칩 기반 등온증폭법을 이용한 악제 내성 포도상구균의 검출

조민호 · 장원철 · 최재구^{†,*}

단국대학교 첨단과학대학 화학과 및 기초과학연구소/조직재생연구소

[†]동남보건대학 바이오환경과

(접수 2012. 10. 2; 게재확정 2012. 11. 12)

Detection for Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Using Bio-Chip Based Loop Mediated Isothermal Amplification Assay

Min-Ho Cho, Won-Cheoul Jang, and Jae-Gu Choi*

Department of Chemistry, School of Advanced Science and Basic Science Research Institute,
Institute of Tissue and Regeneration Engineering, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

[†]Departement of Bio & Environmental Science, Dongnam Health College, Gyeonggi 440-714, Korea

*E-mail: jgchoi@dongnam.ac.kr

(Received October 2, 2012; Accepted November 12, 2012)

요 약. 황색포도상구균은 병원에 의한 감염, 혈류 감염을 포함하는 중요한 병원체이다. 특히, 포도상구균의 혈액 수집의 신속한 동정과 메치실린 내성이 일어나게 되면 폐혈증으로 추측되어 진다. 본 저자는 적은 양의 핵산을 등온증폭반응에 적응시켜 증폭산물을 SYBR Green I을 결합하여 염기서열에 특이적으로 검출할 수 있는 새로운 방법을 제시하고 있다. 그리고 이 독특한 유전자 증폭방법은 등온의 상태에서 하나의 효소만으로 증폭이 가능하다. 포도상구균-등온증폭반응은 황색포도상구균에 특이적인 protein A를 암호화하는 *spa* 유전자와, 메치실린 내성인 penicillin-binding protein-2를 암호화하는 *mecA* 유전자를 타겟으로 하여 MRSA와 MRSE를 검출하였다. 본 연구에서는 등온증폭법을 사용하여 황색포도상구균과 표피포도상구균의 임상샘플을 검출하였다. 황색포도상구균과 표피포도상구균을 10배위 정량 희석하여 시리즈별로 샘플을 만들어 실험을 수행하였다. 칩을 기반으로 하는 LAMP법은 포도상구균 감염여부를 쉽고, 빠르고, 정확하게 민감도 있는 검출을 가능하게 해 주었고, 샘플을 측정할 수 있는 한계값을 넘는 상황에 특이적으로 적용할 수 있다.

주제어: 메치실린 내성 황색포도상구균, 등온증폭법, SYBR Green I, 바이오 칩

ABSTRACT. *Staphylococcus aureus* is the most important pathogen in nosocomial infections, including bloodstream infections. Prompt identification of *S. aureus* from blood cultures and detection of methicillin resistance are essential in cases of suspected sepsis. We have studied a new method for the sequence-specific visual detection of minute amounts of nucleic acids using intercalating reaction by addition of SYBR Green to amplicons of LAMP, and it's a unique gene amplification method in which DNA can be isothermally amplified using only one enzyme. *Staphylococcus*-LAMP, which targets the *spa* gene, encoding *S. aureus*-specific protein A, and the *mecA* gene, encoding penicillin-binding protein-2' for methicillin resistance, detected MRSA and MRSE. In this study, by using LAMP assay, I detected for *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* concentration in the clinical sample. The detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* was tested by using serial 10-fold dilutions standard solution. I have accurately detected the limit of detection, sensitivity, specificity and reproducibility of the assay. The Bio-chip based LAMP assay allowed easy, rapid, accurate and sensitive detection of infection with *Staphylococcus* and especially applicable in a resource-limited situation.

Key words: MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), LAMP (loop mediated isothermal amplification), SYBR Green I, Bio-chip

서 론

포도상구균(*Staphylococcus*)은 *Micrococcaceae*과에 속하며, 현미경으로 보면 포도송이와 같이 연속된 균괴를 형성하는 그람양성 통성 혐기성 구균(직경 0.8–1.0 μm)이다.

페놀이나 염화수은같은 화학 살균제에 다른 세균보다 강한 저항을 가지며, 임상에서 가장 흔히 접하게 되는 병원균으로 건강한 성인의 비강 내 약 30–40%에서 발견이 되며 다른 사람에게 잘 전파되어 병원 내 감염의 주요 원인균으로 작용한다.

임상양상은 피부연조직 감염으로부터 골관절염, 균혈증, 뇌막염, 폐렴들의 중한 감염, 균이 생산하는 독소에 의하여 생기는 식중독, 포도알구균 열상피부증후군, 독성 쇼크 증후군 등이 있다.

또한 임상에서 중요한 의미를 가지는 것이 균이 내성을 가지게 되어 나타나는 문제들이다. Penicillin, Methicillin 등 항포도구균 항균제는 항균력이 우수하여 지난 수 십년간 감염증의 주요 약제로 사용되어 오다가 1940년대에 일부 균들이 Penicillin에 내성을 가지게 되었고 1950년대에 들어와서는 Tetracycline, Chloramphenicol 및 Erythromycin에 내성인 *S. aureus*가 나타났다. Methicillin이 등장한지 일 년 후인 1961년에 Methicillin에 내성을 나타내는 포도상구균이 보고되었다.

포도상구균은 크게 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)과 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*)으로 나뉘는데, 황색포도상구균은 건조된 화농이나 객담에서 수 주간 생존할 수 있고 아포를 형성하지 않는 대다수의 다른 세균에 비해 황색포도구균은 불리한 환경조건하에서도 저항성이 크다. 열이나 건조 등에도 비교적 저항력이 강하고 7.5-9%의 식염이 함유된 상태에서 생존이 가능하다. 황색포도상구균은 중요한 원내 감염균의 하나로 특히, 메치실린 내성 황색포도상구균(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)과 메치실린 감수성 황색포도상구균(Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus*)로 구별된다.

표피포도상구균은 정상피부균종으로 가장 흔한 서식처는 두부, 겨드랑이, 콧구멍, 양말 및 양다리이며 감염의 오염원이 될 수 있다. 정상 숙주에서 낮은 병원성을 가지지만 면역성이 약화된 환자에게는 심각한 감염을 일으킬 수 있다. 임상적 감염으로는 인공 심장 박동기, 혈관이식, 인공관절의 감염과 복막투석을 한 환자에게서는 복막염을 일으키며, 심장판막이나 대퇴부대치술, 중신경계 선트 삽입에서 단일한 균종으로서 가장 흔히 분리되는 원인균이다. 또 정맥도관에서 감염을 유발하는 가장 흔한 원인균으로 이 균에 의한 균혈증 보고가 점점 증가하고 있는 추세다. 또 요로계 감염의 원인이기도 하다. 표피포도구균 역시, 메치실린 내성 표피포도상구균(Methicillin Resistant *Staphylococcus epidermidis*)와 메치실린 감수성 표피포도상구균(Methicillin Sensitive *Staphylococcus epidermidis*)으로 크게 구별된다.

포도상구균이 β -lactam 약물에 내성을 가지게 되는 것은 Penicillin-binding protein (PBP)2'이라는 새로운 세포벽 합성효소의 생산이 주된 원인이다. PBP은 세균 세포벽 구조물인 peptidoglycan을 합성하는 마지막 단계에 작용하는 효소의 일종이다. Peptidoglycan을 합성하는 마지막 단계에 작용하는 효소의 일종이다. Peptidoglycan은 N-acetylglucos-

amine (NAG)과 N-acetylmuramic acid (NAM)가 연결되어 당사슬을 형성하고, NAM에 붙은 pentapeptide를 pentaglycine이 서로 연결함으로써 만들어진다. PBP는 pentaglycine의 연결작용을 돕는 역할을 하며, β -lactam 약물은 PBP에 결합하여 그 작용을 억제함으로써 세포벽 형성을 막는다. *S. aureus*는 5가지 PBP (PBP1, PBP2, PBP3, PBP3', PBP4)를 보유하고 있는데, MRSA와 MRSE에는 PBP2a (PBP2')라는 다른 PBP가 추가로 존재한다. 이는 β -lactam 약물에 대한 친화성의 감소로써 내성을 가지게 된다. 적절한 농도의 β -lactam 약물을 유지한다고 하여도 MRSA와 MRSE는 지속적으로 세포벽을 생산을 할 수 있게 된다.

PBP2'는 *mecA*라는 유전자에 의해 암호화되어 있는 분자량 76,000 Da 정도의 단백질이다. 따라서 MRSA와 MRSE에는 MSSA와 MSSE에 없는 내성유전자를 가지고 있으며 이를 *mecDNA*라고 한다. *mecDNA*는 *mecA*, *mecI*, *mecR*로 이루어져 있다. *mecI-mecR1-mecA*를 *mecA* 유전자복합체(gene complex)라고 하는데 균주에 따라서는 *mecI*가 손실되어 *mecR1*의 5' 부분만 남은 경우가 있다. *mecDNA*는 새로운 유전자 단위라고 하였고, 이를 SCCmec (staphylococcal cassette chromosome mec)으로 명명하게 되었다. 따라서 *mecA* 유전자는 staphylococcal cassette chromosome mec (scc mec)라는 이동성 유전자 구성요소에 의하여 운반되어 *staphylococcus* 염색체내로 들어가게 된다.

mecA 유전자가 메치실린 내성유전자를 가지고 있는 반면 *spa*의 경우 포도상구균이 생성하는 *spa*라는 단백질은 MRSA, MSSA와 MRSE, MSSE를 선택적으로 구분해주는 유전자이다.

본 연구에서는 포도상구균에서 병원내 감염이 가장 많은 황색포도상구균과 표피포도상구균의 동정과 빠른 검출을 위해 *spa*유전자와 *mecA*유전자를 등온증폭법을 이용하여 증폭산물을 Bio-Chip을 도입하여 확인하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서는 단국대학교병원의 포도상구균에 감염된 환자에서 분리된 메치실린 내성 포도상구균(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)과 메치실린 감수성 포도상구균(Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus*)을 대상으로 하였다.

실험 방법

포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에서 genomic DNA를 추출하여 PCR을 이용하여 *spa*와 *mecA* 유전자 부위를 증폭을 시킨 후 증폭된 DNA를 전기 영동법에 의해 확인하

였고 이를 정제하였다. 정제된 증폭산물이 포도상구균 DNA가 맞는지 최종적으로 확인하기 위해서 DNA 염기서열분석법을 시행하였다.

그 후 동일한 primer에 추가 primer를 첨가하여 결핵균 DNA를 일반 PCR법과 등온 증폭법에 적용하여 실험하였다.

포도상구균주에서 genomic DNA의 추출

뉴트리언트 배지에서 배양한 포도상구균주를 적당량의 콜로니를 취해 1.5 mL 튜브에 옮겨준 후, 1 M Tris HCl (pH 8.5) 1 mL을 넣고 오븐에서 100 °C로 10 분 동안 처리하였다. 처리한 튜브를 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리한 후 상층액을 버린 후 Proteinase K (20 mg/mL) 20 µL와 조직분해 완충용액(tissue lysis buffer) 200 µL를 넣고 5 초 동안 섞은 후 항온 수조에서 60 °C로 1 시간 동안 반응시켰다. 그리고 튜브에 동량의 PCI-9 (phenol chloroform isoamyl alcohol 25:24:1)를 넣고 5 분간 13,000 rpm에서 원심분리한 후 상층액을 새로운 1.5 mL 원심분리 튜브로 옮겼다. 상층액에 2 M sodium acetate를 30 µL와 차가운 100% ethanol을 900 µL 넣은 후 가볍게 섞어준다. DNA의 수율을 최대화하기 위해 -20 °C에서 30분 동안 두었다. 그 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 한 후 상층액을 버렸다. 70% ethanol를 500 µL 넣고 가볍게 섞어 준 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 시킨 후 상층액을 제거했다. Ethanol을 완전히 제거하기 위해 오븐에서 1시간 반 동안 건조 시킨 후 50 µL의 용리 완충용액(Elution buffer)을 넣어 줬다. 이렇게 분리한 DNA는 곧바로 실험에 사용하거나 4 °C에 보관하고, 장기간 보존하기 위해서는 -20 °C에 저장해 두었다.

중합효소연쇄반응(PCR)

다음과 같은 PCR primer set (Table 1)를 이용하여 각 시료의 PCR 산물을 얻었다. 각각 25 µL의 PCR 반응 용액 (Table 2)을 0.2 mL PCR 반응 튜브에 넣은 후, GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA)을 이용해서 DNA를 증폭시켰다.

Agarose gel 전기영동에 의한 증폭산물의 확인

1.5% (w/v) agarose gel을 이용하여 Mupid-α (Advance, Japan) 전기 영동장치로 PCR 산물을 분석하였다.

Table 2. Condition of working solution for PCR and PCR cycle condition of *spa* and *mecA* gene for PCR

Components of PCR	Volume (µL)
10 X reaction buffer (100 mM Tris-HCl; pH 9.0, 400 mM KCl)	2
10 mM dNTP mix (2.5 mM each.)	2.5
Forward primer (10 pmole/µL)	1
Reverse primer (10 pmole/µL)	1
Taq. polymerase (5 U/µL)	0.1
Template DNA (25 ng/µL)	1
Deionized water	17.4
Total	25

Step	Temp (°C)	Time	Cycle
Initial denature	94	5 min	
Denature	94	30 sec	
Annealing	58	30 sec	32
Extension	72	45 sec	
Last extension	72	3 min	

Agarose 1.5 g을 삼각플라스크(250 mL)에 넣고, 0.5X TBE (tris boric acid EDTA) 완충용액 100 mL을 채운 후에 전자렌지에서 2-3분 동안 녹인 후 용액을 gel 용기에 부어서 30분 정도 굳혔다. Gel이 완전히 굳은 것을 확인하고 comb을 뽑고 gel을 수거하였다. 수거한 gel을 전기영동장치에 넣고 0.5X TBE 완충용액으로 채운다. 그리고 PCR 산물 4 µL와 6X BPB (bromo phenol blue) dye 0.8 µL를 섞어서 4 µL씩 loading하고 100 V에서 25분 동안 전기영동하였다. 그 후에 gel을 떼어내어 EtBr(ethidium bromide)로 10 분간 염색하고 다시 10 분간 증류수로 DNA와 결합하지 못한 EtBr를 씻어냈다.

마지막으로 UV transilluminator 위에 agarose gel을 올려 놓고 PCR 여부를 확인하였다.

PCR 산물의 정제

1.5 mL 원심 분리 관에 PCR 산물과 PCR 산물의 5배 양의 결합 완충용액을 넣어 혼합한 후 이를 스핀 컬럼으로 조심히 옮긴다.

8,000 rpm에서 30 초간 원심 분리하여 여과되어 모아진 용액은 버리고 30 초간 원심 분리하였다. 여과되어 모아진 용액을 버리고 마지막으로 13,000 rpm에서 2 분간 원심

Table 1. Primer sequence sets used to amplify *spa* and *mecA* gene for PCR

Gene	Sequence of primers Forward (5' → 3'), Reverse (5' → 3')	Size of fragment (bp)
<i>spa</i>	Forward TGG TGA TAC AGT AAA TGA CAT TG Reverse AGT TGT ACC GAT GAA TGG ATT	205
<i>mecA</i>	Forward GGA AAA GCG ACT TCA CAT C Reverse GCC ATC TTT TTT CTT TTT CTC T	229

Table 3. Primer sequence sets used to amplify *spa* and *mecA* gene for LAMP

Gene	Sequence of primers (5' → 3')	Size of fragment (bp)
<i>spa</i>	F3 5'-TGGTGATACAGTAAATGACATTG-3'	205
	B3 5'-AGTTGTACCGATGAATGGATT-3'	
	FIP 5'-CTTGACCAGGTTTGATCATGTTTTCAAAAGCAAACGGCACTAC-3'	
	BIP 5'-ACTTGTTGTTGATAAGAAGCAACCACACCAAGTTTCTGGTAATGC-3'	
<i>mecA</i>	F3 5'-GGAAAAGCGACTTCACATC-3'	229
	B3 5'-GCCATCTTTTTTCTTTTCTCT-3'	
	FIP 5'-TCCCTTTTACCAATAACTGCATCATTATGTTGGTCCCATTAACCTCT-3'	
	BIP 5'-AAGCTCCAACATGAAGATGGCCGATTGTATTGCTATTATCGTCAA-3'	

분리하였다. 그리고 수집 컬럼을 깨끗한 시험관에 옮긴 후 PCR 산물과 동일한 양의 용리완충용액(elution buffer)을 넣고 실온에서 2분간 반응하고 모아진 용액을 4 °C에 보관하였다.

DNA 염기서열분석법에 의한 유전자 판별

DNA 추출 후 PCR primer set (Table 1)를 이용하여 유전자를 증폭시킨 후 정제를 거쳐 DNA 염기서열분석법(ABI 3730xl DNA analyzer)을 통하여 포도상구균의 *spa*와 *mecA*의 유전자를 최종 확인하였다.

등온증폭반응(LAMP)

다음과 같은 등온증폭 반응 primer set (Table 3)를 이용하여 각 시료의 증폭산물을 얻었다.

총 20 µL의 등온증폭 반응용액(Table 4)은 premix 18.5 µL와 DNA 1.5 µL로 구성되었으며 premix는 한번에 제조하여 0.2 mL PCR 반응 튜브에 18.5 µL씩 동량 분주한 후, DNA를 첨가하여 등온증폭법을 이용해서 DNA를 증폭시켰다.

칩 기반 등온증폭반응(Chip-based LAMP)

다음과 같은 등온증폭반응 oligonucleotide set (Table 3)를 이용하여 각 시료의 증폭산물을 얻었다.

총 20 µL의 등온증폭 반응용액(Table 4)은 premix 18.5 µL와 DNA 1.5 µL로 구성되었으며 premix는 한번에 제조하여 칩의 반응 용기 부위에 18.5 µL 분주하였고 형광 시약 용기에 100X SYBR Green I 6 µL를 분주하였고, 칩 반응 용기 부위에 DNA 2 µL를 첨가하여 등온증폭반응장치에 칩을 넣고 증폭 후 형광 시약의 변화를 확인하였다.

결과 및 고찰

포도상구균에서 genomic DNA 추출

Phenol법을 이용하여 포도상구균(*Staphylococcus*)에서 genomic DNA를 추출하였으며 DNA 추출 결과는 칩을 기반으로 한 등온증폭반응이나 PCR 반응을 통해 확인하였다.

Table 4. Condition of working solution for LAMP and LAMP condition of *spa* and *mecA* gene

Components of premix solution	Volume (µL)
<i>Bst</i> .10 X reaction buffer (10 mM tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 mM MgSO ₄)	2
10 mM dNTP mix (2.5 mM each.)	2
Forward (10 pmole/µL)	0.6
Reverse primer (10 pmole/µL)	0.6
FIP (10 pmole/µL)	1.4
BIP (10 pmole/µL)	1.4
<i>Bst</i> . polymerase (5 U/µL)	1.5
Template DNA (25 ng/µL)	1.5
Deionized water	9
Total	20

Condition	Temperature (°C)	Time (min)	Cycle
Initial denature	61		
Denaturation	61	60	
Annealing	61		
Extension	61		

등온증폭반응(LAMP)을 이용한 포도상구균 검출 결과

임상시료에서 추출한 포도상구균 genomic DNA와 등온증폭반응용 premix와 혼합하여 등온증폭반응기(Fig. 1)에서 증폭하였고 전기영동을 통해 황색포도상구균과 표피포도상구균을 검출하였으며 결과는 Figs. 2, 3, 4와 같았다.

칩 기반 등온증폭반응(Chip-based LAMP)을 이용한 포도상구균 검출 결과

등온증폭반응용 칩(Figs. 5, 6)을 이용하여 등온증폭반응을 수행한 후 장비에서 SYBR Green과 premix와 주형 DNA가 혼합되어 있는 시약을 반응하여 형광색의 변화를 통해 결핵균을 검출할 수 있었다. 즉 황색포도상구균과 표피포도상구균과 특이적으로 결합된 칩에서는 녹색으로 변화하였고 증폭되지 않은 칩에서는 주황색이 관찰되었으며 결과는 Figs. 7, 8과 같았다. 형광색의 변화를 통해서 전기영동 없이 현장에서 손쉽게 결핵균을 검출할 수 있

Fig. 1. A photograph of isothermal amplification device.

Fig. 2. Electrophoresis results of amplicons. Lane 1, 5: *S. aureus*, Lane 2, 6: Methicillin Resistant *S. aureus*, Lane 3, 7: *S. epidermidis*, Lane 4, 8: Methicillin Resistant *S. epidermidis*, Lane M: 100bp Marker.

Fig. 3. Detection limit of *Staphylococcus* gene using LAMP assay. Varying dilutions of the *Staphylococcus aureus* gene genomic DNA ranging undiluted DNA to 10^0 were used for the reactions. Lane 1-7: 10^0 - 10^{-7} (copy/mL) of *S. aureus* DNA, Lane 8, 15: Negative, Lane 9-17: 10^0 - 10^{-7} (copy/mL) of Merhicillin Resistant *S. aureus*, Lane M: 100bp Marker.

었다.

포도상구균은 최근에 들어서 병원내 감염뿐만 아니라 지역사회에서의 감염을 일으키고 있는 위험 균주이다.

황색포도상구균은 사람의 피부와 코에서 발견되는 세균으로 일반적으로 무해한 균이지만 때로는 감염증과 중증을 일으킬 수도 있는 균이다. 황색포도상구균 중에는 감염증을 치료하기 위해 과거에 사용되었던 항생제 메치실린에 대해 내성이 생긴 균종들이 있다. 메치실린 내성

Fig. 4. Detection limit of Methicillin Resistant *Staphylococcus* gene using LAMP assay. Varying dilutions of the Methicillin Resistant *Staphylococcus* gene genomic DNA ranging undiluted DNA to 10^0 were used for the reactions. Lane 1-7: 10^0 - 10^{-7} (copy/mL) of Methicillin Resistant *S. aureus* DNA, Lane 8, 15: Negative, Lane 9-17: 10^0 - 10^{-7} (copy/mL) of Merhicillin Resistant *S. epidermidis*, Lane M: 100bp Marker.

Fig. 5. A design drawing of biochip for LAMP.

Fig. 6. A photograph of biochip for LAMP.

황색포도상구균에 의한 감염증은 이 세균을 죽이는 항생 물질이 거의 없기 때문에 치료하기가 힘든 실정이다.

이러한 위험 요소가 큰 감염증을 유발하는 포도상구균 종을 진단하는 방법으로는 의사가 종기나 상처, 또는 그 외의 피부 병변부위로부터 분비액 또는 표본을 채취한후, 실험실에 보내 검사를 하고 있는 실정이다.

이러한 감염증에 대한 치료 방법으로는 증상에 따른 항생제 치료가 있으나, 이 또한 포도상구균의 내성능력이 뛰어나 갈수록 치료방법이 어려워지고 있다.

감염성이 높고 이에 따라 항생제의 치료가 어려워지고

Fig. 7. Detection of Methicillin Resistant *S. aureus* and *S. epidermidis* using chip-based isothermal amplification device. 1, 5: *S. aureus* 2, 6: Methicillin Resistant *S. aureus* 3, 7: *S. epidermidis* 4, 8: Methicillin Resistant *S. epidermidis*.

Fig. 8. Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus* using chip-based isothermal amplification device. 1–6: 10 folding dilution series 7: Negative.

있는 포도상구균에서 감염 빈도가 높은 메치실린에 내성인 황색포도상구균과 표피포도상구균을 빠르고, 특이적이며 감도가 높은 등온증폭반응법을 등온증폭반응장치와 바이오 칩을 적용하여 실험하였다.

DNA를 추출 후 LAMP primer set (Table 1), 등온증폭장치(Fig. 1), 바이오칩(Fig. 5)을 이용하여 *spa*와 *mecA* 유전자를 증폭시킨 후 정제를 거쳐 DNA 염기서열분석법(ABI 3730xl DNA analyser)을 통하여 황색포도상구균과 표피포도상구균의 메치실린 내성여부를 확인하였다.

검출 능력 테스트 결과에서는 등온증폭법으로 황색포도상구균을 구별하는 *spa* 유전자와 메치실린 내성 여부를 구별하는 *mecA* 유전자를 증폭한 결과(Fig. 2) 포도상구균의 종구분과 메치실린 내성여부가 정확히 검출되었다.

증폭산물을 10배위 정량희석하여 등온증폭법을 사용하여 증폭한 결과(Figs. 3, 4) 1.5×10^7 – 1.5×10^2 copy/mL의 범위내에서 검출되었다.

포도상구균의 등온증폭반응 여부를 확인한 후 등온증폭장치와 바이오칩을 이용하여 테스트한 결과에서는 등온증폭반응과 동일한 조건으로 검출한 결과 바이오 칩내에 등온증폭반응을 통한 증폭산물과 형광시약의 결합으로 증폭여부가 육안으로 확인 가능하였다(Figs. 7, 8).

등온증폭장치에 칩을 적용하여 포도상구균을 검출한

결과 등온증폭반응시 전기영동으로 증폭여부를 확인한 반면에 바이오칩의 형광의 발색여부로 바로 육안으로 결과를 확인할 수 있었다.

본 저자는 앞으로 등온증폭장치와 바이오 칩을 현장적용화 하여 검출 한계를 넓혀서 병원균이 분포되어있는 병원이나 지역사회에서 빠르게 검출 가능한 조건을 확립할 계획이며 포도상구균 이외에도 살모넬라, 바실러스 시리우스, 브루셀라 등 다양한 병원성 미생물에 적용할 계획이며 이외에 현재 심각한 유행성 감염균으로 떠오르고 있는 신종플루에도 적용 가능할 것으로 보인다.

또한 포도상구균의 감염여부의 진단이 필요한 임상 및 기타 장소에서 전문연구원이 아닌 기본적인 검출기술을 가진 일반인에게도 적용할 수 있을 것이며, 진단시간의 단축과 검출기기의 간소화로 감염 이전에 항생제에 대한 내성여부를 판단하여 빠른 치료제 제시와 함께 등온증폭반응장치와 바이오 칩을 현장 적용성으로 개발하여 임상진단에 사용될 계획이다.

Acknowledgments. 이 연구는 2011 학년도 동남보건대학 연구비 지원으로 연구되었음.

REFERENCES

- Misawa, Y.; et al. *J. Infect. Chemother.* **2007**, *13*, 134.
- Arakere, G.; Nadig1, S.; Ito, T.; Xue Ma, X.; Hiramatsu, K. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *292*, 141.
- Ho, Y. C.; Chang, S. C.; Lin, S. R.; Wang, W. K. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 2361.
- Chaves, F.; Garcia-Martinez, J.; de Miguel, S.; Sanz, F.; Otero, J. R. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **2005**, *26*, 150.
- Parida, M.; Sannarangaiah, S.; Kumar Dash, P.; Rao, P. V. L.; M. Kouichi Rev. *Med. Virol.* **2008**, *18*, 407.
- Wu J. J.; Huang A. H.; Dai J. H.; Chang T. C. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *35*, 1460.
- CDC. MRSA in healthcare settings. http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_MRSA_spotlight_2006.html.
- Fang, H.; Hedin, G. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 2894.
- Sabet, N. S.; Subramaniam, G. A.; Navaratnam, P.; Sekaran S. D. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2007**, *29*, 582.
- Palavecino, E. *Clin. Lab. Med.* **2004**, *24*, 403.
- Shrestha, N. K.; Tuohy, M. J.; Hall, G. S.; Isada, C. M.; Procop, G. W. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 2659.
- Renwick, L.; et al. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *27*, 791.
- Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 63.
- Suhaili, Z.; Johari, S. A.; Mohtar, M.; Abdullah, A. R. T.; Ahmad, A.; Ali, A. M. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25*, 253.

15. Bignardi, G. E.; Woodford, N.; Chapman, A.; Johnson, A. P.; Speller, D. C. *J. Antimicrob. Chemother.* **1996**, *37*, 53.
 16. Martineau, F.; Picard, F. J.; Roy, P. H.; Ouellette, M.; Bergeron, M. G. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *29*, 2240.
 17. Fang, H.; Hedin, G. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 2894.
 18. Anupurba, S.; Sen, M. R.; Nath, G.; Sharma, B. M.; Gulati, A. K.; Mohapatra, T. M. *Indian. J. Med. Microbiol.* **2003**, *21*, 49.
 19. Enright, M. C.; Robinson, D. A.; Randle, G.; Feil, E. J.; Grundmann, H.; Spratt, B. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 7687.
 20. Okuma, K.; Iwakawa, K.; Turnidge, J. D. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 4289.
-