J. Fd Hyg. Safety 18(4), 229–236 (2003)

식중독세균 5속의 동시 동정을 위한 ERIC-PCR 반응성분 농도의 최적화

서현아 · 박성희 · 김근성†
중앙대학교 산업과학대학 식품공학과

Optimization of the Concentrations of ERIC-PCR Components to Simultaneously Differentiate Five Foodborne Pathogenic Bacterial Genera

Hyun-Ah Seo, Sung-Hee Park and Keun-Sung Kim†
Department of Food Science and Technology, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University, Ansung, Kyungki-do 456-756 Korea

ABSTRACT – The five different foodborne pathogenic bacterial genera of *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* and *Listeria* are important sources of foodpoison. However, the method was not developed to simultaneously differentiate these five bacteria at molecular level. The optimized concentrations of the four major PCR cocktail components of $MgCl_2$, dNTPs, primers and template DNA were determined when ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus)-PCR reactions were carried out to differentiate the five different foodborne pathogenic bacteria. The optimized concentration of $MgCl_2$ was determined to be 2 mM in order to obtain a consistent fingerprinting pattern. The similar fingerprinting pattern was obtained when ERIC primers and dNTPs were added up to the concentrations of 2 μM and 200 μM, respectively. As for template DNA, the numbers of PCR fragments were not affected, but their intensities were increased as the concentrations of the DNA were increased.

Key words: foodborne pathogenic bacteria, optimization, ERIC-PCR components

우리 나라 경제의 발전과 외국과의 물자교류 확대에 따라 사회구조나 국민생활에 있어서 다양하고 복잡해지는 경향을 보이고 있다. 이에 따라 서구적인 식생활문화의 유입으로 단체급식이나 패스트푸드 등이 보편화되고 있으며, 그러한 현상으로 인한 식중독 미생물에 의한 오염으로, 해마다 식중독 발생건수 당 발병자수도 급속도로 증가하고 있는 추세이다. 이중에서도 *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Listeria* 등 5속의 병원성 세균들은 식중독 유발에 있어서 중요한 비중을 차지한다. 이 세균들은 사람을 매개로 하여 식육, 야채, 난류, 우유나 유제품, 그리고 조리가공 식품 등의 여러 가지 음식물을 오염시킬 수 있으며, 이를 섭취한 사람으로 하여금 심각한 식중독을 유발시킨다.

최근 이와 같은 식중독균을 분자생물학적인 방법들을 사용하여 분리 · 동정하는 방법이 많이 연구되어지고 있으며, 이들을 실제로 적용하여 식중독 유발의 원인 균과 오염경로 등을 파악하려는 시도도 이루어지고 있다.[1-10] 이러한 분자생물학적인 방법 중 원시핵 세포의 genome상에 간헐적으로 분산되어 있는 반복적인 DNA sequence를 응용한 PCR (polymerase chain reaction) 방법은 그 예로서 ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequence,[11] REP(repetitive extragenic palindromic) sequence[12] 그리고 BOX sequence[13] 등이 있다. 또한 진핵세포의 게놈에서도 이와 유사한 현상이 발견되지만, ribosomal RNA 유전자들과 insertional sequence들처럼 전사되는 DNA sequence들은 비교적 길이가 긴 반복되는 element들로써 상대적으로 낮은 빈도수로 존재하고, transfer RNA(tRNA)와 같은 다른 관련된 유전자들도 또한 각각의 genome에 동일한 염기서열들이 여러 개 존재한다. 그러한 낮은 빈도수로 존재하는 길이가 긴 element들에 비하여 산재된 반복성 sequence들은 전형적으로 15~수백 개의 염기쌍으로 구성되며 세균 염색체 상에 널리 분포되어 있다.[14]

이러한 산재된 반복성 sequence를 함유하는 probe을 이용한 게놈 fingerprinting은 각각의 세균 균주들에 있어서 반복성 sequence들 사이의 거리가 다르다는 점을 이용하여 상호 연관성이 있는 균주들끼리 구분하여 구별할 수 있다. 같은 원리를 적용하여 PCR 반응 후 얻어지는 PCR 산물(DNA 단편들)의 크기와 숫자의 차이점을 이용하여 각기 다른 세균 균주들에 대하여 각기 다른 DNA fingerprinting pattern들이 얻어질 수 있다.[15]

이러한 보존된 반복성 sequence중에서 ERIC sequence들

†Author to whom correspondence should be addressed.

은 126bp element들로서 중앙에 보존된 palindromic 구조를 가지고 있으며,[12] 그들은 또한 염색체 상에서 non-coding 부위에 위치하며 그들의 염색체상의 위치는 종(species)마다 각기 다르고, 전사 방향과 비교하여 방향성(orientation)에 있어서 같은 방향 혹은 반대방향에 관계없이 염색체 상에 위치할 수 있다. ERIC sequence들은 초기연구단계에서는 *E. coli*와 *S. typhimurium*과 같이 서로 연관성 있는 그람음성 장내세균들에서 발견되었으나, 이후에 이들 ERIC element들은 모든 연관된 그람음성 장내세균들 뿐만 아니라 많은 계통분류 체계상 서로 연관이 없는 다양한 문(phyla)들에 속하는 세균들에서도 발견되었다.[16]

이러한 ERIC sequence를 응용한 PCR을 통해 식중독 미생물을 분리·동정하기 위하여, PCR 증폭반응을 실시하기 위한 필수 반응성분인 $MgCl_2$, dNTPs, primer, template DNA등의 농도 최적화가 우선적으로 실시되어야 한다. $MgCl_2$는 primer의 annealing과 DNA의 double strand와 증폭된 산물의 denaturation을 돕고, Taq DNA polymerase의 보조인자로서의 역할을 하며, primer는 증폭하고자 하는 부위의 sequence를 토대로 최소 16개의 nucleotide에서부터 대개 20~24개 정도의 nucleotide들로 구성되며,[17] target sequence에 결합 후 이를 기점으로 하여 template와 상보적인 염기서열로 연장되게 된다. DNA의 연장단계에서 상보적인 서열을 합성하기 위하여 primer의 3' end에 Taq DNA polymerase가 각각의 염기를 하나씩 붙여주는데 이것의 급원이 바로 dATP, dCTP, dGTP, dTTP로 구성된 dNTPs이며, 목적하고자 하는 부분의 sequence를 증폭하기 위한 주형이 되는 template DNA도 PCR 증폭반응을 일으키기 위한 필수요소라 할 수 있다. 이 네 가지 반응성분들의 최적 농도 결정은 실험의 경제성과 각 균주들의 정확한 DNA fingerprinting pattern 파악에 아주 중요한 단계이다.

그러므로 본 연구에서는 *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Listeria* 등의 주요 식중독 유발세균들을 동시에 동정하기 위하여 이러한 ERIC DNA sequence를 이용한 PCR 반응을 일으키기 위한 반응성분들 중 $MgCl_2$, dNTPs, primer, template DNA의 농도에 따른 fingerprinting pattern을 비교·분석하여 증폭반응에 영향을 미칠 수 있는 각 PCR 반응성분들의 농도를 최적화 하였다.

재료 및 방법

균주 및 재료

본 연구에 사용된 5속 6균주는 Table 1에 열거되었으며, 균주 배양과 수확을 위해 LB(Luria-Bertani) media를 사용하였고, DNA 추출과정 및 PCR 반응에 사용된 모든 시약은 molecular biology용 및 ACS grade 이상을 사용하였다. PCR 반응용 primer들은 Bioneer에서 합성하여 구입하였고, PCR 기계는 PTC-100(MJ research Inc., U.S.A.)을 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains used in this study

Gram staining	Strain name
Gram (-) bacteria	*Escherichia coli* H10407
	Escherichia coli O157:H7 ATCC 35150
	Salmonella typhi Ty2 ATCC 19430
	Vibrio cholerae NIH 35A3
	Shigella flexneri ATCC 29903
Gram (+) bacteria	*Listeria monocytogenes* HPB#3

Gram 음성균의 Total DNA 추출[18]

Table 1에 열거된 5가지 그람음성 균주들을 각각 5 ml의 LB 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후, 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 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 1시간동안 반응시켰다. 그리고 이 분해된 세포현탁액으로부터 phenol과 에탄올을 이용하여 DNA를 추출하였으며, 추출된 DNA를 50 μl의 1×TE 용액에 용해하였다.

Gram 양성균의 Total DNA 추출[19]

Table 1에 열거된 1가지 그람양성 균주를 5 ml의 LB 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 위와 같이 세포를 수확하였다. 수확한 세포를 위와 같이 처리하여 1×TE 용액에 현탁하여 10 μl의 mutanolysin(1 mg/ml)을 가한 후, 20 μl RNase A(10 mg/ml)를 가하여 37°C에서 40분간 반응시킨 후에 50 μl의 10% SDS와 50 μl의 proteinase K(10 mg/ml)를 넣어 다시 37°C에서 60분간 방치하였다. 그리고 분해된 세포현탁액으로부터 위와 같이 DNA를 추출하였다.

ERIC-PCR 반응 조건

ERIC-PCR 반응액의 조성은 template DNA, 5 μl 10× Tris 함유 반응 buffer(pH 9.0), primer쌍, $MgCl_2$, dNTPs와 1 unit의 Taq DNA polymerase를 혼합한 후 멸균된 증류수로 전체부피를 50 μl가 되게 하였다. 이 실험에서 농도별

변수가 된 각 구성성분은 $MgCl_2$, dNTPs, primer, template DNA이다. $MgCl_2$ 변수의 경우, 각 tube에 함유한 설정농도를 0 mM, 0.5 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM로 정하였고 dNTPs는 200 μM, primer는 2.0 μM, DNA는 1 μl로 고정하였다. dNTPs변수의 경우는 0 μM, 50 μM, 100 μM, 150 μM, 200 μM, 250 μM로 각 농도를 정하고 $MgCl_2$는 2.0 mM, primer는 2.0 μM, DNA는 1 μl로 고정하였다. Primer변수의 경우는 0 μM, 0.5 μM, 1.0 μM, 1.5 μM, 2.0 μM, 2.5 μM로 정하였고 $MgCl_2$는 2.0 mM, dNTPs는 200 μM, DNA는 1 μl로 고정하였다. DNA변수의 경우는 0 μl, 0.25 μl, 0.5 μl, 0.75 μl, 1.0 μl, 1.25 μl로 정하였고 $MgCl_2$는 2.0 mM, dNTPs는 200 μM, primer는 2.0 μM로 고정하였다. 각 성분변수에 따라서 설정한 농도를 Table 2에 나타내었다.

ERIC-PCR 반응을 위하여 ERIC1R(5'-ATGTAAGCTC-CTGGGGATTCAC-3')과 ERIC2(5'-AAGTAAGTGACTGG-GGTGAGCG-3') primer들을 사용하였으며,[20] PCR 반응 조건은 예비 변성(pre-denaturation) 단계 94°C에서 7분, 변성(denaturation) 단계 94°C에서 1분, 냉각(annealing) 단계 52°C에서 1분, 연장(extension) 단계 72°C에서 3분으로서 변성, 냉각, 연장을 30회 반복 수행하였다(Table 3).

Agarose 전기영동

각각의 PCR에 의하여 증폭된 DNA 단편 50 μl중 10 μl를 취하여 2.5 μl의 agarose 전기영동용 5×loading buffer와 섞은 후, 1% agarose gel상에서 전기영동을 실시하였고, 실시 후 ethidium bromide 용액에 30분간 담근 후 자외선등으로 DNA를 관찰하고 즉석사진을 찍었다.

Table 2. Concentrations of each variable ingredient used for PCR reactions

Ingredients	Tube numbers					
	1	2	3	4	5	6
$MgCl_2$ (mM)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
dNTP (μM)	0	50	100	150	200	250
primer (μM)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
DNA (μl)	0	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25

Table 3. PCR reaction conditions used in this study

Steps	Temp. (°C)	Time (min)	No. of cycles
predenaturation	94	7	
denaturation	94	1	
annealing	52	1	30
extension	72	3	
cooling-off	4	30	

결과 및 고찰

$MgCl_2$ 농도의 최적화

PCR 방법은 민감도가 높기 때문에 각 연구환경에 맞도록 구성성분들의 최적농도를 설정하고 적용하는 것이 연구의 경제성과 효율성을 높이는데 많은 영향을 준다.

본 $MgCl_2$ 농도결정 실험에서 적용된 농도 중 PCR 반응이 일어나기 시작한 농도는 연구에 사용된 5속(genus), 6균주 모두 1.0 mM이었다. 이 결과로 PCR 증폭 반응을 유발할 수 있는 $MgCl_2$의 최소한계농도는 0.5 mM에서 1.0 mM범위 내에 존재할 것이라는 추측이 가능하였다. *E. coli*의 경우 0.4 kb 분자량의 단편을 중심으로 최소 0.2 kb에서 최대 3.0 kb의 범위에서 단편들이 생성되었으며, 1.5 mM의 농도에서는 최대 단편의 분자량은 1.2 kb였다. *E. coli* 균주는 2.0 mM에서 완전한 fingerprinting pattern을 나타내었으며 2.5 mM에서는 약간의 단편강도만 증가되었을 뿐 fingerprinting pattern의 변화는 없었다(Fig. 1, Panel A). *E. coli* O157:H7은 1.2 kb의 단편을 중심으로 작은 분자량과 큰 분자량의 단편들의 강도와 수가 증가되는 양상을 보였으며 1.5 mM부터 최대 단편인 2.0 kb 단편이 나타났다(Fig. 1, Panel B). *Salmonella* 균주는 1.0 mM에서 0.7 kb의 단편과 0.4 kb의 단편이 나타났으나, 0.4 kb의 단편이 $MgCl_2$의 농도가 증가함에 따라 강도가 증가한 반면 0.7 kb의 단편은 강도가 점차 약해졌다. 2.0 mM에서부터는 단편의 수가 더 이상 증가되지 않고 최대 단편수를 유지하며 그 이상의 농도(2.5 mM)를 적용했을 경우 단편의 강도만 증가되었다(Fig. 1, Panel C). *Shigella* 균주는 1.0 mM 농도에서 0.7 kb 분자량의 강도 높은 단편이 나타났으며 1.5 mM의 농도에서 1.2 kb, 0.4 kb와 0.3 kb의 단편이 나타났고 이를 중심으로 작은 단편들이 생성되었다. 이 단편들은 농도 증가에 따라 0.7 kb의 단편은 강도가 약해졌으나 이외의 모든 단편들은 강도가 증가하였다(Fig. 1, Panel D). *Vibrio* 균주의 경우, 0.6 kb와 0.7 kb 단편을 중심으로 단편생성범위가 점차 확대되었으며, 1.5 mM 에서부터 최대 1.8 kb 분자량의 단편까지 생성되었다. 그러나 1.0 mM에서 매우 강도 높게 나타났던 0.5 kb, 0.6 kb와 0.7 kb 단편은 $MgCl_2$ 적용농도가 증가함에 따라 강도가 감소하였고 0.5kb단편의 경우 2.5 mM에서는 거의 보이지 않았다(Fig. 1, Panel E). *Listeria* 균주는 1.0 mM과 1.5 mM의 농도에서 0.2 kb와 0.3 kb의 단편만이 생성되었고 점차 두 단편의 강도가 증가하였으나 2.0 mM의 농도를 적용하였을 때 최대 1.2 kb의 단편이 생성되었고, 2.5 mM에서는 1.5 kb의 단편까지도 생성되었다(Fig. 1, Panel F).

$MgCl_2$의 농도에 따른 단편들의 변화를 살펴볼 때 적용한

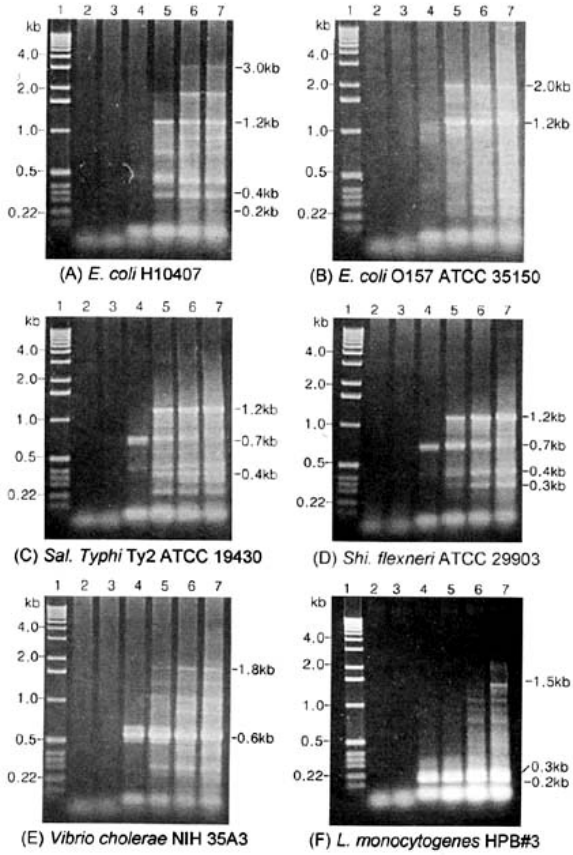

Fig. 1. Fingerprinting patterns shown as the concentrations of $MgCl_2$ increase.
Panels A to F represent fingerprinting patterns of six strains. Panel A: *E. coli* H10407, Panel B: *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, Panel C: *Sal. typhi* Ty2 ATCC 19430, Panel D: *Shi. flexneri* ATCC 29903. Panel E: *V. cholerae* NIH 35A3, Panel F: *L. monocytogenes* HPB#3. Lane 1 showed 1 kb DNA ladders. The concentrations of $MgCl_2$ for each PCR reaction increased with an increment of 0.5 mM from 0 mM (lane 2) to 2.5 mM (lane 7). The other ingredients consisted of primers (2.0 μM), dNTPs (200 μM) and template DNA (1.0 μl) for PCR reaction.

5속의 6균주 모두 0.5 kb와 1.0 kb 사이 범위에 위치하는 단편들은 농도의 증가에 따라 오히려 그 강도가 줄어드는 양상을 보였으나 그 이외의 범위에 속하는 단편들은 농도의 증가에 따라 강도도 증가하였다. 일반적으로 $MgCl_2$의 적용농도는 PCR에 사용되는 dNTPs의 농도에 기준 한다.[21] 이것은 $MgCl_2$가 반응중의 pH를 일정하게 유지시켜 주는 역할을 하므로 음극성을 갖는 dNTPs의 농도가 높을 경우 이와 상충하기 위한 정도의 극성을 가져야하기 때문이다. 그러므로 $MgCl_2$의 최적농도를 파악하기 위해서는 적용된 dNTPs의 농도를 우선적으로 고려해야한다. 본 실험에는 *Listeria*를 제외한 나머지 5균주의 경우 2.0 mM과 2.5 mM을 적용하였을 때 얻어진 fingerprinting pattern의 변화는 없었다. 그러나 *Listeria* 균주의 경우, 2.5 mM에서 1.5kb의 추가적인 단편이 생성됨으로서 다른 균주들과는 다른 양상을 보였다.

일반적인 PCR 반응의 기본조건으로 $MgCl_2$의 농도를 대개 1.5 mM로 설정하여 적용한다.[22] 한편 Lin 등[23]은 그들의 연구 방법을 위해 $MgCl_2$의 농도를 3.5 mM로 최적화하여 제안한 바 있다. 그러나 본 ERIC-PCR 실험에서 식중독을 유발하는 5속 6균주를 대상으로 하여 2.0 mM 농도의 $MgCl_2$를 200 μM의 dNTPs와 함께 사용하는 것이 $MgCl_2$의 최적농도로 결정하였다.

dNTPs 농도의 최적화

dNTPs 농도를 달리 적용하여 나타난 각 균주들의 fingerprinting pattern을 비교해 본 결과, *E. coli* 균주는 50 μM을 적용하였을 때 최소 0.4 kb에서 최대 3.0 kb의 단편 크기 범위를 나타내었으며 250 μM의 농도를 적용 시에도 단편들의 크기 범위는 변화가 없었고, 단지 부수적인 작은 단편들의 추가와 단편 강도의 증가만이 관찰되었다(Fig. 2, Panel A). *E. coli* O157:H7은 50 μM과 100 μM의 경우, 1.2 kb 단편보다 작은 분자량의 단편들은 나타나지 않았으나 150 μM을 적용할 때부터 0.3 kb의 단편이 생성되었고 점차 강도가 증가되었다(Fig. 2, Panel B). *Salmonella* 균주는 0.7 kb의 단편이 50 μM에서 생성되었으나 dNTPs의 적용농도가 증가함에 따라 강도가 약해졌고, 1.2 kb 단편은 100 μM에서 생성되었으며 적용농도 증가에 따라 강도도 증가하였다. 0.4 kb 단편은 150 μM에서 생성되었고 0.2 kb 단편은 200 μM에서 처음으로 관찰되었다(Fig. 2, Panel C). *Shigella* 균주는 0.4 kb 분자량의 단편이 50 μM 적용 시 생성되지 않았으며, dNTPs의 적용농도가 증가함에 따라 0.3 kb, 0.4 kb와 1.2 kb의 단편들은 강도가 증가하였으나 0.7 kb 단편은 강도가 감소하였다. 200 μM의 농도에서부터는 fingerprinting pattern의 변화없이 더 이상의 단편 수의 증감은 없었다(Fig. 2, Panel D). *Vibrio* 균주는 0.6 kb의 단편이 주요 단편으로서 적용농도의 증가에 따라 강도가 증가하였으나 이외의 분자량을 갖는 단편들은 두드러진 강도의 증감은 관찰되지 않았다(Fig. 2, Panel E). *Listeria* 균주는 50 μM의 농도에서 0.2kb와 0.3kb의 단편을 기준으로 1.5kb까지의 범위에서 작은 단편들이 나타났고, 100 μM에서는 거의 완전한 fingerprinting pattern이 얻어진 후 dNTPs 적용농도의 증가에 따라 단편들의 강도만 증가하였다(Fig. 2, Panel F).

dNTPs를 0 μM에서 250 μM까지 50 μM씩 증가시키면서 적용해본 결과, 6균주 모두 200 μM까지는 농도 증가와

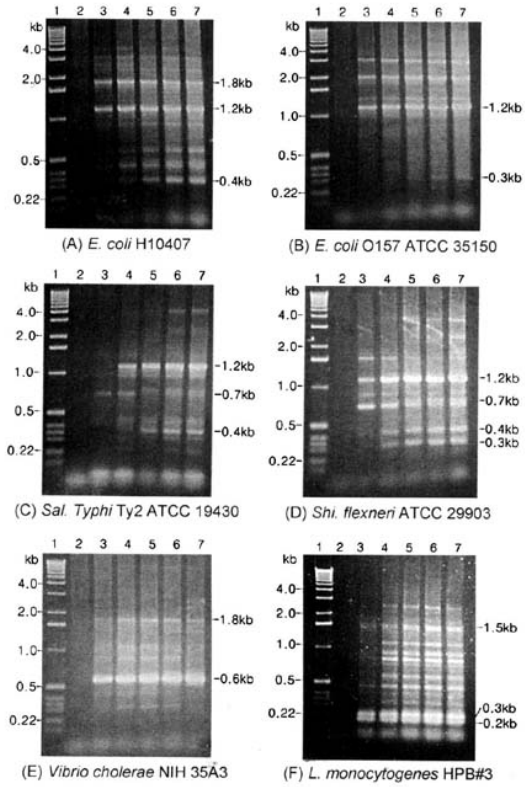

Fig. 2. Fingerprinting patterns shown as the concentrations of primers increase.
Panels A to F represent fingerprinting patterns of six strains. Panel A: *E. coli* H10407, Panel B: *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, Panel C: *Sal. typhi* Ty2 ATCC 19430, Panel D: *Shi. flexneri* ATCC 29903. Panel E: *V. cholerae* NIH 35A3, Panel F: *L. monocytogenes* HPB#3. Lane 1 showed 1kb DNA ladders. The concentrations of Primers for each PCR reaction increased with an increment of 0.5 μM from 0 μM (lane 2) to 2.5 μM (lane 7). The other ingredients consisted of $MgCl_2$ (2 mM), dNTPs (200 μM) and template DNA (1.0 μl) for PCR reaction.

비례하여 단편 수와 강도가 점증하였다. 그러나 200 μM에서 부터는 더 이상의 단편 수나 강도의 변화는 관찰되지 않았기 때문에 fingerprinting pattern의 파악을 위한 목적에는 200 μM의 dNTPs 농도만으로도 충분하였다.

Primer 농도의 최적화

Primer 농도 결정을 위한 실험에서 적용된 모든 균주가 0.5 μM에서 단편이 생성되었기 때문에 PCR 반응을 일으키기 위한 최소 농도는 0 μM에서 0.5 μM 사이의 범위일 것이라고 추측이 가능했다. *E. coli* 균주는 1.2 kb와 1.8 kb의 단편이 주요 단편으로서 두 단편을 중심으로 부수적인 단편들의 수와 강도가 증가하였다. 반면 두 단편의 강도는 primer의 농도와 상관없이 일정한 강도를 유지하였다. 2.0 μM을 적용했을 때부터 더 이상 단편수의 증가는 나타나지 않았다(Fig. 3, Panel A). *E. coli* O157:H7 균주는 최대 4.0 kb 분자량의 단편이 0.5 μM을 적용했을 때부터 나타났으나 주요 단편인 1.2 kb보다 작은 분자량을 갖는 단편들은

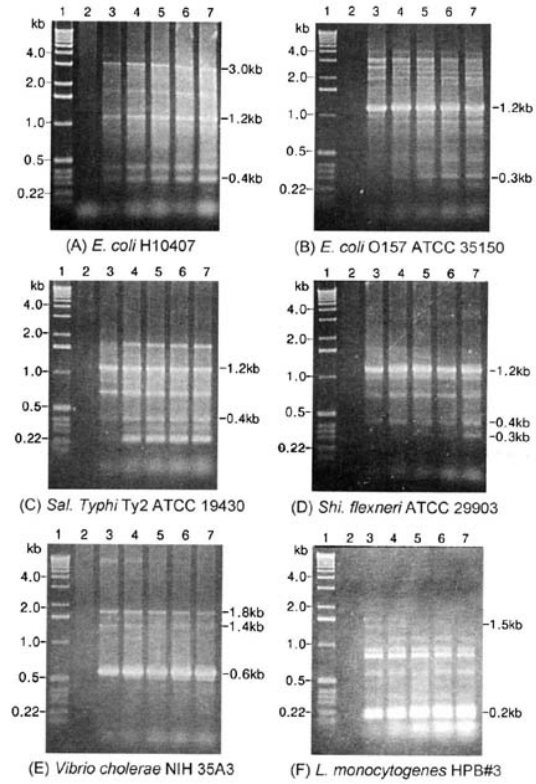

Fig. 3. Fingerprinting patterns shown as the concentrations of dNTPs increase.
Panels A to F represent fingerprinting patterns of six strains. Panel A: *E. coli* H10407, Panel B: *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, Panel C: *Sal. typhi* Ty2 ATCC 19430, Panel D: *Shi. flexneri* ATCC 29903. Panel E: *V. cholerae* NIH 35A3, Panel F: *L. monocytogenes* HPB#3. Lane 1 showed 1 kb DNA ladders. The concentrations of dNTPs for each PCR reaction increased with an increment of 50 μM from 0 μM (lane 2) to 250 μM (lane 7). The other ingredients consisted of $MgCl_2$ (2 mM), primers (2.0 μM), and template DNA (1.0 μl) for PCR reaction.

거의 나타나지 않았다. Primer 적용농도의 증가에 따라 1.2 kb보다 작은 단편들의 수와 강도가 증가하였으나 1.2 kb를 포함한 분자량 1.2 kb 이상의 단편들은 강도가 증가되지 않았다(Fig. 3, Panel B). *Salmonella* 균주는 1.0 μM의 primer를 적용할 때부터 단편들의 수는 증가되지 않았고 일정한 fingerprinting pattern을 유지했으며 단편 강도의 증가는 완만하게 나타났다(Fig. 3, Panel C). *Shigella* 균주는 1.2 kb 단편을 중심으로 작은 분자량을 갖는 단편들의 수와 강도가 증가하였다. 0.4 kb의 단편은 1.5 μM 농도를 적용했을 때 생성되었으며, 2.0 μM을 적용했을 때 더 이상의 단편 수가 증가하지 않는 일정한 fingerprinting pattern을 보여주었다(Fig. 3, Panel D). *Vibrio* 균주는 0.6kb의 단편과 1.4 kb, 1.8 kb 단편이 주요 단편들로서, 적용 primer 농도에 따른 세 단편의 강도 증가는 관찰되지 않았으나 1.0 μM에서 0.5 kb의 작은 단편이 생성되어 점차 강도가 증가되는 양상을 보였다. 그러나, 0.5 kb 분자량 이하의 작은 단편들은 거의 나타나지 않았다(Fig. 3, Panel E). *Listeria* 균주는 0.5 μM에서 최소 0.2 kb에서 최대 1.6 kb까지의 범위에서 단편들이 생성되었고, 적용농도를 증가시킴에 따라 1.5 kb와 1.6 kb 단편들의 강도가 감소하였으나, 0.2 kb 부근의 단편들은 단편의 강도가 증가하였다(Fig. 3, Panel F).

일반적인 PCR 방법에서는 30회 반복에 적당한 primer의 농도를 1 μM로 사용하고 있다.[17] Primer의 양이 초기 주형 DNA의 양에 비해 과량이 적용되었을 때, mis-priming이나 primer들끼리 접합이 되어 primer-dimer라는 산물을 만들어 낼 수 있기 때문에[21] 주형 DNA와 PCR 반복회수를 고려한 primer양의 최적화는 정확한 fingerprinting pattern을 만들어 내기 위해 우선되어야 한다. Lin 등[23]은 그들의 연구에서 적용한 균주의 fingerprinting pattern을 획득하기 위해 primer의 농도를 2.5 μM로 최적화하여 적용하였다. 그러나 본 연구에서 5속의 식중독 유발가능 6균주에 대하여 적용해 본 결과 ERIC primer들은 2.0 μM의 농도를 적용했을 때부터 일정한 fingerprinting pattern을 모두 나타낼 수 있었으며 그 이상의 농도를 적용했을 경우 단지 단편들의 강도만이 증가하였을 뿐이었다.

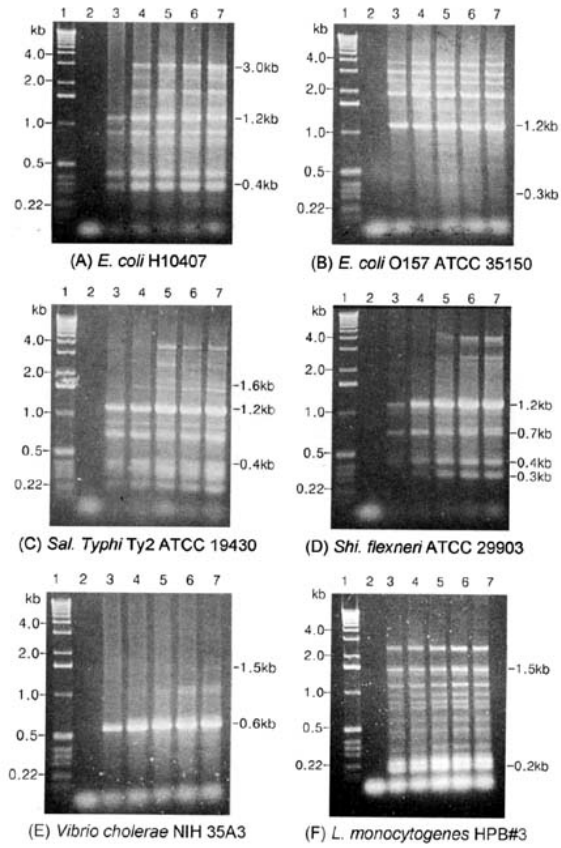

Fig. 4. Fingerprinting patterns shown as the concentrations of template DNA increase.
Panels A to F represent fingerprinting patterns of six strains. Panel A: *E. coli* H10407, Panel B: *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, Panel C: *Sal. typhi* Ty2 ATCC 19430, Panel D: *Shi. flexneri* ATCC 29903. Panel E: *V. cholerae* NIH 35A3, Panel F: *L. monocytogenes* HPB#3. Lane 1 showed 1 kb DNA ladders. The concentrations of template DNA for each PCR reaction increased with an increment of 0.25 μl from 0 μl (lane 2) to 1.25 μl (lane 7). The other ingredients consisted of $MgCl_2$ (2 mM), primers (2.0 μM) and dNTPs (200 μM) for PCR reaction.

Template DNA 농도의 최적화

PCR 반응은 아주 적은 양의 template DNA만으로도 증폭반응이 일어날 수 있다. 그렇기 때문에 0.25 μl의 template DNA를 적용하였을 때도 전체 fingerprinting pattern을 모두 나타내지는 못했으나 생성된 단편들의 강도는 높게 나타났다. *E. coli* 균주는 단편 생성범위가 0.4 kb에서 3.0 kb까지로 나타났다. 0.25 μl의 주형 DNA를 적용했을 때 분자량 1.2 kb 이상의 단편은 생성되지 않았다. 0.5 μl에서부터 0.4 kb에서 3.0 kb 사이의 범위내의 단편들이 모두 생성되어 농도변화에 상관없이 일정한 강도를 보였으며 1.0 μl에서 0.8 kb와 1.3 kb의 약한 단편이 생성되었으며 1.25 μl를 적용할 때도 관찰되었다(Fig. 4, Panel A). *E. coli* O157:H7 균주는 최초 적용 농도인 0.25 μl에서부터 전체 단편수를 모두 나타내었으며 농도의 증가에 따라 단편의 강도가 증가되는 것으로 그 특징이 나타났다(Fig. 4, Panel B). *Salmonella* 균주는 0.25 μl에서 최대분자량의 단편은 1.2 kb였고, 0.5

μl에서는 약한 1.6 kb의 단편이 추가적으로 생성되었다. 완전한 fingerprinting pattern은 0.75 μl에서 얻어졌으며 이후의 농도에서는 0.75 μl에서 생성된 단편들의 강도만 증가하였다(Fig. 4, Panel C). *Shigella* 균주의 경우, 0.25 μl를 적용했을 때 0.7 kb와 1.2 kb의 희미한 단편이 생성되었고, 두 단편을 중심으로 단편의 수와 강도가 증가하는 양상을 보였다. 1.0 μl에서 더 이상의 단편수의 증가는 관찰되지 않았다(Fig. 4, Panel D). *Vibrio* 균주는 0.6 kb의 주 단편이 주형 DNA의 적용농도의 증가에 따라 강도가 증가되었고 1.0 μl에서 1.0 kb와 1.5 kb의 단편이 최초로 생성되었다(Fig. 4, Panel E). *Listeria* 균주는 0.25 μl의 주형을 적용한 시점부터 최소 0.2 kb, 최대 2.5 kb의 범위에서 단편을 생성하였고, 주형 DNA의 적용농도를 증가시킴에 따라 단편수의 변화 없이 단편의 강도만 증가하였다(Fig. 4, Panel F).

주형 DNA의 양을 변화시키며 적용한 실험도 다른 PCR 구성성분을 이용한 실험과 마찬가지로 적용한 양의 증가에 따라 단편의 강도가 증가하였다. 그러나 대부분의 대상 균주들이 적용된 농도가 낮을 때 얻어진 fingerprinting pattern과 적용된 최고 치인 1.25 μl를 적용하여 얻어진 fingerprinting pattern을 비교할 때 단편 수에 있어서 많은 차이를 나타내지는 않았다.

감사의 말

이 논문은 보건의료기술 연구개발사업(관리번호 : HMP-99-F-06-0001, 식품중 각종 위해요인의 위해성 평가와 관리방안 수립에 관한 연구)의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사하는 바입니다.

국문요약

본 연구는 식품을 오염시켜 식중독을 유발하는 주요 식중독 세균인 *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Listeria* 등 5속의 병원성 세균들을 반복성 염기서열을 이용한 ERIC-PCR을 이용하여 동시에 동정할 때 이용되는 주요 PCR 반응성분인 $MgCl_2$, dNTPs, primer, template DNA의 최적 농도를 결정하였다. $MgCl_2$ 반응성분은 2 mM을 적용하였을 때부터 일정한 fingerprinting pattern을 얻을 수 있었으므로 2 mM을 $MgCl_2$의 최적농도로 결정하였다. dNTPs의 농도는 250 μM까지 증가함에 따라서 6균주 모두 200 μM까지는 농도 증가와 비례하여 단편의 수와 강도가 점증하였으나 그 이상의 농도에서는 단편의 수와 강도가 일정하였다. 그러므로 일정한 fingerprinting pattern을 얻기 위하여 200 μM의 dNTPs만으로도 충분하였다. ERIC primer들은 2 μM의 농도를 적용했을 때부터 일정한 fingerprinting pattern을 나타낼 수 있었으며, 그 이상의 농도를 적용했을 때 단지 단편들의 강도만이 증가하였다. Template DNA도 다른 PCR 반응성분에 대한 실험과 마찬가지로 적용한 DNA양의 증가에 따라 단편의 강도가 증가하였다. 그러나 대부분의 적용 균주들에 대하여 DNA의 양이 최소일 때와 최대일 때 각각의 얻어진 fingerprinting pattern들을 비교할 때 단편의 수는 별 차이가 없었다.

참고문헌

1. Rajashekara, G., Haverly, E., Halvorson, D.A., Ferris, K.E., Lauer, D.C. and Nagaraja, K.V.: Multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in poultry. *J. Food Protect.*, **63**, 155-161 (2000).
2. Johnson, J.R. and 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, P.E., Johnson, L.K., Zimmerley, S.T. and Sadowsky, M.J.: 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, J.R. and O'Bryan, T.T.: 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, L.M., Irino, K., Rodrigues, J., Rivera, I.N.G. and Trabulsi, L.R.: Characterization of diarrhoeagenic *Escherichia coli* clones by ribotyping and ERIC-PCR. *J. Med. Microbiol.*, **47**, 227-234 (1998).
6. Liu, P.Y.F., Lau, Y.J., Hu, B.S., Shyr, J.M., Shi, Z.Y., Tsai, W.S., Lin, Y.H. and Tseng, C.Y.: Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 1779-1783 (1995).
7. Navia, M.M., Capitano, L., Ruiz, J., Vargas, M., Urassa, H.,

Schellemberg, D., Gascon, J., and 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. Wieser, M. and Buess, H.J.: Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. Int. J. Sys. *Evol. Microbiol.*, **50**, 1087-1093 (2000).
9. Jersek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E., Rijpens, N. and Herman, L.: Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 103-109 (1999).
10. Clark, C.G., Kravetz, A.N., Dendy, C., Wang, G., Tyler, K.D. and Johnson, W.M.: Investigation of the 1994-5 Ukrainian *Vibrio cholerae* epidemic using molecular methods. *Epidemiol. Infect.*, **121**, 15-29 (1998).
11. Hulton, C.S.J., Higgins, C.F. and Sharp, P.M.: 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).
12. Higgins, C.F., Ames, G.F.L., Barnes, W.M., Clement, J.M. and Hofnung, M.: A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature,* **298**: 760-762 (1982).
13. Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D.A., Boulnois, G.J. and Claverys, J.-P.: A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3479-3483 (1992).
14. Lupski, J.R. and Weinstock, G.M.: Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.*, **174**, 4525-4529 (1992).
15. Rivera, I.G., Chowdhury, M.A.R., Huq, A., Jacobs, D., Martins, M.T. and 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).
16. de Bruijn, F.J.: 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).
17. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: Molecular cloning; A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA., 14.15-14.17 (1989).
18. Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R.: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6823-6831 (1991).
19. Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupski, J.R.: Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.*, **5**, 25-40 (1994).
20. de la Puente-Redondo, V.A., del Blanco, N.G., Gutierrez-Martin, C.B., Garcia-Pena, F.J. and Rodriguez-Ferri, E.F.: Comparison of different PCR Approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1016-1022 (2000).
21. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.): PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., San Diego, California, USA., 4-11 (1992).
22. Erlich, H.A. (ed.).: PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification.. Oxford University Press Inc., New York, New York, USA., 7-16.(1992).
23. Lin, A.W., Usera, A., Barrett, 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).