

주요 식중독 그람 음성 세균 4속의 REP-PCR genotyping

정혜진 · 서현아 · 김영준 · 조준일 · 김근성*

중앙대학교 식품공학과

REP-PCR Genotyping of Four Major Gram-negative Foodborne Bacterial Pathogens

Hye-Jin Jung, Hyeon-A Seo, Young-Joon Kim, Joon-Il Cho, and Keun-Sung Kim*

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

Dispersed repetitive DNA elements in genomes of microorganisms differ among and within species. Because distances between repetitive sequences vary depending on bacterial strains, genomic fingerprinting with interspersed repetitive sequence-based probes can be used to distinguish unrelated organisms. Among well-known bacterial repetitive sequences, Repetitive Extragenic Palindromic (REP) sequence has been used to identify environmental bacterial species and strains. We applied REP-PCR to detect and differentiate four major Gram-negative food-borne bacterial pathogens, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, and *Vibrio*. Target DNA fragments of these pathogens were amplified by REP-PCR method. PCR-generated DNA fragments were separated on 1.5% agarose gel. Dendrograms for PCR products of each strain were constructed using photo-documentation system. REP-PCR reactions with primer pairs REP1R-I and REP2-I revealed distinct REP-PCR-derived genomic fingerprinting patterns from *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, and *Vibrio*. REP-PCR method provided clear distinctions among different bacterial species containing REP-repetitive elements and can be widely used for typing food-borne Gram-negative strains. Results showed established REP-PCR reaction conditions and generated dendrograms could be used with other supplementary genotyping or phenotyping methods to identify isolates from outbreak and to estimate relative degrees of genetic similarities among isolates from different outbreaks to determine whether they are clonally related.

Key words: foodborne bacterial pathogens, REP-PCR, genotyping, genetic similarity

서 론

현대 사회가 경제 발전과 더불어 고도로 조직화, 산업화 되어감에 따라 식생활의 양상에도 변화가 일어 식생활이 점차 서구화, 다양화되고 있다. 이와 더불어 최근 학교나 집단에서의 단체급식의 확산 그리고 국가간의 물자교류와 인구의 이동 증가로 식중독의 원인이 다양해지고 발생지역이 광역화되어 그것의 직·간접적인 영향이 한 지역에 국한되지 않고 전국적, 국제적인 사안으로까지 확대되고 있다. 이에 따라 국내에서도 식품의 위생관리와 안전성 확보에 지속적인 발전이 이루어지고 있다. 그러나, 식중독을 비롯한 식품매개성질환의 발생은 증가되는 추세여서 식중독 원인균에 대한 관리와 오염원을 추적하는 기술의 확립 등이 시급한 현실이다.

최근 여러 식중독 유발세균들 중에서 *Salmonella*(1,2), *Escher-*

ichia coli(3-5), *Shigella*(6,7), *Vibrio*(8) 등 4속의 그람 음성 병원성 세균들에 의한 식중독 유발이 많은 비중을 차지하며, 이러한 식중독 유발세균들을 분자생물학적인 방법들을 사용하여 분리·동정하는 방법이 많이 연구되어지고 있다. 그리고 이들을 실제로 적용하여 식중독 유발의 원인균과 오염경로등을 파악하려는 시도도 이루어지고 있다(9). 이와 같은 분자생물학적 기술중 미생물의 genomic DNA 상의 반복적인 염기서열을 이용한 PCR 기술은 분별능이 뛰어나며 실험의 재현성과 경제성의 측면에서도 많은 장점을 갖고 있는 것으로 보고되고 있으며(10), 이러한 반복성 DNA sequence의 예로서는 REP(repetitive extragenic palindromic) sequence(11), ERIC(enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequence(12), 그리고 BOX sequence(13) 등이 있다.

이 중에서 5 bp의 유동적인 loop구조를 포함한 35-40 bp palindromic unit으로 구성되어 있는 REP sequence들은 염색체 상에서 전사되는 non-coding 부위에 위치하며 방향성에 있어서 전사 방향과 같은 방향 혹은 반대방향에 관계없이 염색체 상에 위치할 수 있다(14). 또한 초기 연구단계에서 REP sequence 들은 *E. coli*와 *S. typhimurium*과 같은 그람음성 장내세균들에서 주로 발견되었으나(15), 이후 이러한 반복적 DNA sequence

*Corresponding author: Keun-Sung Kim, Department of Food Science and Technology, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University, 72-1, Ansong-si, Gyunggi 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-3032
Fax: 82-31-675-4853
E-mail: keunsung@post.cau.ac.kr

들의 존재는 *Neisseria*, *Myxococcus*, *Deinococcus*, *Streptococcus* 등과 같이 몇 개의 다른 genera를 포함하는 그람 음성 및 그람 양성균들에서도 발견되어 연구되었다(16).

한편 종(species)마다 반복성 sequence가 염색체상의 위치하는 부분이 다르기 때문에 이러한 산재된 반복성 sequence를 함유하는 probe를 이용한 genome fingerprinting은 결과적으로 PCR 반응 후 얻어지는 DNA 단편들의 크기와 갯수가 종(species)마다 다르게 나타난다. 즉, 각각 다른 DNA fingerprinting pattern들이 얻어져서 상호연관성이 있는 균주들끼리 구분하여 구별할 수 있다(17).

따라서 본 연구에서는, 높은 분리능을 가지고 있어 미생물의 형태적, 생리학적 특성을 근거로한 분리·동정을 체계화시킬 수 있을 뿐만 아니라 실험의 재현성과 경제성의 측면에서도 많은 장점을 갖고 있는 REP DNA sequence를 응용한 REP-PCR을 이용하여 *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* 등 4속의 주요 그람 음성 식중독유발 세균의 동일속 혹은 종내 균주간 유전적 다양성을 분석하고 상호 유전적 근연관계를 조사하였다. 또한 다양한 source로부터 분리된 동일한 4속의 분리균주들에도 REP-PCR을 적용하여 표준균주들과 상호 비교 분석을 통해 이를 바탕으로 식중독 유발 미생물의 분리·동정 기술을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

실험에 사용된 4속(*Salmonella*, *E. coli*, *Shigella*, *Vibrio* 등)의 표준균주는 Table 1에 나타내었다. 또한 다양한 source로부터 분리된 4속의 분리균주는 Table 2에 나타내었다. 이들 균주들을 사용전 tryptic soy broth(TSB, Difco Laboratories, MI, USA) 및 tryptic soy agar(TSA, Difco Laboratories, MI, USA)에 수회 계대배양하여 사용하였다.

Table 1. Reference strains used in this study

This study	Strains
ESC-R1	<i>Escherichia coli</i> H1029 (serotype unconfirmed)
ESC-R2	<i>Escherichia coli</i> 330C1 (O159:H4)
ESC-R3	<i>Escherichia coli</i> 411C1 (O25:H24)
ESC-R4	<i>Escherichia coli</i> 214-4 (serotype unconfirmed)
ESC-R5	<i>Escherichia coli</i> H10407 (O78:H11)
ESC-R6	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (serotype unconfirmed)
ESC-R7	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35150 (O157:H7)
SAT-R1	<i>Salmonella typhi</i> Ty2 ATCC 19430
SAT-R2	<i>Salmonella typhi</i> O901W ATCC 10749
SAT-R3	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028
SAT-R4	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19585
SAT-R5	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 29629
SAE-R1	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076
SHD-R1	<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 27345
SHF-R1	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903
SHB-R1	<i>Shigella boydii</i> ATCC 8700
SHS-R1	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 29930
VIC-R1	<i>Vibrio cholerae</i> NIH 35A3
VIM-R1	<i>Vibrio mimicus</i> ATCC 33653
VIP-R1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802
VIP-R2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 33844

Total DNA 추출

Versalovic 등(18)의 방법에 따라 *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp.의 total DNA를 각각 추출하였다. Table 1과 Table 2에 나타난 바와 같이 4속의 균주들을 5 mL의 TSB 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 진탕배양 후, 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 수확한 다음, 1 mL의 1 M NaCl을 넣어서 2회 세척한 후, 다시 원심분리하여 균체를 수확한 후 700 µL의 1×TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 용액에 현탁시켰다. 현탁된 세포에 100 µL의 lysozyme(2 mg/mL)과 30 µL의 RNase A(10 mg/mL)를 넣어서 37°C에서 20분간 방치한 후, lysozyme으로 분해가 안됐을 경우 60 µL의 SDS(10%)를 가하였다. 이 현탁액에 100 µL의 sarkosyl(10%)과 60 µL의 proteinase K(10 mg/mL)를 가한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰

Table 2. Isolated strains used in this study

This study	Strains
ESC-I1	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0056
ESC-I2	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0059
ESC-I3	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0061
ESC-I4	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0079
ESC-I5	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0081
ESC-I6	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0084
ESC-I7	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0087
ESC-I8	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0096
ESC-I9	<i>Escherichia coli</i> KMEC-00228
ESC-I10	<i>Escherichia coli</i> KMEC-00231
SAE-I1	<i>Salmonella enteritidis</i> KMSM0002
SAS-I1	<i>Salmonella</i> spp. Y17
SAS-I2	<i>Salmonella</i> spp. Y19
SAS-I3	<i>Salmonella</i> spp. Y20
SAS-I4	<i>Salmonella</i> spp. Y21
SAS-I5	<i>Salmonella</i> spp. Y22
SHS-I1	<i>Shigella sonnei</i> S1
SHS-I2	<i>Shigella sonnei</i> S2
SHS-I3	<i>Shigella sonnei</i> S3
SHS-I4	<i>Shigella sonnei</i> S4
SHS-I5	<i>Shigella sonnei</i> S5
SHS-I6	<i>Shigella sonnei</i> S6
SHS-I7	<i>Shigella sonnei</i> S7
SHS-I8	<i>Shigella sonnei</i> S8
SHS-I9	<i>Shigella sonnei</i> S9
SHS-I10	<i>Shigella sonnei</i> S10
VIP-I1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V2
VIP-I2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V3
VIP-I3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V5
VIP-I4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V6
VIP-I5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V8
VIP-I6	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V111
VIP-I7	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V112
VIP-I8	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V113
VIP-I9	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V114
VIP-I10	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V115
VIP-I11	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V116
VIP-I12	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V117
VIP-I13	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V118
VIP-I14	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V119

다. 그리고 이 분해된 세포현탁액으로부터 phenol과 ethanol을 이용하여 DNA를 추출하였으며, 추출된 DNA를 50 µL의 1×TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 용액에 용해하여 사용하였다.

PCR 분석 및 확인

PCR 반응 혼합액은 5 µL의 10× reaction buffer(최종 농도-400 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0), 5 µL의 dNTP, 1U의 Taq DNA polymerase(Bioneer, Daejeon, Korea), 2.0 µM의 각 primer 및 template DNA 1 µL의 혼합액에 증류수를 최종 50 µL가 되도록 첨가하여 DNA 연쇄증합반응기 PTC-100(MJ Research, Inc., MA, USA)에서 증폭시켰다. 본 연구에서 위의 4속의 식중독유발 세균들은 REP1R-I(5'-IIIICGICGICATCIGGC-3')와 REP2-I(5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3')의 primer set를 이용하여 증합반응을 실행하였다(19). 한편 REP-PCR 반응 조건은 94°C에서 7분간 가열한 후, denaturation을 94°C에서 1분, annealing을 40°C에서 1분, 그리고 extension을 72°C 3분으로 30 cycle 반복하였고, 마지막에 72°C에서 3분간 더 반응시킨 뒤, 4°C에서 30분간 방치시켰다. PCR 산물은 1.5% agarose(1×TAE) gel에서 120V로 1시간 전기영동하고 ethidium bromide(5 µg/mL)로 염색한 후 transilluminator로 확인하였다. 산물의 크기는 1 kb DNA Ladder(Gibco-BRL laboratories, NY, USA)를 사용하여 측정하였다.

균주간의 연관성 분석

각 균주간 band pattern의 비교를 위하여 동일한 크기의 band는 동일 부위의 증폭 band로 가정하여 band의 유무에 따라 1

과 0으로 구분하여 Bio-Gene software(version 96, Vilber Lourmat, Marne la vallee, France) 프로그램에 입력한 뒤, UPGMA (unweighted paired group methods with arithmetic average)법(20)을 이용하여 dendrogram을 작성하였으며, Dice coefficient(21,22)를 근거로 유사도 값을 구하였다.

결과 및 고찰

E. coli

E. coli O157:H7을 포함하는 7개의 *E. coli* 표준균주와 다양한 source로부터 분리된 10개의 *E. coli* 분리균주를 대상으로 REP-PCR을 실시한 결과, 300 bp에서 4.5 kb 범위에 걸쳐 5-14개의 band가 증폭되었다(Fig. 1, Panel A). 그러므로 Dombek 등(3)에 의하여 사람과 동물로부터 분리된 *E. coli*를 대상으로 수행한 유사한 연구에서 300 bp에서 4.5 kb 범위에 걸쳐 25-30개의 band가 증폭되었다는 보고와 Mclellan 등(23)에 의하여 다양한 source로부터 분리된 *E. coli*를 대상으로 수행한 유사한 연구에서 300 bp에서 6.0 kb 범위에 걸쳐 13-22개의 band가 증폭되었다는 보고보다는 본 연구에 사용된 균주들로부터는 더 적은 숫자의 band가 증폭되었다. 그러나 Fig. 1에서 보는 바와 같이 전형적으로 520 bp 크기의 band가 주로 검출되는 결과는 위의 이전에 보고된 결과와 유사함을 나타내었다. 한편 혈청형이 O78:H11인 ESC-R5(*E. coli* H10407)와 혈청형이 확인되지 않은 ESC-R4(*E. coli* 214-4)는 유사한 band pattern을 나타내었다. 또한 *E. coli* 분리균주중 ESC-I2와 ESC-I3도 유사한 band pattern을 나타내었다.

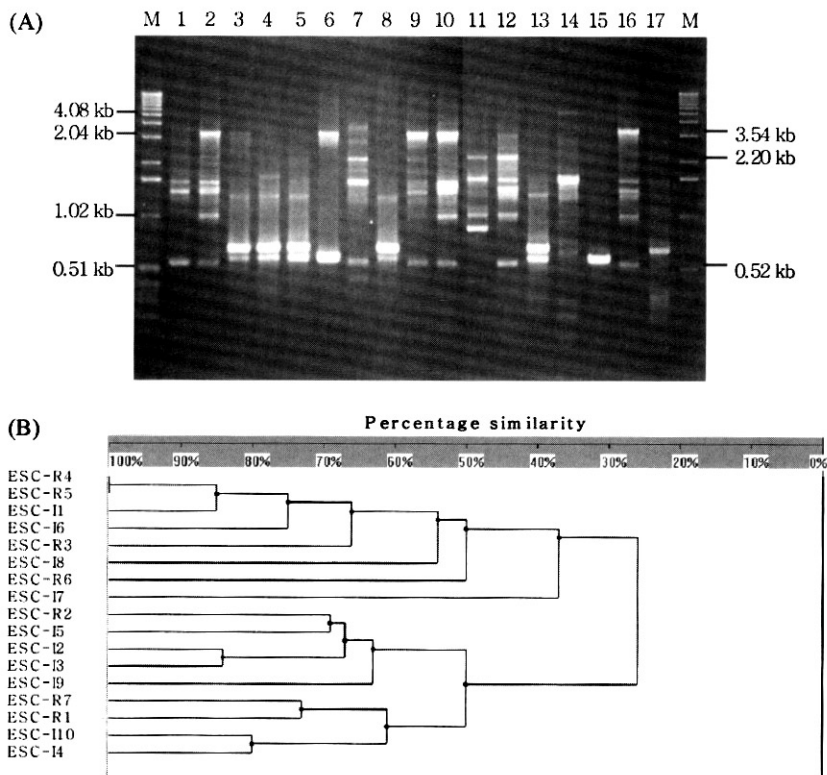


Fig. 1. Panels A and B represent fingerprinting patterns generated using the REP-PCR products from *E. coli* strains and a corresponding dendrogram depicting REP-PCR-derived genetic similarities among them, respectively. Lanes M showed 1 kb DNA ladders. Lanes 1 to 7 showed reference strains and other lanes showed isolated strains. Lane 1: ESC-R1, Lane 2: ESC-R2, Lane 3: ESC-R3, Lane 4: ESC-R4, Lane 5: ESC-R5, Lane 6: ESC-R6, Lane 7: ESC-R7, Lane 8: ESC-I1, Lane 9: ESC-I2, Lane 10: ESC-I3, Lane 11: ESC-I4, Lane 12: ESC-I5, Lane 13: ESC-I6, Lane 14: ESC-I7, Lane 15: ESC-I8, Lane 16: ESC-I9, Lane 17: ESC-I10.

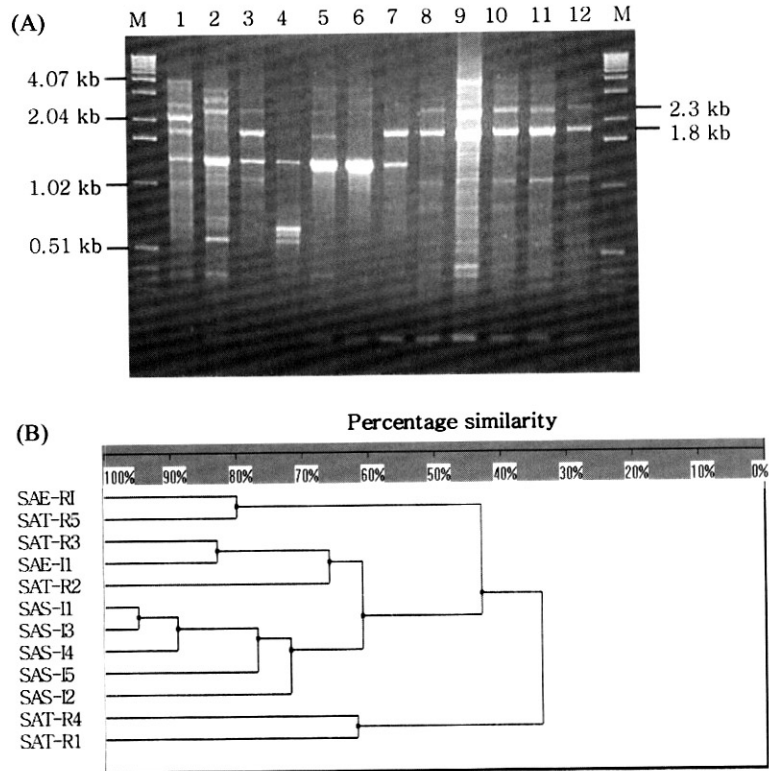


Fig. 2. Panels A and B represent fingerprinting patterns generated using the REP-PCR products from *Salmonella* strains and a corresponding dendrogram depicting REP-PCR-derived genetic similarities among them, respectively.

Lanes M showed 1 kb DNA ladders. Lanes 1 to 6 showed reference strains and other lanes showed isolated strains. Lane 1: SAT-R1, Lane 2: SAT-R2, Lane 3: SAT-R3, Lane 4: SAT-R4, Lane 5: SAT-R5, Lane 6: SAE-R1, Lane 7: SAE-I1, Lane 8: SAS-I1, Lane 9: SAS-I2, Lane 10: SAS-I3, Lane 11: SAS-I4, Lane 12: SAS-I5.

각 DNA fingerprint의 연관성 분석 결과, 실험균주들은 genetic similarity 90% 수준에서 16개의 type을 나타내었고(Fig. 1, Panel B), 38% 수준에서 두 group으로 양분되었다. 그리고 유사한 band pattern을 나타내었던 ESC-R4와 ESC-R5는 DNA 연관성 분석에서 100% 일치하는 결과를 나타내었고, ESC-I2와 ESC-I3도 genetic similarity가 80% 이상이므로 높은 연관성을 나타내었다. 한편 본 연구에서는 혈청형이 확인되지 않은 ESC-R1, ESC-R4 및 ESC-R6를 제외하고 각기 다른 혈청형을 갖는 것으로 확인된 *E. coli* 표준균주들에 대한 본 연구 결과에 의하면 균주마다 각기 다른 band pattern 및 낮은 genetic similarity를 나타내었다. 이러한 결과는 식품과 임상에서 분리한 각기 다른 혈청형을 가진 *E. coli* 균주를 대상으로 한 REP-PCR 결과에 의하면 같은 혈청형내에서는 genetic similarity가 높았던 반면, 다른 혈청형끼리는 낮은 유사도를 나타내었다는 Hahm 등(24)의 보고와 매우 유사하였다.

Salmonella spp.

*Salmonella*속의 주요 종인 *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* 등의 6개 표준균주와 다양한 육제품에서 분리한 *Salmonella* spp. 6개 분리균주를 대상으로 REP-PCR을 실시한 결과 350 bp에서 4.0 kb 범위에 걸쳐 4-15개의 band가 증폭되었다(Fig. 2, Panel A). 이중 *S. enteritidis* 표준균주의 경우 4-7개의 band로 다른 종보다 적은 band수로 증폭되었다. 한편 *S. typhi*와 *S. typhimurium* 표준균주들은 동일한 band pattern을 나타내었으며, 이는 Versalovic 등(18)의 연구에서 *S. typhi*와 *S. typhimurium*에 속하는 균주들이 200 bp에서 3.5 kb 범위에서 band가 집중적

로 증폭되었다는 보고와 유사한 결과이다.

각 DNA fingerprint의 연관성 분석 결과, 실험균주들은 genetic similarity 90% 수준에서 11개의 type으로 나뉘어졌다. 또한 본 연구에서는 같은 종에 속하는 균주들간에 REP-PCR fingerprinting pattern과 관련된 유전적 연관성이 적은 것으로 확인되어 일반적으로 반복성 sequence를 이용한 PCR 방법이 중수준, 더 나아가 균주 수준에서도 분리·동정되어질 수 있다는 Louws 등(25)의 주장을 뒷받침 해주는 결과라 할 수 있겠다.

Shigella spp.

국내·외에서 발생한 *Shigella*속에 의한 식중독중 *S. sonnei*에 의한 식중독 발생 보고가 가장 큰 비율을 차지하므로(6) 본 연구에서는 *Shigella*속에 속하는 4개 표준균주와 다양한 source로부터 분리된 10개 *S. sonnei* 분리균주를 대상으로 REP-PCR을 실시하였다. 그 결과 200 bp에서 7.0 kb 범위에 걸쳐 8-16개의 band가 증폭되었으며, 모든 *Shigella* 균주에서 0.99 kb와 1.85 kb의 단편이 증폭되었다(Fig. 3, Panel A). 한편 10개 *S. sonnei* 분리균주들은 band pattern에 의하여 SHS-II(*S. sonnei* S1)부터 SHS-I4(*S. sonnei* S4)와 SHS-I5(*S. sonnei* S5)부터 SHS-I10(*S. sonnei* S10)까지의 두 가지 type으로 구분되었다. 또한 *S. flexneri*와 *S. sonnei*의 REP-PCR fingerprint는 Versalovic 등(18)에 의한 연구 결과와 매우 유사한 band pattern을 나타내었다.

각 DNA fingerprint의 연관성 분석 결과, 실험균주들은 genetic similarity 90% 수준에서 6개의 type을 나타내었고(Fig. 3, Panel B), 64% 수준에서 2개 type으로 나뉘어졌다. 또한 72% 수준에서 표준 균주의 경우 각기 다른 type을 나타낸 반

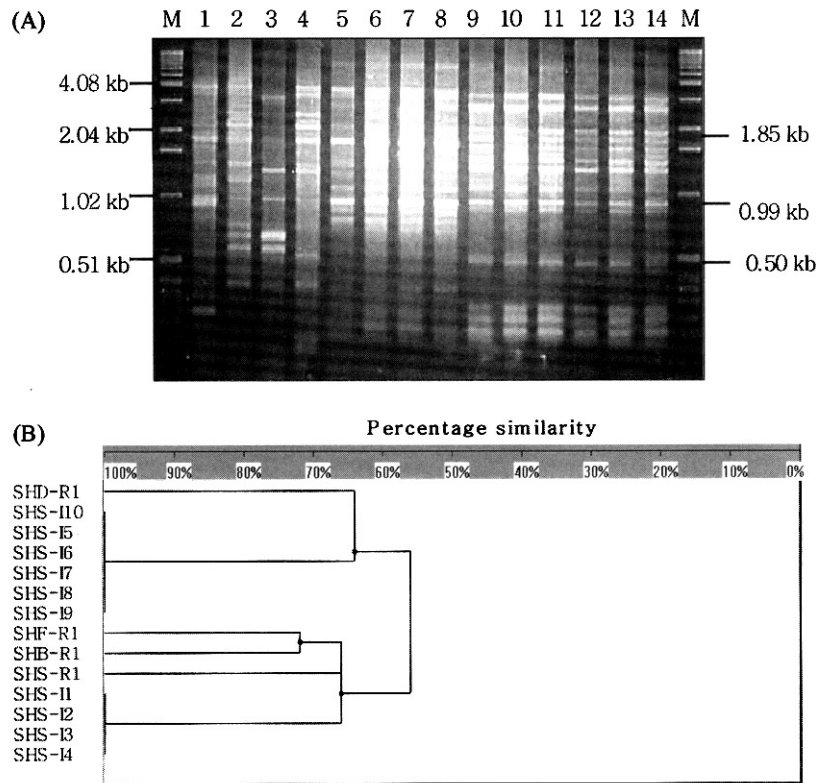


Fig. 3. Panels A and B represent fingerprinting patterns generated using the REP-PCR products from *Shigella* strains and a corresponding dendrogram depicting REP-PCR-derived genetic similarities among them, respectively.

Lanes M showed 1 kb DNA ladders. Lanes 1 Lane 4 showed reference strains and other lanes showed isolated strains. Lane 1: SHD-R1, Lane 2: SHF-R1, Lane 3: SHB-R1, Lane 4: SHS-R1, Lane 5: SHS-11, Lane 6: SHS-12, Lane 7: SHS-13, Lane 8: SHS-14, Lane 9: SHS-15, Lane 10: SHS-16, Lane 11: SHS-17, Lane 12: SHS-18, Lane 13: SHS-19, Lane 14: SHS-110.

면, *S. sonnei* 분리균주들은 위에서와 같이 두 가지 type으로 구분되었다.

Vibrio spp.

우리 나라는 삼면이 바다로 둘러싸여 있어서 식품소재 중 수산물이 차지하는 비중이 높는데, 어·패류를 중심으로 한 수산물의 경우 그 특성상 위해미생물에 의한 오염 확률이 높으며, 수산물의 대표적 병원성 세균이라고 할 수 있는 *V. parahaemolyticus*의 경우, 이로 인한 식중독 사고가 매년 끊임없이 발생하고 있다. 따라서 본 연구에서는 일반적으로 병원성 *Vibrio* 속에 속하는 1개 *V. cholerae* 표준균주, 1개 *V. mimicus* 표준균주, 2개 *V. parahaemolyticus* 표준균주등의 4개 표준균주와 바지락, 홍합 등 다양한 패류로부터 분리된 14개 *V. parahaemolyticus* 분리균주를 대상으로 REP-PCR을 실시하였다. 그 결과 300 bp에서 5.0 kb 범위에 걸쳐 6-16개의 band가 증폭되었으며, *V. parahaemolyticus*의 경우 모든 표준균주와 분리균주에서 0.61 kb, 1.34 kb 및 2.92 kb의 band가 확인되어 *V. cholerae*, *V. mimicus*와는 다른 band pattern을 나타내었다(Fig. 4, Panel A). 이러한 band pattern은 Wong 등(26)이 식중독 환자로부터 분리된 *V. parahaemolyticus*를 대상으로 실험한 결과와 유사한 band pattern이다.

각 DNA fingerprint의 연관성 분석 결과, 실험균주들은 genetic similarity 90% 수준에서 16개의 type을 나타내었고(Fig. 4, Panel B), VIP-13(*V. parahaemolyticus* V5)과 VIP-14(*V. parahaemolyticus* V6)이 같은 type이고, 또한 VIP-16(*V. parahaemolyticus* V11)과 VIP-113(*V. parahaemolyticus* V118)이 같은 type으로 확

인되었다. 또한 *V. parahaemolyticus* 분리균주들은 50% 수준에서 크게 두 가지 type으로 양분되었으며, 한 type은 VIC-R1(*V. cholerae* NIH 35A3)과 다른 type은 VIM-R1(*V. mimicus* ATCC 33653)과 band pattern이 유사한 것으로 나타났다.

4속 식중독 세균간의 유전적 유사도 분석

REP-PCR 반응후 4속의 모든 식중독 균주들로부터 증폭된 band의 수가 다르게 나타났다. *E. coli*로부터 가장 적은수(14개)의 band가 증폭되었고, *Shigella*와 *Vibrio*속으로부터 가장 많은 수(16개)의 band가 증폭되었다. 또한 4속의 모든 식중독 균주마다 REP-PCR 후 생성되는 fingerprint pattern에서 속마다 1-3개의 공통적이며 독특한 band가 생성되는 것이 확인되어 이를 이용한 속 수준의 분리·동정과 또한 이러한 주요 band를 중심으로 추가적인 band들을 고려하여 종 수준까지의 분리도 가능성이 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* 등 4속의 주요 식중독유발 그람 음성 세균들을 대상으로 반복성 염기서열인 REP DNA sequence를 응용한 REP-PCR을 실시하였다. 이전의 보고에서 이들 4속의 식중독 유발세균 중 각각 혹은 일부를 대상으로 반복성 염기서열을 이용한 PCR을 적용한 사례는 있지만 그때 적용한 primer, PCR 반응조건 및 전기영동조건 등이 다양하였다. 그러므로 본 연구에서는 이와같은 4속의 세균들에 대하여 최적화된 동일한 primer와 PCR 반응조건 및

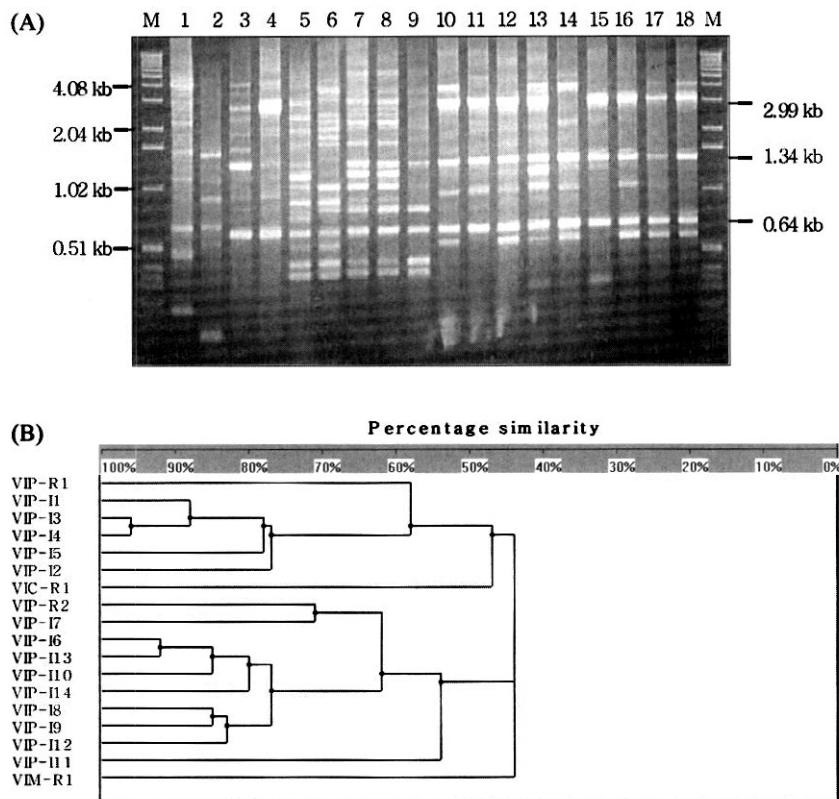


Fig. 4. Panels A and B represent fingerprinting patterns generated using the REP-PCR products from *Vibrio* strains and a corresponding dendrogram depicting REP-PCR-derived genetic similarities among them, respectively.

Lanes M showed 1 kb DNA ladders. Lanes 1 to 4 showed reference strains and other lanes showed isolated strains. Lane 1: VIC-R1, Lane 2: VIM-R1, Lane 3: VIP-R1, Lane 4: VIP-R2. Lane 5: VIP-I1, Lane 6: VIP-I2, Lane 7: VIP-I3, Lane 8: VIP-I4, Lane 9: VIP-I5, Lane 10: VIP-I6, Lane 11: VIP-I7, Lane 12: VIP-I8, Lane 13: VIP-I9, Lane 14: VIP-I10, Lane 15: VIP-I11, Lane 16: VIP-I12, Lane 17: VIP-I13, Lane 18: VIP-I14.

전기영동조건을 표준조건으로서 적용하였다. 그 결과로서 모든 4속의 식중독 세균 균주마다 REP-PCR 후 생성되는 fingerprinting pattern에서 속마다 1-3개의 공통적이며 독특한 band가 생성되는 것이 확인되어 이러한 pattern을 이용한 속 수준의 분리·동정과 그와 같은 주요 band들 이외의 부수적인 band들을 고려하여 종 수준까지의 분리도 가능함을 확인하였다. 따라서 본 연구를 통하여 반복적 DNA 염기서열을 이용한 REP-PCR이 주요 식중독 세균의 분리·동정 방법으로 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한 본 연구를 통하여 얻은 결과는 더 많은 속(genus)의 식중독세균을 대상으로 한 새로운 분리·동정 방법을 확립하기 위하여 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 논문은 2005학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의해 수행된 연구 결과이며, 이에 감사드립니다.

문헌

1. Rajashekara G, Haverly E, Halvorson DA, Ferris KE, Lauer DC, Nagaraja KV. Multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in poultry. *J. Food Prot.* 63: 155-161 (2000)
2. Johnson JR, Clabots C. Improved repetitive-element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 7: 258-264 (2000)
3. Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST, Sadowsky MJ. Use of

repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2572-2577 (2000)

4. Johnson JR, O'Bryan TT. Improved repetitive-element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 7: 265-273 (2000)
5. Dalla-Costa LM, Irino K, Rodrigues J, Rivera ING, Trabulsi I.R. Characterisation of diarrhoeagenic *Escherichia coli* clones by ribotyping and ERIC-PCR. *J. Med. Microbiol.* 47: 227-234 (1998)
6. Liu PYF, Lau YJ, Hu BS, Shyr JM, Shi ZY, Tsai WS, Lin YH, Tseng CY. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1779-1783 (1995)
7. Navia MM, Capitano L, Ruiz J, Vargas M, Urassa H, Schelleberg D, Gascon J, Vila J. Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3113-3117 (1999)
8. Clark CG, Kravetz AN, Dendy C, Wang G, Tyler KD, Johnson WM. Investigation of the 1994-5 Ukrainian *Vibrio cholerae* epidemic using molecular methods. *Epidemiol. Infect.* 121: 15-29 (1998)
9. Olsen JE, Aabo S, Hill W, Notermars K, Granum PE, Popovic T, Rasmussen HN, Olsvik O. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 1-78 (1995)
10. Olive DM, Bean P. Principle and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1661-1669 (1999)
11. Higgins CF, Ames GFL, Barnes WM, Clement JM, Hofnung M.

- A novel intergenic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature* 298: 760-762 (1982)
12. Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5: 825-834 (1991)
 13. Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, Andrew P, Prudhomme M, Alloing G, Hakenbeck R, Morrison DA, Boulnois GJ, Claverys JP. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 20: 3479-3483 (1992)
 14. de Bruijn FJ. 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 (1992)
 15. Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40 (1994)
 16. Lupski JR, Weinstock GM. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174: 4525-4529 (1992)
 17. Rivera IG, Chowdhury MAR, Huq A, Jacobs D, Martins MT, Colwell R. 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 (1995)
 18. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831 (1991)
 19. Del Vecchio VG, Petroziello JM, Gress MJ, McCleskey FK, Melcher GP, Crouch HK, Lupski JR. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2141-2144 (1995)
 20. Li WH. Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1085-1089 (1981)
 21. Loubinoux J, Lozniewski A, Lion C, Garin D, Weber M, Le Faou AE. Value of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR for study of *Pasteurella multocida* strains isolated from mouths of dogs. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2488-2492 (1999)
 22. Sander A, Ruess M, Bereswill S, Schuppler M, Steinbrueckner B. Comparison of different DNA fingerprinting technique for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1973-2981 (1998)
 23. McLellan SL, Daniels AD, Salmore AK. Genetic characterization of *Escherichia coli* populations from host sources of fecal pollution by using DNA fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2587-2594 (2003)
 24. Hahm BK, Maldonado Y, Schreiber E, Bhunia AK, Nakatsu CH. Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP. *J. Microbiol. Methods.* 53: 387-399 (2003)
 25. Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas pathovars* and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2286-2295 (1994)
 26. Wong HC, Lin CH. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4233-4240 (2001)

(2005년 7월 6일 접수; 2005년 7월 28일 채택)