

독소원성 대장균(EC81)이 생산하는 이열성장독소와 *Clostridium perfringens* A형 (NCTC8238)이 생산하는 장독소의 검사를 위한 중합효소 연쇄반응기법의 감도 비교

정 희 곤
송원대 식품영양과

Comparison of Sensitivity for Detection of Heat-Labile Enterotoxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli*(EC81) and Enterotoxin of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A(NCTC8238) by Means of a Polymerase Chain Reaction Assay

Hee-Kon Jung

Dept. of Food and Nutrition, Songwon College, Kwangju, 502-742, Korea

Abstract

Detection for heat-labile enterotoxin (LT) of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC, EC81, O148:H28) and enterotoxin of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A (CP, NCTC8238, Hobbs serotype 2) by use of a polymerase chain reaction (PCR) assay were positive reaction, which using LT gene-specific primers of ETEC with a detection limit equivalent from 100 ng/ μ l to 1 pg of a DNA fragment of 417-bp in EC81 and enterotoxin gene-specific primers of CP with a detection limit equivalent from 100 ng/ μ l to 10 pg of a DNA fragment of 364-bp in NCTC8238. Detection for a LT gene of ETEC highly appeared 10-fold sensitivity than an enterotoxin gene of CP.

Key words: *E. coli*, *C. perfringens*, enterotoxin gene, PCR.

서 론

독소원성 대장균(enterotoxigenic *Escherichia coli*)은 사람과 동물의 설사증을 일으키는데¹⁻³⁾, 설사를 일으키는 병인은 대장균이 생산하는 장독소(enterotoxin)와 밀접한 관계가 있다⁴⁾. 이 균이 생산하는 장독소는 이열성 장독소(heat-labile enterotoxin, LT)와 내열성 장독소(heat-stable enterotoxin, ST)가 있다²⁾. LT는 항원구조나 작용기전이 콜레라 독소와 유사하며⁵⁾, 단백질 구조상 하나의 A subunit(분자량 25,000)와 5개의 B subunit(분자량 11,500)로 구성되어 있고 각각 18개와 21개의 signal peptide와 함께 합성된다⁶⁾. 합성된 LT는 대개 periplasmic space에 위

치하며 소량액이 배양액으로 분비된다⁷⁾.

*Clostridium perfringens*는 A, B, C, D, E 등 5가지 형의 독소를 생산하는데, A형은 alpha, eta, theta, kappa, Mu, Nu, neuraminidase 및 enterotoxin을 생산하며 B형은 alpha, beta 및 epsilon을 생산하고, C형은 alpha 및 beta를 생산하며 D형은 alpha 및 epsilon을 생산하고, E형은 alpha, eta 및 iota을 생산한다^{8,9)}. 독소원성 *C. perfringens*(enterotoxigenic *C. perfringens*)가 생산하는 장독소(enterotoxin)는 아포를 형성(sporulation)할 때에만 생산되는데, 이 장독소는 사람에게 식중독을 일으킨다는 많은 보고가 있다⁸⁻¹⁶⁾. 또한 이 균은 세포숫자가 $10^8 \sim 10^9$ 정도 발육증식된 식품을 섭취하였을 때에도 식중독을 일으키는데, 이의

*Corresponding author: Hee-Kon Jung

식중독 증상은 보통 경증이다^{2,16)}.

장독소를 검색하는 방법은 면역학적 기법으로서 reversed passive latex agglutination assay (RPLA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), solid modified radioimmunoassay 등이 있으며 분자생물학적 기법으로서 특히 probe를 이용하는 DNA hybridization, polymerase chain reaction (PCR) assay, amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis 등이 있다^{1,17)}.

본 연구는 독소원성 대장균과 독소원성 *Clostridium perfringens* A형이 생산하는 장독소의 검색을 위한 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 기법의 감도에 대하여 비교실험을 실시하였는데, 이는 장독소를 생산하는 각종 세균을 신속히 검색하고 진단함과 동시에 조기 치료 및 예방대책 수립에 기여코자 한다.

재료 및 방법

1. 실험균주

독소원성 대장균의 실험균주는 경상의대 미생물학 교실에서 분양 받은 LT를 생산하는 대장균 EC81 (O148:H28) 및 LT를 생산하지 않은 대장균 EC84 (O1:H7)이었으며 독소원성 *Clostridium perfringens* A형의 실험균주는 일본국 오오사카 부립 위생연구소에서 분양받은 NCTC8238 (Hobbs serotype 2)을 사용하여 본 실험을 실시하였다.

2. 독소원성 대장균의 plasmid DNA의 분리

Plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis법¹⁸⁾에 준하였는데, LB(luria-bertani) broth 5 ml에 균을 접종 배양하여 원심집균한 pellet를 TE buffer(10 mM tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) 1 ml로 부유시켜 세척한 후, 원심침전시켰다. Lysozyme(1 mg/ml)이 들어 있는 용액 1(GET용액: 50 mM glucose, 25 mM tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0) 100 μ l를 넣어 진탕 배양하여 침전물을 완전히 부유시킨 후, 얼음에 30분간 유지시켰다. 용액 2(lysis buffer: 1% SDS, 0.2 N NaOH) 150 μ l를 넣어 얼음에 5분간 방치한 후, 3 M sodium acetate (pH 4.8) 용액 200 μ l를 넣어 얼음에 1시간 유지시켰다. 12,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후, 상청액을 다른 tube로 옮기고 무수 ethanol 1 ml를 넣어 -70°C에서 30분간 유지시켰다. 12,000 \times g로 10분간 원심분리한 후, 침전물을 70% ethanol로 2회 세척하였으며 침전된 DNA를 진공 건조시킨 후,

TE buffer 50 μ l로 부유시켜 37°C에서 하룻밤 동안 반응시켜 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. 독소원성 *C. perfringens* A형의 plasmid DNA의 분리

Cooked meat medium (DIFCO) 및 Gifu anaerobic medium broth (GAM, Nissui)에서 37°C, 24시간 배양한 후, 원심집균한 pellet를 50 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma, St. Louis, MO) 1.5 ml로 부유시켜 achromopeptidase (10 mg/ml, 50 mM EDTA, Wako Pure Chemical Industries, Osaka) 100 μ l가 들어 있는 5 mM EDTA 200 μ l로 세척한 후, 원심침전시켰다. 이를 37°C, 90분 동안 진탕배양한 후, 10% SDS(sodium dodecyl sulphate, Wako Pure Chemical Industries, Osaka) 50 μ l를 가한 후, 60°C, 10분간 진탕배양 하였으며 phenol-chloroform 500 μ l를 가하여 14,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후, 침전물을 70% ethanol로 3회 세척하였으며 침전된 DNA를 진공건조시킨 후, TE buffer 50 μ l로 부유시켜 37°C에서 하룻밤 반응시켜 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

4. 독소원성 대장균의 PCR 반응조건

Primer는 Yamamoto 등¹⁹⁾이 보고한 염기 서열을 참조하여 DNA synthesizer(Applied Biosystem Co., Model 392)를 이용하여 제작하였다(Table 1 참조). 500 ml sample tube에 증류수 34.5 ml, 10 \times PCR buffer (Mg free, Promega Corp., Madison, WI) 5.0 μ l, 2.5 mM dNTP 1.0 μ l, Taq polymerase (Perkin Elmer Corp.) 0.5 μ l, 20 mM PT-1 1.0 μ l, 20 mM PT-2 1.0 μ l, 25 mM MgCl₂ 6.0 μ l 및 10 ng/ml DNA 1.0 μ l을 넣고 증발을 방지하기 위하여 mineral oil (Sigma)로 증충한 후, thermal cycler (Pharmacia Co.)에서 전배양(preincubation)은 94°C 5분, 열변성(denaturation)은 94°C 1분, 교잡(anneal)은 55°C 1분, 신장(extension)은 72°C 1분간 30회 반복 실시하고 최종가열(final heating)은 72°C 5분간 실시하였다^{1,2)}.

5. 독소원성 *C. perfringens* A형의 PCR 반응조건

Primer는 정¹⁰⁾ 및 Richardson 등¹⁶⁾이 보고한 염기 서열을 참조하여 DNA synthesizer(Applied Biosystem Co., Model 392)를 이용하여 제작하였다(Table 2 참조). 500 ml sample tube에 증류수 33.7 μ l, 10 \times PCR μ l buffer(Mg free, Promega Corp.,

Table 1. Nucleotide sequences of PCR primers for the amplification of *Escherichia coli* enterotoxin gene

Primers	Nucleotide sequences	Location
PT-1	5'-TTCATACTGATTGCCGCA-3'	351~368
PT-2	5'-CAGACTATCAGTCAGAGGTTG-3'	713~733

Table 2. Nucleotide sequences of PCR primers for the amplification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin gene

Primers	Nucleotide sequences	Location
PT-1	5'-TGTAGAATATGGATTTGGAAT-3'	426~446
PT-2	5'-AGCTGGGTTTGAGTTTAAATG-3'	770~789

Madison, WI) 5.0 μ l, dNTP (2.5 mM) 4.0 μ l, Taq DNA polymerase (Promega) 0.3 μ l, 20 mM PT-1 1.0 μ l, 20 mM PT-2 1.0 μ l, DNA용액 5.0 μ l을 넣고 증발을 방지하기 위하여 mineral oil (Sigma)로 중층한 후, thermal cycler (Pharmacia Co.)에서 전배양 (preincubation)은 94°C 5분, 열변성 (denaturation)은 94°C 1.5분, 교잡 (anneal)은 55°C 2.3분, 신장 (extension)은 72°C 1.3분간 25~30회 반복 실시하고 최종가열 (final heating)은 72°C 5분간 실시하였다^{10,16)}.

6. PCR기법의 감도 비교

이열성 장독소를 생산하는 독소원성 대장균과 장독소를 생산하는 독소원성 *C. perfringens* A형의 plasmid DNA를 DNA calculator (Pharmacia Co.)에서 그 양을 산정하여 100 ng/ μ l이 되도록 정량한 후, 이를 10

ag/ μ l 농도까지 10진법으로 희석하여 mini-size electrophoresis system (Cosmobic Corp., Tokyo)으로 120V 1시간 동안 전기영동하여 0.003% ethidium bromide로 염색한 후, UV transilluminator (Viber Lourmat, Villed, France)를 이용하여 증폭산물을 확인하였다^{1,2,10,17)}.

결과 및 고찰

종래에는 장독소를 검색하기 위해서 동물이나 세포 조직에 대하여 장독소가 나타내는 변화를 검사하여 독소생산여부를 판정하는 생물학적기법과 항체를 이용하여 독소를 검색하는 면역학적 기법이나 DNA probe를 이용하여 장독소 유전자를 검색하는 hybridization 기법 등이 이용되어 왔으나, 근래에는 PCR 기법을 이용하여 식품, 물, 분변, 요 등으로부터

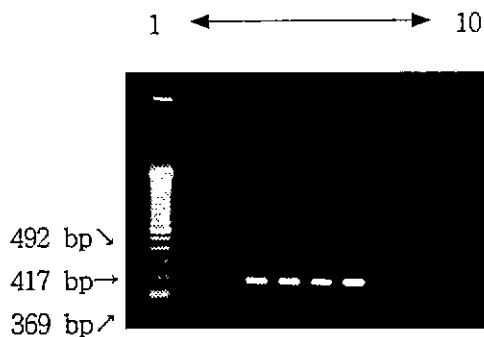


Fig. 1. Electrophoretic analysis of PCR-amplified of *E. coli* enterotoxin gene. Lanes 1, 100-bp ladder DNA marker; 2, *E. coli* 81 (LT⁺); 3, *E. coli* 84 (LT⁻); 4-10, 10-fold dilution of DNA extract of *E. coli* 81 (LT⁺) from 1 ng to 10 ag (anneal temperature: 55°C).

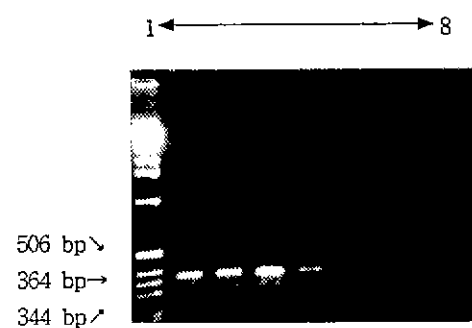


Fig. 2. Electrophoretic analysis of PCR-amplified of *C. perfringens* enterotoxin gene. Lanes 1, 1-Kb ladder DNA marker; 2-8, 10-fold dilution of DNA extract of *C. perfringens* NCTC 8238 (Hobbs serotype 2, ET⁺) from 100 ng to 100 ag (anneal temperature: 55°C).

직접 유전자를 검색하는 연구가 진행되고 있다.

그러므로 독소원성 대장균이 생산하는 이열성 장독소와 독소원성 *C. perfringens* A형이 생산하는 장독소에 대하여 PCR기법의 감도를 검색하기 위하여 각각 장독소의 양을 100 ng/μl 이 되도록 한 후, 10진 희석법으로 10 ag/μl 농도까지 희석하여 검사한 결과, 독소원성 대장균은 Fig. 1에서 보는 바와 같이, template DNA에서 1 pg까지 417-bp의 LT DNA fragment가 확인되었으며 독소원성 *C. perfringens* A형은 Fig. 2에서 보는 바와 같이, template DNA 10 pg까지 364-bp의 장독소 DNA fragment가 확인되어, 독소원성 대장균이 독소원성 *C. perfringens* 보다 10배의 높은 감도를 나타내었다.

PCR기법을 이용한 1999년 정²⁾에 의하면 독소원성 대장균이 생산하는 LT은 1 pg 희석용액에서까지 417-bp의 DNA fragment(EC81)가 확인되었으며, 1997년 정¹⁰⁾에 의하면 *C. perfringens* A형이 생산하는 장독소는 10 pg 희석용액에서까지 364-bp의 DNA fragment (NCTC 8238, Hobbs serotype 2)가 확인되었다고 보고하여 본 실험성과 일치하였는데, 이는 균속의 차이에 따라서 감도의 차이를 나타낸 것으로 생각된다.

1990년 Cryan^{20,21)}에 의하면 ELISA법은 suckling mouse assay보다 감도가 높았으며 gene probe assay는 infant mouse method에 비하여 99%의 특이성과 90.4%의 감도를 갖는다고 하였으며 1989년 Olive²²⁾는 생물학적 기법으로 Y-I adrenal cell assay를 실시하여 LT를 생산하지 않는 것으로 판정된 대장균 1군주가 PCR에 의하여 LT유전자를 생산한 것으로 확인되었다고 보고하였으며 PCR기법이 성공적으로 진단에 이용되기 위해서는 template DNA량, primer의 농도, dNTP의 농도, Mg²⁺농도, 반응농도, 반응시간 등이 알아야 한다. 이러한 조건들은 제작된 primer와 예상되는 증폭산물의 크기 등에 따라서 차이가 있다고 보고하였다.

보통 Mg²⁺, dNTP와 primer의 농도가 높은 경우, template DNA의 양이 많은 경우, anneal 온도가 낮은 경우에는 비특이적인 산물이 나타나는데, 1991년 Erlich 등²³⁾은 dNTP, Mg²⁺의 농도를 낮추고 anneal 온도를 높이며 extension 시간을 단축시키므로서 비특이적인 산물을 감소시켰다고 보고 하였다.

그러므로 PCR기법을 이용한 독소원성 대장균과 독소원성 *C. perfringens* A형의 병원성 확인은 LT나 ST의 한쪽에 편중된 검색보다는 각각의 유전자에 특이한 primer를 이용한 multiplex PCR에 대한 연구가

이루어져야 할 것이다.

요 약

독소원성 대장균(EC81,O148:H28)이 생산하는 이열성 장독소와 독소원성 *C. perfringens* A형(NCTC 8238, Hobbs serotype 2)이 생산하는 장독소에 대하여 PCR기법의 감도를 검색한 결과, 독소원성 대장균은 100 ng/μl로부터 1 pg 희석용액에서까지 417-bp의 LT DNA fragment가 확인되었으며 독소원성 *C. perfringens* A형은 100 ng/μl 로부터 10 pg 희석용액에서까지 364-bp의 장독소 DNA fragment가 확인되어, 독소원성 대장균이 독소원성 *C. perfringens* A형보다 10배의 높은 감도를 나타내었다.

참고문헌

1. Jung, Hee Kon: Identification of serotype by use of serologic assay and detection of the enterotoxin gene of *Escherichia coli* by means of a polymerase chain reaction assay for isolates from pigs, chickens, and cows. *AJVR*, 60(4), 468~472 (1999).
2. 정회곤: 독소원성 대장균이 생산하는 장독소의 검색을 위한 RPLA법과 PCR기법의 감도 비교. *한국환경위생학회지*, 25(1), 6~9 (1999).
3. Moon, H. W.: Pathogenesis of enteric disease caused by *Escherichia coli*. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 18, 179- 211 (1974).
4. Zwadyk, P.: Opportunistic enterobacteriaceae. In "Joklik, W.K.(ed.): Zimser microbiology", 9th ed., Prentice-Hall International Inc., Connecticut, 464 (1988).
5. Dean, A. G., Chung, Y. C., Williams, R. G., and Harden, L. B.: Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice. Application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Inf. Dis.*, 125(4), 407~411 (1972).
6. Dallas, W. S., Gill, D. M., and Falkow, S.: Cistrons encoding *Escherichia coli* heat-labile toxin. *J. Bacteriol.*, 139, 850~858 (1979).
7. Hirst, T. R., Randall, L. L., and Hardy, S. J. S.: Cellular location of heat-labile enterotoxin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 157, 637~642 (1984).
8. Sterne, M., and Warrack, G. H.: The type of *Clostridium perfringens*. *J. Pathol. Bacteriol.*, 88, 279~283 (1964).
9. 정회곤: 건강한 산양 및 개에서 분리한 *Clostridium perfringens*의 항생제에 대한 감수성. *한국식품영양학회지*, 11(3), 289~292 (1998).

10. 정희곤: *Clostridium perfringens* A형이 생산하는 장독소의 검사를 위한 RPLA법과 PCR기법의 감도비교. *한국환경위생학회지*, 23(4), 45~49 (1997).
11. 정희곤: 닭의 피사성 장염, 새끼돼지 및 소의 장독혈증에서 분리한 *Clostridium perfringens*의 S-R 변이와 항균요법제의 감수성. *한국식품영양학회지*, 10(2) 166~173 (1997).
12. Hobbs, B. C.: *Clostridium welchii* as a food poisoning organism. *J. App. Bacteriol.*, 28, 74~82 (1965).
13. Uemura, T., Akai, T., and Sakaguchi, G.: Structure and function of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Microbial toxin in foods and feeds*, Plenum Press, 203~212 (1990).
14. Uemura, T.: Incidence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in healthy human in relation to the enhancement of enterotoxin production by heat-treatment. *J. App. Bacteriol.*, 44, 411~419 (1977).
15. Tsukamoto, T., Ishibashi, M., Asao, T., Ohtsu, K., Shinagawa, K., Kunito, D., and Uemura, T.: Detection of strain and enterotoxin in fecal specimens of *Clostridium perfringens* food poisoning. *Jpn. J. Publ. Hlth.*, 28, 487~491 (1981).
16. Richardson, M., and Granum, P. E.: The amino acid sequence of the enterotoxin from *Clostridium perfringens* type A. *Fed. Eur. Biochem. Soci.*, 182, 479~484 (1985).
17. 이상운, 정석찬, 박용호, 우희종: PCR에 의한 이열성 장독소 유전자 검출. *대한미생물학회지*, 31(2), 145~154 (1996).
18. Bimboim, H. C., and Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids Res.*, 7, 1513~1515 (1979).
19. Yamamoto, T., Gojobori, T., and Yokota, T.: Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1. *J. Bacteriol.*, 169, 1352~1359 (1987).
20. Cryan, B.: Comparison of three assay system for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 792~794 (1990a).
21. Cryan, B.: Comparison of the synthetic oligonucleotide gene probe and infant mouse bioassay for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.*, 9, 229~232 (1990b).
22. Olive, D. M.: Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 261~265 (1989).
23. Erlich, H. A., Gelfand, D., and Sninsky, J. J.: Recent advances in the polymerase chain reaction. *Sci.*, 252, 1643~1651 (1991).

(1999년 12월 14일 접수)