

## 식중독균 현장탐지를 위한 DNA 크로마토그래피 분석시스템의 개발

<sup>1</sup>김 석 하 · <sup>1</sup>정 우 성 · <sup>1,2</sup>† 백 세 환  
<sup>1</sup>고려대학교 생명공학원, <sup>2</sup>고려대학교 자연과학대학 생명정보공학과  
(접수 : 2003. 3. 26., 게재승인 : 2003. 6. 27.)

### Development of DNA Chromatographic System for On-Site Detection of Food-Contaminating Bacteria

Serka Kim<sup>1</sup>, Woo-Sung Jung<sup>1</sup>, and Se-Hwan Paek<sup>1,2</sup>†

<sup>1</sup>Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Korea University, Choongnam 339-800, Korea

(Received : 2003. 3. 26., Accepted : 2003. 6. 27.)

An analytical system detecting DNA particularly utilizing a concept of membrane strip chromatography initially applied to home-version tests for, such as, pregnancy and ovulation has been developed. We have chosen *S. typhimurium* as model analyte among food-contaminating microorganisms that occurred in high frequencies, and used *invA* gene, as a detection target, specific to *Salmonella* species. This gene was able to be amplified by PCR under optimal conditions employing newly designed primers in our laboratory. The PCR product was specifically measured via hybridization between the analyte and a DNA probe, which was a totally different feature from the conventional gel electrophoresis detecting the products based only on the molecular size. It is notable that the DNA probe sequence was specially designed such that no separation of excess primers present after PCR was required. This was immobilized on a nitrocellulose (NC) membrane via streptavidin-biotin linkage minimizing a steric effect when the hybridization with the amplified DNA took place. The analytical system detected the microorganism in a concentration of minimum  $10^3$  cfu/mL (i.e., 10 cells per system), estimated from the standard curve, 20 to 40 minutes after adding the sample. This sensitivity was approximately 10 times higher than that of gel electrophoresis as an analytical tool conventionally used. Furthermore, the assay was able to be run at room temperature, which would offer an extra advantage to users.

**Key Words** : Membrane chromatography, DNA probe, hybridization, *Salmonella typhimurium*, on-site analysis

#### 서 론

박테리아와 바이러스와 같은 질병 유발 균에 대한 진단을 단시간 내에 수행하는 방법은 크게 항원-항체반응에 기초하는 면역진단과 핵산접합반응을 이용하는 유전자 진단으로 나눌 수 있다. 이들 두 방법은 각각 단백질과 핵산을 분석물질로 측정한다는 다른 방향성을 가지고 있다. 이중 핵산은 단백질과 비교하여 모든 세포에 고르게 분포하여 존재하고 그 양도 상대적으로 일정하며 안정한 성질을 가지고 있다. 이와 같은 관점에서 유전자 측정은 분석물질의 선택과 취급측면에서 면역학적 진단방법에 비해 장점을 가지고 있다.

1980년대 중반이후 유전자 진단방법은 상당한 수준으로 발

전하여 왔다. 대부분의 유전자 진단방법은 polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 적은양의 유전물질을 증폭해낸 후 (1, 2) 그것을 전기영동을 통하여 확인하거나 특정 핵산서열을 인지할 수 있는 probe와의 접합반응을 통하여 확인한다. 이 중 전기영동법은 DNA 분자의 크기에 따라 분리된 DNA를 염색한 후 UV를 통하여 관찰 확인하는 방법을 사용하고 있는데 이러한 방법은 기기취급 등 전문적인 기술이 있어야 함은 물론 인체에 유해한 염색물질을 사용한다(3). 또한 단순히 크기에 의한 분리이기 때문에 그 측정 특이성이 낮다고 할 수 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 분석대상 DNA와 그 핵산서열에 특이한 oligonucleotide에 방사성 동위원소나 형광물질 또는 효소 등을 표지한 probe와의 접합반응을 수행하여 특이성을 향상시키는 기술들이 개발되어 유전자 진단 분야에 사용되고 있다(4-6). 이것의 대표적인 예로써, Northern blotting, Southern blotting, *in situ* hybridization 등을 들 수 있다(7-9). 그러나 이러한 방법들은 그 특이성은 높으나 분석시간이 많이 걸리며 방사성 동위원소나 형광물질 또

† Corresponding Author : Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Tel : +82-2-3290-3438 FAX : +82-2-927-2797

E-mail : shpaek@korea.ac.kr

는 효소활성 등을 분석해야 하므로 고가의 분석 장비가 필요하다는 단점이 있다. 이러한 현재의 여건들을 종합해보면, 아직까지 미생물 등 생명체를 분석하는 유전자 진단분야는 실험실 수준을 벗어나지 못하고 있으며 분석장비도 대부분 크고 가격이 매우 비싸다.

현재 유전자와 같은 고분자 화합물질의 분석은 병원의 중앙검사실과 같은 전문화된 시설에서 대부분 수행되고 있으나 질병의 자가진단 혹은 식품의 유통관리에서와 같이 실험실 조건을 벗어나 현장에서 속성으로 탐지하는 기술의 개발이 요구되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 현장분석을 위해 주로 이용되는 membrane strip 크로마토그래피 분석방법을(10-12) 채택하여 한 예로써 식중독 균의 유전자 분석에 응용하였다. 식중독 균 중 배양이 용이하며 특정 유전부위가 이미 밝혀진 *Salmonella typhimurium*(13)을 모델 분석물질로 선택하였다. Membrane strip의 세공을 통한 모세관현상을 이용하면 분석물질인 DNA의 물질전달을 가속시킬 수 있고 또한 일정지역에 고정되어 있는 DNA capture probe와의 접합반응을 유도함으로써 분석물질을 속성으로 특이하게 측정할 수 있다. 이와 같이 접합반응을 통한 분석물질의 탐지는 colloidal gold와 같은 표지물질을 이용하여 그 반응부위에서 발색을 생성시킴으로써 분석물질의 유무를 눈으로 직접 확인할 수 있게 된다. 더욱이, 이와 같은 DNA probe 분석시스템을 PCR 공정과 결합시킴으로써 유전자 분석 시 잠재적인 낮은 측정 민감도를 보완하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

분석대상 미생물로 *S. typhimurium* (KCTC 1925)를 사용하였고, 이것을 배양하기 위해 nutrient broth (Difco Lab., USA)와 agar (Junsei Chemical Co., Japan)을 구입하였으며 DNA 정제를 위해서 sodium dodecyl sulfate, EDTA, phenol, chloroform, isoamylalcohol, NaCl, EtOH, Trisma base (Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였다. 또한 PCR을 수행하기 위해 *Taq. polymerase* (GeneCraft Co., Germany)와 여기에 사용되는 buffer (GeneCraft Co., Germany) 등을 구입하였고 primer와 DNA capture probe (Genset Co., France)는 제작 의뢰하였다. 그리고 nitrocellulose membrane, cellulose membrane (Whatman Co., USA)과 glass fiber membrane (Millipore Co., USA)를 사용하여 분석 시스템을 구성하였으며. Probe 고정화 시에는 glutaldehyde, poly-L-lysine (Sigma Chemical Co., USA), 그리고 streptavidin (International enzyme, USA) 역시 구입하여 사용하였다. 이외의 시약은 모두 분석용 급을 구입하여 사용하였다.

### 균주 배양

본 실험에서 분석대상 미생물로서 *S. typhimurium* (KCTC 1925)를 사용하였고 배지를 준비하기 위해 nutrient broth (Difco Lab., USA)를 탈이온수에 8 g/L의 농도로 녹인 후 5 mL씩 cap tube에 넣고 121°C 그리고 1.5 기압에서 15분 동안 멸균하였다. 이 후 균주를 멸균된 배지에 접종시켰고 37°C 그리고 200 rpm이 유지되는 배양기에서 18시간 동안 배

양하였다.

### 균주 농도 측정

배양된 균주의 농도를 측정하기 위하여 8 g/L nutrient 액상배지에 agar (Junsei Chemical Co., Japan)를 3%로 넣어 혼합하였다. 이 배지를 petri dish에 부어 굳힌 후 위에서 준비된 균주 배양액을  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ , 그리고  $10^9$ 으로 희석하여 100  $\mu$ L 씩 도말하였다. 37°C로 유지되는 배양기 내에서 9시간 동안 배양한 후 형성된 콜로니 수를 세어서 균주의 농도를 측정하였다.

### Genomic DNA 추출

균주배양액 1 mL를 1.5 mL 크기의 튜브에 넣고 14,000 rpm에서 3분동안 원심분리 시킨 후 상층액을 제거하였다. 20 mg/mL 농도의 protease K (Takara Co., Japan)를 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)와 5 mM EDTA가 포함된 10 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.8)으로 희석하여 100  $\mu$ g/mL로 제조하였다. 이와 같이 준비하여 원심분리로 얻은 균주와 protease K 용액을 1 : 1의 비율로 섞어 37°C에서 30분 동안 반응시켰다(3). 여기에 phenol과 chloroform 그리고 isoamylalcohol 혼합 용액을 200  $\mu$ L 첨가하였고 1분 동안 섞은 후 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 상층액을 조심스럽게 제거한 후 5 M NaCl 20  $\mu$ L와 100% EtOH (4°C로 냉각된) 400  $\mu$ L를 넣고 -20°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 14,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 상층액을 버리고 다시 70% EtOH (4°C로 냉각된) 400  $\mu$ L를 넣고 14,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 상층액을 털어 내었다. 여기서 침전된 DNA를 60°C에서 말린 후 멸균된 증류수를 넣어  $10^8$  cfu/mL 균에 해당하는 농도로 맞추어 4°C에 보관하였다.

### PCR

분석대상 물질인 DNA를 증폭하기 위해 PCR을 수행하였다(14). 위에서 준비된 genomic DNA를  $10^3$ 에서  $10^7$  cfu/mL 균에 해당하는 농도로 희석하였다. 각 DNA 용액 10  $\mu$ L 그리고 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs, 2.5 U *Taq. polymerase* (GeneCraft Co., Germany), 그리고 20 pmol *LinVA*와 형광이 표지된 *RinvA* (primers, Table 1 참조)를 5 mM KCl과 2 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 포함된 7.5 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 9.0, PCR 반응용액; GeneCraft Co., Germany)에 넣어 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건으로써, 94°C에서 4분 동안 1회 수행한 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 1분, 그리고 72°C에서 1분 동안 30회 반복 수행하였고, 마지막으로 72°C에서 5분 동안 1회 반응시켰다.

### 고정확용 DNA probe 제조

PCR 공정을 통하여 증폭된 DNA를 특이하게 탐지하기 위한 probe로써 biotin이 표지된 *PinvA*를 합성하였다(Table 1). 고체표면에 고정화하기 위해 이 probe를 streptavidin과 4:1 몰비로 반응시켰다. 이 때 streptavidin을 10 mM phosphate 완충용액 (pH 7.4)으로 1 mg/mL 농도로 희석하여 사용하였고, biotin이 표지된 *PinvA*를 탈이온수에 용해시켜 100 pmol로

회색하여 사용하였다. 두 성분을 혼합 후 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다.

**Table 1.** Sequences of the primers and DNA probe used for amplifying *invA* gene specific to *S. typhimurium* and capturing the amplified product. The reverse primer, *RinvA*, and probe, *PinvA*, were labeled with FITC and biotin at the 5'-end, respectively

Gene	Name	Sequence
<i>invA</i>	<i>LinvA</i>	5'-CTCTACTTAAGTGTCTCGTTTAC-3'
	<i>RinvA</i>	5'-FITC-TTGATAAACTTCATCGCACCGTCA-3'
	<i>PinvA</i>	5'-biotin-d(T)10-CTGAATTACTGATTCTGGTACTGGTGA-3'

**항체와 colloidal gold 간 중합**

Colloidal gold (평균 약 30 nm 직경, 15) 용액 1 mL에 0.1 M carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 완충용액을 가하여 산성도를 pH 9로 조절하였다. 여기에 100 µg/mL의 농도로 회색된 형광물질 특이 토끼항체 (rabbit anti-FITC IgG) 100 µL를 첨가하였다. 이 용액을 30분 동안 상온에서 반응시킨 후 5% casein이 들어있는 10 mM phosphate 완충용액 (pH 7.4) 110 µL를 가하여 상온에서 30분 동안 다시 반응시켰다. 이 용액을 14,000 rpm에서 45분 동안 원심분리시킨 후 상층액을 조심스럽게 제거한 후 0.5% casein을 포함하는 10 mM phosphate 완충용액 50 µL를 첨가하여 4°C에서 보관하였다.

**DNA probe 고정화 및 신호발생패드 제조**

Nitrocellulose membrane (7x24 mm; 8 µm pore, Whatman Co., USA)을 0.5% glutaraldehyde (GA)용액에 완전히 넣어 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이것을 140 mM NaCl을 포함하는 10 mM phosphate 완충용액 (pH 7.4, PBS)으로 5분 동안 3회 세척하였다. 이것을 37°C에서 1시간 동안 완전히 건조시킨 후 strip의 길이 방향으로 하단으로부터 10 mm 지점에 준비된 고정화용 DNA probe를 streptavidin 기준으로 1 mg/mL 용액 1.5 µL를 첨가하였다. 이것을 37°C 그리고 100% 상대습도가 유지되는 상자 내에서 1시간 동안 반응시킨 후, 0.5% casein과 0.1% tween 20이 함유된 100 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.6)에 완전히 담가 1시간 동안 잔여표면처리를 수행하였고 이것을 용액에서 꺼내어 37°C에서 완전히 건조시켰다.

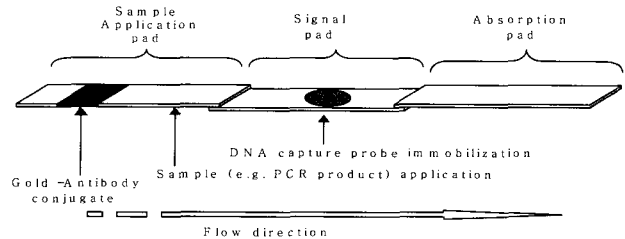
**시료첨가패드 제조**

Glass fiber membrane (7x30 mm; AHLSTROM #8980, Millipore Co., USA)을 0.1% tween 20과 0.5% casein이 들어있는 10 mM PBS 용액에 완전히 담가 상온에서 20분간 처리한 후 이것을 꺼내어 37°C oven에 넣고 완전히 건조시켰다. 미리 준비된 항체-colloidal gold 중합체에 trehalose를 첨가한 후 이것을 시료첨가패드 길이방향으로 하단에서 10 mm 위치에 5 µL를 첨가하였다. 이 membrane을 37°C에서 50분 동안 완전히 건조시켰다.

**유전자분석 strip 제작**

Plastic film (overhead projection film, 3MM Co., USA)에 양면테이프를 붙인 후 그 위에 제작된 신호발생 패드를 붙였

다. 그 하단에 준비된 시료첨가패드를 2 mm 정도 신호발생 패드와 중첩하여 붙였다. 마지막으로 흡수패드 (7x25 mm; 17 chromatography grade, Whatman Co., USA)를 신호발생 패드의 상단에 중첩하여 붙여 유전자분석용 strip을 제작하였다 (Fig. 1 참조).



**Figure 1.** Structure of an analytical system for geno-chromatographic assay.

**PCR 반응액 분석**

20% formamide를 PCR 반응액에 넣은 후 7분동안 100°C에서 중탕하였다. 그 후 즉시 얼음에 담가 온도를 급격히 낮춘 후 그 용액 20 µL를 위에서 제조한 유전자분석 strip의 시료첨가패드에 첨가하였다. 이것의 하단을 0.5% casein이 포함된 100 mM Tris-HCl 완충용액 150 µL가 들어있는 5 mL 유리관에 꽂아 넣어 용액을 모세관현상에 의해 흡수시켰다. 분석개시 20분 혹은 40분 후에 꺼내어 신호가 발생된 strip을 스캐닝하여 이미지를 컴퓨터에 저장하였고 Multi-Analyst (BioRad Co., USA) 분석 프로그램을 이용하여 발생된 발색의 optical density를 측정하였다(16).

**결과 및 고찰**

**유전자 크로마토그래피 분석원리**

시료가 제공되는 현장에서 속성으로 시료를 검사할 수 있는 한 방법으로 유전자 분석용 크로마토그래피 시스템은 전형적으로 상호 포개어 연결된 시료첨가패드, 신호발생패드, 그리고 흡수패드로 구성된다(Fig. 1; 11-13). 길이 방향으로 최하단에 위치하는 시료첨가패드는 신호발생원으로 항체-colloidal gold 중합체를 포함하며 증폭된 DNA가 함유된 PCR 반응물이 시료로 첨가되는 곳이다. 신호발생패드는 PCR 생성물로서 분석물질인 DNA와 특이하게 핵산접합 할 수 있는 probe를 고정된 상태로 포함하므로 그 고정부위에서 분석물질 농도에 비례한 신호를 나타낸다. 마지막으로 흡수패드는 수용액을 지속적으로 흡수하여 물질전달과 미반응 성분들의 분리를 가능하게 한다.

이와 같이 제조된 기능성 membrane strip을 이용한 유전자 크로마토그래피 분석과정은 다음과 같다(Fig. 2). 첫째 과정으로, PCR 생성물을 시료첨가패드에 첨가한 후(2a), 두 번째 과정으로 시료첨가패드 최하단으로부터 시료용반응액을 흡수한다(2b). 이 때 흡수된 수용액은 시료첨가패드 상에 고정되어있는 항체-colloidal gold 중합체를 용해시킨다. 이 용액은 또한 분석물질인 증폭된 DNA를 신호발생패드로 운반하여 이 패드 상의 일정 지역에 고정되어있는 DNA probe와 접합 반응을 유발한다. 셋째 과정으로 용해된 항체-colloidal gold

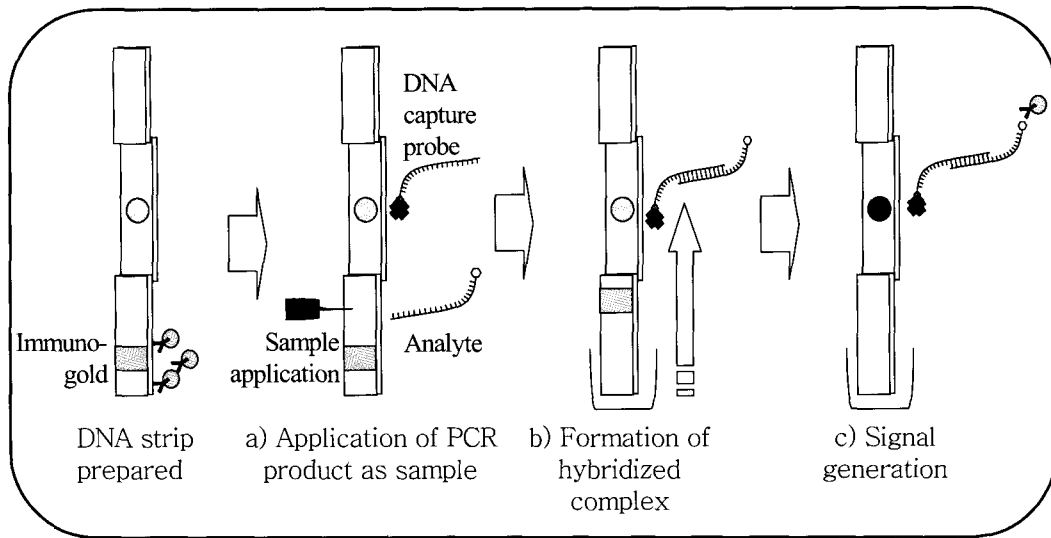


Figure 2. Principle of a geno-chromatographic assay.

중합체가 연이어 운반되어 probe에 포획된 DNA 분자의 5'-말단에 표지되어있는 형광물질과 반응하여 결합한다(2c). 이 결합체는 colloidal gold를 포함하므로 눈으로 확인할 수 있는 발색이 신호로써 발생되고 결과적으로 분석하고자 하는 식중독균의 유무를 육안으로 쉽게 확인할 수 있다.

**Primers 및 DNA Probe 제작**

*S. typhimurium*을 특이하게 증폭하기 위해 거의 대부분의 *Salmonella* 종에 존재하는 *invA*를 목표유전자로 결정하였다(17). 이 유전자는 그람 음성 미생물이 숙주세포로 침투하는데 사용되는 type III 분비시스템에 관여하는 유전자로서 *invC*와 *invG* 등과 함께 작용한다. 이러한 유전자들은 다른 그람 음성 균주에서도 같은 기능으로 유사하게 존재하는데 이중 *invA* gene은 *Salmonella* 종을 특이하게 분류하는데 사용되고 있다(18). 이 유전자를 PCR을 통해 증폭하고자 정방향 (*LinvA*) 그리고 역방향 (*RinvA*) primer들을 설계하였다 (Table 1). 그 성능을 시험하기 위해  $10^3$ - $10^7$  cfu/mL 농도범위로 희석된 균의 DNA를 시료로 이용하여 PCR을 실시하였고 그 결과를 전기영동을 통하여 분석하였다. 예측한 바와 같이 전기영동 gel 상에 570 bp 크기의 *invA* 유전자가 단일 band로 탐지되었고  $10^4$  cfu/mL의 시료에 대해서도 측정할 수 있는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과로부터 설계된 primer가 목표 유전자에 대해 특이할 뿐만 아니라 PCR을 통한 증폭이 매우 효율적임을 확인하였다. 참고로, 우리는 미생물을 고농도로 배양하여 이로부터 DNA를 정제한 후 표준시료로 사용하여 위에서 설명된 실험을 수행하였다. 그러나 실제로 식중독균에 대한 진단키트의 현장시험 시에는 각기 다른 식품(예: 유가공 제품)에 식중독균이 분포할 수 있으므로 특히 DNA 추출 효율의 변이가 예상된다. 따라서 분석재현성을 확보하기 위해서는 추가적으로 효율적인 DNA 추출방법의 개발이 필요하다.

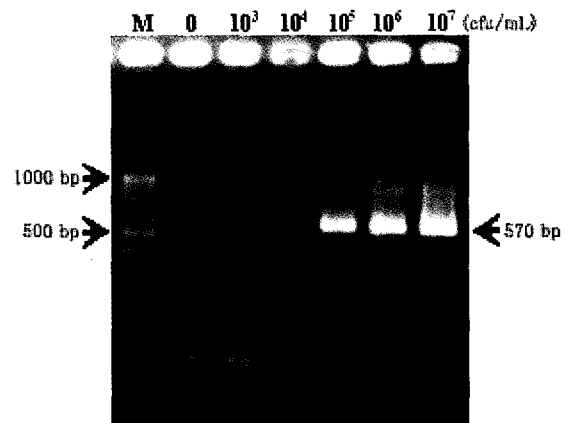


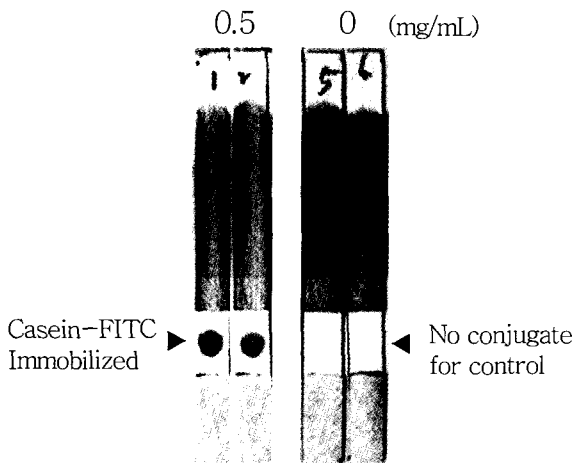
Figure 3. Electrophoretic analysis of the amplified product by PCR toward *invA* gene specific to *S. typhimurium*.

**분석조건 최적화 및 농도응답**

**발색신호 발생**

유전자분석 strip 시스템의 성능에 대해 조건 최적화를 수행하기 위해 신호발생이 우선 성취되어야 하므로 신호발생원으로 사용될 colloidal gold-형체 (형광물질에 특이 함) 중합체를 합성하였고 그 기능을 시험하였다. 이 중합체는 유전자 분석 시 궁극적으로 고체표면에 고정된 probe와의 핵산결합에 의해 포획되는 DNA 분자 상의 형광물질을 항원으로 인지하여 발색신호를 발생한다(Fig. 2c). 이를 모방하여 우유 단백질인 casein과 형광물질 간의 중합체를 신호발생패드의 일정 지역에 고정한 후 신호발생원으로 합성한 gold 중합체를 모세관 현상에 의해 하단으로부터 유입시켜 크로마토그래피 방법에 의한 항원-항체 반응을 시험하였다(Fig. 4). 그 결과,

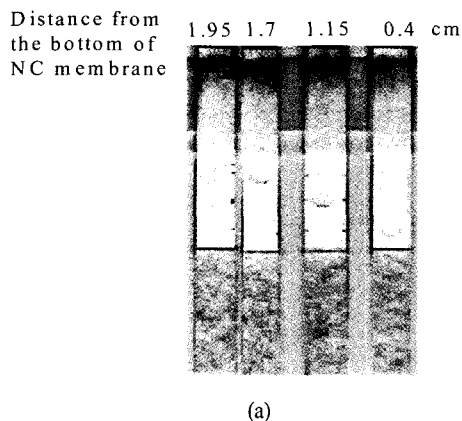
형광물질이 고정화된 strip에서는 강한 발색신호가 발생된 반면에 형광물질을 포함하지 않은 strip에서는 어떤 신호도 나타나지 않았다. 이것은 gold 중합체가 membrane 상에 고정되어 있는 형광물질을 특이하게 인지하는 기능을 보유하고 있었으며 이에 따라 발색신호 발생을 이용한 분석시스템의 조건최적화를 수행할 수 있었다.



**Figure 4.** Test of a conjugate between colloidal gold and an antibody to fluorescein for signal generation. Casein coupled with a fluorescein derivative (FITC) was immobilized onto signal generation pad only for the test of the gold conjugate. Specific reaction of the conjugate to fluorescein occurred.

**Probe 고정화 위치**

PCR 과정에 의해 증폭된 DNA를 특이하게 분석하기 위해 그 분석물질과 핵산서열 상보성이 있는 DNA probe를 위에서 설명한 바와 같이 제작한 후 부착단백질인 streptavidin과 중합하여 신호발생 패드 상에 고정하였다. 이 때 probe의 고정된 위치에 따라 각 시료에 포함된 화학성분들의 농도, 온도와 같은 물리적 조건, 그리고 중력에 역행하는 액체 흐름의 속도 등의 변화가 예상되었다. 따라서 DNA probe의 패드 상의 수직배열 위치에 따른 신호세기 효과를 시험하였고 발생된 신호는 optical density로 전환한 후 그래프로 나타내었다

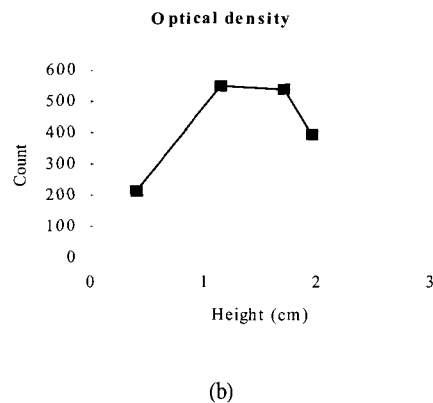


(Fig. 5). 시험 결과로부터, 발색신호 세기는 신호발생패드 하단으로부터 거리에 비례하여 증가하지만 최상단 부근에서는 오히려 감소하는 것으로 나타났다. 신호발생패드의 대부분 지역 (하단으로부터 0.4-0.7 cm 지역)에서 DNA probe가 고정화된 거리에 따라 신호가 증가하는 것은 nitrocellulose membrane 세공 내에서의 수용액 이동속도가 감소되어 반응시간이 늘어났기 때문으로 예측된다. 더욱이 시료에 첨가된 유기용매 (예: formamide)의 농도가 운반수용액에 의해 희석되어 접합반응이 강화된 결과가 또한 반영되었을 것으로 판단된다. 패드의 최상단 (말단으로부터 1.95 cm 지역)에서 신호가 감소한 것은 시료에 포함되었던 유기용매가 점차 희석되어 DNA 단일가닥들이 renaturation 되기 때문으로 예측된다. 이와 같은 결과에 근거하여, DNA probe의 고정화 배열시 nitrocellulose membrane 하단으로부터 1.15 cm 거리가 최적이라는 것을 알 수 있었다.

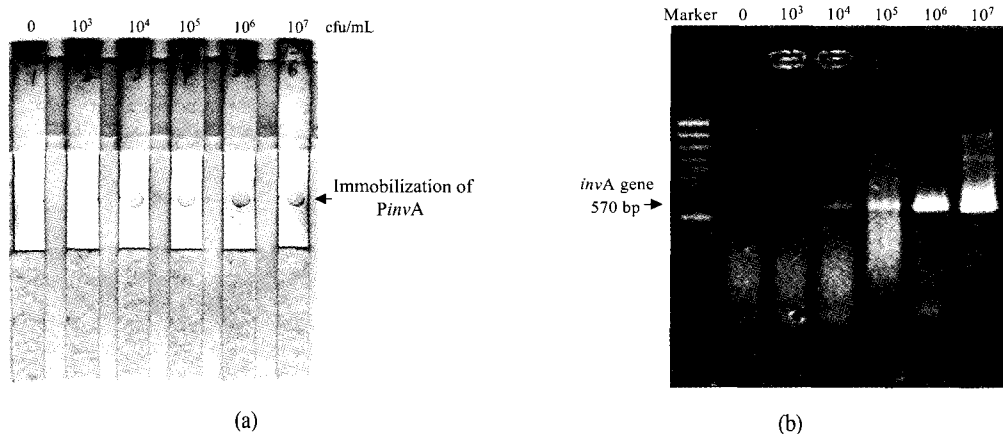
**농도응답**

다른 농도로 존재하는 *invA* gene에 대해 증폭된 DNA의 크로마토그래피 분석을 최적조건 하에서 수행하였고 그 결과를 전기영동 분석결과와 비교하였다(Fig. 6). 유전자 크로마토그래피 분석을 위한 핵산접합반응은 비평형 상태 하에서 속성으로 수행되기 때문에 그 결합체의 형성은 분석시간에 따라 변화한다(19). 따라서 분석시간에 대한 측정성능의 변화를 우선 결정하였고 최적조건 하에서 농도응답을 구하였다. 본 실험에서 사용된 조건 하에서 분석시간을 20분으로 고정하면 분석물질의 탐지하한농도는 약  $10^4$  cfu/mL이지만, 분석시간을 2배 증가시키면 발생하는 신호가 높아져서 탐지하한농도는 약 10배 정도 낮아지는 것으로 나타났다(6a). 더욱이 분석물질 부재 하에서의 비특이 신호발생은 전무하여 고안된 분석시스템은 매우 특이성이 높은 것으로 나타났다. 사용된 조건 하에서 크로마토그래피 분석시스템의 농도응답(6a)을 전기영동 분석결과(6b)와 비교하면 크로마토그래피 시스템이 측정민감도 측면에서 10배 더 우수한 것으로 규명되었다.

결론적으로, 유전자 크로마토그래피 분석시스템의 성능을 조절하는 주요 변수들을 최적화 하였고 이 조건 하에서  $10^3$  cfu/mL 농도에 상응하는 *S. typhimurium*에 특이한 *invA* 유전자를 간편하게 그리고 속성으로 검출하였다. 이와 같은 측정



**Figure 5.** Effect of the location of the DNA probe immobilized on nitrocellulose membrane. The colorimetric signals (a) resulting from geno-chromatographic assay were converted to optical densities (b) by means of scanning photometry.



**Figure 6.** Dose responses of two different analytical systems, geno-chromatography (a) and electrophoresis (b), to *invA* gene amplified by PCR. The geno-chromatographic analysis was carried out for 40 min at room temperature.

하한농도는 실제로 응용할 경우 분석시스템 당 5개의 미생물 세포의 존재 유무를 확인할 수 있을 정도의 우수한 성능을 나타낸다. 유전자 크로마토그래피 방법을 기존에 일반적으로 사용되고 있는 전기영동법과 비교하면 분석시간이 상대적으로 짧고 그 분석특이성도 높을 뿐만 아니라 측정민감도도 향상된 분석시스템이다. 부가하여, 증폭산물 분석 시 기기를 사용하지 않고 또한 인체에 유해한 염색물질을 사용하지 않기 때문에 매우 안전하므로 분석시료가 제공되는 현장에서 간편하게 사용이 가능하다는 장점을 제공한다. 그러나 현재의 기술수준에서 이 방법은 PCR과 같이 실험실에서 사용가능한 반면에 현장에서 수행되기 어려운 공정을 요구하고 있다. 그러나 현재 시료만을 첨가하여 수행이 완료될 수 있는 PCR용 마이크로시스템을 개발하는 연구들이 진행되고 있을 뿐만 아니라(20) PCR과 비교하여 상대적으로 사용이 간편한 다양한 증폭기술의 개발이 이루어지고 있다(21, 22). 따라서 본 연구에서 개발된 유전자 크로마토그래피 분석시스템은 가까운 미래에 현장사용이 가능한 DNA 증폭공정 기술과 융합될 수 있을 것으로 전망된다. 이렇게 현장 진단을 위한 주요기술들과 융합되어진 유전자 크로마토그래피 분석시스템은 다양한 유전자 측정을 위해 응용이 매우 용이해서 식중독균의 검사 외에도 유전자 변형작물의 분류, 병원성 박테리아 및 바이러스의 검출, 유전성 질환의 조기 검진, 암 발생 인자의 조사 등 그 응용의 범위는 매우 넓다.

**요 약**

임신이나 배란진단과 같이 가정에서 직접 사용할 수 있는 형태의 membrane strip 크로마토그래피 방법을 이용하여 식중독 균 DNA 분석시스템을 개발 하였다. 분석물질로서는 빈번하게 발생하고 있는 식중독 미생물 중에서 *S. typhimurium* 을 선택하였으며, *Salmonella* 종에 특이한 유전자 부위인 *invA* 유전자 분석을 목표로 하였다. 우선 이 유전자는 본 실험실 내에서 설계한 primer 쌍을 사용한 PCR 공정을 통하여 증폭되었다. 이렇게 증폭한 산물을 본 연구자들이 설계한 DNA probe와의 hybridization을 통하여 분석함으로써 전통적

으로 사용하고 있는 전기영동 분석법의 단순히 분자크기에 의한 분리법과 비교하여 특이한 분석을 할 수 있었다. 이때 PCR 후 과량으로 잔존하는 primer를 별도로 제거하지 않고 hybridization을 수행할 수 있도록 특별하게 DNA probe를 설계하였다. 또한, probe가 증폭된 DNA와 hybridization 하였을 때 고체표면에 의한 간섭효과가 최소화되도록 설계 시 반영되었고 더욱이 streptavidin-비오틴의 결합을 이용하여 probe를 고정함으로써 고상에서의 상호작용이 더욱 용이하도록 배려하였다. 이러한 분석방법을 이용하여 분석한 결과 시료첨가 후 20-40분 정도에 최소 10<sup>3</sup> cfu/mL (10 cells/system) 농도의 박테리아를 분석할 수 있었다. 이러한 결과는 일반적으로 사용하는 전기영동법보다 약 10배정도 더 민감한 결과일 뿐만 아니라 실험실 기기를 사용하지 않고 분석을 수행함으로써 분석시료가 제공되는 현장에서도 식중독 균의 탐지가 가능하게 되었다.

**감 사**

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구 되었으며 (과제번호: KRF-2001-041-H0352500) 이에 감사드립니다.

**REFERENCES**

- Mullis K. B. and F. A. Faloona (1987), Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Method. in Enzymol.* 155, pp335-350, Academic Press, San diego.
- Mullis, K. B. (1989), The polymerase chain reaction: Why it works. In *Polymerase Chain Reaction*, H. A. Erlich, R. Gibbs, and H. H. Kazazian Jr., Eds, pp237-243, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Müller, D., B. Hofer, A. Koch and H. Köster (1983), Aspects of the mechanism of acid-phenol extraction of nucleic acids, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 740, 1-7.
- Kricka, L. J. (1999), Nucleic acid Detection technologies-labels, strategies, and formats, *Clin. chem.* 45, 453-458.
- Dill, K., Samuel D., H. Chan, and T. W. Gibbs (1997), Detection of plasmids using DNA and RNA probes and the light-addressable

- potentiometric sensor, *J. Biochem. Biophys. Methods* **35**, 197-202.
6. Guillot, E. and C. Mouton (1996), A PCR-DNA probe assay specific for *Bacteroides forsythus*, *Mol. Cell. Probes* **10**, 413-421.
  7. Sambrook J. and D. W. Russell (2001), *Molecular cloning - a laboratory manual* 3rd ed., pp42-45, Cold Spring Harbor, New York.
  8. Sambrook J. and D. W. Russell (2001), *Molecular cloning - a laboratory manual* 3rd ed., pp39-58, Cold Spring Harbor, New York.
  9. Sambrook J. and D. W. Russell (2001), *Molecular cloning - a laboratory manual* 3rd ed., pp1-36, Cold Spring Harbor, New York.
  10. Paek, S. H., C. W. Lee, S. H. Yook, O. H. Kwon and Y. N. Park (1999), Performance control strategies of one-step immunochromatographic assay system for *Salmonella typhimurium*, *Anal. Lett.* **32**, 335-336.
  11. Paek, S. H., S. H. Lee, J. H. Cho, and Y. S. Kim (2000), Development of rapid one-step immunochromatographic assay, *Methods* **22**, 53-60.
  12. Zhang, S. (2000), Paper chromatography hybridization: A rapid method for detection of *Onchocerca Volvulus* DNA amplified by PCR, *ASTMH.* **63**, 85-89.
  13. Burkhalter, P. W., C. Muller, J. Luthy and U. Candrian (1995), Detection of *Salmonella spp* in eggs: DNA analysis, culture techniques, and serology, *J. AIAC Int.* **78**, 1531-1537.
  14. Landre, P. A., D. H. Gelfand and R. M. Watson (1995), The Use of Convents to Enhance Amplification by the Polymerase Chain Reaction, In *PCR Strategies*, M. A. Innis, D. H. Gelfand, and J. J. Sninsky, Eds, pp3-16, Academic Press, San diego
  15. Vorobyova, S. A., N. S. Sobal and A. I. Lesnikovich (2001), Colloidal gold, prepared by interphase reduction, *Coll. and Sur. A: Physicochemical and Engineering Aspects* **176**, 273-277
  16. Lönnberg, M. and J. Carlsson (2001), Quantitative Detection in the Attomole Range for Immunochromatographic Tests by Means of a Flatbed Scanner, *Anal. Biochem.* **293**, 224-231
  17. Bijlde, M. and P. Jakob (1995), The use of a PCR-generated invA probe for the detection of *Salmonella spp.* in artificially and naturally contaminated foods, *Int. J. Food Microbiol.* **26**, 335-344
  18. Katrin. E. and E. Jorge (1999), Differential regulation of *Salmonella typhimurium* type III secreted proteins by pathogenicity island 1 (SPI-1)-encoded transcriptional activators *invF* and *HilA*, *Infect and Immun.* **67**, 4099-4105.
  19. Wemhoff, G. A., S. Y. Rabbany, A. W. Kusterbeck, R. A. Ogert, R. Bredehorst and F. S. Ligler (1992), Kinetics of antibody binding at solid-liquid interfaces in flow, *J. Immunol. Methods* **156**, 223-230.
  20. Kopp, M. U., A. J. Demello, and A. Manz (1998), Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip, *Sci.* **280**, 1046-1048.
  21. Schweitzer, B. and S. Kingsmore (2001), Combining nucleic acid amplification and detection, *Cur. op. in Biotech.* **12**, 21-27
  22. Hatch, A., T. Sano, J. Misasi and C. L. Smith (1999), Rolling circle amplification of DNA immobilized on surface and its application to multiplex mutation detection, *Genet. anal.: Biomol. Eng.* **15**, 35-40