

Salmonella spp. 특이적인 검출을 위한 SYBR Green real-time PCR 기법 적용

신승원¹ · 차승빈¹ · 이원정¹ · 신민경¹ · 정명환¹ · 유안나¹ · 정병열² · 유한상^{1,*}

¹서울대학교 수의과대학 및 BK21 수의과학인력양성 사업단, ²농림수산물검역검사본부 동식물위생연구부 세균질병과
(접수: 2012년 8월 9일, 수정: 2012년 12월 10일, 게재승인: 2012년 12월 14일)

Application of SYBR Green real-time PCR assay for the specific detection of *Salmonella* spp.

Seung Won Shin¹, Seung Bin Cha¹, Won-Jung Lee¹, Min-Kyoung Shin¹, Myunghwan Jung¹,
Anna Yoo¹, Byeng Yeal Jung², Han Sang Yoo^{1,*}

¹Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine and Brain Korea 21 Program for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²Bacterial Disease Division, Department of Animal and Plant Health Research, Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency, Anyang 430-757, Korea

(Received: August 9, 2012; Revised: December 10, 2012; Accepted: December 14, 2012)

Abstract : The aim of this study was to applicate and evaluate a SYBR Green real-time PCR for the specific detection of *Salmonella* spp. Specificity of the PCR method was confirmed with 48 *Salmonella* spp. and 5 non-*Salmonella* strains using *invA* gene primer. The average threshold cycle (C_T) of *Salmonella* spp. was 11.83 ± 0.78 while non-*Salmonella* spp. was 30.86 ± 1.19 . Correlation coefficients of standard curves constructed using C_T versus copy number of *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 showed good linearity ($R^2 = 0.993$; slope = 3.563). Minimum level of detection with the method was $> 10^2$ colony forming units (CFU)/mL. These results suggested that the SYBR Green real-time PCR might be applicable for the specific detection of *Salmonella* spp. isolates.

Keywords : *invA*, *Salmonella* spp, specific detection, SYBR Green real-time PCR

서 론

최근 우리나라에서도 식습관의 서구화로 인해 축산물의 소비가 증가함에 따라 축산물의 안정적인 공급과 안전성에 대한 관심이 갈수록 커지고 있다. 대부분의 선진국에서 식품의 안전성과 관련해 가장 연구가 활발히 진행되고 있는 질병 중 하나가 살모넬라균증(Salmonellosis)이다 [28].

Salmonella 균은 종종 사람에서 식중독과 같은 위장관 질병뿐만 아니라, 장티푸스(typhoid fever)와 같은 급성 전신 감염 질환을 유발하는 위험성을 지니고 있다 [8, 22, 24]. 이러한 *Salmonella*는 대부분 축산 현장에서 감염된 동물들의 도축·가공되는 과정에서 *Salmonella* 균이 식육 및 축산가공품에 잔재하여 발생한다 [7, 13]. 국내에서 생산되는 다양한 육류 및 축산가공품도 이러한 경로를 통해 오염이 된다.

대부분의 *Salmonella* 혈청형들은 잠재적으로 병원성을 지니고 있어 신속한 검출이 요구되는 바이나, 기존의 세균배양

기법은 시간이 오래 걸리고, 분리가 어려울 뿐만 아니라, 혈청형 동정이 매우 까다로운 단점이 있다 [29]. 이러한 이유로 신속한 동정을 위한 많은 연구들이 진행되어 왔다 [11, 12, 25]. 이러한 동정 기법들 중 하나가 바로 real-time PCR 기법이다. Real-time PCR 기법은 기존의 conventional PCR에 비해 높은 민감도와 특이도를 가지며, amplicon의 크기를 줄일 수 있으며, PCR 이후의 과정이 필요 없어 PCR product의 오염을 방지할 수 있다 [15, 27].

TaqMan 탐침 기반의 real-time PCR을 이용한 *Salmonella* 균 검출기법들이 여러 차례 소개되었다 [4, 9, 16, 19, 23, 27]. 그러나 이들 검출 기법은 primer와 형광탐침 간의 결합력에 크게 영향을 받는 등 실험조건이 까다로우며 쉽게 적용하지 못하는 단점이 있었다 [21]. SYBR Green의 사용은 이러한 한계를 극복하여 형광탐침을 사용하지 않고도 real-time PCR이 가능하게 되었다 [1].

최근 SYBR Green real-time PCR을 이용한 많은 연구들

*Corresponding author

Tel: +82-2-880-1263, Fax: +82-2-874-2738

E-mail: yoohs@snu.ac.kr

이 진행되고 있다. *E. coli*, *Yersinia*, *Campylobacter* 등의 미생물을 검출하기 위한 방법들이 소개되었고 [14, 17], 가공육과 채소에서 *Salmonella* 검출을 위한 방법들도 소개되었다 [2, 10].

이번 연구의 목적은 SYBR Green을 이용한 real-time PCR 기법으로 국내에서 분리된 *Salmonella* spp.들에서의 적용을 통한, 간단하고 신속한 *Salmonella* 균 검출을 위한 기법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

공시 균주

실험에 사용된 균주는 총 48주의 *Salmonella* spp.와 이에 대한 음성대조균으로서 5주의 non-*Salmonella* spp.가 사용되었다(Table 1). 농림수산검역검사본부로부터 제공받은 균주 및 본 연구실에서 분리동정하여 보관 중인 균주를 이용하였다.

세균배양 및 genomic DNA 추출

-80°C에서 보관되어 있던 각각의 균주들을 blood agar에서 37°C로 18~24시간 동안 배양하여 단일 균주 상태임을 확인한 뒤, MacConkey agar와 Xylose Lysin Deoxycholate (XLD) agar에서 동일 조건(37°C, 18~24 h)으로 다시 배양하였다. 생성된 colony의 특성을 바탕으로 *Salmonella* spp.와 non-*Salmonella* spp.를 1차적으로 구분하였다. 이후 real-time PCR assay을 위한 DNA 추출을 목적으로 Tryptic Soy Broth(TSB) 1 mL에 각각의 균주들을 접종하여 37°C에서 18~24시간 동안 배양하였다. 배양된 균주로부터 genomic DNA를 추출하기 위해 GenElute Bacterial Genomic DNA Kit(Sigma-Aldrich, USA)를 이용하였으며, 추출방법은 제조사의 매뉴얼에 따라 실행하였다. 추출된 DNA는 실험에 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였다. 실험에 사용된 모든 균주들은 Bacteriological Analytical Manual(BAM)에 기초한 생화학적 테스트와 Vitek2 system(Biomerieux, France)을 통해 다시 동정하여 확인하였다.

Salmonella spp. 동정을 위한 real-time PCR assay

Real-time PCR assay에 사용된 dye 및 primer: 본 실험에서는 QuantiTect SYBR green PCR Kit(Qiagen, Korea)를 사용하여 real-time PCR을 진행하였다. 또한 *Salmonella* spp.의 병원성 인자 중 invasion protein과 관련이 있는 *invA* 유전자에 특이적인 primer를 선택하여 실험에 사용하였으며 [6], 그 primer의 염기서열은 다음과 같다. *InvA* F: 5'-TCGTCATTCCATTACCTACC-3', *InvA* R: 5'-AAACGT TGAAAACTGAGGA-3'. 이 primer에 의해 증폭된 PCR product는 119 bp의 크기를 나타내었다.

Real-time PCR amplification condition: 모든 real-time PCR은 ABI 7300 system(Applied Biosystems, USA)을 이용하였다. PCR mixture는 2X QuantiTect SYBR Green

Table 1. Bacterial strains used for assay development and comparison of C_T values between *Salmonella* spp. and non-*Salmonella* spp.

Bacteria	No. of isolates	C_T	Source
<i>Salmonella</i> spp.			
<i>S. Enteritidis</i> ATCC* 13076	1	11.27 ± 0.01	SNU†
<i>S. Enteritidis</i>	4	12.05 ± 0.17	SNU
<i>S. Typhimurium</i>	5	12.04 ± 0.13	SNU
<i>S. Typhimurium</i> DT 104	1	12.32 ± 0.16	SNU
<i>S. Arizonae</i>	2	13.78 ± 0.13	SNU
<i>S. Indiana</i>	2	12.80 ± 0.13	SNU
<i>S. Gallinarum</i>	5	12.99 ± 0.01	SNU
<i>S. Montevideo</i>	1	12.55 ± 0.07	SNU
<i>S. Ruiru</i>	10	11.85 ± 0.14	QIA‡
<i>S. Jos</i>	1	11.96 ± 0.15	QIA
<i>S. London</i>	2	10.94 ± 0.14	QIA
<i>S. Ohlstedt</i>	1	11.36 ± 0.16	QIA
<i>Salmonella</i> group B, non-motile	1	11.04 ± 0.06	QIA
<i>Salmonella</i> spp. non-serotyped	12	12.14 ± 0.41	SNU
Total/Average	48	11.83 ± 0.78	
Non- <i>Salmonella</i> spp.			
<i>E. coli</i>	1	30.01 ± 0.02	SNU
<i>E. coli</i> ATCC 48053	1	30.88 ± 0.48	SNU
<i>Citrobacter youngae</i>	1	29.49 ± 0.09	SNU
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	30.82 ± 0.71	SNU
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	32.05 ± 0.01	SNU
Total/Average	5	30.86 ± 1.19	

*ATCC: American Type Culture Collection. †Laboratory of Infectious Disease, College of Veterinary Medicine, Seoul National University. ‡Animal, Plant and Fisheries Quarantine and Inspection Agency.

PCR master mix(QuantiTect SYBR Green PCR buffer, HotStarTaq DNA polymerase, dNTP mix, SYBR Green I dye, passive reference dye ROX) 12.5 µL, primer 각각 1 µM씩, DNA template 1 µL으로 총 25 µL을 반응시켰다. 모든 실험은 negative control로 RNase free distilled water를, *S. Enteritidis* ATCC 13076을 positive control로 사용하였다. PCR amplification 조건은 95°C에서 15분간 initial denaturation 과정을 거친 뒤, 95°C에서 15초, 55°C에서 15초, 72°C에서 30초의 과정을 40 cycle 동안 반복하였고, final extension 과정으로 72°C에서 5분간 유지한 뒤, 생성된 PCR product는 실험에 사용하기 전까지 4°C에서 보관하였다. 모든 실험은 하나의 샘플에 대해 3회 반복하여 실행하였다.

Real-time PCR를 이용해 동정 가능한 최소 균수 측정:

먼저 *S. Enteritidis* ATCC 13076을 이용하여 real-time PCR assay로 동정 가능한 최소 균수를 측정하고자 하였다. *S. Enteritidis* ATCC 13076을 TSB에서 18~24시간 동안 배양한 뒤, XLD 평판배지에 10⁹부터 10⁰ 배로 단계 희석하여

plating한 후 37°C에서 18~24시간 동안 다시 배양하였다. 배양된 균수를 바탕으로 standard plate count법을 이용하여 colony forming unit(CFU) 값을 구하였다. 구해진 CFU값을 기준으로 앞서 추출한 genomic DNA를 10⁰부터 10⁹까지 단계 희석하여 real-time PCR assay을 실행한 후, 각 희석 단계의 CFU값과 threshold cycle(C_T)값으로 standard curve를 작성하여 동정 가능한 최소 균수를 구하였다.

Data analysis: 48개의 *Salmonella* spp.과 5개의 non-*Salmonella* spp.에 대해 real-time PCR assay를 실행하여 각 균의 평균 C_T값 및 melting temperature(T_m)을 구하고 두 실험군 간의 차이를 비교하였다. 평균 C_T값은 Student's *t*-test를 실시하여 $p < 0.05$ 일 경우 유의적 차이가 있다고 판단하였다.

결 과

Standard curve 및 detection limit

각 희석단계의 CFU값과 평균 C_T값을 이용하여 표준곡선을 작성하였다. 평균 C_T값과 CFU의 대수값 사이에는 반비례관계가 형성되었으며, 상관계수는 0.993(slope = 3.5631)으로 나타났다. 이 표준곡선을 바탕으로 *Salmonella* spp.를 검출할 수 있는 최소 균수는 10² CFU/mL로 나타났다(Fig. 1).

Real-time PCR을 이용한 *Salmomella* 균 detection

총 48주의 *Salmonella* spp.와 5주의 non-*Salmonella* spp.의 genomic DNA에 대해 *Salmonella invA* gene에 특이적인 real-time PCR을 실시한 결과 *Salmomella* spp. 모두 증폭곡선을 나타냈으며, 평균 C_T값은 11.83 ± 0.78을 나타내었다. non-*Salmomella* spp.은 오차범위 밖의 증폭이 관찰되었으며, 평균 C_T값은 30.86 ± 1.19로 나타났다(Table 1). 또한 모든 *Salmonella* spp.들은 유사한 melting curve를 보였으며, 평균T_m은 77.1 ± 0.30으로 나타났다. 이와 반대로 negative control과 모든 non-*Salmonella* spp.들은 melting curve를 형성하지 않았다.

고 찰

Salmonella spp.을 검출하기 위한 PCR 기법에서 사용될 수 있는 목적유전자는 *invA* [9], *sefA* [10], *himA* [5], *iagA* [20], *fimA* [18] 등과 같이 그 종류가 다양하다. 이중 *invA* 유전자는 *Salmonella* 검출을 위해 많이 이용되는 유전자로서 앞서 이 유전자를 이용한 conventional PCR 및 real-time PCR 기법에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다 [3, 9, 16, 26, 27]. 이번 연구에서는 대부분의 *Salmonella* spp. 내에 보존적으로 존재하는 *invA* 유전자에 특이적인 primer를 제작하여 real-time PCR을 실시하였다.

Real-time PCR 실험 결과 *Salmomella* spp.의 평균 C_T값은 11.83 ± 0.78으로 나왔고, non-*Salmomella* spp.의 평균

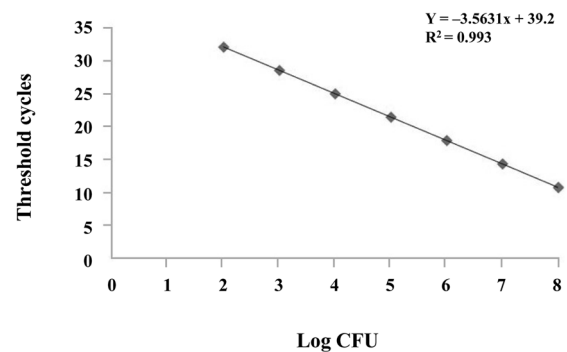


Fig. 1. Standard curve showing the linear relationship between C_T and log colony forming units (CFU) for serially 10-fold diluted *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 ($R^2 = 0.993$, slope = 3.5631).

C_T 값은 30.86 ± 1.19로 나타나 *Salmomella* spp.에 대한 특이도가 높게 나타남을 알 수 있다. 특히 *invA* gene을 대상으로 한 이전의 real-time PCR 연구들에 비해 낮은 C_T 값을 나타내어 보다 적은 양의 template DNA에서도 검출이 가능하며, 또한 검출시간을 단축시킬 수 있을 것으로 판단된다 [21, 27].

또한 실험에 사용된 *Salmonella* spp.들은 모두 77.1 ± 0.30의 melting temperature를 나타내었다. Melting temperature 역시 *Salmonella* spp.를 다른 세균들과 구별할 수 있는 지표가 될 수 있다.

S. Enteritidis ATCC 13076를 positive control로 사용하여 세균의 희석 단계별(10⁰부터 10⁹) 평균 C_T값과 CFU 값을 이용하여 표준곡선을 작성하였다. 평균 C_T값과 CFU의 대수값 사이에는 반비례관계가 성립되었으며, 상관계수는 0.993(slope = 3.5631)로 나왔다. 이를 바탕으로 검출 가능한 최소 균 수는 10² CFU/mL로 유추할 수 있었다. 그러나 이 결과는 실험실과 같이 모든 조건이 충족시키는 상태에서 나온 것이며 실제 사용현장에서 채취하는 경우, 균의 생장이나 기타 환경물질이 첨가되는 것을 고려해봤을 때, 검출에 더 많은 균 수가 필요함을 의미한다. 따라서 검출에 충분한 수 만큼 균을 증식시키는 증균 과정이 필요하다. 일반적으로 Buffered Peptone Water(BPW)나 Pre-enrichment Broth(UPB)와 같은 증균용 배지가 사용된다 [21].

기존의 conventional PCR 기법의 경우 PCR product를 전기 영동하여 유전자의 유무를 확인하므로 PCR 이후 추가적인 시간이 소요되고, 또한 PCR product의 오염에도 주의를 기울여야 하는 제약이 있다. 이로 인해 점차 신속하고, 편리한 real-time PCR 기법으로 대체되고 있는 경향이다. 특히 SYBR Green과 같은 dye의 사용으로 까다로운 제약 없이 실시간으로 목적 유전자의 유무를 확인할 수 있게 되었다.

본 연구 결과를 바탕으로 판단하였을 때, real-time PCR을 이용하여 오염된 식욕이나 동물의 분변과 같은 살모넬라증 감염원인체에서 적은 양으로도 빠른 시간 내에 오염 여부를 판단할 수 있을 것이다. 이번 연구에서 *Salmonella* spp. 국내 분리주들을 대상으로 SYBR Green real-time PCR 기법

을 시도한 결과 기타 세균과 차별적으로 *Salmonella* spp.만을 검출해 낼 수 있었다. 이를 바탕으로 간편하고, 신속하고 살모넬라증 원인체 진단에 기여할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 (No. 110032-3), BK21 수의과학연구인력양성사업단 및 서울대학교 수의과학 연구소의 지원이 있었습니다.

참고문헌

1. Aarts HJM, Joosten RG, Henkens MHC, Stegeman H, van Hoek AHAM. Rapid duplex PCR assay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. *J Microbiol Methods* 2001, **47**, 209-217.
2. Bhagwat AA. Rapid detection of *Salmonella* from vegetable rinse-water using real-time PCR. *Food Microbiol* 2004, **21**, 73-78.
3. Carli KT, Unal CB, Caner V, Eyigor A. Detection of *Salmonellae* in chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2001, **39**, 1871-1876.
4. Chen S, Yee A, Griffiths M, Larkin C, Yamashiro CT, Behari R, Paszko-Kolva C, Rahn K, De Grandis SA. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *Int J Food Microbiol* 1997, **35**, 239-250.
5. Chen W, Martinez G, Mulchandani A. Molecular beacons: a real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Anal Biochem* 2000, **280**, 166-172.
6. Chiu TH, Chen TR, Hwang WZ, Tsen HY. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. *Int J Food Microbiol* 2005, **97**, 259-265.
7. Cogan TA, Humphrey TJ. The rise and fall of *Salmonella* Enteritidis in the UK. *J Appl Microbiol* 2003, **94** (Suppl), 114S-119S.
8. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* 2004, **82**, 346-353.
9. Daum LT, Barnes WJ, McAvin JC, Neidert MS, Cooper LA, Huff WB, Gaul L, Riggins WS, Morris S, Salmen A, Lohman KL. Real-time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. *J Clin Microbiol* 2002, **40**, 3050-3052.
10. De Medici D, Croci L, Delibato E, Di Pasquale S, Filetici E, Toti T. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in poultry. *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**, 3456-3461.
11. Eijkelkamp JM, Aarts HJM, van der Fels-Klerx HJ. Suitability of rapid detection methods for *Salmonella* in poultry slaughterhouses. *Food Anal Methods* 2009, **2**, 1-13.
12. Eriksson E, Aspan A. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Vet Res* 2007, **3**, 21.
13. Foley B, McKeown P, de Lappe N, Cormican M. Salmonellosis in Ireland, 2006. *EPI Insight* 2007, **8**, 2-3.
14. Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R. Duplex real-time SYBR Green PCR assays for detection of 17 Species of food- or waterborne pathogens in stools. *J Clin Microbiol* 2003, **41**, 5134-5146.
15. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996, **6**, 986-994.
16. Hoorfar J, Ahrens P, Rådström P. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol* 2000, **38**, 3429-3435.
17. Jothikumar N, Griffiths MW. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays. *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**, 3169-3171.
18. Jothikumar N, Wang X, Griffiths MW. Real-time multiplex SYBR Green I-based PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 2003, **66**, 2141-2145.
19. Knutsson R, Löfström C, Grage H, Hoorfar J, Rådström P. Modeling of 5' nuclease real-time responses for optimization of a high-throughput enrichment PCR procedure for *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol* 2002, **40**, 52-60.
20. Liming SH, Bhagwat AA. Application of a molecular beacon-real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables. *Int J Food Microbiol* 2004, **95**, 177-187.
21. Nam HM, Srinivasan V, Gillespie BE, Murinda SE, Oliver SP. Application of SYBR Green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Int J Food Microbiol* 2005, **102**, 161-171.
22. Newton-Clarke M. Principles of prevention and control of salmonellosis. *Equine Vet Educ* 1995, **7**, 67-69.
23. Nogva HK, Lillehaug D. Detection and quantification of *Salmonella* in pure cultures using 5'-nuclease polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol* 1999, **51**, 191-196.
24. Oosterom J. Epidemiological studies and proposed preventive measures in the fight against human salmonellosis. *Int J Food Microbiol* 1991, **12**, 41-51.
25. Perry JD, Freydière AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J Appl Microbiol* 2007, **103**, 2046-2055.
26. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R 3rd, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes* 1992, **6**, 271-279.
27. Rodríguez-Lázaro D, Hernández M, Esteve T, Hoorfar J, Pla M. A rapid and direct real time PCR-based method for identification of *Salmonella* spp. *J Microbiol Methods* 2003, **54**, 381-390.
28. Tirado C, Schmidt K. WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe *J Infect* 2001, **43**, 80-84.
29. Waltman WD, Mallinson ET. Isolation of *Salmonella* from poultry tissue and environmental samples: a nationwide survey. *Avian Dis* 1995, **39**, 45-54.