

## Polymerization chain reaction과 Southern hybridization을 이용한 *Salmonella*속 균의 신속한 검출

김원용 · 장영효 · 박경윤\* · 김철중\*\* · 신광순\*\* · 박용하

한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자은행  
바이엘코리아(주) 동물의약품사업부\*  
충남대학교 수의과대학\*\*  
(1995년 5월 4일 접수)

### A rapid detection of *Salmonella* species using polymerization chain reaction and Southern hybridization

Won-yong Kim, Young-hyo Chang, Kyoung-yoon Park\*,  
Chul-joong Kim,\*\* Kwang-soon Shin\*\*, Yong-ha Park

Korean Collection for Type Cultures  
Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST  
Bayer Korea Ltd Animal Health Division\*  
College of Veterinary Medicine, Chungnam National University\*\*  
(Received May 4, 1995)

**Abstract :** *Salmonella* species are the most prevalent etiologic agents of food-borne acute gastroenteritis. Direct isolation of bacteria from the contaminated food, stool and animal tissues has been used for the diagnosis of salmonellosis routinely. However, isolation of bacteria is time consuming work and not so highly sensitive. In recent years, improved methods of polymerization chain reaction(PCR) and probe hybridization technique have led to the development of diagnostic assays which employ to detect various human and animal pathogenic bacteria. In this study, we have performed the polymerization chain reaction to detect *Salmonella pullorum* from tissues and stool samples of chickens with two specific primers, ST5 and ST8C. The target DNA fragment of *PhoE* gene was successfully amplified from liver, spleen, pancreas, heart, lung, ovary, oviduct and feces samples. The amplified DNA fragments were hybridized with *Salmonella typhimurium* TA3000 *PhoE* probe by Southern hybridization. The PCR to amplify the *PhoE* gene was highly rapid and sensitive method to detect *Salmonella pullorum* from tissues and stool samples.

**Key words :** *Salmonella*, DNA probe, specific primer, *PhoE*, Southern hybridization

## 서 론

*Salmonella*속 균은 사람 및 동물에서 패혈증, 설사 등을 유발하는 장내세균으로서 동물에서의 감염증은 경제적인 피해를 미칠뿐만 아니라 식육 및 환경오염을 통한 사람의 질병발생에 관련되므로 공중위생상으로도 중요시되고 있다.

*Salmonella* 감염의 진단은 크게 두가지 방법으로 구분할 수 있다. 하나는 혈액이나 분변으로부터 원인균을 분리 동정하는 것이고, 다른 하나는 혈청학적인 방법으로 항체를 검출하는 것이다. 검체로부터 *Salmonella*속 균을 분리동정하는 과정은 여러가지 시험단계를 거쳐 혈청형의 규명까지 해야 하는 복잡한 과정이므로 많은 노력과 시간이 필요하다. 혈청학적 방법으로서 lipopolysaccharide에 대한 ELISA검출법<sup>1</sup>이 소개된 이래 여러가지 O항원에 대한 단클론항체에 의한 검출이 시도되고 있다<sup>3</sup>. 그러나 *Salmonella*속 균은 혈청형별로 O항원이 각기 다르므로 여러가지 O항원에 대한 단클론항체를 만들어 사용해야 하며 교차반응이 나타날 수도 있다. 최근 *Salmonella*속 균을 micro-ELISA(*Salmonella*-TEK kit)로 세균수  $10^4$ cells/ml까지 검출할 수 있다는 보고가 있으나<sup>5</sup> 세균수가 적을 경우 증균과정이 필요하다. *S. typhi*의 경우 국내에서도 단클론항체를 이용한 ELISA법을 진단에 이용하고자 하는 노력이 있으나<sup>19</sup> 이의 민감성은 세균수  $10^4$ cells/ml로서 급성패혈증의 경우처럼 많은 수의 세균이 대변속에 함유되어야만 검출이 가능하다.

이와같이 세균배양법 및 ELISA에 의한 방법은 시간과 민감성에서 그 문제점이 나타나고 있다.

*S. typhimurium*은 *E. coli* K-12와 유사하게 phosphate 결핍 배지에서 anion-selective porin인 *PhoE* (Phosphate-limitation inducible outer membrane protein)를 발현한다<sup>6</sup>. 그러나 *PhoE*는 면역학적으로 다른 장내세균의 일반적인 porin과는 약간의 차이가 있으며, *E. coli*와는 달리 *S. typhimurium*의 *PhoE*는 염색체지도상의 proBA operon 근처인 min 6의 위치에 존재한다<sup>7</sup>. *PhoE* protein은 세포막을 16번 굴곡하며 통과하는 동안 8군데의 세포표면 노출부위를 나타내게 되고 그 노출부위는 hypervariable region으로서 종 특유의 단백질을 구성하는 부위이다. *S. typhimurium* LT12 *PhoE* gene의 완전한 염기서열이 밝혀진 후 세포표면 노출부위 가운데 5번째와 6번째 세포표면 노출부위의 아미노산배열이 다른 장내세균에 비하여 변화부위가 많음에 근거하여 *Salmonella*-specific primer를 밝힌 바 있다<sup>12</sup>.

PCR은 내열성 중합효소인 Taq DNA polymerase를 이용하여 검체 DNA내에 존재하는 표적염기서열을 2<sup>n</sup> 배로 증폭시키는 DNA합성방법으로서 분자생물학 분야에서 응용범위가 넓고, 미생물의 검출에도 많이 응용되고 있다. 세균 또는 바이러스에 존재하는 고유의 특이염기서열이 밝혀지고 있는 경우 이 염기서열을 표적염기서열로 응용하면 검출이 가능한 정도까지 증폭시킬 수 있으므로 극미량의 DNA 또는 몇개의 세균도 검체의 대상이 될 수 있다. 또한 RNA 바이러스일 경우에도 바이러스 RNA를 reverse transcriptase에 의하여 cDNA로 만든 다음, 이를 표적염기서열로 하여 PCR를 시행함으로써 검출이 가능하다. 지금까지 PCR에 의한 검출법은 수많은 세균 및 바이러스에서 응용가능함이 알려졌으며 곰팡이 및 기생충의 검출에도 응용되고 있다<sup>8</sup>.

본 연구는 Spierings et al<sup>2</sup>의 연구에 근거하여 최근에 많이 응용하고 있는 PCR을 *Salmonella*속 균의 신속한 검출에 활용하고자 하였다. 이를 위하여 *PhoE* gene을 증폭하였으며, 이를 DNA 특이적인 *PhoE* 유전자 probe로 이용하여 Southern hybridization을 통하여 신속 정확하게 *Salmonella*속 균을 검출하는 방법을 모색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**Salmonella** 균주 : *Salmonella pullorum*은 살모넬라증을 나타내는 닭의 장기로부터 분리, 동정하고 생화학적인 실험을 수행하였으며, *S. typhimurium*, *S. gallinarum*, *S. enteritidis*는 유전공학연구소 유전자은행(KCTC)에서 분양받아 사용하였다.

세포 Genomic DNA의 분리 : 세포의 genomic DNA는 Glass-Bellard et al의 방법에 따라 분리하였다. 즉 *Salmonella*에 감염된 장기 1g에 12ml의 digestion buffer(100mM NaCl, 10mM Tris Cl, 25mM EDTA, 0.5% SDS, 0.1mg/ml proteinase K, pH 8.0)를 가하고 glass homogenizer(Pyrex, USA)를 사용하여 마쇄한 다음, 50℃에서 12-18시간동안 진탕배양하여 세포막을 완전히 파쇄하였다. 여기에 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)를 가하고 6,000×g에서 10분간 원심분리하여 단백질을 제거한다음 순수한 DNA를 함유하는 상층액에 1/2배량의 7.5M ammonium acetate와 2배량의 100% ethanol을 가하고 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 DNA를 침전하였다. DNA침전물

은 70% ethanol로 세척하고 실온에서 건조한후 TE buffer(pH 8.0)로 녹여 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

세균 genomic DNA의 분리 : 세균의 genomic DNA는 Murry et al<sup>16</sup>의 방법에 따라 분리하였다. 즉 각 균주를 LB broth 5ml에 접종하여 20시간동안 진탕배양한후, 1.5ml을 원심분리하여 균체를 침전시키고 배지성분을 제거하였다. 이 침전균체에 TE bufer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0) 567μl를 가하여 재부유한 다음, 10% SDS 30μl와 proteinase K(0.1mg/ml in DW) 3μl를 가하여 37℃에서 1시간 반응하여 세포막을 파쇄하였다. 세포성분, LPS 및 단백질 성분을 제거하기 위하여 5M NaCl 100μl와 CTAB/NaCl(10% CTAB in 0.7M NaCl) 80μl를 가하여 65℃에서 10분간 반응한 다음, 동량의 C/I(chloroform: isoimylalcohol=24:1) 및 P/C/I(phenol:chloroform:isoimylalcohol=25:24:1)를 가하고 6,000×g에서 10분간 원심분리하여 단백질성분을 완전히 제거하였다. 순수한 DNA를 함유하는 상층액은 새로운 tube에 옮겨 0.6배량의 isopropanol을 가하여 DNA를 침전하였다. DNA침전물은 70% ethanol로 세척하고 실온에서 건조한후 TE buffer(pH 8.0)로 녹여 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Oligonucleotide primer의 합성 및 정제 : Spicing<sup>2</sup>의 연구를 토대로 다음과 같이 PCR을 위한 primer를 합성하였다 (ST5: 5'-AGCGCCGCGGTACGGGCGA-TAAA-3', ST8C: 5'-ATCATCGTCAT-TAATGCCTAACGT-3'). Oligonucleide primer는 DNA synthesizer(Phamacia, Sweden)를 이용하여 합성하였으며 합성한 oligonucleide는 SEP-PAK column (Waters, USA)을 이용하여 정제하였다.

Polymerase Chain Reaction(PCR) : PCR반응은 검체 DNA 10μl에 200μM의 dNTP(Perkin Elmer Cetus, USA)와 10μM의 ST5 및 ST8C primer를 함유한 PCR완충액(10×; 100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2% gelatin)을 가하여 2.5U의 AmpliTaq DNA polymerase(Perkin Elmer Cetus, USA)를 첨가한 다음, automated thermal cycler(DNA thermal cycler 480, Perkin Elmer Cetus, USA)로 검체 DNA의 증폭을 시행하였다. 이때 증폭 cycle의 회수는 1단계에 29 cycles, 2단계에 1 cycle로서 총 30 cycles로 하였으며, 1단계의 cycle은 매 cycle당 94℃에서 40초간 denaturation, 45℃에서 90초간 annealing, 72℃에서 60초간 extension의 순으로 반응을 진행하였다. 2단계의 cycle은 1단계보다 시간을 연장하

여 45℃에서 2분, 72℃에서 6분간 반응하였으며 1.6% agarose gel로 TAE bufer(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.0)에서 전기영동하여 겔체의 target DNA의 증폭여부를 검사하였다.

Southern hybridization : PCR products의 확인을 위하여 *Salmonella typhimurium* LT2로부터 클로닝한 DNA절편을 probe로 이용하여 PCR products를 확인하기 위하여 enhanced chemiluminescence(ECL)-DNA labelling and detection system(Amersham, UK)을 이용하여 Southern hybridization을 실시하였다.

Capillary transfer : 증폭한 PCR products를 전기영동하고 gel을 0.25M HCl의 depurination용액에 침지하여 Red Rotor(Hofer, USA)로 30분동안 천천히 진탕한 후 증류수로 세척하고 1.5M NaCl, 0.5M NaOH의 denaturation용액에서 30분간 반응하였다. 반응후 gel상에 0.4M NaOH용액에 5분간 담가둔 Hybond-N+ membrane(Amersham, UK)을 올리고 0.4M NaOH용액을 통하여 capillary blotting으로 DNA가 membrane으로 이동하게 한 다음, 고정과정을 거치지 않고 바로 hybridization반응에 사용하였다.

Probe DNA의 표지 : *S typhimurium* TA 3,000의 PCR products를 염기서열분석을 통해 그 배열을 확인하고 이를 클로닝한후 hybridization을 위한 probe로 사용하였다. 순수하게 분리정제한 재조합 plasmid DNA를 EcoR I과 XbaI으로 절단하고 agarose gel에서 전기영동한 다음, GeneClean II kit(Bio101, USA)를 이용하여 gel로부터 insert를 elution하였다. elution한 DNA를 표지하기 위하여 200-300ng의 DNA를 100℃에서 5분간 끓여 denature하고 얼음위에 5분간 냉각한 다음, ECL-system내의 DNA labelling reagent용액과 glutaraldehyde용액을 같은 양으로 첨가하고 37℃에서 10분간 반응하여 probe DNA에 horseradish peroxidase가 결합되게 하였다.

Hybridization : Hybaid minioven bottle(Hybaid, USA)에 membrane과 hybridization buffer 5ml을 넣고 42℃에서 천천히 회전시켜 1시간 동안 prehybridization한 다음, labelling한 probe DNA와 hybridization buffer를 혼합하고 42℃에서 8시간이상 반응하여 hybridization하였다. 반응이 끝난 blots은 1차 세척액(Urea 360g, SDS 4g, 20× SSC 25ml/L H<sub>2</sub>O)으로 42℃에서 5분간 2회, 2차세척액(2× SSC)으로 가볍게 1회 세척한 다음, ECL-DNA labelling and detection system내의 detection solution I과 II를 동일부피로 혼합하여 실온에서 1분간 blot에 처리하고 과다한 detection-용액을 제거하였다. 이와

같이 처리한 blot은 Hyperfilm-ECL(Amersham, UK)에 실온에서 1분 30초간 노출하고 X-ray film processor (Konica Qx-40, Japan)에서 현상하였다.

## 결 과

*Salmonella pullorum*의 분리 : 분리 동정된 *Salmonella pullorum*의 생화학적 시험의 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Biochemical characteristics of *Salmonella pullorum* isolated from chicken specimens

Test	Result	Test	Result
KIA	K/A	H2S	-
Indole	-	MR/VP	+/-
Citrate	-	Urease	-
Motility	-	Lysn.decarb.	+
Argn.dehydr.	+	Orn.decarb.	+
Penyl.deam	-	Malonate	-
Glucose/gas	+	Lactose	-
Sucrose	-	Mannose	+
Dulcitol	-	Salicine	-
Adonitol	-	Inositol	-
Sorbitol	-	Arabinose	+
Raffinose	-	Rhamnose	-
Maltose	+	Xylose	+
Trehalose	+	Mannitol	+
Cellobiose	-	Fucose	-
Dextrin	-	Jordan's tartrate	-

*Salmonella*속 균 specific DNA의 PCR 증폭 : *Salmonella*속 균 4종과 heart, lung, liver, pancreas, spleen, ovary, oviduct, feces 등 감염닭의 장기와 분변에서 분리한 *Salmonella pullorum*의 specific DNA를 순수분리하여 정량하고 DNA 100ng을 *Salmonella*속 균에 특이성을 가진 ST5와 ST8C primer를 이용하여 PCR로 증폭한 다음, 1.6% agarose gel에 전기영동한 결과, 모든 *Salmonella*속 균과 검체로부터 같은 365bp크기의 단일 증폭산물이 나타남을 확인할 수 있었다(Fig 1).

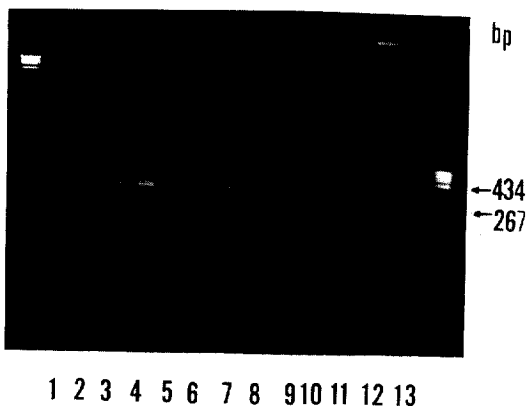


Fig 1. PCR amplification of genomic DNA from *Salmonella* in infected chicken organs. Electrophoretic profiles of the amplified-DNA from *Salmonella* spp.

- 1: *S typhimurium*, 2: *S gallinarum*, 3: *S enteritidis*,  
 4: *S pullorum*, 5: infected chicken heart,  
 6: infected chicken lung, 7: infected chicken liver,  
 8: infected chicken pancreas, 9: infected chicken spleen,  
 10: infected chicken ovary, 11: infected chicken oviduct,  
 12: infected chicken feces, 13: negative control

Southern hybridization : PCR에 의한 검출의 민감성을 더욱 높이고 PCR products를 확인함으로써 *Salmonella*속 균을 동정하기 위하여 *S typhimurium* TA 3,000유래의 DNA probe를 이용하여 Southern hybridization 하였다. *S typhimurium* TA 3,000유래의 DNA probe를 이용하여 다른 *Salmonella*속 균을 검출할 수 있는가를 알아보기 위하여 4종의 다른 *Salmonella*속 균과 heart, lung, liver, pancreas, spleen, ovary, oviduct, feces 등의 장기에서 분리된 *S pullorum*의 genomic DNA를 순수분리하여 PCR amplification 한 후 Southern hybridization한 결과, 다른 *Salmonella*속 균과 각 장기의 PCR products와 모두 특이적으로 양성반응하였다(Fig 2).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

**Fig 2.** Southern blot analysis of PCR products with ECL-labelled *S typhimurium* TA 3,000 probe.

1: *S typhimurium*, 2: *S gallinarum*, 3: *S enteritidis*, 4: *S pullorum*, 5: heart, 6: lung, 7: liver, 8: pancreas, 9: spleen, 10: oviduct, 12: Feces, 13: negative control

## 고 찰

*Salmonella*속 균의 검출은 증균과정<sup>16</sup> 거쳐 선택배지에서 의심되는 집락을 선택하고, 이의 생화학적 성상을 확인하여야 한다. 이러한 과정은 많은 노력과 시간을 요하며, 또한 생존상태나 배양이 불가능한 세균의 경우는 이러한 배양법으로 검출할 수 없으며, ELISA에 의한 검출방법은 균수가 낮은 세균을 검출하기에는 민감성이 저조하므로 좀더 신속하고 민감하며 정확한 검출법이 요구되고 있다.

미생물의 검색목적으로 PCR을 사용할 경우, 특정 유전자나 특정 DNA염기서열을 선택적으로 증폭시킴으로써<sup>19</sup> 검체내에 미량으로 존재하는 미생물도 쉽게 검색할 수 있기 때문에 미생물 감염의 조기진단에 활용할 수 있다. PCR에 의한 검출은 특이적인 유전자를 2<sup>n</sup>으로 증폭시키므로 그 자체로도 ELISA 등의 면역학적인 방법보다 예민하다. 부가하여 Southern hybridization이나 dot hybridization함으로써 더욱 높은 민감성을 얻을 수 있으며, 특히 DNA를 probe로 사용하므로 증폭산물이 정확한지를 확인할 수 있다<sup>17</sup>. 본 실험의 경우에도 세균수가 많은 가검물일 경우에는 간편한 가열용균법에 의하여 *Salmonella*속 균을 검출할 수 있었으나, 균수가 적은 경우에는 DNA를 순수 분리하여 PCR을 시행하는 것이 효율적임을 확인할 수 있었으며, 아울러 Southern hybridization할 경우는 더욱 민감성이 증가하였다.

PCR에 의한 검출은 반응시간 4-5시간에 Southern hybridization 10-12시간을 더하여 14시간 정도면 확실한 결과를 알 수 있으므로 시간적인 측면에서 커다란 장점을 지니고 있다. 또 굳이 Southern hybridization을 하지 않더라도 전기영동상의 증폭산물을 비교함으로써 결과를 해석할 수 있으므로 민감성과 시간적인 면에서 어떠한 검출법보다도 많은 가검물의 검사에 적합하다. 그리고 검체로부터 감염균을 순수 분리하지 않고 검체 그 자체를 시료로 사용하여 검색할 수 있어서 더욱 간편하게 결과를 얻을 수 있다.

## 결 론

*Salmonella*속 균을 신속 정확하게 검출할 수 있는 방법으로서 PCR을 활용하고자 *PhoE* gene인 ST5 및 ST8C primer를 사용하여 PCR방법으로 DNA를 증폭하고 특이성이 있음을 증명하였으며, Southern hybridization을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PCR에 사용한 ST5 및 ST8C primer는 *Salmonella*속균과 heart, lung, liver, pancreas, spleen, ovary, oviduct, feces 등의 감염된 가금의 장기에서 *Salmonella*의 특이적인 증폭산물을 나타내어 가검물에서 *Salmonella*의 신속정확한 검색이 가능하였다.

2. 또한 *S typhimurium* TA 3,000의 *PhoE* gene clone을 DNA probe로 이용하여 *Salmonella*속균과 heart, lung, liver, pancreas, spleen, ovary, oviduct, feces 등의 감염된 가금의 장기에서의 PCR products와 Southern hybridization한 결과 특이적으로 민감하게 반응함을 확인하였다.

3. 이와같은 결과를 바탕으로 짧은시간에 대량의 검체를 정확하게 검색하는 것이 가능하였다.

## 참 고 문 헌

1. Spierings G, Ockhuijsen C, Hofstra H, et al. Characterization of the *Citrobacter freundii* *PhoE* gene and development of *C freundii*-specific oligonucleotides. FEMS-Microbiol-Lett 1992; 99: 199-204.
2. Spierings G, Hofstra H, Huis in Veld J, et al. Development of enterobacterium-specific oligonucleotide probes based on the surface exposed

- region of outer membrane proteins. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55: 250-252.
3. Torensma R, Visser MJC, Aarsman CJM, et al. Monoclonal antibodies that detect live *Salmonella*. *Appl Environ Microbiol* 1990; 58: 3868-3872.
  4. Rigby CE. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Salmonella* lipopolysaccharide in poultry specimens. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47: 1327-1330.
  5. Lieve SG, Van Poucke. *Salmonella*-TEK, a rapid screening method for *Salmonella* species in food. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 924-927.
  6. Bauer K, Benz R, Brass J, et al. *Salmonella typhimurium* contains an anion-selective outer membrane porin induced by phosphate starvation. *J Bacteriol* 1985; 161: 813-816.
  7. Singh SP, Upshaw Y, Abdullah T, et al. Structural relatedness of enteric bacteria porins assessed with monoclonal antibodies to *Salmonella typhimurium* OmpD and OmpC. *J Bacteriol* 1992; 174: 1956-1973.
  8. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, et al. Diagnostic Molecular Microbiology-Principles and Application. Washington: America Society for Microbiology, 1993; 51-87.
  9. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1513.
  10. Desmonts C, Jacques M, Rita C, et al. Fluorescent-antibody method useful for detecting viable but nonculturable *Salmonella* spp. in chlorinated waste-water. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 1448-1452.
  11. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.
  12. Kitchin PA, Szotyori Z, Fromholz C, et al. Avoidance of false positive *Nature* 1990; 344: 201.
  13. Myra N, Widjoatmodjo et al. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of *Salmonella* in fecal samples. *J Clin Microbiol*. 1992; 30: 3195-3199.
  14. Luk JMC, Lindburg AA. Rapid and sensitive detection of *Salmonella*(O:6,7) by immunomagnetic monoclonal antibody-based assays. *J Immunol Methods* 1991; 137: 1-8.
  15. Knight IT, Shults S, Kaspar CW, et al. Direct detection of *Salmonella* spp. in estuaries by using a DNA probe. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 1059-1066.
  16. Murray MG, Thompson WF, Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* 1980; 8: 4321-4325.
  17. 박두희, 김원용, 김철중 등. Polymerase chain reaction에 의한 *Salmonella*속 균의 검출. *대한수의학회지* 1994; 34(1): 115-125.
  18. 국윤희, 박정규, 임동균 등. 단세포균향체를 이용한 신속한 탐지법 개발 및 임상검체에의 적용 시험. *대한미생물학회지* 1989; 24: 247-258.
  19. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.