

Random Amplification of Polymorphic DNA와 혈청학적 분석을 이용한 국내식품에서 분리한 *Listeria monocytogenes*의 분류

김현중 · 박시홍 · 김해영*

경희대학교 생명자원과학연구소 및 생명과학대학 식품생명공학과

Classification of *Listeria monocytogenes* Isolates from Korean Domestic Foods Using Random Amplification of Polymorphic DNA and Serotyping Analysis. Kim, Hyun-Joong, Si-Hong Park, and Hae-Yeong Kim*. Institute of Life Sciences & Resources and Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea – Molecular subtyping of *Listeria monocytogenes*, including type strains and isolates from Korean foods, were performed using random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Each *Listeria* species showed specific RAPD band patterns, and *L. monocytogenes* serotypes and isolates were divided into two clusters. RAPD results showed that *L. monocytogenes* isolates from Korean foods were divided into two groups. Group I contained *L. monocytogenes* serotypes 1/2b and 4b, whereas Group II contained serotypes 1/2a and 1/2c. These results suggested RAPD as possible subtyping methods for *Listeria* species. Also, RAPD Results showed significant correlation between molecular subtyping and serotyping of *L. monocytogenes*, and classified two different groups of *L. monocytogenes* isolated from Korean foods.

Key words: Classification, *Listeria*, pathogen, Random Amplification of Polymorphic DNA, serotyping

*Listeria*는 *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* 등 6종이 알려져 있으며 이 중에서 특히 *L. monocytogenes*는 사람과 가축에 listeriosis를 일으키는 원인균이다. *L. monocytogenes*는 그람양성, 통성혐기성의 비아포성 간균으로 편모를 가지고 있어 운동성이 활발하며 인축공동 질병균(Zoonosis)이다[13]. 또한 가축, 야생동물, 토양 그리고 물 등 자연계에 널리 분포되어 있으며 생육온도가 4~40°C로 저온에서도 생장이 가능하기 때문에 저온유통에 있어서 식품 위생상 중요한 문제로 대두되고 있다. 주로 냉장, 냉동식품, 육가공 식품에서 많이 검출되고 있으며 우리 나라에서는 흔하지 않지만 외국의 경우 양배추, 샐러드, 수산물 등과 같은 다양한 식품에서 발병이 되고 있다[14]. 미국에서는 매년 800건 이상의 listeriosis가 발생하며, 그 중 약 50% 정도가 식육과 가공육에 의한 발병으로 보고되고 있다. 특히 *L. monocytogenes*는 사람을 포함한 동물들에 리스테리아병, 심내막염 그리고 수뇌막염과 같은 질병을 일으키는 원인균으로 널리 알려져 왔으며 20~40%의 높은 치사율을 나타낸다[3]. 일반적으로 *L. monocytogenes*는 식품 속에서 2-100 CFU/g의 적은 양으로도 식중독을 일으킬 수 있기 때문에 민감도가 높은 검출방법을 확립하려는 노력들이 많이 이루어지고 있다. *L. monocytogenes*를 분리, 동정하는 고전적인 방법들 중에서 생화학적인 특징을 이용한

방법은 다양한 선택 배지와 항원, 항체 반응을 이용한다. 뿐만 아니라 최근에는 RFLP(restriction fragment length polymorphism)[10, 12], AFLP(amplified fragment length polymorphism)[4], RAPD(random amplification of polymorphic DNA)[2, 5, 6], ribotyping[1, 7, 15], MLEE(multilocus enzyme electrophoresis)[9], virulence gene polymorphisms[11, 15]과 같은 실험 기법들이 사용되고 있다. 그러나 이러한 방법들은 많은 시간과 비용이 소모되며 특이성과 재현성이 결여되는 단점이 알려져 있다.

이러한 단점을 극복하기 위해 RAPD 실험 기법과 serotyping 방법을 활용하여 기존의 *L. monocytogenes*의 분류 방법을 개선하고자 하였다. 본 연구에서는 *L. monocytogenes*에 특이적인 프라이머들을 사용하여 국내의 다양한 식품류에서 분리된 *L. monocytogenes*에 적용하여 serotyping과 함께 분류하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 사용균주

본 실험에 사용된 식품류는 돼지고기, 소고기, 닭 등의 육류와 냉동식품, 수입산 아이스크림, 생우유, 조개류 등을 2003년 8월에서 9월 동안 경기지역의 재래시장에서 무작위적으로 구입하여 사용하였다. 표준 균주는 5개의 *L. monocytogenes*와 5개의 비병원성 *Listeria* species가 사용되었으며 이러한 균주들은 Korean Collection for Type Cultures(KCTC)와 American Type Culture Collection

*Corresponding author
Tel: 82-31-201-2660; Fax: 82-31-204-8116
E-mail: hykim@khu.ac.kr

Table 1. List and serotypes of *Listeria* species type strains used in this study and subtyping results using RAPD.

| Species | Serotype | Results of RAPD | Origin |
|--|----------|-----------------|-----------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111 | 1/2a | II | Poultry |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115 | 4b | I | Human |
| <i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119 | | III | Sheep |
| <i>Listeria grayi</i> ATCC 25401 | | III | Corn and leaves |
| <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 | | III | Cow |
| <i>Listeria welshimeri</i> ATCC 35897 | | III | Plant |
| <i>Listeria seeligeri</i> ATCC 35967 | | III | Soil |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114 | 4a | I | Ruminant brain |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113 | 3 | II | Human |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118 | 4e | I | Chicken |

Clustered results of RAPD; I, Group I; II, Group II; III, Group III.

(ATCC)에서 구입하였고 균주들의 목록은 아래의 Table 1과 같다.

모든 *Listeria* 균주는 37°C의 배양기에서 brain heart infusion(BHI) 배지를 사용하여 20시간 배양을 하였다.

시료로부터 *L. monocytogenes*의 분리 및 혈청형 구분

시중의 시료로부터 *L. monocytogenes* 균주의 분리는 United States Department of Agriculture(USDA)에서 사용하는 검출 방법을 일부 변형하여 사용하였으며 그 방법은 다음과 같다. 225 ml의 UVM(University of Vermont Modified) 배지에 25 g의 시료를 넣고 2분간 균질화를 시킨 후 30°C에서 24시간 동안 배양하고, 배양액의 0.1 ml을 다시 10 ml의 Fraser broth에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 2차 배양을 하였다. *L. monocytogenes*를 특이적으로 검출하기 위하여 2차 배양액을 modified Oxford agar에 streaking을 하고 35에서 48시간 이상 배양한 후, 의심되는 집락은 생화학적인 분석을 통해서 *L. monocytogenes*를 구분하였다. 또한 분리한 *L. monocytogenes*는 혈청형을 구분하기 위해서 TSA-YE에서 35°C에서 18시간 배양한 후 slide agglutination 방법을 이용하여 혈청형을 결정하였다. 사용된 체세포 항체는 OI, OI-II, OIV, OV-VI, OVI, OVII, OVIII, OIX를 사용하였다(Denka Seiken, Tokyo, Japan).

Genomic DNA 추출

Genomic DNA를 추출하기 위하여 *L. monocytogenes*를 brain heart infusion(BHI) broth(Difco Laboratories, Sparks, MD, U.S.A.) 5 ml에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 균체를 모으기 위하여 3 ml의 배양액을 13,000×g, 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 1 ml 멸균수를 이용하여 1번 세척하였다. Genomic DNA는 Genomic DNA Isolation Kit(Nucleogen, Seoul, Korea)을 사용하여 추출하였다. DNA의 농도는 UV-spectrophotometer(Model UV-1700, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 260 nm에서 측정하였으며, 순도가 1.8~2.0(A₂₆₀/A₂₈₀)사이의 DNA를 본

Table 2. Sequences of the seven primers used in this study and the results of amplified products in RAPD.

| Primers | Sequence (5'-3') | No. of bands | Size of Bands (kb) |
|---------|------------------|--------------|--------------------|
| HLWL85 | ACAACTGCTC | 4 - 9 | 0.2 - 3.5 |
| UBC127 | ATCTGGCAGC | 2 - 7 | 0.25 - 3.5 |
| UBC155 | CTGGCGGCTG | 3 - 8 | 0.2 - 3.5 |
| PB1 | GGAACTGCTA | 2 - 6 | 0.25 - 3 |
| PB4 | AAGGATCAGC | 2 - 7 | 0.3 - 3 |
| LA6 | GTTGGTGGCT | 3 - 10 | 0.3 - 3.5 |
| BL3 | ACCGCCTGCT | 3 - 7 | 0.25 - 3 |

실험에 사용하였다. 각각의 추출한 genomic DNA는 25 ng/μl로 희석을 하여 실험에 사용하기 전까지 4°C에 보관하였다.

PCR 조건(RAPD)

본 실험에 사용된 *L. monocytogenes*에 특이적인 프라이머 들[7]은 총 7개가 사용이 되었으며 프라이머 염기서열은 Table 2와 같다. PCR 반응액은 template DNA 25 ng, 1 X *Taq*TM buffer(Mg²⁺ plus), 프라이머 1.6 μmol, dNTP 200 μmol, *Ex Taq*TM DNA polymerase(TaKaRa, Otsu, Shiga, Japan) 1 Unit을 사용하였으며 전체 반응액이 25 μl가 되도록 멸균수를 첨가하였다. PCR은 94°C에서 4분간 pre-denaturation을 한 후에 denaturation을 94°C에서 1분, annealing을 40°C에서 45초, extension을 72°C에서 2분간 수행하였으며 전체 35 cycle을 실시하였다.

전기영동과 RAPD 확인

PCR반응의 결과는 전기영동을 통해서 확인하였다. 전체 반응액에 5 μl의 6X loading buffer를 첨가하여 혼합한 후에 10 μl를 전기영동 하였다. 전기영동은 0.5 μg/ml 농도의 ethidium bromide가 첨가된 0.5X TAE buffer로 만든 1.2% agarose gel에서 50 V, 30분간 전기영동을 하였다. 전기영동 후, gel은 UV transilluminator위에서 밴드의 강도와 크기를

확인한 후에 디지털 카메라(Model DC120, Kodak, Rochester, New York, U.S.A)를 이용하여 사진을 촬영 보관하였다.

RAPD 밴드패턴의 분석

디지털 카메라를 이용하여 이미지 파일로 저장된 PCR 결과 사진을 분석에 사용하였다. 분석 방법은 numerical taxonomy 분석 방법을 이용한 NTSYS-pc(numerical taxonomy system using multivariate statistical program, version 2.02j, Exeter software, Setauket, NY, USA) 프로그램을 이용하였으며 SIMQUAL(similarity for qualitative data) 유사도 매트릭스와 UPGMA(unweighted pair-group method using arithmetic means) 클러스터 분석방법을 이용하였다.

결과 및 고찰

*Listeria monocytogenes*의 분리와 serotyping

국내에 유통중인 식품 중에서 돼지고기(13균주), 소고기(2균주), 닭(28균주), 냉동식품(50균주), 수입아이스크림(7균주), 생우유(1균주), 조개류(3균주), 훈제고기(3균주)의 식품시료로부터 USDA에서 사용하고 있는 *L. monocytogenes* 검출 방법을 이용하여 107개의 *L. monocytogenes*로 추정되는 분리 균주 들을 확보하고, 각 균주의 분리원은 Table 3에 나타내었다. 분리된 *L. monocytogenes*들은 4개의 서로 다른 혈청형을 가지고 있으며, 분리 균주 대부분이 serotype 1/2a(35균주), 1/2b(44균주), 1/2c(25균주)이며, serotype 4b에 속하는 균주는 3개로 나타났다.

Listeria 표준균주 사이의 RAPD 결과 비교

7쌍의 프라이머를 사용하여 *Listeria* species 표준균주와 *L. monocytogenes*의 혈청형 사이의 RAPD 결과는 Fig. 1과 같다. 각각의 프라이머는 각 균주의 genomic DNA와 반응하여 0.2에서 3 kb 크기의 밴드들이 약 3개에서 10개가 나타나는 것을 확인하였다. *Listeria* species 사이에서 밴드 패턴은 서로 구분할 수 있을 만큼 차이를 나타내고 있지만, Fig. 2에서 보는 바와 같이 *L. monocytogenes* 사이에서는 밴드 패턴이 크게 다르지 않는 것으로 나타나고 있다. RAPD 결과를 바탕으로 하여 *L. monocytogenes*는 크게 그룹 I (serotype 1/2b, 4b, 4e)과 그룹 II (serotype 1/2a, 1/2c, 3)로 나눌 수가 있다.

분리 균주 *Listeria monocytogenes*의 RAPD결과 및 subtyping

몇몇의 분자생물학적 방법들이 *Listeria* species와 *L. monocytogenes*의 혈청형을 구분하기 위하여 사용되어 왔으며, 더 나아가 *L. monocytogenes*를 subtyping에도 적용이 되어왔다. 본 연구에서는 국내 식품에서 분리한 다양한 종류의 *L. monocytogenes*를 RAPD 방법을 사용하여 분류하였다. 국내 식품에서 분리한 *L. monocytogenes*를 7쌍의 프라이머들을 이용하여 RAPD를 수행하였으며 분석결과는 Fig. 3과 같다.

표준균주 *Listeria* species와 분리균주 *L. monocytogenes*의 RAPD 결과를 포함하여 분석한 결과 3개의 그룹으로 나눌 수가 있으며, 이 중에서 분리균주 *L. monocytogenes*는 2개의 그룹으로 나누어졌다. 분리 균주 *L. monocytogenes* 그

Table 3. List and serotypes of *Listeria monocytogenes* isolates used in this study and subtyping results using RAPD.

| Species | Serotype | Results of RAPD | Origin | Number of isolates |
|-------------------------------|----------|-----------------|----------------|--------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2b | I | Chicken | 3 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2b | I | Beef | 1 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2b | I | Frozen food | 27 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2b | I | smoked mussels | 3 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2b | I | Ice cream | 7 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2b | I | Pork | 2 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2b | I | Raw milk | 1 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 4b | I | Frozen food | 1 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 4b | I | Shellfish | 1 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 4b | I | Pork | 1 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2a | II | Chicken | 17 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2a | II | Frozen food | 14 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2a | II | Pork | 3 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2a | II | Shellfish | 1 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2c | II | Beef | 1 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2c | II | Chicken | 8 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2c | II | Frozen food | 8 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2c | II | Pork | 7 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> | 1/2c | II | Shellfish | 1 |

Clustered results of RAPD; I, Group I; II, Group II.

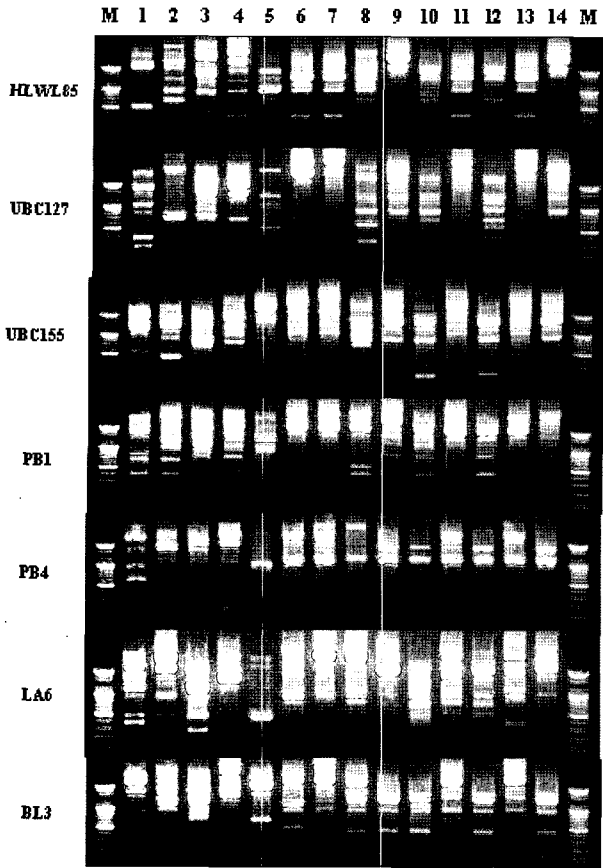


Fig. 1. RAPD patterns of various *Listeria* species with 7 primers. M, 100bp ladder; 1, *L. innocua* ATCC 33090; 2, *L. welshimeri* ATCC 35897; 3, *L. grayi* ATCC 25401; 4, *L. ivanovii* ATCC 19119; 5, *L. seeligeri* ATCC 35967; 6, *L. monocytogenes* ATCC 19111; 7, *L. monocytogenes* ATCC 19113; 8, *L. monocytogenes* ATCC 19114; 9, *L. monocytogenes* ATCC 19115; 10, *L. monocytogenes* ATCC 19118; 11, *L. monocytogenes* (serotype 1/2a); 12, *L. monocytogenes* (serotype 1/2b); 13, *L. monocytogenes* (serotype 1/2c); 14, *L. monocytogenes* (serotype 4b).

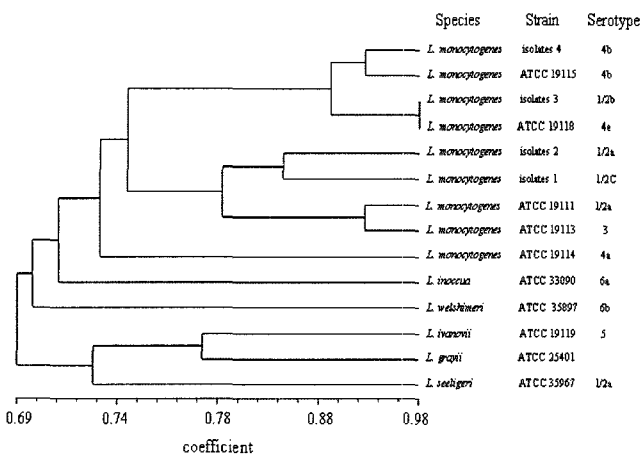


Fig. 2. Dendrogram of the cluster analysis based on RAPD patterns of *Listeria* species and various serotypes of *L. monocytogenes* with seven primers.

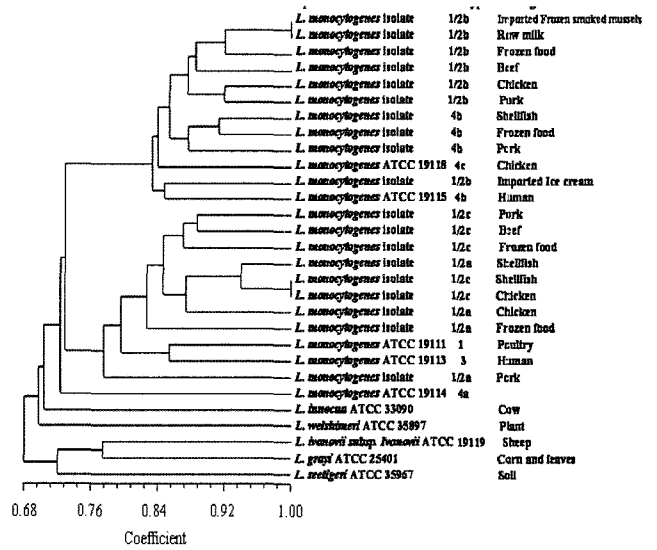


Fig. 3. Dendrogram of the cluster analysis based on RAPD patterns of *Listeria* species and *L. monocytogenes* isolates from various foods obtained with seven primers.

그룹 I에는 serotype 4b, 1/2b로 이루어진 47개의 균주가 속하였으며, 그룹 II에는 serotype 1/2a, 1/2c로 이루어진 60개의 균주가 속하였다. *L. monocytogenes* 혈청형을 7쌍의 프라이머를 사용하여 수행한 RAPD 결과로 구분한 2개의 그룹 (serotype 1/2b, 4b, 4e and serotype 1/2a, 1/2c, 3)은 기존에 보고 되어진 연구와도 같은 결과를 나타내었다[8].

결론적으로 본 연구에서는 RAPD를 이용하여 국내 식품에서 분리한 *L. monocytogenes*의 다양성을 밝혀낼 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 RAPD를 이용한 *L. monocytogenes*의 분자 생물학적 subtyping과 serotyping으로부터 민감도와 재현성이 높은 분류 방법을 제시하였다.

요 약

본 연구에서는 국내시장에서 유통되는 육류, 냉동식품, 생우유, 조개류 등과 같은 식품으로부터 *L. monocytogenes*들을 분리하고 혈청형을 결정하였다. RAPD 결과를 통해서 *L. monocytogenes*는 *Listeria* 속의 다른 균주들과 전체 밴드의 수와 크기에서 구별이 되었다. 또한, *L. monocytogenes*는 2개 그룹으로 구별되었으며, 그룹 I은 *L. monocytogenes* 1/2b, 4e, 4b, 그룹 II는 *L. monocytogenes* 1/2a, 1/2c, 3 혈청형 그룹별로 분류되었다. 결론적으로 RAPD 방법과 serotyping은 *L. monocytogenes*를 분류하는 데에 있어서 기존의 방법의 단점을 보완한 새로운 가능성을 제시하였다.

감사의 글

본 연구논문은 Korea Health 21 R&D Project, Ministry

of Health & Welfare, Republic of Korea(02-PJ1-PG1-CH08-0002)의 지원에 얻은 결과로 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Allerberger, F. and S. J. Fritschel. 1999. Use of automated ribotyping of Austrian *Listeria monocytogenes* isolates to support epidemiological typing. *J. Microbiol. Meth.* **35**: 237-244.
- Byun, S. K., S. C. Jung, and H. S. Yoo. 2001. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. *Int. J. Food Microbiol.* **69**: 227-235.
- Carroll, S. A., L. E. Carr, E. T. Mallison, C. Lamichanne, B. Rice, D. M. Rollins, and S. W. Joseph. 1999. Development and evaluation of a 24-hour method for the detection and quantification of *Listeria monocytogenes* in meat product. *J. Food Prot.* **63**: 347-353.
- Guerra, M. M., F. Bernardo, and J. Mclauchlin. 2002. Amplified Fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *System. Appl. Microbiol.* **25**: 456-461.
- Malak, M., A. Vivier, P. Andre, J. Decallonne, and P. Gilot. 2001. RAPD analysis, serotyping and esterase typing indicate that the population of *Listeria monocytogenes* strains recovered from cheese and from patients with listeriosis in Belgium are different. *Can. J. Microbiol.* **47**: 883-887.
- Martinez, I., L. M. Rorvik, V. Brox, J. Lassen, M. Seppola, L. Gram, and B. Fønnesbech-Vogel. 2003. Genetic variability among isolate of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environment, estimated by RAPD typing. *Int. J. Food Microbiol.* **84**: 285-297.
- Mereghetti, L., P. Lanotte, V. N. Savoye-Marczuk, A. Audurier, and R. Quentin. 2002. Combined ribotyping and random multiprimer DNA analysis to probe the population structure of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2849-2856.
- Nadon, C.A., D. L. Woodward, C. Young, F. G. Rodgers, and M. Wiedmann. 2001. Correlation between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2704-2707.
- Norrunng, B. and N. Skovgaard. 1993. Application of multilocus enzyme electrophoresis in studies of the epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Denmark. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2817-2822.
- Paillard, D., V. Dubois, R. Duran, F. Nathier, C. Guittet, P. Caumette, and C. Quentin. 2003. Rapid identification of *Listeria* species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 23S rRNA gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6386-6392.
- Rasmussen, O. F., P. Skouboe, L. Dons, L. Rossen, and J.E. Olsen. 1995. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology* **141**: 2053-2061.
- Smith, M. L. and J. B. Anderson. 1989. Restriction fragment length polymorphism in mitochondrial DNAs of *Armillaria*. *Mycolog. Res.* **93**: 247-256.
- Tabouret, M., J. D. Rycke, and G. Dubray. 1992. Analysis of surface proteins of *Listeria* in relation to species, serovar and pathogenicity. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 743-753.
- Volokhov, D., A. Rasooly, K. Chummakov, and V. Chizhikov. 2002. Identification of *Listeria* species by Microarray-based assay. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4720-4728.
- Wiedmann, M., J. L. Bruce, C. Keating, A. E. Johnson, P. L. McDonough, and C. A. Batt. 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.* **65**: 2707-2716.

(Received Mar. 2, 2006/Accepted Mar. 16, 2006)