

16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region을 이용한 *Vibrio ichthyoenteri* Species-specific Primer 개발

문영건 · 허문수*

제주대학교 해양과학대학 해양생물공학과

Rotifer와 병든 넙치 자어로부터 분리된 2개의 균주는 표현형적인 특성 확인 결과 *Vibrio ichthyoenteri* 로 확인이 되었다. *V. ichthyoenteri*를 검출하기 위해 고감도 PCR 방법 개발을 하기 위해 *V. ichthyoenteri* 16S-23S rRNA intergenic spacer region(ISR)을 분석하였고, *V. ichthyoenteri* 종 특이적 primer를 개발하였다. *V. ichthyoenteri*의 ISR를 분석한 결과 1개의 다형성 ISR type 서열을 포함하고 있었다. ISR 서열은 길이는 348bp이며 tRNA gene을 가지고 있지 않았다. 이 서열을 가지고 이미 알려진 다른 *Vibrio* 종의 ISR 서열과 mutiple alignment를 수행한 결과 여러 영역에서 높은 가변성을 나타내어 가변 부위를 표적으로 하여 *V. ichthyoenteri*를 검출하기 위한 종 특이적 primer를 제작하였다. 제작된 primer의 특이성을 확인하기 위해 *Vibrio* 표준균주 19종의 genomic DNA와 분리 균주 18 group에 genomic DNA 그리고 *V. ichthyoenteri*와 가장 유사한 서열을 가지고 있다고 알려진 *Vibrio* 종의 genomic DNA를 가지고 시험하였다. 그 결과 본 연구에서 제작된 종 특이적 primer를 가지고 PCR 반응을 하면 *V. ichthyoenteri*를 검출 할 수가 있다.

Key words □ bacterial enteritis, species-specific primer, tRNA gene, *Vibrio ichthyoenteri*, 16S-23S rRNA ISR

넙치 종묘생산에 있어 특히 자어기에 발생하는 감염성 질병에는 바이러스가 원인인 상피증생증(VEH; viral epidermal hyperplasia)과 세균이 원인인 장관백탁증(Bacterial enteritis)이 가장 피해가 큰 질병으로 들 수 있다. 특히 장관백탁증의 경우는 자어기에만 주로 감수성이 있는 것으로 알려져 있으며, 부화 후 25-30일령 경의 자어에 발생하고 단기간에 거의 전멸에 가까운 폐해를 주는 질병이다(11, 12). 이 질병의 특징은 장의 점막 상피에 세균이 감염되어 점막에 괴사, 박리가 일어나고, 소화관의 백탁 및 위축, 복부의 함몰 등의 주요 증상을 나타낸다(1). Masumura(10)등은 장관백탁증을 유발하는 원인균을 분리하여 형태학적, 생화학적, 생리학적, 병리학적 그리고 혈청학적 시험을 통하여 *Vibrio* species INFL (intestinal necrosis of flounder larvae)로 명명하였다. Muroga(13)등은 이 분리균을 먹인 rotifer (*Brachionus plicatilis*)와 brine shrimp (*Artemia salina nauplii*)를 일령별로 넙치 자어에 경구 감염실험을 하였으며, 이 후 Ishimaru 등(11)이 *V. ichthyoenteri* 로 명명하였다. 일반적으로 *V. ichthyoenteri* 는 현재 경구가 유일한 감염경로로 인식되고 있으며 발병되면 대부분 대량 폐사로 이어지는 질병이지만 약 40일령 이후에는 감수성이 없는 것으로 알려져 있다(5, 13). 따라서 본 연구에서는 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 자어기의 먹이생물 섭취에 의한 장관백탁증 원인 경로를 파악하기 위하여 초기 먹이로 공급되어지는 동물성 플랑크톤인 rotifer와 넙치 자어에서

장관백탁증 원인균으로 알려진 *Vibrio ichthyoenteri* 의 분리를 실시하였다. 또한 분리되어진 균주의 생육 및 생장 특성을 조사하여 *V. ichthyoenteri* 에 관한 기초 자료를 획득하였다. 그리고 대부분의 세균은 세 개의 rRNA 유전자를 16S-23S-5S rRNA의 순서로 하나의 operon에 가지고 있다. 이중 16S rRNA 유전자는 종 수준으로 구분할 수 있는 정보를 담고 있는 정보를 담고 있는 영역으로 미생물간의 유연관계를 파악하는데 유용하여 가장 많이 쓰이고 있으며, 현대 세균 분류학의 토대가 되는 기준으로 쓰이고 있다. 그러나 16S rRNA 유전자를 비롯한 RNA 유전자 부분은 염기서열 변이도가 낮아 종 단계 미만, 예를 들면 serotype의 동정에는 사용하기 어렵다고 알려져 있다. 그래서 현재 환경, 식품 의학 등 자연계로부터 분리한 미생물의 동정 수단으로 가장 널리 쓰이고 있는 16S rDNA 염기서열 비교는 대부분 속(genus) 혹은 근연 속까지의 동정이 가능할 뿐이다. 그러나, 각각의 유전자 사이에 존재하는 Intergenic Spacer Region (ISR)은 상대적으로 변이도가 크다. 두개의 ISR중 특히 16S와 23S rRNA 사이의 ISR이 세균동정에 많이 사용되고 있다. 그러므로 *Vibrio ichthyoenteri* 의 16S-23S rRNA ISR 분석을 통하여 종 특이적인 검출 primer를 개발하고, 이를 이용하여 원인균을 신속 검출 함으로써 자어기 먹이 및 양식 수계에서의 감염을 사전 예방하는 방법을 개발하고자 하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 064-754-3473, Fax: 064-756-3493
E-mail: msheo@cheju.ac.kr

재료 및 방법

원인균의 분리과 사용균주

장관백탁증을 유발하는 원인균의 분리를 위하여 2003년 5월에서 10월 동안 제주도내 5개소의 넙치 종묘 배양장에서 초기 먹이로 공급되어지는 동물성 플랑크톤인 rotifer와 넙치 자어 배양수 및 20~30일령 넙치 자어에서 월 1회 시료를 채취하여 장관백탁증 원인균으로 추정되는 세균을 분리 하였다. 병원균의 분리를 위해서 rotifer는 0.8% 멸균 생리 식염수를 사용하여 3회 세척 후 무균적으로 멸균 스틱을 사용하여 마쇄하였고, 넙치 자어는 해부현미경으로 소화관을 관찰하면서 장관을 무균적으로 절취하여 Marine agar (MA, Difco)와 1.5% NaCl이 첨가된 Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS, Difco)에 희석 도말 한 후 26°C, 24시간 배양한 후 우점적 형태의 세균 집락을 순수분리 하는 방법을 사용하였으며, 넙치 자어 배양수는 pore size 0.45 µm membrane filter (GN-6 Metrice Membrane Disc Filter Grid 47 mm, pall corporation, USA)를 이용하여 500 ml의 배양수를 여과한 후 membrane filter를 각각 MA와 1.5% NaCl이 첨가된 TCBS 평판에 놓고 26°C에서 24시간 배양 하여 우점적으로 자란 세균 집락을 순수 분리 하는 방법을 사용하였다.

참조 균주는 한국미생물보존센터(Korea culture center of microorganisms, KCCM)에서 제공받아 본 실험에 사용하였다 (Table 1).

공시균의 선정

총 분리된 71개의 균들을 대상으로 공시균주를 선정하기 위하여 1개의 참조균주를 포함하여 1.5% NaCl을 첨가한 Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Difco)에서 26°C, 24시간 배양 후 그림 음성 간균을 확인하였다.

*Vibrioaceae*와 *Aeromonadaceae*를 구분하기 위하여 비브리오 1차 선택배지인 TCBS에서의 성장유무, 0/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine phosphate)에 내성을 조사 하였다(8). 그 외 생화학적 성상 시험은 표준생화학 검사법(14)에 따라 시험하였다.

공시균의 생육조건 검토

생화학적 성상 검사를 통하여 선정된 공시균주 2개(YG-1, YG-2)와 1개의 참조균주는 MA (Marine agar, Difco)에 희석 도말하여 26°C에서 24시간을 배양 후 단일 집락을 BHI (brain heart infusion, Difco) broth 10 ml에 접종 하여 26°C에서 10⁶CFU/ml가 되도록 진탕 배양하여 전배양액으로 실험에 사용하였다. 최적 배양 조건을 검토하기 위하여 온도는 4~40°C, pH는

4~10, NaCl 농도는 0%~8%의 범위로 설정하여 micro plate spectrophotometer 로 630 nm의 흡광도에서 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간의 생육도를 측정하였다.

공시균주의 DNA 분리 및 Random Amplified Polymorphic DNA를 이용한 균주 비교

참조균주(KCCM 40870)와 분리 균주(YG-1, YG-2)는 1.5% NaCl이 첨가된 BHIB (Difco, USA) 배지 5 ml에 접종하여 Shacking incubator를 이용하여 26°C에서 200 × g으로 24시간 배양한 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮겨서 16000 × g에서 1분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 모아진 bacteria pellet을 수집하여 Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)을 사용하여 genomic DNA를 분리 한 후, UnicamUV/VIS Spectrophotometer (Helios β, Unicam Ltd, United Kingdom)를 사용하여 파장 260 nm에서 DNA농도를 측정하였다.

장관백탁증 원인균인 *V. ichthyenteri* (KCCM 40870)와 분리 균주 중 생육조건 시험및 생화학적 성상검사에서 *V. ichthyenteri*로 동정 되어진 YG-1과 YG-2에 대해 TaKaRa에서 개발한 Microbial Universal Primer (MUP) Strain-typing kit을 사용하여 종내 유전자 다형성을 분석하였다. PCR반응은 bacterial genomic DNA 50 ng, MUP (20pmol/ml) 1 µl, dNTP mixture 2 µl, 10X PCR buffer 2 µl, 5 unit *Ex taq* polymerase (TaKaRa, Japan) 혼합액을 멸균증류수를 첨가하여 최종부피 20 µl로 맞추고, PTC-150 Mini cycler (MJ Research)를 사용하여 반응 시켰고, PCR과정은 94°C에서 predenaturation 5분, 94°C에서 denaturation 45초, 55°C에서 annealing 45초, 72°C에서 extension 1분간에 반응을 30회 동안 수행하였고, 마지막 72°C에서 extension 반응을 5분간 반응하였다.

증폭된 PCR 반응 산물은 GeneRuler[™] 1 kb DNA ladder (Fermentas, USA)를 maker로 사용하여 2% agarose gel 전기영동으로 확인 하였다(Fig. 1).

V. ichthyenteri ISR 증폭을 위한 primer 제작 및 PCR 반응

V. ichthyenteri intergenic spacer region (ISR)의 증폭을 위한 primer는 *Vibrio*속의 16S rRNA gene과 23S rRNA gene을 multiple alignment를 수행하여 보존영역이 높은 16s rRNA 3'말단, 23s rRNA 5'말단 서열을 기초로 primer를 선택하였다. Forward primer 16SF ICH와 reverse primer 23SR ICH primer는 (주)Bioneer에 의뢰하여 제작하였다(Table 2).

PCR 반응은 bacterial genomic DNA 100 ng, 1 µM에 primer

Table 1. The strains used in this study

Stains		Origin	
<i>Vibrio ichthyenteri</i>	Isolated strains	YG-1 YG-2	Intestine of olive flounder Jeju, 2003
	Reference strain	R-1(KCCM ^a 40870)	Hiroshima University, 1996

a : KCCM ; Korea Culture Center of Microorganisms

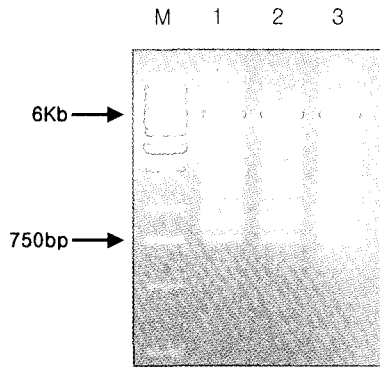


Fig. 1. Random amplification of polymorphic DNA fragment patterns of *V. ichthyoenteri* and isolated strain YG-1, YG-2 by MUP3 (microbial universal primer 3). M: 1 kb DNA ladder, 1: *V. ichthyoenteri* (KCCM 40870), 2: YG-1, 3: YG-2.

pairs (16SF ICH, 23SR ICH), 10 mM dNTPs, 10X PCR buffer, 5 Unit Taq polymerase (TAKARA, Japan) 혼합액에 멸균된 증류수를 첨가하여 최종부피를 50 µl로 맞추고, PTC-150 Minicycler (MJ Research)를 사용하여 증폭하였다. ISR 증폭 과정은 94°C predenaturation 2분, 94°C denaturation 45초, 57°C annealing 45초, 72°C extension 1분의 반응을 30회 동안 수행하였고, 마지막 72°C에서 5분간 extension을 실시하였다. 증폭된 PCR 반응 산물은 GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas, USA)를 maker로 사용하여 1.7% agarose gel 전기영동으로 크기를 확인 하였다(Fig. 2).

PCR 반응 산물의 Cloning과 Sequencing

AccuPrep™ PCR Purification Kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 증폭된 DNA를 분리하여 cloning을 위한 insert로 이용하였다. 분리된 DNA는 pGEM T-easy vector (Promega, USA)에 ligation을 실시한 후 *E. coli* XL-1 Blue에 형질전환 하였다. Ampicillin (50 µg/mL), IPTG (Isopropylthio-β-D-galactopyranoside, 25 mg/

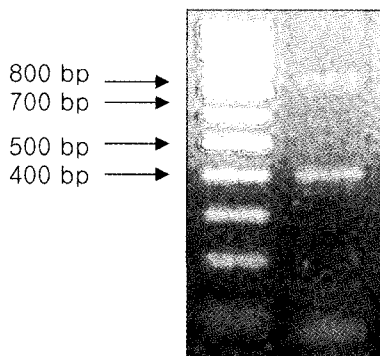


Fig. 2. Electrophoresis of PCR-amplified 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *V. ichthyoenteri* (KCCM 40870) on 1.7% agarose gel. Left lane is molecular weight marker (100 bp ladder). Right lane is the PCR-amplified 16S-23S rRNA intergenic spacers of *V. ichthyoenteri* KCCM 40870.

Table 2. Primer used for intergenic spacer region PCR amplification and detection PCR

Primer Name	Gene Position	Sequence
16SF ^a ICH	16S 5'end	CAC ACC ATG GGA GTG GGC TG
23SR ^a ICH ^b	23S 3' end	GGT GGC ACA TGC GAA TCA GTG
ICH ISR-F ^b	ISR	CCA GCA CTG GCT AAT CCA CAA CT
ICH ISR-R ^b	ISR	GTG CGC AAC GGC TAT GAT A
pUC/M13F ^c		GTT TTC CCA GTC ACG AC
pUC/M13R ^c		CAG GAA AAC AGC TAT GAC

a : primers designed for ISR amplification (F; forward and R; reverse)
 b : primers designed for the *V. ichthyoenteri* detection
 c : primers designed for the pGEM T-easy vector

mL)와 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside, 10 µg/ml)이 포함된 LB배지(1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 1.5% agar, 1% NaCl)에 도말하여 배양한 후 white colony를 선별하여 ampicillin이 첨가된 LB broth에 접종하여 37°C에서 250 rpm에서 16시간 동안 진탕 배양하였다. 배양 16시간 후 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 16,000 × g 에서 1분간 원심분리하여 상등액을 버리고 bacteria cell을 모은 후 AccuPrep™ plasmid extraction kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 Plasmid DNA를 분리 하였다. 삽입된 insert 크기를 확인하기 위하여 제한효소 *Eco*R1 (Bioneer, Korea)로 절단한 후 2% agarose gel 전기영동을 하여 insert 크기를 확인하였다. 염기서열 분석은 (주)마크로젠에 의뢰 하였다.

자료 분석

*V. ichthyoenteri*의 ISR 염기서열 분석을 위하여 ClustalW (ver. 1.71) program을 사용하여 multiple alignment을 수행하였으며, ISR의 유전자 구성을 알아보기 위해 tRNAscan-SE program을 사용하여 tRNA gene을 확인하였다(Table 7).

장관백탁증 원인균 검출을 위한 primer 제작과 Detection PCR 반응

장관백탁증 원인균인 *V. ichthyoenteri* 검출을 위한 detection primer를 제작하기 위해 *V. ichthyoenteri* ISR 서열을 Clustal W program을 사용하여 이미 밝혀진 6종의 *Vibrio* ISR 서열과 multiple alignment을 수행하여 *V. ichthyoenteri* 에 종 특이적 primer를 제작하였다(Table 2). 제작된 primer에 특이성을 확인하기 위해서 *V. ichthyoenteri* KCCM 40870 이외에 19개의 *V.* strain (Table 4)과, 분리되어진 총 71개의 *Vibrio* sp.에서 생물학적 검사와 생화학 검사, 탄수화물 발효능 검사에 의해 분류되어진 18개 group (Table 6)에서 각 1균주씩, 그리고 *V. ichthyoenteri* 와 가장 유사한 염기서열을 가지고 있다고 알려진 *V. scophthalmi* (Table 5)를 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)을 사용하여 genomic DNA를 분리하여 detection PCR을 실시하였다. PCR 반응은 동일 농도의 DNA를 template로 하여 반응시켰는데, genomic DNA, 1 µM에 primer pairs (ICH ISR-F, ICH ISR-R), dNTPs, 10X PCR buffer, Taq

DNA polymerase (TAKARA, Japan)을 혼합액에 3차 증류수를 첨가하여 최종부피를 50 μ l로 맞추고, PTC-150 Minicycler (MJ Research)를 사용하여 PCR 증폭하였다.

PCR 반응조건은 최초 94°C에서 denaturation 5분, 94°C에서 denaturation 45초, 58°C에서 annealing 45초, 72°C에서 extension 1분간에 반응을 30회 반복하였고, 마지막 extension은 72°C에서 5분간 반응시켜 반응 산물은 1.7% agarose gel 전기영동으로 증폭된 산물의 크기를 확인하기 위해 100 bp DNA ladder를 maker로 사용하였다.

결과 및 고찰

원인균의 분리

실험에 사용한 군주는 2003년 5월과 2003년 10월에 걸쳐 제주도내 5개소 종묘배양장에서 초기 먹이로 공급되어지는 rotifer와 넙치 자어 배양수 그리고 20-30일령 넙치 자어에서 월1회 시료를 채취하여 장관백탁증 원인균 분리를 시도하였다. MA와 TCBS에서 형성된 집락을 순수 분리하여 *Vibrio*의 기본적인 성상을 나타내는 보이는 군주를 7개의 균을 분리하였으며 생화학적 동정 실험을 통하여 장관 백탁증 원인균으로 동정이 이루어진 균은 2 group으로 분류되었다. 각 group에서 1군주씩을 선택하여 (YG-1, YG-2) 본 실험에 사용하였다. 각 군주는 1.5% NaCl이 첨가된 BHIA에서 크림색 집락을, TCBS에서는 YG-1은 녹색, YG-2는 황색의 집락을 형성하였다.

공시균주의 특성과 Random Amplified Polymorphic DNA

참조균주 및 2개의 공시균주에 대한 생화학적 대사 및 당 발효능과 염분농도, 온도, pH에 따른 최적 생육조건 결과는 Table 3과 같았다. 세 균주 모두 생육을 위해 염분을 필요로 하였으며 8%이상의 염분농도에서는 생육이 이루어지지 않았다. 온도는 25°C, pH7-8 에서 최적의 생육능을 보였으며 glucose, fructose, sucrose에서 생육능이 양호하나 lactose는 이용하지 못하였다. 분리균주들의 생화학적 및 생육특성과 본 균주들의 중간 유연관계를 확인하기 위하여 TaKaRa에서 시판되는 Microbial Universal Primer (MUP)인 MUP Strain-typing Kit (TaKaRa, Japan)을 사용하여 PCR을 한 후 gel 상에서 표준균주와 분리균주인 YG-1과 YG-2의 polymorphism을 분석한 결과 750 bp에서 6 kb까지의 분자량으로 동일한 다형성 밴드를 형성하였으며(Fig. 1) 본 균주들은 동일한 종으로 판단되었다. 본 실험은 모두 10개의 primer를 이용하여 *Vibrio*속의 다른 종과 비교하였으며 1개의 primer (MUP3)에서만 분리균주 및 참조균주에서 동일한 다형성 밴드를 얻었고 다른 종들에서는 다른 양상을 보였다.

V. ichthyenteri 16S-23S rRNA ISR 분석

V. ichthyenteri (KCCM 40870)의 genomic DNA를 주형으로 하여 16SF-ICH와 23SR-ICH primer를 이용 PCR반응을 수행하였다. PCR반응에 의해 증폭되어진 ISR fragment는 1.7% agarose gel 전기영동으로 증폭된 산물의 크기를 확인하였다(Fig.

Table 3. Biochemical and physiological characteristics of the used strains

Tested items	Reference strain		
	R-1	YG-1	YG-2
Gram stain	-	-	-
Motility	+	+	+
Oxidase activity	+	+	+
Catalase activity	+	+	+
Fermentation glucose	+	+	+
Gas production of glucose	-	-	-
Indole	-	-	-
Methyl red	+	+	+
ONPG hydrolysis	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-
CF test	F	F	F
MR test	+	+	+
VP test	-	-	-
O/129 sensitivity	+	+	+
Hydrolysis of Tween 80	-	-	-
Growth at:			
4°C	-	-	-
15°C	-	-	-
25°C	+	+	+
30°C	+w	+w	+w
35°C	-	-	-
40°C	-	-	-
Growth in the presence of:			
0% NaCl	-	-	-
1% NaCl	+w	+w	+w
3% NaCl	+	+	+
6% NaCl	+w	+w	+w
8% NaCl	-	-	-
10% NaCl	-	-	-
Growth on:			
pH4	-	-	-
pH5	-	-	-
pH6	-	-	-
pH7	+	+	+
pH8	+	+	+
pH9	+w	+w	+w
pH10	-	-	-
Acid production from			
adonitol	-	-	-
myo-inositol	-	-	-
D-sorbitol	-	-	-
maltose	+	+	+
D-xylose	-	-	-
D-galactose	-	-	-
D-mannose	+	+	+
fructose	+	+	+
sucrose	+w	+w	+
D-glucose	+	+	+
lactose	-	-	-
D-mannitol	-	-	-

Table 4. Reference strains used in ISR-targetted PCR reaction

Strains number*	Species	Strains number*	Species
KCCM 40870	<i>V. ichthyoenteri</i>	KCTC 2730	<i>V. proteolyticus</i>
KCTC 2714	<i>V. aestuarianus</i>	KCTC 2731	<i>V. furnisii</i>
KCTC 2715	<i>V. cholerae</i>	KCTC 2733	<i>V. cincinnatiensis</i>
KCTC 2716	<i>V. campbelli</i>	KCTC 2735	<i>V. mediterranei</i>
KCTC 2719	<i>V. gazogenes</i>	KCTC 2736	<i>V. metschnikovii</i>
KCTC 2720	<i>V. harveyi</i>	KCTC 2737	<i>V. minicus</i>
KCTC 2721	<i>V. logei</i>	KCTC 2810	<i>V. cyclospites</i>
KCTC 2722	<i>V. nereis</i>	KCTC 2928	<i>V. alginolyticus</i>
KCTC 2726	<i>V. salmonicida</i>	KCTC 2954	<i>V. vulnificus</i>
KCTC 2729	<i>V. parahaemolyticus</i>	KCTC 2962	<i>V. vulnificus</i>

*KCCM : Korea Culture Center of Microorganisms

*KCTC : Korean Collection for Type Cultures

2). 400 bp와 500 bp사이에 1개의 major band, 700에서 800 bp사이에 1개의 minor band를 확인 할 수 있었다. 증폭된 ISR fragment를 plasmid vector에 cloning하여 선택된 clone을 EcoRI으로 절단한 후 agarose gel 전기영동으로 insert 크기를 확인하였다. ISR 증폭 PCR반응에서 나왔던 800 bp fragment는 cloning이 확인된 clone이 존재하지 않았으며 cloning이 확인된 major band의 염기서열을 확인하였다. 염기서열 분석 후 5' 말단 16S rRNA와 3'말단 23S rRNA 염기서열 부분을 제외하고 tRNAscan-1.21을 이용하여 tRNA를 gene을 분석하였다. ISR에

존재하는 tRNA coding gene의 조합에 따른 *Vibrio*의 ISR type은 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 등 10가지 종류의 ISR이 보고 되고 있으며 가장 일반적인 것은 ISR type이 ISR-E와 ISE-IA이나 장관백탁증 원인균인 *V. ichthyoenteri* (KCCM 40870) ISR은 tRNA gene이 없는 ISR-no type으로 밝혀졌다(Table 7).

Table 5. Most similar sequence of other known bacterial species

Strain	Species	Origin
Isolated strain	<i>V. scopthalmi</i>	Jejudo, 2003, tubot

Table 6. Isolated strains used in ISR-targetted PCR reaction

group	Isolated strain number
A(<i>V. fischeri</i>)	6, 22, 27, 28, 33
B(<i>V. cholerae</i>)	5
C(<i>V. campbellii</i>)	8, 10
D(<i>Vibrio</i> sp.)	11, 15, 19, 31
E(<i>V. gazogenes</i>)	12, 38
F(<i>V. harveyi</i>)	13, 20, 30, 37, 41, 48, 70
G(<i>V. alginolyticus</i>)	14, 16, 50, 56, 58, 65, 66, 67
H(<i>V. costicola</i>)	17, 18
I(<i>Vibrio</i> sp.)	29
J(<i>Vibrio</i> sp.)	32, 34, 78
K(<i>Vibrio</i> sp.)	36
L(<i>Vibrio</i> sp.)	43
M(<i>Vibrio</i> sp.)	59
N(<i>V. pelagius</i>)	35, 53, 69, 79
O(<i>Vibrio</i> sp.)	64
P(<i>Vibrio</i> sp.)	76, 77
Q <i>V. ichthyoenteri</i> (-)	4, 9, 21, 23, 24, 25, 26, 39, 40, 44, 45, 46, 47, 62, 68, 73, 74, 75, 80, 81, 82, 83
R <i>V. ichthyoenteri</i> (+)	61, 63
Not <i>Vibrio</i> sp.	1, 2, 3, 7, 42, 49, 52, 54, 55, 60, 71, 72, 84, 85

***V. ichthyoenteri* 검출을 위한 primer 제작 및 detection PCR 반응**

*V. ichthyoenteri*에 대한 종 특이적 primer를 제작하기 위하여 GenBank에 등록되어 있는 6종의 *Vibrio* genus에 ISR nucleotide 서열을 참고하여 *V. ichthyoenteri* ISR-no type 서열과 multiple alignment를 수행하였다(Fig. 3). Multiple alignment 수행 후 non coding region내의 가변 부위를 표적으로 하여 Foward primer ICH ISR-F 5'-CCAGCACTGGCTAATCCACAAC-3'와 Reverse primer ICH ISR-R 5'-GTGCGCAACGCTATGATA-3'를 제작하였다 제작된 primer의 종 특이성을 확인하기 위하여 16SF ICH와 23SR ICH primer와 ICH ISR-F와 ICH ISR-R primer를 혼합 첨가하여(data not shown) 각각의 primer에 따른 적절한 조합에 의해 predenaturation시간과 primer aneling 온도를 제외하고 16S-23S ISR 증폭 PCR 조건과 동일하게 하여 PCR 반응을 실시하였다. 유전자은행 KCTC에서 19종의 *Vibrio* 균주를 분양받아 genomic DNA를 분리하여 detection PCR 반응에 사용하였으며 positive control로 *V. ichthyoenteri* (KCCM 40870)을 동일하게 PCR 반응을 실시하였다. Fig. 4에서 보는바와 같이 positive control로 사용된 *V. ichthyoenteri* (KCCM 40870)만이 원하는 크기의 밴드(348 bp)를 형성하였을 뿐 다른 19개의 *Vibrio* 균주는

Table 7. The size and tRNA composition of the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *V. ichthyoenteri* KCCM 40870

Type	tRNA gene	Size (bp)		Number of clones (n=20)
		spacer	amplified fragment	
ISR-no	No	348	410	5

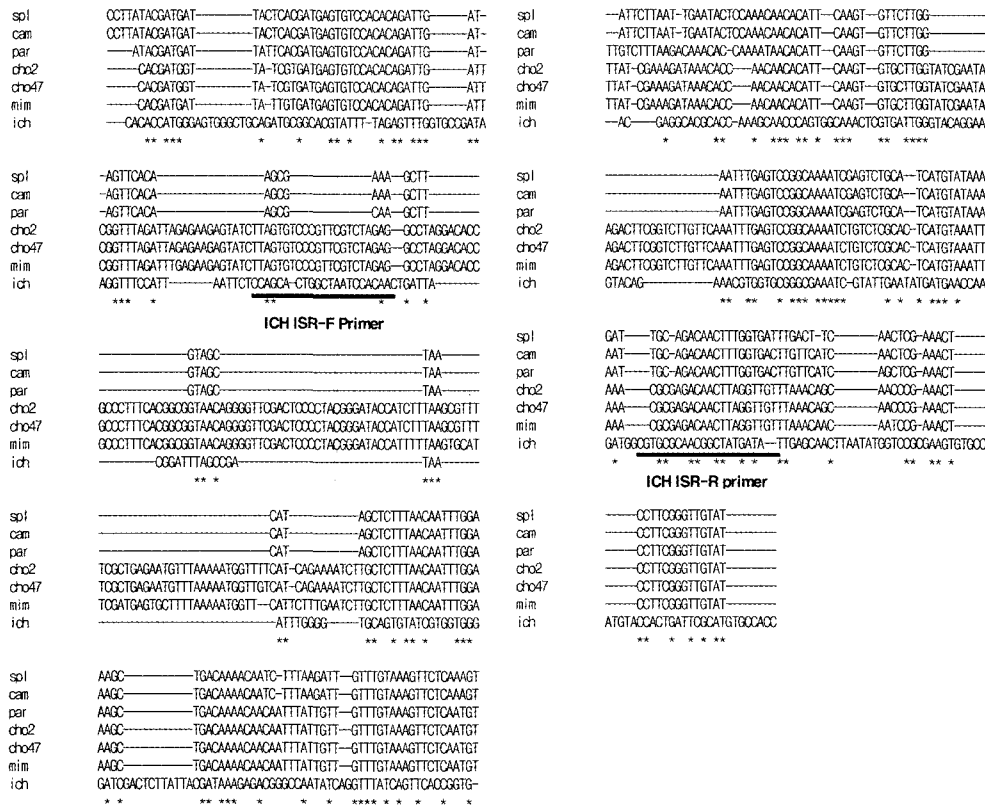


Fig. 3. Alignment of representative 16S-23S ISR sequence of *Vibrio* species. spl; *V. splendidus* (accession number AF 413024), cam; *V. campbellii* (accession number AF 412997), par; *V. parahaemolyticus* (accession number AY 298808), cho2; *V. cholerae* (accession number AF 114721), cho47; *V. cholerae* (accession number AF 114743), mim; *V. mimicus* (accession number AF 114747), ich; *V. ichthyenteri* KCCM 40870. Forward and reverse primer used in the species-specific PCR detection are underlined.

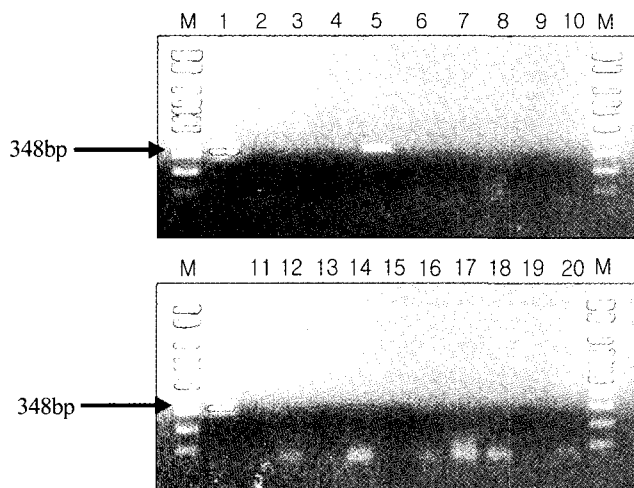


Fig. 4. PCR amplification of the rRNA of different *Vibrio* strains using ISR-targeted primer. ICH ISR-F and 23SR-ICH. Lane M, 100bp DNA ladder; 1, KCCM40870; 2, KCTC2714; 3, KCTC 2715; 4, KCTC 2716; 5, KCTC 2719; 6, KCTC 2720; 7, KCTC 2721; 8, KCTC 2722; 9, KCTC 2726; 10, KCTC 2729; 11, KCTC2730; 12, KCTC 2731; 13, KCTC 27331; 14, KCTC 2735; 15, KCTC 736; 16, KCTC 2737; 17. KCTC 2810; 18. KCTC 2928; 19. KCTC 2954; 20. KCTC 2962.

목적하는 크기의 band를 확인할 수 없었다. 이상의 결과를 토대로 자어, 배양수, 먹이생물에서 분리된 *Vibrio* 균주의 *V. ichthyenteri* 종 특이적 primer에 대한 확인을 위하여 이전 실험에서 분리된 18 group에 균주의 genomic DNA를 분리하여 detection PCR 반응을 수행한 결과(Fig. 5) 생화학적 성상 등을 통해 *V. ichthyenteri*로 분류되었던 2개 그룹의 균주에서 목적하는 band를 확인하였고, 확인된 그룹에 genomic DNA를 16S rRNA sequencing한 결과 *V. ichthyenteri*와 99% 일치하는 결과를 보였다. 또한 *V. ichthyenteri*와 가장 유사한 염기서열을 가지고 있다고 알려진 *V. scophthalmi* 야생분리균주(Table 5, Fig 6)를 detection primer (Table 2)를 가지고 detection PCR을 수행한 결과 Fig. 7에서 나타나듯이 *V. ichthyenteri*만이 검출되었다. 따라서 *V. ichthyenteri* (KCCM 40870) ISR의 서열로 제작한 primer가 넘치 자어에 발병하는 장관백탁증 원인균인 *V. ichthyenteri*의 신속한 검출과 정확한 동정을 위한 molecular marker로 이용할 수 있음을 확인하였고, 배양수나 먹이생물의 신속 진단 검출 방법으로 장관백탁증의 예방에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

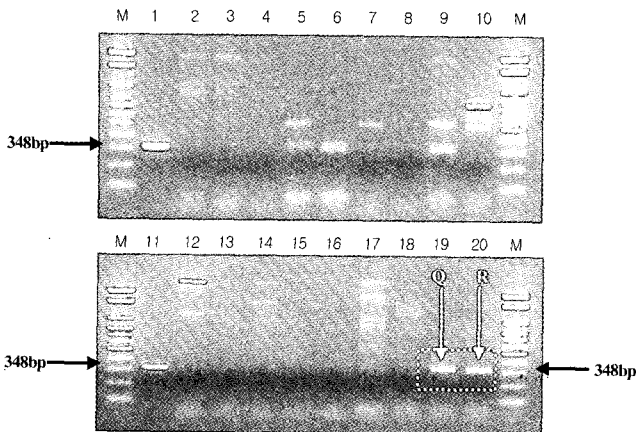


Fig. 5. PCR amplification of the rDNA of different *Vibrio* strains using ISR-targeted primer. ICH ISR-F and 23SR-ICH. Lane M, 100bp DNA ladder; 1, 11: KCCM 40870; 2: isolated A group; 3: isolated B group; 4: isolated C group; 5: isolated D group; 6: isolated E group; 7: isolated F group; 8: isolated G group; 9: isolated H group; 10: isolated I group; 12: isolated J group; 13: isolated K group; 14: isolated L group; 15: isolated M group; 16: isolated N group; 17: isolated O group; 18: isolated P group; 19: isolated Q group; 20: isolated R group.

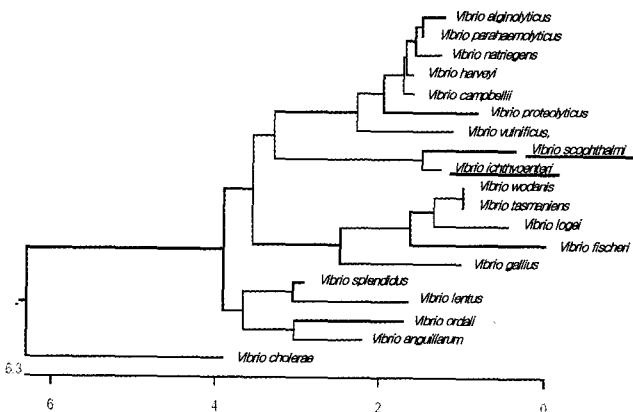


Fig. 6. Dendrogram showing the phylogenetic relationship among strains of *Vibrio* genus and closely related bacteria. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of the tree indicate the number of substitution events.

요 약

2003년 5월과 2003년 10월동안에 넙치 종묘배양장에서 초기 먹이로 공급되어지는 동물성 플랑크톤인 rotifer와 20~30일령 넙치 자어 및 넙치 자어 배양수에서 *V. ichthyoenteri*를 분리하기 위해 실험한 결과 총 71개의 *Vibrio* sp. 분리가 되었고, 생화학적 동정결과 2개의 그룹에서 24개 균의 *V. ichthyoenteri*로 동정되어 일본에서 분리된 참조균주와 중간 유연관계를 확인하여 본 결과 750 bp에서 6 kb까지의 분자량으로 동일한 다형성 band pattern을 나타내어 동일한 종으로 판단되었다. *V. ichthyoenteri*의 신속한 검출을 위한 종특이적 primer는 *V. ichthyoenteri* (KCCM

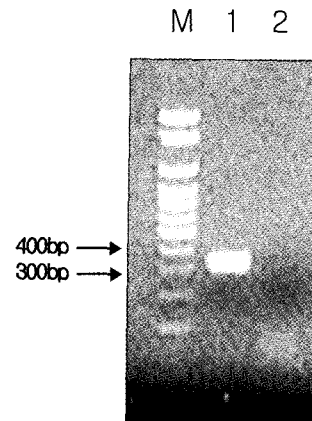


Fig. 7. PCR amplification of the rDNA of different *Vibrio* strains using ISR-targeted primer. ICH ISR-F and 23SR-ICH. Lane M, 100 bp DNA ladder, Lane 1, *V. ichthyoenteri*, Lane 2, *V. scophthalmi*.

40870) ISR의 서열 중 non-coding region내 가변부위를 표적으로 하여 제작하였다. 그리고 제작된 primer에 특이성을 확인하기 위하여 *V. ichthyoenteri* (KCCM 40870)을 Positive control로 하여 KCTC에서 분양받은 19종의 *Vibrio* 속 균주의 genomic DNA와 분리 균주 18 group genomic DNA 그리고 참조균주와 가장 유사한 염기서열을 가지고 있다는 *V. scophthalmi*의 genomic DNA를 가지고 PCR 결과 *V. ichthyoenteri*만의 특이적인 band가 생성됨을 알 수가 있다. 또한 분리 균주 18 group PCR 결과에서 생화학적 동정에서 *V. ichthyoenteri*로 동정 되어진 Q, R group에서 참조균주와 동일한 band pattern을 나타내어 16S rRNA sequencing 결과 *V. ichthyoenteri*와 99% 일치하였다.

따라서 *V. ichthyoenteri* (KCCM 40870) ISR의 서열로 제작한 primer가 넙치 자어에 발생하는 장관백탁증 원인균인 *V. ichthyoenteri*의 신속한 검출과 정확한 동정을 할 수 있는 molecular marker로 이용할 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 제주대학교 해양과학대학 NURI 사업에 의해 지원되었음.

참고문헌

1. 박성우, 오명주(2001). 어류질병. 진술., pp.100-104.
2. 심두생, 이주석, 허문수, 김진우(1995). 양식생물 질병진단 연구(분리균주에 대한 혈청학적 진단 및 최소발육저장능도 조사). 수진사업보고서, 405-423.
3. 이정백, 노섭, 송춘복(1995). 넙치, *Paralichthys olivaceus* 자어에서 분리한 장관백탁증의 원인균인 *Vibrio* sp.(INFL group)의 생물학적 및 생화학적 특성. 한국어병학회지, 8(2), 99-109.
4. 진창남, 이창훈, 오상필, 나오수, 허문수(2003). 양식넙치, *Paralichthys olivaceus* 치어의 스킨카충 감염경로. 한국

- 어병학회지, 16(1), 13-21.
5. D-H Kim, H-J Han, S-M Kim, D-C Lee and S-I Park. 2004. Bacterial enteritis and development of the larval digestive tract in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*(Temminck & schlegel). *J. Fish Diseases*. 27, 497-505.
 6. G.A. Bisbal., and D.A. Bengston. 1995. Development of the digestive tract in larval summer flounder. *J. Fish Biol.* 47, 277-291.
 7. Ishimaru, K., M. Akagawa-Matsushita, and K. Muroga. 1996. *Vibrio ichthyoenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Inter. J. syst. bacteriol.* 46(1), 155-159.
 8. Lee HK., SS Lee. 1997. Identification of the *Vibriosis* isolation from the Shrimp(*Carangon affinis*) in estuary of Nakdong river in Kor. *J. Microbiol.* 32, 523-537.
 9. 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.
 10. Masumura, K., Y. Iida, T. Nakai, T. Mekuchi. 1989. The effects of water temperature and fish age on a herpesvirus infection of Japanese flounder larvae, *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.* 24, 111-114.
 11. Murata, O. 1987. Infectious intestinal necrosis in flounder. *Fish Pathol.* 22, 59-61.
 12. Muroga, K. 2001. Viral and bacterial diseases in larval and juvenile marine fish and shellfish : A review. *Fish Pathol.* 30, 71-85.
 13. Muroga, K., H. Yasunobu, N. Okada, & K. Masumura. 1990. Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Dis. Aquat. Org.* 9, 121-125.
 14. MacFaddin, J.F. 2000. Individual biochemical tests. In: *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 3rd ed. pp.1-456.
 15. Valle, L.D., L. Zanella, P. Belvedere, and L. Colombo. 2002. Use of random amplification to develop a PCR detection method for the causative agent of fish pasteurellosis, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*(Vibrionaceae). *Aquaculture.* 207, 187-202.
 16. 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.
 17. Yasuda, K., and N. Taga. 1980. A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. *Mer.* 18, 53-62.
 18. Yoshimizu, M., I. Kaori, K. Kazuko, I. Nao, and Takahisa. 1999. Bacteria flora of hatchery reared Japanese flounder. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 50, 193-200.

(Received February 22, 2005/Accepted May 30, 2005)

ABSTRACT : Use of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region for Species-specific Primer Developed of *Vibrio Ichthyoenteri*

Young-Gun Moon and Moon-Soo Heo*(Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea)

Two bacterial isolates obtained from rotifer and diseased olive flounder larvae, *Paralichthys olivaceus*, were identified as *Vibrio ichthyoenteri* based on the results of phenotypic characterization. In an attempt to develop rapid PCR method for the detection of *V. ichthyoenteri*, we examined the 16S-23S rRNA intergenic spacer region(ISR) of *V. ichthyoenteri* and developed species-specific primer for *V. ichthyoenteri*. Analysis of the ISR sequences showed that *V. ichthyoenteri* contains one type of polymorphic ISRs. The size of ISRs was 348 bp length and did not contain tRNA genes. Multiple alignment of representative sequences from different *V.* species revealed several domains of high sequence variability, and allowed to design species-specific primer for detection of *V. ichthyoenteri*. The specificity of the primer was examined using genomic DNA prepared from 19 different *V.* species, isolated 18 group *Vibrio* species and most similar sequence of other known *Vibrio* species. The results showed that the PCR reaction using species-specific primer designed in this study can be used to detect *V. ichthyoenteri*.