

발간등록번호

11-1541000-001372-01

수출·입 농축산식품 병원균 검역을 위한 바이오칩 기술 개발

(Development of Biochip Tehnology
for Pathogen Inspection of Import and
Export Agro-livestock Food)

포항공과대학교 산학협력단

농림수산식품자료실



0007248

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “수출·입 농축산식품 병원균 검역을 위한 바이오칩 기술 개발에 관한 연구”
과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 4월 9일

주관연구기관명 : 포항공과대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 차 형 준

연 구 원 : 서 정 현

연 구 원 : 강 동 균

연 구 원 : 최 유 성

연 구 원 : 황 병 희

연 구 원 : 신 화 희

연 구 원 : 김 창 섭

연 구 원 : 양 윤 정

연 구 원 : 최 봉 혁

연 구 원 : 임 성 혜

연 구 원 : 김 범 진

연 구 원 : 반 소 영

연 구 원 : 정 두 엽

연 구 원 : 김 경 로

연 구 원 : 조 영 화

연 구 원 : 김 혜 련

요 약 문

I. 제 목

수출·입 농축산식품 병원균 검역을 위한 바이오칩 기술 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 매년 꾸준히 발생하는 식중독 발생 횟수 및 환자 수를 감소시키고 식중독 발병으로 인한 경제, 사회적 손실을 최소화하기 위한 수출입 농축산 식품에 오염된 여러 종류의 병원성 미생물들을 신속, 정확, 저렴하게 동시 진단하여 예방하는 것이 중요하다. 농산물 수출입 품목이 다양화 및 증대됨에 따라 유입 가능한 병원성 미생물의 신속·정확한 진단법의 필요성이 증대되고 있으며 이를 위한 효율적인 병원성 미생물 진단법 개발이 시급하다.

- 따라서 본 연구는 1. 수출입 농축산물에서의 DNA 마이크로어레이를 이용하는 다양한 식중독균들의 신속 동시진단법의 개발, 2. 수출입 농축산 식품소재에서 식중독균들의 효율적인 DNA 추출방법 확립 및 적용법 개발, 3. 수출입 농축산 식품 소재 검역을 위한 병원성 미생물에 대한 통합검출 시스템 구축, 4. 농축산 식품 소재로부터 식품성 병원성 미생물 직접 검출 가능 DNA 마이크로어레이 키트와 분석 솔루션 개발 및 실용화 연구를 목표로 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 16종 식중독균의 표준균주 및 동정된 분리균주 확보
 - 표준균주은행으로부터 식중독 균 및 유사관련 균 등 다양한 균주 확보
 - 국내외 연구자로부터 분리, 동정된 균주 확보
- 특이적 프로브 설계 및 제작
 - 검출 원리 탐색과 선정
 - 각 균주별 검출원리 염기서열 판독
 - 염기서열분석으로 복수의 프로브 설계, 제작
- DNA microarray 설계 및 제작

- 정량 검출을 위한 표준 프로브 도입
- 재현성과 정확도를 고려한 microarray 설계
- 특이적 프로브 선별 및 추가 실험
 - 유전체를 이용한 실험으로 프로브 선별
 - 반복적인 피드백으로 최상의 어레이 제작
- 농축산 매트릭스별 RNA 추출방법 확립
 - 육류, 우유, 및 계란류 등에서 RNA 추출방법 확립
 - 곡류, 채소류 등에서 RNA 추출방법 확립
 - 농축산 가공식품별 RNA 추출방법 확립
- 농축산 식품 매트릭스를 이용한 실험
 - 실험을 통한 검증
 - 반복적 실험을 통한 소스 데이터 수집
- 제작된 DNA chip의 농축산물식품 매트릭스에 감도 측정
 - 식품 매트릭스별 감도 측정
- 실험 키트로 개발
 - 시약과 시료가 최적화된 실험 과정 확립
 - 사용자를 위한 실험 매뉴얼 작성
- 분석 프로그램 제작
 - 분석에 맞는 알고리즘의 고려와 선택
 - 수집데이터를 이용한 분석 프로그램 개발
 - 사용자의 편의를 고려한 GUI 개발

IV. 연구개발결과

- 16종의 검출 대상 병원성 미생물의 16S rDNA 염기서열을 확보 및 판독하여 특이적으로 검출할 수 있는 검출 프로브를 설계 및 제작하였다. 또한 혈청형별로 구분 검출이 어려운 *Salmonella enterica subsp. enterica*에 대한 genomic analysis를 통해 검출 원리인 *carB* 유전자를 선정하고 검출 대상 *S. enterica subsp. enterica*의 *carB* 염기서열을 확보 및 판독하여 역시 특이적 검출 프로브를 설계 및 제작하였다. 각 검출 원리 기반 제작된 프로브들을 포함하는 DNA microarray를 디자인 및 제작하여 대상 병원성 미생물로부터 해당하는 타겟 DNA를 PCR을 이용하여 증폭 및 형광 표지를 하여 혼성화 반응을 수행하였으며 반복실험을 통해 프로브 선별과정을 거쳐 최상의 DNA 마이크로어레이를 각각 구성하였다. 각 어레이의 민감도를 측정하였는데 16S rDNA 기반 마이크로어레이의 최소 민감도는 5~9 nM, *carB* 기반 *Salmonella enterica subsp. enterica* 혈청형 검출용 마이크로어레이의 최소 민감도는 11~22 nM로 도출하였다. 특히, 16S rDNA 기반 마이크로어레이는

식품 매트릭스에서의 사용이 가능하도록 농축산 식품 및 가공 식품 매트릭스별로 RNA 추출법을 확립 및 실험을 통한 검증을 하였다.

- 실제 검출 현장에서 사용 가능하도록 시약 및 실험 조건의 최적화를 거쳐 실험 키트의 개발을 시도하였으며 마이크로어레이의 복잡한 데이터 분석을 간단하고 쉽게, 그리고 사용자 편리를 도모할 수 있는 분석 소프트웨어 프로그램을 개발하였다.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

- 본 연구 결과는 배양에 의한 전통적 방법의 한계를 극복할 수 있는 동시 다중 분석 병행성 미생물 검출 시스템으로써 제시될 수 있다. 또한, 농축산 식품에 대한 가능성 있는 실용적인 바이오칩을 이용한 검출 시스템을 제안하였으며 국내 뿐 아니라 외국에서 수입되는 식품의 안전성 및 식품 품질관리에 폭넓게 활용될 수 있을 것으로 기대되며 마이크로어레이를 활용한 기술은 미생물 검출 뿐 만 아니라 식품에 존재하는 각종 독소 및 일반성분 분석에도 확장되어 활용될 수 있을 것이다.

- 본 연구 결과를 바탕으로 하여 2개의 출원된 특허 및 1개의 등록된 특허를 확보하고 있으며 1개의 특허를 추가적으로 출원할 계획에 있다. 또한, 관련 논문은 3편이 SCI 급 학술지에 게재되었으며 현재 1편이 게재승인 되었고 1편은 revision 중에 있고 carB 기반 *Salmonella enterica subsp. enterica* 혈청형 검출용 마이크로어레이에 관한 논문 작성이 계획되어 있다.

SUMMARY

I. Subject

Development of Biochip Technology for Pathogen Inspection of Import and Export Agro-livestock Food

II. Purpose and Need of Research and Development

To relieve the frequently occurring cases of food poisoning and to minimize economic and societal cost from the food poisoning, the efficient prevention and the rapid detection of various kinds of pathogens at low cost becomes critical as the import and export of agricultural product increases. As importing and exporting agricultural products diversifies, the chance of pathogen infected product coming to domestic shore increases that rapid and accurate method for detecting multiple pathogens at the same time is required ever than before.

Thus, the goals of this research is set as follows:

1. Developing rapid and multiple food poisoning pathogen detection method based on DNA micro-arrays for importing and exporting agricultural products
2. Establishing efficient ways to extract DNA of pathogens on importing and exporting agricultural products and develop its applications
3. Building an integrated pathogen detection system for the inspection of importing and exporting agricultural products
4. Developing and commercializing DNA micro-array kit and its analytical equipment solutions for direct and instant detection of food poisoning pathogens from importing and exporting agricultural products

III. Subject matters and boundaries of the research

- Securing type culture strains and culture strains of 16 food-borne pathogenic bacteria
 - Securing various food-borne pathogenic bacteria and other related strains from the type culture strain banks
 - Obtaining culture strains from domestic and foreign researchers

- Designing and constructing novel probes
 - Exploring and determine detection mechanism
 - Decoding genetic sequence and detection mechanism for each strain
 - Design and construct novel probes using decoded genetic information
- Designing and constructing DNA micro-array
 - Introducing standard probe for quantitative detection
 - Micro-array design for reproducibility and accuracy
- Selecting novel probes and supplementary experiment
 - Selecting probes based on experiment using amplified DNA
 - Construct the best micro-arrays based on repetitive feedbacks
- Establishing RNA extraction method for each agricultural product matrix
 - Establishing RNA extraction method for meats, milks and other dairy products
 - Establishing RNA extraction method for grains, vegetables and etc.
 - Establishing RNA extraction method for processed agricultural products
- Experiment on agricultural food matrix
 - Verification through experiment
 - Collecting source data through repetitive feedbacks
- Measuring the sensitivity of constructed DNA chip on agricultural food matrix
 - Measuring the sensitivity for each matrix
- Developing a test kit
 - Establishing experimental procedures with optimal reagents and samples
 - Establish experimental manuals for the users
- Build an analysis program
 - Considering and choosing an algorithm most suitable for the analysis
 - Developing analysis program based on the collected data
 - Developing Guided-User-Interface favorable to the users

IV. Result of the Research

Based on the secured and decoded genetic information of 16 target 16s rDNA pathogens, unique detection probes for them were designed and produced. In addition, after securing and decoding the *carB* gene sequence, a novel probe was successfully produced based on *carB* gene of *Salmonella enterica subsp. enterica*, so could overcome the shortcoming of serum test.

DNA micro-array was designed and produced based on novel probes with specific detection mechanism; DNA micro-array of the best performance was built based on the novel probes for DNA of each target pathogenic bacteria through intensive test of PCR amplification and of annealing fluorescent. Then, the sensitivity of each arrays

were measured; minimal sensitivity of 16S rDNA was 5~9nM, and that of carB gene based serum test for *Salmonella enterica subsp. enterica* was 11~22nM. Especially, 16S rDNA based micro-array was verified its detection capability on food matrix, such as on agricultural products and processed food through establishing and testing novel RNA extraction method.

V. Achievement and Its Utilization Plan

The results of this research strongly suggested that this micro-array system can be an alternative method to go beyond the traditional way of detecting multiple pathogens through bacterial cultivation. Moreover, it revealed its potential as food-borne bacterial pathogen detection system for agricultural food products, so that the safety and quality control of not only domestic food products, but also of exporting and importing ones; the micro-array system can possibly extend its boundaries of applications to detecting various toxicities and to analytical techniques to find ingredients, beyond its previous usage.

Based on the achievement on micro-arrays, two pending patents and one registered patent, followed by another plan to apply for patent. In addition, three research papers have been published on this topic; another research paper about carB-based micro-arrays for serum detection of *Salmonella enterica subsp. enterica* is being written.

CONTENTS

Chapter 1. Summary of Research

- Section 1. Purpose of this research & development
- Section 2. Necessity of this research & development
- Section 3. Boundaries of this research & development
 - 1. Subject matters
 - 2. Annual goals and plans

Chapter 2. International and Domestic current-trend on this topic

- Section 1. Present state of technical development in the world
 - 1. Technical trend in the world
 - 2. Specific international-cases
- Section 2. Present state of technical development in domestics
 - 1. Technical trend in domestic
 - 2. Specific domestic-cases

Chapter 3. Experimental Design and its results

- Section 1. Theoretical background and experimental design
 - 1. Theoretical background
 - 2. Experimental design
- Section 2. Experimental procedure and its result
 - 1. Selecting and securing food-borne pathogenic bacteria on importing and exporting agricultural product
 - 2. Designing and producing unique probe
 - 3. Designing and producing DNA Micro-array
 - 4. Selecting unique probes and supplementary examinations
 - 5. Measuring the sensitivity of DNA micro-array
 - 6. Establishing and verifying RNA extraction method for each matrix of agricultural products
 - 7. Developing experimental DNA micro-array kit
 - 8. Developing data analysis program for DNA micro-array

Chapter 4. Achievement and Contribution to this field of study

- Section 1. Annual research goals and its achievement

1. 1st year (2009) research goals and achievement
2. 2nd year (2010) research goals and achievement
3. 3rd year (2011) research goals and achievement

Section 2. Contribution to this field of study

Chapter 5. Results of the research, and plans for its utilization

Section 1. Plan for securing intellectual properties

1. Patent
2. Publication

Chapter 6. Collection of Foreign Science and Technologies

Section 1. Rapid detection of *Campylobacter spp.* based on DNA micro-arrays

1. Information on foreign science and technologies
2. Its subject matters

Section 2. Direct detection of soil-origin 16S rRNA based on oligonucleotide micro-array

1. Information on foreign science and technologies
2. Its subject matters

Chapter 7. Reference

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 제 1절 연구 개발의 목적
- 제 2절 연구 개발의 필요성
- 제 3절 연구 개발의 범위
 - 1. 연구개발의 주요 내용
 - 2. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 제 1절 국외 기술개발 현황
 - 1. 해외 기술 동향
 - 2. 자세한 기술 사례
- 제 2절 국내 기술 개발 현황
 - 1. 국내 기술 동향
 - 2. 자세한 기술 사례

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- 제 1절 이론 및 실험적 접근 방법
 - 1. 이론적 접근 방법
 - 2. 실험적 접근 방법
- 제 2절 연구 내용 및 연구 결과
 - 1. 수·출입 농수산물 식품 병원균 균주 선정 및 확보
 - 2. 특이적 프로브 설계 및 제작
 - 3. DNA Microarray 설계 및 제작
 - 4. 특이적 프로브 선별 및 추가 실험
 - 5. 제작된 DNA microarray의 감도 측정
 - 6. 농·축산 식품 매트릭스별 RNA 추출 방법 확립 및 검증
 - 7. DNA 마이크로어레이를 이용한 실험 키트 개발
 - 8. DNA 마이크로어레이 데이터 분석 프로그램 제작

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 제 1절 연도별 연구 목표 및 달성도
 - 1. 1차년도(2009년) 연구 목표 및 달성도
 - 2. 2차년도(2010년) 연구 목표 및 달성도
 - 3. 3차년도(2011년) 연구 목표 및 달성도

제 2절 관련 분야의 기술발전예의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 지식 재산권 확보 계획

1. 특허
2. 논문

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1절 DNA 마이크로어레이를 이용한 *Campylobacter spp.*의 신속 검출

1. 해외 과학기술 정보
2. 해외 과학기술의 내용

제 1절 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이를 이용한 토양 추출물의 16S rRNA의 직접 검출

1. 해외 과학기술 정보
2. 해외 과학기술의 내용

제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제 1절 연구 개발의 목적

1. 수출입 농축산물에서 분자생물학적 DNA 마이크로어레이를 이용하는 다양한 식중독균들의 신속 동시진단법의 개발
2. 수출입 농축산 식품소재에서 식중독균들의 효율적인 DNA 추출방법 확립하여 DNA 마이크로어레이에 적용법 개발
3. 수출입 농축산 식품 소재 검역을 위한 병원성 미생물에 대한 통합검출 시스템 구축
4. 식품성 병원성 미생물로 지정된 균주들을 농축산 식품 소재로부터 직접 검출하는 DNA 마이크로어레이 키트와 분석 솔루션 개발 및 실용화

제 2절 연구 개발의 필요성

최근 국내에서 식품에 오염된 식중독에 대한 식품의약품안전청에 발표된 통계에 따르면 2007년 510건에 9,686명, 2008년 354건에 7,487명, 2009년 228건에 5,999명, 2010년 271건에 7,218명, 2011년 9월까지 212건에 6,513명의 환자가 발생하였다. 따라서, 매년 꾸준히 발생하는 식중독 발생 횟수 및 환자 수를 줄이고 식중독 발병으로 인한 경제, 사회적 손실을 최소화하기 위해서는 식품 특히, 수출입 농축산 식품에 오염된 여러 종류의 병원성 미생물들을 신속, 정확, 저렴하게 동시 진단하여 예방하는 것이 중요하다.

최근 농산물 수출입 품목이 다양해지고 수출입 규모가 증가함에 따라, 국내 유입 가능성이 있는 병원성 미생물과 수출입 상의 문제가 되는 병원성 미생물의 신속·정확한 진단법의 필요성이 증대되고 있으며 이를 위한 효율적인 병원성 미생물 진단법 개발이 시급하다.

현재 식품공전에 기재된 전통적 미생물 검출법의 경우 각 식중독 원인균들의 배양을 통한 개별적 진단만 가능하기 때문에 많은 노동력과 비용(11종 검사 시 12만원 이상) 그리고 시간(3-7일)이 소모된다. 이러한 단점을 극복하기 위해 도입된 분자생물학적 검출법의 경우 항원-항체 반응과 같은 면역학적 원리를 이용하는 fluorescent antibody, ELISA나 polymerase chain reaction (PCR)등의 분자유전학적 원리를 이용하는 신속진단법은 기존보다 빠르지만 (24시간 이내) 역시 각

균주별 실험을 따로 수행해야 하기 때문에 비용이나 정확성, 그리고 동시 진단에 제약을 가지고 있다.

이에 반해 본 연구에서 제안된 유전자 마이크로어레이는 여러 검출 프로브들을 좁은 면적의 고체 기판위에 집적하여 한 실험으로 다양한 식중독 원인균들을 동시 검출하기 때문에 적은 노동력과 비용이 들며, 검사에 소요되는 시간(24시간 이내)이 짧아 농축산 식품으로부터 정확하고 신속하게 배양이 불가능한 미생물들을 포함하여 여러 균주를 동시 검출할 수 있을 것으로 기대된다.

세계 각국이 HACCP제도와 병원성 미생물의 신속한 검출에 관한 노력을 강구하고 있는 시점에서 우리나라의 식품업체에서는 이에 대한 인식과 적용이 아직 미흡한 실정이며 특히 우리나라는 여름철에 식중독 발생가능성이 높으므로 이에 대한 충분한 대비 없이는 앞으로 국내식품의 경쟁력이 떨어질 것으로 예상된다. 또한 신속한 검출기법의 개발이 이루어지지 않아 비위생적으로 생산된 외국 식품의 수입을 제대로 막지 못하는 결과를 초래하게 될 것이기 때문에 식품의 수입개방화가 진행되고 있는 현시점에서 위생적으로 안전한 식품의 생산 및 국제 경쟁력확보를 위해서는 주요 식중독균에 대한 신속하고, 정확한 검출방법의 개발이 시급하며 필수적인 실정이다.

제 3절 연구 개발의 범위

1. 연구 개발의 주요 내용

가. 16종 식중독균의 표준균주 및 동정된 분리균주 확보

- (1) 표준균주은행으로부터 식중독 균 및 유사관련 균 등 다양한 균주 확보
- (2) 국내외 연구자로부터 분리, 동정된 균주 확보

나. 특이적 프로브 설계 및 제작

- (1) 검출 원리 탐색과 선정
- (2) 각 균주별 검출원리 염기서열 판독
- (3) 염기서열분석으로 복수의 프로브 설계, 제작

다. DNA microarray 설계 및 제작

- (1) 정량 검출을 위한 표준 프로브 도입
- (2) 재현성과 정확도를 고려한 microarray 설계

- 라. 특이적 프로브 선별 및 추가 실험
 - (1) 유전체를 이용한 실험으로 프로브 선별
 - (2) 반복적인 피드백으로 최상의 어레이 제작
- 마. 농축산 식품 매트릭스별 RNA 추출방법 확립
 - (1) 육류, 우유, 및 계란류 등에서 RNA 추출방법 확립
 - (2) 곡류, 채소류 등에서 RNA 추출방법 확립
 - (3) 가공식품류 등에서 RNA 추출방법 확립
- 바. 농축산 식품 매트릭스를 이용한 실험
 - (1) 실험을 통한 검증
 - (2) 반복적 실험을 통한 소스 데이터 수집
- 사. 제작된 DNA chip의 농축산물 식품 매트릭스에 감도 측정
 - (1) 표준균주, 분리균주들에 대한 특이성 측정
 - (2) 식품 매트릭스별 감도 측정
- 아. 실험 키트로 개발
 - (1) 시약과 시료가 최적화된 실험 과정 확립
 - (2) 사용자를 위한 실험 매뉴얼 작성
- 자. 분석 프로그램 제작
 - (1) 분석에 맞는 알고리즘의 고려와 선택
 - (2) 수집데이터를 이용한 분석 프로그램 개발
 - (3) 사용자의 편의를 고려한 GUI 개발

2. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2009	DNA microarray의 제작	<p>가. 16종 식중독균의 표준균주에 속하는 <i>E. coli</i> (ATCC 25922), <i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 43894), <i>Salmonella choleraesuis</i>, <i>Salmonella enteritidis</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Listeria monocytogenes</i> 및 식품 공전에 명시되거나 계놈 서열이 알려진 <i>Clostridium perfringens</i> (ATCC 13124), <i>Bacillus cereus</i>, <i>Campylobacter jejuni</i>, <i>Shigella boydii</i>, <i>Shigella sonnei</i> 중 현실적 필요가 있는 균주들을 선별하여 추가함</p> <p>(1) 표준균주은행으로부터 식중독 균 및 유사관련 균 등 다양한 균주 확보</p> <p>(2) 국내외 연구자로부터 분리, 동정된 균주 확보</p> <p>나. 특이적 프로브 설계 및 제작</p>

			<ul style="list-style-type: none"> (1) 검출 원리 탐색과 선정 (2) 각 균주별 검출원리 염기서열 판독 (3) 염기서열분석으로 복수의 프로브 설계, 제작 (4) 정확성을 높이기 위해서 한 균주에 대해 다수의 검출원리의 설계와 최적의 프로브 선별 실험 <p>다. DNA microarray 설계 및 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 정량 검출을 위한 표준 프로브 도입 (2) 재현성과 정확도를 고려한 microarray 설계
2차년도	2010	DNA microarray의 식품 검체에 대한 적용	<p>가. 특이적 프로브 선별 및 추가 실험</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 유전체를 이용한 실험으로 프로브 선별 (2) 반복적인 피드백으로 최상의 어레이 제작 <p>나. 농축산 식품 매트릭스별 DNA 추출방법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 육류, 우유, 및 계란류 등에서 DNA 추출방법 확립 (2) 곡류, 채소류 등에서 DNA 추출방법 확립 (3) 가공 식품류 등을 이용하여 순도 높은 DNA 추출 방법 확립 <p>다. 농축산 식품 매트릭스를 이용한 실험</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 효율, 민감도향상 위한 레이블링 반응 최적화 (2) Genomic DNA의 multiplex PCR 증폭을 통한 민감도 향상 (3) 반복적 실험을 통한 소스 데이터 수집
3차년도	2011	제작된 DNA microarray의 실용화 연구	<p>가. 제작된 DNA chip의 농축산물식품 매트릭스에 감도 측정</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 표준균주, 분리균주들에 대한 특이성 측정 (2) 식품 매트릭스별 감도 측정 <p>나. 실험 키트로 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 시약과 시료가 최적화된 실험 과정 확립 (2) 사용자를 위한 실험 매뉴얼 작성 <p>다. 분석 프로그램 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> (1) 분석에 맞는 알고리즘의 고려와 선택 (2) 수집데이터를 이용한 분석 프로그램 개발 (3) 사용자의 편의를 고려한 GUI 개발

제 2 장 국내·외 기술 개발 현황

제 1절 국외 관련 분야에 대한 기술 개발 현황

1. 해외 기술 동향

가. 미국이나 EU와 같은 선진국에서는 유전자를 이용한 13종 식중독 세균 동시 검출 기술을 보유하고 있으며, 항체를 이용한 신속, 간편 진단 키트 형태의 바이오센서는 상품화가 되었다.

나. 식품 위해 인자 검출 및 추적 기술과 관련하여 다중 위해 성분 휴대용 검출기가 상용화되고 있다.

2. 자세한 기술 사례

가. 2001년 Chizhkov et al.은 *eaeA*, *slt-I*, *slt-II*, *fliC*, *rfbE*, *ipaH*라는 6개의 유전자를 이용하여 *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*의 총 15개 균주를 detection할 수 있는 DNA 마이크로어레이를 제안하였다.

나. Call et al. 은 면역자기 분리법(immunomagnetic separation)을 통해 장관 출형성 대장균(Enterohemorrhagic *E. coli*, EHCE) 세포를 분리하여 multiplex PCR 생성물을 마이크로어레이를 통하여 검출하였다.

다. Call et al. 은 특정 토양추출 미생물에서 16S rRNA를 추출하여 바이오틴이 표지된 검출 프로브(detector probe)를 이용하여 검출하였으나 검출 감도가 7.5×10^6 CFU로써 매우 낮은 검출 감도를 보였다.

라. Nelson et al. 은 thiol이 표지된 올리고뉴클레오타이드를 금 표면에 마이크로어레이하여 *E. coli*와 *B. subtilis* 16S rRNA를 동시에 진단하였다.

마. 23S rRNA 유전자 서열 바탕으로 디자인한 DNA microarray를 Hong et al.은 개발하였으며 16종의 식품유래 병원성 미생물을 PCR을 통해 증폭된 DNA로 검출을 시도하였다.

- 바. Chiang et al.은 2006년에 16S rDNA로 *Bacillus* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Vibrio* spp.을 DNA 마이크로어레이로 검출하였으며 그 감도는 그람 음성(Gram-negative) 박테리아의 경우 500 CFU/ml, 그람 양성(Gram-positive) 박테리아의 경우 4,500 CFU/ml 수준으로 박테리아 종류에 따른 감도 차이가 크다.
- 사. Sergeev et al. 은 19개의 서로 다른 유전자 마커를 사용하여 5개의 *Bacillus* spp.를 검출하는 DNA 마이크로어레이 기술을 제안하였다.
- 아. Schmidt-Heydt et al. 은 식품에서 미생물의 mycotoxin 생산 여부를 마이크로어레이를 통해 모니터링하여 검출하는 기술을 보고하였으나 실제 식품에 적용하여 검출한 연구 사례는 미비한 실정이다.
- 자. 2008년에 Wang et al.은 보편적인 22개의 음식유래 병원성 미생물을 16S rRNA+*invA* 와 *virA*을 타겟 유전자로 삼은 DNA 마이크로어레이를 개발하였으며 100CFU/ml의 감도로 상대적으로 높은 감도를 보였다.
- 차. Cremonesi et al. 역시 16S rRNA를 바탕으로 병원성 미생물을 검출 할 수 있는 DNA 마이크로어레이를 제안하였다.
- 카. 2010년에는 Suo et al. 이 14개의 다른 유전자와 2개의 toxin 유전자 서열 차이를 이용한 DNA 마이크로어레이를 디자인하여 4개의 병원성 미생물 실제 음식물에서의 검출을 시도하였으며 그 감도는 1000 CFU/ml로 비교적 낮은 감도를 보였다.
- 타. 미국의 대학을 중심으로 신속하게 5개 이상 미생물을 검출하는 DNA 마이크로어레이 시스템이 개발되었다는 보고가 있으나, 특정 미생물에 대한 선택성이 높지 않고 식품에 직접 적용한 상품화 단계는 아직 요원한 것으로 평가된다.

제 2절 국내 관련 분야에 대한 기술 개발 현황

1. 국내 기술 동향

- 가. 국내 시장에서는 전반적으로 식품 위해인자 검출 및 추적 기술의 산업화가 미진한 상태이다.
- 나. 국내 바이오센서 기업들의 주력 제품 분야는 90% 이상이 의료용 바이오센서로 아직 식품 분석용과 환경용 및 그밖에 다른 분야의 바이오센서에 대한 관심 정도가 상대적으로 낮다.
- 다. 정부출연기관 등에서 바이오센서 기술을 이용한 식중독균 신속검출기술 연구 개발이 시도되고 있으나 기반기술이 취약하다.

2. 자세한 기술 사례

- 가. 국내 식품 관련 신속검출 기술 개발 업체로 제노프라社에서 '05년 대장균 검사용 바이오센서 기술을 개발하였다.
- 나. (주)지온코리아에서 바이러스 및 병원성 미생물 시험용 바이오센서를 개발하여 판매 중에 있다.
- 다. 포스텍의 차형준 교수 연구팀에서는 2007년에 16S rDNA를 이용하여 7개의 병원성 미생물(*S. dysenteriae*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *C. jejuni*)을 species 수준으로 검출할 수 있는 DNA 마이크로어레이를 개발하였으며 그 감도는 1,000~10,000 cells 수준으로 가능하다.
- 라. 경희대의 김현중 연구원 등은 2008년에 whole genome을 이용하는 DNA 마이크로 어레이를 개발하였으며 이것을 이용하여 *Salmonella enterica*를 비롯한 *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. anthracis*, *L. monocytogenes* 8개의 병원성 미생물의 검출을 시도하였다.

마. 포스텍 차형준 교수 연구팀은 16S rDNA sequence를 이용하여 음식물 유래 병원성 미생물 11종 대상 균주를 동시 검출 할 수 있는 올리고뉴클레오타이트 마이크로어레이를 개발하였으며 그 감도는 10 CFU로써 매우 높은 감도를 보였다. 또한 낮은 선택성(Specificity)을 보이는 균주들을 쉽게 검출 및 분석하기 위해서 pattern-mapping tool도 함께 개발하였다.

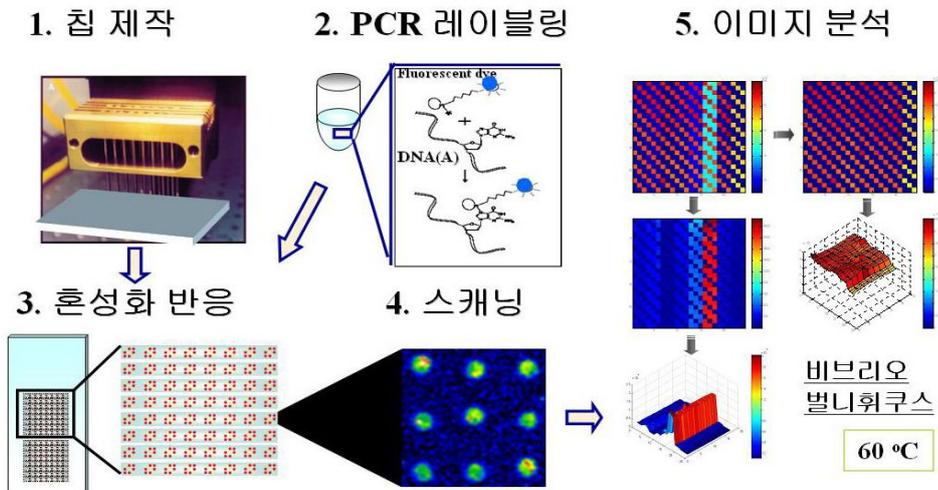
제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1절 이론 및 실험적 접근 방법

1. 이론적 접근 방법

DNA 마이크로어레이는 가장 기본적으로 상보적인 염기서열 간의 특이적 혼성화 반응을 이용하는 것이다. 즉 마이크로어레이 상의 여러 개의 염기 서열 간의 차이가 있는 DNA 프로브들을 심고 타겟 DNA와의 상보성이 높을수록 혼성화가 잘 일어나고 반대로 염기서열 차이가 클수록(상보성이 낮을수록) 혼성화가 어려워지는 것을 이용하는 것이다. 따라서 병원성 미생물 간의 염기서열 간 차이가 나는 DNA를 이용하여 프로브를 제작하고 프로브 및 대상 미생물마다 다른 혼성화 반응의 정도 차이를 이용하여 특이적으로 병원성 미생물을 검출하도록 한다. 따라서 병원성 미생물을 특이적으로 검출하기 위해서는 미생물 간 염기서열의 차이가 많이 나는 대상 유전자를 선정하고 적절한 프로브를 디자인을 해야 하는데 본 연구에서는 미생물 간의 유전자 염기서열의 차이가 10-15% 이상이 되고 그 길이가 20~25 bp인 특이적 DNA 프로브들을 설계하는 것으로 접근하였다.

2. 실험적 접근 방법



고형 기관의 표면에 특이적 검출 프로브들을 고정시켜 DNA 마이크로어레이

를 제작한다. 타겟 DNA는 병원성 미생물로부터 추출한 chromosome DNA로부터 PCR을 이용하여 증폭을 하여 얻고 형광 염료로 표지를 한다. 얻어진 DNA를 제작한 DNA 마이크로어레이에 혼성화 반응을 시키고 형광 스캐너를 이용하여 마이크로어레이 상의 프로브 각각의 형광세기를 읽는다. 형광 세기를 통하여 DNA의 혼성화 여부 및 정도를 유추한다.

제 2절 연구 내용 및 연구 결과

1. 수·출입 농수산 식품 병원균 균주 선정 및 확보

가. 대상 균주 선정(총 10종)

치명적인 질병을 유발하거나 수출입 농수산 식품에서 발생 빈도가 높은 병원성 미생물을 우선적으로 검출하고자 DNA 마이크로어레이의 대상균주로 총 11종 (16아종)을 선정하였으나 (표1) 관련 부처의 전문가의 도움을 받아 대상균주를 재검토 받았다.

표 1. 검출 대상균주 11종 (총 16아종)

Bacterium	Source and Strain	Biosafety Level
<i>Bacillus anthracis</i>	.	.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	ATCC 25584	3
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 23715 (KCCM 41657)	2
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 43478	2
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291 (KCTC 5327)	2
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124 (KCTC 3269)	2
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 13313	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538 (KCCM 11335)	2
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 (KCTC 1682)	1
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43894	2
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313 (KCCM 40307)	2
<i>Vibrio cholerae</i>	ATCC 14035	2

<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	2
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	2
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Choleraesuis	ATCC 10708	2
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Enteritidis	ATCC 31194 (IFO 3313)	2
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Paratyphi C	ATCC 13428	2
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Typhimurium	ATCC 13311	2

그 결과 농축산 식품에서는 검출되지 않는 *Mycobacterium tuberculosis*, 국내 검출 횟수가 낮은 *Campylobacter coli*를 대상균주에서 제외하였으며 고위험 균으로 균주 확보가 어려운 *Bacillus anthracis*를 제외하는 대신 곡류나 두류에서 많이 검출되는 *Bacillus cereus*를 대상균주로 추가하였다. 또, 국내에서 많이 발견되어 검출요구가 높은 *Shigella sonnei*, *Shigella boydii* 2종을 추가하여 검출대상균주를 총 10종(17아종)으로 재조정하였다 (표2).

표 2. 최종 검출 대상균주 10종 (총 17아종)

Bacterium	Source and Strain	Biosafety Level
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778 (KCCM 11204) ATCC 13061 (KCCM 40022) ATCC 14579 (KCCM 40935)	1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 23715 (KCCM 41657)	2
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291 (KCTC 5327)	2
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124 (KCTC 3269)	2
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 13313	2
<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 9290 (KCTM 2009) ATCC 25931 (KCTM 2518) ATCC 29930 (KCCM 40949)	2
<i>Shigella boydii</i>	ATCC 8700 (KCCM 41649) ATCC 35966 (KCCM 35966)	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 (KCCM 11335)	2
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 (KCTC 1682)	1

<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC 43894 (KCCM 40406)	2
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313 (KCCM 40307)	2
<i>Vibrio cholerae</i>	ATCC 14035	2
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	2
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	2
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Choleraesuis	ATCC 10708 (KCCM 41598) ATCC 13312 (KCCM 41034) ATCC 7001	2
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Enteritidis	ATCC 31194 (IFO 3313)	2
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Typhimurium	ATCC 13311	2

나. 11종 식중독 균의 표준 균주 및 동정된 분리 균주 확보

본 연구에 필요한 10종 (총 16 아종)의 식중독 균을 확보하고자 하였다. 추가적으로 대상 균주에 포함된 균주들을 비롯하여 확보하지 못한 균주들을 ATCC, KCTC, KCCM 균주은행으로부터 구매하였다(표3). 대부분의 균주는 배양에 성공하여 chromosome DNA 및 균주 세포를 확보하였고 *Campylobacter jejuni*는 혐기성 미생물로 본 실험실에서 배양을 몇 차례 시도하였으나 세포 배양이 어려워 유전자은행을 통해 chromosome DNA를 확보하였다.

표 3. 표준 균주 확보 상태

	Bacterium	표준 균주 확보 상태		비고
		완료	미확보	
대상 균주	<i>Bacillus cereus</i>	○		임상균주로써 확보됨 ATCC 11778 (KCCM 11204) ATCC 13061 (KCCM 40022) ATCC 14579 (KCCM 40935)
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	○		
	<i>Campylobacter jejuni</i>	○		배양 불가 Chromosome으로 확보
	<i>Clostridium perfringens</i>	○		
	<i>Shigella dysenteriae</i>	○		
	<i>Shigella boydii</i>	○		ATCC 8700 (KCCM 41649) ATCC 35966 (KCCM 35966)
	<i>Shigella sonnei</i>	○		ATCC 9290 (KCTM 2009) ATCC 25931 (KCTM 2518) ATCC 29930 (KCCM 40949)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	○		
	<i>Escherichia coli</i>	○		ATCC 8739 ATCC 25922

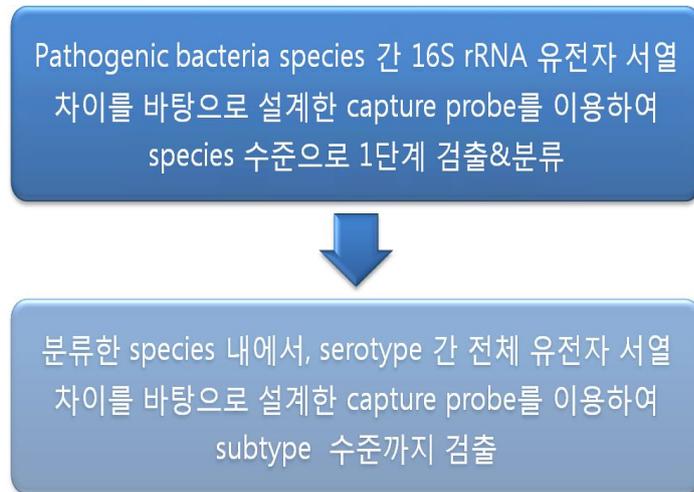
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	○		ATCC 43894 (KCCM 40406)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	○		
	<i>Vibrio cholerae</i>	○		
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	○		
	<i>Vibrio vulnificus</i>	○		
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Choleraesuis	○		ATCC 7001 ATCC 13312 ATCC 10708
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Enteritidis	○		
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Typhimurium	○		
기 타 균 주	<i>Bacillus subtilis</i>	○		
	<i>Escherichia coli</i> K12	○		Control
	<i>Listeria monocytogenes</i>	○		
	<i>Listeria innocua</i>	○		
	<i>Stapylococcus xylosum</i>	○		
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	○		
	<i>Vibrio cambelli</i>	○		
	<i>Vibrio cholerae</i> O1	○		ATCC 9459 ATCC 14033
	<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	○		
	<i>Vibrio diazotrophicus</i>	○		
	<i>Vibrio fischeri</i>	○		
	<i>Vibrio fluvialis</i>	○		
	<i>Vibrio furnissii</i>	○		
	<i>Vibrio harveyi</i>	○		
	<i>Vibrio hollisae</i>	○		
	<i>Vibrio mediterranei</i>	○		
	<i>Vibrio metchnikovii</i>	○		
	<i>Vibrio mimicus</i>	○		
<i>Vibrio navarrensis</i>	○			
<i>Vibrio ordalii</i>	○			

2. 특이적 프로브 설계 및 제작

가. 검출원리 탐색 및 선정

본 연구에서는 크게 두 가지의 검출 원리로 수출입 농축산식품 병원균 검역을 위한 바이오칩을 개발할 예정이다. 그 중의 하나는 16S rDNA 유전자 서열을 검출 원리로 이용하는 것이다. 이 방법은 기존의 균주를 분자생물학

적으로 동정할 때 주로 사용되는 16S rDNA의 계통학적인 유사성을 이용하여 속이나 종, 혹은 최대한 아종까지도 분류할 수도 있다. 또 다른 방법은 genomic comparison 방법인데 이는 16S rDNA의 높은 유사성으로 인해 아종까지는 분류하기 어려운 균주에 대하여 적용되는 것으로 특별히 아종이 많고 구분하기 힘든 *E. coli*나 *Salmonella*와 같은 병원균들을 게놈 레벨의 검색을 통해서 유전자 간의 차이를 확인하고 그 유전자를 검출 원리로 이용하여 프로브를 제작하는 방법이다. 이 두 가지 원리는 상호 보완적으로 16S rDNA로는 전체 균주에서의 계통학적인 위치를 genomic comparison으로는 정확한 아종까지의 검출을 가능하게 하여 정확하고 완전한 분류를 가능하게 할 것으로 기대된다 (그림 1).



<그림 1> 검출 원리

본 연구에서 genomic comparison을 통해 찾은 검출 원리는 *carB*라는 유전자로 carbamolyphosphate synthetase large subunit를 인코딩하고 있다. 이 효소는 중요한 생화학적 반응을 촉매하는데 그 반응에서 생성된 carbamolyphosphate는 arginine과 pyrimidine nucleotide를 생성하는데 이용된다. 또, 몇몇 연구자들은 이 효소의 유전자들을 이용하여 계통학 연구에 사용하기도 하여 본 연구의 검출원리로 사용되기에 적합할 것으로 판단되었다. 이 유전자 서열을 바탕으로, 매우 유사한 16S rDNA 서열을 가지며 혈청형간의 구분이 어려운 *Salmonella enterica* subsp. *enterica*의 혈청형 (serotype)들의 검출하고자 하였다.

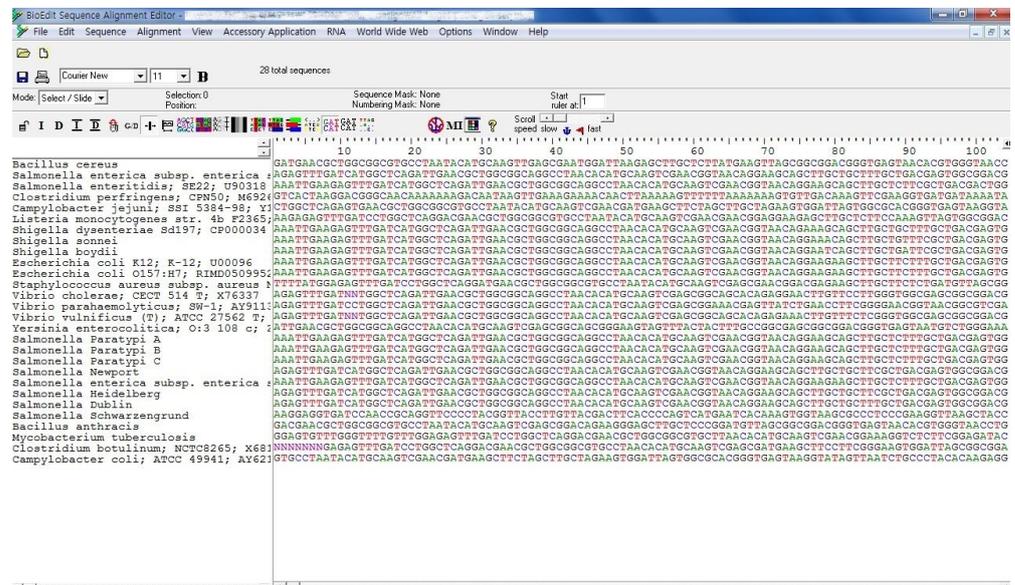
두 검출 원리 모두 염기 서열의 차이에 의한 혼성화 효율에 따라서 차이를 보이게 된다. 그러므로 검출하기를 원하는 모든 대상 균주들과 비슷한 아종

들의 16S rDNA 염기서열 혹은 다른 검출 원리 염기 서열들을 모두 모아서 multiple alignment를 통해 염기 서열을 비교하여 유전자 서열 중에서도 다른 균주들과 구분되는 차이를 보이는 염기 서열군들(capture probe candidates)을 분류하였다. 분류된 염기 서열들 각각의 열역학적인 특성을 비교하여 최적의 조건을 찾고 NCBI의 blast search나 RDP의 probe match 와 같은 데이터베이스 툴을 이용하여 특이성(specificity)이나 선택도(selectivity)를 확인하였다.

나. 각 균주별 검출 원리 염기서열 수집 및 판독

(1) 16S rDNA 염기 서열 수집 및 판독

16S rDNA 유전자 서열 차이를 이용하여 검출할 병원성 미생물 대상은 *Bacillus*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Vibrio*, *E.coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*이다. 이 균주들에 대한 16S rDNA capture probe를 설계하기 위해서 각 균주별 대상 유전자 서열을 확보해야 하므로 NCBI gene bank와 RDP II database에서 각 균주의 16S rDNA 염기 서열을 수집하였다 (그림 2-1). 그리고 16S rDNA 유전자 차이를 비교하기 위해서 대상 균주뿐만 아니라 다른 아종들의 유전자 서열도 추가적으로 수집하였다.

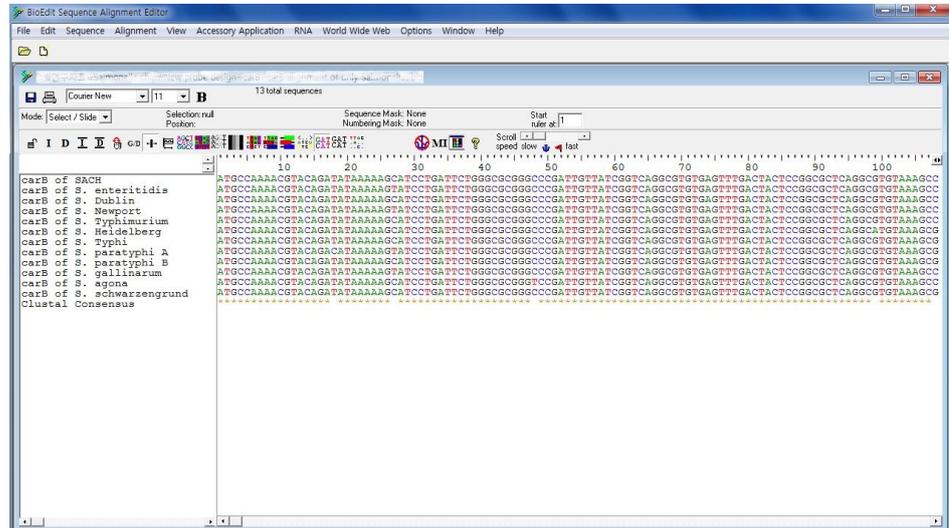


<그림 2-1> 16S rDNA 유전자 서열의 수집

(2) CarB 염기 서열 수집 및 판독

16S rDNA 유전자와 마찬가지로 *carB* 유전자를 이용하여 검출하고자하

는 *S. enterica* subsp. *enterica*의 대표 균주인 *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis, *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Choleraesuis, *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium의 해당 유전자 서열을 수집하였으며 그 밖에 *S. enterica* subsp. *enterica* 혈청형들의 유전자 서열 또한 비교에 사용될 목적으로 추가 수집하였다(그림 2-2)

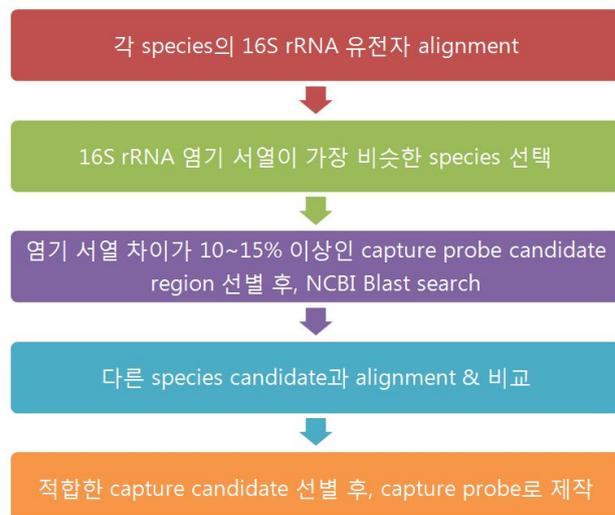


<그림 2-2> *carB* 유전자 서열의 수집

다. 염기서열 분석으로 복수의 프로브 설계 및 제작

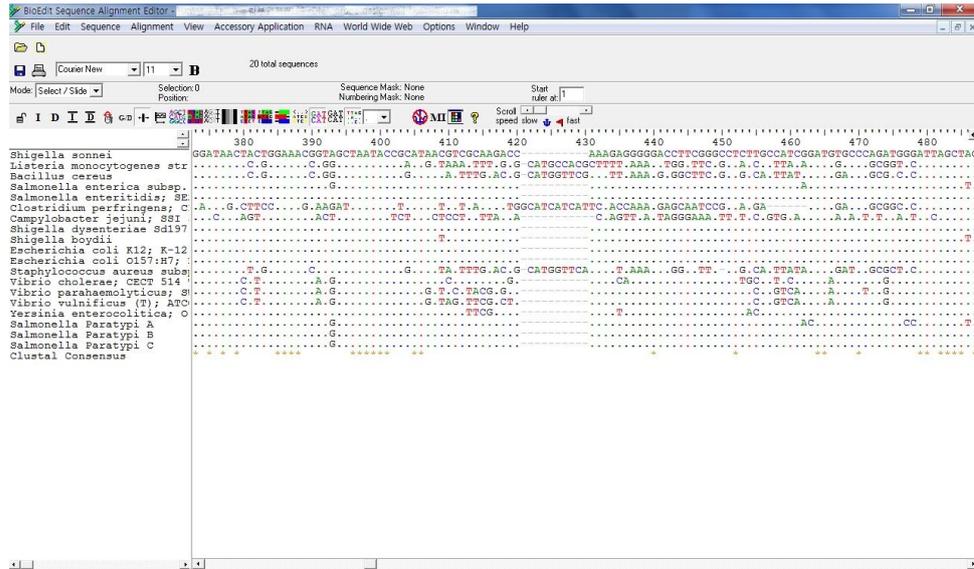
(1) 16S rDNA 서열 기반 프로브 설계 및 제작

16S rDNA 염기 서열 차이 기반으로 5 한 capture probe를 설계를 위한 전체적인 순서는 다음과 같다 (그림 3).



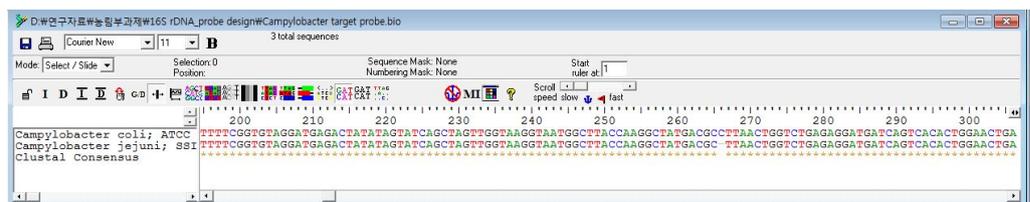
<그림 3> Capture probe 설계 순서도

앞서 수집한 *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Cholerasuis, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* 16S rDNA 염기 서열을 BioEdit Sequence Alignment Editor를 이용하여 alignment한다 (그림 4).



< 그림 4> 각 균주별 16S rDNA 염기 서열 Alignment

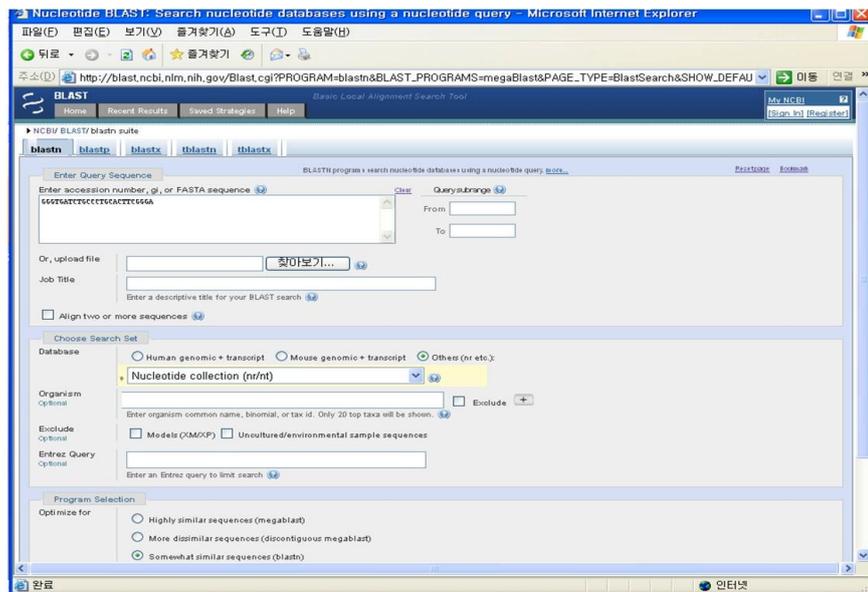
이 alignment 결과를 바탕으로 각 균주별 16S rDNA 염기 서열을 판독하여 가장 작은 염기 서열 차이를 보이는 표적 병원성 미생물 2개의 균주를 선택하였다. 다시 이 균주들의 16S rDNA 유전자 서열을 alignment하여 염기 서열의 차이가 10~15% 이상의 차이를 보이는 capture probe candidate region을 선별하였다(그림 5). *Campylobacter jejuni*의 경우, 가장 적은 염기 서열 차이를 보이는 병원성 미생물은 *Campylobacter coli*로 이 두 균주를 선택 및 서열 비교를 하여 capture probe candidate region을 20~25bp 길이 정도로 구분하여 선별하였다.



<그림 5> Campylobacter coli와 Campylobacter jejuni 16S rDNA Alignment

선별한 capture probe candidate를 NCBI blast search를 하여 다른 병원성 미생물 16S rDNA 염기 서열과 차이는 정도를 확인했다(그림 6).

확인 후, 다른 병원성 미생물 과 차이가 적은 것들을 제외하고 10~15% 이상의 차이를 보이는 capture probe candidate만을 선별하여 모았다 (그림 7). 이렇게 모은 candidates가 다른 대상 병원성 미생물 16S rDNA 와 염기 서열이 10~15% 이상 차이가 나는지 alignment 결과로 다시 판독하여 확인한 후 이 조건을 만족하는 candidates를 capture probe로 제작 하였다(그림 8).



NCBI Blast:Nucleotide Sequence (25 letters) - Microsoft Internet Explorer

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene, GEO, Gene, Structure, Map Viewer

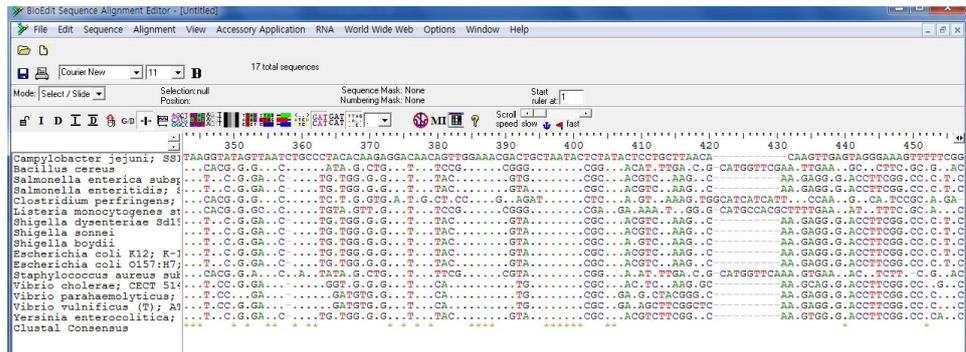
Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
GU332596.1	Rhodococcus aloberulus strain A21-15 16S ribosomal RNA gene	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
GU367155.1	Rhodococcus sp. VIM 65754 16S ribosomal RNA gene, partial s	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
GU367129.1	Rhodococcus sp. VIM 65670 16S ribosomal RNA gene, partial s	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
GU458972.1	Uncultured Rhodococcus sp. clone T0088 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
GU458993.1	Uncultured Corynebacterium sp. clone T0702 16S ribosomal RN	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
GU458886.1	Uncultured Corynebacterium sp. clone T0776 16S ribosomal RN	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
GU458887.1	Uncultured Corynebacterium sp. clone T0238 16S ribosomal RN	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
GU458885.1	Uncultured Corynebacterium sp. clone T0071 16S ribosomal RN	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
GU458878.1	Uncultured Corynebacterium sp. clone T0254 16S ribosomal RN	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
GU458876.1	Uncultured Corynebacterium sp. clone T0311 16S ribosomal RN	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
GQ924564.1	Uncultured bacterium clone BY16 9 16S ribosomal RNA gene, p	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
GQ924500.1	Uncultured bacterium clone 7Y30 2 16S ribosomal RNA gene, p	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
GQ924444.1	Uncultured bacterium clone 7G09 3 16S ribosomal RNA gene, p	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675659.1	Uncultured bacterium clone LL141-8P22 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675625.1	Uncultured bacterium clone LL141-8M4 16S ribosomal RNA gen	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675616.1	Uncultured bacterium clone LL141-8N18 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675604.1	Uncultured bacterium clone LL141-8M5 16S ribosomal RNA gen	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675603.1	Uncultured bacterium clone LL141-8M4 16S ribosomal RNA gen	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675590.1	Uncultured bacterium clone LL141-8M11 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675587.1	Uncultured bacterium clone LL141-8L8 16S ribosomal RNA gen	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675584.1	Uncultured bacterium clone LL141-8L4 16S ribosomal RNA gen	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675517.1	Uncultured bacterium clone LL141-8I12 16S ribosomal RNA gen	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675507.1	Uncultured bacterium clone LL141-8H23 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675487.1	Uncultured bacterium clone LL141-8G2 16S ribosomal RNA gen	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675484.1	Uncultured bacterium clone LL141-8E19 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675432.1	Uncultured bacterium clone LL141-8D23 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675426.1	Uncultured bacterium clone LL141-8D18 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675409.1	Uncultured bacterium clone LL141-8C21 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675380.1	Uncultured bacterium clone LL141-8B13 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675352.1	Uncultured bacterium clone LL141-7P9 16S ribosomal RNA gen	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675226.1	Uncultured bacterium clone LL141-7D12 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675177.1	Uncultured bacterium clone LL141-6P6 16S ribosomal RNA gen	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675163.1	Uncultured bacterium clone LL141-6O6 16S ribosomal RNA gen	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675132.1	Uncultured bacterium clone LL141-6M15 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	
FJ675109.1	Uncultured bacterium clone LL141-6K18 16S ribosomal RNA se	50.1	50.1	100%	2e-04	100%	

<그림 6> *Campylobacterium* capture probe candidate의 blast search

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
1																						
2		1450-1451																				
3	jejunii	CGTAAACAAGGTACCCCGA																				
4	coli	CGTAAACAAGGTAAACCGTA																				
5																						
6																						
7	2 Species인 구분	Shigella에 비교																				
8	Campylobacter	AACGATGA-AGCTCTAGCTT	AGGTATAGTAA	ACTCTATA	TGCTTAC	GGCCAA	CCTAAGG	ACTCGGA	GGAAATG	CGCCCTA	CGCCCTA	CCACGTAT	TGCCCAAG	CGCGAA	AGTGTAT	CTACTGAA	AGCCGGA	AATACTAACT	AGTTACCCGCTCAAGTGAATCAATCGG			
9		65-115	120-170	175-260	265-320	370-465	490-510	555-675	675-770	810-830	865-1077	1120-1131	1220-1310	1340-1331	1425-1490							
10		Helicobacter의는 일치	(jejunii와 98%동일함)																			
11	위인 seq 20-25개씩 할당 확인																					
12		65-85	90-115	120-145	145-170	175-192	200-226	230-255	255-275	275-295	360-387	390-415	415-440									
13	Campylobacter	AACGATGA-AGCTCTAGCTT	GAA-GTGGATT	AGGTATAGTAA	AGAGGAC	ACTCTATACTCTGCTT	TGAGACT	GTTAAGG	AGGCTATAT	TAGGGAA	GACGCA	GACACCTTTTTCGACGAACTAACTCTT										
14		Helicobacter																				
15																						
16																						
17		N																				
18		440-454	475-500	575-605	610-630	635-665	670-695	700-720	720-740	745-765	820-840	840-865	890-1015	1025-1090								
19		TTTCTAGGGAGAA	TTCTGACGATC	AAGGGGCG	AATCTAA1	GCTTGGG	CAGATGG	CGGTAGA	ACCCATTC	AATCTAA1	GATGTAC1	GTGCTA1	GGCTTA1	GGTCTA1	GGCTTA1	GGCTTA1	GGCTTA1	GGCTTA1	GGCTTA1	GGCTTA1	GGCTTA1	GGCTTA1
20																						
21																						
22																						
23		1120-1145	1145-1165	1165-1155	1250-127	1275-131	1300-131	1330-131	1360-131	1425-141	1445-141	1480-1500										
24		CACGTATTAGTCTAAGCG	CGCGAGCACT	TGCTCTG	ATATCA	AGGTGGA	GTCCCA	GGACAT	TAGATCA	AGTGTAT	ACT	GGATCA	CGGACTGGG	GGTGA								
25																						
26																						
27																						
28	Probe Candidate	Length	Tm	Rating	GC%																	
29	65 AACGATGA-AGCTCTAGCTT	25	61.4	73	44	hairpin	dimer															
30	90 GAA-GTGGATTAGTGGCCAC	25	72.4																			
31	120 AGGTATAGTAACTGCTCTA	26	58.6																			
32	145 AGAGGACACAGTGGAAAC	26	67.1	87	50	hairpin	dimer															
33	175 ACTCTATACTCTCTAAGC	23	51.2	92	40																	
34	200 TTGATAGGGA-AGTTTTTC	23	63.5	91	38.5	hairpin	dimer															
35																	

<그림 7> Campylobacter jejuni capture probe candidates 선별 모습



<그림 8> Campylobacter jejuni capture probe candidate의 alignment

Campylobacter jejuni의 capture probe 설계한 방법처럼 동일하게 설계된 총 11종의 대상 병원성 미생물의 capture probe의 물리적 성질은 다음 표와 같이 정리하였다 (표 3).

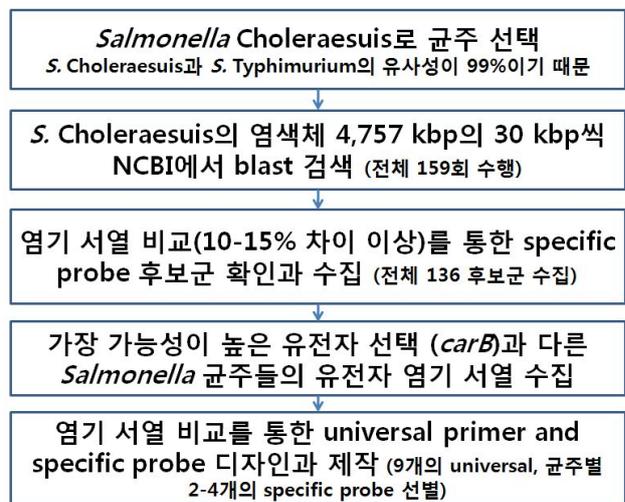
<표 3> 16S rDNA 기반 특이적 프로브

Bacterium	Probe Name	Length (bp)	T _m (°C)	Rating
Bacillus cereus	BACE1	20	63.6	85
	BACE2	20	63	81
	BACE3	21	65	100
Clostridium perfringens	CLPE1	20	65	100
	CLPE2	20	62.9	100
Listeria monocytogenes	LIMO1	22	62.6	80
	LIMO2	22	64.0	90
Staphylococcus aureus	STAU1	22	63.4	81
	STAU2	31	63.0	74
Campylobacter coli	CAJE1	26	65.7	89
	CAJE2	26	69.6	79
Escherichia coli	ESCO	26	62.9	91
	ESCOO1	24	63.8	73
Escherichia coli O157:H7	ESCOO2	23	62.7	86
	SACH1	23	63.2	86
Samoella enterica subsp. enterica serotype Choleraesuis	SACH2	22	64.2	87

<i>Samoella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Enteritidis	SAEN	24	63.5	74
<i>Shigella boydii</i>	SHBO1	21	62.3	68
	SHBO2	21	63.1	57.1
	SHBO3	26	62.1	92
<i>Shigella dysenteriae</i>	SHDY1	24	63.1	89
	SHDY2	21	68.9	100
<i>Shigella sonnei</i>	SHSO1	21	62.5	67
	SHSO2	25	62.9	86
<i>Vibrio cholerae</i>	VICH1	19	63.5	79
	VICH2	20	62.3	79
<i>Vibrio parphaemolyticus</i>	VIPA1	24	63.1	88
	VIPA2	25	66.9	93
<i>Vibrio vulnificus</i>	VIVU1	22	63.8	84
	VIVU2	23	63.1	89
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YEEN1	22	63.8	91
	YEEN2	23	63.1	83

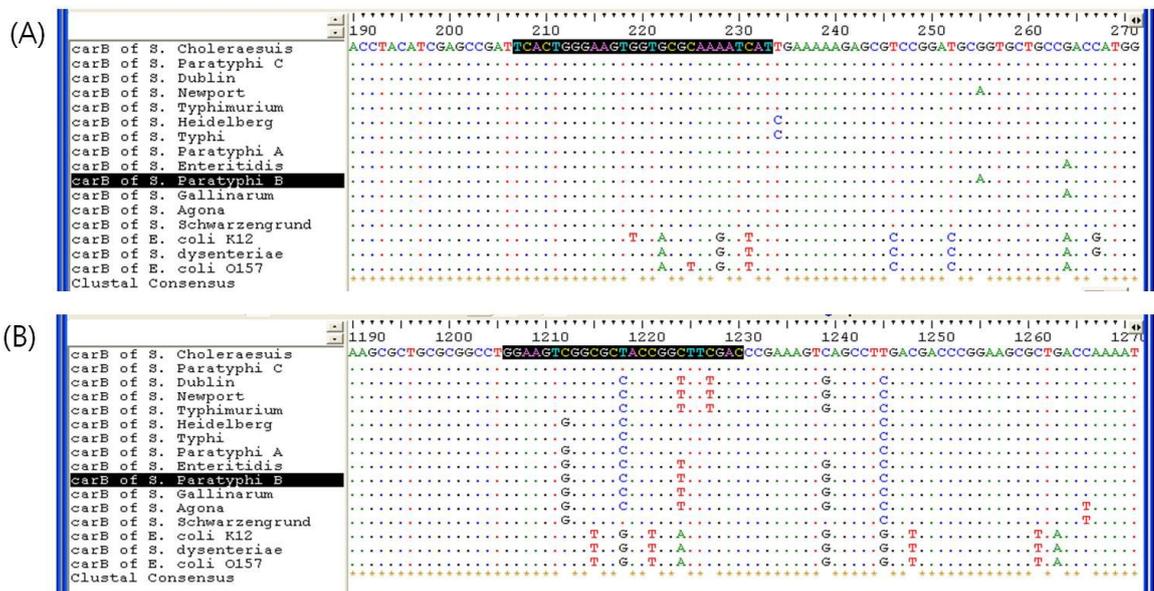
(2) 전체 Genome 유전자 서열 기반 프로브 설계 및 제작

특별히 *Salmonella*를 혈청형 수준으로 분류하기 위한 capture probe 설계의 전체적인 도식은 그림 9와 같다. 순서대로 *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Choleraesuis의 염색체를 이용하여 4,757,000 bp의 전체 염기서열을 30,000 bp씩 나누어서 NCBI에서 blast search를 통해서 검색하였다 (그림 10-A). 그 중에서도 구분하고자 하는 *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium이나 *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis와 같은 균주와 차이가 나는 유전자의 부분들의 염색체에서 위치, 염기서열, mismatch의 개수, 유전자의 이름 등을 정리하였다 (그림 10-B). 그 결과 전체 염색체에 대해서 136 개의 후보균을 검색할 수 있었다 (그림 10-C).



<그림 9> Genome-wide 검색을 통한 검출원리 선정과 primer와 probe 제작 도식

이 중에서도 특별히 여러 후보군들을 포함하고 있기 때문에 특이적인 검출 프로브를 제작하기에 가장 용이하고 가능성이 높은 유전자인 carbamoyl-phosphate synthetase large subunit(*carB*)를 선택하여 여러 다른 *Salmonella* 균주들의 *carB* 염기 서열을 수집하였다. 총 13개의 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* 혈청형들의 염기 서열이 수집되었고, 이와 동시에 가장 가까운 종인 *E. coli*나 *S. dysenteriae*와도 비교하였다. 그 중에서도 universal primer를 제작하기 위해서는 *Salmonella*끼리는 같은 염기 서열을 가지지만 다른 균주들과는 차이는 보이는 부분을 검색하였다 (그림 11A). 또한 specific probe 제작을 위해서는 다른 모든 균주들과 차이를 보이는 부분들을 찾아서 정리하였다 (그림 11B).



<그림 11> 염기 서열 비교를 통한 (A) universal primer, (B) specific probe 제작 방법

그 이후에 염기 서열의 차이나 특이적 프로브의 녹는점 등을 고려하여 각각에 맞는 primer와 probe들의 염기 서열을 결정한 것은 표 4, 표 5와 같다. 아래와 같이 여러 특성들을 고려하여 프로브들을 선택한 뒤, 이를 blast search 등을 통해 확인한 후에 최적의 프라이머들과 프로브들을 1차적으로 선별하였다.

<표 4 > *CarB* gene universal primers

Universal Primers	Length	Tm	Rating
Sal_87f	15	60.4	78
Sal_220f	19	58.7	77
Sal_378f	19	58.8	86
Sal_564f	19	59.3	87

Sal_1596r	15	62.2	81
Sal_1662r	16	60.6	93
Sal_2277r	19	59.2	89
Sal_2361r	18	60	79
Sal_3174r	20	58.6	89

<표 5> *CarB* 유전자 기반 특이적 프로브

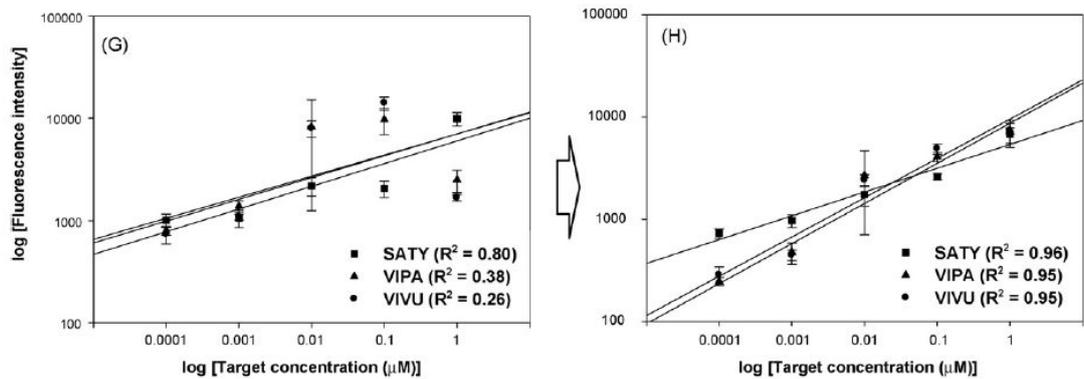
Bacterium	Probe Name	Length (bp)	T _m (°C)	Rating
All <i>Samoella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (Positive control)	Sal_POCO	22	63.2	88
<i>Samoella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Choleraesuis	SC 1	17	64.1	82
	SC 2	22	64.6	82
<i>Samoella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Enteritidis	SE 1	22	63.8	94
	SE 2	23	64	89
	SE 3	21	64.3	80
<i>Samoella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Typhimurium	ST 1	23	63.4	83
	ST 2	21	64	89

3. DNA Microarray 설계 및 제작

가. 정량 검출을 위한 표준 프로브 도입

DNA microarray의 정량 검출은 주로 병원균의 감염 최소량(infectious dose)을 넘는 오염도를 판별하기 위해서 중요한 요소이다. DNA microarray는 넓은 농도 분포에 대해서 검출이 가능하며 또한 정량적인 검출이 용이한 편이지만 chip-to-chip variation, spot-to-spot variation 등의 여러 오차들로 인하여 정확한 차이를 검출하기는 쉽지 않다. 그래서 주로 내부 표준이나 외부 표준 등을 이용하여 정량 분석을 수행하게 된다. 이 연구에서는 본 연구실에서 기존에 제작하여 특허와 논문이 제출되어 있는 인위적인 표준 프로브(Artificial standard capture probe) 전략을 도입하였다. 인위적인 표준 프로브는 다른 균주들이나 프로브들에 false-positive 반응이 일어나지 않는 인위적으로 제작한 DNA 염기서열로써 인위적인 표준 타깃 과만 혼성화 반응을 일으킨다. 이는 외부 표준으로써 증폭 반응이나 정제 반응을 거치지 않고 바로 사용되기 때문에 간단하고 저렴할 뿐만 아니라

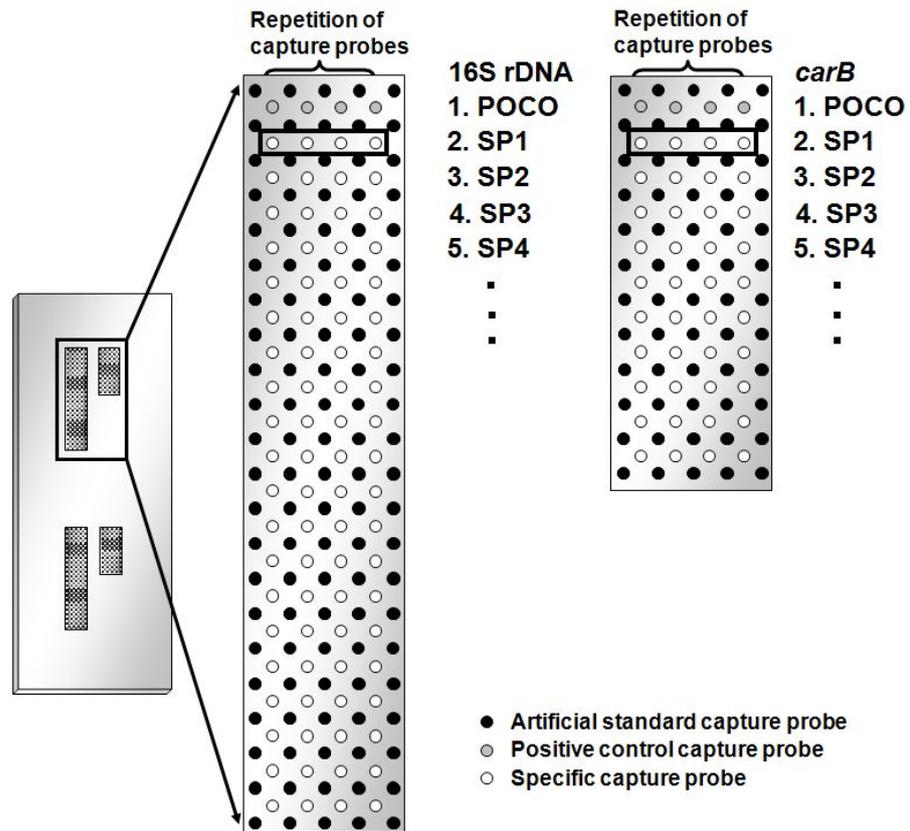
오차가 적다는 장점이 있다. 그림 12는 인위적 표준 프로브를 사용하여 실험한 결과를 보여주며 타깃의 농도와 형광세기가 정량적이지 않은 편인 것에 비해서 인위적 표준 프로브를 사용하여 형광세기를 보정한 경우에는 타깃의 농도와 상관관계 결정계수가 0.95 이상의 정량적인 실험 결과를 얻을 수 있었다.



<그림 12> 인위적으로 제작된 표준 프로브를 이용한 형광세기의 보정 전후의 상관관계

나. 재현성과 정확도를 고려한 microarray 설계

마이크로어레이는 바이오센서의 한 종류로서 주로 형광 검출을 이용하기 때문에 재현성 있는 실험을 위해서는 반복되는 스팟들과 어레이가 필요하며 또한 정확한 결과를 위해서는 정성적이고 정량적인 정확성을 확인할 수 있는데 특별히 정성적인 면에서는 일단 원하는 균주가 정확하게 검출되는가를 판별하기 위해서 프로브의 특이성 등의 고려가 필요하며 정량적인 면에서는 정량적인 상관관계 계수 등을 보면 얼마나 정확한 양을 측정할 수 있는지를 판별할 수 있다. 이를 고려하기 위해서는 일단 혼성화 반응의 성공적인 수행 여부를 판별하기 위해서 인위적 표준 프로브를 도입하면 된다. 앞서 언급했듯이 인위적 표준 프로브는 또한 chip-to-chip variation이나 spot-to-spot variation을 보정하여 재현성이나 정량적인 재현성을 높일 수 있다. 또한 특이적인 검출 프로브의 경우에도 스팟들을 반복하는 것이 정성적인 정확성이나 통계적인 의미를 가지며 정확성을 높일 수 있는 방법이다. 이런 원리들을 이용하여 본 연구에서 사용될 microarray는 기본적으로 다음과 같이 설계되었다. (그림 13).



<그림 13> 마이크로어레이의 기본적인 디자인 모식도

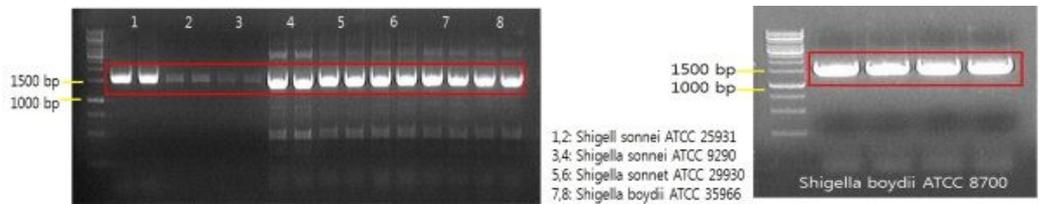
그림에서 인위적 표준 프로브들은 각각의 특이적인 프로브들을 정사각형 모양으로 감싸고 있으며 5 X 특이적인 프로브의 개수 + 1의 행렬 모양을 가진다. 그 사이사이에 있는 스팟들은 가장 첫 줄은 양성 대조군 프로브이며 4개씩 반복적으로 나타난다. 그리고 각 행의 4개의 반복적인 스팟들은 특이적인 프로브들로써 한 균주에 대해서 최대한 많은 숫자를 만들었다. 두 개의 큰 어레이 세트 중에서 왼쪽 것은 16S rDNA를 검출원리로 하여 속이나 종을 알아내기 위해서 만들었고, 오른쪽 것은 *Salmonella*의 혈청형까지 검출하기 위해서 *carB* 유전자를 이용한 특이적 검출 프로브의 어레이이다.

4. 특이적 프로브 선별 및 추가 실험

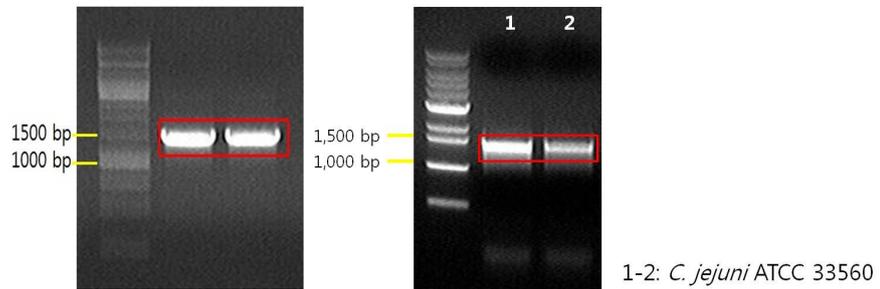
가. SNP 고려를 위한 동종 염기서열의 *in silico* 분석

(1) 16S rDNA기반 DNA 마이크로어레이 대상균주를 위한 *in silico* 분석
 실제 대상 균주로부터 검출 원리 염기서열을 얻고 기존 데이터베이스 상의 염기서열과의 비교 분석을 통해 제작한 프로브의 특이성을 점검해 볼 수 있다. *In silico* 분석을 거치지 않은 새로운 균주들을 대상으로 검출 원리 염기서열을 획득하기 위해 *Clostridium perfringens*, *Shigella sonnei*,

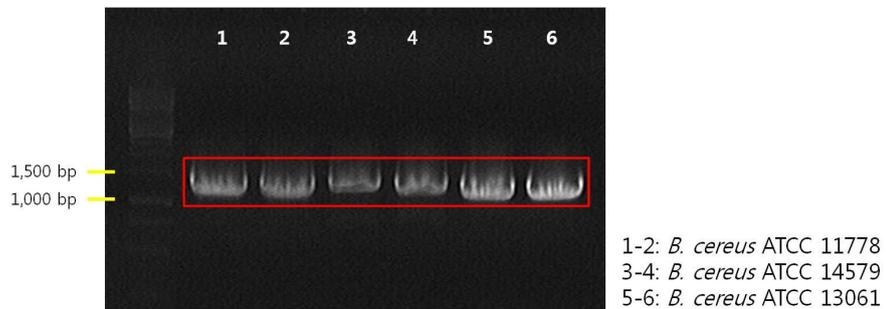
Shigella boydii, *Bacillus cereus* 균주를 배양하였다. 이 세 균주 중 *Clostridium perfringens*는 혐기 미생물로 glove box 내에서 차단된 유리 병에서 reinforced clostridial media에 접종 후 37°C에서 배양하였으며 *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*와 *B. cereus*는 nutrient broth media에 접종 후 역시 37°C에 배양하였다. 배양 후 얻은 세포로부터 DNeasy® Tissue kit을 이용하여 각각의 DNA chromosome을 추출하였다. 추출한 chromosome을 template로 사용하여 각 균주별로 16S rDNA PCR 반응을 하였으며 1% agarose로 gel electrophoresis를 하여 그 결과를 확인하였다(그림14-16). *Campylobacter jejuni*는 혐기 미생물로 본 연구실에서 배양을 시도하였으나 배양이 어려워 DNA chromosome을 KTCK에서 구입하여 다른 미생물과 같은 실험을 수행하였다(그림 15 오른쪽). 약 1,500 bp 크기를 가지는 DNA band로부터 gel purification을 거쳐 16S rDNA을 얻어 DNA 시퀀싱을 수행하였다.



<그림 14> *Shigella sonnei* & *boydii* 16S rDNA PCR



<그림 15> *C. perfringens* & *C. jejuni* 16S rDNA PCR



<그림 16> *B. cereus* 16S rDNA PCR

시퀀싱 결과로 얻은 세 균주의 염기서열 정보를 데이터베이스로부터 얻은 염기서열 정보와 BioEdit 프로그램을 이용하여 alignment 후 비교, 분

석하였다. 이 분석에서 실제 균주의 16S rDNA 염기 서열과 설계한 특이적 프로브의 염기 서열의 차이 여부가 중요하므로 이를 중점적으로 비교하였다. 그 결과는 아래의 표로 정리하였다(표6). 또, *Shigella sonnei*와 *Shigella boydii*의 경우는 두 균주는 같은 genus이므로 한 균주의 16S rDNA 실제 염기서열과 다른 균주의 특이적 프로브 염기서열과의 차이가 어느 정도인지도 함께 확인하였다.

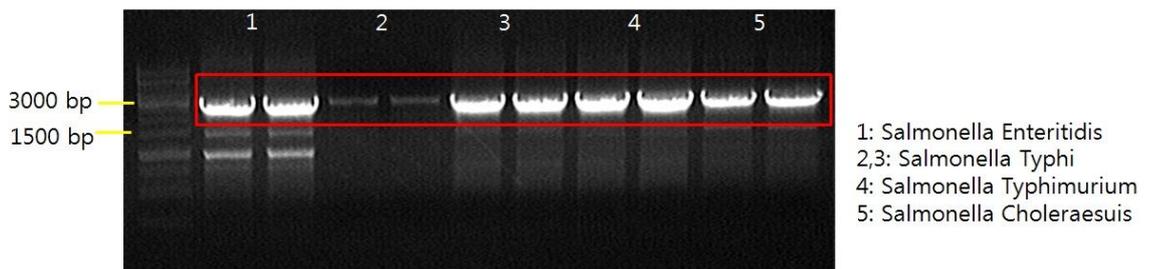
<표 6> 시퀀싱 염기 서열 분석 결과

검출 대상 균주	특이적 프로브	시퀀싱한 대상 균주	ATCC No.	분석 결과
<i>Shigella sonnei</i>	SHSO 1	<i>S. sonnei</i>	25931	일치
			9290	일치
			29930	일치
		<i>S. boydii</i>	35966	2bp 차이
	8700		2bp 차이	
	SHSO 2	<i>S. sonnei</i>	25931	2bp 차이 가능성 있음
			9290	3bp 차이 가능성 있음
			29930	2bp 차이 가능성 있음
<i>S. boydii</i>		35966	6bp 차이	
	8700	6bp 차이		
<i>Shigella boydii</i>	SHBO 1	<i>S. sonnei</i>	25931	2bp 차이
			9290	2bp 차이
			29930	2bp 차이
		<i>S. boydii</i>	35966	1bp 차이
	8700		일치	
	SHBO 2	<i>S. sonnei</i>	25931	2bp 차이
			9290	2bp 차이
			29930	2bp 차이
		<i>S. boydii</i>	35966	일치
	8700		일치	
	SHBO 2	<i>S. sonnei</i>	25931	6bp 차이
			9290	6bp 차이
29930			6bp 차이	
<i>S. boydii</i>		35966	일치	
	8700	일치		
<i>Clostridium perfringens</i>	CLPE 1	<i>C. perfringens</i>	13124	일치
	CLPE 2	<i>C. perfringens</i>	13124	판독 불가
<i>Campylobacter jejuni</i>	CAJE 1	<i>C. jejuni</i>	33560	일치
	CAJE 2	<i>C. jejuni</i>	33560	일치
<i>Bacillus cereus</i>	BACE 1	<i>B.cereus</i>	11778	일치
			13061	일치
			14579	일치
	BACE 2	<i>B.cereus</i>	11778	일치
			13061	2bp 차이 가능성 있음
			14579	일치
	BACE 3	<i>B.cereus</i>	11778	일치
			13061	2bp 차이 가능성 있음
			14579	일치

*Clostridium perfringens*의 특이적 프로브인 CLPE 1은 균주의 실제 염기서열과 차이가 없으므로 특이적으로 대상 미생물을 검출할 수 있을 것으로 예상된다. CLPE2의 경우 염기 서열상의 마지막 지역에 위치하여 정확한 염기서열의 비교가 불가능 하였다. 특이적 프로브 SHSO 1은 *Shigella sonnei* 표준 균주 3종과 염기 서열이 일치함을 확인할 수 있었지만 *Shigella boydii*와도 2bp 차이 정도로 유사성이 높아 실제 실험에 적용하였을 때 이 두 균주를 구분하지 못할 가능성도 있음을 확인했다. SHSO 2는 *Shigella boydii*와 염기 서열의 차이를 많이 보이지만 역시, 검출 대상인 *Shigella sonnei*의 실제 염기서열과도 차이를 보이고 있어 실제 검출함에 한계가 있을 것으로 예상했다. SHBO 1은 *Shigella boydii*의 표준 균주 중 한 종과는 염기서열의 일치를 보였지만 다른 한 종과는 1bp 차이를 보였으며 *Shigella sonnei* 표준 균주와는 보통 2bp 차이를 보여 높은 특이성을 기대하기는 어려워 보인다. 반면 SHBO2는 *Shigella sonnei*와도 6bp 차이를 보여 특이적 검출을 기대할 수 있었다. CAJE 1, 2는 실제 *Campylobacter jejuni*의 실제 염기서열과도 일치함을 보여 특이적 검출에 무리가 없을 것으로 생각된다. BACE 1과 달리 BACE 2, 3은 *Bacillus cereus* 한 균주와 2bp정도의 염기서열 차이가 있을 가능성이 있지만 특이적 검출에는 전반적으로 문제가 없을 것이라고 생각했다.

(2) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* 혈청형에 대한 *in silico* 분석

앞서 언급한 것과 마찬가지로 대상 균주로부터 직접 얻은 검출 원리 염기서열과 기존 데이터베이스 상의 염기서열과의 비교 분석을 통해 *Salmonella* 아종 검출용으로 제작한 프로브의 특이성을 점검하기 위해 *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Choleraesuis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Typhi의 각 chromosome DNA를 template로 CarB용 universal 프라이머 220f와 3174r로 CarB gene을 PCR 반응으로 증폭하였다(그림 17).



<그림 17> CarB gene PCR 결과

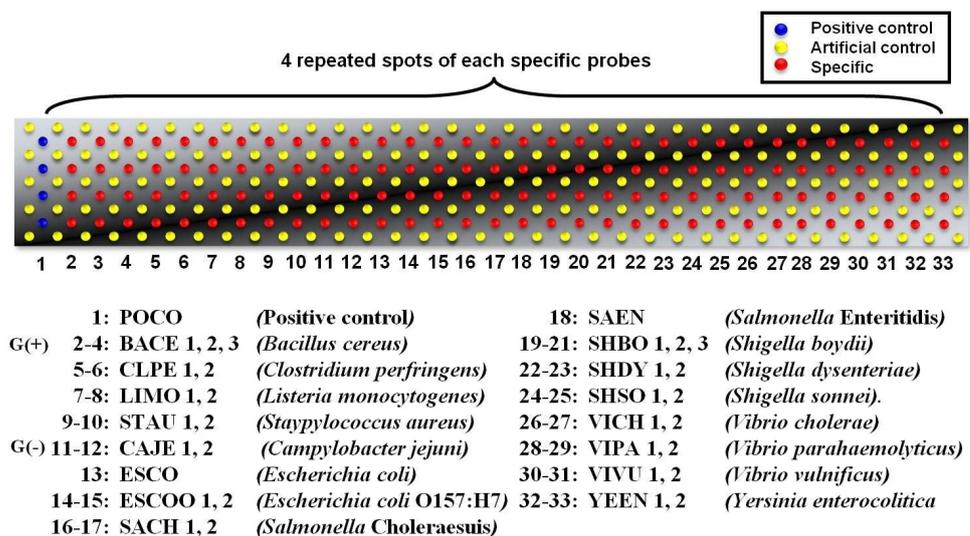
증폭한 CarB gene 역시 gel purification을 거쳐 (주)제노텍에 시퀀싱 의뢰하였다. 시퀀싱을 통해 얻은 염기서열을 alignment하고 각 *Salmonella* 아종에 해당하는 특이적 프로브와 비교 분석 하였다. 그 결과 *Salmonella* Typhimurium의 특이적 프로브 ST 1, 2 와 *Salmonella* Enteritidis의 특이

적 프로브 SE 1, 2, 3은 해당 실제 균주 염기서열과 일치함을 확인할 수 있었다. 그러나 *Salmonella Choleraesuis*의 특이적 프로브 SC 1, 2는 실제 균주 염기서열과 많은 차이가 있는 것으로 확인되었다. 이것은 당시 보유하고 있던 *Salmonella Choleraesuis* 균주가 사실은 *Salmonella Typhimurium*임이 밝혀져 이로 인해 염기 서열의 차이가 나타난 것으로 보인다. 그렇기 때문에 *Salmonella Choleraesuis* 새로운 균주 확보가 요구되어 세 개의 균주를 균주은행 ATCC와 KCCM으로부터 구매하였다. 새롭게 구입한 *Salmonella Choleraesuis* 중 ATCC 13312, 10708, 7001 strain은 nutrient media에 37°C 배양을 하여 Chromosomal DNA를 추출하고 마찬가지로 16S rDNA PCR 및 *CarB* gene PCR을 수행하였다. 시퀀싱을 다시 한 결과 세 개의 균주의 염기서열과 SC 1, 2의 차이는 없는 것으로 확인되어 특이적 검출이 가능할 것으로 예상했다.

나. 유전체를 이용한 실험으로 프로브 선별

(1) 16S rDNA 기반 DNA 마이크로어레이를 위한 프로브 선별

16S rDNA 기반으로 설계 및 제작한 각 균주들의 프로브들을 균주의 유전체를 이용하여 실제적으로 검출 가능한지 확인하기 위해서 1개의 양성 대조군 프로브와 16종의 균주에 대해 각각 특이적인 프로브 32개를 포함한 총 33의 프로브 배열을 가지는 DNA 마이크로 어레이를 다음과 같이 설계 및 제작하였다(그림 18).



<그림 18> 16S rDNA 기반 DNA microarray 모식도

DNA 마이크로어레이를 제작한 후 실험을 위한 DNA sample을 준비하기 위해서 각 균주별 chromosome DNA를 template로 하며 16S rDNA 27f, 1492r universal primer를 사용하여 16S rDNA PCR을 하였다.

PCR을 통해 증폭된 16S rDNA은 정제 과정을 거친 뒤 Alexa Fluor® 647 형광 염료로 표지하고 다시 정제를 거쳐 최종적으로 타겟 DNA sample을 준비했다. 준비된 DNA sample을 이용하여 앞서 제작한 DNA 마이크로어레이 기판에서 DNA 혼성화 반응을 하고, 1시간 뒤에 세척 후 형광 이미지 스캐너를 이용하여 신호 검출을 확인하였다 (그림 19).

◆ DNA를 이용한 Microarray 실험

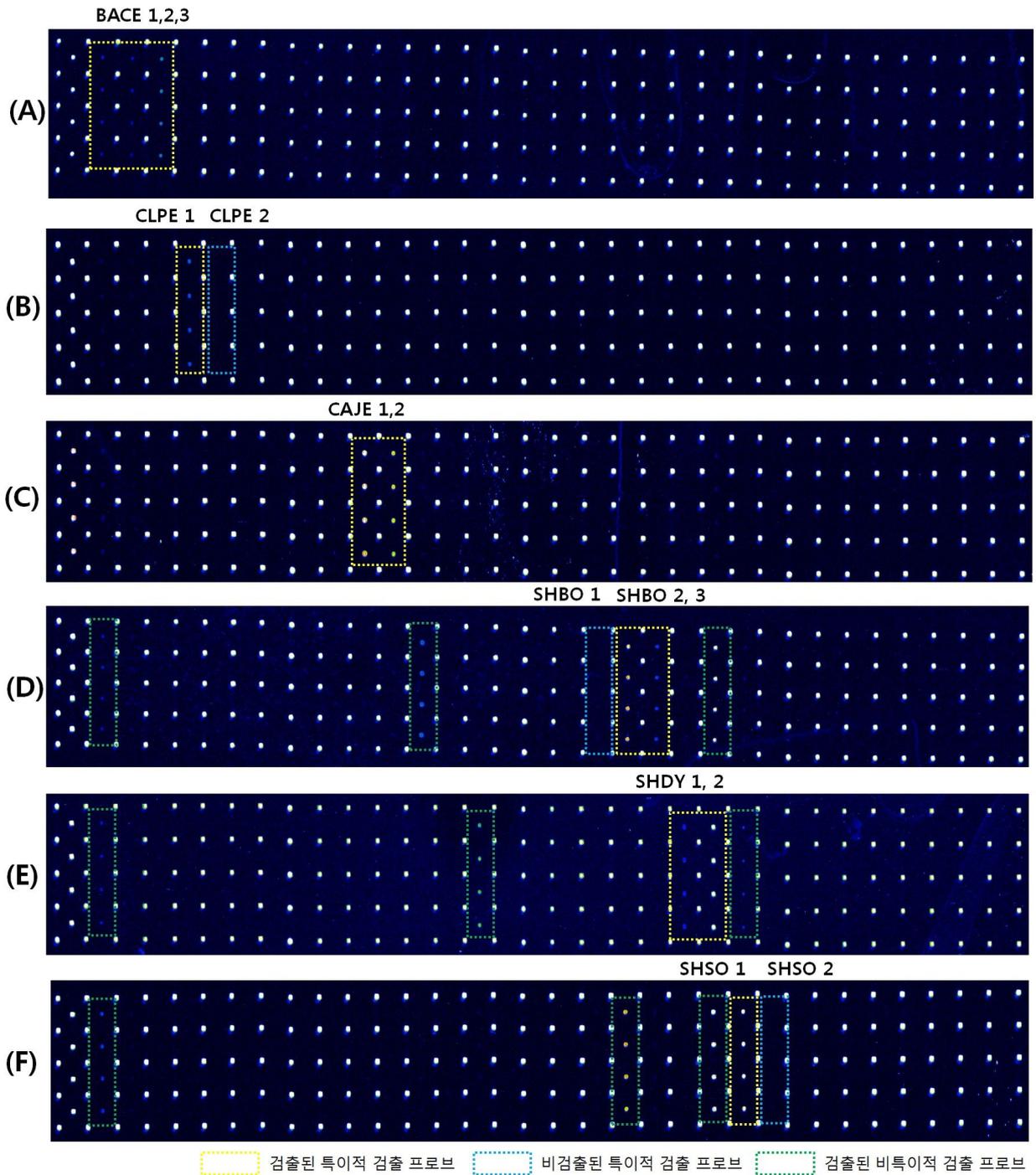


<그림 19> DNA 이용한 16S rDNA 기반 microarray 실험 과정

먼저, 본 연구에서 새롭게 디자인한 *B. cereus*, *C. perfringens*, *C. jejuni*, *S. boydii*, *S. sonnei*의 특이적 검출 프로브 12개의 특이성 및 검출 능력을 확인하고자 하였다. 그래서 *B. cereus*, *C. perfringens*, *C. jejuni*, *S. boydii*, *S. sonnei* 및 *S. dysenteriae* 16S rDNA를 준비하여 위와 같은 방법으로 마이크로어레이 실험을 수행하였고 결과는 그림 20과 같다.

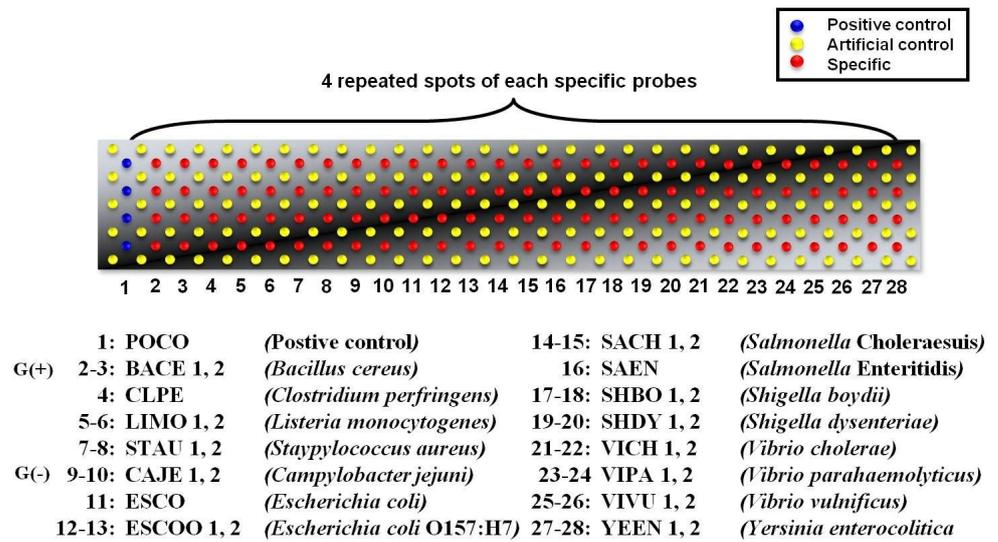
첫 번째로 *B. cereus*를 시험한 결과(그림 20-A)를 보면, 특이적 검출 프로브인 BACE 1, 2, 3의 형광신호가 검출이 되었고 다른 비특이적 검출 프로브 신호는 보이지 않는다. 그러나 다른 대상 균주를 시험하였을 때, BACE 1의 비특이적 신호가 비교적 자주 나타나는 경향을 보였다. 다른 대상 균주인 *C. perfringens*의 경우(그림 20-B), 특이적 검출 프로브 중 CLPE 1는 형광 신호가 나타났지만 CLPE 2의 형광 신호는 보이지 않는다. 이는 CLPE 2의 16S rDNA 내 위치가 증폭되는 타겟 DNA 상에 포함되지 않기 때문으로 보인다. *C. jejuni*(그림 20-C)는 특이적인 프로브인 CAJE 1, 2만 형광신호를 보였다. *S. boydii*는 세 개의 특이적 검출 프로브가 있는데 그 중 SHBO 2, 3만이 형광 신호를 보였고 SHBO 1는 형광신호를 나타내지 않았다. 또한, 특이적 검출 신호뿐만 아니라 비특이적 검출 프로브인 ESCO (*E. coli* 검출 프로브)와 SHDY 2(*S. dysenteriae* 검출 프로브)의 형광 신호도 같이 나타났다. *S. sonnei*의 경우(그림 20-F)에는 특이적 검출 프로브인 SHSO 1과 비특이적 검출 프로브인 SHBO 2, SHDY 2의 신호 역시 같이 검출이 되었다. 다른 *shigella* 검출 프로브의 crossreactivity를 확인하기 위해서 *S. dysenteriae*를 시험하였는데 특이적 프로브 외에도 ESCOO 2(*E. coli* O157:H7 검출 프로브)와 SHSO 1의 검출 프로브가 같이 확인되었다.

여러 번의 반복 실험의 결과, CLPE 2, SHBO 1은 형광 신호를 계속 보이지 않았기 때문에 검출 프로브에서 제외하기로 하였으며 지속적으로 비대상 검출 균주에서 비특이적 신호를 자주 보이는 BACE 1과 SHSO 1도 같이 제외하기로 하였다. 그런데 *S. sonnei*의 검출 프로브 중 SHSO 2는 신호가 약해 SHSO 1이 없는 경우에는 검출이 어려울 것으로 판단되어 최종 검출 대상 균주에서도 제외하기로 결정하였다.



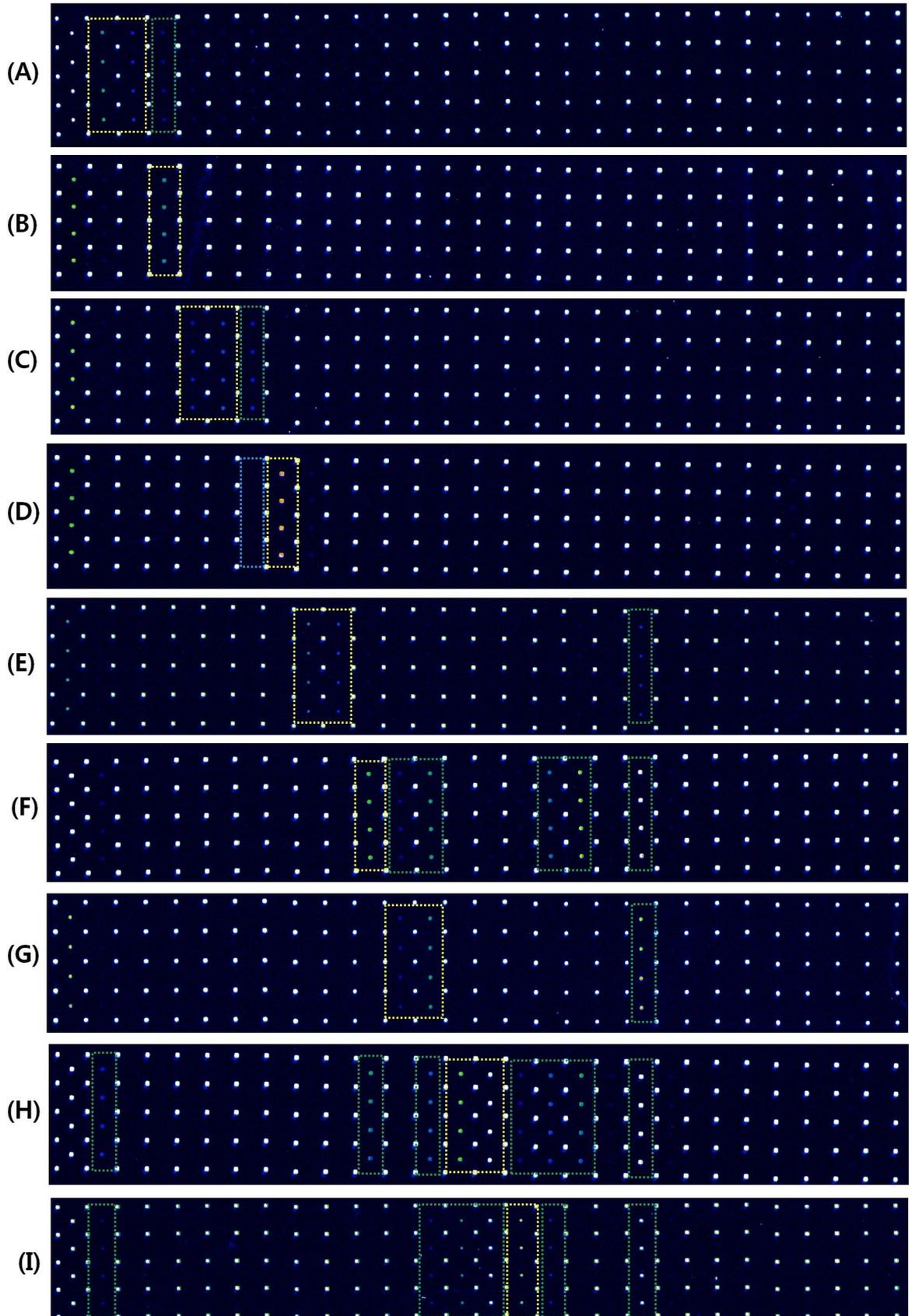
<그림 20> 16S rDNA 기반 마이크로어레이 실험 결과 (A) *B. cereus* (B) *C. perfringens* (C) *C. jejuni* (D) *S. boydii* (E) *S. dysenteriae* (F) *S. sonnei*

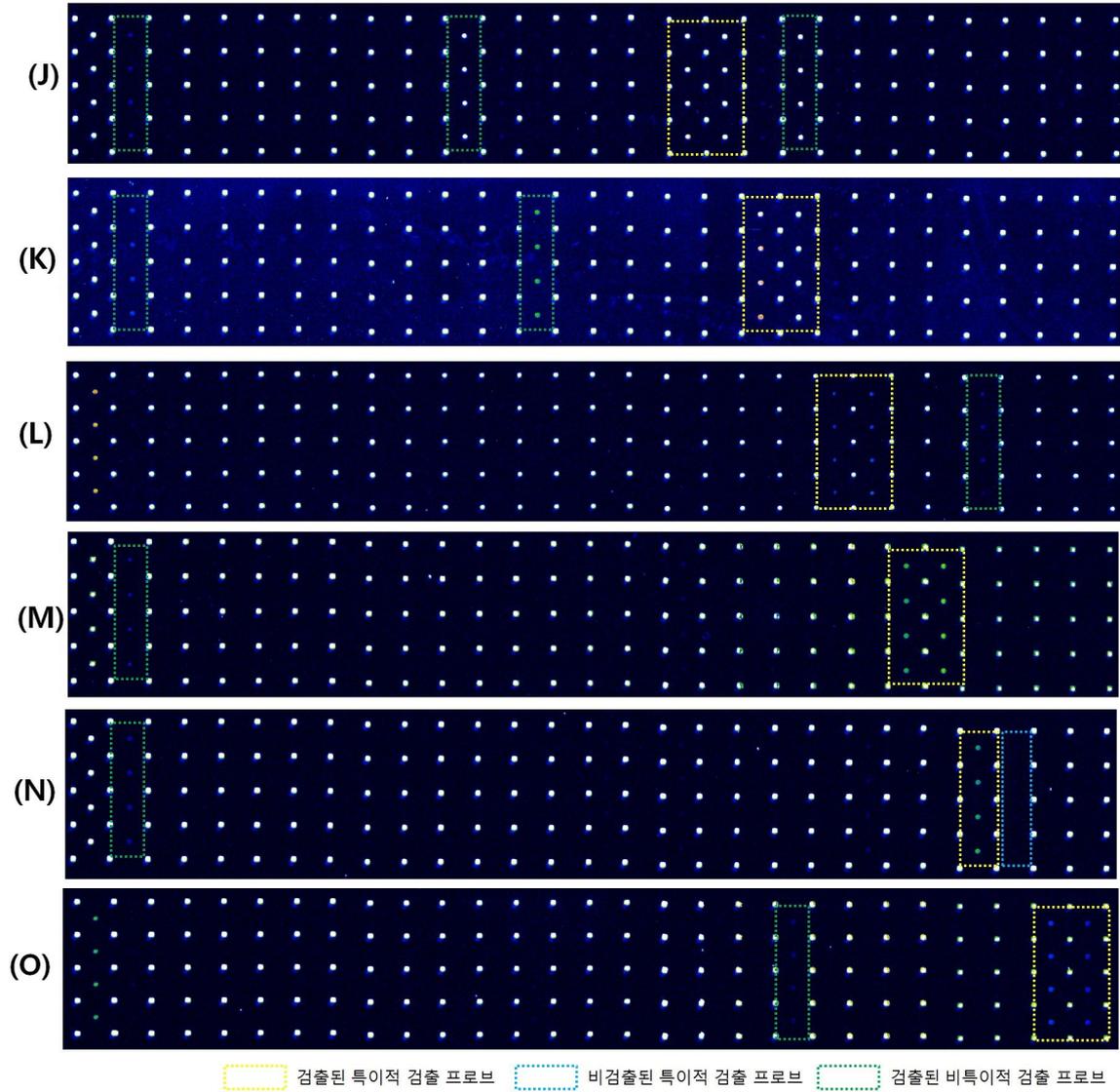
위의 실험 결과를 반영하여 검출 프로브의 이름을 재조정하고 다시 16S rDNA 기반 DNA 마이크로어레이를 설계 및 제작하였다 (그림 21).



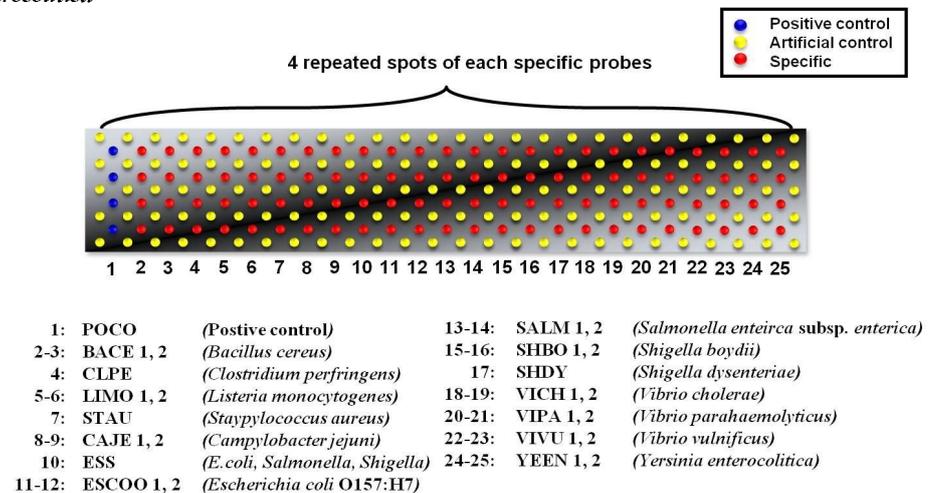
<그림 21> 선별된 검출 프로브를 포함한 16S rDNA 기반 DNA microarray

1차적으로 선별된 검출 프로브를 포함한 16S rDNA 기반 DNA microarray을 시험해보기 위해서 대상 균주 16종의 16S rDNA를 준비하여 각각을 테스트하였다(그림 22). 그 결과 대부분의 검출 대상 균주들은 각각 해당하는 특이적 검출 프로브의 형광 신호가 나타났다. 그러나 *S. aureus*의 경우(그림 22-D)에는 특이적 검출 프로브 중 STAU 1이 신호를 보이지 않고 *L. monocytogenes*(그림 22-C)를 시험하였을 경우에 비특이적 신호로써 나타났다. 반복적으로 실험해도 같은 결과가 도출되어 STAU 1을 특이적 검출 프로브에서 제외하기로 결정하였다. *E. coli*는 병원성 미생물은 아니지만 컨트롤 박테리아로서 검출 대상으로 포함하였었는데 해당 특이적 검출 프로브뿐만 아니라 다른 대상 균주의 검출 프로브 ESCOO 1, 2, SHBO 1, 2, SHDY 2와도 높은 반응성을 보였다(그림 22-F). 또한 다른 대상 균주들의 16S rDNA가 *E. coli*의 특이적 검출 프로브인 ESCO와 종종 반응을 하여 비특이적 형광 신호를 나타내는 경우도 있어(그림 22-H, J) 검출 대상 균주에서 제외함으로써 검출 신호의 혼란을 줄이고자 하였다. *Salmonella Choleraesuis*와 *Salmonella Enteritidis*는 앞서 언급하였듯이 두 균주의 16S rDNA 염기서열의 차이가 거의 없기 때문에 16S rDNA 염기 서열을 이용해서는 구분하여 검출하기가 불가능하다(그림 22-H, I). 따라서, 두 균주에 동시에 신호가 나타나는 SACH 1, 2를 대표 검출 프로브로 설정하고 SAEN 프로브를 제외하기로 결정하였다. 또, *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* 균주에서 공통적으로 그리고 강한 신호로 나타나는 SHDY 2(그림 22-F~K)를 *S. dysenteriae*을 검출하는 특이적 프로브에서 *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*를 동시에 검출할 수 있는 프로브로 역할을 바꾸기로 결정하였다.





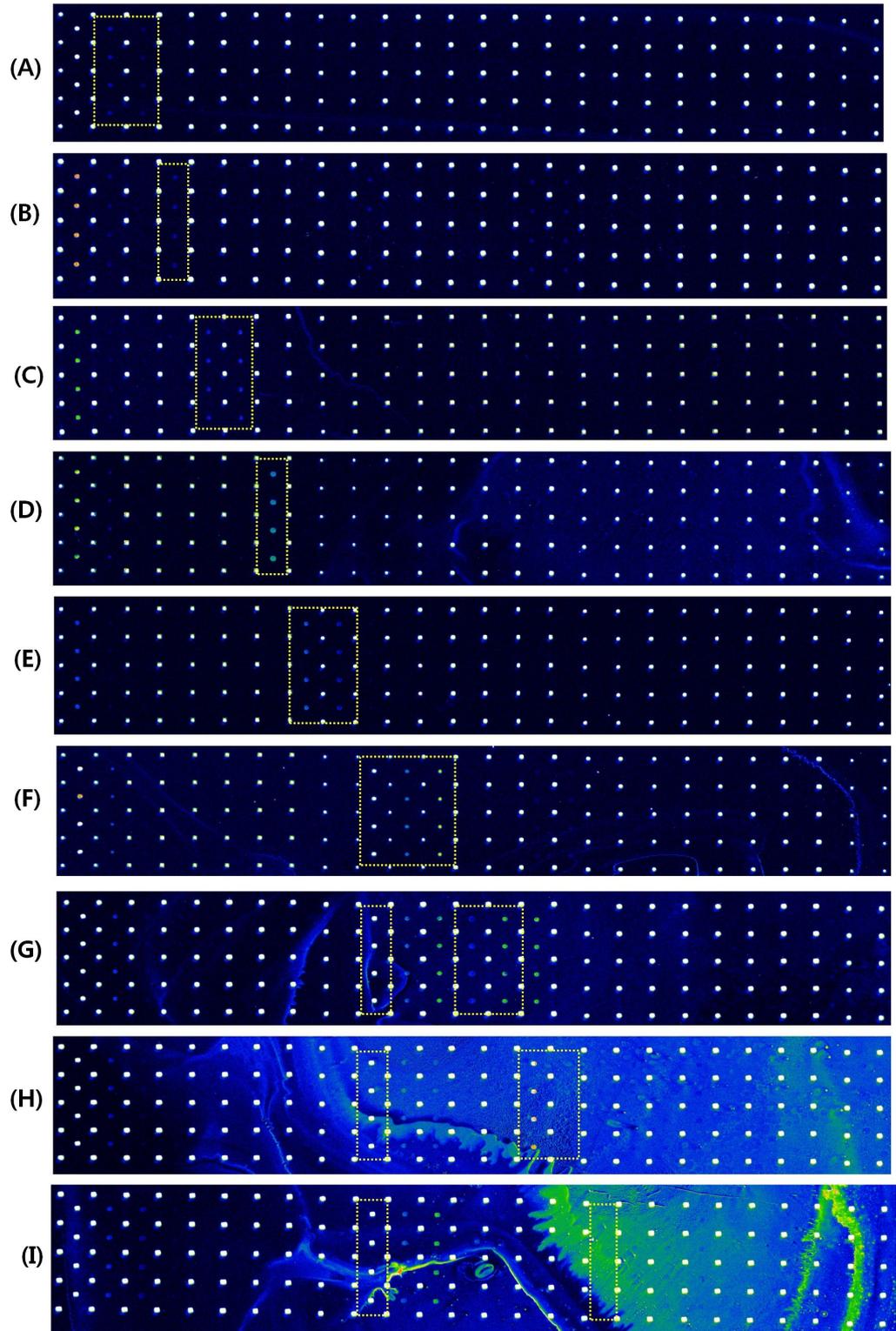
<그림 22> 1차 선별한 검출 프로브를 포함한 16S rDNA 기반 DNA Microarray (A) *B. cereus* (B) *C. perfringens* (C) *L. monocytogenes* (C) *S. aureus* (E) *C. jejuni* (F) *E. coli* (G) *E. coli* O157:H7 (H) *S. Choleraesuis* (I) *S. Enteritidis* (J) *S. boydii* (K) *S. dysenteriae* (L) *V. cholerae* (M) *V. parahaemolyticus* (N) *V. vulnificus* (O) *Y. enterocolitica*

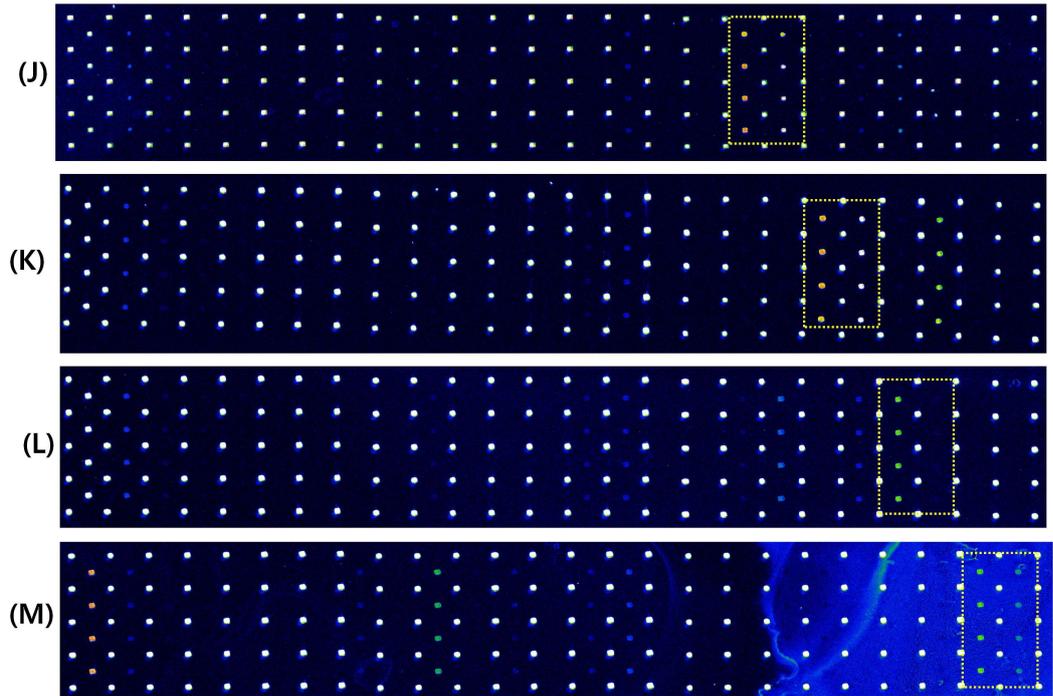


<그림 23> 최상의 16S rDNA 기반 DNA microarray

위의 실험 결과를 바탕으로 2차 선별된 검출 프로브들의 이름과 대상 균주를 다시 설정하고 이를 포함한 최상의 16S rDNA microarray를 다음 모식도와 같이 설계 및 제작하였다(그림 23).

위와 같이 최종으로 결정된 DNA microarray에 대해서 모든 검출 대상 병원성 미생물을 시험한 결과는 그림 24와 같다.





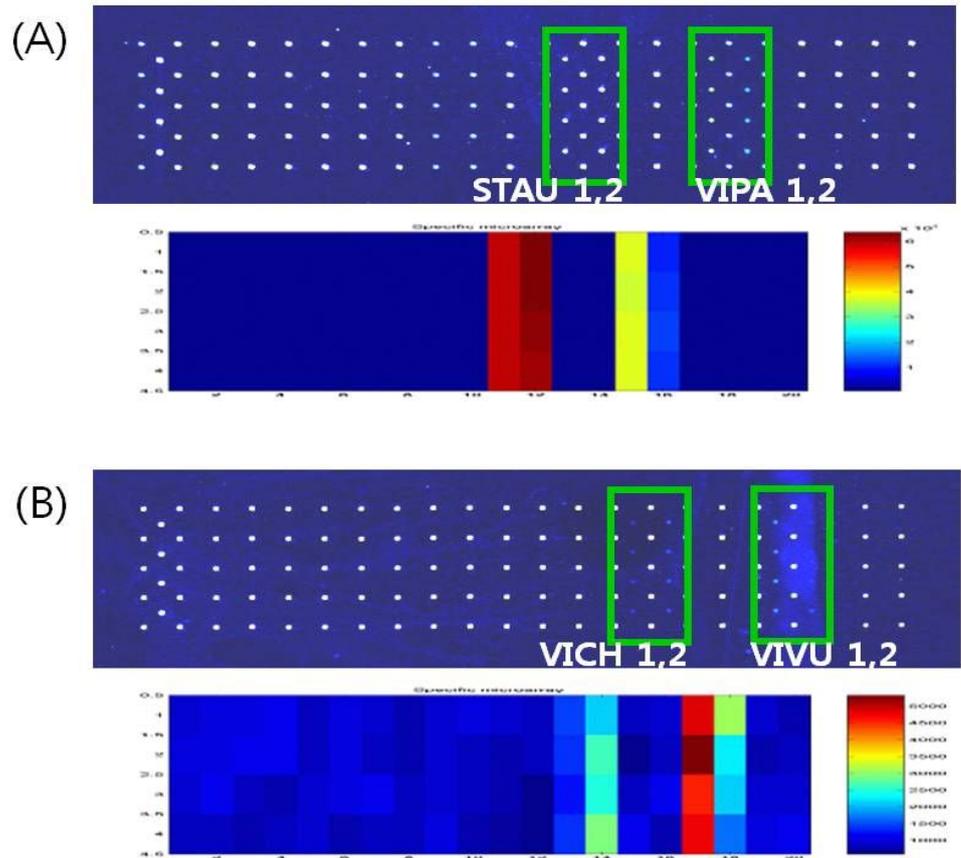
<그림 24> 최종 선별한 검출 프로브를 포함한 16S rDNA 기반 DNA Microarray (A) *B. cereus* (B) *C. perfringens* (C) *L. monocytogenes* (C) *S. aureus* (E) *C. jejuni* (F) *E. coli* O157:H7 (G) *S. Enteritidis* (H) *S. boydii* (I) *S. dysenteriae* (J) *V. cholerae* (K) *V. parahaemolyticus* (L) *V. vulnificus* (M) *Y. enterocolitica*

(2) 제작된 DNA 마이크로어레이를 이용한 동시 검출

본 연구에서 개발한 마이크로어레이를 이용하여 병원성 미생물을 동시 검출의 가능성을 확인하기 위해서, 2종의 병원성 미생물 염색체를 섞어 16S rDNA를 증폭하여 혼성화 실험을 수행하였다 (그림 25).

*S. aureus*와 *V. parahaemolyticus*의 염색체를 혼합하여 실험을 수행한 경우 (그림 25-A), 각 대상 병원성 미생물의 특이적 프로브인 STAU 1, 2와 VIPA 1, 2의 형광 신호가 동시에 성공적으로 검출되었다. 또, *V. cholerae*와 *V. vulnificus*의 염색체를 혼합하여 실험을 수행한 경우에도 VICH 1, 2와 VIVU 1, 2의 형광신호를 검출 할 수 있었다(그림 25-B).

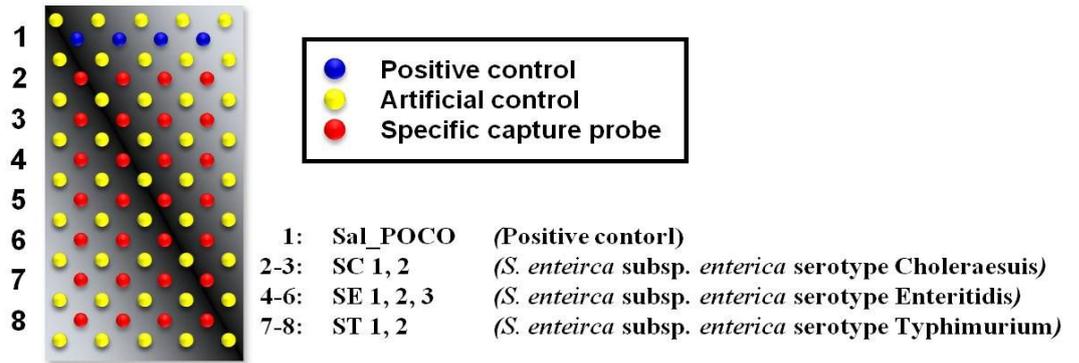
이를 통하여 여러 종류의 병원성 미생물들이 혼합되어 있는 경우에도, 제작된 DNA 마이크로어레이를 이용하여 한 번의 시험으로 각각의 병원성 미생물들을 특이적이며 동시에 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 본 실험에서 검출된 형광 세기를 1종의 병원성 미생물을 검출하는 경우와 비교 했을 때, 거의 차이가 없음을 확인 할 수 있었으며 이를 통해 신호들 간의 간섭 없이 성공적으로 독립적 동시 검출이 가능함을 확인할 수 있었다.



<그림 25> (A) *S. aureus*와 *V. parahaemolyticus*의 염색체를 혼합하여 수행한 혼성화 실험 결과 (B) *V. cholerae*와 *V. vulnificus*의 염색체를 혼합하여 수행한 혼성화 실험 결과

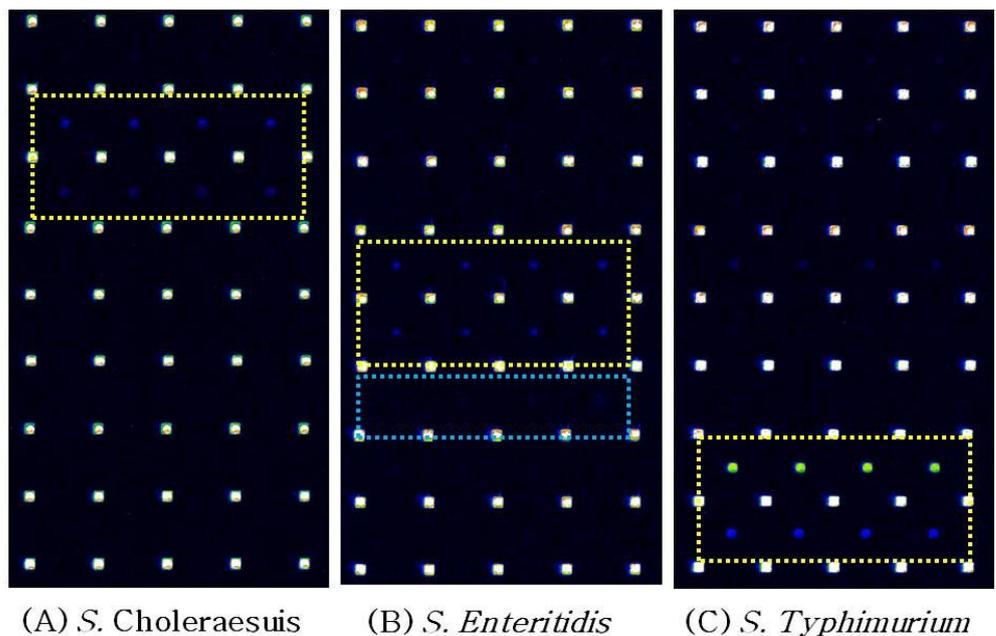
(3) *S. enterica* subsp. *enterica* 혈청형 검출용 DNA 마이크로어레이를 위한 프로브 선별

S. enterica subsp. *enterica* 혈청형 구분하기 위해서 전체 chromosome 유전자 서열 중에서도 *CarB* gene을 선정하여 *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Choleraesuis, *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium, *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis를 대상으로 각각 특이적 프로브를 설계 및 제작하였다. 제작한 프로브를 기반으로 다음과 같은 *S. enterica* subsp. *enterica* 혈청형 검출용 DNA 마이크로어레이를 설계 및 제작하였다 (그림 26).



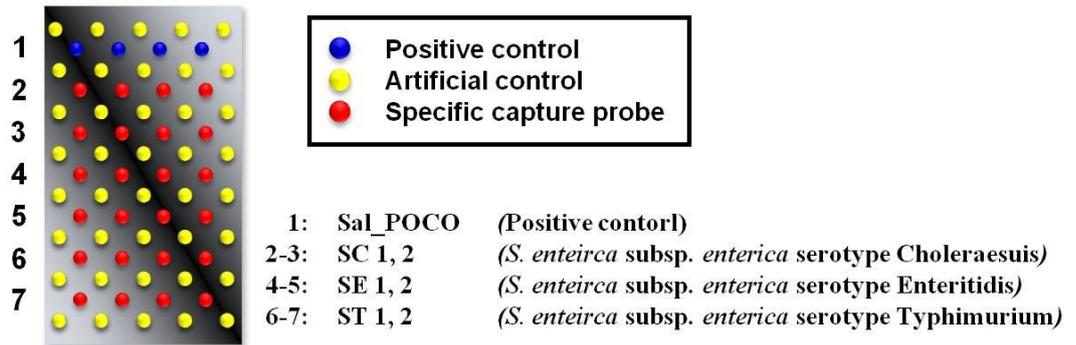
<그림 26> *S. enterica* subsp. *enterica* 혈청형 검출용 DNA microarray

S. enterica subsp. *enterica* 혈청형 검출용 DNA 마이크로어레이도 16S rDNA 기반 DNA 마이크로어레이 PCR 일부 과정을 제외한 나머지 과정과 흡사하다. 단, PCR 반응을 할 때에는 *CarB* gene을 증폭하기 위해서 따로 제작한 universal 프라이머들 중에서 Sal_87f와 Sal_1596r 프라이머를 이용하였다. 이것은 전체 *CarB* gene을 PCR을 하는 것이 아니라 일부 길이(약 15,000bp)만을 증폭하기 위함이며 이 DNA 지역 내에는 Positive control을 비롯한 나머지 7개의 특이적 프로브들이 위치하고 있어 검출에는 전혀 영향을 주지 않는다. 16S rDNA 기반 DNA 마이크로어레이와 같은 실험 방법으로 *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Choleraesuis, *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis, *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium 세 검출 대상 균주들을 시험해보았다(그림 27).



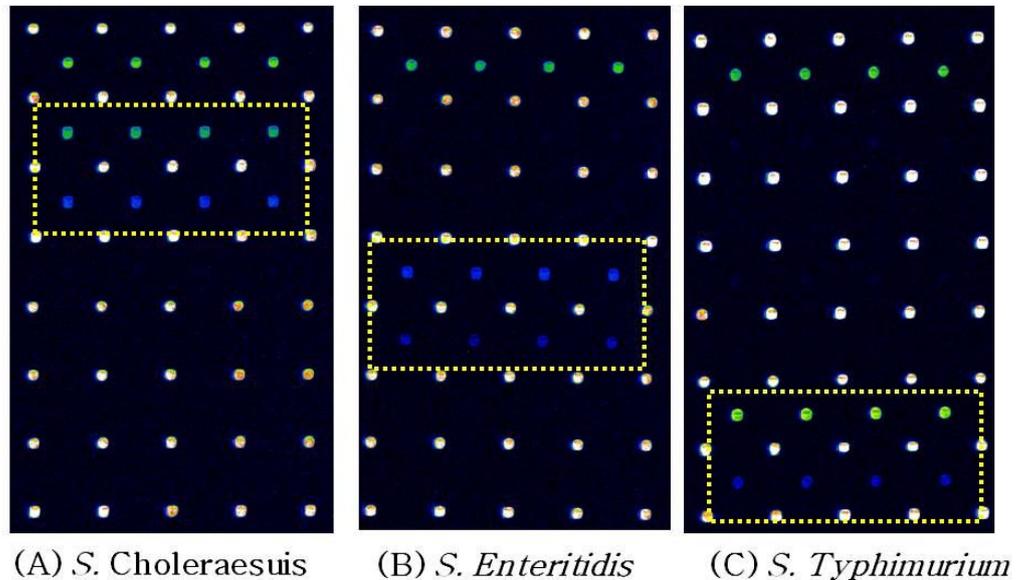
<그림 27> *S. enterica* subsp. *enterica* 혈청형 검출용 DNA microarray 실험 결과

그 결과, *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Choleraesuis와 *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium는 각각 해당하는 특이적 검출 프로브 형광 신호가 성공적으로 검출이 되었지만 *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis의 경우에는 특이적 검출 프로브 3개 중에 2개인 SE 1, 2만이 형광 신호를 보였고 SE 3는 형광 신호가 검출되지 않았다. 반복실험을 통해 검증한 결과 위와 같은 결과가 반복되어 최종적으로 SE 3를 제외한 positive control을 포함한 7개의 검출 프로브를 포함하는 최상의 *S. enterica* subsp. *enterica* 혈청형 검출용 DNA 마이크로어레이 형태로 결정하였다(그림 28).



<그림 28> 최상의 *S. enterica* subsp. *enterica* 혈청형 검출용 DNA 마이크로어레이

위의 그림과 같이 설계 및 제작한 DNA microarray를 시험한 결과는 아래 그림 29과 같으며 세 균주에 대해 각각의 특이적인 검출 프로브의 신호가 성공적으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

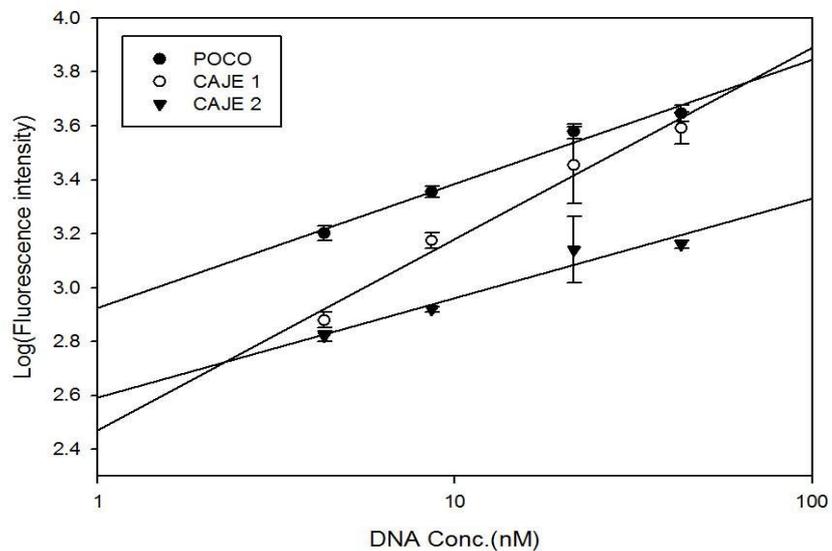


<그림 29> *S. enterica* subsp. *enterica* 혈청형 검출용 DNA 마이크로어레이 실험 결과

5. 제작된 DNA microarray의 감도 측정

가. 16S rDNA 기반 DNA 마이크로어레이의 감도 측정

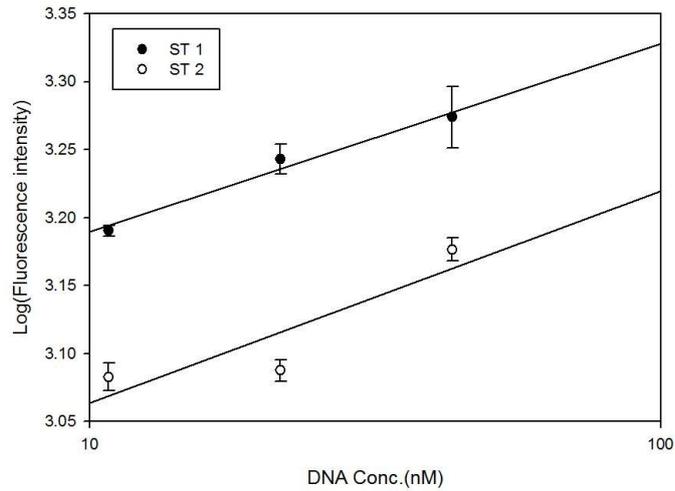
16S rDNA 기반 DNA 마이크로어레이의 대상 검출 균주 중에 *C. jejuni*를 대상으로 대표적으로 DNA 마이크로어레이의 감도를 측정하였다(그림 30). *C. jejuni*의 희석된 4개의 DNA 샘플을 준비하였으며 각각의 DNA 농도는 43nM, 21.5nM, 8.6nM, 4.3nM이었다. 4.3nM DNA 농도에서는 인정할 수 있는 형광 신호가 검출되지 않았으므로 LOD(limit of detection)은 4.3~8.6nM로 추정된다.



<그림 30> 16S rDNA 기반 DNA microarray 감도 그래프

나. *S. enterica* subsp. *enterica* 혈청형 검출용 DNA 마이크로어레이의 감도 측정

S. enterica subsp. *enterica* 혈청형 검출용 DNA 마이크로어레이의 대상 검출 균주 중에 *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium을 대상으로 대표적으로 DNA 마이크로어레이의 감도를 측정하였다(그림 31). *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium DNA 샘플은 3개를 준비하였으며 각각의 DNA 농도는 43nM, 21.6nM, 10.8nM이었다. 세 개 DNA 샘플 중 10.8nM을 시험하였을 때, 특이적 형광 신호가 검출되지 않아 LOD 범위는 10.8~21.6nM로 생각할 수 있다.



<그림 31> *S. enterica subsp. enterica* 혈청형 검출용 DNA 마이크로어레이의 감도 그래프

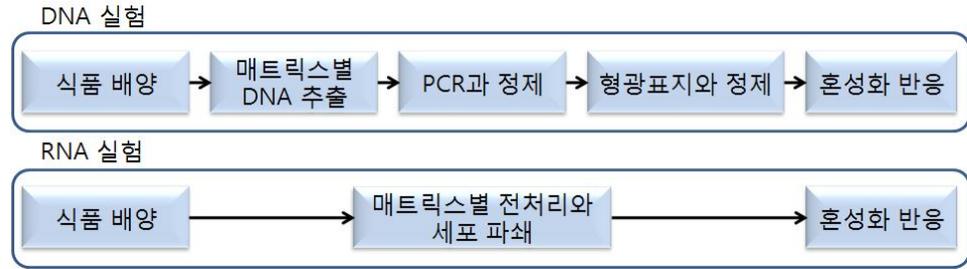
6. 농·축산 식품 매트릭스별 RNA 추출 방법 확립 및 검증

가. 농·축산 식품 매트릭스에서 RNA 추출 방법 확립 및 검증

(1) 농·축산 식품 매트릭스에서 RNA 추출 방법 확립

기존 DNA 마이크로어레이 실험은 세포로부터 염색체 DNA를 추출하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하여 형광 표지된 타깃을 제작한 후에 실험을 진행한다. 그러므로 2차년도 계획에는 중합효소연쇄반응을 수행하기 위해서 농축산 식품 매트릭스별 염색체 DNA를 추출하는 방법에 대한 실험을 수행하는 계획을 수립하였었다.

그러나 본 연구 과제 수행 중 곡류와 채소류, 육류, 계란류의 복합 식품 매트릭스인 김밥에 오염된 병원성 미생물의 세포파쇄로부터 얻은 16S rRNA를 직접 DNA 마이크로어레이에 적용하여 실험한 결과 비록 배경의 노이즈가 많아지긴 하지만 성공적으로 병원성 미생물을 검출하는데 성공하였다. 이 결과는 염색체를 DNA를 추출하여 중합효소연쇄반응을 수행하는 실험에 비해서 아래 그림과 같이 훨씬 간단한 실험 수행이 가능하다(그림 32).

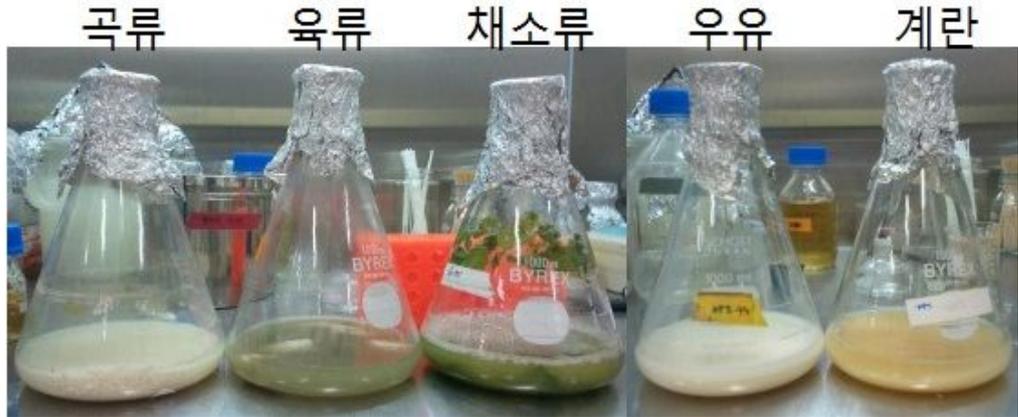


<그림 32> DNA 실험과 RNA 실험 과정

그 뿐 아니라 DNA 타깃을 이용한 실험은 시간상 염색체 DNA 추출부터 증합효소연쇄반응과 형광 표지 및 정제까지 대략 7시간 정도나 그 이상이 소요되지만 RNA 실험은 전처리와 세포 파쇄까지 30분 이내에 가능하다. 그러므로 RNA를 이용하는 실험이 보다 간단하며, 효율적이고, 신속한 검출이 가능하다. 그 뿐 아니라 증합효소연쇄반응을 수행하는 실험은 선형 증폭이 아니기 때문에 정량 분석에 적합하지 않으며 효소 반응이기 때문에 추출된 염색체의 순도가 효소 반응에 큰 영향을 미칠 수 있다는 등의 여러 단점들이 있다. 이에 비하여 RNA를 이용하는 실험에서는 세포의 수와 RNA의 양이 비례하기 때문에 정량적인 실험 수행이 가능하며, RNase의 오염만 주의한다면 혼성화 반응에서는 불순물이 들어가도 검출이 가능하다. 이러한 여러 특성들을 고려하여 본 실험에서는 본 연구의 의도인 빠르고 쉬운 검출에 더 적합하도록 연구 방향을 농축산 식품 매트릭스별 RNA 추출로 변경하였다.

일단 수출입 농축산물의 식품별 종류를 나누어보면 고체류에는 곡류, 육류, 채소류가 있고, 액체류에는 우유, 계란가 있을 수 있다. 이 중 우유나 계란류는 실제로는 신선도 그리고 위생상의 이유 때문에 잘 수입하지 않지만 그래도 우리나라에서 가까운 나라로의 수출이나 혹은 정제된 성분들은 수입이 이루어지고 있기 때문에 병원성 미생물의 검출이 필요할 것으로 생각된다.

샘플로 사용하기 위해 슈퍼마켓에서 정제미, 국내산 돼지고기, 찜배추, 우유, 계란 등을 구입하였으며 이들을 적당한 크기로 자르거나 무게를 재어 식품 매트릭스별로 25g의 샘플을 채취하였다. 25g의 샘플을 1L 삼각 플라스크에 200ml의 LB 배지에 넣어 하루 정도 증균 배양을 수행한 결과는 다음 그림과 같다(그림 33). 왼쪽에서는 식품의 고형물이 작은 파티클로 나뉘어 배지에 부유하는 것을 확인할 수 있으며 오른쪽에서는 기존의 액상에 주로 콜로이드 형태를 가지고 있던 혼합물이 배지와 골고루 섞여 있는 것을 확인할 수 있다.



<그림 33> 식품 매트릭스별 증균 배양 결과: 곡류, 육류, 채소류, 우유, 계란

각각의 배양된 샘플에 대하여 E-tube에 1ml씩 상등액을 채취하여 13000rpm에서 1분간 원심 분리한 결과는 다음 그림과 같다(그림 34). 순서는 왼쪽부터 채소류, 육류, 곡류, 우유, 계란이며 우유를 제외하면 많은 침전물이 가라앉는 것을 확인할 수 있었다. 이는 샘플 조직에서 떨어져 나온 조각이거나 세포 혹은 식품 조성물인 것으로 보인다. 이러한 침전물의 존재 하에서는 실험의 노이즈가 커질 가능성이 높기 때문에 침전물을 최소화하기 위한 음식의 전처리를 위한 실험을 수행하였다.

먼저 우유의 경우에는 그림에서 확인 가능한 바와 같이 거의 침전물이 생기지 않기 때문에 13000 rpm에서 1분간 원심분리 후에 바로 세포파쇄와 혼성화 실험이 가능하며 이는 부유물들이 대부분 세포보다 훨씬 밀도도 낮고 가볍기 때문에 가라앉지 않은 것으로 유추 가능하다.



<그림 34> 증균 배양된 상등액의 원심분리 후 침전물

곡류와 채소류의 경우에는 500 rpm 이하에서 1분간 원심 분리할 경우 침전물이 생기기 때문에 분리가 가능한 것으로 보인다. 이는 쌀과 채소의 고형물의 경우 밀도가 병원균에 비해서 높고, 크기도 크기 때문에 낮은 rpm의 원심분리에서도 세포보다 먼저 가라앉기 때문인 것으로 보여지며 이 특성을 이용하여 전처리를 통해 고형물을 제거한 후에 실험을

수행하였다. 계란의 경우에는 13000 rpm에서 1분 이상 원심 분리하는 경우 세포와 침전물이 함께 가라앉지만 두 개의 층으로 분리되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 계란의 침전물이 좀 더 비중이 높고, 상분리가 일어나기 때문인 것으로 추측되며 이 특성을 이용하면 먼저 13000 rpm에서 2분 정도 원심분리 한 후에 위에 분리된 세포들을 가볍게 흔들어주며 상층액에 다시 섞이도록 하여 침전물과 분리하는 전처리 과정을 통해 실험을 수행할 수 있다. 육류의 경우 위의 방법들로는 원심분리로는 세포와 침전물을 분리할 수 없었기 때문에 전처리 없이 실험을 수행하였다.

(2) 농·축산 식품 매트릭스를 이용한 실험 및 검증

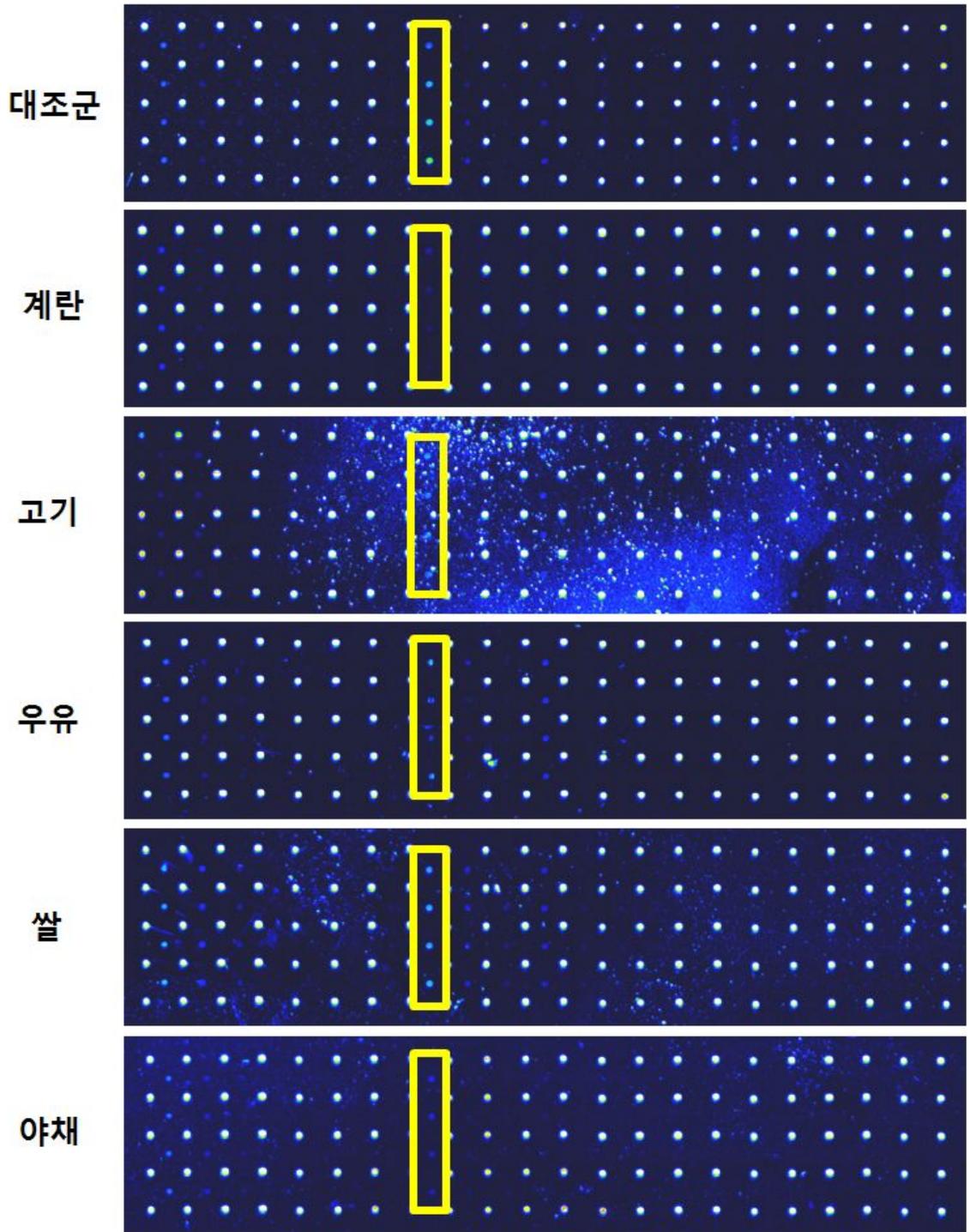
침전물을 제거하는 전처리를 수행한 후에는 13000 rpm에서 원심분리를 1분간 수행한 후에 배지를 버리고 PBS 버퍼를 800ml씩 넣고 vortexing을 15초간해서 다시 씻어주는 과정을 2번 반복 수행하였다. 이후에 세포파쇄 용액(조성은 논문을 참조) 10ul씩 넣고 상온(섭씨 25도)에서 5분간 세포파쇄를 수행하였으며 그 직후에 190 ul의 1M phosphate 버퍼를 넣고 중성화시킨 후에 이 용액을 준비된 혼성화 용액에 7ul 넣어서 준비된 용액을 암실에서 형광 표지된 검출 프로브를 넣어서 혼성화 챔버에 위치한 DNA 마이크로어레이가 집적된 유리 글라스에 떨어뜨리고 그 위에 커버글라스를 씌워서 상온에서 1시간 동안 혼성화 반응을 하였다. 혼성화 반응이 끝나면 암실에서 커버글라스를 벗기고, 유리 글라스를 글라스 캐리어에 장착한 후에 3 종류의 washing 용액을 이용하여 30초씩 빠르게 up and down 하며 씻어주고 1500rpm에서 1분 30초간 원심분리하면서 말려준 후 형광 스캐너를 이용하여 형광세기를 측정된 결과는 다음 그림과 같다(그림35).

전체적으로 골고루 관측되는 하얀 점들은 인위적으로 다른 염기서열과 혼합되지 않으며 실험에서 anchor의 역할과 동시에 칩 간, 위치 간 편차를 보정해주는 역할을 할 수 있는 인위적인 표준 프로브이다. 그리고 가장 왼쪽에 흰 점에 둘러싸인 4개의 점들이 양성 대조 프로브이며 균주에 구별 없이 반응의 성공여부를 확인할 수 있다. 사용한 균주는 *Salmonella Typhimurium*인데 대조군에서 확인 가능한 바와 같이 왼쪽에서 8, 9번째의 녹색 점들이 특이 프로브가 검출된 결과를 보여준다. 이외의 2번째, 11번째의 파란 점들은 비특이적 프로브가 검출된 결과를 보인다.

계란의 경우 8번째 특이 프로브에서 약한 검출 결과를 보여주는데 이는 전처리 시에 세포가 계란 침전물에 섞여서 완벽하게 구분되지 못하고 일부분만 분리되었기 때문인 것으로 보이며 반면에 배경의 노이즈는 거의 관측되지 않는 깨끗한 결과를 보여주었는데 이는 계란 침전물이 거의 다

분리가 가능했기 때문이다. 고기류의 경우에는 특이 프로브나 비특이적 프로브에서 거의 대조군과 비슷한 패턴을 보이고 있지만 아쉽게도 노이즈가 너무 많이 검출되는데 이는 고기류의 침전물과 세포가 분리되지 않아 전처리를 할 수 없었을 뿐 아니라 고기류의 침전물이 특성상 유리 표면에 달라붙기 때문인 것으로 보여 진다. 우유의 경우에는 대조군과 거의 비슷한 패턴을 보이며 이는 아무런 전처리 없이도 침전물이 거의 없기 때문에 깨끗한 결과가 나타났다. 곡류인 쌀의 경우에는 역시 대조군과 거의 비슷한 패턴을 보이는 검출 결과를 보임. 노이즈가 약간 관측되지만 검출에 지장이 없으며 전처리만으로도 충분히 검출이 가능하다는 결과를 보여준다. 야채의 경우에는 대조군과 패턴은 비슷하지만 전반적으로 신호세기가 약한 것을 확인할 수 있다. 이는 식품 매트릭스별 특성이라기보다는 실험마다의 편차에 의한 것으로 보이며 노이즈는 약간 관측되긴 하지만 역시 균주 검출에는 전혀 지장이 없다는 것을 확인할 수 있었다.

실험의 결과를 전반적으로 요약하면 식품 매트릭스별 실험에서 고기류를 제외한 대부분의 경우 RNA의 직접 추출을 이용한 실험에서 원하는 균주를 낮은 노이즈에서 성공적으로 검출할 수 있다는 것을 확인하였다. 다만 고기류의 경우에는 노이즈를 줄이기 위한 전처리가 추가될 필요가 있다.



<그림 35> 각 농축산 식품 매트릭스별 마이크로어레이 실험 결과

나. 농·축산 가공 식품 매트릭스에서 RNA 추출 방법 확립 및 검증

(1) 농·축산 가공 식품 매트릭스에서 RNA 추출 방법 확립

농축산 가공 식품 매트릭스는 크게 세 가지 농산물 가공식품, 수산물 가공식품, 축산물 가공식품으로 나뉜다(표 7). 가공 식품류는 농축산 식품에 비해서 수입이 용이하고 보존 기간이 길어 미생물 오염 가능성이

높기 때문에 미생물 검출이 더욱 필요할 것으로 생각된다.

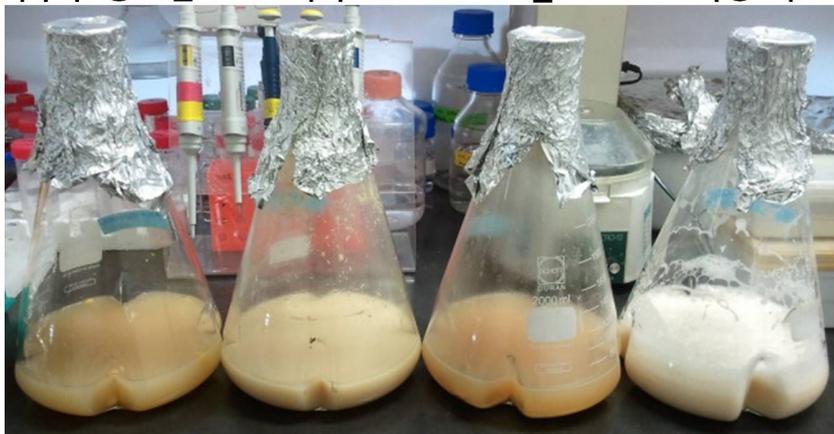
가공 식품 매트릭스별 검출 방법을 확립하고 검증하기 위해서 각 가공식품군별로 한 종류씩 대표 식품 매트릭스를 선정하였는데 농산물 가공식품에서는 태국산 옥수수 통조림, 수산물 가공식품에는 수입산 어묵, 축산물 가공식품에는 국내산 햄 및 뉴질랜드산 가공 치즈를 선정하여 구입을 하였다.

<표 7> 가공식품 분류

농산물 가공식품	면류, 과자류, 차류, 당류, 장류, 조미식품, 두부류, 전분, 열매 채소류 또는 곡류 가공품, 음료, 통조림 또는 병조림, 곡분류, 식용유지류, 인삼제품류, 절임식품류, 건제품
수산물 가공식품	연제품, 냉동품, 훈제품, 염장품, 건제품, 통조림 또는 병조림, 해조류 가공품, 조미가공품, 어유
축산물 가공식품	유가공품, 육가공품, 알가공품, 통조림 또는 병조림, 벌꿀, 아이스크림류
그 밖의 가공식품	청량음료, 특수영양식품, 농수축산물 복합가공품, 껌, 조미료, 그 밖에 자식경제부장관이 농림수산식품부장관과 협의하여 고시로 정하는 가공식품

샘플로써 사용하기 위해서 적당한 크기로 자르거나 무게를 재어 식품 매트릭스별로 50g의 샘플을 채취하였으며, 채취한 각각의 식품 매트릭스들은 2L 삼각 플라스크에 400ml의 NB(nutrient broth) 배지에 넣어 *S. enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium을 접종하여 하루 정도 증균 배양을 수행하였다(그림 36). 옥수수 통조림이나 햄과 같은 가공 식품의 고형물과 그 일부가 작은 파티클로 배지에 부유하고 있었으며 어묵의 경우에는 원래 고체형태가 사라지고 작은 파티클로 배지 전체에 부유하고 있었다. 치즈의 경우에는 배양 온도로 인해 배지 내에 용해되어 액상에 가까운 형태로 배지와 골고루 섞여 있으며 거품이 많이 발생하였다.

옥수수 통조림 어묵 햄 가공 치즈



<그림 36> 가공 식품 매트릭스별 증균 배양 결과

각각의 배양된 샘플에 대하여 E-tube에 1.5ml씩 상등액을 취하였으며 배지 내에 포함되어 있는 식품 조성이 포함된 채로 실험을 수행할 경우, 신호의 배경 노이즈가 커져 미생물 검출을 방해할 수 있는 가능성이 높아져 이를 최소화하기 위해서 각 가공식품 매트릭스별로 배지에 혼합되어 있는 식품 조성을 제거하기 위해서 전처리를 수행하였다.

먼저 옥수수 통조림, 어묵 및 햄의 경우에는 비교적 무거운 고체 침전물이 포함되어 있어 500 rpm에서 1분간 원심 분리하여 부유물들을 1차적으로 제거하였다(그림 37). 식품의 고체 부유물들의 밀도가 미생물 밀도에 비해 클 것으로 기대되어 낮은 rpm으로 식품 부유물들을 제거할 수 있을 것으로 기대했다. 치즈의 경우에는 식품이 대부분 배지에 혼합되어 있지만 13000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 가라앉는 부유물들을 제거할 수 있었다(그림 37).



<그림 37> 평균 배양된 가공 식품 매트릭스별 원심 분리 후 침전물

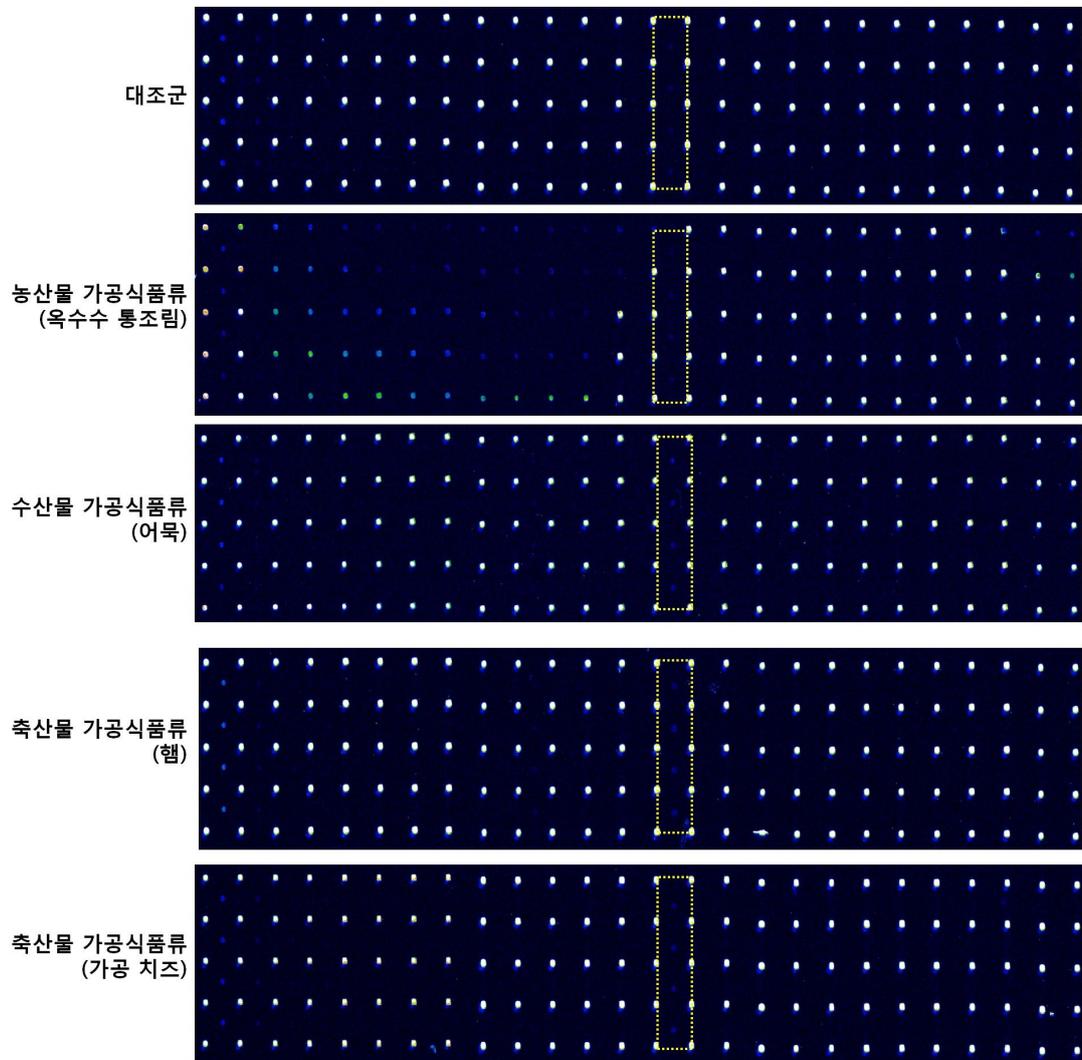
(2) 농·축산 가공 식품 매트릭스를 이용한 실험 및 검증

식품 부유물들을 제거하는 전처리를 거친 식품 매트릭스별 샘플들은 13000 rpm에서 원심분리를 1분간 수행한 후에 배지를 버리고 PBS 버퍼를 800ml씩 넣고 vortexing을 15초간해서 다시 씻어주는 과정을 2번 반복 수행하여 실험에 사용할 샘플을 다음 그림 38과 같이 획득하였다.



<그림 38> 가공 식품 매트릭스별 회수된 최종 세포 침전물

이후에 세포 파쇄 용액 10ul씩 넣고 상온(섭씨 25도)에서 5분간 세포파쇄를 수행하였으며 그 직후에 190 ul의 1M phosphate 버퍼를 넣고 중성화시킨 후에 이 용액을 준비된 혼성화 용액에 14ul 넣어서 혼성화 실험용 용액을 준비하였다. 이 후의 과정은 농축산 식품 매트릭스와 동일하였으며 실험을 통해 얻어진 결과는 다음 그림 39와 같다.



<그림 39> 각 농축산 가공 식품 매트릭스별 마이크로어레이 실험 결과

사용한 균주는 *Salmonella Typhimurium*으로 대조군에서 확인 가능한 바와 같이 왼쪽에서 1번째(양성 대조군 프로브), 14번째의 파란 점들이 특이 프로브가 검출된 결과를 보여준다. 이외의 파란 점들은 비특이적 프로브가 검출된 결과를 보인다.

옥수수의 경우 획득한 세포의 양이 많음에도 1번째 양성 대조군 프로브와 14번째 특이 프로브에서 다른 가공 식품매트릭스에 비해서도 약한 검출 결과를 보여주고 있다. 또한, 인위적 양성 대조군의 검출 신호가 균일

하지 못하고 왼쪽에서는 낮은 형광 신호를 보이는 것으로 보아 실험 동안 혼성화 반응 용액이 칩 내에서 골고루 반응하지 못했을 가능성을 시사하고 있다. 또, 옥수수 통조림에서 얻은 세포양이 많았음에도 불구하고 오히려 세포양이 너무 많아서 세포파쇄용액이 효율적으로 작용하지 못해 세포 파쇄율이 낮아 형광 검출 신호가 특히 낮았을 것으로 생각된다.

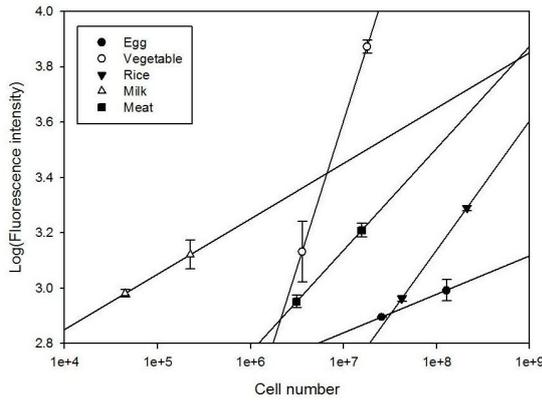
다른 가공식품 매트릭스인 어묵, 햄, 치즈의 경우 1번째 양성 대조군 프로브와 14번째 특이적 프로브의 형광신호가 대조군의 칩 형광 신호와 비슷한 양상을 보이고 있다. 또한, 농축산 식품 매트릭스와 다르게 배경 노이즈가 거의 없는 깨끗한 결과를 보여주고 있다.

이 실험을 통해서, 비교적 약한 형광 검출 신호를 보이고 있지만 원심분리를 이용한 간단한 전처리만으로도 배경 노이즈를 줄일 수 있으며 가공식품 매트릭스별로 RNA를 이용한 마이크로어레이 실험을 통해 병원성 미생물을 검출할 수 있다는 가능성을 확인하였다.

다. 농·축산 가공 식품 매트릭스별 감도 측정

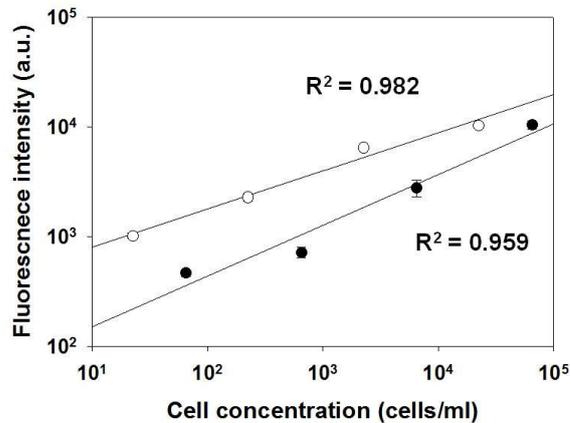
(1) 농·축산 식품 매트릭스별 감도 측정

병원성 미생물을 검출하는 방법의 감도를 측정하는 것은 중요하다. 검출할 수 있는 최소 감도가 적을수록 적은 수의 병원성 미생물도 검출할 수 있는 능력이 보장되는 것이기 때문에 미생물 검출 방법의 감도를 측정하고 측정 가능 범위를 설정하는 것이 중요하다. 따라서 농축산 식품 매트릭스에서 병원성 미생물을 검출할 수 있는 최소 감도를 측정하고 검량선을 작성하기 위하여 앞서 설명한 방법과 마찬가지로 각 농축산 식품 매트릭스별(곡류, 계란류, 우유, 육류, 채소류)로 평균 배양을 하고 상등액을 채취하여 전처리 과정을 수행하였다. 전처리를 통해 얻은 세포 샘플을 희석하여 매트릭스별로 마이크로어레이 실험을 수행하고 얻은 형광 신호 데이터를 정량하여 각 매트릭스별로 검량선을 작성하였다(그림 40).



<그림 40> 농축산 식품 매트릭스별 검량선

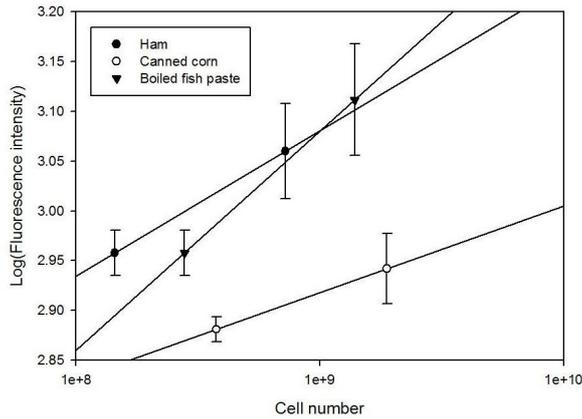
계란류와 곡류는 $10^7 \sim 10^8$ cells의 최소 감도를 보였고 육류 및 채소류는 $10^6 \sim 10^7$ cells의 최소 감도를 보였다. 우유의 최소 감도는 $10^4 \sim 10^5$ cells로 농축산 식품 매트릭스 중에서 가장 낮은 감도를 보였다. 이는 다른 농축산 식품 매트릭스와 다르게 액체류의 식품 매트릭스로 평균 배양 시 생기는 고체 부유물이 없기 때문에 마이크로어레이 실험에서 배경 노이즈가 거의 생기지 않아 가장 낮은 감도를 보이는 것으로 생각된다. 그러나 기존 순수 배양으로 얻은 미생물 세포를 이용한 마이크로어레이에서의 최소 감도($10^2 \sim 10^3$ cells/ml, 그림 41)와 비교하면 감도가 떨어지는 것을 알 수 있고, 감도를 향상시킬 수 있도록 개선이 필요하다.



<그림 41> 순수 배양의 검량선

(2) 농·축산 가공 식품 매트릭스별 감도 측정

농축산 식품 매트릭스별 감도 측정과 마찬가지로 농축산 가공 식품 매트릭스(옥수수 통조림, 어묵, 햄)의 감도를 측정하여 검량선을 작성하였다(그림 42). 세 개의 가공 식품 매트릭스의 감도는 비슷한 범위를 가지며 최소 감도는 $10^8 \sim 10^9$ cells 수준이다. 이 감도는 농축산 식품 매트릭스와 비교하여도 10배 정도 민감도가 떨어지는 수치이다. 가공 식품 매트릭스도 마찬가지로 감도를 높일 수 있도록 추가 개선이 필요할 것으로 생각된다.



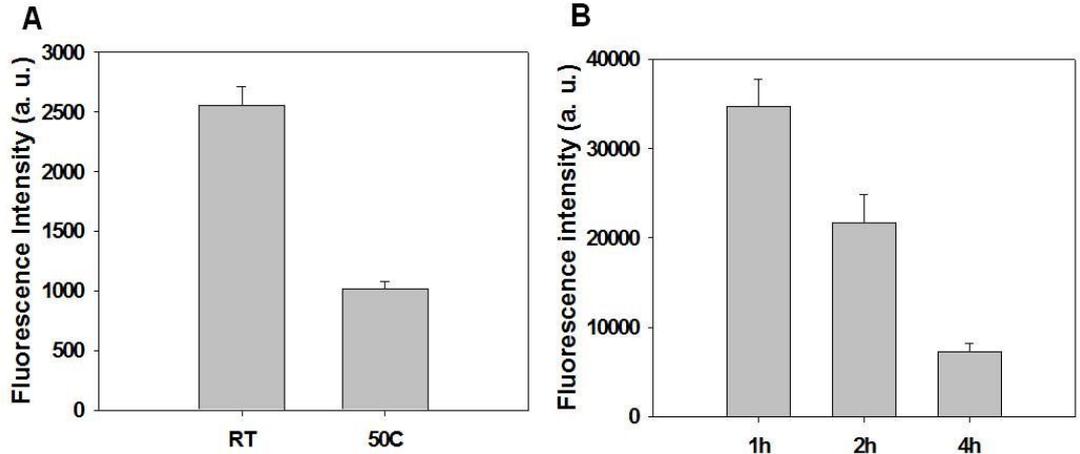
<그림 42> 농축산 가공식품 매트릭스별 검량선

7. DNA 마이크로어레이를 이용한 실험 키트 개발

가. 시약과 실험 조건이 최적화된 실험 과정 확립

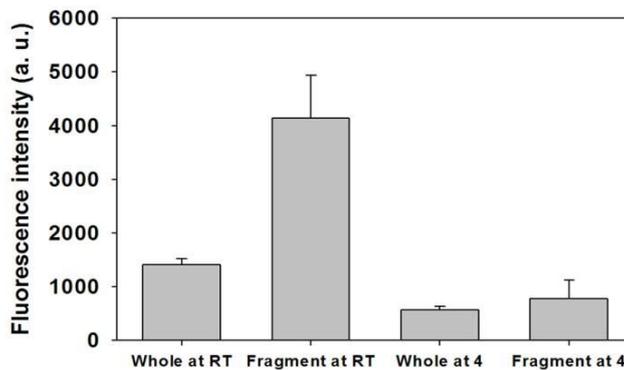
식품 매트릭스에서 사용하였던 RNA를 이용한 마이크로어레이 실험 키트로 개발하고자 하였다. 이는 앞서 언급하였듯(그림 31) 기존 DNA 마이크로어레이 실험은 세포로부터 염색체 DNA를 추출하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하여 형광 표지된 타깃을 제작한 후에 실험을 진행하지만 RNA를 이용하는 경우에는 얻어진 세포를 파쇄(lysis)하고 얻어진 세포 파쇄물을 혼성화 반응물로 바로 사용 가능하기 때문에 실험 과정이 간단하다. 그러나 RNA는 DNA에 비해서 불안정하기 때문에 적절한 시약 및 실험 조건이 설정되어야 한다.

따라서 우리는 RNA를 이용한 혼성화 반응에서 가장 큰 영향을 미칠 수 있는 혼성화 반응 온도 및 시간을 최적화하였다(그림 43). 혼성화 온도는 상온(RT)과 50℃ 조건을 설정하여 비교하였으며 혼성화 시간은 1시간, 2시간 및 4시간의 세 가지 조건을 설정하였으며 RNA의 마이크로어레이의 혼성화 정도를 검출한 형광 신호 세기 통해 유추하였다. 형광 신호의 세기는 혼성화 반응 온도가 상온일 때가 50℃일 때보다 2.5배가량 높았으며(그림 43-A) 혼성화 반응 시간은 짧을수록 형광 신호 세기가 높아짐을 확인하였다(그림 43-B).



<그림 43> 혼성화 반응 온도 및 시간에 따른 형광 세기 변화 비교

RNA를 이용하는 경우 형광신호가 DNA를 이용하는 경우보다 상대적으로 낮기 때문에 이를 높이기 위해서 RNA를 파쇄하여 사용하기도 한다. 이것은 파쇄된 RNA는 2차 구조 형성이 억제 혹은 파괴되어 혼성화 효율이 더 높아지기 때문이다. 따라서 본 연구에서도 전체(whole) RNA 가닥을 혼성화 반응한 것과 파쇄(fragmentation)한 RNA를 혼성화 반응한 경우를 비교하였다(그림 44).

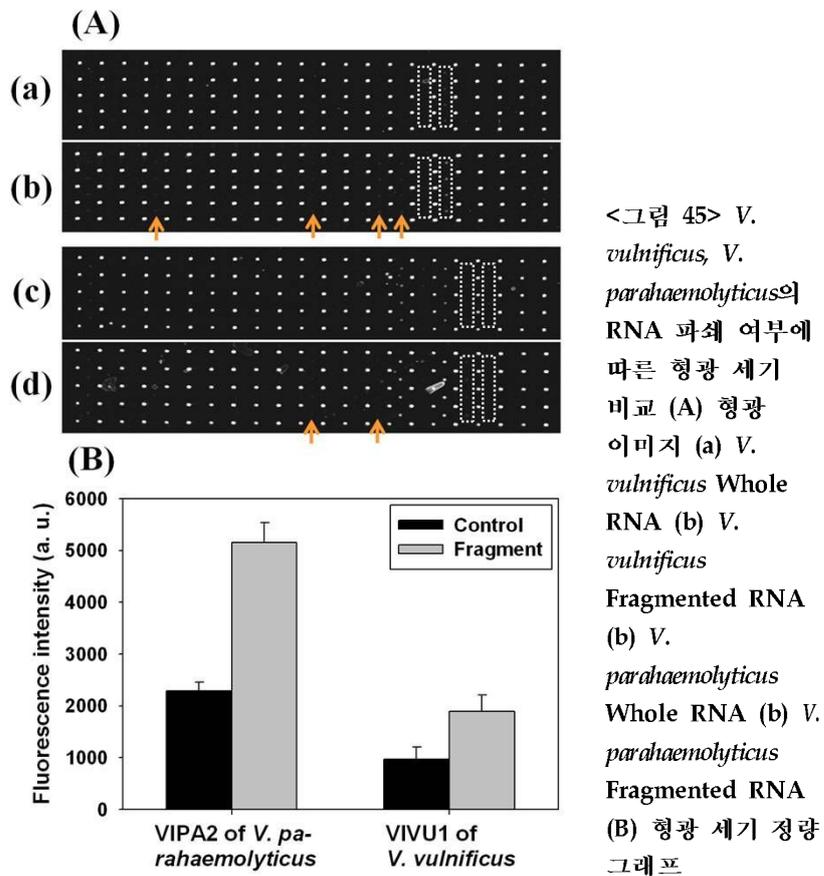


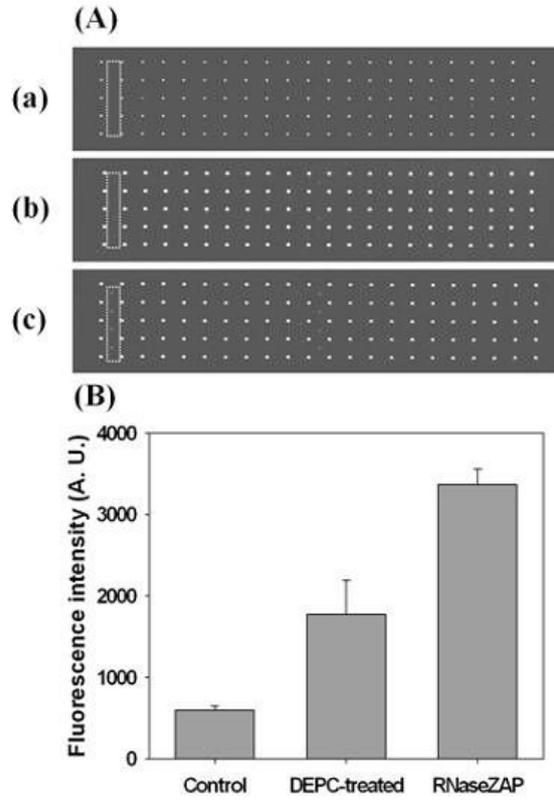
<그림 44> 혼성화 반응 온도 및 시간, RNA 파쇄 여부에 따른 형광 세기 변화 비교

그림 44의 (a)는 상온에서 1시간의 반응시간 그리고 전체 RNA를 사용하였으며 (b)는 파쇄한 RNA를 상온, 1시간 반응시킨 것이며 (c)는 4°C에서 12시간동안 전체 RNA를, (d)는 4°C에서 12시간동안 파쇄한 RNA를 혼성화 반응시킨 경우이다. 형광세기는 상온에서 1시간 그리고 RNA를 파쇄하였을 때 가장 높았다. 즉, 반응 온도보다는 반응 시간이 좀 더 중요하게 혼성화에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었으며 전체 RNA 가닥을 사용하는 것보다 파쇄한 RNA가 형광 세기가 더 높아지는 것 또한 확인 가능하였다. 이를 결과를 다시 검증하기 위해서 *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* 2개의

병원성 미생물의 각각 RNA를 파쇄 여부를 다르게 하여 마이크로어레이 실험에 적용해보았다(그림 45). 2개의 미생물 모두 파쇄한 RNA를 사용한 경우에 형광 신호가 더 높게 나왔지만 검출되는 비특이적 신호 수가 함께 늘어났다. 따라서, 파쇄한 RNA를 사용하면 형광세기는 증가하지만 비특이적 검출의 가능성 또한 높아짐을 확인하였다. 그러므로 본 연구에서는 RNA는 파쇄하지 않고 전체 가닥을 사용하기로 결정하였으며 혼성화 온도는 상온, 혼성화 시간은 1시간으로 최적화 시켰다.

이외에도 RNase로 인한 RNA 손실을 방지하기 위해서 RNA inhibitor 사용 여부 및 종류에 따른 형광 세기 변화를 확인하였다(그림 46). RNA inhibitor는 DEPC와 RNaseZAP을 사용하였으며 RNA inhibitor를 사용하지 않을 때보다는 사용하였을 때 형광 세기가 상대적으로 높았으며 RNA inhibitor는 RNaseZAP을 사용하였을 때가 더 효과적이었음을 확인하였다. 따라서 실험시 RNaseZAP을 사용하여 RNase의 활동을 억제하여 마이크로어레이 상의 RNA 손실을 방지하고자 하였다.





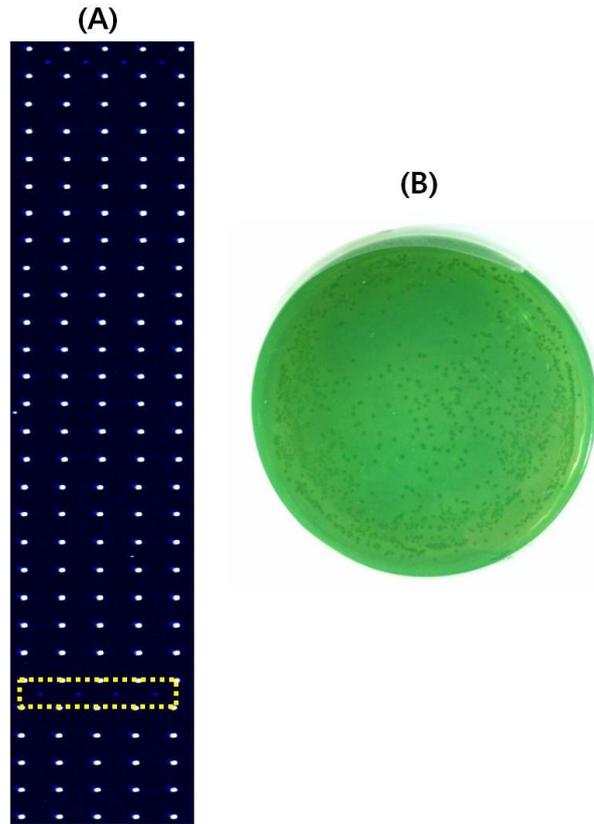
<그림 46> RNase inhibitor 사용 여부 및 종류에 따른 형광 세기 비교 (A) 형광 이미지(a) control (b) DEPC (c) RNaseZAP

나. 개발된 실험 키트의 정확도 및 신뢰도 검토

RNA를 이용한 실험 키트의 정확도 및 신뢰도를 확인하기 위해서 동일한 미생물 샘플을 이용하여 실험 키트와 선택 배지를 이용한 표준 미생물 검출법으로 시험하였다. *V. parahaemolyticus* 세포를 준비하여 절반은 파쇄하여 마이크로어레이 실험을 수행하였으며 나머지 절반은 *V. parahaemolyticus*의 선택 배지인 TCBS에 도말하여 배양하였다(그림 48).



<그림 47> 개발된 실험 키트



<그림 48> 개발된
실험 키트의 정확도
및 신뢰도 검토
(A) 개발된 실험
키트를 이용한 *V.*
parahaemolyticus
검출
(B) 선택 배지를
이용한 표준미생물
검출법

그림 48-A는 실험 키트를 사용하여 *V. parahaemolyticus*를 검출한 결과이며 48-B는 선택 배지를 이용하여 *V. parahaemolyticus*를 검출한 결과이다. 검출 키트를 사용하였을 때 *V. parahaemolyticus*에 해당하는 특이적 프로브가 검출 되었으며 역시 선택 배지에서도 성공적으로 배양되어 콜로니를 형성하여 두 방법의 결과가 일치함을 확인하였다.

다. 사용자를 위한 실험 매뉴얼 작성

실험 키트의 매뉴얼은 다음과 같이 작성하였다.

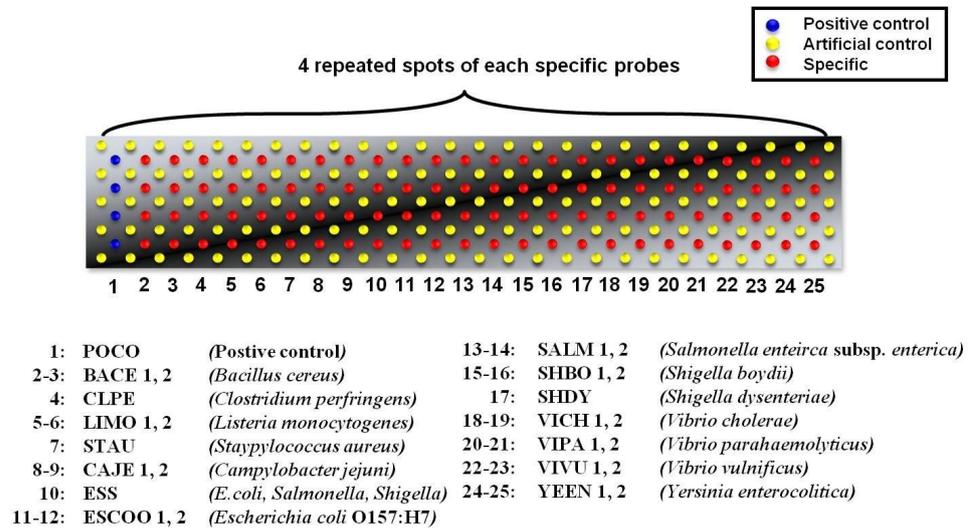
RNA를 이용한 병원성 미생물 검출용 마이크로어레이 키트

◆ 검출 가능 병원성 미생물

B.cereus, *C. perfringens*, *L.monocytogenes*, *S. aureus*, *E.coli* O157:H7, *S. enterica* subsp. *enterica*, *S.boydii*, *S. dysenteriae*, *V. cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Y. enterocolitico*

◆ 구성품

- 마이크로어레이: 건조한 장소에서 보관



- 세포 파쇄 용액: 4~25℃ 보관,
사용 직전 lysozyme(20mg/ml)을 첨가
- 1M Phosphate 용액: 상온 보관
- 혼성화 용액: -20~-4℃ 보관, 빛으로부터 보호 및 암실에서 사용

◆ 사용 전 준비 사항

- Blocking 용액 준비: 사용 직전에 신선하게 제조를 권유

Reagent	Amounts
20X SSPE	3 ml
1% BSA	1.5 ml
D.W	10.5 ml
Total	30 ml

- 세척 용액 준비: 준비한 세척 용액은 filtering 혹은 autoclave 처리요

- ① 1X SSPE + 0.1% Tween 20
- ② 0.1X SSPE + 0.1% Tween 20
- ③ 0.1X SSPE + 0.1% Tween 20

<참고> 20X SSPE(pH 7.4)
3M NaCl
0.2M NaH₂PO₄
0.02M EDTA

◆ 사용 방법

1. Blocking 반응

- ① 마이크로어레이를 준비한 blocking 용액에 담그고 상온에서 agitation과 함께 30분간 반응시킨다.
- ② 반응이 끝나면 DEPC-treated water에 위, 아래로 세척하고 건조시켜 사용할 준비를 한다.

2. 세포 파쇄

- ① 반응시킬 세포를 PBS로 세척하여 펠렛 상태로 만들고 세포 파쇄 용액 10 μ l를 넣고 vortexing한다. 재현탁된 세포를 5분간 상온에서 반응시킨다.
- ② 반응 후, 190 μ l의 1M phosphate buffer를 첨가한다.
* 만들어진 세포 파쇄물은 바로 혼성화 반응에 사용하도록 한다.

3. 혼성화 반응 (암실)

- ① 앞서 준비한 세포 파쇄물을 혼성화 용액에 14 μ l를 넣는다.
- ② 혼성화 챔버에 준비한 마이크로어레이를 두고 세포 파쇄물을 넣은 혼성화 용액을 그 위에 떨어뜨린다.
- ③ 커버슬립으로 기포가 생기지 않게 잘 덮고 혼성화 챔버를 닫는다.
* 커버슬립을 RNaseZAP과 같은 RNase inhibitor를 미리 처리하면 RNA 손실을 방지할 수 있다.
- ④ 상온에서 agitation하며 1시간 동안 반응시킨다.

4. 세척 (암실) 및 스캐닝

- ① 반응이 끝난 마이크로어레이를 마이크로어레이 캐리어에 옮겨 앞서 준비한 세척용액 1, 2, 3에서 각각 30초간 위, 아래로 세척한다.
- ② 세척이 끝나면 건조 후, 형광 스캐너로 마이크로어레이를 스캐닝한다.

8. DNA 마이크로어레이 데이터 분석 프로그램 제작

가. 분석에 맞는 알고리즘의 고려와 선택

DNA 마이크로어레이는 한 번에 얻어지는 데이터 양이 많고 복잡한 양상을 띠고 있어 그것을 쉽게 처리하고 분석하는 방법이 중요하고 필요하다. 또한 어느 정도 수준의 신호를 신호로써 인정할 것인지를 결정하는 기준을 설정하는 것 또한 마이크로어레이 데이터를 분석하는데 있어 중요한 문제이다. 따라서 본 연구에서는 병원성 미생물 검출을 위한 DNA 마이크로어레이로부터 얻어지는 데이터를 손쉽게 처리하여 분석할 수 있는 분석 프로그램을 개발하고자 하였다.

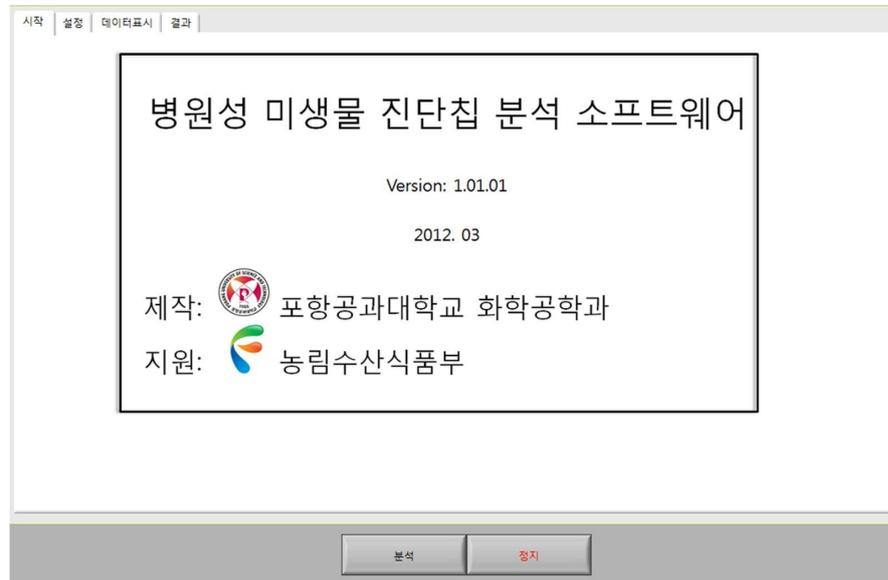
분석 프로그램이 수치로 얻어지는 형광 신호 세기의 값들을 읽어 기준 값 이상의 세기를 보이는 경우에 신호로써 검출되었음을 판단할 수 있게 하고자 하였다. 기준 값을 설정하는 문제가 남는데 이것은 다음과 같이 설정하였다. 많은 연구자들은 마이크로어레이에서 신호 세기가 노이즈 세기와의 비(signal to noise)가 1.5~2.0 이상인 것을 신호로써 인정한다. 따라서 본 연구에서도 신호 판단 기준을 신호 대 노이즈 비를 도출하여 그 값이 1.5~2.0으로 삼았다.

간략하게 정리하면 데이터 분석 프로그램에서 마이크로어레이의 형광 신호 세기 데이터를 파일로 읽어 각 검출 프로브의 형광 세기 대 노이즈 비를 도출하고 그 값이 기준 이상인 경우에 신호라고 판단할 수 있도록 하며 그 검출 프로브에 해당하는 병원성 미생물이 검출되었음을 알려준다.

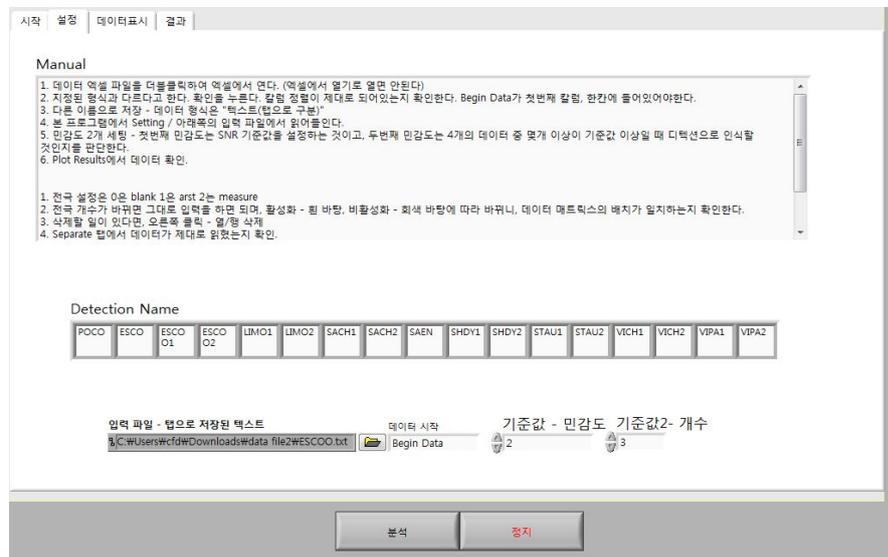
나. 수집 데이터를 이용한 분석 프로그램 및 GUI 개발

그 동안 수집한 데이터를 바탕으로 분석 프로그램 및 GUI를 개발하였다. 개발 프로그램은 다음 그림 49-53과 같다. 그림 49은 분석 프로그램 첫 시작 화면으로 프로그램명, 버전, 제작, 후원 등의 내용이 기재되어 있다. 그림 50은 분석 프로그램의 설정 페이지로 사용 매뉴얼이 정리되어 있으며 사용자들이 쉽게 사용할 수 있도록 하였다. 그 아래에 있는 detection name은 미생물 검출 프로브 이름을 기입하는 곳으로 이곳을 통해 마이크로어레이의 검출 프로브 수와 순서를 동시에 설정할 수 있다. 그러므로 마이크로어레이의 검출 프로브의 수나 순서와 바뀌었을 때 분석 프로그램에서도 손쉽게 설정을 변경할 수 있다. 또 그 아래에 위치한 입력 파일에서는 마이크로어레이의 형광 세기를 정량한 파일을 로딩하는 곳으로 스캐너로부터 정량된 데이터 파일을 다른 처리가 필요 없이 읽을 수가 있다. 기준 값의 민감도에서는 앞서 설명한 신호 여부를 판단하는 기준 값을 설정할 수 있으

며 4개씩 반복되어 있는 동일한 검출 프로브 중에서 기준 값-민감도 이상인 것이 몇 개 초과되어야 병원성 미생물이 검출되었는지 판단할 수 있도록 기준 값 이상인 검출 프로브의 개수를 설정할 수 있도록 기준 값2-개수라는 것을 만들었다.



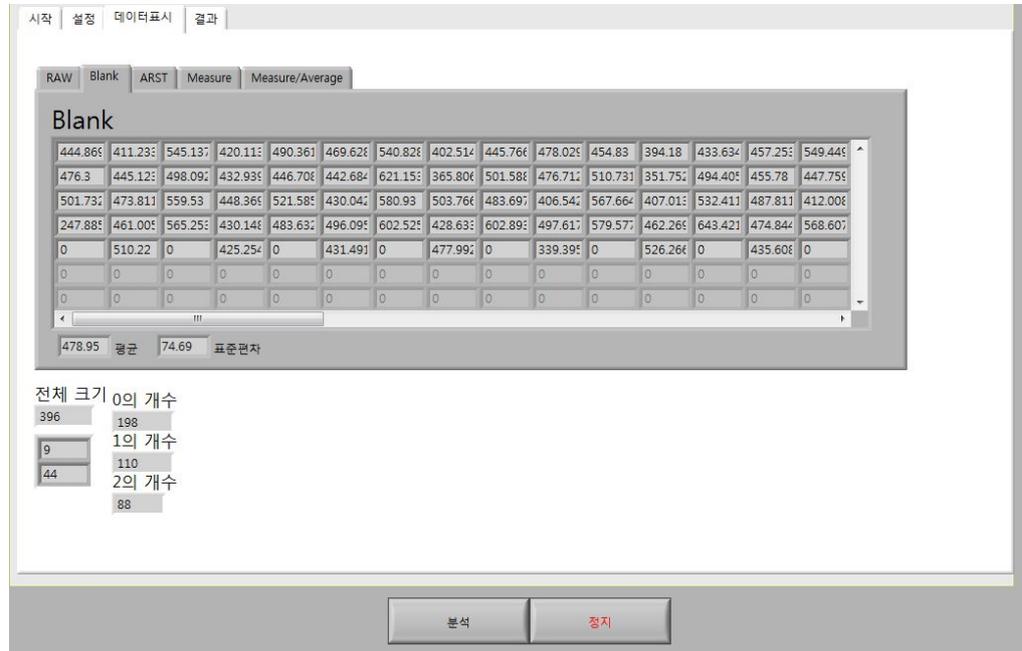
<그림 49> 병원성 미생물 진단칩 분석 소프트웨어 시작화면



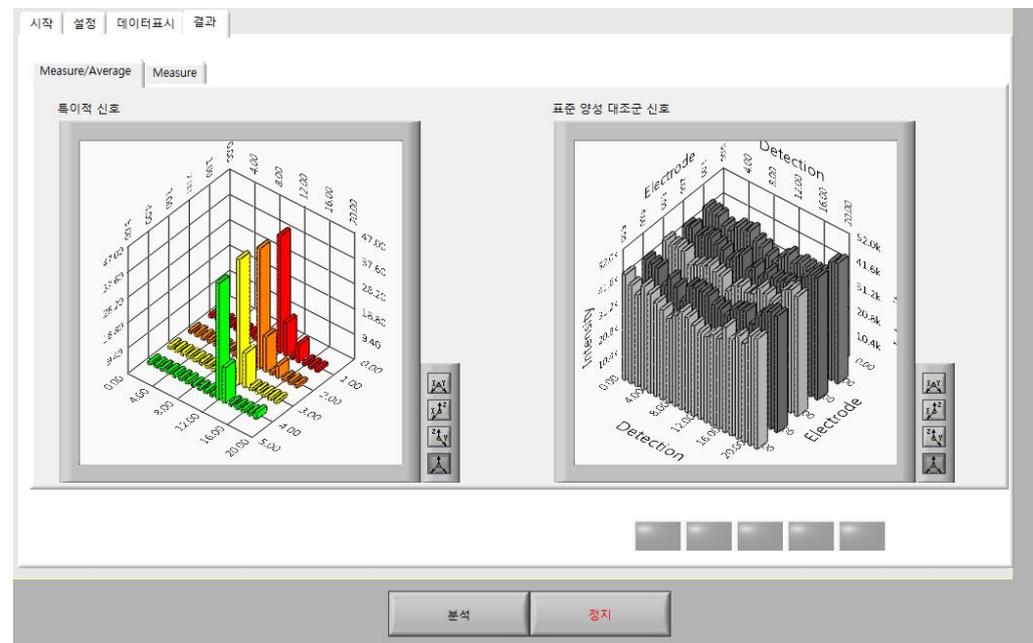
<그림 50> 병원성 미생물 진단칩 분석 소프트웨어 설정 화면

그 다음, 그림 51은 세 번째 탭인 데이터 표시로 처리된 데이터들 각각을 보여 주는 부분이며 그림 52은 처리된 데이터를 3D 그래프를 나타낸 것이다. 왼쪽의 그래프는 각 특이적 검출 프로브의 신호 세기 및 노이즈 비를 나타낸 것이며 오른쪽의 그래프는 인위적 양성 대조군 프로브의 신호 세기를 그래프로 나타낸 것이다. 오른쪽 그래프를 통해 칩 상에서의 variation과 균일한 반응 여부를 판단할 수 있다. 그림 53은 결과 탭에서 measure에 해

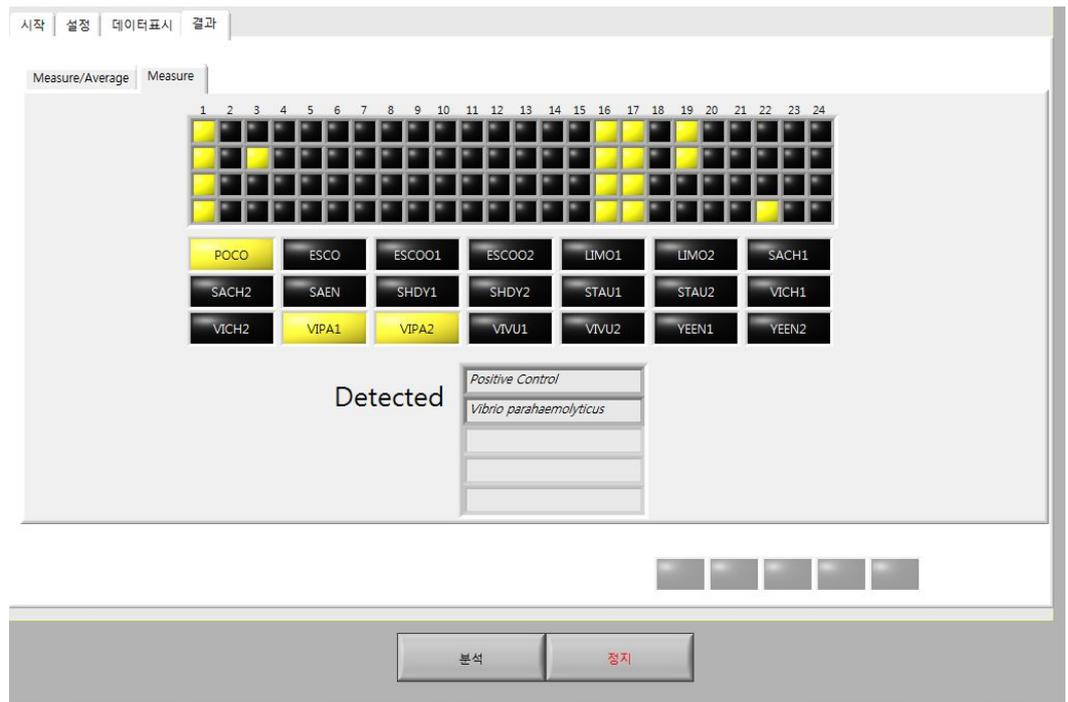
당하는 것으로 앞서 설정한 기준 값에 따라 신호로써 검출된 특이적 프로브 및 병원성 미생물을 판단하여 결과로써 보여주는 곳으로 마이크로어레이를 통해 검출한 병원성 미생물을 최종적으로 판단하여 보여준다.



<그림 51> 병원성 미생물 진단칩 분석 소프트웨어 데이터 표시 화면



<그림 52> 병원성 미생물 진단칩 분석 소프트웨어 결과(Measure/Average) 화면



<그림 53> 병원성 미생물 진단칩 분석 소프트웨어 설정 화면

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

제 1절 연도별 연구 목표 및 달성도

1. 1차년도(2009년) 연구 목표 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	16종 식중독 균의 표준 균주 및 동정된 분리 균주 확보	표준균주은행으로부터 식중독 균 및 유산관련 균 등 다양한 균주 확보	100	검출 대상 균주 16종 중 15종 확보. 그러나 <i>C. jejuni</i> 의 경우, 균주 배양이 불가하여 유전체로 대신 확보
		국내외 연구자로부터 분리, 동정된 균주 확보	100	<i>Vibrio, Staphylococcus, Bacillus</i> 관련 균주 8 종 확보
	특이적 프로브 설계 및 제작	검출 원리 탐색과 선정	100	16S rDNA와 genome-wide 탐색을 통한 <i>carB</i> 유전자 선정
		각 균주별 검출원리 염기서열 판독	100	검출원리 염기서열(16S rDNA gene sequence) 판독 완료 <i>Salmonella</i> 의 <i>carB</i> 유전자 판독 완료
		염기서열 분석으로 복수의 프로브 설계, 제작	100	16S rDNA 기반 프로브 설계 및 제작 완료 <i>Salmonella carB</i> 기반 프로브 설계 및 제작 완료
	DNA Microarray 설계 및 제작	정량 검출을 위한 표준 프로브 도입	100	인위적으로 제작되어 거짓양성반응이 일어나지 않는 표준 프로브 설계 및 제작
		재현성과 정확도를 고려한 microarray 설계	100	표준 프로브, 양성대조균과 16S rDNA, <i>carB</i> 의 특이프로브를 포함하는 어레이의 설계

2. 2차년도(2010년) 연구 목표 및 달성도

구분 (연도)	세부 과제명	세부 연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2010)	특이적 프로브 선별 및 추가 실험	연구 협의를 통한 검출 균주 검토와 프로브 추가, 제거	100	관련 부처 전문가와의 협의를 통해 검출 균주 검토 완료
		유전체를 이용한 실험으로 프로브 선별	100	16S rDNA기반 프로브 선별 완료 CarB기반 프로브 선별 완료
		SNP 고려를 위한 동종 염기서열의 in silico 분석	100	동종 염기서열의 in silico 분석 완료
		반복적인 피드백으로 최상의 어레이 제작	100	선별된 프로브들을 이용한 최적의 어레이로 2차 개선
	농축산 식품 매트릭스별 RNA 추출방법 확립 및 검증	육류, 우유, 및 계란류 등의 매트릭스에서 RNA 추출방법 확립 및 검증	100	육류, 우유, 계란 등의 매트릭스 전처리 및 균주 배양법, RNA 추출법 적용과 검증
		곡류, 채소류 등의 매트릭스에서 RNA 추출방법 확립 및 검증	100	곡류 채소류 등의 매트릭스 전처리 및 균주 배양법, RNA 추출법 적용과 검증
	농축산 식품 매트릭스를 이용한 실험 및 검증	농축산 식품 매트릭스를 이용한 실험 및 검증	100	식품 샘플과 RNA 추출법을 이용한 마이크로 어레이 실험
		반복적 실험을 통한 소스 데이터 수집	100	3차례의 반복 실험

3. 3차년도(2011년) 연구 목표 및 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도	연구범위
3차 년도 (2011)	제작된 DNA chip의 농축산물식품에 감도 측정	표준균주, 분리균주들에 대한 특이성 측정	100	획득한 모든 종에 대하여 선 별된 특이적 프로브의 각각 특이성 측정
		표준균주, 분리균주들에 대한 마이크로어레이의 감도 측정	100	선별된 특이적 프로브로 구성 된 마이크로어레이의 균주 검 출 최소 감도 측정 및 감도 검량선 작성
		가공 식품 매트릭스별 RNA 추출 방법 확립 및 적용	100	가공식품 매트릭스를 추가적 으로 RNA 추출 방법을 확립 및 마이크로어레이의 적용과 분리 균주에 대한 적용가능 여부도 확인

		식품 매트릭스별 감도 측정	95	육류, 우유 및 계란류 등의 매트릭스, 곡류 및 채소류 매트릭스와 가공식품 매트릭스 별로 균주 검출 최소 감도 측정 및 검량선 작성
실험 키트로 개발		시약과 시료가 최적화된 실험 과정 확립	100	마이크로 어레이 실험을 위한 타겟 RNA 샘플 준비 과정부터 신호 검출까지의 전 과정에 걸친 시약, 시료를 최적화 및 표준화
		개발된 실험 키트의 정확도 및 신뢰도 검토	100	미생물 표준 검출법을 이용하여 비교 분석하여 개발된 키트의 정확도 및 신뢰도 검증
		사용자를 위한 실험 매뉴얼 작성	100	최적화 및 표준화가 완료된 실험 조건, 시약 시료 및 과정을 사용자를 위해 실험 매뉴얼 작성
분석 프로그램 제작		분석에 맞는 알고리즘의 고려와 선택	100	실험을 통해 획득한 데이터를 분석하기에 적합한 알고리즘 검토 및 선택 완료
		수집데이터를 이용한 분석 프로그램 개발	100	선택한 알고리즘으로 분석 프로그램 개발 및 수집 데이터를 이용하여 분석 프로그램에 적용 및 검증
		사용자의 편의를 고려한 GUI 개발	100	사용하기 편리한 간단한 GUI를 개발

제 2절 관련 분야의 기술발전예의 기여도

배양에 의한 전통적 방법의 한계를 극복할 수 있는 동시 다중 분석 시스템의 요구가 증대되고 있는 이에 해당하는 기술로써 본 연구가 제시될 수 있다. 또한 국내 및 국외시장을 분석한 결과 주로 PCR이나 항체를 이용한 병원균 검출 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으며, 바이오칩은 현재 적용기에 접어들었으므로, 본 연구과제에서 농축산 식품에 대한 가능성 있는 실용적인 바이오칩을 이용한 검출 시스템을 제안하였다. 또, 단 한번의 실험으로 빠른 시간 내 정확한 정성 및 정량 분석이 가능한 시스템으로써 확립된 분석법은 국내 뿐 아니라 외국에서 수입되는 식품의 안전성 및 식품 품질관리에 폭넓게 활용될 수 있을 것으로 기대되며 마이크로어레이를 활용한 기술은 미생물 검출 뿐 만 아니라 식품에 존재하는 각종 독소 및 일반성분 분석에도 확장되어 활용될 수 있을 것이다. 본 연구를 통해 농축산식품에서 보다 효율적인 위해 미생물 사전 안전관리 시스템의 초석이 될 수 있을 것으로 기대한다.

제 5 장 연구 개발 성과 및 성과 활용 계획

제 1절 지식 재산권 확보 계획

1. 특허

본 연구와 관련된 지식 재산권은 다음과 같이 확보를 완료하였으며 병원균 비브리오 콜레라 검출을 탄수화물 칩 및 이의 제조 방법에 관한 특허를 작성 중이므로 빠른 시일 내에 출원할 계획이다.

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2010	Ribosomal RNA 탐지용 프로브 및 이를 이용한 살아 있는 병원성 미생물의 검출방법	포항공과대학교 산학협력단	한국	10-2010-0040307	2009	패턴인식에 의한 생물분자 검출 방법 및 검출 프로세스	포항공과대학교 산학협력단	한국	10-0929524
2012	살모넬라 검출용 프로브	포항공과대학교 산학협력단	한국	10-2012-0009808					
2012	병원균 비브리오 콜레라 검출을 위한 탄수화물 칩 및 이의 제조 방법	포항공과대학교 산학협력단	한국	10-2012-0037303					

2. 논문

본 연구와 관련된 논문은 아래 표와 같이 출판을 완료하였으며 RNA를 이용한 oligonucleotide microarray에서의 병원성 미생물 검출과 관련된 논문을 현재 제출하여 진행 중에 있으며 CarB gene을 이용한 S. enterica subsp. enterica 혈청형을 검출 및 구분하는 연구에 관한 내용을 논문으로 작성할 계획을 가지고 있다.

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Pattern-Mapped Multiple Detection of 11 Pathogenic Bacteria using a 16S rDNA-Based Oligonucleotide Microarray	황병희	차형준		Biotechnology and Bioengineering	106(2)	국외	SCI
2010	Polymerase Chain Reaction-Based Detection of Total and Specific Vibrio Species	황병희	차형준	이재원	Applied Biochemistry and Biotechnology	162(4)	국외	SCI
2011	Interactive Configuration through Force Analysis of GM1 Pentasaccharide-Vibrio cholera Toxin Interaction	서정현	차형준		Analytical Chemistry	83	국외	SCI
2012	Characterization of the GM1 pentasaccharide-Vibrio cholera toxin interaction using a carbohydrate-based electrochemical system	서정현	차형준	이혜연	Analyst	137	국외	SCI
2012	Specific and rapid multiplex analysis of pathogens using direct 16S rRNA hybridization in microarray system	황병희	차형준	신화희, 서정현	Analytical Chemistry	84	국외	SCI

제 6 장 연구 개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

제 1절 DNA 마이크로어레이를 이용한 *Campylobacter* spp.의 신속 검출

1. 해외 과학기술 정보

가. 기술명

Development of a sensitive DNA microarray suitable for rapid detection of *Campylobacter* spp.

나. 기술 개발 주체

Georgios Keramas^a, Dang Duong Bang^b, Marianne Lund^b, Mogens Madsen^c, Svend Erik Rasmussen^d, Henrik Bunkenborg^a, Pieter Telleman, Claus Bo Voøge Christensen^a

a Mikroelektronik Centret (MIC), Technical University of Denmark, Building 345 East, Kongens Lyngby 2800, Denmark

b Department of Poultry, Fish and Fur Animals, Danish Veterinary Institute, Aarhus, Denmark

c NUNC A/S, Roskilde, Denmark

d Danish Broiler Meat Association (DBMA), Copenhagen, Denmark

2. 해외 과학기술의 내용

*Campylobacter*는 급성 세균성 장염의 주요 원인으로 전 세계 곳곳에서 질병을 일으킬 뿐만 아니라 인간을 비롯한 여러 종류의 숙주에서 발견된다. 따라서 음식 안전성을 소비자에서 보장하기 위해서 신속하고 민감하면 특이적인 *Campylobacter*를 개발하는 것이 필요로 한다.

Capture probe	sample number	1	2	3	4	5	6	7	8	negative Ctrl
		6 x 10 ¹ ng/ul 330,000 GE	6 x 10 ² ng/ul 33,000 GE	6 x 10 ³ ng/ul 3,300 GE	6 x 10 ⁴ ng/ul 330 GE	6 x 10 ⁵ ng/ul 33 GE	6 x 10 ⁶ ng/ul 3 GE	6 x 10 ⁷ ng/ul 0.3 GE	6 x 10 ⁸ ng/ul 0.03 GE	
Universal Bacterial	on gel	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	on array	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Universal Campylobacter	on gel	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	on array	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Campylobacter jejuni	on gel	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	on array	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Campylobacter Jejuni-Hippuricase	on gel	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	on array	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Campylobacter coli	on gel	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	on array	+	+	+	+	+	+	-	-	-

<그림 1> Keramas et al.이 개발한 DNA 마이크로어레이를 이용한 미생물 검출 결과

이를 위해서 Keramas et al.은 민감한 DNA 마이크로어레이 기반의 검출 기술을 개발하여 *Campylobacter*와 non-*Campylobacter* bacteria를 구분하고자 하였으며 배설물로부터 채취한 샘플로부터 미생물을 바로 검출을 시도하였다. Keramas et al.은 16S rRNA와 16S-23S rRNA의 중간 지역의 염기서열을 이용하여 DNA 프로브를 제작하여 DNA 마이크로어레이를 구성하였다. 타겟 DNA는 범용 PCR 프라이머를 이용하여 multiplex-PCR로 증폭하고 Cy5로 표지하였다. 그 뒤에 준비된 DNA 타겟으로 DNA 마이크로어레이에 혼성화 반응을 시켰다. Keramas et al. 이 개발한 마이크로어레이를 이용하면 3시간 이내, 미생물의 genome 6-60 fg의 최소 감도로 검출이 가능하다.

제 2절 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이를 이용한 토양 추출물의 16S rRNA의 직접 검출

1. 해외 과학기술 정보

가. 기술명

Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays

나. 기술 개발 주체

Jack Small^a, Douglas R. Call^b, Fred J. Brockman^c, Timothy M. Straub^a, Darrell P. Chandler^a

a Analytical Microbiology Group, Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington 99352, and Department of Veterinary Microbiology

and Pathology

b Washington State University, Pullman, Washington 99164

c Environmental Microbiology Group, Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington 99352, and Department of Veterinary Microbiology and Pathology

2. 해외 과학기술의 내용

Small et al. 은 정제하지 않은 토양 추출물로부터의 16S rRNA를 직접 검출할 수 있는 마이크로어레이를 검출하고 검증하였다. 이 마이크로어레이는 종 특이적인(species-specific) 16S rRNA 프로브로 구성되어 있다. 먼저 RNA를 이용해서 마이크로어레이 시험하기 전에 Small et al.은 DNA를 PCR로 증폭하여 혼성화 반응 시간, 온도 그리고 버퍼 조건을 최적화하였다. 이를 통해서, 혼성화 시간은 2시간, 상온에서 혼성화 하였을 때 가장 재현성있고 특이적인 검출이 가능하였다. 또, formamide를 혼성화 버퍼에 넣어주면 RNA의 2차 구조를 denature 시켜주어 더 특이적으로 혼성화 반응이 일어났다.

이 연구팀에서는 16S rRNA를 직접 검출하기 위해서는 chaperone-detector 프로브 전략을 채택하였다. Chaperone-detector 프로브를 사용하면 특이적 검출 프로브와의 혼성화 뿐만 아니라 chaperone-detector 프로브와의 혼성화도 같이 일어나야하기 때문에 특이성을 더 높여줄 수 있다.

Small et al.은 토양으로부터 추출한 샘플을 추가적인 정제과정이 없이 마이크로어레이 사용가능함을 증명하였으며 7.5×10^6 cell의 민감도로 미생물을 검출할 수 있었다.

제 7 장 참고문헌

- [1] 식품의약품안전청, 2011 식품의약품 통계연보, 13, 42-46
- [2] 김현주, 김용수, 정명섭, 오덕환, 박경진, 전향숙, 하상도, 신기술 이용 식중독균 신속검출법 개발 동향 분석, *J. Fd. Hyg. Safety*, 25(4), 376-387 (2010)
- [3] Severgnini, M., Cremonesi, P., Consolanini, C., Bellis, G. D., Castiglioni, B., Advances in DNA microarray technology for the detection of foodborne pathogens, *Food Bioprocess Technol*, 4, 936-953 (2011)
- [4] Gould, L.H., et al., Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks-United States, 2008 (Reprinted from MMWR, vol 60, pg 1197-1202, 2011). *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2011. 306(20): p. 2212-2214.
- [5] Arora, P., et al., Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosens Bioelectron*, 2011. 28(1): p. 1-12.
- [6] 정효암, 최호석, 김민곤, 식품 위해 미생물 검출을 위한 DNA 마이크로어레이 기술, *Safe Food* 2006년 12월호, 1(4), 24-30 (2006)
- [7] Call, D.R., M.K. Borucki, and F.J. Loge, Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *J Microbiol Methods*, 2003. 53(2): p. 235-243.
- [8] Uttamchandani, M., et al., Applications of microarrays in pathogen detection and biodefence. *Trends in Biotechnology*, 2009. 27(1): p. 53-61.
- [9] de Boer, E. and R.R. Beumer, Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 1999. 50(1-2): p. 119-30.
- [10] Bell, J., The polymerase chain reaction. *Immunol Today*, 1989. 10(10): p. 351-5.
- [11] Lockwood, D.E., A.S. Kreger, and S.H. Richardson, Detection of toxins produced by vibrio fluvialis. *Infect Immun*, 1982. 35(2): p. 702-8.
- [12] Yershov, G., et al., DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(10): p. 4913-8.
- [13] 이상현, 조아영, 농림축수산물 품질관리·유통기술 R&D 동향 및 시사점, 과학 기술 및 연구개발 사업 동향 브리프, 2011-5호, 4--10 (2011)
- [14] Call, D.R., Challenges and opportunities for pathogen detection using DNA microarrays. *Crit Rev Microbiol*, 2005. 31(2): p. 91-9.
- [15] Rouillard, J.M., M. Zuker, and E. Gulari, OligoArray 2.0: design of oligonucleotide probes for DNA microarrays using a thermodynamic approach. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(12): p. 3057-62.
- [16] Guschin, D.Y., et al., Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Appl Environ Microbiol*, 1997. 63(6): p. 2397-2402.
- [17] Rudi, K., et al., Application of sequence-specific labeled 16S rRNA gene oligonucleotide probes for genetic profiling of cyanobacterial abundance and diversity

- by array hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 2000. 66(9): p. 4004-4011.
- [18] Loy, A., et al., 16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the betaproteobacterial order "Rhodocyclales". *Appl Environ Microbiol*, 2005. 71(3): p. 1373-1386.
- [19] Wu, C.F., et al., DNA microarray for discrimination between pathogenic O157 : H7 EDL933 and non-pathogenic *Escherichia coli* strains. *Biosens Bioelectron*, 2003. 19(1): p. 1-8.
- [20] Sergeev, N., et al., Multipathogen oligonucleotide microarray for environmental and biodefense applications. *Biosens Bioelectron*, 2004. 20(4): p. 684-698.
- [21] Reyes-Lopez, M.A., et al., Fingerprinting of prokaryotic 16S rRNA genes using oligodeoxyribonucleotide microarrays and virtual hybridization. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(2): p. 779-89.
- [22] Eom, H.S., et al., Multiple detection of food-borne pathogenic bacteria using a novel 16S rDNA-based oligonucleotide signature chip. *Biosens Bioelectron*, 2007. 22(6): p. 845-53.
- [23] Hwang, B.H. and H.J. Cha, Quantitative oligonucleotide microarray data analysis with an artificial standard probe strategy. *Biosens Bioelectron*, 2008. 23(11): p. 1738-44.
- [24] Hwang, B.H. and H.J. Cha, Pattern-mapped multiple detection of 11 pathogenic bacteria using a 16s rDNA-based oligonucleotide microarray. *Biotechnol Bioeng*, 2010. 106(2): p. 183-92.
- [25] Keramas, G., et al., Development of a sensitive DNA microarray suitable for rapid detection of *Campylobacter* spp. *Mol Cell Probes*, 2003. 17(4): p. 187-96.
- [26] Vernet, G., et al., Species differentiation and antibiotic susceptibility testing with DNA microarrays. *J Appl Microbiol*, 2004. 96(1): p. 59-68.
- [27] 황병희, 16S rDNA 기반의 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이를 이용한 병원성 미생물 동시 검출, 2010, 포항: 포항공과대학교 대학원.
- [28] Chiu, C.H., L.H. Su, and C. Chu, *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin Microbiol Rev*, 2004. 17(2): p. 311-22.
- [29] Kim, S., et al., Multiplex PCR-based method for identification of common clinical serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *J Clin Microbiol*, 2006. 44(10): p. 3608-15.
- [30] Brenner, F.W., et al., *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol*, 2000. 38(7): p. 2465-7.
- [31] Ahn, S. and D.R. Walt, Detection of *Salmonella* spp. using microsphere-based, fiber-optic DNA microarrays. *Anal Chem*, 2005. 77(15): p. 5041-7.
- [32] Murray, P.R., E.J. Baron, and American Society for Microbiology., *Manual of clinical microbiology*. 8th ed2003, Washington, D.C.: ASM Press.

주 의

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