더 정밀 · 정확한 분자생물학적인 검사법 – LAMP 등온증폭 Molecular Detection System

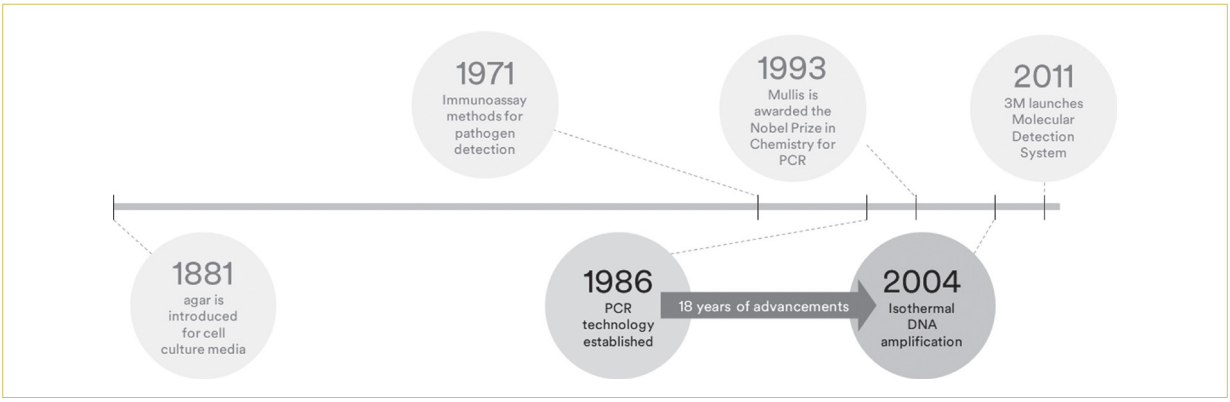
진보된 검사법

1881년 평판배지법이 소개된 이후 Immunoassay method를 거쳐 PCR까지 식중독균을 검출하는 기술은 진보해 왔다. 2004년 개발된 등온증폭법은 PCR 이후의 차세대 검사법이며, 그 중 Loop mediated isothermal DNA amplification(LAMP DNA 등온증폭법)[1]은 핵산 증폭에 있어 매우 민감하고 특이도 높은 효율적인 방법으로 인정받고 있다[2,3]. 진보된 검사법을 판단하는 기준은 크게 더 나은 정확도, 더 빠른 검사시간, 더 간편한 사용 편의성 등으로 볼 수 있다. 이는 시료의 전배양부터 양 · 음성의 결과 확인까지 전 과정에 해당되는 기준이라, 단지 분석 장비의 신기술 특허만으로는 진보된 방법이라 할 수 없다.

더 정밀 · 정확하다고 인정된 방법

식품공전 제1. 총칙 1. 일반원칙의 3항에 '이 고시에서 규정한 시험방법보다 더 정밀 · 정확하다고 인정된 방법을 사용할 수 있고 미생물 및 독소 등에 대한 시험에는 상품화된 키트(kit) 또는 장비를 사용할 수 있으나 그 결과에 대하여 의문이 있다고 인정될 때에는 규정한 방법에 의하여 시험하고 판정하여야 한다.'는 조항이 있다. 문장 그대로 해석하면 모든 상품화된 시험법을 사용할 수 있고, 그 결과에 의문이 없으면 규정한 방법에 의한 추가 시험이 없기 때문에 부정확한 시험법까지도 통용될 수 있다는 우려가 있다.

따라서, 중요하게 판단하여야 할 부분은 '더 정밀 · 정확하다고 인정된 방법'인데, 이는 validation과 verification으로 해석 가능하다. Validation은 표준법



과 비교하여 동등 이상의 결과를 보임을 검증하는 것이고 AOAC 혹은 ISO(NF Validation, Microval) 등의 국제공인이 이에 해당되며, verification은 이 검증된 시험법이 실제 시료에서 유효하게 작용하는지를 확인하는 것이다. 3M™ Molecular Detection System(이하 MDS)은 출시된 모든 키트에 대해 validation을 완료했고, 전 세계 각국의 정부기관을 비롯해 검사기관 및 식품업체에서 모든 식품군에 대해 우수한 verification 결과를 보이며 적용되고 있다.

전배양의 중요성

정성으로 관리하는 식중독균은 n=5, c=0, m=0/25g의 기준으로 관리한다. 시료 25g 에서 하나의 균이 검출되어도 부적합이기 때문에 적절한 전배양 과정이 필수이다. 만약 1cfu/25g(mL)으로 식중독균이 오염되었을 때, 이 시료를 전배양 없이 희석만 하면, 평판배지법으로 실험하더라도 양성으로 검출할 수 있는 가능성은 희박하기 때문이다. 평판배지의 검출 한계는 1cfu/g(mL)이라고 볼 수 있기 때문에, 완충액 225mL에 희석한 1cfu/250mL은 검출하기 어렵다. 이론상으로는 250cfu/250mL이상이면 검출 가능하다고 할 수 있겠지만, 1cfu/mL은 피펫팅 오차 발생 시 충분히 위음성으로 나올 수 있는 농도이다. 결론적으로, 더 높은 농도로의 배양이 필요하며, 시료에서의 저해를 고려하면 전배양은 Stationary phase에 도달할 때까지 진행해야 안정적이라고 할 수 있다.

이 측면에서는 분자생물학적인 방법도 마찬가지이다. 키트 혹은 장비의 검출한계가 다를 수 있으나 충분한 전배양만 이루어진다면 검출한계의 차이만으로는 그 검출법의 좋고 나쁨을 평가할 수 없다. 검출한계가 낮은 키트가 더 좋다고 말할 수 있으나 전배양까지 고려하지 않은 키트라면 그 검출한계는 무의미하다.

3M™ MDS는 LAMP를 기반으로 하기 때문에 6개의 프라이머가 사용되어 표적 DNA의 8개의 다른 부분을 인식한다. 따라서, 매우 특이적인 증폭이 가능하고, 이러한 성질 때문에 PCR 보다 훨씬 많은 양의 DNA를 증폭한다. 그리고, LAMP에 사용된 *Bst* DNA polymerase는 *Taq* polymerase와 비교하여 보다 강력하며, 증폭시 간섭 물질에 의한 저해작용을 덜 받는다[4-8]. LAMP의 검출한계가 PCR보다 더 좋은 이유이다.

그럼에도 3M™ MDS는 여느 다른 시험법보다 우월한 전배양법을 포함하고 있다. 각 균종별로 전 세계적으로 규정되어 있는 매트릭스마다 적합한 전배양 조건을 설정하여 AOAC 및 NF Validation등의 국제 공인으로 검증되었다.

3M의 전배양 배지들도 차별화 되어 있는데, *Salmonella* spp., STEC, EHEC, *Cronobacter* spp. 등의 전배양에 사용되는 BPW ISO는 peptone성분으로 casein을 사용하고, pH가 7.0으로 맞춰져 있어 일반 BPW에 비해 완충작용이 더 좋다. TSB는 전배양에 좋은 배지이지만 영양분이 매우 풍부하여 표적 균이 아닌 다른 균들도 빠르게 증식시킬 수 있기 때문에, background flora가 우점종하여 자연적으로 오염된 식중독균의 배양에 영향을 줄 수 있다. 이는 평판배지법의 선택배양에서도 정확한 의심 집락 분리를 어렵게 할 수도 있다.

Listeria spp. 및 *Listeria monocytogenes*의 전배양에는 Demi Fraser배지를 사용한다. 일반 식품 배양 시 사용하는 LEB배지는 *Listeria monocytogenes*를 선택적으로 배양하기 위한 inhibitor 성분이 많아 오히려 *Listeria monocytogenes*의 배양을 저해할 수도 있다. Demi Fraser배지는 그 inhibitor 성분이 절반가량 낮게 함유되어 있어, 적절한 선택성을 제공하면서 배양을 돕는다. 이에 따른 가장 큰 차이점은 배양시간이며 Demi Fraser로 배양시 37℃에서 24-32시간 배양하기 때문에 배양시간을 Listeria Enrichment Broth보다 절반까지 줄일 수 있다.

Campylobacter Enrichment Broth는 산소제거성분이 함유되어 있어 미호기성 세균인 *Campylobacter* 배양을 호기 상태에서 가능하게 해주는 특징이 있다. 22-28시간 배양하기 때문에 식품공전법의 1차 배양보다 빠르고, CO_2 pack 혹은 CO_2 incubator를 사용하지 않아 더 편하고 경제적이다.

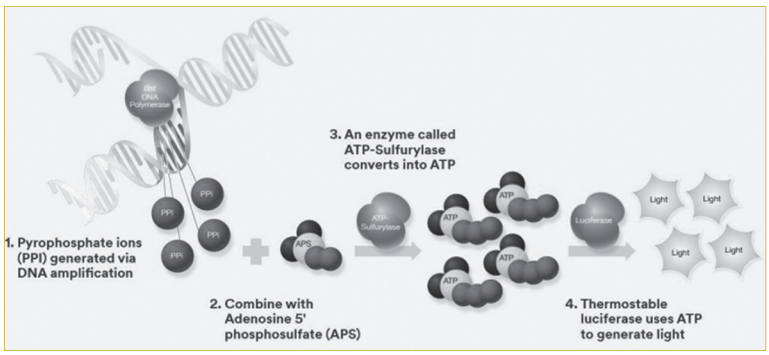
이와 같이 validation을 거친 차별화된 3M™ MDS의 안정적인 전배양은 위음성의 가능성을 없애고, 더 민감하고 특이적인 결과를 도출할 수 있도록 한다. '등온증폭은 검출한계가 높다'는 확인되지 않은 루머에도 불구하고 3M™ MDS가 정확할 수밖에 없는 근거이며, LAMP의 정밀 · 정확한 원리 때문에 USDA FSIS는 기존의 mTSB와 UVM 전배양을 유지하면서 3M™ MDS를 표준법(MLG, Microbiology Laboratory Guidebook)으로 등재할 수 있었다.

분자생물학적인 방법의 최적 조합

3M™ MDS는 LAMP와 Bioluminescence(ATP) 검출의 두 가지 원리로 조합되어 있다. LAMP기반으로 60℃에서 지속적으로 증폭하기 때문에 *Bst* polymerase를 사용하고, 이는 94℃의 고온에서 DNA를 denaturation하기 위해 PCR에서 사용하는 *Taq* polymerase의 한계를 없앤다.

Taq polymerase는 3'→5' exonuclease 활성이 없어서 DNA활성 에러율이 높고, inhibitor가 존재하면 제한된 cycle내의 시간동안 DNA extension을 저해하여 불완전한 증폭산물을 생성할 수 있어 위음성의 가능성이 있다[9]. PCR의 cycling중 DNA extension은 thermocycler의 cycle횟수에 따라 제한을 받기 때문이다. 따라서, PCR은 식품 및 환경 시료에서 발견되는 다양한 화합물에 의해 저해된다고 알려져 있다[9,10,11].

PCR에서의 온도 cycling과 denaturation시 polymerase의 결합 및 분리는 LAMP의 단일 온도 조건에서 DNA template이 polymerase와의 분리 없이 연속적인 DNA증폭을 하는 것보다 inhibitor에 의한 더 많은 저해 작용의 기회를 제공한다. 특히, LAMP의 결과는 PCR inhibitor 또는 식품 제조 시설에서 사용하는 살균소독제에 의한 영향이 없다. 예를 들어, PCR



의 경우 저온 살균된 달걀 매트릭스[12] 및 향신료[13,14]의 성분이 증폭과정 중 inhibitor로 작용했지만, LAMP와 Bioluminescence(ATP) 기술을 기반으로 한 3M™ MDS는 증폭과정 중 저해작용이 관찰되지 않았다. Peer-reviewed study 결과에 따르면 3M™ MDS는 다양한 식품 시료에서 우수한 검출 성능을 보이는 것으로 나타났다[15-31].

Bioluminescence(ATP) 검출은 높은 신뢰성을 바탕으로 시료에 따른 간섭의 영향을 받지 않는다[32]. DNA에 존재하는 pyrophosphate는 ATP sulfurylase에 의해 ATP로 변환되고, ATP는 luciferase에 의해 발광하여 검출 가능하다. LAMP의 원리에 의해 DNA는 PCR보다 훨씬 많이 증폭되고, 이에 따라 생성되는 ATP의 양은 PCR보다 정확한 결과를 도출할 만큼 충분하다. 반면, 대부분의 PCR 및 Immunoassay based system에서 사용하는 fluorescence 검출은 일부 식품 및 전배양 배지에서의 자연적인 형광에 의한 간섭을 받아 위양성의 결과를 초래할 수 있다[33].

정확한 Lysis와 혁신적인 Prep

3M™ Molecular Detection Assay 2는 enzymatic lysis buffer 대신 chemical lysis buffer를 사용하여 불완전한 lysis에 대한 가능성을 줄였다. 가장 완전하게 lysis를 할 수 있는 solution이라 할 수 있으며, 단지 100℃에서 10-15분간 끓이는 것만으로 lysis를 완료하는 Crude lysis는 불완전한 반응으로 인해 위음성을 초래할 수 있다.

분자생물학적인 방법의 정확한 결과 도출에 있어, 전배양과 Lysis만큼 중요한 필수 절차는 Prep이다. 충분한 양으로 증균시켜 효과적으로 DNA를 추출했다 하더라도, 금속 양이온 및 저해 단백질 등의 polymerase의 작용에 간섭을 일으킬 수 있는 성분을 제거하지 않으면 결국 증폭이 제대로 되지 않아 위음성의 결과를 얻을 가능성이 있다.

Lysis Solution Tubes
- Advanced chemistry based on 3M nanotechnology
- Color-change process control for increased confidence in process reaction
- No reagent preparation required

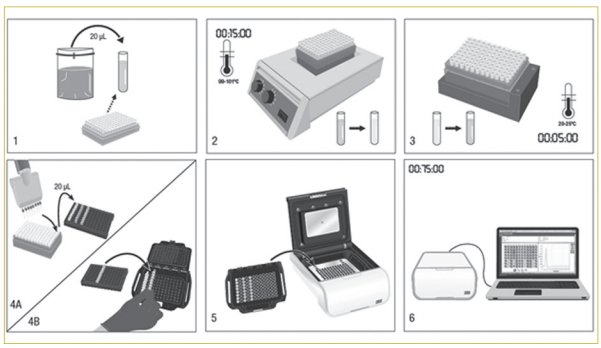
Prep은 장비를 사용하지 않으면 꽤 복잡하고 번거로운 절차이며, 키트를 사용해도 작업자의 손이 많이 간다. 키트도 없이 매뉴얼로 vortexing과 원심분리를 반복하여 상층액을 제거하는 방법은 간섭 물질을 제거할 수 없을 뿐 아니라, 표적 균주의 손실을 초래할 수 있어 가장 불안한 방법이다.

3M™ MDS의 lysis solution은 나노입자와 킬레이트 시약을 함유하고 있다. 나노입자는 표면에 전하를 띠고 있어, polymerase에 간섭을 일으킬 수 있는 저해 단백질과 결합하여 침전한다. 마찬가지로 간섭 물질 중 하나인 금속 양이온은 킬레이트 시약에 의해 결합 및 침전된다. Vortexing과 원심분리 등의 매뉴얼 작업 없이 복잡한 절차를 자동으로 완료해 주기 때문에 더 정확하고 효율적이다.

추가로, 반응 중 Lysis solution의 분홍-노랑-분홍으로의 색 변화는 온도의 변화를 나타낼 뿐 아니라, 낮은 pH에 대한 지시약으로 작용하여 산성으로 인한 불완전한 전배양 가능성을 확인할 수 있다.

간소화된 전처리

3M™ MDS는 20㎕ 피펫팅 2번으로 전처리를 완료한다. DNA 증폭 효율이 좋고, 간섭 물질에 대한 내성이 강한 등온증폭의 특성은 전처리를 간소화할 수 있다는 이점으로 작용한다. 그럼에도 불구하고 3M™ MDS의 전처리는 다른 분자생물학적인 방법보다 더 견고하다. 3M 고유의 테크놀로지를 활용하여 매뉴얼 작업을 최소화하면서도 충분히 정확한 결과를 낼 수 있는 등온증폭의 이점을 최대화시켰다.



결론

식품 안전 계획의 초기 단계부터 검사 시료의 확인시험까지, 위험 관리의 조치가 브랜드를 보호하기 위해 취해지는지의 여부에는 많은 요소가 영향을 미친다. 정확한 식중독균 검사는 과학적으로 검증되고 정교하게 수행된 선행요건 프로그램, 예방 관리, 시료채취 계획,

A Systems Approach to Accurate Microbiological Hazard Risk Management

Prerequisite Programs	Preventative Controls	Sampling Plans	Sample Collection	Sample Prep/Enrichment	Sample Testing	Test Confirmation	Risk Management
•Appropriate •Validated •Executed	•Appropriate •Validated •Executed	•Appropriate •Validated •Executed	•Appropriate •Validated •Executed	•Validated •Executed	•Validated •Executed	•Appropriate •Executed	•Aligns with risk tolerance

시료 전처리, 시료에 대한 실험 및 확인시험과 위험 관리의 절차에 따라 달라진다. 3M 식품안전 사업팀이 지원하는 교육 및 상담은 이러한 중요 외부 요소 중 일부를 제어할 수 있도록 도와주며, 동시에 3M™ MDS는 신뢰할 수 있고 검증된 방법으로 정확한 식중독균 검사 결과를 적시에 평가할 수 있도록 한다.

참고 문헌

1. Notomi T, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28:E63.
2. Fu S, et al. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011, 163:845-50.
3. Parida M, et al. Loop mediated isothermal amplification(LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* 2008, 18:407-21.
4. Francois P, et al. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011, 62:41-48.
5. Kaneko H, et al. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2007, 70:499-501.
6. Kiddle G, et al. GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use. *BMC Biotechnology.* 2012, 12:15.
7. Plutzer J, and Karanis P. Rapid identification of Giardia duodenalis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods. *Parasitol. Res.* 2009, 104:1527-1533.
8. Nkouawa A, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of Taenia species from humans. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48:3350-3352.
9. Opel K, et al. A study of PCR inhibition mechanisms using Real Time PCR. *J. Forensic Sci.* 2010, 55:25-33.
10. Rossen L, Nørskov P, Holmstrøm K, Rasmussen OF. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol.* 17:37-45.
11. Hoorfar J, et. al. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2004, 42:1863-1868.
12. Hu L, et al. Evaluation of 3M Molecular Detection System and ANSR Pathogen Detection System for rapid detection of *Salmonella* from egg products. *Poultry Sci.* 2017, 96:1410-1418.
13. Lins P. Detection of *Salmonella* spp. in spices and herbs, Food Control, 2017, 83: 61-68.
14. Sarowska J, et al. Detection of *Salmonella* in Foods Using a Reference PN-ISO Method and an Alternative Method Based on Loop- mediated Isothermal Amplification Coupled with Bioluminescence. Adv Clin Exp Med. 2016, 25:945-950.

15. Yang Q, et al. Rapid detection of *Salmonella* in food and feed by coupling loop-mediated isothermal amplification with bioluminescent assay in real-time. *BMC Microbiol.* 2016, 16:112.

16. Miks-Krajnik M, et al Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) coupled with bioluminescence for the detection of *Listeria monocytogenes* at low levels on food contact surfaces. *Food Control,* 2016, 60:237-240.

17. Abirami N, et al. Evaluation of commercial loop-mediated isothermal amplification based kit and ready-to-use plating system for detection of *Salmonella* in naturally contaminated poultry and their processing environment. *Food Control,* 2016, 70:74-78.

18. Vongkamjan K, et al Various Ready-to-Eat Products from Retail Stores Linked to Occurrence of Diverse *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. Isolates. *J Food Prot.* 2016, 79:239-45.

19. Lim HS, et al. Evaluation of commercial kit based on loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of low levels of uninjured and injured *Salmonella* on duck meat, bean sprouts, and fishballs in Singapore. *J Food Prot.* 2015, 78:1203-1207.

20. Ryan G, et al. Evaluation of Rapid Molecular Detection Assays for *Salmonella* in Challenging Food Matrices at Low Inoculation Levels and Using Difficult- to-Detect Strains. *J Food Prot.* 2015, 78:1632-41.

21. Loff M, et al 3M™ Molecular detection system versus MALDI-TOF mass spectrometry and molecular techniques for the identification of Escherichia coli 0157:H7, *Salmonella* spp. & *Listeria* spp. *J Microbiol Methods.* 2014, 101:33-43.

22. Fortes ED, et al. Validation of the 3M molecular detection system for the detection of *listeria* in meat, seafood, dairy, and retail environments. *J Food Prot.* 2013, 76:874-878.

23. Bonardi S, et al. Comparison of an isothermal amplification and bioluminescence detection of DNA method and ISO 6579:2002 for the detection of *Salmonella enterica* serovars in retail meat samples. *J Food Prot.* 2013, 76:657-61.

24. Bird P, et al. Evaluation of 3M Molecular Detection Assay (MDA) 2- *E. coli* O157 (including H7) for the Detection of *E. coli* O157 in Select Foods: Collaborative Study, First Action 2017.01. *J AOAC Int.* 2017, In Press.

25. Bird P, et al. Evaluation of 3M Molecular Detection Assay (MDA) 2- *Listeria* for the Detection of *Listeria* Species in Select Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2016.07. *J AOAC Int.* 2017, 100:82-98.

26. Bird P, et al. Evaluation of the 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2 - *Listeria monocytogenes* for the Detection of *Listeria monocytogenes* in a Variety of Foods and Select Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2016.08. *J AOAC Int.* 2017, 100:454-469.

27. Bird P, et al. Evaluation of the 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2 - *Salmonella* for the Detection of *Salmonella* spp. in Select Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2016.01. *J AOAC Int.* 2016, 99:980-997.

28. Bird P, et al. Evaluation of 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) *Listeria* for the Detection of *Listeria* species in Selected Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2014.06. *J AOAC Int.* 2015, 98:993-1002.

29. Bird P, et al. Evaluation of 3M™ Molecular Detection

Assay (MDA) *Listeria monocytogenes* for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Selected Foods and Environmental Surfaces: Collaborative Study, First Action 2014.07. *J AOAC Int.* 2015, 98:980–992.

30. Bird P, et al. Evaluation of Modification of the 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) *Salmonella* Method (2013.09) for the Detection of *Salmonella* in Selected Foods: Collaborative Study. *J AOAC Int.* 2014, 97:1329–1342.

31. Bird P, et al. Evaluation of 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) *Salmonella* for the detection of *Salmonella* in selected foods: collaborative study. *J AOAC Int.* 2013, 96:1325–1335.

32. Gandelman OA. Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real–time. *PloS ONE.* 2010, 5: e14155.

33. Rossmanith P, et al. The fluorescence characteristics of enrichment media in the wavelength range of Real–Time PCR thermocycler optical path assignments. *Food Anal. Methods.* 2010, 3:219–224.

자료제공: 한국3M