

HlyA 유전자 Primer를 이용한 PCR에 의한 식품으로부터 *Listeria monocytogenes*의 신속 검출 방법

최영춘 · 박부길 · 오덕환[†]

강원대학교 식품생명공학부

Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods Using HlyA Gene Primers

Young-Chun Choi, Boo-Kil Park and Deog-Hwan Oh[†]

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

Abstract

The study was conducted to develop a rapid method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods via polymerase chain reaction (PCR) technique using hemolysin gene (*hlyA*) primers. Specificity and sensitivity of PCR, optimal conditions for PCR and application of *hlyA* gene primers for the detection of *L. monocytogenes* from milk and beef were investigated. Each of the 20 *L. monocytogenes* strains gave a single 713 bp band, but other *Listeria* spp. and other bacteria did not show any bands. As few as 1 pg of *L. monocytogenes* DNA or 2.4×10^4 *L. monocytogenes* cells could be detected with *hlyA* gene primers. PCR product was most improved at 20~30 cycle in terms of removal of tailing and sensitivity. Also, the sensitivity was significantly improved by the further 10~15 cycle after 20 cycle PCR amplification. Milk (10 mL) and beef (10 g) samples were inoculated with *L. monocytogenes* at the concentrations ranging from 0 to 10^7 CFU/mL or g to determine the best sensitivity of PCR for the rapid detection of *L. monocytogenes*. PCR assay could detect 2 cells in milk with repeating PCR amplification and 2.6×10^2 cells in beef sample after 24 hr enrichment growth at 35°C in LEB.

Key words: *Listeria monocytogenes*, polymerase chain reaction, *hlyA* gene, milk, beef

서 론

*Listeria monocytogenes*는 Gram 양성, 비아포성의 통성혐기성 간균이며, 냉온성의 미생물로서 자연계에 널리 분포하고 있다. 이 균은 오랜 기간동안 사람 및 동물에서 산발적으로 발생하는 리스테리아병의 원인균으로 알려져 왔으며 특히, 면역결핍환자, 신생아 및 임신부에게 뇌척수막염, 유산, 패혈증 등을 유발하는 것으로 보고되어져 왔고 최근에는 미국, 캐나다, 유럽 등에서 리스테리아증이 식품을 매개로 하여 집단 발생됨이 입증됨으로써 식품 안전성 측면에서 매우 주목받는 식중독균으로서 부각되었다(1-5). 또한 이 균은 5°C 이하의 냉장온도에서도 증식할 수 있기 때문에 특히 냉장보존 식품에서 문제되고 있다(6-9). 따라서 이들 식품의 안전성 확보를 위해서는 무엇보다도 원인식품으로부터 *L. monocytogenes*를 신속하게 검사하여 이를 사전에 배제시키는 것이 중요하다. 식품 속에 존재하는 *L. monocytogenes*의 수가 2~100 CFU/mL (또는 g)의 적은 양이고 이 적은 양으로도

식중독을 일으킬 수 있기 때문에 신속하면서도 민감도가 높은 검출방법을 개발하고자 많은 연구가 이루어지고 있다(10). 그러나 다른 나라에 비해 우리나라에서는 국내 식품 또는 환자로부터 분리한 균주들의 생리, 생화학적 정보 정보가 거의 축적되지 못하고 있어 *L. monocytogenes*에 대한 검색기술이 취약한 실정이다.

일반적으로 고전적인 방법을 이용하여 각종 식품으로부터의 *L. monocytogenes*를 분리, 동정하려면 5~7일의 많은 시간을 요하고 방법이 까다롭고 전문성과 경험을 필요로 하는 등 어려움이 있기 때문에 최근에는 면역학적인 방법과 분자생물학적인 방법이 많이 사용되고 있다. 이 중에서도 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)기법은 특이성과 민감성이 뛰어난 것으로 평가되고 있고 특히 단시간에 검출이 가능하다는 장점이 있어 가장 많이 이용되어지고 있다(11-20).

이러한 분자생물학적인 방법은 주로 *L. monocytogenes*의 병원성 인자를 가진 유전자를 이용하고 있으며 주로 hemolysin과 관련된 *hlyA*(21) 유전자를 비롯하여

[†]To whom all correspondence should be addressed

invasion과 관련된 단백질을 생산하는 *iap*(22), phospholipase C의 *plcB*(23), *mpl*(24), *dth*-18(25) 등과 16S rRNA 서열(15,26)과 16S-23S rRNA space 영역(27)이 보고되어 있으며 이 중에서 *hlyA* 유전자와 16S rRNA 서열이 가장 널리 이용되어지고 있다. 국내에서도 우유, 닭고기 등의 식품에서 16S rRNA-based primer를 이용한 PCR 검출에 대한 연구(28-31)와 *iap*와 listeriolysin O 유전자의 primer를 이용한 PCR기법이 보고되었고(32,33), *hlyA* 유전자를 이용한 PCR 검출에 대해서도 보고된 바 있으나(34) 식품에 대한 적용연구가 미흡하였다.

본 연구에서는 배지와 식품으로부터 *L. monocytogenes*를 신속하게 검출하기 위한 효율적인 PCR방법을 찾기 위하여 *hlyA*의 primer를 사용하여 그 특이성과 민감도를 확인하였고 다른 종류의 식품에서 이 균을 신속하게 검출할 수 있는 PCR기법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

실험에 사용한 균주는 Table 1과 같다. 공시된 *Listeria monocytogenes*, *Listeria* spp. 및 기타 균주들은 표준균주와 식품에서 분리한 균주를 사용하였으며 사용전 tryptic soy broth(TSB), listeria enrichment broth(LEB) 및 tryptic soy agar에 수회 계대배양하여 사용하였다.

Genomic DNA 추출

PCR 반응에 적합한 *Listeria* spp.와 다른 균주의 chromosomal DNA를 분리하기 위하여 각 균주를 10 mL의 BHI(brain heart infusion, Difco, USA, Detroit)에 접종하였으며 35°C에서 24시간 배양한 후 3,000×g로 10분간 원심 분리하여 균체를 침전시키고 배지성분을 제거한 다음 균체는 1%(w/v) SDS와 100 µg/mL의 Proteinase

K가 포함된 TE 완충액(10 mM Tris-HCl, 1 mM/L EDTA; pH 7.8) 9.5 mL에 부유시킨 다음 37°C에서 1 시간 동안 방치한 후 5 M/L NaCl 1.8 mL를 첨가하여 65°C 항온수조에 20분간 방치하였다. 동량의 chloroform-isomyl 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 DNA를 침전시켰으며 침전된 DNA를 70%(v/v) 에탄올을 첨가하여 3분간 10,000×g로 원심 분리한 후 공기중에서 건조하였다. DNA를 TE 완충액 150~200 mL로 녹인 후 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

PCR 분석

Primer는 Klein과 Juneja(35)가 사용한 *L. monocytogenes*의 nucleotides 1620-2333의 *hlyA* gene를 이용한 primer로서 ELMHLYF(5'-TCCGCCTGCAAGTCCTAAGA-3')와 ELMHLYR(5'-GCGCTTGCAACTGCTCTTTA-3')를 Bioneer(충북, 청원)에서 합성 정제하였다. 준비된 DNA 주형 2 µL를 PCR용 eppendorf tube에 취하고 여기에 *hlyA* primer ELMHLYF 및 ELMHLYR 각 0.5 µM, dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP)각 200 µM, 10×PCR buffer 5 µL 및 *Taq* DNA polymerase 2.5 U를 가하여 멸균한 3차 증류수로 총량이 50 µL가 되게 하여 PCR을 수행하였다.

PCR 분석은 Biometra(UNO-Thermoblock, Germany, Biotron)를 사용하였다. 이때 증폭 cycle 회수는 총 40 cycle로 하였으며, 매 cycle당 95°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension의 순으로 반응하였고, 단 최초의 cycle은 denaturation 4분, 최종 cycle 후 extension을 5분으로 하였다. PCR 산물은 4°C에 보존하여 1.5% agarose gel로 전기영동하였으며 EtBr로 염색한 후 목적 DNA의 증폭여부를 확인하였다.

Primer의 특이성 검사

Primer의 특이성을 확인하기 위하여 *L. monocytogenes* 20균주와 *Listeria* spp. 14균주, 기타 그람 양성세균 3종 및 그람 음성세균 2종으로부터 genomic DNA를 분리하여 동일한 조건 하에서 PCR을 수행한 다음, 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 *L. monocytogenes*의 특이 증폭산물인 713 bp DNA절편 유무를 확인하였다.

PCR 민감성 시험

PCR법으로 검출 가능한 DNA의 최소량을 알아보기 위하여 *L. monocytogenes* ATCC 19111의 genomic DNA를 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg으로 희석하여 PCR을 실시하였다. 또한 검출 가능한 최소 세균수를 알아보기 위하여 *L. monocytogenes* ATCC 19111을 단계 희석하여 2.5×10^6 , 2.5×10^5 , 2.5×10^4 , 2.5×10^3 , 2.5×10^2 ,

Table 1. Bacterial strains used in this study

No.	Bacterial 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>	Isolated in foods
21	<i>L. ivanovii</i>	ATCC 19119
22~23	<i>L. seeligeri</i>	Isolated in foods
24	<i>L. innocua</i>	ATCC 33090
25~31	<i>L. innocua</i>	Isolated in foods
32	<i>L. welshimeri</i>	ATCC 43547
33~34	<i>L. welshimeri</i>	Isolated in foods
	<i>Bacillus cereus</i>	IFO 3836
Other	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
species	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 12348
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IFO 3321

2.5×10^1 CFU/mL의 균액을 주형으로 직접 사용하여 PCR을 실시하였다.

L. monocytogenes 검출을 위한 개선된 PCR 방법 모색

PCR cycle 수가 *L. monocytogenes* ATCC 19111 균주의 target DNA 증폭효율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 균수를 2.5×10^7 으로 하고 cycle 수를 20, 30 및 35로 하여 PCR을 실시하였다. 또한 PCR 수행의 반복이 민감도의 증진에 미치는 영향을 조사하기 위하여 20 cycle PCR을 행한 산물에서 2 μ L를 취해 한번 더 PCR을 각각 10, 15, 20 cycle을 실시하였다. 또한 DNA 주형의 준비 방법이 민감도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 $1 \times 10^6 \sim 0$ 까지 단계적으로 희석한 똑같은 배양액 10 mL를 각각 한 번은 DNA 추출을 행하고 한 번은 배양액에서 직접 2 μ L를 PCR의 DNA 주형으로 사용했다.

원유에 대한 PCR의 적용실험

우유로부터 *L. monocytogenes*의 검출을 알아보기 위해 *L. monocytogenes* ATCC 19111을 2.0×10^7 , 2.0×10^6 , 2.0×10^5 , 2.0×10^4 , 2.0×10^3 , 2.0×10^2 , 2.0×10^1 , 2 CFU/mL로 접종시킨 우유시료에서 DNA 추출 없이 직접 2 μ L를 취하여 24 cycle로 1차 PCR을 수행한 후 이 PCR 산물 2 μ L를 이용하여 10 cycle로 2차 PCR을 실시하였다.

쇠고기에 대한 PCR의 적용실험

쇠고기로부터 *L. monocytogenes*의 검출을 알아보기 위해 쇠고기 절편 20 g에 *L. monocytogenes* ATCC 19111의 배양액 2 mL(BHI broth, 35°C에서 24 hr 배양액을 10배씩 희석한 것)를 접종하여 6×10^7 , 2.6×10^6 , 2.6×10^5 , 2.6×10^4 , 2.6×10^3 , 2.6×10^2 , 2.6×10^1 , 2.6, 2.6×10^{-1} , 2.6×10^{-2} 및 0 CFU/g(접종 후 접종한 쇠고기 10 g에 90 mL 0.1% peptone buffer를 가한 후 균질화시켜 Oxford agar plate에 도말하여 35°C에서 24~48시간 배양 후 균수 측정)으로 준비한 쇠고기 10 g을 *Listeria* enrichment broth (LEB) 90 mL를 가하여 stomacher시킨 후 균질화한 직후 및 35°C에서 24시간 배양한 시료에서 각 1 mL를 취해 2번 원심분리한 후 100 mL 멸균수로 재현탁하였다. 현탁액의 3 μ L를 DNA 추출 없이 직접 PCR 주형으로 사용하여 30 cycle PCR을 실시하였다.

결 과

Primer의 특이성

HlyA gene primer ELMHLYF 및 ELMHLYR의 *L. monocytogenes*에 대한 특이성을 확인하기 위하여 *L. monocytogenes* 20균주와 *Listeria* spp. 14균주로부터 추출한 각 genomic DNA를 PCR로 증폭시킨 다음, 1.5% agarose gel에서 전기영동한 결과는 Fig. 1A에서와 같다. *L. monocytogenes*는 20균주 모두 713 bp 크기의 증

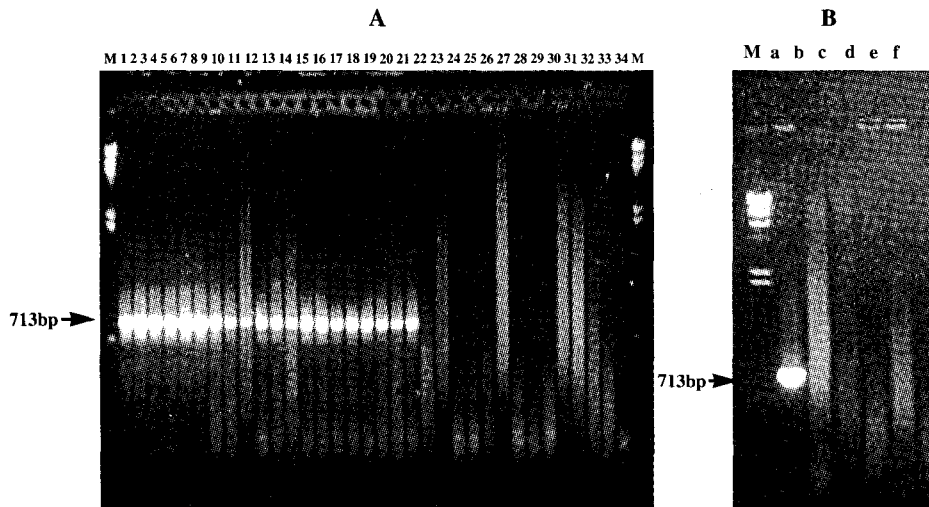


Fig. 1. Specificity test for detection of *L. monocytogenes* in the PCR assay using the *hly A* gene primer.

Pannel A: *Listeria* sp. Amplification products.

Lane M: Lambda DNA/*Hind*III Marker, 1: *L. monocytogenes* ATCC 19111, 2: *L. monocytogenes* ATCC 19114, 3: *L. monocytogenes* ATCC 19115, 4: *L. monocytogenes* Scott A, 5~20: *L. monocytogenes* isolates, 21: *L. ivanovi* ATCC 19119, 22~23: *L. seeligeri* isolates, 24: *L. innocua* ATCC 33090, 25~31: *L. innocua* isolates, 32: *L. weelshimeri* ATCC 43547, 33~34: *L. weelshimeri* isolates.

Pannel B: other bacteria amplification products.

a: *L. monocytogenes* ATCC 19111, b: *Bacillus cereus* IFO 3836, c: *Escherichia coli* ATCC 25922, d: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e: *Streptococcus pyogenes* ATCC 12348, f: *Klebsiella pneumoniae* IFO 3321.

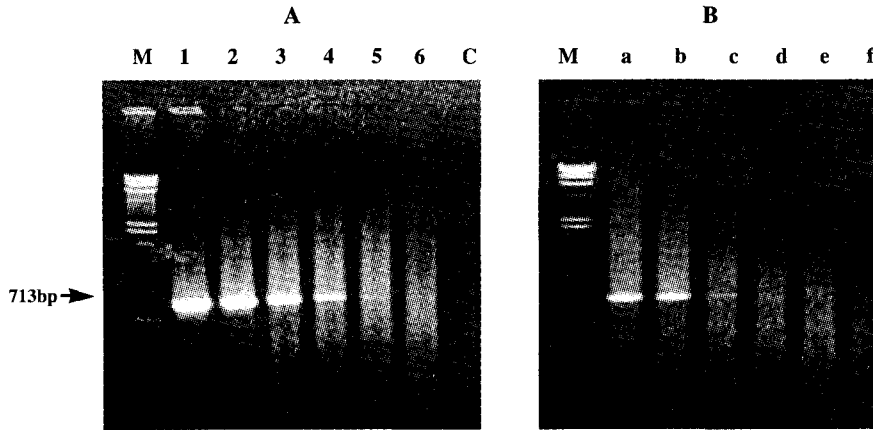


Fig. 2. Sensitivity test for detection of *L. monocytogenes* in pure cultures.

Panel A : PCR products with extracted DNA.

Lane M : Lambda DNA/*Hind*III Marker, 1 : 100 ng DNA, 2 : 10 ng DNA, 3 : 1 ng DNA, 4 : 100 pg DNA, 5 : 10 pg DNA, 6 : 1 pg DNA, C : no DNA (negative control)

Panel B : PCR products with whole cell.

a : 2.5×10^6 , b : 2.5×10^5 , c : 2.5×10^4 , d : 2.5×10^3 , e : 2.5×10^2 , f : 2.5×10^1

폭산물을 나타내었으나, 다른 균종에서는 같은 크기의 증폭산물이 나타나지 않았으며 또한 *Listeria* 속균 이외의 그람 양성균 3종, 그람 음성균 2종의 전기영동 결과도 Fig. 1B에서 나타난 바와 같이 713 bp의 증폭산물이 나타나지 않아 ELMHLYF 및 ELMHLYR primer가 *L. monocytogenes*에만 특이적으로 증폭산물을 생성하는 primer임을 알 수 있었다.

PCR 민감성 시험

PCR에 의하여 검출 가능한 DNA의 양과 최소 세균수를 측정하기 위하여 *L. monocytogenes* ATCC 19111 균주를 각각 100 pg ~ 1 pg 까지, $2.5 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10$ cell 수준으로 PCR한 결과는 Fig. 2와 같으며 최소 DNA 수준은 1 pg 으로 나타났고 검출 가능한 cell 수는 2.5×10^4 cell로 나타났다.

L. monocytogenes 검출을 위한 개선된 PCR 방법 모색

기존의 보고된 방법(35)으로 PCR을 행했을 때 tailing의 현상과 낮은 민감도가 나타났다. 따라서 본 실험에서는 tailing의 제거와 민감도를 높이기 위하여 PCR cycle 수에 따른 최적조건을 조사 하였다. *L. monocytogenes* ATCC 19111의 균수를 2.5×10^7 수준으로 하고 cycle 수를 20, 30, 35로 PCR한 결과 모든 cycle에서 PCR 산물이 관찰되었고, cycle 수가 증가할수록 증폭량도 증가하는 것으로 나타났으나 또한 tailing 현상도 증가하기 때문에 tailing 현상이 없는 깨끗한 관찰을 위해서는 20~30 cycle 정도의 PCR cycle 수가 좋은 것으로 나타났다(Fig. 3). 또한 PCR 수행의 반복이 민감도를 높이는지의 영향을

조사하기 위하여 20 cycle PCR을 행한 product에서 2 μ L를 취해 한번 더 PCR을 각각 10, 15, 20 cycle PCR을 실시한 결과 반복 PCR을 수행할 때 10 cycle로 한 경우는 기존의 보고된 40 cycle로 한번만 PCR한 경우보다 10배 민감도가 증가하였고 15와 20 cycle로 했을 때는 100배 증가하였으며 10과 15 cycle한 경우는 깨끗한 band가 관찰되었고 20 cycle에서는 tailing이 관찰되어 반복 PCR을 행할 경우 15 cycle이 적당한 것으로 확인되었으며 그 결과 10^2 cell까지 검출이 가능했다.

DNA template의 준비 방법이 민감도를 변화시키는

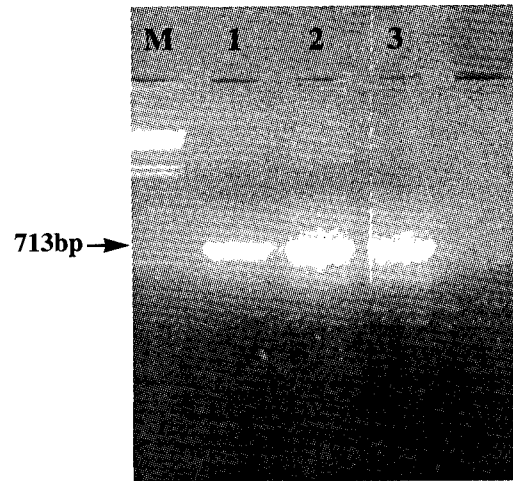


Fig. 3. PCR amplification products obtained from 2.5×10^7 cell of *L. monocytogenes* ATCC 19111 were subjected to PCR in various cycle numbers. Lane M : Lambda DNA/*Hind*III Marker, 1 : 20 cycle, 2 : 30 cycle, 3 : 35 cycle.

지 알기 위하여 $1 \times 10^6 \sim 0$ 까지 단계적으로 희석한 똑같은 배양액 10 mL를 각각 한 번은 DNA 추출을 행하고 한 번은 배양액에서 직접 2 μ L를 PCR의 DNA template로 사용한 결과 DNA의 민감도 수준은 1×10^2 cell으로 두가지 방법의 차이없이 모두 5번 희석한 수준까지 증폭산물이 관찰되었다(Fig. 4).

원유에 대한 PCR의 적용

우유로부터 *L. monocytogenes*를 배양하지 않고 직접

검출한 경우 우유 성분에 의해 PCR 증폭이 억제되어 더 많은 tailing 현상이 관찰되었다(Fig. 5A). 이를 개선하기 위하여 PCR cycle 수를 변화시킨 결과 24~26 cycle 수로 수행했을 경우 tailing이 없는 깨끗한 PCR 산물을 얻을 수 있었으며 Fig. 5B에서 보는 것과 같이 24 cycle로 1차 PCR을 행한 경우는 2×10^5 까지 검출이 가능하였으며, 1차 PCR products를 DNA template로 하여 다시 2차 PCR을 10 cycle 수로 수행했을 때 2 cell 수준까지 검출할 수 있는 높은 민감도를 나타내었다(Fig. 5C).

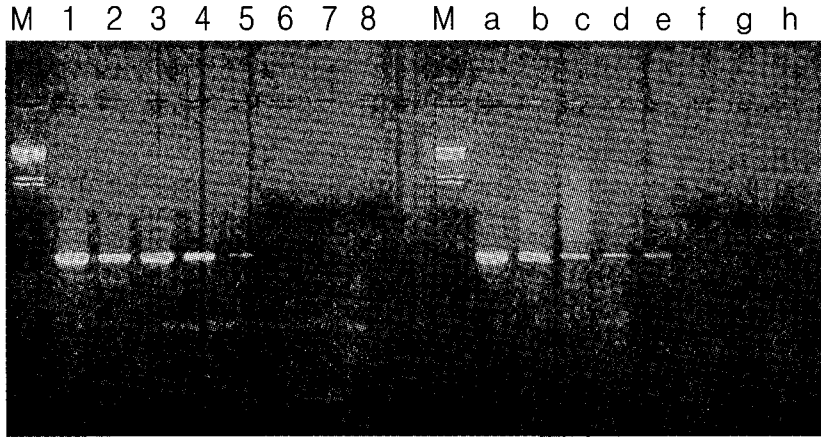


Fig. 4. PCR amplification products of *L. monocytogenes* ATCC 19111 using different DNA template method. 1~8: using DNA template to DNA extraction, a~h: using DNA template to whole cell. Lane M: Lambda DNA/*Hind* III Markers, 1 and a: 1×10^6 CFU/mL, 2 and b: 1×10^5 CFU/mL, 3 and c: 1×10^4 CFU/mL, 4 and d: 1×10^3 CFU/mL, 5 and e: 1×10^2 CFU/mL, 6 and f: 1×10 CFU/mL, 7 and g: 1 CFU/mL, 8 and h: 0 CFU/mL

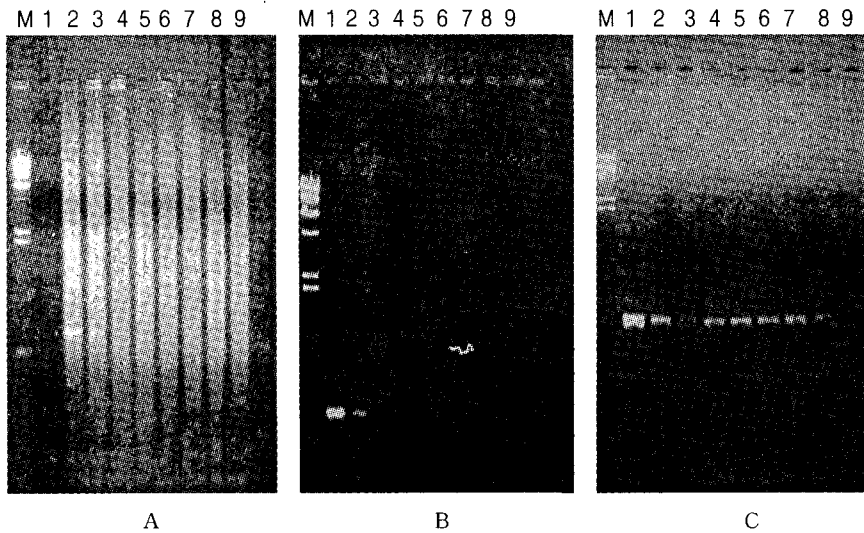


Fig 5. Detection limit of the PCR method using *hlyA* gene primer for *L. monocytogenes* ATCC 19111 cells inoculated into raw milk. Panel A: 40 PCR cycle, Panel B: 24 PCR cycle, Panel C: 24 PCR cycle then again 10 PCR cycle. Lane M: Lambda DNA/*Hind* III Markers, 1: 1×10^6 CFU/mL, 2: 1×10^5 CFU/mL, 3: 1×10^4 CFU/mL, 4: 1×10^3 CFU/mL, 5: 1×10^2 CFU/mL, 6: 1×10 CFU/mL, 7: 1 CFU/mL, 8: 1×10^{-1} CFU/mL, 9: negative control.

쇠고기에 대한 PCR의 적용실험

쇠고기로부터 *L. monocytogenes*를 배양하지 않고 직접 검출한 경우 쇠고기에 의해 PCR 증폭이 많이 억제되어 tailing 현상도 심하여 증폭산물이 확인되지 않았다. 따라서 최적 cycle을 찾기 위해 cycle 수를 변화시킨 결과 30 cycle이 가장 적당한 것으로 나타났으며(data not shown), 최종 cycle의 extension 시간을 5분으로 했을 경우엔 증폭산물의 band가 불안정하여 10분내에 사라지는 것이 관찰되었으나 최종 cycle의 extension 시간을 10분으로 연장하였을 때 증폭산물의 band가 안정하여지는 것을 확인할 수 있었다(data not shown). 또한 민감도는 배양하지 않은 0시간에서 2.6×10^5 CFU/g 수준으로 또한 24시간 배양한 것에서는 민감도가 2.6×10^2 CFU/g 수준으로 관찰되었으며 그 결과는 Fig. 6에 나타내었다.

고 찰

*L. monocytogenes*는 자연계에 널리 분포하고 냉장온도에서도 증식할 수 있어 *L. monocytogenes*에 오염된 식품을 섭취함으로써 건강한 개체도 리스테리아증을 일으킬 수 있기 때문에 이의 발생을 예방하기 위하여 원인 식품에서 이 균을 신속하고 정확하게 검색해야 할 필요성이 증대되고 있다. 본 연구는 현재 널리 사용되고 있는 *L. monocytogenes*의 분리 배양법은 분리, 동정하는데 5~7일의 많은 시간이 소요되는 결점을 가지고 있기에 특이성과 감도가 높고 신속하게 검출할 수 있는 장점이 있는 PCR 기법에 *hlyA* gene을 이용한 primer의 사용을 분석하여 이를 식품에 적용하여 원유와 쇠고기에서 *L. monocytogenes*를 검색하고자 하였다.

*L. monocytogenes*를 검출하는데 PCR을 사용한 것에 관한 연구는 Border 등(36)이 16S rRNA based primer를 합성하여 *Listeria* spp.에 대한 특이성을 검색하였으며 Thomas 등(16)은 우유와 쇠고기에 대하여 PCR 기법의 민감도와 특이성을 검색하였고, Wang 등(15,26)도 16S rRNA based primer를 제작하여 식품에서의 *L. monocytogenes*의 검출에 관하여 보고하였다. 특히, Wang 등(15)이 제작한 primer를 이용한 PCR 기법에 관하여는 국내에서도 원유, 닭고기, 수입동물성 식품 등에의 적용에 관한 연구가 많이 이루어졌고 그 특이성도 인정되었고 민감도도 2 cell 수준으로 매우 높게 보고가 되어있다(29-34).

본 실험에서 사용한 *hlyA* gene을 이용한 ELMHLYF 및 ELMHLYR primer는 균주에 대한 민감도가 PCR cycle 수가 40이었을 때 2.5×10^4 으로 나타났으나 민감도를 개선하기 위하여 PCR cycle 수를 24 cycle로 변화시켰을 때 1×10^2 cell로 나타내었으며 1차 PCR을 행한 것을 2차 PCR을 행했을 때 우유에서 2 cell 수준까지 민감도를 높일 수 있었다. 이는 Thomas 등(16)이 민감도를 개선하기 위하여 cycle 횟수를 늘리는 방향으로 변화시키는 것이 바람직하다고 한 결과와 일치하였다. Wang 등(15)은 DNA template가 열추출물일 경우 PCR cycle에서 denaturation 시간을 95°C에서 3분간만 하는 것이 denaturation과 *Taq* polymerase의 역가가 저하되는 것을 막을 수 있다고 하였고 DNA template가 열추출이 아닐 경우는 첫 cycle에서 denaturation time을 6~7분으로 해야 한다고 하였다. 본 실험에서 식품으로부터 *L. monocytogenes*의 검출을 위하여 DNA 추출을 행하지 않고

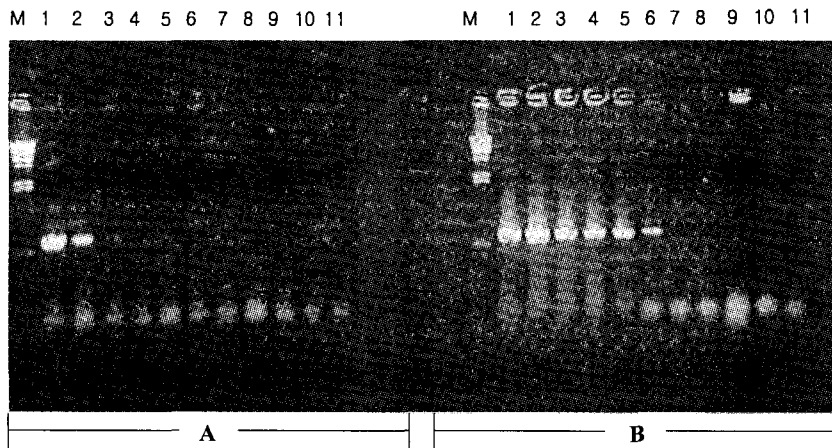


Fig. 6. Detection limit of the PCR method using *hlyA* gene primer for *L. monocytogenes* ATCC 19111 cells inoculated into cut beef.

Panel A: not cultured, Panel B: cultured for 24 hours

Lane M: Lambda DNA/*Hind* III Markers, 1: 2.6×10^7 CFU/g, 2: 2.6×10^6 CFU/g, 3: 2.6×10^5 CFU/g, 4: 2.6×10^4 CFU/g, 5: 2.6×10^3 CFU/g, 6: 2.6×10^2 CFU/g, 7: 2.6×10 CFU/g, 8: 2.6 CFU/g, 9: 2.6×10^{-1} CFU/g, 10: 2.6×10^{-2} CFU/g, 11: negative control

원심분리를 통한 세척과정만으로 PCR 억제제를 제거할 수 있었으며 Wang 등(15)의 논문을 참고하여 첫 denaturation 시간을 4분으로 함으로써 cell이 충분히 lysate됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Shin 등(37)이 세포 현탁액을 직접 PCR을 위한 DNA 주형으로 사용하여 좋은 결과를 얻은 것과도 일치하였다. 이러한 방법은 미량의 균을 DNA 추출과정에서 유실하지 않고 열로 lysate시켜 직접 PCR을 행하므로 시간과 노력이 줄어든다는 장점이 있다.

따라서 본 연구에서는 오염된 우유를 증균하지 않은 시료의 whole cell을 열추출이나 DNA 추출없이 직접 DNA template로 사용하고 denaturation time을 4분으로 하여 PCR 분석을 한 결과 총 20 cycle부터 증폭산물이 생겼으며 30 cycle이 넘으면 tailing 현상이 증가하였다. 또한 cycle을 35~40 cycle로 했을 경우는 tailing이 심하였으나 24 cycle로 증폭된 PCR products의 1 µL를 사용하여 다시 한번 10 cycle로 PCR을 수행한 결과 1차 PCR amplification에서는 관찰되지 않았던 lane에서도 모두 증폭산물이 관찰되어 민감도를 높일 수 있는 것으로 확인되었다. 이는 Thomas 등(16)이 10 mL의 우유와 LEB 증균배지 90 mL를 혼합하여 증균하지 않고 직접 PCR 검색하였을 때 PCR products를 확인할 수 없었던 결과와 비교하여 생각할 때 매우 높은 민감도라 할 수 있다. 따라서, 본 실험에 사용한 *hlyA* gene을 이용한 ELMHLYF 및 ELMHLYR primer는 우유에서 *L. monocytogenes*를 증균과정 없이 신속하게 검출할 수 있는 유용한 PCR primer라고 생각되어진다.

Wang 등(15), Thomas 등(16), Fitter 등(38) 및 Wernars 등(39)은 식품 시료 내에 존재하는 PCR inhibitor를 제거하기 위해 여과, 세척, 희석 등의 방법과 phenol-extraction과 affinity chromatography 등의 방법을 효과적임을 보고하였지만 DNA의 유실이 많고 직접 PCR을 행했을 때에 비하여 DNA 추출을 위해 부과적인 실험을 해야 하는 번거로움이 있다. 이는 식품에 많은 수보다 10~100 CFU의 적은 양의 *L. monocytogenes*가 오염되어 있을 경우가 더 많은데 이의 위음성 반응이 나타날 수 있는 충분한 이유가 되므로 짧은 증균과정 후에 PCR을 행하든지 1차 PCR후에 nested PCR 또는 반복 PCR을 한번 더 수행하여 민감도를 높이는 것이 식품 안전성의 관점에서 더 좋은 방법이라 할 수 있을 것이다.

본 실험에서 쇠고기에서의 *L. monocytogenes* PCR 검출은 우유에서의 검출과 비교하여 낮은 민감도를 보였다. 이는 Fitter 등(38)에 의한 닭고기의 지방함량이 많고 처리과정에 따라서 타세균이 오염되어 PCR에 비특이적 반응을 나타낼 수 있다는 것을 생각할 때 쇠고기의 지방, 단백질 또는 쇠고기를 균질화하기 위해 마쇄하는 과정에서 쇠고기 조직내의 성분 유출과 혈액들이 PCR inhibitor로 작용하는 것이라 생각되어진다. 따라서 쇠고기의 경우

는 본 실험에 사용된 우유와는 달리 반드시 원심분리를 통한 세척과정을 거쳐야 했으며 낮은 민감도로 인하여 12~24시간의 증균 과정을 거치는 방법으로 검출하여야만 했다. 이는 Suk 등(30)이 닭고기에서의 *L. monocytogenes*의 검색을 할 때 PCR을 위한 시료의 증균배양은 LEB를 사용하여 30°C에서 12시간 이상 배양하면 PCR의 검출효율을 보다 높일 수 있다고 한 것과 일치하는 결과이다.

PCR 분석시 고기의 조직 성분이 저해제로 작용하기 때문에 이 고기 조직을 제거하여 주는 것은 아주 중요한 일 중의 하나라 할 수 있을 것이다. 따라서 쇠고기와 같은 식육시료에서 더욱 높은 민감도를 나타내기 위해서는 마쇄하는 방법보다는 진탕법을 통하여 시료에 붙어 있는 cell을 buffer로 떼어낸 후 집균하여 PCR을 행하거나 증균후 PCR을 행하는 것이 효과적이라 할 수 있다. 본 실험에서 1 mL를 원심 집균하였을 때 2.6×10^5 까지 관찰이 가능하였으므로 실제로 식품내의 균의 유무를 관찰할 때 100 mL를 원심 집균하여 이를 12~24시간 증균하여 PCR을 수행한다면 쇠고기 식품에서의 inhibitor가 되는 조직도 제거할 수 있고 증균을 통해 확실한 균의 검출이 가능함을 알 수 있었다. Wang 등(15)은 식육시료와 University of Vermont broth(UVM) 증균배지를 혼합하여 직접 PCR로 분석했을 때 배지성분의 어떤 형광기질이 90~140 bp에 해당하는 지점에 나타났다고 보고하였는데 본 실험실에서도 UVM 증균배지와 Fraser broth 증균배지에서 이러한 형광 기질이 발견되었으나 전기영동 겔 상에서 시간이 지나면 사라지는 것을 알 수 있었다. 그러나 LEB의 경우엔 이러한 형광 기질은 발견되지 않았다. 또한, 본 연구에서는 최종 cycle의 extension time을 5분으로 하였을 때 PCR product가 매우 불안정하여 겔 상에서 band가 존재하다가 없어지는 현상이 관찰되었는데 이러한 현상은 PCR 최종 cycle의 extension time을 10분으로 하여 안정화시킬 수 있었는데 이는 소고기의 조직내의 어떤 물질이 *Taq* polymerase의 효율을 떨어뜨린 것으로 생각되어진다. 따라서 최종 extension 반응시간을 연장하여 *Taq* polymerase가 충분히 반응하도록 했을 때 증폭산물이 안정화되는 것으로 나타났다. 앞으로 *Taq* polymerase보다 우수한 polymerase를 사용할 경우 tailing의 제거나 PCR 산물이 더욱 안정화되어 보다 좋은 검출효능을 보일 수 있을 것으로 예상되어진다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 연구에서 *hlyA* gene을 이용한 primer를 사용하여 *L. monocytogenes*를 검출하는 PCR 분석시 기준에 보고된 PCR 40 cycle의 결과(35)보다는 20~30 cycle로 PCR을 수행함으로써 더 깨끗한 products의 band를 관찰할 수 있었으며 우유에서 *L. monocytogenes*를 검출할 경우엔 이 *hlyA*를 이용한 primer를 이용한 PCR 기법이 증균을 하지 않고도 2 cell까지 검출할 수 있는 신속하며 효율이 높은 방법으로 사

료되며, 쇠고기에서 *L. monocytogenes*를 검출할 경우엔 낮은 민감도를 보완하기 위하여 12~24시간의 증균과정을 거친 후 PCR을 수행하여야 할 것으로 사료된다. 즉 같은 primer를 사용한 PCR 기법이라도 식품에 따라 민감도가 다르기 때문에 cycle time과 cycle 횟수를 다르게 하여 PCR을 수행하여야 할 것으로 사료되며 이러한 기초자료가 많이 축적되어 식품에 따라 가장 적절한 PCR 기법이 수립되어 식품에서의 *L. monocytogenes*의 빠르고 민감한 검출방법이 확립되어야 할 것이다.

요 약

본 연구는 식품에 존재하는 *L. monocytogenes*균의 신속한 검출방법을 조사하기 위하여 *hlyA* 유전자 primer를 사용하여 PCR 기법으로 행하였으며 primer의 특이성과 PCR의 민감성, *L. monocytogenes*균의 검출을 위한 최적조건 및 우유 및 소고기의 적용시험을 각각 조사하였다. PCR 특이성 실험에서는 *L. monocytogenes* 20주에 대한 PCR 분석결과 모두 713 bp 크기의 PCR products를 확인할 수 있었고, *Listeria* spp. 및 다른 세균에서는 동일한 products가 증폭되지 않으므로써 *hlyA* based primer의 *L. monocytogenes*에 대한 PCR 특이성이 관찰되었다. PCR 분석법의 민감도는 *L. monocytogenes* ATCC 19111의 1 pg DNA와 2.4×10^4 cell 수준에서 target DNA가 증폭되었다. Tailing의 제거와 민감도를 높이기 위하여 PCR cycle 수에 따른 최적조건을 조사한 결과 20~30 cycle 정도의 PCR cycle 수가 좋은 것으로 나타났으며 민감도는 20 cycle PCR amplification을 행한 후 한번 더 10~15 cycle로 처리했을 때 훨씬 증가하였다. 한편, 우유(10 mL)와 쇠고기 절편(10 g)에 $0 \sim 10^7$ CFU/mL 또는 g 수준으로 *L. monocytogenes*를 신속하게 검출하기 위하여 PCR을 적용한 결과, 우유시료에서는 2번 PCR을 반복함으로써 2 cells까지 검출할 수 있었고, 쇠고기 절편은 LEB로 35°C에서 24시간 증균하여 PCR함으로써 2.6×10^2 cell까지 검출할 수 있었다.

문 헌

1. 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)
2. 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, Washington, DC, 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. Fluit, A.C., Torensma, R., Visser, M.J., Aarsman, C.J., Poppelier, M.J., Keller, B.H., Klapwijk, P. and Verhoef, J. : Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1289-1293 (1993)
 22. Cooray, K.J., Nishibori, T., Xiong, H., Matsuyama, T., Fujita, M. and Mitsuyama, M. : Detection of multiple virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3023-3026 (1994)
 23. Bubert, A., Kohler, S. and Goebel, W. : The homologous and heterologous regions within the iap gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2625-2632 (1992)
 24. Vines, A., Reeves, M.W., Hunter, S. and Swaminathan, B. : Restriction fragment length polymorphism in four virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes*. *Res. Microbiol.*, **143**, 281-294 (1992)
 25. Bessesen, M.T., Luo, Q.A., Rotbart, H.A., Blaser, M.J. and Ellison, R.T. : Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2930-2932 (1990)
 26. Wang, R.F., Cao, W.W. and Johnson, M.G. : Development of a 16S rRNA-based oligomer probe specific for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3666-3670 (1991).
 27. Graham, T.A., Golsteyn-Thomas, E.J., Thomas, J.E. and Gannon, V.P. : Inter- and intraspecies comparison of the 16S-23S rRNA operon intergenic spacer regions of six *Listeria* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 863-869 (1997)
 29. Yi, C.H., Son, W.G. and Kang, H.J. : Improvement of polymerase chain reaction methods for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Korean J. Vet. Res.*, **36**, 119-129 (1996)
 30. Suk, J.M., Kang, H.J. and Son, W.G. : Comparison of polymerase chain reaction with enrichment cultural procedure for detection of *Listeria monocytogenes* in chickens. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.*, **22**, 215-223 (1998)
 31. Kang, H.J., Suk, J.M. and Son, W.G. : Application and development of polymerase chain reaction for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in the imported animal foods. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.*, **21**, 149-157 (1997)
 32. Kang, H.J., Lee, S.M., Suk, J.M., Lee, D.K. and Son, W.G. : Rapid diagnosis of experimental listeriosis in mice by polymerase chain reaction. *Korean J. Vet. Res.*, **38**, 559-564 (1998)
 33. Yang, B.S. and Park, J.S. : Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction. *J. Korean Soc. Microbiol.*, **32**, 213-218 (1997)
 34. Ryu, C.H., Cho, S.H., Inoue, S., Igimi, S. and Kumagai, S. : The most specific primers for the identification of *Listeria monocytogenes* by the polymerase chain reaction method. *Foods and Biotechnol.*, **5**, 30-33 (1996)
 35. Klein, P.G. and Juneja, V.K. : Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4441-4448 (1997)
 36. Border, P.M., Howard, J.J., Plastow, G.S. and Sigens, K.W. : Detection of *Listeria* species and *Listeira monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.*, **11**, 158-162 (1990)
 37. Shin, S.H., Koo, Y.J. and Kim, W.J. : Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods by a polymerase chain reaction. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **31**, 1628-1634 (1999)
 38. Fitter, S., Heuzenroeder, M. and Thomas, C.J. : A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 53-59 (1992)
 39. Wernars, K., Heuvelman, C.J., Chakraborty, T. and No-termans, S.H.W. : Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 121-126 (1991)

(2000년 7월 18일 접수)