

탄저균과 부루셀라균의 신속 검출법 개발

최재구[†]

동남보건대학 환경생명과학과
(2007. 6. 19. 접수/2007. 9. 22. 채택)

Development of Rapid Detection Method for *Bacillus Anthrax* and *Brucella Abortus*

Jae-Gu Choi[†]

Department of Environmental & Life Science, Dongnam Health College
(Received June 19, 2007/Accepted September 22, 2007)

ABSTRACT

The livestock are sometimes infected with pathogenic microorganisms such as bird influenza, brucellosis, pig cholerae, and salmonella. However, it is difficult to predict the outcome of these diseases because the livestock are mostly raised in the rural areas. Efficient systems for detecting and alerting the onset of livestock diseases are urgently required. In these studies, the fluorescent analysis method, luminescent analysis method, and frequently used gene amplification method (polymerase chain reaction) have been developed in order to detect the pathogenic microbes in the early stages of disease progression. By using these developed systems, damages due to the livestock diseases induced by microbes can be minimized. If we can detect livestock diseases in the early stage, the costs for diagnosis and treatment will be reduced, and the livestock can be quickly recovered.

Keywords: bird influenza, brucellosis, pig cholerae, salmonella, fluorescent analysis

I. 서 론

최근 미국에서 발생한 9.11 테러 이후 생물학 작용제에 의한 테러의 위험성이 크게 증가하고 있다. 따라서 생물학 테러에 대한 국제적 관심도 높아졌으며 국가적인 방어대책이 시급하다. 또한 인간 생활과 밀접한 관계가 있는 가축들에게 발생하는 조류독감, 소 부루셀라, 돼지 콜레라 및 살모넬라 감염이 빈번히 일어나며 가축 사육지 등이 도시 외곽이나 시골에 위치하기 때문에 질병 발생 시 조기 대처가 어렵다는 단점이 있으므로 가축질병에 대한 조기 경보 시스템의 개발이 절실하게 필요하게 되었다.

사육자가 질병을 조기에 발견하기 위해서는 항상 사육하는 동물을 가까이 접촉하면서 평상시 건강할 때의 개체적 특징을 잘 파악해 두어야 하며, 가축의 외모와 거동에 이상 현상이 나타날 경우 그 병은 상당히 진행

된 상태이기 때문에 사육자는 늘 세심하게 가축들을 관찰해야 한다.

본 연구에서는 탄저병과 부루셀라증에 대한 조기 탐지 및 검출 시스템을 개발하고자 한다. 탄저병은 치명적인 감염성 질환으로 원인균은 *Bacillus anthracis*로 크기가 큰 그람 양성간균으로 아포를 형성하는 호기성 균이다. 탄저병은 전 세계적으로 널리 퍼져 있으며 특히 초식 동물인 소, 말, 양, 염소 등에서 유행하며 사람에게는 이들 감염된 동물과의 피부 접촉에 의해 감염되는 것이 대부분이며 경구 또는 흡입에 의해 감염되기도 한다.¹⁻³⁾

부루셀라증은 전 세계적으로 사람과 가축에 발생하는 중요한 인수공통전염병으로 국가간의 발생 양상이 다양하나 *Brucella abortus* 감염에 의한 소 부루셀라증이 가장 많이 발생하고 있다.

병원소는 이 세균에 감염된 동물이고 감염원은 감염 동물의 장지 혈액, 오줌, 우유, 태반, 유산된 태자 등에 접촉하거나 살균되지 않은 우유나 유제품의 섭취 등에 의하여 전파된다. 따라서 사람에 있어 탄저병과 부루셀라증의 감염예방은 동물 숙주에서의 질병을 제거하여

[†]Corresponding author : Department of Environmental & Life Science, Dongnam Health College
Tel: 82-31-249-6473, Fax: 82-31-249-6470
E-mail: jgchoi@dongnam.ac.kr

나 관리하고, 직업적인 노출위험군의 관리, 오염식품의 열처리 등이 필요하다.^{4,5)} 이러한 가축 질병에 관련된 미생물을 분석하기 위해서는 분자 생물학적 방법으로 자주 사용되는 형광-발광 방법과 유전자 증폭반응을 이용하고, 병원성 미생물을 조기에 탐지-검출하는 시스템을 개발하여 차량에 분석 장치를 탑재하여 이동성을 좋게 하여 가축 관련 미생물을 조기에 경보하여 피해를 최소화 하고자 한다.

미생물 탐지-검출 분석 방법은 공기, 수질 등에서 미생물을 포집하여^{6,8)} 초음파 파쇄기를 사용하여 세포벽을 파괴하고 이때 세포벽으로부터 외부로 나온 유전자(DNA, RNA), 단백질, ATP 등을 형광 또는 발광 시약과 혼합하여 형광-발광 검출기를 이용하여 미생물의 존재 여부를 탐지한 후 미생물이 가축이나 인체에 질병을 일으킬 수 있는 기준 이상 존재한다고 할 때 실시간 유전자 증폭 반응을 이용하여 미생물의 종을 검출하고자 한다.

*Bacillus globigii*의 특징은 *Bacillus anthracis*와 비슷하게 포자를 생성하며 생성된 포자는 열에 강한 성질을 가지나 독성이 없으며 전염성이 없다. 또한 검출 시스템에는 PCR 산물을 클로닝하여 실시간 유전자 반응 시 응용하고자 한다.⁹⁾

이와 같이 가축에 질병을 발생하는 미생물을 조기에 발견함으로써 진단과 치료가 용이해 지고, 치료약품에 대한 반응이 좋아서 질병에 걸린 가축이 빨리 회복되며, 치료비가 절감되며 보다 환축기간을 줄일 수 있다. 또한 전염병이 다른 동물에 전염되기 전에 예방할 수 있는 시간적 여유를 가질 수 있다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 연구에서는 KCCM 11314 *Bacillus subtilis varniger*, *Bacillus globigii*, ATCC 7705 *Brucella abortus*, ATCC 14578 *Bacillus anthracis*를 사용하였다.

2. 시약 및 기기

1) 시약

PCR 증폭반응을 위해 사용한 DNA *Taq*. polymerase는 제넷 바이오 제품을 사용하였고 PCR 산물 정제 시 사용한 *AccuPrep*TM PCR Purification Kit는 Bioneer의 제품을 사용하였다. 탐지 시스템에 사용된 ATP와 Genomic DNA 추출하기 위해서 사용한 Guanidine-HCl과 Agarose는 Sigma Chemical에서 구입해 사용하였으며 TA cloning을 위한 pGEM T easy Vector는

Promega 제품을 구입하여 사용하였다. SYBR Green I과 NanoOrange Protein Quantitation Kit은 Molecular Probe사의 제품을 구입하여 사용하였다.

2) 기기

형광-발광 검출기는 Fluoreskan II(Labsystems)를 사용하였으며 DNA의 증폭은 GeneAmp PCR System 2400(Perkin-Elmer, USA)를 사용하였고, PCR의 확인은 Agaro PowerTM(Bioneer, Kor) 전기영동장치로 확인하였다. Real Time PCR 반응은 Rotor-Gene 3000 (Corbett Research)을 사용하였다.

3. 실험 방법

초음파 파쇄기를 사용하여 미생물의 세포벽을 파괴 후 나온 유전자, 단백질, ATP를 형광-발광 검출기와 실시간 유전자 증폭반응을 통해 탐지-검출하였다.

1) Lamda DNA를 이용한 DNA 표준정량곡선 작성

(1) 농도를 알고 있는 lamda DNA(500 ng/ μ)를 3차 증류수를 사용하여 농도별로 희석하고 농도별로 튜브에 180 μ 씩 분주하였다.

(2) 10X SYBR Green I 20 μ 를 분주하고 잘 섞어준 다음 형광 검출기의 파장을 485~538 nm으로 설정한 후 형광 값을 수 회 측정하였다.

2) BSA(Bovine Serum Albumin)를 이용한 단백질 표준정량곡선 작성

(1) 1X Nano-Orange 용액을 제조한 후 597 μ 를 튜브에 분주하고 BSA 3 μ 를 첨가하여 10 μ g/ml의 표준 BSA 시료를 만들었다.

(2) BSA를 농도별로 희석하여 준비하고 각각의 BSA를 90°C 이상에서 10분 동안 가열한 후 8°C로 급속 냉각하였다.

(3) 튜브에 200 μ 씩 분주하여 형광 검출기의 파장을 470~570 nm으로 설정한 뒤 형광 값을 수 회 측정하였다.

3) ATP를 이용한 표준정량곡선 작성

(1) ATP를 농도별로 희석하여 튜브 안에 180 μ 씩 분주하고 Luciferin과 Luciferase를 혼합하여 잘 섞어 주었다.

(2) 발광 검출기를 이용하여 수 회 측정하였다(ATP를 이용하여 발광 값을 측정할 때는 1분 이내 여러 번 측정하여 결과를 얻는 것이 중요하다.).

4) 균주 배양

동결 건조된 상태로 분양받은 균주를 멸균된 영양(nutrient) 배지(bacto peptone 5 g/l; Beef extract 3 g/l)에 현탁하여 30°C 진동 배양기에서 16시간 이상 배양한 후 15% glycerol stock을 제조하였다.

5) *Bacillus globigii*의 sporulation

(1) 제조되어진 배지에 이식 배양된 *Bacillus globigii* 100 µl씩 분주하여 도말하였다.

(2) 30°C 배양기에서 3일간 정지 배양하였다.

(3) 각각의 plate에서 균집을 따서 포자 염색을 하여 포자의 형성 정도를 확인하였다.

(4) 포자 수가 많으면 멸균된 50 ml Falcon 튜브에 3차 증류수 30 ml를 채우고 plate 배지 위의 균체를 긁어서 튜브에 담았다.

(5) 회수 되어진 균체를 65°C에서 30분간 중탕 저온 살균하여 포자가 형성되지 않은 cell들을 모두 사멸시켰다.

(6) 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 다시 멸균된 3차 증류수를 30 ml 첨가하여 현탁하였다.

(7) 회수되어진 균체(spore)를 100 µl 취하여 포자 수를 확인하였다.

(8) 4°C 냉장고에 보관하였다.

6) 포자 염색방법

(1) agar plate에서 약간의 cell을 긁어서 슬라이드 글라스위에 올려놓고 3차 증류수 5 µl를 첨가하여 골고루 퍼지게 하였다.

(2) 골고루 퍼진 슬라이드 글라스를 알코올램프 위에

서 불꽃 고정하였다.

(3) 슬라이드 글라스 위에 malachite green base(95% ethanol) 1 ml을 건조되어진 슬라이드 글라스 위에 펼쳐 바른 후 60~80°C에서 5분 가온 염색하였다.

(4) 가온염색이 끝나면 녹색이 모두 흘러 내리도록 슬라이드 글라스의 뒷면을 흐르는 물로 세척하였다.

(5) Safranin O(s2255) 0.25 g을 95% 에탄올 10 ml에 녹인 다음 3차 증류수를 100 ml이 되게 부어서 대비염색 용액을 만들었다. 이 용액을 슬라이드 글라스 위에 1 ml 정도 부어서 30초~1분간 염색시켰다. 이때 포자는 푸른색으로 염색이 되고 포자가 아닌 균체는 분홍색으로 염색이 되어지기 때문에 현미경으로 육안 관찰이 가능하였다.

(6) 포자가 확인이 되면 사진을 찍어 보관하였다.

7) Genomic DNA 추출

(1) 배양된 미생물(10^7 cfu/ml)을 2 ml 튜브에 넣고 원심 분리, 작은 덩어리를 모았다.

(2) 1X PBS 1 ml을 작은 덩어리(pellet)에 첨가하여 작은 덩어리를 잘 풀어주고 원심 분리하여 상층액을 버렸다.

(3) 250 µl의 Lysis 완충용액을 첨가하고, Proteinase K를 첨가한 후 55°C에서 1시간 배양(incubation)하였다.

(4) 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol를 첨가한 후 잘 섞어 주고 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다.

(5) 3 M 초산나트륨과 100% 에탄올 1 ml을 첨가하고 냉동고에 1시간 방치하였다.

(6) 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상층액을

Table 1. Primer sequence and PCR step used to amplify *Bacillus anthracis*

Step	Temp. (°C)	Time	Cycle
Initial denature	94	5 min	
Denature	94	15 sec	
Annealing	58	20 sec	45 repeats
Extension	72	20 sec	

	Sequence of primers Sense (5'→3') Antisense (3'→5')	Size of fragment (bp)	Location (bp)
1	TCGTCAAGTGTAGGTCCCATAACA GGTGAGCAACGCAGGGTAGTT	185	56825~57009
2	AAGTTTACGAAGGCGACAACGC TTTCTTTTCATTGCTTTTGAGCGA	252	897880~898131
3	CGGTCCAGACCGTGACAATG TAAGCTGCCACAAGGGGTG	256	656~911

Table 2. Primer sequence used to amplify *Brucella abortus*

	Sequence of primers		Size of fragment (bp)	Location (bp)
	Sense (5'→3')	Antisense (3'→5')		
Sense	ACCCAAATGCTCACAAAAACCA		230	1271~1500
Antisense		AACCTCACCAGCGAACTCAACA		

Table 3. The condition of working solution for Real Time PCR

Components of PCR	Volume
10× reaction buffer (10 mM Tris-HCl; pH 8.3, 50 mM KCl)	2 µl
10 mM dNTP mix (2.5 mM ea.)	2 µl
10 mM MgCl ₂	2 µl
Forward primer (5 pM)	2 µl
Reverse primer (5 pM)	2 µl
DNA <i>Taq.</i> polymerase (1 U/µl)	1 µl
Template DNA (50 ng/µl)	2 µl
Deionized water	6 µl
SYBR Green I	1 µl
Total	20 µl

버렸다.

(7) 70% 에탄올을 1 ml를 첨가하여 작은 덩어리를 2회 씻어주고 12,000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 버리고 작은 덩어리를 건조하였다.

(8) 건조된 작은 덩어리에 100 µl의 용출 완충용액을 첨가하여 작은 덩어리를 녹이고 PCR 반응에 사용하거나 냉동고에 보관하였다.

8) 실시간 유전자 증폭반응(Real-Time PCR)

PCR primer set(Table 1, 2)을 이용하여 실시간 유전자 증폭반응 산물을 얻었다.^{1,5,9-12)} 20 µl의 PCR reaction solution(Table 3)을 0.2 ml PCR reaction 튜브에 넣은 후, Rotor Gene 3000(Corbett Research)를 이용해서 실시간 유전자 증폭반응을 수행하였다.

9) PCR 산물 정제(Silica Method)

(1) PCR 산물의 5배 부피의 실리카 결합 완충용액을 넣고 잘 섞어주고 실리카를 첨가하여 실온에서 10분정도 방치하면서 2-3분 간격으로 잘 흔들어 주었다.

(2) 12,000 rpm에서 60초 원심 분리하고 상층액을 제거한 후 500 µl의 세척 완충용액을 첨가하여 작은 덩어리를 잘 씻어 주었다.

(3) 12,000 rpm에서 60초 원심분리하고 상층액을 제거한 후 실리카 작은 덩어리가 하얗게 변할 때까지 실온에서 건조한 후 20-30 µl 용출 완충용액을 첨가했다.

(4) 12,000 rpm에서 60초 원심분리하고 상층액을 새 튜브로 옮겼다.

10) TA Cloning

Competent cell 제조

(1) Host cell 50 µl를 Ampicillin이 없는 LB Plate에 접종하고 12시간 키운 후 단일 균집을 LB broth에 접종하여 12시간 키웠다.

(2) 12시간 후 Main culture 부피의 1/100로 seed culture를 접종하고 스펙트럼을 측정하여 OD₆₀₀ 값이 0.4일 때 배양을 멈췄다.

(3) 15 ml Falcon 튜브에 담아 4,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하여 작은 덩어리를 모으고 배지는 천천히 버리고 1 ml Sol A를 넣고 작은 덩어리를 조심스럽게 풀어주고 다시 6 ml를 넣고 가볍게 뒤집어 섞어주고 4,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 버렸다.

(4) 1 ml Sol B를 넣고 작은 덩어리를 조심스럽게 풀어준 후, 다시 6 ml를 넣고 가볍게 뒤집어 섞어준 후 얼음위에 30분간 방치했다.

(5) 4,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 버린 후 Sol B 1 ml를 넣고 작은 덩어리를 풀어 주었다.

Ligation & Transformation

(1) 1 µl의 pGEM T Vector, 5 µl의 2X 봉합 완충용액, 1 µl의 T4 DNA ligase, 2 µl의 삽입 DNA와 1 µl의 3차 증류수를 잘 혼합하였다.

(2) 37°C에서 1~2시간 배양한 후 준비된 100 µl 적격 세포와 DNA를 혼합하여 얼음위에 30분간 방치하였다.

(3) 42°C에서 90초 동안 열 충격을 수행한 후 얼음위에서 10분간 방치하였다.

(4) LB Media 200 µl에 넣고 1~2시간 배양하고 원심 분리 후 작은 덩어리를 모아 aga-plate에 펼친 후 37°C에서 하루 밤 동안 두었다.

(5) 흰색 균집을 선택하여 LB 배지에 키웠다.

(6) 제한효소 처리, 염기분석 및 PCR 반응을 수행하여 삽입을 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *Bacillus globigii*의 최적 배지

*Bacillus globigii*의 초기 성장을 위한 배지의 선택 실험으로서 기존에 알려진 3종류의 *Bacillus* 배지를 이용하여 성장의 변화를 확인하였다.²⁾ 이때 사용된 배지는 영양(nutrient) 배지와 *Bacillus* 배지 그리고 LB 배지로 기존의 *Bacillus sp.*에만 사용되어져 왔던 배지를 일차적으로 선택하였으며 유전자은행의 균주에 대한 자료를 참고로 하였다. 실험의 결과 *Bacillus sp.* 배지에서 성장이 가장 좋은 것으로 나타났으며, 향후 실험에 사용되어지는 모든 seed culture 및 생균수의 확인은 *Bacillus sp.* 배지로 이루어 졌다.

2. 형광-발광 검출기를 이용한 미생물 탐지 시스템

초음파 파쇄기를 이용하여 신속하게 미생물의 세포벽을 파괴하고 이때 나오는 유전자, 단백질, ATP를 형광 또는 발광 시약과 혼합하여 빠른 시간에 미생물의 존재 여부를 탐지할 수 있다. SYBR Green I 경우 이중 가닥 DNA의 염기쌍 사이에 삽입되어 DNA량을 정량할 수 있고 Nano Orange의 경우 단백질량을 정량할 수 있으며 Luciferin과 Luciferase를 이용하여 살아있는 미생물 속에 존재하는 ATP양을 측정할 수 있다.

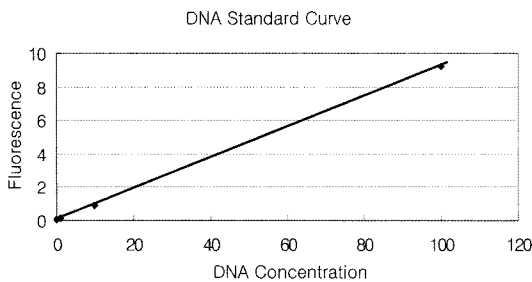


Fig. 1. DNA standard calibration plot for lamda DNA using the Fluoreskan system and the SYBR Green I.

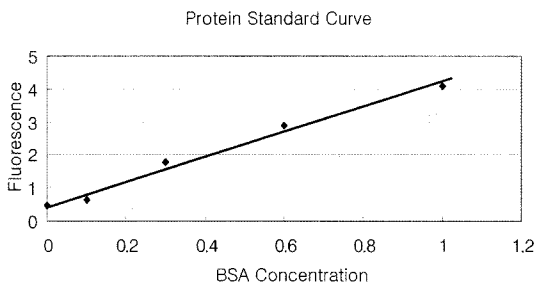


Fig. 2. Protein standard calibration plot for bovine serum albumin (BSA) using the Fluoreskan system and the NanoOrange Protein Quantitation Kit.

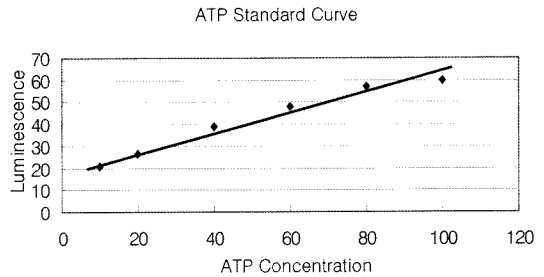


Fig. 3. ATP standard calibration plot using the Fluoreskan system.

Lamda DNA, BSA, 그리고 ATP를 이용하여 DNA 표준정량곡선(Fig. 1), 단백질 표준정량곡선(Fig. 2) 그리고 ATP 표준정량곡선(Fig. 3)을 작성하였다.

DNA 정량곡선 실험에서 끓이기 방법을 위해서 대장균과 *Bacillus globigii*를 각각 농도별로 희석하여 끓는 물에서 10분 정도 물 증탕하여 세포벽을 파괴하였고 초음파파쇄 방법을 위해서는 30초 정도 초음파로 세포벽을 파괴하였다.

유전자, 단백질, ATP가 존재한다는 것은 살아있는 미생물이 존재한다는 것을 의미하고 기존의 대기나 수질 속에 존재하는 미생물 수를 수시로 확인하여 지역마다 통계치를 가지고 있으면 비교 실험을 통해 그 지역의 미생물의 수를 정확하게 측정할 수 있다. 이것은 미생물에 의한 가축 질병의 조기 탐지에 있어서 중요한 사항이다.

3. 실시간 유전자 증폭 반응을 이용한 미생물 검출시스템

PCR법은 분자 생물학 뿐 아니라 기초 생물학, 의학, 식품, 환경, 동식물 검사 등의 다양한 분야에서 적용되고 있다. 본 연구에서 사용한 미생물은 탄저와 부루셀라로 각각을 검출할 수 있는 프라이머를 디자인하였으

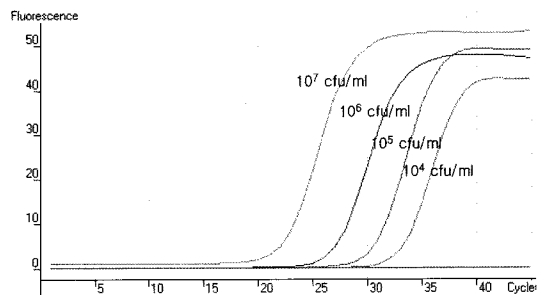


Fig. 4. *Brucella abortus* SYBR Green PCR. Fluorescence emission curves of the duplicate *Brucella abortus* standard DNAs at concentrations of 10^7 - 10^4 template copies per PCR are displayed.

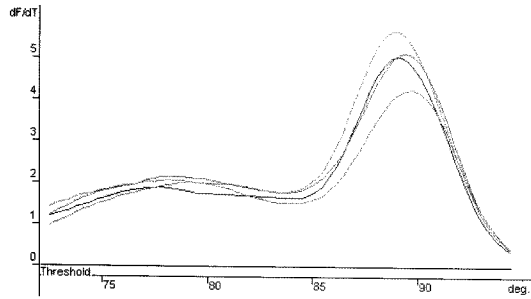


Fig. 5. Melting curve analysis of final products showing single product amplification (*Brucella abortus*).

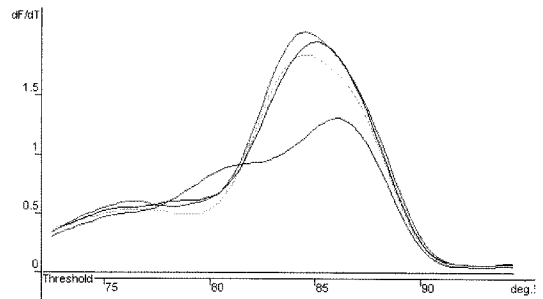


Fig. 7. Melting curve analysis of final products showing single product amplification (*Bacillus anthracis*).

며 PCR 방법을 사용하여 제작된 프라이머의 성능을 확인하였다. 부루셀라의 경우 실시간 유전자 증폭반응을 통해 증폭된 산물과 프라이머 이합체의 그래프를 얻었으며, 녹음 곡선을 작성하여 부루셀라에 의해서 얻어진 PCR 산물과 프라이머 이합체나 부반응을 확인할 수 있었다. 또한 부루셀라를 농도별로 희석하여 실시간 증폭반응을 수행할 결과 농도에 의한 증폭 그래프(Fig. 4)를 얻었으며 녹음 곡선(Fig. 5)을 작성하여 부루셀라에 의해서 증폭된 산물의 녹는 온도를 확인할 수 있었다.

탄저의 경우 농도별로 희석하여 실시간 유전자 증폭반응을 수행하여 증폭산물에 대한 그래프(Fig. 6)를 얻었으며 녹음 곡선(Fig. 7)을 작성하여 녹는 온도를 확인하였다. 기존의 PCR 법은 end-point 측정법으로 유전자 증폭 반응 후 전기영동법에 의해 결과를 확인해야 하기 때문에 PCR 산물에 의한 오염의 위험성이 있었으며 또한 정량 개념을 도입하는데도 어려움이 있었다.

최근에는 기존의 PCR 법 보다 신속하고 감도도 높으며 오염의 위험성을 줄일 수 있는 실시간 유전자 증

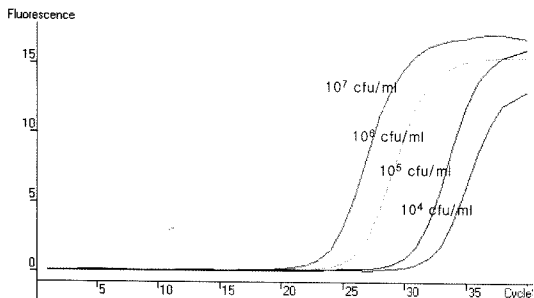


Fig. 6. *Bacillus anthracis* SYBR Green PCR. Fluorescence emission curves of the duplicate *Bacillus anthracis* standard DNAs at concentrations of 10^7 - 10^4 template copies per PCR are displayed.

폭반응(Real Time PCR) 법이 널리 보급되어 가는 실정이다.¹³⁻²⁴⁾ 따라서 형광-발광 검출기로 미생물의 존재가 확인되면 실시간 유전자 증폭반응을 통해 미생물의 종을 조기에 발견할 수 있게 된다.

IV. 결 론

본 연구에서 개발하고자 하는 시스템은 분자 생물학 실험에서 기본으로 사용되는 형광-발광 검출기와 실시간 유전자증폭반응을 통해 가축 질병 관련 미생물을 신속 정확하게 탐지-검출하고자 하였으며 또한 시스템 운용에 필요한 교육 기자재들을 개발하여 실제 현장에서 활용할 수 있도록 하였다. 세포내의 유전자, 단백질, ATP 등을 신속하게 세포 밖으로 나오게 하기 위해 초음파파쇄법을 사용하여 1분 안에 세포를 파쇄 할 수 있게 하였고 형광-발광 검출기를 사용하여 미생물의 존재 여부를 신속하게 탐지할 수 있게 하였고 또한 미생물의 종을 구분하는 방법으로 유전자 증폭반응을 사용하였는데 이 방법은 기존의 세포 배양법보다 신속하게 종을 구분할 수 있게 방법이다. 그런데 최근에는 실시간 PCR 방법의 출현으로 기존의 PCR 방법 보다 민감도, 신속성이 증가 되었으며 실험 시 발생하는 오염도 획기적으로 감소할 수 있게 되었다. 또한 실험 결과를 실시간으로 모니터링할 수 있어 공기 또는 수질 중에서 포집되어 탐지된 미생물에 대한 종을 빠른 시간에 검출할 수 있어 질병의 조기 진단에 있어 활용도가 크다고 할 수 있다.

또한 본 시스템을 차량에 탑재하여 이동성을 부여함으로써 어떤 지역에서든지 실시간으로 미생물을 탐지-검출할 수 있으므로 생물학 작용제 탐지 및 검출, 행사 발생 시 유입되는 미생물의 양 및 종 확인, 대형 백화점 할인점 내의 위험 미생물 확인 등의 응용성이 뛰어나다고 할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 동남보건대학 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Yagupsky, P. : Detection of brucellae in blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 3437-3442, 1999.
2. Eamon, C., Donnacha O', Orla, F., Rory, O', Mark, R., Frances, Q., John, E. and John, G. : Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 3217-3222, 1998.
3. Matthew, D. E., Axel, Cloeckaert, and Philip, H. E. : Brucella species lacking the major outer membrane protein *Omp25* are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Veterinary Microbiology*, **88**, 205-221, 2002.
4. Lizzie, J. and Einsele, H. : Polymorphisms in the genes encoding chemokine receptor 5, interleukin-10, and monocyte chemoattractant protein 1 contribute to cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem cell transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**, 1847-1850, 1995.
5. Michael, J. Brumlik : Use of long-range repetitive element polymorphism-PCR to differentiate *Bacillus anthracis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 3021-3028, 2001.
6. 송주희, 민진영, 조경아, 윤영희, 백남원 : 서울시 일부 종합병원의 공기 중 미생물 농도 분포. *한국환경보건학회지*, **33**(2), 104-114, 2007.
7. 이향, 오영희, 최성민, 박석기 : 어패류에서 분리한 장비브리오균의 분포 및 항상제 감수성. *한국환경보건학회지*, **33**(1), 16-20, 2007.
8. 김기연, 장규엽, 박재범, 김치연, 이경중 : 배지 종류 및 저장 조건에 따른 *impactor*의 부유세균 시료 채취 효율 평가. *한국환경보건학회지*, **33**(2), 145-149, 2007.
9. Isalell, E. T. : Characterization of the *Bacillus anthracis* S-Layer: cloning and sequencing of the structural gene. *Journal of Bacteriology*, **177**, 614-620, 1995.
10. Nielsen, K. : Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Veterinary Microbiology*, **100**, 25-30, 2004.
11. Maria Isabel Queipo-Ortun, and Miguel Angel García-Ordonz : PCR-DIG ELISA with biotinylated primers is unsuitable for use in whole blood samples from patients with brucellosis. *Molecular and Cellular Probes*, **18**, 243-250, 2004.
12. Zahra Fayazi, Ali Ghadersohi and Robert, G. : Development of a *Brucella suis* specific hybridisation probe and PCR which distinguishes *B. suis* from *Brucella abortus*. *HirstVeterinary Microbiology*, **84**, 253-261, 2002.
13. Navarro, E. and Escribano, J. : Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp in human blood samples. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **34**, 147-151, 2002.
14. Redkar, R., Rose, S., Bricker, B. and Del Vecchio, V. : Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Molecular and Cellular Probes*, **15**, 43-52, 2001.
15. Smith, K. L. : Bacillus anthracis diversity in kruger national park. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 3780-3784, 2000.
16. Shively, L. and Chang, L. : Real-time PCR assay for quantitative mismatch detection. *BioTechniques* **34**, 498-504, 2003.
17. Alessandra Ciervo and Lorenzo Ciceroni : Rapid detection and differentiation of Bartonella spp. by a single-run real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes*, **18**, 307-312, 2004.
18. Dixon, T. J., Taggart, J. B. and George, S. G. : Application of real time PCR determination to assess interanimal variabilities in CYP1A induction in the European flounder (*Platichthys flesus*). *Marine Environmental Research*, **54**, 267-270, 2002.
19. Nicola C. Elviss, Andrew J. Lawson, Robert, J. Owen : Application of 3-mismatched reverse primer PCR compared with real-time PCR and PCR-RFLP for the rapid detection of 23S rDNA mutations associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobia*, **23**, 349-355, 2004.
20. Bell, A., S. and Ranford-Cartwright. L. C. : *International Journal for Parasitology*, **34**, 795-802, 2004.
21. Jim O'Mahony and Colin Hill. : A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using SYBR Green and the Light Cycler. *Journal of Microbiological Methods*, **51**, 283-293, 2002.
22. Stuart N. Peirson, Jason N. Butler and Russell G. Foster : Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research*, **31**, e73, 2003.
23. Carole A. Foy, Helen C. Parkes : Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*, **47**, 990-1000, 2001.
24. Jessica L. Dang, Karen Heroux, John Kearney, Ameen Arasteh, Mark Gostomsi and Peter A. Emanuel : Bacillus spore inactivation methods affect detection assays. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 3665-3670, 2001.