

11-  
1543000  
-  
001409-  
01

발간등록번호

11-1543000-001409-01

# 분자농축기술개발을 통한 식중독균 검출시간 단축 및 현장형 검출시스템 개발 최종보고서

2016. 10. 31.

주관연구기관 / (주)비엠에스  
협동연구기관 / 국민대학교

농림축산식품부

고부가가치기술개발 R&D Report

분자농축기술개발을 통한 식중독균 검출시간 단축 및  
현장형 검출시스템 개발 최종보고서

2016

농림축산식품부

## 2. 제출문

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “분자농축 기술 개발을 통한 식중독균 검출시간 단축 및 현장형 검출시스템 개발”(개발기간 : 2013. 5. 15 ~ 2016. 7. 15) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016 . 8 . 30 .

주관연구기관명 : 비엠에스 (대표자) 김 동 호 (인)  
협동연구기관명 : 국민대학교 (대표자) 오 세 옥 (인)  
참여기관명 : (대표자) (인)

주관연구책임자 : 김 동 호

협동연구책임자 : 오 세 옥

참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	113016-3	해당단계 연구기간	2015.7.16 -2016.7.15	단계구분	(해당단계)/ (총단계)
연구사업명	중사업명	고부가가치 식품기술개발사업			
	세부 사업명	고부가가치 식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명	분자농축 기술 개발을 통한 식중독균 검출시간 단축 및 현장형 검출 시스템 개발			
	세부 과제명	식품산업 현장형 고효율 검출장비 개발(주관연구기관) 분자농축에 의한 검출시간 단축 기술 개발(협동연구기관)			
연구책임자	김 동 호	해당단계 참여 연구원 수	총: 8 명 내부: 8 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:110,000천원 민간: 천원 계:110,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 26 명 내부: 26 명 외부: 명	총 연구개발비	정부:330,000천원 민간: 천원 계:330,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)비엠에스 비엠에스 생명과학 연구소			참여기업명	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수	

#### 4. 국문 요약문

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<p>식품에 낮은 농도로 존재하는 식중독균을 정확하고 신속하게 검출하기 위하여 rate-limiting 과정인 microbial enrichment를 대체할 수 있는 분자농축 (molecular enrichment) 기술 개발로 검출기간을 획기적으로 단축시키며 최종적으로 식품산업 현장형 고효율 검출 기술을 개발하고자 함</p>				
연구개발성과	<p><b>핵심요소기술</b></p> <p>식품으로부터 미생물 분리기술 (여과, 원심분리)</p> <p>저농도의 균으로부터 DNA 분리 기술</p> <p>WGA를 이용한 genomic DNA 증폭 기술</p> <p>개발기술의 간편 kit와 기술</p> <p>연장 적용을 위한 소영 및 간편기기와 기술</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 분자농축 수행을 위하여 우선적으로 전처리 조작으로 식품으로부터 미생물의 효율적 분리 기술을 개발</li> <li>- 전처리된 미생물로 부터 genomic DNA 분리기술 개발</li> <li>- 분리된 genomic DNA를 이용하여 WGA를 수행하여 기존의 microbial enrichment와 비교 검토</li> <li>- 분리된 genomic DNA로 WGA가 원활하지 않을 경우 단시간 microbial enrichment를 활용</li> <li>- 분자기준 검출방법을 활용하여 신속검출 기술 개발</li> <li>- 개발기술의 식품산업 현장 적용을 위하여 분석기기의 미니어처화 및 간편화를 구현</li> </ul>			
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 본 연구과제를 통하여 개발되는 분석기술은 편이성과 간편성을 위하여 kit화 하여 상업적으로 활용될 수 있는 가능성을 높이고자 함.</li> <li>- 연구과제 수행 후 주관연구기관에서 기업화 하는 것을 우선적으로 추진하고자 하며 식품에서 미생물 분리 기술 등은 주관연구기관과 별도로 3M에 기술이전 추진함</li> <li>- 분자농축 기술은 현재 신속검출에 사용되지 않은 기술로서 향후 유전자를 기반으로 하는 모든 검출법에 사용할 수 있으므로 신규개발 제품을 통한 매출·수출 증대 등 시장 파급효과가 있음</li> <li>- 또한 과거 선행기술과 접목할 수 있는 기술이므로 관련분야의 기술 향상 효과도 있음</li> </ul>				
중심어 (5개 이내)	농축	전유전체증폭	검출	식중독	PCR

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호		D-02	
Purpose& Contents	To develop a field-type high-efficiency detection technology using molecular enrichment that can replace the microbial enrichment is rate-limiting process to detect food poisoning bacteria present at low concentrations in the food accurately				
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>- To develop an efficient separation technology of microorganisms from the food in the predominantly pre-processing operation for molecular enrichment</li> <li>- To develop a genomic DNA separation technique from the pre-treated microorganisms</li> <li>- To compare that using WGA with traditional microbial enrichment</li> <li>- If WGA is not smooth, utilizing short microbial enrichment</li> <li>- The development of rapid detection technology by using molecular detection method</li> <li>- To reduce the size and simplify the analysis equipment for on-site application of food industry</li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analysis techniques have been developed throughout this study, that can be commercially utilized turned into kit for the convenience and simplicity</li> <li>- Trying to promote commercialization in the main research institute, and such as microbial separation techniques from the food to promote technology transfer to 3M</li> <li>- Molecular concentration techniques that are not used for rapid detection now, therefore it can be used in the future for all detection methods based gene. It can increase in exports through newly developed products, therefore there will be a market spillover effects</li> <li>- Furthermore, this technique that is capable of improving the related technologies by fusing with the prior technologies</li> </ul>				
Keywords	enrichment	whole genome amplification	detection	food poisoning	PCR

## 6. 영문목차

- Chapter 1. Introduction and summary of the research
- Chapter 2. The present technical state
- Chapter 3. Research contents and results
- Chapter 4. Object achievement and related fields of their application
- Chapter 5. Products of research and their Application-plan
- Chapter 6. Technical Information of foreign countries
- Chapter 7. Security evaluation of the results of research and development
- Chapter 8. Research equipments and facilities
- Chapter 9. Safe management of laboratory
- Chapter 10. Representative research results of the research
- Chapter 11. Others
- Chapter 12. Reference

## 7. 본문목차

# < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요
2. 국내외 기술개발 현황
3. 연구수행 내용 및 결과
  - 제 1 절. 식중독균으로부터 DNA 분리 방법과 filtration에 의한 균 농축방법 확립
    - 1장. 식중독균 신속검출 kit제품 및 시장 분석
    - 2장. 소량의 DNA 검출을 위한 Digital PCR 최신 방법 조사
    - 3장. 협동기관 결과 validation
    - 4장. 대상균주 및 식품 선발
    - 5장. Filtration에 의한 균 농축(효과정량)
    - 6장. Genomic DNA 분리기술
  - 제 2 절. 식중독균 최적 enrichment 방법 확립과 식품 내 식중독균 분리 kit 가능성 검토
    - 1장. 식품에서 식중독균 검출 방법 및 kit 분석
    - 2장. 개발중인 방법(Digital PCR 및 chromato chip)을 이용한 식중독균 검출 테스트
    - 3장. 식중독균 검출에 대한 특허 정보 조사
    - 4장. 협동기관 결과 validation
    - 5장. 1차년도 연구를 통해 개발된 식품 내 식중독균의 filtering 농축기법에 의한 식중독균 검출한계 향상
    - 6장. 식중독균의 신속.정확 검출을 위한 filtering 시스템/enrichment/분자생물학적 기법융합과 최적 조건
    - 7장. Filtering 농축기술과 분자생물학적 분석기법을 융합한 식품 내 식중독균 신속.간편 검출 기술 개발
  - 제 3 절. 식중독균 검출시간 단축을 위한 최종적인 시스템 확립
    - 1장. QX200을 이용한 Multiplex test run
    - 2장. 실제 식품을 대상으로 협동기관에서 개발한 lateral flow assay validation test
    - 3장. Amplification 후의 detection 기술 검토
    - 4장. 분리/WGA/검출로 구성된 시스템 구축
    - 5장. 주관연구기관에 정보 전달 및 feedback
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
5. 연구결과의 활용계획 등
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보
7. 연구개발성과의 보안등급
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설.장비현황
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적
11. 기타사항
12. 참고문헌

## 8. 뒷면지

### 주의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.



## 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

### 1-1. 연구개발 목적

○ 식품에 낮은 농도로 존재하는 식중독균을 정확하고 신속하게 검출하기 위하여 rate-limiting 과정인 microbial enrichment를 분자농축(molecular enrichment) 기술 개발로 대체하여, 검출기간의 획기적 단축하여 식품산업 현장형 고효율 검출 기술을 최종적으로 개발하고자 함

### 1-2. 연구개발의 필요성

○ 식생활 패턴 변화, 지구 온난화 현상, 실내온도 상승 등 환경변화로 인하여 국내·외 가공식품과 즉석 식품에서 다양한 식중독세균이 검출되고 있으며 이에 따라 식중독발생이 증가하고 있으며 규모면에서도 집단화·대형화하고 있는 실정임

○ 2010년 우리나라의 식중독 발생건수는 136건으로 총 4,546명의 환자가 발생하였음. 원인균으로는 병원성대장균 미생물 중에서는 가장 높았으며 살모넬라, 황색포도상구균 등이었음. 바이러스로는 노로바이러스가 높은 환자수를 발생시켰음

○ 세균성 식중독 원인균중 병원성 대장균은 2002년 이후 가장 많은 환자를 발생시키는 것으로 나타나고 있음

○ 조리 기구 및 도구의 재질 표면에 오염된 병원성 세균은 외식 및 단체급식에서 교차 오염의 원인으로 작용할 수 있으며, 이들이 표면에 형성시킨 biofilm은 세척 및 살균소독 과정에서도 미생물이 살아남을 수 있는 환경을 제공하여 식중독 위험을 증가시킬 수 있음

원인균	건수	환자수
살모넬라	16	497
황색포도상구균	10	302
장염비브리오균	2	12
바실러스세레우스	7	70
클로스트리디움퍼프리젠스	3	104
캠필로박터제주니	9	287
병원성대장균	10	1,096
노로바이러스	21	1,604
자연독	3	16
불명	55	558
합 계	136	4,546

Table 1. 2010년 식중독 발생 통계

○ 특히 최근 급식과 외식의 증가로 5년 전('03년)보다 건수는 3.8배 증가, 환자수는 20% 증가되었음. 음식점과 집단급식소에서 여름철(5-8월)에 주로 많이('07년 48%) 발생

○ 우리나라 인구 백만명당 식중독 환자수는 60.6명('96) → 157.6명('00) → 201명('07) → 154('08)명으로 발생하고 있음

연도별	'04	'05	'06	'07	'08
건수(건)	165	109	259	510	354
환자수(명)	10,388	5,711	10,833	9,686	7,487

Table 2. 우리나라 식중독 발생건수 및 환자수

○ 집단급식소 식중독 발생 건수는 '03년 67건에서 '07년 98건으로 46.3% 증가하였으며 계속적으로 증가하고 있는 추세임. 학교급식 발생 건수 16.3% 증가('03, 49건 4,621명 → '07, 57건 3,101명 → '08, 39건 2,983명)한 것으로 나타났음. 전체적으로 집단급식소 발생 건수는 증가하였고, 환자수는 다소 감소하였음

○ 음식점 식중독 발생건수는 '03년 46건에서 '07년 289건으로 6.3배 증가한 것으로 나타나 최근 증가 추세임. 이는 외식·급식을 이용하는 비율이 증가하였으며 식중독에 대한 보고 체계가 개선('07)된 것 등에 의한 것으로 판단됨. 도시 가게 식료품비 중 외식비 지출 비중은 '90년 20.3%에서 '00년 39.4%, '06년 46%로 증가하고 있음. 학교, 보육시설, 기업체 집단 급식 등은 '07. 12월 현재, 56천개소 1,180만명이 상시 급식을 하는 것으로 조사되고 있음

○ 식중독 발생이 많은 하절기 집단급식소 식중독 발생 원인으로는 병원성대장균, 황색포도상구균, 노로바이러스, 캄필로박터균, 바실러스균에 의해 발생한 것으로 조사되고 있으며 음식점 등의 경우 병원성대장균(17.3%), 장염비브리오(11.3%), 황색포도상구균(10.9%) 등이 주로 발생('05-'07)하는 것으로 조사되었음. 식중독 원인으로는 조리 온도 불충분, 교차오염(식육↔칼·도마), 개인위생불량, 노로바이러스에 오염된 지하수로 처리된 식재료 등의 섭취, 사람간의 2차 감염 등에 의한 것으로 추정 되고 있음

○ 향후 전망으로는 급식·외식 시설에 대한 이용이 증가할 것으로 예상되며 노로바이러스 식중독이 지속적으로 확산될 것으로 예상됨. 특히, 1회 급식인원이 많은 집단급식소에 공동으로 식재료를 제공하는 사례 증가로 대규모 환자 발생 가능성과 사회문제로 확산될 우려가 증가되고 있음

○ 또한, 지구 온난화에 따른 기온 상승 등으로 식중독 발생이 지속적으로 증가할 것으로 예상됨. 기온 1°C 상승 시 식중독 발생 건수는 5.27%, 환자수는 6.18% 증가할 것으로 추산 ('2020년 우리나라 기온 2000년보다 1.2°C 증가 예측)되고 있음. 의료비 등 식중독의 경제·사회적 비용은 미국이 연 6조5천억원, 한국이 1조3천억원으로 추정되고 있음(식품의약품안전성, 식중독예방 대국민 홍보사이트)

○ 단체급식에서, 특히 학교급식에서 식중독을 예방하기 위해서는 조리된 식품에서의 식중독균 검출 기술이 효과적으로 사용될 수 있음. 식중독균이 조리된 식품에 존재할 경우 온도위험구간인 5~60°C에서 4시간 이상 방치 시 식중독을 유발할 수 있을 정도로 성장할 수 있음. 따라서 조리된 식품에 대한 식중독균에 대한 신속검사법은 반드시 필요할 기술이라고 할 수 있음

○ 또한 식중독균 신속 검출 기술은 RTE 식품 및 샐러드 제품 등의 비가열처리 식품에 존재하는 식중독균을 검출하는데 사용될 수 있음. 생산 공정에서 원료에 대한 식중독균 신속 검출 기술은 생산된 제품이 유통과정에 들어가기 전에 원천 차단할 수 있는 시간적 여유를 확보할 수 있어 국민 건강 수호에 이바지 할 수 있음

### 1-3. 연구개발 범위

○ - 식품에서의 분리 기술 확립

(대상식품 : 농산물, 수산물, 축산물의 원재료)

(대상균주 : 병원성대장균, 바실러스세레우스, 황색포도상구균, 살모넬라)

- 저농도균으로부터 DNA 분리 기술 확립 (단시간 배양 가능성 검토)

- Whole genome amplification을 이용한 DNA 증폭 기술 개발
- LAMP(loop-mediated isothermal amplification), real-time PCR을 이용한 검출 기술개발
- 최적화된 조건과 그에 상응하는 장비 개발
- 식품산업 현장형 소형/고효율 검출시스템 개발

작성요령(제출 시 삭제할 것)

- 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술
  - 선정당시 「연구개발계획서」와 전년도 제출하였던 「연차실적·계획서」 또는 「단계실적·계획서」상의 내용과 동일하게 작성

## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

### 1-1. 신속검출 기술 현황

- 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 기술은 식중독 예방을 위하여 반드시 필요한 기술임. 최근 신속·간편·편리한 검출기법의 개발이 급속하게 증가하고 있는 반면 생화학적 특성을 활용한 전통적인 검출방법에 대한 연구는 감소하고 있음
- 식중독세균의 신속검출법으로는 ELISA(Enzyme linked immuno sorbent assay)등이 사용되고 있으며 DNA chip, PCR(polymerase chain reaction)을 이용한 유전자 검출이 이용되고 있음
- 항원항체를 이용하는 검출법은 항체를 사용하기 때문에 민감도(sensitivity)가 높은 장점이 있지만 선택성(specificity)이 떨어지는 단점이 있음. 항체와 미생물간의 물리적인 접촉이 일어나야 검출될 수 있으나 식품매트릭스에서 효율적으로 항체와 미생물이 접촉하는 것이 어려운 현실적인 단점이 있음.
- 신속검출에 사용되는 검출법은 다음과 같은 특성이 있음

	선택배지법	PCR	면역기법	Microarray
속도 (speed)	-	++	+++	+
감도 (Sensitivity)	+	++	+++	++
선택성 (Specificity)	-	+++	+	+++
편리성 (Simplicity)	-	+	+++	+
비용 (Cost)	+++	++	+	-

(하상도. 식중독세균 검출기술 동향 분석)

- Real-time PCR이나 DNA probe를 사용하는 방법은 보통 항원항체를 이용한 검출법에 비하여 특이적이며 신뢰성이 높은 실험법으로 알려져 있지만 숙련된 기술과 고가의 장비가 필요하다는 단점이 있음.
- 미생물검출 센서도 개발되고 있음. 센서는 항원·항체 반응을 기반으로 하고 있음. 식중독균과 결합할 수 있는 항체에 나노입자 크기의 금속(주로 금을 사용)을 붙여서 항원에 항체가 결합되어 발생하는 시그널(SERS)을 감지하여 측정함

## 1-2. 기존 신속검출의 문제점

### <항원 . 항체 기반 검출법의 문제점>

- 최근 특정 물질 검출법 개발에 있어 라만분광법에 대한 연구가 활발하며, SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) 발견은 라만분광법의 문제점이었던 낮은 signal-to-noise 현상을 극복하게 되었음
- 라만스펙트럼은 항원 . 항체 반응에서 발생하는 시그널을 감지할 수 있어 널리 사용되고 있음. 라만분광법은 빛을 물질에 조사하였을 경우 조사된 빛과 산란된 빛이 다른 특성을 나타내는 것을 검출하는 방법임. 물질에 따라 물질에 따라 조사된 빛에 대해 흡수 및 반사하는 고유의 라만특성을 나타내고, 이를 이용하여 특정 물질을 파악하고 진단하는 detection 방법에 대해 최근 활발하게 연구되고 있음
- 물질에 따른 상이한 라만산란현상은 특정 물질을 검출할 수 있게 하였음. 라만분광법 연구는 고분자 유기물 및 미생물 분석으로 그 범위가 확대되고 있는 실정임
- 라만산란현상은 분자단위의 물리화학적 특성에 반응함에 따라, 라만분광법을 이용한 특정 물질 검출은 라만 spectrum 패턴을 분석을 기반으로 이루어짐. 따라서 특정물질 이외의 기타 물질이 존재할 경우 라만 spectrum 패턴의 변화가 불가피 하여 물질 검출이 매우 어려운 단점이 있음
- 즉, 식품에 존재하는 물리화학적 결합의 대부분은 미생물의 물리화학적 결합과 중복됨. 따라서 식중독균을 식품의 다양한 유기, 무기물질과 함께 라만분광법으로 분석할 경우 라만 spectrum 패턴변화로 인해 분석이 불가능함. 또한 식품에 존재하는 미생물은 빈번하게 동정을 요구하게 되나, 라만분광법을 기반의 미생물 검출법의 미생물 동정 가능성은 희박한 것으로 판단됨
- 따라서 다양한 식품의 매트릭스적 특성과 검출대상으로 하는 식중독균의 다양성을 고려하였을 경우, 항원 . 항체를 이용한 검출방법은 식품에서의 신속검출에 효과성이 떨어짐

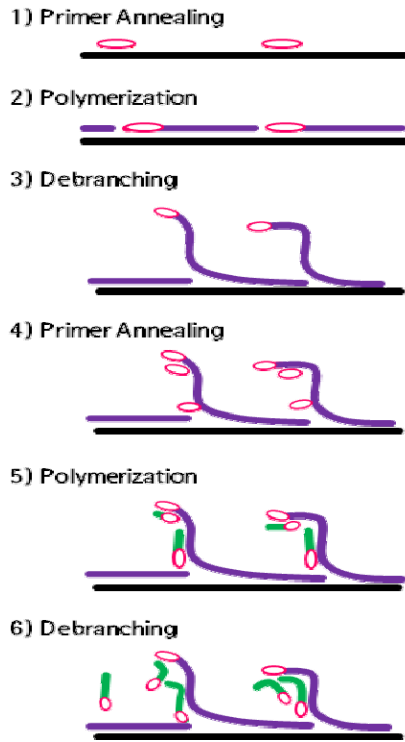
### <테라헤르츠 분광/영상을 이용한 물리적 검출 기술의 문제점>

- 테라헤르츠파가 가진 고유한 특성을 활용하여 분석함. 세균이나 바이러스에 테라헤르츠파가 어떤 식으로 흡수되는지 혹은 어떤 식으로 반사되는지를 계측하여 데이터베이스와 비교하여 분석함
- 탄저균과 소맥분 등 분말의 구별을 시도한 보고가 있음
- 그러나 라만스펙트럼과 마찬가지로 식품에 존재하는 다양한 성분에 의해 테라헤르츠 스펙트럼 패턴 변화로 분석하기는 매우 어려운 것으로 생각됨

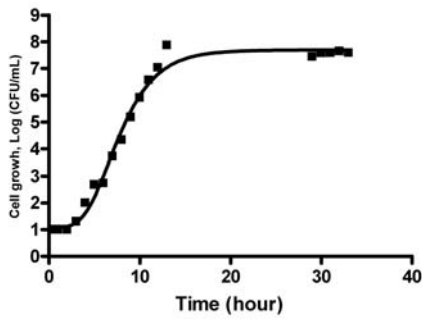
### <PCR 등 DNA 기반 기술>

- PCR은 미생물이 고유하게 가지는 유전자의 일부분을 primer를 이용하여 증폭시키게 됨. 따라서 고유의 DNA sequence를 target으로 하므로 선택성(specificity)이 우수한 검출기술로 알려져 있음
- PCR 검출기술 가운데 한가지인 real-time PCR은 일반 PCR과는 달리 반응초기에 검출이 가능하므로 일반 PCR에 비하여 검출시간이 훨씬 더 단축되는 장점이 있음. 또한 전기영동에서는 눈에 보이지 않을 정도의 적은 양으로 증폭되어도 검출이 가능함. 따라서 미생물에 대한 신속검출기술에 효과적으로 사용될 수 있음
- 미생물의 신속검출에서 가장 중요한 기준이 되는 것이 검출한계(detection limit)임. 모든 신속검출시험법에는 고유의 검출한계가 있으며 검출한계가 낮을수록 민감한 검출방법임. 항원 . 항체 반응을 이용한 임신진단 kit와 같은 lateral flow kit는  $10^4$ - $10^6$  cfu/mL 수준의 검출한계가 있어 검출을 위해서는 고농도의 균을 미리 배양하여야 가능함
- 현재까지 사용되고 있는 신속검출기술 중 가장 낮은 검출한계를 가지고 있는 것이 real-time PCR으로서 buffer나 water에서는  $10^1$ - $10^2$  cfu/mL 정도이며 식품에서는  $10^2$ - $10^4$  cfu/mL로 알려져 있음. 따라서 식중독균을 선택적(specificity)으로 신속하게 검출하기 위해서는 real-time PCR이 가장 효과적이라고 할 수 있음

Genomic DNA를 빠르게 증폭시킬 수 있는 방법이 whole genome amplification (WGA) 방법임. WGA는 Phi29 DNA polymerase를 이용하여 strand displacement activity를 이용하여 계속적으로 DNA를 합성하는 기술로서 30°C 조건에서 DNA의 증폭이 가능함

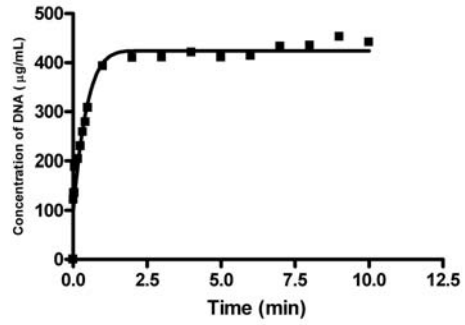


- WGA는 다양한 시료(single cell, blood card, buccal swab, soil, plant, formaline-fixed paraffin-embedded tissue 등)의 극소량 (nano gram) DNA를 증폭하여 10 µg 이상의 whole genomic DNA를 얻을 수 있음
- 식품에 극소량 존재하는 식중독균을 real-time PCR로 검출하기 위하여, 미생물 증균과정을 거쳐 검출한계 까지 균수를 증가시켜 DNA를 분리하여 검출할 수 있음. 또는 미생물 증균과정 없이 genomic DNA를 검출한계까지 증가시키면 real-time PCR에 의한 검출이 가능할 것임
- 미생물 증균 과정을 대신하여 WGA를 이용할 경우 미량 DNA를 신속하게 증폭시킬 수 있으며 7시간 걸리는 미생물농축 시간을 획기적으로 단축할 수 있음.
- 다음은 *Clostridium difficile*에 대한 미생물 성장 곡선과 WGA에 의한 DNA 증폭곡선을 비교하여 나타내었음. 미생물 enrichment에는 7시간 정도 배양하여야 detection limit에 도달하였지만 WGA의 경우, 5분 이내에 도달하였음을 알 수 있었음



Microbial enrichment

VS



Molecular enrichment

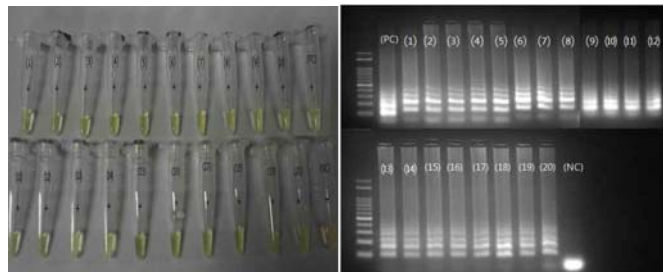
○ 그러나 실험결과 WGA는 저농도의 균에서 DNA의 분리가 어려운 것으로 판단되었음. 균의 농도가  $10^2$  cfu/mL 이하 조건에서는 DNA가 원활하게 분리되지 않았으며 따라서 WGA에 의한 증폭도 발생하지 않았음. 그러므로 저농도에서 균의 DNA를 분리할 수 있는 기술이 개발되어야 함

Table. 균농도에 따른 WGA 가능 여부

cfu/mL	$1 \times 10^0$	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$
가능여부	-	-	-	+	+	+

○ 분자농축 후에 검출은 현재 가장 검출한계가 낮다고 알려져 있는 real-time PCR을 활용할 예정임. 아울러 특정한 유전자서열을 목적으로 증폭할 수 있는 기술인 loop-mediated isothermal amplification (LAMP)를 염기서열 증폭 방법 및 검출방법을 검토할 예정임. LAMP product는 전기영동으로 확인할 수 있지만 dye를 첨가할 경우, 눈으로도 판단할 수 있어 현장활용 기술로도 적합한 것으로 판단됨

○ LAMP는 1fg 정도의 template DNA만 있어도 검출 가능하다고 알려져 있으며 PCR의 100배 정도 높은 민감도를 가짐



LAMP를 이용한 *Clostridium difficile* 검출 (Oh et al. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 2012)

○ LFA는 lateral flow immunoassay로, digoxigenin과 anti-digoxigenin, streptavidin과 biotin의 antigen-antibody의 특성을 이용해 DNA를 검출함

○ Streptavidin에는 goldparticle을 부착해 육안으로 확인할 수 있게 제작함

- LAMP의 경우에는 FIP primer의 5'에 Digoxigenin을 붙여 제작하고 표적균주의 target sequence 부분에 맞게 Biotin probe를 제작하여 검출함
- PCR의 경우에는 Forward primer의 5'에 Digoxigenin을 붙여 제작하고 reverse primer의 5'에 Biotin 붙여 제작하여 검출함
- 최종 증폭물의 biotin 부분은 gold particle이 부착된 streptavidin과 붙게 되고 Digoxigenin 부분은 Lateral flow 상의 test line에 뿌려진 anti-digoxigenin과 antigen antibody interaction을 통해서 붙게 됨. 이후, gold particle에 의해 육안으로 확인할 수 있음
- 이는 현장형 신속검출에 활용될 수 있음

### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

제 1 절. 식중독균으로부터 DNA 분리 방법과 filtration에 의한 균 농축방법 확립

#### 1. 1장. 식중독균 신속검출 kit 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

##### 1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 시료 전처리용 kit로 식품에서 미생물을 검출하기 위한 kit는 판매되고 있지 않다. 특히 식품에서부터 식중독 검출을 위한 시료 전처리 kit는 판매되지 않고 있다.
- 식품의 metagenome 분석을 위한 kit로는 Chelex method를 이용한 kit가 판매되고 있으나 이는 고농도의 DNA 분리를 위한 목적으로 사용된다.
- 식중독균 검출 kit로는 현재 국내 코젠바이오텍에서 foodborne pathogen에 대한 realtime PCR용 kit와 PCR용 키트를 판매하고 있으며 이밖에도 여러회사가 식중독균 검출 kit를 판매하고 있다.
- 삼성에버랜드에서 RapiDx란 이름으로 신속검출기를 판매하고 있다. 이 기기는 등온증폭기술인 LAMP를 이용한 기술로서 발색되는 것을 spectrophotometer로 검출하는 원리로 되어 있다.
- 그리고 디지털지노믹스사의 분자진단 검사기 smartDOG이 있다. Solid-phase PCR 기법을 이용한 기술로 전용칩을 사용하여 DNA의 일부만을 증폭시켜 식중독균을 확인하는데 활용하고 있다.



Multiplex PCR kit(코젠바이오텍) RapiDx(삼성에버랜드) smartDOG(디지털지노믹스)

- 그러나 코젠바이오텍과 RapidDx 등은 식중독균이 배양된 상태, 즉 검출한계 이상으로 존재할

때 검출이 가능한 제품으로 신속검출에 사용되는 kit나 기기라고 하기에는 무리가 있다.  
 <현재 국내에서 시판되고 있는 DNA 기반 검출 kit>

- Seegene

	Species	Gene
Virus V	Rotavirus	<i>VP4</i>
	Norovirus GI	<i>ORF2</i>
	Norovirus GII	<i>ORF2</i>
	Astrovirus	<i>OFR1a</i>
	Enteric adenovirus	<i>Hexon</i>
Bacteria B1	<i>Salmonella</i> spp	<i>sopB</i>
	<i>Shigella</i> Spp.	<i>vif, ipaH</i>
	<i>Vibrio</i> spp.	<i>hly, hlh, wh</i>
	<i>Campylobacter</i> spp	<i>hip, asp</i>
	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B	<i>tcdB</i>
Bacteria B2	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpa</i>
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>inv</i>
	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>hly, ela</i>
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>stx1, stx2</i>

- Kogene

	Species	Gene
14 pathogen	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>hipO</i>
	<i>Campylobacter coli</i>	<i>glyA</i>
	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>alpha-toxin</i>
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>hly</i>
	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>vvh</i>
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>toxR</i>
	<i>Shigella</i>	<i>ipa</i>
	<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>
	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>VT2</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>prfA</i>
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>groEL</i>
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>inv</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femA</i>
	<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>ITS</i>
pathogenic <i>E. coli</i>	EHEC	<i>stx1, stx2</i>
	ETEC	<i>LT, ST</i>
	EAEC	<i>aggR, easT</i>
	EPEC	<i>bfpA, eaeA</i>

- Bioneer



	Species	Gene
Norovirus	Norovirus GI and GII	

- LG 생명

	Species	Gene
Toxin	<i>Clostridium difficile</i> toxin A and B	

- 삼성 에버랜드

	Species	Gene
© gene-check	<i>Salmonella</i> <i>Listeria/Listeria mono</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> O157:H7 <i>Campylobacter</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>E. sakazakii</i>	

<식중독균 검출에 관한 문헌적 보고 예>

- World Academy of Science, Engineering and Technology, 2010

Species	Target Gene
<i>Salmonella</i>	Fimbriae
Pathogenic <i>E. coli</i>	Afa
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coagulase
MRSA	Methicillin resistance

- Appl Microbiol Biotechnol, 2009

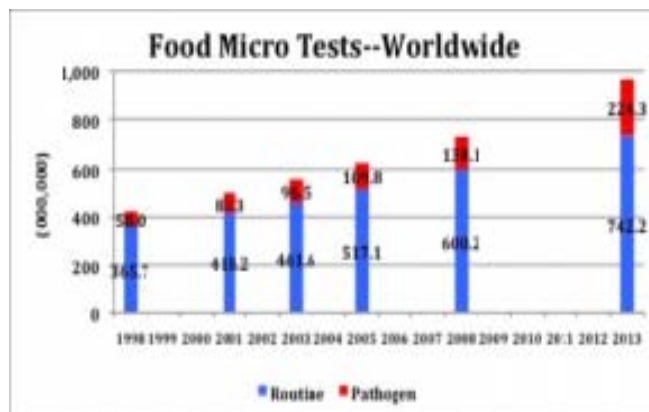
Species	Target Gene
<i>Shigella</i>	ipaH
<i>S. aureus</i>	gsp
<i>Y. enterocolitica</i>	16S rRNA
<i>L. monocytogenes</i>	Invasion-associated protein
<i>C. jejuni</i>	Cytochrome c oxidase
<i>E. coli</i> O157:H7	Perosamine synthetase
<i>V. parahaemolyticus</i>	Membrane protein ToxS
<i>V. cholerae</i>	Hemolysin
<i>E. sakazakii</i>	Macromolecular synthesis (MMS) operon
<i>P. aeruginosa</i>	Gyrase B

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

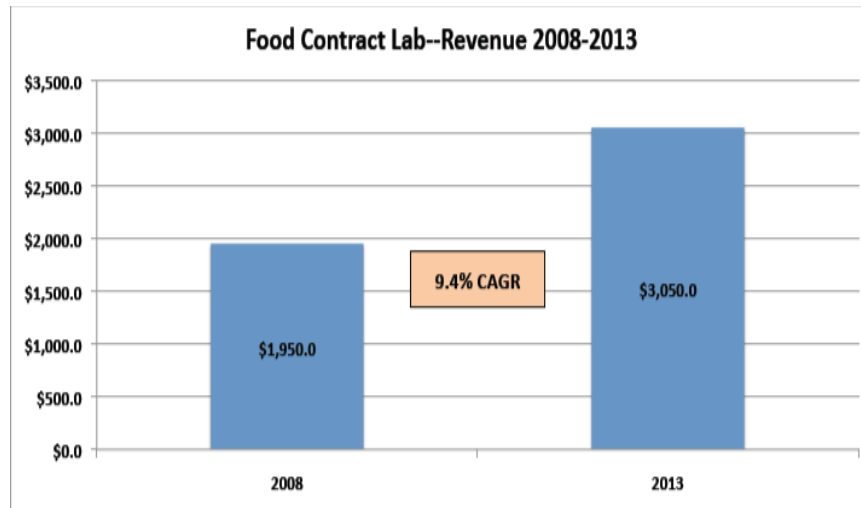
○ 최근 소매 식품체인 산업이 성장하면서 전세계 식품 서비스 산업도 자동화하고 있다. 동시에

식품 오염에 대한 소비자의 인식이 증가하고, 고속 미생물학적 검사방법(Rapid microbial detection method)이 등장하면서 식품안전검사 시장(Food Safety Testing Market)의 대폭적인 성장이 예상된다.

- 전세계 식품안전검사 시장 규모는 2010년 기준 약 2.5조원으로 알려져 있으며, 발생률이 높은 오염물질(살모넬라, 대장균과 같은 병원체)에 대한 검사가 주류를 이루고 있다. 실제로 미국에서는 식품안전검사 중 식중독균 검사에 차지하는 비중이 55%로 가장 높으며 살충제 검사 비중이 13%로 그 다음으로 높다.
- 식품안전검사 방법에는 배양법과 같이 오랜 기간 사용되어온 전통검사방법(Traditional Method)과 비교적 최근에 등장한 고속검사방법(Rapid Screening Method)이 있다. 고속검사 방법에는 면역진단(Immunoassay) 및 분자진단(Molecular Diagnostics: PCR 등)이 있으며, 고속검사방법이 보다 정확하고 빠른 검진 결과를 제공하기 때문에 전통 검사방법을 대체하고 있다.
- 기존의 식중독균 검출방법은 높은 경제성을 가지고 있으나 예비증균배양, 선택증균배양, 선택 배지에 의한 검출 후 생화학적 동정이나 면역학적 검사를 거쳐 5-10일 정도가 소요되어야만 하는 단점을 가지고 있어 식품의 안전성을 보장하는데 치명적인 단점을 드러낸다.
- 식품업체는 HACCP의 원활한 적용을 위해서 식품검사를 통해 식품원료에 대한 건전성 및 완제품에 대한 건전성을 확보해야 한다.
- 따라서 신속검출기술에 대한 요구가 높아지고 있다. 세계에서 식품업계가 실시한 미생물검사 건수는 10억 건에 달하고 있음. 이는 1998년에 비하여 125%가 증가한 수치이다. ([www.strategic-consult.com/2013/06/many-niches-global-food-microbiology-testing-market](http://www.strategic-consult.com/2013/06/many-niches-global-food-microbiology-testing-market))



- 작년 한 해 세계 식품위해물질 검사 시장은 3십억 5천만 달러라고 보고되고 있다. 이는 5년 전의 19억 5천만 달러에서 11억 달러가 증가한 수치로 매년 큰 폭의 성장을 하고 있는 것을 알 수 있다. (Strategic Consulting 2013: <http://www.strategic-consult.com/product/food-contract-lab-report/>).



- 신속 검사법을 담당하는 기관은 AFNOR, Rapid AOAC Official Methods, AOAC Performance Tested Methods, Certification Reports, MicroVal, NordVal 등이다.
- 식품검사 시장의 대폭적인 확장과 생명공학 기술의 발달로 첨단기술을 활용한 식품 위해물질 진단 kit 및 분석기기가 지속적으로 개발되고 있다.
- 따라서 국제적으로 인정받을 수 있는 식중독균 검출기기가 개발된다면 국내 식중독균 진단 산업 분야를 활성화 시키는 계기가 될 것으로 생각된다(식약청 용역연구사업보고서, 2009).
- 동시진단 능력이 우수한 현장 진단형 시스템이 개발될 경우, 향후 신 시장 창출, 바이오칩 기술발전, 식중독균을 포함한 위해 미생물의 동시진단 및 역학조사 등에 지대한 기여를 할 것으로 판단된다.(Journal of Food Hygiene and Safety Vol. 25, No. 4, pp. 376~387 (2010) : 신기술 이용 식중독균 신속검출법 개발 동향 분석)

### 3) 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

- 특허분석 측면
  - 식중독균의 신속검출 관련 특허는 항원 . 항체 반응과 나노기술을 융합한 센서기술 등이 있다. 그러나 식품에서 미생물을 분리하는 기술, 미량의 미생물에서 핵산을 분리하는 기술 등은 없다. 또한 유전자 기반 검출기술로서 목적 유전자 서열을 검출하기 위한 primer, probe 서열 및 이를 이용한 특허가 있다. LAMP는 일본 기업이 특허를 가지고 있으며 이에 활용되는 primer도 회사 자체에서 프로그램을 무상으로 제공하고 있다. 그러나 본 과제에서 추구하고 있는, 효율성 높은 식품의 전처리 기술은 보고된 바가 없기 때문에 충분한 연구 가치가 있다고 생각된다.
- 논문분석 측면
  - 기존 논문은 특허와 마찬가지로 다양한 식품조건에서 식중독균을 분리하는 기술에 대한 논문, 식중독균을 검출하는 방법으로 realtime PCR 활용 기술, LAMP 기술 등이 보고되고 있다. 그러나 본 연구에서 추구하는 것과 같이 microbial enrichment를 molecular enrichment로 대체하여 신속검출에 활용한 논문은 아직까지 발표된 바 없기 때문에 충분히 창의성이 있다고 사료된다.
- 제품 및 시장분석 측면
  - 국내 및 국외시장 분석결과 식중독균이 일정농도에 도달된 것을 사용하여 realtime PCR이

나 LAMP로 분석하는 기술 및 제품이 매우 다양하게 생산 판매되고 있다. 그러나 식품에 존재하는 식중독균을 대상으로 한, 식품으로부터 식중독균의 효율적인 분리 kit, 분리된 낮은 농도의 식중독균에서 DNA 분리 kit는 개발된 바 없다. 따라서 이 기술이 개발된다면 다양한 식품에서 특정 식중독균을 신속하게 검출하는 기술로서 널리 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 2. 2장. 소량의 DNA 검출을 위한 Digital PCR 최신 방법 조사

### 가. RainDrop Digital PCR 방법 및 적용가능성

#### 1) Conventional real-time PCR의 정량 원리

- 기존 실시간 정량 PCR (real-time quantitative PCR) 방법은 타겟 유전자를 정량하기 위해서 양을 알고 있는 DNA 표준물질들 (주로 standard plasmid를 사용, Fig. 1)을 사용하여 시료의 PCR 실험에 함께 포함시킨다. 이 때 serial dilution을 통해 일정한 차이를 만들 수 있는 DNA 표준물질의 set를 준비한다.

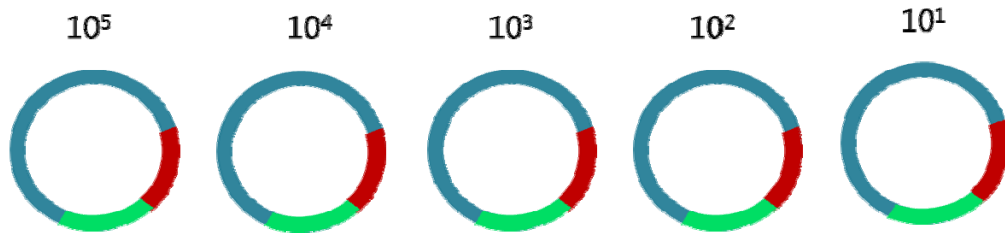


Fig. 1. 타겟지역을 포함하고 있는 DNA 표준물질

- 시료의 PCR 실험이 진행 되면서 함께 실험에 포함된 DNA 표준물질들도 점차 PCR 반응을 하게 되며, 서로 다른 양으로 PCR 실험을 시작한 DNA 표준물질들은 그 양의 차이에 해당되는 만큼 PCR 반응에서 차이를 만들어 낸다. 만들어진 PCR 반응의 생성물과 증가된 PCR 반응의 cycle 수를 이용한 그래프를 작성하면 각각의 DNA 표준물질에 대해 Fig. 2에서와 같은 PCR 증폭 곡선을 만들어 낼 수 있다.

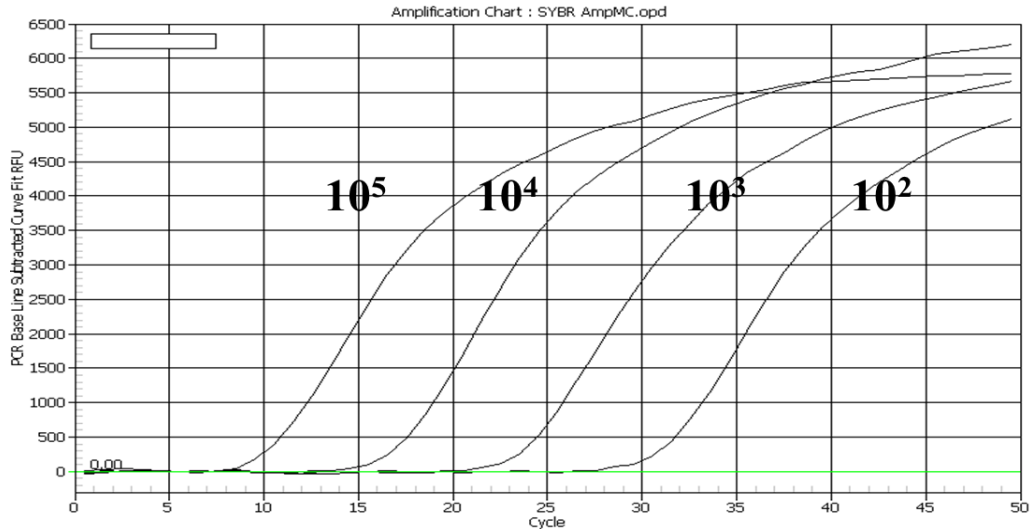


Fig. 2. 각각 다른 양의 standard plasmid가 만들어내는 PCR 증폭 그래프

○ Fig. 2와 같은 PCR 증폭곡선을 이용하여 DNA 표준물질들이 만들어내는 그래프에서 직선 구간에 해당되는 특정 범위(주로 최초로 직선 구간이 만들어지는 위치)를 통과하기 위해 소요된 PCR Cycle 수(일명, threshold cycle)를 구할 수 있다. 알고 있는 DNA 표준물질들의 DNA 양과 이들의 threshold cycle수를 각각 x축과 y축으로 하는 그래프를 작성할 수 있다. 이러한 그래프는 모든 PCR 반응이 정해진 과정에 의해 정상적으로 잘 이루어졌을 경우 Fig. 3 과 같이 직선의 standard curve를 나타낸다.

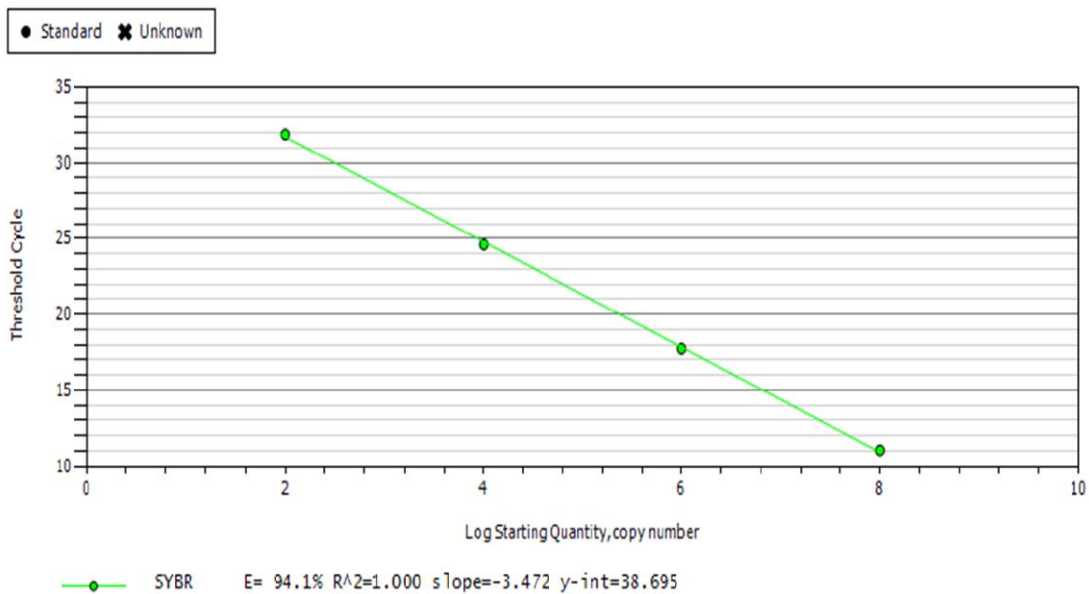


Fig. 3. 표준 DNA 양과 그들의 threshold cycle을 사용하여 작성된 standard curve

- DNA 표준물질들과 함께 PCR 실험에 포함된 시료들도 각 시료들의 고유한 PCR 증폭 그래프를 갖게 되며, 이 때 각 시료들이 갖는 threshold cycle 수를 Fig. 3과 같은 standard curve에 대입하여 각 시료에 포함된 target 물질 (혹은 유전자)의 수를 계산해 낼 수 있다.

2) RainDrop Digital PCR 의 원리

- 디지털 PCR은 기존 실시간 정량 PCR (real-time quantitative PCR)에서 사용하는 방법과는 다른 방법으로 DNA 시료 내에 존재하는 타겟 물질 (혹은 유전자)의 양을 정량한다. 즉, 표준 곡선을 만드는 방법이 아닌 단일분자계수법을 적용하여 절대정량 한다. Fig. 4에서 보는 것과 같이 Digital PCR은 다른 종류의 PCR에 비해 동일 시료의 PCR 실험 횟수에 있어서 상당한 차이를 보인다. 5pL에 해당되는 초미세 기름방울 (Oil droplet)을 만들어 그 안에서 PCR 반응이 이루어지는 특징을 가지고 있다. 즉 한 개의 기름방울이 마치 PCR 반응이 이루어지는 한 개의 튜브 역할을 하게 된다. RainDrop digital PCR 에서는 시료에 대해서 100만개 이상의 droplet을 만들어 일반적인 PCR에 비해 104에서 106개 이상의 PCR 실험을 더 실시하게 되는 효과가 있다. 이러한 효과는 시료 내에 매우 적은 양으로 존재하는 타겟 물질 (또는 유전자)을 검출 할 수 있다는 장점을 가져다준다.

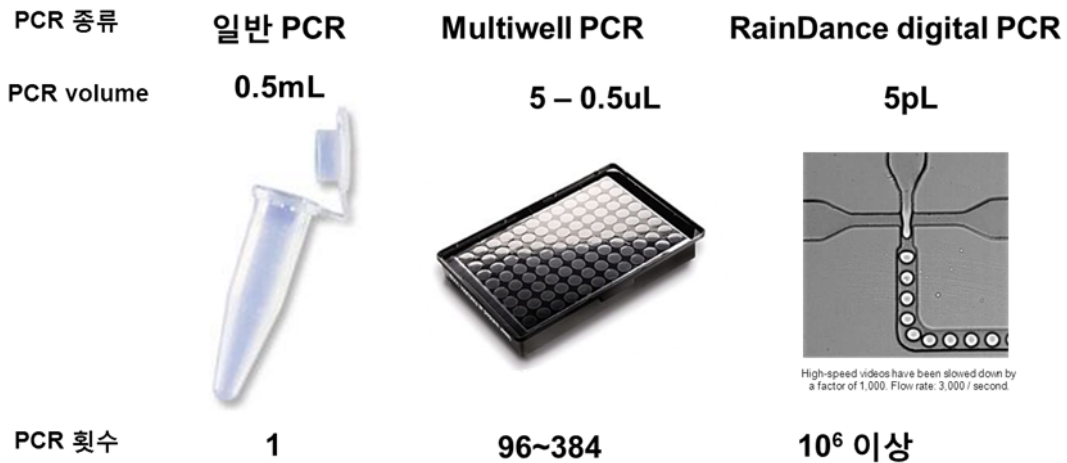


Fig. 4. RainDrop digital PCR의 특징

- RainDrop digital PCR에서의 정량은 반응이 있거나 없는 두 가지 가능성만으로 프 아송 분포를 통해 positive와 negative의 비율을 계산한다. 예를 들어 Fig. 5(A)에서와 같이 어떤 DNA시료 안에 타겟 유전자가 있다고 가정 한다면, RainDrop digital PCR은 각각의 유전자들이 서로 다른 공간에 존재하도록 10<sup>6</sup>개 이상의 droplet을 만들고 타겟에 대한 PCR 반응을 시작하게 된다. PCR 반응 종료 후 각각의 droplet들을 타겟으로 부터의 신호(주로 형광) 신호를 감지할 수 있는 sensor에 통과시켜 신호들을 파악해 PCR +와 PCR -를 구별하게 된다(Fig. 5 (B)). 최종적으로

로 구별된 신호들은 그래프의 해당 위치에 표시되어 PCR+ 신호를 보여주는 droplet을 측정하여 타겟 유전자의 정량을 알아내게 된다(Fig. 5 (B)).

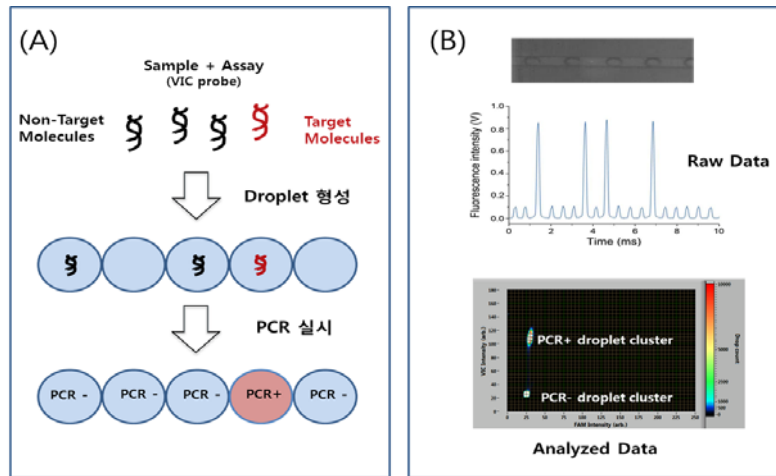


Fig. 5. RainDrop Digital PCR의 측정 원리

- RainDrop Digital PCR의 경우 한 번의 run으로 샘플 당 백 만개 이상의 droplet PCR 증폭을 하루 안에 완료할 수 있으며, 모두 8개의 lane을 가지고 있어 한번에 8 개 시료까지 동시 진행이 가능하다. 이 새로운 방식은 한 lane 당 pico-liter 수준의 droplets를 백만 개~천만 개까지 만들어 기존 방식의 PCR에 비해 500배에서 10,000배까지 민감도를 증가시켰다. 이는 현존하는 모든 PCR 기술 수준을 뛰어넘어 6 log 이상의 범위에서 민감도를 가능하게 하여 보다 정확한 절대정량을 수행할 수 있게 한다(Fig. 6).

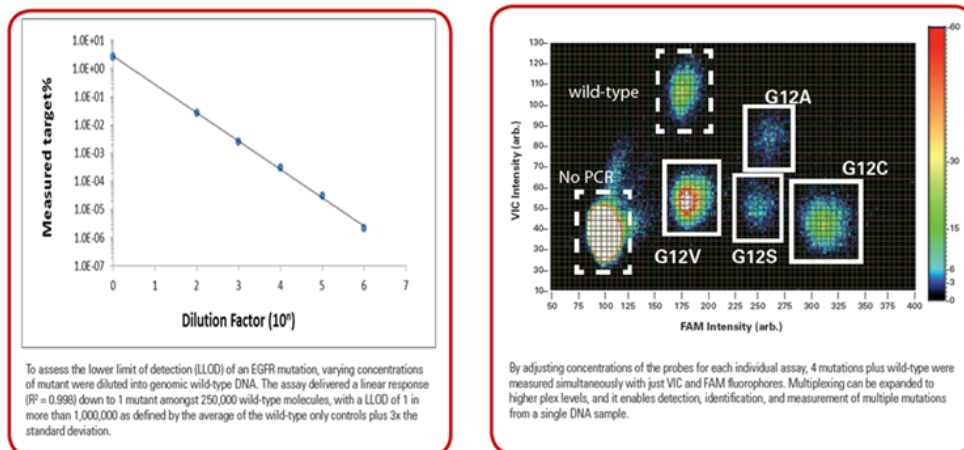


Fig. 6. RainDrop digital PCR의 민감도와 multiplex

- 한 마커 당 하나의 color를 사용하던 기존 Real time PCR 방식에서 multi-color와 다양한 intensity를 사용하여 여러 target을 한 번에 정확하게 측정할 수 있다(Fig. 6). 현재 target 6 개까지 multiplexing이 가능하다. 현재 논문 등을 통해 알려진 민감도는 Normal : Mutation = 250,000:1 수준이다.

### 3) RainDrop Workflow

- 먼저 분석하고자하는 시료 및 assay 시약을 준비하여 RainDrop source system에 로딩하면 자동으로 백만 개~천만 개의 droplet을 생산하여 PCR tube에 담겨진다.
- 시료와 PCR 시약이 포함된 천만 개의 droplet이 담긴 tube를 thermal cycler로 옮겨 PCR을 진행하게 된다. PCR 반응 완료 후 tube를 다시 RainDrop sense system에 옮겨주면 자동으로 droplet 수를 세고 신호를 분석한다.
- 관련하여 'RainDrop Analyst' 소프트웨어를 통해 결과에 대한 분석을 진행할 수 있다. 실제 Hands-on time은 처음 시료를 로딩하고 tube를 옮겨 주는 정도이며, 대부분의 과정은 자동으로 진행된다(Fig. 7).

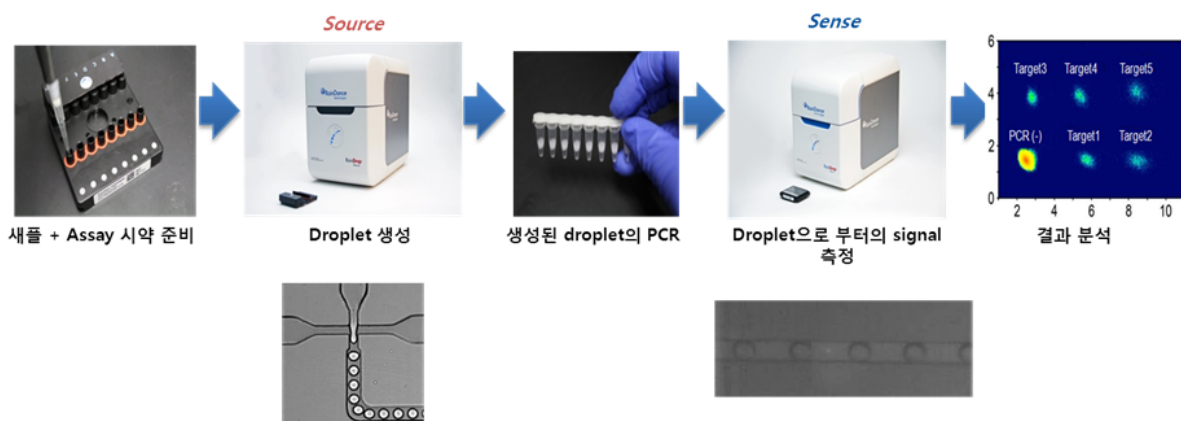


Fig. 7. RainDrop digital PCR의 전체적인 진행 과정

### 4) Applications

- RainDrop Digital PCR은 Realtime PCR에서 사용하는 Probe와 Master Mix 등의 시약을 그대로 이용할 수 있으며, 다양한 시약에 대한 호환성이 이미 테스트 되어 다양한 assay에 가장 적합한 시스템을 골라서 적용할 수 있다.
- 이러한 특징 이외에도 여러 장점들을 합쳐 다양한 적용 분야에서 RainDrop digital PCR이 응용 및 적용되고 있다(Fig. 8). 본과제의 중점 연구 분야 중의 하나인 적은 양의 타겟 식중독 병원성균의 검출은 target molecule이 적을 때도 검출 가능하다는 측면에서 “rare mutation detection” 또는 “viral load measurement” 등의 분야와 그 성격이 유사하여 RainDrop digital PCR의 사용을 충분히 검토해 볼 만 하다.



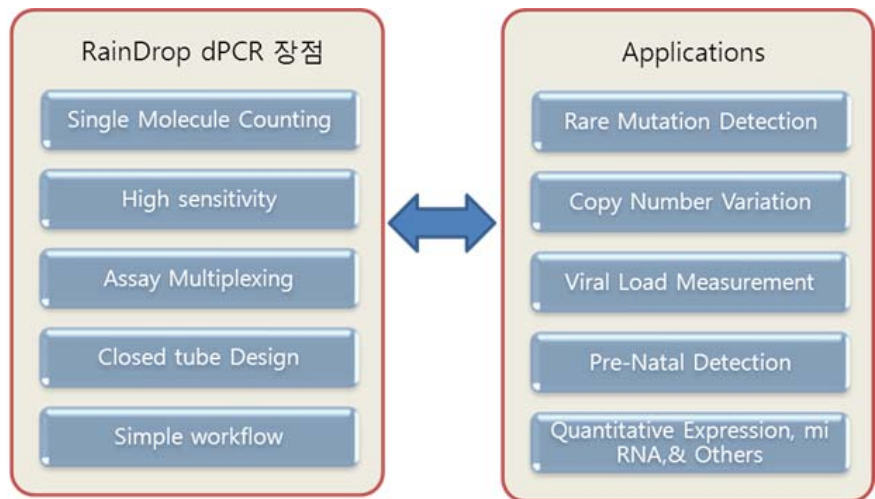


Fig. 8. 장점 및 다양한 적용 분야

#### 나. BioRad Digital PCR QX 200 방법 및 적용가능성

##### 1) BioRad QX200의 원리

- 최근 들어 수많은 생물학적 분석장비 발전 추세는 정성분석에서 정량분석으로, 그리고 정량분석범위에 있어 상대정량에서 절대정량의 방향으로 변모하고 있다.

#### End point analysis

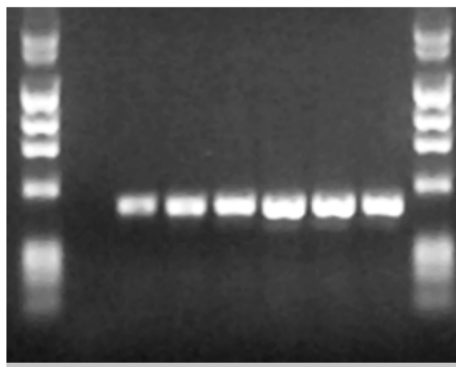


Fig. 9. 전통적 정성 분석 PCR

### Fluorescence detection

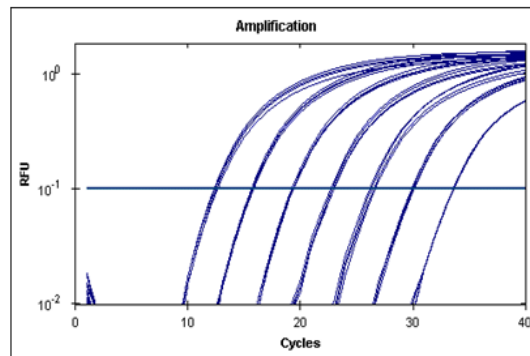


Fig. 10. 정량분석 PCR

- 1세대 PCR의 분석범위는 정성분석에 국한되어 분석하고자 하는 샘플의 핵산 증폭 시 초기 샘플의 유전자 copy 숫자와 최종 증폭산물간의 상관 관계없이 목표산물의 존재여부만을 판별하는 정성분석에 국한되어 왔다. 저렴한 비용과 간편한 실험방법, 신속한 결과 확인 등의 장점으로 많은 실험실에서 연구목적은 물론 다양한 진단분석키트로 사용되어지고 있으나 정량분석에 제한적인 단점으로 농도분석을 요하는 중요한 응용 시에 사용에 제한적인 특성이 있다.
- 이어 개발된 실시간 정량분석 장비인 real time PCR 장비는 2세대 장비로 분류할 수 있으며 표준물질을 이용한 정량곡선을 만들고 이를 바탕으로 상대적 정량분석을 실시하는 정량분석 PCR이 유전자 정량분석의 표준으로 인정되고 있다.
- QX200은 micro-droplet을 이용한 PCR 방법으로 micro-droplet reactor에 의하여 형성된 초미세물방울에 각각 한 copy의 주형유전자와 primer를 가두어 하나의 소자형태로 PCR 증폭을 시키는 실험방법이다.
- 이 방법은 기존의 PCR 방법이 96-well PCR plate나 200 ul micro tube에서 하나의 reaction이 일어난 반면 micro droplet PCR은 하나의 tube에서 수만 개의 소자를 발생시켜 민감도와 정확도는 물론 미량의 원료샘플을 이용할 수 있어 쉽게 구하기 어렵거나 극소량의 샘플로도 유전자 증폭결과를 도출할 수 있는 장점이 있다 (Fig. 11).

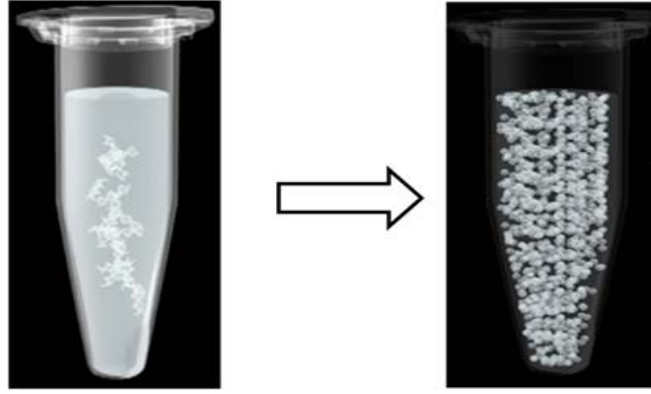


Fig. 11. 기존 PCR 개념과 digital PCR의 신개념 비교

2) BioRad digital PCR workflow

- QX 200은 두 개의 module로 분리되어 있어서 micro droplet을 만들어 주는 Droplet Generator와 PCR 증폭된 microdroplet을 검출하는 Droplet Reader로 구성되어 있다(Fig. 12).
- Droplet Generator를 통해 시료, 타겟 검출을 위한 PCR primer, PCR reaction reagent 등을 포함하는 oil droplet(Fig. 13)을 만들게 된다.



Fig. 12. Droplet generation와 Droplet Reader로 구성된 BioRad Digital PCR

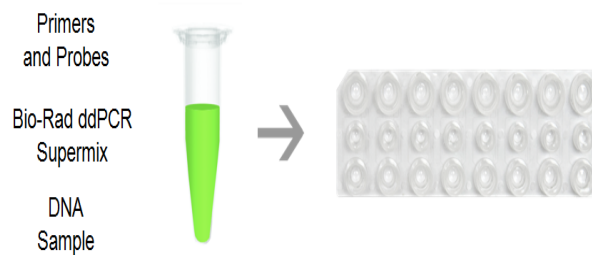


Fig. 13. Reaction mixture를 포함한 droplet 생성

- 생성된 droplet은 일반 PCR 장비를 통해 PCR 반응을 수행하게 되며, 수행된 PCR 샘플들을 Droplet Reader에 loading 하여 타겟 물질 검출을 위한 reading을 수행하게 된다. 읽혀진 형광 신호를 바탕으로 분석을 실시하여 타겟 물질의 양을 정량하게 된다(Fig. 14).

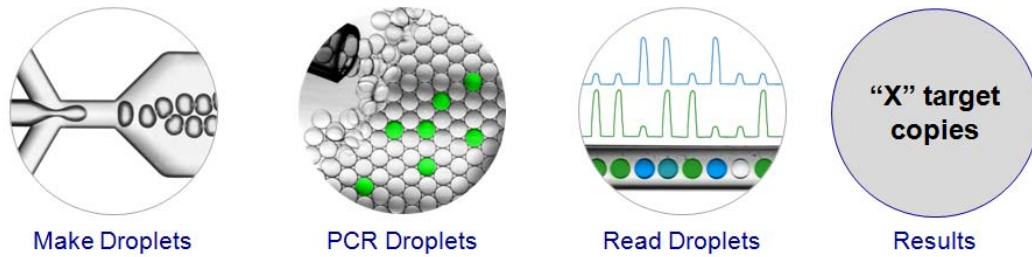


Fig. 14. BioRad digital PCR의 전체적인 진행 과정

- 샘플 준비는 일반 정량분석 PCR과 동일하게 준비하면 된다. PCR 증폭에 필요한 primer와 Taqman probe를 design하고 ddPCR supermix와 증폭하고자 하는 유전자를 포함하는 샘플을 Droplet generation cartridge에 각각 분주한 후 cartridge를 Droplet Generator에 장착하여 droplet을 형성시킨다.
- Droplet은 일반적으로 reaction well당 2분 30초의 시간에 1 nL의 droplet 20,000개를 형성한다. 만들어진 droplet은 일반 conventional PCR tube에 옮겨 일반적인 PCR 장비를 이용하여 PCR을 실시한다.
- PCR이 완료되면 Droplet Reader에 PCR tube를 장착하면 microfluiding syringe가 droplet을 빨아들이고 각각의 droplet의 형광값을 감지한다.
- 읽혀진 droplet 들은 digital 신호로 전환되며 positive signal의 경우 최소 한 개 이상의 표적 유전자를 포함하고 있으며 negative droplet간의 형광분포를 분석 프로그램상에서 분석하여 정량분석을 진행한다.

### 3) Applications

- 일반적으로 positive droplet이 한 개의 표적유전자를 포함한다는 가정은 Poisson 분산 법칙에 따른 논리이다.
- Poisson 분산 법칙은 시간, 면적 등 지정된 단위 구간에서 확률변수 X (단위 사상의 발생 횟수)가 나타내는 분포로 단위구간을 아주 작은 미세 단위로 분할할 경우 두 개의 사건이 동시에 발행할 확률은 0에 가까워진다는 법칙으로 이는 작은 단위의 micro-droplet 안에 동시에 두 개 이상의 target 유전자가 분포할 확률 역시 0에 가깝다는 의미이며 결국 positive droplet은 하나의 target signal로 간주됨.
- 따라서 적절한 농도의 샘플은 후속적인 dilution 없이 실험 가능하다. 실제 count 된

droplet은 분석 프로그램상에서 Poisson 분산 법칙에 따른 계산 값으로 수정되어 표기된다(Fig. 15).

- Q200은 200,000 copy에서 1 copy 까지 넓은 dynamic range와 높은 민감도를 가지고 있으며 copy number variation 분석은 물론 매우 낮은 빈도의 돌연변이 검출이 가능하다.
- 특히 single cell analysis 등 극소량의 샘플에서 분석 가능한 민감도를 보유하고 식중독균의 초기 검출에 효과적인 대안이 될 수 있다.

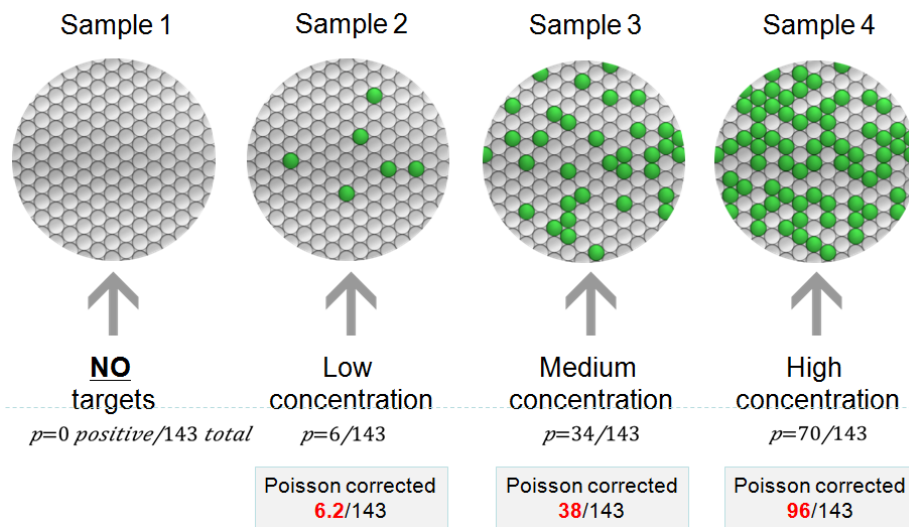


Fig. 15. Poisson 분산 법칙에 따른 계산값으로 수정되어 표기되는 정량 표시 예

#### 다. Fluidigm BioMark digital array

##### 1) BioMark digital array PCR 개요 및 원리

- 초미세유체기술(Micro-fluidic technology)에 바탕을 digital PCR 방법으로 2006년에 소개되었으며, digital PCR이란 이름을 최초로 사용하기 시작한 기술이다. 원하는 타겟 물질에 대한 정량을 위해서 일반 실시간 정량 PCR(real-time quantitative PCR)에서 사용하는 standard curve의 작성 없이, 절대 정량이 가능한 기술이다.
- 정량을 위해서 Fig. 16과 같은 array chip을 사용한다. 이들 chip은 각각 12 샘플과 48 샘플을 정량 할 수 있게 디자인 되어있다. 12.765 chip (Fig. 16-A)의 경우 각각의 샘플은 PCR 반응을 위한 assay 시약과 섞여 reaction mixture가 만들어지며 IFC controller를 이용하여 panel로 유입되게 된다. 유입된 reaction mixture는 각 panel을 구성하고 있는 nano liter 볼륨의 765개 chamber로 나누어진다(Fig. 17).
- 765개의 각 각의 chamber는 PCR 반응을 일으키는 튜브 역할을 하게 되어, 한 시료에 대해서 765 번의 PCR 반응을 실시하는 효과를 가져온다.

- 반면 48.770 chip (Fig. 16-B)의 경우 각 각의 샘플은 PCR 반응을 위한 assay 시약과 섞여 reaction mixture가 만들어지며 IFC controller를 이용하여 panel로 유입되게 된다.
- 유입된 reaction mixture는 각 panel을 구성하고 있는 nano liter 볼륨의 770개 chamber로 나누어진다. 770개의 각 각의 chamber는 PCR 반응을 일으키는 튜브 역할을 하게 되어, 한 시료에 대해서 770 번의 PCR 반응을 실시하는 효과를 가져온다.

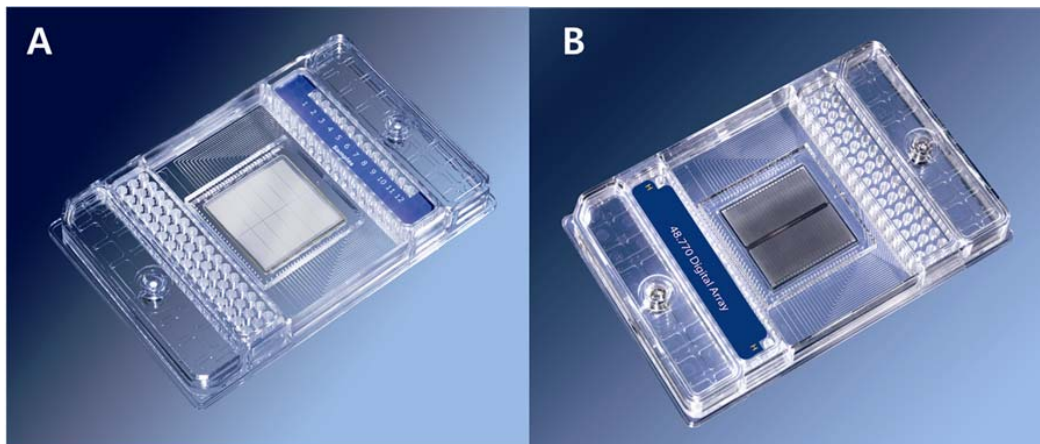


Fig. 16. Digital array chip. (A) 12 샘플, 765 chamber (12.765) 와 (B) 48 샘플, 770 chamber (48.770)

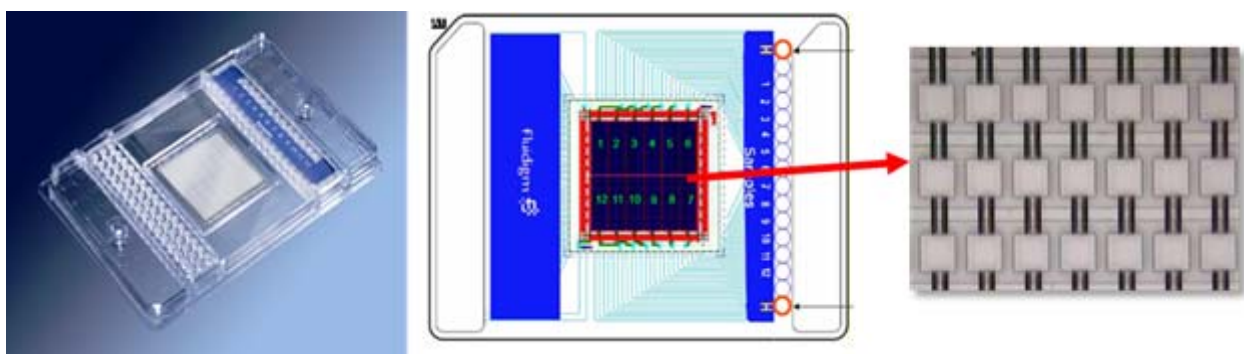


Fig. 17. Digital array chip의 구조 및 PCR 반응이 일어나는 reaction chamber

## 2) BioMark Digital array Workflow

- BioMark digital array는 타겟 물질 (혹은 유전자)을 포함한 시료와 반응에 필요한 PCR reagent들을 섞어 reaction mixture를 만든 다음 해당 array chip에 loading을 한다. 준비된 array chip은 IFC controller에 옮겨져 각 샘플의 reaction mixture가 array chip에 위치한 해당 panel의 chamber 안으로 이동되게 된다. 이후 array chip은 전용 thermal cycle로 옮겨져 PCR 반응을 시작하게 되며, 반응이 완료된 후 증폭된 PCR 결과를 전용 소프트웨어를 통해 분석, 관찰 할 수 있다(Fig. 18).



Fig. 18. BioMark Digital PCR의 전체적인 진행 과정

## 3) Applications

- BioMark Digital array PCR은 Realtime PCR에서 사용하는 Probe와 Master Mix 등의 시약을 그대로 이용할 수 있으며, 다양한 시약에 대한 호환성이 이미 테스트 되어 다양한 assay에 가장 적합한 시스템을 골라서 적용할 수 있다.
- 이러한 특징 이외에도 여러 장점들을 합쳐 다양한 적용 분야에서 BioMark digital array PCR이 응용 및 적용되고 있다. 특히 digital array chip의 partition 원리는 Fig. 19-A에서 처럼 적은 양의 타겟 물질을 reaction chamber에 존재하게 만들어 주어 일반 PCR에서 성공하기 힘든 PCR 반응이 보다 더 유리한 조건에서 이루어 질수 있는 환경을 만들어 낸다.
- 또한 각 각의 reaction chamber에서 이루어진 PCR 반응을 해당 PCR 증폭 곡선을 관찰하여 검증할 수 있다(Fig. 19-B). 이러한 검증은 위양성 (false positive) 반응의 확실한 구별을 가능케 하여, 미세량의 타겟 식중독 병원성균의 검출에 안전장치 역할을 제공 할 수 있다.
- 또한 BioMark digital array PCR은 copy number variation (CNV) 연구, rare mutation detection, absolute quantitation 등의 분야에 적용되고 있다.

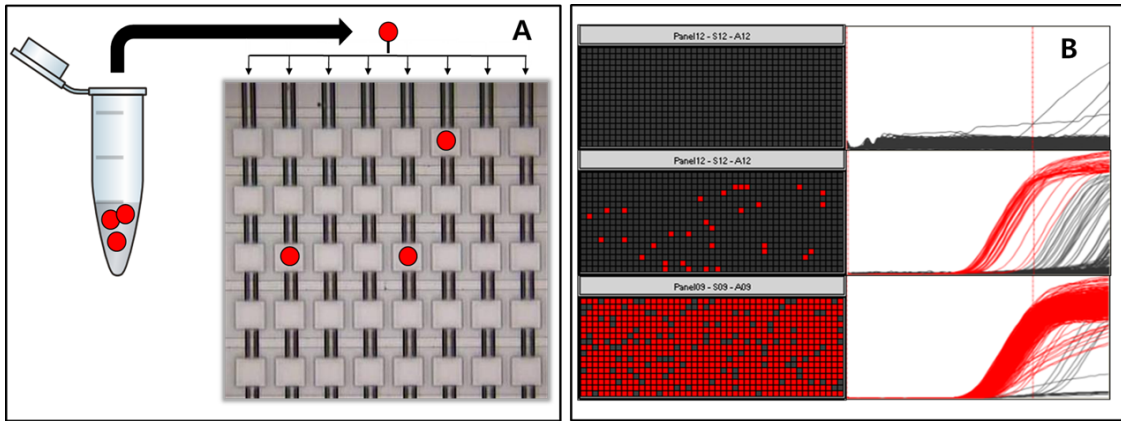


Fig. 19. Digital array의 partition 원리 (A) 및 PCR positive reaction 결과 (B)

라. 각 Digital PCR의 적용 가능성 검토를 위한 예비 실험

1) RainDrop digital PCR

가) 실험 개요

- (1) 적은 양의 타겟 물질 (또는 유전자) 검출을 위한 RainDrop의 유용성 검증한다. 유용성 검증을 위해 target plasmid를 제작 했으며, target plasmid의 serial dilution을 통해 일정 범위의 copy number를 갖는 target plasmid set을 준비하였다. 이들 target plasmid set을 RainDrop을 이용하여 copy 수 증,감에 따르는 장비의 검출 상관관계를 관찰하고자 하였다.

나) 실험 방법

(1) 시료 준비

- wild type plasmid와 mutant type plasmid를 준비하여 wild type 100 : mutant type 1 비율로 첫 번째 시료를 준비함
- 첫 번째 시료를 wild type plasmid solution으로 10-fold serial dilution을 실시하여 mutant type의 양을 10배 씩 감소시킴
- 이들 시료를 RainDrop digital PCR을 실시하여 wild type plasmid 및 mutant type plasmid의 숫자 변화의 상관관계를 관찰

다) RainDrop Run

(1) Source run

- 샘플은 총 4개, Probe는 wild-type (ViC) 과 mutant type (FAM) probe를 사용하였음. RainDrop은 샘플양과 상태에 따라 25ul, 50ul 두 가지 reaction volume을 선택적으로 진행할 수 있으며, 25ul reaction 시에는 최대 5M개, 50 ul reaction 시에는 최대 10M개의 droplet이 생성됨.
- 아래 Table 1과 같이 PCR reaction mix를 혼합하여 25 ul의 reaction mix를 source chip의 각 well에 loading 후, chip을 source 장비에 장착하여 droplet을 생성함.



Table 1. PCR reaction mix

Reagent Mix	Per Reaction	Company
TaqMan Genotyping Master Mix	1X	Life Tech.
10X Drop Stabilizer	1X	RainDance
20X TaqMan MGB Probe/primer mix	1X	Life Tech.
DNA template	30 ng	
DNase/Rnase-free sterile water	Bring to volume	
<b>Total volume</b>	<b>26 ul</b>	

(2) Endpoint PCR

- 생성된 droplet이 담겨진 PCR 8 strip tube에 전용 cap을 덮은 후, PCR로 옮겨 PCR 반응을 진행함.
- PCR 조건은 아래 Table 2와 같음.

Table 2. Endpoint PCR 조건

Step	Temp	Time	Cycles
Polymerase activation	95 °C	10 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing & Extension	58 °C	1 min	45
Final Hold	98 °C	10 min	1
Cool down and storage	4 °C		

(3) Sense Run

- PCR 반응이 끝난 PCR 8 strip tube를 sense 장비에 옮기고, sense chip을 장착한 후 droplet count 및 형광 signal을 분석한다.

라) 실험 결과

- (1) wild-type plasmid는 일정한 수치를 유지하였고, mutant type plasmid는 serial dilution의 결과에 따라 유사한 비율로 감소하는 수치를 보여 줌 (Fig. 20 및 Table 3)

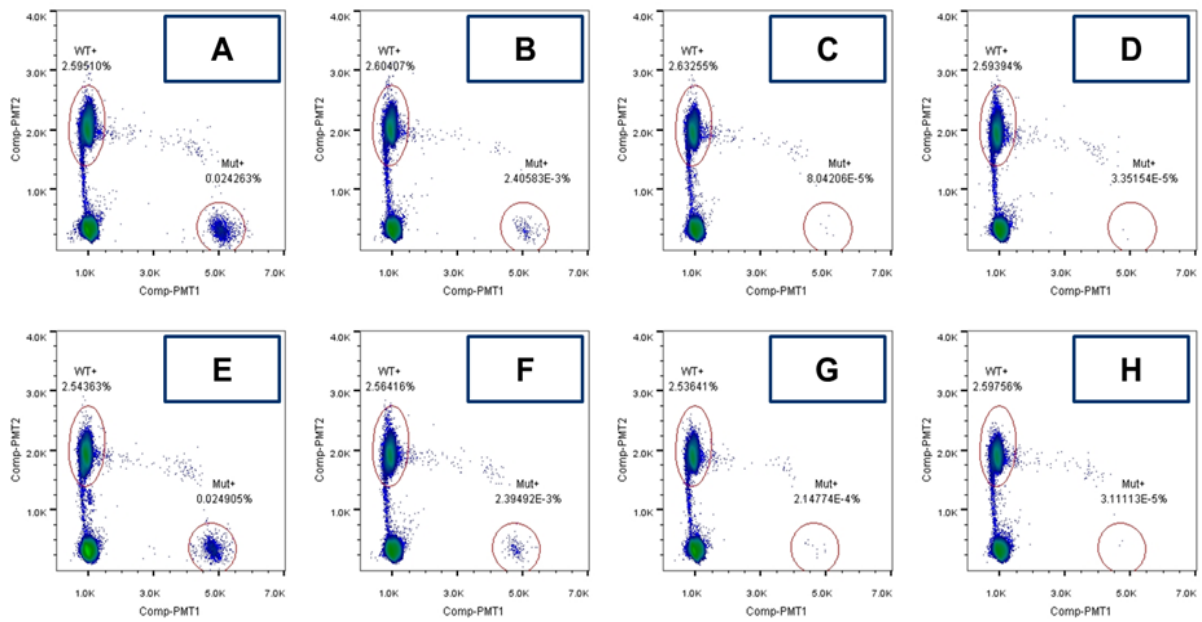


Fig. 20. RainDrop target gene counting graph; Y축에 위치한 붉은색 원안에 존재하는 점들은 wild-type plasmid의 counting 결과에 해당하며, X축에 위치한 붉은색 원안에 존재하는 점들은 mutant-type plasmid counting에 해당.

(2) 1차 실험 결과 (A, B, C & D)와 2차 실험 결과 (E, F, G & H)의 결과를 비교할 때 유사한 재현성을 관찰할 수 있었음

Table 3. RainDrop 1차(샘플 A-D) 및 2차(샘플 E-H) 테스트 타겟 counting 결과

Sample	Intact Droplet	Wild	Mutant	Ratio MT to WT (%)
A	2880000	100398	2040	2.0319
B	2720000	120498	291	0.2415
C	2690000	109876	18	0.0164
D	2310000	134011	2	0.0015
E	2730000	128092	2801	2.1867
F	2250000	118248	247	0.2089
G	2550000	130961	21	0.0160
H	2630000	104532	3	0.0029

## 2) BioMark digital PCR

### 가) 실험개요

- 적은 양의 타겟 물질(혹은 유전자)을 절대 정량을 알 수 있는 검출법이 가능한지를 검증한다.

나) 실험방법

(1) 시료 준비

(가) copy수를 알고 있는 standard plasmid를 이용하여 이들의 검출 및 정량을 위해 103 및 102 copy를 갖게 시료를 준비 함

(나) Digital PCR 실험을 위해 total 103 및 102 copy가 포함되도록 각 시료를 reaction volume에 포함시킴

(2) BioMark digital array run;

(가) pre-amplification;  $10^3$  및  $10^2$  copy를 포함한 reaction mixture 최종 volume 20uL 준비하여 아래 표 1의 조건과 같이 pre-amplification 실시

Table 4. BioMark Digital array PCR을 위한 pre-amplification 조건

Step	Temp	Sec	Note
Denaturation	95C	15 min	1cycle
Denaturation	95C	15 sec	
Annealing	60C	4 min	12 Cycles

(나) Digital PCR amplification;

- ① Pre-amplification 반응 종료 후 각 샘플을 1000배 dilution 하여 이 중 2 uL 를 사용하여 digital PCR을 위한 reaction mixture를 준비함.
- ② 12.765 chip에 reaction mixture loading 후 IFC controller를 이용하여 priming process 진행함.
- ③ priming 된 12.765 chip을 BioMark 전용 thermal cycler에 loading한 후 PCR reaction 진행. Digital PCR 조건은 Fig. 21과 같음.

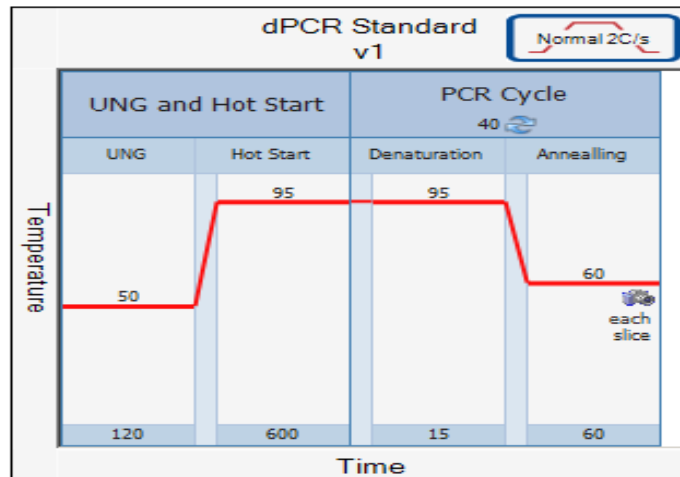


Fig. 21. BioMark digital array PCR 반응 조건

다) 실험 결과

○  $10^3$  및  $10^2$  샘플 모두에서 타겟 plasmid 검출이 가능하였다(Fig. 22).

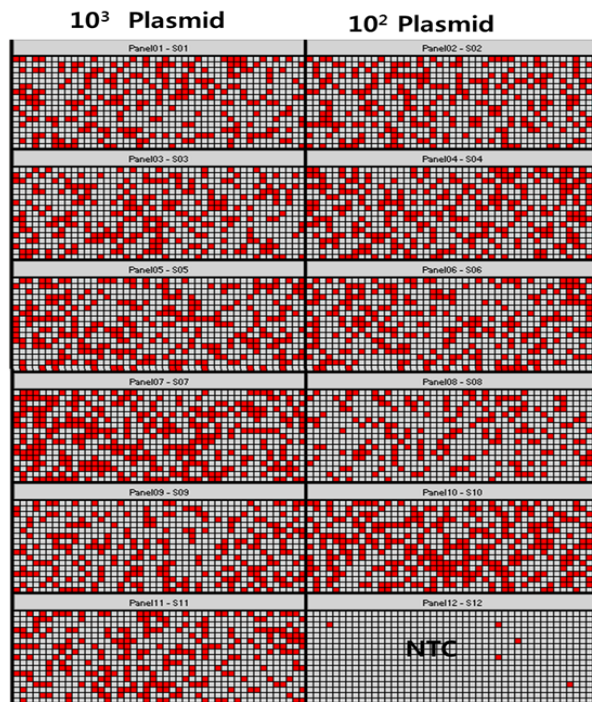


Fig 22.  $10^3$  및  $10^2$  copy 샘플에 대한 BioMark digital array PCR 결과. 765개 reaction chamber들 중 붉은 색으로 표시된 부분이 타겟 물질의 PCR positive를 나타냄. NTC, no template control.

- 그러나  $10^3$  및  $10^2$ 에 대한 정량적 차이는 관찰 되지 않았다. Pre-amplification을 거쳐서 digital PCR이 이루어져야 하는 protocol의 특성 때문에 두 샘플 조건에 대한 차이를 사실대로 반영하지 못하는 것으로 판단되었다.
- 낮은 수준으로 존재하는 타겟 샘플의 존재 여부를 endpoint PCR의 차원에서 관찰하기에는 매우 우수한 방법으로 판단되지만 절대 정량을 이용한 상대적인 copy수 차이를 정확하게 반영하지 않은 것으로 생각되었다.
- 따라서 이를 반영할 수 있는 최적화된 조건 찾기 위한 실험을 후차년도에 실행해야 할 것으로 판단되었다.

### 3. 3장. 협동기관 결과 validation

#### 가. 개요

- 1) 협동기관에서 분리한 DNA의 농도를 측정하고자 하였다.
- 2) 협동기관에서 제공한 DNA 시료는 *E. coli* O157:H7의 DNA로서 각 미생물 농도에 대하여 시판되고 있는 분리 kit로 분리한 DNA와 양상추, 동태포, 소고기에 인위접종한 후 분리된 DNA이었다,
- 3) DNA 시료는 총 175개를 분석하였다(Table 5).

Table 5. 실험에 공시한 DNA 추출 조건 및 시료

No.	Sample	No.	Sample	No.	Sample
1	Kit. 1. 1 Log	61	Kit. 10. 5 Log	121	Kit. 10. 4 Log
2	Kit. 1. 2 Log	62	Kit. 1. -1 Log	122	Kit. 9. control. 동태포
3	Kit. 1. 3 Log	63	Kit. 1. 0 Log	123	Kit. 9. 0 Log 접종. 동태포
4	Kit. 1. 4 Log	64	Kit. 1. 1 Log	124	Kit. 9. 1 Log 접종. 동태포
5	Kit. 1. 5 Log	65	Kit. 1. 2 Log	125	Kit. 9. 2 Log 접종. 동태포
6	Kit. 1. 6 Log	66	Kit. 1. 3 Log	126	Kit. 9. 3 Log 접종. 동태포
7	Kit. 1. 7 Log	67	Kit. 1. 4 Log	127	Kit. 9. 4 Log 접종. 동태포
8	Kit. 1. 8 Log	68	Kit. 2. -1 Log	128	Kit. 9. 5 Log 접종. 동태포
9	Kit. 1. 9 Log	69	Kit. 2. 0 Log	129	Kit. 9. 6 Log 접종. 동태포
10	Kit. 2. 1 Log	70	Kit. 2. 1 Log	130	Kit. 9. 7 Log 접종. 동태포
11	Kit. 2. 2 Log	71	Kit. 2. 2 Log	131	Kit. 1. control. 동태포
12	Kit. 2. 3 Log	72	Kit. 2. 3 Log	132	Kit. 1. 0 Log 접종. 동태포
13	Kit. 2. 4 Log	73	Kit. 2. 4 Log	133	Kit. 1. 1 Log 접종. 동태포
14	Kit. 2. 5 Log	74	Kit. 3. -1 Log	134	Kit. 1. 2 Log 접종. 동태포
15	Kit. 3. 1 Log	75	Kit. 3. 0 Log	135	Kit. 1. 3 Log 접종. 동태포
16	Kit. 3. 2 Log	76	Kit. 3. 1 Log	136	Kit. 1. 4 Log 접종. 동태포
17	Kit. 3. 3 Log	77	Kit. 3. 2 Log	137	Kit. 1. 5 Log 접종. 동태포
18	Kit. 3. 4 Log	78	Kit. 3. 3 Log	138	Kit. 1. 6 Log 접종. 동태포
19	Kit. 3. 5 Log	79	Kit. 3. 4 Log	139	Kit. 1. 7 Log 접종. 동태포
20	Kit. 3. 6 Log	80	Kit. 4. -1 Log	140	Kit. 9. control. 소고기
21	Kit. 3. 7 Log	81	Kit. 4. 0 Log	141	Kit. 9. 0 Log 접종. 소고기
22	Kit. 3. 8 Log	82	Kit. 4. 1 Log	142	Kit. 9. 1 Log 접종. 소고기
23	Kit. 3. 9 Log	83	Kit. 4. 2 Log	143	Kit. 9. 2 Log 접종. 소고기
24	Kit. 4. 1 Log	84	Kit. 4. 3 Log	144	Kit. 9. 3 Log 접종. 소고기
25	Kit. 4. 2 Log	85	Kit. 4. 4 Log	145	Kit. 9. 4 Log 접종. 소고기
26	Kit. 4. 3 Log	86	Kit. 5. -1 Log	146	Kit. 9. 5 Log 접종. 소고기
27	Kit. 4. 4 Log	87	Kit. 5. 0 Log	147	Kit. 9. 6 Log 접종. 소고기
28	Kit. 4. 5 Log	88	Kit. 5. 1 Log	148	Kit. 9. 7 Log 접종. 소고기
29	Kit. 5. 1 Log	89	Kit. 5. 2 Log	149	Kit. 1. control. 소고기
30	Kit. 5. 3 Log	90	Kit. 5. 3 Log	150	Kit. 1. 0 Log 접종. 소고기
31	Kit. 5. 4 Log	91	Kit. 5. 4 Log	151	Kit. 1. 1 Log 접종. 소고기
32	Kit. 5. 5 Log	92	Kit. 6. -1 Log	152	Kit. 1. 2 Log 접종. 소고기
33	Kit. 6. 1 Log	93	Kit. 6. 0 Log	153	Kit. 1. 3 Log 접종. 소고기
34	Kit. 6. 2 Log	94	Kit. 6. 1 Log	154	Kit. 1. 4 Log 접종. 소고기
35	Kit. 6. 3 Log	95	Kit. 6. 2 Log	155	Kit. 1. 5 Log 접종. 소고기
36	Kit. 6. 4 Log	96	Kit. 6. 3 Log	156	Kit. 1. 6 Log 접종. 소고기

37	Kit. 6. 5 Log	97	Kit. 6. 4 Log	157	Kit. 1. 7 Log 접종. 소고기
38	Kit. 7. 1 Log	98	Kit. 7. -1 Log	158	Kit. 9. control. 양상추
39	Kit. 7. 2 Log	99	Kit. 7. 0 Log	159	Kit. 9. 0 Log 접종. 양상추
40	Kit. 7. 3 Log	100	Kit. 7. 1 Log	160	Kit. 9. 1 Log 접종. 양상추
41	Kit. 7. 4 Log	101	Kit. 7. 2 Log	161	Kit. 9. 2 Log 접종. 양상추
42	Kit. 7. 5 Log	102	Kit. 7. 3 Log	162	Kit. 9. 3 Log 접종. 양상추
43	Kit. 8. 1 Log	103	Kit. 7. 4 Log	163	Kit. 9. 4 Log 접종. 양상추
44	Kit. 8. 2 Log	104	Kit. 8. -1 Log	164	Kit. 9. 5 Log 접종. 양상추
45	Kit. 8. 3 Log	105	Kit. 8. 0 Log	165	Kit. 9. 6 Log 접종. 양상추
46	Kit. 8. 4 Log	106	Kit. 8. 1 Log	166	Kit. 9. 7 Log 접종. 양상추
47	Kit. 8. 5 Log	107	Kit. 8. 2 Log	167	Kit. 1. control. 양상추
48	Kit. 8. 6 Log	108	Kit. 8. 3 Log	168	Kit. 1. 0 Log 접종. 양상추
49	Kit. 8. 7 Log	109	Kit. 8. 4 Log	169	Kit. 1. 1 Log 접종. 양상추
50	Kit. 8. 8 Log	110	Kit. 9. -1 Log	170	Kit. 1. 2 Log 접종. 양상추
51	Kit. 8. 9 Log	111	Kit. 9. 0 Log	171	Kit. 1. 3 Log 접종. 양상추
52	Kit. 9. 1 Log	112	Kit. 9. 1 Log	172	Kit. 1. 4 Log 접종. 양상추
53	Kit. 9. 2 Log	113	Kit. 9. 2 Log	173	Kit. 1. 5 Log 접종. 양상추
54	Kit. 9. 3 Log	114	Kit. 9. 3 Log	174	Kit. 1. 6 Log 접종. 양상추
55	Kit. 9. 4 Log	115	Kit. 9. 4 Log	175	Kit. 1. 7 Log 접종. 양상추
56	Kit. 9. 5 Log	116	Kit. 10. -1 Log		
57	Kit. 10. 1 Log	117	Kit. 10. 0 Log		
58	Kit. 10. 2 Log	118	Kit. 10. 1 Log		
59	Kit. 10. 3 Log	119	Kit. 10. 2 Log		
60	Kit. 10. 4 Log	120	Kit. 10. 3 Log		

## 나. 실험 방법

### 1) 1. Preparing the Assay Buffer

가) Quant-iT™ PicoGreen® 염색시약은 사용 전에 빛을 차단하여 상온에서 녹인다.

나) Quant-iT™ PicoGreen® 반응 용액을 제조하기 위하여 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.5)를 사용한다. Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kits에 포함된 20 x TE buffer를 20배 희석하여 1 x TE buffer를 만든다.

다) Quant-iT™ PicoGreen® 염색시약을 1, 1 x TE buffer를 500 비율로 희석하여 Quant-iT™ PicoGreen® Assay buffer를 제조한다.

### 2) Preparing the Standard DNA

가) Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kits에 포함된 lambda DNA(100µg/mL)를 2-fold serial dilution하여 (농도 범위: 100ng/µl ~ blank) Standard DNA를 제조한다.

### 3) Preparing the Sample

가) 측정하고자 하는 샘플의 농도가 Standard DNA의 범위에 포함되도록 준비한다.

### 4) Measure the fluorescence

가) Step 2와 Step 3에서 준비한 시료를 96 microplate(PerkinElmer)의 각 well에 2µl씩 분주한다.

나) Step 1에서 제조한 Quant-iT™ PicoGreen® Assay buffer를 195µl 씩 첨가한 후, Aluminum sealing film으로 밀봉하여 빛을 차단하고, 상온에서 2~5분간 반응한다.

다) 플레이트 형광 리더기(Victor, PerkinElmer)를 이용하여 파장(excitation ~480 nm, emission ~520 nm)에서의 형광 값을 측정한다

### 5) Analysis

가) Standard DNA의 농도와 측정된 형광 값을 이용하여 DNA Standard Curve를 그린다.  
 나) 샘플 DNA의 형광 값을 DNA Standard Curve 수식에 대입하여 DNA 농도( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )를 계산한다.

6) References

- 1. Biotechniques 20, 676 (1996)
- 2. Anal Biochem 102, 344 (1980)
- 3. Anal Biochem 208, 144 (1993)
- 4. Biophys J 61, A314 (1992)
- 5. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)

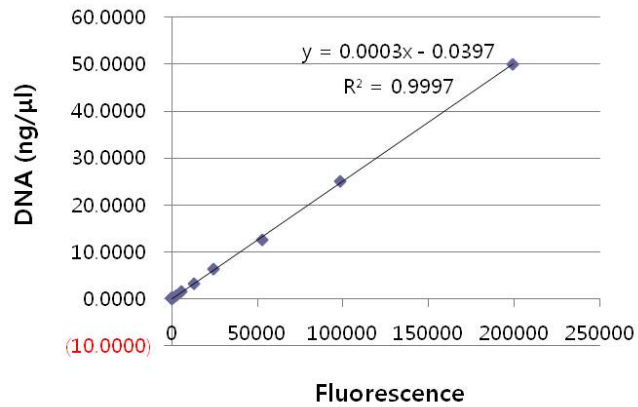
다. 실험 결과

1) DNA Standard Curve: DNA 농도별 standard curve를 작성하기 위한 조건을 Table 6에 서술하였다.

Table 6. DNA standard curve 작성

standard		AVERAGE	AVERAGE-Blank
183269	215622	199446	199201
92051	105099	98575	98330
51530	55117	53324	53079
23906	26157	25032	24787
14185	12994	13590	13345
6190	6485	6338	6093
3006	3032	3019	2774
1680	1774	1727	1482
1084	1066	1075	830
690	700	695	450
488	438	463	218
400	382	391	146
330	316	323	78
288	276	282	37
244	280	262	17
222	268	245	0

AVERAGE-Blank	Conc. (ng/μl)
199201	50.0000
98330	25.0000
53079	12.5000
24787	6.2500
13345	3.1250
6093	1.5625
2774	0.7813
1482	0.3906
830	0.1953
450	0.0977
218	0.0488
146	0.0244
78	0.0122
37	0.0061
17	0.0031
0	0.0000



2) Sample Concentration;

가) Picogreen 방법을 이용하여 DNA 농도를 측정하였으며 그 결과를 Table 7에 나타내었다. 배지에서 분리된 DNA는 음의 값을 나타내기도 하였으며 식품에 접종한 후 분리한 DNA는 식품에서 DNA가 유래하여 높은 농도값을 나타내었다.

Table 7. Picogreen을 이용한 *E. coli* O157:H7 DNA 농도 측정



N0.	Sample		AVERAGE	AVERAGE-Blank	final Conc. (ng/ul)
1	328	264	296	51.00	-0.0244
2	296	276	282	37.00	-0.0286
3	272	288	280	35.00	-0.0292
4	296	312	299	54.00	-0.0235
5	430	504	497	252.00	0.0359
6	2740	2668	2704	2459.00	0.698
7	4590	4673	4634	4389.00	1.277
8	6797	6985	6891	6646.00	1.9541
9	26833	-	26833	26588.00	7.9367
10	296	-	296	53.00	-0.0238
11	430	-	400	155.00	0.0068
12	352	-	352	107.00	-0.0076
13	612	-	612	367.00	0.0704
14	896	-	896	651.00	0.1556
15	234	-	234	(11.00)	-0.043
16	228	-	228	(17.00)	-0.0448
17	252	274	266	23.00	-0.0328
18	258	290	274	29.00	-0.031
19	258	270	264	19.00	-0.034
20	352	394	373	128.00	-0.0013
21	2'08	2039	2073	1828.00	0.5087
22	20748	18754	19751	19506.00	5.8121
23	312646	340796	326716	326471.00	97.9016
24	228	260	244	(1.00)	-0.04
25	234	202	233	(12.00)	-0.0433
26	238	270	254	9.00	-0.037
27	238	296	282	37.00	-0.0286
28	544	550	547	302.00	0.0509
29	246	234	240	(5.00)	-0.0412
30	258	298	278	33.00	-0.0298
31	270	244	257	12.00	-0.0361
32	238	272	270	25.00	-0.0322
33	214	264	239	(6.00)	-0.0415
34	250	232	241	(4.00)	-0.0409
35	270	266	268	23.00	-0.0328
36	234	228	246	1.00	-0.0394

N0.	Sample		AVERAGE	AVERAGE-Blank	final Conc. (ng/ul)
37	280	254	267	22.00	-0.0331
38	918	242	580	335.00	0.0803
39	294	256	275	30.00	-0.0307
40	332	260	296	51.00	-0.0244
41	474	418	446	201.00	0.0206
42	1520	1186	1353	1108.00	0.2927
43	240	242	241	(4.00)	-0.0409
44	302	272	287	42.00	-0.0271
45	262	270	266	21.00	-0.0334
46	254	238	246	1.00	-0.0394
47	260	232	246	1.00	-0.0394
48	466	474	470	225.00	0.0278
49	1656	1876	1766	1521.00	0.4166
50	10971	9148	10059.5	9814.50	2.90485
51	30861	36579	33720	33475.00	10.0028
52	200	218	209	(36.00)	-0.0505
53	238	200	219	(26.00)	-0.0475
54	200	210	205	(40.00)	-0.0517
55	254	264	259	14.00	-0.0355
56	668	826	747	502.00	0.1109
57	210	228	219	(26.00)	-0.0475
58	230	226	228	(17.00)	-0.0448
59	224	246	235	(10.00)	0.0427
60	220	204	212	(33.00)	-0.0496
61	268	282	275	30.00	-0.0307
62	212	226	219	(26.00)	-0.0475
63	202	254	228	(17.00)	-0.0448
64	222	232	227	(18.00)	-0.0451
65	272	274	273	28.00	-0.0313
66	274	246	260	15.00	-0.0352
67	280	298	289	44.00	-0.0265
68	306	256	281	36.00	-0.0289
69	294	222	258	13.00	-0.0358
70	466	254	360	115.00	-0.0052
71	296	214	255	10.00	-0.0367
72	526	314	420	175.00	0.0128

<b>NO.</b>	<b>Sample</b>		<b>AVERAGE</b>	<b>AVERAGE-Blank</b>	<b>final Conc. (ng/ul)</b>
73	250	274	262	17 00	-0.0346
74	238	276	257	12 00	-0.0361
75	228	236	232	(13 00)	-0.0436
76	252	208	230	(15 00)	-0.0442
77	198	202	200	(45 00)	-0.0532
78	224	218	221	(24 00)	-0.0469
79	194	222	208	(37 00)	-0.0508
80	242	220	231	(14 00)	-0.0439
81	252	224	238	(7.00)	0.0418
82	228	236	232	(13 00)	-0.0436
83	254	192	223	(22 00)	-0.0463
84	226	220	223	(22 00)	-0.0463
85	238	254	246	1.00	-0.0394
86	192	194	193	(52 00)	-0.0553
87	214	200	207	(38 00)	-0.0511
88	254	106	225	(20 00)	0.0457
89	310	234	272	27 00	-0.0316
90	428	296	362	117.00	-0.0046
91	296	246	271	26 00	-0.0319
92	222	238	230	(15 00)	-0.0442
93	202	226	214	(31 00)	-0.049
94	208	220	214	(31 00)	-0.049
95	222	226	224	(21 00)	-0.046
96	218	208	213	(32 00)	-0.0493
97	230	260	245	0.00	-0.0397
98	258	238	248	3.00	-0.0388
99	388	240	314	69 00	-0.019
100	238	248	243	(2.00)	-0.0403
101	254	238	246	1.00	-0.0394
102	216	202	209	(36 00)	-0.0505
103	618	298	458	213.00	0.0242
104	232	232	232	(13 00)	-0.0436
105	258	272	265	20 00	-0.0337
106	250	226	238	(7.00)	-0.0418
107	244	236	240	(5.00)	-0.0412
108	230	238	234	(11 00)	-0.043

NO.	Sample		AVERAGE	AVERAGE-Blank	final Conc. (ng/ul)
109	238	236	237	(8.00)	-0.0421
110	246	234	240	(5.00)	0.0412
111	252	282	267	22.00	-0.0331
112	290	236	263	18.00	-0.0343
113	252	262	257	12.00	-0.0361
114	326	258	292	47.00	-0.0256
115	294	262	278	33.00	-0.0298
116	232	238	235	(10.00)	-0.0427
117	186	238	212	(33.00)	-0.0496
118	282	230	256	11.00	-0.0364
119	240	226	233	(12.00)	-0.0433
120	190	242	216	(29.00)	-0.0484
121	260	268	264	19.00	-0.034
122	252	302	277	32.00	-0.0301
123	272	286	279	34.00	-0.0295
124	288	204	201	46.00	0.0250
125	262	304	283	38.00	-0.0283
126	256	244	250	5.00	-0.0382
127	240	240	240	(5.00)	-0.0412
128	272	292	282	37.00	-0.0286
129	286	276	281	36.00	-0.0289
130	316	312	314	69.00	-0.019
131	1778	1666	1722	1477.00	0.4034
132	1778	1522	1650	1405.00	0.3818
133	1650	1508	1579	1334.00	0.3605
134	1614	1550	1582	1337.00	0.3614
135	1908	1588	1748	1503.00	0.4112
136	2140	1990	2065	1820.00	0.5063
137	2966	2598	2782	2537.00	0.7214
138	2222	1960	2091	1846.00	0.5141
139	2060	1834	1947	1702.00	0.4709
140	2406	2676	2541	2296.00	0.6491
141	3602	4136	3870	3625.00	1.0478
142	5732	6375	6053.5	5808.50	1.70285
143	2636	3584	3110	2865.00	0.8198
144	2628	2320	2474	2229.00	0.629

나) Picogreen에 의한 DNA 함량 측정은 Nanodrop에 비해서는 적게는 100배에서 많게는 10000배 이상을 감도가 높은 것으로 측정되었다.

다) Picogreen이 식품에 적은 양으로 존재하는 식중독균의 농도를 바로 검출하기에는 무리가 있지만 2차년도, 3차년도에서 진행될 Whole genome amplification(WGA), isothermal loop mediated amplification(LAMP)에서 증폭

N0.	Sample		AVERAGE	AVERAGE-Blank	final Conc. (ng/ul)
145	4700	5340	5020	4775.00	1.3928
146	3616	4160	3888	3643.00	1.0532
147	5870	6549	6209.5	5964.50	1.74965
148	6419	6773	6596	6351.00	1.8656
149	686	668	677	432.00	0.0899
150	460	398	429	184.00	0.0155
151	924	796	860	615.00	0.1448
152	580	666	623	378.00	0.0737
153	806	844	825	580.00	0.1343
154	1202	1358	1280	1035.00	0.2708
155	942	910	926	681.00	0.1646
156	864	796	830	585.00	0.1358
157	798	748	773	528.00	0.1187
158	578	600	589	344.00	0.0635
159	538	464	501	256.00	0.0371
160	684	712	698	453.00	0.0962
161	526	548	537	292.00	0.0479
162	440	430	435	190.00	0.0173
163	588	592	590	345.00	0.0639
164	906	842	874	629.00	0.149
165	676	644	660	415.00	0.0848
166	800	810	805	560.00	0.1283
167	368	364	366	121.00	-0.0034
168	708	774	741	496.00	0.1091
169	466	490	478	233.00	0.0302
170	616	650	633	388.00	0.0767
171	420	452	436	191.00	0.0176
172	416	496	456	211.00	0.0236
173	716	700	708	463.00	0.0992
174	698	656	677	432.00	0.0899
175	590	622	606	361.00	0.0666

되는 DNA 함량을 측정할 때 효과적으로 사용될 수 있을 것이라고 생각되었다.

#### 4. 4장. 대상균주 및 식품선발

##### 가. 개요

- 식품에 낮은 농도로 존재하는 식중독균을 정확하고 신속하게 검출하기 위하여 rate-limiting 과정인 microbial enrichment를 분자농축(molecular enrichment) 기술 개발로 대체하여, 검출기간을 획기적으로 단축하여 식품산업 현장형 고효율 검출 기술을 개발하고자 하였다.
- 우선 대상식품은 농산물, 수산물, 축산물 원재료 이므로 양상추, 동태포, 쇠고기를 대상으로 하였다. 수산물은 횡감이나 조개류를 대상으로 하여야 시의성이 있는 것으로 생각되었으나 계절에 관계없이 일정한 품질을 담보하여 실험결과 산출이 용이한 동태포를 우선적인 시료로 실험하였다.
- 대상균주는 우리나라 주요 식중독균인 *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*를 대상으로 하였다. Realtime PCR에 사용된 primer 및 probe의 sequence를 Table 8~Table 11에 나타내었다.

Table 8. *E. coli* O157:H7 검출을 위한 primer 및 probe sequence

Target gene	Primer	<i>E. coli</i> O157:H7 Sequence*1
<i>Stx1</i>	Forward	GTGGCATTAACTGAATTGTCATCA
	Reverse	GCGTAATCCCACGGACTCTTC
	Probe	[5FAM]TGATGAGTTTCCTTCTATGTGTCCGGCAGAT[3TAMRA]

Table 9. *Salmonella* spp. 검출을 위한 primer 및 probe sequence

Target gene	Primer	<i>Salmonella</i> spp. Sequence*2
<i>inv A</i>	Forward	GCGTTCTGAACCTTTGGTAATAA
	Reverse	CGTTCGGGCAATTCGTTA
	probe	[5FAM]TGGCGGTGGGTTTTGTTGTCTTCT[3TAMRA]

Table 10. *Staphylococcus aureus* 검출을 위한 primer 및 probe sequence

Target gene	Primer	<i>Staphylococcus aureus</i> Sequence*3
<i>femA</i>	Forward	AATAATAACGAGGTCATTGCAGCTT
	Reverse	TGGACCGCGATTTGAATAAAA
	probe	[5FAM]CTTACTTACTGCTGTACCTGTT[3TAMRA]

Table 11. *Bacillus cereus* 검출을 위한 primer 및 probe sequence

Target gene	Primer	<i>Bacillus cereus</i> Sequence*4
16s rRNA	Forward	GCGGCGTGCCTAATACATGC
	Reverse	CTCAGGTCGGCTACGCATCG
	probe	[5FAM]TCGAGCGAATGGATTAAGAGC TGC[3TAMRA]

\*Reference

- 1. Willis M. Fedio , Karen C. Jinneman , Ken J. Yoshitomi , Ruben Zapata , Chitra N. Wendakoon , Paul Browning , Stephen D. Weagant , Detection of *E. coli* O157:H7 in raw ground beef by Pathatrix™ immunomagnetic-separation, real-time PCR and cultural methods, International Journal of Food Microbiology 148 (2011) 87-92.
- 2. Waleed A. Ibrahim , Wafaa A. Abd El-Ghany , Soad A. Nasef , M.E. Hatem , A comparative study on the use of real time polymerase chain reaction (RT-PCR) and standard isolation techniques for the detection of Salmonellae in broiler chicks , Int J of Vet Sci Med (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.11.001>
- 3. Jae-Hoon Lee, Kwang-Young Song, Ji-Yeon Hyeon, In-Gyun Hwang, Hyo-Sun Kwak, Jeong-A Han, Yun-Hee Chung, Kun-Ho Seo, Comparison of Standard Culture Method and Real-time PCR Assay for Detection of *Staphylococcus aureus* in Processed and Unprocessed Foods, Korean J. Food Sci. Ani. Resour., Vol. 30, No. 3, pp. 410~418(2010)
- 4. R. Reekmans, P. Stevens, T. Vervust and P. De Vos , An alternative real-time PCR method to detect the *Bacillus cereus* group in naturally contaminated food gelatine : a comparison study , Letters in Applied Microbiology 48 (2009) 97-104

5. 5장. Filtration에 의한 균 농축(효과정량)

- 식품에 식중독균이 매우 낮은 농도로 존재하며 또한 10배량의 buffer를 첨가하여 stomaching하여 균질화하므로 미생물의 농도가 매우 낮게 된다. 따라서 realtime PCR 이나 LAMP 등의 분자진단을 하기 전에 미생물 농도를 증가시키는 것이 필요하다.



Fig. 23. Millipore manifold filtration 장치

- 따라서 250 mL 용량의 buffer에 *Salmonella* spp.를  $3 \times 10^2$  cfu 넣은 후 여과를 실시 하였다. 이후 필터페이퍼를 분리하여 2.5mL buffer에 넣고 vortexing을 하여 균을 filter에서 분리시켰다. 이렇게 하면 결국, 250 mL에서 2.5 mL로 volume이 줄어들어 100배 농축하는 효과가 있을 것으로 예상되었으며 실질적으로 80 cfu/mL의 미생물 농도가 측정되었다. 2.5 mL 용액을 37°C에서 배양하면서 시간에 따른 균농도를 측정하여 그 결과를 Table 12에 나타내었다.

Table 12. 필터여과지를 미생물배지에서 배양하는 동안 미생물의 성장

배양 시간	미생물수 (cfu/mL)
0 시간	80
2 시간	290
4 시간	2400
6 시간	36000
8 시간	222000

- 따라서 필터에 의해 농축된 균은 바로 Realtime PCR로 검출될 수 있거나 Whole genome amplification 과정을 거치는 등 DNA를 농축한 후 다양한 분자진단 방법으로 검출이 가능할 것으로 생각되었다. Fig. 2는 여과후 필터를 여과한 후 25 mL과 2.5 mL의 buffer에 넣은 후 37°C에서 배양하면서 균의 성장을 측정한 결과이다.



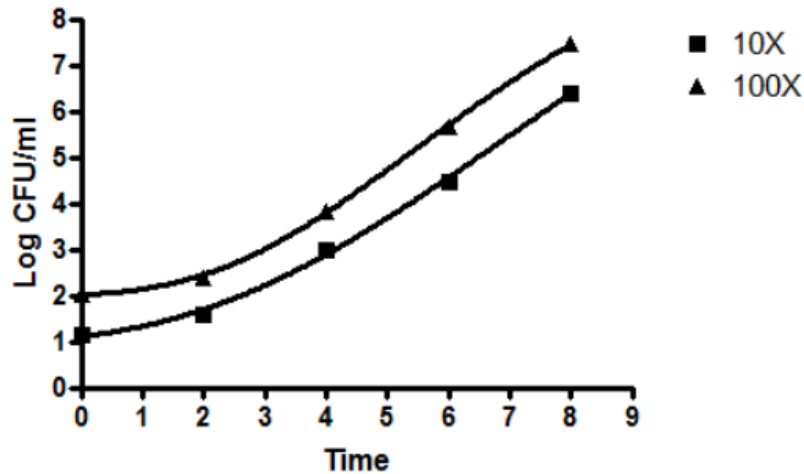


Fig. 24. 필터여과지를 미생물배지에서 배양한 균의 성장 곡선

○ 균의 성장속도의 특성을 파악하기 위하여 modified gompertz model을 이용하여 modelling 하였다. 비성장속도와 lag time을 Table 13에 나타내었다.

Equation:Gompertz\*

$$Y=N_0+C*\exp(-\exp((2.718*\mu_e/C)*(Lag-X)+1))$$

;For fitting bacterial growth data (sigmoidal)

; N<sub>0</sub>, log initial number of cells

; C, difference between initial and final cell numbers

; Lag, delay before growth, same units as X

;  $\mu_e$ , maximum specific growth rate.\

; X is time, Y is log cell #

Table 13. Modified gompertz model에 의한 성장특성

	25 mL에서 배양	2.5 mL에서 배양
MUE	0.9206	0.9788
LAG	2.061	2.202

- 실험결과 25mL에서 배양한 10배 농축한 처리구와 2.5 mL에서 배양한 100배 농축한 처리구 모두 2시간 정도의 lag time을 가지고 있어 초기 성장이 더딘 특성이 있었으며 이후 성장이 빠르게 일어남을 알 수 있었다. 따라서 filtration에 의한 균 농축은 filtering 후 적은 양의 buffer에서 배양하는 것이 바람직하다고 생각되었으며 따라서 작은 filter diameter를 가진 filter를 사용하는 것이 신속검출 기술에 적합하다고 판단되었다.
- 그러나 본 실험은 배지에서서의 실험으로서 식품에 존재하는 식중독균은 이와 다른 양상을 나타낼 것이라고 생각된다. 따라서 현재 식품을 이용한 실험이 진행 중이다. Filtration은 13 mm sintered glass, 25 mm sintered glass와 47 mm KG-47 filter를 현재 구축하여 실험 중에 있다.

## 6. 6장. Genomic DNA 분리 기술

### 가. Commercial kit를 이용한 DNA분리 비교 테스트

#### 1) 개요

- 가) Realtime PCR이나 LAMP 등의 분자진단기술을 이용한 식중독균을 검출하기 위해서는 우선 template로 사용되는 DNA의 농도가 중요한 요인이 된다. 식중독균에서 genomic DNA의 농도가 높게 분리되거나 분자진단이 원활하게 진행될 수 있도록 고순도로 분리되는 것이 바람직하다.
- 나) 따라서 시중에 판매되고 있는 genomic DNA purification kit를 수거하여 성능을 비교검증하였다. DNA purification kit는 spin type과 column type으로 분리되는데, 수거하여 분석한 kit는 Solgent column kit, Solgent solution kit, Bioneer column kit, iNtron kit, Bioline kit, Abi kit, Qiagen kit, Takara kit, geneall kit 이었다.
- 다) 각 kit를 이용하여 overnight 배양된 E. coli O157:H7(ATCC 35150)에 대한 genomic DNA를 분리하였으며 이를 Nanodrop과 realtime PCR로 검출한 결과를 Table 14에 나타내었다.

Table 14. Boiling 법에 의한 DNA 분리농도 및 Ct value

Concentration (log cfu/mL)	AU(260.00nm)	AU(280.00nm)	Ratio(260.00nm/280.00nm)	Ratio(280.00nm/260.00nm)	Protein (mol)	Nucleic Acid(mol)	Ct mean
9	0.1787	0.1190	1.50	0.67	0.30	178.85	15.62
8	0.0478	0.0266	1.80	0.56	0.07	47.78	16.74
7	0.0253	0.0119	2.12	0.47	0.04	25.30	18.08
6	0.0133	0.0070	1.92	0.52	0.02	13.34	20.55
5	0.0071	0.0033	2.16	0.46	0.01	7.09	23.56
4	0.0088	0.0063	1.39	0.72	0.02	8.80	27.74

3	0.0076	0.0048	1.60	0.63	0.01	7.63	31.64
2	0.0054	0.0025	2.16	0.46	0.01	5.37	34.32
1	0.0062	0.0037	1.68	0.6	0.01	6.23	0.00

2) 각 Kit에 의한 분리 방법 테스트

가) Boiling 방법에 의한 분리

- 10<sup>9</sup> cfu/mL로 배양된 E. coli O157:H7에 대하여 boiling 방법으로 DNA를 추출하여 Nano drop으로 분석한 결과는 Table 14와 같다. 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며 이를 단백질 농도와 DNA 농도로 환산 결과 농도는 178.85 mol 부터 6.23 mol 까지로 측정되었다.
- DNA 정제도인 260 nm에 대한 280 nm 비율(260/280)이 1.7~2.0 사이에 있을 때 DNA가 template로서 인정하였을 때 9 log, 8 log, 6 log가 의미 있는 DNA 농도임을 알 수 있었다. 한편 Realtime PCR로 이를 검출하였을 경우의 평균값을 Ct mean에 나타내었다. Ct value에서는 2 log 농도까지 검출할 수 있는 것으로 측정되었다.

Table 15. Solgent column kit에 의한 DNA 분리농도 및 Ct value

Concentration (log cfu/mL)	AU(260.00nm)	AU(280.00nm)	Ratio(260.00nm/280.00nm)	Ratio(280.00nm/260.00nm)	Protein (mol)	Nucleic Acid(mol)	Ct mean
5	0.0006	-0.0006	-0.94	-1.07	0.00	0.59	21.58
4	0.0010	-0.0001	-18.05	-0.06	0.00	0.97	24.22
3	0.0018	0.0012	1.53	0.65	0.00	1.77	27.75
2	0.0015	0.0000	57.77	0.02	0.00	1.55	31.37
1	0.0010	-0.0005	-2.07	-0.48	0.00	1.03	34.76

나) Solgent column kit에 의한 분리

- Solgent column kit에 의한 DNA purification시 260 nm에 대한 280 nm 비율(260/280)이 1.7~2.0에 속하는 것이 없으므로 의미 있는 DNA 농도는 없는 것으로 판단되었다. DNA 농도는 5 log 미생물 농도에서 0.59 mol을 나타내었다.

Table 16. Solgent solution kit에 의한 DNA 분리농도 및 Ct value

Concentration (log cfu/mL)	AU(260.00nm)	AU(280.00nm)	Ratio(260.00nm/280.00nm)	Ratio(280.00nm/260.00nm)	Protein (mol)	Nucleic Acid(mol)	Ct mean
9	0.0267	0.0140	1.90	0.53	0.04	26.72	14.79

8	0.0048	0.0026	1.82	0.55	0.01	4.79	16.29
7	0.0013	0.0005	2.74	0.37	0.00	1.33	19.94
6	-0.0003	0.0004	-0.72	-1.39	0.00	-0.29	24.02
5	-0.0033	-0.0021	1.61	0.62	-0.01	-3.34	27.73
4	-0.0029	-0.0029	0.99	1.01	-0.01	-2.86	31.90
3	-0.0011	-0.0002	4.52	0.22	0.00	-1.07	32.21
2	-0.0008	-0.0004	1.80	0.56	0.00	-0.79	34.12
1	-0.0007	-0.0001	5.02	0.20	0.00	-0.72	32.13

○ Solgent solution kit에 의한 DNA 분리시 9 log, 8 log에서 의미 있는 농도로 측정되었으며 Ct value는 1 log 까지 검출되는 것으로 측정되었다.

Table 17. Bioneer column kit에 의한 DNA 분리농도 및 Ct value

Concentration (log cfu/mL)	AU(260.00nm)	AU(280.00nm)	Ratio(260.00nm/280.00nm)	Ratio(280.00nm/260.00nm)	Protein(mol)	Nucleic Acid(mol)	Ct mean
5	0.0018	0.0011	1.64	0.61	0.00	1.81	22.23
4	0.0020	0.0021	0.98	1.02	0.00	2.04	25.77
3	0.0016	0.0010	1.55	0.65	0.00	1.61	28.88
2	-0.0003	0.0004	-0.76	-1.32	0.00	-0.33	32.23
1	-0.0005	0.0001	-5.72	-0.17	0.00	-0.45	34.77

다) Bioneer column kit에 의한 분리

○ DNA purification시 260 nm에 대한 280 nm 비율(260/280)이 1.7~2.0에 속하는 것은 5 log이었으며 그 이하의 농도에서는 의미가 있는 DNA 농도는 없으므로 판단되었다. DNA 농도는 5 log 미생물 농도에서 1.81 mol을 나타내었다.

Table 18. iNtron kit에 의한 DNA 분리농도 및 Ct value

Concentration (log cfu/mL)	AU(260.00nm)	AU(280.00nm)	Ratio(260.00nm/280.00nm)	Ratio(280.00nm/260.00nm)	Protein (mol)	Nucleic Acid(mol)	Ct mean
5	0.0011	0.0006	1.77	0.56	0.00	1.08	27.42
4	0.0020	0.0004	5.07	0.20	0.00	2.04	28.92
3	0.0028	0.0012	2.33	0.43	0.00	2.82	31.67

2	0.0041	0.0023	1.76	0.57	0.01	4.07	37.54
1	0.0045	0.0013	3.41	0.29	0.01	4.54	0.00

라) iNtron kit로 DNA를 분리

- iNtron kit로 DNA를 분리한 경우도 Bioneer column kit에 의해 DNA를 분리한 것과 같이 5 log에서 의미 있는 결과를 나타내었으며 그 이하의 농도에서는 의미가 있는 DNA 농도는 없었다.
- DNA 농도는 1.08~4.54 mol을 나타내었지만 미생물 농도가 감소함에 따라 DNA 농도가 증가하는 이상 현상을 나타내었다.

Table 19. Bioline kit에 의한 DNA 분리농도 및 Ct value

Concentration (log cfu/mL)	AU(260.00nm)	AU(280.00nm)	Ratio(260.00nm/280.00nm)	Ratio(280.00nm/260.00nm)	Protein (mol)	Nucleic Acid(mol)	Ct mean
5	0.0031	0.0025	1.27	0.79	0.01	3.13	25.09
4	0.0027	0.0019	1.45	0.69	0.00	2.72	28.37
3	0.0015	0.0014	1.05	0.95	0.00	1.52	31.42
2	0.0062	0.0043	1.45	0.69	0.01	6.21	34.93
1	-0.0012	-0.0004	3.21	0.31	0.00	-1.21	0.00

마) Bioline kit에 의한 DNA purification

- Bioline kit에 의한 DNA purification시 260 nm에 대한 280 nm 비율(260/280)이 1.7~2.0에 속하는 것은 없었으며 따라서 전체의 미생물 농도에서 의미 있는 실험구는 없었다.
- DNA 농도는 5 log에서 3.13 mol을, 4 log에서 2.72 mol을 나타내었다.

Table 20. Abi kit에 의한 DNA 분리농도 및 Ct value

Concentration (log cfu/mL)	AU(260.00nm)	AU(280.00nm)	Ratio(260.00nm/280.00nm)	Ratio(280.00nm/260.00nm)	Protein (mol)	Nucleic Acid(mol)	Ct mean
5	0.0024	0.0021	1.14	0.88	0.00	2.38	21.93
4	0.0002	0.0010	0.21	4.79	0.00	0.21	26.01
3	0.0021	0.0023	0.89	1.13	0.00	2.05	28.91
2	0.0007	0.0001	5.10	0.20	0.00	0.73	32.63

1	0.0024	0.0003	6.97	0.14	0.00	2.38	34.57
---	--------	--------	------	------	------	------	-------

바) ABi kit에 의한 DNA purification

- ABi kit에 의한 DNA purification시 260 nm에 대한 280 nm 비율(260/280)이 1.7~2.0에 속하는 것은 없었으며 따라서 전체의 미생물 농도에서 의미가 없었다.
- DNA 농도는 5 log 미생물농도에서 2.38 mol을 나타내었으며 4 log 미생물 농도에서 0.12 mol을 나타내었다.

Table 21. Qiagen kit에 의한 DNA 분리농도 및 Ct value

Concentration (log cfu/mL)	AU(260. 00nm)	AU(280. 00nm)	Ratio(260 .00nm/28 0.00nm)	Ratio(280 .00nm/26 0.00nm)	Protein (mol)	Nucleic Acid(mol)	Ct mean
9	0.0146	0.0078	1.87	0.54	0.02	14.57	15.36
8	0.0048	0.0030	1.61	0.62	0.01	4.82	16.74
7	0.0045	0.0023	1.99	0.50	0.01	4.54	19.56
6	-0.0007	-0.0020	0.35	2.84	0.00	-0.72	22.81
5	0.0016	0.0008	2.13	0.47	0.00	1.60	26.76
4	0.0023	0.0016	1.50	0.67	0.00	2.33	30.22
3	0.0043	0.0029	1.48	0.67	0.01	4.26	33.21
2	0.0037	0.0024	1.56	0.64	0.01	3.70	0.00
1	0.0035	0.0012	2.88	0.35	0.00	3.52	0.00

사) Qiagen kit에 의한 DNA purification

- Qiagen kit에 의한 DNA purification시 260 nm에 대한 280 nm 비율(260/280)이 1.7~2.0에 속하는 것은 9 log, 8 log, 7 log이었다.
- DNA 농도는 9 log 미생물 농도에서 14.57 mol이었으며 1~3 mol 수준으로 나타났다.

Table 22. Takara kit에 의한 DNA 분리농도 및 Ct value

Concentration (log cfu/mL)	AU(260. 00nm)	AU(280. 00nm)	Ratio(260 .00nm/28 0.00nm)	Ratio(280 .00nm/26 0.00nm)	Protein (mol)	Nucleic Acid(mol)	Ct mean
5	0.0034	0.0028	1.23	0.81	0.01	3.44	22.02

4	0.0079	0.0053	1.49	0.67	0.01	7.92	25.57
3	0.0093	0.0064	1.46	0.68	0.02	9.30	27.57
2	0.0071	0.0059	1.19	0.84	0.01	7.09	30.65
1	0.0095	0.0067	1.42	0.70	0.02	9.55	33.47

아) Takara kit에 의한 DNA purification

- Takara kit에 의한 DNA purification시 260 nm에 대한 280 nm 비율(260/280)이 1.7~2.0에 속하는 것은 없었으며 DNA 농도는 미생물 농도에 따라 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 23. Geneall kit에 의한 DNA 분리농도 및 Ct value

Concentration (log cfu/mL)	AU(260.00nm)	AU(280.00nm)	Ratio(260.00nm/280.00nm)	Ratio(280.00nm/260.00nm)	Protein (mol)	Nucleic Acid(mol)	Ct mean
5	0.0023	0.002	1.15	0.87	0	2.3	24.98
4	0.0008	0.0007	1.24	0.81	0	0.83	28.25
3	-0.0005	-0.0003	1.84	0.54	0	-0.46	31.86
2	-0.001	-0.0005	2.03	0.49	0	-0.99	35.46
1	0.0009	0.0005	1.73	0.58	0	0.89	37.77

자) Geneall kit에 의한 DNA purification

- Geneall kit에 의한 DNA purification시 260 nm에 대한 280 nm 비율(260/280)이 1.7~2.0에 속하는 것은 3 log이었지만 4 log, 5 log에서 그 이하를 나타내었다.
- DNA 농도는 5 log 미생물 농도에서 2.3 mol이었으며 3 log, 2 log에서는 음의 값을 나타내었다.

3) 결론

- 10종의 kit에 의한 분석 결과 분리된 DNA 농도를 저농도에서 분석하기가 어려운 것으로 판단되었다. 즉 의미 있는 DNA 농도는 6 log 이상이었으며 따라서 실질적으로 식중독균이 식품에 존재하는 저농도에서의 DNA 농도 측정은 어려운 것으로 판단되었다.
- 저농도 DNA의 정량을 위하여 주관연구기관인 BMS에서 picogreen 방법에 의한 DNA 농도 측정을 하였다. Picogreen이 double stranded DNA에 intercalating 되는

특성을 이용하여 picogreen이 생성하는 fluorescence을 검출하는 것이 원리인데, 일반적으로 DNA를 spectrophotometer로 측정하는 것보다 감도가 높은 것으로 알려져 있다.

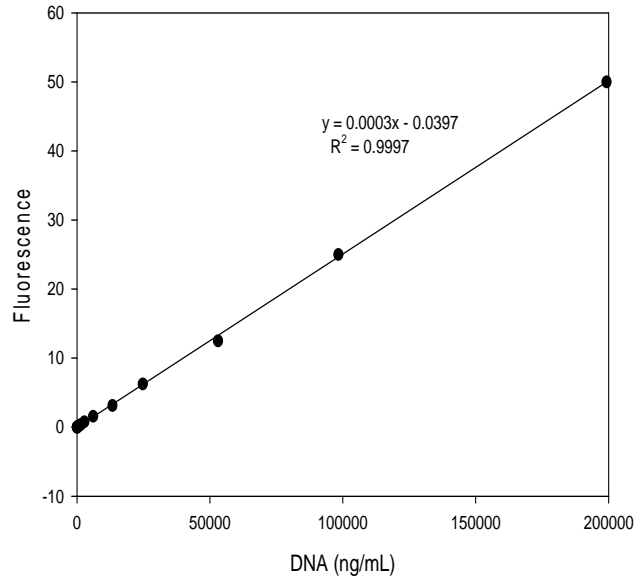


Fig. 25. Picogreen에 의한 DNA 농도 측정, standard curve

#### 나. Picogreen을 이용한 DNA 농도 측정

##### 1) 개요

- 가) Picogreen은 dsDNA에 끼어 들어간 형광물질을 480 nm의 흡광도로 측정하여 25 pg/mL 수준의 dsDNA를 정량적으로 측정할 수 있다.
- 나) UV 흡광도보다 훨씬 높은 민감성을 가진 물질로 RNA 및 free nucleotides가 존재하더라도 double stranded DNA에 특이적으로 반응하여 검출할 수 있다.

##### 2) Commercial kit를 이용해 추출한 DNA의 정량적 측정

- 가) Commercial kit를 이용해 추출한 DNA의 정량적 측정을 위하여 picogreen을 사용하여 측정하여 보았다.
  - 우선 25 pg/mL 부터 200,000 ng/mL 까지의 dsDNA를 사용하여 R2 = 0.99997 의 standard curve를 산출하였다.
  - 추출한 DNA의 흡광도 값을 standard curve에 대입하여 DNA의 양을 산출하였다(Fig. 25).
- 나) Picogreen에 의해 DNA 농도를 측정
  - 측정 결과를 Table 24에 나타내었다.
  - 의미 있는 농도는 양의 값을 가지는 시료로서 Boiling method에 의하면 5 log 이상이였다.
  - Solgent column kit는 4 log 이상에서 의미가 있었으며 Solgent solution kit는 7 log 이상에서 의미가 있었다. Bioneer kit는 5 log 이상, iNtron kit와 Bioline kit는 양의 값을 가지지 않았다. Abi kit는 4 log 이상, Qiagen kit는 6 log 이상, Takara kit는 5 log 이상에



서 의미가 있는 것으로 측정되었다.

- iNtron kit, Bioline kit, Geneal kit는 모든 미생물농도에서 의미 있는 DNA 농도가 측정되지 않았다.

3) 결론

- 따라서 최종적으로 Picogreen에 의한 DNA 함량 측정은 Nanodrop에 비해서는 적게는 100배에서 많게는 10000배 이상을 감도가 높은 것으로 측정되었다.
- 그러나 Picogreen도 식품에 적은 양으로 존재하는 식중독균의 농도를 바로 검출하기에는 무리가 있는 것으로 판단되었다.
- 그렇지만 Picogreen을 이용한 DNA 농도 측정은 2차년도, 3차년도에서 진행될 Whole genome amplification(WGA), isothermal loop mediated amplification(LAMP)에서 증폭되는 DNA 함량을 측정할 때 효과적으로 사용될 수 있을 것이라고 생각되었다.

Table 24. DNA prep. kit에 의해 분리된 DNA의 Picogreen에 의한 농도 측정

Kit	9 log	8 log	7 log	6 log	5 log	4 log	3 log	2 log	1 log	0 log
1	7.937	1.954	1.277	0.698	0.036	-0.024	-0.029	-0.029	-0.024	-0.045
2					0.156	0.070	-0.008	0.007	-0.024	-0.036
3	97.902	5.812	0.509	-0.001	-0.034	-0.031	-0.033	-0.045	-0.043	-0.044
4					0.051	-0.029	-0.037	-0.043	-0.040	-0.042
5					-0.032	-0.036	-0.030		-0.041	-0.051
6					-0.033	-0.039	-0.033	-0.041	-0.042	-0.049
7					0.293	0.021	-0.024	-0.031	0.061	-0.019
8	10.003	2.905	0.417	0.028	-0.039	-0.039	-0.033	-0.027	-0.041	-0.034
9					0.111	-0.036	-0.052	-0.048	-0.051	-0.033
10					-0.031	-0.050	-0.043	-0.045	-0.048	-0.050

1: Boiling, 2: Solgent column kit, 3: Solgent solution kit, 4: Bioneer column kit, 5: iNtron kit, 6: Bioline kit, 7: Abi kit, 8: Qiagen kit, 9: Takara kit, 10: Geneall kit

다. PCR에 의한 DNA 농도 측정

- 1) Nanodrop과 Picogreen에 의한 DNA 농도 측정은 어려웠지만 상대적으로 realtime PCR에 의한 target 유전자의 검출은 저농도에서도 가능한 것으로 나타났다. Realtime PCR로 식중독균을 검출하는 경우 Boiling method의 경우 Picogreen에 비해 3 log 즉, 1000배 정도로 감도가 높음을 알 수 있었다. Solgent column kit에서는 1000배, Solgent solution kit에서는 105배 감도가 높음을 알 수 있었다. 따라서 식품에 저농도로 존재하는 식중독균의 DNA의 직접적인 검출은 어려운 것으로 판단되었으며 realtime PCR이나 LAMP 등에 의한 증폭과정을 통해 검출하는

것이 바람직함을 알 수 있었다. 각 kit로 분리된 DNA의 realtime PCR에 의한 Ct value를 정리하여 Table 25에 나타내었다.

2) Table 25에 나타낸 바와 같이 Picogreen 방법이나 Nanodrop 방법으로는 DNA 정량이 불가능하였지만 realtime PCR을 이용한 경우 동일한 DNA 시료에서 매우 낮은 미생물 농도까지 검출이 가능한 것으로 나타났다. Solgent column kit, Solgent solution kit, Bioneer column kit, Abi kit, Takara kit는 1 log 미생물 농도에서 까지 검출이 가능한 것으로 측정되었다. Boiling method, Bioline kit, Geneall kit는 2 log 수준의 미생물 농도에서 검출이 가능하였다. iNtron kit, Qiagen kit는 다른 kit에 비하여 10~100배의 높은 미생물 농도를 요구하였기 때문에 본 실험의 목적과는 차이가 있었다. 1 log 미생물 농도는 picogreen 방법으로도 유효하게 측정할 수 있는 농도 보다 1000배 이하의 적은 농도이며 따라서 적은 양의 DNA의 양을 측정하기 위해서는 Picogreen, Nanodrop과 같은 직접적인 정량법은 적용하기 어려우며 따라서 realtime PCR과 같은 증폭후 검출하는 간접적인 정량법이 효과적임을 알 수 있었다.

Table 25. DNA 분리 kit에 따른 Ct value

Kit	9 log	8 log	7 log	6 log	5 log	4 log	3 log	2 log	1 log	0 log
1	15.62	16.74	18.08	20.55	23.56	27.74	31.64	34.32		
2					21.575	24.22	27.745	31.37	34.76	
3	14.79	16.29	19.94	24.02	27.73	31.90	32.21	34.12	32.13	
4					22.23	25.77	28.88	32.23	34.77	
5					27.42	28.92	31.67			
6					25.09	28.37	31.42	34.93		
7					21.925	26.005	28.905	32.63	34.57	
8	15.36	16.74	19.56	22.81	26.76	30.22	33.21			
9					22.015	25.565	27.57	30.65	33.47	
10					24.98	28.25	31.86	35.46		

1: Boiling, 2: Solgent column kit, 3: Solgent solution kit, 4: Bioneer column kit, 5: iNtron kit, 6: Bioline kit, 7: Abi kit, 8: Qiagen kit, 9: Takara kit, 10: Geneall kit

3)

4) 그람양성 세균은 그람음성 세균과 달리 peptidoglycan 층이 넓어 그람음성 세균과는 다른 DNA 분리기술이 필요하다. 보통 peptidoglycan 층을 분해할 수 있는 lysozyme을 처리하는 과정이 포함되기 때문에 보다 긴 추출시간을 요구한다. 그람 양성세균인 Staphylococcus aureus ATCC 25923에서 Bioneer column kit, Abi kit 및 Takara kit를 이용하여 DNA를 분리하였으며 이후 저농도의 DNA 함량 측정에 가장 적합한 tool인 realtime PCR에 의해 검출실험을 실시하였다. 분리된 DNA를 realtime PCR로 검출하기 위해 사용된 primer 및 probe의 sequence를 Table 9에 나타내었다.

5)

6) 그람 양성 분리용 kit는 Abi kit 처럼 peptidoglycan 층을 분해하기 위해 lysozyme을 처리하는 kit도 있었으며 lysozyme 처리 없이 분리하는 kit도 있었다. 분리된 DNA를 realtime PCR로 검출한 결과 Bioneer column kit와 Abi kit에서 분리한 처리구 모두 5 log 수준 이상에서 검출되는 것으로 나타났다. 따라서 그람 음성균에 비하여 그람 양성균은 현재 시중에 판매되고 있는 kit를 이용해서는 DNA가 원활하게 분리되지 않음을 알 수 있었다. 따라서 저농도의 균에서 DNA를 분리할 수 있는 새로운 타입의 DNA 분리 kit가 필요함을 알 수 있었다. 식품공전에 게재된 식중독균에서 그람 양성균은 Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Clostridium perfringens, Clostridium botulinum이 있는데, 앞에 2가지 균주는 위해도가 높지 않은 것으로 인정되어 식품에 따른 정량기준이 설정되어 있는 균이며 나머지 균은 식품에서 검출되지 않아야 한다는 정성기준이 설정되어 있는 균이지만 그람 음성균에 비하여 식중독 발생은 비교적 낮게 유발하는 균이라고 판단되었다.

Table 26. DNA 분리 kit에 따른 Ct value

Kit	9 log	8 log	7 log	6 log	5 log	4 log	3 log	2 log	1 log	0 log
1	21.13	25.44	27.72	31.32	35.36	38.58	38.22	38.66	0.00	0.00
2	18.47	22.89	26.27	29.34	32.65	36.28	36.61	37.92	0.00	0.00

1: Bioneer column kit, 2: Abi kit

7) 그람음성 세균의 DNA 분리실험 결과, 실험에 사용된 kit는 1 log에서 3 log 수준까지 realtime PCR로 검출되는 것으로 나타났다. 그렇지만 이는 미생물배지에서 분석된 결과로 식품에서는 좀 더 높은 Ct value를 가질 것으로 생각되었다. 따라서 이번에는 식품을 대상으로 실험을 실시하였다.

8)

9) 대상식품인 양상추, 소고기, 동태살에 E. coli O157:H7을 인위적으로 접종한 후 DNA를 분리한 후 realtime PCR에 의한 검출실험을 실시하였다. 대상식품 10g에 농도를 달리하여 E. coli O157:H7를 접종하였다. 이후 9배량의 0.85% saline을 첨가하고 stomaching한 후 균질액 1 mL을 취하여 DNA를 분리하였으며 이후 realtime PCR에 의한 검출실험을 실시하였다.

10)

11) DNA의 분리는 10개의 test된 kit 중 가장 분리 효율이 좋다고 평가되는 Takara kit와 보편적으로 사용되는 boiling method를 사용하였으며 그 결과를 Table 27, 28에 나타내었다.

Table 27. Takara kit를 이용한 식품중의 E. coli O157:H7 분리 및 Ct value

	Media	Seafood	Meat	Lettuce
0 log				
1 log	33.47			

2 log	30.65		35.03	35.42
3 log	27.57	32.68	30.21	31.54
4 log	25.57	29.64	26.75	27.76
5 log	22.02	26.21	23.91	24.50

12) Takara kit를 이용하여 인위적으로 접종된 식품에서 분리한 DNA에 대한 realtime PCR 결과 배지에서는 detection limit이 1 log인 것에 비하여 동태살은 3 log, 소고기는 2 log, 양상추는 2 log 수준의 detection limit을 가지는 것으로 나타났다. Ct value에서 36 cycle 이상은 재현된 결과 산출이 어려워 제거하였다. 미생물 배지에 비하여 실제적인 식품에서는 소고기, 양상추는 10배, 동태살은 100배 detection limit이 증가하는 것으로 나타났다.

Table 28. Boiling method를 이용한 식품중의 *E. coli* O157:H7 분리 및 Ct value

	Media	Seafood	Meat	Lettuce
0 log				
1 log				
2 log	34.32			
3 log	31.64	35.92		33.32
4 log	27.74	31.91	37.36	29.53
5 log	23.56	28.38	33.78	26.18

13) Boiling method를 이용하여 인위적으로 접종된 식품에서 분리한 DNA에 대한 realtime PCR 결과 배지에서는 detection limit이 2 log인 것에 비하여 동태살은 3 log, 소고기는 4 log, 양상추는 3 log 수준의 detection limit을 가지는 것으로 나타났다. 미생물 배지에 비하여 실제적인 식품에서는 동태포, 양상추는 10배, 소고기는 100배 detection limit이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 실질적으로 식중독균이 존재하는 식품에서 식중독균을 검출하고자 할 때는 미생물배지에서 검출하는 것보다 10배에서 100배 정도 검출한계가 증가하는 것으로 나타났다. 이는 식품의 다양한 성분에 의한 DNA 추출 저해나 realtime PCR 반응 저해에 기인한 것으로 생각된다. 이는 식품에 극소량 존재하는 미생물의 특성을 고려하여 볼 때 식품에서 바로 DNA를 추출하여 realtime PCR이나 기타 분자진단방법에 의해 검출할 수 없음을 의미한다. 따라서 식품에서 식중독균을 검출하고자 할때는 식중독균의 농도를 증가시키는 enrichment 과정이 필수적이라고 할 수 있다. 식중독균의 농도를 증가시키는 방법은 우선적으로 filter 등을 이용한 농축과정에 의해 농도를 높이는 방법이 있으며 또한 식중독균의 성장을 빠르게 하거나 식중독

균의 DNA의 증폭과정을 거쳐 template를 증폭하는 방법이 있다. 식중독균의 성장은 한계가 있어 일정시간 이상으로 빠르게 할 수 없지만 식중독균의 DNA를 증폭시키는 방법은 Whole genome amplification이나 LAMP 등을 이용하여 단시간 내에 DNA를 대량 증폭시킬 수 있다.

#### 라. 분리방법 kit화 가능성 검토

##### 1) Food sample treatment kit

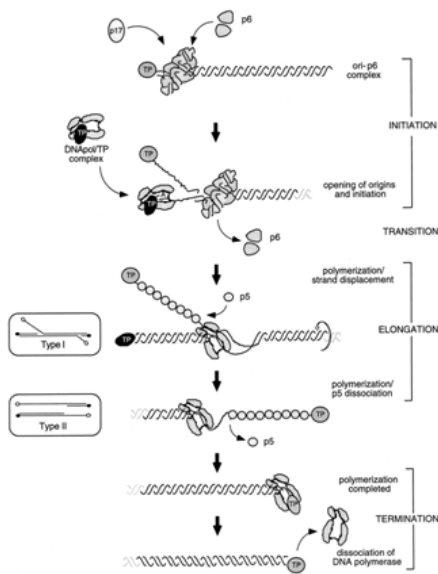
2) 식중독균은 식품에 극미량 존재하며 따라서 법적인 기준도 시료 25 g중 불검출로 되어 있는 균이 많다. Salmonella spp., E. coli O157:H7, Listeria monocytogenes 등이 이러한 미생물적 기준을 가지고 있다. 25 g에서 불검출 된다는 이야기는 1 cell이 존재한다는 의미이며 또한 9배량의 buffer를 넣고 stomaching 한 후의 농도로 계산하면 250 mL 중에 1 cell이 존재한다는 의미로 0.004 cfu/g, mL의 농도를 의미한다. 문제는 이러한 낮은 농도에서는 어떠한 기술을 이용하여도 식중독균을 검출할 수 없다는 것이고 이는 현재 사용되고 있는 검출기술의 검출한계가 이 농도에 비하여 현저하게 높음을 의미한다. 따라서 식품에서 식중독균을 검출하기 위해서는 미생물 숫자를 늘리는 것이 필요한데, 이것을 보통 enrichment라고 한다. 따라서 미생물을 증가시키는 enrichment가 매우 중요하다. 이러한 enrichment 방법을 우회할 수 있는 방법은 미생물의 농축시키는 방법이 있는데, 본 과제에서는 filter를 이용한 농축기술을 개발하고 있어 향후 이를 kit화 할 계획이다. 또한 미생물을 증식시키지 않고, 미생물 DNA를 증폭시키는 방법이 있는데 Whole genome amplification(WGA), loop-mediated isothermal amplification(LAMP)이 있다. 따라서 식중독균에 특이적인 WGA, LAMP kit의 개발도 가능하다.

##### 3) Whole genome amplification(WGA) kit

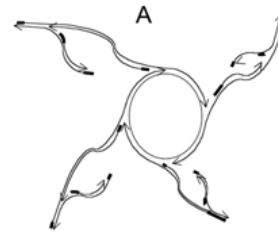
4) 식중독균의 신속검출에 이용할 수 있는 것은 미생물이 아닌 genomic DNA 자체를 검출한계 이상으로 증폭시키는 것이다. 식중독균을 검출하는 다양한 기술 가운데, specificity를 가지고 있으며 낮은 검출한계를 가지는 분석법은 realtime PCR을 이용하는 방법이다. Realtime PCR을 이용하여 분석을 할 경우 DNA prep. realtime 조작 등 3시간 이내에 충분히 분석이 가능하지만 단 이 경우는 검출한계 이상의 식중독균이 존재할 경우이다. 그러나, 식품에서 직접 realtime PCR을 이용하여 분석할 정도로 높은 숫자의 식중독균은 거의 존재하지 않기 때문에 검출한계까지 균을 증폭하는 시간이 필요하다.

5) 따라서 미생물을 빠르게 성장시키는 방법이 있지만 미생물은 생명체이므로 growth를 무한정 빠르게 하기는 어렵다. 따라서 미생물의 enrichment 보다는 미생물에서 분리한 genomic DNA에 대한 증폭이 속도를 빠르게 할 수 있다. Genomic DNA를 빠르게 증폭시킬 수 있는 방법이 whole genome amplification (WGA) 방법이 있다. WGA는 Phi29 DNA polymerase를 이용하여 strand displacement activity를 이용하여 계속적으로 DNA를 합성하는 기술로서 30°C 조건에서 DNA의 증폭이 가능하다.

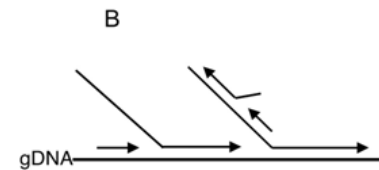
### Rolling circle amplification



### Circular DNA amplification



Circular DNA



Linear DNA

### Strand displacement reaction

### Linear DNA amplification

Fig. 26. Whole genome amplification

6) 실질적으로 WGA는 다양한 시료(single cell, blood card, buccal swab, soil, plant, formaline-fixed paraffin-embedded tissue 등)의 극소량 (nano gram) DNA를 증폭하여 10 µg 이상의 whole genomic DNA를 얻을 수 있다고 알려져 있다. 식품에 극소량 존재하는 식중독균을 real-time PCR로 검출하기 위하여, 미생물 증균과정을 거쳐 검출한계 까지 균수를 증가시켜 DNA를 분리하여 검출할 수 있다. 또는 미생물 증균과정 없이 genomic DNA를 검출한계까지 증가시키면 real-time PCR에 의한 검출이 가능할 것이다.

7) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit

8) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)는 WGA와는 달리 DNA의 증폭과 검출이 가능한 분자방법이다. LAMP는 고가의 PCR 기계 없이 단일 온도에서 DNA를 증폭시킬 수 있는 기술로 증폭된 산물의 검출은 magnesium pyrophosphate의 증가나 SYBR green을 첨가하여 별도의 장비 없이 눈으로 결과를 측정할 수 있어 현장에서 활용할 가능성이 매우 높은 kit 구성이 가능하다. LAMP는 strand displacement가 높은 Bst polymerase를 이용함으로써 4개의 프라이머로 이루어진다. 먼저 내부 프라이머가 결합되어 신장되면서 strand displacement가 발생하며 먼저 형성된 가닥은 떨어져 나오며 떨어져 나온 단일 가닥의 5'-말단에서부터 loop 구조가 형성되며 이는 3'-말단에서도 같이 과정이 반복되고 loop 구조가 신장된다. LAMP를 이용하면 한 시간 내에 유전자 증폭이 가능하며 또한 온도에 따른 DNA 손상이 없기 때문에 증폭효율이 높다고 알려져 있다. LAMP를 수행하기 위해서는 증폭시킬 유전자의 6개의 위치를 인식하도록 특별히 고안된 4개의 프라이머를 사용하므로 이는 일반 PCR이 2개의 프라이머를 인식하는 것과 비교했을 때 target DNA에 대한 특이성이 매우 높아짐을 의미하기 때문에 식중독균을

specific 하게 검출하는 것이 가능하다. LAMP는 1 fg 정도의 template DNA만 있어도 검출 가능하다고 알려져 있으므로 PCR에 비하여 100배 정도의 sensitivity가 있다고 할 수 있다. 또한 LAMP는 일정한 온도만 유지하면 고가의 장비가 필요 없이 항온수조를 가지고도 반응이 가능하며 증폭결과를 눈으로도 판단할 수 있어 현장 활용 기술로도 적합한 것으로 판단되어 현장에서 사용할 수 있는 식중독 검출 kit 구성이 가능할 것으로 예상된다.

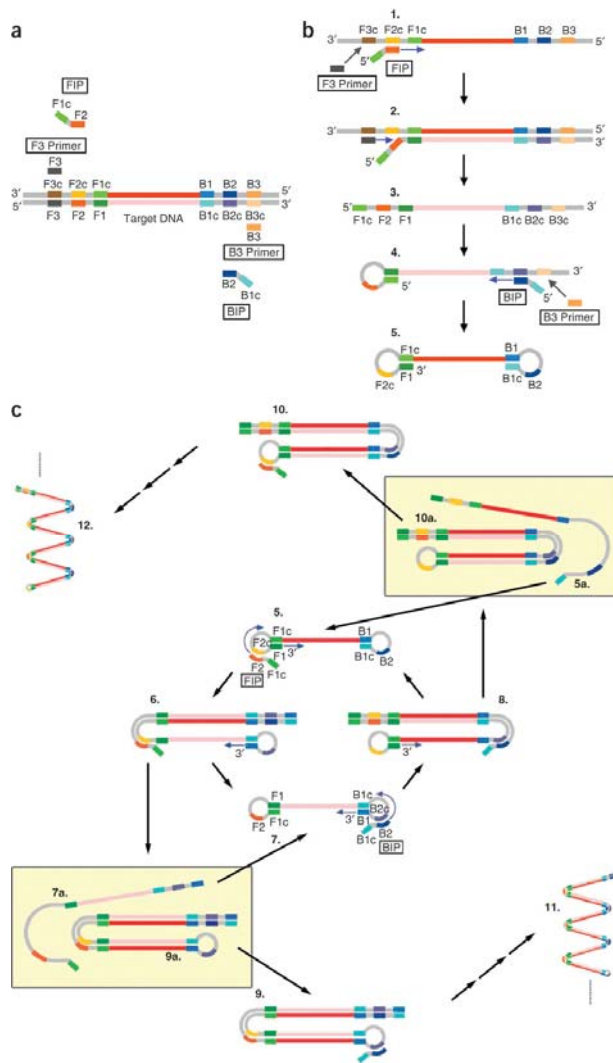


Fig. 27. LAMP에 의한 target site의 증폭

9) 따라서 LAMP는 target site의 증폭 뿐 아니라 detection도 동시에 수행이 가능하므로 WGA와 같이 DNA amplification 기술로도 사용될 수 있으며 또한 realtime PCR과 같이 detection 기술로도 사용될 수 있다. 따라서 본 과제를 통하여 식중독균에 specific한 LAMP kit와 WGA kit 및 realtime PCR kit의 개발이 가능할 것으로 예상된다.

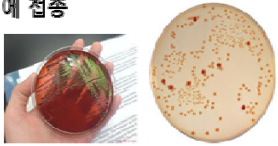
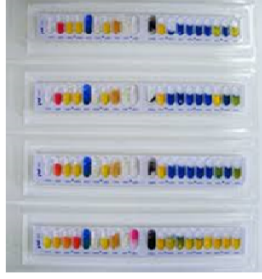


제 2 절. 식중독균 최적 enrichment 방법 확립과 식품 내 식중독균 분리 kit화 가능성 검토

1. 1장. 식품에서 식중독균 검출 방법 및 kit 분석

가. 식품의약품안전처의 식중독 원인조사(주요 세균) 방법


1) 대장균 O157:H7 (*Escherichia coli* serovar O157:H7)

시험목적	시험법/실험예
증균배양	<ul style="list-style-type: none"> <li>검체 25g 또는 25mL를 취하여 225mL의 mEC 배지에 가한 후 35~37°C에서 24±2시간 증균배양</li> </ul>
분리배양	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 증균배양액을 cefixime(0.05mg/L) 및 potassium tellurite(2.5mg/L)가 첨가된 MacConkey sorbital 한천배지에 접종</li> <li>• 35~37°C에서 18시간 배양</li> <li>• Sorbital을 분해하지 않는 무색집락을 취하여 EMB 한천배지에 접종</li> <li>• 35~37°C에서 24±2시간 배양</li> <li>• 녹색의 금속성 광택이 확인된 집락은 확인시험을 실시</li> </ul> 
확인시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EMB 한천배지에서 녹색의 금속성 광택을 보이는 집락을 보통 한천배지에 옮김</li> <li>• 35~37°C에서 18~24시간 배양</li> <li>• 그림염성간균임을 확인하고 생화학시험을 실시</li> </ul>  <p>• API Kit 결과 확인</p>
혈청형시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 대장균으로 확인 동정된 균은 O157 항혈청을 사용하여 혈청형을 결정하고 O157이 확인된 균은 H7의 혈청형 시험을 실시</li> </ul>



2) 살모넬라균 (*Salmonella* spp.)

시험목적	시험법
증균배양	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 검체 25g 또는 25mL를 취하여 225mL의 펄톤수에 가한 후</li> <li>• 35~37°C에서 18~24시간 증균배양 배양액 0.1mL 취하여 10mL의 Rappaport-Vassiliadis 배지에 접종</li> <li>• 42±1°C에서 24±2시간 배양</li> </ul> 
분리배양	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 증균배양액을 MacConkey 한천배지 또는 Desoxycholate 한천배지 또는 XLD 한천배지 또는 Bismuth Sulfite 한천배지에 접종</li> <li>• 35~37°C에서 24±2시간 배양 후 전형적인 집락은 확인시험 실시</li> </ul>  <p>(macconkey agar) (SS agar) (xld agar) (glucose 분해 확인)</p>
확인시험	<p>생화학적 확인시험</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 분리배양된 평판배지상의 집락을 보통한천배지에 옮김</li> <li>• 35~37°C에서 18~24시간 배양</li> <li>• TSI 사면배지의 사면과 고층부에 접종</li> <li>• 35~37°C에서 18~24시간 배양하여 생물학적 성상을 검사 ※살모넬라는 유당, 서당 비분해(사면부 적색), 가스생성(균열 확인) 양성인 균에 대하여 그람음성 간균, urease 음성, lysine decarboxylase 양성 등의 특성이 확인되면 살모넬라 양성으로 판정</li> </ul> <p>응집시험</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 균종 확인이 필요한 경우 Spicer-Edwards 등과 같은 H혼합혈청과 O혼합혈청을 사용하여 응집반응을 확인</li> </ul>

3) 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*)

시험목적	시험법	
분리배양	<ul style="list-style-type: none"> <li>•검체 25g 또는 25mL를 취하여 225mL의 mEC 배지에 가한 후 35~37°C에서 24±2시간 증균배양</li> </ul>	
확인시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>•MYP 한천배지에서 전형적인 집락을 선별하여 보통한천배지에 접종</li> <li>•30°C에서 18~24시간 배양</li> <li>•배양 후 그람염색을 실시하여 포자를 갖는 그람양성 간균을 확인</li> <li>•확인된 균은 nitrate 환원능, VP, β-hemolysis, tyrosine분해능, 혐기배양시의 포도당 이용 등의 생화학시험을 실시</li> <li>•추가로 24~48시간 배양하여 곤충독소단백질(Insecticidal crystal protein)생성 확인시험(주)도 실시</li> <li>•(주)이 시험법은 <i>Bacillus cereus</i>와 <i>Bacillus thuringiensis</i>를 구분하는 시험법으로, 보통한천배지에 30°C, 24~48시간 배양한 후 직접 또는 염색하여 현미경 관찰결과(×1000배), 곤충독소단백질이 확인되면 <i>Bacillus thuringiensis</i>로 동정</li> </ul>	

4) 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)

시험목적	시험법	
증균배양	<ul style="list-style-type: none"> <li>•검체 25g 또는 25mL를 취하여 225mL의 10% NaCl 첨가한 TSB 배지에 가한 후 35~37°C에서 18~24시간 증균배양</li> </ul>	
분리배양	<ul style="list-style-type: none"> <li>•증균배양액을 난황첨가 만니틀 식염한천배지 또는 Baird-Parker 한천배지에 접종</li> <li>•35~37°C에서 18~24시간 배양 (황색불투명 집락 확인)</li> </ul>	 
확인시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>•분리배양된 평판배지상의 집락을 보통 한천배지에 옮김</li> <li>•35~37°C에서 18~24시간 배양</li> <li>•그람염색을 실시하여 포도상의 배열을 갖는 그람양성 구균 확인 후 coagulase 시험을 실시(24시간 이내에 응고 유무 판정)</li> <li>※ Baird-Parker 한천배지에서 전형적인 집락으로 확인된 것은 coagulase 시험을 생략할 수 있음</li> <li>•Coagulase 양성으로 확인된 것은 생화학 시험을 실시하여 판정</li> </ul>	

나. 기타 검출기술현황 (미생물 및 면역학적 방법)

- 식중독 유발 병원성 세균에 의한 영향이 가장 크며, 식중독균에 대한 검출 기술의 수준이 빠르게 발전하고 있으며, 최근 신속, 간편, 편리한 검출기법의 개발이 증가하고 있음

표 1. 미생물 검출 및 진단 키트 제품

진단 방법	제품	특징
미생물 배양을 통한 검출 및 진단	 <p>Reveal Kit(Neogen, 미국)</p>	시료를 증균 후 3~4 방울을 device에 떨어 주어 20분 후, 결과를 판독하며, 띠가 하나면 음성, 두 개면 양성으로 판정
	 <p>NEO-GRID/ISO-GRID (Neogen, 미국)</p>	시료의 증균 없이 미생물을 계수하기 때문에 빠른 결과확인이 가능하고, 계수된 미생물 수를 MPN으로 전환 가능함
	 <p>GeneQuence Kit (Neogen, 미국)</p>	시료를 배양 후 microwell에서 반응 시킨 후ELISA reader에서 결과를 측정함 특정 미생물의 rRNA를 target으로 함
	 <p>이진체크 ISO T (삼성에버랜드+래플린(주), 대한민국)</p>	검출 가능 식중독균은 위해성이 높은 대장균과 살모넬라균 2종이며, 그 외 콜레라균, 장염비브리오균 등도 개발 예정임 최소 8시간에서 최대 24시간 이내에 결과 확인 가능)

	 <p>PANArray™ (PANAGENE, 대한민국)</p>	<p>병원성 또는 비병원 바이러스, 세균, 곰팡이, 선충, 곤충 등 기생성 또는 공생성 미생물의 검출, 진단 및 모니터링 용도 DNA microarray 보다 높은 민감도와 특이도</p>
<p>항체항원시스템을 통한 검출 및 진단</p>	 <p>Soleris System (Neogen, 미국)</p>	<p>식품, 음료, 유제품 등 다양한 시료에 존재하는 미생물을 신속, 정확하게 검출하는 장비. 몇 일이 걸리는 전통적인 방법과 달리 수 시간 내에 결과 확인이 가능</p>
	 <p>식중독균 검출용 광섬유 바이오센서 장치(농진청)</p>	<p>특정한 식중독균에만 반응하는 항체와 바이오 센서의 전기 또는 광 신호를 이용하여 농식품 시료에 오염되어 있는 식중독균 검출 검출 식중독균 : 살모넬라균 검출성능 : 106 cfu/mL</p>
	 <p>Celsis Rapid Detection (Celsis, 미국)</p>	<p>미생물이 대사를 통해 방출하는 ATP를 측정하는 방식 RapiScreen Kit : 빛의 발현도를 Blank 및 Control과 대조하여 미생물의 양을 측정 AkuScreen Kit : 미생물 내의 Adenylate Kinase (AK)가 ADP를 ATP로 전환시키는 원리를 추가로 적용하여, 더 많은 ATP를 생성하게 함으로써 민감도를 좀더 향상시킴</p>

Table 1-1. 식중독균 검출 및 진단 kit 제품

다. Digital PCR 기술을 이용한 식중독균 검출

1) RainDrop PCR

가) RainDrop Digital PCR 의 원리

- 디지털 PCR은 기존 실시간 정량 PCR (real-time quantitative PCR)에서 사용하는 방법과는 다른 방법으로 DNA 시료 내에 존재하는 타겟 물질 (혹은 유전자)의 양을 정량함. 즉, 표준 곡선을 만드는 방법이 아닌 단일분자계수법을 적용하여 절대정량을 실시 함
- RainDrop digital PCR 에서는 시료에 대해서 100만개 이상의 5 pL에 해당되는

초미세 기름방울 (Oil droplet)을 만들어 그 안에서 PCR 반응이 이루어지는 특징을 가지고 있음, 즉 한 개의 기름방울이 마치 PCR 반응이 이루어지는 한 개의 튜브 역할을 하게 됨

- 이러한 효과는 시료 내에 매우 적은 양으로 존재하는 타겟 물질 (또는 유전자)을 검출 할 수 있다는 장점을 가져다 줌
- RainDrip digital PCR에서의 정량은 반응이 있거나 없는 두 가지 가능성만으로 프 아송 분포를 통해 positive와 negative의 비율을 계산한다.
- Fig. 1-1 (A)에서와 같이 어떤 DNA시료 안에 타겟 유전자가 있다고 가정 한다면, RainDrop digital PCR은 각각의 유전자들이 서로 다른 공간에 존재하도록 106개 이상의 droplet을 만들고 타겟에 대한 PCR 반응을 시작하게 됨
- PCR 반응 종료 후 각각의 droplet들을 타겟으로 부더의 신호(주로 형광 신호)를 감지할 수 있는 sensor에 통과시켜 신호들을 파악해 PCR +와 PCR -를 구별하게 됨(Fig. 1-1 (B)).
- 최종적으로 구별된 신호들은 그래프의 해당 위치에 표시되어 PCR+ 신호를 보여주는 droplet을 측정하여 타겟 유전자의 정량을 알아냄 (Fig. 1-1(B)).
- 이 새로운 방식은 한 lane 당 pico-liter 수준의 droplets를 백만 개~천만 개까지 만들어 기존 방식의 PCR에 비해 500배에서 10,000배까지 민감도를 증가시켰고, 이는 현존하는 모든 PCR 기술 수준을 뛰어넘어 6 log 이상의 범위에서 민감도를 가능하게 하여 보다 정확한 절대정량을 수행할 수 있게 함 (Fig. 1-2.).

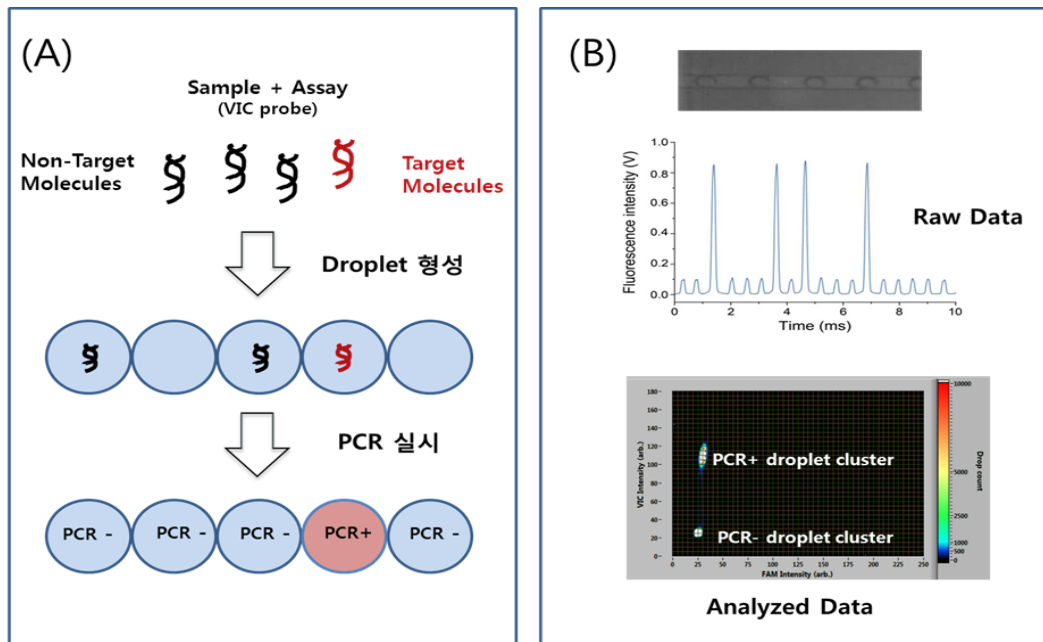


Figure 1-1. RainDrop Digital PCR의 측정 원리

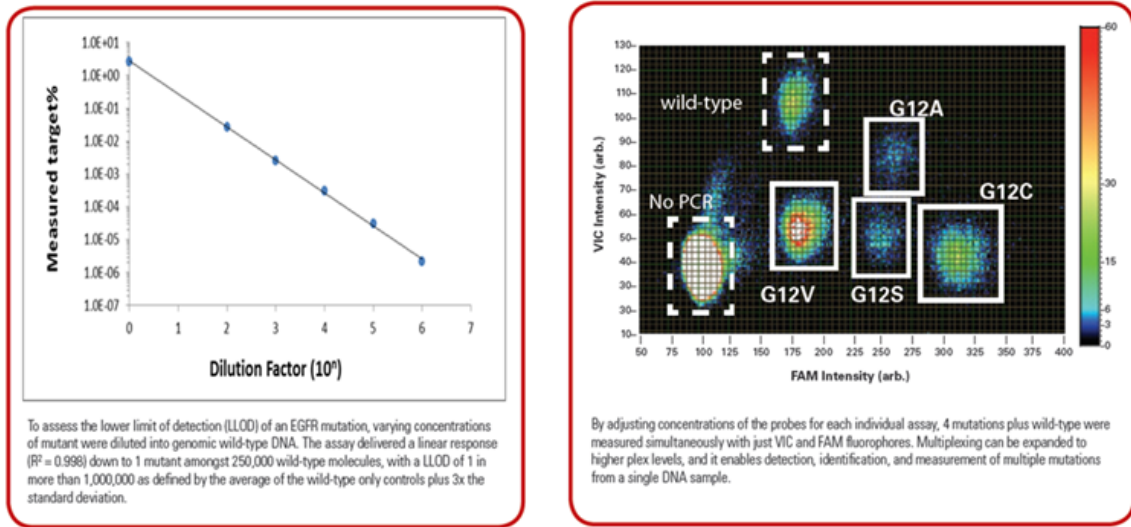


Figure 1-2. RainDrop Digital PCR의 민감도와 Multiplex performance

#### 나) RainDrop Workflow

- 먼저 분석하고자하는 시료 및 assay 시약을 준비하여 RainDrop source system에 로딩하면 자동으로 백만 개~천만 개의 droplet을 생산하여 PCR tube에 담겨 짐
- 시료와 PCR 시약이 포함된 천만 개의 droplet이 담긴 tube를 thermal cycler로 옮겨 PCR을 진행하게 됨
- PCR 반응 완료 후 tube를 다시 RainDrop sense system에 옮겨주면 자동으로 droplet 수를 세고 신호를 분석함
- 관련하여 'RainDrop Analyst' 소프트웨어를 통해 결과에 대한 분석을 진행할 수 있음 (Fig. 1-3).

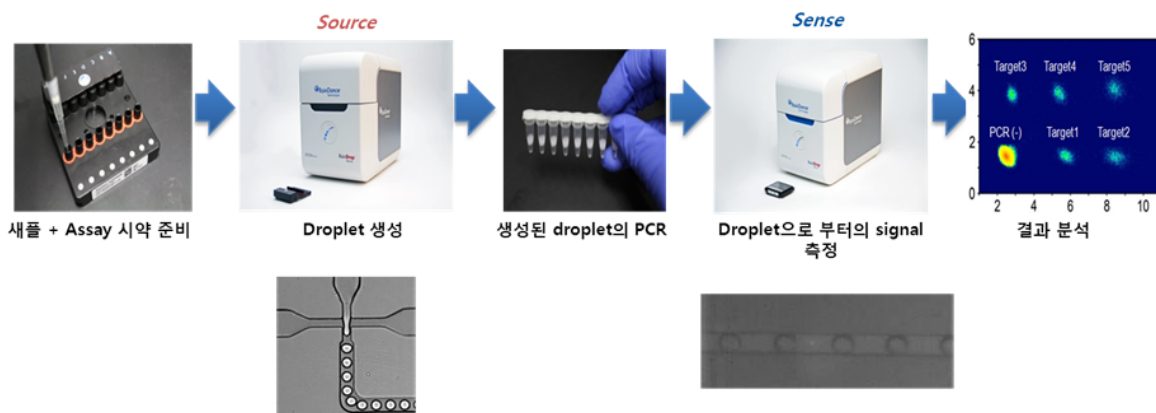


Figure 1-3. RainDrop Digital PCR의 전체적인 진행 과정

다) Applications

- RainDrop Digital PCR은 Realtime PCR에서 사용하는 Probe와 Master Mix 등의 시약을 그대로 이용할 수 있으며, 다양한 시약에 대한 호환성이 이미 테스트 되어 다양한 assay에 가장 적합한 시스템을 골라서 적용할 수 있음
- 본과제의 중점 연구 분야 중의 하나인 적은량의 타겟 식중독 병원성균의 검출은 target molecule이 적을 때도 검출 가능하다는 측면에서 “rare mutation detection” 또는 “viral load measurement” 등의 분야와 그 성격이 유사하여 RainDrop digital PCR의 사용을 충분히 검토해 볼 만 함

2) BioRad QX 200 Digital PCR

가) 원리

- QX200은 micro-droplet을 이용한 PCR 방법으로 micro-droplet reactor에 의하여 형성된 초미세물방울에 각각 한 copy의 주형유전자와 primer를 가두어 하나의 소자형태로 PCR 증폭을 시키는 실험방법임
- 이 방법은 기존의 PCR 방법이 96-well PCR plate나 200 ul micro tube에서 하나의 reaction이 일어난 반면 micro droplet PCR은 하나의 tube에서 수만 개의 소자를 발생시켜 민감도와 정확도는 물론 미량의 원료샘플을 이용할 수 있어 쉽게 구하기 어렵거나 극소량의 샘플로도 유전자 증폭결과를 도출할 수 있는 장점이 있음 (Fig. 1-4)

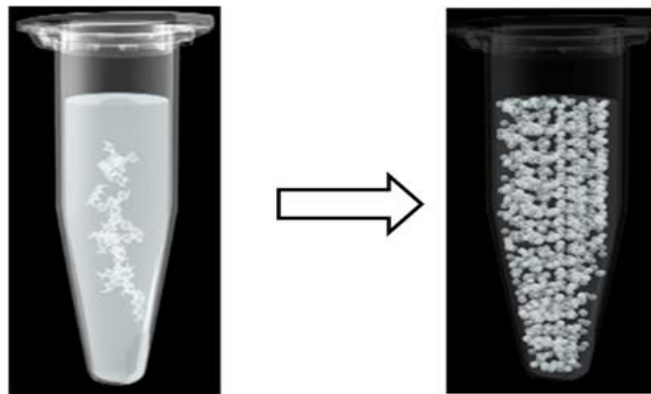


Figure 1-4. 기존 PCR 개념과 Digital PCR의  
신개념 비교

나) BioRad digital PCR workflow

- QX 200은 두 개의 module로 분리되어 있어서 micro droplet을 만들어 주는 Droplet Generator와 PCR 증폭된 microdroplet을 검출하는 Droplet Reader로 구성되어 있음 (Fig. 1-5).
- Droplet Generator를 통해 시료, 타겟 검출을 위한 PCR primer, PCR reaction reagent 등을 포함하는 oil droplet(Fig. 1-6)을 생성함
- Droplet은 일반적으로 reaction well당 2분 30초의 시간에 1 nl의 droplet 20,000 개를 형성함



Figure 1-5. Droplet generation와 Droplet Reader로 구성된 BioRad Digital PCR

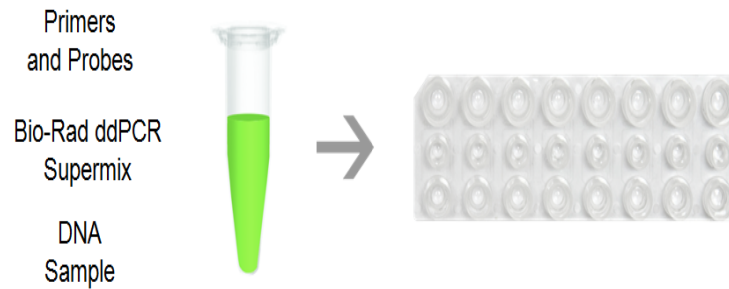


Figure 1-6. Reaction mixture를 포함한 droplet 생성

- 생성된 droplet은 일반 PCR 장비를 통해 PCR 반응을 수행하게 되며, 수행된 PCR 샘플들을 Droplet Reader에 loading 하여 타겟 물질 검출을 위한 reading을 수행하게 됨
- 읽혀진 형광 신호를 바탕으로 분석을 실시하여 타겟 물질의 양을 정량하게 됨 (Fig. 1-7).

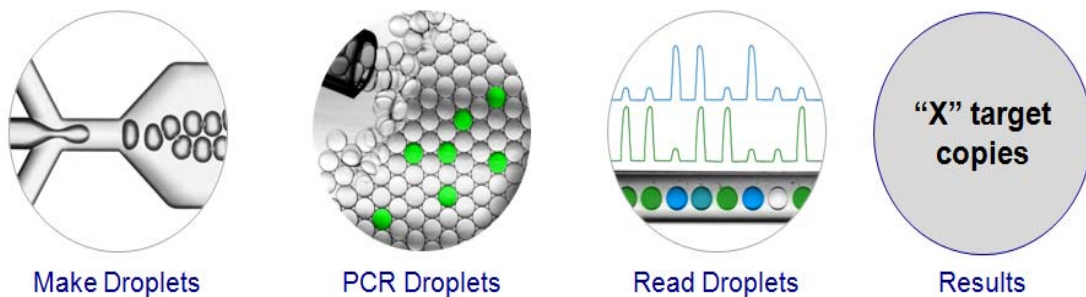


Figure 1-7. BioRad digital PCR의 전체적인 진행 과정



- 읽혀진 droplet 들은 digital 신호로 전환되며 positive signal의 경우 최소 한 개 이상의 표적 유전자를 포함하고 있으며 negative droplet간의 형광분포를 분석 프로그램상에서 분석하여 정량분석을 진행함

다) Application

- 실제 count 된 droplet은 분석 프로그램상에서 Poisson 분산 법칙에 따른 계산값으로 수정되어 표기됨 (Fig. 1-8).
- Poisson 분산 법칙은 시간, 면적 등 지정된 단위 구간에서 확률변수  $X$  (단위 사상의 발생 횟수)가 나타내는 분포로 단위구간을 아주 작은 미세 단위로 분할할 경우 두 개의 사건이 동시에 발생할 확률은 0에 가까워진다는 법칙으로 이는 작은 단위의 micro-droplet 안에 동시에 두 개 이상의 target 유전자가 분포할 확률 역시 0에 가깝다는 의미이며 결국 positive droplet은 하나의 target signal로 간주됨.
- 따라서 적절한 농도의 샘플은 후속적인 dilution 없이 실험 가능함.
- Q200은 200,000 copy에서 1 copy 까지 넓은 dynamic range와 높은 민감도를 가지고 있으며 copy number variation 분석은 물론 매우 낮은 빈도의 돌연변이 검출이 가능함.
- 특히 single cell analysis 등 극소량의 샘플에서 분석 가능한 민감도를 보유하고 식중독균의 초기 검출에 효과적인 대안이 될 수 있을 것 임.

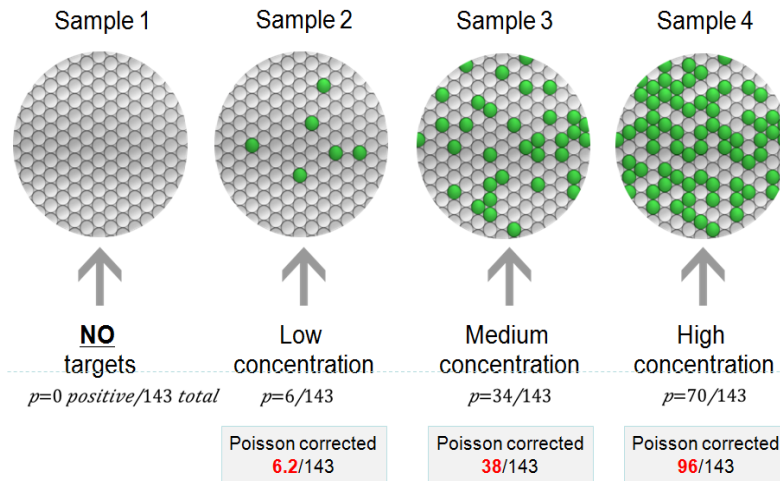


Figure 1-8. Poisson 분산 법칙에 따른 계산값으로 수정되어 표기되는 정량 표시 예

나. 초고속 PCR을 이용한 식중독균 검출

1) XXpress®

가) 특징



Figure 1-9. XXpress®의 외관 및 XXplate 투입구

- XXpress®는 현재 세계에서 가장 빠른 qPCR system으로 알려져 있다. 1초당 10°C의 빠른 램프 온도 상승 속도로, 10분 내에 40 cycle의 PCR 반응이 가능하므로 1시간에 약 5번의 실험이 가능함
- 극도로 낮은 열용량과 높은 전도성을 가진 XXpress만의 열 저항 시스템은 기존의 방법보다 램프 온도 상승 시간이 짧고, 시간적 측면에서 더 효율적임
- 형광신호를 감지할 수 있는 센서는 다섯 개의 채널로 구성되며 FAM, SYBR green, NED, TA, ROX, Texas Red 등의 다양한 형광물질을 감지할 수 있음 (Table 1-2).

Channel	Excitation (nm)	Emission (nm)	Common Dyes
Channel 1 - Blue	470	513 - 531	FAM/SYBR Green
Channel 2 - Green	530	569 - 588	NED/TA
Channel 3 - Amber	590	600 - 617	ROX/Texas Red
Channel 4 - Red	627	662 - 685	Cy 5
Channel 5 - Red	627	694 - 734	Cy 5.5

Table 1-2. XXpress®에 내재된 Fluorescence filter 종류

- XXpress®의 경우 PCR이 진행되는 동안 sample에 전달되는 온도는  $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 로 모든 sample에 걸쳐 균일하게 열전달이 가능하도록 고정밀 적외선 센서를 사용함

- 최종적으로 일반적인 qPCR과 같이 Ct value 및 melting curve도 확인 할 수 있으며 스크린을 통하여 바로 그래프와 Ct value 및 Threshold의 보정이 가능하다. 또한 터치 스크린을 적용하여 사용자의 편리함을 높이고, 결과 분석이 용이하도록 RDML 및 Excel 형식의 파일을 지원하고 있음
- XXpress®는 일반적인 Real-time PCR에 사용되는 probe와 master mix 등의 시약을 그대로 사용하여 PCR 작업을 수행할 수 있으며, 다양한 시약에 대한 호환성이 이미 테스트되었기 때문에 사용자에게 맞는 가장 적합한 시스템을 골라서 적용할 수 있음
- XXpress®는 기존의 probe 방법에 의한 Real-time PCR 반응 시간인 약 1시간 30분에 비하여 1시간 정도 절약된 30분 이내에 반응이 완료되고, SYBR green 방법 같은 경우, 기존 반응시간인 약 2시간 이상에 비하여 1시간 40분 이상 절약된 20분 이내에 반응이 완료됨

나) 실험 방법 및 조건



Fig 1-10. XXpress®를 수행하기 위한 준비 과정

- 측정하고자 하는 Sample DNA(S. Typhimurium), SensiFAST™ Probe Hi-ROX mix(Bioline, UK), primer, probe 등 PCR 반응에 필요한 물질을 준비하여 mixture 형태로 만들고, XXplate에 반응시키고자 하는 양을 넣었다. PCR 반응을 위한 성분 조건은 다음과 같다 (Table 1-3).

Reagent	Volume	Final Conc.
SensiFAST probe Hi-ROX mix (2X conc.)	10 $\mu$ l	2X
PCR Forward Primer(10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
PCR Reverse Primer(10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M
PCR probe(5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.25 $\mu$ M
Template (<100ng)	2 $\mu$ l	
dH2O(sterile distilled water)	6 $\mu$ l	
Total	20 $\mu$ l	

Table 1-3. XXpress® 수행에 사용된 PCR 성분 조건

- XXplate film을 XXplate 위에 얹고 미리 예열시켜 놓은 XXsealer를 이용하여 filme 을 plate에 밀착시킴
- XXplate 전용 원심분리기인 XXcentrifuge를 이용하여 spin down을 실시
- XXplate를 XXpress®에 넣고, 원하는 조건을 설정한 후, PCR을 수행한다. XXpress®의 조건은 다음과 같음

PCR step	Thermal condition	
Initial denaturation	95°C, 2 min	
Denaturation	95°C, 10 sec	Reps
Annealing / extension	60°C, 20 sec	40

Table 1-4. XXpress® 수행 온도 조건

다) XXpress® 결과

- XXpress® 수행 결과, 기존의 probe 방법을 이용한 Real-time PCR과 결과가 크게 상이하지 않음을 알 수 있었음

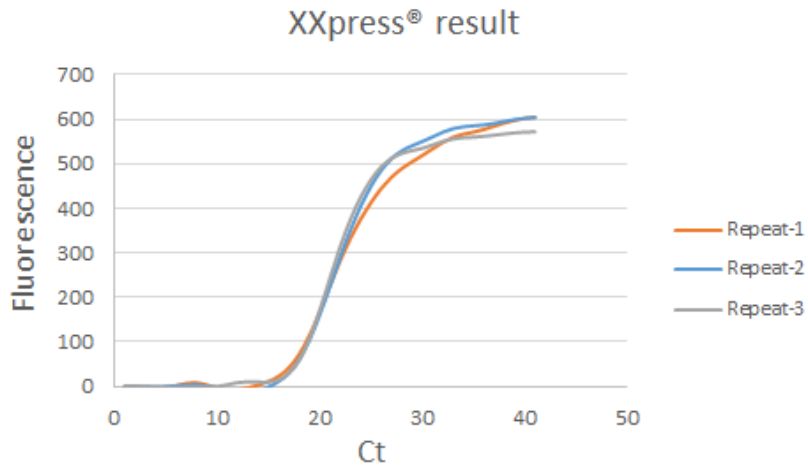


Figure 1-11. XXpress® 증폭 곡선

- 최종 PCR 진행 시간은 22분으로, 기존의 probe를 이용한 Real-time PCR 방법보다 PCR 반응 시간을 1시간 이상 단축시킬 수 있었다. 이와 같이 신속한 실험이 가능할 수 있다는 측면에서 식중독 균 신속 검출에 XXpress®를 적용해 볼 가치가 있음

2) Chromato strip을 이용한 신속 검출

가) Chromato strip의 구성

- Chromato strip의 구성은 Fig 1-12와 같으며, 각 각의 설명은 아래와 같음

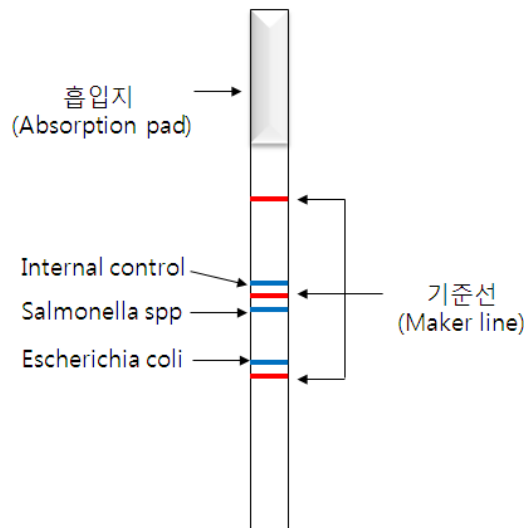


Fig 1-12. Chromato strip 구성

- 해당 박테리아의 특정 유전자 부분 (Salmonella spp의 경우 invA, Escherichia coli

의 경우 Shiga2)의 probe를(oligo nucleotide 40mer 길이) 제작하여 strip에 printing 하였음.

- 이들 박테리아 probe의 위치를 쉽게 구분하기 위해 3개의 기준선(marker line) 함께 printing하였음.
- Fig 1-12에서와 같이 두 번째 기준선 아래에 salmonella의 probe를 배치했으며, 세 번째 기준선 위 에 E coli. 의 probe를 배치하여 해당 박테리아의 존재 여부를 손쉽게 판단하도록 하였음.
- 또한 두 번째 기준선 바로 위에 다른 종의 유전자 (Human betta actin) probe도 함께 printing 하여 PCR 반응 자체의 이상 여부를 확인하기 위한 internal control로 사용하였음.
- 본 chromato strip은 PCR 반응 종료 후, strip을 PCR tube 속에 담그고, 반응산물들이 모세관 현상에 의해 strip을 따라 이동하면서 해당 probe와 반응하도록 구성 되어 있음. 따라서 반응산물들의 효율적인 흡입 및 이동이 매우 중요하며 이를 돕기 위해 strip 상단에 흡입지를(Absorption pad) 설치하였음

#### 나) Chromato strip의 원리

- 해당 박테리아의 타겟 유전자 부분을 증폭하기 위한 forward primer 와 reverse primer에는 발색(colorification) 및 교잡반응(hybridization)을 일으키기 위한 변형을 첨가하였음
- 즉 Forward primer의 5' 말단에는 biotin을 부착하였고, 이는 PCR 반응이 완결된 후, 표면에 streptavidin이 부착되어있는 blue latex와 반응시켜 결합하게 하기 위함 임
- 또한 Reverse primer의 5' 말단에는 40mer의 oligonucleotide를 부착하였음. 이는 chromato strip에 printing 되어 있는 probe와 hybridization을 일으키기 위함 임

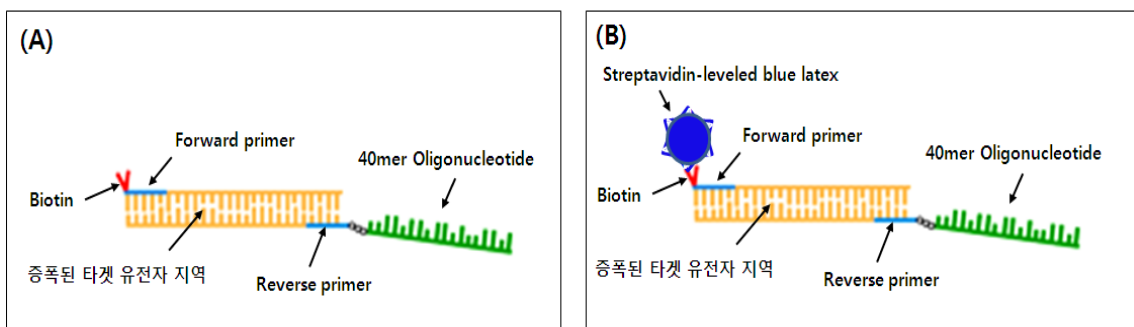


Figure 1-13. (A) PCR 반응 후 생성된 타겟 유전자의 증폭 형태 및 primer의 모식도 및 (B) PCR 생성물을 Blue latex와 반응시킨 후 얻은 최종 산물의 모식도

- PCR 반응 후, Fig 1-13 (B)와 같이 streptavidin이 부착된 blue latex를 첨가하고 일정시간 (5분) 반응시켜 biotin과 결합하게 하여 최종 산물을 생산한다.
- 이 최종 산물에 Fig 1-14과 같이 chromato strip을 담근 후 10분 경과 후 strip 상에 나타나는 밴드의 위치를 관찰하여 타겟 박테리아의 존재 여부를 결정하게 됨.
- 실제 PCR 반응 종료 후, 타겟 박테리아 유전자의 증폭을 확인하기 위해 PCR tube에 strip을 넣고 10여분 경과 후 strip 상에 생긴 band의 위치를 관찰하여 박테리아의 존재여부를 결정할 수 있음 (Fig 1-15).
- 이는 박테리아의 존재 여부를 확인하기 위해 일반적으로 사용하는 gel의 제작을 포함한 전기영동을 실시하지 않아도 되는 간편함을 제공함.

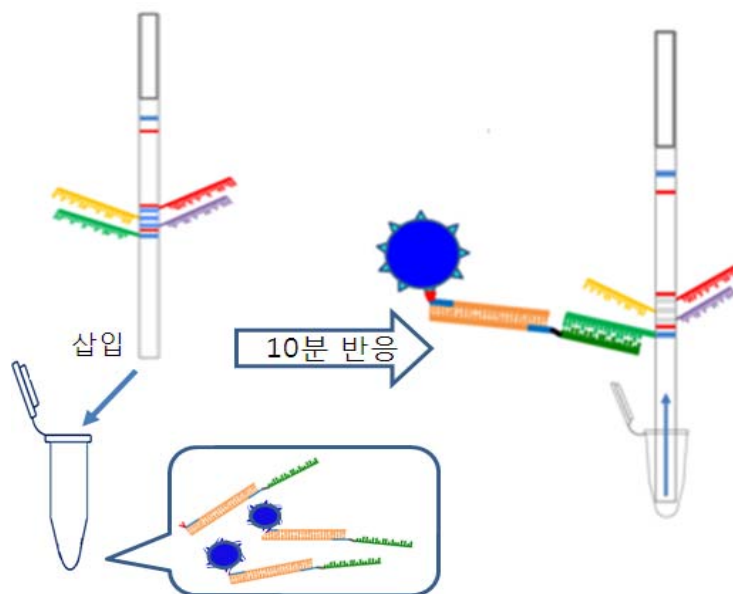


Figure 1-14. Chromato strip과 PCR amplicon의 반응 모식도

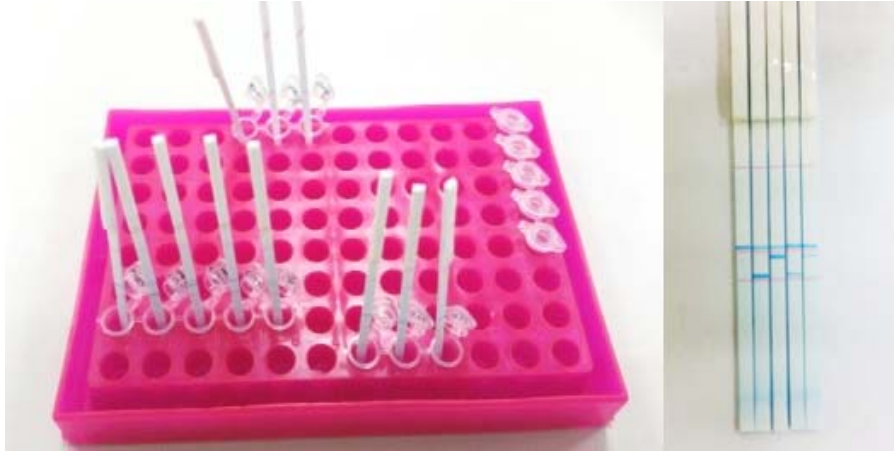


Figure 1-15. PCR 반응 생성물과 strip의 반응 및 해당 박테리아의 검출

## 2. 2장. 개발중인 방법 (Digital PCR 및 chromato strip)을 이용한 식중독균 검출 테스트

### 가. RainDrop의 타겟 식중독균의 검출 유효성 검증

#### 1) 실험 개요.

- 적은 양의 타겟 물질 (또는 유전자) 검출을 위해 개발된 digital PCR (RainDrop)의 유용성을 식중독균 검출에 적용 가능한지 검증 하는 실험.
- 유용성 검증을 위하여 target plasmid를 제작
- Target plasmid는 Salmonella Typhimurium, 및 E. coli 의 특정부위에 해당되는 DNA (200~400bp 길이) fragment가 삽입되도록 제작
- Target plasmid는 serial dilution을 통하여 일정 범위의 copy number를 갖는 target plasmid set을 준비
- Serial dilution을 위하여 internal control (human beta actin gene) DNA fragment가 삽입된 control plasmid를 제작하여 target plasmid의 회색에 사용함
- 이들 target plasmid set을 RainDrop을 이용하여 copy수 증감에 따른 장비의 검출 상관관계를 관찰 하고자 함

#### 2) 실험 방법

##### 가) 시료의 준비

- pUC57 plasmid에 human beta actin gene fragment를 삽입하여 control plasmid로 제작
- pUC57 plasmid에 Salmonella Typhimurium, 및 E. coli 의 타겟 부위에 해당되는 gene fragment를 삽입하여 박테리아 타겟 plasmid로 제작
- Control plasmid : 박테리아 target plasmid 의 비율이 100: 1의 비율로 첫 번째 시료를 준비
- 첫 번째 시료를 다시 control plasmid solution으로 10-fold serial dilution을 실



시하여 mutant type의 양을 10배씩 감소시켜 총 4종류의 set을 마련함.

- primer & probe design
- 각 박테리아의 해당 유전자 증폭을 위한 primer 와 probe set을 디자인 함 (Table 2-1.)

Species	Gene	Sequence (5' - 3')
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	ces-F	TATGCCCCGTTCTCAAACCTG
	ces-R	CGCCGAAAGTGATTATACCAA
	probe	FAM-GGGAAAATAACGAGAAATGCA-TAMRA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6994	fem-F	AATAATAACGAGGTCATTGCAGCTT
	fem-R	TGGACCGCGATTTGAATAAAA
	probe	FAN-CTTACTTACTGCTGTACCTGTT-TAMRA
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 19585	invA-F	GCGTTCTGAACCTTTGGTAA
	invA-R	CGTTCGGGCAATTTCGTTA
	probe	FAM-TGGCGGTGGGTTTTGTTGTCTTCT-TAMRA
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 19585	stx2-F	ATTAACCACACCCCACCG
	stx2-R	GTCATGGAACCGTTGTCAC
	probe	FAM-CAGTTATTTTGGCTGTGGATATACGAGGGCTTG-TAMRA

Table2-1. Digital PCR을 위한 각 박테리아 해당 유전자 증폭을 위한 primer 와 probe

- 이들 시료를 RainDrop digital PCR 을 실시하여 internal control 및 target plasmid 의 숫자 변화의 상관관계를 관찰함.

나) RainDrop run

- Source run
  - 샘플은 총 4개, probe는 Internal control (VIC)과 target (FAM)을 사용하였으며, 최대 10M개의 droplet이 생성됨.
  - Table 2-2와 같이 PCR reaction mix를 혼합하여 50 uL 의 reaction mix를 source chip의 각 well에 loading 후, chip을 source 장비에 장착하여 droplet을 생성.

Reagent Mix	Per Reaction	Company
Taqman Genotyping Master Mix	1X	Life Tech.
25X Drop stabilizer	1X	RainDance
TaqMan probe	200 nM	Life Tech.
Primer	350 nM	Life Tech.

DNase/Rnase-free sterile water	Bring to volume	
template		
Total volume	50 uL	

Table 2-2. RainDrop PCR reaction Mix

- 생성된 droplet을 이용하여 Endpoint PCR을 Table 2-3과 같은 조건으로 실시

Step	Temp	Time	Cycles
Polymerase activation	95 °C	10 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing & Extension	58 °C	1 min	
Final Hold	98 °C	10 min	1
Cool down and storage	12 °C	Hold	

Table 2-3.. RainDrop endpoint PCR 조건

○ Sense Run

- PCR 반응이 끝난 8 strip PCR Tube를 sense 장비에 옮김
- sense chip을 장착한 후 droplet counting 및 형광 signal 을 분석함

1) 실험 결과

- Control plasmid는 모든 샘플에서 일정한 수치로 관찰되었음 (Fig 2-1, Table 2-4)
- Salmonella Typhimurium, 및 E. coli plasmid는control plasmid 와의 serial dilution의 결과에 따라 유사한 비율로 감소하는 수치를 보여 줌 (Fig 2-1과 Table 2-4)
- 100 배 희석을 통해 관찰된 결과를 기준으로 10개 이상의 target copy가 존재하면 이를 충분히 식별 할 수 있을 것으로 판단 됨

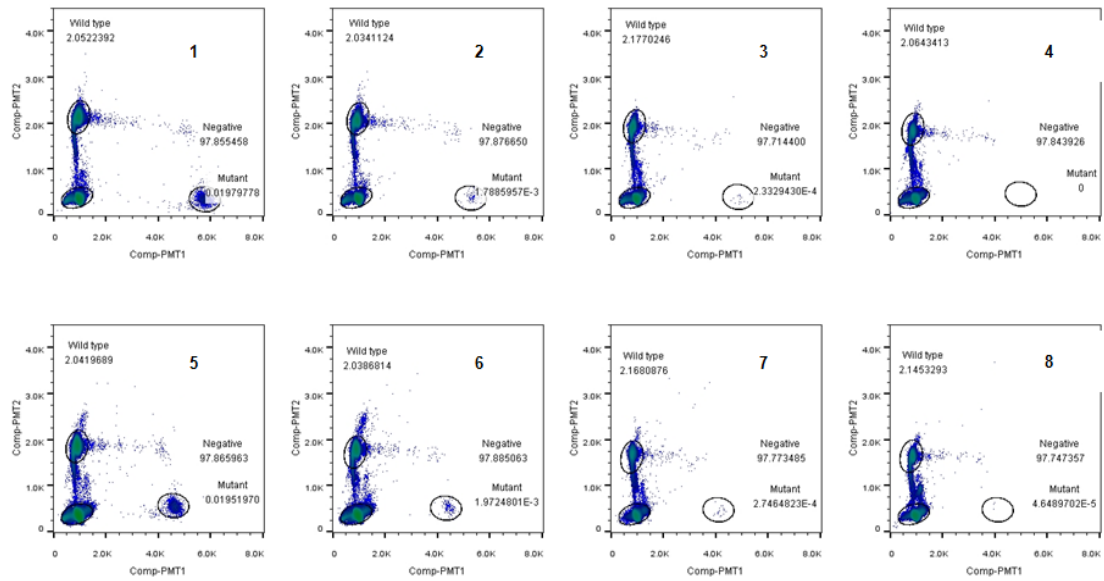


Fig 2-1. RainDrop target gene counting graph: Y축에 위치한 원안에 존재하는 점들은 control plasmid의 counting 결과에 해당하며, X축에 위치한 원안에 존재하는 점들은 target plasmid counting 결과임. 1-4; *salmonella*, 5-8; *E. coli*

Wells	sample	Intact count	Target plasmid	Control Plasmid
1	<i>salmonella</i>	6894713	1365	141496
2	<i>salmonella</i> 10x희석	6261896	112	127374
3	<i>salmonella</i> 100x희석	6429647	15	139975
4	<i>salmonella</i> 1000x희석	7336529	0	151451
5	<i>E. coli</i>	7684544	1500	156916
6	<i>E. coli</i> 10x희석	7300454	144	148833
7	<i>E. coli</i> 100x희석	6917940	19	149987
8	<i>E. coli</i> 1000x희석	6453042	3	138439

Table 2-4. RainDrop을 통한 *salmonella* (샘플 1-4) 및 *E. coli* (샘플 5-8) 검출 한도 관찰

#### 나. RainDrop에서 식중독균 gDNA의 검출 확인

##### 1) 실험 개요.

- Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella Typhimurium, 및 E. coli 박테리아를 각 액상 배지에 접종하여 37°C 에서 shaking (250 rpm)하며 충분한 시간 동안 배양
- 각 액의 배양액에서 박테리아를 원심분리하여 gDNA를 추출 (NucleoSpin Tissue

- XS 사용, MN, Germany)하여 농도 및 순도 측정  
 ○ 한 샘플당 gDNA농도는 100 pg을 실험에 사용.

2) 실험 방법

가) 시료의 준비

- Primer & probe는 선행 실험에서 사용한 것을 같이 사용.
- Internal Control plasmid는 각각의 target DNA에 1: 100이 되도록 spike in 하여 샘플을 준비 함.

나) RainDrop run

- Source run
  - 샘플은 총 5개, probe는 Interanl contorl (VIC)과 target (FAM)을 사용하였으며, 최대 10M개의 droplet이 생성됨.
  - Table 2-5와 같이 PCR reaction mix를 혼합하여 50 uL 의 reaction mix를 source

Reagent Mix	Per Reaction	Company
Taqman Genotyping Master Mix	1X	Life Tech.
25X Drop stabilizer	1X	RainDance
TaqMan probe	200 nM	Life Tech.
Primer	350 nM	Life Tech.
DNase/Rnase-free sterile water	Bring to volume	
template	1 ng	
Total volume	50 uL	

Table 2-5. RainDrop PCR reaction Mix  
 chip의 각 well에 loading 후, chip을 source 장비에 장착하여 droplet을 생성.

Step	Temp	Time	Cycles
Polymerase activation	95 °C	10 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing & Extension	58 °C	1 min	
Final Hold	98 °C	10 min	1
Cool down and storage	12 °C	Hold	

Table 2-6. RainDrop endpoint PCR 조건

- 생성된 droplet을 이용하여 Endpoint PCR을 Table 2-6과 같은 조건으로 실시.

○ Sense Run

- PCR 반응이 끝난 8 strip PCR Tube를 sense 장비에 옮김.
- sense chip을 장착한 후 droplet counting 및 형광 signal 을 분석함.

3) 실험 결과

- Internal control과 target gene의 비율은 100 : 1 정도 이며, 결과 상 99 : 1 로 근접한 값으로 확인 되었음. (Fig2-2 와 Table 2-7)
- Bacillus 및 E. coli 샘플에서 droplet의 수가 다른 샘플들에 비하여 낮게 관찰 되었으나, 이는 PCR 과정의 Evaporation으로 생각되어짐.

Sample name	intact drops	Internal control	Target gene
-------------	--------------	------------------	-------------

NTC	8512632	0	0
Bacillus	6124457	829	79
Staphylococcus	8326116	1502	144
Salmonella	8313253	1733	141
E. coli	7882764	901	87

Table 2-7. RainDrop을 통한 식중독 균의 검출

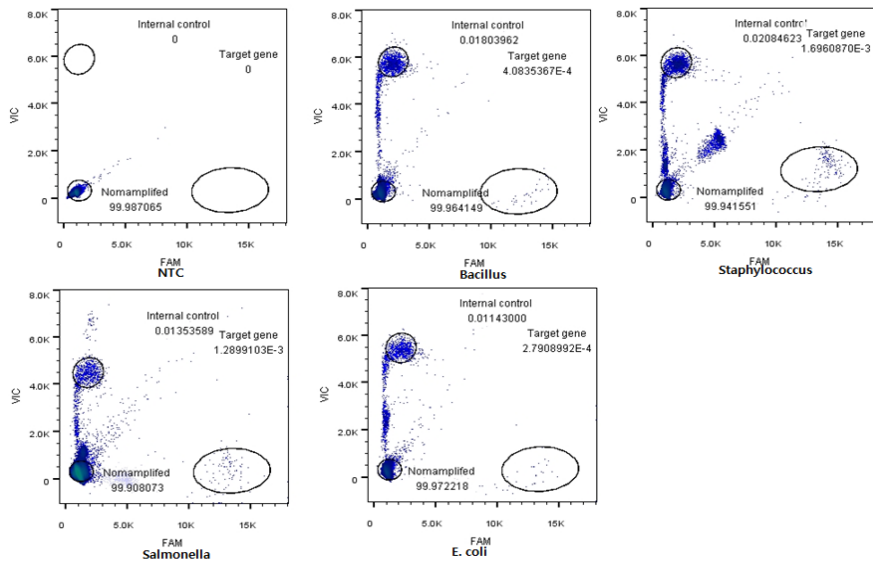


Fig 2-2. RainDrop을 이용한 100 pg의 식중독균의 검출

### 1) 논의 사항

- Digital PCR을 이용한 실험에서 RainDrop의 경우, 8개 샘플 검사를 위한 droplet을 생성하는데 30분 정도의 시간이 소요되며 이렇게 만들어진 droplet의 개수는 reaction volume에 따라서  $5 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$  으로 만들 수 있음
- 이렇게 만들어진 droplet은 sense로 옮긴 뒤 signal을 detection 하는데, 1 well 당 약 30분의 시간이 소요되며, 8개 well을 다 확인 할 경우 약 4시간 소모 됨
- 8샘플에 대한 식중독균 검사의 경우, droplet의 generation, PCR, Sense의 reading까지 총 9시간의 시간이 사용 됨
- 검출 한계에서는 무척 뛰어난 platform 이지만, 반응시간이 상대적으로 길게 소요되어 신속 검출 진단법 개발에는 고려해야 할 사항이라 판단 됨

### 다. QX200의 타겟 식중독균의 검출 유효성 검증

#### 1) 실험개요

- QX200을 이용하여 4가지의 타겟 물질 (Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella Typhimurium, 및 E. coli) 검출을 위한 QX200의 유효성을 검증 함
- 이를 위해 디자인한 Primer 및 probe의 검출 효율 및 기능을 테스트 함

#### 2) 실험 방법

가) 시료의 준비

- Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella Typhimurium, 및 E. coli 박테리아를 각 액상 배지에 접종하여 37°C 에서 shaking(250 rpm)하며 충분한 시간 동안 배양함
- 각 액상 배양액에서 박테리아를 원심분리하여 gDNA를 추출 (NucleoSpin Tissue XS 사용, MN, Germany)하여 농도 및 순도 측정
- 시료 각 20 ng를 사용하여 QX200이 테스트를 위한 template로 사용하였음

나) QX200 work flow (Fig 2-3)

- Partitioning; PCR master mix (1x), target primer (200 nM final concentration), template (20 ng)을 혼합 한 후 Droplet generator에 넣어 partitioning을 통해 droplet을 생산해 냄. 이때 생산되는 droplet의 수는 15,000~20,000 개 정도가 생산 됨
- Thermal cycle; 생산된 droplet을 PCR 장비로 옮겨 PCR 반응을 일으킴
- Count; PCR 반응이 완료된 droplet들을 droplet reader에 넣어서 signal을 확인.

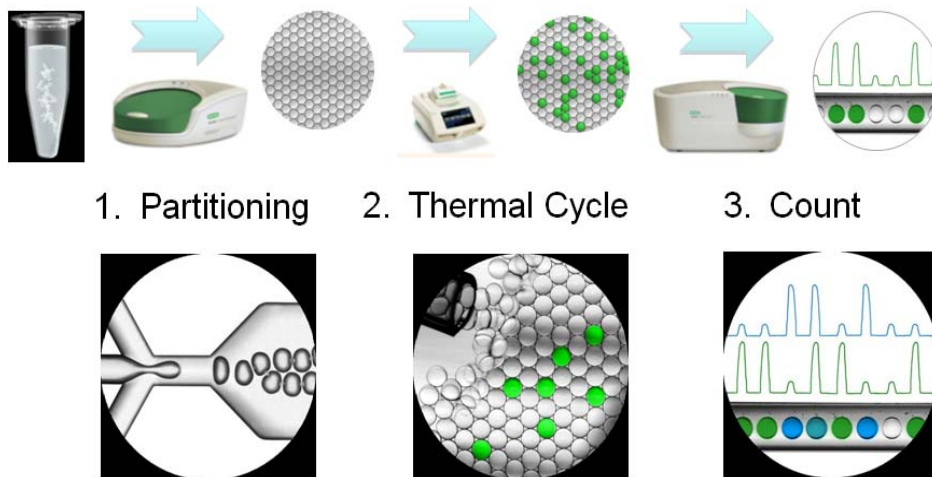


Figure 2-3. QX200의 work flow

- Thermal cycle 단계를 위한 digital PCR mix를 Table 2-8와 같이 제작함.

Reagent Mix	Per Reaction	Company
QX200 Evagreen master mix	1X	Bio-rad
Primer	200 nM	Bioneer
DNA template	20 ng	
DNase/Rnase-free sterile water	Bring to volume	
Total volume	20 uL	

Table 2-8. Digital PCR reaction mix

○ Thermal cycle 단계의 End PCR 반응 조건은 Table 2-9과 같이 구성하여 PCR을 진행 함

Step	Temp	Time	Cycles
Polymerase activation	95 °C	10 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	40
Annealing / Extension	58 °C	1 min	
Signal stabilization	4 °C	5 min	1
	90 °C	5 min	1
Cool down and storage	4 °C	Hold	

Table 2-9. QX200 Endpoint PCR 조건

○ QX 200 Digital PCR에 사용된 primer 정보는 아래 Table 2-10 와 같음

Species	Gene	Sequence (5' - 3')
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	hem-F	CTGTAGCGAATCGTACGTATC
	hem-R	TACTGCTCCAGCCACATTAC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6994	nuc-F	GCGATTGATGGTGATACGG
	nuc-R	CAAGCCTTGACGAACTAAAGC
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 19585	HTO-F	ACTGGCGTTATCCCTTTCTCTGGTG
	HTO-R	ATGTTGTCCTGCCCTGGTAAGAGA
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 19585	stx2-F	GGCACTGTCTGAACTGCTCC
	stx2-R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG

Table 2-10. QX 200 을 위한 박테리아 PCR primer set

3) 실험 결과

가) Bacteria gDNA 농도의 확인

- Picogreen fluorescence 방법을 이용하여 농도 측정
- control 물질을 이용하여 standard curve를 작성한 후 이를 농도 측정에 사용함 (Table 2-11)

나) Bacteria 타겟의 증폭 검출 확인

Standard 측정치		평균	평균-blank	Concentration (ng/uL)
98930	94708	96819	96698	50.0000
45984	45950	45967	45846	25.0000
20494	20669	20582	20461	12.5000
10613	10395	10504	10383	6.2500
5045	5057	5051	4930	3.1250
2308	2602	2455	2334	1.5625
134	108	121	0	0.0000

식중독균 sample 농도 측정값

N0.	Sample		평균	평균-Blank	Con. (ng/ul)	final Con. (ng/ul)
E. coli	148989	136093	142541	142420	71.99	719.93
Salmonella	141447	128078	134763	134642	68.10	681.03

Table 2-11. standard curve 작성 및 식중독균 (*Salmonella* 및 *E. coli*) gDNA 의 농도 측정

- 20 ng gDNA 를 template로 하여 digital PCR을 진행했으며, 타겟이 존재하는 droplet으로 threshold (그래프 상의 분홍색 선) 이상의 형광값을 보이며 positive 구분되어 그 숫자들이 계산됨
- 이들 숫자들은 반응에 사용한 reaction volume을 고려하여 단위 volume 당 숫자로 표현되어 타겟의 copy수를 계산해 줌

다) Bacillus cereus validation 결과

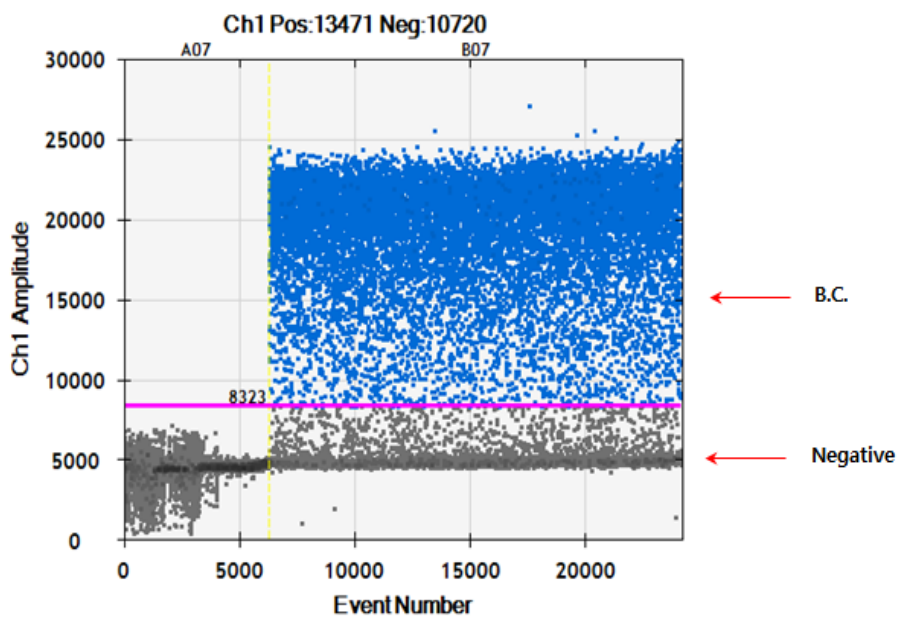


Figure 2-4. QX200을 사용하여 Bacillus 확인.



Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uL Well	Positives	Negatives	Accepted Droplets
A07 (NTC)	0	0	0	6336	6336
B07 (B.C.)	1652	33040	13471	4384	17855

Table 2-12. QX200을 이용한 *Bacillus cereus* 의 counting 결과

라) *Staphylococcus aureus*의 validation 결과

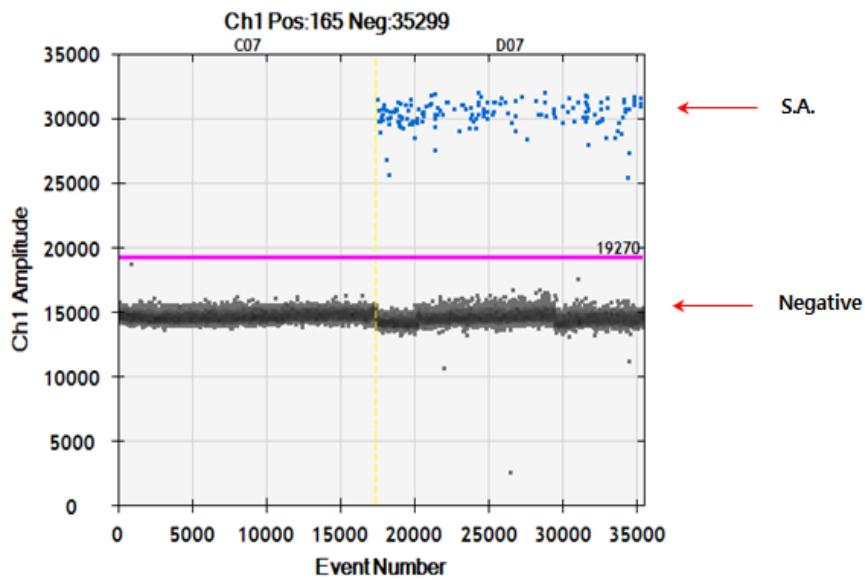


Figure 2-5. QX 200을 이용한 *Staphylococcus aureus*의 확인

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uL Well	Positives	Negatives	Accepted Droplets
C07 (NTC)	0	0	0	17471	17471
D07 (S.A.)	10.8	216	165	17828	17993

Table 2-13. QX200을 이용한 *Staphylococcus aureus* 의 counting 결과

마) *Salmonella Typhimurium* 의 validation 결과

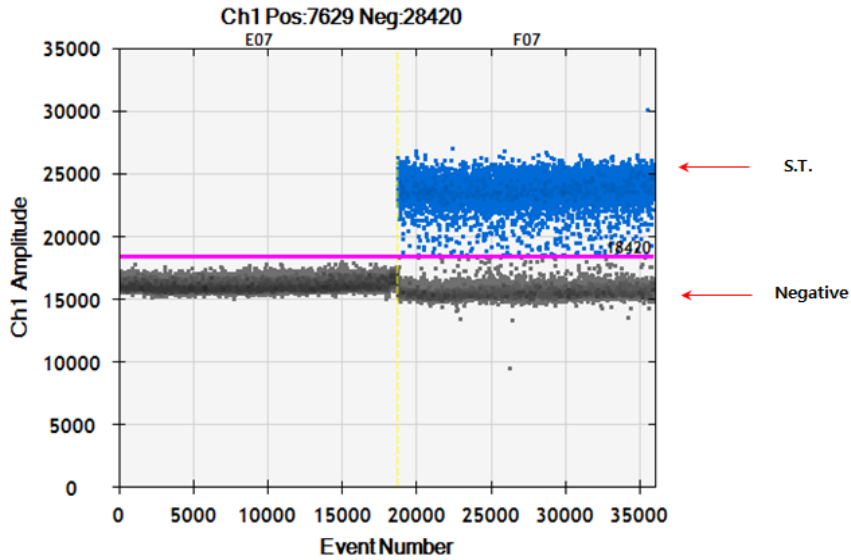


Fig 2-6. QX 200을 이용한 *Salmonella* Typhimurium의 확인

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uL Well	Positives	Negatives	Accepted Droplets
E07 (NTC)	0	0	0	18792	18792
F07 (S.T.)	687	13740	7629	9628	17257

Table 2-14. QX200을 이용한 *Salmonella* Typhimurium의 counting 결과

바) *E. coli* 의 validation 결과

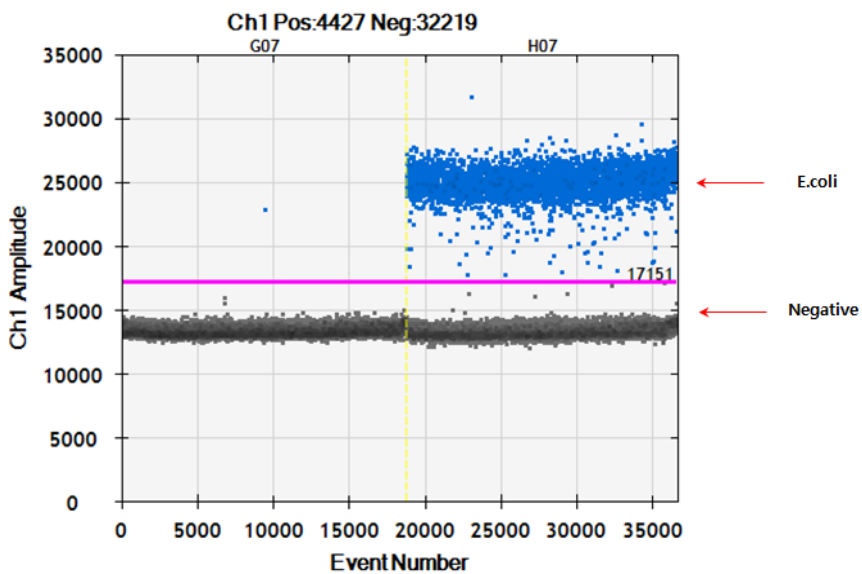


Figure 2-7. QX 200을 이용한 *E. coli*의 확인

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uL Well	Positives	Negatives	Accepted Droplets
G07(NTC)	0.06	1.2	1	18823	18824
H07(E. coli)	336	6720	4426	13396	17822

Table 2-15. QX200을 이용한 *E. coli* counting 결과

4) 논의 사항

- QX200 실험의 경우 최대로 만들어질 수 있는 한 well당 droplet을 생성하는데 2분 정도의 시간이 소요되며, 이렇게 만들어진 droplet의 수는 최대 20000개, 한 샘플을 reading 하여 signal을 detection 하는데 걸리는 시간도 한 well당 2 분 정도 소요됨.
- 만약 8개의 샘플을 사용하여 droplet을 만들고 PCR을 수행, signal detection 하는데 걸리는 시간은 약 2시간 40분 정도 사용되어지며, RainDrop을 이용하여 너무 많은 droplet을 만드는 것 보다 적당한 droplet을 만들어 시간을 단축시키는 platform인 QX200이 이 실험을 위해서는 더 적당한 것으로 사료됨.
- 심층 실험을 통해 QX200의 적합성을 증명하기 위해 다음 단계의 실험을 진행 함

라. QX200 심층 테스트를 위한 식중독균 검출 한계 테스트

1) 실험개요

- 선행실험을 통해 QX200을 이용하여 4가지의 타겟 식중독균 (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, 및 *E. coli*) 검출을 위한 장비의 유용성을 확인하였음.
- 또한 타겟 식중독균 검출을 위한 digital PCR primer 및 probe의 효율을 검증하였고 이를 바탕으로 QX200 digital PCR 장비의 타겟 식중독균에 대한 검출 한계를 규정하려 함.
- 검출한계 규정을 위해 타겟 식중독균의 gDNA 농도를 serial dilution 하여 pg 이하 까지 QX200의 sensitivity를 관찰하고자 함.

2) 실험 방법

가) 시료의 준비

- *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, 및 *E. coli* 박테리아를 각 각 액상 배지에 접종하여 37°C 에서 shaking(250 rpm)하며 충분한 시간 동안 배양함
- 각 각의 배양액에서 박테리아를 원심분리하여 gDNA를 추출 (NucleoSpin Tissue XS 사용, MN, Germany)하여 농도 및 순도 측정
- 또한 첫 번째 시료를 사용하여 10-fold serial dilution을 실시하여, DNA농도를 10 배씩 감소시킴.(즉 각각의 샘플의 DNA는 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng,

0.001 ng, 0.0001 ng의 6개 point를 마련 함)

나) QX200 work flow 및 Digital PCR 조건은 선행 실험과 동일하게 진행.

○ 다만 template의 양을 10 ng, 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, 0.001 ng, 0.0001 ng의 6개 point를 마련 함

3) QX200 digital PCR의 검출 한계 결과

가) *E. coli* 균에서 검출한계 확인 실험

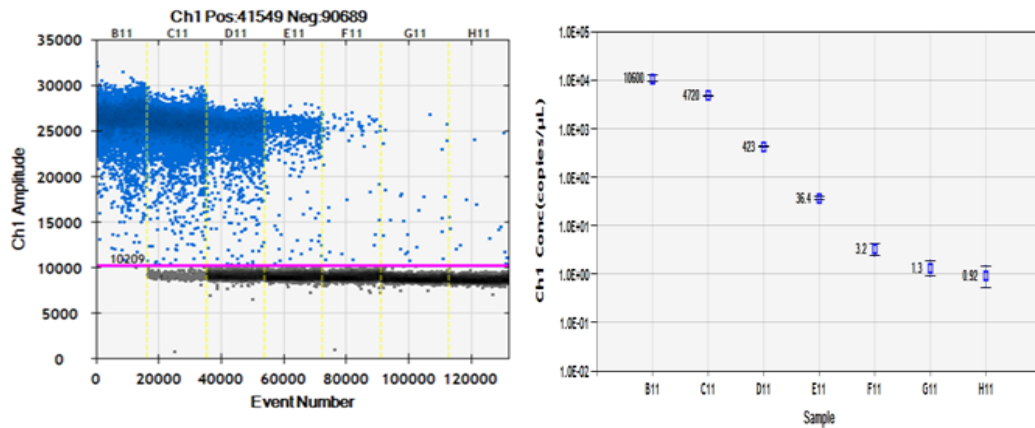


Figure 2-8. QX 200을 이용한 *E. coli*의 검출 한계

○ DNA의 serial dilution에 의한 농도가 1/10씩 감소하는 경향성을 보이며,

○ 100fg/ul까지도 detection이 확인 됨.

○ 100 fg의 *E. coli* gDNA는 *E. coli* genome size(4 x 10<sup>6</sup> base pair) 로 계산 하면 *E. coli* 10 ~ 20 마리에 해당되는 수치임.

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
B11(10ngl)	10600	212000	16604	2	16606
C11(1ng)	4720	94400	18722	345	19067
D11(100pg)	423	8460	5568	12876	18444
E11(10pg)	36.4	728	564	17960	18524
F11(1pg)	3.2	64	52	18871	18923
G11(100fg)	1.3	26	24	21551	21575
H11(NTC)	0.92	18.4	15	19084	19099

Table 2-16. QX200을 이용한 *E. coli* counting 결과

나) *Salmonella* Typhimurium (ATCC 19585) 균에서 검출한계 확인 실험

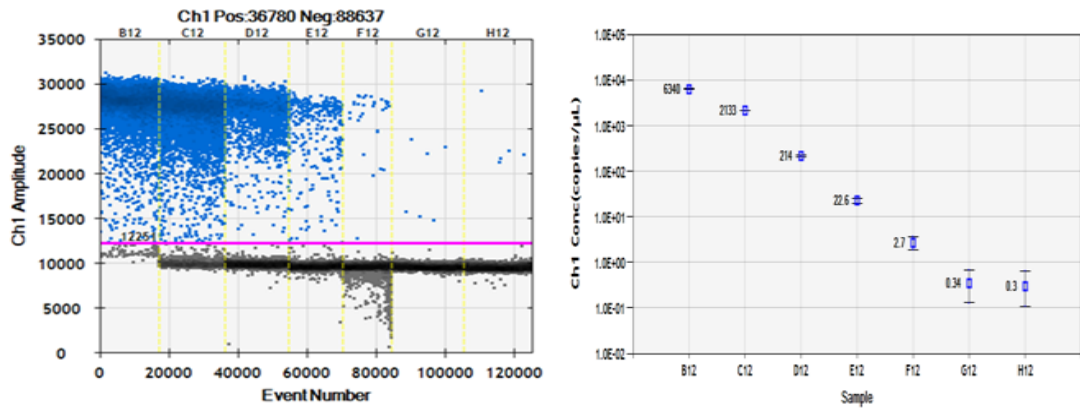


Figure 2-9. QX 200을 이용한 *salmonella*의 검출 한계

○ DNA의 serial dilution에 의한 농도가 1/10씩 감소하는 경향성을 보이며, 1pg/uL 까지도 detection이 확인 됨.

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
B12(10ng)	6340	126800	17397	80	17477
C12(1ng)	2133	42660	15949	3108	19057
D12(100pg)	214	4280	3095	15530	18625
E12(10pg)	22.6	452	296	15271	15567
F12(1pg)	2.7	54	32	14053	14085
G12(100fg)	0.34	6.8	6	20915	20921
H12(NTC)	0.3	6	5	19680	19685

Table 2-17. QX200을 이용한 *Salmonella* Typhimurium counting 결과

다) *Bacillus cereus*균에서 검출한계 확인 실험

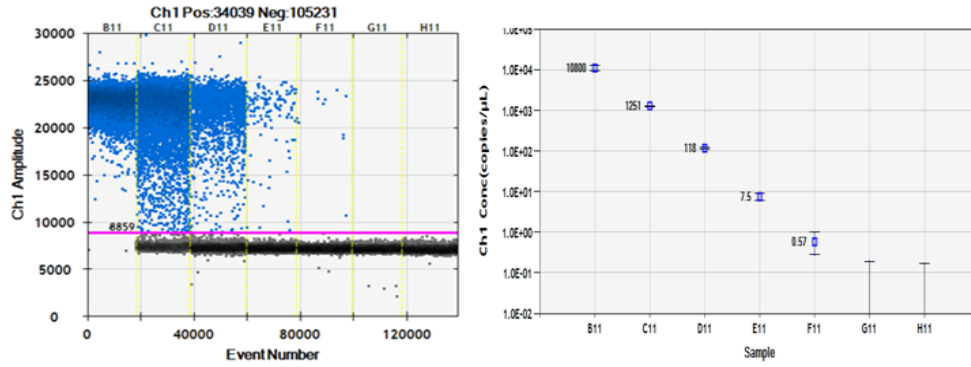


Figure 2-10. QX 200을 이용한 *Bacillus*의 검출 한계

- DNA의 serial dilution에 의한 농도가 1/10씩 감소하는 경향성을 보이며, 1pg 까지 detection이 확인 됨.

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
B11 (10ng)	10800	216000	18659	2	18661
C11 (1 ng)	1251	25020	13229	6974	20203
D11 (100pg)	118	2360	2020	19074	21094
E11 (10pg)	7.5	150	121	18826	18947
F11(1 pg)	0.57	11.4	10	20705	20715
G11(100fg)	0	0	0	18919	18919
H11 (NTC)	0	0	0	20731	20731

Table2-18. QX200을 이용한 *Bacillus* counting 결과

라) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6994)균에서 검출한계 확인 실험

- gDNA을 이용하여 10ng부터 10-fold serial dilution 하여 실험에 사용하였음

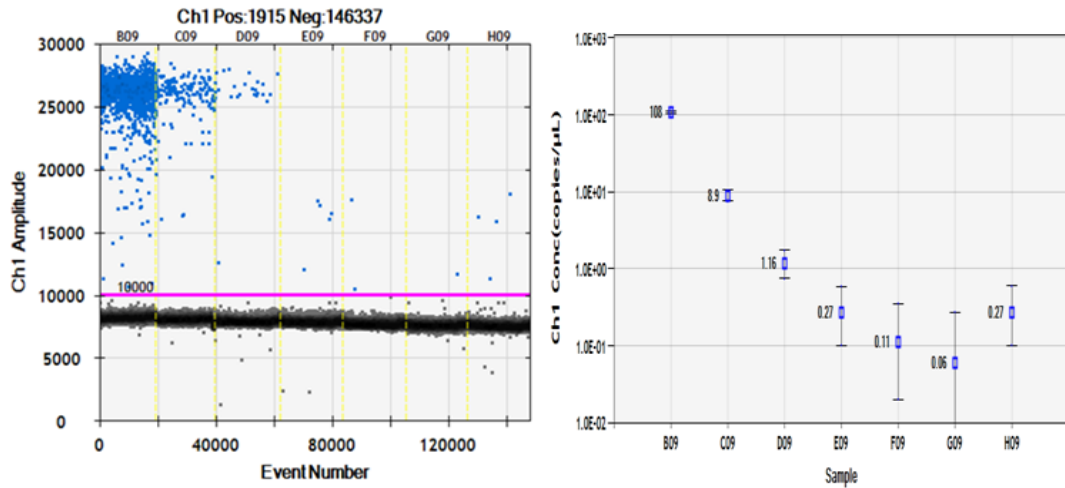


Figure 2-11. QX 200을 이용한 *Staphylococcus*의 검출 한계

○ DNA의 serial dilution에 의한 농도가 1/10씩 감소하는 경향성을 보이며, 100fg/ul까지도 detection이 확인 됨

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
B09(10ng)	108	2160	1725	17888	19613
C09(1ng)	8.9	178	155	20298	20453
D09(100pg)	1.16	23.2	22	22262	22284
E09(10pg)	0.27	5.4	5	21758	21763
F09(1pg)	0.11	2.2	2	21679	21681
G09(100fg)	0.06	1.2	1	20987	20988
H09(NTC)	0.27	5.4	5	21465	21470

Table 2-19. QX200을 이용한 *Staphylococcus* counting 결과

마. QX200 심층 테스트를 위한 Multiplex test run

1) 실험 개요

- QX 200 digital PCR의 장점 중에 하나인 multiplex 방법은 target 유전자의 primer의 농도를 다르게 하여 한 well에서 확인 할 수 있는 방법
- 여러 개의 target gene을 한 well에서 확인하게 되면 식중독균 검출 진단키트의 단가에도 영향을 줄 수 있음.

- *E. coli*와 *Bacillus*의 multiplex PCR 그리고 *Salmonella*와 *Staphylococcus*의 multiplex PCR 가능성을 테스트 해 봄

2) 시료의 준비

- 4 종의 샘플 (*Bacillus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*)의 gDNA를 각각 50 ng으로 normalization 하여 pooling 하여 사용하였음
- gDNA농도를 높인 이유는 *Staphylococcus*의 결과에서 positive droplet의 counting 수가 다른 샘플들에 비하여 낮아서 이를 개선하기 위함이었음

3) Multiplex 테스트 결과

가) *E. coli* 와 *Bacillus*의 multiplex test :

- 본 multiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- *Bacillus* primer 농도는 최종반응 시료상태에서 50 nM, 그리고 *E. coli*는 300 nM 이 되도록 조절함.

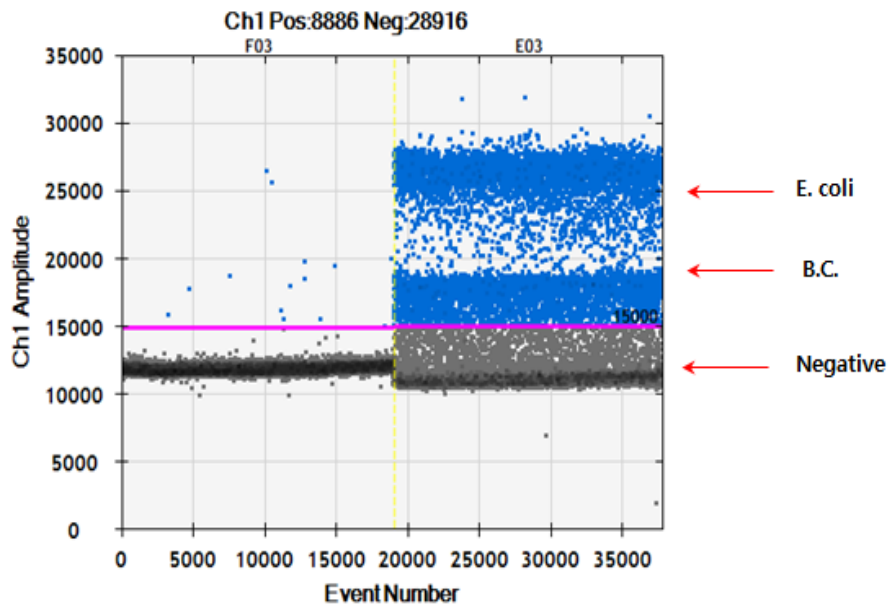


Figure 2-12. Digital PCR (QX 200)을 이용한 *E. coli* 와 *Bacillus*의 multiplex test 실험.

- Fig 2-12에서 볼 수 있는 것처럼 *E. coli*와 *Bacillus*의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (*E. coli* 25,000 ~ 28,000, *Bacillus* 15,000 ~ 19,000)가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인하였음.



Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
F03 (NTC)	0.92	18.4	15	19104	19119
E03 (B.C)	758	15160	8871	9812	18683

Table 2-20. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *Bacillus* counting 결과

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
F03 (NTC)	0.18	3.6	3	19116	19119
E03 (E. coli)	381	7620	5172	13511	18683

Table 2-21. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *E. coli* counting 결과

나) *Salmonella*와 *Staphylococcus*의 multiplex test :

- 본 mutiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- *Staphylococcus* primer 농도는 최종반응 시료상태에서 350 nM, 그리고 *Salmonella* 는 200 nM 이 되도록 조절함.

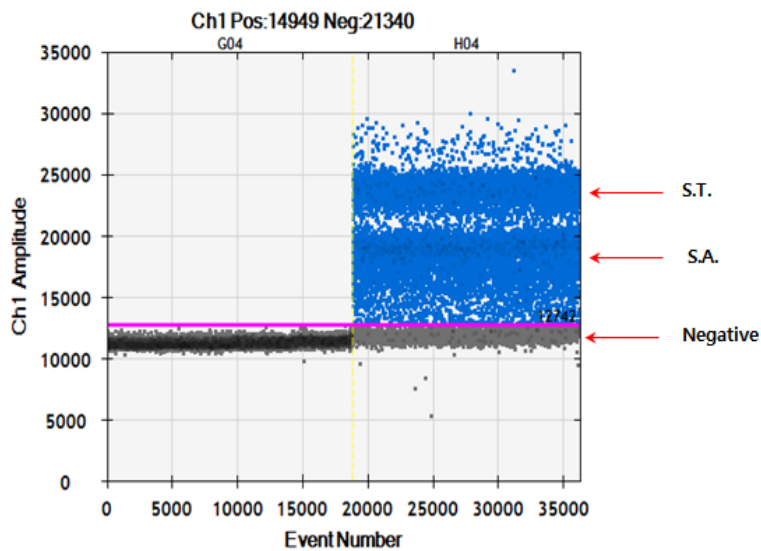


Fig 2-13. Digital PCR (QX 200)을 이용한 *Staphylococcus* 와 *Salmonella*의 multiplex test 실험.

○ Fig 3-6에서 볼 수 있는 것처럼 *Staphylococcus* 와 *Salmonella* 의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (*Staphylococcus* 21000 ~ 29500, *Salmonella* 12242 ~ 21500)가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인하였음.

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
G04(NTC)	0.06	1.2	1	18882	18883
H04(S.A)	2303	46060	14948	2458	17406

Table 2-22. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *Staphylococcus* counting 결과

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
G04(NTC)	0	0	0	18883	18883
H04(S.T)	427	8540	5300	12106	17406

Table 2-23. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *Salmonella* counting 결과

#### 4) 논의 사항

- 현재 4개의 target 유전자 중에서 2 개의 유전자의 multiplex 가능성을 확인 하였고, 이에 따라 앞으로 4개의 유전자의 multiplex까지 가능하게 되면, 식중독균 검출 진단 키트의 단가 및 활용성이 높아질 수 있음
- 비록 4개 종류의 식중독균을 단 한번의 PCR로 검출해내지 못해도 현재 2개 식중독균의 multiplex도 충분히 반응 단가와 시간을 줄이기에 충분하리라 판단 됨

### 바. Chromato strip을 이용한 현장 검출 시스템 가능성 테스트

#### 1) 실험 개요.

- 가) 식중독균 검출 시간 단축 및 식중독균 현장 검출 시스템 (on site screening test system) 개발의 가능성 여부를 알아보기 위하여 본 테스트를 실시함
- 나) AMR사 (Advanced Micoorganism Research, Japan)에 customized chlomato strip을 주문 제작하여 이를 이용하여 현장형 검출 시스템의 가능성을 확인 하고자 함

#### 2) Chromato strip의 구성 및 원리

- 가) Chromato strip의 구성 (Fig 2-14)과 반응 원리 (Fig 2-15)에 대한 설명은 “1 장. 식품에서 식중독균 검출 방법 및 kit 분석’ 중 “마. Chromato strip을 이용한 신속 검출”에서 자세히 설명 하였음.

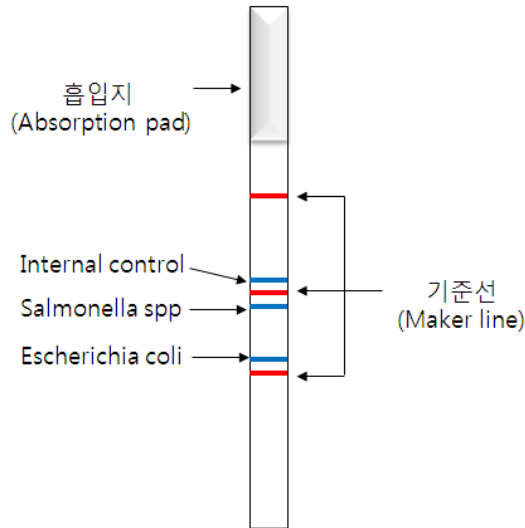


Figure 2-14. Chromato strip 구성

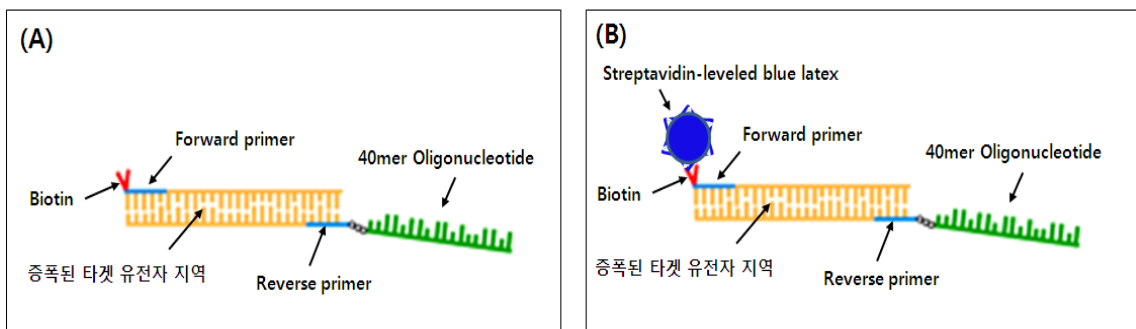


Figure 2-15. (A) PCR 반응 후 생성된 타겟 유전자의 증폭 형태 및 primer의 모식도 및 (B) PCR 생성물을 Blue latex와 반응시킨 후 얻은 최종 산물의 모식도

### 3) 실험 방법

#### 가) Chromato strip 준비

Pathogene	Target Genes	Position of Positive line
<i>Salmonella</i> spp.	invA	middle 기준선의 아래
<i>Escherichia coli</i> EHEC	Shiga 2(stx-2)	bottom 기준선의 위
Human (internal control)	Betta actin	middle 기준선의 위

Table 2-24. strip 상의 Target information 및 위치

나) *Salmonella* 와 *E coli*를 배양 후 배양된 균으로부터 분리한 gDNA 및 WGA 샘플, culture bacteria 샘플을 준비.

다) PCR 샘플 준비

Reagent Mix	Per Reaction	Company
2X SYBR PreMix Ex Taq	1X	Takara
Template	10 ng	
DNase/RNase-free sterile water	Bring to volume	
Forward primer set (10 uM) for Sallomnella, E coli and internal control	1 uL	
Reverse primer set (10 uM) for Sallomnella, E coli and internal control	1 uL	
Total volume	10 uL	

Table 2-25. PCR reaction Mix

라) Endpoint PCR 조건

Step	Temp	Time	Cycles
Polymerase activation	97 °C	2 min	1
Denaturation	97 °C	10 sec	
Annealing	60 °C	10 sec	30
Extension	72 °C	10 sec	

Table 2-26. Endpoint PCR 조건

마) 발색반응 준비

- Endpoint PCR 반응 완결 후, chromato development Reagent (10uL)와 Latex Reagent (1uL)를 섞어서 bubble이 없도록 주의 한 뒤,
- PCR reaction tube에 넣어주고 상온에서 5분 정도 incubation

바) chromato strip 반응

- 발생반응 준비가 완료된 PCR reaction tube에 chromato strip을 넣어서 10분 정도 반응이 일어나도록 준비 한 뒤,
- target gene의 band가 형성되는지를 확인

4) 실험결과

가) gDNA 와 whole genome amplified DNA

- E coli와 salmonella에서부터 분리한 gDNA 및 분리된 gDNA를 증폭시킨 whole genome amplification DNA를 사용하여 PCR 반응을 실시했으며, 반응 후 chromato strip을 사용하여 타겟 균의 존재여부를 관찰

- Fig 2-16에서 볼수 있듯이 하였으며 두 종류의 DNA (gDNA 및 amplified gDNA)에서 모두 해당 균의 검출이 잘 되는 것을 확인하였음
- 다만 whole genome amplification DNA를 이용한 샘플에서 gDNA를 사용한 샘플 보다 상대적으로 band의 색상이 조금 옅은 것이 관찰되었음.
- 비록 chromato strip의 지량 (quantification)의 개념으로 제작된 것은 아니지만, whole genome amplification반응에서 사용된 enzyme 및 reagent가 template와 함께 PCR 반응에 (소량이긴 하나) 포함되었을 것으로 판단되며, 이들이 PCR 반응에 영향을 미쳤을 것으로 추측됨.
- 그러나 두 가지 DNA 모두 타겟 균의 존재여부를 판단하기에 검출을 위해 사용하기 충분하다는 결과를 보여 주었음.

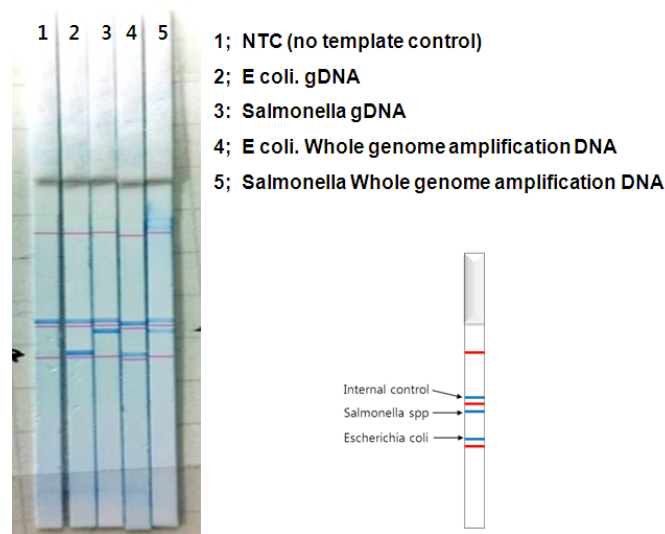


Figure 2-16. Chromato strip을 이용한 salmonella 및 E coli. 균의 확인

#### 나) Reagent Validation 테스트

- Chromato strip을 주문 제작한 AMR사에서 PCR reaction을 위해 Takara사의 2X SYBR PreMix Ex Taq을 사용할 것을 권장하여, 다른 종류의 enzyme으로도 동일 실험을 진행하여 동일한 결과를 얻을 수 있는지를 테스트 하였음
- salmonella 와 E. coli의 gDNA를 사용했으며, PCR을 위해서 Toyobo quick Taq을 사용하여 실험 하였으나, 타겟 균의 검출이 관찰되지 않았음 (Fig 2-17)
- 최적화된 반응을 위해 반드시 reagent validation이 필요하다는 결론을 얻음

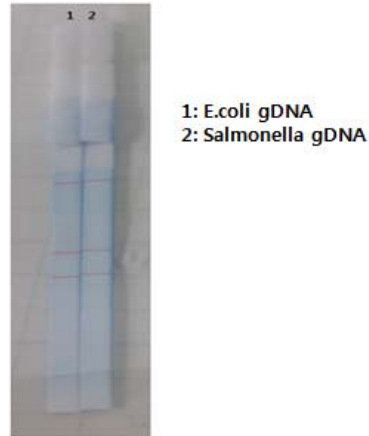


Figure 2-17. 타 PCR enzyme 제품을 이용한 식중독균 검출 결과

다) PCR 장비 validation 테스트

- PCR에 사용한 장비 (Quickbath, ThermoGen, Japan)에 따라 온도변화를 위한 ramp rate가 장비 마다 다르게 되어있음
- 이러한 차이가 chromato strip을 이용한 검출에 영향을 주는지를 확인하기 위해 다른 PCR 장비를 이용하여 테스트를 진행하였음
- PCR 장비 이외의 조건은 모두 Fig 2-16의 결과를 얻은 반응 조건과 동일하게 진행하였음. Fig 2-18에서 관찰되는 것과 같이, 동일 조건에서 다른 PCR 장비를 사용했을 때 최적화된 결과를 얻을 수 없었음

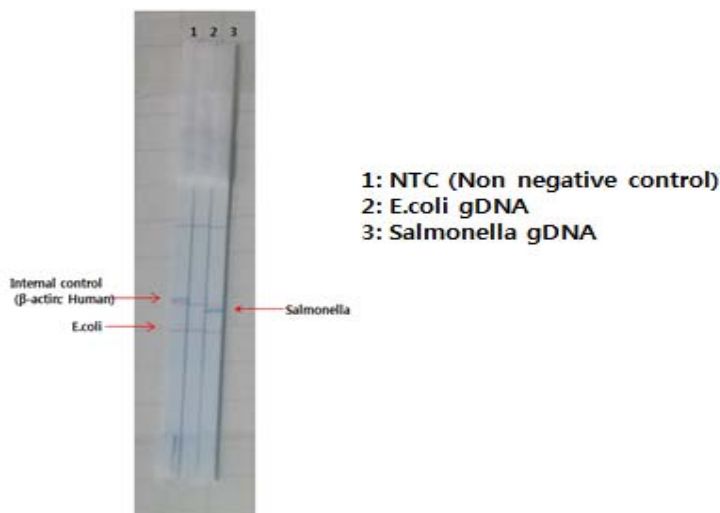


Fig 2-18. 다른 PCR 장비 (T100, BioRad)를 사용한 검출 결과

- 이에 PCR 조건을 조절해 가며 최적화 테스트를 진행하여, annealing 및 extension 시간을 다르게 조절하여 최적화된 PCR 반응 조건 (Table 2-27)을 찾아가면서 Fig 2-19과 같은 결과를 얻었음.

- 즉, 현장 혹은 검사소에서 사용하는 PCR 장비에 따라 각 장비에 맞는 PCR 반응 조건을 확립하면 개별 PCR 장비의 사용이 가능하다는 결론을 얻음

Step	Temp	Time	Cycles
Polymerase activation	97 °C	2 min	1
Denaturation	97 °C	5 sec	40
Annealing	60 °C	20 sec	
Extension	72 °C	20 sec	

Table 2-27. Endpoint PCR 조건

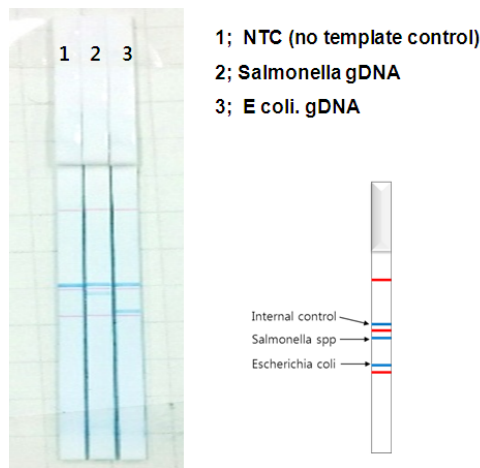


Figure 2-19. PCR 장비 변화에 따른 최적화 실험 결과

라) 배양된 균에서 확인 실험

- 앞선 테스트들은 모두 배양한 식중독균으로부터 추출한 gDNA 또는 추출한 gDNA를 amplification (whole genome amplification)한 DNA를 타겟으로 하여 진행되었음
- 따라서 실제 식품에 존재하는 식중독균으로부터의 직접 검출이 가능한지를 확인하고자 테스트를 진행함
- 균 접종 후 배양을 통해 105 cell/mL의 배양 균주 상태를 만든 후 이 배양액으로부터 일정량 (100 uL)을 사용하여 테스트를 진행 함.
- PCR을 위한 식중독균의 변형을 위해 97°C에서 5분 반응 시킨 뒤 (cell wall이 파괴되며 gDNA가 배양액으로 유리 됨) 이 유리용액으로부터 5 uL (500 cell)을

실험에 사용하였음. 최종적으로 테스트에 포함된 균의 수는 이론적으로 500cell 정도로 계산 됨.

Reagent Mix	Per Reaction	Company
2X SYBR PreMix Ex Taq	1X	Takara
Template	5 uL	
DNase/Rnase-free sterile water	Bring to volume	
Forward primer set (10 uM) for Sallomnella, E coli and internal control	1 uL	
Reverse primer set (10 uM) for Sallomnella, E coli and internal control	1 uL	
Total volume	10 uL	

Table 2-28. PCR reaction Mix

- 지금 까지 gDNA 및 T100 (BioRad) PCR 장비를 사용하여 확립된 PCR 조건 (Table 2-27) 과 동일하게 PCR 조건을 사용하여 균 배양액에 대한 PCR 반응을 실시한 뒤 chromato strip을 이용하여 타겟 균이 검출되는 지를 관찰하였음.
- Cell lysate를 사용하여 T100(BioRad) PCR 장비를 이용하여 실험 하였으며, gDNA와 같은 조건으로 PCR을 수행하였으나, 3 샘플 모두 internal control은 확인 되었으나, E. coli는 detection 되지 않았음 (Fig 2-20).
- 순수하게 분리된 gDNA와 비교할 때 균배양액으로부터 얻은 cell lysate는 배지 성분을 포함한 여러 가지 PCR 반응 저해요소들이 존재할 하며, 이러한 저해 요소들이 최적화된 PCR 반응에 영향을 미쳤을 것으로 판단 됨.

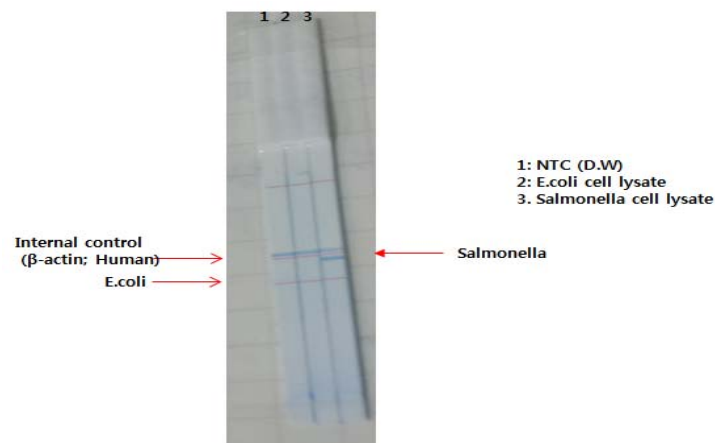


Figure 2-20. cell lysate를 이용한 식중독균 검출 실험. cell lysate에 존재하는 저해 요소들이 PCR 반응에 영향을 미쳐 E. coli의 검출이 이루어지지 않았음



- PCR 반응 조건을 Table 2-29과 같이 변화하여 cell lysate 테스트를 다시 진행하였음. cell lysate의 양을 줄인 샘플 (2.5uL 사용)도 포함시켜 cell lysate의 양의 변화에 따른 PCR 반응 여부도 관찰하였음

Step	Temp	Time	Cycles
Polymerase activation	97 °C	2 min	1
Denaturation	97 °C	5 sec	40
Annealing	59 °C	60 sec	
Extension	72 °C	60 sec	

Table 2-29. cell lysate를 이용한 PCR 반응 개선을 위한 PCR 반응 조건

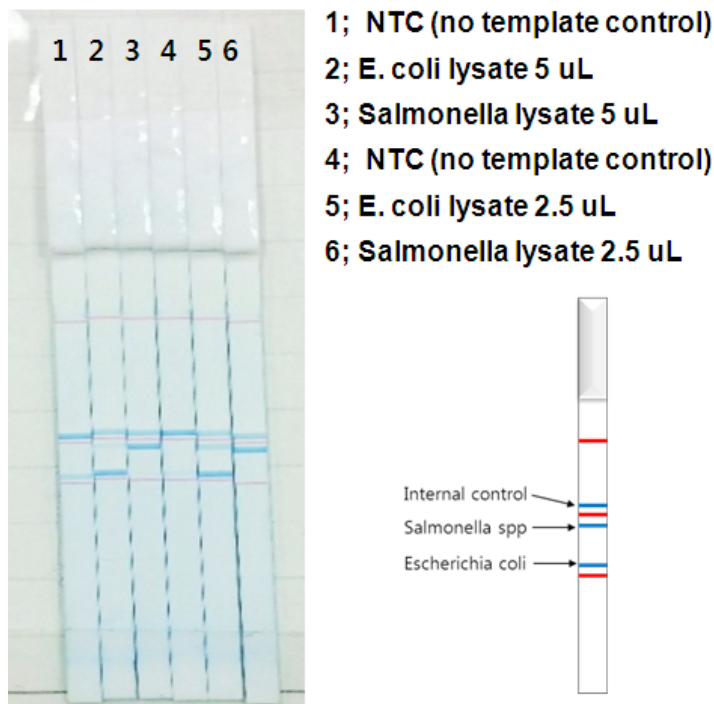


Fig 2-21. 개선된 PCR 조건을 적용한, cell lysate로부터의 식중독균 검출 실험

- Fig 2-21에서 볼 수 있는 것과 같이 cell lysate 5uL와 2.5uL 사용 조건에서 모두 성공적으로 해당 식중독균의 검출이 이루어졌음.
- 다만 back ground 에 의한 band가 관찰되어 PCR 반응 시간을 줄여 strip상에서 strong back ground에 의해 band의 색깔이 나타나는 현상을 방지할 필요가 있음
- 이에 PCR 반응 시간을 Table 2-30과 같이 감소시켜 테스트를 진행하였음.
- Fig 2-22에서 볼 수 있는 것과 같이 PCR 반응시간 감소로 인해 back-ground 밴드 색깔이 현저히 사라졌으며 target band의 색깔도 선명해 지는 결과를 얻었

음

Step	Temp	Time	Cycles
Polymerase activation	97 °C	2 min	1
Denaturation	97 °C	5 sec	40
Annealing	59 °C	40 sec	
Extension	72 °C	40 sec	

Table 2-30. PCR 반응 시간을 감소시킨 PCR 반응 조건

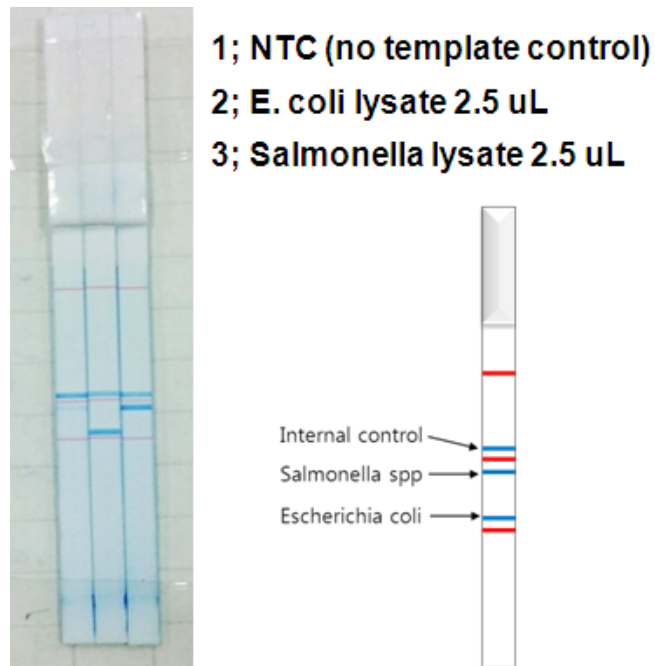


Figure 2-22. 개선된 back-ground를 보여주는 cell lysate를 이용한 식중독균 검출 실험

마) Detection 한계 확인

- Chromato strip의 식중독균 검출 한계를 알아보고자 실험을 진행
- 대상 균주: Salmonella 균을 사용하여 식품에서 존재하는 Salmonella 균의 검출 한계를 알아보기 위하여 본 테스트를 실시 함
- PCR 조건은 Table 2-30과 같음
- 검출한계 테스트를 위해 salmonella 1 pg(=1000 fg), 0.5 pg (=500 fg), 0.1 pg

(=100 fg), 0.01 pg (=10fg) gDNA를 사용하여 PCR을 하였음.

- 0.5 pg (=500 fg)까지는 chromato strip의 검출이 용이해 보이나, 0.01 pg 부터는 *Salmonella* 균의 확인이 용이치 않았음 (Fig 2-23)
- 최종적으로 이 실험에서 확인하고자 했던 *Salmonella* 균의 detection 한계는 500 fg 정도로 판단됨
- 이는 gDNA의 양으로 계산하면 이는 salmonella 약 50 ~ 100마리의 정도에 해당되는 것으로 계산 됨.

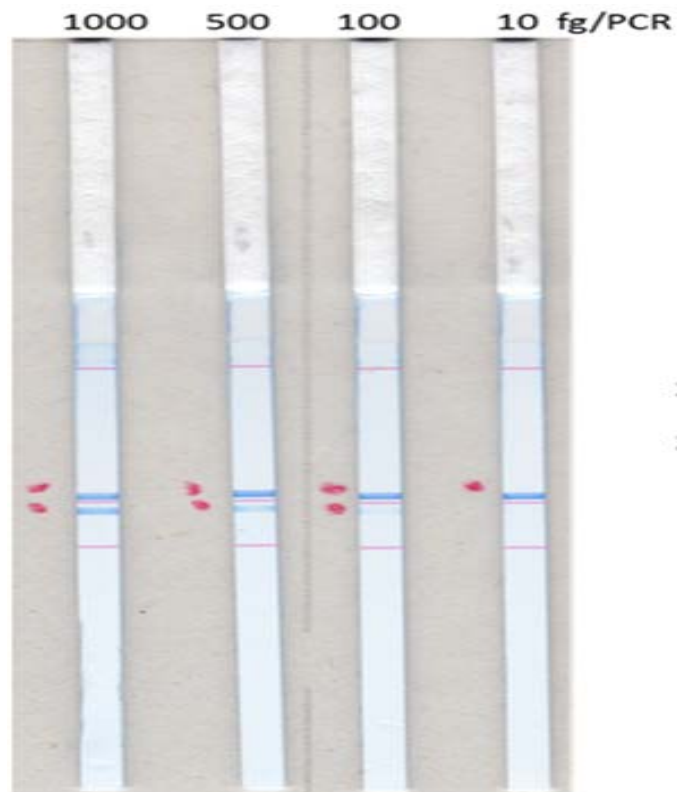


Figure 2-23. *Salmonella* 균을 이용한 Chromato strip의 검출 한계

### 3. 3장. 식중독균 검출에 대한 특허 정보 조사

#### 가. 국내 식중독 발생 현황

##### 1) 국내 식중독 발생현황

- 국내 식중독 발생건수는 2007년 510건으로 가장 많았으며 2009년 이후로 300건 내로 많은 감소가 있었음
- 반면, 식중독 환자는 2002년 약 3 천여 명으로부터 2006년에 1만 8 백여 명으로 가장 많은 환자수가 발생하였으며 그 후, 국가적인 노력에 의해 지속적으로 감소하는 추세를 보이나 지난해(2014년)에는 약 6 천여 명의 환자가 발생하였음

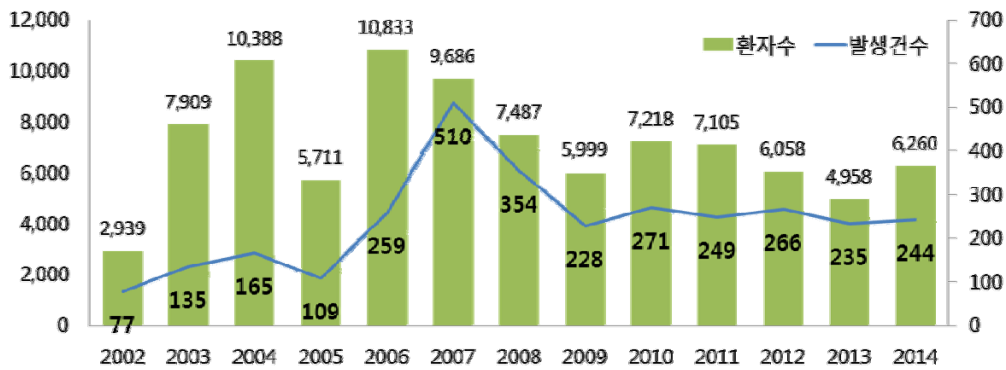


Figure 3-1. 국내 식중독 발생현황

- 발생환자 수의 변화에 따르면 여전히 집단급식에 의한 환자 발생이 가장 많은 것으로 나타남 (Fig 3-2)
- 특히, 원인을 알 수 없는 식중독 현상에 대한 점유율이 낮아진 것을 보아 식중독 원인에 관한 역학적 조사가 활발히 이루어지고 있는 것으로 나타남 (Fig 3-2)

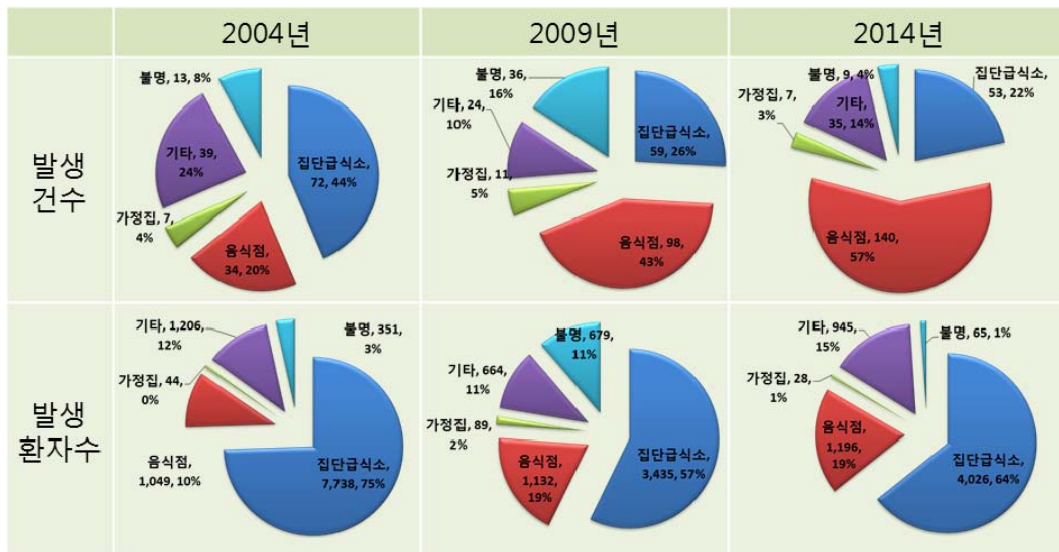


Figure 3-2. 식중독 발생 건수 및 발생 환자수 변화(5년 단위)

- 식중독 예방 및 국민 건강 증진을 위해 주요 식중독 균의 신속한 검출이 가능한 우수 기술 개발이 이루어져야 하며, 간편한 검출방법 개발로 식중독 균 검출기술의 활용범위를 확대가 필요한 시점임

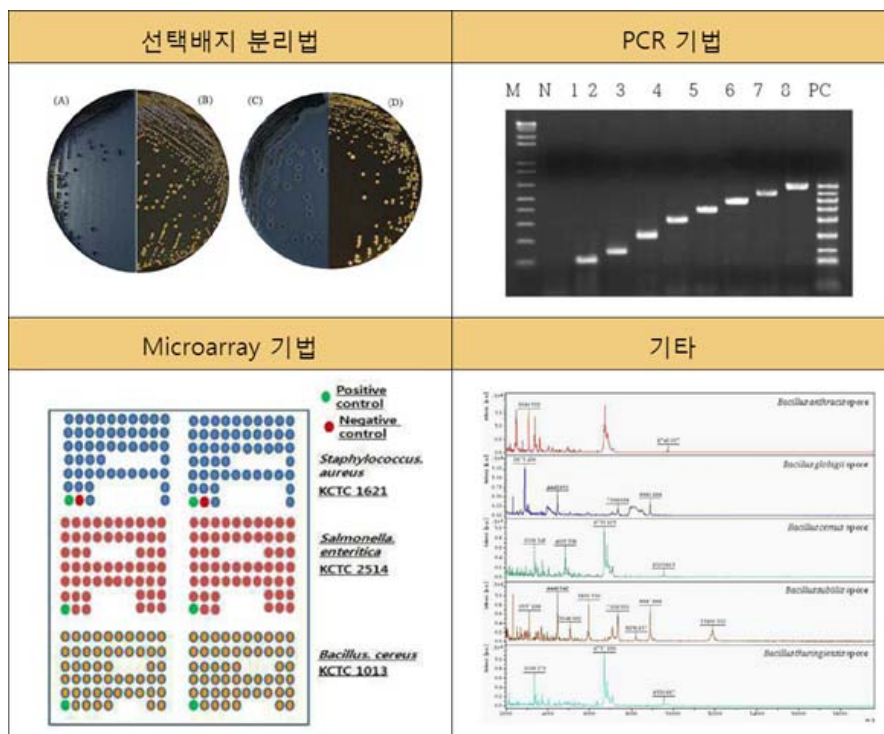
## 나. 식중독균주의 신속 검출관련 특허분석 조건

### 1) 분석 기준

- 본 분석은 4가지 식중독 균주의 교집합군에서 Immunoassay, ELISA를 제외한 PCR 혹은 Genome amplification을 이용한 신속한 검출 방법에 대한 것으로, 2005년 01월 1일부터 출원된 특허를 분석 대상으로 함
- 균주는 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Escherichia Coli* O157로 한정하여 분석함
- 식중독 균 검출 기술로는 선택배지 분리법, 면역기법, PCR 기법, Microarray 기법, 기타 원리에 의한 미생물 검출 방법이 있는데 본 분석에서는 면역기법은 제외하기로 함

### 2) 기술 개요

- 4가지 식중독 균주의 신속한 검출과 관련된 특허 기술 개요를 아래 4가지 기술분야에 대해 조사함



### 3) 기술 분류

- Table 3-1. 과 같이 기술별 한정사항을 지정한 후 기술 분류에 따는 특허 조사를

시행함

Table 3-1. 기술별 한정사항

분류	기술분류	기술한정
4가지 식중독 균주의 신속한 검출 방법	선택배지 분리법	배양장치, 균 분리용 배양지, 세균용 검출 배양지, 검출용 장치, 배양방법, 배지 조성물
	PCR 기법	PCR, 유전자, 프라이머, PNA 프로브, 프로브, 유전자 증폭, 멀티플렉스 PCR, real-time PCR, DNA
	Microarray 기법	애타머, PCR 칩, 마이크로에레이
	기타	항원-항체, 질량분석기, 바이오센서, 표면 플라즈몬 공명

4) 분석 범위

- 활용 DB : WIPS 데이터를 사용하여 분석에 활용함

Table 3-2. 국가별 분석구간

자료 구분	국 가	전체분석구간
공개특허 (출원일 기준)	한국	2005.1.1 ~ 2015.3.16
	일본	2005.1.1 ~ 2015.3.16
	유럽	2005.1.1 ~ 2015.3.16
	미국	2005.1.1 ~ 2015.3.16
	PCT	2005.1.1 ~ 2015.3.16

5) 검색식 및 검색 건수

- 검색식 작성 방법 : 대상기술 관련 핵심 키워드 추출 및 조합을 통해 기술 분야별 특허 검색식 작성하여 검색함(제목+요약+대표청구항)

Table 3-3. 기술 분야별 특허 검색식

구분	검색식
특허	<p>국문</p> <pre>                 (((((황색포도상구균 살모넬라* [대장균 adj O157] [staphylococcus aureus] [bacillus cereus] salmonella [escherichia coli O157]) AND @AD&gt;=20050101))) and (((검출* 측정* 진단* 신속검출* PCR 선택배지* 마이크로에레이* AND @AD&gt;=20050101))))             </pre> <p>영문</p> <pre>                 (((((((([staphylococcus aureus] and [bacillus cereus] and salmonella and [escherichia coli O157])) AND @AD&gt;=20050101) and             </pre>

PCR)) and (rapid adj detect\*)))) or (((((((([staphylococcus aureus] and [bacillus cereus] and salmonella and [escherichia coli O157])) AND @AD>=20050101) and PCR (genome adj ampli\*))) and (rapid adj detect\*))))))

○ 아래와 같은 검색 건수를 얻음

Table 3-4. 특허 검색 건수

	한국	미국	일본	유럽	PCT	합계
검색결과	198	392	99	8	2	699
유효데이터	124	47	59	5	1	236

다. 4가지 식중독 균주의 신속한 검출 분야의 특허동향

1) 주요 국가의 연도별 특허출원 동향 및 국가별 점유율

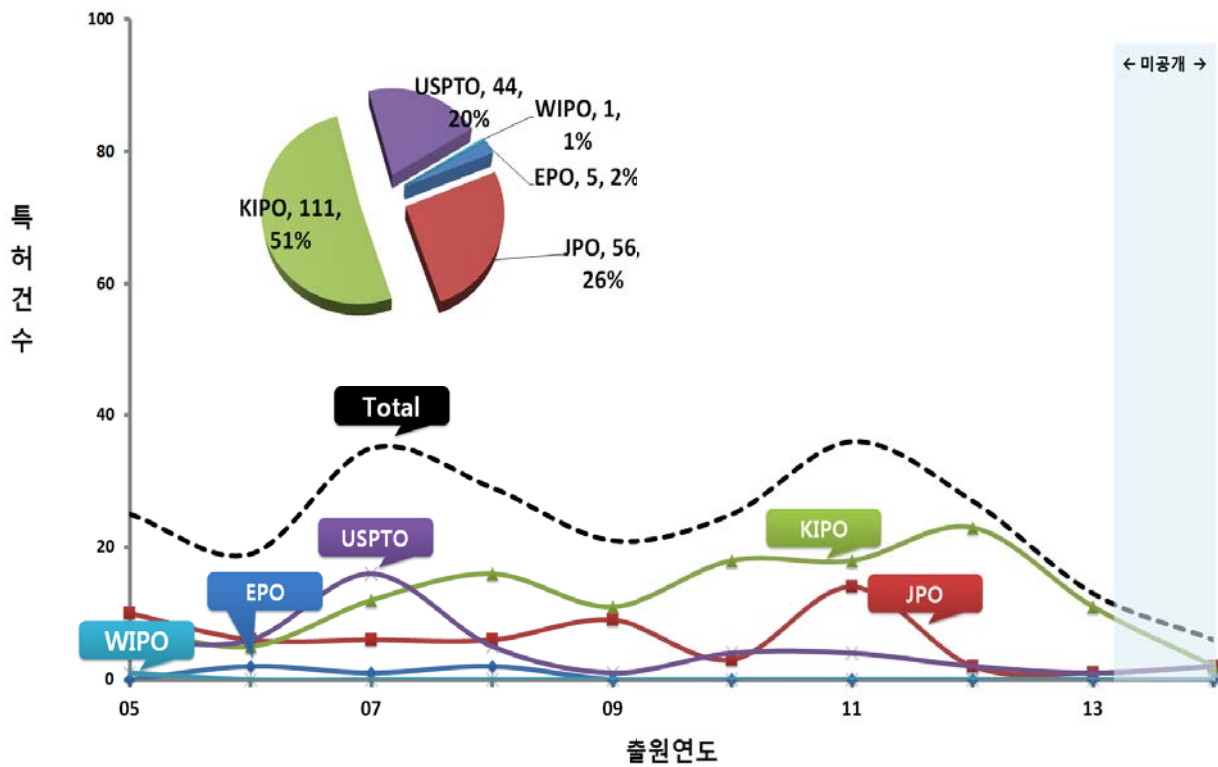


Figure 3-3. 연도별/국가별 특허출원 동향,

\* 일반적으로 특허출원 후 18개월이 경과된 때에 출원 관련정보를 대중에게 공개함

- 4가지 식중독 균주의 신속한 검출 방법 분야의 특허점유율은 한국(111건, 51%), 일본(56건, 26%), 미국(44건, 20%), 유럽(5건, 2%) 순으로 나타남
- 최근 10년 동안 특허 출원 동향은 2007년과 2011년에 가장 많은 특허를 출원한 것으로 나타났으며, 한국의 경우 2009년 이래로 지속적으로 증가하는 추세에 있으며,

일본은 2011년 이래로 감소하는 추세이며, 미국은 2007년 이래로 감소하는 추세로 나타남

2) 출원인 동향

- 4가지 식중독 균주의 신속한 검출 방법 분야의 출원인 국적으로는 한국 46%, 미국 22%, 일본 17%, 프랑스 4%, 캐나다 2% 순으로 나타남

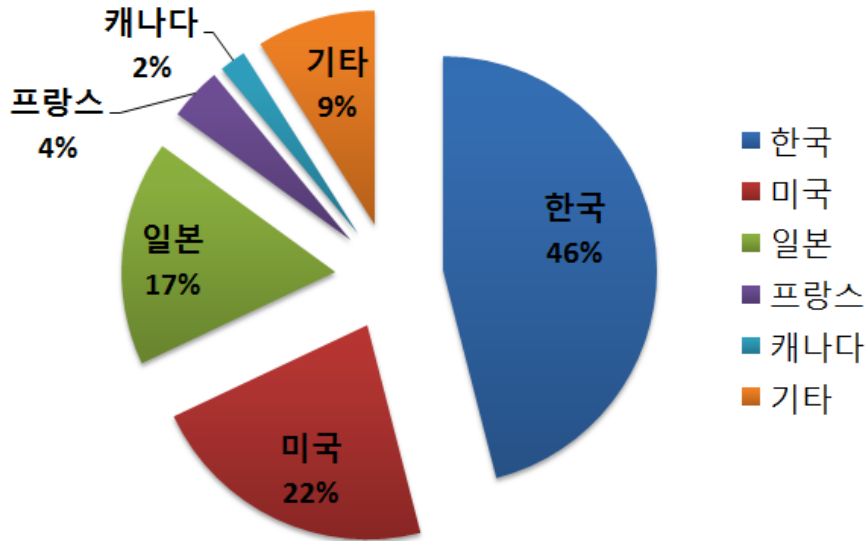


Figure 3-4. 출원인 국적 현황

- 4가지 식중독 균주의 신속한 검출 방법 분야의 Top 10 출원인은 주로 한국, 미국, 일본의 출원인으로 나타났으며, 한국의 경우 삼성에버랜드 주식회사, 대한민국, 한국식품연구원, 건국대학교, 나노바이오시스 주식회사, 삼성테크윈 주식회사 등 6개의 출원인이 Top 10에 들었으며, 미국의 Ibis Biosciences사, 미국의 EI Du Pont De Nemours and Company, Geneohm Sciences사 등이 각각 3위, 6위, 7위를 차지하였으며, 일본의 National Agriculture and Food Research Organization이 5위를 나타냄
- 삼성 에버랜드주식회사 및 삼성테크윈 주식회사를 제외한 국내 다른 기업 및 연구소들은 주로 국내에 특허를 출원하는 것으로 나타났으며, 삼성에버랜드 주식회사 및 삼성테크윈 주식회사는 국내는 물론 일본과 미국에도 특허를 출원하고 있는 것으로 나타났으며, 미국의 주요 출원인은 미국을 포함한 유럽, 일본에 특허를 출원하고 있는 것으로 나타남



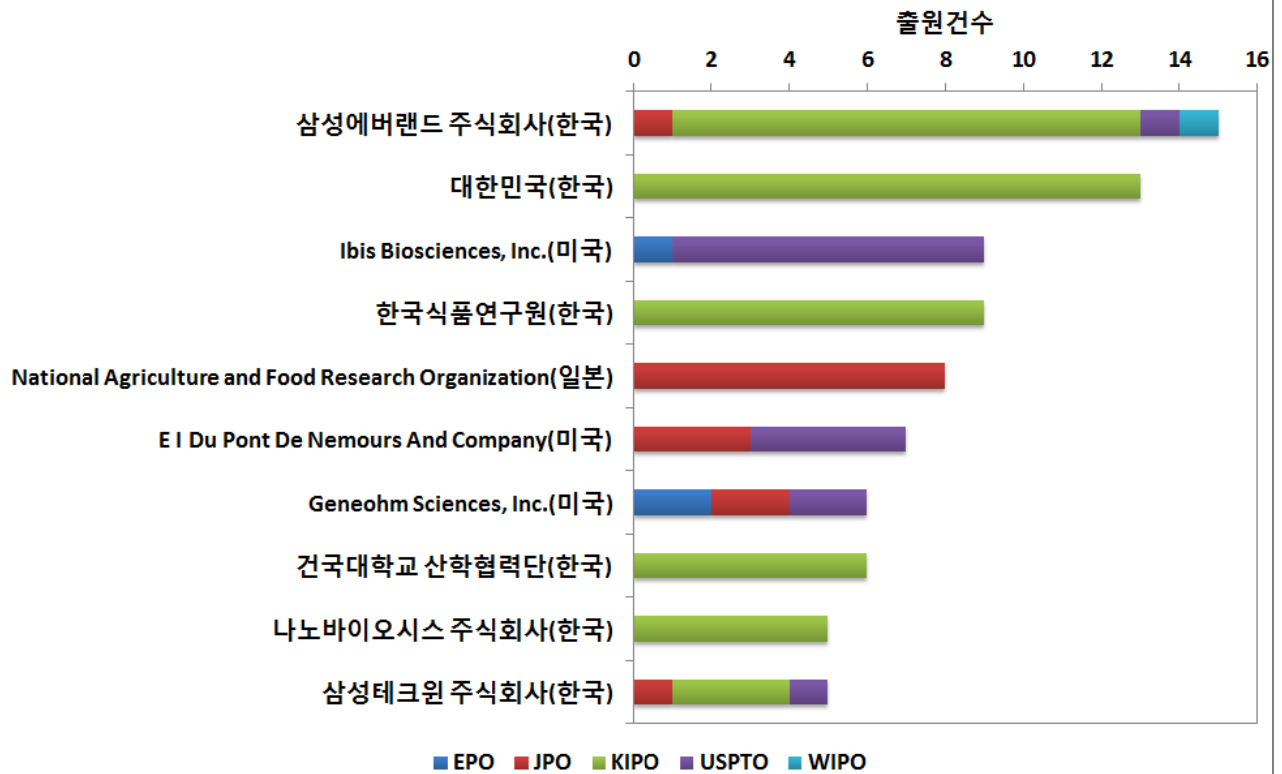


Figure 3-5. 주요 출원인의 국가별 특허 출원 현황

### 3) 국제특허분류별 특허 출원 동향

- 4가지 식중독 균주의 신속한 검출 방법 분야의 IPC(International patent classification)특허 출원현황을 살펴보면, 효소 또는 미생물을 함유한 측정 또는 시험방법; 그것을 위한 조성물; 그 조성물의 제조방법(C12Q-001) 분야의 특허 출원이 118건으로 가장 높은 것으로 나타남
- 2005-2008년 대비 2009-2012년 특허출원 증감율에 있어서는 돌연변이 또는 유전공학; 유전자 공학과 관련된 DNA 또는 RNA, 벡터 또는 그것의 분리, 조제, 정제; 그것을 위한 숙주의 이용(C12N-015)가 43% 증가하였으며, 미생물, 예. 원생동물; 그 조성물; 미생물의 증식, 유지, 보존 방법 및 그 조성물; 미생물을 포함한 조성물의 조제 또는 분리방법; 그것을 위한 배양배지(C12N-001)가 33% 증가한 것으로 나타남

IPC 그룹	내용
C07H-021	뉴클레오시드의 당류기가 결합되어 있는 인산 또는 폴리인산 에스테르를 각기 별도로 갖는 2개 이상의 모노뉴클레오티드 단위를 함유하는 화합물, 예, 핵산
C12N-001	미생물, 예. 원생동물; 그 조성물; 미생물의 증식, 유지, 보존 방법 및 그 조성물; 미생물을 포함한 조성물의 조제 또는 분리방법; 그것을 위한 배양배

	지
C12N-015	돌연변이 또는 유전공학 ; 유전자 공학과 관련된 DNA 또는 RNA, 벡터 또는 그것의 분리, 조제, 정제 ; 그것을 위한 숙주의 이용
C12Q-001	효소 또는 미생물을 함유한 측정 또는 시험방법; 그것을 위한 조성물 ; 그 조성물의 제조방법
G01N-033	그룹 1/00~31/00에 포함되지 않는 특유의 방법에 의한 재료의 조사 또는 분석

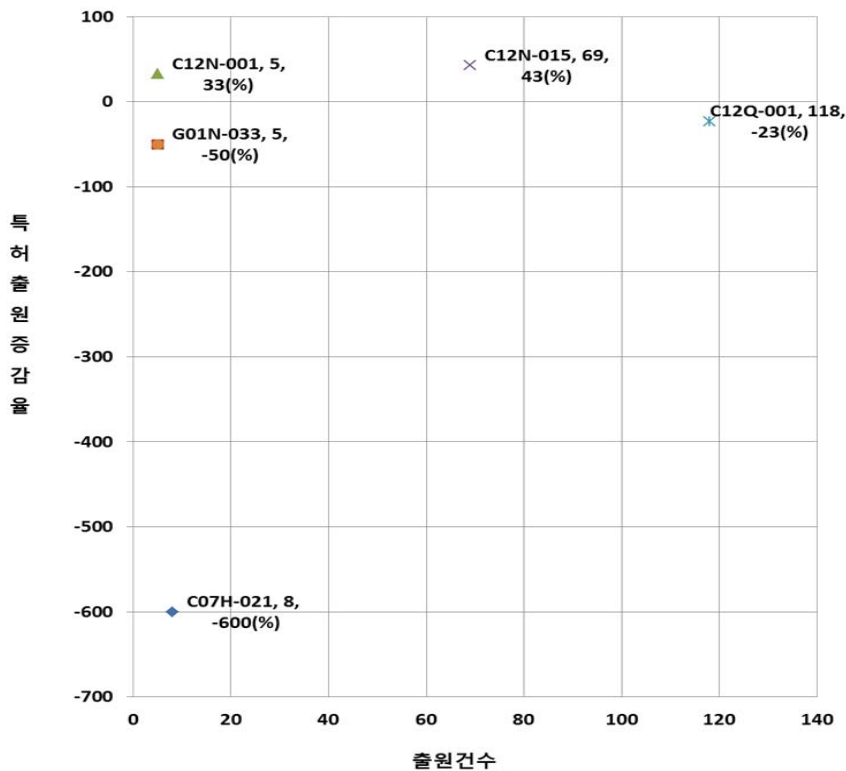


Figure 3-6. 국제특허분류별 특허 출원 현황, 특허출원 증감율(2005-2008 대비 2009-2012)

출처 : 국제특허분류(IPC) 2014

#### 4) 세부 기술 분류 별 특허 출원 동향

○ 4가지 식중독 균주의 신속한 검출 방법 분야의 세부 기술분류는 선택배지 분리법, PCR기법, Microarray 기법, 기타로 나누어서 살펴본 결과, PCR 기법이 74%, 선택적 배지 분리법 14%, Microarray 기법 10%, 기타 2% 순으로 나타났으며, 최근 들어 PCR 기법은 지속적으로 특허출원이 이루어지는 것으로 나타남

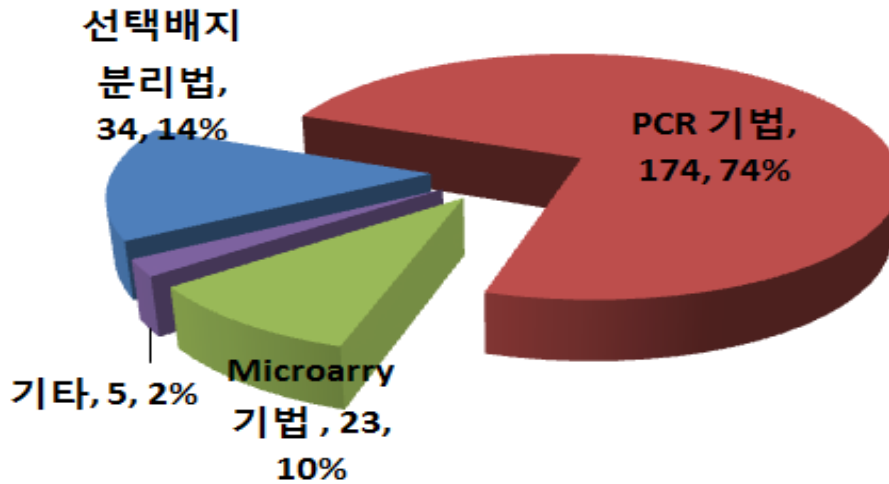


Figure 3-7. 세부기술별 특허 점유율 (2005년 이후 총 합)

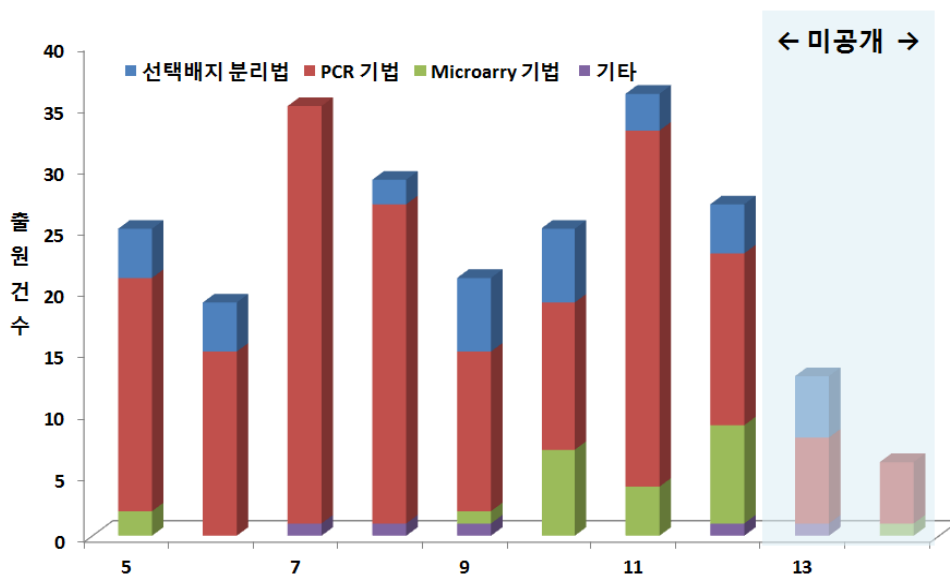


Figure 3-8. 세부기술별 특허 점유율 (년도별), \* 일반적으로 특허출원 후 18개월이 경과된 때에 출원 관련정보를 대중에게 공개됨

- 4가지 식중독 균주의 신속한 검출 방법 분야의 국가별 세부 기술별 점유율을 살펴 보면, 한국의 경우 PCR 기법이 63%, Microarray 기법 19%, 선택배지 분리법 14%, 기타 4% 순으로 나타났음
- 일본의 경우 PCR 기법이 75%, 선택배지 분리법 25% 순으로 나타났으며, 미국의 경우 PCR 기법이 98%, 선택배지 분리법 2% 순으로 나타났으며, 유럽의 경우 PCR 기법의 특허점유율이 100%로 나타남

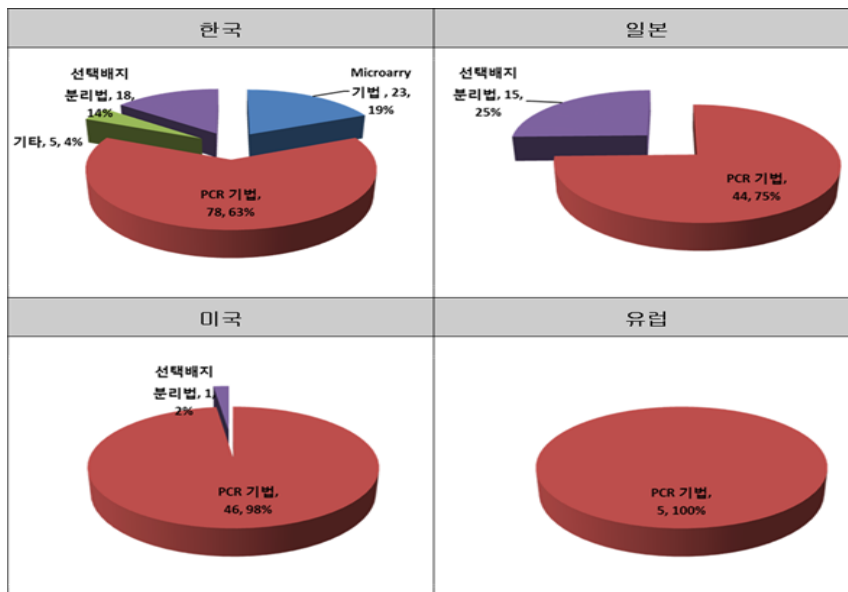


Figure 3-9. 국가별, 세부기술별 특허 점유율

- 선택배지 분리법 분야에서는 건국대학교 4건, 미국의 Pilots Point Llc 3건, 일본의 Eiken Chemical, 미국의 Micrology Lab, 프랑스의 Rambach, Alain, 일본의 Takei Kazuki, 한국의 서울대학교가 각각 2건씩 출원하여 주요 출원인으로 나타남
- PCR 기법기술분야에서는 한국의 삼성에버랜드가 15건, 미국의 Ibis Bioscience 9건, 대한민국 9건, 일본의 National Agriculture and Food Research Organization 8건, 미국의 E I Du Pont 7건, 미국의 Geneohm Sciences 6건, 한국의 삼성테크윈 5건 순으로 주요 출원인으로 나타남

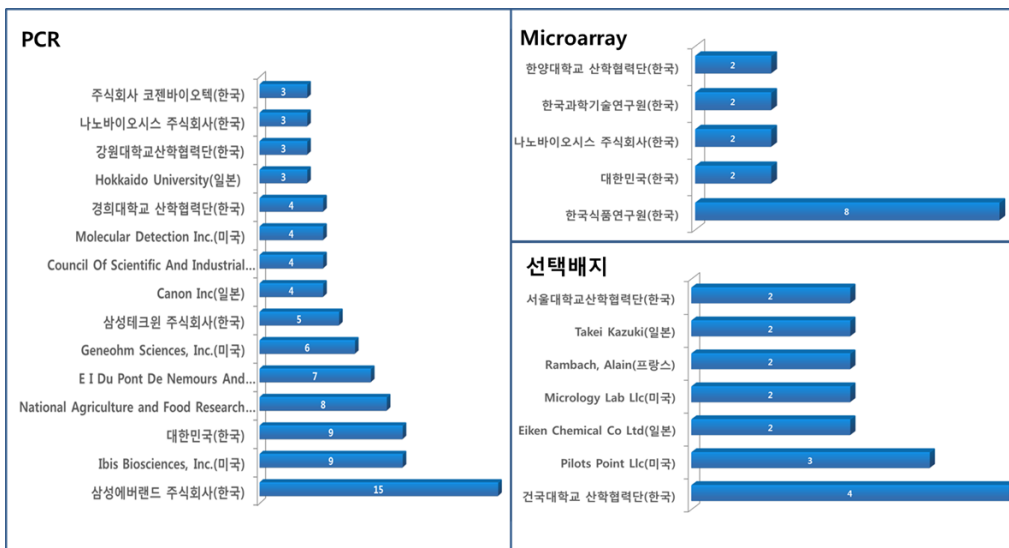


Figure 3-10. 세부 기술별 출원인 현황

- Microarray 분야에서는 한국의 한국식품연구원 8건, 대한민국, 나노바이오시스 주식회사, 한국과학기술연구원, 한양대학교가 각각 2건 씩 출원하여 주요 출원인으로 나타남
- 4가지 식중독 균주의 신속한 검출 방법 분야 (세부기술 전체)의 균주별로 살펴보면 Salmonella 38%, Staphylococcus aureus 33%, E. coli O157 16%, Bacillus cereus 13%순으로 나타남

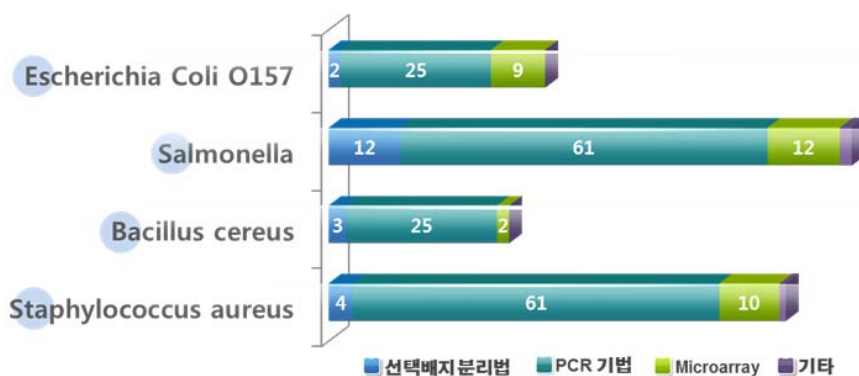


Figure 3-11. 식중독 균주별 세부 기술 동향 (건수)

가. 핵심특허 분석

- 분석한 유효데이터로 총 236건의 특허를 정량분석을 실시하였으며, 아래 총 42건의 핵심특허를 선별하여 정성분석을 실시함

No.	출원번호	발명의 명칭	출원인
1	국제공개특허 PCT-KR2005-000727 (2005-03-15)	primer for detecting food poisoning and method for rapid detection of food born pathogene	삼성에버랜드 주식회사
2	한국등록특허 2009-0090169 (2009-09-23)	핵산증폭방법을 이용한 세포치료제 오염세균 또는 진균의 검출방법	대한민국
3	한국등록특허 2011-0071815 (2011-07-20)	PNA 칩을 이용한 다중 식중독균 검출 방법	대한민국
4	한국등록특허 2007-0093037 (2007-09-13)	식중독 병원체의 검출 방법 및 신속한 검출 키트	주식회사 코젠바이오텍
5	한국등록특허 2009-0033798 (2009-04-17)	병원성 미생물 검출용 프라이머, 이를 이용한 병원성 미생물의 검출방법 및 검출키트	나노바이오시스 주식회사
6	한국등록특허 2011-0132153 (2011-12-09)	식중독균 검출용 키트 및 이를 이용한 식중독균 검출	나노바이오시스 주식회사
7	한국등록특허 2013-0031126 (2013-03-22)	식중독 검출용 프라이머 세트, 이를 이용한 PCR 장치, 및 이를 이용한 식중독 검출 방법	나노바이오시스 주식회사
8	한국등록특허 2005-0112536 (2005-11-23)	식중독균에 특이적으로 결합하는 단일가닥핵산 압타머	제노프라 주 회사
9	한국등록특허 2005-336201 (2005-11-21)	배양 병용 인사이추 하이브리다이제이션법에 의하여 살아 있는 식중독 세균 및 위생 지표 세균군을 신속하면서 특이적으로 계수하기 위한 유전자 프로브 및 그 방법	HOKKAIDO UNIV
10	일본공개특허 2011-172174 (2011-08-05)	배양 병용 인사이추 하이브리다이제이션법에 의하여 살아 있는 식중독 세균 및 위생 지표 세균군을 신속하고 특이적으로 계수하기 위한 유전자 프로브 및 그 방법(장염 비리오)	HOKKAIDO UNIV
11	한국등록특허 2007-0023155 (2007-03-08)	식품 위해 미생물 검출용 프라이머 및 이를 이용한 식품 위해 미생물 검출방법	삼성에버랜드 주식회사
12	한국등록특허 2008-0056912 (2008-06-17)	식품 위해 미생물 검출용 프라이머 및 이를 이용한 식품 위해 미생물 검출방법	삼성에버랜드 주식회사
13	한국등록특허 2008-0056915 (2008-06-17)	식품 위해 미생물 검출용 프라이머 및 이를 이용한 식품 위해 미생물 검출방법	삼성에버랜드 주식회사
14	한국공개특허 2008-0056927 (2008-06-17)	식품 위해 미생물 검출용 프라이머 및 이를 이용한 식품 위해 미생물 검출방법	삼성에버랜드 주식회사
15	한국공개특허	식품 위해 미생물 검출용 프라이머 및 이를 이용한 식품	삼성에버랜드

	2008-0056928 (2008-06-17)	위해 미생물 검출방법	주식회사
16	한국공개특허 2008-0056929 (2008-06-17)	식품 위해 미생물 검출용 프라이머 및 이를 이용한 식품 위해 미생물 검출방법	삼성에버랜드 주식회사
17	한국공개특허 2008-0056936 (2008-06-17)	식품 위해 미생물 검출용 프라이머 및 이를 이용한 식품 위해 미생물 검출방법	삼성에버랜드 주식회사
18	한국공개특허 2008-0056937 (2008-06-17)	식품 위해 미생물 검출용 프라이머 및 이를 이용한 식품 위해 미생물 검출방법	삼성에버랜드 주식회사
19	한국등록특허 2008-0056938 (2008-06-17)	식품 위해 미생물 검출용 프라이머 및 이를 이용한 식품 위해 미생물 검출방법	삼성에버랜드 주식회사
20	일본공개특허 2007-305628 (2007-11-27)	세균 계놈 증폭 반응용 프라이머	CANON INC
21	미국등록특허 2007-930002	Methods for rapid identification of pathogens in humans and animals	Ibis Biosciences, Inc.
22	미국등록특허 2008-194952 (2008-08-20)	Method for identifying pathogenic microorganisms responsible for infection by extracting the DNA of a microorganism	National University Corporation University of Toyama
23	한국등록특허 2009-0033798 (2009-04-17)	병원성 미생물 검출용 프라이머, 이를 이용한 병원성 미생물의 검출방법 및 검출키트	나노바이오시스 주식회사
24	한국공개특허 2009-0106006 (2009-11-04)	식중독 원인균의 다중 실시간 검출방법	재단법인 대구테크노파크
25	미국등록특허 2009-589463 (2009-10-23)	Compositions and methods for detecting food-borne pathogens	InfrAegis, Inc.
26	한국공개특허 2009-7009173 (2007-09-26)	DNA J 유전자를 사용한 박테리아의 검출, 및 그의 용도	고꾸리츠 다이가꾸호오징 기후다이가꾸
27	한국등록특허 2010-0020733 (2010-03-09)	식중독 세균 동시 검출용 프라이머 및 이의 용도	국민대학교산학 협력단
28	한국공개특허 2012-0001468 (2012-01-05)	그람양성 식중독 유발 세균 검출용 올리고뉴클레오타이드 및 이의 용도	한국외국어대학 교 연구산학협력단
29	한국등록특허 2010-0058096 (2010-06-18)	주요 병원성 미생물 신속검출용 멀티플렉스 PCR 방법 및 이를 위한 PCR 프라이머	건국대학교 산학협력단
30	한국등록특허 2010-0139292 (2010-12-30)	호기성 그람양성 식중독균 감별진단용 PNA 마이크로어레이 및 이를 이용하여 상기 균을 감별진단하는 방법	대한민국
31	한국공개특허	절단 가능한 키메라 프로브를 사용한 살모넬라의 실시간	삼성테크윈

	2011-0021871 (2011-03-11)	검출 방법	주식회사
32	일본공개특허 2011-052720 (2011-03-10)	절단 가능한 카메라 프로브를 사용한 살모넬라의 실시간 검출 방법	삼성테크윈 주식회사
33	한국등록특허 2011-0071815 (2011-07-20)	PNA 칩을 이용한 다중 식중독균 검출 방법	대한민국
34	한국등록특허 2011-0077756 (2011-08-04)	식중독균 검출 센서용 슬라이드 칩 및 그 제조방법	한국식품연구원
35	한국공개특허 2011-0087184 (2011-08-30)	살모넬라 종 및 대장균 O157:H7의 표적 서열을 동시에 증폭하는 방법 및 그를 위한 키트	삼성테크윈 주식회사
36	미국공개특허 2011-159904 (2011-06-14)	METHOD OF SIMULTANEOUSLY AMPLIFYING TARGET SEQUENCES FROM SALMONELLA SPP. AND E. COLI O157:H7 AND KIT THEREFOR	삼성테크윈 주식회사
37	한국등록특허 2011-0107959 (2011-10-21)	병원성 대장균 검출방법 및 검출세트	대한민국
38	한국등록특허 2012-0077731 (2012-07-17)	식중독균 검출 키트 및 이를 이용한 식중독균 검출 방법	한국식품연구원
39	한국공개특허 2012-0154563 (2012-12-27)	식중독 검출용 프라이머 세트, 이를 이용한 PCR 장치, 및 이를 이용한 식중독 검출 방법	나노바이오시스 주식회사
40	한국공개특허 2012-0154567 (2012-12-27)	식중독 검출용 프라이머 세트를 포함하는 마이크로 PCR 칩, 이를 포함하는 실시간 PCR 장치, 및 이를 이용한 식중독 검출 방법	나노바이오시스 주식회사
41	미국등록특허 2013-870779 (2013-04-25)	Nucleic acid amplification methods for specific detection of E. coli O157:H7 without co-detection of E. coli O55:H7	Life Technologies Corporation
42	한국등록특허 2014-0025644 (2014-03-04)	살모넬라균 검출을 위한 등온증폭반응용 프라이머 조성물 및 이를 이용한 살모넬라균의 검출 방법	서울대학교산학 협력단

#### 나. 분석결과 종합

- 4대 식중독균 검출 기술에 대해 총 699건이 검색되었으며, 유효데이터로 총 236건의 특허를 정량분석을 실시하였으며, 현재 진행 중인 연구와 관련된 총 42건의 핵심특허를 선별하여 정성분석을 실시함
- 정성분석 결과 국내 주요 출원인으로는 삼성에버랜드 주식회사 10건(등록 4건, 공개 1건, 거절 5건), 나노바이오시스 주식회사 6건(등록 4건, 공개 2건), 대한민국 5건(등록 5건), 삼성테크윈 주식회사 4건(공개 2건, 거절 1건, 취하 1건), 한국식품연구원 2건(등록 2건) 그 외, 주식회사 코젠바이오텍, 제노프라 주식회사, 재단법인 대구테크노파크, 국민대학교, 한국외국어대학교, 건국대학교, 서울대학교 등이 각각 1건씩 있음
- 미국 특허 5건에 대해서는 Ibis Biosciences, InfrAegis, Life technologies가 각각 1



건씩 등록 특허를 보유하고 있으며, 일본의 Toyma 대학 및 한국의 삼성테크윈 주식회사가 미국에 특허를 출원하고 있음

- 일본 특허 3건에 대해서는 홋카이도 대학에서 2건의 특허를 2005년과 2011년에 출원하였으나 모두 거절 되었으며, 2007년 캐논에서 출원한 특허는 취하되었음
- 삼성에버랜드 주식회사의 경우 2005년 1건 2007년 1건, 2008년 8건의 특허를 출원하였으며, 이 중 2008년 여러 개의 식중독균을 검출할 수 있는 특허를 출원하였다가 다시 분할 출원을 진행한 결과 일부 식중독균에 대해서는 특허등록을 받았음
- 나노바이오시스 주식회사는 2009년 2건, 2011년 1건, 2012년 2건 2013년 1건 등으로 지속적으로 특허를 출원하고 있음
- 국내의 경우 식중독 균을 검출하기 위한 프라이머, PNA 칩을 이용하여, 유전자 증폭 및 마이크로 에레이 등을 이용해 식중독균을 검출하고 있으며, 각각의 기술에 대해서는 핵심특허 분석 부문에 설명하였음
- PCR을 이용한 식중독균 검출에 유용한 특허들이 출원되어 있으나, conventional PCR 또는 real-time PCR을 이용한 기술이 대부분임
- Digital PCR과 같은 차세대 PCR 기술을 이용한 특허 출원은 아직 없어, 본 연구의 결과물을 이용하여 이 부분에 대한 특허 출원을 진행 할 예정임

#### 4. 4장. 협동기관 결과 validation

가. Whole genome amplification (WGA) 에 의한 분자 농축 테스트

- 식중독균을 신속하게 검출하기 위한 DNA 증폭의 기반 기술인 whole genome amplification (WGA)에 대한 식중독균 증폭 가능성을 검토하였음
- DNA template는 협동기관에서 4종류의 균을 제공받아 사용하였으며 WGA 결과는 협동기관의 WGA 결과와 비교분석하여 우선적으로 최적 조건을 파악하고자 하였음
- 또한 실험실간의 정도관리가 가능하도록 실험 기술을 표준화하여 공유하고자 하였음

나. 실험 개요

- 기존 검출방법에서 측정할 수 있는 한계 이하로 식중독균이 존재하는 경우 이들의 즉각적인 존재 여부 확인은 불가능.
- 만약 식중독균의 genomic DNA (gDNA)를 증폭시키고 이를 분자 생물학적 방법으로 검출할 수 있는 방법이 있다면 식자재에 (기존 검출방법에서 검출하기 어려운) 적은 수의 식중독균이 존재하는 경우에도 이들을 검색이 가능할 것임.
- 이에 whole genome amplification이라는 새로운 기법으로 미생물의 수가 아닌 gDNA 자체를 검출한계 이상으로 증폭시켜 이들의 존재를 확인하려 함
- 현재 genomic DNA 자체를 증폭 시키는 방법으로 mammalian single cell 연구에 주로 사용되는 방법을 식중독균 연구에 적용시켜 보려했으며, PicoPLEX Whole genome amplification 방법(Rubicon, USA) 이용하여 bacteria의 genome이 증폭되는지 관찰하고자 하였음.

다. 실험 방법

1) 시료의 준비

- Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella Typhimurium, 및 E. coli 박테리아를 각 각 액상 배지에 접종하여 37°C 에서 shaking(250 rpm)하며 충분한 시간 동안 배양함
- 각 각의 배양액에서 박테리아를 원심분리하여 gDNA를 추출하여 (NucleoSpin Tissue XS 사용, MN, Germany) 농도 및 순도 측정
- 각 각의 추출된 gDNA를 150 pg/uL가 되도록 준비
- PicoPLEXTM whole genome amplification 방법(Rubicon, USA)을 적용하여 전장 유전체 증폭 실시

2) whole genome amplification

- 150 pg/uL가 되도록 준비된 샘플에서 1 uL(=150 pg을 시작 물질로 사용)를 준비 한 뒤, cell extraction buffer에 넣어서 5uL가 되도록 만듦.
- 위의 샘플에 table 4-1의 다음의 시약을 5 uL를 넣어 75도에서 10분간 incubation 하며 extraction을 실시함.

Extraction cocktail Component	Volume Per 5 samples
Extraction Enzyme Dilution buffer	24 uL
Cell extraction Enzyme	1 uL
Total Volume	25 uL

Table 4-1. Extraction PCR reaction mix

- Incubation이 끝난 샘플에 Pre-amplification을 위한 시약 (Table 4-3)을 준비하여 PCR 장비를 이용한 pre-amplification 반응을 Table 4-2와 같이 실시

Temperature	Time	Cycle
95°C	2 min	1 cycle
95°C	15 sec	12 cycle
15°C	50 sec	
25°C	40 sec	
35°C	30 sec	
65°C	40 sec	
75°C	40 sec	
4°C	Hold	1 cycle

Table 4-2. Pre-Amplification PCR 조건

Pre-Amp Cocktail Component	Volume Per 5 samples
Extraction Enzyme Dilution buffer	24 uL
Pre-Amp Enzyme	1 uL
Total Volume	25 uL

Table 4-3. Pre-Amplification PCR reaction mix

- 반응이 끝난 샘플은 amplification 시약 (Table 4-4)을 첨가한 후 (60 uL씩) Table 4-5와 같이 PCR amplification을 실시 함

Amplification cocktail component	Volume Per 5 samples
Amplification buffer	125 uL
Amplification Enzyme	4 uL
Nuclease-Free Water	171 uL
Total Volume	300 uL

Table 4-4. Amplification PCR reaction mix

Temperature	Time	Cycle
95°C	2 min	1 cycle
95°C	15 sec	14 cycle
65°C	1 min	
75°C	1 min	
4°C	Hold	1 cycle

Table 4-5. Amplification PCR 조건

- PCR 반응이 끝난 샘플은 2 % Agarose gel을 통해서 증폭이 되었는지 확인 하며, 증폭이 된 샘플은 Nucleospin Gel and PCR purification kit (MN, Germany) 을 이용하여 purification 하여 후속 실험을 준비 함.

#### 라. 실험 결과

##### 1) 증폭된 gDNA 농도 측정

- 각 각의 박테리아 샘플 150 pg으로부터 whole genome amplification을 실시하여 아래와 Table 4-6과 같이 농도측정치를 얻었음
- whole genome amplification으로 150 pg의 시작 물질을 2140 ng 이상의 증폭물질을 생산했으며 약 14,000 배 이상의 증가를 가져왔음

Sample name	Concentration (ng/ul)	A260/A280	A260/A230	Yield (ng)
Bacillus cereus	107	1.87	1.69	2140
Salmonella Typhimurium	165	1.92	1.84	3300
Escherichia coli O157:H7	201	2.07	1.69	4020

Table 4-6. Whole Genome Amplification 샘플 농도 측정 (Nanodrop 이용)

2) 전기 영동 관찰

- Fig 4-1에서 관찰되어지는 것과 모든 박테리아에서 비슷한 영역에서 증폭이 이루어 졌음
- mammalian cell 의 gDNA amplification 양상과 비슷한 양상을 보이는 것으로 미루어 박테리아 gDNA amplification도 본 실험에서 적용한 방법을 충분히 사용할 수 있을 것으로 판단 됨

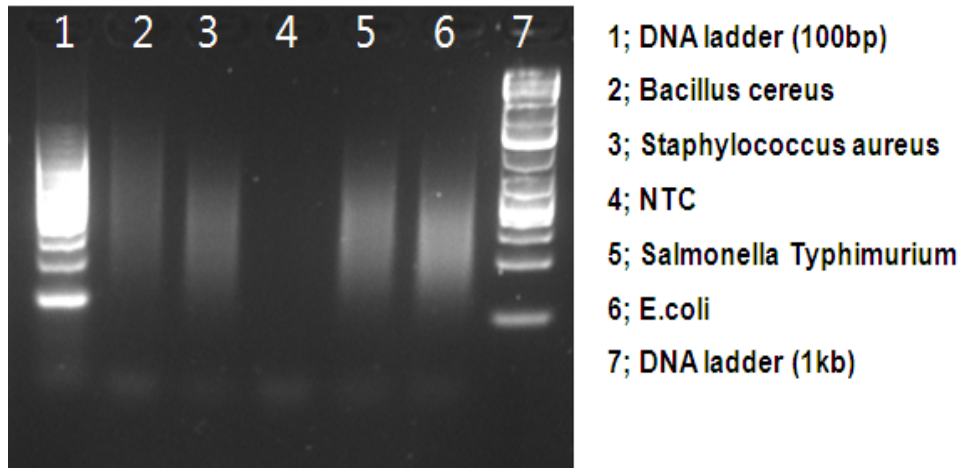


Fig 4-1. WGA을 이용한 4가지 종류의 균주의 증폭 실험 결과

## 5. 5장. 1차년도 연구를 통해 개발된 식품 내 식중독균의 filtering 농축기법에 의한 식중독균 검출한계 향상

협동기관 연구 수행 결과

종합 연구의 개요

급식현장 및 식당 등에서 식품, 특히 신선식품은 신선도에 따라 최종 조리식품의 품질이 결정지어 짐에 따라 생산, 유통, 수급 직후 저장되지 않고 바로 소비, 섭취되는 특성을 가지고 있으며, 식중독 대부분은 신선식품의 섭취에 의해 발생되고 있는 현실이다.

신선식품 섭취에 의한 식중독 안전성은 최초 신선식품의 미생물 안전성을 분석하고 평가하여 이후 위해 미생물이 함유된 것으로 판단될 경우 오염 식품을 제거함으로써 확보될 수 있음

신선식품의 미생물 안전성을 기존의 전통적 배지배양법을 이용하여 분석할 경우 증균 및 배지 배양시간을 포함하여 총 2일 또는 그 이상의 시간이 소요되는 실정이다 (Figure 5-1). 신선식품은 일반적으로 수급한 후 2일 이내에 조리되고 소비됨에 따라 신선식품의 미생물 안전성 진단에 2일 또는 그 이상이 소요 될 경우 신선식품 섭취에 의한 식중독을 방지 할 수 없다.

따라서 최근 식중독균 검출 연구는 정확성을 겸비한 신속성을 중점으로 이루어지고 있음

신선식품의 미생물 오염은 생산과정에 제한되지 않고 유통, 저장 중 빈번하게 발생할 수 있으며, 일반적으로 생산, 포장, 및 유통 시간 보다 소매점 및 급식현장과 같이 소규모의 현장에서 더 길게 정치되고 있는 실정이다.

따라서 신선식품의 미생물 안전성을 소규모의 현장에서 검진하고 확인하기 위한 간편 분석에 대한 연구가 최근 활발하게 진행되고 있으며, 본 연구는 식품 내 식중독균을 신속, 정확하고, 간단하게 검출할 수 있는 기법 개발을 그 목표로 추진되고 있음

본 연구보고서의 제 5 장에서는 1차년도 연구를 통해 개발된 식품 내 식중독균의 filtering 농축기법에 의한 식중독균 검출한계 향상을 실험적으로 도시화한 결과를 제시하고 있으며, 제 6 장에서는 filtering 농축기술/생물학적 농축기술 또는 분자생물학적 농축기술/분자생물학적 분석 기술에 적용되는 기법의 구체적인 조건 확립에 대한 결과를, 그리고 제 7 장에서는 식품 소매점 및 급식현장에 적용할 수 있는 신속, 간편 검출기술 개발에 대한 구체적인 실험 결과를 기술하고 있음

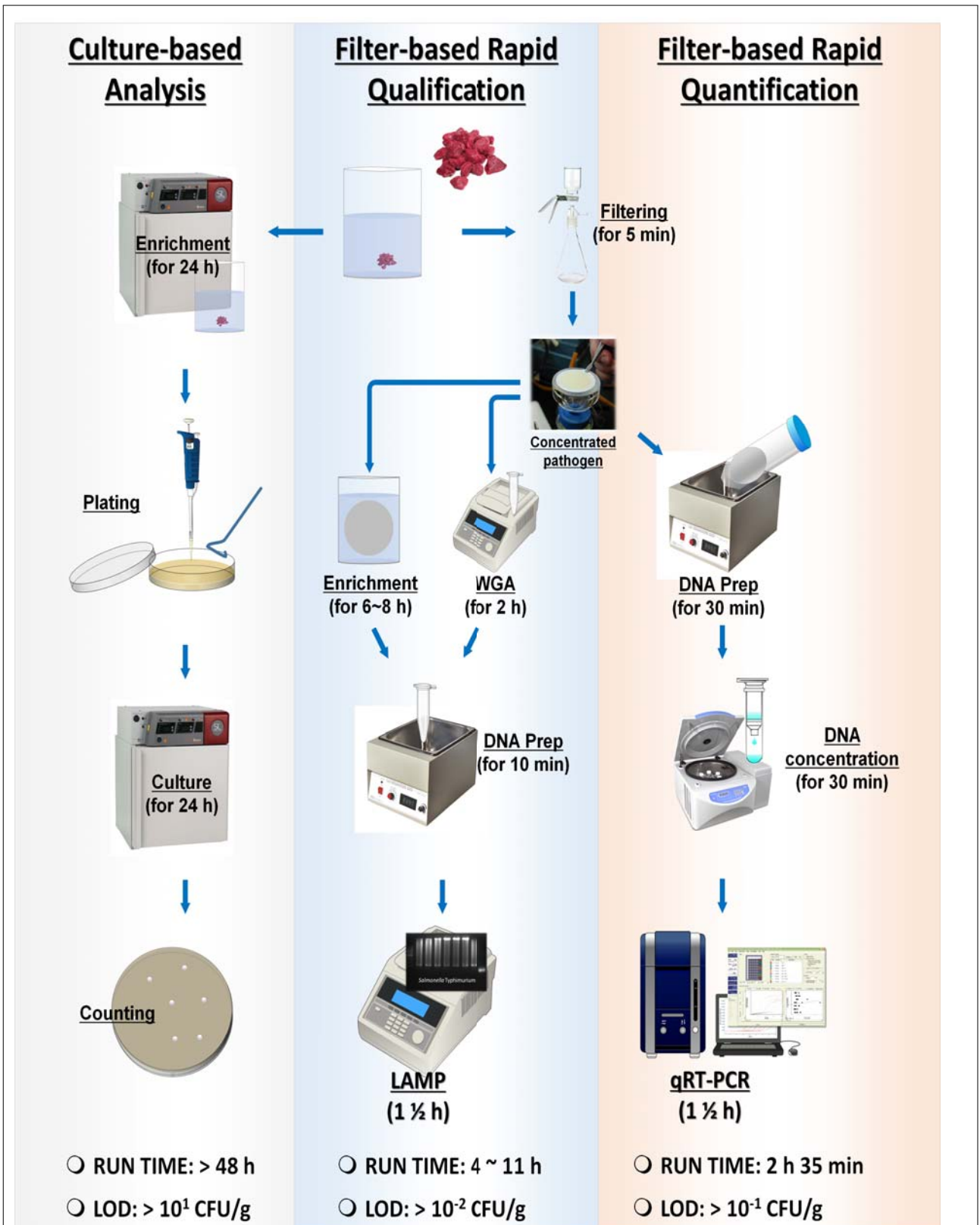


Figure 5-1. 기존 배지배양법과 본 연구에서 개발하는 식중독균 검출법의 workflows 및 각 기술의 검출시간과 검출한계

가. 식중독균 신속·정확 분석을 위한 enrichment 기술 검토

1) 실험 배경

- 고유의 색, 입자, 성분을 가지고 있는 식품에 존재하는 식중독균은 희석액으로 전이·이전을 통해 검출될 수 있으며, 만약 그렇지 않을 경우 식중독균은 식품의 입자 및 성분과 구분되지 않거나 식중독균의 DNA가 추출되지 않아 검출될 수 없음.
- 식품공전에 기술된 식중독균 검출방법에 따르면 희석액 225 mL을 이용한 검체 25 g 희석을 권장하고 있으며, 이 경우 검체의 식중독균은 10배 희석되는 결과를 나타냄.
- 특히 *S. aureus*, nonpathogenic *E. coli* 등과 같은 정량 기준의 식중독균을 식품공전법에 의거하여 검출할 경우 검체의 희석과 기준 방법으로 사용되는 배지배양법의 검출 한계에 따라 식중독균 검출방법의 최종 검출한계는 최대 250 CFU/g 수준을 나타내었으며, 배지배양법은 약 2일 이상의 분석시간이 소요되며 기존의 식중독균 검출법을 이용할 경우 신선식품에서 발생하는 식중독을 원천적으로 통제하기 어려운 실정임.
- 본 연구팀은 검체 희석에 따른 식중독균 검출 한계를 극복하기 위한 membrane filtering 기법을 연구하여 개발하였으며, 그 결과를 전년도 연구보고서에 서술하였음 (Figure 5-2).

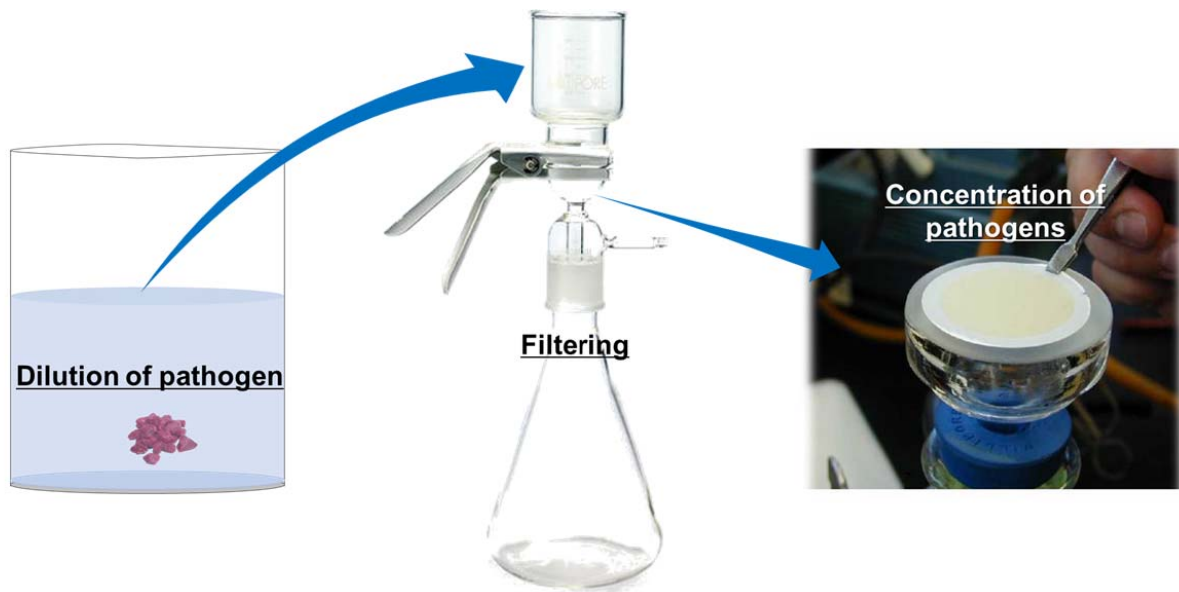


Figure 5-2. Filtering을 이용한 식중독균 농축

- 당해 연도에서는 개발된 filtering 농축기법을 식품에 적용하고 식품 내 식중독균을 신속하고 정확한 정성 및 정량 기술을 개발하기 위해 체계적인 연구를 수행하였음.
- 식중독균의 신속·정확 검출법 개발에 있어 식중독균의 대사적 특성을 이용한 생화학적 기법부터 식중독균의 DNA추출 및 검출에 관련된 분자생물학적 기법까지 기존에 시도되지 않았던 다양한 기법을 검토하고 해당 기술을 개발하고자 하였음.

2) 식중독균 검출한계 향상을 위한 filtering 농축기법의 식품적용과 효율 평가

- 본 연구팀은 전년도 연구에서 검체 및 희석액이 포함된 250 mL의 시료에서 식중독균을 지름 4.7 cm membrane filter에 농축할 수 있는 기술을 개발하였으며, 그 결과를 보고서에 기술하였음
- 당 filtering 농축기술을 식품 식중독균 검출기법에 적용하기 위해 당 기술의 농축 효율 평가가 요구되었으며, filtering 농축기술의 효율평가는 향후 개발될 새로운 형태의 식중독균 신속·정확 기술의 검출 정확도 판단에 결정적 요소로 작용될 것으로 판단됨
- Filtering 농축기술의 농축효율 평가를 위한 신선식품은 섭취빈도에 따라 양상추로 선정하였으며, 양상추에서 빈번하게 검출되는 *S. Typhimurium*을 대상으로 수행함
- Filtering 농축기술의 농축효율은 양상추에 첨가된 *S. Typhimurium*의 이론적 수와 4.7 cm membrane filter (cellulose nitrate)에 회수된 *S. Typhimurium*의 실험적 검출 수에 대한 검출비율의 비교를 통해 이루어졌으며, 통계적의미를 부여하기 위해 6반복하여 그 평균값을 제시하였다 (Table 5-1).
- Filtering 농축기술의 농축효율 평가를 위한 실험의 개략적 과정은 다음과 같음.
  - (1) 양상추 25 g에 약 101-2 CFU/25g 수준의 *S. Typhimurium* 접종
  - (2) 접종된 양상추 25 g에 멸균식염수 225 mL 첨가
  - (3) Pulsifer를 이용한 교반 (15 s)
  - (4) Filtering 농축 시스템을 이용한 *S. Typhimurium* 농축 (Figure 5-2)
  - (5) *S. Typhimurium*이 농축된 4.7 cm membrane filter의 XLD agar (*S. Typhimurium* 선택 배지) 위에서 24시간 배양 (37°C)한 후 검은색 집락 계수 (Figure 5-3)

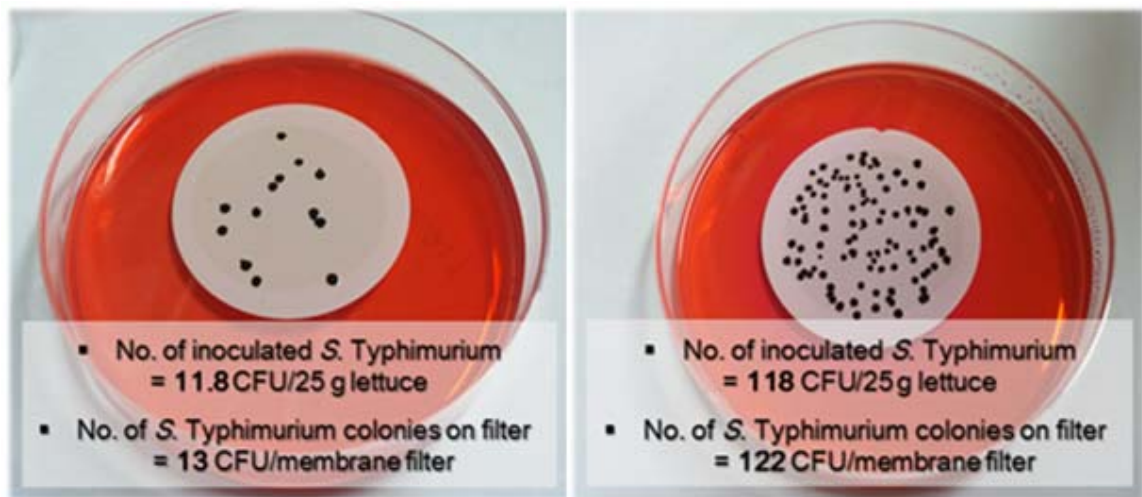


Figure 5-3. Filtering 농축에 의한 양상추 내 *S. Typhimurium* 농축과

선택배지 배양에 의한 *S. Typhimurium*의 선별적 검출

- Filtering 농축기술의 농축효율 평가에 접종된 *S. Typhimurium*의 수는 약  $1.18 \times 10^1 \pm 0.9 \times 10^1$ ,  $1.18 \times 10^2 \pm 0.9 \times 10^2$  CFU/25 g를 나타내었음.
- 25 g의 양상추의 멸균식염수 225 mL 희석 결과 멸균식염수 내 *S. Typhimurium* 최종 농도는  $1.18 \times 10^1 \pm 0.9 \times 10^1$  CFU/25 g의 경우  $4.7 \times 10^{-1} \pm 3.6 \times 10^{-1}$  CFU/mL,  $1.18 \times 10^2 \pm 0.9 \times 10^2$  CFU/25 g의 경우  $4.7 \times 10^0 \pm 3.6 \times 10^0$  CFU/mL



를 나타남.

- $4.7 \times 10^{-1} \pm 3.6 \times 10^{-1}$  CFU/mL 및  $4.7 \times 10^0 \pm 3.6 \times 10^0$  CFU/mL 수준의 *S. Typhimurium*을 식품공전에 기술된 기준방법을 이용하여 검출할 경우 100회의 배지배양 당 XLD agar 위에서 1개 또는 그 이상의 *S. Typhimurium* 집락이 발견될 경우의 수는 각각 약 4.7회 및 47회에 달하는 바 기존 방법을 이용할 경우  $1.18 \times 10^1 \pm 0.9 \times 10^1$ ,  $1.18 \times 10^2 \pm 0.9 \times 10^2$  CFU/25 g 수준으로 *S. Typhimurium*이 접종된 양상추에서 *S. Typhimurium*의 검출은 불가능함.
- 반면 filtering 농축기술을 이용할 경우 양상추에 접종된 *S. Typhimurium* 거의 전량이 4.7 cm membrane filter에 농축되어 모든 XLD agar에서 *S. Typhimurium* 집락이 발견되었음 (Figure 5-3).
- 따라서 filtering 농축기술을 식중독균 검출에 적용할 경우 검출한계를 약 10 배 또는 100 배 향상 시킬 수 있음 (Figure 5-3).
- 양상추 내 *S. Typhimurium* 농축을 위한 filtering 농축기술의 반복 적용과 농축효율은 Table 5-1과 같음.
- 농축효율 (concentration efficiency)은 접종된 4.7 cm membrane filter에서 계수된 *S. Typhimurium* 집락의 수와 양상추에 접종된 *S. Typhimurium* 수의 비를 퍼센트로 제시하였음 (Table 5-1).
- 농축효율 = (No. of *S. Typhimurium* colonies on filter)  $\times$  (No. of inoculated *S. Typhimurium*).

No. of inoculated <i>S. Typhimurium</i> (CFU/25g of sample)	No. of <i>S. Typhimurium</i> colonies on filter	Concentration efficiency (%)	Time consumed for filtering
$1.18 \times 10^1 \pm 0.1 \times 10^1$	$1.18 \times 10^1 \pm 0.1 \times 10^1$	<b>100.7 <math>\pm</math> 11.3</b>	< 3 min ( $\approx$ 115.3 sec)
$1.18 \times 10^2 \pm 0.9 \times 10^2$	$1.12 \times 10^2 \pm 0.2 \times 10^2$	<b>95.2 <math>\pm</math> 12.5</b>	< 4 min ( $\approx$ 117.5 sec)

Table 5-1. 양상추 내 *S. Typhimurium* 농축을 위한 filtering 농축기술 적용과 적용 후 농축효율\*

\*농축효율 (concentration efficiency)는 *S. Typhimurium*이 접종된 양상추의 filtering 농축기법 적용에 대한 6반복의 결과 값을 평균으로 제시함.

- Filtering 농축기법을 *S. Typhimurium* 101 CFU/25 g 수준의 양상추에 적용한 결과 농축효율은 100% 이상을 나타내었고 101 CFU/25 g 수준 집종의 경우 95%의 농축효율을 보임 그러나 선택배지 (XLD agar)에 존재하는 다양한 항생물질의 *S. Typhimurium* 성장 억제 효과와 함께 일반적으로 미생물 배지배양에서 나타나는 실험적 오차를 고려할 경우 접종된 *S. Typhimurium* 전량이 4.7 cm membrane filter에 농축된 것으로 판단됨.
- 또한 filtering 농축기법에 의해 여과되어 용출된 용액을 nutrient agar 및 XLD agar에 배양한 결과 어떠한 미생도 계수되지 않음에 따라 filtering 농축기법을 식품 내 미생물 농축 및 회수에 이용할 경우 손실 없이 식중독균을 포함하는 미생물의 손실

없이 membrane filter에 농축할 수 있는 것으로 판단됨.

- 본 연구팀이 개발한 filtering 농축기술을 기존 식품공전법에 적용할 경우 식중독균 검출한계의 10 배 이상 향상 시킬 수 있을 것으로 판단되나 기존 방법 (식품공전법)은 1일 이상 배양을 요구하는 배지배양법에 기반을 두고 있는바 당해 연도에서는 filtering 농축기법을 신속 검출법에 적용하고자하는 체계적인 연구가 수행하였음.

나. Filtering 시스템을 이용한 식중독균 농축과 enrichment를 이용한 검출한계 향상 평가

1) 식품 내 식중독균 검출에서 enrichment의 필요성

- S. Typhimurium와 같은 미생물은 식품에 1마리가 존재할 경우 식품의 유통 및 저장 간 증식이 가능하고 식품을 통해 섭취 시 식중독을 발생할 수 있음에 따라 법적으로 정성기준의 식중독균으로 분류되며, 식품에 1마리 또는 그 이상 존재할 경우 부적합으로 판정됨.
- 앞서 기술한 바와 같이 기존 식품공전에 의한 식품 내 식중독균 검출 방법에 의하면 검체의 식중독균은 검출과정 중 10배 또는 그 이상 희석됨에 따라 S. Typhimurium과 같은 정성기준의 식중독균 검출에 있어 해당 식중독균을 증식시키기 위한 enrichment 과정이 필수적으로 포함됨.
- 본 연구팀이 개발한 filtering 농축기법을 적용할 경우 식품 검체 25 g에 존재하는 모든 식중독균을 4.7 cm membrane filter에 농축할 수 있으나, 대상 식중독균이 25 g 식품 검체에 10마리 미만인 존재할 경우 처리과정 중 대상 식중독균의 구조 또는 대사 특성이 손상에 따른 식중독균 위음성 결과를 배제 할 수 없음.
- 비록 최근 분자생물학적 기법을 이용할 경우 enrichment 없는 대상 식중독균 정성·정량의 가능성이 존재하나 당 기법은 식중독균 DNA 추출과정이 필요하며, 4.7 cm membrane filter에 대상 식중독균이 10개 또는 그 미만으로 존재할 때 DNA 추출과정 중 대상 식중독균 DNA이 희석되어 대상 식중독균의 증균이 요구될 수 있음.
- 본 연구에서는 분자생물학적 기법을 이용하여 식품 내 식중독균 검출에서 식품, 식중독균 종류, 및 식중독균의 접종 수준에 따른 검출 결과를 enrichment 배양 이전과 이후를 비교하여 분자생물학적 식중독균 검출기법의 식품, 식중독균, 및 접종 수준별 검출한계를 조사하였음.
- 식중독에 취약한 신선식품인 훈제연어, 쇠고기, 양상추를 대상 식품으로 S. aureus, S. Typhimurium, E. coli O157:H7, 및 B. cereus을 대상 식중독균으로 선정하여 연구를 수행하였음.

Pathogen	Enrichment media
S. Typhimurium	0.2% peptone water
S. aureus	TSB containing 10% NaCl
E. coli O157:H7	mTSB (TSB containing novobiocin and bile salt)
B. cereus	N.A.

Table 5-2. 대상 식중독균별 선택배지

Species	Gene	Sequence (5' - 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Product size(bp)	Reference
<i>S. Typhimurium</i>	HTO-F	ACTGGCGTTATCCCTTTCTCTGGTG	62.3	496	Cohenetal. (1993)
	HTO-R	ATGTTGTCCTGCCCTGGTAAGAGA	62.7		
<i>S. aureus</i>	nuc-F	GCGATTGATGGTGATACGG	53.5	275	BrakstadOG etal.(1992)
	nuc-R	CAAGCCTTGACGAACTAAAGC	54.3		
<i>E. coli</i> O157:H7	stx2-F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	56	255	StephanieM.Br andt etal.(2011)
	stx2-R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	54.2		
<i>B. cereus</i>	hem-F	CTGTAGCGAATCGTACGTATC	52.6	185	Wangetal. (1997)
	hem-R	TACTGCTCCAGCCACATTAC	54.5		

Table 5-3. 각 식중독균 검출에 이용된 primer 정보

2) Enrichment 유무에 따른 대상 식품 내 대상 식중독균의 검출한계 평가

가) 검출한계 평가에 대한 개략적 연구방법은 아래와 같음

- 혼제연어, 쇠고기, 양상추를 10 g 씩 멸균백에 소분 후 *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, 및 *B. cereus*를 100 ~ 102 CFU/g 수준으로 접종
- 각 식중독균에 대한 선택배지 90 mL을 멸균백에 첨가하고 pulsifier를 이용하여 교반한 후 24 시간동안 배양 (각각의 식중독균에 대한 선택배지는 Table 5-2에 기술됨)
- *B. cereus*의 경우 증균배지가 존재하지 않음에 따라 enrichment을 수행하지 않음
- Enrichment 배양 후 배양액 1 mL을 취한 후 DNA prep-kit (Takara MiniBest DNA extraction kit Ver. 5.0)을 이용하여 DNA 추출.
- Enrichment를 하지 않은 처리구의 경우 90 mL 멸균식염수 첨가·교반한 후 1 mL을 취하여 DNA를 추출함.
- PCR을 이용한 식중독균 검출을 위한 primer sets 및 PCR 조건은 Table 5-3와 5-4과 같음.
- 식중독균의 식품 첨가 및 enrichment 유무에 따른 검출한계 평가는 6번 반복되었으며, 전기영동 결과 (Figure 5-4)에서 나타나는 검출 유무를 빈도수로 나타냄 (Table 5-5)

Step	Temperature	Time	
Starting reaction	94°C	5 min	
Denaturation	94°C	30 sec	
Annealing	T <sub>m</sub> for each primer	30 sec	35 cycles
Extension	74°C	1 min	
Shut down	74°C	5 min	

Table 5-4. 식품 내 식중독균 검출을 위해 수행된 PCR 조건

나) Enrichment 없이 실시된 PCR 검출 결과

다) 훈제연어, 쇠고기, 양상추에 접종된 *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, 및 *B. cereus*의 enrichment 없이 실시한 PCR검출 결과는 Figure 5-4 같음.

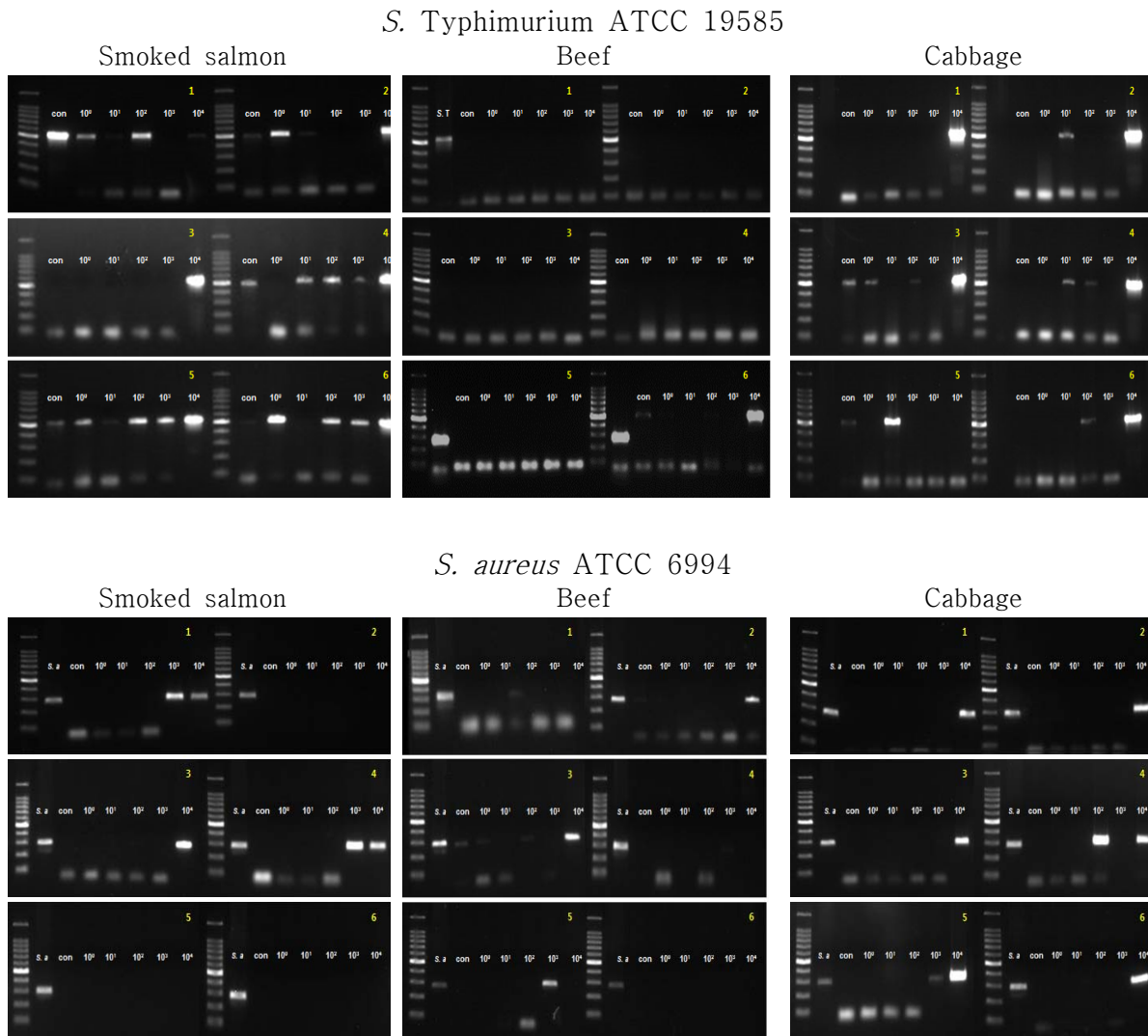
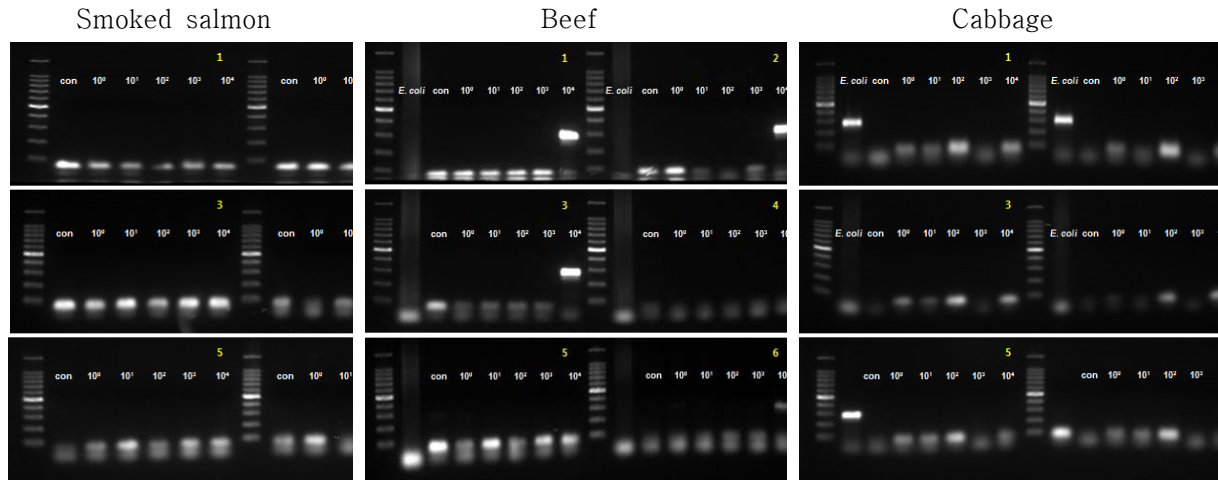


Figure 5-4. Enrichment 배양을 하지 않았을 경우 식품 내 식중독균 DNA의 PCR 증폭 및 식중독균 검출 결과

*E. coli* O157:H7 ATCC 35150



*B. cereus* ATCC 10876

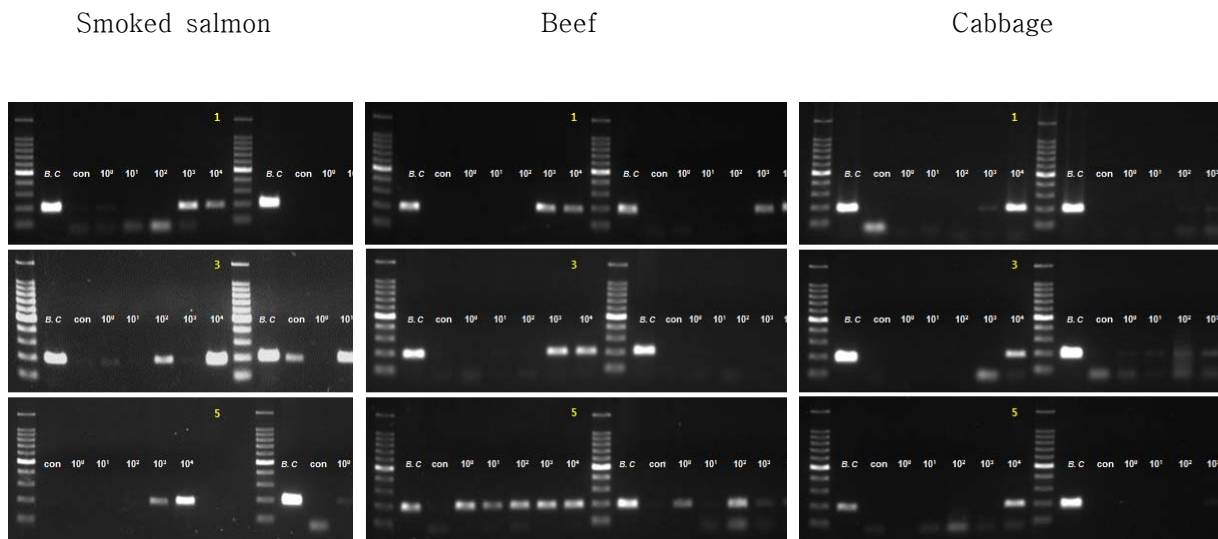
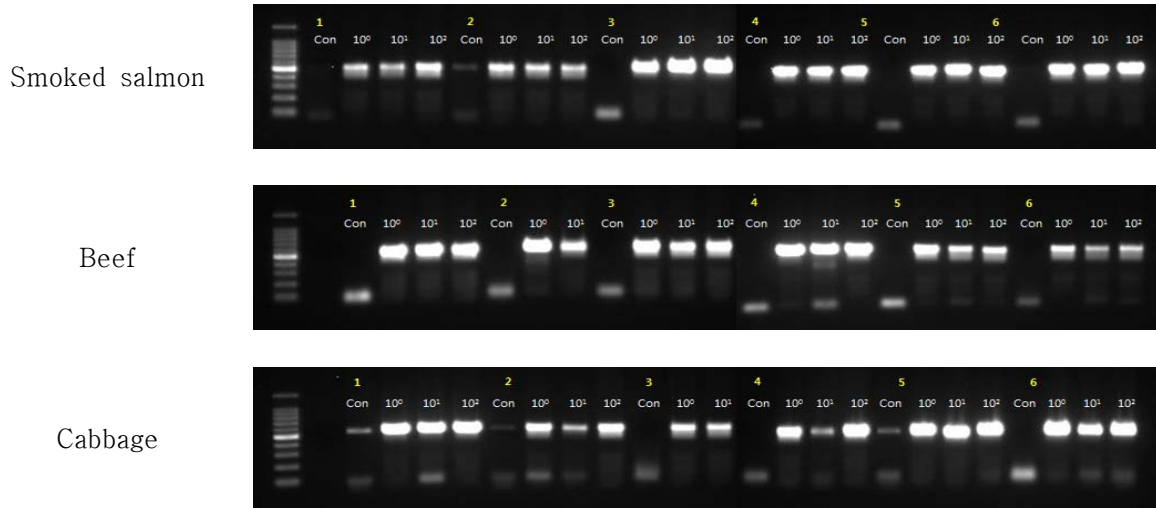


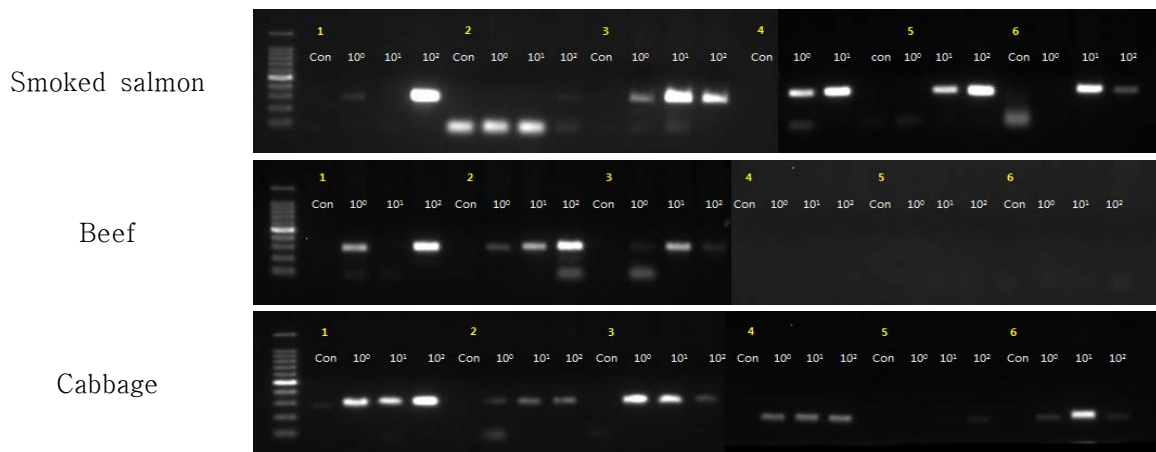
Figure 5-4. Enrichment 배양을 하지 않았을 경우 식품 내 식중독균 DNA의 PCR 증폭 및 식중독균 검출 결과

라) 훈제연어, 쇠고기, 양상추에 접종된 *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, 및 *B. cereus*의 enrichment 와 함께 실시한 PCR검출 결과는 Figure 5-5 같음

*S. Typhimurium* ATCC 19585



*S. aureus* ATCC 6994



*E. coli* O157:H7 ATCC 35150

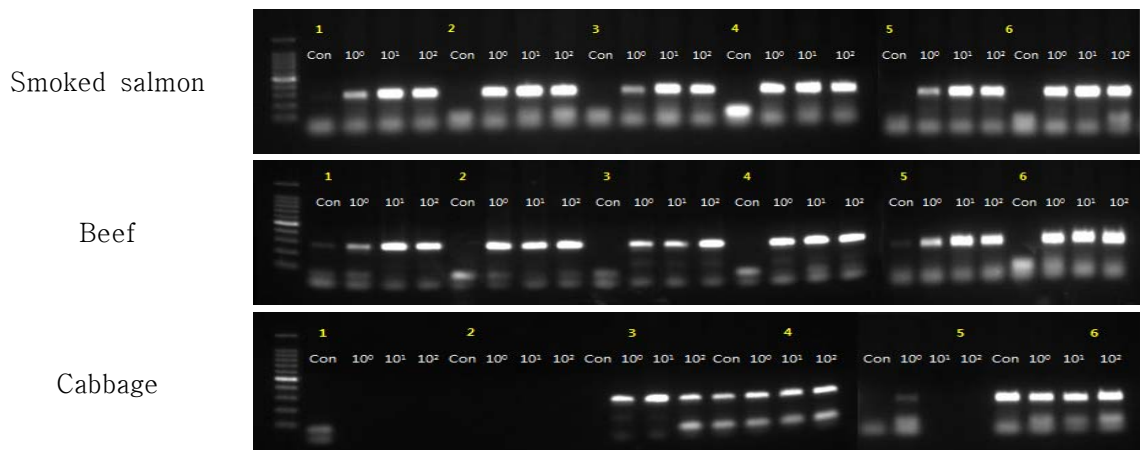


Figure 5-5. Enrichment 배양 후 식품 내 식중독균 DNA의 PCR 증폭 및 식중독균 검출 결과

마) Enrichment 유무에 따른 식품 내 식중독균의 PCR에 의한 검출

○ Enrichment 유무에 따른 식품 내 식중독균의 PCR에 의한 검출 유무를 빈도로 표현할 경우 Table 5-5와 같음.

Pathogens	Level of pathogen (CFU/g)	With enrichment			Without enrichment		
		Cabbage	Beef	Smoked salmon	Cabbage	Beef	Smoked salmon
<i>S. Typhimurium</i>	10 <sup>4</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	5/6	1/6	6/6
	10 <sup>3</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	0/6	0/6	3/6
	10 <sup>2</sup>	6/6	6/6	6/6	3/6	0/6	4/6
	10 <sup>1</sup>	6/6	6/6	6/6	3/6	0/6	2/6
	10 <sup>0</sup>	6/6	6/6	6/6	1/6	0/6	4/6
<i>S. aureus</i>	10 <sup>4</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	6/6	2/6	3/6
	10 <sup>3</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	1/6	1/6	2/6
	10 <sup>2</sup>	6/6	3/6	6/6	1/6	1/6	0/6
	10 <sup>1</sup>	5/6	2/6	4/6	0/6	1/6	0/6
	10 <sup>0</sup>	5/6	3/6	3/6	0/6	1/6	0/6
<i>E. coli</i> O157:H7	10 <sup>4</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	0/6	4/6	0/6
	10 <sup>3</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	0/6	0/6	0/6
	10 <sup>2</sup>	3/6	6/6	6/6	0/6	0/6	0/6
	10 <sup>1</sup>	3/6	6/6	6/6	0/6	0/6	0/6
	10 <sup>0</sup>	4/6	6/6	6/6	0/6	0/6	0/6
<i>B. cereus</i>	10 <sup>4</sup>	N.A. due to no enrichment media for <i>B. cereus</i>			6/6	5/6	6/6
	10 <sup>3</sup>				4/6	5/6	5/6
	10 <sup>2</sup>				1/6	2/6	2/6
	10 <sup>1</sup>				1/6	1/6	1/6
	10 <sup>0</sup>				1/6	2/6	3/6

Table 5-5. Enrichment 유무에 따른 식품 내 식중독균의 PCR 검출 유무의 빈도

- 식품 내 식중독균 검출 빈도는 enrichment 배양 및 접종 수준의 증가에 따라 높아지는 양상을 나타내었음.
- 식품에 접종된 식중독균의 증균을 위해 enrichment 배양을 수행하였으나, 모든 검체에서 식중독균이 검출되지 않는 결과를 보여줌.
- 본 연구에 사용된 식품은 인위 접종한 식중독균 이외에 식품에 내재된 미생물을 포함하며 대상 식중독균의 증균을 위해 식품검체를 enrichment 배양하였으나, 대상 식중독균은 enrichment 배양 중 식품에 내재된 미생물과 경쟁이 불가피 함 타 처리구에 비한 양상추에서 *E. coli* O157:H7의 낮은 검출빈도는 양상추에 내재된 미생물과 접종된 *E. coli* O157:H7의 경쟁의 결과로 추정됨.
- 특히 enrichment 배양이 배제된 조건에서 104 CFU/g 수준으로 식중독균이 접종되었을 경우의 검출 빈도가 그 이하 수준으로 접종된 검체에 비해 현저히 높은 검출 빈도를 나타내었으며 쇠고기에서 식중독 검출 빈도는 타 식품에 비해 낮은 것으로 나타났음.

- 식품에 존재하는 식중독균을 PCR을 이용하여 검출할 경우 DNA 추출과정이 포함됨에 따라 DNA 추출과정에 따른 희석 효과를 고려해야함 본 연구는 DNA 추출 키트를 사용하였으며, 당 키트는 spin column을 이용하는 방법으로 1 mL에 존재하는 식중독균 DNA가 최종 50  $\mu$ L의 elution buffer에 의해 용출되고 PCR 수행 중 DNA 추출물 4  $\mu$ L를 첨가 하는 바 식중독균 DNA를 103 CFU/g 수준으로 접종된 식품에서 추출하여 PCR에 사용할 경우 PCR reaction 당 약 10개 미만의 DNA가 첨가되며 104 CFU/g 수준으로 접종된 식품에서 식중독균 DNA를 추출하여 PCR에 반응할 경우 약 100 개 미만의 식중독균 DNA가 PCR 반응에 첨가되는 것으로 계산됨.
- Enrichment 배양이 포함되지 않은 경우 식중독균 104 CFU/g 접종 검체에서 높은 검출율은 PCR 반응에 첨가된 DNA의 수에 의한 것으로 판단됨.
- 식품에서 유래되는 다양한 성분은 DNA 추출 효율 및 PCR에 의한 대상 DNA의 증폭에 부정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 쇠고기에서 *S. Typhimurium*의 낮은 검출 빈도와 모든 식품에서 *E. coli* O157:H7의 낮은 검출 빈도는 식품에 존재하는 성분에 의한 DNA 추출효율 및 PCR 작용에 대한 간섭에 의한 것으로 판단됨.
- 따라서 식품 내 식중독균을 filtering 시스템을 이용하여 4.7 cm membrane filter에 농축하여 enrichment에 적용할 경우 식중독균 초기 농도 상승에 따른 빠른 enrichment와 함께 식품에서 유래되는 성분을 손쉽게 제거할 수 있을 것으로 기대됨.

#### 다. Filtering에 의한 식품 내 식중독균 농축과 enrichment 적용

##### 1) Enrichment 필요성

- 기존 식품공전법에 의한 배지배양법의 경우 24시간 이상의 배양시간이 요구됨에 따라 식중독균의 신속 검진 적용이 실질적으로 불가능함.
- 최근 폭넓게 사용되고 있는 분자생물학적 기법을 이용할 경우 수 시간 이내에 식중독균을 검출이 가능하나 당 기법은 식중독균 DNA 추출이 필수적이고 DNA 추출과정 중 DNA 희석이 불가피 함 결과적으로 분자생물학적 기법을 이용하여 식중독균을 검출할 경우 높은 수준의 식중독균이 필요함.
- Filtering 시스템을 이용하여 식품 내 식중독균을 농축할 경우 배지배양법의 검출한계가 10 ~ 100 배 이상 향상될 수 있으며(Figure 5-2, Table 5-1) 당 기법의 분자생물학적 검출 기법 적용에 따른 검출한계 향상이 기대됨.

##### 2) Membrane Filtering에 의한 enrichment

- 그러나 극미량 (약 10<sup>-1</sup> ~ 100 CFU/g)의 식중독균이 존재하는 식품의 경우 filtering 시스템에 의한 식중독 농축에도 불구하고 membrane filter에 농축되는 식중독균의 수가 1 ~ 100 마리에 불과하며, 식중독균 DNA를 추출할 경우 희석효과를 극복하기 어려움.
- 본 연구팀은 membrane filter에 농축된 식중독균의 enrichment 배양을 통해 DNA



회석효과를 극복할 수 있을 것으로 기대함.

- 또한 filtering 시스템을 이용하여 식품 내 식중독균을 농축하고 배양할 경우 식품에서 유래되는 식품성분의 식중독균 성장 및 DNA 추출에 대한 간섭을 배제할 수 있으므로 당 기술 적용은 분자생물학적 식중독균 검출기법의 효율을 향상 시킬 수 있을 것으로 판단하였음.

3) Membrane filtering에 의한 enrichment 테스트

- 본 연구는 4.7 cm membrane filter에 농축된 식중독균이 enrichment 배양에 따른 증식 특성을 파악하고자 하였으며, 그 결과를 통해 filtering 농축기술과 분자생물학적 기법을 이용한 식중독균 검출기법의 검출한계 향상가능성을 판단하였음.
- Membrane filter에 농축된 식중독균의 enrichment 배양 간 증식 특성 파악을 위해 대상 식품으로는 양상추를 그리고 대상 식중독균으로는 S. Typhimurium을 선정하여 연구에 이용함.
- Membrane filter 상의 S. Typhimurium의 농도에 따른 enrichment 배양 간 증식특성 파악을 위해 S. Typhimurium의 접종 수준을 달리 하였으며, 개략적인 연구방법은 다음과 같음.
  - 양상추 25 g을 교반용 멸균백에 소분 후 S. Typhimurium 100 ~ 102 CFU/g 수준 접종.
  - 멸균식염수 225 mL 첨가 후 pulsifier를 이용한 교반.
  - Filtering 시스템을 이용한 식중독균 농축.
  - 식중독균이 농축된 4.7 cm membrane filter를 7.6 × 12.7 cm 멸균백에 넣은 후 S. Typhimurium 선택배지인 0.2% peptone water 11.25 mL 첨가.
  - 37°C 배양 간 1 시간 마다 2 mL의 배양액을 취하여 1 mL은 배지배양법을 이용하여 정량하고 1 mL은 DNA를 추출하여 real-time PCR을 이용하여 정량.
- Real-time PCR 조건은 Table 5-6, 5-7에 기술함.

4) S. Typhimurium의 Membrane filtering에 의한 enrichment 결과

- 미생물 증식은 최대 성장 속도 (maximum growth rate) 및 성장에 대한 지체시간 (lag time)에 의해 크게 영향을 받으며 최대 성장 속도의 경우 배양액의 영양성분에 큰 영향을 받으며, 지체시간은 최초 미생물의 수 및 영양성분에 영향을 받는 것으로 알려져 있음.

Reagent	Volume	Final Conc.
Prime Ex Taq (Probe qPCR) (2X conc.)	10 µL	1X
PCR Forward Primer (10µM)	1 µL	0.25 µM
PCR Reverse Primer (10µM)	1 µL	0.25 µM
TaqMan Probe	1 µL	0.25 µM
Template	2 ~ 4 µL	
dH <sub>2</sub> O(sterile distilled water)	3 ~ 5 µL	
Total		20 µL

Table 5-6. Real-time PCR에 사용된 PCR 용액의 성분 조건

PCR step	Thermal condition	
Initial denaturation	95°C, 30 sec	
Denaturation	95°C, 5 sec	Reps.
Annealing / extension	60°C, 30 sec	40

Table 5-7. Real-time PCR (TaqMan) thermal condition

- Membrane filter에 농축된 *S. Typhimurium*은 처리구에 따라 수를 달리하였으나, 동일한 배지 및 온도에서 enrichment됨에 따라 성장의 기울기는 모든 처리구에서 비슷한 결과를 나타내었음 (Figure 5-6a).
- 그러나 membrane filter에 존재하는 *S. Typhimurium*의 수가 적어질수록 더 오랜 지체기를 가지는 양상을 보임 (Figure 5-6a).
- 실험결과 양상추는 약  $1.95 \times 10^0 \sim 1.95 \times 10^2$  CFU/g 수준으로 접종된 바 membrane filter에 농축된 *S. Typhimurium* 수는 약  $4.85 \times 10^1 \sim 1.95 \times 10^3$  CFU로 추정됨.
- Membrane filter에 농축된 *S. Typhimurium*이 전량 enrichment 배지에 전량 전이됨이고 가정할 경우 *S. Typhimurium*은 enrichment 배지 1 mL 당 약  $4.3 \times 10^0 \sim 4.3 \times 10^2$  CFU가 존재할 것으로 추정되며, Takara MiniBest DNA extraction kit Ver. 5.0을 이용한 *S. Typhimurium* DNA 추출 후 용출액 2  $\mu$ L 당 약 0.17 ~ 17.3 개의 *S. Typhimurium*이 함유될 것으로 추정됨 따라서 membrane filter에 농축된 *S. Typhimurium*이 전량 enrichment 배지에 전량 전이됨이고 가정할 경우  $10^1 \sim 10^2$  CFU/g 수준으로 접종된 양상추의 *S. Typhimurium*은 enrichment 배양 없이 검출될 수 있음.
- 그러나 real-time PCR 분석 결과 enrichment 배양 0 시간에서 *S. Typhimurium*이 검출되지 않음에 따라 membrane filter에서 *S. Typhimurium*은 enrichment 배지로 원활하게 전이되지 않은 것으로 판단됨 (Figure 5-6b).
- 비록 membrane filter에 흡착된 *S. Typhimurium*은 enrichment 배양액에 원활하게 전이되지 않았으나 enrichment 배양에 따라 증균되어  $1.95 \times 10^2$  CFU/g *S. Typhimurium*이 접종된 양상추는 2시간 enrichment 배양 후,  $1.95 \times 10^1$  CFU/g는 3시간 배양 후, 그리고  $1.95 \times 10^0$  CFU/g는 4 시간 배양 후 real-time PCR을 이용하여 *S. Typhimurium*을 검출할 수 있음 (Figure 5-6b).
- 기존 식품공전에 기술된 배지배양법에 따라 양상추의 *S. Typhimurium*을 검출할 경우, 검출한계는 101 CFU/g 또는 그 이상을 나타냄은 물론 enrichment 배양 및 평판배지 도말·배양을 포함하여 약 2일의 분석 시간이 소요됨.
- 반면 본 연구의 결과는 filtering 농축기술과 enrichment 배양기법 그리고 real-time PCR 검출기법을 복합적으로 적용할 경우 식품 내 100 CFU/g 수준의 식중독균을 filtering 농축 5분, enrichment 배양 4 시간, DNA 추출 30분, real-time PCR 90분을 포함하여 총 7시간 30분 이내에 검출할 수 있는 가능성을 제시함.
- 이와 함께 기존 배지배양법의 enrichment 방법은 enrichment 배지 225 mL 첨가가

요구되나 filtering 농축기술을 적용할 경우 11.25 mL의 enrichment 배지가 요구되는 바 filtering 농축기술을 적용할 경우 경제적 효과를 꾀할 수 있음.

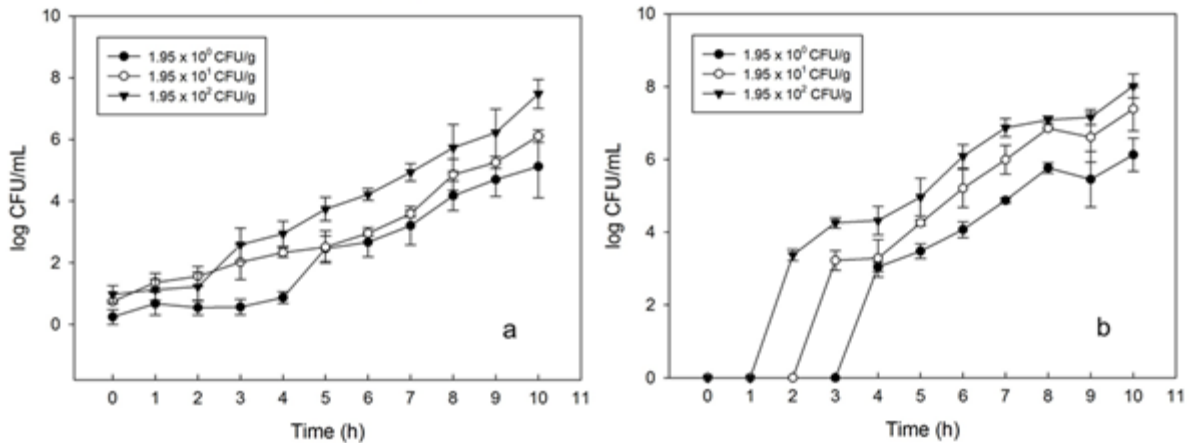


Figure 5-6. Membrane filter에 농축된 *S. Typhimurium*의 enrichment 배양에 따른 성장.

a) 평판배지법에 의한 정량 결과, b) real-time PCR에 의한 정량 결과

라. 식중독균 DNA 등은 증폭을 위한 whole genome amplification (WGA) 기법 검토

1) WGA에 의한 DNA 증폭의 이론적 배경 및 식중독균 검출 적용 가능성 판단

- WGA 기법은 비교적 최근 소개된 기술로써 시료의 DNA를 상온에서 증폭할 수 있음
- WGA는 시료의 DNA를 무작위적으로 증폭하기 위해 6 ~ 8개의 nucleotides로 구성된 random primer를 사용하며, 일반적으로 *Bacillus subtilis* phase polymerase를 기반으로 생산된  $\Phi 29$  polymerase를 이용하여 대상 DNA를 증폭한다 (Figure 5-7).
- 특히  $\Phi 29$  polymerase는 proof-reading 기능을 가지고 있어 WGA는 타 DNA 증폭 기법에 비해 대상 DNA를 아주 정확하게 증폭하는 특성을 나타냄.
- WGA는 미량 DNA를 정확하게 증폭할 수 있음에 따라 검체에 미량 존재하는 세균 균종의 DNA 증폭과 증폭을 통한 세균균종의 DNA sequencing (pyrosequencing)에 적용되고 있으며, 또한 법의학 분야에서 활발하게 적용되고 있음 현재 유전병 진단 기법 연구가 활발하게 진행되고 있는바 향후 WGA를 이용한 새로운 진단방법 개발이 기대됨 (Lee 등 2015., Blair 등 2015). WGA를 식품에 극미량 존재하는 식중독균 검출에 적용할 경우 검출한계의 향상을 꾀할 수 있을 것으로 기대되나 식중독 검출 및 식품안전분야에서 WGA 연구는 아직 초기단계에 머물러 있음.
- 더욱이 WGA 1회 수행당 약 2만원 이상에 달하는 WGA 키트 높은 가격은 식품안전분야에서 WGA 연구를 직접적으로 방해하는 요소로 판단됨.
- 본 연구는 식중독균 검출에 WGA를 적용하여 검출한계 및 검출시간 향상을 꾀하고자 먼저 WGA 적용 가능성을 판단하였고, WGA 키트 제조의 실험적·경제적 가능성을 판단함과 동시에 직접 제조한 WGA 키트를 이용한 대상 DNA 증폭을 확인하고자 함.
- 식품 내 식중독균 검출을 위한 WGA 사용에 대한 구체적 연구는 현재까지 보고된

바 없다. 그러나 1개의 E. coli DNA 증폭을 위한 WGA 기법 적용에 대한 연구가 보고된 바 있으며, 당 연구에 따르면 16시간의 WGA 반응을 통해 1개의 E. coli DNA가 109배 증폭됨 (Raghunathan 등 2005).

- Maheux 등 (2011)의 연구에 의하면, 음용수에 존재하는 E. coli를 WGA를 이용하여 3시간 이내에 1개의 E. coli 검출에 성공한 바 있음
- 그러나 두 연구 이상 검체 또는 음용수를 검체로 사용하였고 식품을 검체로 사용하지 않음에 따라 당 기법을 식품 내 식중독균 검출에 직접 적용할 수 없음.
- 특히 식품을 검체로 사용할 경우 식품에서 유래된 DNA의 WGA 참여와 추후 real-time PCR 간섭이 예상됨에 따라 구체적인 연구가 필요할 것으로 판단됨.
- 또한 두 연구는 상용화되어 있는 WGA 키트를 사용하였으며, 당 키트는 1회 분석당 약 2만원에 달함에 따라 식품 식중독균 검출 적용에 경제적 문제점을 야기할 것으로 판단되어 본 연구팀은 WGA 키트를 직접제작하여 사용하기 위한 연구를 수행함.

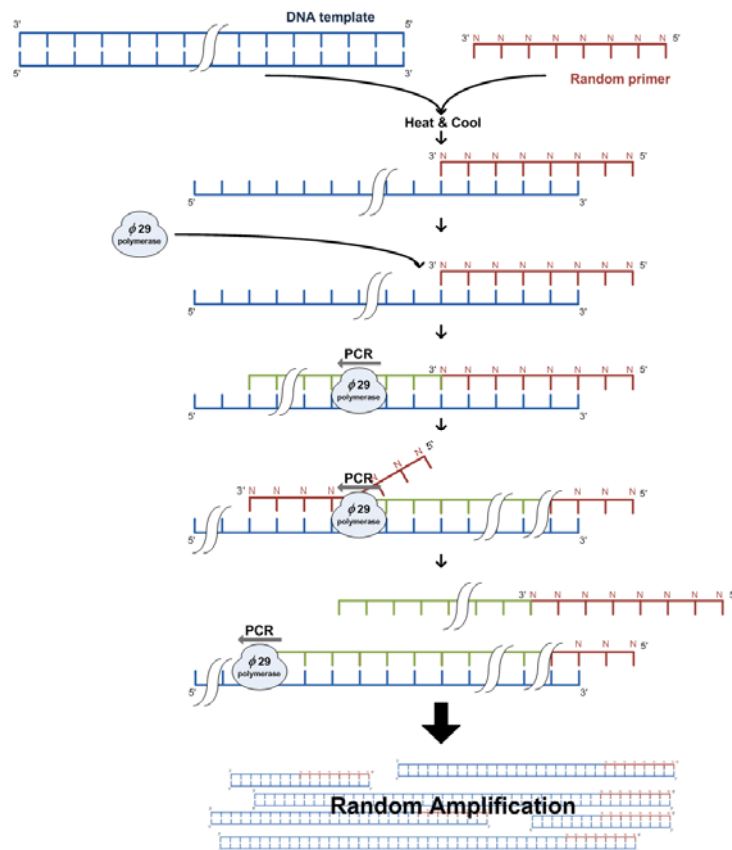


Figure 5-7. Whole genome amplification (WGA)에 의한 DNA 증폭

2) 식품 내 식중독균 신속 검출을 위한 proto-type WGA 키트 개발

- 본 연구팀은 WGA 키트의 자체제작 가능성을 판단하기 위해 WGA 키트의 주요 요

소인  $\Phi$ 29 polymerase 수급 가능성을 조사한 결과 국내 2개 업체 및 국외 1개 업체에서  $\Phi$ 29 polymerase가 제작·판매됨을 확인하였으며,  $\Phi$ 29 polymerase를 구매하여 키트화 할 경우 WGA를 1회 당 2천원 미만으로 수행할 수 있음을 확인함 그 중 국내 1개 업체의  $\Phi$ 29 polymerase (HelixAmp Phi29 DNA Pollymerase)를 구매·이용하여 WGA에 의한 식중독균 DNA 증폭 가능성을 조사함.

- 다양한 문헌 조사를 통해 WGA 수행을 위한 buffer 및 PCR 조건을 Table 2-8과 같이 결정하였다 (Raghunathan 등 2005, Renard 등 2008, Maheux 등 2011).
- WGA 수행의 온도 조건은 다음과 같음.
  - 식중독균 DNA 1  $\mu$ L와 sample buffer 4  $\mu$ L을 섞은 용액을 95°C에서 3분간 가열 후 냉각.
  - 냉각된 용액에 reaction buffer 14  $\mu$ L과  $\Phi$ 29 polymerase 1  $\mu$ L을 첨가 후 30°C 2시간 반응.
  - 본 연구에서는 본 연구팀이 직접 제조한 WGA 키트의 식중독균 DNA 증폭 가능성을 판단하기 위해 추출된 S. Typhimurium DNA 106/ $\mu$ L을 WGA에 의한 DNA 증폭에 사용하였으며, WGA 결과 산물을 2% agarose gel에 전기영동하여 그 결과를 관찰하였음 (Figure 5-8).
- $10^6$  S. Typhimurium DNA를 본 연구팀이 직접 제조한 WGA 키트에 적용한 결과 S. Typhimurium DNA의 원활한 증폭을 확인할 수 있었다. 따라서 직접 제조한 WGA 키트는 식중독균 신속검출에 적용될 수 있을 것으로 판단됨.
- 다만 당 WGA 키트는 106 미만의 S. Typhimurium DNA를 증폭하지 못하는 결과가 관찰됨에 따라 WGA DNA 증폭효율 향상에 대한 연구가 요구되는 실정이며, 현재 이를 극복하기 위한 다각도의 연구가 진행 중.
- 특히 문헌에 따르면 WGA에 사용되는  $\Phi$ 29 polymerase의 품질이 대상 DNA 증폭에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있음에 따라  $\Phi$ 29 polymerase 종류에 따른 DNA 증폭효율에 대한 평가를 진행하고 있음.

Component		Concentration (final in 20 $\mu$ L)
Sample buffer	Tris-HCl	0.8 mM
	MgCl <sub>2</sub>	0.05 mM
	8-mer random primer	5 mM
Reaction buffer	dNTPs	0.4 mM
	Tris-acetate	33 mM
	Mg-acetate	10 mM
	Tween 20	66 mM
	K-acetate	0.1 % (v/v)
	DTT	1 mM
$\Phi$ 29 polymerase		5 U
Final volume		20 $\mu$ L

Table 5-8. 식중독균 WGA 수행에 사용된 buffer 및 PCR 성분 조건

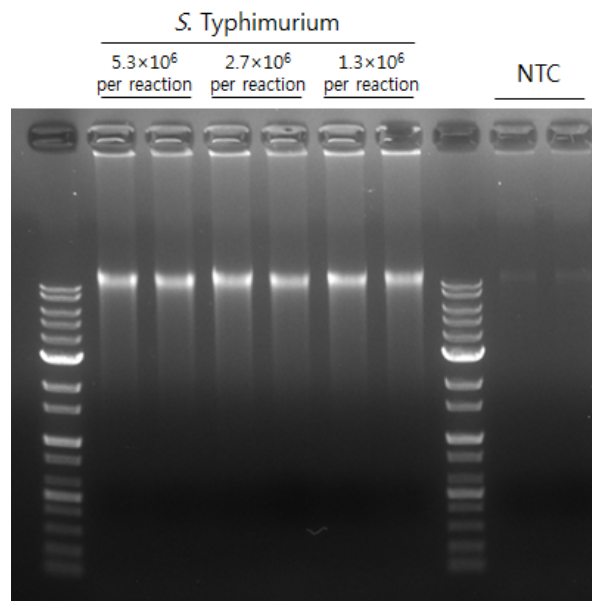


Figure 5-8. *S. Typhimurium* whole genome 증폭을 위한 WGA 키트 적용과 전기영동 결과

## 6. 6장. 식중독균의 신속·정확 검출을 위한 filtering 시스템/enrichment/분자생물학적 기법융합과 최적 조건

가. 정량 PCR (quantitative real-time PCR; Q-PCR)의 방법 비교와 식중독균 검출을 위한 최적 조건 확립

### 1) 개요

- 식품공전에 기술된 식중독균 검출방법인 배지배양법을 이용하여 식품 내 식중독균을 검출할 경우 최소 1일 이상의 배양시간이 요구되는 반면 PCR 등과 같은 분자생물학적 기법을 이용할 경우 수 시간 이내에 대상 식중독균 검출이 가능함.
- 현재 식품 내 식중독균 신속·검출에 대한 연구는 PCR 및 이를 응용한 방법을 중심으로 이루어지고 있음 특히 Q-PCR 기법의 발전은 식중독균 정량을 가능케 하여 이를 통한 식중독균 신속·정확 검출기법에 대한 연구가 활발함 (Law 등 2015).
- 본 연구는 식품 내 식중독균의 신속하고 정확한 정성 및 정량을 위해 RT-PCR 기반의 검출기법 개발을 최종 목적으로 함.

### 2) Q-PCR 방법 중 TaqMan과 SYBERgreen 방법의 비교

- Q-PCR은 대상 DNA 검출 방법에 따라 TaqMan과 SYBR green 방법으로 분류됨 두 방법 모두 형광물질의 발광억제 및 생화학적 발광 반응을 이용하여 DNA 증폭 유무를 기반으로 하고 있으나 TaqMan 방법의 경우 추가적인 probe의 첨가와 당 probe에서 발생하는 발광억제 및 발광반응을 기반으로하고 있음 (Figure 6-1) 그러나 SYBR green 방법의 경우 probe가 추가적으로 첨가되지 않고 증폭되는 DNA 이중구조에 포함되는 SYBR green의 발광현상을 이용함.
- 일반적으로 대상 DNA에 특이적으로 반응하는 probe가 추가되는 TaqMan 방법이 SYBR green 방법에 비해 더욱 specific한 것으로 알려져 있음 그러나 추가적인 PCR 과정이 포함됨에 따른 TaqMan 방법은 SYBR green 방법에 비해 경제적이지 못한 단점을 나타냄.
- 본 연구에서는 식중독균 검출을 위해 사용될 수 있는 두 가지 Q-PCR 방법의 특성을 파악하고 정량결과에 대한 특성을 비교하여 향후 식중독균 신속검출에 사용될 수 있는 적합한 Q-PCR 방법을 선정하고자 체계적인 실험을 수행함.
- Q-PCR 결과는 cycle threshold (Ct) value로 나타나며, Ct value는 대상 DNA 증폭에 따른 형광 intensity의 검출한계 초과를 의미함에 따라 두 Q-PCR (TaqMan, SYBR green)방법의 증폭효율의 비교는 Ct value의 비교를 통해 이루어졌음 특히 RT-PCR은 식중독균 정성뿐만 아니라 정량에 적용될 수 있음에 따라 Q-PCR에 사용된 식중독균 DNA 수에 대한 Ct value의 standard curve의 1차 방정식 fitting 유무에 유의함.
- TaqMan Q-PCR의 조건은 Table 5-6, 5-7과 같음 또한 SYBR green Q-PCR의 온도조건은 TaqMan Q-PCR과 동일하고 시약 조건은 Table 6-1과 같음.

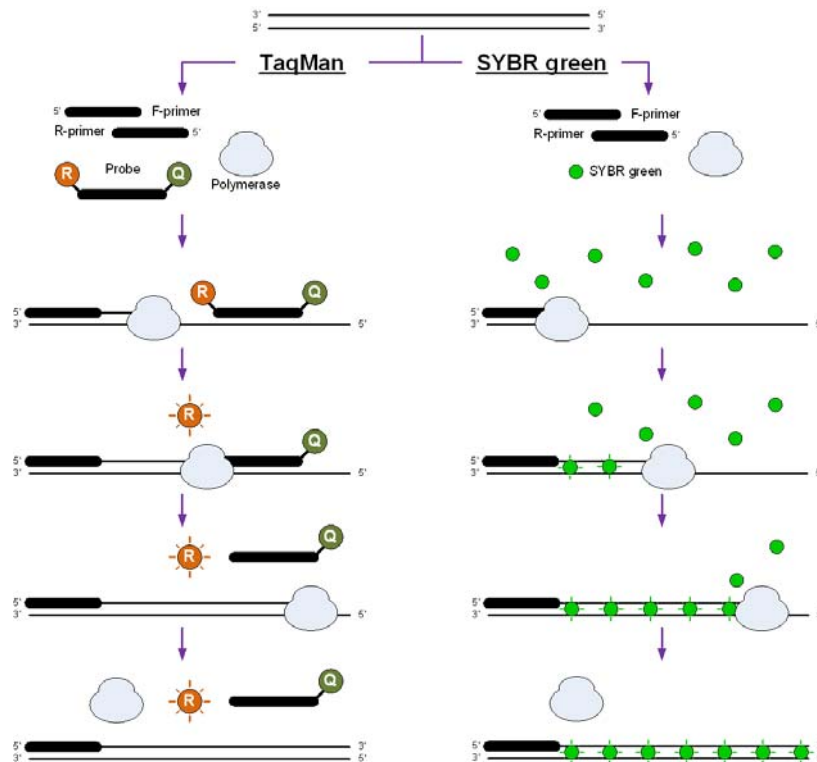


Figure 6-1. TaqMan 및 SYBR green 방법의 Q-PCR의 workflows

Reagent	Volume	Final Conc.
SYBR Premix Ex Taq (2X conc.)(Tli RNaseH Plus)	10 $\mu$ L	1 X
PCR Forward Primer(10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ L	0.4 $\mu$ M
PCR Reverse Primer(10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ L	0.4 $\mu$ M
Template (<100ng)	2 $\mu$ L	
dH <sub>2</sub> O(sterile distilled water)	6.4 $\mu$ L	
Total		20 $\mu$ L

Table 6-1. SYBR Q-PCR에 사용된 PCR 용액의 성분 조건

### 3) Q-PCR 방법 중 *S. Typhimurium*를 이용한 평가 비교

- PCR 반응에서 대상 DNA 증폭 효율은 primer의 특이성과 반응에 참여하는 polymerase의 안정성에 크게 영향을 받음 본 연구는 RT-PCR 수행에 열에 안정한 Taq polymerase를 이용하였으나, Taq polymerase는 일반적으로 40 thermal cycle 이후 열안정성을 소실함은 물론 약 38 thermal cycle 이후 비특이적 DNA 증폭이 상승하는 것으로 알려져 있음.
- 따라서 Q-PCR을 이용한 DNA 정량에서 38 이후의 Ct value는 정량결과에 포함시키지 않음 본 연구에서는 검출의 정확도를 기하기 위해 Ct value에 대한 상한선을



37.5로 설정함.

- Figure 6-1 은  $10^9$  CFU/mL 수준으로 성장한 *S. Typhimurium*에서 DNA를 DNA extraction kit (Takara MiniBest DNA extraction kit Ver. 5.0)를 이용하여 추출한 후 10진 희석한 *S. Typhimurium* DNA의 TaqMan 및 SYBR green Q-PCR 결과를 도시하고 있음.
- *S. Typhimurium* DNA 추출과정 중 DNA는 spin column에서 50  $\mu$ L elution buffer를 이용하여 용출됨에 따라 Q-PCR 정량의 이론적 최소 검출한계는 약  $10^1$  CFU/mL로 산정됨
- *S. Typhimurium* DNA를 RT-PCR을 이용하여 분석한 결과 TaqMan Q-PCR은 *S. Typhimurium*  $10^1$  CFU/mL을 검출하지 못하는 결과를 나타낸 반면 SYBR green Q-PCR은  $10^1$  CFU/mL을 검출할 수 있었음. 또한 standard curve의 R2를 비교할 경우 SYBR green Q-PCR의 R2 값이 TaqMan Q-PCR의 R2 값에 비해 높게 나타났음 (Figure 6-2)
- 따라서 SYBR green Q-PCR이 TaqMan Q-PCR에 비해 더 민감하고 정확하게 식중독균을 정량하는 것으로 판단되어 SYBR green Q-PCR 방법을 식품 내 식중독균 신속검출 기법으로 선정하여 향후 식품 내 식중독균 신속검출 기법 연구에 사용되었음.

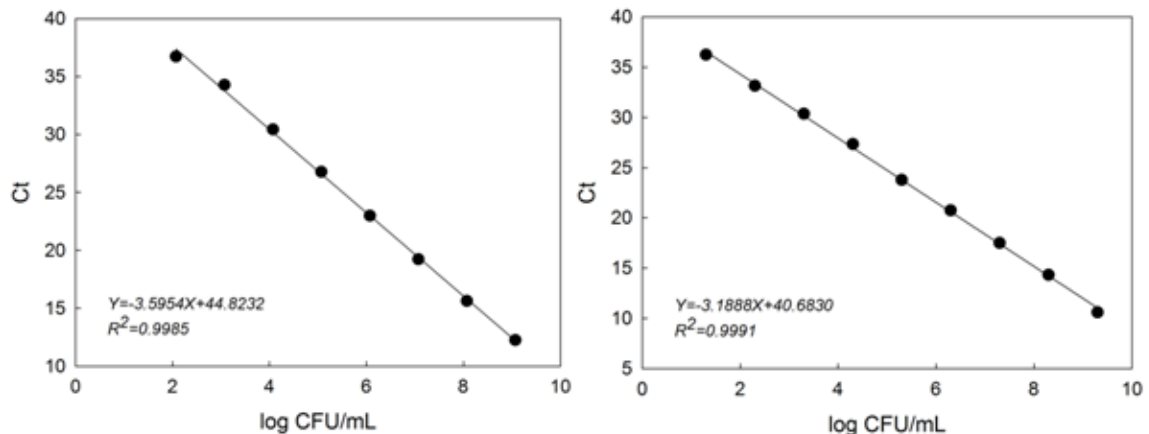


Figure 6-2. *S. Typhimurium* DNA 농도에 따른 TaqMan 및 SYBR green RT-PCR 정량 분석과 standard curves

#### 나. 식중독균 DNA 추출방법 비교를 통한 최적 DNA 추출법 선정

##### 1) 개요

- 미생물 DNA 추출은 전통적인 boiling 방법, spin column을 이용한 방법, 상온에서 DNA를 추출할 수 있는 alkaline 방법, 및 boiling 방법을 응용한 PrepMan (Life Technologies)에 의해 추출될 수 있음
- 다양한 종류의 DNA 추출법이 존재함은 물론 식품 내 식중독균 검출에서 DNA 추

추출효율은 최종 식중독균 검출 한계를 결정짓는 주요 요소임에 따라 앞서 언급된 DNA 추출법의 추출효율을 평가하고자 하였으며, 추후 선정된 방법을 식품 내 신속 검출법에 적용하고자 함.

## 2) DNA 추출법 평가

- DNA 추출법 평가는 E. coli DNA 추출에 대한 추출효율을 비교하여 수행되었으며, 추출효율은 다양한 농도로 희석된 E. coli 용액에서 추출된 DNA를 SYBR green Q-PCR 분석결과인 Ct value 비교를 통해 평가되었음.
- DNA 추출법 평가에 대한 개략적 연구 방법은 다음과 같음
  - E. coli 배양액을 이용한 통해 E. coli 10<sup>3</sup> ~ 10<sup>8</sup> CFU/mL 용액 제조
  - 각 DNA 추출법을 이용한 1 mL 희석액의 E. coli DNA 추출
  - Boiling 방법
    - ① E. coli 희석액 1 mL 원심분리 후 상등액 제거
    - ② E. coli pellet에 Tris-EDTA buffer 200 µL 첨가 후 95°C에서 10분간 처리
    - ③ 원심분리 후 상등액 보관
    - ④ 추출소요시간: 20분
    - ⑤ 최종 추출 vol.: 200 µL 미만
  - Spin column 추출법 (Takara MiniBest DNA extraction kit Ver. 5.0)
    - ① 제조사의 방법에 의해 추출됨
    - ② 추출소요시간: 50분
    - ③ 최종 추출 vol.: 50 µL
  - Alkaline lysis 추출법
    - ① E. coli 희석액 1 mL 원심분리 후 상등액 제거
    - ② E. coli pellet에 alkaline lysis 용액 (100 mM NaOH, 50% PEG 400) 100 µL 첨가 후 15분간 상온 정치
    - ③ Ice cold ethanol 200 µL 및 3 M sodium acetate 50 µL 첨가 후 원심분리
    - ④ 상등액 제거 후 감압건조
    - ⑤ 건조된 pellet에 100 µL DW 첨가 후 용해
    - ⑥ 추출소요시간: 50분
    - ⑦ 최종 추출 vol.: 100 µL
  - Prepman 추출법
    - ① E. coli 희석액 1 mL 원심분리 후 상등액 제거
    - ② E. coli pellet에 PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 200 µL 첨가 후 100°C에서 10분간 처리
    - ③ 원심분리 후 상등액 보관
    - ④ 추출소요시간: 20분

⑤ 최종 추출 vol.: 100  $\mu$ L

- DNA가 추출된 용액 중 2  $\mu$ L를 취하여 SYBR green Q-PCR 분석 (Q-PCR은 Figure 6-1에 기술된 방법에 의해 수행됨. 다만 사용된 primer는 Table 6-2와 같음.)

Primer	Sequence
Forward	5'-ATT AAC CAC ACC CCA CCG-3'
Reverse	5'-GTC ATG GAA ACC GTT GTC AC-3'

Table 6-2. *E. coli* DNA의 SYBR green RT-PCR에 사용된 primer

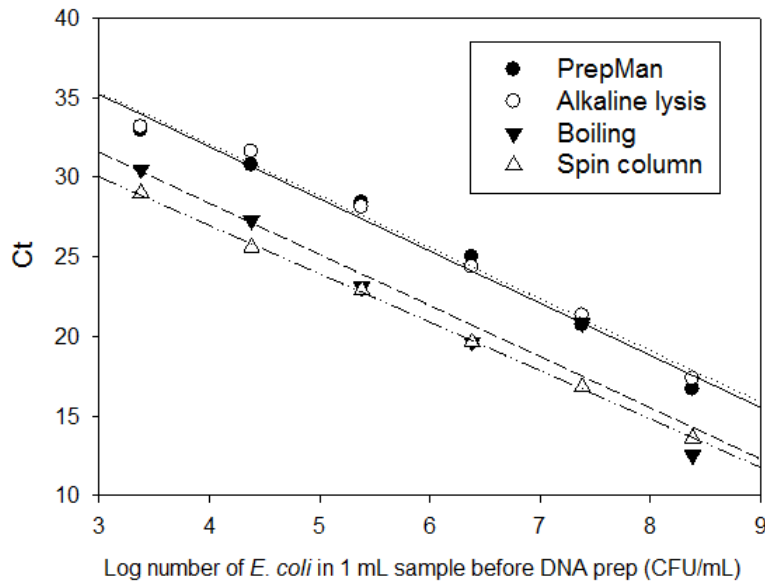


Figure 6-3. DNA 추출방법 별 추출효율 비교

### 3) DNA 추출법에 따른 식중독균 검출 비교

- 각기 다른 방법으로 추출된 *E. coli* DNA의 RT-PCR 분석 결과 PrepMan과 alkaline lysis방법에 의한 추출 효율이 spin column 및 boiling 방법에 비해 더 높은 것으로 나타났음 (Figure 6-3)
- Spin column DNA 추출법을 이용하여 DNA를 추출할 경우 최종 sample에 DNA 이외의 오염물질을 최소화 할 수 있는 것으로 알려져 있음 그러나 추출과정이 복잡함은 물론 각 과정에서 DNA의 손실 가능성이 존재함 spin column DNA 추출법의 낮은 추출 효율은 추출과정 중 DNA 손실에 의한 것으로 추정됨
- Boiling DNA 추출방법은 DNA의 손실을 막을 수 있고 추출과정이 간단함은 장점을 가지고 있으나 DNA 이외의 오염물질을 배제 할 수 없다. Boiling 추출법의 낮은 DNA 추출효율은 DNA 이외의 오염물질 함유와 이에 의한 Q-PCR 간섭의 결과로

추정됨

- PrepMan DNA 추출법은 그 과정이 boiling 방법과 유사하나 DNA 이외의 오염 물질을 원심분리에 의한 제거에 따라 높은 추출효율을 나타낸 것으로 판단됨
- PrepMan 추출법과 alkaline lysis 추출법의 DNA 추출효율은 유사한 결과를 나타내었음 그러나 alkaline lysis 추출법은 PrepMan 추출법에 비해 더 긴 시간이 소요되고 ethanol 침전과정 중 DNA 손실이 가능함 따라서 본 연구팀은 단 시간에 DNA 추출이 가능하고 가장 높은 추출효율을 나타낸 PrepMan 추출법을 향후 식중독균 신속 진단법 개발을 위한 최적 DNA 추출법으로 선정함

다. Membrane filter에 농축된 식중독균의 신속 검출을 위한 최단 enrichment 시간 산정

#### 1) 개요

- Filtering에 농축된 식중독균에서 DNA를 추출할 경우 희석이 불가피 함 따라서 membrane filter당 1 ~ 50 CFU 수준의 식중독균을 검출하고자 할 때 식중독균의 수를 증균하기 위한 enrichment과정이 필요함.
- 식중독균 검출의 신속성을 고려할 경우 식중독균을 일정수준으로 증균 하기 위한 enrichment 시간을 최소로 설정하여야 함.
- 식중독균은 각 균종별로 성장의 특성이 상이하며, 식품의 성분에 따라 다른 성장특성을 나타내는 것으로 알려져 있음 비록 filtering 시스템을 이용하여 식품에서 유래되는 식품성분의 enrichment 배양 배지 전이 수준을 최소화 할 수 있으나 식품 유래 성분이 enrichment 배지로 이전됨을 방지할 수 없음.
- 본 연구팀은 식품 내 식중독균을 filtering 시스템을 이용하여 membrane filter에 농축하여 enrichment 배양 과정 중 식중독균별, 식품별 성장 특성이 상이할 것으로 판단하였으며, 각 조건에서 membrane filter에 농축된 식중독균을 분자생물학적 방법의 검출한계 이상으로 증균할 수 있는 최단 enrichment 배양 시간을 산정하기 위해 체계적인 연구를 수행함.

#### 2) 연구 방법

- 연구에 사용된 식품은 식중독 유발의 빈도에 따라 선정되었으며, 각 식품에 대한 오염도를 판단하여 식중독균을 선정함 선정된 식품 및 식품에 해당되는 식중독균은 Table 6-3와 같음.
- 식중독균이 인위 접종된 식품을 filtering 농축기법에 적용하고 enrichment 배양에 따른 성장 특성을 배지배양법 및 qRT-PCR을 이용하여 분석함.
- 식중독균의 신속 검출을 위한 최단 enrichment 시간 산정에 대한 연구방법은 다음과 같다. 그러나 사용된 우육과 쇠고기는 각각 *B. cereus* 및 *S. aureus*을 이미 내재된 상태로 오염되어 있는바 우육의 *B. cereus*와 쇠고기의 *S. aureus*는 인위접종과 enrichment 배양 없이 정량하여 배지배양법과 분자생물학적 방법의 검출 효율을 비교함.
- 25 g의 양상추, 쇠고기, 횃감용 우육을 교반용 멸균백에 소분.
- *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus* 배양액을 십진희석을 통해 일정수준으로 희

석한 후 25 g의 식품검체에  $10^0 \sim 10^2$  CFU/g (양상추의 경우) 또는 100 CFU/g (쇠고기 및 우력의 경우) 접종.

- 우력의 *B. cereus*와 쇠고기의 *S. aureus*는 분석의 경우 본 과정이 생략됨.
- 멸균식염수 225 mL을 첨가한 후 pulsifier를 이용하여 교반.
- 교반된 검액을 filtering 시스템에 적용하여 검액 내 식중독균을 4.7 cm membrane filter에 수집.
- 식중독균이 농축된 membrane filter를  $7.6 \times 12.7$  cm 멸균백에 넣은 후 enrichment 배지 2.5 mL 첨가 (해당 식중독균 증식에 이용되는 enrichment 배지를 선정하여 첨가함 Table 6-4)하고 37°C 배양.
- 적정 시간동안 enrichment 배양 후 1 mL은 배지배양법을 이용하여 식중독균을 정량하였고, 나머지 1 mL에 존재하는 식중독균의 DNA를 추출하여 SYBR green Q-PCR을 이용하여 정량함.

Pathogen	Food
<i>S. Typhimurium</i>	Lettuce
<i>S. aureus</i>	Rock fish, Beef
<i>B. cereus</i>	Rock fish, Beef

Table 6-3. 식중독균의 신속검출을 위한 최단 enrichment 시간 산정에 사용된 식품 및 식중독균

Pathogen	Enrichment media
<i>S. Typhimurium</i>	0.2% peptone water
<i>S. aureus</i>	TSB containing 10% NaCL
<i>B. cereus</i>	MYP broth

Table 6-4. 식중독균별 사용 enrichment 배지

### 3) Enrichment 시간 산정 결과

가) 우력의 *B. cereus*와 쇠고기의 *S. aureus*의 배지배양법 및 SYBR green Q-PCR에 의한 정량

- 우력의 *B. cereus*와 쇠고기의 *S. aureus*의 오염 수준을 배지배양법과 SYBR green Q-PCR에 의해 정량하여 그 결과를 비교한 결과 SYBR green Q-PCR에 의한 정량값이 배지배양법에 의한 정량값 보다 높게 나타냄 (Figure 6-4).
- 배지배양법에 의한 식품 내 식중독균 검출에서 식품에 내재된 background 미생물의 대상 식중독균에 대한 간섭에 따라 항생제 및 특성 당이 포함된 선택배지를 이용하여 대상 식중독균을 검출함
- 선택배지 상에서 특정 식중독균은 배지에 포함된 항생제에 대한 내성을 나타내어 성장하여 집락을 형성하나 항생제의 존재는 해당 식중독균의 성장에는 부정적인

영향을 미치는 것으로 알려져 있음

- 선택배지를 이용하여 식품 내 식중독균을 정량할 경우 선택배지에 포함된 항생제의 부정적 영향에 따라 실질적으로 존재하는 식중독의 수보다 더 적게 정량될 수 있음
- 배지배양법의 정량결과에 비한 SYBR green RT-PCR의 높은 정량결과는 선택배지 상에서 *B. cereus* 및 *S. aureus*의 성장 억제에 의한 것으로 판단되며, SYBR green Q-PCR 분석은 식중독 정량분석에서 신뢰할 수 있는 결과를 산출하는 것으로 판단됨

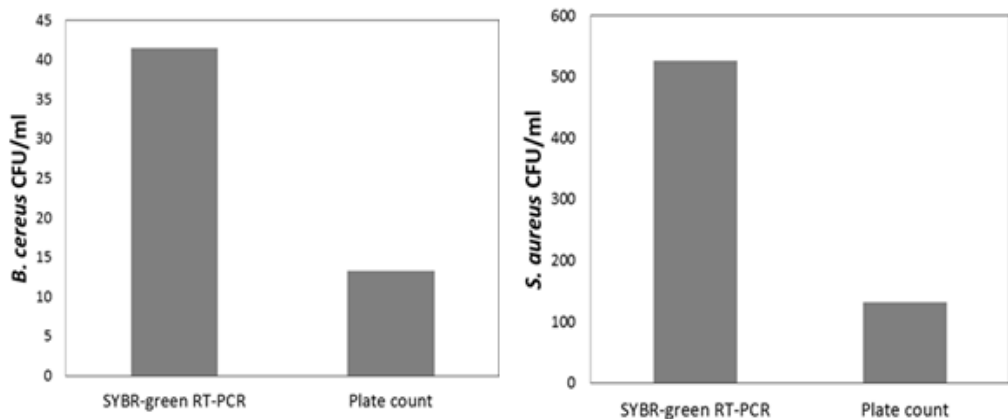


Figure 6-4. 우럭의 *B. cereus* (a) 및 쇠고기의 *S. aureus* (b)의 배지배양법과 SYBR green RT-PCR에 의한 정량

- 나) Membrane filter 상에 농축된 식중독균의 enrichment 배양과 신속검출을 위한 enrichment 최단시간 산정
- 양상추의 *S. Typhimurium*, 쇠고기의 *B. cereus*, 우럭의 *S. aureus*는 해당 식품에  $10^0$  CFU/g 수준으로 접종하여 enrichment 배양하였으며, 배양 간 식중독균의 성장을 배지배양법 및 SYBR green Q-PCR로 정량함
  - 지체기 (lag time) 및 최대성장속도 (maximum growth rate)는 미생물의 성장 특성을 대표하는 요소로써 지체기와 최대성장속도는 식중독균에 따라 상이한 값을 나타내며, 각 식중독균의 지체기 및 최대성장속도는 온도 및 영양조건에 의해 좌우됨 그러나 미생물의 최대성장속도는 동일한 영양 및 온도조건에서 같은 수치를 나타내는 것으로 알려져 있음
  - 양상추에 접종된 *S. Typhimurium*은 처리구에 따라 접종 수준이 상이하였으나 enrichment 배양에 사용된 배지 및 온도 조건은 동일함. 따라서 각 처리구의 6 ~ 10 시간 enrichment 배양에서 나타나는 성장의 기울기는 거의 동일한 것으로 판단됨 (Figure 6-5).
  - 동일온도 및 영양조건에서 최대성장속도는 일정한 결과를 나타내었으나, 지체기는 접종된 *S. Typhimurium* 수준에 크게 영향을 받아 접종수가 증가할수록 지체기(lag time)가 감소함을 관찰함 (Figure 6-5)

- 배지배양법에 의한 양상추에서의 *S. Typhimurium* 검출은 100 CFU/g 접종 수준은 4시간까지 검출한계 미만을 나타내었고,  $10^1 \sim 10^2$  CFU/g 접종 수준은 2시간까지 검출한계 미만을 나타낸 반면, SBYR green Q-PCR 방법은 100 CFU/g 접종 수준의 경우 배양시간 3시간 이후,  $10^1 \sim 10^2$  CFU/g 접종 수준의 경우 배양시간 2시간 이후,  $10^0$  CFU/g 접종 수준의 경우 배양시간 1시간 이후부터 검출이 가능함
- 따라서 양상추 1 g 당 100 *S. Typhimurium*을 filtering 시스템을 이용하여 membrane filter에 농축시킨 후 SYBR green Q-PCR을 이용한 검출할 경우 약 4시간의 enrichment 배양이 필요한 것으로 판단됨
- Figure 6-5는 *B. cereus*가 인위적으로 접종된 쇠고기에서 *B. cereus*를 filtering 시스템을 이용하여 농축하고 membrane filter에 농축된 *B. cereus*의 enrichment 배양에 따른 성장 분석결과를 도시하고 있음.

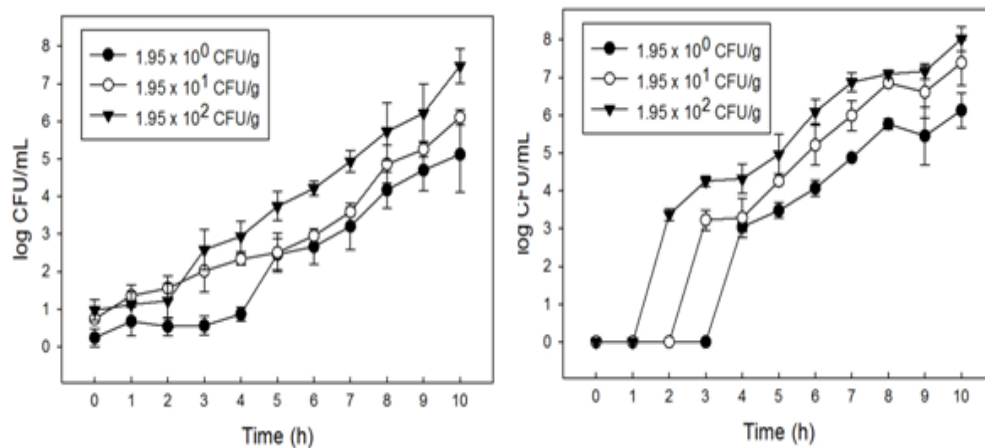


Figure 6-5. 양상추 내 오염 *S. Typhimurium*의 filtering 농축 후 membrane filter에 농축된 *S. Typhimurium*의 enrichment 배양 간 성장. (a) 배지배양법에 의한 정량결과, (b) SYBR green Q-PCR에 의한 정량결과

- 최초 쇠고기를 배지배양법에 의해 분석한 결과 *B. cereus*가 존재하지 않는 것으로 나타나 해당 검체에 *B. cereus*를 인위적으로 접종하여 연구에 사용함 *B. cereus*가 인위적으로 접종된 쇠고기로부터 미생물을 filtering 시스템에 의해 농축하여 membrane filter에 존재하는 *B. cereus* 분석을 배지배양법에 의해 분석한 결과 역시 *B. cereus* 음성으로 나타났으나 SYBR green Q-PCR 분석결과 검체에 약 27마리의 *B. cereus*가 존재하는 것으로 나타났으며, 당 분석결과는 반복에 따라 유사한 값을 나타내는 바 최초 검체에 *B. cereus*가 오염되었던 것으로 판단됨
- 앞서 언급한 바와 같이 배지배양법에 의한 식중독균 검출은 선택배지를 이용함에 따라 대상 식중독균의 항생제에 대한 영향성을 배제할 수 없다. 쇠고기의 *B. cereus*의 배지배양법에 의한 *B. cereus* 음성결과는 쇠고기에 미량 존재하던 *B. cereus*가 선택배지 상에서 원활하게 성장하지 못하여 발생한 것으로 판단되며, 본 분석의 경우 위음성으로 판정될 수 있음 앞에서 언급한 바와 같이 SYBR green Q-PCR을 이용한 분석이 배지배양법에 의한 분석에 비해 더욱 신뢰도가

높은 것으로 판단됨

- 비록 사용된 쇠고기 검체의 *B. cereus* 오염에 따라 최단 enrichment 배양시간을 산출할 수 없었으나, SYBR green Q-PCR 정량결과를 살펴볼 때 *B. cereus*는 약 3시간 수준의 지체기를 가지는 것으로 판단됨에 따라 쇠고기에 약  $10^0$  CFU/g 수준으로 *B. cereus*가 존재할 경우 filtering 농축 후 membrane filter를 MYP 배지에서 약 4시간 배양할 경우 검출 될 수 있을 것으로 판단됨
- *S. aureus*가 인위 접종된 헛감용 우력의 filtering 농축과 enrichment에 의한 정량은 *S. Typhimurium*을 인위접종한 양상추와 유사한 양상을 나타내었음
- SYBR green Q-PCR을 이용한 정량결과가 배지배양법에 의한 정량결과에 비해 높게 나타났으며, 3시간의 enrichment에 의해 검출 후 검체의 *S. aureus* 존재 여부를 배지배양법 및 SYBR green Q-PCR에 의해 확인할 수 있었음 SYBR green Q-PCR의 배지배양법에 비한 높은 정량값은 앞서 언급한바와 같이 선택배지에 포함된 항생제의 *S. aureus* 성장에 대한 부정적 영향의 결과로 판단됨
- Filtering 시스템을 이용하여 식품 내 식중독균을 농축할 경우 검출한계를 향상시킬 수 있었으며, 검출한계 미만으로 식중독균이 존재할 경우 enrichment에 의해 검출한계를 극복할 수 있었음.

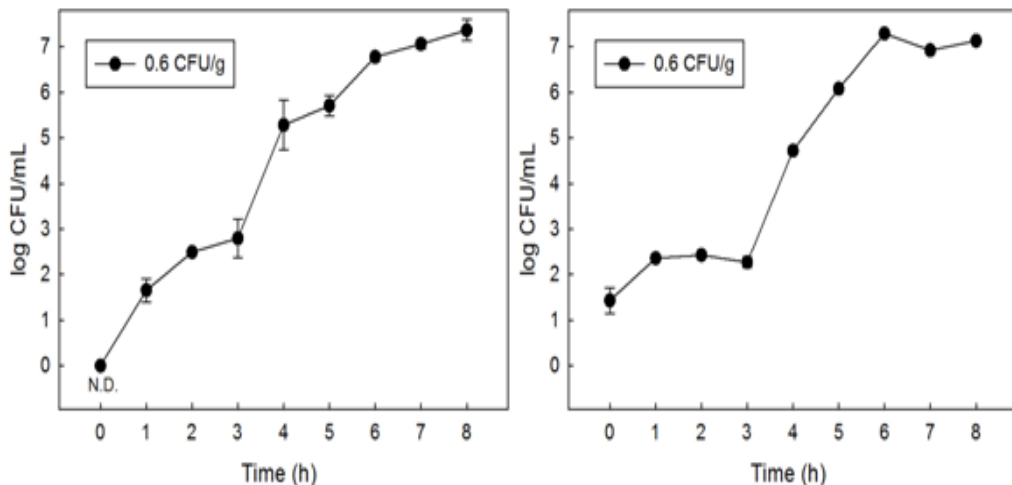


Figure 6-6. 쇠고기 내 오염 *B. cereus*의 filtering 농축 후

membrane filter에 농축된 *B. cereus*의 enrichment 배양 간 성장.

(a) 배지배양법에 의한 정량결과, (b) SYBR green Q-PCR에 의한 정량결과

- 특히SYBR green Q-PCR에 의한 정량 결과가 배지배양법에 비해 더욱 신뢰성이 있는 것으로 판단되었음
- 본 연구는 식품 내 식중독균의 신속한 검출법 개발을 목적하고 있는바 filtering 농축기법의 배지배양법 및 SYBR green Q-PCR 분석법 적용에 대한 소요시간을 산정하면 Table 6-5와 같음 Filtering 농축기법과 분자생물학적 분석기법을 융합하여 식중독균 검출에 적용할 경우 2시간 미만에 대상 식중독균을 정량할 수 있



으며, 또한 6 시간 미만에  $10^{-1} \sim 10^0$  CFU/g의 식중독을 검출할 수 있음

Step	Culture-based method		SYBR green RT-PCR based method	
	Quantification	Qualification	Quantification	Qualification
Filtering	5 min	5 min	5 min	5 min
Enrichment	-	3 ~ 4 h	-	3 ~ 4 h
Detection	24 h <	24 h <	1.5 h	1.5 h
Total	~ 25 h <	~ 29 h <	12 h >	6 h >

Table 6-5. Filtering 농축기법의 식품 내 식중독균 검출 적용에 따른 방법별 분석 소요 시간 산정

라. 식품 내 식중독균 검출의 신속성 향상을 위한 WGA 적용

1) 개요

- 앞서 본 연구팀은 WGA 키트를 직접 개발하였으며, 당 키트를 이용하여 *S. Typhimurium* DNA의 증폭 확인을 기술한 바 있음 그러나 당 키트는  $10^6$  이하의 DNA 적용 후 결과 산물을 전기영동을 통해 확인하였을 때 결과 산물에 대한 증폭 band를 관찰하지 못하였으며, 이 역시 앞서 언급한 바 있음.
- 특히 WGA의 DNA 증폭은 주로  $30^\circ\text{C}$ 에서 수행되는 반면 일반적인 PCR의 증폭 반응은  $70^\circ\text{C}$  이상에서 이루어진다. Fick의 제 1법칙에 의하면 물질의 이동량은 확산 계수 ( $D$ )에 비례하며,  $D$ 는  $T/2$ 에 비례한다 (Equation 1, 2). 따라서  $C$ 는  $T/2$ 에 비례함.
- 따라서  $30^\circ\text{C}$ 에서 수행되는 WGA의 DNA 증폭효율은 일반적인 PCR 증폭효율의 약 0.7 ~ 0.8 수준을 나타낼 수 있음 결국 WGA에 의한 DNA 증폭에도 불구하고 증폭된 양이 적을 경우 전기영동에서 band를 생성하지 못하는 결과를 초래할 수 있음.
- 비록 본 연구팀이 제조한 WGA 키트의  $10^5$  개의 *S. Typhimurium* DNA 증폭결과를 전기영동에서 확인하지 못하였으나 적은 수의 DNA가 증폭되었을 가능성이 존재하며, 이 경우 증폭의 수준은 미량이나 추후 Q-PCR에 의한 식중독균 검출한계를 향상시킬 가능성이 존재함.
- WGA에 의한 105 개의 DNA 증폭과 WGA 기법의 식품적용 가능성을 판단하기 위해 membrane filter에 농축된 *S. Typhimurium*의 enrichment 배양하고 증균 시간 별로 채취된 *S. Typhimurium* DNA를 WGA에 의해 증폭한 후 Q-PCR에 적용하였을 경우 검출 가능성을 조사함. 또한 WGA에 의한 DNA 증폭 가능성 판단을 위해 WGA에 사용된 *S. Typhimurium* DNA를 Q-PCR을 이용하여 분석하여 WGA-Q-PCR과 Q-PCR의 Ct value를 비교함.

$$C \sim D$$

[Equation 1]

where  $C$  is concentration of diffused matters,  $D$  is diffusion coefficient, and  $T$  is temperature.

$$D \sim T^{3/2} \quad \text{[Equation 2]}$$

$$C \sim T^{3/2} \quad \text{[Equation 3]}$$

2) 본 연구에 대한 개략적 연구방법

- 양상추 25 g에 *S. Typhimurium* 100 CFU/25 g 수준 접종 후 교반용 멸균백에 소분
- 멸균식염수 225 mL 첨가 후 교반
- 교반된 멸균식염수에 존재하는 *S. Typhimurium*을 filtering 시스템 적용
- *S. Typhimurium*이 농축된 4.7 cm membrnae filter를 소형 멸균백으로 이동
- 소형 멸균백에 2.5 mL 0.2% peptone water 첨가 후 37°C 배양
- 일정시간 enrichment 배양 후 1 mL의 배양액을 취하여 DNA 추출
- 추출된 DNA의 Q-PCR 분석 또는 WGA 반응 후 Q-PCR 분석

a)	Enrichment time	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h
		ND	ND	34.6 7	37.2 8	36.7 2	36.2 8	ND	ND	33.7 5	27.8 6	24.8 0
	Real-time PCR	ND	ND	35.8 8	38.5 6	36.5 8	ND	ND	ND	34.4 5	27.6 5	24.6 1
		ND	ND	ND	ND	34.6 9	36.8 7	ND	ND	34.3 4	27.7 1	24.6 2
	Detection frequency	0/3	0/3	2/3	2/3	3/3	2/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3

b)	Enrichment time	0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h
		ND	ND	35.4 1	ND	ND	ND	ND	ND	36.2 7	32.2 8	33.7 1
	WGA + Realtime PCR	37.0 7	ND	34.3 0	ND	ND	36.3 10	ND	ND	36.2 5	31.5 7	33.6 6
		ND	ND	34.3 3	36.3 8	ND	ND	ND	ND	ND	31.7 8	33.3 9
	Detection frequency	1/3	0/3	3/3	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3	2/3	3/3	3/3

Table 6-6. 양상추로부터 membrane filter에 농축된 *S. Typhimurium*의 enrichment 배양 시간에 따른 (a) RT-PCR 분석과 (b) WGA 증폭산물의 RT-PCR 분석의 Ct value 및 검출 빈도 비교

### 3) 분석 결과

- Membrane filter 상의 *S. Typhimurium*의 enrichment 배양 시간에 따른 증균은 각 시간별 분석검체가 필요함에 따라 동일한 조건의 검체를 이용하여 다수의 *S. Typhimurium* 농축 membrane filter를 처리하였으며, 각 membrane filter를 각기 다른 멸균백으로 이동 시킨 후 2.5 mL의 enrichment 배지 (0.2% peptone water)를 첨가하여 배양하였으며, 각 시간별 각 membrane filter에서 DNA를 추출하여 Q-PCR 및 WGA-Q-PCR 분석을 수행함 따라서 Q-PCR 분석 결과는 다소 높은 변이차를 나타내었음(Table 6-6)
- Q-PCR 분석 결과 2, 3, 4, 5시간의 enrichment 배양 결과 *S. Typhimurium* 존재를 확인할 수 있었으나 6 및 7시간 배양 후 RT-PCR 분석에 대한 결과 *S. Typhimurium*이 검출되지 않는 결과를 나타내었다. 이는 앞서 언급한 바와 같이 각기 다른 처리구의 enrichment 배양에 따른 오차로 판단됨 그럼에도 불구하고 2, 3, 4, 5 시간 enrichment 배양액의 RT-PCR 결과는 반복적인 결과를 나타냄에 따라 Q-PCR에 *S. Typhimurium* DNA가 1개 또는 그 이상 포함된 것으로 판단됨 (Table 6-6a).
- WGA-Q-PCR 수행에 따른 Ct value 및 검출빈도를 WGA 수행 없는 Q-PCR의 것과 비교할 경우 WGA 수행없이 Q-PCR을 사용할 경우 더욱 높은 검출효율을 나타내었다 (Table 6-6). 검체의 *S. Typhimurium* DNA는 WGA 수행에 따라 증폭되지 않은 것으로 판단할 수 있으나, WGA에 사용된 검체의 DNA 농도를 고려할 경우 다소 흥미로운 결과를 도출 할 수 있었다.
- WGA에 사용된 DNA 검체는 WGA를 수행하지 않고 Q-PCR 수행에 사용된 검체와 같다. DNA 검체 1  $\mu$ L을 최종 volume 25  $\mu$ L WGA에 적용함에 따라 WGA에 의한 DNA 증폭을 고려하지 않을 경우 WGA 후 Q-PCR에 사용된 검체의 DNA 농도는 WGA 수행없이 Q-PCR에 사용된 검체의 DNA 농도에 비해 25배 적은 것으로 산출됨
- Q-PCR을 포함하는 PCR에 의한 DNA 증폭은 cycle에 따라 2배 씩 증가함 따라서 DNA 증폭물의 수는 Equation 4와 같이 표현될 수 있음.

$$N = N_0 \cdot 2^n \quad \text{[Equation 4]}$$

where  $N$  is the number of PCR amplicon,  $N_0$  is the number of loaded DNA, and  $n$  is the number of PCR cycle

- WGA에 의해 DNA가 전혀 증폭되지 않았다고 가정할 경우 그리고 Q-PCR 단독 수행 및 WGA-Q-PCR 수행에 투입된 DNA가 모두 증폭되었다고 가정할 경우 Equation 5와 같이 Ct value를 계산 할 수 있으며, 그 값은 약 4.6으로 산출됨.
- 즉 WGA에 의해 DNA가 전혀 증폭되지 않았다고 가정할 경우 Q-PCR와 WGA-Q-PCR의 Ct value의 차이가 약 4.6을 나타내어야 하며, 차이가 4.6 미만을 나타낼 경우 검체의 DNA는 WGA에 의해 증폭되었다고 결론지을 수 있음.

- 2시간의 enrichment 검체의 RT-PCR과 WGA-Q-PCR의 Ct value는 거의 차이를 나타내지 않는다. 따라서 WGA를 통해 검체의 DNA가 증폭된 것으로 판단함.
- 그러나 enrichment 배양 8시간 이후의 Q-PCR Ct value와 WGA-Q-PCR Ct value의 차이는 배양시간의 증가에 따라 증가하는 결과를 나타내었다. 앞서 언급한 바와 같이 enrichment 배양에 따라 S. Typhimurium DNA의 수는 증가하였으나, 오히려 WGA에 의한 증폭은 감소되어 WGA에 의해 S. Typhimurium이 원활하게 증폭되지 않은 것으로 판단됨.

#### 4) 논의 사항

- WGA는 상온에서 random primer annealing이 유도되고  $\Phi$ 29 polymerase에 의해 증폭된 일반적인 PCR 반응과는 달리 primer annealing을 위한 온도 변화가 없음에 따라 WGA의 primer annealing은 환경적 요인에 크게 영향을 받으며, 특히 저분자 물질은 primer annealing에 부정적인 영향을 미치며 WGA에 의한 DNA 증폭을 억제하는 것으로 알려져 있음.

$$N_{WGA-RT-PCR} = \frac{1}{25} \cdot N_{RT-PCR}$$

$$2^{dCt} = 25 = \frac{N_{RT-PCR}}{N_{WGA-RT-PCR}} \quad \text{[Equation 5]}$$

$$dCt = 4.64$$

where  $dCt$  is the difference of Ct value between Q-PCR and WGA-Q-PCR.

- Enrichment 배양에 따라 membrane filter의 S. Typhimurium은 배지 내 물질을 분해하여 성장·증식함 따라서 배지 내 저분자 물질은 enrichment 배양 시간의 증가에 따라 증가할 것으로 추정되며, 저분자 물질의 DNA 추출용액 함유는 추후 WGA에 의한 DNA 증폭을 억제할 수 있음 8시간의 enrichment 배양 이후 WGA 증폭 저하는 enrichment에 따른 저분자 물질의 생성과 당 물질에 의한 WGA DNA 증폭 억제로 판단됨.
- 저분자 비 DNA물질 제거를 위한 다양한 형태의 DNA cleanup 키트가 현재 시판 중이며, 당 DNA cleanup 키트를 사용할 경우 WGA에 의한 DNA 증폭 효율을 크게 향상시킬 수 있을 것으로 판단됨 현재 본 연구팀은 이를 극복하기 위해 다각도의 방법을 고려중 이며, 연구 중에 있음.

## 7. 7 장. Filtering 농축기술과 분자생물학적 분석기법을 융합한 식품 내 식중독균 신속·간편 검출기술 개발

### 가. 개요

- 식품 소매점 및 급식현장에서 사용되는 신선식품의 미생물 안전성 검증과 섭취 이전 오염 신선 식품의 제거는 식중독 발생을 방지하는 궁극적 수단으로 인식되고 있음 그러나 기존 배지배양법은 2일 이상의 검출시간을 요구하기 때문에 현장에서 적용될 수 없는 실정임.
- 비록 분자생물학적 방법의 기술적 발전에 따라 수 시간 이내에 오염 식중독균을 검진할 수 있는 기법이 개발되었으나, 기존 분자생물학적 기법은 고가의 thermal cycler 사용이 필수적임에 따라 소규모의 식품가공 및 급식현장에 보급되어 사용될 수 없음.
- 따라서 특정 장비 없이 대상 식중독균 DNA를 증폭하여 식품 내 식중독균을 진단할 수 있는 기법이 요구되었으며, 이에 대한 활발한 연구가 진행된 바 있음 최근 thermal cycler 없이 등온에서 대상 DNA를 증폭할 수 있는 PCR 기법 (Loop-mediated isothermal AMPLification; LAMP)이 소개됨에 따라 식품가공 및 급식현장에서 DNA 증폭을 통한 식중독균 간편 검출 기법에 대한 관심이 증가되고 있음 (Biswas 등 2014).
- 일반적인 PCR은 온도를 50 ~ 95°C 까지 변화를 통해 DNA denaturation, primer annealing, polymerase extension를 통해 DNA 증폭을 유지하는 반면 LAMP 기법은 온도의 변화 없이 약 60°C에서 DNA를 증폭할 수 있음에 따라 고가의 thermal cycler 없이 DNA 증폭을 수행할 수 있음 (Biswas 등 2014).
- LAMP는 일반적인 PCR과는 달리 2쌍 또는 3쌍의 primer를 이용하며, 각 쌍의 반응에 증폭과정 중 DNA loop를 형성하며, DNA 증폭이 연속적으로 발생하여 아주 긴 PCR amplicon을 생성함 (Figure 7-1). 긴 DNA amplicon이 생성되는 만큼 high fidelity 특성을 나타내고 긴 DNA chain 증폭에 적합한 Bst polymerase가 LAMP에 사용됨 (Parida 등 2008).
- 특히 LAMP에 의한 DNA 증폭은 일반 PCR에 비해 아주 활발하며, 아주 긴 DNA amplicon을 형성함에 따라 DNA 증폭 결과 용액의 탁도가 육안으로 확인될 만큼 증가되는 특성을 나타냄 (Figure 7-1). 또한 형광물질을 사용할 경우 DNA 증폭 유무를 육안으로 쉽게 확인할 수 있어 식품가공 및 급식현장에서 식중독균 검출을 손쉽게 수행할 수 있는 큰 장점을 가지고 있음 (Biswas 등 2014) 또한 LAMP는 1개의 DNA를 증폭할 수 있을 만큼 높은 증폭효율을 나타내는 것으로 알려져 있음 (Yi 등 2014).
- LAMP는 높은 DNA 증폭효율을 나타내는 반면 비특이적 증폭 빈도 역시 높게 나타남에 따라 식중독 검출에서 높은 위양성 검출율을 나타냄 따라서 LAMP를 이용하여 식중독균을 검출하기 위해서는 각 식중독균에 대한 온도 및 환경조건 확립이 우선시 되어야 함.
- 더욱이 현재 상용화되어 판매되는 LAMP 키트를 사용할 경우 1회 분석 당 약 1만원에 달하는 등 분석에 대한 낮은 경제성을 나타냄에 따라 당 기술의 식품 내 식중독균 검출 적용에 큰 걸림돌이 되고 있으며, 현재 식품 내 식중독균 검출에 대한 LAMP 기법 적용은 저조한 실정임.
- 따라서 LAMP를 이용한 식중독균 신속·간편 검출기법 개발은 식중독균의 종류에 따른 LAMP 적용의 구체적 환경조건 확립과 함께 경제성을 향상시키기 위한 LAMP 키트개발이 동시에 이루어져야 할 것으로 판단됨.
- 본 연구팀은 식품 내 식중독균 신속·간편 검출 기법을 개발하기 위해 LAMP를 적용하고자 하였으며, LAMP에 의한 식중독균 검출의 정확성을 기하기 위해 식중독균별 LAMP 조건을 확립

하고자 하였으며, 또한 식품안전분야에서 LAMP 기법의 원활한 적용을 위해 LAMP 키트의 경제성을 고려하였고 이를 기반으로 효율적이며 민감한 LAMP 키트 개발을 목적으로 연구를 진행함.

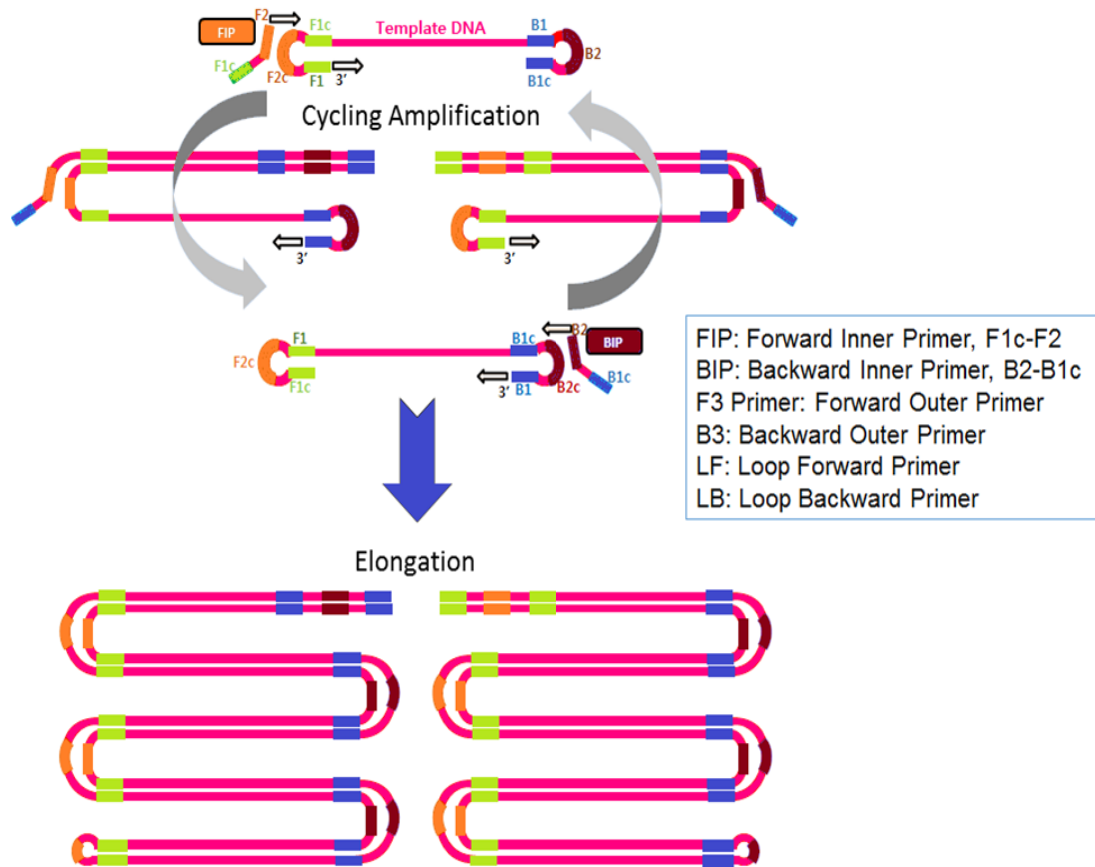


Figure 7-1. LAMP에 의한 DNA 증폭

#### 나. 경제적 LAMP 키트 개발과 분석 조건 확립

##### 1) 경제적 LAMP 키트 제작을 위한 요소 선정과 기초 LAMP 분석 조건 조사

- LAMP 키트의 경제성을 부여하기 위해 LAMP 키트의 핵심요소인 Bst polymerase의 제조업체를 조사한 결과 1개의 국내업체와 2개의 국외업체에서 LAMP에 사용할 수 있는 Bst polymerase를 생산·판매함을 확인함.
- 그중 국내 공급의 용이성 및 경제성을 고려하여 국내 1개 업체와 국외 1개 업체의 Bst polymerase를 구입하여 LAMP에 사용하여 DNA 증폭효율을 평가하였음 (data not shown).
- 평가결과에 따라 국외 업체 (Lucigen Co., England)의 Bst polymerase를 선정하여 LAMP 키트 제작에 사용됨.
- Bst polymerase를 사용할 경우 LAMP 1회 분석 당 5천원이 소요됨에 따라 기존 상용 LAMP 키트에 비해 경제적으로 우수한 LAMP 키트를 제작할 수 있었음.

2) 본 연구팀에 의한 LAMP 키트 제작

- 가) 제작에 사용된 Bst polymerase 제조사에서 제공하는 제품 정보와 여러 문헌 조사를 통해 LAMP 키트의 구성성분 및 농도를 Table 7-1와 같이 선정함.
- 나) 본 연구팀이 개발한 LAMP 키트는 Table 7-1에 기술된 요소 이외에 betaine을 포함하고 있으며, betaine은 LAMP에 의한 DNA 증폭에서 비특이적 증폭을 억제하기 위해 첨가되었음.
- 다) 또한 betaine의 적정 농도를 확립하기 위해 betaine 농도별 식중독균 DNA 증폭결과를 비교함 LAMP 조건을 명확하게 확립하기 위해 LAMP 관련 문헌에 가장 빈번하게 사용되는 *Vibrio parahaemolyticus* DNA를 추출하여 LAMP에 적용할 경우 betaine 농도에 따른 DNA 증폭결과를 비교하여 적정 betaine 농도를 선정할 수 있었음
- 라) *V. parahaemolyticus*의 경우 본 연구과제의 대상 미생물로 선정되어 있지 않은 바 *V. parahaemolyticus* DNA의 LAMP 증폭에 대한 primer 정보는 본 연구보고서에 기술하지 않음.
- 마) LAMP 키트를 이용한 DNA 증폭의 개략적 과정은 다음과 같음
- Table 7-1과 같은 농도의 용액 제조
  - 식중독균 DNA 2  $\mu$ L 첨가
  - Bst polymerase (8 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L 첨가
  - 적정 온도에서 1시간 LAMP 반응 (58 ~ 72°C)
  - 95°C, 3분 처리를 통한 Bst polymerase 불활성화
  - 전기영동을 통한 증폭 유무 확인
- 바) 앞서 언급한 바와 같이 LAMP는 대상 DNA가 부재한 조건에서 primer간의 비특이적 반응에 따라 loop 형태의 DNA 증폭 결과를 유발함 이와 같은 비특이적 증폭은 betaine 첨가에 의해 방지할 수 있었으며, betaine의 농도가 1 M 일 경우 비특이적 DNA 증폭을 방지할 수 있었으며 따라서 betaine을 LAMP 키트에 첨가하였으며, 식중독균 DNA 증폭을 위한 적정 농도는 1 M로 결정.

Reagent	Concentration	
10 $\times$ reaction mix (provided from Bst polymerase manufacturer)	2.5 $\mu$ L	
dNTP	1.2 mM	
MgSO <sub>4</sub>	6 mM	
Primers	FIP	40 pmol/25 $\mu$ L
	BIP	40 pmol/25 $\mu$ L
	LF	20 pmol/25 $\mu$ L
	LB	20 pmol/25 $\mu$ L
	F3	5 pmol/25 $\mu$ L
	B3	5 pmol/25 $\mu$ L
Total volume	25 $\mu$ L	

Table 7-1. 자체 제작 LAMP 키트의 구성 성분 및 농도

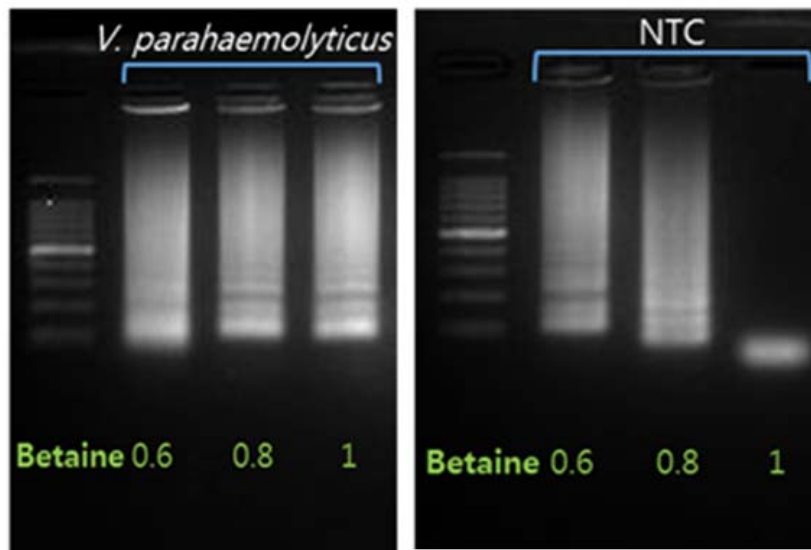


Figure 7-2. Betaine 농도에 따른 *V. parahaemolyticus* DNA의 LAMP 증폭

3) *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, 및 *B. cereus* 신속검출을 위한 LAMP 분석조건 확립

- LAMP 기법을 이용한 식중독균 검출에 사용되는 primer는 식중독균별 상이함. 따라서 각 식중독 DNA와 primer가 특이하게 반응하는 온도 구간이 존재하며, 식중독균의 정확한 검출을 위한 LAMP 분석의 정확한 온도 조건 확립이 요구됨
- 본 연구는 식품에서 검출되는 주요 식중독균인 *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, 및 *B. cereus*를 신속하고 간편하게 검출하고자 LAMP 분석의 온도조건을 확립하기 위한 체계적인 실험을 수행하였으며, 그 결과를 바탕으로 해당 식중독균 검출을 위한 LAMP 분석의 최적 조건을 확립함
- 각 식중독균 primer sequence는 NCBI에 구축된 GenBank에서 각 식중독균의 DNA sequence를 Primer Explore V4 software (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>)에 적용하여 최적 primer를 선정하였으며, 각 primer sequence는 LAMP 관련 문헌의 sequence와 비교하여 확정하였음 (Figure 7-3). 또한 LAMP 기반의 각 식중독균 DNA 검출법의 primer sequence는 Table 7-2와 같음.
- LAMP에 의한 *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, 및 *B. cereus* DNA 검출을 위한 LAMP 수행의 조건은 앞서 언급한 방법에 의해 수행되었으며, 비특이적 반응을 억제하기 위해 1 M의 betaine이 모든 처리구에 첨가되었음 또한 reaction 당 106 수준의 DNA가 LAMP 반응에 적용되었음.
- 각 식중독균 DNA의 최적 LAMP 온도는 LAMP 반응온도를 58 ~ 72°C



temperature gradient 조건에서 수행한 후 전기영동에 의한 DNA 증폭 유무를 파악하여 결정되었음 (Figure 7-4).

PrimerExplorer V4		Software	
<b>Primer Information</b>			
1	ID:3	dimer(minimum)dG=-2.11	
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence			
F3	400	417	18 59.98 -5.34 -4.36 0.61 GAACGTGTGGGGAAAGTC
B3	581	598	18 59.26 -6.69 -5.00 0.56 GGGCAATAGCGTCACTCT
FIP	38		GGGGGATCCGCATCAATA-TCTGGATGGATGGCGGG
BIP	39		GAAGGGCAAGCGTACTGGA-CATCGCACCGTCAAGGAA
F2	432	449	18 60.28 -5.11 -7.97 0.61 TCTGGATGGATGGCGGG
F1c	489	508	20 65.71 -8.70 -3.15 0.60 GCGCGGCATCCGCATCAATA
B2	552	570	19 59.93 -6.08 -4.36 0.53 CATCGCACCGTCAAGGAA
B1c	511	530	20 64.27 -5.79 -5.25 0.60 GAAGGGCAAGCGTACTGGA
<b>Primer Information</b>			
4	ID:12	dimer(minimum)dG=-2.18	
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence			
F3	644	663	20 59.75 -4.76 -4.23 0.55 GGATGACTGGCATGGTATG
B3	812	830	19 59.76 -4.18 -6.59 0.47 TTGTTCACAGAGCGGTCA
FIP	39		CTGGGGGACAGACCATCACCC-ATTGTGCTCCGGCTGT
BIP	41		TCCCGGCATTGTGTATTGGCA-TCCGGCCATATTATCCGTA
F2	605	682	18 60.44 -3.71 -5.84 0.56 ATTTGTCTCCGGCTGT
F1c	706	726	21 64.97 -6.69 -4.90 0.62 CTGGGGGACAGACCATCACCC
B2	786	805	20 59.86 -7.38 -5.27 0.50 TCCCGGCATATTATCCGTA
B1c	728	748	21 65.01 -6.98 -6.10 0.52 TCCCGGCATTGTGTATTGGCA
<b>Primer Information</b>			
2	ID:8	dimer(minimum)dG=-2.46	
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence			
F3	516	534	19 60.26 -6.03 -4.46 0.58 GGGAGCGTACTGGAAAGG
B3	724	742	19 59.48 -4.58 -4.25 0.53 TCAACATGGGGGATCTG
FIP	42		ATGATGGCGGCATAGCGTCAAC-AAAAGCCAGCTTACGGTTCC
BIP	39		GTGGGGATGACTCCGCATGG-ADCACTACCCAAATGGTCAAG
F2	536	555	20 60.40 -5.35 -5.46 0.50 AAAAGCCAGCTTACGGTTCC
F1c	584	605	22 65.47 -3.95 -5.84 0.55 ATGATGGCGGCATAGCGTCAAC
B2	696	714	19 59.48 -4.90 -5.75 0.53 ACCATCAACAAATGGTCAAG
B1c	640	659	20 64.69 -6.45 -5.07 0.65 GTGGGGATGACTCCGCATGG
<b>Primer Information</b>			
5	ID:7	dimer(minimum)dG=-2.11	
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence			
F3	419	436	18 59.66 -7.97 -5.19 0.61 GGGCCGATTTTCTCTGG
B3	581	598	18 59.26 -6.69 -5.00 0.56 GGGCAATAGCGTCACTCT
FIP	40		GGGGGATCCGCATCAATA-TGGCCGGTAAACAGATGAT
BIP	39		GAAGGGCAAGCGTACTGGA-CATCGCACCGTCAAGGAA
F2	443	462	20 60.86 -7.53 -4.29 0.50 TGGCCGGTAAACAGATGAT
F1c	489	508	20 65.71 -8.70 -3.15 0.60 GCGCGGCATCCGCATCAATA
B2	552	570	19 59.93 -6.08 -4.36 0.53 CATCGCACCGTCAAGGAA
B1c	511	530	20 64.27 -5.79 -5.25 0.60 GAAGGGCAAGCGTACTGGA
<b>Primer Information</b>			
3	ID:1	dimer(minimum)dG=-2.11	
label 5'pos 3'pos len Tm 5'dG 3'dG GCrate Sequence			
F3	400	417	18 59.98 -5.34 -4.36 0.61 GAACGTGTGGGGAAAGTC
B3	581	598	18 59.26 -6.69 -5.00 0.56 GGGCAATAGCGTCACTCT
FIP	42		GGGGGATCCGCATCAATA-GGGCCGATTTTCTCTGGATG
BIP	39		GAAGGGCAAGCGTACTGGA-CATCGCACCGTCAAGGAA
F2	420	439	20 60.30 -7.97 -4.91 0.55 GGGCCGATTTTCTCTGGATG
F1c	464	485	22 65.74 -7.97 -4.07 0.55 GGGCCGATTTTCTCTGGATG
B2	552	570	19 59.93 -6.08 -4.36 0.53 CATCGCACCGTCAAGGAA
B1c	511	530	20 64.27 -5.79 -5.25 0.60 GAAGGGCAAGCGTACTGGA

Figure 7-3. LAMP primer 설계 및 적정 primer 선정을 위한 Primer Explore V4 software 사용의 예

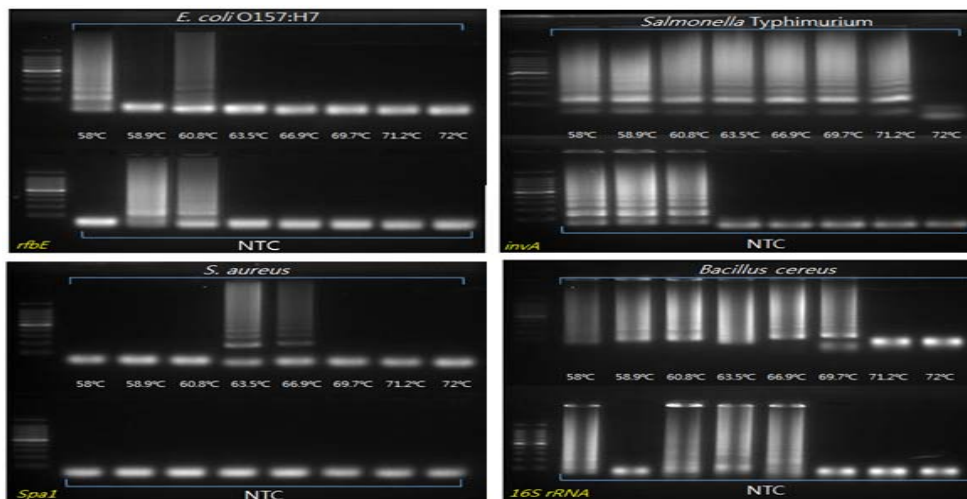


Figure 7-4. 식중독균 DNA의 온도에 따른 LAMP 증폭과 결과산물의 전기영동

Target	Sequence (5' - 3')
<i>E. coli</i> (rfbE)	F3 5'-AACAGTCTTGTACAAGTCCA-3'
	B3 5'-GGTGCTTTTGATATTTTTCCG-3'
	FIP 5'-CTCTCTTTCTCTGCGGTCCGATGTTTTTTCACACTTATTGGAT-3'
	BIP 5'-TAAGGAATCACCTTGCAGATAAACTAGTACATTGGCATCGTGT-3'
	LF 5'-CCAGAGTTAAGATTGAT-3'
	LB 5'-CGAAACAAGGCCAGTTTTTTTACC-3'
<i>S. aureus</i> (spa1)	F3 5'-AATGACTCTCAAGCTCCAA-3'
	B3 5'-CTTTGTTGAAATTGTTGTCAGC-3'
	FIP 5'-GCTCTTCGTTTAAGTTAGGCATGTTTGCGCAACAAAATAAGTTCA-3'
	BIP 5'-AAGTCTTAAAGACGATCCAAGCCTTCGGTGCTTGAGATTTCG-3'
<i>B. cereus</i> (16S rDNA)	F3 5'-ACGAAAGTCTGACGGAGCA-3'
	B3 5'-ACTTAAGAAACCACCTGCGC-3'
	FIP 5'-ACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTGTGATGAAGGCTTTCGGGT-3'
	BIP 5'-AACCAGAAAGCCACGGCTAACTCCGGATAACGCTTGCCAC-3'
<i>S. Typhimurium</i> (invA)	F3 5'-GGCGATATTGGTGTTTATGGGG-3'
	B3 5'-AACGATAAACTGGACCACGG-3'
	FIP 5'-GACGACTGGTACTGATCGATAGTTTTTCAACGTTTCTGCGG-3'
	BIP 5'-CCGGTCAAATTATCGCCACACAAAACCCACCGCCAGG-3'
	LF 5'-GACGAAAGAGCGTGGTAATTAAC-3'
LB 5'-GGCAATTTCGTTATTGGCGATAG-3'	

Table 7-2. LAMP DNA 증폭에 사용된 식중독균별 primer 정보

- 사용된 primer의 Tm은 55 ~ 68°C을 나타내었다. 따라서 Tm에 비해 현저히 높은 온도에서 LAMP를 수행할 경우 primer가 DNA template에 annealing 되지 않음에 따라 70°C 이상의 온도에서 LAMP를 수행할 경우 대상 DNA가 증폭되지 않는 결과를 나타내었음 (Figure 7-4).
- *E. coli* O157:H7 DNA의 LAMP 증폭 결과 58°C에서 *E. coli* O157:H7 DNA가 증폭된 반면 당 온도에서 NTC에서 비특이적 증폭이 관찰되지 않았다. 그러나 온도가 낮을수록 비특이적 반응의 가능성이 높아지는 것으로 알려져있음에 따라 추후 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단됨 특히 60.8°C 이상의 온도에서 *E. coli* O157:H7 과 NTC에서 모두 LAMP 결과산물이 발견되지 않음에 따라 betaine의 농도변화를 통한 적정 온도 검색이 요구되는 것으로 판단됨 (Figure 7-4).
- *S. Typhimurium*의 경우 낮은 온도 즉 60.8°C 미만에서 비특이적 반응에 의한 LAMP 증폭 산물이 NTC에서 나타났다. 반면 그 이상의 온도에서는 비특이적 LAMP 결과물을 관찰하지 못함 *S. Typhimurium* DNA를 첨가한 LAMP 처리구는 63.5°C 이상의 조건에서 template에 특이한 LAMP 증폭이 발생함에 따라 *S. Typhimurium* DNA의 LAMP 분석을 위한 최적 온도 조건을 67°C로 결정하였음 (Figure 7-4).
- *S. aureus*의 경우 63.5 및 66.9°C에서 LAMP 반응을 유도한 *S. aureus* DNA가 첨가 처리구에서만 LAMP 증폭산물을 관찰할 수 있음에 따라 67°C를 *S. aureus*

LAMP 분석을 위한 최적 온도로 결정하였음 (Figure 7-4).

- *B. cereus*의 LAMP 증폭 결과는 *S. Typhimurium* DNA 증폭결과와 다소 유사하였으며, *B. cereus* DNA의 LAMP 분석을 위한 최적 온도는 67°C로 결정하였음 (Figure 7-4)

다. 다. 식중독균 신속·간편 검출방법 적용을 위한 LAMP의 분석 특성 평가

- LAMP 기술의 식중독균 신속검출에 대한 적합성 판단은 본 연구의 연구종료에 따라 개발될 상용 LAMP 키트의 현장적용성과 보급성을 결정할 것으로 판단됨에 따라 LAMP 기술의 분석특성을 평가하고자 함.
- 식중독균 검출법의 적용적합성으로써 사용편의성, 장비의존성, 현장적용 적합성, 검출한계 등에 따라 평가되었다. 이를 판단하기 위해 본 연구팀에서 자체 제작한 LAMP 키트의 검출한계 분석을 수행함.
- 본 연구팀에서 자체 제작한 LAMP 키트의 검출한계는 *S. aureus*를 대상으로 수행되었으며, 정확성을 기하기 위해 농축된 *S. aureus* 배양액 ( $5.8 \times 10^7$  CFU/mL)에서 DNA를 추출하여 10진 희석을 통해 2  $\mu$ L 당 103, 102, 101, 100, 10-1로 희석하여 LAMP에 2  $\mu$ L를 적용함.
- LAMP의 수행방법은 앞서 기술한 바와 같으며, 67°C에서 1시간 동안 LAMP 수행을 통해 *S. aureus* DNA 증폭을 유도한 후 증폭 유무를 전기영동을 통해 확인하였음 (Figure 7-5).
- LAMP는 대조군으로 사용된 103/reaction *S. aureus* DNA를 원활하게 증폭하였으며, NTC에서 LAMP 증폭산물이 나타나지 않음에 따라 LAMP에 의한 *S. aureus* DNA 증폭은 target 특이적인 것으로 판단됨.
- LAMP에 의한 *S. aureus* DNA 증폭은 일반적인 타 PCR 방법에서 나타나는 바와 같이 LAMP에 사용된 target DNA template 수의 감소에 따라 전기영동에서 나타나는 band의 세기가 감소함 Gel electrophoresis의 사진에 의하면 LAMP에 의해 102/reaction까지 *S. aureus* DNA가 증폭되는 것으로 나타났으나 육안관찰의 경우 102/reaction 처리구에서 희미한 증폭 band가 관찰되었음.
- 본 연구팀이 제작한 LAMP 키트는 분석의 정확도를 고려하여 타 LAMP 키트의 수행 온도보다 다소 높게 수행되었다. LAMP 수행 온도의 재설정과 betaine 농도의 재설정을 통해 본 연구팀의 LAMP 키트의 검출한계 향상이 가능할 것으로 판단되며, 현재 이를 위한 다각도의 연구가 진행 중임.
- 식중독균 검출방법 중 PCR, Q-PCR 방법이 분자생물학적 방법으로 사용되고 있으며, PCR, Q-PCR과 LAMP의 사용편의성을 포함한 분석 능력을 평가하여 Table 7-3에 기술함.
- LAMP는 식품가공, 유통, 및 판매 현장 적용을 목적으로 개발되었기 때문에 기타 분석법이 가질 수 없는 LAMP만의 장점을 가지고 있음 또한 장비의존도가 낮아 장비조작이 필요하지 않으며 분석의 방법이 간단함. 그럼에도 불구하고 LAMP는 SYBR green Q-PCR의 검출한계에 버금가는 분석성능을 나타냄 문헌에 의하면, LAMP는 1개의 DNA 검체를 증폭할 수 있는 것으로 알려진바 향후 본 연구팀이 자체 제작한

LAMP 키트의 성능향상과 함께 검출한계를 향상 시킬 수 있을 것으로 기대됨.

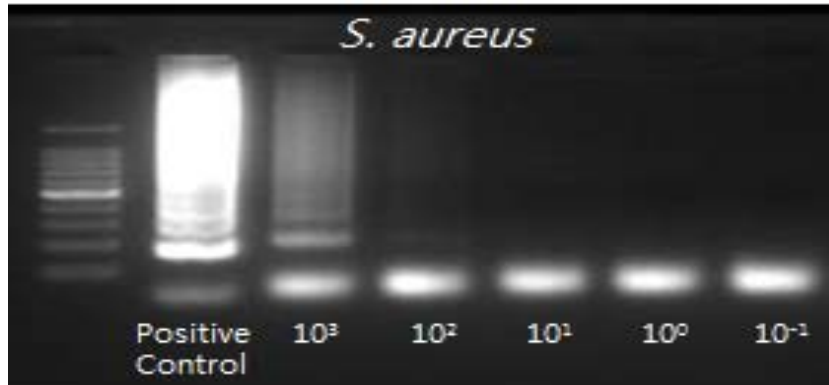


Figure 7-5. LAMP의 검출한계 평가를 위한 다양한 농도를 가지는 *S. aureus* DNA의 LAMP 증폭과 증폭산물의 전기영동 결과

- LAMP 키트를 이용한 1개의 DNA 검출이 가능함에도 불구하고 DNA 추출과정에서 발생하는 희석효과에 따라 enrichment 과정이 요구됨 앞서 기술한 바와 같이 membrane filter에 농축된 1 ~ 10개의 식중독균을 enrichment 배지에서 3 ~ 4시간 배양할 경우  $10^2 \sim 10^3$  CFU/mL 수준으로 증가함에 따라 filtering 농축기법, enrichment 기법 및 LAMP 기법을 병행 적용할 경우 식품 1 g 당  $10^{-1} \sim 10^0$  수준의 식중독균을 약 6 시간 미만에 검출할 수 있을 것으로 기대됨.
- 비록 현재 본 연구팀은 LAMP에 의한 대상 DNA 증폭 결과를 전기영동을 통해 확인하고 있으나, LAMP에 형광물질을 이용할 경우 전기영동 없이 육안으로 증폭 유무를 확인할 수 있음 그리고 본 연구팀은 이에 대한 연구를 추진·진행 중임.
- 다만 LAMP 기법은 대상 식중독균 정량에 사용될 수 없으나, 현재 식중독 발생의 위험성과 법적으로 제정된 식중독균의 한계를 고려할 경우 식중독균 정성에 요구되는 수준이 정량에 비해 더욱 빈번한 것으로 판단됨 따라서 LAMP 기술을 적용할 경우 향후 식품 내 식중독균을 현장에서 직접 실시간으로 모니터링 할 수 있으며, 결과적으로 한국 식품안전분야의 큰 발전을 가져올 것으로 기대됨.

Analysis attribute	Traditional PCR	SYBR green RT-PCR	LAMP
Easiness	Complicate	More complicate	<b>Easy</b>
Dependency on instrument	Medium	High	<b>Low</b>
Field applicability	No good	No good	<b>Applicable</b>
Quantification	No	Yes	No
Limit of detection	$10^1$	$10^1$	$10^1 \sim 10^2$
	per reaction	per reaction	per reaction
Time for analysis	2 h*	1 1/2 h	<b>&lt; 1 1/2 h*</b>

Table 7-3. 분자생물학적 식중독균 검출기술의 분석 능력 평가

\* PCR에 의한 DNA 증폭 및 전기영동 시간 포함

### 제 3 절. 식중독균 검출시간 단축을 위한 최종적인 시스템 확립

#### 1. 1장. QX200을 이용한 Multiplex test run

##### 가. 실험 개요

- 검출 민감도가 가장 뛰어나다고 알려진 digital PCR을 이용하여 4가지 식중독 원인균의 검출 가능성을 실험 함.
- 특히 4가지 식중독 원인균의 동시 검출이 가능할 경우 검출 방법의 간편성과 실효성을 가져다 줄 수 있을 것임.
- 이를 위해 digital PCR의 여러 platform 들 중, 1차년도 그리고 2차년도 연구를 통해 결정된 QX 200 digital PCR를 사용 함.
- Multiplex 검출 방법을 위해 4개 식중독 원인균의 target 유전자를 찾아낼 수 있는 primer의 농도를 다르게 하여 한 번에 4가지 균의 검출 확인을 시도 함.
- 여러 개의 target gene을 한 well에서 확인하게 되면 식중독균 검출 진단키트의 단가에도 영향을 줄 수 있을 것으로 판단 됨.

##### 나. 시료의 준비

- 4 종의 샘플 (Bacillus, E. coli, Salmonella, Staphylococcus)의 gDNA를 분리하여 동일량의 gDNA를 갖고 실험을 진행함
- 이를 위해 각각 10 ng으로 균등화하였으며, 균등화 된 각 각의 gDNA를 pooling 하여 사용하였음
- Pooling 한 샘플을 희석하여 최종 사용량이 식중독 원인균 당 각 각 0.1 ng을 갖고 모든 실험을 진행 하였음.

##### 다. Multiplex 테스트 결과

###### 1) Staphylococcus 와 E. coli test :

- 본 mutiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- Staphylococcus 와 E. coli 농도는 최종반응 시료상태에서 각각 80 nM, E. coli forward 20 nM, reverse 45 nM 이 되도록 조절함.
- Fig 1에서 볼 수 있는 것처럼 *Staphylococcus* 와 *E. coli* 의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (*E. coli* 8000 ~ 11000, *Staphylococcus* 12000 ~ 15000) 가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인하였음.

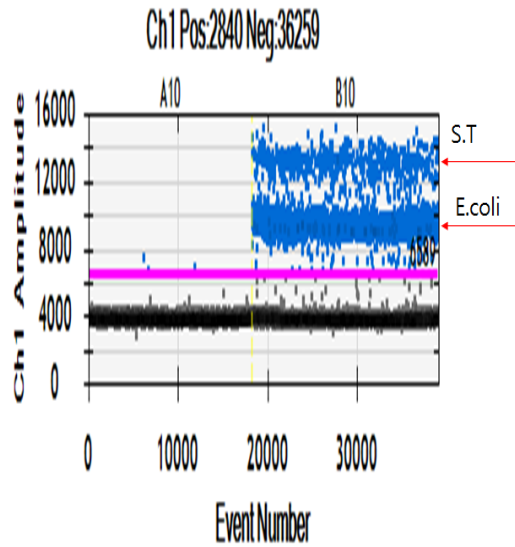


Figure 1. Digital PCR (QX 200)을 이용한 *Staphylococcus* 와 *E. coli* 의 multiplex test 실험.

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
A10 (NTC)	0	0	0	18372	18372
B10 (S.T)	32.6	652	566	20161	20272
B10 (E. coli)	138.6	2772	2241	17920	20272

Table 1. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *Staphylococcus* 와 *E. coli* counting 결과

2) *Staphylococcus* 와 *Salmonella* test :

- 본 mutiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- *Staphylococcus* 와 *Salmonella* 농도는 최종반응 시료상태에서 각각 80 nM, 110 nM 이 되도록 조절함.
- Fig 2에서 볼 수 있는 것처럼 *E. coli*와 *Bacillus*의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (*Salmonella* 11000 ~ 12000, *Staphylococcus* 12000 ~ 15000)가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인하였음.

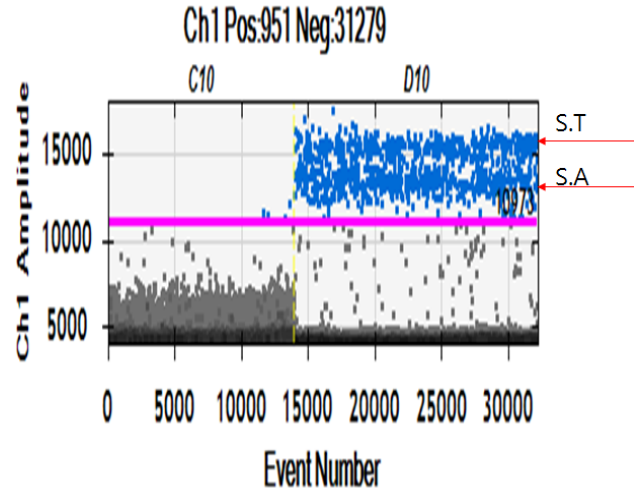


Figure 2. Digital PCR (QX 200)을 이용한 *Staphylococcus* 와 *Salmonella*의 multiplex test 실험.

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
C10 (NTC)	0.42	8.4	5	14026	14031
D10 (S.A)	25.7	514	394	17805	18199
D10 (S.T)	36.8	736	520	17920	18199

Table 2. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *Staphylococcus* 와 *Salmonella* counting 결과

3) *Staphylococcus* 와 *Bacillus* test :

- 본 multiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- *Staphylococcus* 와 *Bacillus* 농도는 최종반응 시료상태에서 각각 80 nM, *Bacillus* forward 85 nM, *Bacillus* reverse 35 nM 이 되도록 조절함.
- Fig 3에서 볼 수 있는 것처럼 *Staphylococcus* 와 *Bacillus* 의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (*Bacillus* 6000 ~ 12000, *Staphylococcus* 12000 ~ 15000)가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인하였음.

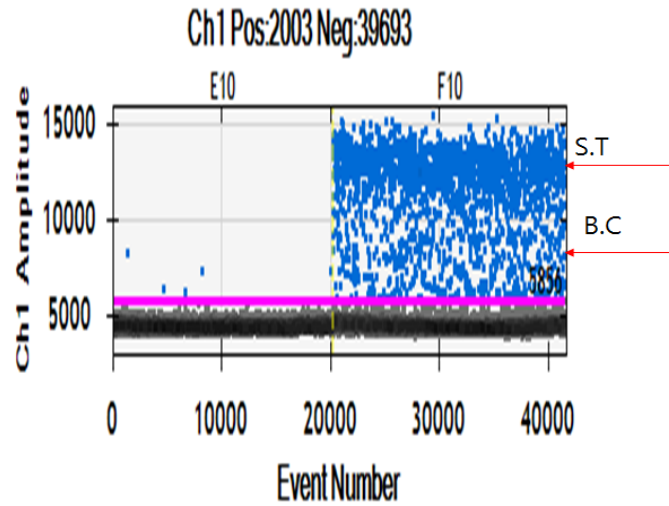


Figure 3. Digital PCR (QX 200)을 이용한 Staphylococcus 와 Bacillus 의 multiplex test 실험.

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
E10 (NTC)	0.29	5.8	5	20308	20308
F10 (Bacillus)	73.8	1475	1256	20132	21388
F10 (S.T)	40.2	805	719	20237	21388

Table 3. QX200을 이용하여 multiplex test 중 Staphylococcus 와 Bacillus counting 결과

4) E. coli 와 Salmonella test :

- 본 multiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- E. coli 와 Salmonella 농도는 최종반응 시료상태에서 각각 E. coli forward 20 nM, E. coli reverse 45 nM, 110 nM,이 되도록 조절함.



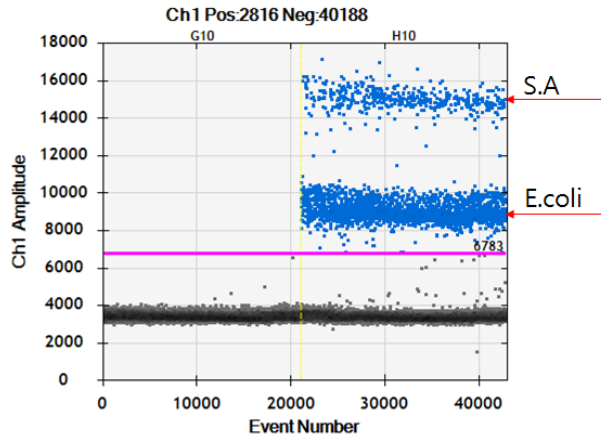


Figure 4. Digital PCR (QX 200)을 이용한 *E. coli* 와 *Salmonella* 의 multiplex test 실험.

- Fig 4에서 볼 수 있는 것처럼 *E. coli*와 *Salmonella* 의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (*E. coli* 8000 ~ 10000, *Salmonella* 14000 ~ 16000)가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인하였음.

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
G10 (NTC)	0	0	0	21205	21205
H10 ( <i>E. coli</i> )	137.8	2756	2359	19440	21799
H10 ( <i>S.A</i> )	24.9	498	457	21342	21799

Table 4. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *E. coli* 와 *Salmonella* counting 결과

5) *E. coli* 와 *Bacillus* test :

- 본 multiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- *E. coli* 와 *Bacillus* 농도는 최종반응 시료상태에서 각각 *E. coli* forward 20 nM, reverse 45 nM, *Bacillus* forward 85 nM, *Bacillus* reverse 35 nM 이 되도록 조절함.

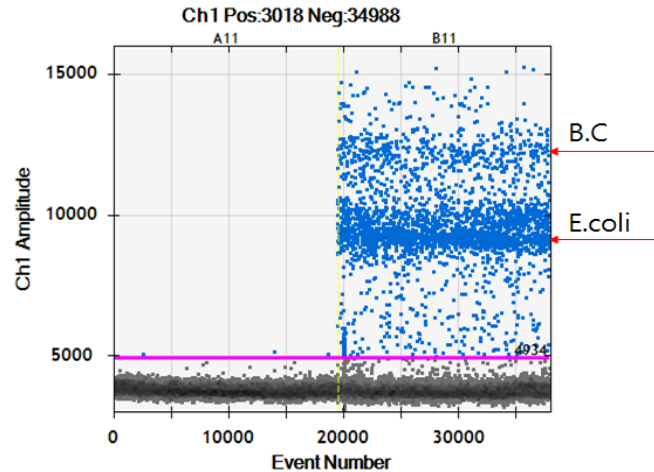


Figure 5. Digital PCR (QX 200)을 이용한 *E. coli* 와 *Bacillus* 의 multiplex test 실험.

○ Fig 5에서 볼 수 있는 것처럼 *E. coli*와 *Bacillus* 의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (*E. coli* 5000 ~ 9000, *Bacillus* 10000 ~ 13000)가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인하였음.

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
A11 (NTC)	0.06	1.2	1	19591	19592
B11 ( <i>E. coli</i> )	126.1	2522	1744	16670	18414
B11 (B.C)	81.9	1638	1239	17175	18414

Table 5. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *E. coli* 와 *Bacillus* counting 결과

6) *Salmonella* 와 *Bacillus* test :

- 본 mutiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- *Salmonella* 와 *Bacillus* 농도는 최종반응 시료상태에서 각각 110 nM, *Bacillus* forward 85 nM, *Bacillus* reverse 35 nM 이 되도록 조절함.
- Fig 6에서 볼 수 있는 것처럼 *Bacillus*와 *Salmonella* 의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (*Bacillus* 5000 ~ 12000, *Salmonella* 13000 ~ 16000)가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인하였음.

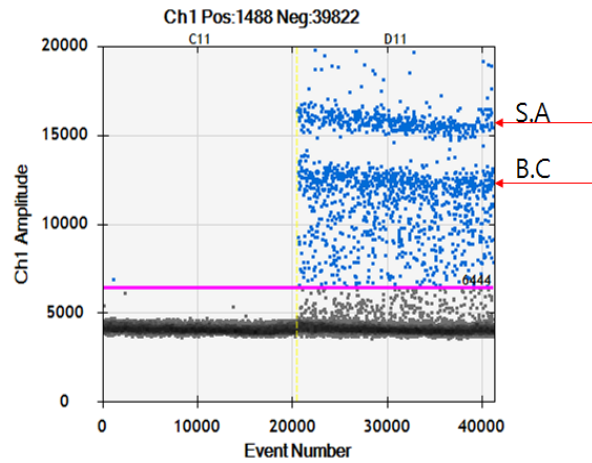


Figure 6. Digital PCR (QX 200)을 이용한 *Bacillus* 와 *Salmonella* 의 multiplex test 실험.

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
C11 (NTC)	0.23	4.6	4	20619	20623
D11 (S.A)	26.4	528	459	20228	20687
D11 (B.C)	99.6	1464	1221	19466	20687

Table 6. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *Bacillus* 와 *Salmonella* counting 결과

7) Staphylococcus, E. coli 와 Salmonella test :

- 본 mutiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- Staphylococcus, E. coli와 Salmonella 농도는 최종반응 시료상태에서 각각 80 nM, E. coli forward 20 nM, E. coli reverse 45 nM, 110 nM이 되도록 조절함.
- Fig 7에서 볼 수 있는 것처럼 Staphylococcus, E. coli 와 Salmonella의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (E. coli 6000 ~ 8000, Staphylococcus 10000 ~ 11000, Salmonella 12000 ~ 13000)가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인하였음.

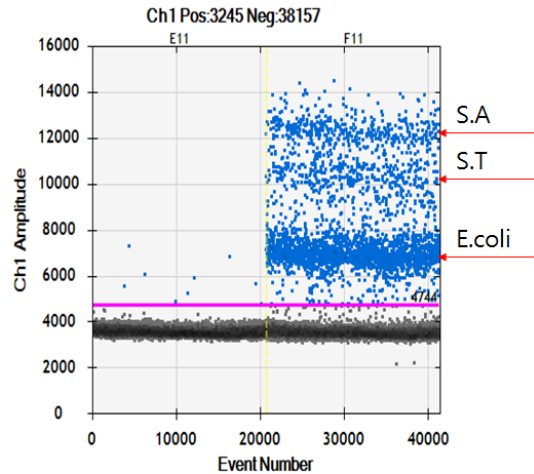


Figure 7. Digital PCR (QX 200)을 이  
 용한 *Staphylococcus*, *E. coli* 와  
*Salmonella* multiplex test 실험

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
E11 (NTC)	0.4	8	7	20776	20783
F11 (E. coli)	142.1	2842	2231	18348	20579
F11 (S.T)	31.1	622	527	20052	20579
F11 (S.A)	26.8	536	464	20115	20579

Table 7. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *Staphylococcus*, *E. coli* 와 *Salmonella* counting 결과

8) *Staphylococcus*, *E. coli* 와 *Bacillus* test :

- 본 mutiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- *Staphylococcus*, *E. coli*와 *Bacillus* 농도는 최종반응 시료상태에서 각각 80 nM, *E. coli* forward 20 nM, *E. coli* reverse 45 nM, 120 nM, *Bacillus* forward 85 nM, *Bacillus* reverse 35 nM 이 되도록 조절함.
- Fig 8에서 볼 수 있는 것처럼 *Staphylococcus*, *E. coli* 와 *Salmonella*의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (*E. coli* 6000 ~ 8000, *Bacillus* 80000 ~

9000, Staphylococcus 12000 ~ 13000)가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인 하였음.

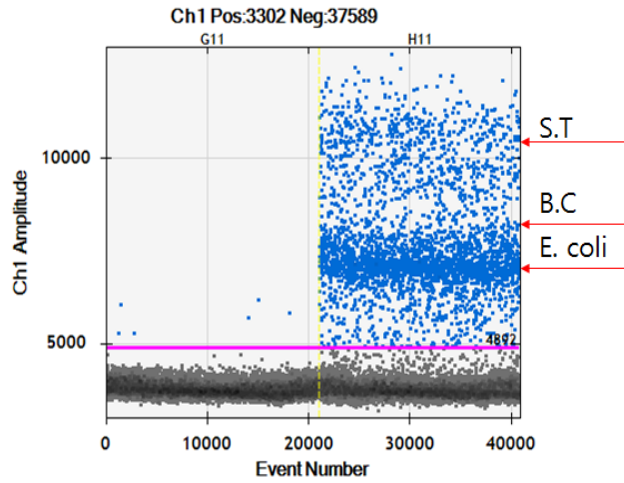


Figure 8. Digital PCR (QX 200)을 이용한 *Staphylococcus*, *E. coli* 와 *Bacillus* multiplex test 실험.

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
G11 (NTC)	0.33	6.6	6	21154	21160
H11 (E. coli)	106.6	2132	1669	18062	19731
H11 (B.C)	89	1780	1286	18445	19731
H11 (S.T)	25.4	508	421	19310	19731

Table 8. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *Staphylococcus*, *E. coli* 와 *Bacillus* counting 결과

9) *Staphylococcus*, *Salmonella* 와 *Bacillus* test :

- 본 multiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- *Staphylococcus*, *Salmonella* 와 *Bacillus* 농도는 최종반응 시료상태에서 각각 80 nM, 110 nM, *Bacillus* forward 85 nM, *Bacillus* reverse 35 nM 이 되도록 조절함.
- Fig 9에서 볼 수 있는 것처럼 *Staphylococcus*, *Bacillus* 와 *Salmonella*의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (*Bacillus* 6000 ~ 8000, *Staphylococcus*,

100000 ~ 12000, Salmonella 12000 ~ 13000)가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인하였음. 오른쪽 그림은 2D로 표현한 그래프이며, 1D로 보았을 때, 구분이 잘 안되는 것을 좀 더 명확하게 구분 시켜줌.

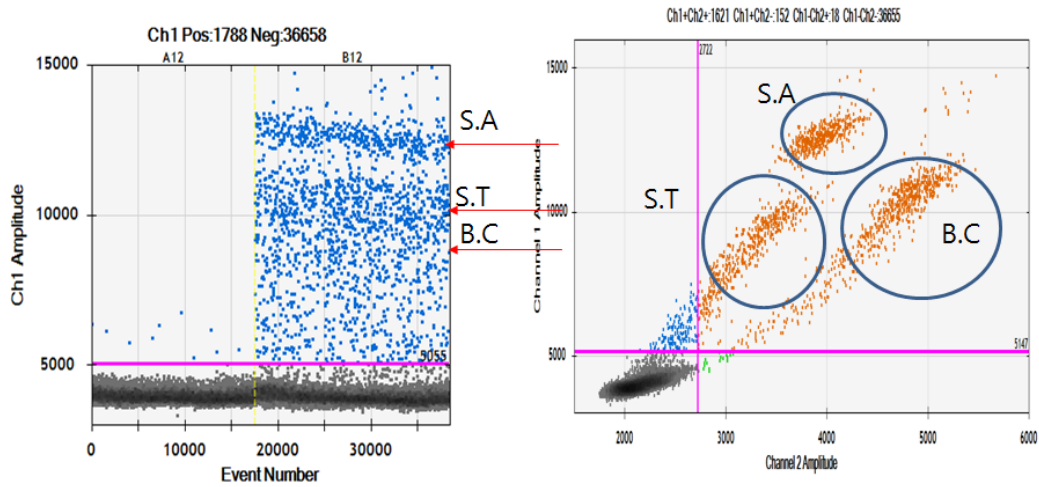


Figure 9. Digital PCR (QX 200)을 이용한 *Staphylococcus*, *Salmonella* 와 *Bacillus* multiplex test 실험

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
A12 (NTC)	0.67	13.4	10	17603	17613
B12 (B.C)	46.9	1138	948	19886	20834
B12 (S.T)	27.9	552	473	20361	20834
B12 (S.A)	23.1	462	405	20429	20834

Table 9. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *Staphylococcus*, *Salmonella* 와 *Bacillus* counting 결과

10) Salmonella, E. coli 와 Bacillus test :

- 본 mutiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- Salmonella, E. coli와 Bacillus 농도는 최종반응 시료상태에서 각각 110 nM, E. coli forward 20 nM, E. coli reverse 45 nM, Bacillus forward 85 nM, Bacillus reverse 35 nM 이 되도록 조절함.
- Fig 10에서 볼 수 있는 것처럼 E. coli, Bacillus 와 Salmonella의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (E. coli 7000 ~ 8000, Bacillus 80000 ~ 10000,

Salmonella 12000 ~ 13000)가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인하였음. 오른쪽 그림은 2D로 표현한 그래프이며, 1D로 보았을 때, 구분이 잘 안 되는 것을 좀 더 명확하게 구분 시켜줌.

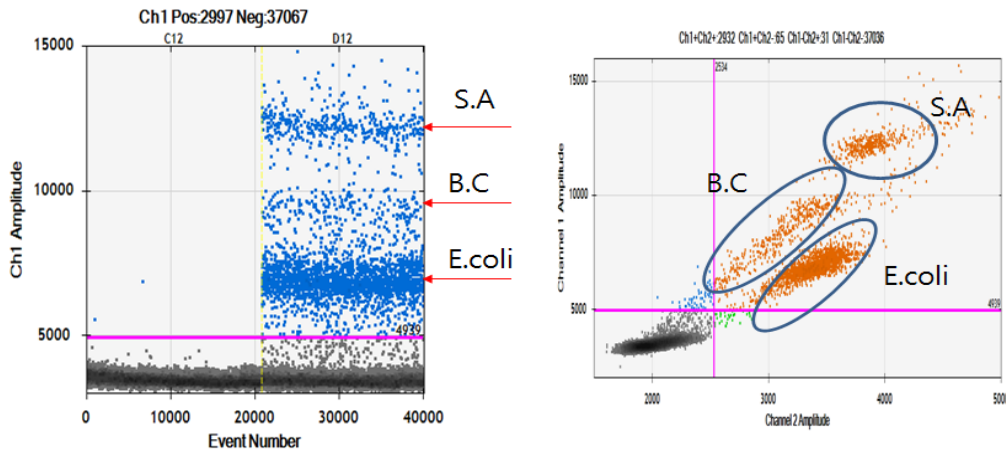


Figure 10. Digital PCR (QX 200)을 이용한 *Salmonella*, *E. coli* 와 *Bacillus* multiplex test 실험

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
C12 (NTC)	0.11	2.2	2	20863	20865
D12 (E. coli)	102	2040	1473	17396	18869
D12 (B.C)	70.7	1414	1095	17774	18869
D12 (S.A)	26.3	26	425	18774	18869

Table 10. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *Salmonella*, *E. coli* 와 *Bacillus* counting 결과

11) Staphylococcus, Salmonella, E. coli 와 Bacillus test :

- 본 mutiplex test를 위하여 target bacteria에 대한 primer의 농도를 다르게 하여 실험에 적용하였음.
- 이는 그래프 상에 나타나는 target의 분포가 다르게 구별되도록 하기 위함임.
- Salmonella, Staphylococcus, E. coli와 Bacillus 농도는 최종반응 시료상태에서 각각 110 nM, 80 nM, E. coli forward 20 nM, E. coli reverse 45 nM, Bacillus forward 85 nM, Bacillus reverse 35 nM 이 되도록 조절함.
- Fig 11에서 볼 수 있는 것처럼 Staphylococcus, E. coli, Bacillus 와 Salmonella의 존재가 서로 다른 ch1 amplitude 값을 보이며 (E. coli 12000 ~ 13000, Bacillus 150000 ~ 18000, Staphylococcus 18000 ~ 20000 Salmonella 21000 ~ 23000)가 분획이 잘 되어 구분할 수 있음을 확인하였음. 오른쪽 그림은 2D로 표현한 그래프이며, 1D로 보았을 때, 구분이 잘 안 되는 것을 좀 더 명확하게 구분 시켜줌.

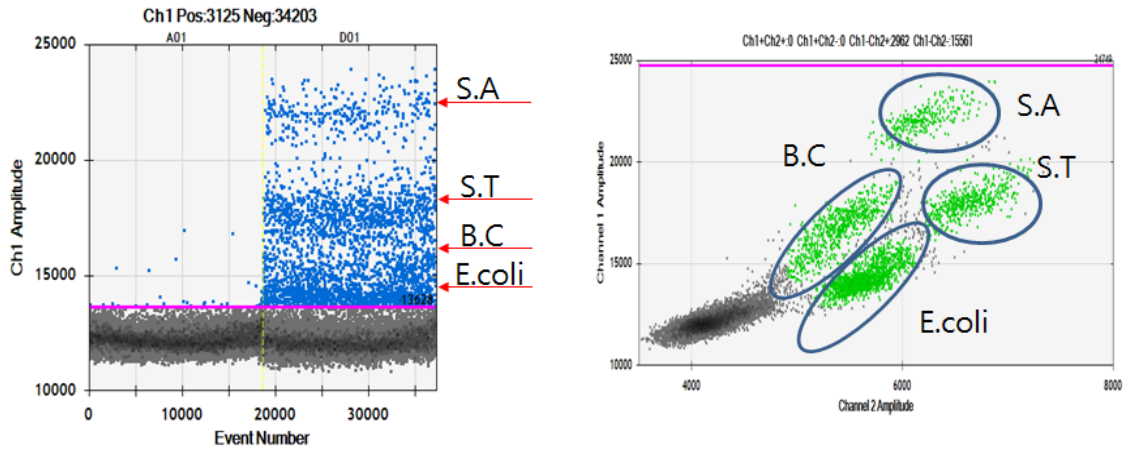


Figure 11. Digital PCR (QX 200)을 이용한 *Staphylococcus*, *Salmonella*, *E. coli* 와 *Bacillus* multiplex test 실험.

Well	Concentration (copies/uL)	Copies per 20 uLwell	Positives	Negatives	Accepted Droplets
A01 (NTC)	0.94	18.8	15	18790	18805
D01 (E. coli)	124	2480	1646	16886	18532
D01 (B.C)	60.3	1206	872	17660	18532
D01 (S.T)	56.6	1132	857	17675	18532
D01 (S.A)	18.1	362	283	18240	18523

Table 11. QX200을 이용하여 multiplex test 중 *Staphylococcus*, *Salmonella*, *E. coli* 와 *Bacillus* counting 결과

## 2. 2장. 실제 식품을 대상으로 협동기관에서 개발한 lateral flow assay validation test

### 가. 실험 개요

- 협동기관에서 개발한 샘플 전처리 및 lateral flow assay (LFA)를 활용하여 실제 식품을 대상으로 4가지 대상 균주인 *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*에 대한 validation을 시행함.
- 협동기관에서 개발한 LFA는 장비가 필요한 전기영동과는 달리 간편하게 target DNA 증폭 결과를 확인할 수 있으므로 식품 현장에서 간편하게 적용이 가능함.
- 협동기관에서 개발한 방법에 따라 실제 식품의 전처리를 하였으며, DNA extraction, Whole genome amplification, PCR 반응은 본 연구팀의 방법을 적용함.

### 나. 시료의 준비



- 4 종의 샘플 (Bacillus, E. coli, Salmonella, Staphylococcus)을 107-108 CFU/ml의 수준으로 배양 후, 희석하여 사용
- 본 연구의 대상 식품인 양상추, 소고기, 회를 25g씩 준비
- 식품에 균을 102 CFU/g, 100 CFU/g, 100 CFU/25g 단위로 접종한 후, 30분 이내로 협동기관에서 개발한 샘플 전처리 방법 (stomaching + flitering)을 통해 식중독균 분리 및 농축.
- MN kit을 사용하여 분리 농축 된 식중독균으로부터 gDNA 분리함
- 접종 단위가 낮아 (100 CFU/g 또는 100 CFU/25g) 검출되지 않은 식중독균에 한하여 Rubicon kit을 이용하여 whole genome amplication (WGA)을 실시하여 검출 한도를 개선하는 실험을 함께 진행 하였음.

다. Lateral Flow Assay (LFA) 실험 결과

1) Whole genome amplication 결과 ;

- 검출 한계 개선을 위해 LFA에서 검출 되지 않은 샘플에 대해 WGA을 별도로 실시하였고, 성공적인 WGA 결과를 전기영동을 통해 확인 함.

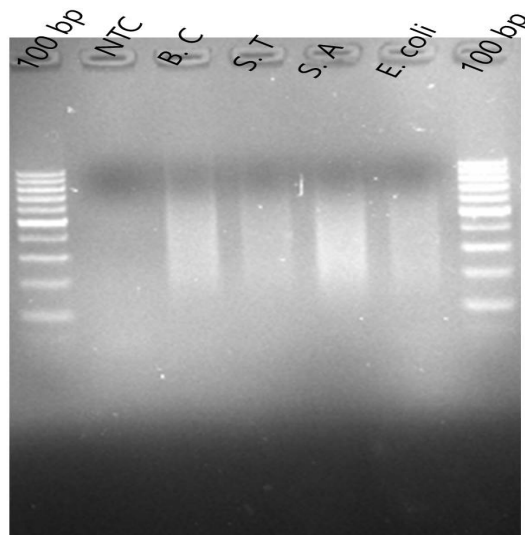


Figure 12. Rubicon Genomics 사의 PicoPLEX WGA kit을 사용하여 4개의 target gene 을 amplication 함

2) Bacillus 의 LFA 결과

- PCR reaction contents; 아래 표와 같이 실시하였으며, 4 target 모두 PCR reaction 은 동일 조건임
- 사용 균주량; 식품에서 102 CFU/g, 100 CFU/g, 100 CFU/25g를 접종한 Bacillus 샘플의 gDNA를 분리.

	1 reaction	Final concentration
Master mix (Myfi, MyTaq)	25 ul	
Biotin Primce (20 pmol)	0.5 ul	0.2 uM
DIG Primer (20 pmol)	0.5 ul	0.2 uM
D.W	19 ul	
DNA	5 ul	
Total volume	50 ul	

PCR step; Bacillus의 경우 아래 표와 같은 Step으로 PCR을 수행

Step	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	1 min	1
Denaturation	95°C	15 s	35
Annealing	50°C	15 s	
Extention	72°C	15 s	
Cooling	4°C	hold	

- PCR 50 ul 중 20 ul를 사용하여 lateral flow assay (LFA)를 실시하였음.
- LFA의 샘플 loading부위에 PCR 샘플을 loading하여 internal control, target gene에 대한 반응을 관찰했음 (Figure 13): 102 CFU/g, 100 CFU/g 접종 샘플에서는 PCR 증폭 후 Bacillus의 존재를 확인 함. (각 각 Figure 13 a, b 샘플)
- 또한 100 CFU/25g 접종한 샘플 (Figure 13 c)은 PCR 후 LFA에서 검출 되지 않았음. 이를 개선하기 위해 WGA를 실시한 후 PCR 반응 후 LFA에 loading 하여 해당 식중독균의 검출여부를 확인 하였으며 WGA를 통한 Bacillus 검출이 확인 됨 (Figure 13 d).

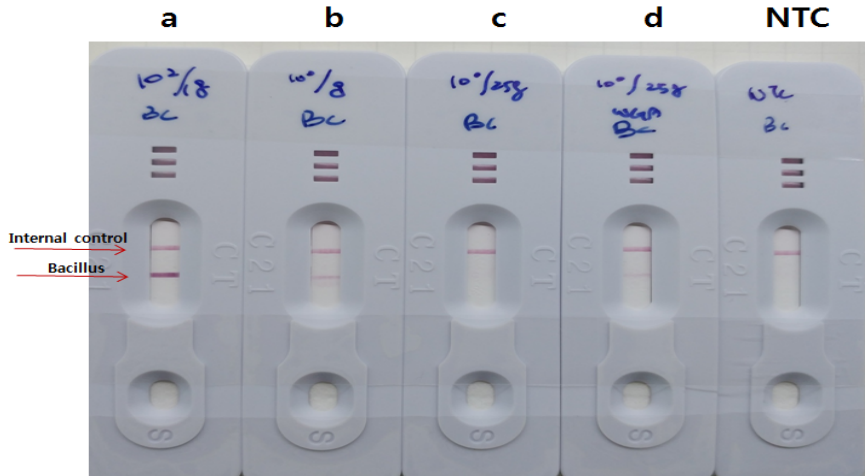


Figure 13. *Bacillus* 균의 lateral flow assay (LFA)결과.  
 (a)  $10^2$  CFU/g, (b)  $10^0$  CFU/g, (c)  $10^0$  CFU/25g 의 PCR후 LFA를 통한 *Bacillus* 검출 결과. (d) whole genome amplification을 통해 검출 개선을 보인 LFA 결과. NTC는 negative control을 의미.

### 3) *Staphylococcus aureus*

PCR step; *Staphylococcus aureus* 의 경우 아래 표와 같은 Step으로 PCR을 수행

Step	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	1 min	1
Denaturation	95°C	15 s	35
Annealing	60°C	15 s	
Extention	72°C	15 s	
Cooling	4°C	hold	

- PCR 50 ul 중 20 ul를 사용하여 LFA를 실시하였음.
- LFA의 샘플 loading부위에 PCR 샘플을 loading하여 internal control, target gene에 대한 반응을 관찰했음 (Figure 14):  $10^2$  CFU/g,  $10^0$  CFU/g 접종 샘플에서는 PCR 증폭 후 *Staphylococcus aureus*의 존재를 확인 함. (각 각 Figure 14 a, b 샘플)
- 또한  $10^0$  CFU/25g 접종한 샘플 (Figure 14 c)은 PCR 후 LFA에서 검출 되지 않았음. 이를 개선하기 위해 WGA를 실시한 후 PCR 반응 후 LFA에 loading 하여 해당 식중독균의 검출여부를 확인 하였으며 WGA를 통한 *Staphylococcus aureus* 검출이 확인 됨 (Figure 14 d).

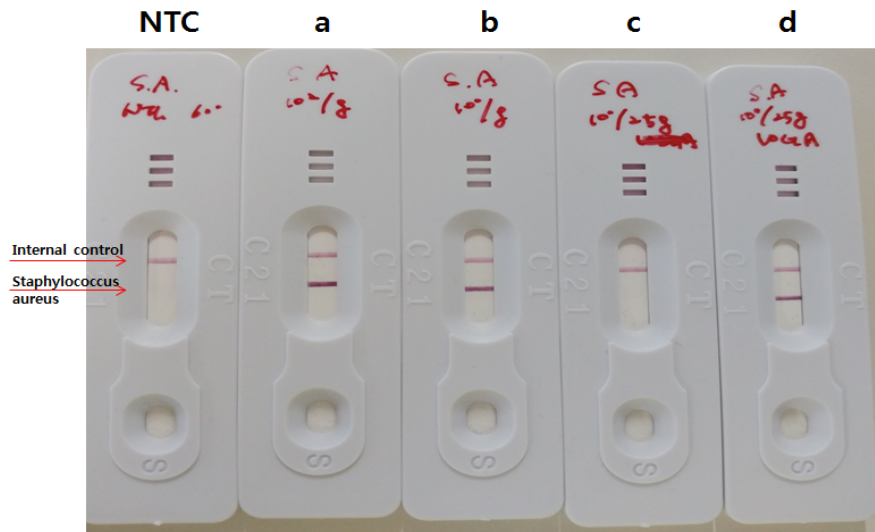


Figure 14. *Staphylococcus aureus* 균의 lateral flow assay (LFA) 결과.

(a)  $10^2$  CFU/g, (b)  $10^0$  CFU/g, (c)  $10^0$  CFU/25g 의 PCR 후 LFA를 통한 *Staphylococcus aureus* 검출 결과. (d) whole genome amplification을 통해 검출 개선을 보인 LFA 결과. NTC는 negative control을 의미.

#### 4) E. coli의 LFA 결과

PCR step: *E. coli*의 경우 아래 표와 같은 Step으로 PCR을 수행

Step	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	1 min	1
Denaturation	95°C	15 s	35
Annealing	65°C	15 s	
Extention	72°C	15 s	
Cooling	4°C	hold	

- PCR 50 ul 중 20 ul를 사용하여 LFA를 실시하였음.
- LFA의 샘플 loading부위에 PCR 샘플을 loading하여 internal control, target gene에 대한 반응을 관찰했음 (Figure 15): 102 CFU/g 접종 샘플에서는 PCR 증폭 후 *E. coli*의 존재를 확인 함. (각 각 Figure 15 a 샘플)
- 또한 100 CFU/g 및 100 CFU/25g 접종한 샘플 (Figure 15 b, d)은 PCR 후 LFA

에서 검출 되지 않았음. 이를 개선하기 위해 WGA를 실시한 후 PCR 반응 후 LFA에 loading 하여 해당 식중독균의 검출여부를 확인 하였으며 WGA를 통한 E coli. 검출이 확인 됨 (Figure 15 c, e).

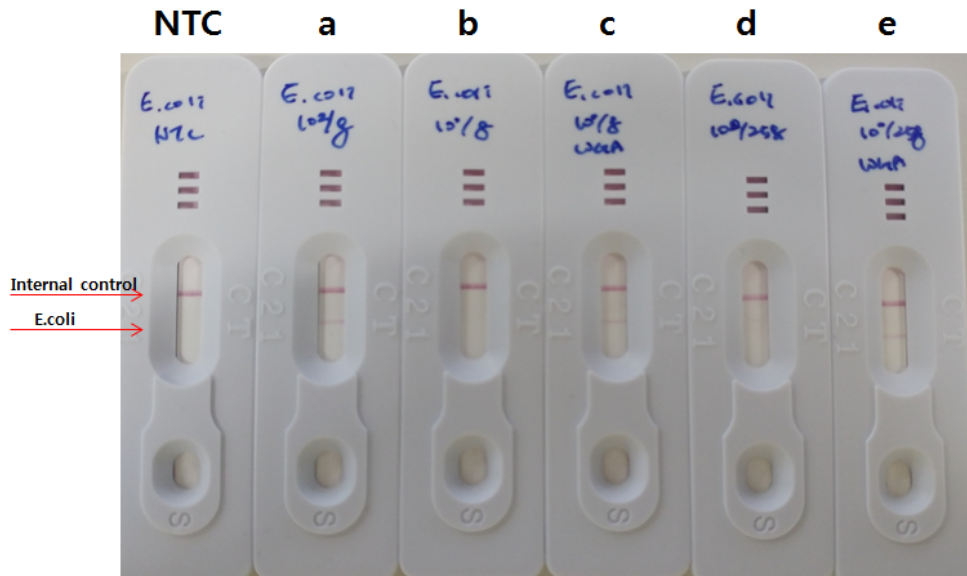


Figure 15. *E. coli* 균의 lateral flow assay (LFA)결과.

(a)  $10^2$  CFU/g, (b)  $10^0$  CFU/g, (d)  $10^0$  CFU/25g 의 PCR후 LFA를 통한 *E. coli* 검출 결과. (c) whole genome amplification을 통해 검출 개선을 보인  $10^0$  CFU/g의 LFA 결과. (e) whole genome amplification을 통해 검출 개선을 보인  $10^0$  CFU/25g의 LFA 결과. NTC는 negative control을 의미.

#### 5) Salmonella Typhimurium 결과

PCR step; *Salmonella* Typhimurium의 경우 아래 표와 같은 Step으로 PCR을 수행

Step	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	1 min	1
Denaturation	95°C	15 s	35
Annealing	65°C	15 s	
Extention	72°C	15 s	
Cooling	4°C	hold	

○ PCR 50 ul 중 20 ul를 사용하여 LFA를 실시하였음.

○ LFA의 샘플 loading부위에 PCR 샘플을 loading하여 internal control, target gene

에 대한 반응을 관찰했음 (Figure 16): 10<sup>2</sup> CFU/g 접종 샘플에서는 PCR 증폭 후 *Salmonella* Typhimurium 의 존재를 확인 함. (각 각 Figure 16 a 샘플)

- 또한 10<sup>0</sup> CFU/g 및 10<sup>0</sup> CFU/25g 접종한 샘플 (Figure 16 b, d)은 PCR 후 LFA 에서 검출 되지 않았음. 이를 개선하기 위해 WGA을 실시한 후 PCR 반응 후 LFA 에 loading 하여 해당 식중독균의 검출여부를 확인 하였으며 WGA를 통한 *Salmonella* Typhimurium 검출이 확인 됨 (Figure 16 c, e).

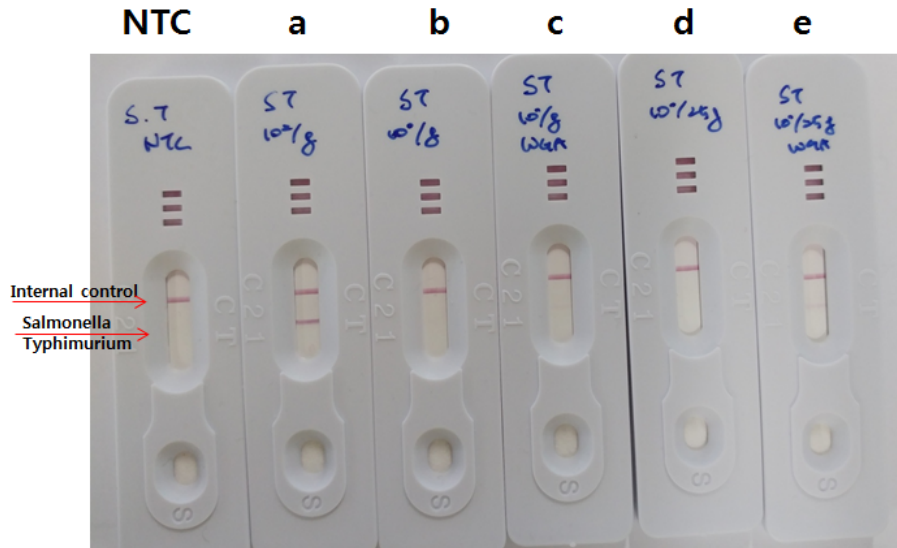


Figure 16. *Salmonella* Typhimurium 균의 lateral flow assay (LFA)결과.

(a) 10<sup>2</sup> CFU/g, (b) 10<sup>0</sup> CFU/g, (d) 10<sup>0</sup> CFU/25g 의 PCR후 LFA를 통한 *Salmonella* Typhimurium 검출 결과. (c) whole genome amplification을 통해 검출 개선을 보인 10<sup>0</sup> CFU/g의 LFA 결과. (e) whole genome amplification을 통해 검출 개선을 보인 10<sup>0</sup> CFU/25g의 LFA 결과. NTC는 negative control을 의미.

### 3. 3장. Amplification 후의 detection 기술 검토

#### 가. Real-time PCR과 LAMP를 이용한 detection limit 설정

##### 1) 실험배경

- 식품공전에 기재된 식중독균 검출방법인 배지방법에 따르면, 식품 내 식중독균을 검출하고자 할 때 최소 1일 이상의 배양시간을 필요로 함
- 이는 신속검출이 불가능하며 PCR (Polymerase chain reaction, 중합효소연쇄반응) 등의 신속검출법의 하나인 분자생물학적 기법을 이용할 경우에 이러한 단점을 극복할 수 있음
- Conventional PCR은 DNA를 증폭한 후 바로 확인이 불가능하며 전기영동을 통해 확인해야하는 단점이 있음
- 이에 반해 real-time PCR은 실시간으로 정량이 가능하기 때문에 더욱 신속하게 식중독균을 검출할 수 있음
- 이는 형광물질의 발광억제 및 생화학적 발광 반응을 이용하는 방법으로 SYBR

green 방법과 TaqMan방법 등이 있음(Figure 5-1)

- SYBR방법은 probe를 필요로 하지 않으며 DNA 이중구조에 첨가되는 SYBR green 이 발광하는 것을 감지하여 증폭 정도를 확인할 수 있음
- TaqMan방법은 probe를 필요로 하는 방법으로 probe가 발광하는 것을 통해 증폭 정도를 확인함
- 일반적으로 TaqMan방법이 probe를 첨가하기 때문에 DNA에 특이적으로 반응하게 때문에 더욱 specific하게 증폭을 일으키게 됨
- Real-time PCR의 결과는 cycle threshold (Ct) value로 나타내고 이는 DNA가 증폭함에 따라 형광발현이 되는데, 형광발현정도가 검출한계를 초과한 정도를 의미함
- LAMP 증폭 방법은 4-6 개의 primer를 이용하여 고리를 매개로 target sequence를 연속적으로 증폭하는 방법으로 증폭물의 sensitivity와 specificity가 conventional PCR 보다 높고 등온에서 증폭되기 때문에 특별한 장치를 필요로 하지 않아 LAMP를 이용한 검출이 증가하고 있는 추세임
- LAMP는 증폭한 후 탁도가 증가하여 육안으로 증폭여부를 확인 할 수 있지만 정확한 증폭 여부를 판별하기 위한 검출 방법이 필요함
- Nucleic acid lateral flow immunoassay (NALFA)반응의 항원 항체반응을 이용한 검출법으로 primer에 항원을 붙여 DNA를 증폭 하여 항체가 붙어있는 필터에 흘러 보내 줌으로써 증폭된 DNA를 육안으로 확인할 수 있는 방법임

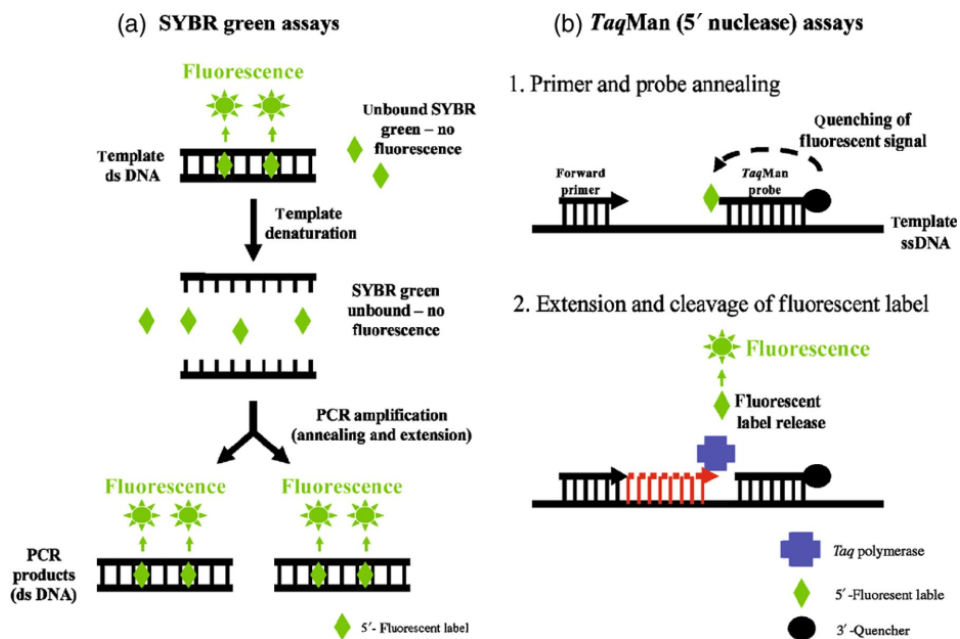


Figure 5-1. SYBR green 방법과 TaqMan 방법을 이용한 real-time PCR 원리

- NALFA는 특히 일반적인 PCR 증폭물뿐만 아니라 primer에 항원을 붙여 증폭한 LAMP도 확인 할 수 있기 때문에 활용도가 높음
- 하지만 일반적인 PCR 증폭에서는 높은 위양성을 나타내기 때문에 LAMP를 이용하여 특이적으로 검출할 수 있는 방법을 모색함
- LAMP를 이용한 LFA 방법은 일반 primer가 아닌 증폭된 부분에 probe primer를 hybridization 시켜 검출하는 방법으로 위양성을 상당히 낮출 수 있음 (Figure 5-2)
- 또한 LAMP-LFA 키트를 사용할 경우 1회 분석당 약 5천원으로 대량생산하여 판매할 경우 높은 경제성을 나타내고, LFA의 수행방법이 간단하여 해당기술의 식품 가공 및 급식현장에서 식품 내 식중독균 검출 적용이 용이할 것으로 판단됨
- 본 연구팀은 식품 내 식중독균의 신속하고 간편한 검출 기법을 개발하기 위해 LAMP와 복합적으로 NALFA를 적용하고자 하였으며, 또한 식품안전분야의 LAMP-LFA 방법의 원활한 적용을 위해 식중독균별 LAMP-LFA 조건을 확립하고자 하였으며 이를 기반으로 효율적이고 민감한 LAMP-LFA 키트 개발을 목적으로 연구를 진행함

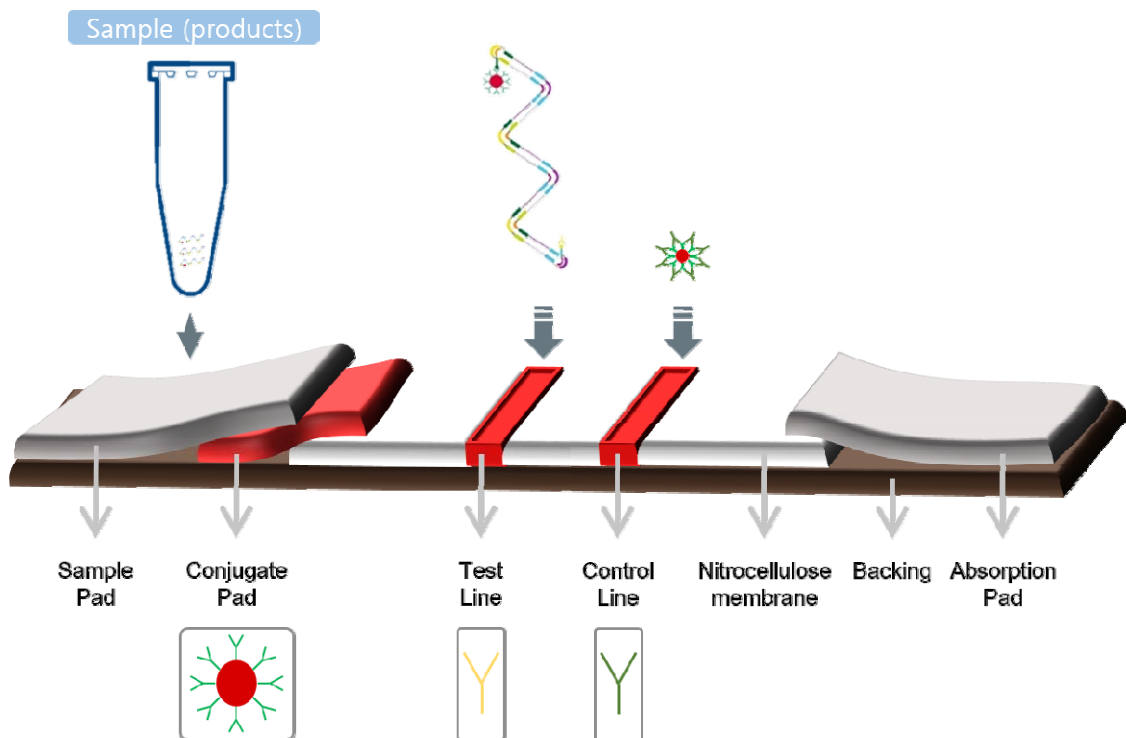


Figure 5-2. LAMP-LFA 원리 및 구성도

- 따라서 본 연구에서는 식중독균의 신속한 검출과 더욱 특이적인 검출을 위해 TaqMan을 이용한 real-time PCR과 LAMP를 수행하였음
- 대상식품은 양상추, 회, 소고기로 하였으며 대상균주는 Escherichia coli O157:H7,



Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus로 하였음

- 각 균주와 식품에서 real-time PCR과 LAMP를 수행하여 각각의 detection limit을 확인하고자 실험을 수행하였음

## 2) 식품 전처리

- 대상식품은 농산물, 수산물, 축산물 중 섭취가 빈번하며 식중독균의 오염 위험성이 높은 양상추, 회, 소고기로 각각 선정함 (Table 5-1)
- 각각의 식중독균은 발생 위험이 높은 식품에 각각 적용하여 실험하였음
- 양상추에서 오염이 빈번한 S. Typhimurium과 B. cereus는 양상추에 접종하여 실험하였고, 조리자의 손 등에 의해 오염이 쉬운 S. aureus는 회에 접종하여 사용하였으며 쇠고기에서는 가축의 분변 등에 의해 오염이 쉬운 E. coli O157:H7을 접종하여 실험하였음.

Table 5-1. 본 실험에서 사용된 식품 및 식중독균

Pathogens	Food
<i>S. Typhimurium</i>	Lettuce
<i>B. cereus</i>	Lettuce
<i>S. aureus</i>	Rock fish
<i>E. coli</i> O157:H7	Beef

- 각 식품을 정릉동 인근마트에서 구입하여 25 g 씩 무균적으로 멸균백에 소분하였음
- E. coli O157:H7, S. Typhimurium, S. aureus, B. cereus를 TSB에 18 시간 동안 37°C에서 배양하여 사용하였음
- 각 균주를 대상 식품에 1 mL씩 접종하였음
- 식품 25 g의 9배에 달하는 0.85% saline 225 mL을 첨가하여 균질화하였음
- 이후 1 mL을 취하여 spin column kit를 이용하여 DNA를 추출하였음
- 위 DNA를 이용하여 real-time PCR과 LAMP를 수행하였음

## 3) Real-time PCR 실험방법과 detection limit

- 타겟 DNA에 특이적으로 반응하여 specific하게 증폭을 일으킬 수 있는 TaqMan 방법을 이용하여 real-time PCR을 수행하였음
- E. coli O157:H7, S. Typhimurium, S. aureus, B. cereus의 target gene은 각각 stx2, invA, femA, 16s rRNA로 하여 primer와 probe를 제작하였고 각각의 sequence는 Table 5-2와 같음

- Real-time PCR mixture 조성은 Table 5-3과 같으며 총 volume은 20  $\mu$ l로 하였음
- Real-time PCR 반응온도와 시간은 Table 5-4와 같음

Table 5-2. 각 식중독균을 realtime PCR로 검출할 때 사용한 primer와 probe 정보

Species	Target gene	Sequence (5' - 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Reference	
<i>S. Typhimurium</i>	Primer	inv-F	GCGTTCTGAACCTTTGGTAA	62.3	Waleed A. Ibrahim et al. (2014)
		inv-R	CGTTCGGGCAATTCGTTA	62.7	
	Probe	FAM-TGGCGGTGGGTTTTGTTGTC TTCT-TAMRA	63		
<i>S. aureus</i>	Primer	fem-F	ACTGTGACGATGAATGCGACAA	57.6	Negar Shafiei Sabet et al. (2007)
		fem-R	ATGTTGTGGTGTTCCTTATACCAAA TCC	57.4	
	Probe	FAM-CGACAACCTGGCACATTGGCT ATCGCTTT-TAMRA	68.8		
<i>E. coli</i> O157:H7	Primer	stx2-F	ATTAACCACACCCCACCG	56	Ibekwe MA et al. (2002)
		stx2-R	GTCATGGAAACCGTTGTCAC	54.2	
	Probe	FAM-CAGTTATTTTGCTGTGGATA TACGAGGGCTTG-TAMRA	58		
<i>B. cereus</i>	Primer	16s rRNA -F	GCGGCGTGCCTAATACATGC	59.4	Reekmans et al. (2008)
		16s rRNS-R	CTCAGGTCGGCTACGCATCG	60.2	
	Probe	FAM-TCGAGCGAATGGATTAAGAG CTTGC-BHQ	59.3		

Table 5-3. Real-time PCR에 사용된 PCR 용액의 성분 조건

Reagent	Volume	Final Conc.
Prime Ex Taq (Probe qPCR) (2X conc.)	10 $\mu$ L	1X
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0.25 $\mu$ M
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0.25 $\mu$ M
TaqMan Probe	1 $\mu$ L	0.25 $\mu$ M
Template	2 ~ 4 $\mu$ L	
dH <sub>2</sub> O(sterile distilled water)	3 ~ 5 $\mu$ L	
Total	20 $\mu$ L	

Table 5-4. Real-time PCR (TaqMan) 반응온도 및 시간

PCR step	Thermal condition	
Initial denaturation	95°C, 30sec	
Denaturation	95°C, 5 sec	Reps
Annealing / extension	60°C, 30sec	40

- Real-time PCR을 수행한 결과 각 균주의 해당 식품에서의 detection limit은 Table 5-5와 같음
- 양상추에서 *S. Typhimurium*과 *B. cereus*는 모두 101 CFU/mL로 동일하였고, 세가지 식품 중 가장 높은 detection limit을 나타내었음
- 이는 양상추에는 단백질 등의 PCR inhibitor가 적게 존재하기 때문으로 판단됨
- 회에서 *S. aureus*는 104 CFU/mL로 가장 낮은 detection limit을 나타내었음
- 회는 수용성 단백질이 풍부한 식품이기 때문에 mixture에 단백질 성분이 많이 용해되어 PCR 반응 시 inhibitor로 작용하였을 것으로 보임
- 소고기에서 *E. coli* O157:H7은 103 CFU/mL의 detection limit을 나타냄
- 소고기는 단백질과 지방 성분이 PCR반응에 영향을 미쳤을 것으로 보임
- 식중독균의 오염이 의심되는 식품에서 저농도의 식중독균을 검출하고자 할 때, detection limit이 중요한 요인이 될 수 있음

Table 5-5. Real-time PCR을 이용한 각 식품에서 식중독균의 detection limit

Pathogen	Food	Detection limit
<i>S. Typhimurium</i>	Lettuce	10 <sup>1</sup> CFU/g
<i>B. cereus</i>	Lettuce	10 <sup>1</sup> CFU/g
<i>S. aureus</i>	Rock fish	10 <sup>4</sup> CFU/g
<i>E. coli</i> O157:H7	Beef	10 <sup>3</sup> CFU/g

4) LAMP 실험방법과 detection limit

- 표적 DNA에 특이적으로 반응하여 specific하게 증폭을 일으킬 수 있는 4종의 primer와 specific하게 증폭된 부분과 상보적인 probe를 제작하여 LAMP-LFA를 수행하였음
- *S. Typhimurium*의 target gene은 invA로 Primer Explorer version 4 (<http://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>)을 이용하여 primer를 제작하였고, 증폭된 부분 중 FIP primer 사이의 sequence를 probe로 제작하였음 (Table 5-6-1)
- *B. cereus*의 target gene은 16s rRNA로 Primer Explorer version 4를 이용하여 primer를 제작하였고, FIP primer 사이의 sequence를 probe로 제작하였음 (Table 5-6-2)
- *S. aureus*의 target gene은 femA로 Primer Explorer version 4를 이용하여 primer를 제작하였고, FIP primer 사이의 sequence를 probe로 제작하였음 (Table 5-6-3)
- *E. coli* O157:H7의 target gene은 stx2로 하여 Primer Explorer version 4를 이용해 primer를 제작하였고 FIP primer 사이의 sequence를 probe로 제작하였음. primer와 probe의 sequence는 Table 5-6-4과 같음
- LAMP-LFA mixture 조성은 Table 5-7와 같으며 총 volume은 25 μL로 하여 각 반응온도에 등온증폭 하였음
- LAMP-LFA 반응온도는 *S. Typhimurium*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 은 각각 60.8°C, 63.5°C, 63.5°C, 63.5°C 임
- 1시간 동안 LAMP 과정을 거친 후, 20 mM probe를 5 μL 첨가하여 63°C 5분간 hybridization 과정 통해 probe와 target sequence를 상보적으로 결합시킴
- 최종적으로 dilution buffer 120 μL 와 LAMP amplicon 8 μL를 혼합하여 LFA에 분주하여 증폭 유무를 확인함

Table 5-6-1. *S. Typhimurium*을 LAMP-LFA로 검출할 때 사용한 primer와 probe 정보

Species	Gene	Sequence (5' - 3')	5' label
<i>S. Typhimurium</i>	invA-F IP	GACGACTGGTACTGATCGATAGTTTTTC AACGTTTCCTGCGG	Digoxigenin
	invA-B IP	CCGGTGAAATTATCGCCACACAAAACCC ACCGCCAGG	
	invA-F <sub>3</sub>	GGCGATATTGGTGTTTATGGGG	
	invA-B <sub>3</sub>	AACGATAAACTGGACCACGG	
	Probe	GGGCAATTCGTTATTGGCGATAG	Biotin

Table 5-6-2. *B. cereus*를 LAMP-LFA로 검출할 때 사용한 primer와 probe 정보

Species	Gene	Sequence (5' - 3')	5' label
<i>B. cereus</i>	16s rRNA-FIP	ACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTGTGATG AAGGCTTTCGGGT	Digoxigenin
	16s rRNA-BIP	AACCAGAAAGCCACGGCTAACTCCGGAT AACGCTTGCCAC	
	16s rRNA-F3	ACGAAAGTCTGACGGAGCA	
	16s rRNA-B3	ACTTAAGAAACCACCTGCGC	
	Probe	CAGCCGCGGTAATACGTAG	Biotin

Table 5-6-3. *S. aureus*를 LAMP-LFA로 검출할 때 사용한 primer와 probe 정보

Species	Gene	Sequence (5' - 3')	5' label
<i>S. aureus</i>	femA-FIP	GAAACCAGCAGAGATAGGTAATTCAAGATTG AAGAAGGTAAACGTCT	Digoxigenin
	femA-BIP	TGTTTATTATGCTGGTGGTACATCAATTGCA CTGCATAACTTCC	
	femA-F3	ACAACCTTGATGCAAATGAGC	
	femA-B3	GTCAATGCCATGATTTAATGC	
	Probe	CATTCCGTCATTTTGCC	5' Biotin

Table 5-6-4. *E. coli* O157:H7을 LAMP-LFA로 검출할 때 사용한 primer와 probe 정보

Species	Gene	Sequence (5' - 3')	5' label
<i>E. coli</i> O157:H7	stx2-FI P	AGACGAAGATGGTCAAAACGC-GCAGTT ATTTTGCTGTGGA	Digoxigenin
	stx2-BI P	CCGGGTTCGTTAATACGGCA-CGGGCAC TGATATATGTGT	
	stx2-F 3	TCGGTGTCTGTTATTAACCA	
	stx2-B 3	TGGAAACCGTTGTCACAC	
	Probe	CTACCGTTTTTCAGATTTT	Biotin

Table 5-7. LAMP-LFA에 사용된 PCR 용액의 성분 조건

Reagents	Volume	Final Conc.
Distilled Water (DW)	6.5 $\mu$ L	
10X DNA Polymerase Buffer B (PB)	2.5 $\mu$ L	1X
Primer	FIP	1 $\mu$ L 1.6 $\mu$ M
	BIP	1 $\mu$ L 1.6 $\mu$ M
	F3	1 $\mu$ L 0.8 $\mu$ M
	B3	1 $\mu$ L 0.8 $\mu$ M
Betaine	4 $\mu$ L	0.8 M
dNTP	3.5 $\mu$ L	1.4 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.5 $\mu$ L	6 mM
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1 $\mu$ L	8 U
Template	2 $\mu$ L	
Total		25 $\mu$ L

- LAMP-LFA를 수행한 결과 각 균주의 해당 식품에서의 detection limit은 Table 5-8과 같음
- 양상추에서 *S. Typhimurium*와 *B. cereus*는 100 CFU/g 였으며 세 가지 식품 중 가장 낮은 detection limit을 나타내었음
- 이는 양상추 내 단백질이나 지방 등의 PCR inhibitor가 적게 존재하기 때문으로 판단됨
- 회에서 *S. aureus*는 10<sup>4</sup> CFU/g로 가장 높은 detection limit을 나타내었음
- 이는 real-time PCR 결과보다 더 detection limit이 높은 결과로 회의 수용성 단백질과 지방 성분에 민감하게 반응하여 PCR 작용에 영향을 미쳤을 것으로 판단됨
- 소고기에서 *E. coli* O157:H7은 10<sup>1</sup> CFU/g의 detection limit을 나타냄
- 회를 제외한 다른 균주에서는 기존의 real-time PCR의 detection limit보다 낮은 결과를 보여 detection limit을 낮추는 방법으로 사용될 수 있을 것으로 판단됨
- LAMP 증폭 방법은 real-time PCR 보다 detection limit이 낮아 식품에서 저농도의 식중독균이 오염되어 있을 경우 더욱 민감하게 검출 가능함

Table 5-8. LAMP-LFA를 이용한 각 식품에서 식중독균의 detection limit

Pathogen	Food	Detection limit
<i>S. Typhimurium</i>	Lettuce	10 <sup>0</sup> CFU/g
<i>B. cereus</i>	Lettuce	10 <sup>0</sup> CFU/g
<i>S. aureus</i>	Rock fish	10 <sup>4</sup> CFU/g
<i>E. coli</i> O157:H7	Beef	10 <sup>1</sup> CFU/g

나. Detection limit을 향상시키는 방법: Filtration, WGA, microbial enrichment

1) Filtration

- 식중독균 검출 시 희석액 225 mL을 이용하여 25 g의 검체를 희석하게 되는데, 이 과정을 통해 검체의 식중독균이 10배 희석됨
- 따라서 균이 저농도로 존재하는 경우 희석에 의해 검출이 안 되는 경우가 빈번함
- 검체희석에 따른 식중독균 검출 한계를 극복하기 위한 방법의 하나로 membrane filtration을 개발하였음(Figure 5-3)
- 이는 식품 내 저농도로 존재하는 식중독균을 효과적으로 검출할 수 있음
- 또한 이는 detection limit을 향상시킬 수 있음
- 지난 실험결과에 따르면 양상추에서 *S. Typhimurium*을 접종하여 filtration한 경우 전량이 filter에 농축이 되었음
- 따라서 filtration은 detection limit을 약 10배 또는 100배 향상시킬 수 있는 효율적인 방법의 하나임

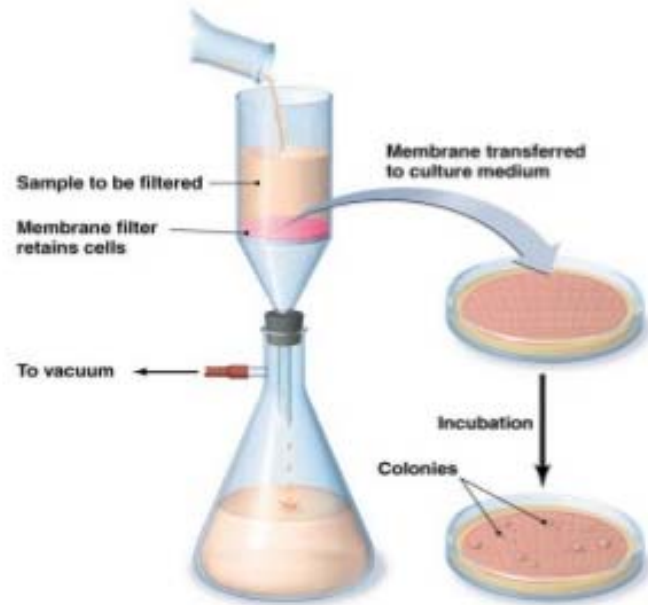


Figure 5-3. Membrane filtration workflow

## 2) WGA

### 가) 실험배경

- WGA 기법은 비교적 최근에 DNA를 상온에서 증폭시키는데 사용되는 기술로써 정확하고 높은 효율로 DNA를 증폭할 수 있음
- WGA는 증폭시키고자 하는 DNA를 무작위적으로 증폭하기 위해 6개의 nucleotides로 구성된 random primer를 사용하며, phi 29 polymerase를 이용하여 genome을 등온에서 비특이적으로 증폭시킴(Figure 5-4). Phi 29 polymerase는 높은 정확성과 proofreading 기능을 가지기 때문에 Taq polymerase를 사용하는 다른 PCR 방법에 비하여 오류가 적게 발생함.
- 식품에 존재하는 식중독세균은 극미량으로 검출한계 이하 수준으로 존재하므로 이를 극복하기 위하여 농축배양 과정이 필요한데 이는 보통 10 시간 이상이 소요됨. 따라서 WGA를 이용한 분자농축을 사용함
- 하지만 WGA로 식중독세균의 DNA를 증폭하여 검출한 연구는 보고되지 않았음. 이에 본 연구팀은 식중독세균의 검출 기술 개발의 기초연구로서 본 연구를 진행함
- WGA를 이용하여 식중독세균 DNA의 증폭을 연구하였으며 realtime PCR을 이용하여 증폭된 DNA를 검출함으로써 WGA의 분자농축 가능성을 타진하였음



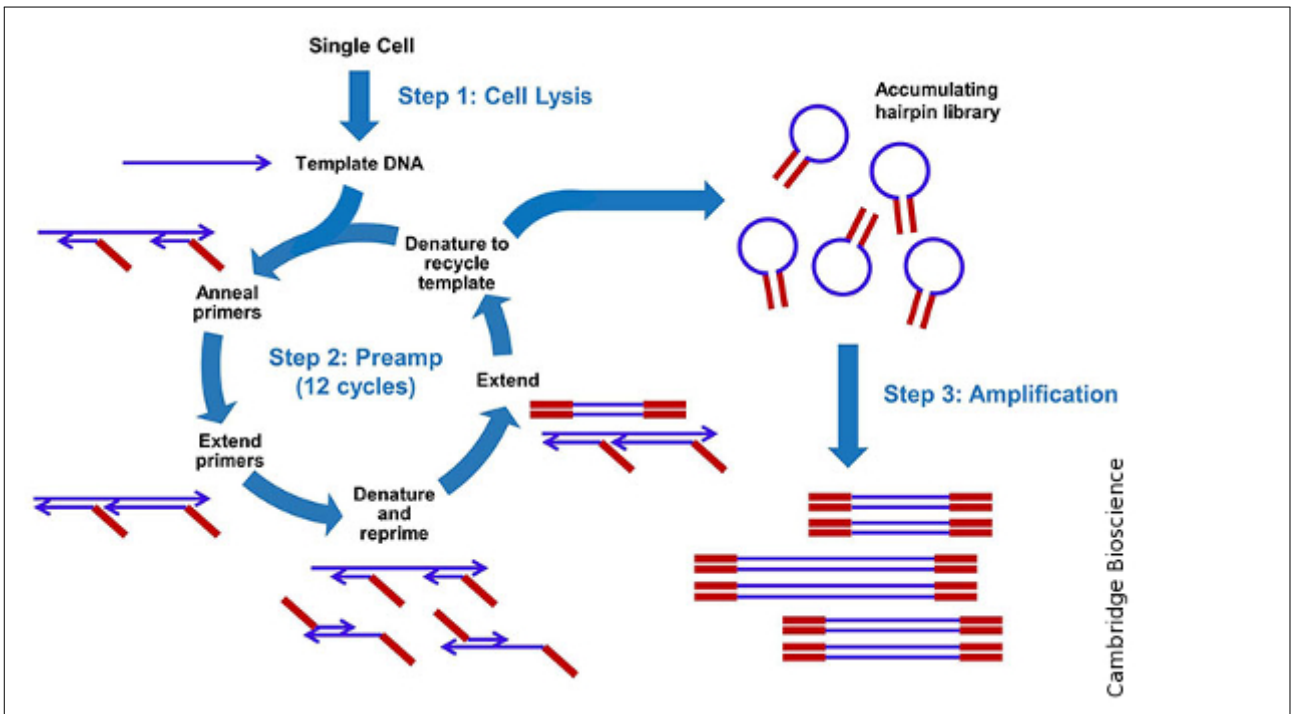


Figure 5-4. Whole genome amplification의 증폭 과정

### 3) Microbial enrichment

- 식품 내 식중독균이 1마리 이상 존재할 경우 식품의 유통과 저장기간 중에 증식이 가능함
- 이를 섭취할 경우 식중독 발생의 우려가 있기 때문에 식품에 1마리 이상 존재할 경우 부적합한 것으로 판정함
- 식품공전의 식중독균 검출방법에 따르면 검체가 버퍼에 의해 희석되기 때문에 저농도의 균은 검출이 되지 않을 수 있음
- 저농도의 균을 검출하기 위해 식중독균을 증식시키는 microbial enrichment 과정이 필수적임
- 전년도 연구결과에 따르면 식품 내 식중독균의 검출빈도가 enrichment 유무에 따라 확연히 달라지는 결과를 확인하였고 enrichment 배양 및 접종 수준의 증가에 따라 식중독균의 검출 빈도가 높아지는 양상을 보임
- 따라서 microbial enrichment는 저농도의 균을 검출하기 위한 필수적 요소이며 이는 detection limit을 향상시킬 수 있음

### 4. 4장. 분리/WGA/검출로 구성된 시스템 구축

가. Filtration 후 미생물 분리 방법 확립

#### 1) Filter로부터 미생물 분리방법 확립 실험

- Filtration을 수행하는 경우 결과적으로 membrane filter에 식중독균이 concentration 됨.
- Filter자체를 선택배지에 올려서 배양하는 경우, 배지배양시간이 24-48시간 소요

됨.

- 따라서 이보다 더욱 신속하게 검출하기 위해 필터에서 균을 떼어낸 뒤 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행하여 Ct값을 통해 균의 검출여부를 정량적으로 확인할 수 있음.
- Filter에서 균을 떼어내는 방법으로는 voltexing, stomaching, sonication 등이 있으며 각각을 시간별로 효율을 비교하였음.
- Voltexing은 각각 15초, 30초, 60분 동안 수행했으며 stomaching은 20회, 50회, 100회 수행했고 sonication은 15초, 30초, 60초 동안 수행함.
- Cellulose nitrate filter와 cellulose acetate filter를 이용하여 filtration을 수행한 뒤 각각의 방법을 통해 필터에서 균을 떼어내고자 하였음.
- Filtration을 수행한 뒤 filter를 7.5 X 12.5 cm의 멸균백에 넣고 2.5 mL의 0.85% saline을 첨가하여 각각의 방법으로 균을 떼어냄.
- 1 mL은 selective agar인 XLD에 plating 한 뒤 recovery ratio를 계산하였고, injured cell의 형성여부를 확인하기 위해 1 mL은 TSA에 plating하여 injured cell ratio를 계산하였음.
- 대상식품은 양상추, 대상균주는 S. Typhimurium으로 선정하였음.
- 결과는 Table 6-1에 나타내었음.

Table 6-1. Comparison of methods to recover cells from filters

Filter type	Recovery method	processing time/count	recovery ratio (%)	Injured ratio (%)
Cellulose Nitrate	Voltexing	15 sec	18.42 ± 2.00	25.28 ± 12.73
		30 sec	24.85 ± 0.91	26.21 ± 14.10
		60 min	41.96 ± 8.15	18.59 ± 8.16
	Stomaching	20 rep	48.83 ± 7.04	29.88 ± 4.25
		50 rep	71.05 ± 7.22	35.97 ± 12.03
		100 rep	87.87 ± 13.66	35.40 ± 3.55
	Sonication	15 sec	100.58 ± 14.76	29.28 ± 3.17
		30 sec	52.05 ± 31.82	28.02 ± 60.64
		60 sec	85.09 ± 8.74	28.16 ± 5.66
Cellulose Acetate	Voltexing	15 sec	81.85 ± 9.02	70.57 ± 20.08
		30 sec	67.71 ± 35.74	29.15 ± 27.58
		60 min	79.61 ± 7.18	62.87 ± 11.28
	Stomaching	20 rep	57.29 ± 18.98	26.62 ± 29.76
		50 rep	69.94 ± 21.10	51.19 ± 20.03
		100 rep	71.43 ± 12.43	54.37 ± 20.79
Sonication	15 sec	34.23 ± 16.75	79.98 ± 6.02	

30 sec	32.74 ± 5.61	56.37 ± 49.75
60 sec	49.85 ± 7.84	55.89 ± 15.47

- Cellulose nitrate filter의 경우, voltexing 방법 중 60분간 진행한 것이 recovery 효율이 좋았고 injured cell의 형성이 적었음.
- Stomaching의 경우, 횡수가 증가할수록 recovery 효율이 높아지는 양상을 보였으나 injured cell의 형성이 많이 되는 것을 확인하였음.
- Sonication의 경우 15초 간 수행했을 때 recovery 효율이 100%에 가깝게 나타나 가장 좋은 처리구임을 확인하였음.
- 다른 처리구에서는 시간, 횡수가 증가할수록 recovery 효율이 높아지는 양상을 보였으나, sonication의 경우에는 횡수가 증가하면 오히려 recovery 효율이 떨어지는 경향이 보임.
- Cellulose acetate filter의 경우, vortexing 방법 중 15초만 수행한 것이 recovery 효율은 가장 좋았으나 injured cell이 무려 70%가 형성되는 것을 확인하여 이는 적합하지 않은 방법으로 판단하였음.
- Stomaching의 경우 마찬가지로 횡수가 증가할수록 recovery 효율이 증가하는 양상을 보였음. 하지만 이는 injured cell 형성 비율이 50%에 가까운 결과를 확인하였고 적합하지 않은 것으로 판단하였음.
- Sonication의 경우 시간이 증가할수록 recovery 효율이 증가하는 양상을 보였으나 역시 injured cell 형성 비율이 매우 높은 것을 확인하였음.
- 따라서 filter에서 균을 떼어내는 실험을 진행할 경우 cellulose nitrate filter가 좀 더 적합한 것을 확인하였음.
- 또한 voltexing보다는 stomaching 100회와 sonication 15초, 30초의 경우에서 가장 효율이 좋은 결과를 보였음.
- 따라서 stomaching 200회를 수행하고, sonication 15초, 30초를 수행하여 재실험을 진행하였고 그 결과는 Table 6-2, Figure 6-1에 나타냈음.

Table 6-2. Comparison of methods to recover cells from Cellulose nitrate filters

Recovery method	processing time/count	recovery ratio (%)	Injured ratio (%)
Stomaching	200 rep	96.16 ± 6.89	4.01 ± 7.64
Sonication	15 sec	67.51 ± 37.31	13.94 ± 8.36
	30 sec	92.19 ± 17.47	20.02 ± 14.01

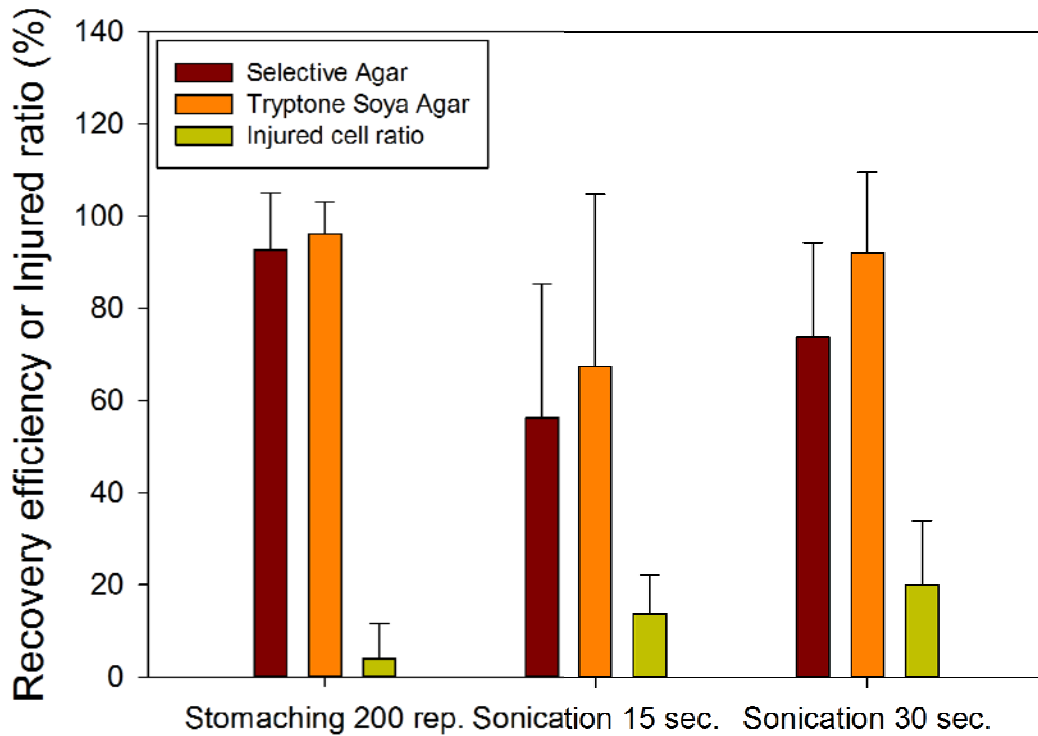


Figure 6-1. Comparison of recover efficiency and injured ratio by recovery methods from cellulose nitrate filters

- Cellulose nitrate filter에서 균을 떼어내는 방법 3가지를 비교한 결과, stomaching 200회를 수행하는 것이 가장 효율적인 결과를 나타내었음.
- Stomaching 200회를 수행한 결과 recovery 효율이 96%에 달하였으며 injured cell ratio가 4%밖에 되지 않아 거의 모든 cell이 검출되었다고 볼 수 있음.
- Sonication 15초의 경우 recovery 효율이 67%이고, injured cell ratio가 13%로 stomaching 200회에 비해 효율이 떨어지는 것을 확인함.
- Sonication 30초의 경우 recovery 효율이 92%로 높았으나 injured cell ratio가 20%에 달하는 결과를 보였음.
- Stomaching 200회와 sonication 30초의 경우 recovery 효율은 비슷하였으나 injured cell ratio가 16%이상 차이 나는 결과를 보였으므로 stomaching 200회가 가장 효율적인 방법인 것으로 판단하였음.
- 따라서 filtration을 수행한 뒤 filter에서 균을 떼어내는 방법으로 stomaching 200회를 통하여 실험을 진행하였음.

## 2) Filtration을 이용하여 미생물 분리방법 확립 실험

### 가) 개요;

- (1) 식품에 낮은 농도로 존재하는 식중독균을 효율적으로 단시간내에 검출하기 위한 방법으로 filtration을 이용하여 검출하고자 함.
- (2) 대상 식품과 균주는 양상추에서 B. cereus, S. Typhimurium을 검출하고자 했으

며 회에서 *S. aureus*, 소고기에서 *E. coli* O157:H7을 검출하고자 하였음.

나) 방법;

(1) Filtration 실험은 다음과 같이 수행됨.

- 각 식품 25 g에 약 100–5 CFU/25 g 수준의 pathogen을 접종.
- 접종된 각 식품 25 g의 9배에 달하는 buffer인 225 mL의 0.85% saline을 첨가.
- Pulsifier를 이용하여 15초간 교반.
- Filtering 기법을 이용하여 membrane filter에 각 pathogen을 농축.
- Filtration 후, 앞서 서술한 filter로부터 균을 떼어내는 방법을 토대로 하여 filter에서 균을 분리.
- 1 mL은 각각의 selective agar에 plating하여 정량, 1 mL은 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행하여 정량.

(2) Real-time

- PCR 조건은 Table 5-2, 5-4에 기술함.

다) 결과; 실험결과는 균 종류별로 기술하였음.

(1) Filtration을 이용한 양상추에서의 *Salmonella* Typhimurium 검출

- 양상추에 *S. Typhimurium*을 접종하여 filtration을 수행한 뒤 배지배양법과 real-time PCR로 비교했을 때의 결과를 Table 6-3, Figure 6-2, Table 6-4에 나타내었음.
- 먼저 Table 6-3에서 *S. Typhimurium*을 접종한 양상추에서 filtration을 수행할 때 적합한 filter를 선정하기 위해 5가지의 filter에서 각각의 recovery 효율과 filtration time을 비교하였음.
- Filter는 총 5가지를 사용했으며, cellulose nitrate 0.2  $\mu$ m, cellulose nitrate 0.45  $\mu$ m, cellulose acetate 0.45  $\mu$ m, Mixed cellulose ester 0.45  $\mu$ m, polyethersulfone 0.45  $\mu$ m를 사용하였음.
- 5가지의 filter 중 cellulose nitrate 0.45  $\mu$ m에서 recovery 효율이 95%로 가장 높았으며, filtration time이 46초로 가장 짧았음.
- 또한 5반복 중 5번 모두 filtration이 가능했으므로 이를 가장 효율이 좋은 filter로 판단하였음.
- Figure 6-2에서 양상추에 농도별로 인위적으로 접종된 *S. Typhimurium*에서 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행하여 standard curve를 나타내었음.
- Table 6-4에 filtration 전 plating을 통한 정량결과, filtration 후 plating을 통한 정량결과, filtration 후 real-time PCR을 통한 정량결과를 나타내었음.
- Filtration 후 real-time PCR을 통한 정량결과의 경우, standard curve를 구성한 뒤 추세식의 x값에 Ct value를 대입하여 도출하였음.
- Filtration 전 plating하여 정량한 결과, 103까지 모두 검출이 가능했고 102에서 3반복 중 2번밖에 검출이 되지 않았음.
- 101과 100은 3반복 모두 검출되지 않음.
- 반면 filtration 후 plating을 통해 정량한 경우, 101까지 3반복 모두 정량이 가능하였음.
- 하지만 100은 3반복 중 2번밖에 검출되지 않았음.

- Filtration 후 real-time PCR을 통해 정량한 경우 plating 결과보다 조금 낮은 양상을 보였음.
- 또한 10<sup>0</sup>에서는 3반복 중 3반복 모두 검출되지 않았음

Table 6-3. Comparison of filter type for detection of *S. Typhimurium* in lettuce

Filter type	pore size (μm)	Recovery of cells on filter (%)	filtration time	probability of filtration
Cellulose Nitrate	0.2	63 ± 18.2	114 sec	4/5
Cellulose Nitrate	0.45	95 ± 3.5	46 sec	5/5
Cellulose Acetate	0.45	74 ± 17.1	47 sec	5/5
Mixed Cellulose Ester	0.45	46 ± 4.6	85 sec	5/5
polyethersulfone	0.45	21 ± 8.9	83 sec	4/5

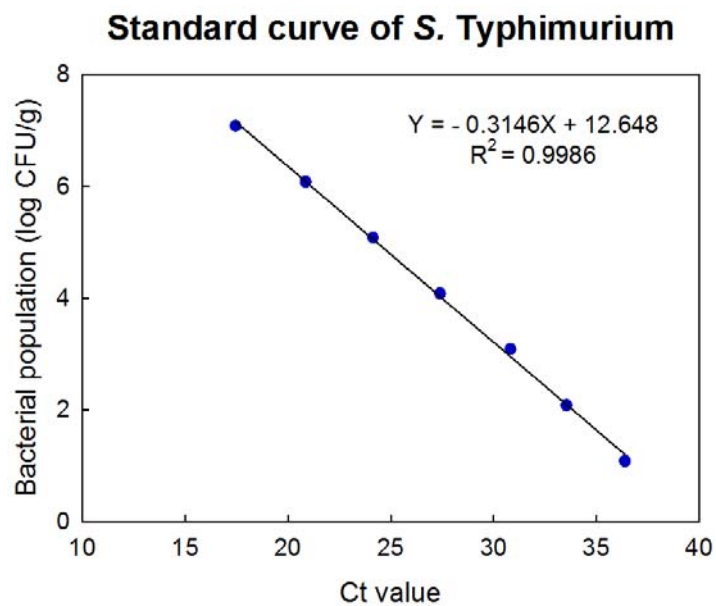


Figure 6-2. Standard curve of *S. Typhimurium*

Table 6-4. Quantitation of *S. Typhimurium* in artificially contaminated lettuce by plating, filtration and real-time PCR

Before filtration as determined by plating (CFU/25g of sample)	After filtration as determined by plating (CFU/25g of sample)	After filtration as determined by real-time PCR (CFU/mL)
$2.39 \times 10^5 \pm 0.1 \times 10^5$	$4.33 \times 10^5 \pm 0.5 \times 10^5$	$1.02 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^4$
$1.46 \times 10^4 \pm 0.5 \times 10^4$	$2.36 \times 10^4 \pm 1.0 \times 10^4$	$8.60 \times 10^3 \pm 3.5 \times 10^3$
$2.03 \times 10^3 \pm 0.6 \times 10^3$	$2.64 \times 10^3 \pm 0.9 \times 10^3$	$6.24 \times 10^2 \pm 4.6 \times 10^2$
2/3	$3.00 \times 10^2 \pm 1.8 \times 10^2$	$4.89 \times 10^1 \pm 2.3 \times 10^1$
0/3	$3.67 \times 10^1 \pm 0.5 \times 10^1$	$6.00 \times 10^0 \pm 3.5 \times 10^0$
0/3	2/3	0/3

(2) Filtration을 이용한 양상추에서의 *B. cereus* 검출

- 양상추에 *B. cereus*를 접종하여 filtration을 수행한 뒤 배지배양법과 real-time PCR로 비교했을 때의 결과를 Table 6-5, Figure 6-3, Table 6-6에 나타내었음.
- 먼저 Table 6-5에서 *B. cereus*를 접종한 양상추에서 filtration을 수행할 때 적합한 filter를 선정하기 위해 5가지의 filter에서 각각의 recovery 효율과 filtration time을 비교하였음.
- Filter는 총 5가지를 사용했으며, cellulose nitrate 0.45  $\mu$ m, cellulose acetate 0.45  $\mu$ m, Mixed cellulose ester 0.45  $\mu$ m, polyethersulfone 0.45  $\mu$ m, nylon 0.45  $\mu$ m를 사용하였음.
- 5가지의 filter 중 cellulose acetate 0.45  $\mu$ m에서 recovery 효율이 90%로 가장 높았으며, filtration time이 48초로 짧았음.
- 또한 5반복 중 5번 모두 filtration이 가능했으므로 이를 가장 효율이 좋은 filter로 판단하였음.
- Figure 6-3에서 양상추에 농도별로 인위적으로 접종된 *B. cereus*에서 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행하여 standard curve를 나타내었음.
- Table 6-6에 filtration 전 plating을 통한 정량결과, filtration 후 plating을 통한 정량결과, filtration 후 real-time PCR을 통한 정량결과를 나타내었음.
- Filtration 후 real-time PCR을 통한 정량결과의 경우, standard curve를 구성한 뒤 추세식의 x값에 Ct value를 대입하여 도출하였음.
- Filtration 전 plating하여 정량한 결과, 103부터 3반복 중 2번밖에 검출이 되지 않았고 102도 마찬가지로 었음.
- 101과 100은 3반복 모두 검출되지 않음.
- 반면 filtration 후 plating을 통해 정량한 경우, 101까지 3반복 모두 정량이 가능하였음.
- 하지만 100은 검출되지 않음.
- Filtration 후 real-time PCR을 통해 정량한 경우 plating 결과와 비슷하거나 균이 더 많이 검출되는 양상을 보였으나 역시 100은 검출되지 않는 결과를 보였음.

Table 6–6. Comparison of filter type for detection of *B. cereus* in lettuce

Filter type	pore size (µm)	Recovery of cells on filter (%)	filtration time	probability of filtration
Cellulose Nitrate	0.45	89 ± 8.8	60 sec	5/5
Cellulose Acetate	0.45	90 ± 14.2	48 sec	5/5
Mixed Cellulose Ester	0.45	54 ± 17.0	46 sec	5/5
polyethersulfone	0.45	42 ± 22.3	42 sec	5/5
Nylon	0.45	53 ± 14.8	58 sec	5/5

**Standard curve of *B. cereus***

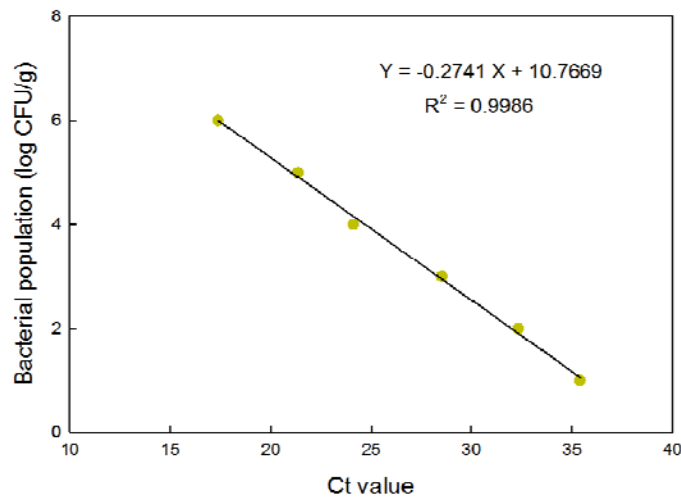


Figure 6–3. Standard curve of *B. cereus*

Table 6–6. Quantitation of *B. cereus* in artificially contaminated lettuce by plating, filtration and real–time PCR

Before filtration as determined by plating (CFU/25g of sample)	After filtration as determined by plating (CFU/25g of sample)	After filtration as determined by real–time PCR (CFU/mL)
$3.98 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^5$	$1.03 \times 10^5 \pm 5.4 \times 10^5$	$8.20 \times 10^5 \pm 1.4 \times 10^5$
$5.63 \times 10^4 \pm 3.4 \times 10^4$	$6.39 \times 10^4 \pm 5.7 \times 10^4$	$1.43 \times 10^4 \pm 2.7 \times 10^4$
2/3	$8.51 \times 10^3 \pm 3.2 \times 10^3$	$8.95 \times 10^2 \pm 4.2 \times 10^3$
2/3	$5.53 \times 10^2 \pm 3.6 \times 10^2$	$8.12 \times 10^1 \pm 4.5 \times 10^1$
0/3	$7.92 \times 10^1 \pm 5.4 \times 10^1$	$1.17 \times 10^1 \pm 2.4 \times 10^1$
0/3	0/3	0/3



(3) Filtration을 이용한 우럭회에서의 *S. aureus* 검출

- 우럭회에 *S. aureus*를 접종하여 filtration을 수행한 뒤 배지배양법과 real-time PCR로 비교했을 때의 결과를 Table 6-7, Figure 6-4, Table 6-8에 나타내었음.
- 먼저 Table 6-7에서 *S. aureus*를 접종한 우럭회에서 filtration을 수행할 때 적합한 filter를 선정하기 위해 5가지의 filter에서 각각의 recovery 효율과 filtration time을 비교하였음.
- Filter는 총 5가지를 사용했으며, cellulose nitrate 0.45  $\mu\text{m}$ , cellulose acetate 0.45  $\mu\text{m}$ , Mixed cellulose ester 0.45  $\mu\text{m}$ , polyethersulfone 0.45  $\mu\text{m}$ , nylon 0.45  $\mu\text{m}$ 를 사용하였음.
- 5가지의 filter 중 cellulose nitrate 0.45  $\mu\text{m}$ 에서 recovery 효율이 93%로 가장 높았으며, filtration time이 69초로 짧았음.
- 또한 5반복 중 5번 모두 filtration이 가능했으므로 이를 가장 효율이 좋은 filter로 판단하였음.
- Figure 6-4에서 우럭회에 농도별로 인위적으로 접종된 *S. aureus*에서 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행하여 standard curve를 나타내었음.
- Table 6-8에 filtration 전 plating을 통한 정량결과, filtration 후 plating을 통한 정량결과, filtration 후 real-time PCR을 통한 정량결과를 나타내었음
- Filtration 후 real-time PCR을 통한 정량결과와 비교하여, standard curve를 구성한 뒤 추세식의 x값에 Ct value를 대입하여 도출하였음.
- Filtration 전 plating하여 정량한 결과, 102까지 모두 검출이 가능하였음.
- 101과 100은 3반복 모두 검출되지 않음.
- 반면 filtration 후 plating을 통해 정량한 경우, 101까지 3반복 모두 정량이 가능하였음.
- 하지만 100은 3반복 중 1번밖에 검출되지 않음.
- Filtration 후 real-time PCR을 통해 정량한 경우 plating 결과와 비슷하거나 조금 더 낮은 양상을 보였으나 역시 100은 3반복 중 1번만 검출이 되었음.

Table 6-7. Comparison of filter type for detection of *S. aureus* in sliced raw rockfish

Filter type	pore size ( $\mu\text{m}$ )	Recovery of cells on filter (%)	filtration time	probability of filtration
Cellulose Nitrate	0.45	93 $\pm$ 21.8	69 sec	5/5
Cellulose Acetate	0.45	92 $\pm$ 16.9	66 sec	5/5
Mixed Cellulose Ester	0.45	67 $\pm$ 21.5	55 sec	5/5
polyethersulfone	0.45	53 $\pm$ 35.8	91 sec	3/5
Nylon	0.45	78 $\pm$ 12.5	121 sec	3/5

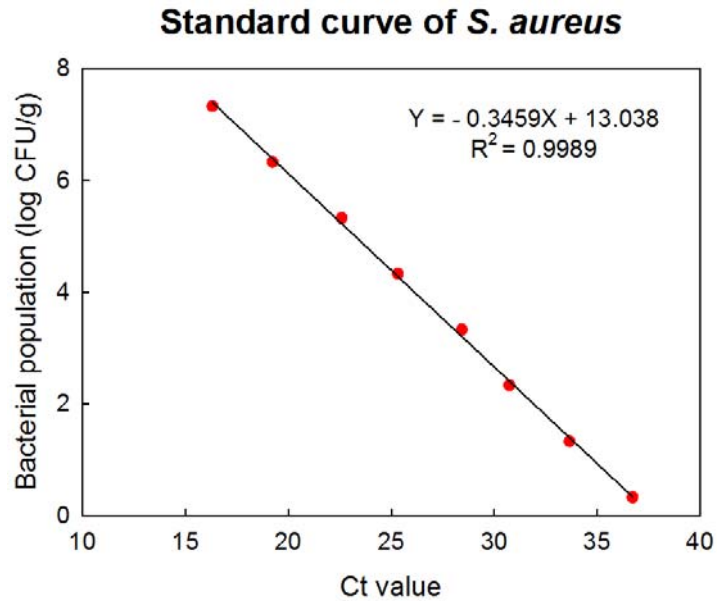


Figure 6-4. Standard curve of *S. aureus*

Table 6-8. Quantitation of *S. aureus* in artificially contaminated sliced raw rockfish by plating, filtration and real-time PCR

Before filtration as determined by plating (CFU/25g of sample)	After filtration as determined by plating (CFU/25g of sample)	After filtration as determined by real-time PCR (CFU/mL)
$1.04 \times 10^5 \pm 5.8 \times 10^5$	$6.39 \times 10^5 \pm 5.1 \times 10^5$	$1.40 \times 10^6 \pm 6.4 \times 10^5$
$7.46 \times 10^4 \pm 5.2 \times 10^4$	$4.23 \times 10^4 \pm 3.2 \times 10^4$	$1.18 \times 10^4 \pm 2.8 \times 10^4$
$9.83 \times 10^3 \pm 4.3 \times 10^3$	$8.34 \times 10^3 \pm 5.7 \times 10^3$	$1.06 \times 10^3 \pm 3.3 \times 10^3$
$1.05 \times 10^3 \pm 4.7 \times 10^2$	$4.43 \times 10^2 \pm 2.9 \times 10^2$	$7.11 \times 10^2 \pm 4.3 \times 10^2$
0/3	$9.58 \times 10^1 \pm 1.1 \times 10^1$	$1.67 \times 10^1 \pm 2.2 \times 10^1$
0/3	1/3	1/3

(4) Filtration을 이용한 소고기에서의 *E. coli* O157:H7 검출

- 소고기에 *E. coli* O157:H7을 접종하여 filtration을 수행한 뒤 배지배양법과 real-time PCR로 비교했을 때의 결과를 Table6-7, Figure 6-8, Table6-8에 나타내었음
- 먼저 Table 6-7에서 *E. coli* O157:H7를 접종한 소고기에서 filtration을 수행할 때 적합한 filter를 선정하기 위해 5가지의 filter에서 각각의 recovery 효율과 filtration time을 비교하였음
- Filter는 총 5가지를 사용했으며, cellulose nitrate 0.45  $\mu$ m, cellulose acetate 0.45  $\mu$ m, Mixed cellulose ester 0.45  $\mu$ m, polyethersulfone 0.45  $\mu$ m, nylon 0.45  $\mu$ m를 사용하였음
- 5가지의 filter 중 cellulose nitrate 0.45  $\mu$ m에서 recovery 효율이 96%로 가장 높았으나, filtration time이 100초로 다른 filter에 비해 오래 걸린다는 단점이 있었음

- Cellulose acetate 0.45  $\mu\text{m}$ 에서 recovery효율이 이와 비슷한 95%였으며 filtration time이 55초로 짧은 것을 확인하였음
- 또한 5반복 중 5번 모두 filtration이 가능했으므로 이를 가장 효율이 좋은 filter로 판단하였음
- Figure 6-5에서 소고기에 농도별로 인위적으로 접종된 *E. coli* O157:H7에서 DNA를 추출하여 real-time PCR을 수행하여 standard curve를 나타내었음
- Table 6-8에 filtration 전 plating을 통한 정량결과, filtration 후 plating을 통한 정량결과, filtration 후 real-time PCR을 통한 정량결과를 나타내었음
- Filtration 후 real-time PCR을 통한 정량결과의 경우, standard curve를 구성한 뒤 추세식의 x값에 Ct value를 대입하여 도출하였음
- Filtration 전 plating하여 정량한 결과, 103까지 모두 검출이 가능하였으며 102은 3반복 중 1번밖에 검출되지 않음
- 101과 100은 3반복 모두 검출되지 않음
- 반면 filtration 후 plating을 통해 정량한 경우, 100까지 3반복 모두 정량이 가능하였음
- Filtration 후 real-time PCR을 통해 정량한 경우 plating 결과와 비슷하거나 조금 더 높은 양상을 보였으며 역시 100까지 모두 검출이 가능하였음

Table 6-7. Comparison of filter type for detection of *E. coli* O157:H7 in Beef

Filter type	pore size ( $\mu\text{m}$ )	Recovery of cells on filter (%)	filtration time	probability of filtration
Cellulose Nitrate	0.45	96 $\pm$ 16.7	100 sec	5/5
Cellulose Acetate	0.45	95 $\pm$ 30	55 sec	4/5
Mixed Cellulose Ester	0.45	73 $\pm$ 45.6	200 sec	5/5
polyethersulfone	0.45	84 $\pm$ 35.8	49 sec	5/5
Nylon	0.45	52 $\pm$ 30.3	234 sec	5/5

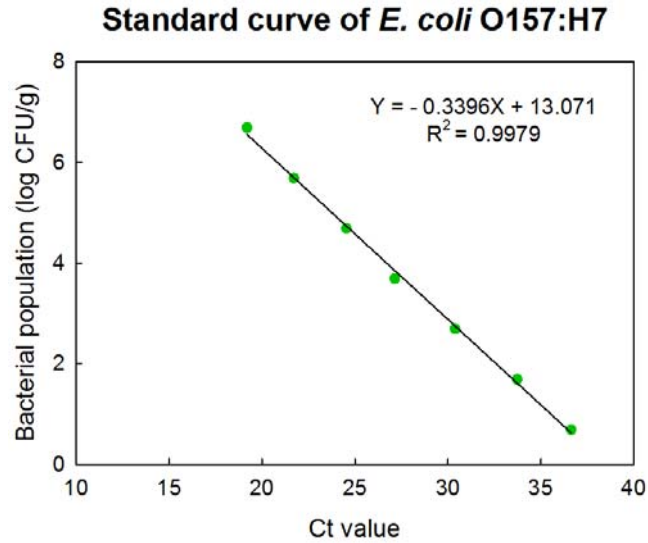


Figure 6-5. Standard curve of *E. coli* O157:H7

Table 6-8. Quantitation of *E. coli* O157:H7 in artificially contaminated beef by plating, filtration and real-time PCR

Before filtration as determined by plating (CFU/25g of sample)	After filtration as determined by plating (CFU/25g of sample)	After filtration as determined by real-time PCR (CFU/mL)
$1.48 \times 10^5 \pm 0.4 \times 10^5$	$2.67 \times 10^5 \pm 1.8 \times 10^5$	$3.77 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$
$1.50 \times 10^4 \pm 0.3 \times 10^4$	$3.78 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^4$	$5.59 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$
$3.68 \times 10^3 \pm 2.5 \times 10^3$	$4.67 \times 10^3 \pm 1.3 \times 10^3$	$4.08 \times 10^3 \pm 3.9 \times 10^3$
1/3	$2.67 \times 10^2 \pm 0.9 \times 10^2$	$3.03 \times 10^2 \pm 1.8 \times 10^2$
0/3	$2.17 \times 10^1 \pm 0.5 \times 10^1$	$5.68 \times 10^1 \pm 4.3 \times 10^1$
0/3	$5.83 \times 10^0 \pm 3.8 \times 10^0$	$5.28 \times 10^0 \pm 1.5 \times 10^0$

라) 결론

- 위의 결과를 종합하여 볼 때, filtration을 통해 균을 정량할 경우, 101까지는 대부분 검출이 가능하여 detection limit을 향상시킬 수 있는 것으로 보임
- 또한 filtration후 plating으로 정량한 결과와 real-time PCR을 통해 정량한 결과가 비슷한 것으로 보아 real-time PCR로 정량이 가능할 것으로 보임
- 이는 정량에 필요한 시간을 효과적으로 단축시킬 수 있을 것으로 보임
- 하지만 100의 식중독균이 존재하는 경우 검출되지 않을 수 있기 때문에 좀 더 효율적으로 검출할 수 있는 방법이 필요하다고 판단됨
- 따라서 filtration후 단순히 real-time PCR을 이용하여 정량하는 것이 아니라, 100 정도의 저농도균을 효과적으로 증폭하여 검출할 수 있을 것으로 판단되는 WGA와 LAMP를 병합하여 실험을 수행하였음

나. WGA operating condition 확립 및 WGA kit 개발

1) WGA operating condition 확립

가) WGA operating mix 조성 조사

- 본 연구팀은 식중독 세균의 DNA를 증폭하는데 사용하는 WGA kit를 개발하였으며, 그 결과를 보고서에 기술하였음. 개발된 WGA kit는 향후 개발될 새로운 형태의 식중독균 신속·정확 기술의 검출 정확도 판단에 결정적 요소로 작용될 것으로 판단됨
- WGA operating condition의 최적화 평가를 위하여 선행된 연구를 조사하여 operating mix를 선정하였음. 당 기술의 최적화는 E. coli O157:H7의 DNA를 사용하였으며 WGA 후 진행한 전기영동 사진을 통해 DNA 증폭 효율을 비교함
- 다양한 문헌 조사를 통해 WGA 수행을 위한 buffer 및 PCR 조건을 Table 6-9과 같이 정리하였다 (SJ Foster등 2005, FB Dean 등 2002, A Jeyaprakash 등 2004).

Table 6-9. WGA mix 조성 관련 논문

	논문 제목	저널 명	발표 년도
1	Whole genome amplification from filamentous fungi using Phi29-mediated multiple displacement amplification	Fungal Genetics and Biology	2005
2	Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	2002
3	Multiple displacement amplification in combination with high-fidelity PCR improves detection of bacteria from single females or eggs of <i>Metaseiulus occidentalis</i> (Nesbitt) (Acari: Phytoseiidae)	Journal of Invertebrate Pathology	2004

Table 6-10. 1, 3번 논문 WGA mix 조성 정보

		최종 농도	
		1	3
sample buffer	Tris-HCl	10 mM	20 mM
	EDTA	1 mM	0.01 mM
	primer	200 uM	0.1 mM
	KCl		20 mM
reaction buffer	Tris-HCl	74 mM	50 mM
	MgCl <sub>2</sub>	20 mM	10 mM
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 mM	20 mM
	dNTP	2 mM	2 mM
	enzyme	500 U/mL	8 U
	pyrophosphatase	0.5 U/mL	0.2 U
	primer		0.1 mM
	KCl	100 mM	

Table 6-11. 2번 논문 WGA mix 조성 정보

	최종 농도
Tris-HCl	37 mM
primer	50 uM
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 mM
dNTP	1 mM
pyrophosphatase	1 U/mL
enzyme	800 U/mL

1번 논문 operating condition

- ① sample buffer 20 μL + DNA 5 μL → 95°C, 3min
- ② + reaction buffer 25 μL → 30°C, 8h → 65°C, 10min

2번 논문 operating condition

- ① mix 45 μL + DNA 5 μL → 30°C, 8h → 65°C, 10min

3번 논문 operating condition

- ① sample buffer 20 μL + DNA 5 μL → 93°C, 3min
- ② + reaction buffer 22.5 μL + enzyme mix 2.5 μL → 30°C, 8h → 65°C, 10min

- 논문 별 operating condition에 맞추어 WGA를 진행하였으며 DNA는 모두 총 volume에 5 μL가 되도록 동일하게 사용하였음
- 108/mL, 104/mL 농도의 DNA를 사용하여 WGA를 수행함

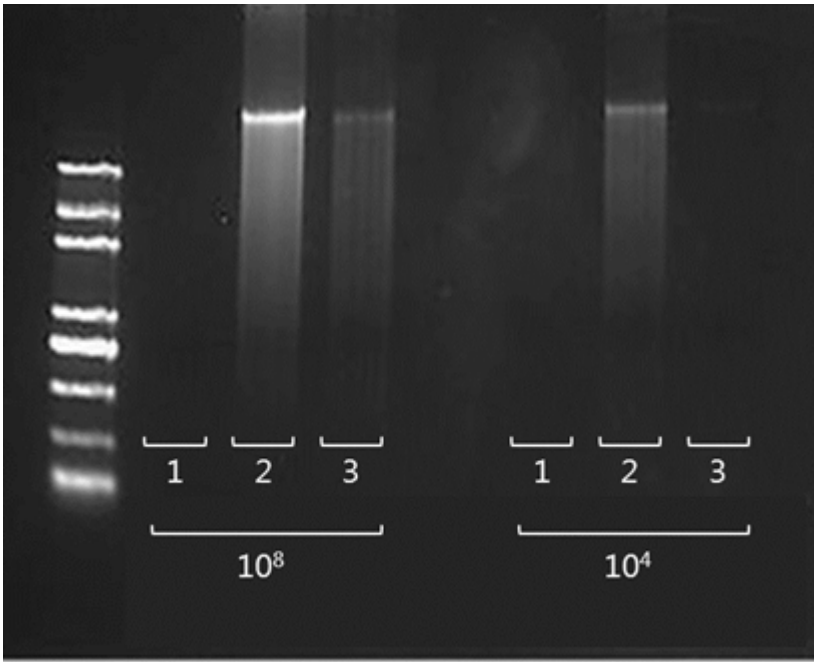


Figure 6-6. 논문 별 WGA 전기영동 결과

- Figure 6-6에서 보드시피 2번 논문의 방법을 사용한 처리구에서 가장 밝은 band가 나타난 것으로 보아 가장 좋은 증폭 효율을 나타낸다고 사료되며 1번 논문을 참고한 방법에서는 band가 108/mL, 104/mL 둘 다 나타나지 않았음. 3번 논문은 108/mL 농도의 DNA를 사용한 처리구에서만 증폭된 것을 확인함.
- 농도가 높은 DNA일수록 농도가 낮은 DNA에 비하여 진하고 선명한 band가 나타나는 것으로 나타남.
- 시중 판매되는 WGA kit를 사용하지 않고도 WGA를 이용하여 식중독세균의 DNA를 증폭시킬 수 있는 가능성을 보았음. 이에 본 연구팀은 WGA를 이용한 DNA 증폭 효율 향상에 중점을 맞추어 다음 실험을 진행함

나) Pyrophosphatase와 DNA 변성의 유무가 WGA operation에 미치는 영향 판단

- DNA가 증폭되며 생기는 phosphate를 제거해주는 역할을 하는 pyrophosphatase는 WGA에 의하여 DNA가 증폭되는 반응에 영향을 끼칠 것으로 판단되어 pyrophosphatase의 유무에 따른 DNA 증폭 효율 양상을 살펴봄
- 또한, DNA를 증폭시킬 때 DNA를 변성시키는 과정에서 DNA의 손상이 일어난다는 논문이 보고된 바 있음. 이에 본 연구팀은 DNA 변성 유무에 따른 DNA 증폭 양상을 살펴봄(Table 6-12)

Table 6-12. pyrophosphatase와 DNA 변성 유무에 따른 mix 조성

방법	mix	enzyme	pyrophosphatase 유무	DNA 변성 유무
1	2번 논문 참고	enzynomics	O	O
2	2번 논문 참고	enzynomics	X	O
3	2번 논문 참고	enzynomics	O	X
4	2번 논문 참고	enzynomics	X	X

- WGA에 사용된 operating mix는 2번 논문을 참고하였으며 enzyme은 Enzymomics 사의 Phi 29 polymerase를 사용함
- Pyrophosphatase는 WGA operating mix에 첨가하여 사용하였으며 DNA 변성은 95도에서 3분간 이루어짐
- 2반복 결과 모두에서 DNA 변성을 하고 pyrophosphatase를 사용하지 않은 처리구에서 가장 크고 선명한 band가 나타남 (Figure 6-7)

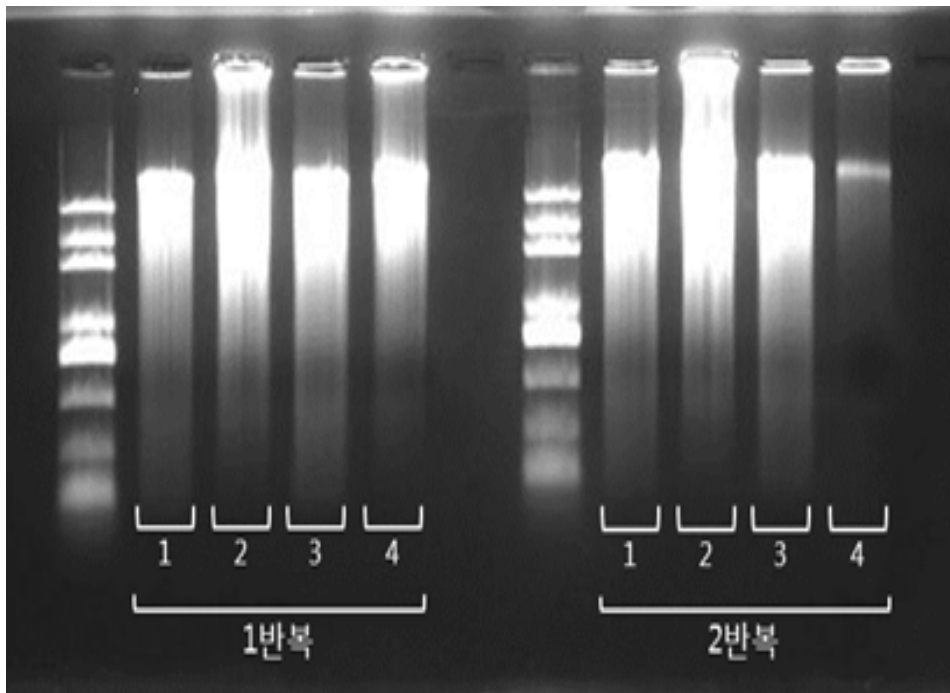


Figure 6-7. 실험 방법 별 WGA를 이용한 DNA 증폭 효율 양상 확인

- 다) 낮은 농도의 DNA를 WGA 후 realtime PCR을 수행한 결과물에서 검출될 확률
- WGA는 DNA를 증폭시키는 방법 중 하나이지만 증폭 후 특정균의 검출됨을 확인하기 위해서는 다른 검출 방법이 필요함
  - 이에 본 연구팀은 WGA로 DNA를 증폭시킨 후 realtime PCR을 이용하여 특정균 검출 가능성을 검토함
  - 103/mL~100/mL(102/reaction~10<sup>-1</sup>/reaction)의 E. coli O157:H7의 DNA를 사용하였으며 2반복의 WGA 후 realtime PCR 3반복을 진행함
  - 103/mL~100/mL의 E. coli O157:H7의 DNA를 WGA 후 전기영동을 통하여 증폭이 잘 이루어진 것을 확인함(Figure 6-8)
  - Realtime PCR의 operating condition은 Table 5-2, 5-4와 같음



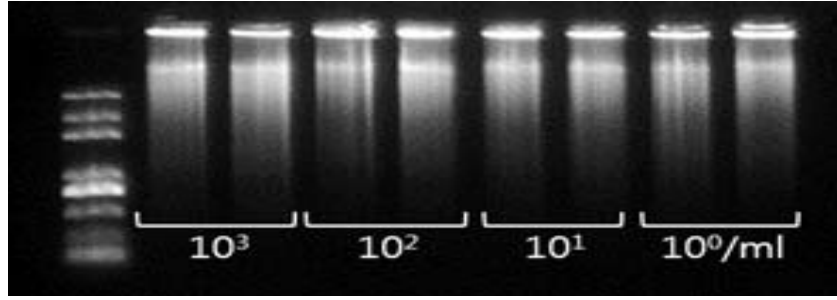


Figure 6-8. *E. coli* O157:H7의 DNA 농도 별 WGA 증폭 양상

Table 6-13. *E. coli* O157:H7의 DNA 농도 별 WGA 후 real-time PCR을 이용한 검출 비교

$10^3$ /mL ( $10^2$ /reaction)		$10^2$ /mL ( $10^1$ /reaction)		$10^1$ /mL ( $10^0$ /reaction)		$10^0$ /mL ( $10^{-1}$ /reaction)	
lane 1	lane 2	lane 1	lane 2	lane 1	lane 2	lane 1	lane 2
10.25	12.88	37.08	ND	ND	ND	ND	ND
10.13	12.67	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10.25	12.82	ND	ND	ND	ND	ND	ND

- Table 6-13의 lane1과 lane2는 각각 WGA 1반복, 2반복을 나타내며 mL과 WGA reaction 단위당 DNA 농도를 표시하였음
- *E. coli* O157:H7의 DNA를 대상으로 WGA를 했을 때, 10<sup>3</sup>/mL (10<sup>2</sup>/reaction)까지 검출이 가능하였음
- 본 연구팀은 WGA를 이용한 DNA 농축 효과를 기대하였지만 일반적으로 사용되는 realtime PCR보다 검출 효율이 좋지 않은 것으로 나타남. 이에 polymerase의 농도를 2배로 늘려서 실험을 진행하였음
- WGA 후 전기영동 결과는 Figure 6-9과 같음

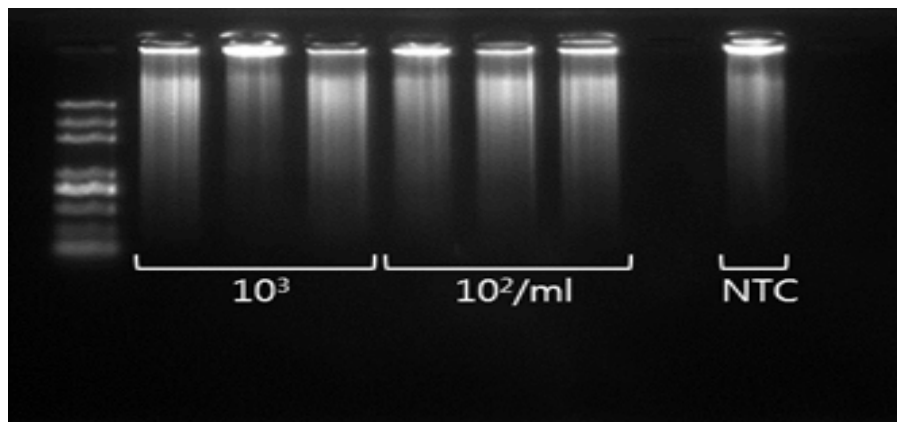


Figure 6-9. 10<sup>3</sup>~10<sup>2</sup>/mL의 *E. coli* O157:H7의 WGA 증폭 양상

Table 6-14.  $10^3 \sim 10^2/\text{mL}$ 의 *E. coli* O157:H7의 DNA를 WGA 증폭 후 real-time PCR

결과

$10^3/\text{mL}$ ( $10^2/\text{reaction}$ )			$10^2/\text{mL}$ ( $10^1/\text{reaction}$ )			NTC
lane 1	lane 2	lane 3	lane 1	lane 2	lane 3	
12.04	12.22	12.25	11.89	10.1	18.63	ND
11.95	12.52	12.12	12.45	10.78	18.75	
11.96	12.16	12.17	11.47	10.52	18.52	

Table 6-15. WGA 유무에 따른 *E. coli* O157:H7의 real-time PCR 검출 확률 비교

검출확률	$10^3/\text{mL}$ ( $10^2/\text{reaction}$ )	$10^2/\text{mL}$ ( $10^1/\text{reaction}$ )
WGA O	9/9	9/9
WGA X	3/3	1/3

- WGA 후 전기영동 사진을 통해  $10^3$ ,  $10^2/\text{mL}$ 의 DNA 농도에서 모두 증폭이 일어난 것을 확인함
- WGA 산물을 realtime PCR로 확인한 결과(Table 6-14, 6-15),  $10^3/\text{mL}$  농도의 DNA에서는 WGA의 유무에 상관없이 realtime PCR로 검출이 가능했지만  $10^2/\text{mL}$  농도의 DNA에서는 WGA를 했을 때 모든 처리구에서 검출이 가능했던 것에 비하여 WGA를 하지 않으면 전체 처리구의 1/3에서만 검출이 가능함.

라) WGA의 시간별 증폭 양상

- 현재 WGA의 총 operation time은 8시간임. 본 연구팀은 WGA가 진행됨에 따라 시간별 DNA의 증폭 양상을 관찰하고자 다음 실험을 진행하였음.
- *E. coli* O157:H7 DNA를 사용하여 WGA를 수행하였으며 0시간부터 8시간까지 1시간 간격마다 sampling하여 관찰하였음.
- WGA 후 전기영동을 통하여 증폭을 확인하였고 realtime PCR을 통해 Ct값을 비교함.

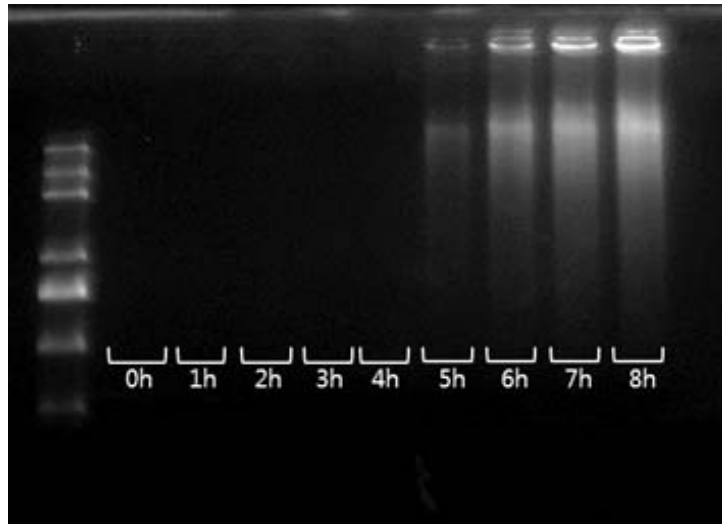


Figure 6-10. WGA의 시간별 증폭 양상

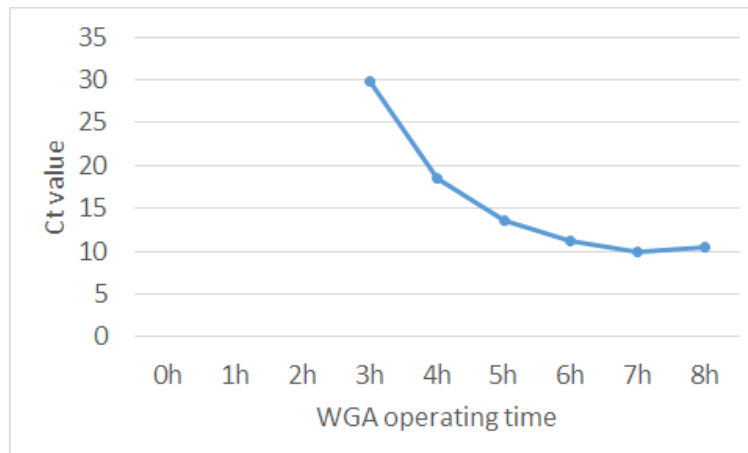


Figure 6-11. 시간별 WGA 후 real-time PCR 결과

Table 6-16. 시간별 WGA 후 real-time PCR 결과

Time (h)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ct value	ND	ND	ND	29.89	18.57	13.56	11.17	9.99	10.53

- WGA 후 전기영동으로 확인했을 때, WGA operating time이 길어질수록 band의 선명도가 높아지고 굵기가 굵어지는 것을 확인하였으며 5시간이 진행된 다음부터 전기영동 상에서 band를 확인할 수 있었음
- Real-time PCR로 확인한 결과 (figure 6-10, 6-11, Table 6-16), 전기영동 상보다 빠른 3시간부터 Ct value가 나타나기 시작하였으며 6시간 이후 최대치가 나타난 것으로 사료됨

2) WGA를 이용한 미생물 검출방법 확립

가) WGA & real-time PCR

- 본 연구팀은 WGA kit를 개발하여 식중독 세균의 DNA를 증폭하고 real-time PCR로 검출하려 하였음.
- Real-time PCR에 사용된 primer 조성은 Table 5-2와 같음. qPCR master mix는 Bioline 사의 SensiFast Probe type을 이용하였음. Real-time PCR에 사용된 용액 조성은 Table 5-3과 같음.
- Real-time PCR로 검출되지 않는 농도의 식중독균의 DNA를 대상으로 진행하였음. 식품에 농도별로 접종한 식중독균의 DNA를 WGA를 통하여 증폭시킨 결과, 전기영동 상에서 Figure 6-12와 같이 나타남. 모두 증폭이 잘 이루어진 것으로 사료됨.

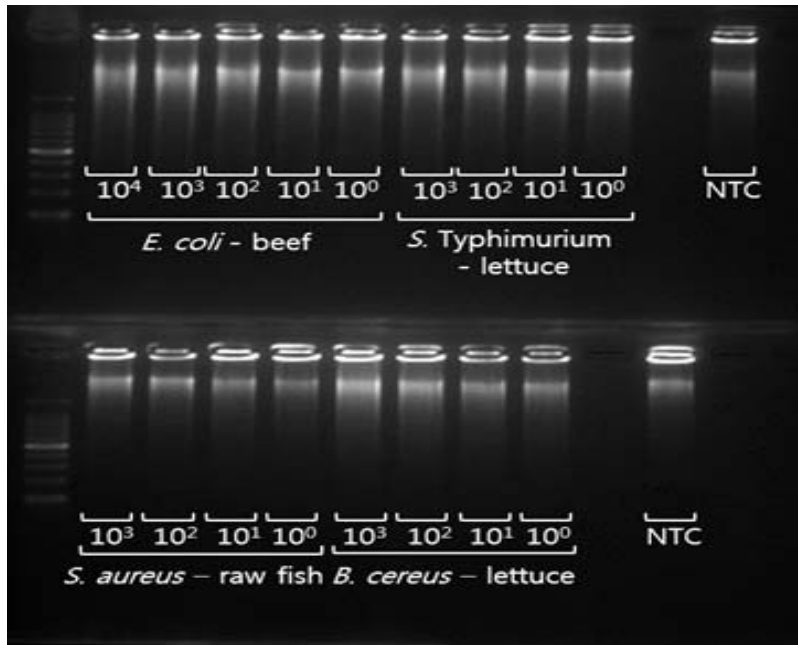


Figure 6-12. 식품에 존재하는 식중독균의 DNA를 WGA를 이용하여 증폭시킨 후 전기영동을 통하여 확인

- WGA로 증폭시킨 식중독균 DNA를 real-time PCR로 확인하였음(Table 6-18)

Table 6-18. WGA 후 real-time PCR을 이용한 식품에 존재하는 식중독균 검출

Ct value	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
$10^4$	8.89±0.52			
$10^3$	8.77±0.75	37.02±0.28	10.79±0.11	10.39±0.38
$10^2$	9.43±0.16	36.63±0.19	12.94±0.21	11.26±0.21
$10^1$	9.56±0.09	36.44±0.21	9.78±0.12	11.54±0.24
$10^0$	10.75±0.32	-	-	12.09±0.38

- WGA로 증폭시킨 뒤, realtime PCR로 확인한 결과, E. coli O157:H7, B. cereus는 100/g까지 검출 가능하였으나 S. Typhimurium, S. aureus의 경우에는 101/g까지 검출됨
- WGA를 하지 않고 real-time PCR만을 이용하여 식중독 세균을 검출했을 때와 비교하면 100~100000배 더 검출이 된 것을 확인함
- 이는, WGA를 통하여 whole genome이 증폭되어 real-time PCR을 통한 검출이 더 잘 이루어진 것으로 판단됨
- Ct 값을 비교했을 때, E. coli O157:H7에서 가장 좋은 DNA 증폭 효과가 나타났으며 그 뒤로 S. aureus, B. cereus, S. Typhimurium의 순서로 증폭 효과가 좋게 나타남.

나) WGA & PCR & LFA

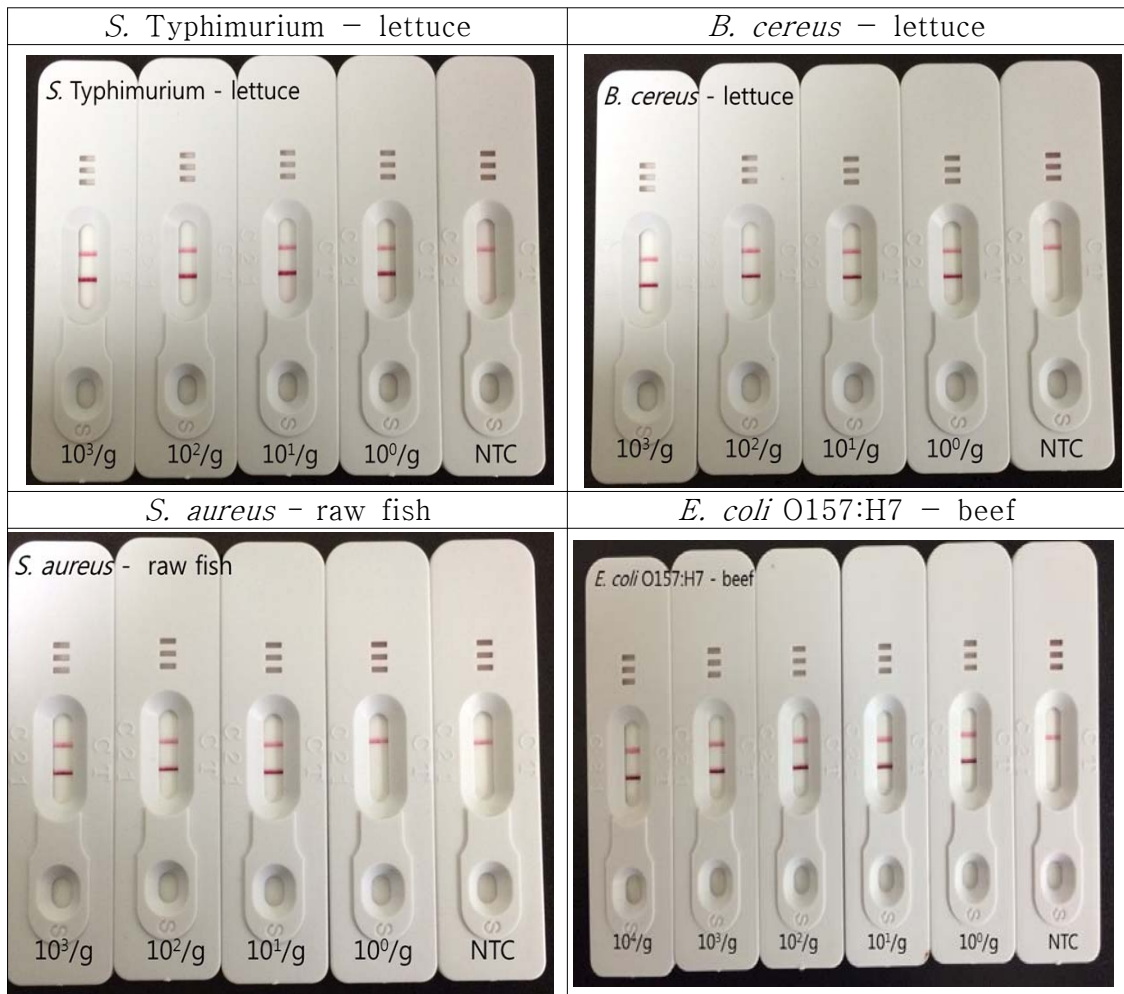
- 본 연구팀은 증폭된 DNA를 검출하는 방법 중 하나로 PCR & LFA를 사용하였음.
- WGA로 식중독균의 DNA의 whole genome을 증폭시킨 후, PCR로 target sequence만을 증폭시켜 LFA로 검출하였음.
- PCR에 사용된 primer는 Table 6-19와 같음

Table 6-19. 식품에 존재하는 식중독균을 검출하기 위한 PCR primer 정보

Strain	Target gene	Sequence	
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC19585	HTO-F	ACTGGCGTTATCCCTTTCTCT GGTG	DIG
	HTO-R	ATGTTGTCCTGCCCCTGGTAA GAGA	BIOTIN
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	hem-F	CTGTAGCGAATCGTACGTATC	DIG
	hem-R	TACTGCTCCAGCCACATTAC	BIOTIN
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	femA-F	ACTGTGACGATGAATGCGAC AA	DIG
	femA-R	ATGTTGTGGTGTCTTATAC CAAATCC	BIOTIN
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC19585	stx2-F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	DIG
	stx2-R	TCGCCAGTTATCTGACATTCT G	BIOTIN

- WGA로 DNA를 증폭시킨 후 PCR, LFA로 식중독균을 검출한 실험 결과는 Table 6-20와 같음

Table 6-20. 식품에 존재하는 식중독균을 검출하기 위한 WGA 후 PCR, LFA 실험 결과



- Table 6-19에 보이는 것과 마찬가지로, *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus*는 각각 검출 한계가 100/g, 100/g, 10<sup>1</sup>/g, 100/g로 나타남.
- Real-time PCR에 비하여 1000~10000배 정도 민감하게 검출이 되는 것을 알 수 있었음.

다. LAMP operating condition 확립 및 WGA kit 개발

1) LAMP-LFA를 위한 primer

가) *S. Typhimurium*

- primer의 설계는 문헌 조사를 통해 *S. Typhimurium*의 LAMP-LFA 수행을 위한 primer의 sequence를 설계하였음 (Hara-Kudo 등 2005) (Figure 6-13).
- probe는 loopB 구역의 sequence에 biotin을 붙여 제작하였음.

```

1   GATATTGCCT ACAAGCATGA AATGGCAGAA CAGCGTCGTA CTATTGAAAA GCTGTCCTAA   60
61  TTTAATATTA ACAGGATACC TATAGTGCTG CTTTCTCTAC TTAACAGTGC TCGTTTACGA   120
121 CCTGAATTAC TGATTCTGGT ACTAATGGTG ATGATCATT CTATGTTCGT CATTCCATTA   180
181 CCTACCTATC TGGTTGATT CCTGATCGCA CTGAATATCG TACTGGCGAT ATTGGTGTTT   240
    F3 →      ← F1      Biotin-Probe      F2 → ← Loop F
241 ATGGGGTCGT TCTACATTGA CAGAATC      CGTTTCCTGC GGTACTGTTA   300
301 ATTACCACGC TCTTTCGTCT GGCATTATCG ATCAGTACCA GTCGTCTTAT CTTGATTGAA   360
    ← B1      B2 → ← Loop B
361 GCCGATGCCG GTGAAATTAT CGCCACGTTT GGGCAATTCT TTATTGGCGA TACCTGGCGG   420
    ← B3
421 GTGGGTTTTG TTGCTTCTC TATTGTACC GTGGTCCAGT TTATCGTTAT TACCAAAGGT   480
481 TCAGAACGTC TCGCGGAAGT CGCGGCCCGA TTTTCTCTGG ATGGTATGCC CGGTAAACAG   540
541 ATGAGTATTG ATGCCGATT GAAGGCCGGT ATTATTGATG CGGATGCCGC GCGCGAACGG   600
601 CGAAGCGTAC TGGAAAGGGA AAGCCAGCTT TACGGTTCCT TTGACGGTGC GATGAAGTTT   660
661 ATCAAAGGTG ACGCTATTGC CGGCATCATT ATTATCTTTG TGAACTTTAT TGGCGGTATT   720

```

Figure 6-13. *S. Typhimurium*의 LAMP-LFA primer 설계도

나) *B. cereus*

- 본 연구팀은 식중독 세균의 DNA를 증폭하는데 적합한 primer sequence를 찾기 위해 genbank의 sequence 데이터를 이용하여 Primer Explorer version 4 (<http://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>)을 이용하여 16s rRNA gene의 5개의 서로 다른 region의 sequence를 이용해 primer를 설계하였음
- primer의 설계는 invA gene의 genbank accession number (EU283326) 정보를 이용해 Figure 6-14 와 같이 설계하였음.
- probe의 sequence는 BIP의 양쪽 sequence의 사이에 위치하는 sequence 부분을 사용하였음

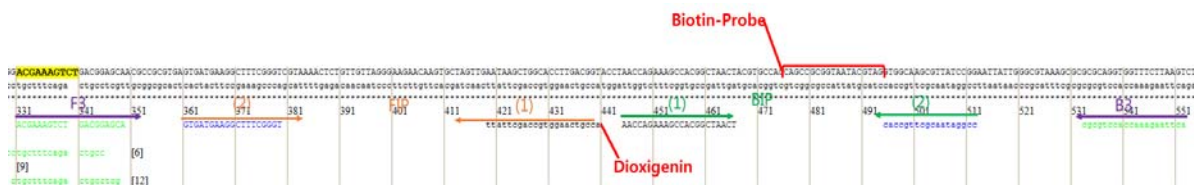


Figure 6-14. *B. cereus*의 LAMP-LFA primer 설계도

다) *S. aureus*

- primer의 설계는 Primer Explorer version 4를 이용하여 femA gene의 genbank accession number (X17688) 정보를 이용해 Figure 6-15 와 같이 설계하였음.
- probe의 sequence는 BIP의 양쪽 sequence의 사이에 위치하는 sequence 부분을 사용하였음.

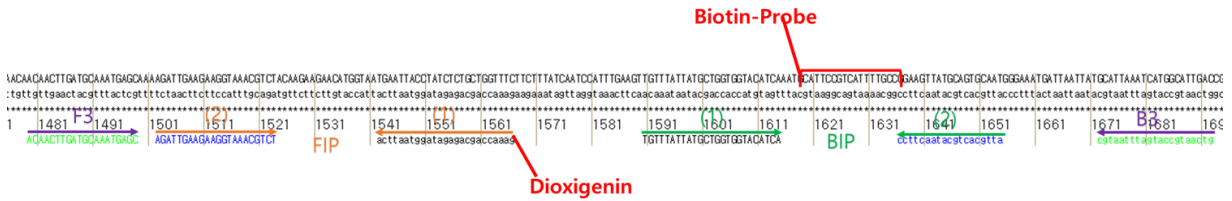


Figure 6-15. *S. aureus*의 LAMP-LFA primer 설계도

라) *E. coli* O157:H7

- primer의 설계는 Primer Explorer version 4를 이용하여 Stx2 gene의 genbank accession number (AF162758) 정보를 이용해 Figure 6-16 와 같이 설계하였음.
- probe의 sequence는 BIP의 양쪽 sequence의 사이에 위치하는 sequence 부분을 사용하였음

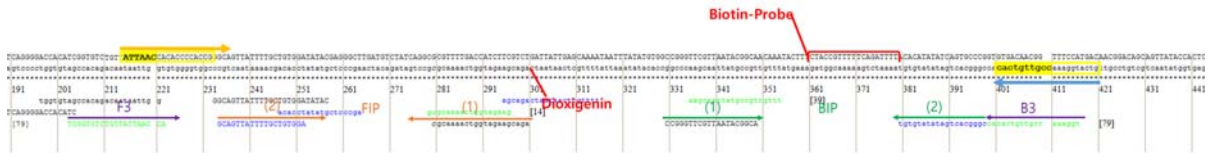


Figure 6-16. *E. coli* O157:H7의 LAMP-LFA primer 설계도

2) LAMP operating condition 확립

가) LAMP 온도조건 확립

- 본 연구팀은 식중독 세균의 DNA를 증폭하는데 사용하는 LAMP의 operation condition 조건을 확립했으며, 그 결과를 보고서에 기술하였음. 개발된 LAMP 조성을 이용해 각 표적 균주별 primer의 온도 조건을 전기영동 사진을 통해 확인하고, 최종적으로 LFA로 검출 가능 여부를 확인함
- *S. Typhimurium*의 경우 Figure 6-17와 같이 60.8°C에서 밝기가 진하고 선이 굵은 것으로 보아 가장 증폭률이 높은 것을 확인함
- 이후 LFA를 이용해 최종 검출 가능 여부를 확인한 결과 60.8°C에서 LFA도 양성 증폭 결과를 보여 *S. Typhimurium*의 검출에 적합한 것으로 판단함 (Figure 6-18).



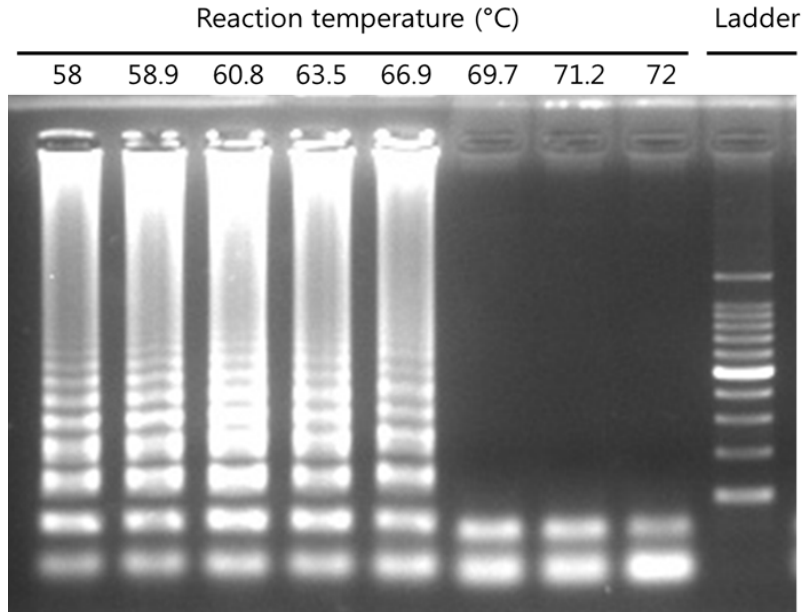


Figure 6-17. *S. Typhimurium* DNA의 온도에 따른 LAMP 증폭과 결과산물의 전기영동

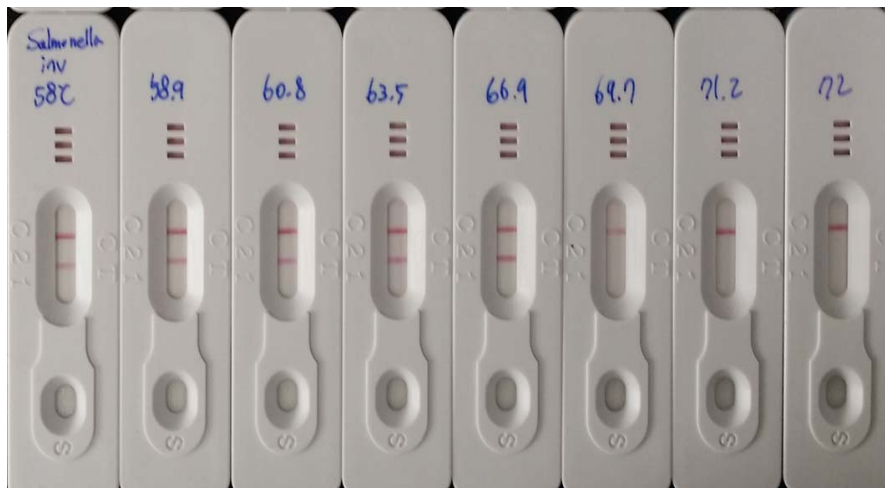


Figure 6-18. *S. Typhimurium* DNA의 온도에 따른 LAMP 증폭물의 LFA에 의한 양성 판정 결과

- *B. cereus*의 경우 Figure 6-19와 같이 69.7°C에서 가장 증폭률이 높은 것을 확인하였으나 69.7°C에서 위양성을 보여 두 번째로 증폭이 잘 되고, 위양성이 나타나지 않은 63.5°C에서 LAMP-LFA 증폭함.
- 이후 LFA를 이용해 최종 검출 가능 여부를 확인한 결과 63.5°C에서 LFA도 양성성을 보여 적합한 것으로 판단함 (Figure 생략).

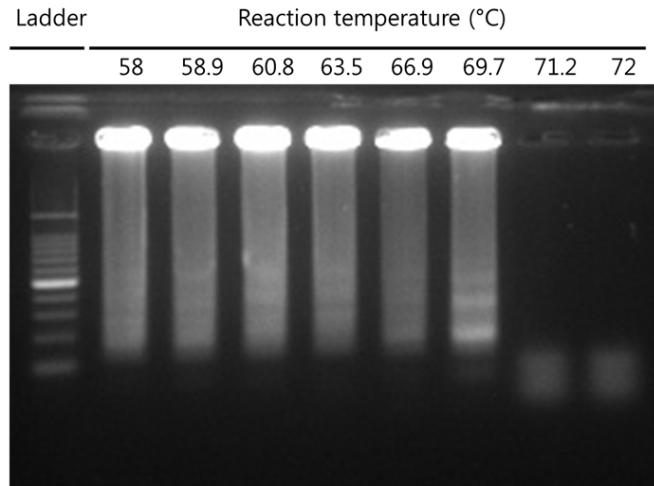


Figure 6-19. *B. cereus* DNA의 온도에 따른 LAMP 증폭과 결과산물의 전기영동

- *S. aureus*의 경우 Figure 6-20과 같이 전기영동 상에 dimer가 없는 60.8, 63.5°C 중에서 loading 선 부분이 가장 짙고 밝은 63.5°C를 반응 온도로 결정함.
- 이후 LFA를 이용해 최종 검출 가능 여부를 확인한 결과 63.5°C에서 LFA도 양성 반응을 보여 적합한 것으로 판단함 (Figure 생략).

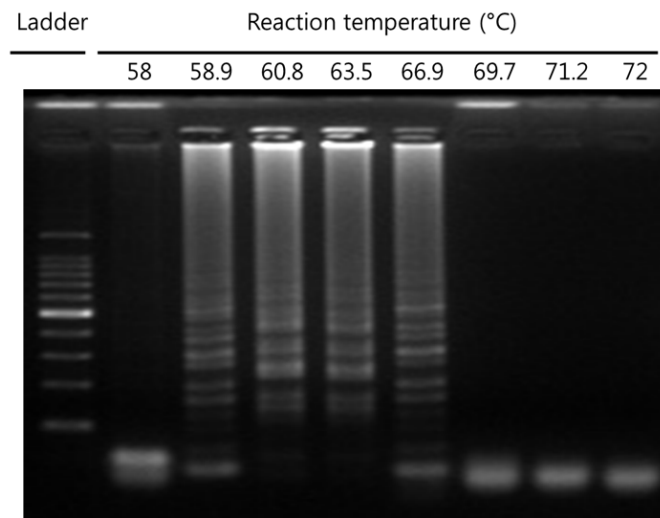


Figure 6-21. *S. aureus*의 DNA의 온도에 따른 LAMP 증폭과 결과산물의 전기영동

- *E. coli* O157:H7의 경우 Figure 6-22와 같이 전기영동상 loading 선이 가장 굵고 dimer가 가장 적은 63.5°C을 증폭률이 가장 높은 것으로 판단함.
- 이후 LFA를 이용해 최종 검출 가능 여부를 확인한 결과 63.5°C에서 LFA도 양성 반응을 보여 적합한 것으로 판단함 (Figure 생략).

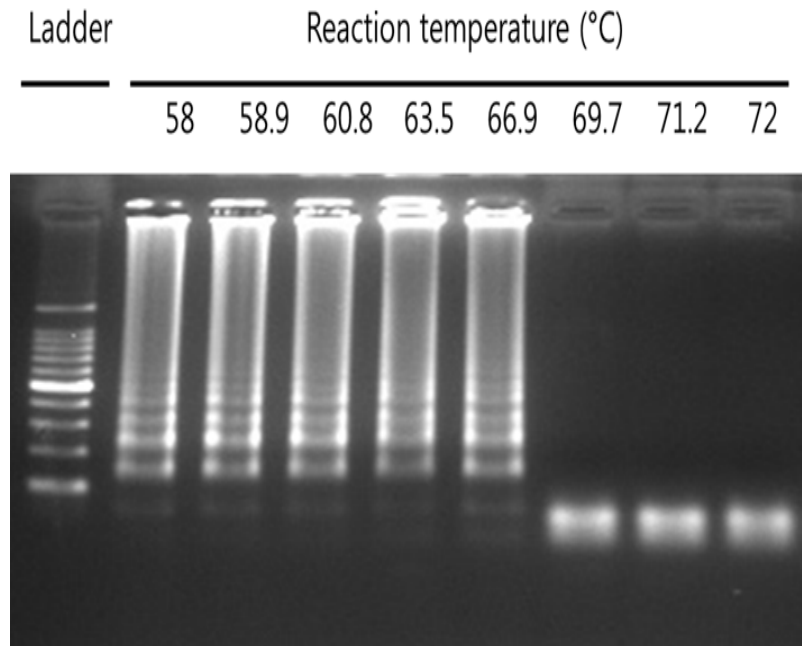


Figure 6-22. *E. coli* O157:H7의 DNA의 온도에 따른 LAMP 증폭과 결과산물의 전기영동

### 3) LAMP-LFA를 이용한 미생물 검출방법 확립

#### 가) LAMP & LFA

- 본 연구팀은 LAMP kit를 개발하여 식중독 세균의 DNA를 증폭하고 LFA로 검출하려 하였음.
- 양상추에 접종된 *S. Typhimurium*, *B. cereus*의 detection limit은 LFA로 확인한 결과 100 CFU/g 으로 확인되었음 (Figure 6-23).
- 회에 접종된 *S. aureus*의 detection limit은 LFA로 확인한 결과 104 CFU/g 으로 확인되었음 (Figure 6-23).
- 소고기에 접종된 *E. coli* O157:H7의 detection limit은 LFA로 확인한 결과 101 CFU/g 으로 확인되었음 (Figure 6-23).
- *S. aureus*를 제외한 균주는 모두 real-time PCR보다 detection limit이 낮음.
- real-time PCR과 비교했을 때 10-100배 detection limit이 낮아지는 것을 확인함.

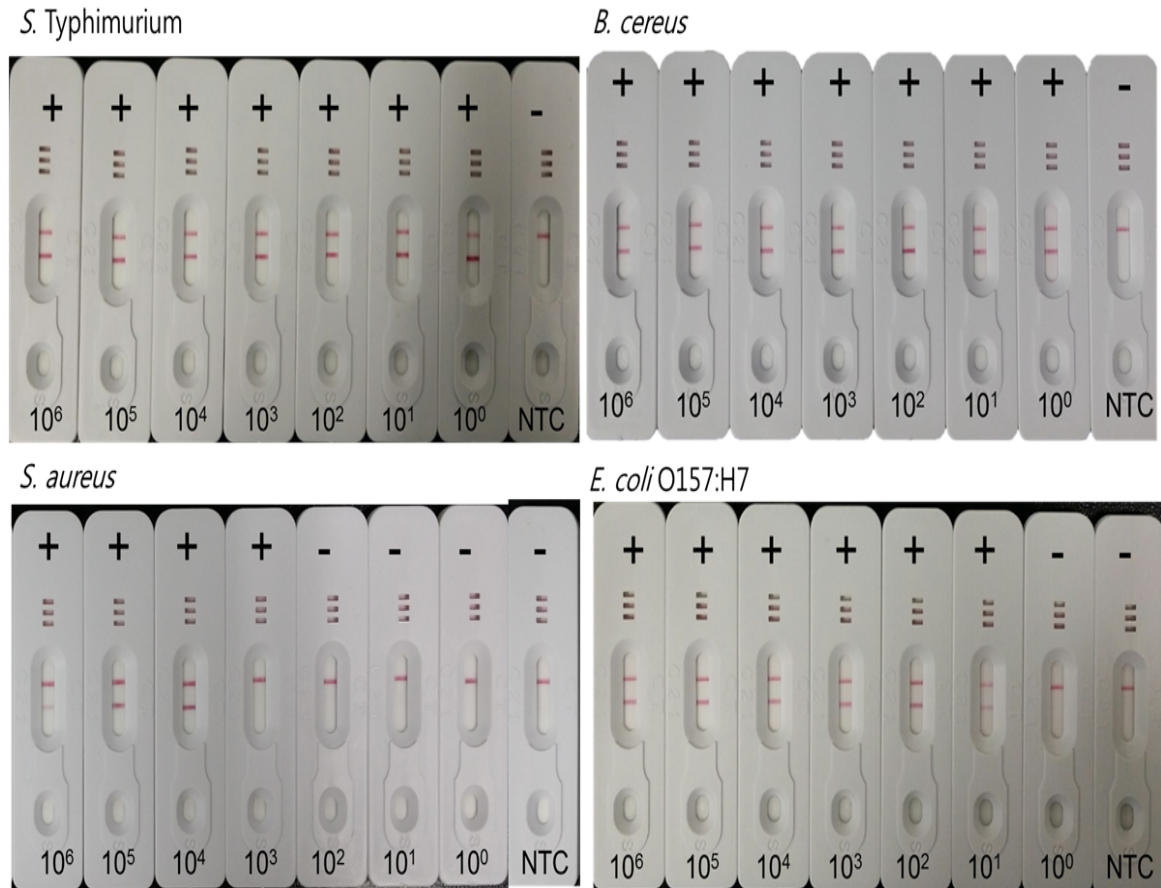


Figure 6-23. 식중독균 DNA의 온도에 따른 LAMP 증폭과 결과산물의 LFA 결과

## 5. 5장. 주관연구기관에 정보 전달 및 feedback

### 가. 최종적으로 가장 적합한 기술 선발

#### 1) Filtration 후 WGA

##### 가) Filtration & WGA & real-time PCR

- 본 연구팀은 filtration에 의한 분자농축 효과를 증명하였음. 이에 filtration과 WGA를 함께 사용하여 식품에 미량 존재하는 식중독균을 검출하고자 하였음
- Filtration 후 얻은 DNA를 WGA로 증폭시킨 뒤 real-time PCR로 검출하였음. 본 연구팀은 식중독 세균을 filtration을 이용하여 농축시킨 뒤, WGA를 이용하여 DNA를 증폭시켰음. 그 후, real-time PCR로 target sequence를 증폭시켜 검출하였음
- Filtration 후 real-time PCR만으로 검출이 되지 않은 DNA 농도를 대상으로 실험하였음
- Real-time PCR의 primer, probe는 Table 5-2와 같음
- Real-time PCR 결과는 Table 7-1에 나타냈음

Table 7-1. Filtration, WGA 후 realtime PCR 결과

Ct value	<i>S.</i> Typhimurium	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
10 <sup>4</sup>	<del>22.40±0.24</del>	<del>23.51±0.16</del>	<del>31.46±0.30</del>	22.40±0.24
10 <sup>3</sup>	<del>28.75±0.25</del>	<del>27.07±0.06</del>	<del>28.95±0.16</del>	23.51±0.16
10 <sup>2</sup>	<del>30.97±0.25</del>	22.19±0.06	—	31.46±0.30
10 <sup>1</sup>	28.75±0.25	27.07±0.06	—	28.95±0.16
10 <sup>0</sup>	30.97±0.25	—	—	33.64±0.44

- 실험 결과, *S. Typhimurium*과 *E. coli* O157:H7에서는 100/g까지 검출이 가능하였음
- *B. cereus*는 101/g까지 검출 가능하였던 반면 *S. aureus*는 모든 농도에서 검출이 불가능하였음
- *E. coli* O157:H7는 100000배로 가장 증폭 효과가 크게 나타났으며 *S. Typhimurium*과 *B. cereus*의 경우에는 filtration 후 real-time PCR에 비하여 100배 정도 검출한계를 낮출 수 있었음.
- 이러한 결과는, 식중독 세균과 식품의 차이에 따라 검출 민감도에 차이가 나타나는 것으로 보임.

나) Filtration & WGA & PCR & LFA

- 본 연구팀은 filtration 후 WGA를 이용하여 DNA를 증폭시킨 후 PCR 과 LFA를 이용하여 식중독 세균을 검출하고자 함
- PCR은 WGA로 증폭된 whole genome을 대상으로 target sequence만을 증폭시켜 LFA로 검출시키기 위하여 사용되었음

Table 7-2. Filtration, WGA 후 PCR과 LFA를 사용한 식중독균 검출 방법 결과

<i>S. Typhimurium</i>	<i>B. cereus</i>
<p><i>S. Typhimurium</i> - lettuce</p>  <p>10<sup>1</sup>/g 10<sup>0</sup>/g NTC</p>	<p><i>B. cereus</i> - lettuce</p>  <p>10<sup>2</sup>/g 10<sup>1</sup>/g 10<sup>0</sup>/g NTC</p>
<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O157:H7
<p><i>S. aureus</i> - raw fish</p>  <p>10<sup>3</sup>/g 10<sup>2</sup>/g 10<sup>1</sup>/g 10<sup>0</sup>/g NTC</p>	<p><i>E. coli</i> O157:H7 - beef</p>  <p>10<sup>4</sup>/g 10<sup>3</sup>/g 10<sup>2</sup>/g 10<sup>1</sup>/g 10<sup>0</sup>/g NTC</p>

- 실험결과, *S. aureus*를 제외한 모든 식중독 균에서 100/g까지 검출이 가능하였음 (Table 7-2).
- *S. Typhimurium*의 경우, 밴드의 양상을 보았을 때 100/g까지 WGA에 의한 DNA 증폭이 많이 이루어진 것으로 판단됨
- *B. cereus*와 *E. coli* O157:H7의 경우, DNA 농도가 낮아질수록 밴드의 진하기가 연해지는 양상을 보이는 것으로 나타남
- DNA template를 넣지 않은 처리구(NTC)에서는 band가 나타나지 않은 것을 확인하였음

## 2) Filtration 후 LAMP; Filtration & LAMP & LFA

- 본 연구팀은 식품에 낮은 농도로 존재하는 식중독균을 검출하는 방법 중 하나로 Filtration & LFA를 사용하였음
- 위의 Filtration방법으로 식중독균을 각각 1배, 10배, 100배의 volume으로 농축시킨 후, LAMP를 이용하여 증폭시킨 후, LFA로 target sequence를 검출하였음
- 1배의 처리구는 DNA 증폭과정에서의 inhibitor 제거를 위해 수행되었음.

- 양상추에 접종한 *S. Typhimurium*의 경우  $10^1 \sim 10^0$  CFU/g의 1배, 10배, 100배 농축한 처리구에서  $10^0$  CFU/g 으로 접종된 처리구의 1배, 10배 농축 샘플을 제외한 모든 처리구의 LFA결과 양성으로 확인됨 (Figure 7-1).
- $10^0$  CFU/g에서  $10^0$  CFU/g으로 *E. coli* O157:H7의 detection limit이 동일하였음.

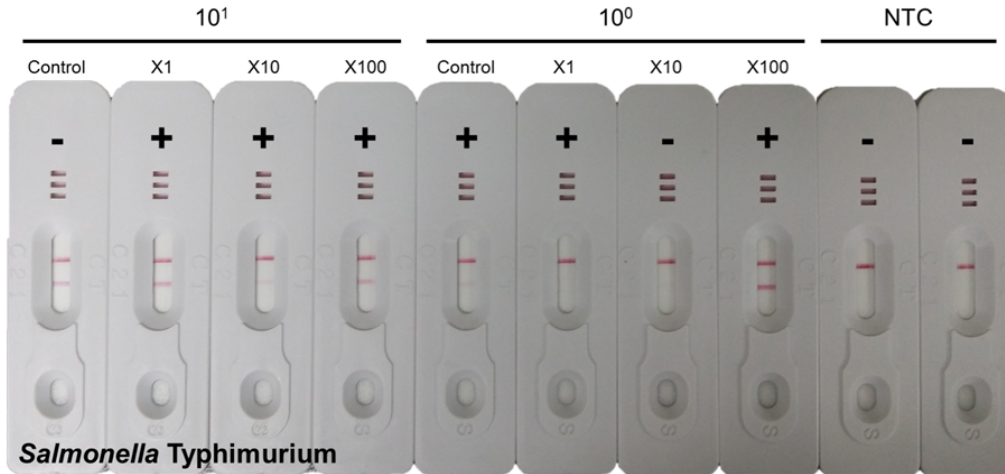


Figure 7-1. *S. Typhimurium*의 Filtration 후의 증폭 효율 비교

- 양상추에 접종한 *B. cereus*의 경우도  $10^2 \sim 10^0$  CFU/g의 1배, 10배, 100배 농축한 모든 처리구의 LFA결과 양성으로 확인됨 (Figure 7-2).
- $10^0$  CFU/g에서  $10^0$  CFU/g으로 *B. cereus*의 detection limit이 동일하였음.

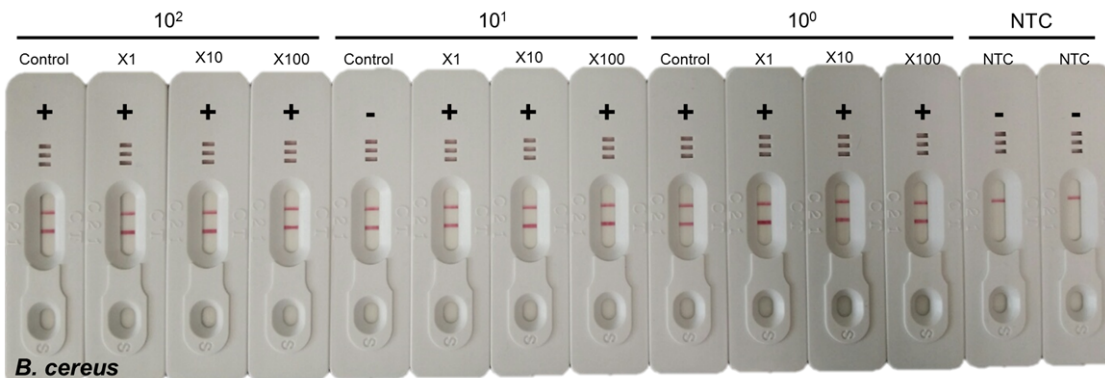


Figure 7-2. *B. cereus*의 Filtration 후의 증폭 효율 비교

- 
- 소고기에 접종한 *E. coli* O157:H7의 경우  $10^2 \sim 10^0$  CFU/g의 1배, 10배, 100배 농축한 처리구에서  $10^0$  CFU/g 으로 접종된 처리구의 1배, 10배 농축 샘플을 제외한 모든 처리구의 LFA 결과 양성으로 확인됨 (Figure 7-3).
- $10^1$  CFU/g에서  $10^0$  CFU/g으로 *E. coli* O157:H7의 detection limit이 감소하였음.
- 모든 실험 처리구에서 DNA template를 넣지 않은 No template control(NTC)에서는 band가 나타나지 않는 것을 확인하였음.
- *E. coli* O157:H7의 경우 LAMP-LFA로 검출하는 것보다 filtration 후 LAMP-LFA로

검출하는 것 보다 10배 더 민감하게 검출되는 것으로 나타남.

- 본 결과는 일반적인 real-time PCR의 detection limit보다 10~1000배 낮은 detection limit을 갖는 것을 확인할 수 있었음

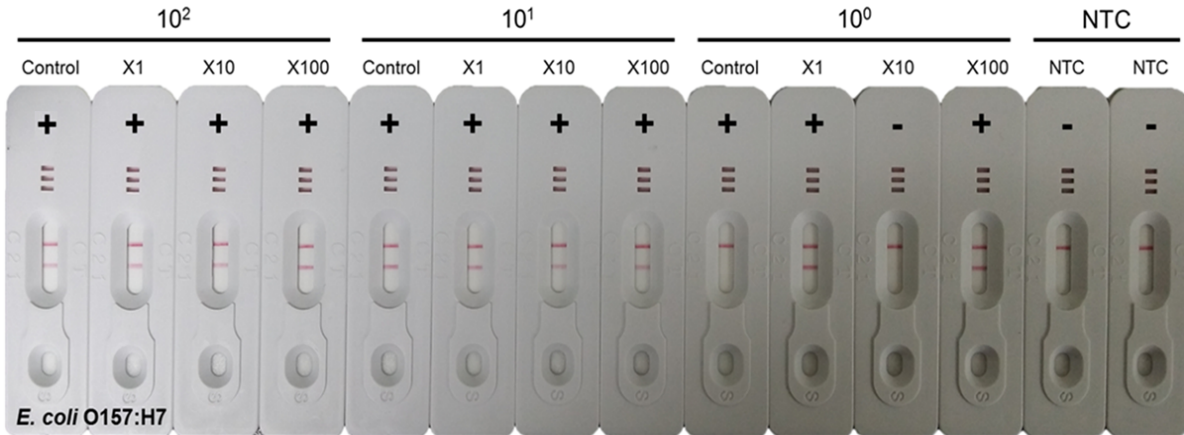


Figure 7-3. *E. coli* O157:H7의 Filtration 후의 증폭 효율 비교

#### 나. 소형기구나 키트 형태의 제품 개발 - LFA

##### 1) 실험배경

- 식품공장 및 급식현장에서 사용되는 미생물 안전성 검증방법으로 일반적으로 배지배양법이 사용되고 있으나 2일 이상의 검출시간을 요구하기 때문에 현장에서의 적용이 어려움
- 비록 PCR 및 real-time PCR과 같은 DNA를 이용한 분자생물학적 방법으로 수 시간 내에 오염된 식중독균을 검출할 수 있는 기술이 개발되었으나, thermal cycler 등의 고가의 장비가 필요함에 따라 소규모 식품공장 및 급식현장에서는 적용될 수 없음
- 따라서 특정 장비 없이 대상 식중독균의 DNA를 증폭하고 진단할 수 있는 기법이 요구되었으며, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음
- 최근 thermal cycler 없이 water bath를 이용해 등온에서 DNA를 증폭할 수 있는 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 방법이 사용되고 있음
- LAMP 증폭의 확인은 기존의 전기영동방법 뿐만 아니라 DNA가 증폭됨에 따라 magnesium pyrophosphate가 증가함에 따라 탁도가 육안으로 확인 될 만큼 증가되는 특성을 나타내고, 형광물질을 사용할 경우 DNA 증폭유무를 눈으로 확인할 수 있지만 육안으로 낮은 농도의 DNA의 증폭 여부를 확인하기 어렵고, 형광물질의 사용 시 교차오염의 확률이 증가하여 현장에서의 적용이 어려움
- 따라서 LAMP 증폭물을 현장에서 간편하게 확인할 수 있는 검출 키트 개발을 목적으로 연구를 진행함

##### 2) LAMP-LFA

- Digoxigenin과 anti-digoxigenin, streptavidin과 biotin의 antigen-antibody의 특성



을 이용해 DNA를 검출함

- Streptavidin에는 goldparticle을 부착해 육안으로 확인할 수 있게 제작함
- LAMP의 FIP primer의 5'에 digoxigenin을 붙여 제작하고 표적균주의 target sequence 부분에 맞게 Biotin probe를 제작하였음
- LAMP 증폭 과정 DNA에는 digoxigenin이 부착되어 신장됨
- 증폭이 완료된 DNA에 target sequence 부분과 상보적인 biotin probe를 63°C 5min간 hybridization 시켜 DNA 증폭물에 biotin을 부착시킴
- 최종 LAMP 증폭물에는 digoxigenin과 Biotin이 모두 부착되어 있게 됨
- 최종 증폭물의 biotin 부분은 gold particle이 부착된 streptavidin과 붙게 되고 digoxigenin 부분은 lateral flow 상의 test line에 뿌려진 anti-digoxigenin과 antigen antibody interaction을 통해 서로 붙게 됨. 이후, gold particle에 의해 육안으로 확인할 수 있음 (Figure 7-4)

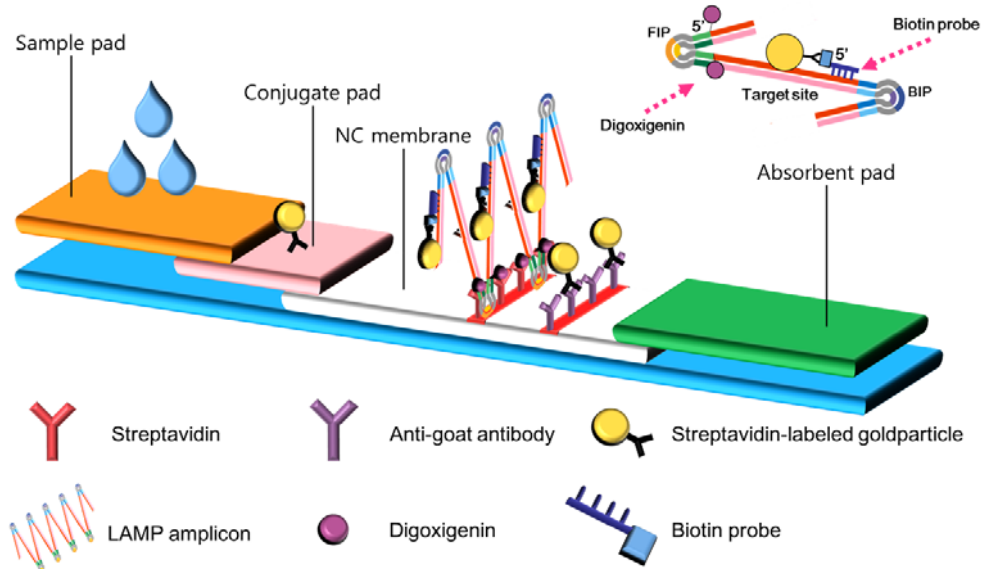


Figure 7-4. LAMP-LFA 흐름도

- 따라서 LAMP-LFA는 식품공장 및 급식현장에서 검출하고자 하는 식중독 균의 종류에 따라 제작된 LAMP Mix를 이용해 현장에서 water bath로 손쉽게 DNA를 증폭하고 최종적으로 LFA에 증폭물을 흘려보냄으로써 표적균주의 오염 여부를 판별할 수 있어 소형 키트로써 적용 가능함

#### 다. 검출 방법 매뉴얼 (Filtration, WGA, LAMP 매뉴얼)

##### 1) Filtration 매뉴얼

- Filtration을 수행하기 위한 매뉴얼을 제시하였음(Figure 7-5).
- 식중독균을 검출하고자 하는 25 g의 식품을 멸균백에 무균적으로 소분한 뒤, 식품 질량의 9배에 달하는 225 mL의 0.85% saline을 첨가하여 stomacher를 이용하여 약 15초간 pulsifier를 이용하여 균질화 함.

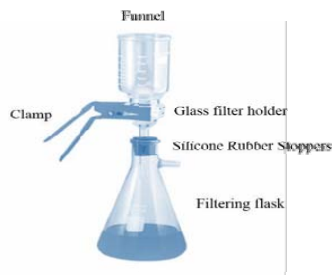
- Filtering flask에 silicone rubber stopper가 끼워진 glass filter holder를 끼운 후, filter holder에 0.45  $\mu\text{m}$ , 47 mm의 filter를 얹은 뒤 funnel을 올리고 clamp로 고정함.
- 진공펌프에 연결하고 위의 균질액을 funnel에 넣고 filtration을 수행함.
- Filter를 7.5 X 12.5 cm의 Whirl-Pak®에 넣은 뒤 2.5 mL의 0.85% saline을 첨가하고 200회 stomaching을 통해 filter로부터 균을 떼어냄.
- 균을 떼어낸 뒤, 1 mL을 취하여 spin column kit나 boiling 등의 방법을 이용하여 DNA를 분리함.
- 추출한 DNA를 이용하여 real-time PCR을 수행하여 Ct값을 확인함.

1. 멸균백에 25g의 식품을 무균적으로 소분한다.

2. 식품 질량의 9배에 해당하는 buffer (0.85% saline)를 넣고 15 s 간 균질화한다.



3. 필터장치를 아래와 같이 조립하고 진공펌프에 연결한다.



4. cellulose nitrate (Whatman™), 0.45 $\mu\text{m}$ , 47mm의 filter를 얹은 후 균질화한 sample을 filtration하여 균을 농축한다.

5. 필터를 멸균백에 담은 뒤, 2.5ml의 buffer (0.85% saline)를 넣고 필터로부터 균을 분리한다 (stomaching 200회).

6. 균을 분리한 뒤, 1ml을 취하여 DNA를 추출(column kit법, boiling법 등)한다.



7. 추출한 DNA로 real-time PCR로 detection한다.

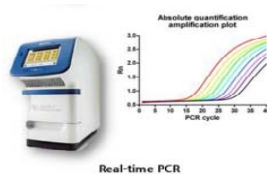


Figure 7-5. Filtration manual

## 2) WGA 매뉴얼

- WGA를 수행하기 위한 매뉴얼을 제시하였음(Figure 7-6)
- 식중독균을 검출하고자 하는 식품의 DNA를 prep하여 DNA template를 준비함
- 아래 매뉴얼의 master mix.의 구성에 따라 reaction mix를 제조함
- reaction mix를 tube에 45  $\mu$ L 씩 분주함
- 5  $\mu$ L의 DNA template와 negative control로 distilled water를 넣고 혼합함
- 30 $^{\circ}$ C, 8시간 동안 amplification함
- 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하여 증폭을 종결시킴

### **Contents**

#### **Kit Contents**

#### **Shipping and Storage**

#### **Additional Required Materials**

#### **Protocol**

##### *Amplification of purified genomic DNA*

- Things to do before starting

- Procedure

## Kit Contents

Number of 50 µl reactions	10
1000mM Tris-HCl (pH 7.5)	20 µl
1000mM KCl	30 µl
1000mM MgCl <sub>2</sub>	7 µl
1000mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4 µl
10mM dNTP	55 µl
1000µM Primer (5'-NNNN*N*3')	30 µl
Phi 29 polymerase (10 unit/1 µl)	45 µl
Nuclease-Free water	300 µl
User Manual	

## Shipping and Storage

The WGA kit should be shipped on dry ice and stored at -20°C in a constant temperature freezer.

## Additional Required Materials

- Thermal cycler
- PCR tubes
- Low-binding barrier tips
- Micro pipette

## Protocol

### Amplification of purified genomic DNA

- Things to do before starting

1. The template DNA should be suspended in TE.
2. All buffers and reagents should be vortexed before use
3. Phi 29 polymerase should be thawed on ice

- Procedure

For each reaction:

Volume, µl	Component
Tris-HCl	1.85
KCl	2.5
MgCl <sub>2</sub>	0.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25
Primer	2.5
Nuclease-Free water	24.4
Phi 29 polymerase	8

1. Add all of the above reagents to PCR tubes.
2. Incubate at 30°C for 30 minutes in a thermal cycle.
3. Store on ice.
4. Add 5 µl of dNTP to all tubes and mix carefully by flicking the tube and centrifuge briefly.
5. Add 5 µl of DNA (For negative control, replace target DNA with H<sub>2</sub>O).
6. Mix reactions by pipetting.
7. Incubate at 30°C for 8 hours in a thermal cycle.
8. Inactivate phi 29 polymerase at 65°C for 5 minutes in a thermal cycle.
9. Store DNA at -20°C for storage.

Figure 7-6. WGA manual

### 3) LAMP 매뉴얼

- LAMP-LFA를 수행하기 위한 매뉴얼을 제시하였음(Figure 7-7).
- 식중독균을 검출하고자 하는 식품의 DNA를 추출하여 DNA template를 준비함.
- 아래 매뉴얼의 master mix.의 구성에 따라 reaction mix를 제조함.
- Reaction mix를 tube에 23  $\mu$ L 씩 분주함.
- 2  $\mu$ L의 DNA template와 negative control로 distilled water를 넣고 혼합함.
- 각 표적 균주의 reaction 온도에 따라 1시간 동안 amplification함.
- Amplification이 끝난 후 증폭물과 probe(20  $\mu$ M) 5  $\mu$ L를 혼합함.
- 63°C에서 5분간 hybridization 시킴.
- Hybridization된 DNA 8  $\mu$ L와 LFA buffer 120  $\mu$ L를 혼합함.
- 혼합 용액을 LFA의 sample pad에 넣어 DNA의 증폭 여부를 확인함 (2줄일 경우 양성, 1줄일 경우 음성).

#### Contents

		250 tests
1. 10X DNA Polymerase Buffer B (PB)	1.2 mL	
2. <i>Bsf</i> DNA Polymerase 2,000 Units	250 $\mu$ L	X1
3. Distilled Water (DW)	2 mL	X1
4. 5M Betaine	1 mL	X1
5. 10mM dNTP	0.9 mL	X1
6. 100mM MgSO <sub>4</sub>	0.4 mL	X1

Store: Betaine, MgSO<sub>4</sub>를 제외한 모든 reagent는 -20°C에 보관

## Protocol

### 1. 필요한 재료

- 1) 1.5 mL 멸균 tubes
- 2) Micropipettes
- 3) Pipette tips with filter (DNase, RNase free)
- 4) 200  $\mu$ L 8-strip tubes
- 5) Vortex mixer
- 6) Ice & ice box

### 2. Primer 제작 유의사항

LAMP로 증폭 후 LFA로 detection 하기 위해서는 FIP primer의 5'에 Digoxigenin, Probe의 5'에 Biotin을 붙여 제작하여 사용하여 주십시오.

### 3. Reagent preparation

- 1) Betaine과  $MgSO_4$ 를 제외한 모든 reagent는  $-20^{\circ}C$ 에 보관하여 주시고, 실험시 ice위에서 진행하여 주십시오.
- 2) master mix. 의 준비  
이 표에 제시된 구성은 1 reaction 입니다.

Reagents	Amount
Distilled Water (DW)	X $\mu$ L (ad q.s.)
10X DNA Polymerase Buffer B (PB)	2.5 $\mu$ L
Primer :	
FIP	1.6 $\mu$ M
BIP	1.6 $\mu$ M
LF'	0.2 $\mu$ M
LB'	0.2 $\mu$ M
F3	0.8 $\mu$ M
B3	0.8 $\mu$ M
Betaine	0.8 M
dNTP	1.4 mM
$MgSO_4$	6 mM
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1 $\mu$ L /test
Total	23 $\mu$ L /test

\*LF, LB primer는 선택사항입니다.

- 3) vortex mixer을 사용하거나 pipetting하여 잘 섞어줍니다.

## Operation procedure (Operate on ice)

### < Mixing of Reagent and Samples >

- 1) master mix.를 reaction tube에 23.0  $\mu$ L씩 분주한다.
- 2) 2.0  $\mu$ L의 sample solution을 넣는다.  
Negative control: Distilled Water (DW)을 넣는다.
- 3) pipetting하여 잘 섞어준다.

### < Amplification >

- 1) PCR reaction block에 reaction tube를 넣어 준비합니다.
- 2) 각 균주의 반응온도에 따라 60분간 반응시킵니다.  
*Eecherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* at 63.5°C  
*Salmonella* Typhimurium at 60.8°C

### < Hybridization >

- 1) 증폭물과 Biotine이 붙여진 20  $\mu$ M 농도의 probe 5.0  $\mu$ L를 섞어줍니다.
- 2) 63°C에서 5분간 반응시킵니다.

### < Detection >

- 1) Hybridization된 DNA 8  $\mu$ L와 LFA buffer 120  $\mu$ L을 섞어줍니다.
- 2) Solution을 LFA의 sample pad에 넣어 DNA의 증폭 여부를 확인합니다.  
(2줄: 양성, 1줄: 음성) 예)



Figure 7-7. LAMP-LFA manual

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

##### 4-1. 목표달성도

○ 식품에 낮은 농도로 존재하는 식중독균을 정확하고 신속하게 검출하기 위하여 rate-limiting 과정인 microbial enrichment를 분자농축(molecular enrichment) 기술 개발로 대체하여, 검출기간을 획기적으로 단축하여 식품산업 현장형 고효율 검출 기술을 개발하는 것이 연구의 목표로서 molecular enrichment 기술개발로 먼저 filtration 농축, 등온증폭에 의한 DNA 증폭, Whole genome amplification에 의한 DNA 증폭과 real-time PCR을 기반으로 한 검출기술을 개발하였으며 또한 현장형 고효율 검출기술 개발로서 isothermal amplification후에 amplicon을 dig-antidig, avidin-streptoavidin을 이용한 lateral flow assay를 개발 하였으며, 또한 일반 PCR보다 민감도가 높은 Digital PCR 방법을 이용하여 1회의 디지털 PCR 수행으로 4종의 식중독균을 동시에 신속, 정확하게 검출하고 식중독균의 정량 분석을 할 수 있음을 확인 하였으며, 이에 따라 과제 목표가 달성되었다고 평가함

구분	연구개발의 목표		연구개발의 내용	달성도(%)
1차년도	분자농축을 위한 전처리 기술 개발	주관기관	- 식중독균 검출 키트 개발 구현을 위한 정보수집, 협동기관 개발기술에 대한 validation을 수행하였음	100
		협동기관	- filtration에 의한 균 농축을 실시하였으며 분자증폭을 위한 DNA 분리기술 등을 확립하였음	100
2차년도	분자농축에 의한 검출시간 단축 기술 개발	주관기관	- 식중독균 검출 키트 개발 가능성을 검토하였음 - 민감도가 매우 높은 Digital PCR 방법 중 하나인 QX200을 이용하여 식중독균 검출 키트 개발 가능성을 확인 하였으며, 개발 가능성에 대한 결과를 이용하여 특허를 출원하였음.	100
		협동기관	- 미생물배양에 의한 enrichment, WGA에 의한 증폭, LAMP 증폭 및 검출, Real-time PCR에 의한 검출 기술을 확립하였음	100
3차년도	현장용 검출시스템 구축 및 산업화 기반 기술 개발	주관기관	- 최종시스템을 확정하였으며 협동기관에서 개발된 kit에 대한 validation을 실시하였음 - 2차년도에 식중독균 검출 키트 개발 가능성을 확인한 QX200을 이용하여 4가지 식중독균을 한 번에 확인할 수 있는 Multiplex 방법을 개발하여, 협동기관에서 개발한 방법으로 진단이 불가능한 샘플의 경우 진단 가능성을 향상시킴.	100
		협동기관	- 분자농축기술인 WGA kit 개발하였으며, LAMP amplicon을 검출할 수 있는 lateral flow assay를 개발하였음	100



#### 4-2. 관련분야 기여도

- 식품에 낮은 농도로 존재하는 식중독균 검출을 위해 개발된 다양한 증폭기술은 관련분야 발전에 일조할 것을 생각됨
- Filtration을 이용한 농축기술은 식중독균을 단 시간 내에 100배 이상 농축할 수 있는 기술로서 향후 식중독균의 신속검출에 널리 사용될 수 있을 것으로 생각함
- Isothermal amplification, whole genome amplification은 microbial enrichment 과정 없이 DNA 분자에 대한 enrichment/amplification이 가능하므로 detection limit에 도달하는 시간을 대폭적으로 단축하여 신속검출기술로서 활용도가 높을 것으로 판단됨
- PCR primer나 LAMP primer에 dig, avidin을 첨가하여 증폭산물을 lateral flow assay로 검출하는 기술은 식중독균 검출을 위한 현장용기기로서 다양한 균에 대해 적용이 가능한 플랫폼기술로 관련분야에 기여도가 높을 것으로 판단함
- 식품에 존재하는 소량의 식중독균을 검출하기 위하여 사용되는 Digital PCR 방법(QX200) 으로 식품에 존재하는 4종의 식중독균 즉, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*의 양을 판단할 수 있으며, 기존에 개발된 모든 PCR 방법 중 가장 높은 감수성을 나타내며, 표준물질 없이 양적인 값을 알려주는 방법으로 정량분석에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 판단 됨.

### 5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 본 연구결과는 식품에 낮은 농도로 존재하는 식중독균을 검출 할 수 있는 기반기술로 활용이 가능할 것으로 생각됨</li> <li>○ 본 연구를 통해 확립된 분자농축 기술 (Filtration + Whole genome amplification)은 환경에 존재하는 기타 병원 미생물의 존재 확인 분야에 충분히 응용 될 수 있을 것으로 생각 됨</li> <li>○ Digital PCR, filtration, molecular enrichment를 이용해 식중독균의 detection limit를 대폭적으로 낮추어 식중독균 신속검출이 가능하므로 향후 단일기술이나 융합기술로 상업화될 수 있을 것으로 판단 됨</li> <li>○ 또한 등온조건에서의 LAMP에 의한 식중독균의 검출 및 증폭산물의 lateral flow assay 기술은 식중독세균 및 기타 세균 검출의 플랫폼기술로서 활용이 가능할 것으로 사료됨</li> </ul>		

### 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○ 해당사항 없음		

## 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당사항 없음		

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>○ 주관연구기관인 BMS와 협동연구기관인 국민대학교에서는 사고와 재해방지 및 사후처리에 관한 사항을 정함으로써 교직원의 생명과 건강을 보호하고 연구원의 재산을 보존하고자 안전관리지침을 작성하여 관리하고 있음</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 연구실 안전점검</li> <li>2. 연구실 정밀안전진단 실시</li> <li>3. 참여연구원에 대한 교육</li> <li>4. 연구활동종사자에 대한 건강진단</li> <li>5. 폐기물 안전관리</li> </ol>		

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	디지털PCR을 이용한 식중독균의 검출 방법	(주)비엠티 에스		대한민국		2015.06.30		특허출원
2	특허	필터를 이용한 미생물 신속 검출 방법	국민대 산학협력 단		대한민국		2015.12.29		특허출원
3	특허	중합효소연쇄반응 증폭 산물을 이용한 미생물 검출 방법, 및 미생물 검출 키트	국민대 산학협력 단		대한민국		2015.12.29		특허출원
4	논문	식품으로부터 식중독 세균 검출을 위한 Real-time PCR에 적합한 DNA 추출방법 비교	국민대		한국식품과 학회지		2016.08.31	단독사사	비SCI
5	논문	Droplet Digital PCR을 이용한 <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium과 <i>Escherichia coli</i> O157:H7의 검출 및 정량	국민대		한국식품과 학회지		2016.09.30	단독사사	비SCI

## 11. 기타사항

코드번호		D-13
○		

## 12. 참고문헌

	코드번호	D-14
1. LAW, Jodi Woan-Fei, et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. <i>Frontiers in microbiology</i> , 2015, 5: 770.		
2. HARA-KUDO, Yukiko, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of Salmonella. <i>FEMS Microbiology Letters</i> , 2005, 253.1: 155-161.		
3. PLAON, Saranya, et al. Rapid and sensitive detection of <i>Vibrio alginolyticus</i> by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick targeted to the <i>rpoX</i> gene. <i>Journal of aquatic animal health</i> , 2015, 27.3: 156-163.		
4. SONG, Chunmei, et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the simultaneous detection of <i>Shigella boydii</i> and <i>Escherichia coli</i> O157: H7 in bread, milk and jelly samples. <i>Food Control</i> , 2016, 59: 345-351.		
5. PLAON, Saranya, et al. Rapid and sensitive detection of <i>Vibrio alginolyticus</i> by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick targeted to the <i>rpoX</i> gene. <i>Journal of aquatic animal health</i> , 2015, 27.3: 156-163.		
6. MOERS, A. P. H. A., et al. Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms in <i>Plasmodium falciparum</i> by PCR Primer Extension and Lateral Flow Immunoassay. <i>Antimicrobial agents and chemotherapy</i> , 2015, 59.1: 365-371.		
7. PATEL, Jaimin S., et al. Implementation of loop-mediated isothermal amplification methods in lateral flow devices for the detection of <i>Rhizoctonia solani</i> . <i>Canadian Journal of Plant Pathology</i> , 2015, 37.1: 118-129.		
8. YONGKIETTRAKUL, Suganya, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification assay combined with lateral flow dipstick for detection of <i>Plasmodium falciparum</i> and <i>Plasmodium vivax</i> . <i>Parasitology international</i> , 2014, 63.6: 777-784.		
9. BLAŽKOVÁ, Martina, et al. Development of a nucleic acid lateral flow immunoassay for simultaneous detection of <i>Listeria</i> spp. and <i>Listeria monocytogenes</i> in food. <i>European Food Research and Technology</i> , 2009, 229.6: 867-874.		
10. BLAŽKOVÁ, M., et al. Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay for the Detection of Pathogenic Bacteria from Food. <i>Czech J. Food Sci</i> , 2009, 27: S350-S353.		
11. RIGANO, Luciano A., et al. Rapid and sensitive detection of <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> by loop mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. <i>BMC microbiology</i> , 2014, 14.1: 1.		
12. 김현주, et al. 신기술 이용 식중독균 신속검출법 개발 동향 분석. <i>한국식품위생안전성학회지</i> , 2010, 25.4: 376-387.		