Journal of the Korean Chemical Society
2008, *Vol. 52, No. 2*
Printed in the Republic of Korea

단 신

*B. cereus*의 검출을 위한 칩-기반 실시간 PCR과 시험관-기반 실시간 PCR의 방법 비교

남윤형 · 안영창 · 박수민 · 조민호 · 서재원 · 윤일규 · 박상범 · 김종규*
단국대학교 첨단과학부 화학과, 기초과학연구소
(2008. 1. 31 접수)

Comparison of Chip-Base Real-Time PCR and Tube-Base Real-Time PCR Methods for Detection of *B. cereus*

Youn-Hyoung Nam, Young-Chang Ahn, Su-Min Park, Min-Ho Cho, Jae-Won Seo, Il-Kyu Yoon, Sang-Bum Park and Jong-Gyu Kim*
Department of Chemistry, School of Advanced Science and Basic Science Research Institute Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
(Received January 31, 2008)

주제어: *B. Cereus*, 칩-기반 실시간 PCR, 시험관-기반 실시간 PCR
Keywords: *B. Cereus*, Micro PCR, Real-Time PCR

서 론

*B. cereus*는 자연계(토양, 먼지, 하수 등)에 널리 분포하며 식물에 오염되어 부패, 변패, 때로는 식중독을 일으킨다. 검출되는 비율은 높으나 식중독 발생은 특별한 경우에만 발생하므로 상대적으로 그 발생빈도는 낮다. 영국 등 유럽에서는 발생빈도가 높아 오래 전부터 주목을 받아 왔으며, 최근 우리나라에서도 각종 식품에서 검출되어 규제 대상이 되고 있다.[1-2]

우리나라의 경우 2001~2005년까지 발생건수는 0~3건으로 건수 자체는 그리 많지 않으나 2003년의 경우 건당 평균 66명의 환자가 발생하여 단체급식이나 대규모 식품업소의 철저한 위생관리가 필요하다 하겠다. 미국 CDC(Centers for Disease Control) 에서 1980년에 9건의 집단발생이 보고되었고, 원인식품으로는 쇠고기, 칠면조고기 및 멕시칸 요리가 꼽혔다. 1981년에는 8건이 발생하였으며 쌀밥과 조개가 원인이었다. 기타 집단발병이 있었을 것으로 판단되나 B. cereus로 인한 식중독 증상이 황색 포도상구균 식중독(구토형 B. cereus 식중독)이나 클로스트리듐 퍼프린젠스 식중독(설사형 B. cereus 식중독)과 증상이 유사하여 실제보다 보고가 덜 되고 있는 것으로 보인다.[3-7]

B. cereus DNA검사에는 hybrid capture 방법, branched DNA 방법, PCR 방법, 시험관-기반 실시간 PCR 방법, 칩-기반 실시간 PCR 방법 등이 있는데 시험관-기반 실시간 PCR 방법은 다른 방법들 보다 짧은 시간 안에 극소량의 *B. cereus* DNA까지 검출해낼 수 있는 방법으로서 현재 정량측정 방법 중 가장 많이 쓰이고 있는 방법이다. 그러나 현장에서 바로 쓰일 수 있고 시험관-기반 실시간 PCR 방법보다 더욱 빠르고 간편한 방법이 요구되었기에 본 저자는 이와 같은 문제점을 해결해야 할 필요성을 느끼고 마이크로 칩에 기반을 둔 칩-기반 실시간 PCR 방법을 연구하였다.[8-11]

칩-기반 실시간 PCR 방법은 시험관-기반 실시간 PCR 방법과 같은 방법이지만 반도체 제작공정과 MEMS(micro electro mechanical system) 기술로 제작된 칩이 사용되는데 사이즈는 7.5 mm×15 mm이며 이 안에 1 μL의 시료를 주입시킬 수 있다.

이와 같은 특징을 가지고 있고 특히 마이크로칩에

기반을 둔 방법을 선택한 이유는 실리콘 판에 백금 전도체와 온도센서가 한 곳에 부착되어 있는 마이크로 가열판은 빠른 온도변화와 정확한 온도전달이 가능하다는 장점을 가지고 있는데 이는 마이크로칩에 들어있는 시료에 바로 전달이 되기에 빠른 시간 안에 PCR의 성공률을 극대화 할 수 있는 방법이기 때문이다. 그리고 software와 hard-ware가 통합형으로 전원공급만 된다면 현장 및 기타 어느 장소에서도 사용이 가능하여 실시간 PCR이 가지고 있는 한계를 충분히 뛰어넘어 새로운 대안을 제시해줄 수 있는 강력한 방법이라 할 수 있다.[12-15]

본 연구에서는 *B. cereus*를 이용하여 시험관-기반 실시간 PCR 방법과 칩-기반 실시간 PCR 방법에서 최적의 증폭 조건을 확립하였다. 그 후 검출한계와 재현성, 민감성, 분석시간에 대한 반복 테스트를 시행하였고 특이성에 대한 테스트를 시행하였다.

실 험

시료

본 연구에서는 단국대학교 미생물학과에서 제공받은 식중독 원인균인 *B. cereus* 균을 이용하여 실험하였다.

시약 및 기기

*B. Cereus*에서 DNA 추출에는 *PrimePrep*™ Genomic DNA Isolation Kit(GeNet Bio, Korea)를 사용하였고, 시험관-기반 실시간 PCR 방법과 칩-기반 실시간 PCR 방법에 사용된 반응 시약은 *Prime* Q Master Mix 2X (GeNet Bio, Korea)을 사용하였다. 전기영동의 agarose는 QA-Agarose™(Q-bio gene, USA)을 이용하였다.

DNA의 증폭은 GeneAmp PCR System 2700(Applied Biosystems, USA), Chromo 4™ System(Bio-Rad, USA), GENSPECTOR TMC-1000 SYSTEM(Samsung, Korea)을 사용하였고, PCR 증폭물 확인은 Mupid-*a*(Advance, Japan) 전기영동장치를 이용하였다.

실험방법

*Bacillus cereus*의 비 용혈성 장독소 유전자로 알려진 *bce T* 유전자를 Forward(GAA CTG GAT GCT GTT ATT GAC, Tm 48.48), Reverse(ATA TAC GCT TTC TGG AGG TGG Tm 50.23)를 선별하여 사용하였으며 NCBI(National Center for Biotechnology Information)를 이용하여 primer의 특이성을 확인 후 실험하였다. PCR산물의 크기는 102bp이다. 반응조건으로는 94 °C에서 5분간 예열 후 94 °C에서 30초, 53 °C에서 30초, 72 °C에서 45초의 조건으로 33회 돌려준 후 72 °C에서 4분간 방치한다. Annealing temperature는 50 °C에서 55 °C까지 실험 후 가장 실험에 적합한 온도를 설정하여 실험하였다. 동일한 primer와 조건으로 *B. cereus* DNA를 시험관-기반 실시간 PCR 방법과 칩-기반 실시간 PCR 방법에 적용하여 실험하였다.

결과 및 고찰

Bacillus Cereus DNA를 통한 재현성 테스트

동일한 양성 대조군(10^8 CFU/mL)을 칩-기반 실시간 PCR 방법과 시험관-기반 실시간 PCR 방법을 이용하여 한번에 6개의 동일 시료를 30번 반복 시행하여 각 실험간 재현성을 테스트 하였다. 실시간 모니터링 시스템은 master mix속에 들어있는 SYBR Green Ⅰ이 DNA 이중나선 사이로 결합되어 나타나는 형광을 측정함으로써 Ct와 Tm을 알 수 있고 이를 통해 시료의 농도, 증폭여부 및 종을 확인 할 수 있다. Ct 값은 증폭물이 나타나면서 형광이 증가하기 시작하는 점으로 주형의 농도가 많을수록 빠른 시간 내에 나타난다. Tm 값은 반응이 끝난 후 60~95 °C까지 온도를 올려주게 되면 DNA의 이중나선이 단일 가닥으로 떨어지면서 SYBR Green I이 방출되게 되는데 염기서열의 길이 및 구성에 따라 방출되는 온도가 다르다. 이 특정 온도를 이용하여 타겟 DNA가 맞는지 확인할 수 있다. 재현성 테스트 결과 시험관-기반 실시간 PCR 방법의 Ct 값과 Tm 값은 21.5±0.5 cycle과 78.0±0.8 °C, 칩-기반 실시간 PCR 방법의 경우는 21.7±0.5 cycle과 78.8±1 °C로 나타났다(*Table* 1, *Fig.* 1-4).

Bacillus Cereus DNA를 통한 민감성 테스트

B. cereus 균에서 추출한 DNA 원액(2.7×10^8 CFU/mL)을 단계희석을 하여 2.7×10^8~2.7×10^3 CFU/mL의 농도에서 검출 테스트를 한 결과 각각의 장비에서 농도별 Ct 값의 간격이 3~4 cycle을 유지하며 나타나는 것을 확인하였다(*Table* 2, *Fig.* 5, 6).

Table 1. Comparison of the PCR results conducted on micro-PCR with real time-PCR

Machine / Test	Micro-PCR	Real-time PCR
Detection range	2.7×10^{8}~10^{5} CFU/mL	2.7×10^{8}~10^{5} CFU/mL
PCR time	25 min	80 min
PCR volume	1 μL	20 μL
Ct/deviation	21.7±0.5 cycle	21.5±0.5 cycle
Tm/deviation	78.8±1 °C	78.0±0.8 °C

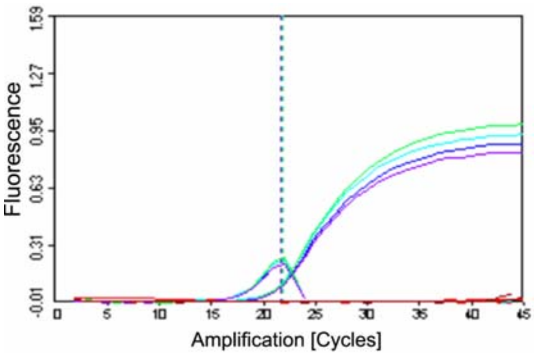

Fig. 1. Micro-PCR amplification of *B. cereus* DNA (2.7×10^{8} CFU/mL).

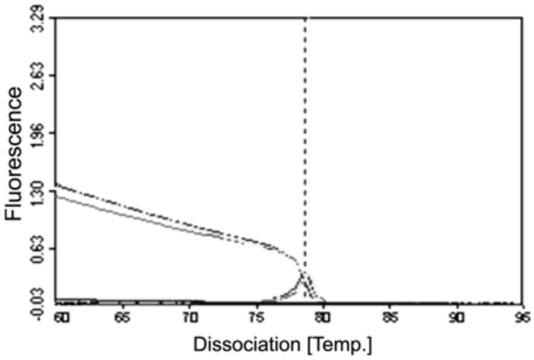

Fig. 2. Melting curve analysis of micro-PCR.

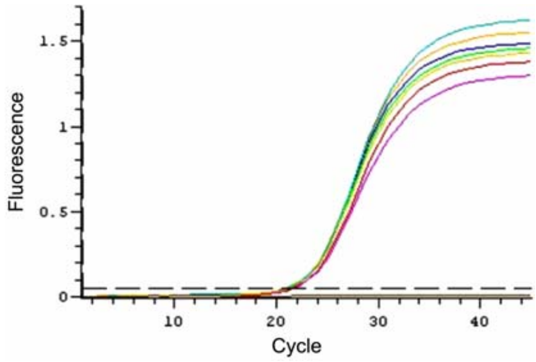

Fig. 3. Real-time PCR amplification of *B. cereus* DNA (2.7×10^{8} CFU/mL).

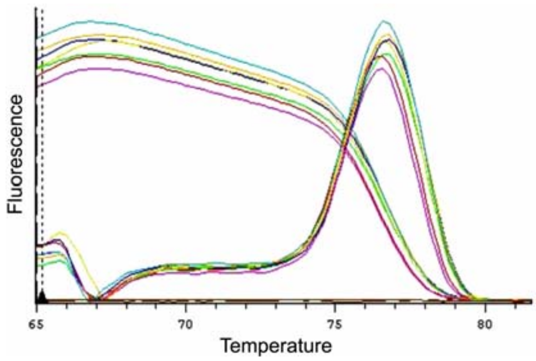

Fig. 4. Melting curve analysis of real-time PCR.

결　론

B. cereus DNA를 실시간으로 모니터링 하기 위하여 기존에 알려져 있고 현재 많이 사용하고 있는 시험관-기반 실시간 PCR 방법과 여기에 칩에 개념을 도입하여 새롭게 개발된 칩-기반 실시간 PCR 방법을 가지고 비교실험을 하였다.

첫 번째로 재현성 테스트 결과 시험관-기반 실시간 PCR 방법의 Ct와 Tm 값은 21.5±0.5 cycle과 78.0±0.8 °C, 칩-기반 실시간 PCR 방법의 경우는 21.7±0.5 cycle과 78.8±1 °C를 나타냄으로써 둘의 편차 범위가 비슷하게 나타남을 알 수 있었다. 두 번째로 검출 가능한 농도 범위 테스트 결과는 2.7×10^{8}~2.7×10^{5} CFU/mL의 범위로 동일한 결과를 나타냈다.

Table 2. Comparison of the sensitivity conducted on micro-PCR with real time-PCR

Machine / Concentration(copy/mL)	Micro-PCR	Real-time PCR
2.7×10^{8}	21.4 cycle	21.7 cycle
2.7×10^{7}	24.9 cycle	25.2 cycle
2.7×10^{6}	29.0 cycle	29.1 cycle
2.7×10^{5}	33.8 cycle	33.7 cycle

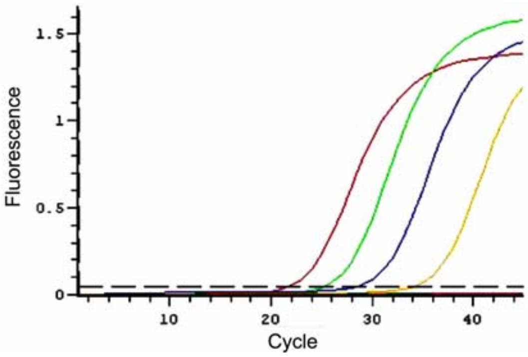

Fig. 5. In situ monitoring of real-time PCR with a broad range of concentration from 2.7×10^5 to 2.7×10^8 CFU/mL of *B. cereus* DNA, from left to right (10^8, 10^7, 10^6, 10^5, N).

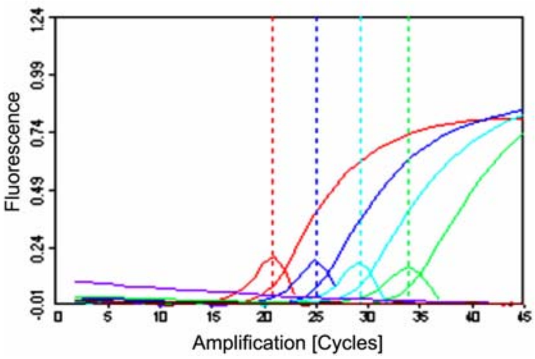

Fig. 6. In situ monitoring of micro-PCR with a broad range of concentration from 2.7×10^5 to 2.7×10^8 CFU/mL of *B. cereus* DNA, from left to right (10^8, 10^7, 10^6, 10^5, N).

세 번째로 시료에 대한 특이성 테스트 결과에서는 염기서열분석법으로 *B. cereus* DNA서열과 일치함을 알 수 있었다. 그 외에 PCR에 소요되는 시간은 칩-기반 실시간 PCR 방법이 25분, 시험관-기반 실시간 PCR 방법은 80분이 소요됐고 소모되는 시약의 양도 칩-기반 실시간 PCR 방법이 1/10~1/50 적게 소모됨을 확인함으로서 각종 진단이나 검사법에 매우 유용하다는 사실을 알 수 있었다. 더욱이 칩-기반 실시간 PCR 방법은 6개의 모듈로 이루어져 있어 여러 가지의 조건으로 실험할 수 있고 서로 다른 유전자를 동시에 검출해 낼 수 있고 컴퓨터와 PCR 장비가 하나로 이루어져 있어 이동이 용이하여 다방면에 응용 할 수 있는 강점을 가지고 있다. 그러나 칩-기반 실시간 PCR 방법은 많은 수의 시료를 동시에 할 수 없고 PCR 반응용액의 양이 적기 때문에 연구목적으로 사용하기에는 다소 어려운 점이 있다. 본 저자는 앞으로 칩-기반 실시간 PCR 방법과 실시간 PCR 방법의 검출 범위를 넓혀서 10^2개의 copy 에서도 검출 가능한 조건을 확립할 계획이며 *B. cereus* 이외에도 결핵, 탄저균, 살모넬라, 브루셀라 등 다양한 균 및 바이러스에 적용할 계획이다. 그리고 마지막으로 인간 유전자의 돌연변이 검출까지 확대 응용하여 기존의 방법으로 5시간 이상 걸리는 돌연변이 검출의 시간을 1시간 이내로 앞당김으로서 돌연변이 검출의 새로운 대안을 제시하고자 한다.

이 연구는 2006년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 연구되었음.

인 용 문 헌

1. Elisangela, R.; Castanha, Marvin Vestal *Molecular and Cellular Probes* **2007**, *21*, 190.
2. Ash, C.; Collins, M. D., *FEMS Microbiol Lett* **1992**, *94*, 75.
3. Sylvestre, P.; Couture-Tosi, E.; Mock, M., *J. Bacteriol* **2003**, *185*, 1555.
4. Hilliard, N. J.; Schelonka, R. L.; Waites. K. B., *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 3441.
5. Huang, X.; Gaballa, A.; Cao, M.; Helmann. J. D., *W. Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 361.
6. Ivanova, N.; Sorokin, A.; Anderson, I.; Galleron, N., *Nature 423*, 87.
7. Pannucci, J.; Okinaka, R. T.; Williams, E.; Sabin, R.; L. O. *BMC Genomics 3*, 34.
8. Petersohn, A.; Brigulla, M.; Haas, S.; Hoheisel, J. D., *J. Bacteriol. 183*, 5617.
9. Kolsto, A. B.; Gronstad, A.; Oppegaard, H., *J. Bacteriol* **1990**, *172*(7), 3821.
10. Wilcks, A.; Jayaswal, N.; Lereclus, D.; Andrup, L., *Microbiology* **1998**, *144*, 1263.
11. Ghelardi, E.; Celandroni, F.; Salvetti, S. *FEMS Microbiol Lett*. **2002**, *208*, 129.
12. Ehling-Schulz, M.; Fricker, M.; Scherer, S. *FEMS Microbiol Lett.* **2004**, *232*, 189.
13. Berry, C.; O'Neil, S. *Appl Environ Microbiol.* **2002**, *68*, 5082.
14. Beecher, D. J.; Schoeni, J. L.; Wong, A. C. *Immun* **1995**, *63*, 4423.
15. Agata, N.; Ohta, M.; Mori, M.; Isobe, M. *FEMS Microbiol Lett.* **1995**, *129*, 17.