碩 士 學 位 論 文

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 자치어의 장관백탁증 (Bacterial enteritis)원인균 *Vibrio ichthyoenteri* 신속진단법 개발

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

濟 州 大 學 校 大 學 院

海 洋 生 物 工 學 科

文 榮 健

2004年 12月

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 자치어의 장관백탁증 (Bacterial enteritis)원인균 *Vibrio ichthyoenteri* 신속진단법 개발

指導敎授 許 文 洙

文 榮 健

이 論文을 理學碩士 論文으로 提出함

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2004年 12月

文榮健의 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 송 춘 복 (인)
委 員 박 근 태 (인)
委 員 허 문 수 (인)

濟州大學校 大學院
2004年 12月

Rapid Detection of the Pathogenic Agent of Bacterial Enteritis of Larval and Juvenile Stages in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Young-Gun Moon
(Supervised by Professor Moonsoo Heo)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

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

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2004. 12.

목 차

Abstract i

I. 서 론 1

II. 재료 및 방법

1. 장관백탁증 원인 병원균의 분리 및 사용균주 3
2. 공시균주의 선정 6
2.1. 공시균주의 선정을 위한 생화학적 성상 검사 6
3. 공시균주의 생육조건 검토 6
3.1. 공시균주의 배양 6
3.2. 염분 농도에 따른 생육능 검토 6
3.3. 온도에 따른 생육능 검토 7
3.4. pH에 따른 생육능 검토 7
4. MUP(Microbial Uiversal Primer)를 이용한 공시균주의 동정확인 7
4.1. 참조균주와 공시균주의 genomic DNA 분리 7
4.2. MUP(Microbial Uiversal Primer)에 의한 유전자 다형성 분석 8
5. *Vibrio ichthyoenteri* 16S-23S Ribosomal RNA intergenic spacer region (ISR)의 clonig과 sequencing 8
5.1. 사용균주 8
5.2. *V. ichthyoenteri*(KCCM 40870)의 genomic DNA 분리 9
5.3. *V. ichthyoenteri* 16S-23S Ribosomal RNA ISR 증폭을 위한 oligonucleotide 제작 9
5.4. *V. ichthyoenteri* 16S-23S rRNA ISR 증폭을 위한 PCR 반응 11
5.5. PCR 반응 산물의 Cloning과 Sequencing 11
5.6. Data analysis 12

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

6. 장관백탁증 원인균인 V. ichthyoenteri 검출을 위한 Oligonucleotide
제작과 PCR 반응 13

III. 결 과

1. 장관백탁증 원인균의 분리 17

2. 공시균주의 선정 19

3. MUP(Microbial Universal Primer)를 이용한 공시균주의 동정확인 23

4. *V. ichthyoenteri*(KCCM 40870) 16S-23S Ribosomal RNA ISR 분석 24

5. *V. ichthyoenteri* 검출을 위한 Oligonucleotide 제작과
detection PCR 반응 27

IV. 고 찰 41

V. 요 약 46

VI. 참 고 문 헌 48

감사의 글 57

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Abstract

Bacterial wihte enteritis ocurred by infection of *V. ichthyoenteri* is a devastating disease in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) hatcheries in Korea. Since white enteritis has been a problem in aquqtic industries, necessity of a rapid detection method is increased. In an attempt to develop rapid PCR method 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*. The intergenic spacers were amplified by primers complementary to conserved region of 16S and 23S rRNA genes. The intergenic spacer region between the 16S and 23S rRNA genes of *V. ichthoenteri* were investigated by PCR fragment length typing and DNA sequencing. Analysis of the ISR sequences showed that *V. ichthyoenteri* contains one types of polymorphic ISRs. The size of ISRs ranged 348bp length and not contains tRNA genes. Mutiple alignment of representative sequences from different *Vibrio* species revealed several domains of high sequence variability, and allowed to design species-specific primer for detection PCR. The specific of the primer was examined using genomic DNA prepared from 19 different *Vibrio* species, isolated 18group *Vibrio* species. The results showed that the PCR reaction using species-specific primer designed in this study can be used to detect *V. ichthyoenteri*.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅰ. 서론

1970년대 후반부터 국내 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 종묘 생산이 시작되었으며 1986년에는 제주도에서 종묘 생산 기술개발을 계기로 육상 수조식 양식이 시작되어 현재 해수 양식 어종에서 가장 높은 비중을 차지하는 중요한 어종으로 자리 잡고 있다. 넙치양식 업체의 수도 최근 급격히 증가하여 2002년 247개의 양식업체가 있으며 년간 매출액이 1,200억원으로 제주도내의 1차 산업의 가장 중요한 부분을 차지하고 있다(제주도, 2003). 시설 규모도 소규모에서 대규모로 전환되는 경향이며 사육방법도 고밀도 사육이 많아 관리 부주의 등으로 각종 질병이 증가하고 있다(심 등, 1995).

매년 여러 가지 원인에 의해 질병이 증가하고 있으며 특히 넙치 자치어기의 폐사 원인는 유전적, 환경적 또는 영양적 요인에 의한 비감염성 질병이 비율이 상당히 높은 편이나 바이러스 및 세균의 감염에 의한 감염성 질병도 계속 증가하고 있다(오 등, 1998., Nishioka *et* al., 1997). 물고기의 질병도 다른 육상 동물의 감염증과 마찬가지로 "숙주-기생체 관계(host-parasite relationship)"가 균형을 상실하여 발생하는 것이지만 어류 감염증의 최대의 특징은 숙주가 수중생물이기에 감염증을 유발시킨 병원체가 숙주에서 이탈하였을 경우 육상의 대기중에 비하여 훨씬 더 오래 생존할 수 있다는 것이다. 따라서 수중생물이 서식하고 있는 물을 매개로 하여 전염병의 전파가 쉽사리 일어난다는 것이라 할 수 있다. 이러한 어류 질병은 종묘 생산단계에서 뿐만 아니라 양식어류에 있어 유행하는 질병 중 병원성 세균에 의한 피해가 가장 크다고 알려져 있다(전, 1988). 특히, 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 장관백탁증은 자어기에만 주로 감수성이 있는 것으로 알려져 있으며, 부화 후 25~30일령 경의 자어에 발생하고 단기간에 집단 폐사를 일으키는 질병이다(Murata, 1987; Muroga, 2001). 이 질병은 내장의 점막 상피에 세균이 감염되어 점막의 괴사, 박리가 일어나고, 소화관의 백탁 및 위축, 복부 함몰 등의 주요 증상을 나타낸다(박 등, 2001). Masumura(1989)등은 질병을 유발하는 원인균을 분

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

리하여 형태학적, 생화학적, 생리학적, 병리학적 그리고 혈청학적 시험을 통하여 *Vibrio* species INFL(intestinal necrosis of flounder larvae)로 명명하였다. Muroga등(1990)은 이 분리균을 먹인 rotifer, (*Brachionus plicatilis*)와 brine shrimp, (*Artemia salina nauplii*)를 일령별로 넙치 자어에 경구 감염시켰으며, 이후 Ishimaru 등(1996)이 *Vibrio ichthyoenteri*로 명명하였다. 일반적으로 *Vibrio ichthyoenteri*는 경구감염이 유일한 감염경로로 인식되고 있으며, 발병시 대량 폐사로 이어지는 질병이지만 약 40일령 이후에는 감수성이 없는 것으로 알려져 있다(Muroga *et* al, 1990). 따라서 본 연구에서는 넙치 자어기의 먹이생물 섭취에 의한 장관백탁증 원인 균의 감염 경로를 파악하기 위하여 초기 먹이로 공급되어지는 동물성 플랑크톤인 rotifer와 넙치 자치어에서 장관백탁증 원인균으로 알려진 *V. ichthyoentri*의 분리를 실시하였다. 또한 분리되어진 균주의 생육 및 생장 특성을 조사하여 *Vibrio 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 종단계 미만, 예를 들면 serotype 의 동정에는 사용하기 어렵다고 알려져 있다. 그래서 현재 환경, 식품 의약 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*의16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region(ISR) 분석을 통하여 종 특이적인 검출 primer를 개발하였으며 이를 이용하여 질병 원인균을 신속검출 함으로써 자어기 먹이 및 양식 수계에서의 감염을 사전 예방하는 방법을 개발하고자 하였다.

제주대학교 중앙도서관

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 장관백탁증 원인 병원균의 분리 및 사용균주

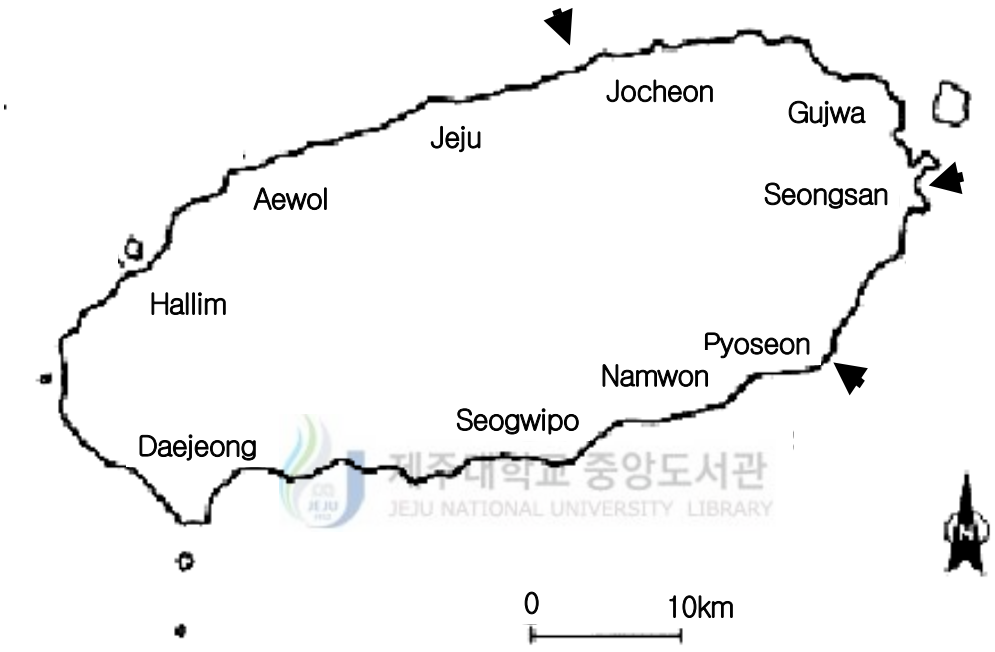
장관백탁증을 유발하는 원인균의 분리를 위하여 2003년 5월에서 10월동안 제주도내 5개소의 넙치 종묘배양장(Fig. 1.)에서 초기 먹이로 공급되어지는 동물성 플랑크톤인 rotifer와 배양수 및 20~30일령 넙치 자어에서 월1회 시료를 채취하여 장관백탁증 원인균을 분리하였다.

원인균을 분리한 배양장의 사육환경은 수온은 23~26℃ 범위였고, 염분농도는 28~30‰, 용존산소(Dissolved Oxygen, DO)는 4.0~5.2 mg/ℓ였으며, pH는 7.7 -7.9를 유지하였다. 넙치 자어는 부화 후 17~20일령 까지 rotifer를 먹이로 사용하고 있다.

병원균의 분리를 위해서 rotifer는 0.8% 멸균 생리 식염수를 사용하여 3회 세척 후 무균적으로 멸균 스틱을 사용하여 마쇄하고 Marine agar(MA)와 Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar(TCBS)에 획선 도말 하였다. 26℃에서 24시간 배양 후 우점종으로 판단되는 세균 집락을 순수 분리 하였다. 배양수는 멸균된 pore size 0.45㎛ membrane filter(GN-6 Metrice Membrane Disc Filter Grid 47mm, pall corporation, USA)를 이용하여 적당량의 시료를 여과한 후 membrane filter를 MA와 TCBS 평판에 놓고 26℃에서 24시간 배양 하여 우점적으로 자란 세균 집락을 순수 분리 하는 방법을 사용하였다. 넙치 자어는 해부현미경으로 소화관을 관찰하면서 장관을 무균적으로 절취하여 MA와 TCBS에 획선 도말 한 후 25℃, 24시간 배양한 후 우점적 형태의 세균 집락을 순수분리 하는 방법을 사용하였다.

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

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 1. Location of the sampling site in Jeju island, Korea

Table 1. The strains used in this study

Strains			Origin	
Vibrio ichthyoenteri	Isolated strains	YG-1	Intestine of olive flounder	Jejudo, 2003
		YG-2		
	Reference strain	R-1 (KCCM[a] 40870)		Hiroshima University, 1996

a : KCCM(Korea Culture Center of Microorganisms)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 공시균주의 선정

2.1. 공시균주의 선정을 위한 생화학적 성상 검사

분리된 시험 균주를 대상으로 공시균주를 선정하기 위하여, 시험균주를 1.5% 염화나트륨을 첨가한 BHIA에서 26℃로 24시간 배양한 다음, 그람염색 후 현미경 검사를 통하여 그람 음성 간균을 확인 후 *Vibrioaceae*와 *Aeromonadaceae*를 구분하기 위하여 비브리오 1차 선택배지인 TCBS에서의 성장유무, 0/129(2, 4,-diamino-6, 7-diisopropylpteridine phosphate)에 내성을 조사 하였다(Lee *et* al, 1997). 그리고, 주요 생화학적 성상 시험은 표준생화학 검사법(MacFaddin 2000)에 따라 시험하였다.

3. 공시균주의 생육조건 검토

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3.1. 공시균주의 배양

생화학적 성상 검사를 통하여 선정된 공시균주 2개와 1개의 참조균주는 MA(Marine agar, Difco)에 획선 도말하여 26℃에서 24시간을 배양 후 단일 집락을 BHI(brain heart infusion, Difco)broth 10ml에 접종 하여 26℃에서 10^6CFU/ml가 되도록 진탕 배양하여 전배양액으로 실험에 사용하였다.

3.2. 염분 농도에 따른 생육능 검토

실험에 사용된 총 71개의 균주를 대상으로 염분 농도에 따른 생육 특성을 조사하기 위하여 1% peptone을 첨가하여 만든 alkali-peptone 수 배지를 염분농도 0, 1, 3, 6, 8%의 농도로 각각 100ml씩 준비하고, 미리 준비한 전균액 20㎕를 접종하여 26℃에서 배

양하면서 microplate spectrophotometer 기기를 사용하여 630nm의 흡광도에서 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간에 생육도를 측정하였다.

3.3. 온도에 따른 생육능 검토

온도에 따른 생육 특성을 조사하기 위하여, 1.5% 염화나트륨을 첨가하여 만든 alkali-peptone 수 배지 각100ml에 미리 준비한 전균액 20㎕를 접종하여 4, 15, 25, 30, 35, 40℃에서 배양하면서 microplate spectrophotometer 기기를 사용하여 630nm의 흡광도에서 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간에 생육도를 측정하였다.

3.4. pH에 따른 생육능 검토

pH에 따른 생육 특성을 조사하기 위하여, 1.5% 염화나트륨을 첨가하여 만든 alkali-peptone수 배지 각100ml를 pH4, 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 만들어 준비한 전균액 20 ㎕를 접종하여 26℃에서 배양하면서 microplate spectrophotometer 기기를 사용하여 630nm의 흡광도에서 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24시간에 생육도를 측정하였다.

4. MUP(Microbial Universal Primer)를 이용한 공시균주의 동정확인

4.1 참조균주 및 공시균주 genomic DNA 분리

참조균주(KCCM 40870, R-1)와 분리 균주(YG-1, YG-2)는 1.5% 염화나트륨이 첨가된 BHIB(Difco, USA) 배지 5ml에 접종하여 Shacking incubator를 이용하여 26℃에서 200rpm으로 24시간 배양한 배양액을 1.5ml microcentrifuge tube로 옮겨서 16000xg에서 1분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 모아진 bacteria pellet을 수집하여 Wizard®

제주대학교 중앙도서관

Genomic DNA Purification Kit(Promega, USA)을 사용하여 genomic DNA를 분리 한 후, UnicamUV/VIS Spectrophotometer (Heλios β. Unicam Ltd, United Kingdom)를 사용하여 파장 260 nm에서 DNA농도를 측정하였다.

4.2. MUP(Microbial Universal Primer)에 의한 유전자 다형성 분석

장관백탁증 원인균인 *Vibrio ichthyoenteri* (KCCM 40870)와 분리균주 중 생육조건 시험및 생화학적 성상검사에서 *V. ichthyoenteri*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 50ng, MUP(20pmol/ml) 1㎕, dNTP mixture 2㎕, 10X PCR buffer 2㎕, 5unit *Ex taq* polymerase(TaKaRa, Japan) 혼합액을 멸균증류수를 첨가하여 최종부피 20㎕로 맞추고, PTC-150 Mini cycler(MJ Research)를 사용하여 반응 시켰고, PCR과정은 94℃에서predenaturation 5분, 94℃에서 denaturation 45초, 55℃에서 annealing 45초, 72℃에서 extension 1분간에 반응을 30회 동안 수행하였고, 마지막 72℃에서 extension 반응을 5분간 반응하였다.

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

5. *Vibrio ichthyoenteri* 16S-23S Ribosomal RNA intergenic spacer region(ISR)의 cloning 과 sequencing

5.1. 사용균주

장관백탁증 원인균에 대한 species-specific 검출을 위한 primer를 제작하기위하여 한국

미생물보존센터(KCCM)에서 *Vibrio ichthyoenteri* (KCCM 40870)표준균주를 제공받아 실험에 사용하였다.

5.2. *V. ichthyoenteri*(KCCM 40870)의 genomic DNA 분리

참조균주(KCCM 40870, R-1)를 1.5% 염화나트륨이 첨가된 BHIB(Difco, USA) 배지 5ml에 접종하여 Shacking incubator를 이용하여 26℃에서 200rpm으로 24시간 배양한 배양액을 1.5ml microcentrifuge tube로 옮겨서 16000xg에서 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 (Heλios β. Unicam Ltd, United Kingdom)를 사용하여 파장 260 nm에서 DNA농도를 측정하였다.

제주대학교 중앙도서관

5.3. *V. ichthyoenteri* 16S-23S rRNA ISR 증폭을 위한 oligonucleotide 제작

Vibrio ichthyoenteri intergenic spacer region (ISR)를 증폭하기 위한 primer를 제작하기 위해서 GenBank에 등록되어 있는 *Vibrio*의 16S rRNA gene과 23S rRNA gene을 이용하여 mutiple aligment를 수행하여 가장 높게 보존된 16s rRNA 3′말단, 23s rRNA 5′말단 서열을 이용하여 PCR 반응에 이용하기 위한 primer를 디자인 하여 제작하였다. Forward primer 16SF ICH와 Reverse primer 23SR ICH primer는 (주)Bioneer에 의뢰하여 제작하였다(Table 2.).

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/M13 F [c]		GTT TTC CCA GTC ACG AC
pUC/M13 R [c]		CAG GAA AAC AGC TAT GAC

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

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

b : primers designed for the *V.ichthyoenteri* detection

c : primers desingned for the pGEM T-easy vector

5.4. *V. ichthyoenteri* 16S-23S rRNA ISR 증폭을 위한 PCR 반응

PCR 반응은 bacterial genomic DNA 100ng, 1μM에 primer pairs(16SF ICH, 23SR ICH), 10 mM dNTPs, 10X PCR buffer, 5 Unit Taq polymerase(TAKARA, Japan))을 혼합액에 멸균된 증류수를 첨가하여 최종부피를 50㎕로 맞추고, PTC-150 Minicycler (MJ Research)를 사용하여 PCR 증폭하였다. ISR 증폭 과정은 94℃에서 predenaturation 2분, 94℃에서 denaturation 45초, 57℃에서 annealing 45초, 72℃에서 extension 1분간에 반응을 30회 동안 수행하였고, 마지막 72℃에서 extension 반응을 5분간 반응하였다.

증폭된 PCR 반응 산물은 GeneRuler^{TM} 100bp DNA ladder(Fermentas, USA)를 maker로 사용하여 1.7% agarose gel 전기영동으로 크기를 확인 하였다(Fig.2.).

5.5. PCR 반응 산물의 Cloning과 Sequencing

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

AccuPrep ^{TM}PCR Purification Kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 PCR product에 남아 있는 primers, nucleotides, polymerase, salts를 제거하여 정제하고 30㎕에 elution buffer (10mM Tris-Cl, pH 8.5)로 DNA를 elution하였다.

PCR Product를 cloning하기 위하여 cloning vector로 pGEM T-easy vector(Promega)를 사용하였다. PCR Product를 T easy vector protocol에 따라 총 ligation 반응량(2X Rapid ligation buffer 7.5㎕, T4 DNA ligase 1㎕, T-easy vector 1㎕, PCR product x ㎕, deionized water를 첨가하여 최종부피를 맞춘다.)을 15㎕로하여 Room Temperature에서 1시간 반응시킨 후 PTC-150 Minicycler (MJ Research)를 사용하여 4℃에서 16시간 동안 ligation을 실시하였다.

이 반응물을 -70℃에 보관된 100㎕의 competent cell(Escherichia coli XL-1 Blue)에 7.5㎕를 첨가하여 얼음에서 40분간 반응시킨 후 42℃에서 1분 30초간 heat shock을 시

키고 SOC medium 800㎕를 첨가하여 37℃에서 1시간 regeneration하고나서 8000rpm으로 30초 원심분리 후 상층액을 제거하고 200㎕ SOC medium을 첨가하여 cell을 부유시켜 Ampicilin(50㎍/mL), IPTG(Isopropylthio-β-D-galactopyranoside, 25㎎/mL)와 X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranoside, 10㎍/mL)이 포함된 LB배지(1% Tryptone,0.5% Yeast extract, 1.5% agar, 1% NaCl)에 37℃에서 16hr 동안 배양하여 white colony를 선별하였다. 선별된 colony는 ampicilin이 첨가된 LB broth에 접종하여 37℃에서 250rpm에서 16시간 동안 진탕 배양하였다. 배양 16시간 후 배양액을 1.5ml microcetrifuge tube에 옮겨 16000xg에서 1분간 원심분리하여 상등액을 버리고 bacteria cell을 모은 후 AccuPrep™ plasmid extraction kit (Bioneer)을 이용하여 Plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid DNA의 insert 크기를 확인하기 위하여 제한효소 EcoR1(Bioneer, Korea)을 가지고 제한효소 반응을 수행하였다. plasmid DNA, 10X buffer, EcoR1(Bioneer, Korea)을 첨가하고 총 부피 10㎕가 되도록 3차 증류수를 첨가하여 37℃ water bath에서 1시간 동안 digestion반응을 수행하였다. 1시간 반응 후 1.2% agaros gel 전기영동을 하여 insert 크기를 확인하고 크기에 따라 그룹으로 분류하였다. insert의 크기를 확인하기 위해서 100bp DNA ladder(Fermentas, USA)을 maker로 사용하였다.

Sequencing은 (주)마크로젠에 의뢰하였으며, sequening을 위한 primer는 pGEM T-easy vector의 mutiple cloning site의 pUC/M13 primer pairs(Table 2)를 사용하였고, DNA sequencing에 이용된 kit과 automated sequences은 각각 Dye Terminator Cycle Sequencing kit과 ABI 377(Applied Biosystems) DNA sequencer를 사용하여 sequencing을 하였다.

5.6. Data analysis

Vibrio ichthyoenteri KCCM 40870의 ISR 염기 서열을 분석하기 위해 Clustal

제주대학교 중앙도서관

W(version1.71) program을 사용하여 multiple aligment을 하였으며, ISR의 유전자 구성을 알아보기 위해 tRNAscan-SE 1.21 program을 사용하여 tRNA gene을 분석하였다.

6. 장관백탁증 원인균인 *V. ichtyoenteri* 검출을 위한 Oligonucleotide 제작과 PCR 반응

장관백탁증 원인균인 *Vibrio ichhtyoenteri* 검출을 위한 detection primer를 제작하기 위해 *Vibrio ichthyoenteri* ISR 서열을 Clustal W program을 사용하여 이미 밝혀진 6종의 Vibrio ISR 서열과 multiple aligment을 실행하여 *Vibrio ichthyoenteri*에 species-specific detection primer 제작하였다(Table 2.).

제작된 detection primer에 특이성을 확인하기 위해서 *Vibrio ichthyoenteri* KCCM 40870 이외에 19개의 *Vibrio* strain(Table 3)과, 분리되어진 총 71개(Table 5)의 *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 4)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㎕로 맞추고, PTC-150 Minicycler (MJ Research)를 사용하여 PCR 증폭하였다.

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

제주대학교 중앙도서관

Table 3. Reference strains used in ISR-targetted PCR reaction .

Strains number*	Species	Strains number*	Species
KCCM 40870	*VIBRIO ichthyoenteri*	KCTC 2730	*VIBRIO proteolyticus*
KCTC 2714	*VIBRIO aestuarianus*	KCTC 2731	*VIBRIO furnisii*
KCTC 2715	*VIBRIO cholerae*	KCTC 2733	*VIBRIO cincinnatiensis*
KCTC 2716	*VIBRIO campbelli*	KCTC 2735	*VIBRIO mediterranei*
KCTC 2719	*VIBRIO gazogenes*	KCTC 2736	*VIBRIO metschnikovii*
KCTC 2720	*VIBRIO harveyi*	KCTC 2737	*VIBRIO mimicus*
KCTC 2721	*VIBRIO logei*	KCTC 2810	*VIBRIO cyclosites*
KCTC 2722	*VIBRIO nereis*	KCTC 2928	*VIBRIO alginolyticus*
KCTC 2726	*VIBRIO salmonicida*	KCTC 2954	*VIBRIO vulnificus*
KCTC 2729	*VIBRIO parahaemolyticus*	KCTC 2962	*VIBRIO vulnificus*

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

*KCCM : Korea Culture Center of Microorganisms

*KCTC : Korean Collection for Type Cultures

Table 4. Most similar sequence of other known bacterial species

Strain number	Species	Origin
ISOLATED STRAIN	*VIBRIO SCOPHTHALMI*	Jejudo,2003., tubot

Table 5. Isolated strains

number	origin	number	origin	number	origin	number	origin
1	*R-1	25	R-25	49	R-49	73	L-5
2	R-2	26	R-26	50	*W-1	74	L-6
3	R-3	27	R-27	51	W-2	75	L-7
4	R-4	28	R-28	52	W-3	76	L-8
5	R-5	29	R-29	53	W-4	77	L-9
6	R-6	30	R-30	54	W-5	78	L-10
7	R-7	31	R-31	55	W-6	79	L-11
8	R-8	32	R-32	56	W-7	80	L-12
9	R-9	33	R-33	57	W-8	81	L-13
10	R-10	34	R-34	58	W-9	82	L-14
11	R-11	35	R-35	59	W-10	83	L-15
12	R-12	36	R-36	60	W-11	84	L-16
13	R-13	37	R-37	61	W-12	85	L-17
14	R-14	38	R-38	62	W-13		
15	R-15	39	R-39	63	W-14		
16	R-16	40	R-40	64	W-15		
17	R-17	41	R-41	65	W-16		
18	R-18	42	R-42	66	W-17		
19	R-19	43	R-43	67	W-18		
20	R-20	44	R-44	68	W-19		
21	R-21	45	R-45	69	*L-1		
22	R-22	46	R-46	70	L-2		
23	R-23	47	R-47	71	L-3		
24	R-24	48	R-48	72	L-4		

* : R; Rotifer, W; Culture water, L; Larval

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

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

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

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅲ. 결과

1. 장관백탁증 원인병원균의 분리

실험에 사용한 분리 균주는 2003년 5월과 2003년 10월에 걸쳐 제주도내 5개소 종묘배양장에서 초기 먹이로 공급되어지는 동물성 플랑크톤인 rotifer와 배양수에서는 월1회씩 그리고 20~30일령 넙치 자어에서는 월1회 시료를 채취하여 장관백탁증 원인균 분리하였다. 넙치에서 분리된 균주들중 장관백탁증 원인균으로 동정되는 균이 2group(Q, R group)으로 분류되었으며, 각 group에서 1균주씩 선택하여 YG-1(Q group), YG-2(R group)를 실험에 사용하였으며 1.5% 염화나트륨이 첨가된 BHIA에서 크림색 집락을 형성하며 TCBS에서는 green colony와 yellow colony를 형성하였다(Fig. 2.). 각 균주의 유래는 Table 1, 5, 6.에 나타내었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

(YG-1) (YG-2)

Fig. 2. Reaction of *Vibrio ichthyoenteri* Isolated from diseased flounders on TCBS agar.

2. 공시균주의 선정

71개의 분리된 균주와 참조균주를 그람염색을 통한 형태학적 시험 및 TCBS의 성장 유무, 0/129의 내성 조사 및 Macfaddin등의 방법을 이용한 생화학적 제 동정 시험을 통하여 2개의 균주가 *Vibrio ichthyoenteri*로 동정되었다.

Table 7, 8, 9에는 1개의 참조균주와 2개의 공시균주의 생육 특성, 즉 염분농도별, 온도별 성장시험, pH별 성장시험과 각종 생화학적 성상 시험 결과를 나타내었다. 염분 농도별 성장시험 결과 1개의 참조균주와 YG-1, YG-2는 1, 3, 6% NaCl 첨가 peptone수에서 자랐으며 3% NaCl 첨가 peptone수에서 최적 생육도를 나타냈다. 온도별 성장시험에서 모든 시험 균주는 25~30℃에서 성장하였으나 30℃에서 생육상태는 아주 약했다. pH별 발육시험에서는 pH 7~8에서 최적생육도를 나타내었다. 생화학적 성상시험에서 1개의 참조균주와 2개의 분리균주, 즉 R-1과 YG-1는 결과에서 sucrose 이용능이 YG-2의 sucrose 이용능보다 약해 TCBS상에서 green colony를 형성한 것 이외에 다른 특성들은 일치하였다.

제주대학교 중앙도서관

Table 7. Biochemical charateristics of the used strains

Tested items	Reference strain	Isolated strains	
	R-1	YG-1	YG-2
Gram stain	−	−	−
Motility	+	+	+
Oxidase activity	+	+	+
Catalase activity	+	+	+
Fermentetion of glucose	+	+	+
Gas production of glucose	−	−	−
Indole	−	−	−
Methyl red	+	+	+
ONPG hydrolysis	−	−	−
H2S production	−	−	−
OF test	F	F	F
MR test	+	+	+
VP test	−	−	−
O/129 sensitivity	+	+	+
Hydrolysis of Tween 80	−	−	−

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 8. Biological charateristics of the used strains

Tested items	Reference strain	Isolated strains	
	R-1	YG-1	YG-2
Growth at :			
4℃	–	–	–
15℃	–	–	–
25℃	+	+	+
30℃	+w	+w	+w
35℃	–	–	–
40℃	–	–	–
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	–	–	–

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

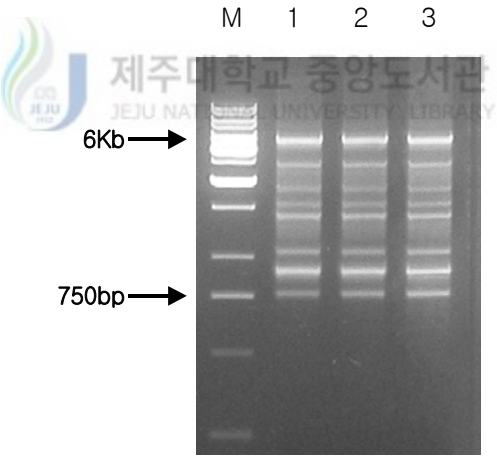
Table 9. Carbohydrate untilization patterns of the used strains

Tested items	Reference strain	Isolated strains	
	R-1	YG-1	YG-2
Acid production from :			
adonitol	–	–	–
myo-inositol	–	–	–
D-sorbitol	+	+	–
maltose	–	–	+
D-xylose	–	–	–
D-galactose	–	–	–
D-mannose	+	+	+
fructose	+	+	+
sucrose	+w	+w	+
D-glucose	+	+	+
lactose	–	–	–
D-mannitol	–	–	–

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3. MUP(Microbial Universal Primer)를 이용한 공시균주의 동정 확인

장관백탁증 원인균인 *Vibrio ichthyoenteri* (KCCM 40870)와 분리균주 중 *V. ichthyoenteri*로 동정 되어진 YG-1과 YG-2의 동일종 판단을 위하여 TaKaRa에서 시판중인 Microbial Universal Primer(MUP) Strain-typing kit을 사용하여 PCR 반응 후 2% agarose gel 전기영동 후 gel상에서 직접 표준균주와 분리균주인 YG-1과 YG-2의 종내 유전자 다형성을 분석한 결과 750bp에서 6kb까지의 동일한 분자량을 가지는 다형성 밴드를 형성하였다(Fig. 3.)



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 3. Random amplification of polymorphic DNA fragment patterns of *V. ichthyoenteri* and isolated strain YG-1, YG-2 by Microbial Universal Primer 3.

M: 1kb DNA ladder, 1: R-1(*V. ichthyoenteri* KCCM 40870), 2: YG-1, 3: YG-2

4. *V. ichthyoenteri* (KCCM 40870) 16S-23S rRNA ISR 분석

Vibrio ichthyoenteri (KCCM 4070)의 genomic DNA를 주형으로하여 16S-23S rRNA ISR의 분석을 위해 제작한 16SF-ICH와 23SR-ICH primer를 이용하여 PCR반응을 수행하였다. PCR반응에 의해 증폭되어진 ISR fragment는 1.7% agarose gel 전기영동을 통하여 증폭된 산물에 크기를 확인하였다(Fig. 4). 그 결과 400bp와 500bp사이에 1개의 major band가 증폭이 되었고, 700bp와 800bp 사이에도 1개의 minor band가 증폭이 되어, *Vibrio ichthyoenteri* chromosome내에 multiple ribosomal RNA operons이 존재함을 확인 할수가 있다.

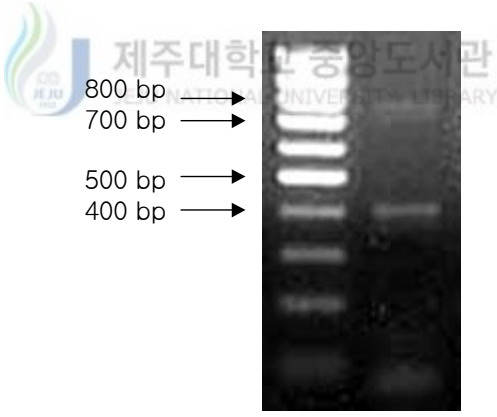


Fig. 4. Electrophoresis of PCR-amplified 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *V. ichthyoenteri* (KCCM 40870) on 1.7% agarose gel.
Left lane is molecular weight marker(100 bp ladder). Right lane is the PCR-amplified 16S-23S rRNA intergenic spacers of *V.ichthyoenteri* KCCM 40870.

PCR반응에 의해 증폭된 *Vibrio ichthyoenteri* (KCCM 40870)의 ISR fragment를 pGEM T-easy vector(Promega, USA)를 cloning vector로 사용하여 cloning하였다. 이렇게 하여 얻어진 20개의 clone을 EcoR1으로 처리 후 insert 크기에 따라 분류하여 3개의 그룹으로 분류하여 각 그룹에서 3개의 clone을 선택하여 vector내 pUC/M13 primer paris을 이용하여 automatic sequencer로 ISR nucleotides 분석을 수행하였다.

이렇게 하여 분석된 결과를 볼때 *Vibrio ichthyoenteri*(KCCM 40870)ISR 증폭 PCR반응에서 나왔던 800bp size에 fragment는 cloning이 확인된 clone이 존재하지 않았으며, 또한 3개의 그룹 중 ISR-no type 1개의 그룹을 제외하고 나머지 2개의 그룹은 sequence 분석이 이루어지지 않았다. *Vibrio ichthyoenteri*(KCCM 40870)의 ISR clone의 서열내 5‘ 말단 16S rRNA와 3’말단 23S rRNA 염기서열을 제외하여 분석하였고, 분석된 염기서열을 토대로 tRNAscan-1.21을 이용하여 그 안에 있는 tRNA를 gene을 분석하였다(Table 10).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 10. The size and tRNA composition of the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Vibrio ichthyoenteri* KCCM 40870

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

ISR에 존재하는 tRNA coding gene의 조합에 따라 현재까지 보고된 *Vibrio*에 ISR type을 분석한 결과를 보면 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 10종류의 ISR을 확인 할 수가 있다. 또한 Vibrio의 있어 가장 일반적인 ISR type이 ISR-E와 ISE-IA라는 것도 확인 할 수가 있다(박 등 2002).

본 실험에 사용된 장관백탁증 원인균인 *Vibrio ichthyoenteri* (KCCM 40870) ISR은 tRNA gene이 없는 ISR-no type 인 것으로 분석이 된다.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

5. *V. ichthyoenteri* 검출을 위한 Oilgonucleotide 제작과 detection PCR 반응

*Vibrio ichthyoenteri*에 대한 Species-specific primer를 제작하기 위하여 GenBank에 등록되어 있는 *Vibrio cholerae*(accession number AF 114721, AF 114738), *Vibrio campellii*(accession number AF 412997), *Vibrio splendidus*(accession number AF 413024), *Vibrio parahaemolyticus*(accession number AY 2988080), *Vibrio mimicus*(accession number AF 114747)에 ISR nucleotide 서열을 참고하여 *Vibrio ichthyoenteri* ISR-no type 서열과 multiple aligment를 수행하였다(Fig. 5).

넙치 치자어에 있어 가장 피해가 심각한 세균성 질병인 장관백탁증에 원인균으로 밝혀진 *Vibrio ichthyoenteri*를 특이적으로 검출하기 위한 oligonucleotide는 mutiple aligment 수행 후 non coding region내에서 가변 부위를 표적으로 하여 (Fig. 5) Foward primer ICH ISR-F 5′-CCAGCACTGGCTAATCCACAACT-3′와 Reverse primer ICH ISR-R 5′-GTGCGCAACGGCTATGATA-3′을 디자인 하여 Bioneer사에 의뢰하여 제작하였으며, GenBank의 있는 BLAST progaram을 사용하여 nucelotide homology을 확인하였다.

제주대학교 중앙도서관

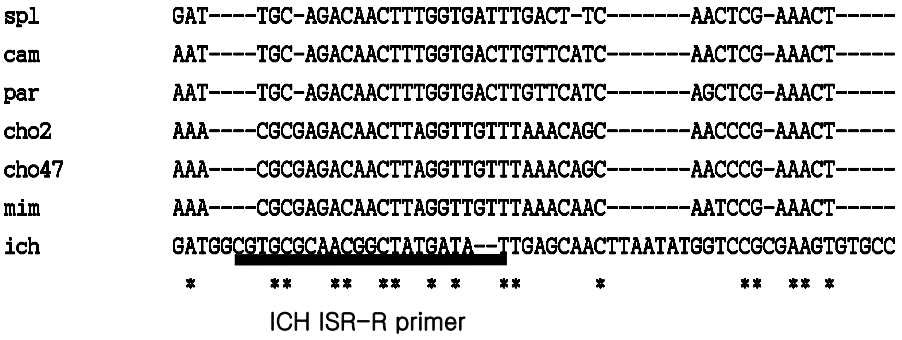
이 primer에 특이성을 확인하기 위해 유전자 은행(Korean Collection for Type Culture)에서 19종(Table 3)의 *Vibrio* 균주를 분양받아 genomic DNA를 분리하여 detection PCR 반응에 Template로 이용하였으며, Positive control로 사용한 *Vibrio ichthyoenteri* KCCM 40870의 genomic DNA에 16SF ICH와 23SR ICH primer와 ICH ISR-F와 ICH ISR-R primer를 혼합 첨가하여(data not shown) 각각의 primer에 따른 적절한 조합에 의해 Predenaturation시간과 primer anneling 온도를 제외하고 16S-23S ISR 증폭 PCR 조건과 동일하게 하여 PCR 반응을 실시하였다(Fig. 6).

Fig. 6. 에서 보듯이 *Vibrio ichthyoenteri* 에 band pattern이 348bp에서 하나에 band만이 생성이 되어 다른 19개의 Vibrio strains과 *Vibrio ichthyoenteri*를 1.7% agarose gel에서 전기영동하였을때 쉽게 구분 할 수가 있다.

```
spl          CCTTATACGATGAT---------TACTCACGATGAGTGTCCACACAGATTG------AT-
cam          CCTTATACGATGAT---------TACTCACGATGAGTGTCCACACAGATTG------AT-
par          ----ATACGATGAT---------TATTCACGATGAGTGTCCACACAGATTG------AT-
cho2         -----CACGATGGT---------TA-TCGTGATGAGTGTCCACACAGATTG------ATT
cho47        -----CACGATGGT---------TA-TCGTGATGAGTGTCCACACAGATTG------ATT
mim          -----CACGATGAT---------TA-TTGTGATGAGTGTCCACACAGATTG------ATT
ich          ---CACACCATGGGAGTGGGCTGCAGATGCGGCACGTATTT-TAGAGTTTGGTGCCGATA
                  ** ***           *     *    ** *    * ** ***      **

spl         -AGTTCACA----------------AGCG-------------AAA--GCTT--------
cam         -AGTTCACA----------------AGCG-------------AAA--GCTT--------
par         -AGTTCACA----------------AGCG-------------CAA--GCTT--------
cho2        CGGTTTAGATTAGAGAAGAGTATCTTAGTGTCCCGTTCGTCTAGAG--GCCTAGGACACC
cho47       CGGTTTAGATTAGAGAAGAGTATCTTAGTGTCCCGTTCGTCTAGAG--GCCTAGGACACC
mim         CGGTTTAGATTTGAGAAGAGTATCTTAGTGTCCCGTTCGTCTAGAG--GCCTAGGACACC
ich         AGGTTTCCATT-------AATTCTCCAGCA-CTGGCTAATCCACAACTGATTA-------
              ***   *          **            *   *  *
                                ICH ISR-F primer

spl         --------------GTAGC--------------------------------TAA------
cam         --------------GTAGC--------------------------------TAA------
par         --------------GTAGC--------------------------------TAA------
cho2        GCCCTTTCACGGCGGTAACAGGGGTTCGACTCCCCTACGGGATACCATCTTTAAGCGTTT
cho47       GCCCTTTCACGGCGGTAACAGGGGTTCGACTCCCCTACGGGATACCATCTTTAAGCGTTT
mim         GCCCTTTCACGGCGGTAACAGGGGTTCGACTCCCCTACGGGATACCATTTTTAAGTGCAT
ich         ---------CGGATTTAGCCGA-----------------------------TAA------
                     ** *                                    ***

pl          ----------------------------CAT-----------AGCTCTTTAACAATTTGGA
cam         ----------------------------CAT-----------AGCTCTTTAACAATTTGGA
par         ----------------------------CAT-----------AGCTCTTTAACAATTTGGA
cho2        TCGCTGAGAATGTTTAAAAATGGTTTTCAT-CAGAAAATCTTGCTCTTTAACAATTTGGA
cho47       TCGCTGAGAATGTTTAAAAATGGTTGTCAT-CAGAAAATCTTGCTCTTTAACAATTTGGA
mim         TCGATGAGTGCTTTTAAAAATGGTT--CATTCTTTGAATCTTGCTCTTTAACAATTTGGA
ich         ----------------------------ATTTGGGG-----TGCAGTGTATCGTGGTGGG
                                        **           **  * ** *    ***
```

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

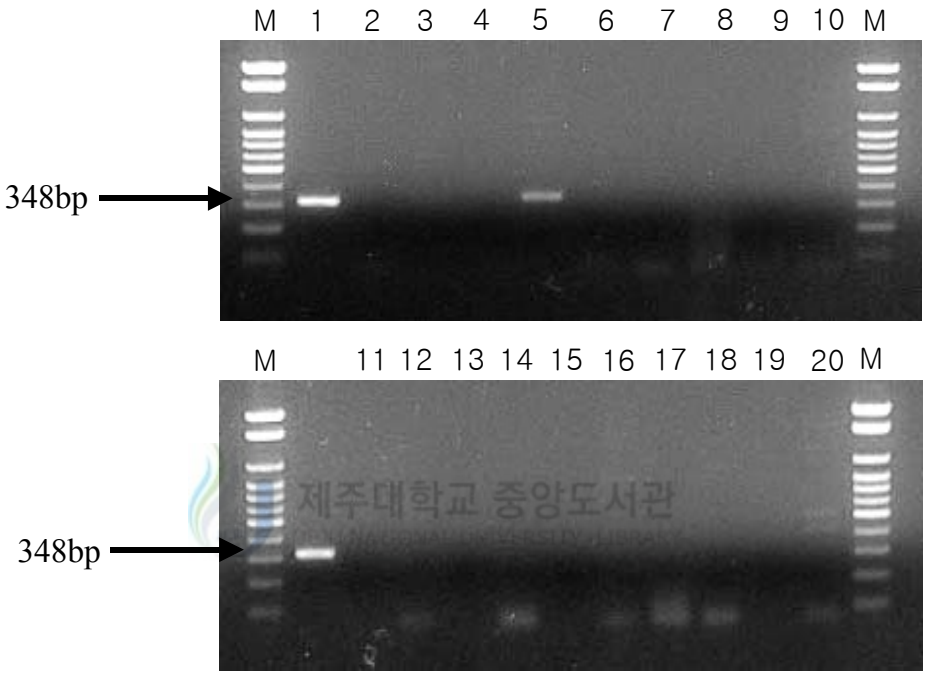
```
spl          AAGC-----------TGACAAAACAATC-TTTAAGATT--GTTTGTAAAGTTCTCAAAGT
cam          AAGC-----------TGACAAAACAATC-TTTAAGATT--GTTTGTAAAGTTCTCAAAGT
par          AAGC-----------TGACAAAACAACAATTTATTGTT--GTTTGTAAAGTTCTCAATGT
cho2         AAGC-----------TGACAAAACAACAATTTATTGTT--GTTTGTAAAGTTCTCAATGT
cho47        AAGC-----------TGACAAAACAACAATTTATTGTT--GTTTGTAAAGTTCTCAATGT
mim          AAGC-----------TGACAAAACAACAATTTATTGTT--GTTTGTAAAGTTCTCAATGT
ich          GATCGACTCTTATTACGATAAAGAGACGGGCCAATATCAGGTTTATCAGTTCACCGGTG-
              * *           ** ***   *      *   *   **** * *  *   *   *

spl          --ATTCTTAAT-TGAATACTCCAAACAACACATT--CAAGT--GTTCTTGG---------
cam          --ATTCTTAAT-TGAATACTCCAAACAACACATT--CAAGT--GTTCTTGG---------
par          TTGTCTTTAAGACAAACAC-CAAAATAACACATT--CAAGT--GTTCTTGG---------
cho2         TTAT-CGAAAGATAAACACC---AACAACACATT--CAAGT--GTGCTTGGTATCGAATA
cho47        TTAT-CGAAAGATAAACACC---AACAACACATT--CAAGT--GTGCTTGGTATCGAATA
mim          TTAT-CGAAAGATAAACACC---AACAACACATT--CAAGT--GTGCTTGGTATCGAATA
ich          --AC----GAGGCACGCACC-AAAGCAACCCAGTGGCAAACTCGTGATTGGGTACAGGAA
                     *       **    *  *** ** *  ***    **  ****

spl          ------------------AATTTGAGTCCGGCAAAATCGAGTCTGCA--TCATGTATAAA
cam          ------------------AATTTGAGTCCGGCAAAATCGAGTCTGCA--TCATGTATAAA
par          ------------------AATTTGAGTCCGGCAAAATCGAGTCTGCA--TCATGTATAAA
cho2         AGACTTCGGTCTTGTTCAAATTTGAGTCCGGCAAAATCTGTCTCGCAC-TCATGTAAATT
cho47        AGACTTCGGTCTTGTTCAAATTTGAGTCCGGCAAAATCTGTCTCGCAC-TCATGTAAATT
mim          AGACTTCGGTCTTGTTCAAATTTGAGTCCGGCAAAATCTGTCTCGCAC-TCATGTAAATT
ich          GTACAG-----------AAACGTGGTGCGGGCGAAATC-GTATTGAATATGATGAACCAA
                              **  **   * *** *****      * *  * *** *
```



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 5. Alignment of representetive 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. ichthyoenteri* KCCM 40870.

Forward and reverse primer used in the species-specific PCR detection are underlined.



제주대학교 중앙도서관

Fig. 6. 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,KCCM 40870; 2, KCTC 2714; 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 2733; 14, KCTC 2735; 15, KCTC 2736; 16, KCTC 2737; 17, KCTC 2810; 18, KCTC 2928; 19, KCTC 2954; 20, KCTC 2962.

Fig. 6의 결과를 토대로 병어 및 먹이생물에서 분리된 *Vibrio* 균주의 *V. ichthyoenteri* 종 특이적 primer에 대한 확인을 위하여 이전 실험에서 분리된 18group에 균주의 genomic DNA를 분리하여 detection PCR 반응을 수행한 결과 Fig. 7에서 보듯이 Lane 19(isolated strains, Q group)와 20(isolated strains, R group)에서 즉, 생화학적 성상 등을 통해 *V. ichthyoenteri*로 분류되었던 2개 그룹의 균주에서 목적하는 band를 확인하였고, 확인된 그룹에 genomic DNA를 Universal primer인 27F 5′-AGAGTTTGATC CTGGCTCAG-3′ Forward primer와 1522R 5′-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′ Reverse primer를 사용하여 16R ribosomal RNA PCR 반응 후 sequencing 한 결과 *Vibrio ichthyoenteri*와 99% 일치하는 결과를 보여주었다(Fig. 8.).

*Vibrio ichthyoenteri*로 동정 되어진 YG-1과 YG-2는 다른 group으로 분류 되어진 이유는 Table 7, 8, 9에 결과에서도 나타나듯이 다른 특성은 일치하나 탄수화물 발효 특성에서 sucrose 분해능이 약하여 TCBS agar 평판배지에서 Green conoly로 자라는 차이로 나뉘었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

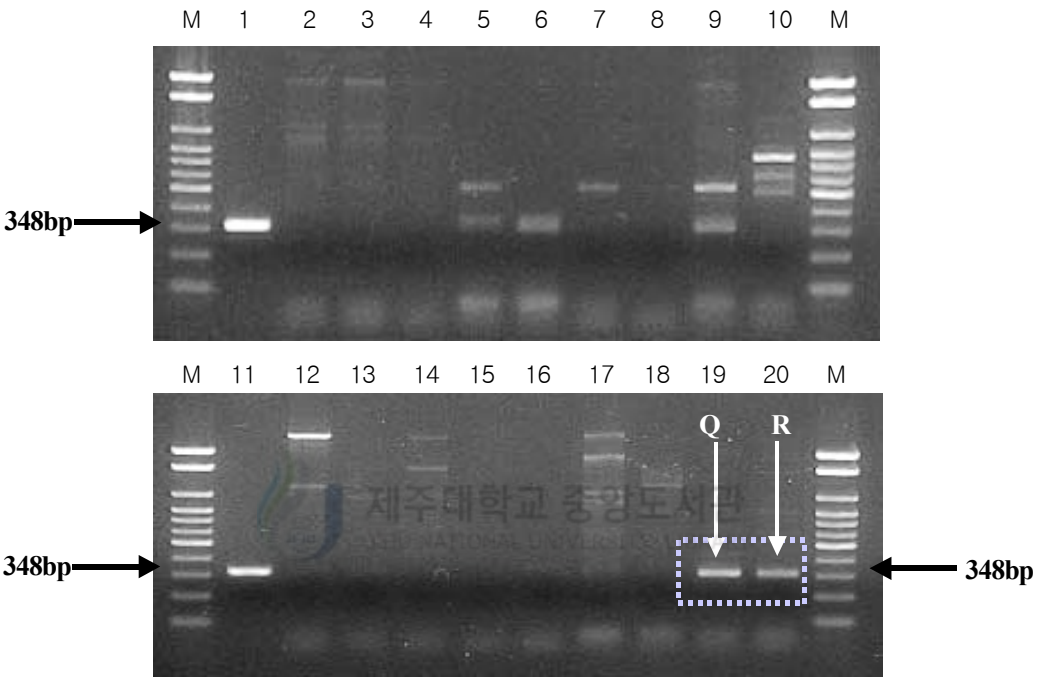


Fig. 7. PCR amplification of the rRNA of different Vibrio strains using ISR-targeted primer. ICH ISR-F and 23SR-ICH. Lane M, 100bp DNA ladder; 1, 11: KCCM 40870; 2: ioslated A group; 3: isolated B group; 4: isolated C group; 5: isolated D group; 6: isolated E group; 7: isolated F group; 8: isolated Ggroup; 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 Qgroup; 20: isolated Rgroup.

```
R-1             GATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACATTTCAAAAGCTT 60
YG-1            ------------------------------------------------------------
YG-2            --------------TGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACATTTCAAAAGCTT 46

R-1             GCTTTTGAAGATGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAATATGCCTTGATGTG 120
YG-1            -------------------------CGGGTGAGTAATGCCTGGGAATATGCCTTGATGTG 35
YG-2            GCTTTTGAAGATGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAATATGCCTTGATGTG 106
                                         **********************************

R-1             GGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGG 180
YG-1            GGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGG 95
YG-2            GGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGG 166
                ************************************************************

R-1             ATCTTCGGACCTCTCGCGTCAAGATTAGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAT 240
YG-1            ATCTTCGGACCTCTCGCGTCAAGATTAGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAT 155
YG-2            ATCTTCGGACCTCTCGCGTCAAGATTAGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAT 226
                ************************************************************

R-1             GGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTG 300
YG-1            GGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTG 215
YG-2            GGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTG 286
                ************************************************************

R-1             AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA-- 358
YG-1            AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA-- 273
YG-2            AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCATA 346
                ********************************************************

R-1             AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAG 418
YG-1            AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAG 333
YG-2            AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAG 406
                ************************************************************
```

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

```
R-1             TCGTGAGGAAGCCGTATTAGCGTTAATAGCGTTATTGTTTGACGTTAGCGACAGAAGAAG 478
YG-1            TCGTGAGGAAG--GTATTAGCGTTAATAGCGTTATTGTTTGACGTTAGCGACAGAAGAAG 391
YG-2            TCGTGAGGAAG--GTATTAGCGTTAATAGCGTTATTGTTTGACGTTAGCGACAGAAGAAG 464
                ***********  **************************************************

R-1             CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAA 538
YG-1            CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAA 451
YG-2            CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAA 524
                ************************************************************

R-1             TTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTC 598
YG-1            TTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTC 511
YG-2            TTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTC 584
                ************************************************************

R-1             AACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTC 658
YG-1            AACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTC 571
YG-2            AACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTC 644
                ************************************************************

R-1             AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT 718
YG-1            AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT 631
YG-2            AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT 704
                ************************************************************

R-1             GGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG 778
YG-1            GGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG 691
YG-2            GGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG 764
                ************************************************************

R-1             TAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGA 838
YG-1            TAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGA 751
YG-2            TAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGA 824
                ************************************************************
```

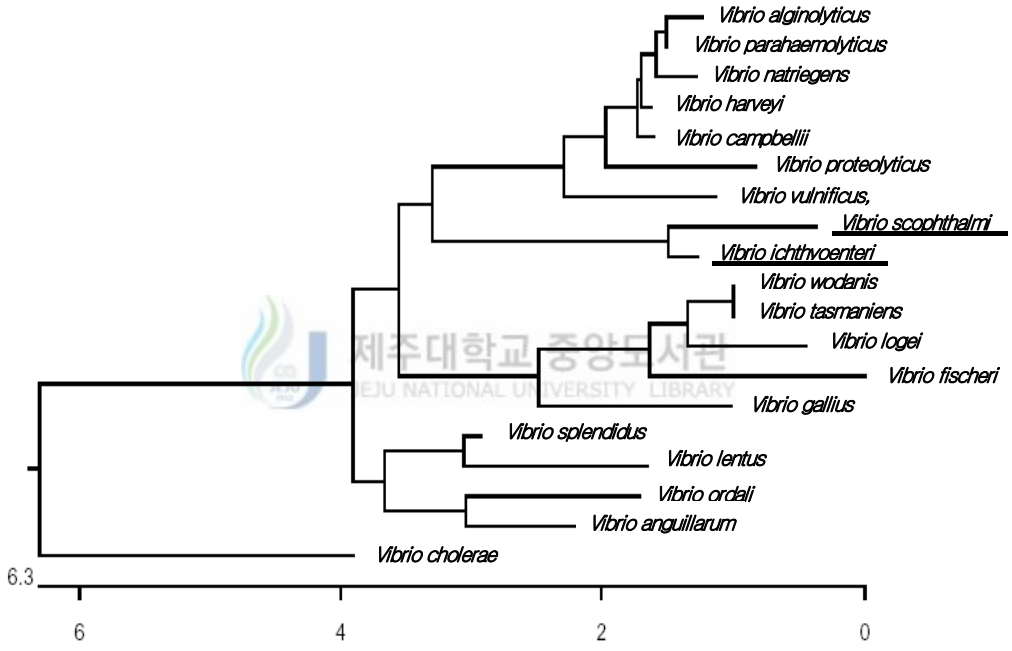
```
R-1             --GCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAATGA 896
YG-1            ATGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAATGA 811
YG-2            --GCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAATGA 882
                  ************************************************************

R-1             ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAA 956
YG-1            ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAA 871
YG-2            ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAA 942
                ************************************************************

R-1             CCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCAGGTGTGCCTTCGGGAACT 1016
YG-1            CCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCAGGTGTGCCTTCGGGAACT 931
YG-2            CCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCAGGTGTGCCTTCGGGAACT 1002
                ************************************************************

R-1             CTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC 1076
YG-1            CTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC 991
YG-2            CTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC 1062
                ************************************************************

R-1             GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGA 1136
YG-1            GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGA 1051
YG-2            GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGA 1122
                ************************************************************

R-1             CTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAG 1196
YG-1            CTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAG 1111
YG-2            CTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAG 1182
                ************************************************************

R-1             TAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCTGCCAACCAGCGATGGTGAGC 1256
YG-1            TAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCTGCCAACCAGCGATGGTGAGC 1171
YG-2            TAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCTGCCATT-------------- 1228
                ******************************************
```

```
R-1             GAATCCCAAAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG 1316
YG-1            GAATCCCAAAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG 1231
YG-2            ------------------------------------------------------------

R-1             GAATCGCTAGTAATT 1331
YG-1            GAATCGCTAGTA--- 1243
YG-2            ---------------
```

Fig. 8. Alignment of representative 16S rRNA sequence of R-1(*Vibrio ichthyoenteri* KCCM 40870) and Isolated strains YG-1(Q group), YG-2(R group).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

그리고 참고적으로 *V. ichthyoenteri* 와 가장 유사한 염기서열을 가지고 있다고 알려진 *V. scophthalmi* 야생분리균주(Table 4, Fig 9.)를 detection primer(Table 2)를 가지고 detection PCR을 수행한 결과 Fig. 10. 에서 나타나듯이 *V. ichthyoenteri* 만이 검출되었다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 9. Dendrogram showing the phylogenetic relationship among trains 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.

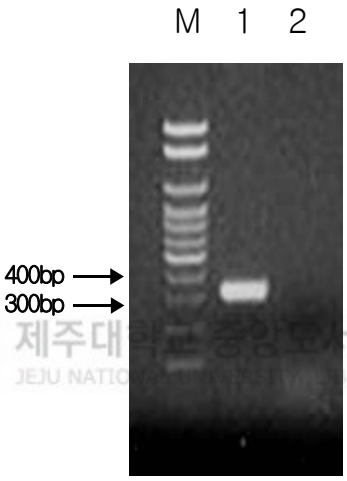


Fig. 10. PCR amplification of the rRNA of different *Vibrio* strains using ISR-targeted primer. ICH ISR-F and 23SR-ICH.

Lane M, 100bp DNA ladder, Lane 1,*Vibrio ichthyoenteri* 2,*Vibrio scophthalmi*

Fig. 6, 7, 10. 에서 나타난 결과를 보면 *Vibrio ichthyoenteri* 를 detection 하기 위해 제작한 species-specfic primer인 ICH ISR-F primer 5′-CCAGCACTGGCTAATCCAC AAC-3′와 23SR-ICH primer 5′-GGTGGCACATGCGAATCAGTG-3′를 이용한 PCR 반응 결과 종 특이적으로 장관백탁증 원인균인 *Vibrio ichthyoenteri* 를 검출할 수가 있었다.

특히, Fig. 9. 에서 실험에 사용된 대조균주 *Vibrio scophthalmi* 는 *Vibrio ichthyoenteri* 와 염기서열이 가장 유사하다고 알려져 있고 또한 배양온도를 비롯한 생물학적 특성이 가장 유사한 세균으로 알려져 있다(M. Cerda-Cuellar and A.R. Blanch., 2002). 이러한 특성을 가지는 *Vibrio* 종과 본 연구에서 제작된 primer를 사용하여 detection PCR을 수행한 결과에서도 *Vibrio ichthyoenteri*만이 검출이 되었다(Fig.10.). 이러한 결과를 종합하여 볼때 본 연구에서 제작한 primer를 사용한 PCR 반응에서 종 특이적으로 장관백탁증 원인균인 *Vibrio ichthyoenteri* 를 검출할 수가 있었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅳ. 고찰

어류의 질병 중에는 세균성 질병이 가장 많은 것으로 알려져 있으며, 국내 양식넙치의 세균성 질병에 대한 연구는 *Edwardsiella tarda*(방 등, 1992), β-용혈성 *Streptococcus* sp.(허 등, 2001), 그리고 이 등(1991)의 *Vibrio* sp. 에 대한 연구 등이 보고되고 있다. 특히 해양에서 많이 분리되는 *Vibrio*속 세균은 담수 및 해수와 같은 넓은 수역에서 검출되는 호염성 종속영양세균으로 몇종을 제외한 대부분은 oxidase, catalase 시험에 양성반응을 나타내는 균으로 성장에는 sodium ion을 필요로 한다. 식중독균을 포함한 인체 병원균, 어류, 동물, 해수 및 환경으로부터 분리되어지고 있다. 현재까지 40종 이상이 알려져 있으며 새로운 종들이 계속 보고되고 있다(Skerman *et al*., 1989; 김 등, 2000).

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

우리나라에서 생선회로 가장 많이 먹고 있는 어종 중의 하나인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 현재 우리나라에서 양식되고 있는 주요한 경제 어종 중의 하나로 분류학적으로 가자미목(Order *Pleuronectida*), 넙치과(Family *Bothidae*)에 속한다. 우리나라의 넙치 종묘 생산은 1970년대 후반부터 본격적으로 시작이 되었고, 제주도 넙치 육상양식은 1986년부터 이루어지기 시작하였으며, 현재는 제주도 양식어민에게 있어 주요한 소득원이 되고 있다. 이렇게 넙치 양식산업의 급격한 성장에도 불구하고 인위적인 양식으로 인한 환경, 영양, 고밀도 양식 등 생물학적, 무생물학적 조건변화로 해마다 어류 질병이 발생하여 양식산업 발전을 크게 저해하고 있다.

어류의 질병을 일으키는 생물학적 요인으로는 어체 자체의 유전적요인 외에도 바이러스, 세균, 진균, 기생충 등에 감염되어 질병이 발생된다. 현재 해산어 양식업에서 가장

피해를 주는 미생물은 세균으로 생각되며, 가장 대표적인 어병세균이 *Vibrio*이다. 궤양증 및 복수증을 보이는 양식 넙치에서 9종의 *Vibrio*가 분리 보고 되었고(이 등, 1991), 가두리 양식장의 넙치 등의 해산어류의 어병 원인균들 중 하나가 *Vibrio*임을 밝혔고(최, 1997), 넙치 알과 유생에서 감염을 유발하는 가장 주요한 세균이 *Vibrio*라는 연구결과들이 보고되고 있다(Miyazaki *et al*,. 1990; Muroga, 1995; Yoshimuzu *et al.*, 1999). 특히, 넙치 종묘생산에 있어 넙치 자치어기의 폐사 원인에는 유전적, 환경적 요인 등과 같은 비감염성 질병에 의한 폐사 비율이 높은 편이나 세균 또는 바이러스성 질병과 같은 감염성 질병에 의한 폐사 비율이 계속 증가하고 있다(Nishioka et al., 1997).

넙치 치어기 이후에 주로 어체에 영향을 미치는 전신성 세균성 질병은 Vibriosis, edwardsiellosis, streptococcosis 등이 보고되어 있으나 자어기에는 이러한 전신성 질병을 일으키는 질병에 관한 보고는 없다(이, 2000; Muroga, 2001). 자어기에 있어 전신성 감염증이 발생하지 않는 이유는 아직까지 명확하게 밝혀져 있지 않지만 넙치 자어기에 있어 높은 폐사율을 나타내는 *V. ichthyoenteri* 에 의한 장관백탁증은 전신성 감염이 아니며 단지 장관내에서만 병리학적인 변화와 함께 폐사를 일으키는 국소성 감염 질병이라고 보고하였다(Muroga, 1990, 2001). 본 논문에서는 넙치 자어기에서만 감수성이 있는 *V. ichthyoenteri* 의 생물학적, 생화학적 특성을 조사하여 *V. ichthyoenteri* 에 관한 기초 자료를 얻는 반면 분자생물학적 기법을 이용하여 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR)분석을 통하여 감염초기에 보다 빠른 병원균의 검출을 위한 Detection probe를 개발하고자 하였다.

2003년 5월과 2003년 10월 동안에 제주도내 5개소 넙치 종묘배양장에서 초기 먹이로 공급되어지는 동물성 플랑크톤인 rotifer와 배양수 그리고 20~30일령 넙치 자어에서 장관백탁증 원인균으로 보고되어진 *V. ichthyoenteri* 를 분리하기 위해 실험한 결과 각각의 종묘배양장에서 총 85개에 우점 세균을 분리할 수가 있었고, 그 중 비브리오 선택배지인 TCBS 성장과 0% 염분농도에서의 성장유무 그리고 4℃에서의 증식 여부

(Alsina and Blanch, 1994), Vibriocidal agent O/129 감수성 시험을 통해 총 71개의 *Vibrio* sp.를 분리하였다. 분리된 각각의 *Vibrio* sp.에 대해 생물학적, 생화학적 특성을 조사한 결과 총 18개의 생화학 group으로 분류 할 수가 있었다. 이 중 2group(Q, R group)의 균주들이 참조균주(Ishimaru *et* al., 1996)와 각각 TCBS 배지내 scurose 이용능에 차이를 제외 하곤 생물학적 및 생화학적 특성과 배양 성상이 동일하였으며, 분리균주와 본 균주의 종간 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 750bp에서 6kb까지의 분자량으로 동일한 다형성 밴드를 형성하였으며, universal primer인 27F forward primer와 1522R reverse primer를 가지고 16S Ribosomal RNA PCR을 수행한 후 NCBI의 blast program을 이용하여 염기서열을 분석한 결과에서도 *V. ichthyoenteri*와 99% 일치하여 동일한 종으로 판단이 되어졌다.

이로써 *V. ichthyoenteri* 는 염분농도 3% 전후와 배양온도 25℃ 그리고 PH 7~8가 최적의 성장조건임을 알수가 있었고, 또한 TCBS에서 성장시 배지내 sucrose 이용능에 차이에따라 green colony와 yellow colony로 나타난다는 것을 알 수가 있었다.

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 (Goodfellow *et* al., 1997). 그러나, 16S rRNA 유전자를 비롯한 RNA 유전자 부분은 염기서열 변이도가 낮아 종단계 미만, 예를 들면 serotype 의 동정에는 사용하기 어렵다고 알려져 있다. 그래서 현재 환경, 식품 의약 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

제주대학교 중앙도서관

변이도가 크다. 두개의 ISR중 특히 16S와 23S rRNA 사이의 ISR이 세균동정에 많이 사용되고 있다.

본 연구는 *V. ichthyoenteri* 의 16S-23S rRNA ISR 분석을 하여 *V. ichthyoenteri* 를 신속하고 정확하게 동정하고 또한, species-specific Detection probe를 개발하여 감염 초기에 보다 빠른 병원균의 검출을 하기위함이다.

지금 까지 *Vibrio*의 ISR에 대한 연구는 *V. parahaemolyticus, V. cholerae, V. mimicus* 를 포함한 13종의 Vibrio를 대상으로 실시되었고(Chun *et al*., 1999; Maeda *et al*., 2000), ISR 증폭을 위해 사용한 Primer는 *E. coli* 의 16S와 23S rRNA 염기서열에 기초하여 제작하여 사용하였는데, 본 연구에서는 *V. ichthyoenteri* 를 포함한 비브리오종 내 16S rRNA gene과 23S rRNA gene의 가장 보존의 잘된 영역의 염기서열을 사용 multiple aligment를 수행한 후 염기서열 변이도가 큰 부분을 선택하여 *V. ichthyoenteri* ISR 증폭 primer를 제작하여, ISR 증폭시 최적의 primer annealing 조건을 얻을 수 있었다.

제주대학교 중앙도서관

ISR에 존재하는 tRNA coding gene의 조합에 따라 현재까지 보고된 *Vibrio* 에 ISR type을 분석한 결과를 보면 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 10종류의 ISR을 확인 할 수가 있다. 또한 Vibrio의 있어 가장 일반적인 ISR type이 ISR-E와 ISE-IA라는 것도 확인 할 수가 있으나, 본 실험에 사용된 장관백탁증 원인균인 *V. ichthyoenteri* (KCCM 40870) ISR type은 tRNA gene이 없는 ISR-no type 인 것으로 확인이 되었다. 이렇게 분석된 ISR 서열을 가지고 *V. ichthyoenteri* 의 신속한 검출을 위한 species-specific primer를 제작하였다.

Vibrio ichthyoenteri KCCM 40870 ISR의 특이적인 서열을 이용하여 제작한 primer와 23S rRNA의 일부 서열에 해당하는 primer(Table 2)를 가지고 *V. ichthyoenteri*를 포함한 20종의 *Vibrio* (Table 3)의 genomic DNA를 PCR 한 산물을 전기영동한 결과 (Fig. 6)와 18개의 생화학 group(Table 6)의 genomic DNA를 PCR 한 산물을 전기영동

한 결과(Fig. 7, Fig. 8), 그리고 *V. ichthyoenteri* 와 가장 유사한 염기 서열을 가지고 있다고 알려진 *V. scophthalmi* 와 PCR 한 결과(Fig. 10)를 분석하여 볼 때 *V. ichthyoenteri* 만의 특이적인 band가 생성됨을 알 수가 있다.

따라서, *V. ichthyoenteri* KCCM 40870 ISR의 서열로 제작한 primer가 넙치 자치어에 발병하는 장관백탁증 원인균인 *Vibrio ichthyoenteri* 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.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅴ. 요약

장관백탁증의 원인균인 *Vibrio ichthyoenteri*는 경구감염이 유일한 감염경로로 인식되고 있으며, 발병시 대량 폐사로 이어지는 질병이지만 약 40일령 이후에는 감수성이 없는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 넙치 자어기의 먹이생물 섭취에 의한 장관백탁증 원인 균의 감염 경로를 파악하기 위하여 초기 먹이로 공급되어지는 동물성 플랑크톤인 rotifer와 넙치 자치어에서 장관백탁증 원인균으로 알려진 *V. ichthyoentri*의 분리를 실시하였다. 또한 분리되어진 *V. ichthyoenteri* 의 생물학적, 생화학적 특성을 조사하여 *V. ichthyoenteri* 에 관한 기초 자료를 얻는 반면 분자생물학적 기법을 이용하여 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region (ISR)분석을 통하여 감염초기에 보다 빠른 병원균의 검출을 위한 Detection probe를 개발하고자 하였다.

2003년 5월과 2003년 10월동안에 넙치 종묘배양장에서 초기 먹이로 공급되어지는 동물성 플랑크톤인 rotifer와 20~30일령 넙치 자어 및 배양수에서 *V. ichthyoenteri*를 분리하기 위해 실험한 결과 총 71개의 *Vibrio* sp. 분리가 되었고, 생화학적 동정결과 2개의 그룹에서 24개의 *V. ichthyoenteri*가 동정되어 일본에서 분리된 참조균주와 종간 유연관계를 확인하여 본 결과 750bp에서 6kb까지의 분자량으로 동일한 다형성 band pattern을 나타내어 동일한 종으로 판단되었다. *V. ichthyoenteri*의 신속한 검출을 위한 종특이적 primer는 *V. ichthyoenteri*(KCCM 40870) ISR의 서열 중 non-coding region 내 가변부위를 표적으로 하여 제작하였다. 그리고 제작된 primer에 특이성을 확인하기 위하여 *V. ichthyoenteri*(KCCM 40870)을 Positive control로 하여 KCTC에서 분양받은

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

19종의 *Vibrio* 속 균주의 genomic DNA와 분리 균주 18group genomic DNA 그리고 참조균주와 가장 유사한 염기서열을 가지고 있다는 *Vibrio scophthalmi*의 genomic DNA를 가지고 PCR 결과 *V. ichthyoenteri* 만의 특이적인 band가 생성됨을 알 수가 있다. 또한 분리 균주 18group PCR 결과에서 생화학적 동정에서 *V. ichthyoenteri*로 동정 되어진 Q, Rgroup에서 참조균주와 동일한 band pattern을 나타내어 16S rRNA sequencing 결과 *V. ichthyoenteri*와 99% 일치하였다.

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

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ⅵ. 참고문헌

Andrews, A. T(1986). Electrophoresis: Theory, techniques, and biochemical and clinical applications. Oxford university press, Oxford, UK.

Alsian, M. & Blanch, R. A(1994). A set of keys for biochemical identification of environmental Vibrio species. J. Appl. Bacteriol., 76:79-85.

Bisbal, G. A. & Bengtson, D.A(1995). Development of the digestive tract in larval summer flounder. J.Fish Biol., 47:277-291.

Berridge BR, Fuller JD., & Frelier PF(1998). Development of Specific Nested Oligonu-cleotide PCR Primers for the Streptococcus iniae 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer. J Clin Microbiol., 36(9):2778-2781.

Chun J, Huq A, Colwell RR(1999). Analysis of 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. Appl Environ Microbiol., 65(5) : 2202-2208.

Criado-Fornelio, A., E. Mialhe, E. Constantin, and H. Grizel(1989). Experimental infection of *Artemia* sp. by *Fusarium solani*. Bull. Eur. Assoc. *Fish Pathol*., 9:35-37.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

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.

Condon, C., C. Squires and C. L. Squires. 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli. Microbiol. Rev.,* 59: 623-645.

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*(Temmminck & schlegel). Journal of Fish Diseases., 27:497-505.

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.

Farmer, J. J., & F.W.Jickman-Bremmer(1992). The genera Vibrio and Photobacterium, P-.2952-3011. In A.Balows, H. G. Tr.per, M. Dworkin, W.Harder, and K.-H. Schleifer(ed), The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, N.Y.

Goodfellow, M ., G. P. Manfio, and J. Chun(1997). Towards a practical species concept for cultivable bacteria, p. 25-59 In M. F. Claridge, H.A. Dawah, and M. R. Wilson (ed.), The Units of Biodiversity- Species in Practice. Chapman and Hall, London.

제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

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.

Govoni, J. J., Boehlert, G. W., Watanabe, Y(1986). The physiology of digestion in fish larvae. Environ. Biol. Fish., 16:59-77.

Gunther, D. C., and A. Catena. 1980. The interaction of *Vibrio* with *Artemia* nauplii, p. 213-221. *In* G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, and E. Jaspers(ed.), The brine shrimp-*Artemia*-ecology, culturing and use in aquaculture, vol. 3. Universa Press, Wetteren, - Belgium. Microbiol., 65:2527-2533.

G. A. Bisbal., and D. A. Bengston(1995). Development of the digestive tract in larval summer flouder. *Journal of Fish Biology.,* 47:277-291.

Ishimaru, K., Akagawa-Matsushita, M., Muroga, K(1996). *Vibrio ichthyoenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder Paralichthys olivaceus larvae. Inter. J.syst bacteriol., 46(1):155-159.

Johan Vandenberghe, Fabiano L. Thompson, & Jean Swings (2003). Phenotypic diversity amongst Vibrio isolates from marine aquaculture systems. Aquaculture., 219:9-20.

Kang, D. L. and H. K. Lee. Unpublished. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer-reigons of *Aermonas veronii biovar sobria and Aermonas caviae.*

제주대학교 중앙도서관

Kim, M. S., Jeong, H. D. 2001. Development of 16S rRNa targeted PCR Methods for the detecion and differntition of *Vibrio vulnificus* in marine environments. *Aquaculture*., 193:199-211.

Lebenthal, E(1989). Concepts in gastrointestinal development. In:Human Gastrointestinal Development. E. Lebenthal,ed. Raven Press, New York,pp.3-18.

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: 410-420.

Lee HK., Lee SS(1997). Identofication of the Vibrios isolation from the Shrmp(*Carngon affinis*) in estuary of Nakdong river in Korea. J Korean Microbiol., 32:523-537.

Michael, T. M., John, M. M., Jack, P(2000). Brock Biology of Microorganisms(Ninth-edition)., 422-452.

Masumura, K., Iida, Y., Nakai, T., Mekuchi, T(1989). The effects of water temperature and fish age on a herpesvirus infection of Japanese flounder larvae, Paralichthys olivaceus. Fish Pathol., 24:111-114.

Masumura, K., Yasunobu, H., Okada, N., Muroga, K(1989). Isolation of a Vibrio sp., the causative bacterium of intestinal necrosis of Japanese flounder larvae.

제주대학교 중앙도서관

Fish Pathol., 24:135-141.61.

Munro P.D., Barbour A. & Barbour A(1993). Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas sp*. Applied and Environmental Microbiology., 61:4425-4428.

Murata, O(1987). Infectious intestinal necrosis in flounder. *Fish Pathol*., 22:59-61.

Miyzaki, T., N. Kajihhara, K. Fujiwara and S. Egusa(1990). A histopathological study on intestinal necrosis of larval Japanese flounder. *Fish Pathol*., 25:7-13.

Muroga, K., Yasunobu, H. Okada, N., & Masumura, K(1990). Bacterial enteritis of cultured flounder Paralichthys olivaceus larvae. Dis. Aquat. Org., 9:121-125.

Muroga, K(2001). Viral and bacterial diseases in larval and juvenile marine fish and shellfish : A review. *Fish Pathol*., 30:71-85.

Michael, T. M., John, M. M., Jack, P(2000). Brock Biology of Microorganisms(Ninth edition)., 422-452.

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.

제주대학교 중앙도서관

MacFaddin J.F(2000). Individual biochemical tests. In: *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 3rd edn, pp.1-456.

M. Cerda-Cuellar and A. R. Blanch(2002). Detection and identification of *Vibrio scophthalmi* in the intestinal microbiota of fish and evalution of host specificity. Journal of Applied Microbiology., 93:261-268.

Nishioka, T., Furusawa, T., & Mixuta, Y(1997). Disease occurring in marine fish and shell-fish hatcheries in Japan(1989-1994). Suisan Zoshoku., 45:285-290.

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.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Ringo, E., & Birkbeck, T. H(1999). Intestinal microflora of fish larvae and fry. Aquaculture Research., 30:73-93

Robert-Pillot, A., S. Baron, J. Lesne, J. M. Fournier and M. L. Quilici(2002). Improved specific detection of *Vibrio cholerae in environmental water samples by culture on selective medium and colony hybridization assay with an oligonucleotide probe. FEMS Microbiol. Ecol.,* 40:39-46.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T(1989). Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Skerman, V.B.D., V. MacGowan and P.H.A. Sneath(1989). Approved lists of bacterial names. American Society for Microbiology. Washington D.C. USA.

Tanasomwang, V. & Muroga, K(1988). Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder Paralichthys olivaceus. Fish Pathol., 23:77-83.

Valle, L. D., Zanella, L., Belvedere, P. and Colombo, L(2002). Use of random amplication to develop a PCR detection method for the causative agent of fish pasteurellosis, *Photobacterium damselae* subsp. *piscicda*(Vibrionaceae). *Aquaculture*.,207:187-202.

Young, R. A., R. Macklis and J. A. Steitz(1979). Sequence of the 16S-23S spacer regionin two ribosomal RNA operons of *Escherichia coli. J. Biol. Chem.,* 254:3264-3271.

Yasuda, K., and N. Taga(1980). A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. Mer 18:53-62.

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.

제주대학교 중앙도서관

김영만, 김영목, 김지희, 목종수, 박미연, 박욱연, 성희경, 신일식, 오은경, 이명숙, 이원동, 이태식, 이희정, 조학래, 최종덕, 허성호(2000). 수산식품 식중독 관련 미생물 - 비브리오속.(수산식품위생학). 정명당., pp. 21-46.

박성우, 오명주(2001). 어류질병.진솔., pp.100-104.

방종득, 전세규, 박수일, 최윤정(1992). 양식넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 생화학적 및 혈청학적 특성에 관한 연구. 한국어병학회지., 5:29-35.

심두생, 이주석, 허문수, 김진우(1995). 양식생물 질병진단 연구(분리균주에 대한 혈청학적 진단 및 최소발육저지농도 조사). 수진사업보고서:405-423.

이정백, 노섬, 송춘복(1995). 넙치, Paralichthys olivaceus 자어에서 분리한 장관백탁증의 원인균인 Vibrio sp.(INFL group)의 생물학적 및 생화학적 특성. 한국어병학회지., 8(2):99-109.

오상필, 김대환, 이정재, 이창훈(1998). 제주도 양식넙치의 세균성질병 발생현황(1991-1997). 한국어병학회., 11(1):23-27.

이길응, 김희연, 박천제, 이현부, 김희제, 이명원, 김호훈, 허종화, 이훈구, 이근선, 박경호, 김동해, 정호역(1993). 연근해 호염균속 및 위생환경에 관한 조사연구. 국립보건원보., 22: 539-554.

제주대학교 중앙도서관

이주석, 손상규, 허문수, 최동림(1995). 양식생물 질병진단 연구(증양식분야). 국립수산진흥원 사업보고서 :496-504.

이훈구, 김희제, 김일(1991). 동절기 한국 남해안의 궤양증 및 복수증 양식넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터 *Vibrio* 종의 분리. 미생물학회지., 29:319-328.

제주도(2003). 해양수산현황.

진창남, 이창훈, 오상필, 나오수, 허문수(2003). 양식넙치, *Paralichthys olivaceus* 치어의 스쿠티카충 감염경로. 한국어병학회지., 16(1):13-21.

장동석, 김창훈, 유홍식, 김신희, 정은탁, 신일식(1996). 병원성 비브리오균과 동물성 플랑크톤과의 관계에 관한 연구. 한국수산학회지., 29:557-566.

최상덕(1997). 가막만 가두리 양식장의 어류질병에 관한 연구. 양식학회지., 10:9-15.

허문수, 송춘복, 이제희, 여인규, 전유진, 이정제(2001). 제주산 양식넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리된 β-용혈성 연쇄구균(β-*Streptococcus* spp.)의 특성. 한국수산학회지., 34:365-369.

제주대학교 중앙도서관

감사의 글

어느덧 2년이란 세월이 흘렀습니다. 논문의 마지막장에 이렇게 글을 올릴수 있기까지는 너무나 많은 분들의 도움이 있었습니다.

때로는 호된 질책으로 때로는 너그러운 사랑으로 제자를 이끌어 주신 허문수 교수님께 커다란 감사의 말씀 전해드립니다. 또한, 지도교수님이 안계시는 동안 많은 가르침을 주신 박근태 박사님께 깊은 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 학부생때부터 실험에 대한 흥미를 이끌어 주시고, 바쁘신 가운데도 논문을 검토해 주신 송춘복 교수님을 비롯한, 저희 들에게 올바른 사람 삶을 깨우쳐 주신 해양생물공학과 이제희 교수님, 여인규 교수님, 전유진 교수님께 깊은 감사에 말씀을 드립니다. 대학원생으로서, 2년의 실험실 생활은 진리탐구와 함께 뜨거운 인간의 정을 보듬어 안는 기간이었습니다. 바쁘신 와중에도 언제나 관심을 아끼지 않았던 제주지방 해양청에 진창남 계장님, 그리고 해양수산자원연구소에 강봉조 연구사님께 감사드립니다. 힘들때마다 조언과 격려를 아끼지 않았던 해양미생물실험실 가족인 병규형, 용욱이형, 철영이형 그리고 믿음직한 후원자가 되어 주었던 실험실 후배인 만철, 수미, 민주, 선경, 태원, 주상, 현식에게 고마움을 전합니다. 아울러 실험을 하는 동안 어려울 때마다 많은 도움을 준 분자 유전학실험실에 철홍, 현실, 영미에게 고마움을 전합니다. 그리고, 2년여의 대학원생활 동안 서로 어려운 상황속에서도 언제나 힘을 잃지 않게 격려해준 나의 친구들인 수진, 영빈, 문휴, 맹진이형, 정환에게 심심한 감사에 말을 전합니다. 또한, 부족한 선배지만 언제나 믿고, 힘이 되어주었던 대학원 후배인 상규, 태형, 길남, 기정, 경임에게 고마움에 마음을 전합니다.

정말 많은 분들이 저를 여기까지 이끌어 주었습니다. 다시 한번 깊은 감사에 마음을 전합니다.

끝으로, 어느 누구보다 저를 걱정해주시고, 믿어주시고 항상 기도해주신 사랑하는 어머니, 아버지에게 그리고 나의 형, 동생들에게 깊은 감사에 마음을 드립니다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY