

비브리오 균속이 생산하는 식중독 유발 Toxin 유전자의 검출

김민정 · 조경자¹ · 류병호*

경성대학교 응용공학부 식품공학과
¹경성대학교 생활과학부 생활경영학과

Detection of Food Poisoning Toxin Genes Produced by *Vibrio* sp.

Min-Jung Kim, Kyung-Ja Cho¹ and Beung-Ho Ryu*

Department of Food Science and Technology, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea
¹Department of Life Management Science, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract

Recently *Vibrio* sp. are the most frequently isolated microorganism, which causing food poisoning. We investigated the detection of toxin genes and effect of chitosan to toxin genes with PCR. Thirty strains of *Vibrio* sp. were isolated from sea water and sea products through biological and biochemical tests. Out of 30 strains, 8 were identified as *V. parahaemolyticus*, 7 as *V. vulnificus*, 6 as *V. damsela*, 5 as *V. vulnificus*, 4 as *V. alginolyticus*. In detection of *ctx*, *tdh*, and *trh* as food poisoning-causing toxin genes, *ctx* from 7 strains, *trh* from 4 strains and *tdh* from 6 strains were detected. Among toxin genes detected strains, we selected *V. vulnificus*-2, *V. damsela*-1 and *V. parahaemolyticus*-7. As adding chitosan solution to PCR product of 3 strains, the amplified DNA bands were not detected over 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration of chitosan. Over the result, chitosan is thought to influence the detection of toxin gene.

Key words - *Vibrio* sp., *ctx*, *tdh*, *trh*, Chitosan

서 론

식중독은 1970년 7월 이후 발생빈도와 위중성이 확인된 이래 현재까지 매년 하절기에 산발적으로 발생하여 다수의 인명 손실을 초래하였다. 어패류 생식의 전호와 같이 식생활 습관과 유병 상황 등의 위험요인으로 인하여 보건 의료계 및 보건 당국에서 질병 발생 감시에 주의를 기울여 왔던 질환이다[5]. 또한, 지난 수 십년간 항공을 비롯한 각종 운송 수단의 발달로 인한 지구촌의 접촉은 여러 가지 전염병

의 문제점을 낳게 하였다. 예방 접종이나 균주의 독성, 개체의 면역성, 성별, 연령 등의 생물학적인 조건들이나 개별적 위험도에 따른 평가가 이루어 질 수 없는 질환들이 증가하는 실정이다[6]. 특히, 음식물의 섭취나 미생물이 분비하는 독소에 의하여 일어나는 식중독의 경우 그 전파 속도는 단 시간내 동시 다발적으로 발생하여, 면역기능의 저하자(im-muno compromised patient's), 유아와 노령층에서는 사망에 이르기 때문에 그 예방이나 치료에 있어서 보다 신속한 대처가 절실히 요구된다. 서구에서도 식중독 및 식중독으로 인한 감염증은 위생관리의 수법의 하나로 일반 생활 환경과 공중위생 측면에서 식중독에 관한 위해 분석과 중요관리법(Hazard Analysis and Critical Control Points, HACCP)을

*To whom all correspondence should be addressed
Tel. 051-620-4712, Fax 051-622-4986
E-mail address: bhryu@star.kyungsung.ac.kr

지정하여 NASA에서 비행사들에게 식품의 안전성을 확보하기 위해 예방을 시도하고 있는 실정이다.

최근, 식품 및 균체가 분비하는 독소에 의해서 발생하는 식중독의 원인균들을 대상으로 고체 및 액체 배양액으로부터 독소를 분리 정제하여 천연물질로 하여금 독소의 활성화에 변화를 줄 수 있는 조건을 찾아 미생물 독소의 생리활성을 저감하는 효과, 독소저해제, 항산화 활성화 등의 다기능성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 연구 방법으로 특이성과 민감도가 높으면서도 원인 물질의 확인에 신속하게 대처할 수 있는 reverse passive latex assay (RPLA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), 조직 배양, bead-enzyme-linked immuno sorbent assay방법 등의 면역학적인 방법, 혈청학적인 진단인 간접항체 면역형광항체법 등의 면역혈청학적인 방법들이 있다[19]. 그러나, 이는 단일항체로 항체가를 확인하기에는 항체가의 유의한 상승으로 진단은 가능하지만 집단발생이 되지 않으면 다소 어려움이 따르는 단점이 있다[16]. 다양한 종류의 가검물에서 유전자 증폭을 실시하는 추가적인 실험 후, 이에 대한 가능성을 증명할 수 있다면 조기 진단에도 도움이 될 것이다. 즉, DNA probe를 이용한 polymerase chain reaction (PCR), DNA-DNA hybridization, RNA-DNA hybridization, Western blot 및 Southern blot hybridization 등의 분자유전학적인 방법들이 식중독 야기 독소유전자 정검출에 높은 특이성(specificity), 민감성(sensitivity) 및 신속성(rapidity)을 나타내어 최근에 널리 이용되고 있다[10,18].

또한, DNA 재조합 기술(recombinant DNA technology)를 이용하여 정상적인 기능 유전자의 functional copies를 환자 세포의 genom 안으로 주입시켜 유전자 결함을 교정하거나 세포에 새로운 기능을 추가시켜 인체세포의 유전적인 변형을 통해 감염성 질병을 예방하거나 치료하는 유전자 치료가 시도되고 있다. 그러나, 현재까지 개발되어 있는 분자생물학적 방법에 비추어 기술적으로 가능한 방법은 새로운 기능을 첨가하는 방법이라고 할 수 있다[3,9]. 생명과학의 발달로 인하여 새로운 연구분야에 세계적인 관심이 가증되어 폭발적인 연구와 투자가 이루어지고 있다. 최첨단의 생물 유전학적인 기법을 이용하여 천연물질로부터 기능성 물질의 정제와 품질 개선은 식중독과 동반된 여러 가지 관련 질병의 예방에 큰 몫을 할 것으로 사료된다. 이러

한 기술을 개선하여 생산기술의 산업화 전략에 맞는 새로운 모델을 제시한다면, 전염으로 인한 국민건강증진과 건강한 삶의 질을 향상시켜 보건 의료비를 줄일 수 있는 효과와 일반 국민들이 양질의 식품을 통하여 질병을 예방하는 제품을 선택하여 보다 안전하게 시용할 수 있어 국민 보건 향상에도 기여할 것이다[6,18]. 지난 4년간 우리나라에서는 월별 식중독 발생 현황을 보면 5월에서 9월까지 하절기에 집중되는 현상을 볼 수 있다[12]. 원인 물질로는 비브리오와 같은 세균으로 인한 식중독이 가장 많았으며 식물성 및 동물성 독성물질이 원인인 경우도 소수 있었다. 자연독에 의한 식중독은 사망률이 높은 특징이 있다. 비브리오와 관련되어 있는 병원성 결정인자로는 세포외 독소(extra cellular enterotoxins)[14], elastolytic protease[13,15], polysaccharide capsule[26]의 존재, 혈청의 살균 작용능[8] 및 담식작용[8] 등이 제시되고 있으나, 아직 병인론적인 전체를 설명할 수는 있는 실정은 아니다. 최근, 이들 병원성 결정인자들 중에서 식중독 환자나 식중독 야기 음식물에서 주로 분리된 비브리오속이 보유하는 독소를 검출하여 이들 독소의 활성을 저해하거나 억제하는 인자들에 관한 연구가 진행중이다[17,21]. Sakazaki 등[21]은 비브리오 균속을 대상으로 enterotoxin을 검출한 결과 heat-labile enterotoxin (*trh*), thermostable direct hemolysin-like hemolysin(*tdh*) 및 cholera toxin(*ctx*) 등이 가장 많다고 보고하였다. 이들 독소의 검출에는 특이 primer를 이용한 관련 독소 유전자와 상보 결합하여 독소 DNA를 증폭시키는 PCR법이 많이 이용되고 있다[2,20,25]. 특히, 식중독과 같은 동시 다발적인 감염 질환의 경우 역학적 조사시 원인균의 동정이 신속히 요구될 때 많이 사용되고 있다[9].

따라서, 본 연구는 식중독을 야기하는 비브리오 균속을 대상으로 독소 유전자의 검출을 PCR로 실시하고 이러한 독소 유전자의 검출에 천연물질로서 chitosan의 영향을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

비브리오균의 분리를 위한 배지

해산물로부터 Ju 등[11,12]의 방법과 TCBS상의 집락의 색깔에 의하여 비브리오속 균의 동정을 실시하였다. 분리

및 동정을 위해 사용한 배지는 Difco Laboratories Detroit Michigan USA의 제품으로 alkaline peptone수, thio-citrate-bile-salt(TCBS) agar 및 tri-sugar-iron(TSI), lysine-indole-motility(LIM) agar 등이며, hemolysin 생성능을 알아보기 위해서는 0.5% NaCl을 첨가한 Brain Heart Infusion(BHI, Sigma Co. St., Louis, USA) 액체배지와 5% 면양 적혈구를 가한 혈액한천배지를 사용하였다.

Enterotoxin 유전자의 검출

분리된 비브리오 균속을 대상으로 식중독을 유발하는 enterotoxin으로써 heat-labile enterotoxin(*trh*), thermostable direct hemolysin-like hemolysin(*tdh*) 및 cholera toxin(*ctx*)의 유전자 검출은 Table 1의 primer[1,4]를 이용하여 Delta Cycler I TM system, Easy Cycler Series(Ericomp, Inc., San Diego, CA, USA)의 PCR로 검증하였다[24].

Polymerase Chain Reaction(PCR)

PCR에 사용할 시료는 lysostaphin처리에 의한 검체의 조정법인 Sambrook 등[22]의 방법으로 조제하였다. 0.5 ml용 microtube에 buffer 100 μ l(50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0)를 분주하고 여기에 균을 부유시켰다. 그리고 10 μ l(1 mg/ml)의 lysostaphin (Sig-

ma Chemical Co., St. Louis, USA)를 첨가하여 37°C에서 각각 5분, 10분, 15분, 30분 및 1시간씩 incubation하고 PCR을 실시한 결과 incubation시간에 관계없이 반응이 같았으므로 37°C에서 5분씩, 95°C에서 5분간 incubation하고 10,000 rpm에서 5분간 원심한 후 상층액을 PCR하였다. 이때의 PCR은 Shirai 등[23]의 방법을 변형하여 사용하였다. 대상균주를 LB broth에 접종하여 37°C에서 18시간 진탕 배양(120 Rev. \times 6 cm stroke, Vision Scientific Co., Ltd. Korea)하였고 단계별로 회석하여 94°C에서 5분간 끓인 후, -80°C에서 2시간 이상 방치하였다. 이것을 약 10초간 원심분리하여 그 상층액을 template DNA로 사용하였다. PCR에 사용한 primer는 Table 1의 gene들과 상보결합하는 primer sequence를 한국생공(Korea Biotech, Taejeon, Korea)에서 주문하여 사용하였다. Purification은 Sep-Pak Catridge로 하였다. 이들 primer가 표적으로 하는 DNA의 크기는 Table 1과 같았다. 반응혼합액은 5 μ l의 10 \times buffer(0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M KCl, 0.015 M MgCl₂), 4 μ l의 2.5 mM dNTP, 10 pmol/ μ l의 sense primer 2 μ l, antisense primer 2 μ l 및 0.25 μ l의 2.5 U Taq polymerase로 구성하였으며, 여기에 검체를 3 \times 10³ 주가 되게 넣어 총 50 μ l가 되게 하였다. PCR 조건은 gene에 따라 Table 2와 같이 실시하였다. 최종 PCR 증폭산물 10 μ l와 molecular weight

Table 1. Synthetic oligonucleotides used as primers for polymerase chain reaction

Primers	Nucleotide base sequence (5'-3')	Target gene	Size of DNA (bp)*
1	5'-CTCAGACGGGATTGTAGGCACG-3' 5'-GCATTATCCCCGATGTCTCTATCT-3'	<i>ctx</i>	302
2	5'-GGTCAAGTACAACCTTCAACATTCC-3' 5'-CCACTACCACTCTCATATGCATCA-3'	<i>trh</i>	400
3	5'-GGGGATCCCTCAGTACAAAGCCCTT-3' 5'-TGGTGTGACATCCTACATGACTGTG-3'	<i>tdh</i>	554

* The nucleotide equence of genes were reported by Arita et al.[1].

Table 2. Conditions of polymerase chain reaction

Enterotoxin producing genes	PCR steps			Total cycle
	Denaturation	Annealing	Extension	
<i>tdh</i>	94°C, 1 min	55°C, 1 min	72°C, 1 min	25
<i>ctx</i>	94°C, 1 min	60°C, 90 secs	72°C, 90 secs	32
<i>trh</i>	94°C, 1 min	55°C, 1 min	72°C, 1 min	25

marker로 phage ϕ X174 HaeIII digested(TaKaRa Shuzu Kyoto, Japan)와 phage λ DNA HindIII digested(TaKaRa Shuzo Kyoto, Japan)를 사용하여 2% agarose gel에서 전기영동(BioRad Mini-protein II)하였고, DNA 단편은 UV하에서 EtBr로 염색하여 확인하였다. 독소 검출균주의 PCR산물의 정제는 QIA quick PCR Purification Kit(Qiagen Ca 28014, Germany)를 이용하여 정제하였다.

Chitosan의 독소 유전자 검출에 관한 영향

상기의 PCR법으로 독소 유전자 검출이 확인된 17주중에서 균의 발육이 양호하였던 *V. vulnificus*-2, *V. damsela*-1와 *V. parahaemolyticus*-7를 선정하여 재차 PCR하였다. 이들의 PCR 산물은 QIA quick PCR purification kit(Qiagen Ca 28014, Germany)로 독소 유전자를 정제한 후, chitosan을 0, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 및 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 농도별로 각각 첨가하여 37°C에서 1시간 반응한 후, 상기와 동일한 조건으로 PCR을 실시하여 비교하였다.

결과 및 고찰

비브리오속균의 선정

해산물을 주[11,12] 등의 방법에 따라 alkaline peptone 수, TCBS agar 및 TSI 및 LIM agar 등의 배양 양상 및 집락의 색깔, hemolysin 생성능 등의 생화학적 성상을 검토한 결과 Table 3과 같이 5종의 비브리오속 30균주가 분류되었다. *V. parahaemolyticus*가 8균주로 가장 많았으며, 그 뒤로 7균주의 *V. mimicus*, 6균주의 *V. damsela*, 5균주의 *V. vulnificus* 그리고 4균주의 *V. alginolyticus* 순으로 분리되어 독소 유전자 검출에 사용하였다.

Enterotoxin 유전자의 검출

비브리오속균이 생산하는 식중독 유발 enterotoxin으로는 heat-labile enterotoxin(*trh*), thermostable direct hemolysin-like hemolysin(*tdh*) 및 cholera toxin(*ctx*) 등의 병원성 인자들이다. 30종의 비브리오속균을 대상으로 식중독을 야기하는 이들 enterotoxin 유전자의 검출을 실시한 결과, Table 4와 같았다. 독소를 생산하는 균주는 총 17주로 56.6%로 비교적 높게 나타났다. 이 중에서 *ctx*는 *V. parahaemolyticus*에서 4주로 가장 많았고 그 다음으로 *V. vulnificus*에서 2주, *V. alginolyticus*에서 1주가 검출되었다. *tdh*는 *V. parahaemolyticus*에서 2주, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. damsela* 및 *V. alginolyticus* 등에서 각각 1주씩 검출되었다. *trh*의 경우, *V. vulnificus*에서 2균주로 가장 많았다. 그리고 *V. damsela*, *V. parahaemolyticus* 등에서 각각 1주씩 검출되었다. Table 3에서 분리된 비율이 16.6%로 비교적 낮았던 *V. vulnificus*에서는 분리 균주 모두에서 하나씩의 독소 유전자가 검출됨에 따라 다른 비브리오속보다 독소 유전자 검출 빈도가 높은 것으로 나타났다. 그 다음으로는 *V. parahaemolyticus*가 87.5%로 나타났으며, *V. mimicus*가 가장 낮았다. 또한, 분리 균주중에서 검출

Table 3. Various *Vibrio* species derived from marine products

<i>Vibrio</i> species	No. of strains
<i>V. vulnificus</i>	5
<i>V. damsela</i>	6
<i>V. parahaemolyticus</i>	8
<i>V. mimicus</i>	7
<i>V. alginolyticus</i>	4
Total	30

Table 4. *Vibrio* species produced food poisoning enterotoxins

<i>Vibrio</i> species	Various toxin of food poison (positive/total strains no.)			
	<i>ctx</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	Enterotoxins producing frequency(%)
<i>V. vulnificus</i>	2/5	1/5	2/5	100.0
<i>V. damsela</i>	0/6	1/6	1/6	33.3
<i>V. parahaemolyticus</i>	4/8	2/8	1/8	87.5
<i>V. mimicus</i>	0/7	1/7	0/7	14.3
<i>V. alginolyticus</i>	1/4	1/4	0/4	50.0
Total	7(23.3)	6(20.0)	4(13.3)	30(100)

된 독소의 종류별로 살펴보면 *ctx* 23.3%, *tdh* 20% 및 *trh* 13.3%로 두드러진 차이는 없었으나 *ctx*가 가장 많이 검출되었다.

Enterotoxin 유전자가 검출된 균주의 PCR 결과

식중독을 야기하는 enterotoxin 유전자가 검출된 균주들을 PCR한 결과, *ctx* 유전자의 DNA를 증폭시킨 결과는 Fig. 1과 같았다. Fig. 1의 lane c에서 i까지의 7균주 즉, *V. vulnificus*-2, *V. vulnificus*-4, *V. parahemolyticus*-1, *V. parahemolyticus*-2, *V. parahaemolyticus*-4, *V. parahemolyticus*-8 및 *V. alginolyticus*-4에서는 lane b의 *ctx* 유전자가 검출된 *V. parahemolyticus* A92와 동일한 302 bp의 뚜렷한 band가 관찰되었다. Lane j에서 q까지에서는 *ctx* 유전자가 검출되지 않은 균주들이다. *tdh* 유전자의 DNA를 증폭시킨 결과는 Fig. 2와 같았다. Fig. 2의 lane f에서 i까지의 *V. parahemolyticus*-3, *V. parahemolyticus*-5, *V. mimicus*-1 및 *V. damsela*-1와 lane l과 lane m의 *V. vulnificus*-1와 *V. alginolyticus*-1 등 6균주에서는 lane b와 마찬가지로 뚜렷하게 증폭된 400 bp의 band가 관찰되었으며, lane b에서 e까지 그리고 lane j, k, n 및 o에서는 *tdh* gene이 검출되지 않아 아무런 band

도 관찰되지 않았다. 또한, *trh* 유전자의 경우는 Fig. 3과 같았다. Fig. 3의 Lane d에서 g까지의 *V. vulnificus*-5, *V. damsela*-2, *V. vulnificus*-6 및 *V. parahemolyticus*-7에서는 554 bp의 뚜렷한 band가 관찰되었으나, lane a와 c는 *trh* gene이 검출되지 않았음을 보여주었다. 또한, 본 실험에 사용된 분리균주에서는 PCR결과 같은 크기의 하나의 band만이 관찰됨에 따라 single-stranded DNA로 사료된다.

독소 유전자에 대한 chitosan의 영향

Enterotoxin 유전자 독소가 검출된 17주 중에서 *ctx* 유전자의 경우 *V. vulnificus*-2 균주를, *trh* 유전자의 경우 *V. damsela*-1 균주를 *tdh* 유전자의 경우 *V. parahemolyticus*-7 균주를 선정하여 이들의 PCR 산물에 chitosan을 농도별로 첨가하여 독소 유전자 검출에 대한 영향을 살펴보았다.

1) *ctx*

ctx 유전자 검출시 chitosan의 영향을 *V. vulnificus*-2로 실시한 결과 Fig. 4와 같았다. Fig. 4에서처럼 chitosan을 첨가하지 않은 b와 c lane에서는 Fig. 1에서 보여지는 동일한 크기의 band를 관찰할 수 있었으나, 농도별 첨가에 따

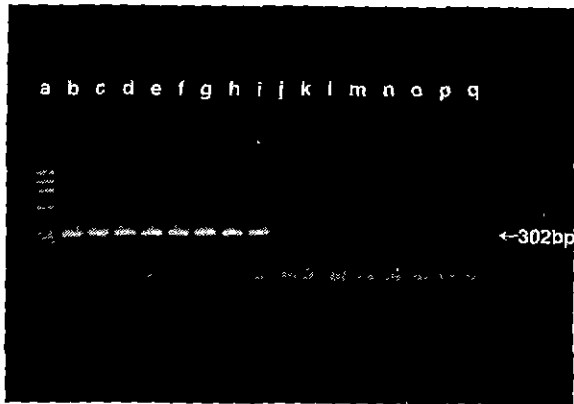


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of amplified 302 bp fragments of the *ctx* gene.

Lane a: ϕ X174RF DNA/Hae III fragments, lane b: *ctx* positive control(*V. parahemolyticus* A92), lane c: *V. vulnificus*-2, lane d: *V. vulnificus*-4, lane e: *V. parahemolyticus*-1, lane f: *V. parahemolyticus*-2, lane g: *V. parahaemolyticus*-4, lane h: *V. parahaemolyticus*-8, lane i: *V. alginolyticus*-4, lane j: *V. parahaemolyticus*-3, lane k: *V. parahaemolyticus*-5, lane l: *V. mimicus*-1, lane m: *V. mimicus*-2, lane n: *V. vulnificus*-1, lane o: *V. vulnificus*-3, lane p: *V. alginolyticus*-1, lane q: *V. alginolyticus*-2.

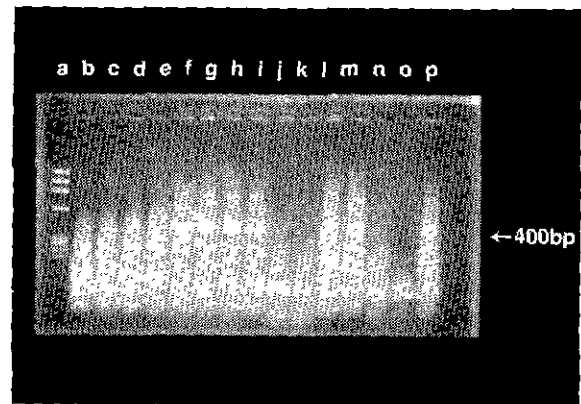


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of amplified 400 bp fragments of the *trh* gene.

Lane a: ϕ X174RF DNA/Hae III fragments, lane b: *V. vulnificus*-2, lane c: *V. vulnificus*-4, lane d: *V. parahemolyticus*-1, lane e: *V. parahemolyticus*-2, lane f: *V. parahemolyticus*-3, lane g: *V. parahemolyticus*-5, lane h: *V. mimicus*-1, lane i: *V. damsela*-1, lane j: *V. parahaemolyticus*-4, lane k: *V. parahemolyticus*-8, lane l: *V. vulnificus*-1, lane m: *V. alginolyticus*-1, lane n: *V. alginolyticus*-4, lane o: *V. damsela*-3, lane p: positive control(*V. parahemolyticus* A92).



Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of amplified 554 bp fragments of the tdh gene.

Lane a: *V. vulnificus*-2, lane b: ϕ X174RF DNA/ Hae III fragments, lane c: *V. parahemolyticus*-1, lane d: *V. vulnificus*-5, lane e: *V. damsela*-2, lane f: *V. vulnificus*-6, lane g: *V. parahemolyticus*-7, lane h: positive control(*V. parahemolyticus* A92).

라 *ctx* 유전자의 양이 점차 줄어드는 것을 알 수 있었으며

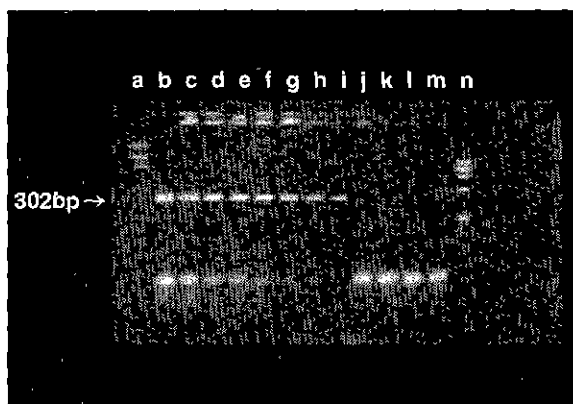


Fig. 4. Effect of various chitosan solution on inhibition of enterotoxin(*ctx*).

Lane a, n: ϕ X174RF DNA/Hae III fragments, lane b: *ctx* positive control(*V. parahemolyticus* A92), lane c: *V. vulnificus*-2, lane d: *V. vulnificus*-2 (with 200 μ g/ml chitosan sol.), lane e: *V. vulnificus*-2 (with 250 μ g/ml chitosan sol.), lane f: *V. vulnificus*-2 (with 300 μ g/ml chitosan sol.), lane g: *V. vulnificus*-2 (with 350 μ g/ml chitosan sol.), lane h: *V. vulnificus*-2 (with 400 μ g/ml chitosan sol.), lane i: *V. vulnificus*-2 (with 450 μ g/ml chitosan sol.), lane j: *V. vulnificus*-2 (with 500 μ g/ml chitosan sol.), lane k: *V. vulnificus*-2 (with 550 μ g/ml chitosan sol.), lane l: *V. vulnificus*-2 (with 600 μ g/ml chitosan sol.), lane m: *V. vulnificus*-1.

450 μ g/ml 이상의 농도에서는 *ctx* 유전자가 검출되지 않아 chitosan이 독소 유전자 DNA의 증폭에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

2) *trh*

trh 유전자 검출시 chitosan의 영향을 *V. damsela*-1로 실험한 결과 Fig. 5와 같았다. Fig. 5에서처럼 chitosan을 첨가하지 않은 b와 c lane에서는 Fig. 2에서 보여지는 동일한 band를 관찰할 수 있었으나, chitosan이 농도별로 첨가됨에 따라 *trh* 유전자의 양이 점차 줄어들어 DNA가 적게 생성되었으며 450 μ g/ml 첨가농도에서부터는 *trh* 유전자가 deletion된 것을 볼 수 있었다. 이는 *ctx*의 경우와 마찬가지로 450 μ g/ml 이상의 농도에서는 *trh* 유전자도 검출되지 않아 chitosan이 독소 유전자 DNA의 증폭에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

3) *tdh*

tdh 유전자 검출시 chitosan의 영향을 *V. parahemolyticus*-7로 실시한 결과 Fig. 6과 같았다. Fig. 6에서처럼 chitosan

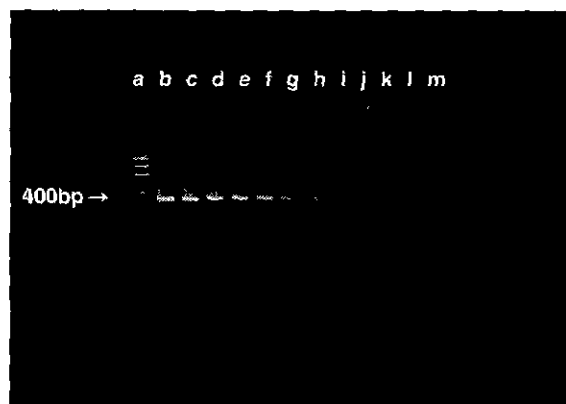


Fig. 5. Effect of various chitosan solution on inhibition of enterotoxin(*trh*).

Lane a: ϕ X174RF DNA/Hae III fragments, lane b: *trh* positive control(*V. parahemolyticus* A92), lane c: *V. damsela*-1, lane d: *V. damsela*-1 (with 200 μ g/ml chitosan sol.), lane e: *V. damsela*-1 (with 250 μ g/ml chitosan sol.), lane f: *V. damsela*-1 (with 300 μ g/ml chitosan sol.), lane g: *V. damsela*-1 (with 350 μ g/ml chitosan sol.), lane h: *V. damsela*-1 (with 400 μ g/ml chitosan sol.), lane i: *V. damsela*-1 (with 450 μ g/ml chitosan sol.), lane j: *V. damsela*-1 (with 500 μ g/ml chitosan sol.), lane k: *V. damsela*-1 (with 550 μ g/ml chitosan sol.), lane l: *V. damsela*-1 (with 600 μ g/ml chitosan sol.), lane m: *V. vulnificus*-2.

을 첨가하지 않은 b와 c lane에서는 Fig. 3에서 보여지는 동일한 band를 관찰할 수 있었으나, chitosan이 농도별로 첨가됨에 따라 *tdh* 유전자의 양과 활성이 점차 줄어들어 DNA가 적게 생성되었으며, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가농도에서부터는 *tdh* 유전자가 전혀 검출되지 않아 *ctx*와 *trh*의 경우와 유사한 결과가 나타났다. 이는 primer의 종류와 PCR 조건 내지는 chitosan의 첨가시 반응시간과 조건 그리고 mutant로서의 작용 가능성 등의 원인을 고려하여 이후 실험을 진행하여야 될 것으로 사료된다.

요 약

식중독을 야기하는 미생물중에서 분리 빈도가 최근 증가하고 있는 비브리오패균을 대상으로 독소 유전자의 검출하였고 PCR을 이용하여 검출된 독소 유전자에 대한 chitosan의 영향을 알아보았다.

해산물과 해수로부터 8균주의 *V. parahemolyticus*, 7균주의 *V. mimicus*, 6균주의 *V. damsela*, 5균주의 *V. vulnificus*,

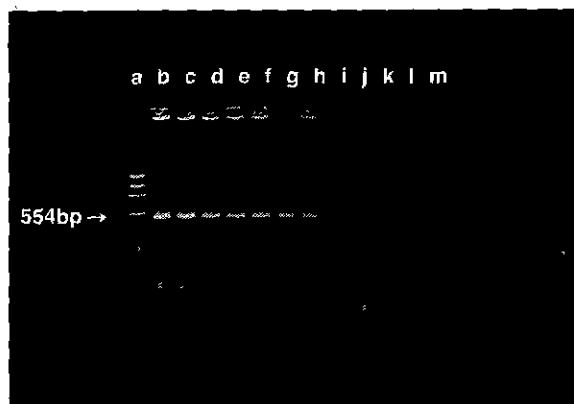


Fig. 6. Effect of various chitosan solution on inhibition of enterotoxin(*tdh*).

Lane a: ϕ X174RF DNA/Hae III fragments, lane b: *tdh* positive control(*V. parahemolyticus* A92), lane c: *V. parahemolyticus*-7, lane d: *V. parahemolyticus*-7(with 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chitosan sol.) lane e: *V. parahemolyticus*-7 (with 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chitosan sol.), lane f: *V. parahemolyticus*-7(with 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chitosan sol.), lane g: *V. parahemolyticus*-7(with 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chitosan sol.), lane h: *V. parahemolyticus*-7(with 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chitosan sol.), lane i: *V. parahemolyticus*-7(with 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chitosan sol.), lane j: *V. parahemolyticus*-7(with 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chitosan sol.), lane k: *V. parahemolyticus*-7(with 550 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chitosan sol.), lane l: *V. parahemolyticus*-7(with 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chitosan sol.), lane m: *V. parahemolyticus*-4.

4균주의 *V. alginolyticus*를 분리하였다. 이들 30주에서 식중독을 야기시키는 독소 유전자인 *ctx*, *trh* 및 *tdh*의 검출을 실시한 결과, 각각 7주, 4주 및 4주에서 검출되었다. 각각의 독소 유전자 검출 양성주 중에서 *V. vulnificus*-2, *V. damsela*-1 및 *V. parahemolyticus*-7를 선정하여 PCR 산물에 chitosan 용액을 농도별로 첨가하여 독소 유전자 검출을 실시하였다. *ctx*와 *trh*는 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 *tdh*는 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 독소 유전자가 검출되지 않아 chitosan이 독소 유전자의 검출에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Arita, M., T. Homda, T. Miwatani, T. Takeda, T. Takao and Y. Shimonishi. 1991. Purification and characterization of a heat-stable enterotoxin of *Vibrio mimicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**, 105-110.
2. Auaubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
3. Brett, M. M. 1998. Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. *Soc-Appl-Bacteriol-Symp-Ser* **27**, 110S-118S.
4. Craig, J. P., K. Yamamoto, Y. Takeda and T. Miwatani. 1981. Production of cholera-like enterotoxin by a *Vibrio cholerae* non-O1 strain isolated from the environment. *Infect. Immun.* **34**, 90-97.
5. Information of Infectious Diseases. 1999. Food poisoning 1991-1995. **7**(2), 13-16.
6. Jawetz, E., J. L. Melnick and E. A. Adelberg. 1980. Enteric Gram-negative microorganism, 14th ed., Calif.
7. Jeung, H.-Y. and J.-H. Jeun. 1987. Infectious diseases. Soo Moon Sa. Co., 750-754.
8. Johnson, J. E., F. M. Calia, D. M. Musher and A. Goree. 1984. Resistance of *Vibrio vulnificus* to serum bactericidal and opsonizing factors: relation to virulence in suckling mice and humans. *J. Infect. Dis.* **150**, 413-418.
9. Johnson, M. B. Jr. and S. A. Khan. 1988. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. *J. Bacteriol.* **170**, 4033-4039.
10. Johnson, W. M., S. D. Tyler, E. P. Ewan, F. E. Ashton, D. R. Pollard and K. R. Rozee. 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and

- toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 426-430.
11. Ju, J.-W. 1990. Identification of *Vibrio* species in Hek San Do and Hong Do, Korea. *J. Kor. Soc. Microbiol.* **25**(2), 107-114.
 12. Ju, J.-W., M.-H. Lee and I. Kim. 1990. Isolation of pathogenic *Vibrio* species in Ul Rng Do, Korea. *J. Kor. Soc. Microbiol.* **25**(4), 283-291.
 13. Kothary, M. H. and A. S. Kreger. 1987. Purification and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1783-1791.
 14. Kreger, A. and D. Lockwood. 1981. Detection of extracellular toxin(s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **33**, 583-590.
 15. Miyoshi, N., S. Miyoshi, K. Sugiyama, Y. Suzuki, H. Furuta and S. Shinoda. Activation of the plasma kallikrein-kinin system by *Vibrio vulnificus* protease. *Infect. Immun.* **55**, 1936-1939.
 16. Nishinushi, M., M. Ishibashi, Y. Takeda and J. B. Kaper. 1985. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* species by the DNA colony hybridization test. *Infect Immun.* **49**, 481-486.
 17. Nishibuchi, M., V. Khaemaneean, T. Honda, J. B. Kaper and T. Miwatani. 1991. Comparative analysis of the hemolysin genes of *Vibrio cholerae non-O1*, *V. mimicus* and *V. hollisae* that are similar to the *tdh* gene of *V. parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**, 251-256.
 18. Okuda, J. M., S. L. Ishibashi, J. M. Abott and M. Nishuchi. 1997. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in the urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1965-1971.
 19. Oku, Y., Y. Ueasaka, T. Hirayama and Y. Takeda. 1988. Development of a highly sensitive bead-ELISA to detect bacterial protein toxins. *Microbiol. Immunol.* **32**, 807-816.
 20. Pierson, M. M. and D. Stern. 1986. Detection and quantitation of foodborne pathogens and their toxins Gram-negative bacterial pathogens. 317, Food-borne microorganism and their toxins. Developing methodology. Marcel decker Inc U.S.A.
 21. Sakazaki, R. and T. Shimada. 1986. *Vibrio* species as causative agents of food-borne infection, p.123, In Robison RK(ed.) *Developments in Food Microbiology 2*. Elsevier Applied Science Publishers, Landon and New York.
 22. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 23. Shirai, H., M. Nishibuchi, T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharaya, S. C. Pal and Y. Takeda. 1991. Polymerase chain reaction for detection of cholera enterotoxin operon of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* **29** (11), 2519-2521.
 24. Southern, E. M. 1980. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
 25. Williams, J. G., A.R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids. Res.* **18**, 6531-6535.
 26. Wnght, A. C., L. M. Simpson, J. D. Oliver and J. G. Morris. 1990. Phenotypic evaluation of a capsular transposon mutants of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **58**, 1769-1773.