

국내 식품으로부터 분리한 *Listeria* Species의 RAPD 분석

최영춘 · 박부길 · 이택수* · 오덕환†

강원대학교 식품생명공학부

*강원도 보건환경연구원

Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis of *Listeria* Species Isolated from Foods in Korea

Young-Chun Choi, Boo-Kil Park, Tex-Soo Lee* and Deog-Hwan Oh†

Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

*Institute of Kangwon-do Health and Environment, Chunchon 200-702, Korea

Abstract

This study was carried out for comparing *Listeria* strains developing genetic markers for *Listeria* strains using *Listeria* sp. genetic markers using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis method. Five of 10 RAPD primers (OPA-01, OP-26-01, OP-26-02, OPB-01, OP-26-10) showed the distinctive polymorphism among *Listeria* sp. isolated from domestic foods. RAPD-PCR with five arbitrary primers produced 76 DNA polymorphism. Among them, OPA-01 and OP-26-10 primers produced about 1.5 kb and 0.7 kb amplified DNA fragments for all the *Listeria* sp., but these amplified DNA fragment did not correspond to specific *Listeria* genus. The genetic relationships of *Listeria* sp. using NTSYS program were grouped into 7 clusters and showed 0.54 to 0.93 similarity among strains. Especially, No. 3 and No. 20 isolates showed genetically most similar relationship by 0.94, and No. 7 and No. 24, or No. 7 and No. 45 isolates showed the least similarity by 0.54. From these results, RAPD analysis method seemed to be successfully applied the classification and genetic analysis for *Listeria* sp. isolates.

Key words: RAPD, *Listeria* sp., PCR

서 론

*Listeria*속은 그람양성 간균이며 통성혐기성균으로서 가축, 가금, 토양, 야채 등 자연계에 널리 분포되어 있는 환경 미생물로서 *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* 등 6종이 포함되며 이 중 *L. monocytogenes*는 가축 및 사람에게 리스테리아병을 일으키는 원인균이다(1-4). 특히 면역기능이 결핍된 고령자나 임신부가 감염되기 쉽고 임신부는 유산, 사산 또는 감염된 미생숙 태아를 분만할 수 있으며, 감염자의 약 30% 정도가 사망하는 것으로 보고되어 있다(1-3). 최근 캐나다, 미국, 영국 등에서 *L. monocytogenes*에 오염된 식품에 기인되어 집단 식중독을 일으키는 사례가 빈번하게 발생되면서 식품 안전성 측면에서 매우 주목받는 입장에서 새로운 식중독균으로서 부각되었다. 또한 이 균은 5°C 이하의 냉장온도에서도 증식할 수 있기 때문에 특히 냉장 보존 식품에서 문제시되고 있다(5-9).

이러한 인체에 유해한 식중독균을 신속하게 분리하는 것은 식품산업체와 공중보건에 항상 중요한 과제가 되어

왔다. 특히, 식품 속에 존재하는 *L. monocytogenes*의 수가 2~100 CFU/mL의 적은 양이고 이 적은 양으로도 식중독을 일으킬 수 있기 때문에 신속하고 민감도가 높은 검출방법을 개발하고자 하는 많은 연구에도 불구하고 다른 나라에 비해 국내 분리 균주들의 생리, 생화학적 정보가 충분하게 축적되지 못하고 있어 체계적인 분류가 아직 어려운 실정이다(10).

최근에 분자 생물학의 발달로 DNA 수준에서의 분류 체계 확립에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 분자유전학적 분석법은 미생물의 동정 및 분류에 다양하게 응용되고 있으며 주로 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 또는 Polymerase Chain Reaction(PCR)에 의한 분류가 시도되고 있다(11-20). PCR으로 특정 DNA sequence 등 증폭하여 증폭도 DNA fragment를 4-base cut 제한 효소로 잘라 전기영동한 후 그 band의 RFLP를 분석하는 RFLP 기술은 시간과 노력이 너무 소요되며, 방사성 동위원소를 사용해야 하는 Southern blot 기술에 기본을 담고 있어서 상대적으로 값이 비싸고 위험성이 따르는 등 여러 가지 단점이 있기에 분자유전학적 기초연구에 있

†To whom all correspondence should be addressed

어서 보편적으로 사용하기에는 많은 문제점이 제기되고 있다(21). 이러한 기술적인 문제를 보충하기에 가장 적합한 것이 AP(arbitrary primer) PCR법에 의한 분류기술이다. Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) 방법은 무작위로 합성된 Oligonucleotide 10-mer를 이용하는 것인데 이 primer는 4¹⁰가지를 만들 수 있어 이 primer 중에서 몇 가지를 이용하여도 기존의 RFLP 기술에 의해서 나타날 수 있는 DNA 변이보다도 월등히 많은 Polymorphism을 찾을 수 있다는 것이 밝혀졌다(20-25). 또한 기술이 용이하고 신속하며 소량의 DNA로도 충분하며 상대적으로 위험성이 적다. 이 방법은 현재까지 다양한 생명체의 DNA 분석에 성공적으로 이용되었으며, 종 또는 분리주 특이성을 보이는 표지자의 분획양상을 관찰하여 분류에 성공적으로 응용되고 있다(26,27). 또한, 최근에 세균의 genomic DNA를 rare cut(8-base cut) 제한효소로 digestion 한 후 PFGE(pulsed-field gel electrophoresis)로 분리한 후, 그 genomic DNA band pattern인 RFDP(restriction endonuclease digestion profile)에 따라 세균을 subspecies level로 분류하려는 시도가 시작되고 있다.

그러나 국내에서는 아직까지 분자유전학적 표지자(molecular genetic markers) 분석에 의한 *Listeria* sp.의 분류는 시도되지 않았기에 본 연구에서는 RAPD 분석법을 이용하여 *Listeria* sp. 한국 분리균주의 분류를 시도하였다. 본 연구는 *Listeria* sp. 분류에 이용될 수 있는 분자유전학적 표지자를 제공하고자 수행되었으며, 한국에서 분리된 *L. monocytogenes* 분리균주들과 *Listeria* sp. 분리균주들과 표준균주 종들과의 유전적인 근연관계를 비교하여 다양한 *Listeria* 균주를 분자유전학 차원에서 신속하게 검출하고 식중독 발생시 원인규명을 위한 방법에 이용할 기초자료로 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

실험에 사용된 *Listeria* sp. 균주는 38개의 국내 식품으로부터 본 실험실에서 분리한 균주와 *L. monocytogenes* ATCC 19111, *L. monocytogenes* ATCC 19114, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *L. monocytogenes* Scott A, *L. monocytogenes* ATCC 19119, *L. monocytogenes* ATCC 33090, *L. monocytogenes* ATCC 43547균을 사용하였으며 Table 1에 나타내었다. 또한 RAPD 분석을 수행하기 전에 모든 균주는 -20°C에서 보관하였다.

Chromosomal DNA의 분리

Listeria sp.의 chromosomal DNA를 분리하기 위해서는 각 균주를 10 mL의 BHI(brain heart infusion, Difco)에 접종하여 35°C에서 24시간 배양한 후 3,000×g로 10

Table 1. *Listeria* strains used for in this study

No.	Species	Strain
1	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19111
2	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19114
3	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19115
4	<i>L. monocytogenes</i>	Scott A
5~20	<i>L. monocytogenes</i>	Isolates from foods
21	<i>L. ivanovii</i>	ATCC 19119
22~23	<i>L. seeligeri</i>	Isolates from foods
24	<i>L. innocua</i>	ATCC 33090
25~42	<i>L. innocua</i>	Isolates from foods
43	<i>L. welshimeri</i>	ATCC 43547
44~45	<i>L. welshimeri</i>	Isolates from foods

분간 원심 분리하여 균체를 침전시키고 배지성분을 제거한 후 상층액을 버리고 멸균수로 원심분리하여 한번 더 세척한 후 균체는 1%(wt/vol) SDS와 100 µg/mL의 proteinase K가 포함된 TE buffer(10 mM Tris HCl, 1 mM, EDTA; pH 7.8) 9.5 mL에 부유시킨 다음 37°C에서 1 시간 동안 방치한 후 5 M NaCl 1.8 mL를 첨가한 후 65°C 항온 수조에 20분간 방치하였다. 동량의 chloroform-isoamyl alcohol (24 : 1)을 첨가하여 5분간 10,000×g로 원심 분리하여 단백질을 제거하고 상층액에 2배 부피의 isopropanol을 첨가한 후 -20°C에서 30분간 방치한 다음 10분간 10,000×g로 원심 분리하여 DNA를 침전시켰으며 침전된 DNA에 70%(vol/vol) 에탄올을 첨가하여 3분간 10,000×g로 원심 분리한 후 공기중에서 30분간 건조시켰다. Chromosomal DNA는 멸균수 150~200 µL로 녹인 후 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

RAPD-PCR 분석

RAPD를 위한 random primer는 모두 10종류를 사용하였으며 각각의 명칭과 자세한 sequence는 Table 2에 표시하였다. PCR 반응액은 30 ng Chromosomal DNA, dNTP 250 µM, reaction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 15 mM MgCl₂, 250 mM KCl, 1 mg/mL gelatin) 2.5 µL와 primer 125 pmoles를 0.2 mL Eppendorf tube에 혼합한 후 *Taq* polymerase 0.8 units와 H₂O를 첨가하여 전체 반응액을 25 µL로 맞추어 Biometra thermocycler(UNO-

Table 2. List of arbitrary 10-mer primers used for the RAPD analysis by PCR

Primers	Sequence (5'→3')
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-07	GAAACGGGTG
OP-26-01	TACAACGAGG
OP-26-02	TGGATTGGTC
OP-26-03	CTTCTACCC
OP-26-10	GGTACTAAGG
OPB-01	GTTTCGCTCC

Thermoblock)를 사용하여 아래의 조건으로 반응시켰다. PCR 프로그램은 초기 denaturation 단계를 95°C에서 1분간 annealing은 35°C에서 1분간, extension은 72°C에서 2분간 실행하였으며 이것을 1회로 하는 온도순환을 45회 반복하였다. 45회 온도순환이 완료된 후, 72°C에서 10분간 유지하여 미완성된 잔여 DNA의 증폭을 마무리한 다음 4°C에서 보관하였다.

Agarose 겔 전기영동법에 의한 중합효소 연쇄반응 증폭산물의 분석

중합효소 연쇄반응 증폭 산물을 loading buffer와 혼합하여 1.5% agarose gel에 TBE 완충액(100 mM Tris HCl, 83 mM boric acid, 1 mM EDTA; pH 8.3)을 사용하여 110 volts로 40~50분간 전기영동시키고, ethidium bromide로 염색하여 자외선 투조기 상에서 polaroid film으로 사진을 찍어 관찰하였다.

유사도 및 유전적 근연관계 분석

RAPD 증폭 산물의 다형성은 전기영동 후 겔 상에서 비교되는 균주간에 동일한 크기의 증폭 산물의 유무의 형태로 관찰되는데, 각 시료에 대한 증폭 산물의 수를 세어 시료간에 공유하는 동일한 크기의 증폭 산물의 수에 따라 유전적 유사도를 기준에 알려진 Nei와 Li(28)의 방법에 의해 다음과 같이 계산하였다.

$$F = \frac{2M_{xy}}{M_x + M_y}$$

F: 유사도(비교되는 시료간에 공유하는 증폭 산물의 비율)

M_{xy}: 비교되는 시료간 공유하는 증폭 산물의 수

M_x, M_y: 비교되는 각각의 시료에서 관찰된 총 증폭 산물의 수

위의 공식에 의해서 계산된 유사도를 이용해서 dissimilarity 값(1-F)을 계산한 후, 컴퓨터 프로그램 PHYLIP(29)을 이용해서 Sokal과 Michener(30)의 unweighted pair-group method with arithmetic mean(UPGMA) 방법에 의해 *Listeria* sp.의 유전적 유연관계를 나타내는 phenogram을 작성하였다.

결과 및 고찰

국내 식품에서 분리한 *Listeria* sp.균과 표준균주는 Table 1에 나타내었으며 유연관계를 비교분석하기 위하여 사용한 10개의 primer는 Table 2에 나타내었다. PCR에 사용한 10개 primer 중 5가지 primer OPA-01, OP-26-01, OP-26-02, OPB-01, OP-26-10에서 *Listeria* sp. 모두에서 유의성을 비교할 수 있는 PCR-product가 관찰

되었다. 실험에 사용된 10개의 random primer를 이용하였을 때 위의 5가지의 primer를 이용한 PCR에서는 분석하기에 좋은 DNA 증폭이 일어났으나 OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-07, OP-26-03 primer를 이용한 PCR에서는 증폭된 DNA 절편이 관찰되지 않거나 증폭된 DNA 절편이 유전형을 결정하는데 유용하지 않았다.

선별된 5개의 primer를 이용하여 RAPD를 수행한 것을 전기영동하여 나타난 결과는 Fig. 1, 2, 3에 나타내었다. 선명한 band만을 고려하면 lane마다 대개 1~15개의 band를 형성하여 총 76개의 증폭단편이 생겼으며, 0.1 ~ 3.5 kb까지 크기가 다양하였다. 어떤 경우에는 희미한 band나 100 bp 이하인 작은 band도 발견되었는데 자료 분석에는 포함시키지 않았다.

OPA-01과 OP-26-01 primer를 사용하여 PCR을 행했을 때 분리균주는 5개의 group로 나눌 수 있었다. Fig. 1(A)에서 OPA-01 primer를 사용하였을 때 모든 분리균주에서 1.5 kb의 PCR product가 형성되었고 *L. seeligeri*, *L. innocua*와 *L. welshimeri*로 동정된 분리균주 No. 21~No. 45에서 0.4 kb의 같은 크기의 PCR product가 형성되었다. 그리고 *L. seeligeri*로 동정된 No. 22와 No. 23에서는 PCR product의 양상이 똑같았다. 사용된 primer 5개의 경우 중에 따라 조금씩 다른 PCR product의 양상을 보이는 것뿐만 아니라 같은 종도 더욱 세분하는 product의 다양한 양상을 보여주었다. 이같은 결과는 Wagner 등(23)이 오스트리아의 치즈공장에서부터 분리한 *L. monocytogenes*와 *L. innocua*의 subtyping을 RAPD 방법으로 조사한 결과 같은 종이라 하여도 DNA 수준에서는 분리균주에 따라 더욱 다양한 구분을 할 수 있다는 보고와 유사하였다. 이와 같은 DNA 다형 현상은 primer의 종류뿐 아니라 염기 조성 특성에 따라 상당한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 사용된 primer 중에서 특히 OPA-01은 약 1.5 kb의 동일한 크기의 band를 형성했으나 OP-26-10(Fig. 3)은 약 0.7 kb의 동일한 크기의 band가 모든 *Listeria* sp. 분리균주에서 형성되었다. Fig. 4는 primer OPA-01과 OP-26-10을 사용하여 이들 primer가 *Listeria* 속에 특이성이 있는지를 확인하기 위하여 다른 식중독균들과 DNA pattern을 비교한 결과를 나타내었다. Primer OPA-01을 사용하였을 경우는 *Streptococcus pyogenes* ATCC 12348에서 같은 크기의 band가 형성되었고, OP-26-10을 사용하였을 경우는 *Bacillus cereus* IFO 3836에서 같은 크기의 band가 형성되어 이 1.5 kb와 0.7 kb의 product가 *Listeria*에만 특이적으로 생성되는 band가 아님을 알 수 있었다. 비록 이 primer들이 *Listeria* 속에 특이적인 것으로 나타나지 않았다 할지라도 본 실험은 10-mer random primer를 사용하여 증폭된 DNA의 절편이 유전적인 marker로서 속간 또는 종간의 분류 가능성이 있음을 시사하였다.

RAPD 분석결과를 계통분석용 프로그램으로 similarity

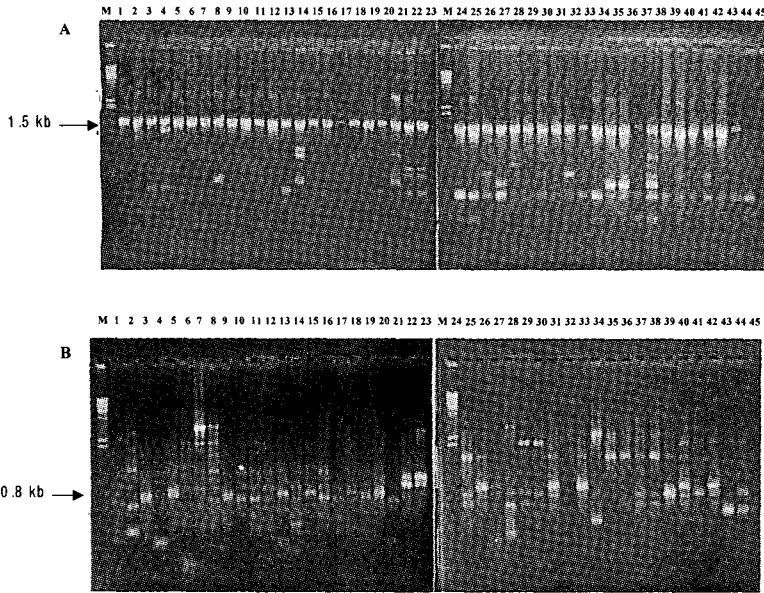


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of RAPD products with OPA-01 primer (A) and OP-26-01 primer (B) of the analyzed *Listeria* sp. Lane M: Lambda DNA/*Hind* III Markers. 1~20: *Listeria monocytogenes*, 21: *Listeria ivanovii*, 22~23: *Listeria seeligeri*, 24~42: *Listeria innocua*, 43~44: *Listeria welshimeri*.

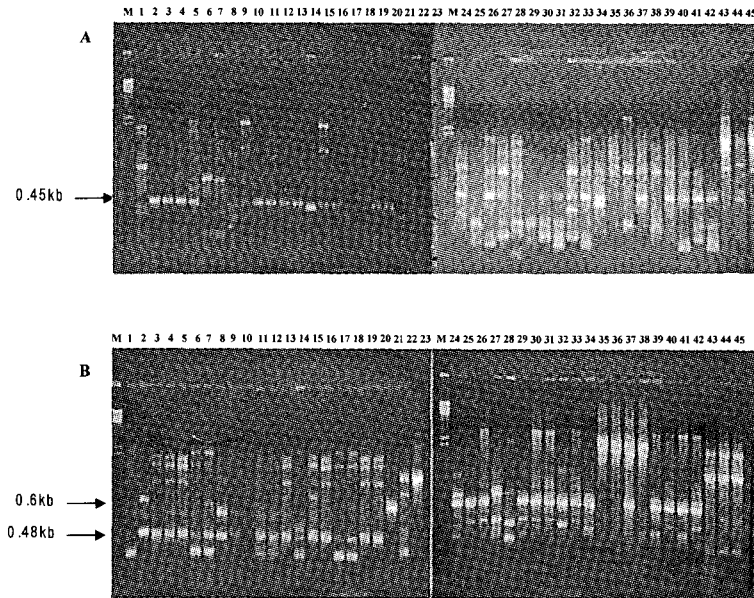


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of RAPD products with OP-26-02 primer (A) and OPB-01 primer (B) of the analyzed *Listeria* sp. Lane M: Lambda DNA/*Hind* III Markers. 1~20: *Listeria monocytogenes*, 21: *Listeria ivanovii*, 22~23: *Listeria seeligeri*, 24~42: *Listeria innocua*, 43~44: *Listeria welshimeri*.

index를 구하여 *Listeria* sp.간의 유연관계를 Table 3에 나타내었다. *Listeria* sp.간의 유사도는 0.54~0.93수준이었으며, 표준균주인 No. 3 *L. monocytogenes* ATCC 19115와 분리균주인 No. 20 *L. monocytogenes*가 0.93으로 가장 가까웠고, 분리균주인 No. 7 *L. monocytogenes*

와 표준균주인 No. 24 *L. innocua* ATCC 33090, 그리고 분리균주인 No. 7 *L. monocytogenes*와 분리균주 No. 45 *L. welshimeri*가 0.54로 가장 낮은 유사도를 보였다.

유사도에 근거해서 이들간의 유전적 근연관계를 UP-GMA법에 의해 분석한 결과(Fig. 5) phenogram 상에 7개

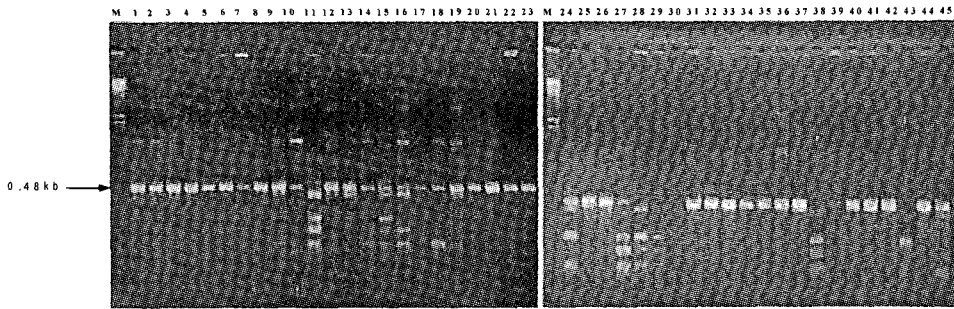


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of RAPD products with OP-26-10 primer of the analyzed *Listeria* sp. Lane M: Lambda DNA/*Hind* III Markers. 1~20: *Listeria monocytogenes*, 21: *Listeria ivanovii*, 22~23: *Listeria seeligeri*, 24~42: *Listeria innocua*, 43~44: *Listeria welshimeri*.

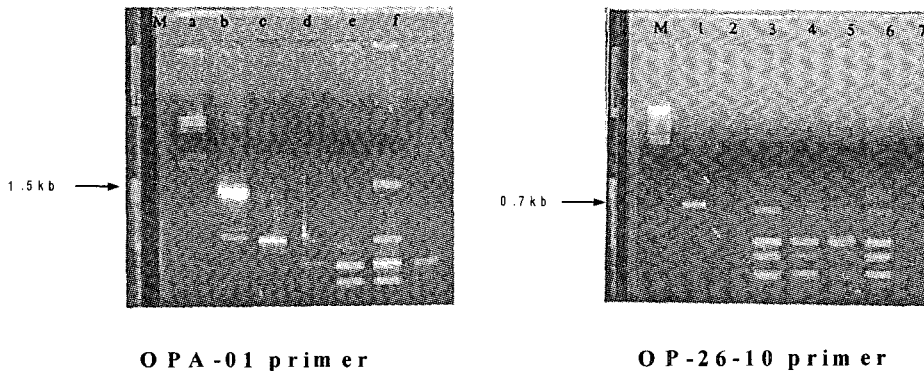


Fig. 4. PCR specificity test for 6 other bacterial genus with OPA-01 and OP-26-10 primer. Lane M: Lambda DNA/*Hind* III Markers. a, 1: *Listeria monocytogenes*. b, 2: *Bacillus subtilis* IFO 13720. 3: *Bacillus cereus* IFO 3836. c, 4: *Escherichia coli* ATCC 25922. d, 5: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. e, 6: *Streptococcus pyogenes* ATCC 12348. f, 7: *Klebsiella pneumoniae* IFO 3321.

의 clusters(L1~L7)로 분류되었고, *L. seeligeri*인 No. 22와 No. 23 균주가 하나의 별개 cluster로 *L. welshimeri*인 No. 43~No. 45가 또 하나의 별개 cluster로 나뉘어졌고, *L. monocytogenes* 분리균주와 *L. innocua* 분리균주들은 각각 더욱 세분된 2개와 3개의 cluster를 형성하였다. 즉 L1, L2는 *L. monocytogenes* strains만으로 L3, L5, L6은 *L. innocua* strains로 L4는 *L. seeligeri* strains로, L7은 *L. welshimeri* strains로 이루어졌다. 이러한 결과로 RAPD가 genotyping에 유용한 방법임을 알 수 있었으며 같은 *L. monocytogenes*를 또다시 L1과 L2로 그리고 *L. innocua*를 L3, L5, L6으로 subtyping 할 수 있음은 앞으로 RAPD를 이용하여 *L. monocytogenes*를 subtyping 할 수 있다는 것을 제시하는 결과이다. *Listeria* 속 중에서 *Listeria welshimeri*가 유사도가 낮은 cluster로 나타나는 것은 유전적으로 다른 종들과 먼 관계에 있음과 같은 종간의 유연관계도 분석할 수 있는 가능성이 있음을 나타내는 결과이다.

본 실험에 사용한 *L. monocytogenes* strains 중 No. 2, 3, 4, 13, 19, 20은 serotype 4이고 나머지 *L. monocytogenes* strains는 serotype 1에 속하였다(data not shown). Fig.

5에서 L2 cluster를 보면 cluster를 다시 No. 3, 20, 4, 13으로 구성된 작은 group으로 나눌 수 있는데 이들은 모두 serotype 4(No. 2와 19를 제외한)에 속하는 균주들이다. 이러한 결과는 Wagner 등(22)이 multiple primer PCR assay로 여러 유제품과 유제품 환경물질로부터 분리한 strains간의 유연관계를 분석한 결과 균주간의 유사도는 serotype들과도 연관성이 있는 것으로 나타났다는 보고와 일치하였으며 Giovannacci 등(31)이 RAPD, PFGE와 PCR-REA의 3가지 molecular typing 방법을 사용하여 돼지고기와 이들의 도살장, 공장 등에서 분리한 *L. monocytogenes*를 genotyping함으로써 얻어진 결과의 균주간의 유연성은 대체로 같은 혈청형에 속하는 것으로 관찰되었다는 보고와도 비슷한 결과를 나타내었으며 균주간의 유연관계와 serotype과는 높은 연관성을 나타냈다. 본 실험의 경우 다른 식물병원균에 대한 RAPD 연구 등에서 발견할 수 있는 분리균주가 포함되었던 식품의 종류나 수집된 지역에 따른 연관성을 찾아보았지만 차이에 따른 유형별 상관관계는 발견되지 않았다(data not shown).

국내의 경우 식품으로부터 *L. monocytogenes*의 오염도 조사에 관한 연구는 1988년 Yeo 등(32)이 처음 보고하

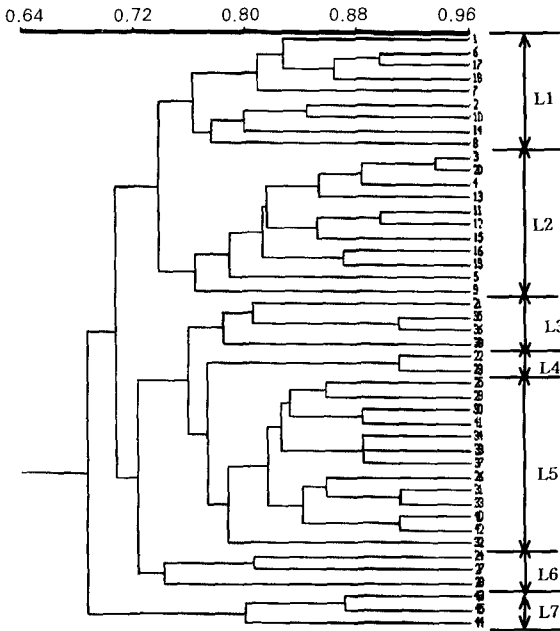


Fig. 5. UPGMA dendrogram showing the relationship among the *Listeria* sp. based on 1.5% agarose gel in RAPD.

1~20: *L. monocytogenes*, 21: *L. ivanovii*, 22~23: *L. seeligeri*, 24~42: *L. innocua*, 43~45: *L. welshimeri*.

였으며 그 후 우유, 가금, 육류, 냉동식품 등에서 *Listeria* sp.의 분포를 조사한 바 있다(33-36). 현재까지 국내의 경우 *L. monocytogenes*로 인한 집단 식중독 사례는 보고된 바 없으나 외국의 경우 집단 식중독 사례가 다수 보고되고 있다. 최근에 농수축산물의 수입이 증가함에 따라 식품의 안전성 확보가 매우 시급한 과제로 제기되면서 식품 유래 병원체로서의 *L. monocytogenes*에 의한 식중독 사고에 대비한 대책마련이 시급하다 하겠다. 외국의 경우 식중독 발생 시 원인규명을 위한 serotyping, phage typing 및 pulsed field gel electrophoresis (PFGE), random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing 방법에 관한 연구가 많이 이루어지고 있으며 세계보건기구(WHO)에서도 1996년에 이미 *L. monocytogenes*의 subtyping 방법으로서 RAPD를 6개의 다른 실험실에서 동일균주로 실험하여 재생력이 있는 RAPD를 표준화하기 위해 노력하고 있다(24).

Kerr 등(37)은 임상과 환경으로부터 분리한 균에 대한 분류체계에 관한 연구 결과 RAPD는 빠르고 재생력이 있는 분석법이라고 하였으며 Lawrence와 Gilmour(25)는 RAPD의 사용이 가금 식품과 가공공장에서 분리한 *L. monocytogenes*의 식품에의 존재와 교차오염의 가능성에 대한 가치 있는 정보를 제공할 수 있다고 평가하였다. 또한 Destro 등(19)은 새우가공장에서 분리한 *L. monocytogenes*의 molecular typing 방법으로 RAPD와 PFGE의 사용 가능성을 조사한 결과 한가지보다 이 두 가지의

방법으로부터 나온 profile을 복합적으로 이용함으로써 분류된 strains 사이의 차이를 더욱 확실하게 할 수 있다고 보고하였으며 이들의 연구는 식품공장에 HACCP 개념을 도입하여 사용할 때 RAPD 방법을 사용함으로써 공장 위생의 처음부터 끝 단계까지 오염의 정도와 수준, 추적과 감시를 하는데 매우 유용한 도구로서의 가능성이 있는 것을 제시하였다.

본 연구의 결과 *L. monocytogenes*를 RAPD를 이용하여 subspecies level로 분류하는 것은 식품의 안전성 향상에 크게 기여할 수 있는 매우 중요한 정보를 제공할 수 있는 것으로 예상되며 만약 그 RAPD의 pattern을 가지고 있는 특정균의 분포와 특성에 대해 더 연구한다면 식품 가공, 저장, 유통 공정과 식중독 발생에도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각되어진다.

요 약

Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) 기술을 이용하여 국내 식품으로부터 분리한 *Listeria* sp. 분리균주에 대한 DNA polymorphism을 분석하고 유연관계를 비교하며, 유용 marker를 개발할 목적으로 10가지 10-mer primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 5개의 primer(OPA-01, OP-26-01, OP-26-02, OPB-01, OP-26-10)가 선별되었고, 76개의 DNA 단편이 증폭되었다. 이 중 OPA-01과 OP-26-10 primer에 의한 약 1.5 kb와 0.7 kb의 증폭 band는 모든 *Listeria* 분리균에서 관찰할 수 있었으나, 이 증폭된 DNA 단편은 *Listeria* sp.에만 특이적인 것은 아니었다. NTSYS 프로그램을 이용해서 *Listeria* sp. 분리균간의 유전적 유연관계를 알아본 결과 7개의 cluster로 나뉘어졌고 유사도는 대체로 0.54~0.93 사이였으며, 특히, No.3과 No. 20은 93%로 가장 높은 유사도를 나타내었고, No. 7과 No. 24 또는 No. 7과 No. 45는 54%로 가장 낮은 유사도를 나타내었다. 이러한 결과는 RAPD 기술을 이용하여 쉽게 *Listeria* sp.를 subspecies 로 분류할 수 있음을 시사하였다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 있어 아낌없는 조언과 기술적인 지원을 해 주신 임춘근 교수와 박덕환 선생에게 심심한 감사함을 드립니다.

문 헌

- Boerlin, P., Boerlin-Petsold, F., Nannerman, E., Bille, J. and Jemmi, T. : Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1338-1343 (1997)
- Farber, J.M. and Peterkin, P.I. : *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Micobiol. Rev.*, **55**, 476-511

- (1991)
3. Pearson, L.J. and Marth, E.H. : *Listeria monocytogenes*-Threat to a safe food supply : A review. *J. Dairy Sci.*, **73**, 912-928 (1990)
 4. Salyers, A.A. and Whitt, D.D. : Bacterial pathogenesis : A molecular approach. American Society for Microbiology, 1325 Massachusetts Avenue, M.W., Washington, DC 20005, p.182-189 (1994)
 5. El-Kest, S.E. and Marth, E.H. : Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms : A review. *J. Food Prot.*, **55**, 639-648 (1991)
 6. Oh, D.H. and Marshall, D.L. : Influence of temperature, pH, and glycerol monolaurate on growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, **56**, 744-749 (1993)
 7. Chen, N. and Shelef, L.A. : Relationship between water activity, salts of lactic acid, and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *J. Food Prot.*, **55**, 574-578 (1992)
 8. Alavi, S.H., Puri, V.M., Knabel, S.J., Mohtar, R.H. and Whiting, R.C. : Development and validation of a dynamic growth model for *Listeria monocytogenes* in fluid whole milk. *J. Food Prot.*, **62**, 170-176 (1999)
 9. Thomas, C., Prior, O. and O'Beirne, D. : Survival and growth of *Listeria* species in a model ready-to-use vegetable product containing raw and cooked ingredients as affected by storage temperature and acidification. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **34**, 317-324 (1999)
 10. Baek, S.Y., Kwak, H.S., Cha, J., Park, S.K., Lim, S.Y., Kim, H.I., Park, S.H. and Kim, C.M. : Incidence of *Listeria monocytogenes* in frozen foods and development of a detection method. *The Annual Report of KFDA.*, **1**, 31-37(1997)
 11. Newton, C.R. and Graham, A. : PCR. ZENECA Pharmaceutical, Mereside, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, UK (1994)
 12. Simon, M.C., Gray, D.I. and Cook, N. : DNA extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 822-824 (1996)
 13. Manzano, M., Coccolin, L., Ferroni, P., Cantoni, C. and Comi, G. : A simple and fast PCR protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat. *J. Sci. Food Agric.*, **74**, 25-30 (1997)
 14. Niederhauser, C., Candrian, U., Höfelein, C., Jermini, M., Bühler, H.-P. and Lüthy, J. : Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1564-1568 (1992)
 15. Wang, R.F., Cao, W.W. and Johnson, M.G. : 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2827-2831 (1992)
 16. Thomas, E.J.G., King, R.K., Burchak, J. and Gannon, V. P.J. : Sensitive and specific of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2576-2580 (1991)
 17. Bassler, H.A., Flood, S.J.A., Livak, K.J., Marmaro, J., Knorr, R. and Batt, C.A. : Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *L. monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3724-3728 (1995)
 18. Herman, L., De Ridder, H. and Vlaemynck, G. : A multiplex PCR method for the identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in dairy samples. *J. Food Prot.*, **58**, 867-872 (1995)
 19. Destro, M.T., Leitao, M.F.F. and Farber, J.M. : Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 705-711 (1996)
 20. Zheng, W. and Kathariou, S. : Differentiation of epidemic-associated strains of *Listeria monocytogenes* by restriction fragment length polymorphism in a gene region essential for growth at low temperatures (4°C). *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4310-4314 (1995)
 21. Hong, Y.P., Oh, S.H., La, M.S. and Im, K.I. : Genetic status of *Acanthamoeba* spp. Korean isolates on the basis of RAPD marker. *Kor. J. Parasitol.*, **33**, 341-348 (1995)
 22. Wagner, M., Maderner, A. and Brandl, E. : Development of a multiple primer RAPD assay as a tool for phylogenetic analysis in *Listeria* spp. strains isolated from milkproduct associated epidemics, sporadic cases of listeriosis and dairy environments. *Int. J. Food Microbiol.*, **52**, 29-37(1999)
 23. Wagner, M., Maderner, A. and Brandl, E. : Random amplification of polymorphic DNA for tracing and molecular epidemiology of *Listeria* contamination in a cheese plant. *J. Food Prot.*, **59**, 384-389 (1996)
 24. Wernars, K., Boerlin, P., Audurier, A., Russell, E.G., Curtis, G.D.W., Herman, L. and van der Mee-Marquet, N. : The WHO multicenter study on *Listeria monocytogenes* subtyping: random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Int. J. Food Microbiol.*, **32**, 325-341 (1996)
 25. Lawrence, L.M., and Gilmour, A. : Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2139-2144 (1995)
 26. Nam, J.S., Lee, J.J., Shin, M.S. and Na, S.H. : Analysis of *Lactobacillus casei* and mutant strains by polymerase chain reaction. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 577-583 (1994)
 27. Lim, Y.P., Shin, S.J., Lee, S.J., Youn, Y.N. and Jo, J.S. : Survey of proper primers and genetic analysis of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) variants using the RAPD technique. *Kor. J. Ginseng Sci.*, **17**, 153-158 (1993)
 28. Nei, M. and Li, W. : Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5269-5273 (1979)
 29. Felsenstein, J. : PHYLIP-Phylogeny Inference Package. Dept. of Genetics, Univ. of Washington, Seattle (1993)
 30. Sokal, R.R. and Michener, C.D. : A statistical method for evaluating systematic relationship. *University of Kansas Sci Bull.*, **28**, 1409-1438 (1958)
 31. Giovannacci, I., Ragimbeau, C., Queguiner, S., Salvat, G., Vendeuvre, J.-L., Carlier, V. and Ermel, G. : *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *Int. J. Food Microbiol.*, **53**, 127-140 (1999)
 32. Yeo, S.G., Kwak, S.D. and Kim, D.K. : Survey on the infection source of *Listeria monocytogenes* for Korean native goats. *J. Korean Soc. Vet. Clin. Med.*, **5**, 53-59 (1988)
 33. Kang, H.J., Son, W.G., Kang, G.S. and Park, C.E. : Characteristics of isolates and incidence of *Listeria monocytogenes*

- togenes* in faeces from animals, feeds and raw foods of animal origin. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.*, **15**, 231-237 (1991)
34. 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)
 35. Chang, Y.H. : Isolation and characteristics of *Listeria monocytogenes* from frozen foods in Korea. *Koran J. Food Sci. Technol.*, **31**, 1324-1329 (1999)
 36. Baek, S.Y., Lim, S.Y., Lee, D.H., Min, K.H. and Kim, C.M. : Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in foods in Korea. *J. Food Prot.*, **63**, 186-189 (2000)
 37. Kerr, K.G., Kite, P., Heritage, J. and Hawkey, P.M. : Typing of epidemiologically associated environmental and clinical strains of *Listeria monocytogenes* by random amplification of polymorphic DNA. *J. Food Prot.*, **58**, 609-613 (1995)

(2000년 4월 24일 접수)