

# Bacteria Screening PCR Kit의 정량 PCR Smart Cycler® System에서의 사용 예

식품제조 현장에서 세균의 신속한 검사를 실시하기 위한 kit으로서 Bacteria Screening PCR Kit (TaKaRa Code RR114A)을 제조, 판매하여 호평을 받았다.  
 위생지표균으로 불리는 균군의 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭하고, 이 PCR 산물을 agarose 전기영동하여 검출하는데, 본 kit을 Real Time PCR법에 적용하면 더욱 신속한 검사가 가능하다.  
 본 고에서는 Real Time PCR용 장치, Smart Cycler® System에서 본 kit을 사용한 예에 대해 소개한다.

Bacteria Screening PCR Kit은 ENT primer에 의해 대장균이나 *Salmonella* 균을 포함한 장내 세균과의 균군의 16S rRNA 유전자를, 또한 BS primer에 의해 *Bacillus cereus*를 포함한 *Bacillus* 속, 황색 포도상구균을 포함한 *Staphylococcus*속의 균군의 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭하여 검출하는 kit이다. 또한 증균배양액을 이용하여 검체 속에 포함된 극소수의 살아 있는 균도 단시간에 검출할 수 있다.

본 kit의 자세한 내용은 Life Science & Biotechnology 26호 또는 2004 TaKaRa On-line Catalog (<http://corp.takara.co.kr/catalogue2003/top.asp>)을 참조하기 바란다.

본 kit을 Smart Cycler® System에서 사용하려면 interchelator로서 SYBR® Green I (TaKaRa Code F50512, F50513)이 필요하다 (본 시약은 kit에는 포함되어 있지 않으므로 별도로 준비하기 바란다). 이 반응계 (interchelator법)에서 23종류의 세균에 대해 Smart Cycler® System을 이용하여 Real Time PCR을 수행한 후 검출 특이성을 조사하였다.

● 방법

각종 세균 genome DNA (50 pg; 약 10<sup>4</sup> copy 전후에 해당)를 시료 (주형)로 하고, ENT primer 또는 BS primer를 이용하여 Smart Cycler® System으로 Real Time PCR을 실시하여 검출 특이성 (각 primer의 반응 특이성)을 조사하였다.

【반응액 조성】

2 × Premix Solution	12.5 μl
SYBR® Green I (3,000배 희석액)*	2.5 μl

Primer Mix ENT or BS (각 5 uM)	1.25 μl
DNA 시료 (주형)	1 μl
dH <sub>2</sub> O	7.75 μl
Total	25 μl

\* SYBR® Green I (제품원액)을 TE 또는 dH<sub>2</sub>O로 3,000배 희석한 제품 (사용시 희석)

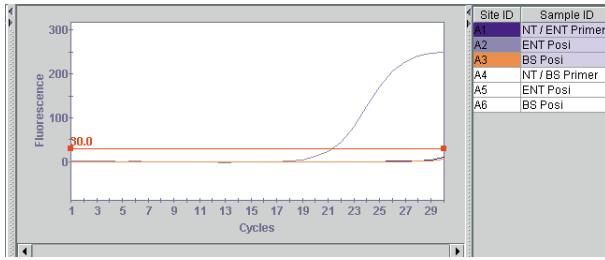
【Cycle 조건】

Stage 1				Stage 2				Stage 3			
Hold				Repeat 30 times.				Melt Curve			
Temp	Secs	Optics		3-Temperature Cycle				Start	End	Optics	Degl...
95	10	Off		Temp	Secs	Optics		60	95	Ch1	0.2
				95	5	Off					
				59	6	Off					
				72	20	On					

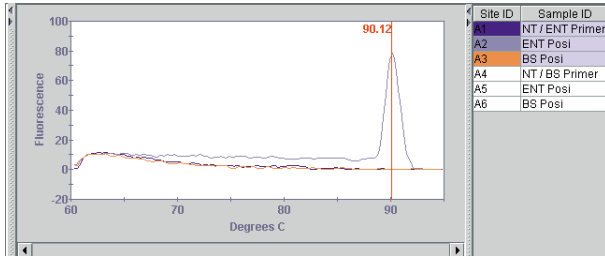
【결과】

ENT primer의 예로서 대장균 genome DNA를 주형으로 한 경우 증폭곡선과 용해곡선 분석결과를 그림 1의 (A)에, BS primer의 예로서 *Bacillus cereus*균 genome DNA를 주형으로 한 경우 결과를 그림 1의 (B)에 나타내었다. 또한 각 증폭산물의 용해온도 (T<sub>m</sub>)를 그림 1의 (C)에 나타내었다. 이와 같은 결과에서 증폭곡선에서는 형광강도 증가를 나타내었고, 동시에 용해곡선 분석에서는 증폭산물의 용해온도가 약 90℃이라는 것을 확인함으로써 Smart Cycler® System을 이용한 Real Time PCR에서도 대장균이나 *Bacillus cereus*균과 같은 위생지표균을 검출할 수 있었다. 23종류의 균주에 대해 검출반응을 수행한 결과를 정리하여 표 1에 나타내었다.

(A)

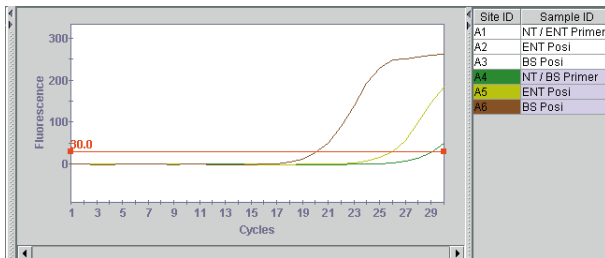


ENT primer에서의 증폭곡선

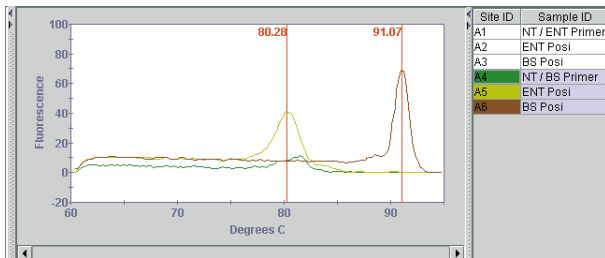


ENT primer에서의 용해곡선

(B)



BS primer에서의 증폭곡선



BS primer에서의 용해곡선

(C)

ENT primer의 반응에서 대장균 genome DNA를 주형으로 한 경우 증폭산물의 용해온도

Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Notes	Status	SyG Ct	Melt Peak1
A1	SYBR PCR BSK	NT / ENT Primer	UNKN		OK	0.00	
A2	SYBR PCR BSK	ENT Posi	UNKN		OK	21.29	90.12
A3	SYBR PCR BSK	BS Posi	UNKN		OK	0.00	
A4	SYBR PCR BSK	NT / BS Primer	UNKN		OK	29.10	
A5	SYBR PCR BSK	ENT Posi	UNKN		OK	25.98	80.28
A6	SYBR PCR BSK	BS Posi	UNKN		OK	20.13	91.07

BS primer의 반응에서 *Bacillus cereus* genome DNA를 주형으로 한 경우 증폭산물의 용해온도

표1 특이성 시험의 결과

균주명	ENT primer 결과			BS primer 결과		
	Ct값	Tm값	판정	Ct값	Tm값	판정
<i>Serratia ficaria</i>	22,89	90,18	+	25,29	80,4	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23,77	90,77	+	27,07	81,35	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	19,85	90,75	+	N.D.	N.D.	-
<i>Escherichia coli</i>	20,09	90,7	+	26,53	81,55	-
<i>Citrobacter freundii</i>	21,55	90,25	+	29,27	N.D.	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	21,49	90,32	+	24,91	80,46	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	24,00	90,86	+	24,46	80,49	-
<i>Photobacterium leiognathi</i>	23,55	90,92	+	27,29	81,79	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	20,78	89,7	+	27,73	81,31	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20,65	90,03	+	26,98	81,53	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	20,91	89,56	+	26,52	81,3	-
<i>Campylobacter coli</i>	20,94	89,25	+	29,08	N.D.	-
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	21,20	89,79	+	24,75	80,39	-
<i>Streptococcus mutans</i>	21,14	89,75	+	28,58	N.D.	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	26,70	90,23	+	24,57	80,28	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	26,66	90,18	+	27,41	81,65	-
<i>Bacillus subtilis</i>	N.D.	N.D.	-	25,88	80,99	-
<i>Bacillus megaterium</i>	N.D.	N.D.	-	26,57	79,06	-
<i>Bacillus cereus</i>	N.D.	N.D.	-	24,67	80,88	-
<i>Aerococcus viridans</i>	N.D.	N.D.	-	26,22	81,12	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	N.D.	N.D.	-	26,21	81,03	-
<i>Lactobacillus casei</i>	N.D.	N.D.	-	28,86	N.D.	-
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	N.D.	N.D.	-	26,45	79,13	-
	N.D.	N.D.	-	24,60	80,7	-
	N.D.	N.D.	-	27,72	79,73	-
	N.D.	N.D.	-	23,55	80,58	-
	N.D.	N.D.	-	19,63	90,84	+
	26,84	80,6	-	19,44	90,58	+
	N.D.	N.D.	-	22,10	90,53	+
	N.D.	N.D.	-	22,09	90,62	+
	N.D.	N.D.	-	21,66	91,35	+
	N.D.	N.D.	-	21,39	91,3	+
	28,66	N.D.	-	18,94	91,02	+
	N.D.	N.D.	-	19,06	90,69	+
	N.D.	N.D.	-	16,60	91,16	+
	N.D.	N.D.	-	16,58	91,12	+
	N.D.	N.D.	-	23,10	90,73	+
	N.D.	N.D.	-	23,48	90,46	+
	N.D.	N.D.	-	28,74	N.D.	-
	28,37	N.D.	-	24,19	91,01	+
	N.D.	N.D.	-	28,60	N.D.	-
	29,93	N.D.	-	27,23	81,39	-
	29,30	N.D.	-	25,98	80,62	-
	N.D.	N.D.	-	26,05	80,54	-

판정은 증폭산물이 생성되고 증폭산물의 용해온도 (Tm)가 약 90°C인 경우를 양성(+), 그 이외의 경우를 음성(-)이라고 했다. N.D.는 'Not Detected'를 나타낸다. 또한 표에 나타낸 Ct 값은 형광 강도가 30에 도달했을 때의 Ct값이다.

- : ENT primer의 target이 되는 균주
- : BS primer의 target이 되는 균주
- : BS primer의 target이 되지 않음, 검출하기 어려운 균주 (반응성이 좋지 않아 검출하기 어렵다)
- : ENT, BS primer의 어느 쪽의 target도 아닌 균주

그림 1 증폭곡선과 용해곡선 분석결과의 예