

PCR detection of food-borne pathogenic microorganisms in milk

김경주, 이기세

명지대학교 환경생명공학과

전화 (031) 330-6689, FAX (031) 336-6336

Milk is easily contaminated by pathogenic microorganisms and contains many ingredients that inhibit normal PCR. In this study, we developed a detection method for pathogenic microorganisms existing in milk by using PCR. Sample pretreatment prior to PCR were compared to overcome the inhibition. A high PCR efficiency was achieved by SDS lysis pretreatment, without further purification of DNA for PCR.

서론

우유는 *Listeria* 등 병원성 미생물에 의해 쉽게 오염될 수 있는 식품류이며 이들의 존재를 신속하게 판단하기 위해서는 PCR 반응의 사용을 추천할 수 있다. 그러나 우유에서 직접 in situ PCR을 수행할 때 우유의 복잡한 성분(단백질, 미네랄, 지방 등)들로 인하여 PCR 반응이 inhibition 받는 것이 알려져 있다. 본 연구에서는 *Giardia lamblia*와 *Listeria monocytogenes*를 우유로부터 PCR 검출할 때 우유성분에 의한 inhibition을 극복하기 위하여 효과적인 시료 전처리 방법을 도출하고자 하였다. 시료 전처리 방법으로 DNA 추출 및 정제의 초기단계인 freeze-thawing과 SDS lysis를 이용하여 전 처리 방법에 따른 PCR 효율을 비교하였다.

재료 및 방법

실험 균주로는 *G. lamblia*, *L. monocytogenes*를 사용하여 실험하였고, 우유는 식품점에서 구입하여 PCR 혼합물에 투입하여 실험하였다. 접종된 각 균은 TYI-S-33, LB배지에서 배양되었고 각각 hemacytometer를 이용한 DMC(direct microscope count)와 agar배지에서의 CFU(colony forming unit)를 측정하였다. 오염 우유 시료를 (i) in situ, (ii) freeze-thawing, (iii) SDS lysis(1% SDS, 20mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 50mM NaCl)처리, (iv) freeze-thawing 후 SDS lysis 처리를 한 네 가지의 PCR 효율을 비교하였다. PCR은 최초 95°C에서 5분간, 그리고 40 cycle의 95°C, 72°C, 50°C를 각 1분간 하였고 마지막 cycle은 72°C에서 10분간 실시하여 4°C로 보관하였다. PCR 생성물은 2% agarose gel electrophoresis를 통하여 확인하였다.

결과 및 고찰

G. lamblia trophozoites로부터 정제된 DNA를 PCR 할 때 투입된 우유의 함량이 증가하면 PCR되어 나타나는 band의 강도가 약해짐을 알 수 있다. PCR 혼합물에 5%이상의 우유가 첨가 되었을 경우에는 PCR 효율이 급격히 감소하였다 (Fig 1).

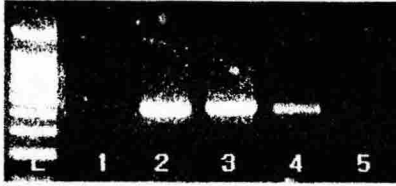


Fig. 1. The result of gel electrophoresis (L: 100 bp ladder, 1: 40% milk in PCR mixture, 2: 1%, 3: 2%, 4: 4%, 5: 9%)

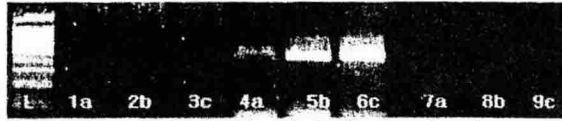


Fig. 2. L: 100 bp ladder, 1-3: freeze-thawing, 4-6: SDS lysis, 7-9: SDS lysis after freeze-thawing, a, b, c: 10, 50 100 cysts / ml of milk, 2.5% milk in PCR mixture

또한 *G. lamblia* cysts의 경우, 우유에 균을 접종한 후, 세 가지의 전처리 방법으로 실험 한 결과 freeze-thawing 전처리 보다 SDS lysis 처리를 이용하는 것이 유리함을 알 수 있다 (Fig 2). *L. monocytogenes*는 Gram-positive bacteria로 colony를 직접 사용하거나 배양액으로도 PCR이 가능하였고, 우유에 접종 시 다른 전처리 과정 없이도 우유농도 5%까지 PCR이 됨을 볼 수 있다 (Fig 3). SDS-lysis 전처리를 함으로써 더 높은 우유농도에서도 PCR이 가능하였다.

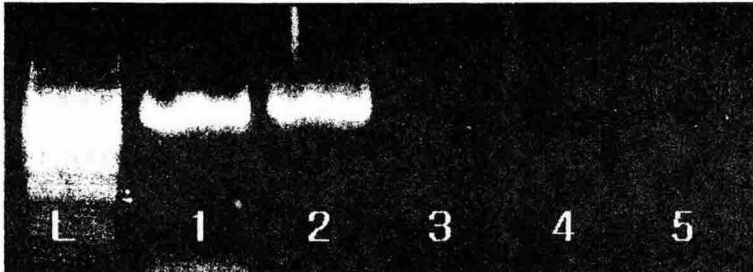


Fig. 3. The result of gel electrophoresis, 1: from colony, 2: from culture broth, 3: 10% milk, 4: 5% milk, 5: 3% milk

요약

본 실험에서는 우유에 존재하는 특정미생물을 PCR에 의해 검출하기 위한 시료 전처리 방법을 비교 하였다. PCR 혼합물 내에 우유의 함량이 높아지면 PCR이 저해됨을 알 수 있으며 SDS lysis 처리를 한 후의 PCR 효율이 가장 좋았다.