

식품으로부터 식중독 세균 검출을 위한 Real-time PCR에 적합한 DNA 추출 방법 비교

구은정 · 김동호¹ · 오세욱*
국민대학교 자연과학대학 식품영양학과, ¹BMS(주)

Comparison of DNA isolation methods for detection of foodborne pathogens by real-time PCR from foods

Eun-Jeong Koo, Dongho Kim¹, and Se-Wook Oh*
Department of Food and Nutrition, Kookmin University
¹Bio-Medical Science Co., Ltd.

Abstract This study was conducted to find out the most suitable DNA isolation methods for PCR detection of foodborne pathogens. Four DNA isolation methods including Universal Genomic DNA Extraction Kit (TaKaRa), PrepMan Ultra (Applied Biosystems), boiling method and alkaline lysis method (w/PEG) were tested and compared. The Universal Genomic DNA Extraction kit (TaKaRa) was considered as the more efficient isolation method for *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in lettuce, fish and beef. Meanwhile to detect the foodborne pathogens directly from foods without enrichment, the four different buffers such as double-distilled water, saline, glycine-saline, glycine-saline with Tween-20 and beef extract were also evaluated. As a result, saline was more suitable buffer for *E. coli* O157:H7. And double-distilled water was more suitable buffer than saline for *S. aureus*, respectively

Keywords: DNA isolation, real-time PCR, pathogens, detection

서 론

Escherichia coli O157:H7은 장관출혈성 대장균으로 그람 음성, 간균 형태의 통성혐기성균으로 verotoxin을 생산하는 균이다. 감염경로는 주로 덜 익힌 고기, 유제품, 과일, 물 등 다양한 것으로 알려져 있다. Verotoxin으로 인해 출혈성 대장염, 혈전성 혈소판 감소증 및 용혈성 요독증후군 등의 증상이 나타나며 사망에 이르기까지 한다(1-3).

*Staphylococcus aureus*는 그람 양성, 구균 형태의 통성혐기성균으로 주요한 식중독 세균의 하나로 오염경로가 매우 다양하며, 사람과 동물의 피부 등에 상재하기 때문에 식품에서의 감염이 빈번하다. *S. aureus*는 장독소(enterotoxin)를 생성하여 독소형 식중독을 일으키며 증상으로는 구토, 설사, 위경련 등을 동반한다(4,5).

현재 *E. coli* O157:H7에 대한 검출방법으로는 시료를 증균배지에서 1차 배양한 뒤, sorbitol MacConkey agar에서 2차 분리 배양한 후 무색 집락을 확인하고 이후 동정검사를 실시한다(6). *S. aureus*에 대한 검출방법으로는 10% (w/v) NaCl을 첨가한 tryptic

soy broth (TSB)를 증균배지로 사용하여 1차 배양한 뒤, Baird-Parker agar, coagulase 확인시험을 실시한다(7). 이와 같은 방법은 전통적인 배지배양법으로 위양성 결과가 빈번하고 검사시간이 오래 걸리며(3-5일) 많은 노동력이 소모되는 것이 단점이다(8,9). 따라서 이와 같은 단점을 보완하여 보다 정확한 결과와 시간 단축을 위해 다양한 신속 검출법이 개발되고 있는 실정이다. 가장 널리 이용되고 신속검출법인 polymerase chain reaction (PCR) 기법은 신속하고 정확하게 식중독 세균을 검출할 수 있다(10,11). PCR법은 정밀하며 특이성이 뛰어나지만, 반응 후 증폭산물을 전기영동으로 확인해야 하는 번거로움이 있다(12). 반면에 real-time PCR법은 실시간으로 증폭산물을 확인할 수 있기 때문에 번거로움이 적은 장점이 있으며(13), 특히 TaqMan 방법은 특이 서열에 결합하는 프로브(probe)를 이용하기 때문에 좀 더 특이성(specificity)이 높은 효율적인 신속검출법으로 활용되고 있다(14).

한편 PCR 수행 시 검출한계에 영향을 주는 다양한 요인이 있는데 그 중 하나가 DNA의 농도와 순도이다. DNA 추출 과정에서 오염이 되거나, 추출 효율이 좋지 않은 경우 PCR을 수행할 때 어려움이 따른다(15). 따라서 적합한 DNA 추출 방법을 선택해야 효율적인 PCR을 수행할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 PCR을 수행할 때 효율을 높일 수 있는 방법을 확인하고자 다양한 DNA 추출법을 비교하였다. 또한 증균과정을 거치지 않고 식품에서 직접 식중독 세균을 검출하기 위한 균질화 버퍼(stomaching buffer)로서 saline, glycine-saline, 증류수 등의 효과를 분석하였다.

*Corresponding author: Se-Wook Oh, Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul 02707, Korea
Tel: +82 2 910 5778
Fax: +82 2 910 5249.
E-mail: swoh@kookmin.ac.kr
Received May 17, 2016; revised June 20, 2016;
accepted June 28, 2016

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

-80°C 냉동고에서 50% glycerol stock에 보관되어 있는 *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150)과 *S. aureus* (ATCC 6538)를 해동하여 tryptic soya agar (TSA; Oxoid, Hampshire, England)에 획선도말(streaking) 하여 37°C에서 배양하였다. 배양된 각 균주의 단일 콜로니를 분리하여 TSB (Oxoid) 10 mL에 1 백금이 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 실험에 사용하였다.

증균배지의 조성

증균배지가 real-time PCR에 미치는 영향을 확인하기 위해 *E. coli* O157:H7의 증균배지인 modified tryptic soy broth (mTSB)와 *S. aureus*의 증균배지인 10% (w/v) NaCl이 첨가된 TSB와 0.85% saline을 비교하였다. 각 증균배지는 식품공전에 따라 제조하였다. mTSB의 조성 및 제조방법은 다음과 같다. 즉, TSB (30 g/L; Oxoid)에 bile salt no. 3 (1.5 g/L; Oxoid), dipotassium phosphate (1.5 g/L; Oxoid), NaCl (15 g/L; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 첨가하여 고압 멸균한 뒤 novobiocin (20 mg/L; Oxoid)을 여과 멸균하여 가하였다. 10% (w/v) NaCl이 첨가된 TSB는 TSB (30 g/L; Oxoid)에 NaCl (90 g/L; Sigma-Aldrich)을 첨가한 뒤 고압 멸균하여 제조하였다.

식품에서의 인위접종

식품은 양상추, 광어회, 소고기를 선정하여 정릉동 인근 마트에서 구입하였다. 각각의 식품을 25 g씩 멸균백(Whirl-pak, 19×30 cm; Nasco, Fort Atkinson, WI, USA)에 소분하였다. 37°C에서 18시간 배양된 9 log CFU/mL 농도의 균 1 mL을 심진희석(serial dilution) 하여 0 log CFU/mL 농도까지 희석한 뒤 각 농도로 100 µL씩 접종하였다.

DNA 분리

225 mL의 saline, 증균배지, 조성을 달리한 다양한 버퍼를 각각 넣은 뒤 stomacher (Laboratory Blender Stomacher 400; Seward, MO, USA)를 이용하여 2분간 균질화하였다. 균질화 후 각각을 1 mL씩 취하여 DNA 분리에 사용하였으며 모두 3반복 실험을 수행하였다. 각 DNA 추출 방법의 효율을 비교하기 위해 미생물배지 배양액과 인위 접종된 각 식품에서 DNA 추출도 수행하였다. DNA 추출 효율을 비교하기 위해 kit를 이용하는 방법, PrepMan Ultra sample preparation reagent (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) method, boiling method, alkaline PEG method의 네 가지 방법을 사용하였다. Kit는 MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction kit ver.5.0 (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)을 사용하였고 제조사에서 제공하는 방법에 따라 추출하였다. PrepMan reagent도 제조사에서 제공하는 방법에 따라 추출하였다. Boiling

method는 de Medici 등(16)에 의한 방법에 따라 추출하였고, alkaline PEG method는 PEG 200 (Sigma-Aldrich)을 이용하여 Chomczynski와 Rymaszewski(17)에 의한 방법에 따라 추출하였다.

Real-time PCR 반응조건

E. coli O157:H7과 *S. aureus*의 목적 유전자(target gene)를 각각 *stx₂*, *femA*로 하여 프라이머(primer)와 프루브(probe)를 제작하였다 (Table 1). Real-time PCR을 위한 반응물 조성은 다음과 같다. TaqMan® universal Master Mix 2X (Applied Biosystems) 10 µL, forward primer 1.8 µL (900 nM), reverse primer 1.8 µL (900 nM), probe 1 µL (250 nM), DNA 2 µL, 증류수 3.4 µL를 혼합하여 총 부피를 20 µL로 96-well plate에 준비하였다. StepOne Plus real-time PCR systems (Applied Biosystems)를 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. 반응조건은 95°C에서 10분간 pre-denaturation 한 뒤, 95°C에서 10초, 60°C에서 1분을 1 cycle로 하여 총 40 cycle 수행되었다. 반응이 끝난 뒤 Ct value (threshold cycle)는 StepOne® software (Applied Biosystems)를 이용하여 분석하였다.

DNA 추출 효율을 높이기 위한 버퍼 선정

식품으로부터 균을 직접 분리하기 위한 균질화 완충액으로는 증류수, 0.85% saline (8.5 g/L NaCl; Sigma-Aldrich), glycine-saline (0.05 mol/L glycine; Sigma-Aldrich), Tween-20 (5 mg/L Tween-20; Sigma-Aldrich)과 beef extract (300 mg/L beef extract; Sigma-Aldrich)를 첨가한 glycine-saline을 사용하였다.

결과 및 고찰

순수배양액에서의 DNA 추출 효율 비교

순수배양액에서 각 균의 DNA 추출 효율을 비교한 결과는 추출 방법에 따라 차이를 보였다(Table 2). *E. coli* O157:H7은 모든 방법에서 10⁷까지 검출이 되었고 Ct value가 대부분 비슷한 것을 확인하였다. *S. aureus*는 TaKaRa kit와 alkaline PEG method에서 10⁷까지 검출되었으며 boiling method와 PrepMan method에서 10²까지 검출되었다. *S. aureus*에서도 Ct value가 비슷한 양상을 보였다. Heller 등(18)의 연구에서 PrepMan Ultra, Bugs'n Beads, NucleoSpin food kit, Wizard magnetic DNA purification system for food의 4가지 추출 방법 중 PrepMan method가 비용대비 효율적이며 사용법이 간편하기 때문에 가장 우수한 DNA 추출법이라고 언급하였다. Elizaquive과 Aznar(19)의 연구에서는 PrepMan method 등 열을 이용하여 DNA를 추출하는 방법은 사용법이 간편하고 비용적인 측면에서 저렴하나 추출물이 불안정하거나 때때로 혼탁하기 때문에 추출 효율이 우수하지 않으며, column kit를 이용하는 방법이 효율적이라고 언급하였다. 본 실험을 통해 확인한 결과 모든 추출 방법에서 효율이 비슷하였다. 순수 배양액으로부터 DNA를 추출하는 경우에는 추출 방법에 따라 효율에

Table 1. Primers and probes sequences used for *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* specific real-time PCR assay

Microorganism	Designation	Sequence (5'-3')	Position	Reference
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>stx₂</i> -forward	ATT AAC CAC ACC CCA CCG	184-201	Ibekwe et al., 2002 (22)
	<i>stx₂</i> -reverse	GTC ATG GAA ACC GTT GTC AC	392-373	
	<i>stx₂</i> -probe	FAM-CAG TTA TTT TGC TGT GGA TAT ACG AGG GCT TG-TAMRA	204-235	
<i>S. aureus</i>	<i>femA</i> -forward	ACT GTG ACG ATG AAT GCG ACA A	34-56	Sabet et al., 2007 (23)
	<i>femA</i> -reverse	ATG TTG TGG TGT TCT TAT ACC AAA TCC	165-192	
	<i>femA</i> -probe	FAM-CGA CAA CTG GCA CAT TGG CTA TCG CTT T-TAMRA	136-164	

Table 2. Comparison of extraction methods in culture broth with different concentration (CFU/mL) of *E. coli* O157:H7 and *S. aureus*

Prep. methods	Mean Ct ± SD											
	10 ⁶		10 ⁵		10 ⁴		10 ³		10 ²		10 ¹	
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>
Boiling	27.0±0.03	26.3±0.08	28.1±0.31	30.5±0.40	31.4±0.04	32.4±0.11	34.0±0.87	36.6±0.32	34.7±0.20	36.8±0.78	36.9±0.31	- ¹⁾
PrepMan	27.1±0.35	27.3±0.11	29.2±0.15	30.6±0.24	32.2±0.19	33.4±0.20	35.0±0.86	35.1±0.38	35.1±0.18	36.4±0.52	36.7±0.06	-
Takara	27.4±0.74	29.7±0.21	28.5±0.70	32.6±0.24	32.1±0.40	34.3±0.59	33.3±0.33	35.1±0.33	35.0±0.08	-	36.0±0.08	-
PEG	28.9±0.85	27.9±0.04	30.5±0.20	31.2±0.13	32.9±0.88	34.5±0.55	35.9±0.39	36.5±0.54	36.3±0.40	-	35.4±0.39	-

¹⁾-, no signal, negative**Table 3. Comparison of extraction methods using saline as buffer of beef, fish and lettuce spiked with different concentration (CFU/mL) of *E. coli* O157:H7 and *S. aureus***

Foods	Prep. methods	Mean Ct ± SD											
		10 ⁶		10 ⁵		10 ⁴		10 ³		10 ²		10 ¹	
		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>
Beef	Boiling	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PrepMan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Takara	25.8±0.04	30.3±0.25	31.7±0.30	31.9±0.12	36.2±0.75	33.7±0.05	-	36.3±0.90	-	-	-	-
	PEG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fish	Boiling	28.8±0.11	30.1±0.12	34.0±0.09	32.6±0.32	36.9±1.15	35.3±0.13	-	-	-	-	-	-
	PrepMan	29.0±0.10	28.6±0.26	32.0±0.40	32.2±0.29	32.8±0.46	-	35.4±0.60	-	-	-	-	-
	Takara	27.8±0.14	30.4±0.14	31.9±1.06	32.6±0.31	34.1±0.43	35.5±0.23	35.5±0.42	36.1±0.89	-	-	-	-
	PEG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lettuce	Boiling	24.7±0.35	30.2±0.10	26.9±0.06	34.8±0.47	30.7±0.15	35.4±0.21	32.7±0.25	-	36.1±1.80	-	-	-
	PrepMan	25.5±0.18	27.5±0.40	29.1±0.25	32.6±0.05	33.1±0.15	35.5±0.86	36.3±0.22	-	-	-	-	-
	Takara	28.7±0.18	30.9±0.01	32.1±0.92	32.6±0.08	35.4±0.48	34.0±0.53	-	-	-	-	-	-
	PEG	25.6±1.49	29.7±0.28	30.3±0.19	33.4±1.61	33.8±0.64	-	36.6±0.38	-	-	-	-	-

¹⁾-, no signal, negative**Table 4. Comparison of extraction methods using enrichment buffer as buffer of beef, fish and lettuce spiked with different concentration (CFU/mL) of *E. coli* O157:H7 and *S. aureus***

Foods	Prep. methods	Mean Ct ± SD											
		10 ⁶		10 ⁵		10 ⁴		10 ³		10 ²		10 ¹	
		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>
Beef	Boiling	30.0±0.24	34.4±0.30	35.3±0.28	35.8±0.28	36.6±0.36	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-
	PrepMan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Takara	27.5±0.15	27.5±0.10	29.6±0.13	31.9±0.21	31.3±0.07	35.1±0.10	33.3±0.35	-	34.5±0.38	-	36.6±0.28	-
	PEG	-	35.9±0.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fish	Boiling	37.9±1.27	31.3±0.04	-	33.7±0.24	-	-	-	-	-	-	-	-
	PrepMan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Takara	26.7±0.10	24.7±0.19	30.4±0.14	28.9±0.09	32.5±0.16	31.5±0.28	36.1±0.77	-	-	-	-	-
	PEG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lettuce	Boiling	25.6±0.04	31.9±0.13	29.8±0.19	35.2±0.26	33.2±0.10	-	34.3±0.44	-	35.9±0.56	-	-	-
	PrepMan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Takara	24.6±0.14	30.7±0.30	29.4±0.24	33.1±0.15	33.1±0.58	35.7±0.27	36.0±0.28	36.3±0.65	-	-	-	-
	PEG	25.7±0.10	28.9±0.17	28.5±0.51	31.9±0.48	33.4±0.06	33.5±0.66	-	34.0±0.54	-	-	-	-

¹⁾-, no signal, negative

큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각되었다. Boiling method와 PrepMan method는 추출하기까지 시료 1개 기준으로 약 15분 정도의 시간이 소요되며, alkaline PEG method는 약 30분, TaKaRa kit를 이용한 경우는 약 50분 정도의 시간이 소요되는 것을 확인하였다. 따라서 비용과 시간의 효율성을 고려한다면 boiling method나 PrepMan method가 순수배양액에서 DNA를 추출하는 효과적인 방법으로 판단되었다.

식품시료에서의 DNA 추출 효율 비교

각각의 식품시료에서 각 균의 DNA 추출 효율을 비교한 결과는 추출 방법에 따라 차이를 보였다(Table 3, 4). Table 3은 saline을 버퍼로 사용했을 때의 결과를 나타냈으며, Table 4는 *E. coli* O157:H7, *S. aureus* 각각의 증균배지인 mTSB와 10% (w/v) NaCl이 첨가된 TSB를 사용했을 때의 결과를 나타내었다. Saline을 버퍼로 사용한 경우에는 소고기에서는 TaKaRa kit를 이용한 경우에만 검출이 되었고, 그 외의 방법에서는 검출이 되지 않음을 확인하였다. *E. coli* O157:H7은 10^4 까지 검출되었고 *S. aureus*는 10^3 까지 검출되었다. 회에서는 alkaline PEG method 외에 모든 방법에서 검출이 되었는데 TaKaRa kit를 이용한 경우에 각 균에서 10^3 까지 검출되었다. 양상추에서는 모든 방법에서 잘 검출이 되었으며 *E. coli* O157:H7에서는 boiling method에서 10^2 로 가장 낮았고, *S. aureus*에서는 TaKaRa kit에서 10^4 로 가장 낮았다. 증균배지를 버퍼로 사용한 경우, 소고기에서는 PrepMan method에서 검출이 되지 않았으며, alkaline PEG method에서는 *S. aureus*만 10^6 까지 검출이 되었다. TaKaRa kit와 boiling method를 이용한 경우에는 각각 *E. coli* O157:H7은 10^1 , 10^4 까지 검출되었고 *S. aureus*는 10^4 , 10^5 까지 검출되었다. 회에서는 PrepMan method와 alkaline PEG method에서 검출이 되지 않았고, TaKaRa kit를 이용한 경우에 각 균에서 10^3 까지 검출되었다. Boiling method에서는 *E. coli* O157:H7은 10^4 까지, *S. aureus*는 10^5 까지 검출되었다. 양상추에서는 PrepMan method 외에 모든 방법에서 검출이 되었으며 *E. coli* O157:H7은 boiling method에서 10^2 로 가장 낮았고, *S. aureus*에서는 alkaline PEG method에서 10^3 로 가장 낮았다. 위의 결과를 토대로 버퍼로 증균배지를 사용했을 때 보다 saline을 사용했을 때 검출한계가 낮은 것을 확인하였다. Hyeon 등(20)의 연구결과에서 증균배지의 성분이 PCR반응에 저해제로 작용하는 것을 보고하였다. 따라서 PCR효율을 높이기 위해서는 이와 같은 저해요인을 제거해야 하는 것이 중요하다고 언급하였다. 정성 시험법에서 증균배지를 사용하여 증균한 뒤 DNA를 추출하여 PCR을 수행하는 경우에는 증균배지 성분을 제거하는 washing step등의 과정을 거친 뒤 DNA를 추출하는 것이 효율을 높일 수 있을 것으로 보인다.

다양한 버퍼의 DNA 추출 효율 비교

정량 시험법에서 식품을 균질화하는 버퍼의 조성을 다르게 했을 때의 DNA 추출 효율을 비교한 결과, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* 각 균에서 차이를 보였다. *E. coli* O157:H7에서는 saline이, *S. aureus*에서는 증류수가 가장 효율적인 것으로 나타났다(Fig. 1, Fig. 2). *E. coli* O157:H7의 경우 Ct값이 소고기는 glycine-saline에서 34.07, 회는 saline에서 34.72, 양상추는 Tween-20과 beef extract를 첨가한 saline에서 34.48로 나타나 증류수가 아닌 saline을 쓰는 것이 효율적인 것으로 확인하였다. *S. aureus*의 경우 Ct값이 소고기는 saline에서 32.71, 회는 증류수에서 34.70, 양상추는 증류수에서 33.99로 전반적으로 증류수가 더 효율적인 것을 확인하였다. 이러한 버퍼의 효율 차이는 bacteria의 종류나 버퍼

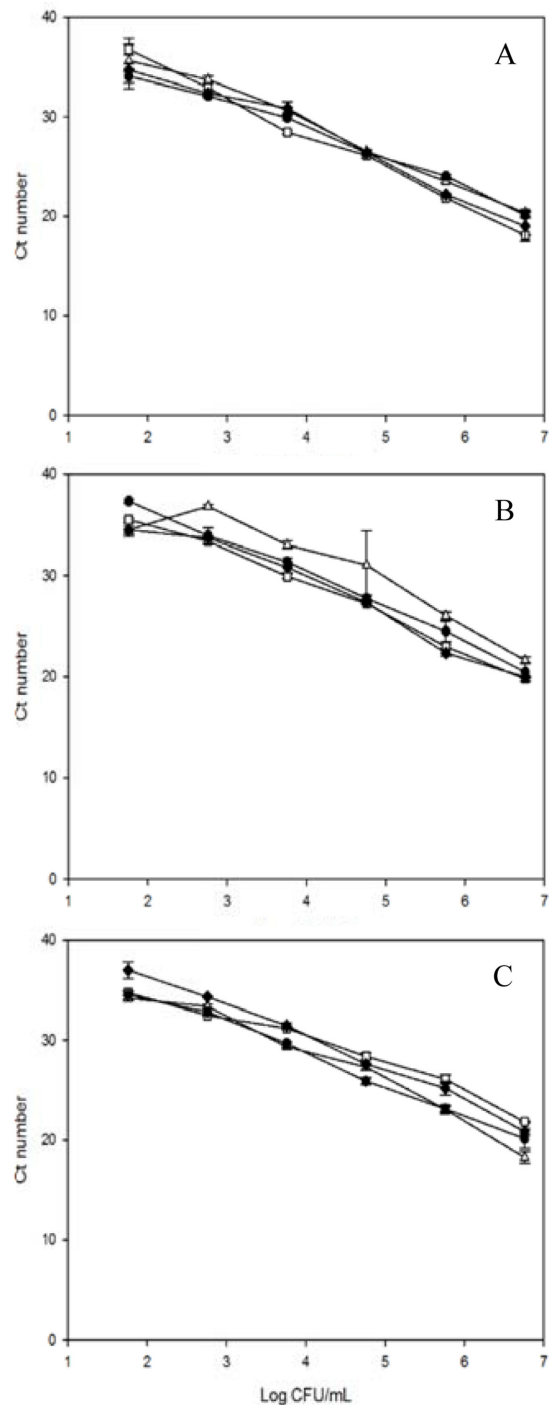


Fig. 1. Comparison of real-time PCR detection of *E. coli* O157:H7 from DNA isolated in each buffer with each inoculated food matrices (A) beef, (B) fish, (C) lettuce. \triangle , addition of double-distilled water; \square , addition of 0.85% saline (NaCl); \bullet , addition of glycine-saline; \blacklozenge , addition of glycine-saline with Tween-20 and beef extract

의 recovery 효과에서 기인한다고 생각되었다. Miller 등(21)의 연구에 의하면 Tween-20과 beef extract를 첨가한 glycine-saline은 식중독 세균의 recovery 효율을 높이는데 효과가 있었다고 언급하였다. *E. coli* O157:H7이 접종된 양상추에서는 recovery 효율이 좋았기 때문에 Ct값이 가장 적게 나온 것으로 생각되었다. 이와 같은 버퍼에 대한 연구는 미비한 실정이기 때문에 추후 이에 대

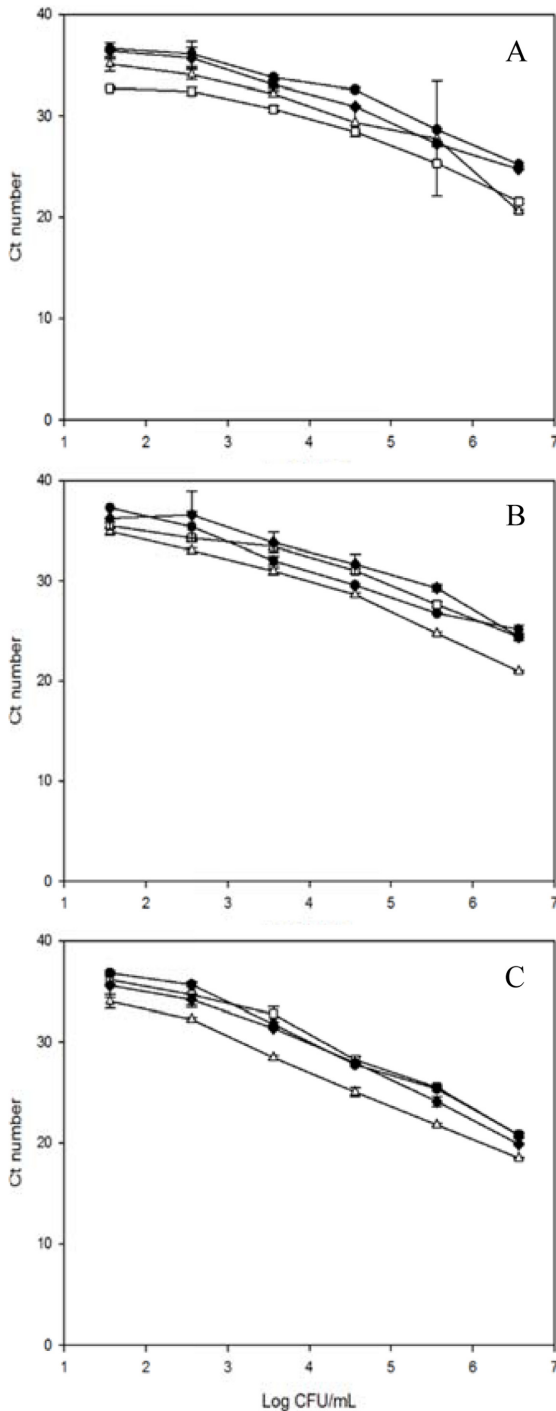


Fig. 2. Comparison of real-time PCR detection of *S. aureus* from DNA isolated in each buffer with each inoculated food matrices (A) beef, (B) fish, (C) lettuce. Δ , addition of double-distilled water; \square , addition of 0.85% saline (NaCl); \bullet , addition of glycine-saline; \blacklozenge , addition of glycine-saline with Tween-20 and beef extract

한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

이러한 결과를 종합해 볼 때, DNA 추출 효율은 식품에 따라, 균에 따라 달라지는 것을 확인하였다. 따라서 적합한 DNA 추출 방법을 선택하는 것이 PCR 효율을 높이는 데 중요한 요인이 될 것으로 보인다. 또한 증균배지가 PCR 작용을 저해하는 것으로 보아 DNA를 추출할 때 증균배지의 성분을 제거하는 washing step

을 거치거나, 두 가지 이상의 DNA 추출 방법을 병합하여 사용하여 저해요인을 제거하는 등의 전처리가 필요할 것으로 보인다. DNA 추출 효율을 높이는 방법 중 버퍼의 조성에 변화를 주는 것도 효과적인 방법이라고 판단된다. 본 연구에서는 *E. coli* O157:H7에서는 saline이 적합하며 *S. aureus*에서는 증류수가 적합한 버퍼인 것으로 추정하였다. 정성 시험법에서 균을 증식하는데 사용되는 증균배지의 성분을 제거하고 식품과 균의 종류에 따라 적합한 버퍼를 사용한다면 DNA 추출 효율이 높아질 것으로 보인다. 정량시험법에서는 식품자체에서 유래하는 PCR 저해물질에 의한 저해를 극복하면서 균을 식품으로부터 효율적으로 분리할 수 있는 버퍼 조성이 중요하다. 따라서 이러한 전처리 조건 확립은 식품에서 효율적으로 균을 분리하여 DNA를 분리할 수 있게 하여 PCR 검출의 효율성을 증대시킬 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 다양한 식품으로부터 식중독 세균의 DNA를 추출하는 효율을 비교 하였다. 사용된 DNA 추출 방법은 TaKaRa Kit를 이용하는 방법, PrepMan reagent를 이용하는 방법, boiling method, PEG를 이용한 alkaline method가 사용되었다. 비용절감이나 시간절약 면에서 boiling method나 PrepMan method도 고려할 수 있지만, column kit를 이용하는 TaKaRa kit가 효율적이라고 판단되었다. 또한 정성 시험법에서 적은 양의 균을 검출하기 위해 증균배양을 거치게 되는데 이때 사용되는 증균배지의 성분이 DNA 추출 후에도 잔류하여 saline과 비교하였을 때 DNA 추출 효율이 낮은 결과를 나타내었다. 따라서 증균배지의 성분을 제거한 뒤 DNA를 추출하는 것이 PCR의 효율을 높일 수 있을 것으로 예상된다. 정량 시험법에서는 증균과정을 거치지 않아 균을 검출할 때 DNA의 추출 효율이 중요하기 때문에 DNA 추출 효율을 높이기 위한 가장 좋은 버퍼를 선정하고자 하였다. 그 결과 *E. coli* O157:H7에서는 saline이, *S. aureus*에서는 증류수를 버퍼로 사용했을 때 DNA 추출 효율이 가장 높은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치기술개발 사업의 지원을 받아 연구되었음 (113016-03-3-HD020).

References

1. Padhye NV, Doyle MP. *Escherichia coli* O157: H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *J. Food Protect.* 55: 555-565 (1992)
2. Centers of Disease Control and Prevention. Outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 and *Campylobacter* among attendees of the Washington county fair-New York, 1999. *Morb. Mortal. Wkly Rep.* 48: 803-805 (1999)
3. Eaton KA, Friedman DI, Francis GJ, Tyler JS, Young VB, Haege J, Abu-Ali G, Whittam TS. Pathogenesis of renal disease due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* in germ-free mice. *Infect. Immun.* 76: 3054-3063 (2008)
4. Alarcon B, Vicedo B, Aznar R. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *J. Appl. Microbiol.* 100: 352-364 (2006)
5. Valle J, Gomez-Lucia E, Piriz S, Goyache J, Orden JA, Vadillo S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1323-1326 (1990)
6. Hitchins AD, Feng P, Watkins WD, Rippey SR, Chandler LA.

- Escherichia coli* and the coliform bacteria. FDA Bacteriological Analytical Manual 8: 4.01-4.29 (1998)
7. QIA. Standards for Processing and Ingredients Specifications of Livestock Products. Quarantine and Inspection Agency, Gimcheon, Korea (2011)
 8. Warren BR, Parish ME, Schneider KR. Comparison of conventional culture methods and FTA filtration-nested PCR for the detection of *Shigella boydii* and *Shigella sonnei* on tomato surfaces. J. Food Protect. 8: 1606-1612 (2005)
 9. Pagadala S, Parveen S, Schwarz JG, Rippen T, Luchansky JB. Comparison of automated BAX PCR and standard culture methods for detection of *Listeria monocytogenes* in blue crabmeat (*Callinectes sapidus*) and blue crab processing plants. J. Food Protect. 11: 1930-1933 (2011)
 10. Malorny B, Huehn S, Dieckmann R, Krmer N, Helmuth R. Polymerase chain reaction for the rapid detection and serovar identification of *Salmonella* in food and feeding stuff. Food Anal. Method. 2: 81-95 (2009)
 11. Hwang BH, Lee JW, Cha HJ. Polymerase chain reaction-based detection of total and specific *vibrio* species. Appl. Biochem. Biotechnol. 162: 1187-1194 (2010)
 12. Daum LT, Barnes WJ, McAvin JC, Neidert MS, Cooper LA, Huff WB, Gaul L, Riggins WS, Morris S, Salmen A, Lohman KL. Real-time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. J. Clin. Microbiol. 40: 3050-3052 (2002)
 13. Prentice N, Murray JS, Scott MF, Coombs JP, Parton A. Rapid isolation and detection of *Escherichia coli* O157: H7 in fresh produce. J. Rapid Methods Autom. Microbiol. 14: 299-308 (2006)
 14. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6: 986-994 (1996)
 15. Narayanan C, Dubey S, Wali SA, Shukla N, Kumar R, Mandal AK, Ansari SA. Comparative efficacy of different DNA extraction methods for PCR-based assay in *Tectona grandis* L.f. Indian J. Biotechnol. 7: 133-136 (2008)
 16. de Medici D, Croci L, Delibato E, di Pasquale S, Filetici E, Toti L. Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3456-3461 (2003)
 17. Chomczynski P, Rymaszewski M. Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood. Biotechniques 40: 454-458 (2006)
 18. Heller LC, Davis CR, Peak KK, Wingfield D, Cannons AC, Amuso PT, Cattani J. Comparison of methods for DNA isolation from food samples for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by real-time PCR. Appl. Environ. Microbiol. 69: 1844-1846 (2003)
 19. Elizaquivel P, Aznar R. Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Staphylococcus aureus* in fresh, minimally processed vegetables. J. Food Protect. 71: 2110-2114 (2008)
 20. Hyeon JY, Hwang IG, Kwak HS, Park CK, Choi IS, Seo KH. Evaluation of PCR inhibitory effect of enrichment broths and comparison of DNA extraction methods for detection of *Salmonella enteritidis* using real-time PCR assay. J. Vet. Sci. 11: 143-149 (2010)
 21. Miller ND, Davidson PM, D'Souza DH. Real-time reverse-transcriptase PCR for *Salmonella typhimurium* detection from lettuce and tomatoes. LWT-Food Sci. Technol. 44: 1088-1097 (2011)
 22. Ibekwe AM, Watt PM, Grieve CM, Sharma VK, Lyons SR. Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157: H7 in dairy wastewater wetlands. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4853-4862 (2002)
 23. Sabet NS, Subramaniam G, Navaratnam P, Sekaran SD. Detection of methicillin-and aminoglycoside-resistant genes and simultaneous identification of *S. aureus* using triplex real-time PCR taq-man assay. J. Microbiol. Meth. 68: 157-162 (2007)