KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 28, No. 6, pp. 1001~1008(1996)

중합효소 연쇄반응에 의한 식중독성 황색포도상구균의 신속한 검출

김은선* · 전덕영
*전남대학교 생물학과, 전남대학교 식품영양학과

Rapid Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction

Eun-Seon Kim* and Deok-Young Jhon
**Department of Biology, Chonnam National University*
Department of Food and Nutrition, Chonnam National University

Abstract

Staphylococcal food poisoning is the major cause of bacterial food poisoning occurring in this country. Therefore government regulates commercial foods through Official Dictionary of Food that there should be free of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Korean rice cakes, bread, and a box lunch. Since at least 5 days are required to identify the *S. aureus* by the official method in the Dictionary it is difficult to prevent the food poisoning and the investigation of the outbreaks. In this report an improved determination method of the *S. aureus* has been developed using polymerase chain reaction (PCR) technique. Sense and antisense primers for specific amplification of genes encoding staphylococcal enterotoxins were designed and synthesized for the PCR. Rapid chromosomal DNA isolation method was also developed from *S. aureus* using lysostaphin. The PCR condition was developed as follows. Reaction solution (50 μl) consisted of target DNA 2 μl (about 20 ng), 10X buffer 5 μl, primer 100pmole, dNTP (10 mM) 4 μl and Taq DNA polymerase 2.5 unit in a thin-wall tube. Operation condition of the PCR was 5 min pre-denaturation at 94°C, 15 sec denaturation at 94°C, 15 sec annealing at 50°C, 20 sec extension at 72°C, and 5 min post-extension at 72°C, and 30 cycles of denaturation-annealing- extension. Using the PCR with Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400, types of enterotoxigenic *S. aureus* could be identified from *Ddok* or bread in a day.

Key words: *Staphylococcus aureus*, enterotoxin detection, polymerase chain reaction (PCR), Korean rice cake

서 론

세계무역기구에의 가입으로 우리나라에도 외국식품의 수입이 대폭 늘어나고 있다. 따라서 식품검사 업무도 폭발적으로 증가하고 있다. 현행의 식중독관련 미생물검사는 모두가 증균에 의한 미생물의 생화학적 및 생리학적 시험으로서 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 따라서 불필요한 국제적 분쟁의 소지가 되기도 하며 식품의 품질에도 영향을 미쳐 식품을 폐기해야 하는 경우도 발생한다. 식중독 미생물인 살모넬라, 장염비브리오, 병원성대장균 등은 보통 5일 이상의 실험기간을 요구한다[1]. 우리나라의 식중독 발생상황은 1976년부터 1989년까지의 자료에 의하면 주로 세균성이며 특히 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 의한 발병자가 가장 많다. 이러한 식중독은 검사기간과 방법의 지루함 때문에 발생빈도는 크지만 사전검사 뿐 아니라 사후조사도 철저하게 이루어지기 어렵다. 더구나 황색포도상구균이 생산하는 독소는 내열성이 대단히 커서 현행의 생균검사만의 결과로는 식품의 안전성을 확보하기가 어렵다. 따라서 효소면역학적 방법 등 검출법의 개발이 지속적으로 이루어져 왔다[2,3]. 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)은 극미량의 유전자를 단시간 내에 대량으로 증폭시키는 방법으로서 그 장치는 생명공학의 발전으로 널리 보급되어 있으며 응용성도 다양해져 가고 있다. 최근에는 원유에 오염된 리스테리아균을 이단계 중복(nested) 중합효소 연쇄반응에 의하여 직접 검출하는

Corresponding author: Deok-Young Jhon, Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Buk-ku, Kwangju 500-757, Korea

방법[3], 조개에서 장바이러스의 검출[4], 식품 중의 보툴리누스독소 유전자의 검출[5], 굴에서 살모넬라균의 검출[6], 역전사효소-중합효소 연쇄반응을 이용한 음료수 중의 간염바이러스의 검출법[7] 등이 대량으로 보고되고 있다. 황색포도상구균에 대해서도 이미 중합효소 연쇄반응에 의한 검출법이 검토되었다[8].

황색포도상구균에 의한 식중독은 독소형의 미생물이 생산하는 장독소에 의한다. 따라서 이 미생물은 빵을 비롯해서 떡, 도시락 등의 식품에서는 검출되어서는 안된다고 규정되어 있다. 이 연구에서는 유전자 증폭 방법을 사용하여 신속하면서도 간편한 황색포도상구균의 검출법을 개발하여 이를 식품검사에 적용하였기에 이를 보고하고자 한다.

실험방법

미생물의 배양

황색포도상구균 ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095, ATCC 27664, ATCC 23235의 5종을 미국 균주 수집소(American Type Culture Collection)로부터 구입하였다. 각각의 미생물들은 tryptic soy broth (TSB) 배지(Difco)에 접종하여 37°C 항온기에서 밤새 배양하였다. 이 실험에 사용된 황색포도상구균과 그 미생물이 생산하는 독소와의 관계는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* used in this experiment

Staphylococcus aureus	Enterotoxin type	Reference
Staphylococcus aureus ATCC 13565	A	17
Staphylococcus aureus ATCC 14458	B	18
Staphylococcus aureus ATCC 19095	C	19
Staphylococcus aureus ATCC 23235	D	20
Staphylococcus aureus ATCC 27664	E	21

중합효소 연쇄반응용 시발물질(primer)의 합성

시발물질용 올리고뉴클레오티드를 고안하기 위하여 황색포도상구균 장독소 A, B, C, D, E를 암호하는 DNA 염기서열들을[17-21] 전산망을 이용하여 미국국립보건연구소의 유전자은행(GenBank)으로부터 입수한 다음 이들의 유사도를 컴퓨터 프로그램(PC/GENE, IntelliGenetics, 스위스)을 이용하여 비교하였다. 독소유전자들간에 유사성이 없으면서 중합효소 연쇄반응 산물의 생산이 가능한 부분을 컴퓨터 프로그램(Oligo, 히다찌, 일본)을 이용하여 고안하였다(Table 2). 이들 시발물질은 한국생공(대전)에 합성을 의뢰하였으며 합성후 특별한 정제과정없이 중합효소 연쇄반응 반응에 사용하였다. Fig. 1은 황색포도상구균 독소 단백질들에 있어서 그 서열의 유사도를 나타내며 각각의 시발물질을 해당 서열상에 표시하였다.

중합효소 연쇄반응의 반응액은 여러가지 변수를 주어 준비하였으며, 유전자 중합효소는 PWO 중합효소 연쇄반응 용구(Boehringer mannheim)와 Taq DNA 중합효소(한국생공)를 사용하여 여러 조건에서 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 각 반응물을 혼합할 때는 표적DNA, 10배 완충액, 시발물질, 멸균된 이차증류수, dNTP, Taq DNA 중합효소의 순서로 넣었다.

중합효소 연쇄반응 시발물질을 사용하여 생성된 산물의 길이는 황색포도상구균 유형 A,B,C,D,E에 대한 것이 각각 402, 532, 281, 383, 425개 염기쌍으로서 DNA 크기 표준품(1 kb 사다리 DNA, Gibco-BRL)과 비교하여 이들 산물의 구별이 가능하도록 하였다.

Table 2. PCR primers for specific amplification of DNAs encoding various staphylococcal enterotoxins

S. aureus by enterotoxin type	Primers for PCR (unpper one; sense sequence) (lower one; antisense sequence)	Size of PCR product
A	SEA1 (345) 5'-TTATGGTTATCAATGTGCGGGTGGT-3' SEA1 (722) 5'-TGCATGTTTTCAGAGTTAATCGTTT-3'	402 bp
B	SEB1 (345) 5'-ACCAGATGAGTTGCACAAATCGAGT-3' SEB2 (852) 5'-CGTTTCATAAGGCGAGTTGTTAAAT-3'	532 bp
C	SEC1 (469) 5'-GTAAACTGCTATTTTTCATCCAAAG-3' SEC2 (725) 5'-CCTGTTTCATATGGTGAACTGTTAA-3'	281 bp
D	SED1 (679) 5'TGGTGGTGAAATAGATAGGACTGCT-3' SED2 (1038) 5'-TGAAGGTGCTCTGTGGATAATGTTT-3'	383 bp
E	SEE1 (238) 5'-GGTTTTTTCACAGGTCATCCATGGT-3' SEE 2 (638) 5'-TCATAACTTACCGTGGACCCTTCAG-3'	425 bp

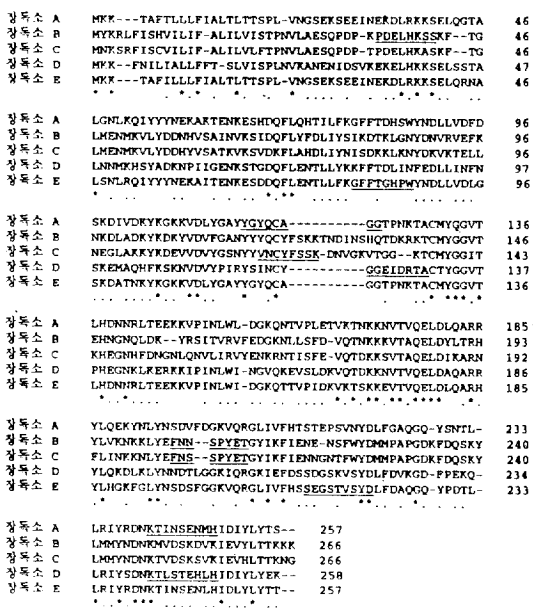

Fig. 1. Arrangement of enterotoxins from *Staphylococcus aureus* and respectively devised primers
The protein sequences were retrieved from GenBank; Accession numbers for the genes of enterotoxins A, B, C, D, E were L22566, M11118, X51661, M28521, and M21319, respectively; The sequences were arranged using PC/GENE softwere and the conditions were as follows; K-tuple value, 1; Gap penalty, 5; Window size, 10; Filtering level, 2.5; Open gap cost, 10; Unit gap cost, 10; Stars and periods represent the degree of similarity. Primers for the PCR amplification are underlined

황색포도상구균과 대장균의 제놈 DNA 추출

황색포도상구균 미생물 세포를 5 m*l*의 TSB배지에 접종하여 37°C에서 밤새 배양하고 10,000 rpm으로 원심분리하여 수확한 다음, 0.5 m*l*의 라이소스타핀 완충액(50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl/pH 7.5)을 넣어서 세척하고 같은 조건으로 원심분리하여 균체를 모은 다음 다시 0.2 m*l*의 라이소스타핀 완충액에 현탁시켰다. 현탁된 세포에 라이소스타핀(lysostaphin, 시그마, 미국)을 용액 1 m*l*당 10 단위가 되게 넣어서 37°C에서 2시간동안 방치한 후에 최종 농도가 1%되게 SDS (sodium dodecyl sulfate, Bio-Rad)를 넣어 65°C에 20분간 두었다. 그리고 NaCl용액을 최종 농도가 1 M되게 넣어 -70°C에 1시간 동안 방치한 후 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하여 상징액을 얻었다. 이 상징액에 리보누클레아제 A (시그마, 10 mg/m*l*) 5 μ*l*를 넣어 37°C에서 1시간동안 반응시키고 단백분해효소 K (시그마, 10 mg/m*l*) 2 μ*l*를 넣어서 같은 조건으로 반응시켰다. 같은 양의 페놀/클로로포름 용액을 넣고 혼합하여 15,000 rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리하고 상징액을 얻어 여기에 다시 동량의 클로로포름을 넣어서 혼합한 후에 같은 조건으로 원심분리하여 상징액을 얻었다. DNA를 침전시키기 위하여 1/10 부피의 3 M 초산나트륨과 2 부피의 에틸알콜을 넣어서 -70°C에 30분간 둔 다음 15,000 rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리하였다. 침전물을 70% 에틸알콜로 세척한 후에 건조시키고 10 μ*l*의 TE 완충액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA/pH 8.0)에 DNA를 용해하였다.

대장균(*Escherichia coli* DH5α)을 5 m*l*의 LB 배지(배지 1리터당 트립톤 10 g, 효모추출물 5 g, NaCl 10 g, pH 7.2)에서 밤새 37°C로 키워 세포를 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 얻어 TE 완충액 567 μ*l*에 재현탁하였다. SDS 처리 등의 다음 과정은 위에 적은 바와 같다.

황색포도상구균 제놈 DNA의 빠른 추출법

TSB 배지 5 m*l*에 배양한 배양액 중에서 1 m*l*를 취하여 10,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 균체를 얻고 라이소스타핀 완충액 500 μ*l*로 세척한 다음 200 μ*l*의 상기 완충액에 재현탁하였다. 여기에 라이소스타핀(m*l*당 2,000 단위) 0.5 μ*l*를 넣어 37°C에서 1시간 방치한 후 95°C에서 5분간 가열하고 15,000 rpm에서 4°C로 15분간 원심분리하여 상등액을 취하여 1 μ*l*만을 중합효소연쇄반응용 표적 DNA로 사용하였다.

곰팡이와 효모의 제놈 DNA의 추출

곰팡이 포자(*Penicillium verruculosum*)를 감자-포도당-한천(potato dextrose agar) 배지에 접종하여 배양한 뒤 포자를 모아 Novozyme 234를 사용하여 원형질체를 생산하였다. 효모(*Phaffia rhodozyma* CBS 6938)는 YEPD배지(효모추출물 1%, 포도당 2%, 펩톤 2%)에 접종하여 대수기의 초기까지 배양하여 세포를 모았다. 이들로부터 스페로플라스트를 만들어 TEN완충액, 리보누클레아제, 단백분해효소 K, pronase 등을 이용하고 페놀클로로포름으로 DNA를 추출한후 실리콘화된 유리봉으로 DNA를 회수하였다[26].

중합효소 연쇄반응 조건

따로 조건을 명시하지 않은 경우엔 다음과 같은 조건으로 Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400 (미국)을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다.

중합효소 연쇄반응 반응액의 조성: 표적 DNA, 2 μ*l*; 10배 농도 반응 완충액, 5 μ*l*; 시발물질, 100 pmole; dNTP (10 mM), 4 μ*l*; Taq 또는 PWO DNA 중합효소,

2.5 단위를 혼합한 뒤 멸균된 2차증류수로 전체부피를 50 μl가 되게 하였다.

중합효소 연쇄반응의 조건: 변성전(pre-denaturation), 94°C/5분; 변성(denaturation), 94°C/15초; 냉각(annealing), 50°C/15초; 연장(extension), 72°C/20초; 연장후, 72°C/5분으로서 변성-냉각-연장을 30회 반복 수행하였다.

중합효소 연쇄반응 조건 설정에 사용된 표적 DNA의 농도는 황색포도상구균 A, 14.75 ng/μl; 황색포도상구균 B, 8.52 ng/μl; 황색포도상구균 C, 13.44 ng/μl; 황색포도상구균 D, 7.41 ng/μl; 황색포도상구균 E, 19.89 ng/μl; 대장균, 14.73 ng/μl; 효모, 22.8 ng/μl; 곰팡이, 1.545 ng/μl이었다.

아가로즈 전기영동

중합효소 연쇄반응에 의하여 증폭된 유전자(50 μl)는 1.5%의 아가로즈 젤에 10 μl의 6배 진한 색소액과 섞은 후 20 μl를 취하여 아가로즈 젤에 주입하여 50볼트의 전압으로 전기영동하였다. 전기영동이 끝나면 젤을 에티디움브로마이드 용액에 30분간 담근후에 자외선등으로 DNA를 관찰하고 즉석사진을 찍었다.

생균수의 측정

TSB배지에 밤새 배양된 세포를 1% 펩톤액을 사용하여 100,000배까지 십진법으로 희석하고 그중에서 각각 100 μl를 취하여 1시간동안 표면을 말린 TSB 한천 평판에 펼쳐바르고 37°C에서 밤새 배양하여 형성된 집락수를 세어 생균수를 측정하였다.

결 과

제놈 DNA의 전기영동

중합효소연쇄반응을 위한 주형DNA와 그 대조 실험에 사용하기 위해서 식중독성 황색포도상구균 5종과 대장균, 효모, 곰팡이로부터 제놈 DNA를 추출하였다. 그리고 그 DNA의 양과 순도를 알아보기 위해서 추출된 시료 1 μl를 0.8% 아가로즈 젤에서 전기영동하였다. Fig. 2는 그 결과를 나타내며 이들이 비교적 순수함을 알 수 있었다. 그러나 황색포도상구균 유형 B와 대장균으로부터 얻은 DNA에는 RNA가 일부 포함되어 있었다.

황색포도상구균 DNA 에 대한 중합효소연쇄반응

합성된 각각의 시발물질이 해당되는 각각의 DNA에 대하여 예상되는 크기의 유전자를 증폭하는지 알아보기 위하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. Fig. 3은 반응용액을 1.5% 아가로즈 젤에 주입하여 전기영동한 결과를 나타내며 예상했던 크기의 중합효소 연쇄반응의 산물들이 생산되었음을 보여주었다. 더구나 부차적으로 생성되는 다른 어떤 DNA도 발견되지 않은 것으로 보아 이 증폭반응은 황색포도상구균 DNA로부터는 유일한 증폭산물을 생성함을 알 수 있었다.

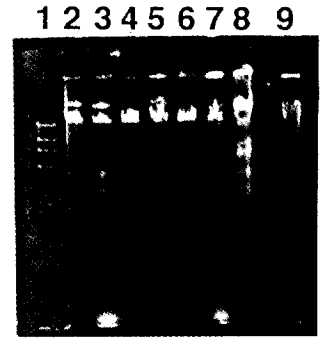

Fig. 2. Genomic DNAs isolated and purified from various microorganisms Lane 1, 1, kb ladder DNA marker (12.2 kb, 11.1 kb, 10.1 kb, 9.1 kb, 8.1 kb, 7.1 kb, 6.1 kb, 5.0 kb, 4.0 kb, 3.0 kb, 2.0 kb, 1.6 kb, 1.0 kb, 506 bp, 396 bp, 344 bp, 298 bp, 220 bp, 201 bp, 154 bp, 134 bp, and 75 bp from top); lane 2, *Staphylococcus areus* producing enterotoxin type A (SEA); lane 3, SEB; lane 4, SEC; lane 5, SED, lane 6, SEE; lane 7, *Escherichia coli* DH5a; lane 8, *Phaffia rhodozyma;* lane 9, *Penicillium verruculosum*

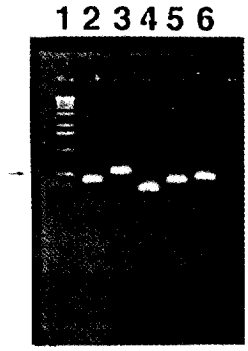

Fig. 3. Amplified DNAs from *Staphylococcus aureus* genomic DNA by PCR Lanes 2 to 6 represent SEA, SEB, SEC, SED, and SEE, respectively, with the DNA size marker (lane 1) arrow indicates 506 bp

중합효소 연쇄반응 시발물질의 특이성

중합효소 연쇄반응을 이용하여 독소형 황색포도상구균을 그 종류까지 확인하기 위해서는 고안된 시발물질이 해당되는 유전자에만 특이적으로 작용하여야

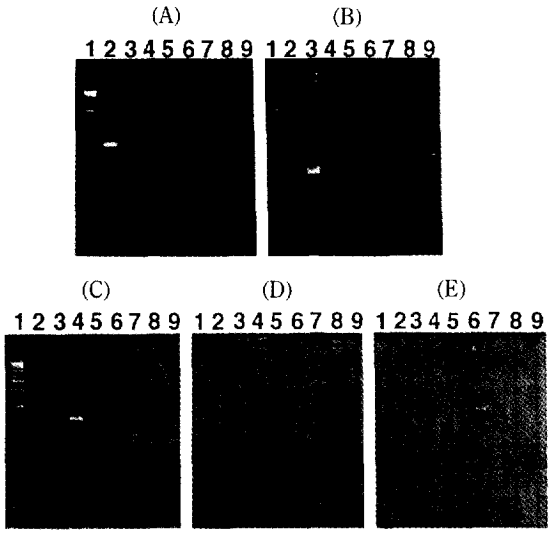

Fig. 4. Specificity of primers PCR was performed with primer A (panel A), primer B (panel B), primer C (panel C), primer D (panel D), and primer E (panel E) against DNAs from SEA (lane 2), SEB (lane 3), SEC (lane 4), SED (lane 5), and SEE (lane 6), *Escherichia coli* (lane 7), *Phaffia rhodozyme* (lane 8), and *Penicillium verruculosum* (lane 9) as target molecules

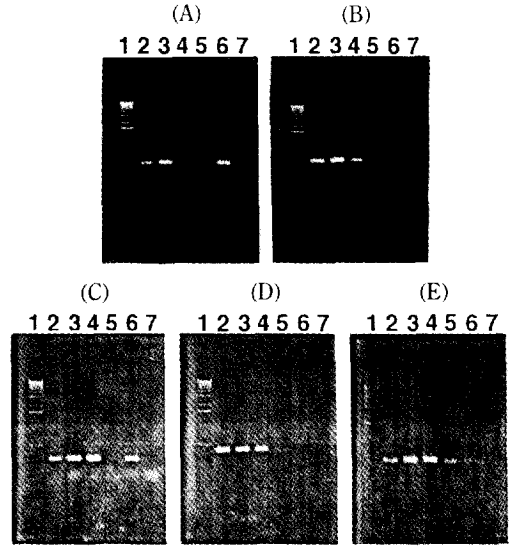

Fig. 5. Effect of annealing temperatures on PCR PCR was performed with primer A (panel A), primer B (panel B), primer C (panel C), primer D (panel D), and primer E (panel E) at 45°C (lane 2), 50°C (lane 3), 55°C (lane 4), 60°C (lane 5), 65°C (lane 6), and 72°C (lane 7)

한다. 따라서 고안된 5종의 시발물질을 황색포도상구균을 비롯하여 대장균, 효모 및 곰팡이의 제놈 DNA에 대하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. Fig. 4는 이들 시발물질이 그들이 고안된 대상 DNA와 특이적으로 반응하는 것을 보여준다. 다만 시발물질 B의 경우는 정제된 곰팡이 DNA에 대해서도 반응산물을 나타냈는데 그 크기(1 kb)에 있어서 황색포도상구균 유형B의 DNA에 대한 산물의 것보다 컸다. 따라서 이들 세균, 효모, 곰팡이의 DNA에 대해서 중합효소 연쇄반응 부반응이 거의 일어나지 않은 것으로 보이며 따라서 중합효소 연쇄반응 시발물질의 선택성은 대단히 큰 것으로 생각되었다.

냉각 온도의 변화에 따른 중합효소 연쇄반응

중합효소 연쇄반응 산물을 얻을수 있는 좋은 반응조건을 선택하기 위하여 냉각온도의 변화를 시도하였다. 따라서 표준반응조건 중에서 냉각온도만을 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 72°C로 바꾸어서 중합효소 연쇄반응을 수행하였다(Fig. 5). 모든 황색포도상구균 독소유전자에 대한 중합효소 연쇄반응을 가능케 함과 동시에 반응산물의 양도 많은 온도는 50°C였다. 황색포도상구균 유형 A와 C의 유전자에 대한 증폭반응은 55°C나 60°C의 조건에서는 잘 일어나지 않았지만 65°C에서는 뚜렷하였다.

황색포도상구균 세포수에 따른 중합효소 연쇄반응

미생물의 수에따른 중합효소 연쇄반응 산물의 생성여부를 알아보기 위해서 세포수를 조정하여 증폭반응을 하였다. TSB배지에 밤새 배양된 배양액의 세포를 1% 펩톤액을 사용하여 100,000배까지 십진법으로 희석하고 생균수를 측정하였다. 그 결과 황색포도상구균 유형 A,B,C,D,E가 각각 5.3×10^8/ml, 6.0×10^8/ml, 3.1×10^8/ml, 7.3×10^8/ml, 3.2×10^8/ml의 생균이 측정되었다. 생균수 측정과는 별도로 측정에 사용한 같은 희석 시료로부터 빠른 DNA 추출방법으로 제놈 DNA를 추출하여서 중합효소 연쇄반응을 수행하였다(Fig. 6). 이 결과는 중합효소 연쇄반응에 의한 황색포도상구균 독소 유전자의 특이적 검출을 위하여는 최소한 150-300마리의 세균이 있어야 함을 보여준다. 따라서 황색포도상구균이 다량으로 오염된 식품의 경우에는 직접 측정이 가능할 것으로 생각되며 혹시 그 숫자가 적은 경우에는 단기간 동안의 증균 배양이 필요할 것이다.

시판되는 떡과 빵 중의 식중독성 황색포도상구균

위의 고안된 방법을 유통중의 식품에 적용하였다. 검사대상 식품으로는 재래시장, 슈퍼마켓, 제과점에서 판매되는 떡(5 종류)과 빵(4 종류)을 구입하여 사용하

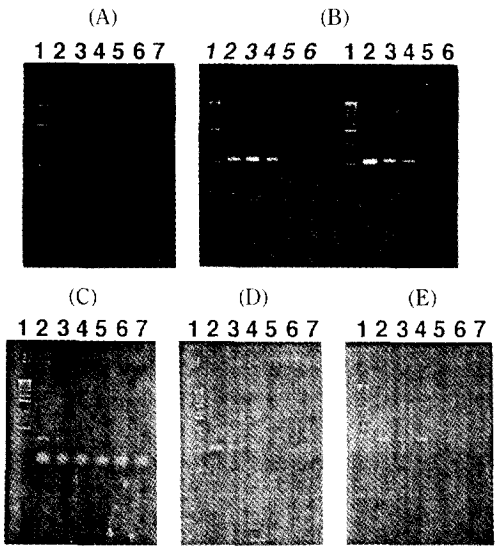

Fig. 6. Effect of cell concentration on PCR PCR was performed with primer A (panel A), primer B (panel B), primer C (panel C), primer D (panel D), and primer E (panel E) using the target DNA isolated from decimally diluted *Staphylococcus aureus* cultures by simple isolation method; Dilution fold were 1× (lane 2), 100× (lane 3), 1,000× (lane 4), 10,000× (lane 5), 100,000× (lane 6); Target DNAs used in italicized lanes in panel B were isolated by phenolchloroform method

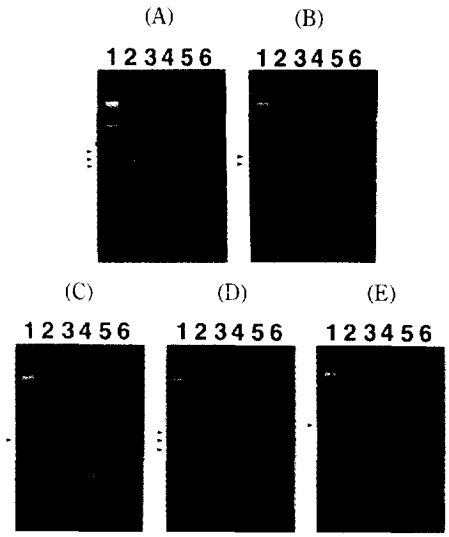

Fig. 7. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. in Korean rice cakes and breads by PCR PCR was performed to determine SEA (lane 2), SEB (lane 3), SEC (lane 4), SED (lane 5), and SEE (lane 6) from various foods; the cake of confectionery (panel A), a bread company #1 (panel B), a bread company #2 (panel C), and a bread of company #3 (panel D), and Korean rice cake (panel E); Lane 1 represents DNA size marker, 1 kb DNA ladder with arrowed 506 bp

었다. 이들은 제과점빵 1종, 제빵회사의 포장된 빵 3종, 슈퍼마켓에서 파는 5종의 떡(시루떡, 팥찹쌀떡, 호박찹쌀떡, 인절미, 백설기)이었다. 이들 식품으로부터 각각 2 g을 취하여 5-20 m*l*의 TSB배지에 넣어 37°C에서 밤새 배양한 다음 1 m*l*의 배양액으로부터 균체를 얻어 제놈 DNA을 추출하였다. 이 DNA를 중합효소 연쇄반응의 표적 DNA로 하여 상기조건으로 40회 반응시켰으며 그 결과는 Fig. 7과 같으며 이를 정리하여 Table 3에 나타내었다. 제과점에서 구입한 빵에는 장독소 B를 비롯하여 C, D를 생산하는 황색포도상구균이 함유되어 있었다. 제빵회사의 빵 3종 모두에도 식중독성 황색포도상구균이 함유되어 있었다. 1종은 장독소 A와 B를 생산하는 미생물을 함유하였고 다른 1종은 D형을 함유하였으며, 나머지 1종은 B, C, D형을 생산하는 황색포도상구균을 함유하는 것으로 판단되었다. 떡중에서는 시루떡의 경우만 D형 독소를 생산하는 미생물이 검출되었다.

Table 3. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods (breads and Korean rice cakes)

Foods	Type of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*				
	A	B	C	D	E
Confectionery cake		++	+	+	
Bread #1	+	+			
Bread #2				++	
Bread #3		++	+	++	
Siru ddok (a rice cake)				+	
Pat chabssal ddok (a rice cake)					
Hobak Chabssal ddok (a rice cake)					
Injeolmi (a rice cake)					
Baekseolgi (a rice cake)					

++ or + indicates degree of DNA amplification

고 찰

황색포도상구균에 의한 식중독은 독소형의 미생물이 생산하는 장독소에 의한다. 따라서 이 미생물은 빵을 비롯해서 떡, 도시락 등의 식품에서는 검출되어서는 안된다고 규정되어 있다. 우리나라의 식품공전에 수록된 황색포도상구균의 검출법은 미생물을 배양하여 그 생리적 및 생화학적 성질을 조사하는 과정으로 최종적인 결과를 얻는데는 보통 7-10일을 요한다. 더구나 내열성의 독소가 직접적인 문제를 야기하는 이 식중독에 있어서는 생균검사만으로는 안전성을 보장

하지 못하는 문제점도 있다.

본 연구에서는 최근에 각종 세균, 효모, 곰팡이, 바이러스 등의 신속한 검출에 응용되고 있는 중합효소 연쇄반응을 사용하여 떡과 빵으로부터 신속하면서도 간편한 황색포도상구균의 검출법을 개발하는 바탕연구를 수행하였다. 먼저 황색포도상구균 독소를 암호하는 유전자들로부터 중합효소 연쇄반응에 필요한 시발물질을 고안하였으며[8-10] 황색포도상구균에 대하여 중합효소 연쇄반응을 수행하여 가장 예민하면서도, 식품에 주로 존재하는 다른 미생물과는 반응하지 않는 특정적인 중합효소 연쇄반응 검출법을 개발하고자 하였다. 이 연구에서는 시발물질을 1쌍만을 사용하였으나 2쌍을 사용하면(nested PCR) 훨씬 더 선명한 결과를 얻을 것으로 생각된다[3,9].

황색포도상구균 유형 C의 경우에는 3가지의 유사 미생물이 알려져 있다. 이들은 독소유형에 따라 C1, C3, novel C로 나뉜다[19,24,25]. 이들은 그들 사이에 98% 이상의 유사도를 가지며 이 연구에서 고안된 시발물질은 이들 세 종류에 모두 공통된 서열로 되어 있다. 따라서 이 연구에서 검출된 황색포도상구균 유형 C는 이들 세 종류중의 하나를 나타낸다.

이미 중합효소 연쇄반응을 사용한 검출법이 보툴리누스 균[5], 리스테리아균[3,11], 녹농균[12], 식품중의 이질균[13], 조개중의 엔테로바이러스[4], 화락균[14], 물과 공기중의 라죠넬라(Legionella)균[15], 간염바이러스 A[16] 등 많은 식품위생에 관련된 미생물에 대하여 개발되어 있으므로 이러한 연구가 황색포도상구균의 검출 뿐만 아니라 우리의 고유식품 중의 다른 미생물의 검출에도 실질적으로 활용이 되어야 할 것으로 생각된다.

현행법규상 떡, 도시락, 빵 중에는 황색포도상구균이 "불검출"되어야 하는 것으로 되어 있다. 따라서 유통 중의 식품을 시험하는데에 특히 중합효소 연쇄반응이 적절하다고 생각된다. 이 방법을 통하여 시판되고 있는 빵과 케이크 중에 여러 종류의 식중독성 황색포도상구균 유전자가 있음을 알 수 있었다. 식품 중에 독소형 식중독균의 유전자가 발견되었다는 점은 바로 살아있는 미생물이 존재한다는 점과 일치하지 않을 수 있다. 그러나 이는 원료식품의 오염상태에 따라서, 열에 안정한 독소가 존재할 가능성도 내포하고 있다. 여기에 대하여는 더욱 자세한 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다. 따라서 식품공전에도 규정되어 있는 것처럼 제조업자들은 이러한 미생물에 오염되지 않도록 더욱 신경을 써야 할 것이며 국가에서도 지속적인 관심이 있어야 할 것이다. 또한 이들 미생물이 대량으로 증식하지 않도록 함으로써 대형의 식중독 사건이 발생하지 않도록 유통체계에도 관심을 가져야 할 것으로 보인다.

요 약

우리나라의 세균성 식중독의 주된 원인은 식중독성 황색포도상구균에 의한다. 따라서 식품공전에는 도시락, 빵, 떡으로부터는 이 미생물이 검출되지 않도록 규정되어 있다. 현행의 황색포도상구균의 검사 방법은 적어도 5일 이상을 요하므로 이 식중독에 대한 대처가 미흡한 실정이다. 이 연구에서는 식중독성 황색포도상구균의 검출법을 중합효소 연쇄반응을 이용하여 개선하였다. 이 반응을 위해 황색포도상구균의 장독소를 암호하는 유전자를 유형별로 증폭할 수 있는 시발물질들을 고안하였다. 또한 황색포도상구균으로부터 중합효소 연쇄반응에 적합한 DNA를 신속하게 추출하는 방법을 개발하였다. 중합효소 반응조건은 다음과 같았다. 반응액의 총부피, (50 μl); 표적 DNA, 2 μl (약 20 ng); 10배 진한 반응완충액, 5 μl; 시발물질, 100 pmole; dNTP (10 mM), 4 μl; Taq DNA 중합효소, 2.5 단위. 작동조건은 변성전, 94°C- 5분; 변성, 94°C-15초; 냉각, 50°C-15초; 연장, 72°C -20초; 연장후, 72°C-5분이었으며 변성-냉각-연장을 30회 되풀이하였다. 이러한 검출조건으로 황색포도상구균을 5시간 이내에 독소 유형별로 확인할 수 있었으며 이를 시판되는 떡과 빵에 적용하여 이 미생물의 존재를 확인하였다.

감사의 글

이 연구는 보건복지부에서 시행한 1995년도 보건의료기술연구개발사업에 의하여 연구비 지원을 받았으므로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. 보건복지부 : 식품공전, 한국식품공업협회 (1995)
2. Park, C.E., Akhtar, M. and Rayman, M.K.: Evaluation of a commercial enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, and E in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 677 (1994)
3. Herman, F., De Block, J.H.G.E., Renaat, L.M. and Moermans, J.B.: Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 milliliters of raw milk by a two-step PCR with nested primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 817 (1995)
4. Lees, D.N., Henshilwood, K. and Dore, W.J.: Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Appl. En-*

viron. Microbiol., **60**, 2999 (1994)
5. Fach, P., Gibert, M., Griffais, R., Guillou, J.P. and Popoff, M.R.: PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 389 (1995)
6. Bej, A.K., Mahbubani, M.H., Boyce, M.J. and Atlas, R. M.: Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 368 (1994)
7. Schwab, K.J., De Leon, R. and Sobsey, M.D.: Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, Hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 531 (1995)
8. Tsen, H.-Y. and Chen, T.-R.: Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 685 (1992)
9. Wilson, I.G., Cooper, J.E. and Gilmour, A.: Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: Use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal entertoxin genes *ent*B and *ent*C1 and the thermonuclease gene nuc. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1793 (1991)
10. Johnson, W.M., Tyler, S.D., Ewan, E.P., Ashton, F.E., Pollard, D.R. and Rozee, K.R: Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clinical Microbiol.*, **29**, 426 (1991)
11. Wernas, K., Heuvelman, C.J., Chakraborty, T. and Notermans, S.H.W. :Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 121 (1991)
12. Khan, A.A. and Cerniglia, C.E.: Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3739 (1994)
13. Lampel, K.A., Jagow, J.A., Trucksess, M. and Hiil, W. E.: Polymerase chain reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1536 (1990)
14. Nakagawa, T., Shimada, M., Mukai, H., Asada, K., Kato, I., Fujino, K. and Sato, T.: Detection of alcohol-tolerant hiochi bacteria by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 637 (1994)
15. Palmer, C.J., Bonilla, G.F., Roll, B., Paszko-Kolva, C., Sangermano, L.R. and Fujioka, R.S.: Detection of *Legionella* species in reclaimed water and air with the enviroAmp *Legionella* PCR kit and direct fluorescent antibody staining. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 407 (1995)
16. Le Guyader, F., Dubois, E., Menard, D. and Pommepuy, M.: Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-seminested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3665 (1994)
17. Borst, D.W. and Betley, M.J.: Mutations in the promoter spacer region and early transcribed region increase expression of staphylococcal enterotoxin A. *Infect. Immun.*, **61**, 5421 (1993)
18. Jones, C.L. and Khan, S.A.: Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **166**, 29 (1986)
19. Hovde, C.J., Hackett, S.P. and Bohach, G.A.: Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. *Mol. Gen. Genet.*, **220**, 329 (1990)
20. Bayles, K.W. and Iandolo, J.J.: Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J. Bacteriol.*, **171**, 4799 (1989)
21. Couch, J.L., Soltis, M.T. and Betley, M.J.: Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.*, **170**, 2954 (1988)
22. Betley, M.J. and Mekalanos, J.J.: Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J. Bacteriol.*, **170**, 34 (1988)
23. Freed, R.C. Evenson, M.L. Reiser, R.F. and Bergdool, M.S.: Enzyme-linked immunosorbert assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Enviorn. Microbiol.*, **44**, 349 (1982)
24. Bohach, G.A. and Schlievert, P.M.: Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol. Gen. Genet.*, **209**, 15 (1987)
25. Marr, J.C., Lyon, J.D., Roberson, J.R., Lupher, M. and Bohach, G.A.: Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins; biological and evolutionary implications. *Infect. Immun.*, **61**, 4254 (1993)
26. Herrmann, G. and Frischauf, A.-M.: Isolation of genomic DNA. *Methods Enzymol.*, **152**, 180 (1987)

(1996년 2월 26일 접수)