

Real Time PCR을 이용한 세균의 신속한 검사!!

Cycleave PCR[®]

Bacteria Screening Kit

TaKaRa Code CY208

50반응용 (ENT, BS 각 25 반응)

- RealTime PCR로 특정 세균을 검사하기 위한 kit이다.
- 식품 제조현장에서 세균의 신속한 검사가 가능하다.
- 검출계에는 고감도 cycling probe법을 채택하였다.
- RealTime PCR 장치로서 Smart Cycler[®] II System을 사용하였다.

식품 제조 현장에서 대장균이나 살모넬라균, 황색포도상구균 그리고 *Bacillus cereus*균 등 이른바 식중독에 관여하는 세균의 오염은 가능한 피해야 한다. 이러한 위험 미생물을 직접 검사하는 것보다 위생 지표균이라고 일컬어지는 균을 포함한 균군 수준으로 screening으로 검사하는 편이 신속하고 경제적이다.

또한 이들의 위생 지표균 군의 오염 상황을 파악하는 것은 제품이나 제조 가공 및 보존 중에 위험미생물의 존재 혹은 품질 저하 등의 위생학적 품질을 간접적이지만 보다 넓은 범위로 파악 할 수 있는 편리성이 있다. 특히 세균 오염도가 비교적 낮은 상황 하에 있는 식품 공장에서는 균군 level 검사법이 합리적인 방법의 하나이다.

이러한 것을 토대로 대장균이나 살모넬라균을 포함한 장내 세균과 황색 포도상구균을 포함한 *Staphylococcus*속 균, 및 *Bacillus cereus* 균을 포함한 *Bacillus*속 균을 위생 지표 균군이라고 보고 이들 균군의 screening을 위한 PCR로 검출하는 Bacteria Screening PCR Kit를 지난해 발매하여 호평을 받고 있다 (Life Science & Biotechnology 27호). 이 kit를 더 발전시켜 cycling probe법을 사용한 Real Time PCR에 적용할 수 있도록 제작한 제품이 Cycleave PCR[®] Bacteria Screening Kit이다.

* : Smart Cycler[®] II System은 Cepheid사의 제품으로 당사가 공급하고 있다.

Cycleave PCR[®] Bacteria Screening PCR Kit

본 제품은 Smart Cycler[®] 또는 Smart Cycler[®] II System을 사용해 cycling probe법으로 균군을 real time으로 검출하는 kit이다. 16S rRNA 유전자를 target으로 ENT primer 및 ENT probe (FAM 표식)로 대장균 및 살모넬라 균을 포함한 장내 세균과의 균군 (그림 1), 또는 BS primer 및 BS probe (ROX 표식)로 *Bacillus cereus* 균을 포함한 *Bacillus* 속, 황색포도상구균을 포함한 *Staphylococcus*속 균군 (그림 2)을 검출한다. 증균 배양을 함께 이용하면 검체 속에 포함된 극소수의 살아있는 균도 단시간에 검출할 수 있다.

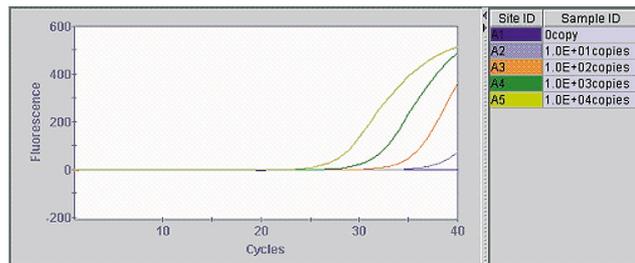


그림 1 Smart Cycler[®] II System을 사용해 ENT 검출계에서 ENT positive control을 검출하였을 때의 channel1 (Ch1) 증폭 곡선

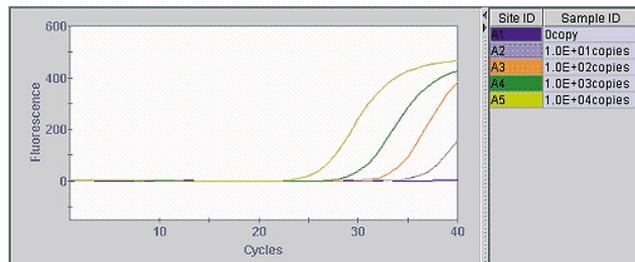


그림 2 Smart Cycler[®] II System을 사용해 BS 검출계에서 BS positive control을 검출하였을 때의 channel 3 (Ch3) 증폭 곡선

Kit 내용 (50반응분: ENT, BS 각 25 반응)

| | |
|--|----------------------|
| TaKaRa Ex Taq [®] HS (5 U/ μ l) | 12.5 μ l (50반응분) |
| Tli RNaseHIII (200 U/ μ l) | 25 μ l (50반응분) |
| 2×Reaction Mixture (2× conc.) | 625 μ l (50반응분) |
| ENT Primer Mix (5 uM each) | 37.5 μ l (25반응분) |
| BS Primer Mix (5 uM each) | 37.5 μ l (25반응분) |
| ENT Probe (25× conc.) | 25 μ l (25반응분) |
| BS Probe (25× conc.) | 25 μ l (25반응분) |
| ENT Positive Control | 10 μ l (10반응분) |
| BS Positive Control | 10 μ l (10반응분) |
| dH ₂ O | 1 ml |
| 10% Chelex [®] Solution* | 12 ml |

*: Chelex[®]는 Bio-Rad사 제품입니다.

Primer와 cycling probe 설계

PCR 증폭의 target으로 세균 유래의 16S rRNA 유전자를 선택하였다. 여러 연구자들의 노력에 의해 얻어진 다양한 미생물의 유전자 서열 데이터 수는 방대하며, 최근 Bergey's Manual의 세균 분류 체계도 16S rRNA 유전자 서열에 기초해 결정되고 있다¹⁾. Genomic DNA 상의 유전자는 여러개 존재하여 PCR 검출에서의 검출 감도 향상에도 유리하다고 생각된다. 예를 들면 장내 세균과 세균에서는 1세포당 6 ~ 7 copy, *Staphylococcus*속 세균에서는 4 ~ 6 copy, *Bacillus*속 세균에서는 7 ~ 12 copy라고 한다²⁾. 또한 분리 균주의 서열 비교에 의해 균 동정이 균종에 가까운 정도까지 검사가 가능하다.

개발 당시 기술한 균종을 일괄적으로 검출하는 PCR primer 설계를 시도해 보았지만, 목적 균종에 대한 검출특이성을 겸비한 것은 설계하지 못하였다. 따라서 목적 균종을 2개로 나누고, 대장균이나 살모넬라균을 포함한 장내 세균과 균종을 검출하는 primer (ENT primer)와 cycling probe (ENT probe), 황색포도상구균을 포함한 *Staphylococcus*속 균종 및 *Bacillus cereus*균을 포함한 *Bacillus*속 균종을 검출하는 primer (BS primer)와 cycling probe (BS probe)를 각각 설계하였다.

세균 유래의 16S rRNA 유전자는 미토콘드리아나 엽록체 유래의 유전자와의 상동성이 높다고 알려져 있다. 특히 후자와의 유사성이 높기 때문에 식물이나 동물 유래 성분을 함유하는 가공식품에서 16S rRNA 유전자를 목적으로 세균종을 PCR로 검출할 경우에는 식물 유래 DNA와 반응하지 않는 것이 중요하다. Primer와 cycling probe 설계시에는 위의 내용에 유의하였다. Cycling probe법 원리에 대해서는 Life Science & Biotechnology 27호, 31호를 참고한다.

증균 배양과 전처리

PCR법을 이용한 미생물 검출에서의 문제점은 살아있는 균과 죽은 균 유래의 DNA를 구별하지 못한다는 것이다³⁾. 이것은 세균의 오염 이력을 파악할 경우에는 문제가 되지 않지만, 살아있는 균에 의한 오염을 검사하고자 할 경우에는 문제가 된다. 이 문제를 해결하기 위해 시료의 증균 배양 조작을 검사 공정에 넣었다. 이 조작에 의한 살아있는 균수 증가는 검출 감도 향상에도 기여한다. 또한 식품 찌꺼기를 제거한 원심상층액상청으로부터 균체를 얻도록 한다. 균체로부터의 DNA 추출에는 chelex를 이용한 가열처리를 실시한다⁴⁾. 또한 황색포도상구균 등의 gram positive 균의 경우에는 세포벽 분해효소 (예를 들면 *Achromopeptidase*) 사용이 유효하다.

검출 감도

지표균을 식품에 첨가하여 약 5시간 증균 조작 후, Real Time PCR을 실시하여 검출 감도를 검토한 결과, 각 식품에서 약 10 ~ 10⁴ cfu/g 시료*의 첨가균이 검출되었다. 단, 가공식품에 따라서는 PCR 저해를 일으키는 경우가 있어 (예를 들면 두부, 향신료 함유식품 등), 이러한 검체에 대해서는 저속원심으로 식품찌꺼기를 간단하게 제거한 원심 상층액에서 얻은 균체를 포함한 시료를 보다 세심한 DNA 정제조작을 실시한 후에 검사할 필요가 있다. 죽은 균수가 과다한 식품에서는 증균 배양 조작을 실시해도 죽은 균이 검출되는 경우가 있다. 이 경우에는 대조군으로 배양 전 검체에도 검사를 실시하고, 증균시간을 늘려 죽은 균과 살아있는 균 구별이 명확해지도록 할 필요가 있다고 생각된다.

*: 균종에 따라서는 검출 감도에 폭이 있으므로 (10 ~ 10⁴cfu/g 시료), 첨가회수 시험을 실시하여 각 용도에 적합한 검출감도를 조사할 것을 권장한다 (특히 황색포도상구균 등의 *Staphylococcus*속 세균 검출에서는 위의 세포벽 분해효소를 사용하지 않을 경우의 검출감도가 좋지 않다).

검출계의 반응특이성

23종의 세균에 대해 Smart Cycler[®] II System를 이용한 Real Time PCR을 수행하여 검출 특이성 실험을 하였다.

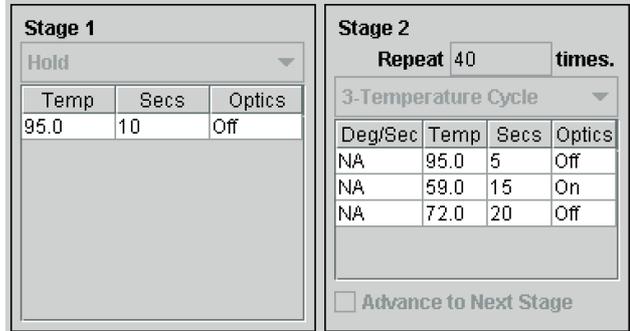
[방법]

각종 세균 genomic DNA (50 pg; 약 10⁴ copy 전후에 상당)를 시료 (주형)로 하며, ENT 및 BS 검출계에서 Smart Cycler[®] II System을 이용한 Real Time PCR (40 cycle 반응)을 수행하여 검출 특이성 (ENT, BS 각각의 반응 특이성)을 조사하였다.

[반응액 조성]

| | |
|--|---------|
| 2× Reaction Mixture | 12.5 μl |
| ENT or BS Primer Mix (5 uM) | 1.5 μl |
| ENT or BS Probe (25×) | 1 μl |
| TaKaRa Ex Taq [®] HS (5 U/μl) | 0.25 μl |
| Tli RNase H II (200 U/μl) | 0.5 μl |
| DNA 시료 (주형) | 1 μl |
| dH ₂ O | 8.25 μl |
| Total | 25 μl |

[결과]



[결과]

23종의 균주에 대해 검출반응을 실시한 결과를 표1에 나타내었다. 이 결과에서 Smart Cycler[®] II System을 이용한 Real Time PCR에서 ENT primer 및 ENT probe (FAM 표식)로 대장균 및 살모넬라균을 포함한 장내 세균과의 균종을, BS primer 및 BS probe (ROX 표식)로 *Bacillus cereus*균을 포함한 *Bacillus*속, 황색포도상구균을 포함한 *Staphylococcus*속 균종이 검출되었다.

식품 시료 (면류)에 첨가한 균종의 검출예

시판되는 면에 4종의 지표균을 첨가하고 Smart Cycler[®] II System을 이용한 Real Time PCR로 첨가균을 검출한 실험 (첨가회수 시험)은 아래와 같다.

| 균주명 | ENT 검출계 | | BS 검출계 | |
|-----------------------------------|---------|-----|--------|-----|
| | C값 | 판정 | C값 | 판정 |
| <i>Serratia ficaria</i> | 28.46 | POS | - | NEG |
| | 28.41 | POS | - | NEG |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 27.42 | POS | - | NEG |
| | 27.53 | POS | - | NEG |
| <i>Salmonella Enteritidis</i> | 27.57 | POS | - | NEG |
| | 27.72 | POS | - | NEG |
| <i>Escherichia coli</i> | 28.37 | POS | - | NEG |
| | 28.75 | POS | - | NEG |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 31.96 | POS | - | NEG |
| | 32.28 | POS | - | NEG |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 27.19 | POS | - | NEG |
| | 27.37 | POS | - | NEG |
| <i>Vibrio vulnificus</i> | 27.93 | POS | - | NEG |
| | 27.44 | POS | - | NEG |
| <i>Photobacterium leiognathi</i> | 29.27 | POS | - | NEG |
| | 28.68 | POS | - | NEG |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | 38.53 | POS | - | NEG |
| | 38.69 | POS | - | NEG |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | NEG | - | NEG |
| | - | NEG | - | NEG |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> | - | NEG | - | NEG |
| | - | NEG | - | NEG |
| <i>Campylobacter coli</i> | - | NEG | - | NEG |
| | - | NEG | - | NEG |
| <i>Flavobacterium johnsoniae</i> | - | NEG | - | NEG |
| | - | NEG | - | NEG |
| <i>Streptococcus mutans</i> | - | NEG | - | NEG |
| | - | NEG | - | NEG |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | - | NEG | 26.27 | POS |
| | - | NEG | 25.93 | POS |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | - | NEG | 25.80 | POS |
| | - | NEG | 26.23 | POS |
| <i>Bacillus subtilis</i> | - | NEG | 26.08 | POS |
| | - | NEG | 26.10 | POS |
| <i>Bacillus megaterium</i> | - | NEG | 29.34 | POS |
| | - | NEG | 29.24 | POS |
| <i>Bacillus cereus</i> | - | NEG | 26.50 | POS |
| | - | NEG | 26.54 | POS |
| <i>Aerococcus viridans</i> | - | NEG | 31.33 | POS |
| | - | NEG | 31.46 | POS |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | - | NEG | - | NEG |
| | - | NEG | - | NEG |
| <i>Lactobacillus casei</i> | - | NEG | - | NEG |
| | - | NEG | - | NEG |
| <i>Corynebacterium kutscheri</i> | - | NEG | - | NEG |
| | - | NEG | - | NEG |

□ : ENT □ : BS Target □ : 어느쪽도 아님

【방법】

시판 되는 면에 9배 양의 BHI 배지를 첨가하고 stomaker로 파쇄혼합한 후, 지표균으로 대장균 (*Escherichia coli*), 살모넬라균 (*Salmonella Enteritidis*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 또는 cereus균 (*Bacillus cereus*)을 본래 시료당 10 ~ 20개/g(1 ~ 2개/ml 배양액)이 되도록 첨가하고, 35℃에서 5시간, 진탕 배양하였다 (약 10 ml).

그 배양액 1.3 ml를 1,000 rpm (약 100×g)으로 1분간 원심으로 찌꺼기를 떨어트린 후, 그 원심상층액의 1.0 ~ 1.2 ml를 12,000 rpm (약 13,000×g)으로 3분간 원심분리하였다. 침전을 500 μl의 TE buffer (10 mM Tris HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0)로 현탁 후, 원심분리하여 침전을 세정하였다. 침전 (균체 포함)에 100 μl의 Achropeptidase액 (250 U/ml Achropeptidase in TE buffer)를 첨가하고, 현탁 후 55℃에서 15분간 효소 처리하였다. 100 μl의 Chelex[®] Solution을 첨가하여 99℃에서 5분간

가열처리한 후, 급냉하였다. 12,000 rpm (약 13,000×g)으로 1분 동안 원심분리하여, 그 상층액을 DNA 시료로 하였다.

위의 방법에 따라 조제한 DNA 시료에 대해 ENT 검출계 또는 BS 검출계의 Real Time PCR을 Smart Cycler[®] II System을 이용하여 실시하였다 (표 2). 한편 증균 배양을 5시간 실시한 배양액의 일부를 agar plate (대장균: Desoxycholate agar plate: 살모넬라균: DHL agar plate: 황색포도상구균: Mannitol 난황 함유 agar plate: *Bacillus cereus*균: NGKG 난황 함유 agar plate)에 파종하고 살아있는 균수를 측정하였다 (표 3).

【결과】

증균 배양을 5시간 실시하고, 초기에 발생한 균수 10 ~ 20개/g 시료의 대장균, 살모넬라균, 황색포도상구균, *Bacillus cereus*균을 ENT 또는 BS 검출계로 모두 검출할 수 있었다. 그 검출 결과를 표 2, 3에 나타내었다.

표 2 Real Time PCR을 이용한 첨가회수시험 검출 결과

| 지표 균종 | 균의 첨가 | 증균 배양시간(hr) | | | |
|-----------------------------------|------------------|-------------|-----|-------|-------------------|
| | | 0 | | 5 | |
| | | Ct값 | 판정 | Ct값 | 판정 |
| 대장균 (ENT 검출계) | 무첨가 | - | NEG | - | NEG |
| | 첨가 ¹⁾ | - | NEG | 34.91 | POS |
| 살모넬라균 (ENT 검출계) | 무첨가 | - | NEG | - | NEG |
| | 첨가 ¹⁾ | - | NEG | 35.53 | POS |
| 황색포도상구균 (BS 검출계) | 무첨가 | - | NEG | - | NEG |
| | 첨가 ¹⁾ | - | NEG | 36.90 | POS |
| <i>Bacillus cereus</i> 균 (BS 검출계) | 무첨가 | - | NEG | 39.42 | POS ²⁾ |
| | 첨가 ¹⁾ | - | NEG | 30.39 | POS |

POS=양성, NEG=음성

*1: 10 cfu/g 시료(1 cfu/ml BHI broth) 첨가

*2: 죽은 균에 의한 영향으로 인해 POS가 되었다

표3 Agar 배지에 의한 살아있는 균의 수¹⁾ 측정

| 지표 균종 | 균의 첨가 | 증균 배양 시간 | |
|--------------------------|------------------|----------|---------------------|
| | | 0hr | 5hr |
| 대장균 | 무첨가 | <1 | <10 |
| | 첨가 ¹⁾ | 3.0 | 7.7×10 ³ |
| 살모넬라균 | 무첨가 | <1 | <10 |
| | 첨가 ¹⁾ | 5.5 | 2.2×10 ³ |
| 황색포도상구균 | 무첨가 | <1 | <10 |
| | 첨가 ¹⁾ | 1.5 | 1.4×10 ³ |
| <i>Bacillus cereus</i> 균 | 무첨가 | <1 | <10 |
| | 첨가 ¹⁾ | 3.5 | 9.4×10 ³ |

*1 : 살아있는 각종 한천배지에서 24시간 배양 후 측정 (단위 : cfu/ml 배양액)

*2 : 10 cfu/g 시료 (1 cfu/ml BHI broth) 첨가

관련 제품

• Bacteria Screening PCR Kit TakRa Code RR114A

참고문헌

- 1) <http://www.cme.msu.edu/bergeys/>
- 2) <http://rmdb.cme.msu.edu/rmdb/servlet/controller>
- 3) Wang, R.-F., Cao, W.-W. and Cerriglia, C. E. (1997) *J. Appl. Microbiol.* **83**, 727-736
- 4) Kobayshi, K., Tagami, M. and Seko, K. (1994) *Kansenshogaku Zasshi* **68**, 1203-1210.