3M™ Molecular Detection System: Next Day Result Solution for Pathogen Detection

서론

소비자의 식생활 변화 및 지구온난화와 같은 환경 변화 등 다양한 요인을 바탕으로 살모넬라균(*Salmonella* spp.), 리스테리아균(*Listeria* spp), 크로노박터균(*Cronobacter* spp.), 캠필로박터균(*Campylobacter* spp.) 등과 같은 병원성 식중독 세균에 대한 위험성이 부각되고 있다. 이에 따라, 국내를 비롯한 세계 각 국가의 식품 제조업체에서는 식품 속 미량 존재하는 병원성 식중독 세균에 의한 식중독 사고를 미연에 방지하고자 신속 정확한 식중독 세균 검출 방법에 주목하고 있다.

기존 전통적인 방법인 표준 방법(Agar method)에 의한 식중독 세균 검출법은 오랜 시간이 요구되는 단점이 있다. 예를 들어, *Salmonella* spp.의 경우 증균배양, 분리배양을 거쳐 확인시험과 생화학 시험 및 혈청시험 등의 과정이 요구되기 때문에 일주일의 시간이 소요된다. 이러한 단점을 극복하고 식중독 세균을 신속하게 검출하기 위한 기술로 세균의 DNA 분석을 기반으로한 polymerase chain reaction(PCR)과 같은 분자생물학적 기법이 최근 많이 사용되고 있다. 그러나 conventional PCR의 경우 증폭 이후 전기영동이 필요한 점과 최근 개발된 Real-time PCR에 비해 검출한계(detection limit)가 높다는 단점이 있다. Real-time PCR 방법의 경우 검출한계가 낮은 효율적인 검출법이지만, probe 등 시약의 값이 비싸고 시험법이 까다롭다.

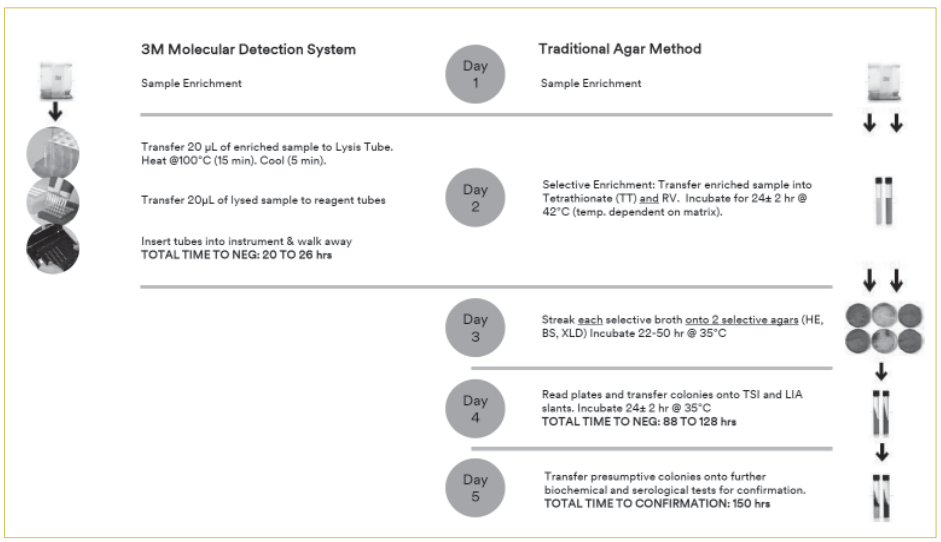

Figure 1. 3M™ MDS protocol과 traditional agar method 비교 (*Salmonella* spp. 검사)

한국쓰리엠에서는 식중독 세균 검사 시 기존 분자생물학적 기법(PCR method)의 단점과 한계를 극복할 수 있는 looped-mediated isothermal amplification(LAMP) 기법을 이용한 식중독 세균 신속 검사 장비를 소개하고자 한다.

Looped-mediated isothermal amplification (LAMP)

LAMP법은 2004년 개발된 DNA 등온증폭법으로 기존의 PCR 반응과 유사하지만 PCR 연쇄반응이 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(extension) 세 가지 단계를 거치면서 온도의 변화를 주어야 하는 반면, 일정한 온도에서 DNA의 접합 및 신장이 가능하다는 특징이 있다. 별도의 온도구배를 두지 않고 주형 DNA의 증폭이 가능하게 됨에 따라 PCR 증폭법보다 소요시간을 줄일 수 있으며 무엇보다 등온 상태에서 DNA 증폭이 일어남에 따라 장비 유지보수면에서 비용이 절감된다는 장점이 있다. 일반적인 PCR과 달리 4~6개의 primer를 이용하여 반응 과정 중 DNA loop 구조를 띄게 되고 large fragment를 가지는 *Bst* polymerase에 의해 DNA 증폭이 연속적으로 발생되어 1시간 이내에 10^9 copies까지 증폭시키며, 증폭물은 콜리플라워 모양을 띄게 된다. 특히 LAMP법에 의한 DNA 증폭은 일반 PCR에 비해 식품과 같은 PCR inhibitor의 영향을 받지 않는 장점이 있다.

3M™ Molecular Detection System(MDS)

MDS는 LAMP법와 Bioluminescence(생체발광 검출)와 같은 특수 기술들의 혁신적인 조합으로 식품 내 미량 존재하는 식중독 세균을 신속, 정확하게 검사한다. MDS는 LAMP법을 이용하여 세균의 DNA를 60 ℃의 일정한 등온조건에서 증폭시키며, 증폭 된

Table 1. 다양한 분자생물학적 방법 비교

Molecular detection methods	Advantage	Limitation	Reference
Conventional PCR	• High sensitivity and specificity • Accurate and reliable results	• Sensitivity may be affected by non-optimized protocols and PCR inhibitors • Requires DNA purification step	• Mandal et al., 2011; Letchumanan et al., 2014
Real-time Quantitative PCR	• Higher sensitivity and specificity than conventional PCR • More rapid than conventional PCR • Assay can be multiplexed • Allows high-throughput analysis	• Costly • Sensitivity may affected by PCR inhibitors • Trained personnel is needed	• Mandal et al., 2011; Letchumanan et al., 2014
LAMP	• Higher sensitivity and specificity than PCR • Cost-effective • Simple • Operates without thermal cycling system	• Complicated primer design	• Letchumanan et al., 2014; Zhao et al., 2014; Law et al., 2015

DNA의 증폭산물인 pyrophosphate를 adeonsine triphosphate(ATP)로 변환하고, 이를 luciferase 효소처리화하여 빛으로 전환시켜 실시간 식중독균 검사 결과를 제공한다. 실험방법은 1) Enrichment, 2) Cell lysis, 3) Reagent pellet hydration, 4) Running the assay 총 4 단계로 구성되어 있다. MDS를 이용한 식중독 세균의 증폭과 검출은 60 - 75분 안에 완료되며, 양성판정은 15분 만에 식별 가능하다. 1회 테스트에 1 - 96개의 샘플 검사가 가능하며, 동시에 아래 복수의 식중독 세균 검사를 진행 할 수 있다.

- *Salmonella* spp.
- *Listeria* spp.
- *Listeria monocytogenes*
- *E. coli* O157 (including H7)
- *Cronobacter* spp.
- *Campylobacter* spp.

가. 민감도(Sensitivity)과 특이도(Specificity)

MDS에 적용 된 LAMP법은 6개의 primer를 이용하여 복제하고자 하는 DNA의 target region 8 곳에 정확히 인식 반응하여 기존 PCR보다 증폭속도와 증폭효율 10^3 배 더 높으며, 검출한계가 10^{-4}으로 낮기 때문에 높은 민감도와 특이도를 보여준다.

나. 간편성과 편의성

MDS가 제공하는 모든 식중독 세균 검사 프로토콜은 4단계로 동일하다. 또한 세균 내 DNA 추출 시 3M nano-technology가 적용 된 ready-to-use 시약(lysis tube)을 제공하여 별도의 시약 제조 및 피펫팅, 원심분리기 등 기타 부수적인 조작과 장비의 사용 없이 DNA를 선택적으로 추출 가능 하도록 하여 기존 Real-time PCR에 비해 간편성과 편의성을 향상시켰다.

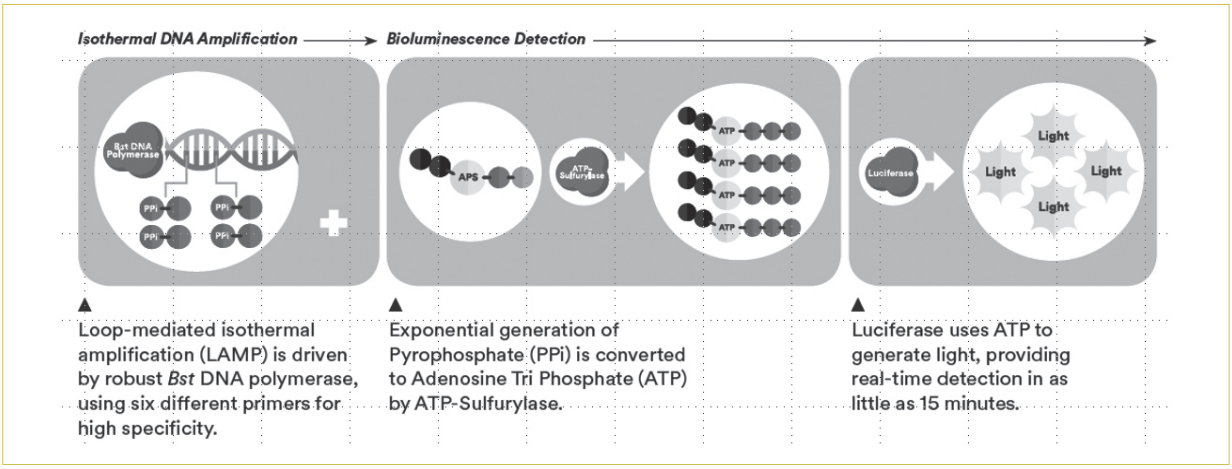

Figure 2. MDS 식중독균 검출 원리

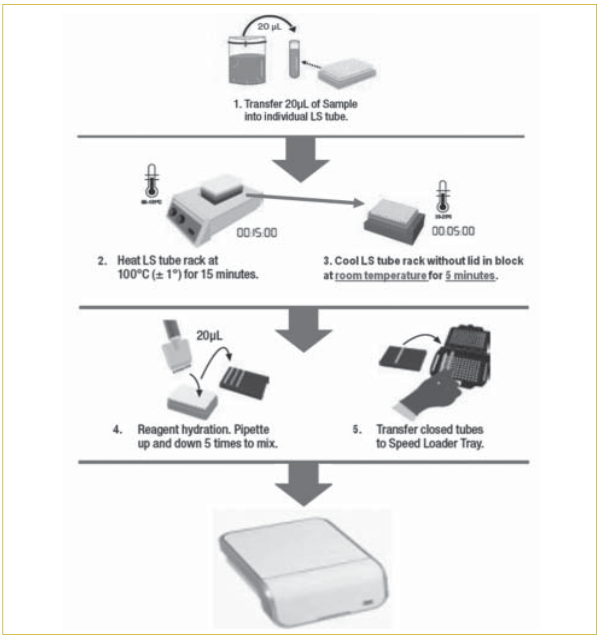

Figure 3. MDS 표준 protocol

다. 소프트웨어

결과는 소프트웨어 내에서 자동 판독되며, 간단한 색 부호를 사용한 실시간 결과가 표시된다. 검사가 완료된 후에는 자동적으로 작성 된 결과보고서를 통해 각각의 샘플 별 양성 및 음성 peak 확인이 가능하다. 자동 작성 된 결과보고서는 PDF 또는 Excel, Word 형태로 추출 가능하며, 소프트웨어 PC가 외부망과 연결되어 있는 경우 LIMS와의 호환 및 결과보고서를 자가품질시험 성적서로 제출할 수 있다.

라. 신뢰성

현재 출시된 모든 식중독 세균 키트 검사 프로토콜에 대하여 국제적인 공인시험법인 AOAC OMA(Official Methods of Analysis)와 AFNOR NF Validation 인증을 취득하여 기존 ISO 미생물 시험법 및 FDA-BAM(Bacteriological Analytical Manual) 실험법과 비교하여 결과에 유의적 차이가 없음을 입증하였다.

결론

식품에서의 식중독 세균은 낮은 수준으로 존재하는 특성을 고려하여 이를 검출하기 위해서는 검출한계까지 신속한 DNA 증폭과 빠른 검출기술이 필요하다. 이러한 요소를 반영하여 출시 된 3M MDS는 식품 및 환경모니터링 등에서 병원성 식중독 세균 검사에 LAMP 법을 적용하여 Next Day Result를 가능하게 하는 최신 분자생물학적 신속 검출 솔루션이다. 획일화된 실험 과정에서의 간편성과 편리성을 기본으로 MDS는 PCR 대비 높은 민감도와 특이도 그리고 낮은 검출한계를 보여준다. 또한 MDS를 이용한 검사법은 다양한 식품 샘플을 이용하여 검증을 완료하였으며, AOAC OMA 및 AFNOR과 같은 국제적인 공인시험법으로 등재되어 있어 모든 테스트에 신뢰할 수 있는 결과를 제공한다. 따라서 3M MDS는 기존 PCR이 가지고 있는 한계를 극복한 최신 분자생물학적 분석법이자 식중독 세균 검출을 위한 total solution 이다.

Reference

1. L. Hu, L. M. Ma, S. Zheng, X. He, H. Wang, E. W. Brown, T. S. Hammack, G. Zhang, Evaluation of 3M Molecular Detection System and ANSR Pathogen Detection System for rapid detection of *Salmonella* from egg products, Poultry Science, Volume 96, Issue 5, p1410-1418

2. Jodi Woan-FeiLaw, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Kok-Gan Chan and Learn-Han Lee, An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food, Frontiews in Microbiology, Volume 6, Article 1227

3. Yanmei Li, Penghui Fan, Shishui Zhou, Li Zhang, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens, Microbial Pathogenesis, Volume 107, p54-61

방현조
한국3M 식품안전사업팀 기술마케팅
hbang2@mmm.com