

발간등록번호

11-1543000-001245-01

**독소 생성 바실러스 세레우스 및 병원성 대장균
신속동시검출 및 제어기술 개발**

*(Development of Rapid Detection and Control
Measures for B. cereus and Pathogenic E. coli)*

강원대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 농생명산업기술개발 사업 “독소 생성 바실러스 세레우스 및 병원성 대장균 신속동시검출 및 제어기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 12월 20일

주관연구기관명 : 강원대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 오 덕 환

세부연구책임자 : 강원대학교

연 구 원 : 오 덕 환

연 구 원 : 페레이돈 포가니

연 구 원 : 박 중 현

연 구 원 : 찰스 탕고

연 구 원 : 위 수

연 구 원 : 나 극

협동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 서 건 호

연 구 원 : 김 윤 경

연 구 원 : 이 수 경

연 구 원 : 임 진 혁

연 구 원 : 김 영 지

연 구 원 : 고 상 원

연 구 원 : 송 광 영

연 구 원 : 임 중 수

연 구 원 : 박 진 형

요 약 문

I. 제 목

‘독소 생성 바실러스 세레우스 및 병원성 대장균 신속동시검출 및 제어기술 개발’

II. 연구성과 목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구분		특허		논문		기술실시 (이전)	상품화 (시제품)	기타
		출원	등록	SCI	비SCI			
1차년도	목표	1		1	1			
	달성	6		2	2			
2차년도	목표	1	0	2	2			
	달성	0	4	1	2			
3차년도	목표	2	1	2	2			
	달성	3	1	3	2			
계	목표	4	1	5	5	2	2	
	달성	9	5	10	4	3	2(5)	

III. 연구개발의 목적 및 필요성

- 식품의약품안전처의 식중독 발생 통계 자료에 따르면 국내 및 국외에서 지속적으로 식중독 사고가 발생하는데, 독소생성 바실러스 세레우스 및 병원성 대장균은 식중독 발병의 주요 원인균들에 속함. 그러므로 이들 병원성 세균들의 다양한 독소 유전자들을 신속하고 동시에 검출할 수 있는 기술의 개발은 농식품 안전 및 국민 보건의 향상에 필요함.
- 바실러스 세레우스는 자연계에 널리 분포하고 내생포자를 형성하며, 병원성 대장균은 주로 식품 및 식수를 통해 오염됨. 이들 병원성 세균들과 정상적 바실러스 및 대장균은 생화학적 성질이 매우 유사하므로 기존의 배지법만으로는 독소생성 바실러스 세레우스나 병원성 대장균을 검출하는데 어려움이 있음.
- 현재 가장 유망한 기술들에 해당하는 Multiplex conventional PCR 및 multiplex real-time PCR 기술의 개발을 통하여 일선 검사현장에서 간편하게 사용가능한 동시진단 PCR 키트의 개발이 요구됨.
- 본 연구에서는 식중독 관련 구토 및 설사형 바실러스 세레우스 또는 5종류 병원성 대장균들을 신속하고 정확하게 동시검출이 가능한 multiplex PCR kit, multiplex real-time PCR kit 및 IAC 포함한 multiplex real-time PCR kit를 개발하고 상용화하기 위한 기초 및 응용 연구를 수행하였음.

IV. 연구개발 내용 및 범위

- 바실러스 세레우스 구토형 및 설사형 독소 유전자를 동시 검출 할 수 있는 multiplex PCR용 프라이머들 및 multiplex real-time PCR용 프라이머들을 선발함
- 병원성 대장균 5종류의 독소 유전자들을 동시 검출 할 수 있는 multiplex PCR용 프라이머들 및 Internal Amplification Control (IAC) 내재 multiplex real-time PCR용 프라이머들을 선발함.
- 선발된 프라이머 마커들과 PCR의 민감도, 특이도, 재현성, 안전성 등 최적 조건을 결정하고 각 PCR 키트의 시제품을 제작함
- 개발된 PCR 키트들의 성능을 AOAC 검증방법과 현장적용 시험을 통해 비교 검증하고 평가함

V. 연구개발 결과

1. 구토 및 설사형 바실러스 세레우스 동시 검출을 위한 Multiplex Conventional PCR 키트 및 Multiplex Real-Time PCR 키트의 개발

- 바실러스 세레우스에서 구토형 및 설사형 독소 유전자들, non-ribosomal peptide synthetase (NRPS, CER primers), cereulide (*ces*), haemolysin BL (*hblDCA*), enterotoxin FM (*entFM*), non-haemolytic enterotoxin (*nheABC*), 및 cytotoxin K (*cytK*), 그리고 *B. cereus* group 마커인 *groEL*을 목표 대상으로 하는 제1, 제2 및 제3 프라이머 세트를 개발하고 multiplex PCR kit를 제작하고 이들의 민감도, 특이도 및 검출한계 등을 시험함.
- 구토형 및 설사형 독소 유전자들의 프로파일/유병률(gene profile/prevalence rate)을 다양한 식품, 환경 및 임상 시료에서 분리한 바실러스 세레우스 야생균주 총 496개에서 조사한 결과, *groEL*은 모든 균주들에서 양성 이었으며(100%). CER 및 *ces*는 구토형 균주들에서만 발견되었으나, 설사형 장독소 유전자들인 *hblD*, *nheA*, *entFM* 및 *cytK*의 유병률은 각각 59.4%, 92.3%, 77.2% 및 47.5%로써 매우 다양한 유전자 프로파일을 나타냈음.
- 제1, 제2 및 제3 프라이머 세트의 PCR 검출한계는 순수배양액에서 추출한 genomic DNA 에서는 각각 약 2, 2 및 0.2 pg/reaction tube 이었으며, 인위접종한 식품 시료에서는 각각 약 10^3 , 10^2 및 10^2 cfu/g으로 제2 및 제3 프라이머 세트가 우수하였음. 제2 프라이머 세트의 *entFM*, *nheA*, *hblD*, *cytK* 및 *ces* 프라이머에 대한 PCR 산물 크기는 각각 488, 376, 163, 106, 및 70 bp 이며, 제3 프라이머 세트의 *entFM*, *nheA*, *hblD*, *cytK* 및 *ces* 프라이머에 대한 PCR 산물의 크기는 각각 255, 163, 127, 97 및 81 bp임.
- 최종적으로 multiplex conventional PCR kit에 제2 프라이머 세트를, multiplex real-time PCR kit에 제3 프라이머 세트를 사용하고, 사용자 편의를 고려한 동결건조형 키트들을 시제품으로 제작하였음. 두 PCR kits와 표준배지배양법을 AOAC protocol에 따라 인위접종 시료, 그리고 실제 식품 및 환경 시료 등을 대상으로 비교 검증한 결과, 세 가지 방법 중 multiplex real-time PCR kit가 가장 우수하였음. 또한 AOAC 검증방법에 따라 3개의 독립된 실험실에서 각각 두 PCR kits의 검증을 수행하여 개발된 PCR kits의 우수한 성능을 검증하였음.

2. 병원성 대장균 5종류 동시검출을 위한 Multiplex Conventional PCR, Internal amplification control, Real-time PCR 키트의 개발

- 5종 병원성 대장균들-장병원성(EPEC), 장출혈성(EHEC), 장침투성(EIEC), 장독소형(ETEC), 및 장부착성(EAEC) 대장균-을 검출하기 위해서 각 병원성 특이 마커 유전자(*eaeA*, *ipaH*, *aggR*, *LT*, *STh*, *STp*, *stx1*, *stx2*, *bfp*, *lacY*, *16srRNA*)에 대한 Primer set 및 Primer/Probe set을 개발하였음.
- Real-time PCR의 위양성 및 위음성 단점을 보완하기 위하여 IAC(내재증폭대조유전자)를 개발하였음.
- 병원성 대장균 5종류를 신속하게 동시 검출할 수 있는 Multiplex Conventional PCR 및 IAC 포함 multiplex real-time PCR 검출법을 개발하였음.
- 개발된 PCR 키트에 대한 AOAC 검증방법을 차용한 현장 적용 테스트 및 검증으로 병원성 대장균 및 기타 식중독균의 검출 시험 및 인위접종 시료를 통해 일선 현장에서 사용 시 그 유효성을 입증하였음.
- 따라서 본 연구를 통하여 시료 내 존재하는 병원성 대장균의 신속검출을 위한 PCR 키트 개발을 성공적으로 달성하였음.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

- 학술논문 총 14편(SCI 10편, 비SCI 4편), 지적재산권 총 14건(특허 출원 9건, 등록 5건), 기술실시(이전) 3건, 상품화 2건(시제품 5종 키트 제작), 인력양성 3건, 학술발표 6건, 홍보 전시 1건 등의 연구 성과를 달성하였음.

2. 연구개발 결과의 활용 방안

- 신속하고 편리한 검출 기술 개발로 일선 현장 검사자들에게 편의성과 안전성 제공
- 식중독 발생 시 정확한 원인체 규명 및 추적 등의 역학조사와 식중독 사고 대처에 활용
- 안전관리 시스템인 GAP과 HACCP 시행을 위한 표준검출법으로 활용
- 식중독 관련 바실러스 세레우스 및 병원성 대장균 동시검사용 PCR 키트 시제품 개발 및 기술이전을 통한 상용화

3. 연구개발 결과의 기대성과

- 설사형/구토형 바실러스 세레우스 동시검출 및 5종 병원성 대장균 동시검출용 PCR 기술 확보 및 관련 지적재산권(특허/상표 출원 및 등록) 확보
- 바실러스 세레우스 및 병원성대장균 5종 동시신속 검출법 시제품 개발 및 기술이전을 통한 상용화
- 개발된 제품의 AOAC validation에 따른 국제 공인의 획득 가능
- IAC(Internal Amplification Control) 사용한 real-time PCR 기술 확보 및 국내 최초 적용
- 다른 식중독 검사 및 진단법에 multiplex PCR 및 IAC 활용 확대
- 식중독세균 신속검출법 국산화 기술 개발에 기여
- 식중독균 검사법의 편리성, 신속성, 정확성 등의 향상으로 HACCP 프로그램의 효율적 시행에 적용 기대
- 검출효율성이 높아 국제 경쟁력 있는 검출 기법 및 제품 개발을 통해 국내 BT 산업 활성화 및 수출 기대

SUMMARY (영문 요약문)

1. multiplex PCR and real-time PCR detection kits for emetic and enterotoxigenic *B. cereus*

- *Bacillus cereus* comprises the largest group of endospore-forming bacteria and can cause emetic and diarrheal food poisoning. It is widespread in nature and therefore, considered a major foodborne pathogen. There is a growing demand for fast, accurate, reliable and economic detection of potentially toxigenic *B. cereus*. A multiplex PCR assay for the rapid detection of enterotoxic and emetic strains in *Bacillus cereus* was developed and evaluated among *B. cereus* emetic and enterotoxic reference strains, *B. cereus* group members and non-target strains.
- A total of 496 *B. cereus* strains isolated from various sources (food, environmental, clinical) were assessed by a multiplex PCR for the presence of enterotoxin genes. The prevalence rate of *nheA*, *entFM*, *hbIC*, and *cytK* enterotoxin genes among all *B. cereus* strains was 92.33%, 77.21%, 59.47%, and 47.58%, respectively. Enterotoxigenic profiles were determined in emetic toxin- (8 patterns) and enterotoxin-producing strains (12 patterns). The results provide important information on toxin prevalence and toxigenic profiles of *B. cereus* from various sources. Our findings revealed that *B. cereus* must be considered a serious health hazard and *Bacillus thuringiensis* should be considered of a greater potential concern to food safety among all *B. cereus* group members. Also, there is need for intensive and continuous monitoring of products embracing both emetic-toxin and enterotoxin genes.
- **Design and verification of the 1st, 2nd and 3rd primer sets for PCR kits.** All primer sets were designed specifically to target genes for *B. cereus* group (*groEL*), diarrheal (*cytK*, *nheA*, *hbIC*, *entFM*) and emetic strains (*CER* or *ces*) and the specificity, sensitivity and detection limits of the primer sets-based PCR approaches were confirmed on pure culture and inoculated foods. The minimum detection limits of PCR approaches using the 1st, 2nd and 3rd primer sets were respectively 20, 2, and 0.2 pg of DNA per reaction tube in pure culture and also respectively 10^3 , 10^3 and 10^3 cfu/g in food samples in artificial contamination of seven different food matrices with distinct bacterial counts and improved approximately 10^1 cfu/g after 7 h enrichment. The sizes of PCR product using the 2nd or 3rd primer sets were 488, 376, 163, 106, and 70 bp, or 255, 163, 127, 97 and 81 bp for *entFM*, *nheA*, *hbID*, *cytK* and *ces* respectively.

- **Development and validation of multiplex PCR and real-time PCR kits.** A highly sensitive pentaplex real-time PCR high resolution melt curve assay using the 3rd primer set was developed for simultaneous detection of 4 major enterotoxin and 1 emetic genes. The average melting temperatures (T_m) of PCR products were 72.20°C, 74.23°C, 76.55°C, 78.42°C and 81.90°C for *ces*, *cytK*, *nheA*, *entFM* and *hblD*, respectively. The inclusivity and exclusivity of the multiplex assay were evaluated using 71 bacterial strains including 17 emetic *B. cereus* reference strains, 9 enterotoxic *B. cereus* reference strains, 4 *B. cereus* group members, 23 wild *B. cereus* strains, 18 non-target strains, and was further tested on artificially inoculated foods. The DNA intercalating dye SYTO9 used in this study generated higher resolution melt curve peaks than SYBR Green dye for the target strains and genes in which the peaks were sharp and easily distinguishable from each other. The developed kits were validated by the same modified method based on the AOAC validation protocol in three independent laboratories from different cities. The validation results presented that the multiplex real-time kit was better than the multiplex PCR kit and the conventional culture method in sensitivity and specificity in pure cultures of *B. cereus*, artificially inoculated foods and naturally contaminated foods. Taken together, the developed multiplex PCR and multiplex real-time PCR kits can be the rapid and reliable tools for the simultaneous monitoring of both emetic and enterotoxic strains of *B. cereus* present in food and food-related samples.
- To the best of our knowledge, this is the first time that an assay for simultaneous detection of *B. cereus* group, emetic and enterotoxic strains with such a wide range of detection target genes in food and environmental samples has been described.

2. multiplex PCR detection kits for 5 pathotypes of pathogenic *E. coli*

- *Escherichia coli* is the predominant facultative organism in the human gastrointestinal tract. Strains of pathogenic *E. coli* (PEC), which have acquired virulence factors, have the ability to cause foodborne and waterborne disease in human. Of the strains that cause diarrheal diseases, five pathotypes are recognized. But PEC strains display a heterogeneous range of phenotypic properties making it difficult to find a common agar to selectively and differentially recover these pathogens. Different molecular methods are used for identification of PEC, and these methods are based on genes related to the pathogenicity of each category. The present study was undertaken to establish a rapid PCR system for identification of the main five prevalent categories of PEC and a real-time PCR assay incorporating an internal amplification control (IAC).
- To develop a PCR for PEC detection, we analyzed genetic information of virulence genes and established system of Conventional PCR and Real-time PCR which based genetic marker. And we developed and evaluated an IAC which could effectively eliminate false-negative results. Multiplex PCR kits, Real-time PCR kits and IAC kits for PEC were developed and validation testing was conducted using food samples spiked with PEC.
- Therefore in this study, we developed Multiplex Conventional PCR and Real-time PCR for PEC detection. We established primer set and primer/probe set for the identification of PEC virulence genes (*eaeA*, *ipaH*, *aggR*, *LT*, *STd*, *STp*, *stx1*, *stx2*, *bfp*, *lacY* and *16s rRNA*) and developed IAC kit by using the Sequence of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus enabling the distinction of true negative results from false negative results caused by PCR malfunction. The effectiveness of developed PCR kits were verified with detection of pathogenic *E. coli*, other foodborne pathogens and food samples artificial inoculation. Throughout this study it was successfully achieved the development of PCR kits for the rapid detection of pathogenic *E. coli* present in the sample.
- The PCR kits for pathogenic *E. coli* can be used for rapid and an efficient detecting of PEC containing food samples. These kits are a useful tool to clarify the source and routes of Pathogenic *E. coli*.

CONTENTS

(영 문 목 차)

제1장	연구개발과제의 개요 및 성과목표	9
제2장	국내외 기술개발 현황	23
제3장	연구개발수행 내용 및 결과	31
제4장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	231
제5장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	233
제6장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	242
제7장	연구시설·장비 현황	244
제8장	연구실 안전관리 이행실적	245
제9장	참고문헌	248

목 차

제1장	연구개발과제의 개요 및 성과목표	9
제2장	국내외 기술개발 현황	23
제3장	연구개발수행 내용 및 결과	31
제1절	<i>B. cereus</i> 구토·설사형 동시검출 multiplex conventional PCR 기법 확립	31
제2절	<i>B. cereus</i> 구토/설사형 동시검출 multiplex real-time PCR kit 개발	49
제3절	<i>B. cereus</i> 동시검출 키트의 현장 적용 테스트 및 AOAC protocol에 따른 검증 ..	90
제4절	5종 병원성 대장균의 특이 유전자적 마커 탐색	130
제5절	5종 병원성 대장균 검출을 위한 Multiplex Conventional PCR의 개발	155
제6절	IAC 및 5종 병원성 대장균 검출을 위한 Real-time PCR의 개발	180
제7절	병원성 대장균 검출을 위한 Real-time PCR의 개발을 위한 동결건조	209
제8절	병원성 대장균 검출을 위하여 제작한 Real-time PCR 키트의 검증 시험	214
제4장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	231
제5장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	233
제6장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	242
제7장	연구시설·장비 현황	244
제8장	연구실 안전관리 이행실적	245
제9장	참고문헌	248

제1장 연구개발과제의 개요¹⁾

제 1절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

1. 연구개발의 필요성 요약

가. 독소생성 바실러스 세레우스

- 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)는 국내에서 식중독을 일으키는 주요 세균들 중 하나로써 쌀을 비롯한 곡류에서 문제가 되고 있으나, 대부분 *B. cereus* 오염도 조사와 특성규명, 분리 균주의 설사형 독소 유전자 분포 및 생성에 초점이 맞추어져 있고, 구토형 독소 생성 *B. cereus* 분리 동정이나 검출기법에 관한 연구는 매우 미비함.
- 본 연구진이 보유하고 있는 설사형 독소 생성 *B. cereus* 균주를 대상으로 구토형 독소생성 유전자를 PCR 기법으로 검색한 결과, 일부 설사형 독소생성 균주들은 구토형 유전자를 가지고 있었음.
- 구토형 식중독은 영국, 미국, 일본 등에서 분리 보고되고 있으나 아직 밝혀지지 않은 사실이 많고 다만 Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) 유전자를 타겟으로 PCR을 실시하여 구토독소 *B. cereus* 균주를 동정하고 있음.
- 따라서, *B. cereus*의 검출은 설사형과 독소형을 분리하여 검출하기 보다는 설사형 독소와 구토형 독소를 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR kit를 개발하여 설사형 및 구토형 독소 생산 *B. cereus*를 동시에 스크리닝하고 동정하는 연구가 보다 효과적이며 필요함.

나. 병원성 대장균

- 병원성 대장균은 국내 세균성 식중독 중 발생률 1위를 차지하고 있으며, 2011년 유럽에서 *E. coli* O104에 의한 식중독 사고가 대규모로 발생되어 많은 사람이 사망하였고 농산물 소비 및 수출입 중단으로 인한 직·간접 피해가 천문학적인 숫자에 이르렀음.
- 병원성 대장균은 ETEC, EPEC, EHEC, EAEC, EIEC 등으로 다양하게 나누어지며, 타입에 따라 발병기전과 병원성이 다르며 최근 병원성 대장균은 다양한 변종이 생성되고 있고, 발생의 규모도 커져 신속하고 정확한 병원성 대장균의 검출이 필요함.
- Internal Amplification Control (IAC)를 내재 조합한 Multiplex conventional PCR 또는 multiplex real-time PCR 기술은 위음성-위양성 결과를 배제하면서도 신속하고 정확하게 다수의 병원균을 동시에 검출할 수 있는 장점이 있어서 기존 검출법에 비해 매우 우수한 방법으로 세계적으로 각

1) 농림수산물식품기술기획평가원 '본문작성요령'에 따라 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉠ 등으로 함

광을 받고 있음.

다. 독소(구토/설사) 생성 *B. cereus* 및 병원성 대장균 신속 동시검출 기술 개발의 필요성

- PCR 기술이 보편화 되어 있음에도 불구하고 검사과정에 필요한 여러 가지 시약과 검사자의 고난도 기술이 필요하여 일선 검사현장에서 일상적으로 사용되는데 많은 제약을 받고 있음.
- 따라서, PCR 기법에 요구되는 모든 유전자와 시약을 검사자가 간편하고 쉽게 사용할 수 있는 키트로 제작 개발하면 일선 검사 현장에서 활용가치가 높아 좋은 시장성을 확보할 것임.
- 본 연구에서는 구토/설사형 독소 생성 바실러스 세레우스 및 병원성 대장균 검출을 위한 multiplex PCR/real-time PCR 기술을 개발하고 이를 kit화 제품으로 개발하였음.
- 개발된 제품을 AOAC 프로토콜에 근거한 방법으로 검증하여 정식으로 인증을 획득하고, 국내외 식중독 검사 현장을 대상으로 상용화하고자 함.

2, 독소생성 *B. cereus*의 개요

가. 독소생성 *B. cereus*란?

- 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*, *B. cereus*)는 포자(spore)를 형성하는 그람 양성 세균으로 다양한 식품에서 자연적으로 존재하고 있음.
- 정상적인 식품 조리 과정 중에 바실러스 세레우스는 파괴되지만 포자는 높은 조리온도에서도 안정하여 식품 중에 남을 수 있음.
- 포자는 높은 습도, 저장성 식품, 10~49°C 조건에서 발아해서 증식할 수 있으므로, 대부분의 경우 가열한 식품의 냉각과 냉장 보관이 적절치 못하여 식중독 등의 문제를 일으키는 것으로 지적되고 있음.
- 바실러스 세레우스는 두 종류의 식중독을 일으킨다고 알려져 있음. 한 가지는 식품에 바실러스 세레우스 균이 성장하여 생산한 독소(cereulide)를 섭취하여 발생하는 구토형 식중독이고, 다른 하나는 바실러스 세레우스 세균의 성장 세포 또는 포자를 섭취한 후 인체의 장 내에서 장독소(enterotoxins)가 생산되어 발생하는 설사형 식중독임.
- 다른 바실러스 세균인 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*), 바실러스 리체니포미스(*B. licheniformis*), 바실러스 푸미루스(*B. pumilus*)는 식중독을 일으킨다고 확인된 사례가 전무함.
- 구토형 식중독은 열에 안정한 독소(heat-stable emetic toxin, ETE)에 의해 발생함. 일반적으로 세레울라이드(cereulide)를 생산하는 바실러스 세레우스 변종에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으며, 이 세균의 경우 10°C 이하 또는 산소가 없는 조건에서는 성장하더라도 독소인 세레울라이드(cereulide)를 생산하지 못한다고 알려져 있음.
- 설사형 식중독은 주로 복통과 설사를 일으키며 잠복기는 8~16시간이며 이것은 열에 불안정

한 장독소(nonhemolytic enterotoxin, NHE) 또는 용혈성 장독소(hemolytic enterotoxin, HBL)가 주요 원인으로 알려짐. 여기에는 포자형성과 아데닐산 시클라제(adenylate cyclase) 효소의 활성화 등을 포함한 여러 가지 기전이 작용할 것으로 여겨지며 두 경우 모두 발생 24시간 이내에 증세가 완화됨.

- 한편 설사형 식중독의 원인이 되는 변종은 감염을 일으키는 기전 자체가 복잡하고 다양하기 때문에 확인이 어려움.
- 바실러스 세균들의 독성 기전에 대해서는 알려져 있는 정보가 많지 않아서 어떠한 변종들이 식중독을 일으키는지 확인하는 것 또한 어려움.
- 대부분의 경우 바실러스 세레우스가 일으키는 식중독은 매개가 되는 식품 중에 바실러스 세레우스 성장세포나 포자가 $10^5 \sim 10^8/g$ 존재할 경우 발생하나, 일부 식중독 사례에서는 이보다 적은 수인 $10^3 \sim 10^4/g$ 이 존재했던 것으로 보고된 바도 있음.
- 일반적으로 바실러스 세레우스를 관리하기 위해서는 HACCP 시스템을 도입하고 온도 관리를 철저히 하는 것이 바람직하며 가열처리한 식품은 신속히 냉각하여 바실러스 세레우스 포자의 발아와 성장을 방지하여야 함.
- 낮은 pH(4.5 미만), 낮은 수분활성도($A_w < 0.92$)는 바실러스 세레우스의 성장을 저해할 수 있으며 식품을 $4^\circ C$ 이하에서 냉장 보관하면 바실러스 세레우스의 증식을 저해할 수 있음.

나. 바실러스 세레우스의 일반적 특징

- 바실러스 세레우스는 그람 양성 간균으로, 사슬 형태로 배열하며, 편모가 있어 운동성이 있으며 아포를 형성함(그림 1.1). 포자를 형성하여 열에 대한 저항성이 강하고 산소 조건에서 잘 증식하는 호기성 세균임.

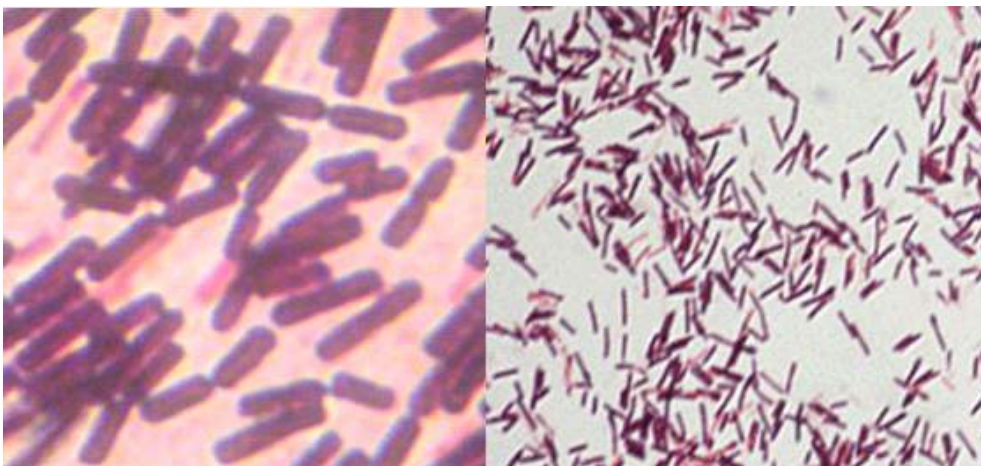


그림 1.1 바실러스 세레우스 성장

- 바실러스 세레우스는 토양세균의 일종으로 토양, 먼지, 하수 등 자연계에 널리 분포하여 식품에 오염되어 부패나 식중독을 일으키며, 동물에 대해서는 기회감염을 일으킴.
- 식품에서 검출되는 비율은 높으나 상대적으로 식중독 발생빈도는 낮음. 그러나 영국 등 유럽에서는 발생빈도가 높아 오래 전부터 주목을 받아 왔으며, 최근 우리나라에서도 각종 식

품에서 검출되고 있음.

- 바실러스 세레우스 포자는 건조식품에서도 발견됨. 바실러스 세레우스 포자의 열 저항성은 100°C에서 1.2~7.5분으로 보고되고 있음.
- 다른 바실러스 속과 구별되는 특징으로는 β-용혈 형상을 가지고 있고, 레시틴 분해효소 (lecithinase)를 생성하여 난황(egg yolk) 반응에서 집락주변이 유백색을 띠는 양성을 나타내며 아포는 내열성이어서 135°C 4시간 가열에도 견디며, 특히 전분성 식품에서 많이 검출됨.

다. 바실러스 세레우스의 독소

(1) 구토형 식중독균의 독소

- 구토형 독소 세레올라이드는 작은 고리형 펩티드(cyclic peptide)로 네 개의 아미노산이 세 번 반복되는 구조를 가지고 있으며, 분자량은 1.2 kD으로 칼륨 이온채널을 형성하며 pH(2~11), 열 및 단백질 분해효소에도 안정하여 바실러스 세레우스 성장세포가 사멸한 가열 식품에서도 존재함.
- 구토형 식중독과 관련이 있는 바실러스 세레우스는 모두 세레올라이드를 생산하는 것으로 알려져 있으며 “구토형 균종(emetic strains)” 또는 “**구토형 바실러스 세레우스(emetic *B. cereus*)**” 라고 불리기도 함.

(2) 설사형 식중독균의 독소

- 바실러스 세레우스는 구토형 독소 외에도 세 개의 다른 장독소(HBL, NHE, CytK)를 생성하며 HBL은 용혈소(hemolysin)이며 NHE는 용혈소가 아님. CytK는 식중독과는 관련이 없는 것으로 보임(표 1.1).
- 모든 장독소들은 세포독성을 가지고 있으며 세포막에 구멍이나 채널을 만듦. 비용혈성 장독소인 NHE가 설사형 식중독을 일으킴. 용혈성 장독소인 HBL은 피부괴사, 혈관 투과 작용을 가지고 있으며 토끼의 회장(ileum)에서 체액저류를 일으킴.
- 바실러스 세레우스가 생산하는 일부 단백질들은 사람상피 세포주(human epithelial cell lines)에서 세포독성을 나타냄.

표 1.1 설사형 식중독균의 독소(*B. cereus* Food Poisoning, 2008)

독소명칭	유전자/단백질	비고
용혈성 독소(HBL)	<i>hblCDA</i>	독소는 1개의 오피론에 있는 3개의 유전자에서 코딩된 3개의 단백질로 구성
비용혈성 장독소(NHE)	<i>nheABC</i>	
세포독소 K (Cytotoxin K, CytK)	<i>CytK1.2</i>	단일 단백질

3. 병원성 대장균의 개요

가. 병원성 대장균이란?

- 최근 유럽에서는 병원성 대장균에 오염된 식품을 섭취한 후 많은 사람이 사망하는 사건이 생겨 국제적으로 이슈가 되었음. 독일에서만 4,446명이 식중독에 감염되었으며 51명이 사망함.
- 이러한 병원성 대장균의 감염원은 새싹채소인 것으로 밝혀졌으며, EAEC과 EHEC의 두 종의 대장균으로부터 변이된 독특한 *E. coli* O104:H4 변종이 원인균인 것으로 드러남(그림 1.2).



그림 1.2 독일에서 발생한 대장균 보도자료(좌) 및 발생균주 확대 모습(우)

- 대장균은 *Escherichia* 속 중 대표적인 균종으로 장의 정상적인 생리기능을 유지하는데 주요한 역할을 하고 있음.
- 그러나 건강한 분변의 대장균과 달리 유아의 전염성 설사증이나 급성장염을 일으키는 특정 혈청형의 대장균이 있어, 병원성 대장균으로 칭함.
- 사람이나 동물의 대장 상주균과는 달리 외래성 대장균으로 식품 및 음용수에 오염되어 식중독을 유발시킴.
- 병원성 대장균의 발생건수는 국내 식중독 발생건수 중 최다를 차지하므로, 식품 내의 대장균의 검출 및 제어는 가장 시급한 문제라 할 수 있음(표 1.2).

표 1.2 2009 국내 병원성 대장균 발생현황 (식품의약품안전청)

구분	합계	세균					
		병원성 대장균	바실러스 세레우스	살모넬라	황색포도상구균	캠피로박터 제주니	클로스트리디움 프렌젠스
건수	90	37	17	12	12	7	5
환자수	4,050	1,671	47	864	106	405	527

나. 병원성 대장균의 분류

- 일반대장균과 병원성 대장균 사이에는 항원성의 차이가 있어서 혈청학적으로만 이들을 구분할 수 있음.
 - O antigens : somatic lipopolysaccharides
 - H antigens : 세균의 편모의 구성 물질로 운동성 균주들이 존재함.
- 병원성 대장균(Enterovirulent *E. coli*)은 독신, 부착인자의 생산능력, 임상증상 등을 기초로 하여 장병원성 대장균(Enteropathogenic *E. coli* ; EPEC), 장독소성 대장균(Enterotoxigenic *E. coli* ; ETEC), 장침입성 대장균(Enteroinvasive *E. coli* ; EIEC), 장출혈성 대장균(Enterohemorrhagic *E. coli* ; EHEC)등 4가지 주요 균으로 분류함.
- 이외에도 장부착성 대장균(Enteroadherent *E. coli*; EAEC), 장응집성 대장균(Enteragggregative *E. coli*, EAggEC), 요로병원성 대장균(Uropathogenic *E. coli*, UPEC)등이 있음.
- 그러나, 유럽에서 발생한 대장균과 같이 두 가지 병원성이 함께 나타나 강한 병원성을 보이는 변종이 생기는 경우도 있음

(1) 장병원성 대장균(Enteropathogenic *E. coli*, EPEC)

- 유아의 여름 설사증 환자로부터 분리된 것으로 미량의 균에 의해서 발병하고 2차 감염됨
- 현재 전 세계적으로 유아설사 원인균으로 1세 이하의 유아 감염 설사의 70%가 장관병원성 대장균으로 알려져 있음
- 13세 이상에서는 식품을 매개로 해서 전염됨
- 발병기작은 현재는 불분명하나 특정 혈청형의 대장균이 설사원성을 갖고 있어서 이질균의 일종인 *Shigella dysenteriae*가 생산하는 것과 비슷한 Shiga-like toxin을 생산하는데 이것이 설사증에 관여하는 것으로 추정
- 감염경로는 분변-경구감염(오염된 식품 또는 유아용 유동식, 토양에서 올 수 있으며)
- 육아시설에서는 종이, 우유, 공기 중의 먼지 등에 의한 오염으로도 대 유행 유발 가능
- 적어도 20종류 이상의 항원형 : O18, O20, O26, O28, O44, O55, O86, O111 등

(2) 장침입성 대장균(Enteroinvasive *E. coli*, EIEC)

- 장관조직 침입성 대장균은 상피세포 침입 능력으로 독성을 나타내는 병원성 대장균
- 대장점막의 상피세포에 침입하여 조직 내 감염을 일으키며, 세포의 괴사, 박리에 의하여 궤양이 발생하여서 점혈변을 유발
- 생화학적 성상이 이질균과 유사한 균이 많음
- 유당을 발효하지 않기 때문에 MacConkey Agar 등의 장내세균 선택배지에서 보통 대장균이 보여주는 핑크색 집락이 아닌 무색 투명한 집락을 형성
- Lysine반응 음성에, 운동성도 음성이며 특정한 혈청형에 속해 있음.
- 발열과 복통을 주 증상으로 하며 환자의 10% 정도는 합병증을 일으키며 점혈변을 유발
- O28, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167등의 혈청형이 알려져 있음
- 사람을 고유숙주로 하여 미량감염을 일으키고 사람으로부터 사람에게로 감염 가능

(3) 장독소성 대장균(Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)

- 1960년대와 1970년대 독소원성 대장균의 장독소를 발견한 이래 각종 환경에서 장독소원성 대장

균이 설사원인균으로서의 중요성 부각.

- 콜레라상 설사증환자로부터 분리된 것으로 콜레라 독소와 비슷한 enterotoxin을 생산
- enterotoxin은 60C, 30분간의 가열로 활성을 잃는 이열성 독소(Heat labile enterotoxin, LT)와 100C, 30분의 가열에도 견디는 내열성 독소(Heat stable enterotoxin, ST)의 2 종류로 구성
- LT는 Cholera enterotoxin과 유사점이 많으며, 두 독소는 모두 장점막 상피세포의 adenylyl cyclase를 자극하여 cyclic AMP의 대량생산을 가져와서 장관 중에 다량의 수분분비를 초래
- 지금까지 분리된 ETEC에는 LT만 생산하는 균주, ST만을 생산하는 균주, LT와 ST를 모두 생산하는 균주가 있지만 발병이 어느 균주에 의한 것인지를 임상적으로 가려낼 수는 없음
- 감염은 어린이나 어른 할 것 없이 일반 식중독처럼 식품을 매개로 하며 물이 원인이 되기도 함
- 열대지방이나 아열대지방 여행자에게서 많이 발생되는데 산발적으로 발생하는 경우는 적고 집단 발생이 많음

(4) 장출혈성 대장균(Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)

- 1982년 미국에서 발생한 식중독의 원인식품인 햄버거에서 O157:H7균이 분리
- Verotoxin을 생산하는 verotoxin 생산성 대장균(VTEC) 중에서 E.coli O157:H7 식중독균은 출혈성 대장염을 일으키기 때문에 이 균을 인체 장관출혈성 대장균이라고 부름.
- 인체 장관 내에서 verotoxin을 생산하여 병을 일으키지만, 식품 중에서 오염되어 생성되는 verotoxin이 식중독을 일으킨다는 보고는 없음
- VTEC는 ETEC와 같이 식품 내에 어느 정도 증식한 세균을 섭취함으로써 발생하는 중간형 식중독
- 일반식중독을 일으키는 포도상구균이나 살모넬라균, 비브리오균보다 독성이 훨씬 강해 10~1000개의 균량으로도 발병할 수 있음
- 장관에서 장관 출혈성 대장균이 분열, 증식하면 대장점막에 궤양이 생겨 조직이 파괴되어 짓무르고 출혈이 발생함
- 혈변성 설사증은 장관침입성 대장균(EIEC) 이외의 아메바성 이질 및 Campylobacter 등에 의한 설사증도 있으나 장관 출혈성 대장균에 의한 설사는 보통 혈변의 색이 장관하부에서 출혈이 나오는 것이므로 선혈상이 특징적임
- 임상증상은 혈변과 심한 복통 외에 구토, 메스꺼움 등이 일부 확인되었으며 발열은 드물
- 이 균에 의한 감염은 혈변을 보이고 특징적인 출혈성 대장염에 이어서 약 2~7%가 용혈성 요독 증후군(Hemolytic Uremic Syndrome, HUS) 또는 혈전성 혈소판 감소증(Thrombotic Thrombocytopenic Purpura, TTP)과 같은 질병을 일으키며 심한 경우 신부전증으로 발전
- 가축에 분포되어 있고 오염식품(주로 식육)을 거쳐 사람에게 감염됨
- 대부분의 사람들은 항생제나 특별한 치료 없이 5~10일 내에 회복 될 수 있음
- 현재 혈청형에 따라 O26, O103, O104, O106 및 최근에 관심을 모으고 있는 O157등이 있음

(5) 장부착성 대장균(Enteroadherent *E. coli*, EAEC)

- 1985년에 최초로 보고된 가장 새로운 설사원성 대장균
- HeLa세포에 부착하는 특성으로 처음에는 enteroadherent *E. coli*(EAEC)으로 불렸으며 부착방식에 따라 국소형(localized), 분산형(diffused)과 집적형(aggregate)으로 구분
- 동남아시아의 개발도상국에서 분리된 예가 많아 수입형 장관감염증의 원인균으로 유의해야 함

표 1.3 병원성 대장균의 특성 및 혈청형

특 성	병 원 성 대 장 균			
	ETEC	EPEC	EIEC	EHEC
독신(toxin)	이열성 및 내열성 독신 (LT/ST)	베로독신 (Verocytotoxin)	-	베로독신 (Verocytotoxin)
장관침입성	-	-	+	-
설 사	수양성	수양성 및 혈액성	점액 및 혈액성	수양성/혈액성
용혈성 요독증	-	-	-	+
열	-	+	+	-
주요 감염장관	소 장	소 장	대 장	대 장
주요 혈청형	O6:H16, O8:H9 O11:H27 O20:H- O25:H42 29종 이상	O20:H26 O26:H-, O55:H6 O86:H27 O111:H2 37종 이상	O28:H- O124:H30 O136:H- O143:H- O159:H- 12종 이상	O4:H- O26:H11 O91:H19 O111:H- O157:H7 26종 이상
감염량	많은량	많은량	적은량	적은량

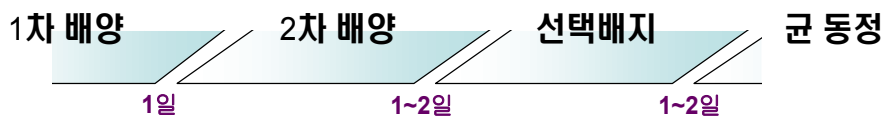
4. 독소(구토/설사형) 생성 바실러스 세레우스 및 병원성 대장균의 검출방법 개선의 필요성

가. Real-time PCR을 비롯한 신속검출기법의 도입 필요성

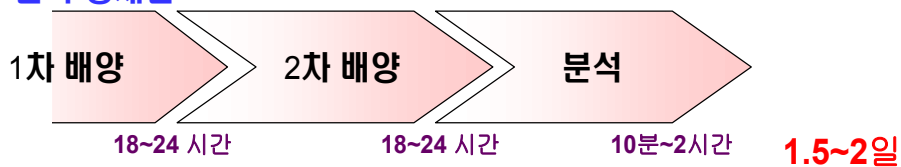
- 산업이 발전하고 수입 자유화에 따른 식품 교역량이 늘어나면서 세계적으로 식품 유래 질병이 늘어나 이에 대한 신속한 검출 및 제어의 중요성이 커짐.
- 세계무역기구(WTO)체제의 출범으로 농산물과 가공식품의 생산과 교역은 더욱 활발해짐.
- 국가 간 무역보호 장벽이 무너지고 위생 및 검역협정 (Agreement on the Application of the Sanitary and Phytosanitary Measure, SPS)이 발효.
- 식품교역에서 과학적인 근거 없이는 관세 이외의 수입통제를 할 수 없음.
- 각국은 수입식품으로부터 자국민의 건강을 지키고 국내 산업을 보호하기 위해 상대국보다 우위에 있는 식품안전평가기술을 가져야만 하거나 국제적으로 공인된 방법으로 대처해야함
- 식중독 사고의 예방과 진단, 역학 조사는 신속·정확한 표준화된 미생물 시험법이 전제.
- 현재 식중독 원인균 검사 과정은 검체를 예비증균배양, 선택증균배양, 선택배지배양 후 생화학적인 동정 검사 등을 거쳐 이루어지고 있는데, 시간(5-10일 정도가 소요), 경비, 노동력 뿐만 아니라 검출능력 면에서도 비효율적임.

- 신속검출기법은 주로 항원-항체 반응을 사용한 면역기법과 DNA나 RNA정보를 이용한 유전자기법이 주된 방법이며 그중 유전자 기법은 높은 감도와 신속성의 장점을 보유하고 있음 (그림 1.3).
- 면역기법의 식중독균에 대한 감도는 10^5 - 10^7 CFU/ml or g 정도이고, 유전자기법은 10^3 CFU/ml or g 이하 정도임.

1. 전통적 배지법 및 생화학적 테스트



2. 면역 항체법



3. Real-time PCR 법



그림 1.3 검출법 소요시간

- 식품업체들은 해썹(HACCP)의 원활한 적용을 위해서 식품검사를 통해 원료품의 사용 여부를 판단하고 완제품의 출시 여부를 결정해야 하므로, HACCP의 성공적인 실시는 위해요소가 될 수 있는 각 단계 혹은 부분을 수시로 모니터링(실시간 검사 혹은 신속검사)하여 시정 조치를 취하는 것이 가장 중요함.

나. Multiplex PCR 기법을 이용한 B. cereus 독소유전자 신속 동시검출 방법 도입 필요성

- 최근 품질 관리에 HACCP system이 도입되고 사후 제품 관리가 중요해지면서 식중독의 주요 원인균들을 신속하고 정확하게 검출하는 것이 필요하게 되었음.
- 지금까지 설사형 독소는 국외에서 많은 연구가 진행되어 왔으며 검출법으로는 HPLC, GC, MS(mass spectrometry) 등이 이용되었고, 최근에는 PCR로 16S rRNA의 특정유전자를 검출하여 동정하거나 독소를 확인하는 연구가 진행되고 있고 상품화된 키트로 enzyme linked immunoassay(ELISA)와 reversed passive latex agglutination(RPLA)이 있음.
- 그러나, 구토형 독소 생산 B. cereus균은 균주 분리 동정과 독소 생성 기작 등과 관련된 생리적 측면에 대한 연구가 현재까지 설사형 독소 균주 분리에 비해 상대적으로 미흡한 실정

이며 우리나라에서는 표준균주(reference strain)조차 없는 실정이고, 현재 기존의 B. cereus 균의 screening 방법이나 동정 방법은 주로 설사형 독소 생산 B. cereus를 대상으로 하여 개발된 방법임.

- 구토독소 생산 관련 유전자 검색만으로는 구토독소 생산 B. cereus 균주를 정확하게 동정하기 곤란하며, 현재 cereulide 구토 독소를 확인 동정하는 방법으로는 sperm assay 또는 cell culture를 이용하는 정성적 방법이나 cereulide와 화학적 구조와 분자량이 매우 유사한 valinomycin을 표준물질로 이용하여 HPLC-MS로 분석하는 정량적 방법이 많이 이용되고 있음.
- 따라서, 설사 독소 생성균의 확인을 위해 독소 유전자(hblACD, nheABC, cytK)들의 유무확인 및 구토 독소 생성균의 확인을 위해 구토 유전자(cereulide)를 각각의 PCR이나 multiplex PCR을 수행하는 것 보다, 구토 독소와 설사형 독소를 함께 동시에 검출해낼 수 있는 PCR용 프라이머를 제작하여 multiplex-PCR 반응을 수행하면 동시에 두 구토/설사 독소 생성균을 검출하는 것이 가능함.

다. conventional PCR 또는 real-time PCR을 활용한 독소생성 바실러스 세레우스 및 병원성 대장균의 동시검출

- PCR은 내열성 DNA 중합효소를 이용하여 시험관내에서 DNA 혹은 RNA(cDNA)를 대량으로 증폭시키는 기술로 이론적으로는 단 하나의 주형 DNA만 있어도 검출할 수 있는 감도가 높은 방법임.
- 1980년 중반부터 개발된 이래 생명공학뿐만 아니라 범죄사건 등을 해결하는 학문인 forensic science 등에도 쓰일 정도로 널리 이용되며, real-time PCR은 실시간 모니터링이 가능한 신 PCR 기술임.
- Real-time PCR의 장점
 - PCR 증폭과정을 실시간으로 모니터링 가능
 - 추가적인 전기영동 확인 과정이 필요 없음
 - 신속성 : 1시간 이내 검사 완료
 - 특이성 : Real-time PCR의 경우 Primers이외에 Probe의 특이성 추가
 - 민감성 : 이론적으로 1 CFU
 - 효율성 : PCR기와 시약의 자동화와 키트화로 사용이 편리하고 많은 샘플가능
 - 정량시험 : Ct 값과 균수(혹은 DNA 양)과의 관계를 이용하여 정량 가능 (큰 장점)
- 복수균검출능 (multiplex PCR): Probe의 형광물질 색을 복수로 사용 다수의 병원균 동시검출, 특히 병원균에 특이적으로 존재하는 DNA 정보를 사용하여 목표하는 세균을 검출할 수 있어서 널리 사용됨.
- 식중독 분야에서는 처음으로 미국의 Dupont Qualicon 회사가 BAX라는 PCR제품 출시하였으며 2000년대 접어들어 모든 제품을 Real-time PCR 시스템으로 전환(그림 1.4).
- PCR 기법 등 유전자 정보를 이용하여 상품화된 식중독균 진단키트 중 많은 제품들이 미국과 캐나다 등의 선진국에서 공식 시험법으로 채택되어 있음.

**United States Department of Agriculture
Food Safety And Inspection Service, Office of Public Health Science**

4C.6 The BAX[®] System for Screening *Salmonella* Test Procedure

Perform the screening on BPW pre-enriched samples following the current BAX[®] User's Guide. Also, follow the current BAX[®] User's Guide for preparing reagents, performing the test, and reading the results. The equipment must be set up, operated, and all records documented, according to laboratory work instructions.

4C.7 Interpretation of Results

a. Samples that test BAX[®]-negative will be reported as negative. Cultural analysis will continue as per MLG 4, Section 4.6, for a BPW pre-enrichment sample that tests BAX[®]-positive, BAX[®]-indeterminate, or has a BAX[®] signal-error result. Alternatively, for samples with BAX[®]-indeterminate or BAX[®] signal-error result the laboratory may review the cause and perform a correction. Based on the findings, the laboratory may analyze the indeterminate or signal-error result samples by:

- repeating the BAX[®] analysis from the rack loading step or
- preparing new BAX[®] tubes and repeating the analysis.

b. In analytical runs where the positive control tests BAX[®]-negative, indeterminate, or has a signal-error result, the entire batch of samples is affected and a review of the cause and a correction shall be performed. Based on the findings the laboratory may analyze the samples by:

- repeating the BAX[®] analysis from the rack loading step
- preparing new BAX[®] tubes and repeating the analysis or
- analyzing all of the samples culturally.

BAX[®] System PCR Assay for *E. coli* O157:H7

Sample preparation

Homogenize raw ground beef, beef trim, spinach or lettuce samples in prepared BAX[®] system *E. coli* O157:H7 MP enrichment broth (1:10 dilution).
Incubate at 42±1°C for 8-24 hours, depending on the work flow of your lab.
See the BAX[®] System User Guide for more information.

BAX[®] system protocol




8:00 Create rack file and warm up cycler.	8:05 Mix protease with lysis buffer and transfer 200 µL of lysis reagent to cluster tubes.	8:10 Transfer 20 µL samples to cluster tubes.
		
8:20 Heat cluster tubes for 20 minutes at 37°C, then 10 minutes at 95°C.	8:50 Cool cluster tubes for 5 minutes in lysate cooling block, then transfer 50 µL to PCR tubes in PCR cooling block.*	9:00 Place sealed PCR tubes in cycler and immediately click "NEXT" to run program.
		

그림 1.4 미국 농무성에서 살모넬라 검색 공인법으로 채택된 BAX real-time PCR 방법

라. Internal Amplification Control (IAC, 내재증폭대조유전자)를 활용한 real-time PCR

- 유럽의 European Standardization Committee는 International Standard Organization과 협동하여 반응액에 IAC를 첨가하여 PCR 분석을 하기 위한 가이드라인 설립 중임.
- 국제 저널에서도 국제 규격에 맞는 새로운 PCR 방법을 요구하므로 논문 투고 시 IAC가 추가된 진단용 PCR을 개발해야 함. 따라서, 위음성을 배제한 정확한 진단을 위해서는 IAC가 필수적이라는 것이 국제적인 추세
- Real-Time PCR은 샘플 내에 PCR 반응을 저해하는 물질이 존재하는 경우에는 위음성의 결과를 얻을 수 있음
- 이에 따라 Internal Amplification Control (IAC, 내재증폭대조유전자)를 이용하여 PCR inhibitor에 의한 위음성을 배제하는 것이 국제적인 추세임.
- 목표유전자와 primer를 공유하는 IAC를 디자인하여 IAC와 사카자키 및 살모넬라 균종을 동시검출하는 triplex real-time PCR의 실용화 필요함.

마. 신속검출키트의 도입 및 활성화 필요성

- HACCP의 실시로 인해 신속, 정확한 미생물의 검사가 공장뿐만 아니라 농장 등 생산지에서도 시행되고 단체급식소와 같은 서비스 기관에서도 시행되어지는 추세여서 식품 유해물질 검사에 대한 수요는 기하급수적으로 증가됨
- 기존의 분석방법으로 그 결과를 얻기까지 원료품의 신선도가 하락할 우려가 있으며 완제품

의 유효기간을 낭비할 수밖에 없는 상황이어서 신속 정확한 유해물질 검사키트 사용의 활성화가 시급함

- 특히 병원성 대장균 및 독소생성 *B. cereus*균의 경우 확진까지 시간이 오래 걸리고, 분류방법이 까다로워 단시간 내에 결과를 얻을 수 있는 신속검출키트의 개발이 절실함
- 현재 real-time PCR 키트를 비롯한 다양한 분자생물학적, 면역학적 키트가 개발되었으나 대부분 대장균 O157:H7 혹은 비병원성 대장균 검출과 관련된 키트임(표 1.4)이며, 구토·설사형 독소생성 *B. cereus*의 동시검출 PCR kit는 개발된 것이 전무하며, 상용화 되지도 않았음
- 병원성 대장균 및 독소생성 *B. cereus*균의 신속 검출 및 병원성 분류에 사용가능한 신속검출 키트의 개발은 희소하며 인증 받은 제품도 없음

표 1.4. AOAC 등을 통하여 인증받은 대장균 검출 키트

Company	Kit Name	Recognition
3M Microbiology Products	·Petrifilm <i>E. coli</i> Count Plate	<ul style="list-style-type: none"> ◆ AOAC Official Method 991.14 ◆ AFNOR ◆ FDA-BAM 8th ed., Rev. A ◆ Health Protection Branch- CANADA MFHPB-34 ◆ NMKL 147.1993 ◆ USDA-FSIS: Pathogen/HACCP Final Rule
BioControl Systems Inc.	ColiComplete	◆ AOAC Official Method 992.30
	ColiTrak	◆ AOAC Official Method 966.24
	ColiTrak +	◆ AOAC Official Method 988.19
	SimPlate coliform/ <i>E. coli</i>	◆ EMMAS
BioMerieux	VIDAS <i>E. coli</i> O157 (ECO) Test w/ O157:H7 ID Agar	◆ Performance Tested Method; Certificate no.010502
	VIDAS Immunoconcentration System	◆ Performance Tested Method; Certificate no.010502
Droege's Wholesale Food Service	RapidChek™ for <i>E. coli</i> O157 (including H7) Lateral Flow Assay	◆ Performance Tested Method; Certificate no. 070201
Dynal Biotech	Dynal Anti- <i>E. coli</i> O157	<ul style="list-style-type: none"> ◆ AFNOR Cert. no. DYN 16/2-0696 ◆ FDA-BAM, DIN 10167, ◆ Health Canada, ◆ NMKL Official Method of Japan
IGEN International	PATHIGEN <i>E. coli</i> O157 Test	◆ Performance Tested Method; Certificate no. 010301
Matrix MicroScience Ltd	PATHATRIX <i>E. coli</i> O157 Test System	◆ Performance Tested; Certificate no. 030202
Molecular Circuitry	Detex System MC-18 for <i>E. coli</i> O157 including H7	◆ Performance Tested Method; Certificate no. 000301
Neogen Corporation	ISO-Grid + SD39 Agar	◆ AOAC Official Method
Neogen Corp.	Alert for <i>E. coli</i> O157	◆ AOAC Official Method 2000.13
	REVEAL 8 for <i>E. coli</i> O157	◆ AOAC Official Method 2000.13
	REVEAL for <i>E. coli</i> O157	◆ AOAC Official Method 2000.14

5. 연구개발의 필요성

- 최근 병원성 대장균은 다양한 변종이 생성되고 있고, 환경변화에 따른 독소생성 *B. cereus*의 식중독 발생의 규모도 커져 다양한 유전자를 신속하게 동시에 잡을 수 있는 검출기술의 개발이 필요함
- Multiplex conventional PCR 및 IAC를 조합한 multiplex real-time PCR 기술의 개발을 통하여, 신속하고 정확한 독소 생성 *B. cereus* 균종들 또는 5종의 병원성 대장균들 각각에 대한 신속 동시검출이 가능함.
- 또한 일선 검사현장에서 간편하게 사용가능한 키트의 제조를 통해 독소생성 *B. cereus* 및 병원성 대장균에 대한 검출이 가능함.
- 본 연구에서는 독소생성 *B. cereus*균 및 병원성 대장균의 동시검출이 가능한 multiplex PCR kit 및 multiplex real-time PCR kit를 개발하여 특허를 획득하고 상용화에 필요한 기초 연구를 수행하였음.

제2절 연구성과 목표 대비 실적

1. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 지식재산권: 특허 출원 4건, 등록 1건	목표 초과 달성함: 특허 출원 9건, 등록 4건
② 기술이전 2건	목표 달성함: 기술이전 2건
③ 제품화 2건	목표 달성함: 제품화 2건(시제품 5건)
④ 학술성과: 논문 10편(SCI 5편, 비SCI 5편)	목표 초과 달성함: 논문 14편(SCI 10편, 비SCI 4편)
⑤ 기타 (당초 목표에 없음)	인력양성 3건, 학술발표 6건, 홍보전시 1건

2. 연구목표 대비 성과

성과목표	10화지표								연구기반지표								
	지식재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타 연구용 등)	
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문				학술발표	정책활용		홍보전시
										SCI	비SCI						
최종목표	4	1	2	2					5	5							
연구기간 내 달성실적	9	5	3	2					10	4	6		3		1		
달성율(%)	225	500	150	100					200	80	100		100		100		

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국외 기술개발 현황

1. 바실러스 세레우스 검출

- *Bacillus cereus*의 설사형 식중독 발병은 옥수수전분, 마쇄감자, 야채류, 육류 제품, 푸딩, 수프, 양념류 등의 곡류 제품과 관련이 있으며 구토형 식중독은 볶음밥이나 찌밥에서 발생되는데, 약 10^5 cells/g 이상을 섭취하면 식중독을 발생시키는 것으로 보고되었으며 FDA는 $10^5 \sim 10^8$ CFU/g의 *Bacillus cereus*균이 존재하는 식품을 섭취할 경우 식중독을 일으킬 수 있다고 보고하였음.
- 미국의 경우 *B. cereus*균에 의한 식품 매개 질환자는 매년 27,360명이 육류, 우유, 야채류, 생선의 섭취로 발생하며, Norway(1988~1993)에서는 식중독의 33%, Iceland(1985~1992)는 47%, Finland(1992)는 22%, Netherland(1991)는 8.5%, Denmark(1990~1992)는 5%, England와 Wales는 0.7%, Japan은 0.8%, Canada는 2.2%, Australia(1977~1984)에서는 *B. cereus*균에 의한 식중독 발생률은 39%였다고 보고되었음.
- 미국에서는 식중독에 의한 의료비용과 생산성 손실이 US\$ 6.6~37.1 billion의 손실이 있었으며(Buzby, 1997) 영국에서도 5종의 병원성세균에 의한 의료비용 및 생산성 감소에 따른 경제적 효과가 연간 £300~700 million에 달한다고 평가하였다(Roberts, 1989).
- 호주에서도 연간 11,500건의 식중독 사고에 의해 연간 A\$ 2.6 billion의 경제적 손실을 보았다고 보고하였으며(ANZFA, 1999) 캐나다에서도 식중독에 의한 경제적 손실을 US\$ 1.3 billion으로 평가한 바 있음(Todd, 1989).
- *B. cereus*균의 오염현황을 살펴보면, 미국이나 영국에서는 쌀밥에서 오염된 *B. cereus*균이 대부분 $<10^2$ CFU/g의 낮은 수준의 오염도를 나타내었고, 대만에서도 즉석섭취식품의 경우 10^{2-3} CFU/g 정도 오염되어 있는 것으로 보고되고 있음(오 등, 2008)
- 스코틀랜드의 한 중국식장에서 8명이 음식을 먹은 지 3시간 이내에 구토와 설사를 하였는데 환자의 분변, 반죽 속의 닭고기, 쇠고기 요리 및 볶음밥에서 *B. cereus*가 검출되었으며, 인도 식당에서 카레라이스를 먹은 두 사람이 급성 구토를 하여 조사한 결과 1명에게서 *B. cereus*가 검출된 예도 있음(Rowan and Anderson, 1998)
- *B. cereus*와 *B. cereus* 독소의 위해평가 (Notermans and Batt, 1998) 결과, 중국음식이나 쌀로 만들어지는 혼합식품은 미국(12/21 from 1988-1992), 네덜란드(17/40 from 1992-1994), 캐나다 (17/39 from 1985-1986)에서 가장 일반적인 *B. cereus*균 및 독소의 식품 매개체로

확인되었음

- Simone(1997)은 *B. cereus*를 포함한 네덜란드 사고의 42.5%는 중국과 인도네시아식 음식과 연관되었다고 보고하였으며 중국과 인도네시아식 음식은 가장 빈번하게 의심되는 매개체이고, 가장 높은 범주(육류와 육류생산물)의 수치보다 두 배가 높다고 보고되었으며 중국식 음식으로 인해 발생한 43.8%의 비슷한 수치는 캐나다에서도 발견되었음(Todd, 1992).
- 영국에서는 의심되는 식품 매개체로 인한 사건의 6.3%가 쌀로 만든 음식 때문이었고 이 사고의 47.8%는 *B. cereus*에 의해 야기되었으며 (Evans et al., 1998) 1992년부터 2000년까지 보고된 12건의 식중독 사고가 *B.cereus*의 enterotoxin 때문에 일어났으며, 53명이 중국식이나 인도식 테이크아웃 음식점으로부터 구입한 쌀을 소비한 후에 영향을 받았음 (Little et al., 2002).
- Agata 등(2002)은 구토형 식중독과 관계된 식품인 밥, 면, 파스타, 빵 등 총 40개의 시료에서의 emetic toxin의 생성을 확인하였고 13개의 시료에서 10 - 1280 ng/g 수준의 독소가 검출되었으며 밥이나 볶음밥에서의 구토독소 수준이 다른 식품보다 높게 검출되었다고 보고하였음
- *B. cereus*에 의한 설사형 독소생성에 관한 검출방법은 주로 외국에서 많은 연구가 진행되어 왔으며 PCR을 이용한 분자생물학적방법이나 면역학적입 방법이 개발되었는데, 독소를 확인하는 검출법으로는 HPLC, GC, mass spectrometry 등이 이용되었고, 최근에는 PCR로 16S rRNA의 특정유전자를 검출하여 동정하거나 독소를 확인하는 연구가 진행되고 있음.
- 또한, 현재 상품화된 kit로는 enzyme linked immunoassay(ELISA)와 reversed passive latex agglutination(RPLA)이 널리 이용되고 있음. 최근에는 PCR로 hblA, hblC, hblD, nheA, nheB, nheC, cytK 등 설사 독소 유전자를 검출하여 동정하거나, 독소 단백질을 확인하는 enzyme linked immunoassay(ELISA)와 reversed passive latex agglutination(RPLA) 방법의 상품화된 kit가 개발되었음.
- 반면에, 구토형 식중독은 설사형 독소와는 달리 저분자의 내열성을 가진 cyclic dodecadepsi-peptide (Cereulide) 구토독소에 의해 발생하며 영국, 미국, 일본 등에서 분리 보고되고 있으나, cereulide 생산 유전자가 아직 정확하게 밝혀지지 않아 저분자 환상구조의 아미노산 펩타이드가 Ribosomal에서 생산되지 않는다는 과학적 사실에 근거하여 Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) 유전자를 target으로 PCR을 실시하여 구토독소 *B. cereus* 균주를 동정하고 있으며 ribosome에서 독소 유전자가 발현되지 않기 때문에 항원·항체 반응에 의한 상업적 kit가 개발되지 못하고 있음.
- 다양한 시료에서 분리된 식중독 미생물을 신속하게 검출하는데 상업적으로 이용되고 있는 대표적인 kit 및 제조회사들의 목록의 다음과 같으며 이중 *B. cereus* 균이 생산하는 구토형 독소의 진단 키트는 아직 상업화 하지 못하고 있음(표 2.1).

- 일본에서는 HPLC-MASS, Sperm assay, cell culture 등의 방법으로 구토 독소가 확인 된 *B. cereus* 구토 독소 균주를 대상으로 RAPD 방법을 이용 설사 독소 생산 *B. cereus* 균주와 구토 독소 생산 *B. cereus*의 유전형 차이점을 밝혀내고 이를 기반으로 특정 유전자를 대상으로 한 PCR primer 개발이 연구되었음.

표 2.1 대표적 *B. cereus* 검출 kit

제조회사	적용 기술
BioControl System (Belleveus, WA)	Lateral-flow, ELISA
Neogen (Lansing, MI)	Lateral-flow
BioMerieux (Marcyl, Etoile, France)	Fluorescent immunoassay
Tecra (France Forest, NSW, Australia)	Dipstick, ELISA
Igen (Gaithersburg, MD)	Electrochemiluminescent immunoassay
Molecular Circuitry	Electroimmunoassay
Organon Teknika (Boxtel, Netherlands)	ELISA
GeneTrack (Hopkinton, MA)	ELISA
DuPont Qualicon (Wilmington, DE)	PCR
Bio-Rad	PCR, PCR-Hybridization
TaKaRa	PCR

2. 병원성 대장균의 검출

- 국외에서는 유전자 기법과 신속검출기법 등이 이미 보편화 되어있어 신속하고 경제적인 식중독균의 관리에 기여하고 있음.
- US FDA의 식품검사 업무를 담당하는 ORA(Office of Regulatory Affairs)의 실험실에서는 Real-time PCR 기기를 갖추고 *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Vibrio*, Norovirus 등의 검출에 사용하기 위한 검출법 평가와 검증 과정을 거쳐 적극 활용함으로써 식품검사에 능동적으로 대처하고 있음.
- 새로운 검출방법은 AOAC에서 제정한 가이드라인에 따른 검증(validation) 과정을 거쳐 공인 인증법에 수록되어 공식적인 인증을 받음.
- 유럽에서도 Real-time PCR 방법과 같은 새로운 식중독 원인균 검출 방법이 활발히 개발되어 왔으며 표준화 방법으로 채택되기 위해서는 CEN (Comite Europeen de Normalisation)의 인증을 받아야 함.

- 검사업무를 담당하고 있는 미국 FDA나 USDA 그리고 캐나다의 Health Canada는 첨단기술을 사용한 크롬배지, 진단키트, 유전자 기법의 사용을 권장하고 있음(그림 2.1).

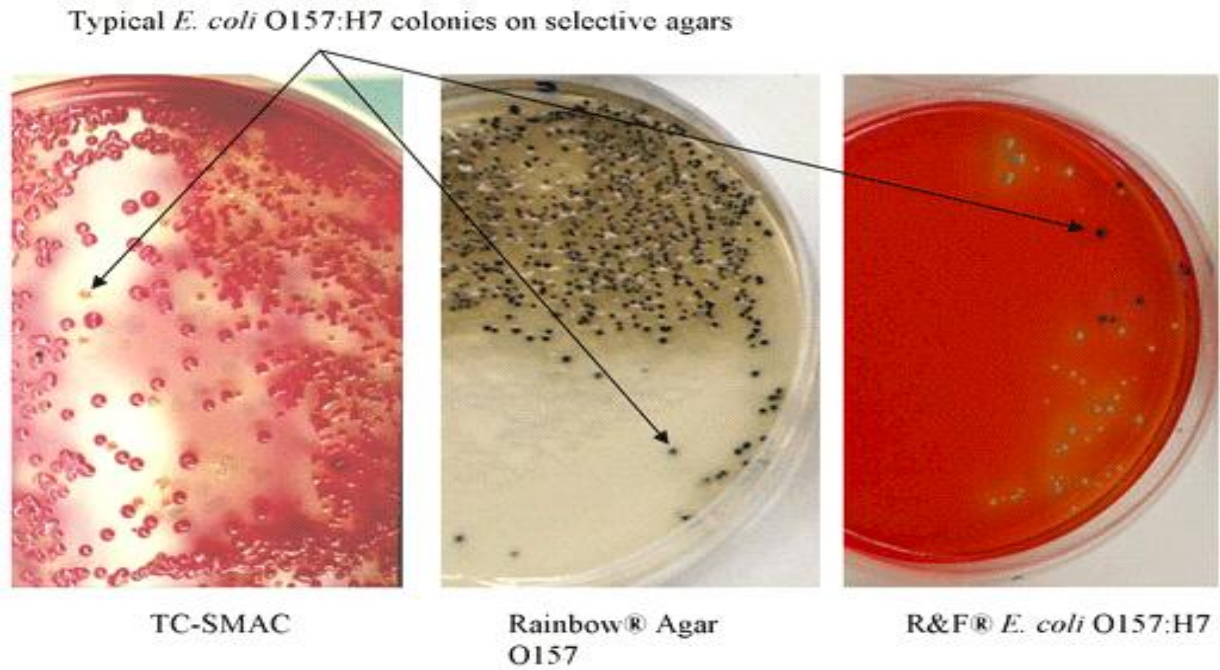


그림 2.1 USDA에서 O157:H7의 검출의 사용되는 크롬아가(Rainbow agar)

- 자체 개발을 위해서는 많은 연구 인력과 다년간의 연구기간이 필요하고 진단키트 개발회사들이 우수한 제품들을 제조하기 때문에 미국이나 캐나다의 식품안전 행정기관에서는 상용화된 제품들을 Validation하여 공식 검출법으로 채택하는 경우가 대부분임.
- 이러한 기술 개발은 Neogen, 3M 등 국제적인 미생물 진단키트 회사를 통해 이루어지고 있으며(표 2.2), 상용화된 검사 기법이나 키트는 AOAC 등 공인 검증기관의 다양한 검증 프로그램을 통해 제조사 자체적으로 검증과정을 거친다.

표 2.2 미국 FDA/USDA 등에서 병원성 대장균 및 일반대장균의 검출을 위해 사용하는 PCR


Target	Product	Method	Company
<i>Escherichia coli</i>	GENE-TRAK	Probe	Neogen
<i>E. coli</i> O157:H7	BAX	PCR ^a	Qualicon
	Probelia	PCR	BioControl

^a PCR, Polymerase Chain Reaction

제2절 국내기술동향

1. 바실러스 세레우스 검출

- 우리나라에서 연간 발생하는 식중독 환자는 약 1,185만 명이고, 입원 환자수는 총 15.4만 명으로 전체 인구의 약 0.3%정도를 차지하며 이러한 식중독 환자에 의한 사회·경제적 손실비용은 1조 3,107억 원으로 추정되었는데 이는 2000년도 우리나라 GNP의 0.28%, 2002년도 정부예산의 1.16%에 해당됨(Park, 2001).
- 현재 우리나라에서는 무순, 샐러드 등의 신선편의식품이 최근 식품공전 상 새로운 유형으로 고시하였고 미생물기준규격이 입안예고(제2007-16호, 2007. 1. 29)됨에 따라 이들 비가열 즉석섭취식품에 대하여 위해세균인 *B. cereus*와 *Clostridium perfringens*가의 검출한도를 각각 제품에서 10^3 CFU/g과 10^2 CFU/g이하로 검출되어야 한다고 정량기준을 신설하였음.
- 우리나라에서 식품에 오염된 *B. cereus*균의 현황을 보면 대부분 선식, 곡류 및 고춧가루 등의 오염도 조사가 정성적인 결과로 보고되어 있으며 정량적으로는 생식이나 김밥에서 *B. cereus*균이 약 0.7~3.4 log CFU/g정도 오염되어 있는 것으로 보고되고 있음(Park 등).
- 우리나라에서도 BT 산업의 눈부신 발전으로 최첨단 기법을 이용한 식중독 원인균 검출법 개발이 활발히 진행 중이며 일부 식중독균에는 상품화된 사례도 보고되고 있으며, 대표적인 기업으로는 1997년 설립된 (주)코메드의 경우, Easy 24E Plus, Easy 24NE 등과 같은 미생물 동정 키트를 출시하였으며, 2000년 3월에 설립된 (주)코젠바이오텍은 식품위해물질 검출법 제조회사로는 가장 많은 제품을 출시하고 있음(그림 2.2)



Pathogen	Target gene
<i>Campylobacter jejuni</i>	probe
<i>E. coli</i> O157:H7	stx1, stx2
<i>Staphylococcus aureus</i>	femA
<i>Bacillus cereus</i>	bceT
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	tox R
<i>Listeria monocytogenes</i>	iap
<i>Yersinia enterocolitica</i>	16SrDNA
<i>Salmonella</i> spp.	invA
<i>Vibrio cholerae</i>	alpha-toxin
<i>Vibrio vulnificus</i>	hemolysin
<i>Clostridium perfringens</i>	alpha-toxin
<i>Shigella</i> spp.	virA

그림 2.2 바실러스를 비롯한 다양한 병원성 세균 검출용 PCR 키트의 예 (코젠 바이오텍)

- 현재까지 *B. cereus*균에 관한 국내의 연구동향을 살펴보면, 대부분 *B. cereus* 오염도 조사와 특성규명, 분리 균주의 설사형 독소 유전자 분포 및 생성에 초점이 맞추어져 있고, 구토

형 독소 생성 *B. cereus* 분리 동정이나 검출기법에 관한 연구는 거의 전무하며 단지 2008년 구토형 독소 생성 *B. cereus* 분리를 real time PCR로 분석한 연구결과가 2008년에 1건 보고되었으나 구토형 독소(cereulide)생성 *B. cereus* 분리를 직접 검출하여 구토 독소 생산 *B. cereus* 균주를 분리 동정하고자 하는 시도는 전무한 실정임.

- 현재, PCR을 이용한 구토독소 생산 관련 유전자 검색으로 구토독소 생산 *B. cereus* 균주를 정확하게 동정하기 곤란하기 때문에 독소생성 확인방법으로 *B. cereus*균주가 생산하는 cereulide 구토독소를 sperm assay 또는 cell culture 방법으로 정성하거나 cereulide와 화학적 구조와 분자량이 매우 유사한 valinomycin을 표준물질로 HPLC-MS를 이용한 정량분석 방법이 사용되고 있으나 아직 국내에서는 구토형 독소분석을 위한 이러한 방법들이 확립되어 있지 않음.
- 일본에서는 *B. cereus*에 의한 식중독의 경우, 설사형 독소 구토형 독소질환이 10배 이상 많이 보고되고 있는데, 식이문화가 일본과 매우 유사한 우리나라에서는 *B. cereus*에 의한 식중독이 대부분 설사형 독소로 보고되고 있으며 구토형 독소에 대한 보고는 거의 전무한 상태이므로 이에 대한 연구가 매우 시급한 것으로 사료됨.
- 본 연구진이 보유하고 있는 설사형 독소 생성 *B. cereus*균을 대상으로 하여 구토형 독소생성 유전자로 PCR을 한 결과, 일부 설사형 독소생성 균주들은 구토형 유전자를 갖고 있는 것을 확인하였으며 이 균주를 HPLC-GC로 cereulide 생성유무를 확인 한 결과, 설사형 독소생성 균주가 구토형 독소인 cereulide를 생성하는 것을 확인하였으며(Park et al. 2013), Ehling-Schulz 등(2006)도 이와 유사한 결과를 보고하였음
- 따라서, *B. cereus*의 분리는 설사형과 독소형을 분리하여 검출하기 보다는 설사형 독소와 구토형 독소를 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR primer kit를 개발하여 설사형 및 구토형 독소 생산 *B. cereus*균을 동시에 screening하고 동정하는 연구가 식품의 안전성을 확보하고 신속 정확한 검출을 하는데 매우 중요하고 유익할 것으로 사료됨.

2. 병원성 대장균의 검출

- 최근 PCR을 이용한 병원성 대장균의 검출방법이 식품공전에 정식으로 등재되었음(표 2.3)

표 2.3 식품공전에 등재된 VT toxin 검출 method

유전자	염기서열(5' → 3')	결과확인
VT1	(F) CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G (R) AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	150bp
VT2	(F) ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G (R) GCG TAT CGT ATA CAC AGG AGG	584bp

- 그러나, 이러한 방법은 병원성 대장균의 분류를 위한 것이 아니라, Verotoxin (VT toxin)을 검출하기 위한 방법이므로, VT toxin을 생성하지 않는 다른 병원성 대장균의 검출에는 한계가 있음.
- 국내에도 병원성 대장균을 비롯한 다양한 식중독 세균을 검출 및 제어하기 위한 PCR 키트가 코젠바이오텍 등에서 개발되어 있음.
- 그러나 병원성 대장균은 변종이 많고 다양한 유전자가 관여하고 있어, 개선된 검출민감도를 지닌 병원성 대장균 검출 키트의 개발이 필요함.

3. 병원성 대장균의 검출 관련분야 산업화 현황

- 병원성 대장균을 비롯한 다양한 식중독 세균을 검출 및 제어하기 위한 PCR 키트가 개발되고 있음(그림 2.3).
- Statens Serum Institut (SSI)의 병원성 대장균 검출 Kit인 DEC PCR kit는 덴마크에서 생산되는 PCR kit임. 연구기관에서 병원성 대장균 검출에 사용 중이나 5종 병원성 대장균 중 EAEC를 제외한 4종의 병원성 대장균만을 검출할 수 있고, 또한 Internal Positive control로 *16s rRNA*를 Target gene으로 사용하고 있음. 이 *16s rRNA*는 *Shigella spp*의 *16s rRNA*와 99% 유사성을 지니므로 Kit의 특이도는 다소 떨어짐..
- 바이오니아 사에서 생산하는 AccuPower® ETEC PCR Kit는 병원성 대장균의 독소 검출에 특화된 PCR kit임. 특히 가축의 분변 및 화장에서 분리된 병원성 대장균 검출에 사용되고 있음. 그러나 독소생성 병원성 대장균만을 검출하고 있으므로 독소를 생성하지 않는 다른 병원성 대장균은 검출하지 못함.

- Dupont 사의 BAX system *E. coli* O157:H7 kit는 US DA의 공인 검출법에서 사용되고 있는 PCR kit임. 신속하게 *E. coli* O157:H7 검출이 가능한 장점을 지니나 그 외의 병원성 대장균을 검출하지 못한다는 단점을 지님.
- 이처럼 시판 중인 병원성 대장균 검출 키트는 병원성 대장균의 많은 변종과 다양한 유전자로 각기 다른 장단점을 지니고 있으나, 공통적으로는 5종의 병원성 대장균을 동시에 검출하기 어렵다는 단점이 있음.
- 따라서 개선된 검출민감도를 지닌 병원성 대장균 검출 키트의 개발이 필요함.

		
<p>DEC PCR kit (Statens Serum Institut)</p>	<p>AccuPower® ETEC PCR Kit (Bioneer)</p>	<p>BAX system <i>E. coli</i> O157:H7 (DU PONT)</p>

그림 2.3 시판 중인 병원성 대장균 진단 kit의 예

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 *B. cereus* 구토·설사형 동시검출 multiplex conventional PCR 기법 확립

<요약>

- 바실러스 세레우스에서 구토형 및 설사형 독소 유전자들, non-ribosomal peptide synthetase (NRPS/CER primers), cereulide (*ces*), haemolysin BL (*hblDCA*), enterotoxin FM (*entFM*), non-haemolytic enterotoxin (*nheABC*), 및 cytotoxin K (*cytK*)을 목표 대상으로 하는 제1 프라이머 세트를 개발함(표 3.1).
- 제1 프라이머 세트의 multiplex PCR 조건을 최적화함: [95°C 10min, (94°C 1min, 54°C 1min, 72°C 1min) × 35 cycles, 72°C 5min] (표 3.3)
- 제1 프라이머 세트의 민감도 및 특이도를 구토 및 설사형 표준균주들에서 검증함. 비목표 세균들에서 PCR 결과는 음성으로 나왔으므로 이들 프라이머들의 특이도는 매우 높은 것으로 증명됨. *groEL*은 모든 바실러스 세레우스 균주들에서, CER(NRPS)은 구토형 균주들에서만 양성으로 나타났으나, 설사형/장독소형 유전자들은 설사형 및 구토형 균주들 양쪽에 혼재하였음.
- 한국에서 분리한 야생형균주로서 구토형 *B. cereus* 71균주와 설사형 *B. cereus* 425균주 등 496 균주들에 대한 PCR 검출시험 결과, *B. cereus* group 마커인 *groEL*은 모든 균주들에서 양성이었으며(100%). 구토형 독소 관련 유전자(*NRPS*(CER) 및 *ces*)는 구토형 균주들에서만 발견되었으나, 설사형 장독소 유전자들인 *hblD*, *nheA*, *entFM* 및 *cytK*의 검출율은 각각 59.4%, 92.3%, 77.2% 및 47.5%로써 매우 다양한 유전자 프로파일을 나타냈음.
- 바실러스 세레우스 순수배양액 및 인위접종한 식품 시료에서 multiplex PCR의 검출한계를 측정함. 순수배양액 시료의 genomic DNA에 대한 PCR 검출한계는 2 pg/reaction tube 이었으며, 인위접종한 시료에서는 약 10³ cfu/g 시료 이었음.
- 농식품(쌀과 김밥) 및 환경(토양과 소분변) 시료들(각 36개 총 144개)에 대한 PCR 기법의 바실러스 세레우스 오염도 검출율은 전통적 방법인 배지배양법과 비교하여 유사하거나 경우에 따라 약간 낮은 것으로 나타남. 바실러스 세레우스의 검출 빈도는 쌀, 김밥, 토양 및 분변에서 각각 63.8%, 38.9%, 84.6% 및 69.2%였음.
- 결론적으로 제1 프라이머 세트의 동시검출 multiplex PCR은 전통적 배지배양법보다 더 나은 검출율을 보이지는 않았으나, PCR 기법은 신속성, 경제성, 효율성 등 많은 장점을 가지므로, 목표 유전자 및 세균들에 대한 민감도 및 특이도 등에서 보다 우수한 primer set의 개발이 필요함(제2절의 제2 및 제3 프라이머 세트 개발).

1. *B. cereus* 구토·설사형 동시검출 multiplex PCR 기법 최적화

가. multiplex PCR primer 디자인

- Primer 디자인은 NCBI(National Center for Biotechnology Information /www.ncbi.nlm.nih.gov)에 각 독소 유전자를 검색하였고 NCBI에 등재된 염기서열을 기초로 디자인하였으며 확보된 독소 유전자 단편의 양 말단에서 약 20 bp 내외의 염기서열에 대응하는 oligonucleotide를 합성하였음.
- Primer 디자인 프로그램은 Genefisher 2 web-based program (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/>)를 이용하였고, 새롭게 디자인된 multiplex PCR용 1st primer set는 다음 표에 나타냄(표 3.1).
- 구토 및 설사형 독소유전자는 본 연구실에서 보유한 기술을 바탕으로 HPLC-MS analysis, Hep-2 cell culture vacuolation assay, PCR 및 *B. cereus* enterotoxin detection kit등을 사용하여 *B. cereus* 균주들에서 분석하였음.

표 3.1 본 과제에서 새로 디자인한 프라이머들(제1 세트)과 그 목표 유전자 및 프라이머 서열, PCR 산물의 크기 및 유전자 번호
(Multiplex PCR newly designed primers and their design source)

Target gene	sequence	Product length	Design source ¹⁾
<i>groEL</i>	AGCTATGATTCGTGAAGGT	236	AB077143
	AAGTAATAACGCCGTCGT		
<i>entFM</i>	AGGCCAGCTACATAACAACG	327	AY789084
	CCACTGCAGTCAAAACCAGC		
<i>hblC</i>	CGCAACGACAAATCAATGAA	421	AY786407
	ATTGCTTCACGAGCTGCTTT		
<i>CER</i>	GCGTACCAAATCACCCGTTT	546	AY576054
	TGCAGGTGGCACACTTGTTA		
<i>nheA</i>	GGAGGGGCAAACAGAAGTGAA	750	DQ019312
	CGAAGAGCTGCTTCTCTCGT		
<i>cytK</i>	TGCTAGTAGTGCTGTAAGTC	881	DQ019311
	CGTTGTTCCAACCCAGT		

¹⁾ 유전자는 행(genebank)에서의 유전자 아이디

나. multiplex PCR 조건 최적화 및 재설정

- 구토독소형 *B. cereus* F4810/72과 설사독소형 *B. cereus* ATCC 12480 표준균주에서 singleplex PCR 기법을 이용하여 각각의 최적 PCR 조건과 1st primer sets을 검증하였음.
- 최적 PCR 온도 조건을 설정하기 위하여 다음 표와 같이 thermal cycle의 조건으로 검증하였고, 그 중 No. 8 [95°C 10분, (94°C 1분, 54°C 1분, 72°C 1분) x 35회 반복, 72°C 5분]를 PCR의 최적온도 조건으로 설정하였음(표 3.2).

표 3.2 Different thermal cycles investigated to find best PCR condition

No.	Pre-denaturation	Thermal cycles	Final extension
1	94°C 2min	(94°C 40sec, 52°C 40sec, 72°C 1min) × 35	72°C 5min
2	94°C 2min	(94°C 40sec, 52°C 1min, 72°C 1min) × 35	72°C 5min
3	94°C 2min	(94°C 40sec, 54°C 40sec, 72°C 1min) × 35	72°C 5min
4	94°C 2min	(94°C 40sec, 54°C 1min, 72°C 1min) × 35	72°C 5min
5	95°C 5min	(94°C 1min, 56°C 1min, 72°C 1min) × 35	72°C 5min
6	95°C 10min	(94°C 30sec, 54°C 1min, 72°C 1min) × 35	72°C 5min
7	95°C 10min	(94°C 30sec, 54°C 1min, 72°C 1min) × 35	72°C 5min
8	95°C 10min	(94°C 1min, 54°C 1min, 72°C 1min) × 35	72°C 5min

- 모든 PCR 분석은 10-15 ng of DNA template를 사용하여 Mygenie32 Thermal Block thermal cycler 기기에서 수행하였으며, 검증된 최종 최적조건에서 15, 20, 25, 30, 35 pM의 primer와 1, 1.5, 2 U의 Taq polymerase의 함량을 조절하여 최적 PCR 조건을 설정하였음.
- 모든 시약 함량의 최적조건을 다음 표와 같은 조건으로 설정하였음(표 3.3)..

표 3.3 개발된 최적의 PCR 내용물 및 제1프라이머 세트의 농도 및 함량
(Optimum PCR conditions and concentrations of 1st set of primer developed)

Component	Volume
Tris-HCl	10 mM
MgCl ₂	1.5 mM
KCl	40 mM
dNTP mixture	250 μM
Taq polymerase (Takara Taq™, Otsu, Japan)	1 U
<i>cytK</i> primers (forward/reverse)	30 pM each
<i>nheA</i> primers (forward/reverse)	30 pM each
<i>CER</i> primers (forward/reverse)	20 pM each
<i>hblC</i> primers (forward/reverse)	20 pM each
<i>entFM</i> primers (forward/reverse)	15 pM each
<i>groEL</i> primers (forward/reverse)	20 pM each
DNA template	10-15 ng
Total volume	25 μL

다. 최적 multiplex PCR 조건 재설정을 위해 사용된 균주들

- 구토/설사형 독소 동시검출 multiplex PCR 기법 연구과정 중 사용된 세균은 설사형 7균주 (표준균주 7), 구토형 11균주(표준균주 1 및 야생형 분리균주 10균주), *B. cereus* group 5 균주, 비목표 세균(non-target bacteria) 12균주 등 총 34균주를 사용하였으며 다음 표에 명시하였음(표 3.4)
- 개발된 multiplex PCR 기법을 검증하기 위해 사용된 wild type *B. cereus*는 총 496균주를 사용하였으며 서로 다른 분리원(feces, vomit, doenjang, vegetables, rice, green tea, kimbab, soil, rice cake, food 그 외 unknown source)에서 검출하였음.

표 3.4 본 연구에 사용한 바실러스 세레우스 표준균주 목록 I
(The list of Reference Bacterial strains used in the study)

Emetic reference strains	Enterotoxigenic reference strains	<i>B. cereus</i> group members	Non-target bacteria
<i>B. cereus</i> F4810/72	<i>B. cereus</i> ATCC13061	<i>B. thuringiensis</i> KCTC1508	<i>Escherichia coli</i> KCCM32396
<i>B. cereus</i> JNHE36	<i>B. cereus</i> ATCC12480	<i>B. thuringiensis</i> 824	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895
<i>B. cereus</i> JNHE78	<i>B. cereus</i> KCTC1013	<i>B. mycooides</i> KCTC 3453	<i>Salmonella</i> typhimurium ATCC14028
<i>B. cereus</i> KUGH164	<i>B. cereus</i> KCTC1014	<i>B. weihenstephanensis</i> KACC12001	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19119
<i>B. cereus</i> KNIHuls1	<i>B. cereus</i> KCTC1092	<i>B. pseudomycooides</i> KACC12098	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19115
<i>B. cereus</i> KNIHuls3	<i>B. cereus</i> KCTC1094		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC12500
<i>B. cereus</i> KNIHuls4	<i>B. cereus</i> KCTC1526		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC27729
<i>B. cereus</i> KNIHuls5			<i>Clustridium perfringens</i> KCTC5101
<i>B. cereus</i> KNIHuls7			<i>B. subtilis</i> KCCM11316
<i>B. cereus</i> KNIHuls8			<i>B. subtilis</i> KCTC3135
<i>B. cereus</i> KFDA250			<i>Pseudomonas putida</i> KCCM35479
			<i>Escherichia coli</i> ATCC3565

라. Multiplex PCR primer의 특이도와 정확도 분석

- 1st primer set-using Multiplex PCR법으로 구토 및 설사독소 유전자 검출의 특이도와 정확도를 순수한 액체 배지에서 배양 후 분석한 결과는 다음 표와 같음(표 3.5).
- *B. cereus* group 유전자인 *groEL*은 구토 및 설사형 *B. cereus* 균과 상관없이 모든 *B. cereus* 균에서 검출되었음.
- 구토 유전자인 *cer*은 구토형 *B. cereus*에서만 검출되었음.
- 대부분의 설사독소 유전자들은 설사형 *B. cereus*에서 검출되므로 새로 디자인된 primers의 특이도와 정확도가 우수한 것으로 판단됨.
- 표 3.5에서 바실러스 세레우스 설사독소형 3 균주와 구토독소형 1 균주에 대한 구토 및 설사 관련 유전자들에 대한 PCR 후, 2% gel에서 전기영동 한 결과는 그림 3.1과 같음.
- *B. thuringiensis* KCTC 1508, *B. thuringiensis* 824, *B. mycoides* KCTC 3453, *B. weihenstephanensis* KACC 12001, *B. pseudomycooides* KACC 12098는 *B. cereus* group으로 *groEL* primer에 의해 검출되었음(그림 3.2).
- 이 결과는 새로 디자인된 *groEL* primer는 *B. cereus* group의 균을 확인 할 수 있는 효과적인 primer임을 입증함..
- *B. cereus* 이외의 non-target 세균 6 균주를 사용하여 1st set of primers의 특이도와 정확도를 평가한 결과는 그림 3.3과 같음.
- 실험에 사용된 non-Bacillus cereus 균주들 모두에서 PCR 밴드들이 나타나지 않았음.
- 이 결과는 구토 및 설사독소형 *B. cereus* 이외의 균주에서는 사용한 프라이머에 대한 PCR 밴드가 증폭되지 않으므로 이들 프라이머들을 이용한 PCR은 *B. cereus*와 다른 세균들의 차이를 효과적으로 구분할 수 있는 것으로 입증됨.
- 설사독소형 *B. cereus*에서 multiplex PCR용 1st set of primers의 특이도와 정확도를 평가하기 위하여 6균주의 설사독소형 *B. cereus*를 사용한 결과는 그림 3.4와 같음.
- 이 결과는 모든 설사독소형 *B. cereus*에서 증폭된 설사독소형 유전자에 대한 PCR band의 형성을 보여줌으로써 디자인된 1st set of primers가 효과적으로 설사독소형 *B. cereus*균주를 구분할 수 있는 것을 입증됨.

표 3.5 구토 및 설사형 표준균주들의 유전자 프로파일(Gene profiles of emetic and enterotoxic reference strains of *B. cereus* using Multiplex PCR assay)

Strain	Type	Multiplex PCR assay					
		<i>CER</i>	<i>groEL</i>	<i>Cyt K</i>	<i>entFM</i>	<i>hblC</i>	<i>nheA</i>
<i>B. cereus</i> ATCC13061	Enterotoxic	-	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> ATCC12480	Enterotoxic	-	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i> KCTC1013	Enterotoxic	-	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i> KCTC1014	Enterotoxic	-	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> KCTC1092	Enterotoxic	-	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i> KCTC1094	Enterotoxic	-	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i> KCTC1526	Enterotoxic	-	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i> F4810/72	Emetic	+	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> JNHE36	Emetic	+	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i> JNHE78	Emetic	+	+	-	-	-	+
<i>B. cereus</i> KUGH164	Emetic	+	+	-	-	-	+
<i>B. cereus</i> KNIHuls1	Emetic	+	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> KNIHuls3	Emetic	+	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> KNIHuls4	Emetic	+	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> KNIHuls5	Emetic	+	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> KNIH7uls7	Emetic	+	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> KNIHuls8	Emetic	+	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> KFDA250	Emetic	+	+	-	+	-	+

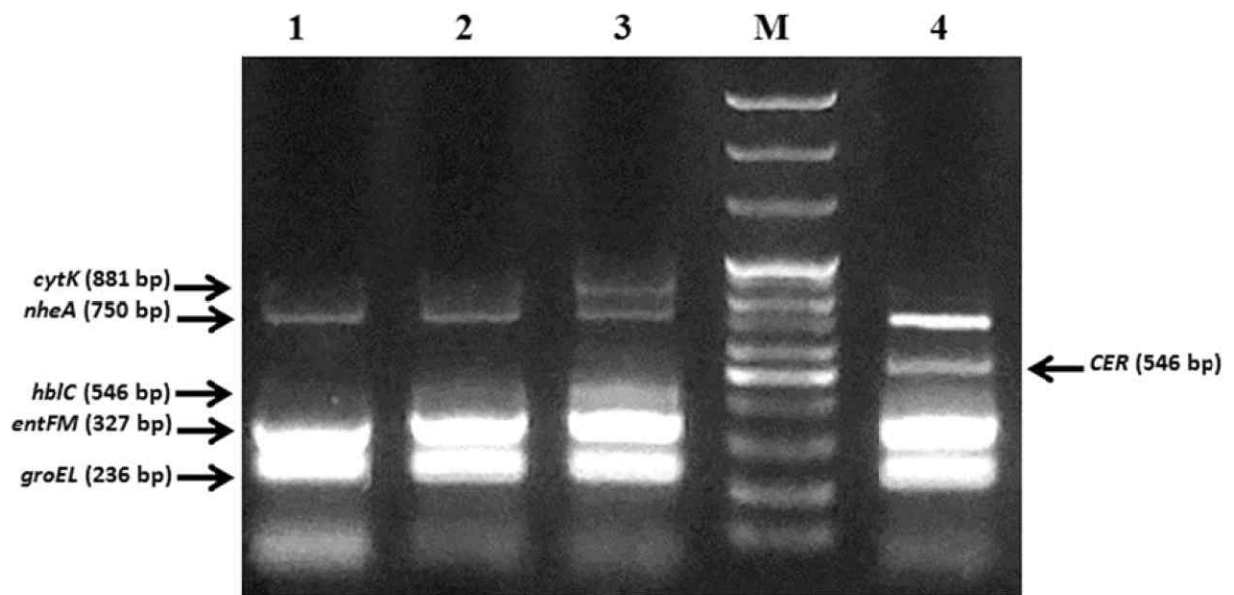


그림 3.1 바실러스 세레우스 표준균주에서 구토 및 설사 관련 유전자들에 대한 PCR의 전기영동 결과 (Gel electrophoresis results of 4 *B. cereus* reference strains detection by multiplex PCR approach in artificially inoculated food (kimbab). M, 100-bp DNA size marker; Lane1, *B. cereus* ATCC 13061; Lane 2, *B. cereus* KCTC 1014; Lane 3, *B. cereus* ATCC 12480; Lane 4, *B. cereus* F4810/72.

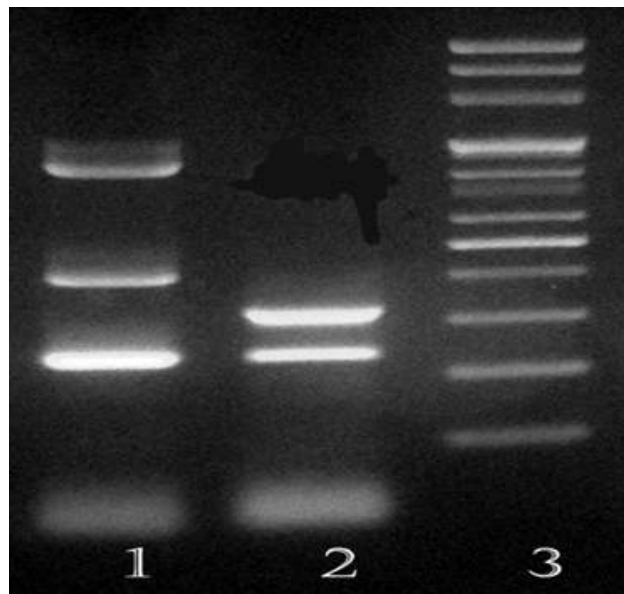


그림 3.2 Gel electrophoresis of multiplex PCR assay products for two *B. cereus* group members). Lane 1, *B. weihenstephanensis* KACC 12001; Lane 2, *B. pseudomycooides* KACC 12098; Lane 3, 100-bp ladder.

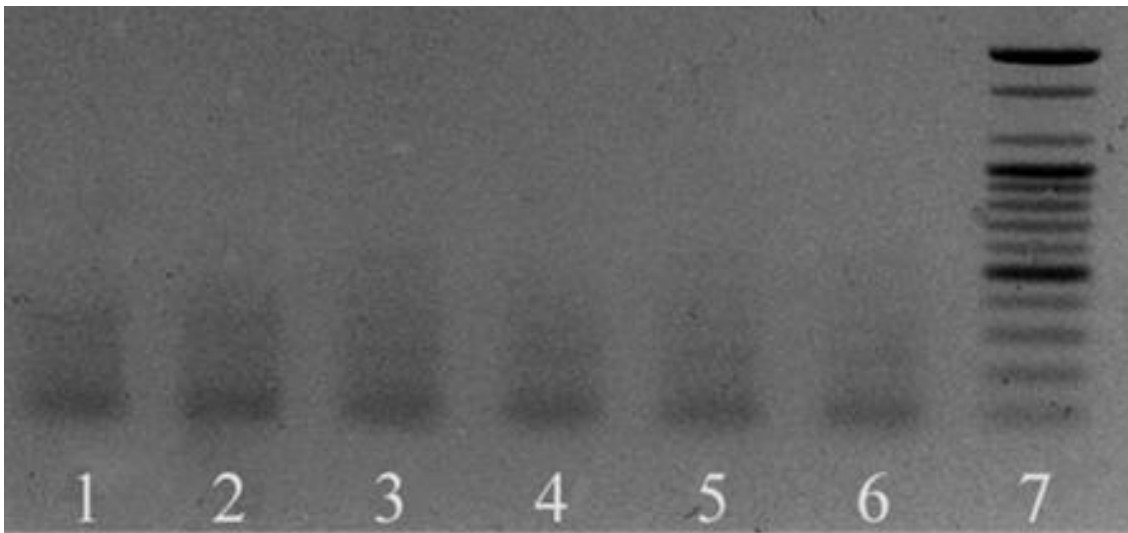


그림 3.3 Gel electrophoresis of multiplex PCR assay products for non-target strains. Lane 1, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895; Lane 2, *B. subtilis* KCCM 11316; Lane 3, *L. monocytogenes* ATCC 19119; Lane 4, *S. typhimurium* ATCC 14028; Lane 5, *S. aureus* ATC C27729; Lane 6, *E. coli* KCCM 32396; Lane 7, 100 bp ladder. (Non-target 세균들에서는 PCR이 수행되지 않으므로 primers의 특이도가 우수함을 나타냄.)

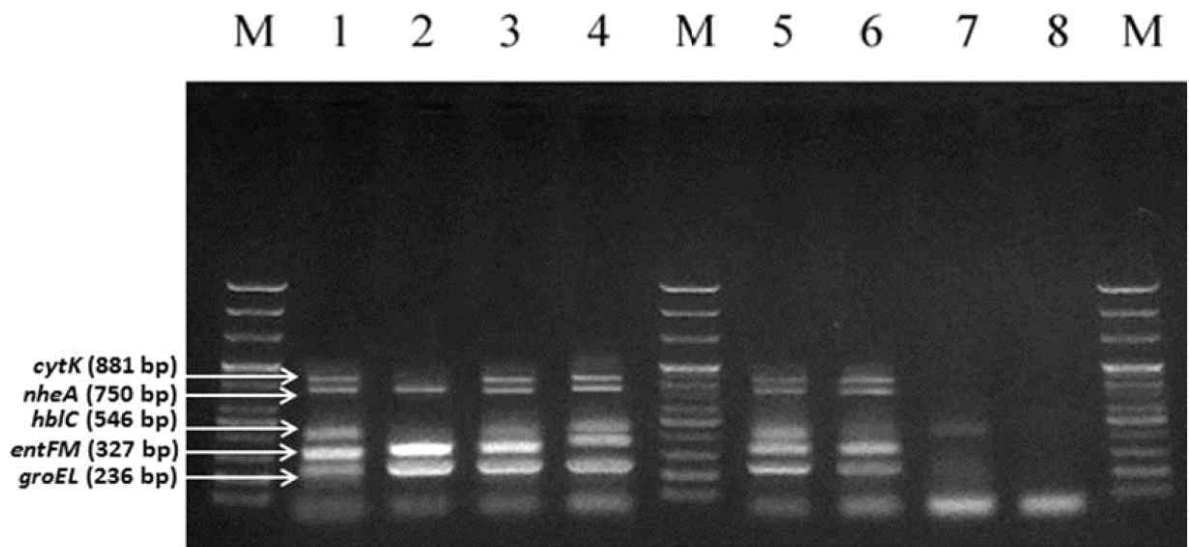


그림 3.4 Gel electrophoresis of 6 enterotoxigenic reference strains and 1 non-target strain. M, 100-bp ladder; Lane 1, *B. cereus* KCTC 1013; Lane 2, *B. cereus* KCTC 1014; Lane 3, *B. cereus* KCTC 1092; Lane 4, *B. cereus* ATCC 12480; Lane 5, *B. cereus* KCTC 1526; Lane 6, *B. cereus* KCTC 1508; Lane 7, *Pseudomonas putida* KCCM 35479; Lane 8, no template control (NTC). (목표 세균들인 장독소 생성 균주들(lane #1~#6)에서 PCR 밴드가 나타나므로 primers의 특이도가 우수함을 보여줌)

2. *B. cereus* wild type strains에서 multiplex PCR primer의 특이도와 정확도 분석

- 식품, 환경 및 임상 시료로부터 분리된 야생형 바실러스 세레우스 균주에서 구토독소 및 설사/장독소 유전자의 분포 패턴을 multiplex PCR 1st set of primers의 결과로 분석하였음(그림 3.5, 표 3.6 ~ 3.9).
- 구토형 *B. cereus* 71균주와 설사형 *B. cereus* 425균주 등 총 496 균주를 사용하였음
- 바실러스 세레우스 야생형 496 균주들 전부에서 *groEL* 유전자에 대한 PCR 증폭이 확인되었음.
- 바실러스 세레우스 야생형 496 균주들에서 *nheA*, *entFM*, *nhlC*, 및 *cytK enterotoxin* 유전자들의 검출율은 각각 92.3%, 77.2%, 59.4% 및 47.6%였음(표 3.8).
- 장독소 유전자 프로파일(enterotoxigenic profile)은 구토형 균주들에서 8가지 패턴(그룹), 장독소 생성 균주들에서 12가지 패턴으로 나타났음(표 3.6 및 표 3.7).
- 이 결과는 다양한 시료로부터 유래한 바실러스 세레우스 야생형 균주들에서 독소 및 독소 생성 유전자들의 프로파일에 대한 중요한 정보를 제공함.
- 이와 같이 광범위하고 다양한 독소 유전자들의 검출 패턴은 바실러스 세레우스가 농식품 및 보건 분야에서 중요한 위해요소로 고려돼야 하며, 바실러스 세레우스 그룹에 속하며 생물농약으로 널리 이용되는 바실러스 썬린지엔시스(Shimada et al. 2014)의 경우에도 여러 장독소 유전자들이 다양한 패턴으로 존재하므로 식품 안전 및 보건의 위해요소가 될 가능성이 있다는 것을 의미함.
- 그러므로 바실러스 세레우스 그룹에서의 구토 및 설사/장독소 유전자들의 동시진단이 매우 중요할 것임을 시사함.
- 이들 결과의 일부는 논문으로도 발표하였음(Forghani et al. 2014, J. of Food Sci).

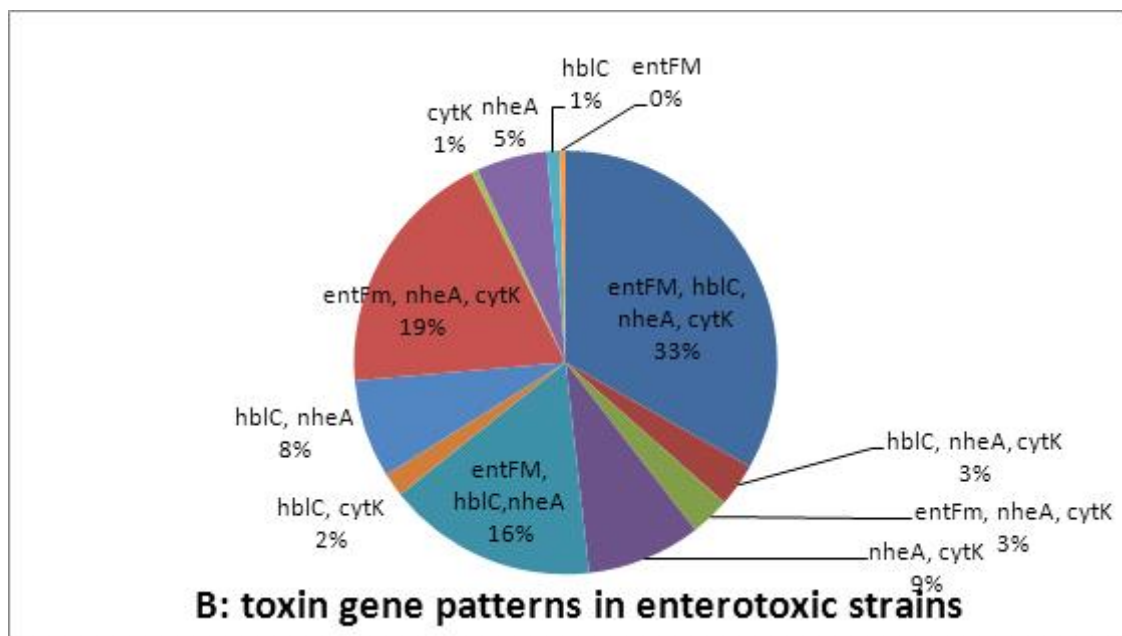
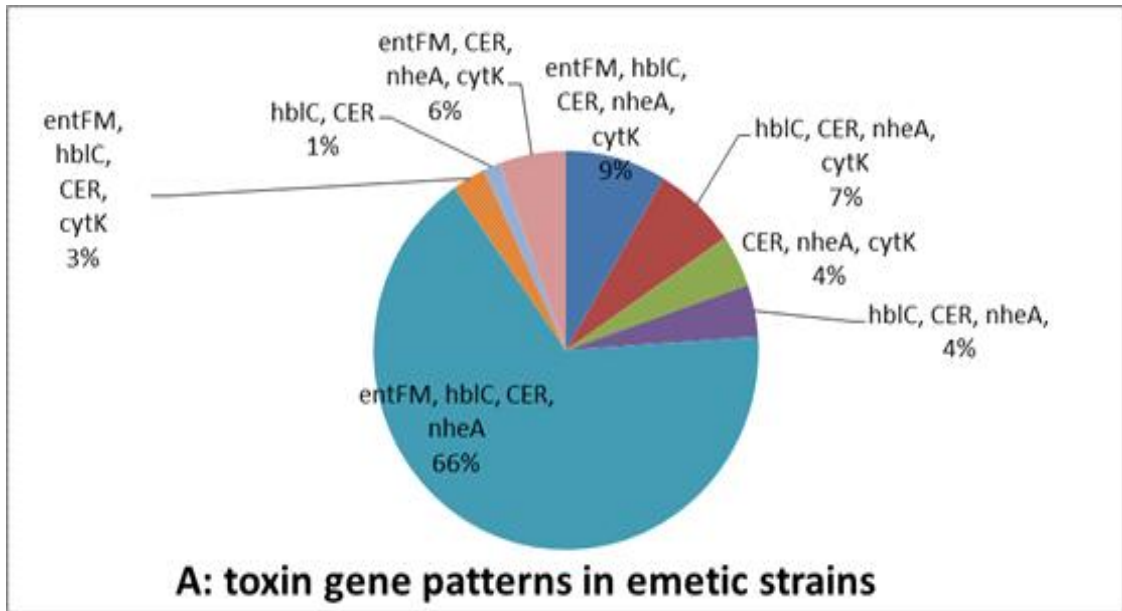


그림 3.5 Toxic gene patterns and their prevalence among 496 wild *B. cereus* strains.

⌘ 3.6 different toxigenic gene profiles of 71 emetic toxin-producing *B. cereus* strains, isolated from different food, clinical, and environmental sources.

Pattern	<i>cytK</i>	<i>nheA</i>	<i>CER</i>	<i>hblC</i>	<i>entFM</i>	Nr (%) of <i>B. cereus</i> isolates
I	–	+	+	+	+	47 (66.20)
II	+	+	+	+	+	6 (8.45)
III	+	+	+	+	–	5 (7.04)
IV	+	+	+	–	+	4 (5.63)
V	+	+	+	–	–	3 (4.23)
VI	–	+	+	+	–	3 (4.23)
VII	+	–	+	+	+	2 (2.82)
VIII	–	–	+	–	+	1 (1.41)

+, PCR product of the expected size was observed; –, no PCR product was observed; Nr, number of strains.

⌘ 3.7 Different toxigenic gene profiles of 425 enterotoxin-producing *B. cereus* strains, isolated from different food, clinical, and environmental sources.

Pattern	<i>cytK</i>	<i>nheA</i>	<i>hblC</i>	<i>entFM</i>	Nr (%) of <i>B. cereus</i> isolates
I	+	+	+	+	141 (33.17)
II	–	+	–	+	81 (19.05)
III	–	+	+	+	68 (16.00)
IV	+	+	–	–	37(8.70)
V	–	+	+	–	32 (7.52)
VI	–	+	–	–	23 (5.41)
VII	+	+	+	–	14 (3.29)
VIII	+	+	–	+	13 (3.05)
IX	+	–	+	–	8 (1.88)
X	–	–	+	–	4 (0.94)
XI	+	–	–	–	2 (0.47)
XII	–	–	–	+	2 (0.47)

+, PCR product of the expected size was observed; –, no PCR product was observed; Nr, number of strains.

⌘ 3.8 Distribution of enterotoxin genes in all *B. cereus* isolates, emetic toxin- and enterotoxin-producing strains, *B. thuringiensis*, and non-*B. thuringiensis* members of *B. cereus* (*B. cereus* group members except *B. thuringiensis*).

Toxin gene	Nr (%) of all <i>B. cereus</i> strains (n = 496)	Nr (%) of emetic strains (n = 71)	Nr (%) of enterotoxigenic strains (n = 425)	Nr (%) of <i>B. thuringiensis</i> (n = 221)	Nr (%) of non- <i>B. thuringiensis</i> (n = 204)
<i>cytK</i>	236 (47.58)	20 (28.16)	216 (50.82)	138 (62.44)	78 (38.23)
<i>nheA</i>	458 (92.33)	66 (92.33)	392 (92.23)	204 (92.30)	188 (92.15)
<i>hblC</i>	295 (59.47)	17 (23.94)	278 (65.41)	178 (80.54)	100 (49.01)
<i>entFM</i>	383 (77.21)	64 (90.14)	320 (75.29)	184 (83.25)	136 (66.66)

Nr, number of strains.

⌘ 3.9 Distribution of enterotoxin genes in *B. cereus* isolated from different sources.

Toxin gene	Nr (%) of <i>B. cereus</i> isolated from:										
	Doenjang (n = 144)	Feces (n = 67)	Food (n = 9)	Green tea (n = 35)	Kimbab (n = 10)	Rice (n = 103)	Rice cake (n = 9)	Soil (n = 38)	Unknown (n = 43)	Vegetables (n = 26)	Vomit (n = 12)
<i>cytK</i>	58 (40.27 ^b)	30 (44.77 ^b)	2 (50.82 ^b)	23 (65.71 ^c)	2 (20.00 ^a)	52 (50.48 ^b)	4 (44.44 ^b)	25 (65.78 ^c)	28 (65.11 ^c)	11 (42.30 ^b)	2 (16.66 ^a)
<i>nheA</i>	132 (91.66 ^a)	62 (92.53 ^a)	7 (92.23 ^a)	31 (88.57 ^a)	10 (100.00 ^a)	95 (92.23 ^a)	9 (100.00 ^a)	37 (97.36 ^a)	40 (93.02 ^a)	25 (96.15 ^a)	12 (100.00 ^a)
<i>hblC</i>	70 (48.61 ^b)	17 (25.37 ^a)	6 (65.41 ^c)	25 (71.42 ^c)	4 (40.00 ^b)	71 (68.93 ^c)	9 (100.00 ^d)	34 (89.47 ^d)	32 (74.41 ^c)	15 (57.69 ^{bc})	2 (16.66 ^a)
<i>entFM</i>	90 (62.50 ^{ab})	36 (53.73 ^a)	5 (75.05 ^b)	27 (77.14 ^b)	6 (60.00 ^{ab})	82 (79.61 ^b)	9 (100.00 ^c)	36 (94.73 ^c)	35 (81.39 ^{bc})	19 (73.07 ^b)	12 (100.00 ^c)

Percentages labeled with different letters in the same row indicate a significant difference ($P \leq 0.05$).

Nr, number of strains.

3. 1st set of primers-using Multiplex PCR의 최소 검출한계 분석

가. 바실러스 세레우스 순수배양액에 대한 multiplex PCR의 검출한계

- 디자인된 1st primer set-using multiplex PCR의 최소 검출한계를 설정하기 위하여 바실러스 세레우스 표준균주 순수배양액(pure culture)에서 PCR의 최소 검출한계를 측정함(표 3.10).
- 바실러스 세레우스 표준균주 순수배양액에서 multiplex PCR의 최소 DNA 검출한계 농도는 20 pg/reaction tube으로 나타남.

표 3.10 바실러스 세레우스 표준균주의 순수배양액에 대한 multiplex PCR의 검출한계 (Limit of detection in pure culture for five *B. cereus* reference strains)

Strain	Type	Concentration of DNA in PCR reaction tube				
		2 ng	200 pg	20 pg	2 pg	200 fg
<i>B. cereus</i> ATCC13061	Enterotoxic	+	+	+	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC12480	Enterotoxic	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> KCTC1013	Enterotoxic	+	+	+	-	-
<i>B. cereus</i> KCTC1094	Enterotoxic	+	+	+	-	-
<i>B. cereus</i> F4810/72	Emetic	+	+	+	+	-

+: presence of amplified product/ -: absence of amplified product.

나. 인위접종한 식품에서 multiplex PCR의 검출한계

- 여러 식품(유아용 시리얼(baby cereal), 김밥(kimbab), 저온살균 우유(pasteurized milk), 파스타(pasta), 쌀쌀(rice), 해바라기씨유(sunflower oil) 및 떡(tteok)에 *B. cereus* 균주를 인위 오염시킨 후 multiplex PCR의 최소 검출한계를 측정함(표 3.11).
- MYP 선택배지의 균주 배양액 0.1 ml 과 1 ml을 각 식품에 분주하여 인위접종한 후 37°C 에서 7시간 배양과정을 거친 시료를 multiplex PCR 기법으로 최소 검출한계를 측정함.
- 모든 식품에서 *B. cereus* F4810/72와 *B. cereus* ATCC 12480의 multiplex PCR 기법의 최소 검출한계는 각각 1.8×10^3 cfu/g과 2.1×10^3 cfu/g으로 나타남.
- multiplex PCR 기법의 민감도는 1 ml을 분주하였을 때 모든 시료에서 *B. cereus* F4810/72 와 *B. cereus* ATCC 12480은 각각 1.8×10^1 cfu/g, 2.1×10^1 cfu/g으로 최소 검출한계의 수준이 상승하였음.
- 따라서, MYP 선택배지에 배양된 시료를 전통적 spread plating 기법을 사용한 결과 conventional method의 민감도를 상승시켰지만, multiplex PCR 기법에는 큰 영향을 미치지 않았음
- 본 표준균주를 사용하여 최소 검출한계를 측정한 결과, 순수배양액 시료에서 보다 증균하지 않은 인위오염시킨 식품 시료에서 multiplex PCR 기법의 최소 검출한계 수준이 약 10배 낮았음.

표 3.11 인위 접종으로 오염시킨 식품들에서 전통적인 배지(MYP) 방법에 의한 바실러스 세레우스의 검출한계 (Limit of detection by conventional culture method on mannitol-egg yolk-polymixin agar (MYP) in artificially inoculated foods.)

Food	Inoculated bacterial strain			
	F4810/72		ATCC12480	
	0.1 ml inoculum	1 ml inoculum	0.1 ml inoculum	1 ml inoculum
Kimbab	1.8×10^4	1.8×10^4	2.1×10^4	2.1×10^3
Milk	1.8×10^3	1.8×10^3	2.1×10^4	2.1×10^3
Rice	1.8×10^3	1.8×10^3	2.1×10^4	2.1×10^3
Baby cereal	1.8×10^4	1.8×10^3	2.1×10^4	2.1×10^3
Sunflower oil	1.8×10^5	1.8×10^3	2.1×10^4	2.1×10^3
Tteok	1.8×10^4	1.8×10^3	2.1×10^4	2.1×10^3
Pasta	1.8×10^4	1.8×10^3	2.1×10^4	2.1×10^3

다. 식품과 토양 및 분변에서 *B. cereus* 검출을 위한 PCR 분석

(1) 쌀과 김밥 시료에서 *B. cereus* 독소유전자에 대한 multiplex PCR의 검출율/민감도 측정

- 개발된 multiplex PCR 기법을 사용하여 36개의 rice 시료 중 *B. cereus*에 오염된 23(63.88%)개의 시료를 검출하였음(표 3. 12).
- 그 중 2개의 시료에서 *CER* primer에 양성반응을 보였음(8.69%).
- 다른 설사독소 유전자는 각각 *entFM* 69.56%, *hblC* 82.6%, *nheA* 86.95%, *cytK* 43.47%의 오염도/검출율을 나타냄.
- 36개의 김밥 시료에서 12(33.33%)의 시료가 *B. cereus*에 오염되었으며, rice 시료에서와 같이 *nheA* (100%) 유전자의 검출율이 가장 높은 것으로 나타남.
- 다른 설사독소 유전자는 *entFM* 66.66%, *hblC* 50%, *cytK* 58.33%의 검출율을 나타냄.
- rice 시료에 대하여 multiplex PCR 결과와 MYP 선택배지의 결과가 동일하게 나타났음. 즉, 같은 시료에서 양성 또는 음성 결과가 동일한 패턴으로 나타남.
- MYP 배지를 사용하여 양성 유무를 확인한 결과 multiplex PCR 결과 보다 5개 많은 rice 시료에서 양성반응을 나타냈음(28/36: 80.55%). 이 결과는 multiplex PCR 최소 검출한계가 낮은 이유에 기인한 것으로 판단됨.
- *CER* 유전자의 검출율은 다른 독소 유전자들의 검출율/유병률 보다 낮게 나타났음.

표 3.12 식품 및 환경 시료에서 바실러스 세레우스의 독소생성 유전자들의 분포. (Summary of toxin genes distribution in positive samples of naturally contaminated rice, kimbab, soil and feces.)

Toxin genes	Kimbab (n = 12)	Rice (n = 23)	soil (n = 11)	Feces (n = 9)
<i>cytK</i>	4 (33.3%)	12 (52.2%)	6 (54.5%)	6 (66.7%)
<i>nheA</i>	11 (91.7%)	20 (86.9%)	11 (100%)	8 (88.9%)
<i>hblC</i>	7 (58.3%)	16 (69.6%)	7 (63.6%)	5 (55.6%)
<i>entFM</i>	9 (75.0%)	18 (78.3%)	7 (63.6%)	5 (55.6%)
<i>CER</i>	ND	2 (8.7%)	ND	ND

ND: not detected.

(2) 토양과 분변 시료에서 *B. cereus* 독소유전자에 대한 multiplex PCR의 검출율 측정

- 개발된 multiplex PCR 기법을 사용하여 분석한 결과, 13개의 soli 샘플 중 11개(84.6%)에서 양성반응 결과를 확인하였음(표 3. 12). 이 결과는 MYP 선택배지법의 결과와 동일하였음.
- 개발된 multiplex PCR 기법을 사용하여 분석한 결과, 13의 cow feces 샘플 중 9개(69.2%)에서 양성반응 결과를 확인하였음. 같은 분변에 대한 direct spread plating 기법을 사용하여 분석한 결과, 7개(53.84%)의 샘플에서 양성반응 결과를 확인하였음. 반면에 선택배지를 사용하여 검출 했을 경우에는 10개(76.92%)의 샘플에서 양성반응 결과를 확인하였음.
- 이 차이는 개발된 multiplex PCR의 검출한계가 상대적으로 낮기 때문일 수 있음.
- 따라서, 본 연구에서 개발된 multiplex PCR 기법은 선택배지 상에서 direct plating method 보다 검출속도가 빠르고 특이도에서 우수성을 확인 하였지만, 몇몇 경우에는 민감도가 떨어짐을 확인하였음.
- 한편, 선택배지를 이용한 conventional plating 기법은 결과를 확인하기까지 적어도 48시간 이 걸리는 단점을 가지고 있음.
- 결과적으로 90% 이상의 정확도를 가지며 몇 시간 내에 검출이 가능한 multiplex PCR 기법을 사용하여 독소유전자를 검출하는 것이 보다 효과적일 것으로 판단됨.
- multiplex의 장점을 이용하고 단점을 보완하기 위하여 중요한 해결과제는 목표 균주나 유전자들에 대한 보다 높은 정확도, 민감도, 특이도 등을 가지는 특정 primer들의 개발임을 확인 함.

제2절 *B. cereus* 구토/설사형 동시검출 multiplex real-time PCR kit 개발

<요약>

- 바실러스 세레우스 구토 및 설사형 독소 유전자 동시검출용 multiplex conventional PCR kit 및 multiplex real-time PCR kit를 개발하기 위하여 구토 독소 유전자(*ces*) 및 설사독소/장독소 유전자들(*hbl*, *nhe*, *entFM*, *cytK*)을 타깃으로 하는 제2 및 제3 프라이머 세트들을 새로 디자인하고,
- 각 프라이머 세트를 사용하는 multiplex PCR 및 multiplex real-time PCR의 반응 조건 및 프라이머 농도 등을 경험적으로 최적화 하였으며, 48개 표준 균주, 인위접종된 시료, 식품 및 환경 시료 등에서 PCR kit의 민감도, 특이도 및 검출한계를 측정하였음.
- multiplex PCR의 premix는 AccuPower™ Multiplex PCR PreMix (SYBR Green), multiplex real-time PCR의 premix는 MeltDoctor™ HRM Master Mix (SYTO 9)를 주로 사용하였음.
- **제2 프라이머 세트**의 염기서열은 표 3.14에 나열하였음.
 - *entFM*, *nheA*, *hblD*, *cytK* 및 *ces* 프라이머에 대한 PCR 산물 크기는 각각 488, 376, 163, 106, 및 70 bp 이며, T_m 값은 각각 72.6, 75.5, 76.2, 77.9, 및 81.1°C 이고, 프라이머 최적 농도는 각각 200, 200, 100, 200 및 100 nM임.
 - multiplex PCR의 최적 반응 조건은 [95 °C 10분, (95°C 15초, 56°C 30초, 72°C 30초) x 35회 반복, 72°C 3분]임.
 - PCR 검출한계는 순수배양액의 DNA 시료에서 약 2 pg/reaction tube이었으며, 인위접종 시료에서 약 10^2 cfu/g시료 이었음.
 - 제2 프라이머 세트에 대한 multiplex PCR의 DNA 밴드 및 singleplex real-time PCR의 분명한 melting peak 결과와 달리, multiplex real-time PCR의 melting peak 결과는 서로 명확하게 구별되지 않았음.
- **제3 프라이머 세트**의 염기서열은 표 3.22에 나열하였음.
 - *entFM*, *nheA*, *hblD*, *cytK* 및 *ces* 프라이머에 대한 PCR 산물의 크기는 각각 255, 163, 127, 97 및 81 bp이며, T_m 값은 각각 78.4, 76.6, 81.9, 74.3 및 72.2°C이고, 프라이머 최적 농도는 각각 50, 100, 100, 150 및 50 nM임.
 - PCR의 검출한계는 순수배양액의 DNA 시료에서 약 200 fg/tube 이었으며, 인위접종 시료에서 증균전 약 10^2 cfu/g 이었으며, 7시간 증균후 약 10^1 cfu/g 이었음.
 - real-time PCR 최적 반응 조건은 [95 °C 10분, (95°C 15초, 58°C 1분) x 35회 반복]이며, melting curve 단계는 60°C에서 95°C까지 매초마다 0.1°C 씩 점진적 증가 반응임.
 - 제3 프라이머 세트에 대한 multiplex PCR의 DNA 밴드 및 singleplex 및 multiplex real-time PCR의 melting peak 결과는 서로 명확하게 구별되었음
- 결론적으로, multiplex conventional PCR kit의 제작에는 제2 프라이머 세트를, multiplex real-time PCR kit의 제작에는 제3 프라이머 세트를 사용하였음.

1. 실험 재료 및 방법

가. Bacterial Strains

- 본 연구에서 사용된 병원성 식중독 균주는 구토형(emetic) 17 균주, 설사형/장독소형(enterotoxigenic) 9 균주, *B. cereus* group 4 균주, 및 non-target 세균 18 균주 등 총 48 균주를 사용하였음(표 3.13).
- 사용한 모든 균주는 강원대학교 식품생명공학과 식품미생물안전성연구실에 보관되어 있음.
- 바실러스 세레우스 균주들에서 각각의 목표 유전자와 구토 및 장독소는 본 연구팀의 이전 연구에서 사용된 HPLC-MS analysis, Hep-2 cell culture vacuolation assay, PCR 그리고 장독소 생성 *B. cereus* 검출 kit (Kim et al., [2009, 2010a, 2010b, 2011, 2012, 2013; Guinebretiere et al., 2002; Stenfors and Granum 2001])를 이용하여 확인하였으며 실험에 사용된 모든 균주는 표 3.13에 요약하였음.
- 한편, 그 동안 본 연구팀에서 수년간 다양한 식품자원(대변, 구토, 김밥, 된장, 야채, 쌀, 녹차, 토양, 떡, 등의 식품)으로부터 수집한 496종의 *B. cereus* 야생(wild type)균주들은 본 연구에서 개발된 프라이머의 최종 평가를 위해 사용되었으며 최종 개발된 primer들은 real-time PCR를 위해 사용되었음.

표 3.13 본 실험에 사용한 세균 목록 II

(The 2nd list of Bacterial strains used in the study.)

Emetic reference strains	Enterotoxigenic reference strains	<i>B. cereus</i> group	Non-target strains
<i>Bacillus cereus</i> F4810/72	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061	<i>Bacillus thuringiensis</i> KCTC 1508	<i>Escherichia coli</i> KCCM32396
<i>Bacillus cereus</i> JNHE 36	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 12480	<i>B. mycoides</i> KCTC 3453	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895
<i>Bacillus cereus</i> JNHE 80	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1013	<i>B. pseudomycooides</i> KACC 12098	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC14028
<i>Bacillus cereus</i> KUGH27	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1014	<i>B. weihenstephanensis</i> KACC 12001	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313
<i>Bacillus cereus</i> JNHE 82	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1092		<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC19115
<i>Bacillus cereus</i> JNHE 88	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1094		<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 19258
<i>Bacillus cereus</i> KUGH 12	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1526		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC27729
<i>Bacillus cereus</i> KNIH 20	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778		<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 33186
<i>Bacillus cereus</i> JNHE 54	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 27348		<i>B. subtilis</i> KCCM3135
<i>Bacillus cereus</i> JNHE 13			<i>Escherichia coli</i> B0499
<i>Bacillus cereus</i> JNHE 95			<i>Escherichia coli</i> B0455
<i>Bacillus cereus</i> JNHE 23			<i>Pseudomonas putida</i> KCCM35479
<i>Bacillus cereus</i> JNHE 61			<i>Escherichia coli</i> ATCC3565
<i>Bacillus cereus</i> JNHE 60			<i>Micrococcus luteus</i> KCCM11211
<i>Bacillus cereus</i> JNHE 15			<i>Streptococcus pyogenes</i> KCCM 11819
<i>Bacillus cereus</i> JNHE 7			<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802
<i>Bacillus cereus</i> KUGH 164			<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291
			<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715

나. DNA 추출 (DNA extraction from pure culture)

- 실험에 사용된 모든 균주들은 35°C에서 18-24시간 동안 tryptic soy agar (TSB)(Difco, Detroit, MI)에서 배양되었으며 single colony는 LB (Luria-Bertani broth)(Difco)에 접종하여 8시간 동안 35°C에서 배양하였음.
- 균액 1 ml를 4°C에서 10분 동안 원심분리(5000 × g) 하고 DNeasy Tissue Kit (Qiagen, VWR International AB, Sweden)를 사용하여 total DNA를 추출하였음.
- Total DNA는 260 nm/280 nm의 흡광도를 spectrophotometer(Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany)를 사용하여 측정하여 정량되었으며 시료 DNA를 최종 10 ng/μL 농도로 희석시킨 후 -20 °C에 보관하였고, PCR 시험을 위해 적당량을 사용하였음.

다. 2nd set of primers의 디자인

- 본 연구의 최종목적은 바실러스 세레우스의 검출/측정에서 5가지의 다른 유전자가 검출되는 multiplex real-time PCR assay를 디자인하는 것임. 또한, 동시 반응에서 다양한 probes의 측정을 지원하는 다채널 real-time PCR은 고가이고 아직 상대적으로 적게 보급되어 있으므로 본 연구에서 디자인된 primer들은 특정 유전자들을 목표로 하는 특정 probe/primer의 PCR 산물을 서로 구별할 수 있는 또 다른 방법인 melting curve 분석을 기반으로 디자인되었음.
- 본 연구에서 primer 디자인은 multiplex real-time PCR에 의한 melting curve 분석을 가능하게 만들기 위해 melting temperatures (T_m)를 고려하여 제작하였으며 multiplex real-time PCR 분석에 의한 specific gene들의 증폭이 가능하도록 하였음.
- Emetic (*ces*) gene과 enterotoxic genes (*cytK*, *nheA*, *hblD*, *entFM*) (Kim et al., 2012)을 검출하기 위한 target oligonucleotide primers는 Primer Express® Software (version 3.0.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) GenBank의 특정 목표 유전자 서열을 사용하여 디자인하였으며 바이오니어사(Bioneer Co., Daejeon, Korea)에서 합성하여 사용하였음.
- 각 primer에 의한 검출 범위를 최대화시키기 위해, 다른 reference 균주와 wild 균주로부터 각각의 보존된 유전자 sequences를 고려하여 primer를 제작하였으며 primer sequences, product sizes와 design sources는 아래 표에 나타내었음(표 3.14).
- 또한, primer의 검출 범위를 최대화하기 위해 the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) 기준이 primer design에 고려되었는데, 이러한 방법은 일부 병원성 세균에서는 일반적인 nucleotide bases를 사용하여 검출되지 않기 때문에 사용되었음(표 3.15).

표 3.14 Multiplex PCR을 위해 새로 디자인한 2nd set of primers의 목록

(list of 2nd set of primers newly designed and design source for Multiplex PCR)

Target gene	Sequence	Product length	Design source
<i>entFM</i>	F: 5' GGAACTGGATACGTAAGC 3' R: 5' TAGTGAATGAATCCACTGC 3'	488 bp	AY789084; AY897207; EF453661; EF453653; EF453659
<i>nheA</i>	F: 5' TGAAATTGTAAATGCTGCAG 3' R: 5' ATGTACTTCAACGTTTGTAACG 3'	376 bp	Y19005; DQ019312; DQ885236; DQ153261; DQ153257
<i>hblD</i>	F: 5' GCATGGTCAATTGGTGGT 3' R: 5' CACCAGCTGCTGTTCCCTA 3'	163 bp	U63928; AJ007794; AY820178; AY820179; AY822582; AY822584
<i>cytK</i>	F: 5' AAATGTTTAGCATTATCCGC 3' R: 5' TTTGCCCGATATCTGTTACAAC 3'	106 bp	AJ277962; DQ019311; JN222929; JN222928; JN222924; CP000001; AJ318875; AJ318877; AJ318876
<i>ces</i>	F: 5' ATGAATCAACGATTATGCG 3' R: 5' GTCGGATTCGATACAATTC 3'	70 bp	AY691650; DQ360825; DQ345790; JN222922; AY691650; DQ238109; DQ459072; JN112795; JN112796

표 3.15 IUPAC nucleotide codes used in this study

IUPAC nucleotide code	Base
A	Adenine
C	Cytosine
G	Guanine
T (or U)	Thymine (or Uracil)
<u>R</u>	<u>A or G</u>
Y	C or T
S	G or C
W	A or T
K	G or T
M	A or C
B	C or G or T
<u>D</u>	<u>A or G or T</u>
H	A or C or T
V	A or C or G
N	any base
. or -	gap

(Underlined bases were used in primer design in this study)

(1) 2nd set of primers를 사용한 PCR의 최적화 및 2번째 프라이머세트의 평가

- 구토독소 생성 표준균주(F4810/72)과 장독소 생성 표준균주(ATCC 12480)는 PCR 조건의 최적화를 위한 multiplex PCR과 primer의 사전 평가를 위해 singleplex PCR에 사용되었음.
- 모든 PCR 분석은 Total DNA의 10-15 ng을 사용해서 Mygenie32 Thermal Block (Bioneer, Daejon, Korea)으로 수행되었으며 다양한 농도의 primer(100 ~ 900 nM)들이 multiplex PCR의 최적화를 위해 평가하였음.
- AccuPower™ PCR PreMix (Bioneer,Daejeon,Korea)는 primer의 초기 평가와 온도 최적화를 위해 사용되었음.
- AccuPower™ Multiplex PCR PreMix(Bioneer)는 한 반응에서 작용하는 primer들의 검출능력뿐만 아니라 primer들의 특이성 측정과 평가에 사용되었음
- 표 3.16는 PCR 2nd set of primers 효능 평가를 위해 사용된 PCR의 측정 조건을 나타내었음.

표 3.16 Different thermal cycles investigated to find best PCR condition for 2nd set of primers.

Pre-denaturation	Thermal cycles	Final extension
95°C 10min	(95°C 15sec, 48°C 30sec, 72°C 30sec) × 35	72°C 3min
95°C 10min	(95°C 15sec, 50°C 30sec, 72°C 30sec) × 35	72°C 3min
95°C 10min	(95°C 15sec, 52°C 30sec, 72°C 30sec) × 35	72°C 3min
95°C 10min	(95°C 15sec, 54°C 30sec, 72°C 30sec) × 35	72°C 3min
95°C 10min	(95°C 15sec, 56°C 30sec, 72°C 30sec) × 35	72°C 3min
95°C 10min	(95°C 15sec, 58°C 30sec, 72°C 30sec) × 35	72°C 3min
95°C 10min	(95°C 15sec, 60°C 30sec, 72°C 30sec) × 35	72°C 3min

(2) 2nd set of primers에 대한 Multiplex PCR의 검출한계 분석

(가) 순수배양액에서의 검출한계

- 순수배양에서 PCR assay의 검출 한계는 5종의 바실러스 세레우스(4종의 구토독소 생성균주와 1개 장독소 생성균주)를 사용하여 분석하였음.
- 5종류 바실러스 세레우스로부터 total DNA를 추출한 후, total DNA를 5 ng/ μ L ~ 200 fg/ μ L까지 연속하여 희석하여 시료를 준비하였고, 이후 PCR product는 아가로스 젤 전기영동에서 확인하였음.

(나) 인위오염된 식품으로부터 검출한계

- 아기용 시리얼, 김밥, 저온살균 우유, 파스타, 쌀, 해바라기 오일, 가래떡 등을 춘천 지역 식품점에서 구입하였음.
- 아기용 시리얼은 제품 구매 후 어떠한 처리도 하지 않고 실험에 사용하였음.
- 우유는 저온 살균한 저지방 우유를 사용하였음.
- 쌀은 조리되지 않은 생쌀을 그대로 사용하였음.
- 가래떡, 파스타, 해바라기씨유, 김밥은 대형마트에서 구매 후 그대로 실험에 사용하였음.
- 식품 시료는 가압멸균 처리된 후 기존 배양방법(Fricker et al., 2007)에 따라 *B. cereus* 배양 후 준비하였음. 요약하면, 시료 25 g을 0.1 % glucose가 포함된 brain heart broth(BHIG; Merck, Darmstadt, Germany) 225 mL에 혼합한 후 filter stomacher bag (Nasco Whirl-Pak, Janesville, WI)에 넣어 Seward stomacher (400 Circulator, Seward, London, UK)를 사용하여 균질화 한 후 24시간동안 37 °C에서 배양하였음. 이후 *B. cereus*균의 존재를 확인하기 위해 시료 100 μ L를 mannitol-egg yolk-polymixin agar(MYP; Difco) plate에 도말하여 배양 후 *B. cereus*가 존재하지 않음을 확인하였음.
- 접종을 위해, 구토독소 생성 *B. cereus*균(F4810/72)와 장독소 생성 *B. cereus* (ATCC 12480)를 각각 식품 25g에 접종한 후 0.1% buffered peptone water(BPW; Difco) 또는 tryptic soy broth(TSB; Difco)의 225 mL와 함께 스토마커 백에 넣어 2분간 균질화 하였음. 최종적으로 *B. cereus* F4810/72와 ATCC 12480 균주는 농도가 각각 약 2.1×10^7 cfu/g과 3.1×10^7 cfu/g으로 되도록 37°C에서 7시간 동안 200rpm으로 교반하여 배양하였음.
- 각 배양한 균을 세척한 후 10진법으로 $10^6 \sim 10^1$ 범위로 균주를 희석하였고 DNA는 DNeasy Food Kit (Qiagen, VWR International AB, Sweden)을 사용해서 희석된 균질액 BPW 1 mL에서 추출하였음.
- 각 균주의 DNA는 multiplex PCR assay에 사용되었으며 동시에 0.1 과 1 mL 각 희석액은 일반적인 배양 방법으로 개발된 방법의 효과를 확인하기 위해 MYP agar에 도말하였음.

(다) 식품으로부터 검출한계

- 새로 개발된 primer의 우수성을 평가하기 위해 제1절에서 수행한 김밥과 쌀밥을 동일하게 사용하였음.
- 쌀밥과 김밥은 각각 36개 씩 사용하였으며 모든 시료는 사용 전까지 저온냉동고에 보관되었음.
- 김밥 시료는 아이스박스를 이용하여 무균상태로 옮겼으며 2시간 이내에 분석되었음.
- 각 시료 25 g는 0.1% BPW(Difco) 또는 TSB 225mL에 혼합된 후 2분간 균질화 하였으며 BPW 균질액 1 mL에서 DNA를 추출하여 개발된 multiplex PCR assay 사용하였음.

(라) 토양과 분변으로부터 검출한계

- 제1절에서 수집된 각 13개의 토양과 소 분변 시료를 개발된 PCR 방법으로 분석하였음.
- 토양 시료는 강원대학교 춘천 캠퍼스에서 수집되었으며 멸균된 시약스푼으로 깊이 10 ~ 20 cm의 토양에서 채취 후 stomacher bag에 수집되었으며 시료들을 사용 전까지 저온냉동고에 보관하였음.
- 소의 분변은 강원대학교에서 관리하는 목장의 축사에서 얻었으며 멸균된 시약스푼을 이용하여 stomacher bag에 수집하여 저온 용기에 담아 실험실로 이동시킨 후, 무균조건에서 시료 10 g을 채취하여 0.1% BPW 또는 Tryptic Soy Broth(TSB, Difco, Sparks, MD, USA) 90 mL에 혼합하고 5분 동안 균질화 하였음.
- 시료들은 2분 동안 이물질이 가라앉도록 방치되었고 BPW 균질액 1ml는 DNA 추출에 사용되었음.

(3) Real-time PCR을 위한 2nd set of primers의 평가

- Real-time PCR에서 primers의 평가는 StepOne (Applied Biosystems)의 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche)와 Rotor gene 6000 (Qiagen) real-time PCR 기기를 사용해서 동시에 수행하였음.
- Primer의 농도는 이전에 사용된 농도가 사용되었으며 온도 조건은 singleplex real-time 방

법의 최적화 수행을 위해 다시 조정되었고 melting curve를 분석하였음.

- Melting curve 분석은 (T_m) 95°C에서 15초 동안 one cycle, 60°C에서 20초 동안 1 cycle, 그리고 20분 동안 60°C에서 95°C까지 1 cycle을 수행하였음.
- Single reaction tube에서 반응 할 수 있는 primers는 각각 구별 가능한 melting peaks를 갖는 것이 필요하며 이러한 측정은 singleplex real time PCR 분석을 사용 하였고 real-time PCR 후 모든 tube의 PCR 산물은 아가로스 겔에서 확인하였음.
- Singleplex 반응 후 다른 5 primer들을 포함하는 상업적으로 구입 가능한 multiplex real-time PCR mix를 사용하여 수행되었으며 Bioneer (Daejeon, Korea)의 AccuPower® Green Star™ qPCR PreMix와 Roche의 master mix도 사용되었음.

(4) 2nd set of primers을 사용한 Real time PCR primer의 민감도 및 특이도 분석

- 본 연구에서 real time PCR의 민감도 및 특이도는 48 strains을 사용하여 전통적 PCR과 같은 조건하에서 확인하였음.
- 전통적 PCR 방식으로는 non-target strains를 양성반응으로 판별하여 오인하게 할 수 있기 때문에 높은 감도를 나타내는 real time PCR 방식의 연구가 필요함..

(5) 2nd set of primers을 사용한 Multiplex real time PCR의 개선

- 온도변화에 따른 cycles 측정은 multiplex real time PCR의 결과를 개선하기 위해 반응 용액에 다른 요소의 내용물을 첨가하여 측정되었음.
- 이러한 과정의 목적은 첫째, 각 반응에서 예상되는 프라이머 밴드의 명확한 향상에 있으며 둘째, specific product bands가 존재하는 경우 melting peak의 특성을 개선하기 위한 것임.
- 또 다른 접근 방식은 SYBR green I이 반응 혼합물에 첨가되어 최적화된 cycling settings으로 개발된 multiplex PCR 분석을 통해 반복하여 수행하였음.

라. 새로운 3rd set of primers의 디자인

(1) 3rd set of primers의 디자인 및 합성

- 2nd set of primers을 이용한 real-time multiplex PCR의 개발은 master mix로 SYBR green을 사용하였는데 singleplex PCR에서는 좋은 결과를 나타내었으나 multiplex PCR에서는 좋은 결과를 도출하지 못하였음.
- 따라서, NCBI Blast Primer3 software를 사용하여 새로운 3rd set of primers를 디자인한 후 합성하였음(바이오니어에 의뢰하여 합성함).
- 본 프라이머는 대략 3°C의 PCR melting temperature (T_m)를 유지하는 형태로 디자인하였으며 디자인된 프라이머들의 특이성은 NCBI BLAST tool을 통해 확인되었음.
- 2nd set of primers의 프라이머들 가운데 *hbID*는 높은 효율과 적합성 때문에 그대로 사용하였으나, 다른 프라이머들은 forward와 reverse가 변화되거나 한 개의 염기서열이 변화되어 개선되었음.
- Singleplex PCR 분석을 통해 가장 우수한 프라이머들이 선택되었고, 이 프라이머들은 PCR 생성물의 T_m 값들 사이에 최대 차이값을 근거로 multiplex PCR 분석을 위해 선별되었음.
- 또한 2nd set of primers의 디자인에 사용된 조건들은 3rd set of primers의 primer 디자인에 똑같이 적용하였음.

(2) 3rd set of primers를 이용한 PCR 반응의 최적화와 3rd set of primers의 평가

- 구토독소 생성균(F4810/72)과 장독소 생성균(ATCC 12480)은 PCR 조건의 최적화를 위한 primer의 사전 평가를 위해 singleplex PCR과 multiplex PCR의 최적화에 사용되었음.
- 모든 PCR 반응물은 StepOne™ real-time PCR를 사용해서 생성되었고 SYTO-9 intercalating dye (MeltDoctor™ HRM, Roche)를 기반으로 새로운 master mix가 사용되었음.
- 이전에 사용된 SYBR green I master mix에 비해 이 SYTO-9 master mix의 차이점은 고효율의 melting analysis를 보완할 수 있다는 것임.
- 즉, SYBR green I을 기반으로 하는 이전의 master mix에 비해 생성물간의 T_m 값 그래프의 폭이 더 좁아(T_m 값 차이가 작거나, T_m 값이 더 가까움을 나타냄)도 PCR 생성물이 측정될 수 있다는 것을 나타냄.

- 온도별 cycling condition은 100 nM 농도의 각각의 프라이머를 사용해서 singleplex PCR에서 확인하였고 온도 조건의 최적화와 프라이머 특이성은 2nd set of primers과 동일하게 분석하였음.

(3) 3rd set of primers의 특이성과 평균 녹는점(T_m) 값

- 3rd set of primers의 primer 특이성은 이 연구에서 사용된 균주들을 사용해서 평가되었음.
- Primer를 사용해서 다른 균주간의 차이점을 확인하기위해, 각 프라이머의 평균 T_m 값을 측정하기 위하여 이전에 사용된 표준균주들(reference strains)이 사용되었음.

(4) 3rd set of primers를 이용한 multiplex real-time PCR의 최적화

- Primer들의 농도별 차이는 50 mM에서 500 nM 범위에서 50 nM씩 증가시키면서 측정하였음.
- *nheA* primer를 먼저 최적화 하였고, 이후에 다른 프라이머들을 순차적으로 하나씩 최적화 하였음.
- Melting peak는 최적의 primer 농도를 측정하기 위해 시간에 따라 비교하였음.

(5) 3rd set of primers를 이용한 multiplex real-time PCR의 최종 평가

- Multiplex에서 효율적으로 작용하는 프라이머의 특이성을 확인하기 위해 multiplex real-time PCR 분석이 수행되었음.
- 먼저, 두 표준균주들(*B. cereus* ATCC 12480 enterotoxic strain과 F4810/72 emetic strain)로부터 동일한 양의 DNA를 준비하였고, DNA 혼합을 통해 개발된 multiplex real-time PCR 분석을 수행하였음.
- 이것은 개발된 5가지의 primer들이 균주에 존재하는 target genes에서 함께 측정될 수 있는지를 확인하는 것임. 또한 5가지 유전자를 통한 5 가지 primers를 포함하는 측정방법은 아직 보고되지 않았음.
- 순수배양액, 인위집중된 식품, 자연적으로 오염된 식품, 토양과 소 분변 등 다양한 시료로부터 3rd set of primers를 이용한 multiplex real-time PCR의 검출한계는 2nd set of primers과 동일한 방법으로 분석하였음.

2. 연구개발 결과

가. *B. cereus* 구토/설사형 독소 동시검출 multiplex PCR kit 및 multiplex real-time PCR kit용 2nd set of primers 및 3rd set of primers의 개발 및 비교평가

(1) 2nd set of primers의 사전평가 및 PCR 조건의 최적화

- 모든 primers는 구토독소 생성균주(F4810/72)와 장독소 생성균주(ATCC 12480)를 사용하여 최적의 PCR product 조건을 탐색하였으며 다르게 setting된 PCR assays는 다음과 같은 증폭조건으로 측정하였음
- PCR 반응 조건: denaturation at 95°C for 10 min, 35 cycles of 95°C for 15 sec, 56°C for 30 sec, 72°C for 30 sec, and a 3 min final extension at 72°C)(표 3.15).
- AccuPower™ PCR PreMix (Bioneer 사)와 AccuPower™ Multiplex PCR PreMix (Bioneer 사)를 사용한 PCR 결과를 통하여 결정된 가장 효율적인 primer의 농도는 *ces*와 *hblD*는 100 nM이었고 *nheA*, *cytK*와 *entFM*는 200 nM 이었음.
- *entFM*, *nheA*, *hblD*, *cytK* 및 *ces*에 대한 primer의 PCR 크기는 각각 488, 376, 163, 106, 및 70 bp로 확인되었음.
- Multiplex PCR 방식의 single reaction tube에 사용된 primers의 특성은 AccuPower™ Multiplex PCR PreMix와 reference strains를 사용하여 확인하였으며 primer들은 주로 장독도 생성 균주 ATCC 12480와 구토독소 생성 균주 F4810/72를 사용하여 측정하였음.
- 각 프라이머를 사용한 PCR 결과, 4개의 장독성 유전자는 정확하게 ATCC 12480 균주에서 검출되었고 *nheA*, *entFM*와 *ces*는 구토성 F4810/72 균주에서 검출되었음.
- 각 primer 디자인은 reference strains의 특정 유전자 DNA 서열을 기준으로 제작하였음.
- 그림 3.6은 각 유전자의 2nd set of primers에 대한 singleplex PCR 결과를 2% 아가로스 겔 전기영동으로 나타냄.

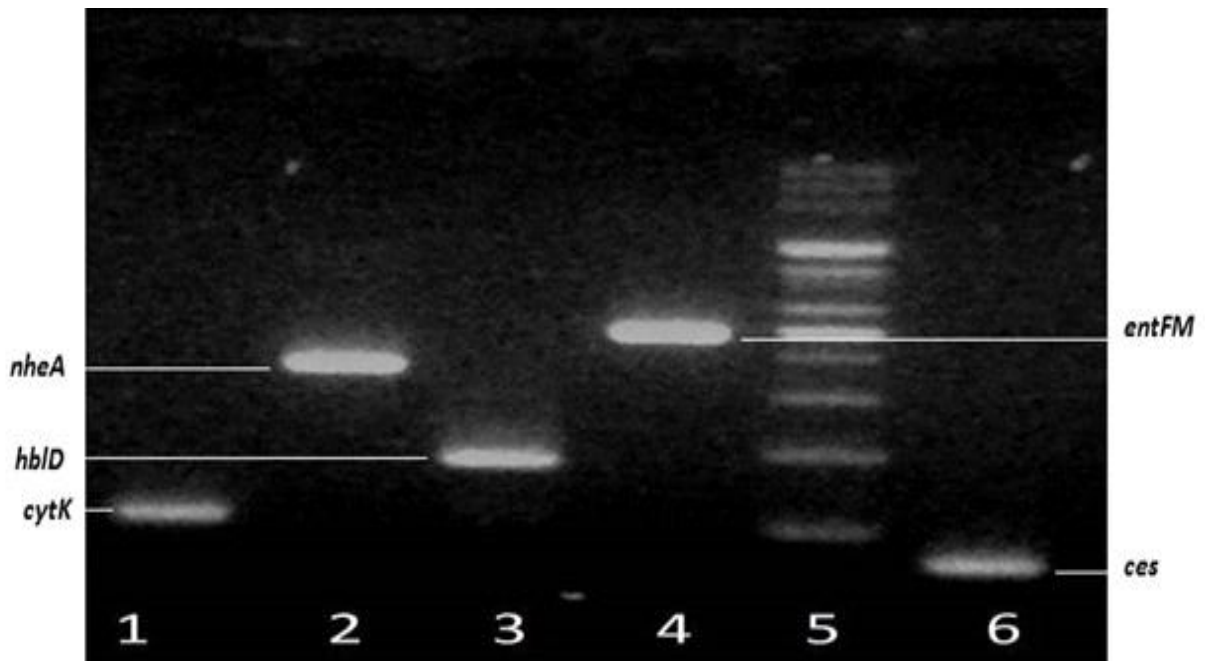


그림 3.6 구토 및 설사 관련 특정 유전자 5 종류에 대한 2nd set of primers 에 대한 PCR 결과. Photograph of the specific products of the genes on agarose gel after electrophoresis (2nd set of primers). Lane1, *cytK*(106 bp); Lane 2, *nheA* (376 bp); Lane 3, *hblD* (163 bp); Lane 4, *entFM* (488 bp); Lane 5, 100-bp ladder, Lane 6, *ces* (70 bp).

(2) 2nd set of primers의 특이성 평가

- 앞서 언급한 것처럼 17종의 구토독소생성 균주, 9종의 장독소 생성 균주, 4종의 *B. cereus* group, 그리고 18종의 식품기인성 병원균을 포함하는 총 48종의 균주를 사용해서 프라이머 세트 2의 특이성을 확인하였음.
- *ces* 유전자는 17개 구토독소생성 균주들에서만 모두 검출되었으며 multiplex PCR 결과의 모든 유전자 프로파일은 primers 특이성이 확인된 문헌을 참고하여 선별하였음(Kim et al., 2010a; Kim et al., 2010b; Kim et al., 2011; Jang et al., 2006; Park et al., 2009).
- 또한 위에서 언급된 primers의 적절한 특이도는 18 non-target 식품기인성 병원균에서 음성 결과를 나타내므로 매우 우수한 것으로 판명되었음.
- 결론적으로, 모든 primer들에 대한 PCR 결과는 예상된 PCR 패턴을 보였으며, 제작된 primer들은 위양성 또는 위음성 결과를 나타내지 않았음. Primer들은 적절한 농도에서 서로 PCR 반응을 간섭하지 않았으며, multiplex PCR 반응의 single reaction tube에서 효과적으로 사용가능함을 보여주었음.

(3) 2nd set of primers을 사용한 Multiplex PCR 결과의 평가

- 8종의 *B. cereus* reference strain을 사용하여 multiplex PCR를 수행한 결과를 2% 아가로스 겔 전기영동으로 나타냄(그림 3.7).

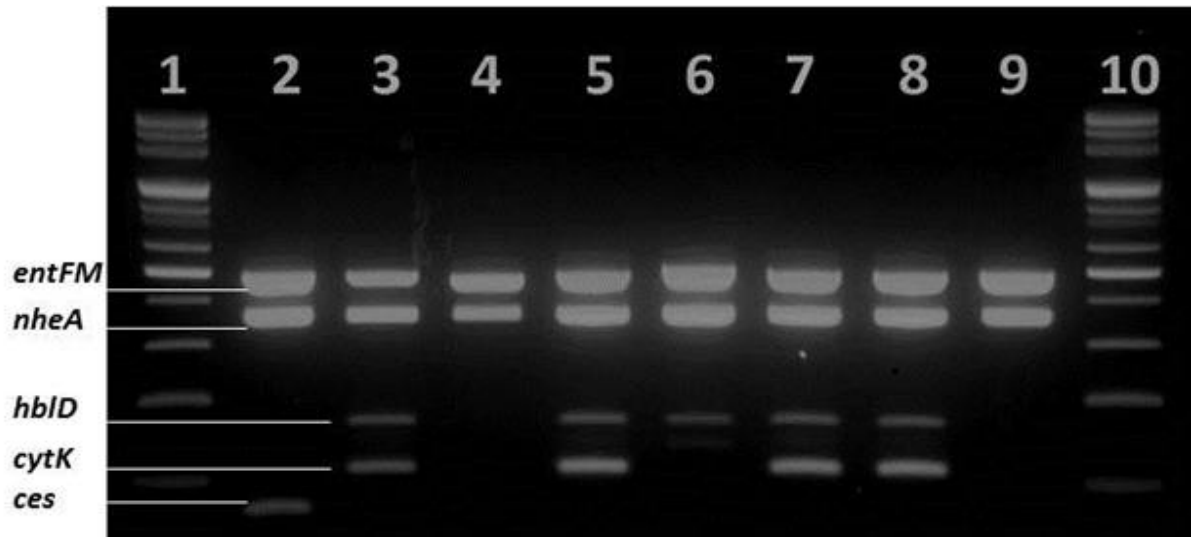


그림 3.7 Multiplex PCR results of 8 *B. cereus* reference strains. Lane1, 100-bp ladder; Lane 2, F4810/72; Lane 3, ATCC12480; Lane 4, ATCC13061; Lane 5, KCTC1013; Lane 6, ATCC27348; Lane 7, KCTC1092; Lane 8, KCTC1094; Lane 9, KCTC1014; Lane 10, 100-bp ladder.

- 한편, 1절에서 언급한 야생형 496 균주들(wild type *B. cereus*)에 대한 2nd set of primers의 multiplex PCR 결과, 각 유전자의 존재는 퍼센트(%)로 평가되었고 각 균주들의 유전적 patterns에 따라 여러 그룹으로 구별되었음(표 3.6과 3.7 및 그림 3.5).(Forghani et al. 2014).
- 본 연구에 사용된 균주들은 71개 구토성 균주와 425개의 장독성 균주로 이루어졌음. 장독소 생성균주 가운데 221개의 균주는 *B. thuringiensis*로 동정되었으며 204개의 균주는 다른 *B. cereus* group에 속하는 균주들이었음.
- 가장 높은 유병률(prevalence rate)을 나타내는 유전자는 94.3 %인 *nhe* gene이고 *cytK*는 45.5%, *hblC*는 59.4% 그리고 *entFM*는 77.2%로 확인되었음.
- 새로 개발된 2nd set of primers의 높은 효율성과 품질은 제1절의 결과와 유사하게 나타났지만 현재 개발된 방법으로 확인된 PCR band의 질(Quality)은 제1절에서 연구된 primers보다 훨씬 우수한 것으로 나타났음.

(4) 2nd set of primers을 사용한 Multiplex PCR의 검출한계 분석

(가) 순수배양에서의 검출한계

- 표 3.17는 5종의 *B. cereus* 표준균주를 순수배양 후 추출한 DNA에 대한 검출한계를 측정 하였음.
- DNA 추출 키트를 사용한 DNA 추출 방법의 최적화를 위해 검출한계는 연구과정 동안 경험적으로 개선되었음.
- 개발된 multiplex PCR assay에서 검출한계는 **2 pg/reaction tube** (0.8 ng/mL) 이었음.
- 전반적으로 본 연구에서 사용한 2nd set of primers은 제1절(1차년도)에서 사용한 primer 세트보다 더 높은 민감성을 나타내었음(표 3.10의 결과와 비교).
- 본 연구의 검출한계(2 pg)는 1차년도(제1절)에 개발된 primer보다 10배 이상 높은 것으로 나타났으며 이러한 결과는 작아진 PCR products size와 보다 효과적인 primer set의 디자인 때문인 것으로 사료됨.

표 3.17 Limits of PCR detection using 2nd set of primers in pure culture for five *B. cereus* reference strains.

Strain	Type	Concentration of DNA in PCR reaction tube				
		2 ng	200 pg	20 pg	2 pg	200 fg
<i>B. cereus</i> ATCC13061	Enterotoxic	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> ATCC12480	Enterotoxic	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> KCTC1013	Enterotoxic	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> KCTC1094	Enterotoxic	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> F4810/72	Emetic	+	+	+	+	-

+: presence of amplified product, -: absence of amplified product

(나) 인위적종한 식품에서의 검출한계

- 식품에서 multiplex PCR assay의 검출한계는 7개 식품(아기 시리얼, 김밥, 저온살균 우유, 파스타, 쌀, 해바라기 오일과 떡)을 사용해서 분석하였음.
- 각각의 결과에서 *B. cereus* F4810/72의 검출한계는 2.1×10^2 cfu/g, ATCC 12480의 검출한계는 3.1×10^2 cfu/g으로 나타났음(그림 3.8).
- 이러한 검출한계는 동시에 수행된 도말 배양법보다 10배 이상 높거나 유사하게 나타났음. 또한 선행 연구(제1절)에서 개발된 multiplex conventional PCR용 1st set of primers 보다 10배 이상 민감도/검출한계가 증가한 것으로 나타났음.
- 증균 배양후, 즉 TSB를 37°C 에서 7시간 동안 200rpm에서 교반하여 배양한(enrichment) 후, multiplex PCR을 수행한 결과, 검출한계/민감도는 *B. cereus* F4810/72와 ATCC 12480에서 각각 2.1×10^1 cfu/g과 3.1×10^1 cfu/g으로 개선되었음.
- MYP agar에서 배양된 시료의 Spread plating 방법은 기존 방법의 민감도를 개선하였음. 그렇지만 이러한 개선효과는 multiplex PCR assay에서 만큼 효율적으로 개선되지는 않았음. 또한 MYP agar spread method의 경우, 7시간 증균배양후의 *B. cereus* 시료 1.8×10^1 cfu/g와 2.1×10^1 cfu/g 레벨에서 음성으로 나타나므로, MYP agar spread method의 검출한계는 약 10^2 cfu/g 이상으로 추정됨.

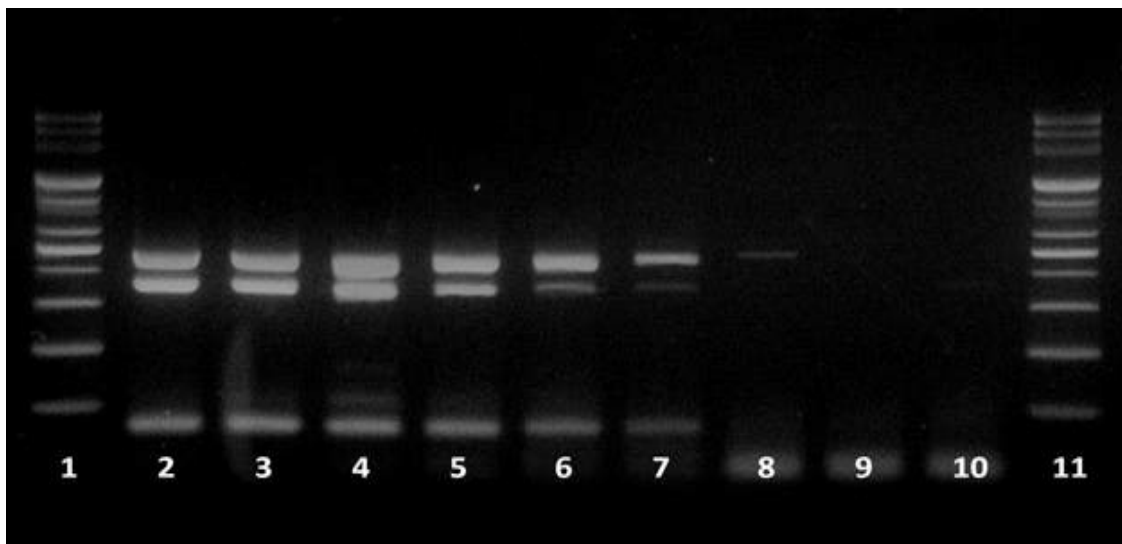


그림 3.8 Gel electrophoresis results of multiplex PCR using 2nd set of primers in 10-fold serial dilutions of artificially *B. cereus* F4810/72 inoculated food (rice). Lane 1 & 11: size marker; Lane 2, 3.1×10^7 cfu/g; Lane 3, 3.1×10^6 cfu/g, Lane 4, 3.1×10^5 cfu/g; Lane 5, 3.1×10^4 cfu/g; Lane 6, 3.1×10^3 cfu/g; Lane 7, 3.1×10^2 cfu/g (LOD); Lane 8, 3.1×10^1 cfu/g; Lane 9, Non-target strain (*B. subtilis* KCCM3135); Lane 10, No template control (NTC).

(다) 자연적 오염된 식품에서의 검출한계

- 분석된 36개 쌀 시료 중에서 *B. cereus* 오염은 새로 개발된 multiplex PCR 방식을 사용하여 25(69.44%)개에서 양성으로 검출되었음.
- *B. cereus* 양성 시료 중 두 시료(8.69 %)에서만 구토성 균주(emetic strains)를 나타내는 *ces* primer 양성이 측정되었음.
- 양성인 strains중에 다른 독성 genes의 검출율은 다음과 같음: *entFM* 73.56%, *hblC* 79.6%, *ces* 8.69%, *nheA* 90.95%, *cytK* 43.47%.
- 또한 분석된 김밥의 36개 시료 중 12개의 시료(33.33 %)는 *B. cereus* 에 오염된 것으로 측정되었음.
- 구토독소 생성균주에 의한 오염은 검출되지 않았으며 *nheA*는 쌀에서 가장 높은 검출률 빈도를 나타냈고, 다른 독성 유전자들의 검출률 빈도는 다음과 같이 측정되었음: *entFM* 66.66%, *hblC* 50%, *nheA* 100%, *cytK* 58.33%.
- 구토성 균주들의 분포 빈도는 매우 낮아 거의 모든 시료에서 발견되지 않았음. 오직 2개의 쌀 시료(전체 오염 시료 중 8.69%)에서 *ces*에 대한 양성을 나타냈음.
- 이러한 결과는 낮은 구토독소 생성균주의 유병률을 보고한 Ehling-Schulz 등(2006)의 결과와 곡물에서 낮은 구토독소 생성균주의 발생빈도를 보고한 Park 등(2009)의 결과와 일치함.
- 일반적으로 김밥의 33.33%와 쌀의 63.88%는 *B. cereus*로 오염되었으며 Yang 등(2005)은 한국에서 쌀에 *B. cereus*에 의한 오염이 평균 41.7%라고 보고하였음.
- 동일한 경향의 연구에서 enrichment 후의 시료에서 95%가 오염된 것으로 검출되었으며 또 다른 연구에서 40%의 오염 수준이 보고되었음(Jang et al., 2006).
- 또한 Cho 등(2008)은 김밥에서 43%의 *B. cereus* 오염을 보고하였음.
- 말레이시아에서 수행된 연구에서는 가공되지 않은 다양한 쌀에서 각각 100%, 76.2%, 70.4%, 50% 오염이 보고되었음(Sandra et al., 2012).
- 위에서 언급한 참고논문들의 결과들은 식품시료에서 *B. cereus*의 검출에 오직 하나의 목표 유전자를 목표로 하였다는 점에 주목해야 함.
- 그러므로 보고된 유병률은 아마 실제의 유병률보다 낮은 것인데, 이는 *B. cereus*에서 toxigenic profiles이 높은 다양성을 갖고 있기 때문으로 사료됨.

(라) 토양과 분변으로부터 검출한계

- 개발된 multiplex PCR 방법으로 토양시료 13개를 측정된 결과, 시료 13개 중 11개(84.6%)에서 *B. cereus*가 양성으로 검출되었음.
- 분변 시료의 경우, 13개 중 9개(69.2%)에서 *B. cereus*가 양성으로 검출되었음.
- 이러한 결과는 증균후 측정 결과와 MYP agar plating 결과를 비교한 것이며, 새로 개발된 multiplex PCR 분석방법의 적용가능성 확인 결과는 제1절의 결과와 동일하였음(표 3.12 참조).
- 보통 10^3 cfu/g이하의 *B. cereus* 오염은 소비자에게 안전함을 제시함(Granum et al., 2002; Martínez-Blanch et al., 2011). 그러나 다른 몇몇 국가에서는 때때로 다른 법적 제한을 두고 있음(Hägglom et al., 2002).
- 그러므로 본 연구에서 개발된 primer는 안전성이 확보되지 않은 식품검출에 유용하게 사용할 수 있으며, 본 연구에 의해 개발된 multiplex PCR의 민감성은 다른 이전의 결과(Kim et al., 2009, 2012, 2013)에 비해 비슷하거나 우수함을 나타내었고, Nakano 등에 의한(2004) 결과에 비해서 우수한 민감성을 나타내었음.
- 그러나 7시간의 증균 과정(enrichment)이 없는 직접 검출 방법에서는 만족할 만한 민감성을 나타내지 않았음. 증균배양(enrichment) 후 검출한계는 *B. cereus*에서 10^1 cfu/g로 개선되었으며 Nakano 등(2004)도 이러한 증균배양의 효과를 보고하였음.
- 기존의 배지 배양법은 결과를 얻기 위해 최소 24시간 걸릴 뿐만 아니라 부분적으로 예상한 것보다 낮은 민감성을 나타냈음. 비록 1 mL의 분주액으로 민감도를 개선시킬 수 있지만, 그러한 다량의 부피는 plate의 처리를 어렵게 만들며 더 많은 시간을 필요하게 하여 최종적으로 연구의 진행을 더 어렵게 만들.

(마) 결론: 2nd set of primers을 사용한 Multiplex PCR의 검출한계 분석

- 본 연구에서 새로이 개발한 multiplex PCR 2nd set of primers은 제1절(1차년도)에서 개발한 multiplex PCR primers에 비하여 10배나 높은 민감도를 나타내었고, 제1절에서 개발한 프라이머 중 일부는 300 bp 이상의 크기 때문에 real-time PCR의 primer로 사용하기에는 적합하지 않아 본 연구에서는 새로운 2nd set of primers을 개발하여 real-time multiplex PCR을 개발하고자 하였음.
- 본 연구에서 개발한 2nd set of primers는 제1절(1차년도)에서 개발한 1st primer set에 비하여 다음과 같은 장점이 있음.
 - ① 새로 개발된 multiplex PCR 분석 방법은 더 적은 dNTPs를 사용하는 저렴한 kit를 생산할 수 있음.
 - ② 새로 개발된 분석방법은 이전 방식보다 5-10배의 적은 primer 양(100, 200 nM)이 사용되는데 이는 더 낮은 생산 비용과 반응 튜브 내에서 화학적 간섭을 낮추는 결과(더 높은 효율)를 가져옴.
 - ③ 새로 개발된 multiplex PCR 분석 방법(2nd primer set-using)은 이전 분석 방법에 비해 식품과 순수배양, 그리고 DNA 샘플에서 *B. cereus* 검출의 높은 민감성을 나타냄.
 - ④ 새로 개발된 multiplex PCR 분석 방법(2nd primer set-using)은 commercial master mixes와 개발된 master mixes보다 광범위한 화학적 검출범위를 나타냄.
 - ⑤ 새로 개발된 분석방법은 IUPAC bases를 기초로 하여 primer가 제작되었으며 야생형 균주(wild strain)에서 더 넓은 검출범위를 나타냄.
 - ⑥ 새로운 분석방법의 민감성 시험은 이전의 primers에 비하여 더 많은 target reference strain과 non-target strains에서 검증 및 확인하였음.
 - ⑦ 새로 개발된 분석방법은 전기영동 젤에서 더 선명한 PCR bands를 만들었으며 이러한 결과는 더 효율적인 DNA 증폭을 의미함. 또한 본 연구과제의 최종 목표인 real-time PCR을 위하여 새로 개발된 primers가 우수한 검출 결과를 산출한다는 것을 의미함.

(5) Real time PCR 분석을 위한 2nd set of primers의 평가

- single PCR과 multiplex PCR에서 확인된 최적 primer의 농도는 real-time PCR에서도 가장 좋은 결과는 나타냈음.
- 2nd set of primers의 최적 PCR 반응 농도는 *cytK*, *nheA*, *entFM* primer는 모두 200 nM 이었고, *ces*와 *hblD* primer는 둘 다 100 nM이었음.
- singleplex real-time PCR reaction에서 최적화된 반응 조건은 [95°C 10분, (95°C 15 sec, 56°C 1 min) x 35회 반복] 이며, PCR 후 C_T 값은 각 PCR 반응의 마지막 extension cycle 후 측정하였음.
- PCR 산물에 대한 melting curve 분석을 측정하여 결과를 얻고, 각 특정 유전자의 특정 primers에 의한 PCR 산물의 녹는점 차이를 구하여 구별하였음.
- 표 3.18과 표 3.19는 각각 StepOne real-time PCR 및 Rotor Gene 6000 machine으로 수행한 real-time PCR 산물의 녹는점 값(T_m)을 나타낸 것임.
- Real-time PCR의 성능을 추가적으로 확인하기 위해, 증폭된 각각의 PCR product에 대한 아가로스 젤 전기영동 분석을 수행하여 PCR 산물의 밴드를 확인하였음. 증폭 curve와 melting peak를 보여주는 real-time PCR의 결과들은 전기영동 상에서 명확한 PCR DNA 밴드를 나타냈음(그림 3.9).
- 반면에 non-target 균주들에 대한 2nd set of primers-using real-time PCR에서 증폭 그래프 및 녹는점 그래프(melting curve)가 나타내지 않았음.
- 표 3.19는 Rotor Gene 6000 기기를 사용한 PCR 산물의 melting curves를 나타낸 결과임.
- 같은 시료와 시약을 사용한 PCR 반응을 두 가지 다른 PCR 분석 기기에서 수행하여 singleplex real-time PCR 결과와 동일한 결과를 얻었으므로, 2nd set of primers를 사용한 real-time PCR 방법의 재현성 및 primer set의 효율성 등을 검증하였음.
- 표 3.18과 표 3.19에서 나타낸 것처럼, 두 PCR 기기를 통한 각 유전자의 T_m 값은 거의 일치하였음. 각 유전자에 대한 PCR 산물의 melting peak는 singleplex 분석방법에서 각 primer의 효율을 측정하기 위해서도 사용됨.

⌘ 3.18 Melting temperatures (T_m) of different gene-specific PCR products after multiplex real-time PCR using 2nd set of primers for *B. cereus* reference strains in StepOne PCR machine.

Genes	Melting temperatures (T_m) of different reference strains					Mean
<i>cytK</i>	76.04	76.2	76.05	76.34	76.43	76.21
<i>nheA</i>	75.14	75.59	75.89	75.74	75	75.47
<i>entFM</i>	77.23	77.53	77.68	79.02	78.12	77.91
<i>ces</i>	72.61	72.45	72.6	72.75	72.47	72.57
<i>hblD</i>	81.4	80.67	80.97	80.95	81.26	81.05

⌘ 3.19 Melting temperatures (T_m) of different gene-specific PCR products after multiplex real-time PCR using 2nd set of primers for *B. cereus* reference strains in Rotor Gene 6000 machine.

Genes	Melting temperatures (T_m) of different reference strains					Mean
<i>cytK</i>	76.91	76.09	76.23	76.26	76.08	76.31
<i>nheA</i>	75.65	75.77	75.43	75.39	75.55	75.55
<i>entFM</i>	77.61	77.29	77.41	77.77	77.48	77.51
<i>ces</i>	72.43	72.44	72.56	72.65	72.78	72.57
<i>hblD</i>	80.69	80.87	81.14	81.2	81.16	81.01

- 두 가지 real-time PCR 기기에서 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche) 시약을 사용하여 각각의 유전자에 대한 PCR 산물의 melting peaks를 나타낸 결과임(그림 3.9).
- 그림 3.9에서 볼 수 있듯이 singleplex real-time PCR에서는 5개 유전자들의 PCR 결과들의 녹는점 그래프를 각각 분명하게 확인할 수 있었음.
- 그러나, FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) 또는 AccuPower® GreenStar™ qPCR PreMix (Bioneer)를 사용한 multiplex real-time PCR의 결과는 좋지 않아서, 두 kit 모두 분명한 녹는점 그래프를 만들지 못함(data not shown). 이 음성 결과는 PCR 산물의 전기영동에서도 선명한 DNA 밴드가 보이지 않음.
- 그 원인은 불분명하나 한 가지 가능성은 사용한 premix가 singleplex가 아닌 multiplex PCR에 적합하지 못해서 일 수 있으므로, 새로운 multiplex PCR용 master mix의 개발이 필요한 것으로 판단됨.

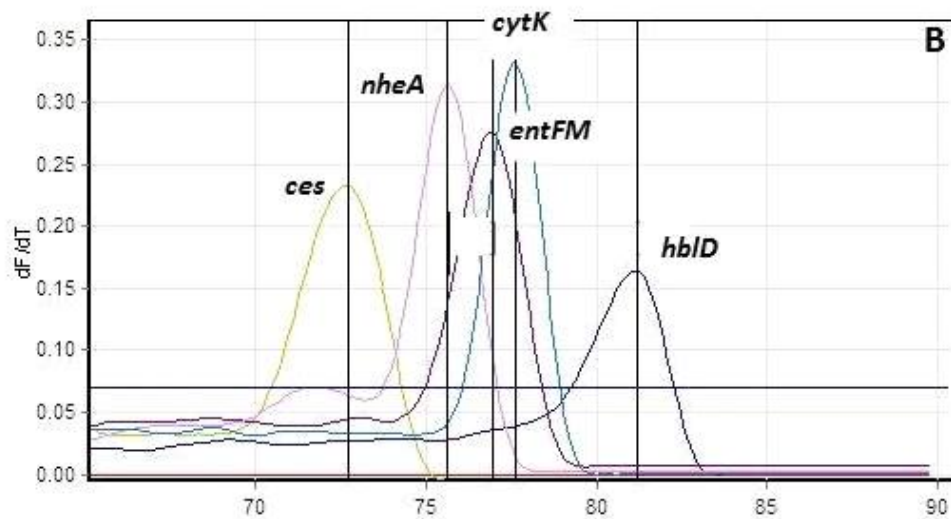
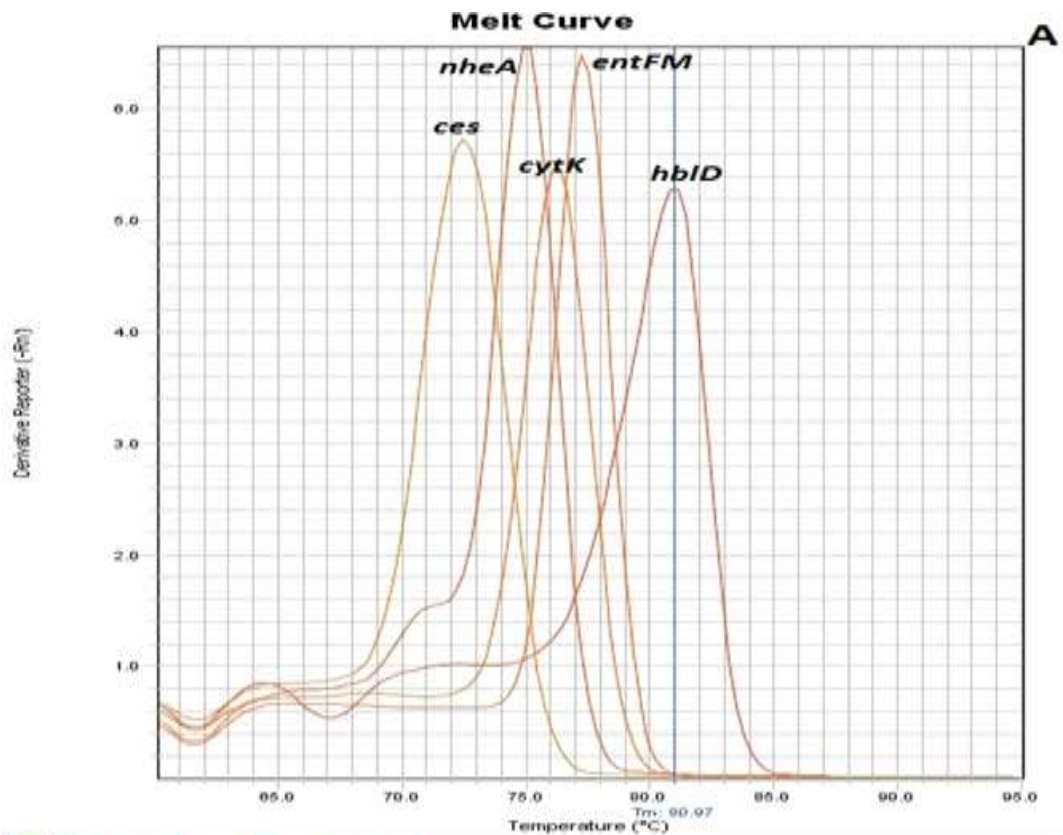


그림 3.9 Melting curves of different genes in singleplex real time PCR (2nd set of primers) using (A) StepOne PCR machine: *cytK*: Tm 76.21°C, *nheA*: Tm 75.47°C, *entFM*: Tm 77.91°C, *ces*: Tm 72.57, *hblD*: Tm 81.05°C; (B) Rotor Gene 6000 real time PCR machine: *cytK*: Tm 76.31°C, *nheA*: Tm 75.55°C, *entFM*: Tm 77.51°C, *ces*: Tm 72.57, *hblD*: Tm 81.01°C

(6) Real-time PCR에서 2nd set of primers의 특이성 분석

- 2nd set of primers의 특이성 확인 결과에서 위양성이나 위음성 반응은 관찰되지 않았음(그림 3.10).
- 그림 3.10는 *cytK* 타겟 primers를 사용한 real-time PCR이 8종의 표준균주 시료에서는 증폭이 일어났으나(양성), non-target strains에서는 증폭이 없음(음성)을 보여주고 있음.
- real-time PCR 반응에서 주형 DNA의 양을 10 ng/reaction으로 수행하여 PCR이 잘 일어나 C_T 값이 12-20 내외이므로, C_T 값이 32 이상이면 음성으로 판단하였음.
- 또한 Real-time PCR 분석에서 melting peak를 나타내는 양성반응 산물은 아가로스 겔에서 선명한 밴드로 확인되었으나, 음성의 경우에는 명확한 DNA 밴드가 나타나지 않았음.

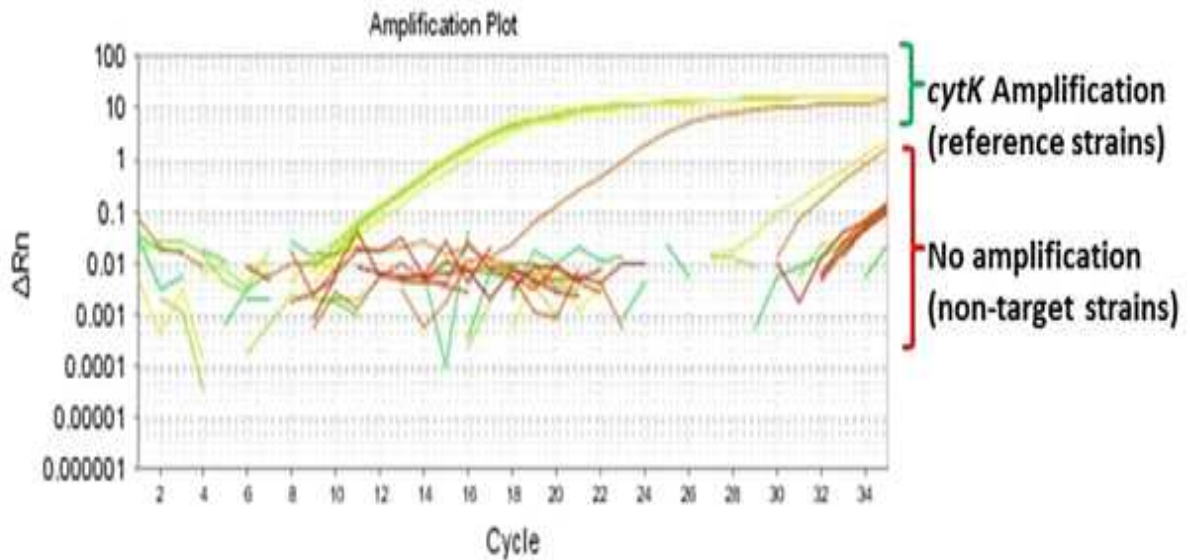


그림 3.10 Amplification plot for *cytK* gene. Reference strains show their amplification in PCR analysis and that there is no amplification for non-target strains (2nd set of primers).

(7) 2nd set of primers을 이용한 multiplex real-time PCR의 개선

- 표 3.20은 multiplex real-time PCR을 위해 Roche commercial master mix를 기본으로 하여 프라이머, dNTP, **MgSO₄**, template DNA, 멸균수 등 여러 가지 성분들의 필요량을 농도와 부피로 나타냈음.
- 추가 성분들을 보충하였을 때 전기영동 젤 상에서 예상되는 크기의 DNA 밴드가 더 명확히 나타났고, multiplex real-time PCR 후 예상되는 melting peaks도 측정되었음.
- multiplex real-time PCR 반응 혼합액의 최종 부피는 25 μ l/tube이며, 최적화된 PCR 반응 조건은 multiplex PCR 반응 조건과 동일하게 사용하였음: (95°C 30 s, 53°C 1 m, 72°C 90 s) x 40 cycles and a final extension of 72°C for 10min.
- Multiplex PCR master mix의 결과는 아가로스 젤에서 명확한 bands를 나타냈으나 multiplex real-time PCR 결과는 서로 구별 할 수 있는 melting curve를 만들지 못하였음.
- 이것은 PCR 반응혼합물에 추가된 SYBR green I의 농도에 대한 추가적인 최적화의 필요성을 의미하며 multiple products가 있을 때 낮은 간섭 또는 방해를 나타내는 것으로 알려진 SYTO-9 dye와 같은 다른 대체물을 통한 최적화 연구가 필요함을 시사함.

표 3.20 Additional components added to Roche master mix to improve multiplex real time PCR results (2nd set of primers).

Component	Volume (μ l)
Roche 2X master mix	12.5
ddH ₂ O	3.5
Primer mix 1 (100 nM <i>hblD/ces</i>)	1
Primer mix 2 (200 nM <i>nheA, cytK, entFM</i>)	1
Q-solution (Qiagen)	2
MgSO ₄	3
dNTP	1
Template DNA	1
Total volume	25 μ l

- 그림 3.11은 여분의 화합물이 첨가된 Roche master mix를 사용하여 수행한 multiplex real time assay의 melting curve 분석을 나타낸 결과임.
- 그림 3.11에서는, multiplex real-time PCR의 melting peaks는 singleplex real-time PCR 처럼 melting peak가 향상된 결과를 나타내지 않았음.
- 이러한 결과는 multiplex real-time PCR의 성공적인 분석을 위하여 추가적인 연구와 개선을 위한 최적화가 필요함을 시사함.

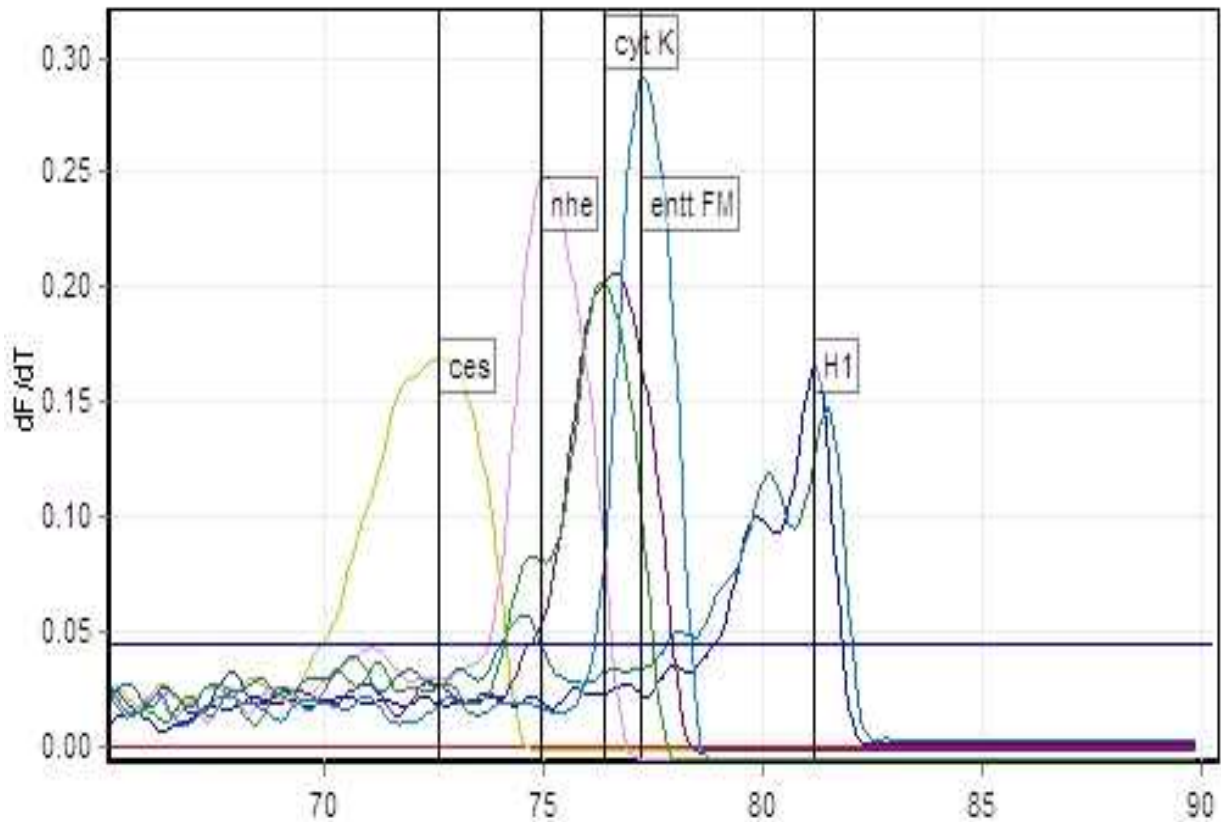


그림 3.11 Melting curve analysis of multiplex PCR real time assay. This analysis was detected using Roche master mix with the addition of extra components (2nd set of primers).

(8) 2nd set of primers을 이용한 multiplex real time PCR의 문제점 분석

- 본 연구진은 지금까지의 결과를 바탕으로 2nd set of primers이 일반적인 conventional multiplex PCR나 singleplex real time PCR은 효율적으로 이용할 수 있으나 real-time multiplex PCR에서 효율적으로 사용할 수 없는지에 대한 문제점을 다음과 같이 분석하였음.
 - ① Primer의 T_m 값은 real-time PCR 분석에서 primer들의 구별을 유도하지 못함.
 - ② DNA의 CG 염기서열에 결합하는 SYBR green dye의 높은 친화력은 동일한 반응 튜브에서 5종의 유전자를 기반으로 개발된 5종 primer의 특이적 반응을 유발하지 못함.
 - ③ 반응튜브에 primer가 많으면 PCR 생성물의 T_m 값을 가깝게 유도하는데 SYBR green dye는 최소 섭씨 3 °C의 T_m 값 차이를 나타내는 PCR 생성물들을 구별하는데 적합하지 않음.
 - ④ FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche)는 multiplex PCR의 생성물을 우수하게 유도하는 화학적 특성을 가지고 있지 않음.
 - ⑤ *EntFM*와 *nheA*의 PCR 반응물은 real-time PCR 측정에서 너무 크게 생성되었기 때문에 크기가 작은 새로운 primer가 필요함.
- 따라서, 이러한 문제점을 바탕으로 melt curve analysis에서 구별이 가능한 melting peak T_m 값과 우수한 반응물을 유도하기 위한 새로운 프라이머를 디자인(3rd set of primers)하였으며
- 기존의 SYBR green I에 비하여 생성물간의 T_m 값 그래프의 폭이 더 좁아(T_m 값 차이가 작거나, T_m 값이 더 가까움을 나타냄)도 PCR 생성물 측정이 가능한 SYTO-9 intercalating dye(MeltDoctor™ HRM)를 기반으로 새로운 master mix를 사용하였음.

나. *B. cereus* 구토/설사형 독소 동시검출용 kit 개발을 위한 multiplex real-time PCR 최적화

- 재 디자인된 3rd set of primers-using multiplex real-time PCR의 최적화를 위하여 순수 배양액(pure culture), 인위적 오염 식품 (아기 시리얼, 김밥, 저온살균 우유, 파스타, 쌀, 떡, 해바라기 오일) 시료를 통하여 3rd set of primers의 특이성 및 민감성을 평가하였음.

(1) 새로운 Primer 디자인 구축(3rd set of primers)

- 표 3.21은 3rd set of primers를 위해 새롭게 디자인한 primer list임.
- 표 3.21에 언급된 primer들 가운데 multiplex real-time PCR 분석을 위해서 이전에 사용된 *hblD* primer를 포함하여 최종적으로 5종의 primer를 선별하였음.
- 표 3.22은 multiplex real-time PCR 분석을 위해 선별된 3rd set of primers의 자료임.

3.21 3rd primer design for multiplex real-time PCR (3rd set of primers).

Target gene	Sequence	Product length	Product <i>T_m</i>	Design source
<i>ces1</i>	5' AACATCACCACCAATGAGCA 3' 5' AATCAATTGGCGGATCAAAA 3'	69 bp	75.31 °C	AY691650; DQ360825; DQ345790; JN222922; AY691650; DQ238109; DQ459072; JN112795; JN112796
<i>ces2</i>	5' TTGATTGGTGCACAATGGTC 3' 5' TTGCTCATTGGTGGTGATGT 3'	71 bp	73.20 °C	AY691650; DQ360825; DQ345790; JN222922; AY691650; DQ238109; DQ459072; JN112795; JN112796
<i>ces3</i>	5' TGCACAATGGTCCATCACTT 3' 5' TTGCTCATTGGTGGTGATGT 3'	63 bp	72.32 °C	AY691650; DQ360825; DQ345790; JN222922; AY691650; DQ238109; DQ459072; JN112795; JN112796
<i>ces4</i>	5' TGGAATGACCACCAAGTTCA 3' 5' GGCTAAAATTTGGCGTGATG 3'	80 bp	73.52 °C	AY691650; DQ360825; DQ345790; JN222922; AY691650; DQ238109; DQ459072; JN112795; JN112796
<i>ces5</i>	5' CATTCTCACTCGGCAACAC 3' 5' TGAACCTGGTGGTCATTCCA 3'	73 bp	72.32 °C	AY691650; DQ360825; DQ345790; JN222922; AY691650; DQ238109; DQ459072; JN112795; JN112796
<i>ces6</i>	5' TCGCATTAAATGGAATGACCA 3' 5' TGGCTAAAATTTGGCGTGAT 3'	90 bp	73.96 °C	AY691650; DQ360825; DQ345790; JN222922; AY691650; DQ238109; DQ459072; JN112795; JN112796
<i>ces7</i>	5' ATCGCGGCTGATTTTATTTG 3' 5' TTTCAAGAACC GCAATCAGA 3'	84 bp	75.72 °C	AY691650; DQ360825; DQ345790; JN222922; AY691650; DQ238109; DQ459072; JN112795; JN112796
<i>ces8</i>	5' ACAATCGCTTTTAGCCCAAG 3' 5' ATTTTGTGGACTGGATGC 3'	83 bp	74.11 °C	AY691650; DQ360825; DQ345790; JN222922; AY691650; DQ238109; DQ459072; JN112795; JN112796
<i>ces9</i>	5' ATGCAACCATCAATGGCATA 3' 5' TGA CTTGGATCCACATCGAG 3'	86 bp	73.37 °C	AY691650; DQ360825; DQ345790; JN222922; AY691650; DQ238109; DQ459072; JN112795; JN112796
<i>ces10</i>	5' GGGAGCCAACAACAATGTCT 3' 5' CATGCAAATGGTGAACGATG 3'	97 bp	72.32 °C	AY691650; DQ360825; DQ345790; JN222922; AY691650; DQ238109; DQ459072; JN112795; JN112796
<i>cytK1</i>	5' CGT TGT TTC CAA CCC AGT TT 3' 5' TAT ACA AAA CAC GCC GAC GA 3'	76 bp	79.17 °C	AJ277962; DQ019311; JN222929; JN222928; JN222924; CP000001; AJ318875; AJ318877; AJ318876
<i>cytK2</i>	5' TTT CCA ACC CAG TTT GCA GT 3' 5' TAT ACA AAA CAC GCC GAC GA 3'	71 bp	79.02 °C	AJ277962; DQ019311; JN222929; JN222928; JN222924; CP000001; AJ318875; AJ318877; AJ318876

표 3.21 (계속) 3rd primer design for multiplex real-time PCR (3rd set of primers)

Target gene	Sequence	Product length	Product T_m	Design source
<i>cytK3</i>	5' TTG CAG TTC CGA ATG TGA AG 3' 5' TAT ACA AAA CAC GCC GAC GA 3'	58 bp	77.2 °C	AJ277962; JN222929; JN222924; AJ318875; AJ318876; DQ019311; JN222928; CP000001; AJ318877;
<i>cytK4</i>	5' CAA CAG CGA TCA TAC CAG GA 3' 5' ACC GAT GGA TCA ACT TCC AG 3'	62 bp	72.9 °C	AJ277962; JN222929; JN222924; AJ318875; AJ318876; DQ019311; JN222928; CP000001; AJ318877;
<i>cytK5</i>	5' TAA AGA AAC GGG CGC TGT TA 3' 5' CTG GCG CTA GTG CAA CAT TA 3'	81 bp	74.55 °C	AJ277962; JN222929; JN222924; AJ318875; AJ318876; DQ019311; JN222928; CP000001; AJ318877;
<i>cytK6</i>	5' GCT TTA ACA GAA CCG CCA AG 3' 5' CGC CCG TTT CTT TAA CGT AG 3'	93 bp	75.74 °C	AJ277962; JN222929; JN222924; AJ318875; AJ318876; DQ019311; JN222928; CP000001; AJ318877;
<i>cytK7</i>	5' AAG CCT GGA CGA AGT TGG TA 3' 5' TCC TGG TAT GAT CGC TGT TG 3'	105 bp	75.59 °C	AJ277962; JN222929; JN222924; AJ318875; AJ318876; DQ019311; JN222928; CP000001; AJ318877;
<i>cytK8</i>	5' CGC TCG GAT CAT CGA TAA AA 3' 5' TTC AAC ACC TGC TGC TTA CG 3'	155 bp	75.14 °C	AJ277962; JN222929; JN222924; AJ318875; AJ318876; DQ019311; JN222928; CP000001; AJ318877;
<i>cytK9</i>	5' TAA AGA AAC GRG CGC TGT TA 3' 5' CTG GYG CTA GTG CAA CAT TA 3'	81 bp	74.4 °C	AJ277962; JN222929; JN222924; AJ318875; AJ318876; DQ019311; JN222928; CP000001; AJ318877;
<i>nheA1</i>	5' TGAAATTGTAATGCTGCA 3' 5' GCCTCTGMTCAGTTTGTGA 3'	114 bp	75.67 °C	Y19005; DQ885236; DQ153257; DQ019312; DQ153261;
<i>nheA2</i>	5' TGAAATTGTAATGCTGCA 3' 5' ATTTGWGTCGCTCTGMTC 3'	123 bp	76.32 °C	Y19005; DQ885236; DQ153257; DQ019312; DQ153261;
<i>nheA3</i>	5' TGAAATTGTAATGCTGCA 3' 5' TGTAATTGWGTCGCCTCTG 3'	127 bp	76.57 °C	Y19005; DQ885236; DQ153257; DQ019312; DQ153261;
<i>entFM1</i>	5' GGAACGGATACGTAAGC 3' 5' GCTGGGCCTGTACGTACTTT 3'	158 bp	77.42 °C	AY789084; EF453661; EF453659; AY897207; EF453653;
<i>entFM2</i>	5' GGAACGGATACGTAAGC 3' 5' TTGTAGTTGTTGTGTGTTTSG 3'	79 bp	74.97 °C	AY789084; EF453661; EF453659; AY897207; EF453653;
<i>entFM3</i>	5' GGAACGGATACGTAAGC 3' 5'CCRITTTGTTACKCCACCGATT 3'	194 bp	78.17 °C	AY789084; EF453661; EF453659; AY897207; EF453653;
<i>entFM4</i>	5' GGAACGGATACGTAAGC 3' 5' CAACCATTTTCAGCRCCAGT 3'	230 bp	78.27 °C	AY789084; EF453661; EF453659; AY897207; EF453653;
<i>entFM5</i>	5' GGAACGGATACGTAAGC 3' 5' CGGCCGTTATGGTTAATTT 3'	255 bp	78.42 °C	AY789084; EF453661; EF453659; AY897207; EF453653;

Figure 3.22 Final list of 3rd set of primers selected for further evaluation for multiplex real-time PCR.

Target gene	Sequence	Product length	Design sources: Genebank identification no.
<i>entFM5</i>	5' GGA ACT GGA TAC GTA AGC 3' 5' CGG CCG TTA TGG TTA ATT T 3'	255 bp	AY789084; AY897207; EF453661; EF453653; EF453659
<i>hblD</i>	5' GCA TGG TCA ATT GGT GGT 3' 5' CAC CAG CTG CTG TTC CTA 3'	163 bp	U63928; AJ007794; AY820178; AY820179; AY822582; AY822584
<i>nheA3</i>	5' TGA AAT TGT AAA TGC TGC A 3' 5' TGT AAT TTG WGT CGC CTC TG 3'	127 bp	Y19005; DQ019312; DQ885236; DQ153261; DQ153257
<i>ces10</i>	5' GGG AGC CAA CAA CAA TGT CT 3' 5' CAT GCA AAT GGT GTA ACG ATG 3'	97 bp	AY691650; DQ360825; DQ345790; JN222922; AY691650; DQ238109; DQ459072; JN112795; JN112796
<i>cytK9</i>	5' TAA AGA AAC GRG CGC TGT TA 3' 5' CTG GYG CTA GTG CAA CAT TA 3'	81 bp	AJ277962; DQ019311; JN222929; JN222928; JN222924; CP000001; AJ318875; AJ318877; AJ318876

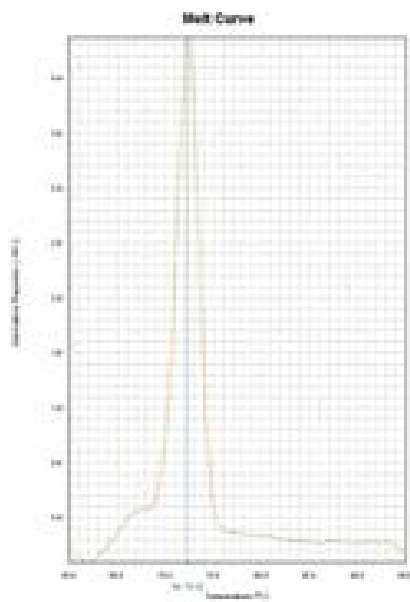
(2) 3rd set of primers의 평가와 PCR 최적화

- real-time PCR의 반응 조건은 총 부피를 25 ul로 정하고, 실험적으로 최적 반응 조건을 구하여 다음과 같은 반응 구성물(2X MeltDoctor™ HRM master mix, DNA 10 ng, Primer와 Sterile distilled water) 및 PCR 반응 조건을 결정하였음(표 3.23).
- singleplex 및 multiplex real-time PCR 반응 조건은 다음과 같음: 95 °C에서 10분(initial denaturation), 95°C 에서 15초와 58°C에서 1분의 35 cycles, 그리고 마지막 단계로 melt curve step (from 60°C to 95°C, with gradual temperature increments of 0.1°C/s).

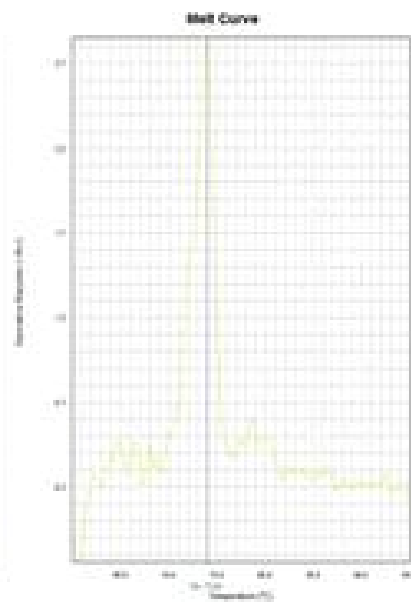
표 3.23 3rd set of primers를 사용하는 multiplex real-time PCR의 반응 조건

반응온도	반응시간	Cycle 수
95°C	10 min	1 cycle
95°C	15 sec	35 cycles
58°C	1 min	
Final step (melting curve step)	from 60°C to 95°C, with gradual temperature increments of 0.1°C/s	-

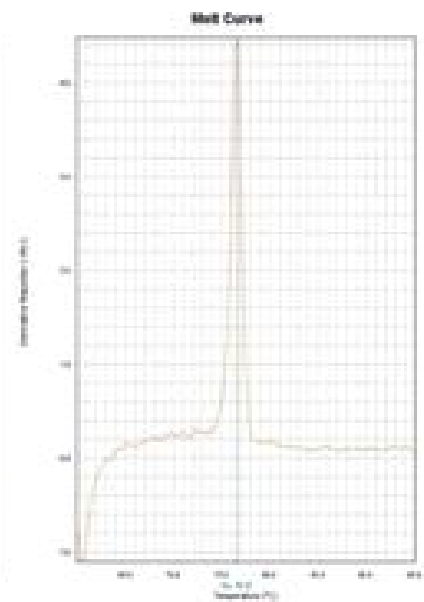
- Melting curve plot는 x축의 온도와 y축의 -Rn (negative derivate fluorescence)으로 제공되며 MeltDoctor™ HRM master mix의 형광 신호는 real-time PCR 측정기기의 FAM channel에서 측정됨.
- 그림 3.12는 singleplex PCR에서 3rd set of primers를 구성하는 각 primer의 우수한 melting curve를 나타내고 있음.
- 각각의 primer 들은 표적 유전자에 대한 Melting curve를 분명하게 만들었음.
- 이것들의 녹는점은 각각 multiplex real-time PCR 실험에서도 충분한 차이를 보였음.



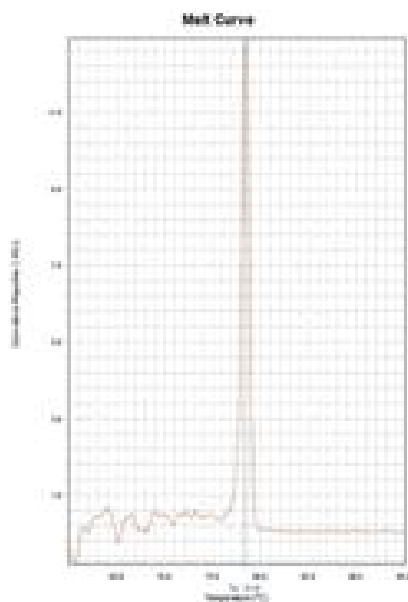
ces
(72.20°C)



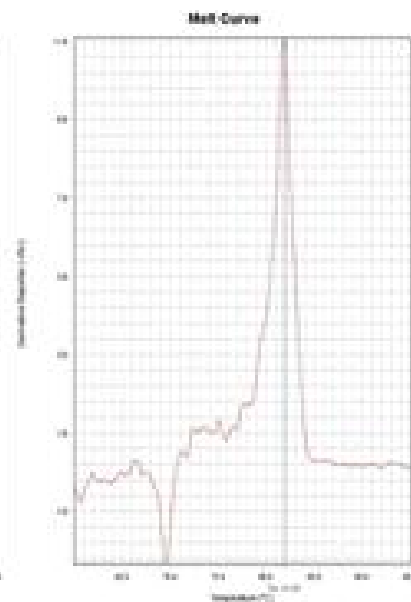
cytK
(74.34°C)



nheA
(76.55°C)



entFM
(78.42°C)



hblD
(81.90°C)

그림 3.12 Singleplex melt curve of primers of 3rd set of primers. *cytK*: Tm 74.4°C, *nheA*: Tm 76.57°C, *entFM*: Tm 78.42°C, *ces*: Tm 72.37, *hblD*: Tm 81.81°C.

(3) 3rd set of primers의 특이성과 평균 T_m 값

- 3rd set of primers의 특이성은 장독소 생성 유전자 특이 프라이머들은 장독소 생성 표준균주를, 구토 유전자 특이 프라이머는 구토독소 생성 표준균주를 각각 사용해서 평가하였음.
- 또한, 여러 구토 및 장독소 생성 표준균주들을 사용하여 각 primer 생성물의 T_m 값을 측정하여 비교하였음.
- 표 3.24는 여러 표준균주들을 사용해서 각 primer로부터 얻어진 T_m 값들을 나타낸 결과임.

표 3.24 Melting temperatures (T_m) of different gene products for *B. cereus* reference strains in StepOne machine using MeltDoctor™ HRM master mix (3rd set of primers).

Genes	Melting temperatures (T_m) of different reference strains (°C)					Mean T_M (°C)
<i>ces10</i>	72.37	71.96	72.14	72.31	72.21	72.20
<i>cytk9</i>	74.40	73.89	74.41	74.46	74.53	74.34
<i>nheA3</i>	76.57	76.39	76.48	76.71	76.62	76.55
<i>entFM5</i>	78.42	78.18	78.63	78.71	78.18	78.42
<i>hbID</i>	81.81	81.64	81.52	82.31	82.26	81.90

(4) 3rd set of primers를 이용한 Multiplex real-time PCR의 최적화

- 그림 3.13은 *B. cereus* 표준균주 ATCC 12480을 사용하여 multiplex real-time PCR melting curve 분석을 나타낸 결과임.
- *ces10*, *cytK9*, *nheA3*, *entFM5*, *hblD* 3rd set of primers의 최적화 농도는 각각 50, 150, 100, 50 nM과 100 nM으로 결정하였음(표 3.25).
- 그러나, singleplex PCR에서 *nheA3*는 다른 4개의 primer들과 같은 50 nM 농도에서 최대의 효율성을 나타냈음(data not shown).

표 3.25 multiplex real-time PCR을 위하여 최적화된 3rd set of primers의 각 농도

Primer name	Optimum concentrations (nM)
<i>ces10</i>	50
<i>cytK9</i>	150
<i>nheA3</i>	100
<i>entFM5</i>	50
<i>hblD</i>	100

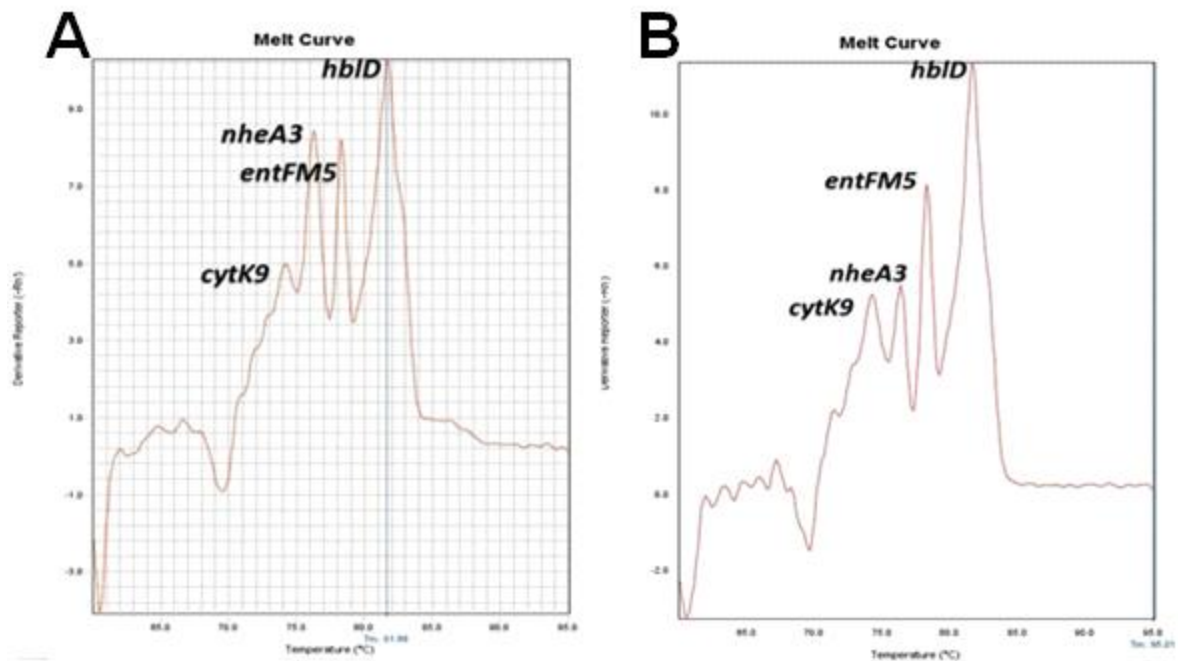


그림 3.13 Optimization of primers concentrations in multiplex real-time PCR melt curve analysis (3rd set of primers). A: a sample of optimization process before finding the optimum primer mixture concentration in *B. cereus* ATCC 12480. B: final optimized primer concentrations in *B. cereus* ATCC 12480 enterotoxic reference strain.

(5) 3rd set of primers를 이용한 Multiplex real-time PCR의 최종평가

- 그림 3.14는 *B. cereus* ATCC 12480 (enterotoxigenic reference strain)과 *B. cereus* F4810/72 (emetic reference strain)로부터 추출된 동일한 DNA량의 혼합을 통하여 효율적으로 작용하는 5개 primer의 측정 효과를 나타낸 결과임.
- 본 결과는 3rd set of primers는 5종류의 유전자를 측정할 수 있다는 결과를 제시한 것임.

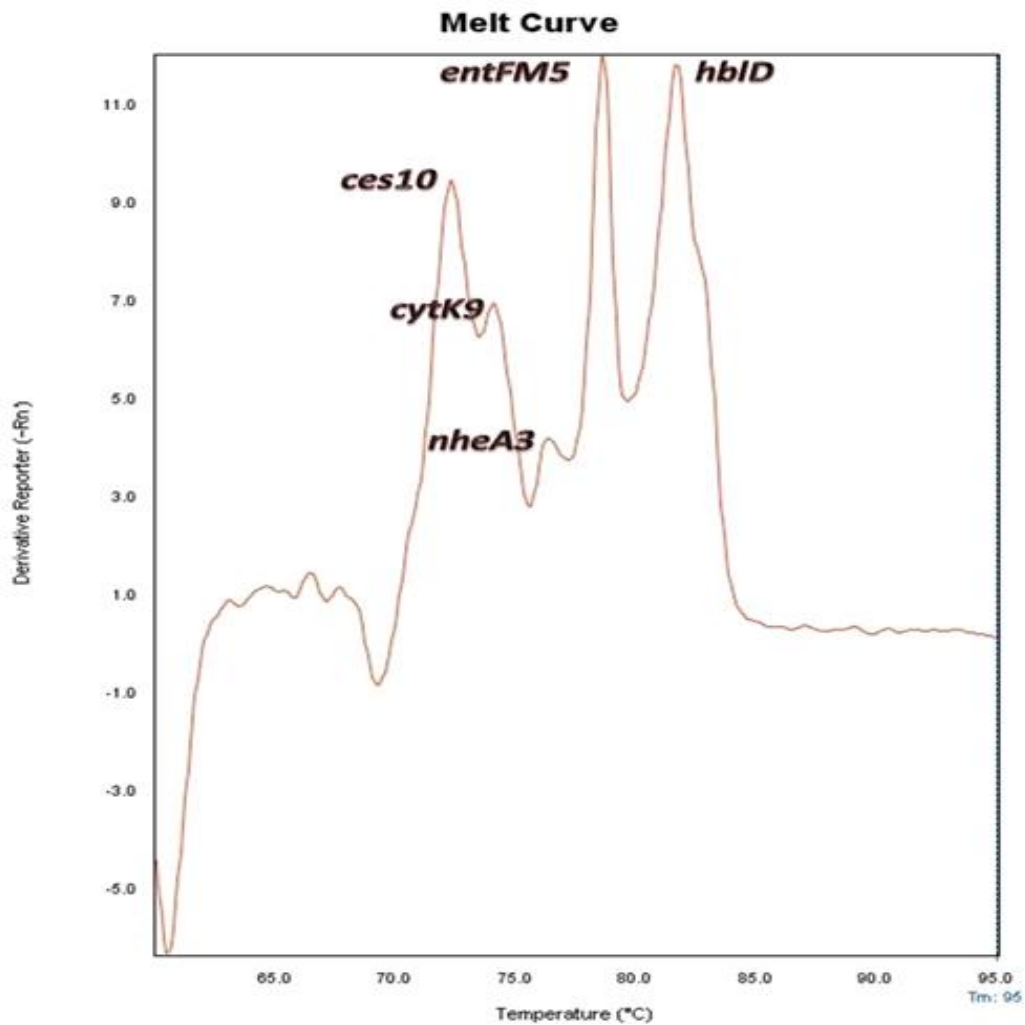


그림 3.14 Ability of all 5 primers to work in multiplex using equal amounts of *B. cereus* ATCC 12480 and F4810/72.

- 그림 3.15는 두 종의 reference strains(4개의 독소생성 유전자를 갖고 있는 균주)를 사용한 multiplex real-time HRM curve analysis의 결과를 나타내었음.
- 본 결과는 개발된 multiplex real-time PCR이 두 종의 표준균주에 존재하는 4가지 목표 유전자들을 정확하게 확인/측정했다는 것을 보여줌.

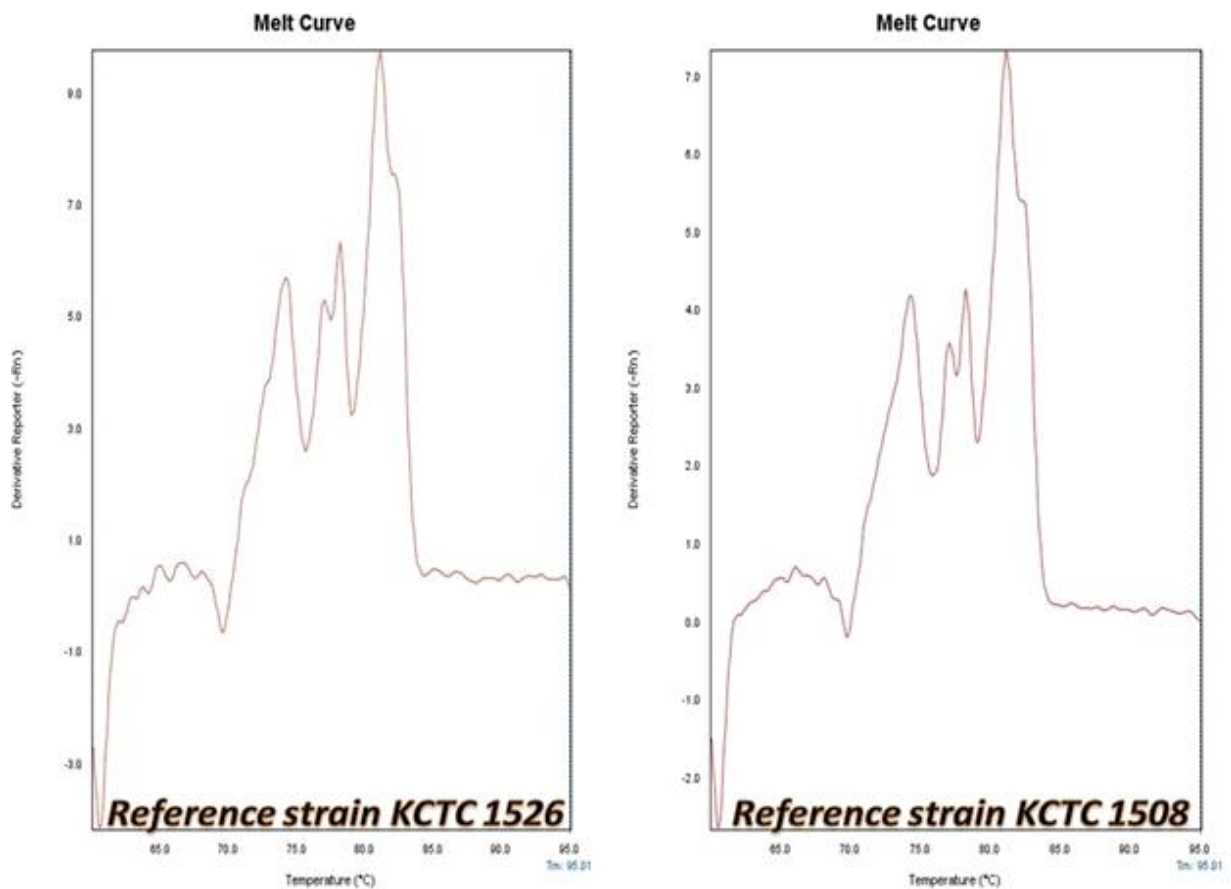


그림 3.15 Final evaluation of the multiplex real-time PCR High Resolution Melting Curve Analysis on two reference strains.

다. 실제 시료에서 개발된 multiplex real-time PCR의 정량분석 효율 검증 및 PCR kit 시제품 개발

- 개발된 3rd set of primers-using multiplex real-time PCR의 효율 검증을 위하여 순수배양액에서의 검출한계 분석과 실제 식품 및 환경 시료에서의 오염도 분석을 수행하여 PCR kit의 우수함을 검증하였음

(1) 3rd set of primers를 이용한 Multiplex PCR의 검출한계 분석

(가) 순수배양액에서의 검출한계

- 3rd set of primers의 검출한계는 200 fg으로, 2nd set of primers의 검출한계보다 10배 이상 우수한 것으로 확인되었음.
- 이러한 결과는 SYBR green I 대신 SYTO 9 intercalating dye의 적용, 새로운 master mix (MeltDoctor™ HRM master mix)의 사용 및 새롭게 디자인된 3rd set of primers의 고감도 효율성 때문에 나타난 결과로 사료됨.
- 표 3.26은 5종의 다른 reference strains를 사용해서 배양된 순수배양에서 균의 검출한계 (LOD, limit of detection)를 나타낸 결과임.

표 3.26 Limit of detection in pure culture for five *B. cereus* reference strains using MeltDoctor™ HRM master mix (3rd set of primers).

Strain	Type	Concentration of DNA in PCR reaction tube					
		2 ng	200 pg	20 pg	2 pg	200 fg	20 fg
<i>B. cereus</i> ATCC13061	Enterotoxic	+	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> ATCC12480	Enterotoxic	+	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> KCTC1013	Enterotoxic	+	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> KCTC1094	Enterotoxic	+	+	+	+	+	-
<i>B. cereus</i> F4810/72	Emetic	+	+	+	+	+	-

+ : presence of amplified product / - : absence of amplified product.

(나) 인위적 접종된 식품시료에서의 검출한계

- 식품에서 HRM real-time multiplex PCR assay의 검출한계는 7개 식품(아기 시리얼, 김밥, 저온살균 우유, 파스타, 쌀, 해바라기 오일과 떡)을 사용해서 평가하였음.
- 각각의 결과에서 *B. cereus* F4810/72의 검출한계는 1.8×10^2 cfu/g, *B. cereus* ATCC 12480의 검출한계는 2.3×10^2 cfu/g으로 나타났다. 이러한 검출한계는 동시에 수행된 전통적 배지 도말 배양보다 10배 이상 높거나 유사하게 측정되었음.
- 또한 이러한 HRM real-time multiplex PCR 분석을 통한 melt curve 측정 방법의 민감성은 균주를 TSB에 접종하여 37°C 에서 7시간 150rpm 교반하여 증균 배양한(enrichment) *B. cereus* F4810/72의 검출한계를 1.8×10^1 cfu/g까지, *B. cereus* ATCC 12480의 검출한계를 2.3×10^1 cfu/g까지 개선하였음.
- 그림 3.16은 밥과 우유 시료에 인위적으로 접종된 균의 검출한계(LOD, limit of detection)를 나타낸 결과임.

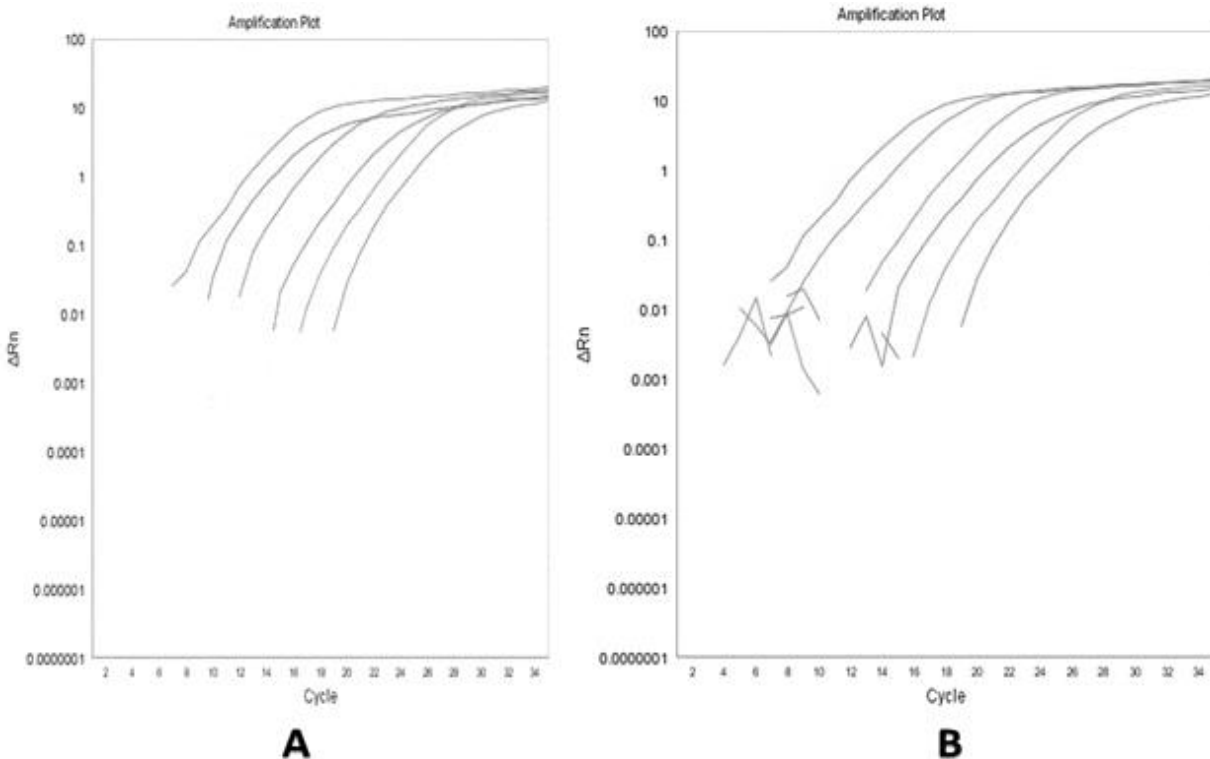


그림 3.16 Limit of detection in artificially inoculated milk (A) and rice (B). The figure shows amplification plot of the HRM multiplex real-time PCR approach (3rd set of primers) for *B. cereus* F4810/72 from 1.8×10^7 to 1.8×10^2 cfu/ml in milk and 2.3×10^7 to 2.3×10^2 cfu/g of *B. cereus* ATCC 12480 in rice.

(다) 자연적 오염된 식품으로부터 검출한계

- 2nd set of primers 개발을 위해 사용된 동일한 시료에서 toxin genes의 확인 결과, 최종 3rd set of primers-using multiplex real-time PCR이 식품에서 대상 유전자를 효과적으로 측정할 수 있다는 것을 보여주었음.
- 모든 결과들은 이전의 2nd set of primers에 의해 얻어진 결과와 동일하게 나타났음.
- 그런데, 몇몇 야생형 균주들에서는 *nheA3* primer가 해당 *nhe* gene을 증폭/측정할 수 없어서 해당 유전자에 대한 PCR 결과를 얻을 수 없음.
- 이러한 문제는 본 연구에서 개발된 multiplex real-time PCR 측정 방법이 독소를 생성하는 wild type 균주에 존재하는 다른 1개 또는 그 이상의 독성 유전자를 고감도로 측정하므로 3rd set of primers - multiplex real-time PCR의 결과에 영향을 주지 않았음.

(라) 토양과 분변으로부터 검출한계

- 본 연구에서 개발한 multiplex PCR 분석방법으로 토양시료에서 *B. cereus*를 검출한 결과 시료 13개 중 11개(84.61 %)에서 양성 결과를 얻었음.
- 또한, 분변 시료의 13개중 9개(69.23 %)에서 양성 결과를 얻었음.
- 이러한 결과는 새로 개발된 multiplex PCR 분석방법의 실용화 가능성을 확인한 것이며 제1 절의 연구결과와 앞서 개발된 real-time multiplex PCR의 2nd set of primers에서 검출이 불가능했던 것을 3rd set of primers를 통해 효과적으로 검출할 수 있다는 것을 보여주는 결과임.
- 따라서, 이러한 결과는 3rd set of primers를 이용한 multiplex real-time PCR 법은 토양과 분변에서 *B. cereus*를 매우 높은 민감도와 선택성으로 검출하는데 사용될 수 있음을 보여주었음.
- 본 연구의 결과에서 얻어진 3rd set of primers를 이용하여 동결건조 기술을 활용한 one step PCR kit 시제품 개발을 위한 연구 결과는 다음 절에 기술하였음.

(2) 결론: *B. cereus* 구토/설사형 독소 동시검출용 kit 개발을 위한 multiplex real-time PCR 최적화

- ◆ 본 연구에서 개발된 2nd set of primers은 *B. cereus* 구토독소와 장독소 생성균주를 동시에 검출하는 multiplex conventional PCR을 위한 키트로 매우 효과적으로 사용될 수 있음.
- ◆ 본 연구에서 개발된 3rd set of primers는 *B. cereus* 구토독소와 장독소 생성균주를 동시에 검출하는 multiplex conventional PCR 뿐만 아니라 High Resolution Melting multiplex real-time PCR에 모두 사용될 수 있음. 즉, 정성과 정량 multiplex PCR을 위한 키트 개발에 활용할 수 있음.
- ◆ 본 연구에서 개발된 3rd set of primers는 그에 알맞은 master mix를 적용하여 구토독소와 장독소 생성균주를 동시에 검출하는 *B. cereus*를 측정하기 위한 detection kit로 상용화가 가능할 것으로 판단됨.

제3절 *B. cereus* 구토/설사형 동시검출 multiplex conventional / multiplex real-time PCR 개발기술의 현장 적용 테스트 및 AOAC protocol에 따른 검증

요약

1. 구토 및 설사형 바실러스 세레우스 멀티플렉스 피씨알 동시검출 키트들(Emetic & Enterotoxic *Bacillus cereus* multiplex detection kit 및 multiplex real-time PCR detection kit)의 시제품을 개발하였음.
 - ◆ 각 PCR 키트 구성 성분들의 농도 및 용량을 대량생산을 위하여 계산하고 오차율을 고려한 값을 결정하고 사용자 편의를 고려한 동결건조형 키트를 제작하였음.
 - ◆ **multiplex PCR kit**는 다음의 3가지 구성요소로 이루어졌음: (1) 0.2 ml 8-stripe PCR tubes (동결건조된 PCR master mix가 들어있음), (2) primer mix tube ('P'로 표시함, 제2 프라이머 세트 혼합액), (3) positive control tube ('C'로 표시함, *B. cereus* ATCC 12480(설사형)와 F4810/72(구토형) 유전체 혼합액).
 - ◆ **multiplex real-time PCR kit**는 다음의 3가지 구성요소로 이루어졌음: (1) real-time PCR premix tube ('2XM'으로 표시함, MeltDoctor™ HRM master mix), (2) primer mix tube ('P'로 표시함, 제3 프라이머 세트 혼합액), (3) positive control tube ('C'로 표시함, *B. cereus* ATCC 12480(설사형)와 F4810/72(구토형) 유전체 혼합액).
2. 개발된 PCR kit의 성능을 AOAC protocol에 따라 검증하고 평가함
 - ◆ PCR kits의 실험법 및 'AOAC 검증을 위한 사용자 편의 프로토콜'을 개발함
 - ◆ AOAC 검증방법으로 인위접종 시료, 그리고 실제 식품 및 환경 시료 등을 대상으로 두 PCR kits와 표준배지배양법을 비교 시험한 검출 결과는 세 가지 방법 중 multiplex real-time PCR kit가 가장 우수함을 나타냄.
 - ◆ AOAC 검증방법에 따라 3개의 독립된 실험실에서 각각 두 PCR kits의 검증을 수행하여 개발된 PCR kits의 우수한 성능을 검증하였음.
3. 개발된 PCR kits는 다음과 같은 장점이 있음: (1) 신속함: 시험 소요 시간이 짧음(1~3 시간 (증균전) 또는 1일 이내(증균후)), (2) 높은 민감도: 식품 그램당 약 10^3 CFU/g (증균전), 10^1 CFU/g (증균후), (3) 높은 특이도: 전통적 배지법과 비교하여 위양성 및 위음성을 최소화할 수 있음, (4) 명확성: 균 동정을 위한 추가 확인 시험이 필요 없음, (5) 경제성: 추가시험이 불필요하고, 할 일이 적으므로 더 경제적임, (6) 독성유전자 프로파일 작성: *B. cereus* 검출 뿐 만 아니라 독성유전자 프로파일을 작성하여 의학적, 전염병학적, 및 환경적 연구에 적용 가능, (7) 기록과 문서화 용이함: 전통적 배지 방법보다 PCR 방법에서 얻어진 결과들은 더 쉽게 문서화 할 수 있고 향후 분석을 위하여 장기간 보관할 수 있음.

1. 개발된 multiplex conventional / real-time PCR kit 현장 적용 테스트

가. 시제품 키트의 생산 (Production of model commercial kit)

- 구토 및 설사 독소 생성 바실러스 세레우스 동시검출용 multiplex PCR (cPCR) detection kit 및 multiplex real-time PCR (rtPCR) detection kit의 상업용 시제품을 아래와 같이 생산함.
- multiplex PCR 및 Multiplex real-time PCR kit용 제3 프라이머 세트들은 본 연구과제에서 디자인되어 개발되었고, 바이오니아사(Bioneer Co., Deajeon, Korea)에 주문하여 만들어졌음.
- 독소 유전자들(ces, cytK, nheA, entFM 및 hblD)을 목표로 하는 특이적 프라이머들은 바이오니아사로부터 구입하여 먼저 농축용액(stock) 농도 100 pmol/ μ l로 준비한 후, substock 용액 농도 10 pmol/ μ l로 희석하고 PCR 키트용 premix를 만드는데 사용하였음.
- 제품 생산을 위한 프라이머 및 Taq 중합효소, 반응버퍼 등 모든 재료들의 특정 양을 계산하고 PCR 및 real-time PCR 키트의 시제품 생산을 위해 코젠바이오텍 ((주)코젠바이오텍, Kogenebiotech, Seoul, Korea)와의 협업으로 생산하였음.
- 제2절의 결과에 근거한 프라이머 정보와 PCR 조건 등의 특정 수치들과 최적화한 조건들이 대량생산 과정을 위하여 사용되었음.
- 표 3.27은 100회 PCR 반응용 키트 생산시 필요한 각 제품 구성요소들의 수치 값들을 나타냈음. 각 키트 당 6 세트를 일차적으로 생산하여 검증 실험에 사용하였음.
- 상업적 생산을 할 때 제품의 수량 및 용량 그리고 오차범위 등이 고려되어야 하므로 각각의 경우에 따른 각 구성요소들의 필요량에 대한 정확한 계산 값들은 중요함. 예를 들어 피펫팅에 의한 부피의 오차 등을 보정할 필요가 있음.
- 각 키트의 산업적 대량생산을 위하여 더 나은 조건을 얻기 위하여 오차(40% w/error rate)를 산정하여 각 프라이머나 키트의 기본 용량에 적용하였음.
- 이러한 모든 데이터들은 코젠바이오텍에서 제품 생산을 위한 정보로 제공됨.
- 각 키트의 시제품(Commercial model kits)은 사용자 편의 시스템을 고려하여 적당한 형태로 생산되었음.

표 3.27 multiplex PCR kit 및 Multiplex real-time PCR kit의 상업적 제품 생산에 적용할 사용 용량에 대한 수치들 (Industrial level calculations for the production of the multiplex PCR and Multiplex real-time PCR kits by Kogenebiotech.)

	primer		stock (pmol/ul)	working vol. (ul)	rxn / Kit	Total vol.(ul)/kit (w/ error rate 40%)	for 6 kits
	Multiplex Real-time PCR Kit	ces	forward	10	0.1	100	14
reverse			10	0.1	100	14	84
cytK		forward	10	0.25	100	35	210
		reverse	10	0.25	100	35	210
nheA		forward	10	0.2	100	28	168
		reverse	10	0.2	100	28	168
entFM		forward	10	0.1	100	14	84
		reverse	10	0.1	100	14	84
hblD		forward	10	0.2	100	28	168
		reverse	10	0.2	100	28	168

	primer		stock (pmol/ul)	working vol. (ul)	rxn / Kit	Total vol.(ul)/kit (w/ error rate 40%)	for 6 kits
	Multiplex cPCR Kit	ces	forward	10	0.2	100	28
reverse			10	0.2	100	28	168
cytK		forward	10	0.4	100	56	336
		reverse	10	0.4	100	56	336
nheA		forward	10	0.4	100	56	336
		reverse	10	0.4	100	56	336
entFM		forward	10	0.4	100	56	336
		reverse	10	0.4	100	56	336
hblD		forward	10	0.2	100	28	168
		reverse	10	0.2	100	28	168

- 그림 3.17은 생산된 각 multiplex PCR kit 및 multiplex real-time PCR detection kit 시제품의 외형을 나타냄.
- 제품 외형에는 제품의 명칭 및 필요한 정보들 그리고 보관 온도를 기재함.
- 각 키트들은 냉동 상태로 보관 및 유통되고 실험시 녹여서 사용함.
- 그림 3.17의 시제품 외형을 참고하여 실제 제품의 외형에는 제조사 및 기타 정보가 포함될 것임.



그림 3.17 개발된 각 PCR kits 시제품의 외형 (Outer view of multiplex PCR and multiplex real-time PCR kits produced by Kogenebiotech.)

(1) Emetic & Enterotoxigenic *Bacillus cereus* multiplex PCR detection kit

- 사용자 편의를 고려하여 생산된 multiplex PCR kit는 3 가지 주요 구성요소로 이루어졌음.
 - ◆ 제1 구성요소: positive control tube (양성대조균 튜브, 뚜껑 위에 “C”라고 표시함) - 이것은 *Bacillus cereus* ATCC 12480 (설사형 표준균주) 및 F4810/72 (구토형 표준균주) 두 균주들 유전체 DNA cocktail (혼합액)
 - ◆ 제2 구성요소: Primer mix tube(프라이머 혼합액 튜브, 뚜껑 위에 “P”라고 표시함) - 모두 5 가지 목표유전자들에 대한 5 종류의 프라이머들 혼합액 (*cytK*, *entFM*, *hblD*, *nheA*, *ces*)
 - ◆ 제3 구성요소: 0.2 ml 8-stripe tubes - 동결건조된 PCR용 master mix (Bioneer)가 들어 있음.
- 그림 3.18은 시제품으로 생산된 multiplex PCR detection kit의 모든 구성요소들을 보여줌.
- 제품은 냉동상태로 보관되고 각 실험시 일정량을 사용함.

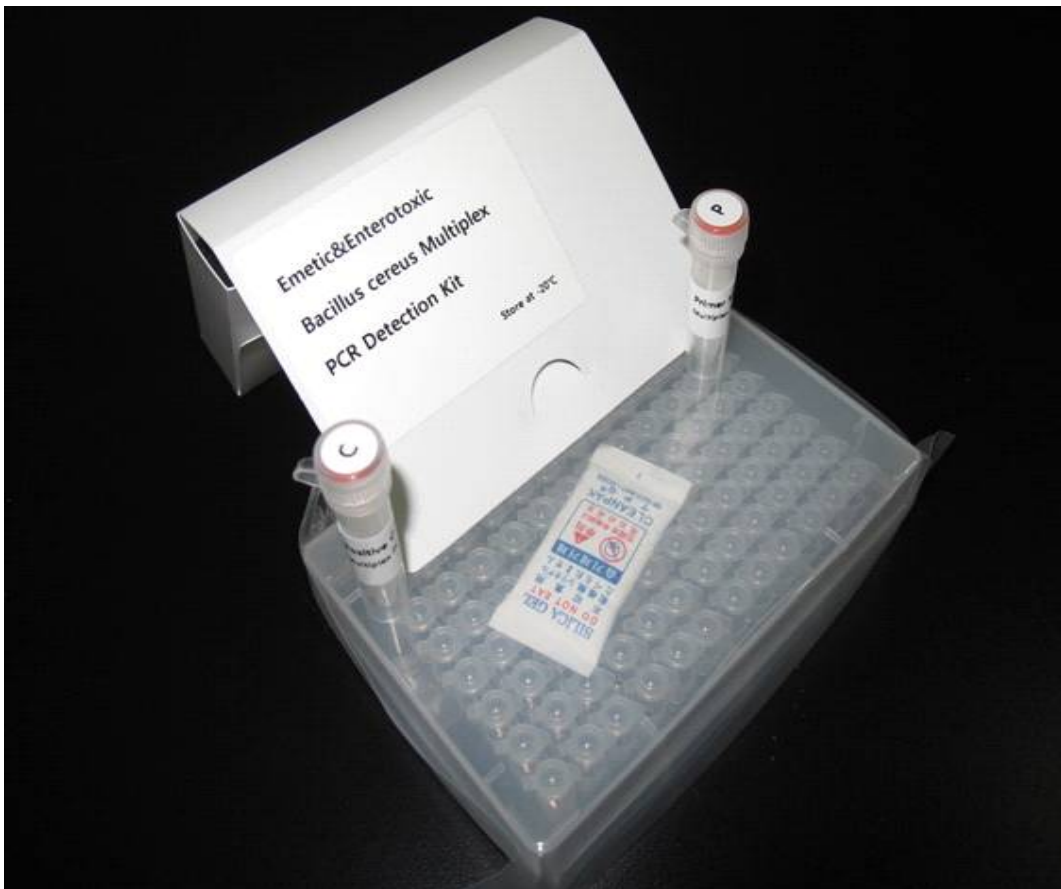


그림 3.18 개발된 multiplex PCR detection kit 시제품 키트의 모든 내용물 (All components of the multiplex PCR detection kit produced by Kogenebiotech.)

(2) Emetic & Enterotoxigenic *Bacillus cereus* multiplex real-time PCR kit

- 사용자 편의를 고려하여 생산된 multiplex real-time PCR kit는 3가지 구성요소로 이루어짐
 - ◆ 제1 구성요소: positive control tube(양성대조균 튜브, 뚜껑 위에 “C”라고 표시함) - 이것은 *Bacillus cereus* ATCC 12480(설사형 표준균주) 및 F4810/72 (구토형 표준균주) 두 균주들 유전체 DNA cocktail (혼합액)
 - ◆ 제2 구성요소: Primer mix tube(프라이머 혼합액 튜브, 뚜껑에 “P”라고 표시함) - 모두 5가지 목표유전자들(*cytK*, *entFM*, *hblD*, *nheA*, *ces*)에 대한 5 종류의 프라이머들 혼합액.
 - ◆ 제3 구성요소: MeltDoctor™ HRM master mix tube (마스터 믹스 튜브, 뚜껑 위에 “2XM”으로 표시함)
- 본 제품에서 제3 구성요소의 real-time PCR master mix는 MeltDoctor™ HRM master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용함.
- 그림 3.19는 시제품으로 생산된 multiplex real-time PCR detection kit의 모든 구성요소들을 보여줌. 제품은 냉동상태로 보관되고 각 실험시 일정량을 사용함. real-time PCR용 tube는 각 real-time PCR 기기에 맞는 tube나 plate를 사용함.




그림 3.19 개발된 multiplex real-time PCR detection kit 시제품 키트의 내용물 (All components of the multiplex real-time PCR detection kit)

나. 개발된 PCR 키트들의 사용법 및 프로토콜의 개발

(Preparation of kits protocols)

- AOAC 가이드라인에 따라 개발된 키트의 검증(validation)을 수행하려면 비슷한 조건 하에서 여러 실험실에서 제품의 평가가 수행되어야만 함(AOAC, 2002).
- 그러므로, 개발된 키트의 평가/검증을 위하여 협력하는 각 실험실에서 동일한 실험을 수행할 때 사용하기 위한 쉽게 이해하고 따라할 수 있는 도표형식(flowchart)의 실험법을 개발하였음.
- 그림 3.20과 그림 3.21은 각각 multiplex PCR kit와 multiplex real-time PCR detection kit protocols을 나타냄. 이 프로토콜들은 종이에 인쇄하여 각 키트에 포함시킴.
- 이 프로토콜은 AOAC 표준에 따라 개발된 키트의 검증을 위한 협력 실험실의 연구자들에 의해 각 키트들의 실험 프로토콜로 사용되었으며, 연구자들의 의견을 반영하여 수정되어 최종으로 user's manual로서 사용될 것임.
- AOAC 검증을 위한 모든 실험들과 자연적으로 오염된 식품 시료들에 대한 실험들에서도 이 프로토콜에 따라 각 키트의 실험을 수행함.
- AOAC 가이드라인에 기초한 개발된 키트의 검증 실험이 세 군데 실험실에서 수행되었음. 강원대학교(제1실험실), 국립농업과학원(제2실험실), 건국대학교(제3실험실) 등 3곳의 실험실이 제품 검증에 참여함
- AOAC 방법에 기초한 키트의 검증 과정이 3곳의 실험실에서 가능한 유사하게 진행되도록 하기 위하여 각 키트의 프로토콜과 필요한 정보가 전달되었으며, 필요하다면 방문, 전화 및 이메일 등을 통하여 각 실험 단계를 명확히 하여 수행되었음.

(1) multiplex PCR detection kit protocols: User's guide (사용자 안내서)

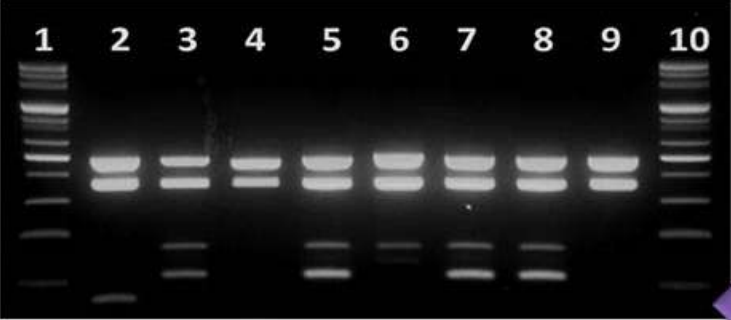


Users' Guide

Each reaction tube:

1. Add sterile DW (11 ul)
2. Add primer mix (4 ul)
3. Add target DNA(5 ul) Mix-Centrifuge-Cap
4. Run PCR

95°C for 10 min, 35 cycles of 95°C for 15 sec, 56°C for 30 sec and 72°C for 30 sec, and a 3 min final extension at 72°C.




Direct loading to agarose gel (2.5 %) / gel electrophoresis

ces: 70 bp *cytK*: 106 bp *hbl*: 163 bp
nheA: 376 bp *entFM*: 488 bp

Lane1 & 10, 100-bp ladder; Lane 2, F4810/72; Lane 3, ATCC 12480; Lane 4, ATCC 13061; Lane 5, KCTC 1013; Lane 6, ATCC 27348; Lane 7, KCTC 1092; Lane 8, KCTC 1094; Lane 9, KCTC 1014;


그림 3.21 multiplex PCR detection kit에 대한 사용자 편의 차트식 실험법 (User friendly Protocol for the multiplex PCR detection kit using an easy to understand flowchart.)

(2) multiplex real-time PCR detection kit protocol: User's guide

 **Users' Guide**

Each reaction tube:

1. Add sterile DW (3 ul)
2. Add primer mix (2 ul)
3. Add master mix (10 ul)
4. Add target DNA (5 ul) – Mix– Centrifuge–Cap
5. Run PCR

 **mPCR conditions:**
95°C for 10 min- (95°C for 15 s & 58°C for 1 min) X 40- HRM Analysis

HRM Analysis (using FAM channel): from 60°C to 95°C with gradual temperature increments of 0.1°C/s.

ces: 72.20 ± 0.24 °C **cytK:** 74.23 ± 0.52 °C **hbl:** 81.90 ± 0.41 °C
nheA: 76.55 ± 0.39 °C **entFM:** 78.42 ± 0.29 °C

One step detection

Melt Curve
entFM5 hbl
ces10
cytK9
nheA3
Detection of all 5 target genes in artificial DNA mix

Melt Curve
hbl
entFM5
nheA3
cytK9
B. Cereus reference strain ATCC 12480

그림 3.22 multiplex real-time PCR detection kit에 대한 사용자 편의 차트식 실험법 (User friendly Protocol for multiplex real-time PCR detection kit using an easy to understand flowchart.)

(3) 개발된 키트 검증을 위한 세균 균주들 및 식품 시료들 (Bacterial Strains and Food Samples)

- 본 연구를 위하여 3 종류의 표준균주들(reference strains)이 AOAC validation guideline과 참고문헌에 따라 선택되었음(AOAC, 2002; Chua et al., 2011; Li et al., 2012; Petrauskene et al., 2012).
- 선택된 3 가지 다른 표준균주들은 다음과 같음: *Bacillus cereus* ATCC 12480 (enterotoxic reference strain), *B. cereus* KCTC 1013 (enterotoxic reference strain) and *B. cereus* F4810/72 (emetic reference strain).
- 또한, 바실러스 세레우스(*B. cereus*)에 오염과 관련된 3가지 다른 식품 시료가 선택되었음: 밥, 우유, 파스타(rice, milk, pasta).
- 이들 식품은 AOAC 검증 과정에 따라 3 가지 다른 표준균주들로 인위적으로 접종하여 실험에 사용되었음(AOAC, 2002; Chua et al., 2011; Li et al., 2012; Petrauskene et al., 2012).
- 밥은 구토 표준균주(F4810/72), 우유는 장독소 표준균주(KCTC 1013), 그리고 파스타는 또 다른 장독소 표준균주(ATCC 12480)로 접종/오염시켰음.
- 그림 3.23은 실험에 사용한 시료들에 대한 자세한 정보를 나타냄.
- 접종 방법 및 분석 방법은 다음에 기술할 검증 과정 프로토콜(validation process protocol)에서 더 자세히 논의할 것임.



그림 3.23 키트 검증을 위해 사용한 3 종류의 식품 시료들 사진. (The 3 food types used in the study for the AOAC validation of the multiplex PCR and multiplex real-time PCR detection kits.)

(4) AOAC 검증용 프로토콜의 개발

(Preparation of AOAC validation protocol for all laboratories)

- AOAC 검증을 위한 사용자 편의 “노하우” 프로토콜을 개발하여 각 협력 실험실들에 제공하였음. 모든 협력 실험실들은 본 과제에서 준비되어 제공된 “사용자 편의 프로토콜”에 따라 검증 실험을 수행함.
- 그림 3.24는 준비된 “사용자 편의 프로토콜”을 나타냄 (AOAC, 2002; Chua et al., 2011; Li et al., 2012; Petrauskene et al., 2012).
- 마지막으로, AOAC 가이드라인에 따라 검증과정을 수행하는 각 실험실에서는 밥, 우유, 파스타 등 3 식품에 대하여 각각 10 고농도 접종 시료(high inoculum level inoculated sample), 10 저농도 접종 시료(low inoculum level inoculated samples), 2 음성대조군(negative controls without inoculation) 그리고 1 양성대조군(positive control, either pure strain culture or DNA from positive references)에 대한 결과를 얻을 것임.
- 그러므로 각 실험실에서는 각 식품에 대하여 총 22개 시료의 데이터를 얻게 될 것임.
- 또한, 3개 실험실의 결과를 합하면, 각 식품에 대하여 총 66개의 시료 데이터로 구성됨

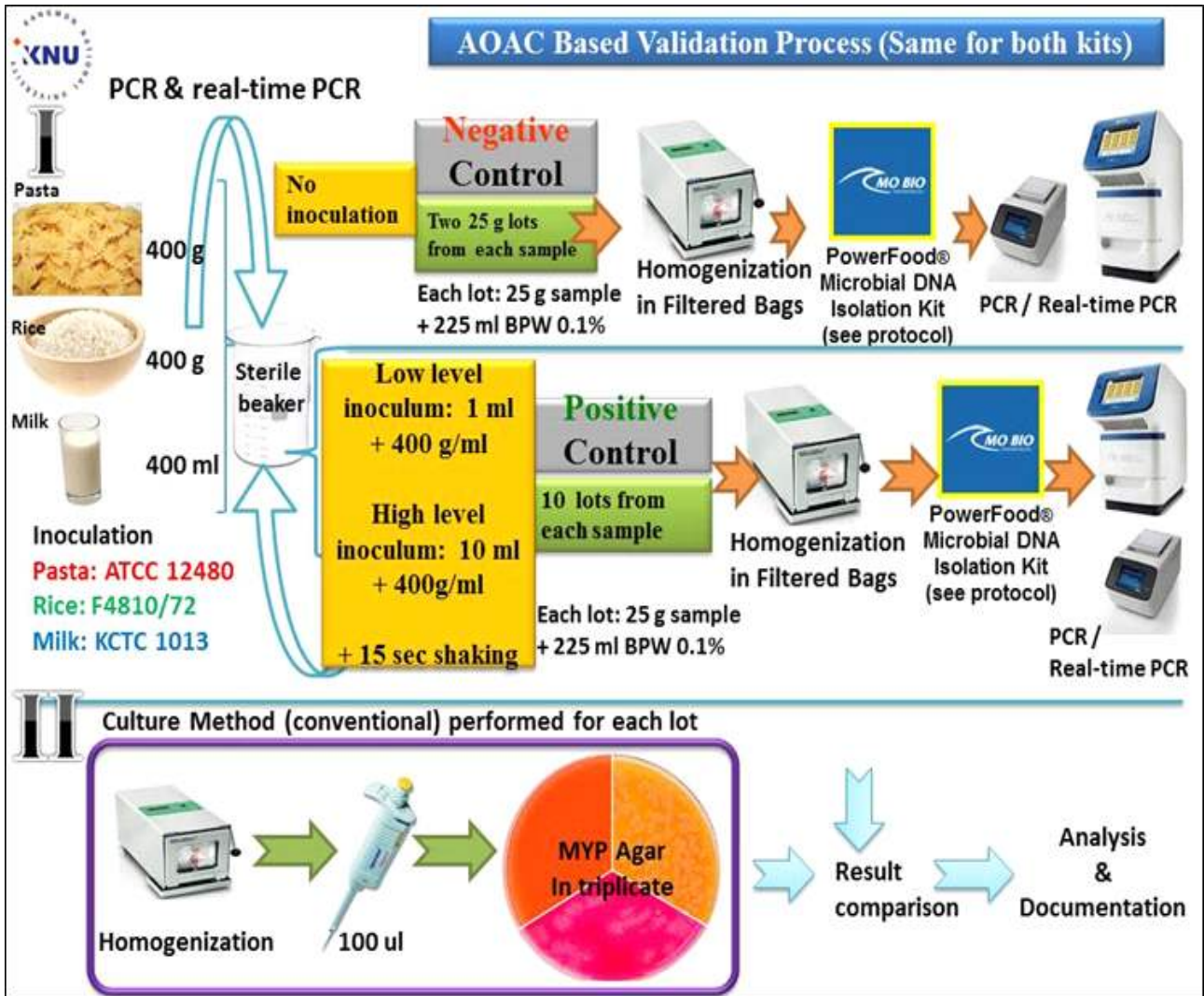


그림 3.24 개발된 키트들에 대한 AOAC에 기초한 검증을 위한 사용자 편의 프로토콜의 요약 (Brief, user friendly protocol for the AOAC based validation of multiplex PCR and multiplex real-time PCR kits.)

○ 그림 3.24의 AOAC 검증을 위한 “사용자 편의 프로토콜”의 간략한 설명서.

AOAC 검증을 위한 “사용자 편의 프로토콜”

1. 먼저, 각 식품 품목(예, 밥, 우유 또는 파스타) 당 24개 시료(lots)를 준비한다.
2. 각 식품 시료 24개 중 각 두 개씩 음성 및 양성대조군으로 준비한다. 음성대조군은 세균을 접종하지 않은 것이며, 양성대조군은 세균의 순수배양액을 직접 사용한다.
3. 24개 시료들 중 10개 씩 두 가지 레벨로 해당 세균에 의해 인위접종한다. 두 가지 세트의 접종균수 표시는 다음과 같다: high level inoculum 및 low level inoculum.
4. 각 세트의 시료는 각 세균을 무작위로 접종한 후, 접종한 세균과 음식물을 잘 섞어준다.
5. 멸균 stomacher bags에 시료 밥 또는 파스타 400 그램 또는 우유 400 밀리리터를 25 g 또는 25 ml 씩 각각 나누는 후, 균질화 하기 위하여 stomacher에서 2분간 혼합한다.
6. 그 후, 이들 시료를 DNA 추출 또는 MYP 선택배지 배양법 등의 실험에 사용한다.
7. 각 키트의 프로토콜에 따라 multiplex PCR kit, multiplex real-time PCR kit를 통해 얻은 결과들 그리고 conventional culture method로부터 얻은 결과들을 AOAC formulas에 따라 분석을 수행하여 서로의 결과를 비교 분석한다.

(5) DNA 시료의 준비

- 인위오염의 집중 및 비집중의 천연 식품 시료에서의 DNA 추출은 Powerfood Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 준비함.
- 이 키트는 다양한 식품 시료에서 세균 DNA 추출에 효율적이면 신뢰할 수 있는 제품임.
- 이 키트는 제품 자체의 특정 프로토콜과 구슬-보조 DNA 추출 시스템을 사용하여 식품 시료에서 추출한 DNA의 품질과 순도를 높임. 이것은 PCR 저해제들의 제거뿐만 아니라 이 키트의 보다 확장된 DNA 추출 과정 때문임.
- 그림 3.25는 Mo Bio kit의 DNA 추출 프로토콜을 요약하여 나타냈음.
- 이 프로토콜은 모든 협력 실험실에서 수행하는 DNA 추출 과정을 동일하게 하기 위하여 그리고 실험자가 더 쉽게 이해하게 되도록 준비되었음.
- 마지막으로 각 실험실의 각 실험자들의 능력과 실험 과정의 일치화를 가능한 높이기 위하여 각 실험자들에게 개별적으로 프로토콜을 설명하였음.
- 또한, 같은 키트와 프로토콜은 현장시험(field test) 연구를 위한 naturally contaminated food samples에서의 DNA 추출에도 사용되었음.

- 1** 1) Add 1.8 ml homogenate to a 2 ml collection tube → centrifuge (13000 × g for 1 min) → decant supernatant → centrifuge again (13000 × g for 1 min) and completely remove supernatant with pipette tip carefully
- 2** Resuspend pellet in 450 ul **PF1** (PF1 should be heated to **55 °C** before use and used at **55 °C**)
- 3** Transfer to MicroBead Tube and vortex for 10 min at maximum speed and centrifuge (13000 × g for 1 min)
- 4** Carefully transfer supernatant to a new clean 2 ml collection tube (approximately 400 ul)
- 5** Add 100 ul PF2 → briefly vortex → store at 4 °C for 5 min
- 6** Centrifuge (13000 × g for 1 min) → avoiding pellet transfer supernatant to a new clean 2 ml collection tube
- 7** Add 900 ul PF3 (PF3 should be heated to **55 °C** before use and used at **55 °C**) and vortex to mix
- 8** Load 650 ul to Spin Filter → centrifuge (13000 × g for 1 min) → discard flow through and repeat with the remaining 650 ul
- 9** Place SpinFilter Basket in a clean new 2 ml collection tube
- 10** Shake PF4 well and add 650 ul of it to SpinFilter Basket → centrifuge (13000 × g for 1 min)
- 11** Discard flow through and add 650 ul PF5 → centrifuge (13000 × g for 1 min) → (13000 × g for 2 min)
- 12** Place SpinFilter in a new 2 ml collection tube
- 13** Add 100 ul PF6 to center of filter → (13000 × g for 1 min) → discard FilterBasket → DNA is ready to use

그림 3.25 식품 시료에서 DNA 추출법을 위한 사용자 편의 프로토콜의 요약 (Brief, user friendly protocol for the DNA extraction from food samples using Mo Bio Powerfood Microbial DNA Isolation Kit.)

(6) AOAC 검증 실험 (AOAC Validation experiments)

- 모든 실험은 그림 3.24에 기술한 프로토콜에 따라 수행되었음.
 - 보다 자세하게 기술하면, 식품 matrix를 고려한 식품과 *B. cereus* 균주는 다음과 같음: 파스타에는 *B. cereus* ATCC 12480, 우유에는 KCTC 1013, 밥에는 F4810/72 균주를 접종
 - 접종한 세균 농도는 다음 3가지 조건임:
 1. low level inoculation은 세균수 15~30 CFU/25 g 시료
 2. high level inoculation은 세균수 150~300 CFU/25 g 시료
 3. uninoculated negative control은 0 CFU/25 g 시료
 - 각 식품 시료 400 g에 각 세균 균주 적당량을 접종한 후 섞어서 혼합시킴.
 - 혼합한 시료를 각 25 g씩 무작위로 나누어 담은 후 225 ml 0.1% buffered peptone water (BPW)를 멸균 bag에 넣은 후, Stomacher에서 2분간 균질화 시킴(homogenized)
 - 각 시료를 균질화한 후, 각 시료의 균질액 1 ml을 DNA 추출을 위하여 그리고 같은 시료의 균질액 0.1 ml을 MYP agar plate에 도말하기 위하여 사용함.
 - 각 시료로부터 추출한 DNA는 multiplex PCR kit 및 multiplex real-time PCR detection kit의 DNA 시료로 사용함.
 - 각각의 실험 조건과 음식에 따라 얻어진 결과들은 아래 기술한 통계 방법에 따라 분석하였음.
 - 각 실험실에서 각 식품에 대한 특정 농도별 접종 시료들에 대한 3가지 분석방법으로부터 얻은 결과들을 표로 정리하여 원천자료(raw data)로 사용함.
 - 이들 결과들은 한 실험실에서 수행된 3가지 다른 분석 방법들에 대하여 그리고 다른 실험실에서의 결과들과도 비교분석함.
- ※ 실험 결과의 분석 (Analysis of raw data)
- 새로 개발한 방법과 MYP 배지를 사용한 표준 방법으로부터 얻은 결과들의 통계적 유의성을 평가하기 위하여 Analysis of variance (ANOVA)를 사용하여 분석하였음
 - 통계 프로그램은 IBM SPSS Statistics Version 19 (SPSS Inc., IBM Co.)를 이용하였음.
 - Tukey's multiple range test를 사용하였으며, 차이에 대한 통계적 유의성을 $P \leq 0.05$ 로 정의하였음.

(7) 식품에서의 오염도 분석 (Analysis of naturally contaminated foods)

- 쌀을 포함한 식품은 *B. cereus* 오염의 주요 원천 중의 하나임 (Agata et al., 1995). 볶음밥은 *B. cereus* 구토 식중독의 약 95%와 연관이 있음 (Jensen et al., 2003).
- 설사 식중독보다 구토 식중독의 빈도가 낮지만, 구토 식중독도 건강에 유해하고, 드물게는 간 손상과 사망까지 일으킬 수 있으므로 아직 중요한 문제임 (Rosenquist et al., 2005, Ladeuze et al., 2011). 그러나 *B. cereus* 은 자연계에 널리 존재하며, 거의 대부분의 식물이나 동물 유래 식품에서 발견됨 (Forghani et al., 2015).
- 그러므로, *B. cereus* 오염과 연관된 7가지 식품을 선택하여 자연 오염도를 평가하였음. 강원도 춘천에서 이들 식품들에 대한 *B. cereus* 오염도에 대한 예비 조사를 수행하였음.
- 쌀, 김밥, 고기, 두부, 시금치, 상추, 토마토 등 각 식품 당 15개 시료를 강원도 춘천 소재의 소매상, 슈퍼, 음식점에서 구입하여 바로 실험실로 운반하여 *B. cereus* natural contamination을 측정하였음.
- 총 105 시료에 대하여 각 시료 당 3 가지 검출방법(multiplex PCR kit, multiplex real-time PCR kit 및 MYP agar culturing method)을 수행하였음.
- 간략하게 묘사하면, 각 시료 25 g을 225 ml TSB 배지를 넣고 2분간 균질화한 후, 1.8 ml의 균질액을 MO BIO Powerfood Microbial DNA Isolation Kit를 이용한 DNA 추출에 사용하고, 0.1 ml을 MYP plating method에 사용함.
- 또한 남은 균질액을 30°C에서 24 시간 증균 배양한 후, 3 가지 검출 방법을 수행함. 모든 실험은 2회 반복으로 수행함.
- DNA 추출 후, 각 DNA는 conventional PCR 및 real-time PCR에 사용하고, 각 MYP 한천배지는 30°C, 24시간 배양하여 potential *B. cereus*를 검출함. 각 검출방법의 결과들을 서로 비교하여 전통적인 방법과 새로 개발된 PCR 방법의 효율을 평가함.
- 또한 그 결과들은 local food에 대한 *B. cereus*의 오염도를 모니터링 하는 자료로 사용될 수 있음.

다. 개발된 PCR 키트들에 대한 AOAC 검증 결과들

- ◆ 실험재료 및 방법에서 설명한 AOAC protocol에 따라 본 연구에서 개발된 multiplex conventional PCR kit 및 multiplex real-time PCR kit의 검증 시험을 수행하였음.
- ◆ 3개의 독립된 실험실들에서 독립적으로 검증 시험을 수행한 결과, 개발된 multiplex real-time PCR 키트의 성능이 제일 우수한 것을 검증됨.
- ◆ 두 PCR kits에서 얻은 결과를 conventional culture method에서 얻은 결과와 비교분석하여 새로 개발된 PCR 방법들의 상업적 스케일의 제품 키트들의 효율을 검증하였음.

(1) 제1실험실의 AOAC 검증 결과들

- 표 3.28은 제1실험실(강원대)에서 수행된 AOAC 검증 방법에 사용된 3 가지 식품(쌀, 파스타, 우유)으로부터 얻은 원천자료임.
- 그림 3.26은 구토 표준균주 F4810/72를 접종한 밥에서 AOAC 가이드라인에 따라 개발된 PCR kit들의 검증과정으로부터 얻은 결과의 일부를 보여줌.(제1실험실)
- 그림 3.27은 장독소 표준균주 ATCC 12480을 접종한 파스타에서 AOAC 가이드라인에 따라 개발된 PCR kit들의 검증과정으로부터 얻은 결과의 일부를 보여줌(제1실험실 결과).
- 표 3.29는 제1실험실에서 수행한 세 가지 검출 방법의 결과를 요약하여 나타냄.
 - 1) multiplex PCR detection kit의 결과(mPCR)
 - 2) multiplex real-time PCR HRM kit의 결과(rtPCR)
 - 3) conventional MYP agar method의 결과(MYP)

* 이 결과들에 대하여 통계적 유의성을 각 결과 값(숫자) 위에 알파벳으로 표시함.

(가) low level of inoculum의 경우

- 식품 시료 중 우유와 밥에서 multiplex PCR detection kit 및 multiplex real-time PCR HRM detection kit의 결과는 conventional MYP agar method 보다 통계적으로 유의하게 더 민감하였음($p \leq 0.05$).
- 식품 시료 중 파스타에서 low level of inoculum의 경우, MYP agar method 와 multiplex real-time PCR detection kit의 결과는 같은 민감도(sensitivity)를 보인 반면, 이들의 결과는 multiplex PCR detection kit의 결과 보다 더 민감한 것으로 나타났음.

- 이 결과는 실험자의 실험 오차일 수 있으므로 앞으로 다른 실험실에서의 결과들을 취합하여 더 많은 시료에서 데이터를 얻어 비교 분석할 필요가 있음.
- 현재의 데이터를 기반으로 분석할 경우에도, low level inoculum의 파스타에서 multiplex PCR detection kit는 양성이 4개이고, MYP method는 양성이 6개이므로, multiplex PCR detection kit는 66% 이상의 검출 효율을 나타냈으며 MYP 방법이 2~3일이 필요한 것에 비하여 multiplex PCR detection kit는 1일 이내에 결과를 얻을 수 있음을 고려해야 함.
- 또한, 2차년도 결과에서 평가한 것처럼, 7시간 증균 과정을 통합하면 개발된 multiplex PCR kit의 민감도는 1 log CFU/g식품 까지 증가할 수 있을 것임.

(나) high level of inoculum의 경우

- 식품 시료 밥과 우유에서는 세 가지 검출 방법의 결과들 모든 인위접종 시료에서 세균의 검출이 이루어졌음.
- 식품 시료 파스타의 경우, multiplex PCR detection kit 와 multiplex real-time PCR detection kit 는 8개 의 시료에서, MYP agar method는 9개의 시료에서 양성으로 나타났으나, 이 차이는 통계적으로 유의하지 않았음.
- 일반적으로, high level of inoculum의 경우에는 세 가지 방법 모두에서 오염된 모든 시료에서 목표 세균의 검출이 성공적으로 이루어지나, low level of inoculation의 경우에는 각 검출 방법의 민감도 차이를 평가하기에 더 유용한 것으로 나타났음.

(다) 각 검출방법의 특이도(specificity) 비교분석

- conventional PCR kit 및 real-time PCR kit의 primer sets(제1, 제2 및 제3 프라이머 세트들, 2절의 결과) 실험에서 이들 프라이머 세트들의 PCR 특이도가 높음을 보여주었으며, conventional PCR 및 real-time PCR kits에 대하여 평가하였음.
- AOAC guideline에 따르면, 음성대조군 및 양성대조군 또한 AOAC 검증 과정에 포함되어 있음.
- 본 실험의 결과, 새로 개발된 두 키트 방법과 전통적 MYP agar 방법에서 음성 대조군(목표 세균 비접종 식품)에서는 음성으로 나타났으며, 반면에, 양성대조군에서는 모두 양성 결과를 얻었음(표 3.28).

- 이러한 결과는 식품 시료에 상관없이 동일하였음.
- 그러므로 multiplex PCR detection kit, multiplex real-time PCR detection kit 및 conventional method 모두에서 같은 특이도를 나타냈음.
- 결론적으로, 제1실험실에서 수행한 AOAC 검증 결과는 본 과제에서 개발된 두 가지 방법들 (multiplex PCR *B. cereus* detection kit 그리고 multiplex real-time PCR HRM *B. cereus* detection kit)은 MYP agar 배지를 사용하는 전통적인 방법보다 식품 시료에서 *B. cereus* 오염을 검출하기 위한 방법으로 더 민감하고, 더 적용범위(sensitivity and working capacity)가 높은 것으로 평가됨.

표 3.28 본 연구에서 사용한 3가지 다른 음식 시료에서 얻어진 검증 결과들 (Raw data obtained from the validation of 3 different foods (rice, milk, pasta) in laboratory number 1 (Kangwon National University)).

Sample		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	
Rice Low	MYP	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
	PCR	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
	rtPCR	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
Rice High	MYP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	rtPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pasta Low	MYP	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
	PCR	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	rtPCR	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
Pasta High	MYP	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
	PCR	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	rtPCR	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
Milk Low	MYP	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	PCR	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
	rtPCR	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
Milk High	MYP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	rtPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+

* -: negative result. +: positive result. rtPCR: real-time PCR

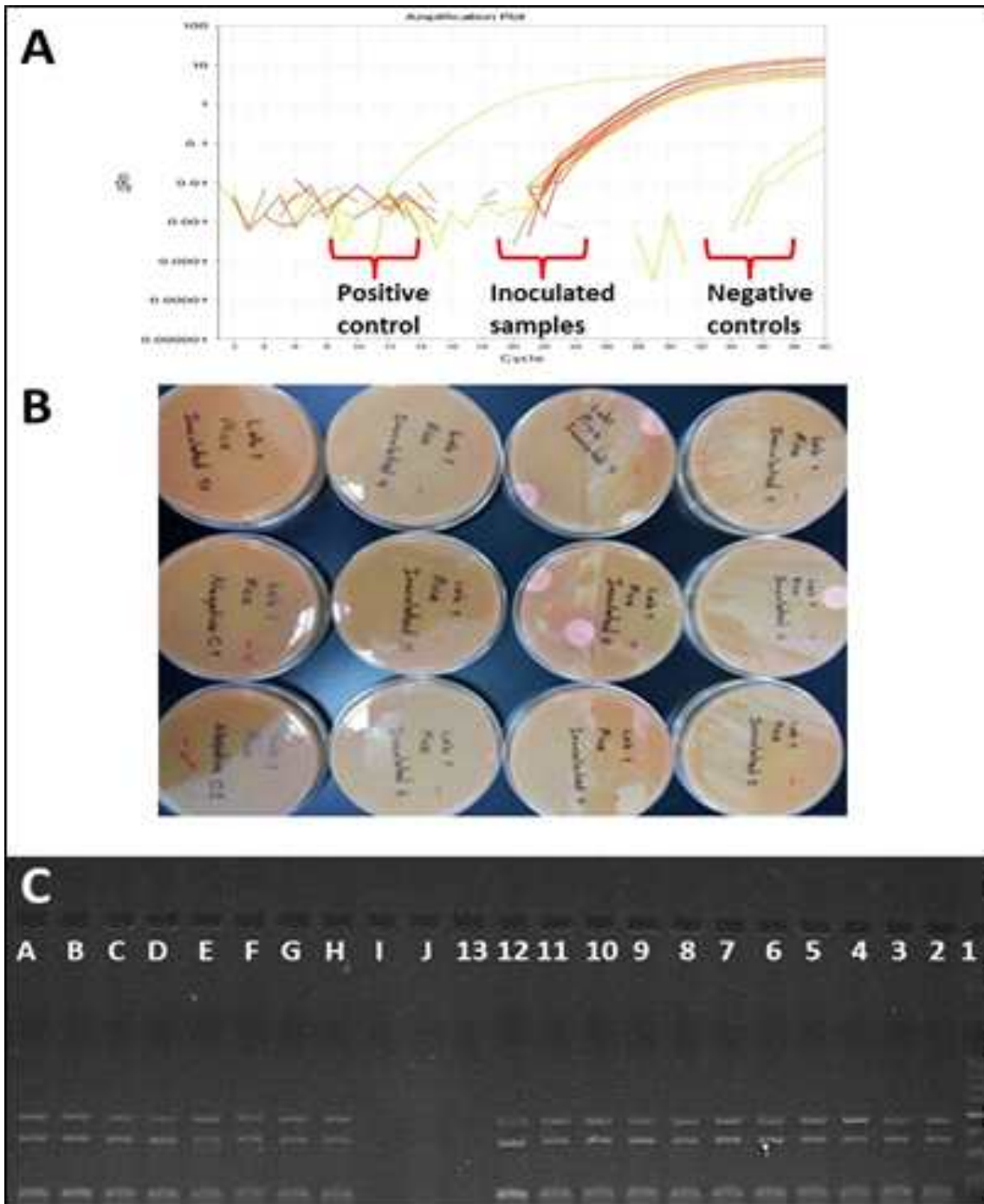


그림 3.26 *B. cereus* F4810/72에 대한 식품 시료(밥)에서의 AOAC 검증 결과. AOAC validation results for rice inoculated with *B. cereus* F4810/72. A) amplification plot for positive control, negative controls and inoculated samples (high inoculum, F4810/72 reference strain) using the multiplex real-time PCR HRM detection kit; B) MYP agar results for low level inoculum (3 positives); C) multiplex PCR detection kit results: Lane 1: ladder, Lane 2-11: high level inoculated samples, Lane 12: positive control, Lane 13: negative control, Lane A-J low level inoculated samples in laboratory number 1 (Kangwon National University).

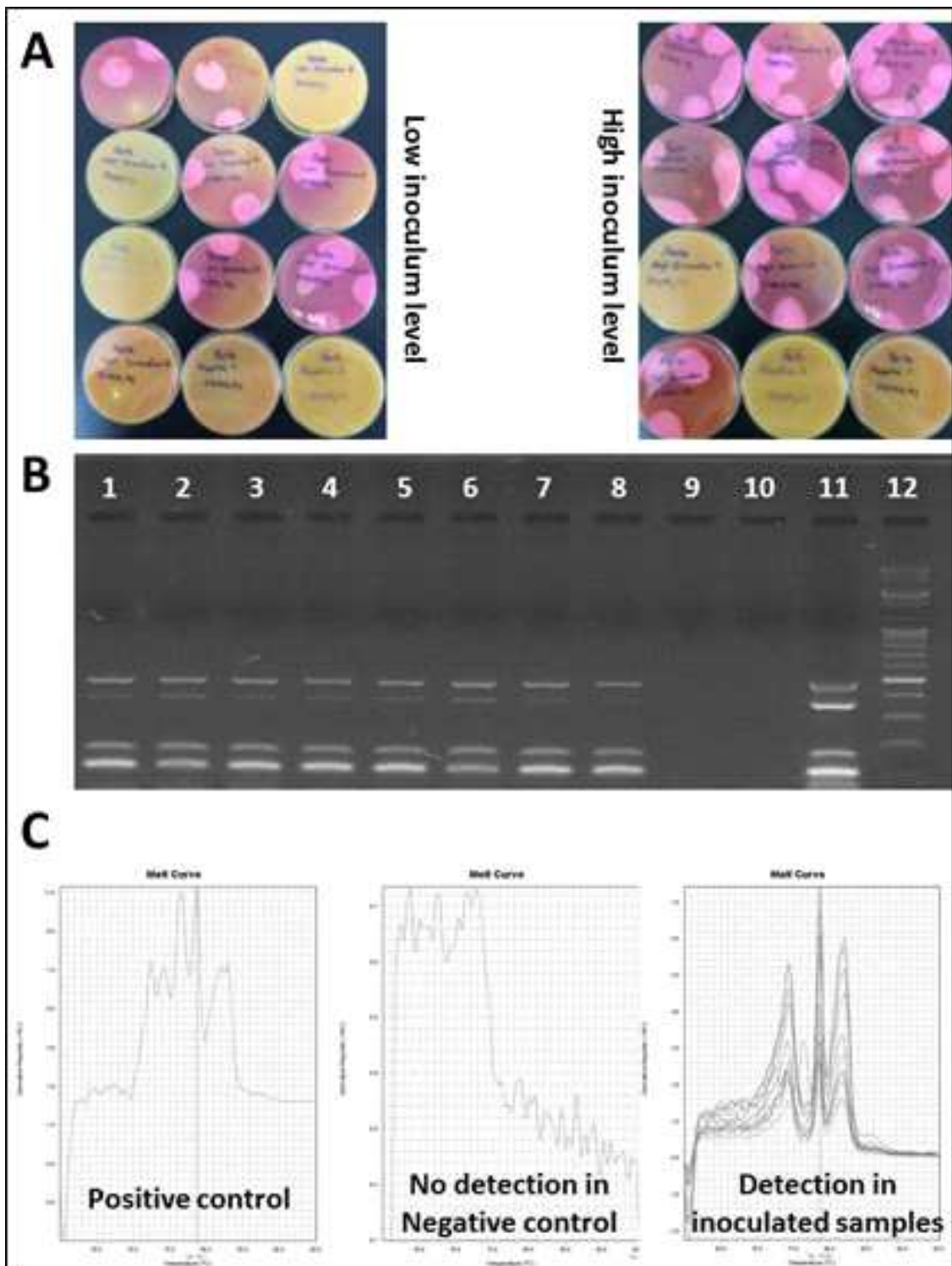


그림 3.27 *B. cereus* ATCC 12480에 대한 식품 시료(파스타)에서의 AOAC 검증 결과. AOAC validation results for pasta inoculated with *B. cereus* ATCC 12480 12480 in laboratory number 1 (Kangwon National University). A) results of MYP agar conventional method in high (9 positives) and low (6 positives) level inoculum; B) multiplex PCR detection kit results: Lane 1-10: inoculated samples; Lane 11: positive control; Lane 12: ladder; C) multiplex real-time PCR detection kit results in StepOne™ machine.

표 3.29 제1실험실에서 수행한 3가지 검출방법에 대한 결과의 종합 (Summarized results for multiplex PCR kit, multiplex real-time PCR kit and MYP agar culture method in laboratory number 1, Kangwon National University).

Food sample		Pasta (ATCC 12480)		Rice (F4810/72)		Milk (KCTC 1013)	
		positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives
Low inoculum	MYP	6 ^b	4	3 ^a	7	2 ^a	8
	PCR	4 ^a	6	8 ^b	2	5 ^b	5
	rtPCR	7 ^b	3	7 ^b	3	5 ^b	5
High inoculum	MYP	9 ^a	1	10 ^a	0	10 ^a	0
	PCR	8 ^a	2	10 ^a	0	10 ^a	0
	rtPCR	8 ^a	2	10 ^a	0	10 ^a	0

*Numbers labeled with different letters for each inoculation level of every individual food represent a significant difference.

(2) 제2실험실의 AOAC 검증 결과들

- 제2실험실에서 각 실험 방법에 따라 얻어진 원천자료들을 양성 및 음성 결과로 나누어 표 3.30에 나타냄.
 - 1) multiplex PCR detection kit의 결과(mPCR)
 - 2) multiplex real-time PCR HRM kit의 결과(rtPCR)
 - 3) conventional MYP agar method의 결과(MYP)

* 이 결과들에 대하여 통계적 유의성을 각 결과 값(숫자) 위에 알파벳으로 표시함.
- 제2실험실에서 얻은 결과들은 3 가지 검출 방법들 모두의 결과가 거의 비슷하거나 같으므로 유사한 또는 같은 수준의 민감도를 보인다고 할 수 있음.
- low inoculum의 경우, 식품 시료 파스타에서 MYP는 8/10, multiplex PCR kit는 10/10, multiplex real-time PCR kit 는 9/10 시료에서 양성으로 나타나 MYP보다 두 PCR 방법이 더 민감한 것으로 나타남(그림 3.28, 3.29 및 표 3.30). 식품 시료 밥의 경우 MYP와 rtPCR의 경우 10/10인데 반하여 PCR은 6/10으로 나타나 상대적으로 multiplex PCR kit가 민감도/효율이 낮은 것으로 나타남 (이 결과는 제1실험실의 결과와는 일치하지 않음.). 시료 우유에서의 결과는 3 방법 모두 10/10으로 결과가 같았음.
- high inoculum의 경우 세 가지 방법 모두 10/10 양성을 보이므로 AOAC 가이드라인에서 무작위적인 접종을 하되, 양성과 음성의 결과가 모두 나타나도록 접종 레벨을 조절하도록 추천하고 있음. 세 가지 검출방법 모두 다 같은 결과(100% 양성)를 나타내므로 이들 사이의 결과의 차이가 없어 비교분석을 할 여지가 없음.
- 전체적으로 제2실험실의 결과가 제1실험실의 결과보다 더 많은 양성을 보이는데 이것은 균주의 접종 레벨의 차이로 분석됨.
- 또 다른 가능성은 각 실험자의 실험 오차 및 실험기기들의 성능에 따른 오차를 가정할 수 있음.
- 그러나, AOAC 검증 방법은 한 실험실에서 얻어진 각 검출방법들에 대한 비교분석이므로 각 실험실 사이의 결과의 직접적 비교는 의미가 없음.
- 두 실험실에서 얻어진 3가지 분석방법들의 효율은 대체적으로 서로 유사한 결과를 나타냄.
- 결론적으로, 제1 및 제2실험실은 다른 실험환경(지역, 실험실, 실험자, 실험기기 등)을 가지지만, 두 실험실에서 수행된 AOAC 검증 실험 결과는 서로 일치하거나 거의 유사하므로 상호보완적임.

표 3.30 제2실험실에서 수행한 3가지 검출방법에 대한 결과의 종합 (Summarized results for multiplex PCR kit, multiplex real-time PCR kit and MYP agar culture method for AOAC validation in laboratory number 2, Korea Agricultural Center).

Food sample		Pasta (ATCC 12480)		Rice (F4810/72)		Milk (KCTC 1013)	
		positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives
Low inoculum	MYP	8 ^a	2	10 ^b	0	10 ^a	0
	PCR	10 ^b	0	6 ^a	4	10 ^a	0
	rtPCR	9 ^{ab}	1	10 ^b	0	10 ^a	0
High inoculum	MYP	10 ^a	0	10 ^a	0	10 ^a	0
	PCR	10 ^a	0	10 ^a	0	10 ^a	0
	rtPCR	10 ^a	0	10 ^a	0	10 ^a	0

*모든 식품의 각 접종레벨에서 세 가지 검출방법에 대한 수치들에 다른 알파벳으로 표시되면 이 수치는 서로 통계적으로 유의한 차이를 나타냄. (Numbers labeled with different letters for each inoculation level of every individual food represent a significant difference.)

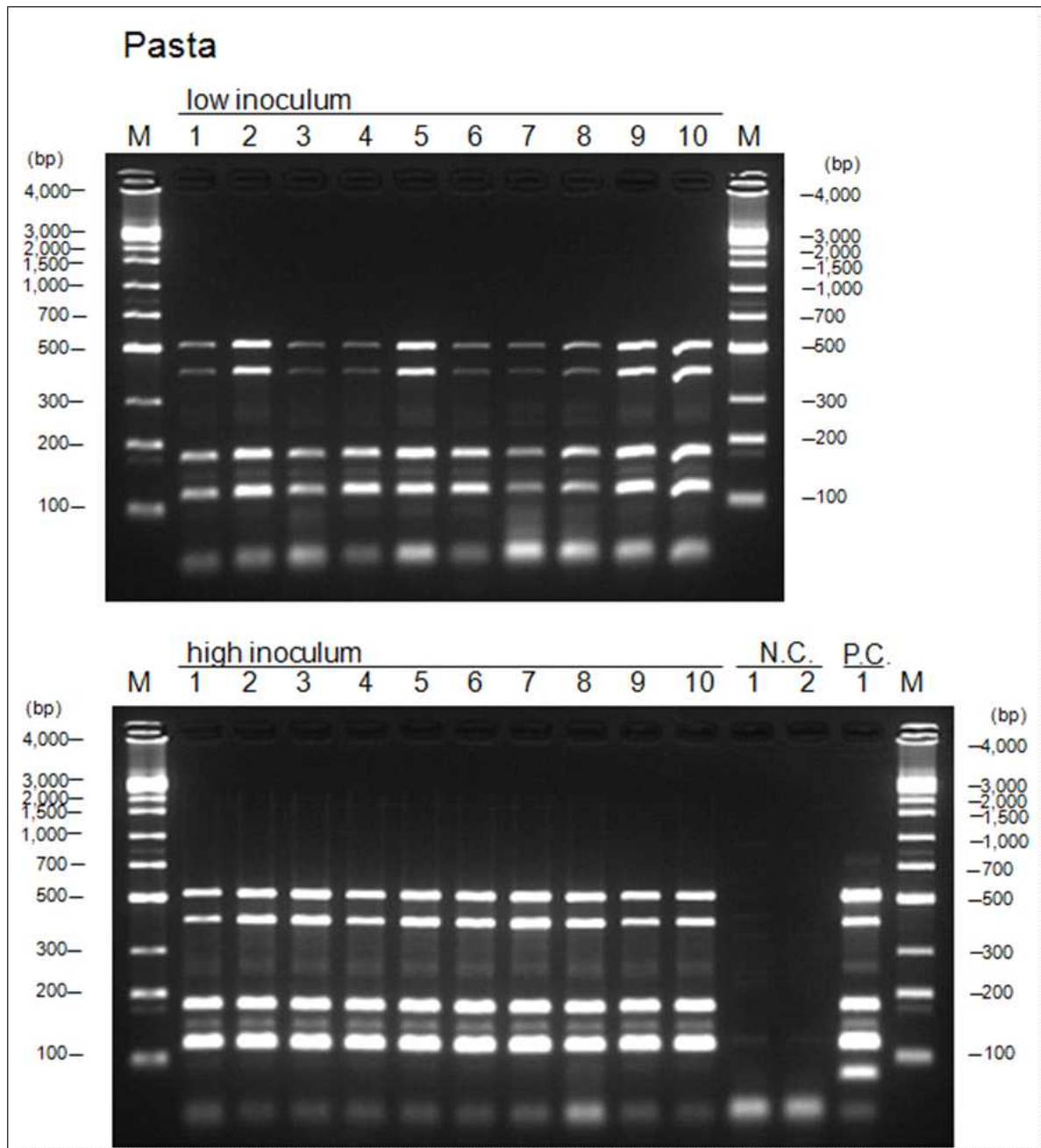


그림 3.28 제2실험실에서 수행된 multiplex PCR detection kit에 대한 AOAC 검증 실험 결과들. multiplex PCR detection kit AOAC validation results for pasta inoculated with *B. cereus* ATCC 12480 in low and high inoculum levels in laboratory number 2 (Agricultural Research Center).

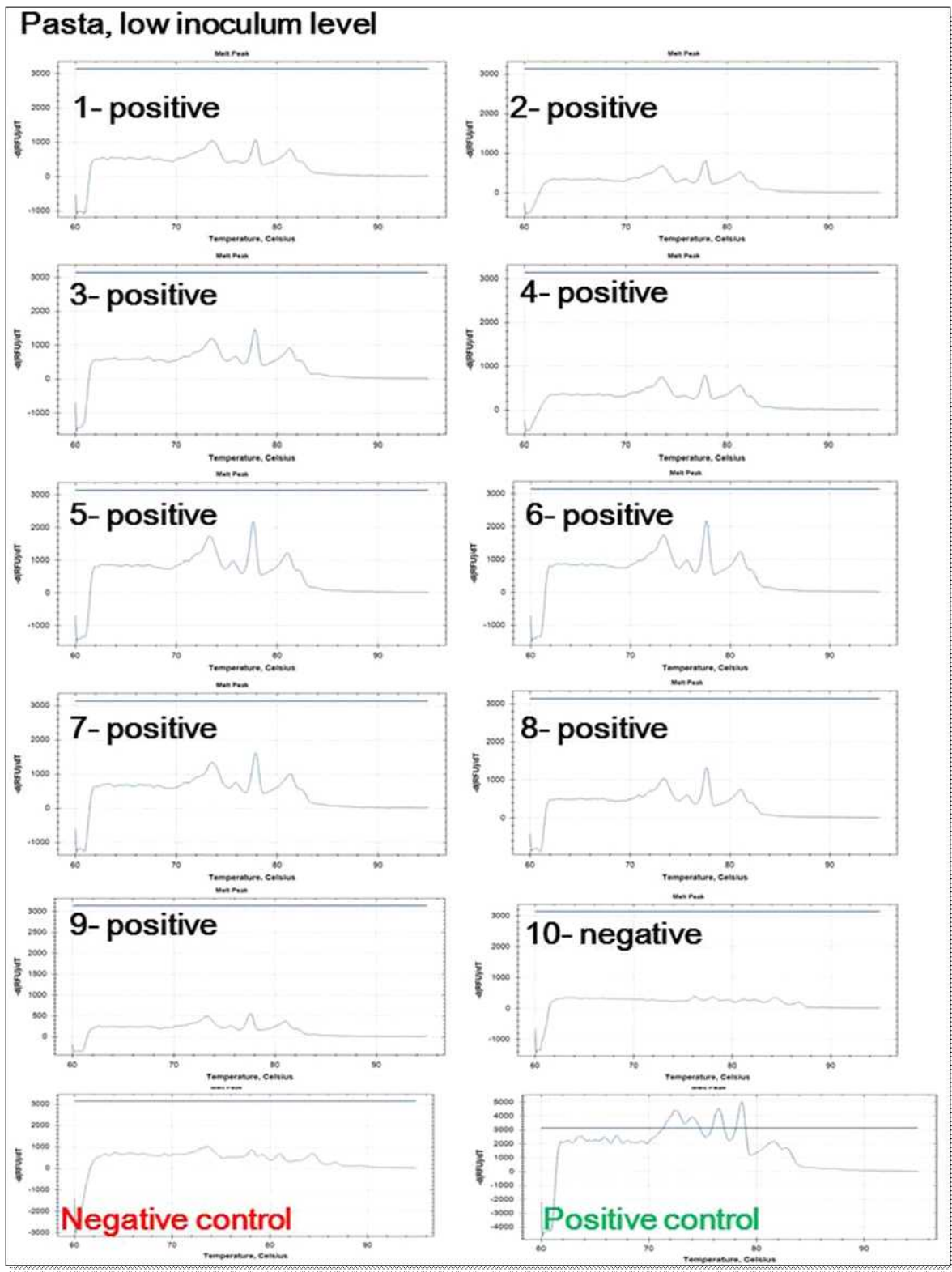


그림 3.29 제2실험실에 수행된 AOAC 검증 실험 결과들. (AOAC validation results for pasta inoculated with *B. cereus* ATCC 12480 in low inoculum level using multiplex real-time PCR kit in laboratory number 2.)

(3) 제3실험실의 AOAC 검증 결과들

- 제3실험실에서 각 실험 방법에 따라 얻어진 원천자료들을 양성 및 음성 결과로 나누어 표 3.31에 나타냄.
 - 1) multiplex PCR detection kit의 결과(mPCR)
 - 2) multiplex real-time PCR HRM kit의 결과(rtPCR)
 - 3) conventional MYP agar method의 결과(MYP)

* 이 결과들에 대하여 통계적 유의성을 각 결과 값(숫자) 위에 알파벳으로 표시함.
- 그림 3.30과 3.31은 식품 시료 파스타에 대한 low 및 high inoculum 시료들에 대한 multiplex PCR detection kit의 결과를 보여줌.
- 제3실험실에서 인위접종한 모든 시료에서 3가지 검출방법의 결과들은 모두 양성을 나타냈음. 이것은 초기 접종균수가 너무 많음을 의미함. AOAC 프로토콜에 의거한 low inoculum 및 high inoculum의 인위접종 경우, 둘 중 한 경우에서 음성 및 양성의 비율이 비슷하게 나오도록 초기 균수의 양을 조절하여야 함.
- 음성대조군과 양성대조군 시료에서는 예상한대로 각각 모두 음성과 양성 결과를 나타냈음 (표 3.31).
- AOAC 검증 방법은 한 실험실에서 얻어진 각 검출방법들에 대한 비교분석이므로 각 실험실 사이의 결과의 직접적 비교는 큰 의미가 없음.
- 결론적으로, 제1, 제2 및 제3 실험실은 다른 실험환경(지역, 실험실, 실험자, 실험기기 등)을 가지지만, 세 실험실에서 수행된 AOAC 검증 실험 결과는 서로 일치하거나 거의 유사하므로 상호보완적임.
- multiplex PCR detection kit, multiplex real-time PCR detection kit 및 conventional method 모두에서 같은 특이도를 나타냈음.
- 본 과제에서 개발된 두 가지 방법들 (multiplex PCR *B. cereus* detection kit 그리고 multiplex real-time PCR HRM *B. cereus* detection kit)은 MYP agar 배지를 사용하는 전통적인 방법보다 식품 시료에서 *B. cereus* 오염을 검출하기 위한 방법으로 더 민감하고, 더 적용범위(sensitivity and working capacity)가 높은 것으로 평가됨.

표 3.31 제3실험실에서 수행한 3가지 검출방법에 대한 결과의 종합 (Summarized results for multiplex PCR kit, multiplex real-time PCR kit and MYP agar culture method for AOAC validation in laboratory number 3, Konkuk University).

Food sample		Pasta (ATCC 12480)		Rice (F4810/72)		Milk (KCTC 1013)	
		positives	negatives	positives	negatives	positives	negatives
Low inoculum	MYP	10 ^a	0	10 ^a	0	10 ^a	0
	PCR	10 ^a	0	10 ^a	0	10 ^a	0
	rtPCR	10 ^a	0	10 ^a	0	10 ^a	0
High inoculum	MYP	10 ^a	0	10 ^a	0	10 ^a	0
	PCR	10 ^a	0	10 ^a	0	10 ^a	0
	rtPCR	10 ^a	0	10 ^a	0	10 ^a	0

*모든 식품의 각 접종레벨에서 세 가지 검출방법에 대한 수치들에 다른 알파벳으로 표시되면 이 수치는 서로 통계적으로 유의한 차이를 나타냄. (Numbers labeled with different letters for each inoculation level of every individual food represent a significant difference.)

Pasta,

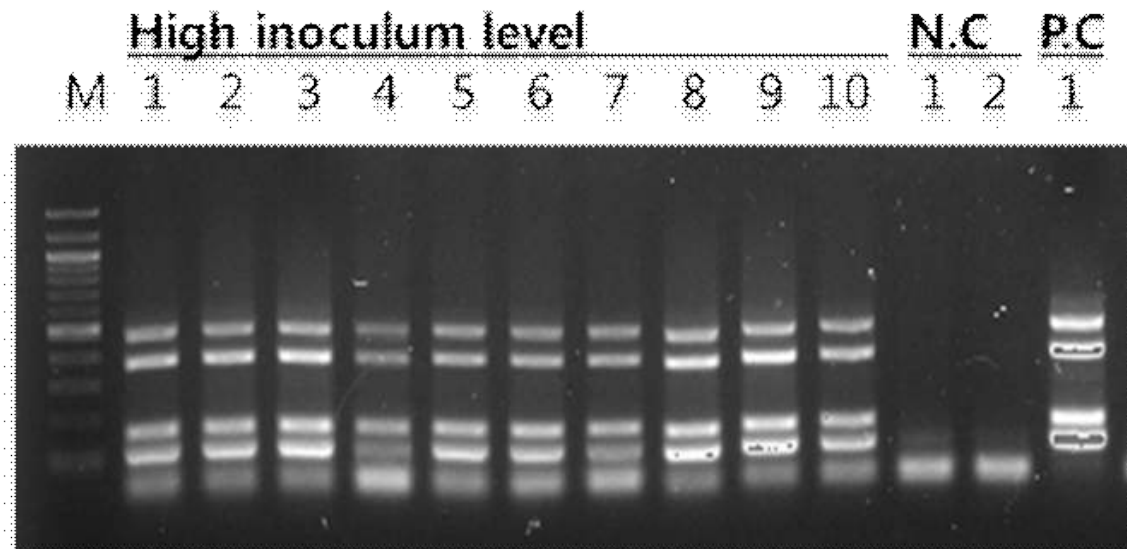
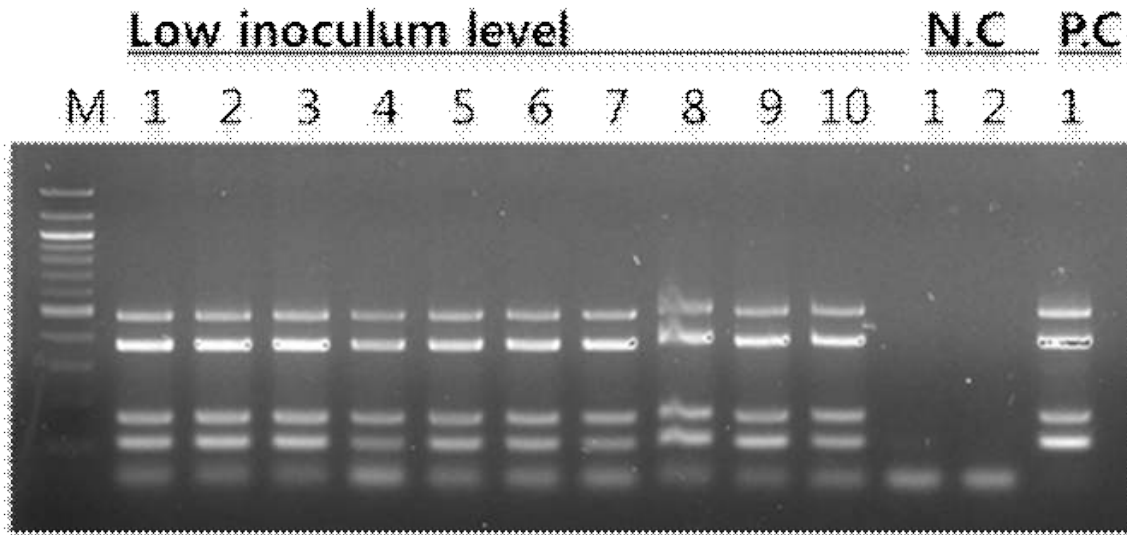


그림 3.30 제3실험실에서 수행된 multiplex PCR detection kit에 대한 AOAC 검증 실험 결과들. AOAC validation results for pasta inoculated with *B. cereus* ATCC 12480 in laboratory number 3 at high and low level inoculum (Konkuk University).

Pasta, Low inoculum level

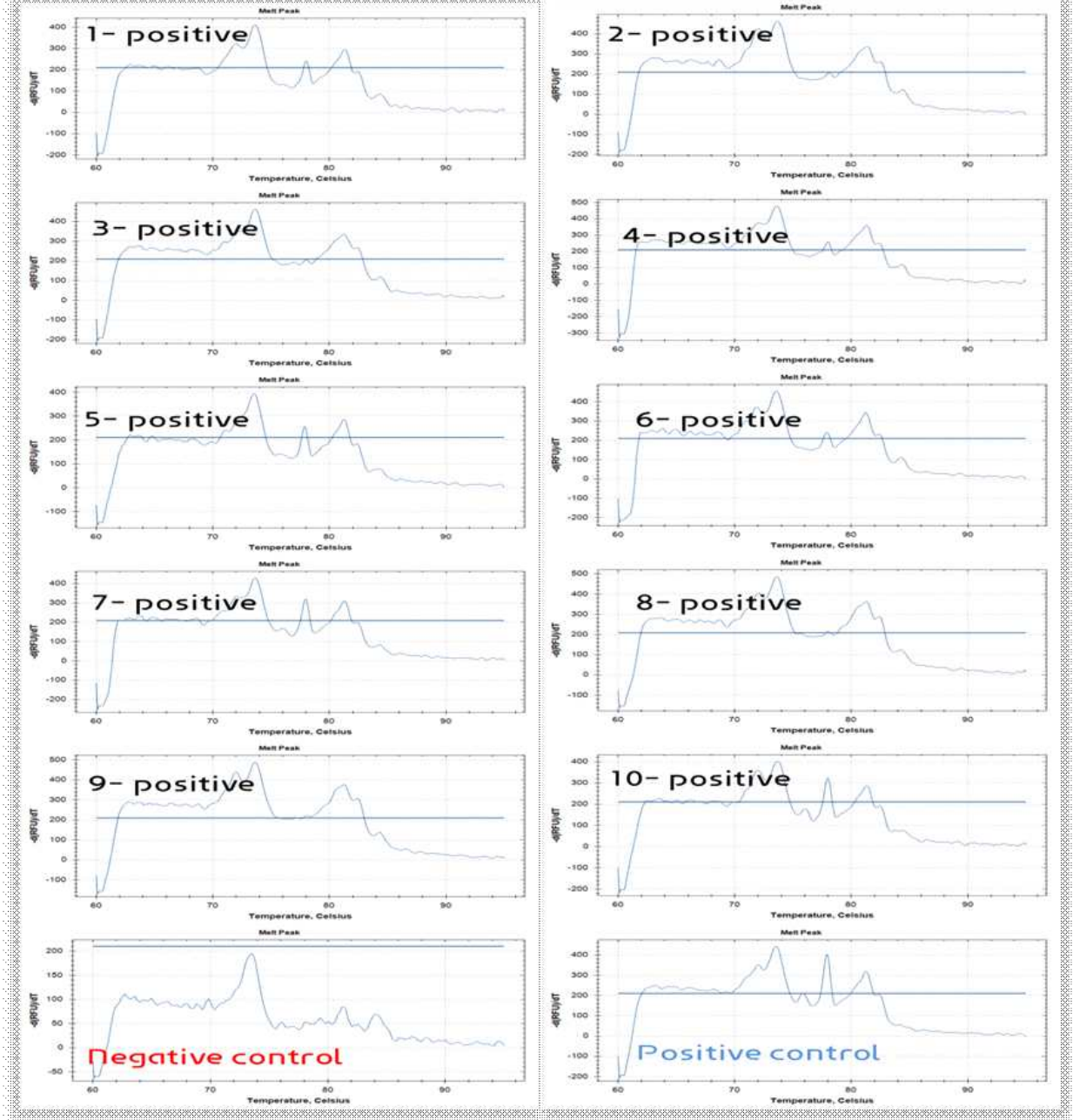


그림 3.31 제3실험실에 수행된 AOAC 검증 실험 결과들. AOAC validation results for pasta inoculated with *B. cereus* ATCC 12480 in low inoculum level using multiplex real-time PCR kit in laboratory number 3 (Konkuk University).

라. 자연적 오염된 식품에서의 개발된 키트의 성능 분석

- 7가지 식품(쌀, 김밥, 돼지고기, 두부, 시금치, 상추, 토마토)을 선택하고 각 식품 종류 당 15개 시료를 취하여 총 105 시료에 대하여 *B. cereus*의 존재를 모니터링 하여 그 오염도 결과를 나타냄(표 3.32).
- 모든 시료들은 증균 전 및 후(30, 24 시간 증균 배양)로 구별하여 MYP (MYP selective agar), PCR (multiplex conventional PCR), rtPCR (multiplex real-time PCR) 등 3가지 검출방법으로 모니터링 하였음.

(1) 김밥의 경우

- 총 15개 김밥 시료에 대한 *B. cereus* 모니터링을 MYP, PCR, 및 rtPCR 키트 방법으로 수행한 결과는 증균 전에는 각각 2, 4, 및 5개가 양성 이었으며, 증균배양 후에는 9, 14, 및 12개 이었음.
- 김밥에서 *B. cereus* 모니터링의 민감도는 증균전 및 증균후 모두에서 real-time PCR kit가 가장 높았으며, 두 번째가 PCR kit이고, 가장 낮은 것이 MYP법 순서였음.
- 본 과제에서 개발한 키트들의 검출한계가 식품에서 증균 없이 약 10^3 CFU/g 이므로, 이 키트 방법에서 양성을 나타낸 식품 시료는 *B. cereus*가 10^3 CFU/g,이상으로 오염되었음을 의미하며, 증균전에는 음성이나 증균후 양성으로 나타난 시료는 *B. cereus*가 10^3 CFU/g,이하로 오염되어 있었던 것을 의미함.

(2) 육류(돼지고기)의 경우

- 총 15개 시료에 대한 *B. cereus* 모니터링을 MYP, PCR, 및 rtPCR 키트 방법으로 수행한 결과는 증균전에는 각각 3, 2, 및 3개가 양성 이었으며, 증균배양 후에는 13, 6, 및 12개 이었음.
- 그러므로 고기에서 *B. cereus* 모니터링의 민감도는 증균전 및 증균후 모두에서 real-time PCR kit와 MYP법이 가장 높았으며, PCR kit가 가장 낮았음.
- 한편, 이 모니터링 결과는 대부분의 고기가 소비자에게 허용될 수 있는 범위의 오염 수준을 가지지만, 아직 오염이 발견되므로 이것은 상당히 중요한 보건 및 식품안전의 문제가 될 여지가 있음.

(3) 두부의 경우

- 총 15개 시료에 대한 *B. cereus* 모니터링을 MYP, PCR, 및 rtPCR 키트 방법으로 수행한 결과는 증균전에는 각각 1, 4, 및 5개가 양성 이었으며, 증균후에는 13, 12, 및 13개 이었음.

- 그러므로 두부에서 *B. cereus* 모니터링의 민감도는 증균전 및 증균후 모두에서 real-time PCR kit, mPCR, MYP법 순서로 나타났음.
- 한편, 이 모니터링 결과에서 증균전과 증균후의 양성 결과가 매우 차이가 나므로, 대부분의 두부 시료에는 적은 수의 *B. cereus* 오염이 존재하는 것을 의미함.
- 이러한 오염 정도는 두부를 바로 생식하거나 요리하여 섭취하는 경우 안전하다는 것을 의미함.

(4) 시금치의 경우

- 총 15개 시료에 대한 *B. cereus* 모니터링을 MYP, PCR, 및 rtPCR 키트 방법으로 수행한 결과는 증균전에는 각각 8, 9, 및 9개가 양성 이었으며, 증균후에는 각각 14, 15 및 15개 이었음.

(5) 상추의 경우

- 총 15개 시료에 대한 *B. cereus* 모니터링을 MYP, PCR, 및 rtPCR 키트 방법으로 수행한 결과, 증균전에는 각각 7, 5, 및 13개 이었으며, 증균후에는 각각 6, 12, 및 13개 이었음.
- 그러므로 시금치와 상추에서 3가지 검출 방법의 민감도는 증균전 및 증균후 모두에서 real-time PCR kit, mPCR, MYP법 순서로 나타났음.
- 시금치와 상추의 경우, 김밥, 고기 및 두부와 비교하여 상대적으로 증균전 높은 오염도를 나타냄. 이것은 상추나 무 등 신선채소류의 식품이 토양에 직접 노출되므로 토양미생물인 *B. cereus*에 대해 더 높은 오염 가능성을 가지는 것으로 추론됨.

(6) 쌀의 경우

- 총 15개 시료에 대한 *B. cereus* 모니터링을 MYP, PCR, 및 rtPCR 키트 방법으로 수행한 결과는 증균전에는 각각 2, 3, 및 9개가 양성 이었으며, 증균후에는 각각 13, 10 및 11개 이었음.
- 그러므로 증균전과 증균후의 3가지 검증 방법의 민감도는 다르게 나타났으나 증균전 및 증균후 모두에서 real-time PCR kit법이 가장 높은 민감도를 나타냈음.

(7) 토마토의 경우

- 총 15개 시료에 대한 *B. cereus* 모니터링을 MYP, PCR, 및 rtPCR 키트 방법으로 수행한 결과는 증균전에는 각각 2, 0, 및 8개가 양성 이었으며, 증균후에는 각각 4, 2 및 8개 이었음.
- 그러므로 증균전 및 증균후 모두에서 real-time PCR kit법이 가장 높은 민감도를 나타냈음.

(8) 종합적 결론

- 종합적으로, 검출방법의 민감도는 multiplex real-time PCR kit가 가장 높았으며, 다음으로 multiplex PCR kit, 그리고 전통적 배지배양법(여기선 MYP plating) 순이었음. 대부분의 경우 새로 개발된 PCR kit 방법들이 전통적인 MYP 방법보다 더 높은 민감도를 나타냈음. 그러나 몇몇 경우에는 MYP가 multiplex PCR kit보다 더 높은 민감도를 보여주었음.
- 그러나 새로 개발된 PCR kit 방법은 민감도뿐만 아니라 여러 장점들이 있음. 그중에 하나는 전통적인 plating 방법보다 특이도가 훨씬 더 높다는 것임. 앞선 논의에서 나타난 것처럼 multiplex PCR kit 및 multiplex real-time PCR kit에서 양성인 결과는 100% *B. cereus* 균주에 해당함(제1절 및 2절 결과)(Forghani et al., 2015).
- 대조적으로 MYP 한천 배지나 대부분의 다른 선택배지에서 양성인 경우, 이것은 일차적인 결과로써 *B. cereus*일 확률이 매우 높지만 완전히 확정하기 위해서는 API 방법이나 다른 분자 DNA 방법 등 더 많은 동정/검출 방법을 필요로 함 (Forghani et al., 2014; Forghani et al., 2015; Kim et al., 2015).
- 전통적 배지법의 또 하나 약점은 식품 시료에는 비표적 세균들(정상세균총)이 높은 농도로 존재하여 때로는 표적세균인 *B. cereus*의 증식을 저해하여 위음성을 나타낼 수도 있음.
- 새로 개발된 PCR 방법의 또 다른 장점은 오염된 시료의 독성 프로파일을 얻을 수 있다는 것임. 두 PCR 방법 모두 주요 장독소 유전자 4가지(*nheA*, *entFM*, *hblD* and *cytK*)와 구토 독소 유전자(*ces*)를 검출할 수 있음.
- 이러한 능력은 전통적인 배지방법에서는 불가능하며, 전통적 배지법에서 양성인 시료일지라도 그 시료(세균)가 독성유전자를 가지고 있는지 여부를 알 수 있는 방법이 없음.
- multiplex PCR의 이런 장점은 특히 의학적 적용, 환경적 연구, 및 전염병학적 연구에 매우 유용함.
- 자연적 오염된 식품에서 *B. cereus* 오염도를 시험할 때, 몇몇 경우 증균 없이 수행한 real-time PCR kit는 증균후 수행한 MYP 한천배지법 보다 더 민감한 것으로 나타났음.
- 7시간 증균후 개발된 PCR kit의 검출한계가 10^1 CFU/g 식품 정도로 낮아진다는 결과를 고려할 때, 식품 시료에 대하여 7시간 증균후 DNA를 추출하고 개발된 검출 키트 법을 적용하면 전통적인 배지법보다 높은 민감도를 가진 결과를 얻을 수 있을 것임.

표 3.32 MYP 배지법, multiplex PCR kit 및 Multiplex real-time PCR kit 등 3가지 검출방법을 이용하여 식품에서 *B. cereus* 오염 모니터링 결과들 (Results of the monitoring of foods using conventional MYP agar culture method, multiplex PCR conventional kit and multiplex real-time PCR kit.)

Kimbab	Without enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	2/15	
	PCR	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	4/15	
	real-time PCR	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	5/15
	With enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	9/15	
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	14/15	
real-time PCR	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	12/15	
pork Meat	Without enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	3/15	
	PCR	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	2/15	
	real-time PCR	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	3/15	
	With enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	13/15	
	PCR	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	6/15	
real-time PCR	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	12/15		
Tofu	Without enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1/15	
	PCR	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	4/15	
	real-time PCR	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	5/15	
	With enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13/15	
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	12/15	
real-time PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	13/15		
Spinach	Without enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	8/15	
	PCR	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	9/15	
	real-time PCR	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	9/15	

	With enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	14/15	
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15/15	
	real-time PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	15/15	
Lettuce	Without enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	7/15	
	PCR	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	5/15	
	real-time PCR	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	13/15	
	With enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	6/15	
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	12/15	
	real-time PCR	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	13/15	
Rice	Without enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2/15
	PCR	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	3/15
	real-time PCR	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	9/15
	With enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	13/15
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	10/15
	real-time PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	11/15	
Tomato	Without enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	2/15
	PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/15
	real-time PCR	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	8/15
	With enrichment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Total	
	MYP	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	4/15
	PCR	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2/15
	real-time PCR	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	8/15	

○ 그림 3.32는 제1실험실에서 상추에 대한 전통적인 MYP 배지 방법과 개발된 PCR 방법의 결과를 보여줌. PCR kit 방법이 전통적인 방법보다 더 빠르고 더 자세한 정보를 보여준다는 것을 알 수 있음.

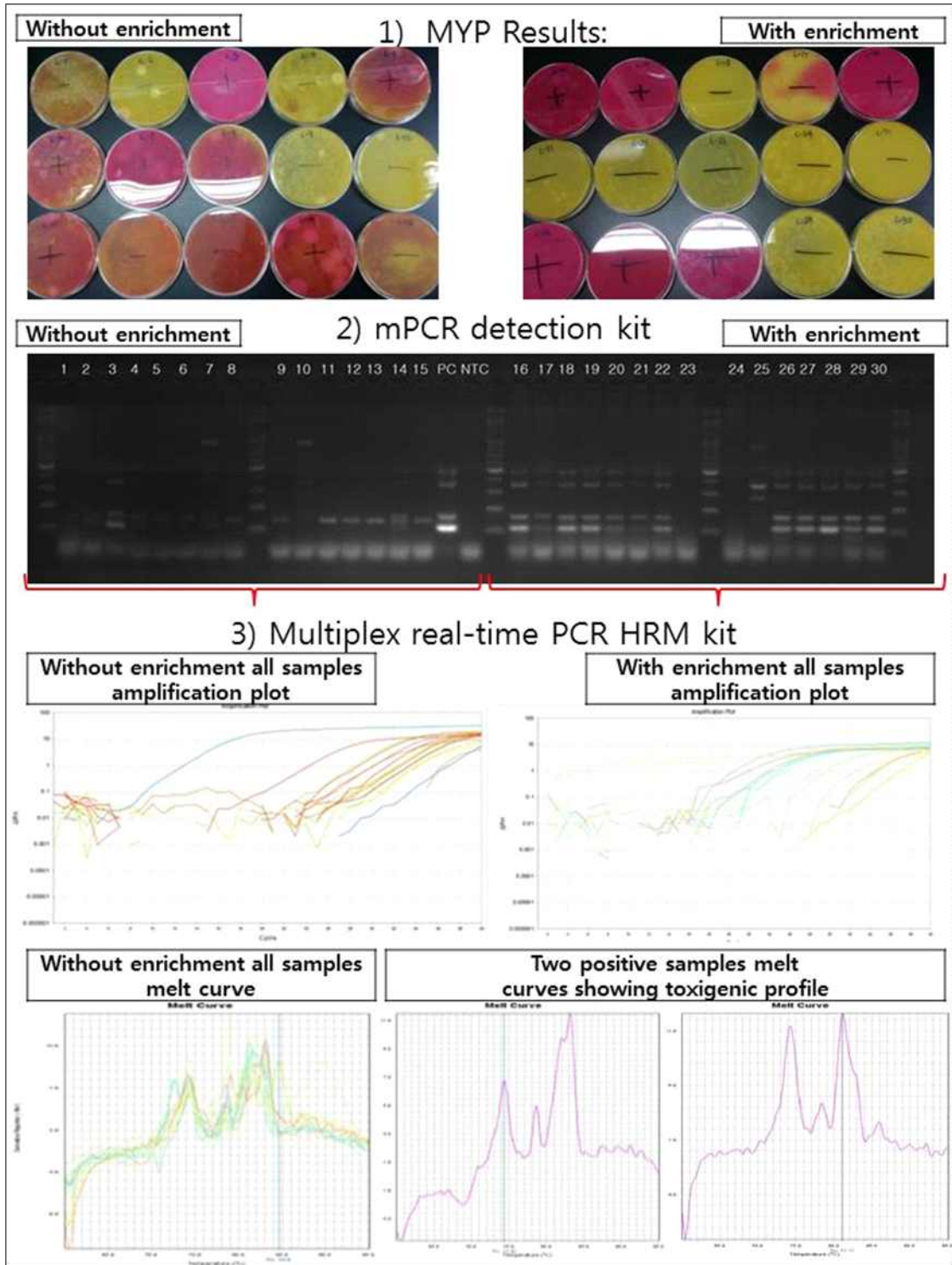


그림 3.32 상추에서 전통적 배지법, multiplex PCR kit 및 multiplex real-time PCR kit에 의한 결과들 (Results of real-time PCR kit, mPCR kit and conventional MYP agar method on lettuce.)

○ 그림 3.33은 7가지 식품 시료에 대한 증균전 및 증균후 3 가지 검출법의 결과들을 종합하여 원뿔형의 크기로 나타냄. 세 가지 방법 모두 증균전보다 증균후에서 더 높은 검출률을 나타냄.

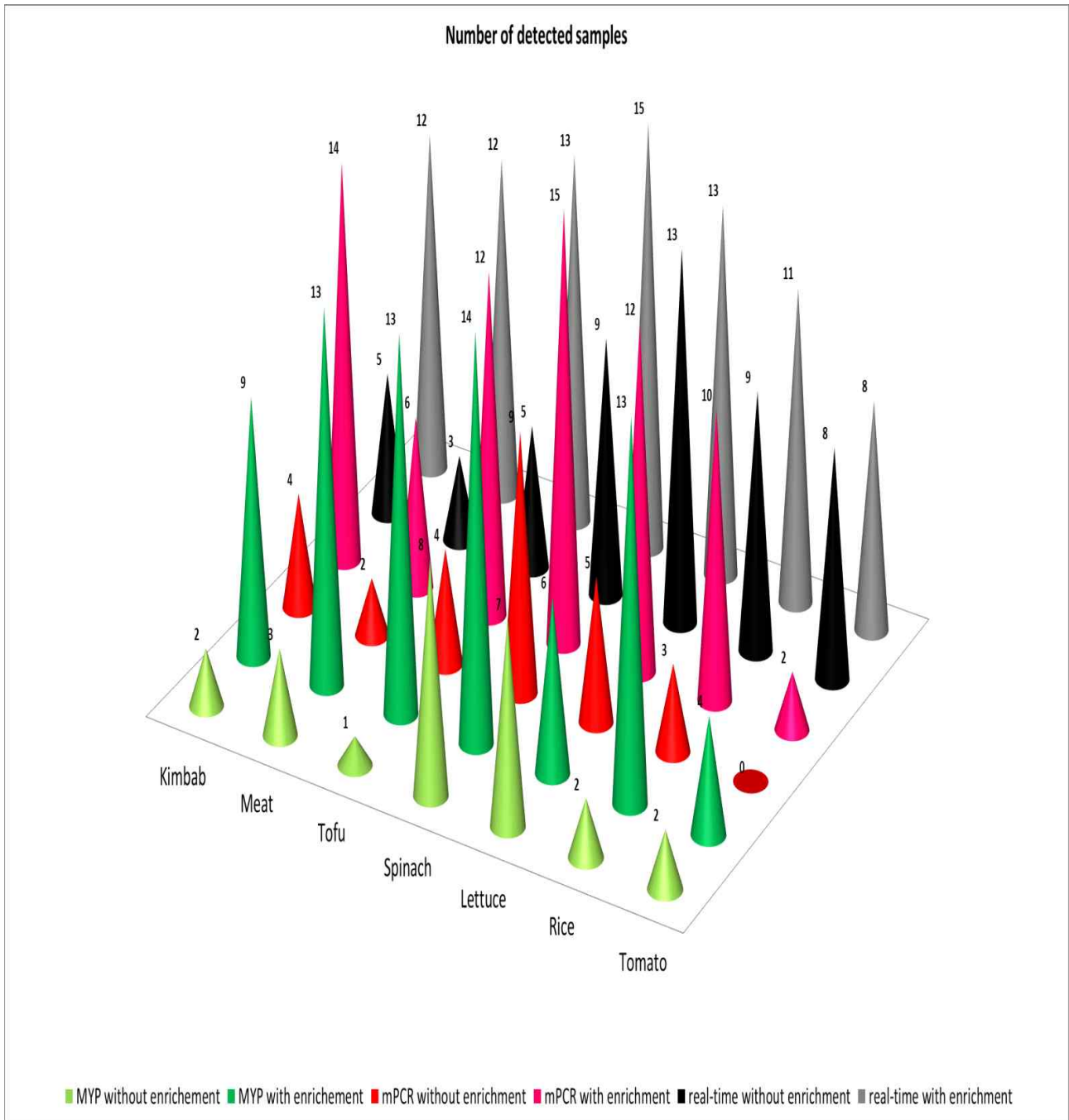


그림 3.33 7가지 식품 시료에서 자연적 오염도에 대한 증균전 및 증균후 세 가지 다른 검출방법의 시험 결과들. Detection rates in naturally contaminated foods for all food samples using the three different methods, with and without enrichment. (증균전 및 증균후 real-time PCR 결과들(흑색)이 전통 배지배양법(녹색)이나 multiplex PCR법(적색) 보다 가장 민감한 것으로 나타남에 주목하라.)

마. 결론

○ 새로 개발된 분자적 검출법들(multiplex PCR kit 및 multiplex real-time PCR kit)은 다음과 같은 이유/장점을 가지므로 전통적 선택배지 배양법(conventional culture method)의 좋은 대체 시험법이 될 수 있음:

- (1) 짧은 시간: 시험에 필요한 시간이 몇 시간 (중균전) 또는 1일 이내(7시간 중균후)
- (2) 높은 민감도: 식품 그램당 대략 10³ CFU/g (중균전), 10¹ CFU/g (중균후)
- (3) 높은 특이도: 전통적 배지법과 비교하여 위양성 및 위음성을 최소화할 수 있음.
- (4) 추가 확인시험이 필요 없음. 양성 결과를 확인하기 위하여 생화학 시험 등 추가 시험을 할 필요가 없음.
- (5) 경제성: 추가시험이 불필요하고, 할 일이 적으므로 더 경제적임
- (6) 독성유전자 프로파일 작성: 새로운 방법은 단순히 *B. cereus*를 검출할 뿐만 아니라 독성유전자 프로파일을 작성할 수 있으므로 의학적, 전염병학적, 및 환경적 연구에 도움이 될 수 있음
- (7) 기록과 문서화가 용이함: 전통적 방법보다 새로 개발된 방법에서 얻어진 결과들은 더 쉽게 문서화 할 수 있고 향후 분석을 위하여 장기간 보관할 수 있음.

제4절 5종 병원성 대장균의 특이 유전자적 마커 탐색

<요약>

- 5종 병원성 대장균 검출을 위한 PCR system의 제작을 위하여 다양한 병원성 대장균 특이 유전자 마커 및 Primer set을 Database화하여 각각의 성능을 평가하였음
- Primer 후보군 중 병원성 대장균의 검출의 성능을 평가하기 위하여 BLAST 및 *in silico* PCR amplification을 통하여 일부를 Rule-Out 하였고, 본 실험실에서 보유하고 있는 병원성 대장균 균주를 대상으로 Primer의 성능을 평가하기 위하여 민감도 및 특이도를 검증하였음.

1. 서론

- 대장균(*Escherichia coli*)은 사람 및 동물의 장내에 위해 없이 존재하는 정상세균총의 일종으로 숙주와 이로운 공생관계를 형성하며 자연계에도 널리 분포하고 있음(Bentley et al., 1982). 그러나 대장균 중 일부는 병원성 인자를 획득함으로써 사람과 동물에게 질환을 유발하게 되는데 장염, 요로감염, 패혈증, 뇌수막염 등 다양한 질병을 유발함(Nataro et al., 1998).
- 식품에서는 햄, 치즈, 소시지, 샐러드 및 오염된 고기 등 여러 종류의 식품이 원인이 될 수 있으며 물을 매개로 한 집단 발생도 가능함.
- 병원성을 나타내는 대장균은 크게 5종으로 구별할 수 있으며 독소를 형성하는 Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)과 장표면에 직접적인 영향을 나타내는 Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC), Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)으로 구별됨(McDaniel et al., 1995)(그림 4.1).
- EHEC는 사람에게서 출혈성 장염 및 급성 신장장애 용혈성 요독증후군(Hemolytic uremic syndrome)등을 유발하여 많은 문제가 되고 있다. *E. coli* O157:H7은 세계 각국에서 주요 식중독 원인균으로 여기고 있음. 주요 오염원은 완전히 조리되지 않은 쇠고기 분쇄육임.
- EPEC는 구토, 복통, 설사, 발열 증상을 나타내며 대장점막에 비침습성이며. 1세 이하의 신생에서 주로 발생하는 것이 특징임.
- ETEC는 개발도상국의 소아설사질환과 여행자 설사의 주요 원인병원체로 세계적으로 210만

명의 환자와 38만 명의 사망을 일으킴. 콜레라와 유사한 장독소(enterotoxin)를 생산하는데, 이 독소는 60°C에서 10분간 가열했을 때 활성을 잃는 이열성 장독소(heat-labile enterotoxin, LT)와 100°C에서 30분간 가열해도 내성을 나타내는 내열성 장독소(heat-stable enterotoxin, ST)로 나눌 수가 있음.

- EAEC는 HeLa 세포 등의 배양세포에 부착하는 대장균으로 다른 균은 HeLa 세포에 부착되지 않는다. 개발도상국에서 소아급성설사증을 일으키는 중요한 원인균으로 인식되어있다. 배양세포에 특징적인 응집모양을 나타내며 응집에 관여하는 응집성 부착섬모(Aggregative adherence fimbriae I:AAF/I)의 발현이 필수적임.
- EIEC는 대장점막의 상피세포에 침입해서 감염을 일으키므로 세포의 괴사 등에 의해 궤양이 형성되고 혈액과 점액이 섞인 설사를 일으키는 세균성 이질(bacillary dysentery) 증상이며 이로 인해 종종 시겔라 종(*Shigella spp*)과 혼돈을 일으킴.
- 최근에는 EAEC와 EHEC의 특성이 동시에 나타나는 병원성 대장균이 유럽에서 발생하였으며 이로 인한 피해가 4,446명의 환자와 51명의 사망자를 내었던 초대형 식중독 사고가 발생하였음 (RASFF annual report 2012).
- 병원성 대장균의 검출은 매우 어려운 편이다. 이는 전통적인 배지 검출방법으로는 병원성 대장균의 생화학적 성상이 일반 대장균과 동일하여 구별할 수 없으므로 병원성에 대한 테스트를 실시해야만 함. 그러나 이들 병원성대장균 테스트는 숙련된 전문 인력과 많은 시간이 소요됨.
- 유전정보를 이용하여 진단하는 Polymerase chain reaction(PCR)을 이용하면 각 병원성 대장균의 Virulence factor를 구성하는 유전자를 신속하고 정확하게 검출할 수 있으므로 본 연구팀에서는 PCR 기술을 사용하기 위해 5종의 병원성 대장균에 대한 특이 유전자 마커를 탐색하고자 하였음.

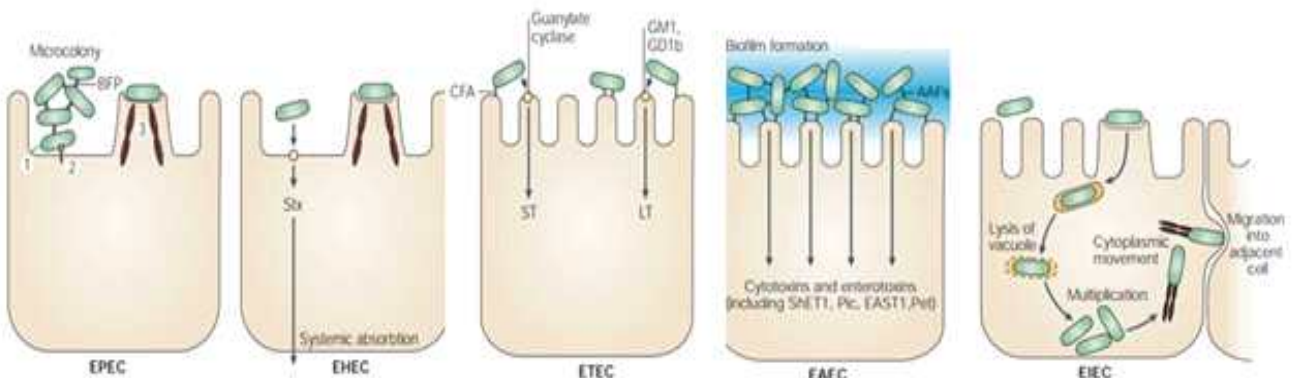


그림 4.1 병원성 대장균의 병리적 메커니즘 모식도

2. 연구 내용 및 방법

가. 5종 병원성 대장균에 대한 유전자 마커의 데이터베이스 구축

- 5종 병원성 대장균에 존재하며 검출에 이용되었던 Gene marker 중 특히 병리적 메커니즘에 영향을 미치는 특이적인 target gene에 대해서 기존에 발표된 문헌들을 참고하여 선정하였음.
- 각 병원성 대장균 타입 별로 1990년부터 2013년까지 발표되었던 논문을 Web of Science 및 Pubmed에서 SCI논문위주로 검색을 하여 Data Base를 구축하였음(그림 4.2).
- 문헌 검색을 통해 얻어진 정보 중 유전자 마커에 대한 Primer의 정보를 중심으로 Data를 정리하였으며 이 Primer의 Multiplex PCR 적용여부, 출간연도, 연구된 국가, 출간 저널, 저널 Impact factor, 해당논문 인용횟수를 파악하여 우선순위를 정하였음.

The image shows two side-by-side screenshots of academic search engines. The left screenshot is from Web of Science, displaying search results for 'Enteropathogenic Escherichia coli per'. It shows a list of articles with titles like 'Genotypic and phenotypic analysis of diarrhoeagenic Escherichia coli strains...' and 'New concepts in diagnostics for infectious diarrhea...'. The right screenshot is from Pubmed, showing search results for 'Enteropathogenic Escherichia coli per'. It displays a list of articles with titles like 'Prevalence of diarrhoeagenic virulence genes and genetic diversity in Escherichia coli strains...' and 'Isolation from faecal samples of diarrhoea-normal hosts...'. Both screenshots include search filters, article details, and citation information.

Web of science

Pubmed

그림 4.2 Web of Science 및 Pubmed를 통한 논문 검색

표 4.1 구축된 Data Base 중 EHEC에 대한 Reference paper의 정리 현황(일부)

No.	논문이름	PCR 종류	연도	국가	Journal	IF *	인용
1	Real-time multiplex PCR assay 1 and melting curve analysis for identifying diarrheagenic Escherichia coli	M **	2013	Brazil	JCM	4.153	0
2	Multiplex Real-Time PCR (MRT-PCR) for Diarrheagenic	M	2013	USA	PCR Detection of Microbial Pathogens Methods in Molecular Biology	ND	0
3	Occurrence of Virulence Genes Associated with Diarrheagenic Pathotypes in Escherichia coli Isolates from Surface Water		2013	Australia	AEM	3.829	0
4	Design of an improved multiplex PCR method for diagnosis of enterohaemorrhagic E.coli and enteropathogenic E.coli pathotypes	M	2012	Iran	Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench	0.727	0
5	Multiplex polymerase chain reaction for rapid identification of diarrheagenic Escherichia coli.	M	2012	Bangladesh	Mymensingh Med J	ND	0
6	Development of a multiplex PCR assay for detection of Shigatoxin-producing Escherichia coli, enterohemorrhagic E.coli, and enteropathogenic E.coli strains	M	2012	USA	Frontiers In Cellular and Infection Microbiology	ND	1
7	A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of enteropathogenic Escherichia coli		2012	Japan	JMM	2.086	0
8	Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for diarrheagenic Escherichia coli and Shigella spp. and its evaluation on colonies, culture broths, and stool	M	2012	USA	Diagnostic Microbiology and Infectious Disease	2.528	4
9	Simple and rapid multiplex PCR for identification of the main human diarrheagenic Escherichia coli	M	2011	Sweden	Microbiological Research	2.308	1
10	Simultaneous detection of virulence factors from a colony in diarrheagenic Escherichia coli by a multiplex PCR assay with Alexa Fluor-labeled primers	M	2011	Japan	JMM	2.086	0
11	Exhaustive isolation of diarrhoeagenic Escherichia coli by a colony hybridization method using hydrophobic grid-membrane filters in combination with multiplex real-time PCR	M	2011	Japan	LAM	1.622	1
12	Multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for simultaneous detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eae) and invasive plasmid antigen H (ipaH) genes in diarrheagenic Escherichia coli	M	2011	Iran	African Journal of Biotechnology	ND	1

* IF : Impact Factor

** M : Multiplex PCR

나. 데이터베이스 내의 Primer set에 대한 검정

- 구축된 Database내 우선 순위를 바탕으로 primer set들을 선정하였으며 병원성 대장균의 정확한 검출을 위한 방법으로 Primer에 대한 검정이 필요함.
- PCR product size, Primer의 annealing temperature, Primer 간의 간섭(예- primer-primer dimer 형성), Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)을 통하여 유전적 상동성을 검정하였으며 최종 후보군을 추려 내었음(그림 4.3).

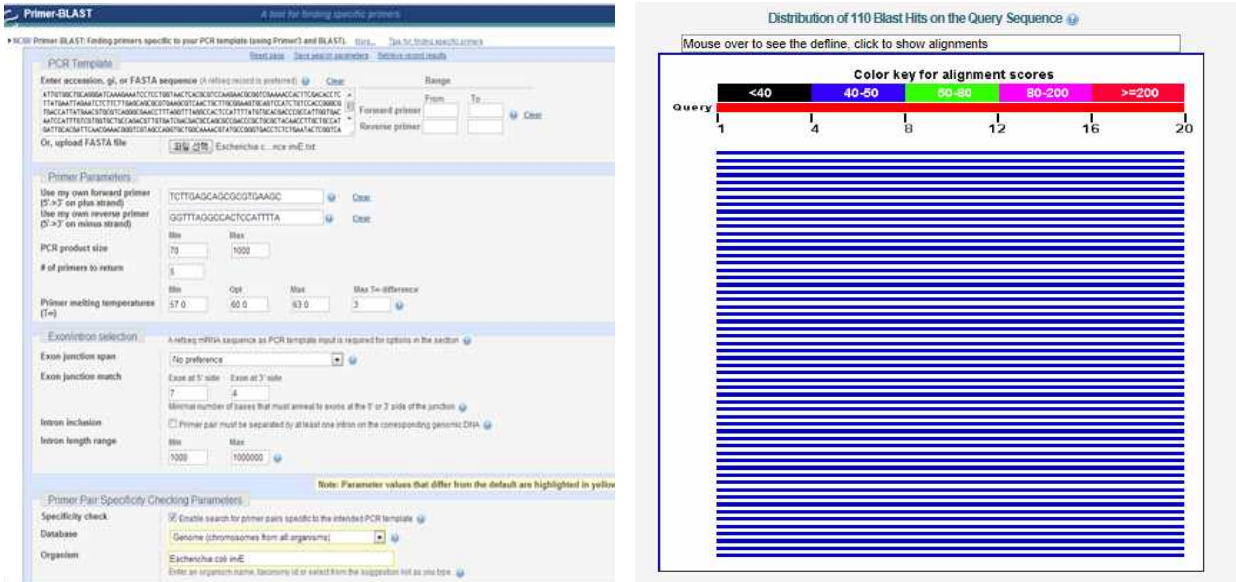


그림 4.3. Primer-blast를 이용한 primer 검정 과정

- Target gene에 대한 선별 Primer는 다음과 같은 일련의 과정을 통해 병원성 대장균의 virulence factor gene 검출에 최적화된 Primer를 선택하였음(그림 4.4).

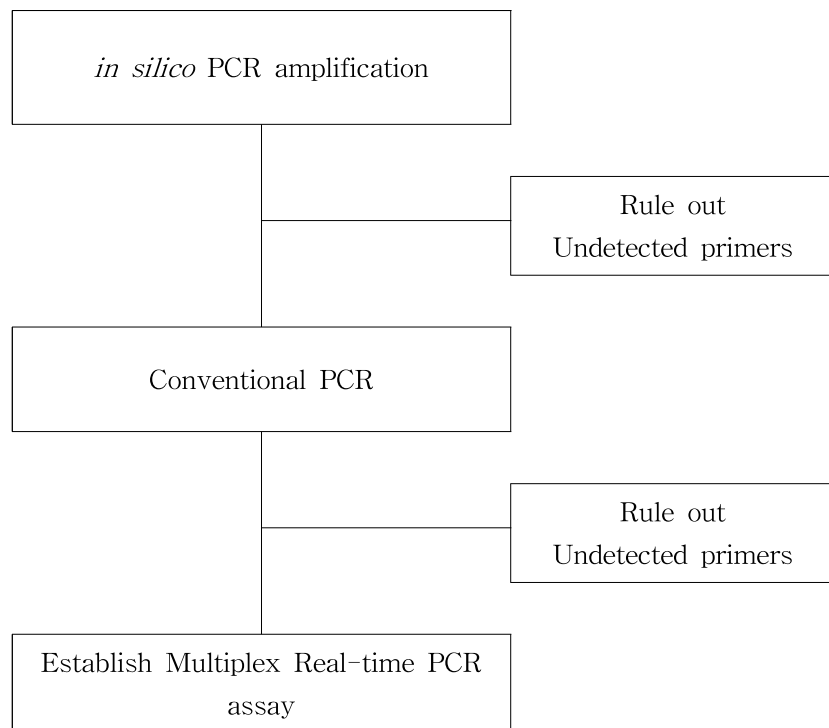


그림 4.4 Schematic diagram for Conventional PCR primer screening

- Real-time PCR을 위한 최적의 Primer와 Probe 선정 시 *in silico* PCR amplification은 Conventional PCR과 동일하게 수행하였으나 TaqMan 방식으로 제작되는 Probe의 경우 시간 및 비용적인 문제로 Primer를 우선적으로 테스트 하였음(그림 4.5).
- 이는 증폭 산물 사이에 Probe가 위치하여 높은 민감도와 특이도를 지니는 TaqMan probe 방식을 이용할 수 있기에 사용되는 검증법임. Real-time PCR에서 Primer의 검증을 위해 SYBR 방식의 Real-time PCR을 수행하였고, 이를 통해 검출능력이 떨어지는 Primer/probe set은 배제할 수 있게 됨.

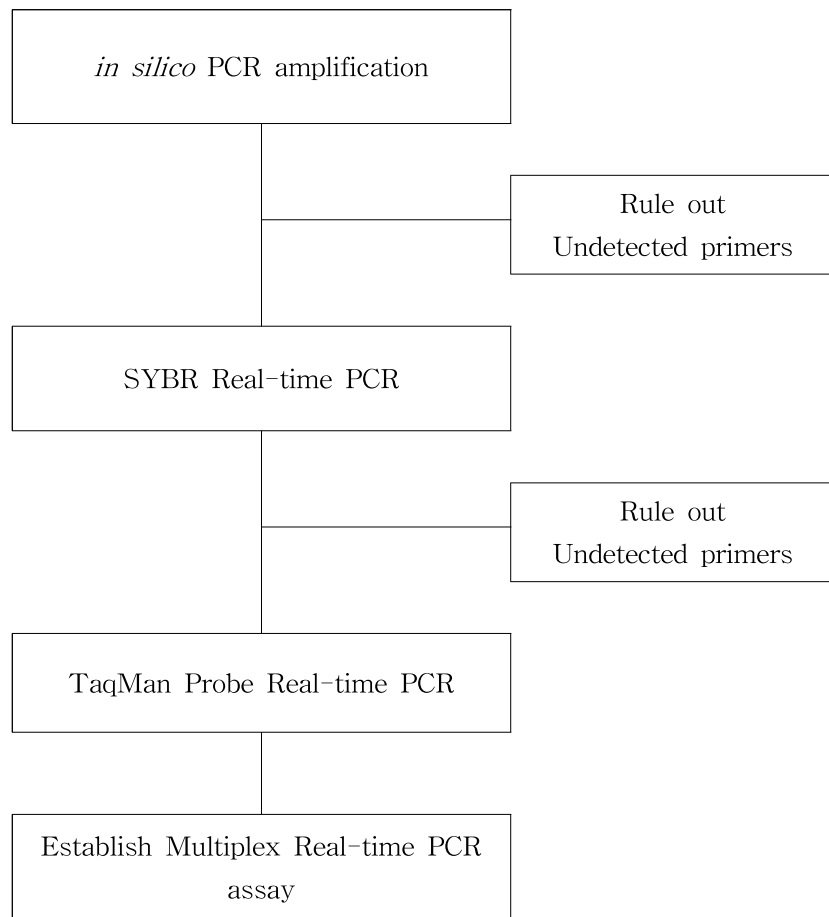



그림 4.5 Schematic diagram for Real-time PCR primer screening

- *in silico* PCR amplification은 University of the Basque Country(Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy)에서 제작한 Tool로써 NCBI에 등록된 유전자 정보를 바탕으로 프로그램을 통한 분자생물학적 실험을 시뮬레이션 할 수 있음(그림4.6).
- *in silico* server (<http://insilico.ehu.es/digest/>)를 통하여 기존 염기서열분석이 완료된 *E. coli* genomic DNA를 이용하여 선정된 primer의 PCR 결과를 미리 예측할 수 있다. 사용된 *E. coli* 균주의 목록은 *E. coli* BW2952, CFT073, DH1 및 H10407을 비롯하여 총 65종의 *E. coli* DNA정보를 이용하였다.

In silico simulation of molecular biology experiments

About, Citing this site Last update: 2015/07/30 (2760 prokaryotic genomes)



insilico.ehu.eus

Experiments against prokaryotic genomes

- PCR amplification
- Restriction digest and PFGE
- PCR-RFLP
- T-RFLP
- Double Digestion fingerprinting
- AFLP-PCR
- SAMPE
- SRE
- QDSL
- resAP-PCR
- DNA fingerprinting
- cDNA-AFLP

Microsatellite Repeats

- Find ORF by name
- Sort sequence locator

Experiments against user's sequences

- Main

Online exercises

- Design of PCR and PCR-RFLP experiments
- Counting Chamber

Restriction digest of DNA

- Translate DNA to protein
- Palindromic sequences finder
- Coloured sequences for presentations
- Discriminatory Power Calculator
- Molecular Weight Calculator
- Basic Tm calculation
- RCF / rpm conversion
- Dice + UPGMA analysis of PFGE patterns
- DNA/Protein Alignment (Smith-Waterman)
- Experiments against eukaryotic genomes
- Multiple Sequence Alignment (ClustalW)
- Primer design (Primer3)

Recommended sites:

- BacterialGenomics.org
- Biopha.org

Prokaryotic genomes: data retrieval

🔍

Strain	G+C	Length	ORFs	Graphs and data
Bacillus licheniformis 9945A	45.9	4376305	4225	

Select a different genome

2003-2015@University of the Basque Country. All rights reserved.
 This website was funded by the Spanish Ministry for Education and Science under the Programme CONSOLIDER-INGENIO 2010








그림 4.6 *in silico* Simulation 홈페이지

○ 실제 임상에서 분리된 wild type 균주를 이용하여 Primer의 검증을 위해 질병관리본부 및 서울시보건환경 연구원으로부터 5종 병원성대장균 균주들을 요청하였으며 총 63개의 병원성 대장균을 분양 받았다. 이를 이용하여 선정된 Primer 및 추가적인 검증 실험을 진행하였음 (그림 4.7과 표 4.2).

미생물 균주 분양 신청

1. 신청인 정보

성명: 서 건 호 (건국대학교 수의과대학 부교수)

주소: 서울시 광진구 회양동 건국대학교 수의과대학 수의공중보건학 실험실 (504호)

전화번호: 02-450-4121

2. 분양 개요

목적: 과제 수행을 위한 PCR primer등의 검증 실험에 필요한 균주 분양

과제명: 독소 생성 바실러스 세레우스 및 병원성 대장균 신속동시검출 및 제어기술 개발

총연구기간: 2012.12.01 ~ 2015.11.30

연구지원기관: 농림부-농림수산식품기술기획평가원

3. 미생물 균주 분양신청목록

번호	균주	수량	비고
1	Enteropathogenic E. coli (EPEC)	15	균주 정보 요청
2	Enterotoxigenic E. coli (ETEC)	20	*
3	Enteroinvasive E. coli (EIEC)	15	*
4	Enteraggregative E. coli (EAEC)	20	*
5	Enterohemorrhagic E. coli (EHEC)	10	*

* 각 균의 확인된 각 병원성 유전자 정보, 혈청형(serotype), 검출대상(source) 목록 첨부 요청

2013년 4월 9일
신청인 서 건 호 (서명 또는 인)

질병관리본부장 귀하

그림 4.7 정부기관으로의 각 병원성대장균 균주분양신청 (질병관리본부)

표 4.2 병원성 대장균 보유 현황

	질병관리본부	서울시보건환경연구원	합계
EPEC	12	3	15
EHEC	8	3	11
EAEC	11	3	14
EIEC	5	3	8
ETEC	12	3	15
Total	48	15	63

3. 연구 결과

가. 5종 병원성 대장균에 대한 유전자 마커

- 구축된 데이터베이스 중 가장 순위가 높았던 병원성 특이 마커 유전자에 대한 정보는 다음 표 4.3과 같음.

표 4.3 선정된 각 병원성 대장균에 특이적인 target gene의 역할

Pathotype	Target gene	Location of gene	Description
EIEC	<i>ipaH</i>	Plasmid	EIEC의 virulence plasmid에 존재하며 EIEC가 장상피세포에 침투할 수 있도록 조절
EAEC	<i>aggR</i>	Plasmid	chromosomal gene의 주 전사조절 인자
	<i>LT</i>	Plasmid	heat-labile toxin 암호화
ETEC	<i>STh</i>	Plasmid	heat-stable toxin 암호화
	<i>STp</i>	Plasmid	heat-stable toxin 암호화
EPEC	<i>eaeA</i>	Chromosome	intimin의 구조 유전자로 병변에 부착 역할
	<i>bfp</i>	Plasmid	bundle-forming pili의 암호화
EHEC	<i>stx1</i>	Phage	shiga-like toxin 1 암호화
	<i>stx2</i>	Phage	shiga-like toxin 2 암호화
<i>E. coli</i>	<i>lac Y</i>	Chromosome	Lactose permease 암호화
	<i>16s</i>	Chromosome	Ribosome 암호화
	<i>rRNA</i>		

- 추가적으로 Entero Invasive *Escherichia coli*의 병원성 유전자인 *ipaH*는 *Shigella spp*의 병원성 유전자와 염기서열이 유사하여 *ipaH*의 검출만으로는 *E. coli*와 *Shigella spp*를 구분할 수가 없음.
- 이러한 문제점을 해결하기 위하여 균의 Species에 대한 Housekeeping 유전자를 마커로 사용하여야 한다. Species에 대한 House keeping 유전자는 균의 분류에 사용되며 주로 *16s rRNA*가 마커로 사용됨.
- 그러나 *Shigella spp*와 *Escherichia coli*의 *16s rRNA*는 99%의 상동성을 보이고 있음(Chen et al., 2011). 따라서 추가적으로 *Shigella spp*와 *Escherichia coli*와의 구별을 위해서는 두 종간의 차이를 나타내는 유전자 마커가 필요하였음(그림 4.8).
- 본 연구에서는 *Shigella spp*가 lactose를 분해하지 못하고 *Escherichia coli*는 lactose를 분해하는 특성을 바탕으로 lactose permease(*lac Y*) 유전자를 균의 특이적 마커로 선정 및 사용하였음.

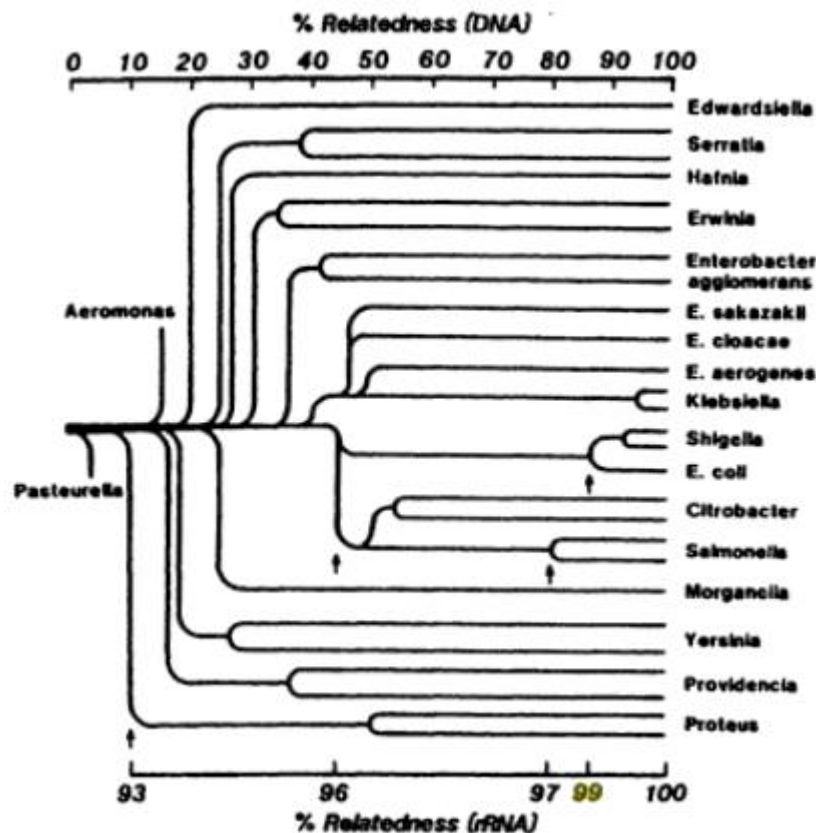


그림 4.8 Enterobacteriaceae 의 DNA 및 rRNA 상동성(Spence et al., 1994)

나. Conventional PCR Primer 후보군 검정 및 최종 후보군 선정

○ 각 Primer set의 선정 기준은 PCR product size, Primer의 annealing temperature, Primer 간의 간섭(예- primer-primer dimer 형성), 해당논문의 IF 및 인용정도를 고려하여 선정하였음(표 4.4).

표 4.4 구축된 DB로부터 검증 후 선정된 Conventional PCR primer set들에 대한 정보

Pathotype	Target genes	Sequence(5' to 3')	Size(bp)	Tm ¹ (°C)	Reference ²
EIEC	<i>ipaH</i>	GAA AAC CCT CCT GGT CCA TCA GG GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC	437	63	*I-5
	<i>ipaH</i>	GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC	619	60	I-8
	<i>ipaH</i>	TGG AAA AAC TCA GTG CCT CT CCA GTC CGT AAA TTC ATT CT	422	65	I-18
EAEC	<i>aggR</i>	GTA TAC ACA AAA GAA GGA AGC ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC	254	55	A-5
	<i>aggR</i>	CCT AAA GGA TGC CCT GAT GA TGC TGC ITT GCT CAT TCT TG	406	57	A-8
	<i>aggR</i>	CAT CTC TTT GAT AAG TCC TTC TCG GTA TAC ACA AAA GAA GGA AGC	434	55	A-9
ETEC	<i>LT</i>	ACG GCG TTA CTA TCC TCT C TGG TCT CGG TCA GAT ATG TG	273	52	T-18
	<i>LT</i>	CTC TAX GTG CAC ACG GAG C CCA TAC TGA TTG CCG CAA T	322	55	T-23
	<i>STh</i>	TTC ACC TTT CCC TCA GGA TG CTA TTC ATG CTT TCA GGA CCA	120	52	T-18
	<i>STh</i>	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG CCT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATTAC	147	52	T-35
	<i>STp</i>	TCT TTC CCC TCT TTT AGT CAG TC CCG CAC AGG CAG GAT TAC	170	55	T-1
	<i>STp</i>	ATG AAA AAG CTA ATG TTG GCA TTA ATA ACA TCC AGC ACA GGCA	239	58	T-22

	<i>eaeA</i>	GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC TG CAA AGC GCA CAA GAC TAC CA	147	60	P-9
	<i>eaeA</i>	ATG CTT AGT GCT GGT TTA GG GTC CGG GGA CAT TTT AGT CA	390	57	P-11
	<i>eaeA</i>	CCC GAA TTC GGC ACAAGC ATA AGC CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G	881	52	P-23
	<i>eaeA</i>	GGA ACG GCA GAG GTT AAT CTG CAG CGA AGC CAT TTG CTG GGC GCT C	360	55	p-35
EPEC	<i>eaeA</i>	ATA TCC GTT TTA ATG GCT ATC T AAr CTT CTG CGT ACT GTG TTC A	425	50	P-36
	<i>bfp</i>	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	326	56	P-37
	<i>bfp</i>	GGA AGT CAA ATT CAT GGG GGT AT GGA ATC AGA CGC AGA CTG GTA GT	254	64	P-29
	<i>bfp</i>	CAC CGT TAC CGC AGG TGT GA GTT GCC GCT TCA GCA GGA GT	450	55	P-25
	<i>stx1</i>	TTG AAC TGG GGA AGG TTG AG TGC GCA CTG AGA AGA AGA GA	482	58	H-10
	<i>stx1</i>	TTC GCT CTG CAA TAG GTA TTC CCC AGT TCA ATG TAA GAT	555	50	H-20
EHEC	<i>stx2</i>	TTC GGT ATC CTA TTC CCG G CGT CAT CGT ATA CAC AGG AG	589	58	H-7
	<i>stx2</i>	GTG CCT GTT ACT GGG TTT TTC TTC AGG GGT CGA TAT CTC TGT CC	518	50	H-20

* I : EIEC, A : EAEC, T : ETEC, P : EPEC, H : EHEC

1 Annealing temperature used in articles

2 Number of articles investigated

- Conventional multiplex PCR protocol의 최적화를 수행하였으며 후보 Primer 군을 대상으로 기 보유하고 있는 병원성 대장균에서 원하는 target gene이 검출되는지를 파악하기 위한 Single plex PCR을 실시하였음
- 각 병원성 대장균의 target gene에 대한 primer들 간의 간섭과 이상 유무가 나타나는지를 파악하고 원하는 target gene이 아닌 다른 형태의 병원성 대장균의 template DNA와 간섭이 나타나는 Primer 후보군들은 배제하며 후보군을 추려내었음(그림 4.9).
- 5종 병원성 대장균의 특이 마커에 대한 Conventional PCR Primer 후보군의 검정을 시행한 결과, 본 연구팀이 보유하고 있는 임상 분리 균주에 대해서 위양성 및 위음성 결과 없이 정확하게 결과를 나타내는 Conventional PCR Primer 만을 선정할 수 있었음(표 4.5 ~ 표 4.9).

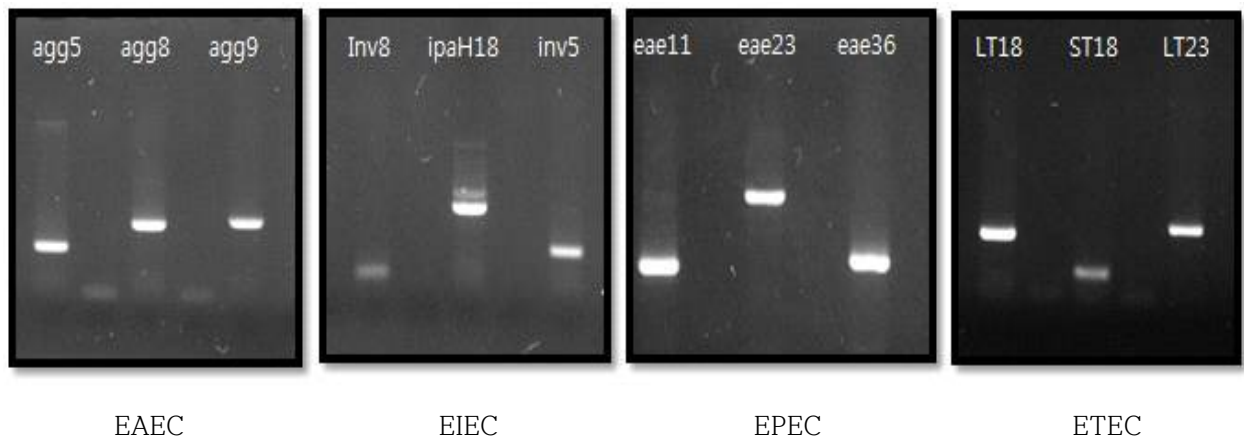


그림 4.9 기 보유한 병원성 대장균들의 각 target gene에 대한 Conventional PCR 검증(일부)

표 4.5. EPEC에 대한 Primer 후보군의 Conventional PCR 결과

EPEC			Primer candidate							
Strain	virulence factor	<i>eaeA</i> -9	<i>eaeA</i> -11	<i>eaeA</i> -23	<i>eaeA</i> -35	<i>eaeA</i> -36	<i>bfp</i> -29	<i>bfp</i> -25	<i>bfp</i> -37	
<i>E. coli</i> O138	<i>eaeA</i>	+	+	+	+	+	-	-	+	
<i>E. coli</i> O88	<i>eaeA</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	
<i>E. coli</i> O101	<i>eaeA</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	
<i>E. coli</i> O138	<i>eaeA</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	
<i>E. coli</i> OUT	<i>eaeA</i> , <i>bfp</i>	+	+	-	+	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> O153	<i>eaeA</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	
<i>E. coli</i> O45	<i>eaeA</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	
<i>E. coli</i> O117	<i>eaeA</i> , <i>bfp</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>E. coli</i> OUT	<i>eaeA</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	
<i>E. coli</i> O180	<i>eaeA</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	
<i>E. coli</i> O177	<i>eaeA</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	
<i>E. coli</i> O138	<i>eaeA</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	
<i>E. coli</i> 6176	<i>eaeA</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	
<i>E. coli</i> 6180	<i>eaeA</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	
<i>E. coli</i> 6182	<i>eaeA</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	
양성		15	15	9	15	15	3	2	3	
음성		0	0	6	0	0	12	13	12	
위양성		0	0	0	0	0	1	0	3	
위음성		0	0	6	0	0	1	0	2	

표 4.6. EHEC에 대한 Primer 후보군의 Conventional PCR 결과

EHEC			Primer candidate			
Strain	virulence factor	<i>stx1</i> -10	<i>stx1</i> -20	<i>stx2</i> -7	<i>stx2</i> -20	
<i>E. coli</i> O111	<i>stx1</i>	+	+	-	-	
<i>E. coli</i> O91	<i>stx1</i>	+	+	-	+	
<i>E. coli</i> O1	<i>stx2</i>	-	-	+	+	
<i>E. coli</i> O66	<i>stx1</i>	+	+	-	+	
<i>E. coli</i> O91	<i>stx1.2</i>	+	+	+	+	
<i>E. coli</i> O174	<i>stx2</i>	-	-	+	+	
<i>E. coli</i> O26	<i>stx1.2</i>	+	+	+	+	
<i>E. coli</i> O26	<i>stx2</i>	-	-	+	+	
<i>E. coli</i> 6067	<i>VT2</i>	-	-	+	+	
<i>E. coli</i> 5910	<i>VT1</i>	+	+	-	+	
<i>E. coli</i> 5597	<i>VT1</i>	+	+	-	-	
양성		7	7	6	9	
음성		4	4	5	2	
위양성		0	0	0	3	
위음성		0	0	0	0	

표 4.7 EAEC에 대한 Primer 후보군의 Conventional PCR 결과

EAEC		virulence factor	Primer candidate		
Strain			<i>aggR</i> -5	<i>aggR</i> -8	<i>aggR</i> -9
<i>E. coli</i>	O176	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O86	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O3	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O130	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O21	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O141	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O1	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O44	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O3	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	6227	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	6203	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	6181	<i>aggR</i>	+	+	+
	양성		13	13	13
	음성		0	0	0
	위양성		0	0	0
	위음성		0	0	0

표 4.8 ETEC에 대한 Primer 후보군의 Conventional PCR 결과

ETEC			Primer candidate					
Strain		virulence factor	<i>LT-18</i>	<i>LT-23</i>	<i>STh-18</i>	<i>STh-35</i>	<i>STp-1</i>	<i>STp-22</i>
<i>E. coli</i>	O153	<i>LT</i>	+	+	-	-	-	+
<i>E. coli</i>	O159	<i>STp</i>	-	-	-	-	+	-
<i>E. coli</i>	O25	<i>LT</i>	+	+	+	-	-	+
<i>E. coli</i>	O169	<i>STp</i>	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i>	O25	<i>LT</i>	+	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i>	O6	<i>LT, STh</i>	+	+	-	+	-	+
<i>E. coli</i>	O6	<i>LT, STh</i>	+	+	+	+	-	+
<i>E. coli</i>	O148	<i>STh</i>	-	-	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	O15	<i>STh</i>	-	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	O15	<i>STh</i>	-	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	O25	<i>STh</i>	-	-	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	O15	<i>STh</i>	-	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	6202	<i>STh</i>	-	-	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	6205	<i>LT, STh</i>	+	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	6173	<i>LT, STh</i>	+	+	+	+	-	-
	양성		7	10	11	10	2	5
	음성		8	5	4	5	13	10
	위 양성		0	3	2	0	0	4
	위 음성		0	0	1	0	0	1

표 4.9 EIEC에 대한 Primer 후보군의 Conventional PCR 결과

EIEC		virulence factor	Primer candidate		
Strain			<i>ipaH</i> -5	<i>ipaH</i> -8	<i>ipaH</i> -18
<i>E. coli</i>	O96	<i>ipaH</i>	-	+	+
<i>E. coli</i>	O96	<i>ipaH</i>	-	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>ipaH</i>	-	-	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>ipaH</i>	-	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>ipaH</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	5688	<i>ipaH</i>	-	-	+
<i>E. coli</i>	5639	<i>ipaH</i>	+	-	+
<i>E. coli</i>	5635	<i>ipaH</i>	-	+	+
양성			2	5	8
음성			6	3	0
위양성			0	0	0
위음성			6	3	0

다. Real-time PCR Primer 후보군 검정 및 최종 후보군 선정

- 각 Primer set의 선정 기준은 Primer의 annealing temperature, Primer 간의 간섭(예-primer-primer dimer 형성), 해당논문의 IF 및 인용정도를 고려하여 선정하였음(표 4.10).
- Real-time PCR protocol의 최적화를 수행하였으며 후보 Primer 군을 대상으로 기 보유하고 있는 병원성 대장균에서 원하는 target gene이 검출되는지를 파악하기 위한 SYBR Real time PCR을 실시하였음(표 4.11 ~ 표 4.15).
- 각 병원성 대장균의 target gene에 대한 primer들 간의 간섭과 이상 유무가 나타나는지를 파악하고 원하는 target gene이 아닌 다른 형태의 병원성 대장균의 template DNA와 간섭이 나타나는 Primer 후보군들은 배제하며 후보군을 추려내었음.
- 5종 병원성 대장균의 특이 마커에 대한 Real-time PCR Primer 후보군의 검정을 시행한 결과, 본 연구팀이 보유하고 있는 임상 분리 균주에 대해서 SYBR Real-time PCR 시행 시 위양성 및 위음성 결과 없이 정확하게 결과를 나타내는 Real-time PCR Primer 만을 선정할 수 있었음.

표 4.10 구축된 DB로부터 검증 후 선정된 Real-time PCR primer/probe set들에 대한 정보

Pathotype	Target genes	Sequence(5' to 3')	Tm ¹ (°C)	Reference ²
EIEC	<i>ipaH</i>	GAA AAC CCT CCT GGT CCA TCA GG GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC	63	*I-D
	<i>ipaH</i>	GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC	60	I-W
	<i>ipaH</i>	TGG AAA AAC TCA GTG CCT CT CCA GTC CGT AAA TTC ATT CT	65	I-T
EAEC	<i>aggR</i>	GTA TAC ACA AAA GAA GGA AGC ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC	55	A-L
	<i>aggR</i>	CCT AAA GGA TGC CCT GAT GA TGC TGC ITT GCT CAT TCT TG	57	A-D
	<i>aggR</i>	CAT CTC TTT GAT AAG TCC TTC TCG GTA TAC ACA AAA GAA GGA AGC	55	A-O
ETEC	<i>LT</i>	ACG GCG TTA CTA TCC TCT C TGG TCT CGG TCA GAT ATG TG	52	T-I
	<i>LT</i>	CTC TAX GTG CAC ACG GAG C CCA TAC TGA TTG CCG CAA T	55	T-Hi

	<i>STh</i>	TTC ACC TTT CCC TCA GGA TG CTA TTC ATG CTT TCA GGA CCA	52	T-Ha
	<i>STh</i>	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG CCT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATTAC	52	T-Hi
	<i>STh</i>	TTC ACC TTT CCC TCA GGA TG CTA TTC ATG CTT TCA GGA CCA	52	T-I
	<i>STp</i>	TCT TTC CCC TCT TTT AGT CAG TC CCG CAC AGG CAG GAT TAC	55	T-Hi
	<i>STp</i>	TCT TTC CCC TCT TTT AGT CAG ACA GGC AGG ATT ACA ACA AAG	52	T-I
EPEC	<i>eaeA</i>	CCG ATT CCT CTG GTG ACG A CCA CGG TTT ATC AAA CTG ATA ACG	61	P-W
	<i>eaeA</i>	ATG CTT AGT GCT GGT TTA GG GTC CGG GGA CAT TTT AGT CA	57	P-F
	<i>eaeA</i>	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA	52	P-N
	<i>eaeA</i>	CCC GAA TTC GGC ACAAGC ATA AGC CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G	52	P-S
EHEC	<i>stx1</i>	GTG GCA TTA ATA CTG AAT TGT CAT CA GCG TAA TCC CAC GGA CTC TTC	58	H-J
	<i>stx1</i>	TTC GCT CTG CAA TAG GTA TTC CCC AGT TCA ATG TAA GAT	50	H-S
	<i>stx1</i>	TGT CAT TCG CTC TGC AAT AGG TA CCC TCT GAC ATC AAC TGC	55	H-K
	<i>stx2</i>	GAT GTT TAT GGC GGT TTT ATT TGC TGG AAA ACT CAA TTT TAC CTT TAG CA	58	H-J
	<i>stx2</i>	GTG CCT GTT ACT GGG TTT TTC TTC AGG GGT CGA TAT CTC TGT CC	50	H-S
	<i>stx2</i>	GTG GTA ATA CAA TGA CCA GAG ATC GTA TAC ACA GGA GCA GT	55	H-K

* I : EIEC, A : EAEC, T : ETEC, P : EPEC, H : EHEC

1 Annealing temperature used in articles

2 Number of articles investigated

표 4.11 EPEC에 대한 Primer 후보군의 Real-time PCR(SYBR) 결과

EPEC			Primer candidates			
Strain	virulence factor	<i>eaeA</i> -W	<i>eaeA</i> -F	<i>eaeA</i> -N	<i>eaeA</i> -S	
<i>E. coli</i> O138	<i>eaeA</i>	+	+	+	+	
<i>E. coli</i> O88	<i>eaeA</i>	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> O101	<i>eaeA</i>	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> O138	<i>eaeA</i>	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> OUT	<i>eaeA, bfp</i>	+	+	+	-	
<i>E. coli</i> O153	<i>eaeA</i>	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> O45	<i>eaeA</i>	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> O117	<i>eaeA, bfp</i>	+	+	+	+	
<i>E. coli</i> OUT	<i>eaeA</i>	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> O180	<i>eaeA</i>	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> O177	<i>eaeA</i>	+	+	+	+	
<i>E. coli</i> O138	<i>eaeA</i>	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> 6176	<i>eaeA</i>	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> 6180	<i>eaeA</i>	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> 6182	<i>eaeA</i>	+	-	+	-	
양성		15	4	15	3	
음성		0	11	0	12	
위양성		0	0	0	0	
위음성		0	11	0	12	

표 4.12 EHEC에 대한 Primer 후보군의 Real-time PCR(SYBR) 결과

EHEC			Primer candidate					
Strain	virulence factor	<i>stx1</i> -J	<i>stx2</i> -J	<i>stx1</i> -S	<i>stx2</i> -S	<i>stx1</i> -K	<i>stx2</i> -K	
<i>E. coli</i> O111	<i>stx1</i>	+	-	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> O91	<i>stx1</i>	+	-	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> O1	<i>stx2</i>	-	+	-	-	-	-	
<i>E. coli</i> O66	<i>stx1</i>	+	-	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> O91	<i>stx1.2</i>	+	+	+	+	-	+	
<i>E. coli</i> O174	<i>stx2</i>	-	+	-	+	-	+	
<i>E. coli</i> O26	<i>stx1.2</i>	+	+	+	+	-	+	
<i>E. coli</i> O26	<i>stx2</i>	-	+	-	+	-	+	
<i>E. coli</i> 6067	<i>VT2</i>	-	+	-	+	-	-	
<i>E. coli</i> 5910	<i>VT1</i>	+	-	+	-	+	-	
<i>E. coli</i> 5597	<i>VT1</i>	+	-	+	-	+	-	
양성		7	6	7	5	5	4	
음성		4	5	4	6	6	7	
위양성		0	0	0	0	0	0	
위음성		0	0	0	1	2	1	

표 4.13 EAEC에 대한 Primer 후보군의 Real-time PCR(SYBR) 결과

EAEC		virulence factor	Primer candidate		
Strain			<i>aggR-L</i>	<i>aggR-D</i>	<i>aggR-O</i>
<i>E. coli</i>	O176	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O86	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O3	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O130	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O21	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O141	<i>aggR</i>	-	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O1	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O44	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O3	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	6227	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	6203	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	6181	<i>aggR</i>	+	+	+
양성			12	13	13
음성			1	0	0
위양성			0	0	0
위음성			1	0	0

표 4.14 EIEC에 대한 Primer 후보군의 Real-time PCR(SYBR) 결과

EIEC		virulence factor	Primer candidate		
Strain	<i>ipaH</i> -D		<i>ipaH</i> -W	<i>ipaH</i> -T	
<i>E. coli</i>	O96	<i>ipaH</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O96	<i>ipaH</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>ipaH</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>ipaH</i>	-	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>ipaH</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	5688	<i>ipaH</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	5639	<i>ipaH</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	5635	<i>ipaH</i>	+	+	+
양성			7	8	8
음성			1	0	0
위양성			0	0	0
위음성			1	0	0

표 4.15 ETEC에 대한 Primer 후보군의 Real-time PCR(SYBR) 결과

ETEC			Primer candidate						
Strain	virulence factor		<i>LT-I</i>	<i>LT-Hi</i>	<i>STh-Ha</i>	<i>STh-Hi</i>	<i>STh-I</i>	<i>STp-Hi</i>	<i>STp-I</i>
<i>E. coli</i> O153	<i>LT</i>		+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O159	<i>STp</i>		+	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> O25	<i>LT</i>		+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O169	<i>STp</i>		+	-	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i> O25	<i>LT</i>		+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O6	<i>LT, STh</i>		+	+	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> O6	<i>LT, STh</i>		+	+	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> O148	<i>STh</i>		-	-	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> O15	<i>STh</i>		+	-	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> O15	<i>STh</i>		+	-	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> O25	<i>STh</i>		+	-	-	+	+	-	-
<i>E. coli</i> O15	<i>STh</i>		+	-	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> 6202	<i>STh</i>		+	+	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> 6205	<i>LT, STh</i>		-	-	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i> 6173	<i>LT, STh</i>		+	+	+	+	+	-	-
양성			13	7	10	9	10	2	2
음성			2	8	5	6	5	13	13
위양성			5	0	0	0	0	0	0
위음성			0	0	0	1	0	0	0

제5절 5종 병원성 대장균 검출을 위한 Multiplex Conventional PCR의 개발

<요약>

1. 대장균 검출을 위한 Primer 디자인

- 기존 E. coli species 의 검출에 사용되는 유전자는 uid A, 16s rRNA가 사용되었으나 한계점이 존재하였음. 따라서 대장균 species 검출을 위한 새로운 Primer의 개발이 필요함.
- Lactose permease를 코딩하는 Lac Y gene을 대상으로 Primer를 개발하였으며 개발된 Primer는 병원성 대장균 및 기타 식중독균을 대상으로 민감도 및 특이도를 평가하였음.
- 총 63개의 대장균에서 양성, 50개의 기타 식중독균을 대상으로 음성 결과를 나타내었으며 따라서 대장균 species 검출을 위한 lac Y primer 개발이 완료되었음.

2. 5종 병원성 검출을 위한 Conventional PCR 개발

- Primer 후보군의 각 유형별 병원성 대장균 및 비 병원성 대장균, 대장균 이외의 식중독균에 대한 민감도 및 특이도 평가를 실시하였음.
- PCR을 이용한 병원성 대장균의 용이한 검출방법을 위하여 Flowchart를 제작하였고 이를 통해 대장균의 병원성 유무를 쉽게 판정할 수 있음.
- 또한 개발된 PCR Primer 후보군의 각 유형별 병원성 대장균 및 비 병원성 대장균, 대장균 이외의 식중독균에 대한 민감도 및 특이도 평가를 실시하였음.
- 최종적으로 선정된 Conventional PCR 세트의 검출 한계를 평가함.
- 순수 배양액에서 검출한계는 4log cfu/ml 이며 식품의 인위 접종 후 24시간 배양후에는 검출 한계가 1log cfu/g(ml) 이다. 이는 대장균의 특성상 외부 균의 영향을 적게 받고 빠르게 증균하기 때문인 것으로 보임.
- 결론적으로 개발된 Conventional PCR 세트는 시료에서 병원성 대장균을 검출하기에 유용한 것으로 평가됨

1. 서론

- 이전 연구에서 5종 병원성 대장균 검출을 위한 Primer 후보군 중 국내에서 분리된 임상 분리 균주에 대한 PCR을 시행하였다. 이를 통해 발표되었던 Primer 중 국내 실정에 가장 적합하게 사용할 수 있는 Primer를 선별하였음.
- Multiplex PCR은 하나의 tube에서 PCR 반응을 진행함으로써 두 개 혹은 그 이상의 유전자를 검출 할 수 있는 PCR 기법이다. 이를 이용하면 소요시간, PCR reagent 및 인력이 적게 소모 되어 경제적임(그림 5.1).
- 본 연구에서는 5종 병원성 대장균의 손쉬운 검출을 위하여 Multiplex PCR 기법을 도입하여 검출 키트를 개발하고자 하였음.

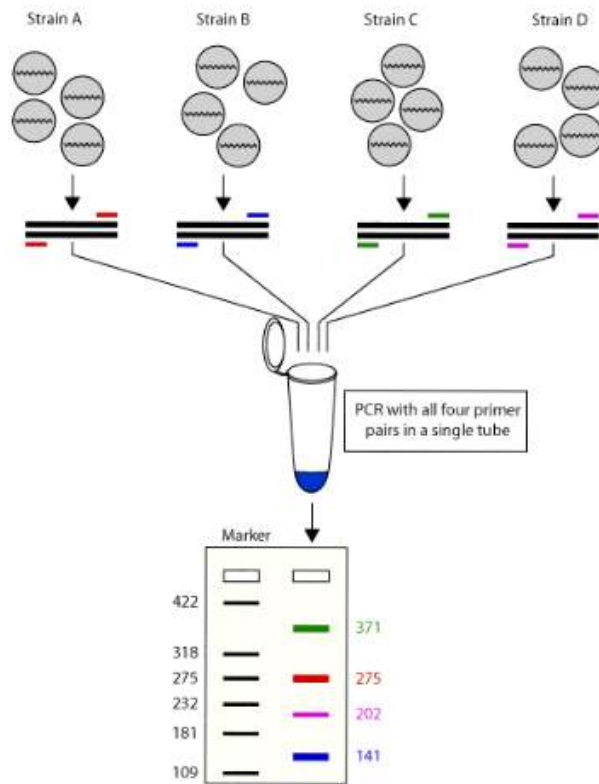


그림 5.1 Multiplex PCR의 모식도

2. 연구내용 및 방법

가. Primer Design

- 기존에 *E. coli* Species 의 검출에 사용되었던 유전자는 *uid A*(B-D-Glucoronidase), *16s rRNA* 등이 있었다. 그러나 본 연구에서 기존의 *uidA* primer를 이용하여 19개의 *E. coli*에 대한 PCR 결과 18개만이 양성 결과를 나타내었음. 또한 *uidA*는 *16s rRNA*와 마찬가지로 *Shigella spp*에 대해서 변별력을 보이지 못하였다(Chen et al., 2012). 따라서 *E. coli* Species를 검출할 수 있는 새로운 Primer의 개발이 필요하였음.
- 모든 병원성 대장균에 대해 sensitivity가 높고 다른 식중독 균에 대해 specificity한 marker 개발을 위해 대장균의 housekeeping 유전자중 하나인 lactose permease gene(*lac Y*)를 Target으로 선정하였다. Lactose permease는 lactose를 세포내로 운반시키는 단백질로써 lactose 대사에 필수적인 단백질로 대장균의 lactose 발효 능을 나타낼 수 있게 하는 인자로 lactose를 galactose와 glucose로 분해하는 효소인 β -galatodase와 한 쌍을 이룸.
- *E. coli* 와 *Shigella spp* 와의 구분을 위하여 *lac Y* 에 대해서 PCR을 진행하기로 하였고 Primer 디자인에 사용한 Tool은 Primer 3 임. *lac Y*의 유전정보는 Public database(Gene ID:949083)를 참고하였으며 Band size, Annealing Temperature등의 정보를 기입하고 여러 Primer set을 도출하였다. 이후 BLAST 로 상동성에 대한 Scoring 후 Single-plex PCR 과정을 수행할 5쌍의 Primer set을 선정하였다. 최종적으로 민감도 및 특이도를 검정하였음(그림 5.2).

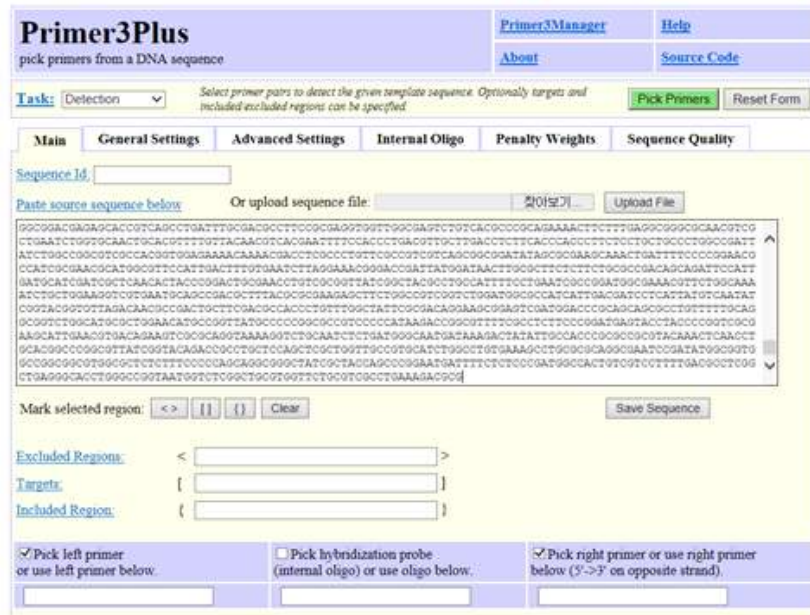


그림 5.2 Primer 3 Plus website

나. 5종 병원성 대장균 검출을 위한 Multiplex Conventional PCR 개발

- 본 연구에서 도출된 5종 병원성 대장균에 대한 최종 Primer 후보군을 대상으로 Multiplex Conventional PCR을 위한 테스트를 실시하였음(표 5.1).
- 하나의 Primer set이 추가 될 때 마다 Primer간의 결합, Dimer를 형성 혹은 비특이 반응을 나타 낼 수 있으므로 각각의 Primer set을 추가할 때 마다 검정을 실시하였음.
- 또한 조합된 Multiplex PCR의 Primer set의 최적화를 위하여 Annealing temperature 및 다양한 Primer concentration을 사용하였음.
- 최종적으로 조합된 Multiplex conventional PCR의 민감도와 특이도를 검정하기 위해서 해당 병원성 대장균 이외에 비병원성 대장균 및 다른 식중독균을 이용하였음.

표 5.1 민감성/특이성 검증에 사용된 균주 목록

<i>E. coli</i>	Serotype	Virulence gene	No. of strains
Atypical EPEC	O138, O88, O101, O101, O138, O138, OUT, O180, O177, O138, O153, O45	<i>eaeA</i>	12
Typical EPEC	OUT, O117	<i>eaeA, bfp</i>	2
EAEC	O176, OUT, O86, O3, O130, O21, O141, OUT, O1, O44, O3	<i>aggR</i>	11
Pathogenic <i>E. coli</i>	O153, O25, O25, O25	<i>LT</i>	4
	ETEC O159, O169	<i>STp</i>	2
	O6, O6	<i>LT, STh</i>	2
	O148, O15, O15, O15	<i>STh</i>	4
	EIEC O96, O96, OUT, OUT, OUT	<i>ipaH</i>	5
EHEC	O111, O91, O66	<i>stx1</i>	3
	O174, O1, O26	<i>stx2</i>	3
	O26, O91	<i>stx1.2</i>	2
Non-pathogenic <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922, <i>Escherichia coli</i> , ATCC11775, 실험실 기 보유 <i>Escherichia coli</i> 분리주(Chicken carcass 분리주 3개)		5
Food borne Pathogens	<i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559, <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 7002, <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 51776, <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12026, <i>Salmonella enteritica</i> subsp <i>Enteritidis</i> 3512H		5

다. 개발된 Multiplex Conventional PCR의 검출한계

- 모든 검출기법은 검출 한계(Detection limit)을 결정하는 것이 중요하다. 이는 검출 기법의 검출 한계에 따라 양성 샘플임에도 불구하고 적정 검출한계 이하로 존재 할 경우 해당 검출 기법은 음성으로 판정하기 때문임.

- 순수배양액에서 PCR의 검출 한계를 측정하기 위해서 다음과 같은 과정을 수행하였음
 - 6종의 병원성 대장균(EHEC, ETEC(*LT*, *STh*), ETEC(*STp*), EAEC, EIEC, EPEC)
 - LB broth에 접종 후 8 log cfu/ml 로 증균
 - IntronBio 사의 G-spin Bacterial DNA extraction kit를 이용하여 균주의 DNA 추출
 - TE buffer를 이용하여 10진 희석 ($10^1 \sim 10^8$ cfu/ml)
 - Multiplex PCR 수행

- 접종된 식품샘플에서 PCR의 검출 한계를 측정하기 위해서 다음과 같은 과정을 수행하였음
 - 6종의 병원성 대장균(EHEC, ETEC(*LT*, *STh*), ETEC(*STp*), EAEC, EIEC, EPEC)
 - LB broth에 접종 후 8 log cfu/ml 로 증균
 - PBS로 10진 희석
 - 우유 및 간 고기(Ground beef) 10g에 각각 ($10^1 \sim 10^8$ cfu/g)이 되도록 접종
 - Brain Heart Infusion(BHI) Broth를 90ml 분주 후 37°C에서 3시간 배양 후 2배농도 Tryptone Phosphate(TP) Broth를 90ml 분주 한 후 42°C 에서 20시간 배양
 - IntronBio 사의 G-spin Bacterial DNA extraction kit를 이용하여 샘플의 DNA 추출
 - Multiplex PCR 수행

3. 연구 결과

가. Primer Design

○ *lac Y*에 대해 총 5개의 Primer Set을 디자인 하였음(표 5.2).

표 5.2 *Escherichia coli* species 의 *lac Y*에 특이적인 Primer의 개발된 sequence

Gene detected	Primer	Sequence(5' → 3')	Annealing Temperature	Amplicon size(Bp)
lactose permease	<i>lac Y_k1</i>	<i>F</i> TGA ATA TCG ACG GTT TCC AT	58°C	1,209
		<i>R</i> AAA AAC GCA CTT CAA ACT GG		
lactose permease	<i>lac Y_k2</i>	<i>F</i> TGA ATA TCG ACG GTT TCC AT	57.7°C	1,370
		<i>R</i> CGT GAA CAC GGA AAT TAA GG		
lactose permease	<i>lac Y_k3</i>	<i>F</i> TGA ATA TCG ACG GTT TCC AT	58.5°C	1,424
		<i>R</i> AGC GAC TTC ATT CAC CTG AC		
lactose permease	<i>lac Y_k4</i>	<i>F</i> TGA ATA TCG ACG GTT TCC AT	57.5°C	1,371
		<i>R</i> GCG TGA ACA CGG AAA TTA AG		
lactose permease	<i>lac Y_k5</i>	<i>F</i> TGA ATA TCG ACG GTT TCC AT	58°C	1,373
		<i>R</i> AAG CGT GAA CAC GGA AAT TA		

- 개발된 Primer 에 대해서 Inclusivity 및 Exclusivity Test를 수행하였음(표 5.3 및 표 5.5).
- 먼저 양성 샘플에 대하여 양성 반응을 확인하는 Inclusivity test에서 63개의 대장균 DNA를 대상으로 PCR을 실시한 결과 2개의 primer set(*lac Y_k2*, *lac Y_k5*)에서 기대하는 target band size와 양성반응이 나타났음(표 5.3 및 그림 5.3).
- *lac Y_k4*의 경우 하나의 균에서 검출이 나타나지 않았고, 다른 두 Primer set은 검출 능력이 현격히 떨어지는 것을 확인하였음.
- 따라서 추가적인 Exclusivity는 *lac Y_k2* 및 *lac Y_k5*를 중심으로 진행하였고, 두 Primer set의 특이도 결과가 다소 떨어질 가능성을 배제할 수 없어 검출능력이 일부 떨어지는 *lac Y_k4* 또한 후보로써 Exclusivity test를 진행하였음.
- *lac Y* primer의 Exclusivity test를 위하여 다음과 같은 non-*E. coli* 균주를 이용하였음(표 5.4).
- *Salmonella spp*를 제외한 15종의 식중독 세균과 31종의 *Salmonella enteritica subsp* 를 대상으로 Exclusivity test를 실시한 결과 *lac Y_k2* primer는 49/50(98%), *lac Y_k4* primer는 50/50(100%), *lac Y_k5* primer는 50/50 (100%)의 특이도를 나타내었음(표 5.5 및 그림 5.3).
- *lac Y_k2*, *lac Y_k4*, *lac Y_k5* primer를 각각 Inclusivity/exclusivity test를 실시한 결과 *lac Y_k5* Primer가 100%의 민감도와 특이도를 나타내어 *lac Y_k5* primer를 대장균 검출 특이 primer로 선택하였음.
- *lac Y* gene는 특히 *Shigella spp*와 EIEC와의 구별에 있어서 유용하게 쓰일 수 있는데 EIEC의 검출에 사용되는 *ipaH*는 *Shigella spp*에서도 존재하는 gene이므로 *Shigella spp*와 EIEC의 구별은 필요한 부분임.
- *Shigella spp*는 lactose permease를 지니고 있지 않으므로 *lac Y* gene의 검출이 EIEC와 *Shigella spp*와의 구분에 있어서 중요하게 쓰일 것으로 보임.

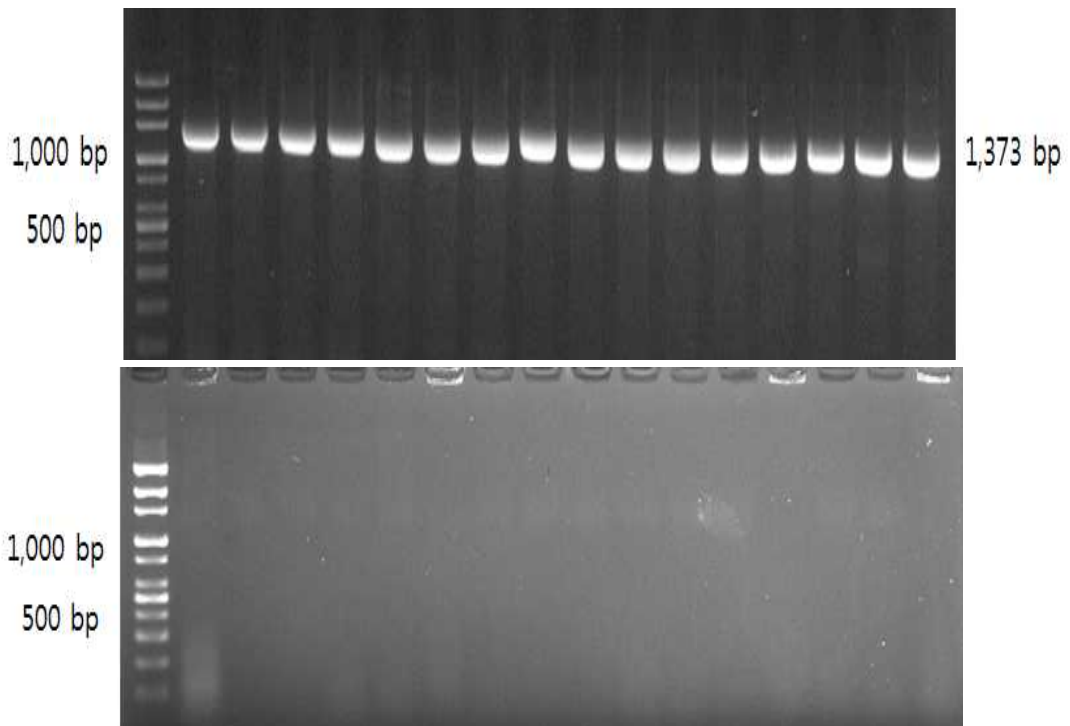


그림 5.3 *lac Y_k5* primer의 Inclusivity test 결과(위)와 Exclusivity test 결과(아래) 일부

표 5.3. *lac Y* Primer의 Inclusivity test 결과

Organism	Total No. of strains	No. of strains for positive test				
		<i>lac Y_k1</i>	<i>lac Y_k2</i>	<i>lac Y_k3</i>	<i>lac Y_k4</i>	<i>lac Y_k5</i>
Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>	14	5	14	8	14	14
Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	8	3	8	7	8	8
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	15	10	15	5	15	15
Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	15	10	15	4	15	15
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	11	6	11	5	10	11
Total	63	34	63	29	62	63

표 5.4 *lac Y* primer의 Exclusivity test를 위하여 다음과 같은 non-*E. coli* 균주들 목록

Organisms
<p><i>Campylobacter coli</i> ATCC 33559, <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048, <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090, <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 7002, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 51776, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 41664, <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 3624, <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579, <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12026, <i>Yersinia enterocolitica</i>, <i>Actinetobacter baumannii</i>, <i>Enterobacter salazarikii</i> KTCT 2949, <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Campylobacter coli</i></p>
<p><i>Salmonella enteritica</i> subsp (Below)</p>
<p>Barcilly 1955H, Anatum 1904H, Agona 4000H, Give E1 1432H, Enteritidis 3512H, Derby 1591H, Cerro 1325H, California 3515H, Javiana 2080H, Infantis 1232H, Java B 2234H, Illinois 2386H, Mbandlaka 37N, Heidelberg UN-L, Bredney 1370H, Enteritidis H3353, Enteritidis Me-13, Baenderup 10N, Heidelberg, 390H, Meleagridis 1054H, Oranienburg 1410H, Mhenophen 2761H, Muenster 1250H, Dublin, Madelia, 2N, Montevideo 1231H, Manhattan1293H, Litchfield 3483H, Kentucky 2035, Poona 3417H, Ohio2060H, Newington 3144H, Typhimurium DT-104, Enteritidis Benson-1</p>

표 5.5 *lac Y* Primer Set의 Exclusivity test 결과

Organisms		Strains testing positive with primer set		
		<i>lac Y_k2</i>	<i>lac Y_k4</i>	<i>lac Y_k5</i>
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 33559	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 7002	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 51776	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 41664	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 3624	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12026	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>		-	-	-
<i>Actinetobacter baumannii</i>		-	-	-
<i>Enterobacter salazarikii</i>	KTCT 2949	+	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>		-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>		-	-	-
<i>Campylobacter coli</i>		-	-	-
<i>Salmonella enteritica subsp</i>	Barcilly 1955H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica subsp</i>	Anatum 1904H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica subsp</i>	Agona 4000H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica subsp</i>	Give E1 1432H	-	-	-

(표 5.5 이어서)

Organisms	Strains testing positive with primer set		
	<i>lac</i> Y_k2	<i>lac</i> Y_k4	<i>lac</i> Y_k5
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Derby 1591H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Cerro 1325H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp California 3515H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Javiana 2080H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Infantis 1232H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Java B 2234H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Illinois 2386H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Mbandlaka 37N	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Heidelberg UN-L	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Bredney 1370H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Baenderup 10N	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Heidelberg 3390H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Meleagridis 1054H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Oranienburg 1410H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Mhenophen 2761H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Muenster 1250H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Dublin	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Madelia 22N	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Montevideo 1231H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Manhattan1293H	-	-	-

(표5.5 이어서)

Organisms	Strains testing positive with primer set		
	<i>lac Y_k2</i>	<i>lac Y_k4</i>	<i>lac Y_k5</i>
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Litchfield 3483H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Kentucky 2035	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Poona 3417H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Ohio2060H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Newington 3144H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Typhimurium DT-104	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Enteritidis Benson-1	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Enteritidis H3353	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Enteritidis 3512H	-	-	-
<i>Salmonella enteritica</i> subsp Enteritidis Me-13	-	-	-
Total	1/50(98%)	0/50(100%)	0/50(100%)

나. Multiplex Conventional PCR 개발

- 병원성 대장균의 동시 검출을 위하여 본 연구팀에서는 Two-Step PCR을 실시하였다. 이는 병원성 대장균의 정확한 분류를 위한 것으로 아래 그림과 같은 Flowchart를 따라 수행하면 해당 대장균의 병원성 유무를 쉽게 판정할 수 있음(그림 5.4).
- PCR-I 과정에서 PEC_KU1은 3종류의 유전자를 검출하여 EAEC(*aggR* 양성), EPEC/EHEC(*eaeA* 양성), EIEC/*Shigella spp*(*ipaH* 양성)을 확출함. 또한 PEC_KU2를 이용하여 ETEC(*LT* 또는 *STh* 또는 *STp* 양성)를 검출함.
- PCR-II Step에서는 PEC_KU1에서 *eaeA* 양성인 샘플의 경우 PEC_KU3를 이용하여 Atypical EPEC(*bfp*, *stx1*, *stx2* 음성), Typical EPEC(*bfp* 양성, *stx1/2* 음성), EHEC (*stx1* 또는 *stx2* 양성)을 검출할 수 있다. 또한 PEC_KU1에서 *ipaH* 양성인 샘플의 경우 PEC_KU4를 이용하여 EIEC(*lac Y*와 *16s rRNA* 양성), *Shigella spp*(*lac Y* 음성, *16s rRNA* 양성)을 검출할 수 있음.

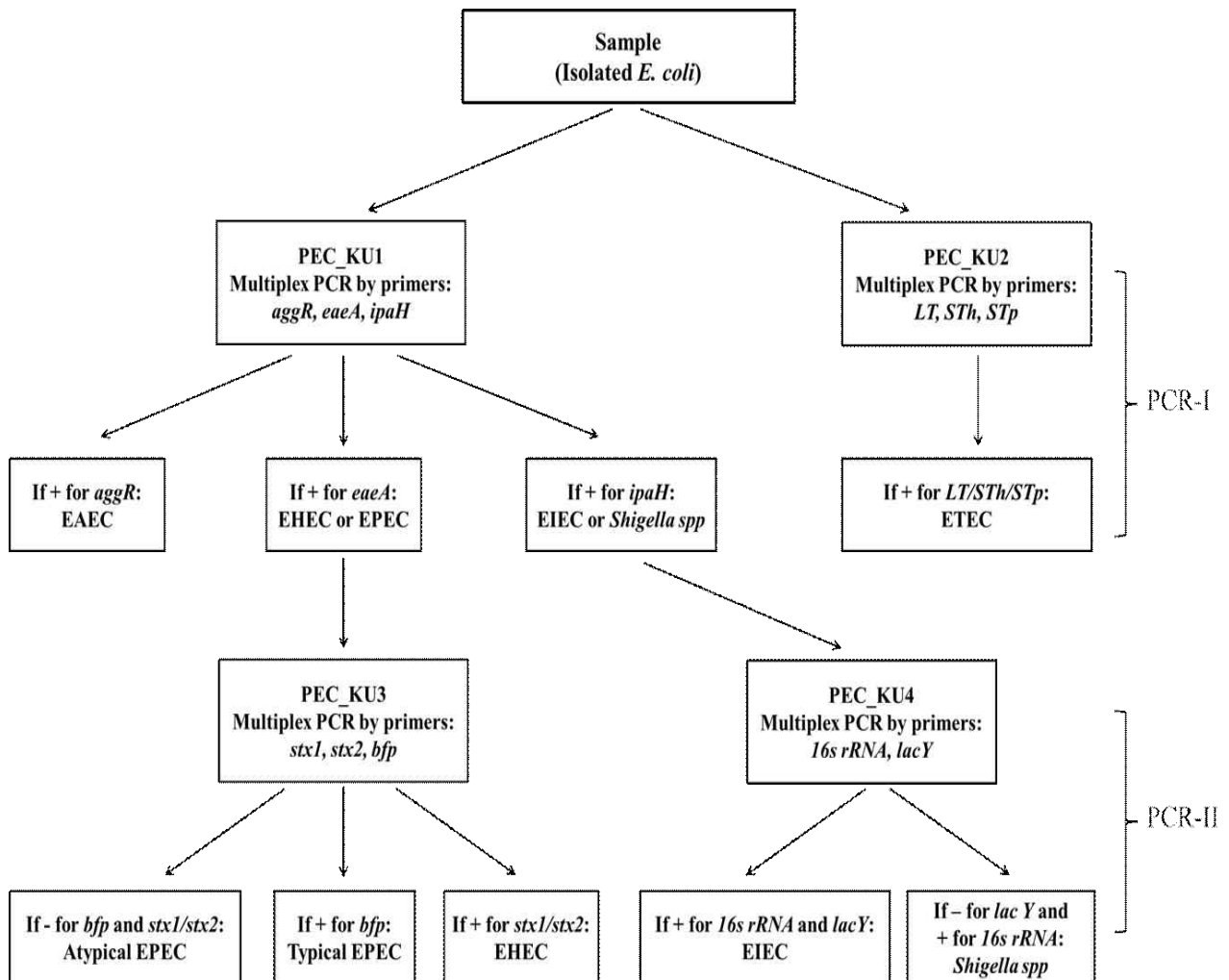
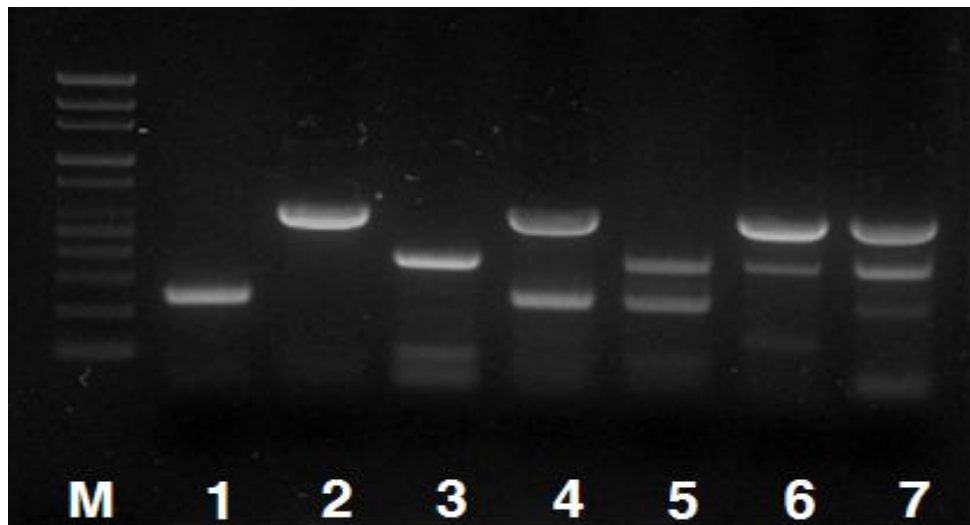


그림 5.4 Multiplex Conventional PCR 을 이용한 병원성 대장균 검출 모식도

- 본 연구팀이 확립한 데이터베이스 중 최종 후보에서 다양한 Primer 조합을 실시하였음. Primer의 조합 시에는 위에서 제시된 모식도의 구성에 따라 각각의 Primer 조합하였으며 평가는 Multiplex PCR시 Target gene의 검출 여부, 비특이 밴드의 형성 및 Primer dimer 형성등을 평가하였음.
- PCR 반응에 사용된 DNA 중합효소 및 dNTP 등은 (주)Intron 사의 동결건조 PCR pre-mix 키트인 “i-Ttaq French mix”를 사용하였다. 반응액을 Veriplex 96 PCR system (Applied Biosystems)을 이용하여 95°C에서 5분간 반응시킨 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 구성된 반응 사이클을 35회 반복 후 72°C에서 추가로 5분을 더 반응시켰다. 증폭산물의 확인을 위하여 2% Agarose gel을 이용한 전기영동분석을 실시하였음(그림 5.5).



Lane M : 100 bp DNA ladder, 1 : EAEC, 2 : EIEC, 3 : EPEC, 4 : EAEC+EIEC,
5 : EAEC+EPEC, 6 : EIEC+EPEC, 7 : EAEC+EIEC+EPEC

그림 5.5 Multiplex Conventional PCR 시 각각의 Target gene에 대한 Primer의 평가(예시)

○ 최종적으로 조합된 5종 병원성 대장균을 위한 Primer 정보는 아래와 같음(표 5.6).

표 5.6 병원성 대장균의 검출을 위한 Multiplex Conventional PCR의 특이적 프라이머 세트 목록

Group	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size(bp)
PEC_KU1	<i>eaeA F</i>	ATG CTT AGT GCT GGT TTA GG	390
	<i>eaeA R</i>	GTC CGG GGA CAT TTT AGT CA	
	<i>aggR F</i>	GTA TAC ACA AAA GAA GGA AGC	254
	<i>aggR R</i>	ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC	
	<i>ipaH F</i>	GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C	619
	<i>ipaH R</i>	GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC	
PEC_KU2	<i>LT F</i>	TCT CTA TGT GCA TAC GGA GC	322
	<i>LT R</i>	CCA TAC TGA TTG CCG CAA T	
	<i>STh F</i>	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC AGG	147
	<i>STh R</i>	CCT GAC TCT TCA AAA GAG AAA ATT AC	
	<i>STp F</i>	ATG AAA AAG CTA ATG TTG GCA	239
	<i>STp R</i>	TTA ATA ACA TCC AGC ACA GGCA	
PEC_KU3	<i>stx1 F</i>	AGT TAA TGT GGT GGC GAA	779
	<i>stx1 R</i>	GAC TCT TCC ATC TGC CG	
	<i>stx2 F</i>	TTG AAC TGG GGA AGG TTG AG	589
	<i>stx2 R</i>	TGC GCA CTG AGA AGA AGA GA	
	<i>Bfp F</i>	CAC CGT TAC CGC AGG TGT GA	450
	<i>Bfp R</i>	GTT GCC GCT TCA GCA GGA GT	
PEC_KU4	<i>lac Y F</i>	TG AAT ATC GAC GGT TTC CAT	1,371
	<i>lac Y R</i>	GCG TGA ACA CGG AAA TTA AG	
	<i>16s rRNA F</i>	CCC CCT GGA CGA AGA CTG AC	401
	<i>16s rRNA R</i>	ACC GCT GGC AAC AAA GGA TA	

- Multiplex Conventional PCR 반응의 최적화를 위하여 Annealing Temperature의 결정을 중요함. 본 연구에서는 유사한 Tm 값을 지니는 Primer를 이용하여 온도 최적화 구간은 적으나 조합된 Primer에 대한 최적의 반응을 위해 Annealing Temperature의 결정이 필요함.
- 먼저, 각 프라이머 세트에 대한 최적 annealing 온도는 추출된 병원성 대장균의 DNA를 이용해 결정했다. 52-62°C의 annealing 온도를 이용한 gradient PCR에서 표적 DNA가 증폭이 나타났으나 낮은 온도에서 비특이적인 PCR 생성물이 관측되었고 62°C의 Annealing Temperature에서는 PCR 반응이 다소 약하게 나타나는걸 확인하였다(Data not shown). Annealing 온도를 60°C로 조정하면, 비특이적 밴드가 사라졌으며, 따라서, annealing 온도는 60°C로 설정했다.
- 두번째 요인은 프라이머 비율이다. 각 PCR Group 별로 이상적인 증폭을 위하여 다양한 농도를 이용하여 실험하였고 최적의 PCR 반응을 나타낸 Primer 농도는 다음 표 5.7와 같음.

표 5.7 Multiplex Conventional PCR 프라이머의 최종 농도

Group	Primer	Conc(pmole)
PEC-KU1	<i>eaeA F</i>	0.50
	<i>eaeA R</i>	0.50
	<i>ipaH F</i>	0.50
	<i>ipaH R</i>	0.50
	<i>aggR F</i>	0.50
	<i>aggR R</i>	0.50
PEC-KU2	<i>LT F</i>	0.10
	<i>LT R</i>	0.10
	<i>STh F</i>	0.75
	<i>STh R</i>	0.75
	<i>STp F</i>	0.75
	<i>STp R</i>	0.75
PEC-KU3	<i>bfpA F</i>	0.50
	<i>bfpA R</i>	0.50
	<i>stx1 F</i>	0.50
	<i>stx1 R</i>	0.50
	<i>stx2 F</i>	0.10
	<i>stx2 R</i>	0.10
PEC-KU4	<i>16s rRNA F</i>	0.02
	<i>16s rRNA R</i>	0.02
	<i>lac Y F</i>	0.50
	<i>lac Y R</i>	0.50

○ 그림 5.6은 병원성 대장균의 genomic DNA를 이용한 Multiplex PCR 에 따른 각각의 반응 양상을 나타낸 결과임(각각의 Lane에 대한 정보는 그림을 참조).

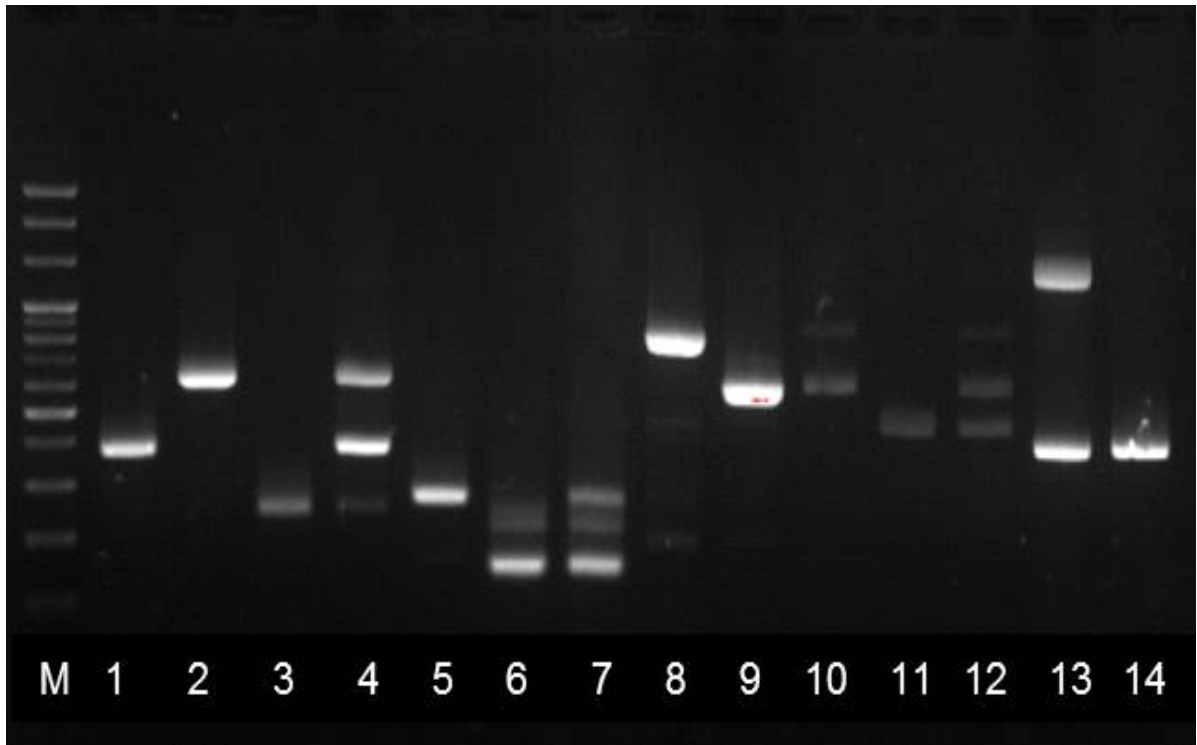


그림 5.6 5종 병원성 대장균 검출을 위한 Multiplex Conventional PCR 결과

Lane M : 100 bp DNA ladder, 1 : EAEC, 2 : EIEC, 3 : EPEC or EHEC, 4 : EPEC+EAEC+EIEC, 5 : ETEC(LT), 6 : ETEC(STh, STp), 7 : ETEC(LT, STh, STp) 8 : EHEC(stx1), 9 : EHEC(stx2), 10 : EHEC(stx1, stx2), 11 : EPEC(bfp), 12 : EHEC + EPEC, 13 : *Escherichia coli* ATCC 25922, 14 : *Shigella flexneri* ATCC 12026

○ Multiplex Conventional PCR 시 Thermal Cycle은 다음 표 5.8과 같음.

표 5.8 Multiplex Conventional PCR의 최적 Thermal Cycle

Pre-denaturation step	X 35			Final extension
	Denaturation	Annealing	Extension	
95°C/5min	95°C/30s	60°C/30s	72°C/1min	72°C/5min

- 개발된 Multiplex Conventional PCR의 5종 병원성 대장균 및 기타 식중독균에 대한 PCR 결과는 다음 표 5.9와 같음.

- 5종 병원성 대장균들의 민감도와 특이도를 검정한 결과 conventional PCR에서 표현형과 PCR 결과가 모두 민감도는 100%로 일치하였으며 특이도인 경우 EIEC의 *ipaH*와 *E. coli*의 *16s rRNA*를 제외한 다른 4종의 병원성 대장균은 conventional PCR 에서 음성 대조군의 결과 모두 0%로 특이도는 100% 였음.

- 그러나 *lac Y* 의 PCR 결과로 *E. coli*와 *Shigella spp*를 특이적으로 검정할 수 있었음.

표 5.9 Multiplex Conventional PCR에 대한 민감도와 특이도 결과

PCR kit	Positive /Negative	Pathotype	Target gene	Number of positives /Number of strains(%)
PEC-KU1	Positive	EPEC (Typical, Atypical)	<i>eaeA</i>	15/15 (100)
			<i>eaeA</i>	0/5 (0)
	Negative	Non- <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> (Non-EPEC)	<i>eaeA</i>	0/5 (0)
			<i>eaeA</i>	0/5 (0)
	Positive	EAEC	<i>aggR</i>	14/14 (100)
			<i>aggR</i>	0/5 (0)
	Negative	Non- <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> (Non-EAEC)	<i>aggR</i>	0/5 (0)
			<i>aggR</i>	0/5 (0)
	Positive	EIEC	<i>ipaH</i>	8/8 (100)
			<i>ipaH</i>	1/5 (20)
Negative	Non- <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> (Non-EIEC)	<i>ipaH</i>	1/5 (20)	
		<i>ipaH</i>	0/5 (0)	
PEC-KU2	Positive	ETEC	<i>LT</i>	8/8 (100)
			<i>STh</i>	9/9 (100)
			<i>STp</i>	2/2 (100)
	Negative	Non- <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> (Non-ETEC)	<i>LT</i>	0/5 (0)
			<i>STh</i>	0/5 (0)
			<i>STp</i>	0/5 (0)
			<i>LT</i>	0/5 (0)
			<i>STh</i>	0/5 (0)
			<i>STp</i>	0/5 (0)
	PEC-KU3	Positive	EHEC	<i>stx1</i>
<i>stx2</i>				6/6 (100)
<i>bfp</i>				2/2(100)
Negative		Non- <i>E. coli</i> <i>E. coli</i> (Non-EHEC, EPEC)	<i>stx1</i>	0/5 (0)
			<i>stx2</i>	0/5 (0)
			<i>bfp</i>	0/2(0)
			<i>stx1</i>	0/5 (0)
		<i>stx2</i>	0/5 (0)	
		<i>bfp</i>	0/2(0)	
PEC-KU4	Positive	<i>Escherichia coli</i>	<i>lac Y</i>	63/63 (100)
			<i>16s rRNA</i>	63/63 (100)
	Negative	Non- <i>E. coli</i>	<i>lac Y</i>	0/5 (100)
			<i>16s rRNA</i>	1/5 (20)

다. 개발된 Multiplex Conventional PCR의 검출한계

(1) 순수 배양액에서의 검출한계

- 순수 배양액에서 Multiplex Conventional PCR의 검출한계는 아래 표 5.10과 같음.
- 검출한계는 *eaeA*, *ipaH*, *16s rRNA*에서 2log cfu/ml, *stx1*, *stx2*, *lac Y*에서 3 log cfu/ml 그리고 나머지 target gene에서는 4log cfu/ml 로 나타났다. 따라서 순수 배양액에서 Multiplex Conventional PCR의 검출한계는 4 log cfu/ml로 이 이상 존재시 본 PCR kit를 이용하여 검출 할 수 있었음(그림 5.7 및 표 5.10).

표 5.10 Pure culture에서 Multiplex Conventional PCR의 검출 한계

PCR kit	Sample	Target gene	Log cfu/ml									
			8	7	6	5	4	3	2	1	D.W	
PEC-KU1	EPEC	<i>eaeA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	EAEC	<i>aggR</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	EIEC	<i>ipaH</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PEC-KU2	ETEC	<i>LT</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		<i>STh</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		<i>STp</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
PEC-KU3	EHEC	<i>stx1</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		<i>stx2</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	EPEC (Typical)	<i>bfp</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
PEC-KU4	<i>Escherichia coli</i>	<i>lac Y</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		<i>16s rRNA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

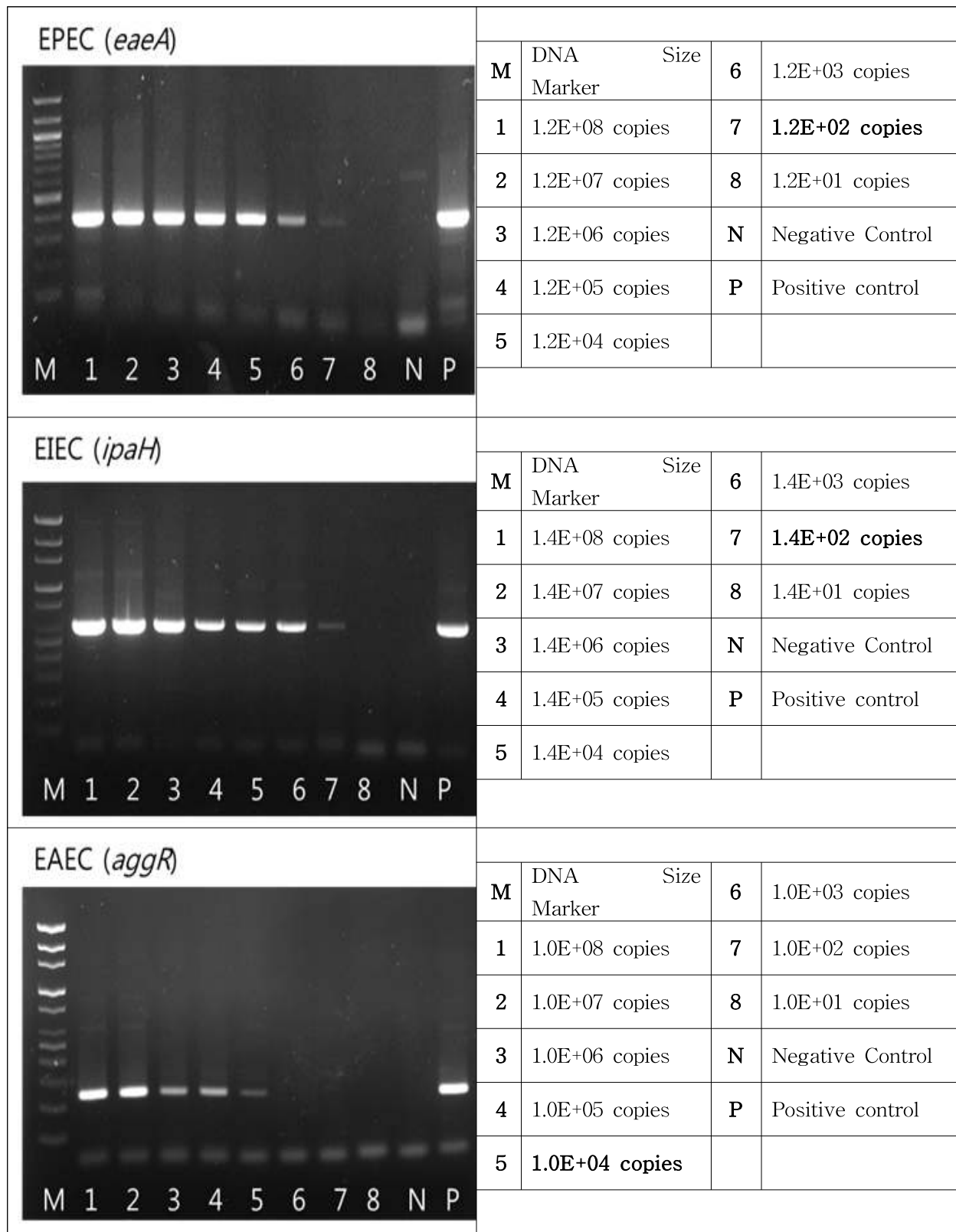


그림 5.7 (이어서) Pure culture에서 Multiplex Conventional PCR의 검출 한계

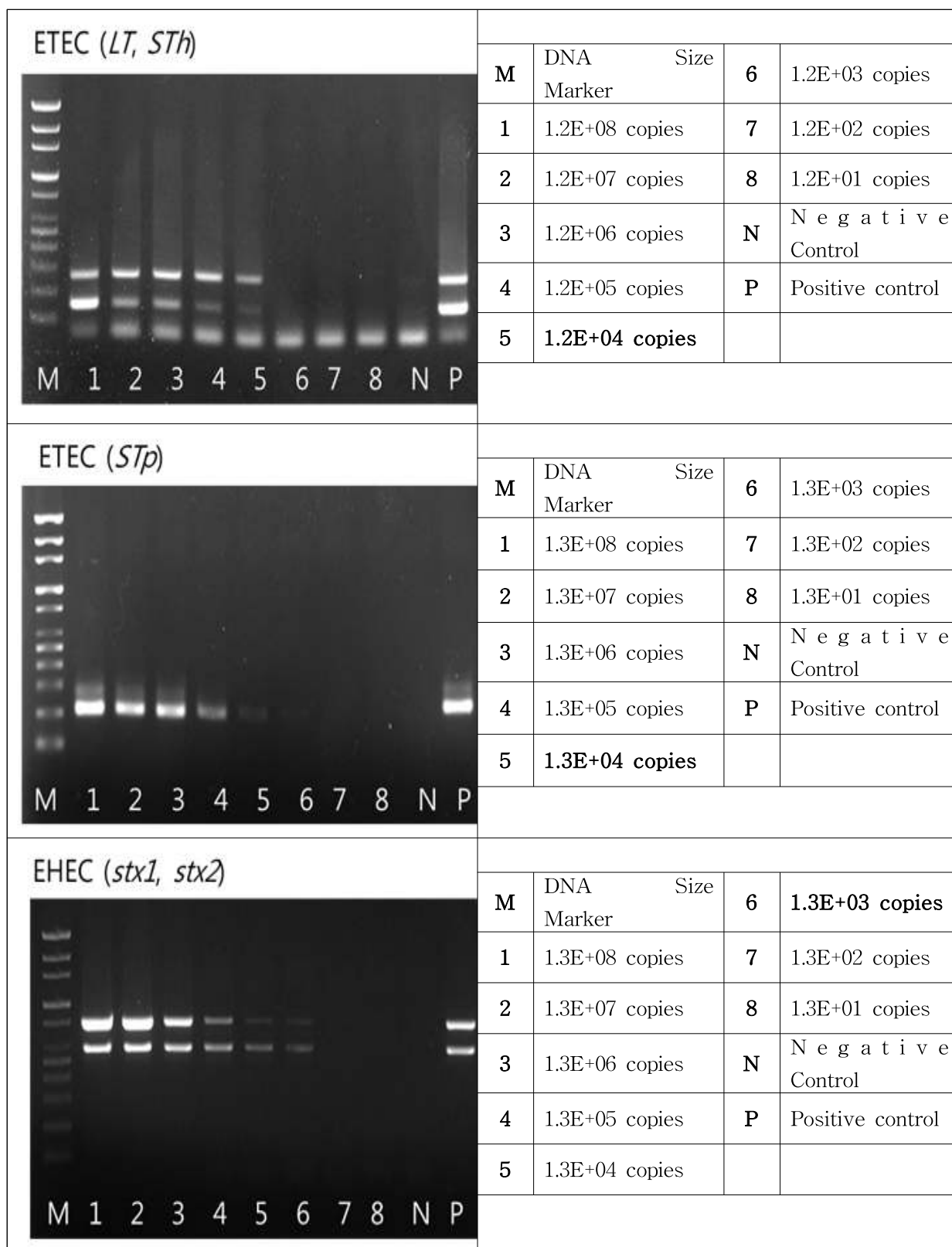


그림 5.7 (이어서) Pure culture에서 Multiplex Conventional PCR의 검출 한계

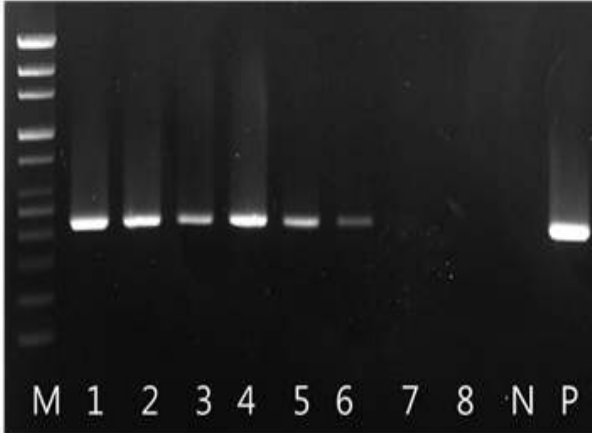
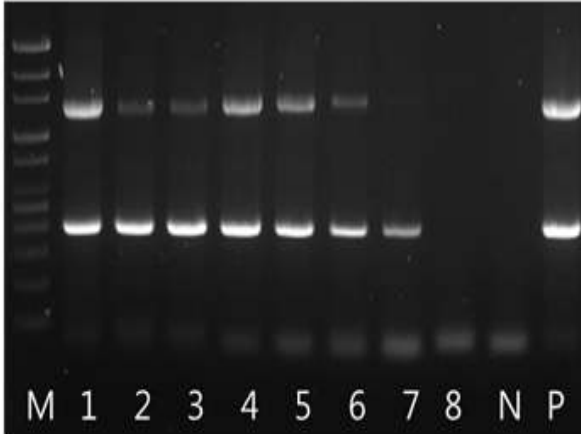
EPEC (<i>bfp</i>)		DNA Marker	Size	6	1.2E+03 copies
	M				
	1	1.2E+08 copies		7	1.2E+02 copies
	2	1.2E+07 copies		8	1.2E+01 copies
	3	1.2E+06 copies		N	N e g a t i v e Control
	4	1.2E+05 copies		P	Positive control
	5	1.2E+04 copies			
Escherichia coli (<i>lac Y, 16s rRNA</i>)		DNA Marker	Size	6	1.1E+03 copies
	M				
	1	1.1E+08 copies		7	1.1E+02 copies
	2	1.1E+07 copies		8	1.1E+01 copies
	3	1.1E+06 copies		N	N e g a t i v e Control
	4	1.1E+05 copies		P	Positive control
	5	1.1E+04 copies			

그림 5.7 Pure culture에서 Multiplex Conventional PCR의 검출 한계

(2) 인위접종한 식품에서의 검출한계

- 식품 샘플에 병원성 대장균을 인위접종 하고 증균 한 Multiplex Conventional PCR의 검출 한계는 아래 표 5.11과 같음.
- 식품에 균을 접종한 후 검출한계를 검정하는 과정에서는 여러 가지 변수가 존재할 수 있다. 식품에 존재하는 PCR inhibitor들의 영향을 받아 PCR 반응이 저해 될 수 있으며, 정상세균 총의 증균으로 인해 목적균의 성장이 더뎠어 검출 한계 이상으로 까지 증균되지 않기도 함.
- 본 연구팀에서 식품의 인위 접종시 검출한계는 모든 Target gene에서 1 log cfu/ml 로 나타났다. 이는 대장균의 특성상 외부 균의 영향을 적게 받고 빠르게 증균하기 때문인 것으로 보임.
- 또한 24시간 배양하였으므로 대부분의 샘플이 적어도 4 log cfu./ml 이상의 균 농도를 지니기 때문임. 식품 내 존재하는 PCR inhibitor는 DNA extraction kit를 사용함으로써 상당부분 제거하였음.
- 따라서 식품 인위 접종 시 Multiplex Conventional PCR의 검출한계는 1 log cfu/ml로 식품에 존재하는 균의 정확한 검출이 가능함.

표 5.11 식품 인위 접종 후 증균 시 Multiplex Conventional PCR의 검출 한계

Sample	PCR kit	Strain	Target gene	Log cfu/g								D.W	
				8	7	6	5	4	3	2	1		
Milk	PEC-KU1	EPEC	<i>eaeA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
		EAEC	<i>aggR</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
		EIEC	<i>ipaH</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
			<i>LT</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	PEC-KU2	ETEC	<i>STh</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
			<i>STp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
			<i>stx1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	PEC-KU3	EHEC	<i>stx2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
			EPEC (Typical)	<i>bfp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	PEC-KU4	<i>Escherichia coli</i>	<i>lac Y</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
			<i>16s rRNA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	Ground beef	PEC-KU1	EPEC	<i>eae A</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
			EAEC	<i>aggR</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
			EIEC	<i>ipaH</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
				<i>LT</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		PEC-KU2	ETEC	<i>STh</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>STp</i>				+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>stx1</i>				+	+	+	+	+	+	+	+	-	
PEC-KU3		EHEC	<i>stx2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
			EPEC (Typical)	<i>bfp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PEC-KU4		<i>Escherichia coli</i>	<i>lac Y</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
			<i>16s rRNA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

제6절 Internal Amplification Control 및 5종 병원성 대장균 검출을 위한 Real-time PCR의 개발

<요약>

1. Internal Amplification Control(IAC) 개발

- 식품, 임상 및 환경 시료에서 DNA를 추출 후 PCR을 실시하였을 시 시료 내 존재하는 PCR inhibitor로 위음성 결과를 나타낼 수 있음.
- IAC는 PCR의 위음성 결과를 배제하여 정확한 결과를 얻을 수 있게 함.
- 본 연구팀은 Viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV)의 DNA sequence를 이용하였으며 VHSV는 사람 및 식품시료에서 검출된 적이 없어 적합함.
- IAC는 10^4 copies/ul의 Template 농도, 75nM Primer 농도 및 250nM Probe 농도가 최종적으로 결정됨.
- 개발된 IAC의 Sequence는 Cloning을 통하여 IAC 생산 및 활용이 용이하도록 하였음.

2. 5종 병원성 검출을 위한 Real-time PCR 개발

- Primer 및 Probe 후보군의 각 유형별 병원성 대장균 및 비 병원성 대장균, 대장균 이외의 식중독균에 대한 민감도 및 특이도 평가를 실시하였음.
- 최종적으로 선정된 Real-time PCR 검출을 위한 Primer/probe는 IAC와 동시에 사용되면서 검출 한계를 평가함.
- 순수 배양액에서 검출한계는 $4\log$ cfu/ml 이며 식품의 인위 접종 후 24시간 배양후에는 검출 한계가 $1\log$ cfu/g(ml) 이다. 이는 대장균의 특성상 외부 균의 영향을 적게 받고 빠르게 증균하기 때문인 것으로 보임.
- 결론적으로 개발된 IAC와 Real-time PCR 세트는 시료에서 병원성 대장균을 검출하기에 유용한 것으로 평가됨

1. 서론

- Polymerase를 이용하여 DNA sequence를 증폭하는 PCR은 반응을 저해하는 PCR inhibitor의 존재 시 Target DNA가 있음에도 불구하고 증폭반응이 나타나지 않음(Klančnik, Anja, et al).
- 시료에 존재하는 PCR inhibitor는 Fat, Bile salt, Heparin 등을 비롯하여 다양한 종류가 존재함.

표 6.1 PCR inhibitor의 종류 및 Source

PCR inhibitor	Source of inhibitor
Bile salts	feces
complex polysaccharides	feces, plant material
collagen	tissues
heme	blood
Humic acid	soil, plant material
Melanin and eumelanin	hair, skin
myoglobin	muscle tissue
polysaccharides	plants
proteinases	milk
calcium ions	milk, bone
urea	urine
Hemoglobin, lactoferrin	blood
immunoglobulin G	blood
indigo dye	denim

- 따라서 이러한 위음성 결과를 배제하기 위해서 Internal Amplification Control(IAC)라는 인위적인 컨트롤을 PCR 반응에 이용하며 이는 PCR을 이용한 진단의 정확성을 위해서 필수적임. IAC가 음성인 경우 PCR 기계 이상이나 시약의 이상, 또는 실수로 인해 PCR 반응이 없음.
- IAC는 목표하지 않은 유전자 서열(non-target DNA sequence)로서 샘플이 들어있는 튜브와 같은 튜브에 첨가되어 목표유전자와 동시에 증폭되는 서열로 PCR 반응이 정상적인 경우 양성으로 나와야 함.

- 현재 PCR에 IAC를 이용한 검사 기법은 세계적인 추세로 유럽의 European Standardization Committee는 International Standard Organization과 협동하여 반응액에 IAC를 첨가하여 PCR 분석을 하기 위한 가이드라인 설립 중이며 국제 저널에서도 국제 규격에 맞는 새로운 PCR 방법을 요구하므로 논문 투고 시 IAC가 추가된 진단용 PCR을 개발해야 하는 등 IAC가 필수적이라는 것이 세계적인 추세임.
- IAC에서 Primer 디자인은 중요한 요소 중 하나임. 이는 IAC를 Heterogenous IAC 로 이용할 것인지 Homogenous IAC로 이용할 것인지 결정하게 해 줌. Heterogenous IAC 는 Target DNA와 IAC template를 증폭하는 Primer가 각각 존재하며 하나의 IAC를 이용하여 여러 Target DNA 및 PCR에 응용 할 수 있다는 장점이 있음.
- 반면 Homogenous IAC는 하나의 Primer set으로 Target DNA와 IAC를 동시에 증폭할 수 있어 편리하고 시간 소모가 적으나 IAC와 Target DNA는 한번에 한쌍으로 사용해야만 한다는 단점이 있다. 각각의 장단점이 존재하므로 IAC 디자인 시에는 이러한 사항을 고려하여야 함.
- Conventional PCR 방법에 더하여, Real-time PCR은 DNA 증폭 과정의 감지를 실시간으로 가능하게 하였다. Real-time PCR 과정에서, DNA의 합성은 PCR 과정 동안 생성되는 형광의 강도에 의해 측정되며 이것은 모니터에서 확인할 수 있음.
- 형광 신호의 생성을 기반으로 한 두 가지의 가장 일반적인 Real-time PCR 방법이 있음. 첫 번째는 이중 가닥DNA에 혼입될 때 형광이 급격히 증가하는 SYBR green I 및 SYBR green ER 염료와 같은 형광 물질이 반응에 첨가되고, DNA가 합성되는 동안 형광물질의 혼입이 감지됨. 두 번째 방법은 Fluorescent Reporter 및 Quencher가 붙은 Probe 방식임. Probe가 온전히 남아있는 동안, Reporter와 Quencher가 근접하고 있어 Reporter에 의해 발산된 형광을 현저하게 감소시킨다. PCR 진행중 DNA가 합성됨으로써 Probe또한 분해되고 Reporter는 Quencher의 영향을 받지 않아 형광을 나타낸다. 따라서 PCR 반응이 진행되면 진행될수록 Reporter에 의한 형광반응은 비례적으로 증가됨.
- 본 연구는 병원성 대장균검출을 효과적으로 스크리닝 할 수 있으며 위음성을 배제하여 신뢰도가 올라갔고 시간 소모가 적은 IAC 내제 Real time PCR 키트를 개발하였음.

2. 연구내용 및 방법

가. Internal amplification control (IAC)

(1) Internal amplificaton control의 디자인 및 개발

- Internal amplificaton control(IAC)는 시료 및 Target DNA 외에 인위적으로 첨부해줘야 하는 Template 이므로 이들에게 자연적으로 존재 하지 않은 IAC sequence를 선택하는 것이 중요함.
- 본 연구팀은 이를 위해서 Viral hemorrhagic septicemia virus(VHSV)의 DNA sequence를 이용하였음. 어류에서 Viral hemorrhagic septicemia(VHS)를 유발하는 이 바이러스는 민물고기 및 바다 물고기 일부에서 증상을 일으키며 사람에게서는 증상을 나타내지 않음. IAC로 사용하기에 VHSV가 적합한 이유는 이들은 식품시료에서 검출된 적이 없어 현재 우리가 검출하고자 하는 식품시료에서 병원성 대장균을 검출하기에는 매우 적합함(Lübeck et al., 2003). VHSV의 유전자 정보는 NCBI의 “GenBank accession no. X66134”를 참고 하였음.
- 본 연구팀이 디자인한 IAC는 Heterogenous IAC로 Target DNA의 Primer와 IAC의 Primer가 각각 독립적으로 존재하는 형태임. 이는 Taqman Probe 방식을 이용한 Real time PCR 과정을 수행할 때 Thermal cycler의 성능에 따라 2~4개의 Detector만을 사용할 수 있기에 효율이 적어진다. 따라서 5종의 병원성 대장균의 다양한 Virulence factor를 검출하기 위해서는 IAC primer를 독립적으로 구성할 필요가 있었음.
- IAC는 DNA sequence이므로 이들을 사용하기 위해서는 DNA의 양을 늘리고 안정적으로 보관하기 위해서는 Cloning 과정을 수행해 주어야 함. 본 연구팀에서는 PCR 로 증폭된 VHSV의 Sequence의 증폭을 위해 두 개의 primer (VHSV_F, 5' ACA CCA CAG ATC ACT CAA CG 3'; VHSV_R 5' GGA GAC CAG TCC CTT GTT TA 3')를 제작하였으며 Taq polymerase를 이용하였으므로 3' 말단에 Adenine이 붙을 수 있도록 하였음.
- VHSV 유전자의 증폭을 위한 PCR은 94°C 5분간의 initial incubation에 이어 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분의 반응 35회를 실시한 후 72°C에서 10분간의 extention을 실시하였다. 확인된 PCR 산물은 Quiagen사의 Gel Extraction kit를 이용하여 겔에서 분리하고 Invitrogen 사의 pCR 2.1-TOPO vector를 이용하여 Real Biotech Corp 사의 HIT competent cell(*E. coli* DH-a)에 Cloning 하였음(그림 6.1과 6.2).
- Cloning 된 *E. coli* 는 Intron bio 사의 Plasmid mini prep kit를 이용하여 Plasmid를 추출한 후 매뉴얼에 따라 PCR 및 Sequencing을 실시하여 이상이 없음을 확인한 후 Cloning 된 *E. coli*는 Stock으로 보관하였음.

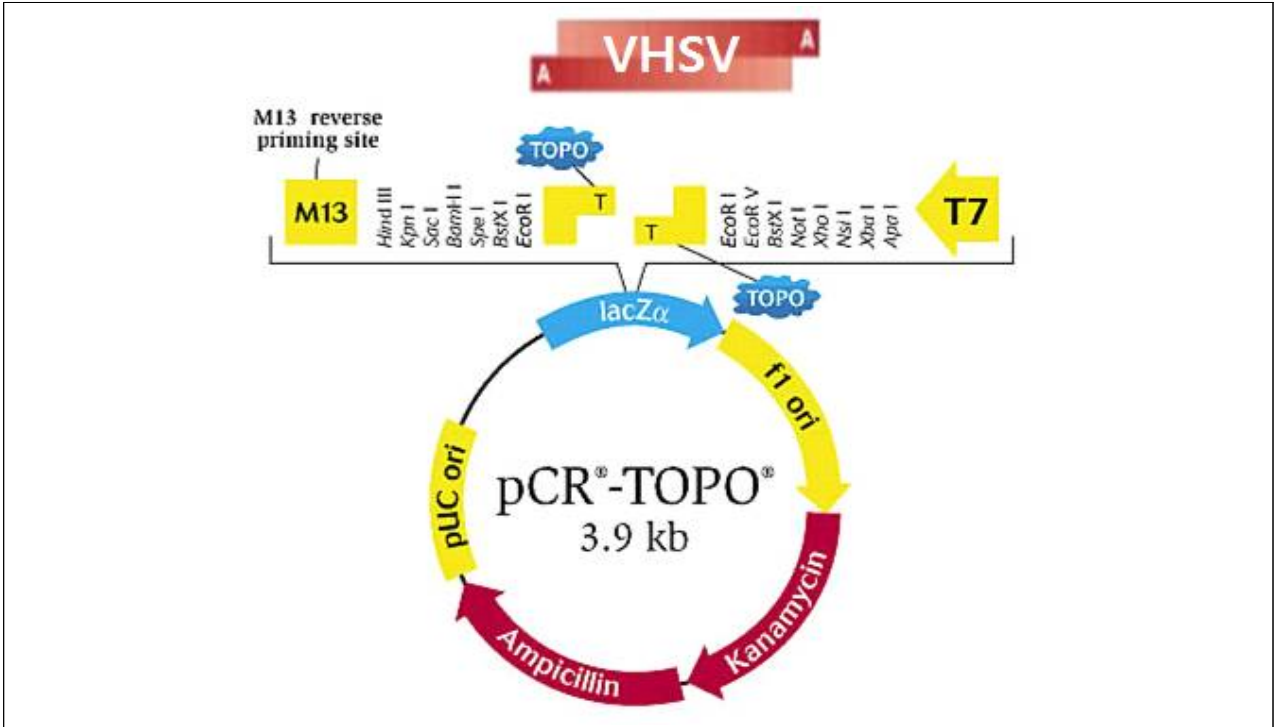


그림 6.1 pCR-TOPO vector의 구조

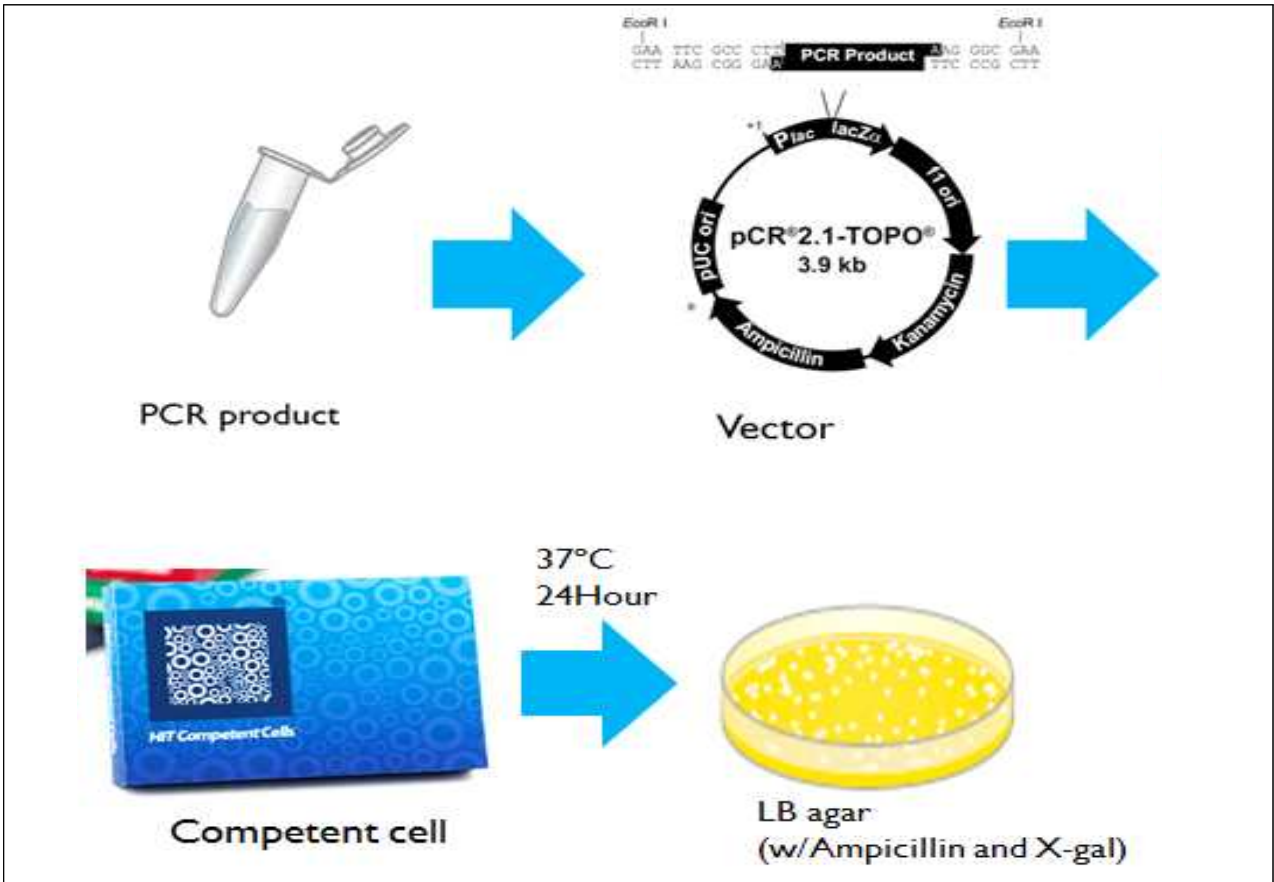


그림 6.2 IAC 의 cloning 과정

(2) Internal amplification의 검정

- Heterogenous IAC에서 중요하게 다뤄야할 사항은 IAC template의 양임. 이는 한정된 Polymerase와 dNTP로 인해 IAC template가 과다하게 존재시 IAC 반응은 양성이나 Target DNA에 대한 PCR 반응은 음성으로 나타날 수 있기 때문임. 따라서 가장 명확한 반응을 나타낼 수 있는 IAC template의 수를 결정하는 것이 중요함.
- Cloning 된 *E. coli*를 ampicillin이 함유된 Luria Bertani broth에 접종 후 37°C에서 24시간 증균 배양함. 배양액을 Intron bio 사의 Plasmid mini prep kit를 이용하여 Plasmid(Vector)를 추출함. Vector를 M13 forward와 M13 Reverse primer를 이용하여 증폭하여 325 bp의 PCR product를 전기영동으로 확인하였으며 Quiagen사의 Gel Extraction kit를 이용하여 IAC template만을 분리하였음.
- 분리된 IAC template는 Agilent사의 Nanodrop으로 DNA concentration을 측정하였으며 다음 공식을 이용하여 Copy수를 계산하였음.

$$\begin{aligned} \text{The Number of Genomic Copies}/\mu\text{l} &= \text{Weight of PCR Fragment (g}/\mu\text{l}) / (660 \text{ g/mol}) \\ &\quad \times \text{the number of base pairs of the PCR fragment} \\ &\quad \times 6.023 \times 10^{23} \end{aligned}$$

- IAC template 는 TE buffer로 10진 희석 하였으며(10¹~10⁷) 이를 Real time PCR 에 사용하였음.
- Real time PCR 조건은 다음과 같음.

PCR mix

TaqMan universal master mix with UNG II	Primer	Probe	IAC Template
1×	0.5 uM	125 nM	Opimal

※ Final volume : 20ul

Thermal Cycle condition

1 Cycle at 50°C (2 min)
 1 Cycle at 95°C (10 min)
 40 Cycle at 95°C (15 sec), 60°C (60 sec)

나. 병원성 대장균 검출을 위한 IAC 내재 Real time PCR 개발

- 이전 데이터베이스에서 선정된 효과가 뛰어난 Real time PCR 용 Primer에서 가장 적합한 Primer 및 Probe set을 선정하기 위해 추가적으로 5' 말단에는 FAM Fluorescent가, 3' 말단에는 TAMRA Quencher가 결합된 Probe을 통해 TaqMan probe Real time PCR을 시행하였음.
- 이전 SYBR Real-time PCR 과 마찬가지로 5종 병원성 대장균에 대한 검출 효과를 시행하였으며 사용 균주는 동일함.

다. 개발된 IAC 포함 Real time PCR의 검출한계

- 순수배양액에서 Real-time PCR의 검출 한계를 측정하기 위해서 다음과 같은 과정을 수행하였음
 - 6종의 병원성 대장균(EHEC, ETEC(*LT*, *STh*), ETEC(*STp*), EAEC, EIEC, EPEC)
 - LB broth에 접종 후 8 log cfu/ml 로 증균
 - IntronBio 사의 G-spin Bacterial DNA extraction kit를 이용하여 균주의 DNA 추출
 - TE buffer를 이용하여 10진 희석 ($10^1 \sim 10^8$ cfu/ml)
 - real-time PCR 수행
- 접종된 식품샘플에서 Real-time PCR의 검출 한계를 측정하기 위해서 다음과 같은 과정을 수행하였음
 - 6종의 병원성 대장균(EHEC, ETEC(*LT*, *STh*), ETEC(*STp*), EAEC, EIEC, EPEC)
 - LB broth에 접종 후 8 log cfu/ml 로 증균
 - PBS로 10진 희석
 - 우유 및 간고기(Ground beef) 10g에 각각 ($10^1 \sim 10^8$ cfu/g)이 되도록 접종
 - Brain Heart Infusion(BHI) Broth를 90ml 분주 후 37°C에서 3시간 배양 후 2배 농도 Tryptone Phosphate(TP) Broth를 90ml 분주 한 후 42°C 에서 20시간 배양
 - IntronBio 사의 G-spin Bacterial DNA extraction kit를 이용하여 샘플의 DNA 추출
 - Real-time PCR 수행

3. 연구 결과

가. Internal amplification control의 디자인 및 개발

- VHSV 유전자 정보를 이용하여 디자인 된 IAC template, Primer 및 Probe Sequence 는 다음과 같음(표 6.2 및 표 6.3).

표 6.2 IAC template의 Sequence 정보

Target	Sequence (5'-3')	Source
Viral Haemorrhagic Septicemia Virus mRNA for envelope protein gene	ACA CCA CAG ATC ACT CAA CGA CCT	GenBank accession no. X66134
	CCG GTC GAA AAC ATC TCG ACG TAC	
	CAT GCA GAT TGG GAC ACT CCG CTA	
	TAC ACT CAT CCC TCC AAC TGC AGG	
	GAC GAT TCC TTT GTC CCG ATT CGA	
	CCA GCT CAA CTC AGG TGT CCT CAT	
	GAA TTT GAA GAC ATA AAC AAG GGA	
CTG GTC TCC		

표 6.3 IAC Primer 및 Probe 정보

Primer & probe	Sequence (5'-3')	Band size(bp)	Source
Forward primer	ACA CCA CAG ATC ACT CAA CG	177	GenBank accession no. X66134
Reverse primer	GGA GAC CAG TCC CTT GTT TA		
IAC probe	JOE-TTC ATG AGG ACA CCT GAG TTG A-BHQ2		

- Cloning 에 사용한 pCR 2.1-TOPO vector는 ampicillin과 kanamycin에 내성을 나타내는 항생제 내성 유전자를 포함하고 있으며 Vector에 원하는 Sequence가 제대로 삽입이 되었는지 확인할 수 있도록 X-gal (5-Bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - beta - D-galactopyranoside)을 분해 할 수 있는 효소를 생성하는 “*Lac Z*”유전자를 포함하고 있음.
- X-gal은 competent cell 로 사용한 *E. coli* DH-a가 정상적으로는 당분해하지 못하며 *Lac Z* 유전자가 삽입되어야 당분해가 가능하다. 당분해가 일어나면 Colony 색상은 푸른빛을 띠며 분해가 일어나지 않을시 흰 색을 나타냄(그림 6.3).



그림 6.3 X-gal을 도포한 LB agar. Sequence의 Vector 삽입 유무 확인

*Blue colony : Vector 내로 Sequence 정상적으로 삽입 안됨

*White colony : Vector 내로 Sequence 정상적으로 삽입

- 흰색 집락으로 하여 모두 Vector내에 원하는 Sequence가 들어갔다고 단정하기는 어려움. 이는 Primer, 증폭이 완전히 끝나지 않은 PCR product, 합성 도중 오차가 발생한 PCR product등 다양한 변수가 존재함.
- 따라서 10개의 후보 집락을 선별하고 이 집락을 모두 증균, Plasmid Extraction, PCR 및 Sequencing과정을 수행함(그림 6.4 및 그림 6.5).
- 1번부터 10번 까지의 후보 집락 중 1번 5번 집락이 IAC sequence가 정상으로 삽입되었을 가능성이 높은 전기 영동 결과를 보여주었으며 이들의 PCR product를 Gel extraction 후 Sequencing 하였을 시 5번 집락에서 본 연구팀이 사용한 IAC sequence와 동일한 Sequence 가 삽입되었음을 확인하였음.

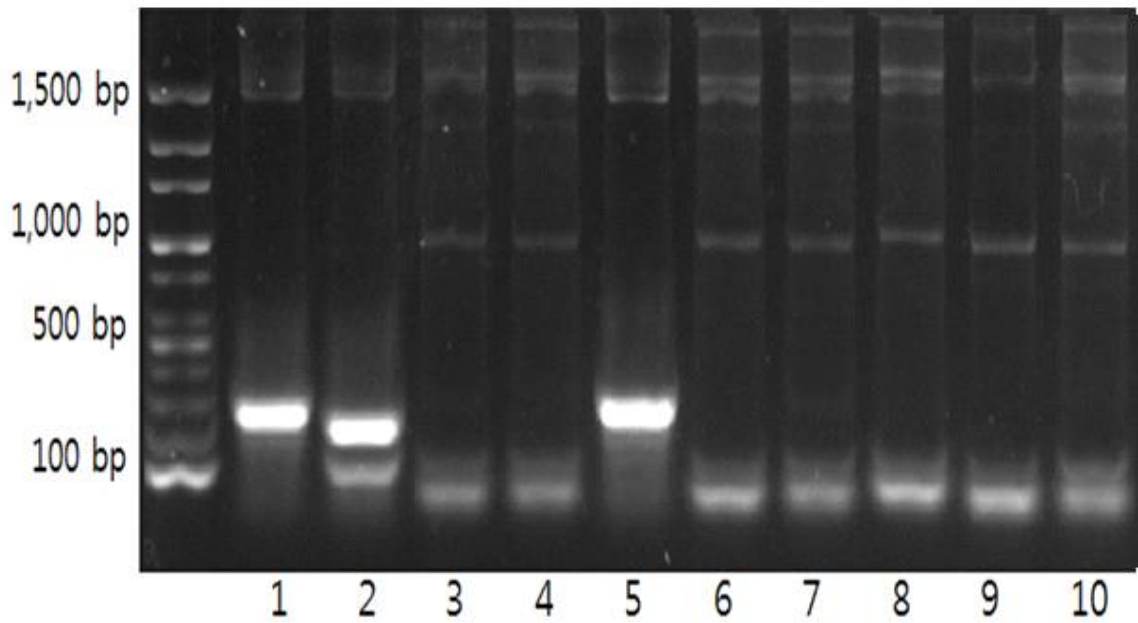


그림 6.4 M13 Primer를 이용한 Vector의 PCR 반응

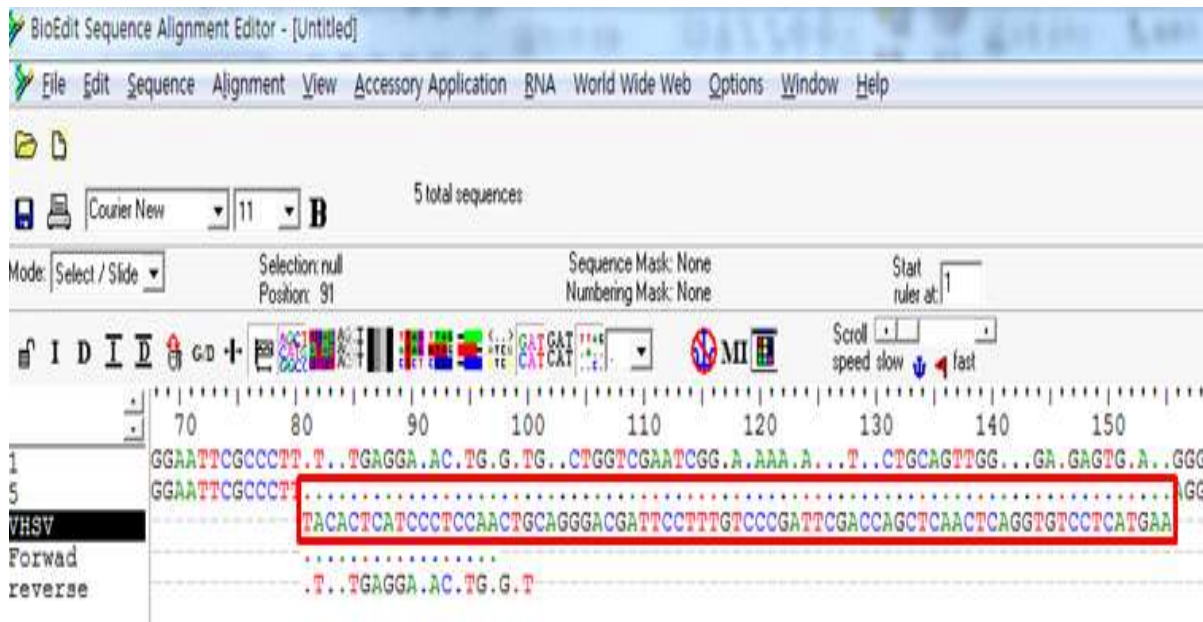


그림 6.5 Bioedit을 이용하여 Target Sequence의 Vector 내 정상적인 삽입 확인

나. Internal amplification의 검증

- Agarose gel에 영동된 PCR product는 QIAEX[®]II Gel extraction Kit (Qiagen, Germany) 를 사용하여 PCR product만을 따로 순수 정제하였음.
- 정제된 PCR amplification product를 Nano drop(Agilent, USA) 로 DNA concentration을 측정하였으며 그 결과는 10.1 ng/ul 이었음. DNA concentration을 이용한 DNA copy수의 계산식에 따른 계산 결과 Gel extraction 과정이후의 IAC DNA template copy수는 2.27×10^7 으로 확인되었음.
- 희석된 IAC Template를 Real time PCR 한 결과는 다음과 같음(그림 6.6 및 표 6.4).
- IAC template copy 수에 따른 standard curve 작성 시 copy수의 증가에 따라 Ct 값이 감소하는 전형적인 standard curve의 모습을 보이고 있으며 2.27×10^4 IAC template copy의 사용 시 Ct값은 28.28 로 나타났음.
- 따라서 이후 실험에 사용될 IAC copy 2.27×10^4 copy로 이는 병원성 대장균의 target gene을 검출함에 있어서 반응이 적정하게 나타날 것으로 고찰되었음.
- 정확하고 재현 가능한 결과를 보이는 최적의 Primer 및 Probe 농도 설정을 위해 여러 농도의 Primer와 Probe를 실험하였음. 준비된 Primer 농도는 10, 25, 50, 75, 100 nM Probe 농도는 15, 30, 60, 125, 250 nM 이다. IAC copy수는 2.27×10^4 copy/ul 를 사용하였음.

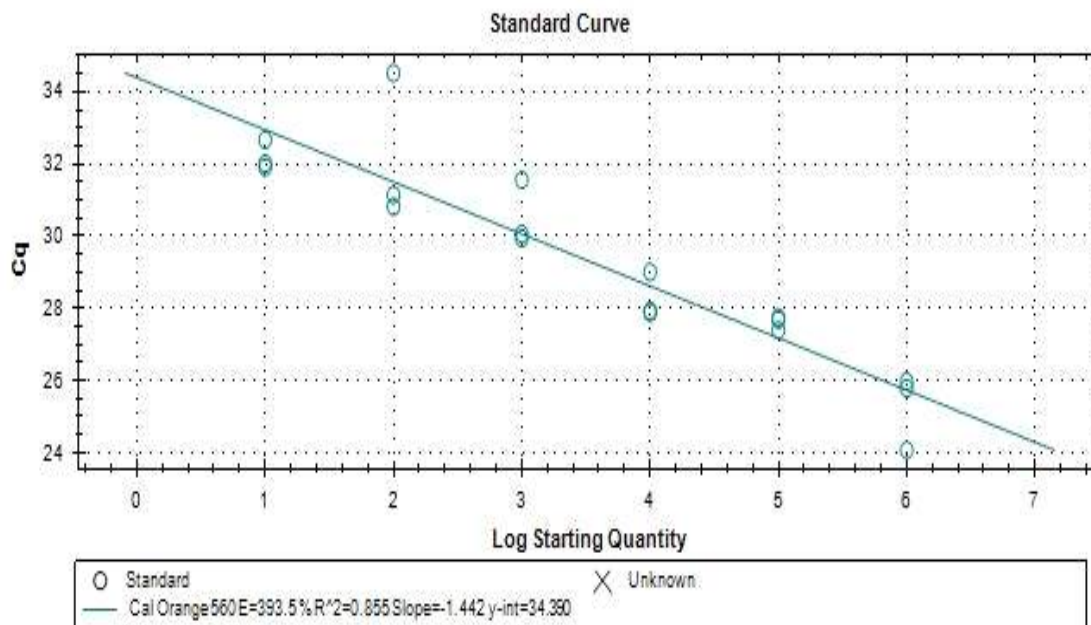


그림 6.6 Standard curve of internal amplification control

○그 결과는 다음 표와 같음(표 6.4 ~ 6.5).

- Primer 및 Probe의 농도에 따라 동일한 IAC copy를 주입하였음에도 많은 차이를 나타내었음. Primer 농도는 25 nM 이하부터 Ct값에 민감한 영향을 미쳤으며 Probe는 60nM이하일시 Ct 값에 영향을 미쳤음. 특히 primer 농도가 10 nM 일시에는 어떠한 양성값도 확인되지 않았으며 Probe의 농도는 30 nM 이하가 될수록 검출능력이 현격히 감소하였음.
- 이 결과를 바탕으로 Primer 농도는 75 nM Probe 농도는 250 nM이 기존의 결과와 크게 차이 나지 않으며 효율적으로 사용할 수 있는 최적화된 primer/probe 조건이라 할 수 있음.

표 6.4. IAC Template copy 에 따른 Real-time PCR 결과

IAC DNA (copies/ul)	n	IAC	
		Avg CT	% Positive
2.27x10 ⁶	3	25.28	100
2.27x10 ⁵	3	27.61	100
2.27x10 ⁴	3	28.28	100
2.27x10 ³	3	30.52	100
2.27x10 ²	3	32.16	100
2.27x10 ¹	3	32.20	100
0	3	UD	0

표 6.5 IAC의 Primer 및 Probe 농도 최적화

Primer concentration	n	Probe concentration				
		250 nM	125 nM	60 nM	30 nM	15 nM
100 nM	3	22.77	27.46	31.17	35.65	UD
75 nM	3	24.35	28.10	31.07	UD	38.92
50 nM	3	25.56	30.92	33.02	UD	UD
25 nM	3	31.63	38.76	38.64	UD	UD
10 nM	3	UD	UD	UD	UD	UD

다. 병원성 대장균 검출을 위한 IAC 내재 Real time PCR 개발

- 이전 데이터베이스 한 Real time PCR 용 Primer에서 SYBR Real time PCR 까지 완료된 Primer 중 효과가 뛰어난 후보군이 선정되었음.
- 최종적으로 가장 적합한 Primer 및 Probe set을 선정하기 위해 추가적으로 5' 말단에는 FAM Fluorescent가, 3' 말단에는 TAMRA Quencher가 결합된 Probe를 주문하여 추가적으로 실험을 진행하였음.
- Probe를 이용한 Real-time PCR을 위하여 ABI사의 “TaqMan universal master mix with UNG II”를 Mix로 이용하였다. 제조사 매뉴얼에 따라 Thermal cycle 조건은 50℃에서 2분, 95℃에서 10분, 그리고 95℃에서 15초와 60℃에서 1분간 반응을 40 cycle 반복하였음.
- 각 병원성 대장균의 Target gene에 대한 Probe 방식의 Real-time PCR 결과는 아래 표와 같음(표 6.6 ~ 6.10).

표 6.6 EPEC에 대한 Primer 후보군의 Real-time PCR(Probe) 결과

EPEC		Primer candidatse		
Strain	virulence factor	<i>eaeA</i> -W	<i>eaeA</i> -N	
<i>E. coli</i>	O138	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	O88	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	O101	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	O138	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	O153	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	O45	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	O117	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	O180	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	O177	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	O138	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	6176	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	6180	<i>eaeA</i>	+	+
<i>E. coli</i>	6182	<i>eaeA</i>	+	+
양성			15	15
음성			0	0
위양성			0	0
위음성			0	0

표 6.7 EHEC에 대한 Primer 후보군의 Real-time PCR(Probe) 결과

EHEC			Primer candidate		
Strain	virulence factor		<i>stx1</i> -J	<i>stx2</i> -J	<i>stx1</i> -S
<i>E. coli</i>	O111	<i>stx1</i>	+	-	-
<i>E. coli</i>	O91	<i>stx1</i>	+	-	-
<i>E. coli</i>	O1	<i>stx2</i>	-	+	-
<i>E. coli</i>	O66	<i>stx1</i>	+	-	+
<i>E. coli</i>	O91	<i>stx1.2</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O174	<i>stx2</i>	-	+	-
<i>E. coli</i>	O26	<i>stx1.2</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O26	<i>stx2</i>	-	+	-
<i>E. coli</i>	6067	<i>stx2</i>	-	+	-
<i>E. coli</i>	5910	<i>stx1</i>	+	-	+
<i>E. coli</i>	5597	<i>stx1</i>	+	-	+
양성			7	6	5
음성			4	5	6
위 양성			0	0	0
위 음성			0	0	2

표 6.8 EAEC에 대한 Primer 후보군의 Real-time PCR(Probe) 결과

EAEC			Primer candidate		
Strain	virulence factor		<i>aggR-L</i>	<i>aggR-D</i>	<i>aggR-O</i>
<i>E. coli</i>	O176	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O86	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O3	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O130	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O21	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O141	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O1	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O44	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	O3	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	6227	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	6203	<i>aggR</i>	+	+	+
<i>E. coli</i>	6181	<i>aggR</i>	+	+	+
	양성		13	13	13
	음성		0	0	0
	위양성		0	0	0
	위음성		0	0	0

표 6.9 EIEC에 대한 Primer 후보군의 Real-time PCR(Probe) 결과

EIEC		Primer candidate		
Strain	virulence factor	<i>ipaH</i> -W	<i>ipaH</i> -T	
<i>E. coli</i>	O96	<i>ipaH</i>	+	+
<i>E. coli</i>	O96	<i>ipaH</i>	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>ipaH</i>	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>ipaH</i>	+	+
<i>E. coli</i>	OUT	<i>ipaH</i>	+	+
<i>E. coli</i>	5688	<i>ipaH</i>	+	-
<i>E. coli</i>	5639	<i>ipaH</i>	+	-
<i>E. coli</i>	5635	<i>ipaH</i>	+	+
양성			8	6
음성			0	2
위양성			0	0
위음성			0	2

표 6.10 ETEC에 대한 Primer 후보군의 Real-time PCR (Probe) 결과

ETEC		virulence factor	Primer candidate				
Strain			LT-Hi	STh-Ha	STh-I	STp-Hi	STp-I
<i>E. coli</i>	O153	<i>LT</i>	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	O159	<i>STp</i>	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i>	O25	<i>LT</i>	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	O169	<i>STp</i>	-	-	-	+	+
<i>E. coli</i>	O25	<i>LT</i>	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	O6	<i>LT, STh</i>	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	O6	<i>LT, STh</i>	+	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	O148	<i>STh</i>	-	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	O15	<i>STh</i>	-	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	O15	<i>STh</i>	-	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	O25	<i>STh</i>	-	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	O15	<i>STh</i>	-	+	+	-	-
<i>E. coli</i>	6202	<i>STh</i>	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i>	6205	<i>LT, STh</i>	-	+	-	-	-
<i>E. coli</i>	6173	<i>LT, STh</i>	+	+	+	-	+
	양성		7	10	8	3	2
	음성		8	5	7	13	13
	위양성		0	0	0	1	0
	위음성		0	0	2	0	0

○ 최종적으로 조합된 5종 병원성 대장균을 위한 Primer 및 Probe 정보는 아래와 같다.

표 6.11 병원성 대장균의 검출을 위한 Real-time PCR의 특이적 프라이머 및 Probe 세트 목록

Pathotype	Target gene	Primer & probe	Sequence(5'-3')	Conc (pmole)	Reference
EPEC	<i>eaeA</i>	Forward	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TG ATA	0.075	Nielsen et al., 2003
		Reverse	CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA	0.075	
		probe	FAM-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC-TAMRA	0.25	
EIEC	<i>ipaH</i>	Forward	CCT TTT CCG CGT TCC TTG	0.075	Thiem et al., 2004
		Reverse	CGG AAT CCG GAG GTA TTG C	0.075	
		probe	FAM-CGC CTT TCC GAT ACC GTC TCT GCA-TAMRA	0.25	
EAEC	<i>aggR</i>	Forward	GCC TAA AGG ATG CCC TGA TG	0.5	Delannoy et al 2012
		Reverse	GAC CAA TTC GGA CAA CTG CAA	0.5	
		probe	FAM-CAT CTA CTT TTG ATA TTC CGT AT-TAMRA	0.25	
EHEC	<i>stx1</i>	Forward	GTG GCA TTA ATA CTG AAT TGT CAT CA	0.075	Jinneman et al.,2012
		Reverse	GCG TAA TCC CAC GGA CTC TTC	0.075	
		probe	FAM-TGA TGA GTT TCC TTC TAT GTG TCC GGC AGA T-TAMRA	0.25	
	Forward	GAT GTT TAT GGC GGT TTT ATT TGC	0.075		
	<i>stx2</i>	Reverse	TGG AAA ACT CAA TTT TAC CTT TAG CA	0.075	
		probe	FAM-TCT GTT AAT GCA ATG GCG GCG GAT T-TAMRA	0.25	

표 6.11 (이어서)

Pathotype	Target gene	Primer & probe	Sequence(5'-3')	Conc (p/mole)	Reference
ETEC	<i>LT</i>	Forward	TTC CCA CCG GAT CAC CAA	0.075	Hidaka et al.,2009
		Reverse	CAA CCT TGT GGT GCA TGA TGA	0.075	
		probe	FAM-CTT GGA GAG AAG AAC CCT-TAMRA	0.25	
	<i>STp</i>	Forward	GAA CAA CAC ATT TTA CTG CTG TGA ACT	0.075	Iijima et al 2007
		Reverse	GCA CCA ATA CAT ATA ATA TAG AGG GAA TCA	0.075	
		probe	FAM-TGT TGT AAT CCT GCC TGT GCT CCA TGT TAT T-TAMRA	0.25	
<i>STh</i>	Forward	CTG GTT TTG ATT CAA ATG TTC GTG	0.075	Hardegen et al., 2010	
	Reverse	TCC TGA GGG AAA GGT GAA AAA GAC	0.075		
	probe	FAM-TTG ATT TCT TCA TAT TAC CTC CGG ACA TGG CA-TAMRA	0.25		
<i>E. coli</i>	<i>lac Y</i>	Forward	ACC AGA CCC AGC ACC AGA TAA G	0.075	Pavlovic et al 2011
		Reverse	CTG CTT CTT TAA GCA ACT GGC GA	0.075	
		probe	CY5-CAT ACA TAT TGC CCG CCA GTA CAG AC-BHQ2	0.25	
<i>E. coli</i>	<i>16s rRNA</i>	Forward	CAT GCC GCG TGT ATG AAG AA	0.075	Huijssdens et al., 2002
		Reverse	CGG GTA ACG TCA ATG AGC AAA	0.075	
		probe	FAM-TAT TAA CTT TAC TCC CTT CCT CCC CGC TGA A-TAMRA	0.25	

○ 5종 병원성 대장균 및 기타 식중독균에 대한 Real-time PCR의 시험결과는 다음 표와 같음.

표 6.12 Multiplex Conventional PCR에 대한 민감도와 특이도 결과

PCR kit	Positive /Negative	Pathotype	Target gene	Number of positives /Number of strains(%)		
PEC-KU1	Positive	EPEC (Typical, Atypical)	<i>eaeA</i>	15/15 (100)		
			IAC	15/15 (100)		
	Negative	Non- <i>E. coli</i>	<i>eaeA</i>	0/5 (0)		
			IAC	5/5 (100)		
			<i>E. coli</i> (Non-EPEC)	<i>eaeA</i>	0/5 (0)	
			IAC	5/5 (100)		
	Positive	EAEC	<i>aggR</i>	14/14 (100)		
			IAC	14/14 (100)		
			Negative	Non- <i>E. coli</i>	<i>aggR</i>	0/5 (0)
					IAC	5/5 (100)
	<i>E. coli</i> (Non-EAEC)	<i>aggR</i>	0/5 (0)			
		IAC	5/5 (100)			
Positive	EIEC	<i>ipaH</i>	8/8 (100)			
		IAC	8/8 (100)			
		Negative	Non- <i>E. coli</i>	<i>ipaH</i>	1/5 (20)	
				IAC	5/5 (100)	
				<i>E. coli</i> (Non-EIEC)	<i>ipaH</i>	0/5 (0)
				IAC	5/5 (100)	

표 6.12 (이어서)

PCR kit	Positive /Negative	Pathotype	Target gene	Number of positives /Number of strains(%)
PEC-KU2	Positive	ETEC	<i>LT</i>	8/8 (100)
			IAC	8/8 (100)
			<i>STh</i>	9/9 (100)
			IAC	9/9 (100)
			<i>STp</i>	2/2 (100)
			IAC	2/2 (100)
	Negative	Non- <i>E. coli</i>	<i>LT</i>	0/5 (0)
			IAC	5/5 (100)
			<i>STh</i>	0/5 (0)
			IAC	5/5 (100)
			<i>STp</i>	0/5 (0)
			IAC	5/5 (100)
		<i>E. coli</i> (Non-ETEC)	<i>LT</i>	0/5 (0)
			IAC	5/5 (100)
			<i>STh</i>	0/5 (0)
			IAC	5/5 (100)
			<i>STp</i>	0/5 (0)
			IAC	5/5 (100)
PEC-KU3	Positive	EHEC	<i>stx1</i>	7/7 (100)
			IAC	7/7 (100)
			<i>stx2</i>	6/6 (100)
			IAC	6/6 (100)
		EPEC(Typical)	<i>bfp</i>	2/2(100)
			IAC	2/2 (100)

표 6.12 (이어서)

PCR kit	Positive /Negative	Pathotype	Target gene	Number of positives /Number of strains(%)	
PEC-KU3	Negative	Non- <i>E. coli</i>	<i>stx1</i>	0/5 (0)	
			IAC	5/5 (100)	
			<i>stx2</i>	0/5 (0)	
			IAC	5/5 (100)	
			<i>bfp</i>	0/5 (0)	
			IAC	5/5 (100)	
	<i>E. coli</i> (Non-EHEC, EPEC)			<i>stx1</i>	0/5 (0)
				IAC	5/5 (100)
				<i>stx2</i>	0/5 (0)
				IAC	5/5 (100)
				<i>bfp</i>	0/5 (0)
				IAC	5/5 (100)
PEC-KU4	Positive	<i>Escherichia coli</i>	<i>lac Y</i>	63/63 (100)	
			<i>16s rRNA</i>	63/63 (100)	
			IAC	63/63 (100)	
	Negative	Non- <i>E. coli</i>		<i>lac Y</i>	0/5 (100)
				<i>16s rRNA</i>	1/5 (20)
				IAC	5/5 (100)

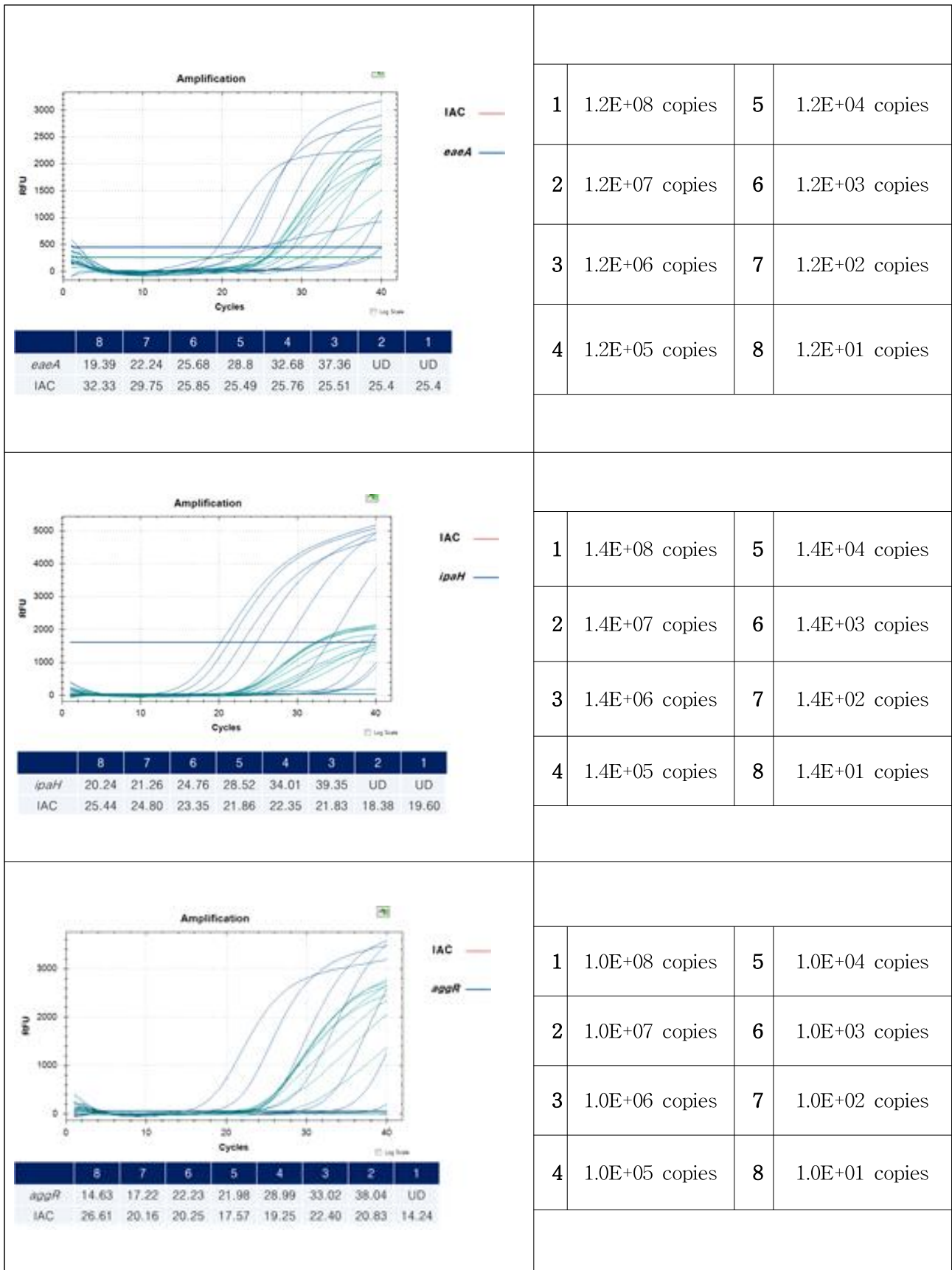
- 5종 병원성 대장균들의 민감도와 특이도를 검정한 결과 Real time PCR에서 표현형과 PCR 결과가 모두 민감도는 100%로 일치하였으며 특이도인 경우 EIEC의 ipaH와 E.coli의 16s rRNA를 제외한 다른 4종의 병원성 대장균은 Real-time PCR에서 음성 대조균의 결과 모두 0%로 특이도는 100% 였다. 또한 lac Y의 PCR 결과로 *E. coli*와 *Shigella spp*를 특이적으로 검정할 수 있었음.
- IAC는 양성 컨트롤 및 음성컨트롤에서 모두 양성반응을 나타내어 PCR이 제대로 수행되었음을 확인 할 수 있었음.

라. 개발된 Real-time PCR의 검출한계

- 순수 배양액에서 Real-time PCR의 검출한계는 아래 표와 같음(표 6.13 및 그림 6.7).
- 검출한계는 *16s rRNA*에서 2log cfu/ml, *stx1*, *stx2*, *aggR*, *LT*, *STh*, *STp*에서 3 log cfu/ml 그리고 나머지 target gene에서는 4log cfu/ml 로 나타났음. IAC는 모든 항목에서 양성반응을 나타내었음.
- 따라서 순수 배양액에서 Real-time PCR의 검출한계는 4log cfu/ml로 이 이상 존재시 본 PCR kit를 이용하여 검출 할 수 있음.

표 6.13 Pure culture에서 Real-time PCR의 검출 한계

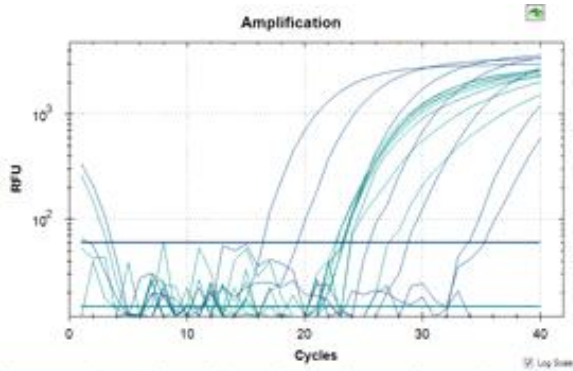
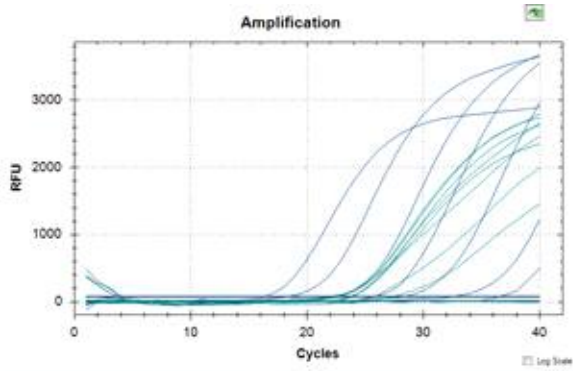
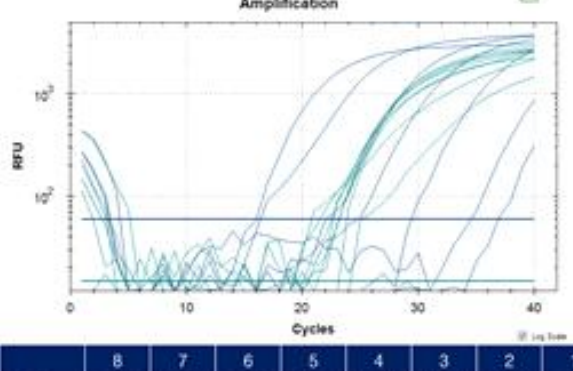
Sample	Target gene	Log cfu/ml								
		8	7	6	5	4	3	2	1	D.W
EPEC	<i>eae A</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EAEC	<i>aggR</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EIEC	<i>ipaH</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ETEC	<i>LT</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>STh</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>STp</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EHEC	<i>stx1</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>stx2</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	<i>lac Y</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	<i>16s rRNA</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+

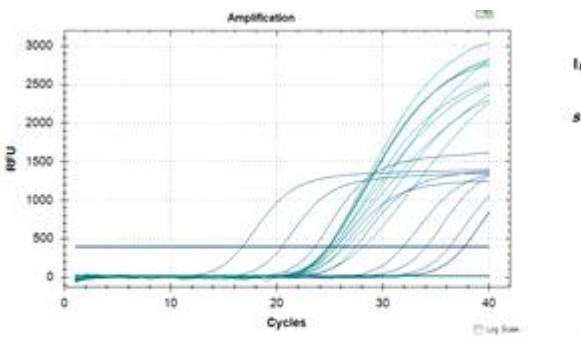
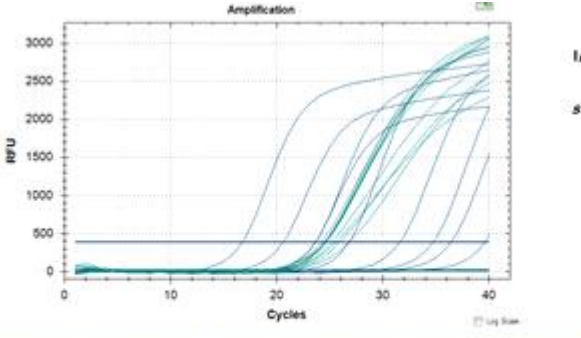
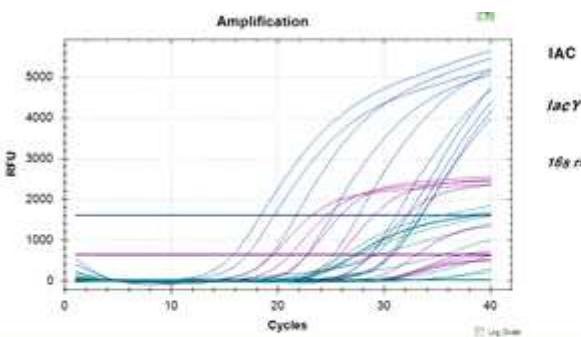


1	1.2E+08 copies	5	1.2E+04 copies
2	1.2E+07 copies	6	1.2E+03 copies
3	1.2E+06 copies	7	1.2E+02 copies
4	1.2E+05 copies	8	1.2E+01 copies

1	1.4E+08 copies	5	1.4E+04 copies
2	1.4E+07 copies	6	1.4E+03 copies
3	1.4E+06 copies	7	1.4E+02 copies
4	1.4E+05 copies	8	1.4E+01 copies

1	1.0E+08 copies	5	1.0E+04 copies
2	1.0E+07 copies	6	1.0E+03 copies
3	1.0E+06 copies	7	1.0E+02 copies
4	1.0E+05 copies	8	1.0E+01 copies

 <table border="1" data-bbox="167 616 790 716"> <thead> <tr> <th></th> <th>8</th> <th>7</th> <th>6</th> <th>5</th> <th>4</th> <th>3</th> <th>2</th> <th>1</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>LT</i></td> <td>16.29</td> <td>19.71</td> <td>23.46</td> <td>25.81</td> <td>29.14</td> <td>34.37</td> <td>35.71</td> <td>UD</td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>IAC</i></td> <td>25.81</td> <td>23.23</td> <td>23.20</td> <td>21.60</td> <td>20.97</td> <td>21.26</td> <td>20.40</td> <td>21.26</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		8	7	6	5	4	3	2	1		<i>LT</i>	16.29	19.71	23.46	25.81	29.14	34.37	35.71	UD		<i>IAC</i>	25.81	23.23	23.20	21.60	20.97	21.26	20.40	21.26		1	1.2E+08 copies	5	1.2E+04 copies
		8	7	6	5	4	3	2	1																									
	<i>LT</i>	16.29	19.71	23.46	25.81	29.14	34.37	35.71	UD																									
	<i>IAC</i>	25.81	23.23	23.20	21.60	20.97	21.26	20.40	21.26																									
	2	1.2E+07 copies	6	1.2E+03 copies																														
3	1.2E+06 copies	7	1.2E+02 copies																															
4	1.2E+05 copies	8	1.2E+01 copies																															
 <table border="1" data-bbox="167 1209 790 1310"> <thead> <tr> <th></th> <th>8</th> <th>7</th> <th>6</th> <th>5</th> <th>4</th> <th>3</th> <th>2</th> <th>1</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>STh</i></td> <td>16.12</td> <td>17.27</td> <td>21.24</td> <td>25.47</td> <td>27.33</td> <td>31.91</td> <td>36.17</td> <td>UD</td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>IAC</i></td> <td>25.13</td> <td>24.11</td> <td>18.26</td> <td>22.56</td> <td>19.14</td> <td>20.31</td> <td>21.50</td> <td>22.11</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		8	7	6	5	4	3	2	1		<i>STh</i>	16.12	17.27	21.24	25.47	27.33	31.91	36.17	UD		<i>IAC</i>	25.13	24.11	18.26	22.56	19.14	20.31	21.50	22.11		1	1.2E+08 copies	5	1.2E+04 copies
		8	7	6	5	4	3	2	1																									
	<i>STh</i>	16.12	17.27	21.24	25.47	27.33	31.91	36.17	UD																									
	<i>IAC</i>	25.13	24.11	18.26	22.56	19.14	20.31	21.50	22.11																									
	2	1.2E+07 copies	6	1.2E+03 copies																														
3	1.2E+06 copies	7	1.2E+02 copies																															
4	1.2E+05 copies	8	1.2E+01 copies																															
 <table border="1" data-bbox="167 1803 790 1904"> <thead> <tr> <th></th> <th>8</th> <th>7</th> <th>6</th> <th>5</th> <th>4</th> <th>3</th> <th>2</th> <th>1</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>STp</i></td> <td>16.03</td> <td>16.32</td> <td>22.02</td> <td>24.78</td> <td>29.34</td> <td>34.51</td> <td>36.89</td> <td>UD</td> <td></td> </tr> <tr> <td><i>IAC</i></td> <td>24.18</td> <td>19.24</td> <td>19.87</td> <td>20.07</td> <td>21.60</td> <td>20.77</td> <td>20.79</td> <td>23.13</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		8	7	6	5	4	3	2	1		<i>STp</i>	16.03	16.32	22.02	24.78	29.34	34.51	36.89	UD		<i>IAC</i>	24.18	19.24	19.87	20.07	21.60	20.77	20.79	23.13		1	1.3E+08 copies	5	1.3E+04 copies
		8	7	6	5	4	3	2	1																									
	<i>STp</i>	16.03	16.32	22.02	24.78	29.34	34.51	36.89	UD																									
	<i>IAC</i>	24.18	19.24	19.87	20.07	21.60	20.77	20.79	23.13																									
	2	1.3E+07 copies	6	1.3E+03 copies																														
3	1.3E+06 copies	7	1.3E+02 copies																															
4	1.3E+05 copies	8	1.3E+01 copies																															

 <table border="1" data-bbox="167 604 750 694"> <thead> <tr> <th></th> <th>8</th> <th>7</th> <th>6</th> <th>5</th> <th>4</th> <th>3</th> <th>2</th> <th>1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>stx1</i></td> <td>16.72</td> <td>20.43</td> <td>23.54</td> <td>27.39</td> <td>31.87</td> <td>34.03</td> <td>36.23</td> <td>37.61</td> </tr> <tr> <td>IAC</td> <td>21.63</td> <td>20.67</td> <td>22.06</td> <td>19.59</td> <td>20.5</td> <td>19.97</td> <td>20.44</td> <td>20.32</td> </tr> </tbody> </table>		8	7	6	5	4	3	2	1	<i>stx1</i>	16.72	20.43	23.54	27.39	31.87	34.03	36.23	37.61	IAC	21.63	20.67	22.06	19.59	20.5	19.97	20.44	20.32													
		8	7	6	5	4	3	2	1																															
	<i>stx1</i>	16.72	20.43	23.54	27.39	31.87	34.03	36.23	37.61																															
	IAC	21.63	20.67	22.06	19.59	20.5	19.97	20.44	20.32																															
	1	1.3E+08 copies	5	1.3E+04 copies																																				
2	1.3E+07 copies	6	1.3E+03 copies																																					
3	1.3E+06 copies	7	1.3E+02 copies																																					
4	1.3E+05 copies	8	1.3E+01 copies																																					
 <table border="1" data-bbox="167 1209 750 1299"> <thead> <tr> <th></th> <th>8</th> <th>7</th> <th>6</th> <th>5</th> <th>4</th> <th>3</th> <th>2</th> <th>1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>stx2</i></td> <td>16.73</td> <td>20.6</td> <td>23.64</td> <td>26.8</td> <td>31.57</td> <td>34.71</td> <td>36.4</td> <td>UD</td> </tr> <tr> <td>IAC</td> <td>21.67</td> <td>20.83</td> <td>20.35</td> <td>18.8</td> <td>20.12</td> <td>19.76</td> <td>18.63</td> <td>19.93</td> </tr> </tbody> </table>		8	7	6	5	4	3	2	1	<i>stx2</i>	16.73	20.6	23.64	26.8	31.57	34.71	36.4	UD	IAC	21.67	20.83	20.35	18.8	20.12	19.76	18.63	19.93													
		8	7	6	5	4	3	2	1																															
	<i>stx2</i>	16.73	20.6	23.64	26.8	31.57	34.71	36.4	UD																															
	IAC	21.67	20.83	20.35	18.8	20.12	19.76	18.63	19.93																															
	1	1.3E+08 copies	5	1.3E+04 copies																																				
2	1.3E+07 copies	6	1.3E+03 copies																																					
3	1.3E+06 copies	7	1.3E+02 copies																																					
4	1.3E+05 copies	8	1.3E+01 copies																																					
 <table border="1" data-bbox="167 1792 750 1926"> <thead> <tr> <th></th> <th>8</th> <th>7</th> <th>6</th> <th>5</th> <th>4</th> <th>3</th> <th>2</th> <th>1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>lacY</i></td> <td>19.59</td> <td>22.8</td> <td>25.89</td> <td>28.73</td> <td>33.05</td> <td>37.52</td> <td>UD</td> <td>UD</td> </tr> <tr> <td><i>16s rRNA</i></td> <td>20.15</td> <td>23.33</td> <td>26.61</td> <td>29.12</td> <td>32.71</td> <td>34.63</td> <td>35.21</td> <td>36.1</td> </tr> <tr> <td>IAC</td> <td>33.21</td> <td>29.67</td> <td>23.48</td> <td>21.62</td> <td>21.4</td> <td>21.52</td> <td>21.58</td> <td>17.72</td> </tr> </tbody> </table>		8	7	6	5	4	3	2	1	<i>lacY</i>	19.59	22.8	25.89	28.73	33.05	37.52	UD	UD	<i>16s rRNA</i>	20.15	23.33	26.61	29.12	32.71	34.63	35.21	36.1	IAC	33.21	29.67	23.48	21.62	21.4	21.52	21.58	17.72				
		8	7	6	5	4	3	2	1																															
	<i>lacY</i>	19.59	22.8	25.89	28.73	33.05	37.52	UD	UD																															
	<i>16s rRNA</i>	20.15	23.33	26.61	29.12	32.71	34.63	35.21	36.1																															
	IAC	33.21	29.67	23.48	21.62	21.4	21.52	21.58	17.72																															
1	1.1E+08 copies	5	1.1E+04 copies																																					
2	1.1E+07 copies	6	1.1E+03 copies																																					
3	1.1E+06 copies	7	1.1E+02 copies																																					
4	1.1E+05 copies	8	1.1E+01 copies																																					

○ 식품 샘플에 병원성 대장균을 인위접종 하고 증균 한 Multiplex Conventional PCR의 검출 한계는 아래 표와 같음(표 6.14 및 6.15).

표 6.14 우유 인위 접종 후 증균 시 Real-time PCR의 검출 한계

Sample	Strain	Target gene	Log cfu/ml								D.W
			8	7	6	5	4	3	2	1	
Milk	EPEC	<i>eae A</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	EAEC	<i>aggR</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	EIEC	<i>ipaH</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ETEC	<i>LT</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		<i>STh</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		<i>STp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	EHEC	<i>stx1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		<i>stx2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Escherichia coli</i>	<i>lac Y</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		<i>16s rRNA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+

표 6.15 Ground beef 인위 접종 후 증균 시 Real-time PCR의 검출 한계

Sample	Strain	Target gene	Log cfu/g									
			8	7	6	5	4	3	2	1	D.W	
Ground beef	EPEC	<i>eae A</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	EAEC	<i>aggR</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	EIEC	<i>ipaH</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ETEC	<i>LT</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		<i>STh</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		<i>STp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	EHEC	<i>stx1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		<i>stx2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Escherichia coli</i>	<i>lac Y</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		<i>16s rRNA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		IAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

마. 결론

- 식품에 균을 접종한 후 검출한계를 검정하는 과정에서는 여러 가지 변수가 존재할 수 있음. 식품에 존재하는 PCR inhibitor들의 영향을 받아 PCR 반응이 저해 될 수 있으며, 정상세균 총의 증균으로 인해 목적균의 성장이 더뎠어 검출 한계 이상으로 까지 증균되지 않기도 함.
- 본 연구팀에서 식품의 인위 접종시 검출한계는 모든 Target gene에서 1 log cfu/ml 로 나타났다. 이는 대장균의 특성상 외부 균의 영향을 적게 받고 빠르게 증균하기 때문인 것으로 보임. 또한 24시간 배양하였으므로 대부분의 샘플이 적어도 4 log cfu./ml 이상의 균 농도를 지니기 때문임.
- 식품 내 존재하는 PCR inhibitor는 DNA extraction kit를 사용함으로써 상당부분 제거하였음. 이는 IAC의 양성 결과로 확인할 수 있었음.
- 따라서 식품 인위 접종 시 Real-time PCR의 검출한계는 1 log cfu/ml로 식품에 존재하는 균의 정확한 검출이 가능함.

제7절 병원성 대장균 검출을 위한 Real-time PCR의 개발을 위한 동결건조

<요약>

- 개발된 키트의 장기 보관을 위해서는 동결건조가 실시 되어야 함.
- 키트는 -20°C 의 냉동고에서 4시간 예비 동결 후 -70°C Ultra-Low freezers에서 8시간 동결시켰으며 동결된 시약을 동결 건조기에서 영하 56°C 온도와 5 mTorr 압력 조건하에 3시간 동결 건조 하였음.
- 동결 건조는 시에는 다양한 동결건조 보호제가 사용되므로 이들에 대하여 D.W 만 사용한 대조군과 평가를 실시하였으며 최종적으로 5% Trehalose가 동결건조 전후 PCR 키트에서 영향을 가장 적게 미치는 것으로 나타나 최종적으로 5% Trehalose가 첨가되어 동결건조를 실시함


1. 서론

- 제조된 PCR kit는 저온상태에 있어도 장기 보관시 Sequence가 끊어지는 등의 원인으로 PCR 반응이 매끄럽게 진행되지 않는 등의 문제가 생김. 이를 보완하기 위해서 PCR kit를 동결건조 하여 안정성을 높여주어야 함.
- 동결건조 (Freeze dry, Lyophilization)는 수용액이나 다량의 수분을 함유한 재료를 동결시키고 감압함으로써 얼음을 승화시켜 수분을 제거하여 건조물을 얻는 방법임. 조작이 저온에서 이루어지므로 열에 약한 물질의 건조법으로 유용함. 또한, 저온에서 건조시켜 분말로 하면 상온에서 장기간 보존할 수 있는 제품을 얻을 수 있음.
- 또한 이 과정에서 동결건조 보호제의 사용이 필수적임. 이는 동결건조시 안정성을 높여 줄 수 있으며 시약의 변성을 억제해줘서 장기간 보관이 가능하게 함.
- 본 연구에서는 동결건조를 이용하여 PCR kit의 장기 보관을 위한 방안을 마련하고자 함.

2. 연구 내용 및 방법

- 동결건조 과정에서 Primer/probe의 안전성을 유지하기 위한 최적의 동결건조 보호제 탐색 및 평가를 실시하였음. 이를 위해서 동결건조 보호제 투입에 따른 PCR 결과 평가 및 동결건조 후 동결건조 보호제에 따른 PCR 결과를 평가하였음(표 7.1).

표 7.1 동결건조에 사용되는 동결건조 보호제에 대한 종류 및 설명

 <p>Bovine serum albumin</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 낮은 온도에서 효소를 안정화 시킴 - DNA polymerase와 dNTP의 동결시 안정성을 확보해줌
 <p>Trehalose</p>	<p>Osmolyte의 일종</p> <ul style="list-style-type: none"> - 동결과 해동과정에서 단백질을 코팅함 - 물분자사이의 수소결합을 촉진시킴 <p>동결건조시 효소의 활성을 유지</p>
 <p>Glycerol</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Glycerol은 액상이나 동결건조 조건에서 고분자를 안정화 시키고 변성을 방지 -빙점이하로 떨어지는 것을 방지하여 안정성을 높임

- 동결건조는 다음과 같이 수행하였음(그림 7.1). 이전 연구에서 확립해 둔 KU-PEC kit, IAC kit 및 Real-time PCR 용 kit를 사용하였으며 Screw cap tube 에 분주하였음.
- PCR kit 에 대한 동결건조 보호제의 영향을 확인하기 위해 4% glycerol, 0.1% BSA 및 0.5% trehalose 를 각각의 PCR assay tube에 첨가하였으며 대조군으로는 D.W를 동량 추가 하였음 (Chua et al., 2011; Klatser et al., 1998).
- 시약의 예비 동결을 위하여 -20℃의 냉동고에서 4시간, -70℃ Ultra-Low freezers (BioFree, korea)에서 8시간 동결시켰으며 동결된 시약을 동결 건조기(FD 5508 system, Ilshin Biobase, korea)에서 영하 56℃ 온도와 5 mTorr 압력 조건하에 3시간 동결 건조 하였 음.

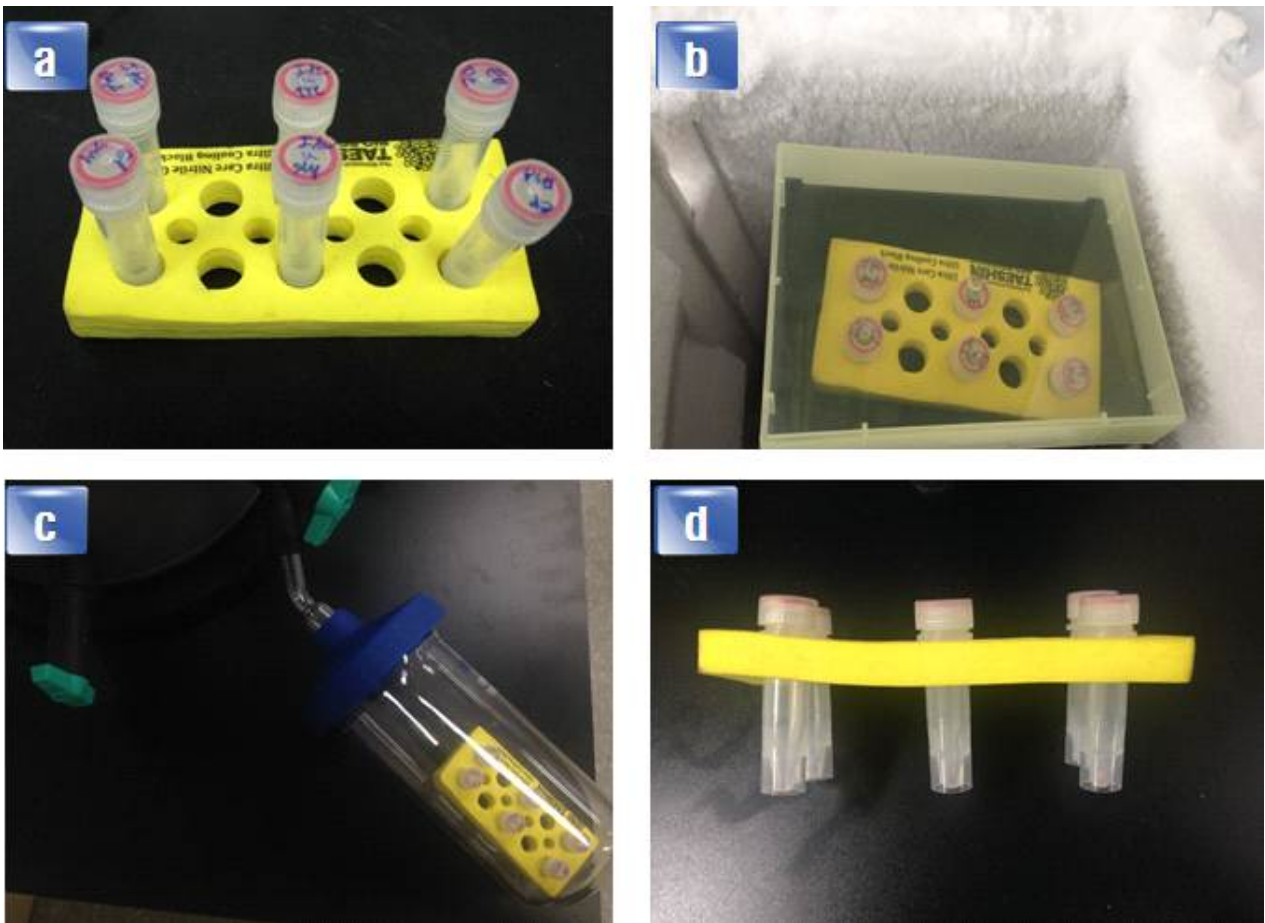


그림 7.1 동결건조 PCR kit의 제작 과정

- (a), PCR kit 의 준비 및 label; (b), -20℃에서 4시간,-70℃에서 8시간 예비 동결; (c), 동결건조; (d), 동결건조 된 PCR kit

3. 연구 결과

- 동결건조 후 동결건조 보호제의 영향을 평가하기 위해 멸균증류수 및 stabilizer를 첨가한 샘플의 양성반응과 음성반응은 stabilizer의 종류에 따라서 검출의 차이를 나타내었음.
- 동결건조 보호제를 사용하지 않은 D.W 시료의 경우, 동결건조후 Conventional PCR 및 Real time PCR에서 위음성 결과를 나타내어 민감도가 다소 떨어지는 결과를 나타내었음.
- 동결건조 보호제로 4% glycerol, 0.1% BSA, 5% Trehalose를 사용하였으며 4% Glycerol 첨가시 Conventional PCR와 Real-time PCR에서 Negative control에 대해 위 양성 결과가 나타났으며 0.1% BSA 첨가 시 Real-time PCR의 Negative control 중 위양성 결과를 나타내었음.
- 5% Trehalose를 stabilizer로 첨가한 tube에서 Conventional PCR, Real-time PCR 및 IAC 양성, 음성 반응에서 동결건조 전과 동일한 결과(민감도:특이도=100%:100%)를 보여 최종적으로 **5% Trehalose를 동결건조 보호제로 선정하였음.**

표 7.2 PCR 결과 대한 동결건조 보호제의 영향

		Real-time PCR					
		Conventional PCR		<i>E. coli</i> Real time PCR		Internal Amplification Control	
		Positive control	Negative control	Positive control	Negative control	Positive control	Negative control
Deionized sterile D.W	Before lyophilized	3/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3
	After lyophilized	2/3	0/3	2/3	0/3	2/3	0/3
4% Glycerol	Before lyophilized	3/3	0/3	3/3	0/3	3/3	1/3
	After lyophilized	3/3	1/3	3/3	1/3	3/3	0/3
0.1% BSA	Before lyophilized	3/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3
	After lyophilized	3/3	0/3	3/3	1/3	3/3	0/3
5% Trehalose	Before lyophilized	3/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3
	After lyophilized	3/3	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3

제8절 병원성 대장균 검출을 위하여 제작한 Real-time PCR 키트의 검증 시험

<요약>

- 개발된 키트 성능의 검증을 위하여 동일한 조건하에 평가 및 검증을 실시하여야 함.
- PCR 키트의 실험법 및 검증을 위한 사용자 편의 프로토콜을 개발하였으며 검증방법으로 인위접종 시료 및 접종균을 준비하고 PCR kit와 배지배양법을 비교, 시험하였음.
- 독립된 2개의 실험실에서 각각 개발된 PCR 키트의 검증을 수행하여 개발된 PCR 키트의 우수한 성능을 검증하였음.

1. 서론

- 개발된 PCR 키트의 검증시험을 위해서는 동일한 조건하에 평가 및 검증을 실시하여야 한다. 일반적으로 식품에서 대장균은 정량적으로 평가 되나 병원성 대장균의 경우에는 식중독을 유발할 가능성이 있으므로 정성으로 평가해야 함.
- 대장균의 검출방법으로 일반적으로 사용되는 방법은 배지법으로 국내를 비롯하여 다양한 국가에서 사용되고 있음. 현재 다양한 선택배지들이 개발되고 있으며 최근에는 Chromogenic Agar를 이용하여 장출혈성 대장균이 가장 많이 검출 되는 Big six STEC Serotype(O26, O45, O103, O111, O121, O145)의 검출에 이용되고 있음.
- 문제는 이러한 배지법으로는 다른 병원성 대장균의 병원성 타입을 판정하기가 어려울 뿐더러 숙달된 전문인력, 다량의 노동력과 시간이 투입되어야 한다는 것임. 이는 병원성 대장균이 비병원성 대장균과 생화학적 특성이 유사하기 때문으로 병원성 대장균 검사를 위해서는 추가적인 검사가 필요함.
- 식품의 경우 유통기한이 존재하므로 시험 검사과정에서 길어질수록 경제적 손실로 이어질 수 있다. 따라서 신속한 검출 방법이 요구됨.
- 본 연구에서는 병원성 대장균을 식품시료에 인위 접종하여 전통적인 배지법과 개발된 PCR kit간의 검출 능력을 비교 분석하고자 함.

2. 연구 내용 및 방법

가. 개발된 키트 실험법의 준비

- 개발된 키트의 검정을 위해서는 동일한 조건 하에서 평가/검증(validation)을 실시하여야 함.
- 동일한 방법으로 실험을 수행하여 키트의 평가/검증을 수행할 때 쉽게 이해하고 재현하기 쉽도록 Flowchart의 실험법을 준비하였음.
- 그림 8.1과 그림 8.2는 Conventional PCR kit와 Real-time PCR kit의 프로토콜을 나타낸 것임.
- 이들 실험법 및 다른 정보들은 AOAC의 Validation 시험법을 차용하여 개발된 키트의 검증을 위해 실험실에서 동일한 조건 하에서 수행될 수 있도록 하기 위하여 제작되었음.



User Guide

Each reaction tube:

1. Add KU-PEC kit(15ul)
2. Add target DNA(5ul)
3. Cap-Mix-Centrifuge
4. Run PCR

PCR condition

Temp.(°C)	Time	Cycle
94	5 min	1
94	30 sec	35
60	30 sec	
72	1 min	1
72	5 min	

Detection kit	Pathogen	Target gene	Bp size
KU-PEC1	EIEC/Shigella	<i>ipaH</i>	619
	EPEC	<i>eeA</i>	390
	EAEC	<i>aggR</i>	254
KU-PEC2	ETEC	<i>LT</i>	322
		<i>STp</i>	239
		<i>STh</i>	147
KU-PEC3	EHEC	<i>stx1</i>	779
	EPEC	<i>bfp</i>	450
KU-PEC4	E. coli	<i>lac Y</i>	1,371
	E. coli/Shigella	<i>16s rRNA</i>	401

Gel electrophoresis

Direct loading to agarose gel (2.5%)



그림 8.1 Conventional PCR detection kit에 대한 사용자 편의 차트식 실험법



User Guide

Each reaction tube:

PEC kit (except E. coli kit)	
Gradient	Volume
Sterile DW	6
PEC kit mix	1
IAC kit mix	1
IAC template	1
Master mix	10
Sample DNA	1
Total	20

E. coli kit	
Gradient	Volume
Sterile DW	5
E.coli kit mix	2
IAC kit mix	1
IAC template	1
Master mix	10
Sample DNA	1
Total	20

PCR condition

Temp.(°C)	Time	Cycle
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	

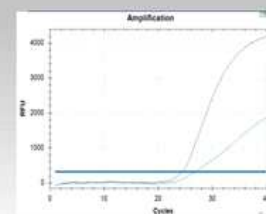


그림 8.2 Real-time PCR kit에 대한 사용자 편의 차트식 실험법

나. 개발된 키트의 검증 시험

- 식품시료 접종을 통한 검증 시험을 위하여 6 종류의 병원성 대장균 균주들이 선택되었음. 선택된 6가지의 서로 다른 표현형을 지닌 병원성 대장균은 다음과 같음.
 - Enteropathogenic *E. coli*(*eaeA*, *bfp*),
 - Enteroinvasive *E. coli*(*ipaH*),
 - Enteroggregative *E. coli*(*aggR*)
 - Enterohemorrhagic *E. coli*(*stx1*, *stx2*)
 - Enterotoxigenic *E. coli*(*LT*, *STh*)
 - Enterotoxigenic *E. coli*(*STp*)

- 또한, 병원성 대장균의 오염과 관련되어 우유, 간 쇠고기가 식품시료가 선택되었으며 이들 식품 시료는 모두 6종의 병원성 대장균이 저농도/고농도 접종 두가지 형태로 인위접종하여 실험에 사용되었음.

- 모든 실험은 본 과제에서 준비되어 제공된 “사용자 편의 프로토콜”에 따라 검증 실험을 수행하였음(그림 8.3).

※ Tryptone Phosphate broth(TP Broth) 배지 조성

TP broth (1L)	1x	2X
Tryptone	20 g	40 g
Tween 80	1.5 ml	3 ml
NaCl	5 g	10 g
K ₂ HPO ₄	2 g	4 g
KH ₂ PO ₄	2 g	4 g

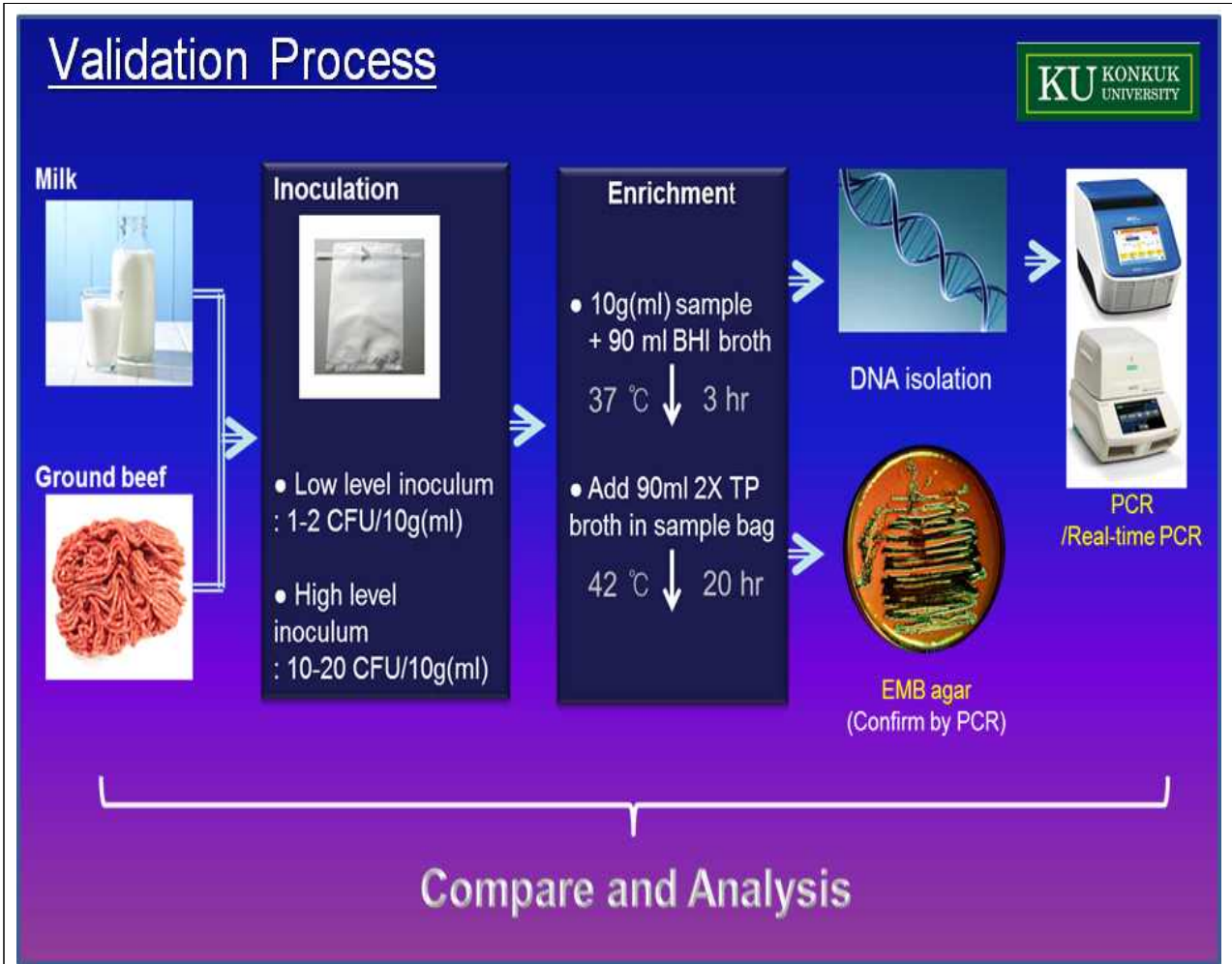


그림 8.3 개발된 키트들의 AOAC에 기초한 검증을 위한 사용자 편의 프로토콜의 요약

○ 그림으로 요약된 “사용자 편의 프로토콜”을 보다 자세히 기술하면 다음 내용과 같음.

<사용자 편의 프로토콜>

- 실험실에서는 각 시료(예, 우유 및 다진 쇠고기)당 12개의 샘플이 준비된다.
- 각 시료의 두 개는 음성대조군과 양성대조군에 사용될 시료이다.
- 나머지 시료 10 개는 인위접종을 수행한다.
- 2 세트의 접종이 수행된다
: high level inoculum (10-20 cfu/10g) 그리고 low level inoculum (1-2 cfu/10g)
(Hidaka et al., 2009 ; Toshima et al., 2004)
- 50g(ml) 시료는 무작위로 선택되어 접종 후 균과 음식물을 잘 섞이게 흔들어 준다.
- 50g(ml)의 시료를 10 g(ml) 로 필터백에 각각 나눈다.
- 시료가 들어있는 필터백에 90ml의 Brain Heart Infusion broth를 첨가하고 이들 시료를 균질화 하기 위하여 멸균 stomacher bags에서 1분간 homogenization 한다.
- 3시간 동안 37°C에서 배양 후 이들 시료에 90ml의 Double Strength Tryptone Phosphate broth를 첨가하고 잘 흔들어 준 뒤 20시간 동안 42°C 에서 증균 배양한다.
- 배양한 시료 중 일부는 멸균 loop를 이용하여 EMB 배지에 streaking 하고 일부는 Intron 사의 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit (for Bacteria) 를 사용하여 DNA를 추출한다.
- EMB agar 배지는 B. cereus를 위한 standard selective medium이다
- 추출된 DNA는 PCR 및 real-time PCR 실험에 사용하고 EMB 배지에서 얻어지는 대장균 의심 집락은 Colony 를 증균 배양 후 DNA를 추출하여 PCR로 확정한다.
- Culture method 및 PCR/ Real-time PCR 서로의 결과를 비교 분석한다.
- 접종 및 비접종 음식 시료에서의 DNA 추출은 G-Spin™ Genomic DNA extraction Kit [For Bacteria] (Intron Bio)를 사용하여 준비한다.
- 그림 8.4는 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit의 추출 프로토콜을 요약하여 보여준다.
- 이 프로토콜은 실험 수행자들의 이해를 돕고 DNA 추출 과정을 동일하게 하기 위하여 준비되었다.



G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit [for Bacterial]
Briefed Protocol

Add 1 ml homogenate to a 1.5 ml collection tube → centrifuge (13000 × g for 1 min) → decant supernatant

Add 300 ul of G-Buffer solution, and invert-mix well

Incubate at 65 °C for 15min)

Add 250 ul of Binding Buffer, and completely mix well by pipetting(at least 10 times) or gently vortexing

Cell lysates loading on column and centrifuge at 13,000 rpm for 1 min

To wash, add 500 ul of Washing Buffer A to column and centrifuge for 1 min at 13,000 rpm

Remove solution. Add 500 ul of Washing Buffer B to column and centrifuge for 1 min at 13,000 rpm

Remove solution and centrifuge for 1 min at 13,000 rpm

Place the G-spin™ column in a clean 1.5ml microcentrifuge tube, and add 100ul of Elution Buffer directly onto the membrane

Incubate at RT for 1 min, and the centrifuge for 1 min at 13,000 rpm

그림 8.4 음식 시료에서 DNA 추출을 위한 사용자 편의 프로토콜의 요약.

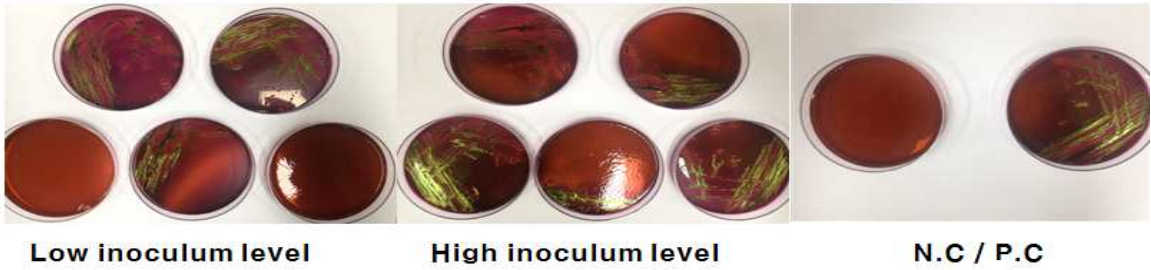
3. 연구 결과

가. 제1 실험실 결과

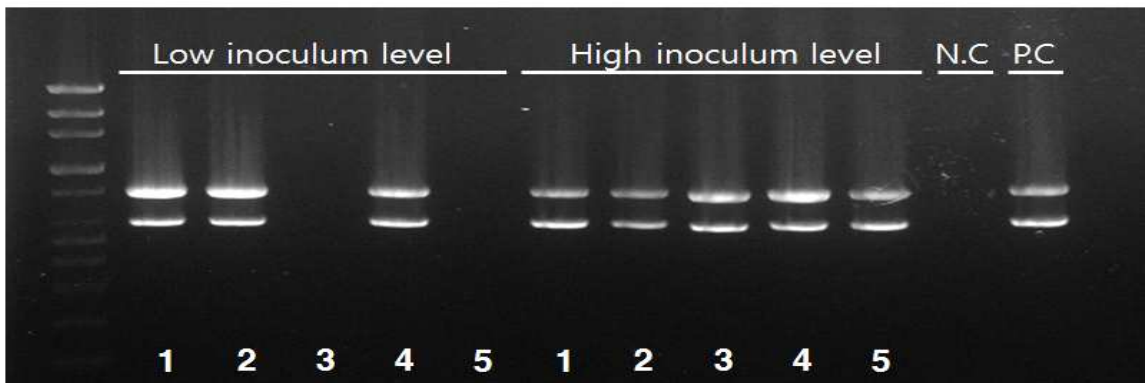
- 식품시료의 접종 결과는 표 8.1와 표 8.2에 제시되어있음. 그림 8.5는 결과의 예를 보여줌.
- 대조군으로 인위접종한 샘플에서는 양성인 결과가, 인위접종하지 않은 샘플은 음성인 결과를 얻어 식품시료에 병원성 대장균이 자연적으로 오염되어 있지 않았다는 것을 확인할 수 있었음.
- 표 8.1에서는 우유에서 병원성 대장균 인위접종 후 결과를 정리한 것임. 우유에 병원성대장균을 낮은 접종량으로 인위접종 하였을 시 20~100%의 양성 결과를 나타내었음.
- 이 중 100%가 나타난 샘플은 EPEC로 이는 병원성 대장균의 경우 적은양이 접종되어 있어도 증균 과정에서 검출 한계 이상으로 증균되었기 때문으로 보임.
- 또한 우유는 살균 우유로 정상세균총이 존재하지 않아 병원성 대장균만 증균이 되었기 때문에 위와 같은 결과가 나타났음.
- 높은 접종량으로 인위접종한 경우 모든 샘플에서 100% 양성인 결과를 나타냈으며 양성 컨트롤과 음성컨트롤 결과 또한 정확하게 나타났음.
- 표 8.2는 쇠고기(ground beef)에서 병원성 대장균 인위접종 후 결과를 정리한 것임.
- 간 쇠고기에 병원성대장균을 낮은 접종량으로 인위접종 하였을 시 40~80%의 양성 결과를 나타내었음.
- 대부분은 배지법과 PCR법의 결과가 일치 하였으나 EHEC의 결과에서 배지법 보다 PCR법에서 검출률이 더 높았음. 이는 간 쇠고기의 경우 정상세균총이 존재하고 있으며 일부에서는 대장균의 오염이 존재한다는 것을 의미함.
- 이 샘플 또한 대장균이 일부 존재하는 샘플이었으나 배지법으로 의심집락을 선택 후 계대배양하여 PCR로 병원성 대장균 유무를 판정한 결과 이는 비병원성 대장균으로 판정되었음.
- 따라서 전통적인 배지법의 문제인 비병원성 대장균과 병원성 대장균의 차이를 확인 할 수 없었으므로 위양성 결과 가능성이 있었으나 배지법에 PCR 법으로 병원성 대장균 여부를 판정하여 이를 최종적으로 음성 판정하였음.
- 높은 접종량으로 인위접종한 경우 모든 샘플에서 100% 양성인 결과를 나타내었음.

Milk

1. Media



2. PCR



3. Real-time PCR

Milk, EHEC(stx1)

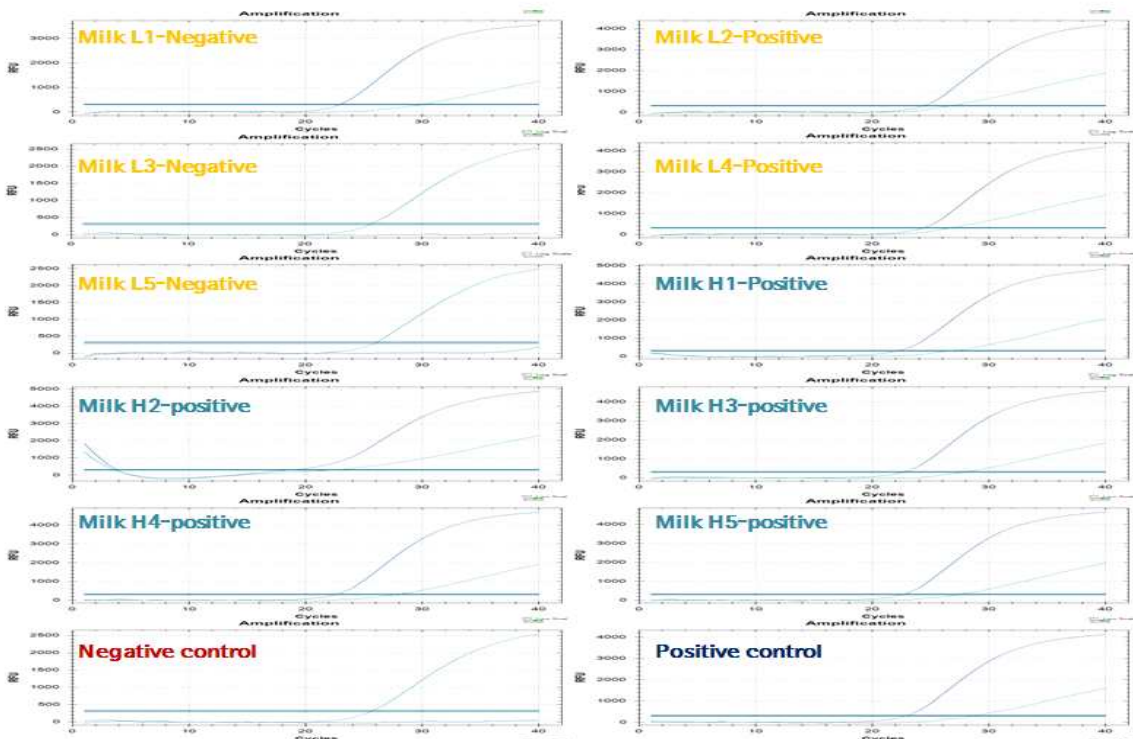


그림 8.5 병원성 대장균(EHEC)에 대한 식품시료(우유)에서의 검증 결과.

표 8.1 병원성 대장균에 대한 식품시료(우유)에서의 검증 결과.

Sample	PEC	Method	Inocula(CFU/10g)		Positive control	Negative control	
			1-2	10-20			
Milk	EHEC	Media	3/5	5/5	1/1	0/1	
		PCR	<i>stx1</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
			<i>stx2</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>stx1</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
			<i>stx2</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
	ETEC (LT, STh)	Media		2/5	5/5	1/1	0/1
		PCR	<i>LT</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
			<i>STh</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>LT</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
	<i>STh</i>		2/5	5/5	1/1	0/1	
	ETEC (STp)	Media		3/5	5/5	1/1	0/1
		PCR	<i>STp</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>STp</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
	EAEC	Media		3/5	5/5	1/1	0/1
		PCR	<i>aggR</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>aggR</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
	EIEC	Media		1/5	5/5	1/1	0/1
		PCR	<i>ipaH</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
			<i>16s</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
			<i>rRNA</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
qPCR		<i>lac Y</i>	1/5	5/5	1/1	0/1	
		<i>ipaH</i>	1/5	5/5	1/1	0/1	
	<i>16s</i>	1/5	5/5	1/1	0/1		
EPEC	Media		5/5	5/5	1/1	0/1	
	PCR	<i>eaeA</i>	5/5	5/5	1/1	0/1	
		<i>bfp</i>	5/5	5/5	1/1	0/1	
	qPCR	<i>eaeA</i>	5/5	5/5	1/1	0/1	

표 8.2 병원성 대장균에 대한 식품시료(간 쇠고기)에서의 검증 결과.

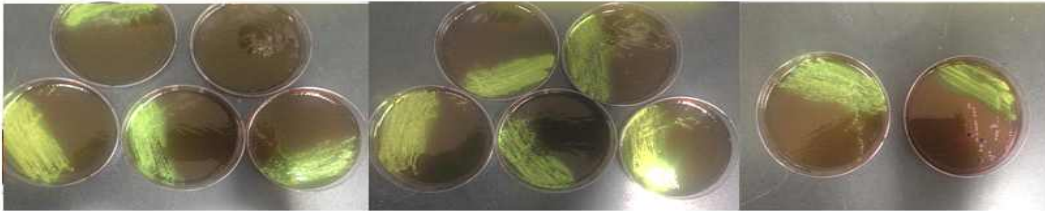
Sample	PEC	Method	Inocula(CFU/10g)		Positive control	Negative control	
			1-2	10-20			
Ground beef	EHEC	Media	1/5	5/5	1/1	0/1	
		PCR	<i>stx1</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
			<i>stx2</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>stx1</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
			<i>stx2</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
	ETEC (LT, STh)	Media	4/5	5/5	1/1	0/1	
		PCR	<i>LT</i>	4/5	5/5	1/1	0/1
			<i>STh</i>	4/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>LT</i>	4/5	5/5	1/1	0/1
			<i>STh</i>	4/5	5/5	1/1	0/1
	ETEC (STp)	Media	4/5	5/5	1/1	0/1	
		PCR	<i>STp</i>	4/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>STp</i>	4/5	5/5	1/1	0/1
	EAEC	Media	4/5	5/5	1/1	0/1	
		PCR	<i>aggR</i>	4/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>aggR</i>	4/5	5/5	1/1	0/1
	EIEC	Media	3/5	5/5	1/1	0/1	
		PCR	<i>ipaH</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
			<i>16s</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
			<i>rRNA</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
<i>lac Y</i>			3/5	5/5	1/1	0/1	
qPCR		<i>ipaH</i>	3/5	5/5	1/1	0/1	
		<i>16s</i>	3/5	5/5	1/1	0/1	
	<i>rRNA</i>	3/5	5/5	1/1	0/1		
EPEC	Media	4/5	5/5	1/1	0/1		
	PCR	<i>eaeA</i>	4/5	5/5	1/1	0/1	
		<i>bfp</i>	4/5	5/5	1/1	0/1	
	qPCR	<i>eaeA</i>	4/5	5/5	1/1	0/1	

나. 제 2 실험실 결과

- 식품시료의 접종 결과는 표 8.3와 표 8.4에 제시되어있음. 그림 8.6은 결과의 예를 보여줌.
- 컨트롤로 인위접종한 샘플에서는 양성인 결과가, 인위접종하지 않은 샘플은 음성인 결과를 얻었으며 식품시료에 병원성 대장균이 자연적으로 오염되어 있지 않았다는 것을 확인할 수 있음.
- 표8.3은 우유에서 병원성 대장균 인위접종 후 결과를 정리한 것이다. 우유에 병원성대장균을 낮은 접종량으로 인위접종 하였을 시 20~100%의 양성 결과를 나타내었다. 병원성 대장균의 경우 1-2 cfu/10g의 적은양으로 접종되어 있어도 증균 과정에서 검출 한계 이상으로 증균되어 약간의 차이로 검출률이 달라진다. 또한 시료로 사용된 우유는 살균된 제품으로 정상세균총이 존재하지 않음.
- 높은 접종량으로 인위접종한 경우 모든 샘플에서 100% 양성인 결과를 나타냈으며 양성 컨트롤과 음성컨트롤 결과또한 정확하게 나타났다.
- 표 8.4에서는 간 쇠고기에서 병원성 대장균 인위접종 후 결과를 정리한 것이다. 간 쇠고기에 병원성대장균을 낮은 접종량으로 인위접종 하였을 시 20~80%의 양성 결과를 나타내었다. 배지법과 PCR/qPCR의 결과가 다소 차이가 있으며 PCR/qPCR의 결과가 배지법보다 우세하였다. 이는 간 쇠고기의 경우 정상세균총이 존재하여 병원성 대장균 접종시 증균과정에서 경쟁집락이 우세하게 증균되는 경우인 것으로 보임.
- 일부 시료에서는 대장균의 오염이 되어있는데 이 샘플 또한 대장균이 일부 존재하는 샘플이었으나 의심집락을 PCR로 검정한 결과 비병원성 대장균으로 판정됨.
- 따라서 전통적인 배지법을 이용한 병원성 대장균 검출 시 집락의 형태만으로는 위양성 결과 가능성이 있으나 PCR/qPCR 법을 통하여 이러한 위양성 결과를 배제할 수 있음.

Beef

1. Media

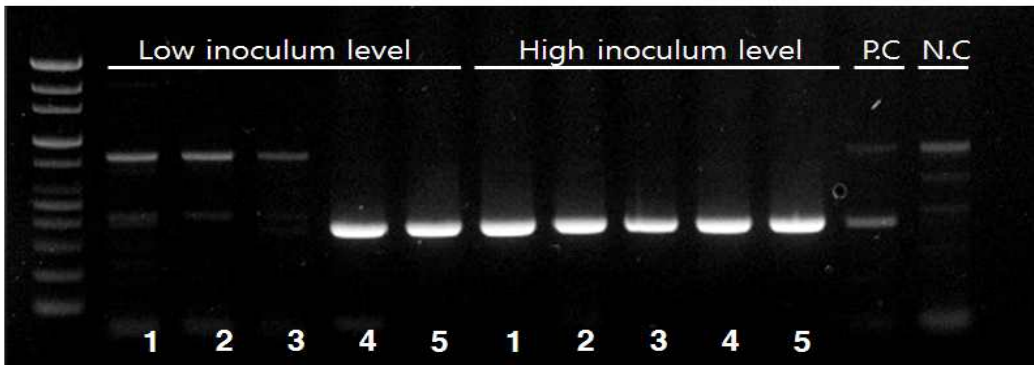


Low inoculum level

High inoculum level

P.C / N.C

2. PCR



3. Real-time PCR

Beef, EPEC (eaeA)

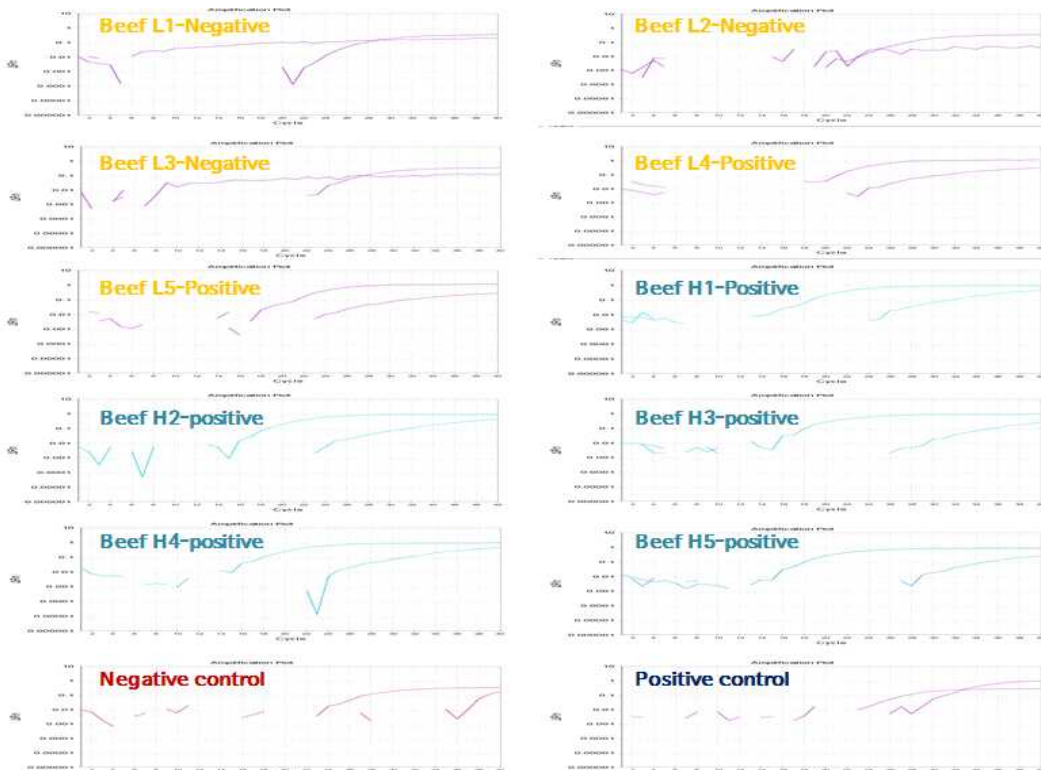


그림 8.6 병원성 대장균(EPEC)에 대한 식품시료(소고기)에서의 검증 결과.

표 8.3 병원성 대장균에 대한 식품시료(우유)에서의 검증 결과.

Sample	PEC	Method	Inocula(CFU/10g)		Positive control	Negative control	
			1-2	10-20			
Milk	EHEC	Media	2/5	5/5	1/1	0/1	
		PCR	<i>stx1</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
			<i>stx2</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>stx1</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
			<i>stx2</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
	ETEC (LT, STh)	Media		1/5	5/5	1/1	0/1
		PCR	<i>LT</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
			<i>STh</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>LT</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
			<i>STh</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
	ETEC (STp)	Media		3/5	5/5	1/1	0/1
		PCR	<i>STp</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>STp</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
	EAEC	Media		5/5	5/5	1/1	0/1
		PCR	<i>aggR</i>	4/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>aggR</i>	5/5	5/5	1/1	0/1
	EIEC	Media		1/5	5/5	1/1	0/1
		PCR	<i>ipaH</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
			<i>16S rRNA</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
			<i>lac Y</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
qPCR		<i>ipaH</i>	1/5	5/5	1/1	0/1	
		<i>16S rRNA</i>	1/5	5/5	1/1	0/1	
		<i>lac Y</i>	1/5	5/5	1/1	0/1	
EPEC	Media		4/5	5/5	1/1	0/1	
	PCR	<i>eaeA</i>	3/5	5/5	1/1	0/1	
		<i>bfp</i>	4/5	5/5	1/1	0/1	
	qPCR	<i>eaeA</i>	4/5	5/5	1/1	0/1	

표 8.3. 병원성 대장균에 대한 식품시료(간 쇠고기)에서의 검증 결과.

Sample	PEC	Method	Inocula(CFU/10g)		Positive control	Negative control	
			1-2	10-20			
Ground beef	EHEC	Media	1/5	5/5	1/1	0/1	
		PCR	<i>stx1</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
			<i>stx2</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>stx1</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
			<i>stx2</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
	ETEC (LT, STh)	Media	3/5	5/5	1/1	0/1	
		PCR	<i>LT</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
			<i>STh</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>LT</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
			<i>STh</i>	3/5	5/5	1/1	0/1
	ETEC (STp)	Media	1/5	5/5	1/1	0/1	
		PCR	<i>STp</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>STp</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
	EAEC	Media	1/5	5/5	1/1	0/1	
		PCR	<i>aggR</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>aggR</i>	1/5	5/5	1/1	0/1
	EIEC	Media	2/5	5/5	1/1	0/1	
		PCR	<i>ipaH</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
			<i>16s rRNA</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
		qPCR	<i>lac Y</i>	2/5	5/5	1/1	0/1
<i>ipaH</i>			2/5	5/5	1/1	0/1	
<i>16s rRNA</i>			2/5	5/5	1/1	0/1	
<i>lac Y</i>		2/5	5/5	1/1	0/1		
EPEC	Media	2/5	5/5	1/1	0/1		
	PCR	<i>eaeA</i>	3/5	5/5	1/1	0/1	
		<i>bfp</i>	3/5	5/5	1/1	0/1	
	qPCR	<i>eaeA</i>	3/5	5/5	1/1	0/1	

다. 결론

- 컨트롤로 인위접종한 샘플에서는 양성인 결과가, 인위접종하지 않은 샘플은 음성인 결과를 얻어 식품시료에 병원성 대장균이 자연적으로 오염되어 있지 않았다는 것을 확인할 수 있었음. 이것은 본 실험이 제대로 수행되었음을 의미함.
- 두 개의 식품시료(우유와 간 쇠고기)에 병원성 대장균을 인위접종하여 증균후 전통적인 배지법과 개발된 PCR 법을 비교하였을 때의 결과는 거의 동일하나, 간 쇠고기의 경우에서 PCR 법이 배지법보다 나은 결과를 보여주었음.
- 이는 매우 낮은 접종량일 때 이러한 경향을 나타내었으며 높은 접종량으로 인위접종한 샘플은 배지법이든 PCR법이든 모두 양성인 결과를 나타내었다.
- 매우 낮은 접종량에서 양성 반응이 비교적 많이 나타난 이유는 병원성 대장균은 식중독균의 증균속도보다 빠르게 증균이 가능하다. 따라서 g(ml)당 0.1~0.2 CFU 로 접종이 되어도 24시간 증균 시에는 샘플에 균이 매우 적게 존재한다 하더라도 양성 반응이 나타날 수 있음.
- 특히 정상세균총이 거의 존재하지 않는 식품 시료인 우유에서는 증균과정에서 병원성 대장균만 증균되므로 배지법과 PCR 법이 동일한 결과를 나타냄. 그러나 간 쇠고기의 경우 정상세균총이 존재하며 증균과정에서 정상 세균총이 증균하게 됨.
- 또한 일부 샘플의 경우 비병원성 대장균이 오염이 되어 있어 배지법만으로는 비병원성 대장균을 판정할 수 없었음. EMB 배지에서 나타난 의심 집락을 Nutrient agar에 계대하여 배양 후 Colony에서 DNA를 추출하였고 이를 PCR 등을 이용하여 병원성을 판정한 결과 비병원성 대장균을 배제 할 수 있었고, 이러한 이유로 간 쇠고기에서 배지법과 PCR 법은 PCR 법이 일부 우세하게 나타났음.
- 또한 배지법의 경우 선택배지에 증균액broth를 도말하고 증균후 의심집락을 계대배양하는 등의 과정에서 시간이 최소 이틀이 소요되므로, PCR 법은 증균 배양 단계에서 DNA를 추출하여 빠르게 병원성 대장균을 검출 할 수 있음.
- 따라서 기존 배지법의 단점을 보완하면서 식품 시료에서 신속하고 정확하게 5종의 병원성 대장균을 검출 할 수 있는 PCR kit의 개발이 이루어 졌음.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

<1세부>

구분 (연도)	세부연구목표	달성 도(%)	연구개발 수행내용
1 차 년 도	B. cereus 구토/설사형 동시검출 multiplex conventional PCR 기법 최적화	100	- B. cereus 구토/설사형 동시검출을 위한 최적 primer 후보군 재선발함 및 multiplex PCR 기반기술 재검증 및 PCR 최적화 조건 재설정 및 검증
	다양한 구토/설사형 B. cereus 분리균주를 대상으로 한 optimization test	100	- B. cereus 표준균주 및 야생 균주(축산/환경/임상/식품 유래 300여 균주)에서 PCR primer 성능 검증 및 Inclusivity/exclusivity test 및 검출한계 (detection limit) test
	실제시료에서 개발된 동시검출용 multiplex PCR 기술 검증	100	- 순수배양액 및 식품에서 multiplex PCR 검증 및 최소 검출한계 평가
2 차 년 도	B. cereus 구토/설사형 동시검출용 multiplex real-time PCR primer/probe 개발	100	- multiplex conventional PCR 개발 확보된 독소 특이 마커 DB 활용하여 B. cereus 구토/설사형 동시검출용 real-time PCR primer set 제작
	B. cereus 구토/설사형 동시검출용 kit 개발을 위한 multiplex real-time PCR 최적화	100	- multiplex real-time PCR kit 최적화 농도 및 반응 온도 조건 설정 - 개발된 PCR kit의 inclusivity/exclusivity test 및 검출한계 test
3 차 년 도	실제 시료에서 개발된 multiplex real-time PCR의 정량분석 효율 검증 및 PCR kit 시제품 개발	100	- 실제시료(축산/환경/임상/식품)에서의 real-time PCR 효율 검증 - 동결건조 기술을 활용한 사용자-편이 one-step PCR kit 시제품 개발
	개발된 multiplex conventional / real-time PCR kit 현장 적용테스트	100	- kit 최적화 농도 및 온도조건 설정 - 시제품의 민감도, 특이도, 검출율 등 - 기존 표준 검사법과 비교검증 시험함
	개발된 PCR kit의 AOAC gold standard method에 따른 검증	100	- 검증 시험에 여러 균주의 순수배양액 및 농식품 및 환경 시료에서 인위접종 및 자연 오염도 검출능 비교 - AOAC 기반 검증법으로 개발된 키트 및 기존 표준 검사법(배지 배양법) 결과를 동시 비교 및 통계적 유의성 평가함
총 괄	구토 및 설사형 바실러스 세레우스 동시 검출을 위한 Multiplex Conventional PCR 키트 및 Multiplex Real-Time PCR 키트의 개발	100	- 구토/설사 독소생성 바실러스 세레우스의 신속 동시검출용 multiplex PCR kit 및 multiplex real-time PCR 키트를 개발 및 시제품을 제작하고 AOAC 기반 검증법 및 다양한 시료에서의 적용 및 성능 분석 완료함

<1 협동>

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년도	5대 병원성 대장균의 특이 유전자 데이터베이스 구축 및 마커 개발	100	- Web of Science 및 Pubmed를 통한 문헌 검색 및 Database화 완료
	Primer/Probe 후보군 탐색	100	- In silico PCR 및 BLAST 등의 과정을 통한 Primer/probe 후보군의 도출 완료
	Internal amplification Control (IAC) 탐색 및 개발	100	- VHSV를 이용한 Heterogenous Internal amplification control의 개발 완료
2차년도	병원성 대장균 5종 동시신속검출 IAC 내재 multiplex conventional PCR 및 multiplex real-time PCR 개발	100	- 제작된 kit의 민감도 및 특이도 조사 - 제작된 kit의 검출 한계 조사
	특수 동결건조 기술을 활용한 사용자 편이 one-step PCR 키트 시제품 개발	100	- 동결건조기술을 사용하여 개발된 kit의 안전성을 높임
3차년도	AOAC 가이드라인에 따른 국제 공인법 인증을 위한 Validation Study	100	- AOAC 가이드 라인의 시험 분석법을 차용하여 제작된 kit의 유효성 평가
	개발된 기술의 필드 테스트	100	- PCR kit의 필드 테스트를 통한 유효성 평가
총괄	5 종 병원성 대장균 검출을 위한 Multiplex Conventional PCR, Internal amplification control, Real-time PCR 키트의 개발	100	- 5종 병원성 대장균을 검출 할 수 있는 Conventional PCR, Real-time PCR 및 IAC 키트의 개발 및 시제품 제작 그리고 성능 분석 완료

제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

(1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		신품종				(예시) 유전자원 등록	논문		기타 (학회발표)
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표	1							1	1	
	달성	6							2	2	
2차 년도	목표	1							2	2	
	달성	0	4						3	0	
3차 년도	목표	2	1						2	2	
	달성	3	1						5	2	
4차 년도	목표										
	달성								(2)		
5차 년도	목표										
	달성										
계	목표	4	1						5	5	
	달성	9	5						10	4	6

* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

** 연구성과는 연구계획에 따라 도출된 것으로 예시와 같이 작성

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타 (홍보전시)
활용건수	목표	2	2				
	달성	3	2				1*

*행사 명칭: 2013 제11회 인터비즈 바이오파트너링 & 투자포럼, 행사장소: 제주도 휘닉스 아일랜드, 행사일: 2013.07.03-05, 행사유형: 제품설명회, 참여품목: 구토, 설사독소 생성 바실러스 세레우스 동시신속검출용 멀티플렉스 중합효소연쇄반응 프라이머 세트

나. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Improvement of modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar by addition of potassium clavulanate for detecting <i>Camylobacter</i> spp. in chicken carcass rinse	Jung-whan Chon	Kun-Ho Seo	Hyunsook Kim Hong-Seok Kim	International journal of food microbiology	165	국외	SCI
2013	Prevalence, characterization, and antimicrobial susceptibility of <i>Salmonella Gallinarum</i> isolated from eggs produced in Conventional or organic farms in South Korea	Soo-kyung Lee	Kun-Ho Seo	Jung-Whan Chon, Kwang-Young Song, Ji-Yeon Hyeon, Jin-San Moon	Poultry Science	92	국외	SCI
2013	생리활성 펩타이드를 함유하는 치즈 유청단백질 가수분해물로부터 기능성 건강음료 개발에 관한 연구: 총설	유성호	송광영	서건호 천정환 김현숙 임종수 윤성식 백현동 윤여창	Journal of Korean Dairy Technology and Science Association	31 (2)	국내	비SCI
2013	발효낙농유제품인 Kefir 다양한 기능 및 특성: 총설	천정환	송광영	김현숙 김동현 김홍석 정동관 김수기 서건호	Journal of Korean Dairy Technology and Science Association	31 (2)	국내	비SCI
2014	Comparison of 3 Selective Media for Enumeration of <i>Bacillus cereus</i> in Several Food Matrixes	Jung-whan Chon	Kun-Ho Seo	Kwang-Young Song	Journal of Food Science	79 (12)	국외	SCI
2014	Improved multiplex PCR detection of <i>Bacillus cereus</i> group and its toxic strains in food and environmental samples	Fereidoun Forghani	Deog-Hwan Oh	Kun-Ho Seo	African Journal of Microbiology Research	8 (47)	국외	SCI
2014	Enterotoxigenic profiling of emetic toxin- and enterotoxin-producing <i>Bacillus cereus</i> , Isolated from food, environmental, and clinical samples by multiplex PCR	Fereidoun Forghani	Deog-Hwan Oh	Jung-Beom Kim	Journal of Food Science	79 (11)	국외	SCI
2015	비살균 원유로 만든 다양한 치즈의 안전성에 관한 연구: 총설	김홍석	송광영	천정환 임종수 김현숙 김동영 김수기 서건호	Journal of Korean Dairy Technology and Science Association	33	국내	비SCI
2015	Sodium Chloride가 치즈의 품질에 미치는 영향과 저염치즈 개발 기술: 총설	천정환	송광영	김현숙 김동현 김홍석 정동관 김수기 서건호	Journal of Korean Dairy Technology and Science Association	33	국내	비SCI
2015	Growth Inhibition of <i>Cronobacter sakazakii</i> in Experimentally	Dong-Hyeon Kim	Kun-Ho Seo	Jung-Wjan Chon Il-Byeong Kamg	Journal of Food	78 (9)	국외	SCI

	Contaminated Powdered Infant Formula by Kefir Supernatant			Hyunsook Kim Hong-Seok Kim Kwamg-Young Song	Protection			
2015	Characterization of <i>Escherichia coli</i> -Producing Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Isolated from Chicken Slaughterhouses in South Korea	Jong-Soo Lim	Kun-Ho Seo	Da-Som Choi Young-Jo Kim Jung-Whan Chon Hong-Seok Kim Hyun-Jung Park Jin-San Moon Sung-Hwan Wee	FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE	12	국외	SCI
2015	Incidence, Antimicrobial Resistance, and Molecular Characteristics of Nontyphoidal <i>Salmonella</i> Including Extended-Spectrum β -Lactamase Producers in Retail Chicken Meat	Dasom Choi	Kun-Ho Seo	Jung-Whan Chon Hong-Seok Kim Dong-Hyeon Kim Jong-Soo Lim Jin-Hyeok Yim	Journal of Food Protection	78	국외	SCI
2015	Rapid detection of viable <i>Bacillus cereus</i> emetic and enterotoxigenic strains in food by coupling propidium monoazide and multiplex PCR (PMA-mPCR)	Fereidoun Forghani	Deog-Hwan Oh	Taimour Langaee, Mohammad Eskandari, Kun-Ho Seo, Mi-Ja Chung	Food control	55	국외	SCI
2015	A novel pentaplex real time (RT)-PCR high resolution melt curve assay for simultaneous detection of emetic and enterotoxin producing <i>Bacillus cereus</i> in food	Fereidoun Forghani	Deog-Hwan Oh	Singh, P. Kun-Ho Seo,	Food control	60	국외	SCI
2015* (Submit)	Pathogenic <i>Escherichia coli</i> isolated from slaughter house environment	임진혁	서건호	천정환, 김동현	International journal of food microbiology	-	국외	SCI
2015* (Submit)	Multiplex PCR method with internal amplification control distinguish <i>Shigella spp</i> and enteroinvasive <i>escherichia coli</i> in ready to eat vegetables	임진혁	서건호	천정환, 김홍석	International journal of food microbiology	-	국외	SCI

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록 번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록 번호
2013	실린지 필터를 이용한 개선된 캄필로박터 검출방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0018267	2014	실린지 필터법을 활용한 개선된 캄필로박터 검출방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-1478310
2013	실린지 필터를 이용한 개선된 캄필로박터 검출방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0018266	2014	실린지 필터를 이용한 개선된 캄필로박터 검출방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-1478311
2013	캄필로박터와 ESBL 생성 대장균 간의 색깔 구분이 가능한 새로운 크롬배지	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0088139	2014	실린지 필터를 이용한 개선된 캄필로박터 검출방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-1478312
2013	실린지 필터를 이용한 개선된 캄필로박터 검출방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0018265	2014	캄필로박터와 ESBL 생성 대장균 간의 색깔 구분이 가능한 새로운 크롬배지	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-1459711
2013	트리클로산과 디옥시콜레이트가 첨가된 개선된 배지 조성물 및 그 용도	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0127908	2015	트리클로산과 디옥시콜레이트가 첨가된 개선된 배지 조성물 및 그 용도	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-1507371
2013	트리클로산과 디옥시콜레이트가 첨가된 개선된 배지 조성물 및 그 용도	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2013-0127909					
2015	5종 병원성 대장균 검출용 프라이머 조성물 및 그 검출방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0190487					
2015	바실러스 세레우스의 독소 유전자 실시간 검출용 키트	강원대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0023661					
2015	바실러스 세레우스의 독소 유전자 검출용 키트	강원대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0023660					

라. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계
-	3,000,000	매출정율사용료 (매출액의3%)	3,000,000+α
-	-	매출정율사용료 (매출액의3%)	(향후 매출액의3%)
20,000,000	20,000,000	-	20,000,000

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
3	2	1			3		1		2

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

사. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 2건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
	3		3			

※ 기술이전 및 실용화·산업화 계획<1세부>

○ 기술이전 1 : 본 연구를 통하여 개발된 기술 ‘바실러스 세레우스의 독소 유전자 검출용 키트(특허번호: 10-2015-0023660, 2015.02.16.)’에 대하여 국내기업인 진성유니텍에 기술이전을 수행하였으며, 이를 통한 기술의 상용화를 진행 중임

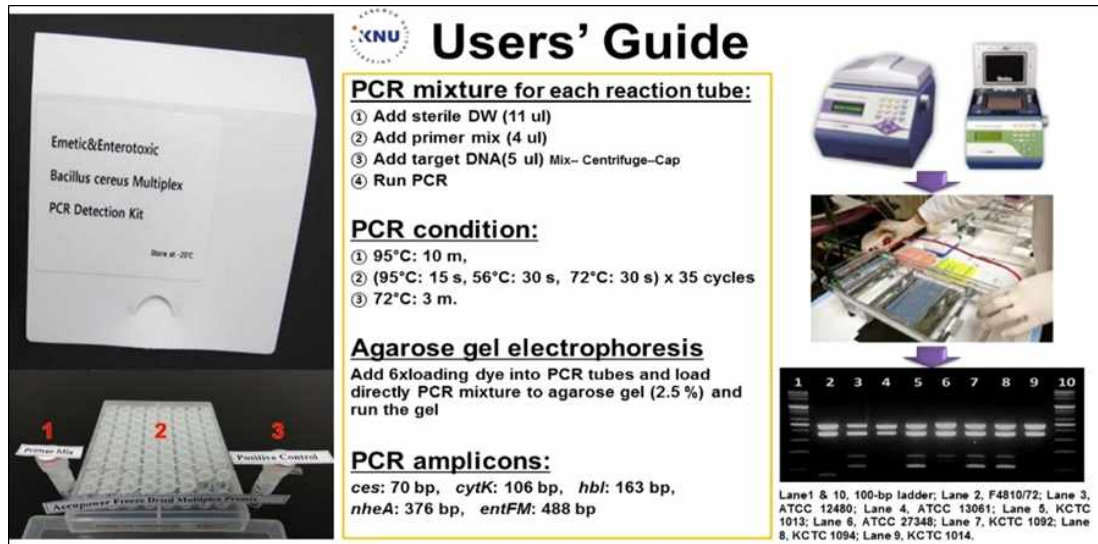
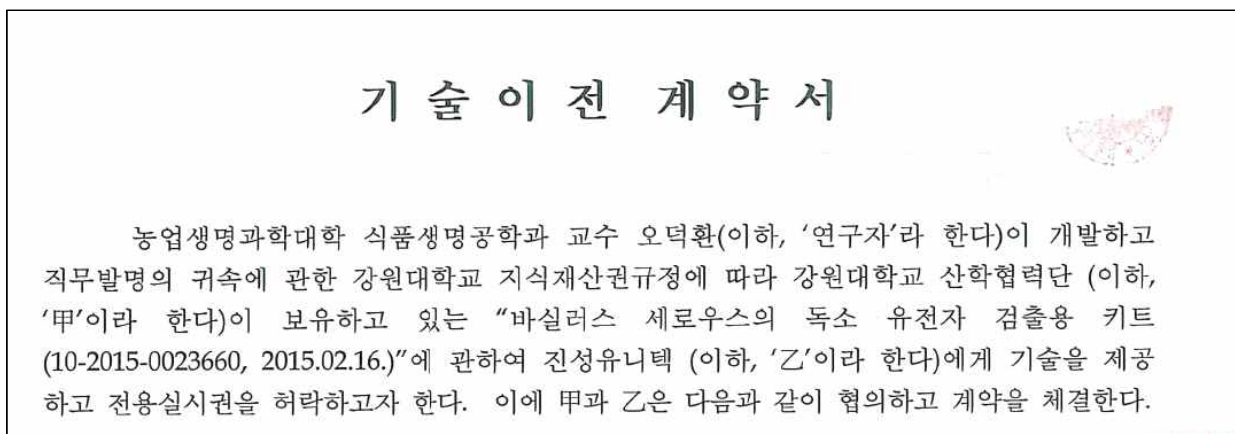


그림 5.1 구토 및 설사형 바실러스 세레우스 세균을 동시에 검출할 수 있는 Multiplex PCR detection kit 시제품(왼쪽) 및 사용설명서 예시.

<기술이전 계약서(1) 사본의 일부>



※ 기술이전 및 실용화·산업화 계획<1세부>

- 기술이전 2 : 본 연구를 통하여 개발된 기술 ‘바실러스 세레우스의 독소 유전자 실시간 검출용 키트(특허번호: 10-2015-0023661, 2015.02.16.)’에 대하여 국내기업인 진성유니텍에 기술이전을 수행하였으며, 이를 통한 기술의 상용화를 진행 중임

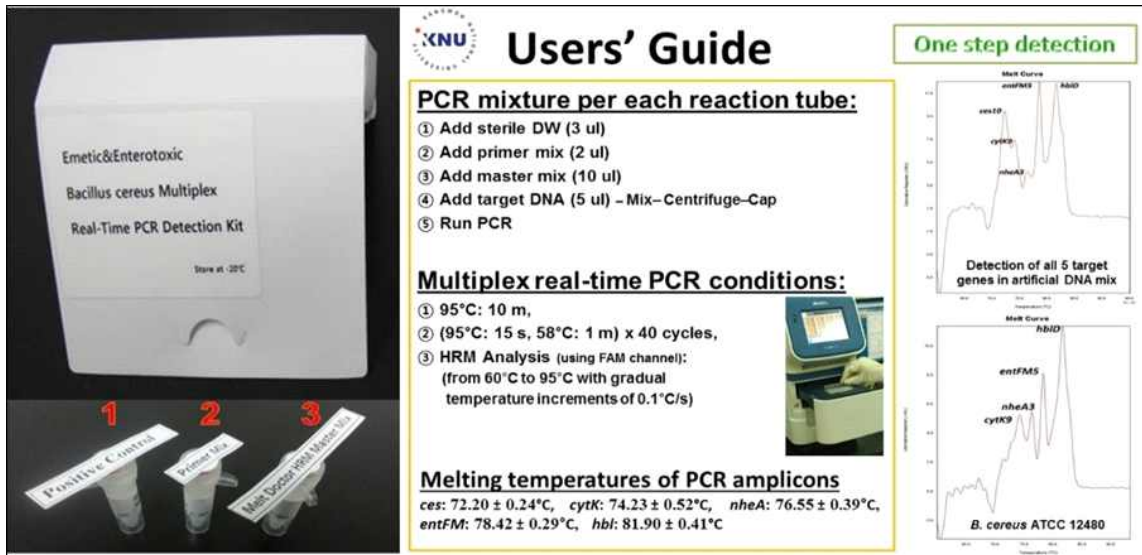


그림 5.2 구토 및 설사형 바실러스 세레우스 세균을 동시에 검출할 수 있는 Multiplex Real-time PCR kit 시제품(왼쪽) 및 사용설명서 예시.

<기술이전 계약서(2) 사본의 일부>

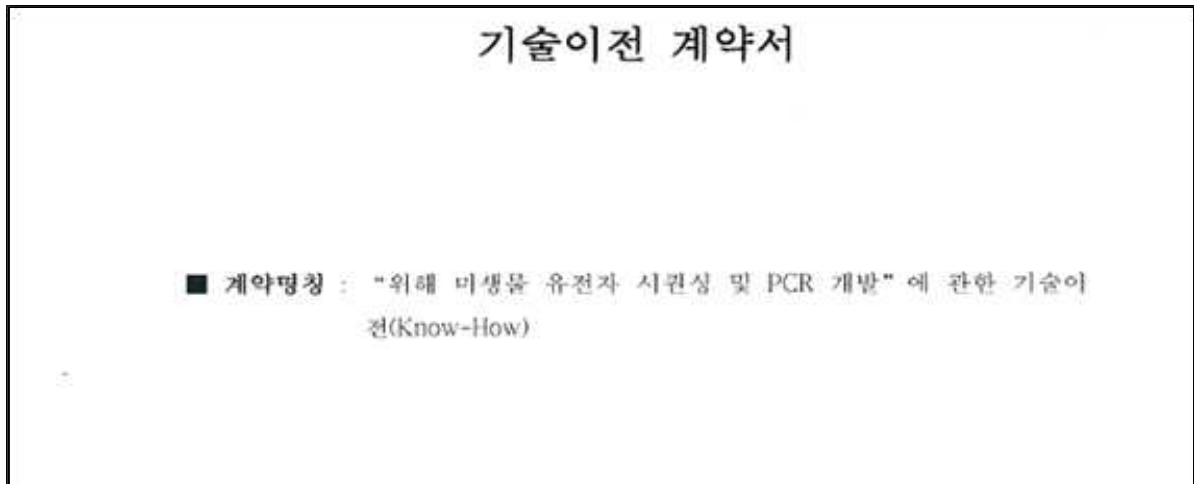
기술이전 계약서

농업생명과학대학 식품생명공학과 교수 오덕환(이하, '연구자'라 한다)이 개발하고 직무발명의 귀속에 관한 강원대학교 지식재산권규정에 따라 강원대학교 산학협력단 (이하, '甲'이라 한다)이 보유하고 있는 "바실러스 세레우스의 독소 유전자 실시간 검출용 키트(10-2015-0023661, 2015.02.16.)"에 관하여 진성유니텍 (이하, '乙'이라 한다)에게 기술을 제공하고 전용실시권을 허락하고자 한다. 이에 甲과 乙은 다음과 같이 협의하고 계약을 체결한다.

※ 기술이전 및 실용화·산업화 계획<1협동>

- 기술이전 3 : 본 연구를 통하여 개발된 “위해 미생물 유전자 시퀀싱 및 PCR 개발”에 관한 기술이전(통상실시권)을 참여기업 **센서젠**에 이전하여 실시함.

<기술이전 계약서(3) 사본의 일부>



※ 기술이전 및 실용화·산업화 계획<1협동>

- 본 연구를 통하여 5종 병원성 대장균 검출할 수 있는 Conventional PCR, Real-time PCR 및 Internal Amplification Control 등 총 3종의 키트를 제작하여 시제품을 제작하고 이들에 대한 실제 적용 실험을 완료하였음.
- 따라서 본 연구 결과에 의한 시제품은 실제 산업화에 대한 모든 준비가 완료된 상태임.
- 개발된 병원성 대장균 검출 PCR 키트는 현재 체외진단(동물용) 의료기기 인허가를 위하여 인허가 컨설팅 업체인 ‘코아엠’ 과 협업 중에 있음.
- 현재 필요 서류 및 자료의 제출과 농림축산 검역 검사본부의 심사를 거친 상태이며 추가적인 과정 이후 의료기기 제조품목 허가가 이루어 질 것으로 전망함.



**KU-PEC Detection kit
For Conventional PCR**



**KU-PEC Detection kit
For Real-time PCR**



**KU-IAC kit
For Real-time PCR**

그림 5.3 5종 병원성 대장균을 동시에 검출할 수 있는 PCR 및 Real-time PCR kit, Real-time PCR에 적용할 수 있는 Internal amplification control kit의 시제품들.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 바실러스 세레우스에 대한 Multiplex PCR 기술에 대한 문헌정보

- 검색어로 “Bacillus cereus” and “multiplex PCR”를 사용하여 ‘PubMed’ 웹사이트에서 검색하면 바실러스 세레우스 관련 논문 8086건, multiplex PCR 관련 논문 15,073건 그리고 이들 모두를 포함한 관련 논문은 총 34건의 검색 결과를 얻을 수 있음(표 1)
- 이 중에서 직접 관련성이 높은 논문은 최근 10년간(2005년부터 2016년까지) 10여 편에 불과하고 이중 2편은 본연구팀의 논문에 해당함(표 2)
- 본 연구팀 및 다른 연구자들의 결과를 분석하면, 대부분 바실러스 세레우스의 설사 관련, 즉 장독소(enterotoxins) 유전자를 타겟으로 하여 동시 검출할 수 있는 multiplex PCR 기법을 개발하고 식품시료 등에 이들 기법을 적용한 결과들을 발표하였음.
- 그러나 바실러스 세레우스에 의한 식중독 유형은 설사형과 구토형이며, 이들 설사 및 구토 독소 생성 바실러스 세레우스를 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR 및 multiplex real-time PCR 방법을 발표한 연구팀은 본 연구팀이 현재 세계적으로 유일함.

표 1. NCBI의 PubMed에서 “Bacillus cereus” 및 “Multiplex PCR”를 검색어로 [all fields]에서 검색한 결과들의 요약표

대상국가	전세계
논문 DB	PubMed [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/]
검색기간	전체
검색범위	주제어(영문)
검색결과 1	Bacillus cereus -> 총 8086건
검색결과 2	Multiplex PCR -> 총 15073건
검색결과 3	“Bacillus cereus” and “multiplex PCR” -> 총 34편
검색결과 4	[검색결과3]에서 실제 관련 논문들 -> 총 10편(최근 10년간)
	이 중에서 3편은 본 과제 결과물인 저자들의 논문임

표 2. NCBI의 PubMed에서 “Bacillus cereus” and “Multiplex PCR”를 검색어로 [all fields]에서 검색한 결과 중에서 관련성이 높은 논문들의 목록 예(selected papers)

번호	논문 제목	저널명 및 년도	분석 (장단점 요약)
1	Detection of viable enterotoxin-producing <i>Bacillus cereus</i> and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR.	J Dairy Sci. 2016	설사독소들을 타겟으로 한 PCR 방법으로 신선채소류와 유아용우유에 적용함. 구토독소 생성세균은 검출 못함
2	A novel multiplex PCR discriminates <i>Bacillus anthracis</i> and its genetically related strains from other <i>Bacillus cereus</i> group species.	PLoS One. 2015	탄저균 검출을 위한 PCR 기법으로 본과제와는 간접적으로 연관됨
3	Rapid detection of viable <i>Bacillus cereus</i> emetic and enterotoxic strains in food by coupling propidium monoazide and multiplex PCR (PMA-mPCR)	Food Control 2015	본 연구팀의 결과임. 구토 및 설사 독소 생성 바실러스를 동시에 검출함. 특히 생균만을 특이적으로 검출 가능함
4	Enterotoxigenic profiling of emetic toxin- and enterotoxin-producing <i>Bacillus cereus</i>, Isolated from food, environmental, and clinical samples by multiplex PCR.	J Food Sci. 2014	본 연구팀의 결과임. 구토 및 설사 독소 생성 바실러스를 동시에 검출함
5	Multiplex PCR assay for the detection of enterotoxic <i>Bacillus cereus</i> group strains and its application in food matrices.	Indian J Microbiol. 2010	설사독소들을 타겟으로 한 PCR 방법으로 여러 식품에 적용함. 구토독소 생성세균은 검출 못함
6	Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxinogenic <i>Bacillus cereus</i> .	J Microbiol Methods. 2009	설사독소들을 타겟으로 한 PCR 법과 면역법 및 세포배양법을 비교함
7	Prevalence and toxigenic profiles of <i>Bacillus cereus</i> isolated from dried red peppers, rice, and Sunsik in Korea.	J Food Prot. 2009	한국의 여러 시료에서 분리한 바실러스에서 독소 유전자들의 존재 양상을 분석함
8	Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among <i>Bacillus thuringiensis</i> and <i>Bacillus cereus</i> as shown by novel primers.	Int J Food Microbiol. 2008	설사독소들을 타겟으로 한 PCR 방법으로 여러 식품에 적용함. 구토독소 생성세균은 검출 못함
9	Simultaneous detection and identification of <i>Bacillus cereus</i> group bacteria using multiplex PCR.	J Microbiol Biotechnol. 2007	바실러스 세레우스 그룹을 동시에 검출할 수 있는 방법. 독소 생성에 집중하지 않음
10	Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the <i>Bacillus cereus</i> group.	J Food Prot. 2005	바실러스 세레우스의 독소생성 균주들에 multiplex PCR을 적용한 선구적 연구임. 그러나 구토 및 설서형 독소 생성세균을 동시검출 못함

제7장 연구시설·장비 현황

- * 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술
- * 구매금액이 3천만원 이상인 연구시설 장비 구매현황 (※해당사항 없음)

연구시설·장비명	구매금액(원)	구매일자	연구시설·장비 활용용도	설치장소	국가과학 기술지식 정보시스템 등록번호
<div style="text-align: left; padding-left: 5px;">(※해당사항 없음)</div>					

제8장 연구실 안전관리 이행실적

<1세부>

1. 연구실 안전 관리

(1) 실험실 안전 교육 및 훈련

- ① 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제18조 및 시행령 제17조에 의하여 2015년도 1학기 개강에 따라 연구활동종사자 안전의식 고취와 사고예방을 위한 연구실 안전교육을 실시를 요청을 받아, 본 연구실에서는 신규자 및 일반연구활동종사자에 대하여 자체 교육을 실시한 후 교육 결과를 관련부서에 제출하였음. 교육기간: 2015년 3월 11일 ~ 3월 31일.
- ② 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제18조(교육·훈련 등)에 따라 연구실 안전정보시스템에서 상시연구활동종사자의 안전교육을 이수하였음. 교육기간: 2015년 3월 19일 ~ 4월 12일.

(2) 실험실 연구활동종사자 건강검진

- ① 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제18조4항에 의하여 교내 유해물질 취급 연구실에 소속된 연구활동종사자의 건강검진을 학교에서 지정해준 장소에서 받았음. 검진기간: 2015년 11월 23일
- ② 산업안전보건법 시행규칙 제100조 제2항(제1차 검사항목) 규정에 의하여 과거병력, 작업경력, 및 자각·타각증상(시진, 촉진, 청진 및 문진), 혈압·혈당·요당·요단백 및 빈혈검사, 흉부방사선 간접 촬영, 혈처 지·오·티 및 지·피·티, 감마 지·티·피 및 총콜레스테롤 항목을 검사하였음.

(3) 실험실 안전 점검

- ① 강원대학교 2015년도 연구실 안전관리 추진 계획에 따라 아래와 같이 실험실 안전 점검을 받았음.

점검구분	점검내용	실시주기 (실시시기)	점검주체	비고
일상점검	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 연구실 정리정돈 상태 ▪ 실험시기 및 재료 이상 유무 	매일 1회 (실험 전)	연구활동 종사자	
월간점검	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 연구실 시설 외관상태 점검 ▪ 안전교육대장, 일상점검일지, MSDS 등 안전자료의 검토 	매월 1회 (매월 4일)	연구활동 종사자	
정밀안전진단	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 화공, 전기, 기계, 가스 등 각 분야 전문가에 의한 점검 ▪ 연구실 공기질 측정등 	1회/2년 (5~6월)	전문기관 용역 의뢰	
특별안전점검	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 연구실 안전관리 중점관리 대상 연구실 방문 및 지도점검 	연중	시설관리 과	별도 계획수립

(4) 실험실 보험 가입

- ① 가입인원: 이공계대학 대학(원)생 및 연구원 약 10,000명
- ② 가입기간: 201. 06. 08 - 2016. 06. 08 (1년간)
- ③ 보장내용: 사망·장애 1억원, 부상·질병 1천만원

<1협동>

1. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

(1) 실험실 안전 점검

위험등급	점검주기	분류 기준
A등급	분기 1회	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
B등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실
C등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

(2) 실험실 정밀안전진단 실시

- 실험실안전관리규정에 의거 실험실의 위험정도에 따라, A,B,C로 관리등급을 분류하여, 실험실환경안전점검을 실시하고 있으며, 안전점검실시 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 전무기관에 의뢰하여 정밀 안전진단을 실시함.

2. 교육 훈련

(1) 관련근거

- 연구실 안전환경 조성에 관한 법령 제 18조, 동법 시행령 제 17조 및 동법 시행규칙 제 9 조 실험실 안전관리 규정 제 16조(안전교육), 제 17조(안전교육의 관리)

(2) 교육대상

- 실험실을 출입하는 모든 이용자 (교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등

(3) 안전교육 시간 및 수료인정기간

- 출입하는 실험실의 위험등급(A, B, C등급) 및 전공특성에 따라 안전교육을 받아야 하며, 1년에 8시간 이상 교육이수 필수
- 수료인정기간은 수료증의 수료인정기간 까지(유효기간이 지나면 재교육 이수)

(4) 안전교육 과정

- 전공특성에 따라 A,B,C 코스로 구분하여 교육 실시
- A코스 : 생물·방사선 취급
- B코스 : 화학·가스 취급
- C코스 : 전기·기계 취급

(5) 안전교육절차



3. 안전관리추진계획

- 각 실험 단과대학별 안전관리실무위원회 구성 및 운영
- 교내 전체 건물 소방시설 통합관리체계(FMS) 구성
- 실험실 내부 점검실시 후 실험등급 지정표찰 부착
- 건물별 복도 및 비상계단 통로 확보와 불법 사무실 철거
- 사이버 안전 교육 훈련

4. 2015년도 연구실 안전공제 증권

- 공제가입기간 : 2015.05.04 15시 ~ 2016.05.04. 15시(366일)
- 공제가입금액 : 사망/후유장해(1급시) : 100,000,000원, 상해 : 10,000,000원
- 총 공제료 : 53,391,000원

제9장 참고문헌

- Agata, N., Ohta M, Arakawa Y, Mori M. 1995. The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxin protein. *Microbiology*. 141, 983-988.
- Alarcon, B., Vicedo B, Aznar R. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. *J. Appl. Microbiol.* 100: 352 - 364 (2005).
- Bentley, R, and Meganathan, R. (1982). Biosynthesis of Vitamin K (menaquinone) in Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 46(3), pp.241-280.
- Bischoff, C., Lüthy, J., Altwegg, M., Baggi, F., 2005. Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* 61, 335 - 341. doi:10.1016/j.mimet.2004.12.007
- Bueris, V., Sircili, M.P., Taddei, C.R., Dos Santos, M.F., Franzolin, M.R., Martinez, M.B., Ferrer, S.R., Barreto, M.L., Trabulsi, L.R., 2007. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 839 - 844. doi:10.1590/S0074-02762007005000116
- Chang, Y.H., Shangkuan, Y.H., Lin, H.C., Liu, H.W. PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4502-4510 (2003).
- Cho, K.M., Kambiranda D.M., Kim S.W., Math, R.K., Lim, W.J., Hong, S.Y., Yun, H.D. Simultaneous detection of food-borne pathogenic bacteria in ready-to-eat kimbab using multiplex PCR method. *Food Sci. Biotechnol.* 17(6): 1240 - 1245 (2008).
- Chua, A.L., Elina, H.T., Lim, B.H., Yean, C.Y., Ravichandran, M., Lalitha, P., 2011. Development of a dry reagent-based triplex PCR for the detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae*. *Journal of Medical Microbiology* 60, 481 - 485. doi:10.1099/jmm.0.027433-0
- Ehling-Schulz, M., Guinebretiere MH, Monthan A, Bergo O. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 232 - 240 (2006).
- Elizaquível, P., Gabaldón JA, Aznar R. Quantification of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in non-spiked food products and evaluation

of real-time PCR as a diagnostic tool in routine food analysis. *Food control* 22: 158 - 164 (2011).

Feldsine, C., Abeyta C, Andrews WH. 2002. AOAC international methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. AOAC International OMA Program Manual, Appendix X, May 2002.

Forghani, Fereidoun, Jung-Beom Kim, Deoh-Hwan Oh. 2014. Enterotoxigenic Profiling of Emetic Toxin- and Enterotoxin-Producing *Bacillus cereus*, Isolated from Food, Environmental, and Clinical Samples by Multiplex PCR. *Journal of Food Science*. 79(11), 2288-2293.

Forghani, Fereidoun, Prashant Singh, Kun-Ho Seo, Deog-Hwan Oh. 2016. A novel pentaplex real time (RT)-PCR high resolution melt curve assay for simultaneous detection of emetic and enterotoxin producing *Bacillus cereus* in food. *Food Control*. 60, 560-568.

Forghani, Fereidoun, Taimour Langae, Mohammad Eskandari, Kun-Ho Seo, Mi-Ja Chung, Deog-Hwan Oh. 2015. Rapid Detection of Viable *Bacillus cereus* Emetic and Enterotoxic Strains in Food by Coupling Propidium Monoazide and Multiplex PCR (PMA-mPCR). *Food Control*. 55, 151-157.

Franck, S.M., Bosworth, B.T., Moon, H.W., Franck, S.M., Bosworth, B.T., 1998. Multiplex PCR for Enterotoxigenic , Attaching and Effacing , and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains from Calves Multiplex PCR for Enterotoxigenic , Attaching and Effacing , and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains from Calves 36, 1 - 4.

Fricker, M, Messelhäußer U, Busch U, Scherer S, Ehking-Schulz M. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(6): 1892 - 1898 (2007).

Fujioka, M., Kasai, K., Miura, T., Sato, T., Otomo, Y., 2009. Rapid diagnostic method for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 62, 476 - 480.

Fujioka, M., Otomo, Y., Ahsan, C.R., 2013. A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods* 92, 289 - 292. doi:10.1016/j.mimet.2012.12.010

Granum, PE. *Bacillus cereus* and food poisoning. In applications and systematics of *Bacillus* and relatives. pp. 37 - 46. In: Berkeley R, Heyndrickx M, Logan N, De Vos P. Eds.

Blackwell Publishing, Oxford (2002).

Guinebretiere, MH, Broussolle V, Nguyen-The C. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3053-3056 (2002).

Guion, C.E., Ochoa, T.J., Walker, C.M., Barletta, F., Cleary, T.G., 2008. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology* 46, 1752 - 7. doi:10.1128/JCM.02341-07

Gunzburg, S.T., Tornieporth, N.G., and Riley, L.W. 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *Journal of Clinical Microbiology* 33(5):1375-1377.

Hardegen, Christoph, Sabine Messler, Birgit Henrich, Klaus Pfeffer, Jens Würthner, and Colin R. MacKenzie. "A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital." *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* 9, no. 1 (2010): 1.

Hägglom, MM, Apetroaie C, Andersson MA, Salkinoja-Salonen MS. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus* produced under various conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5): 2479 - 2483 (2002).

Hidaka, a., Hokyo, T., Arikawa, K., Fujihara, S., Ogasawara, J., Hase, a., Hara-Kudo, Y., Nishikawa, Y., 2009. Multiplex real-time PCR for exhaustive detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* 106, 410 - 420. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04043.x

Huijsdens, Xander W., et al. "Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR." *Journal of Clinical Microbiology* 40.12 (2002): 4423-4427.

Iijima, Yoshio, Shinobu Tanaka, Kanji Miki, Shizuko Kanamori, Masahiro Toyokawa, and Seishi Asari. "Evaluation of colony-based examinations of diarrheagenic *Escherichia coli* in stool specimens: low probability of detection because of low concentrations, particularly during the early stage of gastroenteritis." *Diagnostic microbiology and infectious disease* 58, no. 3 (2007): 303-308.

Jang, JH, Lee NA, Woo GJ, Park JH. Prevalence of *Bacillus cereus* group in rice and distribution of enterotoxin genes. *Food Sci. Biotechnol.* 15: 232 - 237 (2006).

- Jenson, I, Moir C. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In Hocking eds. Foodborne microorganisms of public health significance. pp. 445 - 478. 6th Ed. AIFST Inc, Australia (2003).
- Jinneman, Karen C., Joy G. Waite-Cusic, and Ken J. Yoshitomi. "Evaluation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) method for the detection and identification of STEC O104 strains from sprouts." *Food microbiology* 30.1 (2012): 321-328.
- Kim, Jung Beom, Cheol Woo Kim, Seung Hak Cho, Wan Seob No, Wang June Kim. 2015. Proposal of statistical sampling plans for *Bacillus cereus* in Korean fermented soybean pastes. *Food Science and Biotechnology*. 24(2), 765-770.
- Kim, GH, Forghani F, Oh DH. Rapid detection of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains using triple-primer polymerase chain reaction (PCR) assay. *African J. Microbiol. Research*. 7(8): 620-625 (2013).
- Kim, JB, Kim JM, Cho SH, Oh HS, Choi NJ, Oh DH. Toxin genes profiles and toxin production ability of *Bacillus cereus* isolated from clinical and food samples. *J. Food Sci*. 76: 25-29 (2011).
- Kim, JB, Kim JM, Kim CH, Seo KS, Park YB, Choi NJ, Oh DH. Emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean isolates contain genes encoding diarrheal-related enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol*. 144: 182-186 (2010b).
- Kim, JB, Kim JM, Kim YS, Kim JH, Park YB, Choi NJ, Oh DH. Comparison of enterotoxin production and phenotypic characteristics between emetic and enterotoxic *Bacillus cereus* strains. *J. Food Protect*. 73: 1219-1224 (2010a).
- Kim, JH, Lim EG, Jang HC, Park JY, Lee SJ, Park MS, Chli GB, Lee BK. A case of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains isolated from outbreak. *Korean J. Clin. Microbiol*. 12: 48-52 (2009).
- Kim, JM, Forghani F, Kim JB, Park YB, Park MS, Wang J, Park JH, Oh DH. Improved multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Bacillus cereus* emetic and enterotoxic strains. *Food Sci. Biotechnol*. 21(5): 1436-1444 (2012).
- Kim, SK, Kim KP, Jang SS, Shin EM, Kim MJ, Oh S, Ryu S. Prevalence and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from dried red peppers, rice and sunsik in Korea. *J. Food Prot*. 72: 578 - 582 (2009).

- Klatser, P.R., Kuijper, S., van Ingen, C.W., Kolk, A.H., 1998. Stabilized, freeze-dried PCR mix for detection of mycobacteria. *Journal of clinical microbiology* 36, 1798 - 800.
- Klančnik, Anja, Minka Kovač, Nataša Toplak, Saša Piskernik, and Barbara Jeršek. "PCR in Food Analysis."
- Kong, R.Y.C., So, C.L., Law, W.F., Wu, R.S.S., 1999. A sensitive and versatile multiplex PCR system for the rapid detection of enterotoxigenic (ETEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) strains of *Escherichia coli*. *Marine Pollution Bulletin* 38, 1207 - 1215. doi:10.1016/S0025-326X(99)00164-2
- Kuwayama, M., Shigemoto, N., Oohara, S., Tanizawa, Y., Yamada, H., Takeda, Y., Matsuo, T., Fukuda, S., 2011. Simultaneous detection of virulence factors from a colony in diarrheagenic *Escherichia coli* by a multiplex PCR assay with Alexa Fluor-labeled primers. *Journal of microbiological methods* 86, 119 - 20. doi:10.1016/j.mimet.2011.04.004
- Ladeuze S, Lents N, Delbrassinne L, Hu X, Kahillon J. Antifungal activity displayed by cereulide, the emetic toxin produced by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(7): 2555 - 2558 (2011).
- Li J, Cheung WD, Opdyke J, Harvey J, Chong S, Moon CG. 2012. Samsung Salmonella detection kit AOAC performance tested method SM 021203. *Journal of AOAC International.* 95(6), 1656-1668.
- Martínez-Blanch JF, Sánchez G, Garay E, Aznar R. Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* in food by RT-qPCR. *Eur. Food Res. Technol.* 232: 951 - 955 (2011).
- Martínez-Blanch JF, Sánchez G, Garay E, Aznar R. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 15 - 21 (2009).
- McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Sonnenberg, M. S., and Kaper, J. B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92, pp.1664-668.
- Moyo, S.J., Maselle, S.Y., Matee, M.I., Langeland, N., Mylvaganam, H., 2007. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC infectious diseases* 7, 92. doi:10.1186/1471-2334-7-92
- Nakano S, Maeshima H, Matsumura A, Ohno K, Ueda S, Kuwabara Y, Yamada T. A PCR assay based on a sequence-characterized amplified region marker for detection of emetic *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.* 67(8): 1694 - 1701 (2004).

- Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142 - 201
- Nielsen, Eva Møller, and Marianne Thorup Andersen. "Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay." *Journal of Clinical Microbiology* 41.7 (2003): 2884-2893.
- Park, Y.B., Kim JB, Shin SW, Kim JC, Cho SH, Lee BK, Ahn J, Kim JM, Oh DH. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea. *J. Food Prot.* 72(3): 612 - 617 (2009).
- Pavlovic, M., et al. "Development of a duplex real time PCR for differentiation between *E. coli* and *Shigella* spp." *Journal of applied microbiology* 110.5 (2011): 1245-1251.
- Petrauskene, O.V., Cao Y, Zoder P, Wong LY, Balachandran P, Furtado MR, Tebbs RS. 2012. Evaluation of Applied Biosystems MicroSEQ® real-time PCR system for detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples. *Journal of AOAC International.* 95(4), 1074-1083.
- Priha, O., Hallamaa K, Saarela M, Raaska L. Detection of *Bacillus cereus* group bacteria from cardboard and paper with real-time PCR. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31: 161 - 169 (2004).
- Rivera, F.P., Medina, A.M., Aldasoro, E., Sangil, A., Gascon, J., Ochoa, T.J., Vila, J., Ruiz, J., 2013. Genotypic Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Causing Traveler's Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 633 - 635. doi:10.1128/JCM.02572-12
- Rodas, C., Iniguez, V., Qadri, F., Wiklund, G., Svennerholm, A.-M., Sjöling, A., 2009. Development of multiplex PCR assays for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors and toxins. *Journal of clinical microbiology* 47, 1218 - 20. doi:10.1128/JCM.00316-09
- Rosenquist, H., Smidt L, Anderson SR, Jensen GB, Wilcks A. 2005. Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiology Letters.* 250, 129-136.
- Rubino, Salvatore, Piero Cappuccinelli, and David J. Kelvin. "Escherichia coli (STEC) serotype O104 outbreak causing haemolytic syndrome (HUS) in Germany and France." *The Journal of Infection in Developing Countries* 5.06 (2011): 437-440.

- Sabine, D., et al. "Specific detection of enteroaggregative hemorrhagic *Escherichia coli* O104: H4 strains by use of the CRISPR locus as a target for a diagnostic real-time PCR." *Journal of clinical microbiology* 50.11 (2012): 3485-3492.
- Sandra, A., Afsah-Hejri L, Tunung R, Tuan Zainazor TC, Tang JYH, Ghazali FM, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Son R. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat cooked rice in Malaysia. *Int. Food Res. J.* 19(3): 829 - 836 (2012).
- Seong, S.J., Lim JS, Lee KG, Lee SJ, Hong KW. Toxin gene profiling of *Bacillus cereus* food isolates by PCR. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 51(4), 263-268 (2008).
- Spencer, R.C., E. P. Wright, and Samuel William Babington Newsom. *Rapid methods and automation in microbiology and immunology*. Intercept Ltd, 1994.
- Stenfors, L.P., Granum PE. Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 197: 223-228 (2001)
- Taniuchi, M., Walters, C.C., Gratz, J., Maro, A., Kumburu, H., Serichantalergs, O., Sethabutr, O., Bodhidatta, L., Kibiki, G., Toney, D.M., Berkeley, L., Nataro, J.P., Houpt, E.R., 2012. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. and its evaluation on colonies, culture broths, and stool. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 73, 121 - 128. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.03.008
- Thiem, Vu Dinh, et al. "Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the ipaH gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam." *Journal of clinical microbiology* 42.5 (2004): 2031-2035.
- Toshima, H., Uenaka, E., Bi, Y., Nakamura, H., Ogasawara, J.U.N., Hase, A., Kamata, Y., Nishikawa, Y., 2004. Detection and Isolation of *Escherichia coli* with a Coding Gene for Enterotoxigenic *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin 1 from Food and Comparison with Fecal Isolates 67, 2117 - 2122.
- Tran, S.L., Guillemet E, Gohar M, Lereclus D, Ramarao N. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation and virulence. *J. Bacteriol.* 192(10): 2638 - 2642 (2010).
- Vidal, R.M., Valenzuela, P., Baker, K., Lagos, R., Esparza, M., Livio, S., Farfán, M., Nataro, J.P., Levine, M.M., Prado, V., 2009. Characterization of the most prevalent colonization factor antigens present in Chilean clinical enterotoxigenic *Escherichia coli* strains using a new multiplex polymerase chain reaction. *Diagnostic microbiology and infectious disease*

65, 217 - 23. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.07.005

Wang, L., Wakushima, M., Kamata, Y., Nishikawa, Y., 2011. Exhaustive isolation of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by a colony hybridization method using hydrophobic grid-membrane filters in combination with multiplex real-time PCR. *Letters in applied microbiology* 53, 264 - 70. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03100.x

Wehrle E., Didier A, Moravek M, Dietrich R, Märtlbauer E. Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR. *Mol. Cell. Probes* 24: 124 - 130 (2010).

Wu, L.C., Horng JT, Huang HY, Lin FM, Huang HD, Tsai MF. Primer design for multiplex PCR using a genetic algorithm. *Soft. Comput.* 11: 855 - 863 (2007).

Yang, I.C., Shih DY, Huang TP, Huang YP, Wang JY, Pan TM. Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *J. Food Prot.* 68: 2123 - 2130 (2005).

식품의약품안전처, 식품안전정보포털, 식중독통계
(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do>)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.