

# 16S rRNA 유전자의 Semi-nested Primer를 이용한 Broad-range PCR에 의한 그람음성세균의 검출과 시유에서의 응용

최석호 · 최정준 · 이승배  
상지대학교 생명공학과

## Detection of Gram-negative Bacteria in Broad-range PCR Amplifying 16S rRNA Gene with Semi-nested Primers and Its Application in Market Milk

S. H. Choi, J. J. Choi and S. -B. Lee  
Dept of Biotechnology, Sangji University

### ABSTRACT

A two-step broad-range PCR method detecting gram-negative bacteria at the level as low as 2 CFU was developed by using primers of GNF1 and GNR1 and then semi-nested primer of GNF2 and GNR1. The nucleotide sequences of the primers were determined based on 16S rRNA gene. The DNA fragments of 1173 bp and 169 bp were amplified in one-step PCRs with primer sets of GNF1-GNR1 and GNF2-GNR1, respectively, using template DNA from seven strains of gram-negative bacteria including *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., and *Acinetobacter baumannii* but not from *Achromobacter lyticus*, *Alcaligenes faecalis*, and five strains of gram-positive bacteria. DNA fragments of 180 bp were amplified from LTLT-pasteurized milk and UHT-pasteurized milk in the two-step PCR. The DNA fragments were amplified from LTLT-pasteurized milk which was added with *Pseudomonas fluorescens* and subsequently heated at 65°C, 80°C, and 100°C for 30 min but they were not amplified from the milk auto-claved at 121°C for 15 min. It was suggested in PCR that *Pseudomonas fluorescens* heated at 65°C for 30 min in milk was more sensitive to DNase treatment than viable bacteria.

(Key words : PCR, 16S rRNA, Gram-negative bacteria, Market milk)

### I. 서 론

우유의 2차오염 검출과 저장성 측정법에서 그람음성 내냉성세균의 생장을 촉진하는 배양 방법을 사용하고 있다(IDF, 1993). 그러나 전통적인 배양 방법 대신에 PCR 방법을 이용하여

그람음성 내냉성세균의 DNA만을 증폭하여 검출함으로써 보다 더 신속하게 그람음성 내냉성 세균의 존재여부를 결정할 수 있을 것이다. PCR에서 그람음성세균에 특이성이 있는 primer를 사용하여 DNA 절편을 증폭하여 검출함으로써 신속하게 우유 내 그람음성세균의 존재 여

Corresponding author : Suk Ho Choi, Dept. of Biotechnology, Sangji University, 660 Woosan-dong, Wonju-city, Kangwon-do 220-702, Republic of Korea, Tel : 82-33-730-0543, Fax : 82-33-730-0503, E-mail : shchoi@mail.sangji.ac.kr

부를 결정할 수 있다.

PCR 방법은 식품에 오염된 미생물의 검출에 적용할 수 있는 방법으로서 개발되어 왔다 (Cooray 등, 1994; Herman, 1997; Vaitilinom 등, 1995). PCR 방법에 사용되는 primer들의 염기서열은 검출하려는 DNA 영역의 염기서열로부터 결정된다. 미생물의 동정을 위해 사용된 primer의 염기서열은 미생물에 의한 질병에 관련된 유전자 또는 모든 미생물에 존재하는 유전자들 중 일부 염기서열 영역을 이용하여 결정되었다. 예를 들어 *Listeria monocytogenes*의 병원성과 관련된 유전자인 *prfA*, *hlyA* (listeriolysin O) 및 *plcC* (phospholipase C)의 DNA 절편이 PCR로 증폭되어 검출되었다 (Cooray 등, 1994). 이외에 병원성 유전자를 이용하여 PCR 방법으로 검출한 병원균들에는 *Yersinia enterocolitica* (Rasmussen 등, 1995) 및 *Salmonella typhi* (Hashimoto 등, 1995) 등이 있다.

Ribosomal RNA의 유전자는 생물체에 공통적으로 존재하며 유전자의 부위에 따라 생물체 간에 동일하여 공통된 염기서열을 가지거나 반대로 종간에도 염기서열이 다르다(Woes, 1987). 16S rRNA 유전자의 염기서열에 따라 oligonucleotide를 설계하여 혼성화 탐침으로서 또는 PCR의 primer로서 사용하여 archaeobacteria, eubacteria, eucaryote, 그람음성균 및 그람양성균을 비롯하여 세균의 속과 종을 동정할 수 있다 (Giovannoi 등, 1988, Greisen 등, 1993). 이렇게 생물체 집단을 공통적으로 검출할 수 있는 PCR 방법을 broad-range PCR이라고 한다.

Nested primer를 이용한 2단계 PCR 방법 (Herman, 등, 1995)과 ligase chain reaction (LCR)을 PCR과 병행하여 분석하는 방법 (Wiedmann, 1992, Wiedmann, 1993)을 사용하여 민감도가 증대되고 특이성이 높은 신속 검출 방법이 개발되었다. Semi-nest primer를 이용한 2단계 PCR에서는 첫 번째 PCR 반응과 두 번째 PCR 반응에서 사용하는 두 개의 primer들 중에서 한 개의 primer가 공통적으로 이용된다.

Bej 등(1991)은 70°C에서의 가열 또는 염소제 살균제로서 사멸된 *Legionella pneumophila* 세

균으로부터는 PCR을 사용하여 DNA를 검출할 수 없다고 보고하였다. 그러나 PCR은 미이라 (Paabo 등, 1988) 또는 formalin으로 보존된 세포(Impraim 등, 1987)와 같이 생명이 없는 생체로부터 DNA를 검출할 수 있었다고 보고하여 Bej 등(1988)와 상충되었다. 한편 가열에 의해 살균된 세균에서 DNA가 분해되지 않는다고 보고되고 있다(Masters 등, 1994; Duprey 등, 1997; Herman, 1997; McKillip 등, 1999).

본 연구의 목적은 우유에 오염된 그람음성세균을 직접 검출하기 위한 broad-range PCR 방법을 개발하고 우유의 가열과 DNase 처리에 따른 그람음성세균 DNA의 PCR 검출 여부를 조사하는 것이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세균 균주

본 실험에 사용한 균주 중 *Lactococcus* sp.는 Chr. Hansen's사(Denmark)의 치즈 스타터(R-703)로부터 분리하였으며 다른 세균은 생명공학연구소 유전자은행으로부터 구입하였다 (Table 1).

Table 1. Bacteria used in the study

Bacteria	Sources
<i>Bacillus cereus</i>	KCTC 1013
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC 1928
<i>Enterococcus faecalis</i>	KCTC 3512
<i>Lactococcus</i> sp.	Chr. Hansen's cheese culture
<i>Escherichia coli</i>	KCTC 2441
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KCTC 2001
<i>Enterobacter aerogenes</i>	KCTC 2190
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KCTC 2344
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KCTC 1767
<i>Pseudomonas putida</i>	KCTC 1644
<i>Acinetobacter baumannii</i>	KCTC 2508
<i>Achromobacter lyticus</i>	KCTC 2336
<i>Alkaligenes faecalis</i>	KCTC 2678

*Pseudomonas* 균주들은 26°C에서 다른 세균들은 30°C에서 24시간 동안 2회 계대 배양한 후 실험에 사용하였다.

## 2. DNA의 분리 및 정제

세균으로부터 Versalovic 등(1991)의 방법을 변형하여 genomic DNA를 분리하였다. Tryptic soy agar에서 24시간 배양한 후 형성된 균총을 긁어내어 PBS 용액에 분산하였다. 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세균을 침전시켰다. 1 ml의 1M NaCl 용액으로 한차례 세척하고 50mM TE 용액(50mM Tris, 50mM EDTA, pH 7.8)으로 두 차례 세균을 세척한 후 0.45 ml의 10mM TE 용액(10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7.8)에 분산시키고 25 $\mu$ l의 mutanolysin(5,000 unit/ml 10mM TE 용액)와 25 $\mu$ l의 RNase A(6 mg/ml 10mM Tris, 15mM NaCl, pH 7.8)을 가하고 37°C에서 1시간 배양하였다. 30 $\mu$ l의 SDS(10%)와 30 $\mu$ l의 proteinase K(10 mg/ml, 10mM TE 용액)을 가하고 55°C에서 2시간 배양하였다. Phenol(0.4ml)을 가하고 섞은 후 소형 원심분리기에서 1분간 원심분리하였다. 상부의 수용액 층을 다른 튜브에 옮기고 phenol로 추출을 반복하였으며 chloroform(0.4ml)으로 2회 추출하였다. 수용액 층에 10mM TE 용액을 가하여 0.4ml로 만든 후 40 $\mu$ l의 3M sodium acetate(pH 5.7)를 가하고 0.8 ml의 냉각된 ethanol을 가하고 섞은 후 -20 °C에서 2시간 이상 정치하였다. 용액을 2분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전된 DNA를 냉각된 70% ethanol으로 세척하고 적당한 양의 10mM TE 용액으로 용해하였다. DNA 용액을 앞에 방법에 따라 반복하여 RNase A 및 proteinase K와 SDS로 처리하고 phenol과 chloroform으로 추출하였고 다시 3M sodium acetate(pH 5.2)와 ethanol로 침전하여 DNA를 정제하였다.

## 3. DNA의 신속 추출 방법

DNA를 신속히 추출하는 방법으로서 3종류의 방법을 사용하였다.

첫째는 가열법이었다. 세균분산액 1 ml를 원심분리관에 분주하고 10,000 × g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고 200 $\mu$ l의 TE 용액(10mM Tris, pH 8.0 1mM EDTA)에 분산하였다. 끓는 물에 15분간 가열한 다음에 4 $\mu$ l를 PCR에 사용하였다.

둘째는 분해추출법이었다. 세균분산액 1 ml를 원심분리관에 분주하고 10,000 × g에서 5분간 원심분리하였다. 침전된 세균에 200 $\mu$ l의 lysis buffer(2% triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 1mM EDT, 10mM Tris, pH 8.0)을 넣은 후 vortex하였다. Phenol:chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1)을 200 $\mu$ l를 넣은 후 10 분간 vortex한 후 5분간 원심분리하였다. 상등액을 새 시험관에 옮긴 후 600 $\mu$ l의 ethanol과 20 $\mu$ l의 3M sodium acetate, pH 5.7를 넣고 vortex한 다음 원심분리하였다. 70% ethanol로 세척한 후 상등액을 버리고 건조하고 50 $\mu$ l 증류수를 가하여 용해하였다. 4 $\mu$ l를 PCR에 사용하였다.

셋째로 bead beater 법이다. 세균 분산액 1 ml를 원심분리관에 분주하고 원심분리하여 침전된 균체에 200 $\mu$ l의 lysis buffer, 200 $\mu$ l의 phenol: chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)과 0.3g의 산세척된 glass bead(0.45-0.52 micron)을 가하였다. Mini-bead beater(Biospec Products Inc.)를 이용하여 2분간 진탕한 다음 5분간 원심분리하였다. 상등액을 옮긴 후 600 $\mu$ l의 ethanol과 20 $\mu$ l의 3M sodium acetate, pH 5.7를 넣고 vortex한 다음 10분간 원심분리하였다. 70% ethanol로 세척한 후 상등액을 버리고 건조시킨 다음에 50 $\mu$ l의 증류수에 녹였다. 4 $\mu$ l를 PCR에 사용하였다.

## 4. 시유의 전처리

시중에서 구입한 UHT-살균시유와 LTLT-살균시유 1 ml를 10,000 × g에서 5분간 원심분리한 후에 침전된 균체를 1ml의 PBS로 세척하고

200 $\mu$ l의 TE 용액에 분산한다. 100 $^{\circ}$ C에서 15분간 열처리한 후 4 $\mu$ l를 PCR에 사용하였다.

#### 5. 시유에 *Pseudomonas fluorescens*의 첨가와 열처리

LTLT-살균시유 1 ml에 10<sup>6</sup>CFU의 *P. fluorescens*를 첨가하였다. 10,000  $\times$  g에서 5분간 원심분리한 후에 침전된 균체를 1 ml의 PBS로 세척하고 200 $\mu$ l의 TE 용액에 분산하였다. 0.1 U, 1 U 및 5 U의 DNase(Boehringer Mannheim)를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응하였다. 반응 후에 100 $^{\circ}$ C에서 15분간 열처리한 다음 4  $\mu$ l를 PCR에 사용하였다.

#### 6. PCR

PCR 증폭을 위한 25 $\mu$ l PCR 반응액은 50mM Tris, pH 8.3, 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, 1U *Taq* DNA polymerase(Promega), 100nM primer 및 100ng DNA 또는 4  $\mu$ l 세균추출액을 함유하게 만들었다. Perkin-Elmer thermal cycler을 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후에 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 62 $^{\circ}$ C에서 1분 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 2분을 1 cycle로 하여 35 cycle 증폭하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 가열한 후에 4 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

Semi-nested primer를 사용하는 2단계 PCR에서 1차 PCR에서는 GNF1과 GNR1 primer를 사

용하여 35회 cycle로 증폭하였고 2차 PCR에서는 GNF2와 GNR1 primer를 사용하였다. 2차 PCR에서는 30회 cycle 증폭하였다.

PCR에 사용한 16S rRNA 유전자에서 유도된 primer인 GNF1, GNF2 및 GNR1의 염기서열은 National Center of Biotechnology Information의 homepage(www.ncbi.nlm.nih.gov)에 기술된 Entrez Nucleotides Database를 참조하여 결정하였다 (Table 2). 그람음성세균으로는 *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter johnsonii*, *Aeromonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*. (Genebank accession number: X80721, AB004950, Y17669, AF015300, Z93440, AY689071, AY538264, D84020)과 그람양성세균으로는 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus* sp., *Clostridium* sp. (Genebank accession number: Y15856, AF549498, AF084836, AY239462)의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 비교하였다. GNR1 primer의 염기서열은 Greisen 등(1994)이 보고한 그람음성세균 특이적 probe인 DL04와 RDR278의 서열의 일부이다.

#### 7. Agarose gel electrophoresis

PCR로 증폭된 DNA는 2% agarose gel, 1 $\times$  TAE buffer, 70V에서 전기영동 하였다. DNA 염색은 ethidium bromide로 하였다.

Table 2. Nucleotide sequences of gram-negative bacteria-specific primers based on 16S rRNA gene

Primer		Nucleotide sequence
GNF1 (forward)	31	GGCAGGCC/TTAACACATGCAA 51
GNF2 (forward)	1035	AGGTGCTGCATGGCTGTCTG 1053
GNR1 (reverse)	1203	GTAAGGGCCA/GTGATGACTTG 1194

\* The nucleotide sequence numbers are based on 16S rRNA gene of *Escherichia coli*(Genebank accession number, X80721).

### III. 결과 및 고찰

그람양성세균들과 그람음성세균들의 16S rRNA 유전자의 염기순서를 Entrez Nucleotides Database와 Greisen 등(1994)이 보고한 바에 따라 그람음성세균에 특이적인 primer의 염기 서열을 결정하였다. 그람음성세균에 대해 특이적인 primer로서 그람음성세균들 간에는 공통이고 그람양성세균과는 염기가 다른 oligonucleotide를 설계하였다(Table 2). 그람음성세균간에 염기가 다른 부분은 동일 염기서열에 두 개의 염기를 도입하였다.

*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens* 2균주, *Pseudomonas putida*, *Achromobacter lyticus*, *Acinetobacter baumaii*, 및 *Alkaligenes faecalis*를 포함한 그람음성세균 9균주와 *Lactococcus* sp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria ivanovii*, *Enterococcus faecalis*을 포함한 그람양성세균 5균주에서 각각 순수분리한 DNA를 template로 하여 GNF1-GNR1와 GNF2-GNR1 primer set를 사용하여 각각 PCR을

수행하여 agarose gel electrophoresis로 분석하였다(Fig. 1). GNF1-GNR1와 GNF2-GNR1의 primer set를 사용한 PCR에서는 primer의 염기 위치에 서 계산할 수 있는 1173bp와 169bp의 DNA 절편을 각각 검출하였다. 그람양성세균 5균주들에서는 DNA가 검출되지 않았으며 그람음성세균 9균주들 중에서 *Achromobacter lyticus*와 *Alcaligenes faecalis*을 제외한 그람음성세균 7균주들에서 DNA가 검출되었다.

본 연구에 사용한 primer의 염기서열을 결정함에 있어 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 우유의 2차오염에 흔히 관련된 그람음성세균인 Enterobacteriaceae, *Pseudomonas*, 및 *Acinetobacter*을 중심으로 공통된 염기서열을 결정하였으므로 일부 연관성이 먼 그람음성세균은 PCR에서 DNA가 검출되지 않을 수 있다, *Achromobacter xylosoxidans*와 *Alcaligenes faecalis*의 16S rRNA 유전자(Genebank accession number: AY873802, AY548384)에서 GNF1과 GNR1 primer에 해당하는 염기서열이 다른 그람음성세균들에 대해 각각 2개와 4개의 염기가 달랐으나 두 세균 간에는 동일하였다. GNF2 primer의

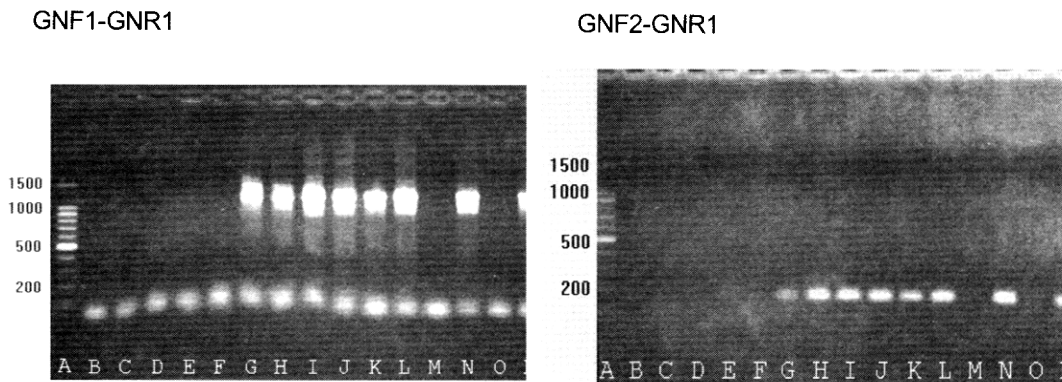


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments of 16S rRNA gene which were amplified with various bacterial DNA extract in the single-step PCR using primers of GNF1-GNR1 and GNF2-GNR1. A, 100 bp ladder; B, *Lactococcus* sp.; C, *Bacillus cereus*; D, *Staphylococcus aureus*; E, *Listeria ivanovii*; F, *Enterococcus faecalis*; G, *Escherichia coli*; H, *Enterobacter aerogenes*; I, *Klebsiella pneumoniae*; J, *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767; K, *Pseudomonase fluorescens* KCTC 2344; L, *Pseudomonas putida*; M, *Achromobacter lyticus*; N, *Acinetobacter baumaii*; O, *Alkaligenes faecalis*.

염기서열은 Entrez Nucleotides Database에서 검색한 모든 그람음성세균에서 일치하였다. 따라서 GNF1과 GNR1의 염기서열의 차이로 인해 *Achromobacter lyticus*와 *Alcalignes faecalis*이 PCR에서 DNA가 검출되지 않은 것으로 생각된다. *Achromobacter xylosoxidans*는 *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans*로 분류되었다 (Holt, 1984).

Broad-range PCR은 특정 집단의 생물체의 공통 염기서열을 primer로 사용하여 PCR을 함으로서 그 집단에 속하는 생물체를 공통으로 검출할 수 있는 방법이다. Greisen 등(1994)이 보고한 바와 같이 16S rRNA의 염기서열을 이용하여 병원성 미생물 뿐만 아니라 그람양성세균, 그람음성세균, 세균 전체를 각각 공통적으로 검출할 수 있는 primer와 probe를 설계하였다. Vatilom 등(1998)은 Elongation factor 유전자(EF-Tu 또는 EF-1 $\alpha$ )의 염기서열을 이용하여 세균, 곰팡이 및 효모를 각각 공통적으로 검출할 수 있는 primer를 설계하여 RT-PCR를 실시하였다. 본 연구에서 16S rRNA 유전자의 염기서열에 근거한 GNF1과 GNR1의 primer들과 GNF2와 GNR1의 primer를 사용한 PCR에 의해서 대장균을 비롯한 Enterobacteriaceae와 *Pseudomonas*와 *Acinetobacter*와 같은 우유와 시유에 흔히 오염되며 저장 중 생육하는 그람음성세균(IDF, 1993; 최 등, 2004)을 검출할 수 있었다.

PCR의 민감도에 영향을 주는 요인 중에는 template DNA의 제조 방법이 있다. 전통적으로 사용하는 lysozyme과 같은 효소를 이용한 세포벽의 분해, phenol-chloroform을 이용한 DNA 추출과 알코올 첨가에 의한 DNA의 침전 분리 방법은 많은 시간과 시 그리고 재료가 소요된다. 이러한 문제점을 해소하기 위한 신속한 DNA 추출방법을 고안하여 비교하였다.

*P. fluorescens*의 배양액을 PBS 용액으로 희석한 후에 가열법, 분해추출법 및 bead beater 방법을 이용하여 DNA 추출물을 제조하여 PCR

에 사용하였다. 각 25 $\mu$ l의 PCR 반응액에 2 $\times$ 10<sup>6</sup>CFU, 2 $\times$ 10<sup>4</sup>CFU, 2 $\times$ 10<sup>2</sup>CFU 및 2CFU의 세균에 해당하는 DNA 추출액을 첨가하였으며 primer로서 GNF1과 GNR1를 사용하였다. 10<sup>6</sup>CFU의 세균수에서 가열법에서 가장 강하게 DNA 절편이 검출되었으며 분해추출법에서는 검출되지 않았으며 bead beater 방법에서는 약하게 DNA가 검출되었다(Fig. 2).

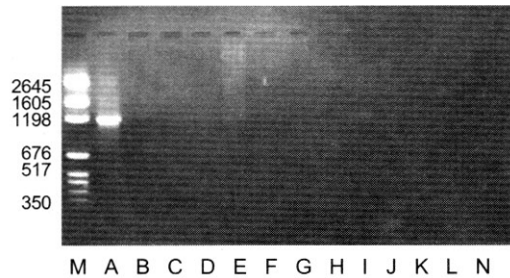


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments of 16S rRNA gene which was amplified using GNF1 and GNR1 in single-step PCR containing template DNA extracts which were isolated from *Pseudomonas fluorescens* using three different DNA extraction methods. M, pGEM DNA ladder; A, B, C and D, boiling method; E, F, G and H, lysis method; I, J, K and L, bead beater method. The bacterial numbers in PCR(25 $\mu$ l) were as follows; A, E and I, 2 $\times$ 10<sup>6</sup>CFU; B, F and J, 2 $\times$ 10<sup>4</sup>CFU; C, G and K, 2 $\times$ 10<sup>2</sup>CFU; D, H and L, 2CFU.

민감도를 향상시키기 위하여 GNF1과 GNR1를 primer로 사용한 1차 PCR 반응에서 합성된 DNA를 template로 한 GNF2와 GNR1의 semi-nested primer를 사용하여 2단계 PCR 반응을 수행하였다(Fig. 3). 가열법에서 25 $\mu$ l의 PCR 반응액 내 2 $\times$ 10<sup>6</sup>CFU 부터 2CFU의 세균까지 DNA가 모두 검출되었으며 bead beater 방법에서 2 $\times$ 10<sup>6</sup>CFU와 2 $\times$ 10<sup>4</sup>CFU에서 DNA가 검출되었다. 이상의 실험 결과 가열법, bead beater 방법, 분

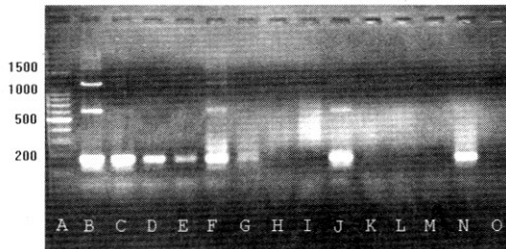


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments of 16S rRNA gene which were amplified using primers of GNF1 and GNR1 and then semi-nested primers of GNF2 and GNR1 in two-step PCR containing template DNA extracts which were isolated from *P. fluorescens* using three different DNA extraction methods. A, 100bp ladder; B, C, D and E, boiling method; F, G, H and I, bead beater method; J, K, L and M, lysis method; N, purified DNA; O, water(control). The bacterial numbers in PCR(25 $\mu$ l) were as follows, B, F and J,  $2 \times 10^6$ CFU; C, G and K,  $2 \times 10^4$ CFU; D, H and L,  $2 \times 10^2$ CFU; E, I and M, 2 CFU.

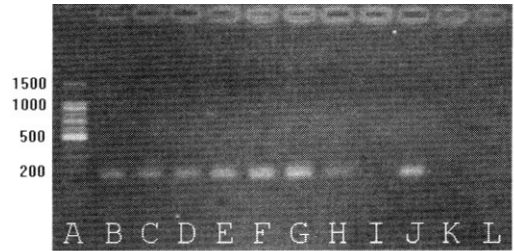


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments of 16S rRNA gene which were amplified using semi-nested primers in two-step PCR containing template DNA extracts which were isolated from market milk. A, 100bp ladder; B, UHT-pasteurized milk; C, UHT-pasteurized milk; D, LTLT-pasteurized milk; E, LTLT-pasteurized milk; F, G, H, I and J, LTLT-pasteurized milk added with *P. fluorescens*; F, heated at 65 $^{\circ}$ C for 30 min; G, heated at 80 $^{\circ}$ C for 30 min; H, heated at 100 $^{\circ}$ C for 30 min; I, autoclaved at 121 $^{\circ}$ C for 15min; J, not heated; K, water(negative control) in semi nested PCR; L, water(negative control) in 2nd PCR.

해추출법의 순서로 민감도가 높았다. 가열법은 또한 민감한 방법일 뿐만 아니라 수행하기에 간단하고 편리한 장점이 있다.

시중에서 구입한 초고온순산살균유 2 제품과 저온장시간살균유 2 제품을 원심분리하여 세균을 세척하고 two-step PCR로 증폭한 결과 4 제품 모두 16S rRNA 유전자의 DNA가 검출되었다 (Fig. 4). PCR 용액에 *P. fluorescens*  $10^6$ CFU를 첨가하고 65 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C 및 100 $^{\circ}$ C에서 30분간 열처리한 시유에서 DNA가 검출되었다. 121 $^{\circ}$ C에서 15분간 autoclave한 시유에서는 DNA가 검출되지 않았다.

Masters 등(1994)은 *Listeria monocytogenes*와 *Escherichia coli*의 건조된 세균, 영양결핍으로 사멸된 세균 및 100 $^{\circ}$ C와 121 $^{\circ}$ C에서 살균된 세균에서도 PCR에 의해 DNA가 검출된다고 하여 이러한 살균처리 후에 DNA가 분해되지 않았음

을 보였다. 사멸된 *Salmonella* DNA가 해수에서 10 $^{\circ}$ C에서 55일 동안 저장한 후에도 PCR에 의해 *Vir*과 *invA*가 검출되었다. 이는 영양부족, 건조 및 가열처리에 의한 사멸에 의해 DNA가 분해되지 않았음을 가리키고 있다(Duprey 등, 1997). Herman(1997)에 의하면 60 $^{\circ}$ C와 100 $^{\circ}$ C의 열처리된 *Listeria monocytogenes*에서 PCR에 의해 DNA가 검출되나 124 $^{\circ}$ C에서 열처리하였을 때에 DNA가 검출되지 않았다. Ethanol과 1% NaOH로 처리하였을 때에 DNA가 검출되었으나 염소제 살균제와 1% 염산으로 처리하였을 때에 검출되지 않았다. McKillip 등(1999)은 *Escherichia coli* O157:H7을 60 $^{\circ}$ C에서 열처리한 후 ribosomal RNA 유전자를 PCR로 증폭할 때에 열처리한 후 48시간 후에도 검출된다고 보고하였다. 본 연구에서는 121 $^{\circ}$ C에서 15분간 가

열한 경우에 PCR에 의해 DNA가 검출되지 않아서 DNA가 파괴되었으며 100°C 이하의 열처리에 의해서는 DNA가 검출되었으므로 DNA가 파괴되지 않았던 것으로 나타나 Herman(1997)의 연구 결과와 유사하였다.

우유 1ml에 10<sup>6</sup>CFU의 *P. fluorescens*를 가하고 65°C에서 30분간 살균한 다음에 원심분리하여 PBS로 세척하고 TE 용액에 분산된 균체를 0.1 U, 1 U와 5 U의 DNase를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응한 다음에 100°C에서 15분간 가열한 다음에 two-step PCR로 16S rRNA 유전자의 DNA를 증폭하였다(Fig. 5). 우유, *P. fluorescens*가 첨가된 우유 및 65°C에서 가열처리된 우유

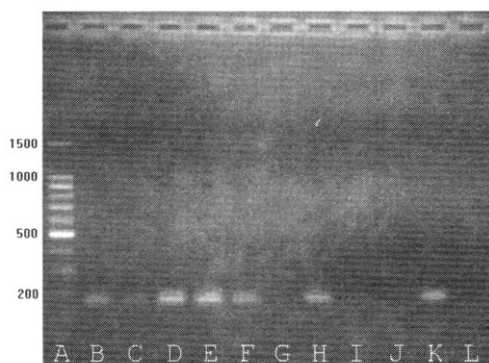


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments of 16S rRNA gene which were amplified using semi-nested primers in two-step PCR containing template DNA extracts isolated from market milk which was added with *Pseudomonas fluorescens*, heated at 60°C for 30min and then treated with DNase. A, 100 bp ladder; B, milk without heat treatment; C~J, milk added with *P. fluorescens*; C, D, H, I, and J, heated at 65°C for 30min; D, treated without DNase at 37°C for 1hr; E and H, treated with 0.1 U DNase; F and I, treated with 1 U DNase; G and J, treated with 5 U DNase; K, purified DNA(positive control), L, water(negative control).

모두 DNA가 검출되어 우유 시료에 그람음성세균 DNA가 존재하며 또한 65°C 30분의 열처리에 의하여 DNA가 파괴되지 않음을 알 수 있었다. 가열처리한 우유에서 DNase를 첨가하여 반응시킬 경우에 0.1 U의 DNase에서는 DNA가 검출되나 1 U와 5 U의 DNase에서는 DNA가 검출되지 않았다. 가열처리하지 않은 경우에는 0.1 U와 1 U에서는 DNA가 검출되었으나 5 U에서는 검출되지 않았다.

이상의 결과에서 65°C에서 30분간 살균된 우유에 있는 *P. fluorescens*의 DNA는 살균되지 않은 우유의 *P. fluorescens*에 비해 DNase에 의해 약간 더 민감하게 분해됨을 알 수 있었다. 살아있는 *P. fluorescens*의 DNA가 10 U의 DNase에 의해 분해되어 시료의 전처리 중에 세균의 활력에 영향이 있거나 가열 처리중에 DNA가 분해되는 것 같다. Zimmermann 등(2001)은 시료를 DNase 또는 RNase로 전처리한 후 PCR 및 RT-PCR을 수행하여 감염 능력이 있는 병원성 바이러스를 검출할 수 있는 방법을 개발하였다. 세균을 함유한 시료를 DNase로 적절한 조건에서 처리함으로써 PCR에 의한 생균과 사균의 분별을 향상시킬 수 있을 것으로 예측되어 이에 대한 추가적인 연구가 진행 중이다.

#### IV. 요약

Semi-nested primer들을 사용하여 그람음성세균을 2 CFU까지 검출할 수 있는 2단계 broad-range PCR을 개발하였다. 첫 번째 PCR에서는 GNFI와 GNRI를 primer로서 사용하였으며 두 번째 PCR에서 GNFI와 GNRI를 semi-nested primer로서 사용하였다. GNFI-GNRI 및 GNFI-GNRI primer 쌍을 사용한 두개의 1단계 PCR 모두에서 *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp. 및 *Acinetobacter baumannii*를 포함한 그람음성세균 7 균주에서 16S rRNA 유전자 절편이 검출되었고 *Achromobacter lyticus*와 *Alcaligenes faecalis*,



및 그람양성세균 5 균주에서는 검출되지 않았다. DNA를 신속하게 추출하는 방법 중에서 가열법으로 *Pseudomonas fluorescens*의 DNA를 추출한 경우에서 semi-nested primer를 사용한 2단계 PCR에 의해 2 CFU까지 검출할 수 있었다. 초고온 순간살균유와 저온장시간 살균유로부터 two-step PCR에 의해 16S rRNA 유전자의 DNA가 검출되었다. 저온장시간 살균유에 *P. fluorescens*로 첨가한 후에 65°C, 80°C 100°C에서 30분간 가열한 시료에서 16S rRNA가 검출되었다. 그러나 121°C에서 15분간 autoclave한 시료에는 검출되지 않았다. *P. fluorescens*를 첨가한 시료를 65°C에서 30분간 가열처리한 시료가 가열처리하지 않은 시료에 비해 DNase 처리에 대해 더 민감하게 DNA가 파괴되어 2단계 PCR에 의해 16S rDNA가 검출되지 않았다.

## V. 사 사

이 연구는 1996년도 농림기술특정연구과제 지원에 의해 수행되었음.

## VI. 인 용 문 헌

1. Bej, A. K., Mahubani, M. H. and Atlas, R. M. 1991. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:597-600.
2. Cooray, K. J., Nishibori, T., Xiong, H., Matsuyama, T., Fujita, M and Mitsuyama, M. 1994. Detection of multiple virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3023-3026.
3. Duprey, E., Caprais, M. P., Derrien, A. and Fach, F. 1997. *Salmonella* DNA persistence in natural eawaters using PCR analysis. *J. Appl. Microbiol.* 82:507-510.
4. Giovannoi, S. -J., DeLong, E. F., Olsen, G. J. and Pace, N. R. 1988. Phylogenetic group-specific oligonucleotide probe for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170:720-726.
5. Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A and Leong, D. 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 32:335-351.
6. Hashimoto, Y., Itho, Y., Fujinaga, Y., Khan, A. Q., Sultana, F., Miyake, M., Hirose, K., Yamamoto, H. and Ezaki, T. 1995. Development of nested PCR based on the *ViaB* sequence to detect *Salmonella typhi*. *J. Clin. Microbiol.*, 33:775-777.
7. Herman, L. 1997. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiol.* 14:103-110.
8. Herman, L. M. F., De Block, J. H. G. E. and Moermans, R. J. B. 1995. Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 milliliters of raw milk by a two-step PCR with nested primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:817-819.
9. Holt, J. G. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore and London.
10. IDF. 1993. Catalogue of tests for the detection of post-pasteurization contamination of milk. *Bulletin of the IDF* 281, pp13-34.
11. Impraim, C. C., Saiki, R. K., Erlich, H. A. and Teplitz, R. L. 1987. Analysis of DNA extract from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142:710-6.
12. Masters, C. L., Shallcross, J. A. and Mackey, B. M. 1994. Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction *J. Appl. Bacteriol.* 77:73-9.
13. McKillip, J. L., Jaykus, L. -A. and Drake M. 1998. rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4264-4268.
14. Paabo, S., Gifford, J. A. and Wilson, A. C. 1988. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year brain. *Nucleic Acids Res.*, 16:0775-87.
15. Rasmussen, H. N., Rasmussen, O. F., Christensen, H. and Olsen, J. E. 1995. Detection of *Yersinia*

- enterocolitica* 0:3 in faecal samples and tonsil swabs from pigs using IMS and PCR. J. Appl. Bacteriol. 78:563-568.
16. Vaitilingom, M., Gendre, F. and Brignon, P. 1998. Direct detection of viable bacteria, molds, and yeasts by reverse transcriptase PCR in contaminated milk samples after heat treatment. Appl. Environ. Microbiol. 64:1157-1160.
17. Versalovic, J., Koeth, T. and Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19:6823-31.
18. Wiedmann, M., Czajka, J., Barany, F. and Batt, C. A. 1992. Discrimination of *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species by ligase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58:3443-3447.
19. Wiedmann, M., Barany, F. and Batt, C. A. 1993. Detection of *Listeria monocytogenes* with a nonisotopic polymerase chain reaction-coupled ligase chain reaction assay. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2743-2745.
20. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51:221-271.
21. Zimmermann, K., Volkei, D., Turceic, P., Schwarz, H. -P. and Rieger, M. 2001. Methods for the detection, quantification and differentiation of infectious versus non-infectious pathogens in a sample. PCT, WO 01/46462 A2.
22. 최석호, 최정준, 이승배, 윤영호. 2004. 시유의 2 차오염과 저장가능기간을 결정하기 위한 resazurin 환원시간검사. 한국동물자원과학회지, 46:999-1006. (접수일자 : 2005. 2. 23. / 채택일자 : 2005. 5. 18.)