

발간등록번호
11-1541000-001473-01

안전 농축산물 확보를 위한
황색포도상구균 장독소 정량 분석 키트 및
위해평가 모델 개발

(Development of The Quantity analysis kit of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins and Risk Assessment Model for Producing Safe Agro and livestock products)

연구기관
한국소비자원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “안전 농축산물 확보를 위한 황색포도상구균 장독소 정량 분석 키트 및 위해평가 모델 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012 년 6 월 일

주관연구기관명 : 한국소비자원
총괄연구책임자 : 홍 준 배
협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 윤 희 정
협동연구기관명 : 한국쓰리엠
협동연구책임자 : 김 상 필
연구 원 : 황 선 영
연구 원 : 최 승 호
연구 원 : 권 가 희
연구 원 : 박 혜 림

요 약 문

I. 제 목

안전 농축산물 확보를 위한 황색포도상구균 장독소 정량 분석 키트 및 위해평가 모델 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- *Staphylococcus aureus*은 화농성질환 및 식중독의 원인균으로서, 식품위생상 중요하게 다루어지고 있으며 저항성이 강하여 공기, 토양 및 사람, 동물의 피부 등의 자연계에 광범위하게 분포하고 있어 농축산물에 쉽게 오염된다. 또한, *Clostridium botulinum*과 마찬가지로 균이 농축산물 등에서 증식하면서 생성된 독소를 섭취함으로써 발생하는 독소형 식중독균이다.
- 섭취된 독소는 단백질이지만 사람의 단백질 분해 소화효소로는 거의 분해가 되지 않고 100℃에서 30분동안 끓여도 파괴되지 않으며, 매우 안정하기 때문에 식품과 함께 섭취되어 메스꺼움, 구토, 복통, 설사 등의 전형적인 식중독 증상을 일으킨다.
- 우리나라의 관련법인 농림수산물부의 『축산물의가공기준 및 성분규격』에는 “식육(제조, 가공용 원료를 제외한다), 살균 또는 멸균처리 하였거나 더 이상의 가공, 가열조리를 하지 않고 그대로 섭취하는 가공품에서는 특성에 따라 *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7등 식중독균이 검출되어서는 아니된다.” 규정되어 있으며(국립수의과학검역원 고시 제2008-9호), 또한 보건복지부의 『식품위생법』에는 “그대로 섭취할 수 있는 샐러드, 새싹 채소 등의 ‘신선편의식품’에 대하여 *S. aureus*을 1g 당 100개 이하” 로 정하여 관리하고 있다.
- 하지만, *S. aureus*의 enterotoxin로 인한 식중독 사고를 고려해 볼 때, *S. aureus*의 enterotoxin으로 관리하는 것이 마땅하나, 이에 대한 정량법이나 독소량에 대한 위해 평가 모델은 없어 과학적인 기준설정에 어려움이 있다.
- 이에 *S. aureus* enterotoxin에 대한 과학적인 정량법 및 진단 키트를 개발하고 이에 따른 농축산물에서의 *S. aureus* 모니터링과 노출량을 평가하며, 독소생성 예측모델 개발을 통한 *S. aureus* 독소 노출량 및 인체위해용량을 산출하여 보다 과학적이고 위생적인 농축산물 생산에 기여하는 위해 미생물 관리 방안 체계를 구축하고자 한다

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. Immunoquantitative real-time PCR을 이용한 Enterotoxin 정량분석법 개발

가) 국내 분리주 및 enterotoxin 발현 균주이용 항원 및 항체 제조

- (1) Enterotoxin의 분리 및 정제
- (2) 세포융합 및 hybridoma의 선발
- (3) 제조항원 및 항체의 특이성 확인
- (4) 단클론 항체의 대량생산

나) immunoquantitative real-time PCR의 개발

- (1) Indirect 및 sandwich format의 결정
- (2) Conventional ELISA를 이용한 검증
- (3) immunoquantitative real-time PCR 확립
- (4) 시장에 판매중인 다른 SE 검출 kit와의 비교
 - VIDAS Staph Enterotoxin Test II (SET II)
 - 3MTM TECRA™ Staph Enterotoxins ID (SET ID)
- (5) Enterotoxin 을 인위적으로 접종한 식품을 이용한 유효성평가
 - 김밥 및 시유 등 실제 시료에 접종을 통한 검증

2. *S. aureus* enterotoxin 정량분석 kit의 상품화

가) Detection antibody와 Biotin의 conjugate system 확립

나) Reporter double strand DNA와 Streptoavidin substrate system 확립

다) 기타 구성시약 제조

라) kit formulation 연구

마) kit 효능평가 system 확보

바) Scale-up 연구

사) 안전성 연구

아) 시제품 생산

3. 농축산물에서의 *S. aureus*의 독소 감소를 위한 위해 평가 모델 개발

가) 도축, 도계단계에서의 *S. aureus* 오염수준 예측

나) *S. aureus* 분리 및 동정

다) PCR로 독소 발현 *S. aureus* 확인 시험

라) 농축산물의 *S. aureus* 독소의 인체위해 용량 제시

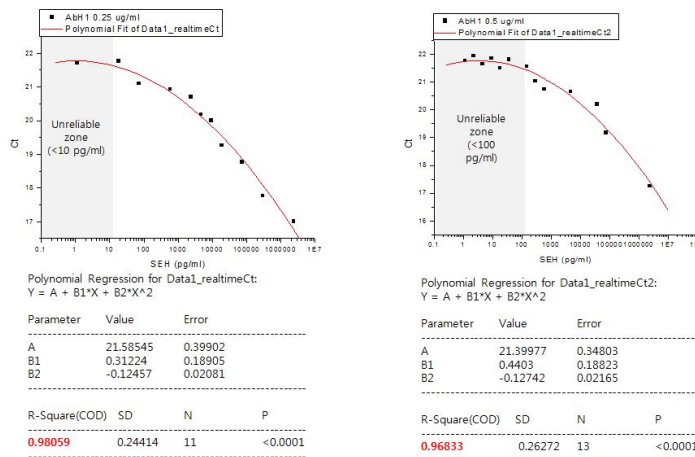
마) 농산물의 이용하여 샐러드 조리시 위해평가모델 개발

IV. 연구개발 결과 및 활용

1. 연구개발 결과

가. Immunoquantitative real time PCR을 이용한 Enterotoxin 정량분석법 개발하기 위하여 제조항원 및 항체의 특이성 확인 및 단클론 항체를 생산하였음. 항체는 현재 시판중인 키트가 없는 SEH를 포함한 총 4가지 독신 (SEA, SEC1, SEE, SEH) 을 대상으로 제작하였으며 독신 단백질의 같은 자리를 인식하는 self-binding을 피하기 위해서 OD값이 3.0이상인 것과 2.8이상 3.0미만으로 나타났던 항체를 각각 선정하였음.

나. Indirect format을 이용하여 SEH와 SEA에 대한 immunoquantitative real-time PCR을 setting하였음.



Immunoquantitative real-time PCR result of inderect format-SEA, SEH

다. 개발된 키트의 Sensitivity 및 Specificity 확인을 통한 immunoquantitative real-time PCR을 평가하였으며 기존 키트가 정성 분석만 가능하고 정량 분석이 불가능한데 반해, Immunoquantitative realtime PCR의 경우 정량검출이 가능하고, 기존 키트가 SEH의 검출을 할 수 없는데 Immunoquantitative realtime PCR은 SEH를 검출할 수 있었으며, 정량 분석도 가능하였음.

라. 개발된 *S. aureus* quantitative 진단 키트의 시제품이 제작되었으며, 검출한계는 10pg/mL의 독소까지도 검출되어 시중에 판매되고 있는 일반 ELISA 진단키트보다도 검출한계가 높았음.

마. 식품에서 오염된 *S. aureus*를 분리 및 동정하였으며, 또한 PCR로 독소발현 *S. aureus*도 확인하였음.

바. 농축산물의 *S. aureus* 저감화를 위한 위해관리 연구 및 *S. aureus*의 독소 인체의 인체위해 용량을 제시하였음.

사. 가정에서 소비자가 농산물을 이용하면서 샐러드를 만드는 과정 중에 발생될 수 있는 *S. aureus*에 대한 위해평가를 실시하였음.

2. 연구결과의 활용

가. 개발된 진단 kit 이용 신속 정량질병진단 가능

1) 본 kit를 *S. aureus* enterotoxin quantity 확인에 사용하게 되면 신속하고 정확하게 독소량을 확인하게 되면 농식품 생산 각 단계별로 중점적으로 오염원 관리를 할 수 있음.

2) 오염이 주로 이루어지는 단계를 파악함으로써 HACCP 과정 중 CCP 설정의 참고자료로 활용

나. 정량분석법 국내 확립으로 기존의 정성분석에서 탈피 모색 가능

다. 이러한 결과를 바탕으로 식품의 생산, 가공, 유통 및 소비 단계까지의 철저한 검증과 오염정도를 정확하게 알아내어 안전한 식품을 제공하고 농수산물식품에 대한 소비자의 신뢰를 쌓게 될 것임.

라. 농수축산식품의 *S. aureus* 장독소 위해평가 모델 개발로 소비자가 주방에서 조리시 안전성 확보에 기여할 수 있음.

SUMMARY

I . Project title

Development of The Quantity analysis kit of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins and Risk Assessment Model for producing Safe Agro and livestock products

II . Objectives and necessities of the project

Staphylococcus aureus is a bacterium that causes suppurative disease and food poisoning, and it is significantly treated for food safety. Because *Staphylococcus aureus* has resistance, it is found in variety of area such as in the air, soil, and on the skin of people and animals; therefore, agricultural and livestock products are easily contaminated by *Staphylococcus aureus*. Also, similar to *Clostridium botulinum*, the bacterium of *Staphylococcus aureus* proliferates in agricultural and livestock products and produces toxins. Consuming those toxins causes toxic food poisoning.

Although the toxins are proteins, the protein digesting enzymes in human hardly break down the toxins. Because they cannot be destroyed by boiling at 100°C for 30 minutes and they are very stable, consuming food contaminated by the toxins causes common food poisoning symptoms such as nausea, vomiting, abdominal pain, and diarrhea.

However, considering food poisoning accidents by enterotoxin of *S. aureus*, it is appropriate to regulate by enterotoxin of *S. aureus*. However, it is difficult to establish a scientific standard because there is no quantitative method or hazard evaluation models for the amount of the toxins.

Therefore, the study has been conducted to develop scientific quantitative method and a diagnostic kit about *S. aureus* enterotoxin and evaluated *S. aureus* monitoring and exposure dose. Using enterotoxin predict model development, we systemized the pathogen bacteria management for producing the safe agricultural and livestock products to calculate *S. aureus* enterotoxin exposure dose and human risk dose.

III. Content of Research

1. Development of enterotoxin quantitative method using Immunoquantitative real-time PCR

- A. Manufacturing antigen and antibody using enterotoxin expression and domestic wild type
 - (1) Separation and purification of enterotoxin
 - (2) Selection of cell fusion and hybridoma
 - (3) Verification of specificity of antibody and antigen
 - (4) Mass production of monoclonal antibodies.
- B. Development of Immunoquantitative real-time PCR
 - (1) Decision of indirect and sandwich format
 - (2) Verification by conventional ELISA
 - (3) Establishment of immunoquantitative real-time PCR
 - (4) Comparison with other existing SE detection kits
 - VIDAS Staph Enterotoxin Test II (SET II)
 - 3MTM TECRA™ Staph Enterotoxins ID (SET ID)
 - (5) Evaluation of effectiveness by using foods is artificially inoculated with enterotoxin
 - Verification by inoculating foods such as Kimbab and milk

2. Commercializing of *S. aureus* enterotoxin quantitative method

- A. Establishment of detection antibody and conjugate system of Biotin
- B. Establishment of Reporter double strand DNA and Streptoavidin substrate system
- C. Manufacturing of reagents
- D. Research of kit formulation
- E. Securement of system of evaluating kit effectiveness
- F. Research of Scale-up
- G. Research of safety
- H. Production of the product

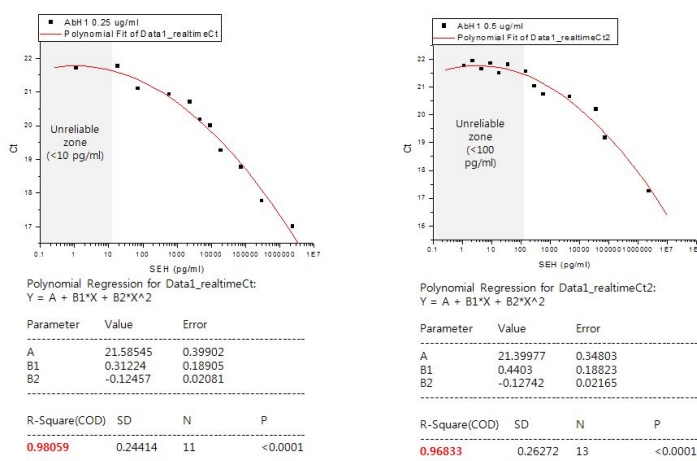
3. Development of risk assessment model for reducing *S. aureus* enterotoxin in agricultural and livestock products

- A. Prediction of *S. aureus* contamination in butchery steps
- B. Separation and identification of *S. aureus*.
- C. Test of verification of *S. aureus* enterotoxin expression using PCR
- D. Suggestion of human risk quantity of *S. aureus* enterotoxin in agricultural and livestock products
- E. Development of risk assessment model when preparing salad using agricultural and livestock products

IV. Result and Suggestion for Application

1. Result of This Research

- 1) To develop enterotoxin quantitative method using Immunoquantitative real time PCR, antigen and antibody specificity was identified monoclonal antibody was produced. Antibodies were produced for 4 toxins (SEA, SEC1, SEE, SEH). Antibodies which OD values were above 3.0 and were between 2.8 and 3.0 were selected for evading self-binding site.
- 2) Using indirect formula, Immunoquantitative real-time PCR was set using SEH and SEA.



Immunoquantitative real-time PCR result of indirect format-SEA, SEH

- 3) The diagnosis kit was evaluated through checking the sensitivity and specificity of the developed kit. Although the existing kits were only available for qualitative method and unavailable for quantitative method, the diagnosis kit was available for quantitative detection. Also, the existing kits were not able to detect SEH, the diagnosis kit was able to detect SEH, and quantitative method was also available.
- 4) Developed *S. aureus* quantitative kits were produced. Identification limit was up to 10pg/mL of enterotoxin, and identification limit was higher than ELISA diagnosis kit.
- 5) From food, contaminated *S. aureus* was separated and identified, and enterotoxin expression of *S. aureus* was identified by PCR.
- 6) To reduce *S. aureus* on agricultural products, risk assessment research was conducted and human risk quantity of *S. aureus* enterotoxin was suggested.
- 7) Risk assessment was conducted for *S. aureus* which could be found when consumers were making salad using agricultural products at home.

2. Application of the results

- A. Application of the developed diagnostic kits for the rapid detection of cause of contamination.
 - 1) When the kit is used for identifying *S. aureus* enterotoxin quantity, enterotoxin quantity can be detected rapidly and accurately and can manage the source of contamination by producing steps of agricultural products.
 - 2) By figuring out the producing steps which contamination happens, efficacious methods for define CCP of HACCP stages can be developed.
- B. Usage of quantitative diagnosis kit by substitution of qualitative kits.
- C. Through these applications, the verification and contamination level of foods can be examined from farm to table for the provision of safe foods. And further consumer creditability for safe food can be obtained.
- D. By developing risk assesment model for *S. aureus* enterotoxin in agricultural and livestock products, consumer can cook safely.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines of the project	15
Section 1. Necessities of the project	15
Chapter 2. Status and problems in related technology in domestic and overseas	21
Section 1. Status of related domestic technology	21
Section 2. Status of related overseas technology	22
Section 3. Problems of current technology status	24
Chapter 3. Contents of the project and its results	26
Section 1. Development of enterotoxin quantitative method using Immnoquantitative real-time PCR	26
Section 2. Commercializing of <i>S. aureus</i> enterotoxin quantitative method ...	67
Section 3. Development of risk assessment model for reducing <i>S. aureus</i> enterotoxin in agricultural and livestock products	86
Chapter 4. Accomplishment and subsequent contributions	120
Section 1. Accomplishment	120
Section 2. Subsequent contributions	121
Chapter 5. Application of the results	122
Section 1. Application	122
Section 2. Publications	124
Chapter 6. Informations of international technology collected	126
Chapter 7. Research facility and apparatus	128
Chapter 8. References	128

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	15
제 1 절	연구개발의 필요성	15
제 2 장	국내외 기술개발 현황	21
제 1 절	국내 현황	21
제 2 절	국외 타 연구기관의 기술 관련 현황	22
제 3 절	문제점 및 전망	24
제 4 절	연구개발의 추진체계	25
제 3 장	연구 개발 수행 내용 및 결과	26
제 1 절	Immunoquantitative real time PCR을 이용한 <i>S. aureus</i> Enterotoxin 정량분석법 개발	26
제 2 절	<i>S. aureus</i> enterotoxin 정량분석 kit의 상품화	67
제 3 절	농축산물에서의 <i>S. aureus</i> 의 장독소 감소를 위한 위해 평가 모델 개발	86
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	120
제 1 절	평가의 착안점 및 기준	120
제 2 절	관련분야의 기술발전예의 기여도	121
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	122
제 1 절	활용계획	122
제 2 절	연구개발 실적	124
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	126
제 7 장	연구시설·장비 현황	128
제 8 장	참고문헌	128

표 목차

Table 1. 원인체별 발생현황	18
Table 2. 역학조사결과 추정 원인식품 현황(건수 기준)	19
Table 3. 외국의 <i>S. aureus</i> enterotoxin 검출 kit	22
Table 4. SE toxin의 증폭에 사용한 primer서열 목록	29
Table 5. anti-SEA 항체 후보 ELISA OD값 측정 결과	44
Table 6. anti-SEC1 항체 후보 ELISA OD값 측정 결과	45
Table 7. anti-SEE 항체 후보 ELISA OD값 측정 결과	47
Table 8. anti-SEH 항체 후보 ELISA OD값 측정 결과	48
Table 9. 각 특신 별 선정된 항체 pair 및 OD 값 (붉은 색)	50
Table 10. Immunoquantitative real-time PCR kit의 민감도	69
Table 11. Immunoquantitative real-time PCR kit의 특이도	70
Table 12. 시중 유통 식품검체를 이용한 field test	71
Table 13. 교차반응 조사	72
Table 14. Prevalence and quantity of <i>S. aureus</i> in slaughterhouses	89
Table 15. <i>S. aureus</i> of log value (\pm Relative uncertainty)	90
Table 16. Qualitative analysis of <i>S. aureus</i> in Markets	92
Table 17. Amounts of dilution and rising fluids used for enumeration of <i>S. aureus</i> on hands, utensils and ready to eat food	93
Table 18. Staphylococcus(CFU) in Chicken Carcass (Before wash)	93
Table 19. Staphylococcus(CFU) in Chicken Carcass (After wash)	94
Table 20. Staphylococcus(CFU) in Breast Fillet (Before wash)	95
Table 21. Staphylococcus(CFU) in Breast Fillet (After wash)	95
Table 22. Multiplex primers information of <i>S. aureus</i> enterotoxins	96
Table 23. Multiplex PCR results for <i>S. aureus</i> enterotoxins	97
Table 24. General properties of SEs and SEIs and genomic location of the encoding genes	103
Table 25. Epidemiological details of the 31 food poisoning outbreaks	105
Table 26. Outbreaks of <i>S. aureus</i>	107
Table 27. References for Human risk quantity of <i>S. aureus</i> enterotoxins	108

Table 28. The contaminated level of <i>S. aureus</i> in fresh vegetables for salad	111
Table 29. The contaminated level of <i>S. aureus</i> in Cook's hand and kitchenware for salad	111
Table 30. Simulation model to estimate the distribution of <i>S. aureus</i> Enterotoxins in Salads	113

그림 목차

Figure 1. Microbial Risk Assessment 의 모식도	20
Figure 2. pET-28a+ 및 pET-30a+의 개요 및 cloning site 모식도	28
Figure 3. SDS PAGE and Western blotting result of SEA induction	32
Figure 4. SDS PAGE and Western blotting result of SEB induction	33
Figure 5. SDS PAGE and Western blotting result of SEC1 induction	33
Figure 6. SED 발현 및 induction 결과 - Western blotting	34
Figure 7. SDS PAGE and Western blotting result of SEE induction	34
Figure 8. SEH 발현 및 induction 결과 - SDS PAGE	35
Figure 9. SEA 정제 결과	35
Figure 10. SEB 정제 결과	36
Figure 11. SEC1 정제 결과	36
Figure 12. SEE 정제 결과	37
Figure 13. SEH 정제 결과	37
Figure 14. 항체 제작 과정	38
Figure 15. 항원투여	39
Figure 16. Feeder cell 준비 과정	39
Figure 17. Hybridoma colony	40
Figure 18. anti-SEA 항체 후보 ELISA 결과	44
Figure 19. anti-SEC1 항체 후보 ELISA 결과	45
Figure 20. anti-SEE 항체 후보 ELISA 결과	47
Figure 21. anti-SEH 항체 후보 ELISA 결과	48
Figure 22. 항체의 교차반응 여부 평가 (cross reactivity check)	50

Figure 23. Format of Immuno-realtime PCR setting	52
Figure 24. HRP-conjugated antibody 선정	53
Figure 25. Negative control plate	53
Figure 26. PCR product of probe	54
Figure 27. Real-time PCR의 Ct value 와 standard curve	55
Figure 28. Classical ELISA result of indirect format-SEH	56
Figure 29. immunoquantitative real-time PCR result of indirect format-SEH	56
Figure 30. Classical ELISA 결과 result of sandwich format-SEH	57
Figure 31. Immunoquantitative real-time PCR result of sandwich format-SEH	58
Figure 32. Classical ELISA result of indirect format-SEA	59
Figure 33. Immunoquantitative real-time PCR result of indirect format-SEA	60
Figure 34. 시중에서 판단되는 <i>S. aureus</i> 정성방법 kit와의 비교분석	62
Figure 35. 김밥 SEA 접종 시험	63
Figure 36. 김밥 SEH 접종 시험	64
Figure 37. 시유 SEA 접종 시험	64
Figure 38. 시유 SEH 접종 시험	65
Figure 39. ELISA용 8-well strip microtiter plate	67
Figure 40. Kit의 제조공정	80
Figure 41. 완성된 시제품	86
Figure 42. <i>S. aureus</i> morphology in Baird Parker-RPF	87
Figure 43. <i>S. aureus</i> morphology in Blood Agar	88
Figure 44. The occurrence of <i>S. aureus</i> during the slaughtering process of chicken by large scale slaughterhouse in 2010 fall	90
Figure 45. The occurrence of <i>S. aureus</i> during the slaughtering process of chicken by large scale slaughterhouse in 2011 spring	91
Figure 46. The occurrence of <i>S. aureus</i> between fall and spring during the slaughtering process of chicken	91
Figure 47. <i>S. aureus</i> reference strain	98
Figure 48. <i>S. aureus</i> from foods PCR results	98
Figure 49. <i>S. aureus</i> from foods PCR results	99

Figure 50. <i>S. aureus</i> from foods PCR results	99
Figure 51. <i>S. aureus</i> from foods PCR results	99
Figure 52. <i>S. aureus</i> from foods PCR results	100
Figure 53. <i>S. aureus</i> from foods PCR results	100
Figure 54. <i>S. aureus</i> from foods PCR results	100
Figure 55. <i>S. aureus</i> from chickens PCR results	101
Figure 56. <i>S. aureus</i> from chickens PCR results	101
Figure 57. <i>S. aureus</i> from chickens PCR results	102
Figure 58. <i>S. aureus</i> from chickens PCR results	102
Figure 59. The Frame-work module for salad making processing	112
Figure 60. Total contaminated level of <i>S. aureus</i> on Salad (TCsa)	116
Figure 61. Total contaminated level of <i>S. aureus</i> Enterotoxins on Salad (TCse)	117
Figure 62. The Regression sensitivities risk factors effecting for final concentration level of <i>S. aureus</i> in salad	118

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 연구 배경

- *Staphylococcus aureus*은 화농성질환 및 식중독의 원인균으로서, 식품위생상 중요하게 다루어지고 있으며 저항성이 강하여 공기, 토양 및 사람, 동물의 피부 등의 자연계에 광범위하게 분포하고 있어 농축산물에 쉽게 오염된다. 또한, *Clostridium botulinum*과 마찬가지로 균이 농축산물 등에서 증식하면서 생성된 독소를 섭취함으로써 발생하는 독소형 식중독균이다.
- 섭취된 독소는 단백질이지만 사람의 단백질 분해 소화효소로는 거의 분해가 되지 않고 100℃에서 30분동안 끓여도 파괴되지 않으며, 매우 안정하기 때문에 식품과 함께 섭취되어 메스꺼움, 구토, 복통, 설사 등의 전형적인 식중독 증상을 일으킨다.
- 하지만, *S. aureus*의 enterotoxin로 인한 식중독 사고를 고려해 볼 때, *S. aureus*의 enterotoxin으로 관리하는 것이 마땅하나, 이에 대한 정량법이나 독소량에 대한 위해 평가 모델은 없어 과학적인 기준설정에서 어려움이 있다.
- 이에 *S. aureus* enterotoxin에 대한 과학적인 정량법 및 진단 키트를 개발하고 이에 따른 농축산물에서의 *S. aureus* 모니터링과 노출량을 평가하며, 독소생성 예측모델 개발을 통한 *S. aureus* 독소 노출량 및 인체위해용량을 산출하여 보다 과학적이고 위생적인 농축산물 생산에 기여하는 위해 미생물 관리 방안 체계를 구축하고자 한다

2. 연구의 필요성

가. 기술적 측면

(1) *S. aureus* enterotoxin의 현황

- 환경 및 각종 식품에 대한 *S. aureus*의 오염도 및 enterotoxin생산주의 분포 등에 관한 연구는 많이 보고되고 있으며, 사람의 25~50%가 황색포도상구균 보균자이며, 이들 중 15~20%는 enterotoxin 생산균을 보균하고 있는 것으로 알려져 있다.
- *S. aureus* 식중독의 예방법은 축산물로의 *S. aureus*의 오염방지, 균의 증식 및 enterotoxin 생성 억제방법, 농축산물에 생산된 독소를 분해하는 방법들을 들 수 있으나 *S. aureus*는 자연계에 널리 분포되어 있을 뿐만 아니라 농축산물으로의 오염경로도 매우 다양하여 축산물이 이 균에 오염될 기회가 대

단히 높기 때문에 근본적으로 *S. aureus*의 오염방지는 거의 불가능하다.

- *S. aureus*에 의한 식중독의 발생은 축산물 장내에 오염되어 있는 *S. aureus* 균이 도축, 도계 단계 또는 유통 또는 판매단계에서 오염되었거나 농산물의 경우 채소 등에 오염되어 있거나 가공처리과정 중 시설 및 종사자의 손에 의해 오염된 STE (Staphylococcal Enterotoxin) 생산 *S. aureus* 증식에 적합한 조건하에 방치하는 등의 부주의한 취급에 기인하는 경우가 많다.
- *S. aureus* 발병균량은 대부분이 10^6 CFU/g 이상인 것으로 보고되고 있으나 10^3 CFU/g 전후라도 식중독이 발생한 사례도 있으며 발병 독소량은 임상 실험결과(사람) $20\sim 25\mu\text{g}/\text{사람}$ (STEB형)으로 축산물의 *S. aureus* 저감화를 위한 위해관리 연구로 발병했다는 보고가 있지만, 실제로는 그보다 낮은 생성량으로 발병한다고 보고되고 있다
- Wall와 Scott는 연구를 통하여 *S. aureus*균이 농도 $>1.2\times 10^6$ CFU/g의 수준 이상에서 장독소를 생성함을 인정하였으며, 이 농도를 *S. aureus*균의 Toxin 생성 가능한 수준으로 정하였으며, 그러나 이러한 장독소 생성은 균수에 비례하는 것이 아니라 온도, pH, Aw등 환경요인에 따라 많은 영향을 미치는 것으로 나타났으며 최적 조건하에서는 균수가 10^5 CFU/g 이하에서도 독소가 생성되었다.

(2) Microbial Risk Assessment(MRA)의 기본 개념

- 미생물학적 위해요소에 대한 위해성 평가 (Microbiological Risk Assessment : MRA)는 어떤 특정 병원성미생물에 의해 오염된 식품을 섭취하는 경우, 그 병원성균에 의한 감염이 일어날 가능성, 즉 위해성(Risk)을 과학적으로 그리고 정량적으로 평가하는 과정으로, 여기에 Bioinformatics 방법을 적용시킬 경우, 특정식품의 섭취에 따른 Bio-safety를 예측 또는 평가할 수 있는 모델개발이 가능하다.
- Quantitative Microbial Risk Assessment(QMRA) 일반절차는 Codex 원칙과 지침에 따라 4가지 구성요소 즉 Hazard identification, Exposure assessment, Hazard characterization (dose-response assessment), Risk characterization 으로 구성되어 있다. QMRA 는 식품에서의 미생물학적 안전성을 공중위생의 입장에서 정량적으로 평가하고자 하는 과정으로 기술적으로는 예측미생물학 모델(Predictive model)과 감염모델(Dose-Response Model)등을 이용하고, 최종적인 결과에서 불확실성과 변이성을 고려하여 해당식품의 위해성을 그 식품섭취에 의한 감염확률로 나타내는 것으로 볼 수 있다.

- 식품안전차원에서의 QMRA는 식품을 통해 발생하는 병원성미생물과 관련된 자료를 수집, 분석하고, 이 결과를 이용하여 집단 혹은 국민전체에 건강상의 영향을 결정짓는 일련의 가정이라 할 수 있다. QMRA는 과학적이고 객관적인 방법으로 식품과 관련한 안전성 평가방법론을 나타낸 것으로, 이의 목적은 소비자에게 노출될 수 있는 식품과 관련된 미생물학적 위해요소에 대한 인정, 즉 Bio-Safety를 어느 수준에서 설정할 것인가에 대한 해답을 제공하는 것이다.

나. 경제 산업적 측면

- 미국은 식중독에 의한 의료비용과 생산성 손실이 US\$ 6.6~37.1 billion의 손실이 있었으며 이중에 *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* 및 *Clostridium perfringens* 6가지 병원성세균에 의한 경제적 손실만 연간 US\$ 6.6~37.1 billion에 달한다고 보고하고 있다(Buzby와 Roberts, 1997).
- 영국에서도 5종의 병원성세균에 의한 의료비용 및 생산성 감소에 따른 경제적 효과가 연간 £ 300~700 million에 달한다고 평가하였다 (Roberts, 1996). 호주에서도 연간 11,500건의 식중독 사고에 의해 연간 A\$ 2.6 billion의 경제적 손실을 보았다고 보고하였다(ANZFA, 1999). 캐나다에서도 식중독에 의한 경제적 손실을 US\$ 1.3 billion으로 평가 한 바 있다(Todd, 1989).
- 우리나라에서는 연간 발생하는 식중독 환자는 약 1,185만명이고, 입원 환자 수는 총 15.4만명으로 전체 인구의 약 0.3%정도를 차지한다. 이러한 식중독 환자에 의한 사회·경제적 손실비용은 1조 3,107 억원으로 추정되었는데 이는 2000년도 우리나라 GNP의 0.28%, 2002년도 정부예산의 1.16%에 해당된다 (박경진, 2001).
- 이러한 경제적 손실을 예방하기 위해서는 과학적 위해평가를 실시하여야 하며, 식중독 예방을 철저히 수행하였을 때의 사업비용이 식중독에 의한 경제적 손실에 비해 크게 못 미치기 때문에 경제적 효과를 거둘 수 있다. 예를 들면 스웨덴에서는 닭고기 생산에서 *Salmonella* 균을 완벽히 제거하는데 US\$ 8million이 소요되었으나 살모넬라에 의한 식중독 치료를 위한 의료비용 등의 경제적 손실은 약 US\$28 million 정도이므로 예방조치가 훨씬 경제적이라는 것이 입증되고 있다 (Altekruse et al. 1993).
- 따라서 위해평가에 의한 생물학적 위험요인의 관리는 필요한 연구이며 *S. aureus* 뿐만 아니라 우리나라에서 빈번히 발생하는 미생물에 대한 위해평가사업은 지속적으로 수행되어야 한다.

다. 사회 문화적 측면

(1) 식중독 사고 현황

- 소비자의 식품으로 인한 식중독 사고는 매년 끊임없이 발생하고 있으며, 세균이나 바이러스에 의한 사고가 가장 많이 일어나고 있다. 그 중 세균으로 발생하는 식중독사고는 병원성대장균(Pathogenic *E. coli*)와 살모넬라(*Salmonella* spp.), 황색포도상구균(*S. aureus*)이 높은 빈도수로 나타내고 있으며, 지난 2008년도에는 *Salmonella*균보다도 많은 환자수를 발생시켰다.

Table 1. 원인체별 발생현황

Year	2003		2004		2005		2006		2007		2008		
	case	Patients	case	Patients	case	Patients	case	Patients	case	Patients	case	Patients	
Total	135	7,909	165	10,388	109	5,711	259	10,833	510	9,686	303	6,077	
Bacteria	계	70	4,112	92	6,040	73	4,406	126	6,156	187	5,499	113	3,009
	<i>E. coli</i>	6	1,502	21	2,043	15	1,883	38	2,832	62	1,945	33	1,043
	<i>Salmonella</i>	17	416	23	839	22	753	22	576	42	1,497	19	335
	<i>S. aureus</i>	13	808	11	763	16	863	32	1,924	38	843	14	535
	<i>Vibrio spp.</i>	22	732	15	300	17	663	25	547	33	634	23	312
	<i>C. jejuni</i>	1	215	3	175	1	175	1	53	7	449	6	73
	<i>B. cereus</i>	3	198	2	84	1	24	5	59	1	50	13	364
	<i>C. perfringens</i>	1	12	4	680			2	160	4	81	5	347
	<i>C. botulium</i>	1	3										
	etc	6	226	13	1,156	1	45	1	5				
viruses	Total	16	1,606	18	1,407	8	744	54	3,371	99	2,377	51	1,445
	Noro Virus	14	1,442	13	922	6	719	51	3,338	97	2,345	50	1,419
	etc	2	164	5	485	2	25	3	33	2	32	1	26
Chemical					1	8	1	14			1	3	
Toxin	2	11	3	15	1	3	1	4	3	22	2	50	
Unknown	47	2,180	52	2,926	26	550	77	1,288	221	1,788	136	1,570	

식품의약품안전청 (2009) : 최근 5년간 식중독 발생 동향 분석

- 2004년도 이후 역학조사 결과 추정된 원인식품 통계를 근거로 발생경향을 분석해 본 결과 어패류, 축산물 및 채소 가공식품에 의한 식중독 발생 급증 경향을 보였으며, 이는 생식섭취, 불충분한 가열·조리, 비위생적 음식물 취급 및 조리 후 보관 불량 등에 기인한 것으로 추정될 수 있다.

Table 2. 역학조사결과 추정 원인식품 현황(건수 기준)

Year	2004	2005	2006	2007
Total	80	50	105	225
seafood & processed foods	18	19	41	114
Live stocks & processed foods	20	9	22	45
Vegetables & processed foods	8	4	7	12
Complex food processed foods	22	13	29	40
Grains & processed foods	1	1	1	2
Waters	11	4	5	12

식품의약품안전청 (2009) : 최근 5년간 식중독 발생 동향 분석

(2) 위해평가의 현황

- 위해평가(Risk Assessment)란 위험물질(Hazard)이나 상황에 노출되어 받는 위험이나 손상의 정도 또는 가능성을 평가하는 기술이다. 이러한 위해평가는 화학물질에 대한 평가 연구는 활발히 이루어져 왔으나 상대적으로 미생물에 대한 위해평가는 비교적 취약한 편으로 CODEX에서 1999년에 정량적 위해평가의 정의를 하였고 가장 많은 연구를 수행한 미국에서도 1998년도에 달걀에서의 *Salmonella enteritidis*에 대한 정량적 미생물 위해평가를 수행하였고 (FSIS, 1998), 2001년도에는 닭고기에서의 *Campylobacter* (FDA, 2001), 즉석섭취식품에서의 *Listeria monocytogenes*(FDA & FSIS, 2001), 굴에서의 *Vibrio parahaemolyticus* (FDA, 2001), 분쇄육에서 *Escherichia coli* O157:H7(FSIS, 2001)에 대한 연구가 수행되어 비교적 최근에 연구가 활발히 이루어져 왔다.
- CODEX에서는 그림. 1과 같이 위험물질 확인(Hazard Identification), 노출평가(Exposure Assessment), 용량-반응평가(Dose-response Assessment), 위해도 확정(Risk Characterization)의 4개 구성요소로 이루어진 모델을 제시하였다. 위해평가에는 불확실성(Uncertainty)과 변이성(Variability)이 존재하기 때문에 이를 고려하여야 한다.
- 미생물 위해평가는 전통적인 화학적 위해평가와 비교할 때 식품에서의 미생물 증식과 사멸 가능성으로 훨씬 더 동적이므로 미생물의 정량적 위해평가를 위해서는 예측미생물학 (Predictive Microbiology)의 개념이 필요하다. 또한 식품의 제조 및 가공, 유통, 조리, 섭취에서 영향을 미치는 각 단계와 요인들이 고유의 다양성을 갖기 때문에 정량적 위해평가의 정확성을 향상시키기 위하여 Monte Carlo simulation과 같은 simulation modeling 방법의 사용도 요구된다.

- 따라서 전 세계적으로 예측미생물학 및 simulation modeling의 방법을 활용하여 미생물의 위해를 정량적으로 평가하기 위한 방법론 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.
- 그러나 우리나라에서는 아직 이 분야에 대한 연구가 미흡하여 기술수준이 비교적 열악한 상태이다. 우리나라는 시작단계로 자료의 수집, 평가 모델 개발 등이 겨우 이루어지고 있으며 아직까지 용어에 대한 통일도 이루어지지 못한 실정이다. 또한 미생물 위해평가를 위한 독성자료 및 역학 자료도 부족하여 연구진척에 어려움이 있는 실정이다

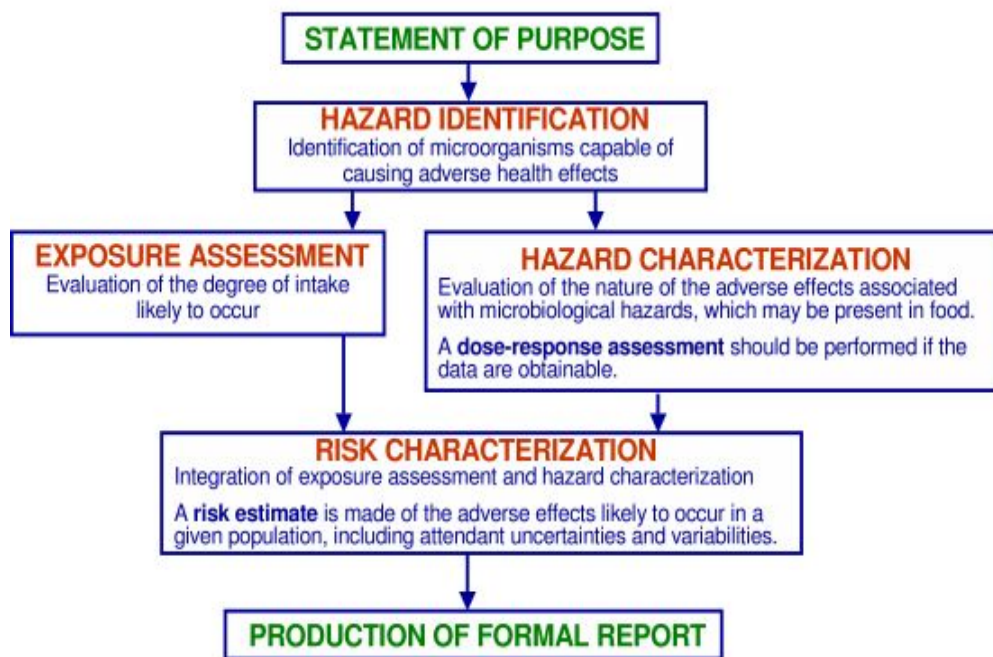


Figure 1. Microbial Risk Assessment 의 모식도

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내현황

1. *S. aureus* Enterotoxin 진단 키트 개발 현황

- *Staphylococcus aureus*의 동정이나 cell counting에만 맞추어져 있으며 현재 시장에 나와 있는 국산 *S. aureus* Enterotoxin 진단 키트제품은 없으며, 전량 외국제품을 수입하고 있다.

2. 우리나라에서의 MRA 평가 기술 개발 현황

- QMRA의 국내 연구는 미미한 실정이며, QMRA의 기본개념 정립 및 기본원칙 그리고 용어사용도 아직 통일되지 않은 상태에 있다. 정부나 산업체 모두 아직은 식품의 안전성확보 차원에서 HACCP의 현장 적용에만 더 관심이 많기 때문에 HACCP를 더욱 확대 발전시키는 QMRA 관련기술 연구나 예측모델을 이용한 예측기술 개발 등에 관한 연구는 시작조차 못하고 있는 실정이다.
- 우리나라의 농축산계에서 안전성확보에 대한 기반은 다른 선진국에 비하여 상대적으로 열세하므로 QMRA을 위한 기초자료 수집에 있어서도 상대적으로 어려움에 처해 있는 것은 사실이다. 보다 과학적인 안전성확보에 국제사회에 뒤떨어지는 결과를 가져올 수 있으므로 우리나라의 현실에 맞는 모델이 개발되어야 한다. 이로써, 국내 생산 농축산물에 대한 Bio-safety를 예측·평가할 수있을 것으로 판단된다.
- 우리나라의 MRA에 관한 연구는 Vibrio 연구가 시초이며, 유가공식품에 대한 정량적 위해평가를 수행하였으나 이들 모두 MRA에 대하여 매우 제한적으로 연구를 수행하였으나 김밥에 오염된 *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *L monocytogenes*에 대한 미생물위해평가(MRA)를 국내에서는 처음으로 실험적 분석과 통계적분석을 병용하여 과학적 위해관리를 위한 기초 자료를 마련하였다.

제 2 절 국외 타 연구기관의 기술 관련 현황

1. Enterotoxin 정량 방법현황

- 외국에서는 모두 5개의 *S. aureus* Enterotoxin의 상용화된 진단 키트가 있으며, 검출한계는 1 ~ 100ng 정도로 정성분석만을 할 수 있다.

Table 3. 외국의 *S. aureus* enterotoxin 검출 kit

제품명	원리	제조사	국가	비고 (정성, 정량유무)
VIDAS Staph Enterotoxin Test II (SET II))	Enzyme Immunoassay	Bimerieux	프랑스	정성
SET-RPLA (Staphylococcal Enterotoxins Detection Kits by Reversed Passive Latex Agglutination)	latex agglutination	Oxoid	영국	정성
Transia™ Immunoenzymatic Test for the Identification of Staphylococcal Enterotoxin	latex agglutination	Transis TM	미국	정성
RIDASCREEN® SET Total Screen for Staph Enterotoxin	ELISA	R-Biopharm AG	독일	정성
TECRA Staphylococcal Enterotoxins Identification (SET ID)	Visual Immunoassay (VIATM)	Tecra	호주	정성

2. 외국에서의 MRA 평가 기술 개발 현황

가. 미국

- 1997년 Food Safety Initiative에서 식품안전 관리책임이 있는 모든 연방기관 들에 게 Inter-agency Risk Assessment Consortium을 설립하게 하여 Predictive Model과 기타 QMRA도구들을 개발하기 위한 연구를 장려함으로써 QMRA 분야를 발전시키는 데 크게 공헌하였다. 1983년부터 미국의 National Academy of Science/National Research Council는 수인성병원균에 대한 Microbial Risk Assessment를 하였으나, 기초지식만을 제공하는데 그쳤 으나, 1995년 National Advisory Committee on Microbiological Criteria for foods (NACMCF)는 육류 및 가공육에서의 병원성미생물 오염예방을 위한 QMRA 기술개발의 중요성을 제기하였고, QMRA 개념에 대한 통일을 이루 자고 하였다. 이에 Codex에서는 1995년 병원성 미생물 등 식품의 규격·기

준 설정에 대한 Risk Assessment의 도입을 권고하였고 이 원칙과 지침은 2000년 Codex 총회에서 최종적으로 승인되었다.

- 이후 미국 등 QMRA에 대한 선진적인 연구가 진행 중인 국가에서는 식품안전에 있어 HACCP와는 별도로 과학적인 위해성 평가에 근거한 안전성 관리를 강화하기 위해서 식품 제조 공정 내 안전기준설정을 위한 Predictive Model 기술개발과 특정식품의 종합적인 Risk를 평가하기 위한 QMRA 연구를 진행하고 있다. 현재 QMRA는 국제적으로 그 개념 및 구조가 정형화되어 가고 있어 국가적인 차원에서 연구가 진행 중에 있고, 자국의 실정에 맞게 원칙과 수행방법을 구체화시키고 있으며, QMRA를 제도권 하에 두어 좀 더 과학적인 식품관련 미생물학적 위해요소 저감화를 위한 위해관리 연구를 체계적으로 관리하기 위하여 보급·확산하려는 연구를 진행하고 있다.

나. 국제식품규격위원회 (Codex Alimentarius Commission)

- Codex는 식품에서의 미생물학적 위해요인에 대한 QMRA방법론 개발을 위하여 2000년 6월 식품위생분과 32차 Codex Committee에서 "Joint FAO/WHO expert consultation on Microbiological Risk Assessment(JEMRA)"를 구성하여, 계란의 *Salmonella enteritidis*, 가금류의 *Salmonella spp.*, Ready-to-eat food의 *L. monocytogenes*에 대한 QMRA를 2001년 6월까지 수행하였다.
- Codex에서 QMRA에 관한 국제공통의 연구접근 방안을 마련한다면, SPS 협약에 근거하여 모든 식품에 대한 과학적이고 정량적인 안전성 평가자료 요구가 확대될 것이다. 현재 FAO/WHO는 risk assessment의 국제적인 protocol 개발을 추진하고 있으며, 국제 표준안이 마련되면 QMRA 연구가 활발해 질 것으로 예상된다.

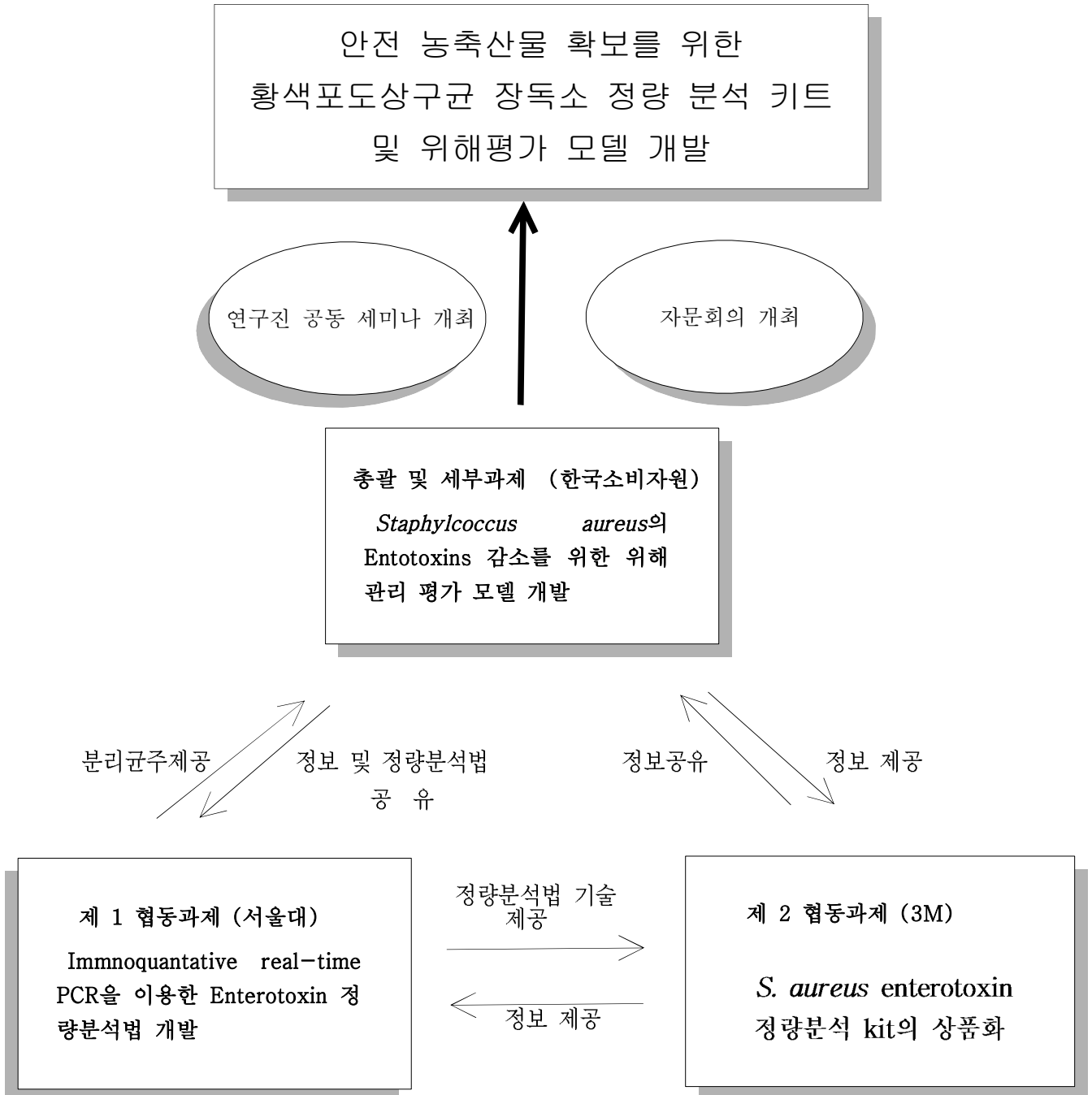
다. 기타 국가

- EU는 Scientific Steering Committees라는 기구를 중심으로 QMRA를 발전시키고 있으며, 캐나다 1장 총괄연구개발과제의 최종연구개발 목표 25다는 식품검사청(CFIA)내의 독립위원회로 Decision-Making Framework (DMF), RiskAnalysis Framework (RAF)를 설치 QMRA를 연구 운영하고 있다. 기타 호주, 일본은 Codex 및 외국의 QMRA 방법 및 결과를 그대로 혹은 보완하여 활용하고 있다.

제 3 절 문제점 및 전망

- 병원성세균 검출진단 kit 개발 회사들은 *S. aureus* Enterotoxin 검출에 반응성과 특이성이 높은 우수한 품질의 항체들을 개발하는데 많은 노력을 기울이고 있으며 최근 일부 선두기업들은 우수한 품질의 단클론 항체를 개발하여 기존에 사용하던 다클론 항체와 조합하여 특이도 및 민감도를 더욱 향상시킨 제품들의 개발에 성공하고 있다.
- 하지만 *S. aureus*로 인한 식중독 사고는 *S. aureus*의 enterotoxin 량에 의해서 발생하기 때문에 기존의 *S. aureus*의 cell counting 이나 Enterotoxin의 정성만으로는 유해성을 판단하기 어렵다. 즉, *S. aureus*의 enterotoxin 발현량으로 관리하는 것이 마땅하나, 이에 대한 정량적인 법이나 독소량에 대한 위해 평가 모델은 없어 과학적인 기준설정에 어려움이 있다.
- 따라서, 본 연구는 식중독 사고의 많은 원인이 되고 있는 농축산물에 오염된 *S. aureus*에의 enterotoxin에 대한 정량분석법과 진단 kit을 개발이 요구되며, 이에 따른 생육에 따른 독소생성 모델을 개발하는 것은 농축산물에 대한 독소형 미생물학적 식품 안전성 확보를 위한 기본 규격을 설정하는 기초 자료를 제공할 수 있다는 점에서 매우 가치 있는 연구이며 또한 국제적으로도 정량적인 독소형 모델개발의 시발점이 될 수 있다는 점에서 매우 중요하다고 사료된다.

제 4 절 연구개발의 추진체계



제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 Immunoquantitative real-time PCR을 이용한 Enterotoxin 정량분석법 개발

1. Enterotoxin의 발현 및 정제

가. 표준균주 선정

(1) Toxin별 complete cDNA 서열 GenBank accession number 목록

<u>Toxins</u>	<u>Complete CDs Acc No.</u>
sea	M18970
seb	M11118
sec	X05815
sed	M28521
see	M21319
seh	U11702

(2) 각 toxin gene을 보유하고 있는 표준균주 목록

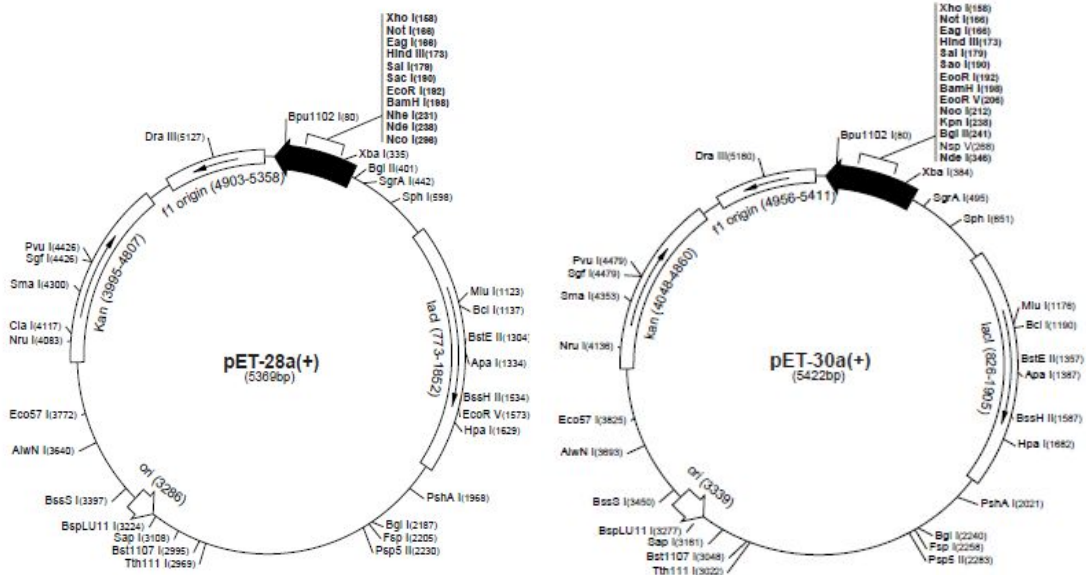
(가) 각 표준균주가 보유하고 있는 toxin 유전자

FRI 569	<u>seh</u>
FRI 472	<u>sed</u> , <u>seg</u> , <u>sei</u> , <u>sej</u> , <u>sem</u> , <u>sen</u> , <u>seo</u> , <u>ser</u>
FRI 913	<u>sea</u> , <u>sec</u> , <u>see</u> , <u>sek</u> , <u>sel</u> , <u>seq</u> , <u>tst-1</u>
MNHOCHC	<u>seb</u>
RN4220	no toxin gene

(나) 각 균주에서 추출한 genomic DNA는 밑줄로 표기 된 유전자의 증폭에 사용 되었으며 RN4220균주는 PCR시 negative control로 사용되었다. 표준균주 배양 및 genomic DNA 추출은 Tryptic soy broth에 접종한 *S. aureus* 균을 37°C에 overnight 배양한 후 실시하였다.

나. PCR primer 제작

- (1) 각 toxin 유전자의 발현 및 정제를 위하여 primer를 제작하였다.
- (2) GenBank 정보에 기초하여 각 toxin의 mature protein으로 발현 될 부위의 nucleotide서열 (signal peptide 및 stop codon을 제외한 부위의 서열)을 증폭시킬 수 있도록 고안함을 원칙으로 하였으며, 또한 5' 부위에 발현벡터에 cloning하기 위한 적절한 restriction site와 tail 부위를 추가하였다.
- (3) 발현 벡터는 IPTG induction system을 이용하기 위하여 T7 promotor를 cloning site 의 5' 부위에 보유하고 있으며, 발현 후 정제에 사용하게 될 6-His-tagging이 될 수 있는 pET-30a+ 혹은 pET-28a+를 대상으로 하였다.
- (4) 각 toxin별로 증폭될 toxin 유전자 서열의 내재적인 restriction site의 종류에 따라 적절한 발현 벡터를 미리 선정하여 primer 고안에 적용하였다.
- (5) 즉 내부에 NdeI site가 있는 SEC나 SED 유전자의 경우 pET-30a+대환 pET-28a+를 사용하여 NdeI 대신 NcoI restriction enzyme을 cloning에 사용할 수 있도록 primer에 해당 서열을 추가하였다(pET-28a+ 및 pET-30a+의 개요와 cloning site 서열은 그림 19를 참조).
- (6) 각 toxin 유전자의 증폭을 위한 primer 서열과 사용된 restriction enzyme 및 발현벡터의 종류는 표21에 나타내었다.



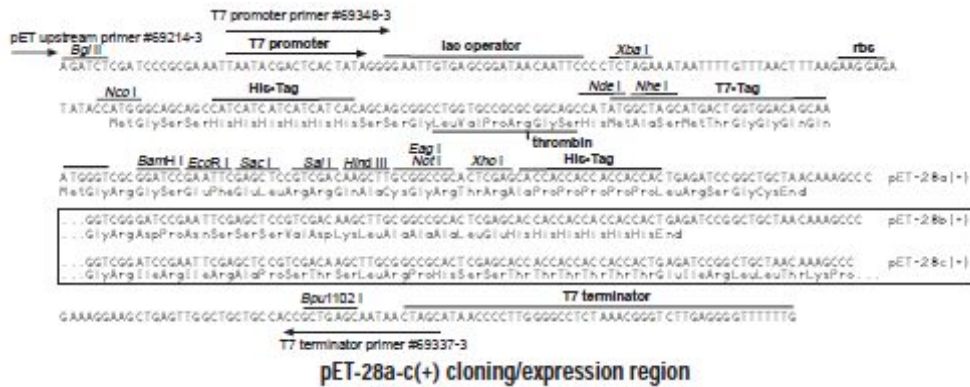


Figure 2. pET-28a+ 및 pET-30a+의 개요 및 cloning site 모식도.

- (7) pET-28에 cloning하는 경우 toxin의 5'은 NcoI, 3'은 XhoI 처리를 하였으며, pET-30에 cloning하는 toxin은 5'은 NdeI, 3'은 XhoI 처리를 하였다. 이로써 cloning된 toxin이 IPTG의 자극을 받은 T7 promotor에 의해 발현이 induction되며 3'에 His-Tag이 붙게되었다.

Table 4. SE toxin의 증폭에 사용한 primer서열 목록

Primer	5'-3'	Restriction site	Vector	Target site and product size
sea-His-f	ata cat atg agc gag aaa agc gaa gaa ata	NdeI	pET-30a+	M18970 [73...771] 711 bp
sea-His-r	ata ctc gag act tgt ata taa ata tat atc	XhoI		
seb-His-f	cac ata tgg aga gtc aac cag atc cta aac c	NdeI	pET-30a+	M11118 [325...1041] 745 bp
seb-His-r	cac tcg agc ttt ttt ctt tgt cgt aag ata aac	XhoI		
sec1-His-f	ata cca tgg aga gcc aac cag acc cta cg	NcoI	pET-28a+	X05815 [199...915] 731 bp
sec1-His-r	ata ctc gag tcc att ctt tgt tgt aag gtg	XhoI		
sed-His-f	cac cat ggc aaa aca ttc tta tgc aga taa aaa tcc	NcoI	pET-28a+	M28521 [445...1065] 634 bp
sed-His-r	cac tcg agc ttt tca tat aaa tag atg tca ata tg	XhoI		
see-His-f	ata cat atg agc gaa gaa ata aat gaa aaa gat	NdeI	pET-30a+	M21319 [82...771] 705 bp
see-His-r	ata ctc gag agt tgt gta taa ata caa atc	XhoI		
seh-His-f	ata cca tgg aag att tac acg ata aaa g	NdeI	pET-30a+	U11702 [280-930] 664 bp
seh-His-r	cac tcg agt act ttt ttc tta gta tat ag	XhoI		

(8) 각 PCR 조건은 sea와 sec1의 경우를 제외하고 다음과 같다.

- ① 95°C 10 min/ 30 cycle of 95°C 30 s, 55°C 30 s and 72°C 30 s/ 72°C 7 min으로 반응하였다.
- ② sea와 sec1 은 위 조건 중 annealing temperature가 각각 50°C과 58°C라는 점을 제외하고 위와 동일한 조건에서 PCR을 수행하였다.

다. TA cloning

- (1) 증폭된 toxin 유전자의 PCR product는 TA cloning을 이용하여 DH5alpha competent cell에 transformation 하였다.
- (2) RBC vector co., Ltd. 의 TA cloning kit (Cat. No. RC001)을 이용하여 실시 하였으며 DH5alpha competent cell은 (주)인트론 (Cat. No. 15046)을 이용하였다.
- (3) 반응 조건은 다음과 같다
- DW 2ul

- 10X A buffer 1ul
- 10X B buffer 1ul
- PCR product 4ul
- TA vector 1ul
- Ligase 1ul

- ① Total 10ul의 반응액을 1.5ml eppendorf tube에 넣고 tapping하여 mix후 spindown하여 반응액을 모은 후 실온에서 1시간동안 정치
- ② competent cell (100 ul)을 얼음에 10분간 정치하여 해동
- ③ 1시간 후 반응액과 competent cell을 혼합한 후 얼음에 20분간 정치
- ④ 42°C 수조에서 1분간 heat shock을 줌
- ⑤ 얼음에 2분간 식힌 후 SOC 배지 800 ul 첨가
- ⑥ invert mix후 37°C 250 r.p.m.에서 1시간 배양
- ⑦ X-gal (40 ug/ml) 과 ampicillin (200 ug/ml)이 포함된 LB 배지에 도말하여 37°C에서 18시간 배양
- ⑧ 흰색으로 자란 집락을 선택하여 계대배양
- ⑨ Colony PCR, plasmid preparation후 PCR, HindIII digestion 등을 통해 toxin gene이 cloning된 집락을 선별
- ⑩ Cloning이 성공한 것으로 확인된 집락을 대량 배양하여 plasmid를 대량 추출

라. 발현벡터 cloning

- (1) 대량으로 정제한 TA cloning SE toxin plasmid를 적절한 restriction enzyme으로 처리 후 전기영동하여 insert만 분리하여 Gel purification kit (Quiagen)로 정제하였다.
- (2) 발현 벡터로 쓰일 pET-28a+ 혹은 pET-30a+를 적절한 restriction enzyme으로 처리후 PCR purification kit (Quiagen)로 정제하였다.
- (3) 준비된 insert와 vector를 ligation 시켰다.
- (4) T4 DNA Ligase kit (SolGent co., Ltd. Cat. No. SDL01-R40k) 이용하였다.
 - ① Vector 5ul
 - ② Insert 12ul
 - ③ 10X buffer 2ul
 - ④ Ligase 1ul
- (5) 위 ligation 반응액을 실온에서 한시간 반응시킨 후 DH5alpha competent cell에 TA cloning 때와 동일한 방법으로 heat shock 원리를 이용하여 transformation 실시하였다.
- (6) Kanamicin (50 ug/ml) 이 포함된 LB 배지에 도말하여 37°C에서 18시간 배양하였다.

- (7) 집락을 임의로 8개 선택하여 colony PCR 실시하여 toxin gene이 cloning된 집락을 선별하였다.
- (8) 선별된 colony에서 plasmid를 정제하여 발현균주에 transformation 실시하였다.
- (9) 발현균주는 발현벡터에 있는 T7 promotor를 이용하기 위하여 T7 phage의 lysogen인 BL21 DE3 strain을 사용하였다.
- (10) BL21 DE3 competent cell (ECOSTM Cat. No. YE207-J)과 준비된 plasmid를 TA cloning때와 마찬가지로 heat shock 방법을 이용하여 transformation 실시하였다.
- (11) Kanamicin (50 ug/ml) 이 포함된 LB 배지에 도말하여 37°C에서 18시간 배양하였다.
- (12) 집락을 임의로 8개 선택하여 colony PCR 실시하여 toxin gene이 cloning된 집락을 선별하였다.
- (13) 선별된 집락을 toxin 발현 및 induction에 이용하였다.

마. Enterotoxin 발현 및 induction

- (1) 균주 배양
 - ① SE toxin cloned strain
 - ② pET vector only cloned strain
 - ③ beta-galactosidase induction control strain (Novagen co., Ltd. Cat. No. 70781-3)
- (2) 위 균주를 Kanamycin 50 ug/ml LB 배지에서 single colony를 selection 하여 다시 Kanamycin 50 ug/ml LB 배지에 spreading 하여 18시간 37°C에서 배양하였다.
- (3) 2-3개 콜로니를 모아서 3 ml Kanamycin 50 ug/ml LB 액체배지에 접종 후 37°C, 250 r.p.m.에서 18시간 배양하였다.
- (4) 신선한 5 ml 액체배지에 1:100으로 접종 후 37°C, 250 r.p.m.에서 2.5시간 배양하였다.
- (5) 멸균한 시험관에 3 ml 전배양(3번)액을 옮기고, 남은 배양액에 최종 농도가 10 mM IPTG 가 되도록 첨가하였다.
- (6) 2 ml짜리 전배양 (IPTG 비처리)액과 3 ml 짜리 후배양 (IPTG 처리)액을 37°C, 250 r.p.m.에서 3-5시간 배양하였다.
- (7) 전배양액과 후배양액 각각 1ml을 1.5ml 튜브에 옮겨 spindown 시킨 후 상층액을 버리고 pellet은 2X sample buffer 100 ul로 재부유하였다.
- (8) 26G 바늘이 달린 1 ml 주사기로 suck in and out 10번 반복하였다. (viscosity 감소)

- (9) 100도에서 5분 boiling
- (10) 10% SDS-PAGE에 5ul씩 loading
- (11) 단백질을 검증하기 위하여 His-tag에 대한 항체 (Anti-His6, IGtherapy co., Ltd., Cat. No. IG-A03001)를 이용하여 Western blotting 실시하였다.

바. Enterotoxin 정제, 투석 및 농축

- (1) SE toxin 정제는 QIAGEN Ni-NTA Fast Start Kit (Cat. No. 30600)를 이용하여 실시하였다.
- (2) 1차 Cell lysate (CL), column에 내린 Flow-through fraction (FL), column을 두 번 wash한 용액 (W1, W2), column을 두 번 elution한 결과 (E1, E2)의 일부를 각각 SDS-PAGE 또는 Western blot을 이용하여 SE toxin이 적절히 정제되었는지 검증하였다.
- (3) SE toxin의 투석 및 농축은 Vivapure® Ion Exchange Spin Columns (Sartorius-Stedim Biotech, Germany)를 이용하여 실시하였다.
- (4) 최종 농축 후 사용전까지 -80℃에 보관하였다.

사. Enterotoxin의 발현 및 정제 결과

○ SEA 발현 및 induction 결과

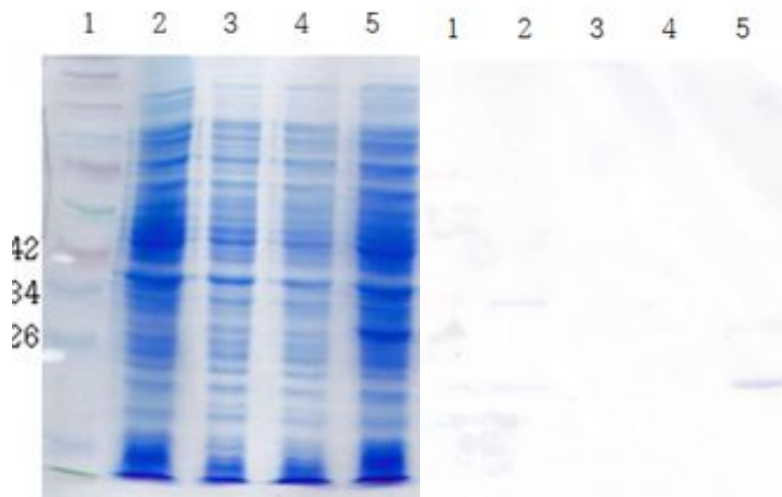


Figure 3. SDS PAGE and Western blotting result of SEA induction

Lane 설명 (1: Fermentas protein Ladder #SM1841, 2: Uninduced pET30 vector only transformant, 3: Induced pET28 vector only transformant, 4: Induced pET30 vector only transformant, 5: Uninduced pET30-sea transformant)

○ SEB 발현 및 induction 결과

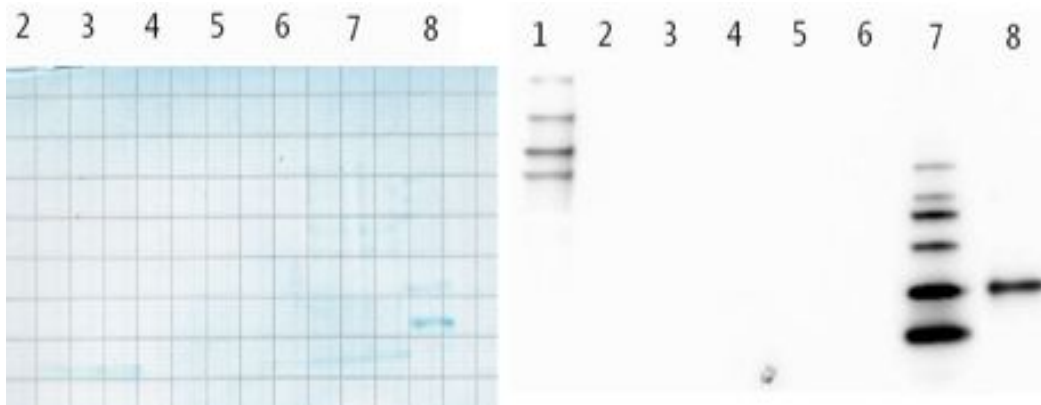


Figure 4. SDS PAGE and Western blotting result of SEB induction

Lane 설명 (1: Prestained maker, 2: Induced induction control, 3: Uninduced induction control, 4: Uninduced sed transformant, 5: Induced pET28 vector only transformant, 6: Uninduced pET28 vector only transformant, 7: Western maker, 8: Induced sed transformant)

○ SEC1 발현 및 induction 결과

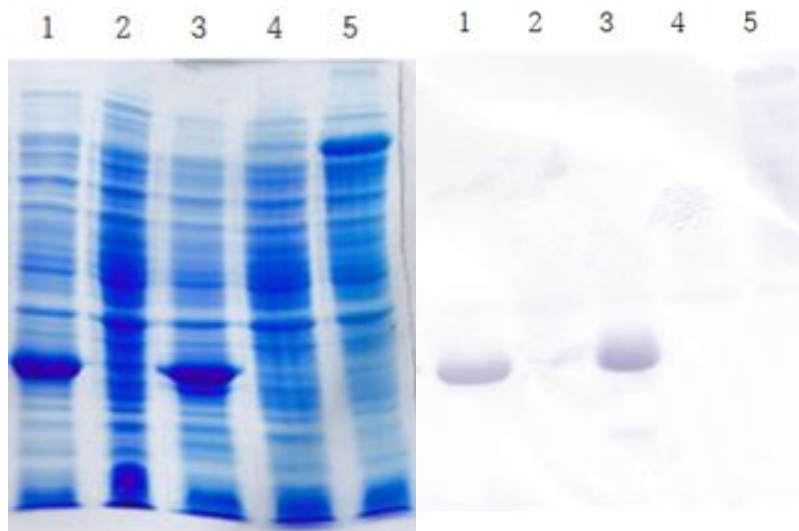


Figure 5. SDS PAGE and Western blotting result of SEC1 induction

Lane 설명 (1: Induced pET28 vector only transformant, 2: Uninduced pET28-sec transformant, 3: Induced pET28-sec transformant, 4: Uninduced induction control, 5: Induced induction control)

○ SED 발현 및 induction 결과

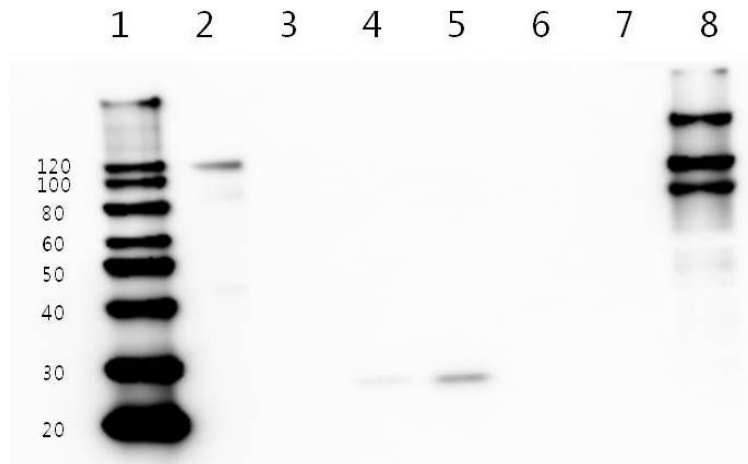


Figure 6. SED 발현 및 induction 결과 - Western blotting

Lane 설명 (1: Western maker, 2: Induced induction control, 3: Uninduced induction control, 4: Uninduced sed transformant, 5: Induced sed transformant, 6: Induced pET28 vector only transformant, 7: Uninduced pET28 vector only transformant, 8: Prestained maker)

○ SEE 발현 및 induction 결과

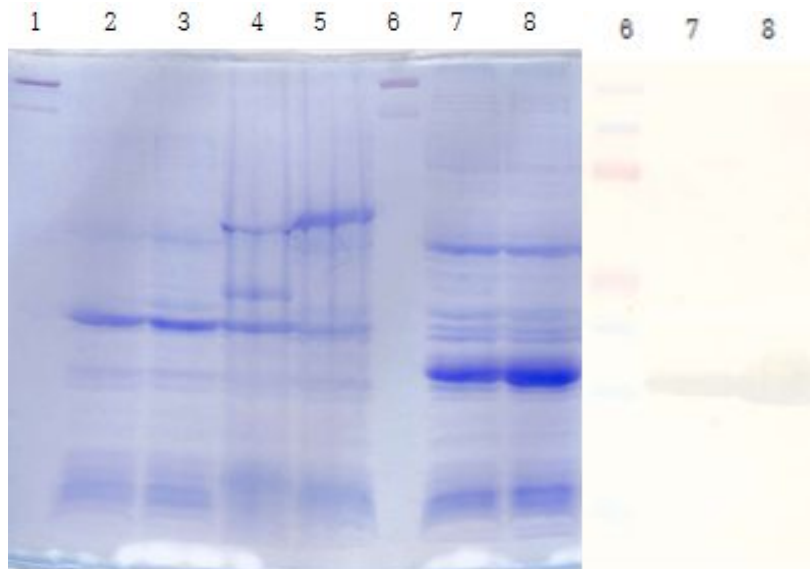


Figure 7. SDS PAGE and Western blotting result of SEE induction

Lane 설명 (1: Prestained maker, 2: Uninduced pET30 vector only transformant, 3: Induced pET30 vector only transformant, 4: Uninduced induction control, 5: Induced induction control, 6: Prestained maker, 7: Uninduced pET30-see transformant, 8: Induced pET30-see transformant)

o SEH 발현 및 induction 결과

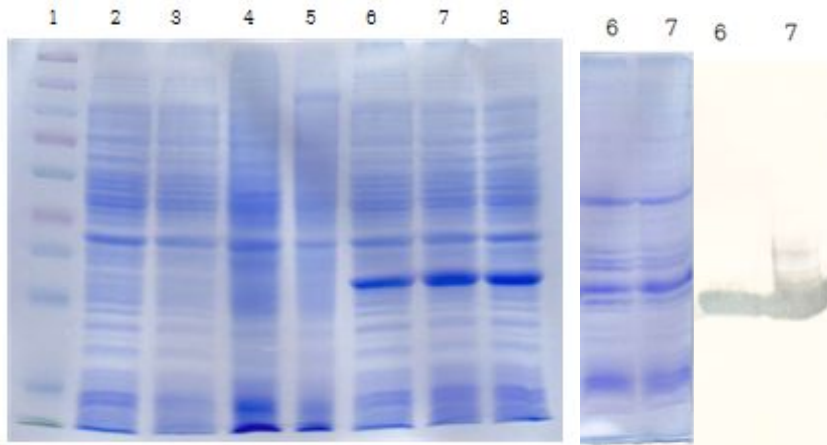


Figure 8. SEH 발현 및 induction 결과 - SDS PAGE

Lane 설명 (1: Prestained maker, 2: Uninduced pET30 vector only transformant, 3: Induced pET30 vector only transformant, 4: Uninduced induction control, 5: Induced inductin control, 6: Uninduced pET30-seh transformant, 7: Induced pET30-seh transformant, 8: Induced pET30-seh transformant,)

o SEA 정제 결과

E1: 5.53 mg/ml (전체 4.4 mg)

E2: 1.395 mg/ml (전체 1.1 mg)

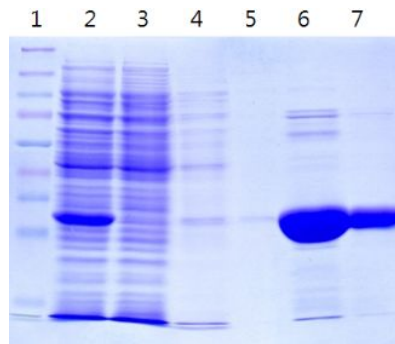


Figure 9. SEA 정제 결과

Lane 설명 (1 : Prestained marker, 2 : CL, 3 : FL, 4 : W1, 5 : W2, 6 : E1, 7 : E2)

○ SEB 정제 결과

- SEB 농도는 2.46mg/ml, volume 3ml, 총 단백질량 : 7.3mg

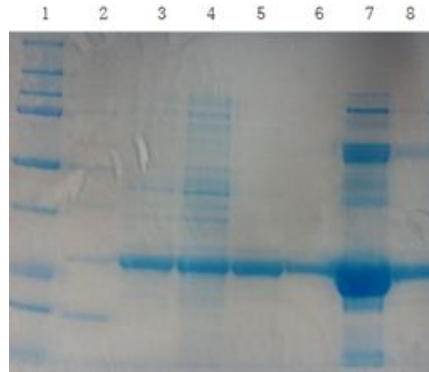


Figure 10. SEB 정제 결과

Lane 설명 (1 : prestained marker, 2 : western marker, 3 : CL, 4 : FL, 5 : W1, 6 : W2, 7 : E1, 8 : E2)

○ SEC1 정제 결과

E1: 23.6 mg/ml (전체 18.9 mg 정제)

E2: 5.1 mg/ml (전체 4.1 mg 정제)

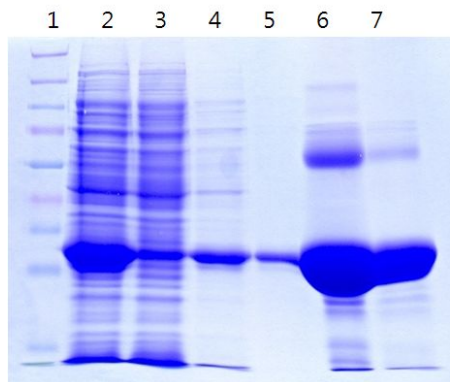


Figure 11. SEC1 정제 결과

Lane 설명 (1 : Prestained marker, 2 : CL, 3 : FL, 4 : W1, 5 : W2, 6 : E1, 7 : E2)

o SEE 정제 결과

- SEE 농도는 1.95mg/ml, volume 4ml, 총 단백질량 : 7.8mg

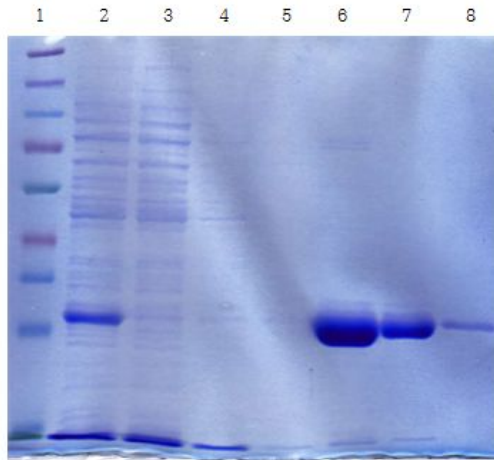


Figure 12. SEE 정제 결과

Lane 설명 (1 : Prestained marker, 2 : CL, 3 : FL, 4 : W1, 5 : W2, 6 : E1, 7 : E2, 8: E3)

o SEH 정제 결과

- SEH 농도는 2.26mg/ml, volume 3ml, 총 단백질량 : 6.7mg

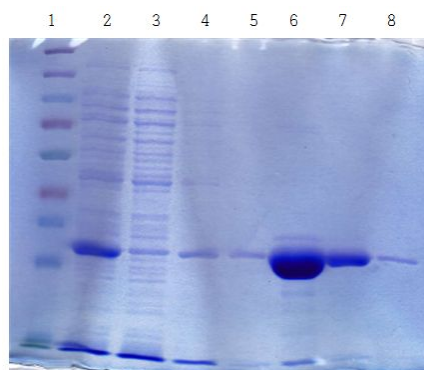


Figure 13. SEH 정제 결과

Lane 설명 (1 : Prestained marker, 2 : CL, 3 : FL, 4 : W1, 5 : W2, 6 : E1, 7 : E2, 8: E3)

2. 제조항원 및 항체의 특이성 확인 및 단클론 항체의 대량생산

가. 마우스에 대한 항원의 투여 (Antigen boosting)

- 상기한 바와 같이 확보된 항원을 첫 번째 면역화로서 항원과 동량 (각기 $250\mu\text{l}$ 정도 되게 하였다)의 complete Freund's adjuvant (Sigma)를 혼합 후 emulsion을 만들어 생후 6주령의 암컷 BALB/c 마우스의 복강 내 (intraperitoneal injection, ip)에 주입하였다. 1마리당 $50\mu\text{g}$ 의 항원을 주사하며 6마리를 대상으로 실시하였다. 두 번째 면역화로서 2주 후에 같은 요령으로 주사하였다. 단, incomplete Freund's adjuvant (Sigma)를 사용하며, 항원의 양을 30% 줄인 양 즉, $35\mu\text{g}$ 으로 하되 volume은 1차 면역화 때와 동량으로 하였다. 세 번째 면역화 또한 두 번째 면역화 과정과 동일한 방법으로 실시하되, 항원의 양을 $25\mu\text{g}$ 으로 줄여 투여하였다.
- 마지막으로 2주 후에 항원(3차 투여 시와 동일한 양)을 PBS에 혼합하여 이를 꼬리의 정맥 (미정맥, intravenous injection, iv)에 주사하였다. 항원의 투여를 거듭할수록 항원의 양을 줄이는 것은 해당 항원에 대한 특이도 높은 B 림프구들의 선택적인 확장을 유도하기 위함이며, 마지막 투여를 미정맥을 통해 하는 것은 특이도 높은 B 림프구들을 비장으로 유도하기 위함이다. 마지막 면역화 후 3일 뒤에 세포융합과정을 거친다.

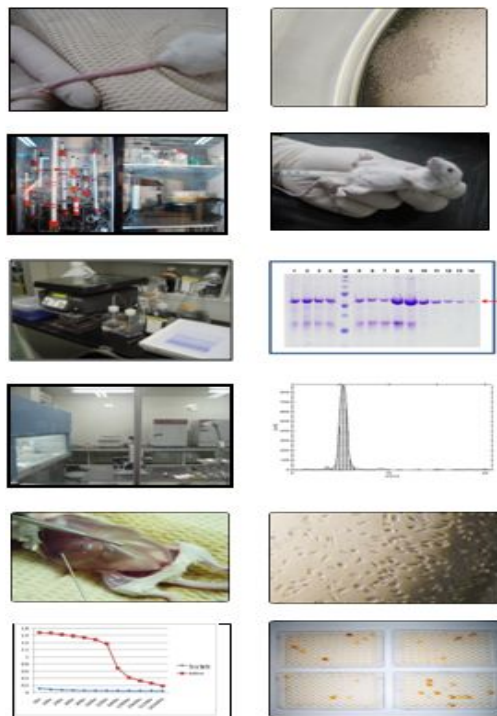


Figure 14. 항체 제작 과정



Figure 15. 항원투여

나. Feeder cell 준비

- (1) DW에 sucrose를 11.6 %로 녹여 멸균 (autoclave, 121 °C, 15 분) 후 50 ml 씩 분주하여 냉장고 (4 °C)에 보관하였다. 골수종세포 (myeloma)와 비장 세포의 융합 18 시간 이전에, 12 주령 이상의 마우스(암수 및 strain은 관계 없으나 Balb/c 암컷을 기준으로 삼겠음)의 복부 피부를 벗겨 낸 후 복근 속 복강내로 8 ml의 4 °C, 11.6 % sucrose (Sigma) 용액을 주입한 후 복강을 마사지 하여 복강 내 대식세포들의 유리를 촉진하였다.
- (2) 이후 이를 회수하여 (약 6ml 이상) 1300 rpm으로 원심분리한 후 pellet을 PBS 혹은 RPMI-1640 (Sigma) 배지를 이용한 세척한 후 1X HAT (hypoxanthine aminopterin thymidine, Sigma), 20 % FBS (fetal bovine serum, Sigma), RPMI-1640에 적절히 풀어 세포배양용 96 well plate (Nunc)에 분주한 후 37°C CO2 incubator (Binder)에서 배양하였다.
- (3) Feeder cell을 미리 준비하는 것은 융합과정 중 여러 단계를 거치면서 손상을 입은 융합세포들이 feeder cell들이 분비하는 다양한 cytokine들에 의한 치유를 촉진함과 아울러 지나친 세포회색으로 인한 성장 저해를 억제하기 위함이다.



Figure 16. Feeder cell 준비 과정

다. 비장세포와 골수종세포의 융합 (Cell fusion)

- (1) 세포융합 방법은 Kohler와 Milstein 방법에 따라서 PEG (polyethylene glycol, Sigma)를 fusogen으로 이용하였다. 세포융합 2주전부터 계대해온 골수종세포 (myeloma, Sp2/0-Ag14, HGPRT-, 한국세포주은행, 세포의 수가 $7-8 \times 10^5/\text{ml}$ 정도 되면 1/2로 희석 계대하여 다음 날의 실험에 이용하였다) 와 항체가 (antibody titer)가 높게 나타난 마우스의 비장세포 (splenocyte) 를 미리 준비한 후 이들을 혼합하여 FBS가 첨가되지 않은 세포배양용 배지로 세척한 후, 미리 가열한 (37°C) 1ml의 polyethylene glycol을 이용하여 1분간에 걸쳐 서서히 저어주면서 융합시킨다.
- (2) 융합 후 수분에 걸쳐 천천히 1X HAT 배지 (20% FBS, RPMI-1640)를 첨가해 주면서 융합과정을 마친다. 이러한 전과정은 37°C 항온수조 (water bath) 를 이용하여 시행하였다. 전날 준비한 feeder cell이 깔린 96 well plate에 well 당 1개의 colony가 생길 정도의 농도로 세포를 HAT가 첨가된 배지로 희석하여 분주하였다.
- (3) 분주된 96well plate들은 37°C CO_2 incubator에 넣어 7일간 배양하며 screening 단계에 접어들 때까지 incubator를 열지 않는다.

라. 특이성 검사 대상 well의 선별

- (1) 세포융합을 실시한 후 1주일 (7일)이 경과하면, 각각의 96 well plate를 꺼내어 inverted microscopy에 올려 세포군 (cell colony)의 형성 여부 및 그 정도 (colony의 크기)를 관찰하여 각 well에 표시하였다. 표시된 well 중 colony의 크기가 전체 well 면적의 25% 내외를 차지하는 것들만을 골라 특이성 검사 대상으로 삼는다.
- (2) 형성되는 colony들의 형태학적 모습은 완전한 부유성, 포도상의 군집성, 부분적인 부착성, 완전한 부착성 등 다양한 형태가 나타나므로 각기 형태에 대한 세포 밀도 등을 감안하여 선별한 후 분류하였다.

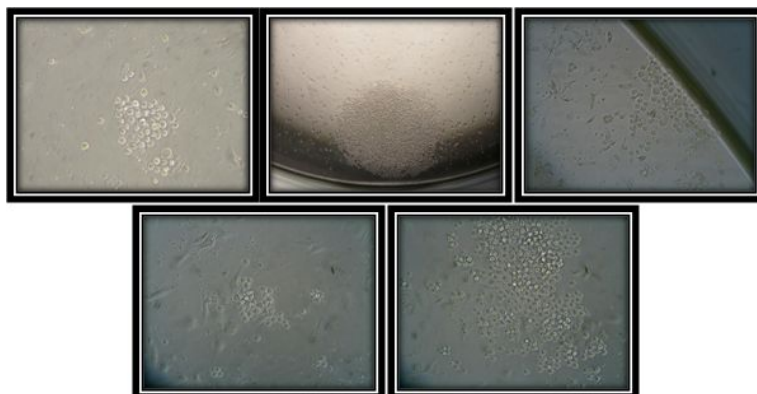


Figure 17. Hybridoma colony

마. 단클론항체의 특이성 검사

(1) 효소면역측정법(ELISA)을 이용한 특이성 검사

- 해당 항원 용액을 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 $100\mu\text{l}$ 씩 96 well plate에 분주하고 37°C , 60분 반응시킨다. 희석액으로는 0.05M sodium bicarbonate용액을 사용하였다. 반응액을 제거하고 세척액 (인산염 완충액, 0.05% Tween 20) well당 $200\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복하였다.
- 세척 후 각 well에 차단액 (blocking solution, 1% BSA가 함유된 인산염 완충액)을 $200\mu\text{l}$ 첨가하고 37°C , 30분 반응하였다. 차단액 반응액을 제거하고 상기 세척액을 well당 $200\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복하였다. 단클론 항체 (MAb)용액을 well당 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 음성대조군용 well에 희석액을 $100\mu\text{l}$ 분주한 다음 37°C 에서 60분간 반응시킨다. 반응액을 제거하고 상기 세척액을 well당 $200\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복하였다.
- 항-마우스 IgG에 HRP (Horse reddish peroxidase)가 융합된 시약을 well당 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 37°C 에서 60분간 반응시킨다. 반응액을 제거하고 상기 세척액을 well당 $200\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 다시 제거하는 과정을 3회 반복하였다. 효소 기질 용액 (o-phenylenediamine $0.4\text{mg}/\text{ml}$ in phosphate citrate buffer pH 5.0))을 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 암실의 상온 에서 30분간 반응시킨다. 492 nm (yellow)에서 흡광도값을 확인하여 음성대조군의 흡광도의 3배 이상 되는 흡광도 값을 양성 반응의 최소치로 기준하여 음성, 양성으로 판정하였다.

(2) Western blotting법을 이용한 특이성 검사

- 정제된 재조합 단백질을 SDS-PAGE상에서 전기영동한 후 nitrocellulose membrane ($0.45\mu\text{m}$; Bio-Rad)에 재조합 단백질을 electrotransfer시킨다. Towbin et al. (1979)의 방법으로 transfer후 membrane을 blocking buffer (0.01 M PBS, 3% skim milk, Sigma)로 실온에서 하룻밤 동안 blocking하고, ELISA를 통해 검증된 항체액 (hybridoma 세포배양액)을 blocking solution에 적절한 농도로 희석하여 1시간 30분 동안 실온에서 반응시킨다.
- 각 반응 단계마다 PBS-Tween 20 (0.05%)으로 3번 씻어내며, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma)를 blocking solution에 적당한 농도로 희석하여 2시간 반응시킨다. 신선한 substrate solution (0.5 mg/ml diaminobenzidine; 0.01% hydrogen peroxide; 0.1 M PBS, pH 7.2)을 준비하여 실온에서 1분간 반응시킨다. 반응의 증지를 위하여 증류수를 첨가하며 결과는 육안으로 판독하였다. 단클론 항체에 따라서

Western blotting에 응용할 수 없는 특성을 지닌 것들이 있을 수 있어 실시하며 이를 ELISA 시험결과와 아울러 정리하였다.

바. 종세포주 및 생산용 세포주의 관리

- (1) 일단 원하는 항체를 분비하였다고 판단되는 융합 세포주는 limiting dilution 방법으로 1, 2차 클로닝을 수행하여 융합 세포 집단이 하나의 세포로부터 유래되는 클론이 되게 하였다. 만들어진 단클론항체 세포주를 배지에 부유시켜 37°C, CO₂ 세포배양기에서 3-4일간 증식시킨 뒤 얻은 세포 부유액을 1,300rpm에서 10분간 원심 분리한 후 침전된 세포는 동결방지 보호제 (RPMI-1640 세포배양액에 10% DMSO, 20% FBS 첨가)에 부유시킨 후 동결보존용 앰플에 1ml (1X10⁶cell/ml)씩 분주하고 세포주명, 계대번호, 계대일자 등을 기록한 후 freezing container에 넣어 deep freezer (-70°C)에 하룻밤 보관 후 영하196°C (액체질소)에 동결 보존하여 원종 세포주로 사용하였다.
- (2) 이후 생산된 원종 단클론 항체 분비 세포주를 꺼내어 37°C 항온수조에서 빠르게 해동시킨 뒤 배지에 부유시켜 37°C CO₂ 세포배양기에서 3-4일간 증식시킨 다음, 증식된 세포 부유액을 1,300rpm에서 10분간 원심 분리한 후 침전된 세포는 동결방지 보호제에 부유시킨 후 동결보존용 앰플에 1ml (1X10⁶cell/ml)씩 분주하고 세포주명, 계대번호, 계대일자 등을 기록한 후 영하 196°C (액체질소)에 동결 보존하여 생산용 단클론 항체 분비 세포주로 사용하였다.

사. 단클론 항체의 isotyping

- 생산된 단클론 항체의 isotyping은 mouse monoclonal antibody isotyping kit (Sigma)을 이용하여 실시하며, 방법은 제조회사의 지침을 따른다.

아. 단클론 항체의 분리 및 정제

- (1) 생후 6-8주된 BALB/c 마우스의 복강에 pristane을 0.5-1 ml 주사하고 해당 항원에 대한 특이적인 항체를 생산하는 세포주를 배지 (RPMI-1640, 10% FBS)에서 키운다. Pristane 처리 후 1주일 째 되는 날 세포주를 1300 rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 pellet에 적당량의 인산염 완충액 (phosphate-buffered saline, PBS)에 현탁한 뒤 계수하였다. 마우스 한 마리당 1.5 x 10⁶개 정도의 세포를 0.5 ml 인산염 완충액에 현탁하여 복강에 주사하였다.
- (2) 1-2주가 지나서 마우스의 배가 부풀어 오르면 주사기를 이용하여 복수를 채취하며, 채취된 복수를 1500 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 취해진 상등액을 0.45 μm syringe filter를 이용하여 여과한 후

protein G column (Amersham phamacia)으로 통과시켜 항체만을 결합시킨 후 column 3배량의 세정액 (0.05M Tris, 0.15M NaCl, 0.1% Tween 20)으로 2번 세척한 후 용출액 (0.1M glycine, pH 3.0)을 통과시킴으로써 fraction collector를 이용하여 항체분획을 얻는다.

- (3) 얻어진 항체액은 desalting column (Amersham phamacia)을 이용하여 차후 실험 목적에 따라 인산염 완충액 (PBS)등의 다양한 완충액으로 교환한 뒤 다음 단계의 실험에 활용하였다.

자. 정제된 항체의 순도 및 농도 평가

- (1) 정제된 항체는 SDS PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 그 순도를 평가하였다. 이때 acrylamide gel은 12%를 이용하며, Hoefer auto- processor를 이용하여 Coommasie blue 염색하여 그 순도를 개략적으로 알아낸다. 순도가 불충분할 경우 affinity chromatography를 통과한 정제물을 gel chromatography (size exclusion)을 재차 실시하여 높은 순도의 항체를 얻는다. 만족할 만한 순도의 항체액이 얻어지면 이를 흡광도 평가 (OD280에서 1OD 당0.75mg/ml으로 환산) 혹은 Bradford method (Bio-rad Bradford reagent)를 이용하여 정량하여 다음 단계의 실험에 이용하였다.

차. 제조항원 및 항체의 특이성 확인 결과

- o 항체는 현재 시판중인 키트가 없는 SEH를 포함한 총 4가지 특신을 대상으로 제작하였음

(1) SEA 항체 후보 검색 결과



Figure 18. anti-SEA 항체 후보 ELISA 결과

Table 5. anti-SEA 항체 후보 ELISA OD값 측정 결과

seA-1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.112	0.117	0.088	0.088	0.091	0.098	0.103	0.101	0.095	0.086	0.124	0.083
B	0.094	0.100	0.098	0.101	0.111	0.106	0.097	0.089	0.092	0.088	0.084	0.087
C	0.096	0.102	0.100	0.092	0.116	0.124	0.099	0.111	3.847	0.105	0.082	0.083
D	0.103	0.135	0.085	0.099	0.122	0.090	0.132	0.108	0.126	0.095	0.105	0.100
E	0.108	0.116	0.102	0.097	0.134	0.119	2.646	0.111	0.133	0.111	0.082	0.112
F	0.113	0.097	0.115	0.109	0.098	0.130	0.119	0.119	0.101	0.115	0.090	0.090
G	0.095	0.092	0.104	0.080	0.103	0.086	0.112	0.113	0.091	0.114	0.104	0.108
H	0.118	0.095	0.097	0.079	0.105	0.122	0.116	0.098	0.117	0.100	0.121	0.136

seA-2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.082	0.084	0.076	0.094	0.091	0.100	0.103	0.093	0.104	0.088	0.074	0.069
B	0.076	0.085	0.089	0.080	0.082	0.089	0.097	0.090	0.106	0.127	0.069	0.072
C	0.078	0.089	0.102	0.098	0.107	0.119	0.128	0.098	0.114	3.142	0.086	0.067
D	0.073	0.091	0.091	0.103	0.103	0.128	3.122	0.124	0.108	0.076	0.086	0.070
E	0.078	0.089	0.108	0.113	0.122	0.108	0.132	0.109	0.105	0.106	0.080	0.071
F	0.079	0.084	0.098	0.102	0.108	0.121	3.007	0.129	0.092	0.136	0.111	0.087
G	0.076	0.086	0.089	0.088	0.095	0.088	0.118	0.132	0.126	0.102	0.096	0.069
H	0.083	0.081	0.088	0.084	0.097	0.104	0.104	0.120	0.102	0.130	0.099	0.080

seA-3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.085	0.080	0.078	0.080	0.082	0.085	0.080	0.097	0.089	0.075	0.083	0.080
B	0.079	0.074	0.071	0.071	0.074	0.073	0.069	0.086	0.085	0.095	0.107	0.087
C	0.082	0.072	0.066	0.067	0.068	0.067	0.067	0.078	0.087	0.104	0.073	0.085
D	0.076	0.071	0.068	0.068	0.068	0.071	0.075	0.079	0.079	0.077	0.080	0.073
E	0.074	0.067	0.071	0.067	0.066	0.066	0.076	0.080	0.086	0.084	0.073	0.069
F	0.073	0.070	0.077	0.071	0.082	0.079	0.083	0.100	0.096	0.099	0.095	0.100
G	0.080	0.074	0.076	0.069	0.078	0.072	0.098	0.079	0.077	2.992	0.075	0.078
H	0.085	0.087	0.088	0.081	0.096	0.080	3.136	0.107	0.097	0.094	0.073	0.075

seA-1

0

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.074	0.078	0.085	0.089	0.099	0.106	0.088	0.087	0.089	0.098	0.081	0.066
B	0.079	0.089	0.106	0.093	0.114	0.131	0.114	0.126	0.196	0.121	0.099	0.086
C	0.072	0.081	0.099	0.092	0.105	0.132	0.116	0.115	0.118	0.095	0.089	0.075
D	0.075	0.087	0.094	0.111	0.108	0.127	0.132	0.125	0.113	0.083	0.094	0.074
E	0.079	0.083	0.082	0.103	0.106	0.106	3.338	0.097	0.092	0.096	0.093	0.071
F	0.084	0.082	0.088	0.096	0.100	0.109	0.095	0.106	0.095	0.085	0.078	0.074
G	0.077	0.068	0.084	0.082	0.077	0.082	0.089	0.091	0.095	0.082	0.069	0.065
H	0.075	0.076	0.075	0.071	0.079	0.086	0.076	0.068	0.079	0.070	0.083	0.078

(2) SEC1 항체 후보 검색 결과



Figure 19. anti-SEC1 항체 후보 ELISA 결과

Table 6. anti-SEC1 항체 후보 ELISA OD값 측정 결과

seC-1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.079	2.387	0.095	0.095	0.099	0.134	0.099	0.104	0.108	0.103	0.087	0.091
B	0.077	0.095	0.088	0.095	0.103	0.109	0.116	0.114	0.113	0.104	0.086	0.079
C	0.081	0.085	0.088	0.099	0.115	0.118	0.117	0.128	0.112	0.122	0.083	0.070
D	0.086	0.085	0.110	0.099	0.111	0.121	2.398	0.114	0.109	0.114	0.084	0.077
E	0.089	0.080	0.091	0.107	0.099	0.113	0.128	0.116	0.113	0.154	0.091	0.078
F	0.082	0.087	0.094	0.104	0.577	0.117	0.110	0.123	0.104	0.113	0.186	0.144
G	0.088	0.081	0.085	0.082	0.097	0.091	0.103	0.105	0.114	0.124	0.096	0.087
H	0.081	0.594	0.082	0.090	0.131	2.359	0.099	0.475	0.101	0.106	0.089	0.080

seC-2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.118	0.082	0.078	0.083	0.093	0.075	0.079	0.077	0.085	0.091	0.082	0.104
B	0.081	0.074	0.073	0.083	0.084	0.088	0.082	0.099	0.092	0.086	0.079	0.155
C	0.077	0.074	0.082	0.079	0.096	2.705	0.088	0.095	0.099	0.082	0.072	0.120
D	0.077	0.078	0.080	0.082	0.093	0.099	2.530	0.121	0.083	0.065	0.078	0.098

B	0.093	2.592	0.089	0.088	0.081	0.079	0.083	0.094	0.072	0.070	0.083	0.086
C	0.097	0.085	0.085	0.101	0.087	0.079	2.503	0.098	0.096	0.091	0.078	0.453
D	0.092	0.080	0.078	0.081	0.090	0.100	0.071	0.099	0.073	0.075	0.076	0.287
E	0.087	0.074	0.079	0.092	0.157	0.104	0.090	0.078	0.066	0.074	0.079	0.072
F	0.083	0.077	0.085	0.087	0.106	0.086	0.084	0.085	0.069	0.081	0.146	0.074
G	0.419	2.696	0.083	0.253	0.082	0.087	0.149	0.086	0.082	0.079	0.084	0.082
H	0.102	0.122	0.080	0.087	0.104	0.086	0.079	0.076	0.083	0.090	0.081	0.085

seC-10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.092	0.108	0.089	0.107	0.131	0.113	0.097	0.119	0.088	0.182	0.131	2.942
B	2.960	0.110	0.098	2.544	0.115	0.112	0.108	0.097	0.136	3.042	0.096	0.184
C	0.094	0.091	0.099	0.114	0.125	3.176	0.428	0.106	0.092	0.129	0.111	0.107
D	0.087	2.902	0.102	0.102	0.127	0.106	0.136	0.146	0.090	0.101	2.812	0.102
E	0.099	0.190	0.127	0.114	0.125	0.124	0.284	0.124	0.104	0.107	0.116	0.119
F	0.107	0.097	0.090	0.136	0.120	0.122	0.109	0.109	0.097	0.100	0.095	0.090
G	0.096	0.085	0.102	0.106	0.085	0.118	0.103	0.091	0.098	0.109	0.107	0.135
H	0.094	0.096	0.091	0.106	0.100	2.557	0.091	0.115	0.110	0.097	0.111	0.105

(3) SEE 항체 후보 검색 결과



Figure 20. anti-SEE 항체 후보 ELISA 결과

Table 7. anti-SEE 항체 후보 ELISA OD값 측정 결과

seE-1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.137	0.153	0.127	0.129	0.111	0.122	0.142	0.129	0.154	0.150	0.139	0.165
B	0.156	0.130	0.127	0.127	0.133	0.124	0.127	0.132	0.127	0.126	0.137	0.128
C	0.123	0.125	0.134	0.124	0.135	0.122	0.142	0.139	0.131	3.283	0.145	0.158
D	0.139	0.133	0.137	0.148	0.122	0.119	0.141	0.146	0.120	0.142	0.156	0.152
E	0.140	0.141	0.136	0.137	0.137	0.143	0.148	0.156	0.155	0.147	0.145	0.162
F	0.150	0.139	0.145	0.145	0.150	0.140	0.139	0.158	0.160	0.149	0.145	0.153
G	0.128	0.128	0.137	0.130	0.128	0.125	0.136	0.139	0.148	0.143	0.141	0.146
H	0.129	0.135	0.141	0.138	0.139	0.143	0.146	0.148	0.156	0.128	0.151	0.151

seE-3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.135	0.128	0.141	0.165	0.159	0.163	0.165	0.198	0.196	0.169	0.138	0.244
B	0.161	0.142	0.155	0.182	0.210	0.163	0.174	0.166	0.146	0.149	0.176	0.205

C	0.157	0.147	0.134	0.163	0.190	0.210	0.209	0.214	0.148	0.206	0.208	0.230
D	0.143	0.150	0.153	0.187	0.156	0.223	3.612	0.162	0.138	0.201	0.175	0.192
E	0.198	0.132	0.158	0.173	0.215	0.179	0.144	0.154	0.137	0.132	0.151	0.184
F	0.141	0.130	0.163	0.145	0.188	0.166	0.163	0.059	0.125	0.162	0.180	0.237
G	0.136	0.128	0.153	0.148	0.169	0.139	0.162	0.116	0.163	0.182	0.184	0.209
H	0.136	0.144	0.162	0.166	0.148	0.150	0.150	0.163	0.181	0.181	0.158	0.217

seE-1

0

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.151	0.172	0.143	0.216	0.155	0.173	0.194	0.190	0.190	0.194	0.201	0.231
B	3.769	0.147	0.159	0.161	0.164	0.173	0.211	0.178	0.210	0.225	0.207	0.227
C	0.159	0.130	0.154	0.152	0.154	0.179	0.195	0.188	0.186	0.194	0.214	0.228
D	0.166	2.893	0.172	0.152	0.159	0.172	0.165	0.182	0.183	0.166	0.188	0.205
E	0.184	0.162	0.149	0.163	0.161	0.166	0.176	0.203	0.192	0.175	0.193	0.220
F	0.154	0.151	0.159	0.159	0.194	0.172	0.202	0.185	0.211	0.201	0.206	3.582
G	0.149	0.144	0.161	0.170	0.155	0.156	0.201	0.194	0.183	0.202	0.217	0.220
H	0.186	0.162	0.149	0.148	0.164	0.203	0.190	0.183	0.200	0.211	0.221	0.225

(4) SEH 항체 후보 검색 결과



Figure 21. anti-SEH 항체 후보 ELISA 결과

Table 8. anti-SEH 항체 후보 ELISA OD값 측정 결과

seH-1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.093	0.090	0.116	0.121	0.101	0.092	0.107	0.084	0.082	0.104	0.106	0.084
B	0.083	0.097	0.100	0.121	0.105	0.087	0.099	0.102	0.088	0.101	0.113	0.090
C	0.099	0.086	0.093	0.091	0.104	0.107	0.099	0.098	0.105	0.126	0.095	0.092
D	0.093	0.088	0.097	0.106	0.101	0.094	0.087	0.089	0.095	0.090	0.085	0.102
E	0.092	0.090	0.094	0.134	0.093	0.097	0.093	0.126	0.098	0.089	0.097	0.110
F	0.084	0.102	0.110	0.105	0.107	0.106	0.106	1.554	0.103	0.119	0.098	0.128
G	0.104	0.090	1.509	0.117	0.114	0.124	0.125	0.123	0.097	0.091	0.097	0.109
H	0.088	0.084	0.119	0.134	0.143	0.129	0.103	0.133	0.109	0.105	0.126	0.125
seH-2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.090	0.095	0.082	0.090	0.103	0.116	0.098	0.121	0.110	0.083	0.131	0.162
B	0.088	0.098	0.090	0.086	0.089	0.098	0.094	0.114	0.100	0.090	0.107	0.081
C	0.087	0.084	0.088	0.081	0.074	0.083	0.083	0.081	0.094	0.081	0.090	0.091

D	0.092	0.087	0.085	0.089	0.085	0.084	0.093	0.098	0.083	0.082	0.094	0.095
E	0.113	0.090	0.085	0.086	0.097	0.090	0.101	0.083	0.084	0.101	0.091	0.091
F	0.108	0.089	0.082	0.081	0.078	0.104	0.089	0.094	0.088	0.136	0.082	0.089
G	0.088	0.096	0.092	0.082	0.087	0.109	1.920	0.102	0.126	0.134	0.106	0.101
H	0.098	0.103	0.107	0.107	0.113	0.092	0.095	0.094	0.093	0.081	0.117	0.127

seH-4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.078	0.100	0.081	0.084	0.087	0.081	0.093	0.113	0.113	0.126	0.123	0.111
B	0.089	0.081	0.077	0.077	0.077	0.077	0.080	0.104	0.099	0.121	0.113	0.119
C	0.091	0.089	0.076	0.085	0.074	0.077	0.082	0.079	0.077	0.109	0.127	0.112
D	0.091	0.087	0.082	0.084	0.100	0.103	0.105	0.091	0.077	0.085	0.094	0.086
E	0.098	0.082	0.078	0.082	0.091	0.086	0.063	0.082	0.090	0.100	0.084	0.100
F	0.102	0.080	0.082	0.081	0.083	0.094	0.103	0.090	0.086	2.610	0.084	0.108
G	0.110	0.084	0.081	0.084	0.090	0.097	0.096	0.104	0.102	0.120	0.093	0.108
H	0.127	0.107	0.098	0.116	0.181	0.126	0.123	0.086	0.127	0.141	0.133	0.122

seH-8

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.092	0.100	0.120	0.131	0.128	0.123	0.118	0.144	0.133	0.149	0.134	0.128
B	0.112	0.098	0.145	0.133	0.122	0.140	0.142	0.164	0.161	0.157	0.148	0.135
C	0.118	0.111	0.107	0.116	0.128	0.133	0.152	0.147	0.142	0.150	0.155	0.130
D	0.123	0.103	0.096	0.120	0.113	0.130	0.128	0.136	0.134	0.123	0.148	0.116
E	0.110	0.097	0.123	0.130	0.140	0.144	0.135	0.141	0.142	0.169	0.155	0.146
F	0.096	0.108	0.101	0.131	0.122	0.148	1.386	0.120	0.132	0.076	0.125	0.143
G	0.133	0.126	0.141	0.149	0.139	0.138	0.131	0.111	0.120	0.139	0.129	0.129
H	0.115	0.122	0.120	0.133	0.137	0.109	0.136	0.128	0.131	0.153	0.151	0.136

seH-9

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.097	0.094	0.085	0.089	0.133	0.101	0.104	0.109	0.093	0.102	0.094	0.108
B	0.098	0.096	0.090	0.081	0.109	0.083	0.087	0.089	0.091	0.101	0.103	0.141
C	0.091	0.086	0.090	0.077	0.087	0.082	0.091	0.082	0.086	0.116	0.111	0.117
D	0.098	0.084	0.085	0.081	0.085	0.095	0.091	0.085	0.083	0.100	0.122	0.139
E	0.089	0.094	0.100	0.091	0.081	0.082	0.088	0.085	0.091	0.095	0.105	0.071
F	1.414	0.087	0.088	0.087	0.088	0.085	0.088	0.088	0.091	0.120	0.127	0.118
G	0.099	0.090	0.095	0.091	0.102	0.100	0.102	0.103	0.103	0.132	0.163	0.138
H	0.098	0.116	0.104	0.092	0.104	0.099	0.125	0.117	0.140	0.127	0.135	0.125

10

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.095	0.095	0.097	0.091	0.124	0.106	0.115	3.036	0.119	0.117	0.126	0.124
B	0.096	0.108	0.101	0.107	0.114	0.125	0.129	2.292	0.109	0.111	0.137	0.123
C	0.103	0.095	0.097	0.115	0.109	0.134	0.134	0.066	0.108	0.130	0.137	0.135
D	0.100	0.118	0.106	0.121	0.124	0.129	0.113	1.319	0.116	0.113	0.122	0.120
E	0.094	0.112	0.105	0.106	0.077	0.135	0.065	1.311	0.118	0.114	0.125	0.134
F	0.102	0.096	0.104	0.112	0.100	0.135	0.111	3.125	0.111	0.118	0.119	0.108
G	0.105	0.105	0.107	0.117	0.114	0.134	0.126	0.086	0.122	0.140	0.151	0.142
H	0.112	0.104	0.117	0.109	0.113	0.110	0.119	2.917	0.123	0.116	0.140	0.129

(5) 항체 선발

- 각 특신별로 각각 2개의 항체를 선택하여 caputre 및 detector 로 사용하였다.
- 특신 단백질의 같은 자리를 인식하는 self-binding을 피하기 위해서 OD값이 3.0이상인 것과 2.8이상 3.0미만으로 나타났던 항체를 각각 선정하였다.

Table 9. 각 특신 별 선정된 항체 pair 및 OD 값 (붉은 색)

seA-1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.112	0.117	0.088	0.088	0.091	0.098	0.103	0.101	0.096	0.088	0.124	0.083
B	0.094	0.100	0.088	0.101	0.111	0.108	0.097	0.089	0.092	0.088	0.084	0.087
O	0.096	0.102	0.100	0.092	0.118	0.124	0.099	0.111	3.342	0.106	0.082	0.083
D	0.103	0.135	0.055	0.099	0.122	0.090	0.132	0.105	0.126	0.095	0.105	0.100
E	0.105	0.116	0.102	0.097	0.134	0.119	2.646	0.111	0.133	0.111	0.082	0.112
F	0.113	0.097	0.116	0.109	0.098	0.130	0.119	0.119	0.101	0.116	0.090	0.090
G	0.086	0.092	0.104	0.080	0.103	0.086	0.112	0.113	0.081	0.114	0.104	0.108
H	0.118	0.086	0.087	0.079	0.106	0.122	0.116	0.088	0.117	0.100	0.121	0.136

anti-SEA-1 (AbA1)

seA-2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.082	0.084	0.078	0.084	0.091	0.100	0.103	0.093	0.104	0.088	0.074	0.089
B	0.076	0.086	0.089	0.080	0.082	0.088	0.097	0.090	0.108	0.127	0.089	0.072
O	0.078	0.089	0.102	0.098	0.107	0.119	0.128	0.098	0.114	3.142	0.088	0.087
D	0.073	0.091	0.091	0.103	0.103	0.128	3.122	0.124	0.108	0.078	0.088	0.070
E	0.075	0.089	0.108	0.113	0.122	0.108	0.132	0.108	0.106	0.108	0.080	0.071
F	0.079	0.084	0.098	0.102	0.108	0.121	3.007	0.129	0.092	0.138	0.111	0.087
G	0.076	0.088	0.089	0.088	0.096	0.088	0.118	0.132	0.128	0.102	0.088	0.089
H	0.083	0.081	0.088	0.084	0.097	0.104	0.104	0.120	0.102	0.130	0.099	0.080

anti-SEA-2 (AbA2)

seO-2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.118	0.092	0.078	0.083	0.093	0.075	0.079	0.077	0.095	0.091	0.082	0.104
B	0.081	0.074	0.073	0.083	0.084	0.088	0.082	0.099	0.092	0.088	0.079	0.168
O	0.077	0.074	0.082	0.079	0.096	2.708	0.088	0.095	0.099	0.082	0.072	0.120
D	0.077	0.078	0.080	0.082	0.093	0.099	2.830	0.121	0.083	0.086	0.078	0.098
E	0.082	0.070	0.076	0.078	0.088	0.080	0.087	0.082	0.088	0.134	0.074	0.164
F	0.131	0.071	0.081	0.078	0.088	0.078	0.086	0.080	0.073	0.088	0.088	3.497
G	0.084	0.073	0.276	0.073	2.341	0.089	0.087	0.077	0.110	0.078	0.069	0.078
H	0.082	0.086	0.082	0.086	0.077	0.078	0.080	2.320	0.073	0.087	0.076	0.088

anti-SEC-1 (AbC1)

seO-10												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.092	0.108	0.089	0.107	0.131	0.113	0.097	0.119	0.088	0.182	0.181	2.942
B	2.980	0.110	0.088	2.644	0.116	0.112	0.108	0.097	0.138	3.042	0.098	0.184
O	0.084	0.091	0.089	0.114	0.126	3.176	4.428	0.108	0.092	0.129	0.111	0.107
D	0.087	2.902	0.102	0.102	0.127	0.108	0.138	0.148	0.090	0.101	2.812	0.102
E	0.099	0.190	0.127	0.114	0.126	0.124	0.284	0.124	0.104	0.107	0.118	0.119
F	0.107	0.097	0.090	0.138	0.120	0.122	0.109	0.109	0.097	0.100	0.096	0.090
G	0.096	0.095	0.102	0.108	0.095	0.119	0.103	0.091	0.095	0.109	0.107	0.138
H	0.084	0.086	0.091	0.108	0.100	2.657	0.091	0.116	0.110	0.097	0.111	0.108

anti-SEC-1 (AbC2)

seE-10												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.161	0.172	0.143	0.218	0.166	0.173	0.194	0.190	0.190	0.194	0.201	0.231
B	3.163	0.147	0.189	0.181	0.184	0.178	0.211	0.178	0.210	0.228	0.207	0.227
O	0.169	0.190	0.164	0.162	0.164	0.179	0.195	0.188	0.198	0.194	0.214	0.228
D	0.166	3.093	0.172	0.162	0.169	0.172	0.165	0.182	0.183	0.188	0.188	0.205
E	0.184	0.162	0.149	0.183	0.181	0.166	0.178	0.203	0.192	0.176	0.193	0.220
F	0.184	0.181	0.189	0.189	0.194	0.172	0.202	0.186	0.211	0.201	0.208	3.682
G	0.149	0.144	0.161	0.170	0.166	0.166	0.201	0.184	0.183	0.202	0.217	0.220
H	0.188	0.182	0.149	0.148	0.184	0.203	0.190	0.183	0.200	0.211	0.221	0.226

anti-SEE-1 (AbE1)
&
anti-SEE-2 (AbE2)

seH-10												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.095	0.095	0.097	0.091	0.124	0.108	0.115	2.035	0.119	0.117	0.128	0.124
B	0.096	0.108	0.101	0.107	0.114	0.128	0.129	2.292	0.109	0.111	0.137	0.123
O	0.103	0.095	0.097	0.116	0.109	0.134	0.134	0.088	0.108	0.130	0.137	0.138
D	0.100	0.118	0.108	0.121	0.124	0.129	0.113	1.319	0.118	0.113	0.122	0.120
E	0.094	0.112	0.106	0.108	0.077	0.138	0.086	1.311	0.118	0.114	0.126	0.134
F	0.102	0.096	0.104	0.112	0.100	0.136	0.111	3.125	0.111	0.118	0.119	0.108
G	0.106	0.108	0.107	0.117	0.114	0.134	0.128	0.088	0.122	0.140	0.161	0.142
H	0.112	0.104	0.117	0.109	0.113	0.110	0.119	2.217	0.123	0.118	0.140	0.129

anti-SEH-1 (AbH1)
&
anti-SEH-2 (AbH2)

(6) 각 항체의 교차반응 여부 평가 (cross reactivity check)

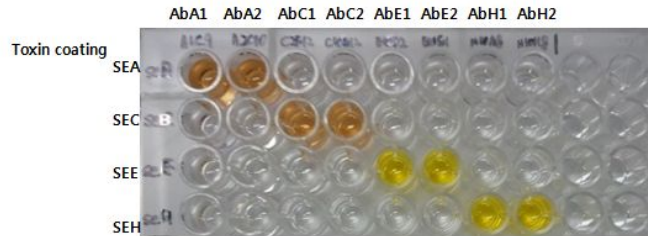


Figure 22. 항체의 교차반응 여부 평가 (cross reactivity check)

- 각 특신별로 한쌍 씩 선택한 항체에서 cross reactivity가 없음을 확인하였다.

3. Immunoquantitative real-time PCR의 개발

가. reporter DNA의 제작

- double-strand reporter DNA에 5' biotinylation(코스모진텍)을 적용하였으며 Biotin labeled primer design은 Journal of Food Protection, Vol. 73, No. 4, 2010, Pages 695 - 700 논문을 참조하였다: pUC-bio (5-biotin-CCCGGATCCCAGCAATAAACCCAGCCAGCC-3)과 BamHI restriction site F1 (5-TATGCAGTGCTGCCATAACCATGA-3)을 사용하였다.
- PCR 조건
 - ① Template: pUC19 plasmid
 - ② 95°C 5m/ 30 cycle of 95°C 30s; 55°C 30s, 72°C 30s/72°C 7m/4°C ∞
 - ③ Final product 340 bp

나. Capture 및 detection 항체의 처리

- Capture 및 detection 항체는 sensitivity 및 specificity 가 높은 조합을 선정 하기 위해 classical ELISA 실시하였다.
- Detection 후보 항체에 streptoavidin 처리하였다.
 - ① 1ul의 EL-Modifier reagent와 항체 10ul를 혼합
 - ② EL-Streptavidin mix와 항체용액을 혼합
 - ③ 실온, 암실에서 3시간가량 정치
 - ④ 사용하기 30분 전 항체용액 10ul 당 EL-Quencher reagent 1 ul를 혼합하여 사용

다. Classical ELISA

- (1) capture 항체 후보를 coating buffer (0.05 M NaHCO₃ and 0.05 M Na₂CO₃, pH 9.4)에 serial dilution 하여 96well plates (50 μL/well)에 4°C에서 overnight
- (2) Phosphate buffer saline (PBS) (0.1 M NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O, pH 7.4) 300 ul로 washing 실시
- (3) PBS with 3% BSA (300 μL/well)를 분주하여 2시간동안 실온에 정치
- (4) PBS로 washing 실시
- (5) Dilution buffer (PBS, 1% BSA)에 정제된 toxin antigen을 1 ug/ml부터 serial dilution하여 분주 하고 1시간동안 실온에 정치
- (6) PBS로 washing 실시
- (7) Streptoavidin conjugated detection antibody 후보를 분주하고 1시간동안 실온에 정치
- (8) PBS with 0.1% Tween 20으로 washing 실시
- (9) Peroxidase-conjugated biotin (Bio-rad)를 분주하고 실온에 30분간 정치

- (10) PBS로 washing 실시
- (11) Peroxidase activity 측정 (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB)과 H₂O₂로 반응 후 2 N H₂SO₄으로 stop
- (12) 450 nm에서 흡광도 측정
- (13) Detection 항체에는 reporter DNA의 biotin과 결합할 수 있는 streptavidin을 중합시킴
- (14) EasyLink Streptavidin Conjugation Kit (3 x 100μg Streptavidin) (Cat. No. ab102921)을 이용하여 실시

라. Immunoquantitative real-time PCR의 항체반응 단계 format 설정

Format of Immuno-realtime PCR setting

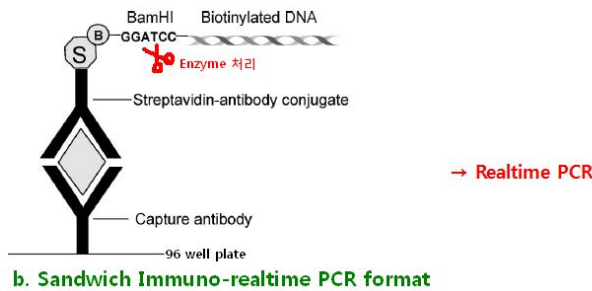
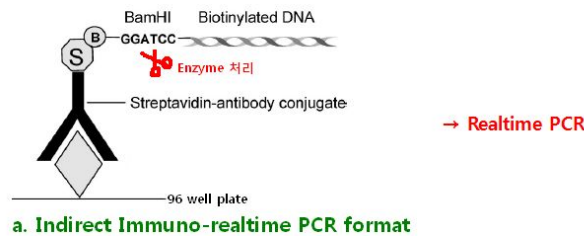


Figure 23. Format of Immuno-realtime PCR setting

- Immunoquantitative real-time PCR의 전반부에 해당하는 단계인 항원 항체 반응의 효과적인 format에는 항원을 plate에 코팅하는 indirect 방법과 capture 항체를 plate에 코팅하는 sandwich 방법이 가능하였다.
- 이 두가지 종류의 항원 항체 반응을 비교하여 immunoquantitative real-time PCR의 민감도와 특이도를 향상시키기 위한 기초자료로 사용하려 하였다..

(1) HRP-conjugated antibody 선정

- 이를 위해 이미 선정된 detector와 capture 항체 이외에 Develper로 사용될 3차 발색 항체로서 HRP conjugated anti-streptavidin Ab와 HRP conjugated anti-mousIgG Ab를 비교하는 시험을 수행하였다.

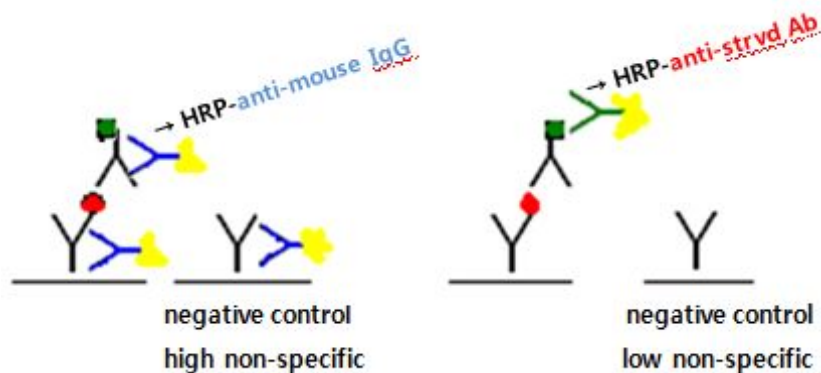


Figure 24. HRP-conjugated antibody 선정

- 이 시험을 수행한 이유는 HRP-anti-mouse IgG를 발색항체로 이용할 경우 capture 항체에도 반응을 하여 비특이도가 증가할 가능성이 있기 때문이다.

(2) 결과

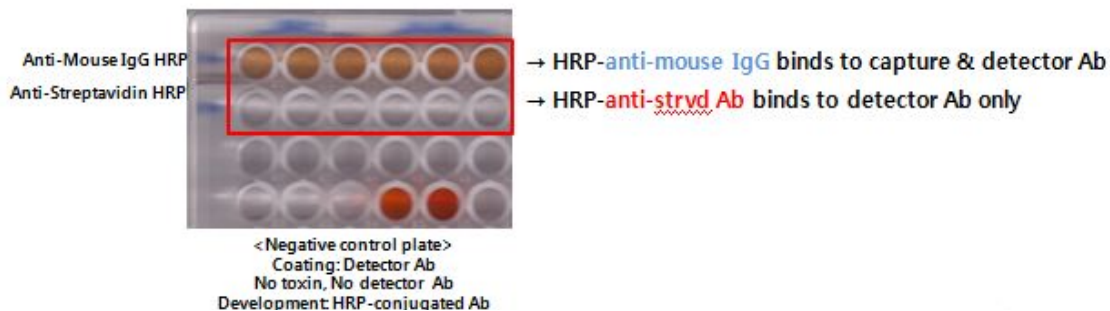


Figure 25. Negative control plate

- 위와 같이 HRP conjugated anti-streptoavidin Ab가 developer로 적절한 것으로 판단되었다.

마. Immunoquantitative real-time PCR 셋팅

(1) 실험방법

- Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96 well plate에 capture 항체 혹은 항원 부착
- 100 ul의 coating buffer (0.05M sodium carbonate Na₂CO₃, 0.05M sodium bicarbonate NaHCO₃, 0.015M sodium azide NaN₃, pH 9.6)로 항체 혹은 항원을 희석하여 각 well에 분주 후 4°C에서 overnight
- 3회 세척 (1× PBS, 0.05% Tween 20)
- 1시간 실온에서 Blocking (2% (w/v) BSA in 1× PBS) 후 3회 wash
- 정제된 toxin antigen 혹은 detector 항체를 wash buffer에 희석하여 분주 후 3시간동안 37°C에 incubation 후 3회 wash

- capture 항체를 코팅한 경우 detection 항체를 100 ul/well 에 분주하고 1 시간 실온에서 정치 후 3회 wash
- 1nM biotinylated reporter DNA를 분주 후 1시간 실온에서 정치
- Unbound reporter는 5회 wash하여 제거후 1× PCR buffer로 추가 1회 wash
- Restriction enzyme BamHI solution 100ul 씩 분주하여 3시간동안 37°C에 incubation
- 상층액을 취하여 Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System 을 이용하여 PCR 실시
- Total 20ul of reaction volume (Journal of Food Protection, Vol. 73, No. 4, 2010, Pages 695 - 700)
 - ① 6ul serially diluted biotinylated probe (10ng to 5pg)
 - ② 10ul SYBR 2X buffer
 - ③ 1ul 10pM Forward primer:
F2 (5-CCATAACCATGAGTGATAAACTGCT-3)
 - ④ 1ul 10pM Reverse primer:
R2 (5-CGATCAAGGCGAGTTACATGATC-3)
 - ⑤ 2ul DW
 - PCR 조건: 95°C 10m/ 40 cycles of 95°C 15s; 62°C 1m. Product size: 115 bp. Threshold cycle (Ct) 는 Applied Biosystems' SDS software v2.3로 측정

(2) Real-time PCR의 Ct value 정하기

- realtime PCR용 probe제작
 - pUC19 플라스미드를 template로 다음의 두 가지 프라이머 (forward: pUC-bio (5-biotin-CCCGGATCCCAGCAATAAACAGCCAGCC-3)와 F1 (5-TATGCAGTGC TGCCATAACCATGA- 3)으로 PCR을 실시한 결과 Final product는 예상대로 340 bp 전후로 나타났다.

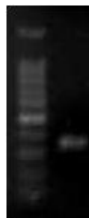


Figure 26. PCR product of probe

- 이렇게 제작된 probe를 농도별로 희석하여 realtime PCR용으로 디자인한 primer를 이용하여 realtime PCR에 적용한 결과 standard curve를 얻을

수 있었다.

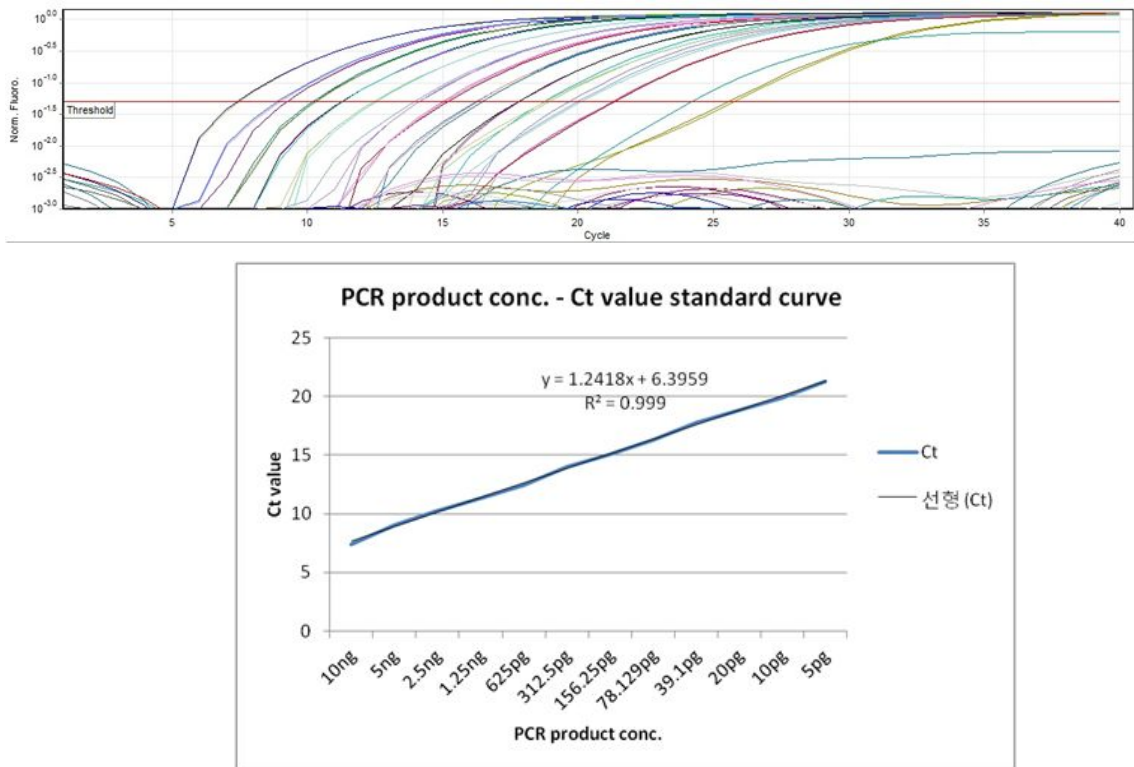


Figure 27. Real-time PCR의 Ct value 와 standard curve

(3) Indirect format을 이용한 평가

- Format의 결정은 SEH 항원 및 항체를 이용하여 수행하였다.
- 우선 항원을 코팅하여 정량을 수행하는 indirect ELISA 방법으로 kit를 구성하여 시험을 실시하였다.
 - SEH 항원을 96well plate에 coating: 1 pg/ml to 1 ug/ml, 2배수 단계희석법
 - anti-SEH streptoavidin conjugated detector Ab 분주: 0.5와 0.25ug/ml 두가지 농도로 시험하였다.
 - Classical ELISA 용 Developer Ab: anti-streptoavidin Ab 사용하였다.

○ 결과 1. Classical ELISA 형태로 실험한 결과

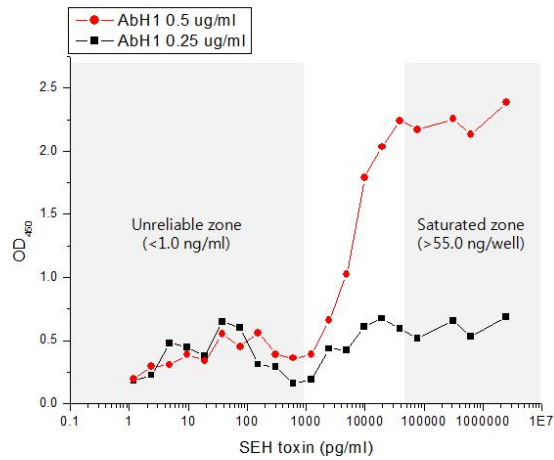


Figure 28. Classical ELISA result of indirect format-SEH

- Detector 항체 농도는 0.25 ug/ml보다 0.5 ug/ml에서 더 정확한 정량이 가능하였으며 약 1.0 ng/ml에서 55.0 ng/ml 사이의 구간에서 정량 가능 구간이 관찰되었다.

○ 결과 2. Immunoquantitative real-time PCR로 적용한 결과

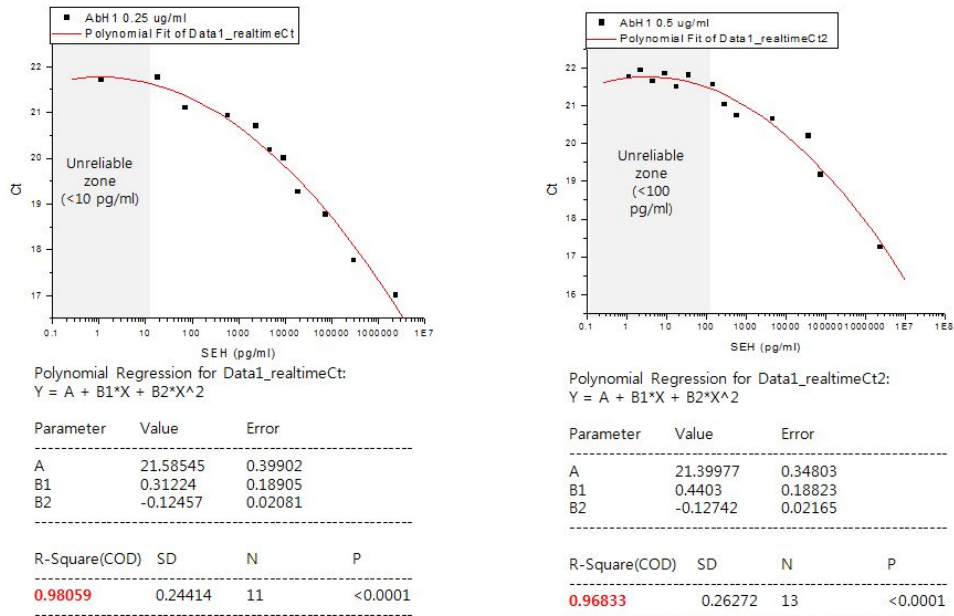


Figure 29. Immunoquantitative real-time PCR result of indirect format-SEH

- 민감도가 classical ELISA 방법을 사용하였을 경우인 1.0 ng/ml보다 낮은 10.0 pg/ml (detector Ab농도 0.25 ug/ml일 때)와 100.0 pg/ml (detector Ab농도 0.5 ug/ml일 때)로 10배에서 100배가량 낮아졌으며 검출 한계선도 classical ELISA 방법을 사용하였을 경우인 55.0 ng/ml보다 높은 1 ug/ml로 관찰되었다.
- 이처럼 classical ELISA 기법을 사용하였을 경우보다 Immunoquantitative real-time PCR 기법을 적용할 경우 민감도가 높아지고 정량 범위가 넓어졌다.
- Detector 항체 농도는 classical ELISA와 달리 0.5 ug/ml보다 0.25 ug/ml에서 더 유의적인 (R-square 값 기준) 정량이 가능한 것으로 판단되었다.

(4) Sandwich format을 이용한 평가

- anti-SEH capture Ab를 96well plate에 4 ug/well이 되도록 coating 하였으며 SEH Toxin 접종: SEH 항원을 96well plate에 1 pg/ml to 10 ug/ml, 2 배수 단계희석 접종하였다.
- anti-SEH streptoavidin conjugated detector Ab 분주: 0.5와 0.25ug/ml 두가지 농도로 시험 하였으며 Developer Ab: anti-streptoavidin Ab 사용하였다.
- **결과 1. Classical ELISA 형태로 실험한 결과**

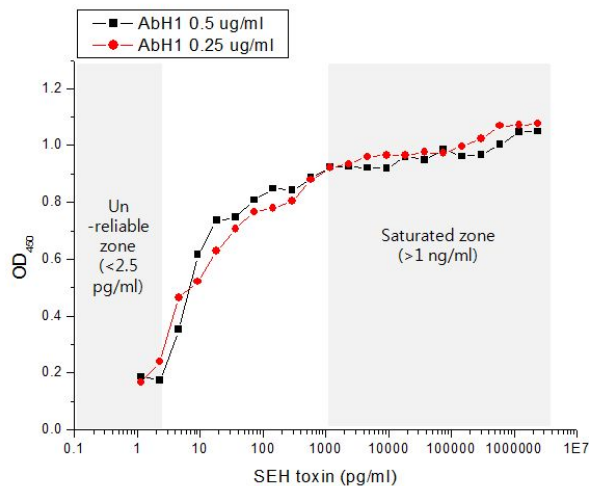


Figure 30. Classical ELISA 결과 result of sandwich format-SEH

- Indirect ELISA format에 비해 sensitivity는 높아지나 saturated zone이 비교적 빨리 나타났으며 Detector 항체 농도는 0.5와 0.25사이에 큰 차이는 없으나 0.25가 정량구간에서 좀더 직선 형태에 가까워 정량에 유리할 것으로 판단되었다.

○ 결과 2. Immunoquantitative real-time PCR로 적용한 결과

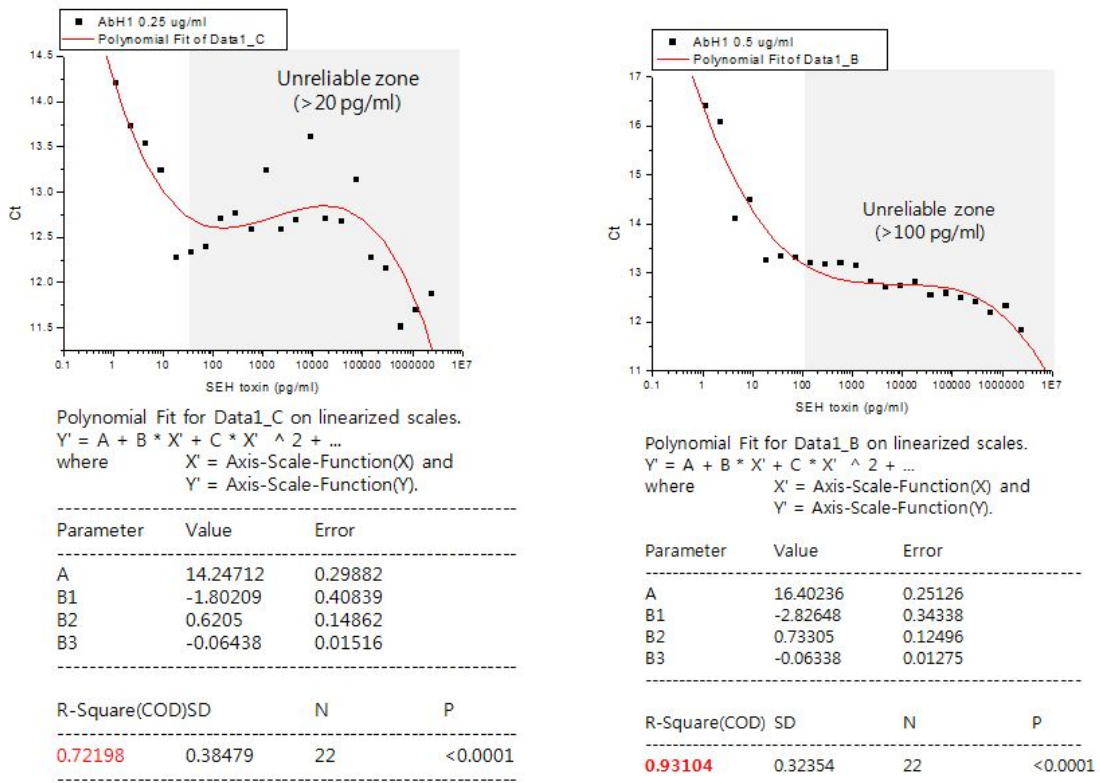


Figure 31. Immunoquantitative real-time PCR result of sandwich format-SEH

- Indirect format에 비해 sensitivity는 높아지나 saturated zone이 비교적 빨리 나타나 정량 구간이 오히려 감소하였고 Detector 항체 농도는 0.25보다 0.5 ug/ml일 때 더 유의적인 (R-square 값 기준) 정량이 가능한 것으로 판단되었다.
- 위 시험의 결과 classical ELISA 기법에서는 sandwich format이 더욱 정량이 유리하나 Immunoquantitative real-time PCR 기법에서는 항원을 코팅하는 indirect format이 정량에 유리한 것으로 판단되어 이후의 모든 Immunoquantitative real-time PCR kit setting은 indirect format을 기반으로 구성하였다.

(5) Indirect format immunoquantitative real-time PCR의 SEA 적용

- 앞에서 설정된 SEH 검출 방법을 바탕으로 SEA 검출 조건을 확립하였다.
- 결과 1. Classical ELISA result of indirect format - SEA

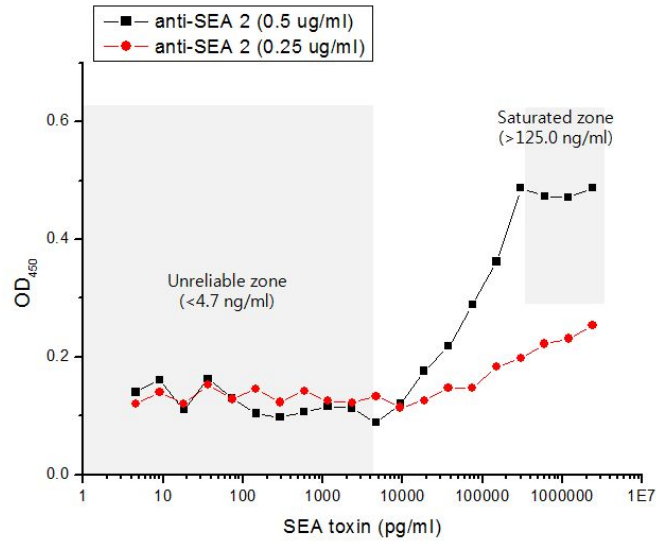


Figure 32. Classical ELISA result of indirect format-SEA

- Detector 항체 농도는 SEH 시험 때와 마찬가지로 0.25 ug/ml보다 0.5 ug/ml에서 더 정확한 정량이 가능하였으며 약 4.7 ng/ml에서 125.0 ng/ml 사이의 구간에서 정량 가능 구간이 관찰되었다.

○ 결과 2. Immunoquantitative real-time PCR로 적용한 결과

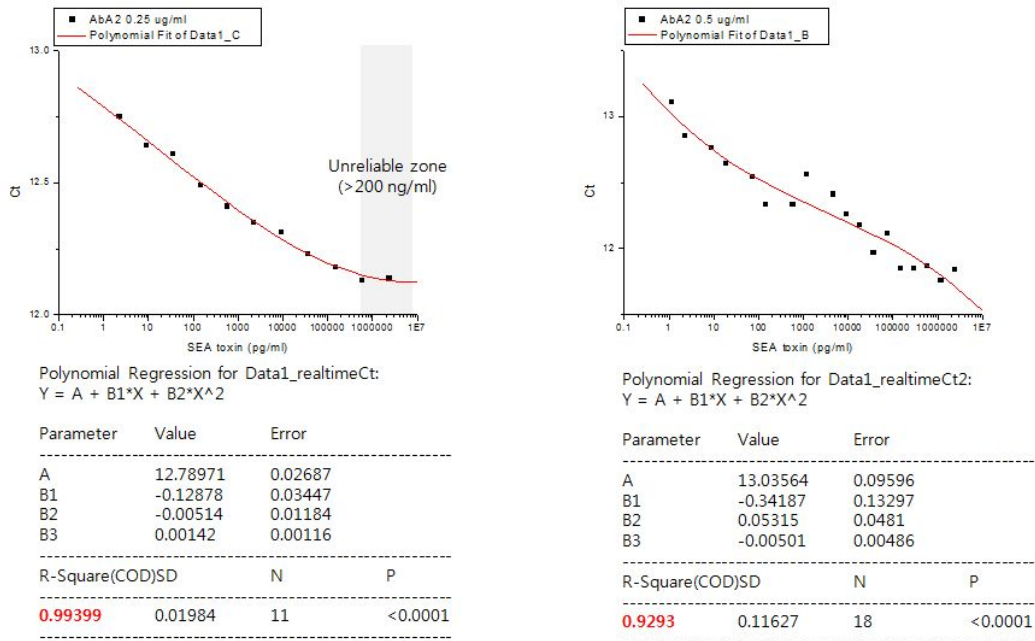


Figure 33. Immunoquantitative real-time PCR result of indirect format-SEA

- 민감도가 증가하며 (1.0 pg/ml 이하) 검출 한계선도 증가하여 classical ELISA 기법을 사용하였을 경우보다 Immunoquantitative real-time PCR 기법을 적용할 경우 민감도가 높아지고 정량 범위가 넓어졌고 Detector 항체 농도는 SEH 검출 시험때와 마찬가지로 0.5 ug/ml보다 0.25 ug/ml에서 더 유의적인 (R-square 값 기준) 정량이 가능한 것으로 판단되었다. 또한 Toxin이 없는 경우 SEA와 SEH 모두에서 Ct값 30 이상이 나와야 하는 것으로 판단되었다.

바. 개발된 Immunoquantitative real-time PCR의 평가

(1) 기존의 개발되어 판매중인 검출 kit와의 비교

(가) 대상

- VIDAS Staph Enterotoxin Test II (SET II): SEA에서 SEE독신을 모두 검출 할 수 있으나 독신의 종류는 구별하지 못하는 키트로써 정성 분석용이며 정량 분석이 불가하다.
- TECRA Staphylococcal Enterotoxins Identification (SET ID) Visual Immuno assay (VIATM) 와의 비교: SEA에서 SEE까지 종류별로 검출이 가능하며, 종류에 관계 없이 검출하는 well이 따로 제공되는 키트이며 정성 분석용이고 정량분석 불가하다.
- SEA 독신 (1 pg/ml, 10 pg/ml, 1 ng/ml, 100 ng/ml) 용액을 제조하여

위 두 가지 기존 검출 kit 및 본 연구에서 개발된 Immunoquantitative realtime PCR에 적용. negative control은 DW를 사용하며 positive control은 기존 키트에서 제공한 양성 시약을 사용하였다.

(나) 방법

- ① 포장을 뜯은 후 필요한 수만큼의 well 을 떼어내었다.
- ② Wash Solution으로 채운 squeeze bottle을 사용하여, 각각의 well을 Wash Solution으로 채우고 10분간 실온(20-25℃)에 방치하였다.
- ③ well을 홀더에 끼운 채로 홀더를 뒤집어 wash solution을 완전히 비운 후 종이 타월에 여러 번 쳐서 남아있는 물기를 완전히 제거하였다.
- ④ 샘플마다 파이펫 팁을 교환하시어, 컨트롤과 샘플을 각각의 well에 200 μ l 씩 덜어내고 플라스틱 접착 필름으로 well을 덮은 후 35-37℃ 에서 2시간 배양하였다.
- ⑤ Well을 완전히 비우고 Wash Solution으로 세척하였다.
- ⑥ 200 μ l의 Conjugate 시약을 각 well에 넣고 플라스틱 접착 필름으로 덮으신 후 실온 (20-25℃)에서 1시간 배양하였다.
- ⑦ well을 완전히 비운 후 5회 세척하였다.
- ⑧ 200 μ l의 Substrate 시약을 각 well에 넣고 실온 (20-25℃)에서 배양하였다.
- ⑨ 결과 판독은 제공된 Color Card를 사용하시거나, plate reader를 사용하였다.
- ⑩ 데이터가 의미있기 위해서는 positive control은 적어도 4번색 보다 진해야 하며 negative control은 카드에서 negative로 표시된 색범위에 있어야 하고 Plate reader의 경우 positive control은 1.0이상, negative control은 0.2이하 여야 한다.

(다) 비교 결과

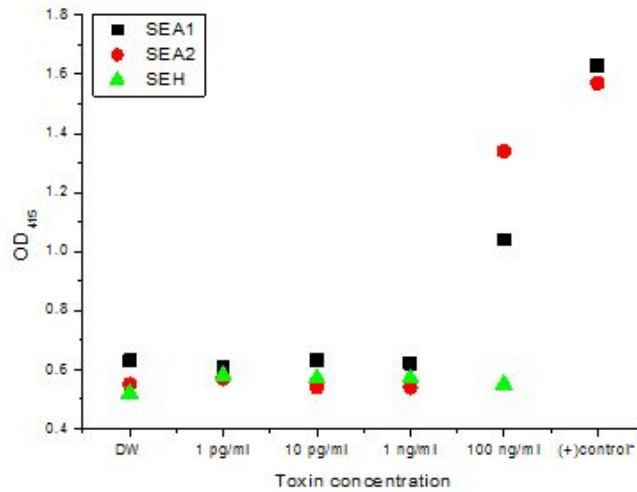


Figure 34. 시중에서 판단되는 *S. aureus* 정성방법 kit와의 비교분석

- SEA1 은 SEA 독신을 3M ID kit 중 SEA specific detection well에 적용한 결과
- SEA2는 SEA 독신을 3M VIDAS kit에 적용한 결과
- SEH는 SEH독신을 ID kit중 all toxin (SEA to SEE) 검출용 well에 적용한 결과
- Negative control은 독신이 없는, 용매로 사용했던 DW를 이용한 결과이며 Positive control (*)은 키트에서 제공한 것을 사용하였음.
- SEH는 3M 키트에서 제공한 positive control이 없다.
- 두 가지 3M 키트 모두 검출한계가 1 ng/ml이라고 하였으나 실제로는 100 ng/ml 이상에서 양성 반응이 나타남을 관찰하였다.
- 두 가지 3M 키트 모두 SEH 독신은 검출할 수 없음을 확인하였다.

(라) 결론

- 비교 결과 기존 키트가 100 ng/ml에서 검출이 가능했던 데 반해, Immunoquantitative realtime PCR의 경우 SEA는 1 pg/ml, SEH는 10 pg/ml부터 검출이 가능하였다.
- 비교 결과 기존 키트가 정성 분석만 가능하고 정량 분석이 불가능한데 반해, Immunoquantitative realtime PCR의 경우 정량검출이 가능하였다
- 비교 결과 기존 키트가 SEH의 검출을 할 수 없는데 반해, 본 연구에서 개발한 Immunoquantitative realtime PCR은 SEH를 검출할 수 있었으며, 정량 분석도 가능하였다.
- 본 비교 결과를 통해 본 연구과제를 통해 발현, 정제된 SE독소가 기존 검출 키트에도 정상적으로 반응하는 것을 확인 하였으며 따라서 본 독소로 만들어진 항체를 신뢰할 수 있을 것으로 기대된다.

(2) 실제 식품 시료를 이용한 독소 접종 시험

(가) 실험 방법

- 시중에서 구입한 김밥 및 시유 25g 혹은 25ml에 이미 알고 있는 농도의 enterotoxin을 serial dilution하여 농도별로 접종하였다. pH7~8 범위에 속하도록 조정하였다.
- BPW 225ml을 넣고 stomaker로 분쇄한 후 상층액을 취하여 개발된 Immunoquantitative realtime PCR 기법에 적용하여 실제 접종 농도를 측정할 수 있는지 검사하였다.

(나) 김밥을 이용한 독소 접종 시험 결과

① SEA 접종 시험

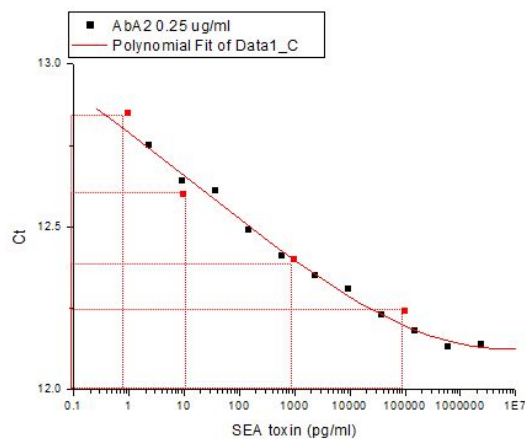


Figure 35. 김밥 SEA 접종 시험

- 붉은 점이 접종한 SEA의 농도 및 실제 결과값을 나타냄
- 10 pg/ml, 1 pg/ml, 1 ng/ml 및 100 ng/ml 농도 모두 유의적인 오차 범위 내로 정량에 성공하였음 (Error=0.003이내).
- DW를 접종한 negative control의 Ct값은 예상대로 30이상이 나옴
- 따라서 김밥의 경우 SEA 특신에 대해 1 pg/ml 이상의 농도에서 유의적인 정량이 가능하였다.
- 3M ID kit에서 제공한 SE positive control 용액을 본 kit에 적용한 결과 위에 나타난 정량곡선과 유의적인 차이가 나지 않는 결과를 얻었다.

② SEH 접종 시험

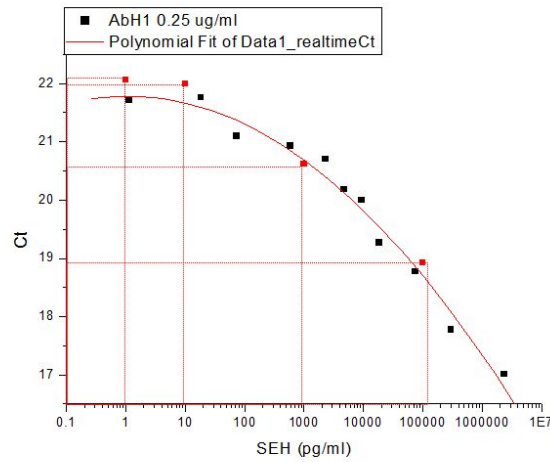


Figure 36. 김밥 SEH 접종 시험

- 붉은 점이 접종한 SEH의 농도 및 실제 결과값을 나타냄
- 1 ng/ml 및 100 ng/ml은 정량에 성공하였음 (Error=0.40 이내).
- 10 pg/ml 과 1 pg/ml은 오차범위 밖의 값이 측정되어 정량에 실패하였음.
- DW를 접종한 negative control의 Ct값은 예상대로 30이상 이 나옴
- 따라서 김밥의 경우 SEH 특신에 대해 100 pg/ml 이상의 농도에서 유의적인 정량이 가능하였다.

(다) 시유를 이용한 독소 접종 시험

① SEA 접종 시험

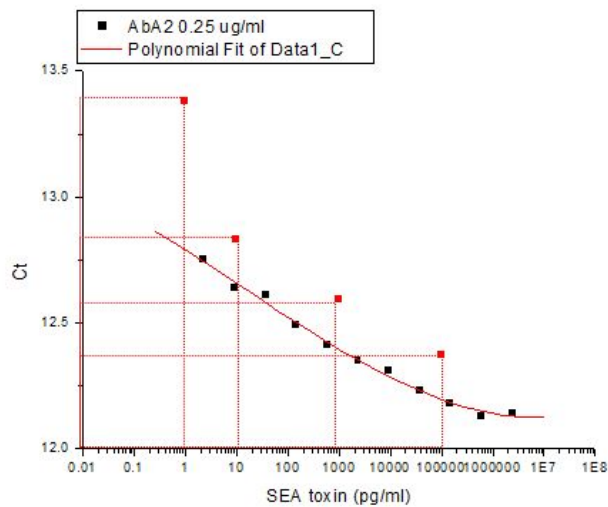


Figure 37. 시유 SEA 접종 시험

- 붉은 점이 접종한 SEA의 농도 및 실제 결과값을 나타냄
- 모든 경우에서 오차범위를 벗어남 (Error=0.003 이상).
- DW를 접종한 negative control의 Ct값은 예상대로 30이상이 나옴
- 따라서 시유의 경우 독립적인 표준 곡선 설정이 필요한 것으로 판단됨.
- 위에서의 시유에서 얻어진 data를 바탕으로 독립적으로 재설정된 표준 곡선의 정보는 다음과 같다.

Model: Logistic

Parameter	Value	Error
Chi ² /DoF	0.0273	
Initial(A1)	15.00202	13.6188
Final (A2)	12.061	0.61686
IC50 (x0)	0.19072	7.92688
Power (p)	0.19774	0.48755

- 3M ID kit에서 제공한 SE positive control 용액을 본 kit에 적용한 결과 재설정된 표준 정량 곡선과 유의적인 차이가 나지 않는 결과를 얻었다.

② SEH 접종 시험

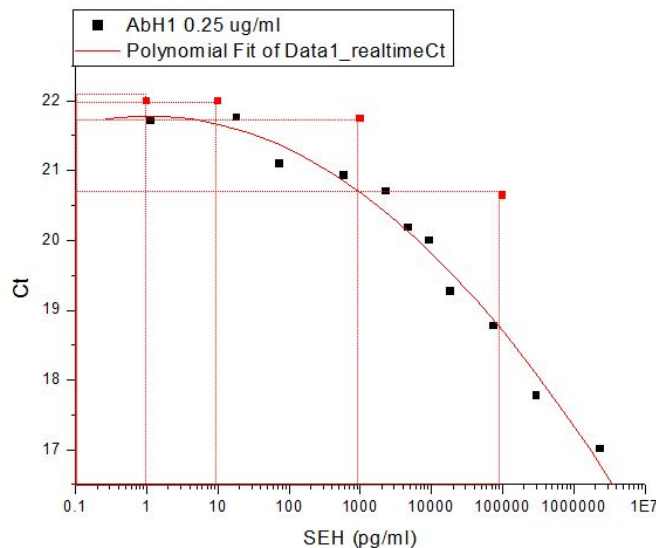


Figure 38. 시유 SEH 접종 시험

- 붉은 점이 접종한 SEH의 농도 및 실제 결과값을 나타냄
- 1 ng/ml 및 100 ng/ml의 경우에서 오차범위를 벗어남 (Error=0.040 이상).
- 10 pg/ml 과 1 pg/ml은 신뢰구간이 겹치면서 서로 유의적인 차이를 보이지 않아 구별할 수 없었다.
- DW를 접종한 negative control의 Ct값은 예상대로 30이상이 나옴
- 따라서 시유의 경우 독립적인 표준 곡선 설정이 필요한 것으로 판단됨.
- 위에서의 시유에서 얻어진 data를 바탕으로 독립적으로 재설정한 표준 곡선의 정보는 다음과 같다.

- Polynomial Fit for Data1_realtimeCt on linearized scales.

$$Y' = A + B * X' + C * X' ^ 2 + ...$$

where X' = Axis-Scale-Function(X) and

Y' = Axis-Scale-Function(Y).

Parameter	Value	Error
A	21.74222	0.75958
B1	0.80593	0.63769
B2	-0.23124	0.09738
R-Square(COD)	SD	N
0.91709	0.86438	5
		P
		0.08291

(라) 결론

- 김밥의 경우 SEA 특신에 대해 1 pg/ml 이상의 농도에서 유의적인 정량이 가능하였고, SEH 특신에 대해 100 pg/ml 이상의 농도에서 유의적인 정량이 가능하였으나 시유를 시료로 한 시험에서는 기존 표준곡선을 벗어나는 측정치가 관찰됨에 따라 시료별로 독립적인 정량 곡선을 작성할 필요성이 제기 되었다.
- 각각의 시료별 그리고 특신별 민감도와 측정 가능 범위가 다를 가능성이 제기되었으며 이를 보정하는 연구가 뒷받침 되어야 할 것으로 판단되었다.

제 2절 *S. aureus* enterotoxin 정량분석 kit의 상품화

1. 항원흡착플레이트 제작

- 거의 대부분의 단백질은 alkaline condition에서 microplate의 polystyrene 표면에 매우 강하게 부착된다. 그러나 일부 단백질 항원의 경우 플라스틱 표면에 낮은 수준으로 부착하거나 혹은 전혀 부착이 되지 않는 경우도 있다. 이것은 항원이 가지는 고유한 charge가 plate와 서로 밀어내는 성질을 가질 경우에 발생한다. 이러한 경우에는 capture 항체를 플레이트에 부착하여 항원을 확보하는 sandwich 방법을 사용하게 된다.
- 항체의 흡착은 항원과 마찬가지로 pH 9이상의 carbonate/bicarbonate buffer를 이용하여 진행된다. 본 키트에서 사용할 흡착 플레이트는 항체가 아니라 항원을 흡착하는 direct coating 방법을 적용하였다. 따라서 본 키트에는 pre-coated plate를 제공하지 않고, coating이 안되어 있는 plate를 제공하게 된다.



Figure 39. ELISA용 8-well strip microtiter plate

- 흡착 plate는 흔히 표면의 전하 차이에 의해 종류가 구별된다. Highly charged polystyrene surface는 polar 혹은 hydrophilic한 단백질 항원에 대한 affinity가 높다. 또한 이 plate는 항체에도 affinity가 좋기 때문에, 항원 처리 후 항체 처리하기 전 blocking이 매우 중요하다. 이 장점을 이용하여 sandwich ELISA에 유리한 plate로 알려져 있다. 두 번째 종류의 plate는 hydrophobic한 성질이 좀 더 높은 것으로서, hydrophobic한 성질이 높은 단백질 항원과 잘 흡착한다. 이러한 성질을 가지는 항원으로는 바이러스 항원과 같은 비단백성 항원이 있다. 마지막으로 그 어떤 종류의 분자에도 low affinity를 가지는 polystyrene이 있는데 이들은 주로 96 well plate가 아닌 tube 형태로 제공된

다. 본 과제에서 개발된 kit는 친수성이 높은 SE toxin을 흡착해야 하므로 가장 처음에 설명했던 종류의 plat를 제공하기로 결정하였다.

- IgG 단백질을 기준으로 하였을 때, 본 plate의 최대 binding capacity는 flat bottom기준으로 650 ng/cm^2 이다. 실험 중의 plate 낭비를 막기 위하여 1 x 8 breakable strip으로 제공 되었다. 이러한 strip들은 spring lock이라고 불리는 고정 장치에 함께 조립되어 제공되었으며, spring lock의 기능은 각각의 well을 수평하게 맞추어 주어 균일한 세척과 반응을 가능하게 한다.
- 본 키트에서 제공하는 plate는 항원의 흡착시에 passive adsorption 방법을 사용해야 한다. 전통적으로 direct coating은 ELISA에서 carbonate/bicarbonate buffer (pH>9)를 이용한 passive adsorption을 사용한다. 본 키트에서 제공하는 plate 표면은 polystyrene이며, gamma ray를 처리해서 표면이 positive charge인 상태이다. Carbonate/bicarbonate buffer는 basic한 성질을 가지기 때문에 대부분의 단백질 항원은 이 pH에서 negative charge를 가지게 된다. 이렇게 발생된 negative charge가 결합하는데 더 도움을 주게 된다.

2. Detection antibody와 Biotin의 conjugate system 확립

- 생산한 Detection 항체에 streptoavidin을 conjugation 하였다.
 - ① 1l의 EL-Modifier reagent와 항체 10l를 혼합
 - ② EL-Streptavidin mix와 항체용액을 혼합
 - ③ 실온, 암실에서 3시간가량 정치
 - ④ 사용하기 30분 전 항체용액 10l 당 EL-Quencher reagent 1 l를 혼합하여 사용

3. Reporter double strand DNA와 Streptoavidin substrate system 확립

- 5' biotinylation된 forward primer를 제작하여 pUC19 template를 이용하여 PCR을 통해 reporter DNA를 생산하였다.
pUC-bio(5-biotin-CCCGGATCCCAGCAATAAACCCAGCCAGCC-3)과 BamHI restriction site F1 (5-TATGCAGTGCTGCCATAACCATGA-3)을 사용하였다.
- PCR 조건
 - ① Template: pUC19 plasmid
 - ② 95°C 5m/ 30 cycle of 95°C 30s; 55°C 30s, 72°C 30s/ 72°C 7m/ 4°C ∞
 - ③ Final product 340 bp

4. Kit 효능평가

(1) 특이도 및 민감도 평가

(가) 시험 방법

① Sensitivity 평가 시험

- enterotoxin을 완충액으로 연속 희석하여 100ug, 10ug, 1ug, 100ng, 10ng, 1ng 100pg, 10pg, 1pg으로 희석하여 검사 실시하였다.
- 양성 표준물질을 100 μ l씩 각기 30개의 진단 kit에 적용 후 아래와 같은 공식을 적용하여 결과를 산출하였다.
- 민감도 = (양성반응 kit 수 / 양성반응 kit 수 + 음성반응 kit 수) \times 100 (%)

② Specificity 평가 시험

- 서로다른 enterotoxin 및 E. coli 등이 분비하는 독소와의 교차반응을 조사하였다.
- 음성 표준물질을 100 μ l씩 각기 100개의 진단kit에 적용 후 아래와 같은 공식을 적용하여 결과를 산출하였다.
- 특이도 = (음성반응 kit 수 / 양성반응 kit 수 + 음성반응 kit 수) \times 100 (%)

(나) 특이도 및 민감도 평가 결과

① Sensitivity 평가 시험

- enterotoxin을 완충액으로 연속 희석하여 100ug, 10ug, 1ug, 100ng, 10ng, 1ng 100pg, 10pg, 1pg으로 희석하여 검사 실시하였다.
- 양성 표준물질을 100 μ l씩 각기 30개의 진단 kit에 적용 후 아래와 같은 공식을 적용하여 결과를 산출하였다.
- 민감도 = (양성반응 kit 수 / 양성반응 kit 수 + 음성반응 kit 수) \times 100 (%)

Table 10. Immunoquantitative real-time PCR kit의 민감도

SEA kit		SEH kit	
SEA 농도	민감도 (%)	SEH 농도	민감도 (%)
100 ug/ml	93.3	100 ug/ml	96.7
10 ug/ml	100.0	10 ug/ml	96.7
1 ug/ml	100.0	1 ug/ml	100.0
100 ng/ml	100.0	100 ng/ml	100.0
10 ng/ml	100.0	10 ng/ml	100.0
1 ng/ml	100.0	1 ng/ml	100.0
100 pg/ml	96.7	100 pg/ml	93.3
10 pg/ml	93.3	10 pg/ml	86.7
1 pg/ml	96.7	1 pg/ml	93.3

② Specificity 평가 시험

- 서로 다른 enterotoxin 및 E. coli 등이 분비하는 독소 (LPS)와의 교차반응을 조사하였다.
- 음성 표준물질을 100 μ l씩 각기 100개의 진단kit에 적용 후 아래와 같은 공식을 적용하여 결과를 산출하였다.
- 특이도 = (음성반응 kit 수 / 양성반응 kit 수 + 음성반응 kit 수) \times 100(%)

Table 11. Immunoquantitative real-time PCR kit의 특이도

SEA kit		SEH kit	
음성표준물질	특이도 (%)	음성표준물질	특이도 (%)
SEB 10 ng/ml	100.0	SEB 10 ng/ml	100.0
SEC1 10 ng/ml	100.0	SEC1 10 ng/ml	100.0
SED 10 ng/ml	100.0	SED 10 ng/ml	100.0
SEE 10 ng/ml	100.0	SEE 10 ng/ml	100.0
SEH 10 ng/ml	100.0	SEH 10 ng/ml	100.0
LPS 1 ug/ml	100.0	LPS 1 ug/ml	100.0

(2) 시약의 안정성 평가

(가) 연구 방법

- 제작된 kit를 4 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C 등 3가지 온도에서 보관하였으며, 2주 간격으로 양성대조 검체 및 음성대조 검체를 이용하여 검사를 수행하였다. 이 때 양성대조 검체 및 음성대조 검체를 각각 3회 반복 검사하였다.

(나) 연구 결과

- 본 키트의 경우 4 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C 등 3가지 보관온도에서 모두 6개월 동안 초기 활성의 90% 이상의 활성을 유지하고 있다. 일반적으로 상온 보관 조건에서의 유효기간은 37 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C의 가혹 조건에서 보관할 때의 유효기간 보다 약 3배 이상의 기간으로 환산되므로, 본 과제의 rapid test kit의 유효기간은 최소 18개월 이상으로 추정된다.

(3) 실제 식품 matrix 별 시험 방법 조사

- 본 과제에서 개발한 키트로서의 적합성을 평가하기 위해, 시중에 유통되는 생닭, 쇠고기, 돼지고기, 김밥, 샌드위치, 크림빵 등 45 검체를 구입하여 독소오염을 확인하였다. 3M TECRA Staph Enterotoxins 전혀 검출이 되지 않았으나 3M Staph Enterotoxins Immunoquantitation kit 제품에는 생닭 1개 제품이 157pg으로 검출되어 Tecra staph enterotoxin 키트보다는 민감도, 특이성 그리고 정량까지 분석되어 본 과제로 개발된 키트의 우수함을 볼 수 있었다.

Table 12 . 시중 유통 식품검체를 이용한 field test

식품검체	검체수	검사방법에 따른 양성판정 검체수	
		3M Staph Enterotoxins Immunoquantitation kit	3M TECRA Staph Enterotoxins
생닭	10	1개 제품검출 (157 pg)	0
쇠고기	10	0	0
돼지고기	10	0	0
김밥	5	0	0
샌드위치	5	0	0
크림빵	5	0	0

(4) 교차반응 조사

- 본 과제에서 개발한 3M Staph Enterotoxins Immunoquantitation kit로 enterotoxin producing 표준균주(*Staphylococcus aureus* FRI 913, *Staphylococcus aureus* FRI 569), enterotoxin non producing 표준균주 (*Staphylococcus aureus* RN4220) 및 기타 다른 식중독 세균과 반응을 확인하였다. enterotoxin producing 표준균주에서만 반응을 보였을 뿐 다른 균주에는 반응이 일어나지 않았다.

Table 13. 교차반응 조사

균주	검사 키트에 따른 결과					
	3M Immunoquantitation kit	Staph	Enterotoxins	3M Enterotoxins	TECRA	Staph
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076			-		-	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313			-		-	
<i>Esherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43888			-		-	
<i>Esherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43890			-		-	
<i>Esherichia coli</i> ATCC 9873			-		-	
<i>Esherichia coli</i> ATCC 25922			-		-	
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313			-		-	
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12026			-		-	
<i>Salmonella paratyphi</i> ATCC 11511			-		-	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311			-		-	
<i>Salmonella newport</i> ATCC 6962			-		-	
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076			-		-	
<i>Salmonella london</i> ATCC 8389			-		-	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111			-		-	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 193131			-		-	
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119			-		-	
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090			-		-	
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 6750			-		-	
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933			-		-	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13036			-		-	
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 700872			-		-	
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124			-		-	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			-		-	
<i>Staphylococcus aureus</i> RN4220			-		-	
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI 913			+(양성)		+	
<i>Staphylococcus aureus</i> FRI 569			+(양성)		+	

5. 안전성 연구

(1) 안전성 · 유효성 심사 관련 규정 조사

가. 본 kit에 포함되어 있는 구성 시약 중 인체에 해를 끼칠 가능성이 있는 시약으로는 recombinant SE protein이 있으며 이 시약에 대한 안전성 연구가 필요하여 해당 관련 법규를 조사하였다.

나. 관련규정

- 1) 약사법 제2조 (정의) ④항 : 의약품이라 함은 1. 대한약전(大韓藥典)에 실린 물품 중 의약품이 아닌 것, 2. 사람이나 동물의 질병을 진단·치료·경감·처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구·기계 또는 장치가 아닌 것, 3. 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적(藥理學的) 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구·기계 또는 장치가 아닌 것. <개정 1965.4.3, 1971.1.13, 2000.1.12>
- 2) 약사법 제42조 (의약품등의 수입허가 등) ⑤항 : 의약품등의 수입 품목을 허가할 때의 허가 대상·기준·조건 및 관리 등에 필요한 사항은 보건복지부령으로 정한다. <개정 1994.1.7, 1997.12.13>
- 3) 약사법시행규칙 제23조 (제조·수입품목의 허가신청 등) ①항 : 법 제26조 제1항 또는 법 제34조 제1항의 규정에 의하여 의약품등의 품목허가를 받고자 하는 자는 별지 제12호 서식에 의한 신청서(전자문서로 된 신청서를 포함한다)에 다음 각호의 구분에 따른 서류(전자문서를 포함한다)를 첨부하여 식품의약품안전청장에게 제출하여야 한다. 나. 기준 및 시험방법 심사결과통지서로서 2년이 지나지 아니한 것, 마. 수입품의 경우, (1) 생산국의 정부 또는 공공기관에서 그 품목이 생산국의 법령에 적합하게 제조되고 있음을 증명하는 제조증명서, (2) 허가 또는 등록국의 정부 또는 공공기관에서 그 품목이 그 국가의 법령에 적합하게 판매되고 있음을 증명하는 판매증명서. <개정 2000.3.3, 2000.6.16, 2002.1.12, 2002.11.5, 2005.10.7>
- 4) 약사법시행규칙 제27조 (안전성·유효성의 심사) ①항 : 법 제34조 제5항의 규정에 의하여 의약품등의 품목허가 또는 품목변경허가를 받거나 품목신고 또는 품목변경신고를 하고자 하는 자는 다음 각호의 자료(전자문서를 포함한다)를 갖추어 그 품목에 대한 안전성·유효성의 심사를 받아야 한다. 이 경우 심사대상 품목, 자료작성요령, 각 자료의

요건 및 면제범위·심사기준 등에 관한 세부규정과 독성 및 약리작용 등에 관한 자료의 작성을 위하여 실시하는 비 임상시험의 관리에 필요한 사항은 식품의약품안전청장이 정하는 바에 의한다. <개정 1997.5.21, 2000.3.3, 2000.6.16, 2002.11.5, 2005.10.7.

- 5) 의약품·의약외품의 제조·수입품목 허가신청(신고)서 검토에 관한 규정 제2조 (정의) ①항 7호 : “체외진단용의약품”이라 함은 인체에서 유래하는 시료를 검체로 하여 검체 중의 물질을 검출하거나 측정하여 인체의 질병감염 여부 등을 판정할 목적으로 사용되는 시약을 말하며, 통상 다른 기구 등(보조시약 포함)과의 조합에 의해 사용하는 경우(예 : 키트)를 포함한다. 다만, 체외진단용의약품을 실험실적으로 사용할 때 보조적 또는 부수적으로 사용되는 것으로서 그 자체만으로는 진단 등 목적으로 사용되지 아니하는 실험실적 조제시약, 반응전후 처리시약, 생화학자동분석기용 시약 등과 같은 보조시약 류는 제외한다. <식약청고시 제2007-18호, 2007.3.28>
- 6) 의약품등의 안전성·유효성 심사에 관한 규정 제3조(심사규정) ①항 : 이 규정에 의한 의약품등의 안전성·유효성 심사는 약사법, 마약류 관리에 관한 법률에 의하여 제조 또는 수입품목허가(변경허가를 포함한다)를 받고자 하는 의약품등을 그 대상으로 한다. 다만, 다음 각호의 어느 하나에 해당하는 경우는 제외한다. 3. 체외진단용의약품으로서 이미 허가된 바 있는 측정원리를 이용하는 품목(측정항목이 새로운 품목은 제외한다). <식약청고시 제2007-30호, 2007.5.25>
- 7) 의약품등의 안전성·유효성 심사에 관한 규정 제5조(의약품등이 제출 자료의 범위) ③항 : 제1항의 규정에 불구하고 체외진단용의약품으로서 측정원리가 새로운 경우 또는 측정항목이 새로운 경우에는 다음 각호의 자료를 제출하여야 한다. 1. 개발경위, 측정원리 및 방법, 외국의 사용현황, 임상진단상의 의의에 관한 자료, 2. 용법·용량의 설정근거에 관한 자료, 3. 사용상의 주의사항 설정에 관한 자료, 4. 저장방법 및 사용기간의 설정에 관한 자료, 5. 시험결과에 대한 임상적 고찰, 6. 동일목적으로 사용되는 다른 체외진단용의약품과의 상관성에 관한 자료. <식약청고시 제2007-30호, 2007.5.25>

다. 3M SE toxin 검출 키트 관련 safety data sheet 초안 작성

- PRODUCT NAME: 3MTM Staph Enterotoxins Immunoquantitation kit
- MANUFACTURER: 3M
- DIVISION: Food Safety Department
- Issue Date: 06/29/12
- This product is a kit or a multipart product which consists of multiple, independently packaged components. An MSDS for each of these components is included. Please do not separate the component MSDSs from this cover page. The document numbers of the MSDSs for components of this product are: 22-8703-5, 22-9033-6, 22-8715-9, 22-9038-5, 22-9172-2, 22-8711-8, 22-8705-0, 22-8712-6, 22-8720-9
- use or application. Given the variety of factors that can affect the use and application of a 3M product, some of which are uniquely within the user's knowledge and control, it is essential that the user evaluate the 3M product to determine whether it is fit for a particular purpose and suitable for user's method of use or application. 3M provides information in electronic form as a service to its customers. Due to the remote possibility that electronic transfer may have resulted in errors, omissions or alterations in this information, 3M makes no representations as to its completeness or accuracy. In addition, information obtained from a database may not be as current as the information in the MSDS available directly from 3M.
- EMERGENCY OVERVIEW
 - Odor, Color, Grade: Colorless liquid
 - General Physical Form: Liquid
 - Immediate health, physical, and environmental hazards:
- POTENTIAL HEALTH EFFECTSMATERIAL SAFETY DATA SHEET
 - Eye Contact:
 - Mild Eye Irritation: Signs/symptoms may include redness, pain, and tearing.
 - Skin Contact: Mild Skin Irritation: Signs/symptoms may include localized redness, swelling, and itching.
 - Inhalation: Respiratory Tract Irritation: Signs/symptoms may include cough, sneezing, nasal discharge, headache, hoarseness, and nose and throat pain. May be absorbed following inhalation and cause target organ effects.
 - Ingestion: Gastrointestinal Irritation: Signs/symptoms may include abdominal pain, stomach upset, nausea, vomiting and diarrhea. May be absorbed following ingestion and cause target organ effects.
 - Target Organ Effects: Prolonged or repeated exposure may cause:
 - Liver Effects: Signs/symptoms may include loss of appetite, weight loss, fatigue, weakness, abdominal tenderness and jaundice.
 - Kidney/Bladder Effects: Signs/symptoms may include changes in urine production, abdominal or lower back pain, increased protein in urine, increased blood urea nitrogen (BUN), blood in

urine, and painful urination.

- FIRST AID PROCEDURES

The following first aid recommendations are based on an assumption that appropriate personal and industrial hygiene practices are followed.

Eye Contact: Flush eyes with large amounts of water. If signs/symptoms persist, get medical attention.

Skin Contact: Wash affected area with soap and water. If signs/symptoms develop, get medical attention.

Inhalation: Remove person to fresh air. If signs/symptoms develop, get medical attention.

If Swallowed: Do not induce vomiting unless instructed to do so by medical personnel. Give victim two glasses of water. Never give anything by mouth to an unconscious person. Get medical attention.

- FLAMMABLE PROPERTIES

Autoignition temperature Not Applicable

Flash Point Not Applicable

Flammable Limits - LEL Not Applicable

Flammable Limits - UEL Not Applicable

- EXTINGUISHING MEDIA

Material will not burn. Use fire extinguishers with class B extinguishing agents (e.g., dry chemical, carbon dioxide).

- PROTECTION OF FIRE FIGHTERS

Special Fire Fighting Procedures: Wear full protective equipment (Bunker Gear) and a self-contained breathing apparatus

Unusual Fire and Explosion Hazards: Not applicable.

Note: See STABILITY AND REACTIVITY (SECTION 10) for hazardous combustion and thermal decomposition information.

- Personal precautions

Evacuate unprotected and untrained personnel from hazard area. The spill should be cleaned up by qualified personnel. Ventilate the area with fresh air. For large spill, or spills in confined spaces, provide mechanical ventilation to disperse or exhaust vapors, in accordance with good industrial hygiene practice. Warning! A motor could be an ignition source and could cause flammable gases or vapors in the spill area to burn or explode. Remember, adding an absorbent material does not remove a toxic, corrosivity or flammability hazard.

- Environmental procedures

For larger spills, cover drains and build dikes to prevent entry into sewer systems or bodies of water. Collect the resulting residue containing solution. Place in a metal container approved for transportation by appropriate authorities. Dispose of collected material as soon as possible.

- Clean-up methods

Refer to other sections of this MSDS for information regarding physical and health hazards, respiratory protection, ventilation, and personal protective equipment. Call 3M-HELPS line (1-800-364-3577) for more information on handling and managing the spill. Contain spill. Working from around the edges of the spill inward, cover with bentonite, vermiculite, or commercially available inorganic absorbent material. Mix in sufficient absorbent until it appears dry. Collect as much of the spilled material as possible. Clean up residue with an appropriate solvent selected by a qualified and authorized person. Ventilate the area with fresh air. Read and follow safety precautions on the solvent label and MSDS. In the event of a release of this material, the user should determine if the release qualifies as reportable according to local, state, and federal regulations.

- HANDLING

Avoid eye contact. Do not eat, drink or smoke when using this product. Wash exposed areas thoroughly with soap and water. Avoid breathing of vapors, mists or spray. Avoid skin contact. Use general dilution ventilation and/or local exhaust ventilation to control airborne exposures to below Occupational Exposure Limits. If ventilation is not adequate, use respiratory protection equipment.

- STORAGE

Store in a cool place.

- ENGINEERING CONTROLS

Use with appropriate local exhaust ventilation. Use general dilution ventilation and/or local exhaust ventilation to control airborne exposures to below Occupational Exposure Limits and/or control mist, vapor, or spray. If ventilation is not adequate, use respiratory protection equipment.

- Eye/Face Protection

Avoid eye contact. The following eye protection(s) are recommended: Safety Glasses with side shields

- Skin Protection

Avoid skin contact. Select and use gloves and/or protective clothing to prevent skin contact based on the results of an exposure assessment. Consult with your glove and/or protective clothing manufacturer for selection of appropriate compatible materials. Gloves made from the following material(s) are recommended: Nitrile Rubber Selection and use of gloves is recommended to prevent skin contact.

- Respiratory Protection

Under normal use conditions, airborne exposures are not expected to be significant enough to require respiratory protection. Avoid breathing of vapors, mists or spray.

- Prevention of Swallowing

Do not eat, drink or smoke when using this product. Wash exposed areas thoroughly with soap and water. Not applicable.

- PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

General Physical Form: Liquid

Autoignition temperature Not Applicable
Flash Point Not Applicable
Flammable Limits - LEL Not Applicable
Flammable Limits - UEL Not Applicable
Boiling point No Data Available
Density No Data Available
Vapor Density No Data Available
Vapor Pressure No Data Available
Specific Gravity ≥ 1
pH No Data Available
Melting point No Data Available
Solubility In Water Not Applicable
Evaporation rate No Data Available
Hazardous Air Pollutants 0.005 - 0.01 % weight
Volatile Organic Compounds 0
Kow - Oct/Water partition coef No Data Available
Percent volatile 0
VOC Less H₂O & Exempt Solvents 0
Viscosity No Data Available

SECTION 10: STABILITY AND REACTIVITY

Stability: Stable.

- TOXICOLOGICAL INFORMATION

Please contact the address listed on the first page of the MSDS for Toxicological Information on this material and/or its components.

- ECOLOGICAL INFORMATION

- CHEMICAL FATE INFORMATION

- DISPOSAL CONSIDERATIONS

Waste Disposal Method: Dispose of waste product in a permitted hazardous waste facility.

EPA Hazardous Waste Number (RCRA): D009 (Mercury)

Since regulations vary, consult applicable regulations or authorities before disposal.

- Fire Hazard - No Pressure Hazard - No Reactivity Hazard - No Immediate Hazard - Yes Delayed Hazard - Yes

- SECTION 16: OTHER INFORMATION

NFPA Hazard Classification

Health: 2 Flammability: 0 Reactivity: 0 Special Hazards: None

National Fire Protection Association (NFPA) hazard ratings are designed for use by emergency response personnel to address the hazards that are presented by short-term, acute exposure to a material under conditions of fire, spill, or similar emergencies. Hazard ratings are primarily based on the inherent physical and toxic properties of the material but also include the toxic properties of combustion or decomposition products that are known to be generated in significant quantities.

Reason for Reissue: Updated waste disposal section.

6. 시제품 생산

(1) 기타 구성 시약 제조

- Tween 20은 유색의 tube에 키트 당 25ul 씩 분주하여 제공하였으며, Skim milk는 plastic bottle에 키트 당 5 g씩 담아서 제공하였다.

(2) Kit의 제조공정

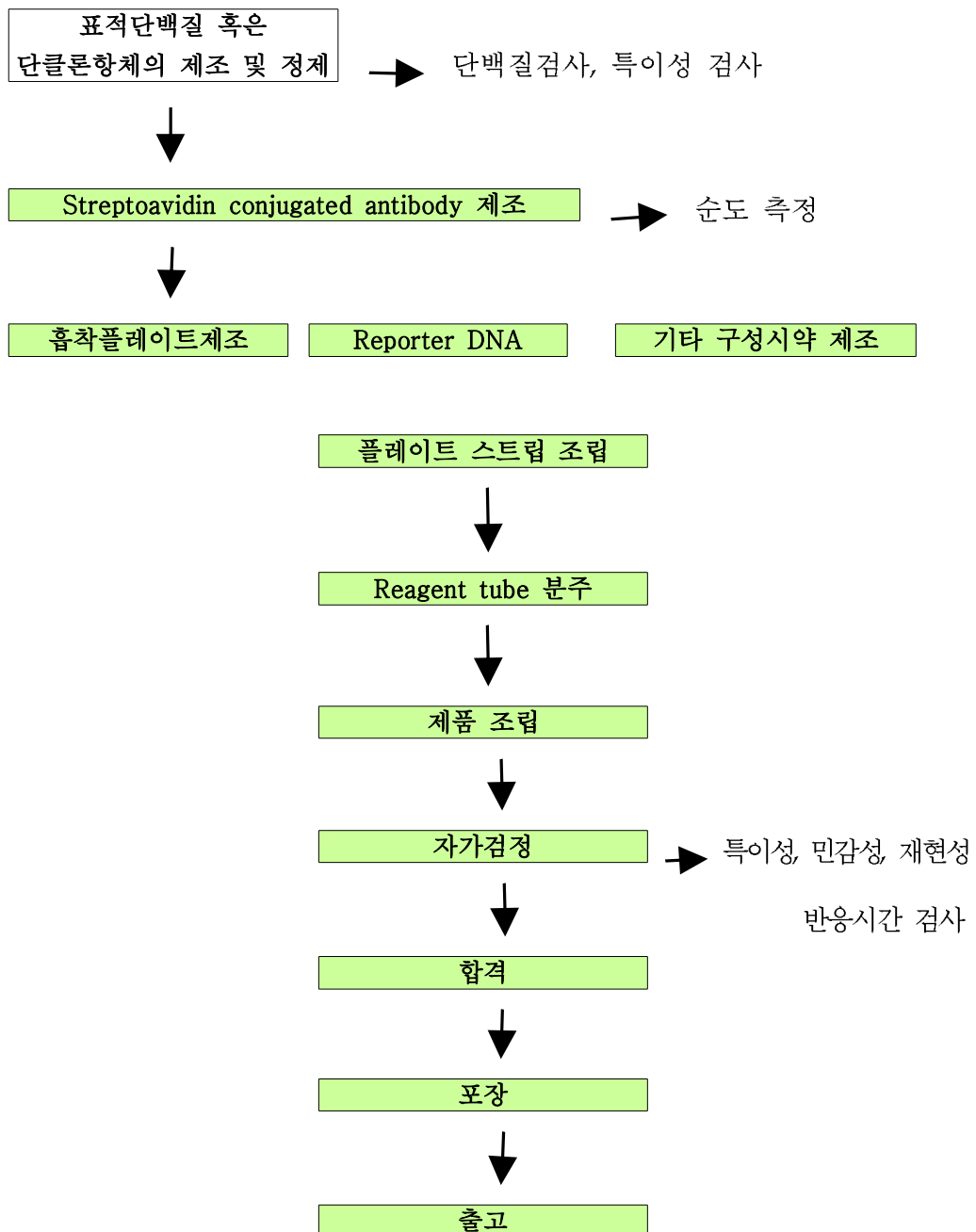


Figure 40. Kit의 제조공정

(3) 대량생산 전 prototype의 시연 및 평가

- 제품 prototype

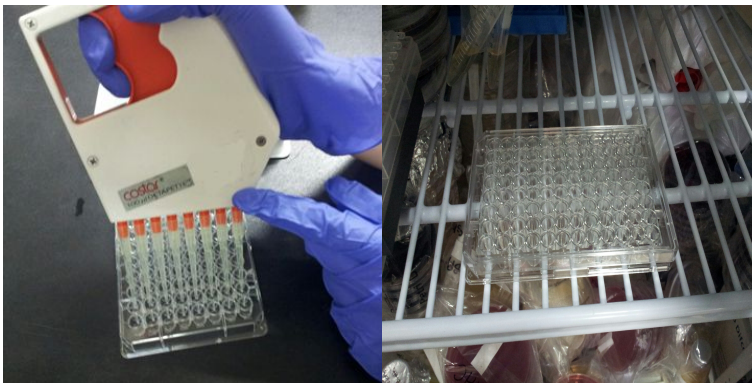
1. PCR template for making DNA probe (Reagent ①, 10 μ l)
2. Botinylated forward primer for making DNA probe (Reagent ②, 10 μ l)
3. Reverse primer for making DNA probe (Reagent ③, 10 μ l)
4. recombinantSEH (rSEH) standard (Reagent ④, 1 μ g/ml, 1.2 ml)
5. Streptavidin conjugated anti-SEH Ab (Reagent ⑤, 50 μ g, 1ml)
6. Real-time Primer 1 (Reagent ⑥, 1 ml, 1 vial)
7. Real-time Primer 2 (Reagent ⑦, 1 ml, 1 vial)
8. BamHI (Reagent ⑧, 100 Unit, 5 μ l)
9. 10X BamHI buffer (Reagent ⑨, 1 ml)
10. Tween 20 (Reagent ⑩, 25 μ l)
11. Skim milk (Reagent ⑪, 5 g)
12. Immunoassay plate (12 strips, 8 well per strip)

- 시연 과정

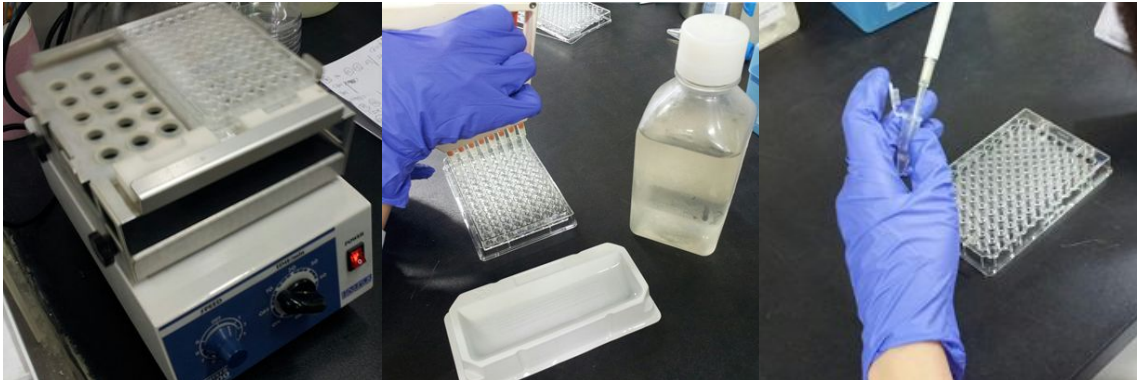
① stomaker를 이용한 샘플 준비 및 제공된 SEH로 특신 standard 준비



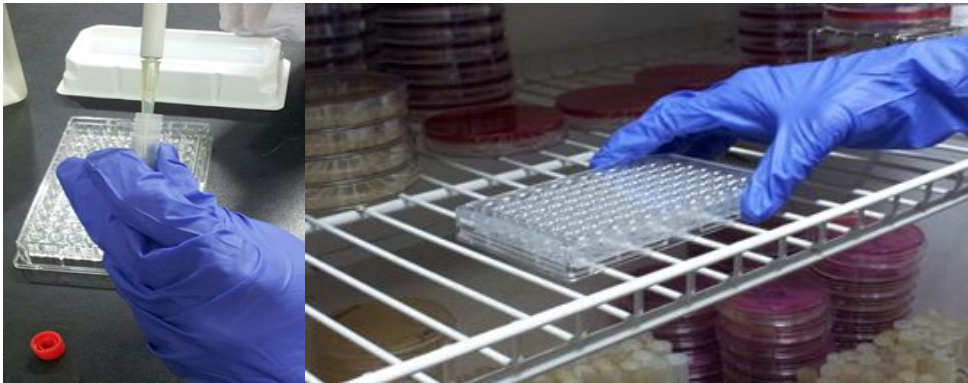
② 시료 및 standard의 분주 및 4°C overnight 정치



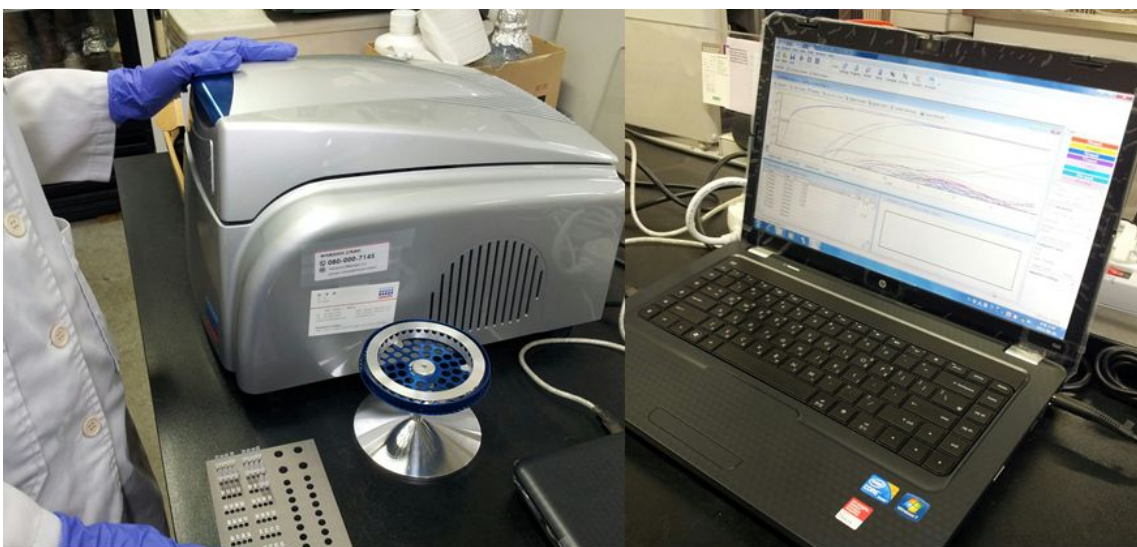
③ 진탕기를 이용한 세척 및 blocking buffer, 항체 및 reporter DNA 희석액 분주



④ 제한효소 분주 및 37°C에서 배양



⑤ real-time PCR 실시 및 결과 확인



(3) Kit의 prototype을 위한 protocol의 정립

LIST OF COMPONENTS

1. PCR template for making DNA probe (Reagent 1, 10 μ l)
2. Botinylated forward primer for making DNA probe (Reagent 2, 10 μ l)
3. Reverse primer for making DNA probe (Reagent 3, 10 μ l)
4. recombinantSEH (rSEH) standard (Reagent 4, 1 μ g/ml, 1.2 ml)
5. Streptavidin conjugated anti-SEH Ab (Reagent 5, 50 μ g, 1ml)
6. Real-time Primer 1 (Reagent 6, 1 ml, 1 vial)
7. Real-time Primer 2 (Reagent 7, 1 ml, 1 vial)
8. BamHI (Reagent 8, 100 Unit, 5 μ l)
9. 10X BamHI buffer (Reagent 9, 1 ml)

All reagents above should be stored at -20°C. Reagent 4 and 5 are recommended to be aliquot after first using.

10. Tween 20 (Reagent 10, 25 μ l)
11. Skim milk (Reagent 11, 5 g)
12. Immunoassay plate (12 strips, 8 well per strip)

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- . Tris-HCl (pH8.3) 10 mM
- . KCl 50 mM
- . MgCl₂ 1.5 mM
- . dNTP Mixture 0.25 mM each
- . Taq polymerase 2 U
- . DW up to 20 μ l
- . PBS
- . 2X SYBR master mix
- . Stomaker
- . Hairdryer
- . Incubator
- . Refrigerator
- . Centrifuge
- . Real-time PCR device and analysis software

- . Micropipettor (s) and disposable pipette tips
- . Multi-channel pipette capable of dispensing 50–100 μ l
- . Solution reservoir (recommended)
- . Microtiter plate washer (recommended)
- . Orbital plate shaker capable of 300–500rpm (recommended)
- . Microtiter plate reader capable of absorbance measurement between 450 nm–650nm.
- . Well-closed containers (15ml tubes or more in capacity)

A. Biotinylated DNA marker 만들기

1. Reagent 1, 2, 3을 이용하여 다음과 같은 조성으로 mixture를 준비

Reagent 2 1 μ l
 Reagent 3 1 μ l
 Reagent 1 1 μ l
 Tris-HCl (pH8.3) 10 mM
 KCl 50 mM
 MgCl₂ 1.5 mM
 dNTP Mixture 0.25 mM each
 Taq polymerase 2 U
 DW up to 20 μ l

2. A에서 만들어진 mixture를 가지고 다음 조건하에 PCR 수행

- 1) initial denaturation : 95°C, 10 min
- 2) amplification : 30cycles
 - denaturation : 95°C, 30sec
 - annealing : 52°C, 30sec
 - extension : 72°C, 40sec
- 3) final extension : 72°C, 7min

3. PCR product 중 3 μ l 를 0.5% agarose gel에 loading하여 크기가 약 340 bp임을 확인 후 PBS를 이용하여 농도를 0.5 ng/ μ l 로 희석

B. Performing Immuno-Assay

1. 샘플 준비: 고체 시료의 경우 25 g, 액체 시료의 경우 25 ml을 측정하여 225 ml의 PBS와 섞은 후 stomaker 등을 이용하여 진탕한 후 이 중에서 1 ml을 1200 rpm, 10 분간 centrifuge하여 상층액을 1.5 ml tube에 옮겨 놓고 4°C에 보관합니다.
2. 샘플 well 준비 (Preparing the Sample Wells): 포장을 뜯은 후 필요한 수만큼의 well 을 떼어냅니다. 이 때 각 샘플마다 2개의 well이 필요하며 한 회 실험당 control 및 standard curve 작성을 위한 well 6개를 더 준비해 주십시오. 뜯어낸 well들을 holder

에 끼워줍니다.

3. Standard well 분주하기: 제공된 rSEH (Reagent 4)를 100 μ l 취하여 PBS 900 μ l에 희석합니다. 이것을 기준으로 10배수씩 단계적으로 PBS에 희석한 것을 4개 더 만듭니다. 이렇게 만들어진 standard rSEH를 총 5개 well에 각각 200 μ l씩 분주 합니다. 6 번째 well에는 PBS를 200 μ l 분주 합니다.
4. B-1에서 준비된 상층액을 2개의 well에 200 μ l씩 분주 합니다. 분주가 끝난 후 plate를 4°C에서 8시간 혹은 overnight 배양한 후 시료를 털어내고 헤어드라이어를 이용하여 plate를 말립니다.
5. Blocking buffer (5% skim milk, Reagent 11 in PBS)를 200 μ l/well 분주한 후 실온에서 2시간 정치합니다
6. Blocking buffer를 털어내고 wash buffer (0.05% Tween20 Reagent 10 in PBS)를 300 μ l/well 분주한 5분간 vigorously shaking하여 세척합니다.
7. Streptavidin conjugated Ab (Reagent 5)을 PBS에 100배 희석하여 100 μ l/well 분주 후 37°C, 1 시간 정치합니다.
8. B-6과 같은 방법으로 4회 세척합니다.
9. A에서 준비된 Biotinylated DNA marker (0.5ng/ μ l in PBS)를 50 μ l/well 분주 후 상온에서 30분 정치 합니다.
10. B-6과 같은 방법으로 4회 세척합니다.
11. PBS를 200 μ l/well 분주하고 실온에서 5분 정치합니다.
12. 위의 것을 털어버리고 새 PBS를 200 μ l/well 분주하고 1시간 실온에서 정치합니다.
13. BamHI 처리: 아래와 같은 조성의 enzyme mixture를 50 μ l/well 분주 후 37°C에서 2 시간 배양합니다.

Enzyme 조성의 예) 8 well의 실험을 수행할 경우, BamHI (Reagent 8) 0.5 μ l + 10X BamHI buffer (Reagent 9) 50 μ l + DW 450 μ l의 조성으로 enzyme mixture 제작
14. 상층액을 well당 6 μ l씩 따서 다음 과정의 template로 사용합니다.

C. real-time PCR

1. B-14에서 준비된 tempate을 이용하여 다음 조건대로 real-time PCR을 위한 mixture를 준비합니다.

Template	6 μ l	
Real-time Primer 1 (Reagent 6)	1 μ l	
Real-time Primer 2 (Reagent 7)	1 μ l	
2X SYBR master mix	10 μ l	
DW	2 μ l	

2. 다음 조건하에 real-time을 실시합니다. 95°C, 10min → 40 cycles of 95°C, 15sec and 62°C, 1min
3. Threshold를 0.5로 설정하기를 권장하나 standard rSEH well의 결과에 따라 소프트웨어 별로 권장하는 threshold가 다를 수 있습니다.
4. 5개의 rSEH standard well에서 얻어진 Ct 값이 25 이하가 아니거나, PBS만을 넣은 negative control well에서 얻어진 Ct값이 30 이상이 아니면 잘못된 실험입니다.
5. 5개의 rSEH standard well에서 얻어진 Ct 값을 이용하여 추세선을 작성하신 후, 2개의 sample well에서 얻어진 평균 Ct 값을 대입하셔서 샘플에서의 SEH 농도를 산출합니다. 이 두개의 Ct값 차이가 1 이상 나타나면 잘못된 실험입니다. 이때, 최초 희석 농도인 10배를 감안하여 최종 계산에 반영합니다.



Figure 41 . 완성된 시제품

제 3 절 농축산물에 오염된 *S. aureus* 장독소 위해평가모델 개발

1. *S. aureus* 오염수준 확인

가. 도축, 도계단계에서의 *S. aureus* 오염수준 확인

(1) *S. aureus* 시험방법

(가) 정량시험

- 황색포도상구균 정량시험은 Baird-Parker배지를 완전히 건조시켜 사용하고 접종액이 Baird-Parker배지에 완전히 흡수되도록 멸균된 Spreader로 100uL를 도말한 다음 10분간 실내에서 방치 후 35~37°C에서 48시간 배양한 다음 직경 1.0~1.5mm 크기의black, shiny, convex한 집락주위에 약 2~5mm의 opaque region이 관찰되는 것을 계수하였다.
- 집락수는 plate당 20 ~ 200개가 적정하고 의심되는 집락 5개 이상에 대해 그람양성구균 및 catalase 양성임을 확인하고 coagulase 검사를 실시하거나 Coagulase test를 동시에 수행할 수 있는 Baird-parker RPF를 사용하였다. 균수계산은 확인 동정된 균수에 희석배수를 곱하여 계산하였다.

(나) 정성시험

- 증균배양은 10% NaCl을 첨가한 Tryptic Soy broth, 35~37°C 16hr 배양하였고, 분리배양은 Baird-Parker Agar의 일종인 BP-RPF(biomerieux, Oxoid. UK)에서 37°C 16~48hr 배양 후 환을 띠고 중심부에 검은빛이 나는 집락을 선택하였다.



Figure 42. *S. aureus* morphology in Baird Parker-RPF

- 확인시험은 환을 띠고 있는 균을 Blood agar에 접종 후 35~37°C 24hr 배양하였다.

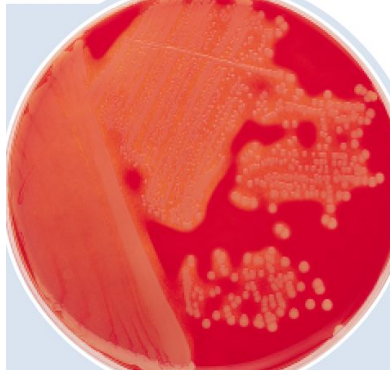


Figure 43. *S. aureus* morphology in Blood Agar

- β -hemolysis 확인된 균을 NA에 접종 후, Coagulase 시험 양성, Catalase 시험 양성 확인 후 PCR 또는 VITEK으로 동정하였다.

(2) 도축장에서의 *S. aureus* 오염 모니터링

- 돈육의 각 유통 및 가공단계인 도축장 (온도체와 냉도체) - 가공장에서의 시료를 채취하여 *S. aureus*를 정량 분석 및 정성분석을 하였다. 도축장, 가공장 두 부분으로 설정하여 도축장에서는 도축 직후의 도체 (온도체) 와 도축 및 냉각 후 1일 저장을 거친 도체(냉도체) 로 나누어 분석하였고, 가공장은 가공 단계를 끝낸 포장 직전의 식육에서 시료 32점을 채취하였다.
- Denmark의 경우 도축장에서 도축공정에 따른 *E. coli*의 분포를 조사한 Shuyu(16)의 결과에 따르면 도축과정인 stunning(전기충격), scalding(열탕처리), splitting(박피), cooling(냉각), cutting(발골, 성형 및 절단) 과정으로 진행됨에 따라 검출율이 각각 16%, 11%, 8%, 1% 이하로 나타났으며 발골, 성형 및 절단 단계에서는 검출되지 않았다. 정량분석 결과 또한 5.0, 4.0, 2.0, 1.0 Log CFU/g인 것으로 나타났다.
- 도축장에서의 *S. aureus* 검출률은 온도체에서 14점 중 3점(21.4%)이 검출되었으며 이중 2.4 log CFU/g이 1점, 1.0 log CFU/g 이하가 2점이 검출되었으며, 냉도체 및 가공장에서는 각 1점씩 에서는 1점이 1.0 log CFU/g 이하였다. 비록 적은 수의 샘플이었으나 공정에 따라 *S. aureus*는 지속적으로 감소하여 도축에서 가공 및 판매장으로 가는 유통과정에서는 효과적으로 관리되고 있는 것으로 보였다.

Table 14. Prevalence and quantity of *S. aureus* in slaughterhouses

	Pre cooling (Post-splitting)	Post cooling	Processed pork
No. of total samples	14	10	8
No. of positive samples	3(21.4)	1(10.0)	1(12.5)
< 1.0 Log CFU/g	2(14.2)	1(10.0)	1(12.5)
2.4 Log CFU/g	1(7.1)	0	0

(3) 도계장에서의 *S. aureus* 오염 모니터링

(가) 도계 단계(1차)

- 하루에 100,000수 이상의 도계능력을 갖춘 대규모 도계장 4곳을 2010년 11월 가을, 2011년 3월 봄에 2차례 방문하여 샘플을 채취하였다. 도계의 과정은 크게 3가지로 나눌 수 있는데 탈모 후(After defeathering or before evisceration), 내장적출 후 (After evisceration), 침냉 후 (After Chilling)이며, 각 단계별 도체를 3수씩 수집하고 최종산물(Cold Storage)도 3수 수집하였다.
- 채취한 샘플은 ice box에 넣어 실험실로 운반한 다음 멸균한 buffered pepton water 400mL을 넣고 200rpm Shaker(HS 501D, Jancke&Kunker, Germany)에 20분 동안 흔들여 homogenation시킨 다음 100uL를 취하여 Baird Parker 배지에 도말하여 배양하였다.
- 도계장의 도계단계별 가을철 시료의 *S. aureus* 검사 결과는 다음 그림과 같다. 모든 도계공정 단계에서 큰 차이를 보여주지 않았는데, 내장 적출 공정 전(탈모작업 후), 내장 적출 공정 후 과 냉각단계 (최종세척단계), 최종보관 단계와는 1~1.5 log CFU 값의 차이를 보였다. 내장적출공정 전, 후는 3 log CFU 값을 보였으나 냉각 및 최종단계는 1~1.5 log 값을 보여 많은 감소를 보였다.
- 차 등(2004)의 도계장에서의 미생물 추이 논문에는 *S. aureus* 균에 대한 접근은 없었으나 Aerobic bacteria count에서는 6~7 log 값을 보였다. 냉장단계에서는 5 log 값을 보였다. *S. aureus*의 경우에는 이보다 훨씬 적은 수가 검출되었다. 하지만 일부의 도계장의 경우, 3.5 log 값을 보이고 있어 비교적 높은 수의 *S. aureus*가 검출되었다.
- *S. aureus* 경우 닭의 사육기간 중 사육면적보다도 많은 수의 닭이 사육이 될 경우, 닭은 서로 부딪치면서 상처가 나기도 하며 영역 다툼, 사육장의 공간배치 등에 의해 외상이 발생된 경우와 사육장에서 도계장으로 이동하는 과정 중에서도 상처를 입을 수 있어 이에 대한 적절한 관리가 요구되기도 한다.

Table 15. *S. aureus* of log value (\pm Relative uncertainty)

	Before evisceration	After evisceration	After main chilling	Cold storage
1	3.30 \pm 0.19	2.90 \pm 0.30	1.00 \pm 0.26	1.58 \pm 0.22
2	2.60 \pm 0.19	3.65 \pm 0.30	1.86 \pm 0.26	1.70 \pm 0.22
3	2.92 \pm 0.19	2.23 \pm 0.30	1.48 \pm 0.26	2.88 \pm 0.22
4	3.34 \pm 0.19	3.33 \pm 0.30	1.51 \pm 0.26	1.34 \pm 0.22
5	4.41 \pm 0.19	4.48 \pm 0.30	2.86 \pm 0.26	2.56 \pm 0.22
6	3.37 \pm 0.19	3.25 \pm 0.30	2.99 \pm 0.26	1.37 \pm 0.22
7	3.49 \pm 0.19	2.31 \pm 0.30	1.30 \pm 0.26	1.15 \pm 0.22
8	3.03 \pm 0.19	1.89 \pm 0.30	1.56 \pm 0.26	1.83 \pm 0.22
Average	3.31 \pm 0.19	3.00 \pm 0.30	1.82 \pm 0.26	1.80 \pm 0.22

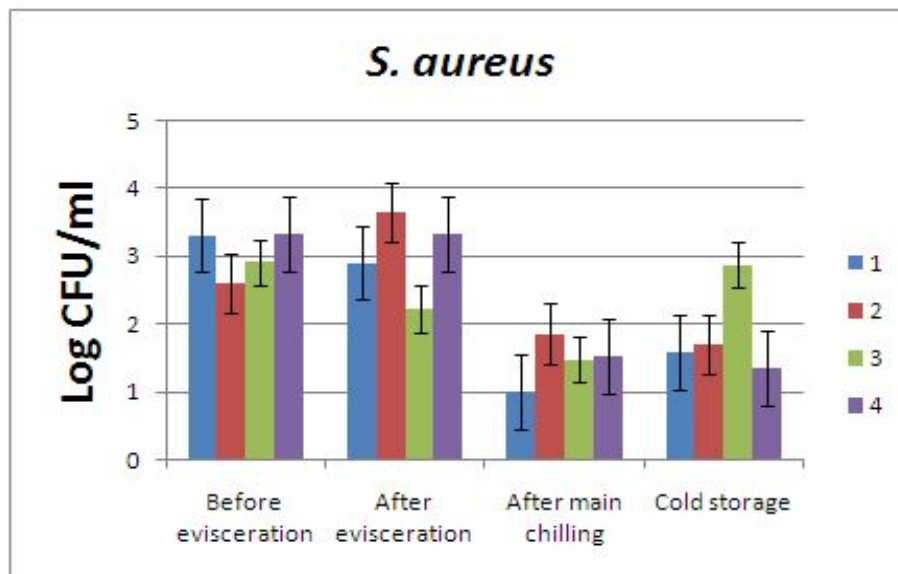


Figure 44. The occurrence of *S. aureus* during the slaughtering process of chicken by large scale slaughterhouse in 2010 fall.

- 2011년도 봄철 도계장에서 *S. aureus* 분포 결과는 다음과 같다. 모든 도계과정 중 내장 적출 공정 전, 후의 과정이 냉각단계, 최종보관단계보다 대부분 높게 나왔다. 내장적출공정 전에는 높게는 4 log, 적게는 2.5 log 값이었고 냉각단계, 최종단계에는 적게는 1.5 log, 많게는 3 log 값이 검출되었다. 초기의 많은 량의 *S. aureus*는 결국 최종단계에서도 높은 량이 검출되기에 사육장에서부터 도계장까지의 사육 및 운반과정 관리가 더욱 필요한 것으로 보인다.

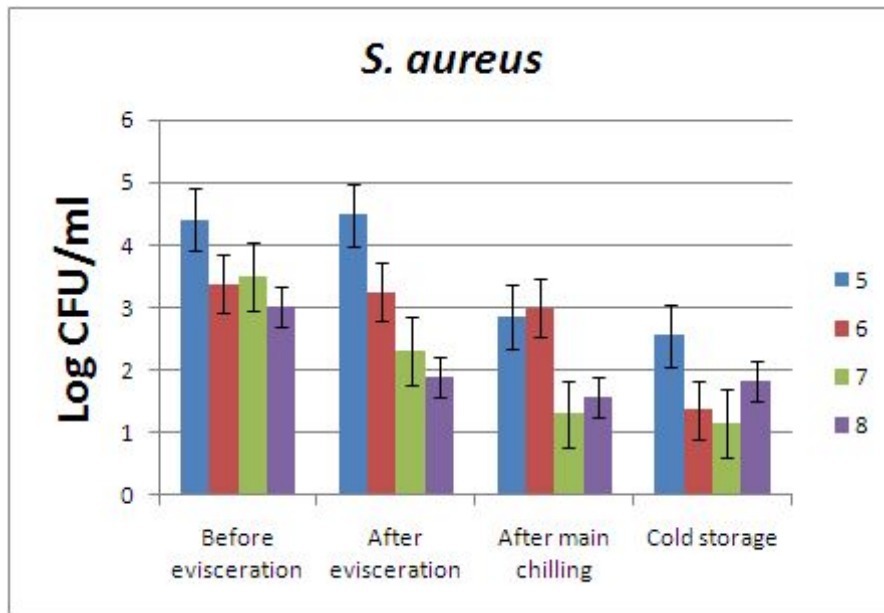


Figure 45. The occurrence of *S. aureus* during the slaughtering process of chicken by large scale slaughterhouse in 2011 spring.

- 계절별로 도계장의 *S. aureus* 분포현황은 다음과 같다. 전체적으로 가을보다는 봄에서의 분포가 1 log 값 높은 것으로 보였다. 가을 보다 봄 계절에 보다 온도가 상승한 것이 *S. aureus*의 높은 분포에 영향을 준 것으로 판단된다.

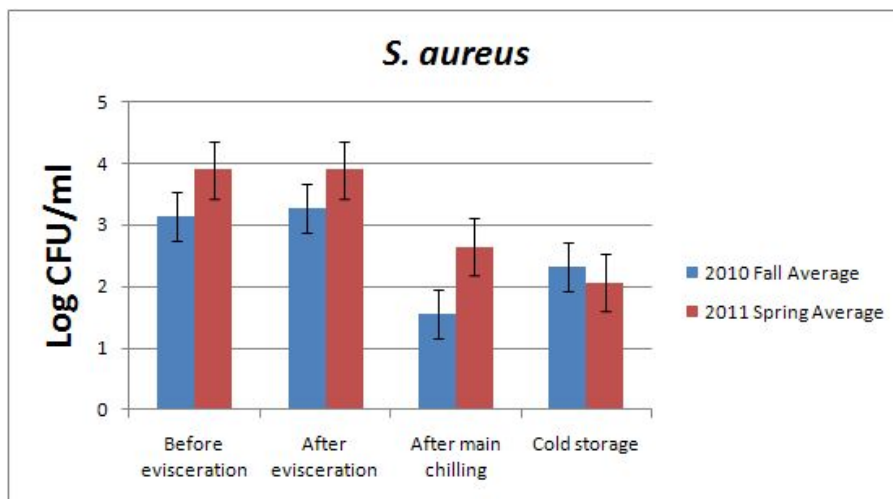


Figure 46. The occurrence of *S. aureus* between fall and spring during the slaughtering process of chicken.

(4) 유통단계에서의 *S. aureus* 오염 모니터링

- 시중에 판매중인 채소(상추, 치커리, 케일, 적근대, 적오크랩, 비타민, 청경채, 고추, 적색치커리 등) 216종, 우육 3종, 돈육 30종, 계육 30종 등 총 336종을 구입하여 정성분석을 하였다.

Table 16. Qualitative analysis of *S. aureus* in Markets.

	Vegetables	Beef	Pork	Raw Chicken	Total
Sample Number	216	30	30	60	336
Detection number	21	9	13	42	85
Detection rates(%)	9.7	30	43	70	25.3

(5) 소비단계에서 *S. aureus* 오염 분석

- 소비단계에서 *S. aureus* 오염분석을 위하여 2011년 3월2일~3월 10일까지 10곳의 소비자 가정 주방을 방문하여 조리 시 단계별 오염률을 파악하였다. 닭도체(Chicken carcass)와 닭 가슴살(Breast fillet) 즉, 도마, 칼, 야채, 손 등의 세척 전(前)과 후(後)를 나누어 각각 *S. aureus* 정량실험을 하였다.
- 샘플채취방법은 멸균솜을 buffered peptone water로 적신 후 도마의 가로세로 10cm 씩 100cm²을 문질러 멸균팩(Whirl pack, Nasco, 미국)에 넣었고, 계육을 자르고 다듬는데 사용한 칼 양면도 멸균솜으로 문질러 멸균팩에 넣었다. 세척한 칼로 채소(상추, 비타민 등)를 다듬고 자르고 난 다음 멸균팩에 넣었다. 손도 세척 전(前)과 후(後)를 나누어 100mL buffered peptone water에 손을 세척하여 멸균팩에 담았다. 각각의 샘플을 ice box에 담아 실험실에 운반하여 정량실험을 실시하였다.
- 닭도체에서 *S. aureus* 오염은 많게는 272,000 CFU/Chicken carcass, 적게는 불검출이었으며 이에 따른 닭도체에서 주방칼로의 전이률은 평균4.1% 으로는 많게는 5.7%에서 0%였으며, 도마로의 전이률은 평균 3.0%로 많게는 7.4%에서 0.2%였으며, 손으로의 전염률은 14.3%로 도마나 주방칼 보다는 많았다.(Table 참조)
 - 이는 닭도체를 만지는 손이 도마나 주방칼날보다 균에 접하는 면이 많아 많이 남아있을 수 있는 것으로 판단되며, 이를 제대로 세척하지 않으면 식중독의 위험에 빠질 수 있는 것으로 나타났다.
- 위의 실험과 같이 세척에 의한 전이률을 확인하기 위하여 세척한 다음 남아있는 *S. aureus*를 확인하였다. 닭도체에서 주방칼, 도마, 야채, 손순으로 각각 0.6%, 0.1%, 0.6% 및 4.8% 확인하였다.
 - 세척한 뒤로 주방칼 경우에는 세척전 4.1%에서 세척후 0.6%, 도마는 3.0%에서 0.1%, 손의 경우에는 14.3%에서 4.8%로 많이 적어짐을 알수 있었다. 세척으로 많은 수의 *S. aureus*가 감소함에 세척의 중요성을 알 수 있는 data 있었다(Table 참조)
- 대부분의 가정에서는 채소용 도마와 육류용 도마를 같이 혼합하여 사용하는 경우가 많다(한국소비자원 2005). 여러개의 도마가 가정마다 있으나 이를 따로 사용하는 가정은 드물다. 본 실험 중 하나는 같은 도마를 사용하였을 경

우 육류 사용 후 세척한 다음 채소로 전이한 것을 가정하고 *S. aureus*를 수 확인하였다.

- 평균적으로는 0.6%로 낮은 수치였으나 높은 곳은 5.7%로 높은 수치가 나타나 세척습관, 하절기 기온 상승, 조리 형태, 음식물보관 관리 등의 다양한 원인으로 세균번식이 용이하게 되면 식중독의 문제까지 발생할 가능성이 있다.

Table 17. Amounts of dilution and rinsing fluids used for enumeration of *S. aureus* on hands, utensils and ready to eat food.

Location	Vol. of Buffered peptone water for rinsing or dilution	Lowest countable no. (CFU) of <i>S. aureus</i> organisms
Chicken carcass	200ml	200
Breast Fillet	200ml	200
Knife	Swabs immersed in 10ml	10
Cutting board	Swabs immersed in 10ml	10
Vegetable	10g diluted in 100ml	100
Hands	100ml	100

Table 18. Staphylococcus(CFU) in Chicken Carcass (Before wash)

<i>Staphylococcus</i> (CFU) in Chicken Carcass	No. of <i>Staphylococcus</i> organisms on :			Percentage of <i>Staphylococcus</i> organisms transferred from :		
	Knife Before wash (CFU/knife)	Cutting board Before wash (CFU/cutting board)	Hands Before wash (CFU/hands)	Chicken carcass to knife	Chicken carcass to board	Chicken carcass to hand
6,000	30	10	500	0.5	0.2	8.3
10,400	20	30	200	0.2	0.3	1.9
272,000	230	410	2,400	0.1	0.2	0.9
34,400	400	500	4,100	1.2	1.5	11.9
3,500	200	260	2,100	5.7	7.4	60.0
3,500	145	180	2,100	4.1	5.1	60.0
6,400	160	240	300	2.5	3.8	4.7
3,700	105	195	1,750	2.8	5.3	47.3
6,200	30	80	5,400	0.5	1.3	87.1
4,000	0	10	0	0.0	0.3	0.0
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mean				1.8	2.5	28.2
SD				2.0	2.7	32.1
Median				0.8	1.4	10.1

Table 19. Staphylococcus(CFU) in Chicken Carcass (After wash)

Staphylococcus(CFU) in Chicken Carcass	No. of <i>Staphylococcus</i> organisms on :				Percentage of <i>Staphylococcus</i> organisms transferred from :			
	Knife After wash (CFU/knife)	Cutting board After wash (CFU/cutting board)	Vegetable (CFU/vegeta ble)	Hands After wash (CFU/hands)	Chicke n carcas s to knife	Chiken carcass to board	Chiken carcass to vegetable	Chiken carcass to hand
6,000	20	0	33	0	0.3	0.0	0.6	0.0
10,400	10	10	0	0	0.1	0.1	0.0	0.0
272,000	0	210	0	0	0.0	0.1	0.0	0.0
34,400	20	140	6	0	0.1	0.4	0.0	0.0
3,500	20	5	0	0	0.6	0.1	0.0	0.0
3,500	0	5	8	100	0.0	0.1	0.2	2.9
6,400	5	10	0	0	0.1	0.2	0.0	0.0
3,700	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
6,200	0	0	354	0	0.0	0.0	5.7	0.0
4,000	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mean					0.6	0.1	0.6	4.8
SD					1.5	0.1	1.7	15.0
Median					0.1	0.1	0.0	0.0

- 최근 우리 식탁이 서양화 되면서 소비자의 선호가 높아진 닭가슴살에 대한 오염 전이도 실험하였다. 닭가슴살 100g 당 5600CFU에서 불검출까지였으며, 주방칼로의 전이는 평균 1.4% 이며 닭개는 3.3%에서 적게는 0%까지였으며, 도마의 경우에는 평균 3.4%이며, 닭개는 7.5%에서 적게는 0%였다. 또한 손으로 오염도는 평균 9.1%로 닭개는 37.5% 적게는 0%였다.
- 닭가슴살은 닭도체보다도 적게 오염되어 있어 전이도에서도 낮은 준수로 인해 불검출된 경우가 많았다. 평균적으로 가슴살에서 주방칼로의 전이률은 0.02%, 도마로는 0.4%, 채소는 0.1%, 손에는 다른 것보다 높은 0.7%로 나타났다.
- 닭가슴살에는 닭도체보다 적게 오염되어 있어 큰 문제가 없어 보이나 일부 가정의 손에서는 1300 CFU의 균이 오염되어 있었으며, 세척 후에도 300 CFU가 있어 다른 야채나 다른 곳으로 전이가 문제가 될 수 있는 소지가 있다. 특히 이곳은 다른 곳보다도 많은 수의 세균이 검출되어 철저한 세척에 대한 인지가 필요할 것으로 판단된다.

Table 20. Staphylococcus(CFU) in Breast Fillet (Before wash)

<i>Staphylococcus</i> (CFU) in Breast Fillet	No. of <i>Staphylococcus</i> organisms on :			Percentage of <i>Staphylococcus</i> organisms transferred from :		
	Knife Before wash (CFU/knife)	Cutting board Before wash (CFU/cutting board)	Hands Before wash (CFU/hands)	Chicken carcass to knife	Chicken carcass to board	Chicken carcass to hand
5,600	120	220	1,300	2.1	3.9	23.2
ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
800	10	0	300	1.3	0.0	37.5
2,400	30	100	200	1.3	4.2	8.3
5,000	0	120	100	0.0	2.4	2.0
200	0	15	0	0.0	7.5	0.0
300	5	5	0	1.7	1.7	0.0
300	10	10	0	3.3	3.3	0.0
ND	ND	40	ND	ND	ND	ND
5,600	70	230	100	1.3	4.1	1.8
Mean				1.4	3.4	9.1
SD				1.1	2.2	13.9
Median				1.3	3.6	1.9

Table 21. Staphylococcus(CFU) in Breast Fillet (After wash)

<i>Staphylococcus</i> (CFU) in Breast Fillet	No. of <i>Staphylococcus</i> organisms on :				Percentage of <i>Staphylococcus</i> organisms transferred from :			
	Knife After wash (CFU/knife)	Cutting board After wash (CFU/cutting board)	Vegetable (CFU/veget able)	Hands After wash (CFU/hands)	Chicken carcass to knife	Chicken carcass to board	Chicken carcass to vegetable	Chicken carcass to hand
5,600	10	30	21	300	0.2	0.5	0.4	5.4
ND	ND	ND	15	ND	ND	ND	ND	ND
800	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
2,400	0	20	9	0	0.0	0.8	0.4	0.0
5,000	0	20	0	0	0.0	0.4	0.0	0.0
200	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
300	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
300	0	5	0	0	0.0	1.7	0.0	0.0
ND	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
5,600	0	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mean					0.0	0.4	0.1	0.7
SD					0.1	0.6	0.2	1.9
Median					0.0	0.2	0.0	0.0

2. *S. aureus* 균주 enterotoxin 분석

가. *S. aureus* enterotoxin gene 검출 시험

- 10% Chelex-100에 현탁한 분리된 *S. aureus* 균을 80°C Heating Block에 6분동안 incubation 시켜 bacterial genomic DNA를 추출하여 다음과 같은 조건에서 PCR을 수행하였다.
- 10uL의 2X PCR Master Mix solution (Taq DNA Polymerase 2.5U, dATP, dGTP, dCTP, dTTT 2.5mM, 2.5mM MgCl₂), primers concentration : 10nM (23S-F1200, 23S-R1698 primers), 20nM (COA-F2591, COA-R2794, SEA-F1170, SEA-R1349, SEC-F97, SEC-R467, SED-F578, SED-R916, SEJ-F349, SEJ-R654, SEL-F158, SEL-R397), 30nM (NUC-F166, NUC-R565, SEG-F322, SEG-R753 primers), 40nM (SEH-F260, SEH-R722, SEI-F71, SEI-R637 primers, Table 참조)로 사용하였으며, 최종반응량은 20uL로 하였다(Cremonesia, 2005)

Table 22. Multiplex primers information of *S. aureus* enterotoxins

Primer name	Oligonucleotide sequence(5'-3')	Target gene	Tm(°C)	PCR annealing temp.(°C)	Amplicon size(bp)
23S-F1200	AGC TGT GGA TTG TCC TTT GG	23S rRNA	60.1	56	499
23S-R1698	TCG CTC GCT CAC CTT AGA AT	23S rRNA	60.2	56	
NUC-F166	AGT TCA GCA AAT GCA TCA CA	nuc	60.5	56	400
NUC-R565	TAG CCA AGC CTT GAC GAA CT	nuc	60.0	56	
COA-F2591	CCG CTT CAA CTT CAG CCT AC	coa	60.0	56	204
COA-R2794	TTA GGT GCT ACA GGG GCA AT	coa	59.5	56	
SEA-F1170	TAA GGA GGT GGT GCC TAT GG	sea	59.9	56	180
SEA-R1349	CAT CGA AAC CAG CCA AAG TT	sea	60.1	56	
SEC-F97	ACC AGA CCC TAT GCC AGA TG	sec	59.9	56	371
SEC-R467	TCC CAT TAT CAA AGT GGT TTC C	sec	60.0	56	
SED-F578	TCA ATT CAA AAG AAA TGG CTC A	sed	59.7	56	339
SED-R916	TTT TTC CGC GCT GTA TTT TT	sed	59.7	56	
SEG-F322	CCA CCT GTT GAA GGA AGA GG	seg	59.6	56	432
SEG-R753	TGC AGA ACC ATC AAA CTC GT	seg	59.2	56	
SEH-F260	TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG	seh	59.8	56	463
SEH-R722	TCG GAC AAT ATT TTT CTG ATC TTT	seh	58.2	56	
SEI-F71	CTC AAG GTG ATA TTG GTG TAG G	sei	58.5	56	529
SEI-R637	CAG GCA GTC CAT CTC CTG TA	sei	58.8	56	
SEJ-F349	GGT TTT CAA TGT TCT GGT GGT	sej	58.8	56	306
SEJ-R654	AAC CAA CGG TTC TTT TGA GG	sej	59.0	56	
SEL-F158	CAC CAG AAT CAC ACC GCT TA	sel	59.7	56	240
SEL-R397	CTG TTT GAT GCT TGC CAT TG	sel	60.2	56	

- 모든 PCR 반응은 Thermal cycler GeneAmp PCR system 9700(Applied Biosystems, CA, USA)으로 수행하였으며, 94℃에서 denaturation을 5분, 30 cycles로 94℃에서 1분, 56℃에서 1분, 68℃에서 1분과 final extension을 7분간 72℃에서 수행하였다.
- Amplified product는 0.002% RedSafe nucleic acid staining 첨가된 3% agarose gel에 150V 1시간 20분동안 전기영동시킨 후 확인하였다.

Table 23. Multiplex PCR results for *S. aureus* enterotoxins

<i>S. aureus</i> enterotoxins	Numbers	et al.
<i>sea</i>	14	
<i>sea, sec</i>	2	
<i>sea, sed, sel</i>	1	
<i>sea, seg</i>	3	
<i>sea, seg, sei</i>	4	
<i>sea, seg, sel</i>	1	
<i>sea, seh</i>	16	
<i>seai</i>	1	
<i>sec</i>	1	
<i>sec, sed</i>	11	
<i>sec, sed, seg</i>	8	
<i>sec, sed, seh</i>	1	
<i>sec, sed, sel</i>	2	
<i>sed</i>	7	
<i>sed, seg</i>	9	
<i>sed, seg, sei</i>	3	
<i>sed, seg, sej</i>	3	
<i>sed, sel</i>	4	
<i>seg</i>	38	
<i>segh</i>	11	
<i>segh, sei</i>	9	
<i>segi</i>	2	
<i>seh</i>	34	
<i>seh, sej</i>	1	
<i>sei</i>	17	
<i>sej</i>	33	
<i>sej, sel</i>	2	
<i>sel</i>	23	
Total	261	

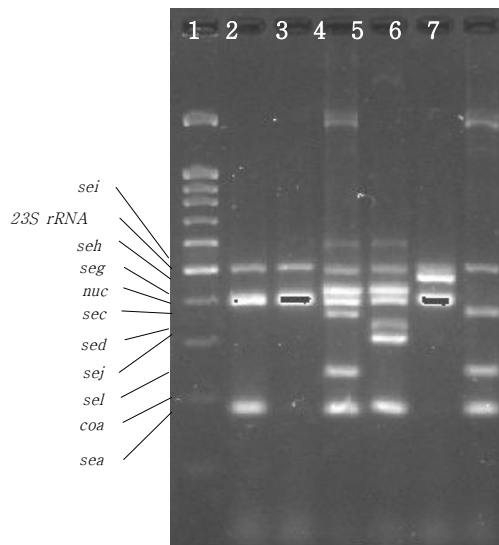


Figure 47. *S. aureus* reference strain

Lane (1 : Size marker, 2 : MNHOCHO(*sea*), 3 : RN4220(no toxin gene), 4 : N315(*sea*, *sec*, *seg*, *sel*), 5 : FRI472(*sea*, *sed*, *seg*, *sej*), 6 : FRI569(*seh*), 7 : FRI913(*sea*, *sec*, *sel*))

나. *S. aureus* enterotoxin gene multiplex PCR 결과

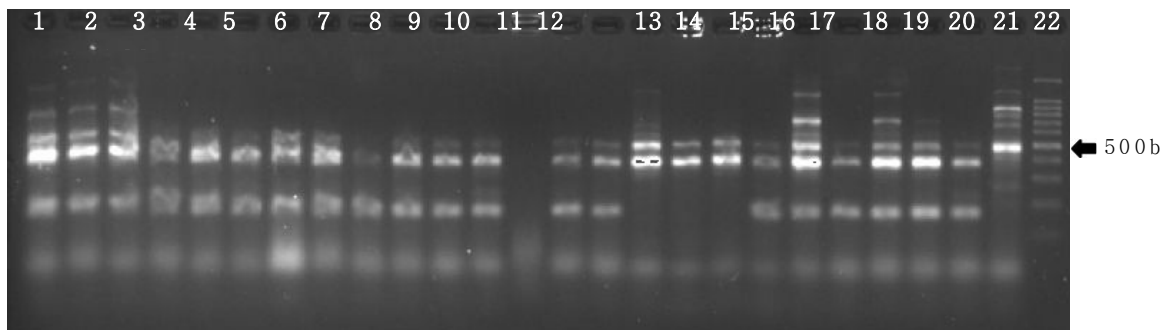


Figure 48. *S. aureus* from foods PCR results

Lane(1 : sample #224-1, 2 : #224-2, 3 : #224-3, 4 : #227-1, 5 : #227-2, 6 : #227-3, 7 : #228-1, 8 : #228-2, 9 : #228-3, 10 : #229-1, 11 : #229-2, 12 : #229-3, 13 : #231-2, 14 : #231-3, 15 : #232-1, 16 : #232-2, 17 : #232-3, 18 : #233-1, 19 : #233-2, 20 : #233-3, 21 : #234-1, 22 : #234-2, 23 : #234-3, 24 : #고31-1, M : size marker)

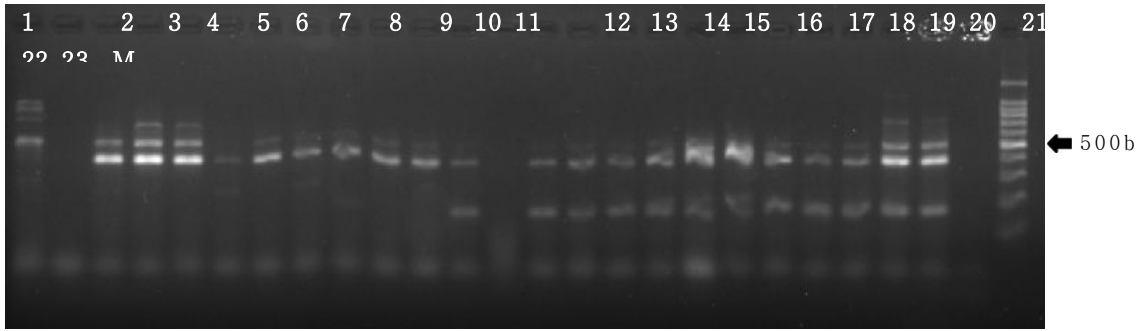


Figure 49. *S. aureus* from foods PCR results

Lane(1 : sample #고40-1, 2 : #나21-1, 3 : #나21-2, 4 : #나22-1, 5 : #나22-2, 6 : #나22-3, 7 : #나30-2, 8 : #나36-1, 9 : #나36-2, 10 : #나44-1, 11 : #나44-2, 12 : #213-1, 13 : #231-2, 14 : #214-1, 15 : #214-2, 16 : #214-3, 17 : # 215-1, 18 : #215-2, 19 : #215-3, 20 : #216-1, 21 : #216-2, 22 : #216-3, 23 : #219-1, 24 : #219-2, M : size marker)

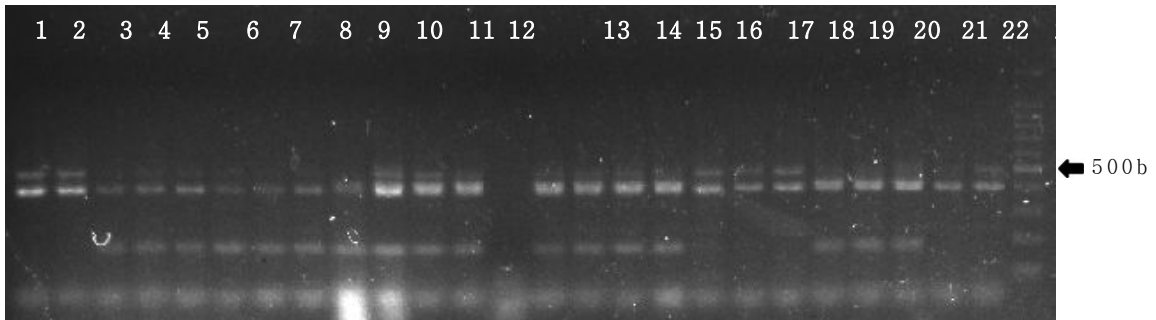


Figure 50. *S. aureus* from foods PCR results

Lane(1 : sample #219-3, 2 : #221-1, 3 : #222-1, 4 : #222-2, 5 : #222-3, 6 : #223-1, 7 : #223-2, 8 : #223-3, 9 : #56, 10 : #60-1, 11 : #60-2, 12 : #69-1, 13 : #69-2, 14 : #71, 15 : #72-1, 16 : #72-2, 17 : # 73-1, 18 : #73-2, 19 : #73-3, 20 : #75-1, 21 : #75-2, 22 : #75-3, 23 : #77-1, 24 : #77-2, M : size marker)

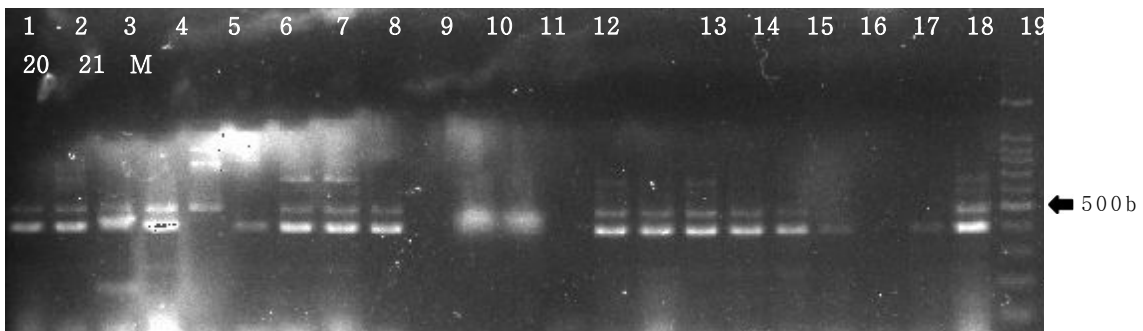


Figure 51. *S. aureus* from foods PCR results

Lane(1 : sample #77-3, 2 : #79, 3 : #80, 4 : #나물30-1, 5 : #나물17-1, 6 : #나물29-3, 7 : #나물29-2, 8 : #나물29-1, 9 : #나물28-2, 10 : #나물28-1, 11 : #나물27-3, 12 : #나물27-2,

13 : #나물27-1, 14 : #나물26-3, 15 : #나물26-2, 16 : #나물26-1, 17 : #나물25, 18 : #나물24-2, 19 : #나물23-1, 20 : #나물23-2, 21 : #나물24-1, M : size marker)

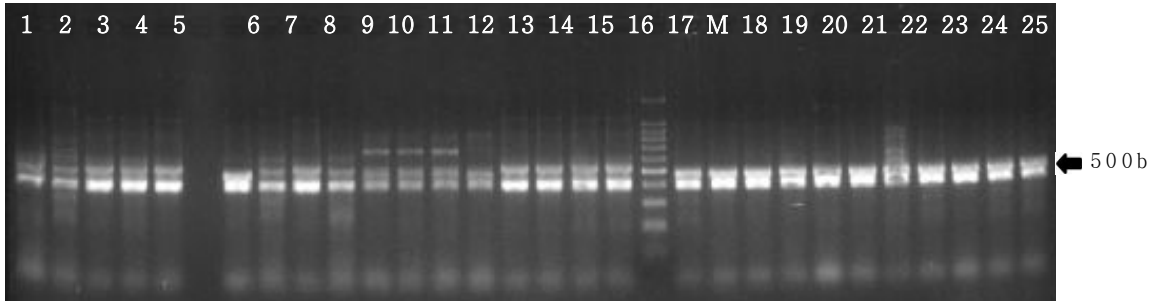


Figure 52. *S. aureus* from foods PCR results

Lane(1 : sample #243-1, 2 : #243-2, 3 : #243-3, 4 : #251, 5 : #252, 6 : #253-1, 7 : #253-2, 8 : #332-2, 9 : #253-3, 10 : #312-s, 11 : #313-s, 12 : #311-o, 13 : #312-o, 14 : #321-14, 15 : #321-2, 16 : #332, 17 : #323, 18 : #123-1, 19 : #123-2, 20 : #123-3, 21 : #131-1, 22 : #131-2, 23 : #131-3, 24 : #132-1, 25 : #132-2, 26 : #132-3, 27 : #133-1, 28 : #133-2, M : size marker)

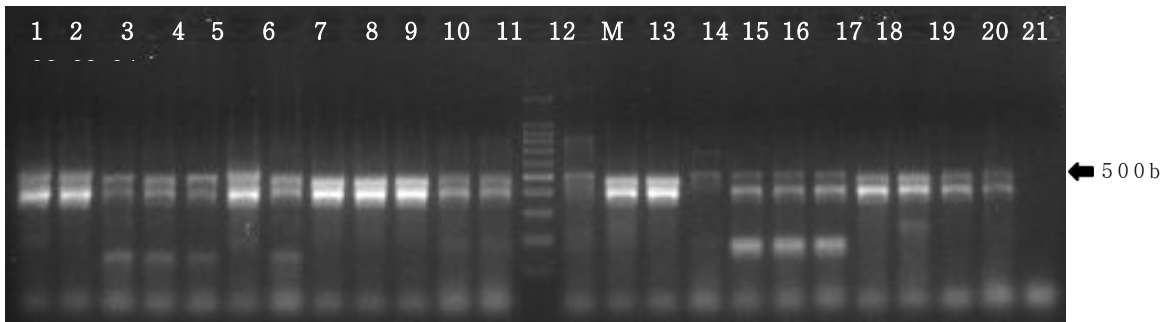


Figure 53. *S. aureus* from foods PCR results

Lane(1 : sample #133-3, 2 : #141, 3 : #142, 4 : #143-1, 5 : #143-2, 6 : #143-3, 7 : #151-1, 8 : #151-2, 9 : #151-3, 10 : #152-1, 11 : #152-2, 12 : #153-1, 13 : #153-2, 14 : #211s, 15 : #212s, 16 : #213s, 17 : #211o, 18 : #212o-1, 19 : #212o-2, 20 : #213o-1, 21 : #213o-2, 22 : #221-1, 23 : #221-2, 24 : #221-3, 25 : #222-1, M : size marker)

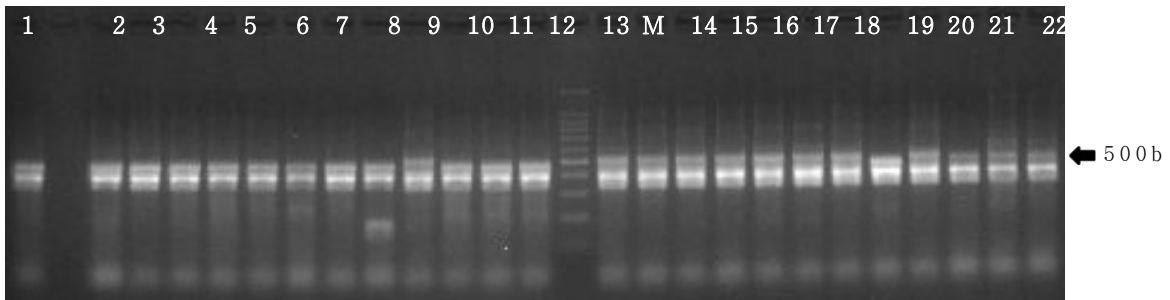


Figure 54. *S. aureus* from foods PCR results

Lane(1 : sample #332-1, 2 : #332-3, 3 : #333, 4 : #341, 5 : #342, 6 : #351, 7 : #353, 8 : #111s-1, 9 : #111s-2, 10 : #111s-3, 11 : #112s, 12 : #113s, 13 : #111o-1, 14 : #111o-2, 15 : #111o-3, 16 : #112o, 17 # 113o-1, 18 : #113o-2, 19 : #113o-3, 20 : #121-1, 21 : #121-2, 22 : #122-1, 23 : #122-2, 24 : #122-3, 25 : #, M : size marker)

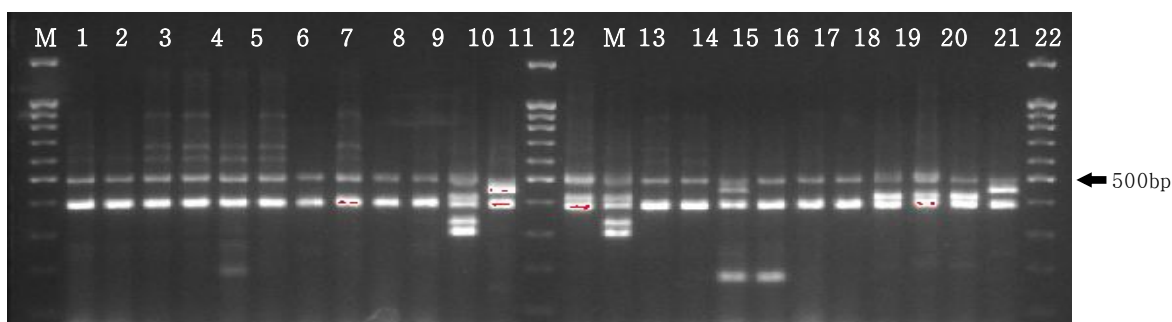


Figure 55. *S. aureus* from chickens PCR results

Lane(1 : sample #c521-1, 2 : #c521-2, 3 : #c522-1, 4 : #c522-2, 5 : #c531-1, 6 : #c532-1, 7 : #c532-2, 8 : #c532-3, 9 : #c533-1, 10 : #c533-2, 11 : #c611-1, 12 : #c612-1, 13 : #c613-1, 14 : #c613-2, 15 : #c621-1, 16 : #c621-2, 17 # c621-3, lane 18 : #c622-1, 19 : #c622-2, 20 : #c622-3, 21 : #c623-1, 22 : #c623-2, 23 : #c623-3, 24 : #631-1, M : size marker)

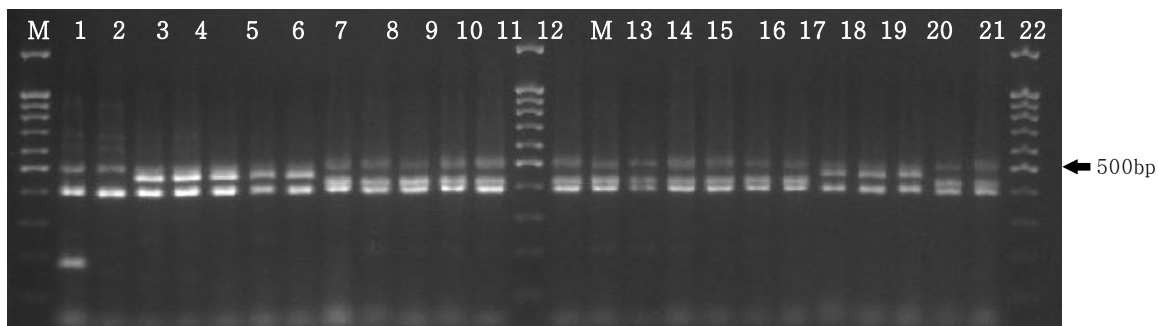


Figure 56. *S. aureus* from chickens PCR results

Lane(1 : sample #c631-2, 2 : #c631-3, 3 : #c632-1, 4 : #c632-2, 5 : #c633-1, 6 : #c633-2, 7 : #c633-3, 8 : #c641-1, 9 : #c641-2, 10 : #c641-3, 11 : #c642-1, 12 : #c642-2, 13 : #c642-3, 14 : #c643-1, 15 : #c643-2, 16 : #c643-3, 17 # c651-1, 18 : #c651-2, 19 : #c651-3, 20 : #c652-1, 21 : #c652-2, 22 : #c652-3, 23 : #c653-1, 24 : #c653-2, M : Size marker)

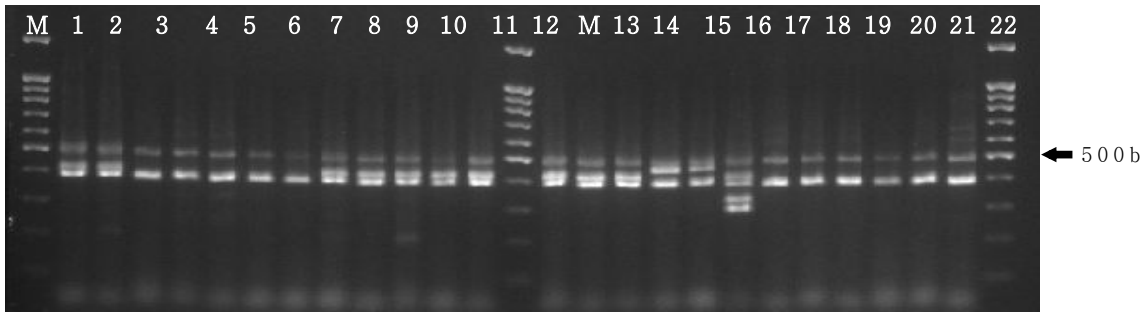


Figure 57. *S. aureus* from chickens PCR results

Lane(1 : sample #c653-3, 2 : #c711-1, 3 : #c712-1, 4 : #c721-1, 5 : #c721-2, 6 : #c722-1, 7 : #c722-2, 8 : #c723-1, 9 : #c731-1, 10 : #c732-1, 11 : #c732-2, 12 : #c733-1, 13 : #c733-2, 14 : #c741-1, 15 : #c742-1, 16 : #c752-1, 17 # c753-1, 18 : #c812-1, 19 : #c821-1, 20 : #c821-2, 21 : #c821-3, 22 : #c822-1, 23 : #c822-2, 24 : #c822-3, M : Size marker)

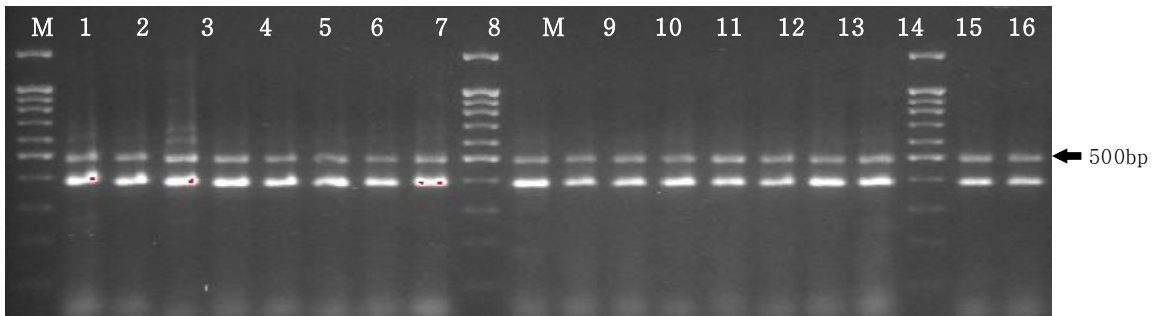


Figure 58. *S. aureus* from chickens PCR results

Lane(1 : sample #c823-1, 2 : #c823-2, 3 : #c823-3, 4 : #c831-1, 5 : #c831-2, 6 : #c831-3, 7 : #c832-1, 8 : #c832-2, 9 : #c832-3, 10 : #c833-1, 11 : #c833-2, 12 : #c833-3, 13 : #c841-1, 14 : #c842-1, 15 : #c842-2, 16 : #c851-1, 17 # c853-1, 18 : #c853-2, M : Size marker)

3. *S. aureus* enterotoxin의 인체 위해 용량 제시

가. Staphylococcal enterotoxin(장독소)별 식중독 발생현황

- Staphylococcal enterotoxin은 분자량이 22,000~28,000 KDa의 단순단백질로 이루어져 있으며, 면역학적으로 A~E, G~I, R~T 등 22가지 형으로 나눌 수 있다. 이중 Emetic effect를 내는 것은 A~G, H 및 S 이며 약한 effect를 내는 것은 I, T 등이고, Emetic effect가 없는 것은 SE/J, SE/K, SE/L, SE/M, SE/N, SE/O, SE/P, SE/Q, SE/U, SE/U2 (SEW), SE/V 등이다.

Table 24. General properties of SEs and SEIs and genomic location of the encoding genes

Toxin	Molecular Mass (kDa)	Emetic Activity	Crystal Structure Solved	Gene	Accessory genetic element
SEA	27.1	yes	yes	<i>sea</i>	ΦSa3ms, ΦSa3mw, Φ252B, ΦNM3, ΦMu50a
SEB	28.4	yes	yes	<i>seb</i>	pZA10, SaPI3
SEC	27.5 - 27.6	yes	yes	<i>sec</i>	SaPI _n 1, SaPI _m 1, SaPI _{mw} 2, SaPI _{bov} 1
SED	26.9	yes	yes	<i>sed</i>	pIB485-like
SEE	26.4	yes	no	<i>see</i>	ΦSa b
SEG	27.0	yes	yes	<i>seg</i>	<i>egc1</i> (vSaβ I); <i>egc2</i> (vSaβ III); <i>egc3</i> ; <i>egc4</i>
SEH	25.1	yes	yes	<i>seh</i>	MGE _{mw} 2/mssa476 <i>seh/Δseo</i>
SEI	24.9	weak	yes	<i>sei</i>	<i>egc1</i> (vSaβ I); <i>egc2</i> (vSaβ III)); <i>egc3</i>
SE/J	28.5	ND	no	<i>selj</i>	pIB485-like; pF5
SE/K	26.0	ND	yes	<i>selk</i>	ΦSa3ms, ΦSa3mw, SaPI1, SaPI3, SaPI _{bov} 1, SaPI5
SE/L	26.0	ND	no	<i>sell</i>	SaPI _n 1, SaPI _m 1, SaPI _{mw} 2, SaPI _{bov} 1
SE/M	24.8	ND	no	<i>selm</i>	<i>egc1</i> (vSaβ I); <i>egc2</i> (vSaβ III)
SE/N	26.1	ND	no	<i>seln</i>	<i>egc1</i> (vSaβ I); <i>egc2</i> (vSaβ III); <i>egc3</i> ; <i>egc4</i>
SE/O	26.7	ND	no	<i>selo</i>	<i>egc1</i> (vSaβ I); <i>egc2</i> (vSaβ III); <i>egc3</i> ; <i>egc4</i> ; MGE _{mw} 2/mssa476 <i>seh/Δseo</i>
SE/P	27.0	ND	no	<i>selp</i>	ΦN315, ΦMu3A
SE/Q	25.0	no	no	<i>selq</i>	ΦSa3ms, ΦSa3mw, SaPI1, SaPI3, SaPI5
SER	27.0	yes	no	<i>ser</i>	pIB485-like; pF5
SES	26.2	yes	no	<i>ses</i>	pF5
SET	22.6	weak	no	<i>set</i>	pF5
SE/U	27.1	ND	no	<i>selu</i>	<i>egc2</i> (vSaβ III); <i>egc3</i>
SE/U2 (SEW)	ND	ND	no	<i>selu</i> ₂	<i>egc4</i>
SE/V	ND	ND	no	<i>selv</i>	<i>egc4</i>

참고문헌: Argudin MA et al, 2010

- 미국에서 발생한 *S. aureus* 식중독 사고의 80%가 enterotoxin (SEA)으로 보고되어 있을 정도로 가장 많이 발견되는 독소이다(Atanassova, et al. 2010, Casman. et al, 1965).
- 일반적으로 황색포도상구균 독소로 인해 식중독을 일으킬 수 있는량은 1 ug 이하이다. 하지만 enterotoxin (SEA) 오염된 초콜릿우유로 인해 발생한 식중독 사고의 독소량은 겨우 0.5 ng/mL이었다(Evenson et al, 1988).
 - 식중독을 유발하는 황색포도상구균의 균수는 식품성분, 온도 등과 같은 환경적인 요소와 균종, 독소 유형과 같은 균의 특성, 오염된 식품에서 생산되는 SE의 양 등에 의해 영향을 받으므로 확실하게 예측하기는 힘들다.
 - 식품의 종류에 따라 존재하는 황색포도상구균의 독소 (SE) 종류는 표에서 정리된 바와 같이 A, B, C, D가 주로 존재하며, 한 식품 안에 여러 독소가 존재하더라도 동일한 독소를 생성하는 것은 아니다.
- 일반적으로 미국식품의약국(Food and Drug Administration: FDA)에 의하면 황색포도상구균에 의한 식중독이 발생하기 위해서는 황색포도상구균이 5.00 log/ CFU/g 이상의 수준이 존재할 때 황색포도상구균의 독소(staphylococcal enterotoxin: SE)가 존재한다고 하였다.

Table 25. Epidemiological details of the 31 food poisoning outbreaks

Outbreak	Year	Number at risk/ill hospitalized	Incubation period	Symptoms	Food	<i>S. aureus</i> CFU/g of food	SE detected in food sample	SFPO assessment
1 ^b	1981	NK/4/NK	4 h	NK	Raw milk semi-hard cheese	3.0×10^7	SEA	C
2 ^b	1983	7/4/3	3 h	V	Cooked beef	7.5×10^9	SEA	C
3	1983	NK/20/NK	3 h	AP, V	Raw milk semi-hard cheese	2.0×10^6	SEA, SED	C
4	1983	NK/85/3	3 h	N	Rice and tuna salad	3.0×10^7	SEA	C
5 ^b	1983	NK/4/0	3.5 h	V, D ^c	Raw milk soft cheese	1.0×10^4	Negative	S
6	1983	NK/NK/NK	NK	NK	Meat	NK	ND	S
7 ^b	1985	7/2/0	4 - 5 h	V, D	Soft cheese	3.0×10^8	SEB	C
8 ^b	1985	NK/3/0	2 h	V, D	Soft cheese	3.0×10^7	SEB	C
9	1986	NK/NK/NK	NK	NK	Sheep's milk cheese	1.0×10^6	SEB	C
10	1987	NK/NK/NK	NK	NK	Cake	5.0×10^7	SEA	C
11	1988	70/20/1	3 - 4 h	AP, V, D ^c	Spaghettis	3.0×10^8	SEA	C
12	1989	NK/3/0	2 - 3 h	V, D	Chicken ^d	1.5×10^6	ND	C
13	1992	32/NK/13	2 h	AP, V, D ^c	Potato and rice salads	5.0×10^9	SEA	C
14	1997	NK/NK/NK	NK	NK	Nougatine	2.0×10^3	Negative	S
15	1997	87/43/10	NK	NK	Raw milk cheese	1.0×10^7	+	C
16	1998	47/NK/15	3 h	AP, V, D ^c	Raw milk cheese	3.0×10^7	+	C
17	1998	17/10/10	NK	AP, V	Raw milk semi-hard cheese	5.7×10^6	Negative	C
18	1999	NK/70/25	3 - 4 h	NK	Chocolate milk	7.6×10^2	SEA	C
19	2000	160/NK/80	NK	NK	Mixed salad	High	SEC	C
20	2000	NK/NK/NK	NK	NK	Raw sheep's milk cheese	2.6×10^4	SEA	C
21	2000	NK/4/2	3 h	V, D	Sliced pork	1.8×10^6	SEA, SED	C
22	2001	2/2/NK	1 h	V, D	Rice ^e	2.9×10^4	Negative	S
23	2001	21/9/1	2 - 4 h	AP, V	Pancakes	1.5×10^6	SEA	C
24 ^b	2001	NK/4/NK	3 h	V, D	Chocolate cake	1.0×10^4	SEA	C
25	2001	85/10/NK	NK	V	Cream	2.2×10^7	SEA	C
26 ^b	2001	6/5/5	3 h	N, AP, V	Roast lamb	3.0×10^7	SEA	C

27 ^b	2001	2/2/0	2 h	N, AP, V, D	Sliced soft cheese	$>1.5 \times 10^5$	SEA	C
28	2001	NK/NK/NK	NK	NK	Roasted pork	4.5×10^6	SED	C
29	2001	17/17/12	2 h	V	Raw milk semi-hard cheese ^a	2.9×10^4	SED ^f	S
30	2002	45/43/16	6 h	N, AP, V, D	Raw sheep's milk cheese	2.8×10^5	SEA	C
31	2002	NK/28/21	4 h	N, V, D	Rillettes (potted meat)	2.3×10^6	SEA	C

NK, not known; V, vomiting; D, diarrhoea; AP, abdominal pain; N, nausea; C, confirmed, or S, suspected, according to the criteria of Bryan et al. (1997).

^a Staphylococcal enterotoxins (SEA, SEB, SEC, SED) tested by radio-immunoassay until 1986, by ELISA after 1986; +, positive result using the global detection SEA-E Transia kit; ND, not determined.

^b Family outbreak.

^c One case notified with either severe prostration or state of shock or fainting or low blood pressure.

^d Strong epidemiological evidence implicating this food in SFPO.

^e *Bacillus cereus* not detected.

^f Result not confirmed by strain characterization.

나. *S. aureus* 식중독 발생 현황

- *S. aureus* 식중독은 비위생적인 조리 방법, 부적절한 보관 및 식품종사자의 보균으로 인한 전파 등으로 발생되고 있으며, 주로 소시지 햄, 우유, 샌드위치 및 치즈로 인해 주로 발생하고 있다. 가장 많은 식중독 발생 case는 2000년 일본의 Powdered Skim Milk의 enterotoxin으로 인한 intoxication이 13,420건으로 가장 많은 결과를 보였다.

Table 26. Outbreaks of *S. aureus*

Year	Places	Cases	Foods	Causes	References
2009	Kansas Italian Restaurant	17	Cannelloni and any entrée containing chicken	Temperature	Kansas Department of Health and Environment. 2009.
2005	Kansas Sausage	138	Sausage served at a catered meal	Improper food handling practices, particularly storage and transport of cooked, ready-to-serve sausage	Kansas Department of Health and Environment. 2005.
1997	Indiana Holiday Meal	37	Cooked ham served at a holiday meal	Improper food handling and temperature abuse	Indiana State Department of Health. 1997.
1990	Rhode Island School Lunch	65	Sliced ham served at a school lunch	Infected food handler who reported peeling hams	Richards, M.S. et al, 1993
1989	Multistate Canned Mushroom	102	Canned mushrooms	Enterotoxin production in the mushrooms before canning or <i>staphylococci</i> contamination after canning, possibly through improperly formed can seams	Do Carmo, L.S., et al, 2002
1988	U.S. Chocolate Milk	850	Contaminated chocolate milk	Inadequate cooling of raw chocolate milk before it was pasteurized	Evenson, M.L. et al, 1988
1986	New Mexico Country Club Buffet	67	Turkey and chicken dressing served at a buffet	Contamination was due to cooling of cooked turkey for three hours at room temperature which allowed sufficient time and temperature for <i>S. aureus</i> proliferation and toxin production	CDC, 1986
1983	U.S. Cream-filled Pastries	215	Contaminated cream-filled pastries	Storage of pastries at warm temperatures for long time	Walterman, S.H et al, 2010
2009	U.K. Sandwiches	47	Contaminated sandwiches	Unrefrigerated storage of sandwiches in a van in summer and inadequate hygienic conditions at the manufacturing location	Health Protection Agency. 2009
2003	Norway Mashed Potato	8	Mashed potatoes	Raw bovine milk used in the preparation of mashed potatoes	Jorgensen, H.J., 20005
2000	Japan Powdered Skim Milk	13,420	Powdered skim milk and dairy products produced from it	Inadequate thermal process that destroyed <i>S. aureus</i> in milk but enterotoxin remained active to cause intoxication	Asao, T et al, 2003
1999	Brazil Minas Cheese	50	Minas white cheese	Transmission of <i>S. aureus</i> from cows to food handlers and then to milk and cheese due to poor sanitary practices	Do Carmo, L.S., 2002
1994	Brazil Cake	12	Cream-filled cake	Preparation of cake by an infected food handler and inadequate cooling before it was consumed	Pereira, M.L et al, 1994
1984 ~1985	U.K. Cheese	13	Cheese made from sheep milk	Sheep milk that was drawn from ewes infected with staphylococcal mastitis	Bone, F.J et al, 1989
1984	U.K. Lasagne	47	Lasagne	Inadequately pasteurized liquid egg used to prepare lasagne	Woolaway, M.C., et al, 1986

다. 황색포도상구균 독소의 인체위해 용량 제시

- *S. aureus* enterotoxin의 위해성을 평가하기 위한 기준이 될 enterotoxin 용량이 필요하다. 국내외 정부 및 관련기관 발간 자료 및 국제학술지에 게재된 문헌자료를 바탕으로 조사하였으며, 특히 인체역학자료와 독성자료 중 *S. aureus* enterotoxin과의 관련된 자료를 on-line 또는 off-line 전문 데이터 베이스를 활용하여 *S. aureus* enterotoxin의 어느 정도량이 인체에 위해를 줄 수있는지를 제시하고자 하였다.
- Balaban & Rasooly (2000, 2001)과 Balaban & Rasooly (2001)은 인체에 미치는 황색포도상구균의 독소양은 100ng이라고 보고하였으며, Bergdoll (1967)은 동물(원숭이)에 영향을 미치는 독소용량은 5~20 μ g으로 설명하였다. 이외에도 Donnelly et (1968)은 우유에서의 독소용량은 100ng, Freed R.C et al (1982)은 skim milk에서 20-100ng, Brunner K.G et al (1992)은 식품에서 50ng 이라고 보고했다. 반면에 Reiser R. et al (1974)은 식품에서의 위해독소양은 100ng라고 보고하여 다른 결과를 나타내기도 하였다. 또 한 Aitichou et al. (2004)는 1 μ g이상의 황색포도구균 독성을 섭취하면 toxic shock가 발생할 수 있다고 했다.
- 본 연구과제에서는 많은 논문 및 자료를 통하여 그 위해 농도를 100ng으로 결정하기는 것이 타당하다(2007년 식약청 연구 용역과제 “즉석섭취 식품 중 *S. aureus* 위해관리연구 참조)

Table 27. References for Human risk quantity of *S. aureus* enterotoxins

No	References	Enterotoxin Quantity
1	Bergdoll M.S (1967), MIT Press., Cambridge. pp 1-15	5-20 μ g/ animal(monkey)
2	Donnelly et (1968), Appl. Microbiol., 16:917-924	100ng (milk)
3	Reiser R. et al (1974). Appl. Microbiol. 27:83-87	100ng (food)
4	Freed R.C et al (1982) Applied and Environmental Microbiology 44:1349-1355	20-100 (skim milk)
5	Evenson M.M. et al (1988) , Int. Food Microbiol., 7:311-317	\leq 100ng / human
6	Brunner K. G et al (1992) Jour. Food Science. 57:700-703	50ng (food)
7	Tempelman L.A. et al (1995) Analytical Biochem. 233:50-77	5-200ng/ml
8	Barg N.L & Harris T.(1997) , Toxinmediated Syndromes. Churchill Livingstone. pp 527-544	<1 μ g (toxic shock)
9	Balaban N. & Rasooly A. (2000), Int. Food Microbiol., 61:1-10	\leq 100ng / human
10	Balaban N. & Rasooly A. (2001), Int. Food Microbiol., 64:33-40	\leq 100ng / human
11	Aitichou M. et al. (2004), Mol. Cell. Probes., 18:373-377	<1 μ g (toxic shock)
12	Sapsford K.E. et al (2005), Appl. Environ. Microbiol., 71:5590-5592	0.02 μ g/kg /bw (airsole type)

4. 가정내 샐러드 조리 과정시 *S. aureu* 위해 평가 모델 제시

가. 서론

- 식품 안전에 대한 인식의 강화와 더불어 식품과학기술의 발달에도 불구하고 우리나라뿐만 아니라 세계적으로 식중독의 발생은 오히려 증가하하는 추세이다(Sobe J. 등 2002). 최근 식습관과 조리행위의 변화, 식품공급의 세계화와 인구의 고령화는 식중독 발생 증가를 이끌고 있다(Altekruse SF 등 1997)
- 식품의약품안전청(2011)의 우리나라에서 발생한 식중독사고의 원인물질별 발생건수에 대한 현황을 보면 병원성대장균 다음으로 *S. aureus*의 식중독질환이 가장 많은 것으로 보고되고 있다. 원인시설별로 분석한 결과 가장 많은 비율을 차지하고 있는 것이 음식점, 집단급식소순이며, 가정집에서는 6%의 비율을 보이고 있다.
- Bahk GJ 등(2003)의 식중독 경험 및 식품아전에 대한 인식조사에서 일반 성인을 대상으로 식중독 발생한 원인 장소를 분석한 결과, 일반음식점에서의 음식섭취가 372%로 가장 높게 나타났고, 가정에서의 부주의 가 21.2%, 결혼식 피로연 등 공동장소에서의 음식 섭취가 17.9%로 나타났다.
- Redmond EC와 Griffith Cj(2003)에 의하면 식중독 발생의 많은 부분이 식당에서보다 가정에서의 부적절한 식품취급으로 더 많은 식중독 발생 가능성이 높다고 지적한 바 있다.
- 특히 가정내의 주방은 가족의 건강과도 밀접하며 주부의 위생인식과도 무관하지 않다. 또한 육류 및 야채류 등에 의한 식중독 발생이 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 이러한 식품은 중성의 pH나 높은 수분활성도를 가지기 때문에 미생물이 활발하게 성장할 수 있는 가능성이 있으며, 존재하는 미생물이 조리자나 조리환경, 조리도구 등으로 오염될 수 있어 조리과정중 주의가 요구된다.
- 현재 국내외적으로 달걀, 식육, 돈육, 김밥 등의 단일품목에 대해 정량적 미생물 위해평가를 통한 위생관리 연구가 진행되고 있으나, 가정에서의 정량적 미생물 위해평가에 대한 정보는 거의 없는 실정이다. 이에 본 연구는 가정내 유기농채소의 섭취와 관련하여 채소별 *S. aureus* 오염 및 장독소 관련한 위해평가를 실시하여 식중독 관리의 기초자료로 활용하고자 한다.

나. 재료 및 방법

(1) 시료

- 서울 및 수도권 가정집 10곳을 방문하여 샐러드에 사용되는 양상추, 상추, 치커리, 로메인 등 4가지 채소의 전처리 과정인 수돗물을 사용하여 세척과정을 통해 균이 얼마큼 감소하는 지 알아보기 위해 칼, 도마, 접시 등을 멸균 면봉으로 시료중 10 cm x 10 cm 의 면적을 취하였다. 주부의 손에 오염된 *S.*

*aureus*를 확인하기 위해 BPW 400mL가 담긴 Whirk-pak에 손에 묻은 세균을 여러번 헹군 다음 4℃이하를 유지한 상태로 실험실로 운반하였으며, 시료채취 4시간 이내에 미생물 분석을 완료하였다.

(2) 미생물 분석

- 각 검체 10~25g을 9배에 해당하는 멸균생리식염수에 넣어 균질기에 2분간 균질화 시킨다. *S. aureus*의 오염수준은 Baird-parker RPF agar medium(Oxoid, UK)을 사용하여 포준 평판법으로 도달하여 확인하였다. 도달된 배지는 37℃에서 24~48시간 동안 배양하였으며, 생성된 균 중 혼탁한 환이 있는 암회색 집락을 VITEK, 및 PCR을 통해서 *S. aureus*로 판정하였다.

(3) 몬테카를로 시뮬레이션 모델 개발 및 분석

- 조리과정에서 *S. aureus*의 오염 및 증식, 온도, 전이 등의 영향인자를 파악하기 위하여 몬테카를로 시뮬레이션 모델을 개발하였다. 시뮬레이션 모델은 원부재료 및 조리 공정 별 입력변수에 필요한 확률분포함수는 미생물 분석 결과를 입력하여 작성하였다. 본 시뮬레이션은 원부재료에서부터 최종 섭취까지의 연속된 경로로 구성되어 있으며, 각 단계에서 이용된 수식과 입력변수는 엑셀에서 작성하였다.
- 시뮬레이션 구동은 @RISK 5.5(Palisade co, NY, US)을 사용하였으며 sampling type은 Median Latin Hyper cube sampling을 generator seed는 random 방법을 선택하였고, 반복시행횟수(Iteration)는 10,000으로 설정하였다.

(4) 민감도 분석(Sensitivity Analysis)

- 각 조리과정 중에서 중요 관리점을 결정하기 위해서 민감도 분석을 실시하였다. 민감도 분석은 입력변수 중에서 최종오염수준에 가장 크게 영향을 미치는 입력변수를 선정하는 것으로 본 연구에서는 최종 결과를 섭취 시 *S. aureus*의 오염수준으로 설정하였다. 입력변수는 원부재료의 초기 오염수준, 균의 발현빈도, 전처리 및 조리과정, 교차오염, 전이율 등으로 설정하였다. Stepwise regresioin을 이용하여 통계적인 분석을 실시하였다.

(5) 시나리오 분석

- 시나리오 분석은 민감도 분석에서 선정된 최종오염수준에 가정 큰 영향을 주는 입력변수의 값에 따라 섭취시의 *S. aureus* 오염수준이 어느 정도로 변화하는지를 파악하여 입력변수의 한계치를 결정하고 이를 한계기준(Control limit:CL) 설정에 이용하기 위하여 실시하였다.
- 시나리오 구성은 민감도 분석에서 영향을 미치는 인자들 중 가정 큰 영향을 미치는 변수로 설정하였으며, 조절 불가능 인자일 경우에는 차순의 변수를 선

택하였다 선택된 입력 변수의 한계값 내에서의 변화를 유도하여 이에 따른 섭취 시 *S. aureus*의 오염수준 변화를 예측하였다.

다. 시험결과

(1) 샐러드에 오염된 *S. aureus* 균 오염 현황

- 채소 4종에 오염된 *S. aureus* 오염 시험 결과, 치커리가 1g 당 $2.10 \pm 0.19 \log$ CFU/g으로 가장 많이 오염되어 있었으며, 상추가 $1.52 \pm 0.26 \log$ CFU/g로 가장 적었다. 또한 양상추는 $1.84 \pm 0.23 \log$ CFU/g이었고, 로메인은 1g 당 2.05 ± 0.21 CFU으로 나타났다.
- 또한 세척후의 균수의 변화는 세척전후의 70~95%의 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 28. The contaminated level of *S. aureus* in fresh vegetables for salad

Vegetables	<i>S. aureus</i> (log CFU/g)
Head lettuce	1.84 ± 0.23
Lettuce	1.52 ± 0.26
Romaine	2.05 ± 0.21
Chicory	2.10 ± 0.19

- 교차오염원의 *S. aureus* 오염수준을 주방에서 확인하기 위하여 주부의 손, 주방칼, 도마, 접시를 대상으로 오염을 확인하였다. 주방칼과, 도마, 접시에서는 *S. aureus*가 검출되지 않았으며, 주부의 손에서는 $1.52 \pm 0.23 \log$ CFU/pair hands 가 오염되어 있었다.

Table 29. The contaminated level of *S. aureus* in Cook's hand and kitchenware for salad

Cook's hand and kitchenware	<i>S. aureus</i> (log CFU/g)
Hand	1.52 ± 0.23
Knife	ND
Cutting board	ND
Dish	ND

Total contaminated level of *S. aureus* enterotoxin on Salad

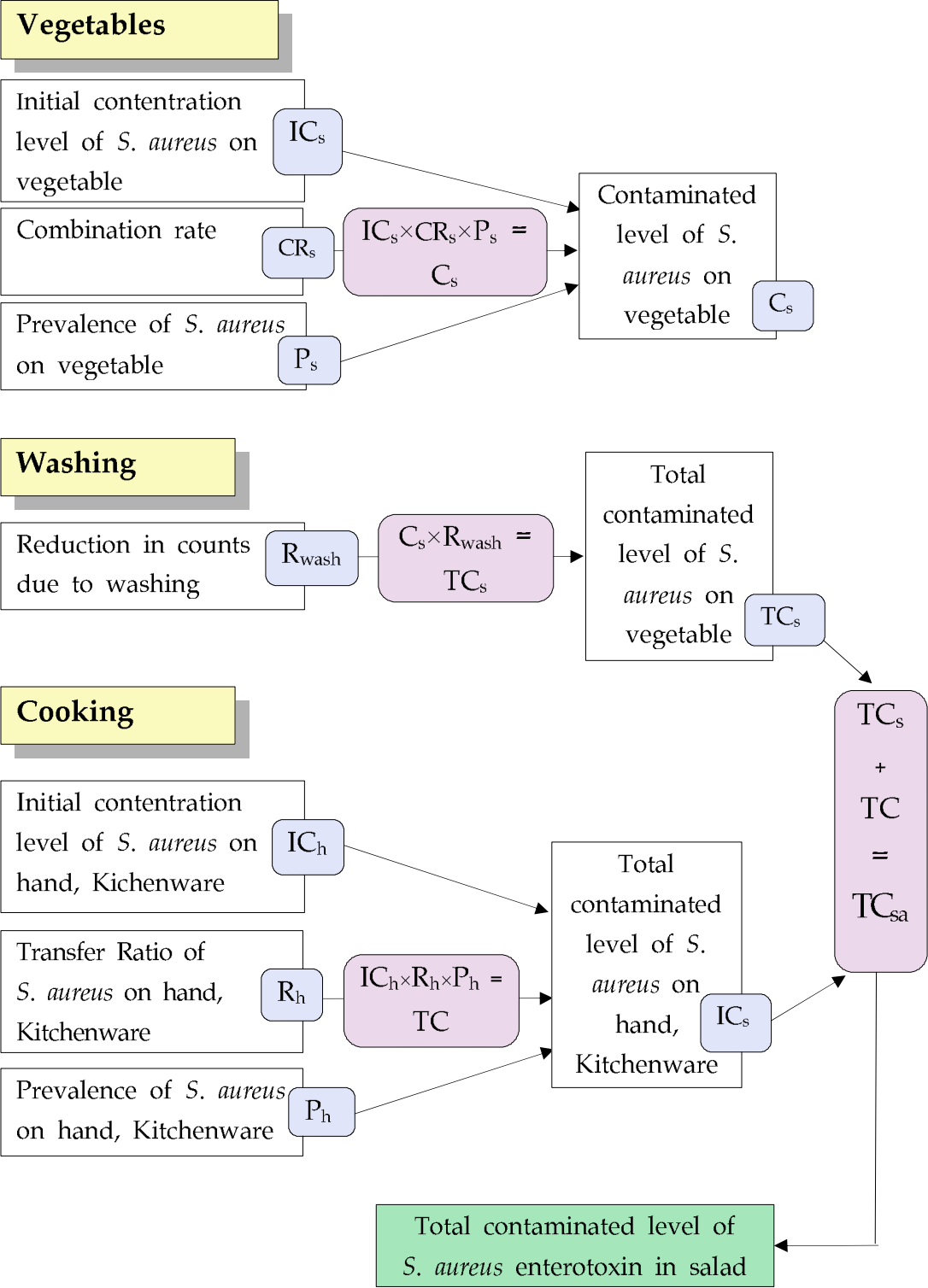


Figure 59. The Frame-work module for salad making processing

Table 30. Simulation model to estimate the distribution of *S. aureus* Enterotoxins in Salads

A. Vegetable

Variables	Description	Unit	Distribution/Model
head lettuce	P_h	Prevalence of <i>S. aureus</i> on head lettuce	% RiskBeta(7,4)
	IC_h	Initial concentration of <i>S. aureus</i> on head lettuce	log CFU/g RiskBetaGeneral(0.14186,0.29709,0,325,RiskName("Head lettuce quantity"))
	CR_h	Combination ratio of head lettuce(%)	% 40912.0000
	C_h	Contaminated level of <i>S. aureus</i> on head lettuce	log CFU/g $P_h * IC_h * E6$
	R_{wash}	Reduction due to washing	% 1-RiskBetaGeneral(0.11411,0.25982,0,0.2037,RiskName("Reduction due to washing of head lettuce"))
	T_{Ch}	level of <i>S. aureus</i> on head lettuce	log CFU/g $C_h * R_{wash}$
Lettuce	P_l	Prevalence of <i>S. aureus</i> on lettuce	% RiskBeta(6,5)
	IC_l	Initial concentration of <i>S. aureus</i> on lettuce	log CFU/g RiskBetaGeneral(0.12407,0.29996,0,210,RiskName("lettuce quantity"))
	CR_l	Combination ratio of lettuce(%)	% 40912.0000
	C_l	Contaminated level of <i>S. aureus</i> on lettuce	log CFU/g $P_l * IC_l * CR_l$
	R_{wash}	Reduction due to washing	% 1-RiskBetaGeneral(0.10047,0.27456,0,0.25714,RiskName("Reduction due to washing of lettuce"))
	TC_l	level of <i>S. aureus</i> on lettuce	log CFU/g $C_l * R_{wash}$
Romane	P_{ro}	Prevalence of <i>S. aureus</i> on romane	% RiskBeta(7,4)
	IC_{ro}	Initial concentration of <i>S. aureus</i> on romane	log CFU/g RiskBetaGeneral(0.13901,0.30461,0,562,RiskName("Romane quantity"))
	CR_{ro}	Combination ratio of romane(%)	% 40912.0000
	C_{ro}	Contaminated level of <i>S. aureus</i> on romane	log CFU/g $P_{ro} * IC_{ro} * CR_{ro}$
	R_{wash}	Reduction due to washing	% 1-RiskBetaGeneral(0.11992,0.30135,0,1.85,RiskName("Reduction due to washing Romane"))

	TC _{ro}	level of <i>S. aureus</i> on romane	log CFU/g	C _{ro} *TC _{ro}
	P _c	Prevalence of <i>S. aureus</i> on chicory	%	RiskBeta(8,3)
	IC _c	Initial concentration of <i>S. aureus</i> on chicory	log CFU/g	RiskBetaGeneral(0.13832,0.29641,0,570,RiskName("quantity4"))
Chicory	CR _c	Combination ratio of chicory(%)	%	40912.0000
	C _c	Contaminated level of <i>S. aureus</i> on chicory	log CFU/g	P _c *IC _c *CR _c
	R _{wash}	Reduction due to washing	%	1-RiskBetaGeneral(0.11462,0.23546,0,0.26316,RiskName("Reduction due to washing of chicory"))
	TC _c	level of <i>S. aureus</i> on chicory	log CFU/g	C _c *R _{wash}
Vegetables	TC _v	Total contaminated level of <i>S. aureus</i> on vegetables		SUM(T _{ch} ,TC _l ,TC _{ro} ,TC _c)

B. Cook's hands, and kitchenware (Environment)

Variables	Description	Unit	Distribution/Model	
Cooks hand	P _{ch}	Prevalence of <i>S. aureus</i> on Cook's hand	%	RiskBeta(8,3)
	IC _{ch}	Initial concentration of <i>S. aureus</i> on Cook's hand	CFU/Hand pair	RiskBetaGeneral(0.11245,0.27058,0,300,RiskName("hand quantity"))
	R _{ch}	Transfer ratio of <i>S. aureus</i> on cook's hand	%	RiskTriang(0.17, 0.23, 0.87)
	TC _{ch}	Total Contaminated level of <i>S. aureus</i> on Cook's hand	CFU/Hand pair	P _{ch} *IC _{ch} *R _{ch}
Knife	P _{kn}	Prevalence of <i>S. aureus</i> on knife	%	1
	IC _{kn}	Initial concentration of <i>S. aureus</i> on knife	CFU/cm2	1
	R _{kn}	Transfer ratio of <i>S. aureus</i> on knife	%	RiskTriang(0.17, 0.23, 0.87)
	TC _{kn}	Total Contaminated level of <i>S. aureus</i> on knife	CFU/cm2	P _{kn} *IC _{kn} *R _{kn}
Choping board	P _{cb}	Prevalence of <i>S. aureus</i> on chopping board	%	1
	IC _{cb}	Initial concentration of <i>S. aureus</i> on chopping board	CFU/cm2	1
	R _{cb}	Transfer ratio of <i>S. aureus</i> on chopping board	%	RiskTriang(0.17, 0.23, 0.87)

	TC _{cb}	Total Contaminated level of <i>S. aureus</i> on chopping board	CFU/cm ²	$P_{cb} * IC_{cb} * R_{cb}$
Dish	P _d	Prevalence of <i>S. aureus</i> on dish	%	RiskBeta(6,2)
	IC _d	Initial concentration of <i>S. aureus</i> on dish	CFU/cm ²	RiskExpon(5.8, RiskShift(28.84))
	R _d	Transfer ratio of <i>S. aureus</i> on dish	%	RiskTriang(0.17, 0.23, 0.87)
	TC _d	Total Contaminated level of <i>S. aureus</i> on dish	CFU/cm ²	$P_d * IC_d * R_d$
Cook's hand, kitchenware	TC _H	Total Contaminated level of <i>S. aureus</i> on Cook's hand and kitchenware	CFU/g	$SUM(TC_{ch}, TC_{kn}, TC_{cb}, TC_d)$

C. Salad

	TC _s	Total Contaminated level of <i>S. aureus</i> on Salad	CFU/g	$LOG(TC_v + TC_H)$
Salad	TC _{se}	Total Contaminated level of <i>S. aureus</i> Enterotoxin on Salad	ng/ mL	$0.9300751 * TC_s - 6.662092$

- 샐러드의 *S. aureus*의 오염수준에 대한 simulation distribution을 Fig 에 나타내었다. 시뮬레이션 모델을 기반으로 예측된 샐러드의 오염수준에 대한 평균 값은 1.9231 log CFU/g이었으며, 최소값이 -0.555 log CFU/g, 최대값이 2.6656 log CFU/g으로, 5%의 값은 1.211 log CFU/g, 95% 값은 2.372 log CFU/g이었다.

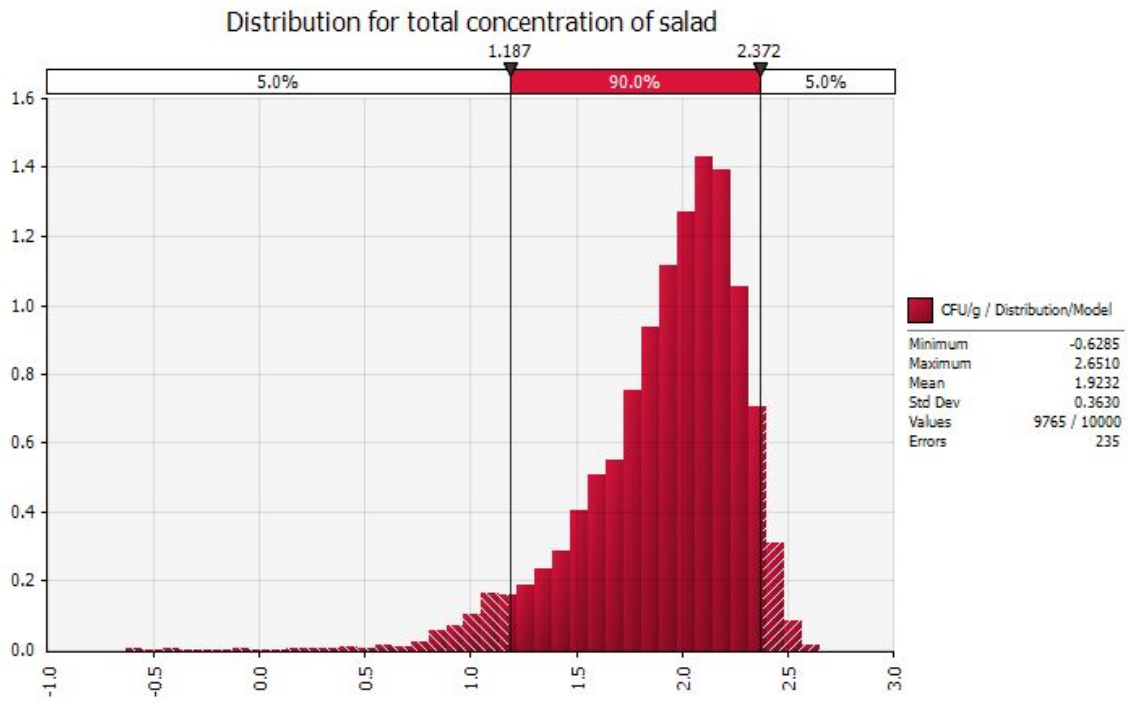


Figure 60. Total contaminated level of *S. aureus* on Salad (TCsa)

- 샐러드의 *S. aureus* enterotoxin 오염수준에 대한 simulation distribution을 Fig에 나타내었다. 시뮬레이션 모델을 기반으로 예측된 샐러드의 *S. aureus* enterotoxin 오염수준에 대한 평균값은 -1.8734 log pg/g (-4.8734 log ng/g) 이었다. 최소값이 -3.2466 log pg/g (-7.2466 log ng/g), 최대값이 -1.1965 log pg/g-4.1965 log ng/g으로 나타났다.
- 사람에게 위해를 일으킬수 있는 양은 논문조사에 의해 100ng/g (2 log ng/g)으로 제시하였는데 그것에 비하면 평균값이 1/10,000정도로 적은 양이라 볼 수 있어 위험에 대한 평가에서는 적다고 볼 수 있다.

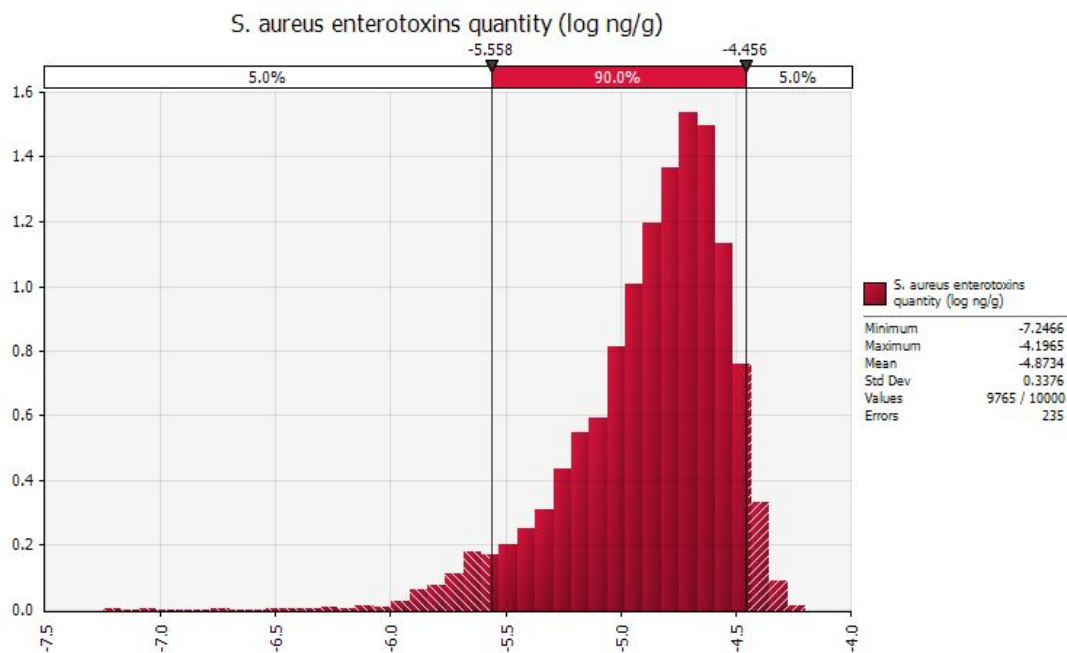


Figure 61. Total contaminated level of *S. aureus* Enterotoxins on Salad (TCse)

- 샐러드의 최종 오염수준에 영향을 미치는 요인은 Fig.에서 나타내었다. Regression coefficient value 는 -1에서 1사이의 범위를 가지며, 1에 가까울수록 최종 샐러드의 오염을 조절하는데 중요한 요인으로 간주된다. 이 결과에서는 1에 가까울수록 최종 오염수준의 증가에 영향을 주며, -1에 가까울수록 최종오염준의 감소에 영향을 주는 것으로 판단할 수 있다.
- 민감도 분석 결과, 샐러드의 최종 오염수준에 가장 영향을 미치는 인자는 치커리 오염량으로써 0.49이었으며, -0.25의 민감도 값을 나타내 주는 것은 로메인의 세척율로 이는 로메인이 다른 채소보다는 앞면의 굴곡이 적고 기다란 모양을 가지고 있어 세척하기에 훨씬 효과적인 것으로 판단되었다.
- 다음으로는 손세척이 0.45로 영향을 주는 인자로 나타났다. 주부의 손 씻는 습관에 따라서도 균의 감소가 큰 영향을 받을 수 있다. 즉 이에 대한 위생관리 및 소비자의 손 씻는 습관에 대한 교육이 필요함을 알 수 있었다. 특히 조리자의 손은 각종 세균의 온상지로 볼 수 있어 소비자의 교육 시스템을 도입시켜야 하는 것으로 보인다.
- 또한 *S. aureus* 는 비강을 통해 전이될 수 있으므로 손으로 얼굴이나 신체부위를 만진 다음에는 반드시 손을 세척해야하며, 특히 얼굴에 여드름, 화농성, 아토피 등의 질환이 있는 사람의 경우, 식사 준비 전 반드시 손을 씻도록 하여 균의 오염에 사전에 예방하여야 한다.

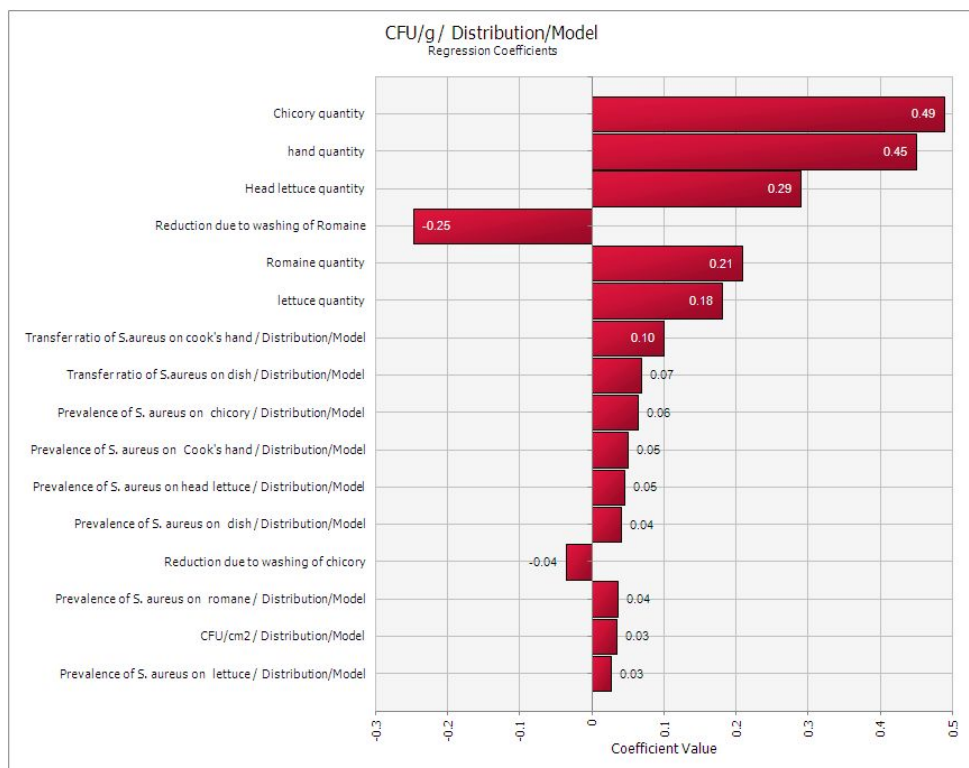


Figure 62. The Regression sensitivities risk factors effecting for final concentration level of *S. aureus* in salad

라. 결론

- 몬테카를로 시뮬레이션을 이용하여 가정에서의 *S. aureus*의 위해평가를 도출한 결과, 샐러드의 경우 원부재료의 세척이, 또한 조리자(주부)의 손에 의한 교차오염이 중요한 요소로 나타났다. 샐러드의 경우 열을 가하지 않기 때문에 채소 등의 원재료의 오염여부 및 조리자의 손 세척여부에 따라 미생물 오염이 발생하고, 이 미생물이 증식할 가능성이 있기 때문에 전처리 과정에서 행해지는 모든 과정에 대하여 주의 세밀하게 세척하여 균의 증식을 사전에 예방하는 것이 절실히 요구된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 평가의 착안점 및 기준

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	척도 (점수)
1차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Immnoquantative real-time PCR을 이용한 Enterotoxin 정량분석법 개발 ○ S. aureus 오염수준예측 및 인체위해 용량 제시 ○ 다클론 항체 생산 공정확립 	40 40 20
2차년도 (2011)	<ul style="list-style-type: none"> ○ S. aureus Enterotoxin 정량 키트 제품화 ○ 황색포도상구균 장독소 진단 키트 유효성평가 ○ 황색포도상구균의 독소 감소를 위한 위해 관리 평가 모델 개발 	40 40 20
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ Immno-quantative real-time PCR을 이용한 Enterotoxin 정량분석법 개발 ○ S. aureus Enterotoxin 정량 키트 제품화 ○ 황색포도상구균의 독소 감소를 위한 위해 관리 평가 모델 개발 	40 40 20

제 2절 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 식품제조업체 기술연구소, 식품의약품안전청, 국립수의과학검역원, 보건환경연구원 등의 정부기관, 식품연구소 등의 분석기관에서 적용 가능
- *S. aureus*균 Enterotoxin의 노출량 추정에 따른 합리적인 정부의 정책 및 관리 방안 마련이 가능
- 미생물위해평가(MRA)기법 개발 및 활용 촉진
 - Enterotoxin을 이용한 새로운 MRA 기법 제시
- *S. aureus* enterotoxins의 특이항원 확보 및 항체 생산기술 확보
 - 각각 enterotoxin에 대한 단클론 항체의 대량 생산 기술 확보와 생산된 항체의 특이성 검증기술을 습득
- *S. aureus* enterotoxins의 정성에 대한 기법은 세계적 기업에서 만들어져 그 기술력을 가지고 있으나, 본 정량방법은 아직까지 상품화를 시키지 못한 것으로 이에 대한 개발 기술을 확보
 - ELISA 방법과 real time PCR을 이용한 개발기술을 확보하며, 고정화 항체 및 항체 접합체의 안정화 기술을 습득 등을 통해서 실전적 경험 축적과 전문인력 양성 및 시스템 구축

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용계획

- *S. aureus*균 Enterotoxin의 노출량 추정에 따른 합리적인 정부의 정책 및 관리 방안 마련이 가능
 - Farm to Table까지의 농축산물에 대한 *S. aureus* 오염현황파악
 - 도축장 및 도계장에서의 도축·도계 단계별 오염도 및 노출량 파악
 - 가검물의 부위별 오염도 확인
 - 시중에 유통 중인 농축산물에서의 오염도 확인
 - 농축산물에 올바른 조리 방법에 대한 Guideline 제시
- 식품안전성 평가에서 과학적 접근 방식 도입 유도
 - HACCP과 더불어 식품안전성 평가에 보다 과학적으로 접근
- 미생물위해평가(MRA)기법 개발 및 활용 촉진
 - Enterotoxin을 이용한 새로운 MRA 기법 제시
- 농축산물 중 *S. aureus*균 enterotoxin 정량 기준 설정에 기초자료를 제공
 - 단순히 *S. aureus*균수만을 control 하는 것이 아니라 enterotoxin으로 설정하여 과학적인 방법으로 유도
- 농축산물 도축·유통 단계에서의 *S. aureus* enterotoxin 관리 지침 제시
- 오염수준/생육온도에 따른 *S. aureus*균의 장독소 생성량에 대한 기초자료 제공
 - *S. aureus*의 enterotoxin은 생육온도, pH, Aw 등 여러 조건에 의해서 생성량이 결정되어 질 수 있으므로 이에 대한 연구는 기초자료로 제공
- 농축산물의 *S. aureus* enterotoxin 정량기준 설정 및 식품의 보존 유효기간 제시
- *S. aureus* enterotoxin에 대한 위해성 평가에 활용

나. 기대성과

1) 기술적 측면

- *S. aureus* enterotoxins의 특이항원 확보 및 항체 생산기술 확보
 - 각각 enterotoxin에 대한 단클론 항체의 대량 생산 기술 확보와 생산된 항체의 특이성 검증기술을 습득
- *S. aureus* enterotoxins의 정성에 대한 기법은 세계적 기업에서 만들어져 그 기술력을 가지고 있으나, 본 정량방법은 아직까지 상품화를 시키지 못한 것으로 이에 대한 개발 기술을 확보
 - ELISA 방법과 real time PCR을 이용한 개발기술을 확보하며, 고정화 항체

및 항체 접합체의 안정화 기술을 습득 등을 통해서 실전적 경험 축적과 전문인력 양성 및 시스템 구축

2) 경제·산업적 측면

- 생산부터 소비자까지의 각 단계별 *S. aureus* enterotoxin 오염 정도를 파악할 수 있으므로 식중독 사고예방은 물론 안전한 농축산물 생산으로 소비자의 신뢰가 높아가 국내산 농축산물의 소비촉진 및 국내 농축산물 생산농가의 수입이 증가 예상
- 개발된 예측 모델은 도축, 도계, 유통 산업체에 각각의 단계에서 과학적인 Critical point를 제시함으로써 경제적인 측면뿐만 아니라 효율적인 관리를 구현

제 2 절 연구개발 실적

1. 학회발표 (국제학회 3편)

- 발표제목 : **Developing a *S. aureus* enterotoxin specific antibody for establishing an immuno- quantitative detection system** (황색포도상구균 장독소를 검출하기 위한 Real time PCR을 이용한 면역 정량 시스템개발)
- 발표자 : 황선영, 홍준배, 윤장원, 권가희, 문보연, 김상필, 박용호
- 학술회의명 : International Association for Food Protection
- 인쇄물명 : IAFP 2011 Program book 통권/호/페이지 61 pages
- 개최장소 : Milwaukee, WI, US, Frontier Airlines Convention Center
- 발표일 : 2011-08-02

- 발표제목 : **Modeling *S. aureus* growth and enterotoxin productions in the Chichen Slaughtering process**(도계장에서의 황색포도상구균 장독소 생산 모델 개발)
- 발표자 : 홍준배, 황선영, 김상필, 박용호
- 학술회의명 : International Association for Food Protection
- 인쇄물명 : IAFP 2011 Program book 통권/호/페이지 67 pages
- 개최장소 : Milwaukee, WI, US, Frontier Airlines Convention Center
- 발표일 : 2011-08-02

- 발표제목 : **Quantification of *S. aureus* cross-contamination during handling of contaminated fresh chicken parts in kitchens**
- 발표자 : 홍준배, 황선영, 박용호
- 학술회의명 : International Union of Microbiological societies
- 인쇄물명 : IUMS 2011 Sapporo FINAL PROGRAM 통권/호/페이지 199 pages
- 개최장소 : Sapporo, Convention center
- 발표일 : 2009-09-04

2. 논문게재(국제논문 1편 게재승인, 1편 투고중, 1편 투고예정)

- 발표제목 : **Occurrence of antimicrobial resistance and virulence genes, and distribution of enterococcal clonal complex 17 from animals and humans in Korea**
- 발표자 : Ka Hee Kwon, Sun Young Hwang, Bo Youn Moon, Young Kyung

Park, Sook Shin, Cheol-Yong Hwang, and Yong Ho Park

- 학회지명 : Journal of Veterinary Diagnostic Investigation (accepted)
Vol. 24, Number 5, September 2012.
- 참고사항 : Acknowledgement: Korea Institute of Planning and Evaluation
for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries
(IPET 110032-3); Korea Food and Drug Administration
(10162Antibiotics113 and 11162KFDA157)

- 발표제목 : **Quantitative microbial Risk assessment of Staphylococcus
aureus enterotoxin in Salad (In preparation)**
- 발표자 : Joonbae Hong, Sun Young Hwang

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 논문

가. Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification

(1) 저자 : Christof M. Niemeyer¹, Michael Adler² and Ron Wacker

(2) 발행연도 : 2005

(3) 내용 : Immuno-PCR 방법 review paper

다양한 Immuno- PCR 방법 제시 및 설명

나. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil

(1) 저자 : Jamaira Ferreira Veras ^a, Luiz Simeao do Carmo ^{b,*}, Lawrence C. Tong ^c, Jeffrey W. Shupp ^c, Christiano Cummings ^c, Deise Aparecida dos Santos ^b, Monica Maria Oliveira Pinho Cerqueira ^a, Alvaro Cantini ^d, Jacques Robert Nicoli ^d, Marti Jett

(2) 저널 : International Journal of Infectious Diseases

(3) 발행연도 : 2008년

(4) 내용 : coagulase negative Staphylococcus 및 Coagulase positive Staphylococcus aureus으로 인한 식중독 발생 사례 관련 균들에게서의 독소 확인

다. Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment

(1) 저자 : Jeann-Marie Mebre

(2) 저널 : International Journal of Food Microbiology

(3) 발행연도 : 2008

(4) 내용 : coagulase negative Staphylococcus 및 Coagulase positive Staphylococcus aureus으로 인한 식중독 발생 사례 관련 균들에게서의 독소 확인

라. Quantitative risk assessment of Campylobacter spp. in poultry based meat preparations as one of the factors to support the development of risk-based microbiological criteria in Belgium

(1) 저자 : M. Uyttendaele ^a, K. Baert ^a, Y. Ghafir ^b, G. Daube ^b, L. De

Zutter c, L. Herman d, K. Dierick e,

(2) 저널 : International Journal of Food Microbiology

(3) 발행연도 : 2006

(4) 내용 : Campylobacter의 정량적 위해평가
가금류의 위해분석 요소 제시

마. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations

(1) 저자 : M. Mataragas, P.N. Skandamis, E.H. Drosinos

(2) 저널 : International Journal of Food Microbiology

(3) 발행연도 : 2008

(4) 내용 : 병원성세균의 Risk 및 분석 방법

사. A comparison of risk assessments on Campylobacter in broiler meat

(1) 저자 : Maarten Nauta a, , Andy Hill b, Hanne Rosenquist c, Sigrid
Brynstad d,e, Alexandra Fetsch d,

(2) 저널 : International Journal of Food Microbiology

(3) 발행연도 : 2009

(4) 내용 : 도계장에서의 도계단계별 위해평가 수행

제 7 장 연구시설·장비 현황 : 해당사항 없음

제 8장 참고문헌

- Christof M. Niemeyer, Michael Adler and Ron Wacker, 2005, Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification, Trends Biotechnol. 23(4):208-16
- Altekruse SF, Cohen ML, Swerdlow DL., 1997, Emerging foodborne diseases, Emerg Infect Dis., 3(3):285-93.
- Asao, T., Y. Kumeda, T. Kawai, T. Shibata, H. Oda, K. Haruki et al. 2003. An Extensive Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Due to Low-fat Milk in Japan: Estimation of Enterotoxin A in the Incriminated Milk and Powdered Skim Milk. Epidemiol. Infect. 130:33-40. Retrieved July 2, 2010, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2869936/pdf/12613743.pdf>.
- Atanassova, V.; Meindl, A.; Ring, C. Prevalence of Staphylococcus aureus and Staphylococcal Enterotoxins in Raw Pork and Uncooked Smoked Ham—Comparison of Classical Culturing Detection and RFLP-PCR. Int. J. Food Microbiol. 2001, 68, 105 - 13. Toxins
- Bone, F.J., D. Bogie and S.C. Morgan-Jones. 1989. Staphylococcal Food Poisoning from Sheep Milk Cheese. Epidem. Inf. 103:449-458. Retrieved August 2, 2010, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2249553/pdf/epid infect00018_0045.pdf. Casman, E.P. Staphylococcal Enterotoxin. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1965, 128, 124 - 31.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1986. Staphylococcal Food Poisoning from Turkey at a Country Club Buffet -- New Mexico. Retrieved July 29, 2010, from <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00000825.htm>.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1989. Epidemiologic Notes and Reports Multiple Outbreaks of Staphylococcal Food Poisoning Caused by Canned Mushrooms. Retrieved July 29, 2010, from <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001410.htm>.
- Do Carmo, L.S., R. S. Dias, V. R. Linardi, M. J. de Sena, D. A. dos Santos et al. 2002. Food Poisoning due to Enterotoxigenic Strains of Staphylococcus Present in Minas Cheese and Raw Milk in Brazil. Food Microbiol. 19:9-14. Abstract Retrieved July 31, 2010, from <http://tinyurl.com/22vheau>.

- Evenson, M.L., M. W. Hinds, R.S. Bernstein and M.S. Bergdoll. 1988. Estimation of Human Dose of Staphylococcal Enterotoxin A from a Large Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Involving Chocolate Milk. *Int. J. Food Microbiol.* 7:311-316. Abstract Retrieved July 29, 2010, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3275329>.
- Evenson, M.L.; Hinds, M.W.; Bernstein, R.S.; Bergdoll, M.S. 1988, Estimation of Human Dose of Staphylococcal Enterotoxin A From a Large Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Involving Chocolate Milk. *Int. J. Food Microbiol.* 7, 311 - 16.
- Health Protection Agency. 2009. Recent Staphylococcal Foodborne Outbreaks. Health Protection Report. Vol. 3, No. 29. Retrieved July 30, 2010, from <http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2009/news2909.htm#stap>
- Heininger, J.C., 등, 2009, Quantitative microbial risk assessment for *S. aureus* and enterotoxin A in Raw mil, *J food prot.* 72:1641-1653
- Indiana State Department of Health. 1997. Summary of Special Disease Outbreak Investigations - 1997. Retrieved July 28, 2010, from <http://www.in.gov/isdh/21186.htm>.
- Jamaira Ferreira Veras a, Luiz Simeao do Carmo b*, Lawrence C. Tong c, Jeffrey W. Shupp c, Christiano Cummings c, Deise Aparecida dos Santos b, Monica Maria Oliveira Pinho Cerqueira a, Alvaro Cantini d, Jacques Robert Nicoli d, Marti Jett, 2008, A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil, *International Journal of Infectious Diseases* 12(4):410-5.
- Jeann-Marie Mebre, Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment, 2008, *International Journal of Food Microbiology* ;128(1):10-5
- Jorgensen, H.J., T. Mathisen, A. Lovseth, K. Omoe, K.S. Qvale and S. Loncarevic. 2005. An Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Caused by Enterotoxin H in Mashed Potato Made with Raw Milk. *FEMS Microbiol. Lett.* 252:267-272. Retrieved July 31, 2010, from <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/full>
- Kansas Department of Health and Environment. 2005. Staphylococcal Food Poisoning Outbreak in Southeast Kansas, December, 2005. Retrieved July 28, 2010, from http://www.kdheks.gov/epi/download/foodborne_illness_outbreak_report_dec_2005.pdf.
- Kansas Department of Health and Environment. 2009. Outbreak of

- Staphylococcus aureus Associated with the Italian Garden Restaurant -- Lyon County, June 2009. Retrieved July 27, 2010, from http://www.kdheks.gov/epi/download/Outbreak_of_Staphylococcus_aureus.pdf.
- M. Mataragas, P.N. Skandamis, E.H. Drosinos, Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations, 2008, *International Journal of Food Microbiology*
- M. Uyttendaele a, , K. Baert a, Y. Ghafir b, G. Daube b, L. De Zutter c, L. Herman d, K. Dierick e, 2006, Quantitative risk assessment of *Campylobacter* spp. in poultry based meat preparations as one of the factors to support the development of risk-based microbiological criteria in Belgium, *International Journal of Food Microbiology* 111(2):149-63
- Maarten Nauta a, , Andy Hill b, Hanne Rosenquist c, Sigrid Brynstad d,e, Alexandra Fetsch d, 2009, A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat, *International Journal of Food Microbiology* 129:107 - 123
- Malou N and Raoult D.,2011, Immno-PCR: a promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies, *Trends in Microbiology* (2011) 1-8
- PahK GJ 등, 2005, Quantitative microbial risk assessment model for *S. aureus* in kimbab. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37:481-491
- Paola Cremonesia, Massimo Luzzanaa, Milena Brascab, Stefano Morandib, Roberta Lodib, Chiara Vimercatic, Dario Agnellinia, Giancarlo Caramentid, Paolo Moronic, Bianca Castiglioni, 2005, Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products, *Molecular and Cellular Probes* 19(5) 2005:299 - 305
- Pereira, M.L., L. S. do Carmo, E.J. dos Santos and M.S. Bergdoll. 1994. Staphylococcal Food Poisoning from Cream-filled Cake in a Metropolitan Area of South-Eastern Brazil. *Rev. Saude Publica.* 28:406-409. Retrieved July 31, 2010, from <http://www.scielosp.org/pdf/rsp/v28n6/03.pdf>.
- Redmond EC, Griffith CJ., 2003, Consumer food handling in the home: a review of food safety studies, *J. Food Prot.* 66(1):130-61.
- Richards, M.S. Rittman M., Gilbert, T.T., Opal, S.M., Debuono, B.A. 1993. Investigation of a Staphylococcal Food Poisoning Outbreak in a Centralized School Lunch Program. *Public Health Reports.* 108:765-771. Retrieved July 28, 2010, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1403460/pdf/pubhealthrep00064>

- Roh MJ 등, Monitoring of microbial hazards at farms, slaughterhouses, and processing lines of swine in Korea. J. food prot. 64:1388-1391
- Schelin, J. 등, 2011, The formation of *S. aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment, Virulence 2(6)580-592
- Vose JD. The application of quantitative risk assessment to microbial food safety. J. food prot. 61:640-648
- Walterman, S.H., T.A. Demarcus, J.G. Wells and P.A. Blake. 1987. Staphylococcal Food Poisoning on a Cruise Ship. Epidem. Inf. 99:349-353. Retrieved July 30, 2010, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2249300/pdf/epidinf00005-0124.pdf>.
- Woolaway, M.C., C.L.R. Bartlett, A.A. Wieneke, R.J. Gilbert, H.C. Murrell and P. Aureli. 1986. International Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Caused by Contaminated Lasagne. J. Hyg. 96:67-73. Retrieved August 2, 2010, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2129594/pdf/jhyg00004-0071.pdf>.
- 송주현 등, 2009, 몬테카를로 시뮬레이션을 이용한 일식메뉴 중 비가열 처리 식품의 정량적 위해평가, Food Engin Pro 13:56-63
- 차성관, 서미영, 김윤숙, 김명호, 김윤지, 2004, 닭 도계과정 중의 미생물 증감 추이, 한국축산식품학회지 24:335~341
- 최유진, 2009, 몬테카를로 시뮬레이션을 이용한 비 가열처리 샐러드와 오리구이의 정량적 미생물위해평가의 수행, 동국대 석사학위 논문

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.