

Multiplex PCR Assay from Colon Biopsy Specimens in Acute Infectious Colitis Patients

Gyusang Lee, Kwanhun Lim and Jong-Bae Kim[†]

Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science,
Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

For the rapid detection of objective pathogenic bacteria from colon biopsy specimens, multiplex PCR (polymerase chain reaction) method was developed. The major objective bacteria in this study were Shiga-like toxin producing *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp. *Salmonella* spp. and *Yersinia* spp.. To detect simultaneously 7 kinds of pathogenic bacteria in single reaction tube, multiplex PCR system was executed using 6 sets of primers used in single PCR system for the respective bacteria. The results in this research might be applied for the detection of pathogenic bacteria form colon biopsy samples.

Key Words: Colon biopsy specimen, Multiplex PCR

급성 감염성 대장염에서의 병원성 세균은 일반적으로 분변 배양 검사를 통해 동정이 이루어지고 있으나 다른 검체에 비해 병원성 세균 분리율이 높지 않아 최근에는 대장내시경을 통한 점막조직 및 장액 배양 검사를 통해 동정율을 높이고자 하는 시도가 이루어지고 있다 (Cho et al., 2002; Jia, 2006; Nayar, 2006). 이에 본 저자들은 대장 점막조직의 배양 검사 및 multiplex PCR을 통한 병원균 동정율을 알아보고자 하였다.

2000년 1월부터 2001년 10월까지 급성 감염성 대장염으로 원주기독병원에 내원한 38명의 환자를 대상으로 분변 배양, 대장 점막조직 배양 검사 및 7가지 병원성 세균들 (*E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp. *Salmonella* spp. *Yersinia* spp.)에 대한 single PCR 기법을 확립하고 multiplex PCR을 시행하였다. 대상세균의 분자생물학적 검출방법을 위하여 고안된 PCR primer들과 예상되는 증폭산물의 크기는 Table 1과 같다.

대상 환자의 성별은 남자 19명 (50%), 여자 19명 (50%)명으로 총 38명이었으며, 평균 연령은 46.9±19.1세로 주로 장년층이 대부분이었다. 이중 28명 (73.7%)의 환자가 복통을 호소하였으며, 34명 (89.5%)은 설사, 11명 (28.9%)은 발열증상을 나타내었다. 대장내시경을 실시한 환자에 대한 소견

은 궤양성 병변 (47.4%), 발적과 부종 (39.5%), 미란성 병변 (13.2%) 등으로 나타났다. 이중 27명의 환자에게서 분변 배양 검사를 시행하였으나 이들 모두에서 연구대상 원인세균이 분리되지 않았다. 대장 점막조직 배양 검사는 38명 모두에서 시행되었으며 *E. coli*는 14예에서 동정되었으나 혈청형 분류가 이루어지지 않아 병원균과 비병원성의 상재균과의 감별은 불가능하였다. 병원성 균주로서는, *Salmonella* group B가 1예, *Salmonella* group D는 2예에서 배양되었다.

전통적인 미생물학적 검사방법에서의 미생물 분리 배양 시간을 단축함으로써 단시간 내에 병원성 세균을 신속하게 검출하기 위한 병원성 세균의 표준균주를 이용한 single PCR 기법을 확립하기 위하여 7속의 대상세균별로 16S rDNA 염기서열을 중심으로 oligonucleotide primer set을 선정하였다. *E. coli*의 경우는 *E. coli* Shiga-like-toxin (SLT) 유전자를 대상으로 *E. coli* O157:H7에 특이적인 primer set를 고안하였다. NCBI (National Center for Biotechnology Information) web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 통해서 각각의 세균들의 sequence를 수집하고, 이를 대상으로 각 세균에 대하여 multiple sequence alignment를 시행하였다. PCR 검출대상 세균별로 특이적인 염기서열로 균주간 감별이 가능한 부위를 선택하여 PCR primer sets를 주문제작 (Bioneer Co., Daejeon, Korea)하여 본 실험에 사용하였다 (Table 1). 또한, 단 한번의 PCR 반응으로 신속하게 검출하기 위해서 single PCR 기법에 사용한 각종 primer set을 혼합하여 multiplex PCR 기법을 실험하였다. 병변부위의 점막조직에서 boiling lysis 방법을 통하여 genomic DNA를 분리하였고, 분자생물학적 검출방법 중 신속 다중 검출방법인 multiplex PCR 검사를 실시하였다

*논문 접수: 2006년 12월 11일
수정재접수: 2006년 3월 15일

[†]교신저자: 김종배, (우) 220-710 강원도 원주시 흥업면 메지리 234, 연세대학교 보건과학대학 임상병리학과 임상미생물학실
Tel: 82-33-760-2423, Fax: 82-33-760-2195
e-mail: Kimjb70@yonsei.ac.kr

Table 1. Oligonucleotide primers used in multiplex PCR

Designation	Oligonucleotides Sequence (5' to 3')	Target gene (16S rDNA)	Expected size (bp)
SlpHU	CTT GAC CGC CTT TCC GAT AC	<i>Shigella</i> spp.	610
SlpHL2	CAG CCA CCC TCT GAG AGT A		
Y16S-86f	GCG GCA GCG GGA AGT AGT TTA	<i>Yersinia</i> spp.	593
Y16S-L571	GAC TCT AGC TTG CCA GTT TCA A		
Sal-U	GTC GAA CGG TAA CAG GAA GC	<i>Salmonella</i> spp.	416
Sal-L	ACT GCG GTT ATT AAC CAC AAC		
SLT-1U	CAG TCT GTG GCA AGA GCG	SLT-1 gene of <i>E. coli</i> O157:H7	354
SLT-1L	CCC ACG GAC TCT TCC ATC		
16sSAU	AAC CGG AGC TAA TAC CAG	<i>S. aureus</i>	335
16sSA1	GTA CCG TCA AGA TGT TCA		
LM1	CGA ATG ATA AAG TGT GGC	<i>L. monocytogenes</i>	298
LM2	CTG TTA TCC TTG TTC TTC TCT		
VP-1	CGC CGT GGG TGT TTC GGT AGT	<i>V. parahemolyticus</i>	289
VP-2r	TCC GCT TCG CGC YCA TCAATA		

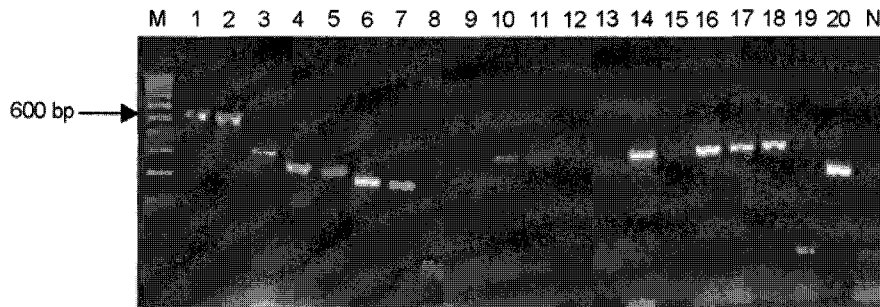


Fig. 1. Agarose gel electrophoretic patterns of multiplex PCR amplification of 16S rRNA genes. Lane M, DNA molecular size standards marker of 100-bp ladder; Lane 1, *Shigella dysenteriae* (610 bp); lane 2, *Y. enterocolitica* (593 bp); lane 3, *Salmonella* serovar Enteritidis ATCC 13076 (416 bp); lane 4, *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 (354 bp); lane 5, *S. aureus* ATCC 14458 (335 bp); lane 6, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (298 bp); lane 7, *Vibrio parahemolyticus* (289 bp); Lanes 8~20, colon biopsy specimens from patients; Lane 10, 11, 14, 16, 17, and 18 shows positive signal for *Salmonella* spp., and lane 20 shows positive for *L. monocytogenes*.; lane N, negative control.

(Ko et al., 2005). Multiplex PCR 반응은 주형 DNA 2 μ l, dATP, dTTP, dCTP, dGTP를 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTP를 2 μ l (각각 200 μ M), 10X buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl) 2.5 μ l를 혼합하였다. 그리고 single PCR의 경우보다 $MgCl_2$ 농도를 상향 조정하여 25 mM $MgCl_2$ 를 3 μ l 가함으로써 $MgCl_2$ 농도가 3 mM이 되도록 조제하였으며, 여기에 *Taq* polymerase 1.0 U를 첨가하였다. 각각의 primer set를 20 pmole/ μ l 최종농도가 1 pmole이 되도록 넣은 후 멸균 증류수로 최종 반응양이 25 μ l이 되도록 한 후 thermal cycler (GeneAmp[®] PCR System 2700, Perkin-Elmer Cetus, Boston, MA, USA)를 사용하여 DNA 증폭을 시도하였다. 첫 cycle이 시작되기 전에 94 $^{\circ}$ C에서 2분 30초간 가온한 후 매 cycle 당 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 52 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 지속하였다. 반응이 종료된 후 0.5 μ l/ml의 ethidium

bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 전기영동하여 ultraviolet trans illuminator (Vilber Louramat, Mame La Valle, France)로 각각의 증폭산물들을 비교 관찰하였다.

본 연구에서 고안한 multiplex PCR 반응결과 원인세균별로 특이적인 증폭산물인 DNA band가 뚜렷하게 구분되어 표준균주 세균별로 특이적인 band pattern을 확인할 수 있었다. 집막조직으로부터 분리된 genomic DNA를 대상으로 multiplex PCR 검사를 실시한 결과 7예 (25.9%)에서 병원균을 확인할 수 있었으며, 6예는 *Salmonella* spp., 1예는 *Listeria monocytogenes*였다 (Fig. 1). 급성 감염성 대장염 환자에서 분변 배양 및 대장 집막조직 배양을 통한 병원성 세균 동정율은 낮았으며, PCR을 통한 병원균의 확인이 급성 감염성 대장염의 원인균 진단에 도움이 되는지는 더 많은 환자를 대상으로 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Cho YH, Park HY, Song KS, Song YG, Park IS. A case of hemolytic uremic syndrom caused by *Escherichia coli* O8. Korean J Gastrointest Endosc. 2002. 25: 213-216.
- Zheng JJ. Clinical aspects of ulcerative colitis in mainland China. Chinese J Digest Disease. 2006. 7: 71-75.
- Ko KS, Oh WS, Peck KR, Lee JH, Lee NY, Song JH. Phenotypic and genotypic discrepancy of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from Asian countries. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005. 45: 63-70.
- Nayar DM, Vetrivel S, McElrov J, Pai P, Koerner RJ. Toxic megacolon complicating *Escherichia coli* O157 infection. J Infect. 2006. 52: 103-106.
-