

Note

rpoS 유전자를 대상으로 하는 Real-Time PCR에 의한 *Vibrio vulnificus* 검출

김동균 · 안선희 · 배주윤 · 공인수*

부경대학교 수산과학대학 생물공학과

Detection of *Vibrio vulnificus* by Real-Time PCR targeted to *rpoS* gene. Dong-Gyun Kim, Sun-Hee Ahn, Ju-Yoon Bae and In-Soo Kong*. Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Abstract *Vibrio vulnificus* is a causative agent of serious diseases in humans resulting from the contact of wound with seawater or consumption of raw seafood. Several studies aimed at detecting *V. vulnificus* have targeted *vvh* as a representative virulence toxin gene belonging to the bacterium. In this study, we targeted the *rpoS* gene, a general stress regulator, to detect *V. vulnificus*. PCR specificity was identified by amplification of 8 *V. vulnificus* templates and by the loss of a PCR product with 36 non-*V. vulnificus* strains. The PCR assay had the 273-bp fragment and the sensitivity of 10 pg DNA from *V. vulnificus*. SYBR Green I-based real-time PCR assay targeting the *rpoS* gene showed a melting temperature of approximately 84°C for *V. vulnificus* strains. The minimum level of detection by real-time PCR was 2 pg of purified genomic DNA, or 10³ *V. vulnificus* cells from pure cultured broth and 10³ cells in 1g of oyster tissue homogenates. These data indicate that real-time PCR is a sensitive, species-specific, and rapid method for detecting this bacterium using the *rpoS* gene in pure cultures and in infected oyster tissues.

Key words : *Vibrio vulnificus*, *rpoS* gene, real-time PCR, oyster.

서 론

최근 급속한 경제발전으로 인한 소득의 증대와 well-being 등의 건강에 관한 관심의 증가로 인하여 사람들의 식단은 육고기에서 신선한 어패류로 바뀌어 가고 있다. 하지만 이러한 수요 및 소비의 증가에도 불구하고 신선한 어패류에 대한 병원성 미생물 유래 식중독 및 패혈증 등의 안정성의 평가는 여전히 미비하다. *Vibrio vulnificus*는 오염된 바닷물에 상처가 노출되거나 오염된 해산물의 섭취로 인하여 감염되며 그 결과 생명에 치명적인 패혈증을 유발하는 대표적인 호염성 병원균이다 [11]. 따라서 해산물 내에서 빠르고 정확한 *V. vulnificus* 균의 검출방법의 개발이 매우 필요하다.

병원성 균을 검출하는 일반적인 방법으로는 생화

학적 검사법, 선별배지법, DNA-DNA hybridization 방법 등이 있으나 이러한 방법들은 많은 수의 시료를 검사하여야 하기 때문에 많은 시간과 인력을 필요로 하며 검사 결과가 틀리는 경우가 빈번하다 [7,18]. 따라서 최근에는 검출할 시에 특정 유전자를 이용한 PCR 법이 주로 사용되는데 이는 이전의 방법들과는 달리 다양한 시료에서 신속, 정확하게 병원성 균을 진단할 수 있다. 그리고 이러한 PCR 방법 중에서 형광 물질인 SYBR Green I dye를 이용한 real-time PCR 법은 좀 더 신속, 정확하게 다양한 미생물을 검출할 수 있다 [3,19].

본 연구에서는 *rpoS* 유전자를 이용한 real-time PCR 방법으로써 병원성 *V. vulnificus*의 검출방법을 개발하였다. *rpoS* 유전자는 house-keeping 유전자로서 미생물이 접하는 다양한 stress에 관여하며 병원

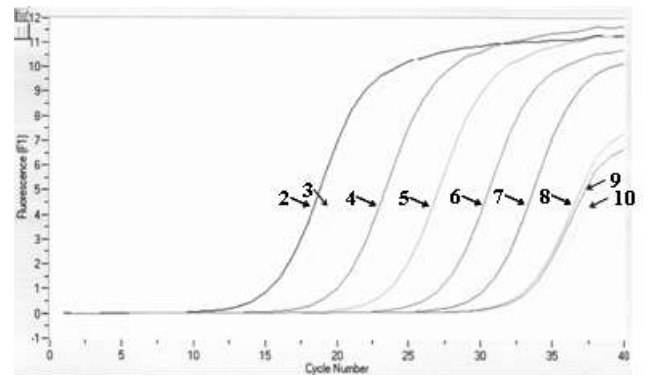
* Corresponding author

Phone: +82-51-620-6185, Fax: +82-51-620-6180

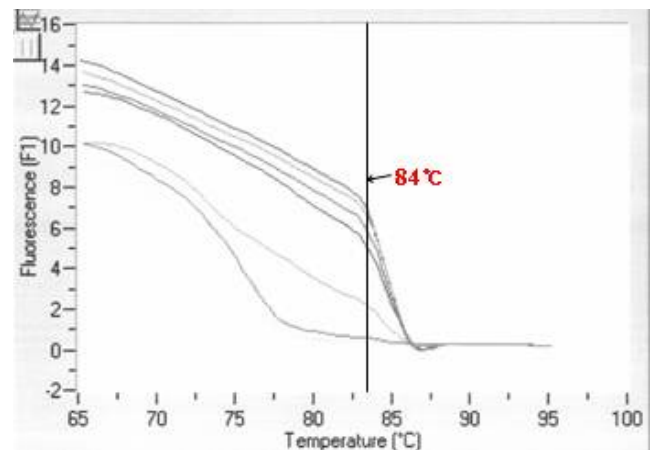
E-mail: iskong@pknu.ac.kr

성 유전자의 발현 및 숙주세포에 침투에도 관련이 있다고 보고되었다 [4-6,9,14,15].

검출을 위한 특이 primer 제작을 위하여 NCBI GenBank에서 염기서열이 알려진 5종의 *Vibrio* 균의 *rpoS* 유전자 염기서열 (accession numbers: AY187681, AE004139, AF144608, AY695434, and AF321124)을 찾아 유사도를 조사하였다. 그 결과 유사도가 떨어지는 부위를 찾을 수 있었으며 이러한 위치의 서열을 토대로 primer set를 제작하였다. 다양한 primer set 중에서 *vulrpoS*-up (5'-CATGCGTGTTTCCTTGATTC-3')와 *vulrpoS*-rp (5'-TCCATAGCCTTTTTTCTATTGG-3') primer set가 가장 특이성을 보였다. 검출반응의 특이성을 조사하기 위하여 8 serotype의 *V. vulnificus*와 36종의 *V. vulnificus*가 아닌 *Vibrio* 균 및 장내세균들을 가지고서 실험을 수행하였다. 각각의 미생물은 BHI, HI 및 LB 배지에서 각각의 최적온도로 배양한 뒤 cell을 모아 phenol-chloroform 법으로써 chromosomal DNA를 분리 하여 PCR 반응의 template로써 사용하였다. 또한 검출법의 민감도를 측정하기 위하여 분리한 chromosomal DNA를 1/10씩 연속적으로 희석한 뒤 농도별 반응을 수행하였으며 그리고 colony 수별로 반응을 수행하여 검출할 수 있는 최소량의 범위를 측정하였다. 그 결과 44종의 미생물 중에서 8 serotype의 *V. vulnificus*만이 274 bp의 증폭산물이 있음을 알 수 있었으며, 2 pg의 DNA 및 10^3 마리 정도의 *V. vulnificus*만 존재하더라도 검출이 가능하였다. 또한 Ct 값이 일정하게 증가하며 melting temperature가 84°C로 일정함을 알 수 있었다 (Fig. 1, 2). 이러한 검출법이 실제로 어패류에 응용이 가능한지를 알기 위하여 굴에 *V. vulnificus*를 감염 시킨 뒤 real-time PCR법으로써 검출 실험을 해 보았다. 깨끗이 수세한 굴의 조직을 PBS와 함께 homogenizer로써 파쇄 하였으며 이를 *V. vulnificus*에 인위적으로 감염 시킨 뒤 5시간의 배양과정을 거친 뒤 total chromosomal DNA를 분리하여 real-time PCR반응의 주형으로 사용하였다. 그 결과 SYBR Green I dye를 이용한 real-time PCR 법은 10^3 마리의 *V. vulnificus*만 있더라도 검출 할 수 있었으며, Ct 값이 일정하게 증가하며, melting temperature이 84°C로 일정하게 유지됨을 알 수 있었다 (Table 1). 본 연구와 마찬가지로 16S rRNA, 23S rRNA, *gyrB*, *whA*, *toxR* 등의 다양한 유전자를 이용한 PCR법으로써 *V. vulnificus*를 검출하기



(A)



(B)

Fig. 1. Real-time PCR sensitivity with primers *vulrpoS*-up and *vulrpoS*-rp and purified genomic DNA from *V. vulnificus*. (A) Representative optic graph for the number of cycles versus the number of fluorescence units for each sample used to calculate the Ct value. 2, PCR-positive control ; 3, 200 ng of DNA; 4, 20 ng of DNA; 5, 2 ng of DNA; 6, 0.2 ng of DNA; 7, 0.02 ng of DNA; 8, 2 pg of DNA; 9, 0.2 pg of DNA; 10, 0.02 pg of DNA. (B) Corresponding melting curve analysis represented by number of fluorescence units versus temperature.

위한 연구가 시도 되었다 [1,8,10,12,13,16,17,20]. 하지만 16S rRNA를 사용한 실험은 *Vibrio* 간 염기서열의 높은 유사도, 23S rRNA를 이용한 방법은 모든 strain의 *V. vulnificus*에서는 검출이 되지 않으며, *whA* 유전자를 이용한 실험에서는 돌연변이 및 병원성이 약한 strain 등이 검출되지 않는 문제가 있었다 [2,10,13,17]. 따라서 이러한 유전자 보다는 *gyrB*와 같은 house-keeping 유전자를 이용한 실험법이 더욱 유용하다. 하지만 *gyrB*를 이용한 실험은 매우 적은 수의 시료만을 분석 하였다는 단점이 있었다. 따라서 본 연구과정 동안 개발한 *rpoS* 유전자를 이용한 real-time PCR 검출법은 신속, 정확한 검출법으로써

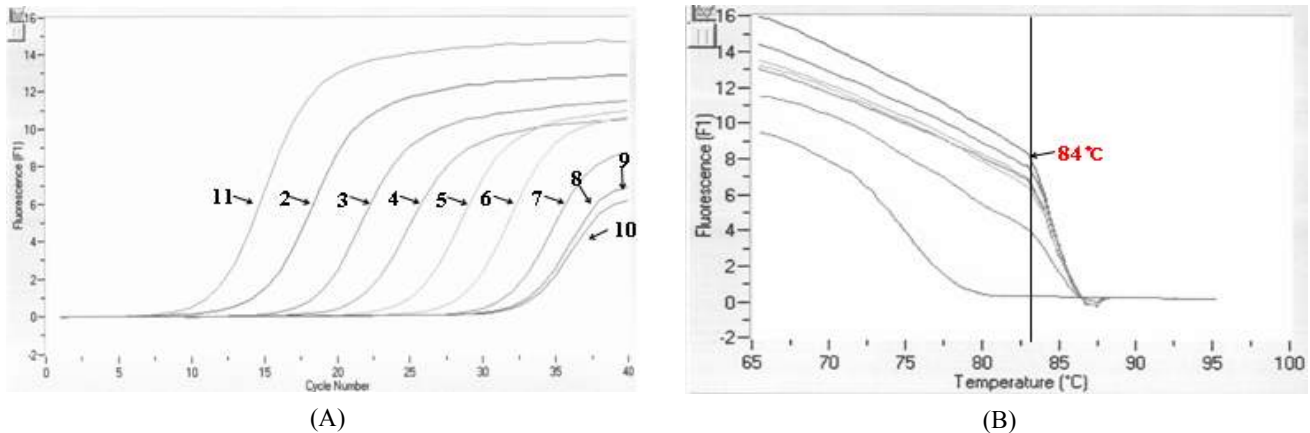


Fig. 2. Real-time PCR sensitivity with primers vulrpoS-up and vulrpoS-rp and purified genomic DNA from tenfold serially diluted pure cultures of *V. vulnificus*. (A) Representative optic graph for the number of cycles versus the number of fluorescence units for each sample used to calculate the Ct value. 2, 10⁸ CFU/ml; 3, 10⁷ CFU/ml; 4, 10⁶ CFU/ml; 5, 10⁵ CFU/ml; 6, 10⁴ CFU/ml; 7, 10³ CFU/ml; 8, 10² CFU/ml; 9, 10¹ CFU/ml; 10, PCR-negative control; 11, PCR-positive control. (B) Corresponding melting curve analysis represented by number of fluorescence units versus temperature.

Table 1. Sensitivity of detection of *V. vulnificus* from seeded oyster tissue homogenate following 5 h^a

Sample	Comcn(CFU/g)	CtValue	Melting temp(°C)
1	10 ⁷	20.58±0.06	84.60±0.02
2	10 ⁶	23.68±0.07	84.60±0.02
3	10 ⁵	27.42±0.12	84.60±0.03
4	10 ⁴	30.50±0.09	84.36±0.15
5	10 ³	32.08±0.05	84.36±0.17
6	10 ²	32.64±0.12	
7	10 ¹	32.48±0.08	
8(positive control)		18.97±0.11	84.56±0.06
9(negative control) ^b		32.48±0.07	76.32±0.08

^aThe values are±standard deviations for three independent experiments.

^bUnseeded oyster tissue homogenate.

V. vulnificus 검출을 위해 매우 적합하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 마린바이오 21사업의 해양 바이오 프로세스연구단 연구비지원 (과제관리번호 M2007-06)에 의해 수행 되었습니다.

참고 문헌

1. Arias, C.R., E. Garay, R. Aznar. 1995. Nested PCR method for rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* in fish, sediments, and water. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3476-3478.
2. Brauns LA, M.C., Hudson, J.D., Oliver. 1991. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable

and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2651-2655.

3. De Medici D, L., Croci, E., Delibato, S., Di Pasquale, E., Filetici, L., Totk. 2003. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3456-3461.
4. Fang FC, S.J., Libbey, N.A., Buchmeier, P.C., Loewen, J., Switala, J., Harwood, D.G., Guiney. 1992. The alternative σ factor KafF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **8**, 11978-11982.
5. Hengge-Aronis R. 2000. A role for the σ^S subunit of RNA polymerase in the regulation of bacterial virulence. *Adv. Exp. Med. Biol.* **485**, 85-93.
6. Hengge-Aronis R. 2000. The general stress response in *Escherichia coli*. P 161-178. In: G. Storz, R. Hengge-Aronis (eds.), *Bacterial Stress Response*. American Society for Microbiology, Washington DC.
7. Kaysner CA, A., DePaola Jr. 2001. *Vibrio*, P 405-420,

- In: F.P. Downes, K. Ito (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*. American Public Health Association, Washington DC.
8. Kim MS, H.D., Jeong. 2001. Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments. *Aquaculture* **193**, 199-211.
 9. Kowarz L, C., Coynault, V., Robbes-Saule, F., Norel. 1994. The *Salmonella typhimurium katF (rpoS)* gene: cloning, nucleotide sequence, and regulation of *spvV* and *spvABCD* virulence plasmid genes. *J. Bacteriol.* **176**, 6852-6860.
 10. Kumar HS, A., Parvathi, I., Karunasagar, I., Karunasagar. 2006. A *gyrB*-based PCR for the detection of *Vibrio vulnificus* and its application for direct detection of this pathogen in oyster enrichment broths. *Int. J. Food Microbiol.* **111**, 216-220.
 11. Linkos DA, J.D., Oliver. 1999. Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 207-214.
 12. Lin Z, K., Kumagai, K., Baba, J.J., Mekalanos, M., Nishibuchi. 1993. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *J. Bacteriol.* **175**, 3844-3855.
 13. Maugeri TL, M., Carbone, M.T., Fera, C., Gugliandolo. 2006. Detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in seawater and plankton of a coastal zone of the Mediterranean Sea. *Res. Microbiol.* **157**, 194-200.
 14. Merrell DS, A.D., Tischler, S.H., Lee, A., Camilli. 2000. *Vibrio cholerae* requires *rpoS* for efficient intestinal colonization. *Infect. Immun.* **68**, 6691-6696.
 15. Olsén A, A., Arnqvist, M., Hammer, S., Sukupolvi, S., Normark. 1993. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin binding curli in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **7**, 523-536.
 16. Osorio CR, K.E., Klose. 2000. A region of the transmembrane regulatory protein ToxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* **182**, 526-528.
 17. Parvathi A, H.S., Kumar, I., Karunasagar, I., Karunasagar. 2005. Study of the occurrence of *Vibrio vulnificus* in oysters in India by polymerase chain reaction (PCR) and heterogeneity among *V. vulnificus* by randomly amplified polymorphic DNA PCR and *gyrB* sequence analysis. *Environ. Microbiol.* **7** 995-1002.
 18. Peeler JT, G.A., Houghtby, A.P., Rainosek. 1992. The most probable number technique. P105-120. In: Downes FP, K. Ito (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*. American Public Health Association, Washington. DC.
 19. Stubner S. 2002. Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* lineage 1 in rice field soil by real-time PCR with SybrGreen detection. *J. Microbiol. Meth.* **50**, 155-164.
 20. Wang RF, W.W., Cao, C.E., Cerniglia. 1997. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 727-736.