

식품검사에서 Lis-mix multiplex PCR 방법의 응용 및 *Listeria ivanovii* 의 특이적 검출

한기호 · 이철우 · 양옥순 · 이영순* · 임윤규** · 윤병수†

경기대학교 자연과학부 생물학과, 서울대학교 수의과대학, **제주대학교 수의과대학

Application of Multiplex PCR Using Lis-mix Primers in Food test and Specific Detection of *Listeria ivanovii*

Ki-Ho Han, Chil-Woo Lee, Ok-Soon Yang, Yong-Soon Lee*,
Yoon-Kyu Lim**, and Byoung-Su Yoon†

Dept. of Biology, College of Natural Science, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

**College of Veterinary Medicine, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

ABSTRACT – *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* are important food-pathogens for human and animal. The diagnostic of *Listeria* in food using culture medium requires time and laborwork, because there are many other non-pathogenic species like *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* and *L. grayi* in Genus *Listeria*. For these reasons, Lis-mix multiplex PCR method was developed as a rapid method for the detection and identification of *Listeria*. In this study we developed a practical system of Lis-mix PCR detection for the application to food samples and new developed Siw-mix III PCR system. Using this Lis-mix PCR system overall 69 listerial strains were successful species-identified and confirmed. Also, the Siw-mix III PCR system allows the species-specific identification among *L. ivanovii*, *L. welshimeri* and *L. seeligeri* in a single PCR.

Key words □ *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, Multiplex PCR, Listeriosis, *iap* gene

*Listeria monocytogenes*는 인간과 동물에서 발생하는 리스테리아종의 원인균으로, 주로 이에 오염된 식품에 의해 전파되며, 노령인구의 증가 및 냉장 즉석식품이 점차 증가됨에 따라 병원균으로의 중요성도 커지고 있다. *L. monocytogenes*는 30-40%에 이르는 치사율로 인하여 식품에서는 발견되지 않아야 하는 병원균으로 규정되어 있다. 또한 *Listeria ivanovii*는 가축의 전염병균으로 육가공품, 유가공품등의 식품에 오염되게 되며, 소, 양 등에 감염되어 주로 낙태를 유발시키게 하며¹³⁾, 최근 이에 감염된 가축에서 생산된 육제품, 유제품을 통하여 인체에 대한 피해 사례도 보고 되고 있다⁶⁾.

세균 분류학상 *Listeria*속에 속하는 균종으로는 *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*를 비롯하여 *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi* 등 6종이 알려져 있으며, 이 중 전자의 2개 종을 제외한 나머지 4개 종은 비병원성 세균이다. 더욱이 비병원성균인 *L. innocua*는 자연계에 가장 많이 존재하는 우점종으로 병원균인 *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*를 검색하는 식품검사 등에서 많은 오판정의 원인이 되고 있

다. 따라서 *Listeria*의 식품검사에서 종의 동정 즉, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*의 존재 유무는 매우 중요한 경제적 의의를 지니고 있다 하겠다.

종래의 *Listeria*의 검색은 선택배양 및 생화학적 검사 등 고전적 방법에 의한 것으로 극소수로 존재하는 이 균 속의 특성에 비추어, 환경 및 식품 등의 전반적인 오염상황을 밝히기에는 역부족이었으나 최근에 이르러 새로운 *Listeria*의 선택배지가 개발되고^{7,17)} *Listeria*의 고유항원에 대한 면역학적 방법^{13,22)}이 상품화되었으며, 이와 별도로 *Listeria* 감염에 대한 우리 몸의 항체형성을 관찰하는 혈청학적 방법¹²⁾이 모색되는 등 다양한 검색방법이 개발되었으며, 특히 *Listeria* colony hybridization¹⁵⁾ 및 PCR 방법^{3,4)} 등 DNA의 특이 염기 서열을 이용한 검색방법의 개발은 *Listeria*의 분포 및 오염실태를 보다 빠르고 쉽게 파악할 수 있는 길을 열게 되었다. 종래 식품내의 *Listeria*를 발견하기 위한 표준방법으로 그 생화학적 분석과 동정에 최소 5일이 소요되었던 반면, PCR을 적용한 방법에서는 검출 시간을 수시간 내로 단축 시키게 되어 신속성 및 정확성을 크게 향상시키게 되었다^{2,33,10)}. 그 외

†Author to whom correspondence should be addressed.

pulsed-field gel electrophoresis를 이용하여 가축, 사람, 식품, 환경등에서 분리된 *L. ivanovii*를 분리, 동정하는 방법²⁵⁾도 보고 되었으며, 식품에서 분리된 *Listeria*의 16s rRNA를 PCR을 이용하여 증폭한 후 temperature gradient gel electrophoresis에 의한 검출법²¹⁾도 보고 되었다.

그러나 개발된 여러 검색방법 중 상품화의 가능성이 가장 큰, 면역학적 방법을 사용하는 검색키트들은 아직 정확성의 면에서 종동정에 까지는 이르는 못하고 있으며, *Listeria*의 존재 유무를 확실하게 하는 데 그치고 있다. 현재 *Listeria*의 종동정을 명확히 할 수 있는 방법으로 PCR법이 가장 많이 사용되고 있으며, 특히 Bubert 등⁴⁾이 개발한 Lis-mix multiplex 방법은 *Listeria*속 고유 단백질인 p60의 *iap* gene의 염기서열을 이용한 PCR법으로, *Listeria*속의 동정 뿐 아니라 종동정을 한번의 PCR로 가능케 하여 주목받고 있다.

본 연구에서 이 Lis-mix multiplex PCR법을 우유 및 육류의 식품검사에 적용하기 위하여 제반 실험조건을 검토하여 실용적인 표준 실험법을 만들고자 하였으며, 이를 다양한 시료에서 수집된 *Listeria*균주에 적용하여 그 유용성을 증명하고자 하였다. 또한 종래의 Lis-mix multiplex PCR에서 미흡하였던, *L. ivanovii*의 검출법을 새로이 개발하여 비병원성 균인 *L. seeligeri*, *L. welshimeri*와 구별할 수 있는 종동정 방법으로 사용하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 재료

본 연구에서 사용된 표준균주는 모두 독일의 Würzburg 대학으로부터 제공받았으며, 식품에서 분리한 균주들은 모두 수입 축산물 및 축산가공품으로부터 수집한 것으로서 국립수의과학검역원에서 생화학적 동정을 마친 것이다. 공시균주는 총 69개의 균주를 이용하였다(Table 1).

본 실험에서 사용된 시약으로는 chromosomal DNA isolation에 사용된 SDS(Sodium dodecyl sulfate)와 saturated phenol은 Sigma(U.S.A)사, Ethanol은 Hayman(England), chloroform과 NaOH, Na-acetate는 Junsei(Japan)사의 제품을 사용하였다. Polymerase Chain Reaction(PCR) 관련 시약은 진 클론(Korea), Promega(USA)사의 제품을 사용하였으며, synthetic oligonucleotide는 바이오닉스(Korea)사에 합성을 의뢰하여 사용하였다. 유전자 조작에 사용된 제한효소는 MBI fermentas(Lithuania)사의 제품을 사용하였다.

본 실험에서 균주 배양을 위한 배지로서 BHI(Brain Heart Infusion)는 Difco(USA)사의 제품을 사용하였으며, *Listeria* 선택배지인 L-PALCAM *Listeria* selective enrichment broth는 MERCK(Germany)사의 제품을 사용하였다.

Oligonucleotide primers

본 실험에 사용된 primer는 *Listeria iap* 유전자에서 유래된 것으로 각기 Mugra, MonoA, Ino, Siwi, IVA, IVA2, IVA3, SEE, SEL2, SEL3, WEL, LisB라 명명 되었으며 그 염기 서열은 Table 2와 같다.

또한 Lis-mix Multiplex PCR에 사용된 Lis-mix는 Mugra, MonoA, Ino, Siwi, LisB를 일정 비율로 혼합하여 사용하였으며, Lis-mix를 이용한 multiplex PCR에서 동일한 size의 PCR product가 나타나는 병원성인 *L. ivanovii*와 비병원성균

Table 1. Number of *Listeria spp.* isolated from foods.

<i>Listeria spp.</i>	number
<i>Listeria monocytogenes</i>	59
<i>Listeria innocua</i>	3
<i>Listeria ivanovii</i>	2
<i>Listeria welshimeri</i>	5
Total	69

Table 2. Sequence of Oligonucleotide used Multiplex PCR for detection of *Listeria spp.*

Oligonucleotide name	Sequence(5'→3')	Specific binding <i>Listeria spp.</i>
Mugra	CCA GCA GTT TCT AAA CCT GCT(21)	<i>L. grayi</i>
MonoA	ACT AGC ACT CCA GTT GTT AAA C(22)	<i>L. monocytogenes</i>
Ino	CAA ACT GCT AAC ACA GCT ACT(21)	<i>L. innocua</i>
Siwi	TAA CTG AGG TGC AAG CGA A(19)	<i>L. ivanovii</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i>
IVA	TAC TAC TGT AAC AAG TGC CCC(21)	<i>L. ivanovii</i>
IVA2	TAC AAA CTC TAA TGC TAG CC(20)	<i>L. ivanovii</i>
IVA3	AAC AAG TGC CCC TGC ACC(18)	<i>L. ivanovii</i>
SEE	GAA ACT AAA ACA ACT GCT CC(20)	<i>L. seeligeri</i>
SEL2	GCA ACT ACT GAA AAA GAT GCA G(22)	<i>L. seeligeri</i>
SEL3	TGC AAG TGC AAT CAT TGC C(19)	<i>L. seeligeri</i>
WEL	GAA ACT TCT ACT CCA GTG GT(20)	<i>L. welshimeri</i>
LisB	TTA TAC GCG ACC GAA GCC AA(20)	Reverse primer for all <i>Listeria spp.</i>

인 *L. seeligeri*, *L. welshimeri*의 detection을 위해 IVA3, SEL3, WEL, LisB를 일정 비율로 혼합한 Siw-mixIII로 명명한 primer-mix를 사용하였다.

Lis-mix Multiplex PCR의 표준균주에서의 최적조건

SDS/Phenol treatment/Ethanol precipitation법을 사용하여 chromosomal DNA를 순수분리하고, 그 DNA 1 µl를 주형으로 하여, 여기에 Lis-mix 2 µl(20pM/µl), dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 0.5 µl(2.5 mM each), 10PCR buffer 10 µl(MgCl₂ 15 mM), Taq polymerase 1 µl(1.25 unit/µl)를 가하여 멸균한 3차 증류수로 총량이 100 µl가 되게 하고 GeneAmp PCR system 9600(PERKIN ELMER, U.S.A)으로 PCR 반응을 실시하여 Lis-mix에서의 *Listeria* 균주 6종의 PCR detection 효율성을 확인하였다.

최적의 온도조건을 설정하기 위한 실험결과, Lis-mix PCR의 최적 조건은 denaturation 94°C 30초, annealing 50°C 30초, extention 72°C 1분의 순서로 30cycle 반응을 진행하는 것이, 또한 최초 pre-denaturation 94°C에서 3분, 최종 extention 72°C에서 5분 진행이 가장 유리한 것으로 나타났다. 위의 PCR product를 1.2% agarose gel로 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator 상에서 PCR 반응 결과를 확인하였다.

L. ivanovii, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*의 검출을 위한 SIW-mixIII Multiplex PCR

L. ivanovii, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*는 Lis-mix multiplex PCR을 수행할 경우 같은 크기의 PCR product가 생성되기 때문에 각각의 종동정을 할 수 없다. 따라서 본 연구에서는 병원성균인 *L. ivanovii*와 비병원성균인 *L. seeligeri*, *L. welshimeri*를 분리 검출하기 위하여 Siw-mixIII를 이용하여 한번의 PCR을 통해 *L. ivanovii* 검출할 수 있는 반응법을 개발하였다.

PCR에 사용된 주형 DNA는 간단히 균주배양액을 1분간 끓인 후 원심분리하여 상등액 1 µl를 사용하였으며, 여기에 Lis-mix 2 µl(20pM/µl), dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 0.5 µl (2.5mM each), 10PCR buffer 10 µl(MgCl₂ 15 mM), Taq polymerase 1 µl(1.25unit/µl)를 가하여 멸균한 3차 증류수로 총량이 100 µl가 되게 하고 PCR 반응을 실시하여 1.2 kb의 PCR product를 확인하였다. 1.2kb의 PCR product가 확인된 시료에 대하여 그 PCR product 1 µl를 주형으로 하여, Siw-mixIII 2 µl(10pM/µl), dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 0.5 µl(2.5 mM each), 10PCR buffer 10 µl(MgCl₂ 15 mM), Taq polymerase 1 µl(1.25unit/µl)를 가하여 멸균한 3차 증류수로 총량이 100 µl가 되게 하고 GeneAmp PCR

system 9600(PERKIN ELMER, U.S.A)으로 PCR 반응을 실시하여 *L. ivanovii*와 *L. seeligeri*, *L. welshimeri*의 검출을 비교하였다.

PCR 분석 조건은 denaturation 94°C 30초, annealing 50°C 30초, extention 72°C 1분의 순서로 30cycle 반응을 진행하고 최초 pre-denaturation 94°C에서 3분, 최종 extention 72°C에서 5분 진행하였다.

Gradient PCR을 이용한 *L. ivanovii*의 최적 검출 조건 검사

Listeria 균주 중 *L. ivanovii*만을 특이적으로 검출하기 위한 PCR 조건을 확립하기 위하여 Gradient PCR을 수행하였다. Gradient PCR 조건은 annealing 온도 조건을 40°C ~70°C에서 조사하였다. 최종적으로 온도범위를 좁혀 최적 annealing 온도를 측정하였으며, 각 12개의 PCR을 동시에 수행하였다. PCR 반응에 사용된 주형 DNA는 열처리를 통해 간단히 분리하였고, 그 중 0.5 µl를 사용하였으며, 여기에 primer로 *L. ivanovii*에 대한 특이적 primer인 IVA3 0.5 µl (20pM/µl), reverse primer(LisB) 0.5 µl(20pM/µl), dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 0.5 µl(2.5 mM each), 10PCR buffer 5 µl(MgCl₂ 15 mM), Taq polymerase 1 µl(1.25unit/µl)를 가하여 멸균한 3차 증류수로 총량이 50 µl가 되게 하고 Master-cycler gradient(Eppendorf사, Germany)로 PCR 반응을 실시하여 PCR 최적 조건을 확립하였다.

PCR 분석 조건은 denaturation 94°C 30초, annealing 49°C~70°C 1분 30초, extention 72°C 1분의 순서로 30cycle 반응을 진행하고 최초 pre-denaturation 94°C에서 3분, 최종 extention 72°C에서 5분으로 진행하였다.

Lis-mix Multiplex PCR 반응을 위한 Chromosomal DNA isolation Method 비교

열처리를 통한 DNA 분리 방법으로는 각각의 균주 1.5 ml를 micro-tube에 담아서 2분간 12000rpm으로 원심분리 후 상등액을 제거하고, 100 µl 1XPCR buffer(MgCl₂ 15 mM)를 넣고 부유하여 100°C 에서 5분간 cell을 파괴 시킨 후 12000rpm으로 5분간 원심분리후 즉시 ice에 정치하여 상등액을 DNA template로서 각각 1 µl를 사용하여 PCR 반응을 실시하였다. 또한 각각의 균주를 SDS/Phenol treatment/Ethanol precipitation법을 2가지 방법으로 변형시켜 Chromosomal DNA isolation하여 DNA template로서 1 µl를 사용하여 PCR 반응(PERKIN ELMER 9600)을 실시함으로써 첫 번째 방법과 효율성에 대한 비교 실험을 실시하였다.

SDS/Phenol treatment/Ethanol precipitation법의 변형 실험은 첫째, SDS/Phenol treatment/Ethanol precipitation법

전 과정을 수행하였고 둘째, SDS처리 후 Phenol treatment 과정 중 saturate phenol처리를 한 후 원심분리하여 상등의 solution을 3분간 재 원심분리하고 상등의 solution을 DNA template로 사용하여 비교 실험을 하였다.

식품에 대한 Lis-mix multiplex PCR 검출법의 효율성 검사

유가공품 및 육가공품등에서 추출한 sample을 이용하여 Lis-mix multiplex PCR 검출법과 SIW-mixIII multiplex PCR 검출법의 효율성을 검사하였다.

국립수의과학검역원에서 수입 육류 및 육류 가공제품으로부터 채취한 균주들에 대해 생화학적 검사를 마치고 *L. monocytogenes*로 판정된 총 69개의 균주를 표준균주와 같은 조건하에서 배양하여 chromosomal DNA를 순수분리하고 그 중 1 μ 를 template로 사용하여 1차적으로 Lis-mix multiplex PCR을 수행한 후 1.2kb의 PCR product가 확인된 sample은 1차 PCR의 product를 template로 하여 SIW-mixIII multiplex PCR을 수행하였다.

결과 및 고찰

Lis-mix Multiplex PCR의 표준균주에서의 최적조건

본 실험에서 얻어진 최적의 조건에서 수행된 Lis-mix multiplex PCR은 480bp의 *L. grayi*, 660bp의 *L. monocytogenes*, 870bp의 *L. innocua*의 PCR product를, 동일한 size인 1.2kb의 *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*의 PCR product를 확인할 수 있었다. 또한 동일 조건에서 annealing 온도 만을 변화시켰을 경우 48°C-52°C 수준에서는 유효한 결과를 볼 수 있었으며, polymerization시간을 단축시키는 것은 1.2kb의 *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*의 PCR product의 생성에 매우 불리한 것으로 나타났다. 따라서 Lis-mix를 이용한 *Listeria* 6종의 PCR 종동정은 정확성이 매우 높은 것으로 나타났다. 그러나 이 Lis-mix를 이용한 multiplex PCR에서는 *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*를 종동정할 수는 없었다(Fig. 1).

L. ivanovii, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*의 검출을 위한 SIW-mixIII Multiplex PCR

L. ivanovii, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*의 종동정은 Lis-mix를 이용하여 1차 검출을 한 후, 이를 주형으로 하여, 또는 바로 균주의 chromosomal DNA를 주형으로 하여 Siw-mix III multiplex PCR을 수행하였다. PCR 산물의 크기는 각 균주에 따라 1.1kb의 *L. ivanovii* PCR product, 477bp의 *L. seeligeri* PCR product, 779bp의 *L. welshimeri* PCR

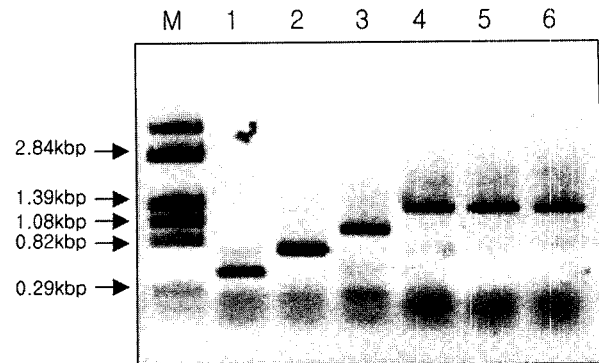


Fig. 1. A detection of *Listeria spp.* by using Lis-mix multiplex PCR

For electrophoresis 1.2% agarose gel was used with 1XTAE buffer. Lane M is the marker that PS44 digested by *Bam*HI and *Hind*III. lane 1 is multiplex PCR product of *L. grayi*(0.48kbp), lane 2 is multiplex PCR product of *L. monocytogenes* (0.66kbp), lane 3 is multiplex PCR product of *L. innocua*(0.87kbp), lane 4 is multiplex PCR product of *L. ivanovii*(1.2kbp), lane 5 is multiplex PCR product of *L. seeligeri*(1.2 kbp), lane 6 is multiplex PCR product of *L. welshimeri*(1.2kbp).

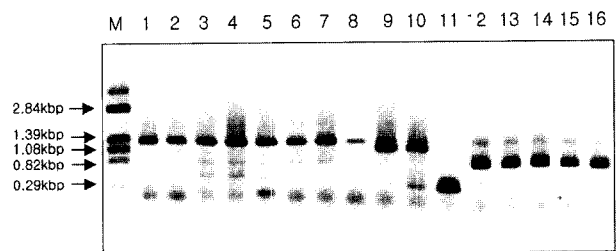


Fig. 2. A detection of *L. ivanovii* by SIW-mixIII multiplex PCR. lane M is the marker that PS44 digested by *Bam*HI and *Hind*III, lane 1 and 2 is PCR product of *L. ivanovii* (1.2kbp) used Lis-mix, lane 3 is PCR product of *L. seeligeri*(1.2kbp) used Lis-mix, lane 4-8 is PCR product of *L. welshimeri*(1.2kbp) used Lis-mix, lane 9 and 10 is PCR product of *L. ivanovii*(1.1kbp) used Siw-mixIII, lane 11 is PCR product of *L. seeligeri*(477bp)used Siw-mixIII, lane 12-16 is PCR product of *L. welshimeri* (779bp) used Siw-mixIII.

product를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Siw-mixIII를 이용한 PCR에 사용되는 template는 Lis-mix를 이용한 PCR에서 얻어진 PCR product이기 때문에 Siw-mixIII를 이용한 PCR 결과에서 1.2kb의 template band를 확인할 수 있다.

Gradient PCR을 이용한 *L. ivanovii*의 최적 검출 조건

*Listeria*균주중 *L. ivanovii*만을 특이적으로 검출하기 위한 PCR 조건을 확립하기 위하여 Gradient PCR을 수행하였다.

Fig. 3은 Gradient PCR 중 annealing 온도 조건을 49°C ~70°C로 설정 후 PCR을 수행한 것이며, annealing 온도 조건 65°C의 상하 5°C 이상에서도 specific한 PCR product를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 안정적 annealing온도 조건 하에서 65°C를 annealing 최적 조건으로 선정하였다.

Lis-mix Multiplex PCR 반응을 위한 chromosomal DNA isolation 방법

*Listeria*에 대한 multiplex PCR 검색에 사용하는 DNA template를 보다 간단하게 추출하기 위해 3가지 방법을 비교 실험하였다(Fig. 4). 3가지 방법에서 약간의 차이는 볼 수 있었으나, 모든 실험에서 *Listeria*를 PCR을 통해서 무리 없이 검출할 수 있었다.

Fig 4의 (a)의 경우 SDS/Phenol treatment/Ethanol precipitation법 전 과정을 수행하여 DNA를 회수한 후 multiplex PCR 반응을 수행 한 결과이며, (b)의 경우 SDS처리 후 Phenol treatment 과정 중 saturate phenol처리만을 한 후 원심분리하여 상등의 solution을 3분간 재 원심분리하고 상등의 solution을 DNA template로 사용하여 multiplex PCR을 수행 한 결과이며, (c)는 균주를 원심분리를 통해 수거한 후 열처리를 통하여 DNA를 회수한 후 multiplex PCR을 수행 한 결과이다.

따라서, 검출하려는 시료에서 PCR 반응에 사용하는 DNA template를 보다 빠른 시간에 간단히 추출하기 위한 방법으로, 100°C에서 5분간 열처리와 원심분리 후 상등액을 사용하는 것이 가장 간편하며, 또한 유용한 것으로 나타났다. 이

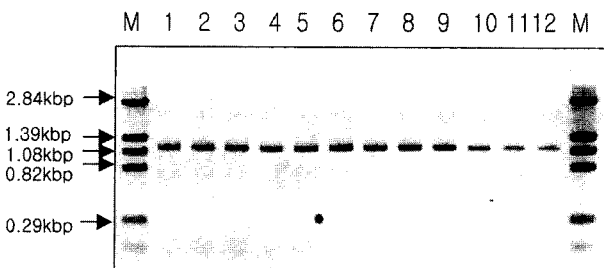


Fig. 3. Gradient PCR for the detection of *L. ivanovii* using IVA3 and LisB primers

lane M is the marker that PS44 digested by *Bam*HI and *Hind*III, lane 1 is PCR product of *L. ivanovii*(1.1kbp) that annealing temperature of PCR is 49.2°C. lane 2 is 51.5°C, lane 3 is 54.1°C, lane 4 is 56.8°C, lane 5 is 59.5°C, lane 6 is 62°C, lane 7 is 64.1°C, lane 8 is 65.7°C, lane 9 is 66.5°C, lane 10 is 68.1°C, lane 11 is 69.7°C, lane 12 is 70.5°C.

방법은 다음의 식품검사에서 *Listeria*를 검출하는 실험에 사용하였다.

식품에 대한 multiplex PCR 검출법의 효율성

본 실험에 의해 도출된 최적 조건에서 Lis-mix multiplex PCR을 다양한 국가에서 수입된 총 69종의 *Listeria* 균주를 대상으로 그 중 동정능력을 실험하였다. 이 균주들은 모두 생화학적 검사에서 *L. monocytogenes*로 1차 분류된 것이었으나, 본 실험결과 *L. monocytogenes*로 확정된 것은 59균주, *L. innocua*로 판정된 것은 3균주, *L. ivanovii*로 판정된 것은

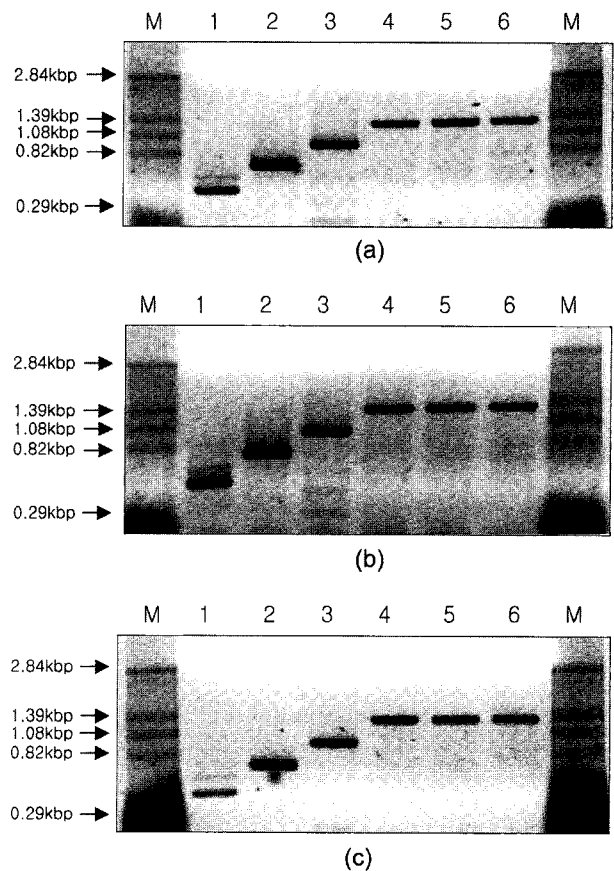


Fig. 4. Lis-mix multiplex PCR of *Listeria* spp. with chromosomal DNA that were isolated by different methods.

(a) Multiplex PCR of *Listeria* spp. with DNA template isolated by SDS/Phenol/Et-OH method, lane M is the marker that PS44 digested by *Bam*HI and *Hind*III. lane 1 is *L. grayi*(0.48kbp), lane 2 is *L. monocytogenes*(0.66 kbp), lane 3 is *L. innocua*(0.87kbp), lane 4 is *L. ivanovii* (1.2kbp), lane 5 is *L. seeligeri*(1.2kbp), lane 6 is *L. welshimeri*(1.2kbp). (b) Multiplex PCR product of *Listeria* spp. with DNA template that were isolated by modified SDS/Phenol/Ethanol method., (c) Multiplex PCR product of *Listeria* spp with DNA template isolated by Boiling method.

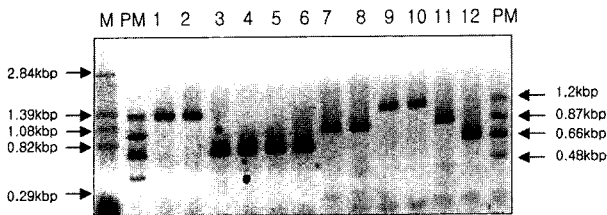


Fig. 5. A detection of *Listeria* spp. by Lis-mix multiplex PCR using field samples

lane M is the marker that PS44 digested by *Bam*HI and *Hind*III, lane PM is the PCR product mix of *L. grayi* (0.48kbp), *L. monocytogenes*(0.66kbp), *L. innocua*(0.87kbp), *L. ivanovii*(1.2kbp). lane 1~12 is the Lis-mix multiplex PCR product with the NVRQS samples. Lane 3,4,5,6,12 were detected as *L. monocytogenes*(0.66kbp), lane 7,8,11 were detected as *L. innocua*(0.87kbp), lane 1,2,9,10 were detected as *L. ivanovii* or *L. seeligeri* or *L. welshimeri*(1.2kbp).

2균주, *L. welshimeri*로 판정된 것은 5균주로 나타났다(Fig. 5). 생화학적 검사로써 *L. monocytogenes*로 판정된 총 69개의 균주 중 10균주가 본 Lis-mix PCR법으로 다른 *Listeria*

균주로 판정된 것이며, 타 균주로 판정된 것들은 모두 후속적인 염기서열결정방법에 의하여 본 Lis-mix PCR방법에 의한 판정이 정확한 판정임을 보여 주었다(자료 미제시).

본 연구에서 *Listeria*속의 6종을 식품 시료로부터 쉽게 종동정할 수 있는 방법으로, 신속하고 정확한 multiplex PCR을 이용한 실용적 검색방법을 제안하였다. 이 방법은 전 세계에서 국내로 수입된 육류 시료에서 분리된 총 69개의 균주에 대하여 *Listeria* 검색 및 종동정을 수행하여 기존의 생화학적 종동정 방법을 크게 능가하는 정확성을 증명하였을 뿐 아니라, Bubert 등(1999)이 제안한 기존의 Lis-mix multiplex PCR방법에서 불가능하였던 *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*를 또 한번의 PCR로 쉽게 동정할 수 있음을 보여 주었다.

감사의 글

본 연구는 농림특정연구과제(SGRP 198043-3)의 연구비 지원과 경기대학교 교내연구비의 지원에 의하여 수행되었으며, 저자들은 상기 연구비 지원에 감사드리는 바이다.

국문요약

*Listeria monocytogenes*와 *L. ivanovii*는 인간과 동물에 대한 식품 유래성 병원성 세균이다. *Listeria* 속에는 이들 병원균 외에 비병원성세균인 *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* 등이 포함되어 있기에, 식품검사에서 배양법을 사용하는 종래의 *Listeria*의 검출방법은 시간과 많은 실험을 필요로 한다. 이런 이유 등으로 *Listeria*의 종동정과 검출을 위한 신속한 검출법으로 Lis-mix multiplex PCR 검출법(Bubert et al., 1999)이 개발되었다. 본 연구에서는 식품검사에 활용하기 위한 실용적인 Lis-mix multiplex PCR 방법을 개발하고, 아울러 새로운 Siw-mixIII PCR 검출법을 개발하였다. 이 방법을 사용하여 식품에서 분리된 총 69개의 *Listeria* 균주를 성공적으로 종동정할 수 있었으며, Siw-mixIII multiplex PCR방법을 사용하여 *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*를 한번의 PCR로 검출 및 종동정을 할 수 있었다.

참고문헌

1. Anonymous. 1895. Listeriosis outbreak associate with Mexicanstyle cheese. *California Morbid Mortal Weekly Report*, **34**, 357.
2. Bessesen, M.T., Lus, O., Rotbart, H.A., Blaser, M.J., Ellison, R.T. 1990. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2930.
3. Bubert, A., S. Koehler, W. Goebel. 1992. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genes and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2625.
4. Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B.S., Goebel, W and Wagner, M. 1999. Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4688.
5. Baetz AL., Wesley IV., Stevens MG. 1996. The use of listeriolysin O an ELISA, a skin test and a lymphocyte blastogenesis assay on sheep experimentally infected with *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* or *Listeria innocua*. *Vet. Microbiol.* **51**(1-2), 151-9.
6. Chung Ho Ryu, Sung Hwan Cho, Satoshi Inoue, Shizunobu Jgimi, Susumu Kumagai. 1996. The Most Specific Primers for the Identification of *Listeria monocytogenes* by the Polymerase Chain Reaction Method. *Food. Biotech.* **5**, 30.

7. Curtis, G.D. W., R.G. Mitchell, A.F.King, E.J.Griffin. 1989. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**, 95.
8. Fhrber, J.M. and P.I.Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*. a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**, 476-511.
9. Fleming, D. W., S.L. Coshi, K. L. MacDonald, J. Brondum, P. S. Hayes, B. D. Pikaytis, M. B. Holmes, A. Audurier, C. V. Broome, A. L. Reingold. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* **312**, 404-407.
10. Fluit, A.C., R. Torensma, M.J. Visser, C.J. Aarsman, M.J. Poppelier, B.H. Keller, P. Klapwijk, and J. Verhoef. 1993. Detec-tion of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1289-1293.
11. Furrer, B., U. Candiran, C. Hoefelein, and J. Luethyl. 1991. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of hemolysin gene fragments. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 372-379.
12. Gentschev, I., Z. Sokolovic, S. Koehler, G. F. Krohne, H. Hof, J. Wagner, and W. Goebel. 1992. Identification of p60 antibodies in human sera and presentation of this listerial antigen on the surface of attenuated Salmonella by the HLYB-HLYD secretion system. *Infec. Immun.* **60**, 501.
13. Gilbert, R. J. and P. N. Pini. 1988. Listeriosis and food-borne transmission. *Lancet* **1**, 472.
14. Karven, J. C., Takeaki Nishibori, Huabao Xiong, Tohry Matsuyama, Masashi Fujita, Masao Mitsuyama. 1994. Method of multiple Virulence-Associated Genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated Milk Samples. *Appl. Eviron. Microbiol.* **60**, 3023.
15. Kim, C. M., L. M. Graves, B. Swaminathan, L. W. Mayer, and R. E. Weaver. 1991a. Evaluation of hybridization characteristics of a cloned pRF106 probe for *Listeria monocytogenes* detection and development of a noninsotopic colony hibridization assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 289.
16. Kim, C. M. and S. S. Yoon. 1993. Development of a chemiluminescent DNA probe assay for identifying of *Listeria monocytogenes*. *Food. Biotech.* **2**, 68.
17. Klinger, J. D. 1988. Isolation of *Listeria*; a review of procedures and future prospects. *Infection* **16** : suppl 2, 98.
18. Linnan, M. J. 1988. Epidemic listeriosis associated with mexican style cheese. *N. Engl.J.Med.* **319**, 823.
19. Lossner, M. J., R. H. Bell, J. M. Jay, and L. A. Shelef. 1988. Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria spp.* *App. Environ. Microbiol.* **54**, 3003.
20. Marth, E. H. and E. T. Ryser. 1990. Occurrence of *Listeria* in food: milk and dairy foods, P. 151-164. In A. L. Miller, J. L. Smith, and G. A. Somkuti (ed.), Foodborne listeriosis. *Elsevier Science publishers, Amsterdam*.
21. Manzano, M., Cocolin, L., Cantoni, C., and Comi, G. 2000. Temperature gradient gel electrophoresis of the amplified product of a small 16S rRNA gene fragment for the *Listeria* species isolated from food. *J. Food. Prot.* **63**(5), 659-61.
22. Mattingly, J. A., B. T. Butman, M. C. Plank, R. J. Curham, and B. J. Robinson. 1988. Rapid Monoclonal antibody based enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Listeria* in food products. *J. Asso. Off. Anal. Chem.* **71**, 679.
23. Niederhauser, C., U. Candrian, C. Hofelein, M. Jerminal, H. P. Buhler, and J. Luthy. 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monosytogenes* in food. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1564-1568.
24. Pini, P. N. and R. J. Gilbert. 1988. The occurencw in the United Kingdum of *Listeria* species in raw chickens and soft cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **6**, 317.
25. Ramage, C.P., Low, J.C., McLauchlin, J., and Donachie, W. 1999. Characterisation of *Listeria ivanovii* isolated from the UK using pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS. Microbiol. Lett.* **15**; 170(2) : 349-353.
26. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Purification of Plasmid DNA. In *Molecular cloning. 2nd Ed. 1.2.0.CSH.*
27. Schlech, W. F., P. M. Lavigne, R. A. Bortolussi, A. C. Allen, E. V. Haldane, A. J. Wort, A. W. Hightower S. E. Johnson, S. H. King, E. S. Nicholls, and C. V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* **308**, 203.
28. Schwarz, B. 1988. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. *Lancet* **2**, 779.
29. Seeliger,H.P.R. and Jones, D. 1986. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, 1235-1245.
30. Seelger, H.P.R. 1988. Listeriosis-history and actual development. *Infection* **16**, 82.
31. Sizmur, K., C.W.Walker. 1988. *Listeria* in prepacked salads. *Lancet* **1**, 1167.
32. Terplan, G., R. Schoen, W. Springmeyer, I. Degle, and H. Becker. 1986. Vorommen, Verhalten and Bedeutung von Listerien in Milch and Milchprodukten. *Arch. Lebensmittelhyg.* **37**, 129.
33. Wang, R. F., W. W. Cao, M. G.Johnson. 1992. 16s rRNA based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 121.
34. Wernars, K., K. Heuvelman, S. Notermans, E. Domann, Leimeister-Wachter, and T. Chakraborty. 1992. Suitability of the *prfA* gene, which encodes a regulator of virylence genes in *Listeria monocytogenes*, in the identification of pathogeneic *Listeria spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 765-768.
35. 윤병수. 1995. *Manual of Methods for Molecular Genetics.* 13-14, 20-21.