

TaqMan 실시간 중합 효소 연쇄반응에 의한 살모넬라속의 검출 및 *ompC* 항원단백 유전자의 비교

이영성, 최경성, 김명철, 한재철, 채준석*

전북대학교 수의과대학 생체안전성연구소
(게재승인 : 2002년 12월 4일)

Detection of *Salmonella* spp. by TaqMan real-time PCR and comparison of nucleotide sequences of *ompC* gene among *Salmonella*

Young-Sung Lee, Kyoung-Seong Choi, Myeong-Chul Kim, Jae-Cheol Han and Joon-Seok Chae*

Bio-Safety Research Institute, College of Veterinary Medicine,
Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea

(Accepted : December 4, 2002)

Abstracts : Antigenic *ompC* genes of *S. gallinarum*, *S. pullorum* and *S. dublin* were characterized among *Salmonella* spp. isolated from chickens and other animals to identify genetic variation. *Salmonella ompC* gene fragment (1,027 bp) was amplified by PCR and the amplicons were cloned for comparison of nucleotide sequences. The identity of the sequences between *S. gallinarum* and *S. pullorum*, *S. gallinarum* and *S. dublin*, *S. pullorum* and *S. dublin* was 99.8 %, 97.6 % and 97.8 %, respectively. Also, we found that *ompC* has some diversity between *S. gallinarum* and *S. pullorum*, and other *Salmonella* spp. which may be useful to type the organisms. Similar to diagnosis in other organisms, the TaqMan PCR method can be applied to rapid and accurate diagnosis of salmonellosis in chickens and other animals. We designed PCR primers and TaqMan probe for flagellin gene (*fljC*) for detection of *Salmonella* spp. by TaqMan PCR. The TaqMan PCR method was 10,000 times more sensitive than conventional PCR.

Key words : *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, TaqMan real-time PCR, *ompC* gene

서 론

가금티푸스(fowl typhoid)는 기회성의 세포내 침습 병원균인 *Salmonella gallinarum*에 의해서 발생하는 급·만성의 전염병으로 병아리는 물론 중추 및 성계에서 패혈증에 의한 높은 폐사율과 난계대 전염을 일으킨다는 특징 때문에 전세계적으로 문제시되고 있는 중요한 질병이다^{1,4}. 닭에 있어서 살모넬라병의 원인균으로는 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum(*S. gallinarum*), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Pullorum(*S.*

pullorum) 그리고 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi(*S. paratyphi*)가 원인체로 알려져 있으며, 국내에서는 추백리로 불리는 원인체인 *S. pullorum*과 가금티푸스의 원인체인 *S. gallinarum*이 양계 농가에 막대한 경제적 손실을 입히고 있다^{5,6}. 가금티푸스는 국내에서 1992년 처음 보고되었으며, 1994년 이후 전국적으로 발병하여 급기야 최근에는 국내 채란업계 전체를 위협하는 국내 양계산업의 가장 피해가 큰 질병으로 알려져 있다^{5,6}. 그러므로 대부분의 양계 선진국에서는 철저한 검역과 도태로 본 병을 근절하고자 노력하고 있다^{7,8}.

이 논문은 2000년도 한국학술진흥재단의 연구비에 의하여 연구되었음(KRF-00-G00092).

* Corresponding author: Joon-Seok Chae

Bio-Safety Research Institute, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea
Tel : +82-63-270-3881, Fax : +82-63-278-3885, E-mail : jschae@chonbuk.ac.kr

가금티푸스에 대한 기존의 진단방법은 부검을 통한 육안적 검사방법, 분변이나 혈액으로부터 원인균을 선택배지에 배양하여 분리 확인하는 방법, IMVic test 등의 생화학적 검사를 이용하여 동정하는 방법 그리고 혈청학적인 방법으로 O항원의 혈청형을 증명하는 방법 등이 시도되어 왔다⁹. 그러나 기존의 진단방법은 여러 가지 실험단계 및 긴 배양시간을 거쳐 혈청형의 규명까지 하여야 하는 복잡한 과정이므로 많은 노력과 시간이 요구되고 있으며, 또한 같은 살모넬라속에 의하여 닭에 감염을 일으키는 추백리와 감별진단을 요하고 있기 때문에 신속하고 명확하게 진단을 수행해 오지 못하고 있는 실정이다^{8,10-12}. 따라서 가금티푸스의 발증을 신속하게 진단하여 치료 및 대처방안을 양계농가에 마련해주어야 함에도 불구하고 기존의 진단법에 의존하고 있는 국내의 진단체계는 양계농가에 큰 도움을 주지 못하고 있어^{13,14}, 발병 즉시 신속하고 명확하게 진단할 수 있는 새로운 진단방법의 확립이 시도되고 있다.

최근에는 그람음성균에 대한 방어면역을 유발하면서 부작용이 적은 항원으로 outer membrane protein component (ompC)들이 중요하게 인식되어 연구되고 있으며¹⁵⁻¹⁹ *S. typhimurium*(GenBank accession number; GAN M31424), *S. typhi*(GAN NC_003198), *S. minnesota*(GAN Y15844) 등의 ompC의 유전자염기서열은 밝혀졌으나, *S. gallinarum*의 ompC 유전자 염기서열은 밝혀지지 않았다. 따라서 *S. gallinarum* 뿐만 아니라 같은 혈청형 그룹에 속해있는 *S. pullorum*과 *S. dublin*의 ompC 유전자를 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 증폭시키고 염기서열을 규명하고, 다른 살모넬라속의 유전자 염기서열과 비교하였으며, 살모넬라속의 신속·정확한 진단을 하기 위하여 flagellin 유전자(*fljC*) 염기서열을 분석하여 TaqMan 시스템을 이용한 실시간 중합 효소연쇄반응(TaqMan real-time PCR, TaqMan PCR)으로 원인체 검출을 시도 하였다.

재료 및 방법

Salmonella 균주

*S. gallinarum*의 야외균주는 전라북도 양계농가에서 폐사한 닭의 가검물 중 간, 폐, 기관지, 비장, 신장에서 분리 동정하였다. 한편, 표준균주로는 같은 혈청형 D 그룹에 해당하는 *S. gallinarum*(ATCC 9184), *S. pullorum*(S-11), *S. enteritidis*(ATCC 13076), *S. dublin*(S-331) 그리고 *S. typhi*(KCTC 2424)는 국립수의과학검역원에서 분양받았다.

야외 *S. gallinarum*의 분리

*S. gallinarum*의 야외균주는 전라북도 양계농가에서 폐사한 닭의 가검물(간, 폐, 기관지, 비장, 신장)에서 살모넬라속 모두를 증폭할 수 있는 TaqMan PCR을 이용하여 *fljC* 유전자가 증폭된 시료에서 brilliant green agar, Hektoen enteric agar, xylose-lysine desoxycholate agar, MacConkey agar, eosin-methylene blue agar 등의 살모넬라 선택배지에 분리 동정하였다. 이 동정된 균집락을 취한 후, 이를 Luria-Bertani(LB) broth에서 증균시켜 genomic DNA를 추출하여, 박 등²⁰이 보고한 바와 같이 *rfsB* 유전자를 증폭한 후 restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 방법을 이용하여 *S. gallinarum*과 *S. pullorum*을 감별진단하여 *S. gallinarum*을 분리하였다.

Genomic DNA의 추출

중합효소연쇄반응에 사용할 genomic DNA는 가금티푸스에 감염된 장기의 조직과 증균된 배양액으로부터 DNeasy™ Tissue kit(Qiagen, Germany)을 이용하여 추출하였다. 유전자 추출을 위한 조직으로서는 장, 간, 폐, 기관지, 비장 그리고 신장을 이용하였고 제조 회사에서 제공되는 방법에 따라 실시하였다.

양계농가에서 폐사한 닭의 각 장기의 조직 25 mg에 1× PBS(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4)를 가하고 유리균질기(Pyrex, USA)를 이용하여 조직을 잘게 마쇄한 다음, proteinase K(20 mg/ml)를 첨가하여 조직이 완전히 용해될 때까지 90분 동안 55℃에서 반응시켰다. 이때 조직에 함유된 RNA를 분해하기 위해 RNase A(100 mg/ml)를 첨가하여 실온에서 2분간 방치하였다. 반응이 끝나면 cell membrane을 파괴하기 위해 lysis buffer 200 μl를 첨가하여 혼합하고, 70℃에서 10분간 가열한 다음 ethanol을 넣어 잘 교반한 후 DNeasy mini column으로 옮겨 6,000 x g에서 1분간 원심분리하여 DNA만 membrane에 흡착시키고, 용액은 제거하고 난 뒤, 남아있는 알콜을 제거하기 위해 세척액을 이용하여 위의 과정을 2회 반복하였다. 마지막 단계에서는 membrane에 직접 nuclease free water를 넣고 1분간 방치한 다음, 6,000 x g에서 1분간 원심분리하여 DNA를 회수하였다.

증폭된 살모넬라 속의 배양액에서의 DNA 추출은 Sambrook의 방법²¹에 준하여 추출하였다. 각각의 균주 *S. gallinarum*(ATCC 9184), *S. pullorum*(S-11), *S. enteritidis*(ATCC 13076), *S. dublin*(S-331) 그리고 *S. typhi*(KCTC 2424)에서 단독 균집락을 취해 LB broth에 접종하고 37℃에서 12시간 동안 진탕배양한 후, 배양액을 원심분리하여 침전된 균체를 회수하고 lysis buffer 200 μl를 첨가하

여 혼합하고, 70°C에서 10분간 가열한 다음 100% 알콜을 넣어 잘 섞은 후 DNeasy mini column으로 옳게 6,000 x g에서 1분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 난 뒤, 남아있는 알콜을 제거하기 위해 세척액을 이용하여 위의 과정을 2회 반복하였다. 마지막 단계에서는 DNeasy membrane에 직접 nuclease freewater를 넣고 1분간 방치한 다음 원심분리하여 DNA를 회수하였다.

중합효소연쇄반응

살모넬라속 *fliC* 유전자 증폭을 위한 TaqMan PCR :

TaqMan PCR을 이용해 모든 *Salmonella* spp.를 증폭시키기 위해서 TaqMan probe와 primer는 *fliC* 유전자에서 Primer Express(Perkin-Elmer, Applied Biosystems, USA) 컴퓨터 프로그램을 이용하여 제작하였다(Table 1). TaqMan PCR 혼합액(총 20 μ l)은 10 pmol forward primer, 10 pmol reverse primer, 2.5 μ mol probe, TaqMan Univ. PCR Master Mix(Perkin Elmer, USA)를 혼합하여 사용하였다. 실시간 유전자 증폭기는 7700 Sequence Detector(SDS 7700, ABI Prism, USA)를 사용하여 50°C에서 2분(uracil N-deglycosylase digest), 95°C에서 10분(AmpliTaq Gold pre-activation), 95°C에서 20초, 55°C에서 60초로 하여 45 cycle을 반응시켰다. 증폭 결과는 Sequence Detector (Ver. 1.7, ABI, USA) 프로그램을 이용해 확인하였다.

살모넬라 *rfbS* 유전자 증폭을 위한 PCR :

*S. gallinarum*과 *S. pullorum*의 감별진단을 하기 위해 박 등²⁰이 보고한 *rfbS* PCR primer를 이용하였다. 중합효소연쇄반응의 혼합액은 10 \times buffer|100 mM Tris-HCl(pH

8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.001%(w/v) gelatin)와 2.5 mM dNTPs, 각각의 10 pmol primer, Taq DNA polymerase(TaKaRa, Japan, 5 IU/ μ l), 살모넬라 혈청형 D 그룹 template를 각각 혼합한 후, 증류수를 첨가하여 최종 혼합물의 양이 50 μ l가 되도록 하였다. 이를 위한 반응조건으로는 94°C에서 2분간 pre-denaturation을 실시하였고, denaturation, annealing, 그리고 polymerization을 각각 94°C에서 1분, 45°C에서 1분, 72°C에서 2분간 30 cycle을 실시하였고, 마지막 cycle에서 72°C에서 10분간 post-extension을 실시하였다. 유전자 증폭기로는 DNA thermal cycler 2400(Perkin-Elmer, USA)을 사용하였다.

중합효소연쇄반응으로 증폭된 유전자 산물의 크기를 확인하기 위해서 반응액 4 μ l를 1% agarose gel에서 120 V로 30분간 전기영동 한 후 ethidium bromide(0.5 μ g/ml, Sigma, St Louis, MO, USA)로 염색하였고, UV transilluminator(Bio-Rad, USA)로 관찰하였다. 증폭된 DNA의 크기를 확인하기 위하여 100 bp DNA ladder(iNTRON Biotechnology, Korea)를 molecular size marker로 사용하였다.

살모넬라 *ompC* 유전자 증폭을 위한 PCR :

살모넬라 *ompC* 유전자 염기서열 규명을 위해 살모넬라속을 증폭할 수 있도록 PCR primer를 제작하였다(Table 1). 중합효소연쇄반응의 혼합액은 10 \times buffer|100 mM Tris-HCl(pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.001%(w/v) gelatin)와 2.5 mM dNTPs, 각각의 10 pmol primer, Taq DNA polymerase(TaKaRa, 5 IU/ μ l), 살모넬라 혈청형 D 그룹의 샘플 DNA를 각각 혼합한 후, 증류수를 첨가하여 최종 혼합물의 양이 50 μ l가 되도록 하였다. 이를 위한 반응조건으로는 94°C에서 2분간 pre-denaturation

Table 1. PCR primers and probe for detection of *fliC*, *rfbS* and *ompC* gene fragments of *Salmonella* spp. by TaqMan real-time and conventional PCR

Primer name*	Length (mer)	Nucleotide sequences(5' to 3')	Expected product size
<i>fliC</i> -1	23	cgctgtgaccagataaacctg	180 bp
<i>fliC</i> -2	20	ttcccgtaacgtaacgacg	
<i>fliC</i> -P	23	5-6-FAM-tcaacagcgca aagacgatgcg-TAMRA-3	
SG-1	18	tcacgacttacatcctac	720 bp
SG-2	18	ctgctatatcagcacaac	
<i>ompC</i> -1	19	ggatccagtaaagtactg	1,027 bp
<i>ompC</i> -2	18	aacatgtccaccaagctt	

* *fliC*, detection for *Salmonella* spp. by TaqMan PCR; SG, differential diagnosis between *S. gallinarum* and *S. pullorum* by PCR-RFLP; *ompC*, comparison of *ompC* antigenic membrane protein gene of *Salmonella* spp.

을 실시하였고, denaturation, annealing, 그리고 polymerization 을 각각 94°C에서 1분, 52°C에서 1분, 70°C에서 2분간 30 cycle을 실시하였고, 마지막 cycle에서 72°C에서 10분간 post-extension을 실시하였다.

일반 PCR 과 TaqMan PCR의 검출 능력 비교

PCR과 TaqMan PCR과의 민감도를 비교하기 위하여 *S. gallinarum*의 genomic DNA를 10배씩 연속희석(100 ng/μl ~ 10⁻⁹ ng/μl)하여 template DNA로 사용하였다. 또한, 전북지역 양계농가에서 폐사한 닭의 가검물인 장, 간, 폐, 기관지, 비장 그리고 신장 조직에서 DNA를 추출하여 각각의 방법으로 *Salmonella* 원인체의 검출 능력을 비교하였다.

가금 티푸스와 추백리의 감별진단을 위한 PCR-RFLP

TaqMan PCR을 이용하여 닭에서 살모넬라 속으로 확인된 시료를 다시 *S. gallinarum*과 *S. pullorum*의 감별진단을 하기 위하여 박 등²⁰의 방법에 의해 *rfs* 유전자 증폭산물을 제한효소 *Tfi* I, *Ple* I (New England BioLabs Co., USA)을 이용하여 PCR 산물 10 μl(0.1 μg/μl), D.W. 7 μl, 10 × buffer 2 μl(New England BioLabs Co., USA), *Tfi* I (5,000 U/ml) 또는 *Ple* I (1,000 U/ml) 1 μl 혼합액을 각각 65°C 2시간(*Tfi* I), 36°C 2시간(*Ple* I) 동안 소화시켰다. 완전히 소화된 반응액 중 10 μl를 1% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide(0.5 μg/ml, Sigma, USA)에서 염색하여 UV transilluminator 상에서 확인하였다.

클론닝

살모넬라 *ompC* 유전자 증폭산물을 QIAquick™ PCR Purification Kit(Qiagen, Germany)을 이용해 정제하여, pGEM-T vector system(Promega Co., USA)을 이용해 유전자를 융합시켜 pGEM-T-*ompC* 플라스미드를 만들었다 (fig. 2). 이 재조합 플라스미드 DNA는 competent *E. coli* strain TOP10F⁺에 삽입하여 ampicillin(50 mg/ml)이 첨가된 LB plate에 평판배양하였다. 플라스미드 DNA는 alkaline lysis methods²¹에 의해서 확인하여 유전자 염기서열 규명에 이용하였다.

살모넬라 *ompC* 유전자 염기서열 분석

염기서열분석은 T3와 T7 primer를 이용해 automatic sequencer(ABI Prism[®] 377, Applied Biosystem, USA)를 사용하여 multi-color fluorescence detection system을 적용하여 분석하였다. 살모넬라 *ompC* 유전자 염기는 National

Center for Biotechnology Information(NCBI)에서 제공하는 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) network service (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)를 통해 유사한 염기 서열 여부를 조사하였다.

S. gallinarum, *S. pullorum*, *S. dublin* 그리고 *S. typhimurium* (GanBank accession number, GAN M31424)과의 multiple sequence alignment는 MultiAlin 프로그램²²을 이용하였으며, 각 strain들 간의 유사성은 ALIGN program (GENSTREA France, <http://www2.igh.cnrs.fr/bin/alignguess.cgi>)을 이용하여 조사하였다.

아미노산 염기서열의 유사성을 분석하기 위하여 nucleotide 염기서열을 아미노산 염기서열로 바꿔주기 위하여 Nucleic Acid to Amino Acid Translation program (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/cgi-bin/attwood/cgina2aa.pl>)을 이용하였으며, 변환된 아미노산 염기서열은 MultiAlin 프로그램²²으로 비교분석하였다.

결 과

TaqMan PCR에 의한 살모넬라 *fliC* 유전자의 검출 민감도

*S. gallinarum*의 DNA template를 10배씩 연속 희석(100 ng/μl ~ 10⁻⁹ ng/μl)하여 살모넬라 *fliC* 유전자에 TaqMan PCR을 실시한 결과 10⁻⁴ ng/μl까지 증폭됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

일반 PCR에 의한 살모넬라 *ompC*와 *fliC* 유전자 검출 민감도

*S. gallinarum*의 DNA template를 10배씩 연속 희석(100 ng/μl ~ 10⁻⁹ ng/μl)하여 살모넬라 *ompC* 유전자와 살모넬라 *fliC* 유전자를 일반 PCR로 각각 증폭한 결과 1 ng/μl까지 증폭됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

일반 PCR과 TaqMan PCR의 검출 민감도 비교

*S. gallinarum*의 DNA template를 10배씩 연속 희석(100 ng/μl ~ 10⁻⁹ ng/μl)하여 살모넬라 *fliC* 유전자와 *ompC* 유전자에 대해 각각 증폭한 결과 TaqMan PCR이 일반 PCR 방법보다 10,000배 더 민감한 것을 알 수 있었다 (Fig. 2와 Fig. 3).

야외시료에서의 비교

야외 조직 시료를 대상으로 살모넬라 *fliC* 유전자를 증폭한 결과 일반 PCR에서는 증폭이 되지 않았지만, TaqMan PCR에서는 총 63개의 조직 시료 중 19개의 조직

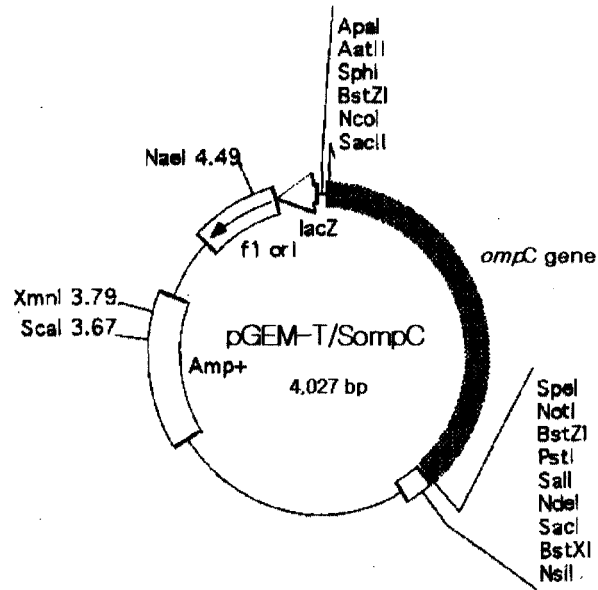


Fig. 1. Map of recombinant plasmid DNA of pGEM-T with *Salmonella ompC* fragment.

Fig. 2. Standardization of *Salmonella fliC* gene in the TaqMan real-time PCR assay. Serial dilutions were made using the *S. gallinarum* (ATCC 9184) genomic DNA by cultivation. A minimum of 10^{-4} ng/ μ l of DNA could be detected after 50 cycles. The intensity of fluorescence was given on the y axis (ΔRn =reporter signal[FAM]/passive reference signal[TAMRA])

Fig. 3. Amplification of *S. gallinarum* (ATCC 9184) *ompC* and *fliC* gene using conventional PCR with 10-fold serial dilution DNA templates. Serial dilutions were made using the *S. gallinarum* (ATCC 9184) genomic DNA by cultivation. A minimum of 1 ng/ μ l (arrow) of DNA could be detected after 35 cycles.

시료에서 증폭됨을 볼 수 있었다. 또한 조직 중에서도 간(15시료 중 6시료)과 폐(16시료 중 6시료)에서 가장 민감하게 증폭되었고, 다음으로 기관, 비장, 신장 순으로 민감도를 보였다(Table 2). 또한 TaqMan PCR을 이용해 검출된 살모넬라 양성 DNA 중에서 닭 티푸스와 추백리의 감별 진단을 하고자 *S. gallinarum*과 *S. pullorum*의 *rfbS* 유전자를 PCR-RFLP를 시도한 결과, 제한효소 *Tfi* I에 의해 235 bp에서 잘려진 유전자 단편은 *S. gallinarum*으로 확인되었으며, 제한효소 *Ple* I에 의해서 239 bp에서 잘려진 유전자 단편은 *S. pullorum*으로 확인되었다.

Table 2. Comparison of sensitivity using conventional PCR and TaqMan PCR in field tissue samples of chickens

Samples (n) [*]	Positive by conventional PCR	Positive by TaqMan PCR
Intestine (5)	0	0
Liver (15)	0	6
Lung (16)	0	6
Kidney (8)	0	1
Spleen (12)	0	2
Trachea (7)	0	4

^{*} Tissue samples were collected from suspected chickens to be infected within fowl typhoid.

Salmonella 혈청형 D 그룹의 *ompC*와 *rfbS* 유전자 단편의 증폭결과

살모넬라 혈청형 D 그룹의 *ompC*와 *rfbS* 유전자의 증폭을 확인하기 위하여 이들 D 그룹의 *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. dublin*, *S. enteritidis* 그리고 *S. typhi*에서 추출한 각 genomic DNA를 중합효소연쇄반응으로 증폭한 다음 1% agarose gel에서 전기영동하여 본 결과 모두 1,027 bp의 *ompC*와 720 bp의 *rfbS* 유전자 단편을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

살모넬라 *ompC* 유전자 염기서열과 아미노산 서열의 규명 및 비교

본 연구에 사용한 *S. gallinarum*(ATCC 9184), *S. pullorum*(S-11) 그리고 *S. dublin*(S-331)의 *ompC* 유전자 단편의 염기서열은 GenBank에 등록을 하였으며, 각각의 GenBank accession number는 AY081183, AY081185, AY081184이다.

S. gallinarum(ATCC 9184), *S. pullorum*(S-11) 그리고 *S. dublin*(S-331)의 *ompC* 유전자의 염기서열을 분석한 결과, *S. gallinarum*(ATCC 9184)과 *S. pullorum*(S-11), *S. gallinarum*(ATCC 9184)과 *S. dublin*(S-331) 그리고 *S.*

Fig. 4. PCR amplification of *ompC* gene (upper) and *rfbS* gene (lower). M, marker (iNtRON Biotechnology, Korea); P, positive (*S. gallinarum*; ATCC 9184); N, negative control; 1, *S. gallinarum*; 2, *S. pullorum*; 3, *S. dublin*; 4, *S. enteritidis*; 5, *S. typhi*.

pullorum(S-11)과 *S. dublin*(S-331)의 동일성은 각각 99.8%, 97.6% 그리고 97.8%이었다. 또한, 두 곳의 variable region(nucleotide position 674~681 bp, 810~816 bp)을 확인할 수 있었다. *S. typhimurium*(GAN M31424) *ompC* 유전자의 염기서열을 *S. gallinarum*(ATCC 9184), *S. pullorum*(S-11) 그리고 *S. dublin*(S-331)과 각각 비교한 결과 각각 98.0%, 98.1% 그리고 99.2%의 동일성을 나타내었다(Table 3).

DNA염기서열을 아미노산서열로 바꾸어 비교한 결과 *S. typhimurium*(GAN M31424)과 *S. dublin*(S-331)은 동일하였고, *S. gallinarum*(ATCC 9184)과 *S. pullorum*(S-11) 또한 동일하였다. 그러나 두 그룹간에는 98.5%의 동일성을 나타내었다.

고 찰

중합효소연쇄반응을 이용한 진단법은 바이러스나 세균의 농도가 낮은 경우나 균의 분리가 까다로운 경우에서도 높은 민감도와 특이성으로 병원균을 검출할 수 있어 혈청학적 진단법이나 생화학적 진단법 보다 훨씬 더 민감한 것으로 알려졌다. 그렇기 때문에, 최근에 중합효소연쇄반응을 이용한 *Salmonellosis*의 진단법이 활발히 연구되고 있으며^{20,23-27}, 최근에는 일반 PCR 보다 민감도와 특이성이 높은 것으로 알려진 실시간(real-time) PCR이 개발되어 진단방법으로 연구되고 있다²⁸⁻³⁰. 또한, 혈청학적 진단방법, 생화학적 진단 방법보다 신속하게 진단할 수 있는 일반 PCR은 중합효소연쇄반응이 끝난 후에

Table 3. Comparison of nucleotide sequences and translated amino acid sequences of *ompC* gene fragment (1,027 bp) among *S. gallinarum*, *S. pullorum*, *S. dublin* and *S. typhimurium*.

Sequence positions	<i>Salmonella</i> species*			
	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. pullorum</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>
205	G	G	A	G
305	A	T	T	T
355	T	T	C	C
373	T	T	C	C
436	C	C	T	C
445	C	C	C	T
448	T	T	C	C
472	C	C	C	T
484	C	C	T	T
507	T	T	C	C
541	C	C	T	C
571	T	T	C	C
588	A	G	G	G
595	T	T	C	T
664	C	C	T	C
674	G	G	A	A
678	A	A	C	C
679	A	A	T	T
681	A	A	G	G
706	T	T	C	C
712	C	C	T	T
810	A	A	G	G
814	T	T	C	C
815	A	A	C	C
816	A	A	C	C
943	C	C	T	C
982	T	T	C	C
225	D	D	N	N
226	E	E	A	A
227	H	H	R	R
270	N	N	S	S
271	K	K	P	P

* *S. gallinarum*, ATCC 9184; *S. pullorum*, S-11; *S. dublin*, S-331; *S. typhimurium*, GenBank accession number M31424.

증폭 여부를 agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide를 이용해 염색과정을 거쳐 UV transilluminator 상에서 확인해야 하지만, TaqMan PCR은 증폭 결과를 Sequence Detector(ABI, USA, Ver. 1.7) 프로그램을 이용해 증합효소연쇄반응이 종료 후 곧바로 컴퓨터 모니터 상에서 그래프를 통해 확인할 수 있어, 일반 PCR보다 신속한 진단법이라 사료된다. 또한 1쌍의 primer 이외에 탐식자가 결합하기 때문에 더욱 정확한 진단법으로 알려져 있다.

전북지역으로부터 수집한 63개의 야의 가검 조직에서 일반 PCR과 TaqMan PCR을 이용하여 살모넬라에 대한 증합효소연쇄반응을 실시한 결과, 일반 PCR에서는 모든 시료에서 증폭이 되지 않았으나 TaqMan PCR에서는 19개의 시료에서 검출이 되었다. PCR 기법에 따라 살모넬라 검출에 차이가 나타난 이유는 첫째, 진단 민감도의 차이에 기인한 결과라고 사료되며, 둘째, 가금 티푸스로 의심되는 시료 수집 시기가 가금티푸스가 주로 발생하는 시기가 아닌 10월이었으며, 가금 티푸스균이 잠복 상태에 있거나 균량이 미량이었기 때문에 검출이 되지 않았을 것으로 사료된다. 또한, 여러 야의 가검 조직에서 검출해 본 결과, 폐, 간에서 높은 검출율을 볼 수 있었다. 이로 미루어 보아 *S. gallinarum*은 주로 폐, 간에 감염이 되어 있거나 잠복해 있는 것으로 사료되고, 균 분리양, PCR 진단을 위한 조직 시료 채취 부위로 유용하다고 사료된다.

본 연구에서 일반 PCR과 TaqMan PCR의 진단 효율을 *S. gallinarum*을 이용해 비교해 본 결과 10,000배 더 민감함을 볼 수 있었으며, 야의 샘플에서도 일반 PCR 방법으로는 전혀 검출할 수 없었던 샘플조직에서 TaqMan PCR 방법으로는 뛰어난 검출능력을 나타낸 것으로 볼 때 살모넬라의 1차 진단 또는 역학 조사용으로 TaqMan PCR 방법을 용이하게 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

현재까지 밝혀지지 않은 *S. gallinarum*, *S. pullorum* 그리고 *S. dublin*의 *ompC* 유전자를 규명하여 유전자 염기서열을 비교 분석한 결과, Puente 등¹⁶의 연구에서와 같이 두 곳의 variable region을 나타내어, 닭에서 발생하는 병원체인 *S. typhimurium*, *S. gallinarum*의 감별진단을 위한 특이 primer를 통한 감별진단은 가능하나, *S. gallinarum*과 *S. pullorum*의 유전자 염기서열 동일성은 99.8%로 매우 유사하여, 이 유전자를 이용한 감별진단은 어려울 것으로 판단된다. 따라서 *S. gallinarum*과 *S. pullorum*의 감별진단을 위해서는 박 등²⁰의 보고와 같이 *rfbS* 유전자를 증폭하여 RFLP를 실시하거나, *ompC* 유전자나 기타 다른 유전자 부위를 이용한 RFLP 감별진단을 활용하는 것이 정확한 진단법으로 사료된다.

이미 밝혀진 *rfbS* 유전자, *fliC* 유전자뿐만 아니라 본 연구에서 확인한 *ompC* 유전자 부분 모두 *S. gallinarum*과 *S. pullorum*의 유전자 염기서열의 동일성은 각각 99.8%, 99.7%, 99.8%로 거의 유사하였고, 공통 항원 구조인 것을 볼 수 있었다. 그렇지만, 가금티푸스와 추백리 모두 닭에서 발생하는 살모넬라에 의한 질병이지만, 계통차, 발생 연령차, 증상의 차이를 보이는 질병이고, 생화학적 성상(ramnose, dulcitol 분해시험) 또한 차이를 보인다. 이러한 점으로 보아 감별진단을 위한 특이 primer를 제작하기 위해서는 더 많은 부분의 유전자 염기서열을 규명하고 분석해야 할 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 TaqMan PCR을 이용해 살모넬라균을 검출하고, 닭에서 아직까지 밝혀지지 않은 살모넬라의 *ompC* 유전자를 밝히고자 하였다. 살모넬라 진단에 있어서 TaqMan PCR이 일반 PCR법 보다 10,000배 더 민감한 검출법으로 판단되었으며, 일반 PCR로는 검출할 수 없었던 야의 시료 중의 TaqMan PCR 방법을 적용한 바, 살모넬라균 *fliC*유전자를 상당수(총63개 시료 중 19개 시료) 증폭할 수 있었다. *Salmonella gallinarum*과 *Salmonella pullorum*의 감별진단은 *rfbS* 유전자를 이용하여 PCR-RFLP의 방법으로 가능하였다. *S. gallinarum*(ATCC 9184), *S. pullorum*(S-11) 그리고 *S. dublin*(S-331)의 *ompC* 유전자를 분석한 결과, *S. gallinarum*(ATCC 9184)과 *S. pullorum*(S-11), *S. gallinarum*(ATCC 9184)과 *S. dublin*(S-331), 그리고 *S. pullorum*(S-11)과 *S. dublin*(S-331)의 유전자 동일성은 각각 99.8%, 97.6%, 그리고 97.8%이었다. *S. typhimurium*(GAN M31424) *ompC* gene을 *S. gallinarum*(ATCC 9184), *S. pullorum*(S-11), 그리고 *S. dublin*(S-331)과 각각 비교한 결과 각각 98.0%, 98.1%, 그리고 99.2%의 동일성을 나타내었다. 이상의 결과로 보아 TaqMan PCR 방법은 닭에서 살모넬라 진단을 위한 신속 정확한 검사법이며, 가금티푸스와 추백리의 감별진단은 PCR-RFLP 방법이 유용한 감별진단방법으로 생각되었다. 또한 닭에 감염되는 *S. gallinarum*과 *S. pullorum*의 *ompC* 표면항원단백 염기서열분석 결과 아미노산 염기서열이 일치하는 것으로 나타났다.

참고 문헌

1. Smith HW, Tucker JF. The virulence of salmonella strains for chickens; their excretion by infected chicken. *J Hyg*, 84:479-488, 1989.

2. Cast RK, Beard CW. Age-related changes in the persistence and pathogenicity of *Salmonella typhimurium* in chickens. *Poultry Sci*, 68:1454-1460, 1989.
3. Li J, Smith NH, Nelson K, et al. Evolutionary origin and radiation of avian-adapted on-motile Salmonellae. *J Med Microbiol*, 38:129-139, 1993.
4. Olsen JE, Skov MN, Christensen JP, et al. Genomic lineage of *Salmonella enterica* serotype Gallinarum. *J Med Microbiol*, 45:413-418, 1996.
5. 김기석, 이희석, 모인필. 국내 닭에서의 가금티푸스 (Fowl typhoid) 발생. 농업과학논문집, 37:544-549, 1995.
6. 오강희, 최원필. 초생추 유래 *Salmonella* 속균의 생물학적 특성. 대학수의학회지, 34:501-510, 1994.
7. Barrow PA. Immunity to experimental fowl typhoid in chickens induced by a virulence plasmid-cured derivative of *Salmonella gallinarum*. *Infect Immun*, 58:2283-2288, 1990.
8. Barrow PA, Burnstead N. Resistance to *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum* and *S. enteritidis* in inbred lines of chickens. *Avian Dis*, 37:189-193, 1993.
9. Ewing WH. Edward and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. Amsterdam Elsevier Biomedical press, 1986.
10. Gast RK, Detecting infections of chickens with recent *Salmonella pullorum* isolates using standard serological methods. *Poultry Sci*, 76:17-23, 1997.
11. Holt PS, Chaubal LH. Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella pullorum* cultures. *J Clin Microbiol*, 35(4):1016-1020, 1997.
12. Gast RK, Holt PS. Application of flagellar-based immunoassays for serologic of *salmonella pullorum* infection in chickens. *Avian Dis*, 42:807-811, 1998.
13. Tuchili LM, Kodama H, Izumoto Y, et al. Detection of *Salmonella gallinarum* and *S. typhimurium* DNA in experimentally infected chicks by polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci*, 57:59-63, 1995.
14. Itoh Y, Hirose K, Miyake M, et al. Amplification of *rfbE* and *fliC* genes by polymerase chain reaction for identification and detection of *Salmonella* serovar *enteritidis*, *dublin* and *gallinarum-pullorum*. *Microbiol Immunol*, 41:791-794, 1997.
15. Singh SP, Singh SR, Williams YU, et al. Antigenic determinants of the *ompC* porin from *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, 63:4600-4605, 1995.
16. Puente JL, Juarez D, Bobadilla M, et al. The *Salmonella ompC* gene : structure and use as a carrier for heterologous sequences. *Gene*, 156:1-9, 1995.
17. Lobos SR, Mora GC. Alteration in the electrophoretic mobility of *ompC* due to variations in the ammonium persulfate concentration in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 12: 488-450, 1991.
18. Puente JL, Alvarez-Scherer V, Gosset G et al. Comparison analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli ompC* genes. *Gene*, 83:197-206, 1989.
19. Puente JL, Flores V, Fernandez M, et al. Isolation of an *ompC*-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*. *Gene*, 156:1-9, 1995.
20. Park MK., Choi KS., Kim MC., et al. Differential diagnosis of *Salmonella gallinarum* and *S. pullorum* using PCR-RFLP. *J Vet Sci*, 2(3):213-219, 2001.
21. Sambrook J, Fritsch EF, Molecular cloning. Although manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1981;1.3-9.58.38. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7:1513-1523, 1979.
22. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl Acids Res*, 16:10881-10890, 1988.
23. 김원용, 장영효, 박경윤 등. Polymerase chain reaction과 Southern hybridization을 이용한 *Salmonella* 속균의 신속한 검출. 대한수의학회지, 35:531-536, 1995.
24. 안종삼, 정석찬, 김종만, 등. *Salmonella* A 및 D group의 특이적 검출을 위한 *rfbS* 염기서열 분석에 기초한 PCR 기법의 적용. 대한위생학회지, 31:155-163, 1996.
25. 최경성, 박진호, 권오덕 등. 중합효소연쇄반응을 이용한 자돈에서 *Salmonella typhimurium*의 신속한 검출. 대한수의학회지, 38(4):763-770, 1998.
26. 박두희, 김원용, 김철중 등. Polymerase chain reaction에 의한 *Salmonella* 속균의 검출. 대한수의학회지, 34:115-125, 1994.
27. Cohen ND, Neiberghs HL, Wallis DE, et al. Genus-specific detection of *salmonellae* in equine feces by use of the polymerase chain reaction. *Am J Vet Res*, 55:1049-1054, 1994.
28. Chen W, Martinez G, Mulchandani A. Molecular Beacons: A real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Anal Biochem*, 280:166-172, 2000.

29. Bratin K, Saha. Baohong Tian, *et al.* Quantitation of HIV-1 by real-time PCR with a unique fluorogenic probe. *J Virol Methods*, 93:33-42, 2001.
30. Ma L, Bluysen HA, De Raeymaeker M, *et al.* Rapid determination of adenoviral vector titers by quantitative real-time PCR. *J Virol Methods*, 93:181-188, 2001.