의 ISR type을 분석한 결과 A에서는 ISR-E, B에서는 ISR-IA가 확인되었다. 이 두 증폭산물의 크기는 각각 603 bp와 686 bp로 확인되었는데, Fig. 1을 보면 흥미롭게도 약 600 bp와 700 bp의 강한 band를 확인할 수 있다. 이러한 결과는 16S rDNA와 23S rDNA 사이에 glutamate에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR와 isoleucine과 alanine에 대한 tRNA gene을 갖는 ISR가 존재하는 *rrn* operon이 chromosome 내에 여러 copy로 존재하기 때문에 생긴 것으로 생각된다.

ISR에 존재하는 tRNA gene의 수와 구성은 각 species마다 매우 다양한 것으로 보고되었다. *E. coli*와 *A. hydrophila* ATCC 7966에서는 ISR-E와 ISR-IA가 확인되었고 (East and Collins, 1993; Condon et al., 1995), *Crenarchaeota*에서는 ISR-no (tRNA에 대한 gene을 갖지 않는 ISR), *Euryarchaeota*에서는 ISR-no와 ISR-A, *Chloroplasts*에서는 ISR-no, ISR-I, ISR-IA, *Cyanobacteria*에서는 ISR-I, ISR-IA가 확인되었다 (Garcia-Martinez et al., 2001). 지금까지 보고된 13종의 *Vibrio* ISR type과 *V. vulnificus*의 ISR type을 종합한 결과 역시 4개의 tRNA gene이 존재하는 ISR-EKAV를 갖는 *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*에서부터 ISR-no가 확인된 *V. campbellii*나 *V. costicola*까지 ISR type의 다양성을 확인할 수 있었다 (Chun et al., 1999; Maeda et al., 2000; Lee et al., 2002). 또한 *Vibrio*의 일반적인 ISR type으로 확인된 ISR-E와 ISR-IA의 크기도 각각 430-559 bp, 507-707 bp로 매우 다양하다는 것을 확인할 수 있었다. ISR의 다양성은 species뿐만 아니라 strain에서도 확인할 수 있었는데 *V. cholerae* RC4, RC42, RC45에서는 ISR-E와 ISR-IA가 확인된 반면 *V. cholerae* RC2, RC25에서는 ISR-A, ISR-E, ISR-IA, ISR-EKV가 확인되었다. 또한 ISR 서열의 다양성은 inter-strain 뿐만 아니라 inter-cistronic에서도 확인되는데 *A. hydrophila*

ATCC 7966에서는 동일한 tRNA gene을 갖지만 tRNA gene의 down-stream과 up-stream의 서열이 조금 다른 ISR-E1과 ISR-E2가 확인되었고 (East and Collins, 1993) *Vibrio*의 ISR type을 분석한 결과 역시 이러한 다양성이 확인되었다.

V. vulnificus KCTC 2959의 ISR을 alignment한 Fig. 2을 보면 16S rDNA와 23S rDNA 부근의 49 bp와 217 bp가 5종류의 ISR 모두에서 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 유사성은 *V. parahaemolyticus*와 *Aeromonas* sp.에서도 확인되었다 (Kong et al., 1999; Maeda et al., 2000). 이러한 유사성이 나타난 부분들은 prokaryote의 16S, 23S rRNA processing에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며 (Srivastava and Schlessinger, 1990; Naimi et al., 1997) *E. coli*의 rRNA maturation process에 관한 연구를 따르면 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 and Miczak, 1993). *E. coli*에서는 16S rDNA의 3' end에서 33 bp down-stream의 GCUCACACA 서열 다음과 23S rDNA의 up-stream인 UCUUCGGGUUGU에서 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 CUUUGGGUUGU가 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.

rRNA transcription의 antitermination에 관여하는 Box A element는 *E. coli*에서는 TGCTCTTTAACAA로 알려져 있으며 (Condon et al., 1995), *V. parahaemolyticus* IFO 12711에서는 염기서열이 하나가 다른 AGCTCTTTAACAA가 확인되었는데 (Maeda et al., 2000), *V. vulnificus* KCTC 2959에서는 *E. coli*의 Box A element와 일치하는 서열인 TGCTCTTTAACAA로 확인되었다.

여러 종류의 *Vibrio* genomic DNA를 추출하여 *V. vulnificus* ISR의 서열을 이용하여 제작한 primer (Vul-DF)와 23S rDNA 서열을 이용한 primer (23S-VR)로 *V. vulnificus*와 동일한 조건에서 PCR한 증폭 산물을 전기영동한 Fig. 3을 보면 각 strain마다 multiple band가 생성된 것을 확인할 수 있다. 이는 Vul-DF의 비특이적인 결합과 *Vibrio* 종간에 유사한 23S rDNA 서열을 이용한 23S-VR primer에 의해 생성된 것으로 생각된다. 모든 strain에서 multiple band가 확인되었

지만, 다른 *Vibrio*와는 다르게 *V. vulnificus*에서는 약 350 bp의 강한 band가 생성되었으며, *V. furnissii* KCTC 2731 역시 약 350 bp의 강한 band가 생성되었지만 그 외의 band pattern에서 차이를 보였다. 특히 *V. vulnificus*와 생화학적 성상이 유사한 것으로 보고되는 *V. parahaemolyticus*와 (Ju et al., 1998) 매우 다른 band pattern이 생성된 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 ISR 가변부위의 염기서열을 토대로 제작한 primer를 이용한 PCR 산물의 분석은 다른 *Vibrio*로부터 *V. vulnificus*를 간편하게 확인할 수 있는 방법에 사용될 수 있을 것이라 사료된다. 그리고 어패류나 해수, 감염 환자의 혈액에서 ISR을 이용해 *V. vulnificus*를 검출하고 진단하기 위해서는 많은 *V. vulnificus* strain의 ISR 분석이 이어져야 한다고 생각된다.

사 사

본 연구는 두뇌한국21 사업의 지원으로 수행되었습니다. 또한 저자인 박영미는 두뇌한국21 연구 조교 프로그램의 지원을 받았으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 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.
- 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, 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, I. 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. Meth.*, 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.
- Ju, J.W., K.S. Kim, S.J. Park, S.O. Yoon and C.R. Jung. 1998. Identification of *Vibrio vulnificus* in Pusan and Southern sea of Korea in 1996 using API 20E Kit. *J. Korean Soc. Microbiol.*, 33, 187-188. (in Korean)
- Ju, J.W., M.J. Park, M.S. Heo and C.R. Jung. 2000. Isolation and identification of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* from coast of Pusan and Daechon. *J. Kor. Soc. Microbiol.*, 35, 309-316. (in Korean)
- Jung, G.Y. and K.K. Ko. 1995. The effect of ox-bile on the multiplication of *Vibrio vulnificus*. *J. Kor. Soc. Microbiol.*, 30, 263-271. (in Korean)
- 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, 412-420.
- 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.K. 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. Morris, Jr. 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, K.S., C. Han, K.Y. Suk, H.C. Jung, Y.H. Kim and C.K. Kim. 1993. Microbiological study and isolation of the *Vibrio vulnificus* in the sea water, sediment, fish and shellfish, kitchen environment of Chunnam Coastal Area. Kor. J. Food Sci. Technol., 25, 449-455. (in Korean)
- 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.
- Sin, S.W. and S.D. Park. Effects of environmental sea water factors on the isolation of *Vibrio vulnificus* in the western coastal area of Korea. Kor. J. Dermatol. 36, 391-398. (in Korean)
- Srivastava, A.K. and D. Schlessinger. 1990. Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. Ann. 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. Morris, Jr. 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.

2003년 4월 4일 접수
2003년 6월 16일 수리