

PCR 방법에 의한 세균성 식중독균의 다중·동시 검출

박주연·문선영·이경하·남정옥·남보라·김진만*

건국대학교 축산대학 축산식품생물공학

서 론

오늘날 산업 문명이 고도로 발달함에 따라 우리의 식생활도 급격히 변화되어 왔으며 식품위생은 식품의 유해 미생물로부터 야기되는 건강장해 즉 식중독과 관련하여 커다란 사회문제로서 그 중요성이 날로 증가되어가고 있다(Oh, *et al.* 1998). 식중독이란 의학적으로 특별한 질병으로 분류되고 있지는 않지만 식중독은 환자 자신뿐만 아니라 사회에 적지 않은 경제적 손실을 초래하게 된다. 식중독은 대부분 세균성 식중독으로서, 여기에는 살모넬라균, 장염 비브리오균, *Clostridium perfringens*, 병원성 대장균 등에 의한 감염형 식중독과 포도상구균, 보툴리누스균 등에 의한 독소형 식중독이 있다(Bae, *et al.* 2005).

일반적으로 식품으로부터 병원성미생물을 분리·동정하는 방법으로는 채취한 검체를 선택배지를 이용하여 배양하고 형성된 콜로니(colony)를 육안으로 확인하거나, 기타 탐지확인하는 수단을 이용하는 방법 등이 있다. 또한 최근에는 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 검사방법이 개발·사용되고 있다. 선택배지를 이용하는 방법은 미생물이 배양·증식되기까지 4~7일의 많은 시간이 필요하며, 전문성과 경험을 필요로 하는 등의 어려움이 있기 때문에 최근에는 면역학적인 방법과 분자생물학적인 방법이 많이 사용되고 있다. 이 중에서도 중합효소 연쇄반응법은 특이성과 민감성이 뛰어난 것으로 평가되고 있고 특히 단시간에 특정한 병원성미생물의 검출이 가능하다는 장점이 있어 많이 이용되어지고 있다(Choi, *et al.* 2000). 중합효소연쇄반응법은 1985년 Saiki 등이 낫세포빈혈증(Sickle cell anemia)의 진단을 위해 처음 시도한 검사방법으로, 찾고자 하는 DNA segment를 선택적으로 대량복제할 수 있고 검사물의 용량이 적어도 선택적으로 DNA를 검색할 수 있어 우수한 진단법으로 알려져 있다. 현재 여러 가지 바이러스나 세균, 기타 병원성미생물의 조기진단법으로 실용화를 위한 연구가 활발히 진행 중에 있다(Hahn, *et al.* 2001).

본 연구는 6종류의 세균성 식중독균(*E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*)을 PCR(Polymerase Chain Reaction) 방법을 이용하여 다중·동시 검출하는 방법을 개발하고자 기획되었다.

재료 및 방법

1. 균주 및 실험방법

본 연구에 사용된 6종류의 세균성 식중독균(*E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

cereus, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp.)을 Nutrient broth에 접종한 후 incubator에서 24~36시간동안 배양하였다. 그 후 배양액을 1ml를 취한 후 12,000rpm에서 5분간 원심분리를 하여 상층액을 제거하고 모아진 균체를 멸균증류수 200 μ l에 현탁한 후 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열처리하고 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 회수하여 이를 열 추출 시료로 사용하였다. 열 추출 시료는 PCR 반응을 실시한 후 전기영동(2% agarose gel)으로 전개시켜 결과를 분석하였다.

2. PCR 반응

PCR 반응을 위해서는 PowerCheckTM Multiplex Pathogen Detection System (Kogenebiotech, Seoul, Korea)을 이용하였다(Table 1). 다중중합효소연쇄반응은 UDG활성을 위하여 50 $^{\circ}$ C에서 3분간 처리하였으며, 그 후 초기 변성(initial denaturation)을 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 수행한 후, 변성(denaturation, 94 $^{\circ}$ C에서 30초), 결합(annealing, 60 $^{\circ}$ C에서 30초), 연장(extension, 72 $^{\circ}$ C에서 30초)을 총 40회 실시하고, 마지막으로 연장(extension, 72 $^{\circ}$ C에서 5분)을 실시하였다.

Table 1. PowerCheckTM Multiplex Pathogen Detection System

열 추출 시료	5 μ L
멀티플렉스 프라이머	4 μ L
5x 반응 완충용액	1 μ L
Taq DNA polymerase	1 μ L
UDG(Uracil DNA glycosylase)	0.5 μ L
멸균 증류수	9.5 μ L
총 부피	25 μ L

결과 및 고찰

반응이 끝난 PCR 산물을 2% agarose gel상에서 단일 프라이머 및 멀티플렉스 프라이머를 이용하여 전기영동한 후 균주 특이적 유전자증폭 산물의 형성유무 및 크기로, 특정 병원성 미생물의 존재를 확인할 수 있었다.

Fig. 1은 6종류의 세균성 식중독균이 혼합된 시료에 각각의 단일 프라이머를 이용하여 그 특이성을 확인한 결과이다. 1번 레인은 208bp의 PCR 산물이 탐지되었으며 *E. coli* O157:H7로 동정되었고, 2번 레인은 *Staphylococcus aureus* (264bp), 3번 레인은 *Bacillus cereus* (305bp), 4번 레인은 *Listeria monocytogenes* (454bp), 5번 레인은 *Salmonella* spp. (678bp), 6번 레인은 *Shigella* spp. (959bp)로 각각 동정되었다(Table 2).

Fig. 2는 6종류의 세균성 식중독균이 혼합된 시료에 멀티플렉스 프라이머를 이용하여 그 특이성을 확인한 결과이다. 1번 레인부터 6번 레인까지의 열 추출 시료는 Fig. 1에 나타난 순서와 같으며 각각의 세균성 식중독균에 특이적인 PCR산물이 증폭된 결과를 나타내고 있다. PCR 산물들이 사다리(ladder) 형태로 증폭됨으로써 동시에 6종류의 세균성 식중독균을 용이하게 확인할 수 있었다. 7번 레인은 Control DNA(C1)을, 8번 레인은 Control DNA(C2) 그리고 9번 레인은 Negative control의 증폭결과를 나타내고 있다.

Table 2. The Size of PCR Products on 6 kinds of Pathogens

Lane	Pathogens	Size	Lane	Pathogens	Size
1	<i>E. coli</i> O157:H7	208bp	4	<i>Listeria monocytogenes</i>	454bp
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	264bp	5	<i>Salmonella</i> spp.	678bp
3	<i>Bacillus cereus</i>	305bp	6	<i>Shigella</i> spp.	959bp

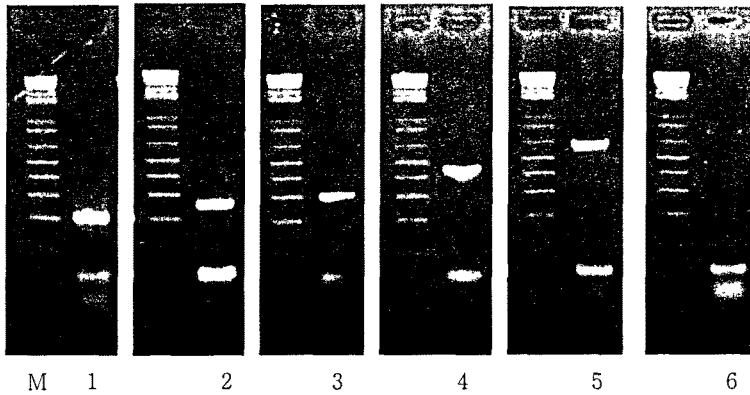


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the identification of specificity with single primer

M : 100bp DNA ladder

1 : *E. coli* O157:H7

2 : *Staphylococcus aureus*

3 : *Bacillus cereus*

4 : *Listeria monocytogenes*

5 : *Salmonella* spp.

6 : *Shigella* spp.

Fig. 2의 10번 레인과 11번 레인은 6종류의 세균성 식중독균이 혼합된 시료에 3개 조합의 멀티플렉스 프라이머를 이용하여 그 특이성을 확인한 결과를 나타내고 있다. 10번 레인에는 *E. coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. 3종류의 세균성 식중독균주의 열 추출 혼합시료이고, 11번 레인은 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp. 3종류의 세균성 식중독균주의 열 추출 혼합시료와 멀티플렉스 프라이머 혼합액과 같이 PCR반응을 수행했을 때 특이적인 PCR산물이 증폭된 결과를 나타내고 있다.

요 약

병원성미생물을 분리·동정하는 방법으로 선택배지를 이용하는 검사방법은 4~7일의 시간이 소요되는 단점이 있으며, 기존의 PCR방법은 대부분 단일 병원성 미생물만을 검출할 수 있는 반면 본 연구에서 사용된 시스템은 6종류의 세균성 식중독균을 한 번의 분석으로 확인할 수 있었기 때문에 비용과 분석시간을 대폭 절감하는 효과가 있었다.

Fig. 1은 6종류의 세균성 식중독균이 혼합된 시료에 각각의 단일 프라이머를 이용하여 특이성을 확인한 결과이며, Fig. 2는 멀티플렉스 프라이머를 이용하여 각각의 세균성 식중독균 열 추출

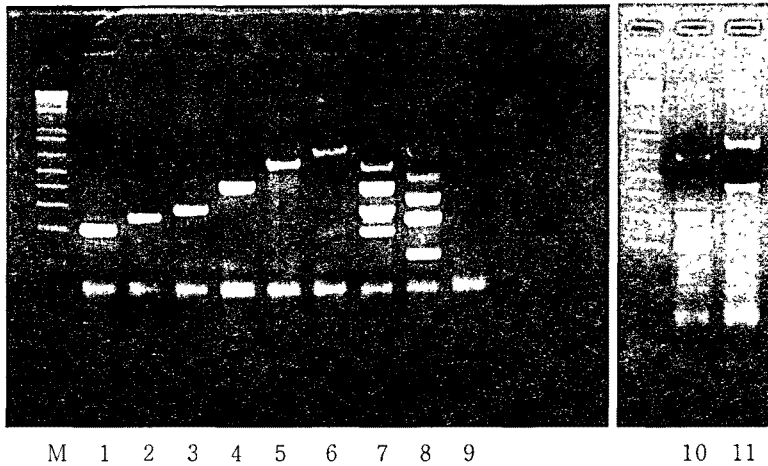


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the identification of specificity with multiplex primer

- M : 100bp DNA ladder
 1 : *E. coli* O157:H7
 2 : *Staphylococcus aureus*
 3 : *Bacillus cereus*
 4 : *Listeria monocytogenes*
 5 : *Salmonella* spp.
 6 : *Shigella* spp.
 7 : Control DNA(C1)
 8 : Control DNA(C2)
 9 : Negative control
 10 : *E. coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp.
 11 : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp.

시료에 대한 특이성을 확인한 결과이다. PCR 산물들이 사다리(ladder) 형태로 증폭됨으로써 동시에 6종류의 세균성 식중독균을 용이하게 확인할 수 있었다(Lane 1 ~Lane 6). 또한 3종류의 세균성 식중독균이 혼합된 열 추출시료에서도 특이적인 PCR 증폭 산물들을 탐지할 수 있었다(Lane 10 & Lane 11).

참고 문헌

1. Bae JH., et al. (2005) *Korean J. Food COOKERY SCI.* 21(1) : 40~46.
2. Choi YC., et al. (2000) *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr* 29(6) : 1016~1024.
3. Hahn TW., et al. (2001) *J. Korean Ophthalmol Soc* 42(1) : 137~144.
4. Oh DH., et al. (1998) *Korean J. Food SCI. TECHNOL.* 30(4) : 957~963.