

Multiplex Polymerase Chain Reaction(PCR)법을 이용한 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica subsp.*, *Vibrio parahaemolyticus*의 다중동시검출

정유석¹ · 정희경¹ · 전원배² · 서화정² · 홍주헌^{3*}

¹(재)대구테크노파크 바이오산업지원센터

²대구경북과학기술원

³대구가톨릭대학교 외식식품산업학부

Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica subsp.*, *Vibrio parahaemolyticus* by Multiplex Polymerase Chain Reaction

Yoo Seok Jeong¹, Hee Kyoung Jung¹, Won-Bae Jeon², Hwa-Jung Seo², and Joo-Heon Hong^{3*}

¹Bio Industry Center, Daegu Technopark, Daegu 704-801, Korea

²Daegu Gyeongbuk Institute of Science & Technology, Daegu 704-230, Korea

³Dept. of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

Abstract

This study was conducted to detect and identify *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Salmonella enterica subsp.* using simultaneous multiplex polymerase chain reaction (multiplex PCR) assay. 23S rRNA partial gene (*S. aureus*), *toxR* gene (*V. parahaemolyticus*), and *invA* gene (*S. enterica subsp.*) as diagnostic marker gene were suggested, and their amplicon sizes were 482 bp, 368 bp, and 284 bp, respectively. Non specific amplicons by STA-5F/STA-5R primer, ToxR-F/ToxR-R primer, and 139/141 primer were not observed in genomic DNA of pathogen bacteria as *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, and *Shigella sonnei*. The extracted crude DNA of targeted bacteria was detected as PCR template successfully. The detection limits were $10^5 \sim 10^4$ CFU/mL and 10 pg of purified genomic DNA of *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, and *S. enterica subsp.* by using simultaneous multiplex PCR.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella enterica subsp.*, multiplex PCR

서 론

사람이 식품에 오염된 화학적 독소, 자연적 독소 및 위해 미생물을 섭취함으로써 발생하는 질병을 식중독이라 하는데 국내 식중독 사고는 1990년 대비 2006년에 환자수는 618명에서 10,833명으로 16년 사이 17배가 증가하였으며, 식중독 사고 1건 당 환자의 발생 비율도 41명으로 약 2.16배가 증가하였다(1). 또한 단체급식의 증가와 외식산업의 발달로 식중독 발생건당 그 규모가 커지고 발생건수에서도 증감을 반복하며 지속적으로 발생하고 있다. 이에 따라 먹거리에 대한 국민의 불안감이 고조되고 건강한 삶의 영위를 위해 식품으로부터 오는 위해를 사전에 예방하거나 최소화하는 등 식품의 안전성 확보에 대한 중요성이 높아졌다. 국내 식중독 현황을 보면, 발생되는 80~90%가 세균성 식중독이 차지하고 있으며 *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* 균의 순서로 발생하고 있다. *Staphylococcus aureus*는 병원 내 감염의 주요 원인균 외에

도 사람과 동물의 화농성 상처를 통해서 식품으로 오염되는 대표적인 독소형 식중독 균으로 알려져 있으며(2-4), *Salmonella*는 급성패혈증, 심한 위장염 증상과 발열, 구토를 동반하는 식중독균으로 유제품이나 가공류, 즉석식품 등에서 발생되며 국내외에서 식중독을 일으키는 가장 큰 주요 원인균으로 알려져 있다(5-8). 국내 수산물에 의한 위장염의 30%를 차지하고 있는 *Vibrio parahaemolyticus*는 해수 온도가 상승하면 균수가 급격히 증가하며 여름철 해수에서 빈번히 분리되어지고 있다(9,10). 지구온난화로 인하여 계절에 관계없이 연중 식중독이 발생할 뿐만 아니라(11), 농·축산물 원료 및 가공식품의 수출입 자유화에 따른 국제간의 교류 확대 및 생활 패턴 변화에 의한 단체급식, 가공식품, 냉장 및 냉동식품, 즉석식품 등의 소비 증가가 다발적인 집단 식중독 발생 증가의 주요 요인이 되고 있다(12).

식품으로부터 경제적, 사회적으로 문제가 되는 병원성 세균 검출을 위한 노력들이 시도되었으며, 생화학적 특성을 이용한 전통적 분석방법에서부터 최근에는 분자생물학적

*Corresponding author. E-mail: jhhong@cu.ac.kr
Phone: 82-53-850-3218, Fax: 82-53-850-3218

방법까지 다양하게 개발되어졌다(13). 전통적인 식중독균 검사 방법은 장기적인 시간과 많은 노동력 등이 요구되어 늘어나는 검사 수요를 감당할 수 없을 뿐만 아니라 신속성이 낮아 조기 발견으로의 역할은 미비하다. 최근의 분자생물학 중심으로 연구되어진 병원성 세균 검출법을 살펴보면, 항체를 이용하여 균주의 특이적 항원을 측정하는 면역학적 방법으로 면역크로마토그래피(14), 면역리포솜(15) 등이 개발되었다. 또한 유전학적 방법으로 일반적으로 Polymerase Chain Reaction(oly)을 이용하여 균주의 특정 DNA 서열을 증폭시켜 진단하는 것으로 대상 유전자들은 주로 병원성 균주의 독소유전자(16-18)나 병원균에서 발견하는 고유 단백질 유전자, 원시 핵세포의 genome상에 간헐적으로 분산되어 있는 반복적인 DNA sequence를 16S rRNA 유전자 등을 사용한 연구도 있다(19,20). 개발되어진 유전학적 검출법은 오판정 확률과 미량 검출이 어렵다는 이유 등으로 산업적으로 활성화가 미약하며, 따라서 시장에서는 검출결과의 정확성 및 검출 비용의 절감과 함께 새로운 검출법 요구가 지속적으로 이루어지고 있다.

본 연구에서는 국내 식중독 주요 원인균으로 보고되어지고 있는 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica subsp.*, *Vibrio parahaemolyticus*의 검사 시간 및 비용 절감을 통해 국내 식품업계의 경제적인 식중독 검출을 위한 기반을 마련하고자 PCR을 이용한 다중동시검출에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

식중독 주요 원인균인 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*), *Salmonella enterica subsp.*(*S. enterica subsp.*), *Vibrio parahaemolyticus*(*V. parahaemolyticus*)에 대한 검출의 지표가 되는 바이오마커 유전자 검출을 위해 본 연구에서 사용되어진 균주들은 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)와 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받아 사용하였다. 사용된 균주와 배양조건은 Table 1과 같다.

Genomic DNA 및 crude DNA 추출

사용되어진 균주들로부터 정제된 genomic DNA와 crude

DNA를 추출하여 PCR을 위한 template로써 사용하였다. 각 균주의 배양액을 5 mL씩 취하여 12,000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 제거하고 회수한 균체를 1 mL의 멸균 증류수로 현탁시킨 후 자동핵산추출기(Magtration system 6GC, PSS, Chiba, Japan)를 사용하여 genomic DNA를 추출 및 정제하였다. 각 균주의 genomic DNA는 Nanodrop(ND-1000, Thermo, Waltham, USA)을 이용하여 260 nm에서 정량하였으며, 10배 단계 희석을 통해 10 ng/μL에서 1 pg/μL 농도까지 PCR 반응으로 검출한계를 확인하였다. 즉, spectrophotometer(Secomam, UVIKON, Leeds, UK)를 이용하여 흡광도 600 nm에서 0.666의 각 균주 배양액(≈10⁸ CFU/mL)을 10배 단계 희석을 통해 10⁶~10² CFU/mL로 준비하였으며 각 균액 100 μL를 Fig. 1과 같은 방법으로 crude DNA를 추출하여 PCR을 위한 template로 사용하였다. 동일부피의 희석되어진 균액을 고체 배지에 도말하여 plate counting 방법으로 균수를 개수하여 CFU/mL 값으로 검출한계를 확인하였다.

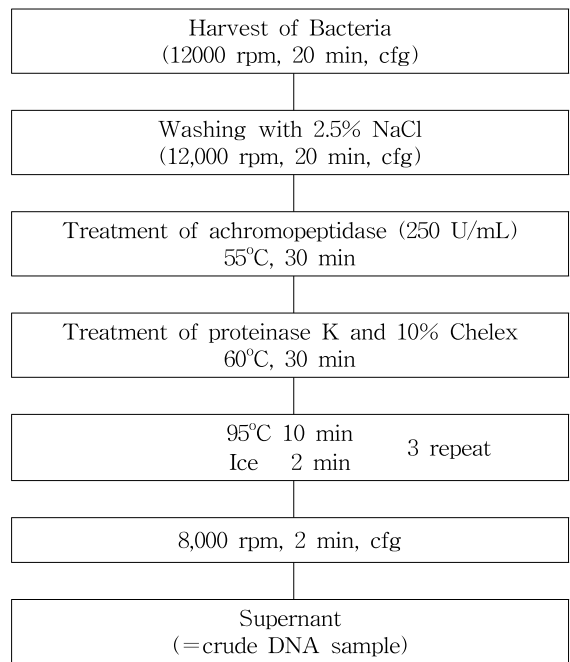


Fig. 1. Extraction of crude DNA as template.

Table 1. Pathogenic bacteria and media used for experiments

Strain	Media	Incubation temperature
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus (KCTC 1621)	Trypticase soy media	37°C
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (KCTC 2471)	Marine media	30°C
<i>Salmonella enterica subsp.</i> (KCTC 2514)	Nutrient media	37°C
<i>Bacillus cereus</i> (KCTC 1012)	Nutrient media	30°C
<i>Proteus vulgaris</i> (KCTC 2433)	Nutrient media	37°C
<i>Escherichia coli</i> (KCTC 2593)	Nutrient media	37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> (KCTC 3569)	Brain heart in fusion media	37°C
<i>Streptococcus pyogenes</i> (KCTC 3096)	Brain heart in fusion media	37°C
<i>Candida albicans</i> (KCTC 7965)	Yeast mold media	25°C
<i>Shigella sonnei</i> (KCCM 41282)	Nutrient media	37°C

Table 2. Oligonucleotide primer sequences used in this study

Strain	Gene (PCR product size)	Primer	DNA sequence (5'-3')	Temp. (°C)
<i>Staphylococcus aureus</i>	23s rRNA (482 bp)	STA-5F (forward primer)	TGGATTGCACGTCTAAGCAG	52
		STA-5R (reverse primer)	TTACCCGACAAGGAATTTTCG	50
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>toxR</i> (368 bp)	TOX-F (forward primer)	GTCTTCTGACGCAATCGTTG	52
		TOX-R (reverse primer)	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG	52
<i>Salmonella enterica subsp.</i>	<i>invA</i> (284 bp)	139 (forward primer)	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	60
		141 (reverse primer)	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	57

Primer set

식중독 주요 원인균인 *S. aureus*, *S. enterica subsp.*, *V. parahaemolyticus*를 검출하고자 선별되어진 특이적 primer set은 Table 2와 같다. *V. parahaemolyticus*는 TOX-F/TOX-R primer set(21), *S. enterica subsp.*는 139/141 primer set(22)를 사용하여 특이적 검출을 위해 유전자를 증폭하고자 하였다. *S. aureus*는 23S rRNA gene의 특이적 부분을 증폭시킬 수 있는 유전자로 본 연구에서 신규 디자인하였으며 사용되어진 primer는 Bioneer(Daejeon, Korea)에 합성을 의뢰하여 사용하였다.

PCR 조건

Singleplex PCR의 조성은 0.2 mL tube에 template DNA 1 µL, 각 forward와 reverse primer(10 pmol/µL) 1 µL씩, 2×Taq premix(Solgent, Daejeon, Korea) 12.5 µL와 최종 반응액이 25 µL가 되도록 멸균 3차 증류수를 첨가하여 iQ5 system(Bio-Rad, Chicago, USA)을 이용하여 표적 유전자를 증폭시켰으며 검출한계 및 비특이적 PCR반응을 조사하였다. *S. aureus*, *S. enterica subsp.*, *V. parahaemolyticus* 균주들의 다중동시검출을 위한 simultaneous multiplex PCR의 조성은 각 균주의 template DNA 1 µL씩, 각 3개의 forward와 reverse primer set(10 pmol/µL) 1 µL씩, 2×Taq premix(Solgent) 12.5 µL와 최종 반응액이 25 µL가 되도록 멸균 3차 증류수를 첨가하여 검출한계를 알아보았다. PCR 반응조건은 95°C에서 3분 pre-denaturation 후 95°C 1분, 61°C 30초, 72°C 30초를 1 cycle로 하여 총 30 cycle 반응 후, 마지막으로 72°C에서 50초 수행하였다. PCR 산물들은 ethidium bromide를 포함한 1.8% agarose gel에서 각 균주 표적 유전자의 예상되어진 size를 확인하였다. 또한 증폭되어진 PCR products를 T-vector(Promega Co., Madison, USA)에 클로닝하여 sequencing 의뢰(Solgent)를 통해 염기

서열을 분석한 결과를 NCBI의 blast search(<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)의 표적 유전자 염기서열과의 비교하여 확인하였다.

결과 및 고찰

S. aureus, *S. enterica subsp.*, *V. parahaemolyticus*의 다중동시검출을 위한 primer set 구성

PCR 방법에 의하여 *S. aureus*, *S. enterica subsp.*, *V. parahaemolyticus*를 다중동시검출 하고자 각각 식중독 원인균주의 특이적 유전자를 조사하였다. 따라서 바이오마커용 유전자의 검출을 위한 primer set을 구축하고자 하였으며, *S. enterica subsp.*의 경우, 균 침입성 인자 관련 유전자인 *invA* 유전자 부위를 증폭시킬 수 있는 139/141 primer를 *V. parahaemolyticus*는 독소 유전자인 *toxR* 유전자 부위를 증폭시킬 수 있는 ToxR-F/ToxR-R primer를 각 균의 검출을 위한 primer로 선정하였다. 또한 *S. aureus*에서는 23S rRNA gene의 특이적 유전자를 증폭시킬 수 있는 STA-5F/STA-5R primer를 본 연구에서 신규로 디자인하여 선정하였다. PCR 증폭을 통해 각 균주 genomic DNA로부터 특이적으로 증폭되어진 바이오마커 유전자, 즉 각기 다른 size의 예상되어진 PCR 산물들을 agarose gel 상에서 284 bp(*S. enterica subsp.*), 368 bp(*V. parahaemolyticus*), 482 bp(*S. aureus*)로 확인하였다. T-vector에 클로닝되어진 각 PCR 산물의 sequencing을 통한 염기서열 분석으로 표적 유전자임을 확인하였으며, 또한 각 primer set들은 해당 균주 외 다른 두 식중독 원인균에 대하여 비특이적인 교차반응이 일어나지 않음을 확인하였다(Fig. 2).

S. aureus, *S. enterica subsp.*, *V. parahaemolyticus* 검출 primer set의 특이성

구축되어진 primer set의 특이성을 확인하고자 타 병원성 균주인 *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia*

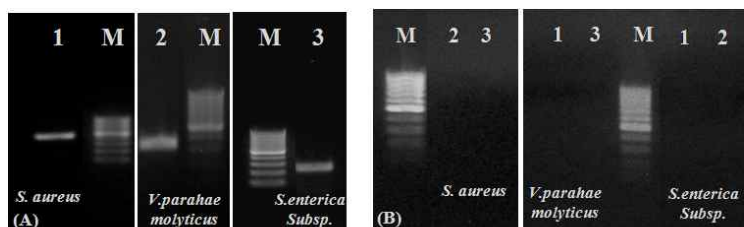


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR fragment generated by PCR amplification with STA-5F/STA-5R, 139/141 and TOX-F/TOX-R primer. Lane 1: STA-5F/STA-5R primer, lane 2: ToxR-F/ToxR-R primer, lane 3: 139/141 primer, lane M: 100 bp ladder. A: a PCR fragment generated by PCR amplification from genomic DNA of *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* and *S. enterica subsp.* with primer. B: a nonspecific PCR products of *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* and *S. enterica subsp.* with each non targeted primer set.



Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR fragment generated by PCR amplification with STA-5F/STA-5R, 139/141, and TOX-F/TOX-R primer. Lane 1: *Bacillus cereus* (KCTC 1012), lane 2: *Listeria monocytogenes* (KCTC 3569), lane 3: *Escherichia coli*, lane 4: *Proteus vulgaris* (KCTC 2433), lane 5: *Streptococcus pyogenes* (KCTC 3096), lane 6: *Candida albicans* (KCTC 7965), lane 7: *Shigella sonnei* (KCCM 41282), lane M: 100 bp ladder.

Table 3. Singleplex PCR for detection of specific gene in various bacteria strain

Strain	Target gene		
	23S rRNA ¹⁾	<i>toxR</i> ²⁾	<i>invA</i> ³⁾
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> (KCTC 1621)	+	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (KCTC 2471)	-	+	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. (KCTC 2514)	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i> (KCTC 1012)	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> (KCTC 3569)	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (KCTC 2593)	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> (KCTC 2433)	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (KCTC 3096)	-	-	-
<i>Candida albicans</i> (KCTC 7965)	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i> (KCCM 41282)	-	-	-

¹⁾STA-5F (forward)/STA-5R (reverse) primer. ²⁾ToxR-F (forward)/ToxR-R (reverse) primer. ³⁾139 (forward)/141 (reverse) primer.

coli, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *Shigella sonnei*의 genomic DNA를 주형으로 PCR을 통해 확인한 결과, 각 primer set들은 타 병원성균주에 대한 비특이적 반응을 일으키지 않았다(Fig. 3, Table 3). *S. aureus*, *S. enterica subsp.*, *V. parahaemolyticus*의 multiplex PCR법에 의한 다중동시검출에 있어서는 template DNA 또는 primer set들이 혼합된 상태에서 정확한 검출과 동정이 이루어져야 한다. 따라서 primer set들 간의 비특이적인 유전자 증폭 반응과 template DNA 간에 비특이적 유전자 증폭 반응에 대하여 조사하였으며, simultaneous multiplex PCR 방법으로 재현성과 정확성에 대해 조사하였다. 그 결과, 각 primer set들 간에 그리고 각 균주의 genomic DNA 간에 비특이적인 유전자 증폭반응이 발생하지 않음을 확인하였으며(Fig. 4, lane 1, 2), 세 종류의 primer set와 한 균주의 genomic DNA의 PCR 반응 시 표적되는 유전자를 특이적으로 각각 예상되어지는 유전자 크기로서 증폭하였으며 균종을 검출 및 동정할 수 있었다(Fig. 4, lane 3~5). 또한 세 균주의 genomic DNA와 각각 한 종류의 primer set 반응 시 표적되는 유전자를 특이적으로 각각 예상되어지는 유전자 크기로서 증폭하였으며 균종을 검출 및 동정할 수 있었다(Fig. 4, lane 6~8). *S. aureus*, *S. enterica subsp.*, *V. parahaemolyticus* 세 균주의 genomic DNA mixture와 3종류의 primer set mixture를 이용한 simultaneous multiplex PCR을 수행하였으며, 주형과 primer set 간에 유전자 증폭이 경쟁적으로 일어나거나 다량의 유전자 증폭에 의하여 multiplex PCR 반응의 저해가 우려되었다. 하지만 각각 식중독균의 바이오마커 유전자, 즉 *S. aureus*의 23S rRNA

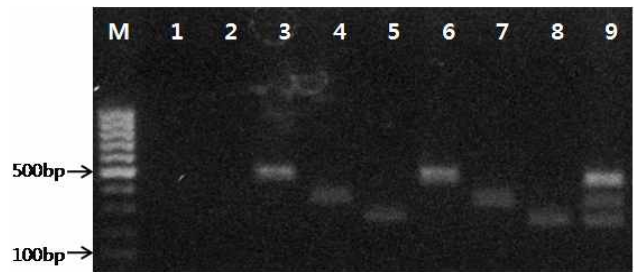


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of specific PCR fragment generated by multiplex PCR amplification with STA-5F/STA-5R, 139/141 and TOX-F/TOX-R primer. Lane M: 100 bp ladder, lane 1: STA-5F/STA-5R, 139/141 and ToxR-F/ToxR-R primer, lane 2: Genomic DNA of *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, and *S. enterica subsp.*, lane 3: Genomic DNA of *S. aureus* with STA-5F/STA-5R, 139/141 and ToxR-F/ToxR-R primer, lane 4: Genomic DNA of *V. parahaemolyticus* with STA-5F/STA-5R, 139/141 and ToxR-F/ToxR-R primer, lane 5: Genomic DNA of *S. enterica subsp.* by STA-5F/STA-5R, 139/141 and ToxR-F/ToxR-R primer, lane 6: Genomic DNA of *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, and *S. enterica subsp.* with STA-5F/STA-5R primer, lane 7: Genomic DNA of *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, and *S. enterica subsp.* with ToxR-F/ToxR-R primer, lane 8: Genomic DNA of *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, and *S. enterica subsp.* with 139/141 primer, lane 9: Genomic DNA of *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, and *S. enterica subsp.* with STA-5F/STA-5R, 139/141 and ToxR-F/ToxR-R primer.

partial gene(482 bp), *V. parahaemolyticus*의 *toxR* gene(368 bp), *S. enterica subsp.* *invA* gene(284 bp)의 특이적 size를 가지는 PCR 산물을 성공적으로 증폭시켰다(Fig. 4, lane 9). 따라서 본 연구에서 구축되어진 ToxR-F/ToxR-R, STA-5F/STA-5R, 139/141 primer는 *S. aureus*, *S. enterica subsp.*, *V. parahaemolyticus*의 다중동시 검출을 위한 적합한 pri-

mer set 구성임을 확인할 수 있었다.

Singleplex 및 multiplex PCR 방법에 의한 genomic DNA의 검출한계

S. aureus, *S. enterica subsp.*, *V. parahaemolyticus* 세 식중독 원인 균주에서 분리 정제되어진 genomic DNA의 농도에 따른 검출한계를 확인하고자 정제되어진 DNA를 10배 단계 희석하여 singleplex PCR 반응 결과를 조사하였다. 그 결과, *S. aureus*, *S. enterica subsp.*, *V. parahaemolyticus*의 genomic DNA를 10 pg까지 검출할 수 있었다. 또한 희석되어진 genomic DNA 혼합액을 template로 multiplex PCR법으로 유전자를 증폭시킨 결과, singleplex PCR에서 보인 동일한 검출한계 즉, 10 pg genomic DNA를 다중동시 검출할 수 있었다. 약 800 bp size의 비특이적 유전자 증폭이 발생하였으나 이는 표적 되어지는 PCR products의 크기에 해당되지 않으며 singleplex와 multiplex PCR에서 검출되어지는 한계의 동일성으로 검출 및 동정에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다(Fig. 5). Jeong 등(18)은 *Salmonella*의 PCR 검출 시 genomic DNA 1 pg까지 검출이 가능하다고 하였는데 본 연구에서는 세 균주 모두 single 및 multiplex PCR법에 의해 10 pg까지의 낮은 검출능을 나타내었다. 이는 simultaneous multiplex PCR 반응 시 비특이적 반응 발생을 방지하고자 설정되어진 본 연구에서 사용되어진 PCR 조건 중 증폭 cycle 수 등의 요인에 의한 것으로 생각되며, 따라서 cycle 수와 최적 primer 농도 설정에 따라 그 검출한계를 높일 수 있을 것이라 사료된다.

생균수와 singleplex 및 multiplex PCR 방법의 검출한계

본 연구에서는 *S. aureus*, *S. enterica subsp.*, *V. parahaemolyticus*의 검출을 위하여 상업적 kit 및 전통적인 방법에 의한 DNA 추출 및 정제방법이 아닌 crude DNA 추출을 통해 비용 절감과 함께 PCR 검출한계를 알아보고자 하였다. 검출하고자 하는 식중독 원인균 중 그람 양성균인 *S. aureus*를 고려하여 achromopeptidase 처리를 통해 균량에 비례되는 crude DNA를 안정적으로 추출하였다. 상업적 kit 사용에 의한 DNA 추출과 본 연구에서 사용되어진 DNA 추출 프로토콜에 의한 시간적 소비는 큰 차이를 보이지 않았으며, 비용 면에서 절감할 수 있었다. 추출되어진 crude DNA는 PCR 반응을 위한 template로써 성공적으로 사용되어졌다. 각 표적 식중독 원인균의 희석 배양액으로부터 plate counting 방법을 통해 얻어진 생균수(CFU/mL)에 대한 검출한계를 조사하였다. 그 결과, *S. aureus*는 6.0×10^1 CFU/reaction 즉, 6.0×10^4 CFU/mL까지 검출확인이 가능하였으며, *V. parahaemolyticus*는 6.1×10^2 CFU/reaction 즉, 6.1×10^5 CFU/mL까지 검출이 가능하였다. *S. enterica subsp.*는 9.5×10^1 CFU/reaction 즉, 9.5×10^4 CFU/mL까지 검출이 가능하였다. Simultaneous multiplex PCR법으로 유전자를 증폭시킨 결과, singleplex PCR에서 나타난 각 검출한계와 동일하게 다중동시검출 되었다(Fig. 6).

Yoon 등(22)의 multiplex PCR 연구와 비교 시 *Salmonella* spp., *S. aureus*에 있어 생균수 검출한계가 1 log 차이의 낮은 검출한계를 보였다. PCR에 의한 검출한계 및 검출 정확성은

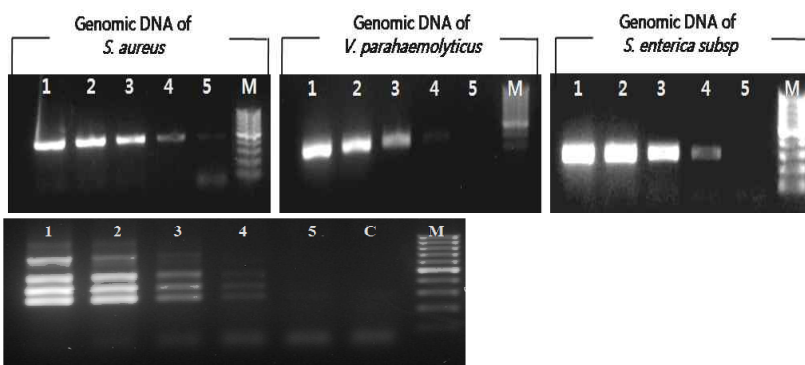


Fig. 5. Detection limits for genomic DNA of *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* and *S. enterica subsp.* by singleplex and multiplex PCR assay. Lane 1: 10 ng genomic DNA, lane 2: 1 ng genomic DNA, lane 3: 100 pg genomic DNA, lane 4: 10 pg genomic DNA, lane 5: 1 pg genomic DNA, lane M: 100 bp ladder.

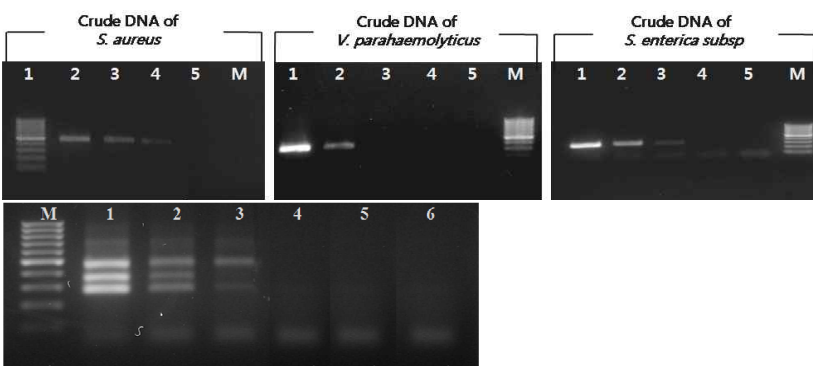


Fig. 6. Detection limits for viable count of *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* and *S. enterica subsp.* by singleplex and multiplex PCR assay. Lane 1: 10^9 CFU/mL, lane 2: 10^5 CFU/mL, lane 3: 10^4 CFU/mL, lane 4: 10^3 CFU/mL, lane 5: 10^2 CFU/mL, lane M: 100 bp ladder.

PCR 조건에 의해서도 많은 영향을 받을 수 있으며, primer 사용농도, annealing 온도 등에 대한 최적화로 검출 민감도를 향상시킬 수 있을 것이다. Lim 등(17)은 혈청형별 *E. coli* O157:H7의 동시검출 최적화 설정에 있어 gradient PCR로 최적 annealing 온도를 선발하였으며, Park 등(23)은 multiplex PCR의 각 primer의 최적 농도를 다르게 하여 multiplex PCR을 수행하기도 하였다. 본 연구결과 PCR 조건 최적화 및 시료부피보다 농축된 crude DNA 추출로 검출한계를 향상시킬 수 있을 것이라 사료된다.

요 약

본 연구는 국내 주요 식중독 원인균인 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica subsp.*, *Vibrio parahaemolyticus*를 동시에 검출 및 동정할 수 있는 simultaneous multiplex PCR방법을 개발하고자 하였다. *S. aureus*의 23s rRNA 유전자(482 bp), *V. Parahaemolyticus*의 *toxR* 유전자(368 bp), *S. enterica subsp.*의 *invA* 유전자(284 bp)를 특이적으로 검출 및 동정할 수 있는 3개 primer set 즉, STA-5F/STA-5R, ToxR-F/ToxR-R, 139/141을 구축하였으며, 그 결과 정제되어진 각 식중독 원인균의 genomic DNA를 template로 하여 세 균주 모두 10 pg까지 다중동시 검출이 가능하였다. 생균수(CFU)와 상응되는 검출한계 결과로써 $10^1 \sim 10^2$ CFU/reaction의 검출한계를 보였으며 이는 즉, *S. aureus* 6.0×10^4 CFU/mL, *S. enterica subsp.* 9.5×10^4 CFU/mL, *V. parahaemolyticus* 6.1×10^5 CFU/mL의 검출한계를 나타내었다. 균체회수부터 agarose gel 상에서 검출 및 동정까지 3~4 hr의 시간 소요로 single tube 반응으로 세 식중독 원인균의 다중동시검출이 가능하였다. 또한 추가적인 연구를 통하여 세 식중독 원인균주의 검출을 위한 향상된 민감도를 가지는 multiplex PCR법 및 real time PCR을 이용한 다중동시검출법 개발을 위한 기초자료로서 활용 가능할 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 대구경북과학기술원(Daegu Gyeongbuk Institute of Science & Technology)의 연구비 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

문 헌

- Lee HJ. 2008. Pathogenic agents and outbreak of foodborne diseases at home and abroad. *Kor J Vet Publ Hlth* 32: 81-89.
- Jung HJ, Cho JI, Park SH, Ha SD, Lee KH, Kim CH, Song ES, Chung DH, Kim MG, Kim KY, Kim KS. 2005. Genotype and phenotype characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from lettuces and raw milk. *Korean J Food Sci Technol* 37: 134-141.
- Ingeborg H, Angelika L, Petra R, Kurt K, Ernst B, Marti W. 2001. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time PCR and quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl Environ Microbiol* 67: 3122-3126.
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2: 63-76.
- Yeh KS, Chen TH, Liao CW, Chang CS, Lo HC. 2002. PCR amplification of the *Salmonella typhimurium* fim Y gene sequence to detect the *Salmonella* species. *Int J Food Microbiol* 78: 227-234.
- Chiu TH, Chen TR, Hwang WZ, Tsen HY. 2005. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. *Int J Food Microbiol* 97: 259-265.
- Jung SJ, Kim HJ, Kim HY. 2005. Quantitative detection of *Salmonella typhimurium* contamination in milk, using real time PCR. *J Microbiol Biotechnol* 15: 1353-1358.
- Park HJ, Kim HH, Park SH, Shin EG, Kim JH, Kim HY. 2008. Direct and quantitative analysis of *Salmonella enterica serovar typhimurium* using real time PCR from artificially contaminated chicken meat. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1453-1458.
- Oh EK, Yu HS, Shin SB, Son KR, Park KB, Kwon JY, Lee TS, Lee HJ. 2008. Trimethoprim resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the fish farm. *J Kor Fish Soc* 41: 324-329.
- di Pinto A, Ciccarese G, de Corato R, Novello L, Terio V. 2008. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish. *Food Control* 19: 1037-1041.
- Kim MM, Oh MH, Lee GY, Hwang IG, Kwak HS, Kang YS, Koh YH, Jun HK, Kwong KS. 2008. Analysis of major food borne pathogens in various foods in Korea. *Food Sci Biotechnol* 17: 483-488.
- Choi KY, Kim BS, Bae WS, Jung WS, Cho YJ. 2008. Developing the index of foodborne disease occurrence. *Korean J Appl Statist* 21: 649-658.
- Adndreja R, Benaissa EM, Mieke U, Philippe B, Willy Z, Ernst H, Ellen F, Johan D. 2006. Immunoquantitative real time PCR for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B in foods. *Appl Environ Microbiol* 72: 16593-16599.
- Kwak HS, Lee DH, Moon HS, Park JS, Woo GJ, Kim CM. 2003. Evaluation of the efficiency of *E. coli* O157:H7 rapid detection kit using immunochromatography. *J Fd Hyg Safety* 18: 118-124.
- Kim MH, Kim WJ, Sin WS, Son DH, Cha SG. 2003. Feasibility study on the use of liposomes for detecting food-borne pathogenic bacteria. *Korean J Food Sci Ani Resour* 23: 278-283.
- Jung HJ, Cho JI, Song ES, Kim JJ, Kim KS. 2005. PCR detection of virulence genes encoding coagulase and other toxins among clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Kor J Microbiol Biotechnol* 33: 207-214.
- Lim JS, Yoon JH, Min BK, Hong KW. 2008. Detection and identification of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *Food Eng Prog* 12: 8-14.
- Jeong SH, Kim MY, Kim HJ, Kim TU, Yu SL, Kim HY. 2003. Rapid detection of *Salmonella* species in foods using PCR. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 225-228.
- Han KH, Lee CW, Lee YS, Yang OS, Lim YK, Yoon BS. 2001. Application of multiplex PCR using Lis-mix primers in food test and specific detection of *Listeria ivanovii*. *J Fd Hyg Safety* 16: 251-257.

20. Seo HA, Park SH, Kim GS. 2003. Optimization of the concentrations of ERIC-PCR components to simultaneously differentiate five foodborne pathogenic bacterial genera. *J Fd Hyg Safety* 18: 229-236.
21. Kim SS, Lee HM, Lee JB. 2003. Molecular epidemiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* as recently wide-spreaded in Korea. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 522-528.
22. Yoon JH, Lee SJ, Hong KW. 2008. A multiplex PCR Assay for the direct detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, and *Staphylococcus aureus* in Food. *Food Eng Prog* 12: 24-31.
23. Park SH, Kim HJ, Kim HY. 2006. Simultaneous detection of *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, and *Shigella* spp. in lettuce using multiplex PCR method. *J Microbiol Biotechnol* 16: 1301-1305.

(2009년 11월 9일 접수; 2010년 3월 16일 채택)