Real-time Food Pathogen Detection : GENE-UP®

안전한 식품 생산 및 품질보증을 위한 Pathogen detection의 중요성

최근 가정식 대체식품(HMR, Home meal replacement)이나 즉석 샐러드 같이 포장재를 제거하고 바로 먹을 수 있는 식품이 시장에서 점점 더 증가하고 있기 때문에, 제조업체들은 신뢰성 있는 제품의 품질관리를 더욱 더 철저히 하게 되고 소비자는 그 제품에 대한 안전을 신뢰하며 구매하고 섭취하게 된다. 하지만 살모넬라나 리스테리아와 같은 Pathogen은 다양한 음식에서 발견될 수 있고 제조나 유통과정 중에 확인되어 제거되지 않으면 소비자들에게 심각한 문제를 일으킬 수 있다. 또한 제조업체는 오염된 제품이 출고되어 문제가 발생한다면 브랜드이미지도 크게 훼손될 수 있으므로 품질에 미치는 영향을 최소화하고 비용이 많이 드는 재고적재 시간을 줄이기 위해 제품을 신속하게 출시해야 한다는 압박을 지속적으로 받고 있다.

때문에 식품산업체에서는 식품의 전 과정에서 발생할 수 있는 위험에 대하여 보다 신속하고 명확하게 Pathogen 오염 여부를 판단하여야 하며 문제 발생 시, 빠르고 정확한 결과를 확인할 수 있는 장비에 대한 Needs가 높아지고 있다. 현재는 Pathogen 관리를 위하여 생화학적 방법, 항원-항체법 및 분자미생물학적 방법 등의 다양한 기술이 사용되고 있으며, 이 중 분자미생물학적 방법은 보다 정확한 결과를 확인할 수 있다고 알려져 있어 식품산업체시장에 널리 사용되고 있다. 이에 비오메리으에서는 FRET의 원리를 이용하여 더욱 높은 특이도와 민감도를 가지고 빠르게 Pathogen 을 검사할 수 있는 real-time PCR 장비인 GENE-UP® 을 소개하고자 한다.

기존 제품의 한계

1. 비효율적인 오류 원인 분석 과정

분자미생물학적인 방법을 이용하여 Pathogen을 분석하기 위해서는 핵산추출부터 유전자 검출까지의 과정이 필요하며 이를 위해서는 Real-time PCR 장비와 시약인 Primer kit가 있어야 한다. 현재 다수의 제조업체들은 장비와 시약을 각기 다른 회사에서 나온 제품으로 사용하고 있어, Pathogen분석과정에서 결과의 오류가 발생하였다면 이를 확인하기 위해 장비와 시약을 공급한 각각의 회사에 이와 관련된 내용으로 논의를 여러 번 진행해야 할 필요도 있을 것이다. 이 때문에 실험의 오류 또는 결과 오류의 원인을 확인하는데 시간이 오래 걸리는 것은 신속하게 결과를 확인하여 제품을 출하하고자 하는 제조업체에게는 부담이 될 것이다.

2. 핵산추출의 번거로움

분자미생물학적인 방법을 이용하여 Pathogen을 분석하기 위해서는 실험 초기단계에서 식품시료 중 핵산추출이 선행되어야 한다. 그러나 핵산추출을 위해서는 별도의 가열장치를 이용하여 boiling을 하거나,

column 및 여러가지의 추출시약들을 사용하여야 하는 번거로움이 있다. 이중 boiling 방법은 다수의 제조업체에서 사용하고 있으나 validation이 되어 있지 않아 핵산추출이 제대로 이루어지는지 확인할 수 있는 방법이 없었다. 이러한 문제점의 개선을 위해 식품 시료를 상온에서 5분만에 핵산추출이 가능하고 그 결과가 validation된 키트가 개발되었다.

3. Ct값만 의존하는 결과

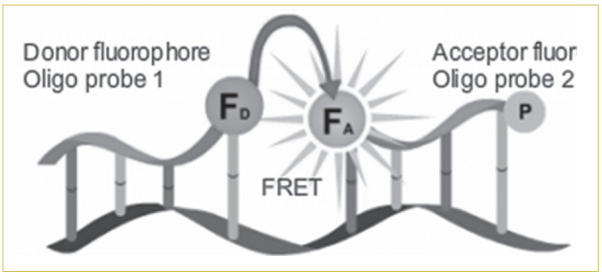
Real-time PCR 기법의 결과는 증폭된 유전자가 나타내는 양에 비례한 형광도의 검출로 나타난다. 기존의 제품들은 probe 1개를 사용하여 증폭된 유전자가 나타내는 역치 이상의 형광도가 검출되는 시점 (cycle) 에서의 값 (즉, Ct값 이하 Ct값으로 명명함) 의 유무로 양/음성 결과를 판단한다. 그러나 Pathogen의 오염 정도가 미미한 시료에 대해서는 Ct값을 나타내기 어려울 수 있기 때문에 이로 인한 위음성의 결과가 발생할 여지가 있다. 이러한 위음성의 결과는 FRET 원리를 이용한 GENE-UP®에서 현저히 줄일 수 있는데, 이는 probe 2개를 사용하여 특이도를 높이고 Ct값 뿐만 아니라 Tm값까지 결과를 나타내기 때문에 가능하며 또한 시약성분 내 내부컨트롤 (Internal Control, IC) 이 포함되어 있어 각 튜브마다 PCR 반응의 유효성도 확인할 수 있다.

왜 GENE-UP® 인가?

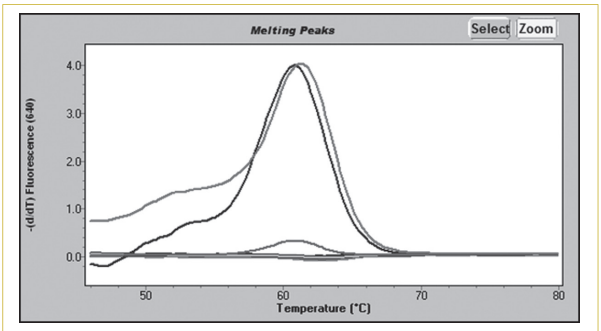
"Bringing confidence to the table" Pathogen 분석 시 신속하게 판단하는 목적으로 널리 사용되고 있는 Real-time PCR 기기의 기존 한계를 개선하여 개발된 비오메리으의 GENE-UP® 은 핵산추출의 번거로움을 극복하기 위해 GENE-UP® Lysis Kit 를 이용하여 5분만에 핵산추출이 가능하게 하였으며 FRET probe를 사용하여 시약의 특이도와 민감도를 높여 더욱 정확한 결과를 얻을 수 있도록 하였다. 핵산추출, 시약, 기기에 대해 각각의 솔루션으로 제공되는 기존법과 달리 GENE-UP® 은 핵산추출부터 유전자 검출까지의 total solution을 제공하며, 각 식품 유래 Pathogen 분석 프로토콜에 대하여 AOAC, AFNOR 등의 국제 인증을 득하였다.

1. 특이도

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



FRET으로 발광되는 probe



Melting peak

2. 민감도

기존 Real-time PCR 분석은 amplification curve의 Ct값으로만 양/음성을 판단한다. 이 경우 시료의 Pathogen 오염의 정도가 매우 낮으면 위음성의 결과를 나타낼 가능성이 있다. 그러나 GENE-UP® 은 amplification curve 뿐만 아니라 melting peak의 결과까지 고려하여 분석을 한다. 예를 들어, Pathogen 오염의 정도가 매우 낮은 경우에 amplification curve가 나타나지 않아 음성으로 표기될 샘플이 있을 때, melting peak의 고유한 Tm값의 결과까지 고려하므로 음성이 아닌 양성으로 결과를 나타낼 수 있다. 즉, 기존의 Ct값만의 분석으로 결과를 나타낼 때보다 더욱 민감한 결과로 위음성의 위험을 줄일 수 있다.

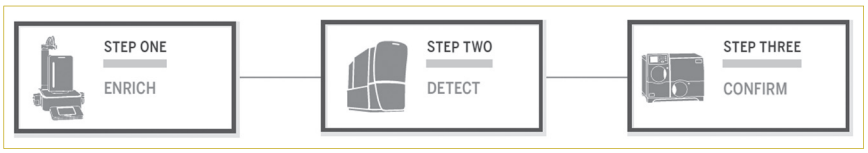
3. 사용 편의성

핵산추출부터 검출까지의 total solution을 제공하는 GENE-UP® 은 GENE-UP® Lysis Kit 로 간편하고 신속하게 핵산추출이 가능하다. 기존 핵산추출법은 여러 가지 시약의 분주 및 가열 시간 등을 필요로 할 뿐만 아니라, 핵산추출 시 튜브의 뚜껑을 여러 번 여닫아야 하는 번거로움이 수반되었다. 그러나 GENE-UP® Lysis Kit 는 기계적인 용해를 위해 beads와 lysis buffer가 이미 들어있는 lysis tube를 사용함에 따라 96 샘플에 대해 상온에서 5분만에 핵산추출을 할 수 있으며 특허받은 lysis tube는 뚜껑을 여닫을 필요 없이 오염의 위험도 줄이며 간편하게 핵산추출을 할 수 있도록 한다. 또한 모든 PCR 시약에 대해 상온보관이 가능하여 별도의 해동시간 없이 바로 사용가능 하기 때문에 편의성이 매우 뛰어나다.

4. Parameter

GENE-UP® 은 Routine mode에서 국제적으로 인증 받은 GENE-UP PCR kit를 이용하여 아래의 parameter를 실험할 수 있으며, Open mode 소프트웨어를 통해 Real-time PCR 조건을 입력하여 homemade 시약과 프로토콜을 사용할 수 있다.

- *Salmonella* spp.(SLM)
- ECO (ECO O157:H7)



Workflow

– *Listeria* spp. (LIS)
– *Listeria monocytogenes* (LMO)
– *Cronobacter* spp.(CRO)
– STEC *stx* & *eae* (EH1)
– STEC Top 6 serogroup* (EH2)

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

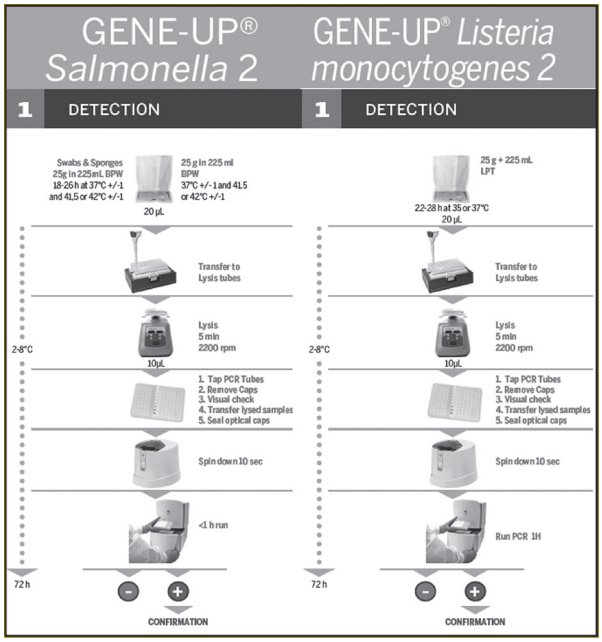
5. 신뢰성

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

Reference	Method	Principle	ISO 16140-2			AOAC RI	AOAC OMA
			Certificate #	Expiration	Version 2016	Certificate #	Certificate #
423105	GENE-UP® *Salmonella* 2	PCR	BIO 12/38-06/16	2020 06	✓	PTM 121802	
423106	GENE-UP® *Listeria* 2		BIO 12/39-09/16	2020 09	✓	PTM 121803	OMA # (new approval) awaiting number
423107	GENE-UP® *Listeria monocytogenes* 2 (including ALOA for confirmation)		BIO 12/40-11/16	2020 11	✓	PTM 121804	OMA # (new approval) awaiting number
423108	GENE-UP® *E coli* O157:H7 2		2015LR59	2021 04	✓	PTM 121805	OMA 2019.03
423109 / 423108 / 414154	GENE-UP® E coli O157:H7 2 GENE-UP® STEC stx & eae 2 GENE-UP® STEC-TOP 6 (Direct Lysis)		2018LR84	2023 12	✓		
423109 / 423108 / 414154 / 30229	GENE-UP® EHEC Series (Immunoconcentration)		2018LR84	2023 12	✓	PTM 121806	
421920	GENE-UP® *Cronobacter* (including ESIA for confirmation)		BIO 12/42-03/18	2022-03	✓	PTM 081801	OMA 2019.01
	Multi dose tests (have been replaced by Unit dose tests)						

(GENE-UP® List of validated methods)

6. GENE-UP® Protocol (예, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*)



결론

GENE-UP® 은 식품 및 환경에서의 Pathogen의 빠른 분석을 위해 최적화된 장비로 단 하루만에 주요 Pathogen 존재여부를 장비에서 확인할 수 있도록 개발된 시스템이다. 기존 Real-time PCR 장비를 이용하여

실험할 때의 한계점을 극복하여 높은 특이도 및 민감도를 제공하며 실험의 편의성 또한 증대시켰다. 뿐만 아니라 AFNOR, AOAC 등의 국제인증으로 신뢰할 수 있는 결과를 보증할 수 있다. 이러한 분자생물학적 실험방법을 이용한 GENE-UP® 으로 산업체에서는 식품의 원료부터 최종산물에 이르는 제품의 안전관리를 보다 손쉽게 진행할 수 있을 것이다.

김혜란
비오메리으