大韓微生物學會誌 第34卷 第6號 1999
J. Korean Soc. Microbiol., Vol. 34, No. 6, 1999

비브리오의 병원성 인자에 관한 연구

부산대학교 의과대학 미생물학교실

오양효 · 김영부 · 박영민 · 김민정 · 차미선 · 김영희 · 임은경

=Abstract=

The Virulence Factors of *Vibrio spp.*

Yang Hyo Oh, Yung Bu Kim, Young Min Park, Min Jung Kim, Mi Sun Cha, Young Hee Kim and Eun Gyoung Lim

Department of Microbiology, College of Medicine, Pusan National University, Pusan 602-739, Korea

A total of 113 *Vibrio* sp. strains were examined for plasmid content which were subjected to digestion with restriction enzymes. About the 55% *Vibrio* spp. have the plasmid more than one. Most of these plasmid various derivatives ranged from 2.4 kb~23 kb, especially two strains of *V. mimicus* and one strain of *V. furnissii* carried one high-molecular weight plasmid (molecular weight ranging between 70 kb~100 kb). Results of restriction analysis for plasmid of this three strains were by no means the rule. For detection of *tdh* and *ctx* gene, the virulence factor involved in the pathogenesis, we carried out the TDH and CT assay, PCR amplification, and hybridization. A total 11 strains were produced TDH, involved in 9 strains of *V. parahaemolyticus* and 1 strain of *V. alginolyticus* from clinical isolates and 1 strains of *V. mimicus* from environmental isolates. In the experiments of *tdh* gene detection, in all, 3 strains of *V. parahaemolyticus* from clinical isolates and 2 strains from environmental isolates could be successfully amplified in 400 bp by PCR. The PCR results were consistent with DNA hybridization tests. In the experiments of CT assay, in all, 3 strains of *V. cholerae* from clinical isolate and 1 strain of *V. cholerae* from environmental isolates were observed CT-producing. These CT-producing strains amplified in 302 bp by PCR for the detection of *ctx* gene. All CT-producing strains hybridized with digoxigenin-labeled DNA probe, while CT-negative strains did not hybridize. Also hybridization tests results for detection of *ctx* gene consistent with PCR.

Key Words: *Vibrio spp*, Extracellular enzyme, *tdh* gene, *ctx* gene, PCR, DNA probe hybridization

서 론

*Vibrio*균 속은 그람음성의 간균으로 전세계의 해안에 널리 분포하고 있다. 적혈구를 파괴하는 용혈소는 장염비브리오 (*V. parahaemolyticus*)를 비롯한 다른 병원성 비브리오균 속이 생성하고 있는데, 특히 세포외 효소인 용혈소는 *V. parahaemolyticus*의 주요한 병원성 인자로써 알려진 thermostable direct hemolysin (TDH)으로 알려져 있으며 *tdh* gene이 관여하고 있다.

*Vibrio*균 속이 일으키는 질병들은 많이 알려졌

접수 : 2000년 1월 31일, 게재결정 : 2000년 1월 31일
책임저자 연락처: 오양효, 부산시 서구 아미동 1가 10번지 부산대학교 의과대학 미생물학교실 (602-739)
전화: 051-240-7710, FAX : 051-243-2259

고 그 중 중요한 콜레라는 장독소를 생산하는 *V. cholerae* O1의 감염에 의해 발병하며, 콜레라균의 동정은 일반적으로 생화학 반응과 혈청학적 반응으로 판정한다. *V. cholerae*의 장독소 생성실험은 RPLA나 ELISA, 배양세포, DNA probe를 이용하기도 하며 최근에는 PCR을 이용하여 직접적인 유전자의 확인을 시도하고 있다.

본 연구자들은 부산시내 해수 및 해산물로부터 *Vibrio* 속들을 분리해 내고, protease 및 용혈소를 비롯한 여러 가지 세포외 효소들의 생성능은 전 논문에서 발표하였다. 한편, 본 연구에서는 *Vibrio* 속의 주요한 병원성 인자로 밝혀진 *tdh* gene, 콜레라 장독소 생성 인자로 밝혀진 *ctx* gene과 plasmid와의 관계를 조사하여 PCR과 DNA probe hybridization 등을 통해 *tdh* gene과 *ctx* gene을 검출하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주

1997년 7월에서 10월 사이에 부산시내의 해수 및 해산물에서 분리한 비브리오 107주와 임상가검물에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 3주, 그리고 *V. cholera* non-O1 3주로 총 113주를 사용하였다.

2. TDH assay

TDH의 생성시험은 bead-ELISA법으로 측정하였다. 판정은 본 kit의 사용법에 준하여 450 nm에서 흡광도를 측정한 결과 0.2 이상인 검체를 독소생성 양성, 0.1 이하인 검체를 음성으로 판정하였다.

3. 콜레라 장독소 생성시험 (CT assay)

콜레라 장독소는 bead-ELISA법을 이용한 BT test Nissui CT Kit (Nissui, Japan)를 사용하였다. 표준독소는 kit 내의 것을 사용하였으며 450 nm에서 흡광도를 측정한 결과, 흡광도가 0.2 이상인 검체를 독소생성 양성검체, 0.1 이하인 검체를 음성으로 판정하였다.

4. Plasmid DNA분리와 전기영동

Plasmid의 분리는 Sambrooke 등의 방법에 따랐다. DNA 침전물을 0.8% TBE agarose에 loading하여 100V로 1시간 전기영동한 후 ethidium bromide 용액 (0.25 μg/ml)으로 3분간 염색하여 transilluminator로 DNA band를 확인하여 filter가 부착된 polaroid camera로 촬영하였다.

5. Chromosomal DNA분리 및 제한효소처리

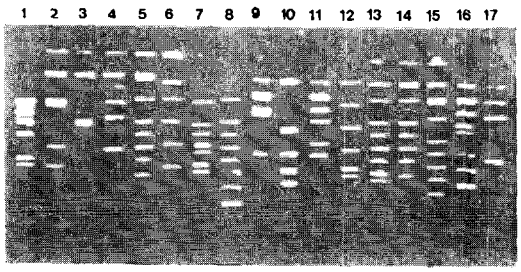
Sambrooke 등의 방법에 따라 분리하였다. 제한효소는 *Hind* III 및 *Bam*H I을 사용하였으며, 18시간 반응시킨 후 pulse controller field inversion gel electrophoresis하였다.

6. Probe DNA의 준비

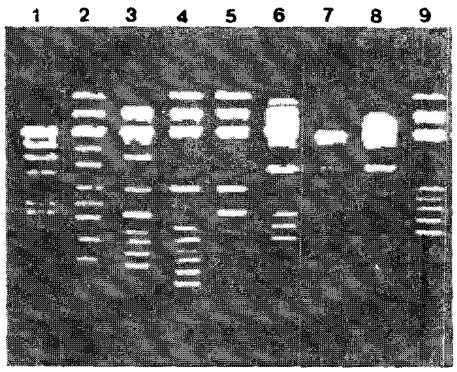
Probe의 labeling은 random primed DNA labeling 법에 의해 dioxygenin-11-deoxyuridine-triphosphate (Boehringer Mannhenim)로 label 시켜 사용하였다.

7. Polymerase chain reaction (PCR)

PCR은 Shirai 등의 방법을 변형하여 사용하였다. PCR에 사용한 primer는 Nishibuchi 등에 의해



A



B

Figure 1. Restriction endonuclease cleavage patterns of selected *Vibrio* plasmids (**A**) lane 1: *Hind* III digested λ phage DNA as molecular weight, lane 2-9: *Bam*H I restriction pattern, lane 10-17: *Hind* III restriction patterns (**B**) lane 1: *Hind* III digested λ phage DNA as molecular weight, lane 2-4: *Bam*H I restriction pattern, lane 5-9: *Hind* III restriction patterns.

Table 1. Results of PCR, TDH assay and DNA hybridization test used to analyze strains of *Vibrio spp.*

Strains	No. of strains (environmental/clinical)	PCR	TDH assay	DNA hybridization
V. parahaemolyticus	5 (2/3)	+	+	+
	4 (4/0)	−	+	−
	18 (18/0)	−	−	−
V. cholerae non-O1	17 (14/3)	−	−	−
V. alginolyticus	13	−	−	−
	1	−	+	−
V. vulnificus	23	−	−	−
V. mimicus	1	−	+	−
	10	−	−	−
V. damsela	10	−	−	−
V. funissii	11	−	−	−

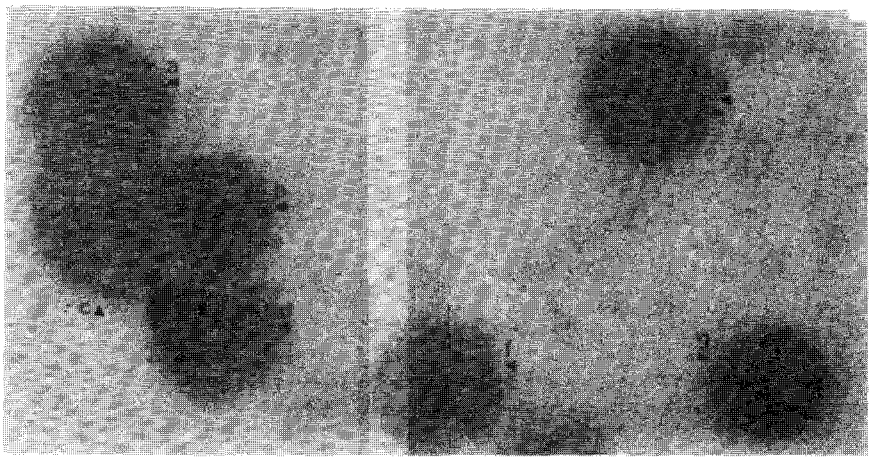


Figure 2. An autoradiograph of a nitrocellulose filter with colonies of *Vibrio spp.* after colony blot hybridization with ^{32}P-labeled TDH probe DNA. a: *tdh* positive control, b-d: *V. parahaemolyticus* from clinical isolates, e-f: *V. parahaemolyticus* from marine products, g: *V. mimicus*. The *tdh* gene is indicated by the triangle.

서 보고된 바 있는 Expedite Acid System으로 합성한 *tdh* gene, *ctx* gene과 상호결합하는 primer sequence를 한국생공에서 주문하여 사용하였으며, purification은 sep-pak catridge로 하였다. 이들 primer가 표적으로 하는 DNA의 크기는 각각 302와 400 bp이다. PCR 조건으로 *tdh* gene의 경우, denaturation step은 94℃에서 1분, annealing step은 55℃에서 1분, extension step은 72℃에서 1분으로 하여 25 cycle을 반응시켰고, *ctx* gene의 경우, denaturation step을 94℃에서 1분간, annealing step을 60℃에서 1분 30초, extension step은 72℃에서 1분 30초간, 32 cycle을 반응시켰다.

8. Southern blot hybridization

PCR을 통해 얻어진 증폭산물을 2% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide 용액 (0.25 μl/

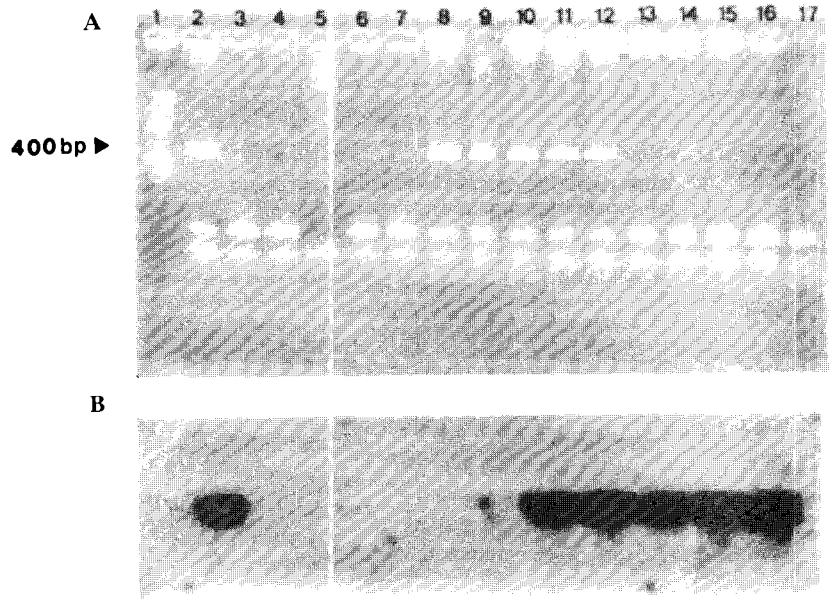


Figure 3. Specific amplification of 400 bp fragments from total DNAs of *Vibrio spp.* by PCR with *tdh* gene primers. **(A)** Agarose gel electrophoresis of PCR product, **(B)** Southern blot analysis of the products. lane 1: ψX 174 *Hae*III digest, lane 2 : *tdh* positive control (*V. parahaemolyticus* A92), lane 3-7: *V. parahaemolyticus* from environmental isolates, lane 8-12: *V. parahaemolyticus* from clinical isolates.

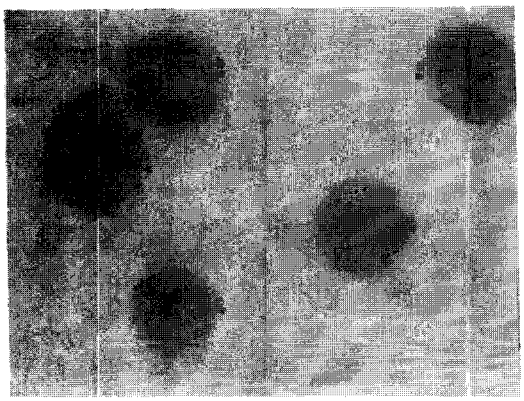


Figure 4. An autoradiograph of a nitrocellulose filter with colonies of *Vibrio spp.* after colony blot hybridization with ^{32}P-labeled CT probe DNA. a: *ctx* positive control, b-d: *V. cholerae* non-O1 from clinical isolates, e: *V. cholerae* non-O1 from environmental isolates. The *ctx* gene is indicated by the triangle.

ml)으로 염색하여 DNA band를 확인하고 gel을 0.2 N NaOH, 0.5 M NaCl 용액에서 30분간 진탕하여 변성시킨 후 사용하였다.

결 과

1. Plasmid 분리

분리된 비브리오 균주들의 plasmid content를 조사한 결과, 55% 이상이 1개 이상의 plasmid를 보유하고 있었다. 대부분의 균주들이 23.1 kb에서 0.56 kb 범위의 plasmid를 보유하고 있었으며, 분자량이 23 kb 이상의 plasmid를 1개 이상 보유하고 있는 균주는 15% 존재하였다. 이들 plasmid를 *Hind* III와 *Bam*H I으로 처리한 결과 매우 다양한 restriction pattern을 보여 주었으며 20 kb 보다 작은 plasmid들은 대체로 2~6개의 restriction site를 가지며, 그 pattern은 대체로 유사하였다 (Fig. 1).

2. *tdh* gene의 검출

β-hemolysis를 일으킨 균주들을 대상으로 *tdh* gene을 검색하였다.

1) TDH assay

V. parahaemolyticus 27주 중 임상가검물에서 분리한 3주 모두에서 양성으로, 환경에서 분리한 24주 중 2주가 양성으로 나타났고 다른 *Vibrio* 균주들은 대부분 음성을 나타내었는데, *V. mimicus,*

Table 2. Results of PCR, CT assay and DNA hybridization test used to analyse strains of *Vibrio spp.*

Strains	No. of strains Examined (environmental/clinical)	No. of CT positive	Results of	
			PCR	Hybridization
V. parahaemolyticus	27 (24/3)	0	0	0
V. cholerae non-O1	17 (14/3)	4 (1/3)	4 (1/3)	4 (1/3)
V. vulnificus	23	0	0	0
V. alginolyticus	14	0	0	0
V. mimicus	11	0	0	0
V. damsela	10	0	0	0
V. furnissii	11	0	0	0

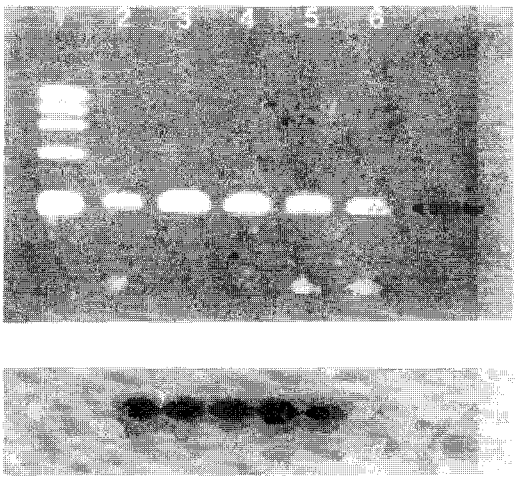


Figure 5. Specific amplification of *ctx* gene from total DNAs of *Vibrio spp.* by PCR with *ctx* gene primer. **(A)** Agarose gel electrophoresis of PCR products, **(B)** Southern blot analysis of the products. lane 1: ψX174 *Hae*III digest, lane 2: *ctx* positive control, lane 3-5: *V. cholerae* from clinical isolates, lane 6: *V. cholerae* from environmental isolates.

V. alginolyticus 각 1주에서 양성반응을 보여 주었다 (Table 1).

2) Colony blot and hybridization에 의한 *tdh* gene의 검색

임상가검물에서 분리한 *V. parahaemolyticus* 3주에서는 TDH assay에서와 같이 *tdh* gene이 검출되었으며, 환경주에서는 TDH assay에서 양성을 나타낸 *V. parahaemolyticus* 2주 및 *V. mimicus* 1주에서 *tdh* gene이 검출되었다 (Fig. 2).

3) Polymerase chain reaction (PCR)

임상가검물에서 분리된 3주의 *V. parahaemolyticus*와 환경에서 분리된 *V. parahaemolyticus* 2주 및 *V. mimicus* 1주에서 *tdh* gene이 검출되었다 (Fig. 3).

4) Southern blot hybridization

PCR과 colony blot hybridization의 결과에서와 같이 임상가검물에서 분리된 3주인 *V. parahaemolyticus*와 환경에서 분리된 2주인 *V. parahaemolyticus*에서 *tdh* gene이 검출되었다 (Fig. 3).

3. *ctx* 유전자의 검출

환경으로부터 분리한 *V. cholerae* non-O1를 비롯한 몇몇 비브리오 속 및 임상가검물로부터 분리된 3주의 *V. cholerae*를 대상으로 PCR 및 hybridization을 실시하여 콜레라 장독소 생성을 유도하는 유전자, 즉 *ctx* gene을 검출한 결과는 다음과 같다.

1) CT assay

V. cholerae non-O1 17주 중 임상가검물에서 분리한 3주에서는 모두 양성으로, 환경에서 분리한 14주 중 1주가 양성으로 나타났으며, 다른 *Vibrio* 균주들은 모두 음성으로 나타났다 (Table 2).

2) DNA colony hybridization

PCR에서 *ctx* gene이 검출된 4주 중 임상가검물로부터 분리된 3주는 모두 양성반응을 나타내었고 환경에서 분리된 균주 중 PCR에서 양성을 나타낸 1주도 양성반응을 나타내었다 (Fig. 4).

3) Polymerase chain reaction (PCR)

임상가검물에서 분리한 *V. cholerae* non-O1 3주와 환경에서 분리된 *V. cholerae* non-O1 1주에서 *ctx* gene이 검출되었고, CT를 생성하지 않는 다른 균주 모두에서는 검출되지 않았다 (Fig. 5).

4) Southern hybridization

PCR 및 colony hybridization에서 마찬가지로 임상가검물로부터 분리된 3주와 환경에서 분리된

1주 모두 양성반응을 나타내었다 (Fig. 4).

고 찰

Miwatani 등은 환경에서 분리된 장염비브리오 균주에서는 *tdh* gene의 존재가 거의 없으며 임상가검물에서 분리된 균주의 99%에서 검출이 된다고 보고하였다. 또한 콜레라 장독소는 *V. cholerae* O1뿐만 아니라 *V. cholerae* non-O1에 의해서도 생성되며 특히 *V. cholerae* O139가 생산하는 장독소는 면역학적으로 *V. cholerae* O1이 생산하는 장독소와 동일하다고 하였다. 본 연구에서 국내의 해산물 및 임상가검물에서 분리한 비브리오 종들의 병원성 인자를 조사한 결과 β-hemolysis를 일으킨 균주들을 대상으로 *tdh* gene을 검색한 결과에서 *V. parahaemolyticus* 27주 중 임상가검물에서 분리된 3주와 환경에서 분리된 2주에서 *tdh* gene의 존재가 확인되었는데, 이는 Miwatani 등의 내용과 일치하였다. 그리고 콜레라 장독소의 검출을 위해 PCR 및 DNA probe hybridization 등을 실시한 결과 환경에서 분리된 균주들에서는 거의 검출이 되지 않았고, 임상가검물에서 분리된 3주에서는 모두 *ctx* gene이 검출되는 동일한 결과를 보여 주었다. 따라서 비브리오의 검출 및 감염증 진단에 대규모로 확산되었을 때 PCR 기법을 이용하면 신속한 동정에 도움이 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1) Miwatani T, Takeda Y: *Vibrio parahaemolyticus*: Causative bacterium of food poisoning, chapter 1. Discovery of *Vibrio parahaemolyticus*, pp. 1-5. *Tokyo: Saikon Pubulishing Co.* 1976.

2) Sakurai J, Matsuzaki A, Takeda Y, Miwatani T: Existence of two distinct hemolysin in *Vibrio parahaemolyticus. Infect Immun* **9(5):** 777, 1974.

3) Sakurai J, Bahavar MA, Jingji Y, Miwatani T: Interaction of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with human erythrocyte. *Biken Journal* **18:** 187, 1975.

4) Yoji HJ, Hitokoto H, Morozumi S, Le Clair RA: Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus. J Infec Dis* **123(6):** 665, 1971.

5) Kim YB, Okuda J, Ishibashi M, Nishibuchi M, Suzuki N: Levels of TDH production of *V. parahaemolyticus* strains carring *tdh* and *trh* gene. 日本 感染症學會誌 **71(12):** 1221-1225, 1997.

6) Kim YB, Chiho Matsumoto, Jun Okuda, Mitsuaki Nishibuchi, Naoki Takahashi, Satoru Hashimoto: Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at species level by PCR targeted to the *tox* R gene. *J of Clinical Micribiology* **37(4):** 1173-1177, 1999.