大韓獸醫學會誌(1994) 第34卷 第1號
Korean J Vet Res (1994) 34(1):115-125

Polymerase chain reaction에 의한 *Salmonella*속균의 검출

박두희 • 김원용* • 김철중** • 마점술

서울대학교 수의과대학
한국과학기술연구원 유전공학연구소*
충남대학교 수의과대학**

(1994년 1월 28일 접수)

Detection of *Salmonella* species by polymerase chain reaction

Doo-hee Park • Won-yong Kim* • Chul-joong Kim • Jum-sool Mah**

College of Veterinary Medicine, Seoul National University
*Genetic Engineering Research Institute, KIST**
*College of Veterinary Medicine, Choongnam National University***

(Received Jan 28, 1994)

Abstract : In this study, we try to establish the rapid and specific detection system for *Salmonella* species. The *PhoE* gene of *Salmonella* species was amplified with two specific primers, ST5 and ST8c, using PCR. The probe prepared from the amplified *PhoE* gene was sequenced and applied for Southern blot analysis. After PCR with ST5 and ST8c primers for *PhoE* gene, DNA bands of expected size(365bp) from 7 different *Salmonella* species were detected, but not from 12 enterobacteriaceae and 3 gram positive bacteria. PCR was highly sensitive to detect up to 10fg of purified DNA template and to identify *Salmonella* species with only 320 heat-lysed bacterial cells. The inhibition of PCR amplification from stool specimen was occured with 50-fold dilution but disappeared over 100-fold dilution of samples. It was confirmed that the *PhoE* genes were amplified and cloned with over 97% nucleotide sequence homology of PCR products compared with that of *S. typhimurium* LT2. The DNA probe derived from *S. typhimurium* TA 3,000 showed highly specific and sensitive reaction with PCR products of all tested *Salmonella* species.

These results indicate that PCR was rapid and sensitive detection method for *Salmonella* species and DNA probe prepared from *S. typhimurium* TA 3,000 was specific to identify PCR products of different *Salmonella* species.

Key words : polymerase chain reaction; *Salmonella*; specific primer; *PhoE*; Southern blot : DNA probe.

서 론

*Salmonella*속균은 사람 및 동물에서 패혈증, 설사 등을 유발하는 장내 세균으로서 다섯가지 subgroup으로 크게 구분되며 그중 subgroup Ⅰ과 Ⅲ에 속하는 것이 주로 병원성을 나타낸다. Salmonella감염증은 사람에는 *S. typhi*,, 동물에는 *S. typhimurium* 및 *S. pullorum* 등을 비롯하여 여러 종류의 *Salmonella*속균에 의해 나타나며, 동물의 Salmonella감염증은 경제적인 피해를 미칠 뿐만 아니라 식육 및 오염환경을 통한 사람의 질병발생에 관련되므로 공중위생상 중요시되고 있다.

*Salmonella*속균의 진단은 크게 두가지 방법으로 구분할 수 있다. 하나는 혈액이나 분변 등으로부터 원인균을 분리확인하는 것이고, 다른 하나는 혈청학적 방법으

로 항체를 증명하는 것이다. 검사재료로부터 *Salmonella*속균을 분리동정하는 과정은 여러가지 실험단계를 거쳐 혈청형의 규명까지 하여야 하는 복잡한 과정이므로 많은 노력과 시간이 필요하다. 혈청학적방법으로서 lipopolysaccharide에 대한 ELISA 검출법[1]이 소개된 이래 여러가지 O항원에 대한 단클론항체에 의한 검출이 시도되고 있다[2-4]. 그러나 *Salmonella*속균은 혈청형별로 O항원이 각각 다르므로 여러가지 O항원에 대한 단클론항체를 만들어 사용해야 하며, 교차반응이 나타날 수도 있다. 최근 *Salmonella*속균을 micro-ELISA (Salmonella-TEK kit)로 세균수 10^4 cells/ml까지 검출할 수 있다는 보고가 있으나[5] 세균수가 적을 경우 증균과정이 필요하다. *S. typhi*의 경우 국내에서도 단클론항체를 이용한 ELISA법을 진단에 응용하고자 하는 노력이 있으나[6], 이의 민감성은 10^6 cells/ml로서 급성패혈증의 경우처럼 많은 수의 세균이 대변속에 함유되어야만 검출이 가능하다. 이와같이 세균배양법 및 ELISA에 의한 방법은 시간과 민감성에서 그 문제점이 나타나고 있다.

*S. typhimurium*은 *E. coli* K-12와 유사하게 phosphate 결핍배지에서 anion-selective porin인 *PhoE*(phosphate-limitation inducible outermembrane protein)를 발현한다[7]. 그러나, *PhoE*는 면역학적으로 다른 장내세균의 일반적인 porin과는 약간의 차이가 있으며, *E. coli*와는 달리 *S. typhimurium*의 *PhoE*는 염색체지도상의 proBA operon근처인 min 6의 위치에 존재한다[8]. *PhoE* protein은 세포막을 16번 굴곡하며 통과하는 동안 8군데의 세포표면 노출부위를 나타내게 되고 그 노출부위는 hypervariable region으로서 종 특유의 oligo를 만드는데 유리한 부위이다. *S. typhimurium* LT2 *PhoE* gene의 완전한 염기서열이 밝혀진후 세포표면 노출부위 가운데 5번째와 8번째 세포표면 노출부위의 아미노산 배열이 다른 장내세균에 비하여 변화부위가 많음에 근거하여 *Salmonella*-specific primer를 밝힌 바 있다[9,10].

PCR은 내열성 중합효소인 Taq DNA polymerase를 이용하여 검체 DNA내에 존재하는 표적염기서열을 2^n배로 증폭시키는 DNA 합성방법으로서 분자생물학 분야에서 응용범위가 넓고, 미생물의 검출에도 많이 응용되고 있다. 세균 또는 바이러스에 존재하는 고유의 특이염기서열이 밝혀져 있는 경우 이 염기서열을 표적염기서열로 사용하면 검출이 가능한 정도까지 증폭시킬 수 있음으로 극히 미량의 DNA 또는 몇개의 세균도 검체의 대상이 될 수 있다. 또한 RNA virus일 경우에도 viral RNA를 reverse transcriptase에 의하여 cDNA로 만든다음 이를 표적염기서열로 하여 RT-PCR을 시행함으로써 검출이 가능하다. 지금까지 PCR에 의한 검출법은 수많은 세균 및 바이러스에서 응용가능함이 알려졌으며, 곰팡이 및 기생충의 검출에도 응용되고 있다[11].

본 연구는 Spierings 등[10]의 연구에 근거하여 최근에 많이 응용하고 있는 PCR을 *Salmonella*속균의 검출에 활용하고자 하였다. 이를 위하여 *PhoE* gene을 증폭하였으며 PCR products를 클로닝하고 이를 DNA probe로 이용하여 Southern blotting을 통하여 신속정확하게 *Salmonella*속균을 동정하는 방법을 모색하는 한편, 염기서열 분석을 통하여 *Salmonella*속균간의 유전자적 상관성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

세균주 : Polymerase chain reaction의 특이성 및 민감성을 측정하기 위하여 사용한 *Salmonella*속 균주와 다른 장내세균 및 그람양성세균은 Table 1 및 Table 2와 같다. *Salmonella*속의 표준균주로서 *S. typhimurum* TA 3,000을 사용하였으며, 그외 사람, 돼지 및 닭으로부터 분리한 7종 32주의 *Salmonella*속균을 사용하였다. *Salmonella*속균외의 장내세균 및 그람양성세균은 한국과학기술연구원 유전공학연구소에 있는 KCTC(Korean Collection for Type Culture)의 표준균주를 사용하였다.

Cloning vector : PCR products를 클로닝하기 위한 vector plasmid로 pUC19유례의 pBluescript II SK(+) (Stratagene), host cell로 *E. coli* XL1-Blue를 transformation에 사용하였다.

Oligonucleotide primer의 합성 및 정제 : Spiering[10]의 연구를 토대로 다음과 같이 PCR을 위한 primer를 합성하였다(ST5 : 5'-AGCGCCGCGGTACGGGCGAT-AAA-3'(23mer), ST8C : 5'-ATCATCGTCATTAAT-GCCTAACGT-3'(24 mer)). oligonucleotide primer는 DNA synthesizer(Pharmacia)를 이용하여 합성하였으며, 합성한 oligonucleotide는 SEP-PAK column (Waters)을 이용하여 정제하였다.

Polymerase chain reaction(PCR) : PCR반응은 검체 DNA 10μl에 200μM의 dNTP(Pharmacia)와 ST5 및 ST8c primer(10μM)를 함유한 PCR 완충액 [10x; 100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$, 0.1% gelatin(w/v)]을 가하여 AmpliTaq DNA polymerase(Perkin Elmer Cetus) 1μl(2.5 units)를 첨가한 다음, automated thermal cycler(DNA thermal cycler 480, Perkin Elmer Cetus)로 검체 DNA의

Table 1. *Salmonella* strains

Strains	Origin	Number of tested	Serogroup	Source
S. typhimurium TA 3,000		1	B	Vet. Med. S.N.U.
S. typhimurium 0901		1	B	Vet. Med. S.N.U.
S. derby		1	B	Vet. Med. S.N.U.
S. typhimurium	human	15	B	Vet. Med. S.N.U.
S. typhimurium	pig	6	B	Bayer Vetchem
S. pullorum	chicken	7	D	Bayer Vetchem
S. enteritidis	chicken	1	D	Bayer Vetchem
S. pullorum-gallinarum	chicken	1	D	Bayer Vetchem
S. gallinarum	chicken	1	D	Bayer Vetchem
S. typhi		1	D	GERI/KIST

Table 2. Non-*Salmonella* strains

Strains	Source
E. coli XL1-Blue	*recAl, endAl, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relAl, lac, [F'proAB, lacI^{q}Z △M15, Tn10(tet^i)]*
E. coli	KCTC 1682, 2597 ATCC 25922
Enterobacter cloacae	KCTC 2361
Klebsiella pneumoniae	KCTC 2208
Pseudomonas aeruginosa	KCTC 2004
Serratia marscence	KCTC 2172
Shigella flexneri	KCTC 2008
Staphylococcus aureus subsp. aureus	KCTC 1621
Staphylococcus epidermidis	KCTC 1917
Bacillus subtils	KCTC 1021
Enterococcus lactis	KCTC 1913
Proteus vulgaris	KCTC 2579
Citrobacter freundii	KCTC 2006

amplification을 시행하였다. 이때 증폭 cycle의 회수는 1단계에 29-34 cycles, 2단계에 1 cycle로서 총 30-35 cycle로 하였으며, 1단계의 cycle은 매 cycle당 94℃에서 40초간 denaturation, 45℃에서 90초간 primer annealing, 72℃에서 60초간 extension의 순으로 반응을 진행하였다. 2단계의 cycle은 1단계보다 시간을 연장하여 45℃에서 2분, 72℃에서 6분간 반응하였으며, 1.6% agarose gel로 TAE buffer(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.0)하에서 전기영동하여 target sequence의 증폭여부를 검사하였다.

Polymerase chain reaction의 특이성 및 민감성 검사

1) 세균의 genomic DNA 분리

세균의 genomic DNA분리는 Murray 등[12]의 방법에 따라 분리하였다. 즉, 각 균주를 LB broth 5ml에 접종하여 하룻밤동안 진탕배양한 후, 1.5ml을 원심분리하여 균체를 침전시키고 배지성분을 제거하였다. 이 침전균체에 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0) 567㎕를 가하여 재 부유한 다음, 10% SDS 30㎕와 proteinase K(20mg/ml in DW) 3 ㎕를 가하여 37℃에서 1시간 처리로 세포막을 파괴하였다. 세포성분, LPS 및 단백질 성분을 제거하기 위하여 5M NaCl용액을 100㎕, CTAB/NaCl용액(10% CTAB in 0.7M NaCl) 80㎕를 가하여 65℃에서 10분간 반응한다음, 동량의 C/I(chloroform:isoamylalcohol=24:1) 및 P/C/I (phenol:chloroform:isoamylalcohol=25:24:1)를 가하고 6,000xg에서 10분간 원심분리하여 단백질 성분을 완전히 제거하였다. 순수한 DNA를 함유하는 상층액은 새

로운 tube로 옮겨 0.6배량의 isopropanol을 가하여 DNA를 침전하였다. DNA침전물은 70% ethanol로 세척하고 실온에서 건조한 후 TE buffer(pH 8.0)로 녹여 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 특이성 검사

primer의 특이성을 확인하기 위하여 표준균주 *S. typhimuirum* TA 3,000과 15주의 장내세균 및 그람양성균으로부터 genomic DNA를 순수 분리하여 동일한 조건하에서 PCR ampification을 시행한 다음, 1.6% agarose gel에서 전기영동하여 *Salmonella*속균의 특이 증폭산물인 365bp의 DNA절편을 검사하였다.

3) 민감성 검사

PCR에 의하여 검출가능한 DNA의 최소량을 알아보기 위하여 *S. typhimuirum* TA 3,000의 genomic DNA를 순수분리한 다음, 양을 달리하여 1μg, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg 및 1fg으로 단계희석한 후 PCR에 적용하였다. 또한, PCR검색을 통하여 *S. typhimuirum* TA 3,000균의 검출가능한 최소 세균수를 측정하기 위하여 LB broth에서 배양한 세균을 생리식염수로 세척한 다음, 증류수로 균부유액을 만들어 흡광도(A_{600})=0.4(1x10^8 cells/ml)로 균수를 조정하고 증류수로 희석하여 10μl당 균수를 10^8, 10^6, 2x10^5, 4x10^4, 8x10^3, 1.6x10^3, 3.2x10^2, 6.4x10^1 및 10^0로 한 다음, 각 균액을 95℃에서 10분간 가열하여 용균시킨 후 PCR amplification을 시행하였다.

4) 분변성분의 PCR 증폭억제능 검사

분변에서 직접 *Salmonella*속균을 검출할 경우 분변성분중에 함유하는 PCR증폭억제물질에 의한 PCR증폭억제정도를 알아보기 위하여 돼지의 정상분변 1g을 PBS 5ml에 부유하고 이를 50배, 100배, 200배, 400배 및 800배로 단계희석하여 앞에서와 같은 방법으로 PCR ampification에 적용하였다.

PCR products의 클로닝 :

1) 정제 및 Klenow 처리

PCR products를 정제하기 위하여 mineral oil을 제거한 다음, 증류수로 미리 세척한 centricon(millipore, MWCO : 30,000)에 넣고 5,500 rpm에서 5분간 원심분리 하여 과다한 primer와 dNTP를 제거하였다. centricon에 남은 용액은 동량의 P/C/I(phenol:chloroform:isoamylalcohol=25:24:1) 및 C/I (chloroform:isoamylalcohol=24:1)로 차례로 추출하여 단백질성분을 완전히 제거하고, 0.1배량의 3M sodium acetate용액(pH 4.5)과 2.5배량의 ethanol을 가하고 -70℃에서 2시간 이상 정치한 후 15분간 원심분리하여 정제된 PCR products를 회수하였다. 회수한 DNA는 증류수 10μl에 녹이고 2μl의 10x ligase buffer(300mM Tris-HCl pH 7.8 100mM $MgCl_2$, 100mM DTT, 5mM ATP), dNTP(final 0.2mM), Klenow enzyme(5units), T4 polynucleotide kinase (4units) 및 T4 DNA ligase(2units)를 차례로 가하고 증류수를 첨가하여 최종 25μl로 조정한 다음, 25℃에서 2시간 반응하여 filling과 kination을 동시에 실시하였다.

2) Ligation

pBluescript II SK(+) vector를 Sma I (Toyobo)으로 절단하고 여기에 insert DNA를 blunt end ligation하였다. 즉, end filling과 kination한 PCR products(200ng)를 P/C/I(phenol : chloroform : isoamylalcohol=25:24:1)로 추출한 다음, 500ng의 vector DNA를 넣어 ethanol로 침전하였다. 이를 70% ethanol로 세척하여 건조한 다음, 7μl의 증류수로 녹이고 여기에 10x ligase buffer, T4 DNA ligase(10 units) 및 Sma I (10 units)을 각 1μl씩 첨가하여 16℃에서 5시간동안 반응함으로써 ligation하였다.

3) Competent cell의 처리 및 transformation

transformation을 위한 competent cell은 Hanahan[13]의 방법에 따라 제조하였으며 eppendorf tube에 100μl씩 분주하여 LN_2로 snap-freezing한 후 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

transformation은 competent cell 100μl에 ligation mixture 10μl를 가하여 잘 혼합하고 얼음위에서 40분간 방치한 후 42℃에서 90초간 heat shock을 준 다음 SOC배지 900μl를 가하여 37℃에서 1시간 배양하였다. 이 배양액은 ampicillin(50μg/ml), IPTG 및 X-gal을 함유하는 LB agar plates에 spreading하고 다시 12-16시간 배양한 후 screening하였다. 원하는 insert가 삽입된 재조합 plasmid를 확인하기 위하여 alkaline lysis법[15]으로 plasmid DNA를 분리한 다음, EcoR I과 Xba I (Promega)으로 절단하고 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 insert의 크기를 확인하였다.

Southern blotting : 클로닝한 DNA절편을 probe로 이용하여 PCR products를 확인하고, 아울러 *Salmonella*속균간의 분자진화적 유전자상동성을 조사하기 위하여 enhanced chemiluminescence(ECL)-DNA labelling and detection system(Amersham, U.K.)을 이용하여 Southern blotting을 실시하였다.

1) Capillary transfer

PCR products를 전기영동한 gel을 depurination용액(0.25M HCl)에 담가 Red Rotor(Hoefer, U.S.A.)로 30분동안 천천히 진탕후 증류수로 세척하고,

denaturation용액(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)에서 30분간 반응하였다. 반응 후 gel상에 0.4M NaOH용액에 5분간 담가둔 Hybond-Nylon(N^+) membrane (Amersham, U.K.)을 얹어 0.4M NaOH 용액을 통하여 capillary blotting[14]으로 DNA가 membrane으로 이동하게 한 다음, 고정과정을 거치지 않고 바로 hybridization반응에 사용하였다.

2) Probe DNA의 표지

probe DNA는 클로닝된 *S. typhimurium* TA 3, 000의 PCR products를 염기서열 분석을 통해 그 배열을 확인하고 이를 probe DNA로 이용하였다. 순수하게 분리정제한 재조합 plasmid DNA를 EcoR I과 Xba I으로 절단하고 agarose gel에서 전기영동한 다음, Geneclean II kit(Bio101, U.S.A.)를 이용하여 gel로부터 insert를 elution하였다. elution한 DNA를 표지하기 위하여 DNA 200~300ng을 100℃에서 5분간 끓여 denature하고 얼음위에 5분간 두어 냉각한 다음, ECL-system내의 DNA labelling reagent용액과 glutaraldehyde용액을 같은 양으로 첨가하고 37℃에서 10분간 반응하여 probe DNA에 horseradish peroxidase가 결합되게 하였다.

3) Hybridization

Hybaid™ minioven bottle(Hybaid, U.S.A.)에 membrane과 hybridization buffer 5ml을 넣고 42℃에서 천천히 회전시켜 1시간 동안 prehybridization한 다음, labelling한 probe DNA와 hybridization buffer를 섞어 42℃에서 8시간 이상 반응하여 hybridization하였다. 반응이 끝난 blot은 1차세척액(urea 360g, SDS 4g, 20x SSC 25ml/L H_2O)으로 42℃에서 5분간 2회, 2차 세척액(2x SSC)으로 가볍게 1회 세척한 다음, ECL-DNA labelling and detection system내의 detection solution I과 II를 동일 부피로 혼합하여 실온에서 1분간 blot에 처리하고 과다한 detection용액을 제거하였다. 이와같이 처리한 blot은 Hyperfilm-ECL (Amersham, U.K.)에 실온에서 30초-10분간 노출하고 film은 X-ray film processor(Konica Qx-40, Japan)에서 현상하였다.

DNA sequencing : DNA 염기서열 분석은 Sanger 등[15]의 dideoxy nucleotide chain termination method를 이용하였으며, sequencing반응은 Sequenase Version 2.0(USB, U.S.A.)을 사용하였다.

1) Template DNA의 정제

insert를 확인한 각 clone으로부터 alkaline lysis법[16]에 의하여 plasmid DNA를 분리한 다음, PEG용액(20% PEG 6,000, 2.5M NaCl)으로 처리하여 염기서열 분석을 위한 template로 사용하였다.

2) DNA sequencing

template인 doulble strand plasmid DNA를 denaturation하기 위하여 DNA용액(3-5μg) 18μl에 2N NaOH용액 2μl를 가하여 실온에서 5분간 반응한 다음, 5M ammonium acetate 8μl와 95% ethanol 100μl를 첨가하여 dry ice-ethanol bath에서 침전하고 건조하였다. 여기에 증류수 7μl, sequencing reaction buffer(40mM Tris-Cl pH 7.5, 20mM $MgCl_2$, 50mM NaCl) 2μl, pUC/M13 forward 또는 reverse primer(0.5pmole) 1μl를 첨가하고 65℃에서 2분간 가열한 다음, 35℃이하까지 실온에서 서서히 annealing하였다. 여기에 diluted labeling mix(1.5μM each dGTP, dATP, dTTP, dCTP) 2μl, 0.1M DTT solution 1μl, [α-^{35}S] dATP 0.5μl를 첨가하고 잘 혼합한 다음, diluted sequenase(1:8 in DW) 2μl를 첨가하여 4분간 labelling하였다. labelling이 끝난 후 미리 37℃로 가온한 각 termination mix(ddG, ddA, ddT, ddC)에 3.5μl씩 분주하고 37℃에서 5분간 반응하여 termination한 다음, 여기에 stop solution(95% formamide, 20mM EDTA, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol) 4μl를 첨가하여 모든 반응을 정지하였다. 이를 loading하기전에 75℃에서 2분간 가열한 다음, 6% polyacrylamide-8M urea gel에서 40W로 5-7시간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 Whatman 3MM paper로 옮겨 gel dryer로 말린다음, X-ray film(Kodak XAR-2)을 넣고 실온에서 1-5일간 노출시켜 암실에서 현상하고 365bp의 염기서열을 분석하였다.

결 과

***Salmonella* genomic DNA의 PCR amplification** : Polymerase chain reaction의 최적 반응조건을 결정하기 위하여 온도, 시간, 그리고 Mg^+이온의 농도에 대한 예비실험을 하였다. denaturation은 94℃에서 40초, annealing 45℃에서 1분 30초, extension은 72℃에서 60초로 시행하였을 때 가장 적절한 온도와 시간이었다. Mg^+이온의 적정온도는 15mM이었으며, 농도를 높이면 비특이적인 산물이 나타나고, 낮게하면 산물의 양이 줄어 들었다. primer의 농도를 너무 높게하거나 dNTP를 너무 많이 사용할 경우에도 비특이적인 산물이 나타남을 알 수 있었고, 너무 적게 사용할 경우에는 증폭산물이 나타나지 않는 결과를 나타내었다.

*Salmonella*속균 7종 32주의 genomic DNA를 순수분

리하여 정량한 다음 100ng씩을 PCR에 적용하고 1.6% agarose gel에서 전기영동한 결과, 모든 *Salmonella*속균에서 같은 365bp크기의 단일 증폭산물이 나타남을 확인할 수 있었다(Fig 1).

Primer의 특이성 : ST5 및 ST8c primer의 *Salmonella*속균에 대한 특이성을 확인하기 위하여 *S. typhimurium* TA 3,000균주와 *Salmonella*속균이외의 장내세균 8종 및 그람양성세균 3종으로부터 추출한 각 genomic DNA를 PCR로 증폭시킨 후 1.6% agarose gel에서 전기영동하였다(Fig 2). 그 결과 *S. typhimurium* TA 3,000은 예측하였던 365bp의 위치에 증폭산물을 나타내었으며, 이와 같은 크기의 증폭산물은 다른 어떤 균종에서도 나타나지 않아 ST5 및 ST8c primer는 *Salmonella*속균에만 특이적으로 증폭산물을 생성하는 primer임을 알 수 있었다.

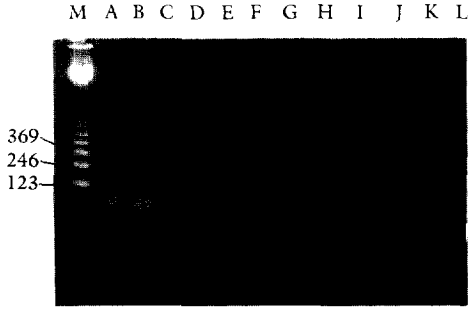

Fig 1. PCR amplification of genomic DNA of *Salmonella* spp. Lanes : A, *S. typhimurium* TA 3,000; B, *S. typhimurium* O901 C, *S. typhimurium*(human); D, *S. typhimurium*(pig); E, *S. pullorum*(chicken); F, *S. enteritidis*; G, *S. derby*; H, *S. pullorum-gallinarum*; I, *S. typhimurium*; J, *S. typhi*; K, *S. dublin*; L, negative control; M, 123bp DNA ladder(BRL).

Fig 2. PCR amplification of genomic DNA of *S. typhimurium* and other species of bacteria. Lanes : A, negative control; B, *S. typhimurium* TA 3,000; C, *E. coli* KCTC 1682; D, *E. coli* KCTC 2597; E, *E. coli* ATCC 25922; F, *En. cloacae* KCTC 2361 G, *K. pneumoniae* KCTA 2208; H, *P. aeruginosa* KCTC 2004; I, *S. marscence* KCTC 2172; J, *S. flexneri* KCTC 2008; K, *C. freundii* KCTC 2006; L. *S. aureus* KCTC 1621; M, *S. epidermidis* KCTC 1917; N, *B. subtilis* KCTC 1021; O, *Enterococcus lactis* KCTC 1913; P, *P. vulgaris* KCTC 2579; Q. *S. typhimurium* KCTC TA 3,000; Ml. pBR322/Hae Ⅲ

Polymerase chain reaction의 민감성 : PCR에 의하여 검출가능한 DNA의 최소량을 알아보기 위하여 *S. typhimurium* TA 3,000균주의 genomic DNA를 각각 1μg, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg, 1fg으로 단계희석한 후 PCR에 적용한 결과 육안으로 검출가능한 DNA최소량은 1pg이었다(Fig 3).

PCR검색을 통해 검출가능한 최소 세균수를 측정하기 위하여 10μl의 검체내에 *S. typhimurium* TA 3,000의 균수를 10^8, 10^6, $2x10^5$, $4x10^4$, $8x10^3$, $1.6x10^3$, $3.2x10^2$, $6.4x10^1$ 및 10^0으로 희석한 각 균액을 95℃에서 10분간 가열하여 용균시킨 후 PCR을 시행한 결과 검출가능한 최소세균수는 약 320개이었다(Fig 4).

분변성분의 PCR 증폭억제정도를 알아보기 위하여 분변을 희석하여 PCR 증폭실험을 한 결과, 100배 이상의 희석배수에서는 증폭억제가 일어나지 않았으나, 50배 이하의 희석배수에서 증폭억제현상이 관찰되었다(Fig 5).

PCR products의 클로닝 : pBluescript Ⅱ SK(+) vector의 MCS부위의 Sma Ⅰ 위치에 PCR products를 blunt end ligation하고 Sma Ⅰ 인식부위 바깥의 EcoR Ⅰ과 Xba Ⅰ으로 절단하여 insert의 크기를 확인하였다. 그 결과 370bp정도의 크기를 나타내는 clone 17개를 확인하였으며 이들 중 대표적인 7개의 clone을 염기서열분석에 이용하였다.

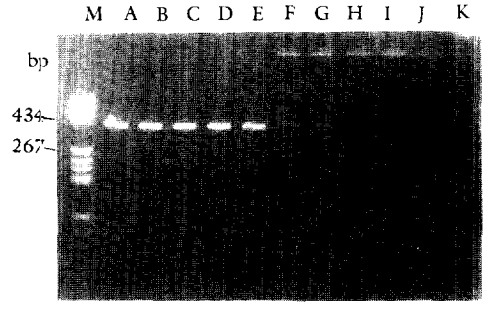

Fig 3. Detection limit of PCR amplification of *S. typhimurium* DNA. Lanes: A-J, serially 10-fold diluted *S. typhimurium* DNA, concentration of 1μg, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg, 1fg, respectively; K, negative control; M, pBR322/Hae Ⅲ

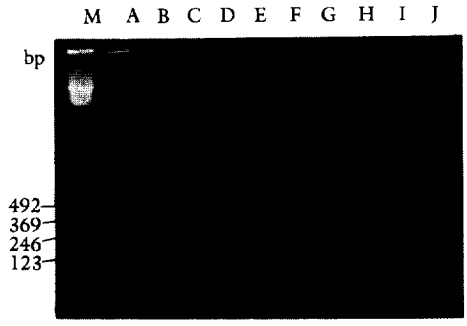

Fig 4. Detection limit of PCR amplification of heat-lysed *S. typhimurium*. Lanes: A-J, the number of bacteria, 10^8, 10^7, 10^6, $2x10^5$, $4x10^4$, $8x10^3$, $1.6x10^3$, $3.2x10^2$, $6.4x10^1$, 10^0, respectively; K, negative control; M, 123bp DNA ladder(BRL).

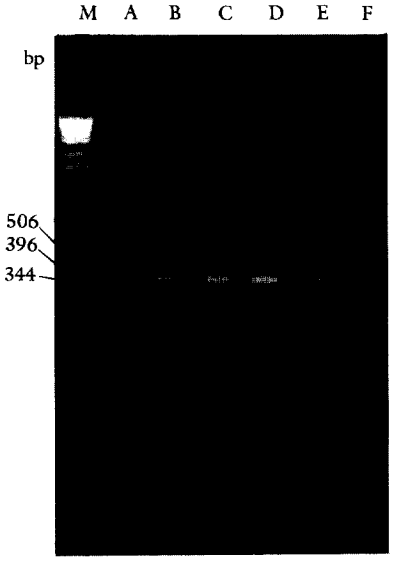

Fig 5. PCR amplification of *S. typhimurium* mixed with serially dilluted stool component. Lane : A, 50-fold dilution; B, 100-fold dilution; C, 200-fold dilution; D, 400-fold dilution, E, 800-fold dilution; F, negative control; M, 1 kb DNA ladder(BRL).

Southen blotting : PCR에 의한 검출의 민감성을 더욱 높이고 PCR products를 확인함으로써 *Salmonella*속균을 동정하기 위하여 *S. typhimurium* TA 3,000유래의 DNA probe를 이용하여 Southern blotting하였다. 먼저 민감도를 비교하기 위하여 ethidium bromide에 의한 염색법 및 Southern blotting으로 검출할 수 있는 genomic DNA의 양을 알아보았다. 그 결과 ethidium bromide에 의한 염색법으로 검출할 수 있는 최소 DNA의 양은 1pg이었으나, Southern blotting으로는 10fg까지 검출할 수 있어, 최소 100배이상 민감한 것으로 나타났다(Fig 6). *S. typhimurium* TA 3,000유래의 DNA probe를 이용하여 다른 *Salmonella*속균을 검출할 수 있는가를 알아보기 위하여 6종의 다른 *Salmonella*속균으로 부터 genomic DNA를 분리하여 PCR amplification한 후 Southern blotting한 결과, 다른 *Salmonella*속균의 PCR products와 모두 특이적으로 양성반응하였다(FIg 7).

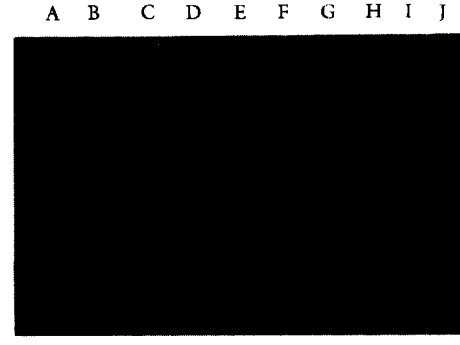

Fig 6. Southern blot analysis of PCR products with ECL-labelled *S. typhimurium* TA 3,000 probe. Lanes: A-J, serially 10-fold diluted *S. typhimurium* DNA, conceneltration of 1μg, 100ng, 10ng, 1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg, 1fg, respectively

염기서열분석 : *S. typhi*, *S. typhimurium* TA 3,000, *S. derby*, *S. pullorum*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum* 및 *S. pullorum-gallinarum* 등 7종의 species으로 부터 유래한 각 PCR products의 재조합clone으로부터 pUC/M 13 forward 및 reverse primer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 분석한 각 clone의 염기서열을 Spierings 등[10]이 밝힌 *S. typhimurium* LT12의 염기서열과 비교하였을 때 모두 97%이상의 높은 유전자 상동성을 나타내었다(Fig 8). 본 실험에서 PCR로 증폭되지 않았던 다른 장내세균의 *PhoE* gene에 해당하는 염기서열을 GenBank Database와 비교분석한 결과, *C. freundii* (85%), *K. oxytoka*(78%), *E. coli*(77%), *En. cloacae*(76%) 등의 *PhoE* gene과 일부 동일한 염기서열을 나타내었다 (Table 3).

고 찰

*Salmonella*속균의 배양에 의한 검출법은 증균과정을

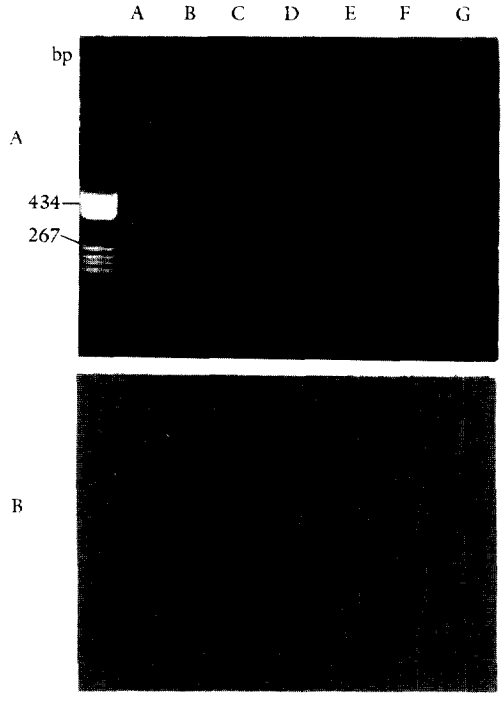

Fig 7. Southern blot analysis of PCR products with ECL-labelled *S. typhimurium* TA 3,000 probe. Panal: A;, agarose gel electrophoresis pattern,. Panal B; Southern blot analysis : Lanes: A *S. typhimurium*; B, *S. pullorum*; C, *S. enteritidis*; D, *S. derby*; E, *S. gallinarum*; F, *S. typhi*; M, pBR322/HaeⅢ

거쳐 선택배지에서 의심되는 집락을 선택하고 이의 생화학적 성상을 확인하여야 한다. 이 과정은 많은 노력을 필요로 하며 최소한 2-3일이 소요된다. 또한 생존상태이나 배양이 불가능한 세균을 배양법으로 검출할 수 없으며[17], ELISA에 의한 검출방법은 소수의 세균을 검출하기에는 민감성이 떨어지므로[5] 좀더 신속하고 민감하며 정확한 검출법이 필요하다.

PCR을 미생물의 검색목적으로 사용할 경우 대상 미생물의 특정 유전자 또는 특정 DNA 염기서열을 선택적으로 증폭시킴으로써[18] 검체내에 존재하는 매우 적은 수의 미생물도 쉽게 찾아낼 수 있기 때문에 민감성 높은 미생물 감염 진단법에 활용할 수 있다. PCR에 의한 검출은 특이적인 유전자를 2^n로 증폭시키므로 그 자체로도 ELISA 등의 면역학적인 방법보다 예민하다. 부가하여 Southern blotting 또는 dot blotting함으로써 더욱 높은 민감성을 얻을 수 있으며 특이 DNA를 probe로 사용하므로 증폭산물이 정확한가를 확인할 수 있다. 본 실험의 경우에도 세균수가 많은 가검물일 경우에는 간편한 가열용균법에 의하여 *Salmonella*속균을 검출할 수 있었으나 균수가 적을 경우에는 DNA를 순수분리하여 PCR을 시행하는 것이 적절한 것으로 생각되었으며, 아울러 Southern blotingt할 경우는 더욱 민감성이 증가하였다. 최근에 DNA를 표지하는 방법이 발전되어 방사성 동위원소 대신 digoxygenin, ECL 등을 이용할 수 있게 되었다. 본 실험에서는 ECL을 사용하여 probe DNA를 표지하였는데 이 방법은 간단하고 노출

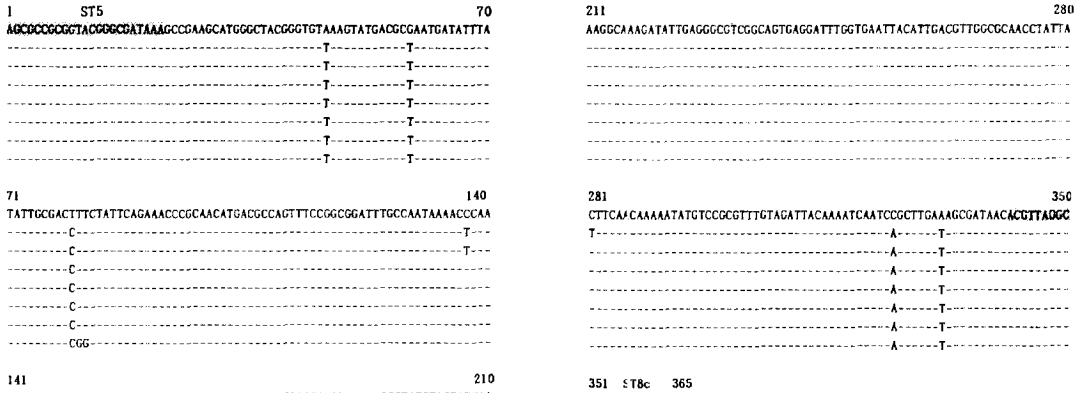

Fig 8. Alignments of the PCR products within *Salmonella* species.
∗ : Sequence from Spiering et al[10].

Table 3. Homology of *PhoE* gene sequence between *Salmonella* species and other enterobacteriaceae compared with *S. typhimurium* LT2

Strains	Homology	%	Reference
S. typhi	355/365	97.2%	seq
S. typhimurium(pig)	362/365	99.2%	seq
S. derby	356/365	97.5%	seq
S. pullorum	355/365	97.2%	seq
S pullorum-gallinarum	355/365	97.2%	seq
S. gallinarum	355/365	97.2%	seq
S. enteritidis	358/365	98.0%	seq
C. freundii	308/360	85.0%	GB
K. oxytoka	274/347	78.0%	GB
E. coli	280/362	77.0%	GB
En. cloacae	276/360	76.0%	GB
K. pneumoniae	276/360	76.0%	GB

seq : sequenced *PhoE* gene in this study
GB : GenBank database

시간이 짧아 편리 하였다. PCR에 의한 검출은 반응시간 4-5시간에 Southern blotting 10-12시간을 더하여 14시간이면 확실한 결과를 알 수 있으므로 시간을 절약할 수 있다. Southern blotting을 하지 않아도 전기영동을 통해 증폭산물의 크기를 비교함으로써 결과를 해석할 수 있으므로 PCR에 의한 검출방법은 민감성과 시간적인 면에서 다른 검출법보다 훨씬 유리하며, 많은 가검물의 검사에도 편리하다[19].

*Salmonella*속균의 유전적 상관성을 규명하고 이를 바탕으로 클로닝한 PCR product중 DNA probe로서 이용가능한 clone을 얻기 위하여 염기서열을 결정하였다. 클로닝하는 과정중 ligation반응시에 Sma I 제한효소를 첨가하여 vector의 재결합을 방지하였는데, 이방법은 일반적인 phosphorylation에 의한 방법보다 효율적으로 vector와 insert를 ligation하며 특히 blunt end ligation시에 유리한 방법으로 생각된다. 7종의 *Salmonella*속균의 PCR products를 클로닝하고 각 염기서열을 비교한 결과, 조금씩의 차이는 있으나 모두 97% 이상의 유전자 상동성을 나타내어 PCR로 부터 증폭된 부위는 *Salmonella*속균의 공통부위로 인정되었다. 또한 클로닝한 PCR products는 모두 염기서열을 분석, 확인하였으므로 특이 probe로 사용가능할 것으로 판단된다.

PCR에 의한 검출의 단점은 증폭된 DNA산물의 오염에 기인한 위양성의 출현[20]과 분변이나혈액 등과 같은 가검물재료에 함유된 증폭억제물질[20-24]에 의하여 민감성이 낮아질 수 있다는 점이다. 첫째, 증폭과정에서 부주의로 인한 비특이적인 PCR 증폭산물이 나타나는 경우가 있음을 유의해야 하는데 본 실험에서는 증폭된 DNA나 template DNA가 PCR 반응액에 오염됨으로써 나타날 수 있는 위양성을 배제하기 위하여 PCR에 사용한 모든 시약을 다른 냉동실 또는 냉장고에 격리 보관하였으며, micropipette을 비롯한 모든 기구를 따로 전용하는 한편, PCR을 시행하는 실험실과 증폭산물을 다루는 실험실을 따로 이용하였다. 그리고 매번 PCR을 시행할 때마다 검체 DNA 대신에 증류수의 음성대조군을 동시에 처리하여 위양성 반응의 출현이 없음을 확인하였다. 둘째, 증폭억제물질의 영향을 받지 않으려면 분변가검물의 경우 이를 희석해야하는 단점이 있는데 분변중의 균을 검출할 목적으로 정상 돼지분변을 PCR 반응액에 차례로 희석, 첨가하여 검체 DNA를 증폭한 결과 100배이상의 희석배수에서는 증폭억제현상이 일어나지 않았으나 약 50배 이하의 희석배수에서 증폭억제현상이 일어났다. 다른 연구자에 따르면 설사분변에는 혈액성분과 담즙성분이 함께 나타나므로 이에 의하여 증폭억제현상이 더욱 심화된다고 한다[25-27]. Marae 등[24]의 보고에 따르면, 사람의 설사분변은 500배 이상 희석해야 한다고 한다. 따라서 분변재료로부터 세균 및 바이러스 검출에 PCR법을 적용하려면 분변중의 증폭억제물질을 고려하여 이를 어떻게 처리할 것인가에 관한 연구가 더 진행되어야 한다.

ELISA를 이용하여 물, 음식물 등에서 *Salmonella*속균을 검출하려는 연구[4,28]가 진척되어 어느정도 만족할 만한 성과를 거두었으나 이의 민감도는 10^4 cells/ml의 수준이며, fluorescence andtibody test로는 10^3cells/ml까지 검출가능하였다고 한다[17]. 최근 하수를 filter unit으로 농축하고 이에서 직접 DNA를 분리한 다음 DNA probe를 이용하여 dot blotting으로약 100pg의

DNA를 검출가능 하다고 하였다[29]. 본 실험의 결과를 이들의 성적과 비교하면 100배 이상 민감성이 높다.

이와 같이 PCR에 의한 검출은 신속하고, 민감한 검출법이나 다만, 혈액, 분변, 뇨 등의 가검물에서 직접 검출시에 나타나기 쉬운 증폭억제현상을 효과적으로 극복할 수 있는 방안이 제시된다면 *Salmonella*속균 뿐만 아니라 기타 장내병원성 미생물의 검출에도 응용가능할 것이다.

결 론

*Salmonella*속균을 신속하고 특이적으로 검색하는 방법으로서 Polymerase chain reaction을 활용하고자 *PhoE* gene을 ST5 및 ST8C primer를 사용하여 PCR법으로 DNA를 amplification하고 특이성을 증명하였으며, Southern blotting, 염기서열분석 등의 실험을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PCR에 사용한 ST5 및 ST8C primer는 *Salmonella*속균 7종에서 *Salmonella*특이적인 365bp의 증폭산물을 나타내었으나, *Salmonella*속균이외의 장내세균 12종 및 그람양성균 3종에서는 증폭산물을 나타내지 않았다.

2. PCR법으로 검출가능한 정제 DNA량은 10fg이었으며, 세균수는 최소 320개만 있어도 검출할 수 있는 높은 민감도를 나타내었다.

3. 분변성분에 의한 PCR 증폭억제정도를 실험한 결과 분변희석 100배이상에서는 증폭억제가 일어나지 않았으나 50배 이하에서는 증폭억제현상이 일어났다.

4. *Salmonella*속균의 PCR 증폭산물을 각각 cloning하고 염기서열을 분석하여 *S. thphimurium* LT2의 염기서열과 비교한 결과 97%이상의 유전자 상동성을 나타내었으므로 *Salmonella*속균 특이적인 *PhoE* gene clone임을 확인하였다.

5. *S. typhimurium* TA 3,000의 *PhoE* gene clone을 DNA probe로 이용하여 *Salmonella*속균의 PCR products와 Southern blotting한 결과 특이적으로 민감하게 반응하였다.

참 고 문 헌

1. Rigby CE. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of salmonella lipopolysaccharide in poultry specimens. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47: 1327-1330.
2. Lee Ha, Wyatt GM, Bramham S, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella typhimurium* in food : Feasibility of 1-day *Salmonella* detection. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 1541-1546.
3. Torensma R,Visser, MJC, Aarsman, CJM, et al. Monoclonal antibodies that detect live *salmonella*. *Appl Environ Microbiol* 1990; 58: 3868-3872.
4. Araj GF, Das Chugh T. Detection of *Salmonella* spp. in clinical specimens by capture enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2150-2153.
5. Lieve SG, Van Poucke. *Salmonella*-TEK, a rapid screening method for *Salmonella* species in food. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 924-927.
6. 국윤호, 박정규, 임동균등. 단세포군항체를 이용한 *Salmonella typhi*의 신속한 탐지법 개발 및 임상검체에의 적용시험. 대한미생물학회지 1989; 24: 247-258.
7. Bauer K, Benz R, Brass J, et al. *Salmonella typhimurium* contains an anion-selective auter membrane porin induced by phosphate starvation. *J Bacteriol* 1985; 161: 813-816.
8. Singh SP, Upshaw Y; Abdullah T, et al. Structural relatedness of enteric bacterial porins assessed with monoclonal antibodies to *Salmonella typhimurium* OmpD and OmpC.*J Bacteriol* 1992; 174: 1956-1973.
9. Spierings G, Hofstra H, Huis in Veld J, et al. Development of enterobacterium-specific oligonucleotide probes based on the surfaceexposed region of outer membrane proteins. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55: 250-252.
10. Spierings G, Ockhuijsen C, Hofstra H, et al. Characterization of the *Citrobacter freundii PhoE* gene and developement of *C. freundii*-soecific oligonucleotides. *FEMS-Microbiol-Lett.* 1992; 99: 199-204.
11. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, et al. Diagnostic Molecular Microbiology-Principles and Application. America society for microbiology. Washington, D.C. 1993; 51-87.
12. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* 1980; 8: 4321-4325.

13. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.*J Mol Biol* 1983; 166: 557-580.
14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. 2nd ed. Cold spring harbor laboratory, 1989.
15. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors.*Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
16. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screeing recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1513..
17. Desmonts C., Jacques M, Rita C, et al. Fluorescent-antibody method useful for detecting viable but nonculturable *Salmonella* spp. in chlorinated wastewater. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 1448-1452.
18. Saiki RK, Gelfand DH, Stofel S, et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
19. 조상래, 이태윤, 윤경한 등. 중합효소 연쇄반응을 이용한 가검물내 *Mycobacterium tuberculosis*의 검출. 대한미생물학회지 1990; 25: 491-499.
20. Cone RW, Hobson AC, Huang MLW, et al. Polymerase chain reaction decontamination: the wipe test. *Lancet* 1990; 336: 686-687.
21. Kitchin PA, Szotyori Z, Fromholc C, et al. Avoidance of false positives. *Nature* 1990; 344: 201.
22. Sarkar G, Sommer SS. Shedding light on PCR contamination. *Nature* 1990; 343: 27.
23. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1990; 339: 237-238.
24. Myra N, Widjojoatmodjo et al. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal samples. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3195-3199.
25. Gerritsen MJ, Olihoek T, Smiths MA, et al. Sample preparation method for polymerase chain reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira interogans* serovar hardjo subtype hardjobovis in bovine urine. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2805-2808.
26. Grimprel E, Sanchez PJ, Wendel JD, et al. Use of polymrase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect *Treponema pallidum* in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1711-1718.
27. Wilde J, Eiden J, Yolken R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1300-1307.
28. Luk JMC, Lindberg AA. Rapid and sensitive detection of *Salmonella*(O:6,7) by immunomagnetic monoclonal antibody-based assays. *J Immunol Methods* 1991; 137: 1-8.
29. Knight IT, Shults S, Kaspar CW, et al. Direct detection of *Salmonella* spp. in estauries by using a DNA probe. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 1059-1066.