

공 학 석 사 학 위 논 문

Real-Time PCR 방법을 이용한
Escherichia coli O157:H7의 검출



김 태 영

공 학 석 사 학 위 논 문

Real-Time PCR 방법을 이용한 *Escherichia coli* O157:H7의 검출

지도교수 김 영 목

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2011년 2월

부경대학교 대학원

식 품 공 학 과

김 태 영

김태영의 공학석사 학위논문으로 인준함.

2011년 2월



목 차

목 차	i
Abstract	iii
List of Tables	vi
List of Figures	ix
서 론	1
재료 및 방법	5
1. 실험에 사용된 균주와 배지	5
2. DNA 추출 Kit	8
3. EC(O157:H7) quantitative PCR kit	8
4. Real-time PCR 장치	10
5. <i>E. coli</i> O157:H7 증균 배양법	11
6. DNA 추출 방법	11
7. agarose gel 전기영동법	12
8. <i>E. coli</i> O157:H7 real-time PCR법	12
결과 및 고찰	15
1. <i>E. coli</i> O157:H7 특이적 primers와 probes 제작	15
2. 증균 배지에서 real-time PCR을 이용한 <i>E. coli</i> O157:H7 의 검출	23

2.1. 일반 증균 배지에서 real-time PCR을 이용한 <i>E. coli</i> O157:H7의 검출	23
2.2. EC(O157:H7) quantitative PCR Kit의 특이성 검증	25
2.3. 선택 증균 배지에서 real-time PCR을 이용한 <i>E. coli</i> O157:H7의 검출	30
3. <i>E. coli</i> O157:H7균 검출을 위한 방법으로 real-time PCR 적용의 문제점	35
4. Real-time PCR 및 선택적 증균 배양법을 이용한 <i>E. coli</i> O157:H7 검출	40
5. 선택적 증균 배양과 병행한 real-time PCR을 이용한 <i>E. coli</i> O157:H7 검출법의 식품시료에의 적용	46
요 약	54
감사의 글	57
참고 문헌	59

**Detection of *Escherichia coli* O157:H7
using Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction) Assay**

Tae Young Kim

**Department of Food Science and Technology,
The Graduate School, Pukyong National University**

Abstract

Escherichia coli O157:H7, a foodborne pathogen, has been reported to cause many outbreaks in the world wide. Most outbreaks have been related with food consumption and the consumption of raw and under cooked ground beef has been specially involved. Apart from the traditional culture methods, which is time consuming and laborious process, relying on biochemical characteristics, molecular methods have been developed for rapid detection of *E. coli* O157:H7 in food. Molecular methods such as PCR are of interest for obtaining information on virulence factors. However, conventional PCR methods have several disadvantage such as poor precision, low sensitivity, non-automated and post-PCR processing for data analysis. Also, the PCR methods base on the amplification of a target gene has a problem to apply for the detection of pathogenic bacteria since the PCR reaction amplify all genetic materials from both dead and live

cells. During food processing such as heat treatment, the genetic materials, specially DNA of bacteria will be remain in food even though the cells will be destroyed.

Recently, a real-time PCR assay has been applied to detect food pathogenic bacteria in various food. The assay has been concerned about time and labor saving to detect the pathogenic bacteria in food compared to the traditional cultivation methods using morphological and biochemical assay and conventional PCR methods.

The object of this study is to develop a real-time PCR method to differentiate between viable cells and dead cells and to apply the method for detecting *E. coli* O157:H7 in food samples. For the purpose, it was developed a new method to detect food pathogenic bacteria based on the combination of the real-time PCR and enriched cultivation supplemented with antibiotics.

The primers and probes designed for detecting *E. coli* O157:H7 using real-time PCR methods were specific only to *E. coli* O157:H7 not non-pathogenic *E. coli* and other bacteria. The Ct (Cycle threshold) values in real-time PCR were to be a does dependent on *E. coli* O157:H7 inocula. It was also observed the difference of Ct values between mEC enrichment cultures of *E. coli* O157:H7 in the presence or absence of gentamicin and tetracycline since *E. coli* O157:H7 cells were not grown in the presence of both antibiotics. These results suggested that it was possible to differentiate viable or dead cells of *E. coli* O157:H7 using the real-time PCR methods

combined with enrichment culture supplemented with antibiotics. In conclusion, it was developed new method to detect only viable *E. coli* O157:H7 using the real-time PCR methods and the same strategy would apply to detect other pathogenic bacteria.



List of Tables

Table 1. Representative foodborne and waterborne outbreaks of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 and other EHEC infections	2
Table 2. Formulation of Luria Bertani broth	6
Table 3. Formulation of mEC broth (reduced bile salts)	7
Table 4. Reaction mixture for real-time PCR detection	9
Table 5. PCR cycle step for real-time PCR detection	13
Table 6. Sequence and position in the <i>eae</i> -gene for PCR oligonucleotides in <i>Escherichia coli</i> O157:H7	16
Table 7. PCR primers for the identification of hemolysin genes in <i>Escherichia coli</i> O157:H7	17
Table 8. Nucleotide sequences of primers and probes for the detection of <i>Escherichia coli</i> O157:H7	18
Table 9. Primers used in MAMA-multiplex PCR to amplify specific fragments from the genes for <i>SLT-I</i> and <i>SLT-II</i> and the <i>uidA</i> gene for the detection of <i>Escherichia coli</i> O157:H7	19
Table 10. Oligonucleotide primers and probes for <i>Listeria</i>	

<i>monocytogenes</i>	20
Table 11. Primers, probes, and IAC sequence used for the <i>Salmonella</i> -specific assay	21
Table 12. Summary of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 detection by real-time PCR in LB broth culture	27
Table 13. Detcetion of bacterial strains used in this study by real-time PCR using <i>Escherichia coli</i> O157:H7 detection kit	28
Table 14. Summary of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 detection by real-time PCR in mEC broth culture	33
Table 15. Summary of autoclave and HClO treated <i>Escherichia coli</i> O157:H7 detection by real-time PCR	38
Table 16. Antibiotic resistance of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 strains isolated from raw milk in Greece	41
Table 17. Antibiotic resistance profiles of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 isolates from cattle and sheep feces and/or colon tissue samples	42
Table 18. Summary of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 detection by real-time PCR combined with enrichment culture supplemented with antibiotics	45

Table 19. Summary of real-time PCR with serial diluted <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in ground beef	50
Table 20. Summary of real-time PCR results in ground beef after enrichment culture with antibiotics	53



List of Figures

Fig. 1. Fluorescence graph of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 target gene amplified by real-time PCR	25
Fig. 2. Quantitative standard curve of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 by real-time PCR	26
Fig. 3. Quantitative standard curve of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 by real-time PCR after cultivation in mEC broth	31
Fig. 4. Fluorescence graph of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 target gene amplified by real-time PCR after cultivation in mEC broth	32
Fig. 5. Electrophoresis profiles after autoclave and HClO treatment	35
Fig. 6. Real-time PCR profiles after autoclave and HClO treatment of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 cells	36

Fig. 7. Fluorescence graph of real-time PCR after autoclave and HClO treatment of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 cells ...	37
Fig. 8. Quantitative real-time PCR profile combined with enrichment culture supplemented with antibiotics	43
Fig. 9. Fluorescence graph of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 using real-time PCR combined with enrichment culture supplemented with antibiotics	44
Fig. 10. Quantitative standard curve of real-time PCR with serial diluted <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in ground beef	48
Fig. 11. Fluorescence graph of real-time PCR with serial diluted <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in ground beef	49
Fig. 12. Quantitative standard curve of real-time PCR results in ground beef after enrichment culture in the presence or absence of antibiotics	51
Fig. 13. Fluorescence graph of real-time PCR Results in ground beef after enrichment culture in the presence or absence of antibiotics	52

서론

Escherichia coli O157:H7(EHEC)균을 통한 장관출혈성 식중독은 오염된 물이나 식품(특히, 쇠고기)을 섭취하여 감염된다. 장내출혈과 복통, 설사를 일으키는 *E. coli* O157:H7은 1982년 미국에서 햄버거의 섭취를 통하여 감염된 사례가 최초로 보고되었다(Belgin *et al.*, 2008). Michigan과 Oregon 지역에서 발생하였으며 전국 단위의 fast food 체인점에서 공급한 덜 익힌 햄버거의 분쇄육이 원인이었다(Doyle, 1991; Kwak *et al.*, 2000). 미국에서는 매년 20,000건의 대장균 O157:H7 감염자가 발생하여 이중 250명이 사망하여 1.3%의 치사율을 나타내는 것으로 추정된다(Nauschuetz, 1998). 미국에서 처음 발병한 후, 영국, 캐나다, 스코틀랜드, 일본 등지로 퍼져나갔다. 유럽과 미국, 남아프리카, 일본 등 세계각지의 나라들에서 *E. coli* O157:H7은 국민의 건강을 위협하는 가장 주의가 요구되는 식중독세균으로 알려져 있다(Hodges *et al.*, 2005). 1996년 5월부터 12월까지 일본에서 11,000여명의 환자가 발생한 사례가 *E. coli* O157:H7균의 가장 큰 발병으로 보고되었으며 이중 12명이 사망하였다(Michino *et al.*, 1999; Funamori *et al.*, 1999). 그 해, 스코틀랜드에서는 501명의 환자가 발생하여 21명의 노인이 사망하였다. 세계 각국의 *E. coli* O157:H7균에 오염된 음식과 물에 의한 상세한 피해 내용은 Table 1에 나타내었다(Tomas *et al.*, 2005). 일본에서의 장관 출혈성 대장균에 의한 질병 발생과 관련하여 식습관이 유사하고 인적, 물적 교류가 많은 우리나라에서도 *E. coli* O157:H7에 대한 주의가 촉구되어 왔고, 식품위생분야에서도 국내 유통식품에 대한 오염실태 조사가 필요해짐에 따라 식품의약품안전청에서는 1996년부터 식육 및 햄버거 등 유통식품에 대하

Table 1. Representative foodborne and waterborne outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 and other EHEC infections

Year	Mo	Location	No. of cases (deaths)	Setting	Vehicle
1982	2	Oregon	26	Community	Ground beef
1982	5	Michigan	21	Community	Ground beef
1985		Canada	73(17)	Nursing home	Sandwiches
1987	6	Utah	51	Custodial institution	Ground beef; person to person
1988	10	Minnesota	54	School	Precooked ground beef
1989	12	Missouri	243	Community	Water
1990	7	North Dakota	65	Community	Roast beef
1991	11	Massachusetts	23	Community	Apple cider
1991	7	Oregon	21	Community	Swimming water
1992	12	Oregon	9	Community	Raw milk
1993	1	California, Idaho, Nevada, Washington	732(4)	Restaurant	Ground beef
1993	3	Oregon	47	Restaurant	Mayonnaise?
1993	7	Washington	16	Church picnic	Pea salad
1993	8	Oregon	27	Restaurant	Cantaloupe
1994	11	Washington, California	19	Home	Salami
1995	10	Kansas	21	Wedding	Punch, fruit salad
1995	11	Oregon	11	Home	Venison jerky
1995	7	Montana	74	Community	Leaf lettuce
1995	9	Maine	37	Camp	Lettuce
1996	5, 6	Connecticut, Illinois	47	Community	Mesclun lettuce
1996	7	Osaka, Japan	7,966(3)	Community	White radish, sprouts
1996	10	California, Washington, Colorado	71(1)	Community	Apple juice
1996	11	Central Scotland	501(21)	Community	Cooked meat
1997	5	Illinois	3	School	Ice cream bars
1997	7	Michigan	60	Community	Alfalfa sprouts
1997	11	Wisconsin	13	Church banquet	Meat balls, coleslaw
1998	6	Wisconsin	63	Community	Cheese curds
1998	6	Wyoming	114	Community	Water
1998	7	North Carolina	142	Restaurant	Coleslaw
1998	7	California	28	Prison	Milk
1998	8	New York	11	Delicatessen	Macaroni salad
1998	9	California	20	Church	Cake
1999	8	New York	900(2)	Fair	Well water

(Tomas *et al.*, 2005)

여 검사하기 시작하였다(Kwak *et al.*, 2000). 국내에서는 *E. coli* O157:H7에 의한 환자의 집단발생 사례는 없으나, 1994년 이후로 꾸준히 환자로부터 *E. coli* O157:H7이 검출되어 국내에서도 환자가 발생할 수 있다는 사실을 보여 주었다(Kim, 1998) EHEC의 발생 원인식품은 덜 익힌 육류에 의한 것이 대부분이나, 오염된 주스와 유제품, 채소, 물 등도 거론되고 있다. 인체 감염 용량은 확실히 밝혀지지 않았으나 *Shigella* spp.와 유사한 10~100균수 정도로 추정되며, 감염되면 보통 복통과 설사를 동반하는데, 심한 경우에는 용혈성-요독성 증후군(溶血性-尿毒症症候群)의 증상을 나타내 환자가 사망에 이르기도 한다(Ken *et al.*, 2006). *E. coli* O157:H7균에 의한 질병은 오염된 식품을 경구로 섭취하면서 발생하고 질병유발 원인물질은 장관계에 심한 손상을 일으키는 verotoxin(VT, Shiga-like toxin)에 의한 것으로 추정하고 있는데, 이 특성을 장관 출혈성 대장균의 확인법에 이용하고 있다(Doyle, 1991; Kwak *et al.*, 2000).

일반적인 PCR (polymerase chain reaction, 중합효소 연쇄반응)법은 증폭된 DNA 조각을 확인하기 위하여 별도의 post-PCR과정을 거치는데, 보통 겔-전기영동을 사용한다. 겔-전기영동 법은 정확성과 효율성이 떨어지고, 시간이 많이 소요되며 실험 과정 중, DNA의 오염이 일어날 수 있다는 단점이 있다. Real-time PCR법은 매우 간편한 DNA 증폭이 가능하며, 증폭 사이클이 진행됨에 따라 특이적인 DNA 증폭산물이 축적되는 것을 실시간으로 모니터링 할 수 있다. 모든 real-time PCR 장비들은 반응장치를 통해 형광물질의 증폭과정의 변화를 확인 할 수 있게 설계되었다. 형광물질량의 변화는 DNA 증폭산물의 축적을 의미한다. 실험과정 중 튜브를 열지 않아도 되어 증폭과정 중, 목표 DNA이외의

물질이 혼입되어 오염되는 것을 막을 수 있는 것은 또 하나의 real-time PCR법의 장점 중 하나이다. 일반적인 PCR의 가장 큰 문제점은 반응이 끝난 시점에서 PCR 결과물을 분석하기 때문에 샘플 내의 목표 시퀀스의 최종 수율을 장담할 수 없다는데 있다. Real-time PCR법은 이러한 한계를 극복했다(Saunders *et al.*, 2009). Real-time PCR기법은 다양한 식품에서 유래한 식중독 세균의 분석에 사용된다. 이 방법은 식중독 세균의 검사에 있어서 기존의 형태학적, 생화학적 방법에 비해 많은 시간 절약을 가능하게 한다. 그러나, 기존의 PCR기법과 real-time PCR법은 식품위해 세균 분석에 있어서 생균과 사균, 즉 모든 유전적 물질들을 증폭시키는 문제점이 있다. 열처리와 같은 식품 가공 및 조리 과정 중에 박테리아 세포들은 파괴 되더라도 DNA와 같은 유전적 물질들은 남게 된다. 그 결과, 생균이 존재하지 않더라도 유전자 증폭법을 기반으로 하는 방법들의 경우에는 균이 존재하는 것으로 분석되기 때문에 식품 중의 세균 검출법으로서는 부적절하다. 이에 본 연구에서는 기존 방법들이 가지고 있는 단점을 극복하여 시간과 경비를 절감할 수 있는 real-time PCR을 이용한 식중독 세균 분석법의 개발을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 실험에 사용된 균주와 배지

본 연구에 사용된 *E. coli* O157:H7 균주는 ATCC 43894 (The American Type Culture Collection)를 사용하였고, *E. coli* O157:H7 검출을 위한 specific primers와 probes가 효율적으로 설계되었는지 확인하기 위하여 사용된 균주는 비병원성인 대장균(*E. coli* KCTC 1116)과 대표적인 장내 세균들을 포함하는 12종의 세균들(*Citrobacter freundii* KCTC 22056, *Enterobacter cloacae* KCTC 1685, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2001, *Salmonella Enteritidis* KCCM 12021, *Salmonella Typhimurium* KCTC 1925, *Serratia liquefaciens* KCCM 12094, *Pediococcus acidolactici* KCTC 13734, *Pediococcus pentosaceus* KCTC 3507, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 22063, *Rhodococcus aquii* KCTC 1298, *Enterococcus faecalis* KCTC 2011, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621)을 KCTC (The Korean Collection for Type Cultures)와 KCCM (The Korean Culture Center of Microbiology)에서 구입하여 사용하였다. 증균 배양에는 Luria-Bertani broth (LB broth, Oxoid, England; Table 2)와 mEC broth with novobiocin (Oxoid, England; Table 3) 등을 사용하였고, 생균 수 측정에는 nutrient agar (Difco, USA)를 사용하였다.

2. DNA 추출 Kit

Genomic DNA 추출 kit는 AccuPrep[®] genomic DNA extraction kit

Table 2. Formulation of Luria-Bertani broth

Typical Formulation	Concentration (g/L)
Tryptone	10.0
Yeast Extreact	5.0
Sodium chloride	10.0



Table 3. Formulation of mEC broth (Reduced bile salts)

Typical Formulation	Concentration (g/L)
Tryptone	20.0
Lactose	5.0
Di-potassium hydrogen phosphate	4.0
Potassium hydrogen phosphate	1.5
Sodium chloride	5.0
Bile salts No.3	1.12
Supplement Novobiocin	0.02

(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였으며, 추출방법은 제조사의 지시서의 방법에서 약간의 수정을 하여 사용하였다. 추출 시, 1.5 ml의 증균 배양액(mEC broth 혹은 LB broth를 사용하여 증균한 것)을 취하여 8,000 rpm에서 1분간 원심분리 과정을 거친 후 얻은 균체로부터 DNA를 추출하였다.

3. EC(O157:H7) quantitative PCR Kit

Real-time PCR에 사용된 primers와 probes가 포함된 *E. coli* O157:H7 특이 PCR kit는 AccuPower[®] EC quantitative PCR Kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였다. Kit는 primers와 probes가 포함된 EC quantitative PCR premix와 *E. coli* O157:H7 standard DNA (2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 copies/ μ l), internal positive control DNA, PCR grade water로 구성되어있다. Non-template control은 PCR grade water 49 μ l, internal positive control DNA 1 μ l를 premix에 투입, 교반하여 사용하였고 *E. coli* O157:H7 standard DNA와 sample은 각각 5 μ l의 시료와 positive control DNA 1 μ l, PCR grade water 44 μ l를 premix에 투입, 교반하여 사용하였다(Table 4).

4. Real-time PCR 장치

실험에 사용된 real-time PCR장치는 real-time quantitative thermal block ExicyclerTM96 (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였다.

Table 4. Reaction mixture for real-time PCR detection

Composition of real-time PCR reaction mixture		Reaction volume / 1 reaction
Sample	Non-template control (NTC)	5µl (PCR grade water)
	EC(O157:H7) standard DNA (2×10^2 ~ 2×10^6) or clinical sample	5µl
	Internal positive control DNA	1µl
	PCR grade water	44µl
	Total	50µl

5. *E. coli* O157:H7 증균 배양법

LB broth를 사용한 *E. coli* O157:H7 균주의 증균 배양은 LB broth 20 ml를 37℃에서 24시간 배양하였고 그 배양액을 100 µl 취하여 LB broth 20 ml에 37℃, 6시간 이차 배양하였다. mEC broth를 사용한 증균 배양은 mEC broth에 0.02 g/L의 농도가 되도록 novobiocin를 투입하여 사용하였고, 35℃에서 24시간동안 증균을 실시하였다. 각각의 실험마다 필요시, 증균 후 정확한 균체량을 측정하기 위해서 NA를 사용하여 생균수를 측정하였으며, 생균수 검사법은 식품공전의 방법(식품공전, 제10. 일반시험법, 8. 미생물 시험법 p.23-24, 2008)을 사용하였다. 필요에 따라 항생제 tetracycline (20 µg/ml)과 gentamicin (15 µg/ml)을 증균 배지에 투입하여 사용하였다.

6. DNA 추출 방법

DNA 추출방법은 먼저, 배양액 1.5 ml를 취하여 멸균시킨 eppendorf tube (E-tube)에 넣고, 200 µl의 TL buffer (Tissue lysis buffer)를 투입하였다. Proteinase K를 20 µl 투입하고 교반한 후 60℃에서 조직이 완전히 용해될 때까지 10~15분간 반응시켰다. 튜브를 스핀다운 시켜 뚜껑과 기벽의 방울들을 제거하고, 200 µl의 binding buffer를 투입하고 즉시 교반 후, 60℃에서 10분간 반응시켰다. 다음, 100 µl의 isopropanol을 투입하고 피펫으로 잘 현탁한 다음 2 ml 튜브에 binding column을 결합하여 조심스럽게 현탁액을 이동시켰다. 다음, 튜브의 뚜껑을 닫고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 튜브를 열고 바인딩 칼럼 튜브를 새로운 2

ml 튜브에 filtration을 위해 결합했다. 500 μ l의 washing buffer를 튜브의 가장자리에 묻지 않게 투입하고 튜브의 뚜껑을 닫아, 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하고, 튜브를 열고 2 ml 튜브에 내려온 솔루션을 버렸다. 다음, 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 에탄올을 제거시키고 바인딩 칼럼튜브를 새로운 1.5 ml 튜브에 용출시키기 위해 옮긴 후 200 μ l의 EL buffer (Elution buffer)를 바인딩 칼럼 튜브에 넣고 실온에서 적어도 1분간 방치시켰다. 8,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 용출된 용액을 DNA 시료로 사용하였다.

7. Agarose gel 전기 영동법

10X loading buffer 1 μ l와 추출된 DNA 시료 3 μ l를 현탁 시킨 후, 전기영동 장치 내부의 agarose gel에 피펫으로 조심스럽게 넣고 30~40분 정도 loading 시킨다. loading 된 agarose gel을 ethidium bromide에 5분간 반응시키고 다시 증류수에 5분간 반응 시킨다. 염색이 끝난 후 UV를 쬔고 사진을 찍어 DNA band를 확인하였다.

8. Real-time PCR 조건

PCR primers와 hybridization probes, internal positive control등이 들어있는 PCR premix에 non-template control, standard DNA, clinical sample을 투입하고 real-time PCR을 실행하였다. 먼저 95℃에서 5분간 DNA 전-변성과정(pre-denaturation)을 실시하고 95℃에서 20초간 변성과정(denaturation)을 켜진 다음 30초간 55℃에서 DNA 풀림 과정

(annealing)과 신장 과정(extension)을 실시하였다. 형광물질 FAM과 quencher가 결합되어 있는 FAM-BHQ를 *E. coli* O157:H7로 하고, 형광물질 TAMRA와 quencher가 결합되어 있는 TAMRA-BHQ를 internal positive control로 설정하고 1번의 cycle마다 형광물질 scan 과정을 거쳤다. Scan이 끝나면 다시 전-변성 과정으로 돌아가 총 45 cycle의 PCR 반응을 진행하였다(Table 5).



Table 5. PCR cycle step for real-time PCR detection

Step	Temperature	Running time
Line 2 : pre-denaturation	95 °C	5 minutes
Line 3 : denaturation	95 °C	20 seconds
Line 4 : Annealing & extension	55 °C	30 seconds
Scan	FAM-BHQ : target / TAMRA-BHQ : internal positive control	
Goto	Line 2, 45 cycles	

결과 및 고찰

1. *E. coli* O157:H7 특이적 primers와 probes 제작

Real-time PCR을 이용하여 위해 식중독 세균들을 검출하기 위한 특이적인 primer 및 probe와 이를 이용한 분석법들이 보고되어 있다(Justin *et al.*, 2007; Malorny *et al.*, 2004; Bhagwat, 2003)(Table 10 및 11). *E. coli* O157:H7균의 경우에도 많은 연구자들이 이 균에만 존재하는 특이적인 염기서열을 이용하여 이 균의 검출을 위한 특이적인 primer를 및 형광 probe 제작하고 이를 이용한 정성 및 정량 법에 대해 보고하고 있다(Uyttendaele *et al.*, 1999; Monika *et al.*, 2005; Bellin *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001; Cebula *et al.*, 1994; Jothikumar *et al.*, 2002; Karch *et al.*, 1989)(Table 6, 7, 8 및 9). Real-time PCR을 이용한 *E. coli* O157:H7균의 검출에 많이 사용되고 있는 target gene은 *stx1*, *stx2*로 이들 유전자는 *E. coli* O157:H7에만 특이적으로 존재한다(Bellin *et al.*, 2000; Table 8). 본 연구에 사용한 primer 및 fluorescent probe는 Bioneer(주)에서 제작한 것을 이용하여 실험을 진행하였다(sequence data not shown). 실험에 사용한 IPC (internal positive control)는 각각의 샘플이 정확한 절차에 따라 실험과정이 진행되었는지 모니터링 하기 위해서 첨가한 내부표준 물질로 target templates와 경쟁적 혹은 비경쟁적으로 이용 가능하다. 경쟁적 IPC는 같은 primer 결합 부위가 이용되지만 내부순서가 그것의 target sequence와 구별될 수 있도록 변경된 모방하는 디자인을 이용한다. 비경쟁적 IPC는 직접적으로 target amplicon과 경쟁하지 않는 완전히 분리된 목표를 이용하고, primer와 probe의 다

양한 세트를 표적 증폭과 공유되지 않게 한다. 따라서 이러한 IPC는 실험자의 실수나 실험과정상의 오류를 파악할 수 있게 해주어 실험의 신뢰도를 높여주는 장치라 할 수 있다(Das *et al.*, 2006).



Table 6. Sequence and position in the *eae*-gene for PCR oligonucleotides in *Escherichia coli* O157:H7

Oligonucleotide	Sequence (5'-3')	Position in <i>eaeA</i> gene
PD866ZP (reverse primer)	TTA TCA TAT ACG ACG GTG CTT	2718 - 738
PD864 (forward primer)	CGA CTG TCG ATG CAT GAG G	2619 - 637
PD865ZP (reverse primer)	CAG CAT AAT AGG CTT GCT TAT	2745 - 769
PD863 (forward primer)	AAG CAA GCG GTG GTG ATG GTA CAT	2565 - 588
AE9 (forward primer)	ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC	2541 to 2521
AE10 (reverse primer)	GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG	274 - 94
AE19 (forward primer)	CAG GTC GTC GTG TCT GCT AAA	1959 - 979
AE20 (reverse primer)	TCA GCG TGG TTG GAT CAA CCT	3027 - 047

(Beebakhee *et al.*, 1992; Uyttendaele *et al.*, 2006)

Table 7. PCR primers for the identification of hemolysin genes in *Escherichia coli* O157:H7

Gene and description	Product size (bp)	Primer name	Primer sequence
hlyA, from the 5region of hlyA from J96	561	hlyA1	5-GTC TGC AAA GCA ATC CGC TGC AAA TAA A-3
		hlyA2	5-CTG TGT CCA CGA GTT GGT TGA TTA G-3
sheA, from the 5region of sheA from pCFP60	920	she1	5-GAG GCG AAT GAT TAT GAC TG-3
		she2	5-ACT TCA GGT ACC TCA AAG AG-3
ehly, from the chromosome of O26 E. coli strain (phage coding)	808	ehly1	5-TCG CAA TCA CAT CAC AAC C-3
		ehly2	5-CCA GCA GTT CGT CAT CAT CTG AA-3
ehx, from the plasmid pO157 carried by EDL933	1,518	ehx1	5-CAG TGA CGC ACA TAC AG-3
		ehx2	5-TCG GGA TAT ATA ATC ATC C-3

(Monika *et al.*, 2005)

Table 8. Nucleotide sequences of primers and probes for the detection of *Escherichia coli* O157:H7

Primer or probe	Name	Sequence (5'-3')	Position
Primers			
<i>stx1</i>	StxA1 598	AGT CGT ACG GGG ATG CAG ATA AAT	598 - 621
	StxA1 1015	CCG GAC ACA TAG AAG GAA ACT CAT	1015 - 992
<i>stx2</i>	StxA2 679	TTC CGG AAT GCA AAT CAG TC	679 - 698
	StxA2 942	CGA TAC TCC GGA AGC ACA TTG	942 - 922
Probes			
<i>stx1</i>	StxA1 FL 724	CTG TCA CAG TAA CAA ACC GTA ACA TCG CTC-X	724 - 695
	StxA1 LC 693 R7	LC-TGC CAC AGA CTG CGT CAG TGA GGT-ph	693 - 670
<i>stx2</i>	StxA2 FL 769	MAG AGC AGT TCT GCG TTT TGT CAC TGT CA-X	769 - 797
	StxA2 LC 799 R6	LC-AGC AGA AGC CTT ACG CTT CAG GC-ph	799 - 821

(Bellin *et al.*, 2000)

Table 9. Primers used in MAMA-multiplex PCR to amplify specific fragments from the genes for SLT-I and SLT-II and the *uidA* gene for the detection of *Escherichia coli* O157:H7

Target	Expected size (bp)	Primer	Sequence
SLT-I	348	LP30	5' - CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG - 3'
		LP31	5' - CACCAGACAATGTAACCGCTG - 3'
SLT-II	584	LP43	5' - ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG - 3'
		LP44	5' - GCGTCATCGTATACACAGGAGC - 3'
<i>uidA</i>	252	PT-2	5' - GCGAAAACGTGTGAATTGGG - 3'
		PT-3	5' - TGATGCTCCATAACTTCCTG - 3'

(Cebula *et al.*, 1994)

Table 10. Oligonucleotide primers and probes for *Listeria monocytogenes*

Name	Type	Sequence (5'-3')
LssrA F	Forward assay primer	GCATCGCCCATGTGCTAC
LssrA R	Reverse assay primer	TCTACGAGCGTAGTCACCG
IAC F	Forward composite primer for IAC generation	GCATCGCCCATGTGCTACATACCCAACCTGGAATG
IAC R	Reverse composite primer for IAC generation	TCTACGAGCGTAGTCACCGTCTTCACCAGAATAA AATTG
Hybprobe 1	<i>E. coli</i> hybridization probe	CCATTCAGCTAGTCTGATTAAGCTCT-fluorescein
Hybprobe 2	<i>E. coli</i> hybridization probe	LCRed640-CTATTTAACCCAGACGGAGA-phosphate
ALS1-FLU	IAS hybridization probe	TGAATGTATCCCCTGGA-fluorescein
ALS1-LC	IAS hybridization probe	LCRed705-TGGCACTGGTACCATCTAA-phosphate

(Justin *et al.*, 2008)

Table 11. Primers, probes, and IAC sequence used for the *Salmonella*-specific assay

Designation	Sequence	Positions
ttr-6 (forward)	CTCACCAGGAGATTACAACATGG	4287 - 4309
ttr-4 (reverse)	AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC	4359 - 4381
Target probe (ttr-5)	FAM-CACCGACGGCGAGACCGACTTT-Dark Quencher	4336 - 4356
IAC probe	Yakima Yellow-CACACGGCGACGCGAACGCTTT-Dark Quencher	
IAC sequence	GACTCACCAGGAGATTACAACATGGCTCTTGCTGTGCATCAT CGCAGAACATCAAAGCGTTTCGCGTCGCCGTGTGG GATGGTCAC TTTTGGTCTGAGCTAC	

(Malorny *et al.*, 2004)

2. 증균 배지에서 real-time PCR을 이용한 *E. coli* O157:H7 의 검출

2.1. 일반 증균 배지에서 real-time PCR을 이용한 *E. coli* O157:H7의 검출

E. coli O157:H7의 검출을 위해 제작된 primer 및 probe들이 *E. coli* O157:H7균(ATCC 43894)에 특이적으로 증폭되는가를 확인하기 위한 실험을 재료 및 방법에서 기술한대로 실시하였다. LB 배지에서 증균 된 *E. coli* O157:H7 균수를 조사하기 위하여 NA로 생균수를 측정한 결과 균수는 3.7×10^8 CFU/ml 로 나타났고 이 균 배양액 1 ml을 집균하여 DNA를 추출하고 real-time PCR을 실시하였다. 그 결과, *E. coli* O157:H7균에서 추출한 DNA를 template로 real-time PCR에서 PCR cycle 증가에 따른 특이적인 형광산물의 증가가 관찰되었다(Fig. 1). *E. coli* O157:H7 ATCC 43894을 이용한 real-time PCR의 Ct value (cycle threshold value)은 26.04였다(Fig. 1 및 Table 12). Ct value는 임계값을 넘기 위해 형광 신호에 요구된 사이클의 수로 규정되며 Ct level은 샘플의 target nucleic acid의 양에 반비례한다. Real-time PCR 분석은 보통 40 cycle의 증폭단계를 거치는데 29 cycle이하의 Ct value를 가지는 샘플들은 풍부한 target 핵산을 가지고 있어 강한 양성 반응을 나타낸다(www.wvdl.wisc.edu/PDF/WVDL.Info.PCR.Ct.Values.pdf). 30~37 cycle은 target 핵산의 중간 양을 나타낸 양성 반응이며, 37 cycle 이하는 양성반응 이지만 target 핵산의 양이 매우 적다. 대조구로 template를

투입하지 않은 non template control (NTC)의 PCR 결과 불검출 (undetermined)임을 확인하였고, IPC 역시 모든 standard와 sample들에서 24 cycle 근처부터 증폭됨에 따라 제작된 primer와 probe가 specific하게 증폭이 됨을 확인하였다 (Fig. 1 및 Table 12).

또한, real-time PCR 반응에 template로 사용한 DNA에서 증폭된 형광산물은 *E. coli* O157:H7 qualification standard curve와 비교하여 균수를 정량적으로 평가한 결과 real-time PCR 반응에 사용한 DNA는 $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml 사이의 균수인 것으로 조사되었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 NA를 이용한 생균수에 의해 조사된 실제 생균수 3.7×10^8 CFU/ml와는 3~4 log 정도의 차이가 있는 것으로 나타났으며 이는 *E. coli* O157:H7 qualification standard curve 작성에서 calibration이 잘못된 결과로 평가 된다.

이상의 결과는 본 연구에 사용된 AccuPower[®] EC quantitative PCR Kit는 *E. coli* O157:H7균의 정성은 가능하지만 정량분석은 아직 미흡하다는 것을 의미하며 정량 분석을 위해서는 향후 수정 및 보완 실험이 필요하다고 판단된다.

2.2. EC(O157:H7) quantitative PCR Kit의 특이성 검증

E. coli O157:H7의 특이적 검출을 위해 제작된 EC(O157:H7) quantitative PCR Kit가 *E. coli* O157:H7균에 대해서만 선택적으로 증폭이 가능한지 조사하기 위하여 비병원성 대장균과 대표적인 장내 세균, 기타 12종의 세균을 증균 시킨 다음, DNA를 추출하고 real-time PCR을 실시하였다. 그 결과, *E. coli* O157:H7균을 제외한 어떠한 균도 증폭되지

않았다(Table 13). 이러한 결과는 본 연구에 사용된 *AccuPower*[®] EC(O157:H7) quantitative PCR Kit는 *E. coli* O157:H7균을 선택적으로 검출할 수 있는 real-time PCR 용 specific primers와 probes임을 의미하며 이 kit를 사용하여 후속 실험을 진행하였다.



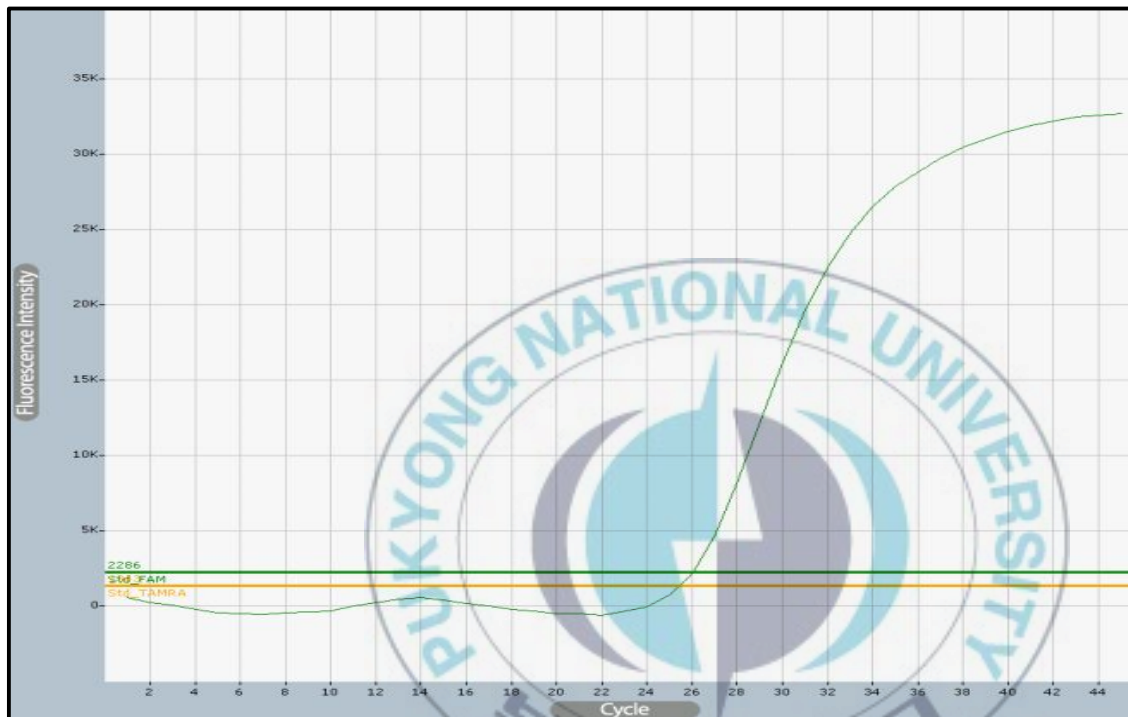


Fig. 1. Fluorescence graph of *Escherichia coli* O157:H7 target gene amplified by real-time PCR. Cells were cultivated in LB broth and then the genomic DNA was extracted.



Fig. 2. Quantitative standard curve of *Escherichia coli* O157:H7 by real-time PCR.

Cells were cultivated in LB broth at 37°C for 24 h.

Table 12. Summary of *Escherichia coli* O157:H7 detection by real-time PCR in LB broth culture

Sample Name	Probe Name	Type	Flu. Dye	Quencher	Ct	Concentration	Ct Threshold
NTC	Std_FAM	NTC	FAM	BHQ	Undetermined	–	2286
NTC	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.47	0	1343
STD1	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	36.97	1	2286
STD1	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.67	0	1343
STD2	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	32.14	10	2286
STD2	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.08	0	1343
STD3	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	28.17	100	2286
STD3	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.31	0	1343
STD4	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	24.98	1000	2286
STD4	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.58	0	1343
STD5	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	21.98	10000	2286
STD5	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.9	0	1343
O157sample	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	26.05	532.96	2286
O157sample	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.01	0	1343

Table 13. Detection of bacterial strains used in this study by real-time PCR using *Escherichia coli* O157:H7 detection kit [EC(O157:H7) quantitative PCR Kit]

Bacterial strains	Result of real-time PCR amplication
Gram negative strains	
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1116	Undetermined
<i>Enterobacter cloacae</i> KCTC 1685	Undetermined
<i>Salmonella Typhimurium</i> KCTC 1925	Undetermined
<i>Salmonella Enteritidis</i> KCCM 12021	Undetermined
<i>Serratia liquefaciens</i> KCCM 12094	Undetermined
<i>Citrobacter freundii</i> KCTC 22056	Undetermined
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 22063	Undetermined
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2001	Undetermined
Gram positive strains	
<i>Pediococcus acidolactici</i> KCTC 13734	Undetermined
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KCTC 3507	Undetermined
<i>Rhodococcus aquí</i> KCTC 1298	Undetermined
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 2011	Undetermined
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	Undetermined

2.3. 선택 증균 배지에서 real-time PCR을 이용한 *E. coli*

O157:H7의 검출

이상의 실험에서는 일반 증균용 배지인 LB 배지에서 *E. coli* O157:H7균을 증균 후에 real-time PCR을 이용한 검출에 대한 조사하였다. 하지만, 실제로 식품시료에서 *E. coli* O157:H7균의 검출을 위해 사용되는 배지는 mEC 배지 등의 선택배지가 사용된다(식품공전, 식품의약품안전청). 이에 mEC 배지에서 *E. coli* O157:H7균을 증균 배양하고 DNA를 추출하고 이를 template로 사용하여 real-time PCR을 실시하였다. mEC배지에서 배양한 *E. coli* O157:H7의 균수는 NA를 이용한 생균수는 4.4×10^8 CFU/ml 였고 이를 단계별로 희석하여 최종 균의 농도가 각각 4.4×10^2 CFU/ml, 4.4×10^0 CFU/ml, 4.4×10^{-2} CFU/ml 이 되도록 0.02 g/L의 novobiocin을 포함하는 mEC broth 10 ml에 투입하였다. 각각을 35℃에서 24 시간 배양한 다음 genomic DNA를 추출하고 real-time PCR을 실시하였다. 그 결과, 4.4×10^2 CFU/ml, 4.4×10^0 CFU/ml, 4.4×10^{-2} CFU/ml의 Ct value는 각각 17.70, 28.66, 38.21 로 mEC broth로 증균된 *E. coli* O157:H7균이 농도 의존적으로 증폭이 됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3, Fig. 4, Table 14). 특히 4.4×10^{-2} CFU/ml의 균을 투입하고 증균 시킨 균은 생균수 측정결과 균이 증식되지 않았지만, 38.21 cycle에서 증폭된 것은 접종배지에 존재하는 극미량의 DNA가 증폭된 것으로 추정된다. 이러한 결과는 시료 (4.4×10^{-2} CFU/ml 접종균) 중에 생균이 존재하지 않지만 조사대상 균의 DNA가 극미량 존재하면 PCR을 기반으로 하는 방법에서는 false result가 초래된다는 것을 의미한다 (Table 14). 즉, real-time PCR 기법을 식중독 세균의 선택적 분석법에

사용하였을 때, 시료 중에 존재하는 사균이나 손상된 cell, 혹은 극미량의 DNA에 의해 false result가 초래될 수 있으며 이러한 점이 식품시료에서 식중독 세균의 검출방법으로 real-time PCR 방법의 적용이 문제가 될 수 있다. 사균 또는 혼입된 DNA에 의한 real-time PCR 검출법의 문제점을 확인하기 위하여 물리적 및 화학적 처리로 균을 인위적으로 사균화시키고 이를 이용한 real-time PCR을 실시하였다.



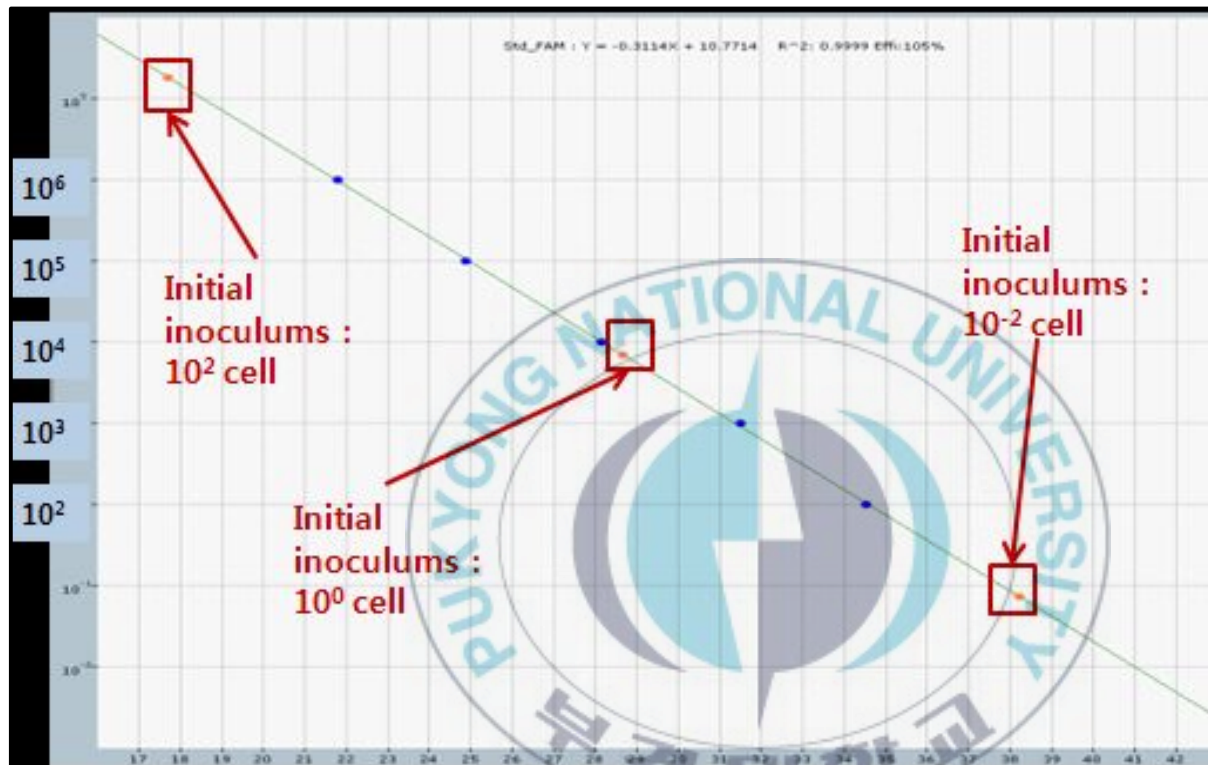


Fig. 3. Quantitative standard curve of *Escherichia coli* O157:H7 by real-time PCR after cultivation in mEC broth. Cells were cultivated in mEC broth at 35°C for 24 h.

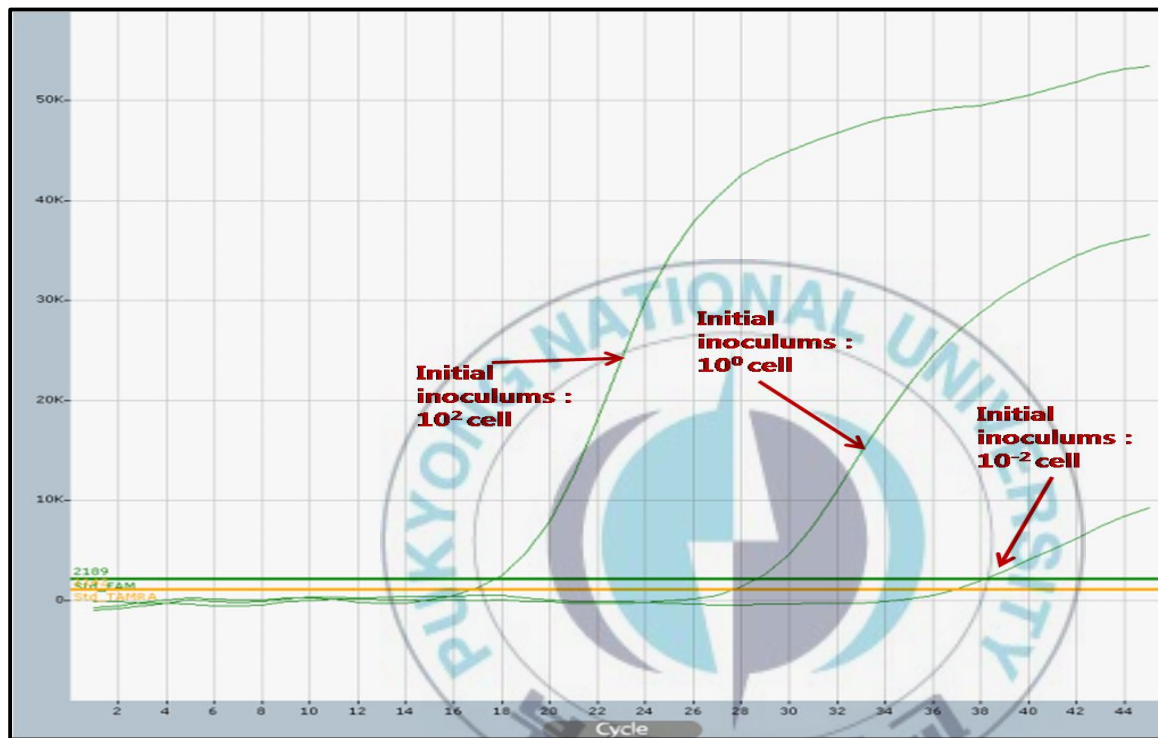


Fig. 4. Fluorescence graph of *Escherichia coli* O157:H7 target gene amplified by real-time PCR after cultivation in mEC broth. Cells were cultivated in mEC broth and then the genomic DNA was extracted.

Table 14. Summary of *Escherichia coli* O157:H7 detection by real-time PCR in mEC broth culture

Sample Name	Probe Name	Type	Flu.Dye	Quencher	Ct	Concentration	Ct Threshold
NTC	Std_FAM	NTC	FAM	BHQ	Undetermined	–	2189
NTC	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.66	0	1142
STD5	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	21.78	10000	2189
STD5	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	26.15	0	1142
STD4	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	24.88	1000	2189
STD4	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.88	0	1142
STD3	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	28.15	100	2189
STD3	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	26.05	0	1142
STD2	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	31.50	10	2189
STD2	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	26.14	0	1142
STD1	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	34.52	1	2189
STD1	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	26.13	0	1142
O157/10 ²	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	17.70	181029.43	2189
O157/10 ²	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.97	0	1142
O157/10 ⁰	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	28.66	70.19	2189
O157/10 ⁰	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.62	0	1142
O157/10 ⁻²	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	38.21	0.07	2189
O157/10 ⁻²	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	26.10	0	1142

3. *E. coli* O157:H7균 검출을 위한 방법으로 real-time PCR

적용의 문제점

Fig. 3, Fig. 4 및 Table 14의 결과는 사균 또는 극미량 존재하는 DNA에 의해 target gene의 증폭이 일어날 수 있다는 것을 시사한다. 따라서 이러한 문제점을 확인해 보고자 *E. coli* O157:H7균을 인위적으로 손상 시킨 후에 DNA를 추출하고 이를 이용하여 real-time PCR을 실시하였다. LB 배지에서 배양한 균 배양액 (2.1×10^8 CFU/ml) 1 ml을 각각 물리적(autoclave) 및 화학적(10,000 ppm HClO, 1 min)으로 처리하고 균이 사멸 되었는지 확인하기 위한 생균수 측정 결과, 두 개의 균 모두에서 생균이 존재하지 않았다. 대조구, 물리적 처리균, 화학적 처리균에서 각각 DNA를 추출하고 agarose gel 전기영동을 실시한 결과, 물리적 처리 균에서는 DNA 밴드가 형성되지 않았다(Fig. 5). 그러나 각 처리균에서 추출된 DNA로 real-time PCR을 실행한 결과, 물리적 처리 균의 Ct value는 17.95, 화학적 처리균의 Ct value는 16.43로 Ct value가 17.29인 대조구와 비슷한 양으로 증폭됨을 확인하였다(Fig. 6, Fig. 7, Table 15). 이러한 결과는 앞에서 추정한 대로 사균, 손상된 세포 및 극미량의 DNA 등이 시료 중에 존재하면 생균과 같이 증폭 되므로 현재의 real-time PCR 방법으로는 식품에 존재할 수 있는 사균, 손상된 cell 및 생균을 구별하기 어렵다는 것을 시사한다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 생균만을 증균하는 선택적 증균 배양과 real-time PCR을 병행한 *E. coli* O157:H7균 검출법의 개발을 시도하였다.

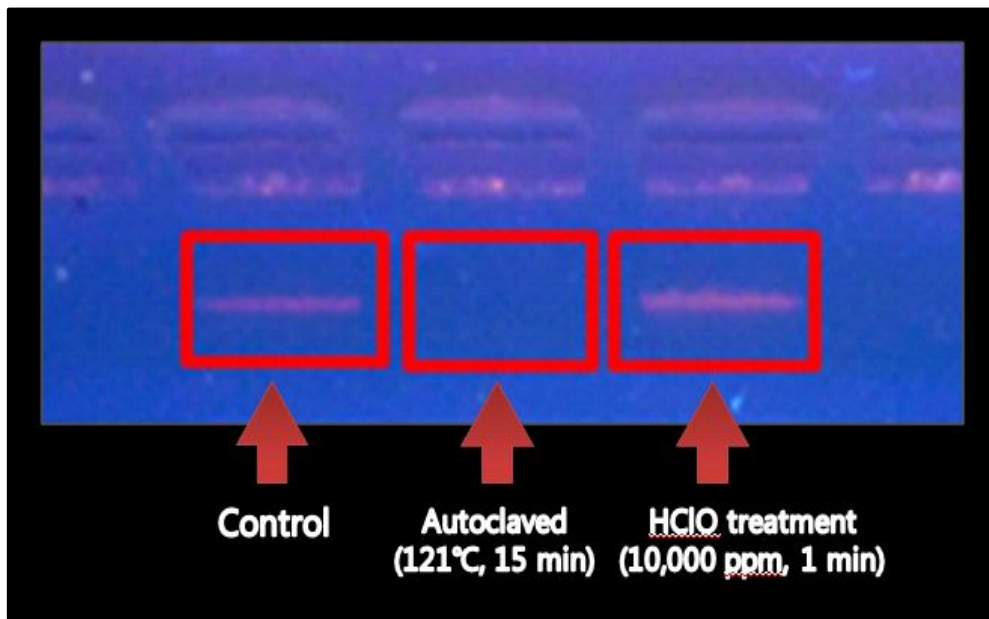


Fig. 5. Electrophoresis profiles after autoclave and HClO treatment.

Escherichia coli O157:H7 were cultivated in LB broth at 37°C for 24 h. One ml of cultivation (2.1×10^8 CFU/ml) was taken for the treatment of autoclave (121.1°C for 15 min) and HClO (10,000 ppm for 1 min). After then, the genomic DNA was extracted.

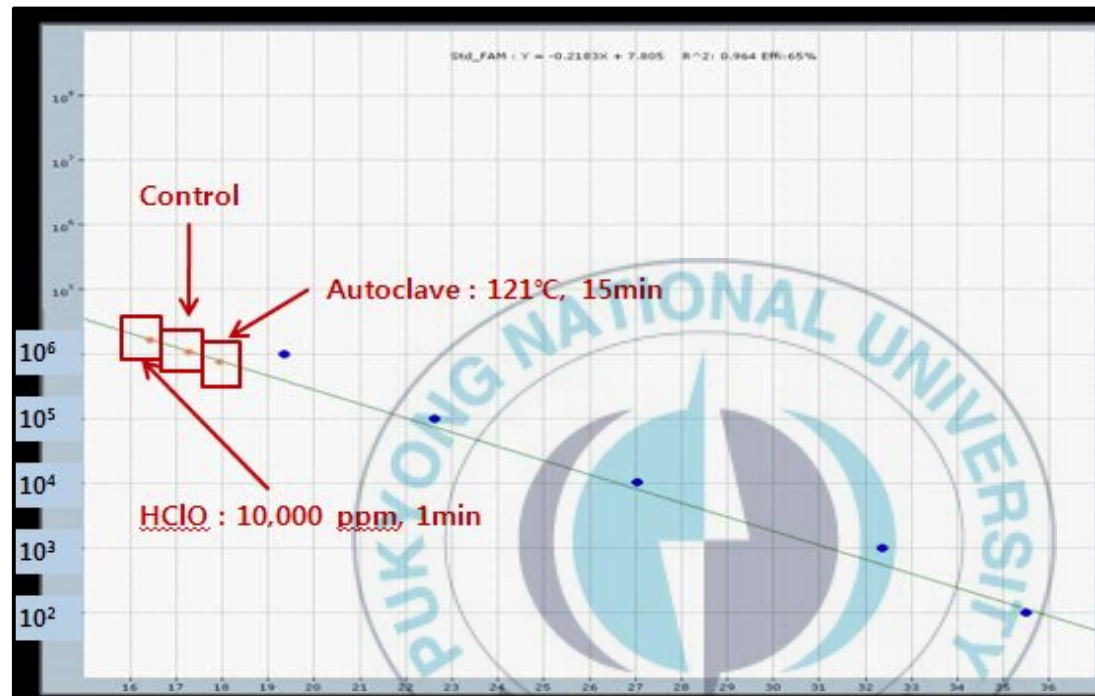


Fig. 6. Real-time PCR profiles after autoclave and HClO treatment of *Escherichia coli* O157:H7 cells. One ml of cultivation (10⁸ CFU/ml) was taken for the treatment of autoclave (121.1°C for 15 min) and HClO (10,000 ppm for 1 min). After then, the genomic DNA was extracted.

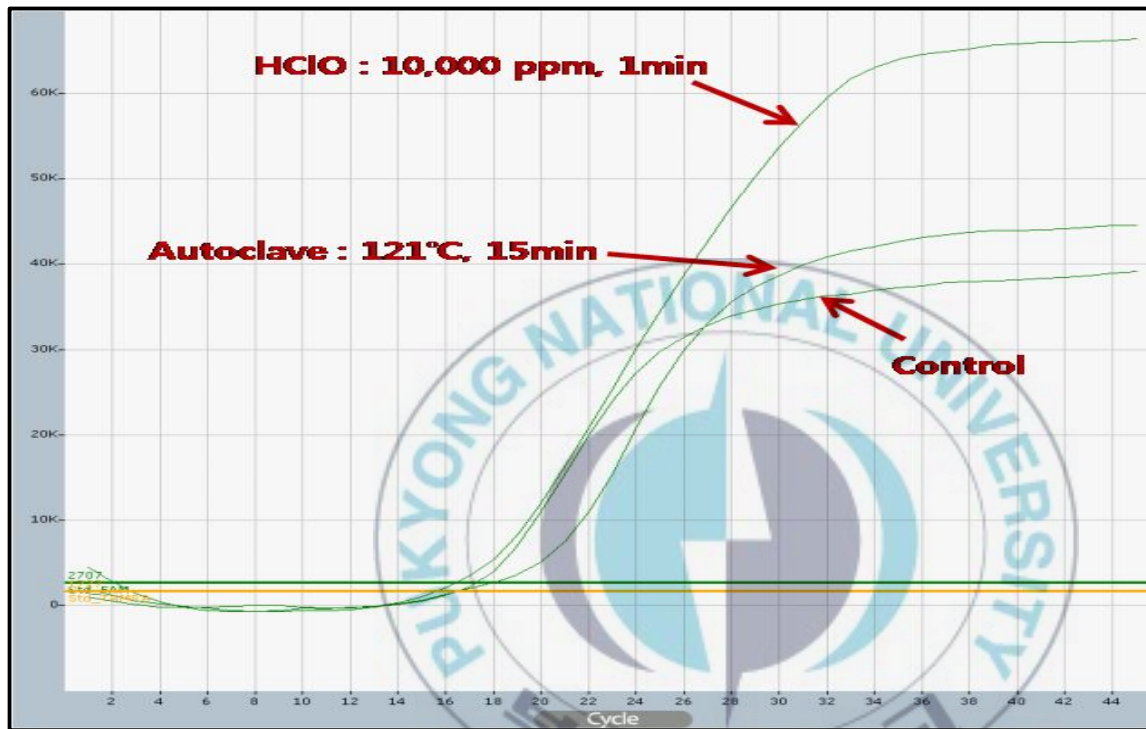


Fig. 7. Fluorescence graph of real-time PCR after autoclave and HClO treatment of *Escherichia coli* O157:H7 cells. One ml of cultivation (10^8 CFU/ml) was taken for the treatment of autoclave (121.1°C for 15 min) and HClO (10,000 ppm for 1 min). After then, the genomic DNA was extracted.

Table 15. Summary of autoclave and HClO treated *Escherichia coli* O157:H7 detection by real-time PCR

Sample Name	Probe Name	Type	Flu.Dye	Quencher	Ct	Concentration	Ct Threshold
NTC	Std_FAM	NTC	FAM	BHQ	Undetermined	0	2707
NTC	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.32	0	1727
STD1	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	35.48	1	2707
STD1	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	23.92	0	1727
STD2	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	32.37	10	2707
STD2	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.35	0	1727
STD3	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	23.13	100	2707
STD3	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.27	0	1727
STD4	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	22.63	1000	2707
STD4	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.95	0	1727
STD5	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	19.36	10000	2707
STD5	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.16	0	1727
O157control	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	17.29	10757.15	2707
O157control	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.88	0	1727
Autoclave	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	17.95	7687.67	2707
Autoclave	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.48	0	1727
HClO	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	16.43	16506.9	2707
HClO	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.32	0	1727

4. Real-time PCR 및 선택적 증균 배양법을 이용한 *E. coli* O157:H7 검출

현재의 real-time PCR 방법이 생균과 사균의 차이를 구별 할 수 없다는 앞의 실험 결과를 바탕으로 항생제를 증균 배양과정에 투입하여 선택적 증균 배양 후 비교 실험을 실행하였다. 논문 검색 등을 통하여 *E. coli* O157:H7균의 증식을 억제하는 항균제로 tetracycline과 gentamicin을 선택하고 실험을 진행하였다(Nikolaos *et al.*, 2009; Muammer *et al.*, 2010)(Table 16, Table 17). 항생제 투입군과 항생제 미투입군을 각각 24 시간 배양 후 생균수 실험을 실시한 결과, 항생제 투입 군은 생균이 자라지 않음을 확인하고 DNA를 추출하여 real-time PCR을 실행하였다. 그 결과, 항생제 투입 군은 Ct value가 32.69, 항생제를 미 투입 군의 Ct value는 15.00으로 큰 차이가 나타났다(Fig. 8, Fig. 9, Table 18). 이 실험으로 특정 항생제를 이용한 선택적 증균 배양과 real-time PCR을 병행한 방법으로 생균과 사균의 차별화가 가능하다는 결과를 도출하였다. 이는 항생제를 이용한 선택적 분리배양법을 통하여 시료 중에 존재하는 생균 상태의 *E. coli* O157:H7의 경우 tetracycline과 gentamicin이 존재하지 않는 mEC 선택배지에서는 정상적으로 균수로 증균되어 낮은 Ct value가 나타나지만 tetracycline과 gentamicin이 존재하는 mEC 선택배지에서는 사균화 되어 높은 Ct value가 나타나게 된다. 즉, 이러한 항생제를 이용한 선택적 배양과 real-time PCR을 병행한 방법은 식품시료 중에 존재하는 생균 상태의 *E. coli* O157:H7균의 존재 유무를 판단할 수 있을 것으로 기대된다.

하지만 항생제를 사용하는 방법은 환경 분리주의 경우, 언제든지 내성을

가지는 균이 나타날 수 있으므로 향후, 이러한 문제점을 보완하기 위한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다. 이상의 배지상의 연구를 바탕으로 식품시료 적용을 통해 real-time PCR을 이용한 식품 위해 미생물의 분석법 개발의 가능성을 타진해 보았다.



Table 16. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from raw milk in Greece.

Strain	Origin	Antibiotic resistance*	Antibiotic sensitivity	MAR index
LFH1	O	A - C, AC, CFA, CP, SM, T - S	CFU, GM, TC	0.67
LFH2	O	A - C, AC, CFA, CP, SM, TC	CFU, GM, T - S	0.67
LFH3	O	A - C, AC, GM, SM, T - S	CFA, CFU, CP, TC	0.56
LFH4	C	A - C, AC, CFA, CFU, CP, SM, T - S	GM, TC	0.78
LFH5	C	A - C, AC, CFA, CP, SM, TC, T - S	CFU, GM	0.78
LFH6	B	A - C, AC, CFA, SM, T - S	CFU, CP, GM, TC	0.56
LFH7	B	A - C, AC, CFA, CP, SM, T - S	CFU, GM, TC	0.67
LFH8	B	A - C, AC, CFA, CP, SM, T - S	CFU, GM, TC	0.67
LFH9	B	A - C, AC, CFA, CP, SM, T - S	CFU, GM, TC	0.67
LFH10	B	A - C, AC, CP, SM, T - S	CFA, CFU, GM, TC	0.56
LFH11	B	A - C, AC, CFA, CFU, SM, T - S	CP, GM, TC	0.67
LFH12	B	A - C, AC, CFA, CFU, CP, SM, T - S	GM, TC	0.78
LFH13	O	A - C, AC, CFA	CFU, CP, GM, SM, TC, T - S	0.33
LFH14	O	AC, CFA, GM, SM, T - S	A - C, CFU, CP, TC	0.56
LFH15	C	A - C, AC, CP, SM	CFA, CFU, GM, TC, T - S	0.44
LFH16	B	A - C, AC, CFA, SM	CFU, CP, GM, TC, T - S	0.44
LFH17	B	A - C, AC, SM	CFA, CFU, CP, GM, TC, T - S	0.33
LFH18	B	AC, CP, SM	A - C, CFA, CFU, GM, TC, T - S	0.33
LFH19	B	AC, CFA, CP, SM	A - C, CFU, GM, TC, T - S	0.44
LFH20	B	AC, CFA, CFU, SM	A - C, CP, GM, TC, T - S	0.44
LFH21	B	AC, CFA, CFU, SM	A - C, CP, GM, TC, T - S	0.44
LFH22	B	A - C, AC, CFA, CFU, SM	CP, GM, TC, T - S	0.56
LFH23	B	A - C, AC, CFA, SM, T - S	CFU, CP, GM, TC	0.56
LFH24	B	A - C, AC, CFA, CP, SM	CFU, GM, TC, T - S	0.56
LFH25	B	AC, CFA, SM	A - C, CFU, CP, GM, TC, T - S	0.33
LFH26	B	A - C, AC, CFA, GM, SM, T - S	CFU, CP, TC	0.67
LFH27	B	A - C, AC, CFA, CFU, SM	T - S CFU, CP, TC	0.56
LFH28	B	AC, CFA, SM	A - C, CFU, CP, GM, TC, T - S	0.33
LFH29	B	A - C, AC, CFA, SM, T - S	CFU, CP, GM, TC	0.56

* A - C, Amoxicillin þ Clavulanic acid; AC, Ampicillin; CFA, Cefachlor; CFU, Cefuroxime; CP, Chloramphenicol; GM, Gentamicin; SM, Streptomycin; TC, Tetracycline; T - S, Trimethoprim þ Sulfonamide. (Nikolaos *et al.*, 2009)

Table 17. Antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle and sheep feces and/or colon tissue samples

Number of <i>E. coli</i> O157:H7 isolates (%)						
Antibiotic (μ g disc-1)	R*	Cattle (n = 11)			Sheep (n = 14)	
		I	S	R	I	S
Ampicillin (AMP-10)		7 (63.63)	4 (36.36)		5 (35.71)	9 (64.28)
Cephazolin (KZ-30)			11 (100)			14 (100)
Cephalothin (KF-30)	4 (36.36)	7 (63.63)			10 (71.42)	4 (28.57)
Gentamicin (CN-120)			11 (100)			14 (100)
Amikacin (AK-30)		5 (45.45)	6 (54.54)		2(14.28)	12 (85.71)
Amoxicillin/clavulanic acid (AMC-30)		1(9.09)	10 (90.90)			14 (100)
Cefoxitin (FOX-30)		1(9.09)	10 (90.90)			14 (100)
Ceftriaxone (CRO-30)			11(100)		1(7.14)	13 (92.85)
Ciprofloxacin(CIP-5)			11 (100)			14 (100)
Imipenem (IPM-10)			11 (100)			14 (100)
Trimethoprim/sulphamethoxazole (SXT-25)			11 (100)			14 (100)
Chloramphenicol (C-30)			11 (100)			14 (100)
Kanamycin (K-30)		8 (72.72)	3 (27.27)		2(14.28)	12 (85.71)
Tetracycline (TE-30)			11 (100)		3(21.42)	11 (78.57)
Trimethoprim (W-5)			11 (100)			14 (100)
Sulphonamide compounds (S3-300)		3 (27.27)	8 (72.72)	1(7.14)		13 (92.85)
Ceftiofur(EFT-30)			11 (100)			14 (100)
Streptomycin (S-10)	1 (9.09)	10 (90.90)		1(7.14)	11 (78.57)	2 (14.28)
Nalidixic acid	1(9.09)		10 (90.90)		3 (21.42)	11 (78.57)
Sulphamethoxazole		7 (63.63)	4 (36.36)	2 (14.28)	7(50.00)	5 (35.71)

* R Resistant, I Intermediately resistant, S Susceptible

(Muammer *et al.*, 2010)

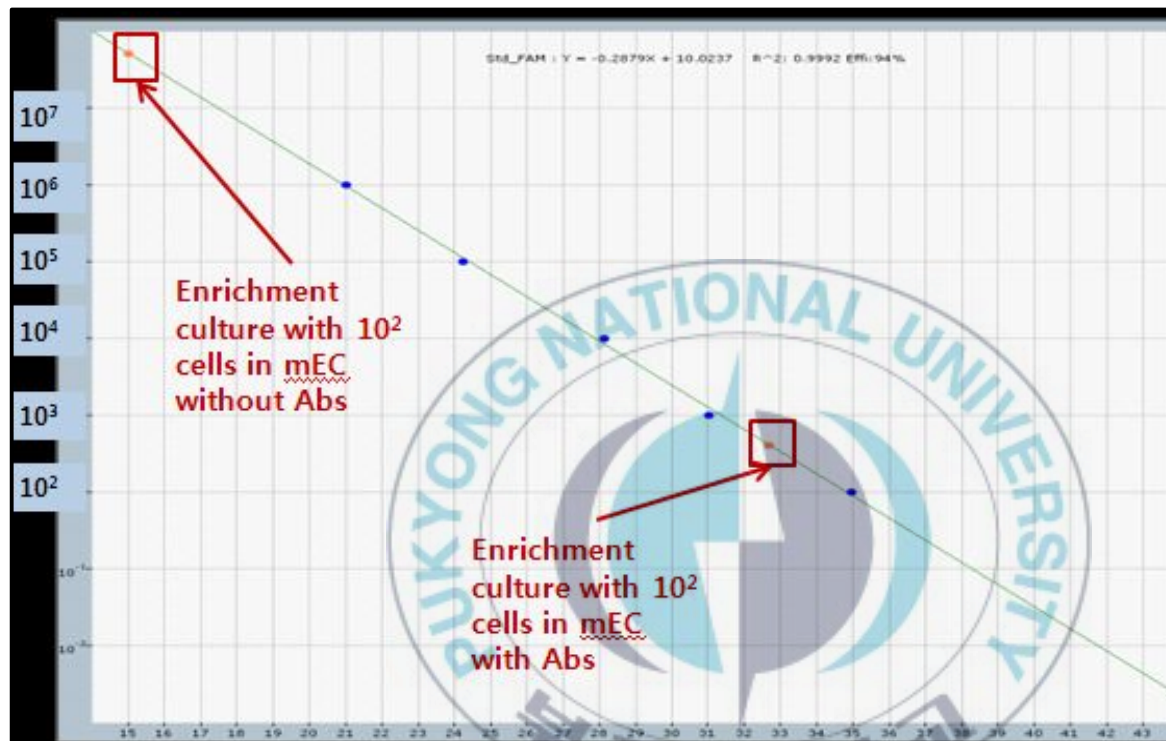


Fig. 8. Quantitative real-time PCR profile combined with enrichment culture supplemented with antibiotics. Cells were cultured in mEC broth in the presence or absence of tetracycline (20 $\mu\text{g/ml}$) and gentamicin (15 $\mu\text{g/ml}$).



Fig. 9. Fluorescence graph of *Escherichia coli* O157:H7 using real-time PCR combined with enrichment culture supplemented with antibiotics. Cells were cultured in mEC broth in the presence or absence of tetracycline (20 µg/ml) and gentamicin (15 µg/ml).

Table 18. Summary of *Escherichia coli* O157:H7 detection by real-time PCR combined with enrichment culture supplemented with antibiotics.

Sample Name	Probe Name	Type	Flu.Dye	Quencher	Ct	Concentration	Ct Threshold
NTC	Std_FAM	NTC	FAM	BHQ	Undetermined	–	2386
NTC	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.06	0	1140
STD5	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	21.01	10000	2386
STD5	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	26.53	0	1140
STD4	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	24.22	1000	2386
STD4	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.77	0	1140
STD3	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	28.13	100	2386
STD3	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	26.14	0	1140
STD2	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	31.03	10	2386
STD2	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	26.06	0	1140
STD1	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	34.95	1	2386
STD1	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.71	0	1140
blank 10 ²	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	15	507027.18	2386
blank 10 ²	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.92	0	1140
*Gen + **Tet 10 ²	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	32.69	4.08	2386
Gen + Tet 10 ²	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	26.11	0	1140

*Gen, gentamicin. **Tet, tetracycline. Cells were cultured in mEC broth in the presence or absence of tetracycline (20 µg/ml) and gentamicin (15 µg/ml).

5. 선택적 증균 배양과 병행한 real-time PCR을 이용한 *E. coli* O157:H7 검출법의 식품시료에의 적용

항생제를 이용한 선택적 증균 배양 결과를 바탕으로 이를 식품시료에 적용하는 실험을 진행하였다. *E. coli* O157:H7 감염증 발병의 대표적 원인 식품중의 하나인 쇠고기에서 real-time PCR 방법으로 검출 가능한 최소량의 *E. coli* O157:H7균 농도를 조사하기 위하여 농도별($10^{-3} \sim 10^2$ CFU/g)로 쇠고기 육에 균을 투입하여 mEC 배지에서 24 시간 증균 배양한 다음 DNA 추출 후 real-time PCR을 실시하였다. Real-time PCR 결과, 10^2 CFU/g, 10^1 CFU/g, 10^0 CFU/g 로 투입된 시료에서는 Ct value가 각각 27.55, 34.01, 41.26으로 나타났으나 10^{-1} CFU/g, 10^{-2} CFU/g, 10^{-3} CFU/g의 시료에서는 전혀 증폭되지 않았다. 이러한 결과는 식품 시료 중에서는 적어도 10^0 CFU/g 이상의 균이 존재해야 real-time PCR 방법으로 검출이 가능함을 확인하였다(Fig. 10, Fig. 11, Table 19). 이는 배지에서와는 달리 DNA 추출 시, 쇠고기 육 유래의 유전물질이 포함됨에 따라 target DNA (*E. coli* O157:H7 유전자)의 수율이 감소하여 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} CFU/g의 시료에서는 real-time PCR에 의해 검출되지 않은 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합해보면, 식품 시료 특히 쇠고기 육에서는 최소한 10^0 CFU/g 이상의 생균이 존재하면 증균 배양 후, real-time PCR 방법으로 *E. coli* O157:H7 검출이 가능하다는 것을 확인하였다.

이 결과를 바탕으로 식품시료 존재 하에서 *E. coli* O157:H7의 선택적 증균 배양이 가능한지 확인하기 위해 10^2 CFU/g의 균이 접종된 쇠고기 육을 tetracycline과 gentamicin이 함유된 mEC 배지 및 두 항생제가 없

는 mEC 배지에 각각 접종하여 증균 배양 후에 real-time PCR을 실행하였다. 그 결과 항생제 투입 군은 Ct 값이 33.21, 항생제 미 투입 군은 17.69로 배지 상의 결과와 큰 차이 없이 선택적 증균 배양에 의한 Ct value 의 차별화가 가능하였다(Fig. 12, Fig. 13, Table 20). 즉, 식품 시료에서도 항생제를 이용한 선택적 배양법을 병행한 real-time PCR 방법으로 *E. coli* O157:H7 균의 선택적 검출이 가능하다는 것을 확인하였다.

이상의 연구를 통하여, 식중독 세균 분석에서의 기존의 real-time PCR 기술이 가지고 있는 문제점인 사균, 손상된 세포 및 극미량의 DNA가 증폭이 되는 것에 대한 해결책을 본 연구에서 제시하였다. 추후, 본 연구 결과를 바탕으로 추가적인 연구를 실시하게 되면 real-time PCR을 이용한 유해 식중독 세균의 검출법의 도입이 가능할 것이라 기대된다.



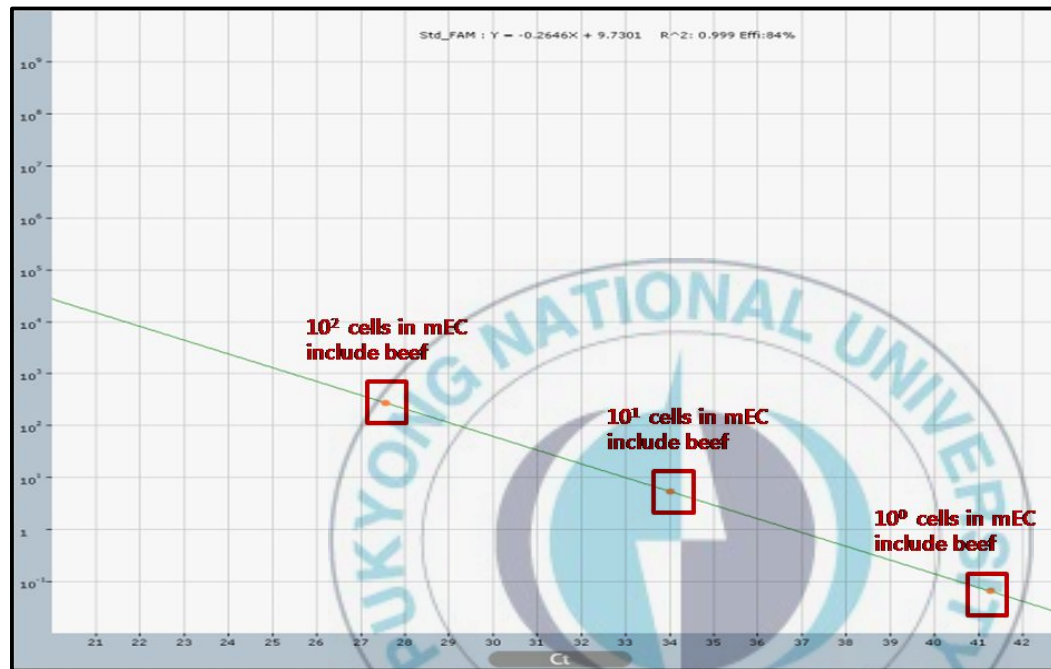


Fig. 10. Quantitative standard curve of real-time PCR with serially diluted *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *E. coli* O157:H7 cells were serially inoculated into ground beef (6.3×10^{-3} , 6.3×10^{-2} , 6.3×10^{-1} , 6.3×10^0 , 6.3×10^1 , and 6.3×10^2 CFU/g). After then, the inoculate ground beef was enriched in mEC medium at 35°C for 24 h.

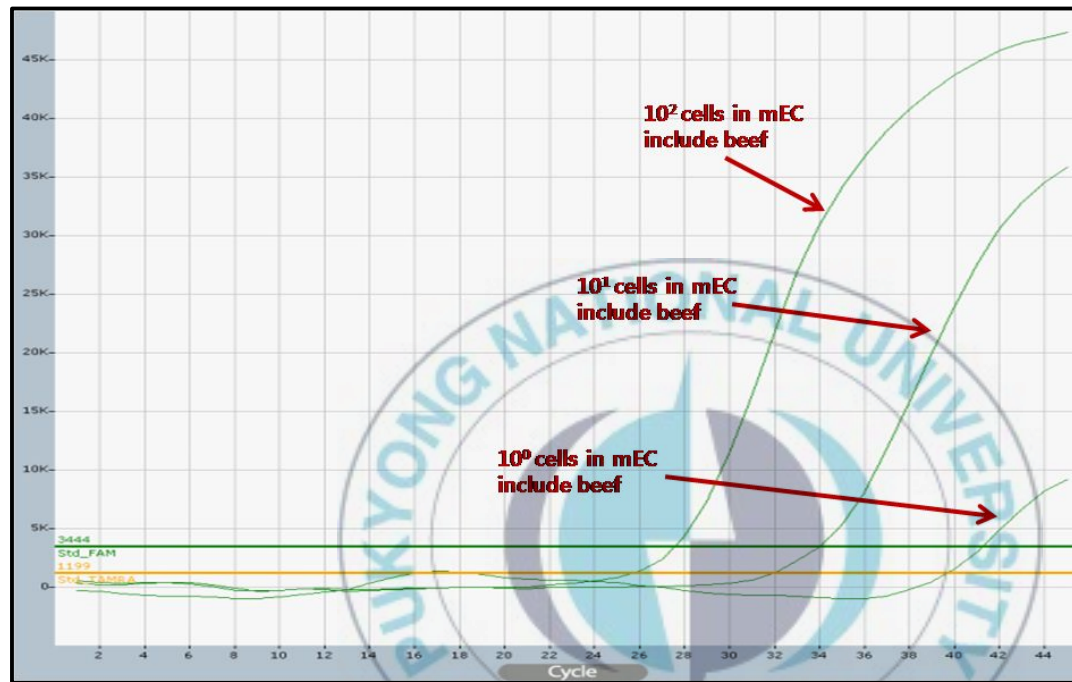


Fig. 11. Fluorescence graph of real-time PCR with serial diluted *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *E. coli* O157:H7 cells were serially inoculated into ground beef (6.3×10^{-3} , 6.3×10^{-2} , 6.3×10^{-1} , 6.3×10^0 , 6.3×10^1 , and 6.3×10^2 CFU/g). After then, the inoculate ground beef was enriched in mEC medium at 35°C for 24 h.

Table 19. Summary of real-time PCR with serial diluted *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef

Sample Name	Probe Name	Type	Flu.Dye	Quencher	Ct	Concentration	Ct	Threshold
NTC	Std_FAM	NTC	FAM	BHQ	Undetermined	-	3444	
NTC	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	23.21	0	1199	
STD5	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	21.98	10000	3444	
STD5	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	23.17	0	1199	
STD4	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	25.27	1000	3444	
STD4	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	23.85	0	1199	
STD3	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	28.94	100	3444	
STD3	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	23.49	0	1199	
STD2	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	32.8	10	3444	
STD2	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.07	0	1199	
STD1	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	37.06	1	3444	
STD1	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	23.76	0	1199	
10 ²	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	27.55	274.49	3444	
10 ²	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	23.18	0	1199	
10 ¹	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	34.01	5.37	3444	
10 ¹	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	23.31	0	1199	
10 ⁰	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	41.26	0.06	3444	
10 ⁰	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	23.44	0	1199	
10 ⁻¹	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	Undetermined	-	3444	
10 ⁻¹	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	23.5	0	1199	
10 ⁻²	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	Undetermined	-	3444	
10 ⁻²	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	23.18	0	1199	
10 ⁻³	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	Undetermined	-	3444	
10 ⁻³	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	23.72	0	1199	

E. coli O157:H7 cells were serially inoculated into ground beef (6.3×10^{-3} , 6.3×10^{-2} , 6.3×10^{-1} , 6.3×10^0 , 6.3×10^1 , and 6.3×10^2 CFU/g). After then, the inoculate ground beef was enriched in mEC medium at 35°C for 24 h.



Fig. 12. Quantitative standard curve of real-time PCR results in ground beef after enrichment culture in the presence or absence of antibiotics. *E. coli* O157:H7 cells were inoculated into ground beef (6.3×10^2 CFU/g). After then, the inoculated ground beef was enriched in mEC medium containing tetracycline and gentamycin or not at 35°C for 24 h.

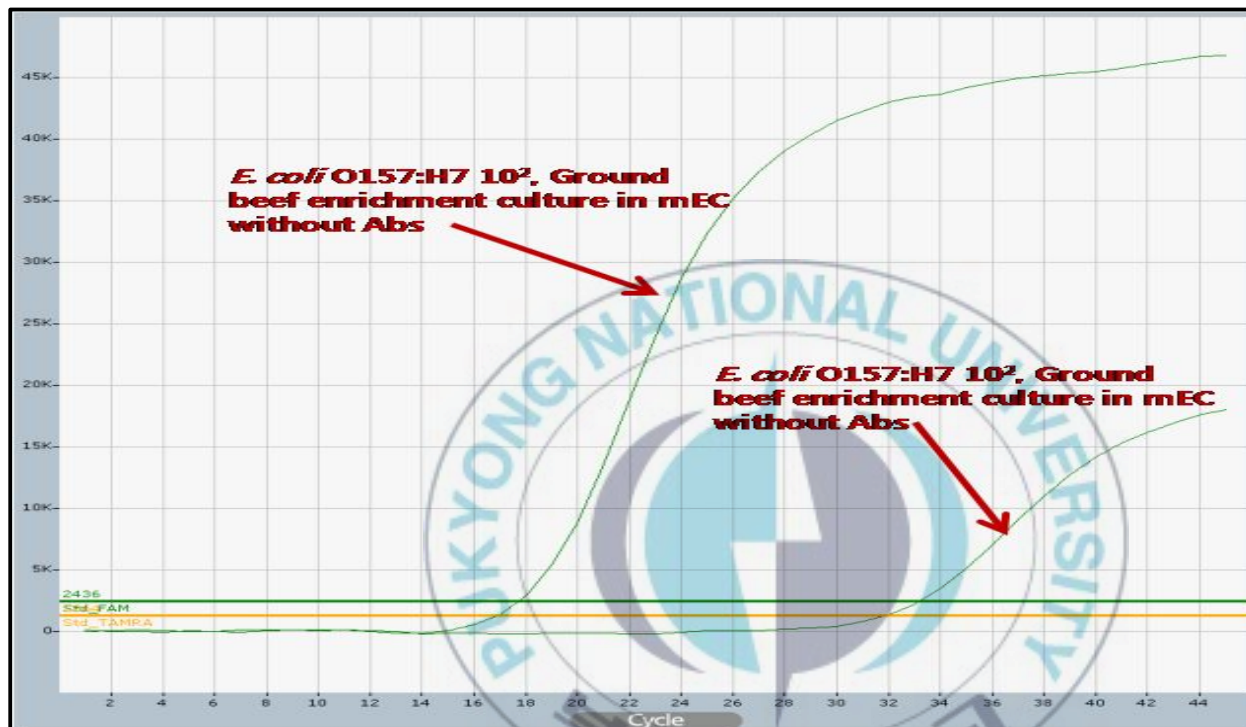


Fig. 13. Fluorescence graph of real-time PCR Results in ground beef after enrichment culture in the presence or absence of antibiotics. *E. coli* O157:H7 cells were inoculated into ground beef (6.3×10^2 CFU/g). After then, the inoculated ground beef was enriched in mEC medium containing tetracycline and gentamycin or not at 35°C for 24 h.

Table 20. Summary of real-time PCR results in ground beef after enrichment culture with antibiotics

Sample Name	Probe Name	Type	Flu.Dye	Quencher	Ct	Concentration	Ct Threshold
NTC	Std_FAM	NTC	FAM	BHQ	Undetermined	–	2436
NTC	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.38	0	1264
STD5	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	20.35	10000	2436
STD5	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.62	0	1264
STD4	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	24.23	1000	2436
STD4	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.26	0	1264
STD3	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	27.06	100	2436
STD3	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.01	0	1264
STD2	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	30.93	10	2436
STD2	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.23	0	1264
STD1	Std_FAM	STD	FAM	BHQ	34.71	1	2436
STD1	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.4	0	1264
BLK10 ² (beef)	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	17.69	56283.76	2436
BLK10 ² (beef)	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	25.17	0	1264
G-T10 ² (beef)	Std_FAM	Sample	FAM	BHQ	33.21	2.39	2436
G-T10 ² (beef)	Std_TAMRA	IPC	TAMRA	BHQ	24.9	0	1264

E. coli O157:H7 cells were inoculated into ground beef (6.3×10^2 CFU/g). After then, the inoculated ground beef was enriched in mEC medium containing tetracycline and gentamycin or not at 35°C for 24 h.

요 약

대표적인 식중독 세균인 *E. coli* O157:H7은 장관 출혈성 식중독을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 보통 부적절하게 조리된 쇠고기나 분변에 오염된 물의 섭취를 통해 감염된다. 질병유발 원인물질은 장관계에 심한 손상을 일으키는 verotoxin에 의한 것으로 추정하고 있고, 이 특성을 장관 출혈성 대장균의 확인법에 이용하고 있다. 현재, 식품공전에서 사용하는 식중독 세균의 검출방법은 시간이 많이 소요되고, 복잡한 과정을 거친다. 식중독 세균의 특정 DNA를 이용하는 PCR 기술은 기존의 방법에 비해 시간과 비용의 절감이 가능하므로 이에 관련된 많은 연구가 진행되어오고 있다. 그러나, 전통적인 PCR 기술은 정확성이 낮고, agarose-gel을 이용한 별도의 과정을 거쳐 결과를 확인해야하는 문제점을 갖고 있다. 이러한 과거의 PCR의 단점을 극복하기 위해 개발된 것이 real-time PCR이다. 과거의 PCR은 PCR 최종산물을 측정하기 때문에 지수적으로 증폭되는 구간의 모든 데이터를 알 수 없으나, real-time PCR은 형광적인 신호를 통해 실시간으로 DNA의 증폭과정을 확인할 수 있기 때문에 별도의 PCR 최종산물 측정 과정이 생략된다. 따라서 본 연구에서는 real-time PCR 기술을 이용한 *E. coli* O157:H7균의 검출에 대하여 연구 하였다. 먼저, *E. coli* O157:H7균의 특정 유전자를 증폭하는 primers 와 probes를 이용하여 *E. coli* O157:H7균의 선택적 검출이 가능한지 알아보기 위하여, *E. coli* O157:H7 균을 증균 배양하여 real-time PCR을 실시한 결과 Ct value가 26.04로 정확히 증폭되는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에 사용된 primer와 probe들이 *E. coli* O157:H7균에 대해서만 선택적으로 작용하는지를 검증하기 위해 비병원성 대장균과 대표적인 그람 양성, 음성의 장내세균 및 기타 세균들의 DNA를 추출하여 실

험해 본 결과 모두 증폭되지 않았다. 이는 본 연구에 사용한 *E. coli* O157:H7 검출을 위한 real-time PCR Kit가 *E. coli* O157:H7균에만 특이적으로 작용한다는 것을 의미한다.

식품시료에도 본 연구에서 real-time PCR Kit가 *E. coli* O157:H7균의 검출에도 사용가능한지를 조사하기 위하여 식품공전에서 *E. coli* O157:H7의 증균 배양에 사용하는 mEC 배지를 사용하여 증균 배양한 다음 실험 한 결과, 접종한 균수에 농도 의존적으로 target gene이 증폭되는 것이 확인되었다. 하지만, 생균이 존재하지 않아도 배양액 내의 극미량의 DNA에 의해서도 target DNA가 증폭 되었다. 이는 배지에 존재하는 극미량의 DNA나 손상된 cell, 사멸된 균에 의해서도 target gene의 증폭이 가능하다는 것을 의미한다. 사멸되거나 손상된 균, 극미량의 target DNA가 존재하의 증폭이 가능한지 확인하기 위해 동일한 균수에 인위적으로 각각 autoclave 처리균, HClO 처리균으로 실험을 진행한 결과 대조군, autoclave 처리균, HClO 처리균 모두 비슷한 양으로 증폭되는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 현재의 real-time PCR 방법의 경우 사균 또는 손상된 cell, 극미량의 target DNA가 분석시료(식품시료) 중에 존재하면 증폭되기 때문에 시료 중에 생균 상태의 식중독균이 존재하지 않더라도 유해세균 (또는 목적 세균)이 있는 것으로 분석되는 문제점이 있다는 것을 의미한다.

식품 분석에 있어서의 이러한 real-time PCR의 문제점을 해결하기 위하여 본 연구에서는 항생제(tetracycline, gentamicin)가 첨가된 mEC 증균 배지에서 *E. coli* O157:H7 균 배양 후 추출된 DNA로 real-time PCR을 실시하여 각 시료의 Ct 값을 비교하였다. 그 결과, 항생제 첨가 군과 항생제 무 첨가 군 간의 Ct 값에 큰 차이가 컸다. 이 실험으로 특정 항생제를 이용한 선택적 증균 배양과 real-time PCR을 병행한 방법으로 생균과 사균의 차별화

가 가능하다는 결과를 도출하였다. 항생제를 이용한 선택적 증균 배양 결과를 바탕으로 이를 식품시료에 적용하는 실험으로 *E. coli* O157:H7의 대표적인 매개식품인 쇠고기에 적용하여 선택적 증균 배양 후 real-time PCR 실행결과 배지 상의 실험과 마찬가지로 Ct 값의 차이가 커 식품 시료에 적용하여도 무리가 없는 것으로 판단되었다. 이러한 선택적 증균 배양을 병행한 real-time PCR 분석 기법은 향후 기존의 재래적인 방법 및 기존의 PCR 기법의 단점을 보완하여 real-time PCR 을 이용한 유해 식중독 세균의 검출법 도입이 가능할 것으로 기대된다.



감사의 글

어느덧 2년이라는 시간이 흘러 석사과정의 종지부를 찍으려 합니다. 힘들었던 시간들도 있었지만 지난 2년은 저를 학문적인 발전뿐만이 아니라 정신적인 성숙의 계기도 되었습니다. 저의 논문이 나오는데 도움을 주신 분들이 많았음에도 불구하고 일일이 찾아뵙고 감사드리지 못하는 점 용서를 구합니다. 가장 먼저, 오늘의 제가 있기까지의 모든 과정을 지켜봐주시고 때론 혼란스러워 할 때마다 정확한 방향을 제시해 주신 김영목 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 백마디의 감사하다는 말보다도 멋지고 훌륭한 사회인이 되는 것으로 교수님이 주신 은혜를 갚아 나가겠습니다. 그리고 학생의 입장에서 생각해 주시고 지도 해주신 이명숙 교수님께 감사드립니다. 진로에 대해 고민하고 있을 때, 교수님께서 제게 해주셨던 말씀은 평생 잊을 수 없는 추억으로 남을 것 같습니다. 학부 시절, 저를 실험실 이라는 곳으로 이끌어 주신 이근태 교수님께도 감사의 인사를 드리며, 논문이 나오기까지 따뜻한 격려와 가르침을 주셨던 조영제 교수님, 김선봉 교수님, 양지영 교수님, 전병수 교수님, 안동현 교수님, 이양봉 교수님께도 깊은 감사의 인사를 올립니다. 항상 저의 든든한 버팀목이자 멘토이신 박성민 선생님과 송호수 박사님께도 감사의 말씀을 전하며 아울러 화공실 시절부터 함께 동거동락 했던 김홍길, 손지원, 정현태, 백성윤, 이세광, 하균호 선배님 그리고 민혜옥, 최은화, 황은미, 양은희, 공주영, 류지은 후배님께도 감사의 인사를 전합니다. 그리고 힘들 때, 즐거울 때 함께했던 02학번 동기들 육군정, 주광희, 조재민, 신동원, 유대웅과 오늘의 결과가 있기까지 저를 물심양면으로 지원해주신 사랑하는 저의 보물들 식미방 식구 엄성환, 강민승, 황혜진 선배, 이윤경, 배향남, 이광덕, 박재홍, 박명철, 윤해원, 도형훈, 김유량, 노호준, 김승용, 정연중, 최은주, 최

지일, 강신국, 김덕훈, 백민정, 김선경, 김효진, 이은혜, 조지윤에게 감사의 말씀을 전합니다. 또한, 함께 식사 생활을 하며 2년간 가족보다 오랜 시간을 함께하며 미운정, 고운정 많이든 식사동기 송원선배, 조현아와 부족한 저를 친동생처럼 아끼고 사랑하고 보살펴 주신 임근식 선배님과 우순성 선배님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 논문이 나오기까지 기술적인 지원에 힘써주신 (주)바이오니아 지원팀에도 감사드립니다. 그리고 저의 베스트 김인탁, 박충희, 김형국, 이현영과 사랑하는 내 동생 김태준에게도 감사의 말씀을 드립니다. 마지막으로, 28년간 남부럽지않게 든든하게 지원해주시고 사랑해주신 자랑스러운 부모님께 감사드리며 사랑한다고 전하고 싶습니다.



참 고 문 헌

- Bellin T, Pulz M, Matussek A, Hempen HG, and Gunzer F. 2000. Rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 370-374.
- Bhagwat AA. 2004. Rapid detection of *Salmonella* from vegetable rinse-water using real-time PCR. *Food Microbiology*, 21, 73-78.
- Cebula TA, Payne WL, and Feng P. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 248-250.
- Das A, Spackman E, Senne D, Pedersen J, and Suarez DL. 2006. Development of an internal positive control for rapid diagnosis of avian influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 3065-3073.
- Doyle MP. 1991. *Escherichia coli* and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 289-302.

- Evans J, Wilson A, Willshaw GA, Cheasty T, Tompkins DS, Wheeler JG, and Smith HR. 2002. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* in a study of infectious intestinal disease in England. *Clinical Microbiology and Infection*, 8, 183-186.
- Funamori Y, Fujinaga Y, Yokota K, Inoue K, Hirai Y, Ogura K, Kira S, and Taketa K. 1999. Molecular typing of enterohemorrhagic isolated in Okayama Prefecture using pulsed field gel electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA. 1999. *Acta Medica Okayama*, 53, 193-200.
- Goncuoglu M, Ormanci FSB, Ayaz ND, and Erol I. 2010. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from cattle and sheep. *Annals of Microbiology*, 60, 489-494.
- Hodges JR and Kimbal AM. 2005. The global diet trade and novel infections. *Globalization and Health*, 1, 1-7.
- Jothikumar N and Griffiths MW. 2002. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays. *Applied and Environmental microbiology*, 68, 3169-3171.
- Karch H and Meyer T. 1989. Single primer for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 2751-2757.

- Kere'nyi M, Allison HE, Ba'tai I, Sonnevend A, Emo'dy L, Plaveczy N, and Pa'l T. 2005. Occurrence of *hlyA* and *sheA* genes in extraintestinal *Escherichia coli* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2965-2968.
- Kwak HS, Cha J, Kwang KJ, Kim H, Park SH, and Kim CM. 2000. Characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from domestic foods. *Journal of Food Hygiene Safety*, 15, 241-247.
- Malorny B, Paccassoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, and Helmuth R. 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7046-7052.
- Michino H, Araki K, Minami S, Sakai N, Miyazaki M, Ono A, and Yanagawa H. 1999. Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in school children in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology*, 50, 787-796.
- Nauschuetz W. 1998. Emerging foodborne pathogens; enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Clinical Laboratory Science*, 11, 298-304.
- O' Grady J, Sedano-Balbas S, Maher M, Smith T, and Barry T. 2008. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. *Food Microbiology*, 25, 75-84.

- Sarimehmetoglu B, Aksoy MH, Ayaz ND, Ayaz Y, Kuplulu O, and Kaplan YZ. 2009. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. *Food Control*, 20, 357-361.
- Saunders NA, Logan JMJ, and Edwards KJ. 2009. Real-time PCR : Current technology and applications. *Caister Academic Press*.
- Solomakos N, Govaris A, Angelidis AS, Pournaras S, Burriel AR, Kritas SK, and Papageorgiou DK. 2008. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. *Food Microbiology*, 26, 865-871.
- Thomas JM and Karl RM 2005. Food microbiology an introduction. *ASM Press*, 118-128.
- Uyttendaele M, van Boxtael S, and Debevere J. 1999. PCR assay for detection of the *E. coli* O157:H7 *eae*-gene and effect of the sample preparation method on PCR detection of heat-killed *E. coli* O157:H7 in ground beef. *International Journal of Food Microbiology*, 52, 85-95.
- Yoshitomi KJ, Jinneman KC, and Weagant SD. 2006. Detection of Shiga toxin genes *stx1*, *stx2*, and the +93 *uidA* mutation of *E. coli* O157:H7/H-using SYBR[®] Green I in a real-time multiplex PCR.

Molecular and Cellular Probes, 20, 31-41.

Kim HH. 1998. The Present World Status and Epidemiology of E. coli O157:H7 Human Infection. *Medical Postgraduates*, 26, 15-20.

www.wvdl.wisc.edu/PDF/WVDL.Info.PCR_Ct_Values.pdf

식품의약품안전청 2008. 식품공전. 10-8-14, 23, 24, 39.

