KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 34, No. 6, pp. 1134~1139 (2002)

연구노트

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

©The Korean Society of Food Science and Technology

*Campylobacter jejuni, C. coli, Arcobacter butzleri*와 *Helicobacter pylori*의 PCR에 의한 분리검출

이영덕 · 박종현*
경원대학교 식품생물공학과

Selective Detection of *Campylobacter jejuni, C. coli, Arcobacter butzleri* and *Helicobacter pylori* by Polymerase Chain Reaction

Young Duck Lee and Jong-Hyun Park*
Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University

Campylobacter, Arcobacter,* and *Helicobacter,* classified into the same rRNA superfamily VI by taxonomy, cause food-borne diseases, stomach ulcer, and gastric cancer. To detect each strain selectively from contaminated foods, PCR, multiplex-PCR, and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were applied on *Campylobacter, Arcobacter,* and *Helicobacter.* The same PCR products could be detected using CHA primer targeted for 16S rRNA of *Campylobacter, Arcobacter,* and *Helicobacter.* To detect *C. jejuni* and *C. coli* from *A. butzleri* and *H. pylori*, pg50/pg3 primer targeted for *fla A* gene was used, and for *A. butzleri*, Arco2/Butz primer targeted for 23S rRNA was utilized. For *H. pylori* detection, icd1/icd2 primer targeted for isocitrate dehydrogenase gene was employed, and JEJ1/JEJ2 primer targeted for *ceuE* gene was effective for *C. jejuni* detection from the three strains. *C. jejuni* and *C. coli* could be separated from *A. butzleri* and *H. pylori* through PCR-RFLP using restriction enzyme *Dde* I. Such primers would be effective for detecting each strain selectively through PCR when *C. jejuni, C. coli, A. butzleri* and *H. pylori* are contaminated together.

Key words: *Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter,* PCR, identification

서 론

식품위생법규상으로 food-borne pathogen으로 *Salmonella, Staphylococcus aureus, Vibrio parahaemolyticus, Bacillus cereus, Campylobacter jejuni, Clostridium perfrigens, C. botulinum, E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica* 등이 주로 관리되고 있다.

이 중 *Campylobacter*에 의한 감염은 미국, 영국, 호주 등의 서구 선진국의 경우 *Salmonella, E. coli* O157:H7 등의 food-borne pathogen과 비교했을 때 유사하거나 계속해서 증가하고 있는 추세이다[1~2]. 그러나 국내에서는 그 연구가 활발히 진행되고 있지 않으나 나이에 따라 전체 장염환자의 0.4~30.5%까지 분리율을 나타낸다는 보고[3]가 있어 국내에서도 역시 그 위해성은 증대되고 있다. *Campylobacter* spp. 중 *C. jejuni, C. coli*는 세균성 설사증 뿐만 아니라 최근에는 급성염증 다발신경병인 Guillain-Barre syndrome[4~6]을 일으켜 심한 경우 사망까지 일으킬 수 있다. Campylobacter는 미호기적 조건에서 생육이 가능하고[7~9] oxygen stress, pH, temperature, A_w 등에 의해서 형태가 spiral-rod에서 coccoid 모양으로 변하는 특성이 있다. 이러한 coccoid 형태는 살아있지만 배양할 수 없는 세포(viable-but nonculturable cell: VBNC)[10~12]가 되는 것으로 알려져 있다. *Campylobacter*가 VBNC 상태로 존재할 때는 *in vitro* 상에서 검출이 되지 않기 때문에 전통적인 배양법으로는 배양에 문제가 있어 현재 식품공전에 있는 방법으로의 검출은 한계가 있고 각종 육류나 수입품의 검사에 어려움이 있다.

이와 같은 *Campylobacter*는 분류학적으로 *Arcobacter, Helicobacter* 등과 같이 rRNA super family VI로 분류되고 있다[13]. 그러나 최근에는 이들 *Arcobacter, Helicobacter*도 식중독 및 위암등의 건강장애를 유발시키고 있는 것으로 알려지고 있다[14].

*Arcobacter*는 현재 newly emerging pathogen으로 *Campylobacter, Yersinia* 등과 함께 최근에 중요하게 부각되고 있는 food-borne pathogen이다. *Arcobacter*는 처음에 *Campylobacter cryaerophila*로 분리되어 명명되어지다가 생리적인 특성과 분자생물학적 차이에 의해 *Arcobacter*로 재분류되었다. *Arcobacter* spp.는 *A. butzleri, A. cryaerophilus, A. skirrowii* 3개

*Corresponding author : Jong-Hyun Park, Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Sujeong-Gu, Seongnam-Si, Kyunggi-Do 461-701 Korea
Tel: 82-31-750-5523
Fax: 82-31-759-5273
E-mail: p5062@mail.kyungwon.ac.kr

가 주로 병원성을 일으키고[15-16], 이 중 *A. butzleri*가 인체 내에서 발병시키는 주 원인균이며, 이것들은 주로 인체에 장염과 패혈증을 유발시킨다. 이렇듯 *Arcobacter*는 *Campylobacter*와 유사한 특성을 가지고 있으면서 생리특성이 aerotolerant하며, 저온에서도 생육이 가능며 *Campylobacter*보다 오염의 가능성이 더 높기 때문에 감염의 가능성도 더욱 높을 것이다.

*Helicobacter*는 사람과 동물에게 장염, 위염, 유산을 일으키며, *Helicobacter*들은 숙주동물이나 감염부위가 약간씩 상이하다[17]. *Helicobacter*중 인체에 가장 많은 감염을 일으키는 것은 *H. pylori*로 위점막에 주로 존재하며, 위궤양, 십이지장궤양, 위암 등의 원인균으로 알려져 있다[18-21]. 그리고 *Campylobacter*와 마찬가지로 생육 조건이 어렵게 되면 coccoid 형태의 VBNC 상태로 존재[6]를 하게 되는데, 예를 들면 물에서 이러한 VBNC 형태로 아주 오랜기간 생존할 수 있다[22-23].

*Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter*는 그 생리특성이 유사하여 같은 family로 분류되어 있고 같이 식품에 존재할 때 서로 쉽게 구분 지어 분리될 수 없다. 더구나 이들 균주는 식품 중에 오염되어 VNBC 상태로 있을 때는 검출할 수 없어 PCR에 의한 검출이 요망된다. 현재 3속 중에서 사람에게 주요한 질병을 일으키는 *C. jejuni, C. coli, A. butzleri, H. pylori*의 검출을 위한 PCR primer들이 각각은 개발[24-30]되어 있으나 이들 균주 들이 서로 혼합되어 있을 때 이들이 효과적으로 신속히 분리 검출될 수 있는지에 대한 연구는 아직 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 rRNA superfamily VI이며 주된 병원성 균인 *C. jejuni, C. coli, A. butzleri, H. pylori*의 선택적 검출 및 각각의 종 및 속을 확인을 위해 PCR, multiplex-PCR 및 restriction fragment length polymorphism의 기법을 이용한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 생육 조건

실험을 위한 표준균주로는 *C. jejuni* ATCC 33291, *C. jejuni* ATCC 43429, *C. jejuni* A74/C, *C. coli* ATCC 43472. *A. butzleri* ATCC 49616, *A. cryaerophilus* ATCC 43158, *H. pylori* KCCM 41351를 사용하였다. 그리고 야생형의 분리균으로 생계육에서 분리한 *C. coli* 5주, *Campylobacter* spp. 2주, *A. butzleri* 5주와 돼지고기에 분리한 *A. butzleri* 2주를 사용하여 실험하였다. *Campylobacter, Arcobacter*는 평판배양으로 Mueller Hinton agar(Difco, MB, USA)에 5% defibrinated sheep blood(Komed, Sungnam, Korea)를 첨가하여 사용하였으며, *H. pylori*는 plate culture로 Mueller Hinton agar에 10% horse blood를 첨가하여 사용하여, anaerobic jar(Difco, MB, USA)에 Campy pack(BBL, MD, USA)을 넣고, 37°C CO_2 항온기에서 2 일간 배양하거나 microaerobic chamber인 Bug box(Ruskinn, West Yorkshire, UK)에서 배양하였다.

Polymerase chain reaction 조건

Primer 합성 및 시료조제: PCR을 위한 primer는 commercial company(Genotech and Bioneer, Daejeon, Korea)에서 합성하였으며, primer의 염기서열은 Table. 1과 같다. PCR을 위한 template DNA는 whole cell을 사용하였다. 배양된 균을 0.85% 생리 식염수에 4 MacFarland unit으로 현탁한 후 2회 세척하고 다시 원심분리하여 상등액을 버리고 멸균 증류수 1/10 volume에 재현탁시켜 이것을 100°C, 5분간 처리해서 cell lysate[31]를 만들어 사용했다.

PCR 조건: *Campylobacter, Arcobacter*와 *Helicobacter*는 rRNA super family VI로, 16S rRNA를 target으로 하여 super family VI 확인하고, 각각의 균에 대한 16S rRNA를 target으로 하여 PCR를 수행하여 속명을 확인하였다. 그리고 *Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter* species 확인을 위해 *C. jejuni*는 *ceuE* gene을, *C. coli*는 *flaA*를 target으로, *A. butzleri*는 23S rRNA를, *H. pylori*는 isocitrate dehydroganse gene을 각각 target으로 하여 PCR을 수행하였다. PCR은 1U thermostable DNA polymerase, 250 μM의 dNTP, 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 40 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$를 포함하는 PCR PreMix에 20 pmol의 primer와 2 μL의 cell lysate를 분주해서 mixture tube를 만들어 이것을 Gene cycler(BioRad, California, USA)로 옮겨 실험하였다. 각각의 primer set에 따른 PCR을 수행하였다. PCR 후 PCR product 10 μL를 0.5 μg/mL ethidium bromide를 포함하는 TAE buffer에 1% agarose gel를 만들어 5 V/cm에서 전기영동을 한 하고 agarose를 UV transilluminator(Seolin Biotech, Suwon, Korea)에서 결과를 확인하였다.

*Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter*의 multiplex PCR을 통한 분리검출

*C. jejuni*와 *C. coli*는 primer set VII인 pg50, pg3와 *A. buzlrei*는 primer set V인 Arco 2, Butz를 사용하였다. *C. jejuni*와 *H. pylori*는 primer set VI인 JEJ1, JEJ2와 primer set III인 icd1, icd2를 사용하였으며, *A. butzleri*와 *H. pylori*는 primer set V인 Arco 2, Butz와 primer set III인 icd1, icd2를 사용하여 각각 multipex PCR을 수행하였다. PCR은 1 U thermostable DNA polymerase, 250 μM의 dNTP, 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 40 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$를 포함하는 PCR PreMix에 primer set VII와 primer set V를 각각 20 pmol의 primer와 2 μL의 cell lysate를 혼합해 Mixture tube를 제조하여 PCR에 사용하였다. PCR cycle은 *C. jejuni, C. coli, A. butzleri*는 predenaturation 94°C 4 min 후 94°C 30 sec, 50°C 1 min, 72°C 1 min을 30 cycle 반응 후 마지막으로 72°C 7 min동안 PCR을 수행하였다. *C. jejuni*와 *H. pylori*는 94°C 5 min 후 94°C 1 min 55°C 1 min 72°C 1 min 30 sec 동안 30 cycle 반응 후 72°C 3 min 반응하였으며, *A. butzleri*와 *H. pylori*는 94°C 5 min 반응 후 94°C 1 min 55°C 2 min, 72°C 2 min동안 30 cycle 반응 후 72°C 5 min간 반응하여 PCR을 수행하였다.

PCR-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)

*Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter*의 16S rRNA를 target gene으로 하여 primer set No. 1로 PCR을 수행한 후, PCR amplicon을 10 mL와 restriction endonuclease인 Dde I (Bioneer Co. Ltd, Taejon, Korea)을 10 U 첨가하여 총 반응

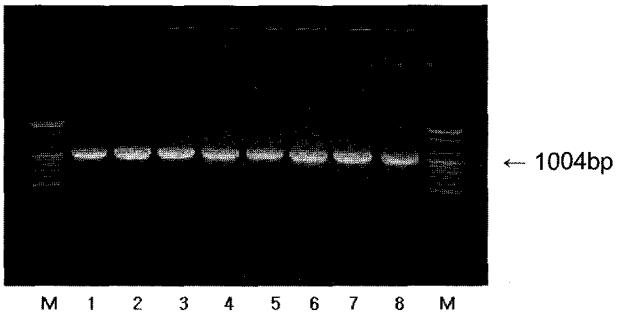

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis showing of PCR product with CHA primer from 16S rRNA of *Campylobacter, Arcobacter* and *Helicobacter*. Lane 1, *A. butzleri*; Lane 2, 3, *C. jejuni*; Lane 4, *C. coli*; Lane 5, IC* 39; Lane 6, IC 47; Lane 7, P** 14; Lane 8, *H. pylori*; M, 100 bp DNA ladder. IC*: *Campylobacter* isolated from chicken, P**: *Arcobacter* isolated from pork.

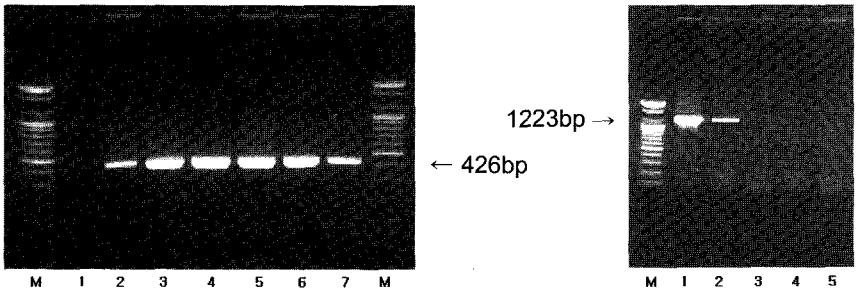

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis showing of PCR product with pA, pB primer from 16S rRNA of *Campylobacter* spp. and Arco I, Arco II primer from 16S rRNA of *Arcobacter* spp. (A) Lane 1, *A. butzleri*; Lane 2, 3, *C. jejuni*; Lane 4, *C. coli*; Lane 5, IC 39; Lane 6, IC 47; Lane7, IC 55; (B) Lane 1, *A. butzleri*; Lane 2, *A. cryaerophilus*; Lane 3, 4, *C. jejuni*; Lane 5, *C. coli*; Lane 6, *H. pylori*; M, 100 bp DNA ladder.

부피가 20 μL가 되게 하여 reaction tube를 heating block에서 60°C에서 24 min동안 처리한다. 반응액 10 μL를 0.5 μg/mL ethidium bromide를 포함하는 TAE buffer에 2 % agarose gel를 만들어 5 V/cm로 전기 영동을 수행 후 UV transilluminator에서 결과를 분석하였다.

결과 및 고찰

*Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter*의 PCR에 의한 동시검출

*Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter*의 16S rRNA를 target으로 하여 PCR을 수행한 결과는 Fig. 1과 같다.

rRNA superfamily VI[16]인 *Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter*의 16S rRNA를 target으로 하는 primer set I인 CAH 16S 1a, CAH 16S 1b로 PCR을 하였을 때 표준균주 및 야생형의 분리균 모두 1004 bp의 산물을 확인할 수 있었다. *Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter*는 인체에 모두 유해한 pathogen으로 국내에서는 *Helicobacter*의 경우 의학에서 연구가 활발히 진행되고 있으나, *Campylobacter, Arcobacter*와 관련되어서는 연구는 극히 미미하다. 본 실험에서 *Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter*의 16S rRNA를 이용한 PCR을 수행하여 이 균들을 동시에 검출이 가능한 것을 확인하였다.

Campylobacter 및 *Arcobacter*의 PCR에 의한 분리검출

***Campylobacter*의 검출:** *Campylobacter*의 16S rRNA를 target으로 하여 *C. jejuni, C. coli*, 야생형의 *Campylobacter*인 IC 39, IC 55 및 *A. butzleri*로 PCR을 수행한 결과는 Fig. 2(A)와 같다.

Campylobacter spp.의 16S rRNA를 target으로 하는 primer set II인 pA, pB으로 PCR을 수행한 결과 *C. jejuni*와 *C. coli* 및 분리균 3 주 모두 426 bp의 PCR product를 확인할 수 있었으나, *A. butzleri*에서는 PCR product를 검출할 수가 없었다. *Campylobacter*의 경우 현재 서구 선진국에서 많은 분리동정 방법들이 개발되고 있으나 국내에서는 주로 분리 후 생화학적 검사를 통한 동정을 많이 하고 있다. 하지만 *Campylobacter*의 생화학적 특성 및 약제 내성으로의 확인은 misidentification할 우려가 높을 것이다. 따라서 국내에서 분리된 *Campylobacter*를 바탕으로 다양한 분자생물학적 기법의 개발이 필요할 것이라 보인다.

***Arcobacter*의 검출:** *Arcobacter*의 16S rRNA를 target으로 하여 *A. butzlrei, A. cryaerophilus* 및 *C. jejuni, C. coli, H. pyolri*를 각각 PCR한 결과는 Fig. 2(B)와 같다. *Arcobacter* spp.의 16S rRNA를 target으로 하는 primer set IV인 Arco I와 Arco II를 사용하여 PCR을 한 결과 *A. butzleri, A. cryaerophilus*의 PCR product가 1223 bp를 결과를 얻었다. 이때 *Campylobacter*와 *Helicobacter*에서는 PCR product가 확인되지 않았다. *Arcobacter*는 *Campylobacter*와 달리 국내에서 연구는 거의 전무한 상태이다. 이미 food-borne pathogen으로 알려진 *Arcobacter*를 본 실험에서 검출할 수 있는 방법을 제시함으로써 국내에서도 연구가 활발히 진행될 수 있으리라 사료된다.

Table 1. Sequences of the oligonuclotide primers

Set No.	Primer	Sequence(5'→3')	Product	Reference
I	CAH 16S 1a	AATACATGAAAGTCGAAGGA	1004 bp	Marshall *et al.* [24]
	CAH 16S 1b	TTAACCCAACATCTCACGAC		
II	pA	GGAGGATGACACTTTTCGGAGC	426 bp	Giesendorf *et al.* [28]
	pB	ATTACTGAGATGACTAGCACCCC		
III	icd1	ATGGCTTACAACCCTAAAATTTTACAAAAGCC	1200 bp	Argyros *et al.* [26]
	icd2	TCACATGTTTTCAATCATCACGC		
IV	Arco I	AGAGATTAGCCTGTATTGTATC	1223 bp	Harmon *et al.* [25]
	Arco II	TAGCATCCCCGCTTCGAATGA		
V	Arco 2	TTCGCTTGCGCTGACAT	686 bp	Harmon *et al.* [25]
	Butz	CTATTCAGCGTAGAAGATG		
VI	JEJ 1	CCTGCTACGGTGAAAGTTTTGC	793 bp	Gonzalez *et al.* [30]
	JEJ 2	GATCTTTTGTTTTGTGCTGC		
VII	pg50	ATGGGATTTCGTATTAAC	450 bp	Oyofo *et al.* [29]
	pg3	GAACTTGAACCGATTTG		

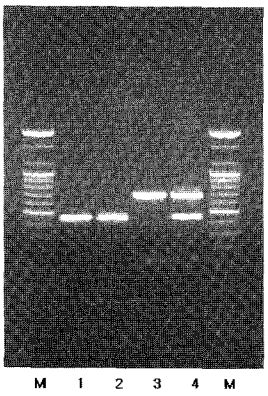

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products with pg3, pg 50 primer from *fla A* gene of *C. jejuni*, *C. coli* and ARCO 2, BUTZ primer from 23S rRNA of *A. butzlrei* strains. Lane 1, *C. jejuni*; Lane 2, *C. coli*; Lane 3, *A. butzlrei*; Lane 4, Mixing of *C. jejuni*, *C. coli* and *A. butzlrei*; M, 100 bp DNA ladder.

이상의 실험 결과로 *Campylobacter*, *Arcobacter*와 *Helicobacter*의 속 및 종에 관련된 primer 및 그 결과를 정리해 보면 Table 1과 같다.

Campylobacter, *Arcobacter*와 *Helicobacter*의 multiplex PCR에 의한 선택검출

***C. jejuni*, *C. coli* and *A. butzleri*의 multiplex PCR:** *C. jejuni*와 *C. coli*의 *fla A* gene을, *A. butzleri*의 23S rRNA를 target으로 해 multiplex PCR을 수행한 결과가 Fig. 3과 같다.

*C. jejuni*와 *C. coli* 및 *A. butzlrei*를 multiplex PCR을 통해 실험한 결과 *C. jejuni*, *C. coli*를 단독으로 PCR 수행했을 때 450 bp의 product를 얻을 수 있었으며, *A. butzlrei*는 686 bp의 product를 확인하였다. 또한 *C. jejuni*, *C. coli* 및 *A. butzlrei*가 섞여있을 때에는 686 bp와 450 bp의 product를 동시에 확인 할 수가 있었다. Winter[32] 등의 multipelx PCR을 이용한 검출에서는 *C. jejuni*와 *A. butzleri*의 2주에 대해서만 수행하여 2균주를 검출했으나, 본 실험에서 *C. jejuni*, *C. coli*와 *A. butzleri* 3주에 대한 multiplex PCR를 수행해 검출이 가능하여 좀 더 효율적으로 확인할 수 있게 되어 빠른 시간에 검출할 수 있었다.

Table 2. Selective detection by PCR with specific primers of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter*

Primer set	*C. jejuni*	*C. coli*	*A. butzleri*	*H. pylori*
CAH 16S 1a CAH 16S 1b	+[1)]	+	+	+
pA pB	+	+	-[2)]	-
JEJ 1 JEJ 2	+	-	-	-
Arco 2 Butz	-	-	+	-
icd1 icd2	-	-	-	+

+[1)]: Detection of PCR product, -[2)]: Non-detection of PCR product

***C. jejuni*와 *H. pylori*의 multiplex PCR:** *C. jejuni*의 *ceuE* gene을 target으로 하는 JEJ1, JEJ2와 *H. pylori*의 isocitrate dehydroganse gene을 target으로 하는 icd1, icd2를 이용하여 multiplex PCR을 수행한 결과는 Fig. 4(A)와 같다. *C. jejuni*와 *H. pylori*를 multiplex PCR을 통한 검출에서 각각에 793 bp와 1200 bp의 특이적인 band를 확인하여 두 균주를 동시에 검출 할 수 있었다.

***A. butzleri*와 *H. pylori*의 multiplex PCR:** *A. butzleri*의 23S rRNA를 target으로 하는 Arco 2, Butz와 *H. pylori*의 isocitrate dehydroganse gene을 사용하여 multiplex PCR을 수행한 결과가 Fig. 4(B)와 같다. *A. butzleri*와 *H. pylori*의 multiplex PCR를 수행하여 *A. butzleri*에서는 686 bp와 *H. pylori*는 1200 bp의 PCR product를 확인 할 수 있었다.

C. jejuni, *C. coli*, *A. butzleri*와 *H. pylori*는 국내외적으로 그 위해성은 널리 알려져 있으며 연구도 활발히 진행되고 있다. 그리고 multiplex PCR을 이용한 검출은 주로 *Campylobacter* spp. 및 *C. jejuni*와 *A. butzleri*를 위주로 되고 있으나 이번 실험을 통해 *C. jejuni*, *C. coli*, *A. butzleri*와 *H. pylori*를 multiplex PCR을 이용해 각각의 특이적인 PCR 결과를 확

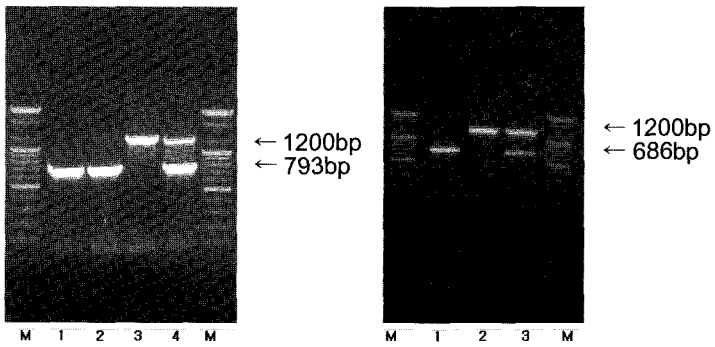

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of PCR products of *C. jejuni*, *H. pylori* and *A. butzleri* strains. (A) Using primers JEJ1, JEJ2, icd1 and icd2. Lane 1 and 2, *C. jejuni*; Lane 3, *H. pylori*; Lane 4, *C. jejuni* and *H. pylori*; (B) Using primers ARCO 2, BUTZ , icd1 and icd2. Lane 1, *A. butzleri*; Lane 2, *H. pylori*; Lane 3, *A. butzleri* and *H. pylori*; M, 100 bp DNA ladder

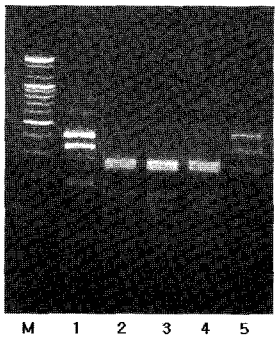

Fig. 5. Agarose gel electrophoresis showing of PCR-RFLP pattern with CHA primer and DdeI. Lane 1, *A. butzleri*; Lane 2 and 3, *C. jejuni*; Lane 4, *C. coli*; Lane 5, *H. pylori*; M, 100 bp DNA ladder

인 할 수 있어 4 균주를 단시간에 분리검출이 가능하리라 사료된다.

PCR-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)

Campylobacter, *Arcobacter*, *Helicobacter*의 16S rRNA를 target으로 하여 PCR을 수행하고 PCR product를 restriction enzyme인 *Dde* I을 사용해 RFLP를 수행하여 그 pattern을 확인하여 각각의 특성을 비교한 결과가 Fig. 5와 같다. *C. jejuni*, *C. coli*, *A. butzlrei* 및 *H. pylori*는 16S rRNA를 target으로 하는 CHA primer로 사용하여 amplification 한 후 PCR product를 endorestriction enzyme인 *Dde* I을 이용해 restriction pattern을 비교한 결과 *C. jejuni*, *C. coli*는 서로 동일하였으며, *A. butzlrei*와 *H. pylori*는 서로 상이하였다.

본 연구에서는 PCR 및 multiplex-PCR의 기법을 사용하여 *Campylobacter*, *Arcobacter*와 *Helicobacter*를 동시에 검출하고자 하였다. 3종류 균주의 16S rRNA를 이용하여 PCR을 수행하여 동시에 검출이 가능하였으며, 이 후 각 균주의 genus 및 species의 확인을 위해 specific-primer를 사용하여 PCR을 하여 검출이 가능하였으며, multiplex-PCR을 이용해 *Campylobacter-Arcobacter*, *Arcobacter-Helicobacter* 및 *Campylobacter-Helicobacter*를 동시에 검출이 가능하여 짧은 시간에 효과적인 실험을 수행할 수 있으리라 보이며, PCR-RFLP 기법 역시 각 균주들의 특성을 확인할 수 있었다. 따라서 PCR, multiplex-PCR 및 PCR-RFLP를 사용하여 *Campylobacter*, *Arcobacter*와 *Helicobacter*를 분리, 동정 할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 경원대학교 학술연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

요 약

Campylobacter, *Arcobacter*, *Helicobacter*는 분류학적으로 동일한 rRNA superfamily VI로 식중독 이외에도 위궤양, 위암, 유산 및 신경 장애를 유발한다. *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*를 오염된 식품 등에서 선택적으로 검출하기 위해 PCR, multiplex-PCR, RFLP(restriction fragment length polymorphism)의 기법을 이용하였다. *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*의 16S rRNA를 target으로 하는 CHA primer를 사용하여 동일한 PCR product의 검출할 수 있었다. *C. jejuni*와 *C.coli*를 *A. butzleri*와 *H. pylori*로부터 선택적으로 검출하기 위해 *fla A* gene을 target으로 하는 pg3, p50을 사용하였으며, *A. butzleri*는 23S rRNA를 target으로 하는 Arco2, Butz를 이용했다. 또한 *H. pyloyi*는 isocitrate dehydrogenase gene을 target으로 하는 icd1, icd2를 사용하였고, *C. jejuni*는 *ceuE* gene을 target으로 하는 JEJ1, JEJ2를 이용하여 효과적으로 분리검출이 이루어졌다. 또한 제한효소 Dde I 을 사용하여 PCR-RFLP를 통해 *C. jejuni*, *C. coli*를 *A. butzleri*, *H. pylori*로부터 분리할 수가 있었다. 따라서 이러한 primer를 이용하여 *C. jejuni*, *C. coli*, *A. butzleri*, *H. pylori*가 함께 오염되었을 때 각각 균주의 선택적인 검출이 가능할 것이다.

문 헌

1. Altekruse, S.F., Cohen, M.L. and Swerdlow, D.L. Emerging foodborne diseases. Emerg. Infect. Dis. 3: 285-293 (1997)
2. Waage, A.S., Vardund, T., Lund, V. and Kapperud, G. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni/coli* cells in environmental water, sewage and food samples by a seminated PCR assay. Appl. Env. Microbiol. 65: 1636-1643 (1999)

3. Chung, Y.S., Yi, K.N. and Lee, S.Y. Isolation rate of *Campylobacter fetus.* subsp. *jejuni* enteritis patients. J. Korea Soc. Microbiol. 17: 43-47 (1982)
4. Nachamkin, I., Allos, B.M. and Ho, T. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. Clin. Microbiol. Rev. 11: 555-567 (1998)
5. Fugimotto, S., Yuki, N., Itoch, T. and Amako, K. Specific serotype of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barre syndrome. J. Infect. Dis. 165: 183 (1992)
6. Wassenaar, T.M. Toxin production by *Campylobacter* spp. Clin. Microbiol. Rev. 10: 466-476 (1997)
7. On, S.L.W. Taxonomy of *Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter* and related bacteria current status, future prospects and immediate concern. J. Appl. Microbiol. 90: 1S-15S (2001)
8. Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. and De Ley, J. Revision of *Campylobacter, Helicobacter* and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of Arcobacter gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 88-103 (1991)
9. Kelly, D.J. The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. J. Appl. Microbiol. 90: 16S-24S (2001)
10. Tholozan, J.L., Cappelier, J.M., Tissier, J.P., Delattre, G. and Federrichi, M. Physiological characterization of viable-but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. Appl. Env. Microbiol. 65: 1111-1116 (1999)
11. Bovill, R.A. and Mackey, B.M. Resuscitation of 'non-culturable' cells fromm aged cultures of *Campylobacter jejuni.* Microbiol. 143: 1575-1581 (1997)
12. Vliet, A.H.M and Ketley, J.M. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. J. Appl. Microbiol. 90: 45S-56S (2001)
13. Vandamme, P., Vancanneyt, B., Pot, L., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D. L., Vlaes, C.V.D.B., Higgins, R., Hommez, J., Kersters, K., Butzler, J.P. and Goosens, H. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butlzeri* com. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 344-356 (1992)
14. Wesley, I.V. *Helicobacter* and Arcobacter species: Risks for foods and beverges. J. Food Prot. 59: 1127-1132 (1996)
15. Mansfield, L.P. and Forsythe, S.J. *Arcobacter butzleri, A. skirrowii* and *A. cryaerophilus*-potential emerging human pathogens. Rev. Med. Microbiol. 11: 161-170 (2000)
16. On, S.L.W., Stacey, A. and Smyth, J. Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. J. Infect. 31: 225-227 (1995)
17. Zenner, L. Pathology, diagnosis and epidemiology of the rodent *Helicobacter* infection. Com. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 22: 41-61 (1999)
18. Dunn, B.E., Cohen, H. and Blaser, M.J. *Helicobacter pylori.* Clin. Microbiol. Rev. 10: 720-741 (1997)
19. Yasuhiro, K. *Helicobacter pylori* association with gastric disease including gastric cancer. pp. 31-38. The 12th International Symposium on Lactic Acid Bacteria and Human Health (2001)
20. Covacci, A., Falkow, A., Berg, D.E. and Rappuoli, R. Did the inheritance of pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori.* Trends in Microbiol. 5: 205-208 (1997)
21. Vwlazquez, M. and Feirtag, J.M. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implication foods and water. Int. J. Food Microbiol. 53: 95-104 (1999)
22. Hulten, K., Han, S.W., Enthro, H., Klein, P.D., Opekun, A.R., Gilman, R.H., Evans, D.G., Engstrand, L., Graham, D.Y. and Elzaatari, F.A.K. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. Gastroenterol. 110: 1031-1035 (1996)
23. Marisa, M.H., Yolanda, L.V., Gonzalo, C.R., Leon, S.P. and Alejandro, C. *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria fresh water environments in Mexico city. Archives Medical Res. 32: 458-467 (2001)
24. Marshall, S.M., Melito, P.L., Woodward, D.L., Johnson, W.M., Rodgers, F.G., and Mulvey, M.R. Rapid identification of *Campylobacter, Arcobacter,* and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. J. Clin. Microbiol. 37: 4158-4160 (1999)
25. Harmon, K.M., and Wesley, I.V. Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from other *Arcobacters.* Vet. Microbiol. 58: 215-227 (1997)
26. Argyros, F.C., Ghosh, M., Huang, L., Masubuchi, N., Cave, D.R. and Grubel, P. Evaluation of a PCR primer based on the isocitrate dehydrogenase gene for detection of *Helicobacter pylori* in feces. J. Clin. Microbiol. 38: 3755-3758 (2000)
27. Olsen, J.E., Aabo, S., Hill, W., Notermans, S., Wernars, K., Granum, P.E., Popovic, T., Rasmussen, H.N. and Olsvik, O. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. Int. J. Food Microbiol. 28: 1-78 (1995)
28. Giesendorf, B.A.J., Quint, W.G.V., Henkens, M.H.C., Stegement, H., Huf, F.A. and Niesters, H.G.M. Rapid and sensitivity detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. Appl. Env. Microbiol. 58: 3804-3808 (1992)
29. Oyofo, B.A., Thornton, S.A., Burr, D.H., Trust, T.J., Pavolvskis, O.R. and Guerry, P. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 30: 2613-2619 (1992)
30. Gonzalez, I., Grant, K.A., Richardson, R.T., Park, S.F. and Collins, M.D. Specific identification of enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. J. Clin. Micobiol. 35: 759-763 (1997)
31. Shin, S.N., 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)
32. Winter, D.K. and Slavik, M.F. Multiplex PCR detection of *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter butzleri* in food production. Mol. Cell Probes 14: 95-99 (2000)

(2002년 9월 3일 접수; 2002년 11월 20일 채택)