

RAPD-PCR(Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction) 방법을 이용한 *Listeria monocytogenes*의 검색

†박 범 준 · 신 언 환
울산과학대학 호텔조리과

Use of RAPD-PCR(Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) Method for a Detection of Pathogenic *Listeria monocytogenes*

†Bum-Joon Park and Eon-Hwan Sihm
Department of Hotel Culinary Arts, Ulsan College, Ulsan, Korea

Abstract

Rapid detection of foodborne pathogens is becoming increasingly important. The requirement for faster, more reliable tests has led to the development of a wide range of rapid methods. Among these methods, the use of systems based on nucleic acid based detection has been increasing since they offer advantages of reduction in test time and more reliable detection or identification. Random Amplification Polymorphic DNA(RAPD) method has been used to fingerprint foodborne microorganisms; *Listeria monocytogenes*.

In this study, 10-mer primer OPG-13(5'-CTCTCCGCCA-3') was used to generate RAPD-PCR for detection of pathogenic *L. monocytogenes* of *Listeria* spp.

Among 20 primers tested, OPG-13 showed on acceptable result for the differentiation of a pathogenic *Listeria* from non-pathogenic microorganisms. Pathogenic *Listeria*, *L. monocytogenes*(ATCC 15313, 19111, 19112, 19113) showed two bands for 700 bp and 1,500 bp while non-pathogenic bacteria, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. murrayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, and *L. seeligeri* had only one band sizing from 2,000 to 2,300 bp. This RAPD method proved to be a valuable to gain important information on sources of pathogenic bacteria in food industry.

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

서 론

식품의 저장·유통 등에 전반적으로 이용되고 있는, 냉장·냉동의 기술이 발달하게 되면서, 냉온성 병원균에 대한 적절한 관리가 필요하게 되었다. 특히, 어패류나 육류 등의 농·수·축산물들은 단지 냉장·냉동의 처리에 의해서만 유통될 뿐만 아니라, 이들은

모든 조리·가공식품의 주 원료로 사용되며, 때에 따라서는 간단한 조리나 세척후 음식물로 섭취되기 때문에 병원성 미생물을 살균할 수 있는 공정을 거치지 않고 최종 소비자 등에게 전달될 수 있는 것이다. 비교적 짧은 시간 안에 유통 및 판매가 이루어지는 이러한 농·수·축산물들은 살균을 할 시간이나 기술적인 문제가 크기 때문에 거의 병원성 미생물에 노출된

† Corresponding author : Bum-Joon Park, Department of Hotel Culinary Arts, Ulsan College, Ulsan, Korea.
Tel : 82-52-230-0745, Fax : 82-52-230-0741, E-mail : bjpark@mail.uc.ac.kr

상태로 유통될 수밖에 없다.

이러한 실정에서 식품으로부터 병원성 미생물을 검색하는 연구는 앞으로 이루어져야 할 농·수·축산물의 미생물에 대한 적절한 관리에 앞서, 반드시 연구되어야 할 기본적인 과제인 것이다.

DNA를 분석하는 방법에는 sequencing을 하는 방법¹⁾, restriction enzyme을 이용한 방법²⁾, hybridization을 이용하는 방법³⁾ 등이 있으나, 기술적인 어려움으로 인해 널리 이용되지 못하고 있다. 이러한 상황에서 1980년도에 Polymerase Chain Reaction(PCR) 방법⁴⁾이 개발된 이래로 DNA의 분석이 매우 용이하게 되었다.

PCR은 여러 가지 요인에 의해 조절되는 반응이다. DNA를 구성하는 단위체인 dNTP(deoxynucleotide triphosphates), enzyme의 activity, primer의 annealing 등에 관여하는 Mg²⁺ ion, PCR의 enzyme인 Taq DNA polymerase, template DNA와 결합하여 PCR을 시작할 수 있도록 하는 primer, PCR의 주형이 되는 template DNA 등이 PCR을 구성하는 요인들^{5,6)}이며 이러한 요인들을 순차적으로 반응시켜 주는 thermal cycler가 있다.

식품에서 미생물을 검색하는데 PCR을 이용하는 연구가 활발히 진행되고 있는 근래에 들어, RAPD-PCR(Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) 방법⁷⁾이 많이 시도되고 있다.

RAPD-PCR은 실험이 간단하여 이용하기는 편리하지만 검색균주, 즉 template DNA의 종류에 따라 PCR condition이 다르므로 condition을 확립하는 것이 무엇보다도 중요하다.

특히, RAPD는 10-mer의 짧은 random primer를 이용하고 특정 target gene이 없기 때문에 template DNA에 대해서 여러 개의 band가 pattern을 이룰 수도 있으며, mismatching 또한 잘 일어난다. DNA 추출시에 DNA strand가 무작위적으로 끊어지므로 이러한 요인들에 의해서도 PCR products의 reproducibility가 낮아지게 된다. 이러한 점을 보완하기 위해 검색균주에 대한 적절한 DNA 추출법과 PCR condition의 확립이 중요한 연구 과제이다.

*Listeria monocytogenes*는 대표적인 냉온성 병원균⁸⁾으로써 외국에서는 오래 전부터 연구되어 왔으나 국내에서는 그 연구가 아직 부족한 실정이다.

Listeriosis는 *Listeria*균에 의해 야기되는 질병으로서 가축과 사람에게 모두 질병을 일으키는 인축공동전염병(Zoonosis)이다. 여러 가지 *Listeria*종 중에서 *L. monocytogenes*가 Listeriosis를 일으키는 주된 병원균으로 알려져 있으며 일반적으로 동물에게만 질병을 일으키는 *L. ivanovii*도 사람에게 질병을 일으킨 적이 있다고

보고된⁹⁾ 바가 있다.

본 연구의 목적은 그람양성의 냉온성 병원균인 *Listeria monocytogenes*를 검색하기 위해 적절한 DNA 추출법 확립과 DNA 조성이 가장 비슷한 *Listeria* spp.들과 비교하여 특이점(specificity)을 찾아내고, specificity를 나타내는 primer를 선별하여 *L. monocytogenes*에 대한 reproducibility를 나타내는 최적 PCR 조건을 확립하는 것이다.

실험 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 그람양성, 냉온성, 병원균인 *Listeria* spp.(Table 1)들은 국립보건원으로부터 분양 받아 이용하였다.

배지(Table 2)는 tryptic soy broth(Difco)와 yeast extract(Difco)를 혼합하여 배지로 이용하였다. Cell wall을 lysis 시키기 위해서는 lysozyme(Sigma)과 SDS(Sigma)를 사용하였으며, PCR용 시약으로 dNTP(Boehringer Mannheim, Germany), Taq DNA polymerase(한국생공, Boehringer Mannheim), 10×reaction buffer(Boehringer Mannheim)를 사용하였다. RAPD를 위한 10-mer의 random primer(Table 3)는 OPG series(Operon)를 이용하였고 이 series는 20가지의 서로 다른 종류의 random primer로 구성되어 있다. 각각의 primer는 동결건조되어 있는 것을 HPLC용 water(Whatman)에 녹여 보관하면서 1 pmole/μl로 희석하여 사용하였다.

그밖에 DNA를 정제하기 위해 NaCl, CTAB/NaCl, Chloroform, Phenol, Isopropanol, Ethanol 등은 first grade level의 시약을 사용하였다.

Table 1. Strains of *Listeria* spp. used in this study

Strain	ATCC No.
<i>Listeria monocytogenes</i>	15313
<i>Listeria monocytogenes</i>	19111
<i>Listeria monocytogenes</i>	19112
<i>Listeria monocytogenes</i>	19113
<i>Listeria monocytogenes</i>	19114
<i>Listeria ivanovii</i>	19119
<i>Listeria grayi</i>	19120
<i>Listeria murrayi</i>	25401
<i>Listeria innocua</i>	33090
<i>Listeria welshimeri</i>	35897
<i>Listeria seeligeri</i>	35967

Table 2. Composition of media

Components		Content
Tryptic soy broth	Tryptone	17 g
	Soytone	3 g
	Dextrose	2.5 g
	Sodium chloride	5 g
	Dipotassium phosphate	2.5 g
Yeast Extract		6 g
Water		1 ℓ

Table 3. 10-mer Random Primer(Operon) used in this study

Primer No.	Length (bp)	Base Sequence	GC Content(%)
OPG - 01	10	5'CTACGGAGGA3'	60
OPG - 02	10	GGCACTGAGG	70
OPG - 03	10	GAGCCCTCCA	70
OPG - 04	10	AGCGTGTCTG	60
OPG - 05	10	CTGAGACGGA	60
OPG - 06	10	GTGCTGCGG	80
OPG - 07	10	GAACCTGCGG	70
OPG - 08	10	TCACGTCCAC	60
OPG - 09	10	CTGACGTCAC	60
OPG - 10	10	AGGGCCGTCT	70
OPG - 11	10	TGCCCGTCGT	70
OPG - 12	10	CAGCTCACGT	60
OPG - 13	10	CTCTCCGCCA	70
OPG - 14	10	GGATGAGACC	60
OPG - 15	10	ACTGGGACTC	60
OPG - 16	10	AGCGTCCTCC	70
OPG - 17	10	ACGACCGACA	60
OPG - 18	10	GGCTCATGTG	60
OPG - 19	10	GTCAGGGCAA	60
OPG - 20	10	TCTCCCTCAG	60

PCR 반응을 하기 위해 Thermal cycler(MJ research, PTC150)를 사용하였고 UV-spectrophotometer (hitachi, 200S)를 사용하여 template DNA의 농도를 측정하였다.

2. 균주 배양

Tryptic soy broth는 3%, yeast extract는 0.6%가 되도록 하여 pH 7.5, 배양 온도 37℃로 유지하여 12시간 동안 shaking incubator에서 2~3회 연속으로 계대배양한 후

사용하였다.

3. DNA의 분리

PCR반응에 적절한 *Listeria* spp.의 DNA를 분리하기 위해 lysozyme을 이용하여 bacterial cell을 lysis시켰고 SDS 1%, NaCl 1 M, CTAB/NaCl solution으로 처리한 후 phenol 처리를 최대한 온화하게 하여 DNA가 물리적, 화학적인 힘으로 분해되는 것을 최소한으로 했다. 분리된 DNA는 λ_{260} 에서 UV spectrophotometer(Hitachi)로 그 농도를 측정하고, 50 ng/ μ l로 희석하여 PCR에 이용하였다.

4. RAPD-PCR 반응

PCR반응용액에는 250 ng의 chromosomal DNA, 200 μ M의 dNTP, 10×reaction buffer(100 mM Tris, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8.3, 0.05% gelatin(w/v)) 5 μ l와 primer 5 pmole을 0.5 ml PCR tube에 혼합하였다. 여기에 Taq DNA Polymerase 2.5 unit을 첨가하여 H₂O로 전체용액이 50 μ l가 되도록 한 후 50 μ l의 mineral oil로 덮어 반응 중 수분의 증발을 막았다.

Thermal Cycler(MJ research)를 사용하여 initial denaturation은 94℃ 3분한 후 denaturation 94℃에서 1분, annealing 32℃에서 1분, extension 72℃에서 2분간하였다. Cycle 회수는 35회로 하였다.

특히, annealing 온도와 시간은 30℃부터 40℃까지 다양하게 변화시키면서 조사한 뒤 최종적으로 32℃에서 1분으로 결정하게 되었다.

GC content에 의해 계산⁽¹⁰⁾된 annealing 온도와 시간은 Table 4와 같다.

5. RAPD-PCR Products의 분석

RAPD-PCR이 끝난 후 product는 4℃에서 냉장 보관 하면서 분석에 이용하였다. 가능한 한 PCR이 끝난 후 빠른 시간 내에 전기영동을 하였으며, 분석하고 남은 PCR product는 -20℃에 냉동 보관하였다.

50 μ l의 전체반응액에서 14 μ l를 채취하여 blue/orange loading dye(Promegar, U.S.A.) 1 μ l와 혼합한 15

Table 4. Calculation for the Annealing temperature(T_m) with GC content

GC content	60%	70%	80%
Annealing temp. (T_m^*)	32℃	34℃	36℃

$$* T_m = (4 \times [G+C]) + (2 \times [A+T]) \text{℃}$$

μl 의 sample을 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethidium bromide(Sigma)가 첨가된 1.5%(w/v)의 agarose gel에서 10 V/cm로 loading 한 후, UV transilluminator(U.V.P., U.S.A) 위에서 관찰하여 band의 크기와 강도를 분석하였다.

Polaroid type 667의 film으로, shutter speed는 1/2초로 하고, 조리개는 5.6으로 촬영하여 data를 보관하였다.

결과 및 고찰

1. *Listeria* spp.들간의 RAPD-PCR Products의 차이점 비교

*L. monocytogenes*를 검색하기 위해 우선 DNA 조성이 가장 비슷하다고 여겨지는 *Listeria* spp.들을 비교함으로써, 그 구별능력을 갖는 primer를 조사하기 위한 실험을 하였다.

본 실험에 사용된 primer 20가지는 모두 GC content가 다르다. 이들 중 12가지는 GC content가 60%이고, 7가지는 70%, 1가지만 80%이다. 이렇게 모두 다른 GC content에 따라 적합한 annealing 온도도 다르다. 앞의 Table 4에서도 보였듯이 각각 GC content가 60%, 70%, 80%에 따라 32°C, 34°C, 36°C를 나타내므로 세 가지의 온도 중, 가장 많은 primer에 적합하고, 가장 annealing이 잘 되는 32°C를 선택하였고, 30°C에서 40°C까지 온도를 변화시키면서 예비실험을 한 결과 32°C가 가장 적당한 것으로 나타났다. 또한 32°C에서 가장 다양하고 많은 band pattern들을 보여 비교하기가 가장 용이하였다.

34°C나 36°C를 이용하였을 경우 GC content가 60%인 primer에서는 PCR이 이루어지지 않는 sample이 많아 20가지 primer들에 대한 전체적인 pattern을 알아보기에는 적당하지 않았다.

Fig. 1과 Fig. 2는 같은 방법으로 추출된 DNA를 OPG-01부터 20번까지의 primer로 PCR을 한 결과 *L. monocytogenes*를 포함한 일곱 가지의 *Listeria* spp.들은 구별이 가능한 band들의 pattern을 나타낸 것이다.

10-mer의 짧은 random primer들은 template DNA에 무작위적으로 결합하여 DNA 단편들을 복제한다. 20가지의 primer들 중 *L. monocytogenes*만이 갖는 특별한 gene과 특이적으로 결합하는 primer를 선택하기 위하여 전체적인 band pattern을 조사한 결과 OPG-01, 07, 09, 15, 20에서는 PCR반응이 거의 이루어지지 않았고, 나머지 primer들은 모두 한 개 이상의 band를 보였다. 특히, OPG-10은 모든 종류의 *Listeria*에 대해 비슷한 크기와 강도의 band를 보여 *L. monocytogenes*를 검색하는데 부적당한 것으로 나타났다.

OPG-03, 05, 08, 11, 13, 16, 17의 7가지 primer들은 각각 *Listeria*들간에 서로 구별이 가능한 band pattern을 보였다. 그러나, OPG-03, 05, 08, 11, 16은 병원성 균인 *L. monocytogenes*만을 그 밖의 다른 *Listeria* spp.들로부터 구별할 수 있는 band pattern을 나타내지는 못하므로 적합한 primer로 선택될 수 없다.

오직 OPG-13과 OPG-17이 *Listeria* spp.들 중 병원성 균인 *L. monocytogenes*를 검색할 수 있는 primer로 선택되었다.

Fig. 1과 Fig. 2의 결과는 annealing을 32°C에서 1분간 한 것으로 GC content가 각각 다른 모든 primer들에 동시에 적합한 조건은 아니었다. 그러므로 annealing 조건이 변화되면 다른 pattern을 보인다.

2. *L. monocytogenes*들간의 RAPD-PCR Products의 공통점 비교

ATCC number가 다른 다섯 종류의 *L. monocytogenes*들간의 band pattern을 비교하여 그들이 갖는 공통적인 band에 대한 primer를 선별하기 위해 같은 방법으로 추출된 DNA를 OPG-01부터 20번까지의 primer로 PCR을

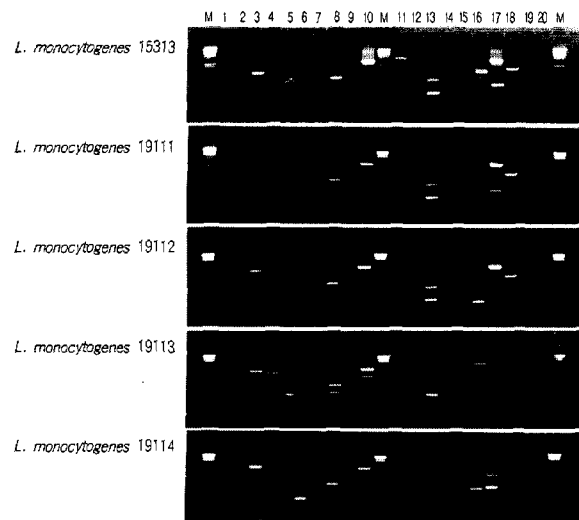


Fig. 1. RAPD patterns for *Listeria monocytogenes*.

Lane 1; OPG-01, Lane 2; OPG-02, Lane 3; OPG-03, Lane 4; OPG-04, Lane 5; OPG-05, Lane 6; OPG-06, Lane 7; OPG-07, Lane 8; OPG-08, Lane 9; OPG-09, Lane 10; OPG-10, Lane 11; OPG-11, Lane 12; OPG-12, Lane 13; OPG-13, Lane 14; OPG-14, Lane 15; OPG-15, Lane 16; OPG-16, Lane 17; OPG-17, Lane 18; OPG-18, Lane 19; OPG-19, Lane 20; OPG-20, Lane M; λ DNA/HindIII. Amplified products were resolved on a 1.5%(w/v) agarose and stained with ethidium bromide.

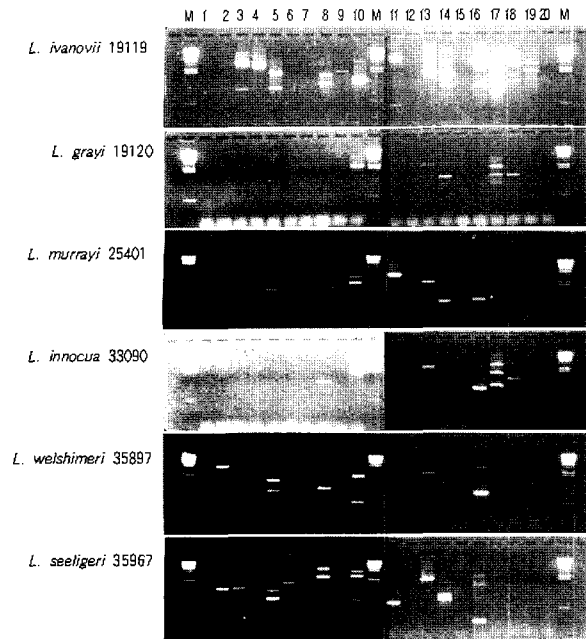


Fig. 2. RAPD patterns for *Listeria* spp.

Lane 1; OPG-01, Lane 2; OPG-02, Lane 3; OPG-03, Lane 4; OPG-04, Lane 5; OPG-05, Lane 6; OPG-06, Lane 7; OPG-07, Lane 8; OPG-08, Lane 9; OPG-09, Lane 10; OPG-10, Lane 11; OPG-11, Lane 12; OPG-12, Lane 13; OPG-13, Lane 14; OPG-14, Lane 15; OPG-15, Lane 16; OPG-16, Lane 17; OPG-17, Lane 18; OPG-18, Lane 19; OPG-19, Lane 20; OPG-20, Lane M; λ DNA/HindIII. Amplified products were resolved on a 1.5% (w/v) agarose and stained with ethidium bromide.

한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. 이들은 전체적으로 고른 band pattern을 보였으며 OPG-13과 OPG-17에서 공통된 band pattern을 보이므로, 우선 이 두 가지 primer가 *L. monocytogenes*를 검색하는데 이용될 수 있다고 보여졌다. 그런데, OPG-17의 경우, 11가지의 *Listeria*들 중 5종류의 *L. monocytogenes*들끼리는 공통된 pattern의 band를 보여, 다른 *Listeria*와 구분을 할 수 있었으나, 단독으로 비교했을 때에는 구분이 매우 애매한 경우가 있어서 병원성 균인 *L. monocytogenes*를 검색하기 위한 primer로 선택되기 어렵다.

OPG-13은 700 bp와 1500 bp 크기의 두 band를 보였고, 이들은 병원성 균인 *L. monocytogenes* ATCC 15313, 19111, 19112, 19113, 19114에만 공통적으로 나타났으며, 또한 매우 분명하고 확실한 band를 형성하여 *L. monocytogenes*를 검색하는데 적합하다고 보여진다.

3. OPG-13을 이용한 RAPD-PCR Products의 분석 Primer 20가지로 *Listeria* spp.에 대해 screening한 결

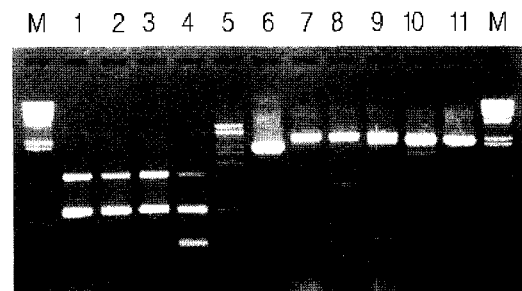


Fig. 3. RAPD pattern for *Listeria* spp. with OPG-13.

Lane 1; *L. monocytogenes*(ATCC15313), Lane 2; *L. monocytogenes* (ATCC19111), Lane 3; *L. monocytogenes* (ATCC-19112), Lane 4; *L. monocytogenes*(ATCC19113), Lane 5; *L. monocytogenes*(ATCC19114), Lane 6; *L. ivanovii*(ATCC-19119), Lane 7; *L. grayi*(ATCC19120), Lane 8; *L. murrayi* (ATCC25401), Lane 9; *L. innocua*(ATCC33090), Lane 10; *L. welshimeri*(ATCC35897), Lane 11; *L. seeligeri*(ATCC-35967), Lane M; λ DNA/HindIII. Amplified products were resolved on a 1.5% (w/v) agarose and stained with ethidium bromide.

과 OPG-13이 병원성 균인 *L. monocytogenes*를 구별하게 하는 band pattern을 보여, OPG-13은 GC content가 70%이므로 annealing 온도가 60%일 때인 32°C보다 2°C 높은 34°C로 annealing하여 낮은 온도에서 mismatching이 일어나는 것을 줄였으며, 온도를 높임으로써 template DNA에 대해 primer가 더욱 specific하게 결합하여 reproductivity가 높게 하였다. 32°C에서 선별된 OPG-13을 이용하여 각 *Listeria* spp.에 대해 primer에 알맞은 annealing 온도인 34°C에서 PCR을 한 결과 Fig. 3과 같은 pattern을 나타냈다.

OPG-13은 GC%가 70%이므로 계산상으로는 annealing 온도가 34°C이다. 34°C에서 annealing한 결과 *L. monocytogenes*만이 갖는 특정한 크기의 band가 형성됨을 보였다.

Line 1부터 4까지 *L. monocytogenes* ATCC15313, 19111, 19112, 19113은 두 종류의 700 bp와 1500 bp band를 형성하였고 그 밖의 *Listeria* spp. Line 6부터 11까지 *L. ivanovii* ATCC19119, *L. grayi* ATCC19120, *L. murrayi* ATCC25401, *L. innocua* ATCC33090, *L. welshimeri* ATCC35897, *L. seeligeri* ATCC35967은 약 2,000~2,300 bp 크기에 해당하는 한 종류의 band를 보여 병원성 균과 비병원성 균이 매우 확실하게 구분되었다.

요 약

Primer 20가지로 *Listeria* spp.에 대해 screening을 하여 병원균인 *L. monocytogenes*를 구별하게 하는 RAPD-PCR의 band pattern을 나타내는 10-mer random primer가 OPG-13이라는 것을 알았다.

OPG-13은 GC%가 70%이므로 계산상으로는 annealing 온도가 34°C이다. 32~36°C까지 다섯 가지의 온도로 annealing한 결과 *L. monocytogenes*만이 갖는 특정한 크기의 band가 역시 34°C에서 형성됨을 알아냈고, 34°C를 annealing 온도로 정하였다.

Line 1부터 4까지 *L. monocytogenes* ATCC15313, 19111, 19112, 19113은 2개의 700 bp와 1500 bp band를 형성하였고 그 밖의 *Listeria* spp.들 Line 6부터 11까지 *L. ivanovii* ATCC19119, *L. grayi* ATCC19120, *L. murrayi* ATCC25401, *L. innocua* ATCC33090, *L. welshimeri* ATCC35897, *L. seeligeri* ATCC35967은 약 2,000~2,300 bp 크기 한 개의 band를 보여 병원성 균과 비병원성 균이 매우 확실하게 구분되는 band pattern이 나타나는 이러한 결과로 10-mer random primer인 OPG-13을 이용한 RAPD-PCR 방법이 병원균인 *L. monocytogenes*를 검색하는데 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

- Eugen, D, Michaela, LW, Werner, G and Trinad, C. Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes*. That is species specific and physically linked to the Listeriolysin Gene. *Infect. Immun.* 59:65-72. 1991
- Portnoy, DA, Chakraborty, T, Goebel, W and Cossart, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect. Immun.* 60:1263-1267. 1992
- Datta, AR, Moore, MA, Wentz, BA and Lane, J. Identification and enumeration of *Listeria monocytogenes* by nonradioactive DNA probe colony hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:144-149. 1993
- Saiki, RK, Gelfand, DH, Stoffel, S, Scharf, SJ, Higuchi, R, Horn, GT, Mullis, KB and Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491. 1988
- Innis, MA, Gelfand, DH, Sninsky, JJ and White, TJ. PCR protocols ; A guide to methods and applications, pp.3-20. Academic press, Inc. 1990
- Fung, DYC. What's needed in rapid detection of foodborne pathogens. *Food Technology* June:64-67. 1995
- Sakallah, SA, Lanning, RW and Cooper, DL. DNA fingerprinting of crude bacterial lysates using degenerate RAPD primers. *PCR Methods Applic.* 4: 265- 268. 1995
- Sneath, PHA, Mair, NS, Sharpe, ME and Holt, JG. Bergey's manual of systematic bacteriology-volume2, pp.1235-1245. Williams & Wilkins. 1986
- Gellin, BG and Broome, CV. Listeriosis. *JAMA.* 261:1313-1320. 1989
- Brown, TA. Gene cloning, An introduction, pp. 228-249. Van Nostrand Reinhold(UK) Co. Ltd. 1986

(2004년 7월 1일 접수)