Journal of the Korean Chemical Society
2010, *Vol. 54, No. 2*
Printed in the Republic of Korea
DOI 10.5012/jkcs.2010.54.02.215

등온 증폭법과 Real-time PCR을 이용한 *Salmonella* 검출

안영창 · 조민호 · 윤일규 · 정덕현 · 이은영 · 김진호 · 장원철*
단국대학교 첨단과학대학 화학과 및 기초과학연구소/조직재생연구소
(접수 2010. 3. 12; 수정 2010. 3. 16; 게재확정 2010. 3. 31)

Detection of *Salmonella* Using the Loop Mediated Isothermal Amplification and Real-time PCR

Young-Chang Ahn, Min-Ho Cho, Il-Kyu Yoon, Duck-Hyun Jung, Eun-Young Lee, Jin-Ho Kim, and Won-Cheoul Jang*
Dept. of Chemistry, School of Advanced Science and Basic Science Research Institute, Institute of Tissue Regeneration Engneering (ITREN), Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
(Received March 12, 2010; Revised March 16, 2010; Accepted March 31, 2010)

요약. 살모넬라는 음식과 식수에서 흔히 나오는 중요한 병원체로 세계 곳곳에서 급성 위장염과 같은 감염증을 일으키며, 일반적으로 인간의 혈청형 임상종으로는 *Salmonella* enterica의 혈청형인 *S.* Typhimurium과 *S.* Enteritidis가 있다. 일반적인 검출 방법으로 살모넬라를 기본으로 하여 선택적인 배양으로 샘플을 수집하였고 살모넬라를 일으키는 군체의 특징을 생화학과 혈청학상인 테스트를 하였으나 이러한 방법들은 일반적으로 시간이 걸리고 높은 감도를 보이지 않았다. 최근, 등온증폭반응법과 real-time PCR법을 이용하여 높은 감도, 특이성으로 현재 병원성 박테리아에 빠르게 수행할 수 있게 되었다. 본 연구에서는 등온증폭반응과 real-time PCR법을 사용하여 *S.* Typhimurium과 *S.* Enteritidis의 검출하였다. 선택적인 타겟 유전자로, *invA*를 살모넬라종의 염기서열에 특이적으로 임의복제 하였다. 등온증폭반응과 real-time PCR은 살모넬라종으로부터 임의의 염기서열을 증폭하여 검출하였고, *invA*는 *S.* Typhimurium과 *S.* Enteritidis의 두 가지 종을 모두 검출하였다. 이러한 등온증폭반응과 real-time PCR법으로 *S.*Typhimurium과 *S.* Enteritidis의 검출 가능성을 보였으며, 살모넬라 종에 대한 특이성, 민감성을 갖춘 유용한 검출방법을 제시하였다.

주제어: 등온증폭반응법, 중합효소연쇄반응, 살모넬라타이피무리움, 살모넬라엔테리티디스

ABSTRACT. *Salmonella* is an important food-and water-borne pathogen associated with acute gastrointestinal illnesses around the world. The most common serotypes isolated from humans are *Salmonella* enterica serotype Typhimurium (*S.* Typhimurium) and *S.* Enteritidis. Traditional detection methods for *Salmonella* are based on cultures using selective media and characterization of suspicious colonies by biochemical and serological tests. These methods are generally time-consuming and not so highly sensitive. Recently, the Loop Mediated Isothermal Amplification and real-time PCR has been used as a highly sensitive, specific, and rapid test for the presence of pathogenic bacteria. In this study, a LAMP and real-time PCR was used to detect *S.* Typhimurium and *S.* Enteritidis. We selected target genes, which were the in *invA* and a randomly cloned sequence specific for the genus *Salmonella*. With LAMP and real-time PCR, random sequence was detected from *Salmonella* spp, *invA* were detected from all strain of *S.* Typhimurium and *S.* Enteritidis. This assay indicate that the specificity, sensitivity and rapid of the LAMP and real-time PCR make them potentially valuable tools for detection of *S.* Typhimurium and *S.* Enteritidis.

Keywords: LAMP(Loop Mediated Isothermal Amplification), PCR(Polymerase Chain Reaction), *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis

서론

살모넬라속 균은 그람음성의 통성 혐기성 세포내 기생세균으로서 사람과 동물을 비롯하여 자연계에 널리 분포하고 있다. 이들 균에 감염되면 설사, 쇠약, 발열 및 패혈증 등의 전신성 증상을 일으키며, 특이성이 있는 소수 균종을 제외한 대부분의 균 속이 인수공통 전염병의 원인세균으로 알려져 있다.[1-2]

살모넬라균속에 속하는 수많은 혈청형들은 사람과 동물에 병원체로 작용한다. 장티푸스의 원인균인 *S.* Typhi와 파라티푸스의 원인균인 *S.* Paratyphi A, B, C는 다른 살모넬라와는 달리 사람에게만 감염되어 증상을 나타낸다. *S.* Typhi는 bacteriophage에 의해 다시 세분(phage typing)되며 이는 역학 조사에 중요한 자료로 이용된다. 환경이나 음식물에 *S.* Typhi가 대변에서 생존할 수 있는 시간은 60시간, 물에서는 5 ~ 15일, 얼음에서 3개월, 육류에서 8주 등 생존 기간이 길고 추위에도 강해서 선진국에서보다 위생상태가 나쁜 개발도상국에서 유행이 계속되는 원인이 되고 있으며 보균자 또한 중요한 발병원인이 되고 있다. 주로 위장염을 일으키는 균종으로는 *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *S.* Infantis, *S.* Heidelberg등이 대표적이지만 지역과 시대에 따라서 분리되는 빈도에는 차이가 있다.[2-5]

Salmonella enterica는 수십 년 동안 사람에서 식중독의 주요 병원체로 인식되어 왔으며, 주로 동물 유래균으로 오염된 음식물 섭취를 통하여 감염된 것으로 알려져 있다. 살모넬라감염증은 사람에서 가장 흔한 식품매개 질병으로서 미국에서 발생하는 식중독의 약 30%를 차지하며, 국내에서도 식중독 원인세균 중 가장 높은 분포를 나타내고 있다.[6-10]

Salmonella enterica serotype Enteritidis (*S.* Enteritidis)는 1980년대 중반 이후 사람에서 식품매개를 통한 질병이 증가되고 있다. 이 균은 사람과 동물에 감염하여 주로 급성장염을 일으키며, 오염된 계란이나 식품을 통하여 폭발적인 식중독발생을 일으키고 있다. 특히 NSC (National *Salmonella* Center)는 이 균을 1997년 이후부터 살모넬라감염증에서 가장 많이 분리되는 serotype (50%)으로 보고하고 있다.[11-14]

S. Typhimurium은 전 세계에 널리 분포하고 있는 균종으로, 사람을 비롯하여 소, 말, 양, 개, 가금, 설치류 및 조류 등 다양한 숙주에 감염되어 장염, 패혈증, 유산 및 폐렴을 일으키며, 사람에서 식품을 매개로 한 식중독 발생이 많아 공중보건학적으로 매우 중요시되고 있다. 소의 살모넬라감염증에는 75종 이상의 serotype이 관련되어 위장염, 패혈증, 수막염, 관절염, 폐렴, 유산, 유량감소 및 발육지연 등을 일으키고, 돼지에서는 S. Choleraesuis와 *S.* Typhisuis에 의한 급·만성위장염을 유발하여 경제적인 피해가 큰 것으로 알려져 있다.[15-17]

경구 감염인 장티푸스는 감염량에 따라 잠복기간이 다르지만 보통 1 ~ 3주이다. 위로 들어가 대부분은 위산으로 인하여 살균되며 일부는 회장에 있는 림프조직인 Peyer판의 괴사로 인하여 장출혈이나 천공 (약1%의 경우)이 생길 수도 있다. 발열, 오한, 위장증세, 장미진, 간장과 비장의 종대 등이 주 증상이며 S. Typhi의 일부가 남아 영구 보균자가 된다. S. Typhi는 초기에 혈액으로부터 분리되고 1주 후 부터는 뇨나 분변에서 분리 할 수 있다. 파라티푸스는 장티푸스의 증상과 비슷하나 장티푸스보다 심하지 않은 임상증상을 보인다. 살모넬라증은 12 ~ 36시간의 잠복기간을 거쳐 발열, 두통, 복통, 설사, 구역, 구토 등의 위장증상이 나타난다. 탈수가 일어나고, 유아나 고령자는 중증이 될 수 있으며, 급성증상은 1 ~ 2일 만에 사라지나 식욕부진과 설사는 7일간 계속되기도 한다. 때로는 급성장염으로 시작되어 패혈증이나 농양, 관절염, 담낭염, 심낭염, 폐렴, 농피증, 신우신염들을 초래하며, 유아나 고령자, 면역억제 환자가 사망하는 일이 있지만 대단히 드물다. 기타 살모넬라의 경우 아주 민감한 사람에게는 낮은 농도로도 감염이 되지만 보통 10^2 ~ 10^3copies이상의 농도에서 감염이 된다. 감염은 인체의 어느 조직에서나 감염이 될 수 있다.[18-20]

혈청형에 따른 감염양상을 살펴보면 1996년 이전까지의 *Salmonella* Typhimurium과 *Salmonella* Enteritidis의 분리율이 가장 높은 것으로 나타났다. 살모넬라속 균의 DNA 검사에는 plasmid profile, 중합효소연쇄반응(PCR), southern blot hybridization을 기초로 한 분자유전학적 분석 및 제한효소 처리에 의한 DNA의 절단 양상 등을 분석하여 역학관계를 규명하고 있다. PCR법이나 기타 DNA 정량기술이 개발되어 도입되기 전까진 살모넬라균의 존재 유무를 조기에 진단할 수 있는 방법은 전무 했기에 항상 위험성에 노출되어 있었다. 그러나 1983년에 PCR법이 개발되었고 기타 DNA 정량기술이 이 분야에 도입되면서 *Salmonella* DNA의 검출에 새로운 장을 열게 되었다. 앞서 보고된 바와 같이 살모넬라증은 낮은 농도로도 감염이 되는 경우가 드물어, 검출하는데 많은 어려움이 있다. 더욱이 여러 미생물균을 검출하는 방법으로 사용될 수 있는 실험법은 여러 가지가 있지만 방법과 절차가 까다로워 신속하고 정확한 검출에 어려움이 많다.

등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification assay, LAMP)은 기존의 PCR법과 유사하지만 기존의 PCR법이 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(extension) 세 가지 단계를 거치면서 온도의 변화를 주어야 하는 반면, 등온증폭법은 일정한 온도에서 접합 및 신장이 가능하다. 이는 기존의 PCR에서 사용되는 *Taq.* DNA polymerase 대신 *Bst.* DNA polymerase를 사용함으로써 가능하게 되었다. *Bst.* DNA polymerase는 일반 PCR의 *Taq.* DNA polymerase와는 달리 5'→3' exonuclease의 성격을 가지고 있어 DNA의 이중나선 구조를 열에 의한 변성을 거치지 않고 Tm 값에 가까운 접합 온도에서 접합 및 신장이 수행되어 진다.[21-22] 따라서 본 연구에서는 그러므로 기존의 검출 방법보다 감도 있고 빠른 현장 적용성이 가능하고, 살모넬라균의 상피세포에 대한 부착과 침습에 관련된 invA 유전자를 낮은 검출률, 긴 소요시간, 오염에 노출, 그리고 작업의 불편함 등의 문제점을 보완한 등온 증폭법과 실시간으로 모니터링이 가능한 real-time PCR법으로 살모넬라균 검출 방법을 연구하였다.

실험 및 방법

시료

본 연구에서는 생물자원센터(BRC)와 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 살모넬라균종인 *S.* Typhimurium과 *S.* Enteritidis를 이용하여 실험하였다.

시약 및 기기

시약

살모넬라균에서의 DNA 추출에는 PrimePrepTM Genomic DNA Isolation Kit(Genet Bio, Korea)을 사용하였고, 전기영동의 agarose는 QA-AgaroseTM(Q-bio gene, USA)을 이용하였다.

기기

DNA의 증폭은 Chromo4™ System(Bio-Rad, USA), GeneAmp® PCR System 2700(Applied Biosystems, USA)을 사용하였고, 중합효소 연쇄반응 산물 확인은 Mupid-α (Advance, Japan) 전기영동장치를 이용하였다.

실험 방법

살모넬라균종인 *S.* Typhimurium과 *S.* Enteritidis에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용하여 *invA* 유전자 부위를 증폭을 시킨 후 증폭된 DNA를 전기영동법에 의해 확인하였고, 이를 정제하였다. 정제된 증폭산물이 살모넬라균 DNA가 맞는지 최종적으로 확인하기 위해서 DNA 염기서열분석법을 시행하였다. 그 후 동일한 primer에 등온 증폭법에 사용할 추가 primer를 첨가하여 살모넬라균종인 S. Typhimurium과 S. Enteritidis를 일반 PCR법과 등온 증폭법을 적용하여 실험하였다.

살모넬라균종에서 genomic DNA의 추출

뉴트리언트 배지에 배양한 살모넬라균주를 적당량의 콜로니를 취해 1.5 mL 튜브에 옮겨준 후, 1 M Tris HCl (pH 8.5) 1 mL을 넣고 오븐에서 100 °C로 10 분 동안 처리하였다. 처리한 튜브를 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리한 후 상층액을 버린 후 Proteinase K (20mg/mL) 20 µL와 조직분해 완충용액(tissue lysis buffer) 200 µL를 넣고 5 초 동안 섞은 후 항온 수조에서 60 °C로 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 튜브에 동량의 PCI-9 (phenol chloroform isoamyl alcohol 25:24:1)를 넣고 5 분간 13,000 rpm에서 원심분리한 후 상층액을 새로운 1.5mL 원심분리 튜브로 옮겼다. 상층액에 2 M sodium acetate를 30 µL와 차가운 100% ethanol를 900 µL 넣은 후 가볍게 섞어준다. DNA의 수율을 최대화하기 위해 -20 °C에서 30 분 동안 두었다. 그 후 13,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리 한 후 상층액을 버렸다. 70% ethanol를 500 µL 넣고 가볍게 섞어 준 후 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리 시킨 후 상층액을 제거했다. Ethanol을 완전히 제거하기 위해 오븐에서 1시간 반 동안 건조 시킨 후 50 µL의 용리 완충용액(Elution buffer)을 넣어 줬다. 이렇게 분리한 DNA는 곧바로 실험에 사용하거나 4 °C에 보관하고, 장기간 보존하기 위해서는 -20 °C에 저장해 두었다.

***Table* 1.** Primer sequence sets used to amplify *invA* gene for PCR

Sequence of primers Forward (5' → 3'), Reverse (5' → 3')	Size of fragment (bp)
Forward GCC ACG GTA CAA CGT ATA TC Reverse CCT CAA CTT CAG CAG ATA CC	226 bp

***Table* 2.** Condition of working solution for PCR and PCR cycle condition of *invA* gene for PCR

Components of PCR	Volume
10 X reaction buffer (100 mM Tris-HCl; pH 9.0, 400 mM KCl)	2 µL
10 mM dNTP mix (2.5 mM each.)	2.5 µL
Forward primer (10 pmole/µL)	1 µL
Reverse primer (10 pmole/µL)	1 µL
Taq. polymerase (5 U/µL)	0.1 µL
Template DNA (25 ng/µL)	1 µL
Deionized water	17.4 µL
Total	25 µL

Step	Temp (°C)	Time	Cycle
Initial denature	94	5 min	
Denature	94	30 sec	32
Annealing	58	30 sec	
Extension	72	45 sec	
Last extension	72	3 min	

중합효소연쇄반응(PCR)

다음과 같은 PCR primer set (*Table* 1)를 이용하여 각 시료의 PCR 산물을 얻었다. 각각 25 µL의 PCR 반응 용액(*Table* 2)을 0.2 mL PCR 반응 튜브에 넣은 후, GeneAmp® PCR System 2700(Applied Biosystems, USA)을 이용해서 DNA를 증폭시켰다.

Agarose gel 전기영동에 의한 증폭산물의 확인

1.5% (w/v) agarose gel을 이용하여 Mupid-α (Advance, Japan) 전기 영동장치로 PCR 산물을 분석하였다. Agarose 1.5 g을 삼각플라스크(250 mL)에 넣고, 0.5X TBE (tris boric acid EDTA) 완충용액 100 mL을 채운 후에 전자렌지에서 2 ~ 3 분 동안 녹인 후 용액을 gel 용기에 부어서 30 분 정도 굳혔다. Gel이 완전히 굳은 것을 확인하고 comb을 뽑고 gel을 수거하였다. 수거한 gel을 전기영동장치에 넣고 0.5X TBE

완충용액으로 채운다. 그리고 PCR 산물 4 μL와 6X BPB (bromo phenol blue)dye 0.8 μL를 섞어서 4 μL씩 loading하고 100 V에서 25분 동안 전기영동 하였다. 그 후에 gel을 떼어내어 EtBr(ethidium bromide)로 10 분간 염색하고 다시 10 분간 증류수로 DNA와 결합하지 못한 EtBr을 씻어냈다. 마지막으로 UV transilluminator 위에 agarose gel을 올려놓고 PCR 여부를 확인하였다.

PCR 산물의 정제

1.5 mL 원심 분리 관에 PCR 산물과 PCR 산물의 5배 양의 결합 완충용액을 넣어 혼합한 후 이를 스핀 컬럼으로 조심히 옮긴다. 8000 rpm에서 30 초간 원심 분리하여 여과되어 모아진 용액은 버리고, 스핀 컬럼은 다시 30초간 원심 분리하였다. 마지막으로 13,000 rpm에서 2 분간 원심 분리하였다.

그리고 수집 컬럼을 깨끗한 시험관에 옮긴 후 PCR 산물과 동일한 양의 용리완충용액(elution buffer)을 넣고 실온에서 2분간 반응하고 모아진 용액을 4 °C에 보관하였다.

***Table* 3.** Condition of working solution for PCR and PCR cycle condition of *invA* gene for real-time PCR

Components of premix solution	Volume	
10 X reaction buffer (100 mM tris-HCl; pH 9.0, $(NH_4)_2SO_4$, PCR enhancers, BSA, Stabilizer)	20 μL	10 μL/ sample
10 mM dNTP mix (2.5 mM each.)	20 μL	
SYBR® Green I (100X)	2 μL	
10X enhancer	20 μL	
$MgCl_2$	6 μL	
Hs taq (25μ/m)	4 μL	
Deionized water	28 μL	
Forward (20 pmole/μL)		0.5 μL
Reverse primer (20 pmole/μL)		0.5 μL
Template DNA (25 ng/μL)		1 μL
Deionized water		8 μL
Total		20 μL

Step	Temp (°C)	Time(sec)	Cycle
Initial denature	94	600	.1
Denaturation	94	30	45
Annealing	62	30	
Extension	72	45	
Melting analysis	60 ~ 95		1

DNA 염기서열분석법에 의한 유전자 판별

DNA 추출 후 PCR primer set(*Table* 1)을 이용하여 유전자를 증폭시킨 후 정제를 거쳐 DNA 염기서열분석법(ABI 3730xl DNA analyer)을 통하여 살모넬라균종 *S.* Typhimurium과 *S.* Enteritidis를 최종 확인하였다.

실시간 중합효소연쇄반응 (Real-time PCR)

다음과 같은 PCR primer set(*Table* 1)를 이용하여 각 시료의 PCR 산물을 얻었다. 총 20 μL의 PCR 반응용액(*Table* 3)은 master mix 10 μL, primer(F,R) 각각 0.5 μL, D.W 8 μL와 DNA 1 μL로 구성되었으며 master mix는 한번에 100 μL를 제조하여 0.2 mL PCR 반응 튜브에 분주한 후, real-time PCR법을 이용해서 DNA를 증폭시켰다.

등온증폭반응(LAMP)

다음과 같은 등온증폭 반응 primer set(*Table* 4)를 이용하여 각 시료의 증폭산물을 얻었다. 총 20 μL의 등온증폭반응용액(*Table* 5)은 premix 18.5 μL와 DNA 1.5 μL로 구성되었으며 premix는 한번에 제조하여 0.2 mL PCR 반응 튜브에 18.5 μL씩 동량 분주한 후, DNA를 첨가하여 등온증폭법을 이용해서 DNA를 증폭시켰다.

결과 및 고찰

살모넬라 균주에서 genomic DNA 추출 결과

Phenol 추출법을 이용하여 살모넬라 균주에서 *S.* Typhimurium과 *S.* Enteritidis의 genomic DNA를 추출(*Fig.* 1)하였으며 추출결과는 등온증폭반응이나 real-time PCR 반응을 통해 확인하였다.

Real-time PCR을 이용한 살모넬라균 검출 결과

살모넬라균에서 추출한 *S.* Typhimurium과 *S.* Enteritidis의 genomic DNA를 real-time PCR을 이용해 검출하였고 master mix 속에 들어있는 SYBR Green I이 DNA 이중나선 사이로 결합되어 나타나는 형광을 측정함으로써 Ct와 Tm을 알 수 있고 이를 통해 시료의 농도, 증폭여부 및 종을 확인할 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 온도

***Table* 4.** Primer sequence sets used to amplify *invA* gene for LAMP

	Sequence of primers (5' → 3')	Size of fragment (bp)
F3	5'-GCATATTCGTGGAGCAATG-3'	210
B3	5'-GCAATCAATAAATCATCCAACTT-3'	
FIP	5'-CCTCAACTTCAGCAGATACCATTACTATTTGTCATAAATTCGCCAATG-3'	
BIP	5'-TTCGCAAAGGGATCCGTCAGGAGATCCATCAAATTAGCGG-3'	

***Table* 5.** Condition of working solution for LAMP and LAMP condition of *invA* gene

Components of premix solution	Volume
Bst.10 X reaction buffer (10 mM tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM $MgSO_4$)	2 μL
10 mM dNTP mix (2.5 mM each.)	2 μL
Forward (10 pmole/μL)	0.6 μL
Reverse primer (10 pmole/μL)	0.6 μL
FIP (10 pmole/μL)	1.4 μL
BIP (10 pmole/μL)	1.4 μL
Bst. polymerase (5 U/μL)	1.5 μL
Template DNA (25 ng/μL)	1.5 μL
Deionized water	9 μL
Total	20 μL

Step	Temp (°C)	Time (min)	Cycle
Initial denature	61	60	.
Denaturation	61		
Annealing	61		
Extension	61		

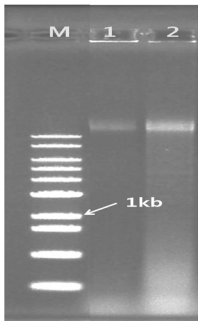


***Fig*. 1.** Genomic DNA extraction result from *Salmonella*. Lane M : 1kb Marker Lane 1 : *S*. Typhimurium Lane 2 : *S*. Enteritidis

를 올려주게 되면 DNA의 이중나선이 단일 가닥으로 떨어지면서 SYBR Green I이 방출되는데 염기서열의 길이 및 구성에 따라 방출되는 온도가 다르다. 이 특정 온도를 이용하여 타겟 DNA가 맞는지 확인할 수 있다. 검출 결과는 다음(*Fig*. 2, 3)과 같았다.

등온증폭반응(LAMP)을 이용한 살모넬라균 검출 결과

임상시료에서 추출한 살모넬라균 genomic DNA와 등온증폭반응용 premix와 혼합하여 등온 증폭하였고 전기영동을 통해 *S*. Typhimurium과 *S*. Enteritidis을 검출하였고 일반 PCR을 통해 등온증폭반응의 특이성과 민감도를 확인하였다(*Table* 6, *Fig*. 4, 5).

살모넬라균 DNA를 통한 민감성 테스트

살모넬라균종 *S*. Typhimurium과 *S*. Enteritidis DNA 원

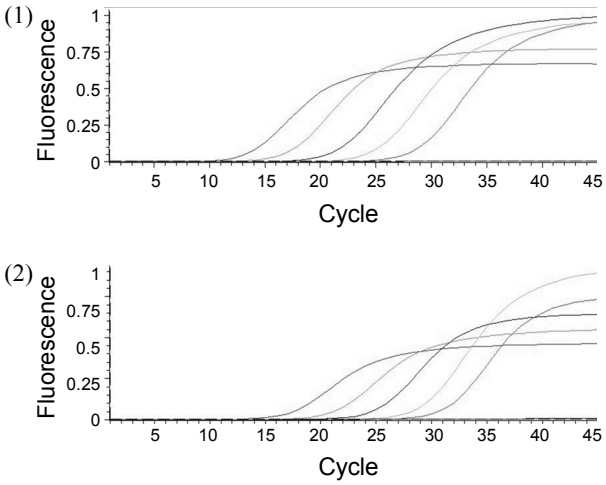


***Fig*. 2.** In situ monitoring of real-time-PCR with a broad range of concentration from $1.4 \times 10^3 \sim 1.4 \times 10^7$ copy/mL of *salmonella* gene DNA from left to right (10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, N). 1: *S*. Typhimurium, 2: *S*. Enteritidis

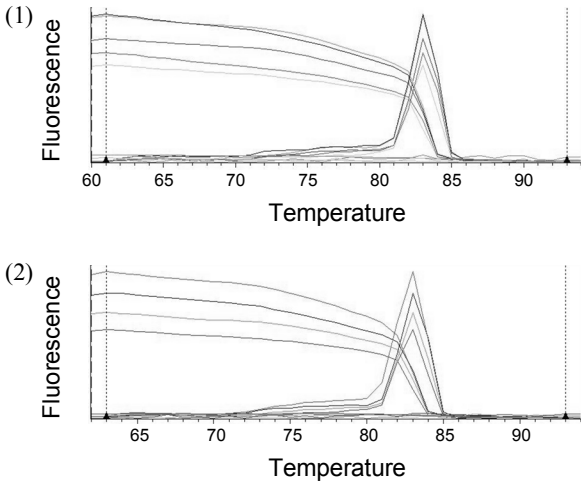


***Fig*. 3.** Melting curve analysis of isothermal amplification. 1: *S*. Typhimurium, 2: *S*. Enteritidis

***Table* 6.** Comparision of the PCR results conducted on general-PCR assay with LAMP assay

Test \ Machine	General-PCR assay	LAMP assay
Detection range	$1.4 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^6$ copy/mL	$1.4 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^2$ copy/mL
PCR time	90 min	60 min
PCR volume	25 μL	20 μL

액(1.4×10^7 copy/mL)을 단계 희석하여 $1.4 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^0$ copy/mL의 농도에서 검출 테스트를 통해 등온증폭법과 real-time PCR를 비교하였다(*Table* 7).

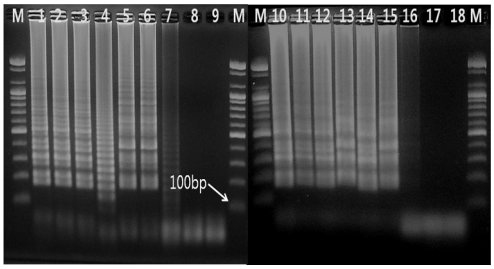


***Fig*. 4.** Detection limit of *Salmonella* gene using LAMP assay. Varying dilutions of the *Salmonella* gene genomic DNA ranging undiluted DNA to 10^0 were used for the reactions. Lane 1~8 : 10^0 ~ 10^{-8} (copy/mL) of *S.* Typhimurium DNA, Lane 9, 18 : Negative, Lane 10 ~ 17 : 10^0 ~ 10^{-8} (copy/mL) of *S.* Enteritidis, Lane M : 100 bp Marker.

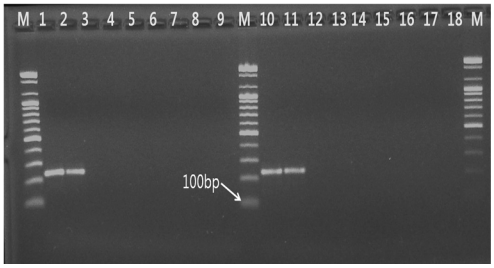


***Fig*. 5.** Detection limit of *Salmonella* gene using general-PCR assay. Varying dilutions of the *Salmonella* gene genomic DNA ranging undiluted DNA to 10^0 were used for the reactions. Lane 1 ~ 8 : 10^0 ~ 10^{-8} (copy/mL) of *S.* Typhimurium DNA, Lane 9, 18 : Negative, Lane 10 ~ 17 : 10^0 ~ 10^{-8} (copy/mL) of *S.* Enteritidis, Lane M : 100 bp Marker.

***Table* 7.** Comparision of the rapidity, specificity and sensitivity conducted on real-time PCR assay with LAMP assay

Machine / Test	Real-time PCR assay	LAMP assay
Detection range	$1.4 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^3$ copy/mL	$1.4 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^2$ copy/mL
PCR time	150 min	60 min
PCR volume	20 μL	20 μL

결론

살모넬라감염증의 역학적 연구는 serotype, 생물형, 약제내성형, phage type의 조사 등으로 이루어지고 있으나 이들을 파악하는 것만으로는 미흡한 실정이므로 최근에는 plasmid profile, 중합효소 연쇄반응(PCR), southern blothybridization 기법을 기초로 한 분자유전학적 분석이 이루어지고 있다. 사람의 주요 식중독균으로 알려진 *S.* Typhimurium과 *S.* Enteritidis를 신속하고 특이적으로 검출하기 위하여 *Salmonella* specific primer를 제작하여 식중독균 내 *invA* 유전자를 증폭하는 real-time PCR법과 등온증폭반응법을 실시하였다.[21-22]

DNA 추출 후 PCR primer set(*Table* 1) 및 LAMP primer set(*Table* 4)을 이용하여 유전자를 증폭시킨 후 정제를 거쳐 DNA 염기서열분석법(ABI 3730xl DNA analyser)을 통하여 식중독균의 *S.* Typhimurium과 *S.* Enteritidis DNA를 최종 확인하였다.

첫 번째로 검출 능력 테스트 결과에서 일반 PCR법으로 식중독균내 *invA* 유전자를 증폭한 결과 $1.4 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^6$ copy/mL의 범위내에서 검출이 가능하였고 Real-time PCR의 경우 *invA* 유전자를 $1.4 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^3$ copy/mL의 범위내에서 검출되었다. 이에 반해 등온증폭반응법은 $1.4 \times 10^7 \sim 1.4 \times 10^2$ copy/mL의 범위내에서 검출되어 등온증폭법이 일반 PCR의 경우보다 더 높은 검출 한계를 가지고 있고 real-time PCR의 경우 비슷한 검출 능력을 보였다. 두 번째로 검출 시간 테스트 결과에서는 일반 PCR법은 변성, 접합, 신장의 온도변화를 두고 90분의 시간이 소요되었고, real-time PCR의 경우 2시간 30분의 시간이 소요되었다. 이에 반해 등온증폭법은 PCR법에서의 변성, 접합, 신장의 온도변화를 두지 않고 한 온도에서 세 단계를 모두 시행함에 따라서 실험소요시간을 단축할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

일반 PCR법, real-time PCR법 그리고 등온증폭법으로 식중독균내의 *invA* 유전자를 증폭한 결과 real-time PCR의 경우 실시간 모니터링이 가능하여 정량정성 분석이 가능하나 분석시간이 긴 반면 등온증폭법의 경우 단시간에 식중독균의 감염 여부를 할 수 있었다.

본 연구에서는 앞으로 등온증폭법의 검출 한계를 넓혀서 현 결과보다 더 낮은 copy수의 주형 DNA에서도 검출 가능한 조건을 확립할 계획이다. 또한 식중독균 이외에도 브루셀라, 바실러스 시리우스, 스타필로 코커스 등 다양한 병원성 미생물에 적용할 계획이며 이외에 현재 심각한 유행성 감염균으로 떠오르고 있는 신종플루에도 적용 가능할 것으로 보인다.

또한 식중독균 진단이 필요한 임상 및 기타 장소에서 진단 시스템으로 사용 할 수 있을 것이며, 진단시간의 단축으로 병원성 미생물 및 유행성 미생물의 조기 검출에 새로운 방법을 제시하고자 한다.

이 연구는 2008년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 연구되었음.

REFERENCES

1. Nam, H.-M.; Srinivasan, V.; Gillespie, B. E.; Murinda, S. E.; Oliver, S. P. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *102*, 161.
2. Bhagwat, A. A. *Food Microbiol.* **2004**, *21*, 73-78.
3. Carli, K. T.; Unal, C. B.; Caner, C.; Eyigor, A. *J. Clin. Micro-*

biol. **2001**, *39*, 1871.
4. Chen, W.; Martinez, G.; Mulchandani, A. *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 166.
5. Daum, L. T.; Barnes, W. J.; McAvin, J. C.; Neidert, M. S.; Cooper, L. A.; Huff, W. B.; Gaul, L.; Riggins, W. S.; Morris, S. Salem; A. Lohman, K. L. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 3050.
6. Fukushima, H.; Tsunomori, Y.; Seki, R. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 5134.
7. Lazaro, D. R.; Hernandez, M.; Esteve, T.; Hoorfar, J.; Pla, M. *J. Microbiol. Methods* **2003**, *54*, 381.
8. Medici, D. D.; Croci, L.; Delibato, E.; Di Pasquale, S.; Filetici, E.; Toti, T. *Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 3456.
9. Rahn, K.; De Grandis, S. A.; Clarks, R. C.; McEwen, S. A.; Galan, J. E.; Ginocchio, C.; Curtis III, R.; Gyles, C. I. *Mol. Cell. Probes* **1992**, *6*, 271.
10. Tirado, C.; Schmidt, K. *J. Infect.* **2001**, *43*, 80-4.
11. Lee, W.-W.; Lee, S.-M.; Lee, G.-R.; Lee, D.-S.; Park, H.-K. *Korean J. Vet. Serv.* **2009**, *32*(2), 147.
12. Taitt, C. R.; Shubin, Y. S.; Angel, R.; Ligler, F. S. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*(1), 152.
13. Wang, L.; Shi, L.; Alam, M. J.; Geng, Y.; Li, L. *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 69.
14. Enosawa, M.; Kageyama, S.; Sawai, K.; Watanabe, K.; Notomi, T.; Onoe, S.; et al. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 4359.
15. Naravanene, R.; & Jamil, K. *J. Med. Microbiol.* **2005**, *54*, 51.
16. Ohtsuka, K.; Yanagawa, K.; Takatori, K.; & Hara-kudo, Y. *Appl. Env.l Microbiol.* **2005**, *71*, 6730.
17. Parida, M.; Horioke, K.; Ishida, H.; Dash, P. K.; Saxena, P.; Jana, A. M.; *et al. J. Clinical Microbiol.* **2005**, *43*, 2895.
18. Andrews, W. H.; June, G. A.; Sherrod, P. A.; Hammack, T. S.; Amaguana, R. M. **1998**, FDA *Bacteriol. Anal. Manual, 8th Ed.; Salmonella. AOAC Intl*.
19. Chopra, A. K.; Peterson, J. W.; Chary, P.; Prasad, R. *Microb. Pathog.* **1994**, *16*, 85.
20. Bennett, A. R.; Greenwood, D.; Tennant, C.; Banks, J. G.; Betts, R. P. *Lett. Appl. Microbiol.* **1998**, *L 26*, 437.
21. Horisaka, T.; Fujita, K.; Iwata, T.; Nakadai, A.; Okatani, A. T.; Horikita, T.; Taniguchi, T.; Honda, E.; Yokomizo, Y.; Hayashidani, H. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 5349.
22. Way, J. S.; Josephson, K. L.; Pillai, S. D.; Abbaszadegan, M.; Gerba, C. P.; Pepper, I. L. *Appli. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 1473.