

Fingerprinting of *Listeria monocytogenes* by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis

Hyun-Seok Jin and Jong-Bae Kim[†]

Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University

Listeria monocytogenes poses an increasing health risk, which in part is due to increasing health risk, consumption of ready-to-eat food products and the introduction of increasing numbers of food products from regions with different dietary habits. *L. monocytogenes* can be present in meat, shellfish, vegetables, unpasteurised milk and soft cheese and poses a risk if food containing these products is stored at refrigeration temperature and is not properly heated before consumption, as *L. monocytogenes* is psychrophilic. Amplified-fragment length polymorphism (AFLP) analysis is the method of genotypic technique in which adaptor oligonucleotides are ligated to restriction enzyme fragments and then used as target sites for primers in a PCR amplification. The amplified fragments are electrophoretically separated to give strain-specific band profiles. Single-enzyme approach that did not require costly equipment or reagents for the fingerprinting of strains of *Listeria monocytogenes* was developed. Single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SE-AFLP) analysis was used to perform species and strain identification of *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* and *E. coli*. By careful selection of AFLP primers, it was possible to obtain reproducible and sensitive identification to strain level. The AFLP patterns of *L. monocytogenes* are divided by the kinds of specimens in which were isolated. SE-AFLP fragments can be analyzed using standard gel electrophoresis, and can be easily scored by visual inspection, due to the low complexity of the fingerprint obtained by this method. These features make SE-AFLP suitable for use in either field or laboratory applications.

Key Words: *L. monocytogenes*, AFLP, PCR, Fingerprint

서 론

병원성 미생물 감염은 치료와 예방방법의 발전에도 불구하고 공중 보건위생분야에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 캔 식품 제조 과정에서의 보툴리눔증²⁸⁾, 냉장 처리하지 않은 아이스크림이나 햄, 고기 등으로 인한 포도상구균성 식중독^{2,11)}, 오염된 고기에서의 살모넬라증 등이 발견되었고^{27,31,34)}, 방균 노력을 기울였음에도 불구하고 새로운 식중독 원인균에 의한 또 다른 문제점이 야기되고 있다.

음식물 매개성 질병의 원인균으로는 *Staphylococcus aureus*^{3,11,12)}, *Escherichia coli* O157:H7^{7,23)}, *Salmonella* spp.^{27,31)}, *Shigella* spp.¹⁴⁾, *Vibrio parahaemolyticus*¹⁵⁾, *Yersinia enterocolitica*²⁹⁾ 등이 비교적 잘 알려져 있고, 최근에는 식생활 변화에 따른

냉동식품 등에서의 *L. monocytogenes*¹⁾에 의한 질병이 사회적 인 관심의 대상이 되고 있다.

*L. monocytogenes*는 모양이 고른 간균으로 크기는 0.4~0.5 μm ×0.5~2.0 μm 이고 날개로, 연쇄로, V자 형으로 혹은 평행으로 배열되며 오래된 배양에서는 사상형을 볼 수 있다. 또한, 그람양성이고, 혐박이나 아포가 없으며, 20°C나 25°C에서 배양하면 운동성이 있고, 편모는 1~4개를 가지며 반고체 배지에서는 우산 모양의 증식이 특징이다¹⁾.

*L. monocytogenes*는 어류, 조류 및 사람을 포함한 포유동물에 감염을 일으키며, 이러한 listeria 증은 식품매개 감염으로 생각된다. 이 감염은 산발적으로, 또는 집단적으로 발생한다. 장기이식, 림프종, AIDS 환자 등 세포매개성 면역부전인 사람이 감염되기 쉽지만 기존질환이 없는 사람도 드물게 감염될 수 있다. 패혈증, 뇌염 및 수막염도 유발할 수 있다¹⁾.

AFLP (amplified fragment length polymorphism) 법은 최근 들어 새롭게 대두되기 시작한 DNA fingerprinting 기법으로서 RFLP (restriction fragment length polymorphism)와 RAPD (random amplified polymorphic DNA)의 유용한 특성들만 간추려 설계된 새로운 분석방법으로서 1995년 Vos 등³³⁾에 의해 개발

*논문 접수: 2002년 2월 10일
수정접수: 2002년 3월 10일

[†]Corresponding author: Jong-Bae Kim, Dept. Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, Wonju, Korea
Tel: 033-760-2423, Fax: 033-760-2195
e-mail: kimjb@dragon.yonsei.ac.kr

되었다. AFLP는 염기서열에 대한 사전정보 없이도 한번의 PCR 증폭으로도 50~100개의 매우 많은 DNA 단편을 생성하므로 높은 민감도의 DNA 지문 분석을 분석할 수 있는 유용한 수단으로 평가되고 있다²¹⁾. AFLP 분석법은 고도의 재현성 및 확실성을 갖춘 강력한 분석기술로서, 제한효소 및 primer의 다양한 조합으로 고도의 다형성과 다수의 polymorphic DNA marker를 신속하게 검출할 수 있는 molecular typing 기법으로서 식물과 미생물의 typing을 위한 새로운 기법으로 유용하게 이용되고 있다^{13,31)}.

최근에 유전형 분석을 위한 분자생물학적 기법들이 미생물 균주간의 감별에 널리 이용되고 있다. 본 연구에서는 냉동식품에서 문제시 되는 *L. monocytogenes* strains을 유전자 분석하기 위해 PCR 방법을 기반으로 한 AFLP 기법을 확립하였다.

본래 AFLP 기법은 식물의 품종개량을 위해 사용하던 것이 지금은 동물과 원핵동물의 DNA 분석에도 사용한다^{5,10,13,16,19)}. 보통은 6개 염기에 대한 인식부위를 가지는 제한효소와 4개 염기에 대한 인식부위를 가지는 제한효소 두 종류를 가지고 AFLP를 적용시키나, 본 실험에서는 실험의 편의성과 비용적인 면을 고려하여 한 개의 제한효소를 이용하였다.

SE-AFLP (Single-enzyme amplified fragment length polymorphism) 방법에 대해서는 이미 *Legionella pneumophila*³⁰⁾, *Helicobacter pylori*⁸⁾, *Chlamydia psittaci*³⁾, *Mycoplasma capricolum*⁴⁾, *Vibrio vulnificus*⁶⁾, *Campylobacter jejuni*⁹⁾, *Clostridium perfringens*¹⁸⁾ 등에 대해 strain 수준에서의 감별에 사용하였다. 이 방법은 복잡하고 비용이 높은 장비나 소프트웨어가 불필요하고, 결과 분석에 있어서도 패턴 분석에 다른 장비 도움이 없이도 가능하다. 이러한 장점들로 인해 SE-AFLP를 병원성 세균 동정 가능성에 대해 많은 실험실에서 시도되고 있다³²⁾.

다양한 형태의 많은 AFLP 분석법이 개발되었다^{10,17,19,30)}. 이 실험에 사용한 AFLP 방법은 크게 다음과 같이 네 가지 과정으로 구성된다. (1) 추출한 DNA를 한 종류의 제한효소로 반응시킨다. (2) 제한효소 인식부위에 맞추어 제작한 adaptor를 제한효소 처리된 DNA에 ligation시킨다. (3) Adaptor에 상보적인 primer를 가지고 PCR 반응을 통해 adaptor-tagged fragment를 증폭시킨다. (4) agarose gel에 전기영동을 한다. 모든 adaptor-tagged fragment가 증폭되지는 않는데, 이것은 primer의 3' 말단부위에 특정 염기를 하나 더 첨가함으로써 여기에 상보적인 염기서열을 가진 단편들만이 증폭이 되기 때문이다.

본 연구에서는 *L. monocytogenes* 표준 균주에 대해 SE-AFLP 분석법에 대한 실험 기준을 잡고, 실제 검체에서 분리된 *L. monocytogenes*에 대해 AFLP 분석법에 의한 유전형을 판독함으로써 임상적용 가능성 여부에 대하여 알아보고, 더 나아가 다른 병원성 미생물에 대해서도 향후 SE-AFLP 분석법의 응용 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 균주와 배양 조건

본 실험에 이용한 표준 균주는 미국의 American Type Culture Collection (ATCC)에 주문하여 구입한 *L. monocytogenes* ATCC15313와 경상대학교에서 분양받은 *L. monocytogenes* #53, *L. monocytogenes* #54, *L. monocytogenes* #55와 *L. monocytogenes* #3, *L. innocua* HPB #14, *L. gray* HPB #29를 사용하였다. 그리고, 소와 돼지 유래 가공육과 포장육 시료 총 812개의 검체에서 분리·동정한 총 12개주의 *L. monocytogenes*를 실험 대상으로 하였다. 또한, 실험실에서 보유하고 있는 Enterobacteriaceae에 속하는 *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*의 6개 균종을 대상으로 하였다.

세균은 brain heart infusion (Difco, Detroit, MI, U.S.A.) broth 3 ml에 접종하여 호기성 상태로 37°C에서 24시간 배양하여 실험에 사용하였다.

2. DNA 정제, 제한효소 처리 및 adaptor의 ligation

세균의 genomic DNA는 전통적인 alkaline lysis 방법과 DNA isolation kit (QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue Kit, QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, U.S.A.)를 사용하여 추출, 정제하였다. 정제된 DNA의 농도는 A₂₆₀에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

정제된 1 µg의 DNA를 제한효소 20 U의 *Hind*III (Promega Co., Madison, WI, U.S.A.)를 BSA가 25% 농도로 첨가된 1× One-Phor-All buffer (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, U.S.A.)에 멸균 증류수로 최종 반응 양이 30 µl가 되도록 하여 37°C에서 5시간 반응시켰다.

제한효소 반응이 5시간 지난 후 각각의 반응액에 5 pmol의 adaptor, 10 mM ATP 1 µl, 5× OPA, 10 Weiss units의 T4 ligase (Takara Shuzo Co., Otsu, Shiga, Japan)에 멸균 증류수로 10 µl가 되도록 한 다음에 반응액에 첨가하였다. 37°C에서 5시간 반응시킨 후, 다른 조건에는 변화가 없는 상태에서 온도 조건만 16°C로 바꾼 상태에서 10시간 반응시켰다. 반응액의 효소들을 불활성화 시키고, DNA를 선택적으로 얻기 위해 에탄올 침전법을 이용하여 PCR 반응에 사용할 template DNA를 제작하였다.

3. PCR 반응과 전기영동

PCR에 사용되는 primer는 Table 1에서와 같이 네 종류로 사용하였다. 실험에 사용한 adaptor와 primer는 Gibson 등⁸⁾이 사용한 것과 같은 염기서열을 주문 제작 (Bioneer Co., Taejeon, Korea)하여 사용하였다. 증폭 반응은 2 µl의 template DNA,

Table 1. Adaptors and primers used for PCR amplification

		Sequence (5' to 3')	Tm (°C)	Reference number
Adaptor	ADH1	ACGGTATGCGACAG	37.1	8
	ADH2	AGCTCTGTCGCATAACCGTGAG	56.6	8
Primer	HI-A	GGTATGCGACAGAGCTTA	45.3	8
	HI-T	GGTATGCGACAGAGCTTT	47.0	8
	HI-C	GGTATGCGACAGAGCTTC	47.3	8
	HI-G	GGTATGCGACAGAGCTTG	48.3	8

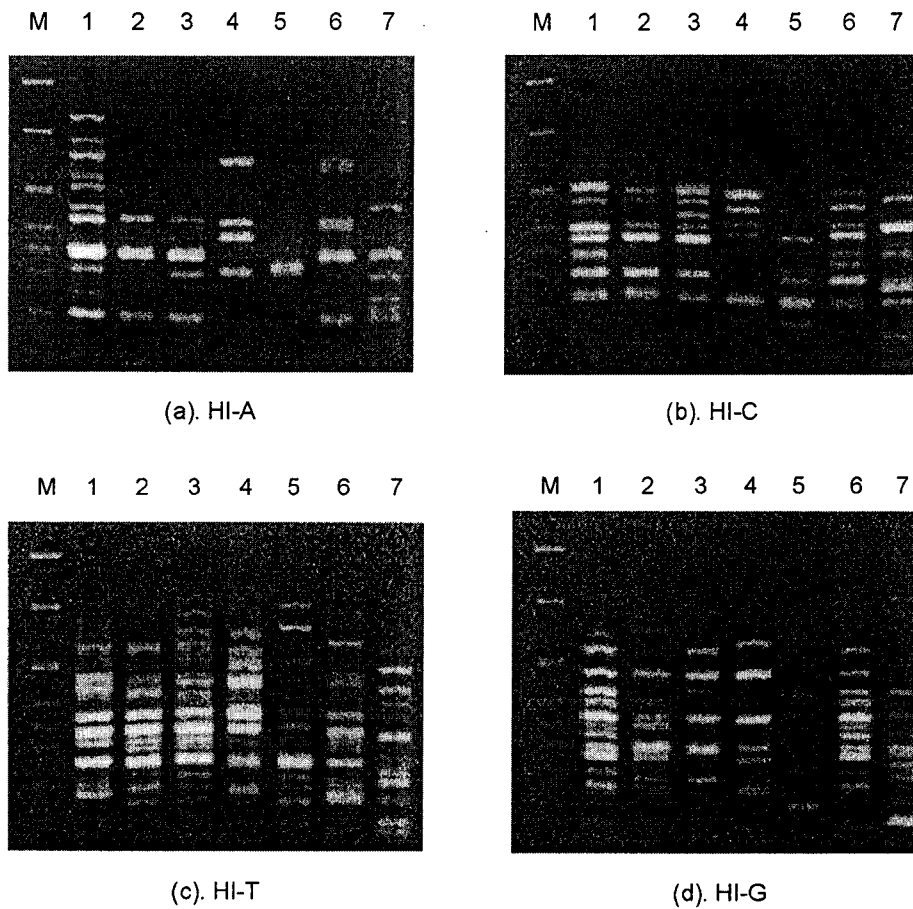


Fig. 1. AFLP analysis of reference strains of *Listeria* spp. Lane M, pBH20 marker; lane 1, *L. monocytogenes* #3; lane 2, *L. monocytogenes* #53; lane 3, *L. monocytogenes* #54; lane 4, *L. monocytogenes* #55; lane 5, *L. monocytogenes* ATCC15313; lane 6, *L. gray* HPB #29; lane 7, *L. innocua* HPB #14.

1.5 mM MgCl₂, 20 pmol single primer, 0.2 mM dNTP, 1×buffer, 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Takara Shuzo Co., Otsu, Shiga, Japan)에 멸균 증류수로 전체 20 µl로 맞춘 다음 thermal cycler (Hybrid Ltd., Middlesex, U.K.)에서 DNA의 증폭을 시도하였다. PCR 반응은 총 35 cycle을 시행하였으며 첫 cycle이 시작하기 전에 94°C에서 4분간 가온하여 denaturation한 후, 매 cycle 당 94°C에서 1분 동안 denaturation, 60°C에서 1분 동안 annealing,

72°C에서 2분간 extension 반응을 시행하였다. 그리고 완전한 extension을 위해 72°C에 15분간 지속하였다. 반응이 종료된 후 TBE buffer (90 mM Tris, 90 mM boric acid, 2 mM EDTA)에 0.5 µl/ml의 ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 전기영동하여 UV transilluminator (Vilber Lourmat, Mame La Vallee, France)에서 관찰되는 DNA 증폭상을 1 D advanced program (Advanced American Biotechnology, Fullerton, C.A., U.S.A.)

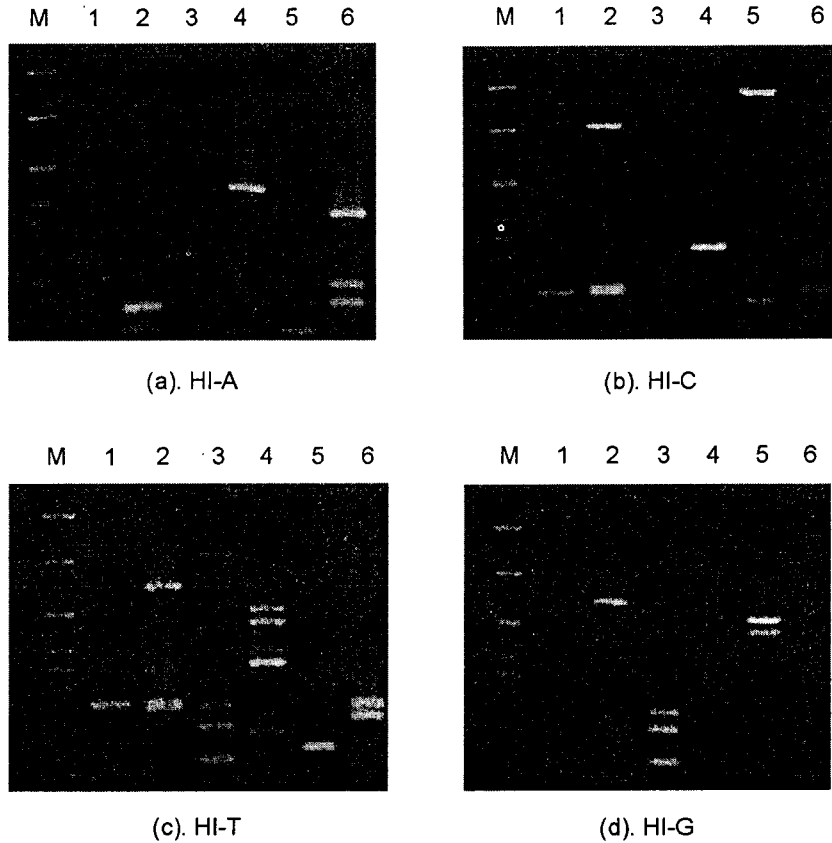


Fig. 2. AFLP analysis of strains of selected Enterobacteriaceae. Lane M, pBH20 marker; lane 1, *E. coli*; lane 2, *E. coli* O157:H7; lane 3, *Y. pseudotuberculosis*; lane 4, *Y. enterocolitica*; lane 5, *S. typhi*; lane 6, *S. dysenteriae*

을 사용하여 결과를 분석하였다.

결 과

1. *Listeria* spp. 표준 균주에 대한 AFLP 실험

5종의 *L. monocytogenes*와 *L. gray*, *L. innocua*에 대해 각 4 종류의 primer에 대해 특정한 양상의 증폭산물을 얻을 수 있었다 (Fig. 1).

2. 대표적인 Enterobacteriaceae에 대한 AFLP 실험결과

대표적인 장내세균에 대하여 AFLP 기법의 적용 여부를 알아보기 위하여 각 4종류의 primer를 사용한 결과, 특정한 증폭 양상을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

3. 가공육과 포장육 시료에서 분리한 세균주를 대상으로 한 AFLP 실험결과

소와 돼지 유래 가공육과 포장육 시료에서 *L. monocytogenes*로 동정된 12개의 시료에 대하여 AFLP 실험을 하여 특정한 증폭 양상을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

4. *Listeria* spp. 표준 균주와 시료에 대한 1 D advanced program을 이용한 근연도 분석

5종의 *L. monocytogenes*와 *L. gray*, *L. innocua*에 대해 각 4 종류의 primer에 대해 특정한 양상의 증폭산물을 얻을 수 있었는데, 이 중에서도 HI-T primer를 사용한 것을 선택하여 근연도를 확인하였다 (Fig. 4). 그 결과 기본적으로 *L. monocytogenes* 간의 밀접한 근연도가 있음을 나타내었고, 또한 분양처에 따라 밀접한 근연도가 있다는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라 소와 돼지 유래 가공육과 포장육 시료에 대해서도 HI-T primer를 사용한 AFLP 결과에 대해 근연도를 살펴본 결과 시료의 종류에 따라 근연도가 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

고 찰

유전자 분석법에 있어서 AFLP의 존재는 최근에 개발된 방법으로서 다른 유전자 분석법들과 비교하여 볼 때 많은 장점을 지니고 있다³³⁾.

대표적인 유전자 분석법에는 대표적으로 RFLP (restriction

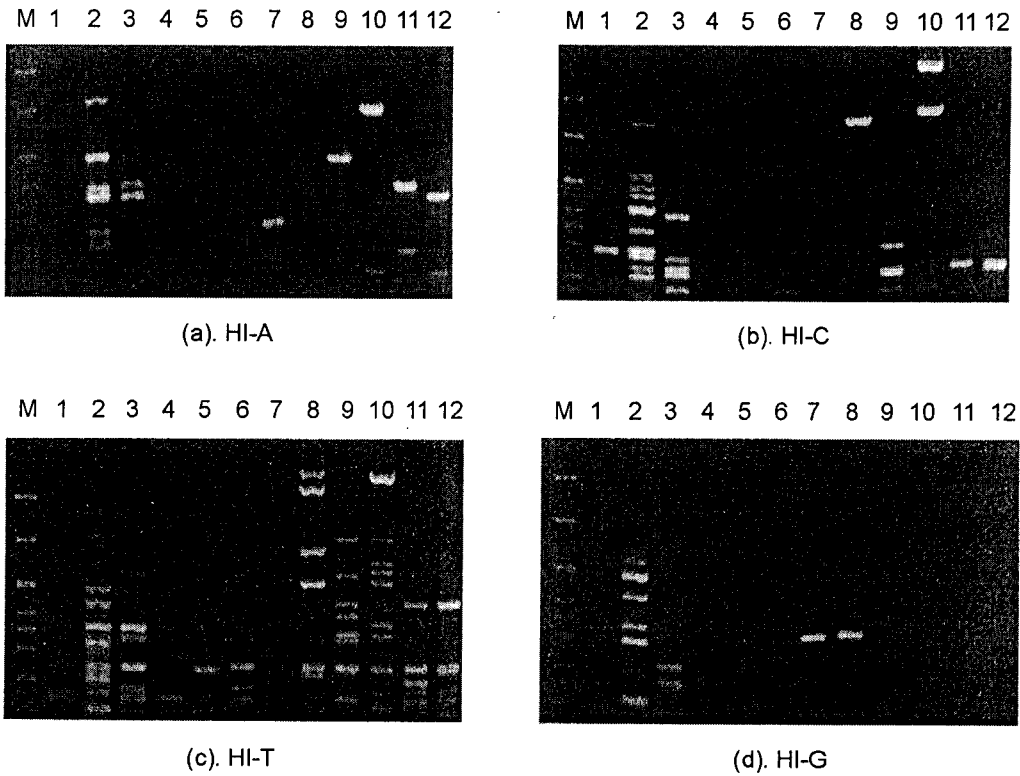


Fig. 3. AFLP analysis of *Listeria monocytogenes* isolates. Lane M, pBH20 marker; lane 1 to 12, isolates 1 to 12.

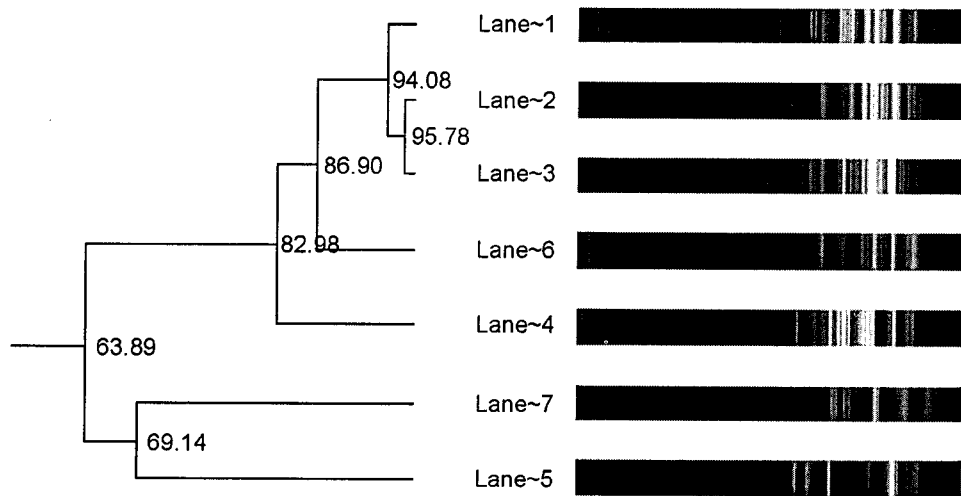


Fig. 4. Dendrogram of the similarity index among reference *Listeria* spp. strains with HI-T primer. Lane 1, *L. monocytogenes* #3; lane 2, *L. monocytogenes* #53; lane 3, *L. monocytogenes* #54; lane 4, *L. monocytogenes* #55; lane 5, *L. monocytogenes* ATCC15313; lane 6, *L. gray* HPB #29; lane 7, *L. innocua* HPB #14

fragment length polymorphism), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), SSR (simple sequence repeat), STEMS (sequence-tagged microsatellite site) 등이 있다. 이들 방법들에 비해서 AFLP 분석법의 장점으로서는 PCR을 이용하기 때문에 소량의 DNA로 가능하고, 재현성이 높아서 실험결과에 대한

신뢰성이 높으며, 실험 대상에 대한 염기서열 정보가 없어도 가능하며, 동일한 primer에 대해 응용성이 높고, 실험의 방향에 따라 장비와 비용의 잇점을 가져 올 수 있어 다른 유전자 분석법들과 비교하여 볼 때 많은 장점을 지니고 있다^{22,33}.

Lin 등¹³에 의하면, AFLP 기법을 이용하여 *Escherichia coli*

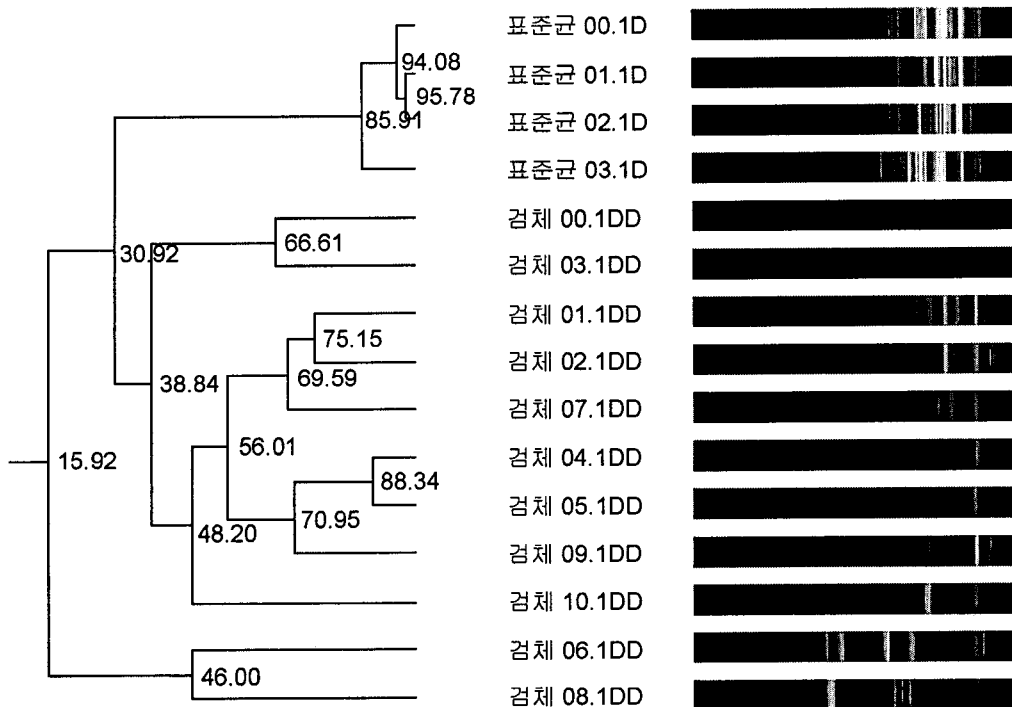


Fig. 5. Dendrogram of the similarity index among reference strains and isolates of *Listeria monocytogenes* by AFLP analysis with HI-T primer.

와 *Agrobacterium tumefaciens*에 대하여 적용하였다. 이 연구에서의 관점은 AFLP 기법의 미생물에 대한 적용 여부에 있어서, 동일한 세균내에서도 plasmid의 유무에 따라 감별할 수 있는지가 관심의 대상이었다. 그리고, 대상이 되는 plasmid는 주로 병원성과 연관된 것으로 궁극적으로는 병원성 세균과 비병원성 세균의 감별에 대한 연구이다.

Velappan 등³²⁾에 의하면, 날로 심각성을 더해가는 병원성 미생물을 대상으로 신속하고, 정확한 동정의 필요성이 증가함에 따라 SE-AFLP (single-enzyme amplified fragment length polymorphism) 기법에 대한 연구를 하였다. AFLP 기법의 재현성에 대한 실험결과를 제시하여, AFLP 방법의 신뢰성을 뒷받침하였고, 한 종류의 제한효소만으로도 AFLP 기법을 적용할 수 있음을 증명하였으며, 다양한 세균들에 대한 감별결과를 제시하였다. 또한 무엇보다도 인위적으로 적은 수의 band 패턴결과를 유도함으로써 부가적인 분석장비의 도움이 불필요하다는 것이 장점이다.

Aarts 등³³⁾에 의하면, listeriosis를 유발하는 *L. monocytogenes*의 혈청형에 따른 AFLP 기법을 확립하였다. 혈청형 사이의 유사도를 계산한 결과 대상으로 한 1/2a, 1/2c, 3a, 4a, 1/2b, 3b, 4ab, 4b, 4e와 1 등이 크게 2군으로 분류가 되었으며, 이 중에서도 1/2a, 1/2b와 4b형이 listeriosis를 일으키는 주요한 혈청형을 밝혀 냈다. 또한 이 논문에서는 AFLP 기법에 의한 감별력과 ALFA (automated laser fluorescent analysis)에 의한 결과

해석의 자동화부분이 결합하여, *L. monocytogenes*의 혈청형 분석에 매우 효과적임을 나타내었다.

Gibson 등⁸⁾은 한 종류의 제한효소를 사용하고, 한 번의 PCR 반응과 agarose gel에서의 전기영동으로 시행하는 AFLP 기법을 *H. pylori*의 유전자 지문 분석과 감별에 이용하였다. 즉, 이제까지의 AFLP 기법을 최대한 단순화시키고 비용·장비면에서도 간소화시켰다. Ribotyping과 urease genotyping으로 대조 실험을 하여 각 typing에 대한 결과를 비교하였다.

실험결과에 대한 가장 신뢰성 있는 결과를 산출하는 실험 방법은 DNA sequencing으로서 어떠한 방법들 보다도 확실한 방법이라는 하지만, 비용과 시간적인 면에서 효율성이 떨어져 실제 임상적용에 어려움이 있다^{21,24)}. 이러한 DNA sequencing의 실제 과정상의 어려움에 비해, AFLP 기법은 많은 장점들로 인해 이미 다양한 미생물을 대상으로 연구가 되었다^{20,25,26)}.

실제로 미생물 분야에 있어서도 전체 genome이 밝혀진 것은 극히 소수에 불과하다. 이러한 사정에 비추어 볼 때 AFLP 분석법이 다른 실험기법들과의 연계를 통해 미생물 분야에서 병원성 세균의 신속한 동정과 역학적인 관점에서 감염원의 추적에 이용할 여지가 충분히 있음을 이 연구를 통해 알았다.

본 연구에서는 AFLP 분석법에서도 본래 식물에서 처음 사용하였던 방법을 실험실 여건에 맞게 변형하였다. 먼저, 사용하는 제한효소를 한 가지로 했다. 그 다음은 대부분의 AFLP

분석법에서는 전기영동을 DNA sequencing이 가능한 PAGE-gel에 하고 있으나, 본 연구에서는 보편적인 agarose gel electrophoresis를 사용하였다. 이러한 방법적인 변형이 가능한 것은 먼저 식물의 genome과 미생물의 genome을 비교해 볼 때 크기에 있어서 많은 차이가 있어서, 식물을 대상으로는 실험 방법의 변형이 적용되기 힘들다, 미생물 분야에 있어서는 적용이 가능하며, 시간적, 비용적으로 절약이 되며, 장비와 시약에 있어서도 간편화 할 수 있다.

AFLP 분석법에 있어서 무엇보다 지켜져야 할 조건은 PCR 반응에 있어서의 엄격성이다. 본 연구에서 사용한 primer간에도 살펴보면 3' 말단의 염기 하나만 차이가 있는 것이기 때문에 non-specific한 DNA 염기배열에 annealing이 될 경우 그 실험결과에 대해서 신뢰할 수가 없다. 따라서 이러한 점을 배제시키기 위해서, 본 연구에서 사용한 방법은 annealing 온도를 60°C로 높여 특이도를 향상시켰다.

이 온도의 의미는 먼저 adaptor로 사용되는 ADH1과 ADH2가 primer로 작용할 가능성에 대해 살펴 볼 때, ADH2는 연장되는 방향이 반대로 되어 annealing이 되더라도 extension은 되지 않으나, ADH1은 방향성도 맞고, 염기서열도 완전히 상보적이어서 primer의 역할을 할 수 있다. 또한 Tm 온도를 살펴보면 ADH1이 37.1°C이고, primers들이 45°C~48°C인데 반하여, 본 연구에서는 annealing 온도를 60°C에서 시행함으로써 ADH1이 primer로의 작용가능성을 최소화하였다.

Annealing 온도를 대상 primer의 Tm 온도보다 큰 쪽으로 올려 줌으로써 ADH1에 의한 간섭현상을 많은 부분 없앨 수 있었으나, primer간의 하나의 염기 차이만으로 PCR 반응에 엄격함을 부여할 수 있으나 하는 점에서는 확실한 진위 여부를 파악할 수가 없다. 다만 그러한 점을 개선하기 위해 앞으로 본 연구의 실험방법에 변화를 준다면, hot-start PCR을 이용하여 비특이적 DNA 증폭을 최소화한다든지, proof-reading 기능을 가지고 있는 Taq DNA polymerase를 이용하는 방법 등이 시도될 수 있을 것이다.

실험결과상 DNA 추출법에 따른 문제점이 제기 되었는데, 본 연구에서 사용한 방법뿐만 아니라 다른 방법에 의한 genomic DNA를 추출하는 방법들에 대한 비교 분석이 이루어져야 할 것이며, adaptor와 절단된 genomic DNA의 ligation 후 효소를 불활성화 시키고, DNA를 얻기 위한 방법으로 에탄올 침전법을 이용하였는데, 고온 상태 (80°C나 65°C)에서 일정시간 처리를 통해 효소를 불활성화 시킨 후 DNA를 얻는 방법에 대해서도 고려할 필요가 있다.

또한 임상적으로 이용하기 위해선 시간 단축의 관점에서, 본 연구를 통해 확립된 실험방법들이 결과에 대해서 영향을 미치지 않으면서, 최대한 시간을 줄일 수 있는 방향으로 개선해 나가야 할 것이다.

여러 가지 실험과정상의 개선을 통해 SE-AFLP 기법이 다

른 병원성 세균들에 대해서도 확립이 된다면, 병원성 세균의 검출에도 응용성을 가지고 있다. 예를 들면, PCR을 이용한 병원성 미생물의 신속한 검출에 있어서 주로 이용되는 gene이 미생물의 16S rRNA를 표적으로 하여 primer를 제작하여 사용하는데, 이 16S rRNA 자체가 미생물 간의 유사성이 너무 커서 종 (species) 이하의 수준에서 분류에 있어 어려움이 있는 경우가 발생한다.

이러한 경우에 genus까지는 16S rRNA 유전자를 이용하여 분류를 하고, 그 이하의 수준에서는 SE-AFLP법을 이용한다면 병원성 세균의 검출에 가능성을 보인다.

감사의 글

이 논문은 보건복지부 보건의료기술 연구개발사업 (관리번호: HMP-99-F-06-0001, 식품중 각종 위해요인의 위해성 평가와 관리방안 수립에 관한 연구)의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사하는 바입니다.

참 고 문 헌

- 1) Aarts HJM, Hakemulder LE and Van Hoef AMA (1999): Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns. *Int J Food Microbiol*, **49**: 95-102.
- 2) Becker K, Roth R and Peters G (1998): Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin gene. *J Clin Microbiol*, **36**: 2548-2553.
- 3) Boumedine K and Rodolakis A (1998): AFLP allows the identification of genomic markers of ruminant *Chlamydia psittaci* strains useful for typing and epidemiological studies. *Res Microbiol*, **149**: 735-744.
- 4) Branko K, Goran B, Peter A and Karl-Erik J (2000): Genomic variations of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* detected by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *FEMS Microbiol Lett*, **184**: 63-68.
- 5) Christopher JR and Paolo D (1999): Use of AFLP in cereals research. *Trends Plant Sci*, **4**(2): 76-79.
- 6) Covadonga RA, Linda V, Jean S, Esperanza G and Rosa A (1997): Intraspecific Differentiation of *Vibrio vulnificus* Biotypes by Amplified Fragment Length Polymorphisms and Ribotyping. *Appl Environ Microbiol*, **63**(7): 2600-2606.
- 7) Day NP, Scotland SM, Cheasty T and Rowe B (1983): *Escherichia coli* O157:H7 associated with human infections in

- the United Kingdom. *Lancet*, **1**: 825.
- 8) Gibson J, Slater E, Xerry J, Tompkin D and Owen R (1998): Use of amplified fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, **36(9)**: 2580-2585.
 - 9) Hanninen ML, Paivikki PM, Hilpi R, Birgitta D and Jaap AW (2001): Genomic Relatedness within Five Common Finnish *Campylobacter Jejuni* Pulsed-Field Gel Electrophoresis Genotypes Studied by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis, Ribotyping, and Serotyping. *Appl Environ Microbiol*, **67(4)**: 1581-1586.
 - 10) Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M and Kersters K (1996): Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*, **142**: 1881-1893.
 - 11) Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR and Rozee KR (1991): Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **29**: 426-430.
 - 12) Kim YS, Kim SK and Hwang EK (2001): Amplified fragment length polymorphism fingerprinting analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk. *Korea J Vet Res*, **41(2)**: 157-165.
 - 13) Lin JJ, Kuo J and Ma J (1999): A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Res*, **24**: 3649-3650.
 - 14) Litwin CM, Storm AL, Chipowsky S and Ryan KJ (1991): Molecular epidemiology of *Shigella* infection: plasmid profiles, serotype correlation, and restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol*, **29**: 104-108.
 - 15) Marano NN, Daniels NA, Easton AN, McShan A, Ray B, Wells JG, Griffin PM and Angulo FJ (2000): A Survey of Stool Culturing Practices for *Vibrio* Species at Clinical Laboratories in Gulf Coast States. *J Clin Microbiol*, **38**: 2267-2270.
 - 16) Masiga DK, Tait A and Turner CMR (2000): Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism in Parasite Genetics. *Parasitology Today*, **16(8)**: 350-353.
 - 17) Mazurak GH, Reddy V, Marston BJ, Haas WA and Crawford JT (1996): DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *J Clin Microbiol*, **34**: 2386-2390.
 - 18) McLauchlin J, Ripabelli G, Brett MM and Threlfall EJ (2000): Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *Int J Food Microbiol*, **56**: 21-28.
 - 19) Mueller UG and Wolfenbarger LL (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree*, **14(10)**: 389-394.
 - 20) Niwat C, Pongrama R, Aroon B, Jiroj S and Stefan BS (2000): Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing Avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *FEMS Immun and Med Microbiol*, **29**: 221-225.
 - 21) Qi X and Lindhout P (1997): Development of AFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*, **254**: 330-336.
 - 22) Savelkoul PHM, Aarts HJM, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls L and Lenstra JA (1999): Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *J Clin Microbiol*, **37(10)**: 3083-3091.
 - 23) Shaohua Z, Sharon EM, Jianghong M, Stephen K, Michael PD, Rob ED, Alexandra MC and Jennifer WW (2000): Genomic typing of *Escherichia coli* O157:H7 by semi-automated fluorescent AFLP analysis. *Microbes and Infection*, **2000**: 107-113.
 - 24) Siegfried LK (2000): Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology*, **9**: 1241-1245.
 - 25) Sloos J, Dijkshoorn L, Vogel L and Van Boven CPA (2000): Performance of Phenotypic and Genotypic Methods To Determine the Clinical Relevance of Serial Blood Isolates of *Staphylococcus epidermidis* in Patients with Septicemia. *J Clin Microbiol*, **38(7)**: 2488-2493.
 - 26) Stephen LW and Clare SH (2000): Identification of taxonomic and epidemiological relationships among *Campylobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles. *FEMS Microbiol Lett*, **193**: 161-169.
 - 27) Stone GG, Oberst RD, Hays MP, McVey S and Chengappa MM (1994): Detection of *Samonella serovars* from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J Clin Microbiol*, **32**: 1742-1749.
 - 28) Szabo EA, Pemberton JM, Gibson AM, Thomas RJ, Pascoe RR and Desmarchelier PM (1994): Application of PCR to a clinical and environmental investigation of a case of equine botulism. *J Clin Microbiol*, **32**: 1986-1991.
 - 29) Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J and Heesemann J (1998): Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J Clin Microbiol*, **36**: 2557-2564.
 - 30) Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduci R and Piffaretti J (1995): Use of amplified fragment length poly-

- morphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol*, **33(7)**: 1716-1719.
- 31) Van Lith LAJT and Aarts HJM (1995): Polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. *Letters in Appl Microbiol*, **19**: 273-276.
- 32) Velappan N, Snodgrass JL, Hakovirta JR, Marrone BL and Burde S (2001): Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **39**: 77-83.
- 33) Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, **23**: 4407-4414.
- 34) Way JS, Josephson KL, Pillai SD, Abbaszadegan M, Gerba CP and Pepper IL (1993): Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Appl Envir Microbiol*, **59**: 1473-1479.
-