

PCR을 이용한 환경수 중의 지아디아 포낭 검출

Detection of *Giardia* Cysts in Environmental Water Using PCR

조은주*, 이목영, 변승헌, 오세종

Eun-ju Cho, Mok-young Lee, Seung-hun Byun, Sea-jong Oh

1. 서론

지아디아는 가장 일반적인 기생성 원생동물로 장기간의 비세균성 설사를 야기하며, 지아디아 감염을 야기하는 집단질병발생은 오염된 급수에 의한 경우가 많다(Meena H Mahbubani et al, 1998). 지아디아는 현재 우리나라 정수처리공정에서 일반적으로 사용되는 소독제인 염소에 대한 내성이 강하여 응집, 침전, 여과 및 소독 공정이 제대로 이루어지지 않을 경우 수요가에게 노출될 우려가 있다. 이러한 우려 때문에 우리나라에서는 올해 7월부터 지아디아에 대한 정수처리기준이 시행되고 있다. 정수처리기준에 고시된 원생동물 표준 시험법은 지아디아 동정시 면역형광항체 염색과 DAPI에 의한 핵 염색 특성 그리고 DIC에 의한 내부구조 확인에 의존한다. 그러나 이는 실험자의 숙련도가 부족할 경우 위양성 결과를 낼 수 있으며, 살아있는지에 대한 활성을 측정할 수 없다. 본 연구에서는 PCR을 이용하여 지아디아를 검출하는 한편 그 활성(viability)을 RT-PCR을 사용하여 평가하였다.

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 정제일로보더 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, 20L이상의 지표수 시료를 채취하여 캡슐필터로 여과하고, 캡슐필터용 추출용액을 사용하여 진탕·추출한 후 원심분리하여 재농축하였다. 이 농축액에 대해 면역자기분리(Immunomagnetic separation ; IMS)과정을 수행하여 다른 협잡물로부터 지아디아를 분리하고, IMS 정제액의 일부는 슬라이드 글라스에 적용하여 형광염색(FA)을 거친 후 현미경 관찰을 행하였고, 일부는 PCR 및 RT-PCR을 수행하기 위한 시료로 사용하였다.

2.2 DNA 추출 및 PCR 증폭

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

DNA 증폭에는 지아디아의 복부 흡반을 구성하는 유전자를 증폭하는 프라이머(giardin primer)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, 299bp 밴드를 생산하는 forward primer(GGP 510-537 : AGCTCAACGAGAAGGTCGCAGAGGGCTT) 및 reverse primer(GGR 789-809 : TTAGTGCTTTGTGACCATCGA) 각 1 μ L씩을 가한 것을 PCR 증폭 반응액으로 사용하였다. PCR 증폭시마다 DNA 추출물 대신 멸균정제수 23 μ L를 첨가한 반응액을 같이 증폭하여 carryover contamination 발생여부를 관찰하였다. PCR 증폭조건은 <Table 1>과 같다.

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

첫번째 PCR 증폭에 사용된 PCR premix 25 μ L에 1차 PCR 증폭산물 2 μ L, 멸균 정제수 21 μ L, forward primer(GGL 639-658 : AAGTGCCTCAACGAGCAGCTC) 및 reverse primer (GGR 789-809 : TTAGTGCTTTGTGACCATCGA) 각 1 μ L를 첨가하여 2차 PCR 증폭하였다. 증폭조건은 1차 PCR 조건과 같다.

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 2.2절에서 서술한 1차 프라이머(forward(GGP 510-537) 및 reverse (GGR 789-809)) 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. 2차 PCR 증폭과정은 2.2절에 서술한 바와 같다. RT-PCR 및 PCR 증폭 조건은 <Table 1>과 같다.

2.4 증폭산물의 확인

DNA에 대한 PCR 및 RNA에 대한 RT-PCR 증폭 후 생산된 171bp의 PCR 증폭산물을 0.5 μ g/mL의 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에 전기영동하여 UV하에서 확인하였다.

Table 1. PCR 및 RT-PCR 증폭 조건

DNA amplification ¹⁾			RT-PCR		
94 $^{\circ}$ C	3분	Initial denaturation	50 $^{\circ}$ C	30분	Reverse transcription
94 $^{\circ}$ C	1분	30 cycles	94 $^{\circ}$ C	3분	Inactivation of RTase and initial denaturation
55 $^{\circ}$ C	1분		94 $^{\circ}$ C	1분	
72 $^{\circ}$ C	1분		55 $^{\circ}$ C	1분	
72 $^{\circ}$ C	10분	Final extension	72 $^{\circ}$ C	1분	30 cycles
			72 $^{\circ}$ C	10분	

1) M. Maux et al. (2001)

3. 결과 및 고찰

3.1 프라이머 선택

프라이머를 선택하기 위하여 Heat shock protein 유전자에 특이적인 HSP 프라이머와 giardin 프라이머를 이용하여 지아디아 25, 10, 2포낭에 대해 비교 검사하였다. HSP 프라이머를 이용한 PCR 증폭은 Morteza Abbaszadegan et al.(1997)이 기술한 조건에 따라 증폭하였다. 그 결과 HSP 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 경우에는 HSP 특이 163bp 밴드를 생성하지 않았으며, giardin 프라이머를 사용한 경우에는 2포낭까지 171bp의 밴드를 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 giardin 프라이머를 선정하여 사용하였다.

3.2 민감도 검사

1) DNA 추출 및 PCR 과정에서의 민감도 검사

먼저 10^5 , 10^4 , 10^3 포낭에 대해 DNA 추출부터 1차 PCR 증폭까지 그리고 2차 PCR(nested PCR) 증폭까지 수행하여 1차 증폭산물(299bp)과 2차 증폭산물(171bp)을 비교하였다. 그 결과 1차 PCR과정까지 수행한 경우 10^4 포낭까지만 299bp의 밴드를 확인할 수 있었으며, 2차 PCR 증폭을 거쳤을 때 비로소 검사된 모든 시료에서 171bp의 진한 밴드를 확인할 수 있었다. 또한 100, 50, 10, 2포낭을 정제수에 접종하여 DNA 추출부터 PCR 증폭까지의 민감도를 검사한 결과 2포낭에서도 171bp의 밴드를 확인할 수 있었다. 따라서 저농도의 지아디아 포낭을 포함하고 있는 환경수 시료에 적용가능함을 확인할 수 있었다(Fig. 1)(Table 2).

2) RNA 추출 및 RT-PCR 과정에서의 민감도 검사

100, 50, 10, 2포낭을 정제수에 접종하여 RNA 추출부터 PCR 증폭까지의 민감도를 검사하였다. 그 결과 첫번째 실험에서는 10포낭까지, 두번째 실험에서는 2포낭까지 증폭산물을 확인하였으며, 이는 사용된 지아디아의 활성(viability) 상태에 따라 다르게 결과된 것으로 생각된다(Fig. 2)(Table 2).

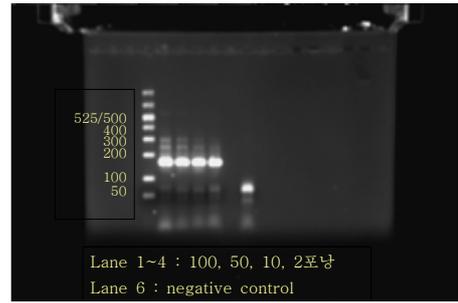


Fig. 1 DNA 추출 및 PCR 과정에서의 민감도 검사 결과

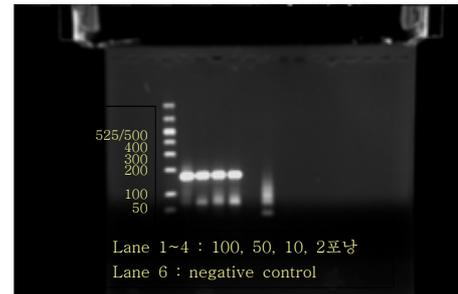


Fig. 2 RNA 추출 및 RT-PCR 과정에서의 민감도 검사 결과

Table 2. Giardin 프라이머를 이용한 PCR 및 RT-PCR 민감도 검사 결과¹⁾

구분 \ 포낭수	100	50	10	2	negative
PCR	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
RT-PCR	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-

¹⁾ 2회 검사한 결과로 각 회별 결과(171bp의 밴드 확인한 경우 +, 확인되지 않은 경우 -으로 표시함).

3.3 환경수 시료에의 적용

1) PCR에 의한 지아디아 포낭 검출

2004년 1월부터 3월까지 지표수 시료 6점을 채취하여 1623방법(USEPA 1623 Method)에 따라 농축·분리한 IMS 정제액에 대하여 DNA를 추출하여 PCR을 적용한 결과, 면역형광항체 염색을 통한 현미경관찰에서 지아디아가 검출된 5개의 시료에서는 모두 171bp의 밴드를 확인할 수 있었으며, 지아디아가 검출되지 않은 1개의 시료에서는 예상 크기의 증폭산물을 내지 않았다(Table 3)(Fig. 3).

2) RT-PCR에 의한 활성 지아디아 포낭 검출

지표수 시료 5점의 IMS정제액에 대하여 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행한 결과 면역형광항체 염색을 통한 현미경관찰에서 지아디아가 검출되지 않은 1개 시료 뿐만 아니라 지아디아가 검출된 4개의 시료에서도 171bp의 밴드를 확인할 수 없었다(Table 3)(Fig. 4).

Table 3. PCR 및 RT-PCR을 이용한 환경수 중의 지아디아 포낭 분석 결과

시료번호	1	2	3	4	5	6
시료량 (L)	10	10	10	7.5	4	1.7
FA ¹⁾	0 (0)	30 (3)	3 (0)	230 (62)	2 (0)	8 (5)
PCR	-	+	+	+	+	+
RT-PCR	-	-	-	-	-	NA ²⁾

¹⁾ 면역형광항체 염색에 의한 현미경 관찰 결과 속빈 포낭까지 포함하는 총 포낭수 (속빈 포낭을 제외한 포낭수)
²⁾ 분석하지 않음

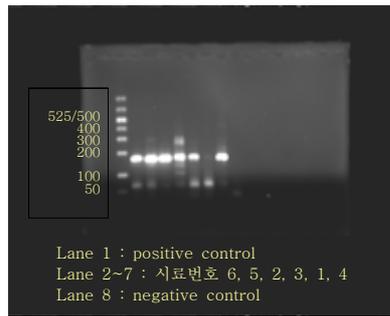


Fig. 3 지아디아 분석 결과

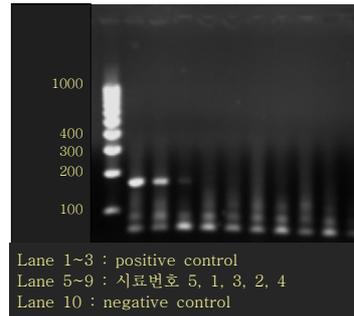


Fig. 4 활성 지아디아 분석 결과

4. 결 론

저농도의 지아디아가 포함되어있는 환경수 시료에 PCR을 적용하기 위하여 DNA 추출 및 PCR 과정에서의 민감도를 검사한 결과 2 포낭까지 검출할 수 있는 것으로 나타났고, 지표수 시료 6개에 PCR을 적용한 결과 현미경 관찰에서 최소 2개까지 검출되었던 시료에서도 PCR 양성 결과가 도출되어 저농도의 환경시료에도 적용 가능한 민감한 검출방법인 것으로 확인되었다.

지아디아 활성 평가를 위해 시도된 RNA 추출 및 RT-PCR 에서는 민감도 검사 결과 10포낭 정도에서도 RT-PCR 양성으로 나타났으나, 지표수 시료 5점의 적용시험에서는 현미경 관찰시 지아디아가 검출된 시료를 포함한 모든 시료에서 음성으로 결과되었다. 향후 RNA 추출 및 RT-PCR에 있어 환경시료내 방해물질여부나 환경시료에서의 민감도에 대한 보다 정밀한 검토가 필요할 것으로 판단된다.

또한 환경수 시료를 분석하고자 할 경우에는 2단계로 증폭을 수행하는 nested PCR 기법을 적용하는 것이 적합하며, nested PCR로 수행할 경우 민감도가 높고 특이적이지만 이러한 고민감도 때문에 시료처리과정에서 carryover contamination이 발생할 우려가 많으므로 PCR 증폭 배치마다 DNA 또는 RNA 시료 대신에 멸균 증류수를 포함한 반응액을 같이 증폭시킴으로써 오염여부를 확인할 필요가 있으며, 형광염색을 통한 현미경 관찰과 병행하여야 하고, 시료처리시 자주 글러브를 바꿔 착용하는 등의 상당한 주의를 기울여야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Meena H. Mahbubani, Frank W. Schaefer III, Daniel D. Jones, Asim K.Bej (1998) Detection of *Giardia* in Environmental Waters by Immuno-PCR Amplification Methods, *Current Microbiology*, **36**, p107
2. M. Maux. I. Bertrand. C. Gantzer and J. Schwartzbrod (2001) Estimating Giardia cyst Viability using RT-PCR, *IWA 2nd congress*, unpublished
3. Morteza Abbaszadegan, Mary S. Huber, Charles P. Gerba and Ian L. Pepper (1997) Detection of Viable Giardia Cysts by Amplification of Heat Shock-Induced mRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, p326