식품 위해 미생물 검출을 위한 DNA 마이크로어레이 기술

DNA Microarray Technology for Detection of Food-Borne Pathogens

정효암[1,2] · 최호석[2] · 김민곤[1*]

Hyou-Arm Joung[1,2] · HO-Suk Choi[2] · Min-Gon Kim[1*]

[1]한국생명공학연구원 바이오나노연구단, [2]충남대학교 화학공학과

[1]BioNanotechnology Research Center, KRIBB

[2]Department of Chemical Engineering, Chungnam National University

서 론

식중독은 병원성 미생물이나 유독, 유해한 물질로 오염된 음식물을 섭취하여 일어나는 건강상의 장해를 말한다. 식중독은 그 원인물질에 따라 생물학적, 화학적, 자연독 식중독으로 분류할 수 있다. 생물학적 식중독은 일정한 수 이상으로 증식한 세균, 곰팡이, 바이러스 또는 이들이 만들어 낸 독소 등을 함유하는 식품을 섭취해 발병하는 경우를 말하며, 화학적 식중독은 수은, 납, 비소 등 중금속류, 농약, 첨가물 등의 화학물질에 의한 식중독을 말한다. 자연독 식중독의 경우 복어독, 마비성 패독 등 동물성 자연독과 독버섯, 감자싹 등 식물성 자연 독에 의한 식중독을 말한다. 집단 식중독의 대부분은 세균에 의하여 생기는 세균성 식중독으로서, 여기에는 살모넬라, 장비브리오, 웰치균, 병원대장균에 의한 감염형 식중독과 포도상 구균, 보툴리누스균이 생성한 독소에 의한 독소형 식중독이 있다.

식품의약품안전청에서 2006년 2월에 발표한 통계에 따르면[1], 우리나라의 연도별 식중독 발생건수는 서서히 증가하여 2004년 165건으로 가장 많이 발생하였으며, 환자수도 매년 증가하여 2004년에 10,388 명으로 가장 높았고 최근 들어 관리 규제 강화를 통하여 서서히 감소하는 추세를 나타내고 있지만 발병 자체를 예방하는 것은 현실적으로 불가능한 상태이다. 2005년도 섭취 장소별 식중독 발생현황을 살펴보면, 학교와 기업체를 포함한 집단급식소가 전체의 65.7%를 차지하는 것으로 나타났으며 발병원인 물질로는 병원성대장균, 살모넬라, 황색포도상구균 등의 박테리아나 노로바이러스 등의 바이러스에 의한 생물학적 식중독이 전체 발병 환자의 약 77 %를 차지하는 것으로 나타났다. 식중독은 무엇보다도 발병 전에 철저한 위생 관리와 기타 환경적 감염 여건을 관리함으로써 예방하는 것이 중요하다. 또한 식중독 발병 시 원인이 되는 물질이나 원인을 정확하게 선별해 내는 것과 동시에 식품을 매개로 감염된다는 것을 감안할 때 현장시료에서 신속한 검출이 이루어 져야 하며, 다양한 원인균이나 독소들을 동시에 진단 할 수 있어야 한다.

전통적인 식품위해 미생물 분석기법에는 직접현미경법, 표

Corresponding Author: Min-Gon Kim
BioNanotechnology Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea
Tel: +82-42-860-4448 / Fax: +82-42-879-8594
E-mail: mgkim@kribb.re.kr

준평판배양법 (Standard Plate Count (SPC)), 최확수법 (Most probable Number (MPN) method), 선 택 배 지 법 (Selective media), 건조 필름법 (Dry film method), 자동화 장비법 (Bactoscan, Impedance method, ATP method 등) 등이 있다. 이 중 가장 많이 사용되는 방법 중의 하나인, 선택배지법은 세균, 효모, 곰팡이 배양세포를 사용하는 실험에서 돌연변이 균주나 재조합형 균주 등의 목적하는 colony만을 분리 배양 하는 것으로서 식품공전에 총 10개의 선택 배지가 제시되어 있다. 선택배지법은 식중독균 검출감도와 선택성에서 매우 우수한 장점이 있으나, 검출하는데 소요되는 시간이 최소 3일에서 최장 10일 까지 소요되며, 검출을 위해 많은 인력이 소비되는 단점이 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 기존 검출법의 자동화를 위한 연구와 동시에 신 검출법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

식품 위해 미생물 검출을 위한 방법은 선택성과 감도, 재현성, 사용의 편리함, 다양한 원인균의 동시진단 그리고 비용 등이 고려된 새로운 방법이 요구되고 있다. 식품 위해 미생물을 분석하는 신기술법으로 면역분석법 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)과 DNA/RNA based system인 중합효소 연쇄반응법(Polymerase Chain Reaction, PCR) 그리고 DNA 마이크로어레이법 등이 개발되고 있다. ELISA는 항체에 효소를 결합시켜 항원-항체 반응을 확인하는 방법으로, 그 방법이 간단하고 비용이 많이 들지 않으며 다량 분석이 가능하여 현재 가장 널리 쓰이고 있는 항원-항체 분석법의 하나가 되고 있다. PCR은 특정 DNA sequence의 copy수를 기하급수적으로 증폭시킬 수 있으므로 매우 높은 검출 감도를 나타낸다. PCR 기법은 가장 일반적으로 사용되는 방법으로 원인 미생물을 분리하지 않고, 대상으로 하는 DNA의 일부만을 시험관 내에서 증폭시켜 오염된 식중독 세균을 확인하는 방법이다.

DNA 마이크로어레이는 염기서열을 알고 있는 서로 다른 DNA 분자를 작은 칩 위에 고밀도로 배열해 놓은 것으로 대량의 유전자 발현 상황을 총체적으로 탐색할 수 있는 기술로서 생명현상과 관련된 유전체 수준의 연구에 크게 기여하고 있다. 마이크로어레이의 종류는 현재, 칩 위에 올려지는 물질의 종류에 따라, DNA 칩, 단백질 칩, 세포 칩, 신경세포 칩 등 여러 가지가 있다. 마이크로어레이 기술은 1995년 Stanford 대학의 Pat Brown Lab에서 유전자의 발현 변화를 연구하기 위한 목적으로 처음 개발하였다[2]. 그 후, 표면에 수백, 수천의 서로 다른 염기서열의 DNA를 고정화하여 새로운 유전자의 염기서열을 해독하는 방법인 DNA microarray기술에 널리 이용되고 있다. 이러한 마이크로어레이 기술의 응용분야는 유전자 발굴(gene discovery)[3], 암 분류(tumor classification)[4,5], 유전자 발현 형태에 따른 질병 위험도 평가 (risk assessment)[6,7], 질병 예후 진단 (prognosis prediction)[8,9], 신약 개발[10] 등에 폭넓게 이용되고 있다. 마이크로어레이를 이용하여 식품 위해 미생물 유전자 검출을 위한 연구는 다양한 위해균를 동시에 진단할 수 있고, 측정시스템을 소자(device)화 할 수 있어 현장 검출이 가능하다는 장점을 가지고 있다. DNA 마이크로어레이 기술은 일반적으로 DNA 어레이칩, 측정시스템, 분석소프트웨어가 별도로 구성되어 있고, 분석시간이 24시간 이상 소요되어 현장 검출에 문제가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 최근에는 총 분석시간이 수시간 이내에 측정이 가능하며, 다양한 광학적, 전기(화학)적 바이오센서 기술의 발전에 힘입어 현장측정용 DNA 마이크로어레이 기술이 가능하게 되었다. Fig. 1 은 바이오 칩/센서에서 식품 위해 미생물 검출을 위한 일반적인 전략을 나타내고 있다. 마이크로어레이 기술은 일반적으로 서로 다른 염기서열을 갖는 oligonucleotide를 센서 칩에 고정화 하여 표적이 되는 균의 유전자를 PCR 과정을 거쳐 증폭하여 검출 하는 방법과 증폭과정을 거치지 않고 직접 추출한 유전자를 검출 하는 방법이 주로 이용되고 있다. 마이크로어레이 기술의 발달과

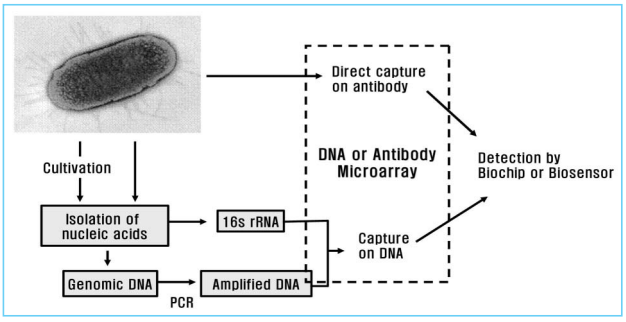

Fig.1. Simple illustration of strategies to detect of microbial pathogens using biochips and biosensors.

더불어 마이크로어레이를 이용한 다양한 식품 위해 미생물 검출 방법이 보고 되고 있으며 현장시료를 동시에 진단하고자 하는 노력이 지속적으로 시도되고 있다.

본 론

DNA 마이크로어레이 제작 및 분석

식품 위해 미생물 검출을 위한 DNA 마이크로어레이는 서로 다른 염기서열을 갖는 oligonucleotide를 표면 처리된 칩 표면에 고정화 시켜 DNA 또는 RNA의 혼성화 (hybridization)를 유도하여 고정화된 유전물질을 분석하는 단계로 이루어진다. 마이크로어레이는 특정 시료 고정화를 위한 마이크로어레이 칩제작, 마이크로어레이를 통한 oligonucleotide 고정화, 표적이 되는 시료를 반응시키고 반응이 완료된 칩을 분석장비를 통하여 분석하는 과정을 거치게 된다. 최초 표면제작과정에서는 수산기 (-OH) 표면 (SiO_2 on Si, Al_2O_3 on Al, Glass. Silicon wafer, TiO_2, ect) 에 유기실리콘 (organosilicon)을 반응시켜 작용기를 표면에 도입하거나, 금 표면에 alkanethiols, alkyl sulfides 또는 aialkyl disulfides 등의 화학물질을 표면에 반응시켜 자기조합 단층박막(SAM, self-assembled monolayer)을 표면에 생성시켜 작용기를 도입하는 방법이 사용된다. 작용기가 도입된 칩 표면은 화학반응을 통해 특정서열을 갖는 oligonucleotide를 고정화 할 수 있고, 이러한 고정화 방법에 있어서 100~200 ㎛ 크기의 서로 다른 염기서열을 갖는 spot을 배열시키는 것이 DNA 마이크로어레이이다. 마이크로어레이는 표면에 고정화 시키는 방법에 따라서 핀 마이크로어레이 (pin microarray), 잉크젯 프린팅(inkjet printing), 광식각 (photolithography), 전자어레이 (electronic array)등 크게 네 가지로 분류할 수 있다. 또한 광식각 어레이 반응을 응용하여 칩 표면에서 직접 DNA를 합성하여 고밀도의 마이크로어레이 칩을 제작하는 예도 있다[11]. 표면에 고정화된 oligonucleotide는 특정 염기서열을 갖는 cDNA, PCR 생성물, 16s rRNA, 16s rDNA, plasmid DNA genomic DNA 등과 혼성화 될 수 있으며, 이러한 특정 반응을 분석하기 위하여 분석하고자 하는 유전물질에 형광물질을 직접 표지 하거나 바이오틴과 같은 분석 가능한 물질을 표지 하는 것이 일반적이다. 직접 형광표지에 사용하는 물질로는 Cy-3와 Cy-5 형광 염료가 가장 많이 사용되며 그 외 AlexaFluor 546등의 다른 형광 염료를 사용하는 예도 있다. 혼성화가 완료된 표면분석은 고 해상도의 형광 스캐너를 이용하고 CCD 카메라를 이용하여 분석하는 예도 있다. 또한 표면플라즈몬공명 이미지(SPR imaging, surface plasmon resonance imaging)기술이 개발됨에 따라 식품 위해 미생물 내의 16s rRNA를 표지 없이 직접 분석하는 방법도 사용되고 있다[12].

PCR-DNA 마이크로어레이 기술

PCR 기법은 검출 감도면에서 다른 방법과 비교하여 매우 높은 우수성을 나타낸다. 이러한 우수성을 바탕으로 식품 위해 미생물 검출을 위한 다양한 연구가 진행되고 있으며 실제로 토양 추출물에서 약 2~20 CFU의 *Listeria monocytogenes*를 분석한 예도 있다[13]. 그러나 높은 검출 감도에도 불구하고 여러 가지 PCR 조건과 비특이적 반응에 의한 원하지 않는 생성물이 생성될 수 있고, 그에 따른 부수적인 염기서열분석을 추가적으로 수행해야 하는 문제점이 있다. 이는 다양한 식품 위해 미생물 진단에 사용하는 데 있어 PCR 기법이 극복해야 할 하나의 제약으로 인지되고 있다[14]. 그러나 DNA 마이크로어레이가 개발됨에 따라 PCR에 기초한 DNA마이크로어레이기법을 사용함으로써 PCR기법이 갖는 높은 검출 감도와 함께 비특이적 PCR 생성물이 만들어질 경우 마이크로어레이 칩에서 그 신호가 검출되지 않을 뿐만 아니라 PCR 과정에서 동시에 표지물질을 유전자에 도입 할 수 있어 PCR기법의 단점을 보완할 수 있기 때문에 그 사용빈도가 높아지고 있다. PCR기법에서는 PCR 프라이머 제작, PCR 과정의 최적화, 복합(multiplexed) PCR, PCR 생성물의 분리 등에 관한 다양한 연구를 통하여 발전되고 있으며, 이러한 연구결과들은 DNA 마이크로어레이 기법에 적용되면서 PCR-DNA 마이크로어레이 기법의 실용성을 향상시킬 수 있고, 분석물질 표지방법에 관한 연구들도 PCR-DNA 마이크로어레이기법에 적용될 수 있으며, 이를 통해 새로운 검출 방법의 개발과 검출 감도 향상에 큰 도

움을 줄 수 있다. *Guo et al*[15]은 최초로 human tyrosinase 유전자를 PCR하여 단일 사슬의 oligonucleotide 마이크로어레이에 응용하였으며, 그 후 많은 연구가 진행되고 있다. *Peplies et al*[16]은 PCR 프라이머에 Cy-3나 Cy-5 가 아닌 indocarbocyanine 형광염료를 표지 하여 단일사슬 DNA를 검출 하였다. 또한 oligonucleotide의 막 고정화 마이크로어레이를 이용하여 16s rDNA를 검출하기도 하였다[17]. 그리고 PCR-DNA 마이크로어레이 검출 법에 있어서 그 검출 감도를 향상시키기 위한 연구도 진행되었다. *Call et al*[18]은 면역 자기 분리 (immunomagnetic separation)법을 이용하여 장관출혈성대장균 (Enterohemorrhagic E. coli, EHEC)세포를 분리하여 multiplex PCR 생성물을 마이크로어레이를 통하여 검출 하였다. 이것은 PCR-DNA마이크로어레이 기법에 면역자기 분리 법을 융합시킴으로써 보다 효과적으로 식품 위해 미생물을 검출 한 예이다. 실제로 그 검출 감도는 100 CFU/mL 이하로써 매우 높은 것으로 나타났다. PCR-DNA마이크로어레이 기법은 DNA마이크로어레이법의 검출감도 향상과 함께 PCR 기법의 단점을 보완해주는 유용한 방법이다. 또한 새롭게 연구되고 있는 방법들은 검출 감도 향상과 함께 현장시료에 적용하여 검출 하기 위한 방향으로 진행되고 있다. PCR-DNA 마이크로어레이는 유전자 데이터를 활용해 단일염기서열변이(SNP)의 상관관계를 분석하는 유전자형 분석(genotyping)[19,20] 이나 특정 유전자 염기서열을 분석하는 유전자 검색법(DNA fingerprinting)[21] 등에도 유용하게 사용되고 있다. Fig. 2는 PCR-DNA 마이크로어레이 기술을 활용한 검출 방법에 대하여 간략하게 요약하였다. PCR-마이크로어레이 검출법은 PCR 생성물의 표지 방법에 따라 분류 할 수 있다. 가장 널리 사용되는 방법은 PCR 프라이머에 검출 물질을 표지하여 PCR 과정에서 직접 표지 되도록 하는 방법이다[16-18]. 그 외에 Cy5 형광 염료 등을 PCR생성물 말단에 표지 하는 방법[22]과 화학반응을 이용하여 표지 하는 방법[24] 으로 분류 할 수 있다. PCR-DNA 마이크로어레이 기술에서 현재 극복되어야 할 과제는 DNA 마이크로어레이 방법의 가장 큰 장점인 다양한 식중독균의 동시분석 특성을 극대화 하기 위한 복합 PCR 기법의 개발에 있는 것으로 평가된다.

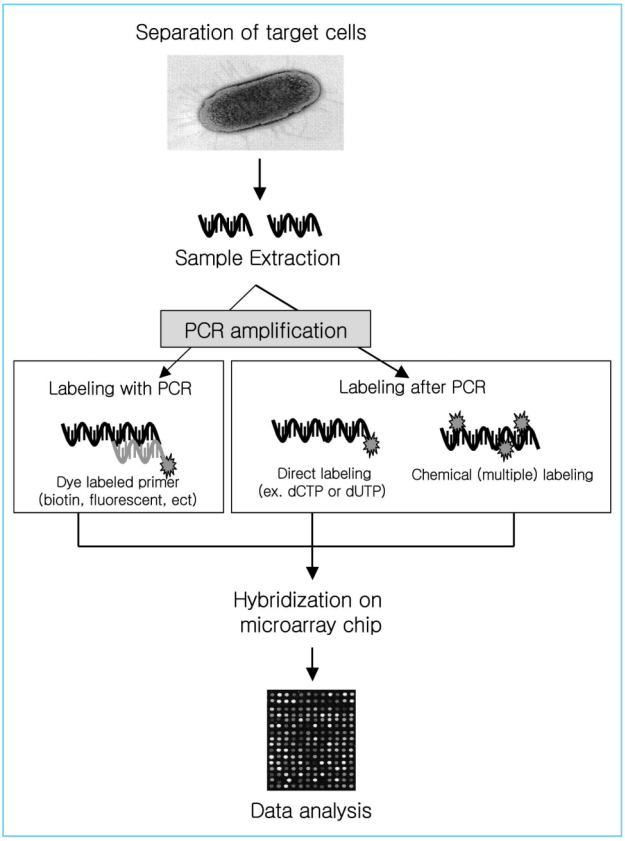

Fig. 2. PCR-DNA 마이크로어레이 기술을 활용한 식중독균 검출 방법.

DNA 마이크로어레이를 이용한 16s rRNA 직접검출

식품 위해 미생물 유전자 검출을 위하여 사용되는 표적 유전자 물질로는 16s ribosomal RNA (16s rRNA)가 일반적이다. 16s rRNA는 리보좀 내에 존재하는 ribosomal RNA의 하나로서, 세균의 동정에서 16s rRNA 염기서열분석이 가장 많이 이용될 정도로 박테리아 고유의 서열을 보유하고 있다[23]. DNA 마이크로어레이 법에서 세균이 분화할 때 DNA에서 RNA로 전사되는 과정에서 발생될 수 있는 염기서열의 오류나 수복에 관계없이 일정한 염기서열을 유지하며, 같은 종의 세균에서 동일한 염기서열을 갖는 특성 때문에 특정 염기서열에 높은 특이적 신호를 나타낸다. 또한 큰 분자량(1500~2000 nucleotides)과 약 18000 copies/cell의 복제수로 존재하기 때문에 PCR 없이 검출하는 것이 가능하다. PCR 과정을 거쳐 검출 하는 방법은 그 검출 감도 면에서 직접검출법과 비교하여 매우 우수하나, 실

제 시료에서 바로 적용 하는 데에는 많은 제약이 따른다. 또한 비특이적 PCR 생성물의 가능성이 존재하기 때문에 실제 시료 검출에 있어서 비특이적 검출 신호가 생성될 가능성이 있다. 이러한 이유로 마이크로 어레이를 이용한 식품 위해 미생물 검출에 있어서 직접검출 법이 선호되고, 16s rRNA를 표적으로 하여 다양한 연구가 진행되고 있다. 그 예로 최근 자연계에 동정이 어려운 미생물의 유전자를 조사하기 위하여 16s rRNA를 직접 추출하여 검출하는 연구가 활발히 진행되고 있다. Small 등은[24] 몇 종류의 특정 토양추출 박테리아에서 16s rRNA를 추출하여 화학적 방법으로 단편화(fragmentation) 하여 혼성화 효율을 높여 주었으며, 검출 방법으로 바이오틴이 표지 된 검출 프로브(detector probe)를 이용하였으며, 검출 프로브의 경우 16s rRNA가 마이크로어레이 표면에 혼성화할 경우 샤페론 프로브(chaperone probe)의 역할도 동시에 이루어 질 수 있도록 하여 검출 하였다. 또 다른 방법으로 화학적 방법으로 직접 형광 표지 된 16s rRNA를 검출한 예도 있다[25]. 그러나 이러한 직접 검출법은 PCR-DNA마이크로어레이법과 비교하여 검출감도가 7.5×10^6 CFU 로써 매우 낮은 검출 감도를 보여주고 있다. 따라서 마이크로어레이를 이용한 식품 위해 미생물 16s rRNA의 직접검출을 위한 새로운 방법이 모색되고 있다. 표면 플라즈몬공명 이미징 (surface plasmon imaging, SPR imaging)을 이용하여 검출 하는 방법이 보고된 바 있는데, SPR imaging은 표면플라즈몬공명 현상을 이용하여 표적물질에 특정 표지 없이 표면에 고정화된 양의 차이에 따른 표면의 빛의 굴절률 변화를 측정하여 이미지로 분석하는 방법을 말한다. 마이크로어레이 칩을 SPR imaging 시스템을 이용하여 분석함으로써, 특정 표지 없이 고감도로 검출하는 것이 가능하다. *Nelson et al*[26]은 thiol이 표지된 oligonucleotide를 금 표면에 마이크로어레이 하여 *E. coli*와 *B. subtilis* 16s rRNA 동시에 진단하였고, *Wang et al*[27]은 tyramide 신호증폭법을 이용하여 직접검출 감도를 향상시키고자 하였고 5×10^3~5×10^4 CFU의 검출 감도를 나타내었다. Fig. 3에서 DNA 마이크로어레이를 이용하여 16s rRNA의 직접검출 방법에 대하여 간략하게 요약하였다. PCR-DNA마이크로어레이와 마찬가지로 직접검출법도 어떠한 방법으로 표지 하느냐에 따라서 다양한 방법으로 분류 할 수 있다. 가장 일반적으로 사용되어 지는 방법은 형광염료나 분석물질이 표지된 검출 프로브를 사용하는 방법이다24. 이 방법은 표지된 프로브가 분석으로 사용됨과 동시에 샤페론 효과를 나타내어 혼성화 효율을 높여주고 결국 검출 감도의 향상을 유도할 수 있는 장점이 있다[28]. 그 외에 화학적 방법을 이용하여 16s rRNA에 직접 표지 하는 방법과 SPR imaging 을 이용하여 비표지 시료를 직접검출 하는 예도 최근 들어 서서히 증가하고 있다. *Frantroussi et al*[29]은 실리카 칼럼을 이용하여 fragmentation 과 화학적 형광표지를 동시에 수행하였고, 약 10^5~10^6 cells 의 검출 감도를 나타내었으며, *Nelson et al*[26]은 SPR imaging 분석을 통하여 약 5,000 CFU

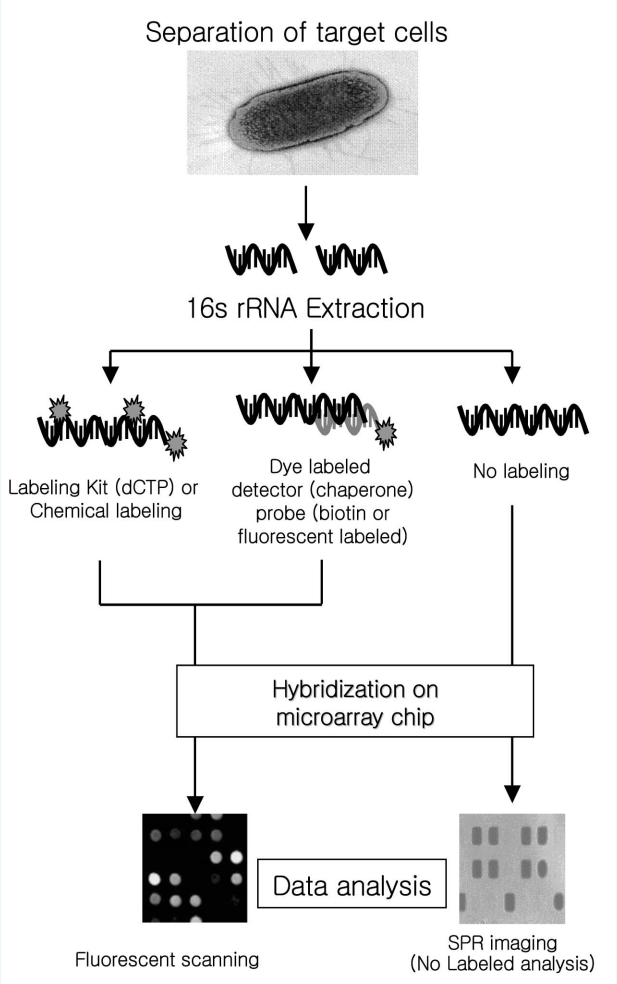

Fig. 3. DNA 마이크로어레이를 이용한 16s rRNA 직접 분석법.

의 검출 감도를 나타내었다. 하지만 이러한 결과로 볼 때 16s rRNA 직접분석법이 현장에 직접 이용되기 위해서는 100배 이상 감도 향상이 더 필요할 것이라 평가된다.

전 망

세균에 의한 집단식중독은 현재 우리나라뿐 아니라 전 세계적으로 폭넓게 발병하고 있다. 이러한 세균성 식중독은 그 발병원인을 규명하는 것이 매우 어려우며, 현재 사용되고 있는 방법으로는 신속하고 고감도로 검출하는 데에 많은 어려움이 있다. 따라서 식품 위해 미생물을 검출하기 위한 대안으로 새로운 방법들이 개발 및 연구되고 있으며 그 최종 목적은 현장 시료를 직접/고감도로 검출함과 동시에 다양한 식품 위해 미생물을 동시에 진단할 수 있는 기술 개발에 있다고 하겠다. DNA 마이크로어레이 기법은 검출시간이 짧고 동시에 다양한 시료를 검출할 수 있다는 장점이 있고, 현장시료를 직접 검출하는데 있어서 매우 효과적으로 사용될 수 있기 때문에 식품 위해 미생물 검출에 있어서 새로운 대안으로 부각되고 있다.

식중독균 분석의 현장성을 높이기 위해서 향후 극복해야 할 과제가 많을 것으로 사료된다. 모든 식중독균 검출기술에서 공통적으로 요구되는 기술은 식품으로부터 식중독균을 효과적으로 분리해 내는 것이라 할 수 있다. 식품을 분석샘플로 직접 사용할 경우 분석에 큰 교란을 주게 되며, 재현성이 매우 떨어질 수 있다. 일반적으로 IMS (immuno-magnetic separation) 기법이 가장 많이 활용되고 있으나[30], 보다 효율적으로 분리할 수 있는 방법이 필요한데, 최근 나노자기입자를 활용하여 기존 마이크로 자기입자를 입자를 활용한 경우 보다 더 높은 분리효율을 높인 결과를 본 연구팀에서 얻은 바 있는데 향후 이에 대한 연구가 더 필요하다 할 수 있다[31]. PCR-DNA 마이크로어레이 기술을 도입할 경우, PCR을 현장에서 직접 수행할 수 있는 PCR용 마이크로칩이 필요한데, 이러한 기술은 최근 국내에서도 삼성종기원 등에서 개발된 것으로 보고 된 바 있다. 향후에는 PCR칩과 DNA 마이크로어레이와 결합하는 기술이 요구될 것이다. PCR 없이 16s rRNA를 직접 분석할 수 있다면, 분석 시간이나 간편성에서도 매우 향상될 것이다. 이것이 실용화되기 위해서는 아직 분석감도의 향상이 절실하다. 최근 본 연구팀의 연구결과에 의하면 DNA 대신 PNA (peptide nucleic acid)를 프로브로 이용할 경우 기존 발표된 분석감도와 비교하여 월등히 증가됨을 알 수 있었다[32,33]. 향후 식품으로부터 식중독균의 효율적인 분리, 16s rRNA 직접검출 감도 향상 등과 같은 중요 기술들이 개발될 경우 DNA 마이크로어레이를 이용하여 10종 이상의 식중독균을 현장에서 수시간 내에 검출하는 것이 가능할 것으로 판단된다.

감 사

This research was supported by a grant of the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (03-PJ1-PG1-CH11-0003).

참고 문헌

1. 집단식중독 발생현황, 식품의약청안정청 (2006.2)
2. Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D. Cluster Analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci* USA, 95: 14863-14868 (1998)
3. Pirrung, C. How to Make a DNA Chip. *Michael. Angew. Chem. Int.* Ed. 41: 1276-1289 (2002)
4. Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., Lander, E. S. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286: 531-537 (1999)
5. Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., Powell, J. I., Yang, L., Marti, G. E., Moore. T., Hudson, J. J., Lu, L., Lewis, D. B., Tibshirani, R., Sherlock, G., Chan, W. C., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Armitage, J. O., Warnke, R., Levy, R., Wilson, W., Grever, M. R., Byrd, J. C., Botstein, D., Brown, P. O., Staudt. L. M. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403: 503-511 (2000)
6. Friedman, N., Linial, M., Nachman, I., and Pe'er, D. Using Bayesian networks to analyze expression data. *J. Comput. Biol. 7*: 601-620 (2000)
7. Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown , D. Botstein, P. O., Futcher, B.

Comprehensive identification of cell cycle- regulated genes of the yeast Saccharomyces cerevisiae by microarray hybridization., *Mol. Biol. Cell,* 9: 3273-3297 (1998)
8. Schena, M. DNA Microarrays : a practical approach. *Oxford University Press*. (1999)
9. Weinstein, J. N. "Omic" and hypothesis-driven research in the molecular pharmacology of cancer., *Curr. Opi Pharmacol*. 2: 361-365 (2002)
10. Scherf, U., Ross, D. T., Waltham, M., Smith, L. H., Lee, J. K., Tanabe, L., Kohn, K. W., Reinhold, W. C., Myers, T. G., Andrews, D. T., Scudiero, D. A., Eisen, M. B., Sausville, E. A., Pommier, Y., Botstein, D., Brown, P. O., Weinstein, J. N. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat. Genet*. 24: 208-209. (2000)
11. Lipshutz, R. J., Stephen, P. A., Thomas, R. G. and David, J. L. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nature Genetics Supplement, 21*: 20-24 (1999)
12. Steiner, G. Surface plasmon resonance imaging. *Anal. Bioanal. Chem*. 379: 328-331 (2004)
13. Wang, R.-F., Cao, W.-W. and Johnson, M. G. rRNA-based and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. *Appl. Environ. Microbiol*. 58: 2827-2831 (1992)
14. Shigemori, Y., Mikawa, T., Shibata, T., Oishi, M. Multiplex PCR: use of heat-stable Thermus thermophilus RecA protein to minimize non-specific PCR products. *Nucleic Acids Res*. 33: e126 (2005)
15. Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R. and Smith, L.M. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res*. 54:565-465 (1994)
16. Peplies, J., Frank, O. G. and Rudolf, A. Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16s rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol*. 69: 1397-1407 (2003)
17. Rudi, K., Skulberg, O.M., Skulberg, R. and Jakobsen, K.S. Application of sequence-specific labeled 16S rRNA gene oligonucleotide probes for genetic profiling of cyanobacterial abundance and diversity by array hybridization. *Appl. Environ. Microbiol*., 66: 4004-4011 (2000)
18. Call, D.R., Brockman, F.J. and Chandler, D.P. Detecting and genotyping Escherichia coli O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *Int. J. Food Microbiol*. 67: 71-80 (2001)
19. Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K. and Levy, D. Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol*. 67: 3258-3263 (2001)
20. Johnson, J.R. and Stell, A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli*strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis*. 181: 261-272 (2000)
21. Borucki, M., Krug, M., Muraoka, W., Call, D.R. Genetic characterization of *Listeria monocytogenesusing* DNA microarrays. *Vet. Microbiol*. 92: 351-362 (2003)
22. Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K.-H., and Wagner, M. Oligonucleotide microarray for 16s rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol*. 68: 5064-5081 (2002)
23. Clarridge Ⅲ, J. E., Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious disease. *Clin. Microbiol. Rev*. 17: 840-862 (2004)
24. Small, J., Call, D.R., Brockman, F.J., Straub, T.M. and Chandler, D.P. Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol*. 67: 4708-4716 (2001)
25. Peplies, J.,Lachmund, C., Glöckner, F. O., and Manz, W. A DNA microarray platform based on direct detection of rRNA for characterization of freshwater sediment-related prokaryotic communities. *Appl. Environ. Microbiol*. 72: 4829-4838 (2006)
26. Nelson, B. P., M. R., Liles, Frederick, K. B., R. M., Corn, and R. M., Goodman, Label-free detection of 16s ribosomal RNA hybridization on reusable DNA arrays using surface plasmon resonance imaging., *Environ. Microbiol*., 4: 735-743 (2002)
27. Wang, D., Lingxiang, Z., Di, J., Xuemei, M., Yuxiang, Z., Jing, C. Direct detection of 16s rRNA using oligonucleotide microarray assisted by base stacking hybridization and tyramide signal amplification., *J. Biochem. Biophys. Method*, 59: 109-120 (2004)
28. Chandler, D. P., Newtion, G. J., Small, J. A., and Daly, D. S. Sequence versus structure forthe direct detection of 16s rRNA on planar oligonucleotide microarray. *Appl. Envrion. Microbiol*. 69: 2950-2958 (2003)
29. Frantroussi, S. E., Urakawa, H., Brenhard, A. E., Kelly, J. J., Noble, P. A., Smidt, H., Yershov, G. M., and Stahl, D. A. Direct profiling of environmental microbial populations by thermal dissociation analysis of native rRNAs hybridized to oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol*. 69: 2377-2382 (2003)
30. Oggel, J J., Nundy,D.C., and Randall, C. J. Modified 1-2 test system as a rapid screening method for detection of Salmonella in foods and feeds. *J. Food Prot. 53*:656-658 (1990)
31. "보건복지부 보건의료바이오기술개발사업 "식중독 원인균의 동시진단 신기술 개발"의 3차년도 보고서
32. 정효암, 식중독균 16s rRNA 동시진단과 검출감도 향상을 위한 SPR바이오센서 및 형광 DNA칩 연구, MS thesis, 2007.
33. Joung, H.-A., Ahn, J. H., Chung, B. H., Choi, H. S., and Kim, M.-G. High-sensitive detection of 16s rRNA using peptide nucleic acid (PNA). 한국바이오칩학회 (2006년 추계)