

PCR을 이용한 육류 내 *Campylobacter* sp. 및 *Campylobacter jejuni*의 분리 검출

주종원^{1*} · 홍경표² · 김용휘² · 조상범³

¹중부대학교 애완동물자원학과, ²중부대학교 호텔외식산업학과, ³건국대학교 동물자원연구센터

Selective Detection of *Campylobacter* sp. and *Campylobacter jejuni* in Meat Food by Polymerase Chain Reaction

Jong-Won Joo^{1*}, Kyung-Pyo Hong², Yong-Hui Kim² and Sang-Buem Cho³

¹Dept. of Companion Animal and Animal Resources Science, Joongbu University, Chungnam 312-702, Korea

²Dept. of Hotel and Foodservice Industry, Joongbu University, Chungnam 312-702, Korea

³Animal Resources Research Center, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Abstract

The principal objective of this study was to develop the optimum oligonucleotide primers for the simple detection of *Campylobacter* in food samples. In order to achieve this goal, a variety of oligonucleotide primers were designed via the modification of 16S rDNA, *ceuE* and *mapA* sequences of *Campylobacter*. Through the subsequent analysis of the specificity and sensitivity of primers, two types of oligonucleotide primers, CB4 and CJ1, were selected for *Campylobacter* genus-specific and *C. jejuni* species-specific primers, respectively. The detection limit was found to be $10^0 \sim 10^1$ cells per reaction with the prepared cell suspension, however, the sensitivity in the meat samples was less, at $10^1 \sim 10^2$. We suggested that PCR inhibitors such as hemoglobin or immunoglobulin in pork or beef influenced.

Key words : *Campylobacter* sp. *Campylobacter jejuni*, selective detection, meat food, polymerase chain reaction.

서 론

세균성 식중독은 세계적으로 발생 빈도가 높은 질병 중 하나이며 최근 발생 건수가 급격하게 증가하고 있고, 피해 규모 또한 대형화되고 있다(Han *et al* 1999). 다양한 세균들이 식중독의 원인으로 분류되고 있으며, *Campylobacter* 또한 이 중 하나로 알려져 있다. *Campylobacter* 감염증은 *Campylobacter fetus* 및 *C. venerealis*의 감염에 의해 소와 양의 불임, 유산 등의 번식 장애를 일으키는 질병으로 오래 전부터 중요시 되어 왔다. 특히 *C. jejuni*는 사람과 동물에 있어서 세균성 설사증의 주요 원인체라는 것이 밝혀졌고 또한 동물이 사람에게 매개원이 된다는 사실이 알려지면서 새로운 인수공통전염병으로서 중요한 위치를 차지하게 되었다(Krieg *et al* 1994, Stem *et al* 1980, Swaminathan *et al* 1982). *Campylobacter* 균은 Gram(-)의 만곡된 간균이며 미호기성 이고, 양단 또는 일단에 극편모를 가지며, 활발한 선회운동성을 한다. *C. fetus* 성장에 따라 *C. fetus* subsp. *fetus*와 *C. fetus* subsp. *venerealis*의 2 아종으로 나뉜다. 감염 경로는 감염된 조직이나 오염된

물질을 섭취함으로써 구강으로도 전염된다.

*Campylobacter*의 진단은 현미경 진단과 배양 검사가 있으나 감도가 낮거나 3~4일 이상의 시일이 소요되는 등의 단점이 있다. 최근에는 가검물에서 nucleic acid나 antigen 등을 추출하여 진단에 응용하려는 시도가 많이 진행되어 있으며, 대표적인 것으로는 antigen-antibody 검출에 기초한 immunodetection법과 PCR에 의한 진단법이 있다. Antigen-antibody method는 flagella에 존재하는 antigen에 대한 antibody를 제조하여 발색 반응을 보는 것으로 별도의 kit을 구성하였을 경우 간단하고 빠르게 검출할 수 있는 장점이 있다. 반면 검출에 대한 민감도는 $10^6 \sim 10^{10}$ CFU/mL로 임상적 질병 유발 농도가 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL인 것을 감안하면 민감도가 떨어지는 단점이 있다(Lee *et al* 2000, Oh *et al* 1996).

PCR 진단법은 PCR을 수행하여 확인할 수 있는 별도의 장치가 필요한 단점이 있으나, antigen-antibody 반응법과는 달리 nucleic acid내의 특정 nucleotide sequence를 증폭하여 진단하는 방법으로 반응 용액당 1개의 증폭 가능한 nucleotide sequence만 존재해도 진단이 가능 하며 시료가 확보되어 있을 빠른 시간 안에 검출이 가능하다(Jung 2001).

본 연구는 식중독 원인균인 *Campylobacter*를 신속하게 검출하기 위한 방법으로 PCR 기법을 사용함에 있어서 보다 특

* Corresponding author : Jong-Won Joo, Tel : +82-41-750-6874, Fax : +82-41-750-6381, E-mail : joojw@joongbu.ac.kr

이적으로 *Campylobacter*를 다른 세균들로부터 구분하여 검출할 수 있고 *Campylobacter jejuni*를 선택적으로 분리 검출할 수 있는 프라이머를 구성하는 데에 그 목적이 있다.

재료 및 방법

1. Microorganisms 및 배양 조건

*Campylobacter jejuni*와 *C. coli* 균주들은 CCARM(Culture Collection of Antimicrobial Resistance Microbes, 한국)으로부터 분양받았으며, 각각 *C. jejuni* CCARM13157, 13155, 13150, 13153, 13141, 13118균주와 *C. coli* CCARM 13078, 13070, 13060, 13062균주를 사용하였다. 프라이머의 특이성 검정에 사용된 *Salmonella mituxre*의 제조에 사용된 균주들은 *Salmonella typhimurium* CCARM 8153, *S. ardwick* CCARM 8110, *S. enteritis* CCARM 8050, *S. risen* CCARM 8036, *S. derby* CCARM 8026이며, *Escherichia coli* K12는 생명공학연구원(대전)에서 제공받았다. 각 균주들은 nutrient agar와 nutrient broth(Oxoid)를 이용하여 36°C에서 24시간 동안 배양하여 사용하였다. *C. jejuni*와 *C. coli*에 오염된 시료를 제작하기 위하여 각각의 균주들을 nutrient broth에서 20시간 이상 배양한 후에 소고기와 돼지고기에 10² CFU/g 수준이 되도록 0.8% NaCl 용액으로 희석하여 혼합하였다.

2. Genomic DNA의 추출

세균 배양액을 직접 PCR 분석에 사용하기 위하여 20시간 동안 배양된 각각의 균주 배양액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세균을 침전하였고 다시 멸균 증류수에 현탁하여 PCR 분석에 사용하였다. 각 균주들의 genomic DNA를 추출하기 위하여 세균 침전물을 1 mL의 용액 A(2% CTAB, 2% PVP4000, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA(pH8.0), 100 mM Tris-HCl (pH8.0), 2% 2-Mercaptoethanol) 현탁한 후, 다시 1 mL의 6 M guanidine HCl을 첨가하여 1분간 강하게 교반한 후에 2 mL의 chloroform을 첨가하여 다시 30초간 vortex mixer (EYELA)를 이용하여 강하게 교반하였다. 혼합액의 상층액을 수거하고, 2 mL의 isopropanol을 첨가한 후에 30초간 강하게 교반한 후, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 침전된 pellet은 70% cold ethanol로 세척한 후에 상온에서 10분간 건조하였고 1 mL의 Tris EDTA (TE) buffer(pH 8.0)용액에 녹여 실험에 사용하였다.

3. Oligonucleotide Primer의 제작

*Campylobacter jejuni*의 검출을 위하여 사용된 oligonucleotide primers는 *Campylobacter*의 *mapA* 유전자와 *ceuE* 유전자 그리고 16S rDNA sequence를 참조하여 Genotech 사(Korea)

에 합성을 의뢰하여 사용하였으며, 사용된 primer의 염기서열은 Table 1과 같다. *Campylobacter*의 *mapA* 유전자는 membrane-associated protein A를 encoding하며, *ceuE* 유전자는 periplasmic enterochelin binding protein을 encoding하는 유전자로서 *C. jejuni*와 *C. coli*를 다른 *Campylobacter*로부터 선택적으로 확인하는데 사용되는 genetic marker로 알려져 있다(Price et al 2006, Gonzalez et al 1997).

Table 1. Primers used for detection of *Campylobacter* sp. and *C. jejuni*

Primer	Sequence (5' to 3')	Amplicon size(bp)
<i>Campylobacter</i> genus specific		
CB1-For	GGA TGA CAC TTT TCG GAG C	816
CB1-Rev	CAT TGT AGC ACG TGT GTC	
CB2-For	CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GG	287
CB2-Rev	TTC TGA GGG TAC CTA AGG AA	
CB3-For	CGC ACG GGT GAG TAA GGT A	180
CB3-Rev	GCG TCA TAG CCT TGG TAA GC	
CB4-For	CGT GGA GGA TGA CAC TTT TCG GAG CGT AAA C	412
CB4-Rev	TGC ATT ACT GAG ATG ACT AGC ACC CAA C	
<i>C. jejuni</i> specific		
CJ1-For	AAC ACT GCT ACG GTG AAA GTT TTG CCT A	993
CJ1-Rev	GAT GAT CTT TTT GTT TTG TGC TGC TTT GG	
CJ2-For	CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG	589
CJ2-Rev	GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT A	
CJ3-For	ATC TAA TGG CTT AAC CAT TAA AC	857
CJ3-Rev	GGA CGG TAA CTA GTT TAG TAT T	
CJ4-For	TGG TGG TTT TGA AGC AAA GA	413
CJ4-Rev	GCT TGG TGC GGA TTG TAA A	
CJ5-For	ACA ACT TGG TGA CGA TGT TGT A	331
CJ5-Rev	TAG GCA TTA TTT TTA CCC CTA ATA GAC AG	
CJ6-For	CAT CTT CCC TAG TCA AGC CT	774
CJ6-Rev	AAG ATA TGG CAC TAG CAA GAC	

4. PCR 조건

PCR은 미국 Biometra사 제품을 이용하여 수행하였다. 20 μ L 반응을 기준으로 0.4 μ M의 oligonucleotide primer와 200 μ M의 dNTP mixture(Larova사, 독일), PCR buffer(20 mM Tris.HCl(pH8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 U Taq DNA Polymerase, 5 μ L의 sample DNA 혹은 2 μ L의 세균 현탁액을 template로 첨가하였다. T1 Thermal Cycler(Biometra, USA)를 이용하여 94°C에서 5분간 pre-incubation 과정을 거친 후, 40 cycle로 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응시킨 후, 72°C에서 10분간 final extension시키고 반응을 종결하였다.

5. Agarose Gel Electrophoresis

10 μ L의 PCR product를 1.5%의 5 μ g/mL 농도의 ethidium bromide가 포함된 agarose gel에 loading한 후 Mupid-2plus kit을 이용하여 electrophoresis를 수행하였다. 이것을 다시 UV transilluminator에서 band pattern을 분석하였다.

6. Sensitivity of PCR Primers

Campylobacter jejuni CCARM13155를 각각 2 μ L당 10⁰, 10¹, 10², 10³ cell이 되도록 희석하여 선별된 oligonucleotide primer에 대한 sensitivity analysis를 수행하였다. PCR 조건은 상기의 과정을 따랐으며, 20 μ L reaction volume당 2 μ L이 각각의 bacterial suspension을 첨가하여 반응을 진행시켰다.

Selection of genus specific, species specific oligonucleotide primers, Genus-specific, 또는 species-specific oligonucleotide primer를 선별하기 위하여 PCR 과정을 통하여 각각의 bacterial strains에 대한 amplification efficiency를 측정하였으며, 이 중에서 8개 oligonucleotide primer set을 선별하여 각 bacterial strains에 대한 specificity를 판별하였다.

균주는 DNA를 정제하지 않고 bacterial suspension을 직접 사용하였으며, 1 μ L 당 100 cell 이상 포함될 수 있도록 하여 반응을 진행시켰다.

7. 음식 샘플로부터 Bacteria 농축 및 DNA 제조

각각 100 CFU/mL의 *Campylobacter* 현탁액을 10 g의 쇠고기와 돼지고기 샘플에 혼합하고, 이것을 잘게 썰고 이후 50 mL 증류수에 넣어 세척하였다. 쇠고기와 돼지고기를 제거한 후 수거된 50 mL의 세척한 용액을 이후의 실험을 위한 샘플로서 준비하였다. 수거된 샘플 중 25 mL를 원심분리한 후 상등액은 버리고, 펠릿(pellet)을 STE(100 mM 염화나트륨, 50 mM Tris-HCl(pH7.0), 1 mM EDTA(pH8.0)에 현탁하고, 다시 원심분리한 후 이것을 2 mL 증류수에 녹여 이후의 직접 PCR 분석(direct PCR analysis)에 이용하였다.

수거된 샘플 중 나머지 25 mL에 대하여 *Campylobacter* 혼합균 25 mL를 *Campylobacter* 농축 매질(Nutrient Broth No 2, 옥소이드(Oxoid), 5% 탈피브린화된 양혈액, 옥소이드 및 *Campylobacter* 선택적 보충물(Merck)에 약 8시간 동안 42°C에 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

균체를 직접 PCR 분석에 사용하였을 때와 균체에서 genomic DNA를 추출한 후에 PCR 분석을 수행하는 것을 비교하기 위하여 *Campylobacter* 배양액을 동일한 양으로 나누어 한쪽은 원심분리 후에 그 pellet을 증류수에 녹여 직접 PCR 분석을 실시하였고, 나머지 한쪽은 genomic DNA 추출 과정을 거쳐서 사용하였다.

결과 및 고찰

1. *Campylobacter* Genus Specific과 *C. jejuni* Specific Primer의 선발

축산식품의 식중독에 관련된 세균 중 가축의 분으로부터 축산물로 오염되는 대표적인 병원성 세균으로 *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* sp., *Yersinia enterocolitica* 등이 있으며, *Campylobacter* sp.중에서 *C. fetus*와 *C. venerealis*는 소와 양의 불임과 유산 등의 번식 장애를 일으키나, *C. jejuni*와 *C. coli*는 사람과 동물에 있어서 세균성 설사 증의 주요 원인균으로 밝혀져 새로운 인수공통전염병으로 인식되고 있어 육류식품에서의 정확하고 신속한 검출이 매우 중요하다(Giesendorf *et al* 1992, Nagva *et al* 2000, Stucki *et al* 1995, Uyttendaele *et al* 1995).

1) Amplification Efficiency 분석

효율적인 *Campylobacter* detection primer를 선별하기 위하여 각각의 oligonucleotide primer에 대한 amplification efficiency를 분석한 결과 Fig. 1과 같다. *Campylobacter* genus specific

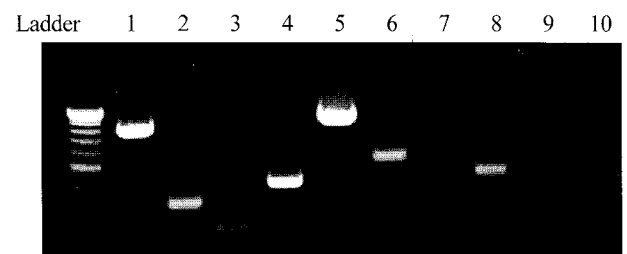


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis represent PCR product with various oligonucleotide primers designed to detect *Campylobacter* genus specific and *C. jejuni* specific.

Lane 1, CB1; Lane 2, CB2; Lane 3, CB3; Lane 4, CB 4; Lane 5, CJ1; Lane 6, CJ2; Lane 7, CJ3; Lane 8, CJ4; lane 9, CJ5; Lane 10, CJ6.

primer인 CB1~4(lane 1~4)의 경우 CB1과 CB4에서 비교적 진한 product band가 나타났다. *Campylobacter jejuni* specific primer인 CJ1~6(lane 5~10)의 경우 CJ1과 CJ2에서 product band가 진하게 형성되었다. 반면에 CJ5와 CJ6의 product band는 육안으로 식별이 불가능한 정도로 희미하게 생성되었다. 이에 *Campylobacter* genus specific primer로는 CB1과 CB4 그리고 *C. jejuni* specific primer로는 CJ1과 CJ2로 총 4개의 oligonucleotide primer set을 선별하였고 이후 특이성 검증 시험에 사용하였다.

2) *Campylobacter* Genus Specific Primer의 특이성 분석

미생물들이 공통적으로 소유하는 유전자들에는 염기서열이 보존 영역과 비보존 영역으로 구분되며, 이 중 ribosomal DNA 세포의 기능을 유지하기 위하여 염기서열이 생물체간에 변이가 적으나 서로 다른 종간의 변이는 큰 것으로 확인됨에 따라 이들 염기서열의 차이를 비교함으로써 생물체의 분류에 활용하여 왔다. 따라서 *Campylobacter*의 특이적 검출을 위하여 16S ribosomal DNA sequence가 널리 이용되었으며 특히 축산물 중 닭의 피부에서 *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* 균의 검출, 닭의 피부, 같은 고기, 우유에서 *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, 균을 검출하는 방법으로 이용되어져 왔다 (Uyttendaele *et al* 1995).

본 연구에서도 16S rDNA sequence에 기초한 *Campylobacter* genus specific primer, CB1과 CB4에 대하여 *Campylobacter*에 대한 특이성을 분석하였다. *E. coli*, *Salmonella* strains mixture, *C. coli*, 그리고 *C. jejuni* 등의 균주에 대하여 CB1과 CB2의 특이성을 분석한 결과 *E. coli*에 대하여서는 검출 band가 나타나지 않은 반면, *Salmonella* mixture에서는 미약한 band가 나타났다. 그리고 *C. coli*와 *C. jejuni*에서는 모두 분명한 band가 나타났다(Fig. 2-a). CB4의 경우 CB1과는 다르게 *C. coli*와 *C. jejuni*에서만 특이적으로 반응이 나타났다(Fig. 2-b). 따라서 여러 가지 세균이 혼합된 검체로부터 *Campylobacter*를 검출하기에는 CB1보다는 CB4가 적합한 것으로 판단된다.

3) *Campylobacter jejuni* Specific Primer의 특이성 분석

*Campylobacter*의 특이적 검출을 위하여 16S rDNA sequence 외에 다양한 genetic marker들이 사용되어지고 있으며, flagella를 구성하는 *flaA*와 *flaB* 유전자가 우유, 치즈, 요구르트에서 *C. jejuni*, *C. coli* 균을 검출하는 방법으로 이용된 바 있다(Wegmuller *et al* 1993). 본 연구에서 사용된 *Campylobacter jejuni* specific primer는 다른 세균으로부터 *C. jejuni*를 선택적으로 분리할 수 있는 genetic marker로 사용되는 *ceuE*(CAAGTAC

TGCAATAAAAACTAGCACTACG, Periplasmic enterochelin-binding protein)와 *mapA*(GCTAGAGGAATAGTTGTGCTTG ACAA, Outer membrane lipoprotein)을 기초로 하여 제작하게 되었다(Price *et al* 2006). Primer CJ1과 CJ2의 특이성을 분석하기 위하여 각각의 primer들은 *E. coli*, *Salmonella* mixture, *C. coli* 그리고 6종의 *C. jejuni*에 대하여 특이성을 평가하였는데, CJ1의 경우 *Salmonella* mixture, *E. coli* 그리고 *C. coli*에 대하여서는 반응이 나타나지 않은 반면 6종의 *C. jejuni*에 대하여 우수한 감도로 검출되어 *C. jejuni*의 선택적 검출에 우수한 특성을 가진 것으로 나타났다 (Fig. 3). 두번째 *C. jejuni* specific primer인 CJ2의 경우, CJ1과 마찬가지로 모든 6종의 모든 *C. jejuni*에서 검출 band가 관찰되었고 *E. coli*와 *Salmonella* mixture에서는 나타나지 않았다. 그러나 미약하나 *C. coli*에서 band가 관찰되어 CJ1에 비하여 특이성이 낮

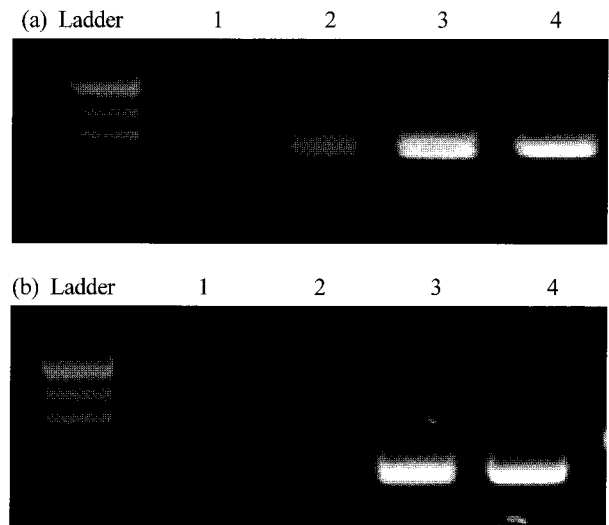


Fig. 2. Specificity of primer CB1 and CB4 to various bacterial culture mixtures.

(a) Specificity of primer CB1, Lane 1, *E. coli*; Lane 2, *Salmonella* mixture; Lane 3, *C. coli*; Lane 4, *C. jejuni*. (b) Specificity of primer CB 4, Lane 1, *E. coli*; Lane 2, *Salmonella* mixture; Lane 3, *C. coli*; Lane 4, *C. jejuni*.

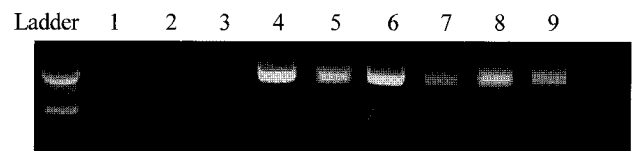


Fig. 3. Specificity of primer CJ1 to various bacteria strains and 6 different strains of *Campylobacter jejuni*.

Lane 1, *E. coli*; Lane 2, *Salmonella* mixture; Lane 3, *C. coli*; Lane 4, *C. jejuni* CCARM13157; Lane 5, *C. jejuni* CCARM13155; Lane 6, *C. jejuni* CCARM13150; Lane 7, *C. jejuni* CCARM13153; Lane 8, *C. jejuni* CCARM13141; Lane 9, *C. jejuni* CCARM13118.

은 것으로 나타났다(Fig. 4).

Primer CJ1과 같이 세균의 특정 유전자를 genetic marker로 사용하는 것은 혼합된 검체로부터 원하는 세균의 검출을 위하여 널리 사용되어져 오고 있다. 우유, 닭고기내 *S. typhimurium*의 특이적 검출을 위하여 *mdh* 유전자가 사용되었고, 고기, 치즈, 소시지내 *Salmonella* 균 검출에는 *invA* 유전자가 사용된다. 또한, 꿀에서 *Salmonella* 균을 검출하기 위하여 *himA* 유전자가 사용되었다(Bej *et al* 1994). Cooray *et al* (1994)은 *Listeria monocytogenes*의 병원성과 관련된 유전자인 *prfA*, *hlyA*(listeriolysin O), *plcC*(phospholipase C) 및 *iap*를 PCR 반응으로 증폭하여 검출하였다. 또한, Chen *et al*(1998)은 장용혈성 *E. coli*(EHEC)에 의해 발병되는 용혈노증을 일으키는 독소인 shiga toxin type 1과 shiga toxin type 2의 유전자인 *stx₁*과 *stx₂*를 증폭하여 검출하는 방법에 대해 보고하였으며, 이외에 병원성 유전자를 이용하여 PCR 방법으로 검출한 병원균들에는 *Y. enterocolitica*(Lee *et al* 2000)와 *S. typhimurium* (Hashimoto 1995) 등이 있다.

2. 검출 민감도 측정

Campylobacter genus specific primer와 *C. jejuni* specific primer로 선발된 각각의 CB4과 CJ1의 최소 검출 농도를 측정하기 위하여 검출 대상 균주로서 PCR product를 가장 많이 만들어 내는 *C. jejuni* CCARM13155를 선발하였고(Figure 4), 그 농도를 10⁰ cell/tube에서 10³ cell/tube까지 다양화한 후에 검출 감도를 측정하였고 그 결과, CB4와 CJ1 primer 모두 10¹ cell/mL에서부터 검출되기 시작하여 선발된 primer의 검출 감도는 최소 10¹ cell인 것으로 나타났다(Fig. 5). 식품으로부터 병원균의 검출은 특이성뿐 만 아니라 민감성 또한 매우 중요한 요인으로 작용한다. 이에 PCR 방법의 민감도와 특이성의 개선을 위해 nested PCR 방법과 PCR 방법과 함께 Li-gase Chain Reaction(LCR) 또는 Nucleic Acid Sequence-based Amplification(NASBA, Uyttendaele *et al* 1995)을 병행하여 분석하는 방법에 대한 연구도 수행된 바 있다.

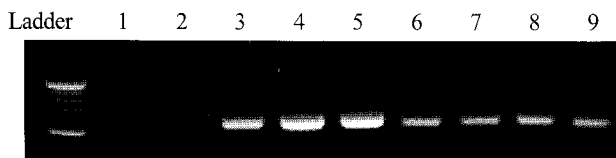


Fig. 4. Specificity of primer CJ2 to various bacteria strains and 6 different strains of *Campylobacter jejuni*.

Lane 1, *E. coli*; Lane 2, *Samonella* mixture; Lane 3, *C. coli* CCARM13078; Lane 4, *C. jejuni* CCARM13157; Lane 5, *C. jejuni* CCARM13155; Lane 6, *C. jejuni* CCARM13150; Lane 7, *C. jejuni* CCARM13153; Lane 8, *C. jejuni* CCARM13141; Lane 9, *C. jejuni* CCARM13118.

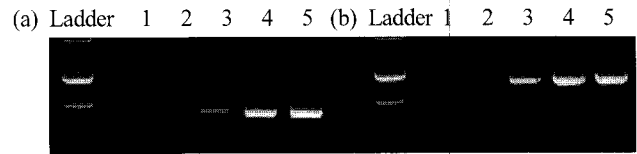


Fig. 5. Sensitivity of primer CB4 and CJ1 to various concentration of *C. jejuni* CCARM13155.

(a) Primer CB4, Lane 1, negative control; Lane 2, 10⁰ cell/tube; Lane 3, 10¹ cell/tube; Lane 4, 10² cell/tube; Lane 5; 10³ cell/tube. (b) Primer CJ1, Lane 1, negative control; Lane 2, 10⁰ cell/tube; Lane 3, 10¹ cell/tube; Lane 4, 10² cell/tube; Lane 5, 10³ cell/tube.

3. *Campylobacter*에 오염된 식품으로부터 *Campylobacter*의 검출

쇠고기와 돼지고기에 *Campylobacter jejuni*를 접종한 후에 선발된 primers를 이용하여 PCR 분석을 수행한 결과, Table 2에서 알 수 있는 바와 같이 양호한 검출 성능이 나타낸다.

음식물 샘플에서는 민감도가 10¹~10²으로 떨어지는 양상을 보였으며, 이는 샘플 중의 쇠고기나 돼지고기 내에 존재하는 헤모글로빈이나 면역글로빈 등의 PCR 억제제의 영향에 의한 것으로 추정된다. 하지만 이전 억제 효과는 상기된 DNA 단리 방법에 의해 상쇄되었으며, 4시간 정도의 농축 과정을 통하여 민감도를 더 많이 향상시킬 수 있었다. 또한 농축 과정 후의 PCR 분석에서는 간단한 세척 과정을 거친 샘플과 DNA 단리 과정을 거친 샘플 사이의 큰 차이는 발견할 수 없었으므로, 본래의 bacteria 세포 자체도 PCR 주형으로서 무난하게 사용될 수 있음을 알 수 있었고, 농축하지 않은 경우에도 비교적 검출이 양호하게 나타났으나, 농축한 후에 보다 뚜렷한 검출 양상을 볼 수 있었다. 하지만 bacteria 현탁액과 정제된 DNA간의 차이는 그리 크게 나타나지 않았다.

샘플 간에는 쇠고기에서 돼지고기보다 약간 더 많은 양의 생성물 band가 생성됨을 볼 수 있었다.

Table 2. Results of PCR performed with food samples with and without enrichment

Samples	Before enrichment	After enrichment	
		Bacterial suspension	DNA solution
CB4	Beef	+ ¹	+++ ³
	Pork	+	++ ²
CJ1	Beef	+	+++
	Pork	+	++

¹+: poor detection efficiency, ²++: medium detection efficiency, ³+++: good detection efficiency.

요 약

본 연구는 식품 샘플에서 단시간 내에 간단한 방법으로 *Campylobacter jejuni* 를 검출하기 위하여 10가지의 *Campylobacter* genus-specific primer와 *C. jejuni* species-specific oligonucleotide를 제작하였고, amplification efficiency test를 통하여 4종으로 축소한 후 다시 specificity, sensitivity analysis를 통하여 최종적으로 CB4, CJ1 2종의 oligonucleotide primer를 선별하였다. 선별된 oligonucleotide primer는 각각 *Campylobacter* genus specific, *Campylobacter jejuni*에 대한 species specific한 특성을 지닌다. 또한, sensitivity analysis를 통하여 isolated colony에서 reaction tube당 $10^0 \sim 10^1$ 까지의 detection limit을 확보하였다. 육류 시료에서는 sensitivity가 $10^1 \sim 10^2$ 로 떨어지는 양상을 보였으며, 이는 쇠고기나 돼지고기에 존재하는 hemoglobin이나 immunoglobulin 등의 PCR inhibitor의 영향에 의한 것으로 추정된다.

감사의 글

본 연구는 (주)파크애비뉴에서 연구비를 지원받아 수행되었으며, 연구 과정에서는 (주)선제네텍스에서 많은 도움을 주셨기에 감사의 말씀을 드립니다.

문 헌

- Bej AK, Mahbubani MH, Boyce MJ, Atlas RM (1994) Detection of *Salmonella* sp. in oysters by PCR. *Appl Environ Microbiol* 60: 368-373.
- Chen S, Xu R, Yee A, Wu KY, Wang CN, Read S, De Grandis SA (1998) An automated fluorescent PCR method for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Appl Environ Microbiol* 64: 4210-4216.
- Cooray KJ, Nishibori T, Xiong H, Matsuyama T, Fujita M, Mitsuyama M (1994) Detection of multiple virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. *Appl Environ Microbiol* 60: 3023-3026.
- Giesendorf BA, Quint WG, Henkens MH, Stegerman H, Huf FA, Niesters HG (1992) Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* sp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 3804-3808.
- Gonzalez I, Grant KA, Richardson PT, Park SF, Collins MD (1997) Species identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J Clin Microbiol* 35: 759-763.
- Han JP, Baek BS, Bae MJ (1999) Productivity, isolation and purification of egg yolk antibody (IgY) against food poisoning bacteria (*Salmonella typhimurium*). *J East Asian Soc Dietary Life* 9: 200-206.
- Hashimoto Y, Itho Y, Fujinaga Y, Khan AQ, Sultana F, Miyake M, Hirose K, Yamamoto K, Ezaki T (1995) Development of nested PCR based on the *viaB* sequence to detect *Salmonella typhi*. *J Clin Microbiol* 33: 775-777.
- Jung HK (2001) Comparison of sensitivity of detection for enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxin and *Clostridium perfringens* Type A enterotoxin by means of the reversed passive latex agglutination and the polymerase chain reaction. *J East Asian Soc Dietary Life* 11: 26-32.
- Krieg NR, Holt JG, Sneath P, Staley JT, Williams ST (1994) *Bergey's manual of systemic bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins Maryland pp 566.
- Lee YK, Choi SM, Shin JY, Ryeom K (2000) Rapid detection method for pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a multiplex PCR. *Korean J Sanitation* 15: 105-113.
- Lee YK, Choi SM, Shin JY, Ryeom K (2000) Rapid detection method for pathogenic *Yersinia enterocolitica* by a multiplex PCR. *Korean J Sanitation* 15: 105-113.
- Nagva HK, Bergh A, Holck A, Rudi K (2000) Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 66: 4029-4036.
- Oh HJ, Kim CM, Seong WK, Min HK (1996) Study on the development of rapid detection method for pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* by polymerase chain reaction (in Korean). *J Korean Soc Microbiol* 31: 165-173.
- Price EP, Huygens F, Giffard PM (2006) Finger printing of *Campylobacter jejuni* by using resolution - optimized binary gene targets derived from comparative genome hybridization studies. *Appl Environ Microbiol* 72: 7793-7803.
- Stem NJ, Pierson MD, Kotula AW (1980) Effects of pH and sodium chloride on *Y. enterocolitica* growth at room and refrigeration temperatures. *J Food Science* 45 :64-67.
- Stucki U, Frey J, Nicolet J, Burnens AP (1995) Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane protein. *J Clin Microbiol*

33: 855-859.

Swaminathan B, Harmon MC, Mehlman IJ (1982) A review
Yersinia enterocolitica. *J Appl Bacteriol* 52: 151-154.

Uyttendaele M, Schukink R, Germen B, Debevere J (1995)
Detection of *Campylobacter jejuni* added to foods by using
combined selective enrichment and nucleic acid sequence-
based amplification (NASBA). *Appl Environ Microbiol* 61:

1341-1347.

Wegmuller B, Luthy J, Candrian U (1993) Direct polymerase
chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Cam-*
pylobacter coli in raw milk and dairy products. *Appl En-*
viron Microbiol 59: 2161-2165.

(2008년 5월 22일 접수, 2008년 10월 2일 채택)