

PCR에 의한 식품으로부터 *Listeria monocytogenes*의 특이적 검출

신순영 · 구영조 · 김왕준
한국식품개발연구원

Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods by a Polymerase Chain Reaction

Soon-Young Shin, Young-Jo Koo and Wang June Kim
Korea Food Research Institute

Abstract

The polymerase chain reaction (PCR) for the sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* was employed by using LM 1 and LM 2 primers which were based on the *listeriolysin O* gene. The direct use of cell suspension as DNA template, without DNA extraction or lysis step, was suitable and specific enough to detect *L. monocytogenes* at the level of 10^2 CFU or less per PCR for the pure culture and milk sample, however, the detection sensitivity became blunt for other food samples such as kimchi and chicken. The nested PCR, in which L-1 and L-2 (both designed from *listeriolysin O* gene) were employed as inner primers, was specific for detecting *L. monocytogenes* and enhanced the detection limit by 10 times. The PCR using LM 1 and LM 2 primers was very effective to detect *L. monocytogenes* from foods in terms of the specificity and time consumed, i. e. within 4~8 hrs (nested PCR).

Key words : *Listeria monocytogenes*, nested PCR, food sources, specific detection

서 론

*Listeria monocytogenes*는 인축 공통 식중독균(Zoonosis)으로 사람에게는 패혈증, 수막염을 일으키고, 가축에게는 뇌염, 유산 등의 주요 증상을 보이는 것으로 알려져 있다. 사람으로의 감염 경로에 대하여서는 태반을 통한 태아의 감염으로 인한 유산, 조산 등도 알려져 있으나⁽¹⁻³⁾, 1980년대에 식품을 통한 경구 감염이 분명하게 되어 집단 발생도 확인하게 되었다⁽⁴⁾.

*L. monocytogenes*는 자연계에 널리 분포되어 있으며, 4~40°C에서 생육하기 때문에 식품의 저온 유통에 있어 식품 위생상 중요한 문제로 지적되고 있다⁽¹⁻⁵⁾. 최근 우리나라에서도 여러 종류의 냉동유통 식품으로부터 *L. monocytogenes*의 검출이 매스컴을 통하여 보도된 바 있으며, 남 과 김⁽⁶⁾은 원유에서 *L. monocytogenes*의 오염을 보고하였으며, 차 등⁽⁷⁾은 189종의 냉동, 냉장 식품으로부터 17 균주의 *Listeria* spp.의 검출을 보고한 바 있다.

*L. monocytogenes*의 식품으로부터의 검출은 선택 배지를 이용한 방법이 일반적이지만, 배양과정은 시간과 노력이 소요되고 그 감도가 낮다는 단점 때문에 최근에는 목적하는 균을 배양 과정 없이 직접 시료에서 검출하는 방법에 대한 관심이 높아지고 있다⁽⁸⁻¹⁰⁾. 그 중에서 PCR은 극미량의 유전자를 단시간 내에 대량으로 증폭시키는 방법으로 생명공학에 널리 응용되고 있으며, PCR을 적용하여 각종 식품으로부터 목적하는 미생물을 검출하기 위한 다양한 실험들이 진행되고 있다⁽¹¹⁻¹⁶⁾.

이러한 배경에서 본 연구에서는 *L. monocytogenes*를 식품으로부터 신속하게 검출하기 위하여, PCR의 이용을 연구하였다. 그리고 그 결과를 기존방법인 선택 배지를 이용한 배양방법과 비교하였으며, 또 각종 식품으로부터 신속한 검출을 시도하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

L. monocytogenes ATCC 19111, ATCC 19116을 분양 받아 실험에 사용하였다. 액체배지는 BHI (Brain

Corresponding author : Wang June Kim, Division of Biotechnology, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-Dong, Bundang-Ku, Songnam-Si, Kyonggi-Do 463-420, Korea

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Primers	Target gene	Sequences (5'→3')	PCR product	Annealing Temp.	Reference
LM 1 and LM 2	Listeriolysin O	CCTAAGACGCCAATCGAA AAGCGCTTGCAACTGCTC	702 bp	55°C	(18)
LL 4 and LL 5	Listeriolysin product	CGCCACACTTGAGATAT AACCTATCCAGGTGCTC	520 bp	55°C	(19)
Lm 3 and Lm 5	16S-rRNA	GGACCGGGGCTAATACCGAATGATAA TTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTA	1,200 bp	55°C	(14)
L-1 and L-2	Listeriolysin O	CGAGCCTAACCTATCCAGGT CTGGAAGGTCTTGTAGGTTC	439 bp	57°C	Inner primer of LM1 and LM2

Heart Infusion, Difco), 고체배지는 Oxford-Listeria-Selective Agar(Merck)에 Oxford Antimicrobial supplement를 첨가한 선택 배지를 사용하였다. 균주의 보관은 BHI에 접종하여 충분히 자란 액체배양액을 4°C에 보관하였고, 7일마다 계대배양 하였다. 기타 대조균으로 사용된 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* p1(본 실험실에서 분리), *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Clostridium perfringens* ATCC 13124은 일반적인 방법⁽¹⁷⁾에 의해 배양하였다.

PCR용 Primer의 합성

Primer로 사용된 oligonucleotide는 이미 발표된 primer들^(14,18,19) 중에서 선택하여 Geno Tech(대전)에 합성을 의뢰하여 사용하였으며, 그 각각의 염기 배열은 Table 1과 같다. 그 중 *listeriolysin O* gene에 근거한 primer LM 1과 LM 2를 사용하여 식품에 적용하기 위한 일련의 실험에 사용하였으며, 두 primer의 염기 배열에서 inner primer를 고안하여 Geno Tech서 합성하여 nested PCR에 사용 하였다.

PCR용 DNA

*L. monocytogenes*의 배양액을 멸균 증류수(SDW)로 2회 씻은 후 다시 1 mL의 SDW에 재 현탁한 후, DNA 추출이나 세포 용해 과정 없이 직접 사용하였다. *L. monocytogenes*의 10⁹ CFU/mL 배양액을 단계적으로 10 배 희석하여 우유, 닭고기 혹은 김치에 접종한 후, 40 mL의 BHI에 가하여 최종 균의 농도가 10⁰~10⁵ CFU/mL(또는 g)의 수준이 되도록 하였다. 이와 같이 준비된 *L. monocytogenes*의 식품시료 접종액은 증균을 위하여 37°C에서 하룻밤 배양하였으며 이 시료들의 증균 전과 후에 각각 PCR을 하였다. 우유 시료의 경우, 시료액 1 mL을 SDW로 2회 세척한 후 0.1 mL의 SDW에 재 현탁 함으로써 1/10로 농축한 후 PCR을 위

한 DNA template로 사용했다. 김치와 닭고기 균 접종액 시료는 1 mL을 취하여 filter paper(Whatman No. 1)로 여과한 후 2회 세척하여 0.1 mL의 SDW에 재 현탁하여 순수 배양액의 경우와 같이 세포 현탁액을 직접 PCR을 위한 DNA template로 사용하였다.

PCR 방법

Bioneer(충북, 청원)의 제품인 PCR PreMix(20 µL용)을 이용하여 1 µL의 DNA template와 10 pmole의 primer를 가하고 SDW로 20 µL의 부피를 맞추어 vortex한 후 BioRad Gene Cyclyer(Model No. 10167, Japan)을 이용하여 PCR을 행하였다. 즉 반응 조건은 1 U thermostable DNA polymerase, 250 µL의 dNTP, 50 mM의 Tris-HCl(pH 8.3), 40 mM의 KCl, 그리고 1.5 mM의 MgCl₂였으며, 온도 조건은 변성 95°C 5분, [변성 95°C 30초, 냉각 55°C 30초, 연장 72°C 1분]의 3가지 온도 30회를 반복한 후 72°C에 5분간 연장 반응을 하였다. 증폭된 DNA는 반응이 끝난 PCR 산물 7~10 µL를 취해 1% agarose gel에 0.5 µg/mL의 EtBr을 넣은 gel에 전기영동하여 UV light하에 band를 확인하였다. Nested PCR은 primer LM 1 과 LM 2를 사용하여 얻은 PCR 산물 1 µL를 DNA template로 하여 inner primer, L-1과 L-2(Table 1)를 각각 10 pmole 가한 후, SDW로 20 µL 부피로 맞추는 다음 1차 PCR과 같은 방법으로 반응하였으며 이때 냉각온도는 57°C로 높여서 실행하였다.

생균수의 측정

*L. monocytogenes*는 Oxford-Listeria-Selective-Agar 배지에 37°C에서 1일간 배양하여 배지 주위를 검정색으로 변하게 하는 집락의 수를 세었으며, 기타 일반 세균은 Plate Count Agar(Merck)에 접종하여 37°C에 24~48시간 배양하여 형성된 집락수를 계수 하였다.

실험 결과

PCR primer의 선택

L. monocytogenes ATCC 19111과 ATCC 19116의 세포 현탁액을 DNA template(20 μ L 반응액당 10^5 cell)로 하여 3종의 primer를 이용하여 각각 PCR을 수행했다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 사용된 primer LM 1, 2, LL 4, 5, 그리고 Lm 3, 5는 각각 예견된 크기의 증폭 산물 702 bp, 520 bp, 그리고 1.2 kbp의 band를 나타냈다. 실험결과 각 primer에 의해 생성된 각각의 PCR 증폭 산물의 band의 강도는 거의 차이가 없었다. 이 실험으로서 본 실험 조건에서의 PCR의 일반적인 적용을 확인할 수 있었다. 사용된 3종의 primer 중, *L. monocytogenes*에 특이적으로 반응하며⁽²⁰⁾, 702 bp의 적절한 크기의 증폭 산물을 생성하는 LM 1, 2 pair만을 사용하여 식품에 적용하기 위한 다음 실험에 사용하였다.

Primer LM 1과 LM 2의 *L. monocytogenes*에 대한 특이성과 민감성

Primer LM 1과 LM 2의 *L. monocytogenes*에 대한 특이성은 *L. monocytogenes* ATCC 19111과 19116 이외에 *E. coli*, *S. enteritidis*, *B. longum*, *C. perfringens* 등 4종의 대조 균주를 사용하여 확인하였다. 이 primer는 이미 *L. monocytogenes*에 대한 특이성이 확인된 것이기 때문에^(10,20) 본 연구에서는 4종의 대조균만을 사용하여 간략하게 *L. monocytogenes*에 대한 특이성을 시험하였다. 그 결과, Fig. 2(A)에서 보듯이 *L.*

Fig. 2. Specificity (A) and sensitivity (B) test for *L. monocytogenes* by LM 1 and LM 2 primer. (A) Lane 1, *L. monocytogenes* ATCC 19116; Lane 2, *L. monocytogenes* ATCC 19111; Lane 3, *E. coli* ATCC 25922; Lane 4, *S. enteritidis* pl; Lane 5, *B. longum* ATCC 15707; Lane 6, *C. perfringens* ATCC 13124. (B) Serially diluted cells from 10^5 ~ 10^1 CFU (Lane 1,2,3,4,5,6 and 7, respectively) of *L. monocytogenes* ATCC 19116. M; DNA marker.

monocytogenes 2종에만 702 bp의 증폭 산물이 생성되고 다른 균주에는 생성되지 않음을 확인할 수 있었다. Primer LM 1과 LM 2의 *L. monocytogenes*에 대한 검출 감도를 알기 위해서, *L. monocytogenes* ATCC 19116 배양액을 10배씩 단계적으로 희석하여 이론적으로 10^5 ~ 10^1 CFU 수준이 되도록 DNA template로서 첨가하여 PCR을 한 결과, Fig. 2(B)에서 보는 바와 같이 10^2 ~ 10^1 CFU수준까지 702 bp의 PCR 증폭 산물을 관찰할 수 있었다. 그러나 10^1 의 경우는 band가 충분히 선명하지 않았으므로, 본 실험에서 설정한 실험 조건에서, primer LM 1과 LM 2에 의한 *L. monocytogenes*의 검출 감도는 10^2 CFU/PCR tube 수준으로 생각할 수 있었다.

우유로부터 *L. monocytogenes*의 검출

우유에 *L. monocytogenes* ATCC 19116을 10^6 ~ 10^5 CFU/mL 수준이 되도록 접종하여 BHI를 가한 후 증균하기 전과 증균 후에 PCR을 하고 같은 시료를 취하여 Listeria-Selective-Agar에 접종하여 그 균수를 측정하는 결과는 Table 2 와 같았다. PCR 결과, 증균 전, 즉 균수가 시료 용액에 10^4 과 10^5 CFU/mL이 함유된 시료에서만 PCR에 의한 DNA 증폭 산물인 702 bp의 band가 확인되었으나, 증균 후에는 접종하지 않은 대조구를 제외한 1 ~ 10^5 CFU/mL수준의 *L. monocytogenes*가 접종된 시료에서 모두 702 bp의 증폭산물이 생성되었다. 이때의 *L. monocytogenes* 균수는 5.7×10^8 ~ 1.1×10^9 CFU/mL 으로 우유 속의 *L. monocytogenes* 균수가 초기 접종량과 관계없이 대수적으로 증가하여 최대치에 이르고 있음을 알 수 있었다. 이 때의 PCR 전기영

Fig. 1. Primer specificities of *L. monocytogenes* by primer pairs, LM 1 and LM 2 (A), LL4 and LL5 (B) and Lm 3 and Lm 5 (C). Lane 1, *L. monocytogenes* ATCC 19111; Lane 2, *L. monocytogenes* ATCC 19116. M; DNA marker. PCR was performed with 10 pmole of primers using 10^5 washed whole cells in 20 μ L PCR reaction mixture.

Table 2. Effect of enrichment time on the amplification of PCR products for *L. monocytogenes* ATCC 19116 in milk sample using LM 1 and LM 2 primer pairs

Initial level of inoculum (CFU/mL) ¹⁾	PCR band amplification		<i>L. monocytogenes</i> (CFU/mL)	
	enrichment time (hr)			
	0	16	0	16
0	- ²⁾	-	0 ³⁾	0
10 ⁰	-	+	0	5.7 × 10 ⁸
10 ¹	-	+	0	6.2 × 10 ⁸
10 ²	-	+	0	6.4 × 10 ⁸
10 ³	-	+	1.1 × 10 ³	6.0 × 10 ⁸
10 ⁴	+	+	6.8 × 10 ³	7.0 × 10 ⁸
10 ⁵	+	+	6.8 × 10 ³	1.1 × 10 ⁹

¹⁾CFU/mL in BHI(Brain Heart Infusion) with milk
²⁾-: 702 bp amplified product not detected
³⁾0: No colony on the Listeria-Selective-Agar from 0.1 mL of undiluted sample

Fig. 3. Effect of enrichment time on the amplification of PCR products for *L. monocytogenes* ATCC 19116 in milk sample using LM 1 and LM 2 primer pairs. Cells were washed twice with sterile distilled water and then directly used as DNA template for PCR. Fig. A and Fig. B stand for before and after 16 hr enrichment of culture.

동 결과를 Fig. 3에 표시하였다.

김치로 부터 *L. monocytogenes*의 검출

김치에 *L. monocytogenes* 19116을 10⁰~10⁵CFU/mL 수준이 되도록 접종하여 증균 전후에 PCR을 하고, 또한 선택 배지를 이용한 균수측정을 한 결과는 Table 3의 (A)과 같았다. 증균 전에는 전 시험 구간에 모두 PCR에 의한 증폭 산물이 관찰되지 않았으며, 증균 후에도 최초의 접종 균수가 10⁴과 10⁵CFU/mL이 되었던 시료에서만 PCR 증폭 산물이 생성되었다. 이 시료들의 *L. monocytogenes* 수는 3.0 × 10⁷과 7.0 × 10⁷/mL에 이르렀었다. 10⁷/mL의 수준보다 적은 수의 균이 생육한 다른 김치 증균 시료들로부터는 PCR 증폭산물이 검출되지 않았다.

Table 3. Amplification of PCR products for *L. monocytogenes* ATCC 19116 in kimchi (A) and chicken (B) samples using LM 1 and LM 2 primers after enrichment culture

(A)

Initial level of inoculum (CFU/mL) ¹⁾	PCR band amplification		<i>L. monocytogenes</i> (CFU/mL)	
	enrichment time (hr)			
	0	16	0	16
0	- ²⁾	-	0 ³⁾	0
10 ⁰	-	-	0	1.2 × 10 ²
10 ¹	-	-	0	1.4 × 10 ³
10 ²	-	-	1.2 × 10 ²	6.4 × 10 ⁵
10 ³	-	-	6.0 × 10 ²	2.6 × 10 ⁵
10 ⁴	-	+	9.2 × 10 ²	3.0 × 10 ⁷
10 ⁵	-	+	1.2 × 10 ⁴	7.0 × 10 ⁷

(B)

Initial level of inoculum (CFU/mL) ¹⁾	PCR band amplification		<i>L. monocytogenes</i> (CFU/mL)	
	enrichment time (hr)			
	0	16	0	16
0	- ²⁾	-	0 ³⁾	0
10 ⁰	-	-	0	0
10 ¹	-	-	0	0
10 ²	-	-	1.4 × 10 ²	0
10 ³	-	-	1.5 × 10 ³	0
10 ⁴	-	+	1.4 × 10 ⁴	1.0 × 10 ⁷
10 ⁵	-	+	8.4 × 10 ⁴	3.0 × 10 ⁷

¹⁾CFU/mL in BHI (Brain Heart Infusion) with kimchi or chicken
²⁾-: 702 bp amplified product not detected, +: 702 bp amplified product detected
³⁾0: No colony on the Listeria- Selective- Agar from 0.1 mL of undiluted sample

닭고기로부터 *L. monocytogenes*의 검출

닭고기에 *L. monocytogenes*를 우유나 김치에서와 같은 방법으로 접종 및 증균하여 PCR과 선택배지에 의한 배양방법을 적용한 결과는 Table 3의 (B)와 같았다. 닭고기 실험결과, 역시 김치에서의 경우와 같이 10⁴과 10⁵CFU/mL이 접종된 시료에서만 증균 후 PCR 증폭 산물이 생성되었다. 이때 배양방법으로 측정된 *L. monocytogenes*의 균수는 1.0 × 10⁷과 3.0 × 10⁷CFU/mL로, 시료 원액에 10⁷CFU/mL 수준의 균이 함유되어 있었다. Table 3(B)에서 보면, *L. monocytogenes*의 배양방법으로 측정된 균수에 있어, 접종된 *L. monocytogenes*이 증균 후 검출되지 않은 시료가 있었는데(초기 접종균이 10⁰~10³ CFU/mL인 시료들) 이는 초기 접종균에 10²~10⁴ CFU/mL 수준으로 증식하던 일반세균이 *L. monocytogenes*의 증균조건에서 함께 증식하여 10⁸~⁹CFU/mL으로 급증하였으며(일반세균의 증식은 Plate

Fig. 4. Nested PCR products of *L. monocytogenes* ATCC 19116 using L-1 and L-2 inner primers pair. (A) First stage PCR: PCR was performed with 10 pmole of LM 1 and LM 2 (Lane 1, 2, 3, and 4) or 10 pmole of L-1 and L-2 primers (Lane 5, 6, 7, and 8) using 10^5 washed whole cells in 20 μ L PCR reaction mixture. Lane 1 and 5, *L. monocytogenes* ATCC 19111; Lane 2 and 6, *L. monocytogenes* ATCC 19116; Lane 3 and 7, *E. coli* ATCC 25922; Lane 4 and 8, *C. perfringens* ATCC 13124. (B) Nested PCR (Lane 4, 5, and 6): PCR was performed with 10 pmole of L-1 and L-2 primers using 1 μ L of first stage PCR products of Lane 1, 2, and 3.; Lane 1 and 4, *L. monocytogenes* ATCC 19116 Land 2 and 5, *E. coli* ATCC 25922; Lane 3 and 6, blank (no DNA). (C) Nested PCR was performed with 10 pmole of L-1 and L-2 inner primers using first stage PCR products produced by serially diluted cells from 10^6 ~ 10^{-1} CFU of *L. monocytogenes* ATCC 19116. Lane 1,2,3,4,5,6,7,8, and 9 were nested PCR amplimers from 10^6 to 10^{-1} CFU and blank. M: marker.

Count Agar에서 확인하였으나 data는 생략했음), 이로 인해 *L. monocytogenes*의 생육이 저해를 받았던 것으로 추측된다.

Nested PCR을 이용한 *L. monocytogenes*의 검출

*L. monocytogenes*를 primer LM 1과 LM 2를 사용하여 PCR을 하고 그 반응산물을 1 μ L 취해 primer LM 1과 LM 2 사이에 L-1과 L-2 primer pair를 고안하여 nested PCR을 하였다. 우선 inner primer만을 사용하여 *L. monocytogenes* ATCC 19111과 19116의 10^5 CFU를 PCR을 위한 DNA template로 하여 반응한 결과, Fig. 4(A)에서와 같이 439 bp에서 *L. monocytogenes*에 특이적인 PCR 증폭산물을 확인할 수 있었다. 또한 LM 1과 LM 2 primer를 이용하여 *L. monocytogenes*, *E. coli*, blank(No DNA template)로 1차 PCR을 수행하고(Fig. 4(B), Lane 1, 2, 3) 그리고 그 각각의 PCR 산물 1 μ L를 취하여 inner primer pair로 nested PCR을 한 결과, *L. monocytogenes*의 PCR 산물에 의해서만 439 bp의 nested PCR 증폭산물을 확인할 수 있었다(Lane 4).

*L. monocytogenes*의 농도별로 얻은 1차 PCR 결과 산물(Fig. 2(B)참조)을 각각 1 μ L씩 취해 nested PCR을 수행한 결과는 Fig. 4(C)와 같았다. 보는 바와 같이

nested PCR의 산물은 10^1 ~ 10^2 의 접종범위에 걸쳐 예견된 439 bp의 위치에 다량 증폭되었다. 이 실험에서는 목적하는 증폭산물 이외에 1차 PCR 산물인 702 bp의 band가 관찰되었고 1,000 bp이상의 위치에 흐린 band들이 보였으나 이는 목적하는 PCR의 증폭산물과 무관한 기타 반응산물로 생각된다.

고 찰

1980년도 이후 식품 위생상 문제 균으로 등장하게 된 대표적인 균으로 *E. coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, 그리고 본 실험에서 연구된 *L. monocytogenes* 등을 들 수 있다. 이러한 균의 검출에 있어, 전통적인 배양 방법의 단점을 극복하고 이들 균의 새로운 검출 방법에 대한 연구가 활발하다^(8-10,21). 식품 위생상 문제 되는 균을 현장에서 즉시 검출할 수 있다면 식품교역, 현장의 실무위생에 매우 실용적인 기술로 기대할 수 있을 것이다.

이러한 관점에서 실시된 *L. monocytogenes*에 대한 본 PCR 적용결과, PCR 방법은 목적하는 균을 신속하고(약 4시간), 특이적으로 검출한다는 점에서 전통적인 배양 방법에 비해 월등하지만, 식품이라는 복합적인 시료 환경에서 높은 감도로 균을 검출해야 한다는 면에서는 좀 더 연구되어야 할 필요성이 있었다. 본 연구에서 검출감도는 *L. monocytogenes*의 순수배양액으로부터, 1차 PCR의 경우 10^2 CFU, nested PCR의 경우 10 CFU로 일반적으로 거론되고 있는 PCR에 의한 검출감도^(22,23), 또는 이 primer를 이용하여 우유로부터 *L. monocytogenes*를 검출한 실험 결과⁽¹⁹⁾와 거의 일치하는 수준이었다. 최⁽¹⁶⁾는 2단계 PCR을 적용함으로써 검출 감도를 1 ~ 10^1 CFU/mL로 향상하였다고 보고하였다. 본 실험 결과는 그 보다는 낮은 수치였지만 nested PCR을 통해서 감도를 10배 높일 수 있었고, 아울러 1차 PCR에 의한 증폭산물이 primer LM 1과 LM 2에 의한 산물임을 확인할 수 있었다.

한편, 식품으로부터 *L. monocytogenes*의 검출 감도는 식품 종류에 따라 차이를 보였다. 본 실험의 시료로 사용된 우유, 김치, 닭고기 시료에서(Table 2, 3) 보면, 우유의 경우 초기 균 접종량이 10^4 ~ 10^5 CFU/mL 인 시료에서는 평균 전에도 PCR에 의한 균의 검출이 가능했다. 이 시료는 PCR을 위하여 배양액 1 mL를 취하여 0.1 mL로 농축한 시료 1 μ L를 취하여 PCR을 하게되므로 실제 PCR 반응에서 균수는 10^3 과 10^2 의 CFU가 있게된다. 그러므로 이 수준의 검출은 순수배양액에서의 검출 감도와 동일한 수준이다. 우유의 경우, 시

료를 평균 함으로써 100 CFU/mL 수준이 접종된 시료라도 37°C에서 하루밤 배양후 *L. monocytogenes*가 5.7×10^8 /mL 수준으로 증식하였고 따라서 PCR에 의한 검출이 가능했다.

그러나 Table 3에서 보듯이 김치나 닭고기 시료의 경우는 평균 후라도 PCR에 의한 검출 감도가 매우 낮았다. 김치의 경우 평균 후 균의 증식이 관찰되었음에도 불구하고 PCR에 의한 검출감도는 시료에 균수가 10^7 CFU/mL인 경우에만 검출이 가능했으며, 이는 전통적인 선택배지를 이용한 배양방법보다 낮은 검출감도이다. 닭고기의 경우 평균에 의한 *L. monocytogenes*의 증식은 현저하지 않았지만 역시 초기 접종 균수가 10^4 와 10^5 CFU/mL이 접종되어 평균 후 10^7 CFU/mL에 이른 시료에만 PCR 증폭 산물이 관찰되었다. 그러므로 김치의 경우는 평균 배양액으로부터 모아진 균체가 식품성분이나 오염된 균주과 잘 분리되지 않아 PCR을 저해한 것으로 보인다. 반면 닭고기의 경우는 불충분한 평균으로 균의 증식이 충분하지 못했을 것으로 생각된다. *C. jejuni*의 경우, 같은 방법으로 처리된 닭고기 시료의 PCR 결과, 순수 배양액에서와 같은 검출 감도를 보인 것을 보면⁽¹²⁾, 균이 증식한 경우라도 선택한 primer 에 따른 PCR 조건의 차이도 있는 것으로 생각된다.

PCR을 식품에 적용하기 위한 여러 가지 해결 되어 할 문제점에도 불구하고, 본 실험에서 사용된 PCR은, 4시간 정도에 균의 특이적인 확인이 가능하고, 실험 방법이 간편하다는 점을 감안하여, 식품 위생 실무에 현장에서 응용되기 위한 잠재력이 매우 높은 방법이라고 생각된다. 앞으로 다양한 식품으로부터 *L. monocytogenes*의 분리기술, 또는 식품의 종류에 따른 평균 과정에 대한 연구가 보완되어 검출감도를 높이는 일이 향후 과제로 생각된다.

요 약

*Listeria monocytogenes*의 식품 속에서 신속하고 특이적인 검출을 위하여, *listeriolysin O* gene에 의한 primer, LM 1과 LM 2를 선택하여 PCR을 수행하였다. *L. monocytogenes*의 DNA 추출이나 cell lysis 없이 intact whole cell을 직접 이용하여 PCR을 하였으며 10^{2-6} CFU 수준의 균체 배양액으로부터 *L. monocytogenes*에 특이적인 702 bp의 PCR 증폭 산물을 확인하였다. 우유, 닭고기, 김치 등의 식품에 *L. monocytogenes*를 접종하여 평균배양 전후 균의 PCR에 대한 감도와 생균수를 비교한 결과, 실험된 식품 속에서의 *L.*

*monocytogenes*의 검출 감도는 순수 배양액에서의 경우에 비해 약 1/10로 둔화되었으나 역시 특이적인 검출이 가능하였다. Primer LM 1과 2를 이용한 본 실험조건에서의 *L. monocytogenes*의 PCR에 의한 검출은 약 4시간으로 확인이 가능하였으며, 기존의 배양 방법에 비해, 특이성이나 검출 속도 면에서 식품위생 실무에 적용하기 위한 높은 잠재력을 보여 주었다.

문 헌

1. Jones, D. and Seeliger, H.P.R. The Genus *Listeria*. Vol. II, pp. 1596-1616. In: The Prokaryotes, 2nd ed., Springer-Verlag, New York Inc, USA (1991)
2. The food safety dictionary publishing committee ed., *Listeria*. pp.931-938. In: Total Dictionary for Food Safety, Korean Dictionary Research Publishing Co., Korea (1998)
3. Seeliger, H.P.R. and Jones, D. Genus *Listeria*. Vol 2, pp.1235-1245. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, USA (1986)
4. Fleming, D.W., Cochi, S.L., McDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Pikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V. and Reingild, A.R. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Engl. J. Med.* 312: 404-407 (1985)
5. Jung, D.S., Kweon, M.R., Auh, J.H. and Cho, K.Y. Effects of temperature and fluctuation range on microbial growth and quality of foods stored in domestic refrigerator. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 632-637 (1996)
6. Nam, K. and Kim, H.U. Studies on *Listeria monocytogenes* contamination of raw milk and their plasmids. *Korean J. Anim. Sci.* 36: 523-532 (1994)
7. Cha, I.H., Jin, S.H., Park, E.H., Park, S.A., Kim, S.B., Cho, H.C., Lee, Y.S. and Lee, Y.G. Prevalence of *Listeria* spp. over commercial frozen and refrigerated foods at the supermarket level. *J. Food Sci. Nutr.* 3: 157-162 (1998)
8. Olsen, T.E., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Ganum, P.E., Poporic, T., Rasmussen, H.N., Slavik, O. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 1-78 (1995)
9. Bjourson, A.J. and Cooper, J.E. Combined subtraction hybridization and PCR amplification for generating high-specificity bacterial DNA probes. pp. 173-180. In: *New Technology in Food and Beverage Microbiology*. Kroll, R.G., Gilmour, A. and Sussman, M. (eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK (1993)
10. Herman, L.M.F., de Block, J.H.G.E. and Moermans, R.J.B. Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 milliliters of raw milk by a two-step PCR with nested primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 817-819 (1995)
11. Kim, E.S. and Jhon, D.Y. Rapid detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 1001-1008 (1996)

12. Shin, S.Y., Park, J.H. and Kim, W.J. Specific detection of enteropathogen *Campylobacter jejuni* in food using a polymerase chain reaction. J. Microbiol. Biotechnol. 9: 184-190 (1999)
13. Wang, R.F., Cao, W.W. and Michael, G.J. Development of cell surface protein associated gene probe specific for *Listeria monocytogenes* and detection of the bacteria in food by PCR. Molecular and Cellular Probes 6: 119-129 (1992)
14. Wiedmann, M., Barany, F. and Batt, C.A. Detection of *Listeria monocytogenes* with a nonisotopic polymerase chain reaction-coupled ligase chain reaction assay. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2743-2745 (1993)
15. Starbuck, M.A.B., Hill, P.J. and Stewart, G.S.A.B. Ultra sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction (PCR). Lett. Appl. Microbiol. 15: 248-252 (1992)
16. Choi, S.H. General suitability of a two-stage nested PCR for direct detection of *Vibrio vulnificus* in various natural samples. pp. 35-56. Paper presented at *Conference for Pathogen for Food Safety of Korean Society of Food Science & Technology*. SeJong Univ., Seoul, Korea (1998)
17. Krieg, N.R. Enrichment and isolation. pp.112-142. In: *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA (1981)
18. Mangaud, J., Vicente, M.F., Chenevert, J., Pereira, J.M., Geoffret, C., Gicquel-Sanzey, B., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C. and Cossart, P. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the *listeriolysin O* determinant of *Listeria monocytogenes*. Infect. Imm. 56: 766-772 (1988)
19. Thomas, E.J.G., King, R.K., Burchak, J. and Gannon, V.P.J. Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2576-2580 (1991)
20. Border, P.M., Howard, J.J., Plastow, G.S. and Siggins, K.W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. Lett. Appl. Microbiol. 11: 158-162 (1990)
21. Park, I.S. and Kim, N.S. Rapid detection of *Salmonella* spp. by antibody immobilization with golden-protein A complex. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1-6 (1999)
22. Venkateswaran, K., Dohmoto, N. and Harayama, S. Cloning and nucleotide sequence of the *GyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. Appl. Environ. Microbiol. 64: 681-687 (1998)
23. Vitanen, A.M., Arstilla, T. P., Lahesmaa, R., Granfors, K., Skurnik, M. and Toivanen, P. Application of polymerase chain reaction and immunofluorescence techniques for the detection of bacteria in Yersinia-triggered reactive arthritis. Arthritis Rheum. 34: 89-96 (1991)

(1999년 7월 26일 접수)