

ERIC-PCR genomic fingerprinting에 의한 주요 식중독 그람 음성 세균 4속의 구별

정혜진 · 박성희 · 서현아 · 김영준 · 조준일 · 박성수¹ · 송대식² · 김근성*

중앙대학교 식품공학과, ¹제주한라대학 제주향토식품연구소, ²(주)신원 FI

Differentiation of Four Major Gram-negative Foodborne Pathogenic Bacterial Genera by Using ERIC-PCR Genomic Fingerprinting

Hye-Jin Jung, Sung-Hee Park, Hyeon-A Seo, Young-Joon Kim, Joon-Il Cho,
Sung-Soo Park¹, Dae-Sik Song², and Keun-Sung Kim*

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

¹Cheju Traditional Food Institute, Cheju Halla College

²Shinwon Food Industry Co., Ltd.

Widespread distributions of repetitive DNA elements in bacteria genomes are useful for analysis of genomes and should be exploited to differentiate food-borne pathogenic bacteria among and within species. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence has been used for ERIC-PCR genomic fingerprinting to identify and differentiate bacterial strains from various environmental sources. ERIC-PCR genomic fingerprinting was applied to detect and differentiate four major Gram-negative food-borne bacterial pathogens, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, and *Vibrio*. Target DNA fragments of pathogens were amplified by ERIC-PCR reactions. Dendrograms of subsequent PCR fingerprinting patterns for each strain were constructed, through which relative similarity coefficients or genetic distances between different strains were obtained numerically. Numerical comparisons revealed ERIC-PCR genotyping is effective for differentiation of strains among and within species of food-borne bacterial pathogens, showing ERIC-PCR fingerprinting methods can be utilized to differentiate isolates from outbreak and to determine their clonal relationships among outbreaks.

Key words: foodborne pathogenic bacteria, ERIC-PCR, genotyping, genetic similarity

서 론

식품은 그 영양적 가치 및 기호성 등에 못지않게 인간의 질병 예방 및 건강을 유지하는 차원에서 반드시 위생학적 안전성이 확보되어야만 한다. 그러나 해마다 국내외적으로 식중독 세균들에 의한 식중독 사건이 끊임 없이 발생하고 그 규모면에 있어서도 대형화되고 있는 추세이다. 이중에서도 *Salmonella* (1,2), *Escherichia coli*(3-5), *Shigella*(6,7), *Vibrio*(8) 등 4속의 그람 음성 식중독세균들은 식중독 유발에 있어 많은 비중을 차지하고 있다. 이들 식중독세균들은 주로 식육, 야채, 난류, 우유나 유제품 그리고 조리가공 식품등의 여러 가지 식품물을 오염시킬 수 있으며, 이를 섭취한 사람으로 하여금 심각한 식중독을 유발시킨다.

최근 이와 같은 식중독세균들을 분자생물학적인 기술들을 사용하여 분리·동정하는 방법이 많이 연구되어지고 있다. 그리고 이들을 실제로 적용하여 식중독 유발의 원인균과 오염경로 등을 파악하려는 시도도 이루어지고 있다(9). 이와 같은 분자생물학적 기술중 세균의 유전체상에 간헐적으로 분산되어 있는 반복성 DNA sequence를 포함하는 probe를 이용한 유전체 fingerprinting 기술은 각각의 세균 균주들에 있어서 그와 같은 반복성 sequence들 사이의 거리가 각각 다르다는 점을 이용하여 각 균주 수준까지도 분류나 동정이 가능하며 높은 재현성과 경제성의 측면에서도 많은 장점을 보이는 최신 기술이다. 특히, 이와 같은 유전체 fingerprinting 기술은 PCR후 얻어지는 band pattern이 균주에 따라 서로 차이를 보여 중, 이종 및 균주 수준까지도 구별이 가능하므로 균주의 신속한 분류 및 동정뿐 아니라 오염원 추적등의 역학적인 연구에도 유용하게 사용되고 있다(10). 현재 이와 같은 유전체 fingerprinting 기술을 위하여 널리 사용되는 반복성 DNA sequence들은 ERIC(enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequence(11), REP(repetitive extragenic palindromic) sequence(12), 그리고 BOX sequence(13) 등이 있다.

*Corresponding author: Keun-Sung Kim, Department of Food Science and Technology, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University, 72-1, Ansong-si, Gyeonggi 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-3032
Fax: 82-31-675-4853
E-mail: keunsung@post.cau.ac.kr

이러한 반복성 sequence들 중에서 126 bp element들로서 중앙에 보존된 palindromic 구조를 가지고 있는 ERIC sequence는 염색체 상에서 non-coding 부위에 위치하며 방향성에 있어서 전사 방향과 같은 방향 혹은 반대방향에 관계없이 염색체 상에 위치할 수 있다(14). 또한 초기 연구단계에서 ERIC sequence는 *E. coli*와 *S. typhimurium*과 같은 그람 음성 장내세균들에서 주로 발견되었으나(15), 이후 이러한 ERIC sequence는 *Neisseria*, *Mycococcus*, *Deinococcus*, *Streptococcus* 등과 같은 속을 포함하는 그람 음성 및 양성 세균들에서 모두 발견되었다(16).

그러므로 본 연구에서는 높은 분리능을 가지고 있을 뿐만 아니라 실험의 재현성과 경제성의 측면에서도 많은 장점을 갖고 있는 ERIC sequence를 사용한 ERIC-PCR을 적용하여 *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella*, *Vibrio* 등 4속의 주요 그람 음성 식중독 유발 세균들로부터 유전체 fingerprinting pattern을 얻었다. 이와 같이 얻어진 유전체 fingerprinting pattern을 사용하여 동일 속 내에서 표준균주들과 식품 혹은 임상에서 분리된 분리균주들과의 dendrogram 상에서 상호 비교 분석을 통하여 유추된 유전적 근연관계를 바탕으로 하여 식중독 유발 세균의 동정 및 오염 경로 파악 방법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

실험에 사용된 4속(*Salmonella*, *E. coli*, *Vibrio*, *Shigella* 등)의 표준균주는 Table 1에 나타내었다. 또한 다양한 source로부터 분리된 4속의 분리균주는 Table 2에 나타내었다. 이러한 균주들을 사용전 tryptic soy broth(TSB, Difco Laboratories, MI, USA) 및 tryptic soy agar(TSA, Difco Laboratories, MI, USA)에 수회 계대배양하여 사용하였다.

Table 1. Reference strains used in this study

Codes	Strains
ESC-R1	<i>Escherichia coli</i> H1029 (serotype unconfirmed)
ESC-R2	<i>Escherichia coli</i> 330C1 (O159:H4)
ESC-R3	<i>Escherichia coli</i> 411C1 (O25:H24)
ESC-R4	<i>Escherichia coli</i> 214-4 (serotype unconfirmed)
ESC-R5	<i>Escherichia coli</i> H10407 (O78:H11)
ESC-R6	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 (serotype unconfirmed)
ESC-R7	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35150 (O157:H7)
SAT-R1	<i>Salmonella typhi</i> Ty2 ATCC 19430
SAT-R2	<i>Salmonella typhi</i> O901W ATCC 10749
SAT-R3	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028
SAT-R4	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 19585
SAT-R5	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 29629
SAE-R1	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076
SHD-R1	<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 27345
SHF-R1	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903
SHB-R1	<i>Shigella boydii</i> ATCC 8700
SHS-R1	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 29930
VIC-R1	<i>Vibrio cholerae</i> NIH 35A3
VIM-R1	<i>Vibrio mimicus</i> ATCC 33653
VIP-R1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802
VIP-R2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 33844

Total DNA 추출

Versalovic 등(17)의 방법에 따라 *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp.의 total DNA를 각각 추출하였다. 각각의 균주를 5 mL의 TSB 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 진탕배양 후, 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 수확한 다음, 1 mL의 1 M NaCl을 넣어서 2회 세척한 후, 다시 원심분리하여 균체를 수확한 후 700 µL의 1×TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 용액에 현탁시켰다. 현탁된 세포에 100 µL의 lysozyme(2 mg/mL)과 30 µL의 RNase A(10 mg/mL)를 넣어서 37°C에서 20분간 방치한 후, lysozyme으로 분해가 안됐을 경우 60 µL의 SDS(10%)를 가하였다. 이 현탁액에 100 µL의 sarkosyl

Table 2. Isolated strains used in this study

Codes	Strains
ESC-I1	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0056
ESC-I2	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0059
ESC-I3	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0061
ESC-I4	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0079
ESC-I5	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0081
ESC-I6	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0084
ESC-I7	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0087
ESC-I8	<i>Escherichia coli</i> KMEC-0096
ESC-I9	<i>Escherichia coli</i> KMEC-00228
ESC-I10	<i>Escherichia coli</i> KMEC-00231
SAE-I1	<i>Salmonella enteritidis</i> KMSM0002
SAS-I1	<i>Salmonella</i> spp. Y17
SAS-I2	<i>Salmonella</i> spp. Y19
SAS-I3	<i>Salmonella</i> spp. Y20
SAS-I4	<i>Salmonella</i> spp. Y21
SAS-I5	<i>Salmonella</i> spp. Y22
SHS-I1	<i>Shigella sonnei</i> S1
SHS-I2	<i>Shigella sonnei</i> S2
SHS-I3	<i>Shigella sonnei</i> S3
SHS-I4	<i>Shigella sonnei</i> S4
SHS-I5	<i>Shigella sonnei</i> S5
SHS-I6	<i>Shigella sonnei</i> S6
SHS-I7	<i>Shigella sonnei</i> S7
SHS-I8	<i>Shigella sonnei</i> S8
SHS-I9	<i>Shigella sonnei</i> S9
SHS-I10	<i>Shigella sonnei</i> S10
VIP-I1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V2
VIP-I2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V3
VIP-I3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V5
VIP-I4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V6
VIP-I5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V8
VIP-I6	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V111
VIP-I7	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V112
VIP-I8	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V113
VIP-I9	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V114
VIP-I10	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V115
VIP-I11	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V116
VIP-I12	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V117
VIP-I13	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V118
VIP-I14	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> V119

(10%)과 60 μ L의 proteinase K(10 mg/mL)를 가한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 이 분해된 세포현탁액으로부터 phenol과 ethanol을 이용하여 DNA를 추출하였으며, 추출된 DNA를 50 μ L의 1 \times TE(10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA) 용액에 용해하여 사용하였다.

PCR 분석 및 확인

PCR 반응 혼합액은 5 μ L의 10 \times reaction Buffer(최종 농도 -400 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0), 5 μ L의 dNTP, 1 U의 Taq DNA polymerase(Bioneer, Daejeon, Korea), 2 μ M의 각 primer 및 template DNA 1 μ L의 혼합액에 증류수를 최종 50 μ L가 되도록 첨가하여 DNA 연쇄중합반응기 PTC-100(MJ Research, Inc., MA, USA)에서 증폭시켰다. 본 연구에서 위의 4속의 식중독유발 세균들은 Versalovic 등(17)에 의해 고안된 ERIC1R과 ERIC2 primer set를 이용하여 중합반응을 실행하였다. 한편 ERIC-PCR 반응 조건은 94°C에서 7분간 가열한 후, denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 52°C에서 1분, 그리고 extension은 72°C에서 3분으로 30 cycle 반복하였고, 마지막에 72°C에서 3분간 더 반응시킨 뒤, 4°C에서 30분간 방치시켰다. PCR 산물은 1.5% agarose(1 \times TAE) gel에서 120V로 1시간 전기영동하고 ethidium bromide(5 μ g/mL)로 염색한 후 transilluminator로 확인하였다. 산물의 크기는 1 kb DNA Ladder(Gibco-BRL laboratories, NY, USA)를 사용하여 측정하였다. 한

편 PCR 결과는 재현성을 확인하기 위하여 3회 반복하여 얻은 결과값을 사용하였다.

균주간의 연관성 분석

각 균주간 band pattern의 비교를 위하여 band intensity는 고려하지 않고 동일한 크기의 band들만을 동일 부위의 증폭 band로 가정하여 동일한 크기의 band 유무에 따라 1과 0으로 구분하여 Bio-Gene software(version 96, Vilber Lourmat, Mame la vallee, France) 프로그램에 입력한 뒤 UPGMA(unweighted paired group methods with arithmetic average)법(18)을 이용하여 dendrogram을 작성하였으며, Jaccard coefficient(19,20)를 근거로 유사도 값을 구하였다. 유사도 값은 0%에서 100%의 범위로 표시되었으며, 본 논문을 위하여 유사도 값이 90% 이상일 경우 genome상 ERIC sequence 분포도와 관련하여 유전적 연관성이 있는 것으로 사료되어 동일한 type으로 구분하였다.

결과 및 고찰

E. coli

E. coli O157:H7을 포함하는 7개의 *E. coli* 표준균주와 다양한 source로부터 분리된 10개의 *E. coli* 균주를 대상으로 ERIC-PCR을 실시한 결과, 100 bp에서 4.0 kb 범위에 걸쳐 5-12개의 band가 증폭되었다(Fig. 1, Panel A). 그 중 0.3 kb, 0.42 kb 및

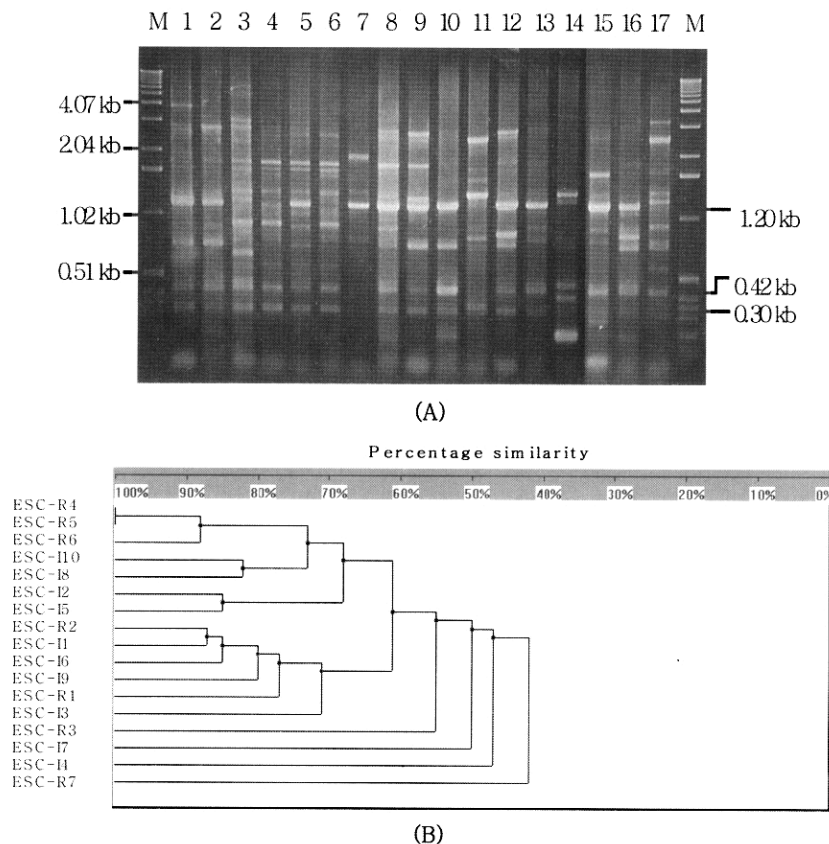


Fig. 1. Panels A and B represent fingerprinting patterns generated using the ERIC-PCR products from *E. coli* strains and a corresponding dendrogram depicting ERIC-PCR-derived genetic similarities among them, respectively.

Lanes M showed 1 kb DNA ladders. Lanes 1 to 7 showed reference strains and other lanes showed isolated strains. Lane 1: ESC-R1, Lane 2: ESC-R2, Lane 3: ESC-R3, Lane 4: ESC-R4, Lane 5: ESC-R5, Lane 6: ESC-R6, Lane 7: ESC-R7, Lane 8: ESC-11, Lane 9: ESC-12, Lane 10: ESC-13, Lane 11: ESC-14, Lane 12: ESC-15, Lane 13: ESC-16, Lane 14: ESC-17, Lane 15: ESC-18, Lane 16: ESC-19, Lane 17: ESC-110.

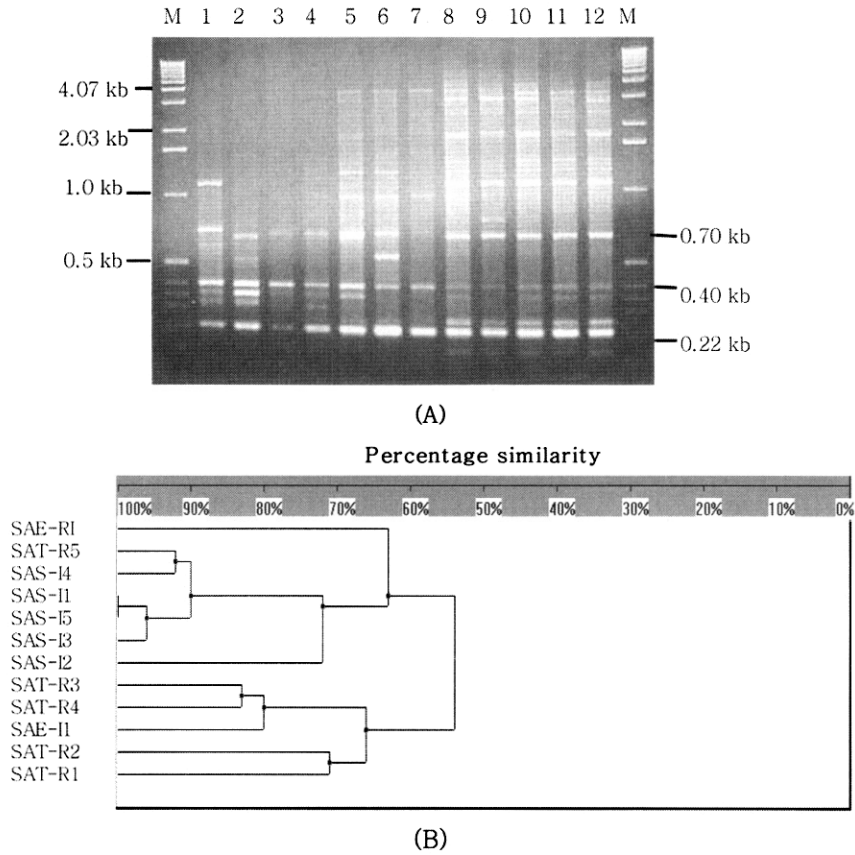


Fig. 2. Panels A and B represent fingerprinting patterns generated using the ERIC-PCR products from *Salmonella* strains and a corresponding dendrogram depicting ERIC-PCR-derived genetic similarities among them, respectively.

Lanes M showed 1 kb DNA ladders. Lanes 1 to 6 showed reference strains and other lanes showed isolated strains. Lane 1: SAT-R1, Lane 2: SAT-R2, Lane 3: SAT-R3, Lane 4: SAT-R4, Lane 5: SAT-R5, Lane 6: SAE-R1, Lane 7: SAE-I1, Lane 8: SAS-I1, Lane 9: SAS-I2, Lane 10: SAS-I3, Lane 11: SAS-I4, Lane 12: SAS-I5.

1.2 kb의 band는 모든 균주에서 공통적으로 확인되었다. 이러한 결과는 Mclellan 등(21)이 다양한 source로부터 분리된 *E. coli* 를 대상으로 수행한 연구에서 300 bp에서 6.0 kb 범위에 걸쳐 7-13개의 band가 증폭되었다는 보고와 Baldy-Chudzik 등(22)이 호수의 물로부터 분리된 *E. coli*를 대상으로 수행한 연구에서 100 bp에서 2.0 kb 범위에 걸쳐 7-12개의 band가 확인되었으며, 0.3 kb, 0.4 kb 및 0.6 kb의 공통적인 band가 확인되었다는 연구 결과와 유사함을 나타내었다. 또한 *E. coli* 균주들은 공통 band를 중심으로 여러개의 단편들이 각기 생성되어 각 균주들의 고유한 fingerprinting pattern을 나타내었다. 한편 혈청형이 O78:H11인 ESC-R5(*E. coli* H10407)와 혈청형이 확인되지 않은 ESC-R4(*E. coli* 214-4)는 유사한 band pattern을 나타내었다.

각 DNA fingerprint의 연관성 분석 결과 실험균주들은 genetic similarity 90% 수준에서 16개의 type을 나타내었고(Fig. 1, Panel B), 42% 수준에서는 두 type으로 양분되었으며, 이는 사용된 *E. coli* 균주중 혈청형이 O157:H7인 균주와 그 이외의 혈청형을 갖는 균주로 나뉘어진 것이었다. 그리고 유사한 band pattern을 나타내었던 ESC-R4와 ESC-R5는 DNA 연관성 분석에서 100% 일치하는 결과를 나타내었다. 한편 본 연구에서는 혈청형이 확인되지 않은 ESC-R1, ESC-R4 및 ESC-R6를 제외하고 각기 다른 혈청형을 갖는 것으로 확인된 *E. coli* 표준균주들에 대한 본 연구 결과에 의하면 균주마다 각기 다른 band pattern 및 낮은 genetic similarity를 나타내었다. 이러한 현상은 일반적으로 반복성 sequence를 이용한 PCR 기술이 종(species) 수준, 더 나아

가 균주 수준에서도 분리·동정되어질 수 있다는 Louws 등(23)의 주장을 뒷받침 해주는 결과라 할 수 있겠다.

Salmonella spp.

*Salmonella*속의 주요 종인 *S. typhi*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* 등의 6개 표준균주와 다양한 육제품에서 분리한 *Salmonella* spp. 6개 분리균주를 대상으로 ERIC-PCR을 실시한 결과 220 bp에서 4.1 kb 범위에 걸쳐 5-14개의 band가 증폭되었다(Fig. 2, Panel A). 그리고 모든 표준균주와 분리균주로부터 비록 band intensity의 차이는 있었으나 0.22 kb, 0.4 kb 및 0.7 kb의 주요 band가 확인되었다. 이러한 결과는 Burr 등(24)이 하수에서 분리된 *Salmonella*를 대상으로 수행한 연구에서 200 bp에서 2.0 kb 범위에 걸쳐 6-10개의 band가 확인되었으며, 0.26 kb, 0.72 kb 및 0.84 kb의 주요 band가 확인되었다는 연구와 Chmielewski 등(25)이 닭으로부터 분리된 *Salmonella*를 대상으로 수행한 연구에서 90 bp에서 1.5 kb 범위에 걸쳐 4-14개의 band가 증폭되었으며, 0.28 kb band가 모든 균주에서 공통적으로 생성된다는 보고와 비교하여 전형적으로 공통적인 band가 1-3개 정도 생성된다고 보고한 점에서는 유사함을 나타내었다.

각 DNA fingerprint의 연관성 분석 결과, 실험균주들은 genetic similarity 90% 수준에서 8개의 type으로 나뉘어졌으며, 55% 수준에서 2개의 type으로 나뉘어졌다. 이때 *S. enteritidis*의 경우 표준균주와 분리균주는 dendrogram상에서 각기 다른 type을 독립적으로 형성하였다(Fig. 2, Panel B).

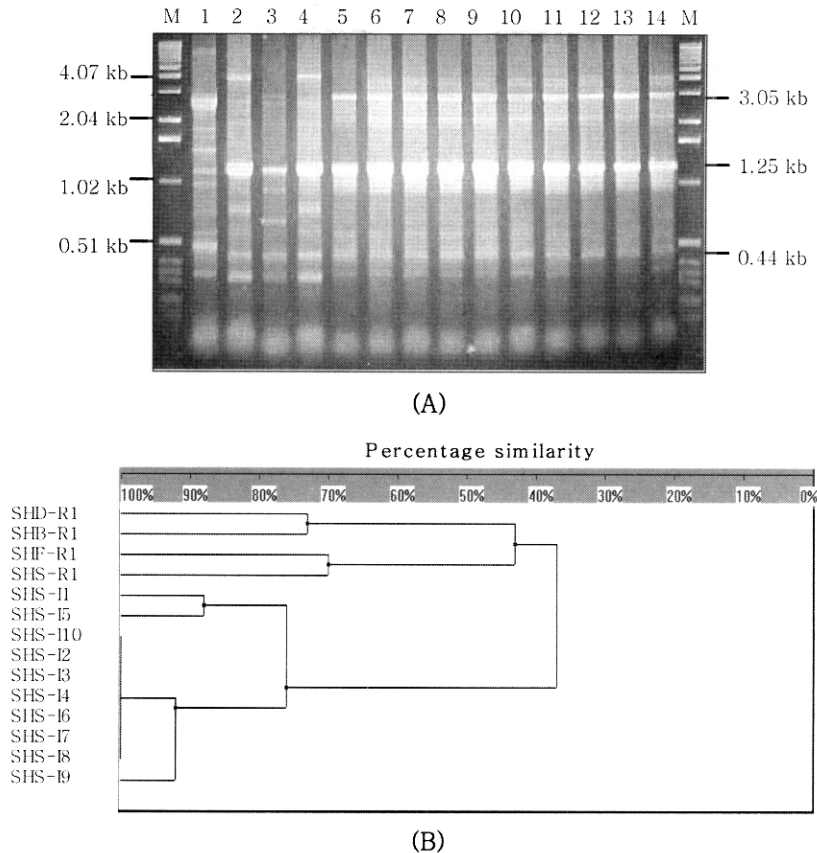


Fig. 3. Panels A and B represent fingerprinting patterns generated using the ERIC-PCR products from *shigella* strains and a corresponding dendrogram depicting ERIC-PCR-derived genetic similarities among them, respectively.

Lanes M showed 1 kb DNA ladders. Lanes 1 Lane 4 showed reference strains and other lanes showed isolated strains. Lane 1: SHD-R1, Lane 2: SHF-R1, Lane 3: SHB-R1, Lane 4: SHS-R1, Lane 5: SHS-I1, Lane 6: SHS-I2, Lane 7: SHS-I3, Lane 8: SHS-I4, Lane 9: SHS-I5, Lane 10: SHS-I6, Lane 11: SHS-I7, Lane 12: SHS-I8, Lane 13: SHS-I9, Lane 14: SHS-I10.

Shigella spp.

국내·외에서 발생한 *Shigella*속에 의한 식중독증 *S. sonnei*에 의한 식중독 발생 보고가 가장 큰 비율을 차지하므로(6) 본 연구에서는 *Shigella*속에 속하는 4개 표준균주와 다양한 source로부터 분리된 10개 *S. sonnei* 분리균주를 대상으로 ERIC-PCR을 실시하였다. 그 결과 330 bp에서 4.0 kb 범위에 걸쳐 4-12개의 band가 증폭되었다. 그리고 모든 균주로부터 0.33 kb와 1.25 kb의 band가 증폭되었으며, *S. sonnei*의 경우 0.33 kb와 1.25 kb band 이외에도 대부분의 균주에서 0.44 kb, 2.0 kb 및 3.05 kb의 band가 확인되어 *Shigella*속내의 다른 종과 구별되는 band pattern을 나타내었다(Fig. 3, Panel A). 또한 *S. flexneri*와 *S. sonnei*의 ERIC-PCR fingerprint는 Versalovic 등(17)에 의한 연구 결과와 매우 유사한 band pattern을 나타내었다. 한편 모든 10개 *S. sonnei* 분리균주들은 ERIC-PCR에 의하여 거의 동일한 fingerprinting pattern을 나타내었는데, 이는 Liu 등(6)이 *S. sonnei*의 분리·동정실험에서 ERIC-PCR이 PFGE와 더불어 *S. sonnei*를 분리하는데 최고 분리능을 갖는 방법이라고 제안한 보고를 뒷받침 해주는 결과라고 할 수 있겠다.

각 DNA fingerprint의 연관성 분석 결과 실험균주들은 genetic similarity 90% 수준에서 7개의 type을 나타내었고(Fig. 3, Panel B), 분리균주 중 SHS-II(*S. sonnei* S1)과 SHS-I5(*S. sonnei* S5)가 각각의 type을 형성하였다(Fig. 6, Panel A). 한편 SHS-II(*S. sonnei* S1)부터 SHS-I10(*S. sonnei* S10)까지의 10개 분리균주중

SHS-II(*S. sonnei* S1)과 SHS-I5(*S. sonnei* S5)를 제외한 8개 분리균주가 동일한 type을 형성하고 있었다.

Vibrio spp.

본 연구에서는 일반적으로 병원성 *Vibrio*속에 속하는 1개 *V. cholerae* 표준균주, 1개 *V. mimicus* 표준균주, 2개 *V. parahaemolyticus* 표준균주 등의 4개 표준균주와 바지락, 홍합등 다양한 패류로부터 분리된 14개 *V. parahaemolyticus* 분리균주를 대상으로 ERIC-PCR을 실시하였다. 그 결과 200 bp에서 5.0 kb 범위에 걸쳐 4-9개의 band가 증폭되었으며, *V. parahaemolyticus*의 경우 모든 표준균주와 분리균주에서 0.51 kb, 1.5 kb의 band가 확인되어 *V. cholerae*, *V. mimicus*와는 다른 band pattern을 나타내었다(Fig. 4, Panel A). 물론 VIM-R1(*Vibrio mimicus*)의 경우, *V. parahaemolyticus*종의 균주들처럼 0.51 kb 부근에서 intensity는 약하나 동일한 분자량의 band를 가지고 있었지만, 1.5 kb 크기의 band가 증폭되지 않아서 *V. parahaemolyticus*와 차이를 나타내었다. 이는 Wong 등(26)이 식중독 환자로 부터 분리된 *V. parahaemolyticus*를 대상으로 수행한 연구에서 0.52 kb의 band가 공통적으로 검출되었다는 보고와 Khan 등(27)이 해수와 수산물에서 분리된 *V. parahaemolyticus*를 대상으로 수행한 연구에서 0.85 kb와 1.5 kb의 band가 공통적으로 검출되었다는 보고와 유사한 band pattern이다.

각 DNA fingerprint의 연관성 분석 결과, *V. parahaemolyticus*

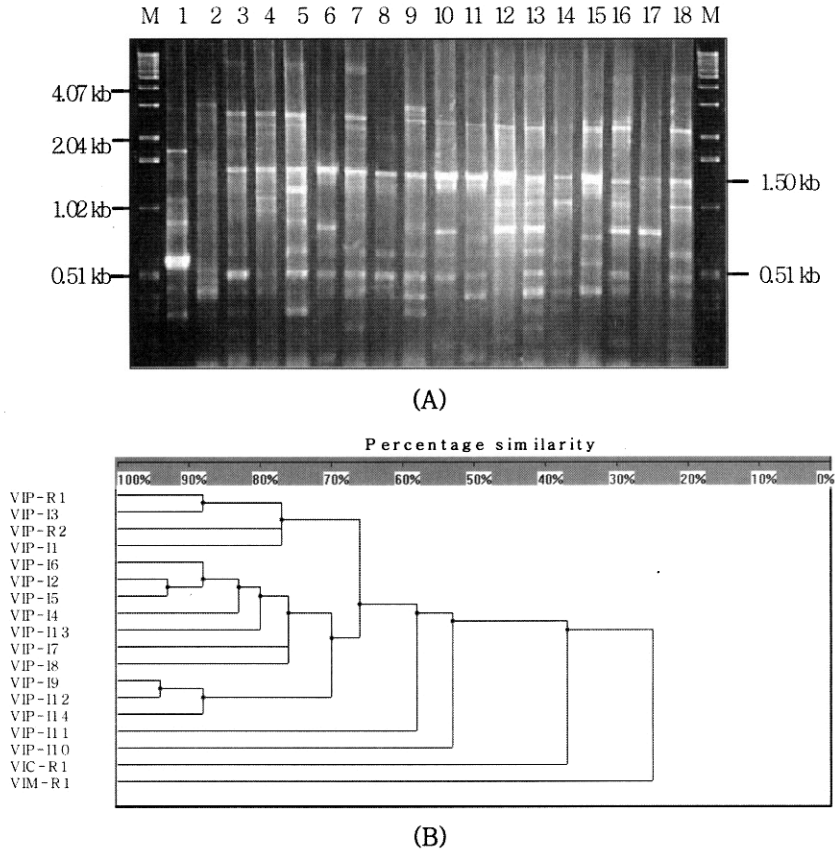


Fig. 4. Panels A and B represent fingerprinting patterns generated using the ERIC-PCR products from *Vibrio* strains and a corresponding dendrogram depicting ERIC-PCR-derived genetic similarities among them, respectively.

Lanes M showed 1 kb DNA ladders. Lanes 1 to 4 showed reference strains and other lanes showed isolated strains. Lane 1: VIC-R1, Lane 2: VIM-R1, Lane 3: VIP-R1, Lane 4: VIP-R2. Lane 5: VIP-I1, Lane 6: VIP-I2, Lane 7: VIP-I3, Lane 8: VIP-I4, Lane 9: VIP-I5, Lane 10: VIP-I6, Lane 11: VIP-I7, Lane 12: VIP-I8, Lane 13: VIP-I9, Lane 14: VIP-I10, Lane 15: VIP-I11, Lane 16: VIP-I12, Lane 17: VIP-I13, Lane 18: VIP-I14.

는 genetic similarity 90% 수준에서는 16개의 type으로 나뉘었으며 VIP-I2(*V. parahaemolyticus* V3)과 VIP-I5(*V. parahaemolyticus* V8), VIP-I9(*V. parahaemolyticus* V114)와 VIP-I12(*V. parahaemolyticus* V117)이 각각 동일한 type을 형성하였다. 한편 genetic similarity 53% 수준에서는 VIC-R1(*V. cholerae* NIH 35A3)과 VIM-R1(*V. mimicus* ATCC 33653)을 제외한 표준균주와 분리균주가 모두 한 type으로 분류되었다. 그리고 VIC-R1(*V. cholerae* NIH 35A3)와 VIM-R1(*V. mimicus* ATCC 33653)는 각각 37%와 25%수준에서 유사성을 갖는 것으로 나타났다(Fig. 4, Panel B).

4속 병원성미생물간의 유전적 유사도 분석

본 연구에서는 *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* 등 4속의 주요 그람 음성 식중독 유발 세균들을 대상으로 반복성 염기서열인 ERIC DNA sequence를 응용한 ERIC-PCR을 실시하였다. 이전의 보고에서 이들 4속의 식중독 유발 세균 중 각각 혹은 일부를 대상으로 반복성 염기서열을 이용한 PCR을 적용한 사례들은 있지만 그때 적용한 primer, PCR 반응조건 및 전기영동조건 등이 다양하였다. 그러므로 본 연구에서는 위의 4속의 그람 음성 식중독 세균들에 대하여 최적화된 동일한 primer 쌍을 이용하였고, 또한 동일한 PCR 반응조건 및 전기영동 조건을 적용하였다. 이와 같은 ERIC-PCR 반응을 통하여 위의 4속에 속하는 본 연구에 사용된 모든 균주들로부터 증폭된 band

수는 속마다 상이하였으며, 4속중 *Vibrio*속으로부터 가장 적은 숫자(9개)의 단편이 증폭되었고, *Salmonella*속으로부터 가장 많은 숫자(14개)의 단편이 증폭되었다. 그리고 모든 4속의 식중독 세균 균주마다 ERIC-PCR 후 생성되는 fingerprinting pattern에서 속마다 1-3개의 공통적이며 독특한 band가 생성되는 것이 확인되어 이러한 pattern을 이용한 속 수준의 분리·동정과 그와 같은 주요 band들 이외의 부수적인 band들을 고려하여 종 수준까지의 분리도 가능성을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 높은 분리능을 가지고 있을 뿐만 아니라 실험의 재현성과 경제성의 측면에서도 많은 장점을 갖고 있는 ERIC DNA sequence를 응용한 ERIC-PCR을 이용하여 *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella*, *Vibrio* 등 4속의 주요 그람 음성 식중독 유발 세균들의 분리·동정 방법을 확립하고자 하였다. ERIC-PCR 결과, *E. coli*의 경우 0.3 kb, 0.42 kb 및 1.2 kb의 band가 모든 균주에서 공통적으로 확인되었고, *Salmonella*속으로부터는 0.22 kb, 0.4 kb 및 0.7 kb의 band가 증폭되었다. *Shigella*속은 모든 표준균주와 분리균주로부터 0.33 kb와 1.25 kb의 band가 증폭되었으며, *S. sonnei*의 경우 위의 주요 2개 band 이외에도 대부분의 균주에서 0.44 kb, 2.0 kb 및 3.05 kb의 band가 증폭되어 다른 종의 *Shigella*와 구별되는 fingerprinting pattern을 나타내었

다. 그리고 *V. parahaemolyticus*의 경우 표준균주와 분리균주 모두 0.51 kb와 1.5 kb의 band가 증폭되어 *V. cholerae*, *V. mimicus* 등과 같은 다른 종의 *Vibrio*와 구별되는 fingerprinting pattern을 나타내었다. 이와 같이 4속의 모든 식중독 균주마다 ERIC-PCR 후 생성되는 fingerprinting pattern에서 3-5개의 공통적인 band가 증폭되는 것이 확인되어 이를 이용한 속 수준의 분리·동정과 이러한 주요 band들 이외의 부수적인 band들을 고려하여 종 수준까지의 분리도 가능함을 확인하였다. 따라서 본 연구의 결과는 ERIC 반복적 DNA 염기서열을 이용한 ERIC-PCR이 식중독균의 분리·동정 방법으로 사용될 수 있음을 확인하였으며, 나아가 더 많은 속(genus)의 식중독세균을 대상으로 한 새로운 분리·동정 방법을 확립하는데도 응용이 될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다(KRF-2003-003-F00046).

문헌

- Rajashkera G, Haverly E, Halvorson, DA, Ferris KE, Lauer DC, Nagaraja KV. Multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in poultry. *J. Food Prot.* 63: 155-161 (2000)
- Johnson JR, Clabots C. Improved repetitive-element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 7: 258-264 (2000)
- Dombek PE, Johnson LK, Zimmerley ST, Sadowsky MJ. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2572-2577 (2000)
- Johnson JR, O'Bryan TT. Improved repetitive-element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 7: 265-273 (2000)
- Dalla-Costa LM, Irino K, Rodrigues J, Rivera ING, Trabulsi LR. Characterisation of diarrhoeagenic *Escherichia coli* clones by ribotyping and ERIC-PCR. *J. Med. Microbiol.* 47: 227-234 (1998)
- Liu PYF, Lau YJ, Hu BS, Shyr JM, Shi ZY, Tsai WS, Lin YH, Tseng CY. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1779-1783 (1995)
- Navia MM, Capitano L, Ruiz J, Vargas M, Urassa H, Schelleberg D, Gascon J, Vila J. Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3113-3117 (1999)
- Clark CG, Kravetz AN, Dendy C, Wang G, Tyler KD, Johnson WM. Investigation of the 1994-5 Ukrainian *Vibrio cholerae* epidemic using molecular methods. *Epidemiol. Infect.* 121: 15-29 (1998)
- Olsen JE, Aabo S, Hill W, Notermans S, Wernars K, Granum PE, Popovic T, Rasmussen HN, Olsvik O. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 1-78 (1995)
- Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1661-1669 (1999)
- Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5: 825-834 (1991)
- Higgins CF, Ames GF, Barnes WM, Clement JM, Hofnung M. A novel intergenic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature* 298: 760-762 (1982)
- Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, Andrew P, Prudhomme M, Alloing G, Hakenbeck R. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 20: 3479-3483 (1992)
- de Bruijn FJ. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2180-2187 (1992)
- Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell Biol.* 5: 25-40 (1994)
- Lupski JR, Weinstock GM. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* 174: 4525-4529 (1992)
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831 (1991)
- Li WH. Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 1085-1089 (1981)
- Loubinoux J, Lozniewski A, Lion C, Garin D, Weber M, Le Faou AE. Value of enterobacterial repetitive intergeneric consensus PCR for study of *Pasteurella multocida* strains isolated from mouths of dogs. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2488-2492 (1999)
- Sander A, Ruess M, Bereswill S, Schuppler M, Steinbrueckner B. Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2973-2981 (1998)
- Rajashkera G, Koeuth T, Nevile S, Back A, Nagaraja KV, Lupski JR, Kapur V. SERE, a widely dispersed bacterial repetitive DNA element. *J. Med. Microbiol.* 47:489-497 (1998)
- Baldy-Chudzick K, Niedbach J, Stosik M. rep-PCR fingerprinting as a tool for the analysis of genomic diversity in *Escherichia coli* strains isolated from an aqueous/freshwater environment. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8: 793-798 (2003)
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2286-2295 (1994)
- Burr MD, Josephson KL, Pepper IL. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 24-30 (1998)
- Chmielewski R, Wieliczko A, Kuczkowski M, Mazurkiewicz M, Ugorski M. Comparison of ITS profiling, REP- and ERIC-PCR of *Salmonella Enteritidis* isolates from Poland. *J. Vet. Med.* 49: 163-168 (2002)
- Wong HC, Lin CH. Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4233-4240 (2001)
- Khan AA, McCarthy S, Wang RF, Cerniglia CE. Characterization of United States outbreak isolates of *Vibrio parahaemolyticus* using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR and development of a rapid PCR method for detection of O3:K6 isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 206: 209-214 (2002)