

[단보, Short communication]

# Digital polymerase chain reaction을 이용한 바지락 기생충 *Perkinsus olseni*의 진단과 정량 가능성

김승현, 자오비원, 박경일

군산대학교 해양과학대학 수산생명의학전공

## Diagnostic potential of digital polymerase chain reaction for quantification of the protozoan parasite *Perkinsus olseni* in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*

Seung-Hyeon Kim, Biyun Zhao and Kyung-Il Park

Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University

### ABSTRACT

The purpose of this study was to test the potential of digital PCR (dPCR) for diagnosing *Perkinsus olseni*. dPCR is currently one of the most effective molecular diagnosis techniques, as it is capable of quantifying the target sequence without a standard. Here, a primer pair and a probe were developed in the non-transcribed spacer region for diagnosis of *P. olseni*. In the sensitivity and specificity test, dPCR was able to detect as little as one *P. olseni* trophozoite, and could discriminate *P. olseni* from *P. marinus*. The number of *P. olseni* cells measured by dPCR was very similar to that determined by conventional cell counting. In conclusion, this study confirms that *P. olseni* can be quantified using dPCR. Additional validation is needed to access the efficiency of the technique in host tissues or environmental samples.

**Key words:** dPCR, quantification, *Perkinsus olseni*, *Ruditapes philippinarum*

### 서 론

Digital PCR (dPCR)은 현재까지 알려진 기술 중 가장 효과적인 분자진단기술 중 하나이다 (Huggett *et al.*, 2015). 한 개의 시료 중 숫자 미상의 핵산에 프라이머가 부착하여 역시 숫자 미상으로 증폭된 핵산을 전기영동을 통해 정성적으로 진단하는 기존의 “아날로그” PCR 방식에 비해 이 기법은 1개 시료의 DNA 추출물을 1만개 이상의 partition에 분배하고 그 안에 DNA 가닥이 최소한 1개씩 위치하도록 조성한 다음, primer와 probe를 이용하여 각 partition에 대해 양성과 음

성을 가려냄으로써 결과적으로 1개의 시료 중 양성 핵산에 대한 copy 수를 정량하므로 이를 “디지털 PCR”이라한다 (Vogelstein and Kinzier, 1999; Huggett *et al.*, 2014).

dPCR 수행 시 각 partition의 양성반응과 음성반응의 결과는 프라이송분포 (Poisson distribution)를 통해 target DNA의 copy 수를 결정하기 때문에 기존의 정량 PCR과는 달리 표준곡선 없이 절대정량이 가능하다 (Huggett *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018). 또한 수많은 partition으로 쪼개어 PCR 반응을 진행하기 때문에 기존의 qPCR보다 높은 민감도와 정확도를 보여주며, PCR 효율에 따른 영향을 받지 않아 항상 일정한 결과를 얻을 수 있다. 최근에는 단일 target 뿐만 아니라 다수의 target에 대해 1회 반응으로 진단할 수 있는 기술이 개발됨으로써 병원체 진단의 획기적인 기술로 평가받고 있다 (Whale *et al.*, 2016; Zonta *et al.*, 2016). dPCR은 시료를 partition에 분배하는 방법에 따라 droplet과 chip 방식 두 가지가 있으며 최근에는 이 두 가지의 장점을 이용한 Clarity™ dPCR이 개발되어 이용되고 있다 (Low *et al.*, 2016; Kahyo *et al.*, 2017).

단세포성 기생충인 *Perkinsus olseni*는 호주와 유럽에서 패

Received: December 23, 2019; Revised: December 24, 2019;  
Accepted: December 26, 2019

Corresponding author: Kyung-Il Park

Tel: +82 (63) 469-1882, e-mail: kipark@kunsan.ac.kr  
1225-3480/24743

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

류의 폐사를 유발하는 것으로 알려져 있는 국제동물보건기구 (World Organisation for Animal Health, OIE) 의 지정 병원체이다 (Villalba *et al.*, 2004). 아시아에서는 처음으로 Choi and Park (1997) 이 우리나라 서남해안에 분포하는 바지락에서 그 존재를 보고하였으며, 우리나라 동해안을 제외한 대부분의 해역에 서식하는 바지락에서 병리적 위해성을 가진 병원체로 알려져 있다 (Park and Choi, 2001). *P. olseni*의 진단 방법은 병리조직학적 방법, Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM) 방법, 항원-항체 반응을 이용한 방법, PCR 방법 등이 있다 (Powell *et al.*, 1993; Fisher and Oliver, 1996; Montes *et al.*, 2002; Moss *et al.*, 2006; Moss, 2007; OIE, 2019). 이들 방법 중 RFTM-2M NaOH 방법과 real-time PCR은 *P. olseni*를 정량할 수 있는 방법으로 널리 이용되고 있다.

RFTM-2M NaOH법은 분석 시 시료를 FTM에 2주가량 배양하여 휴면포자를 발생시키고 NaOH로 숙주 조직을 용해시킨 다음 포자를 계수하는 방식으로 수주의 시간이 소요되는데 점과 real-time PCR은 정량 시 표준곡선을 제작하기 위한 표준 세포의 확보가 필요하다는 단점이 있다. 따라서 본 실험은 Clarity™ dPCR법을 이용하여 신속하고 용이한 *P. olseni*의 정량이 가능한지 확인하기 위하여 실시되었다.

## 재료 및 방법

### 1. *P. olseni* 진단 민감도 및 특이성

dPCR을 이용한 *P. olseni* 진단 시 이 기법의 민감도와 특이성을 확인하기 위하여 실험실에서 보유중인 *P. olseni*와 미국 ATCC에서 분양받은 *P. marinus* (#50510) 영양체를 각각 배양 후 현미경하에서 10,000 개체를 계수하고 이를 10 배씩 희석하여 최종 10,000, 1,000, 100, 10, 1 개의 세포를 확보하였다. 각 농도별 3개의 반복구로부터 AccuPrep® Genomic DNA extraction kit (K3032, Bioneer, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 실험에 이용한 primer는 *P. olseni* non-transcribed spacer region (NTS) 의 종특이적인 서열에서 개발된 Perkinsus o-NTS (F: 5'CGC TTC GTG CGA TAT TTA GTG A 3', R: 5'GCT TGC GAG CTT CTG TGT A 3')를, probe는 FAM-TCA TCA GAG CAC GCT ACG ACT TCA-BHQ-1을 이용하였다. PCR reaction mixture는 3  $\mu$ L의 template DNA, 7.5  $\mu$ L의 2 X qPCRBIO Probe Mix No-ROX, 0.75  $\mu$ L의 20 X JNmedsys solution, 0.8  $\mu$ L의 10 pmol primer set와 0.5  $\mu$ L의 10 pmol probe 및 2.45  $\mu$ L의 멸균증류수를 혼합하여 최종 15  $\mu$ L를 제조하였다. 이 혼합액을 auto loader를 통해 chip tube (Clarity™ Tube-strip 12007, JNmedsys,

Singapore) 에 분주하고 Clarity™ Sealing Enhancer (11003, JNmedsys, Singapore) 를 이용하여 밀봉하였다. PCR 조건은 95°C에서 5 분간 polymerase activation을 하였으며, 95°C에서 50 초간 denaturation과 56°C에서 90 초간 annealing 및 extension을 40 회 진행하고, 70°C에서 5 분 동안 signal enhancement 과정을 실시하였다. 이후 형광량은 Clarity™ Reader (11004, JNmedsys, Singapore)를 통해 확인 하였고, Clarity™ Software (ver. 2.0) 에서 Poission 분포식을 이용해 DNA copy수를 결정한 다음 최종적으로 *P. olseni* copy 수/ DNA ( $\mu$ L) 로 나타냈다.

### 2. dPCR을 이용한 바지락 아가미내 *P. olseni* 정량

전라북도 군산시 수산물 시장에서 구입한 바지락을 군산대 학교 어패류기생충학연구실로 옮겨 이들 중 무작위로 10개체를 선택하여 각각의 아가미를 적출하고 무게를 측정한다. 다음 면도칼을 이용하여 분쇄하고 중량을 측정하였다. 이후 dPCR을 수행하여 *P. olseni*를 정량하였다.

## 결과 및 고찰

dPCR을 이용하여 *P. olseni* 진단과 정량이 가능한지 확인하기 위한 기초 단계로서 진단기술의 특이성과 민감도를 조사하였다. 그 결과 본 연구에서 사용된 *P. olseni* 진단용 프라이머와 마커는 시료의 농도와 상관없이 *P. marinus*에 대한 위양성 (false positive) 을 나타내지 않으므로써 진단기술의 특이성이 인정되었으며, *P. olseni*에 대하여는 1개 세포까지 진단할 수 있는 민감도를 확인하였다 (Table 1). 또한 1, 10, 100, 1,000, 10,000 개로 계수된 *P. olseni*를 본 기술을 이용하여 정량한 결과 현미경을 이용해 계수된 결과와 유사한 결과를 얻음으로써 정량의 재현성과 정확성이 높음을 확인하였다. 한편, 바지락 아가미에 기생하는 *P. olseni*에 대한 정량 결과 모든 바지락이 *P. olseni*에 감염되어 있었으며, 각 시료 당 134-2,177 copies/ $\mu$ L DNA의 총체가 확인되었다. 이는 아가미 1 gram 당 17,533-293,218 copies로 환산되었다 (Table 2).

병원체에 대한 신속한 검출과 신뢰성 있는 진단 및 실시간 모니터링은 효과적인 질병치료 전략을 수립하는데 있어 매우 중요한 과제이다 (Simoska and Stevenson, 2019). 수산양식에 있어서도 신속한 병원체 진단은 효과적인 질병 관리를 위해서는 필수적인 요소로써 임상적 증상이 나타나거나 아임상적 상태 (sub-clinical) 에서 질병 감염의 확인이나 수계에 존재하는 병원체의 조기진단은 성공적인 양식을 위해 중요하다 (Adams, 2019). 그런 의미에서 dPCR은 현재 *P. olseni* 진단에서 사용되고 있는 RFTM-2M NaOH 법이나 real-time PCR의 단점을 해소하는데 중요한 역할을 담당할 수 있을 것

**Table 1.** Sensitivity and specificity for diagnosis of *Perkinsus olseni* by dPCR, using diluted solution of *P. olseni* and *P. marinus* trophozoites.

# of cells	<i>P. olseni</i> (copies/ $\mu$ L, n = 3)	<i>P. marinus</i> (copies/ $\mu$ L, n = 3)
10,000	10,642.4 $\pm$ 304.3	0.23 $\pm$ 0.4
1,000	1,003.3 $\pm$ 4.0	0.81 $\pm$ 0.5
100	110.8 $\pm$ 15.0	0.73 $\pm$ 0.7
10	10.3 $\pm$ 0.2	0.59 $\pm$ 0.6
1	1.8 $\pm$ 0.0	0.29 $\pm$ 1.4
0	0	0

**Table 2.** Quantification by dPCR of *Perkinsus olseni* in the gill tissue of the Manila clam. stdv, standard deviation

Clam ID	copies/ $\mu$ L	Gill copies/g
1	2,177	280,570
2	1,020	293,218
3	499	114,478
4	143	12,933
5	543	50,146
6	1,036	224,150
7	1,033	153,676
8	134	17,313
9	134	17,523
10	480	203,337
Mean	720	136,734
stdv	629	110,218

으로 기대된다.

그러나 본 연구는 dPCR을 이용한 진단과 정량의 가능성을 보여주고 있을 뿐 기존 *P. olseni*의 정량 방법인 RFTM이나 2세대 qPCR를 이용한 정량 결과와의 비교를 통한 검증이 이루어지지 않았기 때문 향후 이를 보완한 실험이 필요할 것으로 판단된다. 특히 RFTM 법은 조사대상의 전체 육질부나 아가미 등 특정부위에 포함된 병원체를 정량할 수 있으며 이는 병원체의 절대량을 정량하는데 매우 유용한 방법이다. 그러나 DNA 기반 분석의 경우 수십 mg의 조직만 필요하기 때문에 *P. olseni*의 체내 분포가 일정하지 않은 점을 감안하면 조직의 균질화 등의 사전 작업을 통한 감염도의 대표성을 확보하기 위한 검증 작업이 필요할 것으로 판단된다. 또한 *Perkinsus* spp.는 빈사상태나 폐사한 개체내에서 영양체가 휴면포자로 전환될 가능성이 있으며, 갯벌 등 해양환경에서도 휴면포자가 확인되므로 (Park *et al.*, 2010) 영양체가 아닌 휴면포자로부터의 DNA 추출 효율에 대한 검증도 수행되어야 할 것으로 보인다.

결론적으로 본 연구를 통하여 dPCR 기법을 이용한 *P. olseni* 진단을 위한 기술개발 가능성을 확인하였으며 이를 확증하고 적용하기 위해서는 기존 기술과의 비교검토를 통한 검증 작업이 필요할 것으로 판단된다.

## 사 사

본 연구는 연구재단 이공분야기초연구사업 (NRF-2017R1D1A1B03028095)의 지원으로 수행되었습니다.

## REFERENCES

- Adams, A. (2019) Rapid detection and identification of fish pathogens. <http://www.fao.org/3/X4946E/x4946e0j.htm>
- Choi, K.S., Wilson, E.A., Lewis, D.H., Powell, E.N., Ray, S.M. (1989) The energetic cost of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: Quantication of the thioglycollate

- method. *Journal of Shellfish Research*, **8**: 125-131.
- Fisher, W.S., Oliver, L.M. (1996) A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *Journal of Shellfish Research*, **15**: 109-117.
- Gevensleben, H., Garcia-Murillas, I., Graeser, M.K., Schiavon, G., Osin, P., Parton, M., Smith, I.E., Ashworth, A., Turner, N.C. (2013) Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR. *Clinical Cancer Research*, **19**(12): 3276-284.
- Hayden, R.T., Gu, Z., Ingersoll, J., Abdul-Ali, D., Shi, L., Pounds, S., Caliendo, A.M. (2013) Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**(2): 540-46.
- Huggett, J.F., Cowen, S., Foy, C.A. (2014) Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clinical Chemistry*, **61**(1): 79-88.
- Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., Kitano, T.K., Hoder, M.R., Pertersen, J.F., Wyatt, P.W., Steenblock, E.R., Shan, P.H., Bousse, L.J., Troup, C.B., Mellen, J.C., Wittmann, D.K., Erndt, N.G., Cauley, T.H., Koehler, R.T., So, A.P., Dube, S., Rose, K.A., Montesclaros, L., Wang, S., Stumbo, D.P., Hodges, S.P., Romine, S., Milanovich, F.P., White, H.E., Regan, J.F., Karlin-Neumann, G.A., Hindson, C.M., Saxonov, S., Colston, B.W. (2011) High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, **83**(22): 8604-8610.
- Kahyo, T., Iwaizumi, M., Yamada, H., Tao, H., Kurachi, K., Sugimura, H. (2017) Application of digital PCR with chip-in-a-tube format to analyze *Adenomatous polyposis coli* (APC) somatic mosaicism. *Clinica Chimica Acta*, **475**: 91-96.
- Kiss, M.M., Ortoleva-Donnelly, L., Beer, N.R., Warner, J., Bailey, C.G., Colston, B.W., Rothberg, J.M., Link, D.R., Leamon, J.H. (2008) High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets. *Analytical Chemistry*, **80**(23): 8975-8981.
- Laurent-Puig, P., Pekin, D., Normand, C., Kotsopoulos, S.K., Nizard, P., Perez-Toralla, K., Rowell, R., Olson, J., Srinivasan, P., Le Corre, D., Hor, T., El Harrak, Z., Li, X., Link, D.R., Bouché, O., Emile, J.F., Landi, B., Boige, V., Hutchison, J.B., Taly, V. (2015) Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clinical Cancer Research*, **21**(5): 1087-1097.
- Li, H., Bai, R., Zhao, Z., Tao, L., Ma, M., Ji, Z., Jian, M., Ding, Z., Dai, X., Bao, F., Liu, A. (2018) Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases. *Bioscience Report*, **15**: 38(6):BSR20181170. doi: 10.1042/BSR20181170. PMID: 30341241; PMCID: PMC6240714.
- Li, X., Liu, Y., Shi, W., Xu, H., Hu, H., Dong, Z., Zhu, G., Sun, Y., Liu, B., Gao, H., Tang, C., Liu, X. (2017) Droplet digital PCR improved the EGFR mutation diagnosis with pleural fluid samples in non-small-cell lung cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, **471**: 177-184.
- Low, H., Chan, S.J., Soo, G.H., Ling, B., Tan, E.L. (2017) Clarity™ digital PCR system: a novel platform for absolute quantification of nucleic acids. *Anal. Bioanal. Chemistry*, **409**(7): 1869-1875.
- Montes, J.F., Durfort, M., Llado, A., Garcia Valero, J. (2002) Characterization and immunolocalization of a main proteinaceous component of the cell wall of the protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Parasitology*, **124**: 477-484.
- Moss, J.A., Burrenson, E.M., Reece, K.S. (2006) Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *Journal of Shellfish Research*, **25**: 65-72.
- Moss, J.A. (2007) Characterization of exotic pathogens associated with the suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. Ph.D. Dissertation. Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary, Gloucester Point, Virginia, USA, 230 pp.
- Ottesen, E.A., Hong, J.W., Quake, S.R., Leadbetter, J.R. (2006) Microfluidic digital PCR enables multigene analysis of individual environmental bacteria. *Science*, **314**(5804): 1464-1467.
- Park, K.I., Choi, K.S. (1997) Report on the occurrence of *Perkinsus* sp. In the Manila clams, *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Aquaculture*, **10**: 227-237.
- Park, K.I., Choi, K.S. (2001) Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp., found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. *Aquaculture*, **203**: 9-22.
- Park, K.I., Yang, H.S., Kang, H.S., Cho, M., Park, K.J., Choi, K.S. (2010) Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. *Journal of Invertebrate Pathology*, **105**: 261-269.
- Powell, E.N., Wilson-Ormond, E.A., Choi, K.S. (1993) Gonadal analysis-*Cassostrea virginica* NOAA Tech. Memo. NOS ORCA, 71, pp. 11.55-11.62.
- Ray, S.M. (1966) A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinum* with suggested modifications and precautions. *Proc. National Shellfish Association*, **54**: 55-69.
- Simoska, O., Stevenson, K.J. (2019) Electrochemical sensors for rapid diagnosis of pathogens in real time. *Analyst*, **144**: 6461-6478.
- Strain, M.C., Lada, S.M., Luong, T., Rought, S.E., Gianella, S., Terry, V.H., Spina, C.A., Woelk, C.H., Richman, D.D. (2013) Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PLoS One*, **8**(4): e55943.
- Sykes, P.J., Neoh, S.H., Brisco, M.J., Hughes, E., Condon, J., Morley, A.A. (1992) Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques*, **13**(3): 444-449.

- Villalba, A., Reece, K.S., Ordas, M.C., Casa, S.M., Figueras, A. (2004) Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquatic Living Resources*, **17**: 411-432.
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (1999) Digital PCR. *PNAS*, **96** (16): 9236-9241. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9236>
- Whale, A.S., Huggett, J.F., Tzonev, S. (2016) Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification*, **10**: 15-23.
- Zonta, E., Garlan, F., Pécuchet, N., Perez-Toralla, K., Caen, O., Milbury, C., Didelot, A., Fabre, E., Blons, H., Laurent-Puig, P., Taly, V. (2016) Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations. *PLoS One*, **11**(7): e0159094.

