

## Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting as a Tool to Study the Genetic Diversity of *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Sources

Young-Sam Kim and Jong-Bae Kim<sup>†</sup>

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

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) is a recently developed PCR-based high resolution fingerprinting method that is able to generate complex banding patterns which can be used to delineate intraspecific genetic relationships among bacteria. In this study, we have modified and evaluated a PCR-based technique, amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis, for use in fingerprinting strains of *Staphylococcus aureus*. Single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SE-AFLP) analysis was used to perform strain identification of *Staphylococcus aureus*. By careful selection of AFLP primers, it was possible to obtain reproducible and sensitive identification to strain level. AFLP fingerprinting of 5 reference strains of *Staphylococcus aureus* and 65 strains of *Staphylococcus aureus* that were isolated from food sources of different area and diverse genomic types of *Staphylococcus aureus* were recognized. As a result of this study, we found that the AFLP patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from Seoul, Taejeon and Gwang-Ju indicated the close relation with genetic similarity. The main purpose of this study was to find an alternative and reliable fingerprinting method to study the overall genetic diversity, using *Staphylococcus aureus* species as an example, and observed if the method can be successfully applied to all staphylococcal species.

**Key Words:** AFLP, *S. aureus*, SE-AFLP, PCR, Fingerprinting

### 서 론

*Staphylococcus aureus*는 오래 전부터 인류에게 잘 알려진 그람 양성균의 세균으로서 염색을 하면 포도송이 같은 불규칙한 배열을 하는 세균이다<sup>1)</sup>. 이 세균의 감염은 아주 흔하며 다른 그람 양성 세균들과 같이 부착소, 용해소와 장독소 등 병원성 인자를 생산함으로써 가장 흔한 피부 감염에서부터 심하면 생명에 위협을 초래할 수 있는 질병인 패혈, 골수염, 심내막염, 뇌수막염이나 폐혈증 등을 일으킨다<sup>2)</sup>. 또한 낙농업에 있어서 소 유방염을 일으켜 세계적으로 낙농가들에게 막대한 경제적 손실을 야기하는 주요 질병 세균으로 알려져 있다<sup>28,30)</sup>. 현재 이 세균의 조기진단, 역학조사, 병원균의 분리 동정 및 병원균의 치료 방법 등에 관한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다<sup>3,14,19)</sup>.

그 동안, 이 세균의 질병학적 및 역학적인 연구에 있어서 여러 방법이 사용되어 왔으나 기존의 분석 방법은 각각 장단점을 내포하고 있으므로 그 이용성에 많은 한계를 드러내고

있다. 그러나, 최근 의학적으로 중요한 미생물들의 genetic typing을 위한 PCR 기술의 이용이 많이 보고되고 있다<sup>5,7,8,22,29,31,32)</sup>. PCR에 기초한 방법으로서 특정 유전자 염기서열을 oligonucleotide primer<sup>5-9)</sup>를 이용하여 증폭한 뒤 증폭 단편을 전기영동한 후 ethidium bromide를 통하여 다형성을 관찰하는 방법으로서 DNA amplification fingerprinting (DAF), random amplified polymorphic DNA (RAPD), pulsed field gel electrophoresis (PFGE)<sup>2)</sup> 및 arbitrarily primed PCR (AP-PCR) 등<sup>25,37)</sup>이 있다. 이들은 실험 절차의 간소화 및 분석 시간의 최소화를 통하여 짧은 시간에 많은 시료를 분석할 수 있다는 장점을 지니고 있는 반면 짧은 비특이적 primer를 이용하기 때문에 실험의 재현성이 떨어지고 신뢰도가 낮은 단점이 있다<sup>16)</sup>.

AFLP법은 최근 들어 새롭게 대두되기 시작한 DNA fingerprinting 기법으로서 RFLP와 RAPD의 유용한 특성들만을 간추려 설계된 새로운 분석 방법으로서 1995년 Vos *et al.*<sup>36)</sup>에 의하여 개발되었다. AFLP는 염기서열에 대한 사전정보 없이도 한번의 PCR 증폭으로 50~100개의 매우 많은 DNA 단편을 생성하므로 DNA 지문 분석에 강력한 수단으로 인정되고 있다<sup>24,26,27)</sup>. AFLP 기술은 고도의 재현성 및 확실성을 갖춘 강력한 분석 기술로서, 제한효소 및 primer의 다양한 조합으로 고도의 다형성과 다수의 polymorphic DNA marker를 신속하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라 미생물의 typing을 위한 새

\*논문 접수: 2002년 2월 10일

수정재접수: 2002년 3월 10일

<sup>†</sup>Corresponding author: Jong-Bae Kim, Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, Wonju, Korea  
Tel: 033-760-2423, e-mail: kimjb@dragon.yonsei.ac.kr

로운 기법으로 이용되고 있다<sup>17,34</sup>). 본래 AFLP 기법은 식물의 품종개량을 위해 사용하던 것이 지금은 동물과 원핵동물의 DNA 분석에도 사용한다<sup>12,18,20</sup>). 보통은 6개 염기에 대한 인식부위를 가지는 제한효소와 4개 염기에 대한 인식부위를 가지는 제한효소 두 종류를 가지고 AFLP 실험이 이루어지지만, 본 실험에서는 한 종류의 제한효소를 이용하였다.

Single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SE-AFLP) 방법에 대해서는 이미 *Legionella pneumophila*<sup>33</sup>), *Helicobacter pylori*<sup>11</sup>), *Chlamydia psittaci*<sup>4</sup>), *Mycoplasma capricolum*<sup>6</sup>), *Vibrio vulnificus*<sup>9</sup>), *Campylobacter jejuni*<sup>12</sup>), *Clostridium perfringens*<sup>21</sup>) 등에 관하여 strain 수준에서의 감별에 사용하였다. 이 방법은 복잡하고 비용이 높은 장비나 소프트웨어가 불필요하다. 결과 분석에 있어서도 패턴 분석에 다른 장비 도움이 없이도 가능하다. 이러한 장점으로 인해 SE-AFLP를 병원성 세균 동정 가능성에 대해 많은 실험실에서 시도하고 있다<sup>11</sup>).

다양한 형태의 많은 AFLP 분석법이 개발되었다<sup>1,13,20,33,36</sup>). 이 실험에 사용한 AFLP 방법은 크게 다음과 같이 네 가지 과정으로 나눌 수 있다. (i) 추출한 DNA를 한 종류의 제한효소로 반응시킨다. (ii) 제한효소 인식부위에 맞추어 제작한 adaptor를 제한효소 처리된 DNA에 ligation시킨다. (iii) Adaptor에 상보적인 primer를 가지고 PCR 반응을 통해 adaptor-tagged fragment를 증폭시킨다. (iv) 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 된다.

따라서 본 연구에서는 SE-AFLP 기법을 이용하여 *S. aureus*의 유전자 지문을 분석하고 *S. aureus* 동종내 유전적 변이성 및 유전적 근연관계를 분석하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. *Staphylococcus aureus* 표준균주

본 실험에 사용된 5종의 *S. aureus* 표준균주는 American Type Culture Collection (ATCC) 27664, ATCC 19095, H288a, KN556 균주와 Dr. Karsten Becker (Münster University, Münster,

Germany)로부터 직접 분양받은 1634/93 균주를 사용하였다.

### 2. 식품에서 *S. aureus* 분리 및 동정

2000년 1월부터 10월까지 식품의약품 안전청에서 연구사업 일환으로 수집한 김밥 검체로부터 전통적인 방식에 따라 분리 동정한 65주의 *S. aureus*를 본 실험에 이용하였다.

### 3. DNA의 분리 및 정제

PCR에 필요한 *S. aureus*의 DNA를 분리하기 위하여 brain heart infusion (Difco, Detroit, MI, U.S.A.) broth 3 ml에 박테리아 단일 집락을 접종하여 37°C 배양기에서 호기성 상태로 24시간 배양하였다. 배양액을 Eppendorf tube에 1.5 ml 씩 분주하고 8000 rpm으로 10분간 원심 침전시킨 후 침전된 pellet을 DNA isolation kit (QIAamp® Blood Kit and QIAamp Tissue Kit, QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, U.S.A.)를 사용하여 genomic DNA를 추출, 정제하였다. 정제한 DNA의 농도는 A<sub>260</sub>에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

### 4. AFLP 분석

#### 1) 제한효소 처리

정제한 genomic DNA 1 µg을 제한효소 20 U *Hind*III (Promega Co., Madison, WI, U.S.A.)를 BSA가 25% 농도로 첨가된 1X 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 반응시켜 절단하였다.

#### 2) Adaptor의 ligation

절단된 반응액 30 µl에 제한효소 절단부위 말단에 필요한 5 pmol의 adaptor와 10 mM ATP 1 µl, 5X OPA, 10 Weiss units의 T4 ligase (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)를 첨가하여 최종 40 µl가 되도록 조정된 다음 37°C에서 5시간 반응시킨 뒤 온도 조건만 16°C로 내려 10시간 ligation시켰다. 반응액의 효소들을 불활성 시키고 DNA를 선택적으로 얻기 위해 에탄올 침전법을 사용하였으며 건조한 DNA를 distilled water에 녹여 template DNA로 사용하였다.

Table 1. Adaptor and primers used in this study

		Sequence (5' to 3')	Tm (°C)	Reference number
Adaptor	ADH1	ACGGTATGCGACAG	37.1	11
	ADH2	AGCTCTGTTCGCATACCGTGAG	56.6	11
Primer	HI-A	GGTATGCGACAGAGCTTA	45.3	11
	HI-T	GGTATGCGACAGAGCTTT	47.0	11
	HI-C	GGTATGCGACAGAGCTTC	47.3	11
	HI-G	GGTATGCGACAGAGCTTG	48.3	11

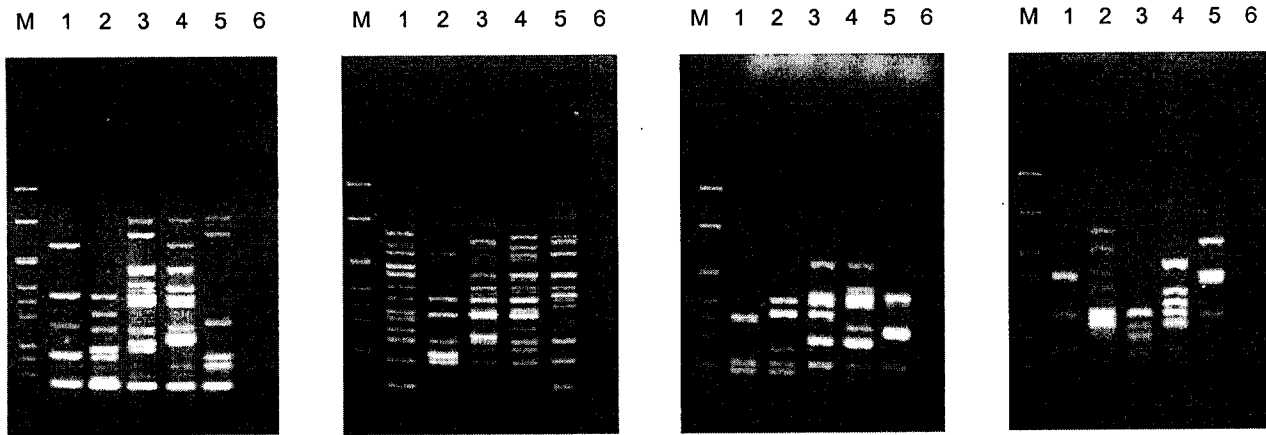


Fig. 1-1. HI-A

Fig. 1-2. HI-T

Fig. 1-3. HI-C

Fig. 1-4. HI-G

Fig. 1. AFLP profiles (Primer HI-A, T, C, G) for 5 reference strains of *S. aureus*. Lane M, pBH20 marker; lane 1, *S. aureus* KN556; lane 2, *S. aureus* H288a; lane 3, *S. aureus* ATCC 19095; lane 4, *S. aureus* 1634/93; lane 5, *S. aureus* ATCC 27664; lane 6, negative control.

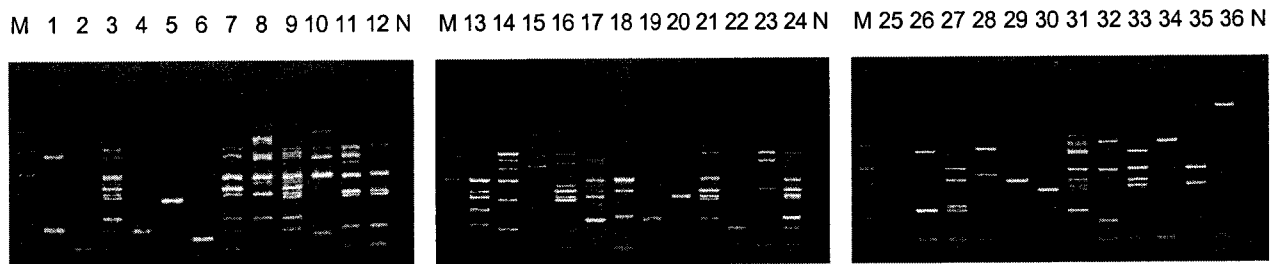


Fig. 2-1.

Fig. 2-2.

Fig. 2-3.

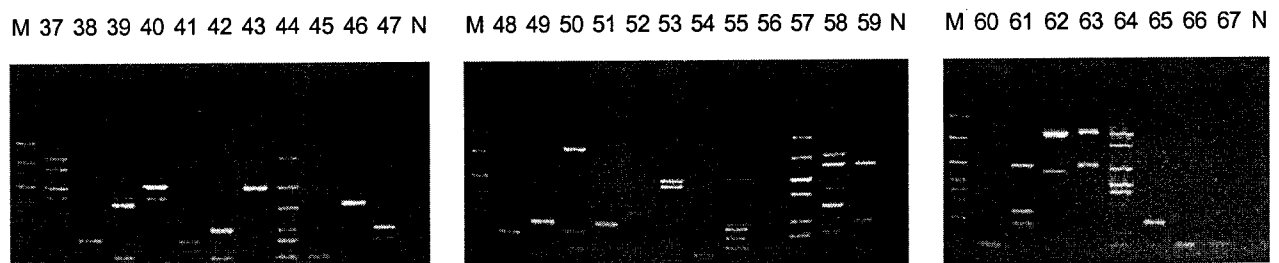


Fig. 2-4.

Fig. 2-5.

Fig. 2-6.

Fig. 2. AFLP analysis of *S. aureus* isolated from food sources with primer HI-A.

## 5. PCR 반응과 전기영동

PCR에 사용하는 primer는 네 종류로 Table 1에 명시되어 있다. 실험에 사용한 adaptor와 primer는 Gibson<sup>11)</sup> 등이 사용한 것과 같은 염기서열을 주문 제작 (Bioneer Co., Taejun, Korea) 하여 사용하였다. 증폭 반응은 DNA thermal cycler (Hybrid Ltd., Middlesex, U.K.)를 이용하여 다음과 같은 조건하에서 실시하였다. 즉, 반응액은 template DNA 2  $\mu$ l에 dATP, dGTP,

dTTP, dCTP를 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTPs를 1.6  $\mu$ l 넣은 후, 10X buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl) 2  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1.2  $\mu$ l, Taq DNA polymerase 0.5 U을 첨가하고 primer set (Bioneer Co., Taejun, Korea) 20 pmol/ $\mu$ l를 각각 2 pmol이 되도록 넣은 후, 최종 반응하는 양이 20  $\mu$ l가 되도록 멸균 증류수를 첨가하여 DNA의 증폭을 시도하였다. 이때 사용한 다중 중합효소 연쇄반응의 시간과 온도 조건으로는 94 $^{\circ}$ C에서 4분간 최초 denaturation 이후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분 동안 denaturation,

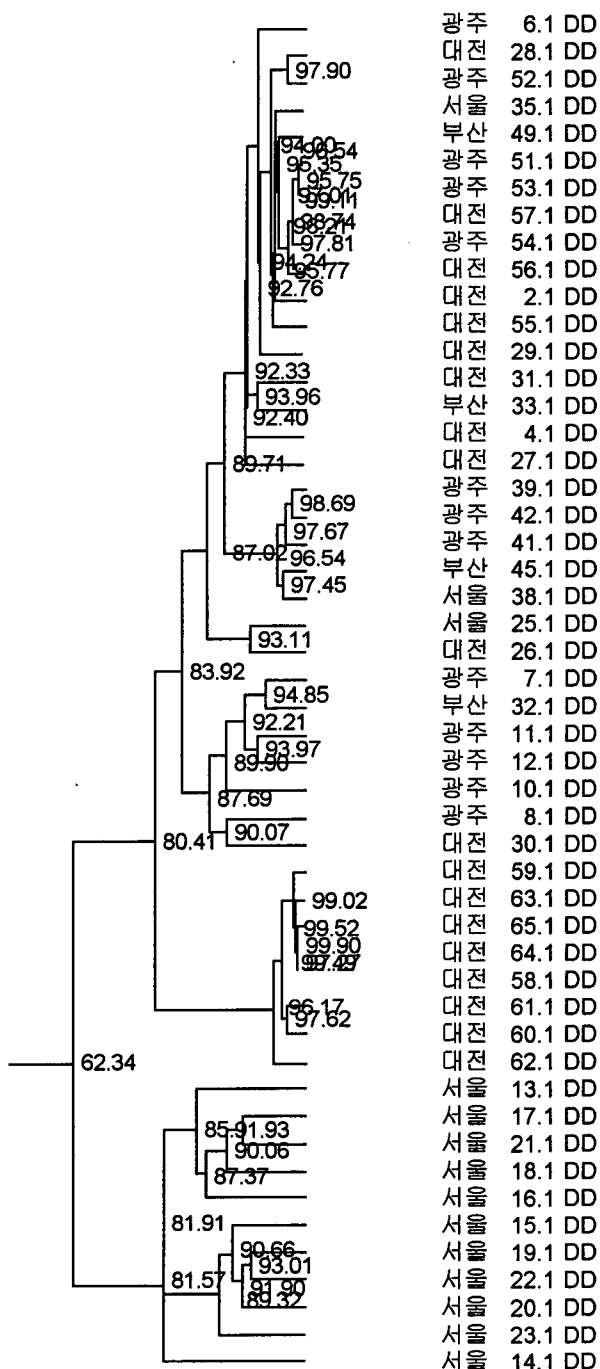


Fig. 3. Dendrogram of the similarity index among *S. aureus* isolated from food sources.

60°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 2분 동안 extension 하는 과정을 35회 반복하였으며, 마지막 extension은 72°C에서 15분간 지속하여 유지함으로써 완전한 extension이 이루어 지도록 하였다. 다중 증합효소 연쇄반응이 끝난 후 생성된 DNA 증폭산물은 0.5 µg/ml의 ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 전기영동하여 ultraviolet trans-illuminator (Vilber

Louramat, Mame La Valle, France)로 각각의 DNA band를 비교 관찰하였다. 관찰한 DNA 증폭상을 ID advanced program (Advanced American Biotechnology, Fullerton, CA, U.S.A.)을 사용하여 유전자형 양상을 분석하였으며 UPGMA program을 이용하여 dendrogram을 작성하였다.

## 결 과

*S. aureus*에 대한 유전자 다양성 연구를 위해 본 실험에서 Gibson<sup>11)</sup> 등의 방법에 따라 AFLP를 실시하였다. 6 bp의 인지 부위를 갖는 *Hind*III 제한효소를 사용하여 이 제한효소와 primer 조합형에 따른 가장 이상적인 AFLP 조건을 잡기 위해서 각각의 primer (HI-A, HI-2, HI-C, HI-G)로 *S. aureus*의 표준균주에 대하여 실험을 먼저 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

### 1. 표준 *S. aureus* 균주의 SE-AFLP

증폭된 PCR 증폭산물의 분자량 범위는 78 bp에서 1005 bp 사이의 증폭된 DNA 단편을 생성하였다. Primer (HI-A)로 실시한 AFLP 실험에서는 7~12개의 fragments 증폭산물을 얻을 수 있었으며 (Fig. 1-1), 다른 primer로 실시한 경우 primer (HI-T)에서는 7~17 fragments (Fig. 1-2), primer (HI-C) 3~7 fragments (Fig. 1-3), 그리고 primer (HI-G)에서는 3~7 fragments (Fig. 1-4) 정도의 증폭산물을 확인할 수 있었다. 실험 결과 primer (HI-A)의 결과가 본 연구에 적합하다는 결론을 내려 sample에 대한 AFLP 실험에 primer (HI-A)를 사용하기로 하였다.

### 2. 음식물에서 분리한 *S. aureus* 균주의 SE-AFLP

Primer (HI-A)를 가지고 음식물에서 분리한 *S. aureus* sample들에 대한 AFLP를 실험을 실시한 결과 증폭된 PCR 증폭산물을 분자량 78 bp와 1005 bp 사이에서 확인한 결과 2~30 정도의 fragments 증폭산물을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

### 3. 음식물에서 분리한 *S. aureus* 균주의 유전적 근연도

분리한 *S. aureus* 균주의 유전적 근연도를 비교하기 위한 실험으로 similarity index에 기초한 UPGMA program 분석을 수행하였다 (Fig. 3). 분석 결과 각각의 유전적 유사성의 수준을 그림에서 확인할 수 있었다. 전체 sample 65개 중 50개의 sample에서 similarity index를 알아본 결과 낮게는 62%에서 높게는 99%에 이르는 유전적 유사성을 나타냈다. 그 중 96% 이상의 similarity index를 나타내는 공통의 sample 15개를 생략하여 전체 similarity index를 알아보았다. 실험 결과 첫번째 분포도에서는 similarity index가 87~99%를 나타내며 지역 별로 광주, 대전, 서울 그리고 부산 등에서 고른 분포도를 나타내었으며, 두번째 분포도는 similarity index에서 80~94%

로 다른 지방에서 분리된 균주와 비교하여 독특하게 광주 지역에서 분리된 균주간의 근연도가 높음으로 나타났다. 세 번째 분포도의 similarity index는 88~99%로 지역별 근연도는 대전 sample들이 높게 나타났으며, 마지막 네번째 분포도의 similarity index는 81~91%로서 지역별 근연도에서 서울 지역의 sample들이 높게 나타났다. 전체 실험을 통한 지역별 근연도는 서울, 대전, 그리고 광주 지역에서 분리한 *S. aureus*에서 높은 유전적 유사성을 나타내었다.

## 고 찰

식물과 동물에서 유전적 다양성 (diversity)의 추이를 연구하는 데에는 여러 가지의 형태적 형질, 생화학적 인자 혹은 분자생물학적 DNA 인자를 이용하는 방법이 사용되어 왔다. Genotype을 결정하기 위한 도구로 지금까지 사용되어 왔던 여러 방법들은 각각 장단점을 내포하고 있으므로 그 이용성에 많은 한계를 드러내고 있다.

AFLP 기법은 PCR을 이용한 다른 어떤 유전자 지문 분석 방법보다도 비교적 신속하고도 경제적으로 가장 많은 수의 다형적 DNA marker와 다수의 다형적 좌위를 동시에 검출할 수 있는 기술로서, 유전자 지도 작성, 생물 다양성 분석 및 식물과 미생물에서 유전적 변이성 및 근연관계 추정에 적합한 기술이다<sup>15,34</sup>.

일반적인 AFLP법의 기본원리는 인식부위가 많지 않은 제한효소 (rare-cutting restriction enzyme)와 인식부위가 많은 (frequent-cutting restriction enzyme) 제한효소 두 가지 이상을 사용하여 특정 제한효소 단편을 증폭시켜 그 산물에서 얻어지는 band 차이의 유무를 염색하여 sequencing gel에서 비교하는 것이다. 그러나 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 있기 때문이다. 식물을 대상으로는 실험 방법의 변형이 적용되기 힘들다, 미생물 분야에 있어서는 적용이 가능하며, 시간적, 비용적으로도 절약이 되며, 장비와 시약에 있어서도 간편화할 수 있다. 이러한 장점들에 반하여, 한 종류의 제한효소를 사용하게 되어 잘리는 DNA 단편의 특이도가 떨어지게 되는 단점이 존재한다. 또한 DNA sequencing이 가능한 PAGE-gel에서는 DNA 단편의 한 염기의 차이도 분별해 낼 수 있지만 일반적인 gel에서는 염기 차이가 얼마 나지 않을 경우에는 분별하기가 어렵다.

AFLP 분석법에 있어서 무엇보다도 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 실험 결과에 대해서 신뢰할 수가 없다. 따라서 이러한 점을 배제시키기 위해서, 본 연구에서 사용한 방법은 annealing 온도를 60°C를 사용하였다. 이 온도의 의미는 먼저 adaptor로 사용되는 ADH1과 ADH2가 primer로 작용할 가능성에 대해 살펴볼 때, ADH2는 연장되는 방향이 반대로 되어 annealing이 되더라도 extension은 되지 않으나, ADH1은 방향성도 맞고, 염기서열도 완전히 상보적이므로 primer의 역할을 할 수 있다. 또한 Tm 온도를 살펴보면 ADH1이 37.1°C이고, primers들이 45~48°C인데 반하여, 본 연구에서는 annealing 온도를 60°C에서 시행함으로써 ADH1이 primer로의 작용 가능성을 최소화 하였다.

Annealing 온도를 대상 primer의 Tm 값보다 큰 쪽으로 올려줌으로써 ADH1에 의한 간섭 현상을 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 실험 방법에 변화를 준다면, hot-start PCR을 이용하여 비특이적 DNA 증폭을 최소화 한다든지, proof-reading 기능을 가지고 있는 *Taq* DNA polymerase를 이용하는 방법 등이 시도될 수 있을 것이다.

실험 결과상 DNA 추출법에 따른 문제점이 제기되었는데, 본 연구에서 사용한 방법 뿐만 아니라 다른 방법에 의한 genomic DNA를 추출하는 방법들에 대한 비교 분석이 이루어져야 할 것이다. Adaptor와 절단된 genomic DNA의 ligation 후 효소를 불활성화 시키고, DNA를 얻기 위한 방법으로 에탄올 침전법을 이용하였는데, 고온 상태 (80°C나 65°C)에서 일정 시간 처리를 통해 효소를 불활성화 시킨 후 DNA를 얻는 방법에 대해서도 고려할 필요가 있다.

여러 가지 실험 과정상의 개선 과정들을 통해 SE-AFLP 기법이 다른 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 미생물간의 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-AFLP 기법을 통한 미생물에 대한 적용이 이루어진다면 여러 가지 연구들이 개선되고 발전되리라 생각한다.

Lin<sup>17</sup> 등에 의하면 AFLP 기법을 이용하여 *Escherchia coli*

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

김<sup>10</sup> 등이 실시한 AFLP를 이용한 *S. aureus*의 지문 분석 방법에서는 세 종류의 제한효소 (*EcoRI*, *TaqI* 및 *HindIII*)를 이용하여 증폭된 27개의 selective primer 조합형으로 검출된 소 유방염 원인균인 16종의 *S. aureus*에 대하여 실험 적용한 결과 *S. aureus*간의 genetic similarity (GS) 분석을 수행한 결과 약 60% 수준에서 3개의 아형으로 나뉘는 것을 관찰하였다는 보고를 하였다.

Velappan<sup>35</sup> 등에 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 실험을 통해, 한 종류의 제한효소만으로도 AFLP 기법을 적용할 수 있음을 증명하였고, 다양한 세균들에 대하여 감별 상태를 제시하였다. 또한 무엇보다도 인위적으로 적은 수의 band 양상으로 결과를 유도함으로써 부가적인 분석 장비의 도움이 필요 없음을 나타내었다.

이러한 실험들에 기초하여 본 실험에서는 각각 지역별로 음식물에서 분리한 *S. aureus*에 대한 SE-AFLP를 실시하여 지역별로의 유전적 근연관계를 알아보고자 하였으며 *S. aureus* 분리 지역에 따른 유전적 근연관계가 확인되었다. 이번 연구 결과를 토대로 다른 여러 방법들의 유전적 근연관계를 확인할 수 있다는 것을 제시하였으며 더 나아가 *S. aureus*의 enterotoxin에 대한 toxin별 지역적 근연관계를 확인한다거나 항생제 사용에 대한 지역별 MRSA 균주의 근연관계를 연구하는데 적용할 수 있을 것이다.

#### 감사의 글

이 논문은 보건복지부 보건의료기술 연구개발사업 (관리번호: HMP-99-F-06-0001, 식품 중 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. *International J Food Microbiol*, **49**: 95-102.

2) Arbeit R, Arthur M, Dunn R, Cheung K, Selander RK and

Goldstein R (1990): Resolution of recent divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *J Infect Dis*, **161**: 230-235.

3) 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.

4) 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.

5) Bourgeois PL, Lautier M and Rtizenthaler P (1993): Chromosome mapping in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, **12**: 109-124.

6) 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.

7) Cassandra LS and Condemine G (1990): New approaches for physical mapping of small genomes. *J Bacteriol*, **172**: 1167-1172.

8) Charles RC, Cassandra LS and Mathew KM (1988): Pulse-Field Gel Electrophoresis of very large DNA molecules. *Ann Rev Biophys Chem*, **17**: 287-384.

9) Covadonga RA, Linda V, Jean S, Esperanza G and Rosa A (1997): Intraspecific Differentiation of *Vibrio vulnificus* Biotypes by Amplified Fragment Length Polymorphism and Ribotyping. *Appl Environ Microbiol*, **63**(7): 2600-2606.

10) 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.

11) Gibson JR, Slaster E, Xerry J, Tompkins DS and Owen RJ (1998): Use of an Amplified-Fragment Length Polymorphism Technique To Fingerprint and Differentiate Isolates of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, **36**: 2580-2585.

12) 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.

13) 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 bacteria taxonomy. *Microbiology*, **142**: 1881-1893.
- 14) 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.
  - 15) Kim JB, Kim H, Jin HS, Kim YS, Kim KS, Kang YS, Park JS, Lee DH, Woo GJ and Kim CM (2001): Detection of Enterotoxins in *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical specimens and Kimbap Using Multiplex PCR. *J Biomed Lab Sci*, **7**: 85-89.
  - 16) 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.
  - 17) Lin JJ, Kuo J and Ma J (1999): A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucl Acids Res*, **24**: 3649-3650.
  - 18) 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.
  - 19) 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.
  - 20) 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.
  - 21) 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.
  - 22) 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.
  - 23) Pak SI and Han HR (1999): A comparison of RPLA and PCR for detection of enterotoxins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated in dogs. *Korean J Vet Res*, **39**(4): 806-810.
  - 24) Qi X and Lindhout P (1997): Development of AFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*, **254**: 330-336.
  - 25) Rafalski JA, Tingey SV and Williams JGK (1991): RAPD markers-a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News Inform*, **3**: 645-648.
  - 26) 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.
  - 27) 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.
  - 28) Sischo WM, Heider LE, Miller GY and Moore DA (1993): Prevalence of contagious pathogens of bovine mastitis and use of mastitis control practices. *J Am Vet Med Assoc*, **202**: 595-600.
  - 29) Stone GG, Oberst RD, Hays MP, McVey S and Chengappa MM (1994): Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment brothcultivation-PCR procedure. *J Clin Microbiol*, **32**: 1742-1749.
  - 30) Sutra L and Poutrel B (1994): Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intrammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, **40**: 79-84.
  - 31) 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.
  - 32) 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.
  - 33) Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduzzi R and Piffaretti J (1995): Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophillia* and application to epidemiological studies. *J Clin Microbiol*, **33**: 1716-1719.
  - 34) Van Lith LAJT and Aarts HJM (1994): Polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. *Letters in Appl Microbiol*, **19**: 273-276.
  - 35) 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.

36) Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Pelemann J, Kuiper M and Zabeau M (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, **23**: 4407-4414.

37) Welsh J and McClelland M (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, **18**: 7213-7224.

---