

## 생물학작용제 검출 키트 개발 및 성능시험 연구

조 혜 은<sup>\*,1)</sup>

<sup>1)</sup> 국방과학연구소 제4기술연구본부

### Development and Validation Study of Biological Agent Detection Kit

Hae Eun Joe<sup>\*,1)</sup>

<sup>1)</sup> The 4th Research and Development Institute, Agency for Defense Development, Korea

(Received 13 May 2019 / Revised 10 June 2019 / Accepted 5 July 2019)

#### ABSTRACT

In biological warfare, it is important to identify biological agents for proper treatment. We focused on developing a real-time RT-PCR kit that can detect multiple species of biological agents. AccuPower® Biothreat Real-Time RT-PCR Kit(v3.0) could detect *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Salmonella typhi*, *Rickettsia prowazekii*, Variola virus, Hantaan virus, Yellow fever virus, *Brucella* spp., *Shigella dysenteriae* in a single reaction. The results showed that the kit was verified to be able to detect at least 0.005 ng of nucleotide and 10,000 CFU/ml of bacteria. Therefore, the kit is expected to be used as a rapid and sensitive detection kit for 11 species of biological agents within 2 hours.

Key Words : Real-Time RT-PCR Kit(실시간 중합효소연쇄반응 키트), Biological Agents(생물학작용제), Detection(검출)

#### 1. 서론

생물학작용제는 박테리아, 바이러스 또는 독소 등의 병원체를 말하는데 무기화되기 용이하고 미량으로도 대량살상이 가능한 특성 때문에 역사적으로 생물학전에 사용되기도 하였다. 그러나 생물학작용제의 사용에 대한 위험을 인지한 나라들은 1972년 생물무기금지협약(Biological Weapons Convention)을 체결하였으며 이에 따라 생물무기를 제조, 획득, 보유, 비축, 운송하지

않도록 협약하였다. 그러나 2001년 미국에서 탄저균 우편물 테러가 발생하면서 생물학작용제의 위협이 여전히 존재하는 것을 인지하고 전 세계적으로 생물학작용제에 대한 예방 및 치료에 관심이 높아졌다<sup>[1]</sup>. 특히 탄저균, 페스트, 천연두, 야토병 등의 고위험군에 속하는 생물학작용제에 대한 백신 또는 치료제를 개발하기 위한 연구가 지속되고 있다.

생물학작용제는 인체 내로 유입 후 일정 잠복기를 가지는 특징이 있는데 이로 인해 초기감염 시 감염 사실을 인지하지 못 하거나 어떤 생물학작용제가 사용되었는지를 확인하기 어려운 문제가 있다<sup>[2]</sup>. 특히 특이적 증상이 발병하고 난 후에는 치료시기를 놓치는

\* Corresponding author, E-mail: jhaeeun@add.re.kr

Copyright © The Korea Institute of Military Science and Technology

경우가 많아 완치될 가능성이 매우 낮아진다. 따라서 이러한 특성을 가진 생물학작용제가 생물학전이나 생물테러에 사용된다면 치료에 앞서 어떤 생물학작용제가 사용되었는지를 빠르고 정확하게 파악하는 것이 적절한 치료를 하기 위해 꼭 필요한 과정이다.

이러한 이유로 생물학작용제를 검출하기 위한 여러 가지 방법이 연구되고 있으며 단일 생물학작용제를 검출할 수 있는 키트도 개발되어 있다. 그러나 상용화된 키트는 한 종류의 특정 균을 검출하기 위한 키트이기 때문에 어떤 생물학작용제가 들어있는지 모르는 미지 시료를 분석하려면 여러 번의 실험을 통해 적합한 키트를 찾아야 하는 한계가 있었다. 따라서 국방과학연구소에서는 산학연 주관 연구개발 과제였던 ‘맞춤형 유사생물학작용제 제조기술 개발’ 선도형 핵심기술 과제에서 주요 생물학작용제를 동시에 검출할 수 있는 키트를 개발하고자 하였다<sup>[3,4]</sup>. 개발한 AccuPower® Biothreat Real-Time RT-PCR Kit(v3.0)는 실시간 중합효소연쇄반응을 이용하여 미량의 DNA를 증폭시킴으로써 시료 속 생물학작용제를 검출할 수 있으며 한 번의 반응으로 고위험 생물학작용제 11 종에 대해 구분할 수 있다.

본 연구에서는 생물학작용제 및 유사작용제를 사용하여 본 키트에 대한 성능시험을 진행하였다.

## 2. 실험

### 2.1 분석시료

#### 2.1.1 Genomic DNA

성능검사에 필요한 분석시료는 탄저균(*Bacillus Anthracis*; BA), 콜레라균 O1/O139(*Vibrio Cholerae*; VC), 야토균(*Francisella Tularensis*; FT), 살모넬라균(*Salmonella Typhi*; ST), 리케치아균(*Rickettsia Prowazekii*; RP), 백신니아 바이러스(*Vaccinia Virus*; VACV), 한탄 바이러스(*Hantaan Virus*; HTNV), 브루셀라균(*Brucella Melitensis*; BM), 이질균(*Shigella Dysenteriae*; SD)에 대한 genomic DNA를 사용하였다.

#### 2.1.2 사균

생물학작용제 사균에 대한 성능검사를 위하여 탄저균 Sterne 균주의 영양세포 및 포자, 콜레라 O1 균주, 살모넬라균 검체는 121 °C에서 40 분간 고압멸균을 한 뒤 20 일간 37 °C에서 배양하여 사멸을 확인한 후

실험에 사용하였다.

### 2.2 Real-time PCR

실시간 중합효소연쇄반응을 위해 AccuPower® Biothreat Real-Time RT-PCR Kit(v3.0)(Bioneer, South Korea)을 사용하였으며, QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR system(Applied BioSystems, USA) 장비를 사용하여 실시간 중합효소연쇄반응 및 분석 시험을 실시하였다.

#### 2.2.1 AccuPower® BioThreat Real-Time RT-PCR kit

AccuPower® Biothreat Real-Time RT-PCR Kit(v3.0)는 11 종의 생물학작용제에 대한 21 개 표적 유전자를 검출할 수 있다(Table 1).

콜레라균은 고위험 병원체로 분류되는 혈청형 O1, O139에 대하여 구분할 수 있도록 표적 유전자를 구성하였다. 그리고 브루셀라균의 경우 사람에게 감염 가능한 브루셀라균을 검출할 수 있도록 양 브루셀라균(*Brucella melitensis*)은 IS711, 소 브루셀라균(*Brucella abortus*)은 *alkB*와 IS711, 돼지 브루셀라균(*Brucella suis*)은 BR0952를 검출할 수 있도록 특이적인 표적 유전자를 사용하였다<sup>[5,6]</sup>.

Table 1. The target gene of biological agents

Species	target
<i>Bacillus anthracis</i>	PA, LF, pXO2, Ba813
<i>Yersinia pestis</i>	CAF1, <i>pla</i> , <i>yihN</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>ctxB</i> , O1, O139
<i>Francisella tularensis</i>	<i>FopA</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>viaB</i> , <i>fltC</i>
<i>Rickettsia prowazekii</i>	17 kDa
Variola virus	HA
Yellow fever virus	Polyprotein
Hantaan virus	NP
<i>Brucella species(spp.)</i>	<i>alkB</i> , IS711, BR0952
<i>Shigella dysenteriae</i>	HP

PA, protective antigen; LF, lethal factor; CAF1, chromatin assembly factor 1; HA, hemagglutinin protein; NP, nucleocapsid protein; IS, insertion sequence; HP, hypothetical proteins

키트는 진공 건조된 형태의 제품으로 primer, dual-labeled fluorogenic(TaqMan®) probe, DNA polymerase, dNTPs가 단일 tube에 1 회 사용 분량으로 건조된 형태로 되어있으며(Table 2) 한 well당 DEPC DW 19 ul 와 Internal Positive Control(IPC) 1 ul 그리고 template 5 ul를 넣어 총 25 ul가 들어가도록 설계되어 있다.

Table 2. List of reagent components

구성품	수량
Biothreat PCR premix	96-well plate × 1 EA
Biothreat Positive Control(PC) DNA/RNA	100 µl/tube × 1 tube (Natural)
Internal Positive Control (IPC)	100 µl/tube × 1 tube (Natural)
DEPC DW(No template Control, NTC)	100 µl/tube × 1 tube (Natural)
DEPC DW	1800 µl/tube × 2 EA or 4 EA
Optical Sealing film	1EA

2.2.2 ABI QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR system

실시간 중합효소연쇄반응을 위하여 QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR system을 사용하였으며 dye와 PCR 반응 프로토콜을 설정하였다(Table 3). Pre-denaturation 은 95 °C에서 5 분간 단회 실시하고, denaturation 과정 은 95 °C에서 15 초간, annealing과 extension 과정은 55 °C에서 30 초간 진행하며 이 두 과정을 45 회 실시 하였다.

3. 결과

3.1 생물학작용제 유전자 검출시험

생물학작용제의 DNA는 0.001(0.005 ng/well), 0.01 (0.05 ng/well), 0.1(0.5 ng/well), 1(5 ng/well), 10 ng/µl (50 ng/well)의 5 가지 농도로 처리하였다. 그 결과 대부분의 생물학작용제 표적 유전자가 검출 되었으며 농도에 따라 유의미하게 Ct(threshold cycle) 값이 변하는 것을 확인하였다. 단, 한탄바이러스의 경우에는 최

Table 3. Reporter dye of target genes

	1		2	
A	<i>B. anthracis</i>		<i>R. prowazekii</i>	
	PA	FAM	17kDa	FAM
	LF	JOE		
B	<i>B. anthracis</i>		Variola virus	
	pXO2	FAM	HA	FAM
	Ba813	Cy5		
C	<i>Y. pestis</i>		Hantaan virus	
	CAF1	FAM	NP	FAM
	<i>pla</i>	JOE		
D	<i>Y. pestis</i>		Yellow fever virus	
	<i>yihN</i>	FAM	Poly-protein	JOE
E	<i>V. cholerae</i>		<i>Brucella</i> spp.	
	<i>ctxB</i>	FAM	<i>alkB</i>	FAM
			IS711	Cy5
F	<i>V. cholerae</i>		<i>Brucella</i> spp.	
	O1	FAM	BR0952	FAM
	O139	Cy5		
G	<i>F. tularensis</i>		<i>S. dysenteriae</i>	
	<i>FopA</i>	FAM	HP	FAM
H	<i>S. typhi</i>			
	<i>viaB</i>	FAM		
	<i>fliC</i>	Cy5		

대 1 ng/µl부터 검출이 가능함을 확인하였다. 그 외 다른 생물학작용제의 경우 동일한 농도에서 각 작용제의 Ct값이 유사하게 측정되는 것을 확인하였다(Table 4, Fig. 1).

이는 동일한 탄저균 DNA 5 ng에 대하여 상용화되어 사용되고 있는 탄저균 검출용 키트(TaqMan™ *Bacillus anthracis* Detection Kit, Applied Biosystems™)로 실시간 중합효소연쇄반응을 하였을 때와 유사한 결과를 나타내었다(pXO1 Ct값 = 19.7, pXO2 Ct값 = 21.0).

Table 4. The Ct value of genomic DNA amplification

Species	Ct value					
	Target Gene	Concentration(ng/μl DNA)				
		10	1	0.1	0.01	0.001
BA	PA	15.3	18.3	21.4	26.0	29.2
	LF	17.0	19.3	22.5	27.2	29.7
	pXO2	16.3	19.7	24.0	27.2	31.7
	Ba813	15.7	19.1	23.4	27.0	30.0
VC	ctxB	17.1	21.3	24.5	27.1	33.0
	O1	17.4	21.6	24.6	28.4	33.4
	O139	17.9	21.2	24.7	28.2	31.9
FT	FopA	14.9	18.1	22.0	26.1	30.1
ST	viaB	18.4	22.0	25.6	31.8	38.7
	fliC	18.6	22.0	25.4	30.5	33.8
RP	17kDa	16.9	19.9	22.9	27.3	31.2
VACV	HA	18.9	22.0	26.5	29.1	32.9
HTNV	NP	-	6.4	12.3	16.6	20.7
BM	alkB	17.8	21.3	24.8	28.8	33.8
	IS711	-	-	-	-	-
	BR0952	-	-	-	-	-
SD	HP	14.4	17.8	21.5	25.2	28.4

브루셀라균의 경우 본 시험에서는 양 브루셀라균의 DNA를 사용하였으나 소 브루셀라균의 특이적 유전자인 *alkB*와 교차 검출되는 것을 확인하였고, 공통 표적 유전자인 IS711은 검출이 되지 않아 추가적인 검증이 필요할 것으로 보인다.

Biothreat Positive Control DNA/RNA는 모든 반응에서 평균 Ct값이 20 부근으로 측정되었고, IPC의 경우는 시료의 DNA 농도에 따라 값이 변하였으나 평균 Ct값이 21~29로 측정되었다.

### 3.2 생물학작용제 사균 검출 시험

추출된 DNA가 아닌 생물학작용제 사균에 대한 검

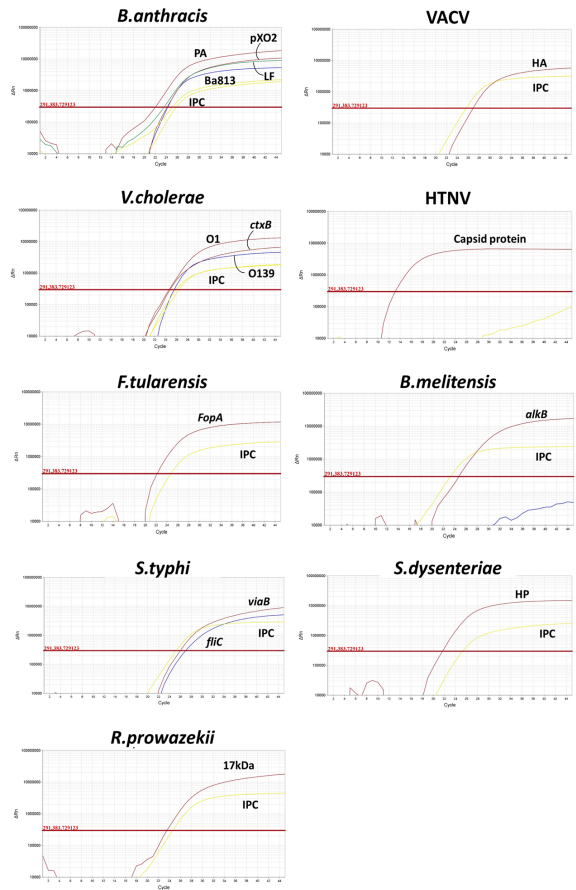


Fig. 1. Results of the real-time PCR amplification of genomic DNA(0.1 ng/μl)

출 성능시험을 위해 탄저균 Sterne 균주의 영양세포 및 포자, 콜레라균(O1균주), 살모넬라균 등의 사균을 사용하였다. 사균은  $2 \times 10^3 (1 \times 10^1 \text{ CFU/well})$ ,  $1 \times 10^4 (5 \times 10^1 \text{ CFU/well})$ ,  $2 \times 10^4 (1 \times 10^2 \text{ CFU/well})$ ,  $1 \times 10^5 (5 \times 10^2 \text{ CFU/well})$ ,  $2 \times 10^6 (1 \times 10^4 \text{ CFU/well})$ ,  $1 \times 10^7 (5 \times 10^4 \text{ CFU/well})$ ,  $2 \times 10^8 (1 \times 10^6 \text{ CFU/well})$ ,  $1 \times 10^9 (5 \times 10^6 \text{ CFU/well})$  CFU/ml의 8 가지 농도로 희석하여 분석을 진행한 결과  $2 \times 10^4 \text{ CFU/ml}$  이하의 농도에서 검출되지 않았으나 그 이상의 농도에서는 Ct값이 유의미하게 변하는 것이 확인되었다(Table 5, Fig. 2).

사용된 탄저균 Sterne 균주의 경우 pXO1(PA, LF, EF)<sup>+</sup>, pXO2<sup>-</sup>이므로 PA, LF 및 염색체 유전자인 Ba813이 검출되었고, 콜레라균의 경우 O1 균주를 사용하였으므로 O1과 장독소 유전자인 *ctxB*가 검출되고 O139는 검출되지 않았다.

Table 5. The Ct value of dead cells amplification

Species	Target Gene	Ct value					
		Concentration(CFU/ml)					
		1×10 <sup>9</sup>	2×10 <sup>8</sup>	1×10 <sup>7</sup>	2×10 <sup>6</sup>	1×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>4</sup>
BA	PA	16.0	19.0	23.1	26.4	29.5	33.8
	LF	16.0	18.9	23.2	26.4	29.3	33.7
	pXO2	-	-	-	-	-	-
	Ba813	19.5	21.8	26.7	29.1	33.8	37.0
VC	ctxB	14.5	16.9	20.8	25.2	27.6	34.4
	O1	14.1	16.8	20.4	24.8	27.1	31.6
	O139	-	-	-	-	-	-
ST	viaB	14.5	16.7	20.3	22.4	27.7	32.9
	fliC	15.3	16.2	20.9	21.8	28.0	30.9

탄저균의 경우 DNA 1 ng/μl과 2×10<sup>8</sup>(1×10<sup>6</sup> CFU/well) CFU/ml 농도의 영양세포 사균 Ct값이 18~20으로 유사하였고, 0.1 ng/μl DNA와 2×10<sup>8</sup>(1×10<sup>6</sup> CFU/well) CFU/ml 농도의 포자 사균이 22~23의 Ct값을 나타내었다. 콜레라균의 경우 0.1 ng/μl의 DNA와 2×10<sup>6</sup>(1×10<sup>4</sup> CFU/well) CFU/ml 사균에서 Ct값이 24로 유사하게 나타났다. 살모넬라균의 경우 2×10<sup>8</sup>(1×10<sup>6</sup> CFU/well) CFU/ml 사균 Ct값이 1 ng/μl DNA의 Ct값보다 높게 나온 것으로 보아 2×10<sup>7</sup>(1×10<sup>5</sup> CFU/well), CFU/ml 사균 Ct값과 유사할 것으로 예상되었다.

#### 4. 결론

AccuPower® Biothreat Real-Time RT-PCR Kit(v3.0)는 생물학작용제 검증용 시약으로 제작한 키트며 세 차례에 걸쳐 성능 개선을 진행하였다. 이 키트는 유전자 시료를 사용하여 진단 시험을 하도록 설계 되었으며 각 well에는 IPC DNA/RNA가 들어감으로써 반응이 제대로 일어나는지를 확인할 수 있도록 제작되었다.

개선된 v3.0 키트에 대한 성능 시험을 진행하기 위해 생물학작용제에 대한 유전자 9 종과 사균 4 종을 대상으로 성능 검증시험을 진행하였다.

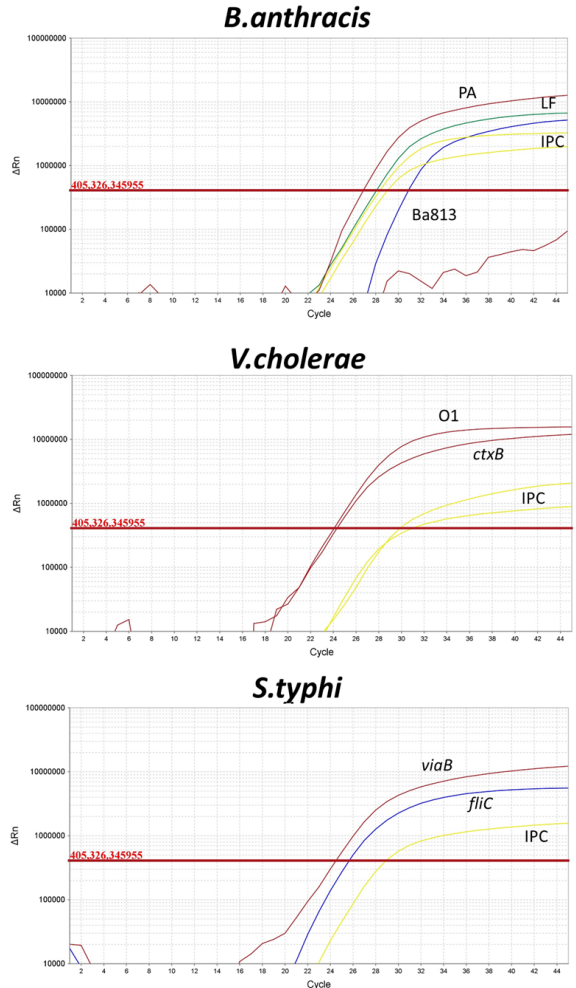


Fig. 2. Results of the real-time PCR amplification of dead cells(1×10<sup>6</sup> CFU/ml)

결과적으로 이 키트는 최소 0.005 ng의 유전자뿐만 아니라 1×10<sup>4</sup> CFU/ml의 사균부터 검출이 가능한 키트며 유전자와 사균 간 상호 농도별 상관관계도 확인되었다. 다시 말해, 본 키트는 11 종의 생물학작용제 유전자 또는 사균을 2 시간 이내에 동시에 검출 가능하기 때문에, 기존 상용화되어 있는 단일 생물학작용제를 검출할 수 있는 키트와는 차별성이 있다. 뿐만 아니라 일부 생물학작용제에 대해서는 유전자가 아닌 사균 자체에 대한 검출도 가능한 것을 확인하였으며, 이는 긴급한 상황에서 시료의 전처리 과정 없이 신속하게 분석을 진행할 수 있다는 이점이 있다. 따라서 본 키트는 단일 혹은 혼합 생물학작용제가 의심되는

미지시료의 생물학작용제 식별 및 검증용 키트로 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 본 키트에 대한 본 키트를 현장에 사용하기 위해서는 휴대가 용이한 분석 장비에 적용할 수 있는 시약 및 키트의 개발이 필요하고, 더 나아가 시료전처리과정을 단순화하여 실시간 분석에 곧바로 적용할 수 있는 형식의 검출시스템 개발이 필요할 것으로 판단된다.

## 후 기

시험을 진행하는데 도와주신 정성태 팀장님, 김성주 박사님, 송동현 박사님, 구세훈 박사님, ㈜바이오니아에 감사드립니다.

## References

- [1] Jernigan, J. A., Stephens, D. S., Ashford, D. A., Omenaca, C., Topiel, M. S., Galbraith, M., Tapper, M., Fisk, T. L., Zaki, S., Popovic, T., Meyer, R. F., Quinn, C. P., Harper, S. A., Fridkin, S. K., Sejvar, J. J., Shepard, C. W., McConnell, M., Guarner, J., Shieh, W. J., Malecki, J. M., Gerberding, J. L., Hughes, J. M., Perkins, B. A. and Anthrax Bioterrorism Investigation Team, "Bioterrorism-Related Inhalational Anthrax: The First 10 Cases Reported in the United States," *Emerg. Infect. Dis.*, Vol. 7, pp. 933-944, 2001.
- [2] V. Barras and G. Greub, "History of Biological Warfare and Bioterrorism," *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 20, No. 6, pp. 497-502, 2014.
- [3] Y. Cha, B. Koo, S. Kim, N. Kim and H. Park, "A Study on the Validation System of Detection for Biological Agents Using Real-Time PCR," *Journal of the Korea Institute of Military Science and Technology*, Vol. 20, No. 5, pp. 726-732, 2017.
- [4] H. E. Joe, D. H. Song, S. H. Gu, S. J. Kim, S. T. Jeong, "Verification Test of Biological Agent Detection Kit," *KIMST Annual Conference Proceedings*, pp. 2367-2368, 2018.
- [5] William S. Probert, Kimmi N. Schrader, Nhi Y. Khuong, Susan L. Bystrom and Margot H. Graves, "Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*," *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, No. 3, pp. 1290-1293, 2004
- [6] Vladyslava G Rarushna, David M Sturgill, Sheela Rmamoorthy, Sherry A Reichow, Yongqun He, Raju Lathigra, Nammalwar Sriranganathan, Shirley M Halling, Stephen M Boyle and Cynthia J Gibas, "Molecular Targets for Rapid Identification of *Brucella* spp.," *BMC Microbiology*, 6:13, 2006.