

인수공통전염병에 대한  
초정밀 진단법 개발 및 적용  
( Development and application of hypersensitive  
diagnosis system for zoonosis )

축산식품에서 병원균 분석방법의 최적화  
(Optimization of pathogens analysis method in meat)  
병원균 동시진단을 위한 비대칭 PCR 및 CE-SSCP 기술 개발  
(Development of asymmetry PCR and CE-SSCP for pathogen simultaneous diagnosis)  
병원균의 초정밀 정량분석 방법 개발  
(Development of hypersensitive quantitative analysis of pathogen)

이화여자대학교 산학협력단

농림수산식품부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “인수공통전염병에 대한 초정밀 진단법 개발 및 적용에 관한 연구” 과제 (세부과제 “축산 식품에서 병원균 분석방법의 최적화” 와 협동 연구과제 “병원균 동시진단을 위한 비대칭 PCR 및 CE-SSCP 기술 개발”, “병원균의 초정밀 정량분석 방법 개발” 에 관한 연구) 의 보고서로 제출합니다.

2009년 6월 25일

주관연구기관명 : 이화여자대학교  
주관연구책임자 : 오상석  
세부연구책임자 : 오상석  
협동연구기관명 : 포항공과대학교/  
(주)푸드사이언스  
협동연구책임자 : 정규열/박진현

## 요 약 문

### I. 제 목

인수공통전염병에 대한 초정밀 진단법 개발 및 적용에 관한 연구

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

인수공통전염병(Zoonosis)은 1952년 세계보건기구(World Health Organization: WHO) 전문가 회의에 의해 “척추동물과 사람 사이 자연적으로 전파하는 질병 또는 감염”으로 정의되었고, 현재 알려진 200여 종의 인수공통 전염병 중 인간과 밀접한 관계에 있는 주요 질병만 100여 종에 이른다. 인수공통전염병의 다양한 매개체이자 주요 감염대상인 가축은 최종적으로 식품으로 인해 섭취하게 되어 가축 내 임상증후가 없었을 경우라도 인간에게 큰 위해가 될 수 있다. 실제로 대부분의 인수공통전염병의 발생현황 사례의 경우 전염이 된 축산물의 섭취 등을 통해 감염되었으며, 이들 감염 형태는 가축 가공품과 음식이 대량화되면서 피해 규모가 대형화 되고 있다.

이에 본 연구는 동물을 매개로 사람에게 전염되는 인수공통전염병 병원균을 모세관 전기영동 단일쇄 형태변환 다형성 방법을 이용한 동시적인 분석을 통해 빠르고 간편하게 정량 분석하는 기술을 개발하여 농촌의 소득증대 및 국민 건강에 이바지 할 수 있을 것이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

총 10종의 인수공통전염병 원인균 유전자를 확보하여 각 균주의 16S rRNA에 상응하는 특이적 PCR primer를 설계하고, 단일쇄 형태변환 다형성장치를 위한 PCR 조건을 확립하여, 모세관 전기영동장치를 통해 동시에 분석할 수 있는 초정밀 진단법 및 정량분석 방법을 개발한다. 개발된 방법은 식품에 적용하여, 식품 중 분석이 가능한 분석법으로 확립한다.

#### IV. 연구개발결과

병원균 동시 진단을 위한 비대칭 PCR 및 단일쇄 형태변환 다형성 장치를 위한 PCR 조건을 확립, 모세관 전기영동 장치를 통해 병원균의 초정밀 정량 분석 기술을 개발 하였고, 이를 축산식품에 적용하여 식품에서의 병원균 분석방법을 최적화 하였다. 이 기술을 통해 실제 식품에서 5종의 식중독균을 5시간 이내에 Cell농도  $10^1-10^3$  CFU/ml에서 동시분석 하였다.

#### V. 연구 성과 및 성과활용 계획

빠르고 정밀한 진단 기술의 확립을 통해 인수공통전염병의 조기 진단 등 위해성에 대한 효과적인 대처방안으로 활용 가능하다. 또한 기존 분석방법과 달리 정량적인 분석으로 감염에 대한 적절한 대응을 통해 국민 건강을 증진할 수 있으며, 최신 BT산업의 도입으로 상대적으로 높은 산업화 가능성, 효율적 인재 양성 등 경제적 파급효과를 창출한다.

## SUMMARY

### I. Title

Development and application of hypersensitive diagnosis system for zoonosis

### II. Objectives & necessity

Zoonosis is "an infectious disease that can be transmitted from other vertebrates, both wild and domestic, to humans or from humans to vertebrates", which defined in WHO at 1952. Over 200 known zoonosis, one hundreds of disease are closely related with humans. Domestic animals which could be taken by humans are important sources of zoonosis, so they can be threats though the animals didn't show any clinical symptoms. In fact, almost all cases of zoonosis were caused from infected stock farm products, and infection to humans were increased by mass production of stock farm products.

In this research, development of pathogenic bacteria detection technique which cause zoonosis will be settled with capillary electrophoresis-based single strand conformation polymorphism in multiplex, rapid, simple, and hypersensitive manner.

### III. Point of research

Develop the hypersensitive and multiplex detection methods with CE-SSCP by design of specific primer and settle the PCR condition for 16S rRNA of 10 zoonosis-causing pathogenic bacteria. The technique will be applied to stock farm products.

### IV. Results

To detect various pathogenic bacteria in the same time with CE-SSCP, condition for asymmetric multiplex PCR technique was settled. With this technique, hypersensitive quantitative detection of pathogenic bacteria was successfully done for 5 zoonosis-causing bacteria in food sample for 5 hours with  $10^1$ – $10^3$  CFU/ml cell concentration.

## V. Outcomes & Applications

By settlement of rapid and sensitive diagnosis technique, result of this research can be the countermeasure of harmful pathogens like zoonosis-causing bacteria. Furthermore, rapid and quantitative detection can be done unlike traditional detection techniques. By those features, health of nation can be promoted, and economical ripple effects can be expected.

# CONTENTS

Document for submission .....	1
Abridgement .....	2
SUMMARY .....	4
CONTENTS(English) .....	6
CONTENTS(Korean) .....	8
Chapter 1. Introduction .....	10
Section 1. Object for research and development .....	10
Section 2. Need for research and development .....	10
가. Technical aspect .....	10
나. Economic and industrial aspect .....	11
다. Social and cultural aspect .....	12
Chapter 2. Present view of technology in domestic and foreign countries ....	15
Section 1. Present view of technology in Korea .....	15
Section 2. Present view of technology in foreign countries .....	18
Chapter 3. Contents and results of research .....	20
Section 1. Results of research : Optimization of pathogens analysis method in meat .....	21
1. DNA isolation and multiplex PCR .....	21
가. Materials .....	21
나. Methods .....	22
다. Results .....	24
2. Simultaneous analysis using CE-SSCP .....	31
가. Materials and methods .....	31
나. Results .....	32
3. Application of pathogen analysis in meat .....	37
가. Materials and methods .....	37
나. Results .....	37
Section 2. Results of research : Development of asymmetry PCR and CE-SSCP for pathogen simultaneous detection .....	43

1. Genomic DNA analysis using CE-SSCP .....	43
2. Simultaneous pathogen detection and quantitative analysis using separated two step .....	44
가. Summary .....	44
나. Specific primer design for pathogens .....	46
다. Genomic DNA isolation and PCR .....	46
라. Simultaneous detection .....	47
마. Quantitative analysis .....	48
3. Pathogen diagnosis using template switching, universal primer and asymmetry PCR .....	50
가. Summary .....	50
나. Production of simulation using <i>in vitro</i> transcription .....	53
다. Template modification and PCR .....	54
4.. Polymetric matrix study on improving CE-SSCP resolution and quantitative analysis .....	66
가. Needs for new polymer matrix and research subject .....	66
나. Test of various PEO-PPO-PEO and optimal condition inquiry .....	67
Section 3. Results of research: Development of hypersensitive quantitative analysis of pathogen .....	78
1. Simultaneous detection .....	78
2. Limit of detection .....	83
3. Quantitative analysis .....	83
Chapter 4. Achievement and contribution .....	86
Section 1. Achievement .....	86
Section 2. Contribution .....	87
Chapter 5. Application and utility .....	89
Chapter 6. Oversea information .....	90
Chapter 7. References .....	92



# 목 차

제 출 문 .....	1
요 약 문 .....	2
SUMMARY .....	4
CONTENTS .....	6
목 차 .....	8
제 1장. 연구개발 과제의 개요 .....	10
제 1절. 연구개발의 목적 .....	10
제 2절. 연구개발의 필요성 .....	10
제 1항. 연구개발의 목적 .....	10
가. 기술적 측면 .....	10
나. 경제• 산업적 측면 .....	11
다. 사회• 문화적 측면 .....	12
제 2장. 국내외 기술개발 현황 .....	15
제 1절. 국내관련 기술의 현황 및 개발수준 .....	15
제 2절. 외국 관련 기술의 현황 및 개발 수준 .....	18
제 3장. 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	20
제 1절. 연구결과 I: 축산식품에서의 병원균 분석방법의 최적화 .....	21
제 1항. DNA분리 및 multiplex PCR .....	21
가. 실험재료 .....	21
나. 실험방법 .....	22
다. 실험결과 .....	24
제 2항. CE-SSCP를 통한 동시 분석 .....	31
가. 실험재료 및 방법 .....	31
나. 실험결과 .....	32
제 3항. 병원균 분석법의 식품적용 .....	37
가. 실험재료 및 방법 .....	37
나. 실험결과 .....	37
제 2절. 연구결과 II: 병원균 동시 진단을 위한 비대칭 PCR 및 CE-SSCP 기술 개발 .....	43
제 1항. 모세관 전기영동과 결합된 단일쇄 형태변환 다형성을 이용한 유전자 분 석 .....	43

제 2항. 분리된 두 단계를 통한 병원균의 동시 검출 및 정량 분석기술	44
가. 개요	44
나. 목표 병원균에 특이적 프라이머의 제작	46
다. 게놈 DNA의 정제 분리 및 PCR	46
라. 동시 검출 실험	47
마. 정량 분석 실험	47
제 3항. Template switching 및 공통 프라이머, 비대칭 PCR을 사용한 병원균 동시 진단 기술	50
가. 개요	50
나. <i>in vitro</i> transcription을 이용한 모의실험 대상 제작	53
다. Template modification 및 PCR	54
제 4항. CE-SSCP resolution 및 정량성 향상을 위한 polymer matrix 연구	66
가. 새로운 polymer matrix 도입의 필요성 및 연구 대상	66
나. 다양한 PEO-PPO-PEO의 시험 및 최적 가동조건 탐색	67
제 3절. 연구결과Ⅲ: 병원균의 초정밀 정량분석 방법 개발	78
제 1항. 동시 검출	78
제 2항. 검출 한계	83
제 3항. 정량 분석	83
제 4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	86
제 1절. 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도	86
제 2절. 관련분야의 기술 발전에의 기여도	87
제 5장. 연구개발 결과의 활용계획	89
제 6장. 연구개발과정에서 수집한 국내외 과학 기술 정보	90
제 7장. 참고문헌	92

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

본 연구는 모세관 전기영동 및 multiplex PCR 을 기반으로 한 단일쇄 형태변환 다형성 기술을 이용하여 단시간 내 최대한 많은 병원균 주(5종 이상)를 동시분석하는 기술을 개발하여, 인수공통전염병 중 식중독 유발균 에 적용, 개발된 동시분석 방법을 실용적으로 이용하기 위한 축산식품 분석방법 개발함으로써 , 동물을 매개로 사람에게 전염되는 인수공통전염병 병원균을 모세관 전기영동-단일쇄 형태변환 다형성방법을 이용한 동시적인 분석을 통해 빠르고 간편하게 정량 분석하는 기술을 개발하여 농촌의 소득증대 및 국민 건강에 이바지 하는 것을 목적으로 한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 제 1 항 연구개발의 필요성

#### 가. 기술적 측면

◆ 각종 병원성 박테리아 또는 바이러스에 의한 감염성 질환은 각종 항생제의 지속적인 개발에도 불구하고 인적 물적 교류가 확대됨에 따라 조기진단 및 신속한 대응에 대한 필요성이 증대되고 있다. 특히, 탄저병과 같이 치명적인 감염성 질환을 유발하는 병원균을 이용한 생물학전에 대비한 신속하고 정밀한 진단기술은 국민 건강에서 나아가 안보적 차원에도 매우 중요하다.

◆ 대부분의 감염성 질환의 경우, 조기진단 및 조기처방이 치료의 핵심이며 이는 감염 초기에 정확하게 진단할 수 있는 진단 기술이 필수적이다. 특히, 정밀하고 신속한 진단 기술은 조기진단 뿐 아니라 치료 후, 질병의 예후에 대한 정확한 분석 및 처방에도 도움을 준다.

◆ 빠르고 정확한 진단 기술의 개발은 다른 신약 개발 사업과는 달리, 높은 기술력과 적은 자본으로 쉽게 사업화할 수 있는 장점이 있으며, 사업화까지 여러 단계의 임상 테스트가 필요하지 않아 짧은 시간 내에 사업화할 수 있다는 점에서 혁신 기술 개발 사업으로 적합하며, 선진 기술력을 바탕으로 한 고급 기술 인력양성은 국가 산업 발전의 원동력이 될 것이다.

◆ 개별적인 인수공통전염병 병원균에 반응하는 특이적 primer 설계는 모든 균주에

동일하게 부착하여 증폭을 유발하는 universal primer 와 달리 개별 균주의 특이적 유전자에 반응하는 특이적인 primer를 설계하여 본 기술의 검출 정확성을 향상시킨다.

◆ CE를 통한 병원균의 정량분석은 기존의 Gel electrophoresis 상에서 band 위치 확인을 통해 정성적으로 존재 여부만을 확인하던 기존의 분석방법과 달리, 민감한 capillary electrophoresis 방법을 통해 정량적 분석이 가능하게 한다.

◆ Multiplex PCR 과 결합한 모세관 전기영동 및 단일쇄 형태변환 다형성 기술을 이용하여 각 인수공통전염병 병원균의 동시분석 단시간 내 최대한 많은 병원균 주 (5종 이상)를 동시적으로 분석이 가능하게 함으로써 gel 상에서 밴드의 위치로 확인해 분석하는 기존의 multiplex PCR 방법보다 획기적으로 빠르게 다양한 인수공통 전염병 병원균의 동시적인 분석이 가능하도록 하며, 자동화된 기기로 많은 샘플을 한꺼번에 분석할 수 있을 뿐 아니라 정량 분석이 가능하다는 매우 큰 장점을 지니고 있다.

◆ 개발된 동시분석 방법을 실용적으로 이용하기위해 확립된 동시적 분석법을 활용하여 식품에 접종된 균주에서 유사한 분석 활성을 보일 수 있는 신속 정확한 분석법 확립함으로써 이의 산업화를 가능하게 한다.

◆ 또한 도축장에서 샘플링 등을 통한 현장 적용 시험을 거쳐 개발된 분석 기술의 효능을 검증하여 Multiplex PCR과 결합한 CE-SSCP를 통해 각 인수공통전염병 병원균의 동시분석을 가능하게 한다.

#### 나. 경제• 산업적 측면

◆ 증가하는 내성 병원균과 범세계적인 인적 물적 교류 등으로 인해, 감염성 질환에 대한 위협성을 증대되어 가고 있으나 그것에 효과적으로 대처하기 위한 진단 기술은 순수배양과 PCR 기반의 클로닝, 유전자 서열분석 등을 포함하는 유전자 서열 분석기반의 병원균 동정법에 의한 것이 가장 최선의 기술로 여겨지고 있다. 그러나 이 기술들은 적어도 수일이 소요되므로, 전염병에 대한 효과적인 대응을 하기에는 미흡한 실정이다. 이에 보다 신속하고 정밀한 진단이 시급하며 이를 위한 기술개발이 필수적이다.

◆ 2007년 2월 과학기술부에서 발표한 자료에 따르면 250여 종의 인수공통전염병 중 대응이 시급한 3대 전염병으로 조류 인플루엔자, 브루셀라, 공수병을 선정하고 이를 대응하기 위한 범정부 R&D 정책 수립을 마련하고자 하였는데, 이와 같은 정

책의 일부로 “신속 대응 기술의 개발”이 필수적임을 밝히고 있어 본 기술과 같은 첨단 BT기술의 개발은 인수공통전염병에 대한 예방 및 대처 능력의 확보를 위해 필수적이다.

#### 다. 사회• 문화적 측면

◆ 인수공통전염병(Zoonosis)은 1952년 세계보건기구(World Health Organization: WHO) 전문가 회의에 의해 “척추동물과 사람사이 자연적으로 전파하는 질병 또는 감염”으로 정의되고 있으며, 현재 200여 종의 인수공통 전염병이 알려져 있다. 그 중 인간과 밀접한 관계에 있는 주요 질병만도 100여 종 이상으로 보고되고 있다. 인수공통전염병은 변이성과 적응성이 매우 빠른 것이 특징으로 지속적으로 인간에게 신종전염병을 제공하는 발생원으로 작용할 가능성이 있어 국민건강에 큰 위협요인으로 작용하고 있다.

◆ 인수공통전염병은 병원체, 전파방식, 인간과의 친숙도 등 여러 가지 기준에 따라 분류 가능하며 동물역학 국제사무소 (International Office of Epizootics: OIE)는 사회경제적 및 공중보건학적 중요성을 고려하여 크게 3가지로 분류하였으나, 2004년 육상동물위생규정 (Terrestrial Animal Health Code)부터는 단일목록으로 발표하고 있다.

◆ 인수공통전염병의 동물과 사람에게 미치는 위해성을 고려한 분류에 의하면 1) 공수병 및 탄저병 등 사람과 동물 모두에게 위해가 크고 국경에 상관없이 빠르게 전파되는 질병, 2) Foot & Mouse disease, Newcastle disease 등과 같이 동물에게 유해하나 사람에게 위해성이 낮은 질병, 3) 브루셀라증, Q열과 같이 동물에게는 증상이 약하나 사람에게 위해도가 큰 질병과 같이 크게 3가지로 나눌 수 있다. 특히 이 중 1)번 분류는 위해도가 매우 크고 3)번 분류는 국민 건강에 미치는 영향력이 매우 크므로 그 중요성이 강조된다.

◆ 전 세계적으로 최근 10년간 새로 언급되고 있는 주요 질병 중 75%가 동물과 축산물로부터 발병되었다는 보고는 인수공통전염병은 여전히 국민건강에 위해성이 높다는 것을 시사한다. 현재 국내에서 가축 숙주로 인한 인수공통전염병 발병 사례의 경우, 공수병, Q열, 탄저병, 리스테리아증, 결핵, 파스튜렐라병 등이 있으며, 야생동물 숙주에 의한 발병 사례로는 일본 뇌염, 공수병, 발진열, Q 열, 브루셀라증, 야생토끼병, 리스테리아증, 렙토스피라증, 사상충병 등이 있다.

◆ 우리나라에서 최근 5년간 인수공통전염병의 발병사례는 다음 표 1과 같다. 인수공통전염병은 축산농가 및 수의사 등 동물과 밀접한 관계에 놓인 사람에게 전염 가능성이 가장 높지만, 최종적으로 축산물 등 식품을 통해 불특정 다수의 소비자의 안전에 위협을 끼칠 수 있기 때문에 매우 위험한 질병으로 분류되고 있다.

◆ 탄저병(Anthrax)나 공수병 등의 중증 감염은 동물의 예방 접종 등 예방 대책을 철저히 하여 그 감염률이 매우 적으나, 경증인 감염은 우리나라뿐 아니라 선진국에서도 높은 발생률이 보고되고 있다. 이는 가축의 경우 그 수명이 짧고 면역성이 없는 동물이 많아 감염이 계속해서 생기며, 집단사육으로 인해 감염이 무리 전체에 퍼지기 쉽고, 감염 동물이 임상 소견을 보이지 않는 경우가 있어 예방 및 빠른 진단이 어렵기 때문이다.

표 1. 최근 5년간 법정 전염병 중 인수공통전염병의 발생 현황

	2002	2003	2004	2005	2006
장출혈성대장균 감염증	8	52	118	43	37
결핵	32,010	30,687	31,503	35,269	35,361
발진열	9	9	19	35	73
쯔쯔가무시증	1,919	1,415	4,697	6,780	6,480
렙토스피라증	122	119	141	83	119
브루셀라증	1	16	47	158	215
탄저병	-	-	-	-	-

◆ 동물 매개성 전염병은 이와 같이 사람에게 질병을 야기해 국민건강에 위협을 끼침과 동시에 매개체인 동물의 후처리로 인해 축산 농가 및 국가에 막대한 경제적 손실을 안겨주고 있다. 현재 인수공통전염병에 대한 가장 빠르고 효과적인 해결방안은 해당 가축의 도축으로 이에 따른 피해액은 매년 높은 수준을 차지하고 있다.

◆ 또한, 2007년 한국농촌경제연구원에서 발표한 “가축질병의 경제적 영향 분석” 보고서에 의하면 가축질병 발생으로 인한 경제적 피해 규모는 축산물 생산액의 약 20% 정도로 추정되며 생산 감소와 치료비 등 직접적 손실 외에도 방역, 질병 치료 비용 및 축산물 수급 차질 등 간접적 손실을 고려할 시 그 피해액은 보다 증가될 것으로 보고 있다. 실례로 소 브루셀라병의 경우 2005년에 약 2만 2,000마리가 살처분되어 최대 3,423억 원의 사회 후생이 감소하였으며, 농림부의 발표 자료에 의하면 2007년 9월 누계 소 브루셀라병의 발생 농가는 1천 835농가, 8천 944마리로 전체

농가에 매우 부정적인 영향력을 행사하고 있다.

◆ 또한 인수공통전염병의 다양한 매개체이자 주요 감염대상인 가축은 최종적으로 식품으로 인해 섭취하게 되어 가축 내 임상 증후가 없었을 경우라도 인간에게 큰 위해가 될 수 있다. 실제로 대부분의 인수공통전염병의 발생현황 사례의 경우 전염이 된 축산물의 섭취 등을 통해 감염되었으며, 이들 감염 형태는 가축 가공품과 음식이 대량화되면서 그 피해의 규모가 대형화될 수 있다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내관련 기술의 현황 및 개발수준

◆ 국내의 진단기술은 면역학, 분자생물학, 유전공학 등의 생명공학 분야 학문이 1980년대부터 급속히 발전하고 진단기술에 적극적으로 활용되면서 더욱 빠르게 발전하고 있다.

◆ 생명공학분야의 발전으로 진단기술로의 발전으로 이어져 면역분석(Immunoassay) 기술, DNA Probe 기술(Oligonucleotide Probe Based on Fluorescence Quenching 또는 DNA Probe In Situ Hybridization), 유전자 증폭기술(Gene-amplification Technology), DNA Chip 기술 등을 이용한 다양한 분석방법으로 응용되고 있다.

◆ 2007년 삼성에버랜드에서 multiplex PCR 을 통해 다양한 식중독균을 동시에 분석하는 방법을 정립한 후 국제위생학회(IAFP) 및 학술지, Journal of food protection에 발표 하였다. 이 방법에 의해 *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Samonella* 가 동시적으로 분석되었다.

◆ 포항공대(세부과제 책임자)에서는 개별 미생물에 대한 항생활성을 한 번의 분석을 통해 동시에 측정 할 수 있는 기술을 개발하여 특허출원을 하였다.

◆ 그 밖에 분자생물학 기법을 이용한 다양한 진단기술방법이 응용되고 있으나(표 2), 기술은 기존 면역분석방법의 민감도가 떨어지는 단점과 병원균을 배양하지 않아도 되며, 미량 감염 시 진단할 수 없다는 단점을 보완하여 고감도의 분석기술로 빠르게 조기 진단이 가능하게 되었다.



표 2. 분자생물학적 진단 기술

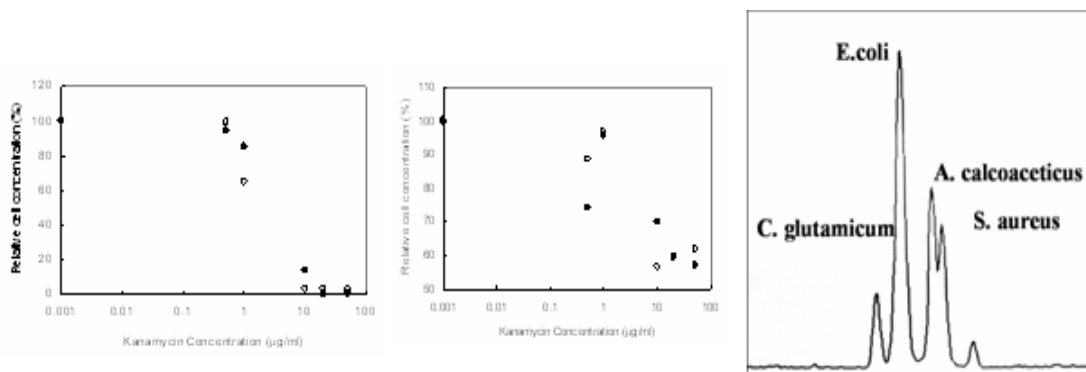
기술	원리 및 특징
Pulsed-Field Gel Electrophoresis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pulsed-field 전기영동 상에서 유전자들의 분자량 및 형태학적인 특성에 의해 분리</li> <li>- 특수제 효소 사용</li> </ul>
Hybrid Capture System	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Probe를 표적 유전자와 결합시킨 후 항체흡착 튜브에서 항원-항체반응을 이용하여 검출하는 원리</li> </ul>
Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 검체의 single-stranded DNA 또는 RNA를 형광표지 probe와 결합시켜 표적유전자를 검출</li> <li>- 유전자 발현부위 확인, 조직특이 m-RNA 전사분석 염색체 mapping 유전자 변이 조사, 바이러스 감염진단 등에 사용</li> </ul>
Peptide Nucleic Acid Technology	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Probe로 표적유전자와 보합결합 할 수 있는 핵산염기를 함유하는 peptide-like peptide nucleic acid 분자를 사용</li> </ul>

◆ 관련기술에 대한 신청연구팀의 선행연구결과

○ 항생활성 동시 분석 실험 수행

- CE-SSCP 응용 기술의 하나로, 기존의 broth dilution assay 등 개별적인 미생물에 대해서 개별적으로 측정함으로써 많은 노력과 시간을 필요로 하는 항생 분석 기술 대신, 여러 종의 미생물이 혼합되어 있는 미생물 군집에 항생제를 직접 투여하고 개별 미생물에 대한 항생활성을 한 번의 분석을 통해 동시에 측정할 수 있는 기술을 개발하여, *Electrophoresis* 에 등재됨으로 공신력을 인증 받았고(별첨참조), 국내 특허 출원하였다.

- 이러한 기술은 여러 종의 미생물에 대한 항생 활성을 동시에 측정하여 분석의 효율을 높여 줄 뿐만 아니라, 높은 민감성 등으로 인해, 환자의 감염부위의 미량의 샘플을 이용해 직접 미생물에 대한 항생반응을 모니터링 함으로써, 항생 처방의 정확한 예후를 관찰하고 적절한 처방을 하도록 도와줄 수 있는 기술을 확보하였다 (그림 1).



Antibiotics Strain	Kanamycin		Spectinomycin		Streptomycin	
	PCR-SSCP	Broth dilution	PCR-SSCP	Broth dilution	PCR-SSCP	Broth dilution
<i>E. coli</i>	10	10	50	50	ND	ND
<i>A. calcoaceticus</i>	10	10	20	20	5	5
<i>C. glutamicum</i>	0.5	0.5	50	50	5	5

그림 1 .단일쇄 형태변환 다형성 기술을 이용한 항생제 활성측정 기술

○주요 식중독균 동시분석 수행

- 우리나라 식중독 발생원인의 약 93%를 차지하는 주요 식중독균 다섯 가지 항목을 PCR 과 결합된 CE-SSCP 를 통해 동시적으로 분석하였다. 다섯 가지 균은 *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* 및 *Bacillus cereus* 이며(그림 2), DNA 구조가 매우 유사한 *E. coli* 와 *Salmonella* 의 분리가 가능했다는 점에서 이 실험의 의의가 높다고 볼 수 있다. 본 실험은 *Food Control* 에 등재됨으로 공신력을 인증 받았다(별첨참조).

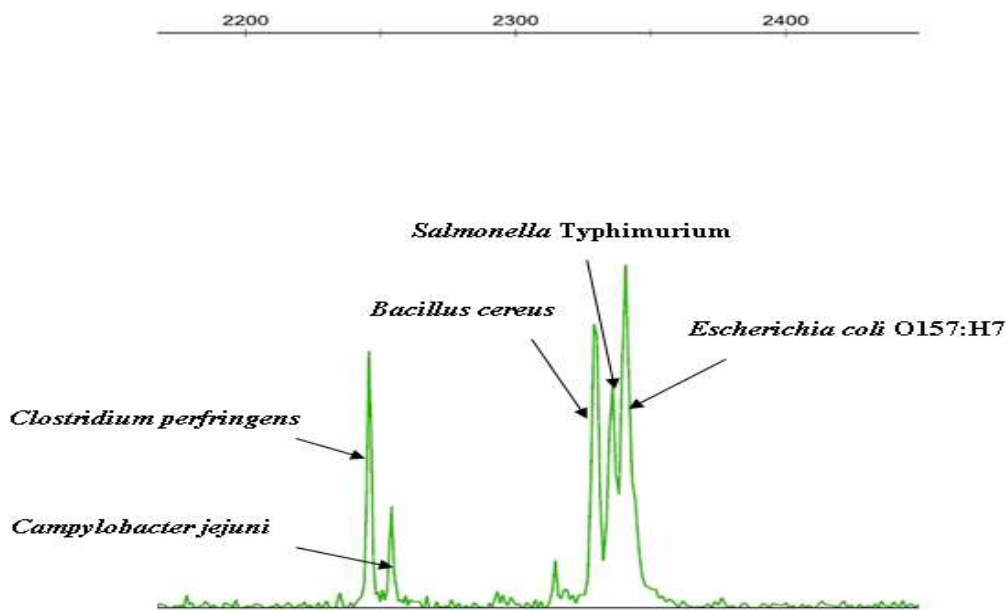


그림 2. 단일쇄 형태변환 다형성 기술을 이용한 식중독균 동시분석

## 제 2 절 외국 관련 기술의 현황 및 개발 수준

개념정립 단계		기업화 단계	√	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

- 본 기술인 단일쇄 형태변환 다형성(SSCP: single-strand conformation polymorphism) 기술은 denaturing HPLC 등과 더불어 대표적인 genotyping 기술의 하나로 개발되었다. 기본 원리는 서로 다른 서열의 denatured된 유전자 단편을 neutral gel에서 전기영동을 수행하였을 경우, 각각의 단일쇄가 서열에 따라 서로 다른 conformation을 형성함으로써, 이로 인하여 mobility가 달라지고 각각의 conformation은 neutral gel의 running 조건이 동일할 경우, 항상 일정하므로, mobility는 각 단일쇄의 염기서열에 따라 고유한 성질을 갖게 된다. 이러한 특성을 이용하여 서로 다른 유전자나 유전자들의 돌연변이를 분석하는 데에 사용되어져 왔다.

- 좀 더 최근에 연구되기 시작한 Capillary electrophoresis를 이용한 SSCP (CE-SSCP) 법은 보다 정밀한 분석을 위하여 CE의 운전조건을 최적화함으로써 각기 서로 다른 서열의 유전자 단편들을 잘 분리할 수 있다는 장점을 가지고 있어서 병원균의 검출에 확대 적용되어 사용되어져 왔다.

- 개별적인 병원균에 대해서는 현재 다양한 진단방법을 이용한 연구들이 진행되어 왔으나 인수공통전염병을 유발하는 다양한 균에 대한 동시적인 분석은 아직 전 세계적으로 확립된 바가 없다.

- 그러나 최근 몇 년간 본 기술로 인해 동시적이며 신속한 분석이 가능하다는 장점으로 인해 임상 실험 및 모델 시스템 상에서 식중독균과 같은 감염 증세에 대한 연구가 발표되고 있다.

### 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

본 연구개발의 1차년도 목표와 내용 및 범위는 다음과 같다.

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도	2008년도	<p><b>인수공통전염병 유발 병원균 10종에 대한 분석방법 확립</b></p> <p>- 2그룹으로 나뉜 정성 분석 및 정량 분석 수행</p> <p><b>식중독을 유발하는 인수공통전염병 유발 병원균 7종 식품에 적용 분석</b></p>	<p>■ Multiplex PCR 및 모세관 전기영동 기술을 이용하여 인수공통 감염성 질환 유발 병원균을 짧은 시간 내 정확하게 동시적(5종 이상)으로 분석하는 기술 개발 및 정량 분석 수행</p> <p>- 10종의 병원균 유전자 확보</p> <p>- 각 박테리아의 16S rRNA 유전자에 대한 특이적 PCR primer 설계</p> <p>- 모세관 전기영동 장치에 의한 정량적 분석을 위한 PCR 조건 확립</p> <p>- 모세관 전기영동 장치에 의한 인수공통전염성 병원균의 정량적 분석</p> <p>■ 확립된 동시분석법을 활용해 식품 적용 후 신속하고 정확한 분석 가능한 최신 분석법 확립</p>	기초 실험 및 기술 개발

- 제 1 절에서는 multiplex PCR과 CE-SSCP를 이용한 병원균 동시분석법을 축산 식품에 적용하여 5시간 이내에 식중독균 5종을 Cell농도  $10^1$ - $10^3$  CFU/ml 에서 동시분석 한 결과를 기록하였다.
- 제 2 절에서는 template tagging을 이용한 공통 프라이머와 비대칭 PCR을 도입한 7종의 병원균에 대해 검출 및 정량을 동시에 수행하는 방법과 상대 정량을 통한 정량성 강화를 수행하였으며, polymer matrix로 PEO-PPO-PEO 삼중블록 공중합체를 도입하여 섬세하고 정량적인 분석 능력을 강화하였다.
- 제 3 절에서는 16S rRNA 유전자의 V2 영역을 이용해 universal 프라이머로 5종의 병원균을 동시에 검출 및 정량하는 방법을 개발하였으며, 샘플에 하나의 세포만이 존재하더라도 검출이 가능한 섬세한 분석능력을 획득하였다.

## 제 1 절 축산식품에서의 병원균 분석방법의 최적화

### 제 1 항 DNA분리 및 multiplex PCR

#### 가. 사용균주

가장 대표적인 식중독 세균인 *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7를 사용하였고, 목록은 다음과 같다.(표 3)

표 3. 실험에 사용된 균주

Bacterial strains	Source
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 6359
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 33459
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 19585
<i>Salmonella paratyphi</i> B	ATCC 10719
<i>Salmonella paratyphi</i> C	ATCC 13428
<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 23715
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 2581
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43894
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 27325

## 나. 실험 방법

호기성균인 *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7은 Food and drug Administration(FDA)'s Bacteriological Analytical Manual(BAM)에서 제시된 방법에 근거하여 10mL Tryptone Soya Broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에서 37°C의 온도로 24시간 배양하였다.

TSB broth에서 약  $10^8 \sim 10^9$  CFU/ml 까지 자란 각 균주를 동일한 농도로 섞어 mixed culture를 만들었다. 각 균을 동일한 농도로 섞어 만든 mixed culture를 9ml의 Buffer Peptone Water (BPW, Difco Laboratories)에 분주하며 연속적으로 희석하여 Cell 을 1:10에서 1:10<sup>8</sup>의 농도로 희석하여 각 각 1 ml씩 취해 e-tube에 담고 DNA 분리를 시작하였다.

E-tube에 담긴 각 sample을 7,500 rpm에서 10분 동안 Microfuge<sup>®</sup> 22R Centrifuge (Beckman Coulter<sup>™</sup>, Fullerton, CA, USA)을 사용하여 원심분리 하였고, 비중이 큰 cell 은 pellete을 형성하며 분리 되었다. 원심 분리 후 상등액을 조심스럽게 따라 버리고 피펫을 이용하여 남은 상등액 까지 모두 제거 하였다. cell 의 세포막과 세포벽을 분해하기 위한 20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 2 mM sodium EDTA, 1.2% Triton<sup>®</sup> X-100, and 20 mg/mL lysozyme (Sigma Aldrich)을 포함하는 lysis buffer 180  $\mu$ L를 첨가하고 피펫을 사용하여 suspension한 다음 37 °C의 water bath에서 30 분 동안 incubation 하였다. DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen Inc., Valenciaga, CA, USA)에 포함된 proteinase K 25 $\mu$ L, buffer AL 200  $\mu$ L를 넣고 vortexing 한 후 56°C의 water bath에서 30 분 동안 incubation 하였다. ethanol (100 %) 200  $\mu$ L를 첨가하고 vortexing 하였다. e-tube 에 있던 혼합물을 DNeasy mini spin column으로 옮기고 8000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하였다. 그리고 단백질에 의한 오염을 최소화 하기위해 AW1, AW2-buffer를 사용하여 두 번에 걸친 washing 작업을 하였는데, AW1 buffer 500  $\mu$ L 첨가 후 8000 rpm에서 1분 동안 원심분리, AW2 buffer 500  $\mu$ L 첨가 후 14000 rpm에서 3분 동안 원심분리 하였다. 그리고 nuclease-free water 100  $\mu$ L로 and 최종 genomic DNA를 분리하였다.

Spectrophotometer (Model UV-1601, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 DNA 농도와 순도를 측정하였다. 260 nm에서 흡광도 측정으로 DNA 농도를 측정하였고,  $A_{260}/A_{280}$ ratio 값을 측정하여 DNA 순도를 알 수 있었다.

*Salmonella typhimurium*, *Yersinea enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella sonnei* 의 5가지 균주의 primer는 16S rRNA

gene의 V2 region을 대상으로 하는 것을 기본으로 하였다. V2 region 은 16S rRNA gene에서 가장 변이가 잘 일어나는 구간으로, 일반적으로 균주를 동정하는데 사용된다.

*Escherichia coli*와 유전적으로 유사한 *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella sonnei* 는 16S rRNA gene의 V2 region 안에서 특이적으로 작용하는 primer를 설계하기가 어려워 각각 lipopolysaccharide O-antibody (*rfbE*), *ipaH* gene을 대상으로 primer를 설계 하였다. 각 primer는 91-600nt 길이의 DNA 염기서열을 증폭시키도록 설계되었다. 각각의 forward primer는 각 균주에만 부착되도록 특이적으로 설계되었고, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*의 reverse primer 는 공통으로 사용되었다. 이 공통된 reverse primer의 염기서열은 5'-GCCAGCAGCCGCGGTAA-3'다음과 같고, *Escherichia coli* O157:H7의 reverse primer의 염기서열은 5'-TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG-3', *Shigella sonnei* reverse primer 염기서열은 5'-GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC-3'이다. reverse primer 5'끝엔 fluorescein의 hexachloro 유도체(HEX)를 붙여 CE(Capillary Electrophoresis)에서 검출이 가능하도록 하였다. 모든 primer는 Bioneer Inc. (Daejeon, Korea)에서 합성하였다.

Primer가 합성된 다음엔 5종의 균주로부터 뽑은 5종의 균의 혼합된 DNA에 각 균주를 대상으로 하는 5종의 primer set을 첨가하는 multiplex PCR이 수행되었다. PCR 조건은 5종균주가 가장 효율적으로 증폭하도록 최적화 되었다. 각 sample 으로부터 얻은 DNA의 증폭은 AccuPower® PCR premix (Bioneer Inc.)를 이용해 수행되었다. 각각의 PCR증폭은 20  $\mu$ L 안에서 이루어졌고, 각각의 sample은 균주로부터 추출한 DNA 1  $\mu$ L와, 각 균주를 대상으로 하는 특이적 primer 10 pmoles, DNA polymerase 1 U, dNTP 250 M, Tris-HCl (pH 9.0) 10 mM, KCl 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM가 포함되었다. PCR은 다음과 같은 온도조건 하에서 수행되었다. 94°C에서 5분 동안 가열하여 DNA 가닥을 변성시켜 두 가닥이던 DNA를 단일가닥으로 분리시킨다. 높은 온도일수록 분리가 더 잘되지만 아주 높은 온도에서는 DNA polymerase의 활성도가 낮아질 수 있어 94°C에서 수행하였다. 그 다음은 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 35초를 30 회 반복하는데, 이때 단일가닥으로 분리된 DNA에 primer가 결합되고, DNA가 합성된다. primer가 결합하는 데는 A와 T사이엔 2중 수소 결합이, G와 C사이엔 3중 수소 결합이 일어나므로 A와 T사이의 결합력과 G와 C사이의 결합력에 차이가 있기 때문에 G+C 함량에 따라 primer가 결합되는 온도에 변화를 주어야 했다 .따라서 5종의 primer가 가장 효율적으로 결합할 수 있는 55°C를 결합 온도로 설정하였다. DNA 합성은 보통 70°C-74°C에서 시행하지만 원하는 PCR 산물의 크기가 크거나 반응 요소의 농도가 낮을 때에는 시간을 연장하고, 반대로 PCR 산물의 크기가 작거나 반응 요소의 농도가 높을 때에는



시간을 단축시키는 방법으로 조절한다. DNA polymerase 는 보통 1분에 2,000-4000 nucleotides를 합성할 수 있으므로 PCR 산물의 크기 1Kb마다 1분 정도의 시간을 배당하면 충분히 반응이 일어날 수 있다. 대상 sample PCR 산물의 크기가 91-600 사이기 때문에 35초로 배당하였고, 마지막 cycle에는 시간을 충분히 (7분) 주어 효소의 활성이 충분히 발휘되도록 하였다.

#### 다. 실험결과

##### 1) DNA 분리

흡광도 측정은 DNA 농도를 측정하는데 가장 많이 사용되는 방법이다. 이중나선의 DNA의 염기는 260nm 의 파장에서 최대 흡광도를 지니고 있다. 이 파장에서 DNA의 흡광 계수는  $E_{260}=20$ 이 되며 DNA 농도와 A260 값은 정비례 관계에 있기 때문에  $50\mu\text{g/ml} = 1 \text{ A260 unit}$  의 환산계수를 사용하여 DNA의 농도를 측정할 수 있다. DNA의 최대 흡광도는 260nm, 단백질의 최대 흡광도는 280nm이므로  $A_{260}/A_{280}$ ratio를 구함으로써 DNA의 정제도를 구할 수 있다. 순도의 비가 1.8 이상이면 단백질 염이 없는 실험에 적합한 순도라고 판단된다. 실험에 사용한 DNA 농도와 순도는 다음과 같다.

표 4. 실험에 사용한 DNA 의 농도와 순도

	260 nm(ng/ $\mu$ l)	280 nm(ng/ $\mu$ l)	$A_{260}/A_{280}$ ratio
$10^8$	267	137	1.94
$10^7$	188	95	1.97
$10^6$	57	27	2.11
$10^5$	38	18	2.11
$10^4$	29	13	2.23
$10^3$	20	9	2.22
$10^2$	15	8	1.87
$10^1$	11	6	1.83

모두 순도 1.8 이상의 DNA를 실험에 사용하였다.

## 2) 특이적 primer 제작

CE-SSCP에서 병원균을 동시분석 하기위해서, 각 균주가 나타내는 peak 위치는 서로 분리되어야 한다. universal primer를 사용하면 PCR 산물의 길이가 peak 위치를 분리시킬 만큼 충분히 다양하지 않다. 이러한 이유로 인해 CE-SSCP 분석에 적합한 specific primer가 design 되었다. 5가지 균주의 primer는 16S rRNA gene의 V2 region을 대상으로 하는 것을 기본으로 하였다. 16S rRNA gene은 염기서열의 다양성을 가지는 몇 개의 variable region 을 가지고 있어 미생물에서 서로 다른 종 사이에는 다른 서열을 가지고 있어 일반적으로 균주를 동정하는데 사용할 수 있다.

그러나 *Escherichia coli*와 유전적으로 유사한 *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella sonnei*는 16S rRNA gene 에서 특이적으로 작용하는 primer를 설계하기가 어려워 각각 lipopolysaccharide O-antibody (*rfbE*)(그림3, 그림4), *ipaH* gene 을 대상으로 하는 특이적 primer를 설계하였다. 각각의 primer set은 gene의 특정 부분만을 증폭시키도록 설계되었다. *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* reverse primer는 16S rRNA gene의 V2 region에 부착되도록 design 되었고, 각각의 forward primer와 *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella sonnei*의 reverse primer는 대상 유전자만 가지고 있는 유일한 서열에만 부착되도록 design 되었다.

CE-SSCP에서 peak 위치에 영향을 주는 요소에는 분자량과 단일가닥의 DNA의 이차구조와 DNA분자의 운동성까지 영향을 미치는 열역학적 변수가 있는데, 이런 요소들을 고려하여 forward primer는 다양한 길이의 PCR 산물이 만들어지도록 고안되었다. 제일 처음엔 coding region을 target으로 하는 primer를 design 했는데 이것은 균에서 구조를 나타내는 유전자 부분에 있어서 현재 구조적으로 다른 기관을 나타내는 유전자이더라도 원래 같은 기관이었던 유전자 부분을 제외한 곳을 target으로 하였다. 이를 통해 15-30 mer의 primer가 선택되었다. 그리고 각각의 primer set은 비 특이적으로 작용하여 원하지 않는 band의 합성할 가능성을 줄이기 위해 거의 비슷한  $T_m$ 값과 GC함량을 갖도록 design 되었다. 이 primer는 각 target 균주의 특정 DNA 부분에 부착되어 특정 부분만을 증폭시켰다. 이 실험에서 설계된 primer는 다음과 같다(표 5).

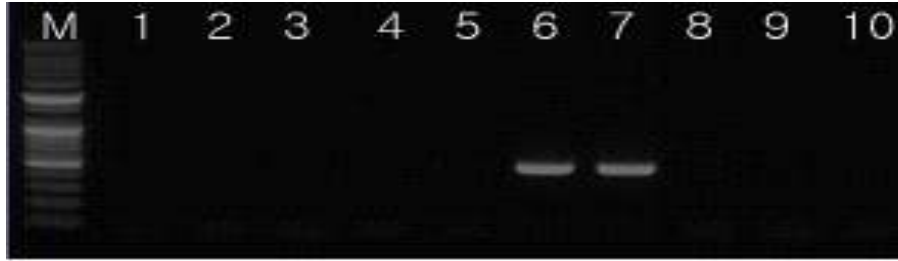


그림 3. 16S rRNA를 대상으로 하는 *E. coli* O157 primerset은 유전적으로 유사한 *E. coli* 와 *E. coli* O157을 증폭시킴

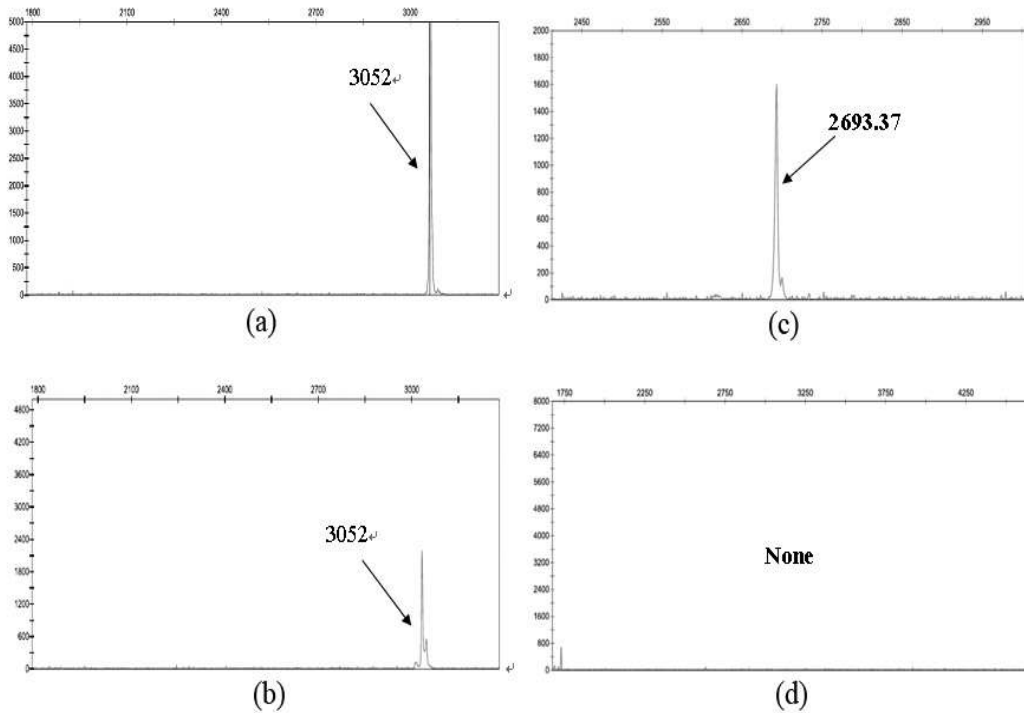


그림 4. 각 각 16S rRNA 와 *rfbE*를 대상으로 하는 *E.coli* O157 primer set 비교. (a) *E.coli* O157의 DNA에 16S rRNA gene을 대상으로 하는 primer 사용, (b) 16S rRNA gene을 대상으로 하는 primer에 *E.coli*가 비 특이적으로 증폭, (C) *E.coli* O157의 DNA 에 *rfbE* gene을 대상으로 하는 primer가 반응하여 증폭, (D)*E.coli* DNA *rfbE* gene을 대상으로 하는 primer가 반응하지 않아 PCR 산물을 생성하지 않음

표 5. 중합효소 연쇄 반응에 사용된 primer 염기서열

Bacterial strain		Primer (5' -3')	Target gene	Product size (bp)	Reference
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (EC O157)	Forward	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC	<i>rfbE</i>	296	Bertrand <i>et al</i> (2007)
	Reverse	TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG			
<i>Salmonella typhimurium</i> (SATY)	Forward	CGGGGAGGAAGGTGTTGTGG	16S rDNA	91	Oh <i>et al</i> (2008)
	Reverse	GCCAGCAGCCGCGGTAA			
<i>Yersinia enterocolitica</i> (YEEN)	Forward	GTAGTTTACTACTTTGCCGG	16S rDNA	455	Oh <i>et al</i> (2008)
	Reverse	GCCAGCAGCCGCGGTAA			
<i>Shigella sonnei</i>	Forward	G TTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	<i>ipaH</i>	600	Kim <i>et al</i> (2006)
	Reverse	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC			
<i>Listeria monocytogenes</i> (LIMO)	Forward	GCGCATGCCACGCTTTTG	16S rDNA	351	Oh <i>et al</i> (2008)
	Reverse	GCCAGCAGCCGCGGTAA			

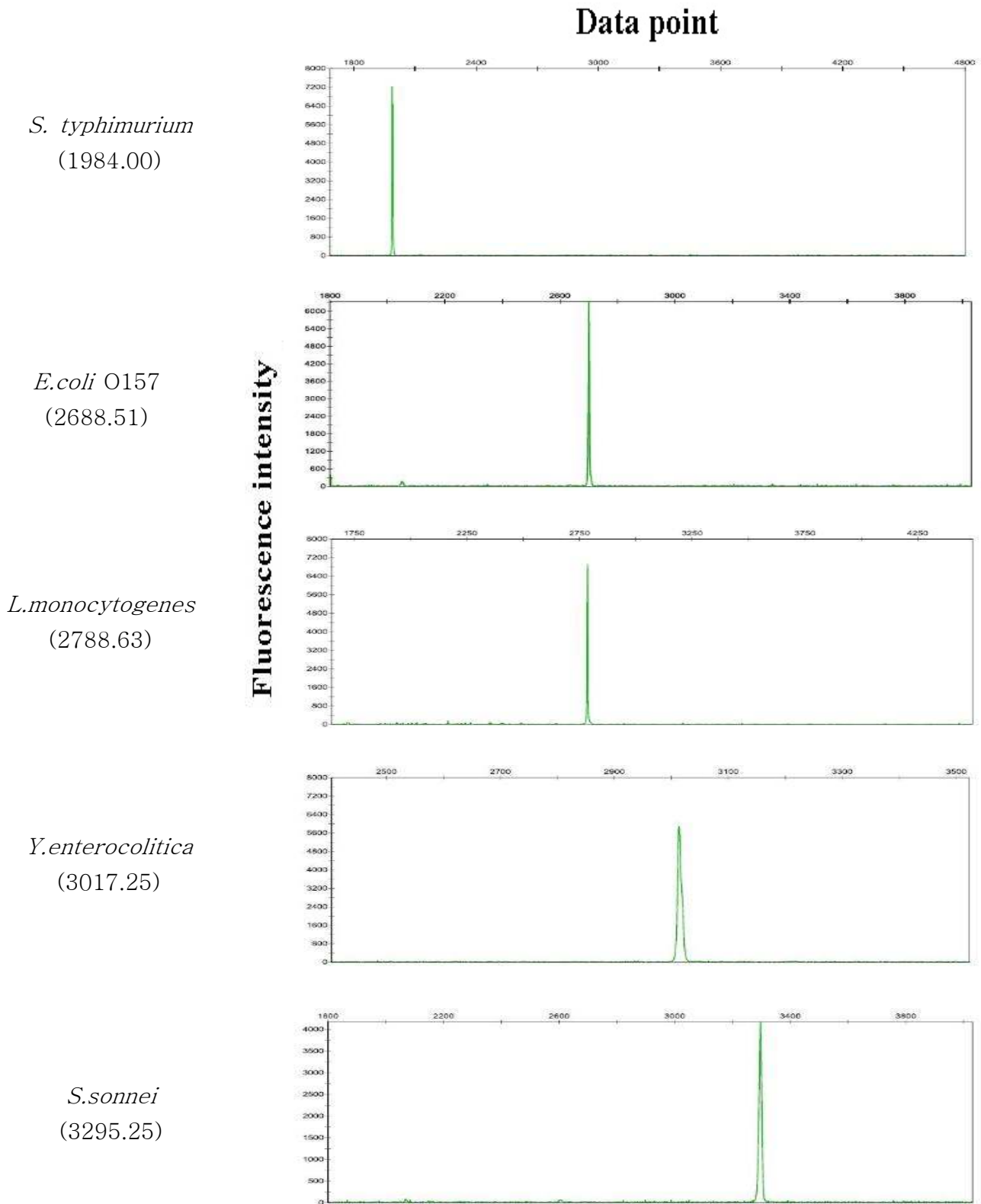


그림 5. 각 대상균주의 target gene 부분만을 증폭시키는 Primer의 특이성

### 3) multiplex PCR

하나의 DNA template에 한 쌍의 primer set을 반응하도록 하는 전형적인 PCR 방법과는 다르게 multiplex PCR은 원치 않는 PCR 산물의 생성 가능성이 많기 때문에 PCR 조건을 까다롭게 조절해야 한다.

반응조건은 primer와 template 사이의 결합 특이성에 영향을 미친다. 이런 반응조건들에는 DNA 이완을 강화시켜 template의 변성을 쉽게 일어나게 하여 PCR의 민감도와 특이성을 개선시킨다고 알려져 있는 DMSO, glycerol, 그리고 BSA와 같은 보조제뿐만 아니라 염 농도, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, DNA polymerase와 같은 다양한 조건들이 PCR반응에 영향을 미치는 요소로 작용한다.

dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, PCR buffer, enzyme 과 primer 등 여러 조건을 바꿔가며 실험하였고, DNA 중합효소를 바꾸고 그 외의 조건은 모두 동일하게 하고 실험 했을 때는 결과에서 확연한 차이를 볼 수 있었다(그림 6). 여러 조건을 바꿔가며 실험하면서 5가지 균주의 DNA 균주에 특이적으로 작용하는 primer set과 다양한 PCR 재료의 농도조건이 가장 효율적으로 최적화 되었다.

또, template 와 primer가 결합하는 온도인 annealing 온도 조건 또한 PCR 결과에 큰 영향을 미치는 변수로 작용한다. multiplex PCR의 효율을 높이기 위해서 50°C에서 60°C사이에서 annealing 온도를 변화시키면서 실험해보았고 55°C가 반응의 민감도를 유지하면서 원치 않는 비 특이적 PCR 산물의 생성을 최소화 하는데 가장 적합한 온도임을 알 수 있었다.

모든 peak는 1990과 3300의 data point의 범위 내에서 single peak으로 잘 분리되었다(그림 5). 그리고 개별 균주에서의 DNA에 각각 하나의 primer set으로 반응시킨 개별적인 PCR 산물로부터의 peak위치와 여러 균주의 DNA에 각각 특이적 primer로 반응시킨 multiplex PCR 산물로부터의 peak 위치가 일치함을 알 수 있었다. 따라서 specific primer를 사용하여 수행한 multiplex PCR은 여러 종의 식중독 세균을 동시분석 할 수 있는 방법임을 알 수 있었다.

## Data point

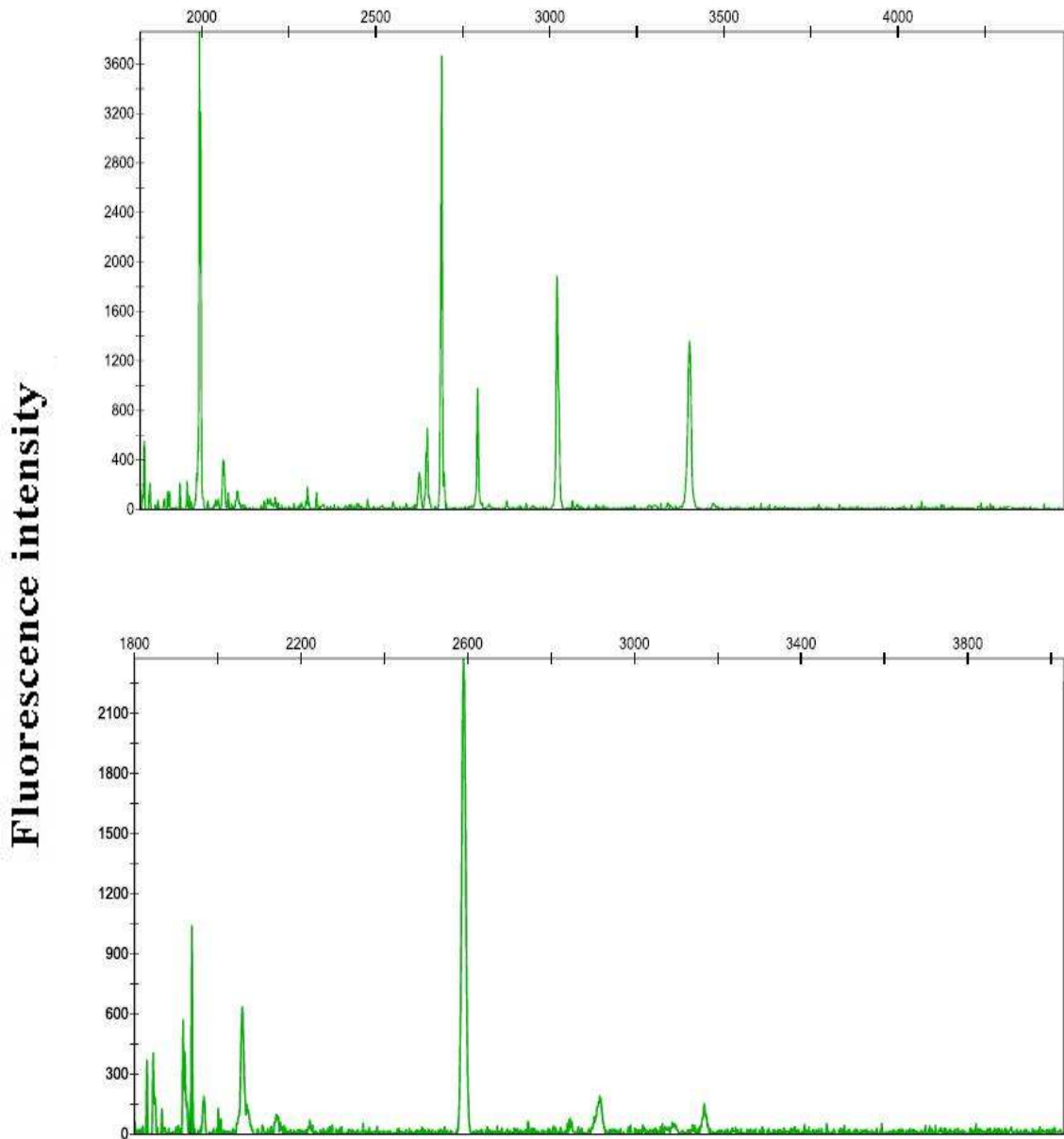


그림 6. DNA 중합효소에 따른 PCR 효율의 차이

## 제 2 항 CE-SSCP를 통한 동시 분석

### 가. 실험재료 및 방법

대상 균주의 target gene이 증폭된 PCR 산물 1  $\mu\text{L}$ 에 CE에서 peak위치를 측정할 수 있도록 deionized formamide (Applied Biosystems, Inc.) 13.5  $\mu\text{L}$ 와 ROX 500 size standard(Applied Biosystems, Inc.) 0.5  $\mu\text{L}$ 가 첨가 되었다. PCR 산물, deionized formamide, size standard의 혼합물은 94°C에서 4분 동안 가열처리 한 후 즉시 ice로 옮겨 냉각시켰다.

CE-SSCP분석은 ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Inc.)에서 이루어졌고, The genetic analyzer는 제조사에서 제공한 정보에 따라 설치되었다. 모세관은 직경 50  $\mu\text{m}$ , 길이 47 cm 크기의 Applied Biosystems사에서 구입한 제품이 사용되었다. polymer matrix는 3.5% GeneScan polymer와 1 $\times$ TBE-10% glycerol buffer (Applied Biosystems, Inc.)가 사용되었다. 전기영동조건은 다음과 같다. Injection voltage = 15.0 kV, electrophoresis voltage = 13.0 kV, sample사이에서 모세관을 세척하기위해 새 polymer를 채우고 buffer를 가동시키는 시간인 syringe pump time = 210 s, constant temperature = 35°C, 그리고 collection time = 18 min이다. ABI 310 Genetic Analyzer에 있는 CCD camera 가 525에서 650nm의 형광 파장을 감지하기 위해 사용되었다. HEX와 같은 ABI PRISM dye에 적합하도록 가상의 filter 가 setting되고, dyes는 488과 514 nm에서 10-mW argon ion laser로 인해 자극받아 신호를 나타내고, 그 신호는 GeneMapper (Applied Biosystems, Inc.) 라는 DNA 분석 프로그램이 Peak의 위치를 결정함으로써 자동으로 분석되었다. Electropherogram의 X축의 data point 값은 GeneMapper가 지정하여 공급한 elution time을 나타내는 단위이다.



## 나. 실험결과

### 1) Singleplex와 multiplex data point 비교

특이적 primer set으로 반응시켜 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 과 capillary electrophoresis에서 각 예상했던 size와 peak를 나타냈다. 그림5, 그림 6에서 볼 수 있듯이 모든 peak는 1990과 3300의 data point의 범위 내에서 single peak으로 다른 균주의 peak와 중복되지 않게 잘 분리 되었다.

개별 균주에서의 DNA에 각각 하나의 primer set으로 반응시킨 개별적인 PCR 산물로부터의 peak위치와 여러 균주의 DNA에 각각 특이적 primer로 반응시킨 multiplex PCR 산물로부터의 peak 위치가 일치함을 알 수 있었다.(그림 7, 그림 8) 따라서 specific primer를 사용하여 multiplex PCR을 이용해 capillary electrophoresis로 분석하는 것은 여러 종의 식중독세균을 동시분석 할 수 있는 방법임을 확인 하였다.

PCR 산물의 size 순서대로 *Salmonella typhimurium* (91 bp), *Escherichia coli* O157:H7 (296 bp), *Listeria monocytogenes* (351 bp), *Yersinia enterocolitica* (455 bp), *Shigella sonnei* (600 bp)이며, capillary electrophoresis에서도 같은 순서대로 검출되어 분자량은 모세관내에서 DNA 이동속도에 영향을 미치고 이에 따라 peak 위치를 결정하는데 중요한 요인으로 작용 하는 것을 알 수 있었다.

## Data point

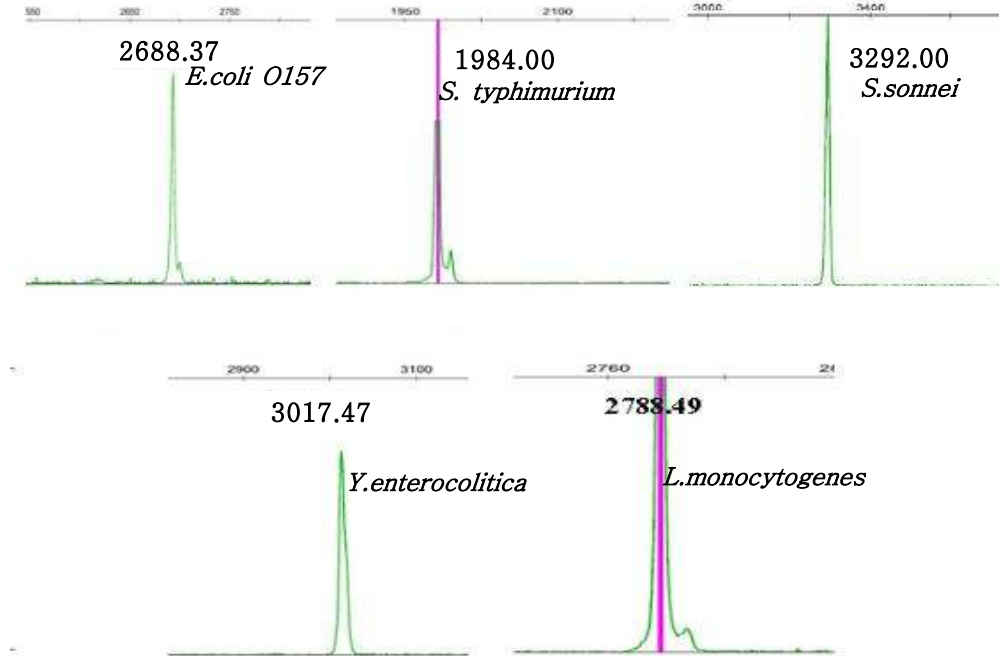


그림 7 . 개별균주에서 분리한 DNA를 사용한 PCR 산물의 data point

## Data point

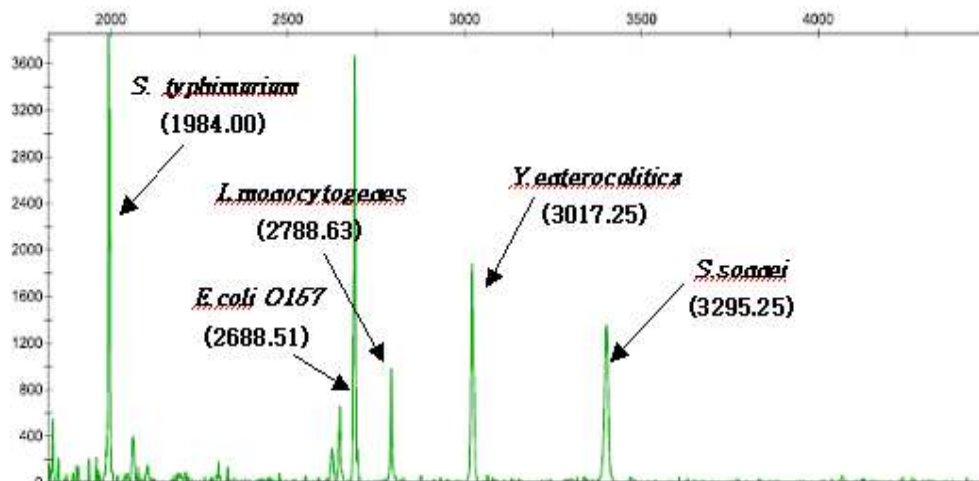


그림 8. 여러 균주가 혼합된 mixed culture에서 분리한 DNA를 사용한 multiplex PCR 산물의 data point

## 2) 모세관 전기영동장치를 통한 정량분석

Multiplex 최적화조건에서 5종의 식중독세균이 동시 분석 되었다. Multiplex PCR 은 singleplex PCR에 비해 특이성이 낮고 민감도가 떨어지며, 여러 template 와 primer사이의 반응간의 효율의 차이가 있다. 따라서 개별균주에서 뽑은 DNA template에 한 set의 primer만을 반응시킨 singleplex PCR 결과를 capillary electrophoresis를 사용하여 정량 분석 하였다 (그림 7).

그림 9는 genomic DNA와 peak area값 사이의 관계를 나타낸 그림이고, 0.95-0.99 의 높은 상관계수를 나타냈다. Sample의 DNA농도가 1/2, 1/5, 1/10배 씩 차이가 나므로 DNA와 peak area값 사이의 관계를 log2 scale에 표현 하였다. 정량분석에 맞는 PCR 조건을 찾기 위해 PCR 조건을 30, 35 cycle을 test 해보았는데, 30cycle 을 수행 하였을 때 DNA 농도와 peak area 사이에서 가장 뚜렷한 선형성을 나타냈다.

이 실험에서 사용된 primer는 g당  $10-10^2$ 의 CFU의 병원균을 포함 하는 것과 동일한 양인 1  $\mu$ L당 1-19 pg의 적은양의 병원균 template도 검출 해낼 수 있을 뛰어난 민감도를 가지고 있었다. 선행연구에 따르면 genomic DNA 농도와 cell 개체 수는 높은 상관관계를 가지고 있어 PCR 산물 농도나 genomic DNA같은 genomic DNA 의존산물의 양을 측정함으로써 cell 농도를 예측할 수 있다고 밝혔다.

DNA 농도와 peak area사이의 상관관계 곡선은 임의의 샘플의 양을 검출하는데 있어서 표준 정량 분석의 지표로 사용될 수 있다. PCR 증폭 후에 임의의 샘플들이 이 지표와 비교를 함으로써 샘플 내에 존재하는 DNA 또는 병원균 세포의 정량적인 분석 값을 도출할 수 있다.

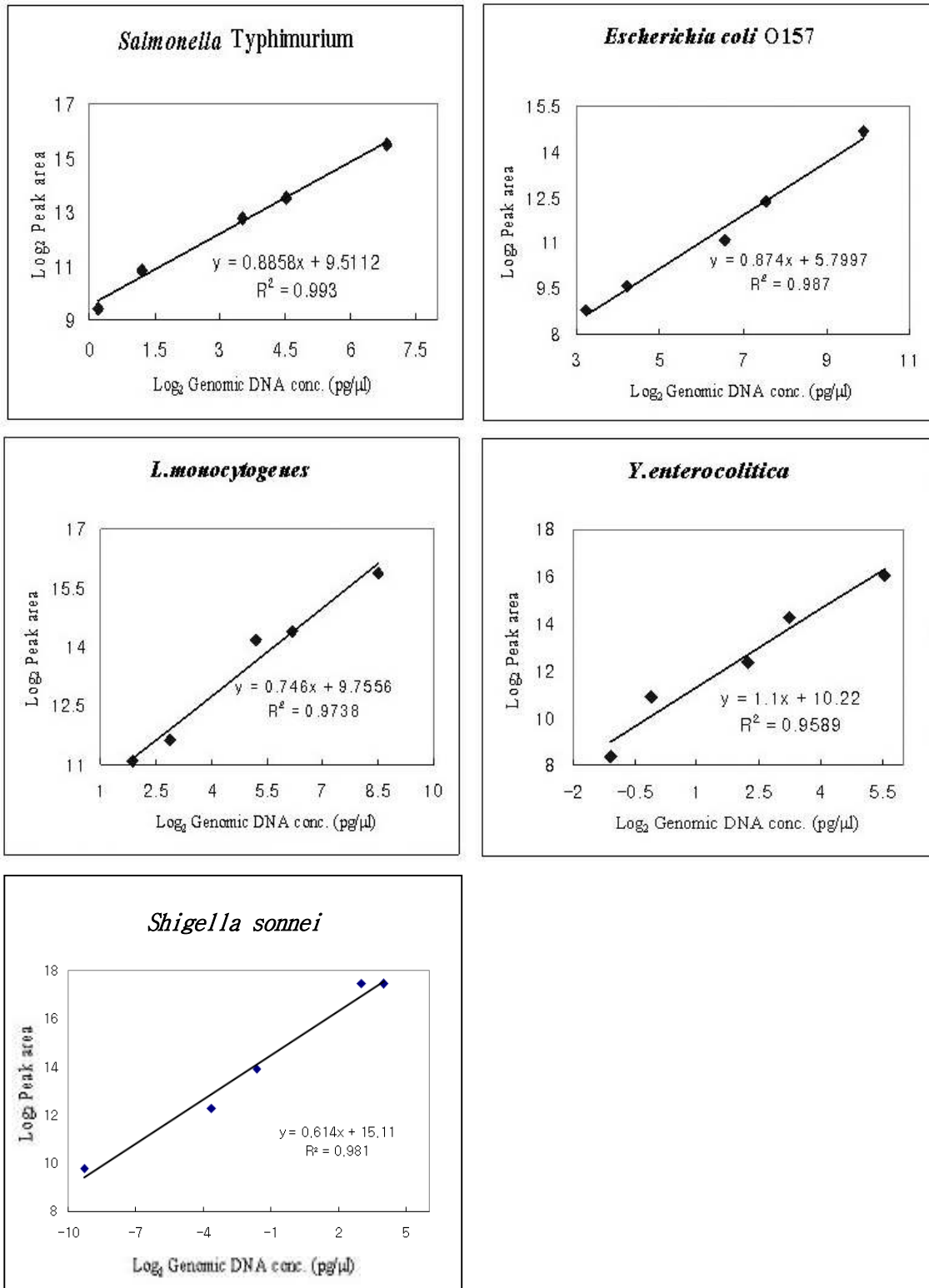


그림 9. DNA 농도와 peak area값 사이의 상관관계

표 6. 본 실험에서 사용된 균주의 검출한계

(단위:pg/μl)

<i>Bacterial strains</i>	Limit of Detection (LOD)
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.2
<i>Escherichia coli</i> O157	18.8
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.5
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.6
<i>Shigella sonnei</i>	0.3

### 제 3 항 병원균 분석법의 식품적용

#### 가. 실험 재료 및 방법

앞에서 서술한대로 대상 균주들은 Food and Drug Administration (FDA)'s Bacteriological Analytical Manual(BAM)에서 제시된 방법에 근거하여 10 mL Tryptone Soya Broth (TSB)에서 37°C 의 온도로 24시간 배양 하였다. TSB broth 에서 대략  $10^8 - 10^9$  CFU/ml 까지 자란 각 균주를 동일한 농도로 섞어 mixed culture를 수행하고, 연속적으로 희석하여 cell이 1:10 에서  $1:10^8$  의 농도로 만들었다.  $10^1 - 10^8$  농도의 균주를 소고기에 접종 하였다. 원하는 대상균주 이외의 균에 의한 오염을 막기 위해 멸균 상태(clean bench)에서 소고기를 멸균 필터 백에 10g 씩 나누어 담고  $10^1 - 10^8$  의 농도로 존재하는 mixed cell을 멸균 필터백이 담긴 소고기에 1ml 취하여 접종하고 incubator에 20분 동안 두어 균이 식품 표면에 잘 접종되도록 하였다. 다음 멸균 상태에서 각각의 균이 접종된 소고기가 담긴 멸균 필터 백에 희석수를 90ml씩 넣고 stomacher를 이용해 1분 동안 높은 속도로 homogenize 과정을 거쳐 균이 식품에 고르게 접종되도록 하였다. 각 필터 백에 담긴 broth를 고기 부유물이 들어가지 않도록 필터에 걸러 falcon tube에 담고, vortexing 후에 1ml 취해 e-tube에 담고 DNA 분리를 시작 하였다. 그 다음엔 1,2 항에서 서술한 방법과 같은 방법으로 DNA분리부터 CE-SSCP를 이용한 동시분석 까지 수행하였다.

#### 나. 실험 결과

##### 1) 식품접종

1, 2항에서까지는 병원성균 유전자를 확보하여 각 균주의 특이적 PCR primer를 설계하고, 단일쇄 형태변환 다형성장치를 위한 PCR 조건을 확립하여, 모세관 전기영동장치를 통해 동시에 분석할 수 있는 초정밀 진단법 및 정량 분석 방법을 개발 하였다. 따라서 이 장에서는 개발된 방법을 식품에 적용하여, 식품에 존재하는 식중독 세균 검출법을 제시하여 인수 공통 전염병의 조기진단 등 위해성에 대한 효과적인 대처 방안으로 활용 가능한 방법임을 확인하였다.

대상 균주 5종의 각 cell 농도 $10^1 - 10^8$  CFU/ml을 소고기에 인위적으로 접종하여 분리한 DNA에 특이적 primer를 사용하여 모세관 전기영동을 통해 동시 분석하였다. cell 농도  $10^2$  이상에서 5종의 식중독 세균이 모두 검출되었다(그림 10, 그림 11). 식품에 접종하지 않고 broth 상태에서 분리한 DNA로부터 얻은 sample과 식품 접종 후 분리한 DNA로부터의 sample 검출한계를 비교해 보았다(표 6).

## Data point

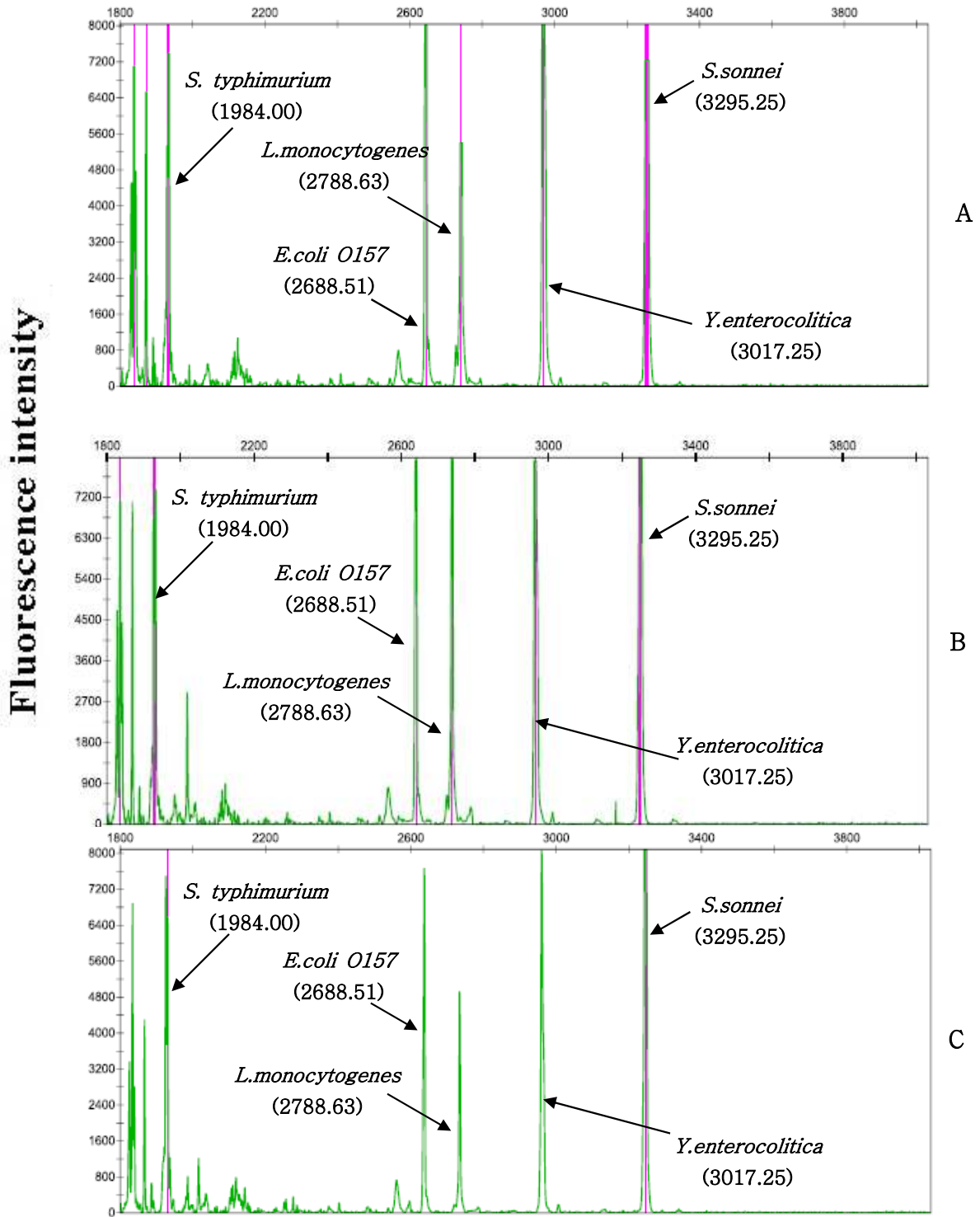


그림 10. 식중독균 혼합 배양액(농도  $10^6 - 10^4$ )을 식품접종 후에 얻은 PCR 산물의 모세관 전기 영동을 통한 검출 (A:  $10^6$  배양액, B:  $10^5$  배양액, C:  $10^4$  배양액)

## Data point

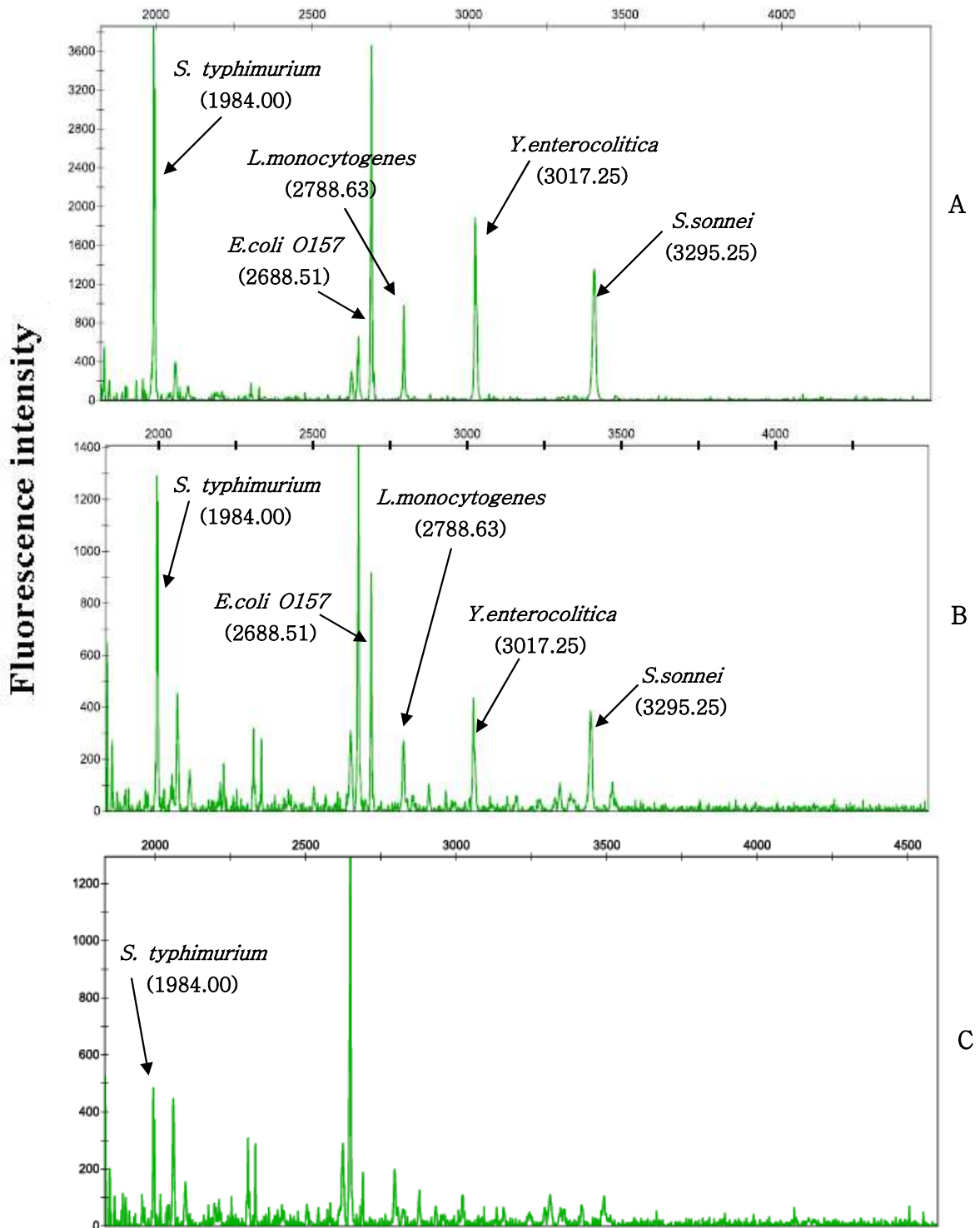


그림 11. 식중독균 혼합 배양액(농도 $10^3 - 10^1$ )을 식품접종 후에 얻은 PCR 산물의 모세관 전기 영동을 통한 검출 (A:  $10^3$  배양액, B:  $10^2$  배양액, C:  $10^1$  배양액)



표 7. 균주 배양액 과 식품접종 후 모세관 전기영동 장치에서의 검출 한계 비교

Bacterial strains	LOD from cultures	LOD from inoculated ground beef
<i>Salmonella typhimurium</i>	$10^1$	$10^1$
<i>Escherichia coli</i> O157	$10^1$	$10^2$
<i>Yersinia enterocolitica</i>	$10^2$	$10^2$
<i>Listeria monocytogenes</i>	$10^2$	$10^2$
<i>Shigella sonnei</i>	$10^2$	$10^2$

## 2) 도축장에서 획득한 실제 시료에 대한 시험

앞서 서술한 결과를 토대로 도축장에서 소고기를 채취하여 별도의 증균 과정 없이 DNA를 추출하고 5종의 특이적 primer를 사용하여 최적 조건으로 PCR 한 후 CE-SSCP 분석 하였다. 또 실험의 정확성을 높이기 위해 아무것도 접종하지 않은 BPW(Buffer Peptone Water)로 대조실험 하였다(그림 12).

실험 결과는 본 실험에서 target으로 했던 *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157:H7 균주는 검출되지 않았다. 따라서 소고기에는 각 균주의 검출한계 이상의 균이 존재하는 것은 아니라고 판단되고, 도축 과정에서 병원균에 노출되지 않고 위생적으로 도축이 이루어졌음을 알 수 있다.

Data point 2070과 2611에서 6개 noise peak가 나타났다. Data point 2070에서 나타내는 peak는 primer가 capillary electrophoresis 상에서 분석되어 나타낸 결과라고 생각되고, data point 2611에서 나타나는 peak는 3개의 sample에서 area 값이 일정하고 대조군(아무것도 접종하지 않은 Buffer Peptone Water를 capillary electrophoresis 상에서 분석한 결과)에도 같은 data point가 검출된 것으로 보아 Buffer Peptone water에 있는 어떤 물질과 primer 사이에 비 특이적 결합으로 인한 noise로 생각된다.

## Data point

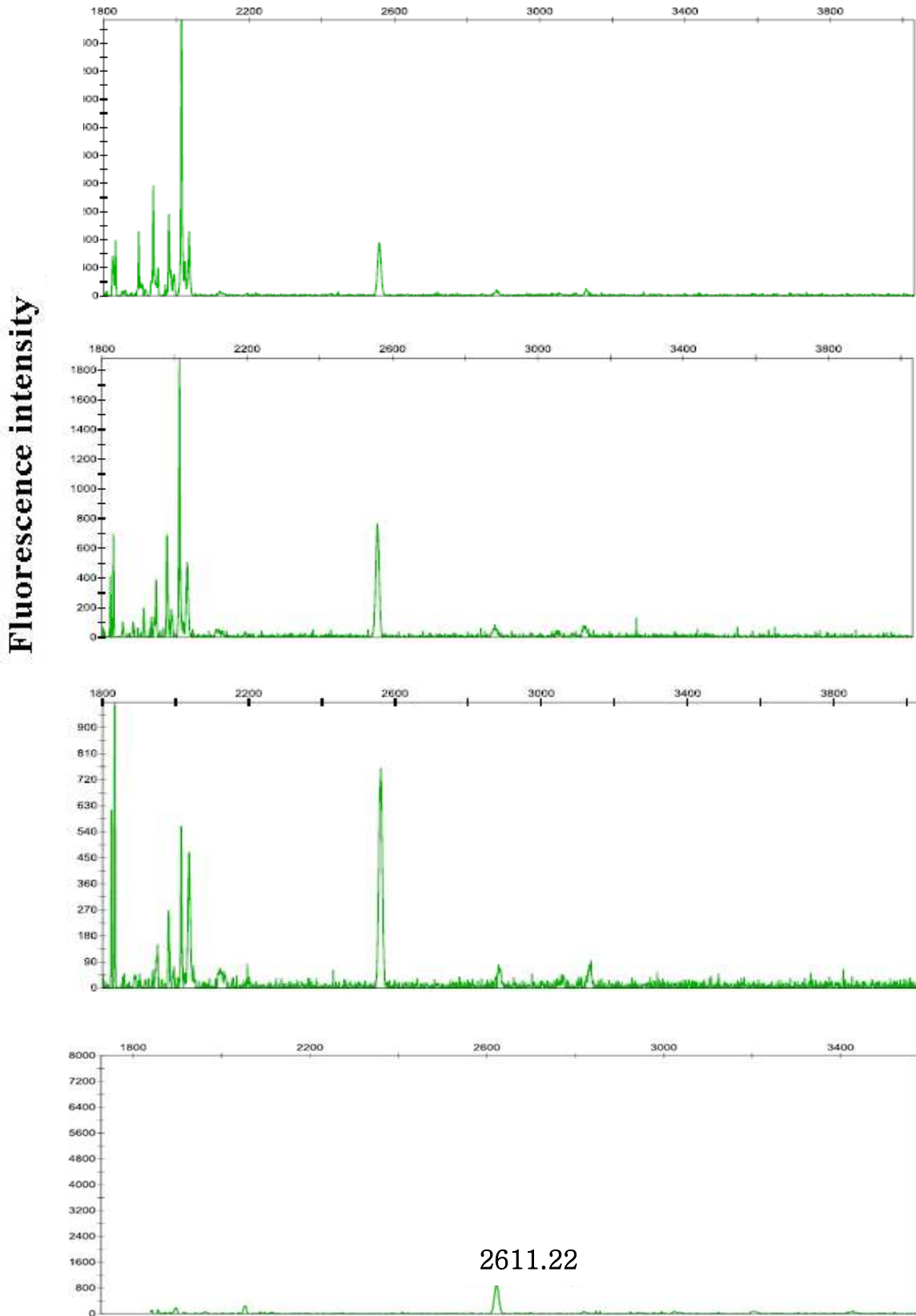


그림 12. 도축장에서 채취한 소고기에서 multiplex PCR과 CE-SSCP를 이용한 병원균 분석과 대조군 BPW(Buffer Peptone Water) 분석 비교

## 제 2 절 병원균 동시진단을 위한 비대칭 PCR 및 CE-SSCP 기술 개발

제 1 항 모세관 전기영동과 결합된 단일쇄 형태변환 다형성을 이용한 유전자 분석

모세관 전기영동 (Capillary Electrophoresis; CE)과 결합된 SSCP (CE-SSCP) 기술은 분석의 편의성 면에서 매우 우수하며, 기존에 염기서열분석에 활용되는 자동화된 CE 장비를 사용하여 재현성이 뛰어나 실제 산업현장에서의 활용가치가 크다.

단일쇄 형태변환 다형성 (Single Strand Conformation Polymorphism; SSCP) 기술은 본래 DHPLC 등과 더불어 대표적인 genotyping 기술의 하나로 개발되었다. 기본 원리는 서로 다른 서열의 denatured 된 유전자 단편을 neutral gel에서 전기영동을 수행하였을 경우, 각각의 단일쇄가 서열에 따라 서로 다른 conformation 을 형성함으로써, 이로 인하여 mobility가 달라지고 각각의 conformation 은 neutral gel 의 running 조건이 동일할 경우, 항상 일정하므로, mobility 는 각 단일쇄의 염기서열에 따라 고유한 성질을 갖게 된다. 이러한 특성을 이용하여 서로 다른 유전자나 유전자들의 돌연변이를 분석하는 데에 사용된다(그림 13).

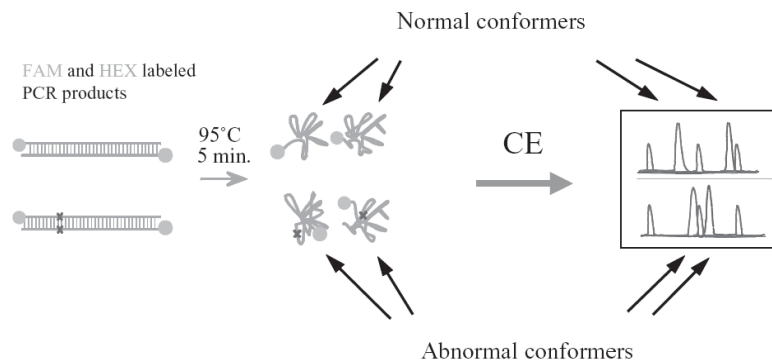


그림 13. 모세관 전기영동 (Capillary Electrophoresis) 기반의 단일쇄 형태변환 다형성 (Single Strand DNA Conformation Polymorphism)의 원리

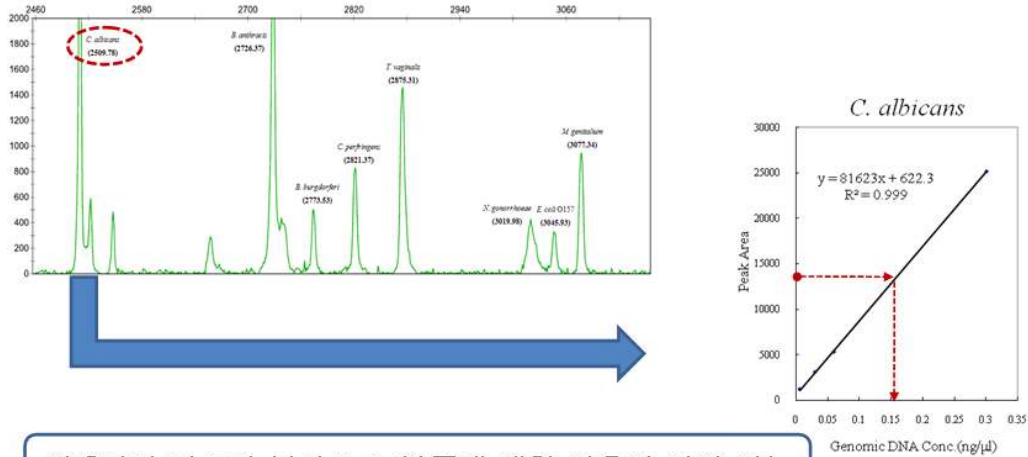
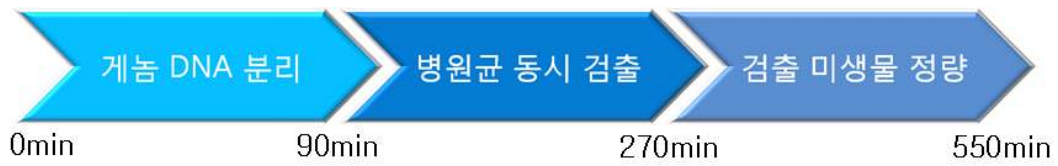
CE-SSCP는 간단한 heating 및 cooling 과정을 거치면 단일쇄 DNA의 conformation에 의존한 분리가 가능하기 때문에 유전자 분석 분야에 다양한 적용이 가능하다.

## 제 2 항 분리된 두 단계를 통한 병원균의 동시 검출 및 정량 분석기술

### 가. 개요

다양한 종류의 미생물에 대한 특이적 primer를 이용, CE-SSCP로 동시에 검출하는 것은 multiplex PCR 과정을 수반하며, 때문에 과정의 최적화가 필수적이다. 본 단락에서는 여러 대상 미생물이 포함된 시료를 효과적으로 분리할 수 있는 primer set을 통한 동시 검출 과정과, 동시 검출 과정에서 검출한 특정 대상 미생물에 특이적으로 결합하는 primer 만을 사용한 정량 분석 과정으로 나뉘서 접근하였다.

모의 실험 대상으로는 8종의 감염성 질환 및 식중독 관련 미생물을 선정, 검출과 정량으로 분리된 두 단계로 미생물을 검출할 수 있으며, 이러한 검출 체계의 모식도는 그림 14와 같다. 대상 균주는 표 8에 정리되어 있다.



약 9시간 정도의 분석으로 11종에 대한 검출과 정량 가능

그림 14. 병원균에 대한 두 단계로 나뉜 검출 및 정량

표 8. 모의 실험 대상으로 사용된 균주 list 및 각 primer

Microbial Name	Top primer (5'-3')	Bottom primer (HEX-5'-3')	Product size (bp)
<i>Mycoplasma genitalium</i> G-37	GGAAGTAGCAATACTTTAGAG	ATTACCGCGGCTGCTGGC	463
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CAGGGAAGCTTGCTTCTC		459
<i>Trichomonas vaginalis</i>	GCGACCAACAGGTCTTAAAT		387
<i>Campylobacter jejuni</i>	CAAGAGGACAACAGTTGGA		367
<i>Clostridium perfringens</i>	AATAGCCTTCCGAAAGGAAGA		365
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	GAACGGTAACAGGAAGAA		471
<i>Bacillus anthracis</i>	CGGCTTCGGCTGTCACTT		330
<i>Borrelia burgdorferi</i>	GATGAAAGGAAGCCTTTAAAG		340

#### 나. 목표 병원균에 특이적 primer의 제작

본 실험에서는 16S rRNA 유전자에 존재하는 V2 영역을 대상으로 Top primer를 제작하였다. 16S rRNA는 universal 영역과 variable 영역으로 구분될 수 있는데, 보통 각 원핵생물의 variable 영역에서의 염기서열 차이를 이용해 종(species)간 분류를 수행하게 된다. 즉, variable 영역은 각 병원균에 따라 다른 염기서열을 갖게 된다. V2 영역은 variable 영역 중에서도 종간 차이가 가장 크게 나타나는 영역이므로 V2 영역을 이용해 Top primer를 설계하였다. Top primer의  $T_m$ 과 특이적 annealing 영역을 확인하기 위해서는 MIT에서 제공하는 Primer3 프로그램과 EBI에서 제공하는 ClustalW2를 이용하였다.

CE-SSCP 검출을 위한 형광 염료는 bottom primer에 부착하였으며, 이 bottom primer를 V2 영역에 인접한 universal 영역에서 설계하여 각 종에 대해 모두 annealing될 수 있도록 하였다. 즉 bottom primer는 9종 모두 공통으로 사용하였으며, Top primer를 각 종에 따라 다르게 설계하여 이들의 크기 차이를 두었다.

*T. vaginalis*의 경우 진핵생물이나, 이의 게놈 상에 존재하는 유사 16S rRNA 염기서열을 이용하였다. 이 염기서열은 원핵생물과 마찬가지로 variable 영역과 universal 영역으로 구성되어 있다.

#### 다. 게놈 DNA의 정제 분리 및 PCR

본 실험에서 사용된 게놈 DNA들은 *C. perfringens*를 제외하고는 모두 ATCC, KCCM, KCTC에서 구매되었다. *C. perfringens*는 10ml의 trypticase soy blood 배지에서 24시간동안 혐기성 조건에서 배양되었으며, 게놈 DNA는 Qiagen사의 DNeasy kit을 사용하여 분리 정제 되었다.

Multiplex PCR 반응은 병원균의 게놈 DNA를 주형으로 사용, 각 primer를 20pmol씩 넣고 수행되었다. 여기에는 0.5U의 *Pfu* DNA polymerase, 각각이 250  $\mu$ M의 농도로 포함된 dNTP, 그리고 5 $\mu$ l의 10 X reaction buffer를 주형과 primer와 함께 넣었으며, 총 부피가 50 $\mu$ l가 되도록 증류수를 첨가하였다. PCR의 온도조건은 최초 denaturation을 위해 2분간 95 $^{\circ}$ C, 뒤이어 30 cycle간 95 $^{\circ}$ C denaturation 30초, 55 $^{\circ}$ C annealing 30초, 72 $^{\circ}$ C extension 30초를 수행하였으며, 최종 extension을 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 수행하여 완료되었다. 획득한 PCR 산물은 gel electrophoresis를 통해 주형의 증폭여부를 확인한 뒤 CE-SSCP 분석을 위해 적당량을 nuclease-free water에 희석되었다.

## 라. 동시 검출 실험

### (1) primer 별 특이성 확인 및 개별 peak 위치 확인 실험

설계된 primer가 여러 균주가 섞인 환경에서 특이적으로 반응, 목표 균주만을 검출할 수 있는지 알아보기 위해 개별 primer를 게놈 DNA가 섞여있는 주형에 대해 실험을 수행하였다. 그 결과 각 균주에 대해 개별 primer가 특이적으로 반응하는 것을 확인하였다(그림 15).

### (2) 다종의 primer를 동시에 사용한 8종 병원균의 동시검출 실험

8종의 병원균에 대해 상기 디자인한 primer를 이용, 이들의 동시검출이 가능한지 알아보았다. 8종의 병원균에서 유래한 게놈 DNA를 적정량으로 섞어 주형으로 삼았으며, 각 primer들 역시 섞어 multiplex PCR을 수행하였다. PCR 산물을 CE-SSCP로 분석한 결과 8종의 병원균에 해당하는 특이적 peak들이 모두 성공적으로 관찰되었다(그림 16).

## 마. 정량 분석 실험

8종의 게놈 DNA가 섞인 시료에 대해 각 미생물에 대한 개별적인 정량 분석이 수행되었다. 각 개별 미생물을 특이적 primer로 증폭, CE-SSCP를 수행한 분석 결과로 각 미생물에 해당하는 peak 넓이를 획득하여 이를 최초 게놈 DNA의 양에 대해 plot하였다. 게놈 DNA의 양은 미생물의 양과 선형적으로 대응되고, 게놈 DNA의 양에 따라 선형적으로 peak의 넓이가 결정되므로 peak의 넓이에 따라 미생물의 양을 정량적으로 획득할 수 있다.

실험은 3회 진행되었으며, 이들의 결과를 평균하여 정량 분석 커브를 획득하였다. 이들의 평균  $R^2$ 값은 0.98로 매우 높은 선형성을 나타내었다. 따라서 각 미생물에 대한 선형적 정량 분석 커브를 획득, 이를 미생물의 정량에 활용하는 것이 가능하였다(그림 17).



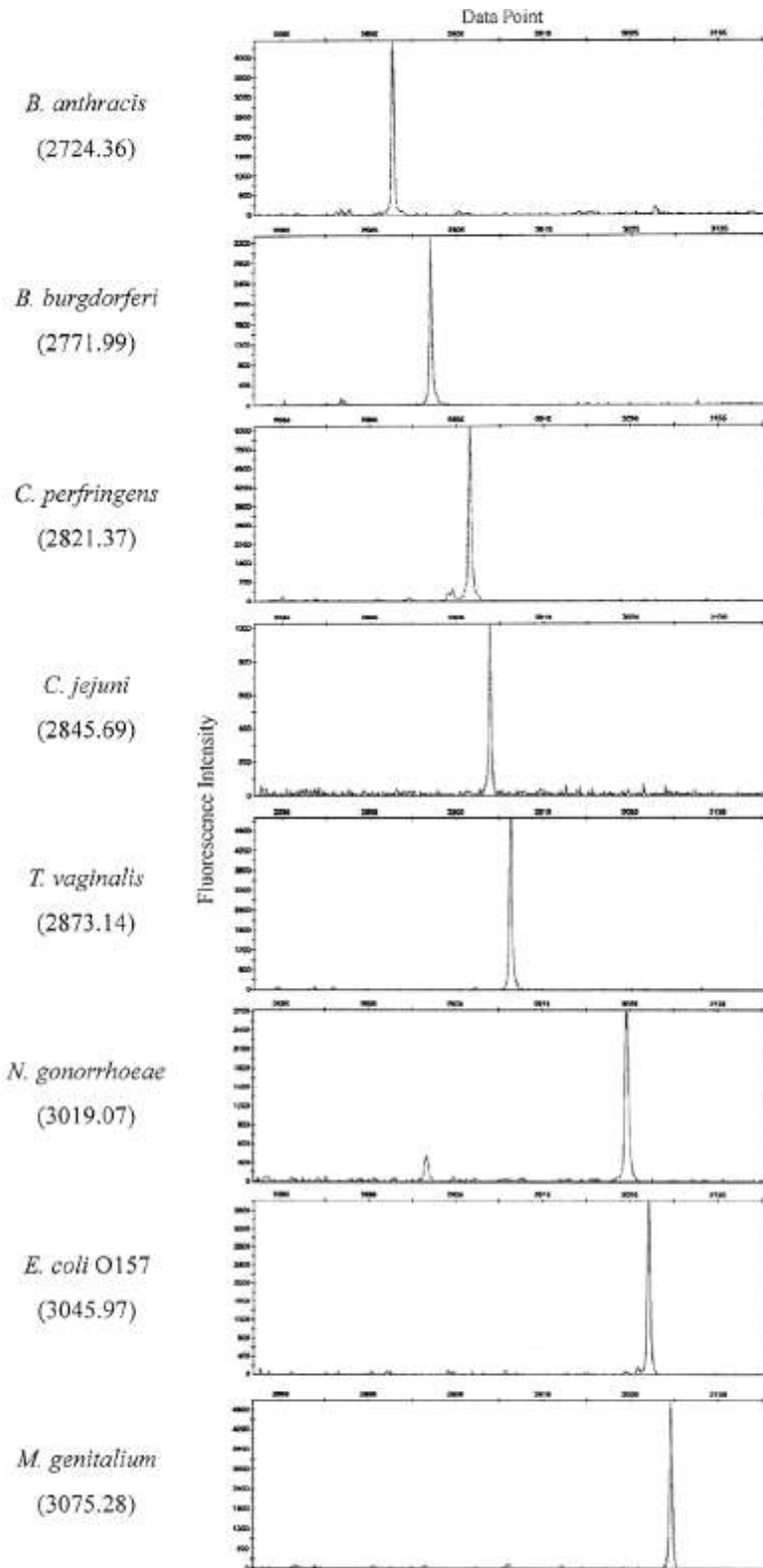


그림 15. 8종 병원균의 개별적 peak 확인

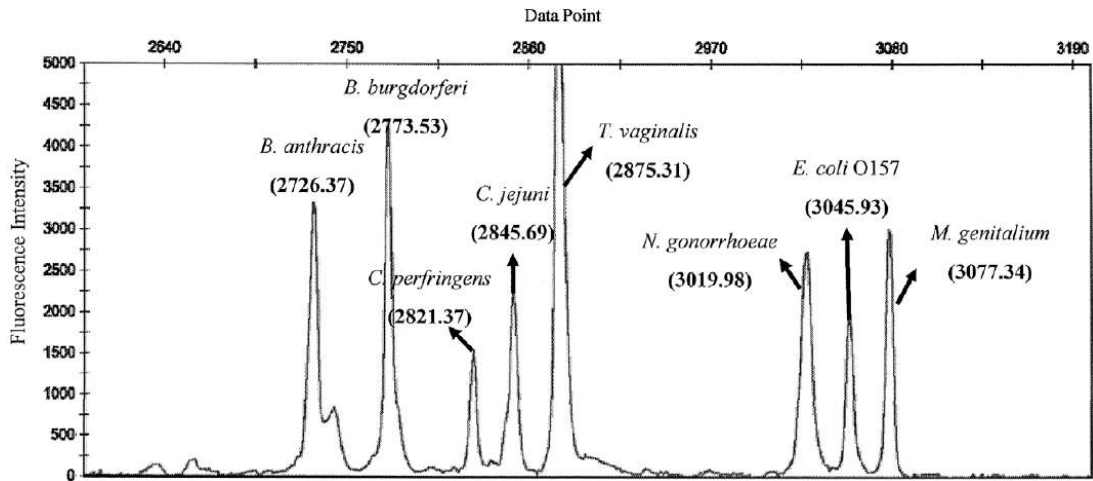


그림 16. 8종 병원균에 대한 peak 동시검출

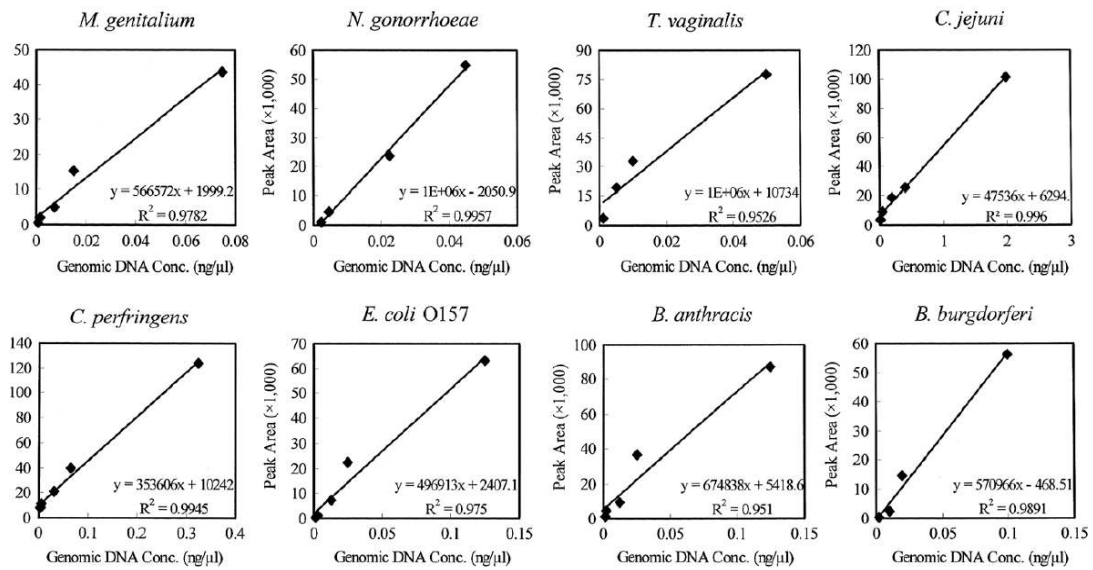


그림 17. 8종 병원균의 정량 곡선

### 제 3 항 Template switching 및 공통 primer, 비대칭 PCR을 사용한 병원균 동시진단 기술

#### 가. 개요

##### (1) Template switching을 이용한 공통 primer 사용

종전까지의 병원균 진단 기술은 병원균의 DNA를 주형으로 한 multiplex PCR을 통해 분석을 수행하였다. 그러나 이 방법은 각 병원균의 DNA에 특이적인 primer를 병원균 각각에 대해 설계하기 때문에 primer의  $T_m$  값을 조절하기가 어려웠으며, 잘못 설계된 primer의 경우 비특이적인 primer 결합 때문에 PCR에 의해 non-specific한 product가 생성되어 동시 진단 및 정량에 어려움을 겪는 일이 많은 단점이 있었다. 이러한 문제를 해결하기 위해 PCR의 주형으로 DNA가 아닌 16S rRNA를 사용, 이에 대해 template switching을 통해 효과적으로 multiplex PCR을 수행하는 방법을 개발하였다.

이러한 방법의 장점은 1. 세포 내에 충분한 양으로 존재(전체 RNA의 90% 이상)하는 ribosomal RNA를 이용함으로써 측정 감도의 향상을 기대할 수 있고, 2. template switching을 이용해 원하는 염기서열을 측정 대상의 앞뒤에 붙여 동일한 primer로 동시 증폭을 수행, 각 template의 증폭효율을 비슷한 수준으로 조절할 수 있다는 점을 들 수 있다(그림 18).

동일 primer를 사용할 경우 앞서 언급한 대로 다종의 주형에 대해 동일한 효율로 증폭이 가능하다는 장점이 있다. 때문에 특정 DNA 가닥들에 대한 서로간의 상대적 양이 변화하지 않고 일정하게 유지된다는 특징이 있으며, 이러한 성질을 이용해 알고 있는 양의 표준 유전자를 함께 증폭하여 측정을 원하는 대상 유전자의 절대량을 확인하는 것이 가능하다. 일반적으로 PCR에 의한 유전자의 증폭은 다음 식과 같이 정의된다.

$$X = I ( 1 + E ) ^ n$$

##### 식 1. PCR cycle과 증폭 효율에 따른 유전자 증폭량

식 1에서 X는 n cycle째의 유전자 양이며, I는 초기 유전자의 양, E는 유전자의 증폭 효율이다. E는 각 유전자에 따라 다른 값을 가지게 되며, 주로 해당 유전자를 증폭하는 primer에 따라 크게 영향을 받는다. 즉, 동일한 primer로 증폭이 가능할 경우 서로 다른 유전자라도 거의 동일한 E 값을 갖게 된다. 따라서  $I_1$ 과  $I_2$ 의 서로

다른 초기 유전자 양을 갖는 서로 다른 유전자가 동일한 E 값을 갖게 될 경우 이들의 비율은 다음 식과 같이 나타낼 수 있다.

$$X_1 / X_2 = I_1 / I_2$$

식 2. 동일한 증폭 효율을 갖는 두 유전자의 PCR 이전의 양과 PCR에 의해 증폭된 양의 비교

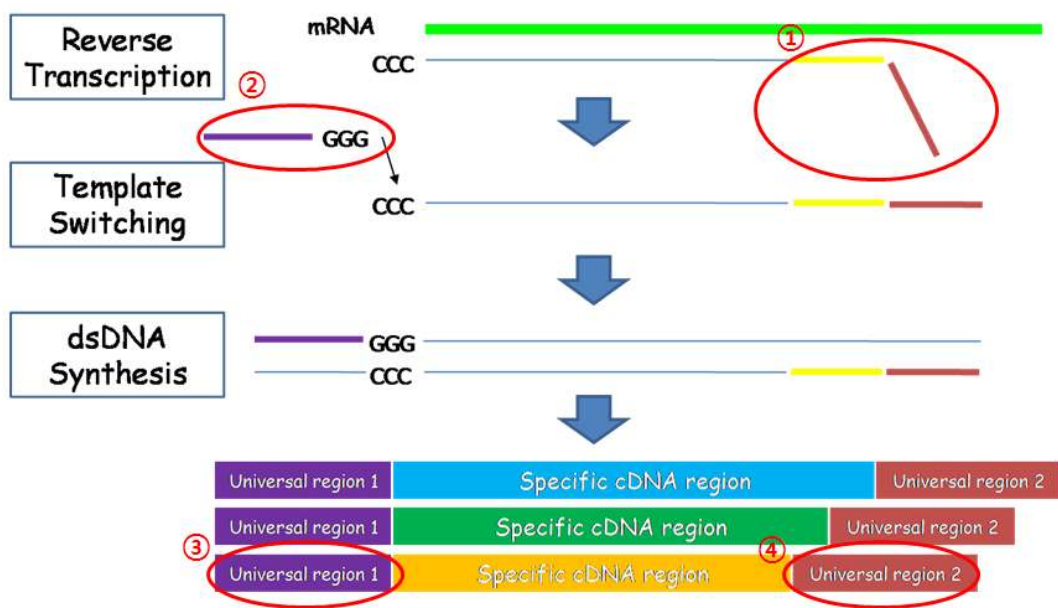
$X_1$ 과  $X_2$ 는 PCR에 의해 증폭된 각기 다른 유전자의 양을 나타낸다. 식 2에서 알 수 있듯 동일한 E 값을 갖는 두 유전자는 증폭 후에도 초기 유전자 양의 비율과 동일한 양을 갖게 된다. 따라서 동일한 E 값을 갖도록 설계한 본 연구에서는 측정을 통해 얻어진  $X_1$ 과  $X_2$ , 그리고 값을 알고 있는  $I_1$ 을 이용해  $I_2$ 의 값을 얻을 수 있으므로, 양을 알고 있는 표준 유전자를 통해 각각의 측정 대상 유전자를 쉽게 정량할 수 있다.

(2) 비대칭 PCR을 이용한 정량적 측정능력 강화

PCR은 식 1에서 나타나는 것처럼 지수 함수 형태로 대상 주형을 증폭시킨다. 그러나 PCR의 cycle이 증가함에 따라 증폭 효율이 감소하게 되며, 따라서 일정 cycle 이후에는 saturation이 발생하여 지수함수 형태의 증폭 시기가 지나가게 된다. 그 결과 초기 주형 양 I가 다른 시료라 하더라도 일정 cycle 이후에는 동일한 양으로 증폭되어 반응 후의 양 X가 동일하게 될 수 있으며, 따라서 식 2를 만족할 때 충족되는 정량적 측정능력이 감소하게 된다.

본 연구에서는 정량적 측정능력을 강화하기 위해 한 쪽 primer의 양을 반대쪽 primer의 양 보다 더 많이 첨가한 비대칭 PCR을 도입하였다. Wangh group이 개발한 비대칭 PCR은 지수함수 형태의 증폭 시기를 증가시켜 saturation이 찾아오는 cycle을 늦추고, 보다 정량적으로 측정할 수 있는 변형된 형태의 PCR이다. 본 연구에서는 형광 염료가 부가된 primer를 반대쪽 primer에 비해 많은 양을 넣어 비대칭 PCR이 구현되도록 하였다.

이러한 방식으로 비대칭 PCR을 구현할 경우 또 다른 장점을 얻을 수 있다. 비대칭 PCR은 더 많이 첨가된 primer가 annealing된 한 쪽 strand가 좀 더 선택적으로 증폭되며, single strand DNA를 분석하는 본 방법에 있어 측정 민감도 측면에서 많은 도움을 줄 수 있다.



**Modified templates for multiplex quantification!**

그림 18. 공통 primer를 이용한 증폭 전 template의 modification 과정 모식도

나. *in vitro* transcription을 이용한 모의실험 대상 제작

Template switching 및 공통 primer, 비대칭 PCR를 이용한 rRNA의 검출 방법이 실제 시료에서 효과적으로 기능하는지 시험해보기에 앞서, *in vitro* transcription을 이용해 모의실험 대상을 제작하였다. 모의실험은 7종의 패혈증 관련 미생물의 rRNA 유전자와 7종의 *E. coli* 유전자를 PCR로 증폭한 후, 이를 template로 한 *in vitro* transcription 하여 얻어진 RNA를 대상으로 하였다. 즉 패혈증 관련 미생물과 *E. coli* 유전자의 두 가지 모의실험 대상을 제작하였으며, 이를 통해 rRNA 및 mRNA 모두에서 일반적으로 사용될 수 있는 RNA 동시 정량 방법을 확립하고자 하였다. 그 제작 방법은 다음과 같다.

게놈 DNA(genomic DNA)는 미생물로부터 Qiagen사의 게놈 DNA 분리용 kit를 이용해 정제하였다. 시료로부터 정제된 게놈 DNA는 이미 확보된 16S rRNA 및 *E. coli*의 유전자 정보를 이용하여 공통 primer 염기서열이 overhang된 forward primer와 reverse primer를 이용하여 16S rRNA 및 *E. coli* gene을 PCR반응으로 증폭하였다. PCR 반응은 주형 DNA의 변성(denaturation) 단계, primer의 결합(annealing) 단계 및 DNA의 합성(polymerization)을 통하여 수행된다.

PCR로 증폭된 16S rRNA 및 *E. coli* gene을 주형으로 하여 Ambion사의 Megascript T7 kit를 사용하여 *in vitro* transcription을 실시하였다. *In vitro* transcription은 제공되는 ATP, GTP, CTP, UTP를 각각 2 $\mu$ l씩 넣고, 10X 반응 버퍼와 linear 주형 DNA(1 $\mu$ g), enzyme mix를 잘 섞어준 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시킨 후, 제공되는 Turbo DNase 1 $\mu$ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켜 완료되었다.

합성된 RNA는 Qiagen사의 RNA Mini kit를 이용해 clean up 하였다. 방법은 다음과 같다. 먼저 제공되는 RLT buffer 1ml당  $\beta$ -mercaptoethanol 10 $\mu$ l를 넣어 잘 섞는다. 그 뒤 *in vitro* transcription에서 얻어진 시료 mixture에 DEPC water 80 $\mu$ l를 넣어 전체 100 $\mu$ l로 만든 후, 각 sample에 350 $\mu$ l의 RLT /  $\beta$ -mercaptoethanol buffer를 넣고 잘 섞는다. 여기에 250 $\mu$ l의 100% 에탄올을 넣고 파이펫으로 잘 섞어준 뒤, kit에서 제공되는 RNeasy mini spin column에 sample 700 $\mu$ l를 넣고 8000 x g에서 15초간 원심분리 한다. 원심분리 후 spin column에 포함된 collection tube에 모인 액체를 버리고 새로운 2ml collection tube로 교체하고, column에 남은 sample에 ethanol이 포함된 500 $\mu$ l RPE buffer를 넣고 2회간 최고의 속도로 원심분리를 수행해 washing한다. 그 뒤 빈 칼럼을 최고 속도로 1분간 더 원심 분리하여 column을 건조시킨 후 kit에서 제공되는 RNase free 1.5ml collection tube에 column을 옮기고 DEPC 또는 Nuclease free water를 50 $\mu$ l넣고 elution하였다.

Clean up 된 RNA는 Agilent 사의 bioanalyzer를 이용하여 농도를 측정하였다. 측정된 RNA는 electrogram과 gel image로 확인할 수 있고, 전체 합성된 RNA중에서 16S rRNA의 %를 조합하여 대상 RNA만의 농도를 구하였다(그림 19).

#### 다. Template modification 및 PCR

##### (1) primer 설계

우선 16S rRNA 및 E. coli 유전자의 mRNA를 reverse transcription(역전사) 및 template switching, 비대칭 PCR을 수행하기 위한 primer를 설계하였다.

① 특이적 reverse transcription primer : 서로간의 homology가 높은 유전자들에 대해 동시에 template switching을 수행하기 위한 reverse transcription primer를 제작하였다. European Bioinformatics Institute (EBI) 에서 제공하는 염기서열 정렬 프로그램인 Clustal W2를 이용, 서열들을 homology에 따라 정렬시키면 각 서열들에 특징적 및 개별적으로 존재하는 특이적 염기서열들을 획득할 수 있다. 여기서 얻어진 특이적 염기서열을 주형으로 하는 reverse complement를 얻어낸 뒤, 이들을 University of Helsinki의 Institute of Biotechnology에서 제공하는 FastPCR 프로그램을 이용하여 multiplex로 reverse transcription을 수행할 경우 어떤 결과를 얻을 수 있는지 알아보고 reverse complement의 서열을 조정, 한 서열에 하나의 reverse transcription primer가 specific하게 반응할 수 있도록 하였다. 표 9에서 “Specific RT primer”에 해당하며, 그림 18에서 ①에 해당하는 primer이다. Reverse transcription primer들은 공통적으로 5' 끝 쪽에 overhang 염기서열을 포함하며, 이는 다음 과정에서 공통 primer의 표적이 되는 부분이다. 표 9에서는 소문자로 표시되었다.

② Template switching primer: Reverse transcription 수행 후 complement DNA (이하 cDNA)의 3' end 쪽의 CCC에 결합하는 primer로, 3'-end에 CCC에 상보적인 GGG를 포함하고 있으며, 나머지 부분의 염기서열은 추후 공통 primer의 표적이 되는 영역이다. 그림 18 에서는 ②에 해당한다. 이 primer는 모든 균주에 대해서 공통이다.

③ 공통 PCR primer: 주형변환 후 PCR 반응에 쓰이는 primer 이며 한쪽 primer 에 HEX로 수식되어 있다. 그림 18 에서는 ③, ④에 결합하도록 설계되어 있다. 이 primer 역시 모든 균주에 대해서 공통이다.

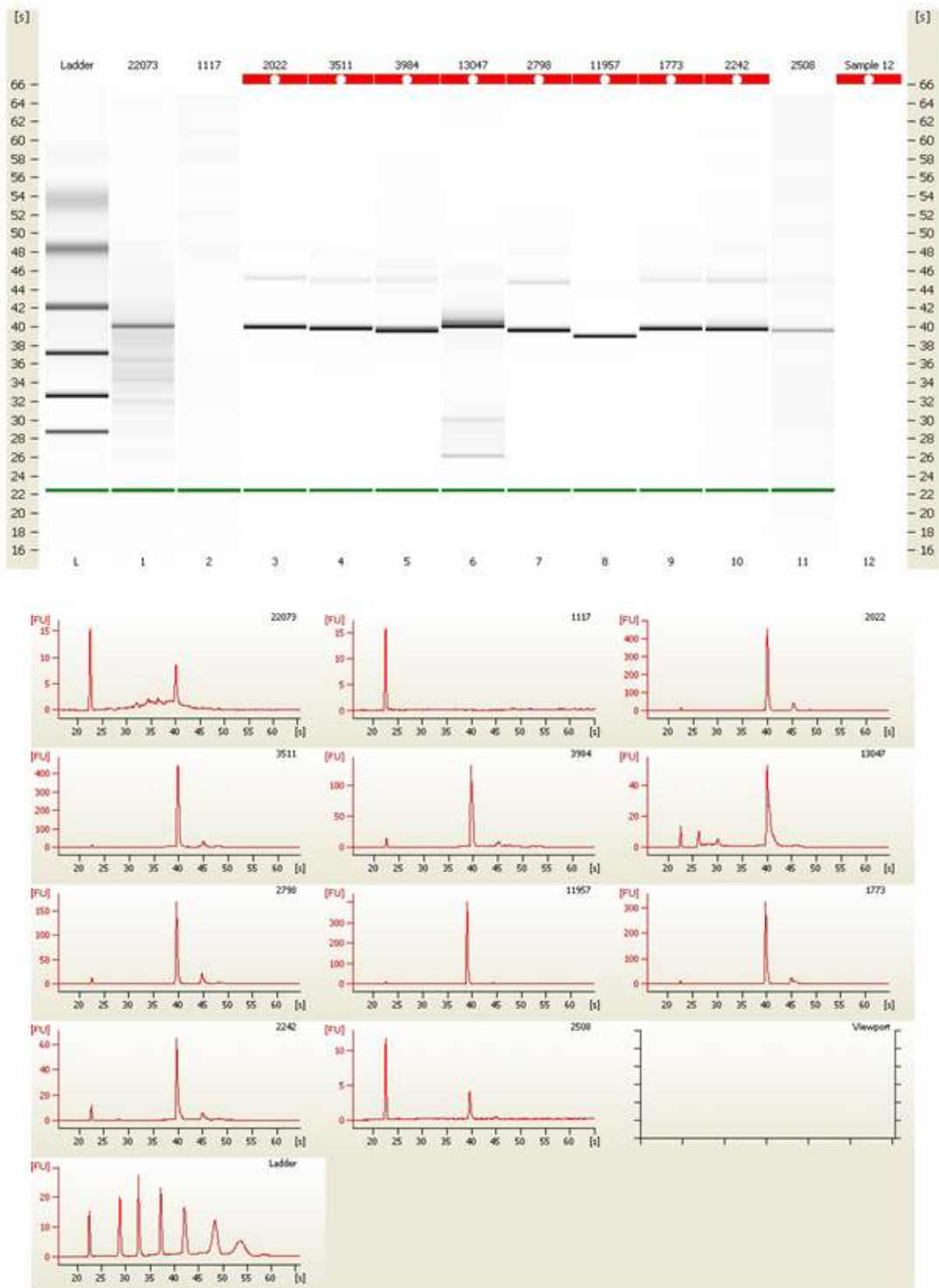


그림 19. *In vitro* transcript (미생물 16S rRNA)의 gel image와 electropherogram



표 9. 사용된 primer들의 염기서열

	ID	primer sequence	비고
Specific RT primer	<i>S. marcescens</i>	tcctggattatgcctggcaccatAACGTCAATTGATGAGCG	
	<i>S. maltophilia</i>	tcctggattatgcctggcaccatGGTATTAACCAGCTGGATT	
	<i>P. mirabilis</i>	tcctggattatgcctggcaccatGGTTCATCCGATAGTGCA	
	<i>K. pneumoniae</i>	tcctggattatgcctggcaccatGTAACGTGCAATCGACAA	
	<i>E. faecium</i>	tcctggattatgcctggcaccatCGCCTTTCAAATCAAAAC	
	<i>E. faecalis</i>	tcctggattatgcctggcaccatTCAGGGGACGTTTCAGTTA	
	<i>S. pyogenes</i>	tcctggattatgcctggcaccatCCCCTTTTAAATTACTAA	
	<i>dnaK</i>	tcctggattatgcctggcaccatACTTCAGCAGAAATCTGCGGCG	
	<i>rpiB</i>	tcctggattatgcctggcaccatAGCCACGCATCCACAATCA	
	<i>pykF</i>	tcctggattatgcctggcaccatGCAGGATAGCGGCGGTTTT	
	<i>ptsG</i>	tcctggattatgcctggcaccatCTGCCATAACATGCGATACAAC	
	<i>ppc</i>	tcctggattatgcctggcaccatGACTAAACGCACGCGCAACG	
	<i>rpiA</i>	tcctggattatgcctggcaccatGGGCTGAACATACTGAAGTGCC	
<i>pckA</i>	tcctggattatgcctggcaccatAGAGGTTTGTTGTCGTTCTT		
Template Switching Primer		AGTCGTACGACTCACGATAGGCGAGTACGCGGG	
Common PCR primer	Forward	AGTCGTACGACTCACGATAGGCGAGTACGC	
	Reverse	TCCTGGATTATGCCTGGCACCAT	HEX 수식

## (2) Reverse transcription, template switching 및 비대칭 PCR 과정

먼저 clean up이 완료된 RNA를 최대 500ng/μl를 7μl와 각 시료의 specific한 공통 primer 염기서열로 overhang된 reverse transcription-PCR(이후 RT-PCR)용 primer를 1μl 넣고 잘 섞어준다. 70°C에서 3분간 denaturation한 후 시료 tube를 바로 얼음에 꽂아 넣는다. 얼음에 시료를 보관한 뒤 5X first strand buffer 4μl, template switch oligomer(1μg/μl) 1μl, RNA inhibitor 1μl, 0.1M DTT 2μl, 10mM dNTP 2μl, superscript II 2μl를 섞어 master mix를 제작한다. 그 후 각 시료 tube에 제작한 master mix를 12μl씩 넣고 조심스럽게 섞어준 뒤 42°C에서 90분간 반응시켜 reverse transcription을 완료한다.

이렇게 만들어진 cDNA는 single strand cDNA이므로 double strand cDNA로 만들기 위해 second strand synthesis를 수행한다. 먼저 DEPC water 108μl, 10X advantage PCR buffer 15μl, RNase H(5U/μl) 1μl, 10mM dNTP 3μl, advantage polymerase 3μl를 섞어 master mix를 제작한다. 이렇게 얻어진 master mix 130μl를 cDNA 시료 tube에 넣고 잘 섞어준 뒤 37°C에서 5분, 94°C에서 2분간 denaturation, 65°C에서 3분 specific priming, 75°C에서 30분 extension하여 double strand cDNA를 획득할 수 있다.

합성된 double strand cDNA는 Qiagen사의 PCR purification kit를 이용해 clean up한다. 먼저 반응 mixture의 5배 양의 PB Qiagen buffer를 넣어 잘 섞어준 뒤 파이프티프로 시료 용액을 제공되는 spin column에 넣는다. 이를 원심분리기를 이용해 1분간 최고속도로 돌려준 후 collection tube에 모인 액체는 버리고 column과 재조립한다. 여기에 제공되는 PE buffer(containing ethanol) 750μl를 넣고 2회 washing한 후, 최고속도로 1분간 원심분리를 2회 수행하여 column의 buffer를 완전히 제거한다. 마지막으로 1.5ml collection tube에 column을 옮기고 28μl로 elution하여 clean up을 완료한다.

Clean up이 완료된 시료로 공통 primer를 이용한 비대칭 PCR을 실시한다. Reverse primer에는 형광 염료인 HEX가 5'에 수식되어 있으며, forward primer와 함께 이용하여 PCR 반응으로 증폭하였다. 각 primer의 양은 forward primer가 0.25 pmol, reverse primer가 5 pmol로 비대칭적으로 사용되었다. PCR 반응은 주형 DNA의 denaturation 단계, primer의 annealing 단계 및 DNA의 polymerization을 통하여 수행된다. PCR을 완료한 뒤 얻어진 시료는 1% agarose gel에서 loading dye와 함께 5μl를 loading, 15분간 전기영동(electrophoresis)을 수행하여 UV상에서 증폭 여부를 확인한다. 증폭이 확인된 뒤 목적 유전자에 대해 모세관 전기영동 기반의 단일쇄 형태변환 다형성(SSCP)을 수행하였다.

### (3) primer 별 특이성 확인 및 개별 peak 위치 확인 실험

디자인된 primer들이 여러 균주가 섞인 환경에서 목표 균주에 특이적으로 반응하여 특정 균주만을 검출할 수 있는지를 알아보기 위해 개별 primer를 이용하여 실험을 진행하였다. 그 결과 각각의 균주에 대해 목표 균주만을 특이적으로 검출할 수 있는 것을 확인하였고, CE-SSCP에 의해 하나의 주된 peak만을 검출할 수 있었다. 그림 20은 패혈증 관련 미생물, 그림 21은 *E. coli*의 mRNA에 관한 실험결과를 나타낸다.

### (4) 7종의 16S rRNA(7종의 패혈증 균주 유래) 및 7종의 *E. coli* mRNA 동시 검출 실험

7종의 16S rRNA 및 7종의 *E. coli* mRNA에 대하여 상기 디자인한 primer를 이용하여 동시 검출이 가능한 지를 알아보았다. 7종의 균주의 16S rRNA가 섞인 타겟과 7종의 mRNA가 섞인 타겟을 대상으로 specific RT primer를 섞어 reverse transcription 및 template switching 그리고 PCR을 수행하였고, PCR 산물을 CE-SSCP로 분석하였다. 그 결과는 그림 22과 같으며 개별 primer로 assay한 결과와 비교하여 예상되는 peak 위치에 7종 모두에 해당하는 peak를 관찰할 수 있었다. (그림 22) 동시 측정 실험에서는 reverse transcription primer의 non specific binding으로 인한 noise peak 들이 관측되었으나 각 균주에 해당하는 peak과 독립적인 위치에 나타나 분석에는 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

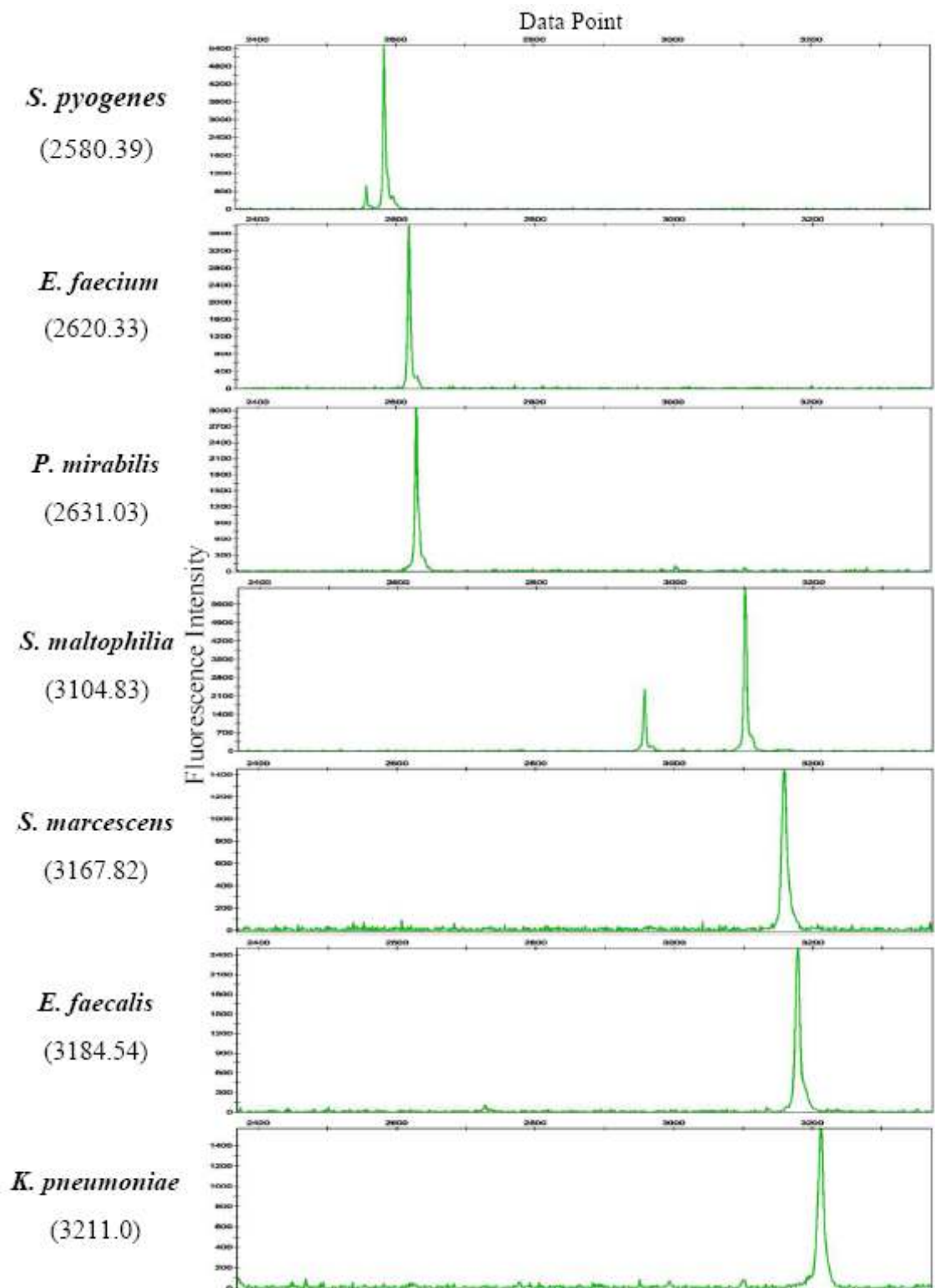


그림 20. 패혈증 관련 미생물 16S rRNA에 대한 CE-SSCP 개별 peak 및 특이성 확인 (7종)

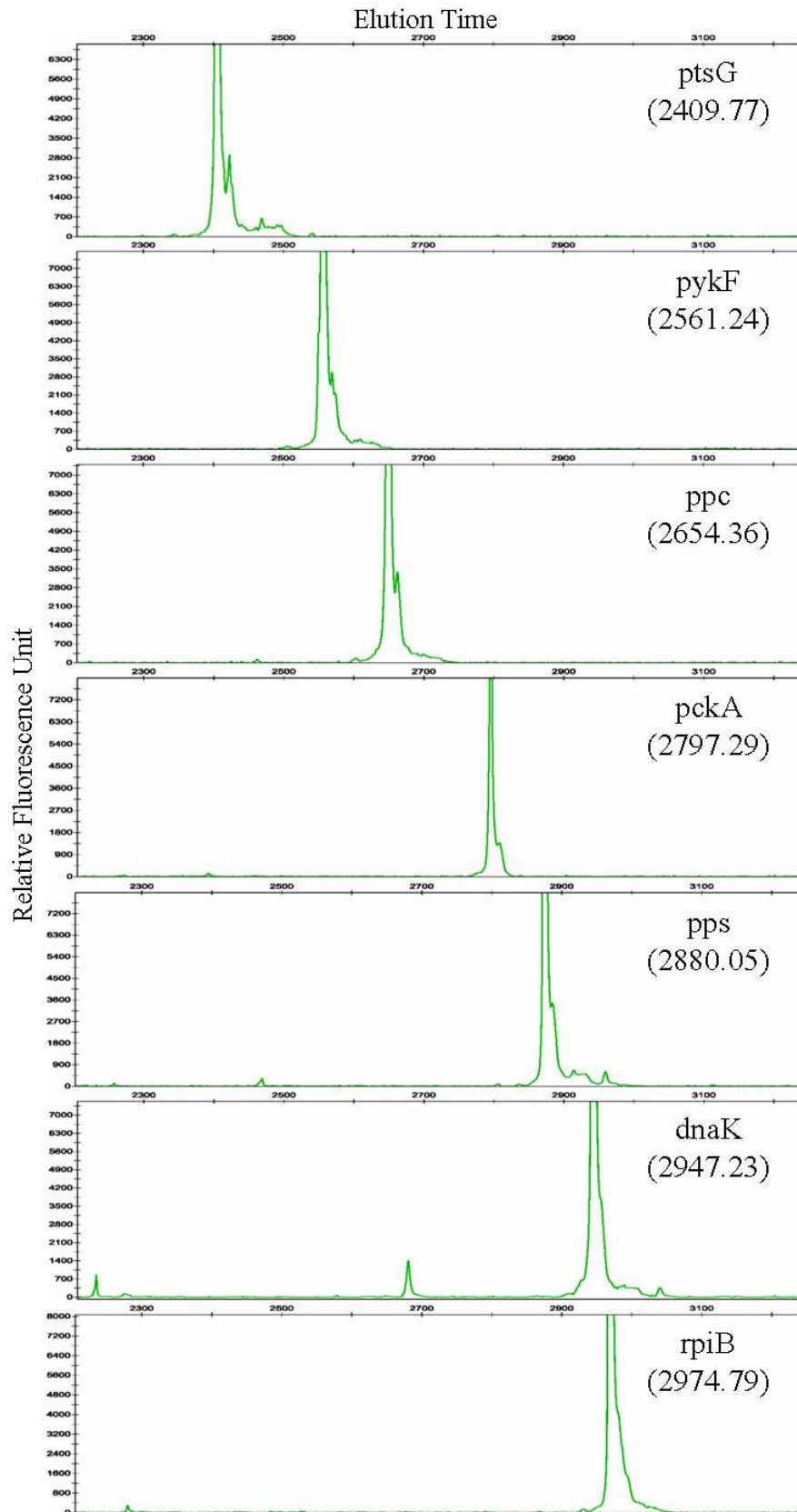


그림 21. *E. coli* mRNA 7종의 개별 CE-SSCP peak 및 특이성 확인

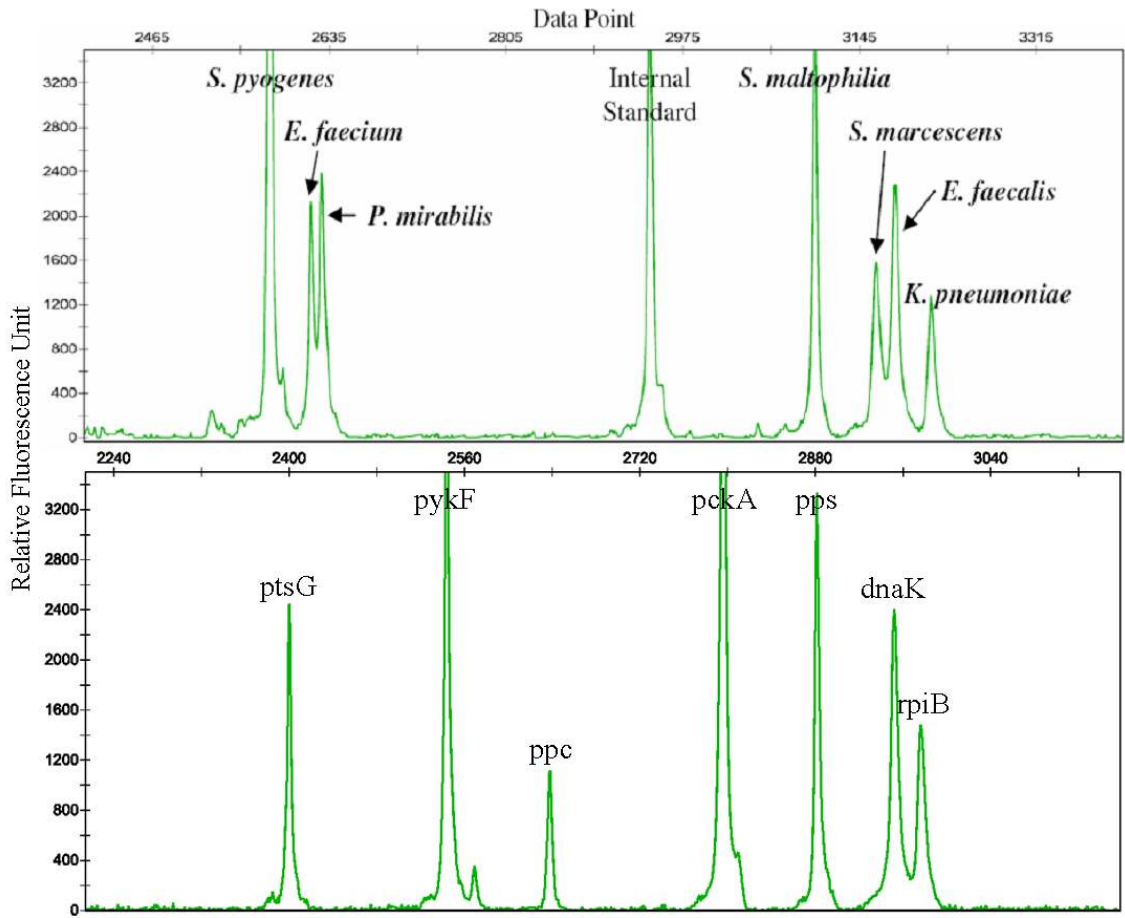


그림 22. 7종의 16S rRNA 및 7종의 *E. coli* mRNA에 대한 동시검출 결과

#### (5) RNA 의 혼합액에서 개별 mRNA serial dilution 결과

RNA의 혼합액에서 개별 RNA의 serial dilution이 CE-SSCP 분석 결과에 잘 반영되는 지를 알아보았다. CE-SSCP 분석 결과 serial dilution으로 해당 RNA의 peak가 변화하는 것을 관찰 할 수 있었고, 해당 dilution된 peak의 다른 peak들에 대한 ratio가 초기 농도와 높은 상관성을 갖는 것을 확인할 수 있었다. 그림 23은 *E. coli*의 *pykF*, *pps* 유전자의 mRNA 농도에 대한 serial dilution 결과로 7종의 mRNA의 혼합액에서 각 대상 유전자의 양이 변화함에 따라 peak pattern이 변화하는 것을 보여주고 있다. 그림 24는 이러한 peak pattern의 변화가 정량적이며, 특히 혼합액에서 그 양이 고정되어 있는 다른 mRNA에 대한 ratio와 선형적인 상관관계를 갖는 것을 나타내어 주는 그래프이다. 이후 7종의 균종에 대한 동시 검출 및 정량 실험에서 그 양이 고정된 internal standard RNA를 포함시켜 고정된 양의 standard RNA에 대한 ratio를 구하여 정량 곡선을 완성하였다.

#### (6) 7종에 대한 혼합 균집에서의 개별 정량 결과

7종의 균주의 균집에서 개별 미생물의 양을 정량할 수 있는지 알아보기 위해서, 16S rRNA의 혼합액에서 한 미생물의 rRNA 만을 serial dilution하여 peak area의 변화를 확인하였다. 이 정량 실험을 통하여 개별 미생물의 rRNA에 해당하는 peak의 internal standard peak에 대한 비율이 일정하며, 초기 rRNA양에 비례한다는 것을 알 수 있었다. 7종 모두에 대한 정량 그래프를 작성하였고, 4~6 point에서 측정이 이루어졌으며, 평균  $R^2$  값은 0.98로 relative peak area가 초기 rRNA의 양과 매우 선형적인 상관관계를 가짐을 알 수 있었다. (그림 25) 참고로,  $R^2$  값은 상관성을 나타내는 지표이며, 1에 가까울수록 선형적 상관관계가 강하다.

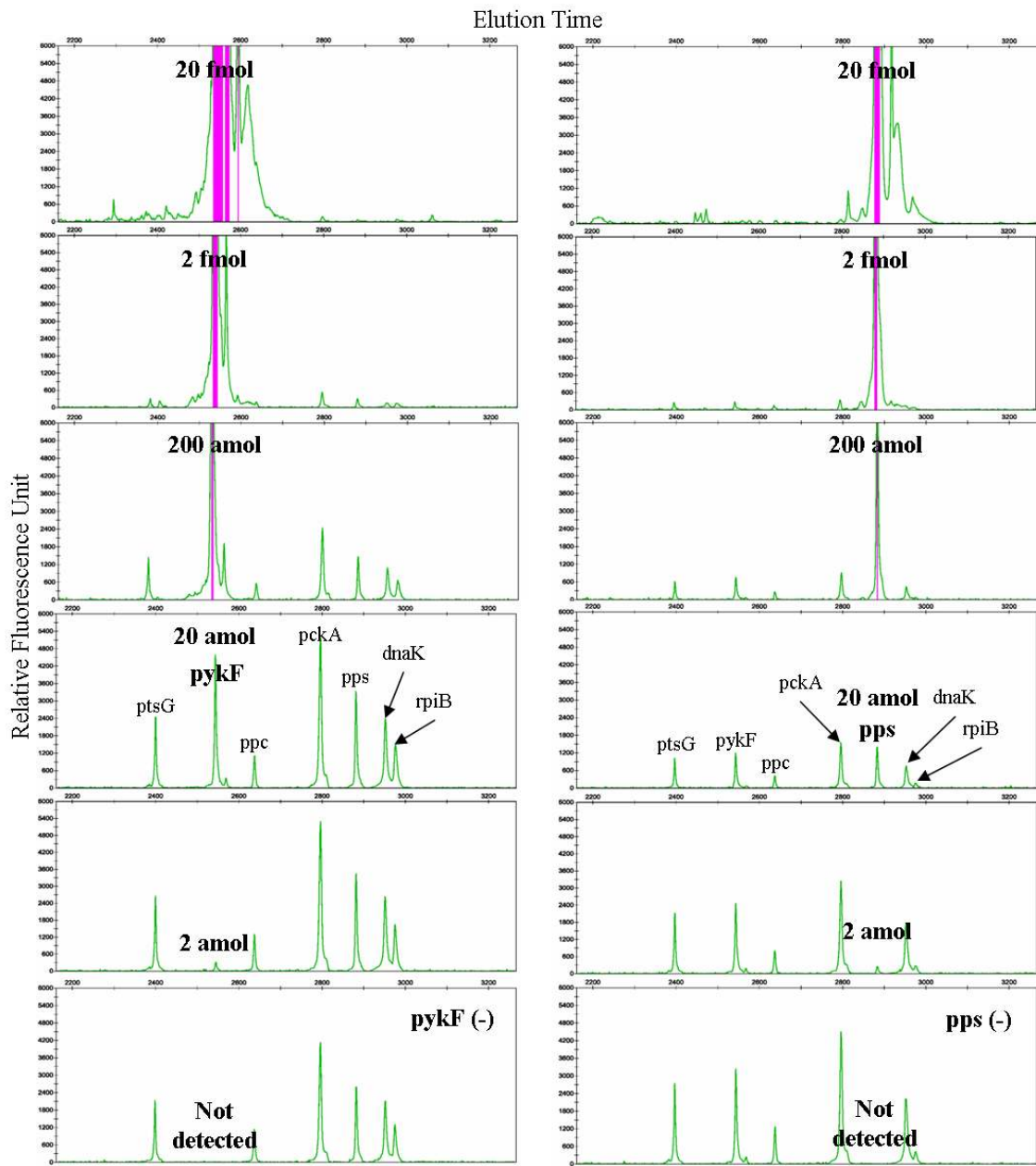


그림 23. pykF와 pps mRNA에 대한 serial dilution에 따른 peak pattern 변화



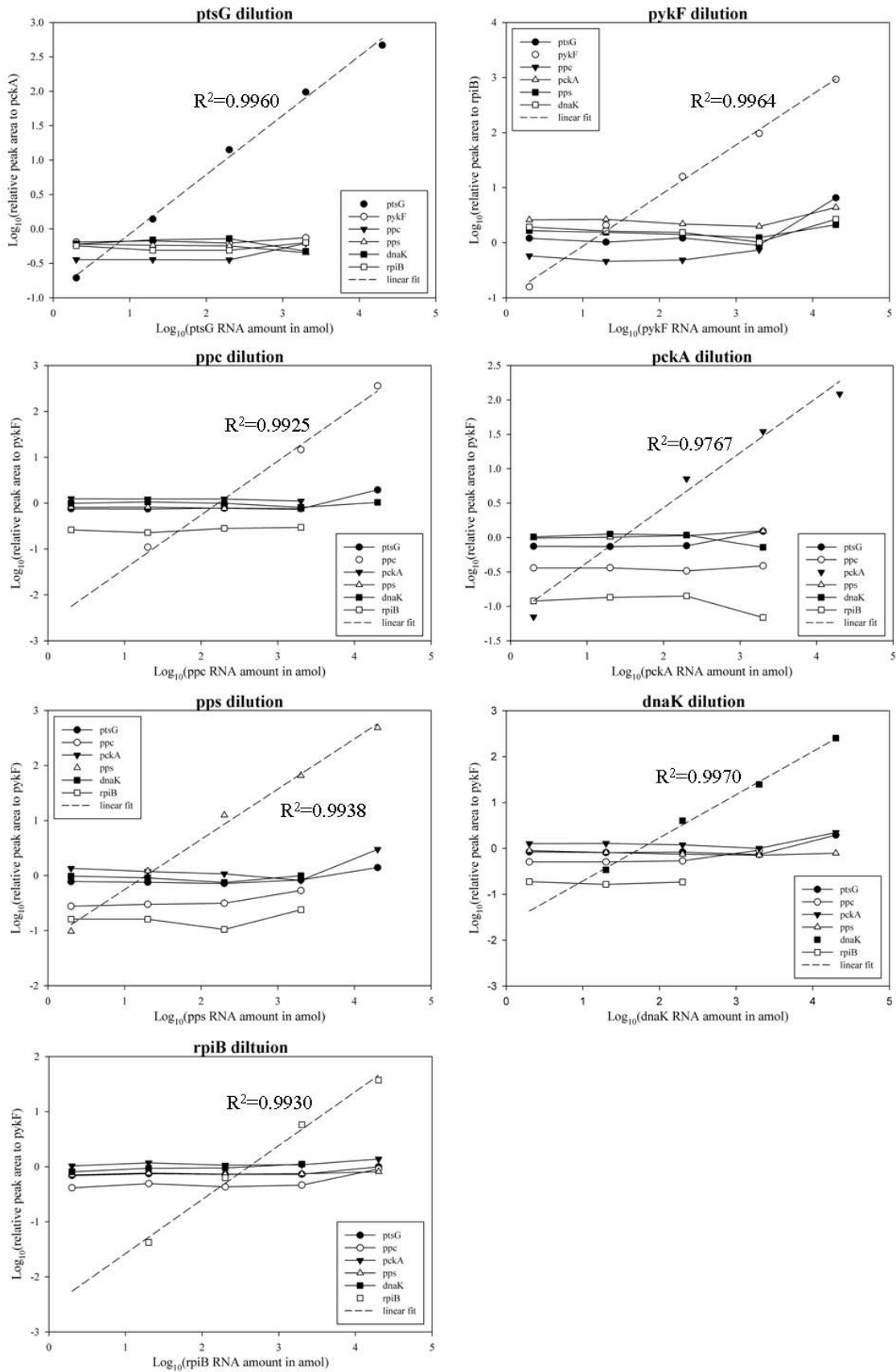


그림 24. Mixed sample에서 각 *E. coli* mRNA의 양을 변화시켰을 때 상대적 peak 넓이와 mRNA 양의 상관관계

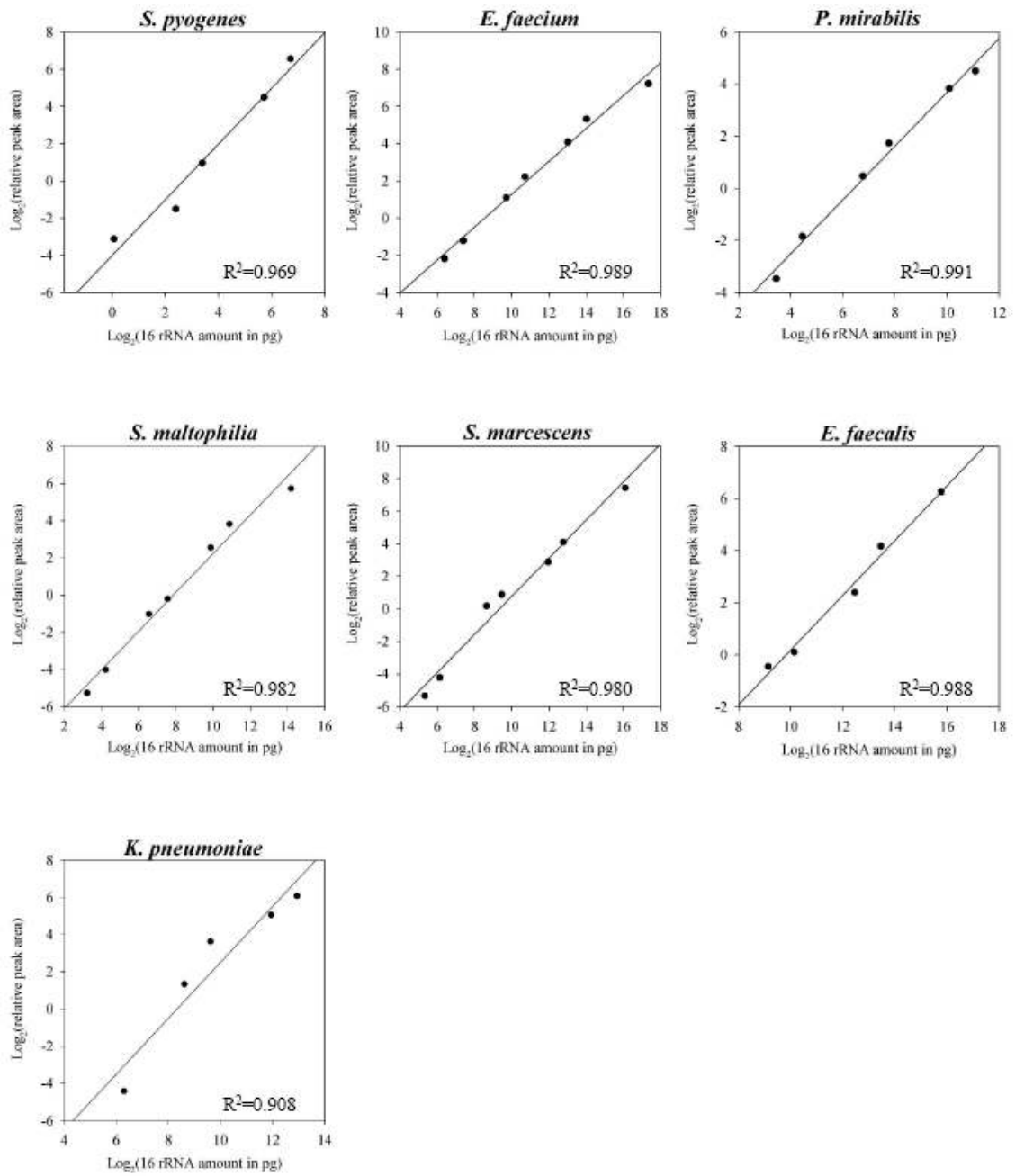


그림 25. 7종 패혈증 균주의 상대적 peak 넓이와 16S rRNA 양과의 상관관계

## 제 4 항 CE-SSCP resolution 및 정량성 향상을 위한 polymer matrix 연구

가. 새로운 polymer matrix 도입의 필요성 및 연구 대상

CE-SSCP 분석의 기반이 되는 모세관 전기영동 (CE) 기술은 개발 당초 염기서열 분석에 그 주된 기능을 할애해 왔으며, 이에 따라 전기영동의 분리과정에서 필수적인 역할을 담당하는 polymer matrix 역시 염기서열 분석에 적합한 것으로 개발되어 왔다. 이러한 연구에 의해 현재 상용화되어있는 모세관 전기영동용 기기들과 마이크로칩의 대부분은 polymer matrix로 linear polyacrylamide(LPA)나 poly(N,N-dimethylacrylamide) (PDMA)를 사용하고 있으며, 이 이들은 좋은 sieving capacity와 적절한 viscosity를 통해 현장에서 널리 사용하기 좋은 polymer matrix로 평가받고 있다.

그러나 LPA homo polymer는 dynamic coating이 불가능하다는 단점을 갖고 있다. 모세관 전기영동은 모세관 혹은 마이크로 채널 전체에 전기장이 가해지며, polymer matrix가 민감한 sieving material로서 좋은 능력을 보이기 위해서는 이 전기장에 의해 영향을 받아 electroosmotic flow를 일으켜서는 안된다. 만약 electroosmotic flow에 의해 polymer matrix가 흐를 경우 최종 단계에서 DNA의 검출은 정량적이지 못한 형태를 띠게 되므로, polymer matrix는 모세관이나 마이크로 채널과 강한 interaction에 의해 고정되어야 한다. 이 interaction에 의한 고정을 dynamic coating이라고 부르며, 이것이 불가능한 LPA homo polymer를 사용하는 모세관과 마이크로 채널의 경우 대부분 그 내벽에 특수한 처리를 하고 있다.

또 PDMA의 경우에는 LPA에 보다는 좋은 dynamic coating 기능을 갖고 있어 capillary의 전처리가 불필요하나, DNA와 polymer간의 hydrophobic interaction 때문에 sieving capacity 측면에서 LPA에 비해 많이 뒤쳐진다. 따라서 이러한 불편한 점들을 극복하고 높은 resolution을 갖는 새로운 polymer matrix의 도입이 필요하다.

CE-SSCP에 활용되는 polymer matrix가 갖춰야 할 요건들은 다음과 같이 정리될 수 있다. 첫째, sieving capacity, 즉 한번에 구분해 낼 수 있는 peak의 숫자가 많아야 한다. 둘째, dynamic coating 능력으로 대표되는 안정적이며 재현성 높은 측정이 가능해야 한다. 셋째, 좋은 sieving 능력을 유지하면서도 현장에서 다루기 편한 정도의 viscosity를 가져야 한다.

이러한 요건을 만족하는 후보로서 본 연구진이 선택한 것은 Poly(ethyleneoxide)-Poly(propyleneoxide)-Poly(ethyleneoxide) Triblock Copolymer

(이하 PEO-PPO-PEO) 이다. PEO-PPO-PEO는 친수성인 PEO 부분과 소수성인 PPO 부분으로 이루어진 삼중블록공중합체이며, 따라서 수용액 상태에서 소수성 부분인 PPO가 서로 뭉쳐 micellar structure를 형성하게 된다.

Micellar structure를 형성한 PEO-PPO-PEO는 소수성의 PPO core와 친수성의 PEO brush 형태로 생성된다. PEO brush는 capillary 내부 벽면의 silanol기와 수소 결합을 하며, 이는 PEO-PPO-PEO가 electroosmotic flow에 의해 움직이는 것을 방해하는 dynamic coating 능력을 가지게 됨을 뜻한다. 그러므로 PEO-PPO-PEO는 안정적인 분석이 가능한 polymer matrix로 예상, 이에 대해 시험을 수행하였다.

나. 다양한 PEO-PPO-PEO의 시험 및 최적 가동조건 탐색

시험해본 PEO-PPO-PEO는 3종류로, 표 10에 정리하였다. 이들은 구입 가능한 다양한 PEO-PPO-PEO 중에서 수용액 상에서 투명한 형태로 존재하는 것들을 고른 것이며, CE의 가동조건을 방해하지 않는 점도에서 시험되었다. Resolution의 비교대상으로는 CE-SSCP 분석을 위해 널리 사용되는 ABI社의 GeneScan polymer를 사용하였으며, 이는 주 성분으로 PDMA를 사용하고 있다.

모의 실험 대상 균주로는 다음 4종의 식중독 관련 균주를 선택하였으며, 16S rRNA 유전자의 V2 영역을 증폭하는 universal primer를 이용하여 PCR을 수행하였다 (표 11). primer의 염기서열은 forward가 5'-GGC GAA CGG GTG AGT AA-3', reverse가 5'-ACT GCT GCC TCC CGT AG-3'였으며, 형광 염료는 forward primer에 수식하였다. 각 균주에서 증폭된 염기서열의 길이는 255nt로 동일하였다.

분석 능력을 비교하기 위해 resolution을 이용하였다. Resolution은 보통 다음과 같은 식으로 나타낼 수 있다.

$$R_s = 0.5887 \Delta d / hw$$

식 3. Resolution의 계산식

식 3에서  $\Delta d$ 는 두 peak 간의 거리이며,  $hw$ 는 두 peak의 중간 높이에서의 평균적인 두께를 나타낸다. 그러므로 resolution은 peak 간의 거리가 크면 높고, peak의 두께가 두꺼우면 낮아지는 경향을 갖고 있다. 이 연구에서는 이러한 resolution을 이용하여 여러 조건의 polymer matrix를 비교하였다.

표 10. 사용된 PEO-PPO-PEO의 종류

이름	Polymer 형태	Molecular weight (Da)	PEO contents
F68	PEO <sub>80</sub> PPO <sub>30</sub> PEO <sub>80</sub>	8400	80%
F127	PEO <sub>99</sub> PPO <sub>69</sub> PEO <sub>99</sub>	12600	70%
Mw14600	PEO <sub>137</sub> PPO <sub>43</sub> PEO <sub>137</sub>	14600	82.5%

표 11. 모의 실험 대상 균주

Pathogen	Amplicon length (bp)	Mw
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	255	79347.4
<i>Yersinia enterocolitica</i>	255	79317.3
<i>Vibrio vulnificus</i>	255	79363.4
<i>Vibrio cholerae</i>	255	79119.2

(1) GeneScan polymer matrix를 이용한 대상 균주의 분리

PDMA를 주성분으로 하는 GeneScan polymer는 보통 3~4%로 EDTA 버퍼에 희석하여 사용된다. 그림 26은 3%에서 6%까지 다양한 농도로 희석된 GeneScan polymer matrix에서의 대상 균주의 분리 경향을 보여주고 있다. 3~4%에서는 분리가 불가능하지만, 6%에서는 4종의 균주가 구분이 가능해진다.

그러나 이렇듯 분리 능력은 증가하였지만, electropherogram을 살펴보면 농도가 증가함에 따라 peak의 두께가 점점 더 증가함을 알 수 있다. 따라서 resolution측면에서 볼 때 과연 이들이 향상되었는지를 확인해 보았다.

이들의 resolution은 그림 27와 같이 계산되었다. 이를 확인해 보면 resolution이 증가한 것도 있으나 *V. parahaemolyticus*와 *Y. enterocolitica* 사이의 resolution은 거의 변화하지 않음을 알 수 있다. 그러므로 단순히 농도를 상승시키는 것만으로는 resolution을 상승시키기는 어렵다고 결론지을 수 있다.

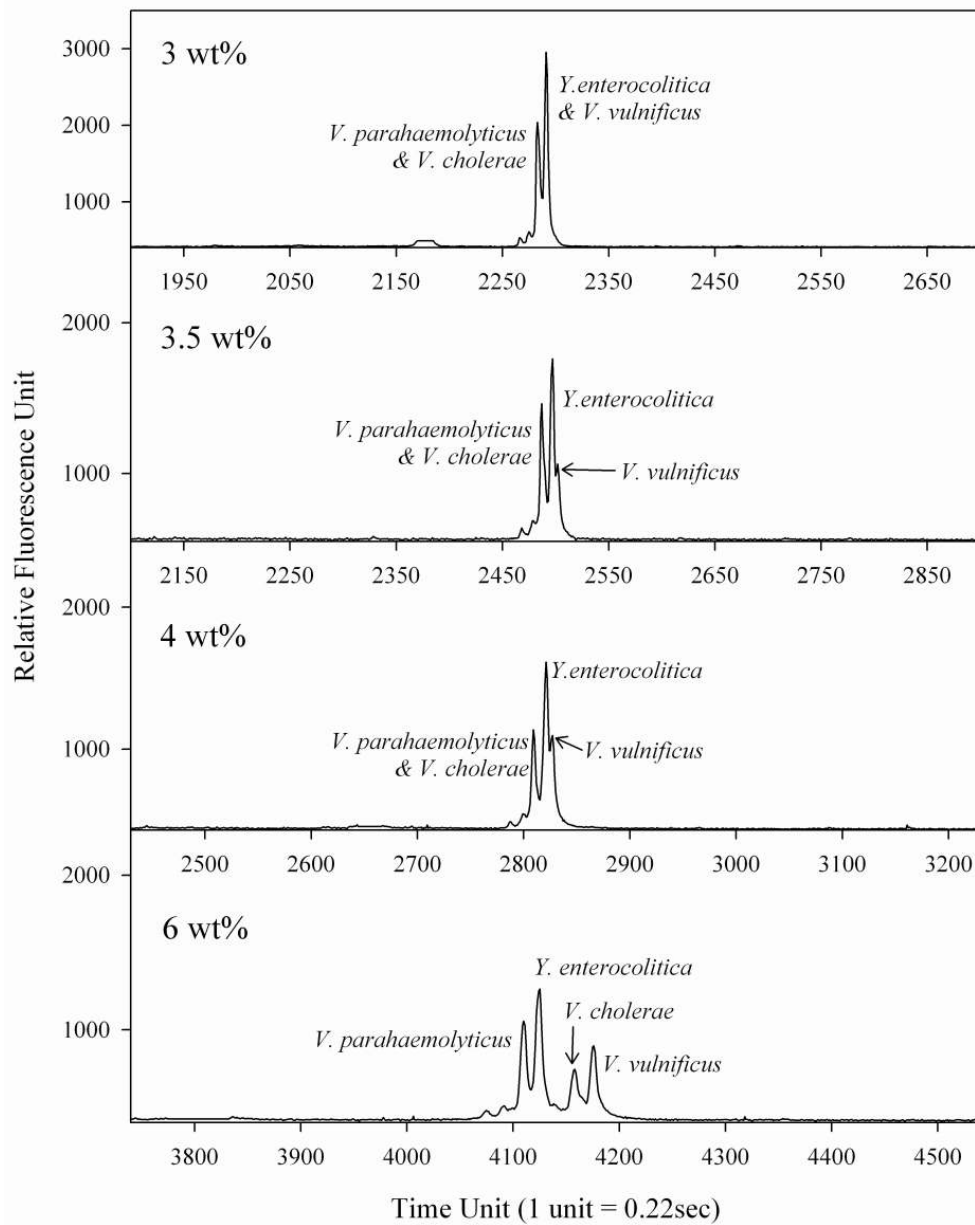


그림 26. GeneScan polymer의 농도에 따른 분리 경향 변화

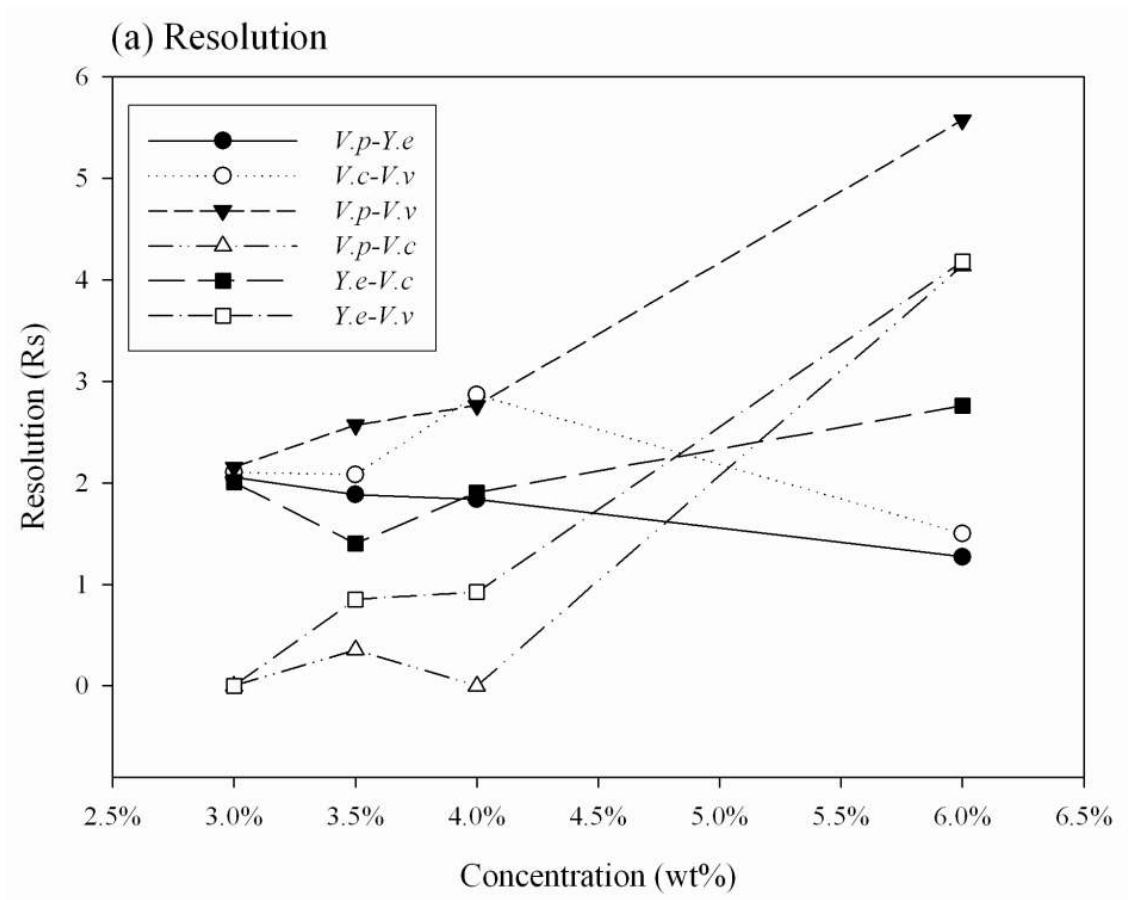


그림 27. GeneScan polymer matrix에서의 농도변화에 따른 resolution 경향



## (2) PEO-PPO-PEO polymer matrix를 이용한 대상 균주의 분리

사용된 PEO-PPO-PEO 중 F68의 경우는 peak이 매우 넓고 결과가 좋지 않아 resolution을 따로 계산하지 않았으며, 결국 F127과 Mw 14600 PEO 82.5%에 대해서만 비교할 수 있었다(그림 28).

그림 29에서 볼 수 있듯 F127은 9~13%의 농도에서 모두 4종의 균주를 분리할 수 있었다. 그러나 15%에서 갑작스럽게 넓은 peak width를 보이고 있다. 때문에 resolution은 그림 31에서 볼 수 있듯 급격한 감소 경향을 나타낸다.

Mw 14600, PEO 82.5%의 경우에도 11~15% 범위에서 모두 4종 균주를 쉽게 분리할 수 있었으며, F127과 마찬가지로 일정 농도 이상에서 갑작스럽게 peak width가 증가한다. 그러므로 그림 32에서 볼 수 있듯 16%에서 resolution이 급락한다. 그러나 Mw 14600 PEO 82.5%의 15% 조건에서 가장 높은 resolution을 나타내고 있으며, 특히 Yersinia peak에서 나타나는 additional peak은 다른 조건에서는 찾아볼 수 없는 것으로 급격한 resolution 상승에서 나타나는 특이한 현상이다.

GeneScan polymer와 비교해 볼 때 resolution 값은 PEO-PPO-PEO가 훨씬 높음을 알 수 있으며, 따라서 PEO-PPO-PEO의 CE-SSCP 분석능력이 일반적으로 사용되는 GeneScan polymer 보다 월등함을 알 수 있다. 이는 농도가 상승하면서 peak의 위치가 재정렬, 비로소 분리가 가능해지는 GeneScan polymer와 달리 PEO-PPO-PEO는 resolution의 상승이 peak width의 감소로 인해 이뤄지는 것이기 때문이다.

(b) Pluronic F68

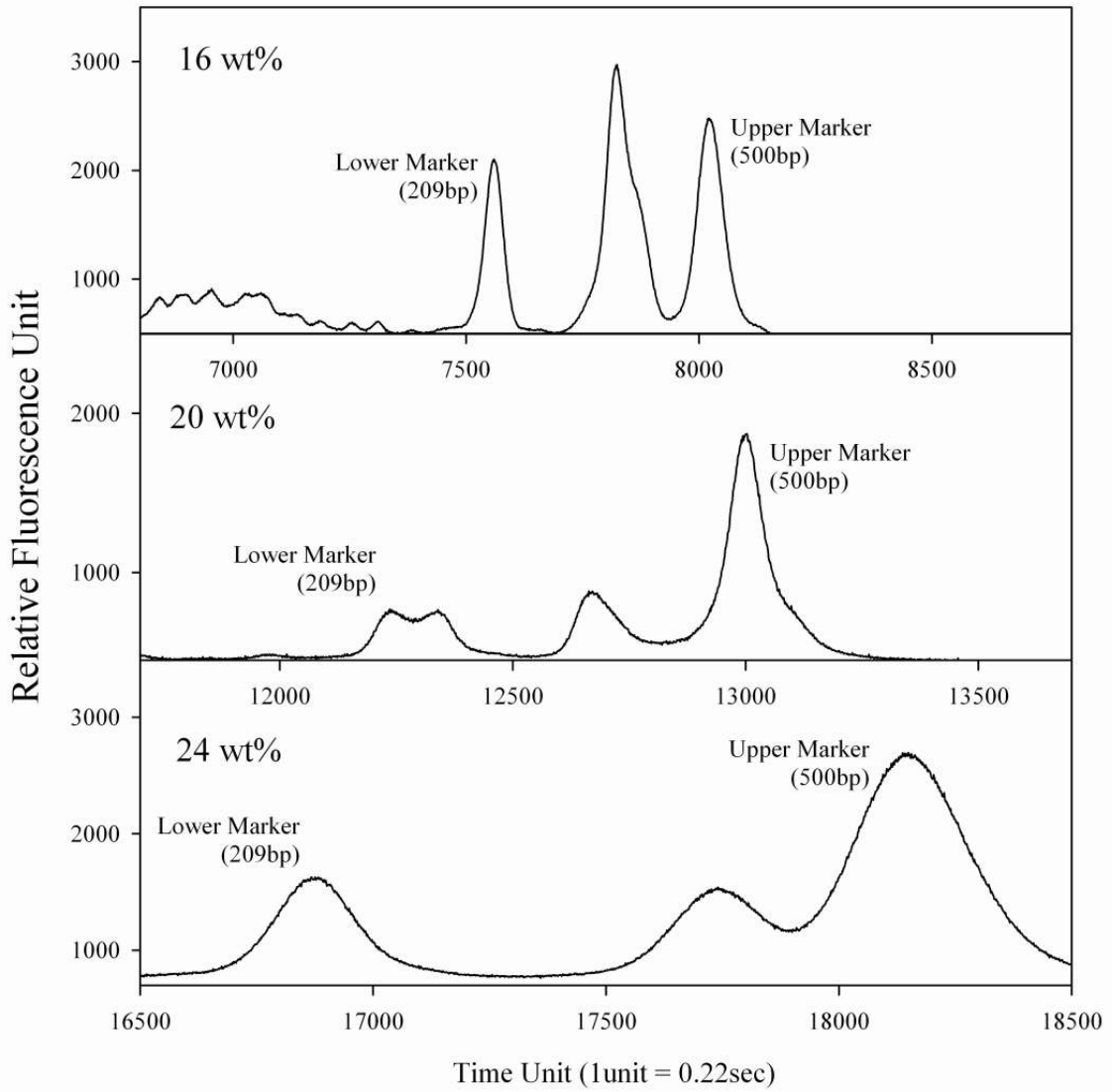


그림 28. F68의 농도에 따른 electropherogram

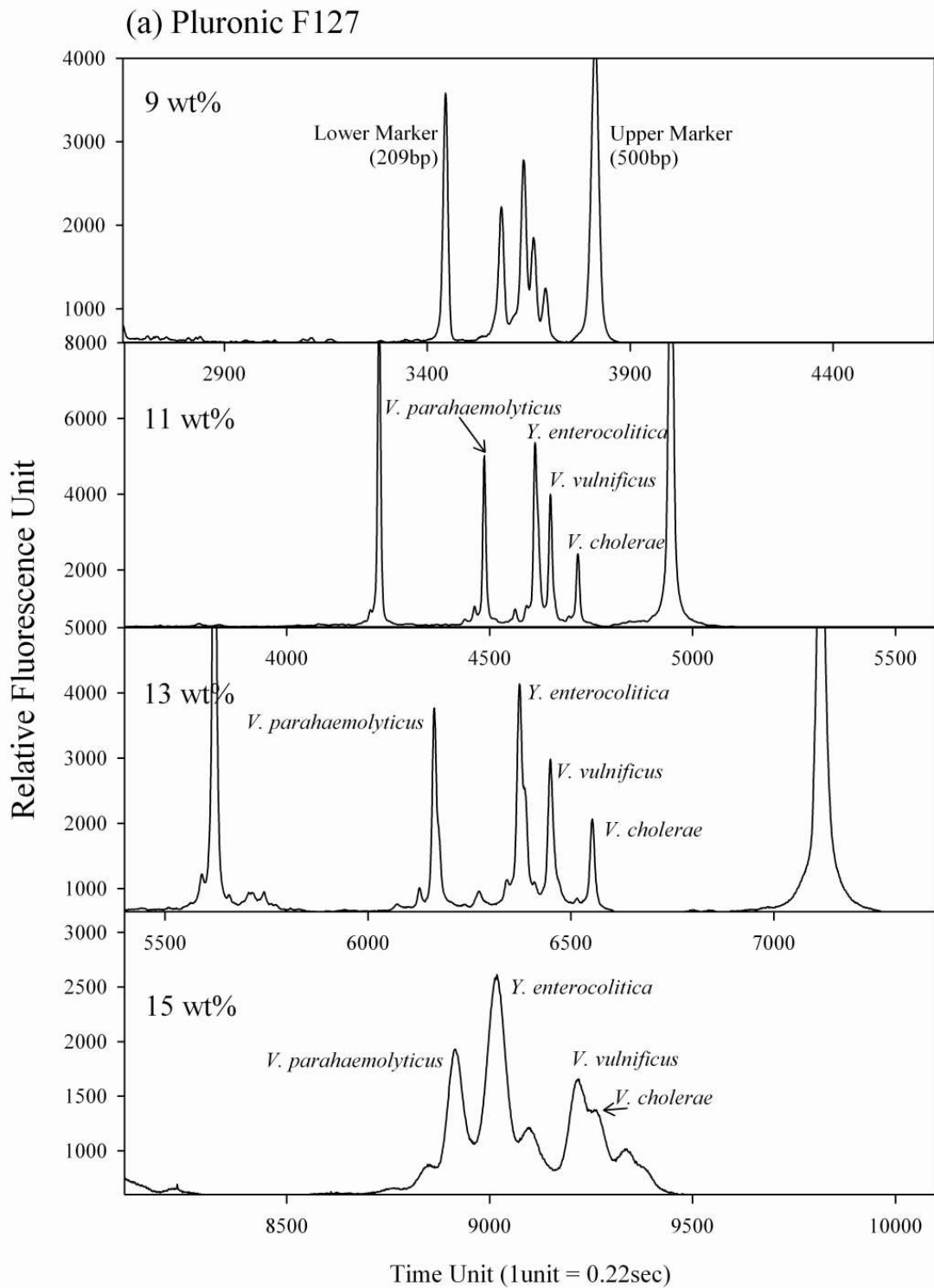


그림 29. F127의 농도에 따른 electropherogram

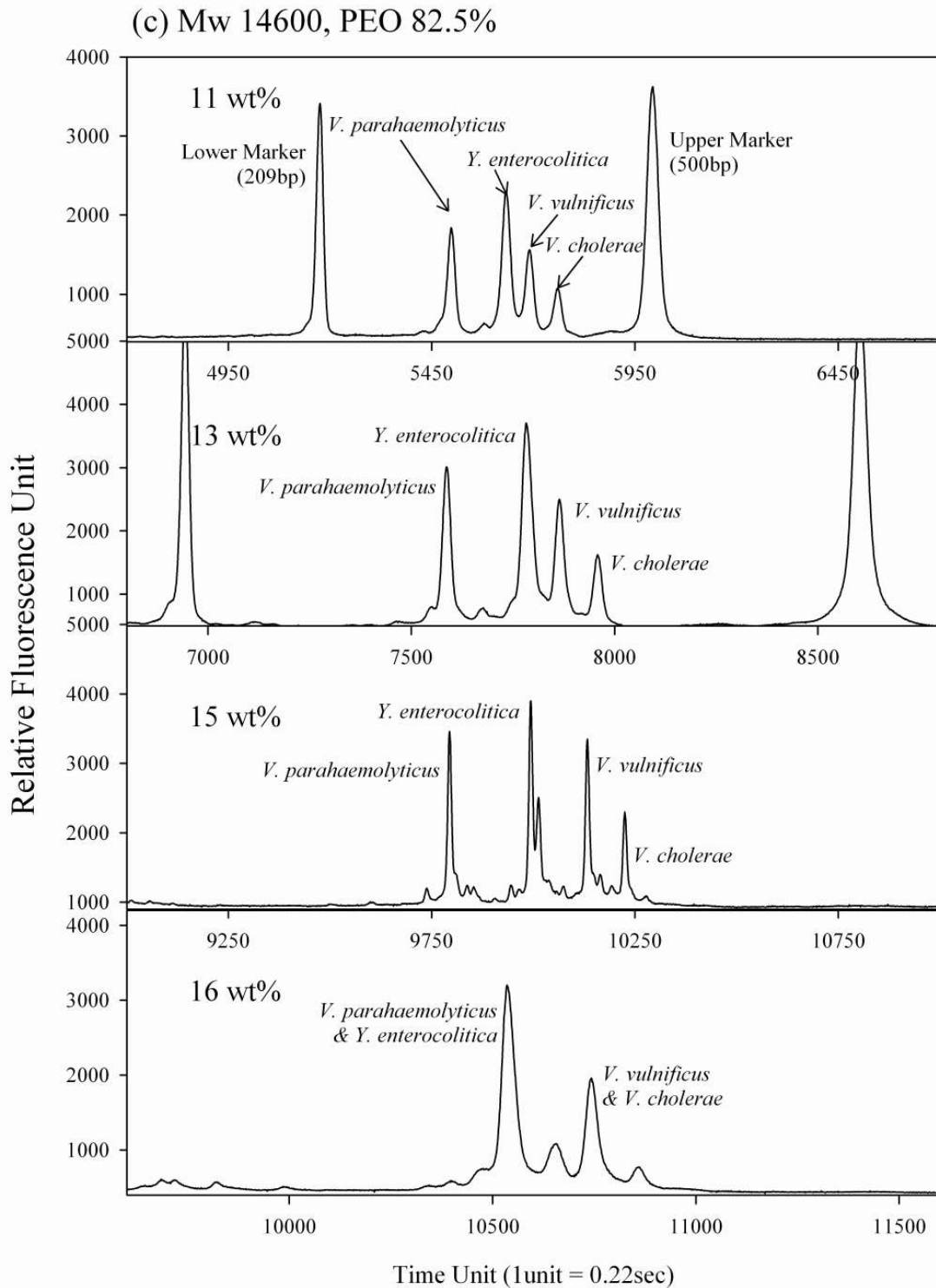


그림 30. Mw 14600, PEO 82.5%에서의 농도에 따른 electropherogram

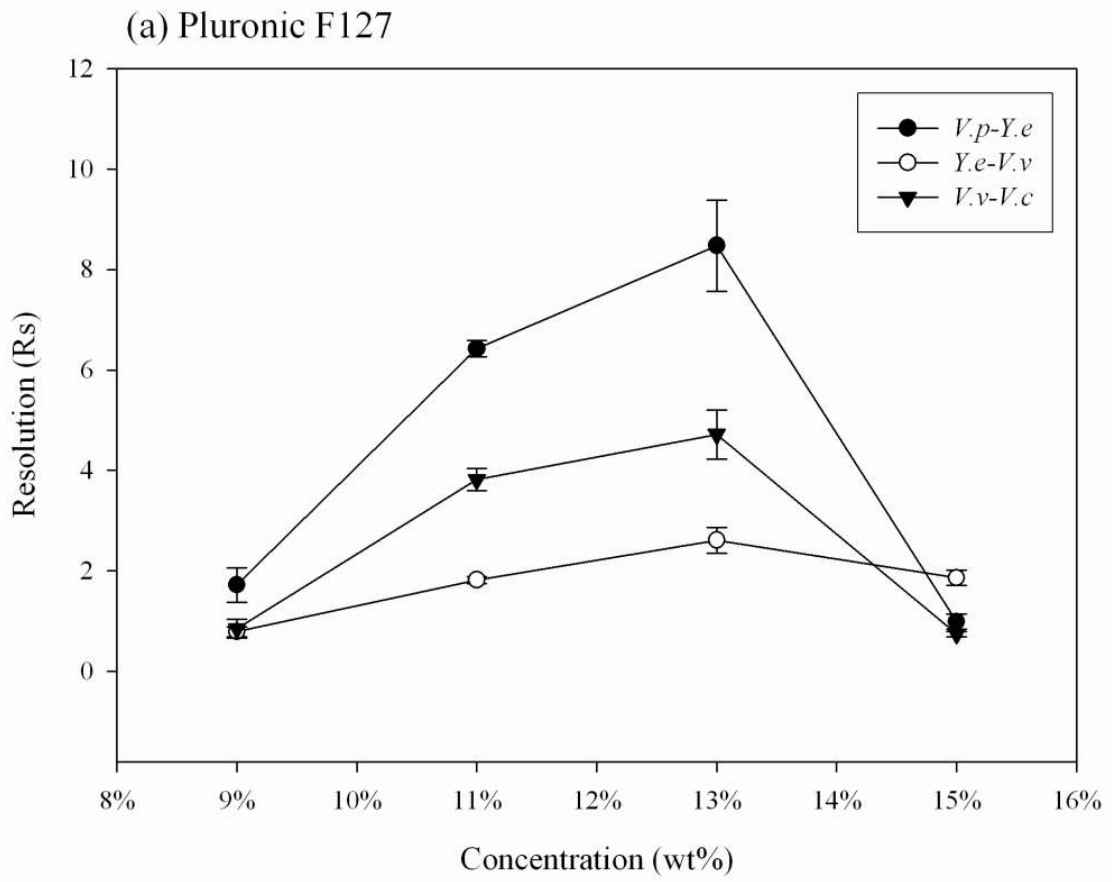


그림 31. F127의 농도 변화에 따른 resolution 변화 경향

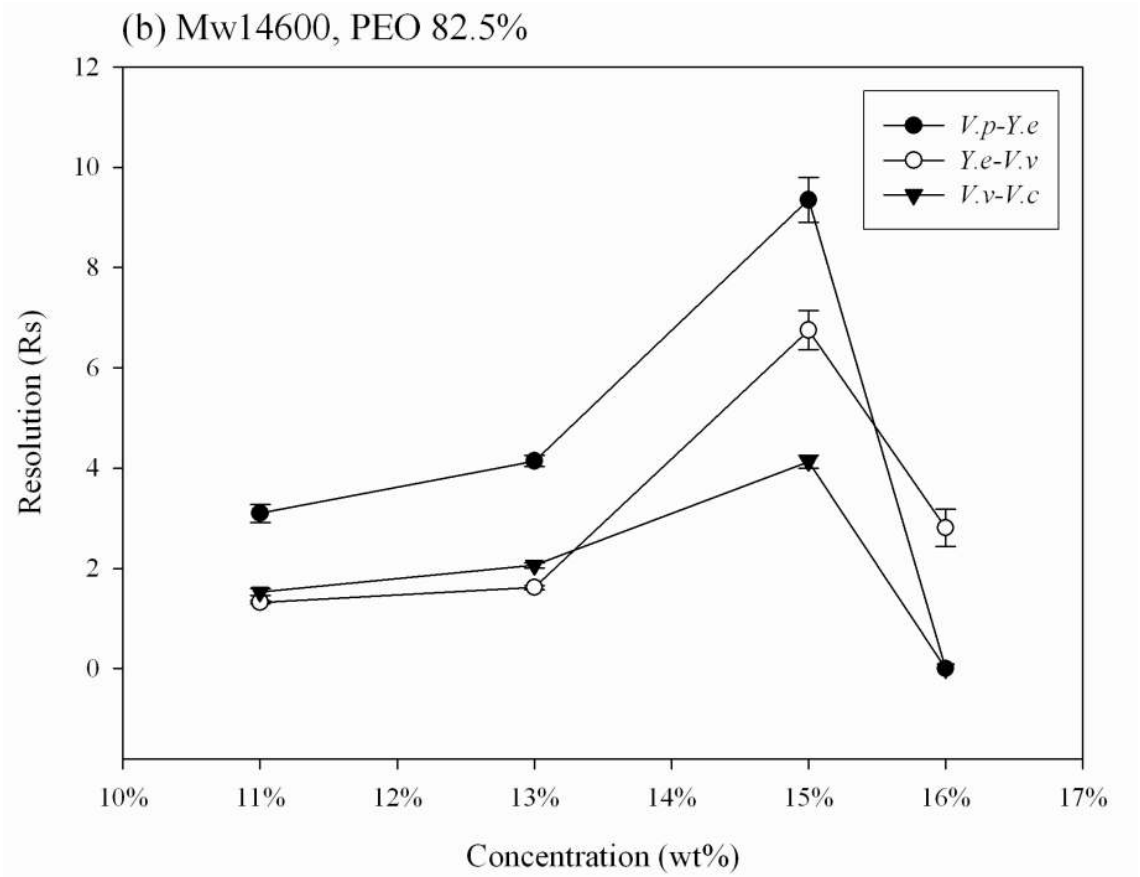


그림 32. Mw 14600, PEO82.5%의 농도 변화에 따른 resolution 변화 경향

### 제 3 절 병원균의 초정밀 정량분석 방법 개발

#### 제 1 항 동시 검출

본 연구팀은 인수 공동감염성 질환의 여러 대상균을 한번의 PCR 반응과 하나의 capillary로 진단함과 동시에 정량적인 정보까지 얻을 수 있는 기술을 개발하고자 하였다. 우선, 모델 시스템으로 인수 공동 감염성 질환의 원인이 되는 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O157 을 선정하여 실험하였다. 16s rDNA는 총 7개의 conserved region과 variable region이 연속적으로 존재하는 구조로 이루어져있다. 그중에서 variable 2 region (V2) 은 다른 strain들 사이에서 염기서열이 가장 다양하다고 알려져 있다. 본 연구에서는 1 set의 universal primer를 이용하여 variable 2 region을 PCR 증폭하여 CE-SSCP로 분석하였으며, 총 5종에 대해서 분리가 가능하였다. 이때, PCR 산물의 길이는 각 strain마다 다양하지 않아서 기존의 전기영동 기술로는 분리가 불가능하나, CE-SSCP의 경우 염기서열 정보에 따른 단일쇄 DNA의 삼차원적 구조에 의해 분리가 일어나므로 분리가 가능하다. 즉 공통의 primer (V2 universal primers)로 증폭하여 분리가 가능하므로 앞선 연구 결과에서처럼 동시 정량이 가능한 것이다.

Universal primer는 V2 Forward (FAM 5'-AGGCAGCAGTGGGGAAT-3')와 V2 Reverse (HEX 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3') primer를 이용하였다. PCR 반응조건은 V2F primer는 5 pmole, V2R primer는 10 pmole, 55°C, 35 cycle에서 반응하였고, PCR product size는 180bp로 동일하였다. (표 12)

표 12. CE-SSCP를 이용한 인수공통 전염병균 분석에서 PCR product의 size와 LOD

Strain	PCR product size (bp)	Limit of Detection (LOD)	
		genomic DNA (fg)	Cell no.
<i>Listeria monocytogenes</i>	180	0.7	1.47
<i>Staphylococcus aureus</i>	180	14	29.50
<i>Bacillus anthracis</i>	180	14	29.50
<i>E. coli O157</i>	180	0.7	1.47
<i>Yersinia enterocolitica</i>	180	14	29.50

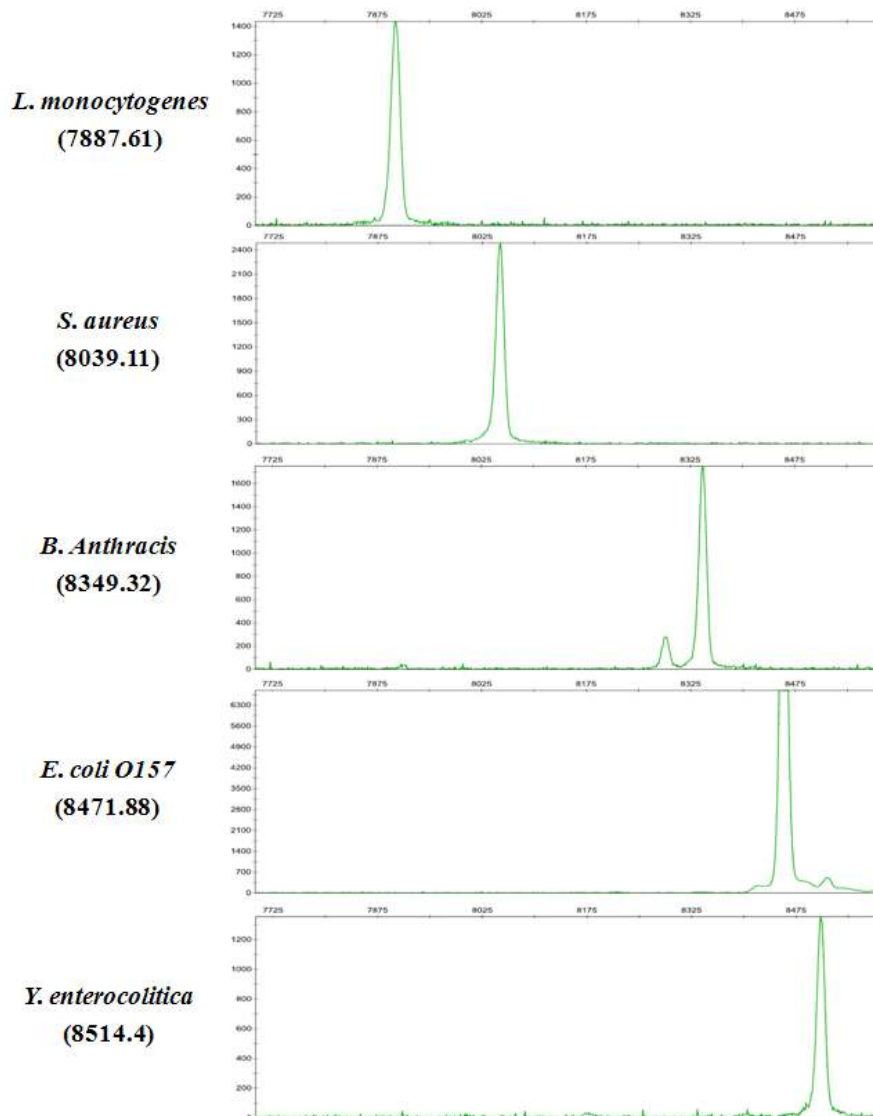


그림 33. CE-SSCP 분리를 위한 개별 반응 결과



먼저 개별적인 strain의 genomic DNA를 template로 하여 분석을 진행하고 CE-SSCP 분석이 각 타겟에 대해 특이적인 전기영동에서의 이동도로 나타나는지를 알아보았다. CE-SSCP를 이용한 분석에서는 그림 33과 같은 peak pattern을 얻을 수 있었다. 그림 33에서와 같이 각 타겟에 대한 전기영동에서의 이동도가 같은 size 임에도 불구하고 다양하게 나타나는 것을 알 수 있었다.

이어서 5종을 동시에 PCR 증폭하여 CE-SSCP로 분석하였을 때에도 분리가 잘 되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 34). 따라서 동시에 여러 균주가 존재하는 상황에서 본 연구팀이 디자인한 실험 과정을 통하여 어느 미생물이 존재하는지를 한 번의 실험을 통하여 검출 할 수 있다.

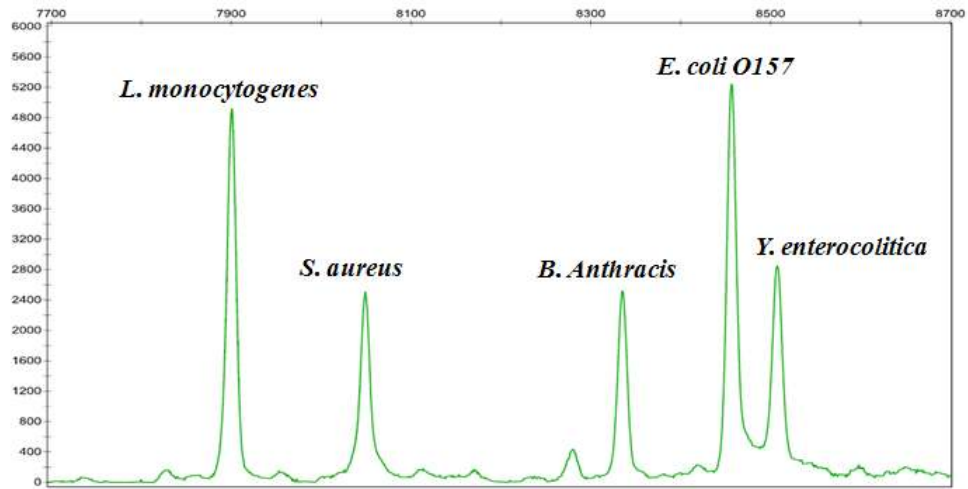


그림 34. 5종의 인수공통전염병균에 대한 CE-SSCP 동시분석 결과

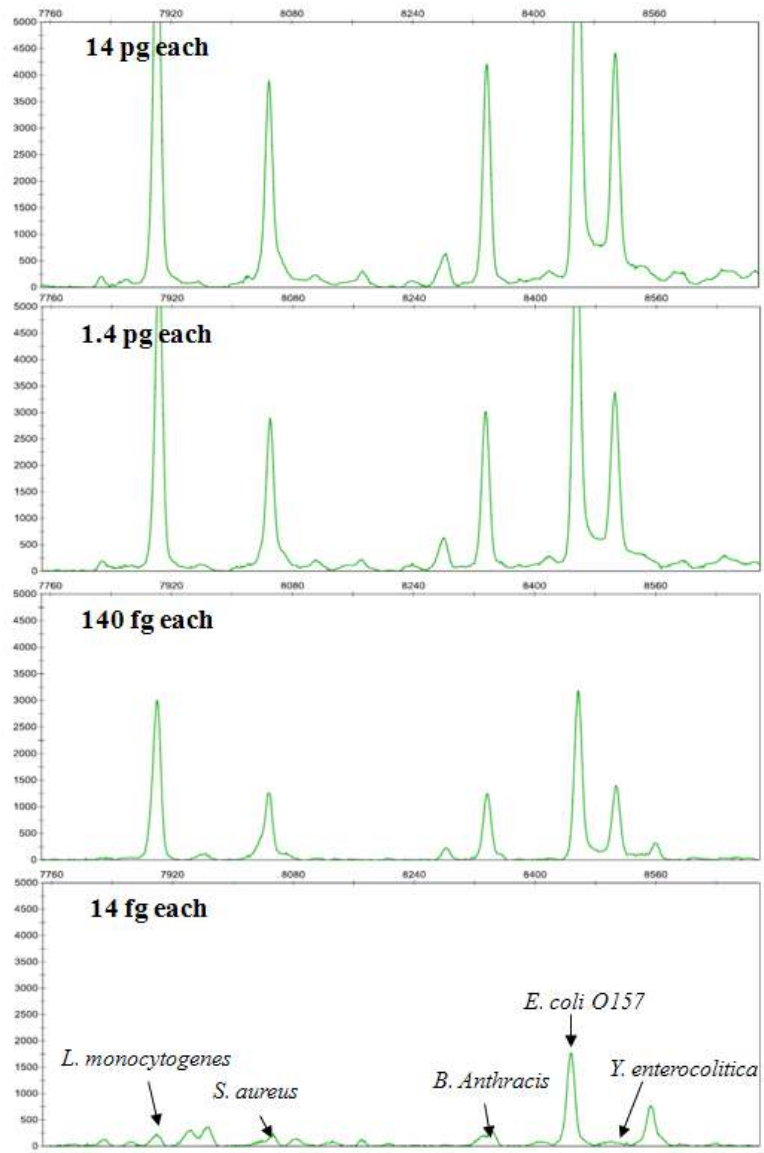


그림 35. 동시분석에서의 LOD 측정을 위한 serial dilution

## 제 2 항 최소한 검출이 가능한 농도 구하기 (Limit of Detection ; LOD)

각 병원균의 genomic DNA 농도를 측정하여 각 농도가 1.4ng/μl가 되도록 5종의 genomic DNA를 섞었다. 섞어진 genomic DNA를 serial dilution하여 PCR 증폭하였으며, PCR product sample 1μl를 취해서 CE-SSCP 분석에 필요한 sample로 만들어서 분석하였다. 분석한 결과 *S. aureus*, *B. anthracis*, *Y. enterocolitica*는 각각 14 fg까지 검출이 가능했고, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157는 각각 0.7 fg까지 검출이 가능했다(그림 35와 표 12).

결론적으로 본 연구를 통해 아주 적은 population의 병원균이 존재할 때에도 검출이 가능하며, cell 수를 측정할 수 있게 되었다. 예를 들어 *E. coli* O157의 경우  $5.44 \times 10^6$  base pair의 genome size를 가지고 있으므로, molecular weight이 약  $2 \times 10^9$  (g/mol)에 달하며 이는 약 1개의 cell만 있어도 검출이 가능한 수준이다.

## 제 3 항 정량 분석

Genomic DNA의 양은 미생물의 양과 선형적으로 대응되는 양이므로, genomic DNA의 양은 미생물의 양을 나타내는 간접적 지표이다. CE-SSCP 분석에서는 PCR 증폭이전의 genomic DNA의 양이 peak area와 높은 상관성을 보이므로, 결국 peak area를 통해 미생물의 양을 측정할 수 있다. 모든 실험은 3번씩 진행되었으며, 결과를 평균하여 반영하였다. 6개의 point에서 측정이 이루어졌으며, *S. aureus*의 양을 serial dilution하여 반응하였다. 그림 36의 electropherogram에서 보면 genomic DNA의 양이 dilution 될 수록의 peak이 점점 감소하는 것을 관찰할 수 있다. 하지만 다른 양이 변하지 않는 타겟의 경우 peak area가 일정하다기 보다 점점 증가하는 경향을 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 이들 다른 병원균의 peak area는 *Y. enterocolitica*의 peak area에 대한 상대값의 경우 일정하게 나타났다(그림 37). 타겟 병원균(*S. aureus*)의 경우도 *Y. enterocolitica*의 peak area에 대한 상대값이 초기 genomic DNA 농도와 선형적인 상관 관계가 있음을 관찰할 수 있었고  $R^2$  값은 0.9848 였다. (선형성을 나타내는 지표, 1에 가까울수록 선형적 상관성이 있음) 결론적으로 각각에 대한 정량 커브에 대한 식을 구할 수 있고, 이를 미생물의 정량에 활용할 수 있다. 결론적으로 인수 공동 감염성 질환의 원인 균주의 동시 검출이 가능하며, 동시 정량분석이 한꺼번에 가능하게 되었다.

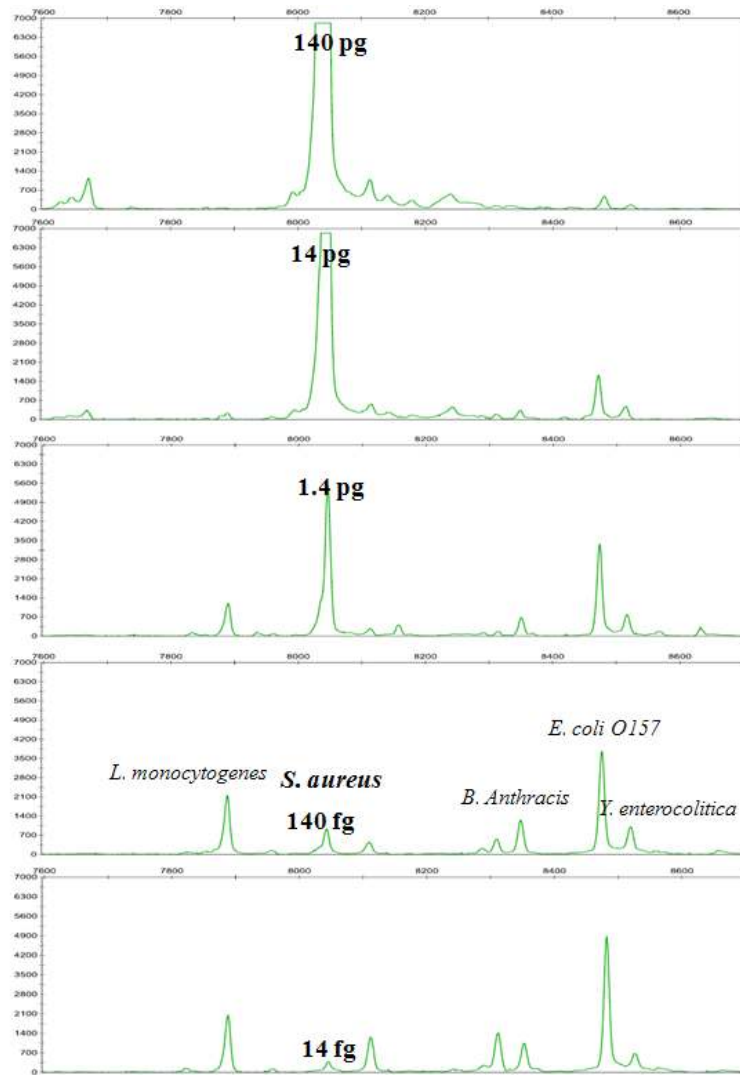


그림 36. 동시 분석 시 개별 타겟에 대한 serial dilution 결과

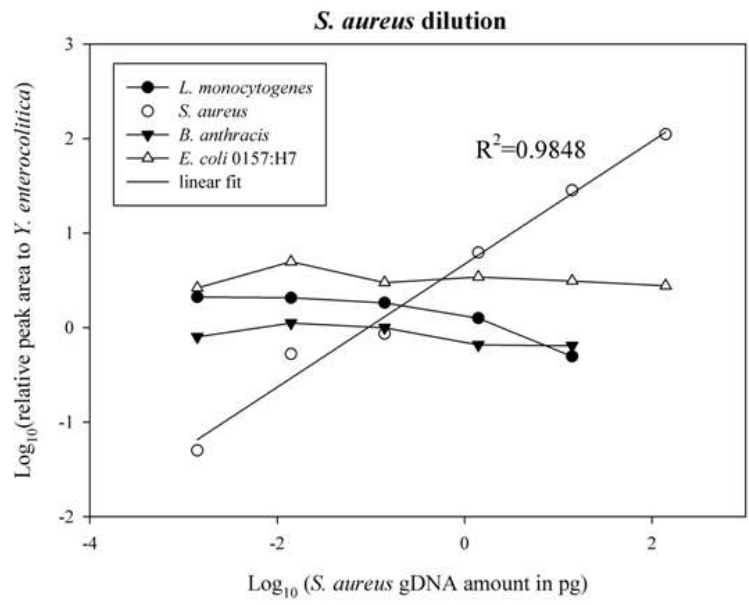


그림 37. Relative peak area와 genomic DNA의 선형적 상관관계

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 평가착안점에 입각한 연구 개발목표의 달성도

구분	평가의 착안점	달성도 (%)
1차년도	○ 인수공통전염병을 유발하는 병원균 10종에 대한 정성 및 정량분석	100
	○ 모세관 전기영동 및 multiplex PCR 을 기반으로 한 단일쇄 형태변환 다형성 기술을 이용하여 단시간 내 최대한 많은 병원균 주( 5종 이상 )를 동시에 분석하는 기술을 개발	100
	- 별도의 배양 또는 클로닝 과정을 생략하고 미량의 시료에서 한번의 PCR 반응로 손쉽게 분석할 수 있는 기술	100
	- 목표 감도: $10^1 - 10^3$ cells/ml - 최대분석 시간: 6 시간 이내	100
	○ 인수공통전염병 중 식중독 유발균의 경우, 개발된 동시분석 방법을 실용적으로 이용하기위한 축산식품 적용 분석방법 개발	100

## 제 2 절 관련 분야의 기술 발전에의 기여도

### (1) 기술적 측면

#### ○ 바이오 기술적 측면

- 증가하는 감염성 질환에 대한 위험성에 대한 효과적인 대처방안으로 조기진단과 신속한 처방이 필수적이며, 이를 위한 정밀하고 빠른 진단 기술이 핵심적이다. 클로닝과 유전자 염기서열분석에 기반한 기존의 진단 기술이 수일이 걸리는 반면, 본 기술은 소량의 샘플로부터 별도의 클로닝 과정이 필요 없이 간단한 효소반응과 모세관 전기영동장치를 이용한 분석을 통해서 수 시간 내에 분석할 수 있다.
- 또한, 병원균의 존재 여부만을 판단할 수 있었던 기존의 분석방법과 달리 본 기술은 시료 내의 감염균에 대한 정량적인 분석이 가능하므로 치료 후, 정확한 예후분석 및 적절한 대응을 가능하게 할 수 있다.
- 이러한 진보된 기술의 개발과 축적은 이 분야에서 국내·외적으로 많은 원천특허의 확보로 이어질 것이다.
- 실험의 재현성과 막강한 분석지원은 이 시스템의 신뢰성을 확고하게 할 것으로 예상된다.

#### ○ 보건산업 측면

- 인수공통전염병에 대한 초정밀 진단기술의 개발로 질병의 감염여부를 정성적 및 정량적인 복합진단에 의해 질병의 빠른 진단이 가능한 장점은 국가적 사회적 차원에서 국민건강복지증진에 크게 기여할 것으로 사료된다.
- 본 연구의 개발과제로서 인수공통 감염성 질환 진단 기반의 통합 모니터링시스템의 개발은 하드웨어적으로 최적화된 조건을 확립하여 실험솔루션과 분석솔루션의 최적화된 통합 시스템을 제공 할 것으로 기대된다.



## (2) 경제적 산업적 측면

### ○ 시장창출

- 현재 국내의 진단시장은 면역분석법 등의 첨단 생물공학기술을 이용한 진단시약이 도입되면서 박테리아 및 바이러스성 감염 진단시장을 중심으로 빠르게 성장하고 있다. 국내 진단시장은 국민생활수준의 향상으로 안전한 먹거리에 대한 중요성이 부각되고, 이에 따라 동식물 검역에 대한 검사 항목이 늘어날 것으로 기대되어 앞으로도 지속적인 성장을 할 것으로 예상된다.

### ○ 수입대체 및 수출 기대

- 초정밀 인수공통전염병 진단기술 개발의 특허화로 인한 원천기술 확보에 경쟁력 강화하게 될 것이며, 전 세계시장을 대상으로 수출 및 바이오 진단 기기의 기술 라이선싱이 가능하게 될 것으로 기대한다.

### ○ 비용절감

- 정확하고 신속한 동물병원균의 진단으로 인해 동물의 질병의 조기 치료가 가능하게 함으로서 전염병의 속성에 따른 질병의 집단화로 인한 집단 폐사처분을 예방하여 농가소득에 대한 피해를 줄일 수 있을 것으로 기대한다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 본 연구에서 수행한 인수공통전염병 병원균에 대한 분석방법의 경우 이 전에 연구되어지지 않았고, 각 균주에 대해 특이성을 보이는 specific primer가 설계되어 있지 않았음. 이에 본 연구에서 개발된 개별적으로 설계된 primer를 통해 높은 정확성을 보이는 분석기술을 국내 및 국외에 특허 출원하고자 함
- 기존 논문은 감염성 병원균 중 식중독균과 같은 분야에 치중되어 있으며, 현재 인수공통전염병 병원균의 동시분석에 대한 연구동향이 부족하며, 정성적으로 존재 여부를 판별할 뿐 정량적인 분석에 있어서의 정확성이 결여되어 있으므로, 본 연구과제에서 수행한 인수공통전염병에 관한 신속하고 정확한 동시 분석 및 정량분석 결과에 관한 논문 등을 국제 학술지 등에 게재할 계획임
- 국내 및 국외시장 분석결과 진단 키트 제품 등의 생산 및 판매가 활발하게 이루어지고 있어 시장에서의 진단제품에 관한 수요가 높은 것을 확인할 수 있어, 본 연구과제에서 얻어진 결과로 보다 높은 정확성을 보이는 분석 제품 개발하여 언론홍보 및 차후 산업화 가능성을 타진할 계획임.
- 소량의 샘플로부터 간단한 효소반응과 모세관 전기영동장치를 이용한 분석을 통해 5시간 이내에 병원균의 정성 및 정량 분석을 동시에 수행 할 수 있는 분석 방법을 개발함으로써 정밀하고 빠른 진단기술이 핵심인 감염성 질환에 대한 효과적인 대처방안으로 활용되어, 국민건강복지 증진에 기여하고자함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 2005년 중국 Dalian Institute of Chemical Physics의 Guowang Xu 그룹이 Journal of Separation Science에 게재한 “Rapid identification of pathogenic bacteria by capillary electrophoretic analysis of rRNA genes”는 RFLP와 CE-SSCP를 이용해 박테리아의 identification을 수행하였다. 이 연구진은 16S rRNA 유전자와 16S-23S rRNA spacer 영역 유전자를 활용하여 이들의 종간 특이성에 따른 염기서열 차이를 RFLP와 CE-SSCP의 혼합을 통한 측정방법을 개발했다.
- 이를 통해 Xu 그룹은 34종의 박테리아에 대해 unique한 SSCP 및 RFLP 패턴을 획득, 많은 수의 병원성 미생물을 이 방법을 통해 구분할 수 있었다. 그러나 이들이 사용한 방법은 정량을 위해서는 따로 정량 분석 방법이 필요하므로 분석 및 정량까지의 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다.
- 미국 Cornell대학의 Antje J. Baeumner 그룹이 2005년 Lab on a Chip에 게재한 “Development of a microfluidic biosensor module for pathogen detection”은 PDMS로 만든 바이오 센서에 DNA probe를 부착하고 reporter probe를 사용, RNA와 hybridization(혼성화) 시켜 reporter probe에 부착된 liposome 내의 형광 물질을 이용해 Dengue 바이러스를 검출하는 기술에 대해 설명하고 있으며, 이는 다른 바이러스나 박테리아에도 적용이 가능하다.
- 그러나 이 기술은 hybridization 기반의 기술로서 정량성 및 민감성에 있어 약점을 가지며, multiplex 검출을 위해서는 다양한 probe를 설계해야 하므로 labor intensive한 방법론이다. 그러나 소형화된 바이오센서 모듈을 이용하므로 휴대 및 시료 소모에 있어서의 장점을 갖고 있다.
- 스위스 Federal institute of Technology 소속의 Peter H. Seeberger 그룹은 2004년 Journal of the American Chemical Society에 게재된 “Detection of Bacteria with Carbohydrate-Functionalized Fluorescent Polymer”라는 논문에서 병원균에 따라 특이적으로 나타나는 탄수화물에 multivalent하게 binding하는 형광 probe를 개발했다고 밝혔다.
- 이 방법은 병원균의 특이적 탄수화물에 binding 하도록 설계된 fluorescent polymer를 사용하여 형광이 검출될 시 병원균의 존재 유무를 확인할 수 있는 방법이다. 하지만 이 경우 여러 병원균에 대해 다양한 fluorescent polymer를 설계

및 제작하는 것이 어렵고, 또한 detection 가능한 조직이나 serum에서 bacteria가 과량으로 존재해야만 detection이 용이하게 가능하므로 민감도 측면에서도 좋은 기술이라고 하기는 어렵다.

## 제 7 장 참고문헌

Bhagwat, A.A., 2003, Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real time PCR, *International Journal of Food Microbiology*, 84, 217–224

Centers for Disease Control and Prevention. 2004. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—selected sites, United States, 2003. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 53:338–343

Paek, S.H., 2008, Sensitive and simultaneous detection of eight foodborne pathogens by capillary electrophoresis–based single–strand conformation polymorphism coupled with multiplex PCR, Ewha Womans University

Korea Food and Drug Association, 2008, Annul listing of food–borne poisoning in Korea, 2004 to 2007, Available at: [http://fm.kfda.go.kr/user/user\\_contents.jsp](http://fm.kfda.go.kr/user/user_contents.jsp)

Centers for Disease Control and Prevention, 2008, Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks --United States, 1993–1997, Available at: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss4901a1.htm>

Mukhopadhyay, A., Mukhopadhyay, U.K., 2007, Novel multiplex PCR approaches for the simultaneous detection of human pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*, *Journal of Microbial methods*, 68, 193–200

Bischoff, C., Luthy, J., Altwegg, M., Baggi, F., 2005, Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real–time PCR, *Journal of Microbiological Methods*, 61, 335–341

Kim, J., Demeke, T., Clear., R.M., Patrick, S.K., 2006, Simultaneous detection by PCR of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in artificially inoculated wheat grain, *International Journal of Food Microbiology*, 111, 21–25

Jofre, A., Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Pla, M., Rodriguez–Lazaro, D., Aymerich, T., 2005, Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham, *Food Microbiology*, 22, 109–115

Park, S.H., Kim H.J., Kim H.Y., 2006, Simultaneous detection of *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, and *Shigella* spp. in lettuce using multiplex PCR method, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 1301–1305

Lambertz, S.T., Nilsson, C., Hallanvuo, S., Lindblad, M., 2008, Real-Time PCR Method for Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Food, *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6060–6067

Sails, A.D., Fox, A.J., Bolton, F.J., Wareing, D.R.A., Greenway, L.A., 2003, A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1383–1390

Ward, L.M., Bej, A.K., 2006 Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish by Use of Multiplexed Real-Time PCR with TaqMan Fluorescent Probes, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2031–2042

Fricke, M., Messelh u ber, U., Busch, U., Scherer, S., Ehling-Schulz, M., 2007, Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1892–1898

Gurjar, A.A., Hegde, N.V., Love B.C., Jayarao, B.M., 2008, Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxin typing of *Clostridium perfringens* toxin producing strains in feces of dairy cattle, *Molecular and cellular probes*, 22, 90–95

Lampel, K.A., Orlandi, P.A., Kornegay L., 2000, Improved Template Preparation for PCR-Based Assays for Detection of Food-Borne Bacterial Pathogens, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4539–4542

Cox, T., Frazier, C., Tuttle, J., Flood, S., Yagi, L., Yamashiro, C.T., Behari, R., et al., 1998, Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dairy samples utilizing a PCR-based fluorogenic 50 nuclease assay. *Journal of International Microbiology and Biotechnology*, 21, 167–174

Grady, J.O., Sedano-Balbas, S., Maher, M., Smith, T., 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

Settanni, L., Corsetti, A., 2007, The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review, *Journal of Microbiological Methods*, 69, 1–22

Rosselló-Mora, R., Amann, R., 2001, The species concept for prokaryotes, *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 39–67

Simon, T. 1999, PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research*, 33, 3545–3556

White, T. J., R. Madej, D. H. Persing. 1992, The polymerase chain reaction: clinical applications. *Advance in Clinical Chemistry*, 29, 161–196

Hongoh, Y., Yuzawa, H., Ohkuma, M., Kudo, T., 2003, Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment, *FEMS Microbiology Letters*, 221, 299–304

Chung J. H., Park Y. S., Kim J., Shin G. W., Nam M. H., Oh M. K., 2007, Parallel analysis of antimicrobial activities in microbial community by SSCP based on CE, *Electrophoresis*, 28, 2416–2423

Gillman L. M., Gunton J., Turenne C. Y., Wolfe J., Kabani A. M., 2001, Identification of Mycobacterium species by multiple-fluorescence PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene., *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 3085–3091

Bertrnad, R., Roig, B., 2007, Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157—Application to municipal wastewater, *Water Research*, 41, 1280–1286

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekita, T., 1989, Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms, *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

Dohrmann, A.B., Tebbe, C.C., 2004, Microbial community analysis by PCR–single–strand conformation polymorphism (PCR–SSCP). In: Kowalchuk, GA, de Bruijn, FJ, Head, IM, Akkermans, ADL, van Elsas, DJ (Eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2<sup>nd</sup> edn, vol. 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 3.16: 809–838

Hoffe, M.G., Flavier, S., Christen, R., Botel, J., Labrenz, M, Brettar, I, 2005, Retrieval of nearly complete 16S rRNA gene sequences from environmental DNA following 16S rRNA–based community fingerprinting, *Environmental Microbiology*, 7, 670–675

Labrenz, M., Jost, G., Pohl, C., Beckmann, S., Martens–Habben, W., Jurgens, K., 2005, Impact of different *in vitro* electron donor/acceptor conditions on potential chemolithoautotrophic communities from marine pelagic redoxclines, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6664–6672

Macedo, A.J., Kuhlicke, U., Neu, T.R., Timmis, K.N., Abraham, W.R., 2005, Three stages of a biofilm community developing at the liquid–liquid interface between polychlorinated biphenyls and water, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7301–7309

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K., 1989, Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5, 874–879

Endo, Y., Zhang, L., Katashima, R., Itakura, M., Doherty, E.A.S., Barron, A.E., Baba, Y., 2005, Effect of polymer matrix and glycerol on rapid single–strand conformation polymorphism analysis by capillary and microchip electrophoresis for detection of mutations in *K–ras* gene, *Electrophoresis*, 26, 3380–3386

Carrilho, E., 2000, DNA sequencing by capillary array electrophoresis and microfabricated array systems, *Electrophoresis*, 21, 55–65

Butler, J.M., Wilson, M.R., Reeder, D.J., 1998, Rapid mitochondrial DNA typing using restriction enzyme digestion of polymerase chain reaction amplicons



followed by capillary electrophoresis separation with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis*, 19, 119–124

Andersen, P.S., Jespersgaard, C., Vuust, J., Christiansen, M., Larsen, L.A., 2003 Capillary electrophoresis-based single strand DNA conformation analysis in high-throughput mutation screening, *Human Mutation*, 21, 455–465

Petersen, J.R., Okorodudu, A.O., Mohammad, A., Payne, D.A., 2003, Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory, *Clinica Chemica Acta*, 1, 1–30

Delbès, C., Moletta, R., Godon, G., 2000, Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis, *Environmental Microbiology*, 2, 506–515

Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2007, Principles of Instrumental Analysis 6th ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole Publishing

40. Pinto, A.D., Forte, V.T., Guastadisegni, M.C., Martino, C., Schena F.P., Tantillo, G., 2007, A comparison of DNA extraction methods for food analysis, *Food Control*, 18, 76–80

Food biochemistry laboratory, Kyung Hee University, Professor; Kim, H.Y., Seocheon-dong, Siheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, Korea

Centers for Food Safety and Applied Nutrition, Bacteriological Analytical Manual, Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>.

Wolffs, P.F.G., Glencross, K., Norling, B., Griffiths, M.W., 2007, Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by a flotation and real-time multiplex PCR procedure, *International Journal of Food Microbiology*, 117, 50–54

Oh, M.H., Park, Y.S., Paek, S.H., Kim, H.Y., Jung, G.Y., Oh, S., 2008, A rapid and sensitive method for detecting foodborne pathogens by capillary electrophoresis-based single-strand conformation polymorphism, *Food Control*, 19, 1100–1104

Park, Y.S., Chu, H.S., Hwang, S.H., Seo, J.H., Choi, C.Y., Jung, G.Y., 2006, A precise mRNA quantification method using CE-based SSCP, *Electrophoresis*, 27, 3836-3845

Glavač, D., Potočnik, U., Podpečnik, D., Žižek, T., Smerkolj, S., Ravnik-Glavač, M., 2002, Correlation of MFOLD-predicted DNA secondary structures with separation patterns obtained by Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis, *Electrophoresis*, 19, 384-394

Shin, G.W., Cho, Y.S., Hwang, H.S., Park, J.H., Jung, G.Y., 2008, A two-step quantitative pathogen detection system based on capillary electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, In press.

Reischl, U., Kochanowski, B., 1995. Quantitative PCR, *Molecular Biotechnology*, 3, 55-71.

Bennetzen, J.L., Coleman, C., Liu, R., Ma, J., Ramakrishna, W., 2004, Consistent over-estimation of gene number in complex plant genomes, *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 732-736

Klerks, M.M., van Bruggen, A.H.C., Zijlstra, C., Donnikov, M., 2006, Comparison of Methods of Extracting *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis DNA from Environmental Substrates and Quantification of Organisms, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3879-3886

Patel, J.R., Bhagwat, A.A., Sanglay, G.C., Solomon, M.B., 2006, Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR, *Food Microbiology*, 23, 39-46

L.M. Gillman, J. Gunton, C.Y. Turenne, J. Wolfe, and A.M. Kabani, Identification of *Mycobacterium* species by multiple-fluorescence PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (2001) 3085-3091.

J.H. Chung, Y.S. Park, J. Kim, G.W. Shin, M.H. Nam, M.K. Oh, C.W. Kim, G.Y. Jung, and J.H. Park, Parallel analysis of antimicrobial activities in microbial

community by SSCP based on CE. *Electrophoresis* 28 (2007) 2416–2423.

G. Gilliland, S. Perrin, K. Blanchard, and H.F. Bunn, Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 2725–9.

Y.S. Park, H.S. Chu, S.H. Hwang, J.H. Seo, C.Y. Choi, and G.Y. Jung, A precise mRNA quantification method using CE-based SSCP. *Electrophoresis* 27 (2006) 3836–45.

G.W. Shin, Y.S. Cho, H.S. Hwang, J.H. Park, and G.Y. Jung, A two-step quantitative pathogen detection system based on capillary electrophoresis. *Anal Biochem* (2008).