

초고속 이단계 PCR에 의한 Shiga 독소 타입 1의 신속 검출법

김일욱¹ · 강민희¹ · 권순환² · 조성학³ · 윤병수^{1*}

¹경기대학교 자연과학대학 생명과학과, ²아주대학교 의과대학 만성염증질환센터

³질병관리본부 장내세균팀

Shiga 독소 생성 대장균(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC)을 가장 빠르게 검출할 수 있는 초고속 이단계 PCR 방법을 개발하였다. 검색 대상 유전자는 STEC에서 생성되는 Shiga 독소(Shiga toxin; Stx)를 암호화하고 있는 유전자 *stx1*이며, 1쌍의 *stx* 유전자 특이 primer를 사용하여 검출을 수행하였다. 초고속 PCR (Ultra-rapid PCR)은 microchip 기반의 6 µl PCR 용량의 Real-time PCR을 사용하고, PCR 회전의 각 단계 중 혼성과 중합을 한 단계로 하였을 뿐 아니라, 각 단계의 적용시간을 각 1초, 3초(해리, 혼성/중합)가 되게 극단적으로 줄여, 검사소요 시간을 최소화하였다. 35회전의 PCR 진단에 사용된 시간은 6분 38초였으며, 용융온도분석에서 *stx1* 특이 유전자가 검출되었음을 확인하는 데까지 총 7분 28초가 소요되었다. 또한 민감도 측정에서 3×10^0 CFU/reaction까지 성공적으로 검출 가능성이 확인되었고, 용융온도분석에서 이 증폭산물은 일정한 $81.42 \pm 0.34^\circ\text{C}$ 의 용융온도를 갖는 것으로 확인되었다. 이 검사법을 다양한 STEC 균주들에게 적용하여 그 성능을 검증하였으며, 이로써 본 초고속 이단계 PCR 방법은 Shiga 독소 생성 대장균의 초신속 검출에 바로 적용될 수 있을 것으로 기대한다.

Key words □ rapid diagnosis, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Shiga toxin type 1, *stx1*, ultra-rapid real-time PCR

Shiga 독소 생성 대장균(Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC)은 장출혈성 대장균(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EHEC) 혹은 Vero 독소 생성 대장균(Vero toxin-producing *Escherichia coli*; VTEC)으로도 알려져 있으며, 인간에게 설사증을 유발시킬 수 있는 대장균 그룹 중 하나이다(11). 가축이나 야생 반추동물들의 배설물은 이러한 Shiga 독소 생성 대장균의 자연공급원이며, 부적절하게 조리된 소고기, 저온 살균되지 않은 유제품이나 채소 혹은 오염된 식수에 의해 이러한 대장균의 감염이 일어나는 것으로 알려져 있다(5, 7). 이러한 Shiga 독소 생성 대장균에 의한 감염은 사람에게 심각한 증상을 보이는 출혈성 대장염(hemorrhagic colitis, HC), 용혈성 요독증 증후군(hemolytic uremic syndrome; HUS) 및 혈전성 혈소판 감소성 자반병(thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) 등의 합병증을 유발시킨다고 보고되어 있다(10, 17). Shiga 독소 생성 대장균에 의해 유발되는 증상들은 수양성 설사와 경련성 복통을 동반한 출혈성 설사의 증세가 있으며, 일부감염자는 수양성 설사만을 보이다가 자연 회복된다고 알려져 있으나(4), 이러한 출혈성 대장염 환자의 2~7%는 위중한 합병증인 용혈성 요독증 증후군으로 이행되며, 이들 중 약 5%는 사망한다고 보고되고 있다(2, 6). 이러한 Shiga 독소 생성 대장균의 병인기전과 관련된 인자 중 Shiga 독소(Shiga toxin; Stx)는 *stx* 유전자에 암호화되어 있으며, 이는 장출혈성대장균과 Shiga 독소 생성 대장균의 병원성을 지

배하는 주요 인자로 알려져 있다. Shiga 독소는 Shiga 독소 타입 1 (Stx1) 혹은 Shiga 독소 타입 2 (Stx2)로 나뉘어지며, Shiga 독소 생성 대장균들은 최소한 이 중 하나의 독소 유전자를 갖는 것으로 보고되어 있다(6, 11).

현재 Shiga 독소 생성 대장균에 대한 진단법은 Enzyme Immunoassays (EIA), Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) 또는 실시간 PCR법 등이 사용되고 있다(11). 이중 EIA 나 ELISA를 이용한 진단법은 빠르고 간편하다는 장점이 있으나 이러한 효소면역방법들은 민감도와 특이성에 있어서 문제점들이 제기되고 있고(13, 14), 보다 신뢰도를 높이기 위하여 실제의 임상시료에 대한 진단에서 정확성을 입증하는 자료의 축적이 보다 더 강조되고 있다(16). 임상 진단에 있어 실시간 PCR 방법은 혈청을 이용한 간이진단법에 비해 높은 민감도와 특이성을 가지는 방법으로 주목 받고 있으며(15), Shiga 독소 생성 대장균을 진단하는데 있어 기존의 혈청학적 방법을 대체할 수 있는 방법으로 기대되고 있다(14).

실시간 PCR의 원리로 개발된 micro-scale chip 기반의 PCR법은 기존에 사용되던 PCR tube를 대신하여 열전도성이 매우 우수한 실리콘과 유리를 이용한 새로운 6 µl의 PCR용 chip을 사용하며, 전용 기기(Genspector[®] TMC-1000; Samsung, Korea)를 사용하여 보다 빠른 온도 변화시간(temperature ramping time)을 가능하게 하였고, 이로써 신속한 실시간 PCR 진단을 가능하게 하였다(8).

이 등(3), 김 등(1) 및 Han 등(9)은 상기 micro-scale chip 기반의 실시간 PCR 기기를 사용한 바이러스와 병원성 세균의 10분

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-31-249-9645, Fax: 82-31-243-1707
E-mail: bsyoon@kyonggi.ac.kr

내 진단법을 개발하였으며 기존의 방법과 구별하기 위해 초고속 PCR (Ultra-rapid Real-time PCR; URRT PCR)법이라 명명하였고, 이들은 각기 30회전의 PCR을 7분 내에 성공적으로 완료시킬 수 있음을 보여 주었다. 또한 이 등(3)은 초고속 PCR의 각 단계를 해리와 혼성/중합의 이단계로 실시하면 PCR에 소요되는 총시간이 30초 가량 더 단축됨과 이단계 PCR이 삼단계 PCR과 비교하여 민감도와 특이성을 손상시키지 않음을 보여 주었다. 아울러, Han 등(9)은 감염성 병원균의 진단에 있어 초고속 이단계 PCR법이 민감도의 면에서 기존의 실시간 PCR법에 뒤지지 않고, 보다 빠르며, 이 10분 이내의 검사소요시간은 초고속 PCR법을 보다 현상성 있는 진단법으로 널리 응용될 수 있을 것으로 예측하였다.

따라서, 본 연구에서는 Stx 1을 생성하는 대장균에 의한 감염을 조기에 빠르게 진단할 수 있는 micro-scale chip 기반의 초고속 PCR법에 근거한 초신속 진단법을 개발하고자 하였으며, 이를 위해 Shiga 독소 생성 대장균 중 *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7)의 genomic DNA를 이용한 초고속 이단계 PCR에서, 필요한 실험조건을 최적화를 진행하였고, 이 검사법이 *stx1* 유전자를 생성하는 Shiga 독소 생성 대장균의 초고속 검색에 적용할 수 있음을 확인하였기에, 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

본 연구에 사용된 균주는 ATCC (American Type Culture Collection)와 질병관리본부(KCDC; Korean Centers for Disease Control and prevention)에서 분양받은 12종류의 대장균 균주들과 본 연구실에서 분리된 shiga 독소 생성 대장균 6균주들이며, 그 외 재조합 DNA법과 염기서열결정을 위하여 *E. coli* strain DH5 α 등을 사용하였다.

각 균주들은 Brain Heart Infusion (BHI; Difco, USA) 배지 또는 LB 배지에서 37°C, 200 rpm의 진탕조건으로 16시간 동안 배양되었다.

Genomic DNA의 추출

Genomic DNA의 추출은 일반적으로 배양액 200 μ l를 사용하여 수행되었으며, 추출과정의 재현성을 높이기 위하여 AccuPrep[®] Genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하였다. 추출방법은 제작사의 지시에 따라 진행되었으며, 추출된 genomic DNA는 각 10 μ l씩 분주하여 사용전까지 -70°C에서 보관하며 사용되었다.

검출용 primer의 설계 및 제작

stx 유전자의 검출을 위해서 GenBank에 등록되어 있는 Shiga 독소 생성 대장균 각각의 strain 30종으로부터 *stx1*의 유전자의 염기서열을 수집하였으며, *stx1* 유전자 검색용 primer는 이들 유전자 중 상동성이 가장 높은 부위를 우선으로, 초고속 PCR에 알맞은 크기로 선정하고, PCR primer 선발용 software인 Primer3 (v. 0.4.0)를 사용하여 설계하였다. 선정된 각 primer의 염기서열들은 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 분석을 통하여 다른 대장균의 염기서열들과 교차성을 비교하였으며, 이로써 그 특이성을 예측할 수 있었다. 각 oligonucleotide는 전문회사 바이오닉스(Bionics, Korea)사에 의뢰하여 제작하게 하였다(Table 1).

검출용 primer의 특이성 검사

stx1 유전자 검색용 primer들의 특이성을 검사하기 위하여 *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*와 인간의 혈액 시료에서 추출된 genomic DNA를 사용하여 실시간 PCR을 수행하였다. 각 genomic DNA는 *stx* 특이 primers를 사용하여 실시간 PCR (Exicycler; Bioneer, Korea)의 기질로 사용되었으며, PCR 조성은 1 μ l 1.5 \times 10⁵ CFU/genomic DNA, 각 10 pmole의 *stx1a80-F*와 *stx1a80-R* primer, 10 μ l의 2 \times prime Q-Master Mix (GeNet bio, Korea)를 사용하여 전체 20 μ l의 반응량으로 조성하였다. 양성 대조균으로 *E. coli* O157:H7 (NCCP 13583; *stx1+*)의 genomic DNA를 사용하였으며 음성 대조균으로 기질을 첨가하지 않고 실시간 PCR을 수행하였다. 실시간 PCR의 조건은 95에서 3분간 전해리과정을 거친 후, 92°C 10초간 해리, 66°C 5초간 혼성, 66°C에서 10초간 중합 반응을 1회전으로 하여 35회전을 수행하였으며, 생성된 증폭산물들은 60°C~90°C 범위에서 용융온도분석을 통하여 증폭산물의 정확성을 확인하였다.

혼성 온도에 따른 PCR 속도의 변화

초고속 이단계 PCR에서 PCR 소요시간을 단축하기 위하여 C_T (threshold cycles)가 증가되지 않는 범위 내에서 혼성과 중합 온도를 일치시킬 수 있는 최적 온도를 측정하여 결과적으로 PCR에 소요되는 시간을 최소화하고자 하였다. 이는 실시간 PCR에서 PCR 총소요시간을 위한 좌표로써 C_T에 도달하는 시간, 즉 C_T 시간(C_T time)을 설정하고 이를 측정함으로써 각 PCR 조건의 효과를 판단하였다. 즉, PCR의 총소요시간은 우선 C_T 시간(C_T time)에 비례하게 되며, C_T 시간이 가장 짧은 혼성온도(C_T에 가장 빨리 도달하게 하는 혼성온도)의 설정은 본 연구의 중요 목

Table 1. Sequence of *stx1* specific primers used to detect Shiga toxin-producing *E. coli*

Target gene	Primer ^a	Primer sequence (5' → 3')	Length (bp)	Original sequence (Position)
<i>stx1</i>	Stx1a80-F	GTGTCCGGCAGATGGAAGAG	80 bp	EF079675 (846 nt~925 nt)
	Stx1a80-R	TCAGAATTGCCCCCAGAGTG		

^a F, forward; R, reverse

적인 PCR 총소요시간의 최소화에 부합되기 때문이다. C_T 시간의 계산은 용융온도분석시간을 제외한 PCR만의 총소요시간을 회전수로 나눈 후 다시 이를 C_T 값과 곱하여 결정하였다.

본 연구에서 이 초고속 PCR의 개발을 위하여 사용된 기기는 Genspector® TMC-1000 (Samsung, Korea)이며, PCR 조성은 1 μ l 1.5×10^5 CFU/ μ l *E. coli* O157:H7 (NCCP 13583; *stx1+*) genomic DNA를 기질로 하여 사용하였으며, 각 5 pmole의 *stx1a80-F*, *stx1a80-R*를 첨가하여 3 μ l가 되게 하였고, 이에 각 2 \times MicroPCR Mastermix (GeNet bio, Korea) 3 μ l를 사용하여 전체 6 μ l의 양으로 하였다. 반응의 조건은 전해리 92°C 20초 진행 후, 해리단계 92°C 1초, 혼성단계 62°C~68°C (2°C 간격) 1초, 중합 반응 72°C 3초로 하여 35회전 동안 진행하였다. 용융온도(T_m) 분석은 70°C~90°C 범위에서 ramping rate 0.2°C/sec, 1°C 간격으로 측정하여 용융온도를 측정하였다. 혼성 온도에 따른 PCR 속도 측정은 독립된 3번의 반복실험을 통하여 결정하였다.

중합 반응온도에 따른 PCR 속도의 변화

본 실험에서 초고속 이단계 PCR을 위한 최적 조건을 측정하기 위해 중합 반응의 온도를 조정하여 그에 따른 PCR 소요시간의 감소 영향을 측정하였다. PCR 속도의 측정은 앞의 혼성온도의 경우와 동일하게 C_T 시간을 측정하여 결정하였다. PCR 조성은 앞의 혼성온도의 경우와 동일하게 하였으며, 각 반응의 조건은 전해리 92°C 20초 진행 후, 해리단계 92°C 1초, 혼성단계 66°C 1초, 중합 단계 66°C~72°C (각 2°C 간격) 3초로 하여, 이를 35회전 진행하였다. 용융온도분석은 70°C~90°C까지 ramping rate 0.2°C/sec로 1°C 간격으로 측정하여 T_m 값을 결정하였고, 중합 온도에 따른 PCR 속도도 독립된 3번의 반복실험을 통하여 측정하였다.

해리 온도에 따른 진단 속도의 측정

PCR 과정에서 온도변화에 소요되는 시간의 단축을 위해서는 온도 변화의 폭을 낮추는 것이 효과적이라 추론되었다. 따라서 초고속 이단계 PCR에서 소요시간을 단축하기 위해 해리 반응온도를 C_T 가 증가되지 않는 범위까지 낮추어 진단에 소요되는 시간을 최소화 하고자 하였다. PCR 속도의 측정은 C_T 시간을 측정하여 결정하였다. PCR 조성은 앞의 혼성온도의 경우와 동일하게 하였으며, 각 반응의 조건은 전해리 92°C 20초 진행 후, 해리단계 94°C~88°C (각 2°C 간격) 1초, 혼성단계 66°C 1초, 중합 단계 66°C 3초로 하여, 이를 35회전 진행하였다. 용융온도분석은 70°C~90°C까지 ramping rate 0.2°C/sec로 1°C 간격으로 측정하였고, 해리 온도에 따른 PCR 속도도 독립된 3번의 반복실험을 통하여 측정하였다.

초고속 이단계 PCR에 의한 진단 속도의 측정

E. coli O157:H7 (NCCP13583; *stx1+*)의 genomic DNA와 *stx* specific primer를 사용하여 초고속 이단계 PCR과 초고속 삼단계 PCR를 각기 별도로 수행하여 C_T 시간과 T_m 값을 측정하여 비교하였다. PCR 조성은 전과 동일하였으며, 삼단계 PCR에서 반응

조건은 전해리 92°C 20초 진행 후, 해리과정 92°C 1초, 혼성단계 66°C 1초, 중합 반응 68°C 3초로 하여, 이를 35회전 진행하였고, 이단계 PCR의 반응 조건은 전해리 92°C 20초 진행 후, 해리과정 92°C 1초, 혼성/중합단계 66°C 3초로 하여, 이를 35회전 진행하였다. 용융온도분석은 이단계 PCR 및 삼단계 PCR 모두 78°C~88°C 범위에서 ramping rate 0.2°C/sec로 1°C 간격으로 측정하여 T_m 값을 결정하였다.

초고속 이단계 PCR의 민감도 및 재현성 측정

초고속 이단계 PCR의 검출 민감도를 보다 정확하게 측정하기 위하여 O.D.₆₀₀ 0.6까지 배양한 *E. coli* O157:H7 (NCCP 13583; *stx1+*)을 단계적으로 희석한 후, 이를 각기 한천배지(Luria-Bertani 배지, 1.5% agar)에 도말하여 각 colony forming unit (CFU)를 결정하였다. 이 생존세포수 측정방법을 시행함과 동시에 동일한 시료의 일부를 사용하여 genomic DNA의 추출을 시행하고, 본 연구에서 제안하는 초고속 이단계 PCR법을 적용하여 그 민감도를 측정하였다. 따라서 각 초고속 PCR법에 사용된 시료의 초기 기질양(initial templates)은 PCR 당 생존세포의 수 (CFU/reaction)로 표현되었으며, 이는 해당 배양액에서 genomic DNA를 추출하고, 10배씩 단계별 희석한 후 이를 PCR 반응에 초기기질로 넣어 준 것이다. 각 PCR 당 생존세포의 수는 각 생존세포수 측정이 결정된 후 보정되었다. 결과적으로 공시균주인 *E. coli* O157:H7 (NCCP 13583; *stx1+*)은 3×10^3 CFU에서 3×10^1 CFU까지 되도록 단계별 희석되었고, 실험에 사용되었다.

초고속 이단계 PCR 조건은 본 연구에서 결정된 최적 조건을 사용하였으며 PCR 조성은 계속 동일하게 유지되었다. 본 연구에서 결정된 *stx1*-특이 검출을 위한 초고속 이단계 PCR의 최적 온도조건은 전해리 92°C 20초 진행 후, 해리과정 92°C 1초, 혼성/중합단계 66°C 3초이었으며, 이를 보통 35회전으로 진행하였다. 초고속 이단계 PCR의 민감도와 재현성을 위하여 독립된 3회의 실험을 수행하였고, 이들의 C_T 값과 T_m 값을 측정하였으며 각각 평균값과 오차를 계산하였다. 또한 배양된 *E. coli* O157:H7 외 12균주에 대하여 각기 *stx1*-특이 초고속 이단계 PCR을 수행하고, 그 결과로써 이 검사법의 실제 적용성을 검토하였다.

결과 및 고찰

검출용 primer의 특이성 검사

본 연구를 통하여 제작된 *stx1* 검색용 primer의 기질 특이성을 검사하기 위해 비-Shiga 독소 생성 균주들인 *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*와 인간의 혈액 시료에서 추출된 genomic DNA를 사용하여 실시간 PCR을 수행하였으며 양성 대조균으로 *E. coli* O157:H7 (NCCP13583; *stx1+*)의 genomic DNA를 동일 조건으로 실시간 PCR을 수행하여 증폭산물을 비교하였다.

실시간 PCR에 의한 *stx1*의 특이적 유전자 검출 결과, 양성 대조균인 *E. coli* O157:H7 (NCCP13583; *stx1+*)의 genomic DNA를 사용한 PCR에서는 *stx1* 특이적인 증폭산물이 생성됨을 확인

하였으며, 비-Shiga 독소 생성 균주들과 인간의 genomic DNA에 대해서는 증폭산물을 만들지 아니하는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

이 결과는 본 연구에서 제안된 primer를 이용한 Shiga 독소 생성 대장균의 PCR 진단이 분변, 식품 등에 혼합되어 있을 수 있는 비-Shiga 독소 생성 균주 및 인간의 genomic DNA의 오염에 의하여 비특이적인 증폭산물을 생성하지 않으며, Shiga 독소 생성 대장균만을 특이적으로 검출할 수 있음을 보여준 것이다.

혼성 온도에 따른 초고속 PCR 속도의 측정

초고속 PCR에 이단계 PCR법을 적용하는 것은 진단에 소요되는 시간을 효과적으로 줄일 수 있다고 보고되었다(3). 따라서 본 실험에서는 삼단계 PCR에서 혼성 온도의 변화에 따른 C_T 시간의 변화 및 PCR 전체 소요시간을 측정하였으며 이 중 C_T 시간이 가장 짧은 혼성 온도를 선정하였다.

stx1의 PCR에 있어 혼성 온도는 62°C부터 2°C 간격으로 68°C까지 올라가며 각각의 C_T 시간을 측정하였고, 결과로써, 혼성 온도가 변화됨에 따라, 62°C에서 68°C까지 온도를 올렸을 때 PCR 과정 전체에 소요되는 시간은 짧아짐을 확인할 수 있었다. 이는 기존의 연구(5)에서 보고되어진 것과 같이 해리 과정과 혼성 과정 간의 온도 차가 좁혀 짐으로 각 회전의 온도 이동에 소요되

는 시간(ramping time)이 감소되었기 때문이라 해석되었다.

그러나 C_T 시간은 혼성 온도가 올라감에 따라 지속적으로 감소되지는 않았으며, 66°C까지 혼성 온도를 상승시켰을 때에는 4분 11초의 가장 짧은 C_T 시간을 보였으나 그 이상의 온도인 68°C에서는 오히려 C_T 시간이 11초 가량 늦어지는 결과를 보였다. 이는 혼성 온도를 올림에 따라 각 회전에 소요되는 시간이 상대적으로 감소하여 보다 빠른 회전속도로 인하여 C_T 시간 또한 감소되었다고 해석되었다. 그러나 68°C 이상의 혼성 온도에서는 회전에 소요되는 시간이 감소됨에도 C_T 시간은 오히려 증가한 것은 제작된 stx1 특이 primer의 염기서열상의 특성 때문이라 해석되었다. 혼성 온도의 변화에도 stx1-특이 PCR은 융점분석에서 일정한 T_m값의 PCR 생성물들만이 만들어진 것으로 나타났으며, 이들 결과로써 stx1a80 primer를 사용하는 35회전의 초고속 실시간 PCR에서 혼성 최적 온도는 C_T 시간을 가장 짧게 줄일 수 있는 66°C를 최적 혼성 온도조건으로 선정하였다(Fig. 2).

중합 온도에 따른 초고속 PCR 속도의 측정

stx1의 초고속 PCR의 최적화를 위하여 중합 온도 변화에 따른 C_T 시간의 변화를 측정하였다. 중합 온도는 72°C에서 66°C까지

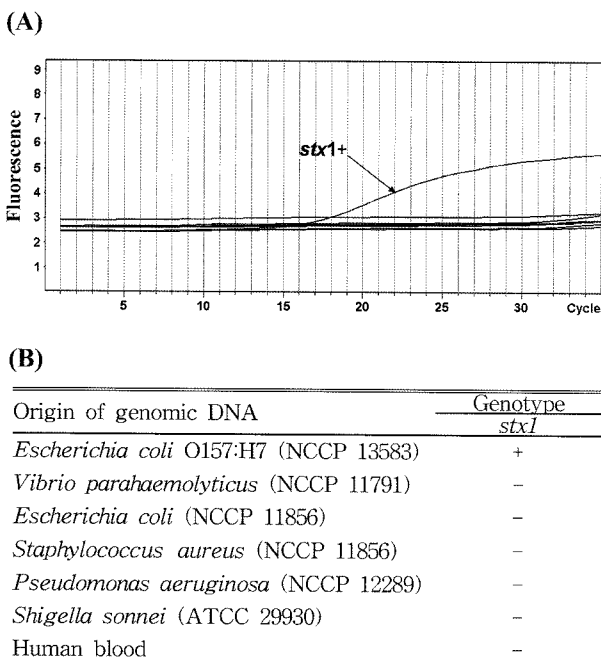


Fig. 1. Specificity of PCR-primers for *stx1*-specific amplification. Extracted genomic DNAs from *E. coli* O157:H7 (NCCP 13583; *stx1*+), *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, and Human blood DNA were tested using real-time PCR with *stx1*-specific primers. Panel (A). The fluorescence curves of real-time PCR using *stx1* specific primer. The *stx1*-specific amplicon was only produced from *E. coli* O157:H7 (*stx1*+) among various non-STEC species including human. Panel (B). Used species and its *stx1*-genotype in real time PCR.

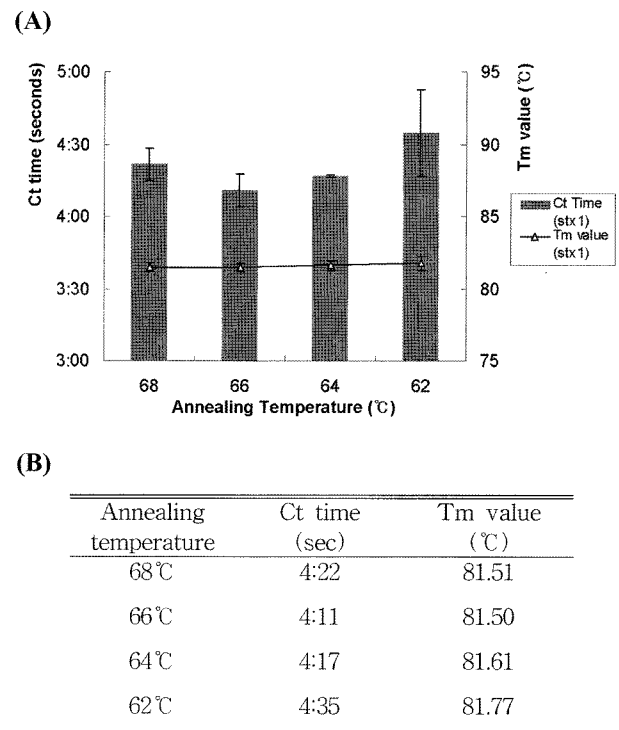


Fig. 2. Relationships among annealing temperature, Ct time and T_m in *stx1*-specific ultra-rapid real-time PCR (URRT PCR). (A) The times until threshold cycles (Ct time) were measured in URRT PCR using various annealing temperatures. The shortest Ct time was determined on 66°C of annealing. Error bars indicate the standard deviations based on triplicated PCRs. Significant change of T_m was not found. (B) The Ct times and T_m values depend on various annealing temperatures.

2°C 간격으로 변화시키며 PCR을 수행하였으며, 이에 따른 C_T 시간과 T_m값의 변화를 측정하였다.

결과로써 중합 온도의 변화는 전체 진단에 소요되는 시간에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었으며, 본 연구에서 측정된 최적의 혼성온도인 66°C에서도 중합과정이 PCR 소요시간 등에 큰 손실없이 진행될 수 있음을 보여주었다. 이는 PCR 과정에 소요되는 시간이 가장 높은 온도인 해리 온도와 가장 낮은 온도인 혼성 과정의 온도 이동에 소요되는 시간에 의해 결정되며 이 중간에 해당하는 중합 과정의 온도는 온도이동에 소요되는 시간의 단축에 기여하지 못하기 때문이라고 해석되었다.

한편, C_T 시간의 측정에서 중합 온도 68°C의 C_T 시간은 72°C의 C_T 시간에 비해 약 14초 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 중합 온도변화에 따른 최단의 C_T시간은 혼성온도 68°C에서 측정되었으나, 초고속 이단계 PCR을 위하여, 혼성 온도와 중합 온도를 동일한 온도로 설정할 필요가 있었기에, C_T 시간은 8초가 증가됨에도 불구하고, 66°C를 최적 혼성/중합 온도조건으로 선정하였다(Fig. 3).

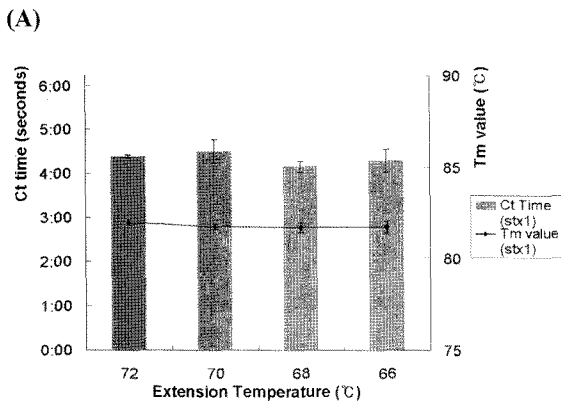
해리 온도에 따른 초고속 PCR 속도의 측정

보다 빠른 초고속 이단계 PCR방법을 *stx1*-특이 PCR에 적용하

기 위하여 해리 온도의 감소를 추구하였다. 본 연구에서는 C_T 시간이 가장 짧게 소요되는 해리 온도를 측정하였으며, 이들의 T_m 값 분석을 통해 PCR 생성물들을 비교하였다.

stx1-특이 PCR에서 해리 온도는 94°C부터 88°C까지 2°C 간격으로 각각 측정되었으며, 결과로써, 해리 온도가 94°C에서 92°C로 낮아졌을 때 C_T값은 0.4 cycle 높아졌으나, C_T 시간은 오히려 3초 감소하는 것으로, 또한 35회전의 PCR에서 총소요시간은 30초 감소되는 것으로 측정되었다. 이는 해리 온도 92°C가 94°C에 비하여 PCR 중 해리작용은 약간 불리할 지라도, 소요시간의 분명한 감소 및 증폭산물의 양의 증가효과도 있음을 보여준 것이다. 그러나 90°C와 88°C에서는 C_T 시간이 각각 25초, 36초 증가한 것으로 나타났으며, 이는 PCR에서 genomic DNA의 해리는 1초의 짧은 시간과 90°C 이하의 온도조건으로는 크게 불리한 것이라 판단되었다.

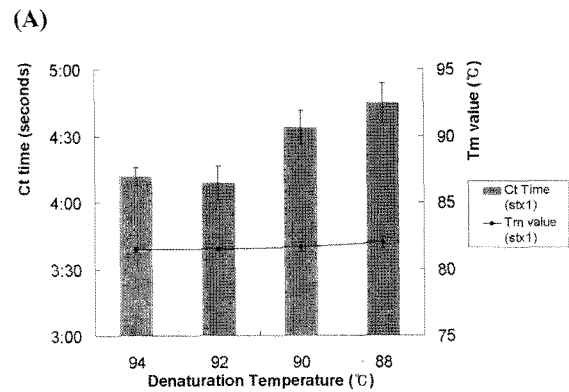
실험 결과의 각 PCR 증폭산물들의 T_m값은 평균 81.61°C로 측정되었으며, 해리 온도의 변화와 무관하게 모든 T_m값은 일정하게 측정되었다. 따라서 본 연구에서는 전체 PCR 소요 시간에서 30초, C_T 시간에서 3초를 단축시킨 92°C를 최적 해리 온도로 설정하였다(Fig. 4).



(B)

Extension temperature	Ct time (sec)	Tm value (°C)
72°C	4:24	81.96
70°C	4:31	81.72
68°C	4:10	81.68
66°C	4:18	81.71

Fig. 3. Relationships among extension temperature, Ct time and T_m in *stx1*-specific ultra-rapid real-time PCR (URRT PCR). (A) The times until threshold cycles (Ct time) were measured in URRT PCR using various extension temperatures. The shortest Ct time was determined on 68°C of extension. Error bars indicate the standard deviations based on triplicated PCRs. Significant change of T_m was not found. (B) The Ct times and T_m values depend on various extension temperatures.



(B)

Denaturation temperature	Ct time (sec)	Tm value (°C)
94°C	4:12	81.42
92°C	4:09	81.44
90°C	4:34	81.61
88°C	4:45	81.98

Fig. 4. Relationships among denaturation temperature, Ct time and T_m in *stx1*-specific ultra-rapid real-time PCR (URRT PCR). (A) The times until threshold cycles (Ct time) were measured in URRT PCR using various denaturation temperatures. The shortest Ct time was determined on 92°C of denaturation. Error bars indicate the standard deviations based on triplicated PCRs. Significant change of T_m was not found. (B) The Ct times and T_m values depend on various denaturation temperatures.

초고속 이단계 PCR과 초고속 삼단계 PCR의 비교

초고속 이단계 PCR에 의한 Shiga 독소 생성 대장균의 신속 진단을 위하여 앞의 결과에서 얻어진 최적의 해리, 혼성, 중합 온도 조건을 사용하여 초고속 삼단계 PCR과 초고속 이단계 PCR을 각기 수행하고 이들의 C_T 시간과 PCR 총소요시간 및 T_m값을 비교 측정하였다.

초고속 삼단계 PCR과 이단계 PCR에서 PCR 조건은 전-해리 과정 92°C 20초와 35회전 중 해리과정 92°C 1초는 각기 동일하게 하였으나, 삼단계 PCR에서는 혼성 66°C 1초, 중합 68°C 3초로 하였으며 이단계 PCR에서는 혼성/중합 66°C 3초로 각기 PCR을 수행하였다.

결과로써, *stx1*에 대한 초고속 PCR에서 이단계 PCR은 삼단계 PCR에 비해 C_T값이 1.15 cycle더 높았으나 C_T 시간은 오히려 16초 감소하는 결과를 확인할 수 있었고, 또한 PCR에 소요되는 총시간 역시 36초 앞당겨지는 결과를 보였다. 한편, T_m값 측정 결과에서는 큰 차이 없이 일정한 값을 보이는 것으로 확인되었다. 이는 초고속 이단계 PCR법이 초고속 삼단계 PCR에 비해 민감도 등에 있어 약간 불리할 수 있으나, C_T 시간의 단축 및 PCR에 소요되는 총시간 역시 최대 30초 단축시킬 수 있음을 보여주는 것으로, *stx1*-특이 초고속 PCR에 있어서도 이단계 PCR이 유용함을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

초고속 이단계 PCR의 민감도 및 재현성 측정

본 연구에서 확립된 초고속 이단계 PCR의 조건을 이용하여 *stx1* 유전자 검출의 한계를 측정하였다. 이는 각기 삼반복 측정하여 *stx* 검출의 오차를 측정하였고, 다른 Shiga 독소 생성 대장균들에 대하여 이 초고속 이단계 PCR법을 적용하여 그 재현성을 확인하였다. 검색에 사용된 genomic DNA의 초기 기질량은 *E. coli* O157:H7 (NCCP 13583; *stx1*+) 3×10³ CFU에서 3×10⁻¹ CFU였다.

측정의 결과, *stx1*의 검출에 대한 초고속 이단계 PCR의 검출 한계(detection limit)는 3×10⁰ CFU/reaction으로 측정되었으며,

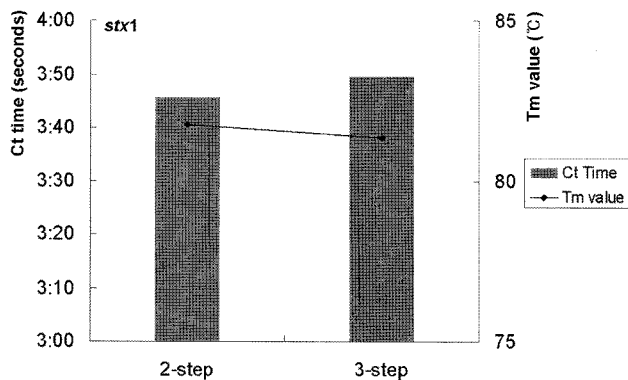


Fig. 5. Comparison between two-step PCR and three-step PCR in *stx1*-specific URRT PCR. Ct time of two-step PCR was shortened 16 sec than Ct time of three-step PCR. In total time for 35 cycled ultra rapid PCR, two-step PCR was finished 30 sec earlier than three-step PCR.

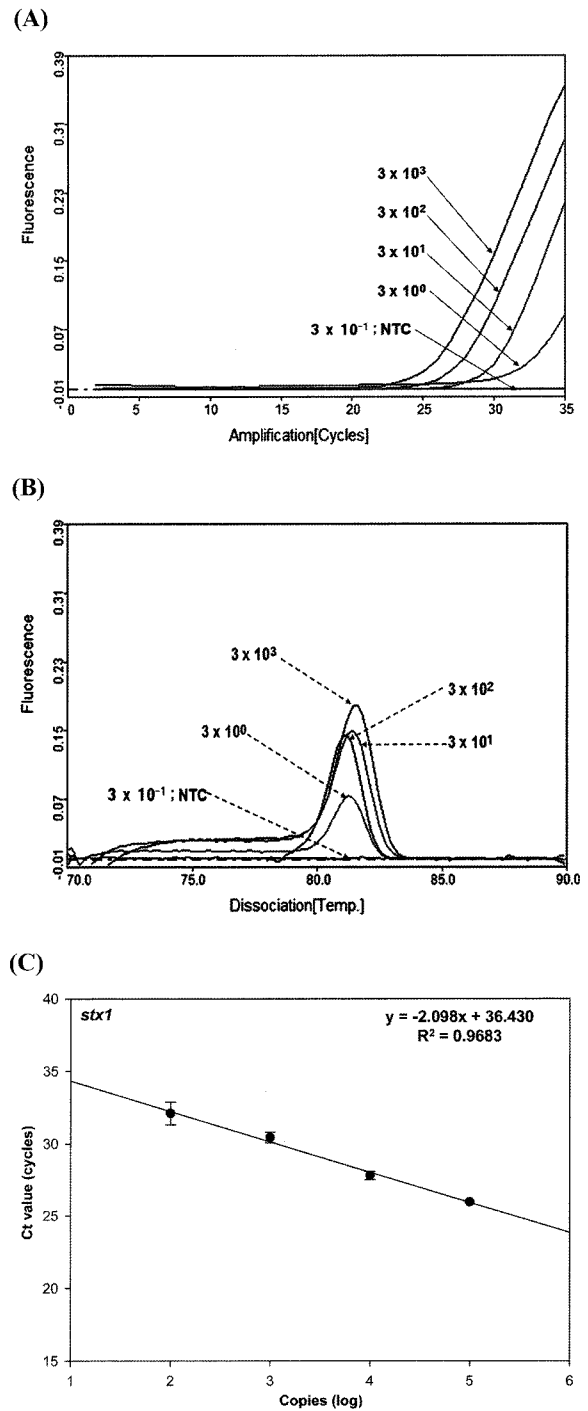


Fig. 6. Sensitivity and reproducibility of *stx*-specific two-step URRT PCR. (A) The fluorescence curve of *stx1*-specific two-step URRT PCRs. URRT PCRs were performed with genomic DNAs which 10-fold serially diluted initial *E. coli* ranging from 3×10³ CFU/reaction to 3×10⁻¹ CFU/reaction during 35 cycle. Amplifications of *stx1* were successfully recognized until 3 CFU/PCR as initial template. (B) Melting temperature analysis of *stx1*-specific PCR product. T_m value was calculated on 81.26±0.17. (C) The reproducibility of *stx* two-step URRT PCR. two-step URRT PCRs were triplicated with 10-fold serially diluted initial template. R square value was calculated at 0.9683. NTC; Non-template control.

그 이하의 농도(3×10^1 CFU/reaction) 및 해당 기질을 첨가하지 아니한 PCR에서는, 50회전의 PCR으로도 *stx* 특이적 산물은 검출되지 않았다. 이 수준의 민감도는 이미 PCR이 보여 줄 수 있는 최고 수준의 민감도로 판단되며, 본 연구에서는 CFU의 계산에서 LB 평판배지를 사용한 생존세포수 측정의 방법을 사용하였고, 이에 따라 genomic DNA의 양을 보정하였기 때문에 실질적 측면에서 가장 높은 민감도를 보여준 것이라 생각된다(Fig. 6A).

용융온도분석의 결과, *stx1*의 PCR 생성물의 Tm은 평균 81.42°C로 측정되었으며 이의 표준편차는 0.34°C로 계산되었다(Fig. 6B). 상기실험들은 자기 독립된 삼반복 실험으로 측정되었으며 이들의 C_T 값을 이용한 회귀식을 계산한 결과, 회귀상수(R^2) 값은 0.9683으로 계산되어, 매우 우수한 재현성을 보여 주었다(Fig. 6C).

초고속 이단계 PCR법의 적용범위를 확인하기 위하여, 본 실험법을 다른 Shiga 독소 생성 대장균과 일반균주에 적용하여 본 결과, 본 연구에서 제안된 실험법은 검사된 모든 다른 Shiga 독소 생성 대장균들의 검출에서 *stx1* 유전자만을 정확하게 판별하는 결과를 보여 주었다(Table 2).

본 연구의 *stx1*-특이 초고속 이단계 PCR 실험법의 최적조건으로 상기의 각 진단에 소요된 시간은, 판정을 위한 35회전의 PCR 소요시간이 6분 38초였으며, 모니터에 의한 *stx1* 유전자의

증폭여부만을 판정기준으로 삼을 경우, 초기 genomic DNA의 농도에 따라 달라지나 Ct 시간 판정의 시간, 즉 PCR 시작 후 4분 대에도 시료 중 *stx1*의 존재여부를 판별할 수 있었다.

보다 확실한 판정을 위하여 *stx1* 증폭산물이 맞는지를 판정하는 용융온도분석(78°C~88°C)의 확인과정을 포함하면 총 7분 28초만에 진단에 필요한 모든 측정을 완료할 수 있었다.

결론적으로 본 연구에서 제안하는 *stx1*-특이 초고속 이단계 PCR법은 3 CFU/reaction이라는 최고 수준의 민감도를 보여 주었으며, 35회전의 특이 PCR에 소요되는 시간은 6분 38초, 융점분석을 포함하여도 7분 28초에 마칠 수 있음을 보여주었다. 이는 본 실험법의 적용으로 일반적 병원체의 진단에서 PCR법이 보여준 높은 민감도의 특성을 그대로 유지하면서, 10분대의 진단시간이 소요되는 면역크로마토그래피법(Immunochromatography; rapid kit)의 신속성을 능가할 수도 있음을 보여준 것이라 하겠다.

병원체의 진단분야에서 PCR법의 일반적 특성은, 높은 민감도를 보이는 정밀 검사이나 실험실적 방법이라고 인식되어 있다. 그러나 본 연구에서 보여주었던 7분대의 *stx1* 특이 검출시간과 사용기기인 Genspector[®] TMC-1000의 휴대가능의 특성은 PCR법을 실험실외의 실험방법으로 적용시킬 수 있는 확장가능성을 보여준 것이라 하겠다. 실험실외적 실험방법이란 결국 현장 즉석 검사를 추구하는 것으로, 초고속 PCR법은 간이검사가 아닌 현장

Table 2. Identification of *stx1* from various species and *E. coli* strains using *stx1*-specific Ultra Rapid Real Time PCR

Species	Serotype	Origin	Genotype ^a		URRT PCR ^b	
			<i>stx1</i>		<i>stx1</i>	
<i>Escherichia coli</i>	O157:H7	NCCP 13583	+		+	
	O157:H7	NCCP 11092	+		+	
	O157:H7	NCCP 11934	-		-	
	O26	NCCP 13667	+		+	
	O91	NCCP 13668	+		+	
	O116	NCCP 13669	+		+	
	O146	KG 10001 ^c	N ^d		-	
	O111	KG 10002	N		+	
	O163	KG 10003	N		-	
	O103	KG 10004	N		+	
	O4	KG 10005	N		-	
	O119	KG 10006	N		-	
<i>Shigella dysenteriae</i>		ATCC 9361	+		+	
<i>Staphylococcus aureus</i>		NCCP 11856	-		-	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		NCCP 12289	-		-	
<i>Escherichia coli</i>		NCCP 10613	-		-	
<i>Shigella sonnei</i>		ATCC 29930	-		-	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		NCCP 11791	-		-	

^a reported results on presence or absence of *stx1* in each species and strains, except KG-strains.

^b Results in this study using *stx1*-specific ultra rapid real time PCR

^c KG : *E. coli* strains were isolated and characterized in Kyonggi University.

^d did not reported

즉석검사이면서도 정밀검사의 수준을 유지할 수 있도록 추구되어야 할 것이다. 따라서 초고속 PCR법은 빠른 시간에 보다 다양한 병원체에 대한 정확한 정보를 연구자에게 제공할 수 있는 가능성 뿐 아니라, 시료의 채취, 운송 등의 과정에서 발생할 수 있는 전파의 위험성을 줄일 수 있어 보다 첨단 검사법으로 발전될 수 있을 것으로 기대될 수 있을 것이다.

본 연구에서 *stx1*을 발현하는 STEC 병원체의 진단을 실시하였으나, STEC 병원체는 *stx1* 혹은 *stx2*의 2가지 독소 표현형을 가질 수 있으므로, *stx1*의 검출만으로는 모든 STEC 그룹을 진단하기는 어려운 실정이다. 따라서 차후의 연구에서 이미 제시된 *stx1*의 신속진단법 뿐만 아니라 *stx2*을 발현하는 STEC 진단법의 개발 역시 수행되어야 할 과제라 할 수 있을 것이다.

또한 본 실험은 STEC 병원체에서 일반적 방법으로 genomic DNA를 분리하고 이를 초고속 PCR에 사용하였다. 초고속 PCR법이 현장 즉석검사법을 지향하고자 한다면, 초고속 genomic DNA의 분리법을 개발하는 것도 매우 중요한 요소이며, 이에 대한 연구도 시급히 수행될 필요가 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는 경기대학교의 특성화 프로그램의 연구비 지원에 의해, 또한 (주)진클론과 (주)삼성테크윈의 지원에 의하여 수행되었으며, 지원에 감사드리는 바이다.

참고문헌

1. 김을환, 이동우, 한상훈, 임윤규, 윤병수. 2007. 조류인플루엔자 H5N1바이러스 유전자의 신속 검출을 위한 초고속 다중 실시간 PCR법의 개발. 대한수의학회지 47, 399-407.
2. 김호훈, 강연호, 김성한, 박미선, 유재연, 전정훈. 1998. 장출혈성 대장균 형질군 O157, O26, O25, O55, O103, O104, O111 및 O145 가토면역 항혈청의 응집소 특이성에 관한 연구. 대한미생물학회지 33, 499-505.
3. 이동우, 김을환, 유미선, 김일욱, 윤병수. 2007. Human Immunodeficiency Virus (HIV) 검출을 위한 초고속 이단계 PCR 진단법. 한국미생물학회지 43, 264-272.
4. Beutin, L., A. Miko, G. Krause, K. Pries, S. Haby, K. Steege, and N. Albrecht. 2007. Identification of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. *Appl. Environ Microbiol.* 73, 4769-4775.
5. Blanco, J.E., M. Blanco, M.P. Alonso, A. Mora, G. Dahbi, M.A. Coira, and J. Blanco. 2004. Serotypes, virulence genes, and

- intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J. Clin. Microbiol.* 42, 311-319.
6. Boerlin, P., S.A. McEwen, F. Boerlin-Petzold, J.B. Wilson, R.P. Johnson, and C.L. Gyles. 1999. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J. Clin. Microbiol.* 37, 497-503.
7. Caprioli, A., S. Morabito, H. Brugère, and E. Oswald. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 36, 289-311.
8. Cho, Y.K., J. Kim, Y. Lee, Y.A. Kim, K. Namkoong, H. Lim, K.W. Oh, S. Kim, J. Han, C. Park, Y.E. Pak, C.S. Ki, J.R. Choi, H.K. Myeong, and C. Ko. 2006. Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. *Biosens. Bioelectron.* 21, 2161-2169.
9. Han, S.H., D.B. Lee, D.W. Lee, E.H. Kim and B.S. Yoon. 2008. Ultra-rapid Real-time PCR for the detection of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood (AFB). *J. Invertebr. Pathol.* (in print; online available).
10. James, C.P. and W.P. Adrienne. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479.
11. James, P.N. and B.K. James. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142-201.
12. Kehl, S.C. 2002. Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2711-2715.
13. Klein, E.J., J.R. Stapp, M.A. Neill, J.M. Besser, M.T. Osterholm, and P.I. Tarr. 2004. Shiga toxin antigen detection should not replace sorbitol MacConkey agar screening of stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4416-4417.
14. Schuurman, T., A. Roovers, W.K. Van Der Zwaluw, A.A. Van Zwet, L.J. Sabbe, A.M. Kooistra-Smid, and Y.T. Van Duynhoven. 2007. Evaluation of 5'-nuclease and hybridization probe assays for the detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human stools. *J. Microbiol. Methods* 70, 406-415.
15. Sharma, V.K. and E.A. Dean-Nystrom. 2003. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxins. *Vet. Microbiol.* 93, 247-260.
16. Teel, L.D., J.A. Daly, R.C. Jerris, D. Maul, G. Svanas, A.D. O'Brien, and C.H. Park. 2007. Rapid detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by optical immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3377-3380.
17. Verweyen, H.M., H. Karch, M. Brandis, and L.B. Zimmerhackl. 2000. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. *Pediatr. Nephrol.* 14, 73-83.

(Received May 20, 2008/Accepted August 11, 2008)

ABSTRACT : Rapid Detection for Shiga Toxin Type 1 (*Stx1*) by Using Two-Step Ultra-Rapid Real-Time (URRT) PCR

Il-Wook Kim¹, Min-Hee Kang¹, Soon hwan Kwon², Seung-Hak Cho³, and Byoung-Su Yoon^{1*} (¹Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Republic of Korea, ²Chronic Inflammatory Disease Research Center, School of Medicine, Ajou University, Suwon 443-721, Republic of Korea, ³Team of Enterobacteria, Korean Centers for Disease Control and Prevention, Seoul 122-701, Republic of Korea)

Rapid detection-method for Shiga toxin type 1 that was produced from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) was developed by two-step ultra-rapid real-time (URRT) PCR. The specific primers were deduced from 80 bp stable region of *stx* type 1 (*stx1*) gene among various informations of STEC strains. URRT PCR is a microchip-based real-time PCR using 6 μ l of reaction volume with extremely short denaturation step and annealing/extension step (1 sec, 3 sec, respectively) in each cycle of PCR. Using the *stx1*-specific URRT PCR, 35 cycled PCR were finished in time of 6 min and 38 sec, also measured 7 min and 28 sec including melting temperature (T_m) analysis. The detection-limit of *stx1*-specific URRT-PCR was estimated until 3 colony forming units / PCR with products with stable T_m at $81.42 \pm 0.34^\circ\text{C}$. In the applications to various STEC strains and contaminated genomic DNAs, *stx1*-specific URRT-PCR were tested and shown that it would be expected an useful method for the rapid detection of *stx1*-coded STEC strains.