

연구과제 최종보고서

과 제 명	Realtime PCR을 이용한 농산물(엽채류) 중 식중독균 정량분석법 연구					
총연구기간	2018년 1월 ~ 2018년 12월		당해연도 연구기간	2018년 1월 ~ 2018년 12월		
수행부서/ 세부수행부서	시험연구소 안전성분석과 (자체)	연구 책임자	구분	직위	성명	
			정	과 장	김동호	
			부	주무관	김성연	
		참여 연구원	직위		성명	
			팀 장		문지영	
			주무관		김민주	
			주무관		김종찬	
			연구원		서동연	
참여부서						
사업구분	단년도 (√) 다년도 ()		총 (1)개년 중 (1)차 연도			
연구결과 요약	<p>○ 본 연구에서는 식중독균 7종을 분석하는 새로운 방법으로, 기존의 배양 기반의 방법을 대체하는 동시에 미생물의 정량분석을 위한, RT-PCR을 이용한 병원성 미생물의 동시 분석법을 개발하고자 하였음</p> <p>○ 농도별로 희석한 균주 혼합액을 이용하여 배지에서 배양을 통한 정량과 DNA를 추출하여 RT-PCR을 실시하여 Ct값으로 얻은 표준곡선의 R²값은 0.9552와 0.9963 사이의 값을 나타냄</p> <p>○ 또한 유전자 분석법의 단점을 극복하기 위하여 불활성화 된 미생물에 대해서는 PMA 처리를 통하여 효율적으로 PCR 증폭이 발생하지 않음을 확인할 수 있었음</p> <p>○ 따라서 RT-PCR은 <i>E. coli</i>, EHEC, <i>Salmonella</i> spp., <i>S. aureus</i>, <i>L. monocytogenes</i>, <i>B. cereus</i>, <i>C. perfringens</i>의 7종 식중독 유발 미생물의 신속검출법 및 정량분석법으로 활용하기에 적합할 것으로 판단됨</p>					

Realtime PCR을 이용한 농산물(엽채류) 중 식중독균 정량분석법 연구

1. 연구배경 및 목표

가. 연구배경

1) 병원성미생물 검출법 개요

- 병원성미생물(식중독균)의 존재를 확인하는 시험방법으로는 ISO(International Organization for Standardization), AOAC(Association of official Analytical Chemists) 등 국제적으로 인정되는 방법들과 국내 식품공전과 같이 국가별로 지정하고 있는 시험법이 다수 활용되고 있음

<ISO 미생물 시험 관련 문서 목록(김현주 등. 2010. J. Food Hyg. Safety)>

ISO 시험법	제정년월일	시험법 Title
ISO 22174	2005.02.15	Microbiology of food and animal feeding stuffs-Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens-General requirements and definitions-First Edition
ISO/TS 20836	2005.08.01	Microbiology of food and animal feeding stuffs-Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens-Performance testing for thermal cyclers-First Edition
ISO 20837	2006.04.01	Microbiology of food and animal feeding stuffs-Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens-Requirements for sample preparation for qualitative detection-First Edition
ISO 20838	2006.04.15	Microbiology of food and animal feeding stuffs-Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens-Requirements for amplification and detection for qualitative methods-First Edition

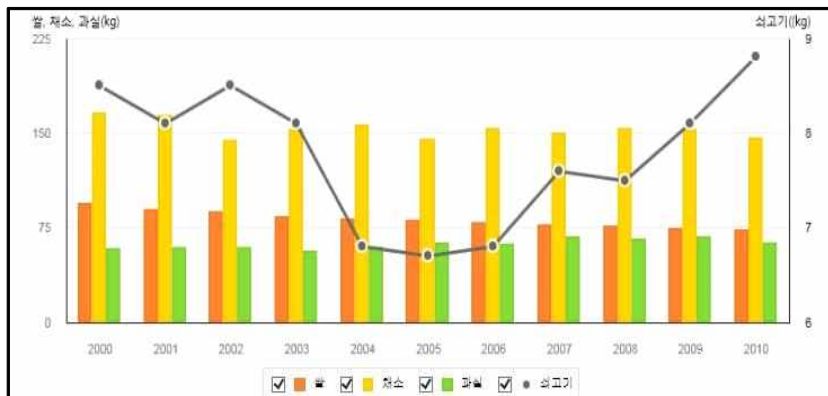
- 현재 국내의 식중독균 검출기술은 식품공전에 기재 및 사용 중인 배양 기반의 기술들에 의존하고 있음
- 병원성미생물의 신속 진단 검출법은 크게 분자생물학적 방법과 면역학적 방법으로 구분하며, 직접형광항체법, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 흔히 사용되고 있으며, 최근에는 DNA hybridization과 PCR (polymerase chain reaction)을 이용한 유전자 검출 방법이 활발히 응용되고 있음

- 식품 중 미생물학적 위해인자에 대한 안전을 확보하기 위한 식중독 원인 미생물의 신속 검출 및 오염원 추적 등의 분야에 PCR을 비롯한 첨단 분자생물학적 또는 면역학적인 기법을 응용 및 적용

2) 농산물 관련 미생물 발생 현황

- 국내외 신선 채소류 등 농산물 수요 및 업체류·과실류에 대한 1인당 소비량이 증가 추세

<국내 주요 농산물 1인당 연간 소비량(2015 농림축산식품부 작물통계)>



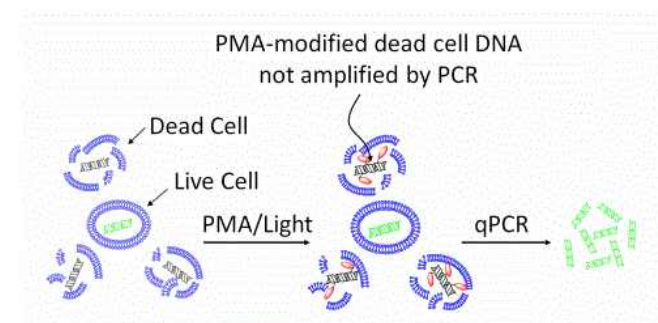
- 농산물의 경우 유해미생물이 육류 등에 비해 상대적으로 적음에도 불구하고, 별도의 가열조리 없이 섭취되므로, 높은 위해도를 가지고 있음
- 살모넬라나 *E. coli* O157 등이 장유래 미생물이므로 과거 채소 및 과일류는 이들 세균으로부터 안전한 것으로 여겨져 왔으나, 최근 채소 및 과일류의 대규모 식중독 사고는 사회 문제 뿐만 아니라 외교 및 무역 마찰 발생의 원인이 됨

3) 미생물 정량분석법 연구 필요성

- 미생물은 존재하는 양에 따라 인체 영향이 다르므로 정량 분석이 중요하며, real-time PCR을 이용한 분석법에 대한 요구 증대
- 집락형성단위(CFU, Colony Forming Unit)를 가지고 표준곡선(검량선)을 그려서 정량 분석에 활용 가능

- 검출하려는 병원성미생물을 배양해서 연속희석(serial dilution)해서 $10^1 \sim 10^8$ CFU/ml 정도 범위에서 PCR을 해서 얻은 Ct(Threshold cycle, 형광을 관측할 수 있는 최소 사이클 수)값과 연관시켜 표준곡선(검량선)을 그림
- 이 표준곡선을 이용해서 농도를 알 수 없는 미지의 샘플에 대해서 검출 농도 예측 가능함
- PCR법은 병원성미생물 검출에 있어서 매우 효과적인 분석법으로 자리 잡아 가고 있지만, 죽은 세포도 검출한다는 한계를 가짐
- PCR법은 검출하려는 해당 미생물의 상태와 상관없이 해당 미생물의 DNA를 증폭하므로 죽거나 불활성화된 미생물의 경우는 역학적으로나 위생학적으로 그리 중요하지 않지만 정성이나 정량분석 결과에 포함됨
- 죽은 세포와 살아있는 세포를 구분하기 위한 PMA(Propidium monoazide) 같은 DNA 삽입염료(DNA intercalating dye) 사용 방법 모색
- PMA는 선택적으로 세포막이 허물어진 죽은 세포에만 침투하며 온전한 세포막을 가진 살아있는 세포는 침투 불가능 함
- PMA는 아자이드 그룹(azide group)을 가지고 있어서 강한 가시광선을 받은 후 DNA에 교차결합(cross linking)을 일으킴
- PMA가 처리된 죽은 세포의 DNA는 화학적으로 구조가 바뀌어서 PCR에 의해 증폭되지 않으므로 이를 통해 죽은 세포와 살아있는 세포를 구분 가능함

<PMA 작용 기작 모식도>



- 현재 유전자 분석법은 정성분석을 위한 스크리닝 방법으로 이용되며, 검출 시 배양을 통한 방법에 의해 확정실험 실시
- 병원성미생물 검출법은 경제적이고 정확성을 필요로 하며, 또한 정성적 결과보다는 정량적인 결과 산출이 가능해야 하므로 real-time PCR 및 PMA를 이용한 신속한 정량분석법 개발이 요구됨

나. 연구목표

- Real-time PCR을 이용한 농산물 중 병원성미생물 정량분석법 확립
- PMA를 이용한 불활성 미생물을 검출하지 않는 최적 조건을 검증하여 실제 농산물 분석에 적용

2. 연구내용 및 방법

가. 연구내용

1) 미생물 배양

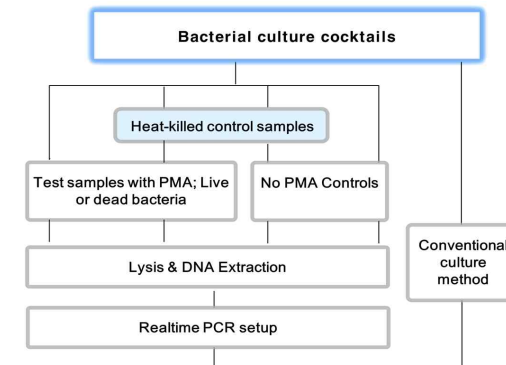
- 본 연구에 이용한 7종의 표준균주의 세부사항은 아래와 같으며, 각각의 균은 5 mL trypton soy broth(TSB) media 37℃ 에서 24시간 배양하였고, 혐기성 균인 클로스트리디움 퍼프린젠스균은 동일한 조건의 혐기상태에서 배양 하였음.

Pathogen	Strain	Target gene	Fluorophore
<i>E. coli</i>	ATCC 11775	msbA	FAM
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43894	VT1 VT2	VIC FAM
<i>Salmonella</i> spp.	ATCC 14028	invA	VIC
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	femA	FAM
<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 11994	prfA	VIC
<i>B. cereus</i>	ATCC 10876	groEL	FAM
<i>C. perfringens</i>	NCTC 8798	cpa cpe	FAM VIC

- 본 실험에서는 4000xg에서 20분 간 원심 분리하여 균체(cell pellet)를 얻은 후, 각각의 미생물의 초기 농도를 맞추고 7종의 균을 하나의 혼합액으로 만들어 10배 단계 희석액을 제조하여 실험에 사용하였다.

2) PMA 처리

- 혼합 균액 각각의 농도별 1mL씩 2개 분주하였고, 1개를 99℃ 에서 10분 간 처리하여 불활성화
- 균액은 400 μ L로 나누어 분주하여 생균과 불활성균 400 μ L에 20mM의 PMA 1 μ L를 처리하여 최종농도는 50 μ M으로 맞추어 10분간 암반응
- 반응이 완료된 후 15분간 LED광원에서 반응시켰고 이 후 원심분리 (2500xg에서 10분)하여 상등액 제거
- DNA추출을 위해 100 μ L의 증류수를 첨가하고 교반하여 99℃ 에서 10분 간 처리하였고, 원심분리한 후 상등액을 DNA template로 사용함



<실험 과정 모식도>

3) Realtime PCR








- Primer와 dNTPs, 효소 등 혼합액 15 μ l와 추출한 DNA 5 μ l를 혼합하여, 7500 Fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 분석하였음
- 먼저 50℃ 에서 1분 간 유지하고 95℃ 에서 10분 유지하고 이후 95℃ 에서

15초, 60°C 에서 1분의 cycle을 40회 반복하였다.

- 표준곡선은 각각의 식중독균 정량분석에 이용되었다. 균주 혼합액의 농도(10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU/mL)에 따른 RT-PCR의 Ct 값을 이용하여 표준곡선을 작성하였다.

4) 미생물 균수 산출

- 선택배지를 이용하여 colony를 확인하여 각 균의 초기 농도를 확인하였으며, 각 미생물의 균 계수를 위한 선택배지로 Trypton Broth Xylose (TBX, OXOID)는 *E. coli*를 위한 배지로, Sorbitol MacConkey agar (SMAC, OXOID)는 *E. coli* O157:H7, Xylose lysine desoxycholate agar (XLD, OXOID)는 *Salmonella* spp., BAIRD-PARKER AGAR BASE (BP-RPF, OXOID)는 *S. aureus*, Oxfrd (OX, OXOID)는 *L. monocytogenes*, BACARA (biomerieux)는 *B. cereus*, Trypton Soy (TSC, 3M)는 *C. perfringens*를 위한 배지로 이용되었음
- 균 혼합액 100 μ l를 각각의 선택배지에 분주하여 35°C 에 배양하였고, 생성된 colony 중 선택배지의 전형적인 colony 수를 측정하였다.

<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocyto</i> genes	<i>B. cereus</i>	<i>C. perfrin</i> gens
						
TBX agar	SMAC agar	XLD agar	BP-RPF agar	Oxford agar	MYP agar	TSC agar

5) 농산물 적용 시험

- 7종의 균주 혼합 배양액을 제조하여 농산물 10 g을 칭량하고 1 mL의 균주 혼합 배양액을 점종(spot inoculation)한 후, 10배 희석하기 위하여 90 mL의 saline과 혼합하였다. Stomacher로 2분 간 혼합하고 4000 xg, 20분 간 원심 분리한 농축액을 실험에 사용되었다

3. 결과 및 고찰

가. 연구결과

1) Realtime PCR을 이용한 미생물 표준곡선

- 추출한 DNA를 단계적으로 희석하여 분석한 결과 7종의 미생물 모두 증폭이 일어났으며, 식중독 균 농도에 따른 PCR amplification plot을 얻을 수 있었음(Figure 1).
- Fluorescence 값이 base line값을 지나는 시점을 의미하는 Ct 값은 절대 값이 낮을수록 DNA 내 존재하는 미생물 균수가 많다는 의미를 나타내며 이를 바탕으로 Ct값의 표준곡선을 얻었고(Figure 2), *E. coli*을 이용한 표준 곡선의 기울기는 -3.0454이고 y절편은 42.129, R^2 값은 0.9707로 나타났음. EHEC을 이용한 표준 곡선의 기울기는 -2.5468이고 y절편은 39.618, R^2 값은 0.9552으로 나타났으며, *Salmonella* spp.을 이용한 표준 곡선의 기울기는 -3.1151이고 y절편은 41.24, R^2 값은 0.9616으로 나타남. *S. aureus*를 이용한 표준 곡선의 기울기는 -2.8344이고 y절편은 44.279, R^2 값은 0.9679로 나타남. *L. monocytogenes*을 이용한 표준 곡선의 기울기는 -2.719이고 y절편은 39.517, R^2 값은 0.9542로 나타남. *B. cereus*를 이용한 표준 곡선의 기울기는 -3.4842이고 y절편은 35.388, R^2 값은 0.9963로 나타남. *C. perfringens*를 이용한 표준 곡선의 기울기는 -3.0363이고 y절편은 35.806, R^2 값은 0.9698로 나타남.
- 실제 미생물 배양을 통해 얻는 균 농도에 따른 RT-PCR의 Ct 값은 Table 1과 같음

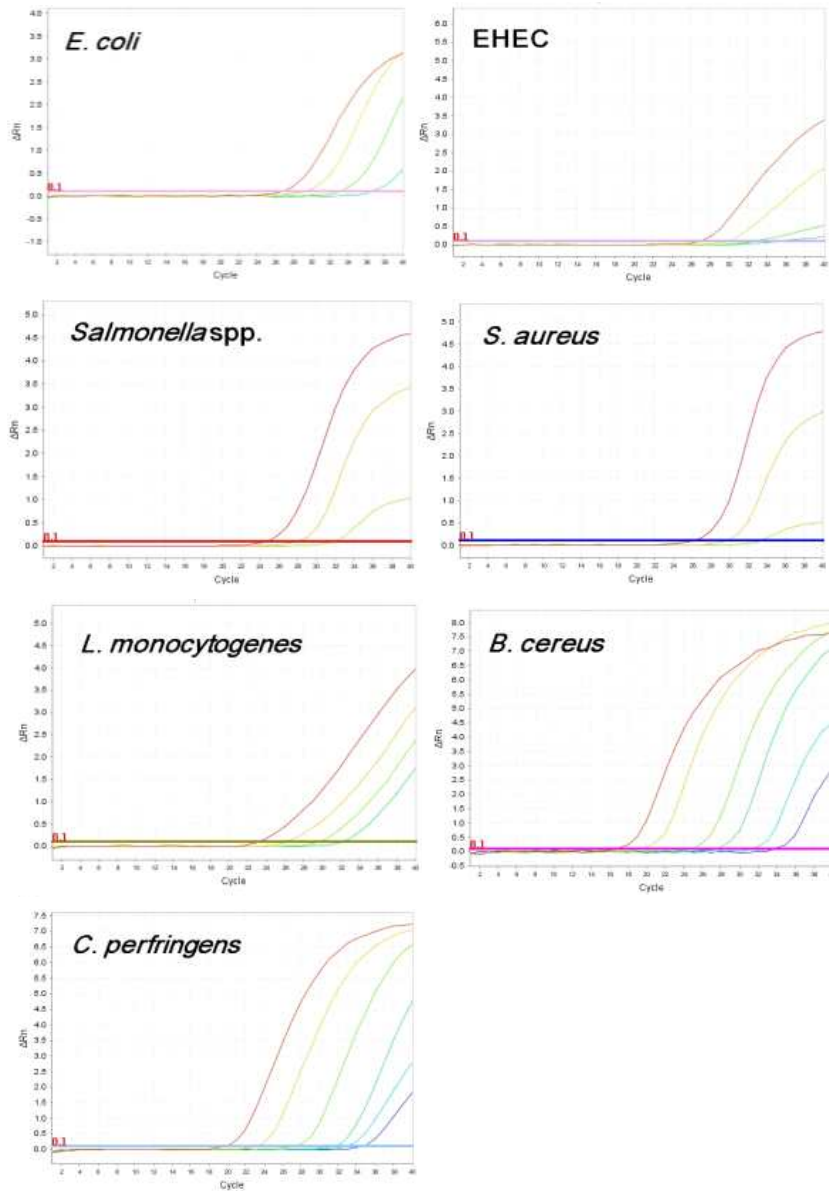


Figure 1. RT-PCR amplification plot

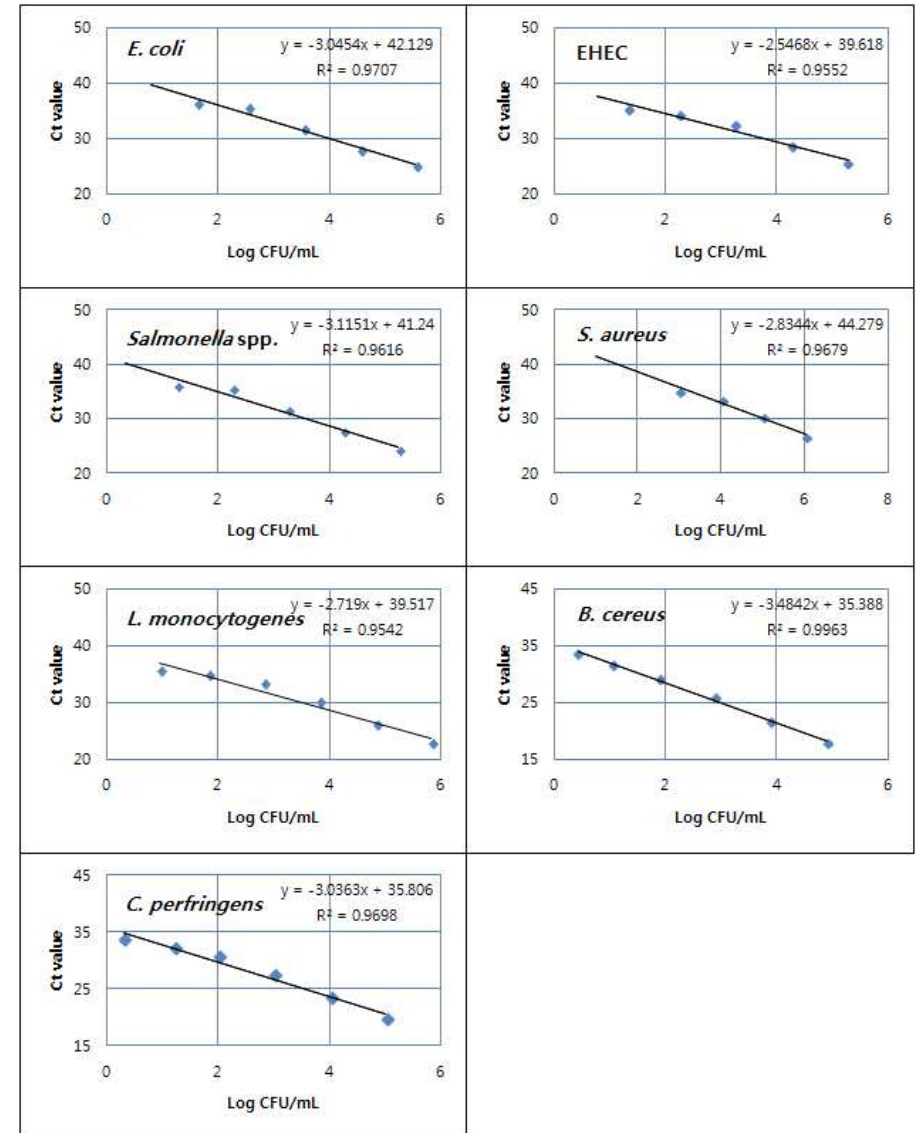


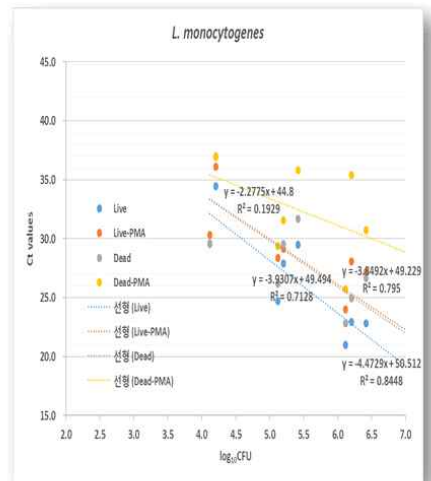
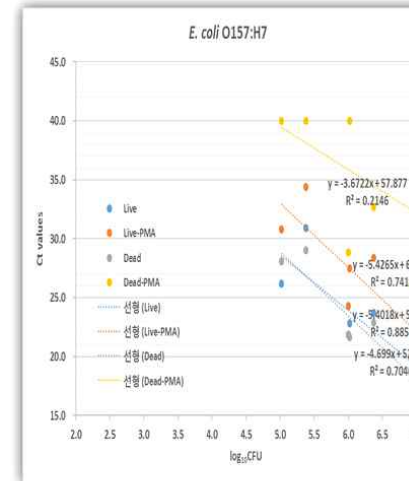
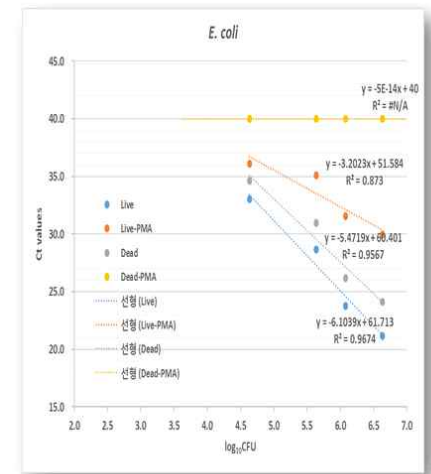
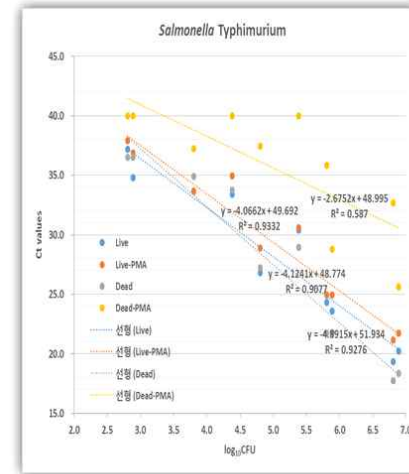
Figure 2. 7종 병원성 미생물의 표준 곡선

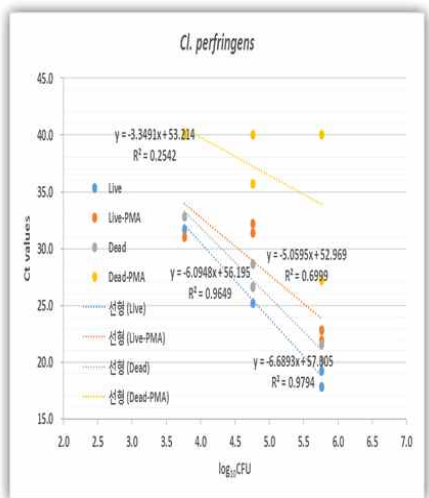
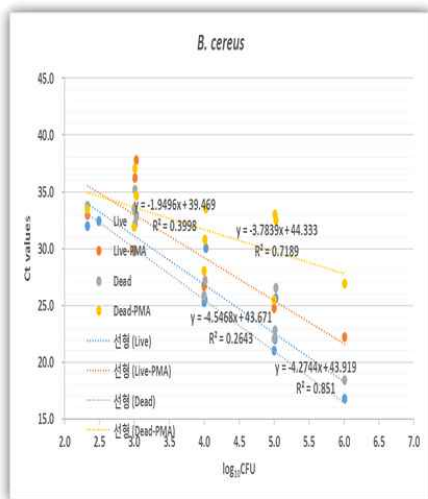
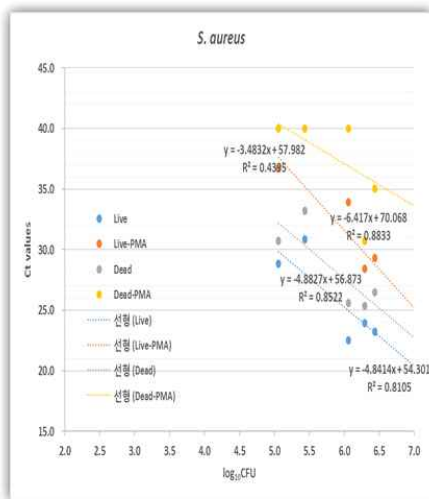
Table 1. 7종의 병원성 미생물 농도에 따른 realtime pcr ct 값

Pathogen	<i>E. coli</i>	EHEC	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. perfringens</i>
CFU/mL							
10^0	ND	ND	ND	ND	35.49 ± 0.00	33.51 ± 0.64	33.70 ± 0.77
10^1	36.24 ± 1.51	35.19 ± 0.00	36.08 ± 2.10	ND	34.87 ± 3.44	31.58 ± 0.80	32.26 ± 0.63
10^2	35.60 ± 0.99	34.32 ± 0.05	35.55 ± 1.83	ND	33.29 ± 1.87	29.16 ± 1.59	30.92 ± 0.96
10^3	31.70 ± 1.24	32.47 ± 0.84	31.74 ± 0.67	35.11 ± 0.11	30.05 ± 1.70	25.80 ± 1.57	27.63 ± 0.72
10^4	27.86 ± 0.95	28.55 ± 0.89	27.89 ± 0.52	33.66 ± 1.69	26.19 ± 1.54	21.72 ± 1.51	23.48 ± 0.91
10^5	25.15 ± 1.06	25.61 ± 0.94	24.40 ± 0.53	30.42 ± 0.99	22.78 ± 1.22	18.01 ± 0.78	19.79 ± 0.66
10^6	ND	ND	ND	26.74 ± 0.97	ND	ND	ND

2) PMA 처리 전후 비교

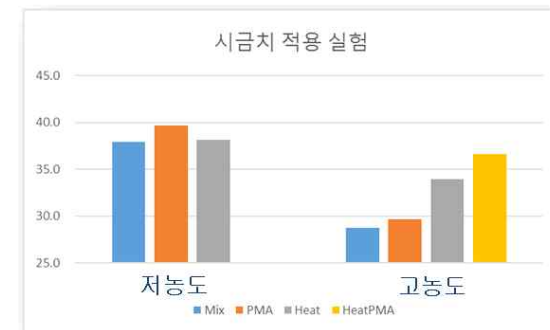
- 균을 농도별로 희석하여 분석하였을 때, 살모넬라 균의 경우, 살아있는 세포에서는 PMA를 처리한 것과 처리하지 않은 실험에서 ct 값의 차이를 나타내지 않았으나 죽은 세포에서는 PMA 처리에 의하여 그 값이 현저하게 차이를 나타냄을 확인할 수 있었음
- 이같은 결과는 이외 6종의 미생물에서도 동일한 경향을 나타내어 이와 같은 실험으로 산출한 표준곡선을 이용하여 미지의 시료에 존재하는 살아있는 미생물 균수를 역추적 하는 것이 가능할 것으로 판단됨
- 특히 EHEC의 경우에는 PMA를 처리한 세포의 경우에는 그 농도에 상관없이 죽은 세포의 경우 모두 PCR 증폭이 일어나지 않은 것을 확인할 수 있어 매우 좋은 효율을 나타내었음





3) 농산물 적용 시험

- 초기 미생물 농도에 따른 검출 민감도 확인을 위하여 낮은 농도의 미생물을 검출할 수 있는 concentrating pipette을 활용한 전처리 방법을 적용하여 균을 저농도, 고농도로 구분하여 분석하였으며,
- 죽은 세포에서는 PMA 처리에 의하여 그 값이 증가함을 확인할 수 있어 향후 활용방안 모색이 요구됨



4. 기대성과 및 활용방안

- 신선농산물에 대한 병원성미생물 신속 정성·정량분석법을 정립하여 농산물 식중독 사고 사전 대응
 - 농산물 중 병원성미생물 분석능력 확보로 식품 안전사고 예방
- 생식 채소류 등을 대상으로 병원성미생물(식중독균) 오염여부에 대한 실태 조사(모니터링) 실시로 생산단계 농산물의 안전성 확보
 - 병원성미생물(식중독균)이 검출된 경우 해당 농산물 생산농장에 위생관리 지도 자료로 활용
 - 식품공전의 신선편의식품 기준을 초과하여 검출된 농산물을 생산 및 보관하고 있는 경우에는 생식용으로 출하·유통 방지를 위한 자료로 활용