

구토독 생산성 식중독균 *Bacillus cereus*균의 신속 검출!!

- 구토독 (cereulide) 생산성 *Bacillus cereus*균의 특이적 검출을 간편하고 신속하게 수행하기 위한 PCR kit이다.
- Cereulide 합성효소 (CRS) 유전자, lecithinase 유전자 및 internal control을 동일 tube에서 PCR 증폭하여 판정한다.

*Bacillus cereus*균은 토양, 공기 및 하천수 등의 자연환경이나 농작물, 사료 등에 널리 분포하는 아포형성간균이다. 이 아포는 고열에도 견디며, 부영양 환경에서 발아하여 영양형이 되어 증식하며 독소를 생산한다. 식중독과 관련된 독소에는 구토독 (cereulide)과 설사 원성독소 (enterotoxin)의 2종류가 있다. Cereulide는 열에 강하기 때문에 cereulide 생산성 *B. cereus*균이 식품 속에서 대량으로 증식해 cereulide를 생산하면 가열해도 식중독을 일으킨다.

Cereulide를 생산하는 *Bacillus cereus*균에 의한 식중독은 쌀밥이나 볶음밥, 스파게티 등의 식품에서 발생하는 것으로 알려져 있다 (가열조리 후 실온에서 장시간 방치하면 균이 증식한 것으로 생각된다). Cereulide는 종래 bioassay나 LGMS 해석으로 검출되었는데, 조작이 복잡하며 시간이 걸려 보다 간편하고 신속한 cereulide 생산성 *B. cereus*균의 특이적인 검출법의 개발이 요구되어져 왔다.

나고야대학 의학부와 나고야시 위생연구소의 연구에서 cereulide 비생산주는 cereulide 합성효소 (CRS) 유전자의 일부가 결손되어 있는 것으로 밝혀져, 이 결손부분의 서열을 sequencing으로 조사하였다. 이 결손부분의 서열을 바탕으로 설계된 primer를 이용하여 이 영역을 PCR 한 후 증폭산물이 검출되면 cereulide 생산주라고 판정할 수 있다. 일본에서 실제로 발생한 *Bacillus cereus*균에 의한 구토형 식중독의 임상주를 무작위로 100주 선별하여 이 방법으로 검토한 결과, 100%의 확률로 PCR 산물이 검출되어 이것이 cereulide 생산주인 것으로 확인되었다.

금번 출시한 *Bacillus cereus* (CRS gene) PCR Detection Kit는 위의 자료를 토대로 개발된 kit로 cereulide 생산성 *B. cereus*균을 PCR법을 이용하여 간편하고 신속하며 또한 확실하게 검출이 가능하다.

제품의 내용 (50 반응분)

5×PCR premix*	500 μl
CRS primer mixture (cereulide 합성효소 유전자 검출용)	50 μl
LE primer mixture (lecithinase 유전자 검출용)	50 μl
I,C. primer mixture (internal control 검출용)	50 μl
CRS positive control template	10 μl
LE positive control template	10 μl

* dNTP mixture, internal control, TaKaRa Ex Taq® HS를 포함한다.

Cereulide 합성효소 (CRS) 유전자와 *B. cereus*균 및 유사균 (*B. thuringiensis*, *B. anthracis*)가 보유하는 lecithinase 유전자 (LE)를 각각 CRS primer, LE primer를 이용하여 하나의 tube 안에서 동시에 PCR 증폭함으로써 cereulide를 생산하는 *B. cereus*균을 관찰한다. Internal control도 동시에 증폭하기 때문에 false negative 판정도 가능하다. 증폭산물은 agarose 전기영동으로 검출한다 (그림 1).

증폭에는 Hot Start용 효소인 TaKaRa Ex Taq® HS (본 kit에 포함)를 사용하므로 mispriming이나 primer dimer에 유래하는 비특이적 증폭을 방지할 수 있어 고감도로 검출이 가능하다.

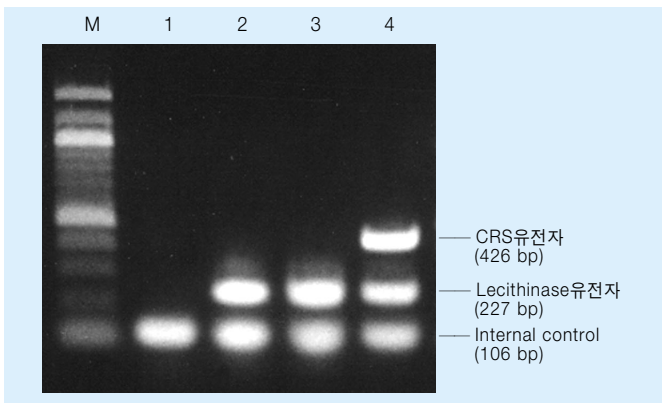


그림 1 본 kit에 의해 얻은 증폭산물의 agarose gel 전기영동의 결과

- M : 100 bp ladder marker
- 1 : *Bacillus subtilis*
- 2 : *Bacillus thuringiensis*
- 3 : Cereulide 비생산성 *Bacillus cereus*
- 4 : Cereulide 생산성 *Bacillus cereus*

Cereulide 생산성 *B. cereus*균의 경우 (Lane 4)에서는 CRS 유전자, lecithinase 유전자 및 internal control 유래의 3가지 밴드가 나타났다

검출계의 반응특이성

9종의 세균에 대해 본 kit로 PCR을 수행하여 검출의 특이성을 조사한 실험을 아래에 나타내었다.

[방법]

Plate 위의 colony에서 멸균된 micropipette용 tip을 이용하여 미량의 균체를 취해 멸균수 100 μl에 현탁하였다. 각 현탁액을 95℃에서 5분간 열처리한 것을 시료로 하여 PCR을 수행해 검출의 특이성을 조사하였다.

[반응액 조성]

5× PCR premix	10 μl
CRS primer mixture	1 μl
LE primer mixture	1 μl
I, C, primer mixture	1 μl
DNA 시료 (주형)	1 μl
dH ₂ O	36 μl
Total	50 μl

[PCR 조건]

94℃ 30 초	} 40 Cycles
55℃ 30 초	
72℃ 30 초	

[결과]

9종의 균주에 대해 검출반응을 수행한 결과를 표 1에 나타낸다. LE primer에 의해 *B. cereus*균 및 *B. thuringiensis*를, CRS primer에 의해 cereulide 생산성 *B. cereus*균의 검출이 가능함이 확인되었다.

표 1 특이성 시험의 결과

균주명 ¹⁾	판정 결과 ²⁾	
	LE primer계	CRS primer계
<i>Bacillus cereus</i> (cereulide 생산균)	POS	POS
<i>Bacillus cereus</i> (cereulide 비생산균)	POS	NEG
<i>Bacillus thuringiensis</i>	POS	NEG
<i>Bacillus megaterium</i>	NEG	NEG
<i>Bacillus pumilus</i>	NEG	NEG
<i>Bacillus subtilis</i>	NEG	NEG
<i>Staphylococcus aureus</i>	NEG	NEG
<i>Staphylococcus epidemidis</i>	NEG	NEG
<i>Escherichia coli</i>	NEG	NEG
<i>Salmonella</i> Enteritidis	NEG	NEG

1) *Bacillus cereus*는 각 5주, 다른 균주는 2주씩 실험함.

2) POS=양성, NEG=음성

식품성분 및 공존균에 의한 영향 검토

구토형 식중독에서 원인식품으로 많이 보고된 쌀밥에 cereulide 생산성 *B. cereus*균 및 *Bacillus subtilis*를 첨가하여 PCR 반응에 대한 식품 (쌀밥) 성분 및 공존균의 영향을 검토한 실험은 아래와 같다.

[방법]

보온 후 30℃로 유지한 쌀밥에 BHI 배지에서 20시간 배양한 cereulide 생산성 *B. cereus*균 및 *B. subtilis*를 각각 10⁵ cfu/g 첨가하여 30℃에서 20시간 배양하였다. 배양 후 TE buffer (10 mM Tris HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)에서 10배 유제(乳劑)를 제작하여 95℃에서 5분간 가열처리 하였다. 이것을 4℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 쌀뜨물을 시료로 PCR을 수행하였다. 또한 배양 후의 쌀밥 속의 각 균의 균수를 측정함과 동시에 HEp-2 세포 공포화(空胞化) 측정시험으로 cereulide 생산량을 측정하였다.

[결과]

표 2와 같이 cereulide 생산성 *B. cereus*균을 공존균 존재 하에서 식품 (쌀밥)으로부터 직접 검출할 수 있었다.

표 2 쌀밥에 첨가 실험의 결과

균수	<i>B. cereus</i> 균: 3.2×10 ⁶ /g
	<i>B. subtilis</i> : 4.4×10 ⁶ /g
Cereulide 생산량	800 ng/g
PCR	LE primer계 : 양성
	CRS primer계 : 음성

* 시료에 따라 분리 후 간단한 정제 또는 pre-culture가 필요한 경우도 있다.