

## Arbitrary-Primed PCR 기법을 이용한 *Salmonella* 균의 다형성 분석

황의경<sup>1</sup>, 김상균<sup>1</sup>, 김연수<sup>2</sup>, 김우태<sup>2</sup>, 이정구<sup>2</sup>

<sup>1</sup>상지대학교 응용동물과학부, <sup>2</sup>강원대학교 동물자원학부  
(게재승인 : 2002년 5월 21일)

### Polymorphism of *Salmonella* Strains Using Arbitrary-Primed Polymerase Chain Reaction

Eui-Kyung Hwang<sup>1</sup>, Sang-Kyun Kim<sup>1</sup>,

Yeon-Soo Kim<sup>2</sup>, Woo-Tea Kim<sup>2</sup>, Jeong-Koo Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied Animal Science, Sangji University, <sup>2</sup>Division of Animal Science, Kangwon University  
(Accepted : May 21, 2002)

**Abstracts :** In this study, eight primers were used to detect genetic variability and phylogenetic relationships among the eighteen *Salmonella* strains by the arbitrary-primed PCR(AP-PCR) techniques. Five strains of *Salmonella typhimurium*, four strains of *S enteritidis*, three strains of *S choleraeuis*, three strains of *S gallinarum* and three strains of *S pullorum* were typed by AP-PCR. The number of AP-PCR bands detected per each primer varied from 39 to 52, with an average of 43.6. A total of 349 AP-PCR bands were generated and among them, 185 bands(53.0%) were polymorphic. Among the primers, GEN 703 and GEN 708 primer showed a high level of polymorphism with 0.682 and 0.676, respectively. But GEN 603, GEN 604 and GEN 607 primer showed a low level of polymorphism with 0.404, 0.460 and 0.472, respectively. Therefore, the these primers will be the most effective for AP-PCR analysis of *Salmonella* strains.

The level of polymorphism of *S typhimurium* CU 2001(0.77) was similar to that of *S typhimurium* CU 2002(0.77) and lower than those of other strains such as *S typhimurium* CU 2003(0.63), *S typhimurium* ATCC 14028(0.50) and *S typhimurium* CU 2004(0.43). The level of polymorphism of *S enteritidis* ATCC 13076(0.83) was similar to that of *S enteritidis* CU 2005(0.83) and lower than those of other strains such as *S enteritidis* CU 2006(0.63) and *S enteritidis* CU 2007(0.58). The level of polymorphism of *S choleraeuis* CU 2009(0.67) was similar to that of *S choleraeuis* CU 2010(0.67) and higher than those of other strains such as *S choleraeuis* CU 2008(0.53). The level of polymorphism of *S gallinarum* CU 2011(0.70) was similar to that of *S gallinarum* CU 2012(0.70) and higher than those of other strains such as *S gallinarum* ATCC 9184(0.60). The level of polymorphism of *S pullorum* CU 2013(0.80) was similar to that of *S pullorum* CU 2014(0.80) and higher than those of other strains such as *S pullorum* No 11(0.53). Therefore, the AP-PCR analysis will be used a powerful tool for estimating genetic variation and phylogenetic relationships among *Salmonella* strains.

**Key words :** AP-PCR, DNA marker, Genetic variation, Genetic relationship, *Salmonella*

### 서 론

살모넬라속균은 *Enterobacteriaceae*과에 속하는 그람

음성의 운동성이 있는 통성 혐기성균으로서 형태학적, 생화학적 성상은 동일한 그룹에 속하지만 그 혈청형이 2,000여종 이상인 것으로 알려져 있다<sup>1,2</sup>. 살모넬라속균

\* Corresponding author : Eui Kyung Hwang, Division of Applied Animal Science, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea.

황의경, 강원도 원주시 우산동 660번지 상지대학교 생명자원과학대학 응용동물과학부  
Phone : +82-33-730-0531 (e-mail: ekhwang@mail.sangji.ac.kr)

은 사람 및 동물에서 패혈증과 설사 등을 유발하는 장내 세균으로서 크게 다섯개의 subgroup으로 구분되는데, 그 중 subgroup I 과 II에 속하는 것이 주로 병원성을 나타낸다<sup>3</sup>. 살모넬라 감염증은 사람에는 *S typhi*, 동물에서는 *S typhimurium*과 *S pullorum* 등을 비롯하여 여러 종류의 살모넬라속균에 의해 나타나며, 동물의 살모넬라 감염증은 가축의 생산성을 저하시켜 축산농가에 직접적인 손실을 초래할 뿐만 아니라 식육 및 오염환경을 통해 사람에게도 전염되므로 공중위생상 중요시되고 있다<sup>4</sup>. 따라서 축산농가에 중요한 영향을 초래하는 다양한 병원체들의 올바른 진단은 무엇보다도 중요한 선결과제이다.

살모넬라속균은 1885년 수의세균학자였던 Smith와 Salmon<sup>5</sup>이 돼지 콜레라로 폐사한 돼지의 장으로부터 *S choleraesuis*를 세계 최초로 분리·보고한 이후 지속적으로 수 많은 혈청형의 균이 분리되고 있는 세균으로서 균체 표면항원성분 중 serogroup의 특성을 부여하는 주체성분인 lipopolysaccharide(LPS ; O-antigen)와 편모항원인 flagellin protein (H-antigen)의 다형성에 근거하여 혈청형을 결정할 수 있음이 보고되었다<sup>6,7,8</sup>.

1980년대 초까지만 하더라도 *S typhimurium*이 식중독의 가장 주된 병원체로 알려져 왔으나 특이하게도 1980년대 중반 이후부터 세계적인 경향으로 *S enteritidis*에 의한 식중독의 폭발적인 증가현상이 보고됨에 따라 이에 관련된 역학적 특성을 파악하기 위한 집중적인 연구가 진행되어 왔다<sup>9,10</sup>. 지금까지 살모넬라 균주의 역학적 연구를 위하여 serotyping, phage typing 및 DNA restriction endonuclease fingerprinting(REF) 등이 이용되어져 왔으나 각기 장단점들을 가지고 있으므로 그 이용에 한계점을 나타내고 있다<sup>2,4,6,7</sup>. 그러나 최근들어 분자생화학적 기법을 이용하여 주요 병원균의 분류 및 typing에 PCR 기법을 적용하는 사례들이 점진적으로 증가하는 추세에 있다<sup>11,12</sup>. 이러한 PCR 기술은 극미량의 DNA 시료로부터 목적으로 하는 염기서열 영역을 특이적으로 증폭할 수 있을 뿐만 아니라 실험조작이 간편하여 신속하게 결과를 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다. 특히, PCR 기술을 이용하는 DNA 다형성 검출방법으로서 arbitrary-primed PCR(AP-PCR) 기법은 PCR 기술을 이용하여 임의의 DNA 단편을 증폭한 후 다형현상을 분석하여 DNA 표지인자를 찾는 방법으로서, 표적 유전자의 특정 염기서열에 대한 사전 정보 없이도 임의의 염기서열을 갖는 primer를 이용하여 DNA를 증폭하여 다형성을 관찰할수있으므로 무한정한 primer의 제작과 이용이 가능하며 고도의 다형성 검출에 효과적으로 활용할 수 있다<sup>13,14</sup>. 그러므로 본 연구는 AP-PCR 기법을 이용하여 살모넬라속균의 유전적 다양성의 비교분석과 함께 질병

진단을 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

본 연구에 사용된 살모넬라속균은 생명공학연구소 유전자은행에서 분양받은 표준균주 4주와 강원도 일대의 축산농가에서 분리 동정한 야외분리 균주 14주이다 (Table 1). 살모넬라 야외균주의 분리와 동정은 가축의 분변이나 장기 등의 가검물을 채취하여 tetrathionate broth(Difco, USA) 또는 selenite broth(Difco, USA)에 접종하여 증균시킨 다음 이를 다시 SS agar(Difco, USA) 또는 MacConkey agar(Difco, USA)에 재접종한 후 배지에 배양된 균에 대하여는 집락의 형태와 색, 균의 그람 염색성 및 당분해성 등 생화학적 검사를 실시하여 수행하였다.

### DNA의 분리 및 정제

배양체균을 eppendorf tube에 1.5ml씩 분주하고 13,000rpm으로 1분간 원심 침전시킨 후 침전된 pellet에 용액 I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM EDTA)과 용액 II (0.2N NaOH, 1% SDS)를 각각 200 $\mu$ l씩 첨가하고 혼합한 후 실온에서 10분간 방치한 뒤, 여기에 용액 III (5M potassium acetate 60 $\mu$ l, acetate acid 11.5 $\mu$ l, DW 28.5 $\mu$ l)를 200 $\mu$ l 첨가하고 조심스럽게 혼합한 후 tube를 얼음속에 담가 10분간 보관한 뒤, 13,000rpm으로 5분간 원심분리한 후 그 상청액을 새 tube로 옮기고 2~3배의 isopropanol을 첨가하여 혼합하고 상온에서 20분 정도 방치한 뒤, 13,000rpm으로 5분간 원심분리하여 상청액을 완전히 제거한 다음, TE buffer(pH 8.0)를 20ml 첨가하여 pellet을 용해시킨 후 냉동보관하였다.

### AP-PCR 분석

AP-PCR 분석에 사용된 arbitrary primer는 Genosys Biotechnologies(Chem-Bio Service, Europe)에서 구입하였으며, GC 함량이 60~70%인 8종류의 primer를 DNA 증폭에 이용하였다(Table 2). PCR 반응은 GeneAmp PCR System 9600(Perkin-Elmer Cetus, USA)을 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 반응액은 0.5ml tube에 template DNA 20ng, primer 0.5 $\mu$ M, dNTP 각 200 $\mu$ M, 10 $\times$ PCR buffer 및 Taq DNA polymerase 1 unit를 첨가하여 PCR 반응액을 총 20 $\mu$ l로 조정하였다. PCR cycle은 최초 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 예비가열 후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 38 $^{\circ}$ C에서 1분 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분간의 cycle을 총 40회 반복한 후 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 종료

Table 1. *Salmonella* strains used in this experiment

Strains	Serogroups	Sources
<i>S typhimurium</i> ATCC 14028	B	Reference strain
<i>S typhimurium</i> CU 2001	B	Isolated strain
<i>S typhimurium</i> CU 2002	B	Isolated strain
<i>S typhimurium</i> CU 2003	B	Isolated strain
<i>S typhimurium</i> CU 2004	B	Isolated strain
<i>S enteritidis</i> ATCC 13076	D1	Reference strain
<i>S enteritidis</i> CU 2005	D1	Isolated strain
<i>S enteritidis</i> CU 2006	D1	Isolated strain
<i>S enteritidis</i> CU 2007	D1	Isolated strain
<i>S choleraesuis</i> CU 2010	C1	Isolated strain
<i>S choleraesuis</i> CU 2011	C1	Isolated strain
<i>S choleraesuis</i> CU 2012	C1	Isolated strain
<i>S gallinarum</i> ATCC 9184	D1	Reference strain
<i>S gallinarum</i> CU 2008	D1	Isolated strain
<i>S gallinarum</i> CU 2009	D1	Isolated strain
<i>S pullorum</i> ATCC No 11	D1	Reference strain
<i>S pullorum</i> CU 2013	D1	Isolated strain
<i>S pullorum</i> CU 2014	D1	Isolated strain

Table 2. Sequences of arbitrary primers used for AP-PCR analysis

Primer	Sequences(5' to 3')
GEN 603	GTGACGTAGG
GEN 604	CAATCGCCGT
GEN 607	GTTTCGCTCC
GEN 702	TGCGCCCTTC
GEN 703	TTCCCCGCT
GEN 704	ACCCCCGAAG
GEN 705	GGTGACGCAG
GEN 708	GTCCACACGG

했다. PCR 종료 후 증폭산물은 TBE buffer system(0.09M Tris-borate, 2.5M EDTA, pH 8.5)을 이용한 2% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 ethidium bromide(0.1 $\mu$ g/ml)로 염색한 다음 UV Photographic system을 이용하여 전기영동상을 촬영하였다.

#### 통계분석

*Salmonella* 균주의 유전자 변이성과 다형성 정도의 추정에는 Bio-prifil software package가 내장된 image analyzer(Perkin Elmer, USA)를 사용하여 PCR 증폭산물의 존재여부와 유전자형 양상을 분석하였으며, 유사도를 나타내는 dendrogram은 UPGMA program(Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average system,

Applied Biostatistics)을 이용하여 작성하였다.

## 결 과

### 1. *Salmonella* 균주의 유전적 특성 분석

먼저, 8종류의 arbitrary primer를 이용하여 18종의 살모넬라 균주에 대해 PCR 분석을 수행한 결과 모든 primer에서 DNA 증폭 양상을 확인할 수 있었다. 증폭된 밴드의 수는 primer의 종류에 따라 적게는 4개에서 많게는 15개까지의 DNA 단편을 검출할 수 있어서 primer 당 평균 8.25개에서 9.25개의 밴드를 확인할 수 있었고 이들 DNA 단편의 분자량의 범위는 200bp에서 1,500bp 사이였다. Fig 1b의 E에서 보는 바와 같이 GEN 703 primer를

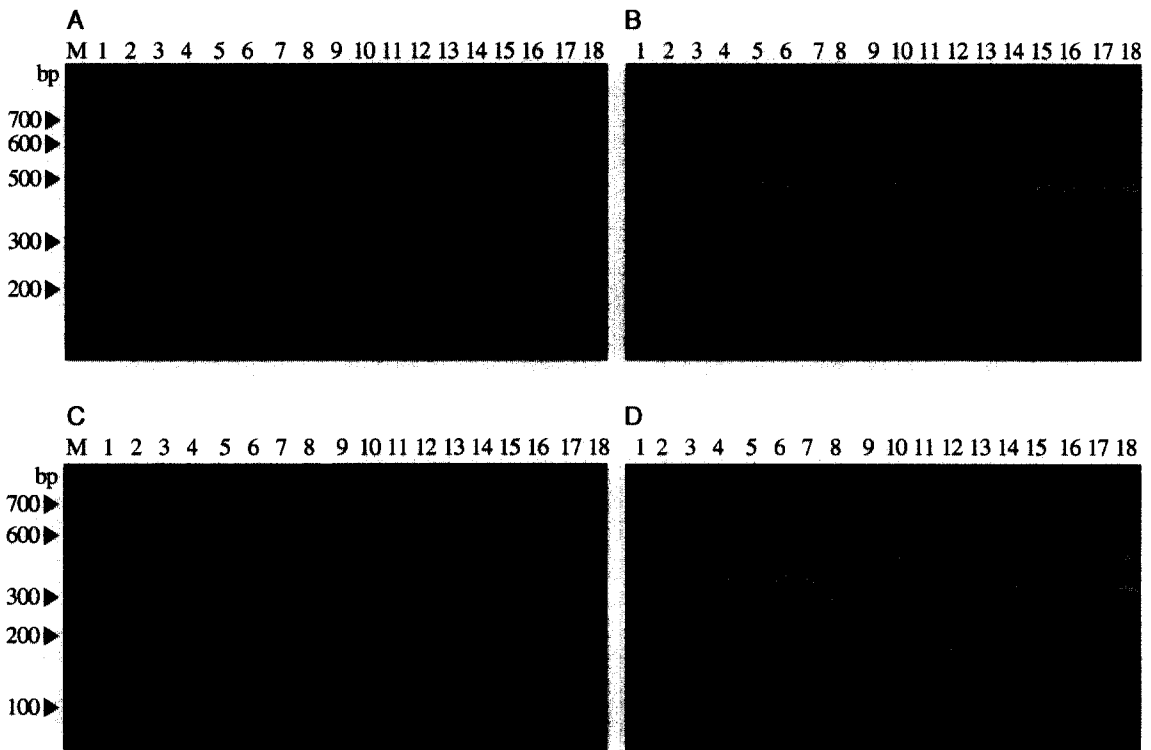


Fig 1a. Arbitrary-primed PCR patterns of *Salmonella* strains by using primer GEN 603(A), GEN 604(B), GEN 607(C) and GEN 702(D). Lanes 1 to 5, *S. typhimurium* strains; 6 to 9, *S. enteritidis* strains; 10 to 12, *S. choleraesuis* strains; 13 to 15, *S. gallinarum* strains; 16 to 18, *S. pullorum* strains; M, 100bp DNA ladder

사용한 결과 분자량이 300bp~1,500bp까지의 밴드가 4개에서 10개까지 고루 분포하였을 뿐만 아니라 균주간에 차이를 보이는 균주 특이적인 밴드의 출현에 있어서도 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 또한 Fig 1b의 H는 GEN 708 primer를 이용하여 검출된 DNA 밴드 양상으로서 Fig 1b의 E와 마찬가지로 400bp에서 1,200bp 사이에서 균주 특이적인 밴드들이 형성되어 있어 균주간의 변별력에 있어서 매우 좋은 결과를 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다. 한편 Fig 1b의 GEN 703(E)와 GEN 708(H) primer를 제외한 6종의 primer를 사용한 PCR에서는 증폭된 DNA 밴드 양상이 너무 고르게 분포되어 있어 균주간의 변별력이 Fig 1b의 E 및 H와 비교해 보면 확연히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

PCR 증폭산물을 전기영동법을 이용하여 분리한 후 각 균주의 유전적 다형성 및 변이성을 분석한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 8종류의 primer에서 *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. gallinarum* 및 *S. pullorum* 균주간에 검출된 총 밴드의 수는 각각 74, 66, 67, 73 및 69개였으며 이 중에서 다형성 밴드의 수는

각각 37, 37, 34, 37 및 41개였다. *S. typhimurium* 균주에서는 총 밴드의 수가 GEN 704 primer에서 13개로 가장 많은 반면 GEN 702 primer가 6개로 가장 적었고 다형성 밴드의 수는 GEN 704 primer가 9개로 가장 많았고 GEN 702 primer가 2개로 가장 적었으며, 다형율은 GEN 705 primer가 10개 중 7개로 70%의 가장 높은 출현율을 보인 반면 GEN 702 primer가 6개 중 2개로 33%의 가장 낮은 출현율을 보였다. *S. enteritidis* 균주에서는 총 밴드의 수가 GEN 703 primer에서 11개로 가장 많은 반면 GEN 603 primer가 6개로 가장 적었고 다형성 밴드의 수는 GEN 704 primer가 8개로 가장 많았고 GEN 603 primer가 2개로 가장 적었으며, 다형율은 GEN 704 primer가 10개 중 8개로 80%의 가장 높은 출현율을 보인 반면 GEN 603 primer가 6개 중 2개로 33%의 가장 낮은 출현율을 보였다. *S. choleraesuis* 균주에서는 총 밴드의 수가 GEN 703 primer에서 14개로 가장 많은 반면 GEN 603 primer가 5개로 가장 적었고 다형성 밴드의 수는 GEN 703 primer가 6개로 가장 많았고 GEN 603 primer가 2개로 가장 적었으며, 다형율은 GEN 705 primer가 7개 중 5개로

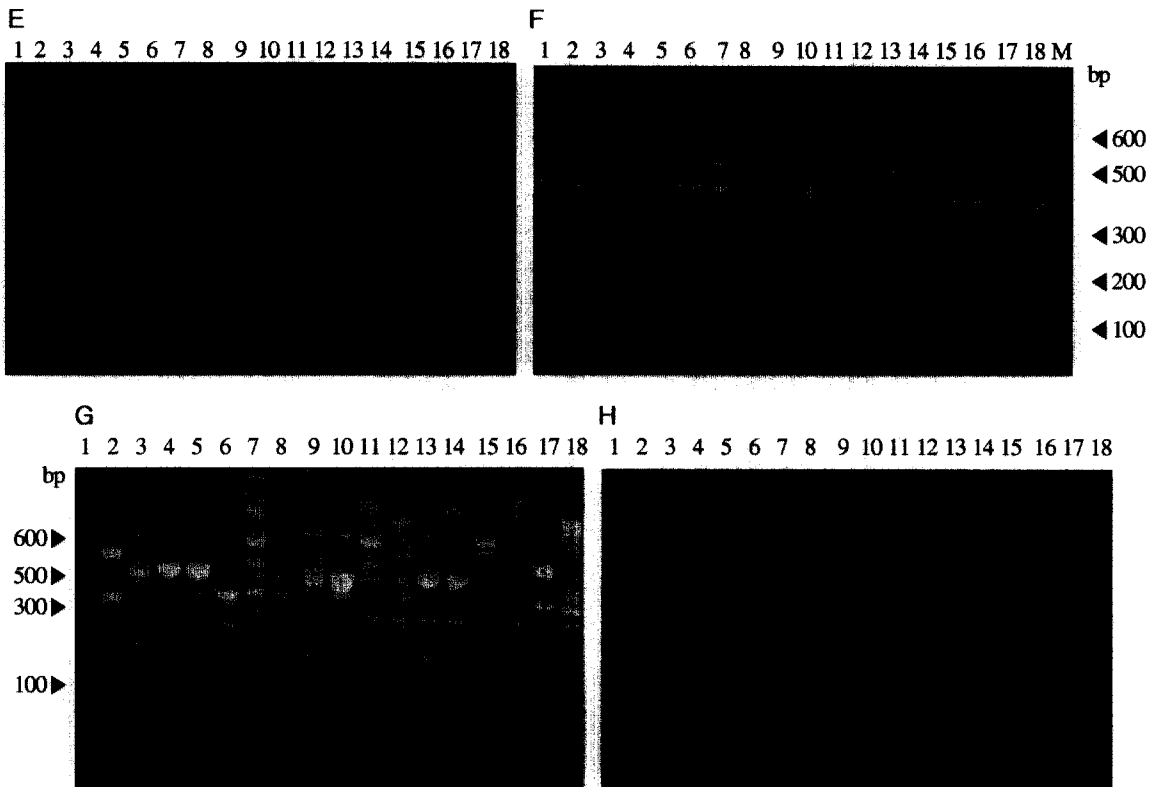


Fig 1b. Arbitrary-primed PCR patterns of *Salmonella* strains by using primer GEN 703(E), GEN 704(F), GEN 705(G) and GEN 708(H). Lanes 1 to 5, *S. typhimurium* strains; 6 to 9, *S. enteritidis* strains; 10 to 12, *S. choleraesuis* strains; 13 to 15, *S. gallinarum* strains; 16 to 18, *S. pullorum* strains; M, 100bp DNA ladder

Table 3. Polymorphisms of *Salmonella* strains using AP-PCR analysis

Primer	No of total bands					No of polymorphic markers					Rate of polymorphisms <sup>*</sup>				
	ST	SE	SC	SG	SP	ST	SE	SC	SG	SP	ST	SE	SC	SG	SP
GEN 603	8	6	5	11	13	3	2	2	5	6	0.38	0.33	0.40	0.45	0.46
GEN 604	7	8	9	10	7	3	3	4	5	3	0.43	0.38	0.44	0.50	0.43
GEN 607	10	7	7	8	9	3	4	3	4	5	0.30	0.57	0.43	0.50	0.56
GEN 702	6	8	8	9	8	2	4	4	5	6	0.33	0.50	0.50	0.56	0.75
GEN 703	9	11	14	8	10	4	6	6	4	6	0.44	0.55	0.43	0.50	0.60
GEN 704	13	10	8	12	9	9	8	5	6	6	0.69	0.80	0.63	0.50	0.67
GEN 705	10	9	7	8	6	7	6	5	5	4	0.70	0.67	0.71	0.63	0.67
GEN 708	11	7	9	7	7	6	4	5	3	4	0.55	0.57	0.56	0.43	0.57
Total	74	66	67	73	69	37	37	34	37	40	3.82	4.37	4.10	4.07	4.70
Mean	9.25	8.25	8.38	9.13	8.63	4.63	4.63	4.25	4.63	5.13	0.48	0.55	0.51	0.51	0.59

\* The rate of polymorphism was derived from polymorphic bands divided by total bands.

\*\* ST : *S. typhimurium*, SE : *S. enteritidis*, SC : *S. choleraesuis*, SG : *S. gallinarum*, SP : *S. pullorum*

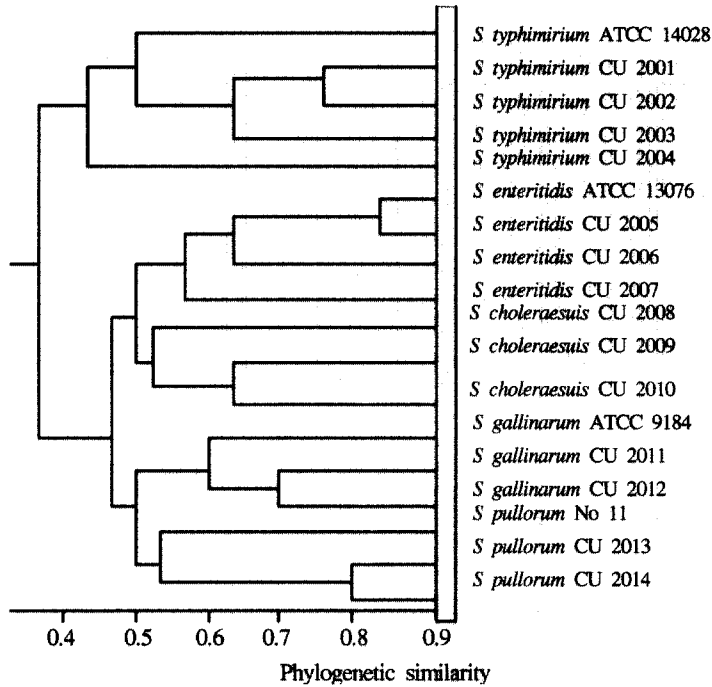


Figure 3. A dendrogram of eighteen *Salmonella* strains based on average linkage cluster analysis by AP-PCR. Genetic distances among the strains are indicated on the left of the dendrogram.

71%의 가장 높은 출현율을 보인 반면 GEN 603 primer가 5개중 2개로 40%의 가장 낮은 출현율을 보였다. *S. gallinarum* 균주에서는 총 밴드의 수가 GEN 704 primer에서 12개로 가장 많은 반면 GEN 708 primer가 7개로 가장 적었고 다형성 밴드의 수는 GEN 704 primer가 6개로 가장 많았고 GEN 708 primer가 3개로 가장 적었으며, 다형율은 GEN 705 primer가 8개 중 5개로 63%의 가장 높은 출현율을 보인 반면 GEN 708 primer가 7개중 3개로 43%의 가장 낮은 출현율을 보였다. *S. pullorum* 균주에서는 총 밴드의 수가 GEN 603 primer에서 13개로 가장 많은 반면 GEN 705 primer가 6개로 가장 적었고 다형성 밴드의 수는 GEN 603, GEN 702, GEN 703 및 GEN 704 primer가 모두 6개로 가장 많았고 GEN 604 primer가 3개로 가장 적었으며, 다형율은 GEN 702 primer가 8개 중 6개로 75%의 가장 높은 출현율을 보인 반면 GEN 604 primer가 7개 중 3개로 43%의 가장 낮은 출현율을 보였다.

## 2. 균주간 유전적 변이성 및 근연관계 분석

8종류의 primer를 이용하여 수행된 AP-PCR 분석을 통하여 검출된 DNA 밴드중에서 232개의 다형성 밴드를 이용하여 18종의 *Salmonella* 균주간의 GS 분석을 통한

genetic distance(GD) 분석을 수행한 결과를 살펴보면 60%~70% 사이의 수준에서 5개의 subgroup으로 나뉘는 것을 관찰할 수 있었다. *S. typhimurium* CU 2001의 다형성 수준은 0.77로 *S. typhimurium* CU 2002와 가장 근연관계가 가까운 것으로 나타났으며 다음이 *S. typhimurium* CU 2003으로서 0.63, *S. typhimurium* ATCC 14028이 0.50, 그리고 *S. typhimurium* CU 2004가 0.43으로 근연관계가 가장 먼 것으로 나타났다. *S. enteritidis* ATCC 13076의 다형성 수준은 0.83으로 *S. enteritidis* CU 2005와 가장 가까운 근연관계를 나타내었으며 다음이 *S. enteritidis* CU 2006으로 0.63, 그리고 *S. enteritidis* CU 2007이 0.58로 가장 근연관계가 먼 것으로 나타났다. *S. choleraesuis* CU 2009의 다형성 수준은 0.67로 *S. choleraesuis* CU 2010과 가장 가까운 근연관계를 나타내었으며 *S. choleraesuis* CU 2008은 0.53으로 가장 근연관계가 먼 것으로 나타났다. *S. gallinarum* CU 2011의 다형성 수준은 0.70으로 *S. gallinarum* CU 2012와 근연관계가 가장 가깝게 나타났으며 *S. gallinarum* ATCC 9184가 0.60으로 가장 근연관계가 먼 것으로 나타났다. 마지막으로 *S. pullorum* CU 2013과 *S. pullorum* CU 2014의 다형성 수준은 0.80으로 가장 근연관계가 가까웠으며 *S. pullorum* No 11이 0.53으로 가장 근연관계가 먼 것으로 나타났다.

## 고 찰

PCR의 유전자 분석기술을 이용하는 DNA 다형성 분석 가운데 AP-PCR 기법은 짧은 8~10bp의 primer를 사용하여 genome내 DNA 염기서열 부위를 임의로 증폭시킨 후 전기영동법으로 분리 검출하는 기법으로서 비용이 저렴하고 단시간 내에 손쉽게 시행할 수 있으며, 세균을 표현형이 아닌 유전형으로 분류할 수 있어 세균의 분류와 역학조사에 폭넓게 응용되어 왔다<sup>13,14,15</sup>. PCR을 이용한 방법은 세균이 가지고 있는 반복되는 DNA 염기서열을 대상으로 한 primer를 사용하여 비교적 낮은 annealing 온도에서 primer의 비특이 부착을 이용하는 방법으로 증폭된 DNA 산물을 분석하는 방법으로서 표현형에 의한 방법과 비교하면 여러 종류의 세균들을 대상으로 적용할 수 있고, 실험이 간단하여 빠른 시간내에 결과를 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 유행균주와 산발적으로 발생하는 감염균주를 완전히 변별할 수 없고 반복 실험시 재현성이 낮은 단점을 가지고 있다<sup>13,16</sup>.

10mer 정도의 비특이 primer와 낮은 annealing 온도를 이용하는 AP-PCR 기법은 사용하는 primer의 염기서열과 온도에 따라서 결과가 많이 달라질 수 있는 방법이다. 현재까지 각종 세균 감염 등 여러 세균들의 역학조사에 이용되고 있는 AP-PCR 분석 방법은 적어도 PFGE와 동일하거나 그 이상의 변별력이 있다고 보고되고 있으며, 특히 *Salmonella* 균주를 대상으로 한 연구자들의 연구에 의하면 사용되는 시약과 DNA의 추출 방법 및 PCR 증폭조건 등을 표준화한 결과 실험실간에 큰 차이가 없이 높은 재현성을 갖는다고 보고되었다<sup>17</sup>. 이번 실험에서 처럼 각각의 균주에서 검출되는 특이적인 밴드들은 사용된 primer의 염기서열과 template DNA의 결합 부위의 염기배열 사이에 상동성이 전혀 없거나 또는 primer와 각 균주의 상동성 비율이 각각 다르게 나타나기 때문에 primer의 결합력이 떨어져서 증폭산물이 검출되지 않을 수도 있다<sup>12,13</sup>. 따라서 향후 균주 특이적인 DNA marker의 특성은 DNA 단편의 클로닝 및 염기서열 결정 그리고 DNA probe를 이용한 Southern blot 분석에 의해 구체적으로 밝혀질 것으로 기대된다. 그러나, AP-PCR marker는 증폭조건에 매우 민감하게 반응하여 밴드의 출현 양상 및 특이적인 DNA 밴드의 재현성이 낮기 때문에 앞으로 보다 더 많은 균주들을 대상으로 재현성 검증을 위한 반복 실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Maslow *et al*<sup>16</sup>은 분류체계를 평가함에 있어서 다섯가지 기준을 적용하였으며 균주 특이성, 재현성, 분별가능성, 해석의 용이성과 사용상의 유익성을 제시한 바 있

다. Aitken *et al*<sup>17</sup>은 회미한 RAPD marker에서 오는 분석의 오류를 극복하고자 random amplified blotted DNA를 probe로 사용하여 많은 집단의 유전자 다형을 분석한 보고에서 이러한 회미하고 애매한 밴드도 유전적 표지인자로 분석이 가능함을 입증하였다. Power<sup>18</sup>는 미생물에 있어서 RAPD typing 기법에 관한 연구결과를 보고하였는데 그는 다양한 분자 생화학적 기법들이 박테리아 종들의 구별에 획기적인 전기를 마련할 수 있음을 보고하였다. Hilton *et al*<sup>19</sup>은 *Salmonella* 균주의 RAPD 지문 분석을 위한 최적 조건을 확립하여 미생물의 역학조사에 유용한 도구로서 이용할 수 있음을 확인하였고, Shangkuan *et al*<sup>20</sup>은 *Salmonella typhi*와 서로 다른 각각의 *Salmonella* 균주들의 typing을 위하여 RAPD 기법을 적용한 결과 5개의 primer를 이용하여 63개의 서로 다른 *Salmonella typhi* 균주를 분리하였음을 보고하였다. 한편, Caetano-Anolles *et al*<sup>12</sup>은 다양한 생물종을 대상으로 증폭산물의 수를 관찰하였으며 그에 따르면 박테리아 DNA는 1~19개, 대두는 2~49개 그리고 인간에서는 0~60개의 DNA 밴드가 관찰되어 genome 크기에 따라 상당한 차이가 있음을 보고하였다. 이와같이 증폭산물의 수는 genome내 산재되어 있는 유전자 돌연변이에 따라 균주간의 유전정보에 매우 귀중한 자료를 제공해 줄 수 있기 때문에 높은 수준의 증폭산물은 상대적으로 고도의 변이를 나타낼 수 있으므로 유전적 표지인자로 이용가능성이 증가하게 된다. 이처럼, *Salmonella* 균주 뿐만 아니라 모든 세균들의 genotyping에 있어서 적절한 primer를 선별하여 AP-PCR 분석을 사용하는 경우 PFGE 수준보다 월등한 균주 특이적 표지인자들의 typing이 가능하였으며, 그 재현성에 있어서도 신뢰할 수 있는 수준일뿐만 아니라 소요되는 시간과 경비면에서도 PFGE보다 유리한 면이 있어 이용가치가 높을 것으로 판단된다. 그러므로, 이상의 연구결과를 종합해 볼 때 유전자 공학 기술을 이용한 AP-PCR 기법은 미생물 및 세균의 높은 유전적 다형성 및 변이성을 검출할 수 있어 각종 미생물 종간의 유전적 근연관계 분석에 효과적으로 이용될 수 있으며 보다 정확한 유전정보를 제공해 줄 수 있기 때문에 앞으로 판정결과와 재현성만 확보된다면 각종 미생물의 유전자원 분석에 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 적 요

이 연구는 AP-PCR 기법을 이용하여 *Salmonella* 균주의 유전적 다양성과 근연관계를 비교하고자 수행하였다. 18종의 *Salmonella* 균주에 대해 8종류의 primer를 이

용하여 각 균주에 대한 DNA 밴드를 검출한 결과 총 AP-PCR 단편의 수는 39에서 52개의 범위였으며 평균 43.6개가 검출되었다. 총 349개의 표지인자가운데 다형성을 나타내는 단편들은 185개로서 53.0%의 다형성 수준을 보여주었다. 살모넬라균주들은 GEN 703과 GEN 708 primer에서 각각 0.682와 0.676의 높은 다형성 수준을 보여주었으나 GEN 603, GEN 604, 및 GEN 607 primer에서는 각각 0.404, 0.460 및 0.472의 비교적 낮은 수준의 다형성을 나타냄으로써 살모넬라균주간 상동성 비율이 높음을 시사해 주고 있다. 따라서, 이들 primer들은 *Salmonella* 균주들의 AP-PCR 분석에 대단히 효율적임을 확인할 수 있었다. *S typhimurium* CU 2001의 다형성 수준은 77%로 *S typhimurium* CU 2002와 가장 근연관계가 가까운 것으로 나타났으며 다음이 *S typhimurium* CU 2003으로 63%, *S typhimurium* ATCC 14028이 50%, 그리고 *S typhimurium* CU 2004가 43%의 근연관계를 나타내었다. *S enteritidis* ATCC 13076의 다형성 수준은 83%로 *S enteritidis* CU 2005와 근연관계가 가장 가깝게 나타내었으며 다음이 *S enteritidis* CU 2006으로 63%, *S enteritidis* CU 2007이 58%의 근연관계를 나타내었다. *S choleraesuis* CU 2009의 다형성 수준은 67%로 *S choleraesuis* CU 2010과 가장 가까운 근연관계를 나타내었으며 *S choleraesuis* CU 2008은 53%의 근연관계를 나타내었다. *S gallinarum* CU 2011과 *S gallinarum* CU 2012의 다형성 수준은 70%로 근연관계가 가장 가깝게 나타났으며 *S gallinarum* ATCC 9184는 60%의 근연관계를 나타내었다. 마지막으로 *S pullorum* CU 2013과 *S pullorum* CU 2014의 다형성 수준은 80%로 매우 높은 근연관계를 나타낸 반면 *S pullorum* No 11은 53%로 근연관계가 먼 것으로 나타났다.

따라서, AP-PCR 분석은 *Salmonella* 균주의 유전적 다양성 및 근연관계를 추정하기 위한 강력한 도구로서 이용할 수 있을 것이다.

## 참고문헌

- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed, Williams & Wilkins, Maryland : 186-187, 1994.
- Cohen HJ, Mechanda SM, Lin W. PCR amplification of the fimA gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. Appl environ microbiol, 62(12):4303-4308, 1996.
- Cohen ND, Wallis DE, Neiberghs HL, et al. Comparison of the polymerase chain reaction using genus-specific oligonucleotide primers and microbiologic culture for the detection of *Salmonella* in drag-swabs from poultry houses. Poult Sci, 73(8):1276-1281, 1994.
- Cohen ND, McGruder ED, Neiberghs HL, et al. Detection of *Salmonella enteritidis* in feces from poultry using booster polymerase chain reaction and oligonucleotide primers specific for all members of the genus *Salmonella*. Poult Sci, 73(2):354-357, 1994.
- Molomy B, Schroeter A, Bunge C et al. Evaluation of molecular typing methods for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT104 isolated in Germany from healthy pigs. Vet Res 32(2); 119-129, 2001.
- Tuchili LM, Kodama H, Sharma RN et al. Detection of salmonella DNA in chicken embryos and environmental samples by polymerase chain reaction. J Vet Med Sci 58(9):881-884, 1996.
- Kwang J, Littledike ET, Keen JE. Use of the polymerase chain reaction for *salmonella* detection. Lett Appl Microbiol 22(1):46-51, 1996.
- Fabricant J, Calnek BW. Avian diseases. Cornell Vet 75(1):124-129, 1985.
- Collins CH, Lyne PM. Microbiological method, 5th ed, Butterworths : 142-145, 1984.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl Acids Res, 18:7213-7219, 1990.
- Williams JGK, Kubelik AR, Licak VJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res, 18:6531-6535, 1990.
- Caetano-Anolles G, Bassam BI, Gresshoff PM. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio/Technology, 9:553-557, 1991.
- Way JS, Josephson KL, Pillai SD, et al. Specific detection of *Salmonella* spp by multiplex polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol, 59(5):1473-1479, 1993.
- Fadl AA, Khan MI. Genotypic evaluation of *Salmonella enteritidis* isolates of known phage types by arbitrarily primed polymerase chain reaction. Avian Disease, 41(3):732-737, 1997.
- Way JS, Josephson KL, Pillai SD, et al. Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol, 59(5):1473-1479, 1993.
- Maslow JN, Mulligan ME, Arbelt RD. Molecular



- epidemiology: the application of contemporary techniques to typing bacteria. *Clin Infect Dis*, 17:153-162, 1993.
17. Aitken SA, Tinker NA, Mather DE, *et al.* *Genome*, 37:506-508, 1994.
  18. Power EG. RAPD typing in microbiology-a technical review. *J Hosp Infect* 34 (4):247-265, 1996.
  19. Hilton AC, Banks JG, Penn CW. Optimization of RAPD for fingerprinting *Salmonella*. *Lett Appl Microbiol*, 24(4):243-248, 1997.
  20. Shangkuan YH, Lin HC. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella typhi* and other *Salmonella* species. *J Appl Microbiol*, 85(4):693-702, 1998.