Salmonella species 검출용 DNA Probe 분석시스템 고안

이웅희, 백세환
고려대학교 생명공학원, 바이오센서 시스템공학 연구실
전화 (02) 3290-4148, FAX (02) 923-9923

Abstract

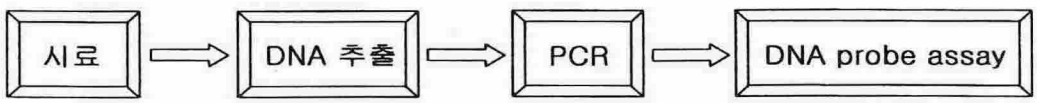
DNA probe assay comprising a microwell as solid matrix for the immobilization of streptavidin (SA) and an oligonucleotide with covalently bound fluorecein as detection probe was developed. The insolubilized SA captured the biotinylated DNA product of polymerase chain reaction (PCR), and the product was denatured under a basic condition. The remaining single-stranded DNA on the solid surface was hybridized with the probe for signal generation that was performed based on enzyme-linked immuno-reactions.

서론

Salmonella species는 여러 나라에서 식중독의 주요 원인이 되고 있으며 전 세계 식중독 사망자의 50%를 넘게 차지할 정도로 검출에 있어 중요한 병원균이다. 기존의 선택배지를 이용한 배양검출방법 (예: 콜로니 법, 면역분석법 등)은 시간과 노동력이 많이 필요로 하는 단점이 있는데 반해 유전자를 증폭하는 PCR 공정과 결합된 DNA probe 분석방법을 사용함으로써 검출시간을 단축시킬 뿐만 아니라 높은 특이성과 측정민감도를 얻을 수 있다. 이에 본 연구에서는 배양과정 없이 시료에서 원하는 *Salmonella* DNA template를 추출하여 최적조건 하에서 PCR을 수행하고 DNA 분자 포획시스템 (예: streptavidin-biotin 반응 이용)과 탐지용 DNA probe를 이용한 신속하고 정밀한 병원균 검출시스템을 개발하고자 한다.

실험설계

· 분석공정 모식도

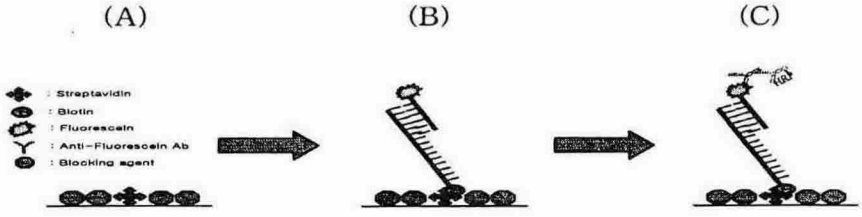


· 실험방법 및 재료

DNA 추출 및 PCR. 검사대상 *Salmonella* species의 특이 유전자인 *inv*A gene을 추출한 후 biotinylated primers를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이때 높은 측정민

감도를 얻기 위해 primer 핵산서열 및 농도, 반응온도, 그리고 마그네슘 농도 등 용액의 화학적 조건을 대상 유전자 증폭율에 대해 최적화하였다.[1] 증폭율의 결정은 microwell을 고정화모체로 사용하는 DNA probe 분석방법에 의해 수행되었다 (다음 절 참조).

DNA probe assay. Microwell 내에 SA을 물리흡착에 의해 고정화시켰다 (아래 그림, A). 이와 같이 준비된 well 내에 PCR 공정에 의해 증폭되고 size exclusion chromatography 방법에 의해 정제된 biotinylated DNA product를 가하여 biotin-SA 반응에 의해 포획하였고 NaOH 용액을 가하여 denaturation 시킨 후 탐지용 형광물질로 표지된 DNA probe를 접합시켰다 (B). 이러한 접합결합체에 형광물질에 특이한 항체를 반응시켰고 제2항체-horseradish peroxidase 중합체를 순차적으로 결합시킨 후 효소기질을 첨가하여 발색방법에 의해 분석하였다[2].



결과 및 고찰

순차적인 PCR과 DNA probe 분석방법을 통하여 배양과정을 거치지 않고도 신속하고 비교적 높은 측정민감도 (10^3~10^4 CFU/mL)를 제공하는 병원균 검출시스템을 개발하였다. PCR의 반응조건은 94℃, 20 초, 53℃, 1분, 그리고 72℃, 1 분으로 총 38 회 실행하였고 이 반응에 있어 최적 조건은 primer 50 pmol, dNTPs 200 μM, $MgCl_2$ 2 mM, annealing temperature 53℃로 결정되었다. 효소반응에 의한 발색방법에 의해 신호를 발생하는 DNA probe 분석시스템은 agarose gel 분석방법(10^4~10^5 CFU/mL)과 비교하여 10배 이상의 측정민감도 향상효과를 가져다 주었다.

참고문헌

1. PM Fratamico and TP strobaug, "Simultaneous detection of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR" (1998) Journal of industrial Microbiology&Biotechnology, 21, 92-98

2. Bernard C., "Development of Internal Controls for Probe-Based Nucleic Acid Diagnostic Assays" (1999) Anal. Biochem., 270, 249-256