

Multiplex PCR을 이용한 Shiga-like toxin 생성 *Escherichia coli* O157:H7의 검출 및 확인

임지수 · 윤장호 · 민복기¹ · 홍광원*
동국대학교 식품공학과, 을지대학교 임상병리학과¹

Detection and Identification of Shiga-like Toxin Producing *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR

Ji Su Lim, Jang Ho Yoon, Bokkee Min¹ and Kwang Won Hong*

Department of Food Science and Technology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

¹Department of Biomedical Laboratory Science, Eulji University, Daejeon, Korea

Abstract

A multiplex polymerase chain reaction method was developed for rapid detection and identification of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 in food. Specificity of 15 primer sets that target genes specific for *E. coli* O157:H7 were tested on five *E. coli* O157:H7 strains, three other serotypes of *E. coli* and ten non-*E. coli* strains using singleplex PCR. Among them, four primer sets for the *E. coli* O157:H7 genes *rfbE*, *eaeA*, *stxI* and *stxII* genes were selected for a multiplex PCR assay. All *E. coli* O157:H7 examined were positive for the *rfbE* and *eaeA* genes, however, the amplifications of Shiga-like toxin genes *stxI* and *stxII* were dependent on the strains. The detection limit of the multiplex PCR assay was 2.2×10^1 CFU/reaction in artificially inoculated lettuce without enrichment. This multiplex PCR method could be used to check the presence of *E. coli* O157:H7 and Shiga-like toxin producing *E. coli* strains in food.

Key words: *E. coli* O157:H7, Shiga-like toxin, multiplex PCR, detection, identification

서 론

Escherichia coli O157:H7은 1982년 미국에서 햄버거를 매개로 하여 발생한 집단 식중독을 통해 알려지게 되었으며 verotoxin을 생산하는 enterohemorrhagic *E. coli* 이다. 이 세균에 감염된 환자는 출혈성 대장염(haemorrhagic colitis), 급성 신부전, 미 맥관성 용혈성 빈혈, 혈전성 혈소판 감소성 자반증 등을 주 증상으로 하는 용혈성 요독 증후군(HUS)으로 진행될 수 있으며 이 경우 사망에까지 이를 수 있어 전 세계적으로 문제가 되는 식중독 균이다. 이들의 주요 감염원은 소나 사람한테 오염된 고기가 잘 조리되지 않았을 경우나 사람과 사람간의 또는 오염된 식수를 통한 전파로 발생할 수 있으며 또한 신선 야채 및 과일을 매개로 한 식중독 발생도 알려져 있다(Yilmaz *et al.*, 2006; Padola *et al.*, 2004; Paik *et al.*, 2002; Ho, 1998; Beuchat *et al.*, 2002).

E. coli O157:H7이 생산하는 verotoxin은 식중독의 직접

적인 원인이 되며 *Shigella dysenteriae* type I의 Shiga toxin과 유사하여 'Shiga-like toxin'이라고 부른다. 이 toxin은 'Shiga-like toxin I'과 'Shiga-like toxin II' 두 가지가 알려져 있으며 O157:H7은 균종에 따라서 이 둘을 모두 생성하지 않을 수도 있고, 둘 중 하나만 생성할 수도 있으며 I, II를 모두 생성하는 균에 감염될 경우 치명적인 합병증을 유발할 수 있다. 또한 toxin 이외에도 장관상피세포에의 부착 및 탈착에 필수적인 intimin 단백질이나 60MDa virulence plasmid가 O157의 병원성에 기여한다고 알려져 있다(Mead *et al.*, 1998).

E. coli O157:H7은 국내에서 현재 제1군 전염병으로 지정되어 있으며 대규모로 발병한 사례는 없으나 최근에 지속적으로 발병 사례가 보고되고 있어 식중독 발생을 미연에 방지하거나 추후 확인하기 위하여 이들의 존재를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 시험법이 필요하다. *E. coli* O157:H7을 검출하고 판정하는 표준 방법은 증균 배양 후 sorbitol Mac-Conkey(SMAC) agar에 도말하여 sorbitol 음성 집락을 확인하고 생화학적인 동정 과정을 거친다. 이러한 배지법은 일반적으로 많은 시간과 노력을 필요로 하므로 배지법 이외에 immunoassay나 polymerase chain reaction

Corresponding author: Kwang Won Hong
Tel: 82-2-2260-3369; Fax: 82-2-2285-3988
E-mail: hkwon@dongguk.edu

(PCR)과 같은 신속 검출법이 널리 연구되어 왔다(Deisingh et al., 2004).

PCR은 대상 균주의 염색체상에 특이적인 염기서열을 증폭시켜 일정한 크기의 DNA 단편의 생성을 확인하는 방법으로 증균 배양 후 수시간 정도면 확인이 가능한 매우 신속하고 정확한 방법으로 알려져 있다. 현재 *E. coli* O157:H7의 lipopolysaccharide O-항원 합성 유전자(*rfbE*), intimin(*eaeA*), galactitol 1-phosphate dehydrogenase(*gatD*), β -glucuronidase(*uidA*), H7 flagella(*fliC*), Shiga-like toxin (*stxI*) 및 toxin II(*stxII*)유전자 등을 target으로 하는 여러 PCR법들이 알려져 있다. 그러나 단일 target을 대상으로 하는 singleplex PCR은 위양성이 나올 수 있고 추가적으로 확인을 해야 하는 경우가 있어 *E. coli* O157:H7 내의 여러 target을 동시에 증폭하여 확인하는 multiplex PCR 방법의 시도가 필요하다(Ajmi et al., 2005; Bertrand et al., 2006; Hu et al., 1999).

본 연구에서는 *E. coli* O157:H7에 특이적으로 알려진 여러 PCR 방법들을 검토하여 그 특이성을 확인하고, O157

항원 합성관련 유전자 *rfbE*와 숙주세포의 부착에 필요한 intimin 유전자 *eaeA* 그리고 Shiga-like toxinI과 II의 유전자 *stxI*과 *stxII*를 동시에 확인할 수 있는 multiplex PCR system을 구성하여 신속 검출법으로서의 사용 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

프라이머, 균주 및 DNA 정제

Multiplex PCR로 *E. coli* O157을 검출하기 위한 primer set들에 대한 염기서열은 Table 1에 나타내었다. 실험에 사용된 대부분의 균주들은 한국미생물보전센터 및 생물자원센터에서 분양 받았으며 Table 2에 표시하였다. 각 균주의 염색체 DNA를 분리 및 정제하기 위해 LB 배지 5 mL에 접종하고 37°C에서 호기적으로 8시간 동안 배양하였다. 1 mL의 배양액을 13,670×g 에서 10분간 원심분리 후 상층액은 제거하고 남은 pellet을 Power Prep™ DNA Extraction Kit(Kogenebiotech, Seoul, Korea)를 사용하여 정제하고

Table 1. Primers used in this study

Target gene	Primers	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)	Ref.
<i>rfbE</i>	rfbE-for	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTGTC	296	Bertrand et al., (2006)
	rfbE-rev	TTAGAATTGAGACCATCCAATAAG		
	O157AF	AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG	497	Ajmi et al., (2005)
	O157AR	CATTGGCATCGTGTGGACAG		
	RfbF	GTGTCCATTTATACGGACATCCATG	292	Hu et al., (1999)
	RfbR	CCTATAACGTCATGCCAATATTGCC		
	O157PF8	CGTGATGATGTTGAGTTG	420	Maurer et al., (1999)
	O157PR8	AGATTGGTTGGCATTACTG		
	O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	259	Panton et al., (1998)
	O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC		
<i>uidA</i>	PT-2	GCGAAAACGTGTGGAATTGGG	252	Cebula et al., (1995)
	PT-3	TGATGCTCCATAACTTCCTG		
<i>eaeA</i>	eaeA-F	AAGCGACTGAGGTCAC	450	Yilmaz et al., (2006)
	eaeA-R	ACGCTGCTCACTAGATGT		
	IntF	GACTGTCGATGCATCAGGCAAAG	368	Hu et al., (1999)
	IntR	TTGGAGTATTAACATTAACCCCAGG		
	eaeAF	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	Panton et al., (1998)
eaeAR	CCACCTGCAGCAACAAGAGG			
<i>Q3H1*</i>	RQ3-f	GGTCACCTCATCAACCAAAATC	455	Lin et al., (2007)
	RQ3-r2	TGGTCACCTCAAACCTAACAAA		
<i>fliC</i>	FLIC-a	TACCATCGCAAAAGCAACTCC	247	Wang et al., (2002)
	FLIC-b	GTCGGCAACGTTAGTGATACC		
	FLIC-F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC	625	Gannon et al., (1997)
	FLIC-R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC		
	F	GCGCGAATTCGTTGGTCTGTCAGAACCCAGCACTGGTAGT	179	Morin et al., (2004)
	R	GCGCGAATTCGCGCACTATACAGTCTCTTACAGCGT		
<i>stxI</i>	stx1F934	GTGGCATTAAACTGAATTGTCATCA	109	Yoshitomi et al., (2005)
	stx1R1042	GCGTAATCCCACGGACTCTTC		
<i>stxII</i>	SLT-IIF	GTTTTCTTCGGIATCCTATTCCG	484	Hu et al., (1999)
	SLT-IIR	GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC		

Table 2. Singleplex PCR detection of *E. coli* O157 specific genes in various bacterial strains

Bacteria	Strain	Primers										
		rfbE-for rfbE-rev	O157AF O157AR	RfbF RfbR	O157PF8 O157PR8	O157F O157R	PT-2 PT-3	eaeA-F eaeA-R	IntF IntR	eaeAF eaeAR	RQ3-f RQ3-r2	
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 35150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 43888	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 43889	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 43890	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ATCC 43894	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> O19:H7	ATCC 23514	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
<i>E. coli</i> O78:H12	ATCC 43896	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>E. coli</i> O111:NM	ATCC 43887	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
<i>Listeria grayi</i>	ATCC 2540	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 2518	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29544	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM 41657	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	KCCM 41654	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 2213	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 13565	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus delphin</i>	ATCC 49171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Salmonella enteritidis</i>	KCCM 12021	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	

Table 3. PCR amplification of *E. coli* strains with flagella H7 gene specific primers

Bacteria	strain	F/R	Primer	
			FLIC-F/FLIC-R	FLIC-a/FLIC-b
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 35150	+	+	+
	ATCC 43888	+	+	+
	ATCC 43889	+	+	+
	ATCC 43890	+	+	+
	ATCC 43894	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> O19:H7	ATCC 23514	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> O78:H12	ATCC 43896	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> O111:NM	ATCC 43887	-	-	-

100 μ L의 멸균증류수로 DNA를 용출하여 사용하였다. 추출된 DNA는 spectrophotometer(Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 260 nm에서 정량 하였다.

E. coli O157의 선택배지

E. coli strain들을 LB 고체배지에 도말 후, 37°C에서 18 시간 배양하여 single colony들을 얻었다. 제조사의 방법에 따라서 준비한 CHROMagar O157(CHROMagar™, Paris, France)에 한 개의 colony를 streaking하여 37°C에서 24시간 배양한 뒤 colony의 색깔을 비교하였다.

PCR 조건

Multiplex PCR 반응액은 적정량의 template DNA와 5× Taq buffer(각각 10 mmol/L의 MgCl₂와 dNTP 포함) 5 μ L, *rfbE* gene과 *eaeA*, *stx* 및 *stx* gene에 특이적인 forward 및 reverse primer를 각각 15 pmol, 5 pmol, 25 pmol, 20

pmol 그리고 Taq polymerase 1 unit을 넣은 후 최종 부피가 25 μ L가 되도록 멸균된 3차 증류수를 첨가하였다. Singleplex PCR의 경우 사용한 primer의 농도는 forward 및 reverse 각각 10 pmol 이었으며 그 외의 조건은 multiplex PCR 조건과 동일하였다. 모든 PCR 반응은 PCR Express thermocycler(Hyaid, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 실시 후, 95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 1분을 35 cycle 수행하였으며 마지막으로 72°C에서 3분간 반응시켰다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동 하여 그 크기를 확인하였다.

RNA의 추출 및 reverse transcription PCR

대장균에서 RNA의 추출은 SV Total RNA isolation kit (Promega corporation, Madison, WI, USA)를 사용하여 RNA를 분리정제 하였으며 reverse transcription PCR(RT-PCR)은 One Step RNA kit(AMV)(Takara BIO INC.,

Otsu, Shiga, Japan)를 이용하였다. RT-PCR 반응액의 조성은 10× One Step RNA PCR Buffer 5 uL, 25 mM MgCl₂ 10 uL, 10 mM dNTP 5 uL, RNase inhibitor(40 units/uL) 1 uL, AMV RTase XL(5 units/uL) 1 uL, AMV-Optimized Taq (5 units/uL) 1 uL, forward 및 reverse primer를 각각 20uM을 첨가하고 최종부피를 50 uL로 하였다. 반응 조건은 50°C에서 30분간 역전사반응을 진행하고 94°C에서 2분간 반응시켜 reverse transcriptase를 불활성화시킨 뒤 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분 30초 반응을 25 cycle 수행하여 합성된 cDNA를 증폭시켰다.

Multiplex PCR의 검출한계 측정 및 식품에서 적용

Multiplex PCR의 검출한계를 조사하기 위해 상추 25 g에 5.5×10⁸ CFU의 *E. coli* O157:H7(ATCC 35150)을 인위적으로 접종한 후, Difco™ EC medium, Modified(BD) 225 mL에 넣고 pulsifier(Microgen Bioproducts, UK)를 이용하여 1분간 진탕하였다. 추가 배양하지 않고 회수한 1 mL의 추출액에서 DNA를 정제하여 100 uL의 멸균증류수로 용출하고 이를 최종농도가 1 uL당 2.2×10⁴ CFU에서 2.2×10⁰ CFU까지 단계적으로 10배씩 희석한 다음 각각 1 uL의 DNA를 검출한계조사에 사용하였다. 동시에 추출액을 단계별로 희석하여 LB 고체배지에 도말한 다음 37°C에서 배양하여 생균수를 측정하였다.

시중에서 판매되고 있는 햄버거 패티와 같은 소고기에서 *E. coli* O157:H7의 오염을 조사하기 위하여 여러 시료를 각각 25 g 칭량하여 novobiocin (20 ug/mL)을 첨가한 Difco™ EC medium 225 mL에 넣고 pulsifier를 이용하여 1분간 진탕 후 37°C에서 20시간 배양하였다. 배양액을 1 mL씩 취하여 DNA 추출 키트의 사용법에 따라 각각의 DNA를 추출하였다.

결과 및 고찰

E. coli O157:H7 특이적 primer의 선정

E. coli O157:H7을 선택적으로 확인할 수 있는 것으로 알려진 PCR 결과들에서 우선 10 종의 primer set를 선정하여 각 primer set들의 *E. coli* O157:H7 균주들에 대한 특이성을 비교하였다. 사용한 10 종의 primer set는 각각 O157 항원 생합성 유전자인 *rfbE*를 검출하는 primer sets 5종 (*rfbE*-for/*rfbE*-rev, O157AF/O157AR, *RfbF*/*RfbR*, O157PF8/O157PR8, O157F/O157R), β-glucuronidase 유전자인 *uidA*를 검출하는 primer set (PT-2/PT-3), 병원성에 필요한 adherence factor인 intimin 유전자를 검출하는 primer sets 3종 (*eaeA*-F/*eaeA*-R, *IntF*/*IntR* 및 *eaeAF*/*eaeAR*)과 randomly amplified polymorphic DNA 단편을 검출하는 primer set (RQ3-f/RQ3-r2)이다. 각각의 primer sets의 염기 서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 2에서 보는 바와 같이 테스트한 10 종의 primer sets 모두 *E. coli* O157:H7 균주들을 검출할 수 있었으나 혈청형이 다른 *E. coli* O78:H12도 모두 양성반응을 보였다. 또한 O111:NM과 O19:H7 균주도 각각 8종과 1종의 primer set에 의해 양성반응을 나타냈다. 그러나 예상외로 *rfbE* 유전자를 검출하는 *rfbE*-for/*rfbE*-rev와 intimin 유전자를 검출하는 *IntF*/*IntR* primer set를 제외한 나머지 8종의 primer set들이 부분적으로 *E. coli* 이외의 다른 식중독균들에 대해서도 양성반응을 나타내 이 primer set들은 multiplex PCR을 위한 primer set 구성에서 배제하였다.

Singleplex PCR을 통해 non-*E. coli* 균주에서 증폭 반응을 일으키지 않은 primer sets는 *rfbE*-for/*rfbE*-rev와 *IntF*/*IntR*뿐이지만 O78:H12 균주를 구분하지 못하였으므로 H7 flagella gene인 *fliC*에 특이적으로 알려진 3종의 F/R, FLIC-F/FLIC-R, FLIC-a/FLIC-b primer set들을 이용하여 PCR을 수행하였다(Table 3). 이 primer set들은 H7 flagella gene을 가진 O157:H7과 O19:H7을 모두 인식하였으나 혈청형이 다른 O78:H12도 모두 인식하였고 O111:NM에 대해서는 모두 음성반응을 나타냈다. 따라서 단일 target만을 증폭시키는 singleplex PCR은 *E. coli* O157:H7을 선택적으로 구분하기에는 충분하지 않은 것으로 보인다.

Multiplex PCR 분석

Singleplex PCR의 한계를 극복하기 위해 여러 target을 동시에 증폭시키는 multiplex PCR이 *E. coli* O157을 구분하기 위하여 일부 알려져 있으나(Hu et al., 1999; Panton et al., 1998; Jung et al., 1998), 각 primer set들의 특이성을 확인해 본 결과, *E. coli* 이외의 다른 식중독 균들이 양성반응을 나타내는 문제점들을 발견하였다(Table 2). 한편 *E. coli* O157:H7은 식중독 증상의 주요 원인이 되는 Shiga-like toxin을 균에 따라 하나 또는 두 가지 toxin 모두를 생산하는 것으로 알려져 있다(Mead et al., 1998). 따라서 *E. coli* O157:H7을 구분할 수 있는 multiplex PCR 방법을 구성하기 위해 non-*E. coli* 균주들에 음성 반응을 나타낸 *rfbE*-for/*rfbE*-rev와 *IntF*/*IntR* primer sets와 이들의 PCR 산물 크기를 고려하여 *stxI*과 *stxII* 유전자 단편을 target으로 하는 *stxI*F934/*stxI*R1042과 SLT-III/SLT-IIIR를 최종 선정하였다. Multiplex PCR을 위한 최적 조건을 설정하기 위해서 *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150) 균주를 사용해 4 종의 primer set 농도를 조절하였고, 55°C에서 65°C 범위의 온도에서 gradient PCR을 수행한 결과 58°C가 가장 적합한 annealing 온도로 나타났다(data not shown).

최적화된 조건으로 *E. coli* O157:H7 및 다른 혈청형의 *E. coli* 균주들에 대해 multiplex PCR을 수행하여 *rfbE*, *eaeA*, *stxI* 및 *stxII* 유전자들의 보유여부를 확인하였다(Table 4). 5 종의 *E. coli* O157:H7 표준 균주들은 모두 *rfbE*와 *eaeA* 유전자에 특이적인 DNA 단편을 확인할 수 있었으나

Table 4. Multiplex PCR analysis of *E. coli* and other bacterial species and the color of *E. coli* colonies on CHROMagar O157 agar medium

Bacteria	strain	Target genes				Colony color on CHROMagarO157
		rfbE	eaeA	stx1	stx2	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 35150	+	+	+	+	Mauve
	ATCC 43888	+	+	-	-	Mauve
	ATCC 43889	+	+	-	+	Mauve
	ATCC 43890	+	+	+	-	Mauve
	ATCC 43894	+	+	+	+	Mauve
<i>Escherichia coli</i> O19:H7	ATCC 23514	-	-	-	-	Mauve
<i>Escherichia coli</i> O78:H12	ATCC 43896	+	+	+	+	Mauve
<i>Escherichia coli</i> O111:NM	ATCC 43887	-	-	-	-	Blue
<i>Listeria grayi</i>	ATCC 2540	-	-	-	-	nt
<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 29544	-	-	-	-	nt
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCCM 41654	-	-	-	-	nt
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	-	-	-	-	nt
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 2213	-	-	-	-	nt
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 13565	-	-	-	-	nt
<i>Staphylococcus delphin</i>	ATCC 49171	-	-	-	-	nt
<i>Salmonella enteritidis</i>	KCCM 12021	-	-	-	-	nt
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 2518	-	-	-	-	nt
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KCCM 41657	-	-	-	-	nt

*nt: not tested

Shiga-like toxin I과 II 유전자의 보유는 균주에 따라 차이를 보였다(Table 4 and Fig. 1). *E. coli* O157:H7 ATCC 35150과 ATCC 43894는 두 toxin 유전자, ATCC 43889와 ATCC 43890은 각각 한 종류의 toxin 유전자에 양성 반응을 나타냈으나 ATCC 43888은 두 toxin 유전자 모두에 대해 음성반응을 나타냈다. 다른 혈청형의 *E. coli* O19:H7과 O111:NM은 두 toxin 유전자에 대해 모두 음성반응을 나타냈으나 O78:H12의 경우 두 toxin 유전자에 대해 모두 양성반응을 나타냈다. *E. coli* O78:H12(ATCC 43896) 균주는 enterotoxigenic group에 속하며 Shiga-like toxin I과 II를 모두 생산하지 않는다고 알려져 있으나(Lang et al., 1994), 본 실험에서는 multiplex PCR을 이용한 *stxI*과 *stxII* 유전자 검출반응에서 양성반응을 나타냈다. 한편 테스트한

non-*E. coli* 균주들에서는 두 toxin 유전자에 대해 모두 음성반응을 나타냈다.

RT-PCR을 이용한 *stxI*과 *stxII* 유전자의 발현 분석

E. coli O157:H7 균주와 혈청형이 서로 다른 *E. coli* O78:H12(ATCC 43896) 균주의 multiplex PCR 결과가 동일하게 나와 실제 *stxI*과 *stxII* 유전자들의 발현여부를 mRNA 수준에서 확인하기 위해 두 균주에 대한 RT-PCR을 시도하였다(Fig. 2). RT-PCR의 경우 추출한 total RNA에 미량의 DNA가 분리되지 않고 남아있을 경우 위양성 반응을 나타낼 수 있으므로 음성 대조군으로 역전사 과정을 거치지 않고 PCR을 수행하여 정제한 RNA에 DNA가 섞여있지 않았음을 확인하였다. *E. coli* O78:H12(ATCC 43896)의

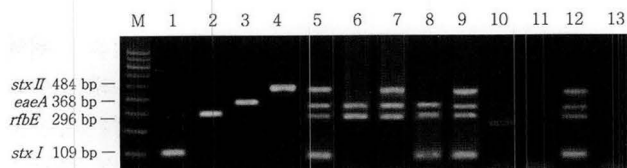


Fig. 1. Electrophoresis of PCR fragments from multiplex PCR of *E. coli* reference strains. Singleplex PCR product using each of four primer sets chosen was used as a positive control(lanes 1 to 4). Lane M, 100-bp ladder; lanes 5 to 9, *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, ATCC 43888, ATCC 43889, ATCC 43890, ATCC 43894, respectively; lane 10, *E. coli* O19:H7 ATCC 23514; lane 11, *E. coli* O111:NM ATCC 43887; lane 12, *E. coli* O78:H12 ATCC 43896; lane 13, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565.

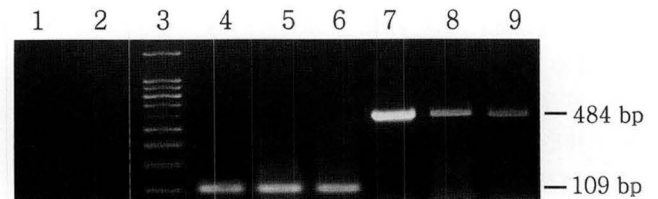


Fig. 2. Detection of *stxI* and *stxII* mRNA in *E. coli* strains by reverse transcription PCR. The total RNA was extracted, DNase treated, and amplified by singleplex PCR(lanes 1 to 2) or RT-PCR(lanes 3, 5, 6, 8, and 9). PCR fragments of lanes 4 and 7 were amplified from the template DNA of *E. coli* O157:H7(ATCC 35150) as positive controls for *stxI*(109 bp) and *stxII*(484 bp), respectively. Lanes 1, 5, and 8, *E. coli* O157:H7(ATCC 35150); lane 2, 6, and 9, *E. coli* O78:H12(ATCC 43896).

경우, 양성 대조군과 마찬가지로 *stxI*과 *II* 유전자가 모두 증폭됨으로써(Fig. 2- lane 6 and 9), 이 균주는 mRNA 수준에서도 역시 두 toxin 유전자가 모두 발현되는 것으로 보인다.

E. coli O157:H7 선택배지를 이용한 분석

Multiplex PCR 결과로도 *E. coli* O157:H7와 혈청형이 다른 *E. coli* O78:H12를 구분할 수 없어서 *E. coli* O157:H7의 선택배지로 알려진 CHROMagar O157을 이용하여 각 *E. coli* 균주들의 colony 색을 확인하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 O157:H7 균주들은 모두 O157의 특이적 표현형인 담자색을 나타냈으나 청색을 띤 O111:NM을 제외한 나머지 O19:H7과 O78:H12 균주들 역시 모두 담자색을 나타냈다. 일반적으로 *E. coli* O157의 스크리닝을 목적으로 사용하는 선택배지를 사용하였으나 역시 본 실험에서 사용한 혈청형이 다른 *E. coli*들의 구분에는 한계가 있었다.

Multiplex PCR의 검출한계 및 활용

식품에서 multiplex PCR 방법의 검출한계를 조사하기 위하여 상추 25 g에 5.5×10^8 CFU의 *E. coli* O157:H7을 인위적으로 접종하고 5분간 방치 후 배지 225 mL을 넣어 pulsifier로 1분간 진탕하였다. 추가배양 없이 1 mL의 추출액을 회수하여 DNA를 정제하고 단계적으로 희석한 DNA를 template DNA로 사용하였다. Multiplex PCR을 수행한 결과, 4종의 primer sets에 대해 모두 2.2×10^1 CFU/reaction까지 검출이 가능하였다(Fig. 3). 이 결과는 증균 과정을 거치지 않아도 검체 1 g에서 2.2×10^4 CFU 이상의 균이 존재하면 본 연구에서 구성한 multiplex PCR로 충분히 검출이 가능하다는 것을 나타낸다. 이 검출한계는 소고기를 대상으로 연구한 multiplex PCR에서 *E. coli* O157:H7의 검출한계가 10^4 CFU/g으로 나타난 것과 유사한 수준이다(Jung et al., 1998).

Multiplex PCR 방법을 직접 식품중의 *E. coli* O157:H7 검출에 적용하기 위하여 국내 햄버거 체인점에서 사용하는

소고기 패티 2종과 대형마트 판매용 1종, 그리고 식육점에서 판매하는 같은 소고기 2종(호주산과 뉴질랜드산)을 구입하여 각 시료를 증균 배지에서 20시간 배양 후 multiplex PCR을 수행하였다. 검사한 5종의 시료는 4종의 primer set 모두에 대해 음성반응을 나타냈으며 *E. coli* O157:H7의 선택배지인 CHROMagar O157에서도 모두 음성으로 나타났다(data not shown). 이상의 결과에서 본 실험에서 구성한 multiplex PCR 방법은 *E. coli* O157:H7이나 Shiga-like toxin을 생성하는 병원성 *E. coli*의 검출에 활용이 가능할 것으로 보이며 향후 multiplex PCR 방법의 신뢰도를 위해 현재 식중독균 검출의 표준 방법으로 이용되고 있는 배양법과의 비교 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

식중독 균인 *E. coli* O157:H7을 검출하고 Shiga-like toxin의 생성 여부를 확인할 수 있는 multiplex PCR system을 구성하였다. *E. coli* O157:H7의 특이적인 유전자를 검출할 수 있는 15종의 primer sets로 5종의 *E. coli* O157:H7, 혈청형이 다른 3종의 *E. coli* 그리고 10종의 non-*E. coli* 균주들에 대한 single PCR을 수행하였다. 그 중에서 *rfbE*, *eaeA*, *stxI* 및 *stxII* 유전자를 target으로 하는 4 set의 primer를 선정하여 multiplex PCR 방법을 구성하였다. *E. coli* O157:H7 5종 모두 *rfbE*와 *eaeA* 유전자가 동시에 증폭이 되었으나 Shiga-like toxin 유전자인 *stxI*과 *stxII*의 증폭은 균에 따라 차이를 보였다. multiplex PCR 방법은 상추에 인위적으로 접종 후, 증균하지 않은 *E. coli* O157:H7을 2.2×10^1 CFU/reaction까지 검출할 수 있었다. 본 연구에서 구성한 multiplex PCR 방법은 식품에서 *E. coli* O157:H7 및 Shiga-like toxin을 생성하는 병원성 *E. coli*의 존재를 확인하는데 활용이 가능할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 서울시 산학연 협력사업의 연구비 지원(10636)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Ajmi DA, Padmanabha J, Denman SE, Gilbert RA, Al Jassim RA and McSweeney CS. 2005. Evaluation of a PCR detection method for *Escherichia coli* O157:H7/H- bovine faecal samples. *Appl. Microbiol.* **42(4)**: 386-391

Beuchat LR. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect.* **4(4)**: 413-423

Bertrand, R. and Roig, B. (2006) Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157-Application to municipal waste water. *Water res.* **41(6)**:

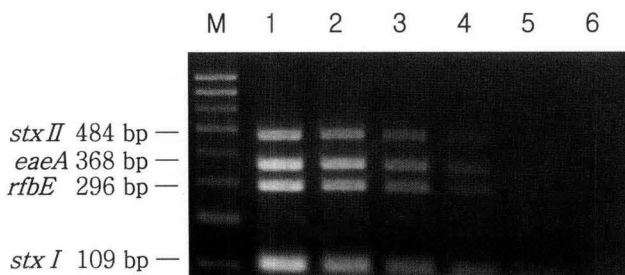


Fig. 3. Detection limits of multiplex PCR assay in artificially inoculated lettuce without enrichment. Ten-fold dilutions of *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 cells were utilized as templates. Lane M, 100-bp ladder; lanes 1 to 5, 2.2×10^4 , 2.2×10^3 , 2.2×10^2 , 2.2×10^1 , 2.2×10^0 CFU/reaction, respectively; lane 6, no template control.

- 1280-1286
- Cebula TA, Payne WL and Feng P. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33(1)**: 248-250
- Deisingh AK and Thompson M. 2004. Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *J Appl Microbiol.* **96(3)**: 419-429
- Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K and Read S. 1997. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* **35(3)**: 656-662
- Ho ST. 1998. Bacteriology of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Med Post.* **26(1)**: 5-14
- Hu Y, Zhang Q and Meitzler JC. 1999. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol.* **87(6)**: 867-876
- Jung SC, Jung BY and Yoon JW. 1998. Development of a multiplex-PCR for the rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 from raw beef. *Korean J. Vet. Res.* **38(1)**: 173-181
- Lang AL, Tsai YL, Mayer CL and Patton KC. 1994. Multiplex PCR for detection of the heat-labile toxin gene and Shiga-like toxin I and II genes in *Escherichia coli* isolate from natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **60(9)**: 3145-3149
- Lin CK and Lin JC. 2007. Development of PCR primers based on a fragment from randomly amplified polymorphic DNA for the detection of *Escherichia coli* O157:H7/NM. *Mol. Cell Probes.* **21(3)**: 182-189
- Maurer JJ, Schmidt D, Petrosko P, Sanchez S, Bolton L and Lee MD. 1999. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *E. coli* O157 by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(7)**: 2954-2960
- Mead PS and Griffin PM. 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet.* **352**: 1207-1212
- Morin NJ, Gong Z and Li XF. 2004. Reverse transcription-multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* OI, and *Salmonella typhi*. *Clin. Chem.* **50(11)**: 2037-2044
- Padola NL, Sanz ME, Balanco JE, Blanco M, Blanco J, Etcheverria AI, Arroyo GH, Usera MA and Parma A. 2004. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet. Microbiol.* **100(1-2)**: 3-9
- Paik IK and Han TH. 2002. Comparison of detection of *Escherichia coli* O157 between culture after acid treatment and polymerase chain reaction after enrichment. *Korean J. Lab. Med.* **22(5)**: 331-335.
- Panton AW and Panton JC. 1998. Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using Multiplex PCR assays for *stx*, *stx*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb_{O157}*, and *rfb_{O157}*. *J. Clin. Microbiol.* **36(2)**: 598-602
- Wang G, Clark CG and Rodgers FG. 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40(10)**: 3613-3619
- Yilmaz A, Gun H, Ugur M, Turan N and Yilmaz H. 2006. Detection and frequency of VT1, VT2 and *eaeA* genes in *Escherichia coli* O157 and O157:H7 strains isolated from cattle, cattle carcasses and abattoir environment in Istanbul. *Int. J. Food Microbiol.* **106(2)**: 213-217
- Yoshitomi KJ, Jinneman DC and Weagant SD. 2005. Detection of Shiga toxin genes *stx1*, *stx2*, and the +93 *uidA* mutation of *E. coli* O157:H7/H-using SYBR Green I in a real-time multiplex PCR. *Mol. Cell. Probes.* **20(1)**: 31-41

(접수 2007년 11월 22일, 채택 2007년 12월 28일)