J. Fd Hyg. Safety
Vol. 23, No. 2, pp. 121~128 (2008)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Real-time PCR을 이용한 원유시료 유래 황색포도상구균의 신속 검출

정재혁 · 정순영[1] · 이상진[1] · 최성숙*
삼육대학교 약학대학, [1]삼육대학교 과학기술대학 동물과학부

SYBR Green I-based Real-time PCR Assay and Melting Curve Analysis for Rapid Detection of *Staphylococcus* aureus from Raw Milks Samples

Jae-Hyuk Jung, Soon-Young Jeong[1], Sang-Jin Lee[1], and Sung-Sook Choi*
School of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul, 139-742 Korea,
[1]Division of Animal Science, Sahmyook University, Seoul, 139-742 Korea
(Received May 6, 2008/Accepted June 16, 2008)

ABSTRACT – The aim of this study was to develop a LightCycler-based real time PCR (LC-PCR) assay and to evaluate its diagnostic use for the detection of *Staphylococcus aureus* in raw milk samples. Following amplification of 113 bp of *coa* gene encoding an coagulase precursor specific for *Staphylococcus aureus*, melting curve and DNA sequencing analysis was performed to verify the specificity of the PCR products. Amplification of 209 bp gene encoding an altered penicillin-binding protein, PBP2a (*mecA*), melting curve analysis and DNA sequencing analysis was performed to verify methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA). According to this study, 6 of 647 raw milk samples showed *S. aureus* positive and 2 of them showed a mecA positive and the detection limit was 10 fg of DNA. And we also isolated *Staphylococcus chromogenes* a causative agent of exudative epidermitis in pigs and cattle from 3 samples.

Key words : Real time PCR, *coa*, Melting curve, *mecA*

서 론

고도의 산업화 사회와 빠른 경제성장은 우리 식생활 양식에 많은 변화를 주었다. 두드러진 식생활 변화중 하나는 우유를 포함한 축산 식품 소비의 급증이라 할 수 있다. 그러나 무역 시장의 개방등에 따라 국내 축산업계에 더 많은 어려움이 있고 우유 소비의 둔화와 생산 과잉으로 인한 원유의 수급 불균형은 낙농가를 더욱 어렵게 만들고 있는 실정이다[1]. 또한 국제 교역이 활발해 지고 식품의 공급이 세계화 되면서 각 나라마다 자국의 산업 보호 차원에서 식품안전을 활용하게 되었다. 국제 식품규격위원회(CODEX)에서는 WTO 체제하에서 객관적이고 과학적인 식품안전관리의 방법으로 위해 분석 (risk analysis)을 제시하였다[2,3]. 위해분석은 위해를 측정하고 위해의 영향인자를 찾는 위해 평가 (risk assessment), 위해를 조절하기 위한 전략을 발전시키고 실행시키는 위해 관리(risk management), 이해 관계가 있는 사람들 사이에서 위해에 대해 정보를 교환하는 위해 정보 교류 (risk communication)로 구성 된다. 이러한 국제적 흐름 속에서 미생물 위해 관리의 중요성은 더욱 높아졌으며 미국과 유럽에서 축적한 식중독이나 관련 질환들의 자료들을 토대로 더욱 정교하고 세분화된 미생물 위해 평가가 가능하게 되었다. 1999년 국제식품규격위원회의 식품위생분과위원회에서는 "미생물의 위해 평가의 원칙과 지침"이라는 보고서를 채택하였다[4]. 이에 따르면 위험 요소확인, 위험요소 특성 분성 노출량 평가 위해 특성 분석으로 구분하고 있다. 식품유래 유해 미생물중 하나인 황색포도상 구균은 그람 양성 구균으로 혈장응고효소인 coagulase를 생산하며 여러 가지 감염증을 일으키는 균으로 알려져 있다[5]. 포도상 구균은 세계 각국에서 식중독의 원인균으로 알려져 있으며 우리나라에서도 서구화 되는 식단에 따라 식중독 원인균의 3위를 차지 하고 있다[6]. 따라서 본 연구에서는 식중독 원인균인 황색포도상구균을 원유시료에서 신속 정확하게 검출하고자 double strand DNA에 선택적 결합을 하는 SYBR Green I을 이용한 real-time PCR기법을 이용하고자 하였다. 중합효소반응 (PCR)은 1985년 처음 소개된 방법으로서 핵산검출에 있어서 매우

*Correspondence to: Sung-Sook Choi, School of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul, 139-742 Korea
Tel: 02-3399-1606, Fax: 02-3399-1617
e-mail: sschoi@syu.ac.kr

민감하고 특이적이어서 분자생물학, 기초 및 응용생물학, 의학등 전분야에서 혁명적인 진단을 가능하게 하였다[7]. 그러나 기존의 PCR법은 단지 증폭된 DNA의 크기에 기초하여 분석하며, 그 분석한계도 최소한 1ng 이상의 DNA가 있어야 가능한 것으로 알려져 있다. 또한 일단 PCR 반응이 끝난 후 전기영동을 실시하여 증폭된 DNA band를 확인하여야 하므로 PCR 및 전기영동에만 최소 3시간 이상의 시간이 소요되는것으로 알려져 있다. 그러나 Real-time PCR 기법은 미량의 DNA만 있어도 확인이 가능하며(>1 fg) PCR 반응 도중에도 증폭되는 과정을 실시간으로 확인이 가능하므로 증폭하는 DNA의 크기에 따라 30분 정도에도 확인을 할 수 있는 신속한 기법이다. 또한 증폭된 DNA의 크기에 기초한 분석이 아니고 증폭된 DNA 조각의 Tm 값에 근거한 분석이므로 DNA band 크기에 기초한 분석기법보다 specificity나 sensitivity가 월등히 우수한 진단 기법이다[8-11]. 따라서 본 연구에서는 원유시료속에 존재하는 황색포도상구균의 검출을 보다 신속, 정확하게 하고자 real-time PCR 기법을 이용하여 분자수준에서 종을 확인하고자 *coa* (coagulase precursor) 유전자에[12,13] 특이적인 primer를 디자인하여 신속 정확하게 황색포도상구균을 검출하는 기법을 개발하고자 하였다. 또한 원유에서 분리된 황색포도상구균을 대상으로 항생제에 대한 위해평가를 시도해 보고자 하였다. 그 목표 항생제로 동물용 항생제로 사료등에 첨가되는 페니실린계 항생제의 일종인 methicillin을 선택하였다[14]. 포도상구균의 감염증의 경우 그 치료에 페니실린계 항생제가 사용되어 왔다. 그러나 페니실린의 빈번한 사용에 따라 내성이 생기고 그에 따라 methicillin이 치료 효과를 거두어 왔으나 지속적인 항생제의 사용으로 오늘날 methicillin에 내성인 황색포도상 구균 (Methicillin Rsistance *Staphylococcus aureus*, MRSA)의 증가가 문제가 되고 있다[15]. MRSA 는 전 세계적으로 항생제 내성균의 대표적인 표상이 되고 있으며 이러한 균의 발견은 최근 집단적 사육환경에서 점차 증가되고 있는것으로 보고 되고 있다. MRSA의 검출에는 일반적으로 PBP2a를 coding하는 methicillin 내성 유전자인 *mecA* 유전자의 존재로 확인하며[16,17] 따라서 본 연구에서는 *mecA* 유전자를 확인하기 위한 primer를 제작하여 real-time PCR을 이용하여 신속하게 *mecA* 유전자 검출을 통한 MRSA검출도 하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 시장 개방 현실속에 우리 축산농가의 우유 실태를 조사하여 식품위해인자중 하나인 식중독의 원인균으로 알려진 황색포도상구균의 검출방법으로서 보다 신속하고 정확한 real-time PCR 기법을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에는 원유 시료에서 분리된 6종의 *Staphylococcus aureus* 균주, 3종의 *Staphylococcus chromogenes*, 품질관리를 위한 표준균으로 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12288 및 MRSA 양성대조균으로 *Staphylococcus aureus* CCARM 3697 (항생제 내성 균주 은행 분양)을 사용하였으며 황색포도상구균의 분리에는 선택배지인 Staphylococcus medium 110 (Difco)를 그 외의 배양에는 Nutrient broth (Difco) 및 Muller-Hinton 배지 (Difco)를 사용하였다.

황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)의 분리 및 동정

2007년 12월부터 2008년 3월에 걸쳐 경기북부지역 젖소 사육 농가 15곳으로부터 647개의 원유 시료를 공급받아 본 실험 사용하였으며 착유시 알코올 소독을 실시하여 2차 감염의 기회를 최소화 하였다. 수집한 원유는 잘 혼화 후 멸균한 면봉으로 Staphylococcus medium 110 (Difco)에 원유시료를 도말 후 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 형성된 집락중 포도상구균 특유의 모양을 나타내는 황색의 집락을 순수배양 후 임상검사센터인 세강 (서울)에 의뢰하여 생화학적 실험을 통한 균동정을 실시하였다.

항생제감수성검사

분리된 황색포도상구균을 대상으로 Oxacillin (Sigma Co. St. Louis MO, USA)에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 본 실험에는 양성대조균 *S. aureus* CCARM 3697을, 음성대조균으로는 *S. aureus* ATCC 6538P를 사용하였다. 감수성 실험은 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, USA)의 고체배지 희석법으로 실시하였으며 배지는 Muller-Hinton 배지(4% NaCl 함유) (Difco)를 사용하였다[18]. 실험에 사용한 균주를 37°C, 17시간 전 배양한 후, 이 균을 10^5 CFU/ml 되도록 희석한후 5 ml씩 항생제 배지에 접종하여 배양하고 균주의 성장을 확인할 수 없는 가장 낮은 oxacillin 농도를 최소억제농도로 결정하였다.

황색포도상구균의 genomic DNA 분리

PCR반응을 하기 위해 원유시료에서 분리한 균주로부터 genomic DNA를 GeneAll Cell SV kit(진올바이오테크놀로지, 서울)을 이용하여 분리하였으며 황색포도상구균의 세포벽의 분해를 용이하게 하기 위하여 lysostaphin (Sigma Co. MO. USA)을 50 ml (100 mg/ml)를 첨가하였다.

Real-time PCR analysis of *coa* gene

원유 시료에서 분리된 균주중 황색 포도상구균 특유의 집락을 보이는 균주를 분자수준에서 확인하기 위하여 종특이적(species specific) 유전자인 *coa* (coagualse precursor)[12,13] 유전자의 존재를 확인하기 위하여 SYBR Green-I을 이용한 realtime PCR을 실시하였다. *coa* 검출을 위한 primer는 Sigma-Proligo (The Woodlands, TX, USA) 사에서 제작하여

실험에 사용하였으며 primer sequence는 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 capillary tube (LightCycler instrument, Roche Diagnostic)에 20 μl 반응액을 기준으로 113 bp의 *coa*특이 유전자를 다음과같은 조건에서 증폭하였다. 2 μl의 LightCycler FastStart DNA master mix for SYBR Green I (Roche Diagnostoc), 0.5 μM 의 각각의 primer (*coa* F, *coa* R), 2.4 μl 4 mM $MgCl_2$, 2 μl의 DNA를 혼합하여 총 20 μl로 capillary에 분취 후 마개를 닫은 후 500 × g에서 30초간 spin-down후 Roche LightCycler를 이용하여 반응을 실시하였다. 95°C, 10분간 polymerase 활성화를 실시한 후, 45회 반복 반응(95°C 10초, 58°C 10초, 72°C 7초)하여 목적 DNA를 증폭하였다. 이때 temperature transition rate는 20°C/s였고 증폭된 DNA는 SYBR Green I의 결합으로 특유의 형광을 발하게 되어 이 형광의 발생 정도를 LightCycler software v. 4.5로 분석하였다. Melting curve 분석은 위 증폭과정 후 즉시 다음과 같은 조건으로 실시하였다. 첫번째 단계는 95°C 0s (hold time), 두 번째 단계는 65°C 15s, 세번째 단계는 95°C 0s (hold time)로 하였으며 온도변화율은 20°C/s이었고 마지막 3번째 단계만 0.1°C/s로 하였다. 이때 얻어지는 melting peak는 증폭된 DNA의 GC%에 따라 특이적으로 나타난다.

Real-time PCR analysis of *mecA* gene

원유 시료에서 분리된 황색포도상구균중 oxacillin 에 저항성을 나타내는 균에서 *mecA* 유전자의[15,16] 존재를 확인하기 위하여 SYBR Green-I을 이용한 realtime PCR을 실시하였다. mecA검출을 위한 primer는 Sigma-Proligo (The Woodlands, TX, USA) 사에서 제작하여 사용하였으며 primer sequence는 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 primer mecAF와 mecAR를 사용하여 209 bp의 *mecA* 특이 유전자를 capillary tube (LightCycler instrument, Roche Diagnostic)에 20 μl 반응액을 기준으로 다음과 같은 조건으로 증폭하였다. 2 μl의 LightCycler FastStart DNA mastermix for SYBR Green I (Roche Diagnostoc), 0.5 μM 의 각각의 primer, 4 mM $MgCl_2$ 2.4 μl , 2 μl의 DNA를 혼합하여 총 20 μl로 capillary에 분취 후 마개를 닫은 후 500 × g에서 30초간 spin-down후 Roche LightCycler를 이용하여 반응을 실시하였다. 95°C, 10분간 polymerase 활성화를 실시한 후, 45회 반복 반응(95°C 10초, 55°CC 10초, 72°C 10초)하여 목적 DNA를 증폭하였다. 이때 temperature transition rate는 20°C/s였고 증폭된 DNA는 SYBR Green I의 결합으로 특유의 형광을 발하게 되어 이 형광의 발생 정도를 LightCycler software v. 4.5로 분석하였다. Melting curve 분석은 위 증폭과정 후 즉시 다음과 같은 조건으로 실시하였다; 첫번째 단계는 95°C 0s (hold time), 두 번째 단계는 65°C 15s, 세번째 단계는 95°C 0s (hold time)로 하였으며 온도변화율은 20°C/s이었고 마지막 3번째 단계만 0.1°C/s로 하였다. 이때 얻어 지는 melting peak는 증폭된 DNA의 GC%에 따라 특이적으로 나타난다.

Real-time PCR for amplification of 16S rRNA specific gene for positive control

본 PCR 실험의 positive control로는 Staphylococcus의 16S rRNA에 특이적인 primer를 제작하여 real-time PCR을 수행하였다. 이 실험에 사용한 primer는 Negar 등[19] 이 사용한 동일한 primer를 사용하였으며 Sigma-Proligo (The Woodlands, TX, USA) 사에서 제작하여 사용하였으며 primer sequence는 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 capillary tube (LightCycler instrument, Roche Diagnostic) 에 20 μl 반응액을 기준으로 다음과 같은 조성으로 사용하였다. 2 μl의 LightCycler FastStart DNA mastermix for SYBR Green I (Roche Diagnostoc), 0.5 μM 의 각각의 primer, 4 mM $MgCl_2$ 2.4 μl, 2 μl의 DNA를 혼합하여 총 20 μl로 capillary에 분취 후 마개를 닫은 후 500 × g에서 30초간 spin-down 후 LightCycler 를 이용하여 반응을 실시하였다. 95°C, 10분간 polymerase 활성화를 실시한 후, 45회 반복 반응(95°C 10초, 58°C 10초, 72°C 15초)하여 목적 DNA를 증폭하였다 . 이때 temperature transition rate는 20°C/s였고 증폭된 DNA는 SYBR Green I의 결합으로 특유의 형광을 발하게 되어 이 형광의 발생 정도를 LightCycler software v. 4.5으로 분석하였다. Melting curve 분석은 위 증폭과정 후 즉시 다음과 같은 조건으로 실시하였다; 첫번째 단계는 95°C 0s (hold time), 두 번째 단계는 65°C 15s, 세번째 단계는 95°C 0s (hold time)로 하였으며 온도변화율은 20°C/s이었고 마지막 3번째 단계만 0.1°C/s로 하였다. 이때 얻어지는 melting peak는 증폭된 DNA에 특이적이다.

Table 1. The sequences of the primers used in this study

Gene	Primer name	Sequence (5' →3')	5' position	Length (bp)
coa	coaF	gtg aat aca cag atg gaa cat ttg g	1442	25
	coaR	tcc gta tga tac tgt gcc atc ttg	1554	24
mecA	mecAF	ttt agg cgt taa aga tat aaa cat tca gg	216	29
	mecAR	tgc ttt ggt ctt tct gca ttc c	424	22
16S rRNA	16SF	gga att caa akg att tga cgg ggg c	911	25
	16SR	cgc gat ccc agg ccc ggg aac gta ttc ac	1371	29

Sequencing of LC-PCR amplicon of *coa* and *mecA*

원유 시료에서 분리된 황색포도상구균에서 Real-Time PCR법으로 증폭된 DNA 절편이 *coa* 및 *mecA*인지 확인하기위하여 DNA 염기서열을 확인하였다. PCR 반응 후 전기영동을 실시하여 113 bp (*coa*), 209 bp (mecA) 크기의 DNA 절편을 agarose gel에서 잘라낸 후 GeneAll PCR purificaiotn kit (진올바이오테그놀로지, 서울)을 이용해 agarose gel에서 DNA를 유출 후 Genotech(대전)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다.

실험 결과 및 고찰

원유시료중의 황색포도상구균의 검색

원유시료중의 황색포도상구균을 검색하기 위하여 경기북부지역 축산농가 15개에서 647개의 원유시료를 공급받아 본 실험에 사용하였다. 포도상구균선택배지인 Staphylococcal Medium 110 (Difco)에 원유시료를 도말 후 48시간 배양 후 생성된 집락중 Staphyloccus 특유의 집락 모양을 나타내는 균주를 선택하고자 하였으며 647개의 원유 시료중 9개의 원유 시료에서 황색포도상구균으로 의심되는 집락이 형성되었다. 따라서 본 9개의 시료에서 각각 균주를 분리 배양 하고 임상검사소 세강 (서울)에 의뢰하여 균 동정을 실시한 결과 9개의 후보 시료중 6개의 시료에서 분리된 균이 황색포도상구균으로 동정되었으며 3개는 *S. chromogenes*로 확인되었다(Table 2). 6개의 황색포도상구균을 대상으로 oxacillin 저항성을 검사한 결과 2개의 균주가 oxacillin에 고도 내성을 보이는 MRSA로 판명되었다. 총 647개의 원유시료중 6개의 황색포도상구균이 검출되고 이중 2균주가 MRSA로 판명된 것은 매우 낮은 검출 빈도이며 이는 축산농가에서의 사육 젖소에 대한 위생관리가 매우 철저히 되고 있음을 보여주는 사례이다. 한편 황색포도상구균 양성으로 판명된 6종의 시료는 유방염 초기의 젖소에서 유래된것으로 사료되며 한편 돼지나 소에서 삼출성 피부염(exudative epidermitis)을[20] 일으킨다고 알려진 *S. chromogenes* 균주가 3개 분리되었으며 이균도 유방염 초기 소에서 분리된 것으로 사료되며 앞으로 원유 시료를 대상으로 *S. chromogenens*의 분리 빈도를 확인하고 독소 생성 유전자인 ExhB의 존재를 신속하게 검출할 RT-PCR 기법을 개발할 예정이다.

항생제 감수성 검사

분리된 황색포도상구균의 methicillin에 대한 저항성을 확인하기 위하여 다양한 농도의 oxacillin을 함유한 Muller-Hinton 배지(4% NaCl함유)에서 CSLI의 방법에[18] 따라 감수성 검사를 실시하였다. 그 결과 Table 2와 같은 결과를 얻었으며(1~100 μg/ml) 특히 이중 2개의 균주에 대한 oxacillin의 MIC가 50 μg/ml 및 100 μg/ml 이상을 나타내었으며 이는 비교적 고농도 내성으로 판단되었다. 원유 시료에서 분리된 MRSA 균주는 비교적 methicillin에 대한 저항성이 높은 것을 알 수 있었으며 특히 본 검사의 정확성을 확인하게 위하여 항생제내성 균주 은행에서 분양받은 MRSA양성인 *S. aureus* CCARM 3679균주를 양성 대조균으로 사용하였으며 양성 대조균의 저항성은 분양 은행의 기록과 동일한 결과를 나타낸것을 보아 저항성 검사방법의 문제는 없는 것으로 사료된다.

Real-Time PCR assay for detection of *coa* specific DNA amplicon

생화학적 동정을 통해 확인된 원유시료에서 분리된 6종의 *S. aureus* 및 3종의 *S. chromogenes*의 종 특이성을 분

Table 2. Characteristics of Staphylococcus sp. Isolated from Raw Milk Samples

Sample No.	Strains	MIC (μg/ml)	genotypes		
			coa	16S rDNA	mecA
B 32-1	*Staphylococcus aureus*	1	+	+	–
D 7071	*Staphylococcus aureus*	2	+	+	–
S 1220	*Staphylococcus chromogenes*	4	–	+	–
S 81-2	*Staphylococcus aureus*	100 <	+	+	+
S 83-5	*Staphylococcus aureus*	50	+	+	+
M-29-1	*Staphylococcus aureus*	1	+	+	–
M-46-1	*Staphylococcus chromogenes*	4	–	+	–
B-58	*Staphylococcus aureus*	2	+	+	–
B-62	*Staphylococcus chromogenes*	4	–	+	–
	Staphylococcus aureus ATCC 6538P	1	+	+	–
	Staphylococcus aureus CCARM 3697	100 <	+	+	+
	Staphylococcus epidermidis ATCC 12288	nt	–	+	–

자수순에서 확인하기 위하여 황색포도상구균 특이적인 coagulase precursor 유전자인 *coa*에 특이적인 primer를 제작하여 PCR을 수행 하였으며 그 결과 *S. aureus*로 확인된 균주에서는 *coa*에 특이적인 Tm 값이 80.33 ± 0.14°C에서 나타내는 113 크기의 band가 증폭된 것을 확인하였다(Fig. 1). 본 실험결과 양성대조균인 *S. aureus* ATCC6538P 및 6종의 원유시료 유래 *S. aureus*에서만 특유의 Tm 값을 나타내었으며 *S. epidermidis* 와 *S. chromogenes*에서는 negative control과 동일하게 특징적인 peak를 관찰할 수가 없었다. 따라서 *S. aureus*에서만 나타난 Tm 80.33 ± 0.14°C의 113 bp의 *coa* DNA 검출은 본 실험에서 사용한 *coa* specific primer 는 아주 선택적으로 본 균주를 분자 수준에서 동정이 가능한 것으로 생각된다. coagulase 생성능은 Staphylococcus 속 균주중 *S. aureus*를 구분하는 특징적인 생화학 반응이다. 기존의 생화학적 반응으로 coagualase 생성을 확인하기 위하여는 균주의 배양시간이 소요되므로 24시간 이상의 시간이 필요하다[21]. 그러나 coagulase precursor를 coding 하는 *coa* 유전자를 real-time PCR로 증폭하여 확인하는 과정은 1시간 이내에 가능한 매우 신속한 기법이다. 또한 DNA의 검출한계가 10 fg정도로 미량의 DNA도 검출이 가능한 것으로 사료되며 이는 Real-Time PCR기법의 우수성을 보여주는 좋은 예라 할 수 있다(Fig. 4).

Real-Time PCR assay for detection of *mecA* gene

원유 시료에서 분리된 MRSA를 대상으로 methicillin저항성의 원인 유전자인 *mecA* 유전자를 확인하기 위하여 SYBR Green I based real-time PCR을 실시하였다. PCR 기계는 Roch LightCycler (1.5)를 사용하였으며 양성대조균으로 MRSA CCARM 3697을 음성 대조균으로 *S. aureus* ATCC 6538P를 사용하였다. MRSA균주가 methicillin에 내성을 나타내는 기전은 고유한 penicillin-binding protein (PBP)인 PBP2a를 생성하기 때문이다. PBP는 세포막에 결합한 단백질로 세균의 세포벽 합성에서 corss-linking 반응

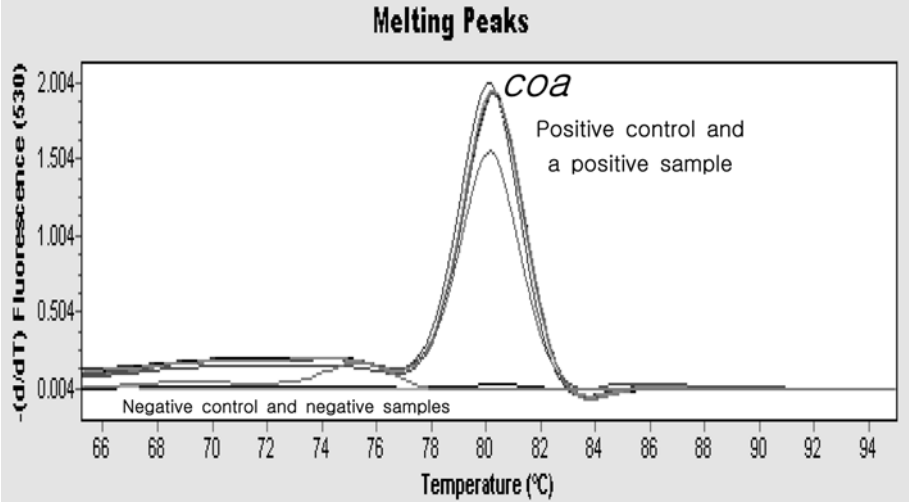

Fig. 1. LightCycler (LC) printouts showing meltimg curves of *coa* specific fragments generated by the LC-PCR assay. Specific signals had melting temperatures of 80.33 ± 0.14°C.

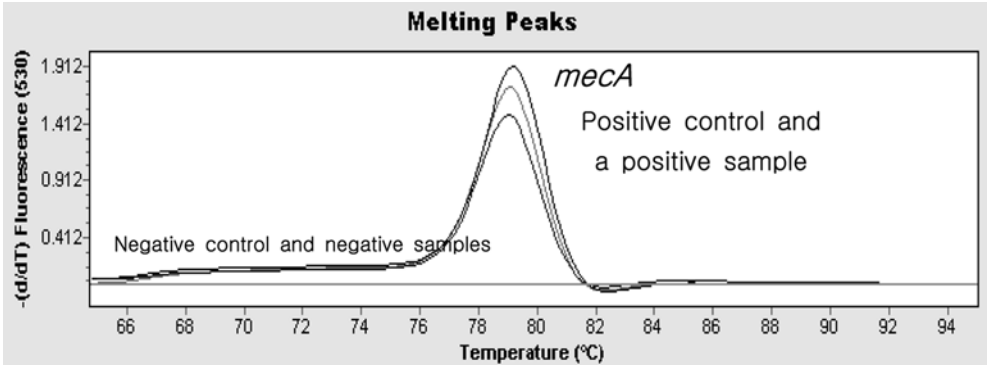

Fig. 2. LightCycler (LC) printouts showing meltimg curves of mecA specific fragments generated by the LC-PCR assay. Specific signals had melting temperatures of 79.11 ± 0.11°C.

을 촉매한다[22]. PBP는 β-lactam 항생제의 결합부위가 되는데 β-lactam 항생제는 catalytic site 에 결합하여 세균의 세포벽 합성을 저해하므로 항생현상을 나타낸다. 대부분의 세균들은 분자량, β-lactam 항생제에 대한 친화력, 효소작용이 다양한 여러 가지 PBP를 생성한다. MRSA 또한 고유한 PBP를 생산하는데 이를 PBP2a 또는 PBP2' 라고 부르며 β-lactam 항생제에 대한 친화력이 낮기 때문에 정상적인 PBP에 결합하는 β-lactam 항생제에 대하여는 결합하지 않으므로 이들 항생제에 내성을 나타낸다[23]. 이 PBP2a를 coding하는 유전자가 *mecA*이며 전체 크기는 2010 bp, 670 aa으로 되어있다[24]. PCR 결과 양성대조균인 CCARM 3679와 원유 시료에서 분리된 2 균주는 79.11 ± 0.11°C에서 특유의 Tm 값을 나타내는 DNA 절편의 증폭을 확인하였고 *S. aureus* ATCC 6538P 및 나머지 *S. aureus*에서는 음성 대조군과 마찬가지로 양성대조균과 동일한 Tm 값을 갖는 peak를 확인할 수 없었다 (Fig. 2). PCR을 통해 증폭된 DNA가 *mecA* 유전자인지 확인하기 위하여 DNA 염기서열 분석을 Genotech (대전)에 의뢰 하였고 그 결과 100% 동일함을 확인하였다 (Fig. 5). 따라서 본 연구에서 디자인한 primer를 이용한 real-time PCR 기법을 이용하면 초기 유방염 젖소에서 황색포도상구균의 조기 검출 및 MRSA의 검출을 신속, 정확하게 할 수 있을 것으로 사료된다.

Real-Time PCR assay for detection of 16S rRNA specific DNA amplicon

본 실험의 전반적인 과정의 문제없음을 확인하기 위하여 양성 대조군으로16S rDNA에 특이적인 primer를 제작

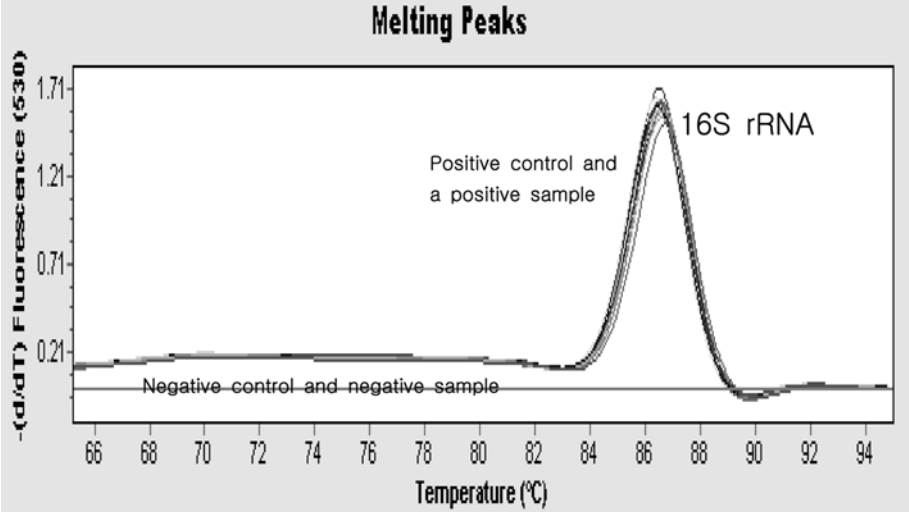

Fig. 3. LightCycler (LC) printouts showing meltimg curves of 16S rDNA specific fragments generated by the LC-PCR assay. Specific signals had melting temperatures of 86.63 ± 0.17°C.

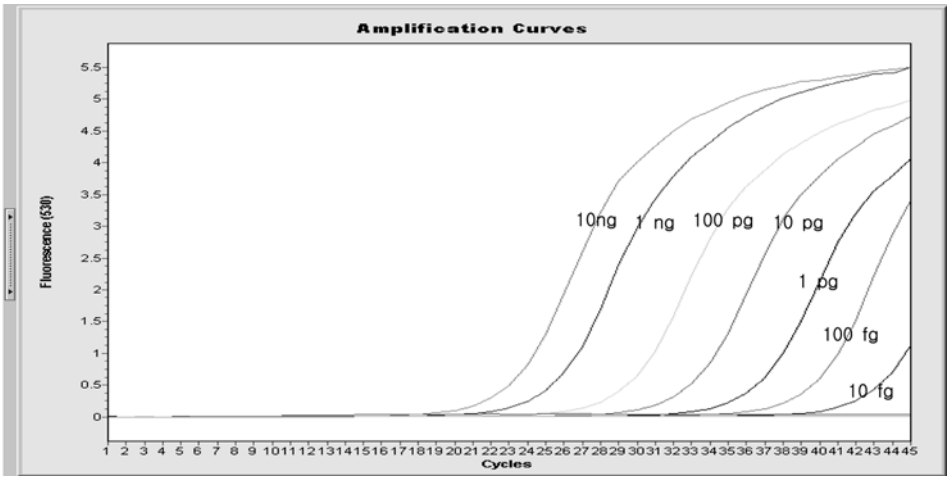

Fig. 4. LightCycler (LC) printouts showing detection of *coa* DNA by LC-PCR assay. Fluorescent signal related to cycle number on a panel of ten-fold dilutions between 10^7 and 10 fg of *S. aureus coa* DNA.

```
dbj|AP009324.1|  Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu3 DNA, coagulase precusor
Score =  185 bits (100),  Expect = 2e-44
Identities = 100/100 (100%), Gaps = 0/100 (0%)

Query  1      ATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGTGAAACAAATGCATACAACGT  60
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  266095ATTTGGATATGAAGCGAGACCAAGATTCAACAAGCCAAGTGAAACAAATGCATACAACGT  266154

Query  61     AACGACAAATCAAGATGGCACAGTATCATACGGAGCTCGC  100
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  266155AACGACAAATCAAGATGGCACAGTATCATACGGAGCTCGC  266194



gb|EF190335.1| Staphylococcus aureus penicillin-binding protein 2a (mecA) gene,
Score = 344 bits (186), Expect = 7e-92
Identities = 186/186 (100%), Gaps = 0/186 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1    CAGGATCGtaaaataaaaaaagtatctaaaaataaaaaacgagtagatgctcaatataaa 60
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 241 CAGGATCGTAAAATAAAAAAAGTATCTAAAAATAAAAAACGAGTAGATGCTCAATATAAA 300
Query 61   attaaaacaaaCTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAAAGAAGAT 120
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 301  ATTAAAACAAACTACGGTAACATTGATCGCAACGTTCAATTTAATTTTGTTAAAGAAGAT 360
Query 121  GGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTCCAGGAATGCAGAAAGACCAA 180
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 361 GGTATGTGGAAGTTAGATTGGGATCATAGCGTCATTATTCCAGGAATGCAGAAAGACCAA 420
Query 181 AGCATA 186
           ||||||
Sbjct 421 AGCATA 426
```

Fig. 5. Sequencing and DNA blast results of PCR amplified *coa* and *mecA* fragmnet.

하여 PCR을 수행 하였으며 그 결과 Staphylococcus 속으로 확인된 균주에서는 16S rDNA에 특이적인 Tm 값이 86.63 ± 0.17°C에서 나타내는 479 bp 크기의 band가 증폭된 것을 확인하였다 (Fig. 3). 즉 본 실험과정의 균주의 분리, 배양, DNA의 분리 및 PCR 과정에서의 실험오류는 없는 것으로 판단되었다.

요 약

본 연구는 LightCycler (Roche)를 이용한 Real-Time PCR (LC-PCR) 기법을 통하여 원유시료에서 신속, 정확하게 황색포도상구균을 검출하는 기법을 개발하고자 하였다. coagulase 전구체를 coding하는 113 bp의 *coa* 유전자의 증폭, melting curve 분석 및 DNA염기서열을 분석하여 황색포도상구균 특유의 유전자 검출하는 기법을 개발하였다. 또한 분리된 균주중 메치실린에 내성을 나타내는 균주를 검출하고자 penicillin-binding protein, PBP2a (*mecA*)를 coding 하는 209 bp의 *mecA* 유전자의 증폭, melting curve 분석 및 DNA염기서열을 분석하여 메치실린내성 황색 포도상구균을 real-time PCR 기법으로 검출하는 기술을 개발하였다. 본 실험에 따르면 647개의 원유시료중 6개의 시료에서 황색포도상구균이 검출되었으며 이중 2개의 시료에서 분리된 황생포도상구균이 메치실린내성 황색포도상구균임을 확인하였다. 또한 DNA 검출한계는 10 fg으로 기존 PCR에 비해 매우 감도가 우수한 것을 확인하였다. 또한 3개의 원유시료에서 돼지나 소의 삼출성 피부염의 원인균인 *Staphylococcus chromogenes*가 분리되었다.

참고문헌

1. Yoon, J. C., Lee, J. C., Kim, S. K., Park, T. S., Kim, J. T., Lee, C. G., and Lee, C. Y.: Prevalence of isolated microorganisms an and antimicrobial susceptibility from half milk in dairy goats. Korea *J. Vet. Res.* **44**(**1**), 151-157 (2004)

2. Anon: Results of the Uruguay round of the multilateral trade negotiations 1993: agreement on application of sanitary and phytosanitary measures. World Trade Organisation, Genova. (1995)
3. Codex Aimentarius Commission: Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. CAC/GL30. Geneva (1999).
4. European Commission: Principles for the development of risk assessment of microbiological hazards under directive 93/43/EEC covering the hygiene of Food shop. (1997).
5. Eley, A. R.,: Microbial food poisoning, 2nd ed., London, Cha,pman & Hall. (1992).
6. Pan, T. M., Wang, T. K., Lee, C. L., Chien, S. w., and Horng, C. B.: Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995. *J. Clin. Microbiol*., **35**(**5**), 1260-1262 (1997).
7. Maurer, J.: The methodology of PCR. pp 27-40: In: PCR methods in foods. Maurer J (ed.), Springer, Inc., New York, NY, USA(2006).
8. Wilhelm, J. and Pingoud, A.: Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem*. **4**, 1120-1128 (2004).
9. Sails, A. D., Fox, A. J., Botton, F. J., Wareing, D. R. and Greenway, D. L. : A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol*. **69**(**3**), 1383-1390 (2003).
10. Seo, K. H., Valentin,-Bon, I. E., Brackett, R. E. and Holt, P. S.: Rapid, specific detection of *Salmonella enteritidis* in pooled eggs by real-time PCR. *J. Food Prot*. **67**, 864-869 (2004).
11. Studer, S., Schaerent, W., Naskova, J., Pfaeffli, H., Kaufmann, T., Kirchhofer, M. and Steiner, A: A longitudinal field study to evaluate the diagnostic properties of a quantitative real-time pplymerase chain reaction-based assay to detect Staphylococcus aureus in Milk. *J. Dairy Sci*. **91**, 1893-1902 (2007).
12. Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M.. and Bergeron, M. G.: Species-specific and ubiquitous-DNA based assay for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol*. **36**, 618-623 (1998).
13. Phonindaeng, P., O'reilly, M., Nowlan, P., Brmley, A. J. and Foster, T. J. : The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Mol. Microbiol*. **4**, 393-404 (1990).
14. Mcdermott, P. F., Zhao, S., Wagner, D. D., Simjee, S., Walker, R. D. and Whitw, D. G. : The food safety perspective of antibiotic resistance. *Animal Biotech*. **13**, 71-84 (2002).
15. Anyliffe, G. A. J. : The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis*., **24** (Suppl. 1), S74-49 (1997).
16. Kuhl, S. A., Pattee, P. A. and Baldwin, N. J.: Chromosomal map location of the methicillin resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*. **135**, 460-465 (1978).
17. Ito, T., and Hiramatsu, K.: Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yunsei Medical Journal*. **39**, 526-533 (1998).
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance standards for antimicrobial susceptibility test; 15th Informational Supplement Document M100-S15, CLSI, Wayne, PA.,(2005)19. Sabet, N. S., Subramaniam, G., Navaratnam, P and Sekaran, S. D.: Simultaneous species identification and detection of methicillin resistance in Staphylococcus using triplex real-time PCR assay. *Dia. Microbiol. Infect. Dis*. **56**, 13-18 (2006).
20. Anserson, L. O., Ahrens, P., Daussard, L. and Bille-Hansen, V.: Exudative epidermitis in pigs caused by toxigenic *Staphylococcus chromogenes*. *Vet. Microbiol*. **105**, 291-300 (2005).
21. Kearns, A. M., Seiders, P. R., Wheeler, J., Freeman, R., and Steward, M.: Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococci by multiplex PCR. *J. Hosp. Infect*. **43**, 33-37 (1999).
22. Waxman, D. J. and Strominger, J. L.: Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of b-lactam antibiotics. *Annu. Rev. Bioche*, **52**, 825-829 (1983).
23. Chambers, H. F. and Sachdeva, M.: Binding of b-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in methicillin-resistanr *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis*. **161**, 1170-1176 (1990).
24. Song, M. D., Wachi, M., Doi, D., Ishino, F. and Matsihashi, M.: Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett*. **221**, 167-171, (1987).