Thermo Fisher Scientific의 식품 미생물 검출 솔루션

식품 안전을 보장하기 위해서는 식품제조공정과정의 모든 측면을 고려해야 합니다. 식품 가공 산업에서 *Salmonella enterica, Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157 : H7*과 같은 병원체 박테리아는 음식 표면을 오염시키고, 오염된 제품은 식중독과 같은 식인성 질환을 유발할 수 있습니다. 기존의 식품 미생물 시험은 배양법에 의존하는 통상적인 미생물학적 방법으로 수행되었으며 완료하는 데 며칠이 소요됩니다. 그러나 중합 효소 연쇄 반응 (polymerase chain reaction, PCR)은 미생물학 분석을 혁명적으로 바꾸어 기존의 분리 및 동정 과정 없이 식품 내 병원성 미생물의 검출을 가능하게 했습니다. PCR은 표적 분자의 초기 양에 관한 정량적 정보를 제공 할 수 없는 반면 Real-Time PCR은 기존 PCR에서 일어나는 반응의 마지막뿐만 아니라 형광을 이용하여 실시간으로 증폭 과정을 모니터링 할 수 있으며, 빠르고 쉬운 분석, 매우 넓은 동적 범위의 정량 (8 배 이상), 그리고 기존 PCR에 비해 훨씬 높은 신뢰도와 민감도를 제공합니다. 1996년에 출판 된 첫 번째 과학 연구 (Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996) 이후, Real-Time PCR의 활용은 기하 급수적으로 증가했으며 *Salmonella spp., L. monocytogenes, E. coli O157 : H7* 등 주요 식인성 병원균을 중심으로 다양한 미생물에 대해 qPCR에 의한 식품 내 병원체의 특이적 검출 및 모니터링에도 적용하고 있습니다. 따라서 현재 PCR 및 Real-Time PCR (또는 quantitative Real-Time PCR; qPCR)은 식품 매개 병원균의 연구자에게 필수적인 분석 도구입니다.

본 기고에서는 Real-Time PCR의 이해와 이를 이용한 Thermo Fisher Scientific의 food pathogen detection solution을 소개하고자 합니다.

Real-Time PCR의 원리 및 소개

중합 효소 연쇄 반응 (PCR)은 분자 생물학에서 가장 강력한 기술 중 하나로 DNA 템플릿 내의 특정 서열을 서열 특이적 올리고 뉴클레오타이드, 열 안정성 DNA 중합 효소 및 thermal cycle을 이용하여 수천 백만 배 내지 수백 만 배로 복사 또는 "증폭"시킬 수 있습니다. 또한 증폭단계에서 실시간으로 DNA 증폭을 모니터링 한다면 매우 정확하게 목표의 초기 양을 결정할 수 있으며 표준과 비교하면 초기 DNA의 수를 정량화 할 수 있습니다. Real-Time PCR은 증폭된 DNA의 양에 비례하여 형광을 증폭하는 형광염료를 각각의 thermal cycle이 끝난 후에 측정함으로써 DNA의 양적인 변화를 추적하게 됩니다. 반응의 지수적 위상에서 수집 된 데이터는 정량적인 정보를 산출합니다. Thermal cycle 번호에 대해 형광을 플로팅함으로써 Real-Time PCR 장비는 전체 PCR 반응의 지속 기간 동안 생성물 축적을 나타내는 증폭 플롯을 생성합니다.

Real-Time PCR의 장점은 다음과 같습니다.

- PCR 반응의 진행을 실시간으로 모니터링 할 수 있습니다.
- 각 사이클에서 증폭된 DNA의 양을 정확하게 측정할 수 있으므로 시료에서 초기 DNA의 양을 매우 정확하게 정량 할 수 있습니다
- 동적 감지 범위가 매우 넓습니다. (10^8~9)
- 증폭 및 검출이 단일 튜브에서 발생하여 PCR이 끝난 후 후속조작이 필요하지 않습니다.

지난 수년 동안 Real-Time PCR은 DNA 또는 RNA의 검출 및 정량화를 위한 선도적 도구가 되어 왔습니다. 이 기술을 사용하면 2 fold 범위 내에서 정밀하고 정확한 검출을 달성 할 수 있습니다.

Real-time PCR 형광 검출 시약

Real-Time PCR에서 사용하는 다양한 형광 검출 시약이 존재하지만 가장 널리 사용되는 것은 5' nuclease assay의 원리를 이용한 TaqMan® Assay 와 염료 기반 원리인 SYBR® Green 입니다. 5' nuclease assay는 Taq DNA 중합 효소의 5' 핵산 가수분해 효소의 기능으로 명명되었습니다. Taq DNA polymerase의 5' nuclease 도메인은 DNA 합성의 downstream에 있는 주형에 결합된 DNA를 분해하는 능력이 있습니다. 5' nuclease assay 의 두 번째 핵심 요소는 FRET : fluorescence resonance energy transfer입니다. Reporter dye의 형광 방출은 근접한 곳에서 소광제 (quencher)라고 하는 다른 염료의 존재로 강하게 감소 될 수 있습니다. 표적 검출 또는 정량을 위한 5' nuclease assay는 일반적으로 1쌍의 PCR primer와 TaqMan® probe로 구성됩니다. PCR이 시작되기 전에 TaqMan® probe의 reporter와 quencher는 서로 자연 친화력이 있어 FRET이 일어나고 reporter의 형광신호는 quencher에 의해서 억제됩니다. PCR이 진행되면 primer와 probe는 증폭하고자하는 target sequence에 결합되고 DNA 중합 효소는 probe의 upstream에 있는 primer로부터 DNA가닥을 확장시키면서 Taq DNA polymerase의 5' nuclease 활성으로 probe를 절단하여 reporter dye를 포함하는 단편을 방출합니다. 방출된 reporter dye는 quencher로부터 멀어져서 더 이상 형광신호가 억제되지 않습니다. 이와 같이 5' nuclease assay인 TaqMan® assay는 기존의 PCR이 primer에 의해서만 특이성이 확보되었던 방식과 달리 reporter와 quencher가 있는 TaqMan® probe에 의해서 더욱 강력하고 특이적인 검출을 확보할 수 있습니다.

TaqMan® MGB Probe의 원리 및 소개

특이성은 분석에서 가장 중요한 측면입니다. PCR을 이용한 food pathogen 분석의 가장 큰 위협은 동족체입니다. 이것은 종내 및 관련 종에서 매우 흔하게 존재합니다. 동족체는 표적과 동일한 순서의 유전자이지만 분석에 의도된 표적은 아닙니다. TaqMan® Assay는 특이성을 위한 두 가지 도구 인 primer와 probe를 제공합니다. 이렇게 강력한 특이성을 보장하는 TaqMan® Assay에서 더욱 개선된 것이 TaqMan® MGB probe입니다. MGB (minor groove binder)는

probe와 목적 DNA의 결합력을 강화하여 보다 짧은 oligo로도 더욱 높은 결합력을 보여주며 probe 길이의 대부분에 걸쳐서 발생할 수 있는 homologue와의 불일치에 대하여 특이성에 강한 영향을 줄 수 있습니다. TaqMan® MGB는 TaqMan®보다 특이성을 더욱 강화하는 강력한 도구입니다.따라서 프로브와 목적DNA의 결합을 강화하고 백그라운드 형광을 낮춤으로써 더 높은 신호 대 잡음비를 산출합니다.

Thermo Fisher Scientific Food Pathogen Detection Solution

Thermo Fisher Scientific은 건강하고 깨끗하고 안전한 세상을 만드는데 기여하는 것을 사명으로 하여 30년 이상 식품 미생물 검출에 대한 solution을 개발하고 연구하였습니다. Real-Time PCR의 선두주자로 TaqMan® Assay에 대한 탁월한 기술력을 가진 Thermo Fisher Scientific은 Real-Time PCR을 이용한 식품 미생물 검출에 대하여 SureTect™ series와 MicroSEQ™ series로 solution을 제공하고 있습니다. 또한 정확하고 간편한 사용과 결과의 판정을 위하여 RapidFinder™ Express Software를 제공합니다.

SureTect™ Food Pathogen PCR Assay

Thermo Scientific™ SureTect™ Food Pathogen PCR Assay는 앞서 살펴본 바와 같이 탁월한 특이성을 제공하는 TaqMan® MGB probe 기술을 바탕으로 Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System과 Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR 및 Applied Biosystems™ RapidFinder™ Express Software와 함께 식품 미생물 분석 및 식별에 사용하도록 고안된 Real-Time PCR assay입니다.

SureTect™Food Pathogen PCR Assay의 PCR pellet에는 동결 건조된 표적 특이적 primer, 형광 표지 probe 및 PCR 마스터 믹스 성분이 포함되어 있습니다. 샘플을 미리 채워진 Lysis Tubes에 Proteinase K와 Lysis reagent 2와 함께 pipetting하여 샘플에 존재하는 박테리아 세포를 용해시키고 이 용해 액을 PCR 튜브에 넣어서 내부 증폭 제어 (IAC)를 위한 probe, primer 및 DNA 템플릿을 포함하여 PCR에 필요한 모든 구성 요소와 시약이 들어있는 PCR pellet을 재수화합니다. 그런 다음 PCR 튜브를 밀봉하고 Applied Biosystems™ Real-Time PCR 기기에 넣은 후 분석 소프트웨어를 사용하여 분석을 시작합니다. 올리고 뉴클레오타이드는 표적 미생물에서만 발견되는 독특한 DNA 서열을 표적으로 하여 표적 DNA가 존재하는 경우에 표적 DNA가 증폭되고 증가 된 형광 신호가 Real-Time PCR Instrument에 의해 검출되고 소프트웨어에 의해 해석됩니다. 결과는 준비된 샘플을 실시간 PCR 장비에 로드하는 데 약 1 시간 20 분이 소요됩니다. (그림 1)

검출 결과를 쉽게 판정 할 수 있는 Applied Biosystems™ RapidFinder™ Express Software를 이용하여 증폭 플롯을 확인 할 수 있으며 간편하게 판정 할 수 있도록 양성 또는 음성 기호로 표시되며 필요에 따라 보고, 저장, 인쇄 및 다운로드 할 수 있습니다.

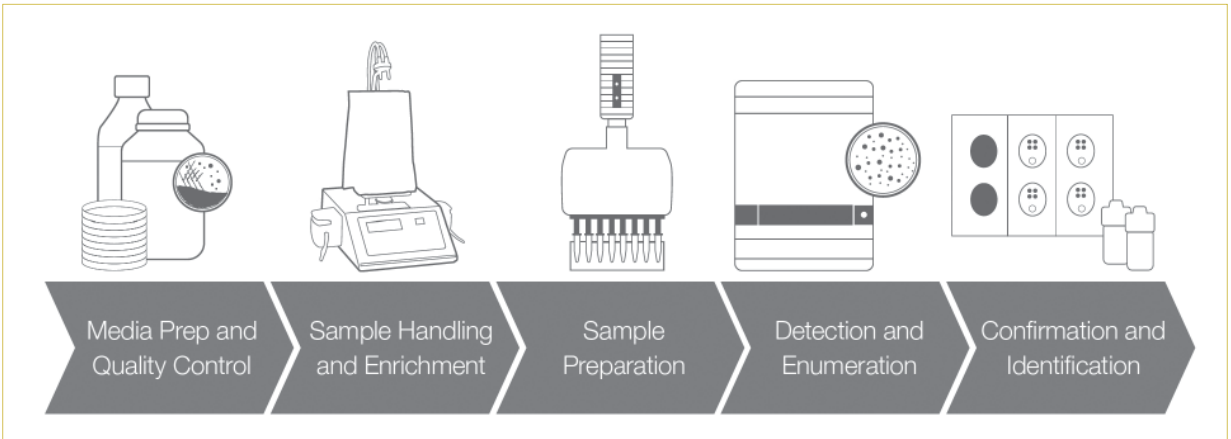

그림 1.

SureTect™Food Pathogen Testing SureTect™ PCR Solution

Assays	
Item Number	**Description**
PT0300A	SureTect™ Listeria monocytogenes PCR Assay
PT0200A	SureTect™ Listeria species PCR Assay
PT0100A	SureTect™ Salmonella species PCR Assay
PT0400A	SureTect™ E.coli O157:H7 PCR Assay
PT1060A	SureTect™ Cronobacter sakaxakii PCR Assay

Software	
Item Number	**Description**
A28811	RapidFinder™ Express Software Version 2.0_ 7500 Fast Real Time PCR instrument

SureTect™ Salmonella 종 PCR Assay는 *Salmonella* 종 특유의 독특한 DNA 서열을 표적으로 하며 PCR Assay에는 박테리아 DNA 추출 및 PCR에 필요한 모든 시약이 포함되어 있어서 검출 과정이 간편하면서도 정확한 결과를 얻을 수 있습니다.

SureTect™ Escherichia coli O157 : H7 PCR Assay는 식품 제조 환경의 다양한 식품 매트릭스 및 샘플에서 광범위하게 테스트할 수 있습니다. 독립적인 외부 확인 과정에서 시험 된 특정 샘플에는 *E.coli O157 : H7*에 의한 오염과 가장 일반적으로 관련이 있는 식품 유형뿐만 아니라 다량의 쇠고기, 다진 쇠고기, 농산물 및 사과 주스와 같이 PCR 검출에 특히 어려움이 있는 것으로 알려진 식품 유형에서 사용이 가능합니다.

SureTect™ Food Pathogen 시스템의 이점

- 더 짧은 성장 단계 – 핵심 식품 매트릭스에 최적화

되어 결과에 대한 시간을 최소화하고, 보유 제품의 신속한 출시 및 재고 비용 절감

- 단일 농축 단계 – 신속하고 간단한 테스트를 위해 2차 농축 또는 재성장이 필요 없음
- 빠르고 간단한 용해 – 적은 양으로 직접 취급 가능
- Pre-filled 용해 튜브 – 편리하며 안정적이고 일관된 세포 용해
- 정제 된 PCR 시약 – 재현성을 높이고 실습 시간을 최소화하기 위해 PCR 시약 피펫을 제거
- 능률화 된 프로토콜 – 최대한의 효율을 위해 동일한 실행에서 여러 분석의 처리 수행
- 탁월한 PCR 기술 – 탁월한 감도 및 특이성을 위한 프로브 기반 실시간 분석
- 최대 신뢰성 – Thermo Scientific™ RapidFinder™ 소프트웨어를 이용하여 표적 증폭과 내부 증폭 제어 (IAC)를 자동 비교
- Small instrument 풋 프린트 – 벤치 공간이 중요한 실험실 환경에 최적화
- 간단하고 직관적인 소프트웨어 – 간단한 교육, 신속한 설정 및 간단한 결과 추적
- 자동 데이터 해석 – 검사 결과를 양성 또는 음성으로 신뢰성있게 report
- 우수한 고객 지원 – 신속한 처리 시간과 최고의 기술 지원
- 편리한 보관 조건 – 동결을 필요로 하지 않는 표준 냉동 조건
- 플러그 앤 플레이 시스템 – 현장 교정과 간편한 설치를 통해서 충분한 교육 시간 확보
- 확장 테스트 메뉴 – *Salmonella species*, *Listeria species*, *Listeria monocytogenes* 및 *E.coli O157:H7* 에 대한 solution
- Complete confidence, run after run – 신뢰성 있는 실험, 간편하고 효율적인 workflow

신속하고 능률적 인 워크 플로우를 특징으로 하는 Thermo Scientific™ SureTect™ 실시간 PCR 시스템으로 신속하고 자신 있게 식품 병원체 테스트를 수행하십시오.

처리량 요구 사항에 맞춰 Real-Time PCR 플랫폼 선택

유연성을 극대화하기 위해 SureTect™ assay workflow는 두 가지 실시간 PCR 장비 중 선택하여 실행되도록 검증되었습니다. 하루에 수백 개의 샘플을 처리하는 데 사용할 수 있는 96-well 장비인 Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR 또는 Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 Real-Time PCR 를 사용하십시오.

전 세계적으로 공인 된 분석법

육류, 유제품, 생선, 과일 및 채소를 포함한 광범위한 식품 매트릭스 및 관련 샘플에서 광범위하게 테스트 한 SureTect™ PCR Assays는 세계적으로 인정 받고 있습니다. (그림 2)

MicroSEQ™ Food Pathogen PCR Assay

Thermo Fisher Scientific은 30년이 넘는 기간 동안

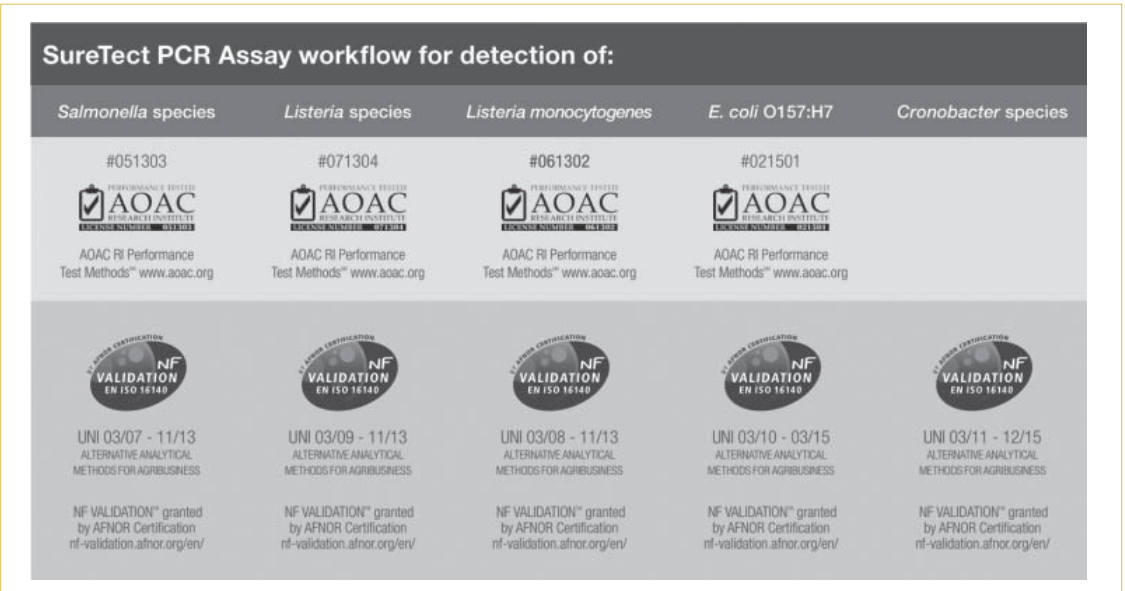

그림 2.

생명 과학 연구 및 검증 된 시장을 위한 유전 혁신 분야를 주도 해 왔으며 식품 산업의 분자 기술 선도 기업입니다. Applied Biosystems™ MicroSEQ™ Pathogen Detection System은 간소화 된 시료 준비, 민감하고 특수한 분석법, 견고한 계측 및 직관적 인 소프트웨어를 모두 갖춘 완벽한 식품 검사 솔루션입니다. Applied Biosystems™ MicroSEQ™ Pathogen Detection System은 속도, 정확성, 감도 및 글로벌 지원을 제공하여 식품 검사 결과에서 항상 최고의 결과를 제공합니다.

식품 미생물 검출은 Thermo Fisher Scientific의 solution과 함께하십시오. 앞서가는 기술과 경험을 바탕으로 최상의 solution을 제공합니다. Thermo Fisher Scientific은 SureTect™ Series와 MicroSEQ™ series로 Real-Time PCR system을 이용하여 빠르고 간편하면서도 정확한 식품 미생물 검출 solution을 제공합니다.

최정룡 수석
GSD/CSD
ThermoFisher Scientific Solutions LLC
http://www.thermofisher.com/kr/ko/home/industrial/food-beverage/food-microbiology-testing

Food Molecular detection and Quantification

MicroSEQ™ Pathogen	
Item Number	**Description**
4427409	MicroSEQ™ E.coli O157:H7 Detection Kit
4445656	MicroSEQ™ E.coli O157:H7 Detection Starter Kit with PrepSEQ™ Nucleic Acid Extraction Kit
4445657	MicroSEQ™ E.coli O157:H7 Detection Starter Kit with PrepSEQ™ Rapid Spin Sample Preparation Kit
4403874	MicroSEQ™ Listeria monocytogenes Detection Kit
4415045	MicroSEQ™ Listeria monocytogenes Detection Starter Kit with PrepSEQ™ Rapid Spin Sample Preparation Kit
4412637	MicroSEQ™ Listeria monocytogenes Detection Starter Kit with PrepSEQ™ Nucleic Acid Extraction Kit
4445659	MicroSEQ™ Listeria spp. Detection Starter Kit with PrepSEQ™ Rapid Spin Sample Preparation Kit
4427410	MicroSEQ™ Listeria spp. Detection Kit
4445658	MicroSEQ™ Listeria spp. Detection Starter Kit with PrepSEQ™ Nucleic Acid Extraction Kit
4403930	MicroSEQ™ Salmonella spp. Detection Kit
4412639	MicroSEQ™ Salmonella spp. Detection Starter Kit with PrepSEQ™ Nucleic Acid Extraction Kit
4415044	MicroSEQ™ Salmonella spp. Detection Starter Kit with PrepSEQ™ Rapid Spin Sample Preparation Kit – Extra Clean

RapidFinder™ STEC Assays	
4480467	MicroSEQ™ STEC Screening Assay Starter kit – with PrepSEQ™ Nucleic Acid Extraction Kit
4476886	RapidFinder™ STEC Screening Assay
4476901	RapidFinder™ STEC Confirmation Assay