

RT-PCR을 이용한 환경수 중 지아디아 람블리아 동정

Identification of *Giardia lamblia* in Environmental water samples Using Reverse Transcription - PCR

조은주*, 이목영, 변승현, 안승구**

Cho, Eun-Ju · Lee, Mok-Young · Byun, Seung-Heun · Ahn, Seung-Koo*

1. 서 론

지아디아는 사람 및 동물에게 설사를 일으키는 병원성 원생동물로써 환경 중에 포낭 형태로 존재하고 있어 차가운 물 속에서 수 개월간 생존할 수 있고, 정수처리시 소독제로 사용되는 염소에 내성을 가지고 있다. 또한 최소감염량이 10 포낭 미만으로 매우 낮아 먹는물에 처리되지 못한 지아디아 포낭이 소량 존재하여도 충분히 감염을 일으킬 수 있으며 상수 공급계통을 매개로 할 경우 대규모로 집단 질병이 발생할 수 있다¹⁾. 따라서 지아디아 처리의 중요성이 부각되면서 우리나라에서도 2004년 7월부터 지아디아에 대한 정수처리기준을 적용하여 탁도와 C*T(소독제 농도×접촉시간)값 관리를 통해 99.9%를 제거하도록 정하고 있다. 상수원수 및 처리수 중의 지아디아를 검출하기 위해 가장 많이 사용되는 방법인 미국 EPA의 1623방법 (USEPA METHOD 1623)이나 국내의 원생동물 표준분석방법은 사람 감염성 중인 *Giardia lamblia* 만을 구분하여 검출할 수 없으며, 생존 여부를 알 수 없고, 관찰 슬라이드 내에 지아디아 포낭 외에 방해물질이 많이 포함되어 있을 경우 발견되지 않을 수 있다는 한계점을 가지고 있다²⁾. 따라서 본 연구는 지아디아 포낭이 저농도로 존재하는 환경수 시료에 PCR 기법을 적용하여 사람에만 감염시키는 *G. lamblia*에 대한 동정을 보다 객관적으로 수행하며, 또한 살아있는 세포에서만 발견되고 반감기가 몇 분 이내로 짧은 mRNA³⁾를 추출하여 RT-PCR을 수행함으로써 살아있는 지아디아 람블리아를 검출하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 지아디아 포낭 및 시료의 준비

포르말린 처리되지 않은 살아있는 상태의 *Giardia lamblia* cysts(H3 isolate, Waterborne INC.)를 구매하여 단계별로 희석하여 정제일로부터 6주 이내의 것을 본 연구에 사용하였다.

지표수 시료를 채취하여 USEPA 1623방법에 따라 여과·농축하고, 면역자기분리과정(IMS)을 거친 정제액을 PCR 및 RT-PCR 시험용 시료로 사용하였다. 방법을 요약하면, 지표수 시료를 채취하여 캡슐필터로 여과하고, 캡슐필터용 추출용액을 사용하여 진탕·추출한 후 원심분리하여 재농축하였다. 이 농축액에 대해 면역자기분리(Immunomagnetic separation ; IMS)과정을 수행하여 다른 방해물질로부터 지아디아를 분리하고, IMS 정제액의 일부는 슬라이드 글라스에 적용하여 형광염색을 거친 후 현미경 관찰을 행하였고(Immunofluorescence assay, 이하 IFA), 일부는 PCR 및 RT-PCR을 수행하기 위한 시료로 사용하였다.

2.2 DNA 추출 및 PCR 증폭

IMS 정제액 또는 살아있는 지아디아 포낭 부유액을 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 최종 10 μ L로 농축하였다. 농축액 10 μ L에 Chelex 수지(InstaGene Matrix, BIO-RAD) 50 μ L를 첨가하여 56°C에서 30분간 배양하고, 액체질소 내에서 동결하고 95°C 열판 위에서 가열하는 과정을 각 2분씩 5회 수행한 후 12,000 rpm에서 3분 원심분리하고, 그의 상등액을 PCR 증폭에 사용하였다.

* 서울특별시 상수도연구소, 02-2049-1088 (E-mail : ejsea@seoul.go.kr)

** 서울시립대학교 환경공학부, 02-2210-2432 (E-mail : asknp@uos.ac.kr)

DNA 증폭에는 지아디아의 복부 흡반을 구성하는 유전자를 증폭하는 프라이머(giardin primer)⁴⁾를 사용하였으며 nested PCR기법을 사용하여 2단계로 PCR 증폭하였다. 1차 PCR 증폭은 시판되는 PCR premix(One Shot LA PCR mix, Takara) 25 μ L, DNA 추출물 23 μ L, forward primer 및 reverse primer(Table 1) 각 1 μ L씩을 가한 것을 PCR증폭 반응액으로 사용하였다. PCR 증폭시마다 DNA 추출물 대신 멸균정제수 23 μ L를 첨가한 반응액을 같이 증폭하여 carryover contamination 발생여부를 관찰하였다. PCR 증폭조건은 Table 2와 같다. 첫 번째 PCR 증폭에 사용된 PCR premix 25 μ L에 1차 PCR 증폭산물 2 μ L, 멸균 정제수 21 μ L, forward primer 및 reverse primer (Table 1) 각 1 μ L를 첨가하여 2차 PCR 증폭하였다. 증폭조건은 1차 PCR 조건과 같았다.

Table 1. Primers for the detection of *G. lamblia* by PCR/RT-PCR

		Primers		Product size (bp)
Name		Sequence		
1st	Forward ; GGP 405-433	5'CATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAA3'		218
	Reverse ; GGR 592-622	5'TTTGTGAGCGCTTCTGTCTGGCAGC GCTAA3'		
2nd	Forward ; GGP 510-537	5'AGCTCAACGAGAAGGTCGCAGAGGGCTT3'		112
	Reverse ; GGR 592-622	5'TTTGTGAGCGCTTCTGTCTGGCAGC GCTAA3'		

Table 2. Conditions of PCR amplification

Amplification step	1st PCR Amplification	2nd PCR Amplification
Conditions	- 94 $^{\circ}$ C, 3 min (initial denaturation) - 94 $^{\circ}$ C 1 min (denaturation), 55 $^{\circ}$ C 1 min (annealing), 72 $^{\circ}$ C 1 min (extension) ⇒ 30 cycles - 72 $^{\circ}$ C 10 min (final extension)	- 94 $^{\circ}$ C, 3 min (initial denaturation) - 94 $^{\circ}$ C 1 min (denaturation), 55 $^{\circ}$ C 1 min (annealing), 72 $^{\circ}$ C 1 min (extension) ⇒ 30 cycles - 72 $^{\circ}$ C 10 min (final extension)

2.3 RNA 추출 및 RT-PCR(Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) 과정

RNA 추출 과정에서의 모든 시약 및 초자는 *RNase*-free material로 구매하거나 DEPC(Diethyl pyrocarbonate)로 처리하여 사용하였다. IMS 정제액 또는 살아있는 지아디아 포낭 부유액을 12,000rpm에서 3분간 원심분리하여 최종 10 μ L로 농축하였다. 농축액 10 μ L에 대해 동결 및 가열(액체질소와 65 $^{\circ}$ C 열판에서 각 1분씩, 5사이클) 과정을 수행하여 깨진 포낭으로부터 방출된 RNA를 RNA 추출키트(NucleoSpin RNA II, Macherey-Nagel)로 추출·정제하여 RNA 추출물 50 μ L를 얻었다.

RNA PCR kit(One Step RNA PCR kit, Takara)을 사용하여 RT와 PCR과정을 동시에 수행하였으며 RNA 추출물 25 μ L, 25mM MgCl₂ 10 μ L, 10X RNA PCR buffer 5 μ L, 10mM dNTP, RNase inhibitor(40units/ μ L) 1 μ L, *RTase*(5units/ μ L) 1 μ L, *Taq* polymerase(5units/ μ L) 1 μ L 및 Table 1에 나타난 1차 프라이머 각 1 μ L씩을 첨가하여 반응액으로 사용하였고, 매 번의 RT-PCR 마다 RNA 추출물 대신 DEPC 처리된 멸균 정제수 25 μ L를 첨가한 반응액을 함께 증폭하여 DNA 및 RNA에 의한 오염발생 여부를 확인하였다. RT-PCR 및 2차 PCR 증폭과정은 Table 3에 나타난 바와 같다.

Table 3. Conditions of RT-PCR amplification

Amplification step	1st PCR Amplification	2nd PCR Amplification
Conditions	- 50°C, 30 min (Reverse Transcription) - 94°C, 3 min (Inactivation of <i>RTase</i> and initial denaturation) - 94°C 1 min(denaturation), 55 °C 1 min(annealing), 72°C 1 min(extension) ⇒ 30 cycles - 72 °C 10min (final extension)	- 94°C, 3 min (initial denaturation) - 94°C 1 min (denaturation), 55 °C 1 min (annealing), 72°C 1 min (extension) ⇒ 30 cycles - 72 °C 10 min (final extension)

2.4 증폭산물의 확인

DNA에 대한 PCR 및 RNA에 대한 RT-PCR 증폭으로부터 생산된 112bp의 PCR 증폭산물을 0.5 µg/mL의 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에 전기영동하여 UV하에서 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 *Giardia lamblia* 에 대한 민감도 검사

지아디아 100, 50, 10, 1 포낭을 DEPC처리된 멸균 PBS 1 mL에 부유시킨 후 2.2절 및 2.3절에 따라 RNA/DNA 추출부터 RT-PCR/PCR 증폭까지 수행하였다. 모든 시험은 2회 수행하였으며, 그 결과 1 포낭까지 증폭산물을 생산하였다(Fig. 1, Fig. 2, Table 4).

Table 4. Sensitivity of PCR / RT-PCR assay for the detection of *G. lamblia*.

Amplification method	Cyst concentrations in tested samples				
	100	50	10	1	negative control
PCR	+/+ ¹⁾	NA ²⁾	+/+	+/+	-/-
RT-PCR	+/+	+/+	NA*	+/+	-/-

¹⁾ 2회 검사한 결과로 각 회별 결과 (112 bp의 밴드 확인한 경우 +, 확인되지 않은 경우 -으로 표시함).

* NA : Not analyzed

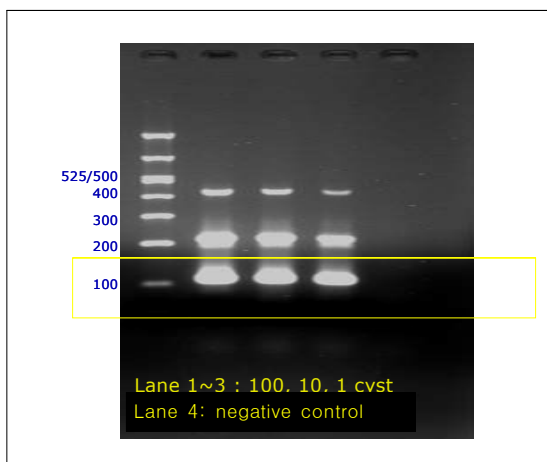


Fig. 1. Sensitivity of PCR assay for the detection of *G. lamblia*

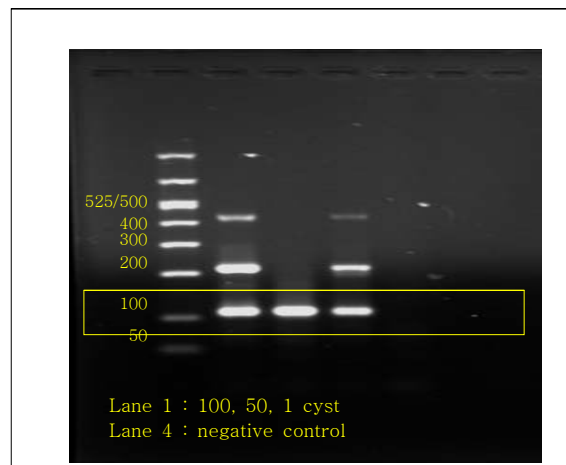
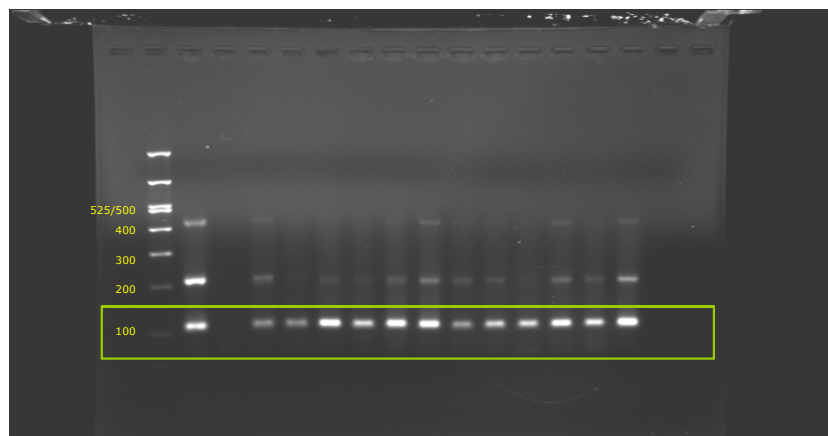


Fig. 2. Sensitivity of RT- PCR assay for the detection of viable *G. lamblia*

3.3 환경수 시료에의 적용

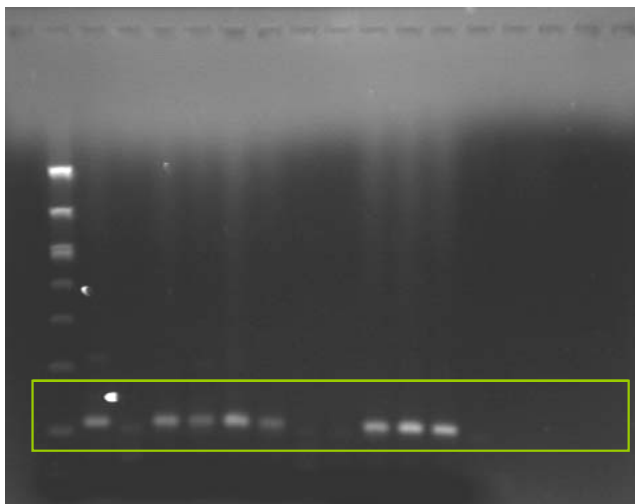
3.3.1 PCR에 의한 *Giardia lamblia* 검출

2005년 1월부터 6월에 걸쳐 환경수 시료 27점에 대해 *G. lamblia* 동정을 위해 PCR을 적용하였다. 현미경 관찰 결과 27개 시료 중 19개 시료에서 1포낭 이상의 지아디아가 발견되었으며, PCR 증폭시에는 27개 시료 중 20개의 시료에서 양성을 나타내었다(Fig. 3). IFA 양성시료 19개 중 17개가 PCR 양성이었으며, IFA 음성시료 8개 중 5개가 PCR 음성으로 나타나, 시험된 시료의 81.5%(22/27)에서 현미경 관찰결과와 PCR 결과가 일치하였다(Table 5). 본 연구에서 사용된 *G. lamblia* 특이 프라이머는 현미경 관찰시 혼란을 줄 우려가 많은 *G. muris*는 증폭하지 않으므로, 현미경 관찰시 육안으로 확인된 지아디아가 대부분 *G. lamblia* 일 것으로 생각된다.



Lane 1 : positive control
Lane 2~14: sample 1~13
Lane 15 : negative control

2005년 1월~3월



Lane 1 : positive control
Lane 2~11 : sample 14~23
Lane 12 : negative control

2005년 4월~5월



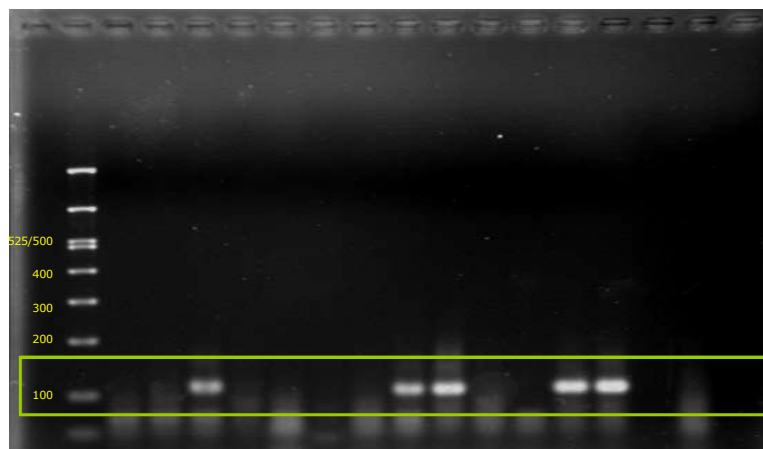
Lane 1 : positive control
Lane 2~5: sample 24~27

2005년
6월

Fig. 3. PCR detection of *G. lamblia* in environmental water samples

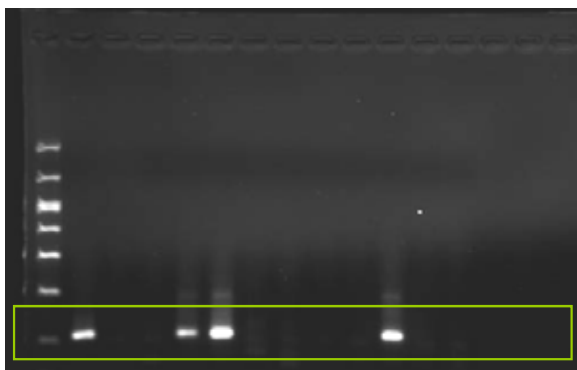
3.3.4 RT-PCR에 의한 살아있는 *G. lamblia* 검출

2005년 1월부터 6월에 걸쳐 환경수 시료 27점에 대해 살아있는 *G. lamblia* 동정을 위해 RT-PCR을 적용하였다. 채취된 환경수 시료 27개 중 8개 시료가 RT-PCR 양성으로, 30%가 살아있는 *G. lamblia*를 포함하고 있는 것으로 나타났다(Fig. 4, Table 5). PCR 양성시료(20개) 중에서는 40 %가 살아있는 *G. lamblia*를 포함하고 있는 것으로 나타났으며, 이때 IFA에서는 1~54 포낭이 관찰된 바, 본 연구에서 사용된 방법이 2포낭 미만의 시료에도 적용가능한, 매우 민감한 방법임이 확인되었다. IFA 음성이나 PCR 음성인 시료에서는 RT-PCR도 모두 음성으로 결과 되었다.



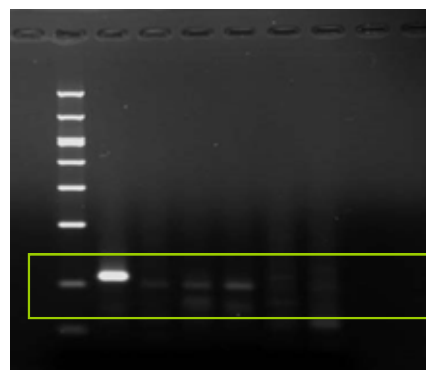
Lane 1 : positive control
Lane 2~14: sample 1~13
Lane 15 : negative control

2005년 1월~3월



Lane 1 : positive control
Lane 2~11 : sample 14~23
Lane 12 : negative control

2005년 4월~5월



Lane 1 : positive control
Lane 2~5: sample 24~27
Lane 6: negative control

2005년
6월

Fig. 4 RT-PCR detection of viable *G. lamblia* in environmental water samples

Table 5. Results of PCR / RT-PCR detection for *G. lamblia* in environmental water samples

sample no. Methods	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IFA	9	0	35	3	3	2	41	2	1
PCR	-	+	+	+	+	+	+	+	+
RT-PCR	-	-	+	-	-	-	-	+	+
sample no. Methods	10	11	12	13	14	15	16	17	18
IFA	0	3	2	54	0	1	6	22	0
PCR	+	+	+	+	-	+	+	+	+
RT-PCR	-	-	+	+	-	-	+	+	-
sample no. Methods	19	20	21	22	23	24	25	26	27
IFA	0	0	3	5	1	0	0	2	8
PCR	-	-	+	+	+	-	-	-	+
RT-PCR	-	-	-	+	-	-	-	-	-

4. 결론

본 연구에서 Giardin primer를 이용하여 *G. lamblia*에 대하여 PCR 및 RT-PCR을 수행한 결과 1 포낭까지 검출이 가능하였다. 또한 저농도의 지아디아 포낭을 포함하고 있는 환경수 시료에 적용한 결과, 81.5% 시료에서 현미경 관찰법인 IFA 결과와 PCR 결과가 일치하였으며, 현미경 관찰시 2 포낭 미만이 발견된 시료에서도 사람 감염성 종인 *G. lamblia*는 물론 살아있는 *G. lamblia* 양성인 경우가 발견되어 본 연구에서 사용된 방법의 높은 민감도를 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 사용된 분석방법은 공중보건학적으로 보다 의미있는 데이터를 제공하는데 적용될 수 있다고 판단된다. 특히 건강에 보다 직접적인 영향을 미치는 수돗물, 지하수 등 먹는물에 적용할 경우 검출된 지아디아 포낭의 사람 감염가능성 및 생사여부에 대한 정보를 줄 수 있으므로 대응방안 마련에도 활용 가능할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. WHO, Guidelines for drinking water quality, p 267
2. Meena H. Mahbubani, Frank W. Schaefer III, Daniel D. Hones, Asim K. Bej, Detection of *Giardia* in Environmental Waters by Immuno-PCR Amplification Methods, Current Microbiology, Vol. 36, pp 107-113
3. Morteza Abbaszadegan, Mary S. Huber, Dharles P. Gerba, Ian L. Pepper, Detection of Viable *Giardia* Cysts by Amplification of Heat Shock-Induced mRNA, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, pp 324-328
4. Meena H. Mahbubani, Bej, A, K, Perlin M, Schaefer III F. W., Jakubowski W. Atlas R. M, Detection of *Giardia* Cysts by Using the Polymerase Chain Reaction and Distinguishing Live from Dead Cysts, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 57, pp. 3456-3461