

Multiplex-PCR에 의한 먹는샘물 및 야채류로부터의 병원성 *Yersinia enterocolitica*의 신속검출

이택수 · 박부길* · 오덕환*†

강원도 보건환경연구원
*강원대학교 식품생명공학부

Detection of Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* in Drinking Water and Vegetables by Mutiplex-PCR

Taek Soo Lee, Boo Kil Park* and Deog Hwan Oh*†

Institute of Health and Environment, Kangwondo, Chunchon 200-702, Korea

*Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

Abstract

The study was conducted to develop a rapid method for the detection of *Yersinia enterocolitica* in spring water and vegetables via multiplex polymerase chain reaction (PCR) technique using *ail*, *yst*, *virF* and subgenus-specific Y16S primers. Specificity and sensitivity of multiplex PCR and application of best primers for the detection of *Y. enterocolitica* from spring water and vegetables were investigated. *Y. enterocolitica* ATCC 27729 strains gave 356 bp (*ail*), 200 bp (Y16S) and 134 bp (*yst*) bands, but *Y. enterocolitica* ATCC 9610 and ATCC 23715 strains gave 200 bp and 134 bp bands. In the meanwhile, non-pathogenic *Yersinia* species, such as *Y. frederikseni*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* and *Y. pseudotuberculosis* gave only single 200 bp band, and other bacteria including *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 25392, *Shigella dysenterii*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 did not show any bands. Among primers, *yst* and Y16S primer showed the best sensitivity. Seven CFU/mL *Y. enterocolitica* cells could be detected with *yst* and Y16S primers and the sensitivity was significantly improved by the further 2nd PCR after 38 cycles of first PCR amplification. Spring water, cabbage and mushroom were inoculated with *Y. enterocolitica* to determine the sensitivity of multiplex-PCR for the rapid detection of *Y. enterocolitica*. Multiplex-PCR assay could detect 7 or 70 cells in spring water and vegetables using whole cell lysate with repeating PCR amplification.

Key words: *Yersinia enterocolitica*, multiplex PCR, spring water, vegetables

서 론

*Yersinia enterocolitica*균은 냉장저장에서도 잘 생육하는 저온균으로서 그람음성 및 비포자형성 식중독균으로 1939년 사람에게서 최초로 분리되었으며 인수공통병원균으로 돼지, 소, 닭, 양, 개 등의 동물과 원유, 유제품, 계란제품, 식육, 야채류 등의 식품 및 환경시료에서 다양하게 분리되어 왔다(1-4). 이 균은 식품안전성을 위협하는 심각한 균으로 대두되었고 감염 시 사람과 동물에게 복통, 발열, 설사, 두통, 구토 등을 동반하는 급성위장질환과 패혈증, 2차면역질환으로 피부의 결절성 홍반, 다발성관절염 등과 같은 여시니아증(Yersiniosis)을 일으키는 병원균이다. 우리 나라에서도 급성 위장염 환자, 건강한 쥐의 분변에서 *Y. enterocolitica*균이 분리된 예가 있고 1994년 이후 현재까지 서울시내 곳곳의 약수터에서 *Yersinia*균이 검출되었다고 보고되었다(5). 또한, 세계 여러 나라에서 이 균으로

인한 세균성 장염은 *Shigella*보다 많이 발생하며, *Salmonella*와 *Campylobacter*만큼 일반적으로 많이 발생한다고 보고되고 있다(6-8). 따라서 이상의 결과를 종합해 볼 때, 이 균의 감염에 예민한 환자나, 오염된 각종 식품 또는 지하수나 야수 등에서 야기될 새로운 식중독의 발생을 예방하기 위하여 이 균을 신속, 정확하게 검출할 수 있는 조기진단법의 기술 개발이 절실히 필요하게 되었다.

일반적으로 고전적인 방법을 이용하여 각종 식품으로부터의 *Y. enterocolitica*를 분리, 동정하려면 저온에서 1주~수주 일의 많은 시간을 요하고 방법이 까다롭고 전문성과 경험을 필요로 하는 등 어려움이 있기 때문에 최근에는 DNA probe 개발, polymerase chain reaction(PCR)개발, 항혈청 방법개발(monoclonal antibodies, polycholnal antibodies), 형광물질 항체분석 등 수많은 분자생물학적 또는 면역학적 방법이 사용되어 왔다(9,10). 이 중에서도 PCR기법은 특이성과 민감성이 뛰

†Corresponding author. E-mail: deoghwa@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6457. Fax: 82-33-250-6457

어난 것으로 평가되고 있고 특히 단시간에 검출이 가능하다는 장점이 있어 가장 많이 이용되어지고 있다(11).

이러한 분자생물학적인 방법은 주로 *Y. enterocolitica*의 병원성 인자를 가진 유전자를 이용하고 있으며 최근까지 *Yersinia* 속 균주의 병원성과 관련있는 연구로는 *Yersinia* 균의 조직침투와 관련이 있는 chromosome 유래 *ail* gene과 *inv* gene, 병원성 관련 plasmid에서 유래한 *virF* gene 및 outer membrane protein을 encoding하는 *yopA* gene 등을 이용한 방법이 많이 보고되었다. 국내에서도 *ail* gene을 이용하여 PCR 또는 dot blot hybridization 방법을 사용하여 *Y. enterocolitica* 균의 조기진단기술에 관한 보고가 있다(11,12). 그러나 PCR은 특정 유전자 부위를 증폭시킨 뒤 증폭된 유전자를 검출하기 때문에 기존의 검출방법에 비하여 민감도가 높은 장점을 갖고 있으나 높은 민감도에서 기인하는 false positive 발생이라는 문제점을 갖고 있다.

본 연구에서는 단순 PCR의 사용으로 인한 false positive의 문제점을 해결하기 위하여 *Y. enterocolitica* 균에 특이적인 *ail*, *yst* 및 *virF*를 병원성 marker로 사용하였고 *Yersinia* 속균을 구별하는 subgenus-specific Y16S primer를 도입하여 multiplex PCR을 수행함으로써 *Y. enterocolitica* 균의 검출 민감도와 특이도를 높이하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

시험 균주로는 1999년부터 2001년 사이에 강원도내 전역에 산재한 먹는샘물에서 분리된 *Y. enterocolitica* 2주와 춘천지역에서 시판되고 있는 야채류로부터 분리된 *Y. enterocolitica* 2주가 사용되었다. 양성 대조균주로는 *Y. enterocolitica* ATCC 9610, ATCC 27729 및 ATCC 23715, 기타 *Y. frederikseni*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. pseudotuberculosis* 등을 사용하였고, 음성 대조균으로는 *E. coli* ATCC 25392, *Shigella dysenterii*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 균을 사용하였으며 이들을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Bacterial strains used in this study

No.	Bacterial species	Strain
1	<i>Y. enterocolitica</i>	ATCC 9610
2	<i>Y. enterocolitica</i>	ATCC 23715
3	<i>Y. enterocolitica</i>	ATCC 27729
5~6	<i>Y. enterocolitica</i>	isolates in spring water
7~8	<i>Y. enterocolitica</i>	isolates in vegetables
9	<i>Y. frederiksenii</i>	
10	<i>Y. intermedia</i>	
11	<i>Y. kristensenii</i>	
12	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	
13	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25392
14	<i>Shigella dysenterii</i>	
15	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
16	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111

Template DNA 준비

주형 DNA는 *Y. enterocolitica* ATCC 27729 표준균주를 trypticase soy broth(5 mL)에 25°C에서 18시간 배양한 후 배양액 1 mL를 원심분리하여 침전시킨 후 cell pellet을 살균증류수로 2회 세척하여 살균증류수 500 µL를 넣고 100°C에서 15분간 열처리 후 DNA 추출없이 균액 3 µL를 직접 주형 DNA로 사용하였다.

PCR primer

병원성 *Y. enterocolitica* 균주를 검출하기 위하여 chromosome에 위치한 병원성 관련 유전자로 356 bp 크기의 *ail*(attachment invasion locus)과 134 bp 크기의 *yst*(heat stable enterotoxin) 유전자 및 plasmid에 위치한 병원성 유전자인 231 bp 크기의 *virF* 유전자를 사용하였으며 마지막으로 *Yersinia* 속을 감별할 수 있는 subgenus-specific primer로 200 bp 크기의 Y16S 유전자를 multiplex-PCR primer로 사용하였다

Multiplex-PCR 분석

세균 DNA의 PCR증폭은 Hamett 등(13)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 단순 열처리한 균액 3 µL를 주형 DNA로 하여 multiplex-PCR을 실시하였으며, reaction mixture는 10X reaction buffer 3 µL, 각각의 50 pM primer 0.6 µL dNTP(2.5 mM) 1.6 µL, *Taq* DNA polymerase(5 unit/µL) 0.25 µL와 증류수로 27 µL되게 조성하였으며, 여기에 template DNA 3 µL를 가하여 총 30 µL가 되도록 한 후 Biometra(UNO-Thermoblock, Germany, Biotron)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 denaturation 94°C 1분, annealing 56°C 1분, extension 72°C 1분 30초를 1 cycle로 하여 35 cycle을 반응시켰다. 단 최초의 cycle은 denaturation 94°C 4분, 최종 cycle후 7분간 72°C에서 extension하여 잔여 DNA 증폭을 마무리한 후 4°C에서 보관하였고, 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel로 100 V에서 50분 동안 전기영동하였으며 ethidium bromide 용액에 30분간 염색한 후 목적 DNA의 증폭여부를 UV transilluminator로 밴드를 분석하였다.

Primer의 특이성 시험

*Y. enterocolitica*의 병원성 관련 유전자 3종과 비병원성 유전자 1종의 primer에 대한 특이성을 확인하기 위하여 *Y. enterocolitica* 분리균주 및 표준균주, *Yersinia* spp. 및 기타 세균을 동일한 조건에서 multiplex PCR로 증폭한 다음 1.5% agarose gel로 전기영동하여 *Y. enterocolitica*의 특이적 DNA 절편을 확인하였다.

민감성 시험

Multiplex-PCR법으로 검출 가능한 최소 세균수를 알아보기 위하여 primer의 특이성 시험에서 특이적 DNA 절편을 가장 잘 나타내는 *Y. enterocolitica* ATCC 27729균을 표준균주로 사용하였으며 초기농도를 7×10^8 CFU/mL로부터 시작하여 연속적인 10진 희석법으로 7 CFU/mL까지 희석한 배양액을

주형으로 직접 사용하여 multiplex-PCR을 실시하였다.

먹는샘물에 대한 multiplex-PCR의 적용시험

특이성 실험에서 가장 좋은 특이밴드를 형성하는 *yst* 유전자와 Y16S 유전자 2종의 primer를 사용하여 먹는샘물로부터 병원성 *Y. enterocolitica*의 검출을 알아보기 위하여 일반세균수가 3600 CFU/mL되는 먹는샘물 시료에 *Y. enterocolitica* ATCC 27729균의 초기농도를 7×10^8 CFU/mL로부터 시작하여 연속적인 10진 희석법으로 7 CFU/mL까지 접종시킨 후 100°C 15분간 열처리한 균액을 주형으로 직접 사용하여 multiplex-PCR을 실시하였다.

야채류에 대한 multiplex-PCR의 적용시험

특이성 실험에서 가장 좋은 특이밴드를 형성하는 *yst* 유전자와 Y16S 유전자 2종의 primer를 사용하여 신선한 상추와 양송이버섯으로부터 병원성 *Y. enterocolitica*의 검출을 알아보기 위하여 각각 10 g에 *Y. enterocolitica* ATCC 27729균을 사용하여 초기농도를 7×10^8 CFU/g로부터 시작하여 연속적인 10진 희석법으로 7 CFU/g까지 접종시킨 후 살균 증류수 90 mL를 가하여 균질화시킨 현탁액을 1 mL씩을 100°C에서 15분간 가열처리한 균액 3 µL를 주형으로 직접 사용하여 multiplex-PCR을 실시하였다.

결과 및 고찰

Multiplex-PCR법에서의 primer의 특이성

Multiplex-PCR을 사용하여 병원성이 있는 *Y. enterocol-*

itica 균주를 신속히 검출하는 방법을 모색하기 위하여 *Y. enterocolitica* ATCC 27729 표준균주를 사용하였다. Chromosome에 위치한 *ail*(attachment invasion locus), *yst*(heat stable enterotoxin) 유전자와 plasmid에 위치한 *virF* 유전자를 사용하였으며, *Yersinia* 속을 감별할 수 있는 Y16S(subgenus-specific primer) 유전자를 사용하여 각각의 primer 특이성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. *Y. enterocolitica* ATCC 27729균은 356 bp(*ail*), 134 bp(*yst*) 및 200 bp(Y16S) 3종의 유전자에 대한 DNA 증폭밴드를 나타내었으며, *Y. enterocolitica* ATCC 9610 및 ATCC 23715는 *yst*와 Y16S 2종에만 밴드 증폭을 보였다. 한편, 기타 비병원성 *Yersinia*균인 *Y. frederikseni*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. pseudotuberculosis* 등은 Y16S에만 DNA밴드를 나타내었으나 plasmid 유래 *virF* primer는 사용된 어떤균에도 특이적인 밴드를 나타내지 않아 *Y. enterocolitica* 균주를 검출하는 primer로는 바람직하지 않는 것으로 나타났다. 한편, 기타 세균인 *E. coli* ATCC 25392, *Shi. dysenteri*, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC 19111균에서는 어떤 primer에서도 특이 DNA밴드를 확인할 수 없었기 때문에 본 연구에 사용된 *ail*, *yst* 및 Y16S primer는 *Y. enterocolitica* 및 *Yersinia* 속을 감별할 수 있는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 Lee 등(12)이 *ail*, *yst* 및 *virF* 유전자를 사용하여 *Y. enterocolitica* 균주를 검출하기 위한 multiplex-PCR을 수행하였을때, *ail*과 *yst* 유전자가 *Y. enterocolitica* ATCC 27729균에 존재하였으며 *virF* 유전자는 존재하지 않았다는 보

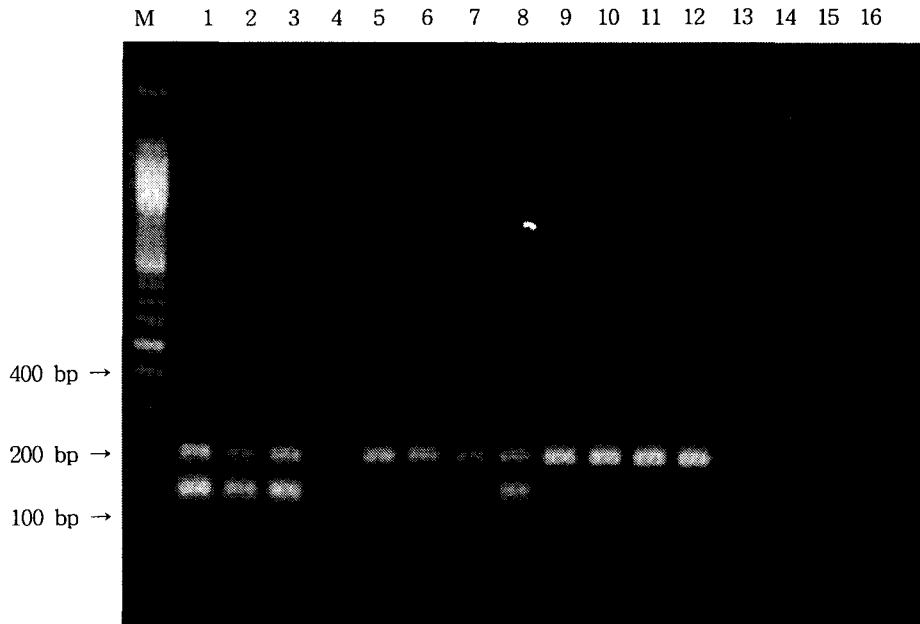


Fig. 1. Specificity of detection of *Y. enterocolitica* in the multiplex-PCR assay for using *ail*, *yst*, *virF* and Y16S primer. Lane M: 100 bp DNA Ladder, 1: *Y. enterocolitica* ATCC 9610, 2: *Y. enterocolitica* ATCC 23715, 3: *Y. enterocolitica* ATCC 27729, 4: Negative control (no cell), 5~6: *Y. enterocolitica* (spring water isolates), 7~8: *Y. enterocolitica* (vegetable isolates), 9: *Y. frederiksenii*, 10: *Y. intermedia*, 11: *Y. kristensenii*, 12: *Y. pseudotuberculosis*, 13: *Escherichia coli* ATCC 25392, 14: *Shigella dysenteri*, 15: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 16: *Listeria monocytogenes* ATCC 19111.

고와 유사한 것으로 나타났다. 또한 팽이버섯에서 분리한 병원성 *Y. enterocolitica* O:8(Lane 8) 균주는 *yst* 유전자를 소유하고 있었으나, 양배추, 미나리 및 콩나물에서 분리한 *Y. enterocolitica* (Lane 5~7) 균주들은 이들 병원성 유전자를 소유하지 않는 것으로 나타났다. *Y. enterocolitica*의 병원성조사는 *ail*, *yst*, *virF* 및 *inv* 유전자 중 어느 한가지를 사용할 경우 단독처리로는 완전한 병원성을 나타내지 못한다. 따라서 이들 유전자들을 병용처리하여 사용하는 것이 바람직하나 이들의 병용 사용시 각각의 유전자에 대한 최적조건을 규명하는 기초조사가 선행되어야 할 것으로 사료된다.

Primer의 multiplex-PCR 민감성

Multiplex primer를 이용하여 *Y. enterocolitica* 균에 대한 특이성 연구결과, *Y. enterocolitica* ATCC 27729균이 *ail*, *yst* 및 Y16S 유전자에 모두 특이적인 증폭을 나타내었기 때문에 민감도실험을 위한 지표세균으로 사용하였다. 또한, 본 실험에서는 multiplex PCR을 수행하였기 때문에 사용된 각 primer들의 PCR특성이 달라 혼합 사용시 민감도가 다르기 때문에 동일한 조건에서 두종 또는 세종류의 primer를 혼합하여 민감도를 조

사하였다.

Fig. 2A는 *yst* 유전자와 Y16S 유전자를 혼합한 PCR을 사용하여 *Y. enterocolitica*의 검출한계를 측정된 결과이다. *Yst* 유전자와 Y16S 유전자 모두 각각 7 CFU/mL의 검출한계를 나타내었으나, *ail* 유전자와 Y16S 유전자를 혼합한 B에서는 7×10^6 CFU/mL 수준까지만 DNA 밴드 증폭을 보여 낮은 민감도를 나타내었다. 한편, *ail*과 *yst* 유전자를 혼합한 C의 경우에서도 *yst* 유전자는 7 CFU/mL의 검출한계를 보였으나 *ail* 유전자는 5×10^6 CFU/mL의 낮은 민감도를 나타내었다. 또한, *ail*, *yst* 및 Y16S 유전자를 혼합한 D의 경우 *ail* 유전자와 *yst* 유전자 두종을 혼합하였을 때보다 민감도가 더 떨어졌다. 이러한 문제점은 1차 PCR product를 주형으로 사용하여 같은 조건으로 2차 PCR을 수행하였을 때 밴드의 형성이 더 선명하게 나타나거나 민감도가 약간 증가함을 나타내었으나(data not shown), 전반적으로 *Y. enterocolitica*에 대하여 *yst* 유전자가 가장 높은 민감도를 나타내었다. 따라서 먹는샘물이나 야채류에 대한 병원성 *Yersinia*균의 지표유전자로서 속을 대표하는 Y16S 유전자와 종을 대표하는 *yst* 유전자를 선정하였다.

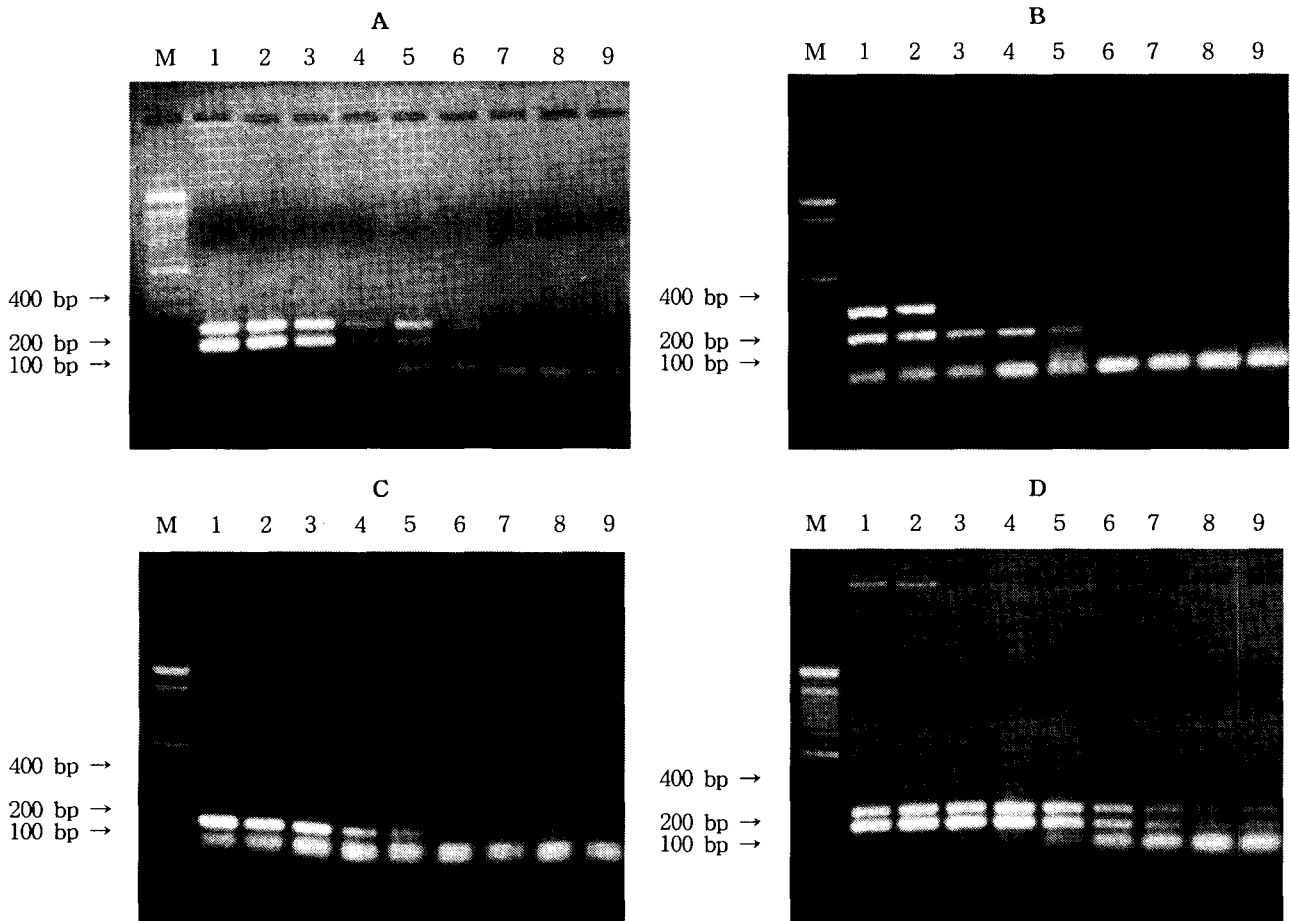


Fig. 2. Sensitivity for detection of *Y. enterocolitica* ATCC 27729 in the multiplex-PCR assay for using *ail*, *yst*, *virF* and Y16S primer.

Lane M: 100 bp DNA Ladder, 1: 7×10^8 , 2: 7×10^7 , 3: 7×10^6 , 4: 7×10^5 , 5: 7×10^4 , 6: 7×10^3 , 7: 7×10^2 , 8: 7×10^1 , 9: 7 CFU/mL. Panel A: *yst* and Y16S primer, Panel B: *ail* and Y16S primer, Panel C: *ail* and *yst* primer, Panel D: *yst*, *ail* and Y16S primer.

Choi 등(14)은 민감도를 증가시키기 위하여 1차 PCR산물을 DNA주형으로 하여 2차 PCR을 수행하였을 때 민감도가 1×10^2 cel에서 2 cell 수준까지 민감도를 높일 수 있었으며 또한 DNA를 분리하지 않고 직접 whole cell을 이용하여 직접 PCR을 수행하였을 때에도 높은 민감도를 얻을 수 있었다고 보고하였으며 Shin 등(15)도 세포 현탁액을 직접 PCR을 위한 DNA 주형으로 사용하여 좋은 결과를 얻었다는 보고와 비교하여 볼 때, 본 연구결과에서도 나타난 바와 같이 DNA를 분리하지 않고 직접 whole cell을 이용하여 직접 PCR을 위한 DNA 주형으로 사용하면서 2차 PCR을 수행하면 DNA를 분리하는 번거로움이 없이 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

먹는샘물에 대한 multiplex PCR 적용시험

먹는샘물에 대한 *Y. enterocolitica*의 검출한계를 알아보기 위하여 multiplex-PCR을 실시한 결과를 Fig 3A와 3B에 나타내었다. 1차 multiplex-PCR에서는 샘플수에 오염된 세균들에 의해 Y16S와 *yst* 유전자 모두 7×10^2 CFU/mL까지 밴드를 형성하였으나(Fig. 3A), 민감도를 증진시키기 위하여 1차 PCR products를 DNA template로 하여 다시 2차 PCR을 38 cycle로 수행하였을 때 Y16S와 *yst* 유전자 모두 7×10^1 CFU/mL 수준까지 민감도가 증진되었다(Fig. 3B). Thomas 등(16)은 민감도를 증진시키기 위하여 PCR cycle횟수를 늘리는 방향으로 변화시키는 것이 바람직하다고 하였으며, Choi 등(14)도 DNA를 추출하지 않고 세포현탁액을 직접 PCR의 주형으로 사용하여 cycle횟수를 변화시킴으로써 민감도를 증진시킬 수 있었다고 보고하였다. 이러한 방법은 미량의 균을 DNA 추출 과정에서 유실하지 않고 열로 lysate시켜 직접 PCR을 행하므로 시간과 노력이 줄어든다는 장점이 있다.

야채류(상추, 양송이버섯)에 대한 multiplex PCR의 적용시험

야채류(상추, 양송이버섯)로부터 병원성 *Y. enterocolitica*

의 신속검출법을 조사하기 위하여 multiplex-PCR을 실시한 결과를 Fig. 4A와 4B에 나타내었다. 상추의 경우, 1차 multiplex-PCR 결과는 식품성분과 오염된 세균들에 의해 PCR증폭이 억제되어 Y16S와 *yst* 유전자 모두 7×10^1 CFU/g까지 검출할 수 있었으나(Fig. 4A), 1차 PCR products를 DNA 주형으로 하여 다시 2차 PCR을 수행하였을 때 Y16S와 *yst* 유전자는 7 및 7×10^1 CFU/g 수준까지 민감도가 현저하게 증진되었다(Fig. 4B). 이러한 양상은 일반세균이 7.1×10^4 CFU/g정도 함유된 양송이버섯에 적용하였을 때에도 비슷한 결과를 나타내었다. 버섯의 경우, 1차 multiplex PCR 결과는 식품성분과 오염된 세균들에 의해 Y16S와 *yst* 유전자 모두에서 7×10^4 CFU/g까지 명확한 밴드가 확인되었으며(Fig. 5A), 2차 PCR을 수행하였을 때는 Y16S 유전자는 7×10^1 CFU/g까지 현저하게 민감도가 증진되었으며 *yst* 유전자는 7×10^1 CFU/g 수준까지 민감도가 증진되었다(Fig. 5B).

식품에서 병원균을 증균과정 없이 직접적으로 PCR을 이용하여 신속하게 검출하는 기술은 공중위생상 매우 중요하다. 그러나 식품 시료내에 존재하는 여러 종류의 PCR 저해제 때문에 효과적인 검출이 어려워 이를 제거해야 하는 기술적인 문제가 있다. 이러한 현상은 식품의 종류나 초기 미생물균총의 오염 정도에 따라 현저하게 다르며 특히 유제품에서 강한 억제현상을 나타내는 것으로 보고되고 있다(16). 지금까지 식품 중에 존재하는 PCR 저해제를 제거하기 위하여 여과, 세척, 회석, 페놀추출, 친화성 크로마토그래피 등 많은 방법이 효과적으로 알려졌지만 DNA의 유실이 많고 직접 PCR을 수행하였을 때에 비하여 DNA를 추출해야하는 번거로움이 있다(17-19). 따라서, 이러한 DNA 추출방법보다는 false positive반응을 줄이기 위하여 증균 시간을 아주 단축하거나 1차 PCR 후에 nested 또는 2차 PCR을 수행하는 것이 민감도를 높이는 것이 식품안전성의 관점에서 바람직할 것으로 생각된다.

본 연구에서 나타난 바와 같이 수질이나 야채류에서 Y16S

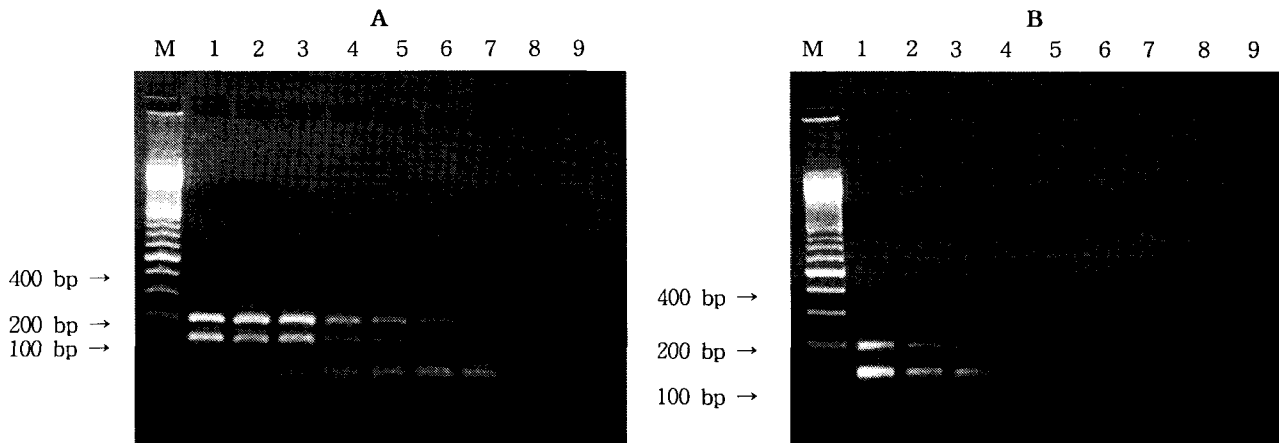


Fig. 3. Detection limit of the multiplex PCR using *yst* and Y16S primer for detection of *Y. enterocolitica* ATCC 27729 cells inoculated into the spring water.

Panel A: first 38 cycle PCR, Panel B: 2nd 38 cycle PCR after first PCR.

Lane M: 100 bp DNA ladder, 1: 7.0×10^8 CFU/mL, 2: 7.0×10^7 CFU/mL, 3: 7.0×10^6 CFU/mL, 4: 7.0×10^5 CFU/mL, 5: 7.0×10^4 CFU/mL, 6: 7.0×10^3 CFU/mL, 7: 7.0×10^2 CFU/mL, 8: 7.0×10^1 CFU/mL, 9: 7.0 CFU/mL.

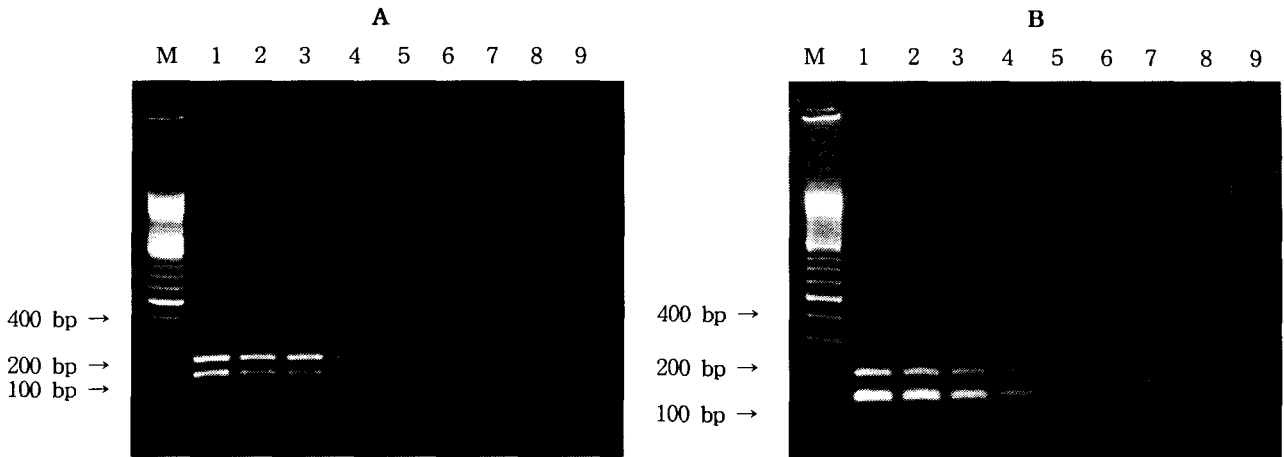


Fig. 4. Detection limit of the multiplex PCR using *yst* and Y16S primer for detection of *Y. enterocolitica* ATCC 27729 cells inoculated into the lettuce.

Panel A: first 38 cycle PCR, Panel B: 2nd 38 cycle PCR after first PCR.

Lane M: 100 bp DNA ladder, 1: 7.0×10^8 CFU/g, 2: 7.0×10^7 CFU/g, 3: 7.0×10^6 CFU/g, 4: 7.0×10^5 CFU/g, 5: 7.0×10^4 CFU/g, 6: 7.0×10^3 CFU/g, 7: 7.0×10^2 CFU/g, 8: 7.0×10^1 CFU/g, 9: 7.0 CFU/g.

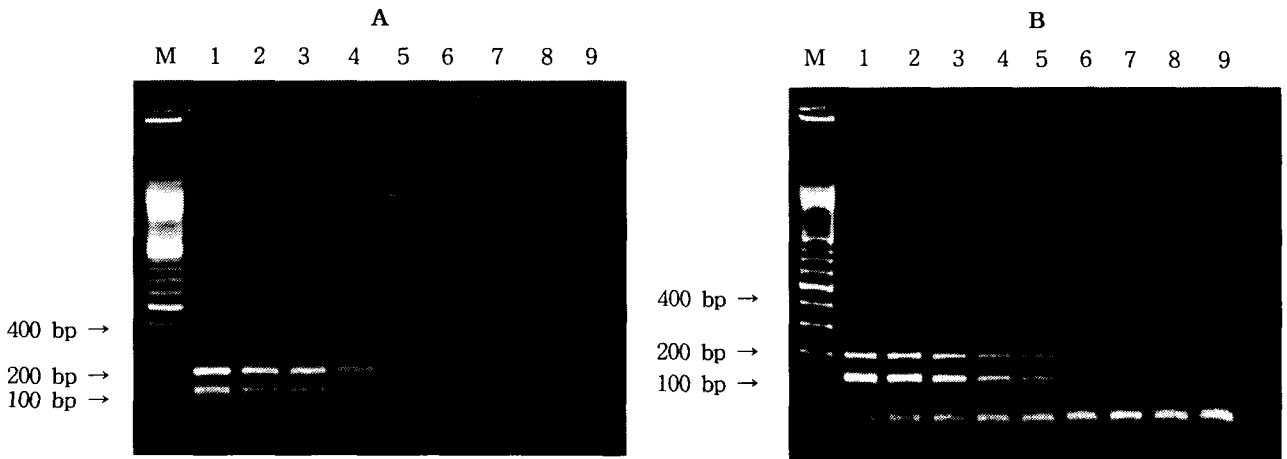


Fig. 5. Detection limit of the multiplex PCR using *yst* and Y16S primer for detection of *Y. enterocolitica* ATCC 27729 cells inoculated into the mushroom.

Panel A: first 38 cycle PCR, Panel B: 2nd 38 cycle PCR after first PCR.

Lane M: 100 bp DNA ladder, 1: 7.0×10^8 CFU/g, 2: 7.0×10^7 CFU/g, 3: 7.0×10^6 CFU/g, 4: 7.0×10^5 CFU/g, 5: 7.0×10^4 CFU/g, 6: 7.0×10^3 CFU/g, 7: 7.0×10^2 CFU/g, 8: 7.0×10^1 CFU/g, 9: 7.0 CFU/g.

와 *yst* 유전자를 혼합하여 *Y. enterocolitica*를 검출할 경우, DNA를 분리하지 않고 직접 whole cell을 lysate하여 DNA추형으로 사용하여도 2차 PCR을 수행할 경우에는 증균과정을 하지 않고도 민감도를 증진시키면서 신속하게 효율적으로 원하는 대상균을 검출할 수 있었다. 향후 좀더 신속하고 효율적인 검출을 위해서는 각각의 식품 특성에 맞는 PCR방법이 개발되어야 하겠다.

요 약

본 연구는 식품에 존재하는 *Y. enterocolitica*균의 신속한 검출방법을 조사하기 위하여 이균에 특이적인 특이적인 *ail*, *yst* 및 *virF* 유전자와 *Yersinia* 속균을 구별하는 subgenus-

specific Y16S primer를 도입하여 multiplex PCR을 수행하였으며 *Y. enterocolitica*균의 검출 민감도와 특이도 및 먹는 샘플과 야채류에서의 적용실험을 각각 조사하였다. PCR 특이성 실험에서는 *Y. enterocolitica* ATCC 27729균은 356 bp(*ail*), 134 bp(*yst*) 및 200 bp(Y16S) 3종의 유전자에 대한 DNA 증폭 밴드를 나타내었으며, *Y. enterocolitica* ATCC 9610 및 ATCC 23715는 *yst*와 Y16S 2종에만 증폭을 보였다. 반면에 기타 비병원성 *Yersinia*균인 *Y. frederikseni*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. pseudotuberculosis* 등은 Y16S에만 DNA밴드를 나타내었으나 기타 세균인 *E. coli* ATCC 25392, *Shi. dysenterii*, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC 19111 균에서는 어떤 primer에서도 특이 DNA 밴드를 확인할 수 없었다. PCR 민감도는 다른 유전자에 비하여 *yst* 유전자가 *Y.*

*enterocolitica*균에 가장 높은 민감도를 나타내었고, Y16S 유전자는 속과 종에 관계없이 높은 민감도를 나타내었다. 따라서, 먹샘물이나 야채류에 대한 병원성 *Yersinia*균의 지표유전자로서 속을 대표하는 Y16S유전자와 종을 대표하는 *yst*유전자를 선정하였다. 수질 중 *Y. enterocolitica*의 검출한계를 알아 보기 위하여 일반세균수가 3600 CFU/mL정도 함유된 먹는샘물의 경우, DNA를 분리하지 않고 단순 열처리한 배양액을 DNA주형으로 사용하여 multiplex-PCR을 실시한 결과, Y16S와 *yst* 유전자 모두 7×10^1 CFU/mL 수준까지 검출할 수 있었으며, 일반세균수가 2.5×10^3 CFU/g 정도 함유된 상치는 7 및 7×10^1 CFU/g, 일반세균이 7.1×10^4 CFU/g정도 함유된 양송이버섯은 7 및 7×10^1 CFU/g 수준까지 검출할 수 있었다. 본 연구에서 나타난 바와 같이, 수질이나 야채류에서 Y16S와 *yst* 유전자를 혼합하여 *Y. enterocolitica*를 검출할 경우, DNA를 분리하지 않고 직접 whole cell을 lysate하여 DNA주형으로 사용하여도 2차 PCR을 수행할 경우에는 증균과정은 하지 않고도 민감도를 증진시키면서 신속하게 효율적으로 원하는 대상균을 검출할 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 한국학술진흥재단에서 지원한 학술연구 조성에 의해 수행된 연구결과의 일부이며 지원에 감사드립니다.

문헌

1. Krieg NR, Holt JG, Sneath P, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's manual of Systemic Bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins, Maryland. p 566.
2. Stern NJ, Pierson MD, Kotula AW. 1980. Effects of pH and sodium chloride on *Y. enterocolitica* growth at room and refrigeration temperatures. *J Food Science* 45: 64-67.
3. Swaminathan B, Harmon MC, Mehlman IJ. 1982. A review *Yersinia enterocolitica*. *J Appl Bacteriol* 52: 151-154.
4. Butler T. 1983. *Plaque and other Yersinia infections*. Plenum Medica Book Comp, New York. p 55-62.
5. Park SG, Choi SM, Oh YH, Choi CS. 1993. Biotyping, serotyping and antimicrobial susceptibility of *Y. enterocolitica* isolated from cattle. *J Korean Soc Microbiol* 28: 453-460.

6. Lim SY, Lee DH, Park SH, Kim CM. 1999. Characteristics of *Yersinia enterocolitica* isolated from foods. *Korean J Food Sci Tech* 31: 183-188.
7. Tassinari A, Franco BDG, Landgraf M. 1994. Incidence of *Yersinia* spp. in food in Sao Paulo, Brazil. *Int J Food Microbiol* 21: 262-270.
8. Cover TL, Aber RC. 1989. Medical progress-(*Yersinia enterocolitica*). *N Engl J Med* 321: 16-24.
9. Kwaga J, Iversen JO, Misra V. 1992. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled polynucleotide probes. *J Clin Microbiol* 30: 2668-2671.
10. Kapperud G, Dommarsnes K, Skurnik M, Homes E. 1990. A synthetic oligonucleotide probe and a cloned polynucleotide probe based on the *yopA* gene for detection and enumeration of virulent *Yersinia enterocolitica*. *Appl Environ Microbiol* 56: 17-20.
11. Oh HJ, Kim CM, Seong WK, Min HK. 1996. Study on the development of rapid detection method for pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by polymerase chain reaction (in Korean). *J Korean Soc Microbiol* 31: 165-173.
12. Lee YK, Choi SM, Oh SK, Shin JY, Ryeom K. 2000. Rapid detection method for pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a multiplex PCR. *Korean J Sanitation* 15: 105-113.
13. Harnett N, Lin YP, Krishnan C. 1996. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* using the multiplex polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 117: 59-67.
14. Choi YC, Park BK, Oh DH. 2000. Polymerase chain reaction for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods using *hly* gene primers. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 1016-1024.
15. Shin SH, Koo YJ, Kim WJ. 1999. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods by a polymerase chain reaction. *Korean J Food Sci Technol* 31: 1628-1634.
16. Thomas EJG, King RK, Burchak J, Gannon VPJ. 1991. Sensitive and specific of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 57: 2576-2580.
17. Wang RF, Cao WW, Johnson MG. 1992. 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. *Appl Environ Microbiol* 58: 2827-2831.
18. Fitter S, Heuzenroeder M, Thomas CJ. 1992. A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Bacteriol* 73: 53-59.
19. Wernars K, Heuvelman CJ, Chakraborty T, Notermans SHW. 1991. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J Appl Bacteriol* 70: 121-126.

(2002년 6월 24일 접수; 2002년 12월 3일 채택)