GENE-UP®, Real Time PCR solution for foodborne pathogen detection

서론

"Farm to Table"

식품의 원재료 관리부터 최종 소비에 이르는 전 과정중의 미생물 관리는 제품의 안전과 품질보증을 위해 필수적이다. 제조사에서는 이러한 전 과정에서 발생할 수 있는 식중독 사고를 미연에 방지하고, 문제 발생 시 신속하게 대처하는 것이 무엇보다 중요하다. 이런 필요에 따라 식중독균 신속미생물검출 방법에 대한 Needs가 높아지고 있다. 현재 미생물 관리를 위하여 널리 사용되는 방법은 항원-항체법, 생화학적 방법, 분자생물학적 방법 등이며 최근에는 실험 시간을 단축하면서 민감도도 높은 분자생물학적 실험방법이 주목을 받고 있다. 그러나 이 실험방법은 실험자의 능숙한 기술이 필요하며 오염도가 낮을 시에 위음성의 결과를 도출할 수 있는 한계점이 있다. 최근 비오메리으에서는 기존 분자생물학적 실험방법의 한계를 극복할 수 있도록 상대적으로 실험방법이 간단하며, 위음성을 줄일 수 있는 높은 특이도와 민감도를 가진 FRET 원리를 이용한 Real-time PCR 장비를 출시하여 소개하고자 한다.

기존 제품의 한계

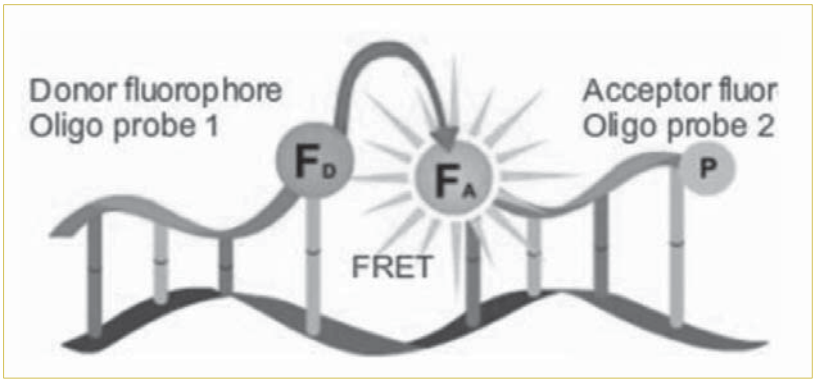
1. 핵산추출의 번거로움

분자생물학적인 방법을 이용하여 식중독균을 검출하기 위해서는 실험 초기단계에서 식품시료 중 핵산추출이 선행되어야 한다. 그러나 핵산추출을 위해서는 별도의 가열과정을 거치거나, 2 종류의 column 및 3~4 가지의 시약들을 사용하여야 하는 번거로움이 있다. 또한 이런 방법들은 식품시료의 특성에 맞게 밸리데이션이 되어 있지 않아 추출이 제대로 이루어지는지 확인할 수 있는 방법이 없었다. 비오메리으는 이러한 문제점을 개선하기 위해 식품 적용으로 밸리데이션 된 핵산추출 키트를 개발하였다. 이 키트로 단 5분만에 핵산추출이 가능하며 기존방법의 제한점인 핵산추출의 번거로움, 교차오염 등을 획기적으로 줄일 수 있게 되었다.

2. Ct값만 의존하는 결과

신속한 검출방법인 Real-time PCR 기법의 결과는 증폭된 유전자가 나타내는 양에 비례한 형광도의 검출로 나타난다. 기존의 Probe 방식은 probe 1개를 사용하여 증폭된 유전자가 나타내는 역치 이상의 형광도가 검출되는 시점 (cycle) 에서의 값 (즉, Ct값 이하 Ct값으로 명명함) 의 유무로 양/음성 결과를 판단한다. 그러나 식중독균 오염 정도가 미미한 시료에 대해서는 Ct값을 나타내기 어려울 수 있기 때문에 이로 인한 위음성의 결과가 발생할 여지가 있다. 이러한 위음성의 결과는 FRET 원리를 이용한 GENE-UP 시스템에서 현저히 줄일 수 있는데, 이는 증폭 후 probe 2개를 사용하여 다시 한번 melt-

peak 분석을 하기 때문이다. 뿐만 아니라 시약성분 내 내부컨트롤 (Internal Control, IC)이 포함되어 있어 각 튜브마다 PCR 반응의 유효성도 확인할 수 있다.



FRET으로 발광되는 probe

GENE-UP System

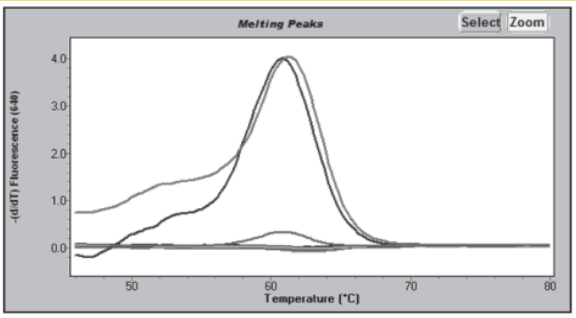
시료 안의 식중독균 유무를 신속하게 판단할 목적으로 널리 사용되고 있는 Real-time PCR 기기의 기존 한계점을 개선하고자 개발된 비오메리으의 GENE-UP system은 핵산추출의 번거로움을 극복하기 위해 GENE-UP® Lysis Kit 를 이용하여 5분만에 핵산추출이 가능하게 하였으며 FRET probe를 사용하여 특이도와 민감도를 높여 더욱 정확한 결과를 얻을 수 있도록 하였다. 핵산추출, 시약, 기기에 대해 각각의 솔루션을 고객이 찾아 시험해야 하는 기존법과 달리 GENE-UP system은 핵산추출부터 유전자 검출까지 total solution을 제공하며, 각 식품 유래 식중독균 검출 프로토콜에 대하여 AOAC, AFNOR 등의 국제 인증을 득하였다.

1. 특이도

1개의 probe만 사용하는 기존 Real-time PCR 기술과 다르게 GENE-UP system은 2개의 probe를 사용한다. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)의 원리로 두 probe 사이에서 에너지를 주고받아 형광이 발생하게 되는데 1개가 아닌 2개의 probe가 모두 target과 알맞게 결합하여야만 검출이 되므로 결과적으로 비 특이적인 결합에 의한 위양성의 결과를 현저히 줄일 수 있다.

2. 민감도

기존 Real-time PCR 분석은 amplification curve의 Ct값으로만 양/음성을 판단한다. 이 경우 시료의 식중독균 오염의 정도가 매우 낮으면 위음성의 결과를 나타낼 가능성이 있다. 그러나 GENE-UP system은 amplification curve 뿐만 아니라 melt-peak의 결과까지 고려하여 분석을 한다. 예를 들어 식중독균 오염의 정도가 매우 낮을 때 amplification curve가 나타나지 않아 음성으로 판독될 가능성이 있는 경우에도 melt-peak 분석을 통하여 재확인 하므로 위음성의 위험을 줄일 수 있다.



Melt-peak 분석

3. 번거로운 핵산추출이 없는 one-stop 방식

핵산추출부터 검출까지의 Total solution을 제공하는 GENE-UP system은 GENE-UP® Lysis Kit 로 간편하고 신속하게 핵산추출이 가능하다. 기존 핵산추출법은 여러 단계의 분주작업 및 원심분리기, heat block, 교반기 등의 장치들을 사용하여야 했다. 그러나 GENE-UP® Lysis Kit 는 beads와 lysis buffer가 이미 들어있는 lysis tube를 사용함에 따라 96 샘플에 대해 상온에서 5분만에 핵산추출을 할 수 있으며 특허 받은 lysis tube는 뚜껑을 여닫을 필요가 없어 교차 오염의 위험도 줄이며 간편하게 핵산추출을 할 수 있도록 한다. 또한 모든 PCR 시약이 상온보관이 가능하여 별도의 해동시간 없이 바로 사용할 수 있기 때문에 편의성이 매우 뛰어나다고 할 수 있다.

4. Parameter

GENE-UP system은 Routine mode에서 국제적으로 인증 받은 GENE-UP PCR kit를 이용하여 아래의 parameter를 실험할 수 있으며, Open mode 소프트웨어를 통해서는 Real-time PCR 조건을 입력하여 고객이 원하는 다양한 시약과 프로토콜을 사용할 수 있다.

- *Salmonella* (SLM)
- *E.coli* O157:H7 (ECO O157:H7)
- *Listeria spp* (LIS)
- *Listeria monocytogenes* (LMO)
- STEC *stx* & *eae* (EH1)
- STEC Top 6 serogroup* (EH2)

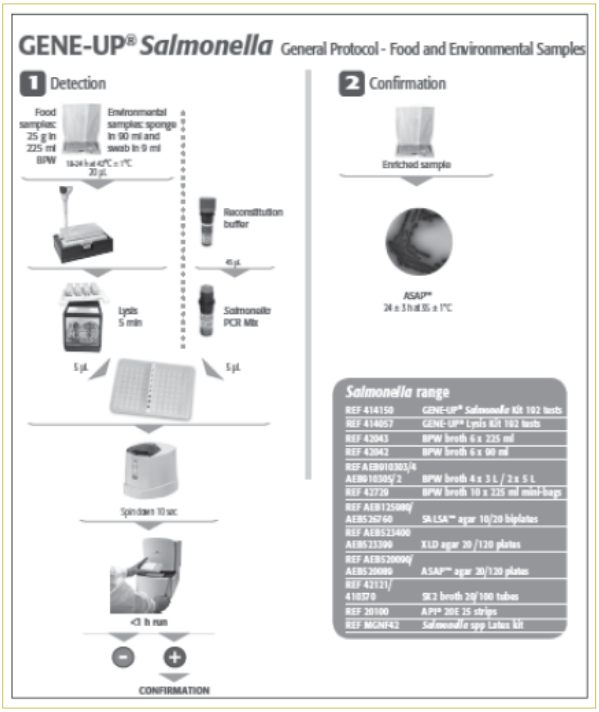
* Top 6 serogroup (O26, O45, O103, O111, O121, O145)

5. 신뢰성

GENE-UP protocol은 ISO 16140에 따른 AFNOR와 AOAC validation 등으로 결과의 정확도와 기존방법과의 상관성에 대한 검증을 받았다.

Solution	분석시간	ISO 16140/ AFNOR	AOAC
Salmonella (SLM)	1시간 >	O	O
E.coli O157:H7 (ECO O157:H7)	1시간 >	O	O
Listeria spp (LIS)	1시간 >	O	O
Listeria monocytogenes (LMO)	1시간 >	O	O
STEC *stx* & *eae* (EH1)	1시간 >		O
STEC Top 6 serogroup* (EH2)	1시간 >		O

6. GENE-UP Protocol (예, *Salmonella*)



결론

GENE-UP system은 식품 및 환경에서의 식중독균 및 병원성미생물 신속검출을 위한 최적화된 솔루션으로 단 하루 만에 주요 병원성 미생물의 존재여부를 확인할 수 있도록 개발되었다. 빠르고 간편하게 핵산을 추출하고 높은 특이도 및 민감도를 가진 결과를 제공하여 기존 Real-time PCR 방법을 식품샘플에 적용할 때의 한계점을 극복하였다. 뿐만 아니라 AFNOR, AOAC 의 국제인증으로 신뢰할 수 있는 결과를 보증할 수 있다. 비오메리으의 GENE-UP 시스템은 식품원료부터 최종제품에 이르기 까지 제품의 안전관리를 보다 정확하게 할 수 있도록 하며 어렵고 생소한 분자생물학적 기술을 쉽게 적용할 수 있도록 하는 최적화된 솔루션이다.

(주)비오메리으코리아 산업체 사업부
Tel. 02-2188-4721