

식품 제조 현장에서 세균의 신속 검사법 개발

Bacteria Screening PCR Kit

TaKaRa Code RR114A

100회용 (ENT, BS 각 50반응)

식품 안전성에 대한 소비자의 신뢰를 확보하기 위하여는 식품 공급의 각 단계마다의 품질 관리가 중요시 되고 있다. 식품 제조 회사는 HACCP의 개념에 준한 제조 공정관리에 노력하고 있으며, 종래부터 엄격한 미생물 검사를 각 공장과 식품 안전 연구소에서 이중으로 체크하고 있다. 그러나 종래의 검사법은 24~48시간 이상의 검사시간이 필요하기 때문에 검사전 출하를 할 수 없어 좀 더 빠른 특정 세균군의 검사법이 요구되고 있었다. 여기서 착안하여 세균의 증식성과 PCR법을 조합한 세균의 신속 검사법의 개발에 착수하였다.

식품 제조 현장에서 대장균이나 살모넬라균, 황색포도상구균 그리고 *Cereus*균 등 식중독에 관여하는 세균의 혼입은 반드시 피해야 한다. 그러나 이러한 위험 미생물을 직접 검사하는 것보다 위생지표균으로 알려진 균을 포함한 균군 수준으로 screening 검사를 하는 것이 신속하고 경제적이다.

또한 이들의 위생지표균군의 오염 상황을 파악하는 것은 제품이나 제조 가공 및 보존 중에 위험 미생물의 존재 혹은 품질 저하 등의 위생학적 품질을 간접적이지만 보다 넓은 범위로 파악할 수 있는 편리성이 있다. 특히 세균 오염도가 비교적 낮은 상황 하에 있는 식품 공장에서는 균군 레벨 검사법이 합리적인 방법의 하나이다.

대장균이나 살모넬라균을 포함한 장내 세균과 균군, 황색포도상구균을 포함한 *Staphylococcus*속 균군 및 *Cereus*균을 포함한 *Bacillus*속 균군을 위생 지표균군이라고 보고 이들 균군의 screening적인 PCR 검출계를 검토해 신속한 검사법을 개발하였다.

본 고에서는 kit의 내용, 개발 경위, 성능 및 응용 예 등에 대해서 소개한다.

Bacteria Screening PCR Kit

본 kit는 ENT primer로 대장균이나 살모넬라균을 포함한 장내 세균과의 균군을 그리고 BS primer에 의해 *Cereus*균을 포함한 *Bacillus*속, 황색 포도상구균을 포함한 *Staphylococcus*속의 균군을 16S rRNA 유전자를 target으로 PCR을 이용하여 검출하는 kit이다. 증균 배양을 실시한 후 본 kit를 사용하면 검체내 포함되어 있는 적은수의 생균도 단시간에 검출할 수 있다.

●Kit의 내용

2 × Premix Solution (2 × conc.)	250 μl × 10 (100 회분)
Primer Mix ENT (각 5 μM)	125 μl (50 회분)
Primer Mix BS (각 5 μM)	125 μl (50 회분)
Positive Control ENT	25 μl (10 회분)
Positive Control BS	25 μl (10 회분)
dH ₂ O (멸균수)	1 ml × 3
10% Chelex® Solution	12 ml × 2

Primer의 설계

PCR법으로 증폭하는 target 유전자로서 세균 유래의 16S rRNA 유전자를 선택하였다. 많은 연구자의 노력에 의해 얻어진 여러 미생물의 같은 유전

자 서열 데이터는 그 수가 방대하며 최근 Bergey's Manual의 세균 분류 체계도 16S rRNA 유전자 서열에 기초를 두어 결정되어 있다¹⁾.

게놈 DNA 상의 동일 유전자는 복수 존재하여 PCR 검출에서 감도의 향상에도 유리하다. 예를 들면 장내 세균과 세균에서는 1 세포당 6~7 copy, *Staphylococcus*속 세균에서는 4~6 copy, *Bacillus*속 세균에서는 7~12 copy라고 알려져 있다²⁾.

또한 분리 균주의 서열 비교를 통해 균의 동정이 균종에 근접할 수 있다. 개발 초기 앞서 기술한 균군을 일괄 검출할 수 있는 PCR primer의 설계를 시도했지만 목적 균군에 대한 검출 특이성을 겸비한 primer는 설계할 수 없었다. 여기서 목적 균군을 2개로 나누어 대장균이나 살모넬라균을 포함한 장내세균과 균군을 검출하는 primer (ENT primer)와 황색포도상 구균을 포함한 *Staphylococcus*속 균군 및 *Cereus*균을 포함한 *Bacillus*속 균군을 검출하는 primer (BS primer)를 각각 설계하였다.

세균 유래의 16S rRNA 유전자는 미토콘드리아나 Chloroplast 유래의 동 유전자와의 상동성이 높은 것이 알려졌다. 특히 후자와의 유사성이 높기 때문에 식물이나 동물 유래 성분을 함유하는 가공식품으로부터 16S rRNA 유전자를 표적으로서 PCR로 세균군을 검출하는 경우에는 식물유래 DNA와 반응하지 않는 것이 중요하다. Primer 설계는 이 부분에 유의하였다. 또한 동일 조건으로 PCR을 실시할 수 있도록 ENT 및 BS primer의 서열을 각각 조정하였다.

이렇게 설계한 각 primer의 반응 특이성을 검토한 결과 당초 의도와 동일하게 반응 특이성을 얻을 수 있었다 (그림1, 2 참조).

그런데 시판중인 Taq DNA polymerase에는 대장균 유래의 DNA가 극소량 혼입하고 있는 것이 있다. 이러한 효소를 사용하면 false positive을 나타내는 것이 있다^{3,4}. 이 문제를 피하기 위해서 효소, dNTP, buffer류는 TaKaRa의 제품을 사용해 사전 검정으로 35 cycle에서도 false positive 밴드가 출현하지 않는 것을 확인하였다. 실제 사용에서는 증폭 cycle 수를 30 cycle로 설정하였다.

증균배양과 전 처리

PCR 법으로 미생물을 검출할 때의 문제점은 살아있는 균과 죽은 균 유래의 DNA를 구별할 수 없다는 것이다⁵. 이점은 세균의 오염 경과를 파악하는 경우에는 문제가 되지 않지만, 살아있는 균에 의한 오염을 검사하고자 하는 경우에는 문제가 된다. 이 문제를 극복하기 위해 대상시료의 증균배양 조사를 첨가했다. 증균배양 조작으로 살아있는 균수의 증가는 검출 감도의 향상에도 기여했다. 또한 식품 잔여물에 의한 PCR 저해도 염려 되어 식품 잔여물을 원심분리 후 원심 상청액에서 균체를 얻었다. 얻은 균체로부터 chelex를 이용한 가열 처리법을 이용하여 DNA를 추출했다⁶. 또한 황색포도상 구균등의 그램 양성균의 경우에는 세포벽 분해 효소의 사용이 유효하다는 결과를 얻었다.

검출 감도

지표균을 식품에 첨가해 약 5 ~ 6시간의 증균 배양한 후 PCR로 검출 감도를 확인한 결과, 각종 식품에 따라 10 ~ 20 cfu/g 시료의 첨가균을 검출할 수 있었다 (표1).

다만, 가공 식품에 따라서 PCR을 저해하는 시료가 있어 (예를 들면 두부, 향신료 함유 식품) 이러한 검사대상에 대해서는 DNA 정제를 한 후에 검사할 필요가 있다. 또한 죽은 균수가 과다한 식품에서는 증균배양을 하여도 죽은 균이 검출되는 경우가 있다. 이 경우는 대조균으로 배양 전의 검체에 대해서도 검사를 실시하여 서로 비교하는 등의 방법을 선택하는 것이 좋다.

Primer의 반응 특이성 검사

●방법

각종 세균의 게놈 DNA (50 pg; 10⁴ copy 상당)를 주형으로 하여 ENT primer 또는 BS primer로 각각 PCR을 하여 각 primer의 반응 특이성을 조사했다.

[PCR 조건]

95℃ 60 sec
 95℃ 30 sec
 59℃ 30 sec
 72℃ 30 sec
 72℃ 60 sec

} 30 cycles

PCR 반응 후 2 μl의 반응액을 agarose gel 전기영동 후 해석했다.

●결과

Agarose gel 전기 영동에 의한 해석 결과의 예를 그림 1에 나타내었다. 각 균군이나 생물종과의 반응성을 그림 2에 나타내었다.

표 1 균첨가 회수 시험에서 매우 미량인 균의 검출이 가능한 식품의 예

Ceufer	균 첨가 회수 시험			
	ENT primer 검출		BS primer 검출	
	대장균	살모넬라 균	황색구균	cereus 균
우유 (130℃ 2초 살균, 요냉장품)	○	NA	○	○
버터 (요냉장품)	○	NA	○	○
생크림 (요냉장품)	○	NA	○	○
햄 (가열 후 포장, 요냉장품)	○	○	○	NA
비엔나소시지(포장 후 과일, 요냉장품)	○	○	○	NA
어묵(요냉장품)	○	○	○	NA
생선살 꼬치구이(요냉장품)	○	○	○	NA
찜만두(요냉장품)	○	○	○	○
푸딩(요냉장품)	○	○	○	NA
경단	○	○	○	NA
식빵	NA	○	○	NA
팥빵	NA	○	○	NA
마요네즈	NA	○	○	NA

○: 적합 확인 (초기 첨가균수: 10~20 cfu/g 시료, 배양 시간: 5~6 시간); NA: 미실시.

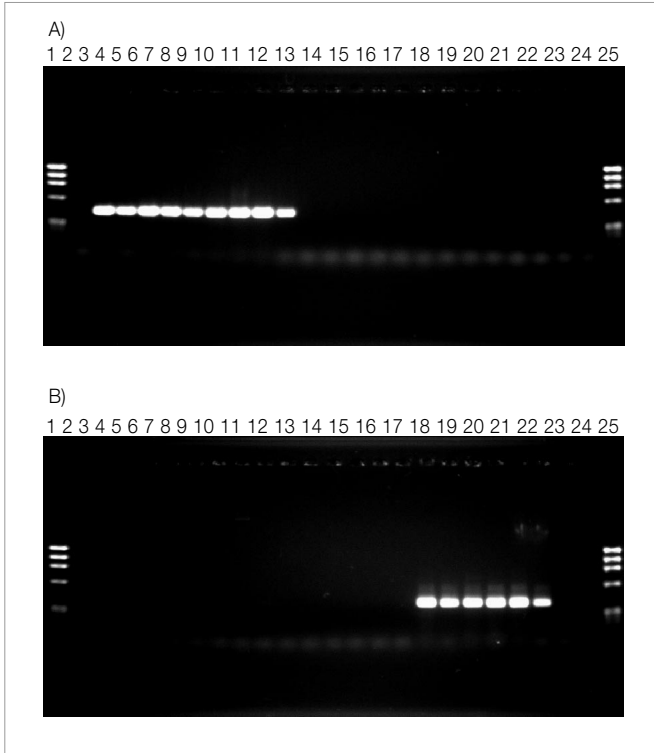


그림 1 검정결과와 일례

Lane	Lane
1: ϕ X174 Hae III digest Marker	13: <i>Alcaligenes faecalis</i> DNA
2: Negative Control (No Template DNA)	14: <i>Campylobacter coli</i> DNA
3: <i>Serratia ficaria</i> DNA	15: <i>Flavobacterium johnsoniae</i> DNA
4: <i>Klebsiella pneumoniae</i> DNA	16: <i>Streptococcus mutans</i> DNA
5: <i>Salmonella enteritidis</i> DNA	17: <i>Staphylococcus epidermidis</i> DNA
6: <i>Escherichia coli</i> DNA	18: <i>Staphylococcus aureus</i> DNA
7: <i>Citrobacter freundii</i> DNA	19: <i>Bacillus subtilis</i> DNA
8: <i>Yersinia enterocolitica</i> DNA	20: <i>Bacillus megaterium</i> DNA
9: <i>Vibrio vulnificus</i> DNA	21: <i>Bacillus cereus</i> DNA
10: <i>Photobacterium leiognathi</i> DNA	22: <i>Aerococcus viridans</i> DNA
11: <i>Aeromonas hydrophila</i> DNA	23: <i>Enterococcus faecalis</i> DNA
12: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DNA	24: <i>Lactobacillus casei</i> DNA
	25: ϕ X174 Hae III digest Marker

응용 예 1 : 시판하는 식품 중 세균의 검출

●방법

시판하는 냉장식품에 9배량의 BHI 배지를 첨가하여, 스토막카로 파쇄 혼합 후, 35°C에서 5시간 진탕 배양하였다 (약 10 ml). 이 배양액 1.3 ml을 1,000 rpm (약 100×g)으로 1분간 원심 분리하여 상청의 1.2 ml을 12,000 rpm (약 13,000×g)으로 3분간 원심 분리하였다. 침전물을 500 μ l의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0)로 현탁한 후 원심 분리하여 세정하였다. 균체를 포함한 침전물에 200 μ l의 chelex용액을 첨가해 99°C에서 5분간 가열 처리한 후 급냉하고 12,000 rpm (약 13,000×g)으로 1분간 원심 분리하여 상청액을 PCR용 DNA로 사용하였다.

위의 방법에 따라 조제한 DNA 시료액에 대해서 ENT primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 한편 각 배양 시간에 있어 배양액의 일부를 배양 plate에 파종하여 살아있는 균수를 측정하였다.

●결과

시판하는 냉장식품 (4품)의 파쇄액을 5시간 배양 후 ENT primer를 이용한 PCR 결과 2개의 검체에서 양성 반응이 검출되었다 (그림 3).

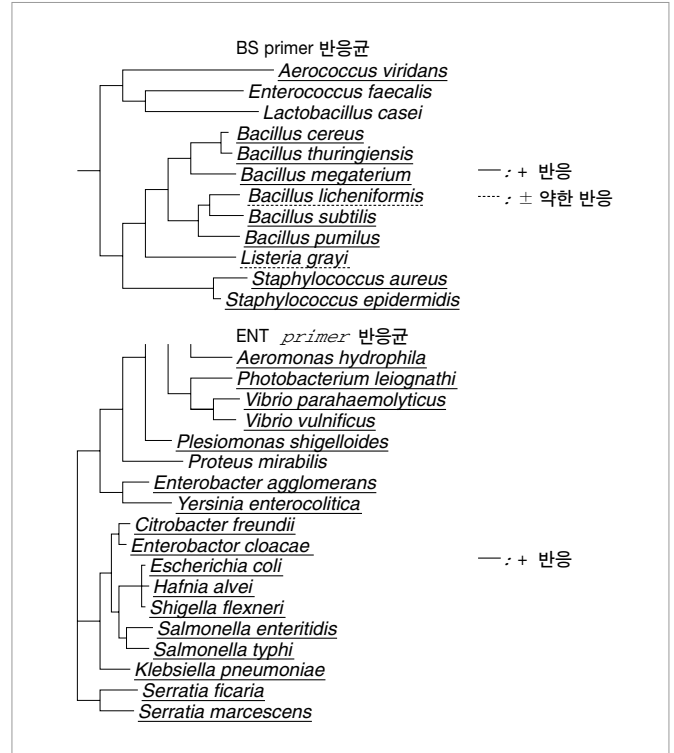


그림 2 ENT, BS primer의 반응성

계통수의 일부를 나타낸다. 또한 두 primer와 이하의 검체 DNA에는 반응하지 않는다. *Triticum aestivum* (コム기), *Zea mays* (옥수수), *Solanum tuberosum* (고구마), *Brassica napus* (유채 씨), *Bos Taurus* (소), *Gallus gallus* (닭), *Oncorhynchus* sp (연어), *Saccharomyces cerevisiae* (효모), *Aspergillus oryzae* (누룩곰팡이)

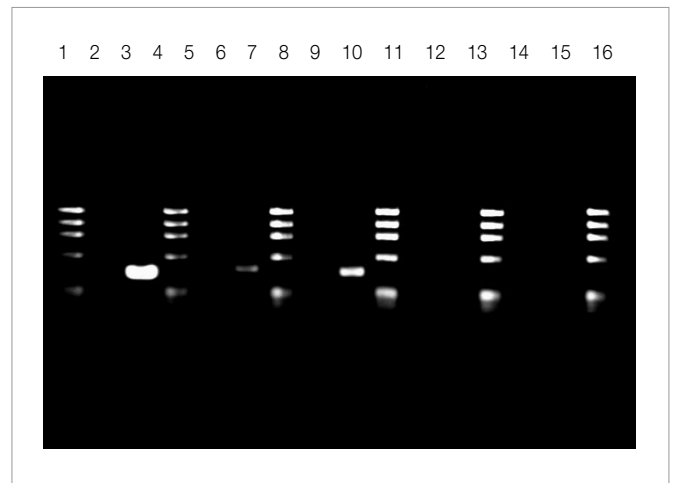


그림 3 PCR의 결과 (ENT primer를 사용)

Lane	Lane
1: ϕ X174 Hae III digest Marker	9: 시판 식품 B (5 hr)
2: Negative Control (No Template DNA)	10: ϕ X174 Hae III digest Marker
3: Positive Control ENT	11: 시판 식품 C (0 hr)
4: ϕ X174 Hae III digest Marker	12: 시판 식품 C (5 hr)
5: 시판 식품 A (0 hr)	13: ϕ X174 Hae III digest Marker
6: 시판 식품 A (5 hr)	14: 시판 식품 D (0 hr)
7: ϕ X174 Hae III digest Marker	15: 시판 식품 D (5 hr)
8: 시판 식품 B (0 hr)	16: ϕ X174 Hae III digest Marker

또한 이 결과는 한천 배지에 의해 살아있는 균수를 측정된 결과 (표2)와 일치한다. 이와 같이 단시간 배양 후 PCR에 의한 균 유전자 검출은 시판하는 냉장식품에서도 가능하다는 것을 보여준다.

표 2 한천 배지에 의해 살아있는 균수의 측정과 PCR 판정 비교

시판 식품 (검체)	살아있는 균수*1		PCR 판정*2	
	증균배양 시간		증균배양 시간	
	0 hr	5 hr	0 hr	5 hr
A	30	1,700	-	+
B	70	4,600	-	+
C	음성	음성	-	+
D	음성	음성	-	+

*1 : Petrifilm™ Enterobacteriaceae Count Plate (3M Center, St. Paul, MN., USA)로 24 시간 배양해 측정 (단위 cfu/ml 배양액).
*2 : 그림 3의 PCR 결과 비교를 위해서 인용.

응용 예 2 : 우유중에 첨가한 균군의 검출

●방법

시판하는 우유 (130℃ 2초 살균, 요냉장품)에 대장균 (*Escherichia coli*), 황색 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*) 또는 *cereus*균 (*Bacillus cereus*)을 1~2 cfu/ml가 되도록 첨가하여 약 10 ml을 그대로 35℃에서 4~7시간 진탕 배양하였다 (증균배양).

각 배양 시간에 있어서 우유 배양액 1.0 ml을 12,000 rpm (약 13,000×g)로 3분간 원심분리하여 침전을 500 µl의 TE buffer (10 mM Tris HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0)로 현탁한 후 원심분리 하여 침전을 세정하였다.

균체를 포함한 침전물을 100 µl의 Achromopeptidase액 (250 U/ml in TE buffer)에 현탁하여 55℃에서 10분간 배양하였다. 그 다음에 100 µl chelex액을 첨가하여 99℃에서 5분간 가열 처리한 후 급냉하고 12,000 rpm (약 13,000×g)로 1분간 원심 분리하여 상청을 PCR용 DNA로 사용하였다.

상기의 방법으로 조제한 DNA 시료액에 대해서 ENT primer 또는 BS primer를 이용해 PCR을 수행하였다. 한편, 각 배양 시간에 있어 배양액의 일부를 배양 plate에 파종하여 살아있는 균수를 측정하였다.

●결과와 고찰

5시간의 증균 배양을 하여 최초 균수 1~2 cfu/ml의 대장균, *cereus*균 또는 황색 포도상구균을 ENT 및 BS primer를 이용하여 PCR로 모두 검출할 수 있었다. 이들 데이터의 일례로서 대장균의 PCR 검출의 결과를 그림 4에, 살아있는 균수의 측정 결과를 표 3에 나타내었다. 이와 같이 단시간의 증균 배양을 한 후 PCR법으로 균의 유전자 검출을 할 수 있었으며, 죽은 균의 유전자를 검출하는 과정없이 살아있는 균을 선택적으로 검출할 수 있었다.

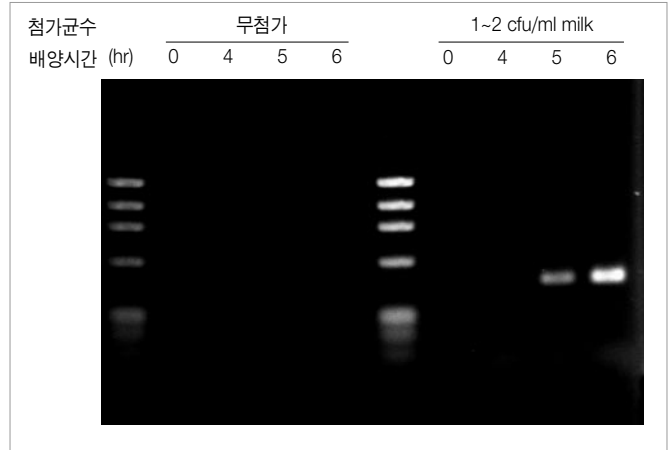


그림 4 대장균의 PCR 검출 결과 (ENT primer를 사용)

표3 한천배지에 의한 살아있는 균수의 측정 (대장균의 경우)

첨가균수	증균배양 시간(hr)			
	0	4	5	6
무첨가	음성	음성	음성	음성
1~2 cfu/ml	1.5	140	790	16,000

살아있는 균수는 desoxycholate 한천 배지에서 24 시간 배양하여 측정(단위 : cfu/ml milk)

맺음말

Kit화 된 제품은 agarose gel 전기영동에 의해 검출하는 type이지만 새로운 신속 검출 및 정량적 검출을 위해 real time PCR법을 검토하고 있다. TaKaRa의 Bacteria Screening PCR Kit을 이용하여 보다 더 정확하고 쉽게 식품의 안전성을 확보할 수 있기를 바란다.

참고 문헌

- 1) <http://www.cme.msu.edu/bergeys/>
- 2) <http://rncdb.cme.msu.edu/rncdb/servlet/controller>
- 3) Rupf, S., Merte, K. and Eschrich, K. (1999) *J. Dent. Res.*, 78, 850-856.
- 4) Coress, C. E., Guiver, Borrow, R. et al. (2000) *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1747-1752.
- 5) Wang, R. -F., Cao, W. -W. and Cerriglia, C.E. (1997) *J. Appl. Microbiol.*, 83, 727-736.
- 6) Kobayashi, K., Tagami, M. and Seko, K. (1994) *Kansenshogaku Zasshi*, 68, 1203-1210.

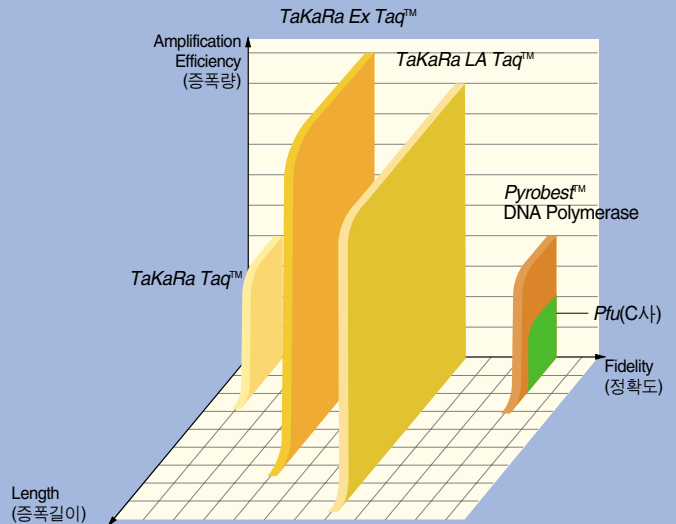
정확한 결과를 위한 탁월한 선택

TaKaRa PCR Enzyme Serise

어떤 실험, 어떤 시료도 100% 성공!

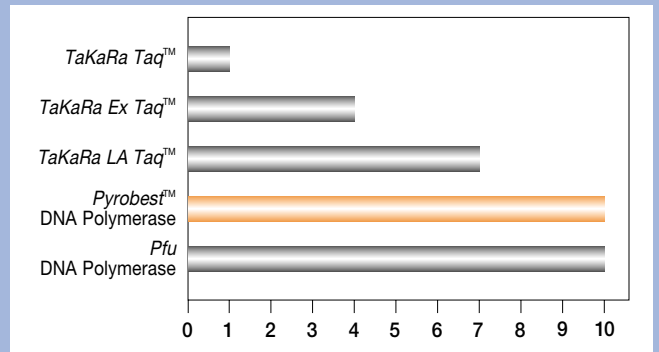
▶ TaKaRa PCR enzymes 성능

TaKaRa Taq™, TaKaRa Ex Taq™, TaKaRa LA Taq™, Pyrobest™ DNA Polymerase 그리고 C사의 Pfu DNA polymerase의 성능(증폭양, 증폭길이, 정확도)를 삼차원 그래프로 표시하였다. 정확도는 TaKaRa Taq™을 기준으로 각각의 상대값을 산출하였다.



▶ TaKaRa PCR Enzymes의 정확도(fidelity)

TaKaRa PCR Enzymes의 정확도(fidelity)를 Cline 등의 방법, Kunkel 등의 방법으로 측정하였다. TaKaRa Taq™을 기준으로 각 DNA polymerase의 정확도의 상대값을 그래프로 표시하였다. Pyrobest™ DNA polymerase는 Pfu DNA polymerase와 동등하게 TaKaRa Taq™의 10배 정도의 fidelity를 나타내었다.



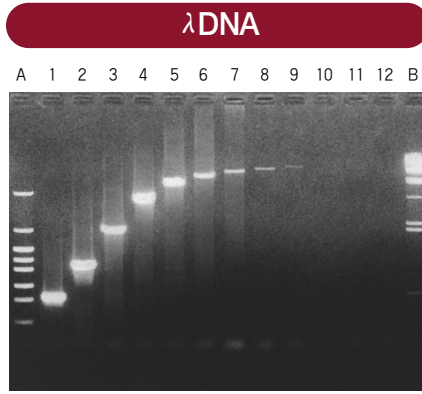
▶ TaKaRa PCR Enzymes의 사용 기준

	TaKaRa Taq TaKaRa Taq HS Pyrobest DNA Polymerase	TaKaRa Ex Taq TaKaRa Ex Taq HS TaKaRa Z-Taq	TaKaRa LA Taq
λ DNA			
양호하게 증폭	~6 kbp 정도	~20 kbp 정도	~35 kbp 정도
증폭 가능 길이	~12 kbp 정도	~30 kbp 정도	~48 kbp 정도
human genomic DNA			
양호하게 증폭	~2 kbp 정도	~10 kbp 정도	~20 kbp 정도
증폭 가능 길이	~4 kbp 정도	~20 kbp 정도	~30 kbp 정도
정확도(fidelity)	TaKaRa Taq TaKaRa Taq HS	TaKaRa Ex Taq TaKaRa Ex Taq HS TaKaRa Z-Taq	TaKaRa LA Taq < Pyrobest DNA Polymerase
증폭효율	TaKaRa Taq TaKaRa Taq HS	Pyrobest DNA Polymerase < TaKaRa LA Taq ≤ TaKaRa Ex Taq TaKaRa Z-Taq	TaKaRa Ex Taq
반응속도	TaKaRa Z-Taq이 TaKaRa Taq 보다 5배 더 빠르다		

주) PCR 증폭단편의 길이가 길어질수록 PCR에 필요한 주형 DNA의 양이 많아지고, 또한 PCR 조건도 까다롭게 됩니다.

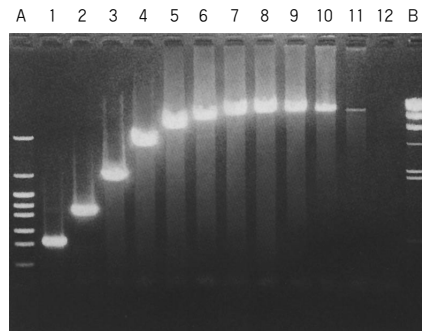
▶ TaKaRa PCR Enzymes 증폭효율의 비교

TaKaRa Taq™



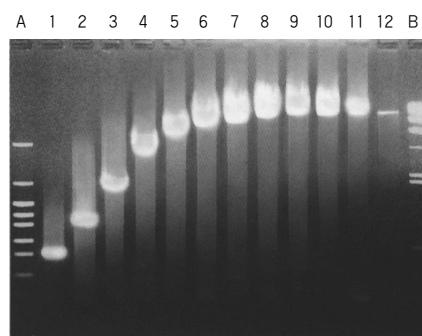
증폭 가능 길이 : ~15 kbp

TaKaRa Ex Taq™



증폭 가능 길이 : ~30 kbp

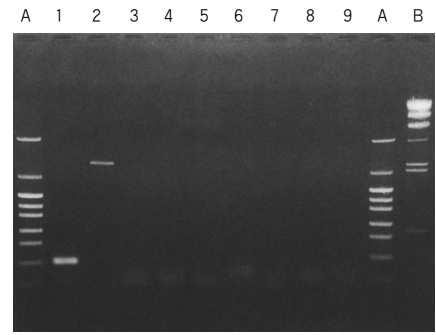
TaKaRa LA Taq™



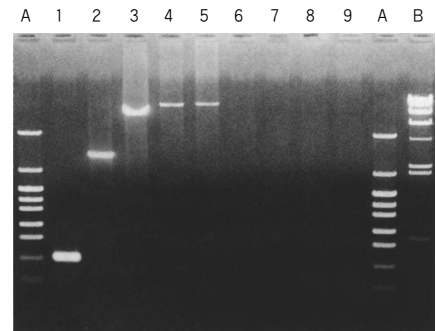
증폭 가능 길이 : ~48 kbp

lane A: pHY Marker 7: 10 kb
 1: 0.5 kb 8: 12 kb
 2: 1 kb 9: 15 kb
 3: 2 kb 10: 20 kb
 4: 4 kb 11: 28 kb
 5: 6 kb 12: 35 kb
 6: 8 kb B: λ-Hind III Marker

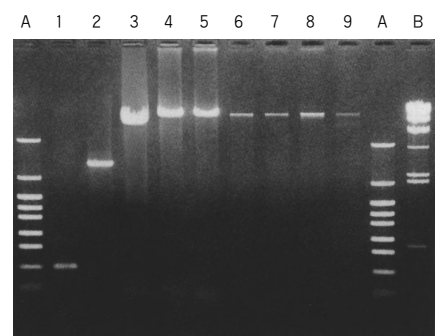
Human Genomic 증폭례



증폭 가능 길이 : ~4 kbp



증폭 가능 길이 : ~20 kbp



증폭 가능 길이 : ~30 kbp

lane A: pHY Marker 7: 28.4 kb
 1: 0.262 kb 8: 29.9 kb
 2: 2.9 kb 9: 30.8 kb
 3: 8.5 kb A: pHY Marker
 4: 17.5 kb B: λ-Hind III Marker
 5: 23.2 kb
 6: 27 kb

▶ TaKaRa PCR Enzymes

- PCR 반응의 가장 기본적인 enzyme

TaKaRa Taq™

- 경이의 증폭량, 향상된 증폭길이의 new standard

TaKaRa Ex Taq™

- 보다 길고 정확한 단편의 증폭에

TaKaRa LA Taq™

- 항 Taq antibody와 결합시킨 TaKaRa Taq

TaKaRa Taq™ Hot Start Version

- 항 Taq antibody와 결합시킨 TaKaRa Ex Taq

TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version

- Real Time PCR용으로 최적화시킨 Hot Start용 Ex Taq

TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Version

- GC rich, repeat sequence 복잡한 2차구조를 갖는 주형의 증폭에

TaKaRa LA Taq™ with GC Buffer

- 초고속 증폭에

TaKaRa Z-Taq®

- High fidelity의 초정확성

Pyrobest™ DNA Polymerase

- Hot Start PCR용 항 Taq antibody

Taq Antibody

- Primer와 주형 DNA를 첨가하는 것으로 모든 반응 OK!

Premix Taq™

(TaKaRa Taq™ version/TaKaRa Ex Taq™ version)

PerfectShot™ Ex Taq (Loading dye mix)