

제한효소 DNA 분석법에 의한 국내분리 렙토스피라균의 동정

서울대학교 의과대학 미생물학교실, 생화학교실², 암연구소, 충북대학교 미생물학교실¹

장우현 · 김석용¹ · 서정선²

=Abstract=

Restriction Endonuclease DNA Analysis of Leptospiral Field Isolates from Korea

Woo-Hyun Chang, Suck-Yong Kim¹ and Jeong-Sun Seo²

Department of Microbiology, Department of Biochemistry², Cancer Research Institute, College of Medicine, Seoul National University and Department of Microbiology¹, College of Medicine, Chungbuk National University

The genomes of leptospiral field isolates from Korea belonging to serogroup *Icterohaemorrhagiae* (21 strains) and serogroup *Canicola* (1 strain) were analysed and compared by restriction enzyme analysis with EcoRI and HindIII as digesting enzymes.

One isolate belonging to serogroup *Canicola* showed the same pattern as serovar *portlandvere*. All 21 isolates belonging to serogroup *Icterohaemorrhagiae* showed almost same patterns as *Leptospira* serovar *lai* from China, But with very slight differences 21 isolates could be classified into 8 subtypes and these grouping seems to reflect the differences in epidemiological niche. And also the geographical data consisted with the grouping into 8 subtypes. According to our results, we concluded that the restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA will be an accurate and reliable method to compare and classify pathogenic leptospires.

Key Words : Restriction endonuclease DNA analysis, *Leptospira*.

서 론

*Leptospira interrogans*는 180여 serovar로 구성되고 있으며 주 공유 응집원을 중심으로 19개의 혈청군으로 나뉘어지고 있다¹⁾. 현재 우리나라에서 분리된 균주는 대부분이 *Icterohaemorrhagiae* 혈청군에 속하고, 일부 *Canicola* 혈청군에 속하고 있다는 것은 알려져 있으나³⁾ 정확한 혈청형은 알려져 있지 않다.

현재 국내분리 균주의 교차 흡수응집 반응에 의해 보고된 혈청형은 *mwogolo* 혈청형과 *birkini*형, *canicola* 혈청형이며²⁾ 새로운 혈청형일 것이라는 보고도 있다¹⁾.

최근에는 단세포균 항체를 이용하여 국내분리 균주의 혈청형을 동정하고자 하는 시도가 계속

되고 있으나 교차반응항원이 많기 때문에 동정에 어려움이 있다.

최근 papilloma virus⁹⁾, herpes simplex virus I 과 II⁶⁾, orthopoxvirus⁸⁾ 등의 동정에 제한효소 분석법이 이용되고 있다.

Leptospira DNA의 제한효소 분석법에 의한 혈청형 동정은 최초로 Marshall등¹³⁾이 보고한 이후로 매우 유용한 렙토스피라의 동정법으로 밝혀지고 있다^{12,14,16,17)}.

이에 저자들은 1984년과 1985년에 발생한 렙토스피라병 환자 및 각 지역의 들쥐에서 분리한 균주를 대상으로 제한효소 분석법에 의하여 렙토스피라균의 혈청형을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

Table 1. Isolated field strain

Human isolates(11 strains)			Rat isolates(11 strains)		
Isolated area	Strain	Year	Isolated area	Strain	Year
Yeoju	HY-1	1985	Yeoju	19R	1985
	HY-2	1985		20R	1985
Paju	AP-2	1985		21R	1985
Wonseong	WH-20	1984		26R	1985
Daedeog	HM4	1985		27R	1985
Jungweon	17H	1985		29R	1985
Goesan	L4H	1984	Paju	AP3	1985
Cheongweon	16H	1985		AP4	1985
Hwaseong	HV8	1985	Wonseong	WR-7	1984
Yeoncheon	HM3	1985	Hongcheon	18R	1985
Kongju	HS7	1985	Gwangsan	23R	1985

Table 2. Reference strains

Serogroup <i>Icterohaemorrhagiae</i>		Serogroup <i>Canicola</i>	
Serovar	Strain	Serovar	Strain
<i>birkini</i>	Birkin	<i>portlandvere</i>	1039(63-69)
<i>bog-vere</i>	LT60-69	<i>bindjei</i>	Bindjei
<i>budapest</i>	PV-1	<i>jonsis</i>	Jonsis
<i>copenhageni</i>	M-20	<i>schueffneri</i>	Vleermuis
<i>gem</i>	Simon	<i>sumneri</i>	Sumneri
<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA	<i>galtoni</i>	1014
<i>monymusk</i>	LT75-600	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV
<i>naam</i>	Naam	<i>benjamin</i>	Benjamin
<i>mwogolo</i>	Mwogolo	<i>bafani</i>	Bafain
<i>dakoda</i>		<i>kamituga</i>	Kamituga
<i>ndahambukuje</i>	Ndahambukuje		
<i>ndambari</i>	Ndambari		
<i>mankarso</i>	Mankarso		
<i>sarmin</i>	Sarmin		
<i>smithi</i>	Smith		
<i>tonkini</i>	LT96-69		
<i>weaveri</i>	CZ-390		
<i>lai</i>	Lai		

1. 분리균주

1984년과 1985년에 국립보건원에서 분양받은 22개 균주를 사용하였다. 분리균주는 인체분리균주 11주와 들쥐분리균주 11주였다(Fig. 1).

이중에서 HS7균주는 혈청군이 *Canicola*였고 나머지 균주는 모두 혈청군이 *Icterohaemorrhagiae*에 속하였다.

2. 참조균주

Table 2에 표시된 모든 *Leptospira* 균주는 미국 CDC에서 분양받았으며, serovar *lai* 균주는 한림의대 조민기 교수로부터 분양받아 사용하였다.

3. 균주 배양

모든 균주는 EMJH 배지에 30°C에서 배양하였으며, 파장 400nm에서 흡광도 0.4까지 배양하여 사용하였다.

로 촬영하였다.

결 과

4. 렙토스피라 DNA분리

렙토스피라 DNA의 분리는 Le Febvre등¹²⁾의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉 potassium acetate 용액대신 5 μ l proteinase K(20mg/ml)용액을 가하고 37°C에서 18시간 반응시킨 후 폐놀로 추출하고 isopropyl alcohol 대신 ethanol로 침전시킨 DNA를 유리막대로 감아올려 DNA를 분리하였다.

5. 제한효소 절단

제한효소로는 EcoRI과 Hind III (New England Biolab)를 사용하였고 반응조건은 각 효소에 대한 제조회사의 조건대로 실시하였다.

6. 전기영동

Gel 농도를 1%와 0.7%로 하여 한천 gel 전기영동을 실시하였다.

12 \times 11cm 크기의 agarose gel을 20V로 16시간 혹은 24시간 영동하였다.

7. DNA염색과 촬영

전기영동된 DNA분획은 Ethidium bromide 염색 후 자외선 조사하에서 플라로이드 필름으

로 촬영하였다.

Fig. 1. REA patterns of serovar *mwogolo* and serovar *birkini* digested with EcoRI and Hind III.

Fig. 2. REA patterns of serovar *mwogolo*, serovar *birkini* and isolated field strains digested with EcoRI.

● : Size marker DNA(lambda phage DNA digested with Hind III)

Fig. 3. REA patterns of serovar *mwogolo*, serovar *birkini* and isolated field strains digested with Hind III.

● : Size marker DNA (lambda phage DNA digested with Hind III)

Fig. 4. REA patterns of 18 reference strains of serogroup *Icterohaemorrhagiae* and HM3 digested with EcoRI.

1. 제한효소 DNA 분석법에 의한 *mwogolo*와 *birkini*의 비교

국내분리균주와 유사한 혈청형으로 보고되고 있는 *mwogolo*와 *birkini*를 EcoRI과 Hind III를 이용한 제한효소 DNA 분석을 시행한 결과 서로 뚜렷이 구분되는 양상을 보였다(Fig. 1).

2. 제한효소 DNA 분석법에 의한 분리균주와 *mwogolo*, *birkini*의 비교

Fig. 5. REA patterns of 18 reference strains of serogroup *Icterohaemorrhagiae* and HM3 digested with Hind III.

국내분리균 22주와 serovar *mwogolo* 및 *birkini*와의 유사점을 알아보기 위하여 EcoRI과 Hind III를 이용한 제한효소 DNA 분석을 시행한 바 HS7균주를 제외한 HY1, HY2, AP2, AP3, AP4, 16H, 17H, L4H, WH20, HM3, HM4, 18R, WR7, HV8, 19R, 20R, 21R, 23R, 26R, 27R, 29R 등 21주는 모두 동일한 양상을 보였다. 그러나 이들은 *mwogolo*, *birkini*와는 일치하지 않았다(Fig. 2, 3).

Fig. 6. REA patterns of serovar *lai* and HM3 digested with EcoRI and Hind III.

● : Size marker DNA (lambda phage DNA digested with Hind III)

3. 제한효소 DNA 분석법에 의한 HM3와 참조균주와의 비교

HS7을 제외한 21개 분리균주중 HM3를 택하고, *Icterohaemorrhagiae* 혈청군에 속하는 *birkini*, *mwogolo* 등 18개의 혈청형과 EcoRI과 Hind III를 이용한 제한효소 DNA 분석법으로 비교하여 어떤 혈청형에 속하는가를 조사하였다 (Fig. 4, 5, 6).

Figure 6에서 보는 바와 같이 HM3는 serovar *lai* 균주와 매우 유사한 양상을 보였다.

이 결과로 미루어 보아 HY1, HY2, AP2, AP3, AP4, 16H, 17H, L4H, WH20, HM3, HM4, 18R, WR7, HV8, 19R, 20R, 21R, 23R, 26R, 27R, 29R 등 21개 분리균주는 모두 *lai* 균주와 유사함을 알 수 있었다.

4. 제한효소 DNA 분석법에 의한 HS7과 참조균주와의 비교

HS7균주와 *Canicola* 혈청군에 속하는 *canico-*

Fig. 7. REA patterns of 10 reference strains of serogroup *Canicola* and HS7 digested with EcoRI.

● : Size marker DNA (lambda phage DNA digested with Hind III)

la, *bindjei* 등 10개의 혈청형을 EcoRI과 Hind III를 이용한 제한효소 DNA 분석법으로 비교하여 HS7이 어떤 혈청형에 속하는가를 조사하였다.

Fig. 7, 8에서 보는 바와 같이 HS7은 serovar *portlandvere* 균주와 일치하는 양상을 보였다.

5. 제한효소 DNA 분석법을 이용한 국내 분리균주의 subtyping

분리균주의 DNA를 제한효소로 절단하여 1% agarose gel에서 16시간 전기영동을 하였을 때 나타나는 완전히 분리되지 아니하는 DNA 절편을 좀더 자세히 구별해보기 위하여 agarose gel의 농도를 0.7%로 낮추고 24시간 전기영동을 실시하였다.

그 결과 21개의 분리균주는 Fig. 9에서 보는 바와 같이 I 부위(9.5kb~11kb)와 II 부위(6kb~7kb)의 DNA 절편의 양상이 서로 차이가 있었다. 이들의 차이점을 분석한 결과 I 부위에는 4가지 형태로 나타났고, II 부위는 2가지 형태를

나타냈다(Fig. 10). 이 결과로 21개의 분리주를 조합하면 다음과 같다.

A1 : 19R, 20R, 26R

A2 : HM4

B1 : 18R, 21R

B2 : 16H, HY1, HV8, 27R

C1 : 29R

C2 : 17H, HY2

D1 : WH20, WR7, L4H

D2 : HM3, 23R, AP2, AP3, AP4

한편, serovar *lai* 균주와 분리균주를 0.7% agarose gel 24시간 전기영동하여 비교한 결과 *lai* 균주는 Fig. 11에서 보는 바와 같이 분리균주의 8가지 형태와 다른 양상을 보였다. 즉 I부위 (9.5kb~11kb)는 A형태보다 가운데 DNA 절편이 위쪽으로 치우친 양상을 보였고 II부위 (6kb~7kb)는 가운데 2개의 절편이 위 아래로 치우친 양상을 보였다.

6. 제한효소 DNA 분석법에 의한 국내분리균주의 Subtyping과 지역별 분포상황과의 비교

제한효소 분석 양상의 차이에 따른 8가지 형태의 분리균주를 분리지역별로 분포를 조사하여 본 결과 Fig. 12에서 보는 바와 같이 연천, 파주, 광산지역에서는 D2형, 홍천에서는 B1형, 원성과 괴산에서는 D1형, 증원에서는 C2형, 청원과 화성에서는 B2형, 대덕에서는 A2형이 분리된 반면에 여주에서는 A1, B1, B2, C1, C2형 등이 모두 분리되었다.

Fig. 8. REA patterns of 10 reference strains of serogroup *Canicola* and HS7 digested with Hind III.

● : Size marker DNA (lambda phage DNA digested with Hind III)

Fig. 9. REA patterns of 21 isolated field strains digested with EcoRI (0.7% agarose gel, 24hr electrophoresis).

● : Size marker DNA (lambda phage DNA digested with Hind III)

Fig. 10. 8 subtypes of 21 isolated field strains digested with EcoRI(0.7% agarose gel, 24hr electrophoresis).

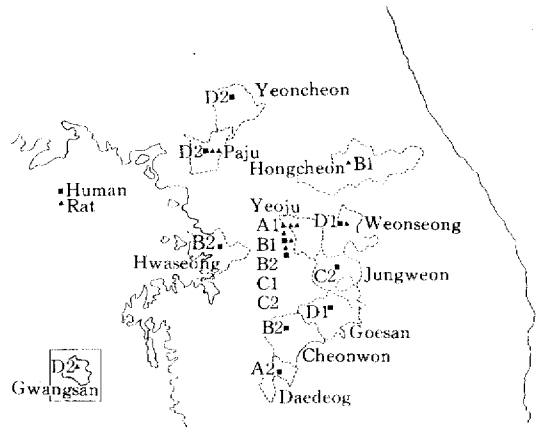


Fig. 12. Epidemiological map of 8 subtypes of 21 isolated field strains.

Fig. 11. REA patterns of serovar *lai* and 8 subtypes of isolated field strains digested with EcoRI(0.7% agarose gel, 24hr electrophoresis).

● : Size marker DNA (lambda phage DNA digested with Hind III)

고 찰

렙토스피라증 원인균의 정확한 serovar를 동

정하는 것은 역학적 연구의 가장 기본적이며 중요한 방법이다. 특정지역 균주의 혈청형을 정확히 파악하는 것은 그 지역의 일상적인 혈청학적 진단에 사용되는 표준균주¹⁸⁾와 Vaccine 개발에 사용되는 균주의 선택에 기본적인 요소이며 항원성의 변화양상^{7, 15, 21)}이나 균주의 병원성 연구^{19, 20)}에도 필수적이다.

국내분리 렙토스피라균의 혈청형에 대해서는 여러가지 보고가 있었다. 즉 교차응집흡수 방법에 의해서 국내분리균주가 serovar *mwogolo*, serovar *birkini*, 혹은 serovar *canicola*에 속한다는 보고²⁾와 또는 단세포균 항체를 이용한 실험에 의하여 혈청균 *Icterohaemorrhagiae*에 속하는 새로운 혈청형이라는 보고¹⁾등 여러가지 논란이 있어왔다. 그러나 아직 국내분리균주의 정확한 혈청형이 결정되지 못하고 있는 실정이다.

1981년 Marshall 등¹³⁾이 보고한 이후로 제한효소 분석 방법은 *Leptospira* 분류에 있어서 매우 유용한 방법임이 증명되어 왔다^{12, 14, 16, 17)}.

제한효소 분석 방법에 의하면 서로 다른 serovar간에서는 제한효소 분석상 뚜렷한 차이를 나타내며 같은 serovar인 경우에도 역학적인 배경(epidemiological niche)이 다른 경우에는 그 양상이 차이를 보일 수도 있음이 보고되고 있다¹⁶⁾.

또한 제한효소 분석 방법은 각 균주의 전체 genomic DNA의 양상을 관찰하는 것이므로 계통발생적인 관계를 확인 할 수 있다는 점이 분

결 론

류상 중요한 장점이라고 볼 수 있다. 제한효소 분석 방법은 또한 해석자체가 통계적인 수치를 사용하지 않고 직접 관찰하므로 실험자간에 방법을 표준화하기가 용이하다.

본 연구 결과에서 보는 바와같이 HS7을 제외한 21개 분리균주는 1% gel, 16시간 전기영동에서 서로 유사한 양상을 보였으며, *Icterohaemorrhagiae* 혈청군의 *birkini*, *mwogolo* 등 18개의 혈청형과 비교한 결과 오직 serovar *lai* 균주만이 21개 분리균주와 유사한 제한효소 분석 양상을 보였다.

그러나 실험중에 분리균주간에 DNA 절편의 두께가 조금씩 차이가 있는 것을 발견하였다. 즉 이것은 아직 완전히 분리되지 아니한 DNA 절편이 있음을 암시하는 것이므로 이것을 분리하기 위하여 gel의 농도를 0.7%로 낮추고, 영동시간을 24시간으로 연장하였다.

그 결과 분리균주는 각 DNA 절편의 미세한 차이에 의하여 8가지 형태로 나눌 수 있었다. 그러나 serovar *lai*는 이들과 비교할 때 I 부위만이 차이가 나는 것을 발견하였다. 즉 이러한 실험결과는 21개의 국내분리균주와 serovar *lai*는 같은 혈청형에 속하며 점돌연변이등에 의하여 변이가 일어난 관계인 것으로 해석된다.

중공에서 분리된 serovar *lai* 균주는 그 특징적인 임상증상이 급성출혈성폐염으로 대개 황달 증상이 없이 나타난다⁵⁾.

이러한 임상증상은 우리나라에서 발생한 렘토스피라병 환자와 매우 유사한 임상증상^{3,4)} 이것은 본 실험결과와 잘 일치하는 점이다.

국내분리균주의 8가지 형태를 분리지역별로 분포양상을 분석해 본 결과 각 형태별 분류와 지역간의 역학관계가 있음을 알 수 있었다. 즉 인접한 지역에서 동일한 형태의 균주가 분리되고 있음을 알 수 있다.

Fig 12에서 보면 여주지방에 여러가지 형태의 렘토스피라가 있고, 이것이 인접한 여러지역으로 퍼져나간 듯한 양상을 보이고 있다.

한편 HS7균주는 serovar *portlandvere*와 일치하였다. 그러나 serovar *canicola*와는 큰 크기의 DNA 절편에서 차이점을 보였다. 이것으로 HS7균주는 serovar *portlandvere*에 속하는 것으로 해석된다.

이러한 결과들을 볼때 제한효소 분석방법은 렘토스피라의 분류와 동정 및 역학적인 연구에 매우 유용한 방법인 것으로 사료된다.

국내에서 분리한 *Leptospira* serogroup *Icterohaemorrhagiae* 21주와 serogroup *Canicola* 1주의 serovar를 결정하기 위하여 EcoRI과 HindIII로 DNA를 절단하여 분석한결과 아래와 같은 결과를 얻었다.

• 1. HS7은 serovar *portlandvere*에 속하였다.
2. HY1, HY2, AP2, AP3, AP4, 16H, 17H, L4H, WH20, HM3, HM4, 18R, WR7, HV8, 19R, 20R, 21R, 23R, 26R, 27R, 29R 등 21주는 모두 serovar *lai*에 속하였다.

3. Serovar *lai*에 속하는 21개 균주를 0.7% gel에서 24시간 전기영동하여 다시 8군의 아형으로 분류할 수 있었다.

4. Serovar *lai*에 속하는 21개 균주의 아형은 지역간에 특징적인 분포양상을 보였다.

REFERENCES

- 1) 김민자 : Monoclonal antibody를 이용한 한국에서 분리된 *Leptospira*의 serovar 동정. 대한내과학회잡지, 32 : 581, 1987.
- 2) 오희복, 박경석, 조민기 : Cross-agglutination adsorption 방법에 의한 렘토스피라균의 혈청학적 분석(1985), 대한미생물학회지, 21 : 337, 1986.
- 3) 장우현 : 한국의 렘토스피라증에 관한 연구 현황, 대한내과학회잡지, 31 : 569, 1987.
- 4) 최인준, 김태승, 진소영, 신계철, 최미란, 최경훈, 심영학 : 급성 폐출혈열(폐염양질환) 1. Leptospirosis로 확인된 1부검례, 대한의학협회지, 28 : 362, 1985.
- 5) Baomin D : Pathogenesis of leptospirosis with pulmonary diffuse hemorrhage. Abstract of the 24th annual meeting of Japanese leptospirosis research conference. 1987.
- 6) Buchman TG, Roizman B, Adams G and Stover BH : Restriction endonuclease fingerprinting of herpes simplex virus DNA : a novel epidemiological tool applied to a nosocomial outbreak. *J. Inf. Dis.*, 138 : 488, 1978.
- 7) Cacciapuoti B, Pinto A and Silver I :

- Antigenic population changes of *leptospira biflexa* strains grown under the selective pressure of factorial antibodies. *J. Gen. Microbiol.* **131** : 521, 1985.
- 8) Esposito JJ, Obijeski JF and Nakano J H : Orthopoxvirus DNA ; strain differentiation by electrophoresis of restriction endonuclease fragmented virion DNA. *Virology*, **89** : 53, 1978.
 - 9) Gissman L, Pfister H and Zur Hausen H : Human papilloma virus (HPV) : characterisation of four different isolates. *Virology*, **76** : 569, 1977.
 - 10) Kojima T, Yanagihara Y and Mifuchi I : Characterization of inhibitor to leptospiral hemolysin present in bovine serum. *Microbiol. Immunol.* **28** : 291, 1984.
 - 11) Krieg NR et al : Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 1984.
 - 12) Le Febvre RB, Foley JW and Thierman AB : Rapid and Simplified protocol for isolation and characterization of leptospiral chromosomal DNA for taxonomy and diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **22** : 606, 1985.
 - 13) Marshall RB, Wilton BE and Robinson AJ : Identification of leptospira serovars by restriction endonuclease analysis. *J. Med. Microbiol.* **14** : 163, 1981.
 - 14) Marshall RB, Winter PJ and Yanagawa R : Restriction endonuclease DNA analysis of *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* and *hebdomadis*. *J. Clin. Microbiol.* **20** : 808, 1984.
 - 15) Pike RM and Schultze ML : Serologic variants of leptospira types resulting from growth in immune serum. *J. Immunol.* **81** : 172, 1958.
 - 16) Robinson AJ, Ramadass P, Lee A and Marshall RB : Differentiation of subtypes within *Leptospira interrogans* serovars *hardjo*, *balcanica* and *tarassovi* by bacterial restriction endonuclease DNA analysis(BRENDA), *J. Med. Microbiol.* **15** : 331, 1982.
 - 17) Thiermann AB, Handsaker AL, Moseley SL and Kingscote B : New method for classification of leptospiral isolates belonging to serogroup *Pomona* by restriction endonuclease analysis : serovar *Kennewicki*. *J. Clin. Microbiol.* **21** : 585, 1985.
 - 18) World Health Organization : Guidelines for the control of leptospirosis. *WHO offset publication No. 67* : 74, 1982.
 - 19) Yanagihara Y, Kamisango K, Yasuda S, Kobayashi S, Mifuchi I, Azuma I, Yamamura Y and Johnson RC : Chemical compositions of cell wall and polysaccharide fractions of spirochetes. *Microbiol. Immunol.* **28** : 535, 1984.
 - 20) Yanagihara Y, Kamisango K, Yakeda K, Mifuchi I and Azuma I : Identification of 4-O-Methylmannose in cell wall polysaccharide of leptospira, *Microbiol. Immunol.* **27** : 711, 1983.
 - 21) Yanakawa R and Takashima I : Conversion of serotype in leptospira from *hebdomadis* to *krematos*. *Infection and Immunity.* **10** : 1439, 1974.