

국내 분리주인 *Vibrio cholerae* KNIH002로부터 독성 유전자 카세트의 클로닝 및 염기서열 분석

신희정 · 박용춘 · 김영창

충북대학교 생명과학부

*Vibrio cholerae*는 사람에게 설사를 일으키는 병원성 세균이며 본 연구에 이용된 *V. cholerae* KNIH002는 국내의 설사질환 환자로부터 분리하였다. 콜레라 독소 검출용 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭한 산물을 탐침자로 이용하여 Southern hybridization을 실시한 결과 *Pst*I 및 *Bgl*II로 이중절단된 4.5-kb 절편내에서 *ctx* 유전자가 존재함을 확인하였다. 따라서 염색체 DNA를 *Pst*I 및 *Bgl*II로 절단 후 *V. cholerae* KNIH002의 유전자 mini-libraries를 제조하였다. 그리고 동일 탐침자를 이용하여 colony hybridization을 실시한 결과 제조된 유전자 mini-libraries로부터 신호를 나타내는 한 개의 클론을 선발하였다. 선발된 클론이 지니는 플라스미드를 pCTX75라 명명하였으며, 이 클론은 CHO 세포에 대한 세포 독력이 나타남을 확인하였다. 염기서열을 결정한 결과 클로닝된 플라스미드에는 *ace*, *zot*, *ctxA* 그리고 *ctxB* 유전자로 구성되어있는 독성 유전자 카세트가 존재함을 알 수 있었다. *ace*와 *zot* 유전자들은 각각 ATG 개시코돈과 TGA 종결코돈을 포함하여 291 bp와 1,200 bp로 구성되어져 있었다. *ace* 유전자의 염기서열은 *V. cholerae* E7946 El Tor Ogawa strain의 것과 100% 일치하였다. 그러나 *zot* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열은 *V. cholerae* 395 Classical Ogawa strain의 것과 각각 99% 및 98.8%의 상동성을 보였다. 특히, *V. cholerae* 395 Classical Ogawa strain의 *Zot* 폴리펩타이드에서 100번, 272번, 281번째 alanine은 *V. cholerae* KNIH002에서 모두 valine으로 치환되어져 있었다.

Key words □ *ace* gene, cholera toxin, *ctxAB* gene, *Vibrio cholerae* KNIH002, *zot* gene,

병원성 *V. cholerae*에 의해 발생하는 콜레라는 전세계적으로 발생되며 특히, 개발도상국가에서 매우 빈번히 발생하는 주된 공중보건학적인 문제로 대두되고있다. 1996년 과학잡지 'Science'에 발표된 바에 의하면 사망률이 높은 세계 10대 질병중 2번째로 설사질환을 꼽고 있다. 그리고 1996년 WHO보고서에 의하면 연간 250만 명이 설사질환으로 사망하고 있으며, 이중 12만 명이 콜레라에 의해 사망한다고 보고되어져 있다. 국립 보건원의 통계에 따르면 국내에서도 1995년 강화도에서 68명의 집단발병이 보고되었으며, 적은 수이지만 매년 환자가 발생되며 외래 유입성 콜레라 균이 발견되고 있는 실정이다.

*V. cholerae*는 그람음성 세균으로 통성혐기성, 무포자, 그리고 운동성이 있는 막대모형의 1.4-2.6 μ m의 크기를 지니는 세균이다. 또한 해수와 담수에서 생존이 가능하며, 세포 외독소를 생산하여 사람의 장내에서 설사를 유발하는 병원성 세균의 일종이다(16). 이 세균은 사람의 배설물 및 오염된 식수로부터 전염되는 대표적인 수인성 질환이며 일반적으로 위생시설이 낙후된 개발도상국에서 그 발생빈도가 매우 높다. 전염성이 있는 *V. cholerae*의 혈청그룹(serogroup)으로는 O1과 O139(non-O1)가 대표적이며, O1은 classical과 El Tor 생물형(biotype)을 가지며 이들은 각각 Inaba, Ogawa의 2가지 혈청형(serotype)으로 나뉘

어진다. Inaba와 Ogawa는 그들이 가지고 있는 O-항원에 의해 분류되며, Inaba는 A와 C를 Ogawa는 A와 B를 지니며 따라서 A는 O1의 공통항원이다(12).

*V. cholerae*에 의해 발생하는 설사의 기작은 세포 외독소 단백질이 점막세포에 작용하여 adenylate cyclase를 자극하며 cyclic AMP를 대량 생산함으로써 막의 수송 조절기능을 마비시켜 세포 내에 존재하는 물을 장내로 대량 방출함으로써 설사병을 유발시킨다(16). 이러한 세포 외독소 단백질은 adenylate cyclase를 활성화하는 한 개의 A-단위체(약 28 kDa)와 장 점막의 GM1 ganglioside receptor에 결합하는 5개의 B-단위체(약 11 kDa)로 구성되어 있는 약 84 kDa의 폴리펩타이드이다(7,9). 이들은 세포질 내에서 각각 A와 B단위체로 합성된 후 periplasmic membrane을 통과하면서 하나의 완전한 독소로 결합된다. 이러한 단백질은 *ctxAB*(cholera toxin) 유전자로부터 합성되는데, 이 유전자는 염색체 상에서 *cep*(core-encoded pilus), *ace*(accessory cholera enterotoxin), *zot*(zonular occludens toxin) 그리고 *ctxAB* 등의 순서로 배열되어 존재하는 독성 유전자 카세트(virulence gene cassette)로 구성되어 있으며(2, 5, 7, 10), 이 독성 유전자 카세트는 RS1으로 불려지는 약 2.7 kb의 유전자가 양 말단에 한 개 혹은 여러 개 존재하는 것으로 알려져 있다(7, 17).

본 연구에서는 국내의 콜레라 환자로부터 분리된 균주인 *V. cholerae* KNIH002로부터 독소 생산에 관여하는 독성 유전자 카세트를 클로닝하였으며, 염기서열 결정을 통하여 유전자의 배열

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 82-0431-261-2302 Fax : 82-0431-268-2538
E-mail: youngkim@cbucc.chungbuk.ac.kr

을 연구하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주, 세포 및 플라스미드

본 연구에 이용된 야생주는 국립보건원으로부터 분양 받은 국내 분리주인 *V. cholerae* KNIH002를 사용하였으며, 클로닝을 위한 벡터 및 숙주균주로는 Stratagene사로부터 pBluescript SKII(+)와 *E. coli* XL1-Blue를 구입하여 사용하였다. 세포 활성의 측정은 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포를 이용하였다. 기타 본 연구에 사용된 균주의 특징은 Table 1과 같다.

배지의 제조

영양 배지는 LB (Luria-Bertani) 배지로 증류수 1 L에 trypton 10 g, yeast extract 5 g 그리고 NaCl 5 g을 첨가하였으며 고체 배지는 한천을 1.5% 되게 첨가 후 사용하였다(4). 또한 클로닝을 위한 선별배지로는 LB고체배지에 tetracyclin, ampicillin, X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 그리고 IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside)를 각각 15 µg/ml, 100 µg/ml, 20 µg/ml 그리고 8 µg/ml되게 첨가 후 사용하였다. CHO 세포 배양을 위한 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO BRL)을 사용하였다.

플라스미드와 염색체 DNA의 추출

플라스미드 분리는 Sambrook등의 방법(14)에 의하여 실시하였다. 그리고 염색체 DNA는 기본적으로 Murray의 방법(11)에 의하여 추출하였다. 즉, 5 ml의 LB 액체 배지에 균체를 배양 후 원심분리하여 균체를 회수하고 TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 완충 용액 567 µl에 현탁 후 sodium dodecyl sulfate (SDS)와 proteinase K의 농도가 각각 0.5% 및 100 µg/ml되게 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 그리고 5 M NaCl을 100 µl 첨가하여 잘 혼합한 후 CTAB/NaCl (10% CTAB, 0.7 M NaCl) 용액 80 µl를 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 용액에 동량의 phenol/chloroform을 섞은 후 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수한 용액에 0.6 배의 이

소프로판올을 첨가하여 잘 섞어 준 후 유리 막대를 이용하여 염색체 DNA를 회수하였다. 회수된 염색체 DNA는 70% 에탄올을 이용하여 1회 세척 후 TE (pH 8.0) 완충 용액에 적당량 녹인 후 사용하였다.

Primer의 구입 및 Polymerase Chain Reaction(PCR) 조건

V. cholerae KNIH002로부터 *ctx* 유전자를 클로닝하기 위한 primer는 일본의 Takara 사로부터 콜레라 독소 유전자 검출용 primer set을 구입하여 이용하였다(Takara Code No. S014). PCR을 실행하기 위하여 먼저 균액을 3 ml 배양 후 균체를 회수하고 멸균수 300 µl에 현탁하여 끓는 물에서 10분간 중탕 후 원심분리하여 상층액 10 µl를 주형 유전자로 사용하며, dNTPs, MgCl₂, primer, *Taq* DNA polymerase등의 농도는 각각 200 µM, 1 mM, 100 pM 그리고 2.5 unit이 되게 첨가하였다. 변성 조건은 94°C에서 1분, 재결합 조건은 50°C에서 1분, 그리고 증합 조건은 72°C에서 1분씩 하여 30회 반복하여 실시하였다.

Southern 및 colony hybridization

Southern hybridization은 나일론 막과 ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham) kit를 사용하였으며, 제조회사의 방침에 따라 수행하였다. 탐침자는 위에서 제조된 PCR 산물을 DNA 표지 용액과 glutaraldehyde 용액을 이용하여 37°C에서 10분간 반응시켜 사용하였다. Hybridization 용액은 hybridization 완충 용액에 Blocking agent와 NaCl을 각각 5% 및 0.5 M 되게 첨가하였고, hybridization 조건은 42°C에서 16-20 시간 행하였다. 세척은 1차 세척 완충 용액 (0.4% SDS, 0.5×SSC)을 55°C에서 20분간 2회 반복한 후, 2차 세척 완충 용액 (2×SSC)을 상온에서 5분간 2회 반복하였다. 검출은 검출 용액 I과 검출 용액 II를 동량 섞어 준 후 상온에서 나일론 막 위에 정확히 1분간 반응시킨 후 사관램으로 나일론 막을 감싸고 Hyperfilm-ECL을 이용하여 1분간 노출시킨 후 현상액과 고정액을 이용하여 필름을 현상하였다.

Colony hybridization은 고체배지에 균주를 picking하여 37°C에서 하룻밤 배양후 나일론막 (Hybond N+)을 그 위에 덮고 약 1분 후에 나일론막을 제거하여 신선한 고체배지로 옮긴 후

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Bacterial strain and plasmid		Relevant characteristics	Sources
Strains			
<i>V. cholerae</i> KNIH002	CTX+		This study
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44hsdR17recA1endA1grA46thirelA1lacF' [proAB⁺lacI^qlacZAM15Tn10(tet)]</i>		Stratagene Co.
Plasmids			
pBluescript SKII(+)	Ap ^r , multiple cloning site in <i>lacZ</i> α; obtained from Stratagene Cloning Systems		Stratagene Co.
pCTX75	4.5-kb <i>Pst</i> I and <i>Bgl</i> II fragment from <i>V. cholerae</i> KNIH002 inserted into SKII(+)		This study
pCTX75-1	4.5-kb <i>Pst</i> I and <i>Bgl</i> II fragment from <i>V. cholerae</i> KNIH002 inserted into KS(+)		This study
pCTX7504-1	Self-ligated large fragment of pCTX75 digested with <i>Eco</i> RV		This study
pCTX7505	Self-ligated large fragment of pCTX75 digested with <i>Cl</i> aI		This study
pCTX7505-1	1.6-kb <i>Sac</i> I and <i>Kpn</i> I fragment from pCTX7505 inserted into KS(+)		This study

5-6시간 동안 배양하였다. 나일론막 위에서 배양된 균체는 고체 배지에서 제거하여 10% SDS에서 20분 방치하여 세포를 파쇄하였다. 세포를 파쇄 후 변성용액(1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH)에서 10분 방치하여 DNA를 단일가닥으로 만든 후 중성용액(0.5 M Tris-Cl, 1.5 M NaCl pH 7.4)에 10분간 방치하였다. 그리고 상온에서 10분간 건조시킨 후 proteinase K(500 µg/ml)를 처리하여 상온에서 약 60분 정도 반응시켰다. 반응시킨 나일론막은 2×SSC로 1회 세척 후 UV-cross linker를 이용하여 유전자를 나일론 막에 고정시킨 후 Southern hybridization과 동일한 방법으로 hybridization 및 세척을 실시하였다.

V. cholerae KNIH002의 유전자 mini-library 제조

V. cholerae KNIH002의 염색체 유전자를 *Pst*I 및 *Bgl*II로 이중절단 후 약 4.5-kb를 회수하였다. 그리고 *Pst*I 및 *Bam*HI로 절단한 SKII(+) 벡터에 결합하고 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환 후 X-gal을 포함하는 선택배지에 도말하여 흰색의 균체만을 선발하였다.

CHO 세포를 이용한 독소 활성 측정

독소 유전자를 포함하는 재조합 균주들은 OD₆₀₀에서 0.1이 될 때까지 배양한 후 IPTG를 40 µg/ml로 첨가하여 OD₆₀₀에서 0.8이 될 때까지 배양하였다. 배양된 세포를 4°C에서 원심 분리하여 회수 후 1×PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2)로 2회 세척한 후 동일 완충용액에 현탁하여 얼음물 중탕으로 1분 간격으로 30초씩 7-8회 sonication함으로써 세포를 완전히 파쇄하였다. 그리고 4°C에서 원심분리하여 상층액을 효소 반응액으로 이용하였다. 독소의 활성은 CHO 세포의 형태적 변화를 관찰하여 측정하였다(3).

독소 생산 유전자의 염기서열 결정 및 상동성 검색

염기서열 결정을 위한 DNA는 Pharmacia사의 GFX™ Micro Plasmid Prep Kit를 이용하여 순수분리 하였으며, 염기서열 결정은 Pharmacia의 ALF expression system을 이용하여 실시하였다. 그리고 GenBank에 수록되어 있는 *V. cholerae* 유전자들과의 비교 분석은 BLAST, DNASIS, PROSIS 등의 프로그램들을 이용하였다.

결과 및 고찰

독소 생산 유전자의 클로닝 및 제한효소 지도 작성

*V. cholerae*는 콜레라 독소를 생산하는 *ctxAB* 유전자 외에 숙주세포의 intracellular tight junction에 영향을 주어 회장조직의 저항성을 감소시키는 Zot 독소 그리고 진행생물의 이온 수송에 관여하는 ATPase와 아미노산 서열이 매우 유사한 Ace 독소 생산 유전자와 함께 독성 유전자 카세트를 이루며 이들은 염색체 상에 존재한다고 알려져 있다(2, 5, 7, 10).

따라서 본 연구에서는 국내분리주인 *V. cholerae* KNIH002로부터 콜레라 독소 생산 유전자를 클로닝하기 위하여 일본의 Takara 사로부터 구입한 콜레라 독소 유전자 검출용 primer

set을 이용하여 PCR을 실시하였다. 그 결과 *ctx* 유전자의 일부 분으로 추측되는 307 bp의 PCR 산물을 얻었고, *V. cholerae*

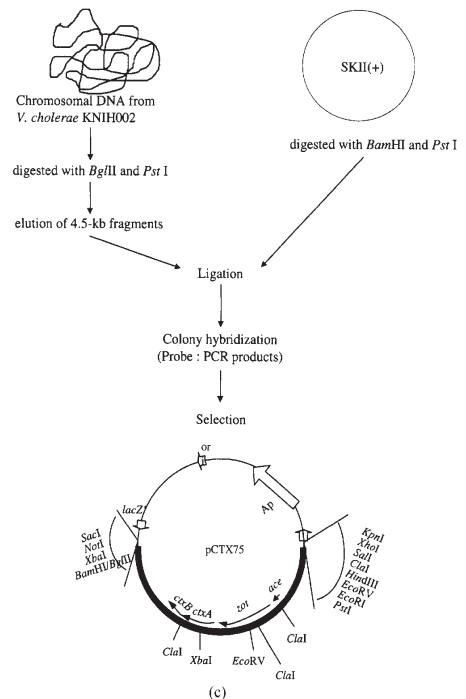
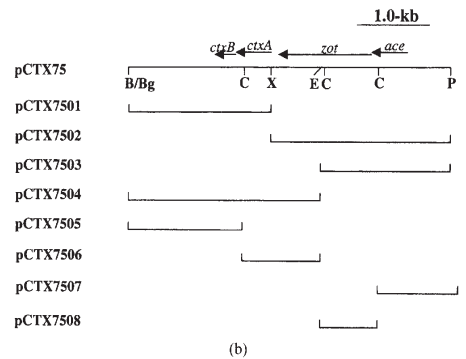
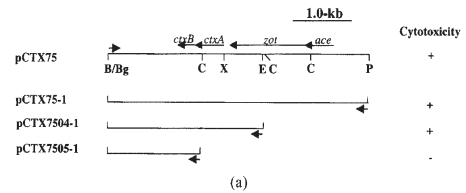


Fig. 1. Physical and genetic map of recombinant plasmid pCTX75 and its derivatives. The cytotoxicity of strains harboring the plasmids were determined by morphological variation of the chinese hamster ovary cells. The direction of transcription of the *lac* promoter is indicated as arrow heads. Abbreviation: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; C, *Cla*I; E, *Eco*RV; X, *Xba*I.

KNIH002의 염색체 유전자를 각종 제한효소로 절단 후 이 PCR 산물을 탐침자로 Southern hybridization을 실시하였다. Southern hybridization을 실시한 결과 염색체 유전자를 *Pst*I과 *Bgl*II로 이중 절단한 약 4.5-kb의 위치에서 신호가 감지됨을 확인하였다. 따라서 *V. cholerae* KNIH002의 염색체 유전자를 *Pst*I과 *Bgl*II로 이중 절단하여 약 4.5-kb의 유전자를 회수 후 SKII(+) 벡터에 옮겨 약 700개의 클론을 얻었다. 이 클론들을 대상으로 위의 PCR 산물을 탐침자로 이용하여 colony hybridization을 실시하였으며 그 결과 강한 신호를 나타내는 1개의 클론을 선별하였고, 선별된 클론 내에 존재하는 플라스미드를 pCTX75라 명명하였다. 그리고 재조합 플라스미드인 pCTX75를 각종 제한효소로 절단 후 제한효소 지도를 작성하였으며, 염기 서열 결정을 위한 각종 subclone을 제조하였다(Fig. 1).

콜레라 독소의 독력 측정

콜레라 독소의 독력은 대부분 토끼의 회장을 이용하여거나 CHO세포를 이용하여 수행되고 있다. 본 연구에서는 Guerrant 등(8)의 방법을 따라 CHO세포를 이용하여 콜레라 독소의 독력을 측정하였다. CHO세포는 원래 마디모양의 세포 형태를 가지고 있지만 콜레라 독소의 작용에 의해 가늘고 길어지게 된다. 이때 가로와 세로의 비율이 3대 1이상이 되면 독력이 있다고 판

단할 수 있다.

균주를 파쇄한 후 얻은 상층액을 효소액으로 이용하여 배양된 CHO 세포에 넣어 주었을 때 *E. coli* XL1-Blue(pCTX75), *E. coli* XL1-Blue(pCTX75-1) 그리고 *E. coli* XL1-Blue(pCTX7504-1)의 효소액을 넣은 세포들은 세포의 형태가 길어지는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 *V. cholerae* KNIH002와 *E. coli* XL1-Blue(pCTX7505-1)의 효소액을 넣은 세포들에서는 세포의 형태적 변화를 관찰할 수가 없었다.

이러한 결과는 야생주인 *V. cholerae* KNIH002의 경우 콜레라 독소는 세포질에서 하나의 A 단위체와 다섯 개의 B 단위체가 각각 합성된 후 periplasmic space를 거쳐 세포외로 분비된다. 그리고 A 단위체는 다시 세포 밖에서 A1과 A2로 나뉘어 A1이 adenylate cyclase를 활성화하는 역할을 한다. 즉, 생성된 콜레라독소는 외독소로서 세포외로 방출되기 때문에 야생주의 경우 세포내에 미량이 존재하여 독력이 나타나지 않은 것으로 추측된다. 그러나 대장균의 경우 *ctxAB* 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드가(pCTX75-1와 pCTX7504-1) 존재하더라도 대장균은 CtxA 및 CtxB를 세포외로 분비하는 분비체계가 없기 때문에 콜레라독소를 세포외로 방출하지 못하고 세포내에 가지고 있기 때문에 세포 파쇄액을 효소반응액으로 사용하였을 경우 독력이 나타난 것으로 생각된다. 그리고 *E. coli* XL1-Blue

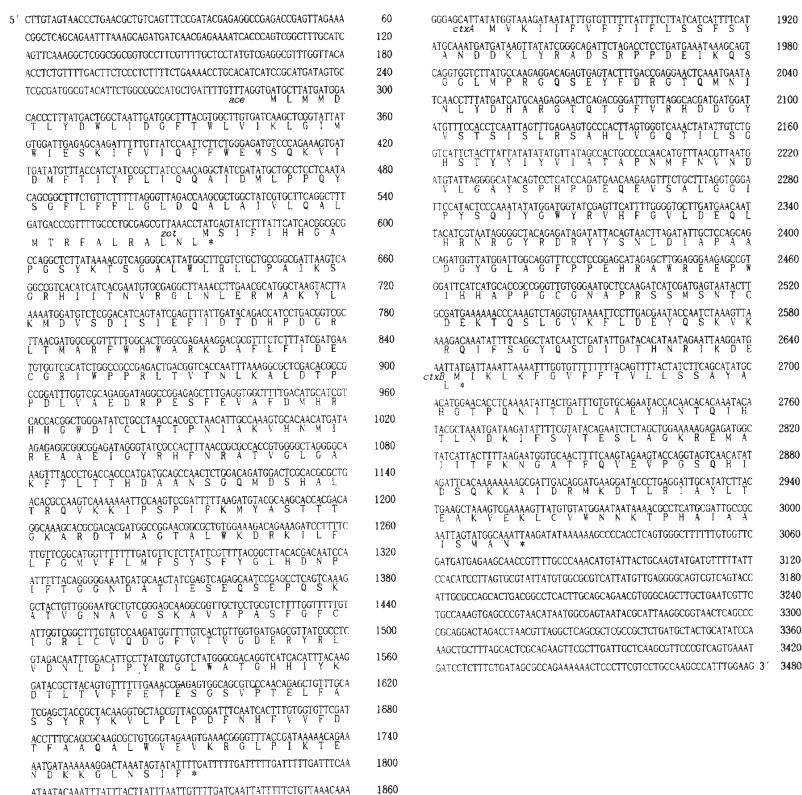


Fig. 2. Nucleotides sequence and deduced amino acids of the *ace*, *zot* and *ctxAB* genes.

(pCTX7505-1)는 콜레라독소를 생산하는 유전자인 *ctxA* 유전자를 포함하지 않기 때문에(Fig. 1) 독력이 나타나지 않은 것으로 생각된다.

독소 유전자 카세트의 염기서열 결정 및 상동성 검색

각종 subclone들을 이용하여 유전자의 염기서열을 결정하였으며(Fig. 2), 결정된 염기서열은 BLASTX 프로그램(15)을 이용하여 DATABASE에 수록되어 있는 유전자들과의 상동성 검색을 실시하였다. 그 결과 pCTX75는 클로닝 부위인 *Pst*I로부터 약 900 bp 정도의 위치에서 *ace*, *zot*, *ctxA* 그리고 *ctxB* 유전자 순으로 배열되어 있는 독성 유전자 카세트가 존재함을 확인하였다. 그리고 이 독성 유전자 카세트는 벡터의 프로모터 방향과 반대방향으로 삽입되어져 있었다.

Ace와 Zot 독소를 생산하는 유전자는 모두 ATG 개시코돈과 TGA 종결코돈으로 구성되어 있다. 그리고 각각의 유전자는 291 bp와 1,200 bp로 이루어졌으며, 유전자의 염기서열로부터 유추한 분자량은 각각 약 11.3 kDa와 44.9 kDa로 추정된다. 또한 Ace 독소를 암호화하는 유전자 말단의 2 bp는 Zot독소 생산 유전자의 개시코돈과 중복되어져 있었다(Fig. 3). 이 두 유전자의 염기서열을 비교분석한 결과 *ace* 유전자의 염기서열은 *V. cholerae* E7946 El Tor Ogawa에서 보고된 것(GenBank accession number Z22569)과 100% 일치하였지만, *zot* 유전자의 아미노산 및 염기 서열은 *V. cholerae* 395 Classical Ogawa에서 보고된 것(GenBank accession number M83653)과 각각 99%와 98.8%의 상동성을 보였다. 특히 *V. cholerae* 395 Classical Ogawa의 Zot를 구성하는 아미노산중 100번, 272번, 281번 위치의 alanine이 *V. cholerae* KNIH002에서는 모두 valine으로 이루어져있다. 그러나 alanine 및 valine은 모두 소수성 그룹(hydrophobic R group)에 속하는 아미노산이다.

콜레라를 일으키는 주원인인 콜레라 독소를 생산하는 *ctxA* 유전자의 경우 다른 그룹에서 발표한 아미노산 서열과 99%이상의 높은 상동성을 보였다. 그러나 염기서열에서는 아미노산의 서열보다 낮은 상동성을 보이고 있다(95-98%). *V. cholerae* KNIH002의 CtxB는 87번째의 아미노산은 aspartic acid인데 다른 그룹에서 발표한 CtxB의 아미노산은 모두 glutamic acid였다. 그러나 이들은 음전하(negatively charged R group)를 지니는 아미노산으로 서로 비슷한 성질을 가진다.

이러한 독소의 아미노산의 구성이 서로 다른 것은 이들이 분리된 지역에서 살아가는데 적합하게 변형된 것으로 추측되고, 이 아미노산 변화들이 이 독소의 독력에 어떠한 영향을 주는지에 관한 연구가 조금 더 진행되어져야 할 필요성이 있다고 사료된다.

본 연구의 최종 목표는 콜레라에 대한 백신개발이다. 외국의 경우 콜레라 독소의 B 단위체를 생산하는 유전자를 이용한 백신 후보주 제조에 관한 연구가 많이 진행되어져 왔다. 단순히 B 단위체만을 과발현시키거나 대장균이나 shiga 독소의 B 단위체를 생산하는 유전자와 재조합하여 백신후보주를 제조하는 연구가 활발히 진행되어져 왔다(1,6,8,14). 그러므로 본 연구에서 클로닝된 *ctxB* 유전자로부터 콜레라 독소의 B 단위체를 과발현

시켜 정제하거나, B 단위체를 생산하는 유전자를 다른 백신 군주 내로 도입하면 국내 기술로도 콜레라에 대한 일가 또는 다가백신의 개발이 가능하리라고 예상된다.

참고문헌

1. Acheson, D.W.K., M.M. Levine, J.B. Kaper, and G.T. Keusch. 1996. Protective immunity to shiga-like toxin I following oral immunization with shiga-like toxin I B-subunit-producing *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR. *Infect. Immun.* **64**, 355-357.
2. Baudry, B., A. Fasano, J. Ketley, and J.B. Kaper. 1992. Cloning of a gene (*zot*) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. *Infect. immun.* **60**, 428-434.
3. Guerrant, L.R., L.L. Brunton, T.D. Schnaitman, L.I. Reghun, and A.G. Gilman. 1974. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **10**, 320-327.
4. Jeffrey, H. Miller. 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
5. Johnson, J.A., J.G. Morris, Jr., and J.B. Kaper. 1993. Gene encoding zonula occludens toxin (*zot*) does not occur independently from cholera enterotoxin genes (*ctx*) in *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 732-733.
6. Lebens, M., V. Shahabi, M. Backstrom, T. Houze, M. Lindblad, and J. Holmgren. 1996. Synthesis of hybrid molecules between heat-labile enterotoxin and cholera toxin B subunits: potential for use in a broad-spectrum vaccine. *Infect. Immun.* **64**, 2144-2150.
7. Lockman, H. and J.B. Kaper. 1983. Nucleotide sequence analysis of the A2 and B subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *J. Biol. Chem.* **258**, 13722-13726.
8. Mart, B.F., J.W. Peterson, L.S. Thai, and R.A. Finkelstein. 1996. A nontoxic cholera enterotoxin (CT) analog is chimeric with regard to both epitopes of CT-B subunits, CT-B-1 and CT-B-2. *Infect. Immun.* **64**, 346-348.
9. Mekalanos, J.J., D.J. Swartz, G.D.N. Pearson, N. Harfors, F. Groyne, and M. de Wilde. 1983. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature* **306**, 551-557.
10. Michele, T., J.E. Galen, J. Michalski, A. Fasano, and J.B. Kaper. 1993. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 5267-5271.
11. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl. Acid. Res.* **8**, 4321-4325.
12. Sakazaki, R. and K. Tamura. 1971. Somatic antigen variation in *Vibrio cholerae*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **24**, 93-100.
13. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1993. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
14. Sanchez, J. and J. Holmgren. 1989. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 481-485.
15. Thompson, J.D., Gibson, T.J., F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided

- by quality analysis tools. *Nucl. Acid. Res.* **25**, 4876-4882.
16. Wachsmuth, K., P.A. Blake, and Ø Olsvik. 1994. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. ASM Press.
17. Waldor, M.K. and J.J. Mekalanos. 1994. Emergence of a new cholera pandemic: molecular analysis of virulence determinants in *Vibrio cholerae* O139 and development of a live vaccine prototype. *J. Infect. Dis.* **170**, 278-283.

(Received July 8, 1999/Accepted August 10, 1999)

ABSTRACT : Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of the Virulence Gene Cassette from *Vibrio cholerae* KNIH002 Isolated in Korea

Hee-Jung Shin, Yong-Chjun Park, and Young-Chang Kim*

(School of Life Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Vibrio cholerae is an important pathogenic organism that causes diarrhea in human beings. *V. cholerae* KNIH002 was isolated from patients suffering with diarrheal disease in Korea. From Southern hybridization using the amplified PCR product of 307 bp as a probe, which was obtained from PCR reaction using primer detecting cholera toxin gene, we have found that the *ctx* gene located in 4.5-kb fragment double digested with *Pst*I and *Bgl*II of the chromosome. Therefore, we made mini-libraries of the isolate using *Pst*I and *Bgl*II restriction endonuclease and pBluescript SKII(+) vector. As a result, we cloned 4.5-kb *Pst*I-*Bgl*II fragment containing the *ctx* gene encoding a cholera toxin from the constructed mini-libraries of *V. cholerae* KNIH002 by colony hybridization using the same probes. This recombinant plasmid was named pCTX75. *E. coli* XL1-Blue harboring pCTX75 showed the cytotoxicity on Chinese Hamster Ovary cells. From the sequencing of the cloned recombinant plasmid, we confirmed that it has virulence gene cassette consisting of *ace*, *zot*, *ctxA* and *ctxB* gene. The *ace* and *zot* genes were composed of 291 bp and 1,200 bp with ATG initiation codon and TGA termination codon, respectively. Nucleotide sequence of the *ace* gene exhibited 100% identity with that of *V. cholerae* E7946 El Tor Ogawa strains. But, nucleotide and amino acid sequence comparison of the *zot* gene exhibited 99% and 98.8% identity with that of *V. cholerae* 395 Classical Ogawa strain, respectively. Specially, the Ala-100, Ala-272 and Ala-281 sites of Zot polypeptide presented in *V. cholerae* 395 Classical Ogawa strain are replaced by Val in *V. cholerae* KNIH002.