Multiplex PCR 기법을 이용한 *B. cereus* 독소생성 (구토/설사) 유전자 동시검출키트 개발기술

바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)는 국내에서 식중독을 일으키는 주요 세균들 중 하나로서 쌀을 비롯한 곡류식품에서 문제가 되고 있으나, 대부분 *B. cereus* 오염도 조사와 특성규명, 분리 균주의 설사형 독소 생성 *B. cereus*균의 분리, 유전자 분포현황 및 생성에 초점이 맞추어져 있다. 반면에, 구토형 독소 생성 *B. cereus* 분리 동정이나 검출기법에 관한 연구는 매우 미비한 실정이다. 구토형 식중독 유발 생성 *B. cereus*균은 영국, 미국, 일본 등에서 분리, 동정 되어 보고되고 있으나 매우 제한적이고, 대부분 non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) 유전자를 타겟으로 PCR을 실시하여 구토독소 *B. cereus* 균주를 동정하고 있다.

본 식품안전기술정보는 2012년부터 2015년까지 3년간 IPET으로부터 지원받은 연구과제를 바탕으로 "구토 및 설사형 독소를 생성하는 바실러스 세레우스균을 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR/real-time PCR 기술개발"에 관한 내용을 중심으로 정리하여 발췌하였으며, 본 연구에서 개발한 PCR kit 제품을 특허등록 하여 J회사에 기술이전을 한 사례가 있어 이를 소개하고자 한다.

구토 및 설사 독소생성 *B. cereus*균의 개요

바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*, *B. cereus*)는 포자(spore)를 형성하는 그람 양성 세균으로 다양한 식품에서 자연적으로 존재하고 있으며 정상적인 식품 조리 과정 중에 바실러스 세레우스는 파괴되지만 포자는 높은 조리온도, 높은 습도에서 발아해서 증식할 수 있으므로, 대부분의 경우 가열한 식품의 냉각과 냉장 보관이 적절치 못하여 식중독 등의 문제를 일으키는 것으로 보고되고 있다. 식품에서 검출되는 비율은 높으나 상대적으로 식중독 발생빈도는 낮으나 영국 등 유럽에서는 발생빈도가 높아 오래 전부터 주목을 받아 왔으며, 우리나라에서도 각종 식품에서 검출되고 있다.

바실러스 세레우스는 두 종류의 식중독을 일으키는데 식품에 바실러스 세레우스 균이 성장하여 생산한 독소(cereulide)를 섭취하여 발생하는 구토형 식중독과 바실러스 세레우스 세균의 세포 또는 포자를 섭취한 후 인체의 장 내에서 장독소(enterotoxins)가 생산되어 발생하는 설사형 식중독이 있다. 구토형 식중독은 볶음밥이나 찐밥에서 발생되는데, 열에 안정한 세레울라이드(cereulide)를 생산하는 바실러스 세레우스 변종에 의해 발생하며, 설사형 식중독은 옥수수전분, 마쇄감자, 야채류, 육류 제품, 푸딩, 수프, 양념류 등의 곡류 제품과 관련이 있으며 열에 불안정한 장독소(nonhemolytic enterotoxin, NHE) 또는 용혈성 장독소(hemolytic enterotoxin, HBL)가 주요 원인으로 알려져 있다.

주요 증상으로는 복통과 설사를 일으키며 잠복기는 8~16시간이고 발병 24시간 이내에 증세가 대부분 완화되며 바실러스 세레우스가 일으키는 식중독은 매개가 되는 식품 중에 균수나 포자수가 10^5~10^8/g 존재할

경우 발생하는 것으로 보고되고 있다.

독소생성 *B. cereus*균 신속검출키트개발 국내외 기술개발 현황

1) 국외기술현황

분자생물학적 방법이나 면역학적 방법 독소를 확인하는 검출법으로는 HPLC, GC, mass spectrometry 등이 이용되었고, 최근에는 PCR로 16S rRNA의 특정유전자를 검출하여 동정하거나 독소를 확인하는 연구가 진행되고 있다. 현재 상품화된 kit로는 enzyme linked immunoassay(ELISA)와 reversed passive latex agglutination(RPLA)이 널리 이용되고 있으며 최근에는 PCR로 hblA, hblC, hblD, nheA, nheB, nheC, cytK 등 설사 독소 유전자를 검출하여 동정하거나, 독소 단백질을 확인하는 enzyme linked immunoassay(ELISA)와 reversed passive latex agglutination(RPLA) 방법의 상품화된 kit가 개발되었다.

반면에, 구토형 식중독은 설사형 독소와는 달리 저분자의 내열성을 가진 cyclic dodecadepsi-peptide (Cereulide) 구토독소에 의해 발생하며 영국, 미국, 일본 등에서 분리 보고되고 있으나, cereulide 생산 유전자가 아직 정확하게 밝혀지지 않아 저분자 환상구조의 아미노산 펩타이드가 Ribosomal에서 생산되지 않는다는 과학적 사실에 근거하여 Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) 유전자를 target으로 PCR을 실시하여 구토독소 *B. cereus* 균주를 동정하고 있으며 ribosome에서 독소 유전자가 발현되지 않기 때문에 항원 · 항체 반응에 의한 상업적 kit가 개발되지 못하고 있다.

현재 식중독 원인균 검사 과정은 전통적인 방법으로는 검체를 예비 증균배양, 선택 증균배양, 선택배지 배양 후 생화학적인 동정 검사 등을 거쳐 이루어지고 있는데, 시간이 5-10일 정도 소요되며, 경비, 노동력 뿐만 아니라 검출능력 면에서도 비효율적이다. 반면에 신속검출기법은 주로 항원-항체 반응을 사용한 면역기법과 DNA나 RNA정보를 이용한 유전자기법이 주된 방법이며 그중에서도 유전자 기법은 높은 감도와 신속성의 장점을 지니고 있다(그림 1.1). 면역항체법의 식중독균에 대한 민감도는 10^5-10^7 CFU/ml or g 으로, 유전자 기법의 10^3 CFU/ml or g 이하에 비하여 현저하게 높다. 따라서, 전통배양 방법으로는 독소생성 *B. cereus* 균의 경우 시료로부터 최종 검출까지 분석시간이 오래 걸리고, 분류방법이 까다로워 단시간 내에 결과를 얻을 수 있는 신속검출키트의 개발이 필요하다. 현재 real-time PCR 킷트를 비롯한 다양한 분자생물학적, 면역학적 키트가 개발되었으나 대부분 대장균 O157:H7 혹은 비병원성 대장균 검출과 관련된 키트이며, 구토 및 설사형 독소생성 *B. cereus*의 동시검출 PCR kit는 개발된 것이 전무하다.

다양한 시료에서 분리된 식중독 미생물을 신속하게 검출하는데 상업적으로 이용되고 있는 대표적인 kit 및 제조회사들의 목록의 다음과 같으며 이중 *B. cereus* 균이 생산하는 구토형 독소의 진단 키트는 아직 상업화하지 못하고 있다(표 1).

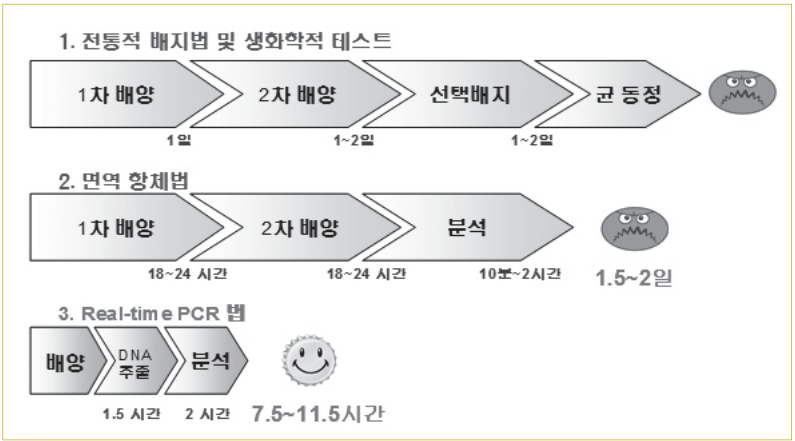

그림 1. 검출법 소요시간

표 1. 대표적 *B. cereus* 검출 kit

제조회사	적용 기술
BioControl System (Belleveus, WA)	Lateral-flow, ELISA
Neogen (Lansing, MI)	Lateral-flow
BioMerieus (Marcyl, Etoile, France)	Fluorescent immunoassay
Tecra (France Forest, NSW, Australia)	Dipstick, ELISA
Igen (Gaithersburg, MD)	Electrochemiluminescent immunoassay
Molecular Circuitry	Electroimmonoassay
Organon Teknika (Boxtel, Netherlands)	ELISA
GeneTrack (Hopkinton, MA)	ELISA
DuPont Qualicon (Wilmington, DE)	PCR
Bio-Rad	PCR, PCR-Hybridization
TaKaRa	PCR

2) 국외기술현황

국내에서 식중독 원인균에 대한 상품화된 키트는 (주)코메드나, (주)코젠바이오텍 등 일부기업에서 출시되고 있으나 대부분 대상 병원성 식중독균에 대한 target gene으로 1-2개의 유전자만 사용하기 때문에 해당 식중독균 중에서 질병유발관련 다른 유전자를 검출하는데 제한성을 지니고 있어 많은 한계점이 있다.

현재까지 *B. cereus*균에 관한 국내의 연구동향을 살펴보면, 대부분 *B. cereus* 오염도 조사와 특성규명, 분리 균주의 설사형 독소 유전자 분포 및 생성에 초점이 맞추어져 있고, 구토형 독소 생성 *B. cereus* 분리 동정이나 검출기법에 관한 연구는 거의 전무하다. 현재, PCR을 이용한 구토독소 생산 관련 유전자 검색으로 구토독소 생산 *B. cereus* 균주를 정확하게 동정하기 곤란하기 때문에 독소생성 확인방법으로 *B. cereus*균주가 생산하는 cereulide 구토독소를 sperm assay 또는 cell culture 방법으로 정성하거나 cereulide와 화학적 구조와 분자량이 매우 유사한 valinomycin을 표준물질로 HPLC-MS를 이용한 정량분석 방법이 사용되고 있으나 아직 국내에서는 구토형 독소분석을 위한 이러한 방법들이 확립되어 있지 않다.

일본에서는 *B. cereus*에 의한 식중독의 경우, 설사형 독소와 구토형 독소질환이 10배 이상 많이 보고되고 있는데, 식이문화가 일본과 매우 유사한 우리나라에서는 *B. cereus*에 의한 식중독이 대부분 설사형 독소로 보고되고 있으며 구토형 독소에 대한 보고는 거의 전무한 상태이므로 이에 대한 연구가 매우 시급하다. 독소생성 *B. cereus*균은 설사독소나 구토독소를 단독으로 생성하는 균주도 있지만 설사독소 생성균주 중에서는 구토독소를 생성하는 균주도 있기 때문에 설사형과 독소형을 분리하여 검출하기 보다는 설사형 독소와 구토형 독소를 동시에 검출할 수 있는 multiplex PCR primer kit를 개발하여 설사형 및 구토형 독소 생산 *B. cereus*균을 동시에 screening하고 동정하는 연구가 식품의 안전성을 확보하고 신속 정확한 검출을 하는데 매우 중요하다고 사료된다.

*B. cereus*균 구토 및 설사형 동시검출 Multiplex PCR 기술개발

1. 최적 multiplex PCR 조건 및 사용균주

본 연구에서 사용된 *B. cereus*균 구토 및 설사 독소 유전자들은 non-ribosomal peptide synthetase (NRPS/CER primers), cereulide (*ces*), haemolysin BL (*hblDCA*), enterotoxin FM (*entFM*), *non-haemolytic entrotoxin* (*nheABC*), 및 *cytotoxin K* (*cytK*)을 목표로 하는 제 1 프라이머 세트를 개발(표 2) 하였으며 프라이머 세트의 multiplex PCR 최적조건은 pre-denaturation(95℃ 10분), Thermal cycles (94℃ 1분, 54℃ 1분, 72℃ 1분), Final extension(35회 반복, 72℃ 5분)으로 설정하였다. 본 연구에 사용된 세균은 설사형 7균주(표준균주 7), 구토형 11균주(표준균주 1 및 야생형 분리균주 10균주), *B. cereus* group 5균주, 비목표 세균(non-target bacteria) 12균주 등 총 34균주를 사용하였으며 개발된 multiplex PCR 을 검증하기 위해 사용된 wild type *B. cereus*는 여러 분리원(분면, 두토, 발효장류, 야채, 밥, 김밥 등)으로부터 총 496균주를 사용하였다.

표 2. 새로 디자인한 프라이머(제1 세트)의 목표 유전자 및 프라이머 서열, PCR산물의 크기 및 유전자 번호

Target gene	sequence	Product length	Design source[1)]
groEL	AGCTATGATTCGTGAAGGT	236	AB077143
	AAGTAATAACGCCGTCGT		
entFM	AGGCCCAGCTACATACAACG	327	AY789084
entFM	CCACTGCAGTCAAAACCAGC		
hblC	CGCAACGACAAATCAATGAA	421	AY786407
hblC	ATTGCTTCACGAGCTGCTTT		
CER	GCGTACCAAATCACCCGTTC	546	AY576054
CER	TGCAGGTGGCACACTTGTTA		
nheA	GGAGGGGCAAACAGAAGTGAA	750	DQ019312
nheA	CGAAGAGCTGCTTCTCTCGT		
cytK	TGCTAGTAGTGCTGTAACTC	881	DQ019311
cytK	CGTTGTTTCCAACCCAGT		

1) 유전자은행(genebank)에서의 유전자 아이디)

2. Mutiplex PCR primer의 특이도와 정확도

○ 1차 프리이머세트 Multiplex PCR법에 의한 구토 및 설사독소 유전자 검출의 특이도와 정확도를 액체배지에서 분석한 결과, *groEL*은 구토 및 설사형 *B. cereus*균에 상관없이 모든 *B. cereus* 균에서 검출되었으며, 구토 유전자인 cer은 구토형 *B. cereus*에서만 검출되었다. 또한, non-*Bacillus cereus* 균주들 모두에서 PCR 밴드가 나타나지 사용된 프라이머 세트는 특이도와 정확도가 높은 것으로 확인되었다(표3, 그림2).

3. 독소생성 *B. cereus*균의 구토 및 장독소 유전자 패턴분석

식품, 환경 및 임상 시료로부터 분리된 야생형 바실러스 세레우스 균주에서 구토독소 생성균(71균주) 및 설사독소 생성균(425균주) 유전자의 분표 패턴을 분석한 결과, 구토 및 설사독소 생성 *B. cereus* 총 496 균주 모두 *groEL* 유전자에 대한 PCR 증폭이 확인되었

표 3. 구토 및 설사형 표준 균주들의 유전자 프로파일

Strain	Type	Multiplex PCR assay					
		CER	*groEL*	*Cyt K*	*entFM*	*hblC*	*nheA*
B. cereus ATCC13061	Enterotoxic	−	+	−	+	−	+
B. cereus ATCC12480	Enterotoxic	−	+	+	+	+	+
B. cereus KCTC1013	Enterotoxic	−	+	+	+	+	+
B. cereus KCTC1014	Enterotoxic	−	+	−	+	−	+
B. cereus KCTC1092	Enterotoxic	−	+	+	+	+	+
B. cereus KCTC1094	Enterotoxic	−	+	+	+	+	+
B. cereus KCTC1526	Enterotoxic	−	+	+	+	+	+
B. cereus F4810/72	Emetic	+	+	−	+	−	+
B. cereus JNHE36	Emetic	+	+	+	+	+	+
B. cereus JNHE78	Emetic	+	+	−	−	−	+
B. cereus KUGH164	Emetic	+	+	−	−	−	+
B. cereus KNIHuls1	Emetic	+	+	−	+	−	+
B. cereus KNIHuls3	Emetic	+	+	−	+	−	+
B. cereus KNIHuls4	Emetic	+	+	−	+	−	+
B. cereus KNIHuls5	Emetic	+	+	−	+	−	+
B. cereus KNIH7uls7	Emetic	+	+	−	+	−	+
B. cereus KNIHuls8	Emetic	+	+	−	+	−	+
B. cereus KFDA250	Emetic	+	+	−	+	−	+

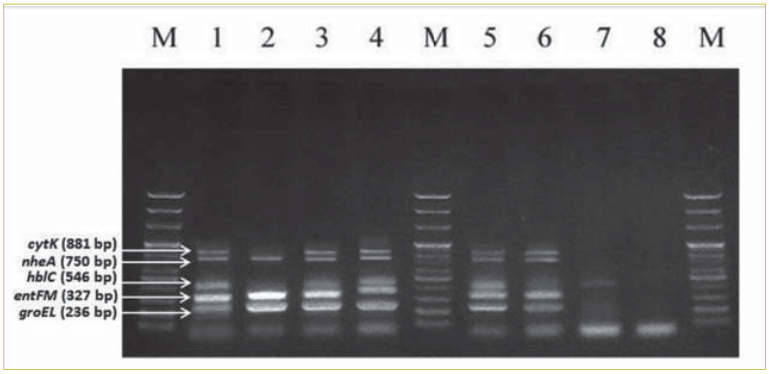

그림 2. Gel electrophoresis of 6 enterotoxic reference strains and 1 non-target strain. M, 100-bp ladder; Lane 1, *B. cereus* KCTC 1013; Lane 2, *B. cereus* KCTC 1014; Lane 3, *B. cereus* KCTC 1092; Lane 4, *B. cereus* ATCC 12480; Lane 5, *B. cereus* KCTC 1526; Lane 6, *B. cereus* KCTC 1508; Lane 7, *Pseudomonas putida* KCCM 35479; Lane 8, no template control (NTC).

다. 또한, 구토/설사독소 생성 바실러스 세레우스 야생형 496 균주 중 *nheA*, *entFM*, *nhlC*, 및 *cytK* 유전자 검출율은 각각 92.3%, 77.2%, 59.4% 및 47.6% 나타났으며, 이중 구토독소 생성균(71)에서도 구토독소 유전자인 CER은 모두 검출되었으며 설사독소 유전자인 *nheA*, *entFM*, *nhlC*, 및 *cytK* 유전자 검출율이 92.3%, 90.1%, 23.9% 및 28.2% 나 보유하고 있는 것으로 나타났다. 따라서, 구토독소 생성균도 구토독소 유전자뿐만 아니라 설사독소 유전자의 8가지 분포유형을 띄고 있기 때문에 본 결과는 독소생성 유전자들의 프로파일에 대한 중요한 정보를 제공할 뿐만 아니라 실러스 세레우스 그룹에 속하며 생물농약으로 널리 이용되는 바실러스 써린지엔시스의 경우에도 여러 장독소 유전자들이 다양한 패턴으로 존재하므로 식품 안전 및 보건의 관점에서 보다 심도 있는 연구가 필요하다.

4. 순수배양액 및 인위접종 식품에 대한 multiplex PCR의 검출한계

Multiplex PCR의 최소 검출한계를 분석하기 위해 순수배양액(pure culture)에서 측정한 결과, multiplex PCR의 최소 DNA 검출한계 농도는 20 pg/reaction tube으로 나타났다(표 4). 반면에, 여러 식품(유아용 시

표 4. 바실러스 세레우스 표준균주의 순수배양액에 대한 multiplex PCR의 검출한계

Strain	Type	Concentration of DNA in PCR reaction tube				
		2 ng	200 pg	20 pg	2 pg	200 fg
B. cereus ATCC13061	Enterotoxic	+	+	+	−	−
B. cereus ATCC12480	Enterotoxic	+	+	+	+	−
B. cereus KCTC1013	Enterotoxic	+	+	+	−	−
B. cereus KCTC1094	Enterotoxic	+	+	+	−	−
B. cereus F4810/72	Emetic	+	+	+	+	−

+: presence of amplified product/ −: absence of amplified product.

리얼(baby cereal), 김밥(kimbab), 저온살균 우유(pasteurized milk), 파스타(pasta), 생쌀(rice), 해바라기씨유(sunflower oil) 및 떡(tteok)에 *B. cereus* 균주를 인위 오염시킨 후 multiplex PCR의 최소 검출한계를 측정한 결과, 모든 식품에서 *B. cereus* F4810/72와 *B. cereus* ATCC 12480의 multiplex PCR 기법의 최소 검출한계는 각각 1.8 x 10^3 cfu/g과 2.1 x 10^3 cfu/g으로 나타났다. 따라서, 인위 접종한 식품에서는 순수배양액 시료에서 보다 최소 검출한계 수준이 약 10배정도 낮은 것으로 나타났다.

표 5. 자연시료(쌀, 김밥, 토양, 분변)에서 *B. cereus* 독소유전자 분포현황

Toxin genes	Kimbab (n = 12)	Rice (n = 23)	soil (n = 11)	Feces (n = 9)
cytK	4 (33.3%)	12 (52.2%)	6 (54.5%)	6 (66.7%)
nheA	11 (91.7%)	20 (86.9%)	11 (100%)	8 (88.9%)
hblC	7 (58.3%)	16 (69.6%)	7 (63.6%)	5 (55.6%)
entFM	9 (75.0%)	18 (78.3%)	7 (63.6%)	5 (55.6%)
CER	ND	2 (8.7%)	ND	ND

ND: not detected.

5. 식품과 토양 및 분변에서 개발한 multiplex PCR 기법의 검출 민감도 검증

1) 쌀과 김밥 시료에서 *B. cereus* 독소유전자에 대한 multiplex PCR의 검출율/민감도 분석

개발된 multiplex PCR 기법을 사용하여 36개의 rice과 김밥시료에서 독소생성 *B. cereus* 오염율 분석한 결과, 쌀에서는 *nheA* 86.95%, *entFM* 69.56%, *hblC* 82.6%, *cytK* 43.47%, CER 8.7%순으로 나타났으며 김밥에서도 *nheA* 91.75%, *entFM* 75.0%, *hblC* 58.3%, *cytK* 33.3%, CER 0%순으로 유사하게 나타났다. 이러한 결과는, 생화학적 방법을 사용한 MYP 배지에서 얻어진 결과와 multiplex PCR의 결과가 동일한 결과를 나타내어 개발한 multiplex PCR 시스템이 좋은 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서 개발된 multiplex PCR 기법은 선택배지 상에서 direct plating method 보다 검출속도가 빠르고 특이도에서 우수성이 나타나 분석시간이 오래 걸리는 전통배양법보다 장점이 많으므로 바실러스 독소생성 유전자를 검출하는 사용하면 보다 효과적일 것으로 판단된다.

6. 개발된 mutiplex PCR kit 현장 적용검증

1) 시제품 PCR 검출키트의 제작

구토 및 설사 독소 생성 바실러스 세레우스 동시검출용 multiplex PCR (cPCR) detection kit 및 multiplex real-time PCR (rtPCR) detection kit의 상업용 시제품을 다음과 같이 생산하였다. 즉, 독소 유전자들(ces, cytK, nheA, entFm 및 hblD)을 목표로 하는 특이적 프라이머들은 B사로부터 구입하여 먼저 농축용액(stock) 농도 100 pmol/μl으로 준비한 후, substock 용액 농도 10 pmol/μl으로 희석하고 PCR 키트용 premix를 만드는데 사용하였으며, 제품 생산을 위한 플라이머 및 Taq 중합효소, 반응버퍼 등 모든 재료들의 특정 양을 계산하고 PCR 키트의 시제품 생산을 위해 K

사와 협업으로 생산하였으며 사용자 편의를 고려하여 생산된 multiplex PCR kit는 3 가지 주요 구성요소로 이루어졌다.

- 제1 구성요소: positive control tube (양성대조군 튜브, 뚜껑 위에 "C"라고 표시함) – 이것은 *Bacillus cereus* ATCC 12480 (설사형 표준균주) 및 F4810/72 (구토형 표준균주) 두 균주들 유전체 DNA cocktail (혼합액)
- 제2 구성요소: Primer mix tube(프라이머 혼합액 튜브, 뚜껑 위에 "P"라고 표시함) – 모두 5 가지 목표유전자들에 대한 5 종류의 프라이머들 혼합액 (*cytK, entFM, hblD, nheA, ces*)
- 제3 구성요소: 0.2 ml 8-stripe tubes – 동결건조된 PCR용 master mix (Bioneer)가 들어 있음.

그림 4는 시제품으로 생산된 multiplex PCR detection kit의 모든 구성요소들을 나타내며 시제품은 냉동상태로 보관되고 각 실험시 일정량을 사용한다. 또한, 아래와 같이 사용자 가이드라인을 제작하였다 (그림 5)

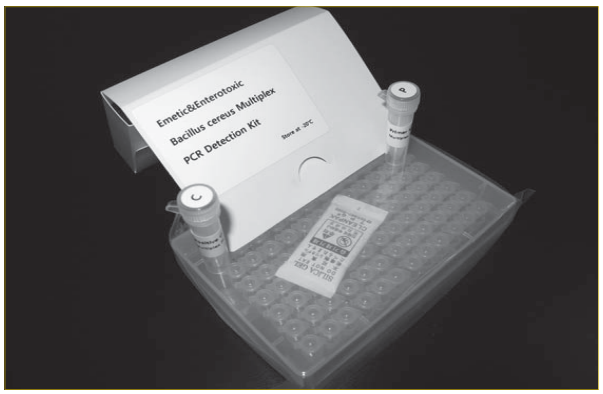

그림 4. 개발된 multiplex PCR detection kit 시제품 키트의 모든 내용물)

2) AOAC 기반 개발된 multiplex PCR 키트 검증

가. 인위접종 식품시료에서의 검증

본 키트의 검증을 위해 AOAC validation guideline에 따라 3종류의 표준균주(설사독소 생성균 : *B. cereus*ATCC 12480, *B. cereus* KCTC 1013, 구토독소 생성균: *B. cereus* F4810/72)와 오염과 관련된 3종류 식품(밥, 우유, 파스타)을 선정 하였으며 밥은 구토표준균주(F4810/72), 우유는 장독소 표준균주(KCTC 1013), 파스타는 장독소 표준균주(ATCC 12480)로 접종하였다. 한편, AOAC 검증을 위한 사용자 편의 "노하우" 프로토콜을 개발하여 3개의 기관(협력 실험실)에 제공하여 "사용자 편의 프로토콜"에 따라 밥, 우유, 파스타 등 3 식품에 대하여 각각 150-300 CFU/25g(고농도 접종 시료), 15-30 CFU/25g(저농도 접종 시료), 2 음성대조군(negative controls without inoculation) 그리고 1 양성대조군으로 나누어 검증 실험을 수행하게 하였다(그림 5).

개발한 PCR Kit의 효능성을 평가한 각 기관별 결과는 다음과 같다.

저농도 접종 식품시료에서는 A기관의 경우, 우유와 밥에서 실시한 multiplex PCR detection kit 결과는 생화학배지 방법인 MYP agar를 사용하는것 보다 통계적으로 유의하게 좋은 결과를 나타내었으나 ($p \leq 0.05$), 파스타에서는 MYP agar배지보다 낮은 민감도

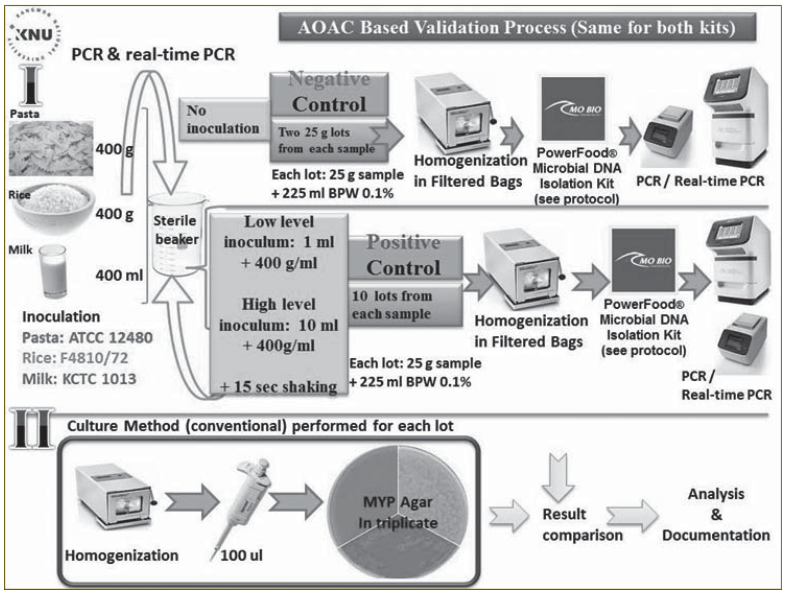

그림 5. 개발된 PCR kit에 대한 AOAC에 기초한 검증을 위한 사용자 편의 프로토콜의 요약

를 나타내었다(표 6). 이같은 결과는 다른 기관에서 분석한 결과와 유사한 결과를 나타내었다. 반면, 고농도 접종 시료에서는 우유, 밥, 파스타 3가지 시료 모두 통계적으로 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났으며, 다른 2기관과 의 결과도 유사한 것으로 나타났다(data not shown). 따라서, 개발된 PCR 키트는 기존의 YP agar 배지를 사용하는 전통적인 방법에 비하여 식품 시료에서 *B. cereus* 오염을 검출하기 위한 방법으로 민감도와 특이성이 높으며 빠른 시간내에 분석할 수 가 있어 상품화가 가능한 것으로 사료된다.

나. 무접종 식품시료에서의 개발된 kit 검증

시중에서 유통되는 7가지 식품(쌀, 김밥, 돼지고기, 두부, 시금치, 상추, 토마토)을 선택하여 각 식품 종류 당 15개 시료를 취하여 총 105 시료에 대하여 MYP (MYP selective agar), PCR (multiplex conventional PCR kit), rtPCR (multiplex real-time PCR kit) 등을 사용하여 독소생성 *B. cereus*의 오염현황을 분석한 결과는 다음과 같다. 모든 시료에서 증균 전보다는 증균배양 후에 많은 시료에서 *B. cereus* 균이 검출되었으며, 검출 민감도는 real-time PCR kit가 가장 높았으며, multiplex PCR kit, MYP법으로 나타났다(data not shown). 일반적으로 전통적 배지법의 약점은 식품 시료에 비표적 세균들(정상세균총)이 높은 농도로 존재할 경우, 때로는 표적세균인 *B. cereus*의 증식을 저해하여 위음성을 나타낼 수도 있다.

본 연구에서 개발된 multiplex PCR kit는 접종식품이나 무접종 식품에서 전통적인 plating 방법에 비하여 민감도 뿐만 아니라 특이도도 훨씬 더 높으며, 장독소 유전자 4가지(*nheA, entFM, hblD and cytK*)와 구토독소 유전자(*ces*)에 대한 독성 프로파일을 얻을 수 있는 장점이 있어 향후, 각종 식품, 환경으로부터 독소생성 *B. cereus*균을 모니터링할 경우 좋은 스크리닝 도구로 사용될 것으로 판단된다.

오덕환 교수
강원대학교 식품생명공학과

표 6. A검기관에서 3종류식품(쌀밥, 우유, 파스타)으로부터 개발된 conventional PCR키트의 검증

Sample		Inoculated samples (1~10)										Negative control		Positive control
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	
Rice Low	MYP	−	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	+
	PCR	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−	+
	rtPCR	+	−	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+
Rice High	MYP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	rtPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pasta Low	MYP	+	+	−	−	+	+	−	+	+	−	−	−	+
	PCR	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+
	rtPCR	+	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−	−	+
Pasta High	MYP	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	−	−	+
	PCR	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+
	rtPCR	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	−	−	+
Milk Low	MYP	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+
	PCR	−	−	+	+	−	−	+	+	−	+	−	−	+
	rtPCR	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−	+
Milk High	MYP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+
	PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+
	rtPCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+

* −: negative result, +: positive result, rtPCR: real-time PCR