

PCR을 이용한 식품 내 *Salmonella* 균주의 신속 검출방법

정상훈 · 김묘영 · 김현중 · 김태운 · 유상렬¹ · 김해영*

경희대학교 생명과학대학, ¹서울대학교 식품공학과

(2003년 6월 2일 접수, 2003년 6월 30일 수리)

여러 종류의 식품에서 *Salmonella* 균주를 손쉽게 빠르게 검출하기 위하여, *Salmonella* 장독소 유전자(*stn*)를 기초로 제작한 primer (STN1, STN2)를 이용하여 PCR을 수행한 결과 617 bp의 특이적인 DNA 단편을 얻을 수 있었다. PCR 민감도는 순수 배양한 균체에서 추출한 template DNA는 1 pg까지 검출이 가능하였고, 직접 균체를 template로 이용한 경우에는 10^2 cells까지 검출이 가능하였다. *Salmonella typhimurium*을 인위적으로 접종시킨 식품에서는 식품 1 g당 10^3 ~ 10^4 cells까지 검출할 수 있었다. 이러한 결과는 PCR을 이용하여 *Salmonella*에 오염된 식품에서 이들 균주를 간편하고 신속하게 검출할 수 있을 것이다.

Key words: *Salmonella*, PCR, DNA 추출

서 론

*Salmonella*균은 장내세균과에 속하는 그람음성의 운동성이 있는 통성 혐기성균으로서 형태학적, 생화학적 성상은 동일하지만 그 혈청형이 2,000여종 이상인 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 이 균은 급성패혈증, 심한 위장염 증상과 발열, 구토를 동반하는 식품유래의 식중독균이며, 일반적으로 장관세포 내에 침입을 한 후 증식하는 것이 발병(*Salmonellosis*)의 필수적인 과정으로 알려져 있다.³⁻⁵⁾ 미국에서는 연간 140만 건의 *Salmonella*균에 의한 식중독이 발생한다고 보고되어 있고,⁶⁾ 우리나라에서는 돼지고기를 이용한 음식에 의해서 높은 발병률을 나타내고 있다.⁷⁾ 주요 원인 균으로는 *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. thompson*, *S. postdam*, *S. oranienburg*, *S. senftenberg*, *S. infantis*, *S. derby* 등이 있으며 특히 육류나 난류가 다른 식품에 비해 높은 비율로 *Salmonella*의 주요 오염원이 되고 있다.^{3,8)}

*Salmonella*가 오염된 식품에서 이들 균주를 검출하는 방법에는 선택배지와 당 발효성 등을 이용한 생화학적 실험을 이용한 방법과 혈청학적 방법으로 항체를 증명하는 방법이 사용되고 있다.⁹⁾ 그러나, 이들 방법들은 분석 결과를 얻는데 많은 노력과 시간이 소요되는 단점이 있다. 최근에는 분자생물학적인 기법을 이용하여 이들 균주를 검출하고자 하는 시도가 이루어지고 있다. 이러한 기법에는 real-time PCR,¹⁰⁾ DNA hybridization 기법,¹¹⁾ DNA microarray법,¹²⁾ polymerase chain reaction(PCR) 등이 있으며 이 중에서 PCR 방법이 빠르고 검출한계가 뛰어난 점 등으로 인하여 많이 이용되고 있다.¹³⁻¹⁵⁾

*Salmonella*의 *stn* 유전자는 *Salmonella* 장독소(enterotoxin) 유전자이며 *Salmonellosis*에 중요한 요인으로 작용한다. 이 유전자는 single polypeptide chain으로 이루어져 있으며 약 29 kDa의 단백질을 전사하는 749 bp의 크기를 가진 유전자로

cholera toxin(CT)이나 *E. coli*가 분비하는 heat-labile toxin (LTs)과 비슷한 생화학적 활성을 가지고 있다. 또한 이 유전자는 다른 장내세균과(*Enterobacteriaceae*)에서는 검출되지 않은 병원성 *Salmonella*의 특이 유전자로도 알려져 있다.^{3,16,17)}

본 실험에서는 이와 같은 *Salmonella*의 특이 유전자를 기초로 제작한 primer를 이용하여 PCR을 수행하여 *Salmonella typhimurium*을 순수 배양과 인위적으로 오염시킨 식품에서의 이들 균주의 검출한계를 알아보았고, 이러한 결과를 바탕으로 현재 시판되고 있는 국내, 외 가공식품에서 *Salmonella* 균주의 오염 정도를 알아보았다.

재료 및 방법

식품시료. 국내에서 제조하여 시판중인 햄, 치즈, 순대, 만두, 김밥, 카스텔라, 달걀껍질, 생닭, 우유, 냉동피자 등을 구입하여 사용하였으며, 수입 식품으로는 sausage, cherry berry fruitlings, pitted prunes, chicken broth, baby meal, tomato paste, mushroom soup, chilli sauce, green giant, onion in vinegar 등을 시중에서 구입하여 사용하였다.

사용균주 및 균수 측정. 실험에 사용한 균주는 국내에서 분리한 *Salmonella typhimurium* 1666으로 국립보건원 장내세균과에서 분양받았다. 균수의 측정은 배양된 균들을 spectrophotometer(Hitachi 220S, Hitachi Ltd., Japan)를 사용하여, 각각 흡광도(A_{600nm})의 값을 측정 후, LB agar plate에 세 개씩 도말하여 평균치의 균수를 측정하여 표준곡선을 만들어 이용하였다.

순수배양액에서의 template DNA 준비. *Salmonella typhimurium* 순수배양액으로부터 추출한 genomic DNA를 spectrophotometer로 정량한 후, 1 fg에서 1 µg까지 희석하여 template DNA로 사용하였다. 또한 *Salmonella typhimurium*을 template DNA 준비방법에 따른 민감도를 알아보기 위하여 각각의 10^0 - 10^6 cells로 희석한 후, 다음과 같은 네 가지 방법을 이용하여 template DNA를 준비하였다. 먼저, 전체의 균체를 그

*연락처

Phone: 82-31-201-2660; Fax: 82-31-204-8116

E-mail: hykim@khu.ac.kr

대로 이용하는 방법, 균체를 100°C에서 5분간 boiling하는 방법, phenol-chloroform 추출법¹⁸⁾, 상용화된 genomic DNA kit (Nucleogen, Korea)를 이용하였다.

식품에서 PCR을 통한 *Salmonella* 균주의 검출한계 측정. 식품공전의 미생물 검출방법에 따라 25 g의 시료에 *Salmonella typhimurium*을 식품 1 g당 각각 10⁰-10⁶ cells가 되도록 접종하였다. 접종된 시료와 멸균 증류수의 비율을 1:5로 섞은 후 mixer를 이용해 혼합하고 분쇄한 후, 500×g로 5분간 원심분리하여 살균된 거즈를 이용하여 식품을 제거한 후, 5,000×g로 10분간 원심분리하여 균을 회수하였다. 우유의 경우에는 시료 25 ml에 각각 10⁰-10⁶ cells/ml까지 접종한 후, vortex로 잘 섞어서 혼합물 1 ml를 취해 1.5 ml microtube에 넣고 14,000×g에서 10분동안 원심분리하여 균을 회수하였으며, 3회 반복실험을 하였다. 회수된 균에서 template DNA 추출은 TEN용액(10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl)으로 세척 후, lysozyme(10 mg/ml)으로 37°C에서 30분간 정지한 후, phenol-chloroform 추출법¹⁸⁾으로 template DNA를 3dH₂O 25 µl에 녹여 4°C에 보관하였다. Template DNA 1 µl를 PCR을 수행하여 검출한계를 측정하였다.

PCR primer 및 조건. 실험에 사용한 primer는 *Salmonella* 장독소(*stn*) 유전자이고 다른 장내세균과는 검출되지 않으며,¹⁷⁾ *Salmonella* 균주에서 특이성이 보고된 617 bp DNA 절편의 두 primer STN1: 5'-TTGTCTCGCTATCACTGGCAACC-3'과 STN2: 5'-ATTCGTAACCCGCTCTCGTCC-3'을 사용하였다. PCR 반응 조성은 다음과 같다. 10×buffer 2.5 µl(Takara, Japan), sense primer 1 µl(10 pmol/µl), antisense primer 1 µl(10 pmol/µl), dNTP 2 µl(Takara, Japan, 2.5 mM each), *Taq* DNA polymerase 0.1 µl(Takara, Japan, 5 units/µl), 3dH₂O 17.4 µl로 하였으며, 준비된 template DNA 1 µl를 넣어 각 sample당 25 µl로 PCR을 수행하였다. PCR 수행조건은 thermal cycler (PTC-100TM, MJ Research Inc., USA)를 사용하여 denaturation은 95°C에서 45초, annealing은 55°C에서 45초, extension은 72°C에서 1분 30초씩 총 35회를 반복 수행하였다.

결과 및 고찰

Template DNA 양에 따른 *Salmonella* 검출 민감도. *Salmonella typhimurium*을 배양한 후, genomic DNA를 추출하여 정량한 후, 1 fg부터 1 µg까지 희석한 template DNA를 가지고 PCR을 수행하였다. Fig. 1에서 보는바와 같이 PCR의 산물은 예측한대로 617 bp의 DNA 단편이 측정되었으며, 1 pg가

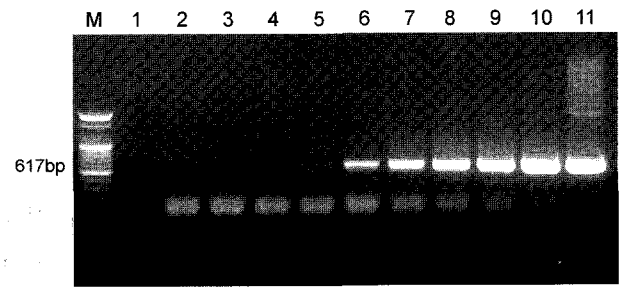


Fig. 1. Sensitivity of PCR assay for detection of *Salmonella typhimurium* in terms of template DNA concentration. Lane M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea); Lane 1-11, Template DNA concentration 0 fg, 1 fg, 10 fg, 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, and 1 µg, respectively.

지 template DNA의 양에서 관찰되었다. 이와 같은 민감도는 PCR 방법을 이용하여 식품에 존재하는 소량의 균체에서도 민감하게 검출이 가능하다고 판단된다.

Template DNA 추출방법에 따른 *Salmonella* 검출 민감도. Template DNA 추출방법에 따른 *Salmonella* 검출의 정도를 비교하기 위해 *Salmonella typhimurium* 순수배양액에서 template DNA를 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 균체를 직접 사용한 방법, 균체의 boiling(95°C, 10분간) 방법, phenol-chloroform 추출법, genomic DNA kit 방법으로 template DNA를 추출하여 검출한계를 비교하였다. Table 1과 같이 순수 배양액에서 *Salmonella typhimurium*은 4가지 방법에서 3회 반복하여 모두 양성 결과를 얻은 것을 기준으로 하여 10² cells까지 검출할 수 있었다. 이러한 결과는 모든 방법에서 유사한 결과를 얻었으나, 균체를 boiling하여 PCR을 사용한 것이 상대적으로 검출감도가 더 높은 것으로 측정되었다. 이것은 boiling에 의한 균체의 분해로 PCR 수행에 이용될 수 있는 template가 더 많은 것으로 추정되어, boiling법으로 사용하는 것이 신속하고 경제적인 방법으로 판단된다.

식품종류별 존재하는 *Salmonella typhimurium* 검출한계 측정. 서로 다른 종류의 식품에 *Salmonella typhimurium*을 인위적으로 농도별로 접종하고 균체를 회수한 다음 lysozyme(10 mg/ml)과 phenol-chloroform 추출법으로 제조한 template DNA를 이용하여 PCR을 수행하였다. Table 2와 같이 냉동피자, 만두, 햄, 순대, 우유, 김밥, 치즈 등 대부분의 식품이 1 g당 10³ cells에서 검출한계를 보였다. 카스텔라, 생닭, 달걀껍질의 경우 1 g당 10⁴ cells에서 검출할 수 있었다. 이와 같이 식품에 따라 농도별 차이가 있는 것은 식품과 혼합 후, 균을 회수하는

Table 1. Sensitivity^a of PCR assay for detection of *Salmonella typhimurium* from pure culture

Template preparation methods	Inoculation level (cells)						
	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
Whole cell	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Boiling	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Phenol extract	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Genomic DNA kit	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

^aSensitivity is shown as the number of positive samples/number of triplicates.

Table 2. Sensitivity^a of PCR assay for detection of *Salmonella typhimurium* from artificially inoculated food samples

Food samples	Inoculation level (cells/g or ml)						
	10 ⁰	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
Raw chicken meat	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
Egg shell	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
Sponge cake	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
Milk	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Cheese	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Frozen pizza	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Mandu	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Ham	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Sundae	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Kimbap	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3

^aSensitivity is shown as the number of positive samples/ number of triplicates.

과정에서의 회수율, template DNA를 분리하는 과정에서 추출량 및 식품 내에 PCR 수행에 있어서 inhibitor가 영향을 주는 것으로 추정된다.^{6,19,20)}

이러한 식품별 검출한계는 한국 식품의약품 안전청(<http://www.kfda.go.kr>)보고에 의하면 *Salmonella*의 경우 발병균량은 정상인의 경우는 식품 1g당 10⁵-10⁷, 신생아 감염은 식품 1g당 수십 cell이기 때문에 일반인에 대한 검출은 본 실험에 사용한 PCR방법으로 충분하나, 신생아에 대한 발병균량 측정은 보다 더 민감한 방법을 개발할 필요가 있을 것으로 사려된다.

시판중인 식품들의 *Salmonella* 균주의 검출여부. 시판중인 국내가공식품 10종과 수입식품 10종을 구입하여 식품공전에 수록된 방법대로 시료 25g을 수거한 뒤, DNA를 추출하여 *Salmonella typhimurium*의 존재여부를 PCR 방법을 이용하여 산물을 agarose gel에서 확인하였다. 측정된 모두의 가공식품에서 *Salmonella typhimurium*이 검출되지 않았다.

본 연구에서는 순수 배양된 *Salmonella typhimurium*을 균체를 그대로 이용하는 방법, 균체를 100°C에서 5분간 boiling하는 방법, phenol-chloroform 추출법 그리고 상용화된 genomic DNA kit를 이용하여 template DNA를 추출한 후, PCR을 이용하여 추출방법에 대한 민감도를 조사하였다. 순수 배양액에서는 네 가지 모두 다 10² cells까지 검출하였으며 가장 신속하고 간편한 방법은 boiling방법이었다. 또한 인위적으로 오염시킨 식품에서는 PCR을 수행하여 식품 1g당 10³-10⁴ cells 까지 검출할 수 있었다. 이와 같은 방법으로 식품에서 *Salmonella* 균주를 간편하고 빠르게 검출할 수 있을 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Holt, J. G., Krieg, N. R. and Sneath, P. (1994) In *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.) Williams & Wilkins, Maryland.
- Scokett, P. N. (1991) The economic impact of human *Salmonella* infection. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 289-295.
- Lim, S. Y. and Ryu, S. R. (2000) Prevalence of *Salmonella* enterotoxin gene (*stn*) among clinical strains isolated in Korea and regulation of *stn* expression. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 316-321.
- Finalay, B. B. and Falkow, S. (1997) Common theme in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 136-169.
- Jones, B. D. and Falkow, S. (1996) Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Ann. Rev. Immunol.* **14**, 533-561.
- Li, Y. and Mustapha, A. (2002) Evaluation of four template preparation methods for polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in ground beef and chicken. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 508-512.
- Kim, J. G. (1998) Effects of cooking processes on the amount of *Salmonella typhimurium* in pork and Korean *japchae* and identification of critical control point in the processes. *J. Food Hyg. Safety* **13**, 441-447.
- Eley, A. R., Fisher, I., Moss, M. O., Roberts, T. A. and Sharp, J. C. M. (1992) In *Microbial food poisoning* Chapman & Hall, London.
- Rigby, C. E. (1984) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Salmonella* lipopolysaccharide in poultry specimens. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1327-1330.
- Chen, W., Martinez, G. and Mulchandani, A. (2000) Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Anal. Biochem.* **280**, 166-172.
- Cano, R. J., Torres, M. I., Klem, R. E., Palomares, J. C. and Casadesus, J. (1992) Detection of salmonellas by DNA hybridization with a fluorescent alkaline phosphatase substrate. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 393-399.
- Chan, K., Baker, S., Kim, C. C., Detweiler, C. S., Dougan, G. and Falkow, S. (2003) Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar Typhimurium DNA microarray. *J. Bacteriol.* **185**, 553-563.
- Trkov, M., Majerikova, I., Jerasek, B., Stefanovicova, A., Rijpens, N. and Kuchta, T. (1999) Detection of *Salmonella* in food over 30h using enrichment and polymerase chain reaction.

- Food Microbiol.* **16**, 393-399.
14. Agarwal, A., Makker, A. and Goel, S. K. (2002) Application of the PCR technique for a rapid, specific and sensitive detection of *Salmonella* spp. in foods. *Mol. Cell. Probes* **16**, 243-250.
 15. Olsen J. E. (2000) DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. *Food Res. Int.* **33**, 257-266.
 16. Chopra, A. K., Peterson, J. W., Chary, P. and Prasad, R (1994) Molecular characterization of an enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Pathogen.* **16**, 85-98.
 17. Rita P., Angelika F. and Tschape H. (1995) *Salmonella* enterotoxin (stn) gene is prevalent among strains of *Salmonella enterica*, but not among *Salmonella bongori* and other Enterobacteriaceae. *FEMS Immuno. Med. Microbiol.* **12**, 47-50.
 18. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. (1999) In *Short protocols in molecular biology* (4th ed.) John Wiley and Sons, Inc., New York.
 19. Wilson I. G. (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3741-3751.
 20. Jitrapakdee S., Tassanakajon A., Boonsaeng V., Piankijagum S. and Panyim S. (1995) A simple, rapid and sensitive detection of *Salmonella* in food by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* **9**, 375-382.

Rapid Detection of *Salmonella* Species in Foods Using PCR

Sang-Hun Jung, Myo-Young Kim,² Hyun-Joong Kim, Tae-Woon Kim, Sang-Ryeol Ryu¹ and Hae-Yeong Kim*
(*Institute of Life Sciences Kyung Hee University, 449-701 Suwon, Korea; ¹Dept. of Food Science Seoul National University, 441-744 Suwon, Korea*)

Abstract: This study was carried out to investigate the simple and rapid detection of *Salmonella* species in different kinds of food using PCR method. The specific primer sets (STN1 and STN2) was designed and utilized to amplify a 617 bp DNA fragment from *Salmonella* species. The sensitivity of PCR was 1 pg of purified template DNA or 10² cells from pure culture. The detection limit of *Salmonella typhimurium* on agarose gel electrophoresis was 10³-10⁴ cells/g in the artificially contaminated food samples. These results suggested that this simple method could be applied to industrial fields for detection of *Salmonella* species in food.

Key words: *Salmonella*, PCR, DNA extraction

*Corresponding author