

갯벌 퇴적물내 병원성 *Vibrio vulnificus*의 신속하고 특이적인 검출

변기득¹ · 이정현* · 이계준¹ · 김상진

한국해양연구원 해양생명공학센터, ¹서울대학교 생명과학부

갯벌 퇴적물에 존재하는 병원성 해양미생물인 *Vibrio vulnificus*를 신속하고 정확하게 검출하기 위해 PCR, Southern hybridization 방법과 real-time PCR을 수행하여 검출 민감도를 비교하였다. 갯벌 퇴적물로부터 bead beater를 이용한 물리적 방법으로 DNA 조추출액을 얻고 상용화된 키트 (Geneclean turbo Kit)를 이용하여 부식물질(humic substances)을 제거하였다. 병원성에 관련된 3종의 유전자(hemolysin, *vvhA*; phosphomannomutase, *pmm*; metalloprotease, *vvpE*)를 대상으로 설계한 프라이머 셋을 동시에 사용하는 multiplex PCR 방법과 Southern hybridization과 병행한 방법(PCR/Southern hybridization)을 수행하였다. Real-time PCR은 hemolysin 유전자(*vvhA*)에 특이한 프라이머와 TaqMan 탐침을 사용하였다. 전처리하지 않은 갯벌 퇴적물의 경우, PCR/Southern hybridization과 real-time PCR 방법의 검출 민감도는 퇴적물 1g 당 약 10² 개의 세포 수준이었다. 농후처리액(APW; alkaline peptone water)으로 35°C에서 2~3시간, 8시간 증균 배양할 경우 갯벌 퇴적물 1g당 2~10개 세포가 존재할때 PCR/Southern hybridization 방법과 real-time PCR 방법으로 각각 검출할 수 있었다. 전처리 과정을 포함하여 real-time PCR은 6~7시간, PCR/Southern hybridization은 약 36시간이 소요되었다.

Key words □ real-time TaqMan PCR, tidal flat sediment, *Vibrio vulnificus*

*Vibrio vulnificus*는 비브리오과(family Vibrionaceae) 비브리오속(*Vibrio* genus)의 운동성이 있는 호염성 그람음성 간균으로서 1979년에 Farmer에 의해 *Vibrio vulnificus* (*vulnus* = wound, *ficus* = forming)로 명명되었다(15). 크기가 0.5~0.8 × 1.4~2.6 μm 이고, 콤파모양, 짧은 막대모양, C자형 등의 여러 가지 형태를 보인다. 보통 단극성의 긴 편모를 가지고 있어서 빠르게 회전하거나 이동한다. 유당을 분해할 수 있기 때문에 'lactose Vibrio'로 불리며 온도, 염농도, pH가 성장에 결정적인 영향을 미치고 최적 배양조건은 37°C, 염도 0.2~5.5%, 및 pH 7~9이다(1, 3, 4, 31). *V. vulnificus*가 유발하는 패혈증(*V. vulnificus* sepsis)은 치사율이 50%로서 환자의 임상증상에 따라 원발성 패혈증(primary septicemia)과 창상감염(wound infection)균으로 구분된다. 패혈증 발생은 한국을 비롯해 미국, 일본, 대만, 이스라엘, 스페인, 터키, 태국, 덴마크, 벨기에, 독일, 네덜란드, 스웨덴 등 세계 전역에서 보고되고 있으며, 미국에서는 해안지방에서 매년 10만 명 당 0.5 명의 발생이 보고되고 있다. 한국에서는 매년 여름철 서남 해안 지역의 수온 18~20°C 이상, 염도 2.5% 정도일 때 주로 40세 이상의 남성을 중심으로 20~40건의 사례가 발생하고 있으며 2000년 8월1일부터 제3군 전염병으로 지정되어 특별 관리되고 있다(2).

*V. vulnificus*는 해수, 플랑크톤, 침전물, 갑각류와 어류 등의 다양한 해양성 서식환경에 존재하는 것으로 알려졌다(14, 28). 한국의 경우 갯벌 퇴적물에서도 높게 검출되는 것으로 보고되었으나,

국민보건 측면에서 정기적 검출조사가 굴 등의 생물시료 및 임상시료를 주 대상으로 진행되었다(21, 43). 갯벌의 생태적 중요성과 아울러 인간의 활동이 이루어진다는 측면에서 갯벌 퇴적물내 병원성 *V. vulnificus*에 대한 지속적인 모니터링과 관찰 체계가 요구될 뿐 아니라 패류 등의 서식환경인 갯벌에서의 *V. vulnificus*의 환경생태학적 연구를 위한 동태 연구가 필요할 것으로 판단된다. 이를 위해 PCR/Southern hybridization과 real-time PCR을 사용하여 갯벌 퇴적물에서 *V. vulnificus*를 신속하고 선택적으로 탐지하는 방법을 확립하고, 그 검출 민감도를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 갯벌 퇴적물

실험에 사용한 표준 균주는 *Vibrio vulnificus* ATCC29307로서 서울대학교 농업생명과학대학 최상호 교수로부터 분양 받았다. 균의 배양은 2% NaCl이 포함된 LB 배지를 이용하였다. *V. vulnificus*의 검출 민감도 측정을 위해, 서해안 강화도 주변 갯벌 퇴적물을 시료로 사용하였다. 갯벌 퇴적물은 한강으로부터 유입되는 오염물질이 확산, 분해되는 장소인 강화도 남단의 장화리 지역(동경 126°25', 북위 37°37')에서 2003년 11월 중 간조시간에 멸균된 시료컵을 이용하여 채취하였다. 채취 후 냉장상태로 운반하여 2 ml 용량의 원심분리용 튜브에 0.5 g씩 분주하고 즉시 -70°C에 냉동 보관하였다.

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 031-400-6243, Fax: 031-406-2495

E-mail: jlee@kordi.re.kr

접종 및 증균 배양

V. vulnificus ATCC 29307을 2% NaCl이 포함된 LB 평판배지에서 신선한 균락을 얻은 후 이로부터 액체배지를 이용하여 1일 간 진탕 배양 (150 rpm)하여 종균으로 사용하였다. 동일 배지에 1%(v/v) 수준으로 접종하고 동일 조건으로 배양하면서 시간별로 배양액을 회수하여 흡광도 (OD₆₀₀)와 세포수의 관계성을 측정하였다. *V. vulnificus* 검출 효율에 대한 선택적 증균 처리의 영향을 비교하고자 *Vibrio* 속 분석에 보편적으로 사용되는 APW (alkaline peptone water: 1% Peptone, 1% NaCl)를 사용하였다 (33). 퇴적물에서 추출된 DNA를 대상으로 *V. vulnificus* 특이적 multiplex-PCR 결과 *V. vulnificus*가 검출되지 않았으므로 이후의 실험은 퇴적물 시료에 *V. vulnificus*를 인위적으로 첨가하여 민감도 실험을 진행하였다. 구체적 조건은 0.5 g (습식 중량)의 갯벌 퇴적물이 들어있는 2 ml 튜브에 *V. vulnificus* 세포 회석액을 농도를 달리하여 첨가하였다. 검출실험을 위한 증식 전처리 과정은 갯벌 퇴적물 시료를 14,000 × g로 3분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 각 튜브에 APW를 1 ml 씩 분주하여 4°C와 35°C에서 각각 8시간까지 배양하여 비교하였다. 또한 증균 배양 시간에 따른 *V. vulnificus* 검출 정도를 조사하고자 갯벌 퇴적물 0.5 g에 *V. vulnificus* 세포를 약 10 개 미만 수준으로 접종하고, 1 ml의 APW를 첨가하여 35°C에서 증균 배양을 실시한 후 시간별 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6시간)로 증균 배양한 갯벌 퇴적물 시료에서 추출한 DNA를 multiplex-PCR 및 real-time PCR의 주형으로 사용하였다.

총 DNA 추출 및 정제

갯벌 퇴적물로부터 총 DNA 추출은 물리적 방법인 mini-bead beater법(5, 20)을 변형하여 사용하였다. *V. vulnificus* cell이 첨가된 0.5 g의 갯벌 퇴적물 (2 ml tube)에 1 ml의 2 × TENS 용액 (100 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2% SDS)을 첨가하고 현탁시켰다. 여기에 멸균된 500 mg의 glass bead (직경 0.1 μm)를 넣고 bead beater (Biospec Products, Bartlesville, USA)를 사용하여 최대속도로 3분간 작동하여 세포를 파쇄한 후, 페놀처리와 isopropanol로 DNA 침전물을 얻고 70% 에탄올로 세척한 후 최종 50 μl의 TE buffer에 용해하였다. 갈색의 부식성

물질을 제거하기 위해 PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) column (5, 7)과 GeneClean Turbo Kit (Qbiogene, Irvine, USA)로 각각 정제하여 비교, 분석하였다. DNA 추출액과 정제된 DNA의 농도 및 순도는 흡광도 측정(Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer; Nanodrop Technologies, Wilmington, USA)과 전기영동 이미지를 통해 확인하였다.

PCR

*V. vulnificus*를 특이적으로 검출하기 위해 병원성 유발 유전자 중 hemolysin (22, 23), phosphomannomutase 및 metalloprotease (18) 유전자의 염기서열을 바탕으로 각각 프라이머를 디자인하였고 (주)제노텍 (대전, 한국)에서 합성하였다(Table 1). 유전자 염기서열을 근거로 예상되는 증폭산물(*vwhA*, *pmm* 및 *vvpE*)의 크기는 각각 704, 820 및 801 bp이었다. 증폭산물의 *V. vulnificus* genomic DNA에 대한 반응 특이성은 염기서열 분석을 통해 확인하였다. PCR 반응액은 1 × 완충용액, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.1% BSA, 5% DMSO, 2.5 U Ex *Taq* polymerase (Takara), 0.5 μM 프라이머와 1 μl의 주형을 포함하여 최종 50 μl가 되도록 하였다. PCR 결과를 향상시키기 위한 방법으로 *V. vulnificus*에 특이한 3종의 프라이머 셋(*vwhA*, *pmm*, *vvpE*)을 한 반응에 모두 사용하는 multiplex-PCR을 수행하였다. PCR 수행은 lid 온도 103°C에서 시작하여 pre-denature는 95°C로 5분, denature는 94°C로 1분, annealing은 62°C에서 1분, elongation은 72°C로 1분, post-elongation은 72°C로 7분간 수행하였다. 증폭반응을 30회 반복 수행하였고, 반응시간은 약 2시간 30분이 소요되었다. PCR 산물을 0.8% 아가로즈 젤에 전개하고 EtBr로 염색하여 UV하에서 DNA 밴드를 확인하였다.

Southern hybridization

PCR 산물이 전개된 0.8% 아가로즈 젤에 대해 Southern hybridization을 실시하였다. Koetsier 등의 방법을 변형하여 gel에 전개된 DNA를 Hybond-N+ membrane으로 전이시켰다(19). 세 종의 PCR 산물을 각각 분리하여 탐침으로 사용하였고, 탐침-labeling, hybridization 및 detection은 최적의 검출 효율을 얻기 위해 'DIG labeling and Detection Kit'(Roche)에서 제시하는 절

Table 1. Sequences of primers and probes used for PCR, Southern hybridization, and real-time PCR for *Vibrio vulnificus* detection

Target	Primer/Probe	Sequence (5' → 3')	Tm ² (°C)	Product (bp)	Remarks
<i>vwhA</i> ¹	<i>vwhA</i> -F	GACTATCGCATCAACAACCG	57.3	704	PCR
	<i>vwhA</i> -R	AGGTAGCGAGTATTACTGCC	57.3		
<i>pmm</i> ¹	<i>pmm</i> -F	GGCGATGGATATGGTGATGAA	57.9	820	PCR
	<i>pmm</i> -R	CTCGGCCTTAAACTGTGCGG	61.4		
<i>vvpE</i> ¹	<i>vvpE</i> -F	TCAACGTCATCGTCTCGGTC	59.4	801	PCR
	<i>vvpE</i> -R	CCGTTGACCGCTTTGTGATC	59.4		
<i>vwhA</i>	<i>vwhA</i> -V3F	CGCTTTGGTACCGTTCTTCCTT	56.3	54	Real-time PCR
	<i>vwhA</i> -V3R	GCCCGCAGAGCCGTAATA	54.5		
	<i>vwhA</i> -V3M1	FAM ³ -CAGCGCTGTTTTTCG-NFQ ³			

¹*vwhA*; hemolysin, *pmm*; phosphomannomutase, *vvpE*; metalloprotease

²Tm, Melting temperature

³FAM, 6-carboxyfluorescein; NFQ, non-fluorescent quencher

차를 변형하여 수행하였다.

Real-time PCR

Real-time PCR에서 사용한 프라이머(*vhA*-V3F, *vhA*-V3R)와 TaqMan 탐침(*vhA*-V3M1)은 *V. vulnificus*의 대표적인 병독성 유전자인 hemolysin (*vhA*)의 염기서열 내에서 real-time PCR 제조사의 프로그램(Primer Express program; Applied Biosystems, Foster, USA)으로 설계하여 Applied Biosystems에서 제작하였으며 PCR 산물의 크기는 54 bp이었다(Table 1, Fig. 1). 설계한 프라이머와 탐침의 특이성을 확인하기 위해서 *vhA* PCR 산물(704 bp)이 클로닝된 pGEM/vhA 벡터를 10배씩 희석하여 real-time PCR의 주형으로 사용하였다. 그 결과 표준검량선 $y = -3.23x + 35.72$, 검출 한계는 반응액 (25 μ l) 당 9.6 copy 및 신뢰도 $R^2 = 0.990291$ 값을 획득하였다(Fig. 2). 이는 Wang 등(39)이 검출 한계로 보고한 10 copy와 Campbell 등(10)이 보고한 6 cell과 유사한 값이었다. Real-time PCR 반응은 최종 25 μ l가 되도록 하고 모든 시료에 대해 동일한 조건으로 3회 반복 실험을 실시하였다. PCR 진행은 제 1 단계로 50°C에서 2분간, 2 단계로 95°C에서 10분간 pre-denature를 실시하였다. 이어서 3 단계로 denature는 95°C로 15초, annealing과 elongation은 60°C에서 1분간 수행하였

으며, 이 과정을 40회 반복하였고 약 110분이 소요되었다. 실험 결과는 ABI Prism 7000 SDS Software 프로그램(Applied Biosystems)으로 분석하였다. PCR 반응간 형광량 변화가 표시된 그래프를 outlying, baseline 조정 및 threshold 조정 순으로 변화시키면서 분석하였다. 표준검량선은 기울기가 -3.32에 근접하고 R^2 가 0.99 이상 되도록 조절하였다.

결 과

환경 DNA 추출 및 정제

갯벌 퇴적물로부터 추출된 총 DNA에는 갈색을 나타내는 물질(humic acid 등)이 포함되어 있었다. 불순물이 포함된 조추출액 DNA를 GeneClean Turbo Kit (Qbiogene, Irvine, USA) 및 PVPP column으로 정제한 결과 모두 10 kb 이상의 DNA가 획득되었다(Fig. 3). 자연상태의 퇴적물로부터 추출된 crude DNA 양은 1 g에서 약 14.0 μ g/g of wet sediment 수준이었다. GeneClean Turbo Kit와 PVPP 컬럼을 사용하여 정제된 환경 DNA의 회수율은 각각 29.5%와 58.5%로서 PVPP column의 회수율이 상대적으로 높았다. 하지만 정제된 DNA에 포함된 DNA와 단백질의 상대적인 비($A_{260/280}$)는 GeneClean Turbo Kit이 1.84로서 PVPP

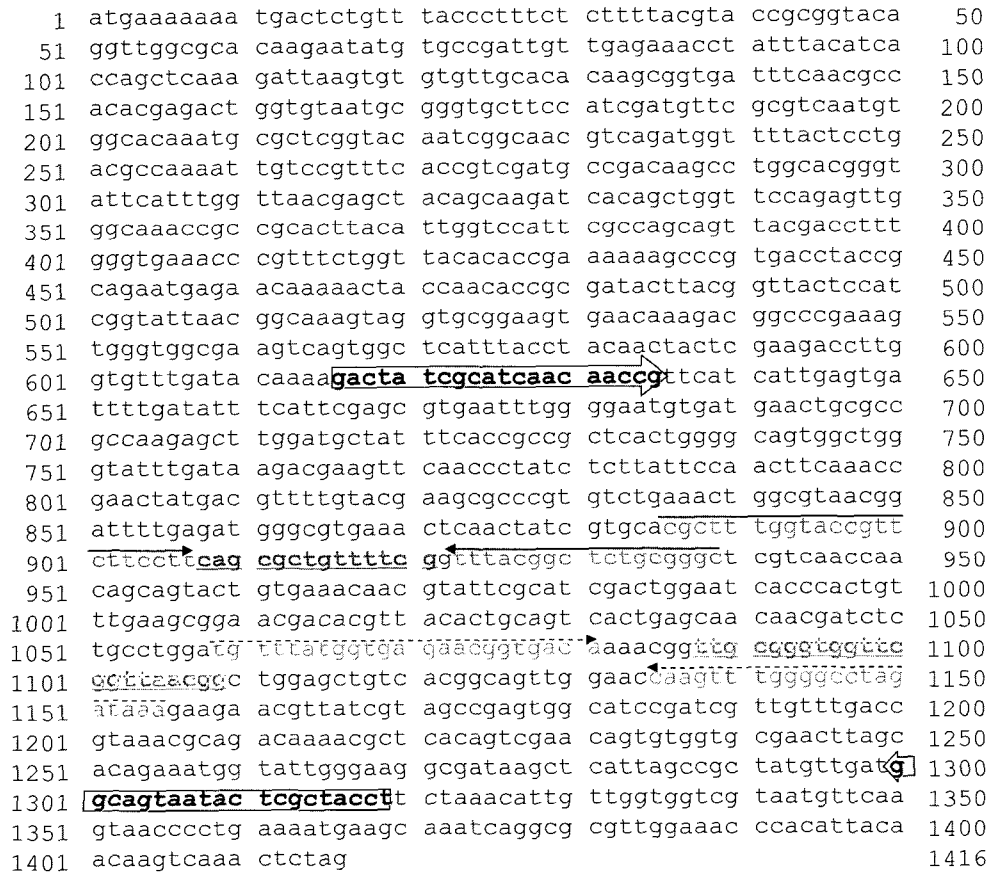


Fig. 1. Location of primers and a TaqMan probe for real-time PCR in the hemolysin gene (*vhA*) of *V. vulnificus*. Arrowed lines and an under-lined sequence in bold denote primer set and TaqMan probe of real-time PCR, respectively. In addition, arrowed dotted and under-lined sequence in bold showed primer and TaqMan probe of other experiment, respectively (10). Arrowed opened bars showed a *vhA* primer set used in PCR detection.

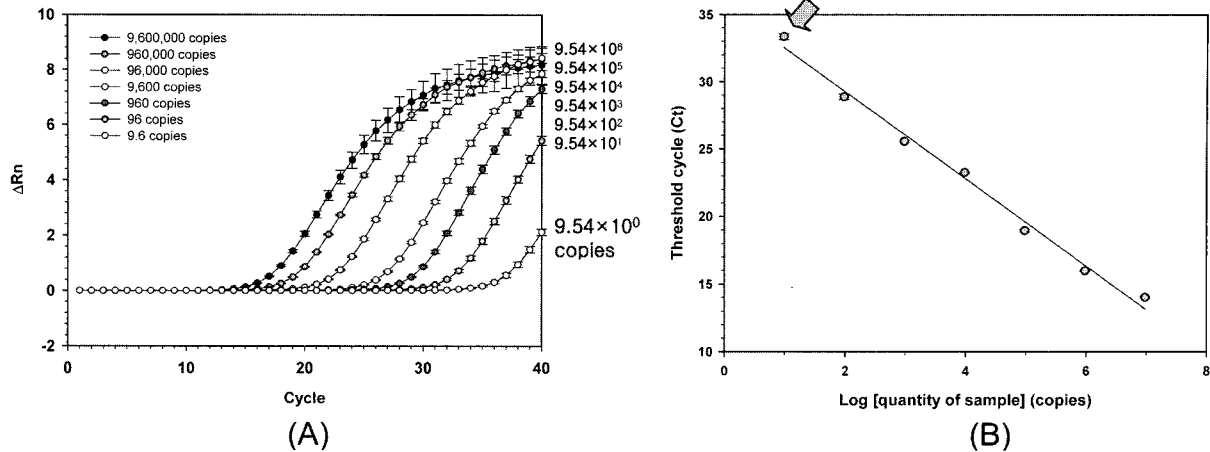


Fig. 2. Real-time PCR sensitivity; ΔRn of log value (A), and standard curve (B) for *V. vulnificus* detection. Standard curve was plotted for the log copy number of the gene versus the number of cycles required to reach Ct on the means of triplicate samples. Samples were made from dilutions of plasmid containing *vwA* gene (pGEM-T Easy/*vwA*). The line equation and detection limit of *vwA* gene of *V. vulnificus* by real-time PCR for *vwA*-fragment containing vector (pGEM-T Easy/*vwA*) is $y = -3.23x + 35.72$ and $9.6 \text{ copies} \cdot \text{reaction solution}^{-1}$. R^2 is 0.99 at $P < 0.0001$.

column의 1.72 보다 높았다. DNA와 humic acid의 상대적인 비를 보여주는 $A_{260/280}$ 값도 Geneclean Turbo 키트의 경우 1.63으로서 PVPP column의 1.21 보다 높기 때문에 상용화된 키트의 단백질 제거 능력이 양호하다고 판단되었다. 결과적으로 bead beater를 사용하여 소량이면서 다수의 갯벌 퇴적물 시료로부터 환경 DNA를 추출하였고 Geneclean Turbo 키트를 사용하여 상대적으로 신속하게 PCR의 주형으로 사용할 수 있는 수준의 순수한 DNA를 획득하였다.

PCR 및 Southern hybridization을 이용한 검출

*V. vulnificus*가 인위적으로 첨가된 갯벌 퇴적물에서 정제한 DNA 추출액을 주형으로 multiplex-PCR을 수행하여 아가로즈 젤

에서 확인한 검출 한계가 갯벌 퇴적물 1 g 당 2×10^3 개 세포 이었고 검출하는데 6시간 정도 소요되었다(Fig. 4). PCR 산물이 전개되어 있는 아가로즈 젤에 대해 Southern hybridization을 실시한 결과 검출 한계가 10배 향상되어 갯벌 퇴적물 1 g 당 2×10^2 개 세포 수준이었고(Fig. 4) 검출하는데 약 30시간이 소요되었다. *V. vulnificus*가 인위적으로 첨가되지 않은 퇴적물 시료에 대해서는 PCR 반응시 검출이 되지 않았고, 이는 퇴적물내에 *V. vulnificus*가 존재하지 않거나 민감도($10^2 \text{ cells} \cdot \text{g}^{-1}$)내 수준으로 존재할 수 있음을 보여준다. 또한 multiplex-PCR은 *vwA* 검출만을 위한 PCR을 실시한 경우 보다 많은 증폭산물이 생성되었다 (자료미제시).

*V. vulnificus*를 인위적으로 접종한 갯벌 퇴적물에 APW를 첨가하고 4°C 및 35°C에서 각각 8시간씩 선택배양을 한 후 추출 및 정제한 DNA를 주형으로 사용하여 PCR 및 Southern hybridization을 실시하였다. PCR의 경우 4°C와 35°C 배양액의 검출 한계는 갯벌 퇴적물 1 g 당 각각 2×10^4 과 2 개 세포 수준이었다(Fig. 5). PCR/Southern hybridization한 경우 4°C와 35°C 배양액의 검출 한계는 갯벌 퇴적물 1 g 당 각각 2×10^3 과 2 개 세포 수준이었다(Fig. 5). 따라서 갯벌 퇴적물 1g에 *V. vulnificus* 2 cell만 존재해도 APW로 35°C에서 8시간 증균 배양하면 PCR 혹은 PCR/Southern hybridization 혼합방법으로 검출할 수 있었다.

위 결과를 바탕으로 더욱 신속한 검출을 위해 증균 배양 시간에 따른 검출 한계를 관찰하였다. 갯벌 퇴적물 1g 에 *V. vulnificus* 10 cell을 접종할 경우 APW로 35°C에서 3시간 배양했을 때 PCR로 검출되었으나, Southern hybridization을 하면 2시간 이상 배양된 시료에서 검출이 가능하였다(Fig. 6). 즉, PCR 산물을 대상으로 Southern hybridization을 수행하면 DNA 추출 전 배양시간을 3시간에서 2시간으로 줄일 수 있었다. 이것은 갯벌 퇴적물 1 g 에 배양 가능한 10개의 *V. vulnificus* 세포가 존재할 경우 APW에 35°C로 2시간 배양하면 PCR의 검출 한계 ($2 \times$

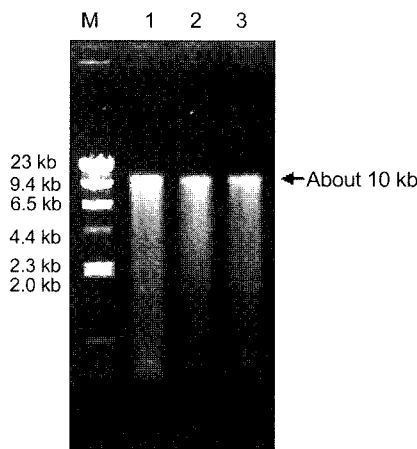


Fig. 3. DNA extraction and purification using Geneclean Turbo Kit (Qbiogene, Irvine, USA) and PVPP column from tidal flat sediments. M, λ DNA/*Hind*III Marker (Promega, Madison, USA); 1, crude DNA extracts; 2, purified DNA using Geneclean turbo Kit; 3, purified DNA using PVPP column.

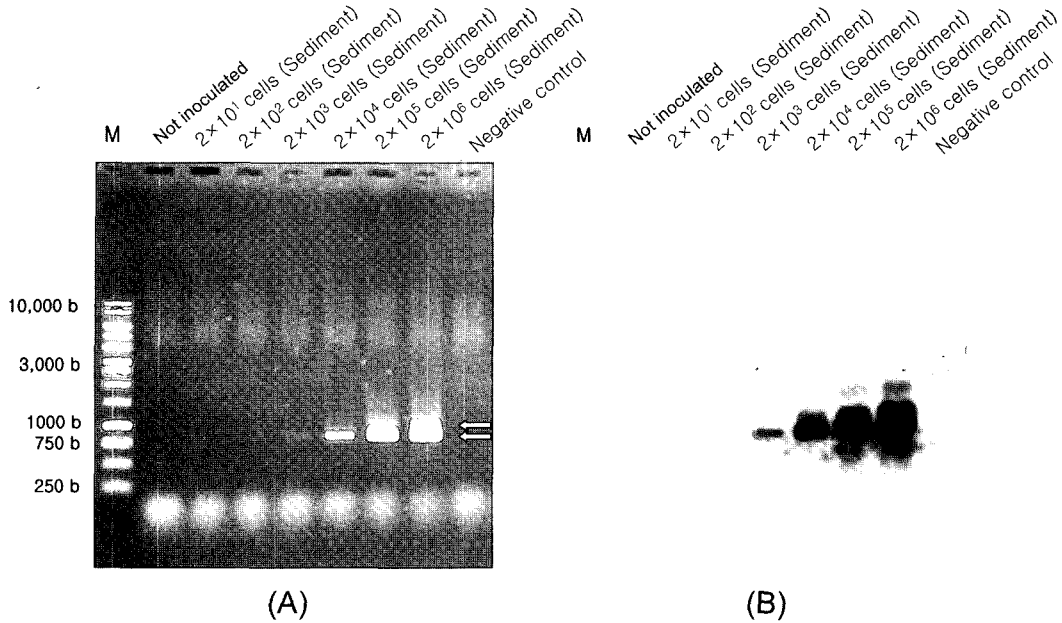


Fig. 4. Sensitivity of PCR (A) and Southern hybridization (B) for the detection of *V. vulnificus* in the tidal flat sediments inoculated with *V. vulnificus* cells.

10^2 cell) 이상으로 증균된다는 것을 의미한다. 결론적으로 갯벌 퇴적물 1 g 에 배양 가능한 *V. vulnificus* 10 개의 세포가 존재할 경우 APW로 35°C에서 2시간 이상 선택 배양했을 때 PCR/Southern hybridization으로 검출이 가능하였다. PCR/Southern hybridization 방법은 시료 전처리 과정을 포함하여 검출 완료시 까지 약 36시간이 소요되어 시간 단축 방안이 요구되었다.

Real-time PCR을 이용한 검출

V. vulnificus cell을 인위적으로 접종한 갯벌 퇴적물에 APW를 첨가하고 35°C에서 8시간 배양을 한 후 추출한 DNA 추출액을

주형으로 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과 검출 한계는 갯벌 퇴적물 1 g 당 2×10^0 개의 세포수준이었다(Fig. 7). 비록 2 개의 세포 수준에서 threshold cycle이 표준검량선상에서 변이를 보여주었으나 이는 실험적 편차로 정확한 회석이 되지 않았음을 의미한다. 이러한 시료간(sample-to-sample) 편차는 많은 실험적 중복 시험을 요구하는 것으로 판단된다. 하지만 이러한 오차를 고려하더라도 표준검량선의 경향으로 판단할 때 검출 한계는 갯벌 퇴적물 1 g 당 2×10^0 개 세포 수준이라고 사료된다.

갯벌 퇴적물 1 g 에 *V. vulnificus* 1×10^1 개의 세포가 존재할 때 증균 배양 시간에 대한 검출 한계는 2-3시간 이었다(Fig. 8).

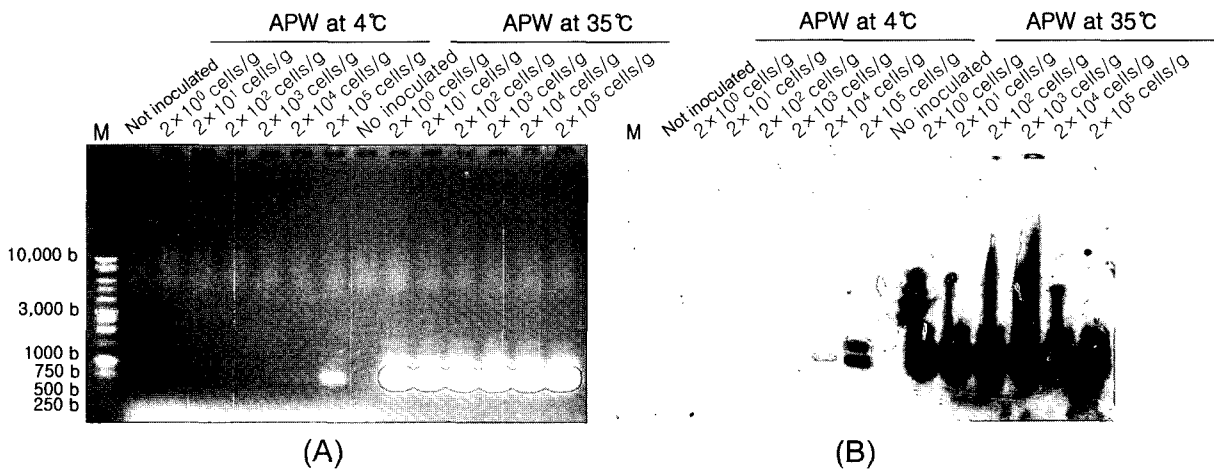


Fig. 5. Sensitivity tests for the detection of *V. vulnificus* from tidal flat sediments by enrichment in APW broth. (A) Sensitivity of multiplex-PCR assay after incubation at 4°C and 35°C in APW. (B) Southern hybridization using *vvhA*, *pmm*, and *vpE* gene segments as probes was determined to be 2×10^3 and 2 cells g^{-1} of tidal flat sediments, respectively. (M, 1 kb ladder; Promega, Madison, USA).

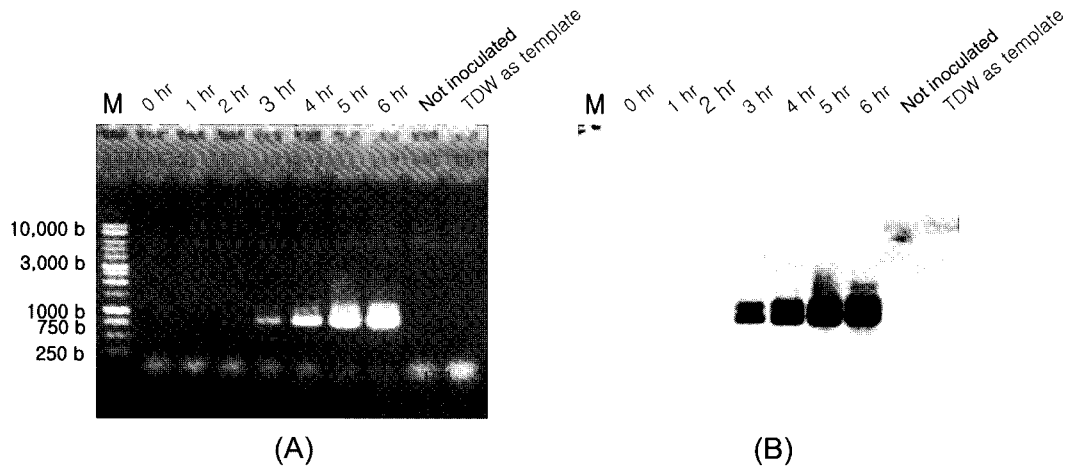


Fig. 6. Effect of enrichment culture time in APW on the sensitivity for the detection of *V. vulnificus*; PCR (A) and Southern hybridization (B).

2시간 배양한 시료에 대한 threshold cycle 값의 오차 범위가 약 2 cycle로서 다른 시료에 비해 크지만 표준검량선의 경향을 기준으로 판단할 때 2~3시간 이상 배양하면 real-time PCR로 검출이 가능한 것으로 판단되었다. 따라서 갯벌 퇴적물 1g 에 *V. vulnificus* 1×10^1 세포 이상 존재할 경우 APW에서 2~3시간 이상 배양하면 real-time PCR로 검출할 수 있었다. Real-time PCR의 검출 한계는 일반적인 PCR 방법보다 10배 이상 향상된 값이며 PCR/Southern hybridization하는 방법과 유사하였고, 전처리 과정을 포함하여 검출을 완료하는데 5~6 시간이 소요되므로

PCR/Southern hybridization 보다 신속하였다.

고찰

*V. vulnificus*는 한국을 비롯한 세계 전역에서 패혈증을 유발하며 치사율이 50%인 대표적인 비브리오속 해양 환경 유래 병원성 미생물이다. 우리나라의 서해안은 갯벌이 잘 발달되어 있어, 해산물 채취와 같은 갯벌에서의 인간활동이 많은 관계로 갯벌 퇴적물에 존재하는 *V. vulnificus*의 신속한 검출과 상시 모니터링

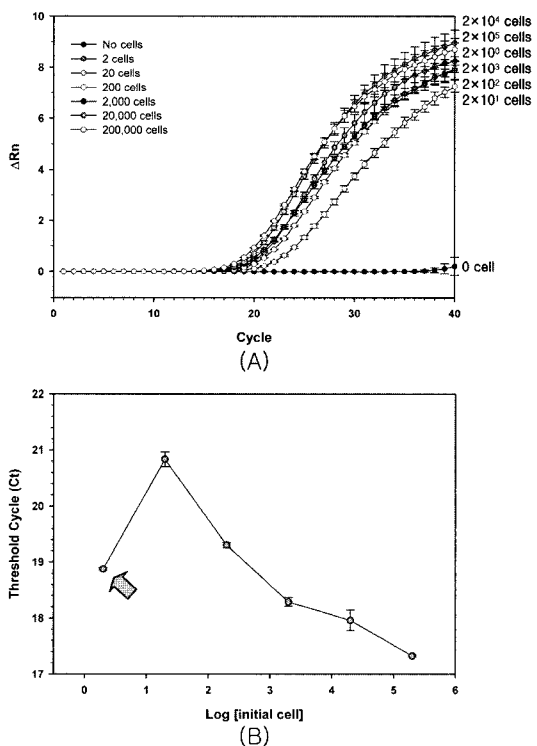


Fig. 7. Real-time PCR for the detection of *V. vulnificus* from tidal flat sediments by enrichment in APW broth at 35°C for 8 hrs; ΔRn of log value (A), and standard curve (B).

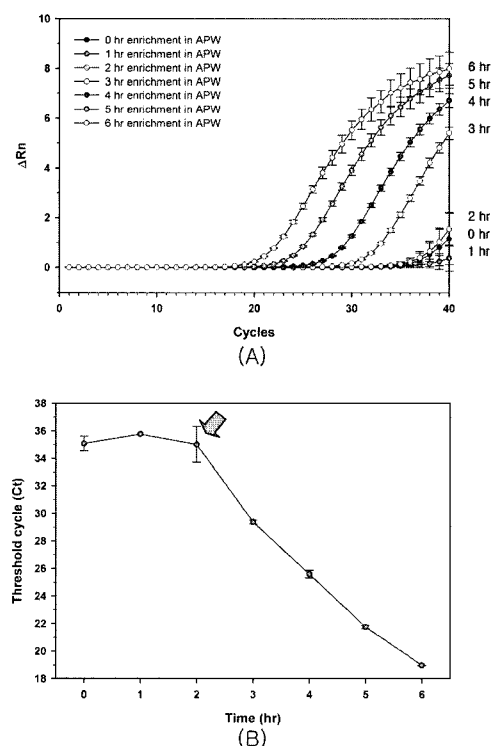


Fig. 8. Effect of enrichment time at 35°C on the detection of *V. vulnificus* in real time PCR; ΔRn of log value (A), and standard curve (B).

체계 확립이 요구된다. 현재까지 해산물 (굴, 조개, 오징어 등) 및 암상시료 등 제한된 시료에서 검출 연구가 진행되었을 뿐 세균의 서식환경으로 판단되는 갯벌에서는 연구가 미미하였다. 특정 미생물을 검출 및 동정하는데 일반적으로 사용되는 배양법은 시간이 많이 소요되므로 신속하고 정확한 검출을 위해 비브리오 특이적인 유전자의 존재 유무를 이용하는 PCR, Southern hybridization 및 real-time PCR을 수행하였다.

검출 효율을 향상시키기 위해, 전처리 과정으로 갯벌 퇴적물을 APW로 35°C에서 증균 배양한 후 bead beater로 환경 DNA를 추출하였다. 환경시료로부터 DNA를 추출하는 방법 중 bead beater를 이용하는 방법은 시료에 따라 다소 차이는 있으나, 소형화된 많은 시료에 대해 추출되는 DNA 양이 상대적으로 많고 크기도 10 kb 이상이며 특히 추출하는 시간이 적게 소요되고 간편하므로(35) 이 연구에 적용하였다. 시료로 사용한 갯벌 퇴적물은 육지와 해수가 접하는 지역으로서 다양한 동식물의 사체와 오염물질의 분해가 일어나므로 다른 토양보다 humic acid와 같은 부식물질이 많이 함유되어 있으므로 이를 제거하기 위한 방법을 개선하였다.

병원성 미생물을 검출하는데 2종 이상의 프라이머 셋을 동시에 사용하는 multiplex-PCR로 검출감도를 향상시키는 시도가 많았지만(16, 24) 이번 실험에서도 *V. vulnificus*에 특이한 3종의 프라이머 셋(*vhA*, *pmm*, *vvpE*)으로 multiplex-PCR을 수행하여 단일 *vhA* 유전자만을 증폭하는 것 보다 1.1~2.3 배 더 많은 PCR 산물을 획득하였다.

전처리 과정 없이 PCR을 이용한 검출 한계 (갯벌 퇴적물 1 g 당 2×10^3 세포)와 소요 시간 (6시간)은 genomic DNA를 주형으로 사용한 검출 한계인 $10^1 \sim 10^2$ cells(8) 보다 낮지만, 인위적으로 *E. coli*를 접종한 토양에 대한 PCR (16S rRNA 유전자) 검출 한계인 3.5×10^3 copy \cdot g⁻¹ (36)과 유사한 결과이다. EIA (enzyme immunoassay)를 통한 검출 한계는 well 당 2×10^3 세포로 유사하였지만 20~46 시간이 소요되었고(34), 단일클론 항체로 sandwich ELISA를 수행한 검출 한계는 well 당 $10^4 \sim 10^7$ 세포 수준이고 4.5 시간이 소요되었으므로(12) 단백질을 이용한 방법보다 전반적으로 검출 한계와 소요시간이 향상되었다.

자연의 해양환경 조건에서 *V. vulnificus* 세포가 VBNC (viable but non-culturable) 상태로 존재하는 것으로 알려졌다(21). *V. vulnificus* VBNC 세포는 세포막의 지방산 중 C16, C16:1의 57% 감소와 C19, C20, C22:1의 증가로 막대모양에서 둥근 모양으로 형상이 변하고 세포벽의 물리적 저항성 증가(25, 27, 40, 41) 등으로 인해 세포의 용해가 완전히 못하여 DNA 추출 효율이 떨어지는 것으로 판단된다. 또한 *E. coli*의 경우 cold shock 단백질인 protein H-NS와 gyrase A가 supercoiling을 풀어지게 만들고 PCR의 template인 DNA에 흠(nick)을 형성시켜서 PCR 효율을 감소시키는 것으로도 보고되었다(13). 이는 *V. vulnificus*를 저온에서 처리한 경우, 저온충격으로 새롭게 생성된 단백질이 DNA와 결합해서 중합효소 (polymerase)의 작용을 방해함으로써 PCR의 효율을 감소시킬 수 있는 가능성을 시사한다. 배양 가능한 세포 보다 배양은 할 수 없으나 살아 있는 즉, VBNC 세포가

PCR을 이용한 검출에서 400배의 DNA가 필요하다는 점을 종합적으로 고려해 볼 때 갯벌에 원래 존재할 것으로 예상되는 *V. vulnificus* VBNC 세포는 PCR 반응에 영향을 주지 않은 것으로 사료된다(9).

PCR을 통해 증폭된 산물을 확인하기 위해 일반적으로 사용하는 전기영동과 Southern hybridization은 염색 및 탐침 표지 등 PCR 이후에 많은 시간이 소요되며 PCR 산물의 특이성을 확인하는 것도 불확실하다. 이러한 end-point 측정 방법의 오류를 최소화하기 위해 quantitative competitive PCR 방법이 고안되어 사용되고 있으나 실험 절차가 매우 복잡하며 실제 성공 확률도 적으므로 보다 신속하며 검출 감도가 높고 오염을 줄일 수 있는 real-time PCR이 널리 사용되고 있는 추세이다. Real-time PCR의 프라이머는 대표적인 병독성 유전자인 hemolysin (*vhA*)의 염기서열 내에서 설계하였는데 real-time PCR로 *V. vulnificus*를 검출하는 연구 중 현재까지 발표된 모든 논문에서 hemolysin 유전자(*vhA*)에서 설계된 프라이머가 사용되었다(10, 32, 39). 본 연구에서 PCR 반응액에 5% DMSO (Sigma)와 0.1% BSA (bovine serum albumin, Roche)를 첨가함으로써 PCR 효율을 높이고자 하였다(42). DMSO는 프라이머의 annealing 효율과 특이적인 증폭을 향상시키고 BSA는 변성제의 중합효소 활성 저해를 최소화한다고 알려져 있다(42). 그러나 real-time PCR 반응시 DMSO와 BSA를 첨가할 경우 PCR 반응을 저해하는 현상이 억제되는 것이나 전반적으로 발생된 형광량이 감소하는 경향을 보여주었다 (자료미제시). 이러한 이유는 BSA와 DMSO가 real-time PCR에서 형광 발생을 억제하는 가능성을 보여준다.

PCR 방법과 TaqMan real-time PCR 방법은 *Salmonella* 종, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7 등을 대상으로 Shiga-like toxin 유전자 및 다양한 음식과 해양시료에 존재하는 비브리오(6, 11, 26, 29, 30, 32, 37, 38) 검출실험에 이용되었다. 특히 TaqMan system은 침전물, 해수 등의 환경시료 뿐만 아니라 해산물에 존재하는 병원성 *V. vulnificus*를 검출하는데 다른 방법보다 더 적합하기 때문에(39) 굴(oyster)과 같은 가공하지 않은 신선한 해산물에서 비브리오를 신속하게 검출함으로써 오염된 해산물의 유통을 방지할 수 있을 것이다(26). 본 연구를 통해 밝혀진 real-time PCR의 검출 한계는 기존의 알려진 결과 즉, 굴 1 g 당 *V. vulnificus* genomic DNA 1 pg (1×10^2 cells)이고 5시간 선택 배양하면 세포 하나를 검출할 수 있다는 보고(32)와 10^3 세포 이상 존재할 경우 인간에게 감염을 유발한다(17)는 보고를 고려할 때 의미 있는 결과라고 판단된다.

본 실험을 통해 PCR을 이용한 검출방법은 35°C에서 8시간의 증균과정을 거칠 경우 g 당 1~10 개의 cell이 존재해도 검출할 수 있음을 보여주었으며, PCR법은 간편성을 고려할 때 *V. vulnificus* 검출의 유용한 방법으로 사료된다. 그러나 동일한 수준으로 검출하기위해 전처리 과정을 포함하여 PCR/Southern hybridization 방법은 약 36시간이 소요되고 부가적 실험이 요구되는 단점이 있다. Real-time PCR 방법은 고가의 장비가 요구되는 면이 있으나 5~6시간이 소요되므로 신속한 검출에 유리하고

정량적 분석까지 가능한 것으로 판단된다. 실제로 TaqMan PCR assay는 퇴적물, 해수 등 환경시료 뿐만 아니라 해산물에 존재하는 병원성 *V. vulnificus*를 검출하는데 적합하기 때문에 활용이 기대된다.

감사의 말

본 연구는 해양수산부의 해양·극한 생물 분자유전체연구단 사업과 한국해양연구원 기본사업(PE91900)의 지원을 받았다.

참고문헌

- 고정운, 박석돈. 1987. 각종 배지에서 *Vibrio vulnificus*의 배양상의 특성. 대한피부과학회지 25, 193-198.
- 국립보건원. 2002. 법정전염병 실험실 진단지침 (Guidelines for Laboratory Diagnosis of Statutory Communicable Diseases).
- 박석돈. 1993. *V. vulnificus* 감염증. 대한피부과학회지 31, 289-304.
- 박석돈, 손동선, 고정운. 1986. 수소이온 농도가 *V. vulnificus* 성장에 미치는 영향. 대한 피부과학회지 24, 354-357.
- 이정현, 신현희, 이홍금, 권개경, 김상진. 1998. 해양퇴적물의 핵산추출물에서 humic substances의 효율적인 제거 방법. 한국미생물학회지 34, 132-136.
- Bassler, H.A., S.J.A. Flood, K.J. Livak, J. Marmaro, R. Knorr, and C.A. Batt. 1995. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3724-3728.
- Berthelet, M., L.G. Whyte, and C.W. Greer. 1996. Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns. *FEMS Microbiol. Lett.* 138, 17-22.
- Brasher, C.W., A. DePaola, D.D. Jones, and A.K. Bej. 1998. Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR. *Curr. Microbiol.* 37, 101-107.
- Brauns, L.A., M.C. Hudson, and J.D. Oliver. 1991. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *V. vulnificus* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2651-2655.
- Campbell, M.S. and A.C. Wright. 2003. Real-time PCR analysis of *V. vulnificus* from oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7137-7144.
- Chen, S., A. Yee, M. Griffiths, C. Larkin, C.T. Yamashiro, R. Behari, C. Paszko-Kolva, K. Rahn, and S.A. De Grandis. 1997. The evaluation of fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *Int. Food Microbiol.* 35, 239-250.
- Chung, M.S., B.M. Rim, T.B. Uhm, and M.K. Park. 1997. A detection method for *V. vulnificus* using monoclonal antibodies. *J. Microbiol.* 35, 87-91.
- 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 *V. vulnificus*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19, 127-132.
- DePaola, A., G.M. Capers, and D. Alexander. 1994. Densities of *V. vulnificus* in the intestines of fish from the U.S. Gulf coast. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 984-988.
- Farmer, J.J. III. 1979. *Vibrio (Benecke) vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septicemia, and the sea. *Lancet* 2, 903.
- Gonzalez, S.F., M.J. Krug, M.E. Nielsen, Y. Santos, and D.R. Call. 2004. Simultaneous detection of marine fish pathogens by using multiplex PCR and a DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1414-1419.
- Jackson, J.K., R.L. Murphree, and M.L. Tamplin. 1997. Evidence that mortality from *V. vulnificus* infection results from single strains among heterogeneous populations in shellfish. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2098-2101.
- Jeong, K.C., H.S. Jeong, J.H. Rhee, S.E. Lee, S.S. Chung, A.M. Starks, G.M. Escudero, P.A. Gulig, and S.H. Choi. 2000. Construction and phenotypic evaluation of a *Vibrio vulnificus* *vvpE* mutant for elastolytic protease. *Infect. Immun.* 68, 5096-5106.
- Koetsier, P.A., J. Schorr, and W. Doerfler. 1993. A rapid optimized protocol for downward alkaline Southern blotting of DNA. *Biotechniques* 15, 260-262.
- Kuske, C.R., K.L. Banton, D.L. Adorada, P.C. Stark, K.K. Hill, and P.J. Jackson. 1998. Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2463-2472.
- Lee, J.H., K.H. Lee, and S.H. Choi. 2001. Enumeration of *V. vulnificus* in natural samples by colony blot hybridization. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 302-309.
- Lee, J.Y. and S.H. Choi. 1995. Rapid and direct detection of *V. vulnificus* in small octopus (*Octopus variabilis*) using polymerase chain reaction. *J. Microbiol. Biotechnol.* 5, 181-187.
- Lee, S.E., S.Y. Kim, S.J. Kim, H.S. Kim, J.H. Shin, S.H. Choi, S.S. Chung, and J.H. Rhee. 1998. Direct identification of *V. vulnificus* in clinical specimens by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2887-2892.
- Lee, Y.K., H.W. Kim, C.L. Liu, and H.K. Lee. 2003. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. *J. Microbiol. Methods* 52, 245-250.
- Linder, K. and J.D. Oliver. 1989. Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but nonculturable state of *V. vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2837-2842.
- Lyon, W.J. 2001. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, Non-O1, and Non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4685-4693.
- Marco-Noales, E., E.G. Biosca, and C. Amaro. 1999. Effects of salinity and temperature on long-term survival of the eel pathogen *V. vulnificus* biotype 2 (serovar E). *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1117-1126.
- Montanari, M.P., C. Pruzzo, L. Pane, and R.R. Colwell. 1999. *Vibrios* associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 241-247.
- Nogva, H.K., K. Rudi, K. Naterstad, A. Holck, and D. Lillehaug. 2000. Application of 5'-nuclease PCR assay for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4266-4271.
- Norton, D.-M., and C.A. Batt. 1999. Detection of viable *Listeria monocytogenes* with a 5' nuclease PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2122-2127.
- Oliver, J.D., R.A. Warner, and D.R. Cleland. 1982. Distribution and ecology of *V. vulnificus* and other lactose-fermenting marine *Vibrios* in coastal waters of the Southeastern United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1404-1414.
- Panicker, G., M.L. Myers, and A.K. Bej. 2004. Rapid detection of *V. vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time

- PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 498-507.
33. Stavric, S. and B. Buchanan. 1995. Laboratory procedure MFLP-73 (The isolation and enumeration of *Vibrio vulnificus* from fish and seafoods). Research Division, Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate, Health Canada.
 34. Tamplin, M.L., A.L. Martin, A.D. Ruple, D.W. Cook, and C.W. Kasper. 1991. Enzyme immunoassay for identification of *V. vulnificus* in seawater, sediment, and oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1235-1240.
 35. Tsai, Y.L. and B.H. Olson. 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1070-1074.
 36. Tsai, Y.L. and B.H. Olson. 1992a. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 754-757.
 37. Tsai, Y.L. and B.H. Olson. 1992b. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2292-2295.
 38. Vishnubhatla, A., D.Y.C. Fung, R.D. Oberst, M.P. Hays, T.G. Nagaraja, and S.J.A. Flood. 2000. Rapid 5-nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4131-4135.
 39. Wang, H.Y. and G-H. Lee. 2003. Rapid identification of *V. vulnificus* in seawater by real-time quantitative TaqMan PCR. *J. Microbiol.* 41, 320-326.
 40. Weichart, D. and S. Kjelleberg. 1996. Stress resistance and recovery potential of culturable and viable but nonculturable cells of *V. vulnificus*. *Microbiology* 142, 845-853.
 41. Weichart, D., D. McDougald, D. Jacobs, and S. Kjelleberg. 1997. *In situ* analysis of nucleic acids in cold-induced nonculturable *V. vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2754-2758.
 42. Wilson, I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741-3751.
 43. Yang, H.C., S.S. Hong, K.H. Kim, S.H. Choi, and H.J. Chung. 1999. Distribution of *V. vulnificus* in Chonnam coastal area. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 70-74.

(Received June 28, 2005/Accepted August 11, 2005)

ABSTRACT: Rapid and Specific Detection of Virulent *V. vulnificus* in Tidal Flat Sediments

Ki-Deuk Byun¹, Jung-Hyun Lee*, Kye Joon Lee¹, and Sang-Jin Kim (Marine Biotechnology Center, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan P.O. Box 29, Seoul 425-600, Korea, ¹School of Biological Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Vibrio vulnificus, one of the marine bacterial pathogens causing septicemia, was detected using molecular methods, namely, PCR and/or Southern hybridization, and real-time PCR. Extracted and purified total DNAs by using commercial kits were used as templates for PCR. Multiplex-PCR was conducted by employing three sets of primers for the genes, hemolysin (*vhA*), phosphomannomutase (*pmm*), and metalloprotease (*vvpE*), for *V. vulnificus* virulence. The presence of DMSO (5%) and BSA (0.1%) in PCR reaction mixture improved a detection efficiency by higher PCR band intensities. TaqMan real-time PCR was carried out by using gene segment of *vhA* as a target. Detection limit of PCR/Southern hybridization without enrichments was to be around 10² cells g⁻¹ of sample. However, those three methods using the enrichment at 35°C in APW showed high sensitivity (2~10 cells g⁻¹ of sediments). Highly sensitive detection of *V. vulnificus* by real-time PCR was achieved within 5~6 hr, whereas the detection by PCR/Southern hybridization required about 36 hr. Thus, it was evident that real-time PCR is the most rapid and efficient method for detecting *V. vulnificus* in tidal flat sediments.