

식품에서 *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* 및 *Staphylococcus aureus*의 직접검출을 위한 Multiplex PCR

윤장호 · 이수진 · 홍광원*
동국대학교 식품공학과

A Multiplex PCR Assay for the Direct Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Staphylococcus aureus* in Food

Jang Ho Yoon, Su Jin Lee and Kwang Won Hong*

Department of Food Science and Technology, Dongguk University

Abstract

A multiplex polymerase chain reaction method was developed for direct detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Staphylococcus aureus* in food. Specificities of 10 primer sets for *Salmonella* spp., 8 primer sets for *Y. enterocolitica*, and 7 primer sets for *S. aureus* were tested against numerous strains from 51 different bacterial species using singleplex PCR. Then the three primer pairs specific to the *invA* gene of *Salmonella* spp., the *ail* gene of *Y. enterocolitica*, and the *nuc* gene of *S. aureus* were combined to establish the multiplex PCR assay, and were applied to rapid detection of them in pure cultures and artificially inoculated milk. The detection limits of multiplex PCR were 1.6×10^3 , 7.0×10^4 , and 1.1×10^5 cfu/ml for *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica*, and *S. aureus*, respectively, in artificially inoculated milk without enrichment. Our multiplex PCR assay is rapid and specific, and may be applicable for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica*, and *S. aureus* strains in food without enrichment step.

Key words: *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, multiplex PCR, detection

서 론

식중독은 오염된 식품을 섭취함으로써 일어나는 질병으로 대량급식과 외식산업의 발달과 더불어 미생물에 의한 식중독 발생이 증가하는 추세에 있다. 그 중 *Salmonella*균과 *Staphylococcus aureus*는 식중독 발생의 주요 원인균이고(Halatsi, et al., 2006; Štěpán et al., 2001), 근래에는 사회적인 well-being 추세에 맞춰 가공되지 않은 채소나 샐러드의 소비가 급증하며 호저온성 세균인 *Yersinia enterocolitica*에 의한 발생도 증가하고 있다(Park et al., 2006).

*Salmonella*균은 형태학적, 생화학적 성상은 동일하지만 그 혈청형이 2,000여종 이상인 것으로 알려져 있다(Yeh et al., 2002). 이 균은 급성패혈증, 심한 위장염 증상과 발열, 구토를 동반하는 식중독균이며, 일반적으로 장관세포 내에 침입을 한 후 증식하는 것이 발병(salmonellosis)의 필수적인 과정이다(Yeh et al., 2002). *S. enteritidis*, *S. typhimurium*,

S. heidelberg, *S. newport*, *S. infantis*, *S. agona*, *S. montevideo*와 *S. saintpaul* 등이 주로 식중독을 일으키는 원인균으로 발견되어지고 있다(Chiu et al., 2005).

*Staphylococcus aureus*는 병원 내 감염의 주요 원인균 외에도 사람과 동물의 화농성 상처를 통해서 식품으로 오염되는 대표적인 독소형 식중독 균이다. 우리나라의 경우, 2003년도 국내 식중독 발생 통계에 따르면 *S. aureus*에 의한 식중독은 9.62%로 장염비브리오, *Salmonella* spp.에 이어 세 번째로 많이 발생한 식중독균이고, 세계적으로 주요한 식중독균의 하나이다(Jung et al., 2005). 또한, *S. aureus*는 주로 임상에서만 검출되었던 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)가 식품에서 분리되었다는 보고도 나오고 있어, 식품 취급자 및 소비자에게 MRSA에 의한 감염 발생 위험이 높아지고 있을 것으로 예상된다(Vannuffel et al., 1995).

*Yersinia enterocolitica*균은 냉장조건에서도 잘 생육하는 저온균으로서 인수공통병원균으로 돼지, 소, 닭, 양, 개 등의 동물과 원유, 유제품, 계란제품, 식육, 야채류 등의 식품 및 환경시료에서 다양하게 분리되었다(Park et al., 2006). 사람과 동물에서 복통, 발열, 설사, 두통, 구토를 수반한 급성위장염 증세를 나타내고 장관막 임파선염, 패혈증, 피부

Corresponding author: Kwang Won Hong, Department of Food Science and Technology, Dongguk University
Tel: 82-2-2260-3369 Fax: 82-2-2285-3988
E-mail: hkwon@dongguk.edu

의 결절성 홍반 및 다발성 관절염 등의 yersiniosis를 일으킨다(Kwaga et al., 1992; Jourdan et al., 2000).

따라서 식중독 발생의 주요 원인균인 *Salmonella* spp.,와 *S. aureus* 및 *Y. enterocolitica*에 의한 식중독 발생을 예방하거나 추후 확인을 위해 신속, 정확하게 검출할 수 있는 조기진단법의 개발이 필요하다. 일반적으로 식중독 균을 검출하는 방법에는 선택배지와 생화학적 실험 등이 사용되고 있으나 분석 결과를 얻는데 많은 노력과 시간이 소요되는 단점이 있다(Oliveira et al., 2002). 최근에는 분자생물학적인 기법을 이용하는 immunoassay, polymerase chain reaction (PCR), DNA hybridization 기법, DNA microarray 법 등이 식중독 균을 검출하는데 이용되고 있다. 이 중에서 대상 균주 염색체 DNA의 특정 염기서열을 증폭하여 생성된 DNA 단편의 크기를 확인하는 PCR 기법은 특이성과 민감성이 뛰어나고 특히 단시간에 검출이 가능하다는 장점이 있어 가장 많이 이용되고 있다(Oliveira et al., 2002).

현재 식중독균을 검출하기 위하여 단일 target을 대상으로 하는 각각의 singleplex PCR 검출법들이 다수 알려져 있다(Oh et al., 1999; Oliveira et al., 2002; Jung et al., 2003; Yeh et al., 2002). 본 연구에서는 기존의 singleplex PCR 법을 비교 검토하여 상기 세 가지 식중독균인 *Salmonella* spp.,와 *S. aureus* 및 *Y. enterocolitica*를 증균과정 없이 1회의 PCR 반응으로 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR 검출법을 구성하고 인위적으로 오염시킨 우유에서 적용가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 실험에 *Salmonella* spp. 21 균주, *S. aureus* 15 균주, *Y. enterocolitica* 1 균주 및 기타 12 균주를 포함하여 총 49 균주를 사용하였다(Table 1). *Salmonella*, *Staphylococcus* 및 *Yersinia* 배양을 위한 배지는 모두 Luria-Bertani 배지

Table 1. Bacterial strains used in this study

Bacterial species	Strain
<i>Salmonella enteritidis</i>	KCCM* 12021, KCTC* 12400
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	KCTC 2929, KCTC 2930, KCTC 2931, KCTC 2932, KCTC 2933, KCTC 2425, KCTC 12455
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	KCTC 12456
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	KCTC 12398
<i>Salmonella typhimurium</i>	KCTC 12399, KCTC 1925, KCTC 1926, KCTC 2053, KCTC 2054, KCTC 2055, KCTC 2057, KCTC 2058, KCTC 12401
<i>Salmonella bongori</i>	KCTC 12397
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM 41657
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC* 13565, ATCC 23235, ATCC 12598, ATCC 25923, ATCC 6538
<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ATCC 29970
<i>Staphylococcus intermedius</i>	ATCC 29663
<i>Staphylococcus muscae</i>	ATCC 49910
<i>Staphylococcus lentus</i>	ATCC 29070
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	ATCC 35539
<i>Staphylococcus equorum</i>	ATCC 43958
<i>Staphylococcus kloosii</i>	ATCC 43959
<i>Staphylococcus delphini</i>	ATCC 49171
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19113
<i>Listeria grayi</i>	ATCC 2540
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 2518
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29544
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 3624
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579
<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC 2213
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCCM 41654
<i>Rhodococcus equi</i>	KCTC 3134
<i>Escherichia coli</i> 0157: H7	ATCC 35150
<i>Escherichia coli</i> 0111	ATCC 43887

* Source of strains: KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms; KCTC, Korean Collection for Type Cultures; ATCC, American Type Culture Collection.

(tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%)를 사용하였다.

DNA 정제

식중독균 순수배양액의 DNA를 분리정제하기 위하여 대수기의 *Salmonella* spp., *S. aureus* 및 *Y. enterocolitica* 배양액을 각각 1 mL씩 취하여 13,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 얻은 pellet을 PowerPrep™ DNA Extraction kit (Kogenbiotech, Korea)를 이용하여 chromosomal DNA를 정제하고 100 μ l의 멸균증류수로 DNA를 용출하여 사용하였다. 추출된 DNA는 spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 정량하였다.

식중독균을 우유에 인위적으로 접종한 후 DNA를 분리정제하기 위하여 LB broth 8 mL에 우유 1 mL을 혼합 후 대수기의 식중독균 배양액을 1 mL씩 접종하였다. 접종된 시료는 증균배양 없이 1분간 충분히 혼합 후 각각 1 mL을 취하여 13,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 얻은 pellet으로부터 동일한 DNA 추출방법으로 chromosomal DNA를 정제하여 사용하였다.

Primer set

Salmonella spp. 특이적 primer set을 선정하기 위해 sen1/sen2 (Csordas et al., 2004), 139(1)/141(1) (Oliveria et al., 2002), Malo2-F/Malo2-Ra (Banavandi et al., 2005), Styinya-JHO-2-left/Styinya-JHO-2-right (Nam et al., 2005), stn-101/stn-111 (Ziemer and Steadham, 2003), SdiA1/SdiA2 (Halatsi et al., 2006), SipB/SipC (Ellingson et al., 2004), fimY1/fimY2 (Yeh et al., 2002), SHIMA-L/SHIMA-R (Bej et al., 1994), ITS-F/ITS-R (Chiu et al., 2005)를 포함한 총 10종의 primer set을 사용하였다. *S. aureus* 검출을 위해서 Sa442-1/Sa442-2 (Martineau et al., 1998), Pri1/Pri2 (Pinto et al., 2005), nuc-F/nuc-R (Park et al., 2006), FemB1/FemB2 (Roth et al., 2001), F1/F2 (Vannuffel et al., 1995), JIRS-2/JIRS-1 (tpn et al., 2001), coa-F2591/coa-R2794 (Cremonesi et al., 2005)를 포함한 총 7종의 primer set을 사용하였다. *Y. enterocolitica* 검출을 위해서 TM1-F/TM1-R (Jourdan et al., 2000), P1/P2 (Nakajima et al., 1992), ail-F/ail-R (Ramesh et al., 2002), ail Forward/ ail Reverse (Thoerner et al., 2003), A1/A2 (Oh et al., 1999), 20-mer/21-mer (Blais and Phillippe, 1995), 16SF/16SR (Sen, 2000), Y1/Y2 (Wannet et al., 2001) 를 포함한 총 8종의 primer set을 사용하였다.

PCR 조건

Salmonella spp., *S. aureus* 및 *Y. enterocolitica* 검출을 위해 최종 선별한 primer set들의 염기서열은 Table 2에 나타내었다

Singleplex PCR의 조성은 0.2 mL tube에 template DNA

1-5 μ L, 각 primer (10 pmol/ μ L) 2 μ l, 5 \times Taq buffer (with MgCl₂, 10 mM and dNTP 10 mM) 5 μ L와 Tap polymerase (1 unit/ μ L) 1 μ L를 넣은 후 최종 반응액이 25 μ L가 되도록 멸균 3차 증류수를 추가하였다. *Salmonella* spp., *S. aureus* 및 *Y. enterocolitica*의 동시 검출하기 위한 multiplex PCR의 조성은 0.2 mL tube에 각각의 template DNA 1-5 μ L와 적절한 농도의 각 primer 첨가를 제외하고는 singleplex PCR 조성과 동일하다.

Singleplex와 multiplex PCR 반응은 PCR Express thermocycler (Hybaid, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 2분간 실시 후, 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초를 1 cycle로 하여 총 35 cycle을 수행하였으며, 마지막 단계로 72°C에서 3분간 수행하였다. PCR product는 ethidium bromide를 포함한 2% agarose gel에서 전기영동하여 DNA 산물의 크기 및 양을 확인하였다.

검출한계 및 생균수조사

Singleplex PCR법과 multiplex PCR법으로 검출 가능한 최소 세균수를 알아보기 위하여 배양액 또는 인위적으로 접종한 우유에서 추출한 DNA를 단계적으로 10배씩 희석하여 PCR을 수행하였다. 또한 PCR과 동시에 단계적으로 희석한 시료액을 LB 고체배지에 도말하여 37°C에서 12 시간 배양 후 생균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

종 특이적 primer의 선정

Salmonella spp., *S. aureus* 및 *Y. enterocolitica* 각 균주의 특이적 검출을 위해 각 균주별 singleplex PCR을 수행하였다. *Salmonella* spp.의 경우 총 10종의 primer set 중 *invA* 유전자를 검출하는 4종의 primer set, *stn* 유전자를 검출하는 primer set 그리고 *sdiA* 유전자를 검출하는 primer set을 포함한 6종의 primer set들이 *Salmonella* spp. 특이적 반응을 나타냈다(Table 2). *S. aureus*의 경우 총 7종의 primer set 중 *nuc* 유전자를 검출하는 2종의 primer set과 *femB* 유전자를 검출하는 primer set을 포함한 3종의 primer set들이 *S. aureus* 특이적 반응을 나타냈다(Table 3). *Y. enterocolitica*의 경우 총 8종의 primer set 중 *ail* 유전자를 검출하는 4종의 primer set들이 *Y. enterocolitica* 특이적 반응을 나타냈다(Table 4).

위의 결과로부터 3균주에 대한 multiplex PCR 방법을 구성하기 위해 각 singleplex PCR의 특이성 및 증폭된 DNA 산물의 크기를 고려하여 *Salmonella* spp.는 *invA* (invasion) 유전자로부터 284 bp의 DNA 산물을 증폭시키는 139(1)/141(1) primer set (Oliveria et al., 2002), *S. aureus*는 *nuc* (nuclease) 유전자로부터 482 bp의 DNA 산물을 증폭시키는 nuc-F/nuc-R primer set (Park et al., 2006), 그

Table 2. Singleplex PCR detection of *Salmonella* spp. specific genes in various bacterial strains

Bacteria	Strain	Primer sets									
		invA				stn	sdiA	sipB-sipC	fimY	himA	16S-23S
		a*	b*	c*	d*	e*	f*	g*	h*	i*	j*
<i>Salmonella enteritidis</i>	KCCM 12021	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 12400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> <i>subsp. enterica</i>	KCTC 2929	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 2930	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 2931	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 2932	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 2933	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 2425	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 12455	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Salmonella enterica subsp. arizonae</i>	KCTC 12456	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica subsp. houtenae</i>	KCTC 12398	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Salmonella typhimurium</i>	KCTC 12399	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 1925	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 1926	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 2053	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 2054	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 2055	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 2057	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 2058	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	KCTC 12401	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Salmonella bongori</i>	KCTC 12397	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeriamonocytogenes</i>	ATCC 19113	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Listeria grayi</i>	ATCC 2540	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 2518	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29544	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM 41657	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 3624	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	KCCM 41654	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC 2213	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	ATCC 35150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Escherichia coli</i> O111	ATCC 43887	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
<i>Rhodococcus equi</i>	KCTC 3134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 13565	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

*a: sen1/sen2 (172bp), *b: 139(1)/141(1) (284bp), *c: Malo2-F/Malo2-Ra (373bp), *d: Styinya-JHO-2-left/ Styinya-JHO-2-right (119bp), *e: stn-101/stn-111 (260bp), *f: SdiA1/SdiA2 (274bp), *g: SipB/SipC (251bp), *h: fimY1/fimY2 (526bp), *i: SHIMA-L/SHIMA-R (120bp), *j: ITSf/ITSr (312bp)

리고 *Y. enterocolitica*의 경우 *ail* (attachment invasion locus) 유전자로부터 359 bp의 DNA 산물을 증폭시키는 *ail-F/ail-R* primer set (Ramesh et al, 2002)을 최종적으로 선정하였다(Table 5).

Multiplex PCR 검출법의 특이성

Salmonella spp., *Y. enterocolitica* 및 *S. aureus*를 동시에 검출하는 multiplex PCR의 최적조건을 구성하고 그 특이성을 조사하기 위하여 *Salmonella enteritidis* KCTC 12400,

Y. enterocolitica KCCM 41657, *S. aureus* ATCC 23235 균주 및 기타 6종의 식중독균(*Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157)의 DNA를 추출하여 단계적으로 희석한 후 각각 또는 혼합하여 singleplex PCR과 multiplex PCR을 수행하였다.

Multiplex PCR의 최적조건을 구성하기 위해 *invA*, *ail* 및 *nuc* primer sets의 농도를 각각 다르게 구성하여 비교 실험하였고(data not shown), 최종적으로 3종 primer set들의

Table 3. Singleplex PCR detection of *Staphylococcus aureus* specific genes in various bacterial strains

Bacteria	Strain	target gene						
		<i>S.aureus</i> -442 bp	nuc	femB	femA	<i>S.aureus</i> -2 kb	coa	
		a*	b*	c*	d*	e*	f*	g*
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 13565	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 23235	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 12598	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 6538	+	+	+	+	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	isolated-1	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	isolated-2	-	+	+	+	-	+	+
<i>Staphylococcus warneri</i>	ATCC 27836	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	ATCC 29970	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus intermedius</i>	ATCC 29663	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus muscae</i>	ATCC 49910	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus lentus</i>	ATCC 29070	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	ATCC 35539	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus equorum</i>	ATCC 43958	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus kloosii</i>	ATCC 43959	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus delphini</i>	ATCC 49171	-	-	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990	-	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19113	-	-	-	-	-	-	+
<i>Listeriagrai</i>	ATCC 2540	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigellasomei</i>	KCTC 2518	-	-	-	-	-	-	+
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-	-	-	-	-	-	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 12021	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29544	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 3624	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC 2213	-	-	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM 41657	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	KCCM 41654	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	KCTC 3134	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 0157: H7	ATCC 35150	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O111	ATCC 43887	-	-	-	-	-	-	-

*a: Sa442-1/Sa442-2 (108bp), *b: Pri1/Pri2 (270bp), *c: nuc-F/nuc-R (482bp), *d: FemB1/FemB2 (651bp), *e: F1/F2 (686bp), *f: JIRS-2/JIRS-1 (826bp), *g: coa-F2591/coa-R2794 (204bp)

농도를 각각 5 pmol, 60 pmol과 50 pmol로 설정하였다. 상기 세 균주에서 추출한 DNA에 대해 최적화된 multiplex PCR 법의 특이성을 조사한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 lane 4의 multiplex PCR 산물로 *Salmonella* 특이적인 284 bp (*invA*), *Y. enterocolitica* 특이적인 359 bp (*ail*)와 *S. aureus* 특이적인 482 bp (*nuc*)의 3개 DNA 단편이 증폭되었고 테스트한 6종의 기타 균주에 대해서는 어떠한 DNA 단편도 증폭시키지 않았다(lane 5-10). 따라서 singleplex PCR을 통해 선정된 3개의 primer set들이 3개 균주의 동시 검출을 위한 multiplex PCR에서도 다른 균주들에 대해 교차반응을 보이지 않아 multiplex PCR 법의 특이성을 확인할 수 있었다.

Singleplex PCR 방법의 검출한계

Salmonella spp., *Y. enterocolitica* 및 *S. aureus*의 종 특이적인 primer set를 이용하여 각 singleplex PCR법의 검출한계를 각각의 순수배양액과 인위적으로 접종 후 증균배양하지 않은 우유에서 조사하였다(Table 6).

Singleplex PCR을 이용한 *Salmonella enteritidis*, *Y. enterocolitica* 및 *S. aureus* 순수 배양액의 검출한계는 각각 4.7×10^3 , 1.9×10^3 및 3.3×10^3 CFU/mL 이었으며, 접종 후 배양하지 않은 우유에서는 각각 4.7×10^3 , 1.9×10^3 과 3.3×10^4 CFU/mL 수준까지 검출할 수 있었다. *Salmonella enteritidis*와 *Y. enterocolitica*는 배양액이나 우유에서 모두 동일한 검출한계를 보였으나, *S. aureus*의 경우 배양액에 비하여 우유에서의 민감도가 10배정도 감소하였다. 본 실

Table 4. Singleplex PCR detection of *Yersinia enterocolitica* specific genes in various bacterial strains

Bacteria	Strain	Primer sets							
		ail						16S rRNA	
		a*	b*	c*	d*	e*	f*	g*	h*
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM 41657	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19113	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Listeria grayi</i>	ATCC 2540	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 2518	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29544	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 3624	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	KCCM 41654	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 2213	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	ATCC 35150	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i> O111	ATCC 43887	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	KCTC 3134	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 13565	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	KCCM 12021	-	-	-	-	+	-	+	-

*a: TM1(forwad)/TM1(reverse) (91bp), *b: P1/P2 (170bp), *c: ail-F/ail-R (359BP), *d: ail Forward/ail Reverse (351bp), *e: A1/A2 (298bp), *f: 20-mer/21-mer (315bp), *g: 16SF/16SR (201bp), *h: Y1/Y2 (330bp)

Table 5. Sequences of primers used in multiplex PCR

Bacteria	Primer	Sequence(5'→3')	Target gene	Amplicon size (bp)
<i>Salmonella</i> spp.	139(1)	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	<i>invA</i>	284
	141(1)	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ail-F	CTATTGGTTATGCGCAAAGC	ail	359
	ail-R	TGCAAGTGGGTTGAATTGCA		
<i>Staphylococcus aureus</i>	nuc-F	GAAAGGGCAATACGCAAAGA	nuc	482
	nuc-R	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		



Fig. 1. Electrophoresis of PCR fragments from multiplex PCR. Singleplex PCR product using each of three primer sets was used as a positive control (lanes 1 to 3). Lane M, 100-bp ladder; lane 1, *Salmonella enteritidis*; lane 2, *Y. enterocolitica*; lane 3, *S. aureus*; lane 4, *Salmonella enteritidis*, *Y. enterocolitica*, and *S. aureus*; lane 5, *Listeria monocytogenes*; lane 6, *Shigella flexneri*; lane 7, *Vibrio parahaemolyticus*; lane 8, *Bacillus cereus*; lane 9, *Enterobacter sakazakii*; lane 10, *Escherichia coli* O157:H7; lane 11, no template control.

험의 우유에서 *Salmonella enteritidis*에 대한 검출한계의 경우, 역시 *Salmonella* spp.를 인위적으로 여러 식품에 접종 후 증균배양을 하지 않고 10³-10⁴ CFU/g까지 검출한 사례(Jung et al., 2003)와 유사한 결과를 나타내었다.

Multiplex PCR 방법의 검출한계

Multiplex PCR 방법으로 동시검출이 가능한 *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica* 및 *S. aureus*의 최소 세균수를 조사하기 위해 순수 배양액과 인위적으로 접종 후 증균배양하지 않은 우유에서 multiplex PCR을 수행하였다. 순수배양액의 경우 대수기의 각 배양액을 1 mL씩 혼합한 후 그중 1 mL을 취하여 DNA를 분리정제 후 template DNA로 사용하였다. 우유는 대수기의 각 배양액 1 mL, 우유 3 mL과 배지 24 mL을 혼합 후 1 mL을 취하여 DNA를 추출하여 template DNA로 사용하였다.

순수배양액에서 multiplex PCR의 검출한계는 Table 7에서 보는 것과 같이 *Salmonella enteritidis*는 1.6×10³ CFU/mL, *Y. enterocolitica*는 7.0×10³ CFU/mL 그리고, *S. aureus*는 1.1×10⁴ CFU/mL 수준까지 검출할 수 있었다. 접종 후 배양하지 않은 우유에서는 각각 1.6×10³, 7.0×10⁴ 및 1.1×10⁵ CFU/mL까지 검출할 수 있었다. *Salmonella enteritidis*의 경우 배양액이나 우유에서 모두 동일한 검출한계를 보

Table 6. Detection limits of the singleplex PCR assay

Bacteria	Detection level (CFU/mL)	Pure culture	Artificially inoculated milk
<i>Salmonella enteritidis</i>	4.7×10^7	+	+
	4.7×10^6	+	+
	4.7×10^5	+	+
	4.7×10^4	+	+
	4.7×10^3	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4.7×10^2	-	-
	1.9×10^7	+	+
	1.9×10^6	+	+
	1.9×10^5	+	+
	1.9×10^4	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.9×10^3	+	+
	1.9×10^2	-	-
	3.3×10^7	+	+
	3.3×10^6	+	+
	3.3×10^5	+	+
	3.3×10^4	+	+
	3.3×10^3	+	-
3.3×10^2	-	-	

Table 7. Detection limits of the multiplex PCR assay

Bacteria	Detection level (CFU/mL)	Pure culture	Artificially inoculated milk
<i>Salmonella enteritidis</i>	1.6×10^7	+	+
	1.6×10^6	+	+
	1.6×10^5	+	+
	1.6×10^4	+	+
	1.6×10^3	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1.6×10^2	-	-
	7.0×10^6	+	+
	7.0×10^5	+	+
	7.0×10^4	+	+
	7.0×10^3	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.0×10^2	-	-
	7.0×10^1	-	-
	1.1×10^7	+	+
	1.1×10^6	+	+
	1.1×10^5	+	+
	1.1×10^4	+	-
	1.1×10^3	-	-
	1.1×10^2	-	-

였으나, *Y. enterocolitica*와 *S. aureus*는 배양액에 비하여 우유에서의 민감도가 10배씩 감소하는 것으로 나타났다. 이 검출 수준은 우유에 인위적으로 *Y. enterocolitica*와 *S. aureus*를 접종하여 duplex PCR을 수행한 결과, 2균주 모두 10^4 CFU/mL까지 검출이 가능하였다는 보고와 비슷하다(Ramesh et al., 2002).

일반적으로 PCR 법의 민감도는 배양액보다는 식품에 적용할 때 감소하는 경향이 있다(Alarcon et al., 2005). 본

실험에서 singleplex PCR과 마찬가지로 multiplex PCR 법에서도 순수 배양액에 비해 우유에서 민감도가 낮은 경향을 보였다. 이러한 결과는 우유와 균을 혼합 후 균을 회수하는 과정에서의 회수율이 감소하거나, 또는 우유에 많이 들어 있는 양이온, 단백질가수분해효소, 핵산가수분해효소 및 지방산 등이 PCR 저해물질로 작용할 수 있으므로(Lee and Fairchild, 2006), 이러한 요인들에 의해 PCR 반응의 효율이나 민감도가 감소하기 때문인 것으로 추정된다.

본 실험에서 *Salmonella* spp.의 *invA*, *Yersinia enterocolitica*의 *ail* 및 *Staphylococcus aureus*의 *nuc* 유전자를 target으로 하여 세 식중독균을 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR법을 확립하고자 하였으며 우유 이외에도 다른 식품 중에서 식중독균들을 신속하고 정확하게 검출하는데 활용이 가능할 것으로 보인다.

요 약

식품에서 *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* 및 *Staphylococcus aureus*를 동시에 신속 정확하게 검출할 수 있는 multiplex PCR 방법을 개발하였다. Singleplex PCR을 이용하여 *Salmonella* spp.에 특이적인 10개의 primer set, *Y. enterocolitica*에 특이적인 8개의 primer set 및 *S. aureus*에 특이적인 7개의 primer set들을 총 51종의 세균에 대해 특이성을 확인하였다. 그 중에서 *Salmonella* spp.의 *invA* 유전자, *Y. enterocolitica*의 *ail* 유전자 그리고 *S. aureus*의 *nuc* 유전자에 특이적인 3개의 primer set로 multiplex PCR 방법을 구성하고 순수배양액과 인위적으로 접종한 우유에서 이 균들을 검출하는데 적용하였다. 인위적으로 접종 후 증균배양하지 않은 우유에서 multiplex PCR 방법은 *Salmonella* spp. *Y. enterocolitica*, 그리고 *S. aureus*에 대해 각각 1.6×10^3 , 7.0×10^4 , 및 1.1×10^5 CFU/mL 까지 검출할 수 있었다. 본 실험의 multiplex PCR 방법은 신속하고 정확하며 증균과정 없이 식품에서 *Salmonella* spp., *Y. enterocolitica*, 및 *S. aureus* 균주들을 동시에 검출하는데 활용할 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 서울시 산학연 협력사업(10636)의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Alarcon B., Vicedo B. and Aznar R. 2005. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. J. Appl. Microbiol. **100(2)**: 352-364
- Banavandi M.J.S., Shahhosseiny M.H., Shahbazzadeh D., Karimi V., Mirzahoseini H., Mahboudi F., Abachi M. and Javadi G.

2005. Selective amplification of *prt*, *tyv* and *invA* genes by multiplex PCR for rapid detection of *Salmonella typhi*. Iranian Biomedical Journal. **9(3)**: 135-138
- Bej A.K., Mahbubani M.H., Boyce M.J. and Atlas R.M. 1994. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. Appl. Environ. Microbiol. **60(1)**: 368-373
- Blais B.W. and Phillippe L.M. 1995. Comparative analysis of *yadA* and *ail* polymerase chain reaction methods for virulent *Yersinia enterocolitica*. Food Control. **6(4)**: 211-214
- Chiu T.H., Chen T.R., Hwang W.Z. and Tsen H.Y. 2005. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. Int. J. Food Microbiol. **97(3)**: 259-265
- Cremonesi P., Luzzana M., Brasca M., Morandi S., Lodi R., Vimercati C., Agnellini D., Caramenti G., Moroni P. and Castiglioni B. 2005. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Molecular and Cellular Probes. **19(5)**: 299-305
- Csordas A.T., Barak J.D. and Delwiche M.J. 2004. Comparison of primers for the detection of *Salmonella enterica* serovars using real-time PCR. Lett. Appl. Microbiol. **39(2)**: 187-193
- Ellingson J.L.E., Anderson J.L., Carlson S.A. and Sharma V.K. 2004. Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products. Molecular and Cellular Probes. **18(1)**: 51-57
- Halatsi K., Oikonomou I., Lambiri M., Mandilara G., Vatopoulos, A. and Kyriacou, A. 2006. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdhA*. FEMS Microbiol. Lett. **259(2)**: 201-207
- Jourdan A.D., Johnson S.C. and Wesley I.V. 2000. Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the *ail* gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Appl. Environ. Microbiol. **66(9)**: 3750-3755
- Jung H.J., Cho J.I., Park S.H., Ha S.D., Lee K.H., Kim C.H., Song E.S., Chung D.H., Kim M.G., Kim K.Y. and Kim K.S. 2005. Genotype and phenotype characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from lettuces and raw milk. Korean J. Food Sci. Technol. **37(1)**: 134-141
- Jung S.H., Kim M.Y., Kim H.J., Kim T.W., Ryu S.R. and Kim H.Y. 2003. Rapid detection of *Salmonella* species in foods using PCR. J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol. **46(3)**: 225-228
- Kwaga J., Iversen J.O. and Misra V. 1992. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled polynucleotide probed. Appl. Environ. Microbiol. **30(10)**: 2668-2673
- Lee M.D. and Fairchild A. 2006. Sample preparation for PCR. In: PCR methods in foods. Maurer JJ (ed). Springer, New York, NY, USA. Pp. 41-50
- Martineau F., Picard F.J., Roy P.H., Ouellette M. and Bergeron M.G. 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. **36(3)**: 618-623
- Nakajima H., Inoue M., Mori T., Itoh K. Arakawa E. and Watanabe H. 1992. Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by improved polymerase chain reaction method. J. Clin. Microbiol. **30(9)**: 2484-2486
- Nam H.M., Srinivasan V., Gillespie B.E., Murinda S.E. and Oliver S.P. 2005. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. Int. J. Food Microbiol. **102(2)**: 161-171
- Oh H.J., Sohn Y.W., Hong S.H. and Min H.K. 1999. Study on the development of a rapid detection method for pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by nested polymerase chain reaction. J. Korean Soc. Microbiol. **34(2)**: 175-187
- Oliveira S.D., Santos L.R., Schuch D.M.T., Silva A.B., Salle C.T.P. and Canal C.W. 2002. Detection and identification of salmonella from poultry-related samples by PCR. Vet. Microbiol. **87(1)**: 25-35
- Park S.H., Kim H.J. and Kim H.Y. 2006. Simultaneous detection of *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, and *Shigella* spp. in lettuce using multiplex PCR method. J. Microbiol. Biotechnol. **16(8)**: 1301-1305
- Pinto B., Chenoll E. and Aznar R. 2005. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. Syst. Appl. Microbiol. **28(4)**: 340-352
- Ramesh A., Padmapriya B.P. and Varadaraj M.C. 2002. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. Molecular and Cellular Probes. **16(4)**: 307-314
- Roth E.P., Martin F.C., Villar J. and Álvarez S.M. 2001. Multiplex PCR for Simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection methicillin and mupirocin resistance. J. Clin. Microbiol. **39(11)**: 4037-4041
- Sen K. 2000. Rapid identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by the 5'nuclease PCR assay. J. Clin. Microbiol. **38(5)**: 1953-1958
- Štěpán J., Pantůček V., Rosypal S., Hájek V. and Doškař J. 2001. Identification of *Staphylococcus aureus* based on PCR amplification of species specific genomic 826bp sequence derived from a common 44-kb *smal* restriction fragment. Molecular and Cellular Probes. **15(5)**: 249-257
- Thoerner P., Kingombe C.I., Stuber K.B., Choizat B.B., Wassenaar T.M., Frey J. and Jemmi T. 2003. PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. Appl. Environ. Microbiol. **69(3)**: 1810-1816
- Vannuffel P., Gigi J., Ezzedine H., Vandercam B., Delmee M., Wauters G. and Gala J.L. 1995. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. **33(11)**: 2864-2867
- Wannet W.J.B., Reessink M., Brunings H.A. and Maas H.M.E. 2001. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a rapid and sensitive duplex PCR assay. J. Clin. Microbiol. **39(12)**: 4483-4486
- Yeh K.-S., Chen T.-H., Liao C.-W., Chang C.-S. and Lo H.-C. 2002. PCR amplification of the *Salmonella typhimurium*, *fimY* gene sequence to detect the *Salmonella* species. Int. J. Food Microbiol. **78(3)**: 227-234
- Ziemer C.J. and Steadham S.R. 2003. Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. Lett. Appl. Microbiol. **37(6)**: 463-469