

TaKaRa ICAN[®] Salmonella Detection Kit

MicrotiterPlate Version TaKaRa Code 9873 32 assays
 ChromatoStrip Version TaKaRa Code 9874 32 assays

살모넬라 (특히 *Salmonella* Enteritidis)는 장내 세균과에 속하는 그램 음성 세균으로 자연계에 폭넓게 분포하고, 소, 돼지, 닭과 같은 가축이나 개, 고양이 같은 애완동물에도 존재한다. 사람에게 감염은 주로 살모넬라로 오염된 식품 (육류 또는 계란)을 섭취함으로써 발생하며, 식중독 원인의 20% 이상을 차지하고 있다.

현재 2,500종류 이상의 혈청 type이 알려져 있으며, 이 대부분의 모든 살모넬라는 침입성 관련 유전자 *invA*를 지니고 있다. 새로 발매하는 TaKaRa ICAN[®] Salmonella Detection Kit은 당사가 개발한 ICAN (등온 유전자 증폭)법에 의해 *invA* 유전자를 특이적으로 증폭하고, 이 증폭산물의 항체를 이용하여 검출하는 kit이다. 등온에서 증폭하므로 특별한 증폭장치가 필요없다. 본 kit에는 검출방법이 다른 MicrotiterPlate version과 ChromatoStrip version의 2종류가 있다.

측정원리

측정 원리는 ICAN법으로 *invA* 유전자 (및 내부표준 DNA)를 증폭하는 단계와 probe 및 항체를 이용하여 증폭산물을 검출하는 단계로 이루어진다. ICAN법은 ICAN primer (DNA-RNA chimera primer), RNase H, DNA polymerase를 사용하여 DNA를 증폭하는 방법으로 일정한 온도에서 incubate 하는 것만으로 시료 속에 존재하는 목적의 DNA를 PCR법과 동

등 이상의 감도로 검출할 수 있다 (Life Science & Biotechnology 27호 참조). 두 종류의 version에서는 ICAN 증폭 단계가 완전히 동일하지만 검출 단계는 다르다.

우선 검체에서 DNA를 추출하고, *invA* 유전자를 포함하는 영역을 biotin화 ICAN primer를 이용하여 등온 (58°C)에서 증폭한다. 다음으로 MicrotiterPlate version에서는 ICAN 반응 종료액을 streptavidin 고정화

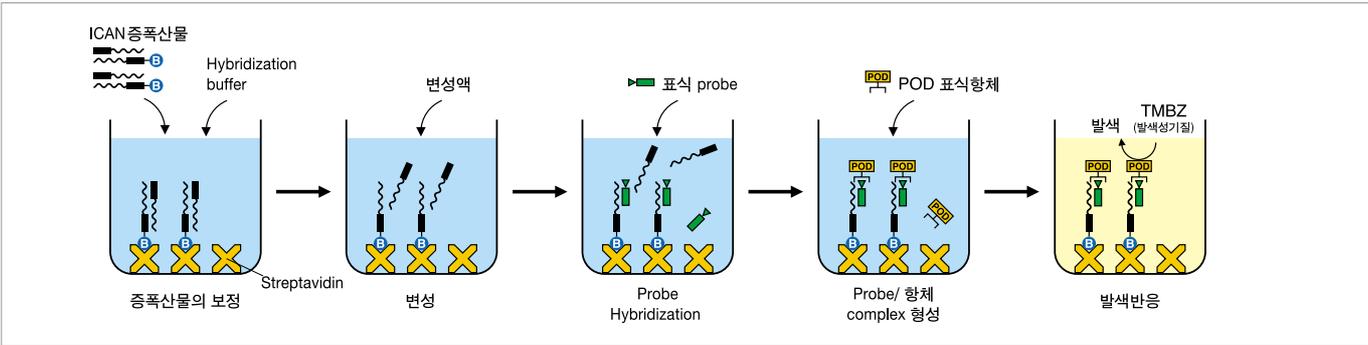


그림 1 검출원리 (MicrotiterPlate version)

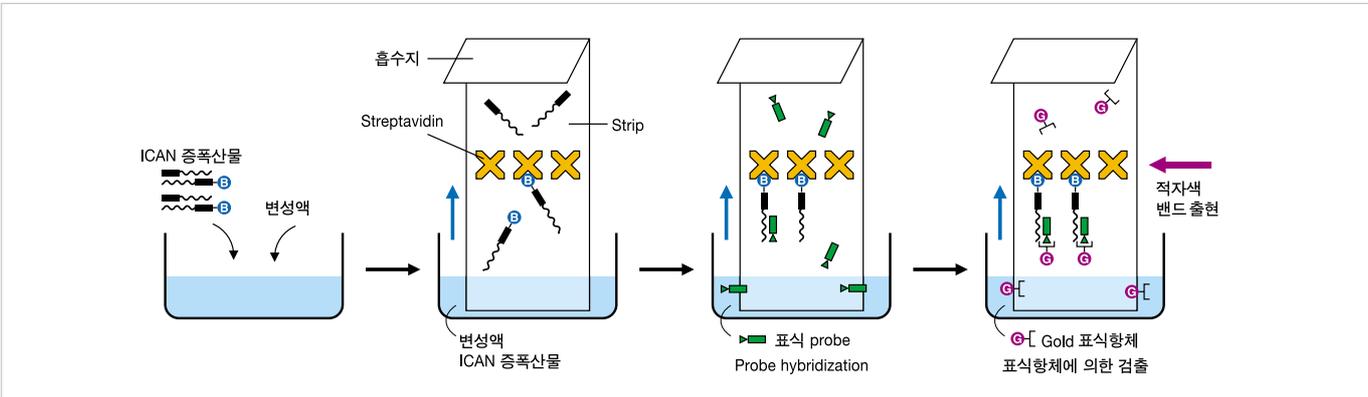


그림 2 검출원리 (ChromatoStrip version)

plate로 옮겨 증폭산물을 첨가한다. 첨가한 증폭산물을 single strand로 변성시킨 후 *invA* 유전자의 내부 서열에 상보적인 표식 probe로 hybrid시키고, POD 표식 항체 및 TMBZ 기질에 의한 발색반응을 수행하여 특이적인 증폭산물을 검출한다 (그림 1).

ChromatoStrip version에서는 일반적인 96 well plate에 ICAN 반응 종료액을 옮기고, 변성액을 첨가한 후 중앙부분 부근에 streptavidin을 선 형태로 고정화한 ChromatoStrip (strip)을 그 well에 담근다. 증폭산물은 위쪽으로 흡수되어 streptavidin 고정화 부위까지 도달된다. 다음에 표식 probe 용액을 추가한 well에 strip을 옮기고, strip 위에서 hybrid시킨 후 Gold 표식 항체를 추가한 well에 항체를 옮긴다. 양성인 경우에는 streptavidin 고정화 부위에 Gold 표식 항체가 보충되며 적자색의 라인이 나타난다 (그림 2).

이 kit에는 ICAN 반응이나 검출계의 저해로 인한 위음성 (false negative)을 확인하기 위하여 ICAN 반응계에 내부표준 DNA가 포함되어 있어 동일한 tube 내에서 *invA* 유전자와 내부표준 DNA가 동시에 증폭하도록 하였다. ICAN 반응 종료액을 두 개로 분류하고, *invA* 유전자에 특이한 표식 probe와 내부표준 DNA에 특이한 표식 probe를 사용한 검출을 각각 별도로 시행함으로써 위음성 (false negative)을 확인할 수 있다.

Kit의 내용

MicrotiterPlate version (32 assays)

Package 1 (증폭 시약 세트): 보존 -20℃	
· Enzyme Mix (8 reactions/tube)	50 µl × 4
· Primer Mix (8 reactions/tube)	150 µl × 4
· Positive Control DNA	50 µl
Package 2 (검출 시약 세트): 보존 4℃	
· Streptavidin Plate	96 well (8 well × 12 strips)
· Detection Probe	11 ml
· Internal Probe	4 ml
· Hybridization Buffer	10 ml
· Denature Reagent	1.2 ml
· 10× Washing Buffer	30 ml
· 100× Antibody POD Conjugate	110 µl
· Substrate Solution(TMBZ): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	12 ml
· Stop Solution: 1 N 황산	12 ml

ChromatoStrip version (32 assays)

Package 1 (증폭 시약 세트): 보존 -20℃	
MicrotiterPlate version과 동일	
Package 2 (검출 시약 세트): 보존 4℃	
· ChromatoStrip	32 strips × 2 packs
· Detection Probe	3.5 ml
· Internal Probe	2 ml
· Denature Diluent	1.5 ml
· Gold Conjugate	3.5 ml
· 96 well Plate	1 plate

Kit의 특이성 시험

2,500종류에 가까운 살모넬라 혈청 type 중에서 대표적인 균주 24종을 선택하여 이것을 검체로 하여 본 kit (MicrotiterPlate version)의 특이성 시험을 하였다. Negative control로서 살모넬라 이외의 균 6종에 대해서도 같은 시험을 하였다.

●방법

Casitone 배양지에 보존한 균주를 tryptic soy agar (TSA) 배지에 도포한 후 하룻밤 배양한 colony를 McFarland 1 (약 3 × 10⁸ cfu/ml) 농도로 멸균 생리식염수와 멸균수 (각 2 시료씩 제작)에 각각 떨어뜨리고, 끓는 물 속에서 10분간 처리하였다. 이것을 원심분리 (15,000 rpm, 5 min)하고, 그 상층을 검체로 하여 본 kit의 manual에 따라 검출하였다.

●결과

테스트한 모든 혈청형의 살모넬라 (*S. Arizonae*를 포함)에서 양성 결과를 얻었다. 또한 *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*와 같은 살모넬라 이외의 균주는 음성으로 본 kit의 특이성이 확인되었다 (표 1).

표 1 특이성 시험의 결과*

균주명	균주의 현탁액			
	멸균수		생리식염수	
	(1)	(2)	(1)	(2)
살모넬라균 혈청형²				
Oranienburg	2,541	1,824	2,881	2,749
Chester	2,130	1,954	2,140	2,133
Pomona	2,564	2,894	over	2,697
Agona	2,194	2,355	2,416	2,900
Typhimurium	1,821	1,678	2,120	2,289
Anatum	2,589	2,221	2,230	2,447
Enteritidis	2,773	2,687	over	2,823
Cerro	2,640	2,982	over	over
Montevideo	2,817	2,766	over	over
Weltevreden	2,811	2,820	over	over
Muenchen	2,816	2,486	over	over
Thompson	2,685	2,712	over	2,607
Havana	2,350	2,459	2,521	2,729
Dublin	1,774	1,516	1,704	1,548
Infantis	2,805	2,671	2,790	2,905
Corvallis	2,662	2,797	over	over
Hvittingfoss	2,849	2,797	2,896	2,835
Hadar	2,837	2,856	2,602	2,752
Senftenberg	2,797	2,728	2,841	2,856
Tennessee	2,761	2,686	2,864	2,883
Litchfield	2,689	2,571	2,728	2,640
Haifa	2,741	2,564	2,777	2,715
II	1,844	2,088	2,411	2,235
Arizonae	2,043	2,227	2,251	2,549
살모넬라균 이외의 균				
<i>Citrobacter freundii</i>	0,065	0,053	0,030	0,055
<i>Proteus mirabilis</i>	0,054	0,057	0,066	0,063
<i>Morganella morganii</i>	0,050	0,055	0,068	0,058
<i>Hafnia alvei</i>	0,060	0,065	0,076	0,063
<i>E. coli</i> (O25)	0,052	0,057	0,066	0,057
<i>Edwardsiella tarda</i>	0,055	0,060	0,071	0,061

*1 표의 수치는 발색 반응 종료 후 450 nm에서의 흡광도를 나타내었다.

*2 살모넬라균은 현재는 일반적으로 DNA의 상동성과 생화학적 성질과 상태를 바탕으로 2 종군 6 아종에 분류되어 아종명의 앞에 혈청 type을 표기하게 되어있다. 여기에서는 편의상 혈청 type만을 나타내고 있다.

Kit의 검출감도 시험

살모넬라 6균주를 검체로 하여 본 kit (MicrotiterPlate version)의 검출감도를 시험하였다.

●방법

특이성 시험과 동일한 방법으로 TSA agar 배지에 하룻밤 배양한 colony에서 측정 시료를 조제하고, 그림 3과 같은 순서로 검출감도를 조사하였다.

●결과

ICAN 반응액 속에 7,500 ~ 8,500 cfu의 균이 존재하면 100% 검출이 가능하였다. 그러나 그것의 약 1/10 (210 ~ 850 cfu)에서는 91.7%로 검출률이 약간 감소하였다. 이 결과 본 kit의 검출한계는 약 500 cfu로 판단된다 (표 2). 검사의 신뢰성을 더욱 높이면 ICAN 증폭반응을 2 회 연속 수행할 것을 권장한다.

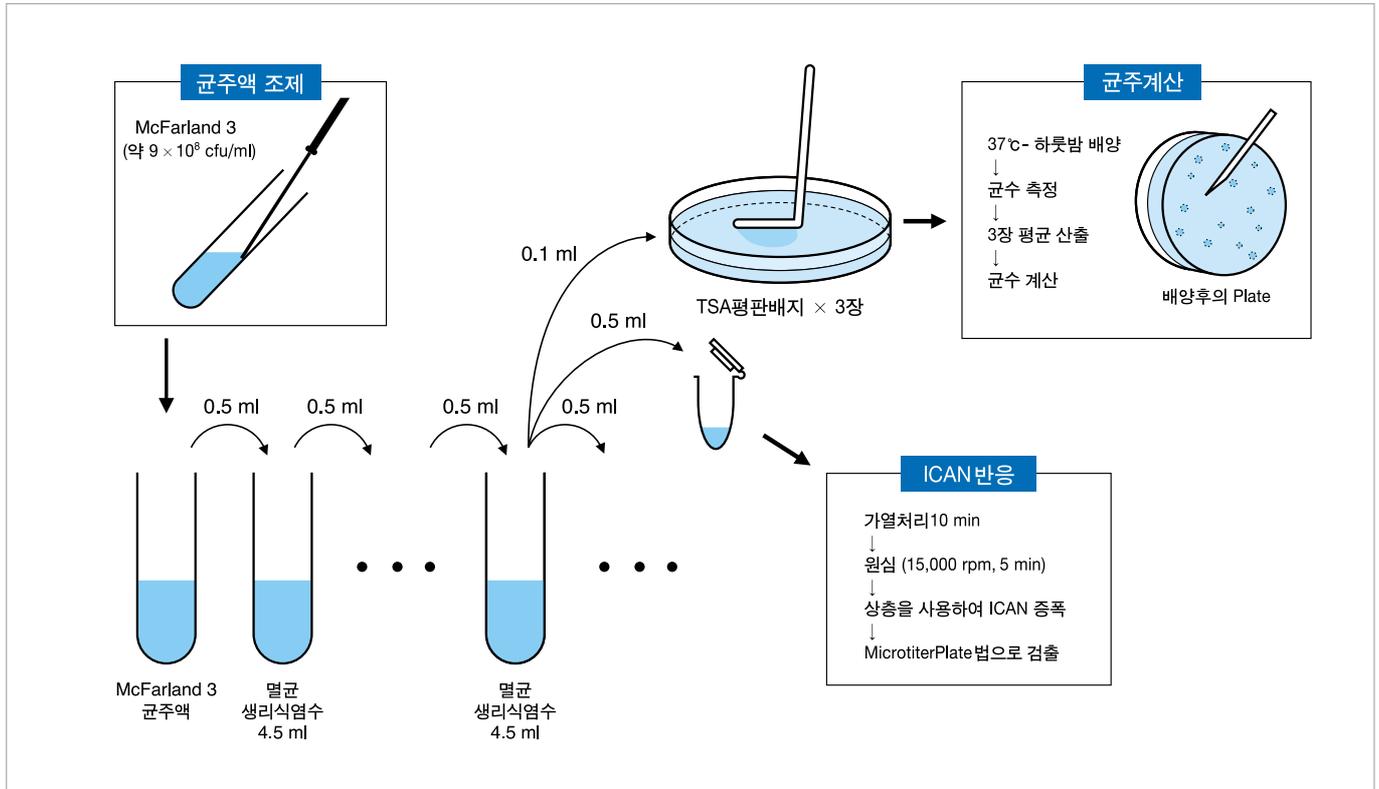


그림 3 감도시험 순서

표2 Kit의 검출감도시험 결과

살모넬라균 형질형	실험 횟수	ICAN 반응액 중의 균수 (cfu) ^{*1}				
		8,500 ~ 7,500	850 ~ 210	85 ~ 21	8.5 ~ 2.1	0.85 ~ 0.21
Typhimurium	2	- ^{*2}	2/2	2/4	0/4	0/4
Enteritidis	2	-	2/2	3/4	0/4	0/4
Dublin	2	-	2/2	1/4	0/4	0/4
Agona	2	4/4	8/8	0/4	0/4	0/4
Infantis	2	4/4	6/8	0/4	0/4	0/4
Arizonae	1	-	2/2	1/2	1/2	0/2
합계 (%)	11	8/8 ^{*3} (100)	22/24 (91.7)	7/22 (31.8)	1/22 (4.5)	0/22 (0)

*1: 검체의 양 5 μl

*2: -는 미측정

*3: 양성 반응수 / 피검수 (양성률)

PCR 실험 성공의 열쇠!

TaKaRa *Perfect* Premix

Add to Primer,
Template, dH₂O



PROPERTIES

- 사용하기 쉬운 ready-to-use master mix
- High specificity and sensitivity
- 신속한 PCR reaction setup과 높은 재현성
- 어떤 실험, 어떤 시료도 높은 성공률 보장
- 저렴한 가격

TaKaRa

다카라코리아바이오메디칼(주) 135-855 서울시 강남구 도곡2동 451-3

TEL 02-577-2002 FAX 02-577-3691 URL www.takara.co.kr E-mail takara@takara.co.kr