J. Fd Hyg. Safety 18(4), 224–228 (2003)

Salmonella spp.의 RAPD Typing을 위한 Primer의 분리력 비교

임형근* · 이경희* · 홍종해** · 박경진*** · 최원상†

동국대학교 생명공학과, *부산대학교 약학과, **강원대학교 수의학과, ***한국보건산업진흥원 HACCP팀

Primers for Typing *Salmonella* spp. using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis

Hyungkun Lim*, Kyung Hee Lee*, Chong-Hae Hong, Gyung-Jin Bahk*** and Weon Sang Choi†**

Department of Biotechnology, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

**Department of Pharmacology, Pusan National University, Pusan 609-735, Republic of Korea*

***Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, 192-1 Hyoja 2 dong, Chunchon, Kangwon-do 200-701, Republic of Korea*

****HACCP Team, Korea Health Industry Development Institute, Seoul 156-050, Republic of Korea*

Abstract – Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis is based on the amplification of random DNA segment using a single arbitrary primer. For typing *Salmonella* spp., polymorphic DNA patterns identified by this method can be used. To select the primers for RAPD typing *Salmonella* spp., the performances of 20 primers were compared by analyzing 16 *Salmonella* spp. reference strains. Reproducible electrophoresis patterns were obtained. Among the 20 primers tested, 4 primers (A, OPG04, OPG10, OPL03) showed better differentiation than the others. At the time discrimination index, band clarity, band number and difficulty of band scoring were considered. These primers will be useful for typing *Salmonella* spp. in the future. Currently, we are under investigation for the RAPD typing of contaminated *Salmonella* spp. for the risk analysis of pork processing plant using these primers.

Key words: Random amplified polymorphic DNA (RAPD), *Salmonella* spp.

살모넬라(*Salmonella* spp.)는 Enterobacteriaceae에 속하는 그람음성, Lac^- 간균이다. 일반적으로 이 속(genus)은 단지 한 개의 종(species)으로 되어 있으나 생화학적 특성에 따라 7개의 subspecies로 나누어지며 혈청형분류(serotyping) 결과는 약 2000가지 이상의 혈청형이 존재하는 것으로 알려져 있다.[1)]

미생물을 형질분류 하는 이유는 일반적으로 크게 2가지로 나눌 수 있는데 그중 하나는 특정 유행병 발발 시 분리된 균들이 서로 어떤 관계를 갖고 있나를 조사해 보는 것이고 또 하나는 역학적으로 별개의 균들이라 할지라도 서로 어떤 관계가 있나 조사해 보는 것이다. 살모넬라의 역학 조사를 위해서는 이미 여러 가지 방법이 개발된 바 있으나 이들은 근본적으로는 살모넬라의 표현형을 조사하거나 유전형을 조사하는 것이다. 표현형을 조사하는 방법으로는 혈청형분류, 파지형분류(phage typing), 박테리오신형 분류(bacteriocin typing) 등을 들 수 있으나 현재까지는 혈청형 분류가 가장 많이 이용되고 있다. 유전형을 조사하는 방법으로는 plasmid profile analysis, RFLP(Restriction fragment length polymorphism), single-stranded conformation polymorphism (SSCP), ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis(PFGE), RAPD(Randomly amplified polymorphic DNA) 등을 들 수가 있다. 이중에서도 RAPD는 한 가지 primer를 이용하여 무작위로 증폭되는 DNA 조각들의 유형을 분석하는 것으로 비록 실험실간의 유형 재연성에는 다소 문제가 있는 것으로 보고되고 있으나[2)] 특정 항체와 높은 순도의 DNA를 요구하지 않으며 많은 시료를 빠른 시간 내에 처리할 수 있으면서도 PFGE에 필적하는 분리력을 가지고 있어[3)] 이미 여러 가지 식중독균 등의 역학 조사와 계통 조사에 활용된 바 있으며 일부 살모넬라의 typing에도 활용된 바 있다.[4-10)]

본 연구에서는 장차 야생 분리한 살모넬라균을 효과적으로 RAPD typing할 수 있는 primer를 엄선하기 위한 것으로 16가지의 살모넬라 혈청형을 대상으로 하였다. 이를 위해 기존에 살모넬라의 RAPD typing에 사용된 primer들을 이용하여 RAPD를 행하였고 이 결과로부터 이 primer들의 typing 능력을 비교하여 장차 야생 분리한 살모넬라균들의 RAPD typing을 위한 기초 자료로 삼고자 하였다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

시약

Taq DNA polymerase와 PCR을 위한 모든 시약은 Takara사(일본)에서 구입하였다. 살모넬라 배양을 위한 트립톤(Tryptone)과 yeast extract는 Difco사로부터 구입하였다. 그 외 모든 시약은 특별한 언급이 없을 경우 Sigma제를 사용하였다.

Primers

본 실험에 사용한 primer들을 Table 1에 정리하였다. 모든 primer는 제노텍(대전)에서 구입하였다.

균주

본 실험에 사용된 살모넬라 균주들은 국립보건원과 서울시 보건환경연구원에서 총 16종을 분양 받아 LB 배지(tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%)에서 배양하여 사용하였다(Table 2).

DNA 분리 정제

살모넬라로부터 DNA를 분리하기 위해 guanidine thiocyanate/phenol/chloroform 방법을 사용하였다.[11] 이를 간략히 기술하면 약 0.5 m*l*의 살모넬라 배양액에 0.25 m*l*의 solution D(4 M guanidine thiocyanate, 0.025 M sodium citrate, 0.5% sarcosyl)와 0.5 m*l*의 phenol-chloroform(1:1)을 첨가하여 약 1시간 정도 현탁 시키고 원심분리 하여 수용액층을 회수한 후 DNA를 isopropanol로 침전시켰다. 얻어진 pellet을 70% ethanol로 세척한 후 말려서 증류수에 녹여 PCR에 사용하였다.

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')	Tm value (°C)	Reference
DG89 (OPB-17)	AGGGAACGAG	28.9	15
DG90 (OPB-6)	TGCTCTGCCC	33.0	15
DG91 (S)	TCACGATGCA	24.8	16
DG92 (OPS-19)	GAGTCAGCAG	28.9	9
DG93 (A)	AGCAGCGCCTCA	42.5	17
DG94 (OPG04)	AGCGTGTCTG	28.9	6
DG95 (OPG08)	TCACGTCCAC	28.9	6
DG96 (OPG10)	AGGGCCGTCT	33.0	6
DG97 (OPH04)	GGAAGTCGCC	33.0	6
DG98 (OPH13)	GACGCCACAC	33.0	6
DG99 (OPL-02)	TGGGCGTCAA	28.9	5
DG100 (OPL-03)	CCAGCAGCTT	28.9	5
DG101 (OPL-12)	GGGCGGTACT	33.0	5
DG102 (primer 1)	GGTGCGGGAA	33.0	18
DG103 (primer 2)	GTTTCGCTCC	28.9	18
DG104 (primer 3)	GTAGACCCGT	28.9	18
DG105 (primer 4)	AAGAGCCCGT	28.9	18
DG106 (primer 5)	AACGCGCAAC	28.9	18
DG107 (primer 6)	CCCGTCAGCA	33.0	18
DG108	GGCTGCAGAA	28.9	10

Table 2. *Salmonella* spp. strains used in this study

Serial number	Species	Strain number	Serotypes	Antigenic properties*
1	*Salmonella*	ATCC19430	*typhi*	9,12,[Vi]: d : -
2	*Salmonella*	ATCC11511	*paratyphi*	2,12: a : -
3	*Salmonella*	ATCC4931	*enteritidis*	phage type 6a
4	*Salmonella*	ATCC10719	*schottmuelleri*	1,4,5,12: b : 1,2
5	*Salmonella*	ATCC13312	*choleraeuis*	6,7: c : 1,5
6	*Salmonella*	ATCC14028	*typhimurium*	4,5,12: I : 1,2
7	*Salmonella*	ATCC9184	*gallinarum*	1,9,12: - : -
8	*Salmonella*	ATCC8389	*london*	3,10: l,v : 1,6
9	*Salmonella*	ATCC13076	*enteritidis*	1,9,12: g,m : -
10	*Salmonella*	IVK B01177	*schwarzengrund*	
11	*Salmonella*	IVK B01183	*eingedi*	
12	*Salmonella*		*uppsala*	
13	*Salmonella*		*ohio*	
14	*Salmonella*		*budapest*	
15	*Salmonella*		*wien*	
16	*Salmonella*		*virginia*	

*source : http://www.atcc.org.

RAPD-polymerase chain reaction(PCR) 조건

각각의 50 μ*l* PCR 반응액에는 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs, 2.5 units *Taq* DNA polymerase, primer 100 pmol과 DNA 주형을 함유되도록 하였다. 각 시료는 thermocycler(Perkin-Elmer 2400, Foster, CA)에서 증폭 cycle을 시작하기 전에 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후 cycle로 진입하게 하였으며 각 cycle은 94°C 1분, 35°C 2분, 72°C 2분으로 하였고 30 cycle후 72°C에서 7분간 연장반응 시킨 후 반응을 종료하였다.

RAPD 결과 분석

Discrimination index는 다음 식을 이용하여 계산하였다.[12]

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{s} nj(nj-1)$$

여기서 D는 numerical index of discrimination, N은 사용된 균주 총수, s는 RAPD type의 수, nj는 j type에 속하

는 균주의 숫자를 의미한다.

군집 분석은 TREECON software[13]를 이용하여 Link 등[14]의 계산식을 이용한 UPGMA방법으로 분석하였다.

결과 및 고찰

모든 RAPD 분석은 최소한 2회 이상 실시하여 결정하였고 동일 기기, 동일 조건 하에서는 RAPD 유형은 재현성이 있었다. 이중 DG100(OPL-03) primer를 이용하여 RAPD를 행한 결과를 Fig. 1에 제시하였다. 총 20가지의 primer중 DG93(A), DG94(OPG04), DG96(OPG10), DG100(OPL-03)은 사실상 16개의 살모넬라 균주들을 16가지의 다른 유형으로 모두 분리할 수 있어 D값이 1이었고, DG89(OPB-17), DG90(OPB-6), DG95(OPG08), DG99(OPL-02)는 16가지의 균주를 15가지 유형으로 분리할 수 있어 D값이 0.9916이었다. 사용된 primer들의 분리력을 분석한 결과를 Table 3에 정리하였다. discrimination index만으로 primer의 분리력을 평가하면 DG93, DG94, DG96, DG100이 분리력

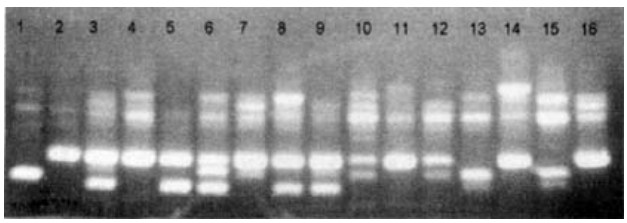

Fig. 1. RAPD patterns generated using primer DG100 (OPL-03) for 16 *Salmonella* spp. strains. Each strain was noted as number in Table 2.

이 가장 좋은 것으로 판단되지만 실제로 이를 typing에 적용할 경우를 가정하면 band scoring의 난이도가 discrimination index만큼 중요한 판단 기준으로 작용할 것으로 보인다. 따라서 discrimination index, band의 숫자, band scoring 난이도 등을 종합적으로 고려할 때 DG100(OPL-03)이 band도 선명하고, band의 숫자도 적합하여 비교해 본 primer들 중 가장 나은 primer로 판단되었다.

이들 primer들은 혈청형이 *enteritidis*인 2개의 균주 즉 ATCC4931과 ATCC13076을 서로 완전히 다른 것으로 분리하였다. 사실 이 2가지는 항원적 특성이 파지형 6a와 1, 9, 12:g, m:-로(Table 2) 서로 직접 비교는 어렵다. 비교 실험에 사용된 나머지 primer들도 이 두 가지 균을 완전히 다른 RAPD 유형으로 분리하였다.

RAPD typing은 분리된 균주들 간에 유전적으로 얼마나 가깝고 먼지도 쉽게 계산이 가능한 것으로 알려져 있다[19]. 이중 DG100(OPL-03)을 이용하여 RAPD를 행한 결과를 UPGMA 방법으로 분석한 결과를 Fig. 2에 정리하였다. 즉 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 15가 하나의 군집을 1, 9, 10, 11, 12, 14, 16가 또 다른 군집을 형성하였다. 그러나 다른 primer(DG93, DG94, DG96, DG102)들을 사용할 경우의 군집 분석 결과는 DG100을 이용하여 분석한 것과는 완전히 다른 분석 결과를 얻을 수 있었다(data not shown). 이는 각각의 primer들이 증폭하는 부위가 달라 생기는 결과로 추측되며 RAPD 유형만으로 균주들 간의 유전적 거리(genetic distance)를 계산하는 것은 다소 무리가 있을 수 있다고 사료된다. 따라서 살모넬라의 특정 유전자 염기서열을 상호 비교하여 이로부터 군집분석을 행한 결과를 RAPD를 이용한 군집분석 결과와 상호보완 하는 것이 더 바람직하다

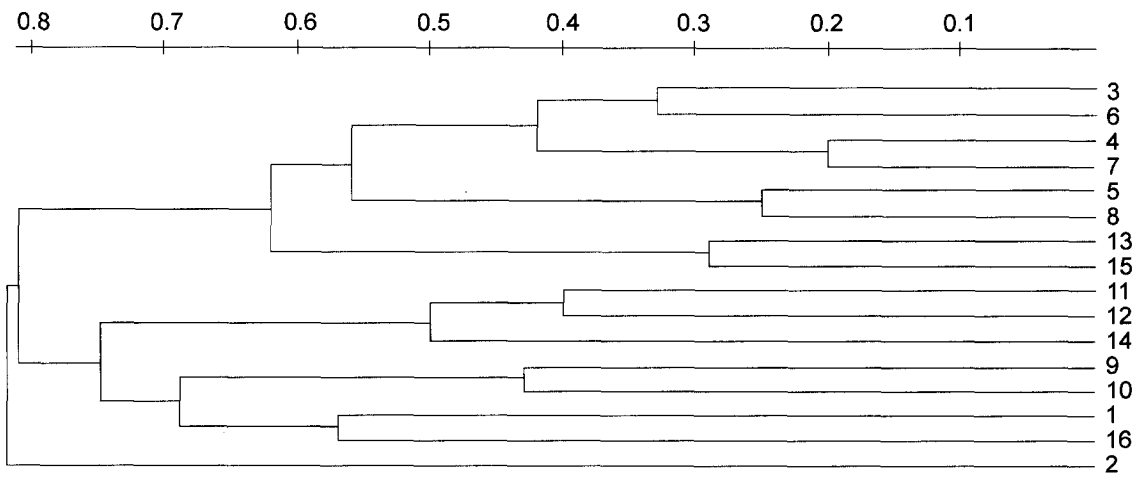

Fig. 2. UPGMA cluster analysis of RAPD profiles obtained with primer DG100 (OPL-03) for 16 *Salmonella* spp. strains. Each strain was noted as number in Table 2.

Table 3. RAPD typing results of *Salmonella* spp.

Serial number of *salmonella* spp.	RAPD profiles																				
	DG89	DG90	DG91	DG92	DG93	DG94	DG95	DG96	DG97	DG98	DG99	DG100	DG101	DG102	DG103	DG104	DG105	DG106	DG107	DG108	cumulative RAPD profiles
1	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1	H1	I1	J1	K1	L1	M1	N1	O1	P1	Q1	R1	S1	T1	1
2	A2	B2	C2	D2	E2	F2	G2	H2	I2	J2	K2	L2	M2	N2	O2	P2	Q2	R2	S2	T2	2
3	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3	I1	J3	K3	L3	M3	N3	O3	P3	Q3	R2	S3	T3	3
4	A4	B4	C3	D4	E4	F4	G1	H4	I3	J2	K4	L4	M4	N4	O4	P2	Q4	R3	S4	T4	4
5	A5	B5	C3	D5	E5	F5	G4	H5	I4	J4	K5	L5	M5	N5	O5	P4	Q5	R4	S5	T5	5
6	A6	B6	C4	D6	E6	F6	G5	H6	I5	J5	K6	L6	M6	N6	O6	P5	Q6	R5	S6	T3	6
7	A7	B3	C4	D7	E7	F7	G6	H7	I6	J6	K7	L7	M7	N3	O3	P5	Q7	R2	S7	T6	7
8	A8	B7	C5	D8	E8	F8	G7	H8	I7	J7	K8	L8	M8	N7	O7	P2	Q8	R6	S8	T3	8
9	A9	B8	C3	D9	E9	F9	G8	H9	I8	J8	K9	L9	M9	N3	O8	P6	Q9	R7	S9	T7	9
10	A10	B9	C6	D10	E10	F10	G9	H10	I4	J9	K10	L10	M10	N8	O9	P6	Q10	R2	S10	T8	10
11	A11	B10	C6	D11	E11	F11	G10	H11	I9	J10	K11	L11	M11	N9	O10	P7	Q11	R8	S6	T9	11
12	A12	B11	C3	D12	E12	F12	G11	H12	I10	J11	K12	L12	M12	N10	O11	P8	Q6	R2	S11	T8	12
13	A13	B12	C7	D13	E13	F13	G12	H13	I11	J12	K13	L13	M13	N11	O12	P9	Q12	R9	S12	T10	13
14	A14	B13	C6	D14	E14	F14	G13	H14	I12	J13	K14	L14	M14	N12	O13	P5	Q13	R6	S13	T11	14
15	A13	B14	C7	D6	E15	F15	G14	H15	I13	J12	K13	L15	M13	N13	O12	P10	Q8	R5	S12	T10	15
16	A15	B15	C3	D2	E16	F16	G15	H16	I14	J2	K15	L16	M6	N14	O14	P10	Q14	R6	S14	T3	16
D value	0.9916	0.9916	0.8333	0.9833	1	1	0.9916	1	0.9833	0.9666	0.9916	1	0.9833	0.975	0.9833	0.9333	0.9833	0.8833	0.9833	0.9333	

고 판단된다.

현재 몇 가지 유전자의 경우(*invA*, *rfb*, *agfA*) 이를 이용하여 PCR을 행하면 살모넬라 속인지 여부를 판별할 수 있다고 알려져 있다.[1] 따라서 실제로 야생주를 사용하여 역학 조사시에는 이들 유전자를 증폭해 보아 살모넬라인지 여부를 우선 판별하고 이중 살모넬라로 분류될 경우 이번에 선발된 primer를 이용하여 RAPD를 행하면 쉽게 typing이 가능할 것으로 보인다.

RAPD typing은 분리력에 있어 현재 알려진 많은 형질분류 방법 중 가장 분리력이 좋은 것으로 알려진 PFGE와 비슷한 것으로 보고되고 있고[3] 고도의 정제도와 손상되지 않은 DNA 그리고 고가의 장비를 요구하는 PFGE에 비해 장비가 싸고 상대적으로 쉽게 이용할 수 있는 기술이므로 장차 식중독 사고의 역학 조사와 식품 공장의 오염원 조사 추적 등에 많이 활용될 수 있을 것으로 보인다.

결론적으로 우리는 총 20가지 primer를 이용하여 살모넬라 표준균주 16종의 RAPD typing을 행한 후 discrimination index, band의 숫자, band scoring의 난이도 등을 고려하여 가장 분리력이 좋은 primer 4개를 엄선하였다. 현재는 이들 primer를 이용하여 돈육 공장에서의 오염원 규명을 위한 연구가 진행 중에 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2002년도 농림부·농림기술개발사업(202138031SB010)의 지원으로 이루어진 것으로서 이에 감사드립니다.

국문요약

RAPD 분석은 한 개의 primer를 이용하여 임의의 DNA조각을 증폭하는 것이다. 이때 만들어지는 여러 형태의 DNA band유형을 이용하여 살모넬라를 분류할 수 있다. 살모넬라를 효과적으로 RAPD typing할 수 있는 primer들을 엄선하기 위하여 살모넬라 표준균주 16종을 대상으로 총 20가지 primer들의 RAPD 분리력을 비교하여 보았다. 결과는 재현성이 높았으며 이중 primer A, OPG04, OPG10, OPL-03은 16가지 균 모두를 다른 유형으로 분리하였고 primer OPB-17, OPB-6, OPG08, OPL-02는 15가지 유형으로 분리하였다. 이들은 discrimination index, band의 숫자, band scoring의 난이도 등을 고려해 볼 때 나머지 primer 들에 비해 우수한 분리력을 보였다. 이들 primer들은 장차 살모넬라의 RAPD typing에 이용될 수 있을 것으로 보이며, 현재는 이들을 이용하여 돈육 공장의 오염원 규명을 위한 연구를 수행 중이다.

참고문헌

1. Olsen, J.E., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P.E., Popovic, T., Rasmussen, H.N. and Olsvik, O: Probes and polymerase chain reaction for the detection of food-borne bacterial pathogens. *International J. Food Microbiol.*, **28**, 1-78 (1995).
2. Carrington, M. and Hoelzel, A.R.: *Molecular Epidemiology.* Oxford University Press, pp 41-43 (2001).
3. Kerouanton, A., Brisabois, A., Denoyer, E., Dilasser, F., Grout, J., Salvat, G. and Picard, B.: Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. *International J. Food Microbiol.*, **43**, 61-71 (1998).
4. Soto, S.M., Guerra, B., Gonzalez-Hevia, M.A. and Mendoza, M.C.: Potential of three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4830-4836 (1999).
5. Mare, L., Dicks, L.M.T. and van der Walt, M.L.: Characterization of south African isolates of *Salmonella* enteritidis by phage typing, numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. International, *J. Food Microbiol.*, **64**, 237-245 (2001).
6. Millemann, Y., Lesage-Descauses, M.-C., Lafont, J.-P. and Chaslus-Dancla, E.: Comparison of randomly amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. *FEMS Immunol. & Microbiol.*, **14**, 129-134 (1996).
7. Martin, M.C., Gonzalez-Hevia, M.A., Moro, I. and Mendoza, M.C.: Genetic typing methods applied to the differentiation of clonal lines among *Salmonella enterica* serogroup G strains causing human salmonellosis. *FEMS Immunol. & Microbiol.*, **19**, 215-221 (1997).
8. Landeras, E., Gonzalez-Hevia, M.A. and Mendoza, M.C.: Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype enteritidis. Relationships between food, water and pathogenic strains. *International J. Food Microbiol.*, **43**, 81-90 (1998).
9. Laconcha, I., Lopez-Molina, N., Rementeria, A., Audicana, A., Perales, I. and Garaizar, J.: Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella* enteritidis strains. *International J. Food Microbiol.*, **40**, 27-34 (1998).
10. Tsen, H., Hu, H.H., Lin, J.S., Huang, C.H. and Wang, T.K.: Analysis of the *Salmonella typhimurium* isolates from food-poisoning cases by molecular subtyping methods. *Food Microbiol.*, **17**, 143-152 (2000).
11. Choi, W.S. and Hong, C.-H.:Rapid enumeration of Listeria monocytogenes in milk using competitive PCR. *International J. Food Microbiol.*, **84**, 79-85 (2003).
12. Hunter, P.R. and Gaston, M.A.: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 2465-2466 (1998).
13. Van de Peer, Y., and De Wachter, R.: TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.*, **10**, 569-570 (1994).
14. Link, W., Dixens, C., Singh, M., Schwall, M. and Melchinger, A.E.: Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, **90**, 27-32 (1995).
15. Lin, A.W., Usera, M.A., Barret, T.J. and Goldsby, R.A.: Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 870-876 (1996).
16. Williams J.G.K., Kubelin, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.: DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531-6535 (1990).
17. Miyata, M., Aoki, T., Inglis, V., Yoshida, T. and Endo, M.: RAPD analysis of Aeromonas salmonicida and Aeromonas hydrophila. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 181-185 (1995).
18. Chansiripornchai, N., Ramasoota, P., Bangtrakulnonth, A., Sasipreeyajan, J. and Svenson, S.B.: Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. enterica. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **29**, 221-225 (2000).
19. Martinez, I., Rorvik, L.-M., Brox, V., Lassen, J., Seppola, M., Gram, L. and Fonnesbech-Vogel, B.: Genetic variability among isolates of Listeria monocytogenes from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. *International J. Food Microbiol.*, **84**, 285-297 (2003).