

## RDA method (Subtraction PCR) 기법을 이용한 닭의 *Salmonella pullorum*과 *S gallinarum*의 specific DNA fragment 분리 연구

박재명<sup>1</sup>, 이종진, 최해연, 조우영, 이경현\*, 송재찬\*\*

충청북도축산위생연구소<sup>1</sup>, 국립수의과학검역원\*, 경북대학교 수의과대학\*\*  
(접수 2005. 2. 21, 게재승인 2005. 3. 2.)

### Specific DNA fragment analysis of *Salmonella pullorum* and *S gallinarum* by subtraction PCR

Jae-Myoung Park<sup>1</sup>, Jong-Jin Lee, Hae-Yeon Choi,  
Woo-Yeong Jo, Kyung-Hyeon Lee\*, Jae-Chan Song\*\*

<sup>1</sup>Chungbuk Livestock and Veterinary Research Institute, Chungwon, 363-931, Korea  
\*National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang, 430-824, Korea  
\*\*College of Veterinary Medicine, Gyeongbuk National University, Daegu, 702-710, Korea  
(Received 21 February 2005, accepted in revised form 10 March 2005)

#### Abstract

Pullorum disease and Fowl typhoid are kind of poultry specific disease for poultry. The peculiar character of these poultry specific diseases is that it can be infected by transmitting vertically and horizontally, also it is hard to be discovered by clinical sign, and pathology or immunology. So, to develop the PCR method which distinguishes these two genetically similar diseases of separated the specific DNA fragment from each strain and use it for differential diagnosis by subtraction PCR method. Standard strain of *S gallinarum* and *S pullorum*, and field isolation strain were verified by biochemistry, It confirmed existence of plasmid by using the PFGE. Then, Isolated DNA from it and used it as materials for the experiment. After cutting genomic DNA of two strains by using *Sau 3AI*, It ligated primer to tester DNA for PCR amplification and separated specific DNA fragment bacteria with method of subtraction PCR. And, It confirmed that

---

<sup>1</sup>Corresponding author  
Phone : +82-43-220-5611, Fax : +82-43-220-5619  
E-mail : jmprk@hanmail.net

it is a piece of unique DNA in every bacteria using base sequence of separated DNA fragment.

1. The six specific DNA fragment were separated from the DNA of *S. gallinarum* and *S. pullorum* by the subtraction PCR method.

2. In the result of comparison after setting base sequence of each fragment, each separated base sequence of DNA fragment they did not correspond to each other.

3. As the result of each DNA fragment is derived from the each strain of DNA, and there was no homology of genomic DNA level in mutual.

4. The fragment originated in plasmid and includes *S. pullorum* did not separate.

5. In the result of searching base sequence in Genebank, it partially shows homology in *Salmonella enterica*, *S. typhimurium*, *S. dublin*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae*.

6. Primer design by *S. gallinarum* DNA 2, 3 fragment used PCR, They are positive reaction in only *S. gallinarum* at 276, 367 bp position.

Key words : *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, subtraction PCR, Specific DNA

## 서론

동물의 살모넬라균 감염증은 다양한 혈청형의 원인균에 의해 발생하는 급성·만성의 소화기 전염병으로 장염, 패혈증의 원인을 나타내며 일부의 원인균은 사람의 식중독 원인균으로써 수의공중보건학상 중요시 되고 있는 병원성균의 하나이다<sup>1,5)</sup>. 그 중에서도 닭을 포함한 가금류에서 질병에 관여하는 중요한 살모넬라균종으로서 1899년 Rettger에 의해 최초 분리되었으며, 난계대에 의해 전염되는 최초의 동물 질병으로 밝혀진 *Salmonella pullorum*은 가금에서 추백리병의 원인균과, *S. gallinarum*은 가금티푸스가 대표적이며,<sup>6,7)</sup> 기타 닭에서는 물론 사람에게까지 식중독을 유발하여 인수공통전염병 원인균이 되는 *S. typhimurium*, *S. enteritidis* 외 200여종 이상 여타의 운동성 살모넬라균에 의해서 발증되는 Poultry paratyphoid infection, 그리고 *S. arizonae*에 의한 Arizonosis가 있다.<sup>6)</sup>

특히 *S. pullorum*과 *S. gallinarum*은 조류

의 비운동성 숙주 적응성 혈청형으로써 닭과 칠면조 등 조류에서만 높은 병원성을 나타내며, 중요한 전파양식은 수평전파 뿐만 아니라 계란을 통한 수직전파(난계대 전염)가 가능한 특성으로 인하여 우리나라 양계산업 구조상 종계장과 일반 농장간에 樹枝型的 연쇄상 형태를 취하고 있는 관계로 종계장에서 오염된 종란을 사용시 역학적으로 일반농장의 위치에 따라 넓은 지역에서 동시다발하는 양상을 보이는 경향이 있다. 일단 살모넬라균에 오염된 농장은 세균의 기생 특성상 항생제에 대한 치료 효율이 낮을 뿐만 아니라 농장에 상재화 되는 경향이 있는 점을 감안하면 양계산업에 큰 손실을 주고 있는 실정이다. 그러나 수의공중보건상의 그 중요성을 거의 무시될 정도로 장기적인 방제대책에서 성공한 세계의 대부분 나라(상업용 양계산업 국가)에서는 추백리가 박멸된 상태이며, 가금티푸스 역시 실질적으로 대부분 서방국가에서는 박멸상태이다. 그러나 한국을 비롯한 중앙 및 남부 아메리카, 아프리카, 중동국가 등 일부국가에서는 가금 위생문제에 있어서 중요한 문제로 남아있다.

우리나라에서 추백리 더불어 가금티푸스의 발생상황을 보면 '50~'60년대의 농립수산 통계자료에서 경북지방에서 300여수가 발생한 기록이 있으며, 1968년에는 추백리 양성계로부터 이 병의 원인체인 *S gallinarum*을 분리한 것으로 보고된 바 있으나 원인균에 대한 역학조사가 수행되지 않았으며, 1992년도 8월 경기 김포에서 산란계 농장에서 발생 확인된 후 1993년부터 경기, 전북, 경남, 경북지역에서 산란계를 중심으로 발생되었으나, 최근 1994년도부터는 육계에서도 분리 시작되어 현재는 종계, 산란계, 육계의 구분없이 무차별로 발생되고 있으며, 특히나 육계에서 많이 발생하고 있는 실정이다.<sup>8,9)</sup> 이는 1990년대 국가방역에서 농장 자율방역으로의 전환, 소비자들의 갈색란 선호에 따른 이른바 동 질병에 저항성이 강한 백색계의 퇴조<sup>8,10,11)</sup> 육용종계의 내병성에 의한 무증상 감염계로부터 난계대된 병아리, 항생제의 오·남용에 의한 내성증가, 균 자체의 특성상 완벽한 치료의 불가능성 등과 무관하지 않다고 보여진다. 또한 육계의 특성상 장기간 농장에서 사육되는 산란계와는 달리 농장에서 사양일수가 약 35일 정도로 짧아 초기의 피해에 대해 약물사용으로 일시적인 증상의 완화조치, 그리고 계열화 사육 체제에 따른 피해액의 일정 부분을 계열화 주체로부터 보상체제로 양계농가에서의 심각성에 대한 인식이 낮은 원인 등 다양한 요인에 의해 발생범위가 확대된다고 사료된다.

이러한 난계대성 살모넬라균증의 주요 임상증상을 문헌적으로 고찰하면, 난계대에 의한 감염의 경우 부화율이 떨어지게 된다. 부화된 병아리는 허약 또는 부화 후 폐사율의 증가, 이환율과 폐사율은 일령·품종·약제·감염정도 등에 따라 다양하게 나타날 수 있으며, 기타 설사증 외에도 호흡기증상·파행·신경증상도 나타날 수 있다. 또한 부검할 경우 육안적인 내부장기의 소견으로써는 간·비장·신장의 종대 및 충혈, 백색

괴사반점 형성, 병아리의 난황흡수 부전증, 만성의 경우 청동색(bronzed-liver)~녹갈색을 띄게 된다. 일반적으로 흰색의 괴사반점이 산재된 간장의 병변<sup>1,12)</sup>이 가장 흔하지만 두 질병간에 유사한 부검소견으로써 육안적인 부검 소견만으로는 감별진단을 위한 특징적인 증상이 되지 못한다.<sup>6,13)</sup> 다만 임상적 감별요소로서 추백리가 주로 어린 일령의 약추에서 백색설사, 성장장애 등 임상적으로 뚜렷한 증상과 더불어 질병을 야기하는 특징이 있다면, 가금티푸스는 주로 산란용 성계에서 청동색의 간 등 뚜렷한 병변을 나타내는 것이 문헌적인 차이점으로 볼 수 있다<sup>1-3,8)</sup>. 그러나 최근 국내에서 동 질병의 발생 동향을 살펴보면 육계에서, 특히 어린 일령의 병아리에서 가금티푸스의 발생이 많은데, 이는 대부분 종계를 통한 난계대 감염에 기인한 것으로 추정되며 임상증례에 있어서도 추백리와 아주 유사한 형태로 나타나고 있어 발생일령과 임상증상, 병리소견으로는 양 질병의 감별이 어려우며, 반드시 실험실 균 분리 후 생화학적검사, 혈청학적 검사를 통한 정밀검사를 요한다고 사료된다.<sup>14,15)</sup> 그러나 *S pullorum*과 *S gallinarum*은 생화학적, 혈청학적 균 특성상 매우 유사한 점이 많다. 이들 균은 *S enteritidis*와 함께 혈청학적으로 1, 9, 12의 동일한 O 항원구조를 가진 Group D1 으로 동일 혈청형 그룹에 속하며, 운동성이 없는 2-4 $\mu$ m의 크기의 Gram negative 간균으로 형태와 성상에 있어서 매우 유사하다. 추백리와 가금티푸스의 혈청학적 진단법에 있어서도 tube agglutination, rapid serum test, 전혈평판응집반응, agar-gel precipitation, egg-yolk agglutination 등에서 조차 동일한 반응을 나타내고 있어 특이적인 두 균종간의 감별 능력이 불확실하며<sup>1,14,16)</sup>, 우 등<sup>10)</sup>은 *S pullorum*과 *S gallinarum*의 항원형의 감별을 위한 항원형 분포조사 결과 *S gallinarum*은 *S pullorum*의 standard-type의 항원형과 동일한 항원

성을 나타내고 있고 현재 국내에서 사용하는 진단용 평판응집반응으로는 감별이 되지 않는다고 보고하였으며, 혈청검사 양성반응일 경우 간장, 비장, 난황 등에서 원인체를 분리하여 생화학적 검사결과로만 확진이 가능하다<sup>17,18)</sup>. 따라서 균 분리시 운동성, group D 항혈청에 대한 응집반응 등 일반적 생화학적 시험 외에 주요 감별 당배지인 dulcitol, maltose, ornithin, d-tartrate 분해능 및 glucose gas유무가 주요 감별 포인트하여 lactose, maltose, sucrose, mannitol, lysine decarboxylase, trehalose 등의 당 분해능과 gas 산생 여부시험을 병행하고 있다<sup>6,19,21)</sup>.

그러나 생화학적 검사결과 판정과정에서 시험자에 따라 특이적인 반응을 나타내지 않는 의양성 반응의 해석방법과, 일반 배양법에 의한 두 균종의 감별의 신속성, 경제적인 요인을 고려하여 최근 일반화된 유전학적 진단기법인 polymerase chain reaction (PCR) method에 의한 진단법 개발에 대한 접근 필요성을 가지게 된다. 그러나 유전자 분석을 위한 방법에 있어서 random amplified polymorphism of DNA (RAPD)법에 의한 분석에서도 균종간 다소의 차이는 있으나 전반적으로는 특이성 있게 모든 균종을 대상으로 뚜렷한 구분을 찾는 데는 한계를 보임으로서<sup>11,22,23)</sup>, 양 균종 간에 비공통적인 specific site를 규명하여 PCR용 primer를 제작하여 동시분석을 통한 진단법을 개발코자 representational difference analysis (RDA) method를 이용한 subtraction PCR법으로 두 균종간 비공통적인 특이부위의 염기서열 부위를 찾아 유전자 진단에 의한 검사효율과 정확성을 높이고자 목적을 두었다.

Genome science의 급격한 발전, 특히 유전자 지도나 cDNA sequencing 분야의 비약적인 진보로 사람의 다양한 질환에 있어 그 원인이 되는 유전적 이상을 발견할 수 있었으며 금후 수년은 positional candidate

cloning 방법에 의해 암 유전자 해석이 진행되리라고 여겨진다. 그 중에서도 RDA법은 유전자좌의 positioning에 유용하고 범용성이 높은 기술로써, RNA 수준에서의 변화 해석에도 응용함으로써 differential display 법 (DDA)과 동일하게 이용할 수 있는 기법이다<sup>16,24)</sup>. RDA method는 복잡한 genome 간의 변이를 민감하고 특이적으로 검출하는 방법으로 whole genomic PCR로 증폭한 genome DNA의 일부를 subtraction법으로 비교함으로써 특이 DNA를 검출, 증폭하는 방법으로서 주로 암세포의 유전자 변이검출에 주로 이용되었고 기타 새로운 병원체의 검출 및 미지의 병원체 검출, 다형성 marker의 제작 등에 일반적으로 사용하고 있는 방법이다. RDA의 일반적인 방법론적으로써 유전형질 또는 표현형질이 유사한 두 검체 중 한 검체 (tester DNA)의 특이한 유전자좌를 찾기 위해 대량의 다른 검체 (driver DNA)와 혼합하여 denaturation 과 annealing을 반복함으로써 tester DNA에만 특이하게 존재하는 DNA 단편을 지수증폭하여 분리한 다음 그 단편을 농축 및 고정하는 PCR의 특성을 충분히 살리는 방법으로 whole genomic PCR로 증폭한 genome DNA의 일부 (representation)를 subtraction법으로 비교하여 변이 DNA를 검출 및 증폭하는 기술이다. RDA법의 응용방법상으로 감염 세포 유래의 DNA를 tester로 하고 비감염 세포의 DNA를 driver로 하여 비교하면 감염 병원체를 검출할 수 있으며, 단일인자 유전형질의 책임유전자좌의 근방에 위치하는 다형성 marker를 얻는데 응용할 수 있는데 mouse 등 실험동물의 유전자 해석에 사용될 뿐만 아니라 사전에 DNA marker를 필요로 하지 않으므로 다른 동물의 유전자 해석에도 유효하다. 또한 암화 과정에서는 유전자 결실, 증폭 등의 변이가 축적되는데 whole genome를 대상으로 scanning 하여 종양관련 유전자를 찾아내는데 본 RDA법이

유용하다. 즉 Tester DNA와 Driver DNA를 어떻게 설정하는냐에 따라 정상세포 DNA를 driver로 이용하면 종양에서 증폭한 DNA를 검출하거나, 암세포 DNA를 driver로 이용하면 암세포 DNA에 특이한 DNA 변이, 즉 염색체 결실을 검출할 수 있는 것이다<sup>24)</sup>.

본 실험에서는 기존의 고등세포 내 DNA를 규명하던 RDA법을 박테리아에 적용하여 임상적, 생화학적 특성이 유사한 균의 특성을 이용하여 유전학적으로 두 균종간 염기서열의 차이를 규명하는데 시도하였다. 구체적으로는 *S. gallinarum* DNA를 Tester DNA로 사용하고, *S. pullorum* DNA를 Driver DNA로 사용하였고, subtraction의 효율을 높이기 위해 representation과 kinetic enrichment(농축)을 조합한 것으로 representation과정에서는 두 개의 genome DNA를 제한효소로 처리한 다음 tester DNA에 adaptor분자를 부가하여 driver DNA와 경쟁시킴으로서 adaptor를 갖고 있는 Tester DNA의 특성의 부위만을 선택적으로 지수증폭을 유도하여 specific DNA fragment를 찾아 회수한 다음 PCR product를 cloning하여 염기서열을 규명하였고, 여타의 유사 살모넬라균과 닭에서 분리될 수 있는 장내 미생물과 교차반응 여부를 확인하기 위하여 Genbank에 등록된 염기서열과 비교하였으며, 양 균종의 특이 부위를 진단용 primer를 제작하여 임상진단에 활용여부를 검토하는데 중점을 두었다.

## 재료 및 방법

### 시험개요

전체적인 실험의 방향은 *S. gallinarum*과 *S. pullorum*을 각각 tester DNA와 driver

DNA로 정하고 tester DNA에만 특이하게 있는 염기서열을 찾기 위한 방법으로 genomic DNA를 제한효소(Sau3AI)로 처리하여 PCR 증폭에 효율적인 size인 2kb이하의 fragment를 만든 다음, tester DNA로 사용할 fragment의 5'말단에 임의의 adaptor(Clos R)를 ligation하여 driver DNA fragment와 혼합한 후 denaturation해서 annealing 하여 재조합하였다. 이때 DNA의 단일가닥이 이중가닥으로 되는 과정에서 tester DNA와 driver DNA의 공통된 염기서열을 가지는 단일가닥들이 경쟁적으로 재조합되도록 유도되도록 adaptor가 없는 driver DNA끼리 그리고 양 균주에서 공통으로 가지고 있는 fragment끼리의 조합을 유도하기 위하여 Driver DNA의 함량을 늘려주었다. 이와 같은 재조합과정에서 만들어진 double strand의 DNA중에 Tester DNA에만 있는 fragment의 조합은 double strand에 모두 가지고 있는 adaptor에 의해서 PCR amplification과정에서 지수증폭되며(2<sup>n</sup>), tester DNA와 Driver DNA가 함께 있는 있는 fragment간에 조합된 단편은 adaptor가 single strand에만 ligation된 adaptor로 인하여 tester DNA의 단일가닥만 증폭됨으로 PCR product는 제한적(2n)으로 증폭된다. 또한 Driver DNA만 있는 단편은 단편의 말단에 adaptor ligation 부위가 없으므로 증폭이 되지 않음을 이용하여 각각의 특이site를 subtraction하여 specific DNA fragment를 분리해내고 정제를 위하여 재 PCR과정을 반복하였다. 이렇게 분리된 증폭된 PCR Product는 agarose gel 상에서 회수하여 plamid 상에 삽입하여 vector를 이용하여 Clonig하고 다시 회수하여 염기서열을 분석하는 이른바 RDA method를 기초로 실험을 수행하였고 전반적인 실험의 개요는 Fig 1과 같다<sup>24~33)</sup>.

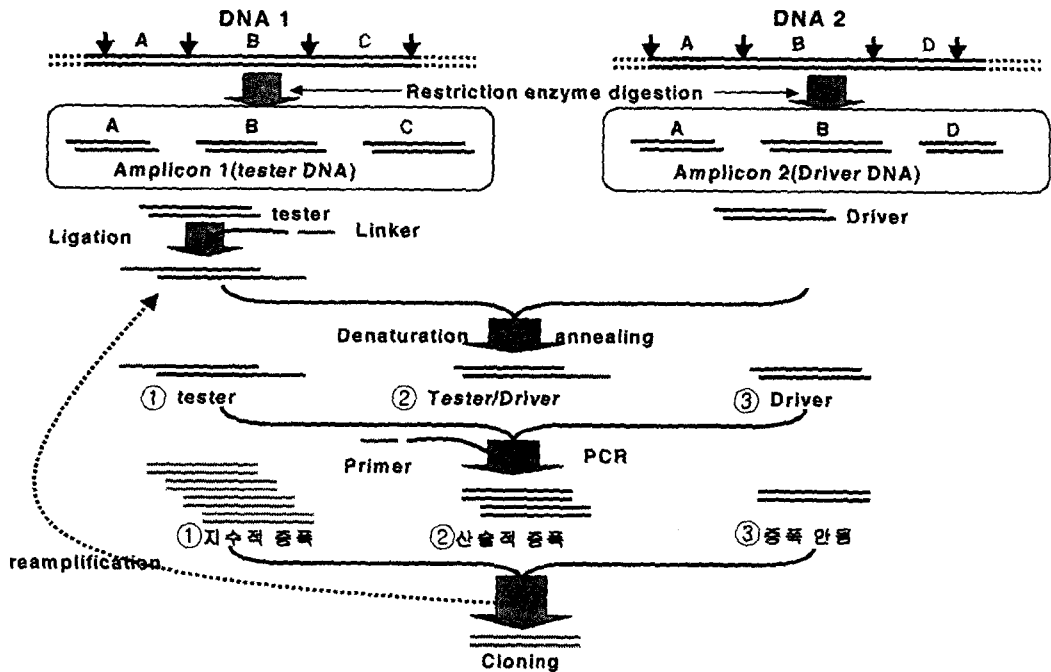


Fig 1. Step of subtraction PCR.

## 공시재료

시험에 사용된 균주는 수의과학검역원에서 분양 받은 추백리 및 가금티푸스 표준균주를 사용하였으며, 분리 방법은 1차 McConkey agar, TSI, Urea agar를 1차 선택배지로 사용하여 *Salmonell spp*를 확인하였으며, 혈청학적으로는 Group D1 항혈청을 사용하여 응집되는 균주에 한하여 운동성 검사와 Easy Kit 24E (Komed Co. Korea)를 이용한 24종의 생화학 검사를 수행하여 최종 동정한 *S pullorum*과 *S gallinarum*을 사용하였고 Tester DNA로 사용할 균주는 전기영동상에서 Plasmid가 없거나 (*S gallinarum*), plasmid를 PFGE를 이용하여 제거한 DNA (*S pullorum*) 다음 시험재료로 사용하였다.<sup>26~28)</sup>

## DNA Isolation

각 균주의 DNA 추출은 LB broth에서 37°C/24시간 동안 진탕 배양하여 PBS (pH 7.2)로 3회 세척한 것을 Fig 2와 같이 Kaufman 등<sup>27)</sup>의 시험법을 기초로 10% SDS와 protenase K를 처리하고 phenol 추출하여 Genomic DNA를 분리한 다음 RNase처리하여 DNA 함량 측정 및 ethanol precipitation하여 사용하였다.

## Tester DNA 준비

제한효소 처리 : 준비된 DNA는 제한효소 Sau3A1 (TAKARA shuzo, Japan)으로 Volum 당 1.5U를 사용하여 37°C/2hr동안 처리하여 random fragment를 처리하였고<sup>33)</sup>, 전기영동하여 2kb이하의 크기로 절단여부를 확인한

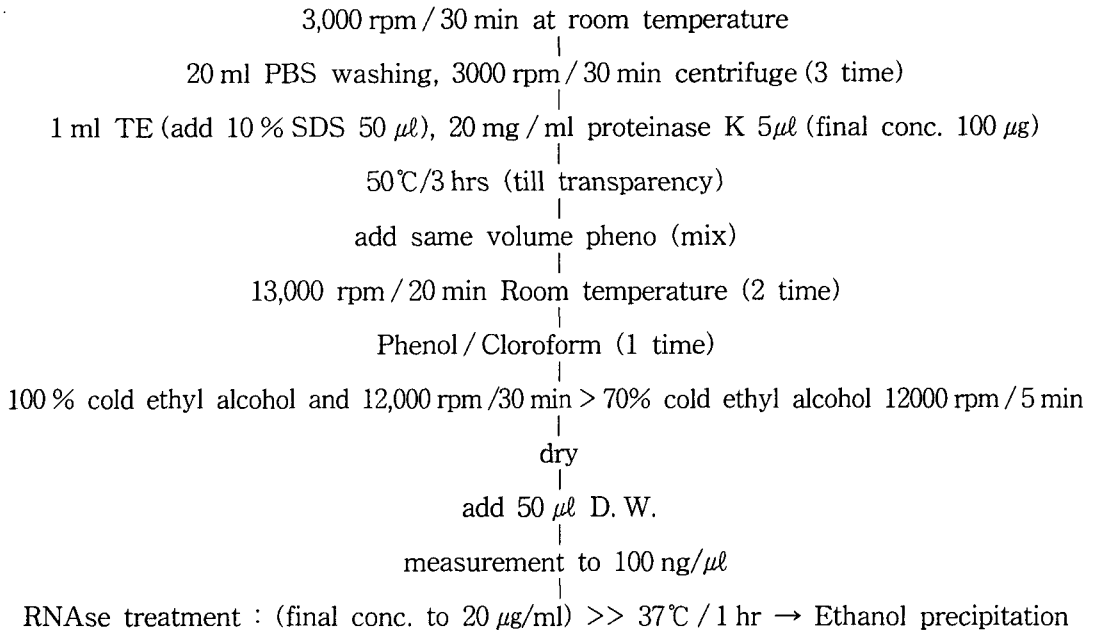


Fig 2. Diagram of DNA isolation from *S pullorum* and *S gallinarum*

다음, Ethanol precipitation 하여 최종 DNA 함량은 30ng/ $\mu$ l가 되도록 멸균 증류수로 희석하였다.

95 $^{\circ}$ C / 5 min 1 cycle  
 95 $^{\circ}$ C / 1 min, 54 $^{\circ}$ C/1 min, 72 $^{\circ}$ C/1 min 35 cycle  
 72 $^{\circ}$ C / 10 min 1 cycle

Fig 3. PCR condition A

Ligation : 제한효소처리된 DNA 3 $\mu$ l(90ng)을 취하여 표지 Adaptor로서 임의의 Primer (Clos R : 5'-TTAGTCTAA ATCCT GGAA CATCTTG-3', 100 pmol) 4 $\mu$ l, II solution 5 $\mu$ l, I solution 10 $\mu$ l (Takara Shuzo, Japan)로 조합하여 16 $^{\circ}$ C/2 시간 동안 ligation 하였고<sup>33)</sup>, ligation의 확인은 아래의 Table 1의 조성과 Fig 3의 PCR condition에 따라 amplification 한 다음 전기영동하여 ligation 여부를 확인하였다.

Driver DNA 준비

Driver DNA는 Tester DNA와 같은 방법으로 DNA 분리 및 RNase 처리, 제한효소 처리 방법과 동일하게 처리하되 adaptor를 연결하지 않고 30ng/ $\mu$ l의 농도로 조정하여 사용하였다.

Table 1. Combination of PCR premix ratio

DNA	DW	primer	dNTP	Taq	buffer	Total
60ng/2 $\mu$ l	32 $\mu$ l	2 $\mu$ l	8 $\mu$ l	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l	50 $\mu$ l

### Amplification by Subtraction PCR

Tester DNA와 Driver DNA간에 공통된 염기서열을 갖지 않는 특이부위를 찾기 위하여 tester DNA와 driver DNA를 임의의 조합비율로 섞은 다음 끓는 물에서 5분간 denaturation하여 서서히 cooling함으로써 tester와 driver DNA fragment에 무작위의 경합적인 double strand를 유도한 것을 template로 사용하여 Taq polymerase를 첨가하여 PCR하였고, PCR program은 Fig 4.의 방법에 따라 실시하여 증폭 확인하되 PCR의 효율성 확인을 위하여 tester DNA와 Driver DNA의 혼합비율과 annealing 온도를 52~58°C사이의 4단계로 변화를 주어서 가장 효율적인 증폭조건을 확인하였다.

72°C / 10 min	1 cycle
95°C / 5 min	1 cycle
95°C / 1 min, 52~58°C / 1 min, 72°C / 1 min	35 cycle
72°C / 10 min	1 cycle

Fig 4. PCR condition B

### Cloning 및 Sequence

Cloning : 전기영동상의 agarose gel에서 회수된 *S pullorum*과 *S gallinarum*의 specific DNA fragment를 회수하여 Core-One™ PCR purification Kit (Core Bio System Co., Ltd Seoul Korea)를 이용하여 정제하였고 (Fig 5), InsT/A clone™ PCR product cloning Kit (Fermentas. Co #K1214, Hanover USA)를 사용하여 pGEM vector에 삽입한 다음 host cell에 transformation하여 cloning하였다 (Fig 6). Cloning의 확인은 3μl를 *EcoRI* 제한효소 처리하여 전기영동하여 각 fragment의 회수여부를 확인하였다.

DNA 1 : 5 volume DNA binding buffer : mix	
12000 rpm / 1 min	
750 μl Colum wash buffer	
12000 rpm / 1 min	
elution by D. W. 50 μl (at 70°C)	

Fig 5. Purification of specific DNA fragment

Purification PCR fragment	4 μl
Plasmid vector (pGEM)	3 μl
10 × ligation buffer	3 μl
PEG 4000 solution	3 μl
DW up to	29 μl
T4 DNA ligase 5U	1 μl

22°C / 1 hr (over night)

host cell transformation and culture

Fig 6. DNA and vector ligation for cloning of DNA

Sequencing : Sequencing running 기기는 ABI 3100 Sequencer (Applied Biosystem Co. USA)를 이용하였고 BigDye는 ABI prism BigDye Terminator kit, Sequencing primer는 T7 (5'-3' : TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) 또는 sp6 (ATT TAG GTG ACA CTA TAG)를 사용하였다. 또한 분석조건은 96°C 20초, 96°C 10초, 50°C 5초를 25 cycle, 60°C 4분 1 cycle한 다음 ethanol down하여 정제 후 sequencer에 running하였다.

## 결 과

### 시험균주의 생화학적 성상검사 결과

Group D1 항혈청검사 및 운동성 검사 외 24종 생화학검사 키트를 이용한 시험균주의 생화학적 성상은 아래와 같으며, textbook 상의 감별 항목은 양 균종 모두 만족한 결과를 얻었으며 세부 검사결과는 Table 2와 같다.



Table 2. Biochemical reaction of *S pullorum* and *S gallinarum*

Properties	<i>S pullorum</i>		<i>S gallinarum</i>	
	Typical reactoin <sup>6)</sup>	Actual reaction	Typical reaction <sup>6)</sup>	Actual reaction
group D1 antiserum coagulase	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Mannitol	+(gas)	+	+(no gas)	+
Dulcitol	-	-	+(no gas)	+
Adonitol		-		-
Sorbitol		+		-
Raffinose		-		-
Rhamnose		+		-
Inositol		-		-
Maltose	-	-	+(no gas)	+
Glucoside		-		-
Escullin		-		-
ONPG		-		-
Indol	-	-	-	-
PDA		-		-
Nitrate		+		+
Urease	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S		+		+
Lysine		+		+
Ornithine		-	-	-

DNA 분리 결과

LB broth에서 분리한 *S galinarum*과 *S pullorum*균을 Fig 1에 따라 분리한 다음의 DNA는 Fig 7과 같았으며, *S pullorum*의 plasmid를 제거한 genomic DNA는 Fig 8과 같았다.

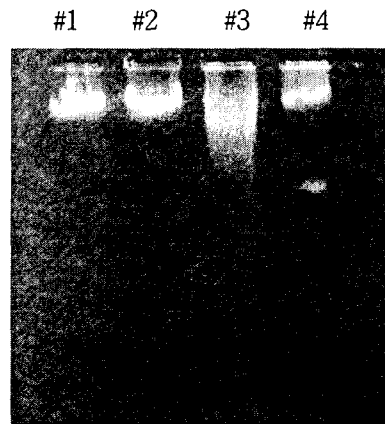


Fig 7. RNase control genomic DNA. lane 1, 2: λDNA, lane 3: *S gallinarum*, lane 4: *S pullorum*.

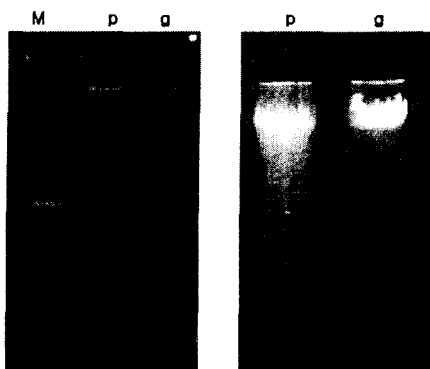


Fig 8. Pattern of genomic DNA isolation from *S gallinarum* and *S pullorum*. lane 1 : 500 bp ladder, lane 4 : *S pullorum*, lane 2, 3  $\lambda$ DNA, lane 5 : *S gallinarum*

#### 제한효소처리 결과

준비된 DNA는 제한효소 Sau3A1 (Takara Shuzo, Japan)으로 volume 당 1.5U를 사용하여 37°C로 2 시간동안 처리하여 random fragment를 처리하였고, 전기영동하여 2kb 이하의 크기로 절단여부를 확인한 genomic DNA는 Fig 9와 같다.

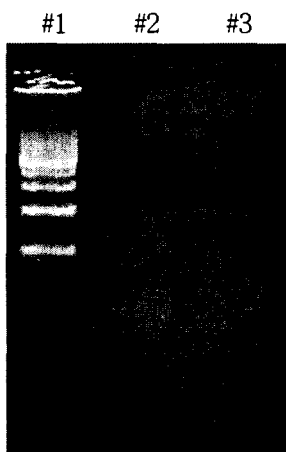


Fig 9. Pattern of restriction enzyme digested *S gallinarum* and *S pullorum* genomic DNA.

lane 1 : 1 kb ladder, lane 2 : *S pullorum*, lane 3 : *S gallinarum*.

#### Ligation 결과

Test DNA로 사용될 DNA (*S gallinarum*)의 fragment와 Clos R Primer의 ligation 여부를 확인하기 위하여 PCR을 한 결과 무작위의 DNA 단편이 증폭산물로 확인되었으며 이 시료를 Tester DNA로 사용하였다 (Fig 10).

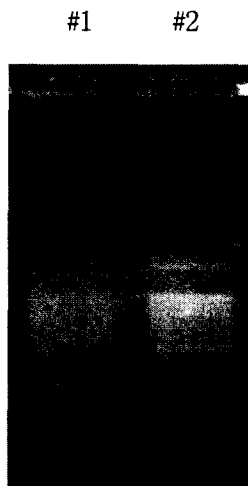


Fig 10. Confirmation of ligation of tester DNA (*S gallinarum*) lane 1 : ligated DNA, lane 2 : 100 bp ladder.

#### *S gallinarum* specific fragment DNA

PCR 효율성을 확인하기 위하여 tester DNA와 driver DNA의 조합비율 Table 3과 같이 조합하여 PCR한 결과 tester DNA (*S gallinarum*) 2 $\mu$ l (60ng)과 driver DNA (*S pullorum*)을 5 $\mu$ l (150ng/ $\mu$ l)를 혼합하여 95°C에서 5분간 denaturation 한 다음, 37°C 까지 서서히 cooling하였고 Table 3과 같은 PCR 조건하에서 amplification한 결과 tester DNA 60ng : driver DNA 150ng에서 증폭효율이 가장 높은 결과를 얻었다 (Fig 11). 또한 54°C, 56°C, 58°C, 60°C 사이의 annealing temperature의 변화를 주어서 PCR한 결과 annealing 온도 58°C에서 증폭효율이 가장 높았다 (Fig 12). 따라서 tester DNA 2 volume (60ng/ $\mu$ l) : driver DNA 5

volume (150ng/ $\mu$ l)을 58°C annealing temperature로 하여 Fig 4의 PCR 조건에서 2차 PCR 및 3차 PCR한 결과는 Fig 13 및 Fig 14와 같

다. 그리고 각각의 band를 agarose gel 상에서 약 520, 700, 1200 bp band를 회수하여 amplification 한 결과는 Fig 15와 같다.

Table 3. Combination of tester DNA and driver DNA

Tester PCR product	PCR DNA	Driver DNA	DW	Taq	buffer	dNTP	primer	Total	Remark
2 $\mu$ l		2	31	1	5	8	1	50	#1
2 $\mu$ l		3	30	1	5	8	1	50	#2
2 $\mu$ l		4	29	1	5	8	1	50	#3
2 $\mu$ l		5	28	1	5	8	1	50	#4

DNA 1 volume = 30 ng, annealing temperature : 54°C

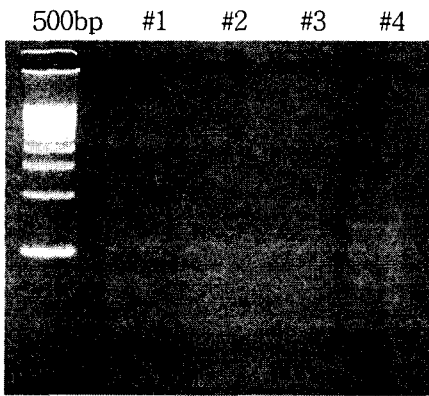


Fig 11. 50°C annealing temp. PCR results lane 1; 500 bp ladder, lane 2 (tester : driver); 2 : 2, lane 3; 2 : 3, lane 4; 2 : 4, lane 5; 2 : 5



Fig 12. 54°C annealing temp PCR result lane 1; 100 bp ladder, lane 2 (tester : driver); 2 : 2, lane 3, 2 : 3, lane 4, 2 : 4, lane 5; 2 : 5

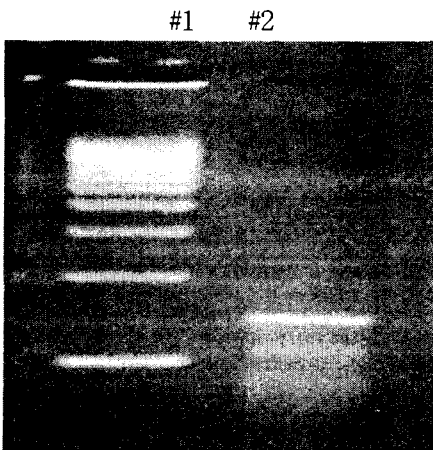


Fig 13. Reamplification of 1'st PCR product.  
lane 1; 500 bp ladder, lane 2; 2'nd PCR product (annealing temp: 58°C)

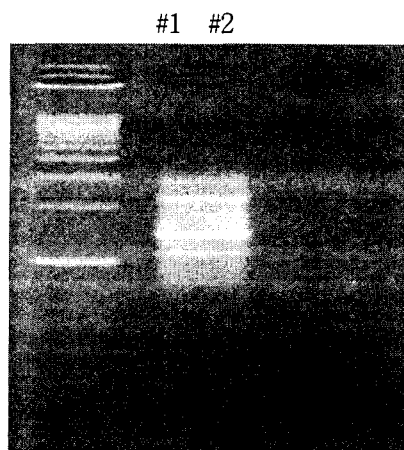


Fig 14. Reamplification of 2'nd PCR product.  
lane 1; 500 bp ladder, lane 2; tester DNA

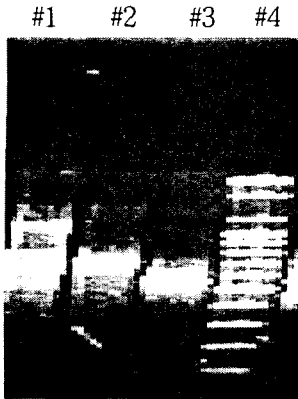


Fig 15. Collection of *S gallinarum* specific DNA fragment at 2% garose gel.  
lane 1; tester DNA *S gallinarum* band 1,  
lane 2; tester DNA *S gallinarum* band 2,  
lane 3; tester DNA *S gallinarum* band 3,  
lane 4; 100 bp ladder.

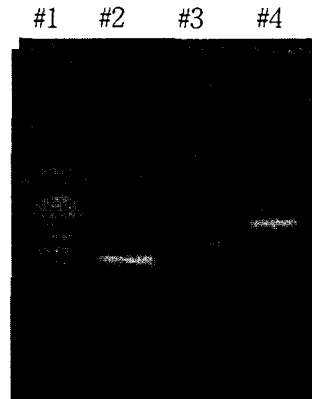


Fig 17. Collection of *S pullorum* specific DNA fragment at 2% agarose gel.  
lane 1; 100 bp ladder, lane 2; *S pulollum* specific band 1, lane 3; *S pulollum* specific band 2, lane 3; *S pulollum* specific band 3.

*S pullorum* specific fragment DNA

Tester DNA를 *S pullorum*으로, Driver DNA를 *S gallinarum*으로 사용했을 때 tester DNA(*S pullorum*)에만 있는 특이 사이트는 450, 550, 650, 710 bp정도에서 확인이 되었으며 (Fig 16), 이중 약 450, 550, 710 bp의 site를 재 PCR한 결과는 Fig 17과 같다.

*S pullorum*과 *S gallinarum*의 specific DNA fragment 비교

*S pullorum*과 *S gallinarum*의 양 균종에서 회수한 DNA fragment를 동시에 비교하기 위하여 전기영동하여 결과 *S pullorum*의 2번, 3번 fragment는 *S gallinarum*과 거의 유사한 size로 나타났으며 (Fig 18), 전기영동상의 gel에서 각각의 fragment는 회수하여 pGEM vector에 삽입하여 host cell에 transformation 하여 cloning하였다.

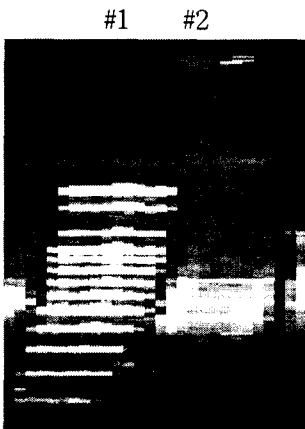


Fig 16. *Salmonella pullorum* specific DNA fragment at 2% garose gel.  
lane 1; 100 bp, lane 2; tester *S pullorum* DNA

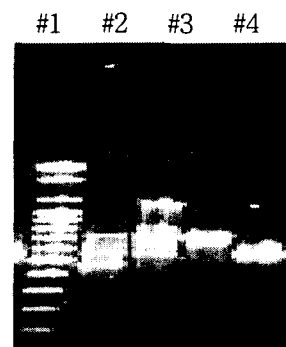


Fig 18. Specific DNA fragment comparison of *S pullorum* and *S gallinarum*.  
lane 1; 100 bp ladder,  
lane 2; *S pullorum* specific band 1, 2, 3,  
lane 3; *S gallinarum* specific band 1,  
lane 4; *S gallinarum* specific band 1,  
lane 5; *S gallinarum* specific band 3.

Cloning의 확인 : pGEM vector에 삽입된 단편의 clonig 후 확인을 위하여 EcoR1 제한 효소 처리 후 전기영동한 결과는 Fig.19와 같으며 각각의 DNA fragment size를 확인한 결과 당초에 분리한 specific DNA fragment의 size(위치)와 동일하게 회수되었음을 알 수 있었다.

Sequence : ABI 3100장비를 이용 (Sequencing primer : T7)한 sequencing 결과를 GeneBank에 등록된 염기서열에 serch한 결과, *S enterica*, *S typhimurium*, *S dublin*, *E coli*, *Shigella flexner*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae* 등의 균주와 95~99% 까지의 상동성을 나타내었으며, *S pullorum*과 *S gallinarum* 간에는 *S pullorum* 2번 DNA fragment와 *S gallinarum* 3 DNA fragment에서는 일부 상동성을 나타내었으나 기타의 fragment 간에 염기서열은 일치하지 않았다. 각각 specific DNA fragment sequence는 Table 4 및 Table 5와 같다.

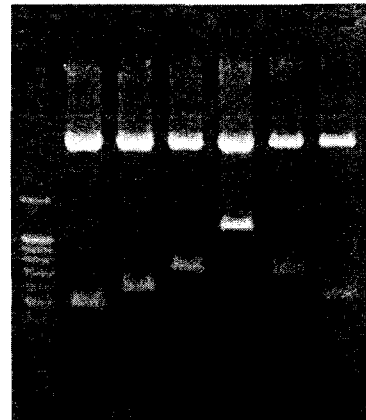


Fig 19. Results of restriction enzyme (EcoR1) treatment at 1.5% agarose. lane 1; 100 bp ladder, lane 2; *S pullorum* specific fragment 3, lane 3; *S pullorum* specific fragment 2, lane 4; *S pullorum* specific fragment 1, lane 5; *S gallinarum* specific fragment 1, lane 6; *S gallinarum* specific fragment 2, lane 7; *S gallinarum* specific fragment 3.

Table 4-1. *S gallinarum* specific fragment 1 and sequecece

```

1  GATCGGCGAA GCCAGATCCA AACGCGCGC TGTTAAGTCT TCGGTAGAAC CGTTACCACG
61 CTCCATACGC AGACGAGAGT TTGCGTGCAG CGGGGTTAAG TCCTCAAAGA GGATTTTGT
121 ACGGGCGTTT TCCGGTTTGT CGTAGTTAAC TTCGTTAACT TTCAACAGCG CAAAATAGCG
181 TTCACCTTCT TTCGGCGGGC GAATCTTACC AGAAATGGTA TCACCAGTGC GGAGGTTGAA
241 ACGGCGGATT TGGCTGGGGG AAACGTAGAT ATCATCAGGA CCGGCGAGGT AGGAGCTGTC
301 TGCAGAACGG AGGAGACCAA ATCCATCCTG CAATATCTCC AGCACACCGT CGCCAAAGAT
361 ATCCTCGCCA CTCTTTGCGT GCTGCTTCAG GATGGCAAAA ATAATGTCCT GCTTGCG
    
```

※ Sequence homology search result at GeneBank

1. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi Ty2
2. *S typhimurium* LT2, section 187 of 220 of the complete genome
3. *S typhimurium* fragment STMD1
4. *S enterica* serovar Typhi (*Salmonella typhi*) strain CT18, complete chromosome
5. *S typhimurium* trxA gene and rho factor gene
6. *S typhimurium* genes for thioredoxin and rho protein
7. *Escherichia coli* rho gene coding for transcription termination factor
8. *E coli* CFT073 section 15 of 18 of the complete genome
9. *Shigella flexneri* 2a str. 2457T section 14 of 16 of the complete genome
10. *E coli* O157:H7 EDL933 genome
11. *E coli* O157:H7 DNA, complete genome
12. *E coli* (clone pRH4) trxA gene encoding thioredoxin, complete cds and rho gene
13. *E coli* K12 MG1655 section 344 of 400 of the complete genome
14. *E coli* genomic sequence of the region from 84.5 to 86.5 minutes
15. *Shigella flexneri* 2a str. 301 section 356 of 412 of the complete genome
16. *Yersinia pestis* strain CO92 complete genome
17. *Y pestis* KIM section 36 of 415 of the complete genome

Table 4-2. Sequence of *S. gallinarum* specific fragment 2 and result of GeneBank database search

---

```

1 CGCCTGAGTT ACGGCTGGAT GGGACGCACA CCGGATTACA AAGCCGCCTT TGGTTGCGCC
61 CTGGGCGCTA ACCCAGCCTT CTACGGCCAG TTTGAGCAGA ACGCCCGCAA CTGGTACACC
121 CGTATTCAGG AGACCGGCTT GTACTTTAAC CATGCAATCG TCAACCCGCC CATTGACCGC
181 CACAAACCTG CCGACGAAGT AAAAGACGTC TATATCAAGC TGGAGAAAGA GACGGACGCT
241 GGGATTATTG TCAGCGGGGC GAAAGTCGTC GCCACTAACT CCGCCCTGAC TCACTACAAC
301 ATGATTGGTT TCGGCTCAGC CCAGGTGATG GCGGAAAACC CGGATTTGCG TCTGATGTTT
361 GTCGCGCCAA TGGATGCCGA AGGCGTAAAA CTTATTTGCG GCGCCTCGTA TGAATGGTC
421 GCGGGCGCGA CGGGCTCGCC GTTTGATTAT CCACTCTCCA GCCGCTTGA TGAAAACGAT
481 GCCATTCTGG TGATGGA

```

※ Sequence homology search result at GeneBank

1. *Salmonella typhimurium* LT2, section 51 of 220 of the complete genome
  2. *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi Ty2
  3. *S. enterica* serovar Typhi (*Salmonella typhi*) strain CT18,
  4. *S. dublin* 4-hydroxyphenylacetate catabolic locus, complete sequence
  5. *Klebsiella pneumoniae* 4-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase (*hpaA*) and coupling protein genes, complete CDs
  6. *Escherichia coli* (ATCC 11105) *hpaA*, *hpaB*, *hpaC* genes for 4-hydroxyphenylacetic hydroxylase
  7. *E. coli* *hpa* [G, R, E, D, F, H, I, X, A, B, C] genes
  8. *Shigella flexneri* 2a str. 2457T section 16 of 16 of the complete genome
  9. *S. flexneri* 2a str. 301 section 406 of 412 of the complete
- 

Table 4-3. *S. gallinarum* specific fragment 2 and sequence

---

```

1 CTCAATGAGT CAGGGATAAA GGACGAAAAT ATGTTACGCA TACTGGGCGC GAAAATGTGC
61 TGGCTAAGGT TGCACAAAG CAATCCCTTG CTGACGGTGA AAGTTTTGTA TGCCCTGGAA
121 GCGCAATTG TCGGCGTACA TGAAGCGGCG CTCCCGGCGA GTCGTCGCCA GGAGCTTGCC
181 GACTGGGCTC ATTCGCTTAC GGCTGGGTAA TTAATGTAGA AGTCGGCGGT GAAATTTGCC
241 GTTGCAAGCG TCCAATCTCG GGCAGTAAGG CAATGAGCAA ACCAATTTGT TGAACAACCA
301 GAGGTTCTTT GCTGTCCGGA CGTGTTTCCA GTGACTGAAC TCGCTGCTTT AAACCCTCCA
361 GCGCTGGTG TACGCGCTGT TCGTCTTCAG GTTGATGATG AAGCGCATCA TCAACGTAGC
421 AGACCGCGTC ATCCAGAAGC CCCAACACGT CCGGATTGCT GAGCTTTTCG CGGTGCGCGC
481 CGAGGGCGGA GATATAGCTG GTAAAGTGTG ATTGANGCAA GCANCTGAAC GCGCTCCNG
541 GTTTCACCGT GACTCGGTTT CTCGAATATT AAAACCGATG CANTNTGCTC CCGCTGGGCC
601 GCCGCTGNAN NNANGCAGNG TNCCGCCGGG ATTGCAAGTC GATAAAAACA AGATCGCCNG
661 GGCCAGGAAC CCNGGGAATG ATAGCANNGA GGAGTTGATT CTCCACAAAA GGGAAANTTTT
681 C

```

※ Sequence homology search result at GeneBank

1. *Salmonella typhimurium* LT2, section 50 of 220 of the complete genome
  2. *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi Ty2, section 7 of 16 of the complete genome
  3. *S. enterica* serovar Typhi (*Salmonella typhi*) strain CT18, complete chromosome; segment 5/20
-

Table 5-1. *S pullorum* specific fragment 1 sequece

---

1 ACAGAAAGCG AGAAAAACCA GCAAGCTGGC AGCATTTACT TGTTGAATC CGAAGAAACG  
61 GCGCGGGCTT ATATTAATAA ACACACTGCG CGTCTGAAAA ATCTTGCGGT TGATGAGGTG  
121 ACGTTTAAAT TATTTGGCGT GAACGACGCG CTGACGAAAA TAAATCACGG CAACCTCTGC  
181 CGCTAAATCA CATAACGCAG CTTTCTGTTC CGGTGCTGCC GACCGCAACG GTAACCTTTA  
241 TATCGGGACG AGTACCGAAG AGGCCTTTAT GGACGAACAG CGGACAACGA ACGTTCTCTT  
301 TCAGCGTGTG CAGCGCCTCG GCGGTGCGGG CGATGTTACC CTTCTCCACA AGCATCATT  
361 AGATGGTGAG CTTGCGGAAG GTAATGTCAT CGGTAATTGA CAGGTTTCATC GTCCGCCCCG  
421 TGCCTTAGAG CCTATCTCAG TAGGCGTAAT TGTTGAAAGC CAGTTTGGGG CCGGACAGCG  
481 CGCAGAAACC GGAGCGTACA CATAGTACGT GAGGATTTTC AGCACTGCCG GCNTAAATG  
541 GCGAATAAAT ANCTATGGGA NAGCTCTAAT CGTCTGNATC ATCGNTCAGC TGNTCTGGGC  
601 TCAGCANGCA TTCACGCTNC ACCCGATTGG GTGCGGANTG NANCCGCTTC NTTNGGGGGC  
661 NAGGGGGNCA TCTCCCGNNA TGNATTCTT TNAGAACTNC NGNNCAGACN CCCCATTNNA  
721 GGGNTTNGGN GTTGNNTTCC CCT

※ Sequence homology search result at GeneBank

1. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi Ty2, section 14 of 16 of the complete genome
  2. *S enterica* serovar Typhi (*Salmonella typhi*) strain CT18, complete chromosome; segment 17/20
  3. *S typhimurium* LT2, section 162 of 220 of the complete genome
  4. *S typhimurium* LT2, section 163 of 220 of the complete genome
  5. *Shigella flexneri* 2a str. 2457T section 15 of 16 of the complete genome
  6. *S flexneri* 2a str. 301 section 308 of 412 of the complete genome
  7. *Escherichia coli* K12 MG1655 section 301 of 400 of the complete genome
  8. *E coli* K-12 chromosomal region from 67.4 to 76.0 minutes
  9. *E coli* CFT073 section 13 of 18 of the complete genome
  10. *E coli* O157:H7 DNA, complete genome, section 15/20
  11. *E coli* O157:H7 EDL933 genome, contig 3 of 3, section 177 of 290
- 

Table 5-2. *S pullorum* specific fragment 2 sequece

---

1 TGCAATATCA CAGGGACGGG TAACCGCCTG CCTATCGCAT GCCAGACGCG CGCGCACGAC  
61 GCGATGCAGA CTGGNATCCG GGTTTCTAAT TGTCGAGCGA CCCGACGTCA GGCTGAAACC  
121 GGGAGGCGGC TTCAGGCTGCT TGCCTCAATC CACTTTTACC GCTATATCTC GCCCTCGGCC  
181 GCACCGCGAA AGCTCAGTAA TCGGACGTGT TGGGCTTCTG GATACGCGGT CTGCACGTTG  
241 ATGATGGCTT CATCATCAAC CTGAAGACGA ACAGCGCGTA CACCAGGCGC TGGAGGGTTT  
301 AAAGCAGCG AGTTCAGTCA CTGGAACAC GTCCGGACAG CAAAGAACCT CTGGTTGTTC  
361 AACAAATTGG TTTGCTCATT GCCTTACTGC CCGAGATTGG ACGCTTGCAA CGGCAAATTT  
421 CACCGCCGAC TTCTACATTA ATTACCCAGC CGTAAGCGAA TGAGCCCAGT CGGCANGCTC  
481 CTGGCGACGA CTCGCCGGA GCGCCGCTTC ATGTACGCCG ACATTGCGCC TCCAGGGCAT  
541 ACAAACCTTC ACGTCACANG GATGCTTGTC CACTTANCAN NATTTCCGCC AGAGGAAAT  
601 TCGCTTNCNG ANTTGACAAG TCNGATAATA TCTAGATCGC CGGGCACTGG AACNNGTGAG  
661 ACTGATAAGC AAATGGAGGA GTCGGANTCC ACAANCAAGA GGAGAATTNC TCACCTACAG  
721 GGNTTC

※ Sequence homology search result at GeneBank

1. *Salmonella typhimurium* LT2, section 50 of 220 of the complete genome
  2. *S enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi Ty2, section 7 of 16 of the complete genome
  3. *S enterica* serovar Typhi (*Salmonella typhi*) strain CT18,
-

Table 5-3. *S. pullorum* specific fragment 3 sequence

1 TCCATCACCA GAATGGCATC GTTTTCATCA AAGCGGCTGG AGAGTGGATA ATCAAACGGC  
 61 GAGCCCGTTCG CGCCCGCGAC CATTTCATAC GAGGCGCGCG AAATAAGTTT TACGCCTTCG  
 121 GCATCCATTG GCGCGACAAA CATCAGAGCG AAATCCGGGT TTTCGCCCAT CACCTGGGCT  
 181 GAGCCGAAAC CAATCATGTT GTAGTGAGTC AGGGCGGAGT TAGTGGCGAC GACTTTCGCC  
 241 CCGCTGACAA TAATCCCGGC GTCCGTCTCT TTCTCCAGCT TGATATAGAC GTCTTTCACT  
 301 TCGTCGGCAG GTTTGTGGCG GTCAATGGGC GGGTTGACGA TTGCATGGTT AAAGTACAGG  
 361 CCGGTCTCCT GAATACGGGT GTACCAGTTG CGGGCGTTCT GCTCAAAGT GCGGTAGAAG  
 421 GCTGGGTTAG CGCCAGGGC GCAACCAAAG GCGGCTTGT ANTCCGGTGT GCGTCCCATC  
 481 CAGCCGTANC TCAGGCGTGA CCACTCGGCG ATAGCAT

※ Sequence homology search result at GeneBank

1. *Salmonella typhimurium* LT2, section 51 of 220 of the complete genome
2. *S. enterica* serovar Typhi (*Salmonella typhi*) strain CT18, complete chromosome; segment 5/20
3. *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi Ty2, section 7 of 16 of the complete genome
4. *S. dublin* 4-hydroxyphenylacetate catabolic locus, complete sequence
5. *Klebsiella pneumoniae* 4-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase (*hpaA*) and coupling protein genes, complete cds
6. *Escherichia coli* (ATCC 11105) *hpaA*, *hpaB*, *hpaC* genes for 4-hydroxyphenylacetic hydroxylase
7. *E. coli* *hpa* [G, R, E, D, F, H, I, X, A, B, C] genes
8. *Shigella flexneri* 2a str. 2457T section 16 of 16 of the complete genome
9. *S. flexneri* 2a str. 301 section 406 of 412 of the complete genome

Primer Design 및 진단평가

공시균주간의 비교 시험결과 : *S. gallinarum*  
 1 DNA fragment를 기초로한 primer를 사용하여 anealing temperature 62℃에서 30 cycle을 PCR한 결과 Fig 20과 같이 276 bp에서 *S. gallinarum*에서 선명한 밴드를 확인할 수 있었으며, 또한 *S. gallinarum* 3 DNA fragment에 기초한 primer design하여 anealing temperature를 50~64℃의 변화를 주어 PCR한 결과 62℃~64℃에서 *S. pullorum*과 *S. gallinarum* 간 뚜렷이 감별 가능한 PCR 결과를 나타냈었다 (Fig 21).

*S. gallinarum* primer design

Left primer 5'-GAC GIT TAA ATT ATT TGG CG-3'  
 Right primer 5'-TAC CGA TGA CAT TAC CIT CC-3'  
 Product size 276

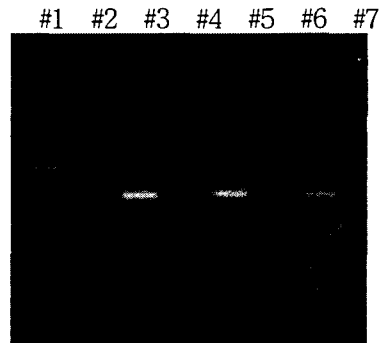


Fig 20. primer design by *S. gallinarum* specific DNA 1 fragment and PCR result.

lane 1; 100 bp primer, lane 2; 100ng *S. pullorum*, lane 3; 100ng *S. gallinarum*, lane 4; 10ng *S. pullorum*, lane 5; 10ng *S. gallinarum*, lane 6; 1ng *S. pullorum*, lane 7; 1ng *S. gallinarum*.



Left primer 5'GCG ATC TTG TTT TTA TCG AC -3'  
 Right primer 5'- GAA CAA CCA GAG GTT CTT TG -3'  
 Product size 367

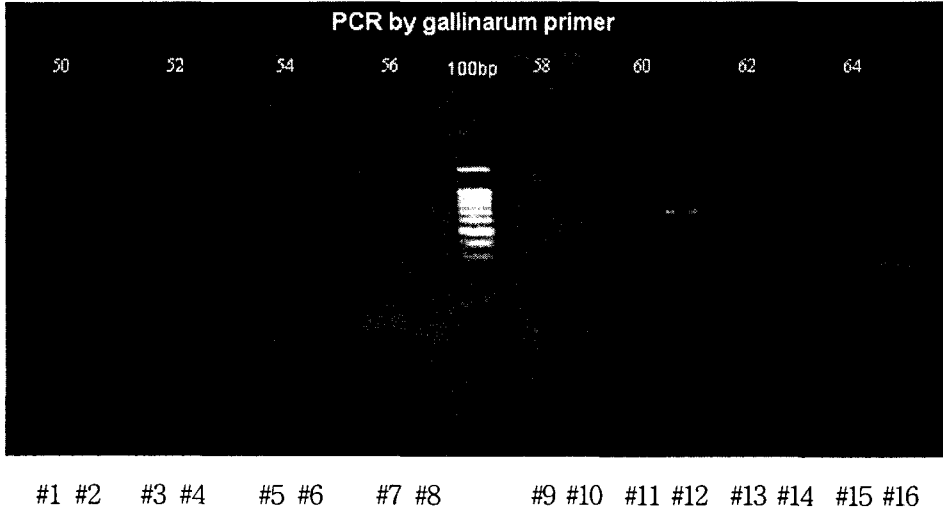


Fig 21. Primer design by *S gallinarum* 3 DNA fragment and PCR result.  
 lan 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 Template DNA is *S pullorum*.  
 lan 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 Template DNA is *S gallinarum*.

## 고찰

RDA법은 subtraction의 효율을 높이기 위하여 representation과 kinetic enrichment (농축)를 조합한 것이다. Representation 과정에서는 두개의 genome DNA를 제한효소로 소화한 후 adaptor 분자를 부가하여 whole genomic PCR로 genome의 일부인 2 kb 이하의 DNA 단편을 증폭한다. 즉 크기가 긴 DNA 단편은 PCR로 증폭하지 않고 일부만이 증폭될 수 있으므로 genome의 복잡도가 낮아져 subtraction법의 효율을 높일 수 있었다. 제한효소가 인식하는 염기배열의 빈도에 따라 genome 전체 중 2~15%를 선택적으로 증폭할 수 있어 비교하는 genome의 크기를 60~450 Mb로 줄일 수 있다. 물론 representation을 높임에 따라 복잡도도 증가하기 때문에 6염기를 인식하는 효소 *BamH I*, *Bgl*

*II*, 짧게는 *Sau3A1*, *MbO1* 등이 적당하다. 이 과정에서 제한효소의 인식부위에 다형이 존재하는지의 여부에 따라 amplicon DNA pool에서의 representation의 유무에로 변환된 것이 된다. 다음으로 농축 과정에서는 subtraction법과 PCR에 의한 동적 농축의 조합으로 tester에 특이적인 DNA 단편이 증폭된다. Driver DNA amplicon에 포함되지 않은, 즉 tester DNA amplicon에만 존재하는 DNA 단편은 hybridization 과정에서 homoduplex를 형성하므로 tester DNA 단편에만 미리 adaptor 분자를 부가한 것이 되어 이후의 PCR 반응에서 기하급수적으로 증폭할 수 있다. 한편 driver DNA 분자와 double strand를 형성한 heteroduplex는 한쪽 말단에만 primer가 결합하기 때문에 직선적인 증폭이 일어나 목적의 DNA 단편을 선택적으로 증폭할 수 있다.

Subtraction과 PCR 증폭을 반복할 경우 두개의 다른 adaptor 분자를 준비하여 서로

이용함으로써 앞 단계에서 생기는 비특이적인 산물의 증폭을 방지할 수 있다. Rosenberg 등<sup>35)</sup>은 homoduplex 분자를 biotin화하여 선별함으로써 농축 과정을 더욱 효과적으로 하여 hybridization 과정을 간소화한 변형방법을 개발하였다. RDA법의 적용에 있어서 주의 점은 contamination에 민감하다는 것이다. 따라서 처음의 실험에서는 양성대조 DNA와 함께 실시하는 것이 바람직하다. 재현성을 높이기 위해서도 일련의 실험에서 동일 batch의 완충액, 효소를 사용하는 것이 좋다. 또 DNA의 품질에 있어서도 비교하는 검체간에 동일한 representation을 얻기 위해서는 제한효소로 완전히 소화하는 것이 중요하다. 합성 oligonucleotide 등에서의 혼입물과 같은 시약의 오염된 순도는 간혹 DNA ligase 등의 반응을 저해한다. Ligase 반응의 가부 판정을 위하여 ligase 반응액의 일부를 전기영동하여 adaptor를 부가함으로써 좋다. 또 충분한 증폭량을 얻기 위해서는 활성이 확실한 Taq Polymerase를 충분한 양으로 사용하는 것 또한 중요하다고 볼 수 있다. Subtraction에 있어서 반응의 정밀도 향상을 위해서는 정확한 tester와 driver의 비를 결정하는 것은 효율적인 subtraction에 있어 중요한 관건이다. Amplicon DNA의 농도를 확인하기 위하여 기존의 방법에 따라 전기영동한 시료를 형광으로 또는  $\lambda$  DNA와 비교하여 정량해 보았으나 이는 정량성이 부족한 것으로 분광광도계로 측정할 경우 정밀도가 향상될 것으로 사료된다.

이와 같은 RDA법은 응용면에 있어서 감염 세포 유래의 DNA를 tester로 하고 비감염 세포의 DNA를 driver로 하여 비교하면 새로운 감염 병원체를 검출할 수 있다. 원리적으로는 동일개체의 검체를 비교해야 하겠지만 목적 병원체가 혈액 등에도 존재할 경우에는 비감염 검체에 혈액이 혼입하여 감염 세포 또는 병원체가 미량이지만 섞이는 경우가 있고, 또 다른 조직을 사용하면 조직에 독특한 상재균이 존재함에 따라 subtraction에 지장을 초래하는 경우도 있다.

그러므로 경우에 따라서는 비감염조직을 채취하는 것도 한 가지 방법으로써 AIDS 환자에 생긴 capodi 육종조직으로부터 병원체를 동정하기 위해 RDA를 실시하였는데, subtraction을 3회 실시한 결과 herpes virus와 유사한 염기배열을 얻은 사례가 있다고 알려져 있다. 또한 질환관련 DNA marker의 분리에 있어서 RDA법은 단일인자 유전형질의 책임 유전자좌의 근방에 위치하는 다형성 marker를 얻는데 응용할 수 있어 mouse 등 실험동물의 유전자 해석에 유용하다. 또 사전에 DNA marker를 필요로 하지 않으므로 다른 동물의 유전자 해석에도 유효하다. 암세포의 유전적 변이의 검출에 있어서 RDA법은 암화 과정에 있는 유전자 결실, 증폭 등의 변이가 축적되는데 전체 genome를 대상으로 scanning 하는 방법으로서 RDA법이 유용하다. Tester와 Driver DNA를 어떻게 설정하는가에 따라 2가지 응용이 가능하다. 첫째는 정상세포 DNA를 driver로 이용하면 종양에서 증폭한 DNA를 검출할 수 있으며 둘째, 암세포 DNA를 driver로 이용하면 암세포 DNA에 특이한 DNA 변이, 즉 염색체 결실을 검출할 수 있다. 실제로 최근 RDA법을 이용하여 신장세포암, 대장암, 식도암, 췌장암 등에서 동형결실 영역을 검출한 바 있다<sup>24)</sup>. 이와 같이 유전자과학의 급격한 진전 특히 유전자 지도나 cDNA sequencing 분야의 비약적인 진보로 사람의 다양한 질환에 있어 그 원인이 되는 유전적 이상을 발견할 수 있었다. 금후 수년은 positional candidate cloning 방법에 의해 암 유전자 해석이 진행되리라고 여겨진다. 그 중에서도 RDA법은 유전자좌의 positioning에 유용하고 범용성이 높은 기술이다. 또 RNA 수준에서의 변화 해석에도 응용함으로써 differential display법(DDA)과 동일하게 이용할 수 있는 등 응용분야가 다양화 할 수 있다고 사료된다.

Genome 연구가 진전함에 따라 positional cloning에 의한 질환유전자의 cloning이 급속도로 진행되고 있으며, 게놈 DNA의 변이

를 검출하기 위하여 subtraction법을 널리 사용하였다. 본 실험에서와 같이 일반적으로 한 검체(tester)를 다른 검체(driver)와 혼합함으로써 tester 검체에만 존재하는 DNA 단편을 농축 및 고정할 수 있다. 그러나 고등동물의 genome은 복잡하여 종래의 방법으로 이들을 비교하기에는 감도가 불충분하다. 즉, genome DNA의 복잡도(complexity)가 높으면 tester와 driver의 혼합액내 각 DNA의 농도를 충분히 높일 수 없어 hybrid형성이 불충분하므로 subtraction 조작을 여러번 반복해도 100배 정도의 농축(enrichment)할 수 없으므로 효율적인 방법의 개발이 필요하였다. Representational difference analysis (RDA)법은 PCR의 특성을 충분히 살린 기법으로 whole genomic PCR로 증폭한 genome DNA의 일부를 subtraction법으로 비교하여 변이 DNA를 검출 및 증폭하는 것으로 PCR과정에 경합반응이 일어나면 짧은 DNA 단편이 효율적으로 증폭된다. 따라서 제한효소처리된 단편의 PCR반응으로 얻은 DNA 단편의 pool은 genome 전체에 비해 복잡도가 낮기 때문에 효율적인 subtraction을 실시할 수 있어 PCR로 선택한 산물은 기하급수적으로 증폭할 수 있으며, 반면에 genome 전체를 해석하는 기술로는 RLGS (restriction landma가 genome scanning)법이 있다<sup>24)</sup>. 이러한 특성상 genome 구조가 비교적 덜 복잡한 미생물에 있어서 특히, 추백리와 가금티푸의 원인균인 *S. gallinarum*과 *S. pullorum*은 임상 증상, 혈청학적, 유전형질적 측면에서 매우 유사하여 염기서열 구조 또한 매우 유사성을 나타낼 것으로 가정할 때, 이러한 점에 있어서 동일 개체 내에서 암을 일으킬 때 관여하는 염기서열을 규명함과 마찬가지로 본 실험에서 두 균종간의 특성상 유사한 *S. gallinarum*과 *S. pullorum*의 RDA method에 의한 형질의 차이를 규명함에 있어서 그동안 고등동물의 genom DNA 변이 검출에 주로 이용하였던 방법을 임상 및 진단, 생화학적 특성이 유사한 두균종의 유전형질을

찾아내는데 처음으로 적용하였고, 그 결과 또한 두 균종을 효율적으로 감별하는데 유의성있는 결과를 얻었다. 그러나 GenBank에 등록된 염기서열의 탐색한 결과 *S. pullorum*과 *S. gallinarum*의 genome 구조가 완전하게 해석된 자료가 없어 homology 결과에 대한 예측가능성이 부족한 점이 있으며 국내 양계산업에 있어서 중요한 이들 질병 연구를 위해서 genome구조에 대한 분석이 필요할 것으로 생각된다.

본 실험을 기초로 제작된 primer로 국내 양계산업에 영향을 미치는 난계대성 질병의 신속 검사 또는 농장내 환경오염 조사에 적극 활용하게 되면 양계산업의 생산성 향상은 물론 위생적인 축산물 생산에 일조할 것으로 기대되며, 또한 추백리와 가금티푸스 질환뿐만 아니라 유사한 동일 균속간의 염기서열의 차이점을 규명하여 이를 기초로 감별진단에 활용될 가치가 매우 높다고 사료되어 다른 유사한 질환 연구에 응용의 가치가 충분하다고 생각된다. 그러나 두 균종간의 더 정확한 감별을 위하여 나머지 fragment의 염기서열을 기초로 특히 *S. pullorum*균 특이성 primer를 제작하여 추백리와 가금티푸스간의 유의성 있는 감별 primer로서의 가치 평가를 수행해야 하는 과제와 각각 분리된 염기서열을 Gene Bank에서 검색한 결과 *S. enterica* 등에서 일부 상동성을 나타냄에 따른 다른 균주 이외의 장내세균과의 교차반응 여부에 대한 비교, 그리고 감별진단법을 실용화하기 specific DNA fragment를 동시에 검출할 수 있는 Duplex PCR의 개발의 과제를 안고 있다.

## 결 론

Subtraction PCR 방법에 의한 *S. pullorum*과 *S. gallinarum*의 specific DNA fragment를 분리하고 진단적 실험을 수행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *S. gallinarum* 과 *S. pullorum*의 DNA에서 subtraction PCR방법으로 각각의 균주 특이한 3개의 DNA fragment을 분리하였다.
2. 각 단편의 염기서열을 결정하여 비교한 결과 *S. pullorum* DNA 2 fragment와 *S. gallinarum* DNA 3 fragment에서 일부 상동성을 나타내었으나 기타의 fragment의 염기서열은 서로 일치하지 않았다.
3. 각각의 염기서열을 Genebank에 등록된 염기서열과 비교결과 *S. enterica*, *S. typhimurium*, *S. dublin*, *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae* 등에서 일부 상동성을 나타내었으나 *S. pullorum* 및 *S. gallinarum* 간에는 없었다.
4. *S. gallinarum* DNA 2, 3 fragment를 기초로 한 primer를 design하여 *S. pullorum*과 *S. gallinarum*의 비교시험 결과 *S. gallinarum*에서만 276 bp와 367 bp에서 특이 밴드를 확인할 수 있었다.

### 참고문헌

1. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. 1988. *Hagan and Brunner's Microbiology and infectious disease of domestic animals*. 8th ed. Comstock Pub. Ass. Ithaca and London : 74-88.
2. Benett IL, Hook ED. 1965. Some aspect of Salmonellosis. *Ann Rev Med* 10 : 1-21.
3. Edward PR, Galton MM. 1967. Salmonellosis. *Adv Vet Sci* 11 : 1-63.
4. William JE, Snoeyenbos GH, Hofstad MS. 1991. *Disease of Poultry*. 8th ed. Iowa State University Press, Ames Iowa : 721-727.
5. Mallinson ET, Snoeyenbos GH. 1990. Salmonellosis. In: *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. Ed by Purchase HG,

- Arp LH, Domermuth CH, et al. 3rd ed. American Association of Avian Pathologists. Kendall/Hunt Publishing Co, Ames Iowa : 3-11.
6. Calnek BW, Barners HJ, Beard CW, et al. 1991. *Disease of Poultry*. Iowa State University Press, Ames Iowa : 72-137.
7. Nielsen B, Baggesen D, Bager F, et al. 1995. The serological response to *Salmonella* serovars *typhimurium* and *infantis* in experimentally infected pigs. *Vet Microbiol* 42 : 205-218.
8. 김기석. 2002. 최근 가금티푸스의 국내 발생동향과 근절대책. *수의과학검역정보* 2002. 6(16) : 54-58.
9. 김석환, 송재찬. 2002. *Salmonella gallinarum* 접종시 산란계 혈장단백질의 변화양상. *경북대학교대학원*.
10. 우용구, 김봉환. 1998. 우리나라에서 분리한 *Salmonella pullorum*과 *Salmonella gallinarum*의 항원형, *대한수의학회지* 38(4) : 784-792.
11. 우용구, 김봉환. 1998. 가금티푸스균의 인공감염에 대한 백색 및 갈색 산란계 계통간의 내병성 비교. *대한수의학회지* 38(4) : 777-778.
12. 이재학. 1995. 가금질병 해부병리 도감. 도서출판 샤론 : 60-62.
13. Smith HW, Turker JF. 1989. The virulence of *Salmonella* strains for chickens: Their excretion by infected chickens. *J Hyg Camp* 84 : 479-488.
14. Gast RK, Beard CW. 1989. Age-related changes in the persistence and pathogenicity of *Salmonella typhimurium* in chicks. *Poult Sci* 68 : 1454-1460.
15. 이동석, 한태욱. 2000. 국내에서 분리한 *Salmonella gallinarum*의 병원성, 항생제감수성 및 plasmid profile. *한국수의 공중보건학회지* 24(1) : 27-49.
16. Barhart HM, Dresen DW, Bastien R.

- et al. 1991. Prevalence of *Salmonella enteritidis* and other serovars in ovaries of laying hens at time of slaughter. *J Food Prot* 54 : 488-495.
17. 가축질병진단전문가반 교재, 2001. 국가 행정전문연수원농업연수부 : 241-245.
  18. 박경운, 유한상, 김선중 등. 1998. 국내 추백리 발생역학 및 감염계로부터 분리한 *Salmonella pullorum*의 특성. 대한수의학회지 38(4) : 803-810.
  19. 김영환, 김경희, 우용구 등. 1997. 경북지방유래 추백리 양성계에서의 균분리 및 혈청역가 추이. 한가위지 20(1) : 19-26.
  20. Waltman WD, Horne AM. 1993. Isolation of *Salmonellae* from chickens reacting in the pullorum-typhoid agglutination test. *Avian Dis* 37 : 805-810.
  21. 유재윤, 전무형. 1999. 추백리 혈청검사 양성 산란계로부터 *Salmonella*속 균분리. 충남대학교대학원.
  22. Soto SM, Guerra B, Gonzalez-Hevia MA, et al. 1999. Potential of three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. *Appl Environ Microbiol.* 65(11) : 4830-4836.
  23. 박명규, 2000. PCR을 이용한 *S gallinarum*과 *S pullorum* rfbs 유전자 검출과 비교. 전북대학교 대학원.
  24. 이제현. 2002. 백전백승 PCR guide. Takara Biomedical : 121-131.
  25. PCR의 넓은 영역에서의 해석 <http://www.bohan.co.kr/doc/ls&bt/11/c-2.htm>
  26. 윤병수. 1999. 분자생물학 실험법 II. 경기대학교연구지원팀.
  27. Kaufman PB, Wu W, Kim DH, et al. 1995. *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. SRC Press : 12-25.
  28. Brown TA. 1998. *Gene cloning. An introduction*. 3rd Eds, Chapman & Hall : 27-85.
  29. 박상대, 김규언, 김동선 등. 1998. 분자세포생물학. 아카데미서적. 서울 : 337-378.
  30. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. 1982. *Molecular cloning*. CSH-Press.
  31. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning*. 2nd Eds. CSH-Press.
  32. 이대실. 1998. 분자생물학노트. Kist 생명공학연구소.
  33. Takara Biotechnology 2000/2001. Takara Shuzo Co., LTD.
  34. PCR Applications Manual, 1999. Roche Molecular Biochemicals, 2nd Eds. Rochs Diagnostic GmbH Mannheim.
  35. Rosenberg M, Przybylska M, Straus D. 1994. "RFLP subtraction": a method for making libraries of polymorphic markers. *Proc Nat Acad Sci USA* 91 : 6113-6117.