

식중독 세균 5속을 검출하기 위한 4개 주요 REP-PCR 반응성분의 최적화

서현아 · 박성희 · 송대식 · 김근성
중앙대학교 산업과학대학 식품공학과

Optimization of 4 Major REP-PCR Components to Detect 5 Food-borne Pathogenic Bacterial Genera

Hyun-Ah Seo, Sung-Hee Park, Dae-Sik Song and Keun-Sung Kim
Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

Abstract

This experiment was conducted to optimize REP (repetitive extragenic palindromic sequence)-PCR reaction conditions in order to simultaneously differentiate the five different foodborne pathogenic bacterial genera of *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* and *Listeria*. The four major PCR cocktail components of $MgCl_2$, dNTPs, primers and template DNA were considered and their optimum concentrations were determined using six reference strains. The optimized concentration of $MgCl_2$ was determined to be 2.5 mM in order to obtain a consistent fingerprinting pattern. The similar fingerprinting pattern was obtained when REP primers and dNTPs were added up to the concentrations of 2 μM and 200 μM , respectively. As for template DNA, the numbers of PCR fragments were not mostly affected, but their intensities were slightly increased as the concentrations of the DNA were increased from 2 times to 5 times.

Key words: foodborne pathogenic bacteria, optimization, REP-PCR components

서 론

미생물에 의한 식중독은 다른 여러가지 화학적, 물리적 원인들로 인해 발생할 수 있는 식중독들에 비해 전염 유발이나 식중독발생의 징후는 나타나지 않으면서 다른 지역으로의 확산등을 초래할 수 있기 때문에 많은 관심과 관리가 필요한 질병이라 할 수 있다. 과거와 비교할 때, 급속한 국내 식생활의 서구화와 단체급식의 확산은 점차 외래 식중독 원인균의 유입이나 확산으로 인한 피해를 증가시키고 있다. 이에 따라 국내의 식품위생에 대한 관심과 주의가 점차 높아지고 있으며 식중독 원인균에 대한 관리와 오염원 추적등의 방법에 대한 확립이 시급한 현실이다. 여러 식중독 유발세균들 중에서

Salmonella, *Escherichia*, *Vibrio*, *Shigella*, *Listeria*, *Staphylococcus*의 6속의 병원성 세균들은 식중독 유발에 있어 가장 흔한 원인미생물들이다. 이러한 식중독 유발세균들을 분리·동정하기 위한 분자생물학적인 방법으로 반복적 염기서열을 이용한 PCR (polymerase chain reaction)법을 응용한 연구가 최근 대두되고 있다(Clark *et al.*, 1998; Dalla-Costa *et al.*, 1998; Dombek *et al.*, 2000; Jersek *et al.*, 1999; Johnson *et al.* 2000).

원시핵 세포의 genome상에는 반복되는 DNA sequence들이 간헐적으로 분산되어 있다. 산재된 반복성 sequence들은 전형적으로 15~수백 개의 염기쌍으로 구성되며 세균 염색체 상에 널리 분포되어 있다(Lupski *et al.*, 1998). 이러한 산재된 반복성 sequence를 함유하는 probe를 이용한 genome fingerprinting 방법은 각 세균 균주들에 있어서 반복성 sequence들 사이의 위치가 다르다는 점을 이용하여 상호연관성이 있는 균주들끼리 구분하여 구별할 수 있다. 결과적으로 PCR 반응 후 얻어지는 DNA 단

Corresponding author: Keun-Sung Kim, Dept. of Food Sci. & Tech., Chung-Ang Univ., Nae-ri 72-1, Daeduk-myun, Ansung, Kyunggi-do 456-756, Korea
Phone: +82-31-670-3032 Fax: +82-31-675-4853
E-mail: keunsung@post.cau.ac.kr

편들의 크기와 숫자의 차이점을 이용하여 각기 다른 세균 균주들에 대하여 각기 다른 DNA fingerprinting pattern들이 얻어질 수 있는 것이다(Rivera *et al.*, 1992). 이러한 보존된 반복성 DNA sequence들의 예로서는 REP(repetitive extragenic palindromic) sequence(Higgins *et al.*, 1982), ERIC(enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequence(Hulton *et al.*, 1992), 그리고 BOX sequence(Martin *et al.*, 1992) 등이 있다. 이들 반복성 DNA sequence들 중에서 5 bp의 유동적인 loop구조를 포함한 38 bp palindromic unit들로 이루어져 있는 REP(repetitive extragenic palindromic) sequence들은(Higgins *et al.*, 1982) 염색체 상에서 non-coding 부위에 위치하며 그들의 염색체상의 위치는 종(species)마다 각기 다르고, 전사 방향과 비교하여 방향성(orientation)에 있어서 같은 방향 혹은 반대방향에 관계없이 염색체 상에 위치할 수 있다. 반복성 DNA sequence의 초기연구단계에서는 *E. coli*와 *S. typhimurium*과 같이 서로 연관성이 있는 그람음성 장내세균들에서 이러한 sequence들이 발견되었으나, 그후 연구결과에 의하면 이들 반복성 DNA sequence들은 모든 연관된 그람음성 장내세균들 뿐만 아니라 많은 계통분류체 계상 서로 연관성이 없는 다양한 문(phyla)들에 속하는 많은 세균들에서도 보존되어 발견되었다(de Bruijn, 1992). 그러므로 이러한 반복성 염기서열들은 여러 속(genus)들에 대한 적용뿐만 아니라 각 속(genus)내에서나 균주수준에서의 유전적인 연관성을 구별하는데 이용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 이러한 REP DNA sequence를 이용한 REP-PCR을 이용하여 주요 식중독 유발세균인 *Salmonella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Listeria*의 6속의 병원성세균의 fingerprinting pattern을 결정하는 과정에서 REP-PCR 반응을 일으키기 위한 반응성분들 중 주요 4가지 성분들인 MgCl₂, dNTPs, primer, 주형 DNA의 농도에 따른 fingerprinting pattern을 비교·분석하여 DNA 증폭반응에 영향을 미칠 수 있는 각 PCR 구성성분들의 최적 농도를 결정하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 기기

연구에 사용된 균주(Table 1)의 배양은 LB media (Luria-Bertani: bacto tryptone 10 g/l, bacto yeast

Table 1. Strains used in this study

strain	
name	Gram staining type
<i>Salmonella typhi</i> Ty2 ATCC 19430	-
<i>E. coli</i> H10407	-
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 35150	-
<i>Vibrio cholerae</i> NIH 35A3	-
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903	-
<i>Listeria monocytogenes</i> HPB#3	+

extract 5 g/l, NaCl 10 g/l)를 사용하였고, 실험에 사용된 lysozyme, SDS, sarkosyl, proteinase K, chloroform, ethidium bromide는 Sigma-Aldrich, Inc.에서 구입하였으며, RNase A는 QIAGEN Inc., phenol과 agarose는 QUANTUM Biotechnologies에서, ammonium acetate는 KANTO Chemical Co.에서, ethanol은 MERCK Co.에서 구입하였다. PCR에 사용된 Taq. DNA polymerase와 primer는 Bioneer에서 합성 및 구입하였고, PCR 기계는 MJ research, Inc.의 PTC-100을 사용하였다. 전기영동 kit는 비전 과학, 1kb DNA ladder는 GIBCO-BRL Laboratories 제품을 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분자생물학용, ACS grade, extra pure grade 또는 특급시약을 사용하였다.

Total DNA 추출

5 ml의 LB 배지에 7종의 균주를 접종하여 37°C 항온기에서 24시간정도 배양 후, 15,000rpm으로 5분간 원심분리하여 수확, 1 ml의 1M NaCl을 넣어서 2회 세척하고 같은 조건으로 원심분리하여 균체를 수확 후 500 µl의 1×TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)를 넣어서 현탁시켰다. 현탁된 세포에 100 µl의 lysozyme(2mg/ml)과 20 µl의 RNase A(10mg/ml)를 넣어서 37°C에서 30분간 방치한 후, lysozyme으로 분해가 안됐을 경우 50 µl의 SDS(10%)를 가한다(Gram 양성균의 경우, *Staphylococcus*는 10 µl의 lysostaphin(1 mg/ml), *Listeria*는 10 µl의 mutanolysin (1 mg/ml)을 가한다). 이 현탁액에 50 µl의 proteinase K(10 mg/ml)를 가한 후 37°C에서 1시간동안 반응시켰다(Gram 음성균은 100 µl의 sarkosyl (10%)을 더 첨가한다). 분해된 세포현탁액에 동량의 phenol을 가하여 혼합하고 15,000rpm으로 5분간 원심분리하여 수용액층을 분리한 후 동일과정을 2회 반복하고, 최종적으로 얻은 수용액층에 동량의 chloroform을 넣

어서 혼합 후 같은 조건으로 원심분리 하여 상등액을 얻었다. 상등액에 0.5배 부피의 1M ammonium acetate와 2.5배 부피의 99% 에탄올을 넣어서 -70°C에 60분간 방치한 다음 15,000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 침전물을 건조시키고 여기에 50 µl의 1×TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)를 넣어서 DNA를 용해하였다(Versalovic *et al.*, 1991).

PCR 반응 조건

PCR 반응액의 조성은 5 µl 10×Tris함유 반응 buffer(pH 9.0), 표적 DNA, primer, MgCl₂, dNTPs와 1unit의 Taq DNA polymerase를 혼합한 후 멸균된 증류수로 전체부피를 50 µl로 맞추었다. Primer로는 REPIR-I(5'-IIIICGICGICATCIGGC-3')과 REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3')를 사용하였다[Versalovic *et al.*, 1994]. 각각의 실험을 위하여 PCR 구성성분 중 MgCl₂, dNTPs, primer, 주형 DNA를 변수로 하여 다음과 같이 각각의 농도를 설정하였다(Table 2). MgCl₂변수는 각 PCR tube 당 농도를 0 mM, 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM로 설정하였고 dNTPs는 200 µM, primer는 2.0 µM, DNA는 1 µl로 고정하였다. dNTPs변수의 경우는 0 µM, 50 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM, 250 µM로 각 농도를 설정하고 MgCl₂는 2.0mM, primer는 2.0 µM, DNA는 1 µl로 고정하였다. Primer변수는 0 µM, 0.5 µM, 1.0 µM, 1.5 µM, 2.0 µM, 2.5 µM로 설정하였고 MgCl₂는 2.0 mM, dNTPs는 200 µM, DNA는 1 µl로 고정하였다. 주형 DNA변수는 0 µl, 0.25 µl, 0.5 µl, 0.75 µl, 1.0 µl, 1.25 µl로 설정하고 MgCl₂는 2.0 mM, dNTPs는 200 µM, primer는 2.0 µM로 고정하였다.

PCR의 반응조건은 예비 변성(pre-denaturation) 단계 94°C에서 7분, 변성(denaturation) 단계 94°C에서 1분, 냉각(annealing) 단계 40°C에서 1분, 연장(extension) 단계 72°C에서 3분이며 변성, 냉각, 연장의 단계를 30회 반복 실시하였고, 후 연장(post-

extension) 단계로 72°C에서 5분간 유지 시켰다.

Agarose 전기영동

증폭된 DNA 산물 10 µl를 취하여 2.5 µl의 agarose 전기영동용 5×loading buffer(60% glycerol, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol, in 1×TAE)와 섞은 후 1 ml 50×TAE buffer(242 g tris base, 57.1 ml glacial acetic acid, 100 ml 0.5M EDTA)와 0.5 g agarose에 증류수를 가하여 제조한 50 ml 1% agarose gel에 주입하여 100V 전압으로 1×TAE running buffer하에서 전기영동을 실시하였고, 실시 후 ethidium bromide 용액(0.5 µg/ml)에 30분간 담근 후 자외선등으로 DNA를 관찰하고 즉석 사진을 찍었다.

결과 및 고찰

MgCl₂ 농도 결정

MgCl₂의 역할은 double strand인 주형 DNA와 증폭된 산물 DNA의 denaturation과 primer의 annealing을 도우며, Taq DNA polymerase의 보조인자로서도 작용을 한다(Sambrook *et al.*, 1989). MgCl₂의 농도를 다르게 설정하여 6species의 식중독 유발균주를 적용해본 결과, 반응이 일어날 수 있는 한계농도의 범위가 매우 다양하게 나타났다. *Listeria*균주가 0.5 mM의 MgCl₂농도에서 반응이 일어난 것에 비해 *Salmonella*와 *Vibrio*는 1.5 mM의 농도에서 최초로 단편이 생성되었다. 이러한 현상은 primer나 주형 DNA에 EDTA나 chelating agent가 존재할 경우 MgCl₂의 역할을 방해할 수 있기 때문에(Innis *et al.*, 1992) 균주마다 DNA 추출과정 중 잔류된 EDTA의 양이 다르므로 MgCl₂의 적용농도에 따른 증폭반응 유발 정도에 있어 차이를 보이고 있다고 할 수 있다. *Salmonella*는 1.5 mM부터 거의 fingerprinting pattern 전체에 해당하는 단편수를 보였고 2.0 mM에서 더 이상의 단편수 증가는 관찰되지 않았다. *E.*

Table 2. Concentrations of each ingredient varied for PCR reactions

ingredients	tube numbers					
	1	2	3	4	5	6
MgCl ₂ (mM)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
dNTP (µM)	0	50	100	150	200	250
primer (µM)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
DNA (µl)	0	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25

*coli*는 0.6kb, 0.7kb를 중심으로 적용농도에 따라 단편의 수와 강도가 증가하였고, *E. coli* O157:H7은 1.0mM에서 0.7kb가 증폭되었고 2.0mM부터 증폭된 단편의 수는 증가하지 않았다. *Vibrio*는 0.5kb의 단편을 중심으로 0.2kb에서 최대 4.0kb의 범위까지 단

편이 생성되었고, *Shigella*는 1.0 mM에서 0.6kb, 0.7kb를 중심으로 단편수와 강도가 점차 증가하였다. *Listeria*는 0.5 mM을 적용하였을 때도 아주 강도가 높은 단편을 0.7kb부근에서 얻을 수 있었다 (Fig. 1). MgCl₂는 음성을 띠는 dNTPs의 첨가로 인

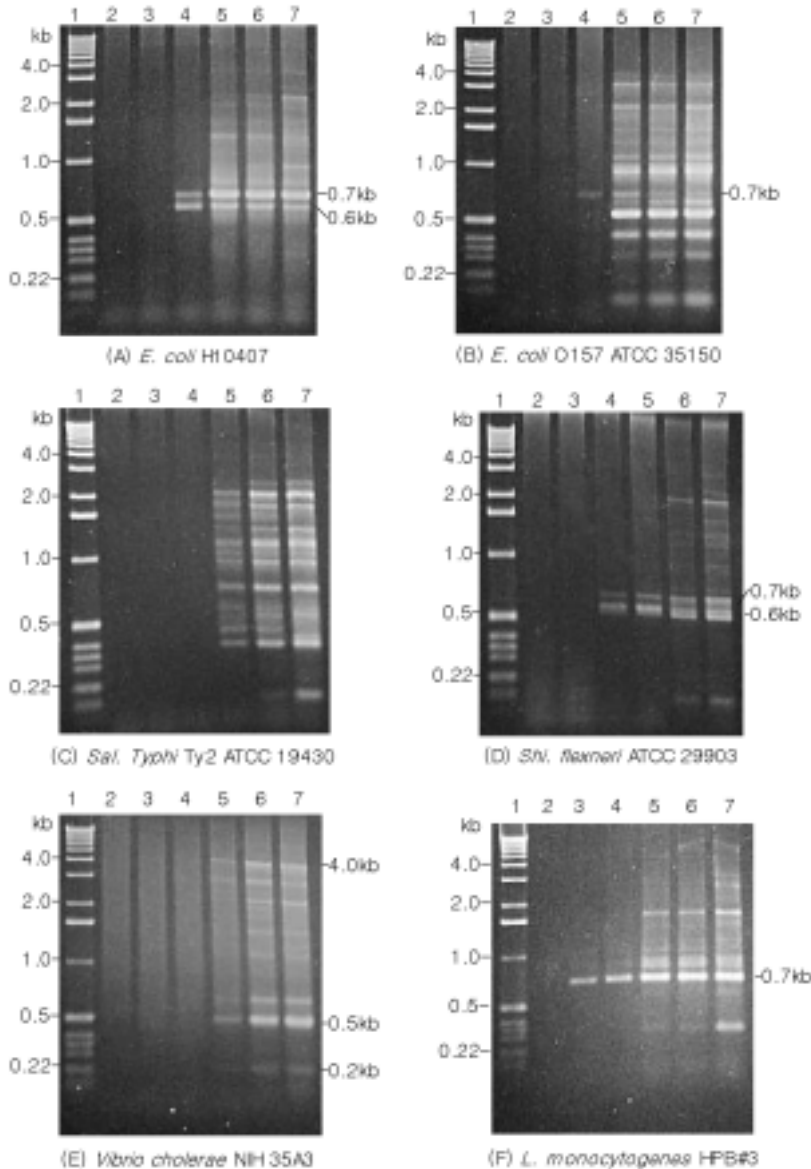


Fig. 1. Fingerprinting patterns shown as the concentrations of MgCl₂ increase: Panels A to Panel F represent fingerprinting pattern of seven species. Panel A: *E. coli* H10407, Panel B: *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, Panel C: *Sal. typhi* Ty2 ATCC 19430, Panel D: *Shi. flexneri* ATCC 29903. Panel E: *V. cholerae* NIH 35A3, Panel F: *L. monocytogenes* HPB#3. Lane 1 showed 1kb DNA ladders. The concentrations of MgCl₂ for each PCR reaction increased with an increment of 0.5 mM from 0mM (lane 2) to 2.5 mM (lane 7). The other ingredients consisted of primers (2.0 μM), dNTPs (200 μM) and template DNA (1.0 μl) for PCR reaction.

해 반응액의 pH가 상승하는 것을 막아주는 역할을 한다. 그렇기 때문에 $MgCl_2$ 의 농도를 최적화하기 위해서는 dNTPs의 양을 고려하여 적용하여야 한다 (Innis *et al.*, 1992). Lin 등(Lin *et al.*, 1996)은 *Salmonella*를 이용한 그들의 연구에서 dNTPs의 농도가 200 μM 일 때 $MgCl_2$ 의 농도를 3.5 mM로 최적화 하여 제안한바 있다. 그러나 본 연구에서는 단일 속의 균주가 아닌 5속, 6종의 균주를 이용하여 실험한 결과, $MgCl_2$ 의 농도가 2.0 mM과 2.5 mM일 때, 균주들의 fingerprinting pattern의 변화가 없거나 적은 것으로 관찰되었으며, REP-PCR을 사용하여 모든 속의 균주를 한가지 조건으로 분리·동정하기 위한 방법으로 적용하기 위해 dNTPs의 농도가 200 μM 일 때 $MgCl_2$ 의 농도는 2.5 mM이 최적인 것으로 결론을 내렸다.

dNTPs 농도 결정

dNTPs는 dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 각각 동일한 농도로 합쳐 놓은 것을 말한다. 주형 DNA의 상보적인 서열을 만들기 위해 DNA 단일 가닥과 결합한 primer의 3' end에 Taq DNA polymerase가 dNTPs중 주형 DNA 단일 가닥에 상보적인 염기를 하나씩 결합시킴으로서 DNA가닥이 연장 되게 된다. 일반적으로 dNTPs의 농도는 50 μM 에서 200 μM 까지의 범위에서 실험을 수행하는데, 적용하는 dNTPs의 농도가 너무 높을 경우, 연장단계에서 Taq DNA polymerase에 의해서 불균형적으로 사용될 수 있다 (Erich, 1992).

dNTPs 농도 결정실험 결과, 6 species의 균주 모두 초기 적용 농도인 50 μM 부터 증폭반응이 일어나기 시작했다. *Salmonella*는 1.4kb의 희미한 단편을 중심으로 농도의 증가에 따라 단편의 수와 강도가 최소 0.6kb에서 4.0kb의 범위에서 증가하는 양상을 보였다. *E. coli*는 0.6kb와 0.7kb의 단편이 50 μM 을 적용할 때부터 250 μM 을 적용할 때까지 동일한 강도를 보였으며 그 이상의 분자량을 갖는 단편들이 점차 생성되었다. *E. coli* O157:H7은 0.7kb의 단편이 50 μM 을 적용하였을 때 나타났으나 dNTPs의 농도가 증가할수록 그 강도가 약해졌고, 반면 다른 단편들은 적용농도의 증가와 함께 수와 강도도 증가했다. *Vibrio*는 초기 적용한 dNTPs의 농도부터 전체적인 fingerprinting pattern을 나타냈으며 단편의 강도만 점증하였다. *Shigella*는 0.6kb, 0.7kb를 기준으로 최대 4.0kb까지 단편들이 생성되었고, *Listeria*는 50 μM 에서 0.7kb의 희미한 단편을 중심

으로 농도에 따라 강도가 증가하며 150 μM 에서 1.7kb의 단편과의 사이에 여러 개의 작은 단편들이 생성되었다(Fig. 2).

dNTPs의 농도를 50 μM 씩 증가시키면서 6가지 구간의 농도를 적용해본 결과, 적용한 농도가 증가함에 따라 단편의 수와 강도가 증가하였다. 초기에 50 μM 의 농도를 적용하였을 때부터 거의 완전한 fingerprinting pattern을 나타내는 균주들도 있었으나 총 단편의 수가 완벽하게 나타나지는 않았고, 200 μM 의 적용시점에서 6종의 균주 모두 더 이상의 단편의 수나 강도의 변화는 관찰되지 않았기 때문에 fingerprinting pattern의 파악을 위한 목적에는 200 μM 의 dNTPs 농도만으로도 충분하였다.

Primer 농도 결정

주형 DNA의 양과 PCR반응의 반복회수를 고려한 primer양의 최적화는 각 균주들의 정확한 fingerprinting pattern을 이끌어내기 위해 우선되어야 한다. 본 연구에서 primer의 농도를 달리 적용하였을 때 *Vibrio*를 제외한 5종의 균주들이 0.5 μM 시점에서부터 증폭반응이 일어났다. *Salmonella*는 0.5 μM 에서 1.4kb에서 4.0kb의 단편범위를 보였으나 1.5 μM 에서는 0.6kb의 단편이 나타남으로써 단편생성의 범위가 확대되었고, *E. coli*는 0.6kb와 0.7kb의 단편이 주 단편으로서 primer 적용농도에 따라 점증하는 양상을 보였다. *E. coli* O157:H7은 0.5 μM 의 농도에서 희미한 0.5kb와 3.8kb의 단편이 나타났으나 1.0 μM 의 농도에서 단편들의 강도가 상대적으로 급하게 증가하였으며 2.0 μM 에서 더 이상의 단편수 증가는 나타나지 않았다. *Vibrio*는 1.5 μM 을 적용할 때 최초의 단편이 발견되었으나 2.5 μM 을 적용할 때까지 기본적인 fingerprinting pattern의 파악은 어려웠다. 그렇기 때문에 다른 PCR성분변수를 응용한 실험에서 표현된 *Vibrio*의 pattern으로 살펴보아 2.5 μM 을 적용하였을 때 pattern이 동일하게 관찰되었다. 그러므로, *Vibrio*의 fingerprinting pattern을 파악할 수 있는 primer의 기준농도는 2.5 μM 로 결정하였다. *Shigella*는 0.5 μM 부터 0.6kb에서 4.0kb까지의 단편범위를 나타내었고, 점차 단편의 강도와 수가 증가하였으나, 1.5 μM 부터의 증가정도는 크지 않았다. *Listeria*는 0.7kb의 단편이 0.5 μM 적용할 때 생성되었고 0.9kb의 단편은 1.5 μM 을 적용하였을 때부터 생성되어 적용농도를 증가시키기에 따라 단편의 강도가 증가하였다(Fig. 3).

적용한 primer의 양이 주형 DNA의 양에 비해 과

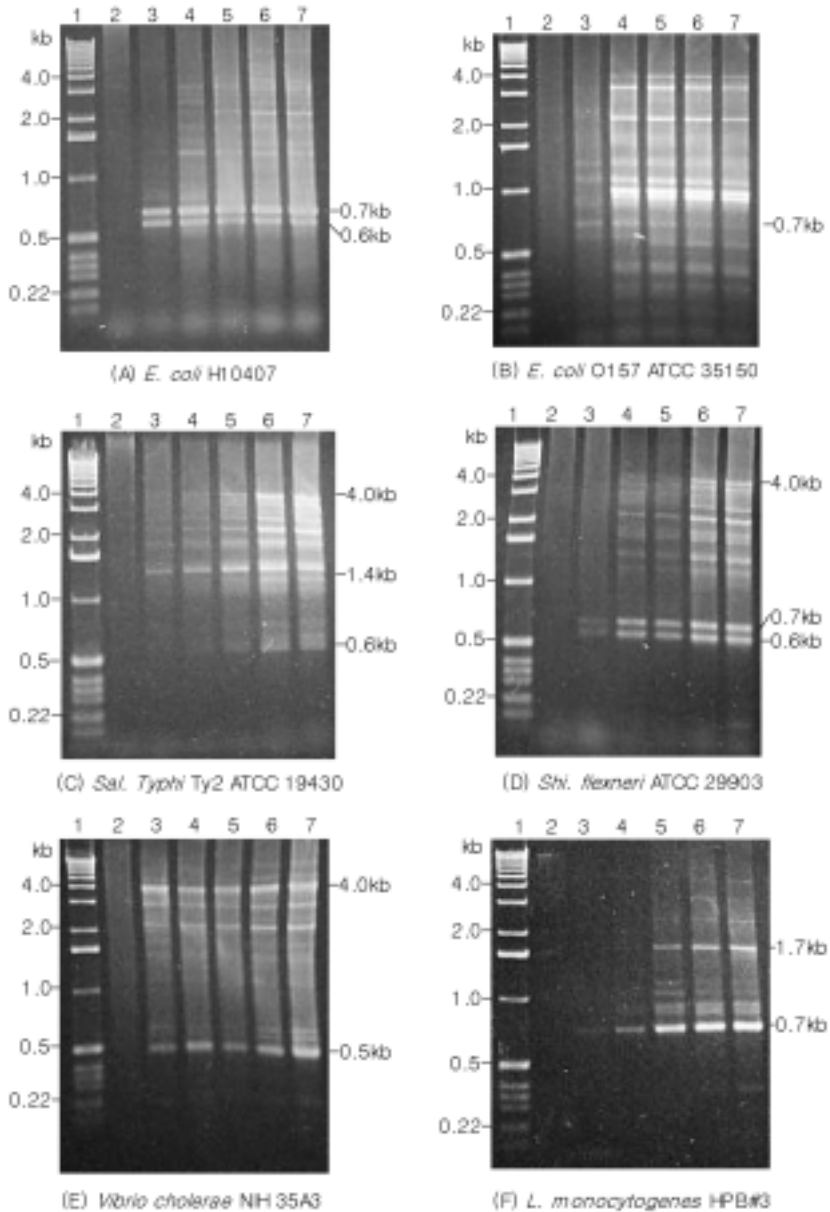


Fig. 2. Fingerprinting patterns shown as the concentrations of dNTPs increase: Panels A to Panel F represent fingerprinting pattern of seven species. Panel A: *E. coli* H10407, Panel B: *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, Panel C: *Sal. typhi* Ty2 ATCC 19430, Panel D: *Shi. flexneri* ATCC 29903. Panel E: *V. cholerae* NIH 35A3, Panel F: *L. monocytogenes* HPB#3. Lane 1 showed 1kb DNA ladders. The concentrations of dNTPs for each PCR reaction increased with an increment of 50 μ M from 0 μ M (lane 2) to 250 μ M (lane 7). The other ingredients consisted of $MgCl_2$ (2 mM), primers (2.0 μ M), and template DNA (1.0 μ l) for PCR reaction.

량이며 PCR의 반복회수가 많을 때 primer들이 서로 결합된 형태인 primer dimer가 생성될 수 있다 (Innis *et al.*, 1992). Lin 등(Lin *et al.*, 1996)은 그

들의 연구에서, 적정 primer의 농도를 2.5 μ M로 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 *Vibrio*를 제외한 6종의 균주 모두 2.0 μ M의 primer를 적용했을 때 고

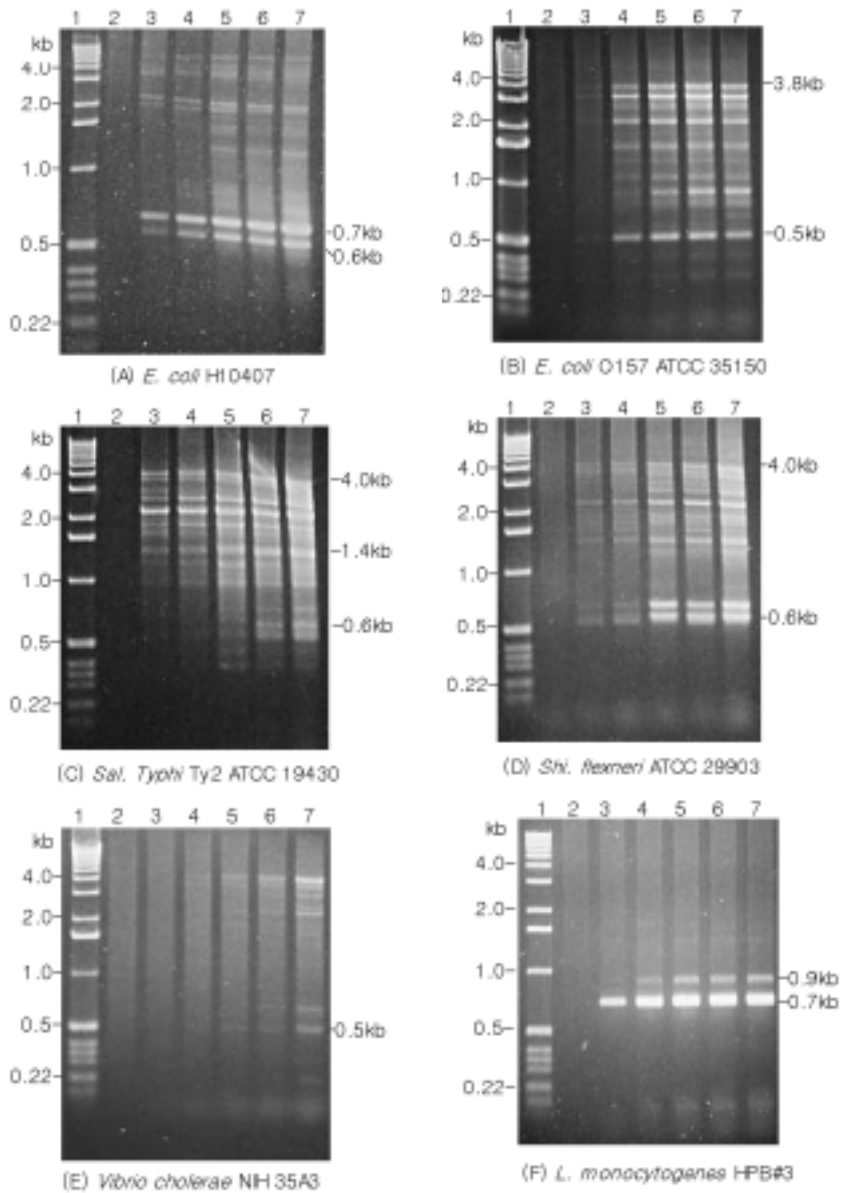


Fig. 3. Fingerprinting patterns shown as the concentrations of primers increase: Panels A to Panel F represent fingerprinting pattern of seven species. Panel A: *E. coli* H10407, Panel B: *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, Panel C: *Sal. typhi* Ty2 ATCC 19430, Panel D: *Shi. flexneri* ATCC 29903. Panel E: *V. cholerae* NIH 35A3, Panel F: *L. monocytogenes* HPB#3. Lane 1 showed 1kb DNA ladders. The concentrations of Primers for each PCR reaction increased with an increment of 0.5 μ M from 0 μ M (lane 2) to 2.5 μ M (lane 7). The other ingredients consisted of MgCl₂ (2 mM), dNTPs (200 μ M) and template DNA (1.0 μ l) for PCR reaction.

유한 fingerprinting pattern을 나타낼 수 있었다.

주형 DNA 양 결정

Chiu 등의 연구(Chiu *et al.*, 1996)에 의하면 최소

약 20여 개체의 세균을 이용한 PCR에서도 증폭반응이 일어남으로서, 아주 적은 양의 주형 DNA를 이용해서도 PCR 반응이 일어날 수 있으며 그 민감도는 상당히 높은 것을 알 수 있다. 이와 같은 결

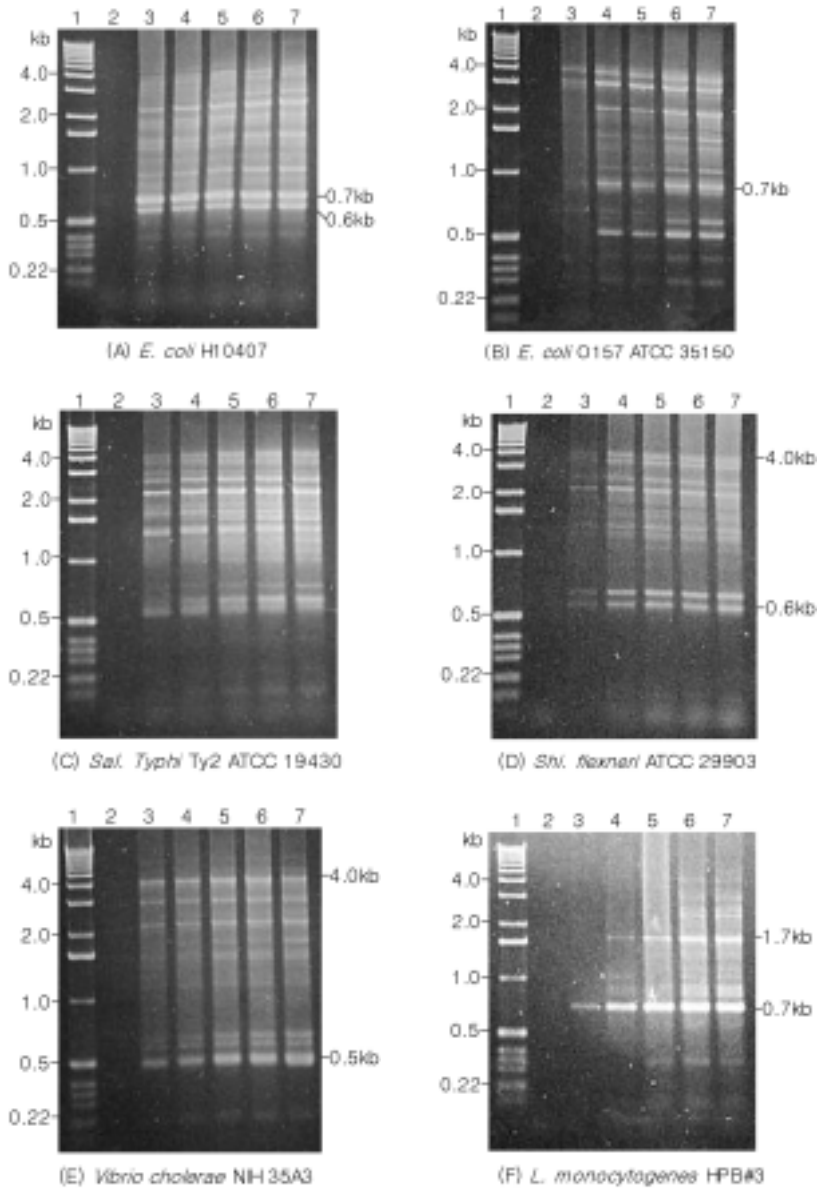


Fig. 4. Fingerprinting patterns shown as the concentrations of template DNA increase: Panels A to Panel F represent fingerprinting pattern of seven species. Panel A: *E. coli* H10407, Panel B: *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, Panel C: *Sal. typhi* Ty2 ATCC 19430, Panel D: *Shi. flexneri* ATCC 29903. Panel E: *V. cholerae* NIH 35A3, Panel F: *L. monocytogenes* HPB#3. Lane 1 showed 1kb DNA ladders. The concentrations of template DNA for each PCR reaction increased with an increment of 0.25 μ l from 0 μ l (lane 2) to 1.25 μ l (lane 7). The other ingredients consisted of $MgCl_2$ (2 mM), primers (2.0 μ M) and dNTPs (200 μ M) for PCR reaction.

과와 마찬가지로 주형 DNA의 양을 아주 소량인 0.25 μ l를 적용하였을 때부터 대부분의 적용 균주들에 대하여 단편들의 강도가 강하게 나타났다. *Salmonella*의 경우, 강도높은 주 단편들이 0.25 μ l를

적용했을 때부터 생성되었고 적용농도를 증가시키기에 따라 단편의 수가 증가하여 1.0 μ l에서는 더 이상의 단편수의 증가는 없었다. *E. coli*는 0.25 μ l의 DNA를 적용할 때부터 주 단편인 0.6kb, 0.7kb의 단

편이 강하게 나타났고 다른 작은 단편들의 강도도 매우 강하게 나타났다. 주형의 양이 증가함에 따라 단편의 강도보다는 수가 증가했지만 1.0 μ l의 DNA를 적용하였을 때부터 더 이상의 수의 증가는 관찰되지 않았다. *E. coli* O157:H7은 0.25 μ l를 적용할 때 4.0kb의 큰 분자량의 단편이 먼저 생성되었고 적용하는 DNA의 양이 증가함에 따라 분자량이 적은 단편들이 생성되어 fingerprinting의 범위가 확대되었다. 1.0 μ l를 기준으로 더 이상의 단편의 변화는 없었다. *Vibrio*와 *Shigella*도 0.25 μ l를 적용했을 때부터 최소단편과 최대단편이 모두 나타났고, 적용량의 증가에 따라 최대와 최소단편사이의 범위에서 작은 단편들이 생성되어 강도가 점차 증가되었다. 그러나 1.0 μ l에서부터는 더 이상의 단편수의 증가는 없었다. *Listeria*는 0.25 μ l에서 0.7kb의 단편이 최초로 생성되었고 0.5 μ l에서 1.7kb의 단편이 생성되며 DNA의 양과 비례하여 강도가 증가하였다(Fig. 4).

주형 DNA의 양을 변화시켜 적용하였을 때 각각의 DNA양들간의 fingerprinting pattern은 많은 차이를 보이지는 않았다. 그러나 적용되는 DNA양에 따라 단편들의 강도와 수가 점증하는 양상을 보였다.

요 약

반복성 염기서열을 응용한 PCR법인 REP-PCR을 사용하여 식중독 미생물의 분리와 동정을 위한 연구에 적용하기 위하여 주요 식중독 유발세균 5속(genus), 6종의 균주를 사용하여 실험을 실시하였다. PCR 구성성분인 $MgCl_2$, dNTPs, REP sequence primer, 주형 DNA의 농도를 최적화하기 위한 연구 결과, $MgCl_2$ 의 농도가 2.0 mM과 2.5 mM일 때, 균주들의 fingerprinting pattern의 변화가 없거나 적은 것으로 관찰되어, 모든 속의 균주를 단일조건으로 분리·동정하기 위해서 $MgCl_2$ 의 농도는 2.5 mM이 최적인 것으로 결론을 내렸다. dNTPs는 50 μ M의 농도를 적용하였을 때부터 전체 fingerprinting pattern범위의 주 단편들을 나타내는 균주들도 있었으나 총 단편의 수가 완벽하게 나타나지는 않았고, 200 μ M의 적용시점에서 6종의 균주 모두 단편의 수나 강도의 변화가 관찰되지 않았기 때문에 fingerprinting pattern의 파악을 위한 목적에는 200 μ M의 dNTPs 농도만으로도 충분하였다. REP primer는 적용한 농도가 증가함에 따라 단편의 수와 강도

가 증가하였으며 *Vibrio*를 제외한 5종의 균주가 2.0 μ M의 primer를 적용했을 때 고유한 fingerprinting pattern을 나타냈다. 주형 DNA의 양을 변화시켜 적용하였을 때 DNA 양의 비율이 2배에서 5배까지 증가하여도 초기 미량 적용 시 생성되었던 fingerprinting pattern은 많은 차이를 보이지는 않았다. 그러나 적용되는 DNA 양에 따라 단편들의 강도와 수가 약간씩 점증하는 양상을 보였다.

감사의 말

이 논문은 보건의료기술 연구개발사업(관리번호: HMP-99-F-06-0001, 식품 중 각종 위해 요인의 위해성 평가와 관리방안 수립에 관한 연구)의 연구비지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사하는 바입니다.

문 헌

- Chiu, C-H. and J. T. Ou. 1996. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2619-2622
- Clark, C. G., A. N. Kravetz, C. Dendy, G. Wang, K. D. Tyler and W. M. Johnson. 1998. Investigation of the 1994-5 Ukrainian *Vibrio cholerae* epidemic using molecular methods. *Epidemiol. Infect.* **121**: 15-29
- Dalla-Costa, L. M., K. Irino, J. Rodrigues, I. N. G. Rivera and L. R. Trabulsi. 1998. Characterization of diarrhoeagenic *Escherichia coli* clones by ribotyping and ERIC-PCR. *J. Med. Microbiol.* **47**: 227-234
- de Bruijn, F. J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic element and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2180-2187
- Dombek, P. E., L. K. Johnson, S. T. Zimmerley and M. J. Sadowsky. 2000. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2572-2577
- Erlich, H. A. (ed.). 1992. *PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification*. pp. 7-16. Oxford University Press, Inc., New York, New York, USA
- Higgins, C. F., G. F. L. Ames, W. M. Barnes, J. M. Clement and M. Hofnung. 1982. A novel intergenic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature* **298**: 760-762

- Hulton, C. S. J., C. F. Higgins and P. M. Sharp. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* **5**: 825-834
- Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. (eds.). 1992. *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*, pp. 4-11. Academic Press, Inc., San Diego, California, USA
- Jersek, B., P. Gilot, M. Gubina, N. Klun, J. Mehle, E. Tcherneva, N. Rijpens and L. Herman. 1999. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 103-109
- Johnson, J. R. and C. Clabots. 2000. Improved repetitive-element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures. *Clin. Diag. Lab. Immun.* **7**: 258-264
- Lin, A. W., A. Usera, T. J. Barrett and R. A. Goldsby. 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiates strains of *Salmonella enteritidis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 870-876
- Lupski, J. R. and G. M. Weinstock. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* **174**: 4525-4529
- Martin, B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Walker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme, G. Alloing, R. Hakenbeck, D. A. Morrison, G. J. Boulnois and J.-P. Claverys. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3479-3483
- Rivera, I. G., M. A. R. Chowdhury, A. Huq, D. Jacobs, M. T. Martins and R. Colwell. 1995. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2898-2904
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, pp. 14.15-14.17. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA
- Versalovic, J., M. Schneider, F. J. de Bruijn and J. R. Lupski. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**: 25-40
- Versalovic, J., T. Koeuth and J. R. Lupski. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6823-6831