

Reverse dot hybridization 방법과 16S rRNA gene(16S rDNA)을 이용한 식품에서 식중독균의 탐색

김민성 · 신규철 · 이형구 · 한명수¹ · 민병례² · 최영길*
한양대학교 자연과학대학 생명과학과, ¹국가지정 물환경생태복원연구소
²상명대학교 자연과학대학 생명과학과

Using Reverse Dot Hybridization Method and 16S rRNA Gene (16S rDNA) for Identifying the Food Poisoning Microorganism in Foods

Min-Seong Kim, Kyu-Chul Shin, Hyung-Gu Lee, Myung-soo Han¹,
Byung-Re Min² and Yong-Keel Choi*

Department of Life Science, Hanyang University

¹National Research Laboratory for Water Environmental & Restoration

²Department of Biology, Sangmyung University

DNA sequence information on small-subunit rRNA gene (16S rDNA) obtained from food-poisoning bacterial culture was used to investigate the presence of bacterial pathogens in food. By reverse dot blot detection method, presence of food-poisoning bacteria could be confirmed on hybridization of digoxigenin-labeled 16S rDNA Polymerase Chain Reaction (PCR) primer product and biotin-labeled specific oligonucleotide probe. *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, and *Salmonella sp.* were used as the representative food-poisoning bacterial microorganisms. An oligonucleotide probe, based on the variable region of 16S rRNA gene, was used as the specific probe. These tools may be more useful than classic biochemical method for rapid identification of contaminated food.

Key words: 16S rRNA gene, food-poisoning bacterial, PCR, reverse dot hybridization

서 론

식중독이라 함은 오염된 식품을 섭취하여 발열, 구역질, 설사 등의 증세가 나타내는 것을 광범위하게 말하는 것이다. 식중독은 원인물질에 따라 세균성 식중독, 화학성 식중독, 자연독 식중독, 미생물 독성 대사물질에 의한 식중독으로 나눌 수 있다. 과거에 비해 의학 및 식품위생이 발달하였으나 전 세계적으로 매년 많은 식중독 사건이 발생하고 있으며 이중 세균성 식중독이 대부분을 차지하고 있다⁽¹⁾.

식중독은 식생활의 다양화와 국제 교류의 증가 및 식생활의 신속화 등으로 식품의 오염과 변질의 기회가 급증하면서 때와 장소를 가리지 않고 발생하며 때로는 규모가 대형화되어 인류의 건강을 위협하는 원인이 되기도 한다. 그러나 발생된 식중독사고 중 식중독으로 집계되는 경우는 선진국에

서조차도 극히 일부로 대개 실제 발생사례의 10% 정도만이 보고되는 것으로 알려지고 있다. 과거에는 식중독을 단순히 설사질환으로 가볍게 취급해왔으나 최근 해외에서 대장균 O-157, 리스테리아 등과 같은 새로운 병원성 미생물에 의한 감염사례가 보고되면서 식중독이 면역력이 약한 사람에게 치명적인 증상도 일으킨다는 것이 알지면서 예방 및 대책의 중요성이 새롭게 부각되고 있다⁽²⁾. 식중독 원인 물질에 대해 자세한 정보를 확보한 후 원인식품이 더 이상 유통되거나 이용되지 않도록 할 필요가 있으며 이러한 일련의 과정이 식중독 역학조사의 기본이 된다. 식품을 통한 식중독 사건의 예방과 확산을 방지하지 하기 위해서는 식중독의 대부분을 차지하고 있는 식중독 원인균을 탐색하는 것이 필요하다. 식중독 원인균을 탐색하는 방법 중 고전적으로 증균, 선택적 배지를 이용한 isolation 그리고 생화학적 특징을 활용한 동정 방법이 있으나 보통 5일 이상의 시간이 필요하기도 한다. 고전적인 방법 외에 상업적으로 판매되는 API identification systems(biMerieux Vitek)과 PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법이 이용되고 있으나 상업적으로 판매되는 것 또한 배양을 통하여 확인 할 수 있는 것이며 PCR과 같은 방법을

*Corresponding author : Yong-Keel Choi, Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea
Tel: 82-2-2290-0952
Fax: 82-2-2293-9230
E-mail: ykchoi@hanyang.ac.kr

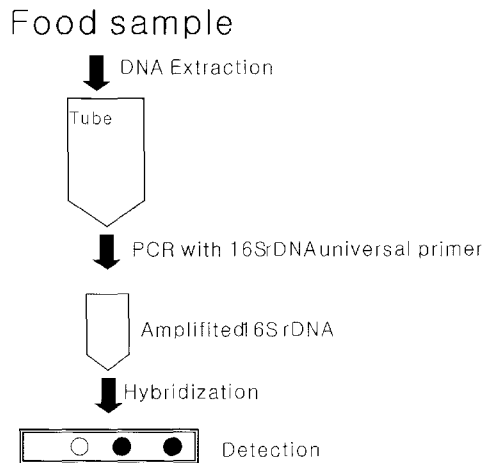


Fig. 1. Schematic representation of the approach used for determining the genetic profiles of food-poisoning microorganism.

이용하였을 때는 multiplex PCR과 같은 방법이 있지만 일반적으로 단일 종의 미생물의 탐색만이 가능한 단점이 있다^{3,4)}.

본 연구에서는 식품에서 식중독 원인균을 탐색하기 위하여 16S ribosomal RNA gene(16S rDNA)에 대한 염기 서열을 이용하였다. 16S rDNA는 진화속도가 매우 느려 특정 분류군에만 존재하는 염기서열을 포함하고 있어 원핵생물의 계통분류학적 연구에 이용되어진다⁵⁾. Universal 16S rDNA primer를 이용한 PCR과 hybridization 방법을 이용하여 신속하게 식품에 존재하는 식중독 원인균을 탐색하고자 하였으며 이러한 연구과정에서 얻어진 각 미생물들에 대하여 특이적인 16S rDNA probe들을 활용한 microarray의 개발을 준비하고자 하였다. 본 연구에서 사용된 식중독 원인균은 널리 알려진 식중독균들 중 *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*(*E. coli*), *Salmonella typhimurium* 3종류의 균을 이용하였으며 각 미생물에 대하여 특이적인 16S rDNA probe들과 16S rDNA PCR 증폭 산물과의 Reverse dot blot method를 이용하여 식중독을 일으키는 균의 존재 유무를 확인하였다⁶⁾. 실험의 간략적인 묘사를 Fig. 1에 나타냈다.

본 연구의 방법을 바탕으로 다양한 종류의 미생물들에 대한 특이적인 16S rDNA oligonucleotide probe들을 개발하고 이를 통하여 16S rDNA microchip으로의 적용을 가능하도록 하여 식중독균등을 포함하는 많은 종의 미생물들을 탐색할 수 있게 될 것이다.

재료 및 방법

식중독 원인 균주 및 배양

실험에 사용된 식중독 원인균은 널리 알려진 식중독균들 중 3종을 택하였다. 연구실에서 보유 중인 균과, 균주은행과 국립보건원 병원체방어연구실에서 분양 받은 균주를 사용하였다. 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행(KCTC)로부터 *Salmonella typhimurium* KCTC 2515를 분양 받았고 국립보건원 병원체방어연구실로부터 *Bacillus cereus* ATCC 11778을 분양 받았다. *Escherichia coli*는 본 연구실이 보유한 것을

사용하였다. 각 균주들은 균주에 맞는 적정 배지에 배양되었다. 배양 조건은 37°C에서 고체배지와 37°C, 150 rpm의 조건에서 액체 배지를 진탕 배양하였다.

Genomic DNA 추출과 universal 16S rDNA primer를 이용한 PCR 증폭

배양된 균주로부터 DNA를 추출하기 위해서 Sambrook 등⁷⁾의 방법을 변형하여 genomic DNA를 추출을 실시하였다. 배양된 시료를 1.5 mL tube에 넣고 2분간 원심분리하여 pellet을 취하였다. 2.5 mg/mL lysozyme이 포함된 567 µL TE buffer(pH 8.0)를 넣고 pellet을 현탁한 후, 30 µL의 10% SDS, 20 mg/mL proteinase K 3 µL를 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 5 M NaCl 100 µL를 첨가한 후 잘 섞고 80 µL CTAP/NaCl를 넣고 65°C에서 10분간 반응시켰다. 동량의 Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol(25 : 24 : 1)를 첨가하고 잘 섞은 후 원심분리(12,000×g(gravity), 10분, 4°C)하여 얻은 상등액을 새로운 1.5 mL tube에 옮기고 동량의 Chloroform : Isoamyl alcohol(24 : 1)를 첨가하고 잘 섞은 후 원심분리(12,000×g, 10분, 4°C)하였다. 상등액을 새로운 1.5 mL tube에 옮기고, 0.1배 3 M sodium acetate와 2.5배 100% alcohol을 첨가한 후 원심분리(12,000×g, 10분, 4°C) 하였다. 상등액은 버리고 70% alcohol 1 mL을 첨가하고 잘 섞은 후 실온에서 5분간 방치하였고, 원심분리(12,000×g, 10분, 4°C)한 후 상등액을 버리고 pellet을 건조하였다. 20 µL TE buffer(pH 8.0)를 첨가한 후 4°C에서 보관하였다.

각 균주로부터 추출된 DNA로부터 16S rDNA를 증폭하기 위하여 Weisburg 등⁸⁾과 Muyzer 등⁹⁾이 제안한 primer를 사용하였다. primer의 sequence는 Table 1에 나타냈다. Reverse primer의 표지물질로 5' 끝에 Digoxigenin(DIG)을 labelled 하여 제작하였다. 이 primer로 증폭된 16S rDNA 결과물은 511 bp이다.

PCR 반응은 30 µL를 최종 부피로 하여 수행하였다. 30 µL 안에는 300 mM Tris-HCl(pH 8.8), 100 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM KCl, 20 mM MgSO₄, 각각의 10 mM deoxynucleotide triphosphate(Gene craft, Germany), 10 pmol primer set, 20 ng DNA 주형, 2 U Tag polymerase(Qiagen, Germany)를 첨가하였다. 모든 PCR 증폭 과정에는 DNA 주형을 제외한 negative control을 포함시켰다. PCR 증폭은 Takara PCR Thermal Cycler MP 3000(Takara, Japan)을 이용하여 증폭하였다.

첫 번째 반응은 3분 동안 95°C DNA를 변성 시켰고 각 단계에서는 95°C 1분 DNA를 변성시키고, 55°C 1분 동안 DNA와 primer를 붙이고, 72°C 2분 동안 증폭하는 반응을 35번 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 10분간 증폭한 후 4°C에 보관하였다. PCR증폭산물은 0.05 µg/mL Et-Br을 포함한 2% agarose gel(FMC Bioproducts, USA)을 1X TAE buffer(0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA)에서 100 mA, 200 V로 전기영동하여 DNA를 band를 확인하였다.

PCR 결과물은 hybridization의 효율을 높이기 위하여 PCR Purification kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 정제하였다.

Probe 제작과 reverse dot-blot hybridization

식중독 원인균의 oligonucleotide probe sequence는 Table 1

Table 1. The sequence of primers and probes, and position

	Sequence	Position ¹⁾	Reference
Primer	27F ²⁾ (5'AGAGTTTGATCATGGCTCAG3')	8-27	8
	PRUN518R ³⁾ (D ⁴⁾ -5'CTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC3')	485-518	9
Probe	Uni P (B ⁵⁾ -5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAG3')	319-338	18
	16E P (B-5'GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC3')	453-477	19
	Bacil P (B-5'TCGAAATTGAAAGGCGGC3')	200-217	20
	Salmo P (B-5'TGTTGTGGTTAATAACCGCA3')	455-474	21

¹⁾The numbering of position is based on *E. coli* 16S rDNA.

²⁾Forward primer.

³⁾Reverse primer.

⁴⁾Digoxigenin labelled.

⁵⁾Biotin labelled.

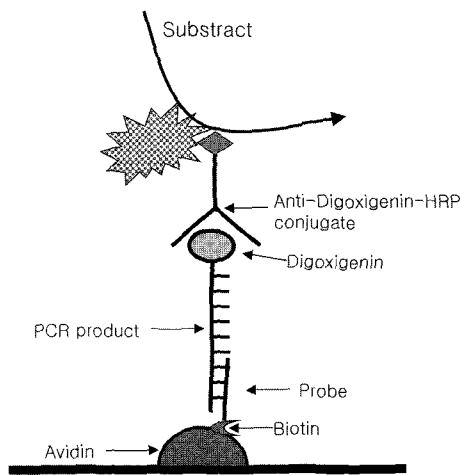


Fig. 2. Diagram of 16S rDNA PCR product and oligonucleotide probe on membrane.

에 나타냈다. RDP databases^(10,11), Check Probe version 2.1r3 을 이용하여 Probe의 specific을 확인하였다. 균주들의 oligonucleotide probe는 5' 끝에 membrane에 고정을 위해 avidin 과 결합력이 높은 biotin을 labelled 하였다(Fig. 2). Uni P(Universal), 16E P(*Escherichia coli*), Bacil P(*Bacillus cereus*), Salmo P(*Salmonella sp.*)로 명하였다.

Biotin labelled oligonucleotide probe(100 pmol/ μ L) 9 μ L와 avidin(2 mg/mL, Sigma, USA) 1 μ L를 섞은 후 37°C에서 30 분 반응 시켰다. 반응 후 Nitrocellulose membrane(Bio-rad, USA) strips에 각각의 oligonucleotide probe을 0.5 μ L (oligonucleotied probe: 45 pmol/dot, avidin: 100 ng/dot) spot 하였다. oligonucleotide probe와 avidin을 membrane상에 spot 한 후 37°C에서 1시간 이상 반응시켰다.

Probe를 spot 시킨 strips를 5% BSA(Bovine serum albumin) 400 μ L가 들어 있는 1.5 mL microcentrifuge tube에 넣고 37°C에서 30분간 Blocking 한 후 여분의 남아 있는 BSA를 제거하기 위하여 PBS(Phosphate-buffered saline)(with 0.05% tween 20, pH 7.6)로 3분간 3회 세척하였다. BSA로 Blocking 된 strips를 새로운 1.5 mL microcentrifuge tube에 넣고 hybridization buffer(5X SSC(1XSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH. 7.0), 1%(w/v) Blocking reagent(Boehringer mannheim, Germany; 0.01%(w/v) N-laur-

ylsarcosine, 0.01%(w/v) NaCl, 0.02%(w/v) SDS)를 385 μ L 넣은 다음 1시간 동안 prehybridization 하였다. 95°C에서 10 분간 denature 시킨 각각의 16S rDNA PCR 증폭 산물을 15 μ L씩 microcentrifuge tube에 넣어 57°C에서 1시간 hybridization시켜주었다. Hybridization 반응 후 PBS(with 0.05% tween 20, pH 7.6)로 3분간 3회 세척하여 반응에 참여하지 않은 PCR 결과물들을 세척하여 제거하였다. strips를 새로운 microcentrifuge tube에 넣고 Membrane 상의 Probe와 hybridization을 이룬 PCR 결과물과 결합하여 발색 반응을 이룰 수 있는 Anti-DIG antibody-HRP conjugate(Boehringer mannheim, Germany) 400 μ L(200 mU/mL)를 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS(with 0.05% tween 20, pH 7.6)로 3회 세척하였다. 세척한 strips에 TMB(3,3',5,5' Tetramethylbenzidine)(Sigma, USA)를 처리하여 발색 시켜준 뒤 이를 관찰하였다.

우유의 세균적 오염 판단

시중에서 유통 중인 살균된 우유를 구입하였다. 본 연구에서 사용되는 식중독 원인균 각각을 인공적으로 오염시킨 것과 3종 모두를 섞은 것으로 하였다. 구입한 우유를 멸균된 250 mL flask에 100 mL씩 나누는 다음 본 연구에서 사용되어진 3종의 적정액체배지에서 배양한 각각 대수성장기의 식중독 원인균($5-9 \times 10^7$ CFU/ml)을 100 μ L씩 주입하여 flask 입구를 cotton plug로 막았다. 12시간 이상 진탕배양 후 DNA를 추출하였다. 자연적으로 우유를 오염시키기 위해 멸균된 500 mL flask에 250 mL를 부은 다음 실내 온도에서 3일 방치하였다. 오염된 우유에서의 Genomic DNA 추출 방법은 Sambrook 등⁽⁷⁾ 방법을 변형하여 이용하였으며 "Genomic DNA 추출과 universal 16S rDNA primer를 이용한 PCR 증폭"에 설명된 방법과 동일하다.

결과 및 고찰

각 균주의 genomic DNA를 template로 사용하여 universal 16S rDNA primer로 PCR 증폭을 실시한 결과 Fig. 3과 같은 511 bp의 PCR 증폭산물을 얻었다. 식중독 원인균의 oligonucleotide probe 염기서열은 문헌과 probe 서열 분석용 Program Check Probe version 2.1r3, RDP databases를 이용하여 선정하였다. Biotin-HRP conjugate(SIGMA, USA)를 이용하여 oli-

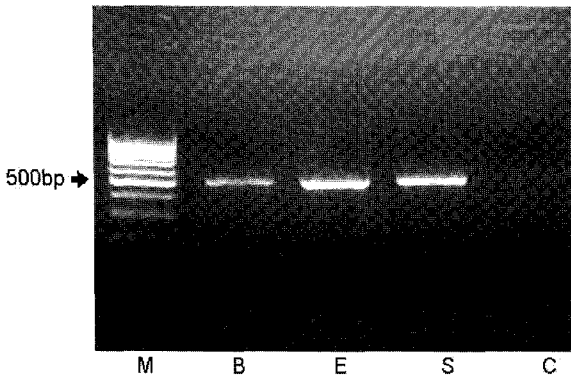


Fig. 3. PCR product of extracted DNA by universal 16S rDNA primer (B: *Bacillus cereus*, E: *Escherichia coli*, S: *Salmonella typhimurium*, C: control, M: 100 bp ladder marker).

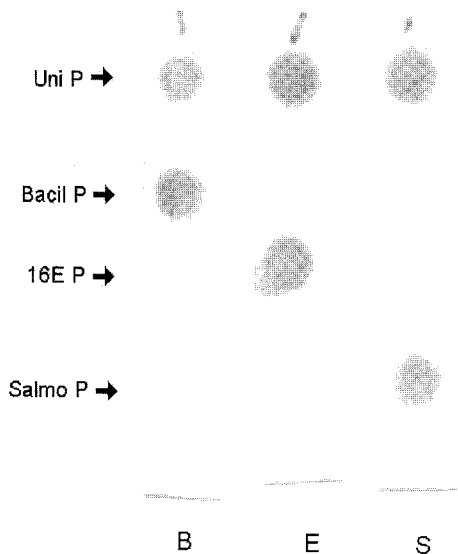


Fig. 4. Results of hybridization (B: *Bacillus cereus*, E: *Escherichia coli*, S: *Salmonella typhimurium*).

gonucleotide probe의 지지체인 avidin이 membrane의 표면에 고정된 여부를 확인하였다.

DIG labelled Universal 16S rDNA primer를 이용하여 증폭시킨 16S rDNA 증폭 산물을 denature 시킨 후 각 oligonucleotide probe가 고정되어 있는 strips에 hybridization 한 결과는 Fig. 4와 같이 *Bacillus cereus*는 Bacil P와 Uni P, *Escherichia coli*는 16E P와 Uni P, *Salmonella typhimurium*는 Salmo P oligonucleotide probe와 Uni P가 고정되어 있는 위치에서 발색되었다.

시중에서 구입한 우유를 각각의 식중독 원인균 별로 인공적으로 오염시킨 후 우유에서 DNA를 추출하여 16S rDNA primer를 이용 PCR로 증폭한 결과물과 제작되어진 oligonucleotide probe와 hybridization 시킨 결과는 Fig. 5와 같이 각각 식중독 원인균에서 추출된 DNA PCR product와 probe hybridization 시킨 결과와 같았으며 3종 모두를 혼합하여 인공적으로 오염시킨 곳에서는 3종 모두에서 발색되었다. 자연적으로 오염시킨 우유에서 DNA를 추출 16S rDNA 증폭하

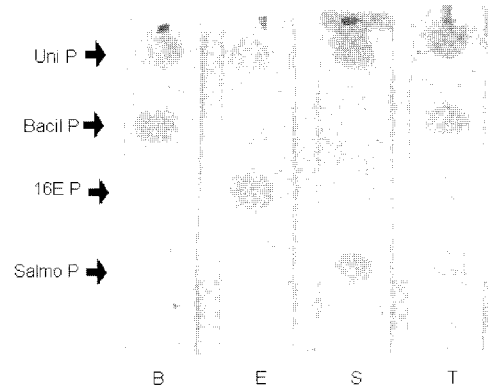


Fig. 5. Results of Hybridization Result on food test (B: *Bacillus cereus*, E: *Escherichia coli*, S: *Salmonella typhimurium* T: total).

여 hybridization한 결과 *Escherichia coli*를 탐지할 수 있는 oligonucleotide 16E P 부분에서 발색이 나타났다.

본 연구에서는 각 식중독 균의 16S rDNA 중 특이적 염기서열을 이용하여 hybridization 방법을 이용하여 다수의 식중독 균을 한 번의 탐색으로 여러 종류의 식중독 균을 빠르고 정확하게 탐색할 수 있도록 하는데 목적을 두었다.

16S rDNA는 linear molecule로 나열했을 때(약 1500 nt), 염기서열의 보전성이 높은 지역과 probe로 제작하기 용이한 variable 지역이 존재한다⁽¹²⁾. 대부분 염기서열의 보전성이 매우 높은 지역은 모든 원핵생물에서 동일하나 대부분의 variable 지역에서는 중간 사이의 판별이 가능할 정도 차이를 보여주기도 한다. 미생물의 분류 및 동정 16S rDNA oligonucleotide probe는 계통학적으로 다양한 수준(domain, kingdom, order, genus, species)에 대하여 특이성을 가질 수 있도록 제작될 수 있다고 알려져 있으며 16S rRNA의 보전성이 높음으로 인하여 probe를 제작하는데 있어 장점이 있다^(13,14).

본 연구에서 oligonucleotide probe를 membrane 표면에 고정시키는 방법(Fig. 2)은 DEIA(DNA enzyme immuno assay)의 방법⁽¹⁵⁾을 변형하여 적용한 것으로 기존의 oligo dT tailing 등의 방법⁽⁶⁾에 비하여 효율적이었다. DEIA 방법은 96 microwell plate에 avidin을 일정량 고정하여 준 후 biotin이 labelled 된 oligonucleotide probe를 다른 종류의 표지물(fluorescein, digoxigenin, etc)이 부착된 PCR product와 hybridization 시켜 microwell 상에서 발색 정도를 확인하는 방법이다. 본 연구에서는 DEIA 방법에서 사용된 microwell plate가 아닌 nitrocellulose membrane에 avidin과 biotin이 labelled 된 결합체를 붙인 것으로 avidin과 biotin labelled oligonucleotide probe 결합체의 적정 농도를 정하여 pipet을 이용 membrane에 spot한 결과 microwell plate와 마찬가지로 잘 고정되어 있었다. 작은 분자량의 Probe를 membrane 표면에 직접 고정하는 경우 고정효율과 hybridization 효율이 매우 낮은 이유로 활용될 수 없었으며 이를 극복하기 위하여 oligo dT tailing 등의 방법으로 probe의 분자량을 증가시켜 membrane상의 고정 효율과 hybridization 효율을 증대시켜 줄 수 있으나 과정이 복잡하고 높은 비용이 소요된다는 단점이 있다⁽⁶⁾. 본 연구에서 적용한 방법의 경우 membrane 표면 위에 고정되는 효율이 높은 avidin을 biotin labeled probe와 결합시켜 사용

하기에 낮은 분자량의 probe가 membrane 표면 위에 고정되어 hybridization 효율을 높여 줄 수 있었다. 16S rDNA PCR product와 membrane 위에 고정되어 있는 특이적 probe들과 hybridization 반응은 43°C에서 64°C까지 3°C씩 증가시켜주어 적용하였으며 57°C가 적절한 hybridization 온도로 확인되었다. 본 연구에서 사용되어진 식중독 원인균의 특이적 probe들로 *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus* 등 3 종류를 이용하였으며 이 외 다른 probe를 제작하여 분석한 결과 특이성이 낮게 나타나는 경우도 있어 무엇보다도 여러 식중독균을 탐색하는데 있어서 가장 중요한 것은 높은 특이성을 갖는 probe를 확보하는 것이라 사료된다.

본 연구는 식중독 원인균과 같은 병원성 미생물을 탐색하는 DNA microchip(microarray)^(16,17)의 개발과정에 기본적인 연구로서 16S rDNA를 이용함으로써 편리성과 정확성을 동시에 얻을 수가 있게 될 것이다.

요 약

식중독은 세균에 의한 발병이 대부분이다. 따라서 식품에서 식중독 원인균을 신속하게 탐색하게 식중독으로부터의 피해 줄일 수 있을 것이다. 고전적인 식중독 원인균 탐색은 증균, 선택적 배지를 이용한 isolation, 생화학적 특징을 활용하는 분석이 있으나 많은 시간이 소요되는 단점을 갖고 있었다. 본 연구는 16S rRNA gene(16S rDNA)로부터 얻은 DNA 염기 서열을 이용 식중독 원인균의 특이적 oligonucleotide probe를 제작 reverse dot blot hybridization과 PCR 방법을 이용하여 고전적인 방법보다 빠른 시간 내에 식품에서 원인균을 탐색 할 수 있었다. 우유를 인공적으로 본 연구에서 사용한 균주로 오염시킨 후 DNA를 추출하여 PCR 증폭 산물과 oligonucleotide probe를 hybridization 시킨 결과 oligonucleotide probe가 위치한 곳에서 발색 반응이 나타났다. 본 연구에서 본 연구를 통해 DNA microchip 으로 활용 짧은 시간 내에 많은 종류의 식중독 원인균을 탐색 할 수 있는 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 국가지정연구실 사업의 과제(2002-NL-01-C-290)에 의하여 수행됨.

문 헌

1. Bean, N.H. and Griffin, P.M. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987; pathogens, vehicles and trends. *J. Food Prot.* 53: 804 (1990)
2. Centers for Disease Control and Prevention. Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-western United States, 1992-1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 42: 258-263 (1993)
3. Anderson, D.Y., Vredevelde, G.N., Brake, S.R., Buchanan, T.F. and Lewis, J.F. Evaluation of API 20E strips for identification of coagulase negative *staphylococci* from the urinary tract. *Am. J. Med. Technol.* 12: 879-881 (1983)

4. Oyarzabal, O.A., Wesley, I.V., Harmon, K.M., Schroeder-Tucker, L., Barbaree, J.M., Lauerman, L.H., Backert, S. and Conner, D.E. Specific identification of *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA. *Veterinary Microbiol.* 58: 61-71 (1997)
5. Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169 (1995)
6. Kawasaki, E., Saiki, R. and Erlich, H. Genetic analysis using polymerase chain reaction-amplified DNA and immobilized oligonucleotide probes reverse dot blot typing. *Methods Enzymol.* 218: 369-381 (1993)
7. Sambrook, J. and Russel, D.W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA (2001)
8. Weisburg, W., Barns, S.M., Pelletier, D.E. and Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703 (1991)
9. Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700 (1993)
10. Alm, E.W., Oerther, D.B., Larsen, N., Stahl, D.A. and Raskin, L. The oligonucleotide probe database. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3557-3559 (1996)
11. Maidak, Cole, B.L., Lilburn, J.R., Parker, T.G., Jr, Saxman, C.T., Stredwick, P.R., J.M., The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res.* 28: 173-174 (2000)
12. Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S. and Pace, N.R. Differential amplification for rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3417-3418 (1992)
13. Stahl, D.A., Flesher, B., Mansfield, H. and Montgomery, L. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1079-1084 (1988)
14. Raskin, L., Stromley, J.M., Rittmann, B.E. and Stahl, D.A. Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1232-1240 (1994)
15. Mantero, G., Zonaro, A., Albertini, A., Bertolo, P., Primi, D. DNA enzyme immunoassay: general method for detecting products of polymerase chain reaction. *Clin. Chem.* 7: 422-429 (1991)
16. Ekins, R., and Chu, F. W. Microarrays; their origins and application. *Trends Biotechnol.* 17: 217-218 (1999)
17. Bavykin, S.G., Akowski, J.P., Zakhariyev, V.M., Barsky, V.E., Perov, A.N. and Mirzabekov, A.D. Portable system for microbial sample preparation and oligonucleotide microarray analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 922-928 (2001)
18. Øvreås, L., Forney, L., Daae, F.L. and Torsvik, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3367-3373 (1997)
19. Tsen, H.Y., Lin, C.K. and Chi, W.R. Development and use of 16S rRNA gene targeted PCR primer for the identification of *Escherichia coli* cells in water. *J. Appl. Microbiol.* 85: 554-560 (1998)
20. Hansen, B.M., Leser, T.D. and Hendriksen, N.B. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 202: 209-213 (2001)
21. Lin, C.K. and Tsen, H.Y. Use of two 16S DNA targeted oligonucleotide as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 659-666 (1996)

(2003년 3월 25일 접수; 2003년 5월 12일 채택)