

碩士學位論文

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



濟州大學校大學院

海洋生物工學科

姜賢實

2002年 12月

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

指導教授 李 濟 熙

姜 賢 實

이 論文을 理學碩士 論文으로 提出함



姜賢實의 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 송 춘 복 (인)

委 員 허 문 수 (인)

委 員 이 제 희 (인)

濟州大學校 大學院


2002年 12月

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

Hyun-Sil Kang

(Supervised by professor Jehoo Lee)

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



Department of Marine Biotechnology
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2002. 12.

목 차

Abstract	i
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	
1. <i>Vibrio fluvialis</i> KCTC 2473의 genomic DNA 분리	3
2. ISR 증폭을 위한 oligonucleotide 제작 및 PCR 반응	3
3. PCR 반응 산물의 cloning	4
4. ISR 분류를 위한 plasmid DNA 제한효소반응 및 sequencing	6
5. ISR sequence data 분석	6
6. <i>Vibrio fluvialis</i> 검출을 위한 PCR 반응	6
III. 결 과	
1. 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 PCR product 분석	9
2. ISR 염기서열 분석	12
3. <i>V. fluvialis</i> 검출을 위한 oligonucleotide 제작 및 detection PCR 반응	16
IV. 고 찰	24
V. 요 약	27
VI. 참 고 문 헌	28
감사의 글	32

Abstract

Vibrio fluvialis is a series of marine bacteria and associated with outbreaks of diarrheal disease in human due to consumption of raw or improperly cooked seafood. However, there is also *V. fluvialis* which is potentially pathogenic to aquatic animals. In the above view, many researchers had attempted to develop species-specific primers for the rapid detection of these organism by PCR (Polymerase Chain Reaction).

We have examined the 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR) and PCR amplified, cloned into plasmid vector and then sequenced. As a result of ISR nucleotide sequence analysis, total of 6 clones were isolated depending on the size. The clones were different in both the number and the composition of the tRNA genes, and were designated ISR-A, ISR-E, ISR-E1, ISR-IA, ISR-EKV, ISR-EKAV. ISR-EKAV contains tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Ala}-tRNA^{Val}; ISR-EKV, tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Val}; ISR-IA, tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala}; ISR-A, tRNA^{Ala}; ISR-E and E1, tRNA^{Glu} clusters.

The ISR-EKV was showed minor type out of the six ISR types. Multiple alignment of representative sequences of these ISR-EKV and other *Vibrios* showed a very limited homology. These regions were used to design *V. fluvialis* species-specific primers for PCR. The specificity of the primers were examined using genomic DNA of other *Vibrios* as templates for PCR reaction. The result showed that PCR method can be used to detect *Vibrio fluvialis* among *Vibrio sp.* in a single PCR reaction.

I. 서 론

비브리오속의 호염성 그람음성균의 하나인 *Vibrio fluvialis*는 Group F Vibrio 또는 Group EF-6로 불리던 해양성 세균으로 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) agar에서 sucrose를 분해하여 황색의 콜로니를 생성하며, NaCl이 없는 조건하에서는 성장을 하지 않는 특징을 갖고 있다 (Huq *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1981; 강재승 등, 1991; Lee *et al.*, 1998). 또한, *Aeromonas*와 유사한 생화학적 성상을 갖고 있어 NaCl, Vibriocidal agent O/129, G+C 함량에 따라 구분되며, 2가지 생물학적형 (biogroup I, II)을 갖고 있다 (강재승 등, 1991; 이해정 등, 1998).

하천 및 연안의 갯벌, 플랑크톤, 어패류에 부착하여 생활하는 *V. fluvialis*는 어패류에서 가끔 분리되고 있으나, 오염된 어패류의 생식을 통한 급성 위장관염을 일으키고 있음이 특이할 만한 점이다 (이해정 등, 1998). 감염증상은 콜레라와 유사하여 설사, 복통, 구토 또는 심한 탈수 증상을 보이며, 환자의 대부분이 5세이하의 소아에서 일어나고 있음이 특이적이다 (Hickman-Brenner *et al.*, 1984; Kolb *et al.*, 1997). 위장관염이 일어나는 기작은 정확히 알려져 있지 않으나, 이열성 독소, 독성인자 (Virulence factor), 배양 배지에 따른 heat-labile enterotoxin과 특정 세포주내 cytotoxin 생성이 확인되어 이들과 연관되었다고 보고되었다 (Lockwood *et al.*, 1982; Nishibuchi and Seidler., 1983; Wall *et al.*, 1984; Rahim and Aziz., 1996; Kim *et al.*, 2001).

자연환경에 존재하는 *V. fluvialis*는 질병 전파의 잠재성을 갖고 있어 이를 검출하기 위한 선택배지와 lipopolysaccharide 조성에 따른 antigen을 사용하여 환경종과 임상종의 동정에 사용하고 있다 (Nishibuchi *et al.*, 1983; Rahman *et al.*, 1992; Kondo *et al.*, 2000). 이와 같이, 자연환경과 임상에 존재하는 *Vibrio*의 동정을 위해 commercial kit을 사용하고 있으나 동정결과의 부정확성, 종의 생화학 및 계통발생학적 다양성이 확인되어 동정에 어려움이 있다 (Alsina and Blanch., 1994). 이런 단점을 극복하기 위해 현재는 분자생물학적 방법의 하나인 DNA에 기초한 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 응용한 RAPD (Arias *et al.*, 1998), TDH (Thermostable Direct Hemolysin)와 TRH (Thermostable Related Hemolysin) gene cloning (Bej *et al.*,

1999)을 세균 동정에 이용하고 있다. 또한, 최근에는 ribosomal RNA operon의 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 서열 및 길이 다양성에 기초한 세균의 동정, 검출 및 동종간 subspecies의 설명에 이용되고 있다 (Jensen *et al.*, 1993; Tyler *et al.*, 1995; Luz *et al.*, 1998; Hinrikson *et al.*, 1999).

Intergenic spacer region (ISR)은 대부분 원핵생물의 ribosomal RNA operon (*rrn*)의 구성원인 16S rRNA gene과 23S rRNA gene 사이에 위치하여 non coding region과 tRNA coding gene을 포함하고 있다. 많은 박테리아에서 *rrn*의 수는 1개에서 11개까지 다양한데, 이는 rRNA operon의 chromosome내에 multiple copy로 존재하기 때문이다 (Garcia-martinez *et al.*, 1996; Gurtler and Stanisich., 1996). 기존의 16S rRNA는 species, genera의 동정을 위한 가장 표준화된 방법에 이용되고 있으나, 염기서열의 보존성으로 인해 분석에 한계가 있다. 이런 특징 때문에 현재 많은 박테리아에서 동정을 위한 분자생물학적 방법으로 ISR 염기서열 분석이 이루어지고 있다. ISR 분석의 예로, *Escherichia coli* K-12는 7개의 ribosomal RNA operon (Garcia-Martinez *et al.*, 1996; Anton *et al.*, 1998), *Aeromonas*는 6개에서 8개의 operons (Gladys and Martin., 1992), *Bacillus subtilis*는 10개의 operons을 갖고 있다 (Vold., 1985).

최근에 비브리오종내 ISR에 관한 연구는 *V. parahaemolyticus*에서 6개의 ISR (Maeda *et al.*, 2000), *V. cholerae*와 *V. mimicus*에서 4개의 ISR type이 확인되었다 (Chun *et al.*, 1999). 그러나, *Vibrio fluvialis* KCTC 2473의 intergenic spacer region에 대한 분석이 이루어지지 않아 본 연구에서는 ribosomal RNA operons의 rRNA gene 사이에 위치하는 intergenic spacer region의 다양한 구성을 확인하고, 이에 기초한 species-specific 검출을 위한 oligonucleotide을 제작하여 환경과 임상사이에서 *V. fluvialis* 동정을 위한 molecular marker로 이용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. *Vibrio fluvialis* KCTC 2473의 genomic DNA 분리

Vibrio fluvialis KCTC 2473을 유전자 은행 (Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받아 Marine Broth 2216 (Difco, USA) 5 ml에 bacteria pellet을 접종하고 37°C, 250 rpm으로 밤새 배양하였다. 밤새 배양된 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮겨 15,000 rpm에서 1분간 원심분리후 상등액을 제거하여 bacteria pellet을 수집하고, 나머지는 40% glycerol을 첨가하여 -70°C에 보관하였다. 수집된 bacteria pellets은 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany)의 protocol에 따라 *Vibrio fluvialis*의 genomic DNA을 분리하였다. 분리된 DNA는 AE buffer (QIAGEN, Germany)에 부유시켜 PCR 반응에 사용하였다. DNA의 농도는 Unicam UV/VIS Spectrophotometer (Helios β, Unicam Ltd, United Kingdom)을 사용하여 파장 260 nm에서 측정하였다.



2. ISR 증폭을 위한 oligonucleotide 제작 및 PCR 반응

V. fluvialis chromosome의 16S rRNA gene과 23S rRNA gene사이에 위치하는 intergenic spacer region (ISR) 증폭을 위해 GenBank에 등록되어 있는 *Vibrio*의 16S rRNA gene과 23S rRNA gene을 이용하여 multiple alignment을 수행하였다. 그 중 가장 높게 보존된 부위의 16S rRNA gene의 3' 말단 일부 서열과 23S rRNA gene의 5' 말단의 일부 서열을 PCR 반응에 사용하기 위해 *Vibrio* 16SF와 *Vibrio* 23SR을 디자인하여 (주)바이오니아에 의뢰하여 제작하였다. 자세한 oligonucleotides의 서열은 Table 1에 나타내었다.

PCR 반응은 총 부피 50 μ l에 genomic DNA, 1 μ M forward와 reverse primer (*Vibrio* 16SF, *Vibrio* 23SR), 10 mM dNTPs (deoxynucleotide triphosphate), 10 \times cloned *pfu* buffer, 0.5 unit의 cloned *pfu* DNA polymerase (Stratagene, USA)을 첨가하여 멸균된 증류수를 넣어 총 부피를 맞추고, 증발을 막기 위해 mineral oil을 넣었다. PCR 반응은 DNA minicycler PTC-150 (MJ research, USA)을 사용하여 수행하였다.

Table 1.

Primers used for intergenic spacer region PCR amplification and detection PCR

Primer Name	Gene Position	Sequence
Vibrio 16SF ^a	16S 5' end	CCG TCA CAC CAT GGG AGT GG
Vibrio 23SR ^a	23S 3' end	ACT GCC AAG GCA TCC ACC GTG
SK ^b		CGC TCT AGA ACT AGT GGA TC
T7 ^b		GTA ATA CGA CTA CCT ATA GGG C
FluF ^c	ISR-EKV	TCC TGC CAC AGG AAA TAC AA
FluF1 ^c	ISR-EKV	TTC TTT CGA TAG AAA GTG GC
FluR1 ^c	ISR-EKV	GCC ACT TTC TAT CGA AAG AA

a : primers designed for ISR amplification (F; forward and R; reverse)

b : sequencing primers designed for the pBluescript phagemid vector

c : primers designed for the *V. fluvialis* detection

PCR 반응조건은 먼저 94°C에서 2 분 denaturation 후, 30회 주기, 94°C에서 45 초 denaturation, 55°C에서 45 초 annealing, 72°C에서 45 초 extension 하여 마지막 72°C에서 10 분간 extension을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물의 크기는 1% agarose gel 전기영동을 하였으며, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide로 염색하여 100 bp DNA ladder (Gibco BRL, USA)를 control로 사용하여 확인하였다.

3. PCR 반응 산물의 cloning

PCR product을 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) protocol에 따라 증폭된 DNA을 분리하였다. 분리된 PCR product을 클로닝하기 위하여 *E. coli* (NovaBlue)와 pBluescript II SK(-) (Stratagene, USA)을 숙주와 벡터로 사용하였다.

pBluescript II SK(-)를 제한효소 *HincII* (Amersham Pharmacia, United Kingdom)로 37°C water bath에서 2 시간 동안 반응시켰다. 이 절단된 벡터를 1% agarose gel에 전기영동하여 얇게 잘라내어 Accu PrepTM Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 분리하고, 분리된 벡터의 농도를 agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

Cloning을 위한 ligation 반응은 *HincII*로 잘린 pBS II SK(-) vector, PCR product, 10× T4 DNA ligase buffer, T4 DNA ligase (TAKARA, Japan)을 혼합하여 16°C에서 24 시간 반응하였다. 이 반응물을 competent cell *Nova Blue*에 혼합하여 얼음에서 1 시간 방치후, 42°C에서 90 초간 heat shock을 하고 LB broth을 첨가하여 37°C에서 30 분간 regeneration하였다. 이것을 IPTG, X-gal, Ampicillin이 첨가된 LB agar plate에 도말하여 37°C에서 하루동안 배양하였다. 백색으로 자란 colony을 선택하여 LB-ampicillin broth 5 ml에 접종하여 37°C, 250 rpm에서 진탕 배양하였다. 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮겨 15,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상등액을 버리고 bacteria pellet을 수집하였다. 수집된 cell pellet을 Accu PrepTM Plasmid Extraction kit (Bioneer, Korea)의 protocol에 따라 plasmid DNA을 분리하였다.

4. ISR 분류를 위한 plasmid DNA 제한효소반응 및 sequencing

분리된 plasmid DNA의 insert 크기를 확인하기 위하여 제한효소 반응을 하였다. plasmid DNA, 10× L buffer, *Kpn*I, *Hind*III (Amersham Pharmacia, United Kingdom)을 첨가하고 총 부피 20 μ l가 되도록 2차 증류수를 첨가하여 37°C에서 2 시간 동안 double digestion을 수행하였다. 2 시간 반응후, 얼음에서 제한효소의 반응을 억제하여 1% agarose gel 전기영동을 하였다. Insert의 크기를 확인하기 위해 100 bp DNA ladder (Gibco BRL, USA)을 marker로 사용하여 ethidium bromide 염색하여 확인하였다. insert의 크기에 따라 각 그룹으로 분류하여, 각 그룹에서 1개 또는 3개의 clones을 선택하여 DNA 염기서열 분석을 수행하였다.

Sequencing은 (주)마크로젠에 의뢰하였으며, DNA sequencing에 사용된 kit과 automated sequences는 각각 Dye Terminator Cycle Sequencing kit과 ABI 377 DNA sequencer을 사용하였다. 그리고, sequencing을 위한 primer는 pBluescript II SK(-) vector의 multiple cloning site의 5' 과 3' 말단의 T7과 SK primer를 사용하였다 (Table 1).



5. Data analysis

ISR의 nucleotide sequence 분석을 위하여 clustalW (version 1.71) program을 사용하여 multiple alignment을 하였으며, ISR의 유전적 구성은 tRNAscan-SE 1.21 program을 사용하여 확인하였다.

6. Detection PCR

ISR-EKV의 서열에 기초하여 *V. fluvialis*을 검출을 위한 oligonucleotide을 제작하여 Table 1에 나타내었다. Oligonucleotide의 종 특이성을 확인하기 위해 유전자는 행에서 19종의 비브리오 균주를 분양받아 (Table 2) Marine Broth 2216 (Difco, USA)과 TSA Broth 5 ml에 pellet을 접종하여 30°C 또는 35°C, 250 rpm으로 밤새 배

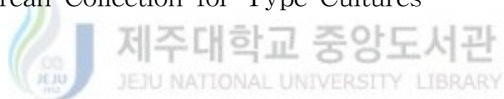
양하여 bacteria pellet을 수집하고 위의 1과 동일하게 genomic DNA을 분리하였다. 이 분리된 DNA 농도는 spectrophotometer을 사용하여 측정하고, 동일 농도의 DNA을 template로 하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응액은 총 25 μ l 반응에 genomic DNA, 10 \times PCR buffer, dNTP mixture, MgCl₂ (25 mM), primer pairs (forward, reverse), Taq DNA polymerase (Promega, USA)을 넣고 2차 증류수로 부피를 맞추었으며, 각각의 primer는 적절히 조합하여 사용하였다. 증폭을 위한 조건은 annealing 45 $^{\circ}$ C 45 초를 제외하고, ISR 증폭 조건과 동일하게 수행하였다. 증폭된 PCR product는 1.5% agarose gel 전기영동으로 증폭된 산물의 크기를 확인하기 위해 100 bp DNA ladder를 marker로 사용하였다.



Table 2. Reference strain used in ISR-targetted PCR reaction.

Number *	Species	Number *	Species
KCTC 2473	<i>V. fluvialis</i>	KCTC 2730	<i>V. proteolyticus</i>
KCTC 2714	<i>V. aestusrianus</i>	KCTC 2731	<i>V. furnissii</i>
KCTC 2715	<i>V. cholerae</i>	KCTC 2733	<i>V. cincinnatiensis</i>
KCTC 2716	<i>V. campbellii</i>	KCTC 2735	<i>V. mediterranei</i>
KCTC 2719	<i>V. gazogenes</i>	KCTC 2736	<i>V. metschnikovii</i>
KCTC 2720	<i>V. harveyii</i>	KCTC 2737	<i>V. mimicus</i>
KCTC 2721	<i>V. logei</i>	KCTC 2810	<i>V. cyclosites</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>

* KCTC: Korean Collection for Type Cultures



III. 결 과

1. 16S-23S rRNA intergenic spacer region의 PCR product 분석

*Vibrio fluvialis*의 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR) 분석을 위해 *Vibrio* 16SF와 *Vibrio* 23SR primer을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR에 의하여 증폭된 ISR amplicon의 band 크기와 양을 확인하기 위하여 agarose gel 전기영동을 수행하여 확인하였다. 그 결과, ISR amplicon은 600, 650, 700 bp을 포함하는 3개의 major band와 820 bp의 크기를 갖는 minor band가 증폭되었다 (Fig. 1). 이로써, *Vibrio fluvialis* chromosome내에 multiple ribosomal RNA (*rrn*) operons이 존재함을 확인하였다.

증폭된 ISR amplicons내 염기서열 구성을 확인하기 위해 PCR product을 vector에 클로닝하여 약 79개의 clone을 획득하였다. 이를 제한효소 *KpnI*과 *HindIII*로 처리 후, insert의 크기에 따라 6개의 그룹으로 분류하였다. 분류된 각 그룹에서 1개 또는 3개의 clones을 선택하여 vector내 SK, T7 primer을 이용하여 ISR nucleotides 분석을 수행하였다. 각 ISR clone의 서열내 5' 말단 16S rRNA와 3' 말단 23S rRNA 염기서열인 119 bp와 28 bp을 제외한 internal ISR nucleotide sequence에서 tRNA gene의 수와 형태, 염기서열의 크기, clone 수를 확인하여 Table 3에 나타내었다.

6개의 그룹에서 분석된 ISR amplicon의 spacer region의 크기는 423 bp에서 706 bp까지 다양한 크기의 범위를 갖으며, tRNA coding gene 수는 1개에서 4개까지 갖고 있다. 분석된 ISR amplicon내 tRNA gene 수와 형태에 따라 각각을 ISR type으로 명명하였으며, 총 6개의 다른 ISR type이 확인되었다.

가장 큰 ISR type은 844 bp을 갖는 ISR-EKAV로 4개의 tRNA gene인 glutamate, lysine, alanine과 valine을 갖고 있으며, 3개의 tRNA gene인 glutamate, lysine, valine을 갖고 있는 813 bp의 ISR-EKV, 두 개의 tRNA gene인 isoleucine, alanine을 갖는 ISR-IA, 하나의 tRNA gene인 glutamate 또는 alanine을 갖는 ISR-E, ISR-E1과 ISR-A을 확인하였다. 이들은 총 79개의 clones중 ISR-A, ISR-E, ISR-IA type에서 73개의 clone (26, 21, 26개를 포함)을 나머지 6 clone은 ISR-E1, ISR-EKV

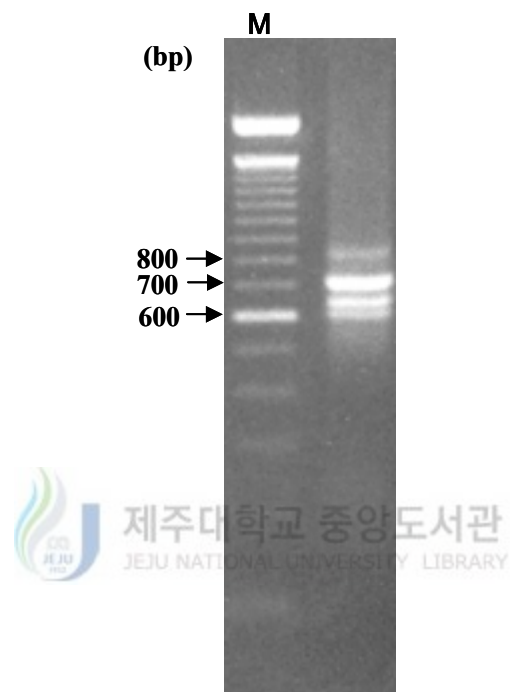


Fig. 1. Electrophoresis on 2% agarose gel of the *V. fluvialis* KCTC 2473 16S-23S intergenic spacer region PCR product. Lane M, molecular marker, 100bp ladder.

Table 3.

The size and tRNA composition of the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *V. fluvialis* KCTC 2473

Type	Size Spacer/ amplified fragment(bp)	Clones(n=79)	tRNA gene (anticodon)
ISR-A	430/568	26	Ala(GGC)
ISR-E1	423/561	1	Glu(UUC)
ISR-E	478/616	21	Glu(UUC)
ISR-IA	553/691	26	Ile(GAU)Ala(UGC)
ISR-EKV	675/813	4	Glu(UUC)Lys(UUU)Val (UAC)
ISR-EKAV	706/844	1	Glu(UUC)Lys(UUU)Ala(UGC)Val (UAC)

와 ISR-EKAV에서 분리되었다.

ISR-A, ISR-E와 ISR-IA는 *V. fluvialis* KCTC 2473에서 확인된 6개의 ISR type 중 430 bp에서 553 bp의 크기를 갖고 있으며, 다른 3개의 ISR type보다 clone의 수가 월등히 많았다. 이는 증폭된 ISR 산물중 3개의 major band의 크기에 해당한다 (Fig. 1) 또한, 본 연구에서는 처음으로 16S, 23S rRNA gene과 glutamate을 전달하는 tRNA coding gene을 ISR-E type과 비교시 염기서열이 동일하나 (100% homology), tRNA gene을 제외한 non-coding region의 염기서열에서 ISR-E와 달리 염기서열 차이가 높은 ISR type을 확인하였으며, 이를 ISR-E1 type으로 명명하였다. 3개 이상의 tRNA gene을 갖는 ISR에 관한 보고는 *V. cholerae*와 *V. mimicus*에서 ISR-EKV (Chun *et al.*, 1999), *V. parahaemolyticus*에서 ISR-EKV와 ISR-EKAV의 두가지 ISR이 확인되었다 (Yamaichi *et al.*, 2000). 이들의 연구결과에 일치하는 3개 이상의 tRNA gene을 갖는 *V. fluvialis*의 ISR-type은 ISR-EKV와 ISR-EKAV로 확인하였으며, 이들은 *V. parahaemolyticus*에서 보고된 바와 같이 작은 수의 clone에서 분리되었다.



2. ISR 염기서열 분석

V. fluvialis 16S-23S ISRs의 염기서열, 길이, tRNA gene 종류에 따른 ISR type을 Table 3에 나타내었다. ISR type에서 5개의 다른 tRNA gene의 일차구조를 확인하였고, 각각의 ISR은 single rrn operons으로 추정된다. 정확한 operons의 수는 확인되지 않았으나, 총 6개의 다른 ISRs 뉴클레오타이드 서열이 확인됨으로 적어도 6개 이상의 rrn operons이 존재한다고 생각된다.

중 특이적 primer을 제작하기 위한 알맞은 표적 부위를 확인하기 위하여 밝혀진 ISRs 염기서열을 multiple alignment을 수행하여 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과, 각 ISR type에서 여러개의 높은 보존성을 갖는 부위가 확인되었다. 첫째로, ISR-E1 type을 제외한 5개의 ISR type에서 ISR의 처음과 마지막 40 bp와 184 bp가 거의 동일한 conserved region이 확인되었다. 이 영역은 원핵생물에서 16S와 23S rRNA processing을 위해 기능적으로 중요한 영역으로 보고되고 있다 (Srivastava and Schlessinger., 1990). 두번째로, ISRs alignment에서 염기서열과 길이 다형성이

16S rRNA

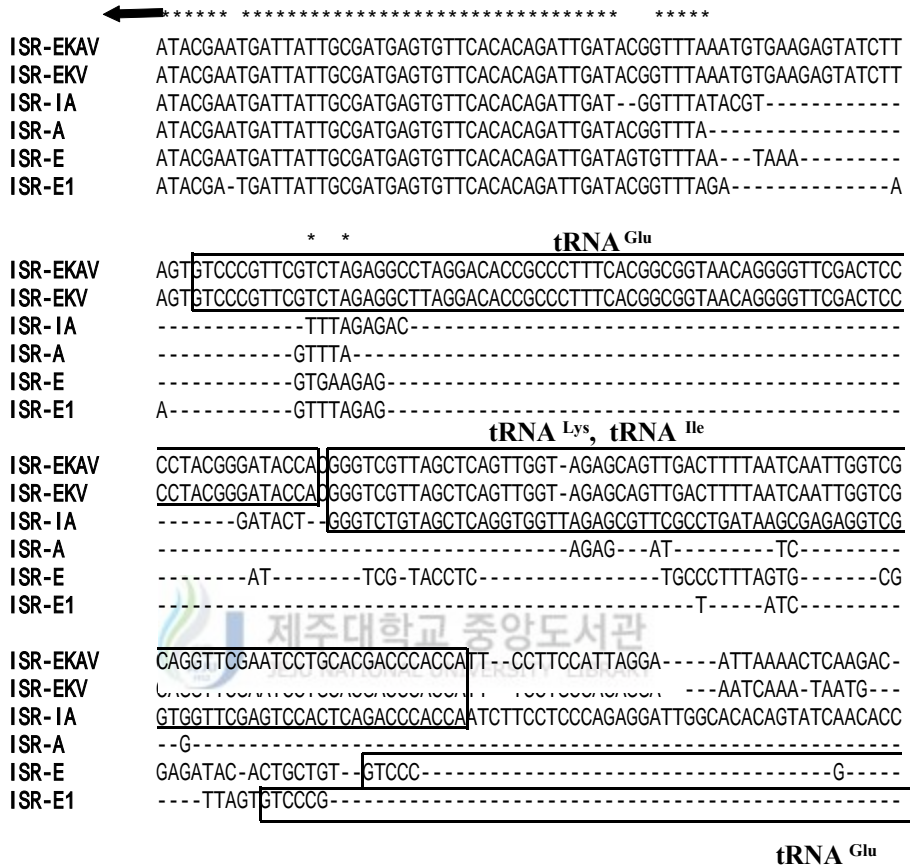


Fig. 2. (Continued)

```

* *      **      *tRNAAla, tRNAVal, tRNAAla      **      ***** *
ISR-EKAV  ---TGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGACAGCAGGAGGTGACGAGTTCGATCC
ISR-EKV   ---TGGGCGATTAGCTCAGTTGGGAGAGCACCTGCCTTACAAGCAGGGGGTCACTGGTTCGAACC
ISR-IA    TGATGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCCTTGACAGCAGGAGGTGACGAGTTCGATCC
ISR-A     ---TGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCATGGCATGCAGGAGGTGACGGGTTCGATCC
ISR-E     ---TTCGTCTAGAGGCC---TAGGACACCGCC---CTTTCACGGCGGTAA-CAGGGGTTCGACTC
ISR-E1    ---TTCGTCTAGAGGCC---TAGGACACCGCC---CTTTCACGGCGGTAA-CAGGGGTTCGACTC

*          **** * * * *          *          *
ISR-EKAV  TGCTTAGCTCCACCA|TCTTGAATAAT|GGGCGATTAGCTCAGTTGGGAGAGCACCTGCCTTACAA
ISR-EKV   CGGTATCGCCACCA|CTCTAAGAATTT----TTGGATAGGATAGCCAAACCACCTCAGTAAAA
ISR-IA    TGCTTAGCTCCACCA-TCTTTAAGCA-----C-ATTTGCTTAA--
ISR-A     CGCTTAGCTCCACCA-TCTTTAAG-----CACATTTATTAA--
ISR-E     CCCTACGGGATACCA-TCTTTAAGGTT-----TTACCTTTA--
ISR-E1    CCCTACGGGATACCA-TCTTTAAG-----CATT- TTACGA

tRNALys      *** * * * *
ISR-EKAV  GCAGGGGGTCACTGGTTCGAACCCGGTATCGCCACCA|CTTTAAGCACATTTGCTTAAAGTGTC
ISR-EKV   C--GGGTGT----GGTTCGGATTTT-TGACGCTGAGAATCCTTAGAAAGTGTTCCTTTTTCGA--T-
ISR-IA    -----GT-----GTTT-----TTAAACATGGTT--TTCAGT----
ISR-A     -----GT-----GTTT-----TTAAACATGGTT--TTCAGT----
ISR-E     -----GAATC-----T-----TTAAAAATGGTTTCTTTCTGA-TA
ISR-E1    -----GTGTG-----TTTAAAAATGGTT--T--CGA----

*          *          boxA      ***** * * * *
ISR-EKAV  TTAACATGGTTTTATCAGAAAATC|TGCTCTTAAACA|TTTGGAAAGCTGACAAAACAACAATTT
ISR-EKV   -AGAAAGTGG---CATA-----GCTCTTAAACA|TTTGGAAAGCTGACAAAACAACAATTT
ISR-IA    -AGAAAATC-----|-----GCTCTTAAACA|TTTGGAAAGCTGACAAAACAATCTTTT
ISR-A     -AGAAAATC-----|-----GCTCTTAAACA|TTTGGAAAGCTGACAAAACAATCTTTT
ISR-E     CAGAAAATGA---ATCT-----TGCTCTTAAACA|TTTGGAAAGCTGACAAAACAACAATTT
ISR-E1    -AAGAAAATC-----T-----GCTCTTAAACA|TTTGGAAAGCTGACAAAACAACAATTT

```

Fig. 2. (Continued)

```

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *
ISR-EKAV  ATTG—TTGTTTGTAAGTTCTCAATGTATTCTGAATGGAATACACCAACAACACATTCAAGT
ISR-EKV   ATTG—TTGTTTGTAAGTTCTCAATGTATTCTGAATGGAATACACCAACAACACATTCAAGT
ISR-IA    AAAAGATTGTTTGTAAGTTCTCAATGTATTCTTAACGGAATACACCAACAACACATTCAAGT
ISR-A     AAAAGATTGTTTGTAAGTTCTCAATGTATTCTTAACGGAATACACCAACAACACATTCAAGT
ISR-E     ATTG—TTGTTTGTAAGTTCTCAATGTATTCTGAATGGAATACACCAACAACACATTCAAGT
ISR-E1    ATTG—TTGTTTGTAAGTTCTCAATGTTTGTCTTTAAGACAACACTAACAAACACATTCAAGT

** *****          *          *          *          *          *          *          *          *          *
ISR-EKAV  GTGCTTGGTATCGAAGCTTACTGATTGAGTAAAGTCTTC-AAATTGAGTCCGGCAAAATCAG---T
ISR-EKV   GTGCTTGGTATCGAAGCTTACTGTTTCAGTAAGTCTTC-AAATTGAGTCCGGCAAAATCAG---T
ISR-IA    GTGCTTGGTATCGAAGCTTACTGTTTCAGTAAGTCTTC-AAATTGAGTCCGGCAAAATCAG---T
ISR-A     GTGCTTGGTATCGAAGCTTACTGTTTCAGTAAGTCTTC-AAATTGAGTCCGGCAAAATCAG---T
ISR-E     GTGCTTGGTATCGAAGCTTACTGATTGAGTAAAGTCTTC-AAATTGAGTCCGGCAAAATCAG---T
ISR-E1    GTTCTTGG----GAAGGTCACT-TTATAGTGACTATTGAAATTGAGTCCGGCAAAATCAACGCT

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *
ISR-EKAV  CACACACTCATGAAAAATAAATGTGTG-ACACCTAGGTTGTTTAAACAGCAACCCGAAACTCCTTC
ISR-EKV   CACACACTCATGAAAAATAAATGTGTG-ACACCTAGGTTGTTTAAACAACAACCCGAAACTCCTTC
ISR-IA    CACACACTCATGAAAAATAAATGTGTG-ACACCTAGGTTGTTTAAACAACAACCCGAAACTCCTTC
ISR-A     CACACACTCATGAAAAATAAATGTGTG-ACACCTAGGTTGTTTAAACAACAACCCGAAACTCCTTC
ISR-E     CACACACTCATGAAAAATAAATGTGTG-ACACCTAGGTTGTTTAAACAACAACCCGAAACTCCTTC
ISR-E1    ATCTCGCTCATTCAAATAATGAGATAGCAAACCTTTGGTTGTTTAAACAAGACCT-----TTG
                                                                                                     23S rRNA

```

Fig. 2. Multiple alignment of the 16S–23S rRNA ISR sequences of *V. fluvialis*. The potential tRNA sequences for Glutamate, Lysine, Alanine, Valine, Isoleucine and BoxA element were showed as boxes.

spacers의 중심부에서 나타나고 있다. 이는 6개의 ISR type내 다양한 tRNA gene sequence의 분포에 의한 것이다. 마지막으로 원핵생물의 *rrn* operon에서 rRNA 전사 시 antitermination에 관여하는 BoxA element를 모든 ISR의 마지막 tRNA coding gene에 인접한 non coding region에서 확인하였다. ISR-EKV의 경우 5' -AGCTCTTAACA-3'로 *V. parahaemolyticus*에서 보고된 서열과 동일하며, 나머지 5개의 ISR type은 *E. coli*에서 보고된 5' -TGCTCTTAACA-3'을 갖고 있다.

6개의 ISR type에서 tRNA gene의 일차구조를 확인하였으며, 이들 염기서열간 상동성을 비교하였다. ISR-EKAV와 ISR-EKV사이의 lysine (UUU : anticodon)과 valine (UAC : anticodon)을 암호화하는 tRNA gene의 nucleotide간 차이는 확인되지 않았다 (100% identity). Glutamate을 전달하는 tRNA gene을 갖는 ISR-E, ISR-EKV, ISR-EKAV 사이에서 염기서열 차이는 없었으며, ISR-E1과의 비교시 1개의 nucleotide 차이를 확인하였다. ISR-A의 alanine (GGC : anticodon)을 전달하는 tRNA gene과 ISR-IA, IAR-EKAV에 존재하는 alanine (UGC : anticodon) tRNA gene사이에서는 anticodon을 포함하여 5개의 nucleotide (93.4%) 차이를 확인하였다. 따라서, tRNA gene은 모든 ISR type에서 높은 보존성을 보이며, 이들 서열은 rRNA 이차구조형성에 중요한 역할을 할 것이다.

3. *V. fluvialis* 검출을 위한 oligonucleotide 제작 및 detection PCR 반응

Species-specific primer을 제작하기 위한 알맞은 표적 부위를 찾기 위하여 GenBank에 등록되어 있는 *V. cholerae* (accession number AF114728, AF114721, AF114738, AF114743), *V. mimicus* (accession number AF114747), *V. parahaemolyticus* (accession number AB041849)의 ISR-EKV nucleotides 서열을 참고하여 *V. fluvialis* ISR-EKV type과의 multiple alignment을 수행하여 Fig. 3에 나타내었다. 이들은 3개의 아미노산인 glutamate, lysine, valine을 위한 염기서열은 대부분이 일치하며, 실제적인 ISR sequences에서 genetic variation region은 tRNA coding gene의 인접부위의 염기서열에서 확인되었다. 따라서, *V. fluvialis*을 검출하기 위한 oligonucleotide는 ISR-EKV type의 tRNA coding gene을 제외한 non coding region내 가변부위를 표적으로 하여 제작하였다. 각각 두 개의 forward primer인 FluF와 FluF1, reverse primer

인 FluR1 (Table 1)을 디자인하여 GenBank의 BLAST program을 이용하여 nucleotide homology을 확인하였으며, 그 결과 이들 염기서열은 *V. fluvialis*에 특이적인 것으로 나타났다.

Fig. 3에 나타낸 바와 같이 3개의 다양성이 높은 가변부위 (VF1-3)가 확인되어 이들 부위를 표적으로 하여 primer 제작에 이용하였다. 제작된 primer의 특이성은 19종의 *Vibrio* 균주를 유전자 은행 (Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받아 genomic DNA을 분리하여 PCR 반응에 사용하였다. 각각의 적절한 primer 조합에 따라 annealing 온도를 제외하고, ISR 증폭 조건과 동일하게 실시하였다. 각 primer 조합에 의한 산물의 크기는 300 bp (Fig. 4A; FluF, *Vibrio* 23SR), 500 bp (Fig. 4B; FluF1, *Vibrio* 23SR), 210 bp (Fig. 4C; FluF, FluR1)로 예측되며, 그 크기는 agarose gel 전기영동을 수행하여 확인하였다. 그 결과, 두 개의 forward primer을 이용한 PCR 산물은 *V. fluvialis*에 특이적인 single band가 증폭되었으나, 다른 비브리오종에서 예측 산물 크기와 유사한 band 또는 여러 크기의 band들이 증폭되었다 (Fig. 4A, 4B). 특이성이 높은 PCR 반응을 얻기 위하여, ISR-EKV 서열을 이용하여 reverse primer FluR1을 제작하고 forward primer FluF 조합에 의한 PCR 반응 결과, 앞의 두 번의 detection PCR 결과보다 더 높은 종 특이적 산물이 증폭되었으며, 그 특이성이 증가됨을 알 수 있었다 (Fig. 4C).



Fig. 4 (Continued)

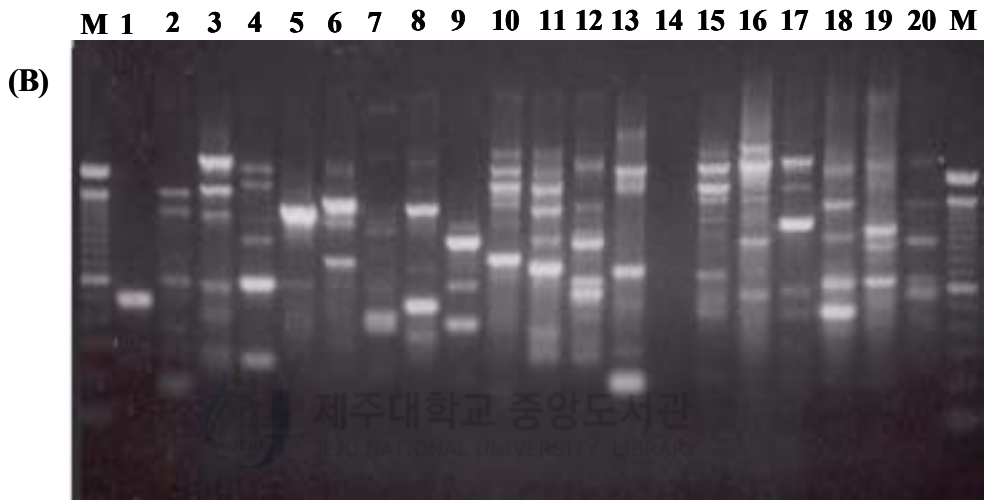


Fig. 4 (Continued)



Fig. 4. PCR amplification of the rRNA of different *Vibrio* strains using ISR-targetted primers. (A) use of FluF and Vibrio 23SR (B) use of FluF1 and Vibrio 23SR (C) use of FluF and FluR1 Lane M, 100 bp DNA ladder; lane 1, KCTC 2473; lane 2, KCTC 2714; lane 3, KCTC 2715; lane 4, KCTC2716; lane 5, KCTC 2719; lane 6, KCTC 2720; lane 7, KCTC 2721; lane 8, KCTC 2722; lane 9, KCTC 2726; lane 10, KCTC 2729; lane 11, KCTC 2730; lane 12, KCTC 2731; lane 13, KCTC 2733; lane 4, KCTC 2735; lane 15, KCTC 2736; lane 16, KCTC 2737; lane 17, KCTC 2810; lane 18, KCTC 2928; lane 19, KCTC 2954; lane 20, KCTC 2962.

IV. 고 찰

*V. fluvialis*는 해양성 세균의 하나로 하천 및 연안 해수에 널리 분포하여 어패류와 식염이 많은 음식물에 번식하기 쉽다. 저온에서 잘 성장하지 못하나, 우리나라나 일본과 같이 해산물을 생식하는 나라의 수양철사 환자에서 *V. fluvialis*에 의한 감염이 보고가 되어지고 있다 (Thekdi *et al.*, 1990). 우리나라의 경우, 1998년 처음으로 만성 간염환자의 해산물 섭취후 *V. fluvialis*에 의한 위장관염의 발병으로 사망한 보고가 있으며 (이혜정 등, 1998), 이외에도 드물게 급성화농성 담관염과 안내염등을 일으키는 보고가 있다 (Yoshi *et al.*, 1987; Hassan *et al.*, 1992). 이 균은 대부분이 철사환자에서 분리되고 있으며, 환자의 대부분이 5세이하의 어린 소아임이 특이적이다 (Huq *et al.*, 1980; Kolb *et al.*, 1997; Hickman-Brenner *et al.*, 1984). 따라서, 이 균의 진단을 위하여 정확한 균의 증명이 필요하다. 그런 이유로 생화학적 동정을 이용한 균의 분리가 이루어지고 있으나, 생화학적 동정시 *Aeromonas*로 진단될 수 있어 Vibriocidal agent O/129 감수성 또는 호염성 시험, DNA내 G와 C 함량에 따라 동정이 이루어지고 있다. 그러므로, 이 균의 정확한 정체는 소아의 위장관염 진단 및 자연과 임상에 존재하는 *V. fluvialis*의 빠른 검출을 위해 필요하며, ISR에 기초한 연구는 중요한 자료로 이용될 것이다.

*V. fluvialis*로부터 생성된 ISR PCR band patterns은 *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*와 *V. mimicus*의 ISR PCR patterns과 유사한 band 양상을 보이고 있다 (Chun *et al.*, 1999; Maeda *et al.*, 2000). 이들이 ISR 증폭에 사용한 primers는 *E. coli*의 16S와 23S rRNA 서열에 기초하여 제작되었으며, 이들의 16S, 23S rRNA gene에 일부 서열이 mismatch 되어있다. 그러나, 본 실험에는 비브리오종내 16S, 23S rRNA gene의 가장 잘 보존된 영역의 서열을 사용함으로써 ISR 증폭시 최적의 annealing PCR 조건을 얻을 수 있었다.

*V. fluvialis*에서 총 6개의 ISR type이 확인되었으며, 그 중 ISR-E1 type에 관한 보고는 아직 비브리오속에서 이루어지지 않았다. 그러나, *E. coli* K-12의 경우 Glutamate를 갖는 4개의 다른 ISR (*rrn* B, C, E, G) *rrn* operons을 갖고 있는 것으로 보아, *V. fluvialis*을 포함한 비브리오속내에 동일 tRNA gene을 갖는 spacer region

type이 존재할 것으로 생각된다. 또한, 3개의 major type으로 확인된 ISR-A, ISR-E, ISR-IA는 *Aeromonas* (Kong *et al.*, 1998), *Escherichia coli* K-12 (Garcia-martinez *et al.*, 1996; Anton *et al.*, 1998), *V. cholerae*와 *V. mimicus*에서 보고된 ISR type에서도 우세하게 나타나고 있다. 그러나, *V. cholerae*와 *V. mimicus*에서 ISR-A가 minor type으로 나타나고 있는 반면, *V. fluvialis*에서는 major type으로 나타나고 있다. 이는 genome내에 있는 ribosomal RNA operons의 copy수에 따라 나타나고 있다 (Gurtler and Stanishi, 1996).

rRNA operon은 단백질 합성에 필요한 ribosome의 구성요소로서 다량의 ribosome이 요구되는 bacteria의 chromosome에 multiple copy로 존재한다. 이들의 주요 기능은 세균 성장을 위한 ribosomes의 합성과 mRNA의 번역, rrn operon의 발현에 필요하다 (Condon *et al.*, 1995). *V. fluvialis*의 정확한 operons의 수는 알려지지 않았으나, 본 연구에서 6개의 ISR type이 확인되어 최소 6개 이상의 rrn operons이 존재할 것으로 생각된다. 그 이유는, *V. parahaemolyticus*의 경우 6개의 ISR type을 갖고 있으나, southern hybridization을 통한 copy number를 확인한 결과 9개의 band를 갖고 있다. 이는 두 개의 ISR type인 ISR-O와 ISR-IA type이 하나이상의 복제수에 의한 것이며 (Yamaichi *et al.*, 1998), 7개의 rrn operon을 갖고 있는 *E. coli*에서도 ISR-E와 ISR-IA의 multiple copy로 구성되어 있음을 보고하고 있다 (Anton *et al.*, 1998). 따라서, *V. fluvialis*의 정확한 operon의 수는 더 많은 클로닝과 16S rRNA gene을 이용한 southern hybridization이 필요하다고 생각된다.

16S-23S rRNA ISRs의 염기서열 다양성은 16S rRNA 염기서열보다 높지만, 아직 이들에 관한 자료의 제공이 제한적으로 보고되어지고 있다. 따라서, 등록된 ISR 정보는 유사한 종 또는 세균의 분리 및 동정, typing, 진화와 계통발생학적 연구들에 빠르고 신뢰할 수 있는 유용한 자료로 사용될 것이다. 일반적으로 세균동정은 간단한 생화학적 시험에 의존하여 이루어지고 있으나, 결과의 부정확성과 생화학 및 계통발생학적 다양성이 나타나고 있어 분리를 위한 시간의 소요가 많고, 전배양등의 단계가 필요하다 (Alsina *et al.*, 1994). 그러나, PCR에 기초한 검출 방법은 정확성, 민감성과 대량의 시료처리가 가능하며, 검출을 위한 전배양이 필요하지 않은 장점을 갖고 있다.

본 실험에서는 6개의 ISR type중 ISR-EKV type의 서열을 표적으로 한 oligonucleotide을 제작하여 PCR 반응시 종 검출에 특이성 유무를 확인하였다. FluF,

FluF1을 이용한 PCR 반응시 다른 비브리오종에서 예측크기와 유사한 크기 또는 multiple band가 증폭되었다. 이는 제작된 forward primer의 유사 서열이 다른 비브리오종의 *rrn* operons에 존재하며, 또한 높은 보존성을 갖고 있는 23S rRNA gene의 5' 말단 서열에 기초하여 제작된 *Vibrio* 23SR을 detection PCR 반응에 reverse primer로 이용하여 종 특이성이 낮은 PCR 검출 결과를 초래하였다. 이에, ISR-EKV type의 서열중 internal reverse primer (FluR1)을 제작하여 PCR 반응을 하였을 경우 높은 종 특이성을 갖는 검출을 할 수 있었다 (Fig. 4C). 이는 ribosomal RNA의 염기 서열에 의존한 *Vibrio* 검출방법보다 보존성 낮은 ISR sequene를 이용함으로써 종 단위에서 *Vibrio*를 빠른 시간내에 검출할 수 있다는 것을 보여준다. 따라서, ISR 서열에 기초한 PCR을 응용한 detection 방법은 자연과 임상에 존재하는 생태학적, 질병학적 *V. fluvialis*을 검출하는 분자적, 생물학적 기준으로 이용될 것이다.



요 약

*Vibrio fluvialis*는 해양성 세균의 하나로 잘못조리된 해산물의 섭취 또는 생식시 사람에게 설사를 일으키는 병원성 세균이다. 또한, 해양 생물에서 잠재적 병원성을 갖고 있다. 이런 관점에서, PCR을 이용한 빠른 검출을 위해 species-specific primer 개발을 위한 많은 연구가 이루어지고 있다.

본 연구에서는 *V. fluvialis*의 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR)을 PCR증폭하여 plasmid vector에 클로닝하였다. ISRs의 염기서열 분석 결과, 크기에 따라 총 6개의 다른 clones을 분리하였다. 이들 모두 tRNA genes의 수와 구성에 차이를 갖고 있으며, 이들 각각을 ISR-A, ISR-E, ISR-E1, ISR-IA, ISR-EKV, ISR-EKAV로 명명하였다. ISR-EKAV는 tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Ala}-tRNA^{Val}; ISR-EKV, tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Val}; ISR-IA, tRNA^{Ile}-tRNA^{Ala}; ISR-A, tRNA^{Ala}; ISR-E 과 E1, tRNA^{Glu}으로 구성되어 있다.

6개의 ISR type중 ISR-EKV는 minor type으로 확인되었다. 이 ISR types의 염기서열을 다른 비브리오종과의 multiple alignment을 수행하여 높은 염기서열 다양성의 영역을 확인하여, 이 부위를 PCR을 위한 species-specific primer 제작에 사용하였다. Primer의 특이성은 다른 *Vibrio*종에서 분리된 genomic DNA을 주형으로 하여 확인하였으며 그 결과, *V. fluvialis*을 다른 *Vibrio* 종으로부터 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 강재승, 고광균, 국윤호, 김각균, 김경호, 김경희. 1991. 의학 생물학. 대한미생물학회
편, 511-7.
- 이혜정, 이성욱, 배영진, 박진곤, 최필선, 조강일, 천종철, 문성채, 황은주. 1998. *Vibrio
fluvialis*에 의한 위장관염 1예. 감염. 30(3):295-300.
- Alsina, M. and A. R. Blanch. 1994. A set of keys for biochemical identification of
environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.* 76:79-85.
- Anton, A. I., A. J. Martinez-Murcia. and F. Rodriguez-Valera. 1998. Sequence
diversity in the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons
in representatives of the *Escherichia coli* ECOR collection. *J. Mol. Evol.*
47(1):62-72.
- Arias, C. R., M. J. Pujalte, E. Garay and R. Aznar. 1998. Genetic relatedness
among environmental, clinical, and diseased-eel *Vibrio vulnificus* isolates from
different geographic regions by ribotyping and randomly amplified polymorphic
DNA PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9):3403-10.
- Bej, A. K., D. P. Patterson, C. W. Brasher, M. C. Vickery, D. D. Jones and C. A.
Kaysner. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio*
parahaemolyticus in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and
trh. *J. Microbiol. Methods.* 36:215-22.
- Condon, C., C. Squires and C. L. Squires. 1995. Control of rRNA transcription on
Escherichia coli. *Microbiol. Rev.* 59(4):623-45.
- Chun, J., A. Huq and R. R. Colwell. 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic
spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl. Environ.
Microbiol.* 65(5):2202-8.
- Garcia-Martinez, J., A. Martinez-Murcia, A. I. Anton and F. Rodriguez-Valera.
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(21):6374-7.
- Garcia-Martinez, J., S. G. Acinas, A. I. Anton and F. Rodriguez-Valera. 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Method.* 36:55-64.
- Gurtler, V. and V. A. Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol.* 142:3-16.
- Hassan, I. J., A. P. MacGowand and S. D. Cook. 1992. Endophthalmitis at the Bristol eye hospital : an 11-year review of 47 patients. *J. Hosp. Infect.* 22:271-8.
- Hickman-Brenner, F. W., D. J. Brenner, A. G. Steigerwalt, M. Schreiber and S. D. Holmberg, L. M. Baldy, C. S. Lewis, N. M. Pickens and J. J. Farmer III. 1984. *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii* isolated from a stool sample of one patient. *J. Clin. Microbiol.* 20(1):125-7.
- Hinrikson, H. P., F. Dulty and M. Altwegg. 1999. Homogeneity of 16S-23S ribosomal intergenic spacer regions of *Tropheryma whippelii* in Swiss patients with Whipple's disease. *J. Clin. Microbiol.* 37(1):152-6.
- Huq, M. I., A. K. Alam, D. J. Brenner and G. K. Morris. 1980. Isolation of *Vibrio* like- group, EF-6, from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 11(6):624-4.
- Jensen, M. A., J. A. Webster and N. Straus. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:945-952.
- Kim, Y. H., C. R. Jung, S. K. Kim, J. -Y. Yang and J. H. Cha. 2001. Distribution of extracellular proteases from various *Vibrio* species. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* 30(2):222-227.
- Kolb, A. K., S. C. Eppes and J. D. Klein. 1997. *Vibrio fluvialis*: an underrecognized enteric pathogen in infants?. *South. Med. J.* 90(5):544-45.
- Kondo, S., Y. Haishima, K. Ishida, Y. Isshiki and K. Hisatsune. 2000. The O-polysaccharide of lipopolysaccharide isolated from *Vibrio fluvialis* O19 is identical to that *Vibrio* bioserogroup 1875 variant.. *Microbiol. Immunol.*

- 44(11):941-944.
- 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 Genus- and species-specific detection of *Aeromonads*. *Marine Pollution Bulletin*. 38(9):802-8.
- Lee, J. V., P. Shread, A. L. Furniss and I. N. Bryant. 1981. Taxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (Synonym group F vibrios, Group EF6). *J. Appl. Bacteriol*, 50:73-94.
- Lockwood, D. E., A. S. Kreger and S. H. Richardson. 1982. Detection of toxins produced by *Vibrio fluvialis*. *Infect. Immun.* 35:702-8.
- Luz, S. R., 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(8): 2144-51.
- Maeda, T., N. Takada, M. Furshita and T. Shiba. 2000. Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 192(1):73-7.
- Nishibuchi, M. and R. J. Seidler. 1983. Medium-dependent production of extracellular enterotoxins by non-o-1 *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, and *Vibrio fluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(1): 228-31.
- Nishibuchi, M., N. C. Roberts, H. B. Bradford, JR. and R. J. Seidler. 1983. Broth medium for enrichment of *Vibrio fluvialis* from the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(2):425-911.
- Rahim, Z. and K. M. Aziz. 1996. Factors affecting production of haemolysin by strains of *Vibrio fluvialis*. *J. Diarrhoeal Dis. Res.* 14(2):113-6.
- Rahman, M. M., F. Qadri, M. J. Albert, A. Hossain and M. Mosihuzzaman. 1992. Lipopolysaccharide composition and virulence properties of clinical and environmental strains of *Vibrio fluvialis* and *Vibrio mimicus*. *Microbiol. Immunol.* 36(4):327-38.
- Srivastava, A. K. and D. Schlessinger. 1990. Mechanism and regulation of

- bacterial ribosomal RNA processing. *Ann. Rev. Microbiol.* 44:105-129.
- Tyler, S. D., C. A. Strathdee, K. R. Rozee and W. M. Johnson. 1995. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic *Pseudomonads* on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2(4):448-453.
- Vold, B. S. 1985. Structure and organization of genes for transfer ribonucleic acid in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 49(1):71-80.
- Wall, V. W., A. S. Kreger and S. H. Richardson. 1984. Production and partial characterization of *Vibrio fluvialis* cytotoxin. *Infect. Immun.* 46(3):773-7.
- Yoshi, Y., H. Nishino, K. Satake and K. Umeyama. 1987. Isolation of *Vibrio fluvialis* :an Un- usual pathogen in acute suppurative cholangitis. *Am. J. Gastroenterol.* 82:903-5.



감사의 글

2년의 학위 과정동안 이 논문을 완성하기까지 부족함이 많았던 저에게 배움을 주시고 학문에 정진할 수 있도록 조언과 격려를 아끼지 않으셨던 이제희 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한, 바쁘신 중에도 저의 논문을 심사해주신 송춘복 교수님, 허문수 교수님과 학부과정과 석사 과정동안 많은 관심과 충고를 아끼지 않으셨던 여인규 교수님, 전유진 교수님께도 감사를 드립니다.

실험하는 동안 실험과 자료준비를 위해 많은 시간을 함께 보내준 분자유전학 실험실의 고순미, 오철홍, 조봉룡 선배님과 나의 친구이자 동기인 박영미, 그리고 실험내내 여러모로 많은 도움을 준 김형건, 박호진, 김상봉, 강경임, 문영주, Helani, 그리고 석사 2년동안 동고동락한 진창남 선생님과 양병규 선배님, 그 외에 해양생물공학과 대학원생들에게도 고마운 마음을 보냅니다.

끝으로 여기까지 저를 헌신과 사랑으로 뒷바라지 해주시느라 고생하신 어머니와 아버지, 그리고 내 유일한 남동생과 항상 나를 걱정해 주던 내 친구들과 친척 가족들에게 자그마한 결실을 드립니다.

