

(옆면)

(앞면)

120038-1

보안 과제(), 일반 과제(○) / 공개(○), 비공개(), 발간등록번호(○)
농식품연구성과후속지원사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003611-01

냉동육 및 육가공품에서 *Listeria monocytogenes*
신속 검출 키트 개발

냉동육 및 육가공품에서 *Listeria monocytogenes* 신속 검출 키트 개발

2021. 07. 19

주관연구기관 / (주)보레다바이오텍

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘냉동육 및 육가공품에서 *Listeria monocytogenes* 신속 검출 키트 개발’ (연구개발 기간 : 2020. 04. 20. ~ 2021. 04. 19.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2021. 07. 19

주관연구기관명 : (주)보레다바이오텍 (대표자) 최동욱



주관연구기관책임자 : 최동욱

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		농식품연구성과후속지원사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				
내역사업명 (해당 시 작성)					연구개발과제번호			120038-1	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB1602	60%	LB1708	15%	LB16	15%	LB17	10%
	농림식품 과학기술분류	PA0302	60%	PA0104	15%	PA03	15%	PA01	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)									
연구개발과제명		냉동육 및 육가공품에서 <i>Listeria monocytogenes</i> 신속 검출 키트 개발							
전체 연구개발기간		2020. 04. 20 - 2021. 04. 19 (12 개월)							
총 연구개발비		총 144,000 천원 (정부지원연구개발비: 108,000 천원, 기관부담연구개발비: 36,000 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)							
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)									
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)									
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 냉동·냉장 저장되는 식육 및 식육가공품 중 <i>L. monocytogenes</i>의 신속한 검출을 위한 등온비색 PCR법의 상품화를 위한 키트의 최적화 및 현장 실증 ○ <i>L. monocytogenes</i> 등온비색 PCR 키트에 필요한 주원료인 DNA Polymerase 개발 ○ 기존의 영업망을 이용하여 개발된 기술의 산업화를 통한 이익창출 및 신규인력 채용 							
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>L. monocytogenes</i> 등온비색 PCR 키트에 필요한 주원료인 DNA Polymerase 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 대장균 발현을 통한 재조합 단백질 개발 - 기존 수입 DNA Polymerase 대비 성능 평가 - 등온비색 PCR 키트에 DNA Polymerase 최적화 ○ 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 검출키트의 상품화를 위한 시료 전처리법 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 냉동육 및 육가공품 시료채취 및 DNA 추출을 위한 전처리 방법 최적화 <ul style="list-style-type: none"> • 시료채취 방법(분쇄법, 직접채취법 등), 시료 전처리(전처리 용액, 균질화 시간, 원심분리법, 여과법, 흡착법 등) 및 <i>L. monocytogenes</i> 증균 방법의 사용 편의성을 위한 최적화 - 기존 진단키트를 이용한 전처리 방법 비교 검증 ○ 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단키트의 상품화를 위한 최적화 							

		<ul style="list-style-type: none"> - 등온비색 PCR의 축산식품에의 적용가능성 평가 <ul style="list-style-type: none"> • 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i>에 대한 등온비색 PCR의 특이성 평가 - 전처리법을 적용한 냉동육 및 육가공품에서의 <i>L. monocytogenes</i> 진단 등온 비색 PCR법 최적화 ○ 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단키트의 상품화를 위한 시료 전처리기술의 현장실증 <ul style="list-style-type: none"> - 개발된 시료 전처리법을 활용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단 현장실증 및 평가 <ul style="list-style-type: none"> • 현장적용에의 문제점 분석 및 현장에 적합한 시료 전처리 방법 보완 ○ 등온비색 PCR을 이용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단기술 현장실증 <ul style="list-style-type: none"> - 최적화된 등온비색 PCR을 활용한 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단 현장 실증 및 평가 - 상품화시 문제점 개선을 통한 등온비색 PCR의 <i>L. monocytogenes</i> 진단키트의 최적화 ○ 냉동육 및 육가공품 내 <i>L. monocytogenes</i> 진단 키트 제품화 				
	1단계 (해당 시 작성)	<table border="1"> <tr> <td>목표</td> <td></td> </tr> <tr> <td>내용</td> <td></td> </tr> </table>	목표		내용	
목표						
내용						
	n단계 (해당 시 작성)	<table border="1"> <tr> <td>목표</td> <td></td> </tr> <tr> <td>내용</td> <td></td> </tr> </table>	목표		내용	
목표						
내용						

연구개발성과	<p>○ 기술적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> - 축산물에 적용할 수 있는 전처리(희석액의 종류, 농도, 시간, 시료와 희석액의 비율 등) 기술을 확립할 수 있음 - 평균 검출한계인 10² CFU/g 이하 농도의 <i>L. monocytogenes</i>를 검출 할 수 있는 정밀 진단 기술 개발을 통하여, 축산물 외의 타 식품 유형에도 적용하는 관련 후속 연구에 활용될 수 있음 - 등온비색 PCR은 특정 기기의 사용 없이 현장에서 빠르게 적용 가능한 기술로 비전문가인 현장 작업자도 빠르게 기술을 습득하여 위생검사를 진행할 수 있음 - 기존 분자생물학적 기술의 과정이 간소화됨과 동시에 검출 시간이 빠르고 특이성이 높은 기술이 개발됨으로써 신속 검출 기술의 새로운 방법을 제시할 수 있을 것으로 예상 - 초고감도 현장 진단 기술 개발이 가능하여 축산물 및 도축현장에서 리스테리아 모노사이토제네스에 의해 발생 가능한 식중독 사고를 미연에 방지하는데 크게 기여할 것임 - 농축수산물 및 그 가공품을 포함한 다른 식품의 위해미생물에 대한 현장진단용 등온비색 증폭기술 개발에 기초연구결과로 활용 가능 - 개발하고자 하는 기술의 경우 LAMP 증폭산물을 전기영동과 같은 별도의 장비 없이 육안으로 확인할 수 있고 온도 구배가 없으므로 증폭장비의 소형화가 유리
--------	--

	<p>하여 휴대성이 높은 시스템의 구축이 가능하기 때문에 연구실뿐만 아니라 현장 등의 장소에 구애받지 않고 적용될 수 있는 장점이 있음</p> <p>○ 경제적·산업적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> - 등온비색 PCR의 핵심 주원료의 자체 개발을 통한 원가 절감 및 기업 매출 증대 - 냉동육 및 육가공품에 적용할 수 있는 신속·정밀 <i>L. monocytogenes</i> 진단 키트 시장개발을 통하여 기업 매출 증대 - 최적화된 전처리법과 검출법의 적용으로 검출 시간, 장비 비용, 인력에 대한 원가 절감 효과가 있음 - 관련 산업 분야의 신규 인력 채용 가능 - <u>현재 수입에 의존하고 있는 진단키트 시장을 국내 키트로 대체할 수 있으며, 나아가 진단키트의 해외 수출도 가능할 것으로 예상됨</u> - 축산물의 상품성 저하를 방지하는 기술을 개발하여 판매 및 수출입 과정에서 발생할 수 있는 경제적 손실을 완화 - 전 세계 분자진단 시장은 2018년 73억 5,570만 달러에서 연평균 성장률 8.7%로 증가하여, 2023년에는 111억 6,620만 달러에 이를 것으로 전망되며 체외진단 시장의 기술 가운데 연평균 증가율이 가장 높음 - 손쉬운 작동 및 저가의 장비를 이용한 비숙련자의 현장 분석이 가능해지므로 전문 인력 육성 비용 절감 효과가 예상됨 - 국가축산업기술 첨단화 및 활성화
<p>연구개발성과 활용계획 및 기대 효과</p>	<p>1) <i>Listeria monocytogenes</i> 신속 진단 키트 제품화</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Listeria monocytogenes</i> 진단용 등온 증폭 기술에 대한 검증완료 및 키트제품화 추진계획 - 본 연구를 통해 개발된 등온 증폭 기술의 주원료인 등온 증폭 효소를 자체 생산함으로써 저렴한 비용으로 생산, 판매 가능하여 손쉽게 사용가능할 것으로 기대 - 고가의 다른 장비가 필요하지 않고 다양한 사용자들이 쉽게 활용할 수 있는 이점이 있는 신속진단키트로 판독법으로 현장 적용 가능성이 높음 - 낮은 가격, 편의성, 신속·정확성, 현장적용성의 용이 등을 마케팅 포인트로 하여 식중독 문제에 취약한 급식업체 및 도축 육류 가공업체, 식품회사에 회사 영업망을 통하여 샘플배포 예정 - 박람회 및 전시회 부스 홍보, 홍보 팜플렛 제작 등 적극적인 홍보계획 - 지속적인 키트의 유효성 검증을 통하여 현장적용 최적화를 단기목표로 하며, 공급, 유통채널 확보를 통한 판로 개척 후 고객 세분화 및 맞춤형 판매 진행, 인도의 ADVY chemical社, 중국의 Genrui社, 일본의 TOYOBO社 등 해외영업망을 통한 글로벌 판매 전략이 중·장기 목표임

	<p>2) 다양한 진단제품 개발 활용 가능성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구를 기반으로 개인진단이 요구되는 질병 및 감염병에 대하여 폭넓게 응용하여 다양한 진단제품의 개발이 가능할 것으로 예상 - 식중독 관련 세균 (E.coli, Salmonella, Vibrio 등) 진단, 식중독 이외 진단하고자 하는 목적균 또는 목적 바이러스에 맞게 프라이머를 디자인하여 제품 개발이 가능 - 현재 등은 PCR을 이용한 암의 미세전이 및 조기진단 제품이 나와 있으며 암 진단 분야에도 적용가능할 것으로 기대 												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종		
		1	1		1			생명 정보	생물 자원		정보	실물	
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명		규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가 격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	축산식품			리스테리아 모노사이토제네스		등온증폭 PCR		핵산증폭		신속 검출 키트			
영문핵심어 (5개 이내)	Meat products			<i>Listeria monocytogenes</i>		LAMP PCR		Nucleic acid amplification		Rapid detection kit			

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
 1. 재조합 Bst DNA polymerase 개발
 - 1-1. 유전자 클로닝
 - 1-2. 재조합 단백질의 발현 및 정제
 - 1-3. 정제된 재조합 단백질의 확인
 2. *L. monocytogenes* 검출키트 개발
 - 2-1. 증균 및 시료 전처리를 위한 시약 키트화
 - 2-2. 등온 PCR을 위한 시약과 신속 검출 키트화
 - (1) LAMP 반응을 위한 Primer 및 LAMP 반응
 - (2) 재조합 Bst DNA polymerase 성능검사
 - (3) Lateral Flow Assay 키트 제작
 - (4) Oligo primer set에 따른 반응성 확인
 - (5) 검출한계 테스트
 - (6) 특이도 테스트
 - 2-3. *Listeria monocytogenes* 신속 검출 키트 시제품 제작
 3. 개발된 시약 및 키트의 성능평가 (위탁연구개발기관)
 - 3-1. 재조합 Bst DNA polymerase 성능시험 (경상대학교)
 - 3-2. *L. monocytogenes* 검출 키트 성능평가 및 시료적용 시험 (숙명여자대학교)
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획
7. 참고 문헌

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 필요성

- 냉동육 및 육가공품을 포함한 축산식품에서 치사율 20-30%인 *L. monocytogenes*의 검출빈도가 높아지고 있고 감염 환자도 보고되고 있음. 특히, 저온성 세균으로 cold chain으로 유통되는 식육 및 육가공품을 통해 *L. monocytogenes* 식중독 발생 위험성이 높음
- 또한, 냉동육 및 육가공품을 포함한 국내 축산물 시장의 규모가 계속해서 증가함에 따라 위해 관리를 위하여 *L. monocytogenes* 검출 기술의 개발에 대한 요구가 계속해서 높아지고 있음
- *L. monocytogenes* 검출 기술은 있으나 대부분 검출시간이 오래 소요되고, 고가의 장비가 필요하거나 민감도가 떨어진다는 단점이 있으며, PCR kit들이 판매되고 있으나 기기가 갖춰진 실험실에서 수행이 가능한 제품들로 현장분석에는 적합하지 않음
- 등온비색 PCR은 1-2시간 내로 비색을 통해 신속한 검출이 가능하여 현장에 적용가능한 제품으로 개발이 가능하다고 판단됨. 또한, 분자수준에서의 진단이 이루어지기 위해서는 시료 채취에서부터 방해물질 제거, DNA 농축 등 전처리 기술이 필수적임
- 등온비색 PCR에 사용되는 주원료인 DNA Polymerase의 경우 전량 수입에 의존하여 원가 상승의 원인이 되었음. *L. monocytogenes* 등온비색 PCR의 제품화에 주원료의 안정적 공급과 원가 절감의 필요성으로 인하여 재조합 단백질 제조 기술을 이용하여 등온비색 PCR에 최적화된 DNA Polymerase 개발을 통한 주원료의 자사화가 필수적임.

1-2. 연구개발의 목적 및 주요내용

- 이에 본 연구에서는 냉동·냉장 저장되는 식육 및 육가공품 중 *L. monocytogenes*의 신속한 검출을 위한 등온비색 PCR법 개발과 검출속도, 민감도 개선을 위한 전처리법의 개발 및 기술의 산업화를 통한 이익창출과 신규인력 채용을 하고자 함
- 따라서, 본 연구에서는 냉동·냉장 저장되는 식육 및 육가공품 중 발생 가능한 *L. monocytogenes* 검출을 위하여 ① 주원료 개발, ②시료 전처리법을 최적화, ③ 전처리법을 적용한 등온비색 PCR 검출 성능의 최적화, 그리고 최종적으로 ④ 현장 실증·보완을 통해 제품화 하고자 함
- 이를 통해 식중독 세균 검출진단 분야의 국내 기술력을 확보하고, 진단기술의 제품화 및 산업화를 통해 경제적 이익을 창출하고자 함

1-3. 본 연구의 차별성 및 목표달성 가능성

- 본 과제의 주관기관인 보레다바이오텍은 진단키트, 진단시약 원료 제조업체로서 항원, 항체를 이용한 제품 개발 기술과 다년간 국내외 거래망을 구축하고 있기 때문에, 본 지원사업에서 사업화된 *L. monocytogenes* 등온비색 PCR 키트의 성공적인 사업화가 가능함
- 위탁 연구 기관인 숙명여자대학교는 진단키트 검증과 전처리법 개발 (특허출원:10-2017-0012693)을 통해 농산물에서 식중독 세균의 진단법 확립연구를 진행한 바 있음

며, 농산물에서 RT-PCR을 이용한 *Listeria*의 정밀 진단법 개발을 진행한 바 있어 식중독 세균 진단 및 전처리법 개발 기술을 보유하고 있음(특허 등록 1건, 관련 논문 4건)

- 또한, 위탁 연구 기관인 경상대학교는 진단기술 개발 연구를 다수 진행해왔으며, 특히 농산물 내 *Listeria*에 대한 등온비색 PCR을 위한 프라이머를 개발한 바 있어, 이를 축산물 내 *L. monocytogenes* 진단 기술 개발에 적용이 가능함(기술이전 3건, 특허 등록 3건, 관련 논문 10건)
- 따라서, 본 연구팀을 구성하는 연구기관들의 기술력과 구축된 제품 생산 및 유통체계를 통하여 ‘냉동육 및 육가공품에 *L. monocytogenes* 검출을 위한 시료 전처리법과 등온비색 PCR 검출기술 개발 및 현장 실증’의 목표를 달성할 수 있을 것으로 판단됨

1-4. 연구개발 대상의 국내·외 현황

(1) 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 식품공전에 제시된 미생물학적 기술을 이용하여 리스테리아균을 분리하고 동정
- 식품공전에 제시된 검사법에 따라 리스테리아균을 선택배지를 이용하여 동정하지만 시간과 민감도, 특이도는 아직 미흡한 실정임.
- 국내의 경우 축산물에 대한 전처리법은 주로 식품공전을 따르고 있으며, 채취된 시료의 일정량(10~25 g)을 멸균 생리식염수 등의 희석액을 가해 균질화하여 시험용액으로 조제하여 사용함.
- 냉동 식육의 경우에는 냉동상태의 검사 시료를 포장된 상태 그대로 40°C이하에서 단시간에 빠르게 녹여 용기, 포장의 표면을 무균적으로 제거하고 시험용액을 조제 하여 사용함.
- 국내의 경우 전처리 용액, 균질화시간, 시료와 전처리 용액의 비율에 따른 회수율을 실험을 통하여 확인하며, 적절한 시료의 전처리 방법을 개발하고자 하는 연구가 지속적으로 진행되고 있음
- 또한 본 실험을 바로 실시하지 않고 균을 활성화 시키는데 증균배지가 사용되는데 국내 증균 배지 연구 현황은 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp., *Shigella* spp.에 대해 이루어진 상태임(표 1).
- 최근 수행된 연구에 따르면, BHI 배지를 기반으로 생육인자의 조성을 변화시켜 *B. cereus*와 *S. aureus*를 6시간 증균 시 10¹ CFU/ml에서 약 10⁴~10⁵ CFU/ml까지 증식 속도를 높였고, *L. monocytogenes*의 경우는 10³~10⁴ CFU/ml까지 증식하였음(Oh et al., 2016).
- 그 외에도 *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7의 배양을 위하여 BPW에 성장촉진 및 손상된 균의 회복을 돕는 물질을 첨가하는 방법을 통하여 증균속도를 높이는 연구가 이루어졌음(표 2).

표 1. 국내에서 수행된 증균배지 개발현황

식중독 세균	개발증균배지	결과	참고문헌
<i>Vibrio vulnificus</i>	PNCB: 5% peptone+1% Nacl+1% cellbiose+ 0.04% bromthymol blue + 0.04% thymol blue	(배양 및 동정시간) <i>V. vulnificus</i> - 4h 30min 패혈증 비슷한 혈액 - 7h 50min	Oh et al., 2002
<i>Shigella</i> spp.	GN broth, Shigella broth, SF broth, SC broth (SF와 SC에는 4 g sodium biselenite 첨가)	식품 종류에 따라 증균되는 특성이 상이하므로 식품에서 <i>Shigella</i> spp.를 분리 하고자 할 경우 우선으로 식품 특성을 고려하여야 함.	In et al., 2011
<i>Listeria monocytogenes</i>	LMEB : sucrose 0.25% + beef extract 1.2% + potassium dihydrogen phosphate 0.5% + sodium chloride 3.0% + acriflavine HCl 0.001% + tween40 0.1%	<i>L. monocytogenes</i> 검출률 : 1%이하 → 30%로 증가 혈청형(4b,4d) : 26%→99%로 증가	Lee, 2016
<i>Bacillus cereus</i>	기존 BHI에 0.034% magnesium sulfate, 1.208% sodium pyruvate, 0.182% yeast extract	초기 농도 1.12 log CFU/mL에서 6시간 배양 후 6.23±0.29 log CFU/mL로 증가	Oh et al., 2016
<i>Staphylococcus aureus</i>	기존 BHI에 0.023% magnesium sulfate, 0.762% sodium pyruvate, 1.986% manitol	6시간 동안 배양하였을 때, <i>S. aureus</i> 의 초기 농도가 1.01 log CFU/mL에서 5.43±0.18 log CFU/mL로 증가	Oh et al., 2016
<i>Listeria monocytogenes</i>	기존 BHI에 0.696% magnesium sulfate, 0.25% sodium pyruvate, 0.709% yeast extract	6시간 동안 배양하였을 때, <i>L. monocytogenes</i> 의 초기 농도가 1.52 log CFU/mL에서 4.38±0.18 log CFU/mL로 증가.	Oh et al., 2016

- 현재 국내외 기존 배지 시장에서는 chromagar, petrifilm 등 신속, 정확, 편리한 배지들이 이용되고 있으며 실제 연구에서도 매우 실용적인 것으로 인정받고 있음.
- 그러나 chromagar등 값비싼 가격으로 인하여 대량 구매가 어려워 현재 식품 공전을 따르며 연구를 진행하고 있음.

표 2. 식중독 세균 별 사용 증균배지 (식품공전, 2018)

식중독 세균	증균배지
<i>Salmonella</i> spp.	RV, RVS, TT
<i>S. aureus</i>	TSB + 10%Nacl
<i>V. parahaemolyticus</i>	Alialine 펩톤수
<i>C. perfringens</i>	Cooked Meat
<i>L. monocytogenes</i>	Palcam broth, UVM-modified listeria, Fraser broth, LEB
장출혈성 대장균	mTSB
<i>Y. enterocolitica</i>	PSBB
<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>	HUNT(CEB), Bolton, Preston
<i>C. botulinum</i>	Cooked Meat, TPGY
<i>Cronobacter</i> spp.	EE

- 현행 우리나라 식품공전 상 등재되어 있는 식중독 세균 분리 배지들은 현재 국제적으로 거의 사용하지 않는 재래식 방법이거나, 분리능이 매우 낮아 현실적으로 사용되지 않는 것이 많다는 문제점이 제기되고 있음. 현재 식품공전이 재개정된 지 수십 년이 되었으나, 배지의 개선은 별로 이루어지지 못한 실정임(Seo et al., 2007).

- 현장적용이 어려운 국내 검출법

- 선택배지를 사용한 기존 검출방법이 현재까지 국제적으로 식품의 미생물 기준을 규정하는 공식적인 분석방법으로 채택되고 있음. 식중독 세균의 신속 검출법으로는 직접형광항체법, ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay) 등이 흔히 사용되고 있으며, 최근에는 DNA hybridization과 PCR (polymerase chain reaction)을 이용한 유전자 검출 방법이 활발히 응용되고 있음(Ha et al., 2010).
- 현재 국내에서 사용되고 있는 미생물 검출법으로는 간이진단키트, PCR, 선택배지 등이 있으며 이는 대부분 수입제품에 의존하고 있음.
- 현재 국내에 판매되고 있는 신속 간이진단키트는 Microgen, Liofilchem s.r.l, Neogen, 3M, Oxoid 제조사에서 제작한 제품들이 되며 주로 대장균, *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*을 검출하고 있음(표 3).

표 3. 현재 판매되고 있는 주요 식중독 세균 신속 간이진단키트

대상 식중독 세균	제품명	제조사
대장균	GeneQuence	Microgen
	Food System	Liofilchem s.r.l
	Soleris-E. coli confirmation	Neogen
	3M Molecular Detection Assay E. coli	3M
<i>Salmonella</i>	Path-Check Salmonella Test	Microgen
	Reveal 2.0 for Salmonella	Neogen
	Microgen Latex Salmonella Kit	Microgen
	Food System	Liofilchem s.r.l
	3MTMTecraTM Salmonella Visual Kit	3M
	ANSR-Salmonella	Neogen
	3M Molecular Detection Assay Salmonella	3M
<i>L. monocytogenes</i>	Reveal 2.0 for Listeria	Neogen
	Microgen Latex Listeria Kit	Microgen
	Food System	Liofilchem s.r.l
	3MTMTecraTMListeria Visual Kit	3M
	Microbact Listeria 12L(20ID' s)	Oxoid
	ANSR-Listeria	Neogen
	3M Molecular Detection Assay Listeria mono	3M
<i>S. aureus</i>	Microgen Latex Staphy Kit	Microgen
	Food System	Liofilchem s.r.l
	Microbact Staph 12S	Oxoid

- 차세대 분자진단 기술 중 하나인 MLPA와 CE-SSCP 기술을 응용한 식중독 세균 동시검출법을 이용할 경우 식중독 세균 10종을 8시간 이내에 미생물 종류와 수를 분석할 수 있으며 분석 가능한 식중독 세균은 *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *B. cereus*, *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus*, *Shigella* spp., *C. perfringens*, *C. jejuni*임(농촌진흥청, 2012).
- 국내에서 분리된 축산물 유래 *L. monocytogenes*의 virulence marker로서 LLO, LCP, CRA, hemolysin activity 및 혈청형을 조사하는 한편 PCR을 이용하여 virulence gene (*inlA*, *inlB*, *actA*, *hlyA*, *plcA* 및 *plcB*)을 분석하는 검출법이 있으며, *L. monocytogenes*에 특이적으로 발현되는 유전자(*hlyA*, *iap*, *prfA*)를 통하여 검출여부를 판단하는 방법이 활용되고 있음(표 4).

표 4. *L. monocytogenes*의 독성 유전자검출에 사용되는 프라이머

Primer	Sequence(5'-3')	Product size (bp)	GenBank Accession No.	References
<i>inlA</i>	F CCT AGC AGG TCT AAC CGC AC R TCT CTA ATT TGG TTA TGC CC	255	AZ012346	Vines and swarninathan, 1998
<i>inlB</i>	F AAA GCA CGA TTT CAT GGG AG R ACA TAG CCT TGT TTG GTC GG	146	AJ012346	Ericsson et al., 2000
<i>actA</i>	F GAC GAA AAT CCC GAA GTG AA R CTA GCG AAG GTG CTG TTT CC	268	AF103807	Jaradat et al., 2002
<i>hlyA</i>	F CGG AGG TTC CGC AAA AGA TG R CCT CCA GAG TCA TCG ATG TT	234	M24199	Mengaud et al., 1989; Furrer et al., 1991
	F CCT AAC ATA TCC AGG TGC TC R CTG ATT GCG CCG AAG TTT AC	350	-	Hossein Jamali et al., 2015
<i>plcA</i>	F CGA GCA AAA CAG CAA CGA TA R CCG CGG ACA TCA TTT AAT GT	129	X54618	Leimeister-wachter et al., 1991
<i>plcB</i>	F GGG AAA TTT GAC ACT GCG TT R ATT TTC GGG TAG TCC GCT TT	261	M82881	Vasquez-Boland et al., 1992
<i>iap</i>	F TGG GAT TGC GGT AAC AGC AT R TTA TCA ACA CCA GCG CCA CT	264	-	Kumar et al., 2014
<i>prfA</i>	F TGA AAC AGA GTC AGG CGG TC R TGC GCG CAA TAC TTT CAT CG	262	-	Lebreton et al., 2016

○ 시장현황

- 국내의 경우 *Listeria*에 의한 식중독 사례는 1993년 뉴질랜드산 수입 홍합에서 최초로 검출된 이후 국내에서 생산된 원유, 우유, 냉동만두, 피자 등 냉동식품과 미국산 아이스크림 등에서 검출돼 사회적으로 문제가 된 적이 있으나 아직까지 *L. monocytogenes*에 의한 식중독 발생 사례는 없었음.
- 그러나 병원에 입원한 수막뇌염 및 패혈증 환자에서 *L. monocytogenes*가 분리되고 있어 집단 식중독 발생가능성이 높을 것으로 예상됨.
- 축산물 가공품의 2016년도 국내시장규모는 전년도에 비해 약 3조 가량 증가했고 그 중 절반 가량이 포장육으로 판매되고 있어 국내 축산물에 대한 시장규모와 소비량은 지속적으로 증가하고 있는 추세임.

○ 경쟁기관현황

- 국내 대학 및 연구소에서 *L. monocytogenes* 대한 검출 및 진단 기술 개발을 지속적으로 하고 있지만, 신속진단검출용 kit 제품은 아직까지는 출시되어 있지 않음.
- 코젠바이오텍과 바이오니아와 같은 기업을 통하여 *L. monocytogenes*에 대한 PCR kit을 판매하고 있으나 기기가 갖춰진 실험실에서 수행이 가능한 제품들로 현장분석에는 적합하지 않음.
- 국내에서도 (주)에스디, (주)올메디쿠스, (주)인포피아 (주)아이센스, (주)바이오포커스 등 몇 군데의 벤처기업에서 의료용 체외진단 센서 제품을 출시하고 있지만 축산물 관련된 식중독 세균에 대한 연구는 상대적으로 낮은 수준임.
- 국내의 경우 *Listeria* 균 및 *L. monocytogenes* 검출 및 진단에 대한 기술은 개발되고 있으나, 아직까지는 외국 제품에 대한 의존성이 높은 실정임.
- 또한 RT-PCR법을 변형하거나 응용하는 LAMP등의 분자진단기법들이 꾸준히 개발되고 있으나, 온도 변화를 유지시킬 수 있는 기계나 검출 후 확인이 번거로운 점, 시간이 오래 걸리는 점 등 현장에서 신속하게 사용하기에는 여전히 문제점이 있음.

○ 지식재산권 현황

특허명	특허 번호	내용
	국가, 출원일자	
리스테리아 모노사이토제네스를 검출하기 위한 등온증폭반응용 프라이머 세트 및 이를 이용한 리스테리아 모노사이토제네스의 검출 방법	(출원)1020140025600	<i>L. monocytogenes</i> 를 검출하기 위한 등온증폭반응용 프라이머 세트, 상 기 프라이머 세트를 포함하는 <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> 검출용 조성물, 키 트 및 검출방법
	한국, 2014.03.04	
리스테리아 모노사이토제네스 검출용 프라이머, 프로브 세트 및 이를 이용한 정량적 검출방법	(출원)1020110068386	<i>L. monocytogenes</i> 검출용 프라이머 세트, 이 프라이머 세트를 포함하는 <i>L. monocytogenes</i> 검출용 조성물, 이를 포함하는 <i>L. monocytogenes</i> 검출용 키트 및 이 조성물을 이용하 여 <i>L. monocytogenes</i> 를 정량적으로 분석하는 방법
	한국, 2011.07.11	
리스테리아 모노사이토제네스 선택 증균 배지	(출원)1020170014607	<i>Listeria</i> 종 중 인간에 대한 감염성 을 가지는 유일한 병원성균인 <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> 만을 선택적으로 증 균하는 방법
	한국, 2017.02.01	
리스테리아 모노사이토제네스 랜덤 지노믹 DNA 단편을 이용한 유전자 칩	(출원)1020100117633	특정 유전 정보 없이 단 하나의 <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> 균주에서 추출된 지 노믹 DNA를 무작위로 절단하여 얻 어진 60개의 DNA 단편을 이용하여 <i>L.monocytogenes</i> 검출용 DNA 칩을 제작하여 <i>Listeria</i> 속의 다른 종 및 <i>Listeria</i> 와 다른 속의 미생물과 차별 되면서 <i>L. monocytogenes</i> 만 검출할 수 있음
	한국, 2010.11.24	
식중독균의 검출을 위한 증균배지 조성물 및 이의 제조방법	(출원)10-2016-01299 19	대장균의 증균 배양법에 있어서 배 지 조성을 변경하여 기존의 증균배 지를 사용하였을 때보다 증균되는 대장균의 성장속도와 균주수를 현 저히 증가시켜 신속하게 검출할 수 있음
	한국, 2016.10.07	

(2) 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- PCR기법을 기반으로 한 미생물 검출법

- 현재 사용하고 있는 식중독 세균 검출 방법에는 핵산, 바이오센서, 면역화학적을 기반으로 하는 방법들이 주로 사용되고 있는데, 자세한 검출법에는 simple polymerase chain reaction (PCR), multiplex PCR, real-time PCR, nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), loop-mediated isothermal amplification (LAMP)과 oligonucleotide DNA microarray 등이 핵산을 기반으로 한 방법에 해당하고, optical, electrochemical 과 mass-based biosensors 등이 바이오센서를 기반으로 한 방법에, 그리고 마지막으로 면역학적 검출법에는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)와 lateral flow immunoassay 등이 있음(Lee et al., 2015).

- 기존 증균 배지를 기반으로 한 미생물 검출법

- 식품에서의 *L. monocytogenes*를 Real-time PCR을 사용하여 검출하기 위한 전처리법으로 ISO 11290-1의 표준 증균 배지를 변형하여 사용함(Justin et al., 2009).
- 오염된 아이스크림 시료에서 *L. monocytogenes*를 검출하기 위한 전처리법으로 FDA(Food and drug administration), ISO(International Organization of Standardization), USDA(U.S. Department of Agriculture)에서 사용하는 증균방법으로 BLEB(Buffered Listeria enrichment broth), HFB(Half-fraser broth), FB(Fraser broth)를 사용함(Andrea et al., 2016).
- 로메인 상추, 토마토, 고수 등의 식품에서 *Salmonella* 속을 검출하기 위한 전처리법으로 TT broth와 RV broth를 사용하였음(Yoshitomi et al., 2015).
- 축산물에서의 화학약품 잔류물을 검출하기 위한 전처리법은 많이 개발되었지만 미생물 검출을 위한 전처리법이 개발된 것은 증균배지를 사용하는 것이 대부분임(표 5).

표 5. 국외 식중독 세균에 따른 증균배지

식중독 세균	증균배지	참고문헌
<i>Listeria monocytogenes</i>	Half-fraser broth (HFB)	Justin et al., 2009
	Buffered <i>Listeria</i> enrichment broth (BLEB)	Andrea et al., 2016
	Fraser broth (FB)	Andrea et al., 2016
<i>Salmonella</i> spp.	TT broth	Yoshitomi et al., 2015
	RV broth	Yoshitomi et al., 2015
<i>Staphylococcus aureus</i>	modified mannitol salt broth (MSB) supplemented with sodium pyruvate	Nagaraj et al., 2014
<i>Esherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> enrichment (EE) broth	Roger et al., 2017

○ 시장현황

- 전 세계적으로 *L. monocytogenes*에 의한 식품 사고가 지속적으로 발생하고 있으며, 이에 대하여 국외에서는 현황조사 및 분석방법에 대한 연구가 면역분석법과 분자진단법 중심으로 개발되고 있음.
- API Listeria test, USDA 방법, FDA 방법, modified cold enrichment 방법을 주로 사용하며, Real-time PCR과 MPN 방법, DNA hybridization 방법, Chormogenic agar 방법 등이 개발되고 있지만 시료 전처리와 분석에 있어 기본 1일 이상 소요되며, 시료 당 분석비용이 큰 단점이 있음(1개 시료 분석비 = 2만원 이상).
- 최근 LAMP 기법을 이용한 등온 PCR법이 개발되고 있으며 SYBR Green과 같은 형광물질과 반응하여 형광반응의 유무로 UV 하에서 양성과 음성을 확인할 수 있음.
- 또한, 등온 상태에서 반응하여 파장의 차이를 통하여 양성을 확인 할 수 있는 기기가 개발되어 있으나, 아직까지는 검출할 수 있는 검출한계가 $10^3\sim 10^4$ CFU/ml로 확인됨(Almasi, 2016).
- 일본에서는 LAMP 기법으로 *L. monocytogenes*를 검출할 수 있는 키트(Eiken chemical co., LTD.)가 출시되어 있으나, 증균 후에 검출까지 최소 2일의 시간이 필요함
- 국외의 휴대용 검출기기 개발 시장은 제한된 세균에 대하여 개발되어 있으나, bio-card 카트리지에 시료 전처리용액을 넣어 휴대용 기기에 카드를 꽂게 되면 오염된 균의 종류를 확인 할 수 있음(Micra, 2015).
- 그 외에도 임신진단키트와 같은 항원-항체 반응을 활용한 검출기기가 활발하게 개발되고 있음.

○ 지식재산권 현황

특허명	특허 번호	내용
	국가, 출원일자	
Method for rapidly detecting <i>Listeria monocytogenes</i> in food	(출원) 201210177173	고리 매개 등은 증폭 (램프)에 의해 음식에서 <i>L. monocytogenes</i> 를 탐지하기 위한 방법
	중국, 2012.06.01	
Detection method and detection kit for pathogenic <i>Listeria monocytogenes</i>	(출원)2017110961241.6	다른 탐지 기구나 과정 없이 병원성 <i>L. monocytogenes</i> 를 탐지하기 위한 방법과 검정 키트 개발
	중국, 2017.10.13	
Sequences and their use for detection of <i>Listeria monocytogenes</i>	(출원)PCT/040753	<i>L. monocytogenes</i> 를 검출하는 PCR 기반 방법인 핵산 서열의 존재를 기반으로 하여 혈청형을 빠르고 정확하게 검출
	미국, 2015.07.16	
Enrichment and selective culture of Mycobacteria	(출원)15549370	Mycobacteria의 증균배양에서 최소한의 9-chloro-9-(4'-diethylamino) phenyl-9,10-dihydro-10-phenylacridine hydrochloride (or C-390)를 첨가하여 균 배양을 최적화 시킴
	미국, 2016.02.04	
Enrichment and selective culture of <i>Salmonella</i> and <i>Shigella</i>	(출원) 15573511	<i>Salmonella</i> 와 <i>Shigella</i> 를 동정, 분리하는데 있어서 L-ornithine을 첨가하여 증균하는 데에 선택성을 높이는 배지 개발
	미국, 2016.05.11	

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1. 재조합 Bst DNA polymerase 개발

1-1. 유전자 클로닝

- LAMP PCR 의 핵심원료 시약을 개발하기 위하여 Bacillus stearothermophilus로부터 Bst DNA polymerase 유전자를 분리하기 위한 primer를 설계하여 PCR을 진행한 후 Bst DNA polymerase 증폭산물을 얻었음.



그림 1. 증폭된 Bst DNA polymerase 확인

- 증폭된 산물은 단백질 발현 벡터인 pET21 vector에 삽입을 한 후 형질전환을 실시하여 콜로니를 얻었음

- 생성된 콜로니는 배양한 후 Plasmid DNA만을 순수하게 분리하였으며 제한효소 처리를 하여 발현벡터와 Insert가 정확하게 분리된 클론을 최종 선별하였음

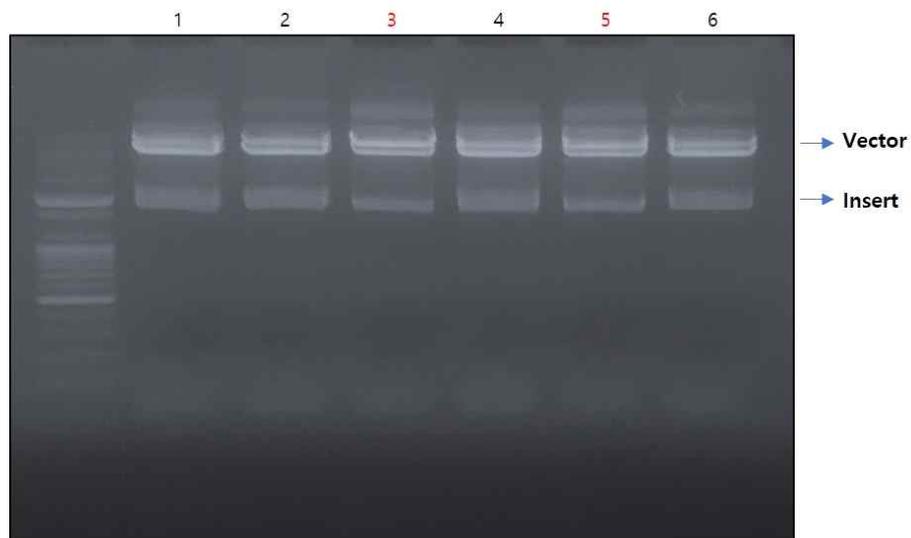


그림 2. 제한효소 처리 후 재조합 유전자의 확인

1-2. 재조합 단백질의 발현 및 정제

- Bst DNA polymerase 재조합 DNA는 단백질의 과잉발현을 유도하기 위해 재조합 단백질 발현을 위한 수용 균주인 BL21(DE3)에 형질전환하였으며, 형질전환된 cell을 항생제 Ampicillin이 포함된 LB 평판배지에 도말하여 37°C 배양기에서 16시간 이상 배양한 후 생성된 단일 콜로니를 LB 배지에서 충분히 키운 후 배양액을 새로운 LB 배지에 1%가 되도록 접종하여 배양하였음. 재조합 Bst DNA polymerase 단백질이 BL21(DE3) 균주에서 발현되는 것을 유도하기 위해 cell이 O.D 600의 값이 0.6 수준으로 자랐을 때 IPTG(최종 농도 0.25mM)를 첨가하고 추가 배양하여 Bst DNA polymerase 단백질의 과잉발현을 유도하였음

- 과잉발현이 끝난 BL21(DE3) cell을 원심분리로 수확하였으며 수확한 cell을 lysis buffer로 현탁하고, 초음파 파쇄를 통하여 분해시킨 후 세포 추출물을 원심분리하여 상층액을 취하여 수용성 단백질을 분리하였으며, 상층액을 취하고 남은 pellet을 다시 8M Urea가 포함된 lysis buffer로 pellet이 모두 풀어질 때까지 충분히 풀어준 후 원심 분리하여 상층액을 얻어 불용성 단백질을 분리하였음. 수용성 단백질, 불용성 단백질을 각각 5배로 농축된 SDS sample loading buffer와 혼합하여 끓는 물에 5분간 끓인 후 샘플을 SDS-PAGE로 전기영동을 하여 Coomassie Blue 염색하여 확인 결과 Bst DNA polymerase 재조합 단백질이 수용성 단백질의 형태로 약 63kDa의 크기로 과잉발현된 것을 확인하였음.

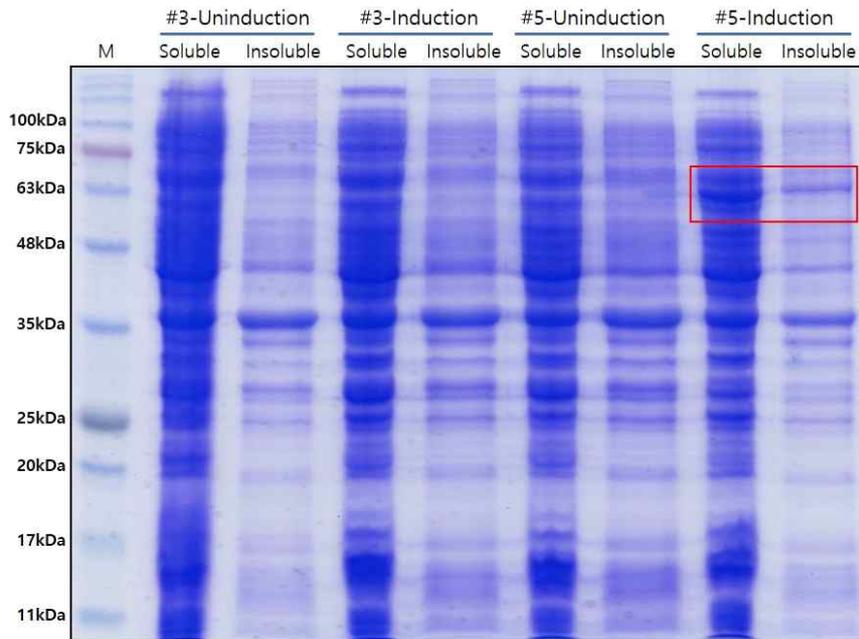


그림 3. Bst DNA polymerase 재조합 단백질 발현확인

- 수용성 단백질의 형태로 발현이 확인된 Bst DNA polymerase 재조합 단백질을 순수하게 분리하기 위해 친화 크로마토그래피를 실시하였음. 친화 크로마토그래피는 Histidine이 결합되어지는 Nickel 레진을 사용하였으며 먼저 Nickel 레진을 완충액으로 충분히 세척하여 평형화 시킨 후 Nickel 레진에 과잉발현이 끝나고 파쇄하여 얻은 Bst DNA polymerase 수용성 단백질 용액을 흘려보내 레진에 Bst DNA polymerase 단백질이 흡착되도록 한 후 세척액을 충분히 흘려보내 Bst DNA polymerase 단백질 이외의 비특이 단백질을 레진에서 제거시킨 후 용출용액을 흘려보내 레진에 흡착되어있는 Bst DNA polymerase 항원을 용출시킨 후 정제한 Bst DNA polymerase 재조합 단백질을 SDS-PAGE 전기영동 후 Coomassie Blue 염색하여 확인하였음

- 과발현 온도조건을 다르게 하여 과발현한 후 정제한 결과, 18°C 에서 과발현시킨 조건에서 가장 많은 단백질을 정제할 수 있음을 확인하였음

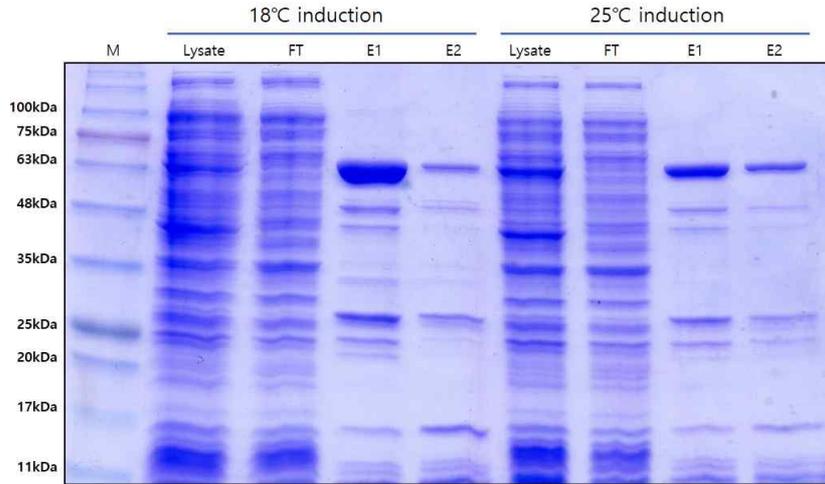


그림 4. induction 온도에 따른 정제 비교

- 단백질의 발현 온도 및 IPTG 농도, 정제시 세척버퍼의 농도 등의 조건을 변화시켜 최적의 정제 조건을 설정하여 정제 진행하여 재조합 Bst DNA polymerase 정제를 확인하였음

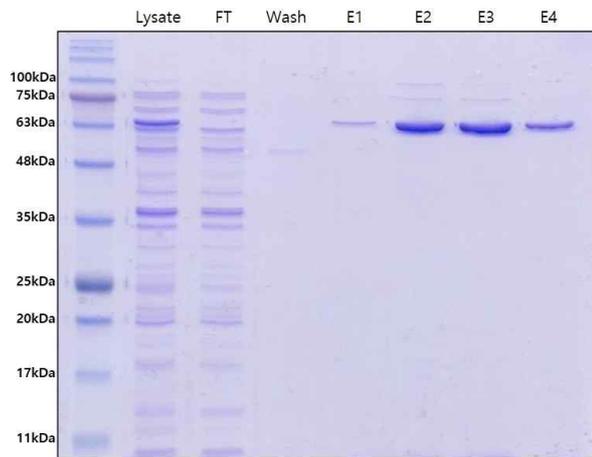


그림 5. 최적정제 조건 설정 후 정제

- 1차로 Affinity 정제 실시 후 정제된 산물을 Heparin resin과 FPLC 장비를 이용, KCl의 농도를 다르게 하여 정제, 고순도의 Bst DNA polymerase만을 순수하게 정제할 수 있었음

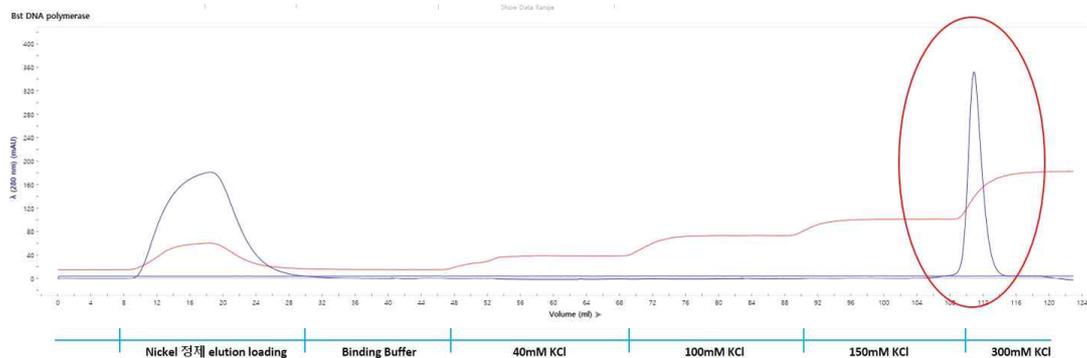


그림 6. Heparin resin 정제 FPLC

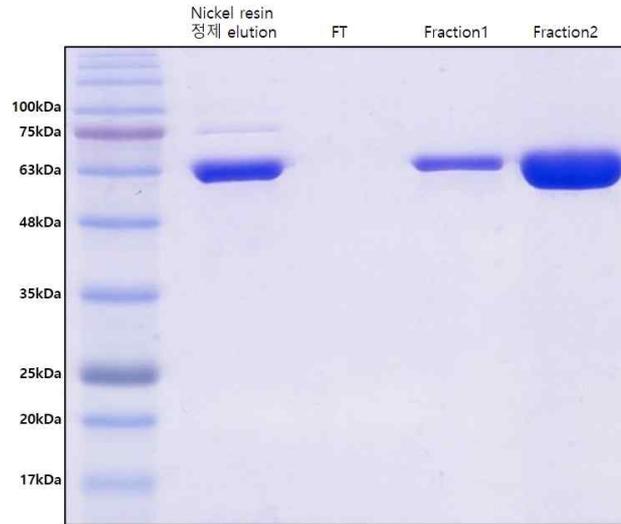


그림 7. Heparin resin 정제 SDS-PAGE 확인

1-3. 정제된 재조합 단백질의 확인

- 판매되고 있는 제품 3개의 Bst DNA polymerase와 같이 순도비교 실시한 결과 동일한 성능을 나타냄을 확인하였음
- N사, E사1과는 비슷한 크기의 단백질로 확인이 되었으며, 정제된 단백질의

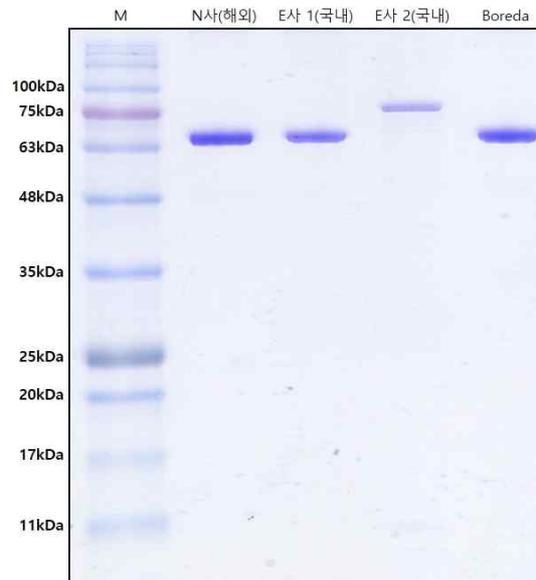


그림 8. 타사 Bst DNA polymerase 비교

2. *L. monocytogenes* 검출키트 개발

2-1. 증균 및 시료 전처리를 위한 시약 키트화

(1) 증균배지 제품화

- 선행과제에서 pyruvate 및 ferric citrate를 첨가하여 개선된 형태로 만들어진 *L. monocytogenes* 증균배지를 제품화하였음. (Cat No. BB1008)
- 1L 당 pancreatic digest of casein 17g, soytone 3g, dextrose 2.5g, sodium chloride 5g, dipotassium phosphate 2.5g, yeast extract 6g, cycloheximide 0.05g, acriflavine HCl 0.015g, nalidixic acid 0.04g, pyruvate 1g, ferric citrate 1g을 넣어 제조한 배지를 멸균 후 225ml씩 소분하여 제품화함

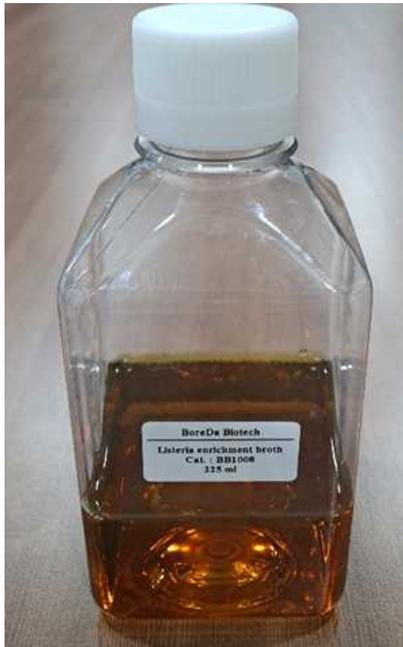


그림 8. 리스테리아 증균배지

(2) 시료 전처리를 위한 시약 키트화

- 선행연구의 결과를 바탕으로 *Listeria monocytogenes* gDNA extraction Kit를 제품화하였음
- 제품의 구성요소는 표 6과 같으며, Lysis buffer, Washing buffer, Elution buffer, DNA extraction column으로 구성되었음

표 6. 시료 전처리를 위한 시약 키트 구성

gDNA extraction Kit Components	Quantity	Storage
Lysis Buffer Solution	50 ml	RT
Washing Buffer Solution	60 ml	RT
Elution Buffer	3 ml	RT
DNA Extraction Column	50 ea	RT

- gDNA extraction 키트 사용법

- ① 시료 25g에 증균배지 (Listeria Enrichment Broth, Cat No. BB1008) 225ml을 넣고 30°C 호기조건에서 12시간 배양을 실시한다.
- ② 증균배양액 50ml을 멸균거즈로 거른 후 원심분리(1,912×g, 15분, 4°C) 후 상층액을 제거한다.
- ③ Lysis Buffer Solution 1mL 첨가 후 상온에서 30분간 처리한다.
- ④ 600μl씩 DNA Extraction Column에 담아 원심분리 (8,000×g, 1분) 후 flow-through를 제거한다.
- ⑤ 600μl의 Washing Buffer Solution 첨가 후 원심분리 (8,000×g, 1분) 후 flow-through를 제거한다. (2회 반복)
- ⑥ 빈 Column으로 원심분리 (8,000×g, 1분)를 실시한다.
- ⑦ 새로운 Microcentrifuge tube (1,5ml)에 column을 끼운 후 Elution buffer 50μl를 넣고 원심분리 (8,000×g, 1분)를 실시한다.



그림 9. Listeria monocytogenes gDNA extraction Kit(Cat No. BB1009)

2-2. 등온 PCR을 위한 시약과 신속 검출 키트화

(1) LAMP 반응을 위한 Primer 및 LAMP 반응

- *Listeria monocytogenes*를 고리 매개 등온증폭(LAMP)으로 검출하기 위해, 선행과제에서 검증이 된 *Listeria monocytogenes*의 영역 6곳을 인식하는 서로 다른 올리고뉴클레오타이드 6종류를 제작하였으며 이는 표 1에 나타내었으며, 6종 프라이머 중 서열번호 3의 5'말단에 디곡시제닌 (digoxigenin, DIG)을 표지화하였음

표 7. LAMP반응을 위한 6종의 Oligo

서열번호	프라이머	염기서열 (5' - 3')	유전자 위치 (bp)
1	FIP	CGTGTTTCTTTTCGATTGGCGTCTTTTTTTC ATCCATGGCACCACC	(150-172)-(107-125)
2	BIP	CCACGGAGATGCAGTGACAAATGTTTTGGA TTTCTTCTTTTCTCCACAAC	(234-256)-(298-321)
3	LF	TAGGACTTGCAGGCGGAGATG	53-71
4	LB	GCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGG	379-398
5	F3	TTGCGCAACAAACTGAAGC	128-148
6	B3	GCTTTTACGAGAGCACCTGG	261-284

- 제작된 프라이머를 이용하여 최적 반응 조건을 확인하기 위한 실험은 상기 표의 FIP, BIP 프라이머

로 구성된 Inner primer (40 pM/μL) 2종, LF 및 LB 프라이머로 구성된 Loop primer (20 pM/μL) 2종, F3 및 B3 프라이머로 구성된 Outer primer (10 pM/μL) 2종을 모두 포함하는 프라이머 혼합액을 제조한 후 LAMP 반응을 위해 프라이머 혼합액, 6 mM MgSO₄, 1.4 mM dNTPs, 1X 완충용액, 8 Unit Bst DNA polymerase (New England Biolabs) 및 게놈 DNA를 포함하는 반응액을 준비한 후 반응액을 PCR 기기를 이용하여 60°C의 온도에서 60분 동안 증폭 반응을 수행하였으며, 음성대조군의 주형으로는 뉴클라아제가 없는 3차 멸균증류수를 첨가하여 수행하였음

(2) 재조합 Bst DNA polymerase 성능검사

- 선행연구에서 증명이 된 NEB사의 Bst DNA polymerase를 표준으로 하여 성능비교를 실시함
- 음성표준물질, 양성표준물질에 대하여 NEB사의 Bst DNA polymerase와 본 연구에서 개발된 Bst DNA polymerase를 사용하여 LAMP 반응을 실시한 후 전기영동으로 확인

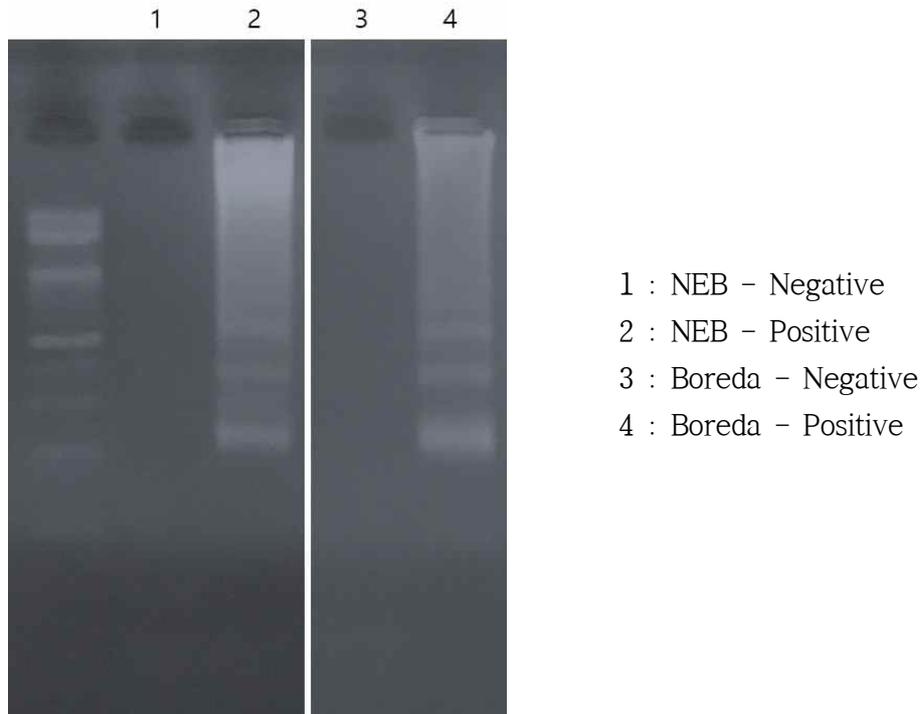


그림 10. 재조합 Bst DNA polymerase 성능비교 (NEB vs Boreda)

(3) Lateral Flow Assay 키트 제작

- Lateral Flow Assay 키트는 검출 패드인 나이트로셀룰로스 멤브레인, 골드접합패드, 샘플패드, 흡수패드 4가지 패드로 구성하였으며, 플라스틱 카드(Millipore)에 나이트로셀룰로스 멤브레인과 흡수패드를 붙인 후, 분주기를 사용하여 대조선에는 염소 항-마우스(Goat anti-mouse) IgG 항체를 1 mg/mL의 농도로 희석하여 멤브레인에 분주하고, 시험선에는 항-디곡시제닌(anti-Digoxigenin) 항체 (보레다바이오텍, 클론번호 A4D8)를 1mg/mL의 농도로 각각 분주하였음
- 금 나노입자 콜로이드 용액 (보레다바이오텍, 50 nm)에 마우스 IgG를 넣고 30분간 반응시켜 대조선 발색을 위한 접합체를 제조하였으며, 스트렙타비딘(Streptavidin)을 넣고 시험선 발색을 위한 접합체를 제조하였음
- 샘플패드는 샘플패드용 용액에 패드를 침적시킨 후 건조, 절단한 뒤 부착하여 제조하였음 흡수 패드는 반응액을 잘 흡수할 수 있도록 건조한 것을 사용했으며, 기판에 나이트로셀룰로스 멤브레인을 부착한 뒤, 상기 멤브레인 끝에 흡수패드를 부착하였음
- 상기에서 제조한 대조선 및 시험선이 분주된 나이트로셀룰로스 멤브레인과 패드들을 지지대(백킹 패드) 위에 중첩되게 접합하고 절단기에 넣어 3 mm 간격으로 절단하였으며, 절단된 스트립을 플라스틱 하판과 상판으로 구성된 카세트에 조립하여 리스테리아균 특이 유전자 등은 증폭 생성물 검출을 위한 측면유동 면역 발색칩을 제조하였음

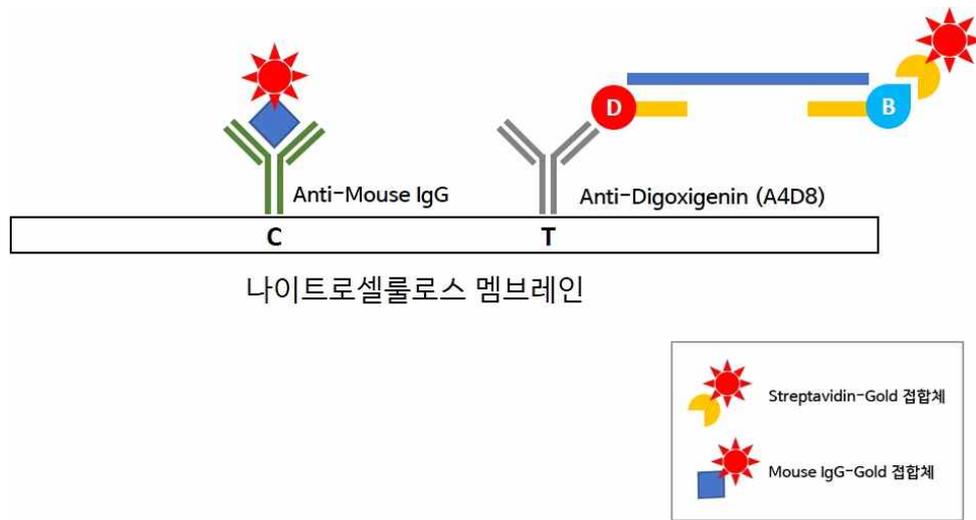


그림 11. *Listeria monocytogenes* LAMP 증폭 산물이 검출되는 원리

(4) Oligo primer set에 따른 반응성 확인

- 3종의 다른 시퀀스로 프로브를 제작하여 증폭이 끝난 증폭산물에 넣고 55°C 에서 5분간 교잡반응(Hybridization)을 한 후 검출키트에 반응시킨 결과 2, 3번 프로브에서는 음성대조군에서도 양성 반응이 나와 사용할 수 없었고, 1번 프로브에서는 음성대조군에서는 발색이 일어나지 않고, 양성 대조군에서만 발색이 일어남을 확인하였음

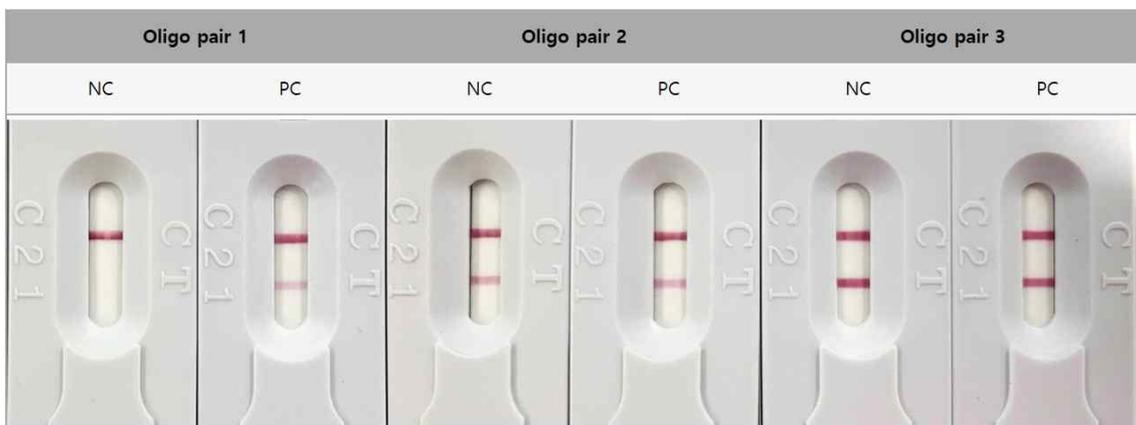


그림 12. Oligo에 따른 반응성 비교 결과

(5) 검출한계 테스트

- 키트의 검출한계 테스트 방법은 *Listeria monocytogenes* 균을 10⁷CFU, 10⁶CFU, 10⁵CFU, 10⁴CFU, 10³CFU, 10²CFU, 10¹CFU, 10⁰CFU/ml 수준의 균 배양액으로부터 게놈 DNA를 추출한 후 등온 증폭 반응을 수행하고 검출 키트에 증폭산물을 올려 검출키트의 발색을 확인하였음

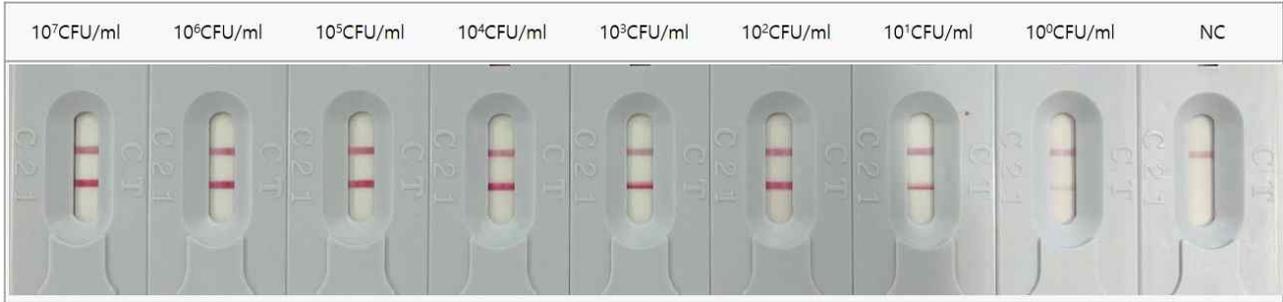


그림 13. 진단키트의 검출한계 확인

(6) 특이도 테스트

- 리스테리아 모노사이토제네스 검출용 키트의 특이성을 확인하기 위하여 음성대조군(NC), 양성대조군(PC) 및 5종의 비교군 키트를 준비하였음 양성대조군(PC) 키트에 사용하기 위한 리스테리아 모노사이토제네스 DNA 시료를 준비하고, 비교군 키트에서 확인하기 위해 식중독을 야기하는 대장균 (*Escherichia coli*), 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*), 살모넬라 티피뮤리움 (*Salmonella Typhimurium*), 비브리오 파라헤모리티쿠스 (*Vibrio parahaemolyticus*)에 대한 DNA 시료를 준비하였음

- 등온 증폭 반응을 수행한 후, 리스테리아 검출키트에 반응물을 올려 검출키트의 발색을 확인 비교한 결과 리스테리아 모노사이토제네스균 외에 다른 균에서는 발색반응이 확인되지 않았음

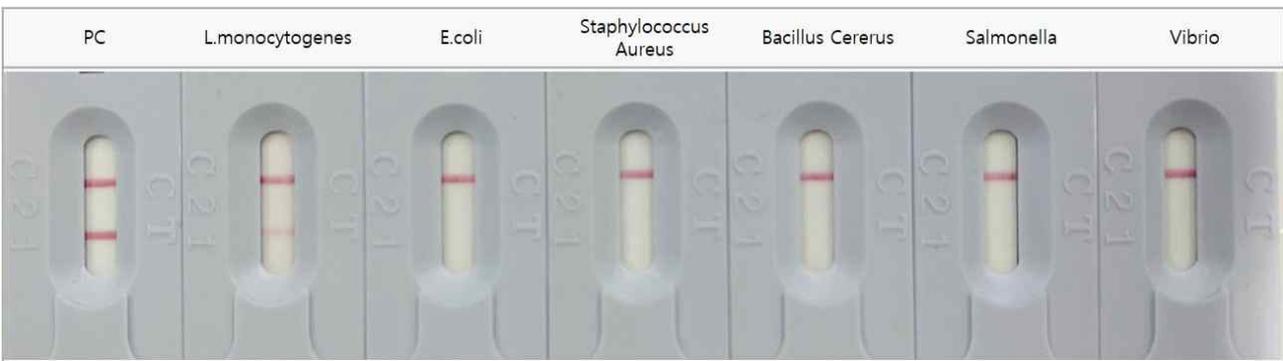


그림 14. 진단키트의 특이도 확인

2-3. *Listeria monocytogenes* 신속 검출 키트 시제품 제작

(1) 시제품의 구성

- *Listeria monocytogenes* 신속 검출 키트는 등은 증폭 반응을 위한 시약과 증폭산물 검출 시약으로 나눌 수 있음. 등은 증폭 반응을 위한 시약은 반응버퍼, dNTP, MgSO₄가 포함되어 있는 2X Master mix, 6종의 oligo가 포함되어 있는 10X primer mix, Bst DNA polymerase, 양성대조군이 포함되어 있으며, 증폭산물 검출 시약은 측방 면역 분석 디바이스와 증폭산물을 희석하여 디바이스에서 전개될 수 있도록 하는 테스트 버퍼가 포함되어 있음

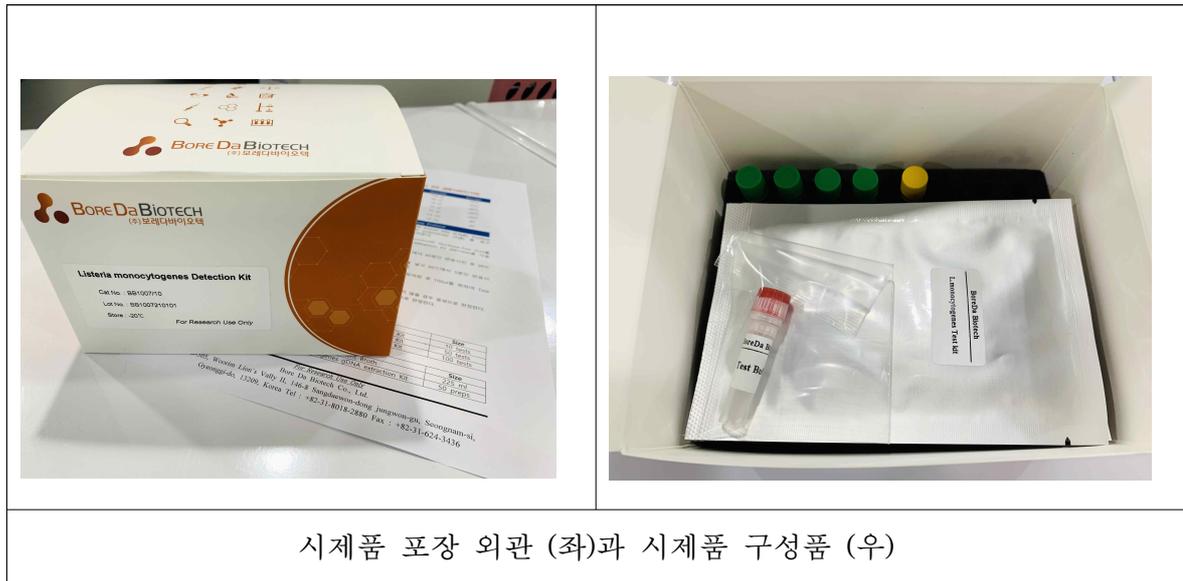


그림 15. *Listeria monocytogenes* 신속 검출 키트

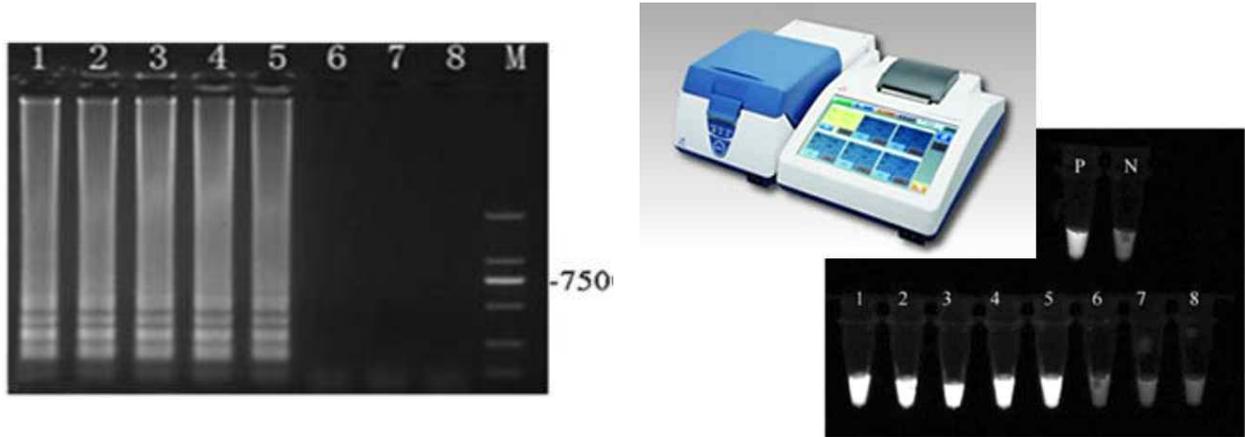
(2) 시제품의 사용법

- PCR tube에 LAMP 2X Master Mix (12.5μl), LAMP 10X Primer Mix (2.5μl), Positive control (1μl) or Sample DNA(3μl), Bst DNA polymerase (1μl) 를 넣고 Nuclease-free H₂O로 최종볼륨을 25μl로 맞춰준 후 잘 섞어준다. 모든 구성물을 잘 섞어준 tube를 LAMP 반응을 위해 60°C 에서 60분간 반응시킨 후 95°C 에서 5분간 반응시킨다. 완료된 증폭산물을 Test Buffer로 10배 희석한 후 100ul를 취하여 Test Kit에 점적하여 10분 뒤에 반응을 확인한다.

(3) LAMP 반응결과 판독

- 유전자 증폭을 통하여 얻은 산물의 검출방법은 여러 가지 방법이 있음
- 그림 16-A와 같이 반응산물을 아가로스 겔 (agarose gel)에 전기영동하여 분리한 후 DNA의 Size와 밴드 굵기를 통하여 원하는 산물을 확인하는 방법이 일반적임
- DNA 증폭으로 생성된 피로인산 (pyrophosphate)는 Mn²⁺ 또는 Mg²⁺와 결합하여 흰색 침전물을 형성하게 되는데, 이 때 생성된 흰색 침전물을 육안으로 관찰하거나 Turbidimeter를 사용하여 반응의 진행여부를 확인하는 방법이 있음
- 또 다른 방법은 형광 금속 지시약인 칼세인 (calcein)을 사용하는 방법으로, 반응이 진행됨에 따라 Mn-pyrophosphate의 결합물이 생기면서 형광의 세기가 증가하게 되고, 형광의 강도로 반응의 진행여부를 확인할 수 있음
- 본 연구에서 검출방법으로 확립한 방법은 측방 유동 면역 분석방법임. 탁도나 형광의 강도 또는

색의 변화로 반응결과를 판독하는 방법은 실험자에 따라 판독결과가 달라질 수 있는 문제점이 있는 반면, 측방 유동 면역분석법은 버퍼만 추가하여 고가의 장비가 필요하지 않고 비전문가도 쉽게 사용할 수 있어 활용도가 높을 것으로 생각됨



(A) Agarose Gel Analysis

(B) Visual Turbidity



(C) Visual Fluorescence

(D) Colorimetric Analysis

그림 16. LAMP 결과 판독법

(4) 시제품의 차별화

- *L. monocytogenes* 시제품은 등온증폭산물이 먼저 Gold nano particle과 결합한 후 증폭산물에 접합된 표지물질에 특이적인 항체가 분주된 멤브레인을 통과하면서 발색이 되는 원리로 증폭산물의 신호가 높은 경우 멤브레인을 통과하면서 바로 발색이 보일 수도 있고, 감도가 낮은 경우에도 10분 이내에 발색 밴드를 확인할 수 있음
- 리스테리아를 검출하는 타사의 제품의 경우 검출한계가 낮아 분석 전 배양 단계를 통해 균을 농축시키거나 균을 배양하는 데에도 28시간 이상의 배양시간이 요구되는 등 긴 시간이 필요함
- 높은 민감도를 가진 본 키트의 경우에는 1×10^1 CFU/ml 수준의 검출도 가능하기 때문에 별도의 증균 단계를 거치지 않아도 시료 분석이 가능함.

3. 개발된 시약 및 키트의 성능평가 (위탁연구기관)

3-1. 재조합 Bst DNA polymerase 성능시험

[위탁연구기관 : 경상대학교 심원보]

(1) 개발한 리스테리아 모노사이토제네스 검출용 등온비색 증폭기술의 평가

1) Standard buffer상의 민감도 측정: g 또는 ml 당 수-수십 CFU

- 개발한 등온비색 증폭기술의 민감도 확인을 위해 리스테리아 모노사이토제네스를 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^1$ CFU/mL 농도로 준비하고, 시판되는 DNA 추출 kit (Labopass™ Tissue Genomic DNA Isolation Kit, Cosmogenetech, Seoul, Korea)를 사용하여 제조사가 제시하는 매뉴얼에 따라 DNA 추출한 후 등온비색 증폭기술로 검출한계를 확인하였음

- 본 위탁연구기관에서 개발한 등온비색 증폭기술의 민감도 확인을 위해 리스테리아 모노사이토제네스를 standard buffer에 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ CFU/ml 농도로 준비하고 등온비색 증폭기술로 분석하였음

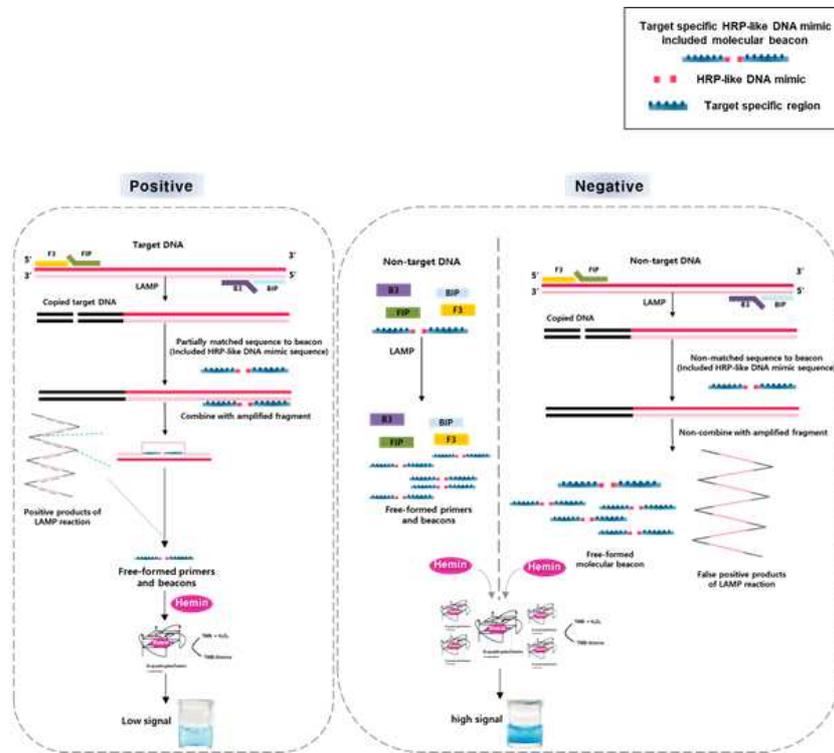


그림 17. 등온비색 증폭기술의 모식도

- 그 결과 아래 그림과 같이 standard buffer 상에서 1×10^1 CFU/ml 농도의 리스테리아 모노사이토제네스를 비색 반응을 통해 육안으로 검출 가능한 것을 확인할 수 있었음

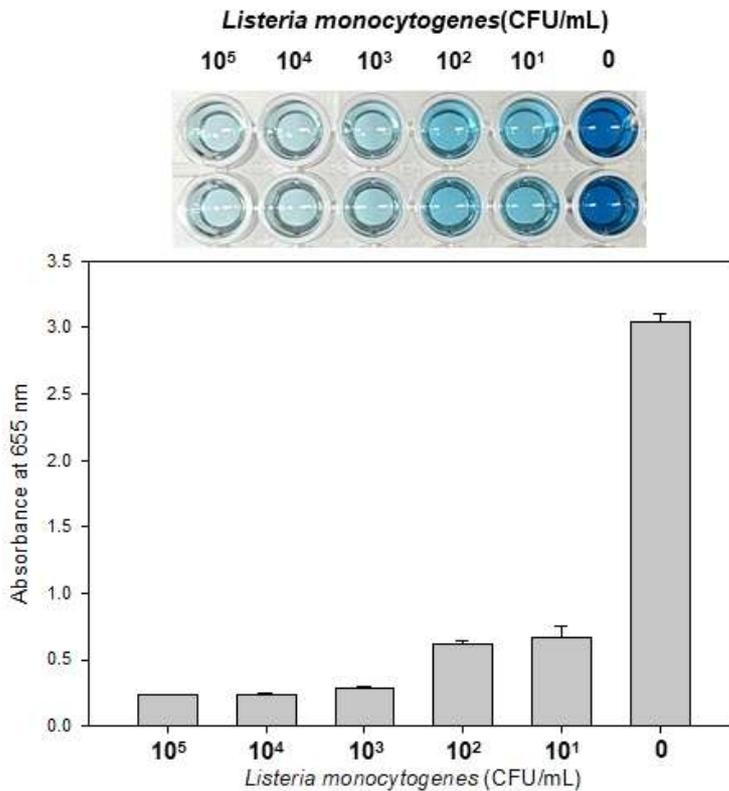


그림 18. 리스테리아 모노사이토제네스 검출용 등온비색 증폭기술의 standard buffer 상 검출한계 확인 결과

2) 등온비색 증폭기술의 특이성 평가: 다른 병원성 미생물과의 교차반응성 확인

- 본 연구에서 개발한 등온비색 증폭기술에 대한 교차반응성을 확인하기 위해 4종의 리스테리아 속(L. monocytogenes, L. innocua, L. welshimeri 및 L. ivanovii)과 5종의 기타 미생물로(Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella Typhimurium 및 Yeast) 분석법의 특이성을 확인하였음

- 모든 미생물은 10³ CFU/ml로 준비 후 앞서 설명한 방법으로 DNA를 추출하고 등온비색 증폭기술로 확인하였음

- 리스테리아 모노사이토제네스 검출용 등온비색 증폭기술에 대한 특이성을 확인하기 위해 4종의 리스테리아 속(L. monocytogenes, L. innocua, L. welshimeri 및 L. ivanovii)과 5종의 기타 미생물로(Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella Typhimurium 및 Yeast)부터 DNA를 추출하고 등온비색 증폭기술의 최적 조건을 이용하여 교차반응성을 확인하였음

- 그 결과 아래 그림과 같이 개발된 등온비색 증폭기술은 4종의 리스테리아 속과 5종의 기타 미생물 중 리스테리아 모노사이토제네스에만 낮은 발색을 띄는 양성 시료 특유의 반응 결과가 관찰되었으며, 그 밖의 다른 균에서는 모두 높은 발색을 띄는 음성 시료 특유의 발색 반응 결과가 확인되었음

- 따라서, 본 연구에서 개발한 등온비색 증폭기술이 리스테리아 모노사이토제네스에만 특이적인 것으로 판단하였음

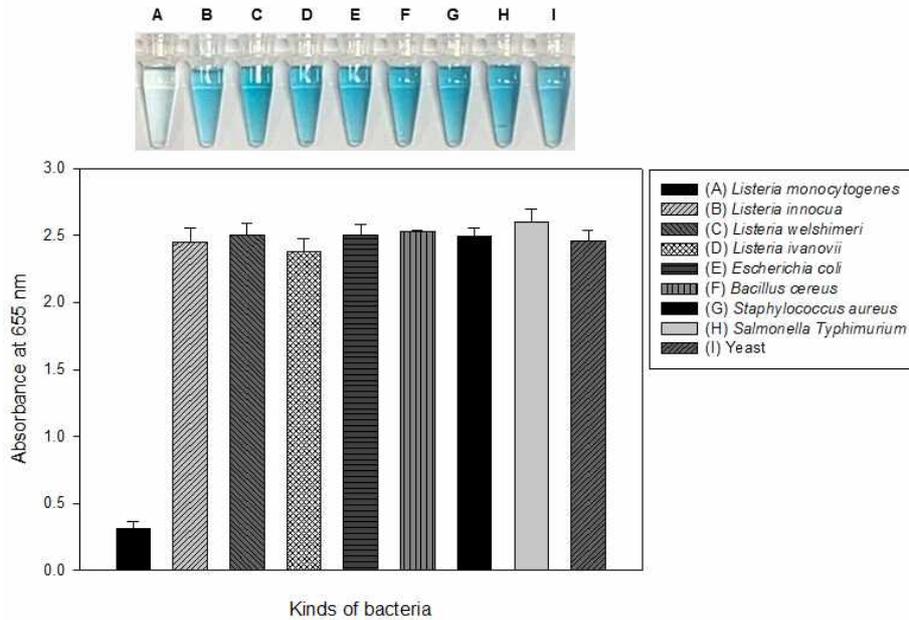


그림 19. 리스테리아 모노사이토제네스 검출용 등온비색 증폭기술의 특이성 확인 결과

3) 임의로 오염시킨 시료 분석

- 식품공전상의 시험법을 통해 리스테리아 모노사이토제네스에 대해 음성으로 확인된 냉동육(대패삼겹살)을 확보하여 리스테리아 모노사이토제네스를 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^1$ CFU/g 농도로 오염시킨 후 등온비색 증폭기술로 분석하고 임의로 오염시킨 시료에 대한 검출한계를 확인하였음

(가) 대상시료 : 냉동육 (대패삼겹살)

- 리스테리아 모노사이토제네스 검출용 등온비색 증폭기술을 이용하여 냉동육(대패삼겹살)에 임의로 리스테리아 모노사이토제네스를 오염시킨 후 그 검출한계를 확인하고자 하였음
- 실험을 위해 리스테리아 모노사이토제네스에 대해 음성으로 확인된 시료를 선별하고 리스테리아 모노사이토제네스의 최종 농도가 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ CFU/g이 되도록 균을 냉동육에 임의로 접종하였음
- 이후 225 mL의 멸균 생리식염수를 첨가한 후 해당 시료로부터 DNA를 추출하여 등온비색 증폭기술로 분석하였으며, 그 결과 아래 그림과 같이 1×10^2 CFU/g의 리스테리아 모노사이토제네스는 육안으로 충분히 검출 가능함을 확인할 수 있었음
- 이를 통해 식품 중에 오염된 리스테리아 모노사이토제네스에 대한 등온비색 증폭기술의 검출한계를 1×10^2 CFU/g로 결정하였음

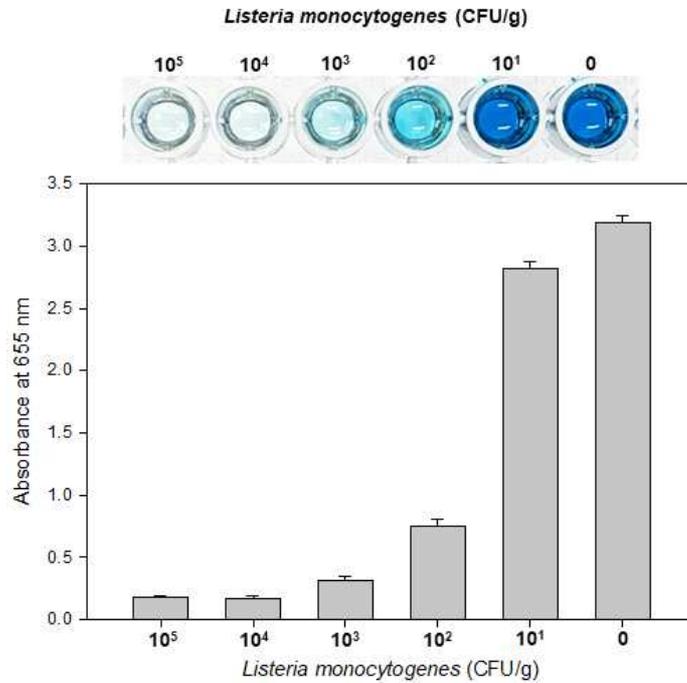


그림 20. 리스테리아 모노사이토제네스를 임의로 오염시킨 냉동육을 등온비색 증폭기술로 분석한 결과

(나) 표준분석 기술을 이용한 유효성 검증: 식품공전상의 시험법을 이용한 등온비색 증폭기술의 유효성 확인·검증

- 리스테리아 모노사이토제네스 검출용 등온비색 증폭기술에 대한 spike test를 진행하고자 먼저 냉동육(대패삼겹살)의 무게를 25g으로 칭량한 뒤 225 ml의 *Listeria* enrichment broth (LEB)를 첨가하여 균질화과정을 거친 후 35°C에서 48시간 동안 배양하였음(1차 증균)
- 배양 후 LEB 배양액 0.1 ml을 10 ml의 fraser broth에 접종하고 35°C에서 24시간 동안 배양하였음(2차 증균)
- 그 결과 fraser broth 내 색 변화가 나타나지 않아 해당 냉동육 시료를 음성으로 판단하였음
- 이후 음성으로 확인된 냉동육(대패삼겹살) 시료에 1x10²~1x10⁶ CFU/ml의 리스테리아 모노사이토제네스를 최종 농도가 1x10¹~1x10⁵ CFU/g이 되도록 임의로 접종하고, 225 ml의 멸균 생리식염수를 넣어 균질화 한 뒤 PALCAM 배지 상에 0.1 ml씩 분주하여 평판배양하였음
- 그 결과 아래 표와 같이 ±23.9 정도의 표준오차는 발생하였으나, calibration curve를 통해 확인한 결과 R²이 0.9963으로 표준시료에 거의 일치하는 결과를 보였으며, 100%의 민감도(95% CI, 78.2~100%), 특이성(95% CI, 29.24~100%) 및 정확도(95% CI, 81.47~100%)를 나타내는 것으로 확인·검증되었음

표 8. 식품공전상의 시험법을 이용한 spike test 시료의 평판배양 결과

CFU/ml or g	Spike test	
	Average	Standard deviation
10	15	7.071068
100	95	7.071068
1000	1035	21.2132
10000	10575	459.6194
100000	109500	3535.534
SLOPE	-	0.035195
INTERCEPT	-	23.99827

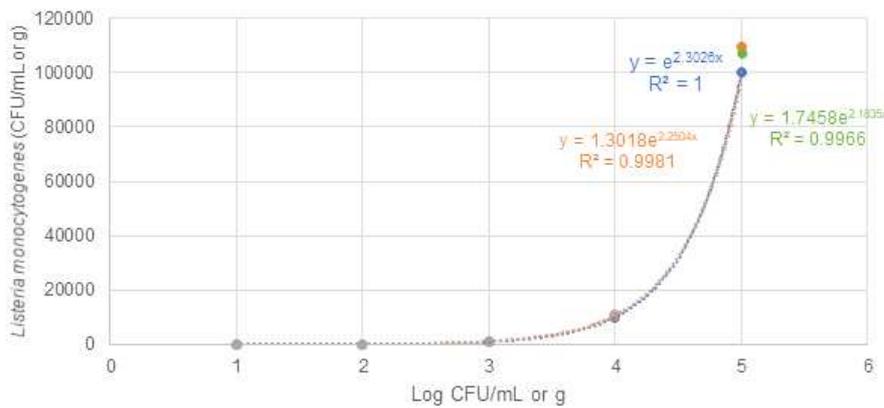


그림 21. 식품공전상의 시험법을 이용한 calibration curve 결과

(2) 시판되는 Bst DNA polymerase(중합효소)와 개발한 중합효소의 비교·평가

1) 국내외에서 시판되는 Bst DNA polymerase의 조사 및 구입

- 국내외에서 시판되고 있는 Bst DNA polymerase를 조사하고 제조사에서 기본적으로 제공하는 data sheet와 loop-mediated isothermal amplification(LAMP)에 대해 작성 및 보고된 참고문헌을 분석하였음
- 이를 바탕으로 국내 및 국외에서 가장 많이 활용되고 있는 Bst DNA polymerase 시판 kit를 각 1개씩 구입하고 비교·분석 실험에 사용하였음
- 등온비색 증폭기술의 핵심 요소인 Bst DNA Polymerase(중합효소)에 대한 비교·평가를 진행하기 위해 국내 및 국외에서 시판되고 있는 Bst DNA Polymerase kit를 아래와 같이 조사하였음
- 조사한 바에 따르면 국내의 경우 현재 Enzymomics사에서만 Bst DNA Polymerase kit를 생산, 제조 및 판매하고 있는 것으로 확인됨
- 국외의 경우 국내에 비해 상대적으로 다양한 기업에서 Bst DNA Polymerase를 생산·제조하고 있으나, 인터넷을 통해 확인 가능한 제품은 아래 표에 기재된 4개 제조사 시판 kit로, 제조사가 제공하는 data sheet 및 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 참고 문헌을 조사함으로써 최종적으로 한 가지 시판 kit를 선정하였음
- 제조사에서 기본적으로 제공하는 data sheet에 따르면 중합효소의 보관조건, 권장 반응시간 및 반응온도가 대부분 비슷한 수준으로 확인되었으며, LAMP법과 관련하여 보고된 참고문헌 중 80% 이상은 New England Biolabs (LEB)사의 시판 kit를 사용하는 것으로 확인되었기 때문에 해당 제품을 실험에 사용하는 것으로 결정하였음
- 따라서, 주관기관에서 개발한 Bst DNA Polymerase에 대한 비교·평가를 위해 NEB사의 Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase kit (Cat.no. M0538S)와 Enzymomics사의 Bst DNA Polymerase kit

(Large fragment) (Cat.no. DP006S)를 구입한 뒤 실험에 사용하였음

표 9. 국내 및 국외 시판 kit(Bst DNA Polymerase) 조사 결과

	제조사	제품명	기타
국외	New England BioLabs (NEB)	<i>Bst</i> 2.0 WarmStart DNA Polymerase (Cat.no. M0538S) 	-Polymerase농도: 8,000U/ml (1회 필요량: 320U/ml) -보관조건: -20°C -권장반응온도: 60-72°C -권장반응시간: 30-60분
	GeneON	<i>Bst</i> DNA Polymerase (Cat.no. A600) 	-Polymerase농도: 8,000U/ml (1회 필요량: 80-320U/ml) -보관조건: -20°C -권장반응온도: 60-65°C -권장반응시간: 30분 이상
	Canvax	<i>Bst</i> DNA Polymerase (Exonuclease Minus) (Cat.no. P0045) 	-Polymerase농도: 8,000U/ml (1회 필요량: 320U/ml) -보관조건: -20°C -권장반응온도: 55-65°C -권장반응시간: 30-60분
	PCR Biosystems	IsoFast™ <i>Bst</i> Polymerase (Cat.no. PB80.10-08) 	-Polymerase농도: 8,000U/ml (1회 필요량: 320U/ml) -보관조건: -15~-30°C -권장반응온도: 65°C -권장반응시간: 30-60분
국내	Enzynomics	<i>Bst</i> DNA Polymerase (Large fragment) (Cat.no. DP006S) 	-Polymerase농도: 8,000U/ml (1회 필요량: 400U/ml) -보관조건: -20°C -권장반응온도: 50-65°C -권장반응시간: 60분

2) 시판되는 *Bst* DNA polymerase와 개발한 중합효소의 효율성 비교 · 평가

(가) 유효성 평가

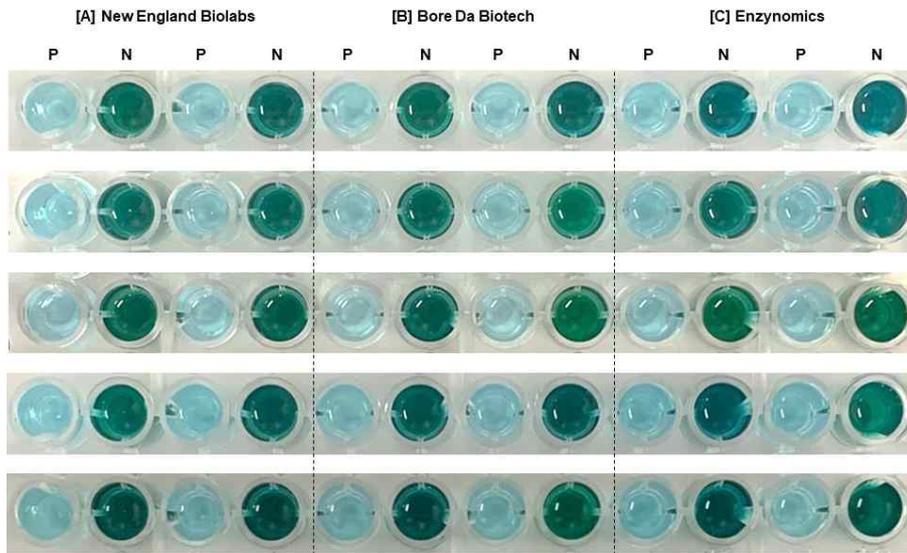
- 앞서 언급한 바와 같이 보레다바이오텍(주관기관)에서 개발한 *Bst* DNA Polymerase 와 시판 kit의 효율성을 비교 · 평가하고자 NEB와 Enzynomics사에서 시판되는 두 가지 kit를 구입하였으며, kit 중 포함된 *Bst* DNA Polymerase만을 실험에 사용하여 주관기관에서 개발한 중합효소에 대한 효율성을 검증하였음

- 실험을 위해 아래에 제시한 조성에 따라 LAMP mixture를 제조하고, 동일한 농도와 용량의 Bst DNA Polymerase를 첨가하였으며, 10회의 반복 실험을 실시하여 재현성과 유의성도 함께 고려하였음

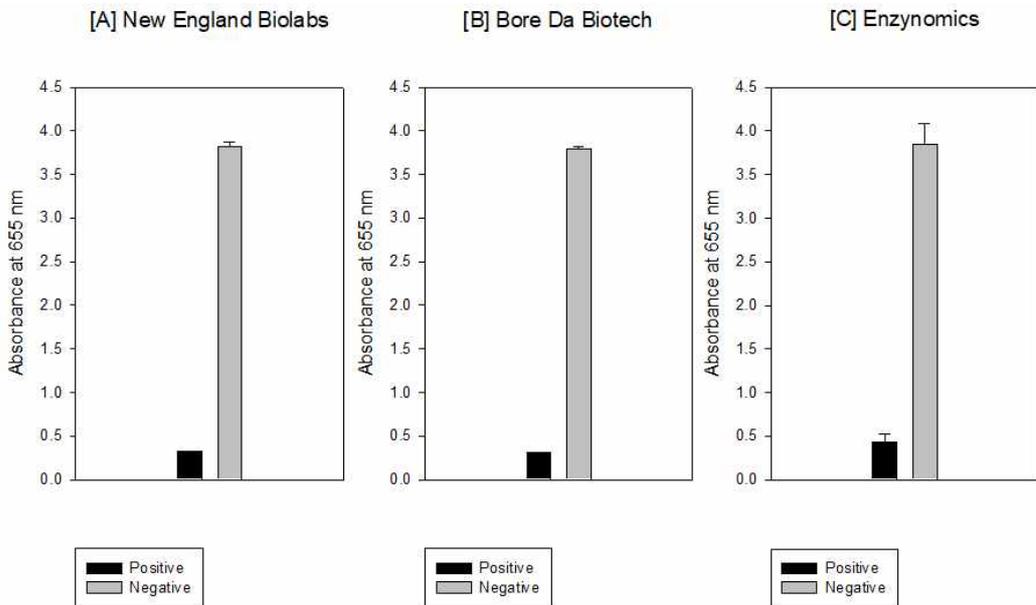
표 10. 등온비색 증폭기술을 위한 혼합액의 조성

연번	시약	최종농도 및 첨가량	반응시간 및 온도
1	Nuclease-free water	-	
2	10X Isothermal Amplification Buffer	1X	
3	MgSO ₄ (100 mM)	2 mM	
4	Primer mixture	0.13~0.52 pmol/μL	60°C, 60분
5	Molecular beacon	0.4 pmol/μL	
6	<i>Bst</i> DNA Polymerase (8,000 U/ml)	320 U/ml	
7	Genomic DNA	1 pg	

- 그 결과 아래 그림과 같이 3종의 중합효소를 사용하였을 때 육안으로 양성과 음성 시료임을 판별하는데는 문제가 없는 것으로 확인됨
- 다만 Enzyomic사 중합효소를 사용한 조건에서 기질용액 첨가 후 육안으로 실험 결과를 확인하는데까지 비교적 긴 시간이 소요되었으며 시료 간 표준편차가 가장 큰 것으로 확인되었음
- 따라서 이후 검출한계, 반응온도 및 반응시간 그리고 현장적용 효율성을 평가하는 실험에는 주관기관에서 개발한 중합효소와 NEB 사의 중합효소를 사용하여 비교·평가하였음



(A)



(B)

그림 22. 주관기관(보레다바이오텍)에서 개발한 Bst DNA Polymerase와 시판 중인 Bst DNA Polymerase의 유효성 및 재현성 확인 결과 (A) 발색 결과, (B) 흡광도 측정 결과

(나) 검출한계

- 주관기관(보레다바이오텍)에서 개발한 중합효소와 국내외에서 시판되는 중합효소를 사용하여 중합효소별 증폭효율을 비교·확인하기 위해 리스테리아 모노사이토제네스를 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^1$ CFU/ml 농도로 준비하고, 등온비색 증폭기술로 분석하였음
- 개발한 중합효소와 NEB사의 제품과의 검출한계 비교를 위해 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ CFU/ml 농도의 리스테리아 모노사이토제네스로부터 추출한 DNA를 주관기관에서 개발한 두 가지 중합효소가 각각 첨가된 mixture에 각각 넣고 증폭시킨 뒤 발색을 통해 결과를 비교·평가하였음
- 그 결과 아래 그림과 같이 두 중합효소를 사용한 조건 모두 발색을 통해 육안으로 1×10^1 CFU/ml의 리스테리아 모노사이토제네스까지 검출 가능한 것을 확인할 수 있었음

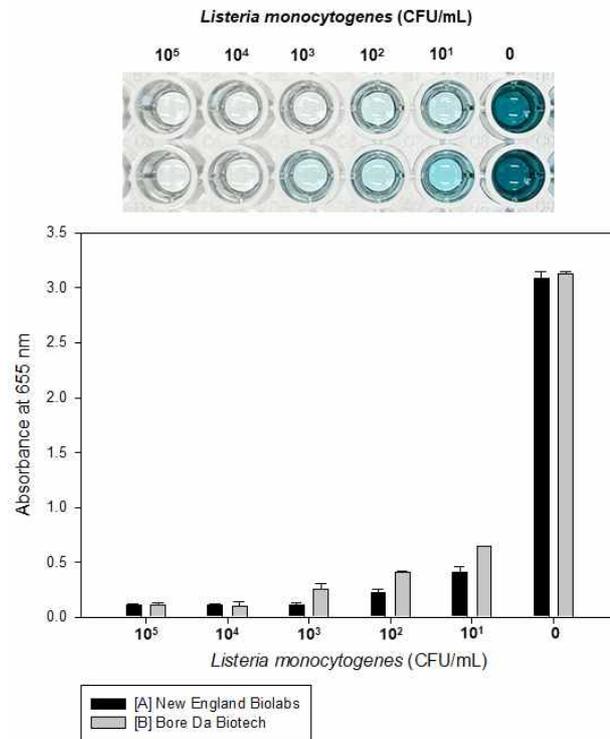


그림 23. 주관기관에서 개발한 Bst DNA Polymerase와 NEB사의 Bst DNA Polymerase를 이용한 등온비색 증폭기술의 검출한계 확인 결과

(다) 최적 반응시간

- 앞서 리스테리아 모노사이토제네스 검출용 등온비색 증폭기술의 최적 조건을 확립하는 과정에서 반응온도가 60°C 일 때 DNA 증폭 및 분자비콘의 hybridization 효율이 가장 좋은 것으로 확인되었음
- 따라서 중합효소 종류 별 반응시간을 확인하는 실험만 진행하였음
- 중합효소 반응시간은 기존에 확립된 60분을 기준으로 40분까지 10분 단위로 줄여가며 비교·평가하였음
- 분석기술의 현장성에 있어 반응시간은 아주 중요한 확인요소로, 민감도에 영향을 미치지 않으면서 검출시간을 단축시키는 것이 매우 중요함
- 앞서 검출한계 확인시 반응시간을 60분으로 설정하였을 때 1x10¹ CFU/ml의 리스테리아 모노사이토제네스를 육안으로도 충분히 검출 및 판별할 수 있음을 확인하였음
- 따라서 60분을 기준으로 시간 단축여부를 확인하고자 반응시간을 40, 50, 60분으로 설정한 뒤 등온비색 증폭기술을 실시하였음
- 그 결과 아래 그림과 같이 50분과 60분을 반응시간으로 설정한 조건에서는 1x10¹ CFU/ml의 리스테리아 모노사이토제네스를 육안으로도 검출할 수 있었으나, 보다 확실한 결과 도출을 위해 최종 반응온도는 두 중합효소 모두 최적의 반응시간을 60분으로 결정하였음

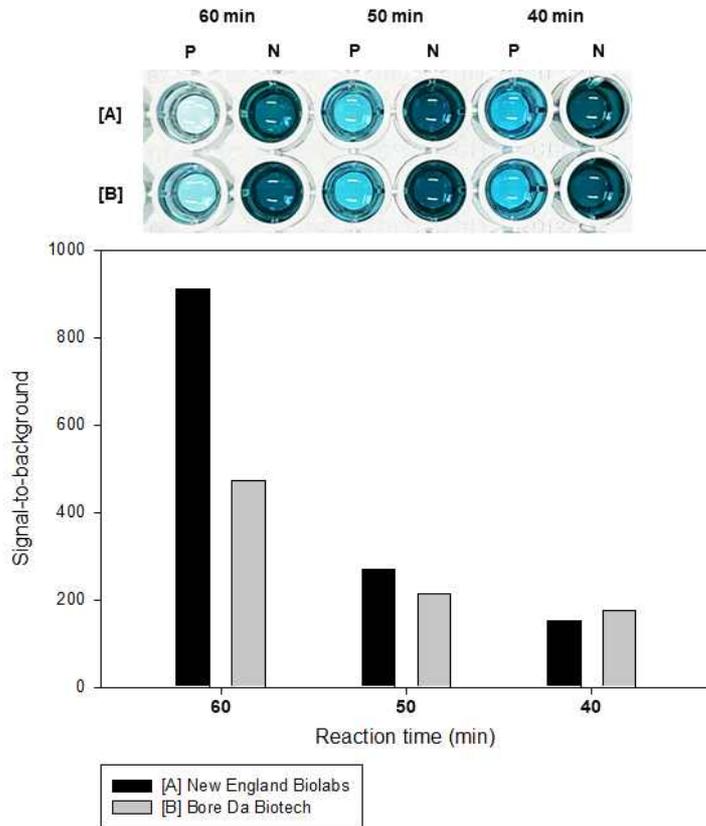


그림 24. 주관기관에서 개발한 Bst DNA Polymerase와 시판 중인 Bst DNA Polymerase를 이용한 등온비색 증폭기술의 최적 반응시간 확인 결과

(라) 현장적용 효율성

- 등온비색 증폭기술과 같은 등온증폭법의 가장 큰 특징은 한 가지 일정한 온도에서 핵산의 증폭이 가능하다는 것임
- 본 연구에서도 개발한 등온비색 증폭기술의 현장적용 가능성 및 효율성을 확인하기 위해 heating block 및 incubator를 사용하여 등온비색 증폭기술을 실시하고, 분석법의 유효성을 검증하였음
- 앞서 확립한 조건을 미루어 볼 때 두 중합효소를 등온비색 증폭기술에 적용시킨 결과가 모두 일치하는 경향을 나타내고, 핵산증폭부터 결과 확인까지 모두 하나의 tube 내에서 진행될 수 있어 개발한 분석법의 현장 적용이 충분히 가능할 것으로 판단됨
- 특히 두 중합효소를 사용한 등온비색 증폭기술 모두 항온수조나 heating block 등을 활용할 수 있는 범위 내의 반응온도로 구성되어 있으며, 실제 heating block(Allsheng, MiniT-100) 및 incubator 내 tube를 넣고 반응시킨 결과 아래 그림과 같이 육안으로도 판별할 수 있을 만큼 뚜렷한 결과가 확인됨
- 뿐만 아니라 앞서 언급한 바와 같이 등온비색 증폭기술의 경우 발색 반응을 통하여 육안으로 결과를 도출할 수 있는 장점이 있기 때문에 별도의 분석장비(전기영동장치나 이미지 분석 장치) 없이도 충분히 현장화가 가능할 것으로 사료됨

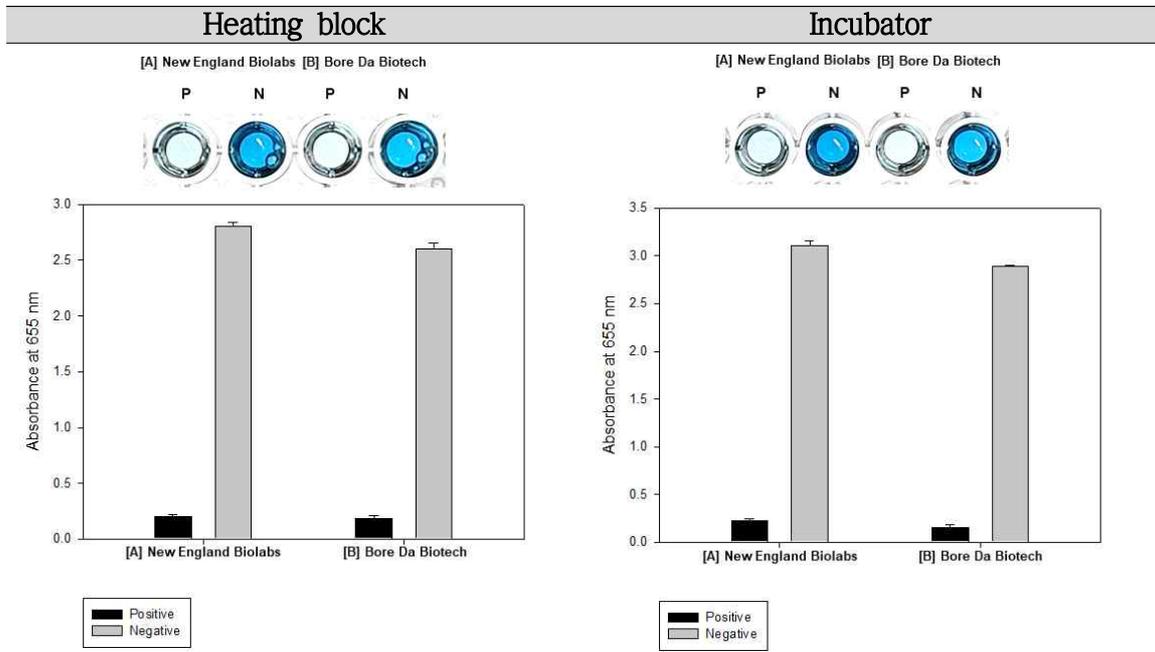


그림 25. Heating block 및 배양기를 이용한 등온비색 증폭기술의 유효성 검증 결과

(3) 기 개발된 분석법과의 비교·평가

1) 식품공전 및 기 개발된 리스테리아 모노사이토제네스 분석법과의 효율성 비교·평가

- 기 개발된 리스테리아 모노사이토제네스 검출용 시판 kit를 조사하여, 현장적용 효율성이 가장 큰 시판 kit를 선정 및 구입하였음
- 구입한 시판 kit와 등온비색 증폭기술을 사용하여 검출한계, 반응시간 및 현장적용 효율성을 비교·평가하였음
- 본 연구에서 개발하고자 하는 등온비색 증폭기술의 경우 실험실 규모 등이 갖추어지지 않은 현장에서 리스테리아 모노사이토제네스를 검출하는데 그 개발 목적이 있음
- 따라서 기 개발된 분석법 중 실제 현장에서 비전문가도 쉽게 취급 및 사용할 수 있는 분석법을 조사하였음
- Dipstick assay는 항원과 항체의 반응성을 이용한 면역진단기술 중 하나로 분석이 간편, 신속하고 현장에서 10분 이내에 실험 결과를 확인할 수 있는 장점이 있어 병원성 미생물 뿐만 아니라 다양한 질병의 진단기법으로도 널리 이용되고 있음
- 본 연구에서는 현장 검사 및 진단에 개발 목적이 있는 dipstick assay를 조사하고, 리스테리아 모노사이토제네스 검출용으로 시판되고 있는 dipstick kit 중 ROMER사의 RapidChek L. monocytogenes 50 Test kit (Cat.no. 10001435)를 구입하여 등온비색 증폭기술과 검출한계, 분석시간 및 현장적용 효율성에 대해 비교·평가하였음



RapidChek®
Listeria monocytogenes

For environmental surfaces and ready-to-eat foods



그림 23. 등온비색 증폭기술과의 비교·평가를 위해 구입한 시판 dipstick kit

(가) 검출한계

- 배양한 1×10^8 CFU/ml의 리스테리아 모노사이토제네스를 멸균 생리식염수를 이용해 $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ CFU/ml의 농도로 희석하고, Romer사의 dipstick kit로 분석하였음
- 그 결과 아래 그림과 같이 dipstick kit의 경우 1×10^4 CFU/ml의 리스테리아 모노사이토제네스만 검출 가능한 것으로 확인되었으며, 등온비색 증폭기술의 경우 앞서 언급한 바와 같이 1×10^1 CFU/ml의 리스테리아 모노사이토제네스도 육안으로 분석 가능한 것으로 확인됨

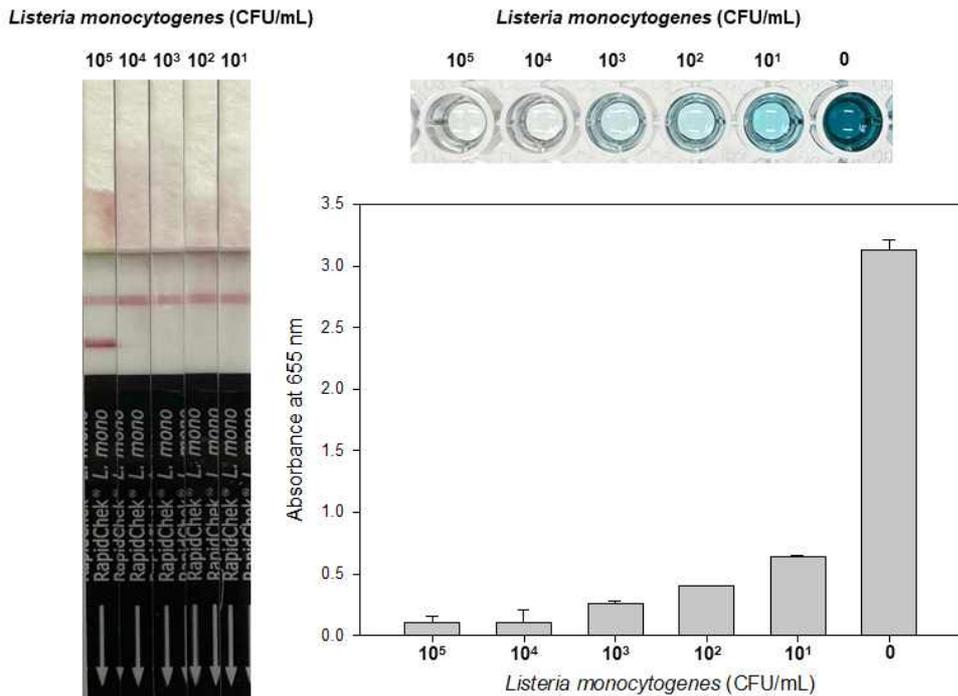


그림 26. 등온비색 증폭기술과 시판 dipstick kit의 검출한계 비교·평가

(나) 분석시간

- Dipstick assay의 경우 시료를 분주하여 결과를 확인하는데 까지 약 10분 정도의 짧은 시간이 소요되는 반면, 등온비색 증폭기술의 경우 약 55분의 비교적 긴 시간이 소요됨
- 다만, dipstick assay의 경우 앞서 언급한 바와 같이 검출한계가 1×10^4 CFU/ml로 낮은 수준이며, 특히 Romer사가 제시하는 매뉴얼에 따르면 분석 전 배양 단계를 통해 균을 농축시킬 것을 권장하

고 있어 1×10^1 CFU/ml 수준의 리스테리아 모노사이토제네스를 검출하기 위해서는 최대 44-48시간이 요구됨

- 반면 등온비색 증폭기술의 경우 별도의 증균 단계를 거치지 않아도 1×10^1 CFU/ml 수준의 리스테리아 모노사이토제네스를 충분히 검출 가능하기 때문에, 식품 및 환경시료를 대상으로한 시료 분석에 검출에 있어 등온비색 증폭기술을 적용한다면 현장에서 신속하게 위해요소에 대한 진단이 가능할 것으로 판단됨

표 11. 등온비색 증폭기술과 시판 dipstick kit와의 분석시간 비교 · 평가

연번	등온비색 증폭기술		연번	시판 kit (Dipstick kit)	
	단계	소요시간		단계	소요시간
1	DNA 추출	15분	1	균 배양	40-44시간
2	증폭	60분	2	결과확인	5분
3	결과확인	5분			
최대 소요시간		1시간 20분	최대 소요시간		44시간 5분

(다) 현장적용 효율성

- 현장 적용 효율성을 판단하기 위해서는 실험에 필요한 장치의 소형화가 가능하거나 특별한 장치 없이도 분석이 가능하여야 함
- 이러한 측면에서 dipstick kit는 현장 적용 효율성이 아주 우수하다고 볼 수 있음
- 하지만 검출한계를 높이기 위한 수단으로 반드시 전배양 단계를 거쳐야 하기 때문에 해당 단계에서 필요로하는 장치(incubator, cleanbench 등)를 갖출 수 있는 실험실이나 유사공간이 필요할 것으로 판단됨
- 반면 등온비색 증폭기술의 경우 아래 표와 같이 dipstick kit에 비해 분석단계가 복잡하지만 별도의 배양 단계가 필요로 하지 않으며, 휴대형 heating block이나 소형화된 기계로도 분석이 가능하기 때문에 훨씬 더 현장 적용이 용이한 장점이 있음

표 12. 등온비색 증폭기술과 시판 dipstick kit와의 현장적용 효율성 비교 · 평가

연번	등온비색 증폭기술		연번	시판 kit (Dipstick kit)	
	단계	필요장비		단계	필요장비
1	DNA 추출	Heating block	1	균 배양	Incubator
2	증폭	-	2	결과확인	
3	결과확인	-			
필요장비		최소 1개 이상	필요장비		최소 1개 이상

3-2. *L. monocytogenes* 검출 키트 성능평가 및 시료적용 시험

[위탁연구기관 : 숙명여자대학교 윤요한]

(1) 개발된 검출 키트의 성능 확인

1) *L. monocytogenes* 민감도 확인

- 농도별로 *L. monocytogenes* 균액의 DNA를 추출하여 개발된 LAMP PCR 검출 키트의 검출한계를 확인함.
- 개발된 키트의 검출 결과를 확인한 후, 실험 결과 및 검출 키트 성능 보완을 위한 의견을 주관연구기관에 전달함.

(가) 균액준비

- *L. monocytogenes* ATCC13932, ATCC51774, ATCC BAA-839의 단일접락을 10 mL의 tryptic soy broth + 0.6% yeast extract (TSBYE)에 접종하여 30°C 에서 24시간 배양한 뒤 새로운 10 mL의 TSBYE에 0.1 mL 접종하여 30°C 에서 24시간 배양하였음.
- 배양액을 혼합(30 mL)하여 현탁하고, 9 mL의 phosphate buffered saline (PBS)로 십진희석하여 로그 수 별 균액을 준비하여 균액민감도 실험에 이용하였음.
- 희석한 균액은 Palcam agar에 평판도말한 뒤, 30°C 에서 48시간 동안 배양하여 균수를 계산하였음.

(나) DNA 추출

균이 포함된 액체를 원심분리(1,912 ×g, 15분, 4°C)하고 상층액을 제거한 뒤 1 mL의 lysis buffer를 가하여 균체를 현탁시킨 후 상온에서 30분간 처리함.

Column에 ①의 용액을 넣고 원심분리(8,000 ×g, 1분, 4°C)하고 flow-through를 버림.

Column에 0.6 mL의 washing buffer를 가하여 원심분리(8,000×g, 1분, 4°C)하고 flow-through를 버림.

Column에 0.6 mL의 washing buffer를 가하여 원심분리(8,000×g, 1분, 4°C)하고 flow-through를 버림.

빈 column으로 원심분리 (8,000 ×g, 1분, 4°C)하고 flow-through를 버림.

새로운 microcentrifuge tube에 column을 끼워 넣고 0.05 mL의 elution buffer를 가하여 원심분리 (8,000 ×g, 1분, 4°C)를 통해 DNA를 추출함.

(다) 키트의 검출 성능 확인

- PCR tube에 LAMP 2× master mix (12.5 μL), LAMP 10× primer mix (2.5 μL), Bst DNA polymerase (1 μL), sample DNA (3 μL), positive control (1 μL)를 넣고, nuclease-free H₂O로 총량을 25 μL로 맞춘 후 현탁함.
- 모든 구성물을 잘 섞어준 tube를 LAMP 반응을 위해 60°C 에서 60분간 반응시킨 후 95°C 에서 5분간 반응시킴.
- 증폭산물에 hybridization probe (1 μL)을 넣고 95°C 에서 5분간 반응시킨 후 55°C 에서 10분간 반응하여 hybridization을 실시함.
- Hybridization까지 완료된 증폭산물을 test buffer로 10배 희석한 후 100 μL 취하여 test kit에 점적하여 10분 뒤 반응을 확인함.

2) DNA 추출방법에 따른 검출 키트 성능 확인

(가) 균액준비 및 DNA 추출

1)-㉔에 명시한 방법과 동일한 방법으로 균액을 준비한 후 본 키트의 추출 방법과 boiling method,

I사의 DNA 추출 키트, Q사의 DNA 추출 키트를 이용하여 DNA를 추출하고 개발된 검출 키트의 성능 확인에 이용하였음(표 13).

표 13. DNA 추출방법

추출 방법	추출 방법
Boiling method	<ol style="list-style-type: none"> ① 배양된 균액 1 mL을 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 15분) 후 상층액 제거 ② 0.25% SDS, 0.05N NaOH와 멸균증류수 혼합액 50 µL으로 pellet을 현탁 ③ 멸균증류수 100 µL를 첨가 ④ 99°C에서 15분 가열 후 실온에서 식힌 후 이를 DNA로 이용
I사 DNA 추출 키트	<ol style="list-style-type: none"> ① 배양된 균액 1 mL을 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 1분) 후 상층액 제거 ② Pre-buffer 50 µL과 lysozyme solution 3 µL를 넣고 균질화 ③ 37°C에서 15분 가열 후 G-buffer 250 µL를 넣고 균질화 ④ 65°C에서 15분 가열 후 binding buffer 250 µL를 넣고 균질화 ⑤ Column에 ④의 용액을 넣고 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 1분) 후 flow-through 제거 ⑥ Washing buffer A 500 µL를 넣고 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 1분) 후 flow-through 제거 ⑦ Washing buffer B 500 µL를 넣고 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 1분) 후 flow-through 제거 ⑧ 새로운 microcentrifuge tube에 column을 끼워 넣고 elution buffer 200 µL를 가하여 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 1분), 이를 DNA로 이용
Q사 DNA 추출 키트	<ol style="list-style-type: none"> ① 배양된 균액 1 mL을 원심분리(7,500 rpm, 4°C, 10분) 후 상층액 제거 ② Enzymatic lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5) + 2 mM EDTA + 1.2% Triton X-100 + lysozyme 20 mg/mL) 180 µL로 pellet을 현탁 ③ 37°C에서 30분 이상 가열 후 proteinase K 25 µL와 buffer AL 200 µL를 넣고 균질화 ④ 56°C에서 30분 가열 후 ethanol(96-100%) 200 µL를 넣고 균질화 ⑤ DNeasy mini spin column에 ④의 용액을 넣고 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 1분) 후 flow-through 제거 ⑥ DNeasy mini spin column에 AW1 500 µL를 넣고 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 1분) 후 flow-through 제거 ⑦ DNeasy mini spin column에 AW2 500 µL를 넣고 원심분리(14,000 rpm, 4°C, 3분) 후 flow-through 제거 ⑧ 새로운 microcentrifuge tube에 column을 끼워 넣고 buffer AE 200 µL를 column memberane에 직접 가하여 실온에서 1분간 incubation한 후, 원심분리(8,000 rpm, 4°C, 1분), 이를 DNA로 이용

㉔ 키트의 검출성능 확인

- PCR tube에 LAMP 2× master mix (12.5 µL), LAMP 10× primer mix (2.5 µL), Bst DNA polymerase (1 µL), sample DNA (3 µL), positive control (1 µL)를 넣고, nuclease-free H₂O로 총량을 25 µL로 맞춘 후 현탁함.

- 모든 구성물을 잘 섞어준 tube를 LAMP 반응을 위해 60°C 에서 60분간 반응시킨 후 95°C 에서 5분간 반응시킴.

완료된 증폭산물을 test buffer로 10배 희석한 후 100 μL 취하여 test kit에 점적하여 10분 뒤 반응을 확인함.

(2) 문제점을 보완한 *L. monocytogenes* 검출 키트 검증

1) 배양액 내 *L. monocytogenes*에 대한 민감도

- 농도별로 *L. monocytogenes* 균액의 DNA를 추출하여 개발된 LAMP PCR 검출 키트의 검출한계를 확인함.

- 균액준비 및 DNA 추출은 (1)에 명시한 방법과 동일하며, 문제점을 보완한 검출 키트를 이용하여 민감도 분석을 수행함.

2) 식품 내 *L. monocytogenes*에 대한 민감도

- 식품에 농도별로 *L. monocytogenes*를 접종하여 DNA를 추출하고 개발된 LAMP PCR 검출 키트의 검출한계를 확인함.

㉠ 균액준비

상기 (1)-1)-(가)에 명시한 방법과 동일하게 준비하였음.

㉡ 시료준비 및 접종

*L. monocytogenes*의 검출률이 높은 식품(팽이버섯, 냉동돼지고기(안심))을 10 g씩 무균적으로 소분하였음.

시료 표면에 로그별 *L. monocytogenes* 균액을 0.1 mL씩 접종하여 30번 문지른 뒤 15분 동안 상온(25°C)에서 부착시킴.

㉢ DNA 추출 및 민감도 분석

0.1% buffered peptone water(BPW) 20 mL을 시료에 가하고, 균질화시킨 후 (1)-1)-(나)에 명시된 방법으로 DNA를 추출함.

Palcam agar에 평판도말한 뒤, 30°C 에서 48시간 동안 배양하여 접종 후 균수를 계산하였음. 민감도 분석은 (1)-1)-(다)에 명시한 방법과 동일함.

3) *L. monocytogenes*에 대한 특이성 확인

- 다른 식중독 세균(*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*)과의 교차 반응성을 확인함.

㉠ 균액준비

- *S. aureus* ATCC19095, *Salmonella* NCCP12231, NCCP12236, NCCP12243, NCCP14544, NCCP10140, *E. coli* NCCP14037, NCCP14038, NCCP14039, NCCP15661, NCCP11142의 단일집락을 10 mL의 tryptic soy broth (TSB)에 접종하여 37°C 에서 24시간 배양한 뒤 새로운 10 mL의 TSB에 0.1 mL 접종하여 37°C 에서 24시간 배양하였음.

- *B. cereus* KCTC1013, KCTC1094, KCTC3624의 단일집락은 10 mL의 TSB에 접종하여 30°C 에서 24시간 배양한 뒤 새로운 10 mL의 TSB에 접종하여 30°C 에서 24시간 배양하였음.

배양액을 세균 종류에 따라 혼합하여 현탁하고, DNA를 추출하여 개발된 검출 키트의 특이성 확인에 이용하였음.

희석한 균액은 각 선택배지에 평판도말한 뒤, 배양하여 균수를 계산하였음.

㉡ DNA 추출 및 검출 키트의 성능 확인

DNA 추출은 (1)-1)-(나)에 명시한 방법과 동일하며, 주관연구기관에서 전달받은 검출 키트를 이용하여 *L. monocytogenes*에 대한 특이성 분석을 수행함.

(3) 식품에 있는 *L. monocytogenes*에 대한 검출 키트 성능 평가

1) 식품공전 검출법과 개발된 *L. monocytogenes* 검출 키트 비교

㉠ 균액준비

상기 (1)-1)-(가)에 명시한 방법과 동일하게 준비하였음.

㉡ 시료준비 및 접종

*L. monocytogenes*의 검출률이 높은 식품(팽이버섯, 냉동돼지고기(안심))을 10 g씩 무균적으로 소분하여 멸균샘플백에 담은 뒤 시료 표면에 *L. monocytogenes* 균액을 0.1 mL씩 접종(target concentration: 2-3 log CFU/g)하여 30회 문지른 뒤 15분 동안 상온에서 부착시킴.

㉢ 식품공전 검출법

1차 증균은 시료와 LEB 증균배지가 1:9가 되도록 LEB 배지를 시료에 가하고 균질화시킨 후 30°C에서 24시간 동안 배양하였음.

2차 증균은 Fraser broth 9 mL에 1차 증균배양액을 1 mL씩 분주하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였음.

2차 증균 후, 멸균된 백금이를 이용하여 증균배양액을 선택배지인 LM chrom agar에 streaking 하여 37°C에서 24시간 배양하였음.

LM chrom agar 상 파란색에 흰색 환을 가진 의심집락을 PCR과 전기영동을 통해 확인함.

PCR에 사용한 primer 및 수행 조건은 아래와 같음.

표 14. *Listeria monocytogenes* 검출을 위한 PCR primer 정보

Primers	Sequence (5' to 3')	Target gene	Size (position) of amplified product*	References
ILMPRFAF	CAATGGGATCCACAAGAATA	<i>prfA</i>	186	Klein and Juneja, 1997
ILMPRFAR	AGCCTGCTCGCTAATGACTT			

*Sizes are in base pairs; positions are in nucleotides.

표 15. *Listeria monocytogenes* 검출을 위한 PCR 수행 조건

구분	온도	시간	cycle 수
Initial denaturation	94°C	4분	1
Denaturation	94°C	30초	40
Annealing	60°C	45초	
Extension	72°C	1분	
Final extension	72°C	5분	1

㉣ 검출 키트의 검출법

㉠의 시료 무게의 9배 분량의 개량된 LEB (LEB + 0.1% pyruvate + 0.1% ferric citrate)를 첨가하고 균질화시킨 후 30°C에서 12시간 동안 배양하였음.

12시간 후, (1)-1)-(나)에 명시한 방법으로 증균배양액에서 추출된 DNA를 (1)-2)-(다)에 명시한 방법으로 식품에 있는 *L. monocytogenes*에 대한 검출 성능을 비교하였음.

2) 상용화된 진단키트와 개발된 키트의 *L. monocytogenes* 검출 성능 비교

*L. monocytogenes*의 검출률이 높은 식품(팽이버섯, 냉동돼지고기(안심))에 임의로 *L. monocytogenes*를 오염시킨 후 시료 무게의 9배 분량의 개량된 LEB (LEB + 0.1% pyruvate + 0.1% ferric citrate)를 첨가하고 균질화시킨 후 30°C에서 12시간 동안 배양하였음.

12시간 후 (1)-1)-(나)에 명시한 방법으로 증균배양액에서 DNA를 추출하였음.

추출된 DNA는 개발된 검출 키트를 사용하여 (1)-2)-(다)의 방법으로 LAMP PCR에 이용되었음.

상용화된 진단키트는 B사의 LAMP PCR kit와 L사의 master mix를 사용하였음.

Primer는 본 연구에서 사용하는 것을 이용하였으며, 각 키트에 대한 PCR 수행 조건은 아래와 같음(표 16, 17, 18).

표 16. *Listeria monocytogenes* 검출용 LAMP PCR primer 정보

Primers	Sequence (5' to 3')
F3	TTG CGC AAC AAA CTG AAG C
B3	GCT TTT ACG AGA GCA CCT GG
FIP	CGT GTT TCT TTT CGA TTG GCG TCT TTT TTT CAT CCA TGG CAC CAC C
BIP	CCA CGG AGA TGC AGT GAC AAA TGT TTT GGA TTT CTT CTT TTT CTC CAC AAC
LF	TAG GAC TTG CAG GCG GAG ATG
LB	GCC AAG AAA AGG TTA CAA AGA TGG

표 17. B사 LAMP PCR kit의 PCR 수행 조건

구분	온도	시간	cycle 수
Amplification	60°C	30분	1
Melt	Start : 50°C End : 99°C		1

표 18. L사 master mix의 PCR 수행 조건

구분	온도	시간	cycle 수
Preheat	90°C	5분	1
Amplification	70°C	45분	1
Hold	4°C	∞	1

3) 전처리방법 성능평가 및 표준화

- 선행연구에서 확립한 전처리방법의 재현성을 확인하기 위해 *L. monocytogenes*의 검출률이 높은 식품(팽이버섯, 냉동돼지고기(안심))에 임의로 *L. monocytogenes*를 오염시킨 후 12시간 증균하여 증균배지(LEB + 0.1% pyruvate + 0.1% ferric citrate)의 증균 효율을 확인하였음.

Lysis buffer로 DNA를 추출하고 Take 3 (BioTeck Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 DNA의 순도와 수율을 측정하였음.

■ 성능 시험 결과

(1) 개발된 키트의 검출 성능



그림 27. 검출 키트 구성품 (주관기관 시제품)

1) *L. monocytogenes*의 민감도

개발된 검출 키트는 대조선 (C)과 검사선 (T)이 모두 나타나는 경우 *L. monocytogenes* 양성으로 판정함.

실험 결과, 모든 시료에서 연한 검사선이 확인되었으나 육안상 positive control (PC)과 negative control (NC)에서 차이를 확인할 수 없었음(표 19).

따라서, 실험 결과 및 검출 키트 보안을 위한 의견을 주관연구기관에 전달함.

표 19. 개발된 검출 키트의 *Listeria monocytogenes*에 대한 민감도

Sample	순도 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	수율 (ng/μL)	검출 키트 결과	
PC	-	-	+*	
NC	-	-	+	
8.6 log	1.90	8.73	+	
7.6 log	1.80	7.70	+	
6.4 log	1.91	7.21	+	
5.6 log	2.08	4.20	+	
4.7 log	2.09	3.53	+	
3.6 log	1.82	4.61	+	
2.5 log	2.08	3.70	+	
2.4 log	1.93	4.07	+	

* +; positive, -; negative

2) DNA 추출방법에 따른 검출 키트 성능

- Positive control, boiling method, I사 DNA 추출 키트, Q사 DNA 추출 키트 및 본 연구의 DNA 추출 키트로 추출한 *L. monocytogenes* DNA 모두 양성으로 확인되었음.

따라서, 본 검출 키트를 *L. monocytogenes* 검출에 이용할 수 있다고 판단하여 보완된 검출 키트를 성능 확인 실험에 이용하였음.

표 20. DNA 추출방법에 따른 키트의 검출 성능

Sample	순도 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	수율 (ng/μL)		검출 키트 결과
PC	-	-	+*	
NC	-	-	-	
Boiling method	2.16	260.24	+	
I사 DNA 추출 키트	1.94	5.6	+	
Q사 DNA 추출 키트	1.95	53.90	+	
본 연구 DNA 추출 키트 (Lysis buffer)	2.41	11.65	+	

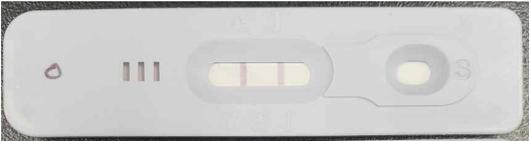
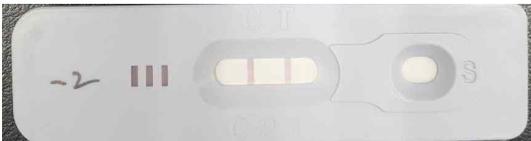
* +; positive, -; negative

(2) 문제점을 보완한 *L. monocytogenes* 검출 키트 검증

1) 배양액 내 *L. monocytogenes*에 대한 민감도

- 문제점이 보완된 *L. monocytogenes* 검출 키트는 *L. monocytogenes*를 1.4 log CFU/mL까지 검출 가능한 것으로 확인되었음.

표 21. 보완된 검출 키트의 *L. monocytogenes* 검출에 대한 민감도

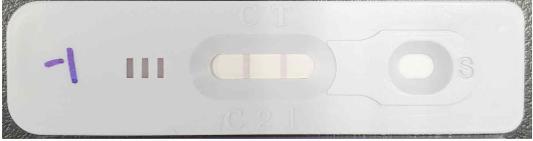
균 수 (log CFU/mL)	순도 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	수율 (ng/μL)		검출 키트 결과
8.4	1.94	12.80	+*	
7.5	1.79	5.25	+	
6.6	1.50	5.47	+	
5.3	2.05	3.73	+	
4.6	1.74	4.68	+	
3.4	2.07	5.68	+	
2.4	1.62	4.39	+	
1.4	1.94	3.33	+	

* +; positive, -; negative

2) 식품 내 *L. monocytogenes*에 대한 민감도

- 문제점이 보완된 *L. monocytogenes* 검출 키트는 팽이버섯 중 *L. monocytogenes*를 2.3 log CFU/g, 냉동돼지고기(안심) 중 *L. monocytogenes*를 1.7 log CFU/g까지 검출 가능한 것으로 확인되었음(표 22).

표 22. 식품 내 *L. monocytogenes*에 대한 보완된 검출 키트의 민감도

식품	균 수 (log CFU/g)	순도 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	수율 (ng/μL)	검출 키트 결과
팽이버섯	7.0	1.75	5.50	+* 
	5.9	1.58	4.36	+ 
	4.6	2.16	4.35	+ 
	3.5	1.75	4.69	+ 
	2.9	2.12	5.79	+ 
	2.3	1.77	3.69	+ 
냉동 돼지고기 (안심)	6.7	1.88	6.19	+ 
	5.5	2.74	1.59	+ 
	4.7	2.83	2.46	+ 
	3.7	2.33	3.01	+ 

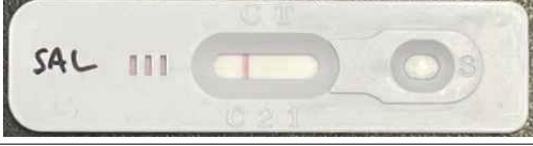
	2.6	1.67	2.94	+	
	1.7	1.77	2.98	+	

* +; positive, -; negative

3) *L. monocytogenes*에 대한 특이성

- 보완된 검출 키트는 *L. monocytogenes*을 제외한 4종의 미생물(*S. aureus*, *B. cereus*, *Salmonella*, *E. coli*)에는 반응하지 않았으므로 *L. monocytogenes*에 대해 특이적으로 검출이 가능하였음(표 23).

표 23. 보완된 검출 키트의 *L. monocytogenes*에 대한 특이성

미생물	순도 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	수율 (ng/μL)		검출 키트 결과
<i>L. monocytogenes</i>	1.82	16.40	+*	
<i>S. aureus</i>	1.89	17.77	-	
<i>B. cereus</i>	2.09	6.94	-	
<i>Salmonella</i>	2.05	11.16	-	
<i>E. coli</i>	1.83	21.26	-	

* +; positive, -; negative

(3) 식품에 있는 *L. monocytogenes*에 대한 검출 키트 성능 평가

1) 식품공전 검출법과 개발된 검출 키트의 비교

- *L. monocytogenes*를 임의로 오염시킨 식품(냉동 돼지고기, 팽이버섯)을 LEB로 1차 증균하고, 1차 증균배양액을 Fraser broth에 2차 증균한 결과 Fraser broth가 검은색으로 변하였음.

2차 증균 배양액을 LM chrom에 희석도말하여 푸른색 집락에 하얀 환이 뜬 집락을 대상으로 확인 시험을 진행한 결과 모든 시료에서 양성반응을 보였음.

표 24. 식품공전 검출법을 이용한 식품 내 *L. monocytogenes* 검출 결과

시료	초기 균 수 (log CFU/g)	시험 결과	
		2차 증균	확인시험
냉동 돼지고기 (안심)	<1.0 ¹⁾	+ ²⁾	+
	1.6±0.4	+	+
	2.4±0.2	+	+
빵이버섯	2.3±0.1	+	+
	2.5±0.1	+	+
	2.8±0.1	+	+

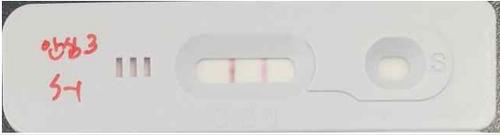
¹⁾ Detection limit

²⁾ +; positive, -; negative

- 본 연구에서 개발된 검출 키트를 이용하여 *L. monocytogenes* 검출을 실시한 결과, 마찬가지로 모든 시료에서 양성반응을 보였음(표 25).

따라서, 식품 중의 *L. monocytogenes* 검출에 개발된 검출 키트를 이용하기에 적합하며 식품공전 검출법보다 *L. monocytogenes* 양성 판정을 위한 시간이 단축되는 것을 확인하였음.

표 25. 개발된 검출 키트를 사용한 식품 내 *L. monocytogenes* 검출 결과

시료	초기 균 수 (log CFU/g)		검출 키트 결과
냉동돼지고기 (안심)	<1.0 ¹⁾	+ ²⁾	
			
	1.3 ± 0.4	+	
			
	2.0 ± 0.0	+	
			
팽이버섯	2.1 ± 0.1	+	
			
	2.7 ± 0.1	+	
			
	2.8 ± 0.2	+	
			

¹⁾ Detection limit; ²⁾ +; positive, -; negative

2) 상용화된 진단키트와 개발된 키트의 *L. monocytogenes* 검출 성능 비교

- B사의 LAMP PCR kit, L사의 master mix를 이용하여 진단한 결과, 모든 시료에서 양성반응을 보였음(표 26, 그림28, 29).

본 연구에서 개발된 검출 키트를 이용하여 *L. monocytogenes* 검출을 실시한 결과, 마찬가지로 모든 시료에서 양성반응을 보였음(표 26).

따라서, 상용화된 진단키트와 개발된 검출 키트의 검출 성능이 유사하였음.

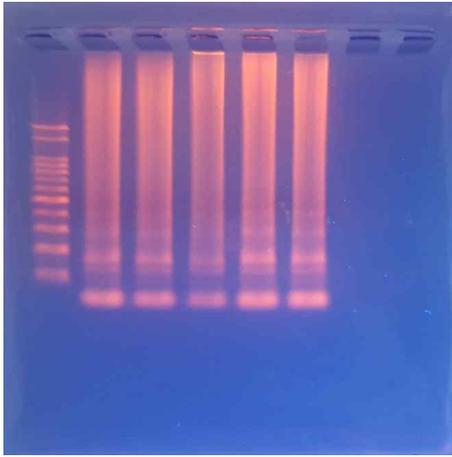
표 26. 상용화된 진단키트와 *L. monocytogenes* 검출 성능 비교

시료	세균 수 (log CFU/g)		B사	L사	개발된 검출 키트
	0 h	12 h			
냉동돼지고기 (안심)	< 1.0 ¹⁾	4.1±0.5	+ ²⁾	+	+
	1.3.±0.4	4.8±0.3	+	+	+
	2.0±0.0	5.4±0.0	+	+	+
팽이버섯	2.1±0.1	4.9±0.0	+	+	+
	2.7±0.1	5.5±0.1	+	+	+
	2.8±0.2	6.1±0.2	+	+	+

¹⁾ Detection limit

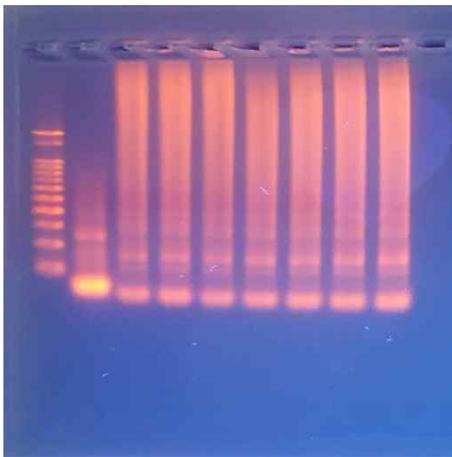
²⁾ +; positive, -; negative

(A)



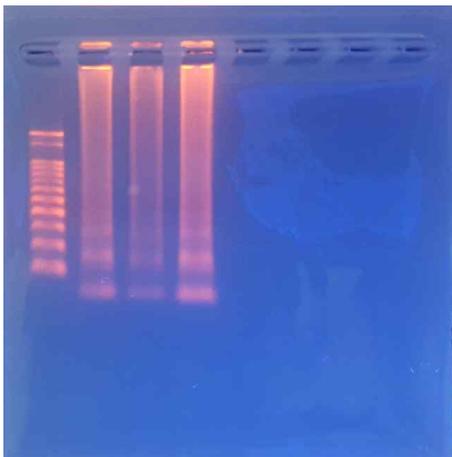
Lane 1: 100bp ladder;
Lane 2: Positive control*
Lane 3: 안심 증균 R1 s-1
Lane 4: 안심 증균 R1 s-2
Lane 5: 안심 증균 R2 s-1
Lane 6: 안심 증균 R2 s-2

(B)



Lane 1: 100bp ladder;
Lane 2: Negative control
Lane 3: Positive control
Lane 4: 안심 증균 R3 s-1
Lane 5: 안심 증균 R3 s-2
Lane 6: 팽이버섯 증균 R1 s-1
Lane 7: 팽이버섯 증균 R1 s-2
Lane 8: 팽이버섯 증균 R2 s-1
Lane 9: 팽이버섯 증균 R2 s-2

(C)

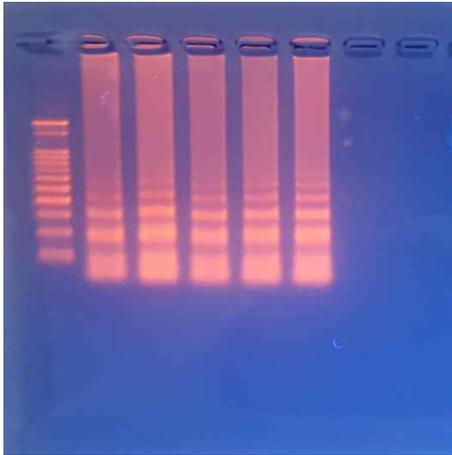


Lane 1: 100bp ladder;
Lane 2: Positive control
Lane 3: 팽이버섯 증균 R3 s-1
Lane 4: 팽이버섯 증균 R3 s-2

* DNeasy Blood & Tissue Kits 추출 *L. monocytogenes* DNA

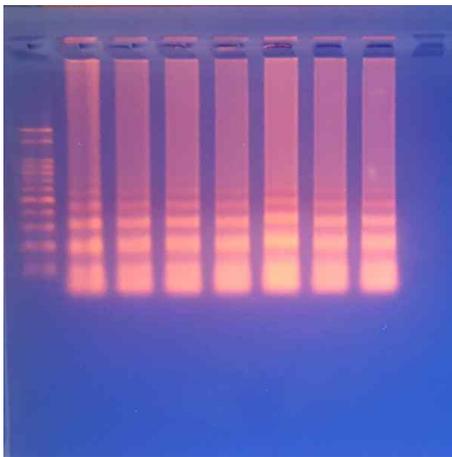
그림 28. B사 LAMP PCR kit의 전기영동 결과

(A)



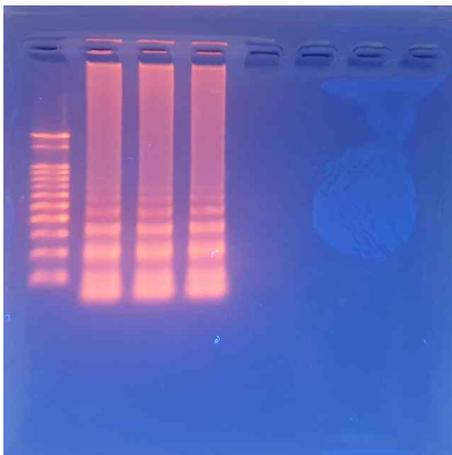
Lane 1: 100bp ladder;
Lane 2: Positive control*
Lane 3: 안심 증균 R1 s-1
Lane 4: 안심 증균 R1 s-2
Lane 5: 안심 증균 R2 s-1
Lane 6: 안심 증균 R2 s-2

(B)



Lane 1: 100bp ladder;
Lane 2: Positive control
Lane 3: 안심 증균 R3 s-1
Lane 4: 안심 증균 R3 s-2
Lane 5: 팽이버섯 증균 R1 s-1
Lane 6: 팽이버섯 증균 R1 s-2
Lane 7: 팽이버섯 증균 R2 s-1
Lane 8: 팽이버섯 증균 R2 s-2

(C)



Lane 1: 100bp ladder;
Lane 2: Positive control
Lane 3: 팽이버섯 증균 R3 s-1
Lane 4: 팽이버섯 증균 R3 s-2

* DNeasy Blood & Tissue Kits 추출 *L. monocytogenes* DNA

그림 29. L사 master mix의 전기영동 결과

3) 전처리방법의 표준화

- 선행연구를 통해 확립한 전처리방법의 재현성을 확인하기 위하여, 개량된 LEB 배지의 12시간 증균 효율과 lysis buffer를 이용하여 추출한 DNA의 순도 및 수율을 측정하였음.

냉동돼지고기(안심)는 증균 12시간 후 초기 세균 수에 비해 평균 3.4 log CFU/g 증균되었고, 빵이 버섯은 평균 3.0 log CFU/g 증균되었음.

일부 시료의 경우 세균이 검출한계 미만으로 존재하더라도 12시간 증균 이후 개발된 검출 키트로 검출 가능한 수준으로 증균됨을 확인함.

- A260/A280의 값이 1.8-2.0일 때 DNA의 순도가 우수하다고 판단하는데, 기존 확립된 전처리법에 따라 *L. monocytogenes* DNA를 추출한 결과 1.8 이상의 값을 보여 순도가 우수한 것으로 나타남. 따라서, 선행연구를 통해 확립한 전처리방법이 유효한 것으로 판단하였고, 개발된 검출 키트의 전처리로는 현행 방법을 유지하면 될 것으로 사료됨.

표 27. 증균배지의 증균 효율과 lysis buffer를 이용하여 추출한 DNA의 순도와 수율

시료	세균 수 (log CFU/g)			DNA	
	0 h	12 h	증균량	순도 (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)	수율 (ng/μL)
냉동돼지고기(안심)	< 1.0*	4.1±0.5	3.4±0.0	2.00±0.18	35.01±19.09
	< 1.0	4.8±0.3		1.91±0.10	54.66±14.72
	2.0±0.0	5.4±0.0		1.86±0.12	29.70±7.08
빵이버섯	2.1±0.1	4.9±0.0	3.0±0.3	1.99±0.26	39.78±36.70
	2.7±0.1	5.5±0.1		2.08±0.06	54.56±34.45
	2.8±0.2	6.1±0.2		2.16±0.04	109.09±24.93

* Detection limit

- 샘플의 범위를 빵이버섯, 냉동돼지고기 외에 생육(삼겹살, 안심), 육가공품(햄, 소시지), 유제품(우유, 치즈) 등과 같은 다양한 식품군으로 넓혀 키트의 유효성을 테스트하고, 본 연구에서 수행한 방법을 다양한 식품군에 리스테리아균을 인위적으로 오염시켜 테스트하여 신속성과 정밀성에 관한 자료를 축적할 예정임

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

냉동·냉장 저장되는 식육 및 식육가공품 중 *L. monocytogenes* 의 신속한 검출을 위한 키트를 개발하여 키트의 성능을 확인하였으며, 등온증폭반응에 사용되는 핵심적인 요소인 Bst polymerase 개발하여 자체적으로 원료를 생산함으로써 키트의 단가를 감소시켜 제품의 경쟁력을 높일 수 있을 뿐만 아니라 증폭된 산물의 판독에 있어서도 측방 유동 면역분석법을 적용한 키트를 개발하여 비전문가도 현장에서 쉽게 활용할 수 있도록 함

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

- 재조합 Bst DNA polymerase 1종 개발
- *Listeria monocytogenes* 신속 검출 키트 개발
- LAMP Master Mix (2X) 제품 개발
- 리스테리아 모노사이토제네스 검출키트에 대한 특허 출원 1건 (10-2021-0029620)

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	1단계 (YYYY~YYYY)		n단계 (YYYY~YYYY)		계	가중치 (%)
		목표(단계별)	실적(누적)	목표(단계별)	실적(누적)		
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾		목표(단계별)					
		실적(누적)					
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾		목표(단계별)					
		실적(누적)					
계							

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1								
2								

* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
	특허	한국	(주)보레다 바이오텍	2021년 3월 5일	10-2021 -002962 0					100%	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

○ 국내 표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
	Listeria monocytogenes detection kit	2021.03.01	(주)보레다바이오텍		진단			
	LAMP Master Mix (2x)	2021.03.01	(주)보레다바이오텍		PCR			

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
	국외				
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
		2021		1				1	1					

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 검출한계-100CFU/g미만	○리스테리아 모노사이토제네스균으로부터 10CFU/g까지의 검출한계를 확인	○ 100%
○ 검출시간-12시간 미만	○리스테리아 모노사이토제네스 DNA 추출부터 증폭 후 결과확인까지 2시간 미만으로 소요됨을 확인	○ 100%
○ 특이도-95% 이상	○식중독을 야기하는 5종의 균에 대해서 테스트한 결과 모두 음성으로 확인되어 특이도 100%를 달성	○ 100%

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

3) 연구개발 과정의 성실성

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 기술적 성과

- 축산물에 적용할 수 있는 전처리(희석액의 종류, 농도, 시간, 시료와 희석액의 비율 등) 기술을 확립할 수 있음
- 평균 검출한계인 10^2 CFU/g 이하 농도의 *L. monocytogenes*를 검출할 수 있는 정밀 진단 기술 개발을 통하여, 축산물 외의 타 식품 유형에도 적용하는 관련 후속 연구에 활용될 수 있음
- 등온비색 PCR은 특정 기기의 사용 없이 현장에서 빠르게 적용 가능한 기술로 비전문가인 현장 작업자도 빠르게 기술을 습득하여 위생검사를 진행할 수 있음
- 기존 분자생물학적 기술의 과정이 간소화되고 동시에 검출 시간이 빠르고 특이성이 높은 기술이 개발됨으로써 신속 검출 기술의 새로운 방법을 제시할 수 있을 것으로 예상
- 초고감도 현장 진단 기술 개발이 가능하여 축산물 및 도축현장에서 리스테리아 모노사이토제네스에 의해 발생 가능한 식중독 사고를 미연에 방지하는데 크게 기여할 것임
- 농축수산물 및 그 가공품을 포함한 다른 식품의 위해미생물에 대한 현장진단용 등온비색 증폭기술 개발에 기초연구결과로 활용 가능
- 개발하고자 하는 기술의 경우 LAMP 증폭산물을 전기영동과 같은 별도의 장비 없이 육안으로 확인할 수 있고 온도 구배가 없으므로 증폭장비의 소형화가 유리하여 휴대성이 높은 시스템의 구축이 가능하기 때문에 연구실뿐만 아니라 현장 등의 장소에 구애받지 않고 적용될 수 있는 장점이 있음

○ 경제적·산업적 성과

- 등온비색 PCR의 핵심 주원료의 자체 개발을 통한 원가 절감 및 기업 매출 증대
 - 냉동육 및 육가공품에 적용할 수 있는 신속·정밀 *L. monocytogenes* 진단 키트 시장개발을 통하여 기업 매출 증대
 - 최적화된 전처리법과 검출법의 적용으로 검출 시간, 장비 비용, 인력에 대한 원가 절감 효과가 있음
 - 관련 산업 분야의 신규 인력 채용 가능
 - 현재 수입에 의존하고 있는 진단키트 시장을 국내 키트로 대체할 수 있으며, 나아가 진단키트의 해외 수출도 가능할 것으로 예상됨
 - 축산물의 상품성 저하를 방지하는 기술을 개발하여 판매 및 수출입 과정에서 발생할 수 있는 경제적 손실을 완화
 - 전 세계 분자진단 시장은 2018년 73억 5,570만 달러에서 연평균 성장률 8.7%로 증가하여, 2023년에는 111억 6,620만 달러에 이를 것으로 전망되며 체외진단 시장의 기술 가운데 연평균 증가율이 가장 높음
 - 손쉬운 작동 및 저가의 장비를 이용한 비숙련자의 현장 분석이 가능해지므로 전문 인력 육성 비용 절감 효과가 예상됨
 - 국가축산업기술 첨단화 및 활성화
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

□ *Listeria monocytogenes* 신속 진단 키트 제품화

- *Listeria monocytogenes* 진단용 등은 증폭 기술에 대한 검증완료 및 키트제품화 추진계획

- 본 연구를 통해 개발된 등은 증폭 기술의 주원료인 등은 증폭 효소를 자체 생산함으로써 저렴한 비용으로 생산, 판매 가능하여 손쉽게 사용가능할 것으로 기대

- 고가의 다른 장비가 필요하지 않고 다양한 사용자들이 쉽게 활용할 수 있는 이점이 있는 신속 진단키트로 판독법으로 현장 적용 가능성이 높음

- 낮은 가격, 편의성, 신속 · 정확성, 현장적용성의 용이 등을 마케팅 포인트로 하여 식중독 문제에 취약한 급식업체 및 도축 육류 가공업체, 식품회사에 회사 영업망을 통하여 샘플배포 예정

- 박람회 및 전시회 부스 홍보, 홍보 팸플렛 제작 등 적극적인 홍보계획

- 지속적인 키트의 유효성 검증을 통하여 현장적용 최적화를 단기목표로 하며, 공급, 유통채널 확보를 통한 판로 개척 후 고객 세분화 및 맞춤형 판매 진행, 인도의 ADVY chemical社, 중국의 Genrui社, 일본의 TOYOBO社 등 해외영업망을 통한 글로벌 판매 전략이 중 · 장기 목표임

□ 주관기관에서는 제품출시 후에도 지속적인 연구를 통하여 제품의 성능을 개선하고 보완하려는 노력을 지속할 예정임

□ 위탁연구기관인 숙명여자대학교, 경상대학교와 지속적인 산학협력을 통하여 제품의 성능을 테스트할 예정임

□ 다양한 진단제품 개발 활용 가능성

- 본 연구를 기반으로 개인진단이 요구되는 질병 및 감염병에 대하여 폭넓게 응용하여 다양한 진단제품의 개발이 가능할 것으로 예상

- 식중독 관련 세균 (*E.coli*, *Salmonella*, *Vibrio* 등) 진단, 식중독 이외 진단하고자 하는 목적균 또는 목적 바이러스에 맞게 프라이머를 디자인하여 제품 개발이 가능

- 현재 등은 PCR을 이용한 암의 미세전이 및 조기진단 제품이 나와 있으며 암 진단 분야에도 적용 가능할 것으로 기대

□ 농축수산물 및 그 가공품을 포함한 다른 식품 위해 미생물에 대한 연구를 위한 기초연구결과로 활용

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	매년 목표치	
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내		
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2021.03.05
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2021-0029620 (접수번호 1-1-2021-0264892-20)
(DAS접근코드F027)
출원인명칭 주식회사 보레다바이오텍(1-2013-016900-0)
대리인성명 특허법인 무한(9-2007-100061-4)
발명자성명 최동욱 윤미진
발명의명칭 리스테리아 모노사이토제네스 검출용 조성물 및 이를 포함하는 키트

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 이용하여 특허로 홈페이지(www.patent.go.kr)에서 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 은행 또는 우체국에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
4. 기타 심사 절차(제도)에 관한 사항은 특허청 홈페이지를 참고하시거나 특허고객상담센터(☎ 1544-8080)에 문의하여 주시기 바랍니다.
※ 심사제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-지식재산제도

7. 참고문헌

- 1) Notomi, Tsugunori, et al. (2000) : Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research* 28.12: e63-e63.
- 2) Tomita N et al. (2008) : Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 3: 877-82.
- 3) Njiru, Zablon Kithinji. (2011) : Rapid and sensitive detection of human African trypanosomiasis by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 69.2: 205-209.
- 4) Parida, Manmohan, et al. (2008) : Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in medical virology* 18.6: 407-421.
- 5) Lin, Zhibing, et al. (2013) : Comparison of three molecular detection methods for detection of *Trichinella* in infected pigs. *Parasitology research* 112.5: 2087-2093.
- 6) Njiru, Zablon Kithinji, et al. (2008) : Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS neglected tropical diseases* 2.2: e147.
- 7) Chen, Yi, Nishant Kumar, and Nusrat Siddique. (2011) : Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay targeting *iap* for the detection of *Listeria monocytogenes* in select food matrices. *Foodborne pathogens and disease* 8.10: 1063-1069.
- 8) Jothikumar, Narayanan, Xiaowen Wang, and Mansel W. Griffiths. (2003) : Real-time multiplex SYBR green I-based PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection* 66.11: 2141-2145.
- 9) Gao, Weifang, et al. (2017) : Recombinase polymerase amplification-based assay for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food analytical methods* 10.6: 1972-1981.
- 10) Lee, Na-Ri, et al. (2011) : Detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* using duplex real-time PCR assay with melting curve analysis on fresh lettuce. *Journal of Food Hygiene and Safety* 26.2: 114-119.
- 11) Shi, Lei, et al. (2015) : A novel method to detect *Listeria monocytogenes* via superparamagnetic lateral flow immunoassay. *Analytical and bioanalytical chemistry* 407.2: 529-535.

- 12) Witte, Anna Kristina, et al. (2016) : Evaluation of the performance of quantitative detection of the *Listeria monocytogenes* prfA locus with droplet digital PCR. *Analytical and bioanalytical chemistry* 408.27: 7583-7593.
- 13) Liu, Dongyou, et al. (2004) : Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology* 91.3: 297-304.
- 14) Go, E. K., et al. (2011) : Prevalence of *Listeria monocytogenes* isolated from livestock processed products in Korea." *Korean Journal of Veterinary Public Health*.
- 15) Kim, Jong-Hui, et al. (2016) : Analysis of the Recovery Rate of Food-borne Pathogens according to Sample Preparation Methods in Animal Origin Foods. *Journal of Food Hygiene and Safety* 31.6: 406-413.
- 16) Uyttendaele, Mieke, P. De Troy, and Johan Debevere. (1999) : Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *International journal of food microbiology* 53.1: 75-80.
- 17) Wang, Yi, et al. (2014) : Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by cross-priming amplification of lmo0733 gene. *FEMS microbiology letters* 361.1: 43-51.
- 18) Bickley, J., et al. (1996) : Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology* 22.2: 153-158.
- 19) Li P., Amenov A., Kalendar R., Abeldenov S., Khassenov B. (2017) : Cloning and purification of large fragment of DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* and it's application in isothermal DNA amplification. *Biotechnology Theory and practice* DOI: 10.11134/btp.1.2017.6
- 20) Cordray, Michael S., and Rebecca R. Richards-Kortum. (2015) : A paper and plastic device for the combined isothermal amplification and lateral flow detection of *Plasmodium* DNA. *Malaria journal* 14.1: 1-8.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품연구성과후속지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품연구성과후속지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.