



# Real Time PCR을 이용한 실제적용

## 식품 및 미생물 검사현장에서 활용되는 Real Time PCR의 예

Real Time PCR은 probe나 intercalator를 이용하여 PCR 증폭 산물을 실시간으로 모니터링하여 해석하는 방법으로, Real Time PCR 검출 방법은 기기와 시약의 성능이 발달됨에 따라 급속히 확대되고 있으며, 현재 유전자발현 해석, SNP typing 등에 가장 적합한 실험방법으로 자리매김하고 있다. Real Time PCR 기기와 시약만 갖추고 있으면 초보자라도 간편하게 실험할 수 있는 간편성과 반응시작 후 몇 시간 이내에 결과판정이 가능한 신속성, 그리고 검사에서 중요시되는 반응 특이성이 증가되어, 식품 검사나 미생물 검사 등에서도 보편적인 방법으로 이용할 수 있게 되었다. 다카라가 개발한 Real Time PCR 관련 제품 또한 실제 검사현장에서 활용되고 있다. 본 내용에서는 실제 검사현장에서 Real Time PCR 활용의 예를 소개하고자 한다.

### [1] 식품 O157 검사에 Real Time PCR 활용의 예

장관출혈성 대장균 감염증은 혈청형 O157과 O26 등의 verotoxin 생산성 장관출혈성 대장균에 의한 감염증이며, 출혈에 이어 장염이나 용혈성 요독증 증후군 (HUS)을 야기시키는 등, 중증의 증상을 수반하는 경우도 있다. O157 검사는 1997년에 일본 후생성에서 통지된 검사법을 바탕으로 운용되고 있지만, 최근 일본에서 원인균의 90%가 O157과 O26인 것으로 보고되고 있어, O157에 이어 O26에도 대응 가능한 검사 방법을 검토하고 있다.

### ■ 유전자검사법 채용에 대해서

2006년 11월 2일 일본 후생노동부 의약식품국 식품안전부 감시안전과에서 공시한 식품의 장관출혈성 대장균 O157 및 O26의 검사법 (食安監發 제 1102004, 1102005, 1102006, 1102007호)에 다카라의 O157 검출 제품 시리즈가 추천되었다.

([http://www.whoirei.mhlw.go.jp/cgi-bin/t\\_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=5333](http://www.whoirei.mhlw.go.jp/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=5333))

종래의 장관출혈성 대장균 검사 방법은 배양법과 혈청형에 의한 검출이었기 때문에 결과를 얻을 때까지 상당한 기간이 걸렸지만, 이번 공시에서는 효율화를 목표로 배양 검사전에 신속한 스크리닝이 가능한 유전자 검사법이 채용되었다.

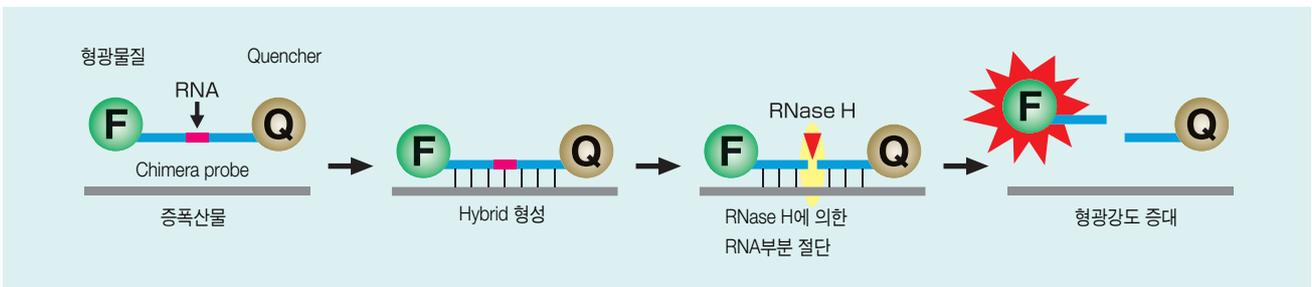
유전자검사법은 이미 바이러스 검사 등에서 채용되고 있으며, 식품의 미생물 검사에는 처음 채용되었지만 높은 신뢰성을 가지고 있으므로 그 유용성이 기대된다. 특히 Real Time PCR을 비롯한 유전자검사법은 감도, 특이성, 신속성이 뛰어나, 배양법에 의한 검사전 스크리닝에 매우 유용하다.

### ■ Real Time PCR에 의한 Verotoxin gene (VT유전자) 검사

다카라에서는 Real Time PCR 기기(Thermal Cycler Dice® Real Time System, Smart Cycler® II System)와 VT 유전자검출용 시약 (Cycleave PCR® O-157(VT gene) Screening Kit, CycleavePCR® O-157(VT1/VT2) Detection Kit Ver. 2.0)을 판매하고 있다. 이 기기와 시약을 사용한 검사 시스템은 O157이나 O26 등의 VT유전자를 고감도로 검출할 수 있으며, 아래와 같은 장점이 있다.

- PCR에 필요한 components가 모두 포함되어 있으므로 번거로운 시약 조제 불필요.
- 반응 시간은 약 1시간 30분. 반응 종료와 동시에 결과판정이 가능.
- 반응 tube의 뚜껑을 열지 않으므로 증폭 산물에 의한 실험실 오염 방지.
- Internal control이 들어있으므로, false positive 확인 가능.

위 전용 시약에는 검출 특이성이 매우 높은 Cycling Probe법을 채용하고 있다. DNA와 RNA로 이루어진 chimera probe를 사용하는 Cycling Probe법은 매우 높은 특이성으로 검출이 가능하며, 검사 목적의 실험에 탁월한 방법이다.



Cycling Probe 법의 개요

■ 배양 검사전 O157 신속 스크리닝 검사

(1) Real Time PCR에 의한 스크리닝

기기 : Thermal Cycler Dice® Real Time System (TaKaRa Code TP800)  
또는 동등 수준의 기기

시약 : CycleavePCR® O-157(VT gene)Screening Kit (TaKaRa Code CY213)

위 기기와 시약을 사용하면 대량 샘플의 신속 스크리닝이 가능하다. Thermal Cycler Dice® Real Time System은 다카라가 2006년 상반기 발매한 96 well plate type의 Real Time PCR 기기로 compact하면서 낮은 가격으로 대단히 높은 성능을 소유하고 있다. 특히 소프트웨어의 조작성이 매우 편리하여 많은 연구자들의 호평을 받고 있다. 검사에 필요한 시약이 모두 포함되어 있는 CycleavePCR® O-157(VT gene) Screening Kit는 Thermal Cycler Dice® Real Time System을 비롯한 각종 Real Time PCR 기기에 사용할 수 있는 시약이다.

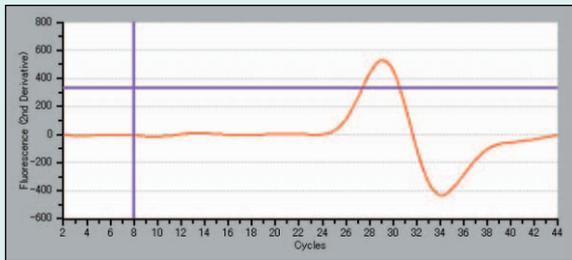
장관출혈성 대장균의 verotoxin 유전자 VT1/VT2의 false positive 확인을 위하여 Internal control을 multiplex PCR로 검출 (FAM, ROX) 하기 때문에, 조제한 DNA에서 PCR 저해물질 혼입 유무도 동시에 검사 가능하다. 따라서 검사 대상이 되는 샘플에 저해 물질이 포함되어 있다 하더라도 결과를 신뢰할 수 있는 시스템이다.

Kit의 프로토콜에 따라서 Real Time PCR을 수행하고 2nd Derivative Maximun법으로 증폭을 확인하였다(그림 1). 결과판정은 Text Report를 확인하면 완료된다. Ct (SDM) 수치를 얻었을 경우 양성이라고 판정할 수 있으며, 검출 한계 이하(음성)일 경우 수치가 나타나지 않는다.

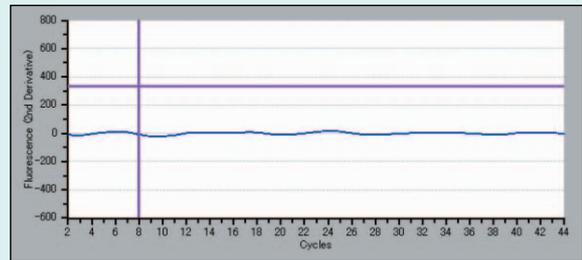


Thermal Cycler Dice® Real Time System (TP 800)

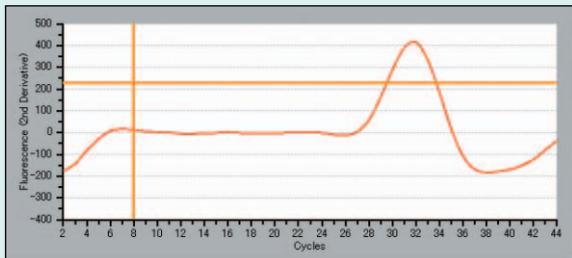
양성 Sample  
VT 유전자 (FAM™ 표지 probe 에 의한 검출)



음성 Sample  
VT 유전자 (FAM™ 표지 probe 에 의한 검출)

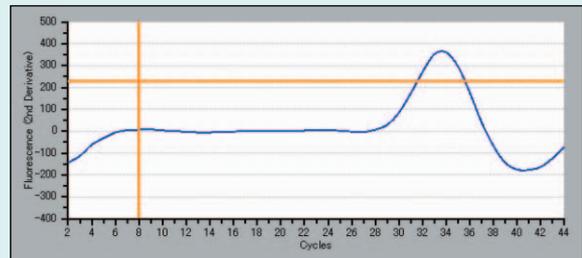


Internal Control (ROX™ 표지 probe 에 의한 검출)



VT유전자, internal control의 signal이 함께 검출되므로, 양성 VT유전자를 가지고 있음을 확인 할 수 있다.

Internal Control (ROX™ 표지 probe 에 의한 검출)



VT유전자는 검출되지 않았고 internal control은 문제없이 검출되었기 때문에, PCR 반응의 저해가 없는 상태로 VT유전자 음성을 확인할 수 있다.

그림 1. Thermal Cycler Dice® Real Time System을 사용하여 O157 (VT 유전자) 검출 예

(2) Real time PCR을 이용한 Typing

기기 : Smart Cycler® II System (TaKaRa Code SC200N)

시약 : CycleavePCR® O-157 (VT1/VT2) Detection Kit Ver. 2.0 (TaKaRa Code CY203)

이 반응계는 VT1 유전자, VT2 유전자, internal control을 multiplex PCR(3파장 동시 검출)로 검출하므로, VT1 및 VT2의 typing이 가능하다. Smart Cycler® II System은 16개의 I-CORE 모듈을 개별적으로 온도제어가 가능한 Real Time PCR 장치로 반응성이 매우 높다. 또, 외기를 받아들여서 온도 control을 하기 때문에 고속 PCR이 가능하고, 약 40분만으로 결과판정이 가능하다. 신속히 typing을 위해서는 이 반응계가 편리하다.



Smart Cycler® II System

### (3) End point PCR에 의한 스크리닝

기기 : TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Standard (TaKaRa Code TP650) 등  
 시약 : O-157(Verocytotoxin Genes) PCR Screening Set (TaKaRa Code RR100)

이 반응계의 시약은 일반적인 PCR용이다. PCR에 필요한 components가 모두 포함되어 있어, 시료(sample)만 준비되면 바로 반응을 할 수 있다. 반응 후 전기영동 결과로 판정한다. VT1 및 VT2 유전자 생산성 배양액에서 조제한 샘플을 이용해서 PCR을 실시하였다(그림 2). 증폭 밴드가 확인되지 않을 경우 음성이라고 판정한다(Lane 1). 증폭 size가 171 bp band가 확인될 경우, VT 유전자 양성이라고 판정한다(Lane 2~4). Kit에 포함된 control template를 이용해 PCR 저해반응 여부를 확인할 수 있다(Lane 5).



TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® & Mupid® - ACE

#### ■ 관련제품

Product	Size	TaKaRa Code
CycleavePCR® <i>Salmonella</i> Detection Kit	50 rxns	CY205
CycleavePCR® Bacteria Screening Kit	50 rxns	CY208
CycleavePCR® <i>Legionella</i> Detection Kit	50 rxns	CY209

#### ■ 본 원고에서 소개된 제품

Product	Size	TaKaRa Code
Mupid® - ACE	1 set	AD150
CycleavePCR® O-157 (VT1/VT2) Detection Kit Ver.2.0	50 rxns	CY203
CycleavePCR® O-157(VT gene) Screening Kit	50 rxns	CY213
O-157(Verocytotoxin Genes) PCR Screening Set	200 rxns	RR100
Smart Cycler® II System(기본 model)	1 set	SC200N
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® mini	1 set	TP100
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient	1 set	TP600
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Standard	1 set	TP650
Thermal Cycler Dice® Real Time System	1 set	TP800

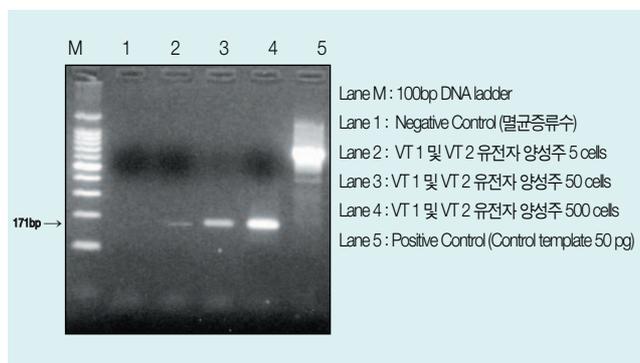


그림 2. O-157(Verocytotoxin Gene) PCR Screening Set를 사용하여 O-157 (VT 유전자) 검출 예

## Kitasato University, Kitasato Institute for Life Sciences, Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents Ubukata Kimiko 교수

Takara에서는 Ubukata Kimiko 교수(Kitasato University, Kitasato Institute for Life Sciences)의 검토 하에 CycleavePCR® 호흡기 감염증 원인균 검출 kit (TaKaRa Code CY214)를 판매하고 있다. 본 고에서는 Ubukata Kimiko 교수가 진행한 검출계 확립의 기초와 kit 소개, Real Time PCR을 이용한 원인균 검출 응용의 필요성 등을 중심으로 정리했다.

#### [Ubukata Kimiko 교수 약력]

일본 여자대학 졸업후, 동경대학 의학부 부속 병원분원 소아과세균 연구실, 테이쿄대학(帝京大) 의학부 소아과학교실, 동대학 임상병리를 거쳐, 일본 의과대학에서 의학박사 취득. 1990년부터 테이쿄 대학(帝京大學) 의학부 조교수, 1998년 (재)미생물화학연구소를 거쳐, 2001년부터 Kitasato University, Kitasato Institute for Life Sciences Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents 연구소교수에 취임하여 현재에 이른다. 현 제19회 일본 임상미생물학회총회 회장.



| Ubukata Kimiko 교수와의 인터뷰 |

**Q. Real Time PCR에 의한 원인균 검출계를 확립하게 된 경위는 무엇입니까?**

A. 세균 동정 혹은 그 병원인자나 약제내성유전자의 신속한 검색을 위하여 오래전부터 PCR 방법이 응용되어 왔습니다. 그러나, PCR 방법을 임상검사에 일반적으로 사용하는 것은 쉽지 않은 일이라고 생각합니다. 가장 큰 요인은 임상소견으로 원인균이라고 추정되는 세균을 PCR법으로 검출해도 결과가 확실하지 않다고 판단될 경우에는 종래의 배양 검사에 의지할 수 밖에 없어, 신속한 진단이 불가능하게 됩니다. 또한 PCR 후에도 전기영동이나 EtBr 등으로 염색을 해야 하는 번잡함 때문에 신속한 검사를 방해하는 요인이 되고 있었습니다. 하지만, 최근 들어 Real Time PCR을 적용하여 간소화와 시간단축이 가능했으며, 검출 감도의 문제점도 해결되었습니다. 본 연구실에서 구축한 Real Time PCR법은 결과 판별까지 소요시간이 검체 수령 후 1.5시간이면 충분합니다. 샘플 중 균의 양이 많으면 양성반응이 빨리 나타나므로, 1시간 이내에 검출되는 경우도 있습니다. 또 유전자의 증폭에서 검출까지 하나의 튜브 내에서 진행하기 때문에, 증폭 산물에 의한 실험실(laboratory)의 오염 및 다른 샘플의 오염을 경감시킬 수 있습니다.

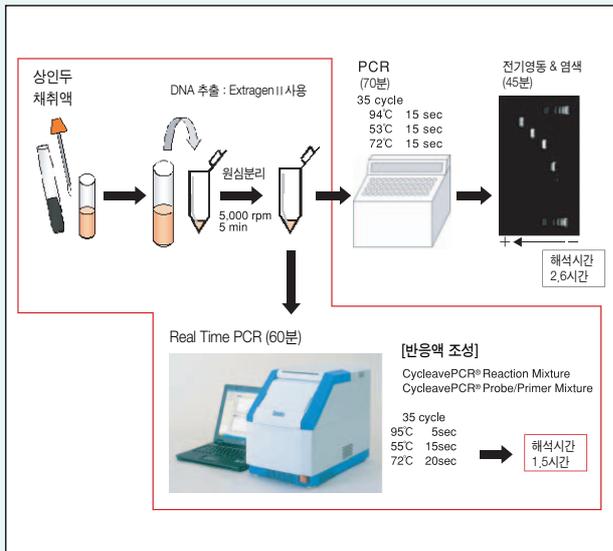


그림1. 원인균 검출 flow

**Q. 호흡기계통 감염증 원인균 검출 kit를 소개해 주십시오.**

A. 감염증 중에 폐렴 혹은 세균성화농성 수막염 등은 그 원인균을 신속하게 감별하여 적절한 항생제 치료가 필요한 질환으로, 원인균의 종류에 따라서 선택되는 항생제가 다릅니다. 또, 감염증 중에서 빈도가 높은 폐렴구균이나 인플루엔자균, mycoplasma의 내성은 증가되고 있습니다. 본 kit는 원인이 될 가능성이 높은 균, 위독화되기 쉬운 균, 혹은 원인균으로 확정될 때까지 3일 이상이 소요되는 균을 포함시킨 6개의 균종을 대상으로 Real Time PCR로 신속하게 검색하는 것을 목적으로 한 시스템입니다.

**Q. Target으로 선정된 6균종은 어떻게 정한 것입니까?**

A. Target이 되는 균은 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*), 인플루엔자균(*Haemophilus influenzae*), A군용혈성 연쇄상구균(*Streptococcus pyogenes*), *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* 6종입니다. 검출하는 target 유전자는 폐렴구균에서는 자기용해 효소를 coding하는 *LytA* 유전자, 인플루엔자균, *Mycoplasma pneumoniae*, A군용혈성 연쇄상구균, *Chlamydomphila pneumoniae*의 4균종은 16S rRNA 유전자, *Legionella pneumophila*는 *macrophage* 염증성 단백질을 coding하고 있는 *mip* 유전자입니다. 이 6균종을 선택한 이유는 소아와 성인에서 가장 감염률이 높은 원인균일 가능성이 높기 때문입니다. 덧붙이자면, 황색 포도상구균은 양성반응을 나타내도 건강한 사람에게서도 높은 비율로 나타날 수 있는 균이기 때문에 원인균인지 아닌지의 판단이 어려우므로 대상으로 삼고 있지 않습니다.

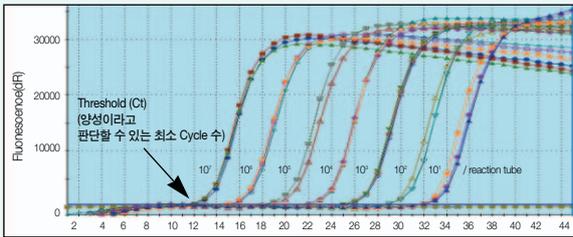
■ 표 1 Target 균

Target 원인균	Target 유전자	Probe 형광표식
폐렴구균 ( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )	<i>LytA</i> 유전자	FAM
인플루엔자균 ( <i>Haemophilus influenzae</i> )	16S rRNA유전자	FAM
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	16S rRNA유전자	FAM
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	16S rRNA유전자	FAM
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>mip</i> 유전자 및 16S rRNA유전자*	FAM & ROX
A군 용혈성 연쇄상구균 ( <i>Streptococcus pyogenes</i> )	16S rRNA유전자 및 <i>SLO</i> 유전자*	RAM & ROX

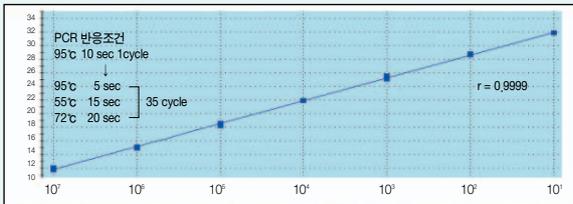
\* 2종의 형광색소로 *L. pneumophila*와 그 밖의 *Legionella*균, *S. pyogenes*과 그밖의 β- 용혈성 연쇄상구균을 구별한다.

**Q. 이전에는 다른 probe법을 이용하여 검출한 것으로 알고 있는데, 현재 Cycling probe (Cycleleave PCR) 법을 채택한 이유는 무엇입니까?**

A. Cycling probe 법은 10~14염기로 구성된 짧은 RNA-DNA chimera probe를 사용하고 있기 때문에 종래의 Real Time PCR에 비해 감도와 특이성에서 높은 결과를 얻을 수 있습니다. 목적유전자의 copy 수와 threshold cycle (Ct) 값으로부터 구한 검량선은 높은 상관성을 나타내고, 6균종 모두 10 copies DNA 만으로도 양성이라고 판정할 수 있는 감도이기 때문입니다.



Cycle수



반응 tube 당 Cycle수

그림 2. *H. influenzae*의 증폭곡선과 검량선 (사용기기 : Mx3000P (Stratagene))

**Q. 본 Kit를 채용한 예와 적용사례를 소개해 주십시오.**

A. 최근 발병한 성인 폐렴의 경우, 객담을 이용하여 Real Time PCR과 배양법을 이용하여 동시에 검출하고 있습니다. 특히 *Mycoplasma*나 *Legionella* 폐렴, 혹은 이 균들과 폐렴구균과의 혼합 감염과 같은 경우, 진단시 매우 유용한 것을 확인했습니다.

여기에는 소개하지 않았지만, 배양에 많은 시간이 소요되는 *Legionella*균은 항원검사도 가능합니다만, 일부 type만 검출 가능하므로, *Legionella*균 전체를 검출할 수 있는 PCR 방법은 매우 유용하다고 생각됩니다.

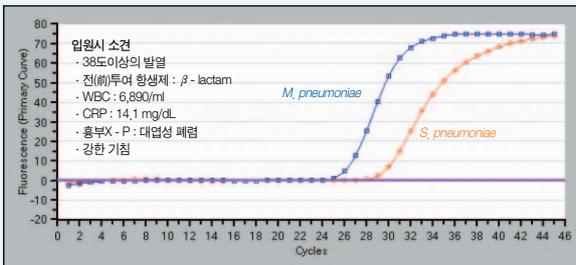


그림 3. 성인폐렴 검출 예  
[사용기기 : Thermal Cycler Dice® Real Time System]

**Q. 사용 기기로 TaKaRa의 Thermal Cycler Dice® Real Time System (TaKaRa Code TP800)을 선정한 이유를 설명해 주십시오.**

A. 본 실험실과 같이 일상적으로 대량 검사를 하는 연구실에서는 문제가 생겼을 때 바로 대응해 줄 수 있는 support line이 절실히 필요합니다. 그 점에서 TaKaRa는 빠른 대응으로 문제를 해결해 주는 것이 선정한 가장 큰 이유입니다. Thermal Cycler Dice® Real Time System은 일반적인 검사에 응용 가능성이 충분한 장치라 생각하고 있습니다.

**Q. 이후 전망에 대해서 말씀해 주십시오.**

A. 병원세균의 약제내성화는 병원내감염균 뿐만 아니라, 시중 감염균에 대해서도 심각한 문제를 일으키고 있습니다. 그 이유는 원인균이 밝혀지지 않은 채로 항생제를 투여하고, 치료의 끝을 정하지 못한채 장기간에 걸쳐 항생제가 사용하고 있기 때문입니다. 이러한 상황은 많은 내성균을 낳는 결과를 초래하고 있습니다. 항생제를 투여하기 전에 원인균을 확실히 밝힌 후에, 균에 따라서 적정량의 항생제를 사용해야 한다고 강조하고 싶습니다. 마지막으로 호흡기감염증에 대한 Real Time PCR의 최종목표는 여기에서 말한 세균뿐만 아니라, 원발성 감염 바이러스도 동시에 검출하는 방법을 확립하는 것에 있다고 생각합니다.



Ubukata Kimiko 교수님 연구실

**[3] Real Time RT- PCR을 이용한 Norovirus의 신속 검출**

일본 후생노동부 의약식품국 식품안전부 감시안전과에서 공시된 「Norovirus의 검출법에 대해서」(食安監潑 제1105001호)에는 Norovirus의 각종 검출 방법이 추천되어 있으나, 그 중에서도 고감도의 검출이 가능하면서도 신속한 Real Time RT- PCR에 의한 검출이 많이 사용되고 있다. 본 고에서는 공시에 추천된 primer 및 probe를 이용하여 positive control RNA를 주형으로 사용한 모델 실험을 소개하고자 한다.

본 실험에는 다카라바이오의 Real Time RT-PCR kit인 PrimeScript® RT-PCR Kit(Perfect Real Time) (TaKaRa Code RR061)를 사용했다. 본 kit는 역전사 효소 PrimeScript® Reverse transcriptase의 뛰어난 신장성에 의해 불과 15분만에 역전사 반응을 완료할 수 있다.

위의 공시에 추천된 방법에는 2시간 30분 이상의 반응 시간을 필요로 하지만, 본 kit를 사용한 Norovirus 검출로 모델 실험에는 약 1시간 30분의 반응 시간으로 positive control RNA의 검출이 가능하므로 반응시간을 대폭 단축할 수 있었다. 또한 효소, buffer가 각각 premix type으로 되어 있기 때문에 반응액 조제가 간편하고 편리성을 향상시켰다.

■ 실험예 : Positive Control RNA를 주형으로 하는 모델 실험

【방법】

Norovirus에 속하는 바이러스는 2개의 유전자군, Genogroup I (GI)과 Genogroup II (GII)로 분류되어 있으며, 각각의 유전자군은 14종류와 17종류의 유전자형(genotype)으로 분류할 수 있다. GI 검출계, II 검출계의 primer 및 probe는 위의 공시된 「Norovirus의 검출법에 대해서」(食安監済제1105001)<sup>1)</sup>의 별첨 「Norovirus의 검출법」<sup>2)</sup>에 기재된 서열을 바탕으로 합성(Applied Biosystems의 TaqMan<sup>®</sup> probe 사용)하고, 반응은 PrimeScript<sup>®</sup> RT-PCR Kit(Perfect Real Time) (TaKaRa Code RR061)의 protocol에 따라 진행했다. Real Time PCR 장치는 Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System (TaKaRa) 및 ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)을 사용했다.

\* 1 : <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/031105-1.html>  
 \* 2 : <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/kanshi/dl/031105-1a.pdf>

Probe, primer의 서열은 아래와 같다.

• Primer 합성

COG1F : CGYTGGATGCGNTTYCATGA  
 COG1R : CTTAGACGCCATCATCATTYAC  
 COG2F : CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG  
 ALPF : TTTGAGTCCATGTACAAGTGGATGCG  
 COG2R : TCGACGCCATCTTCATTCA

• Probe 합성

RING1-TP (a) : (FAM) AGATYGCGATCYCCTGTCCA (TAMRA)  
 RING1-TP (b) : (FAM) AGATCGCGGTCTCCTGTCCA (TAMRA)  
 RING2AL-TP : (FAM) (TAMRA)

\* IUB CODES

R = A or G ; B = C, G or T ; Y = C or T ; D = A, G or T ; K = G or T ; H = A, C or T ; M = A or C ; V = A, C or G ; S = G or C ; W = A or T ; N = any base

【역전사 반응】

37℃ 15분 → 85℃ 5초

【 Real Time PCR】

Thermal Cycler Dice<sup>®</sup>

Real Time System 반응조건

95℃ 10초  
 ↓  
 95℃ 5초  
 56℃ 30초(검출) ] 45 cycles

ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 반응조건

95℃ 10초  
 ↓  
 95℃ 5초  
 56℃ 31초(검출) ] 45 cycles

■ 결과

PrimeScript<sup>®</sup> RT- PCR Kit(Perfect Real Time)을 사용하여 실험한 결과 Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System, ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 두 기기 모두에서 동등한 검출 감도를 얻을 수 있었고, GI, II 검출계 모두 20~2x10<sup>6</sup> copies 상당량의 적절한 검량선을 작성할 수 있었다 (그림 1: 좌 - 증폭 곡선, 우 - 검량선).

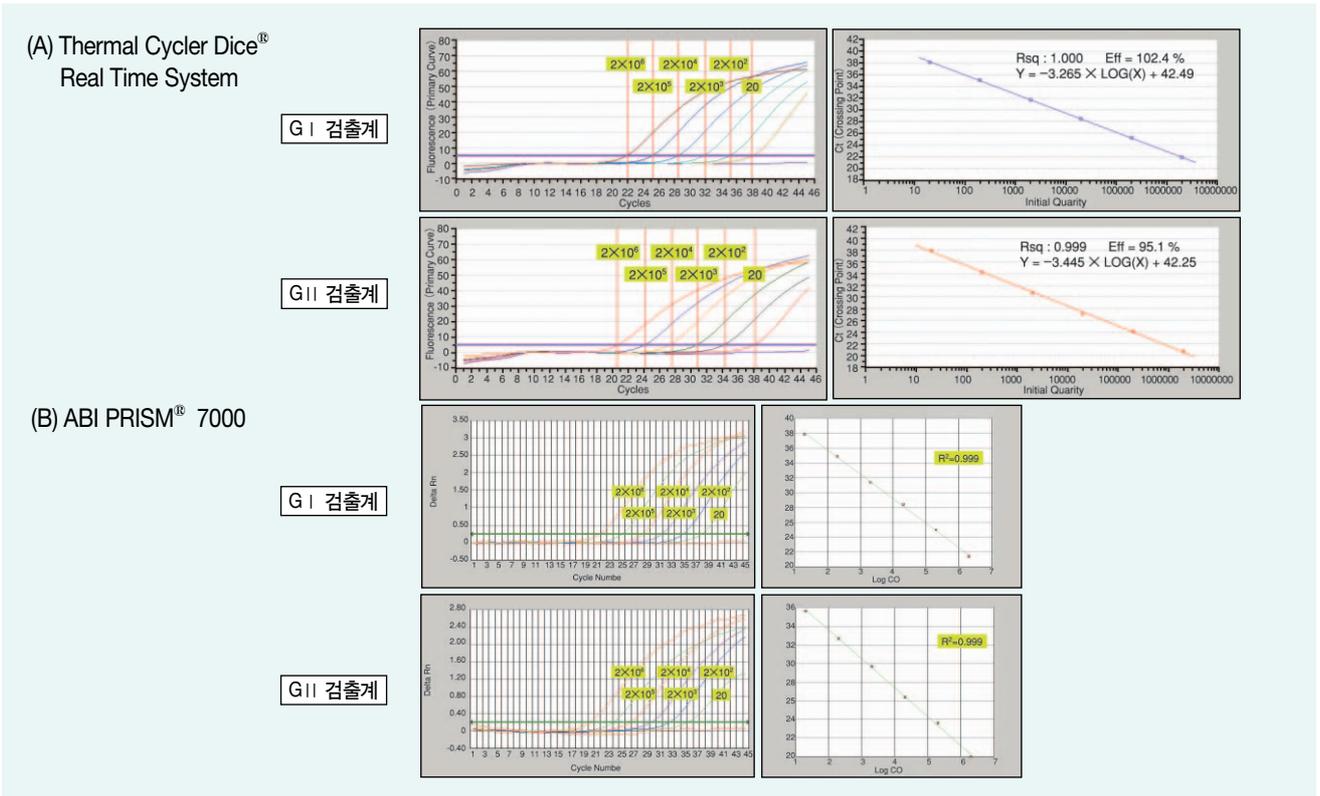


그림 1. Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System와 ABI PRISM<sup>®</sup> 7000에서 GI group과 G II group 증폭곡선과 검량선

※ 본문 중 제품에 해당하는 라이선스 확인사항은 [License Notice] 참조  
 2), 3), 4), 18), 20)