

국내 분리 렙토스피라균의 단클론 항체 및 Genomic DNA의 Pulsed-Field Gel Electrophoresis 분석

조민기* · 기선호 · 김형준 · 김윤원 · 오희복¹ · 장우현
한림대학교 의과대학 미생물학교실, ¹극립보건원 세포질환부

1996년 경기도, 강원도, 충청북도, 전라남도, 전라북도 등 일부지역에서 채집된 들쥐들로부터 분리된 22주의 렙토스피라균의 단클론 항체에 대한 반응양상 및 genomic DNA의 pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) pattern을 분석하였다. 혈청군 *Icterohemorrhagiae* 내의 균주로 면역하여 제조한 7가지 단클론 항체에 대한 분리균주들의 반응은 모두 혈청형 lai와 같은 pattern을 보였다. Not I 제한효소 절단 DNA의 PFGE에서 JR34, JR57, JR77, JR82, JR86, JR109, NR4, NR6, NR13, CR3, KR48, NR2, NR3, NR8, NR9, NR10, NR11, NR12, JR58, 및 JR62주들은 모두 혈청형 lai와 유사한 profile을 보였으며 940 kb와 63 kb 사이에 13개의 절편 band를 보였다. JR89주는 혈청형 lai 및 다른 분리균주에서 관찰되지 않은 1000 kb band와 460 kb band가 관찰되었다. 표준균주 혈청형 lai, birkini, gem, mwogolo, canicola 등은 각기 완전히 다른 pattern을 보였으며 혈청형 yeonchon은 lai와 같은 pattern을 보였다. UPGMA방법에 의한 dendrogram분석결과 분리주는 lai 및 yeonchon 혈청형과 81~85%, 기타 혈청형과는 62% 이하의 유사도를 나타내어 항원분석법에 의한 혈청형 동정결과와 일치하였다. *Ase* I 제한효소 절단 DNA의 PFGE에서는 JR34, JR77, JR82, JR109, NR6, NR13, CR3, KR48 및 JR57, JR58, JR62, JR86, NR2, NR3, NR4, NR8, NR9, NR10, NR11, NR12주들은 모두 1900 kb에서부터 380 kb 사이에 3개의 절편 band를 보였으며 이는 표준균주 lai와 같은 pattern이었다. JR89주는 다른 분리균주와는 달리 1640 kb 대신 650 kb의 band를 보였다. *Fse* I 제한효소 절단 PFGE에서는 JR57, JR77, JR82, JR86, JR109, NR4, NR6, NR13, CR3, KR48주 및 JR34, NR2, NR3, NR9, NR10주들은 모두 1900 kb와 280 kb 사이에 5개의 절편 band를 보였으며 이는 표준균주 lai 및 yeonchon과 같은 pattern 이었다. 그러나 JR89주에서는 280 kb가 나타나지 않아 다른 분리균주와 구분되었다.

Key words □ *Leptospira interrogans*, Monoclonal antibody, Pulsed-field gel electrophoresis

렙토스피라균(*Leptospira interrogans*)은 인수 공통 전염병인 렙토스피라병의 원인균으로 세계적으로 많은 곳에 분포하고 있으며, 우리나라에서는 1984년 처음으로 환자가 확진된(13, 14) 이래 환자 및 들쥐로부터 많은 수의 렙토스피라균이 분리 동정되었으며(1, 13, 14) 우리나라에서 발생하는 렙토스피라병의 임상적 특징이 조사되고(5-7) 분리균에 대한 혈청형도 규명된 바 있다(3, 4, 8-12, 15).

우리나라에서 렙토스피라병 감염의 주된 병원소는 들쥐, 특히 들쥐(*Apodemus agrarius*)로 알려졌으며(1, 2) 1984년부터 1995년까지 환자 및 들쥐로부터 동정된 균주는 모두 80여 주이며 *Icterohemorrhagiae* 혈청군에 속하는 lai, yeonchon, hongchon 혈청형과 *Canicola* 혈청군에 속하는 canicola 혈청형이 동정된 바 있다(3, 10, 12, 15).

병원성 렙토스피라 균종들의 혈청형동정은 주로 교차응집소 흡수시험(cross-agglutinin absorption test: CAAT) 을 통해 이루어지고 있는데 이는 항혈청제조, 참조균주의 배양유지 등의 어려운 점들이 있어 이를 극복하기 위해서 근래에는 DNA를 기초로 한 기술들이 개발되고 이를 통해 진단과 혈청형 동정이 시행되고 있다. 여기에는 restriction endonuclease analysis

(REA)(18, 28, 30, 32, 37, 38), DNA-DNA hybridization 등이 사용되고 있다(29, 34, 40, 44).

근래 분자유전학적 분류 기법은 렙토스피라균연구에 매우 가치 있는 것으로 증명되고 있으며 혈청형 동정에도 크게 도움을 주고 있다. 특히 아혈청형 수준에서 strain 간의 구분이 가능할 수도 있기 때문에 역학적 연구에 유용한 것으로 알려 지고 있다.

저자들은 1996년 우리나라 들쥐의 렙토스피라균 보유 실태와 분리균의 혈청형을 파악하기 위하여 강원도, 경기도, 충청북도, 전라남도, 전라북도 일부지역의 논과 밭에서 생포한 222수의 들쥐(*Apodemus agrarius*)의 콩팥으로부터 22주의 렙토스피라균을 분리한 바 있으며(19) 새로 분리된 균주들의 혈청형 동정을 위하여 교차응집소 흡수 시험을 실시하고 분자유전학적 특성을 파악하기 위하여 PCR-제한효소분석, arbitrarily primed PCR(AP-PCR) 및 16S rRNA 유전자 probe를 이용한 southern hybridization 등을 실시한 바 있다.

근래 Yasuda 등(43)과 Ramandass 등(33)은 DNA-DNA hybridization을 통해 병원성 렙토스피라균을 적어도 7개의 genomic species(*L. interrogans*, *L. weilii*, *L. borgpetersenii*, *L. inada*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. hirschneri*)로 분류하고 있다. REA나 hybridization 등은 그 복잡성과 시간 소요 때문에 통상 사용에 많은 제한을 받고 있다. 이러한 어려운 점을 극복하기 위하여 *Leptospira* DNA 분석에 pulsed-field gel electro-

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 82-0361-240-1663, Fax : 82-0361-253-1664
E-mail : de1660@sun.hallym.ac.kr

phoresis(PFGE)가 이용되고 있는데(16, 17, 22, 23, 25, 36) 소수 인식부위를 갖는 제한효소로 절단한 DNA fragment를 PFGE하면 빠른 시간 내에 간단한 해석이 가능하며(16, 17, 22, 23) 각기 다른 제한효소를 사용하였을 때 혈청형간의 다른 pattern을 쉽게 관찰할 수 있어 혈청형 동정에 도움이 되고 있다. 이에 저자들은 PFGE가 앞으로 국내 분리 균들의 혈청형을 동정하는데 일익을 담당하고 혈청형 내의 유전자적 다양성 파악에 도움이 될 수 있을 것으로 보고 국내에서 새로 분리된 균주들의 DNA를 *Not I*, *Asc I*, *Fse I* 등의 제한효소로 절단하고 PFGE pattern을 관찰하여 국내 분리 균주의 유전자적 특성을 파악하고자 하였다. 또한 혈청형 동정의 일환으로 단클론항체(monoclonal antibody)에 대한 반응양상을 시험 비교하였다.

실험재료 및 방법

균주 및 배양

1996년 강원도, 경기도, 충청북도, 전라남도, 전라북도 일부지역에서 채집한 들쥐로부터 분리한 렙토스피라균 22주(Table 2)와 혈청군 *Icterohemorrhagiae*에 속하는 혈청형 *lai*, *birkini*, *gem*, *mwogolo*, *yeonchon* 등 15주(Table 1)의 표준균주를 사용하였으며 각 균주는 Ellinghausen McCullough Johnson Harris (EMJH) 배지(Difco USA)에 30°C에서 5-6일간 배양한 것을 사용하였다.

단클론항체에 의한 혈청형 추정

단클론항체는 *Icterohemorrhagiae* 혈청군에 속하는 혈청형의 5개 균주들로 면역한 마우스 B림프구의 hybridoma로부터 생산되었으며 사용된 단클론항체 F20C4-3는 *icterohemorrhagiae* (No.1)주, F52C2-2는 *mankarso*(*Mankarso*)주, F70C7-3 및 F70C20-2는 *copenhageni*(M-20)주, F82C1-3 및 F82C2-2는 *lai*(*Lai*)주, 그리고 F89C3-3는 *ndambari*(*Ndambari*)주로 각각 면역하여 얻은 것이었다(15). 이들은 Amsterdam의 WHO/FAO Collaborating Center for Reference and Research on Leptospirosis로부터 분양 받은 것이었다. 단클론항체에 대한 분리균주

Table 1. Reference strains used for serotyping

Serogroup	serovar
<i>Icterohemorrhagiae</i>	<i>icterohemorrhagiae</i>
	<i>copenhageni</i>
	<i>naam</i>
	<i>mwogolo</i>
	<i>ndahambukuje</i>
	<i>ndambari</i>
	<i>mankarso</i>
	<i>birkini</i>
	<i>smithi</i>
	<i>dakota</i>
	<i>lai</i>
	<i>tonkini</i>
	<i>gem</i>
	<i>hongchon</i>
	<i>yeonchon</i>

Table 2. Strains isolated

Strain No.	Originated from	Strain No.	Originated from
JR34	Chunnam Whasoon	NR3	Kangwon Chuncheon
JR57	Chunnam Damyang		
JR58	"	NR4	Kangwon Wonju
JR62	Chunnam Chungmyung	NR6	Chungbuk Jechun
JR72	"	NR8	Kyungki Jungok
JR82	"	NR9	"
JR86	"	NR10	"
JR89	"	NR11	Kyungki Yeonchon
JR94	"	NR12	"
JR109	Chunnam Kwangyang	NR13	"
CR3	Kangwon Chuncheon	KR48	Junbuk Iksan
NR2	"		

및 참조균주들의 반응은 단클론항체를 1:100으로 희석하여 microscopic agglutination test (MAT)의 반응정도에 따라 -, +, ++, +++, +++++ 등으로 표시하였다.

DNA 추출

Leptospira-DNA를 온전한 상태로 분리하기 위하여 Smith 등(35)의 DNA/ agarose block 방법을 토대로 *leptospira* DNA를 분리하였다. 그 방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. *Leptospira* 배양액을 3000×g, 4°C에서 10분간 원심하고 얼음에 냉각된 1× pett 완충액(10 mM Tris, 1M NaCl, pH 7.6)으로 균체를 2회 세척한 다음 pett 완충액으로 부유하여 세균농도를 McFarland scale 3.0-4.0 정도로 맞추었다. 이를 55°C 항온수조에 가온하면서 0.5× TBE 완충액(45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH8.0)에 녹여 미리 55°C에 가온한 동량의 2% pulse field agarose(Bio-Rad, USA)용액을 혼합한 다음 agarose block (plug) 제조용 plastic mold(Bio-Rad)에 혼합된 agarose/DNA 용액을 100 μl씩 분주하였다. 이를 4°C에 30분간 두어 굳힌 후 plug을 100 μl의 proteinase K(20 mg/ml)가 들어있는 1 ml의 lysis용액(50 mM Tris · Cl(pH8.0), 50 mM EDTA, 1% SDS)에 넣고 55°C에서 24시간 동안 처리하여 plug내 *leptospira* 균체를 용균시켰다. 이들 plug을 24well culture plate에 옮긴 후 증류수로 5분간 세척하고 TE완충액(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)으로 30분씩 4회 세척한 다음 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Pulsed-field gel electrophoresis

상기와 같이 분리된 *leptospira* DNA를 제한효소 처리하기 위하여 plug을 멸균된 칼날을 이용하여 전기영동 agarose well size로 절단한 후 해당 제한효소의 1×제한효소 완충액 200 μl로 20분간 세척하였다. 제한효소는 *leptospira* DNA에 소수의 인식 부위를 갖는 *Not I*, *Fse I*, 및 *Asc I* 등(New England BioLabs Inc, USA)을 사용하였다.

세척이 끝난 plug을 30 units의 제한효소가 들어있는 tube에

넣고 37°C에서 20시간 동안 진탕하면서 반응시켰다. PFGE는 contour-clamped homogeneous electrophoresis apparatus(CHEF-DR II, Bio-Rad Labs, Richmond USA)를 사용하여 Herrmann 등(22, 23)이 실시한 방법에 따라 시행하였다. 제한효소로 절단한 DNA가 들어있는 plug을 1% pulsed-field agarose gel의 well에 loading하고 0.5× TBE 완충액(45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 이용하여 전기영동하였다. 전기영동은 150 V에서 40시간 실시하였으며 14°C에서 30초 pulse 13시간, 60초 pulse 13시간, 120초 pulse 14시간 조건으로 실시하였다. Standard DNA marker로는 Yeast Chromosome PFG marker 와 MidRange PFG marker I (NEB, USA)를 사용하였다.

PFGE pattern에서의 유사도는 unweighted pair group method with average(UPGMA)방법으로 Quantity-one 4.0 software (Bio-Rad)를 사용하여 dendrogram을 구하여 분석하였다.

결 과

단클론항체에 대한 반응

혈청균 *Icterohemorrhagiae*에 속하는 혈청형 *copenhageni*, *icteroemorrhagiae*, *mankarso*, *ndambari* 등으로 면역된 마우스 B cell의 hybridoma로부터 얻은 7가지 단클론 항체들에 대한 반응을 본 결과 Table 3에서와 같이 분리된 22주는 모두 같은 반응양상을 보였으며 이는 과거에 분리되어 혈청형 *lai*으로 동정된 HY10주 및 표준균주 *lai* 017와 같은 반응양상이었다. 이들 균주들은 1985년 우리나라에서 분리되어 새로운 혈청형으로 등록된 *yeonchon*(HM3) 및 *hongchon*(18R)들과도 다른 반응양상을 보였다.

혈청균 *Icterohemorrhagiae*에 속하는 15가지 혈청형 참조균

의 단클론항체에 대한 반응양상은 Table 3에서와 같으며 새로 분리된 균의 양상을 이에 비교해 볼 때 혈청형 *lai* 이외의 다른 혈청형과는 현저한 차이를 나타내고 있다. 혈청형 *lai* 이외에 가장 유사한 양상을 나타내는 혈청형은 *mwogolo*, *birkini*, *tonkini*, *gem* 등이 있으나 *mwogolo*와 *gem*은 단클론항체 F82C1-3에 대한 반응에서 다르고 *tonkini*는 단클론항체 F82C2-2에 대한 반응에서 다르며 *birkini*는 단클론항체 F52C2-2 및 F82C2-2에 대한 반응에서 차이를 보였다. 따라서 분리균주들은 혈청형 *lai*에 속할 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

분리균의 PFGE 분석

Not I 제한효소 절단 pattern 분리균주 및 표준균주의 DNA를 *Not I*제한효소로 절단한 후 1% agarose에서 0.5× TBE buffer 내에서 pulse 시간을 30초 13시간, 60초 13시간, 120초 14시간 전기영동 했을 때 DNA의 절단 pattern은 Fig. 1에서와 같이 분리균주 JR34, JR57, JR77, JR82, JR86, JR109, NR4, NR6, NR13, CR3, KR48, NR2, NR3, NR8, NR9, NR10, NR11, NR12, JR58 및 JR62 등은 모두 940 kb와 63 kb 사이에 13개의 절편으로 분리되었다. 이는 표준균주 *lai* 및 *yeonchon*과 똑같은 pattern이었으나 각 절편의 이동도는 미세한 차이로 구별되었다. JR89주는 *lai* 및 다른 표준균주와는 달리 940 kb 대신에 1000 kb band와 다른 분리균주에서 볼 수 없었던 약 460 kb band가 관찰되었다. 혈청형 *lai*, *birkini*, *gem*, *mwogolo*, *canicola* 간에는 뚜렷한 차이를 나타내는 pattern을 보였다(Fig. 1).

Not I 제한효소절단에 따른 PFGE pattern의 clustering을 통한 분리균주 및 참조균주간의 유전적 근연관계 분석결과를 Fig. 2와 같았다. JR89를 제외한 분리주들은 90%이상의 유사도를 나타내었으며 *lai*주와는 85%, JR89주와는 81%의 유사도를 나

Table 3. Reactivities of the isolates to monoclonal antibodies

Serovar (Strain)	MAB	F20-C4-3	F52C2-2	F70C7-3	F70C20-2	F82C1-3	F82C2-2	F89C3-3
all 22 isolates in this study		-	-	++++	-	++	++++	-
lai (HY10*)		-	-	+++	-	++	++++	-
lai (017 [†])		-	-	++++	-	++	++++	-
yeonchon (HM3*)		++	++	+++	++	++	-	+++
hongchon (18R*)		++++	-	+++	-	-	++++	-
icteroemorrhagiae (RGA)		++++	++	++++	+++	-	-	-
copenhageni (M20)		++++	+	++++	++++	-	-	++
naam (Naam)		++	+	++++	-	-	++++	-
mwogolo (Mwogolo)		-	-	+++	-	-	+++	-
ndahambukuje (Ndahambukuje)		+++	±	++++	+	-	-	+
ndambari (Ndambari)		-	+	+++	+	+	-	+++
mankarso (Mankarso)		++++	++	++++	-	-	+++	-
birkini (Birkin)		-	++	++++	-	+++	++	-
smithi (Smith)		-	+++	++++	-	+++	-	+++
dakoda (Grand River)		++++	-	++++	++	-	++++	++
tonkini (LT96-68)		-	+++	++++	-	++	-	-
gem (Simon)		-	-	++++	-	-	++	-

*Reference strain isolated in Korea. [†]Reference strain obtained from NIH Japan.

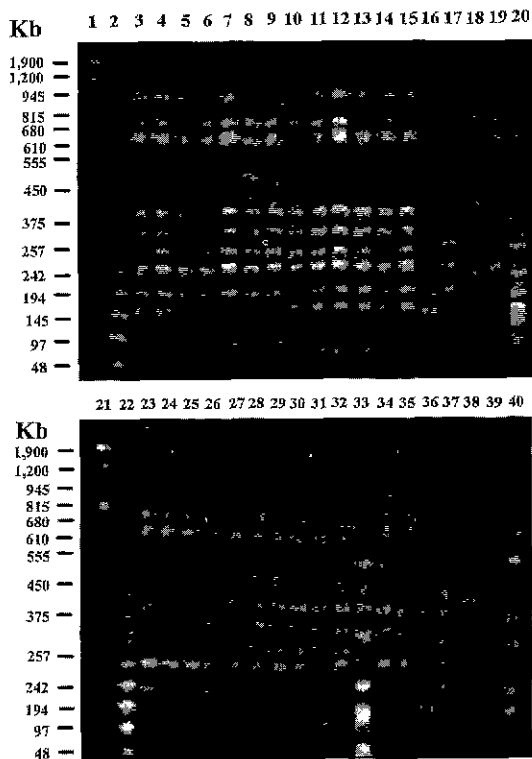


Fig. 1. PFGE of *Not* I restriction fragments from isolates and some reference strains. The digestion products were separated at 150 V for 40 h in 1% agarose-0.5 × TBE with three pulse times as follows: 30 s, 13 h; 60 s, 13 h; 120 s, 14 h. Lanes 1, 21: size marker(Yeast chromosome PFG), Lanes 2, 22: size marker(MidRange PFG), Lanes 3 to 14: isolates JR34, JR57, JR77, JR82, JR86, JR89, JR109, NR4, NR6, NR13, CR3, KR48 Lanes 15 to 20: reference strains yeonchon, canicola, birkini, gem, lai and mwogolo. Lanes 23 to 31: isolates NR2, NR3, NR8, NR9, NR10, NR11, NR12, JR58 and JR62. Lanes 32 to 40: reference strains lai(CH88-19), unknown spiral org., lai(WH-19), hongchon (18R), canicola, birkini, gem, lai, and mwogolo.

타내었다. Yeonchon주는 분리주들과 91% 유사도를 보였고, gem, canicola, birkini, mwogolo 등의 분리주들과의 유사도는 62% 이하였다.

Asc I 제한효소 절단 pattern 분리균주 JR34, JR77, JR82, JR109, NR6, NR13, CR3, KR48 및 JR57, JR58, JR62, JR86, NR2, NR3, NR4, NR8, NR9, NR10, NR11, NR12 등은 모두 1900 kb에서부터 380 kb 사이에 3개의 절편 band를 보였으며 이는 표준균주 lai와 같은 pattern이었다(Fig. 3). JR89주는 다른 분리균주 및 lai주와는 달리 1640 kb 대신 약 650 kb의 band가 관찰되었다. 표준균주 lai, birkini, gem, mwogolo, canicolo 등도 각기 다른 pattern을 보였다(Fig. 3).

Fse I 제한효소 절단 pattern 분리균주 JR57, JR77, JR82, JR86, JR109, NR4, NR6, NR13, CR3, KR48주 및 JR34, NR2, NR3, NR9, NR10 주들은 모두 1900 kb와 280 kb 사이에 5개의 절편 band를 보였으며 이는 표준균주 lai 및 yeonchon과 같은 pattern 이었다. 그러나 JR89주는 다른 균주들에서 볼 수 있었던 280 kb의 band가 나타나지 않아 여기에서도 다른 균주

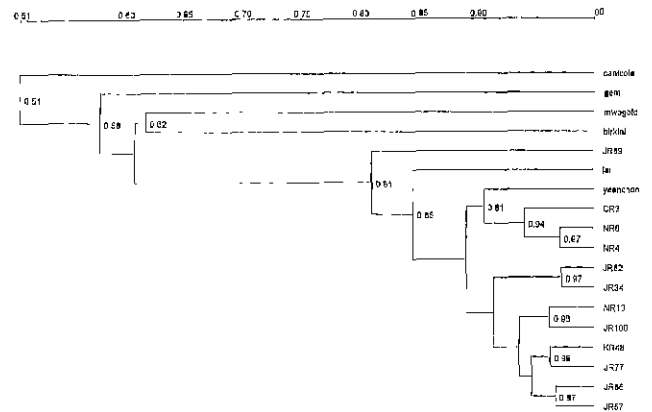


Fig. 2. Dendrogram of *L. interrogans* isolates (Fig.1 PEGE patterns). PFGE patterns were analysed in accordance with UPGMA clustering on a matrix based on the Dice coefficient.

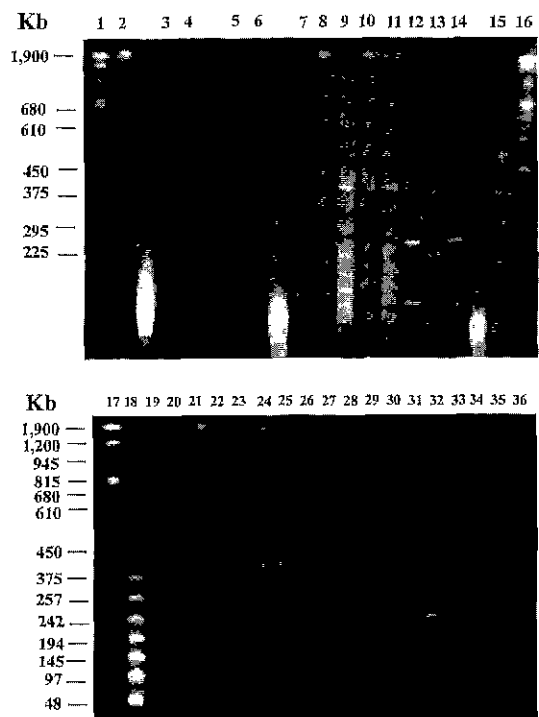


Fig. 3. PFGE of *Asc* I restriction fragments from isolates and some reference strains. The digestion products were separated at 150 V for 40 h in 1% agarose-0.5 × TBE with three pulse times as follows: 30 s, 13 h; 60 s, 13 h; 120 s, 14 h. Lanes 1, 16, 17: size marker(Yeast chromosome PFG), Lane 18, size marker(MidRange PFG), Lanes 2 to 10: isolates JR34, JR77, JR82, JR89, JR109, NR6, NR13, CR3, KR48, Lanes 11 to 15 and Lanes 32 to 36: reference strains yeonchon, canicola, birkini, gem, and mwogolo, Lanes 32 to 36: reference strains canicola, birkini, gem, lai and mwogolo, Lanes 19 to 31 : isolates JR57, JR58, JR62, JR77, JR86, NR2, NR3, NR4, NR8, NR9, NR10, NR11 and NR12.

와 구분되었다.

형질형 lai, birkini, gem, mwogolo, canicola 등 간에 뚜렷한

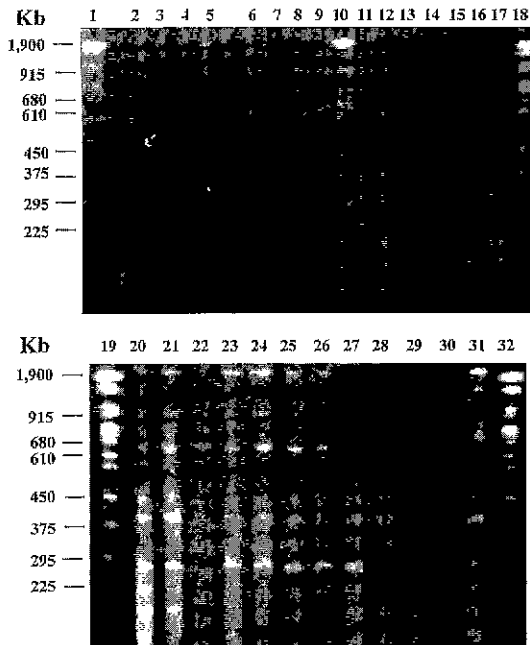


Fig. 4. PFGE of *Fse* I restriction fragments from isolates and some reference strains. The digestion products were separated at 150 V for 40 h in 1% agarose-0.5 × TBE with three pulse times as follows: 30 s, 13 h; 60, 13 h; 120 s, 14 h. Lanes 1, 18, 19, 32: size marker(Yeast chromosome PFG). Lanes 2 to 11: isolates JR57, JR77, JR82, JR86, JR109, NR4, NR6, NR13, CR3, KR48. Lanes 12, 27: reference strain yeonchon. Lane 13: reference strain canicola. Lanes 14 to 17 and Lanes 28 to 31: reference strains birkini, gem, lai, mwogolo. Lanes 20 to 26: isolates JR34, JR57, JR89, NR2, NR3, NR9, NR10

차이를 나타내었다(Fig. 4).

고 찰

저자들은 들쥐의 랩토스피라균 보유실태를 조사하고 우리나라에 존재하는 혈청형을 파악코저 1996년 경기도, 강원도, 충청북도, 전라북도, 전라남도 일부 지역에서 채집한 들쥐로부터 랩토스피라균을 분리하고 균주들의 혈청학적 및 분자유전학적 특성을 연구하였다. 각 지역으로부터 분리된 22주의 혈청균을 결정하기 위하여 16개 혈청군에 속하는 표준균주의 항혈청에 대한 반응을 MAT로 관찰한 결과 혈청군 *Icterohemorrhagiae*에 속하는 혈청형 lai에 대해서 모두 교차응집가가 100% 일치하고 다른 혈청군에 속하는 혈청형에 대해서는 대부분 3% 미만의 교차응집가를 보여 분리된 균주들은 모두 혈청군 *Icterohemorrhagiae*에 속하는 것으로 판단되었다(19).

혈청군 *Icterohemorrhagiae*에 속하는 몇가지 혈청형으로부터 만들어진 7가지의 단클론항체에 대한 반응을 보았을 때 분리균주 모두가 똑같은 반응양상을 보였으며(Table 3) 표준균주들의 반응양상과 비교해 볼 때 혈청형 lai와 같은 것으로 보아 분리균주는 모두 혈청형 lai에 속하는 것으로 추정되었다. 분리균주들은 혈청형 mwogolo, gem, birkini 등과도 유사한 반응양상을

보이기는 하지만 C52C2-2, F82C-3, F82C2-2 등의 단클론항체에 대한 반응의 차이점이 있는 것으로 보아 이들 혈청형과는 거리가 있다고 보여진다. 1985년 우리나라에서 분리되어 새로운 혈청형으로 등록된 yeonchon(HM3) 및 hongchon(18R)의 반응양상과도 다른 것을 볼 수 있다(Table 3).

과거에 우리나라에서 분리된 균주들의 혈청형은 *Icterohemorrhagiae* 혈청군에 속하는 lai, yeonchon, hongchon 등과 *Canicola* 혈청군에 속하는 canicola 등 4가지 혈청형이 알려졌으며(3, 4, 8-12, 15) lai가 대부분을 차지하고 canicola 혈청형은 2주가 확인되었으며 yeonchon, hongchon 혈청형은 1985년에 1주씩 분리된 이래 다시 분리확인된 적이 없다. 지금까지 확인된 혈청형 이외의 혈청형도 존재할 가능성이 있는 것으로 보이며 이를 찾기위해 보다 광범위한 조사가 필요할 것이다.

랩토스피라균은 그 항원구조에 변이가 심하여 현재까지 23개 혈청군에 223여개의 혈청형으로 분류되고 있으며(30) 그 면역학적 다양성은 주로 세포벽의 LPS의 polysaccharide moiety로 이루어진 항원조성의 변이에 기인한다. 혈청형 구분에는 교차응집소 흡수방법이 기본적으로 사용되지만(21, 35) 항원구조의 특이성을 임의의 수치기준으로 구분함에 따라 유사한 항원구조를 갖는 균주들을 제대로 구분할 수 없다는 단점이 상존한다. 최근에는 재현성이 낮고 실험자간의 오차가 많은 혈청학적 분석법의 문제점을 보완하기 위하여 유전자 구조의 차이에 따른 분석법과 세포내 핵산중 염기서열의 보존성과 적절한 정도의 변이성을 지닌 리보솜 RNA 유전자분석법이 미생물분류체계의 재정립에 사용되고 있다(24, 31, 34, 39, 43, 44). 근래에는 미생물의 종간 또는 혈청형간의 빠른 구별을 위해 PCR을 통해 증폭된 표적DNA의 제한효소분석법(PCR-REA)과 임의로 선택한 primer를 사용한 arbitrarily-primed PCR(AP-PCR)를 통한 RFLP방법 등이 랩토스피라균에 대해서 성공적으로 시도되고 있다(18, 32, 41, 42).

저자들은 분리균주들의 분자생물학적 특성을 파악하기 위하여 primer G1/G2를 이용한 PCR 증폭산물을 제한효소 *Dde* I, *Nde* II, *Mae* II 등으로 절단한 PCR-REA 분석과 primer RSP, KF, PB-1을 사용한 AP-PCR 및 16S rRNA gene probe를 이용한 genomic hybridization 등의 profile을 조사한 바 있는데 primer RSP를 사용한 AP-PCR과 16S rRNA gene을 probe로 한 hybridization에서 *Hind*III 및 *Bam*HI digestion은 혈청형간 또는 혈청형내의 다양성을 파악하는데 유용함을 알게 된 바 있으며(data not shown) 본 연구에서는 PCR을 통한 제한효소분석이나 hybridization 등의 복잡성과 시간제한성 등의 제약을 해소하기 위하여 PFGE의 실용성을 파악하고 실제로 분리균주들을 *Not* I, *Asc* I, *Fse* I 제한효소로 처리했을 때의 PFGE pattern을 살펴본다 혈청형간의 또는 혈청형내에서의 유전자적 차이점을 점검해 보았다.

Herrmann 등(22, 23)은 *Not* I 제한효소절단의 PFGE를 통해 23 serogroup 내의 각각의 다른 표준균주들은 모두 독특한 fingerprint를 나타내는 profile을 보였으며 *Icterohemorrhagiae* 혈청군내에서도 혈청형 *icterohemorrhagiae*와 *copenhageni*만 유사성을 나타내고 다른 모든 혈청형들은 뚜렷한 차이점을 나

타내어 PFGE가 혈청형 동정에 매우 유용성이 높다는 것을 입증한 바 있다.

본 실험에서 분리균주 및 표준균주를 *Not I*로 처리한 PFGE에서 pulse time을 150 V에서 30초 13시간, 60초 13시간, 120초 14시간 조건으로 했을 때 분리균주에서는 1000 kb부터 63 kb사이에서 13개의 절편이 관찰되었으며(Fig.1), 표준균주의 경우 본 실험에서와 똑같은 pulse 조건으로 실시되었던 Herrmann 등(22)의 결과와 일치하였고 혈청형간의 뚜렷한 차이를 볼 수 있어 혈청형 구분에 유용함을 알 수 있었다. 분리균주들은 단클론항체 반응, 교차응집소 흡수시험 등에서 혈청형 lai로 동정된 바 있었는데 PFGE에서도 JR89주를 제외한 모든 균주가 lai와 같은 pattern을 나타내었고 각 절편의 크기는 미세한 차이를 나타내었다(Fig. 1).

Not I 처리 PFGE pattern의 UPGMA 방법에 의한 dendrogram 분석결과에 의하면 (Fig.2) JR89를 제외한 분리주들은 서로 90% 이상의 유사도를 나타내었고 lai 혈청형과 85%의 유사도를 나타내어 혈청학적 동정법결과와 일치하였고, JR89주도 lai와 81%의 유사도를 나타낸 반면 기타 혈청형과는 62% 이하의 유사도를 나타내어 유전적 다양성에도 불구하고 혈청형 lai로 동정하는 것이 타당한 것으로 생각되었다. 또한 과거 새로운 혈청형 yeonchon으로 동정되었던 HM3주 및 교차응집소 흡수 시험결과 lai와 구별되었던 NR13주는(19) *Not I*처리 PFGE에서는 구별되지 않아 항원학적변이에도 불구하고 유전적 근연관계를 확인할 수 있었다.

Asc I 절단 PFGE에서 분리균주들은 3개의 절편을 보였으며 여기에서도 JR89주를 제외한 분리균주들은 lai와 똑같은 pattern을 보였다(Fig. 3). *Fse I*절단 PFGE에서는 JR89주를 제외한 분리균주들은 5개의 절편을 보였으며 모두 lai와 같은 pattern을 보였다. JR89주에서는 다른 분리균주에서 관찰되었던 280 kb의 band가 관찰되지 않았다(Fig.4).

본 실험에서 같은 genomic species 내에서 다른 PFGE fingerprint를 나타내고 있음이 확인되고 또한 같은 혈청형 내에서도 또 다른 PFGE fingerprint를 나타낼 수도 있음을 알 수 있었다. 균주들은 다른 생태학적인 환경에 대한 적응력에 따라 같은 조상으로부터 다르게 진화될 수 있으며 그러한 다른 환경에서 세균 DNA는 단지 RFLP 및 PFGE분석에 의해서만 구분될 수 있는 경미한 변화를 갖는 진화과정을 거치게 된다고 본다.

혈청형 동정에는 항원학적 차이에 의한 혈청형, PCR-REA, AP-PCR, 여러가지 제한 효소를 이용한 DNA-DNA hybridization, PFGE등의 특성이 종합해서 분석되어야 할 것으로 보며 우리나라에서 분리되는 균주들의 정확한 혈청형 동정을 위해 이들이 종합된 진단 panel이 필요할 것이다.

본 연구결과로 볼 때 국내 분리 렙토스피라균의 유전자 분석에서는 *Not I*을 비롯한 여러가지 제한효소를 사용한 PFGE 등이 유용한 tool로 사용될 수 있을 것으로 본다.

감사의 말

본 연구는 1997년 한국학술진흥재단 학술연구조성비에 의해

지원되었으며(과제번호. 1997-001-F00059)이에 감사드립니다. 단클론항체를 제공해준 Amsterdam의 Hans Korver(WHO/FAO Collaborating Center for Reference and Research on Leptospirosis)에게 감사드립니다.

참고문헌

1. 국립보건원. 1987. 한국에서 유행하는 렙토스피라증에 관한 연구(I). 국립보건원 연구보고서. 1-149.
2. 국립보건원. 1987. 한국에서 유행하는 렙토스피라증에 관한 연구(II). 국립보건원 연구보고서. 99-153.
3. 오희복, 박경석, 조민기. 1986. Cross-agglutinin absorption법에 의한 렙토스피라균의 혈청학적 분석(1985). 대한미생물학회지. 21, 337-343.
4. 오희복, 장우현, 조민기, 성원근, 박경석. 1991. Identification of new serovar *yeonchon* and *hongchon* belonging to *Leptospira interrogans* Icterohaemorrhagiae serogroup. 대한미생물학회지 26, 253-261.
5. 이정상, 김성권, 윤성철, 한용철, 지계근, 김상윤. 1985. 한국에서 미생물학적으로 확인된 렙토스피라병의 부검례. 대한의학협회지. 28, 373-380.
6. 이정상, 김용훈, 윤성철 안규리, 김성원, 지계근. 1985. 혈청학적으로 증명된 렙토스피라병. 대한내과학회지. 28, 740-746.
7. 이정상, 윤성철, 이훈용, 안규리, 김성권, 지계근. 1984. 혈청학적으로 진단된 Leptospirosis의 임상상. 한국역학회지. 6, 47-51.
8. 장우현, 기선호, 박경희, 김석용, 김익상, 최명식. 1989. 단세포균항체 및 교차응집소 흡수방법을 이용한 국내분리 렙토스피라균의 항원 분석. 대한미생물학회지. 24, 165-173.
9. 장우현, 기선호, 박경희, 김석용, 김익상, 최명식. 1989. 제한효소 DNA 분석법과 단세포균항체를 이용한 국내분리 렙토스피라균의 동정. 대한미생물학회지. 24, 71-79.
10. 장우현, 김석용, 서정선. 1987. 제한효소 DNA분석법에 의한 국내분리 렙토스피라균의 동정. 대한미생물학회지. 22, 463-471.
11. 장우현, 박경희, 이정빈. 1988. 단세포균항체를 이용한 국내분리 렙토스피라균의 혈청형 분석. 대한미생물학회지. 23, 277-292.
12. 조민기, 김윤원, 민창홍, 오희복. 1988. 교차응집소 흡수방법에 의한 국내분리 렙토스피라균의 혈청형 동정(1984-1987). 대한미생물학회지. 23, 169-177.
13. 조민기, 백승복, 오희복, 송철. 1984. 한국에서 유행한 leptospirosis의 세균학적 연구. 한국역학회지. 6, 16-35.
14. 조민기, 오희복, 성원근, 박미연, 이명숙, 송철, 백승복, 심재철, 인선동. 1984. 농촌지역에서 발생한 출혈성 폐염양 질환의 미생물학적연구. 국립보건원보. 21, 233-256.
15. 조민기, 이종호, 윤창순, 김윤원, 민창홍, 김용선, 박경석, 오희복. 1989. 교차응집소 흡수방법 및 단세포균항체를 이용한 렙토스피라균의 혈청학적 분석. 대한미생물학회지 24, 539-548.
16. Baril, C. and I. Saint Girons. 1990. Sizing of the *Leptospira* genome by pulsed-field agarose gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*. 71, 95-100.
17. Baril, C., J.L. Herrmann, C. Richaud, D. Margarita, and I. Saint Girons. 1992. Scattering of the rRNA Genes on the Physical Map of the Circular Chromosome of *Leptospira interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae. *J. Bacteriol.* 174,

- 7566-7571.
18. Brown, P.D. and P.N. Levett. 1997. Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *J. Med. Microbiol.* **46**, 173-181.
 19. Cho, M.K., S.H. Kee, H.J. Song, K.H. Kim, K.J. Song, L.J. Baek, H.H. Kim, H.B. Oh, Y.W. Kim, and W.H. Chang. 1998. Infection rate of *Leptospira interrogans* in the field rodent, *Apodemus agrarius*, in Korea. *Epidemiol. Infect.* **121**, 685-690.
 20. Dickken, H. and E. Kmety. 1978. Serological typing methods of Leptospire. *Methods in Microbiol.* **11**. Academic Press.
 21. Faine, S. 1982. Guidelines for the control of leptospirosis. WHO Offset Publication No. 67. Geneva, *World Health Organization*. **62**. 43.
 22. Herrmann, J.L., C. Baril, E. Bellenger, P. Perolat, G. Baranton, and I. Saint Girons. 1991. Genome Conservation in Isolates of *Leptospira interrogans*. *J. Bacteriol.* **173**, 7582-7588.
 23. Herrmann, J.L., E. Bellenger, P. Perolat, G. Baranton, and I. Saint Girons. 1992. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Not 1 Digests of Leptospiral DNA: a New Rapid Method of Serovar Identification. *J. Clin. Microbiol.* **30**. 1696-1702.
 24. Hookey, J.V. 1993. Characterization of *Leptospiraceae* by 16S DNA restriction fragment length polymorphisms. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1681-1689.
 25. Kathleen, A. Taylor, Alan G. Barbour, and D. Denece Thomas. 1991. Pulsed-Field Gel Electrophoretic Analysis of Leptospiral DNA. *Infection and Immunity*. **59**. 323-329.
 26. Kmety, E. and H. Dikken. 1993. Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. *University Press Groningen*, 17~22.
 27. Kmety, E., M.M. Galton, and C.G. Salzer. 1970. Future standardization of the agglutination-adsorption test in the serology of leptospire. *Bull. WHO.* **42**, 733-738.
 28. Marshall, R.B., B.E. Wilton, and A.J. Robinson. 1981. Identification of *Leptospira* serovars by restriction endonuclease analysis. *J. Med. Microbiol.* **14**, 163-166.
 29. Lefebvre, R.B. 1987. DNA probe for detection of the Leptospire of serovar hardjo. *J. Clin. Microbiol.* **25**. 2236-2238.
 30. Paster, B.J., F.E. Dewhirst, W.G. Weisberg, L.A. Torrdoff, G.J. Fraser, and C.R. Woese. 1991. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J. Bacteriol.* **173**, 6101-6109.
 31. Perolat, P., F. Grimont, B. Regnault, P.A.D. Grimont, E. Fournie, H. Thevenet, and G. Baranton. 1990. rRNA gene restriction patterns of *Leptospira*: a molecular typing system. *Res. Microbiol.* **144**, 159-171.
 32. Perolat, P., F. Merine, W.A. Ellis, and G. Baranton. 1994. Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1949-1957.
 33. Ramadass, P., B.D. W. Jarvis, R.J. Corner, D. Penny, and R.B. Marshall. 1992. Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 215-219.
 34. Segers, R.P.A.M., J.A. Van Gestel, G.J.J.M. Van Eys, B.A.M. Van der Zeijst, and W. Gaastra. Presence of putative sphingomyelinase genes among members of the family *Leptospiraceae*. *Infect. Immun.* **60**, 1707-1710.
 35. Smith, C.L., T. Matsumoto, O. Niwa, S. Kico, J.B. Fan, M. Yanagida, and C.R. Cantor. 1987. An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed-field gel electrophoresis. *Nucl. Acid. Res.* **15**, 4481-4489.
 36. Takahashi, Y., K. Akase, H. Hirano, and M. Fukunaga. 1998. Physical and genetic maps of the *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae strain Ictero No. 1 chromosome and sequencing of a 19-kb region of the genome containing the 5S rRNA gene. *GENE*. **215**, 37-45.
 37. Thiermann, A.B., A.L. Handsaker, J.W. Foley, F.H. White, and B. Kingscote. 1986. Reclassification of north American leptospiral isolates belonging to serogroups Mini and Sejroe by restriction endonuclease analysis. *Am. J. Vet. Res.* **47**. 61-66.
 38. Thiermann, A.B. and R.B. Lefebvre. Restriction endonuclease analysis and other molecular techniques in identification and classification of *Leptospira* and other pathogens of veterinary importance, pp. 145-183 *In* B. Swaminathan and G. Prakash (ed), *Nucleic acid and monoclonal antibody probes. Applications in diagnostic microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York.
 39. Van Eys, G.J.J.M., J. Zaai, G.J. Schoone, and W.J. Terpstra. 1988. DNA hybridization with hardjovis-specific recombinant probes as a method for type discrimination of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 567-574.
 40. Van Eys, G.J.J.M., M.J. Gerritsen, H. Korver, G.J. Schoone, C.C.M. Kroon, and W.J. Terpstra. 1991. Characterization of serovars of the genus *Leptospira* with hardjovis and icterohaemorrhagiae recombinant probes with special attention to serogroup sejroe. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1042-1048.
 41. Welsh, J., M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acid. Res.* **18**, 7213-7218.
 42. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.* **18**. 6531-6535.
 43. Yasuda, P.H., Steigerwalt, A.G., Sulzer, K.R., Kaufmann, A.E., and Brenner, D.J. 1987. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **37**, 407-415.
 44. Zuerner, R.L. and C.A. Bolin. 1990. Nucleic acid probe characterizes *Leptospira interrogans* serovars by restriction fragment length polymorphisms. *Vet. Microbiol.* **24**, 355-366.

(Received August 14, 1999/Accepted September 6, 1999)

ABSTRACT: Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Monoclonal Antibody Analysis of *Leptospira interrogans* Isolated in Korea

Min-Kee Cho*, **Sun-Ho Kee**, **Hyung-Jun Kim**, **Yoon-Won Kim**, **Hee-Bok Oh¹**, and **Woo-Hyun Chang** (Department of Microbiology, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea, ¹Department of Microbiology, National Institute of Health, Seoul, Korea)

A total of 22 *Leptospira interrogans* field isolates from the rats captured in 5 provinces of Korea in 1996, and 6 antigenically closely related reference serovars of lai, yeonchon, birkini, gem, mwogolo, and canicola were analysed. When the antigenic characteristics were analysed by reactivity with 7 monoclonal antibodies prepared with strains belonging to serogroup Icterohaemorrhagiae, all 22 isolates showed the same reaction pattern with that of serovar lai. Large restriction fragment patterns obtained after cleavage of genomic DNAs with infrequently cutting restriction enzymes were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Identification of leptospira strains by PFGE with *Not* I, *Asc* I or *Fse* I digests correlated with their antigenically typed serovars, with a few exceptions. PFGE of isolates, except for JR89, digested with *Not* I showed identical pattern with serovar lai, showing 13 fragments between 940 kb and 63 kb. When PFGE patterns of JR89 were compared with those of serovar lai, *Not* I digest showed additional two bands of 1000 kb and 460 kb, while *Asc* I digest showed 650 kb fragment and *Fse* I digest did not show the fragment of 280 kb. Whereas serovar yeonchon, which was isolated in Korea and identified as a new serovar previously, could be differentiated from serovar lai in antigenic reactivities with monoclonal antibodies, it showed the similar PFGE pattern with serovar lai including reference and field isolates. It was suggested that Korean leptospiral field isolates are closely related in DNA level.