

## 리스테리아균의 특성분석을 위한 Molecular Typing 방법의 상호보완

임형근<sup>1</sup> · 홍종해<sup>2</sup> · 박경진<sup>3</sup> · 최원상\*

<sup>1</sup>부산대학교 약학과

<sup>2</sup>강원대학교 수의학과

<sup>3</sup>한국보건산업진흥원 HACCP팀

\*동국대학교 생명공학과

## Enhanced Discrimination of *Listeria* spp. Using RAPD Fingerprinting Complemented by Ribotyping-PCR

Hyungkun Lim<sup>1</sup>, Chong-Hae Hong<sup>2</sup>, Gyung-Jin Bahk<sup>3</sup> and Weon Sang Choi\*

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, 192-1 Hyoja 2 dong, Chuncheon,  
Kangwon-do 200-701, Republic of Korea

<sup>3</sup>HACCP Team, Korea Health Industry Development Institute, Seoul 156-050, Republic of Korea

\*Department of Biotechnology, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea

### Abstract

The results typed by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) were compared with those obtained by Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) fingerprinting and ribotyping-PCR. The discriminatory power of RAPD typing was the best among the methods tested. RAPD typing with two different primers for 13 *Listeria* spp. reference strains produced 11 patterns each. In contrast, ERIC fingerprinting produced 9 patterns and ribotyping-PCR produced 7 patterns each. Composite of two separate RAPD (Lis 11 and primer 6) results or RAPD (Lis11)/ribotyping-PCR differentiated all 13 *Listeria* spp. reference strains. Therefore, composite of 2 separate RAPD (Lis11 and primer 6) or composite of RAPD (Lis11)/ribotyping-PCR is expected the most promising approach for typing field isolated *Listeria* spp. strains.

**Key words** – random amplification of polymorphic DNA (RAPD), Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) fingerprinting, ribotyping-PCR

### 서 론

*Listeria monocytogenes*는 환경내에 산재되어 육류 및 낙

농제품, 어패류, 야채와 같은 다양한 식품으로부터 분리되고 있으며, 오염된 식품을 섭취시 뇌수막염, 패혈증, 유산 등을 유발할 수 있다[1]. 따라서 식품공장에서의 오염예방은 *L. monocytogenes*으로 인한 피해를 줄이는 근본적인 조치가 된다. *L. monocytogenes*을 신속히 효과적으로 typing 할 수 있는 방법의 개발은 식품공장에서의 오염원

\*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 054-770-2227, Fax: 054-770-2227

E-mail: weonsang@mail.dongguk.ac.kr

추적과 식중독 사고의 역학조사 나아가서는 HACCP의 성공적인 정착에 매우 유용하게 사용되므로 안전한 식품생산에 기여하게 될 것이다.

현재 많이 사용되고 있는 *L. monocytogenes*의 typing방법으로는 serotyping과 phage-typing이 있다. serotyping방법은 O (somatic)와 H (flagella) 항원의 변이에 기초한 것으로[14] 모든 *L. monocytogenes*를 단지 13가지 serovar로만 분류하기 때문에 그 유용성에 있어 다소 제한적이다. Phage-typing기술은 모든 *L. monocytogenes*를 다 typing하지도 못하고 이들 중 일부를 1/2a, 1/2b와 4b로 구별하고 일부 실험실에서만 typing이 가능하다.

이같은 문제점들을 극복하기 위해 분자생물학적인 기술을 이용하는 방법들 즉 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), random amplification polymorphic DNA (RAPD), ribotyping, single-stranded conformation polymorphism (SSCP), restriction enzyme length polymorphism, PCR-based hybridization 등의 기술이 *L. monocytogenes*를 typing하기 위해 이용되었다[7,9,10,11,13,15]. 이 방법들은 기존의 방법에 비해 민감도가 높고 typing에 요하는 시간을 현저히 줄일 수 있다.

Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) fingerprinting[2]은 세균의 chromosome의 untranslated region에 반복적으로 consensus sequences가 존재하되 변이를 보이는 점을 이용한 것으로 대장균과 살모넬라의 typing에 이용된 바 있다[12]. 이 방법은 비록 이들 염기서열의 변이가 어떤 기능상의 차이를 가져오는지는 아직 밝혀져 있지 않지만 리스테리아균의 typing에도 이용 가능할 수도 있을 것으로 판단되어 시험해 보기로 하였다. ribotyping-PCR은 세균의 16S와 23S rRNA transcription units 사이에 존재하는 intergenic space region은 변이가 심하여도 생존 가능하여 다양한 크기변이 (size polymor-

phism)을 보이는 점을 이용한 것으로 다양한 균들의 typing에 적용되고 있으나[8] 리스테리아균의 경우에는 행한 예는 아직 없다.

따라서 본 연구는 리스테리아균 13종을 대상으로 RAPD와 ribotyping-PCR 및 ERIC fingerprinting을 행하고 이들의 typing 능력을 비교, 검토하여 장차 field에서 분리된 *L. monocytogenes*의 typing을 효과적으로 할 수 있는 방법을 찾고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

*L. monocytogenes* 배양을 위한 Tryptic soy broth와 yeast extract는 Difco사로부터 구입하였다. Taq DNA polymerase와 PCR을 위한 모든 시약은 Takara사 (일본)에서 구입하였다. 그 외 모든 시약은 따로 언급이 없을 경우 Sigma제를 사용하였다.

### Primers

모든 primer는 제노텍 (대전)에서 구입하여 사용하였으며 이를 Table 1에 정리하였다.

### 균주

본 실험에 사용된 리스테리아 균주는 총 13종의 표준균주였고 이중 7종은 *L. monocytogenes*였다 (Table 2). 이들은 국립수의과학검역원 (안양)에서 분양받아 TSBY 배지 (Tryptic soy broth에 0.6% yeast extract를 첨가한 배지)에서 배양한 후 사용하였다.

### DNA 분리정제

리스테리아 균체로부터 DNA를 분리하기 위해 guani-

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences(5'-3')	T <sub>m</sub> value(°C)	reference
DG107(primer 6)	CCCGTCAGCA	33.0	[3]
DG109(Rib-F)	TTGTACACACCGCCCGTCA	57.78	[8]
DG110(Rib-r)	GGTACCTTAGATGTTTCAGTTC	46.47	[8]
DG111(ERIC1R)	ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC	55.76	[12]
DG112(ERIC2)	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	56.92	[12]
DG122(Lis11)	AGCCAGGTCA	28.9	[5]

Table 2. *Listeria* spp. strains used in this study<sup>a</sup>

Serial number	Species	Strains	Serotypes	Isolation
1	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19113	3	human
2	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19114	4a	
3	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19115	4b	human
4	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19117	4d	sheep
5	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19118	4e	chicken
6	<i>L.monocytogenes</i>	HPB#410	1/2a	
7	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC35152		guinea pig
8	<i>L.ivanovii</i>	ATCC19119		sheep
9	<i>L.innocua</i>	ATCC33090		cow brain
10	<i>L.welshimeri</i>	ATCC35897	6a	decaying plant
11	<i>L.seeligeri</i>	ATCC35967	6b	soil
12	<i>L.grayi</i>	ATCC19120		chinchilla feces
13	<i>L.murrayi</i>	ATCC25401		corn stalks and leaves

<sup>a</sup>Source: Adapted from Choi and Hong[4].

dine thiocyanate/phenol/chloroform method[4]를 사용하였다. 이를 간략히 기술하면 약 0.5ml의 리스테리아 배양액에 0.25 ml의 solution D (4M guanidine thiocyanate, 0.025 M sodium citrate, 0.5% sarcosyl)와 0.5 ml의 phenol-chloroform (1:1)을 첨가하여 약 1시간 정도 tumbling시키고 원심분리하여 수용액층을 회수한 후 DNA를 isopropanol로 침전시켰다. 얻어진 pellet을 70% ethanol로 세척한 후 말려서 증류수에 녹여 PCR에 사용하였다.

#### PCR 조건

각각의 PCR 반응액에는 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs, 2.5 units *Taq* DNA polymerase, 100 pmol primer과 DNA template가 함유되도록 하되 총 부피는 50 μl가 되도록 하였다. 각 시료는 thermocycler (Perkin-Elmer 2400, Foster, CA)에서 증폭 cycle을 시작하기 전에 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후 cycle로 진입하게 하였으며 45 cycle을 종료한 후 72°C에서 7분간 연장반응 시킨 후 반응을 종료하였다. 각 cycle은 94°C 1분, 35°C 2분, 72°C 2분으로 하였다.

#### Data 분석

discrimination index는 다음 식을 이용하여 계산하였다 [6].

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

여기서 D는 numerical index of discrimination, N은 사용된 균주 총수, s는 RAPD type의 수, n<sub>j</sub>는 j type에 속하는 균주의 숫자를 의미한다.

## 결과 및 고찰

### ERIC fingerprinting

ERIC fingerprinting을 위해서는 DG111 (ERICR)과 DG112 (ERIC2) primer를 사용하였고 (Table 1) 13종의 리스테리아 표준균주를 9가지 유형으로 분리할 수 있었다 (Fig. 1). 그러나 7가지 *L. monocytogenes*중 3가지가 동일한 유형을 보였고 *L. innocua*, *L. grayi*, *L. murrayi*를 구별하지 못하였다 (Table 3).

### ribotyping-PCR

ribotyping-PCR을 위해서는 DG109 (Rib-F)와 DG110 (Rib-R) primer를 사용하였고 (Table 1) 13종의 리스테리아 표준균주를 7가지 유형으로 분리할 수 있었다 (Fig. 2). 검사한 *L. monocytogenes*중 ATCC 19114와 ATCC 19115가 동일 유형으로 나타났고 ATCC 19117과 19118이 동일 유형을 보였다. 그리고 *L. monocytogenes* HPB#410, *L. mono-*

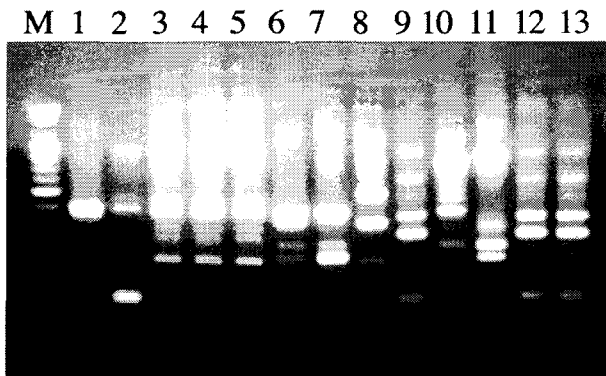


Fig. 1. ERIC-PCR performed with 13 reference *Listeria* spp. strains. Lane M, 100-bp DNA ladder as a size standard. Each strain was noted as number in Table 2.

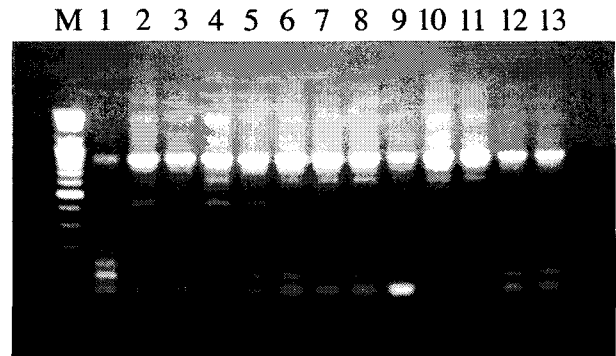


Fig. 2. Ribotype-PCR performed with 13 reference *Listeria* spp. strains. lane M, 100-bp DNA ladder as a size standard. Each strain was noted as number in Table 2.

*cytogenes* ATCC 35152, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* 가 동일한 유형을 보였다 (Table 3).

RAPD

우리는 앞선 연구에서 리스테리아균의 RAPD에 적합한 primer를 선정하기 위해 31가지의 primer를 대상으로 분리력을 비교하여 이중 6가지의 우수한 primer를 선별하여 보고한 바 있다[10]. 그 결과에 의하면 이중 DG122 (Lis 11)을 이용한 RAPD 결과는 *L. monocytogenes* ATCC 19115와 *L. monocytogenes* ATCC 19117이 동일한 유형으로 나타났

으며 *L. innocua*와 *L. grayi*가 동일한 유형을 보였다 (Table 3). 그러나 DG107 (primer 6)을 이용한 RAPD 결과는 *L. monocytogenes* HPB#410과 ATCC 35152를 구분하지 못하고 *L. grayi*와 *L. murrayi*를 구분하지 못하였다 (Table 3).

Typing 방법들의 분리력 비교

비교한 3가지 방법은 D값에 있어 2가지 RAPD가 모두 0.9743, ERIC fingerprinting이 0.9230, ribotyping-PCR이 0.8846으로 RAPD가 ERIC fingerprinting과 ribotyping-PCR에 비해 높은 D값을 보였다. 이들 방법 중 단일방법으로 13가지 리스테리아 표준균주 모두를 분리할 수 있는 방

Table 3. Typing of the 13 *Listeria* spp. strains

Species	Strains	ERIC	Ribotyping	RAPD(DG122)	RAPD(DG107)	compsite1	composite2	composite3	composite4	composite5	composite6
<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19113	i	a	A1	B1	a1	b1	c1	d1	e1	f1
<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19114	ii	b	A2	B2	a2	b2	c2	d2	e2	f2
<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19115	iii	b	A3	B3	a3	b3	c3	d3	e3	f3
<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19117	iii	c	A3	B4	a4	b4	c3	d4	e4	f4
<i>L.monocytogenes</i>	ATCC19118	iii	c	A4	B5	a5	b5	c4	d5	e5	f4
<i>L.monocytogenes</i>	HPB#410	iv	d	A5	B6	a6	b6	c5	d6	e6	f5
<i>L.monocytogenes</i>	ATCC35152	v	d	A6	B6	a7	b7	c6	d7	e6	f6
<i>L.ivanovii</i>	ATCC19119	vi	d	A7	B7	a8	b8	c7	d8	e7	f7
<i>L.innocua</i>	ATCC33090	vii	e	A8	B8	a9	b9	c8	d9	e8	f8
<i>L.welshimeri</i>	ATCC35897	viii	f	A9	B9	a10	b10	c9	d10	e9	f9
<i>L.seeligeri</i>	ATCC35967	ix	d	A10	B10	a11	b11	c10	d11	e10	f10
<i>L.grayi</i>	ATCC19120	vii	g	A8	B11	a12	b12	c8	d12	e11	f11
<i>L.murrayi</i>	ATCC25401	vii	g	A11	B11	a13	b13	c11	d12	e11	f11
D value		0.9230	0.8846	0.9743	0.9743						

법은 없었다. 그러나 RAPD (DG122)와 ribotyping-PCR 2가지를 종합하거나 (composite 1) 2가지 RAPD 결과를 종합하여 판단할 경우 (composite 2)는 13가지 유형으로 모두 분리할 수 있었다 (Table 3). 반면 RAPD (DG122)와 ERIC fingerprinting의 결과를 종합할 경우 (composite 3), DG107을 이용한 RAPD와 ribotyping-PCR을 종합한 경우 (composite 5), 그리고 ERIC fingerprinting과 ribotyping-PCR을 종합한 경우 (composite 6)에는 RAPD를 단독으로 실시한 것과 마찬가지로 11가지 유형으로만 분리할 수 있었다. 또한 RAPD (DG107)와 ERIC fingerprinting을 종합할 경우 12가지 유형으로 분리할 수 있었다 (composite 4).

결론적으로 리스테리아균의 경우 각 방법을 단독으로 행할 경우는 RAPD가 ERIC fingerprinting이나 ribotyping-PCR 보다 분리력이 뛰어나 typing에 더 적합한 것으로 판단되나 이 역시도 13가지를 모두 다른 유형으로 분리하지는 못했다. 그러나 RAPD를 ribotyping-PCR과 병행하여 사용하거나 2가지 primer를 이용하여 각각의 RAPD를 행한 후 이를 종합적으로 판단할 경우는 13가지를 모두 다른 유형으로 분리하는 것이 가능하였다. 따라서 야생주를 이용한 typing에는 2가지 RAPD를 종합하거나 DG122를 이용한 RAPD와 ribotyping-PCR 결과를 종합해서 판단하는 것이 유용할 것으로 판단된다.

## 요 약

리스테리아를 보다 효과적으로 typing할 수 있는 방법을 찾기 위해 표준균주 13종을 대상으로 하여 RAPD, ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) fingerprinting, ribotyping-PCR의 분리력을 비교해 보았다. DG107 (primer 6) 또는 DG122 (Lis 11) primer를 이용한 RAPD의 경우 11가지의 유형으로 분류되는 반면, ERIC fingerprinting은 9가지, ribotyping-PCR은 7가지씩의 유형을 보였다. 그러나 2가지 primer를 이용하여 각각 행한 RAPD 결과를 종합하거나, DG122를 이용한 RAPD와 ribotyping-PCR의 결과를 종합할 경우 13가지의 유형으로 모두 분리할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 2002년도 농림부·농림기술개발사업

(202138031SB010)의 지원으로 이루어진 것으로서 이에 감사 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Adams M. R. and M. O. Moss. 1995. *Food Microbiology*. pp. 186-191, The Royal Society of Chemistry.
2. Brown, E. 2001. Molecular differentiation of bacterial strains, pp. 29-66, In Carrinton, M and A. R. Hoelzel (eds), *Molecular Epidemiology*, Oxford Univ. Press.
3. Chansiripornchai, N., P. Ramasoota, A. Bangtrakulnonth, J. Sasipreeyajan and S. B. Svenson. 2000. Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *FEMS Immunology and Medical Microbiol.* **29**, 221-225.
4. Choi, W. S. and C.-H. Hong. 2003. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using competitive PCR. *International J. Food Microbiol.* **84**, 79-85.
5. Giovannacci, I., C. Ragimbeau, S. Queguiner, G. Salvat, J. L. Vendevre, V. Carlier and G. Ermel. 1999. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International J. Food Microbiol.* **53**, 127-140.
6. Hunter, P. R. and M. A. Gaston. 1998. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 2465-2466.
7. Jaradat, Z. W., G. E. Schutze and A. K. Bhunia. 2002. Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. *International J. Food Microbiol.* **76**, 1-10.
8. Kostman, J. R., T. D. Elliot, J. J. Lipuma and T. L. Stull. 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 2084-2087.
9. Lehner, A., S. Loncarevic, M. Wagner, J. Kreike and E. Brandl. 1999. A rapid differentiation of *Listeria monocytogenes* by use of PCR-SSCP in the listeriolysin O (*hlyA*) locus. *J. Microbiol. Methods* **34**, 165-171.
10. Lim, H., C.-H. Hong, G.-J. Bahk and W. S. Choi. 2003. Primers for typing *Listeria* spp. using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Fd*

- Hyg. Safety.* **18**, 67-72.
11. Manzano, M., L. Cocolin, C. Cantoni and G. Comi. 1998. A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. *International J. Food Microbiol.* **42**, 207-212.
  12. Millemann, Y., M.-C. Lesage-Descauses, J.-P. Lafont and E. Chaslus-Dancla. 1996. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* **14**, 129-134.
  13. Pourshaban M., M. Gianfranceschi, A. Gattuso, F. Menconi and P. Aureli. 2000. Identification of *Listeria monocytogenes* contamination sources in two fresh sauce production plants by pulse-field gel electrophoresis. *Food Microbiol.* **17**, 393-400.
  14. Seeliger, H. P. R. and K. Hohne. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes*., In Bergan, T. and J. R. Norris (eds.), *Method in Microbiology*, Vol. **13**, Academic Press, New York, p. 31-49.
  15. Wang, C. and C. Hong. 1999. A rapid PCR-based hybridization assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in channel catfish. *Food Microbiol.* **16**, 291-297.

(Received July 15, 2003; Accepted October 17, 2003)