

PCR을 이용한 돼지분변에서의 장독소 산생 대장균 검출에 관한 연구

축산물위생검사소

이강록 · 이동수

Detection of Enterotoxigenic *Escherichia Coli*(ETEC) by Polymerase Chain Reaction(PCR)

Veterinary Service Laboratory

Gang-Rok Lee · Dong-Su Lee

Abstrat

This study was carry out to investigated the enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs by PCR.

PCR assay using specific primers was established and differentiates enterotoxin producing *E. coli* from non-enterotoxigenic *E. coli*.

Using developed PCR assay, 18 enterotoxigenic *E. coli* strains among 125 isolates from pigs were able to be detected.

서 론

대장균은 사람과 포유류의 장내에 존재하는 정상 세균총으로서 비병원성세균으로 알려져있으나 일부는 병원성을 나타내는 것으로 알려져있으며 이들을 병원성대장균이라한다. 병원성대장균은 발병기전에 따라 장독소를 산생하여 병원성을 나타내는 Enterotoxigenic *E. coli*(ETEC), EAF (EPEC Adherence Factor)라는 부착인자에 의해 정상상피세포에 부착하여 villi를 없애는 것이 특징인 Enteropathogenic *E. coli*(EPEC), 정상상피세포내로 침습하여 증식하는 Enteroinvasive *E. coli*(EIEC), Shiga like toxin을 산생하여 병원성을 나타내는 Shiga Toxin Producing *E. coli*(SPEC)등으로 분류되어지고 있다.¹⁾

병원성대장균중 특히 ETEC는 어린돼지에 감염되어 심한 수양성 설사나 부종병을 유발함으로써 양축농가에 막대한 경제적 손실을 초래하고 있다.

ETEC가 생산하는 장독소에는 열에대하여 안정성을 나타내는 내열성장독소(heat-stable enterotoxin,ST)와 열에의하여 파괴되는 이열성장독소(heat-lable enterotoxin, LT)로 구분된다.¹⁾

ETEC가 산생하는 장독소검출방법으로는 생물학적 기법^{2,3,4,5)}, 면역학적 기법^{6,7)}, 분자생물학적기법^{8,9)}으로 나눌수 있으며, 이들 중 생물학적기법이나 면역학적기법은 많은 시간의 소요나 검사기법이 번거로와 현재는 DNA prob를 이용한 Polymerase Chain

Reaction(PCR)방법이 많이 이용되고 있다.

본 실험에서는 PCR을 이용한 enterotoxin 검출 방법을 확립하고 직접진단에 이용하고자 부산지역 농장에서 분리한 대장균에 대하여 직접 실시하였다.

재료 및 방법

공사균주

본 실험에 사용한 균주는1994년 1월부터 10월까지 부산시내 23개 양돈장으로부터 분리한 대장균 125주를 대상으로 실시하였다.

균분리동정은 멸균면봉을 이용하여 배설 직후의 신선한 분변을 채취하여 균 분리를 시도하였으며 동정은 IMViC test등 생화학 적 검사를 실시하여 동정하였다.

plasmid DNA 분리

plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis 방법¹⁰⁾에 준하였다. 먼저 LB broth 5mL 에 균을 접종하여 24시간 배양한 다음 원심집균후 TE buffer(10mM Tris-Cl, pH8.0, 1mM EDTA, pH8.0) 1mL로 재부유시켜 세척하여 다시 원심집균하였다. lysozyme (1mg/mL)이 들어있는 Solution I(50mM Glucose, 25mM Tris-Cl, 10mM EDTA) 100 μ L를 넣어 완전 진탕 부유시킨후 얼음에 30분간 두었다. solution II(1% SDS, 0.2N NaOH) 200 μ L를 넣고 얼음에 5분간 정치한 후 3M Sodium acetate 150 μ L를 넣어 얼음에 60분간 유지시켰다. 15,000g 로 4 $^{\circ}$ C

10분간 원심후 상층액을 다른 Tube에 옮기고 absolute alcohol 1mL를 넣어 -70℃에 한시간 정치시킨후 원심한 다음 70% ethanol로 2회세척후 원심하여 진공건조시켰다. 건조된 DNA pellet을 TE buffer 50μL로 부유시킨 다음 -20℃에 보관하면서 template DNA로 사용하였다.

Primer 제작

시험에 사용한 Primer는 BioNEER사에 의뢰 제작하였으며 염기서열은 Table 1과 같다.

PCR 반응조건

작성된 primer를 이용하여 thermal cyclor (Biometra Co)로 DNA 증폭을 시도하였다. PCR 반응액은 최종량이 50μL가 되도록 하였으며 10X PCR buffer(Sigma) 5μL, template DNA 2μL, dNTP 1.5μL Primer 각 1μL Taq DNA polymerase 1μL를 넣어 DNA를 증폭하였다.

PCR의 반응시간과 온도는 최초 94℃ 5분간 denaturation 후, 94℃ 1분간 denaturation, 55℃ 1분간 annealing, 72℃ 1분간 extension과정을 35cycle 반복 실시하였으며,

마지막 extension은 72℃ 5분간 실시하였다.

결과 및 고찰

장독소산생 대장균은 포유중인 어린 자돈에 막대한 피해를 입히는 원인균으로 알려져있으며 이들의 진단을 위해서는 여러 가지 방법들이 사용되고 있지만 많은 비용이나 시간의 소요뿐만 아니라 판정에도 애매한 부분이 없지않다. 이러한 문제점을 극복하기위하여 DNA probe를 이용한 PCR이 많이 사용되고 있다.

PCR은 반응온도등의 조건에 따라 많은 영향을 받는 것으로 알려져있다¹²⁾.

돼지 유래 대장균으로부터 장독소산생 대장균의 검출을 위한 PCR의 조건 확립을 위하여 여러단계의 annealing 온도의 변화와 MgCl₂의 농도변화시킨 결과 온도는 72℃에서 농도는 4mM에서 최적의 증폭된 DNA산물을 얻을수 있었다.

최적의 조건으로 PCR을 수행한 결과 LT를 생산하는 대장균에서는 417bp, ST를 생산하는 대장균에서는 160bp의 증폭산물을 얻을수 있었으며 장독소를 생산하지 않

Table 1. Nucleotide sequence of primer for amplification of LT, ST gene

Primer	Nucleotide sequence	size(bp)	reference
LT	F: 5'-CAGACTATCAGTCAGAGGTTG-3'	417	11
	R: 5'-TTCATACTGATTGCCGCA-3'		
ST	F: 5'-TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG-3'	160	12
	R: 5'-GGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG-3'		

는 대장균에서는 어떠한 증폭산물도 생성되지 않아 PCR이 특이성 및 민감성이 우수하다고 판단된다.



Fig1. Electrophoretic analysis of amplified *E. coli* LT and ST genes by PCR
lane M: marker lane 1: LT(417bp),
lane 2: ST(160bp)

이 PCR기법을 이용하여 설사 자돈의 대장균증을 검사한다면 빠른시간내에 간편하게 ETEC를 검출할수 있어 농가피해를 최대한 줄일수 있으리라 사료된다.

관내 농장에서 분리한 대장균 125주중 18주(14.4%)에서 1개이상의 장독소를 산생하는 병원성 대장균으로 확인되었으며 이는 김등¹³⁾의 49.9%, 함등¹⁴⁾의 48.4%보다는 낮았으나 박등¹⁵⁾의 16.6%와는 유사한 결과로 자돈의 설사 유무와 균주수에 따라 차이가 있을수 있으리라 사료된다.

향후 돼지 분변으로부터 직접 병원성 대장균 검출방법이나 multiplex PCR을 이용

하여 한번에 LT와 ST를 쉽게 검출할수 있는 방법을 개발하여 병원성대장균검사를 실시한다면 24시간내 대장균증 진단이 가능하리라 사료된다.

결 론

1. 돼지분변으로부터 분리한 대장균에 대하여 ETEC 검출을 위하여 PCR을 수행한 결과 annealing 온도 72℃, MgCl₂ 4mM 농도에서 최적의 증폭산물을 얻을수 있었다.
2. 확립된 조건으로 PCR을 수행한 결과 LT 417bp, ST 160bp의 특이 증폭산물을 얻을수 있었다.
3. 부산지역 농장으로부터 분리한 대장균 125주에 대하여 독소산생유무를 검사한 결과 18주(14.4%)에서 독소산생이 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Nataro JP and Kaper JB : Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11, 142-201, 1998
2. Evans DG, Evans DG JR and Pierce NF : Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun 7, 873-880, 1973
3. Donta ST, Moon HW and Whip SC :

- Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science* 183, 334-335, 1974
4. Honda T, Shimizu M, Takeda Y and Miwatani T : Isolation of factor using morphological changes of Chinese hamster ovary cells from the culture filtrate of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun* 14, 1028-1033, 1976
 5. Dean AG, Ching Y, William RG and Harden LB : Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J Infec Dis* 125, 407-411, 1972
 6. Greenberg HB, Sack DA, Rodriguez W, Sack RB, Wyatt RG, Kalica AR, Horswood RL Chanock RM and Kapikian AZ : Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect Immun* 17, 541-545, 1977
 7. Finkelstein RA and yang Z : Rapid test for identification of heat-labile enterotoxin producing *Escherichia coli* colonys. *J Clin. Microbiol* 18, 23-28, 1994
 8. Wernars K, Delfgou E, Soentoro PS and Notermans S : Successful approach for detection of low numbers of enterotoxigenic *Escherichia coli* in Minced Meat by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 57, 1914-1919, 1991
 9. Shacoori ZT, Gougeon AJ, Pornmepuy M, Cormier M and Colwell RR : Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in water by PCR amplification and hybridization. *Can J Microbiol* 40, 243-249, 1994
 10. Bimboim HC and Doly J : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1515, 1979
 11. 이상운, 정석찬, 박용호, 우희종 : PCR에 의한 대장균의 이열성 장독소 유전자 검출, *대한미생물학회지* 31, 145-154, 1996
 12. Pass MA, Odedra R and Batt RM : Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microbiol* 38, 2001-2004, 2000
 13. 김영환, 장지택, 장영술, 오강희, 박영구 : 환축에서 분리한 대장균의 항균제감수성 및 독소산생능. *한국가축위생학회지* 21, 149-156, 1998
 14. 함희진, 신나리, 박용호, 유한상 : 설사자돈으로부터 분리한 *Escherichia coli*의 특성에 관한 연구; 항균제 감수성, 장독소 및 섬모의 유전형의 분포 및 plasmid profiles. *대한수의학회지* 40, 301-310, 2000
 15. 함희진, 천두성, 채찬희 : 포유자돈 소장에서 분리된 대장균의 섬모항원과 장내독소 분포양상. *대한수의학회지* 37, 779-784, 1997