

## 실시간 역전사 중합효소연쇄반응법을 이용한 활성이 있는 작은 와포자충의 검출

남세희 · 이정임 · 이상태 · 이규철<sup>†</sup>  
한국수자원공사 수돗물분석연구센터

### Detection of Viable *Cryptosporidium parvum* by Real-Time RT-PCR

Sehee Nam, Jeongim Lee, Sangtae Lee, and Gyucheol Lee<sup>†</sup>

Water Analysis and Research Center, Korea Water Resources Corporation  
Sintanjin-ro 560, Dedeok-gu, Daejeon 306-711, Korea

*Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) is one of the waterborne protozoan parasites and well known to cause cryptosporidiosis. These parasites exist in the water system in very low densities and are resistant to many environmental stresses, thereby necessitating the development of a very sensitive detection method to detect them. In this study, we developed a real-time reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) method to detect the mRNA of the *hsp70* gene for the detection of viable *C. parvum*. In the results, it was shown that the detection sensitivity for *hsp70* was equal to that of the RT-PCR for *hsp70* which had been developed. Also, it was possible to observe a 10-fold increase of the detection sensitivity when *hsp70* mRNA was induced by giving heat shock, compared with that of the case that was not subjected to heat shock. In conclusion, the real-time PCR method for the *hsp70* gene of *C. parvum* developed in this study is as sensitive as the RT-PCR method, as well as it makes quantification possible. Also, by using primers and probes for *hsp70* gene, it was possible to detect viable *C. parvum* as well as achieve about 10-fold increase in detection sensitivity. Further studies are needed to detect viable *Giardia lamblia*, known to be an important waterborne parasite, by using real-time RT-PCR.

**Key words:** *Cryptosporidium parvum*, *hsp70*, real-time RT-PCR, *Giardia lamblia*

### 1. 서 론

와포자충증(Cryptosporidiosis)을 일으키는 작은 와포자충(*Cryptosporidium parvum*)은 람블편모충증(Giardiasis)을 일으키는 람블편모충(*Giardia lamblia*)과 더불어 잘 알려진 수인성 기생원충이다<sup>1,2)</sup>. 이들은 사람과 사람 사이의 접촉이나 음식을 통해 전파되며, 수돗물, 샘물, 하천수, 그리고 호소수 등 물에 의해 감염될 수도 있다. 작은 와포자충의 물에 의한 대표적인 집단 감염 사례로 1993년 미국 위스콘신 주의 밀워키에서 40만 명 이상이 감염되어 100여명 이상이 사망한 예가 있었으며<sup>3)</sup>, 1996년 일본의 사이타마현과 오코세

마치현에서도 작은 와포자충에 의해 오염된 수돗물을 통해 8,000명 이상이 감염되는 사례가 있었다<sup>4)</sup>. 한국의 경우 작은 와포자충에 의한 집단 감염 사례가 보고된 적은 없지만, 수계에서 이들의 검출과 분포 등에 관한 연구는 꾸준히 이루어져 왔다<sup>5,6)</sup>.

작은 와포자충의 난포낭(oocysts)은 단단한 세포벽으로 둘러싸여 있어 다양한 환경적 요인에 대해 내성을 갖는다. 이로 인해 작은 와포자충은 환경에서 수개월 동안 활성을 유지할 수 있으며, 정수처리과정 중 특히 염소 처리에 대해 내성이 있다고 알려져 있다<sup>7)</sup>. 그러므로 국민들에게 안전한 수돗물을 공급하기 위해 작은 와포자충을 효과적으로 제거하고 불활성화시키기 위한 연구가 필

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gcleee@kwater.or.kr

요하며, 이와 더불어 상수원을 대상으로 이들의 오염에 대한 분포실태를 조사하고, 또한 이를 효과적으로 수행하기 위한 분석법 연구도 매우 중요하다고 할 수 있다.

작은 와포자충은 수계에 매우 낮은 농도로 존재하므로 이들을 효과적으로 검출하기 위해서는 검출 민감도가 높은 방법의 개발이 시급하다. 현재 물에서 이들을 검출하기 위해 사용되는 방법은 필터를 이용하여 물을 여과한 후 자성체 구슬을 접합시킨 항체(immunomagnetic beads)를 이용하여 면역학적으로 분리하고, 이를 형광 항체(fluorescent antibody)로 염색하여 형광현미경으로 난포낭을 계수하는 방법이다<sup>8)</sup>. 그러나 위 방법은 실험이 여러 단계로 나뉘어 있어 많은 분석시간이 소요되며, 검출된 작은 와포자충의 난포낭이 인체에 대해 감염성이 있는 활성 상태인지 아닌지를 판단하기가 매우 어렵다는 단점이 있다. 또한 형광현미경을 사용하여 최종적으로 난포낭의 유무를 판정하는 분석 방법이므로 경험이 풍부한 실험자와 그렇지 못한 실험자 간의 결과 해석에 차이가 있을 수도 있다. 또한 환경 시료의 경우 다양한 물질이 존재하므로, 형광현미경 관찰시 허상(artifacts)에 의한 결과 해석의 오류 가능성이 높다.

이러한 단점들을 보완하기 위해 증합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)과 real-time PCR 등 분자생물학적 방법들이 연구, 개발되고 있으며, 이러한 방법들이 실제 환경시료를 분석하기에 적합하고, 감도나 특이성도 매우 뛰어나다고 보고되었다<sup>9-11)</sup>. 또한 작은 와포자충 난포낭의 활성을 판단하기 위해 인간의 암세포주의 일종인 HCT-8(human ileocaecal adenocarcinoma cells) 세포에 작은 와포자충을 감염시켜 이를 배양하는 방법이나<sup>12)</sup>, 인위적으로 열로 자극(heat shock)을 가하여 heat shock protein 70(*hsp70*) 유전자의 mRNA 전사를 유도한 후 이를 검출해 내는 역전사(reverse transcription, RT)-PCR 방법 등이 보고된 바 있다<sup>13,14)</sup>. 그러나 RT-PCR법의 경우 정성분석은 가능하나 정량이 불가능하며, RT-PCR 후 작은 와포자충의 DNA가 제대로 증폭되었는지 확인하기 위해 전기영동 등의 과정이 필요하고, 증폭된 PCR 산물이 작은 와포자충의 DNA인지 확인하기 위해 추가로 탐침자(probes)를 제작하여 서던부합법(southern hybridization) 등을 수행해야 하는 단점이 있다. PCR의 이러한 단점들은 다른 미생물들을 검출하기 위한 PCR법에서도 많이 보고되어진 것으로, 이를 보완하기 위해 real-time PCR에 대한 연구가 많이 수행되어져 왔다<sup>15-17)</sup>.

이에 본 연구에서는 작은 와포자충의 *hsp70* 유전자

에 대해 특이성을 갖는 개시자(primers)와 형광 탐침자(fluorescent probes)를 제작하여 활성을 판정할 수 있음과 동시에 높은 검출 민감도를 갖는 real-time RT-PCR법을 개발하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 작은 와포자충의 난포낭

당액과 퍼콜을 이용한 농도구배원심분리법(sucrose and percoll density gradient centrifugation)으로 분리한 후 2.5% 인산염완충식염수에 부유시킨 작은 와포자충의 난포낭(Waterborne, New Orleans, LA, USA)을 구입하여 사용하거나, 즉시 사용하지 못할 경우 4~8°C 상태로 사용할 때까지 보관하였다.

### 2.2. 시료의 염색 및 동정

웰슬라이드에서 건조된 시료에 메틸알코올을 떨어 뜨려 고정시킨 후 면역형광염색키트(Aqua-glo G/C, Waterborne)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 형광염색하고 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액으로 핵을 염색한 후 관찰하였다. 형광·미분간섭대비 현미경(Eclipse E800 model, Nikon, Japan)으로 최소 400배 총배율로 면역형광검사(exciter filter, 450~490 nm; dichroic beam-splitting mirror, 510 nm; barrier or suppression filter, 515~520 nm), 핵염색검사(exciter filter, 340~380 nm; dichroic beam-splitting mirror, 400 nm; barrier or suppression filter, 420 nm), 그리고 미분간섭대비(DIC) 관찰을 통해 작은 와포자충의 난포낭을 확인하였다. 웰 전체를 관찰하여 형광항체염색에 특이형광을 나타내는 원형의 입자로 4~6 μm의 전체가 밝은 초록형광을 나타내며 테두리가 보다 선명할 경우 작은 와포자충으로 추정하였고, 미분간섭현미경을 통해 내부에 전형적인 내부구조(1~4개의 스포로조이트)가 관찰되는지 여부와 자외선 필터를 이용하여 관찰된 DAPI에 의한 핵염색 결과(물체의 내부에 1~4개의 밝고 선명한 핵이 관찰되거나, 내부 염색이 외부보다 짙은 하늘색을 띠는 경우 양성)를 참고하여 작은 와포자충 양성 여부를 판정하였다.

### 2.3. RNA 추출

작은 와포자충의 난포낭으로부터 면역자기분리체 키트(Dynabeads mRNA DIRECT™ kit, Dynal Bio-

tech, Oslo, Norway)를 이용하여 제조사의 추천 방법에 따라 mRNA를 추출하였다. 작은 와포자충의 난포낭으로부터 *hsp70* mRNA의 전사를 유도하기 위해 42°C에서 20분 동안 열로 자극을 주었다. 반응이 끝나고 lysis/binding buffer(Dynal Biotech) 200 µL를 첨가한 후 액체 질소에서 1분간 얼리고 65°C 항온수조에서 1분간 녹이는 과정을 총 6회 반복하였다. 20 µL Dynabeads oligo (dT)<sub>25</sub>-bead(Dynal Biotech)를 넣고 30°C에서 30분간 혼합기(Sample Mixer, MXICI model, Dynal Biotech)에서 반응시킨 후 자기입자농축기를 이용하여 자기입자와 핵산을 분리하였고 Washing buffer A와 Washing buffer B로 세척하였다. 세척이 끝난 후 ice-cold 10 mM Tris-HCl 50 µL를 넣고 80°C에서 2분간 반응시켜 mRNA를 자성체로부터 분리하였다. 분리한 mRNA에 DNase I(ABgene, Epsom, UK)을 0.01 U/µL의 농도로 처리하여 DNA를 완전히 제거한 후 cDNA를 만들기 위한 RT-PCR 반응과 real-time RT-PCR의 주형으로 사용하였다.

#### 2.4. RT-PCR

RT-PCR을 수행하기 위해 추출한 mRNA를 주형으로 Sensiscript RT 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 역전사를 실시하였다. 간단히 요약하면, 10× RT buffer 2 µL, dNTP 혼합액 2 µL, 역전사효소(reverse transcriptase) 1 µL와 작은 와포자충의 *hsp70* 유전자에 대한 특이 개시자(Table 1 and Fig. 1) 2 µL 그리고 10 U RNase inhibitor 1 µL(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)를 넣고 추출한 mRNA 5 µL를 섞은 후 RNase-free water(Qiagen)를 최종 부피가 20 µL가 되도록 넣어주었다. 역전사를 위해 37°C에서 60분간 반응시킨 후 합성된 cDNA를 이용하여 *hsp70*에 대한 PCR을 수행하였다. 합성된 *hsp70*에 대한 cDNA 3 µL, PCR용 개시자(Table 1) 10 pmoles/µL를 각각 2 µL, 2×Taq DNA polymerase premixture (Taq DNA polymerase 0.1 units/µL, dATP, dGTP, dCTP, 그리고 dTTP 각각 0.5 mM, 4 mM MgCl<sub>2</sub>; GENET BIO, Nonsan, Republic of Korea) 10 µL를 넣고 nuclease free water(Ambion, Inc., Austin, TX, USA) 3 µL를 넣어 최종 부피가 20 µL가 되도록 하였다. 이를 94°C에서 5분간 반응 후, 94°C에서 1분 동안 변성(denaturation) 반응, 51°C에서 1분 동안 붙임(annealing) 반응, 72°C에서 1분간 증폭 확장(extension) 반응을 총 45회 반복하고 최종적으로 72

°C에서 7분간 반응시켰으며, GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems, Foster City, CA)기기를 사용하였다.

#### 2.5. Real-time RT-PCR

실시간 역전사 중합효소 연쇄반응은 7500 Real-time PCR System(Applied Biosystems)을 사용하여 수행하였다. 앞서 역전사 방법으로부터 합성된 cDNA를 주형으로 하였으며, PCR 반응액은 2×PCR Master Mix (Applied Biosystems) 25 µL, 개시자 각각 900 nM와 형광탐침자 250 nM(Table 1 and Fig. 1), 그리고 cDNA 주형 5 µL를 넣고 nuclease free water (Ambion)를 총 50 µL가 되도록 넣어주었다. 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 반응시킨 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분씩 40회 반응시키는 조건으로 증폭하였다 (Fig. 2).

### 3. 결과 및 고찰

작은 와포자충은 수계에 매우 낮은 농도로 존재하므로 이를 검출하기가 매우 까다로우며, 특히 검출된 작은 와포자충의 난포낭이 활성이 있는지의 여부를 파악하기 위해 많은 단계의 추가실험이 필요하다. 이에 본 연구에서는 활성이 있는 작은 와포자충을 보다 쉽고 정확하게 검출하고자 작은 와포자충의 *hsp70* mRNA를 검출할 수 있는 real-time RT-PCR법을 개발하였다. 작은 와포자충의 *hsp70* 유전자 부위(GenBank accession number, U11761)<sup>11)</sup>를 대상으로 개시자와 탐침자를 Primer Express software version 3.0(Applied Biosystems)을 이용하여 디자인하였으며(Table 1 and Fig. 1), real-time RT-PCR 조건을 정립하였다(Fig. 2a and 2c). 현재 수계에서 작은 와포자충을 검출하기 위해 사용되고 있는 방법은 자성 항체를 이용한 면역형광염색법에 기초한 방법으로, 높은 특이성과 1개의 난포낭까지 검출이 가능한 민감도를 갖는다. 그러나 현미경을 통해 육안으로 난포낭 내의 스포로조이트 존재여부를 관찰함으로써 간접적으로 활성을 추정할 뿐 활성 여부를 직접 판단할 수 없다는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하고자 작은 와포자충의 난포낭을 인위적으로 탈낭시키는 방법(*in vivo* excystation)이나 HCT-8 세포에 작은 와포자충을 감염시킨 후 RT-PCR 등의 방법으로 감염성 유무를 판단하거나 증식과정에서 관찰되는 스포로조이트나 메로조이트 등의 관찰 여부로 활성을

**Table 1.** Primers and probe of RT-PCR and real-time RT-PCR for detecting *Cryptosporidium parvum* hsp70 mRNA.

Target	Primers and probes		Nucleotide sequences(5'-3')
<i>Cryptosporidium parvum</i> hsp70 gene	RT-PCR	F	AAATGGTGAGCAATCCTCTG
		R	CTTGCTGCTCTTACCAGTAC
	Real-time RT-PCR	F	GGTGAGAGAGCCATGACT
		R	GTGCTGGTGAATACCATCAAG
		P	TCCTCGGAAAGTTCCA

F, forward; R, reverse; P, probe

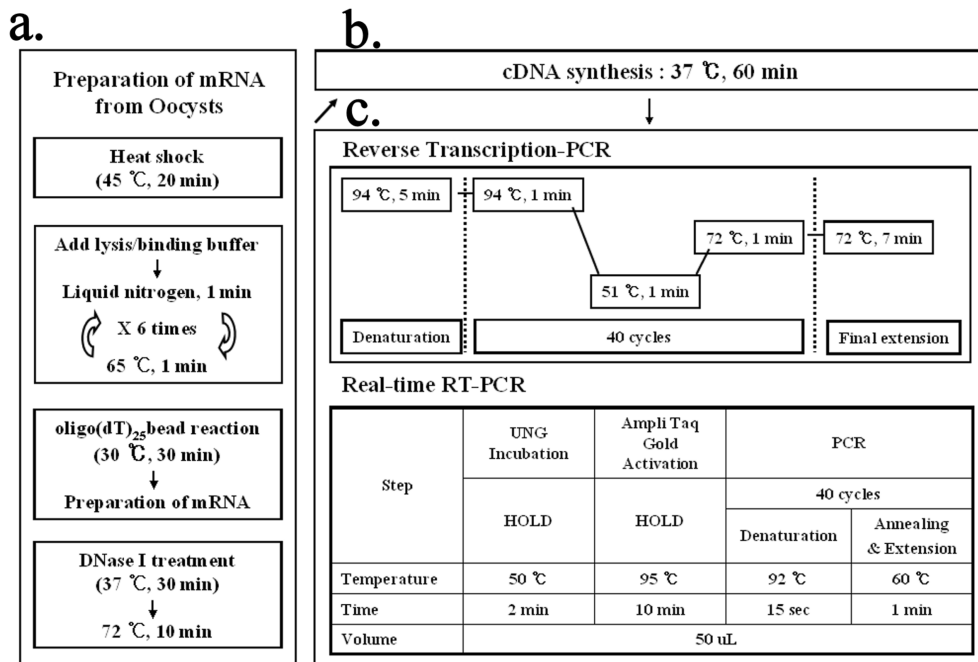
```

1201 tctcactaga taatagttt atttcattt aactgattta ataaattctt atcgaattc
1261 aaaaaacaa gatgacatca tctgaaggtc cagctattgg tattgattta ggtaccacat
1321 actcatgtgt tgggtgatgg agaaacgata ctgtagatat tgttccaaac gatcaaggta
1381 accgtacaac accatcattat gtagcattta cagaaactga gcgtcttatt ggtgatgcag
1441 caaagaacca agttgctaga aaccagaaa atacagtttt tgatgctaaa cgtcttattg
1501 gtagaaagt tgatgacag gcagtacaaa gtgatatgac tcaactggcca tttaaagttag
1561 ttagaggctc aaaggacaag ccaatcatca gtgtaacta cttagggtgaa aagaaggaat
1621 tccatgctga agaaatttct gctatggctt tacaaaagat gaaggagatc tctgaagcat
1681 acttgggtcg ccaaattaag aacgctgtag ttactgttcc agcttatttc aatgactcac
1741 agcgtcaagc acaaaaggat gcaggtgcaa ttgctggttt gaatgtaatg agaatcatta
1801 acgagccaac tgcagctgct attgcttatg gtcttgataa gaaaggaact ggcgagagaa
1861 atgtattgat cttcgattta ggtggtggtta ctttgatgt atcattatta actattgaag
1921 atggtatttt tgaagttaa gctaccgctg gtgatactca cttgggtggt gaagattttg
1981 ataacagact cgtagaattc tgtgtacaag atttcaagag aaagaataga ggtatggatt
2041 taacctcaaa tgctagagct ttaagaagac tcagaactca atgcgagcgt gcaagagaaa
2101 ctttgtcacc ttctactcaa gctacaattg agttagattc actctatgaa ggtattgatt
2161 attcagttgc catcagtaga cttagattcg aagaactctg cgccgattac ttccgtgcaa
2221 ctttagctcc agttgagaaa gtactcaagg atgctggtat ggacaagaga tctgtacatg
2281 atgttgattt ggttgggtgt tctacacgta ttccaaaggt tcaggccttg attcaggaat
2341 tctttaacgg taaagagcca tgcaaaqcaa tcaatccaga cgaagctggt gcttatgggt
2401 ctgctgtaca agctgctatc ttaaatgggt agcaatcctc tgpcgtacag gatctcttat
2461 tattggatgt tgcctcatta tcaactgggt tagaaactgc tgggtggtgt atgaccaagc
2521 ttattgaacg taatacaact atcccagcaa agaagacaca agtcttcaact acttatgctg
2581 ataaccagag tgggtgcttg atccaagttt atgaggggtga gagagccatg actpaggata
2641 accatdtcct cggaaagtcc calcttgat gtattccacc agcacpaaga ggtgtaccac
2701 aaattgaagt cacctttgat attgatgcta atggtatctt gaatgtgtct gctgttgata
2761 agagtactgg taagagcagc aagatcacta ttactaacga taagggtaga ttatcaaagg
2821 tatctgatat tgaacgatg gttaatgatg ctgagaaata caagggtgag gatgagcaga
2881 acagacttaa gattgaggct aagaactctt tggagaacta cctctataac atgaggaaca
2941 ccataccaaga accaaagggt aaggaaaagc tttctcaatc tgaattgat gaggtgaga
3001 agaagatcaa ggatgctctt gactggctcg agcacaacca aactgctgaa aaggacgagt
3061 ttgaacatca acaaaaggag attgaaactc atatgaatcc actcatgatg aagatctact
3121 ctgctgaggg tggatgcca ggtggaatgc cagggtggtat gccagggcgt atgccaggtg
3181 gaatgccagg tggatgcca ggtggaatgc caggcgggtat gccaggtggt atgccaggtg
3241 gtatgccagg tggatgcca ggatctaatt gtccaactgt tgaagaggtc gactaattat
3301 tttagtcacc aaaaaaactc actcaaatg gaaagttaag aactatttac acactttcaa
    
```

**Fig. 1.** Location of primers and probe for RT-PCR and real-time RT-PCR. Blue shaded box, primers for RT-PCR; red shaded box, primers for real-time RT-PCR; green shaded box, probes for real-time RT-PCR; GenBank accession number of *Cryptosporidium parvum* hsp70 gene, U11761.

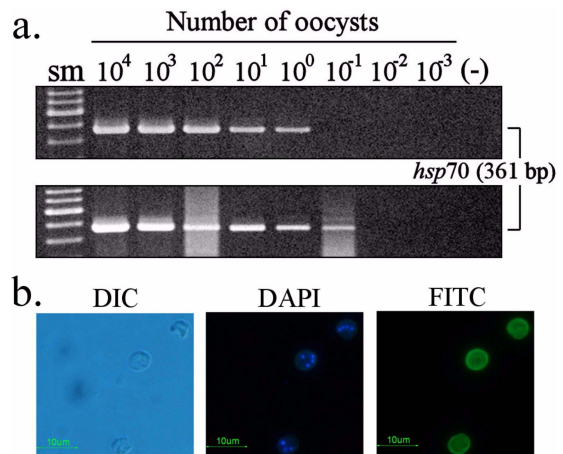
판단하는 방법 등에 관한 연구가 이루어지고 있다. 국립환경과학원(2004)과 박 등(2005)의 보고에 따르면 HCT-8 세포에 작은 외포자충의 난포낭을 감염시켜 활성 여부를 판단한 경우와 작은 외포자충의 난포낭에 열로 자극을 가하여 유도, 전사된 hsp70 mRNA를 RT-PCR로 증폭시켜 활성 여부를 판단한 경우의 결과는 동일했다고 한다<sup>13,18)</sup>.

박 등(2005)의 RT-PCR법은 1개의 난포낭까지 검출이 가능한 민감도가 높은 방법이므로, 본 연구에서 개발한 real-time RT-PCR법의 민감도와 그 민감도를 비교하고자 하였다. 박 등(2005)이 제안한 방법(Fig. 2a and 2b)에 따라 10진 희석된 작은 외포자충의 난포낭에 열 자극을 가하거나 또는 가하지 않은 경우로부터 mRNA를 추출하여 RT-PCR을 수행한 결과 열 자극을



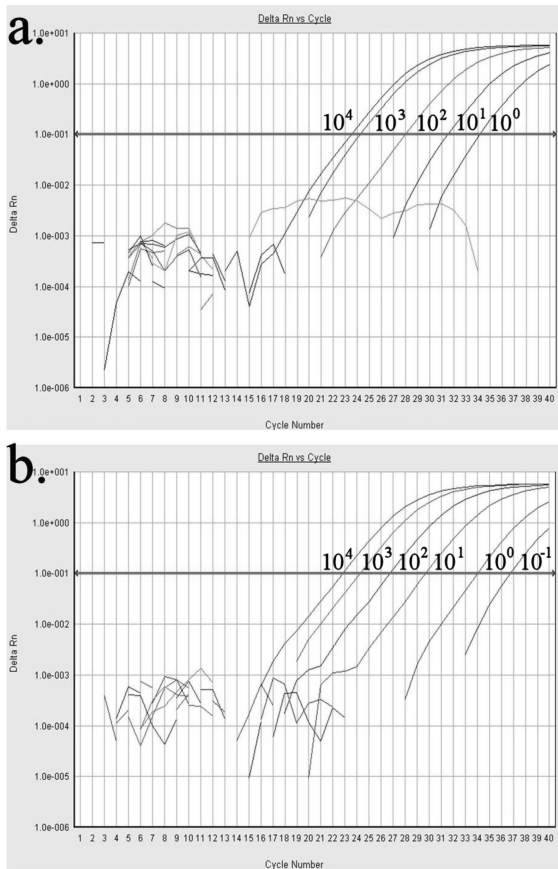
**Fig. 2.** Schematic diagram of RT-PCR and real-time RT-PCR for amplification of *hsp70* mRNA. a. preparation of *hsp70* mRNA; b. reverse transcription; c. RT-PCR and real-time RT-PCR.

가하지 않은 경우 작은 와포자충의 난포낭 1개체 수준의 *hsp70* mRNA를 검출할 수 있었으며, 열로 자극을 가한 경우 민감도가 상승하여 난포낭  $10^{-1}$  개체 수준으로부터 전사된 *hsp70* mRNA까지 검출이 가능하였다 (Fig. 3a). 10진 희석한 작은 와포자충의 난포낭 시료를 염색하고 개수하여 10진 희석 시료에 난포낭이 존재함을 확인하였다(Fig. 3b;  $10^2$ 개 =  $171.5 \pm 51.6$ 개,  $10^1$ 개 =  $19.5 \pm 3.5$ 개,  $10^0$  희석  $1.5 \pm 0.7$ 개). 본 연구에서 개발한 real-time RT-PCR을 수행한 결과, 열 자극을 가하지 않은 경우 1개체의 난포낭이 있는 시료까지 검출이 가능하였으며(Fig. 4a), 열 자극을 가한 경우 검출 민감도가 상승하여  $10^{-1}$ 개의 난포낭으로부터 전사된 *hsp70* mRNA까지 검출이 가능하였다(Fig. 4b). 이상의 결과로부터 본 연구에서 개발한 real-time RT-PCR법이 박 등(2005)이 제안한 RT-PCR법과 동일한 민감도를 갖고 있음을 알 수 있었다. 일반적으로 real-time PCR이 일반 PCR보다 민감도가 더 높다고 알려져 있으나 본 연구에서는 유사한 민감도를 나타내었다. 이는 이미 보고된 RT-PCR의 조건과 본 연구의 real-time RT-PCR의 분석 조건이 최적화 되어있었기 때문이라고 생각된다. 그러나 RT-PCR법은 매우 민감한 방법임에도 불구하고, DNA의 증폭여부를 판단하기 위해 아가로즈 젤을



**Fig. 3.** Increase of detection sensitivity of RT-PCR by heat shock on the oocysts of *Cryptosporidium parvum*. a. oocysts were 10-fold diluted in phosphate buffered saline and heat-shocked (lower row) or not (upper row). mRNA were extracted and RT-PCR was conducted; b. representative images to prove the presence of the oocysts in the diluted samples.

만들고 ethidium bromide 등의 발암성 염료로 염색하고 PCR 산물을 전기영동해야 하며, 자외선을 조사하여 관찰해야 하는 등 복잡한 post-PCR 실험단계가 필요하



**Fig. 4.** Amplification of *hsp70* mRNA of *Cryptosporidium parvum* by real-time RT-PCR and the increase of detection sensitivity by giving heat shock. Oocysts were 10-fold diluted in phosphate buffered saline and heat-shocked (a) or not (b). mRNA were extracted and real-time RT-PCR was conducted.

다는 단점이 있다<sup>19,20</sup>). 또한 *hsp70*의 mRNA의 존재 여부만 알 수 있을 뿐 어느 정도의 *hsp70* mRNA가 증폭되었는지, 즉 시료에 어느 정도의 작은 와포자충의 난포낭이 존재했는지 정량할 수 없다는 단점이 있다. 반면 real-time RT-PCR은 RT-PCR처럼 RNA로부터 DNA를 증폭시킴과 동시에, 증폭된 DNA에 특이적으로 결합할 수 있는 형광 탐침자를 이용하므로 증폭된 DNA의 양을 자동화하여 검출할 수 있다는 장점과 더불어 정량까지 가능한 방법이다.

본 연구에서 개발한 real-time RT-PCR법은 환경 수 시료로부터 작은 와포자충을 검출하고 정량하기 위한 분석에 실제 적용이 가능할 것이라고 판단되며, 아울러 보다 정확하게 감염성 여부를 판단하고, 이를 정량하기 위해 HCT-8 등의 세포를 이용한 세포배양법과 연계한

검출방법 연구에 좋은 자료가 될 수 있을 것이라고 판단된다. 아울러 작은 와포자충과 더불어 중요한 수인성 원생동물인 람블편모충을 검출하기 위한 real-time RT-PCR법의 개발이 필요할 것으로 판단되며, 이 두 가지를 동시에 검출할 수 있는 방법에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

#### 4. 결 론

1. 본 연구에서 작은 와포자충을 검출하고자 개발한 real-time RT-PCR법은 열 쇼크를 주었을 때  $10^{-1}$  개의 난포낭 수준에서 전사된 *hsp70* mRNA까지 검출이 가능했다.

2. 본 방법으로 작은 와포자충의 활성을 간접적으로 판단할 수 있었다.

3. 본 연구에서 개발한 real-time RT-PCR법은 작은 와포자충의 활성을 직접 판단할 수 있는 세포배양연계법 개발에 응용이 가능할 것으로 판단된다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국수자원공사 수자원연구원 수돗물분석 연구센터에서 수행되었습니다. 본 논문을 세심하게 살펴주신 정상기 박사님께 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. J.T. Lisle and J.B. Rose, *J Water Supply Res Technol Aqua*, **1995**, 44, 103-117.
2. A.C. Moore, B.L. Herwaldt, G.F. Craun, R.L. Calderon, A.K. Highsmith, and D.D. Juranek, *J Am Water Works Assoc*, **1994**, 86, 87-99.
3. W.R. Mac Kenzi, N.J. Hoxie, M.E. Proctor, M.S. Gradus, K.A. Blair, D.E. Peterson, J.J. Kazmierczak, D.G. Addiss, K.R. Fox, J.B. Rose and J.P. Davis, *N Eng J Med*, **1994**, 331, 161-167.
4. T. Yamazaki, N. Sasaki, S. Takahashi, A. Satomi, G. Hashikita, F. Oki, A. Itabashi, K. Hirayama and E. Hori, *Kansenshogaku Zasshi*, **1997**, 71, 1031-1036.
5. 김윤희, 이순화, 이철희, *대한환경공학회지*, **2006**, 28, 843-851.
6. 이복영, 김도연, 조은주, 이의광, 오세중, 이채근, 하영철, *한국물환경학회지*, **2000**, 16, 595-608.
7. W.Q. Betancourt and J.B. Rose, *Vet Parasitol*, **2004**, 26, 219-234.

8. U.S. Environmental Protection Agency, **2001**, EPA-821-R-01-025
9. S.M. Caccio, *Acta Microbiol Pol*, **2003**, 52 (Suppl.), 23-34.
10. D.W. Johnson, N.J. Pieniazek, D.W. Griffin, L. Misener and J.B. Rose, *Appl Environ Microbiol*, **1995**, 61, 3849-3855.
11. P.A. Rochelle, R. De Leon, M.H. Stewart and R.L. Wolfe, *Appl Environ Microbiol*, **1997**, 63, 106-114.
12. D.G. Di Giovanni and M.W. LeChevallier, *Appl Environ Microbiol*, **2005**, 71, 1495-1500.
13. 박상정, 유재란, 김종민, 정영희, 정현미, *대한상하수도학회 2005년 춘계 학술발표회 논문집*, **2005**, F-9, 54-59.
14. J. Slapeta and J.S. Keithly, *Eukaryot Cell*, **2004**, 3, 483-494.
15. J.E. Achenbach, C.L. Topliff, V.B. Vassilev, R.O. Donis, K.M. Eskridge, and C.L. Kelling, *J Virol Methods*, **2004**, 121, 1-6.
16. E.M. Gallagher and A.B. Margolin, *J Virol Methods*, **2007**, 139, 195-202.
17. N.T. Goldiwala, A. Vandewalle, H.D. Ward and B.A. Leav, *Appl Environ Microbiol*, **2006**, 72, 4484-4488.
18. 국립환경연구원(현 국립환경과학원), **2004**, 연구용역최종보고서.
19. C. Logan, J.J. O'Leary and N. O'Sullivan, *J Clin Microbiol*, **2006**, 44, 3189-3195.
20. H. Tani, T. Kanagawa, S. Kurata, T. Teramura, K. Nakamura, S. Tsuneda and N. Noda, *Anal Chem*, **2007**, 79, 974-979.