

Detection of *Salmonella typhi* by Loop-mediated Isothermal Amplification Assay

Yoon-kyung Jo^{1,†} and Chang-Yeoul Lee²

¹Department of Clinical Laboratory Science, Dongnam Health College, Suwon 440-714, Korea.

²Chungnam Animal Science Center GenetBio, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea

Salmonella typhi is frequent causes of foodborne illness and its detection is important for monitoring disease progression. In this study, by using general PCR and novel LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) assay, we evaluated the usefulness of LAMP assay for detection of *Salmonella typhi*. In this LAMP assay, forward inner primer (FIP) and back inner primer (BIP) was specially designed for recognizing target *invA* gene. Target DNA was amplified and visualized as ladder-like pattern of bands on agarose gel within 60 min under isothermal conditions at 65°C. When the sensitivity and reproducibility of LAMP were compared to general PCR, there was no difference of reproducibility but sensitivity of LAMP assay was more efficient than PCR (the detection limit of LAMP assay was 30 fg, while the PCR assay was 3 pg). These results indicate that the LAMP assay is a potential and valuable means for detection of *Salmonella typhi*, especially for its rapidity, simplicity and low cost.

Key Words: *Salmonella typhi*, PCR (Polymerase Chain Reaction), LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)

*Salmonella typhi*는 사람 및 동물에서 패혈증, 복통, 설사 등을 유발하는 장내세균과에 속하는 그람음성균으로 형태학적, 생화학적 성상은 동일하지만 그 혈청형이 2000여종 이상인 것으로 알려져 있으며 (Scoekett, 1991; Holt et al., 1994) 주로 부패한 식품을 통해 감염되어 사람의 질병발생과 밀접한 관련되므로 공중위생상으로 중요시되고 있다 (Curiale et al., 1991; Jones and Falkow, 1997; Humphrey, 2000). 지금까지 *Salmonella typhi*의 진단법으로는 환자의 분변 등에서 세균을 배양하거나 항혈청을 이용한 응집반응법이 주로 이용되고 있는데 이 방법은 검사기간이 3~4일 정도로 오래 걸리고 시간과 노력이 많이 요구되며 민감도가 떨어져 그 한계점이 있는 것으로 알려졌다 (Cohen et al., 1996; Kwang et al., 1996). 최근에는 중합효소 연쇄반응 (PCR, polymerase chain reaction)이나 실시간 중합효소 연쇄반응 (real-time PCR)을 이용하여 *Salmonella typhi* DNA를 대량 증폭시켜 검출하는 방법이 성공적으로 진행되고 있으며 특히 real-time PCR은 그

신속하고 정확도, 민감도가 높아 많이 이용하고 있다 (Bhagwat, 2003; Perelle et al., 2004; Malorny et al., 2007). 그러나 PCR법은 환자의 조기진단이 가능하나 carry-over에 의한 검체의 오염과 죽은 균의 DNA에서도 위양성을 보이고, *Taq* polymerase inhibitor에 의한 위음성을 보이는 등의 문제점이 야기되고 있다 (Kox et al., 1994; Pao et al., 1990). 따라서 이런 PCR법을 대치할 수 있는 보다 민감하고 경제적인 방법이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

핵산 증폭방법인 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification, 등온증폭법)는 Notomi 등 (2000)에 의해 개발되었는데 일반 PCR법과는 달리 *Bst* DNA polymerase를 이용해서 60°C나 65°C 사이의 일정한 온도에서 1시간 동안 DNA를 증폭시키는 최신의 방법이다. LAMP법은 첫째 1쌍의 inner primer와 1쌍의 outer primer 모두 4개의 primer를 사용해서 target DNA를 보다 선택적으로 증폭할 수 있고, 둘째 등온상태에서 반응하므로 온도변화에 따른 시간을 줄일 수 있고 셋째 계속적인 증폭으로 많은 양의 증폭산물 (10^9 까지)이 생성되어 백색 침전물을 쉽게 확인할 수도 있으며 넷째 반응산물은 일반 PCR법처럼 전기영동법에서 특이한 사다리모양으로 확인할 수 있다는 특징이 있다 (Notomi et al., 2000; Mori et al., 2001; Enosawa et al., 2003; Parida et al., 2004). 본 연구에서는

*논문 접수: 2008년 4월 10일

수정재접수: 2008년 5월 15일

[†]교신저자: 조윤경, (우)440-714 경기도 수원시 장안구 정자동 937, 동남보건대학 임상병리과

Tel: 031-2496-414, Fax: 031-2496-410

e-mail: ykjo@dongnam.ac.kr

LAMP법을 이용하여 *Salmonella typhi* 균을 검출하여 기존의 PCR법과 비교해 보고 LAMP법의 검출한계와 재현성 및 최적조건을 확립하여 *Salmonella typhi* 검출에 LAMP법을 이용할 수 있는 방법을 제시하고자 한다.

실험에 사용한 균주는 닭고기에서 분리한 *Salmonella typhi*로 단국대학교 생명자원대학에서 분양 받았다. 순수배양으로부터 추출한 *Salmonella typhi* genomic DNA를 spectrophotometer로 정량한 후 3 ng으로 희석하여 template DNA로 사용하였다. 검출한계를 확인하기 위해 DNA를 10^0 부터 10^{-7} 까지 단계 희석한 후 LAMP와 PCR을 시행하였다. *Salmonella typhi*의 *invA* gene의 특이 유전자를 4개의 primer로 디자인하였다. FIP (forward inner primer), BIP (back inner primer)는 증폭산물의 안쪽을 증폭하는 primer로 FIP는 F1서열의 상보적인 서열 (F1C), F2 서열을 연결하여 디자인하였으며 BIP는 B2와 B1C를 연결하여 만들었다. F3, B3 primer는 F2, B2 지역의 바깥쪽으로 선택하였다. 등온증폭 반응은 2쌍의 primer set (F3: TCT GAA GTT TTG CAG CGT, B3: AGA TAC CAT TAC TGC TC GTA AT, FIP: TTC TCT TGG CGC CCA CAA TGT TAA GAG AAC GTG TTT CCG, BIP: AAG ATG TCA TTA ACC TTG TGG TGC GCG AAT TTA TGA CAA ATA)를 이용하여 총 20 μ L의 등온증폭 반응용액을 만든 후 denaturation, annealing, extention 반응의 구별이 없이 모두 65°C에서 1시간 동안 증폭시켰다.

Conventional PCR 방법은 primer set 중 F3, B3를 이용하여 각각 25 μ L의 반응용액을 만든 후 GeneAmp[®] PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA)에서 DNA를 증폭시켰다. PCR 반응조건은 pre-denaturation 반응을 94°C에서 300초, denaturation 반응을 94°C에서 30초, annealing 반응을 58°C에서 30초, extension 반응을 72°C에서 45초로 설정하여 33 cycle 반복해 DNA를 증폭시킨 후 마지막으로 extention 반응을 72°C에서 210초간 유지하였다. 등온 증폭법에 사용된 primer 중 F3, B3만을 이용해 얻은 DNA 증폭산물을 염기서열분석법 (ABI 3730xl DNA analyser, Applied Biosystem, USA)으로 분석하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 확인하였다.

LAMP법을 시행한 결과 *Salmonella typhi*는 LAMP법의 전형적인 결과인 사다리형태의 증폭산물을 얻을 수 있었고 template DNA가 없는 경우에는 증폭산물을 확인할 수 없었다. 그러나 conventional PCR법에서는 195 bp의 *Salmonella typhi* 증폭산물을 확인할 수 있었다 (Fig.

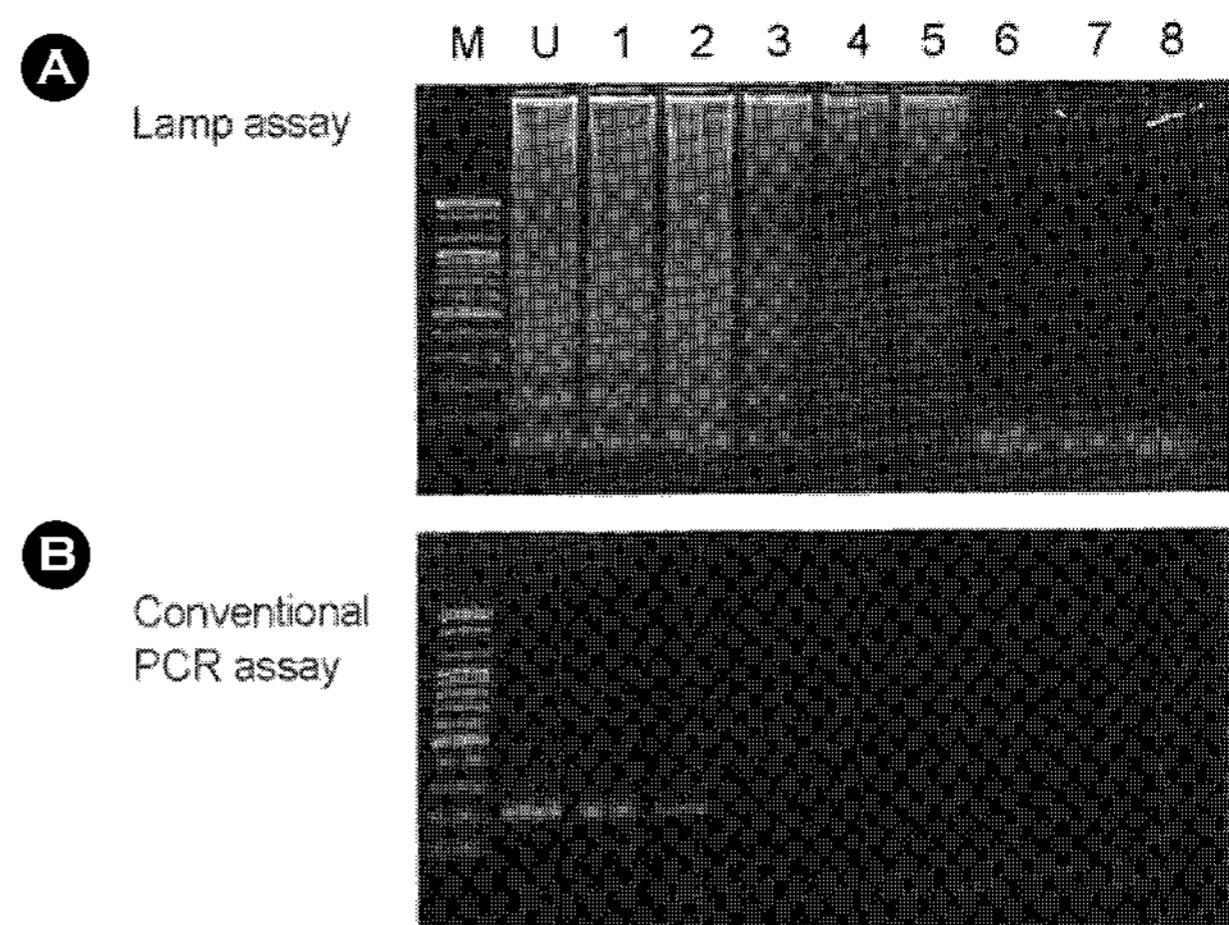


Fig. 1. Sensitivity of the LAMP and conventional PCR for detection of *Salmonella typhi*. Lane M: Marker, Lane U: undiluted *Salmonella typhi* DNA (3 ng), Lane 1~7: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} of DNA, Lane 8: negative control. All the products were electrophoresed on 2% agarose gels and stained with ethidium bromide.

1). LAMP와 Conventional PCR에서 *Salmonella typhi*의 sensitivity를 비교하기 위해 *Salmonella typhi* DNA (3 ng)를 원액부터 10^{-7} 까지 10배씩 단계 희석하여 LAMP와 PCR을 각각 시행한 결과 LAMP에서는 30 fg까지 증폭되었으며 PCR의 경우 3 pg까지 증폭되어 LAMP의 sensitivity가 Conventional PCR보다 100배 높은 것을 확인하였다 (Fig. 1). 또한 각 방법의 재현성을 확인하기 위하여 LAMP법과 PCR법으로 각각 10회 반복 시행한 결과 매회 같은 농도에서 *Salmonella typhi*가 검출되어 재현성은 두 방법 간 차이가 없음을 확인할 수 있었다. 유전자 증폭에 소요되는 시간은 LAMP법은 60분, PCR법에서는 90분이 소요되어 LAMP법은 같은 온도에서 증폭이 이루어 지므로 실험소요시간을 PCR법보다 30분 단축할 수 있음을 확인하였다. 이는 *Salmonella enterica*의 검출에서도 PCR법 보다 LAMP법에서 우수함을 증명한 Ohtsuka 등 (2005)의 연구나 *Salmonella choleraesuis* subsp.를 연구한 Li 등 (2008)와 일치함을 보였다.

그 외 LAMP법과 PCR법을 비교한 다른 연구를 보면 *Mycobacterium avium* (Enosawa et al., 2003), *Yersinia pseudotuberculosis* (Horisaka et al., 2004), *Porphyromonas gingivalis* (Maeda et al., 2005) 등의 검출에서 모두 LAMP법이 민감도와 특이성이 우수함을 증명하였다. 또한 LAMP법은 무엇보다 고가의 PCR 장비가 아닌 등온 유지가 가능한 항온 수조나 오븐, 온장고 등 저가의 장비에서도 증폭이 가능하며, 장소에 구애받지 않게 됨에 따라 임

상진단 실험실과 현장 및 기타 어느 장소에서도 진단이 가능한 강점을 가지고 있다고 주장하였다 (Notomi et al., 2000; Iwamoto et al., 2003; Hong et al., 2004; Wakabayashi et al., 2004; Ryota et al., 2006; Kaneko et al., 2007).

본 저자는 앞으로 LAMP의 검출 한계를 넓혀서 현 결과보다 더 낮은 농도에서의 주형 DNA에서도 검출 가능한 조건을 확립할 계획이며, 특이성 연구를 위해 다양한 균이 혼합되어 있는 검체에서 *Salmonella typhi*의 검출 가능성을 연구하고 더 나아가 다양한 병원성 미생물의 임상 진단 시스템으로 사용할 수 있게 하는 등 미생물의 조기 검출의 새로운 대안을 제시하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 교육인적자원부 특성화 프로그램의 국고재정지원 연구비에 의하여 수행된 것임.

REFERENCES

- Bhagwat A. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *Intl J Food Microbiol.* 2003. 84(2): 217-224.
- Cohen HJ, Mechanda SM, Lin W. PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* a specific method for detection of *Salmonell* spp. *Appl environ microbial.* 1996. 62(12): 4303-4308.
- Curiale MS, Klatt MJ, Bartlett CL. Colorimetric deoxyribonucleic acid hybridization assay for rapid screening of *Salmonellae* in foods: Collaborative study. *JAOAC.* 1991. 73: 248-256.
- Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, Watanabe K, Notomi T, Onoe S. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2003. 41(9): 4359-4365.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath P. In Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed.) Williams & Wilkins, Maryland. 1994. 246-294.
- Hong T, Cam T, Mai QL. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol.* 2004. 42: 1956-1961.
- Horisaka T, Fujita K, Iwata T, Nakadai A, Okatani T, Horikita T. Sensitive and specific detection of *Yersinia pseudotuberculosis* by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 2004. 42(11): 5349-5352.
- Humphrey T. Public-health aspects of *Salmonella* infection. In Way, C. and Way, A. (eds.). *Salmonella in Domestic Animals*, CAB International, Oxon, U.K. 2000. 245-263.
- Iwamoto, T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J. Clin Microbiol.* 2003. 41: 2616-2622.
- Jones BD, Falkow S. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Ann Rev Immunol.* 1997. 14: 533-561.
- Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biol.* 2007. 70: 499-501.
- Kox LFF, Rhienthong D, Miranda AM, Udomsantisuk N, van Leeuwen J. A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1994. 32: 672-678.
- Kwang J, Littledike ET, Keen JE. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Lett Appl Microbiol.* 1996. 21(1): 46-51.
- Li W, Lei S, Alam MJ, Yuhuan G, Lin L. Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Res International.* 2008. 41: 69-74.
- Maeda H, Kokeguchi S, Fujimoto C, Tanimoto I, Yoshizumi W, Nishimura F. Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunol Medi Microbiol.* 2005. 43: 233-239.
- Malorny B, Bunge C, Helmuth T. A real-time PCR for the detection of *Salmonella enteritidis* in poultry meat and consumption eggs. *J Microbiol Methods.* 2007. 70(2): 245-251.
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of Loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Comm.* 2001. 289: 150-154.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000. 28:E63.
- Ohtsuka K, Keiko Y, Kosuke T, Yukiko HK. Detection of *Salmonella enteric* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification and characterization of *Salmonella* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2005. 71: 6730-6735.
- Pao CC, Yen TSB, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH. Detection

- and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J Clin Microbiol. 1990. 28: 1877-1880.
- Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. J Clin Microbiol. 2004. 42: 257-263.
- Perelle S, Dilasser F, Malorny B, Grout J, Hoorfar J, Fach. Comparison of PCR-ELISA and Light Cycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples. Mol Cell Probes. 2004. 18: 409-420.
- Ryota S, Tatsushi Y, Masaru I. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA. J Virol Methods. 2006. 132: 216-221.
- Scokett PN. The economic impact of human *Salmonella* infection. J Appl Bacteriol. 1991. 71: 289-295.
- Wakabayashi T, Yamashita R, Kakita M. Rapid and sensitive diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis by loop-mediated isothermal amplification (lamp) method. Curr. Eye Res. 2004. 28: 445-450.