Korean J. Food Sci. An.
Vol. 33, No. 5, pp. 610~616(2013)
DOI http://dx.do.org/10.5851/kosfa.2013.33.5.610

ARTICLE

분유에 오염된 *Cronobacter sakazakii* 검출을 위한 중합효소연쇄반응, 실시간중합효소연쇄반응, 등온검출법의 비교

김영주[1] · 서승우 · 왕효우 · 서동주 · 이민화 · 손나리 · 이복희 · 최창순*
중앙대학교 식품공학부 식품영양학과, [1]중앙대학교 교육대학원 영양교육전공

Comparison of Polymerase Chain Reaction, Real-time Polymerase Chain Reaction, and Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of *Cronobacter sakazakii* in Milk Powder

Young-Joo Kim[1], Sheungwoo Seo, Xiaoyu Wang, Dong Joo Seo, Min Hwa Lee, Na Ry Son, Bog-Hieu Lee, and Changsun Choi*
School of Food Science and Technology, Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea
[1]Department of Nutrition Education, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

Abstract

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is an emerging detection technology for the amplification of DNA under isothermal conditions. The aim of this study was to develop a rapid and reliable LAMP technique for the detection of *Cronobacter sakazakii* in milk powder. In order to enhance the sensitivity and specificity, LAMP primers targeting outer membrane protein A (*ompA*) gene of *C. sakazakii* were designed using Explorer V4 software. Thirty seven *C. sakazakii* strains and 13 pathogenic microorganisms were used for comparative detection of *C. sakazakii* using polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, and LAMP. LAMP developed in this study could specifically detect *C. sakazakii* strains without cross-reactivity with other foodborne pathogens. LAMP products amplified from *ompA* gene of *C. sakazakii* were digested with with *Hha*I and *Nru*I enzyme. The specificity of LAMP was confirmed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. LAMP could detect *C. sakazakii* within 1 h without bacterial culture and its detection limit was as low as 1 CFU/mL *C. sakazakii* in milk. In the comparison of the sensitivity, LAMP showed 10,000- and 100-times higher detection limit than PCR or real-time PCR, respectively. Therefore, this study can conclude that LAMP is a rapid and reliable detection technique for *C. sakazakii* contaminated in powdered milk.

Key words: loop-mediated isothermal amplification (LAMP), *Cronobacter sakazakii, ompA,* specificity, sensitivity

서 론

*Cronobacter sakazakii*는 Enterobacteriaceae과 속하는 그람 음성 간균이며, 포자를 형성하지 않는 통성혐기성 균이다(Friedemann, 2007). 1980년 *Enterobacter sakazakii*라고 명명되었으나, 2008년에 *Cronobacter* species로 재분류되면서 *C. sakazakii*로 학명이 변경되었다(Iversen *et al*., 2008). 현재 알려진 *Cronobacter* spp.는 *C. sakazakii, Cronobacter dublinensis, Cronobacter malonaticus, Cronobacter muytjensii, Cronobacter turicensis*이다(Iversen *et al.,* 2008).

*C. sakazakii*는 모든 연령대에서 질환을 일으킬 수 있으나, 특히 생후 1개월 이하의 신생아, 조산아, 저체중아 등의 영유아에게 수막염, 패혈증, 신생아 괴사성 장염과 같은 증상을 일으키는 매우 위험한 급성 기회 감염균이다(Arad *et al.,* 2001; Farmer *et al.,* 1980; Guillaume-Gentil, 2005). 현재까지 집계된 바에 의하면, *C. sakazakii*의 발생율은 낮으나 *C. sakazakii*에 감염된 영유아의 치사율은 33-80% 이상으로 매우 치명적이다(Guillaume-Gentil, 2005). 1958년 영국에서 처음으로 *C. sakazakii* 감염에 의해 2명의 신생아가 뇌수막염으로 사망한 사례를 보고한 이후 2003년까지 발생한 76건의 *C. sakazakii* 식중독으로 19명이 사망하였다(Iversen and Forsythe, 2003).

*Corresponding author: Changsun Choi, Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea. Tel: 82-31-670-4589, Fax: 82-31-676-8741, E-mail: cchoi@cau.ac.kr

*C. sakazakii*균의 기존 검출법은 세균배양, 생화학적 검사, 혈청학적 분석이 있지만 이러한 방법들은 시간이 많이 소요되고 정확하지 않다는 문제점이 있다(Derzelle *et al.,* 2007). 미국 Food and Drug Administration(U.S. FDA)는 *C. sakazakii*의 검출법으로 세균분리 배양법, polymerase chain reaction(PCR), real-time PCR 방법을 추천하였다. 시간이 많이 소요되며 민감도가 낮은 세균분리 배양법에 비하여 PCR은 민감도와 특이도가 좋으나 DNA를 확인하기 위해 전기영동과정과 전문적인 기술자가 필요하기 때문에 보편적으로 사용하기 어려운 단점이 있다(Orlandi and Lampel, 2000). Real-time PCR은 PCR보다 민감도가 높고 DNA 증폭 정도를 실시간으로 확인이 가능하고 전기영동과정 없이 형광물질을 이용하여 신속하고 정확하게 확인할 수 있지만 그 과정이 정교하고 복잡하며 고가의 장비가 필요하다는 단점이 있다(Liu *et al*. 2006; Yamazaki *et al.,* 2008).

최근에는 등온 조건 하에서 민감하고 빠르게 DNA를 증폭할 수 있는 등온증폭법(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)이 개발되었다(Notomi *et al.,* 2000). LAMP 검출법은 표적 유전자를 증폭한다는 점에서는 PCR과 유사하지만, 일정한 온도에서 온도변화 없이 특정 유전자의 증폭이 가능하기 때문에 반응시간을 단축할 수 있다. LAMP는 DNA가닥의 변성반응을 위해 등온조건 하에서 *Bst* DNA polymerase와 표적 DNA의 특정 염기서열을 바탕으로 특이적으로 디자인된 4개 혹은 6개의 primer와 몇 가지 간단한 장비만으로 표적 유전자를 다량 증폭할 수 있다(Notomi *et al.,* 2000). 이러한 LAMP기법은 *Campylobacter jejuni, Campylobacter coli*, *Mycobacterium avium, Yersinia pseudotuberculosis, Mycoplasma pneumoniae, Porphyromonas gingivalis*와 같은 병원성 미생물의 신속검출 기술로 활용되고 있어 식중독 병원체의 조기검출 예방에 활용할 수 있을 것으로 생각되고 있다(Enosawa *et al.,* 2003; Saito *et al.,* 2005; Yamazaki *et al.,* 2008; Yoshida *et al.,* 2005).

따라서 본 연구에서는 *C. sakazakii*를 특이적으로 증폭할 수 있는 LAMP 기술을 개발하고, *C. sakazakii*가 오염된 조제분유에서 PCR, real-time PCR, LAMP 검출법의 민감도와 특이도를 비교함으로써 현장적용성을 평가하였다.

재료 및 방법

공시균주

*C. sakazakii*의 LAMP 검출법 개발을 위하여 *C. sakazakii* ATCC 29004, *C. sakazakii* ATCC 29544 2개의 표준균주를 사용하였다. 또한, 본 연구에서 개발한 *C. sakazakii* LAMP 검출법의 특이도 검사를 위해 식품으로부터 분리한 35개의 *C. sakazakii* 균주를 중앙대학교 식품영양학과 식품미생물 연구실에서 제공받았으며, *Arcobacter buzleri* ATCC 49616, *Bacillus cereus* ATCC 13061, *B. cereus* ATCC 10876, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43890, *E. coli* O157:H7 ATCC 43889, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *L. monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella* Typhimurium ATCC 43174, *Salmonella* Enteritidis ATCC 43076, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *S. aureus* ATCC 10768, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 4664, *V. parahaemolyticus* ATCC 43996을 American Type Culture Collection(ATCC; USA)에서 구매하여 음성대조군으로 사용하였다. *C. sakazakii*균주는 Brilliance™ Enterobacter Sakazakii Agar(Oxoid, UK)에서 37ºC 조건으로 24시간 1차 배양하여 단일 집락을 선택하였으며 Tryptic Soy Broth(TSB; Difco, Becton Dickinson, USA)에서 1차 배양과 동일한 조건으로 2차 배양하여 DNA 추출에 사용하였다. *A. buzler*는 Arcobacter Selective Broth (Oxoid)에 1.2% Agar Technical(Oxoid)을 첨가하여 사용하였으며 *B. cereus*는 Tryptic Soy Agar(Oxoid), *E. coli* O157:H7은 Sorbitol McConkey Agar(Oxoid), *L. monocytogenes*는 Listeria Selective Agar Base(Oxoid), *Salmonella* spp.는 Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone Agar(Oxoid), *S. aureus*는 Baird-Parker Agar(Oxoid), *V. parahaemolyticus*는 2% NaCl이 함유된 TSA에 각각 1차 배양하여 단일 집락을 선택하였으며, TSB에 2차 배양한 후 DNA 추출에 사용하였다.

DNA 추출

2차 배양이 끝난 37개의 *C. sakazakii*와 13개의 음성 대조군 균주를 각각 1.5 mL 튜브에 옮겨 담고 100ºC 끓는 물에 10분간 중탕한 후 ice에서 냉각시켰다. 8,000 rpm에 2분간 원심 분리하여 상층액을 새로운 1.5 mL 튜브에 옮겨 담았으며, 이것을 각 균주의 DNA로 사용하였다.

*C. sakazakii*의 LAMP 검출법 개발

LAMP 검출법 개발을 위한 표적 유전자로는 *C. sakazakii*의 병원성과 상관성이 잘 알려진 outer membrane protein A(*ompA*) gene(Genbank accession number: GQ845410)을 표적유전자로 선정하였다. LAMP 프라이머 디자인에는 Explorer V4 software(Fujitsu System Solution)를 이용하였으며, *C. sakazakii ompA* gene을 증폭할 수 있는 LAMP 프라이머 후보군을 다수 확보한 후 예비연구에서 비특이 반응이 없는 최적의 프라이머를 선정하여 본 연구에서 사용하였다(Table 2).

LAMP 검출법을 수행하기 위해 1× reaction buffer (New England BioLabs, USA), 20 mM dNTP, *Bst* polymerase 8 U, inner primer인 FIP와 BIP를 각각 40 pmol, outer primer인 F3와 B3을 각각 20 pmol, template DNA 2 μL로 반응혼합액을 구성한 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated distilled water로 최종 용량을 25 μL로 맞추었다. 이 혼합액은 MJ MINI Personal Thermal Cycler(Bio-Rad, USA)로 64ºC에서 60분, 80ºC에서 10분간 반응시켰다. LAMP product

Table 1. Comparison of PCR and LAMP detection in the reference bacterial stains used in the study

No.	Original ID		LAMP	PCR	No.	Original ID		LAMP	PCR
1	*C. sakazakii* 1	FDA	+	+	26	*C. sakazakii* FSM 292	FDA	+	+
2	*C. sakazakii* 2	FDA	+	+	27	*C. sakazakii* FSM 293	FDA	+	+
3	*C. sakazakii* 3	FDA	+	+	28	*C. sakazakii* FSM 294	FDA	+	+
4	*C. sakazakii* 5	FDA	+	+	29	*C. sakazakii* FSM 295	FDA	+	+
5	*C. sakazakii* 6	FDA	+	+	30	*C. sakazakii* FSM 297	FDA	+	+
6	*C. sakazakii* 2.40	FDA	+	+	31	*C. sakazakii* FSM 298	FDA	+	+
7	*C. sakazakii* 2.44	FDA	+	+	32	*C. sakazakii* FSM 299	FDA	+	+
8	*C. sakazakii* 2.46	FDA	+	+	33	*C. sakazakii* FSM 300	FDA	+	+
9	*C. sakazakii* 2.47	FDA	+	+	34	*C. sakazakii* FSM 302	FDA	+	+
10	*C. sakazakii* 2.80	FDA	+	+	35	*C. sakazakii* FSM 303	FDA	+	+
11	*C. sakazakii* 2.81	FDA	+	+	36	*C. sakazakii* 29004	ATCC	+	+
12	*C. sakazakii* 2.82	FDA	+	+	37	*C. sakazakii* 29544	ATCC	+	+
13	*C. sakazakii* 2.83	FDA	+	+	38	*A. butzleri* 49616	ATCC	–	–
14	*C. sakazakii* 2.84	FDA	+	+	39	*B. cereus* 10876	ATCC	–	–
15	*C. sakazakii* 279-1	FDA	+	+	40	*B. cereus* 13061	ATCC	–	–
16	*C. sakazakii* FSM 262	FDA	+	+	41	*E. coli* O157:H7 43889	ATCC	–	–
17	*C. sakazakii* FSM 265	FDA	+	+	42	*E. coli* O157:H7 43890	ATCC	–	–
18	*C. sakazakii* FSM 270	FDA	+	+	43	*L. monocytogenes* 15313	ATCC	–	–
19	*C. sakazakii* FSM 271	FDA	+	+	44	*L. monocytogenes* 19114	ATCC	–	–
20	*C. sakazakii* FSM 272	FDA	+	+	45	*S. Enteritidis* 13076	ATCC	–	–
21	*C. sakazakii* FSM 273	FDA	+	+	46	*S. Typhimurium* 43971	ATCC	–	–
22	*C. sakazakii* FSM 274	FDA	+	+	47	*S. aureus* 10768	KCCM	–	–
23	*C. sakazakii* FSM 275	FDA	+	+	48	*S. aureus* 12600	ATCC	–	–
24	*C. sakazakii* FSM 287	FDA	+	+	49	*V. parahaemolyticus* 43996	ATCC	–	–
25	*C. sakazakii* FSM 290	FDA	+	+	50	*V. parahaemolyticus* 4664	KACC	–	–

Table 2. Oligonucleotide sequences of PCR, real-time PCR, and LAMP for the detection of *C. sakazakii* outer membrane protein A (*ompA*) gene

	Primer	Oligonucleotide sequence	Reference
LAMP	F3	5'-CCC GGT GAA GGA TTT AAC CG-3'	In this study
	B3	5'-CGT CGT TAG GGA TAA AGC CG-3'	
	BIP	5'-CAG GCC GCA CCG AAA GAT AAC AAT CGT GGA ACT GGG ACC A-3'	
	FIP	5'-TGC AAT CGC GAT AGC CGT CTT TCA AGG AAA AGC GCA TGG C-3'	
Real-time PCR	Forward	5'-CCG GAA CAA GCT GAA AAT TGA-3'	Liu *et al.,* 2006
	Reverse	5'-TCT TCG TGC TGC GAG TTT G-3'	
	Probe	FAM-5'-ACT CTG ACA CAC CGC GCA TTC CTG-3'-TAMRA	

는 1% agarose gel을 사용하여 전기영동을 실시하였으며, Launch DocIT LS (UVP Advanced BioImaging Software version. 5.5.5a, UK)로 분석하였다.

LAMP 검출법의 특이도 검사

PCR에 의하여 얻어지는 DNA 산물과 달리 LAMP 검출법은 연속적인 DNA 증폭산물을 생산하므로 전기영동을 실시하는 경우 사다리(ladder-like)와 같은 유형으로 나타난다. 이러한 DNA 증폭산물의 특이도 검정을 위해서 증폭부위에 존재하는 특이염기서열을 GeneCutter (DNASTAR)로 확인하였다. *C. sakazakii ompA* 증폭산물의 염기서열 분석에서 확인된 부위를 *Hha*I과 *Nru*I을 사용하여 restriction fragment length polymorphism(RFLP)을 수행하여 특이도 검정을 하였다. RFLP는 1× reaction buffer, 10 U *Nru*I 또는 *Hha*I, 2 μg의 Bovine serum albumin(BSA), 4 μL의 LAMP product DNA로 반응 혼합액을 구성한 후 DEPC-treated distilled water를 이용하여 최종 반응 용량을 20 μL로 맞추었다. RFLP는 37ºC 조건에서 2시간 반응시키고, 65ºC에서 25분간 반응시켜 효소를 불활성화하였다. 결과는 전기영동 후 Launch DocIT LS로 분석하였다.

양성 대조군과 음성 대조군에 대한 *C. sakazakii* LAMP 검출법의 특이도를 검증하기 위하여 표준균주를 포함한 37개의 *C. sakazakii*와 13개의 병원성 미생물에 대하여 LAMP 및 PCR을 실시하였다. LAMP 검출법은 본 연구에서 개발한 *C. sakazakii* LAMP 검출법을 사용하였으며 PCR은 다음과 같이 수행하였다. PCR mixture는 1× reaction buffer (Bioneer, Daejeon, Korea), 20 mM dNTP, *Top* polymerase 1 U, template DNA 2 μL와 forward, reverse primer를 각각 20 pmol씩 포함하였으며, LAMP 검출법 개발을 위하여 제작된 outer primer인 F3와 B3를 PCR primer로써 사용하였

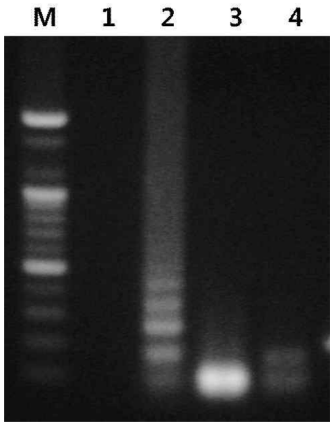

Fig. 1. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of LAMP DNA products using *Hha*I and *Nru*I restriction enzyme. M: 100-bp DNA ladder, Lane 1: Negative control, Lane 2: *C. sakazakii* LAMP product. Lane 3: Digestion of *C. sakazakii* LAMP product with *Hha*I restriction enzyme, Lane 4: Digestion of *C. sakazakii* LAMP product with *Nru*I restriction enzyme.

다(Table 2). PCR 반응은 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후 94°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 30초를 1 cycle로 하여 총 35 cycle로 반응시킨 후 72°C에서 5분간 더 진행시켰다. PCR product는 1% agarose gel를 이용하여 전기영동을 실시하고 Launch DocIT LS로 분석하였다.

LAMP, PCR, real-time PCR의 분유 내 *C. sakazakii* 검출 민감도 비교

실제 조제분유나 powder형 식품에서 *C. sakazakii*균의 검출 가능성을 확인하기 위해 시판 중인 조제분유를 구입하여 검출 민감도 실험을 실시하였다. 접종원은 표준균주인 *C. sakazakii* ATCC 29004로 brain heart infusion broth에 24시간 배양하고, 균수를 측정하여 접종액으로 준비하였다. 조제분유는 0.1% bacteriological peptone water(PW)로 20% 분유액을 만들었으며, 10 mL의 분유액에 *C. sakazakii* ATCC 29004를 7 Log, 6 Log, 5 Log, 4 Log, 3 Log, 2 Log, 1 Log, 0 Log, -1 Log CFU/mL 수준으로 각각 인위 오염시켰다. *C. sakazakii*가 인위 접종된 샘플의 DNA는 Genomic DNA Extraction kit(Bioneer)를 사용하여 추출하였으며, LAMP, PCR, real-time PCR을 각각 실시하여 *C. sakazakii*의 검출 민감도를 비교분석 하였다.

LAMP 및 PCR법은 *C. sakazakii*의 특이도 검사와 동일하게 진행하였으며, real-time PCR은 Liu 등(2006)이 선행연구에서 보고한 TaqMan probe법을 이용하여 검출민감도를 비교하였다. 1× premix Ex *Taq*(Takara Biotech, China), *C. sakazakii* 16S-23S internal transcribed spacer(ITS)를 표적유전자로 증폭하는 forward와 reverse primer를 각각 5 μM, probe 10 μM, template DNA 2 μL로 반응 혼합액을 구성한 후 DEPC-treated distilled water를 이용하여 반응 용량을 25 μL로 맞추었다. Thermal Cycler Dice Real Time System(Takara, Japan)을 이용하여 95°C에서 10초, 55°C에서 20초, 72°C에서 15초간 총 45 cycle로 PCR을 수행하였다(Liu *et al.,* 2006).

결과 및 고찰

LAMP 검출법의 특이도

37개의 *C. sakazakii*균주와 13개의 음성지표균인 병원성 미생물을 사용하여 LAMP 검출법과 PCR법의 특이도를 검증한 결과, LAMP 검출법 및 PCR법 모두 37개의 *C. sakazakii*균주에 대해서는 양성반응을 보였으며 음성지표균에 대해서는 모두 음성반응을 보였다(Table 1 and Fig. 2). 본

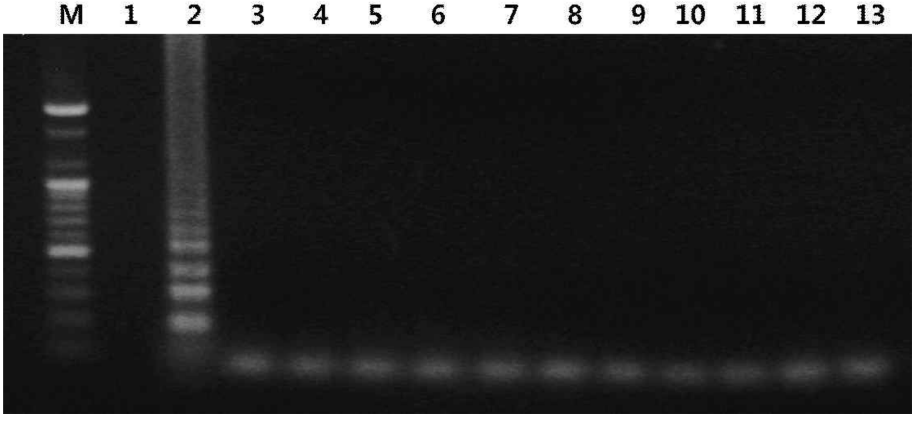

Fig. 2. Specificity of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of *C. sakazakii* using reference strains. M: 100-bp DNA ladder, Lane 1: negative control, Lane 2: *Cronobacter sakazakii* ATCC 29004, Lane 3: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, Lane 4: *Salmonella* Typhimurium ATCC 43971, Lane 5: *Arcobacter butzleri* ATCC 49616, Lane 6: *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, Lane 7: *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, Lane 8: *Vibrio parahaemolyticus* KCCM 4664, Lane 9: *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 43996, Lane 10: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43889, Lane 11: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43890, Lane 12: *Bacillus cereus* ATCC 13061, Lane 13: *Staphylococcus aureus* ATCC 12600.

연구에서 얻어진 LAMP product를 GC GC 염기서열을 특이적으로 절단하는 제한효소 *Hha*I으로 반응시킨 결과, 2개의 cutting site가 존재하여 66 bp, 90 bp, 24 bp 3개 분절로 관찰되었다. 또한 TCG CGA, AGC GCT 염기서열을 특이적으로 절단하는 제한효소 *Nru*I으로 반응시킨 결과, 한 개의 cutting site가 존재하여 각각 164 bp, 79 bp 2개 분절로 관찰되었다. 이와 같이 LAMP products에 대한 RFLP 결과로 *C. sakazakii* LAMP 검출법에 의해 증폭된 DNA가 *C. sakazakii*-specific *ompA*임이 확인되었다(Fig. 1).

본 연구에서 표적유전자로 선정한 *C. sakazakii*의 *ompA*는 유전자 염기서열의 변이가 적고, 종 특이적인 특징이 있어 선행연구에서 개발한 PCR 또는 real time PCR 개발에 사용되었다(Ye *et al.*, 2009). *ompA* 유전자에 의하여 합성되는 outer membrane protein A는 그람 음성 장내세균의 세포 외막에 존재하는 단백질로 N-말단에 β-barrel 도메인을 가지며 C-말단은 α-helix구조로 양친매성 구조를 가지고 있다(Alex and Georg, 1998; Singh *et al*., 2003). *E. coli*나 *S.* Typhimurium과 같은 그람 음성 장내세균과 같이 *C. sakazakii*균의 outer membrane protein A도 인간의 소장 상피세포에 침입과 병원성에 관여한다고 보고되어 있다(Mohan Nair and Venkitanarayanan, 2007; Singh *et al*., 2003). 또한 *C. sakazakii*의 outer membrane protein A는 병원성을 가진 박테리오파지나 박테리오신의 수용체로 작용하고, 대식세포의 세포자살(apoptosis)을 막아 면역계로 침투하는 기능이 알려져 있다(Alex and Georg, 1998; Singh *et al*., 2003).

LAMP 검출법에 의한 분유 내 *C. sakazakii* 검출 민감도

LAMP 검출법에 의한 분유에 접종된 *C. sakazakii*의 검출한계는 1 CFU/mL이었다(Fig. 3). 반면, PCR법에 의한 검출한계는 10^4 CFU/mL이었으며, real-time PCR법에 의한 검출한계는 10^2 CFU/mL이었다. 이를 통해 본 연구에서 개발한 *C. sakazakii* LAMP 검출법이 PCR에 비해 민감도가 10,000배, real-time PCR에 비해 100배 높은 것을 확인하였다.

LAMP 검출법에 사용되는 *Bst* DNA polymerase는 5'→3' exonuclease 부분이 결핍되어있어 유전자의 여러 구역에서 primer를 동시에 사용하더라도 inner primer가 outer primer에 방해 받지 않고 증폭이 가능하다. 따라서 LAMP 검출법은 4개 혹은 6개의 primer로 원하는 유전자를 신속하게 검출할 수 있으며 결과에 있어서 PCR에 비하여 높은 특이도를 가진다(Nagamine *et al.,* 2002). 최근 연구보고에 따르면 LAMP 검출법은 형광물질을 이용하거나 pyrophosphate 이온에 의한 magnesium pyrophosphate의 백색 침전물의 혼탁도를 이용하여 시각적인 판단을 할 수 있기 때문에 전기영동 과정이 생략할 수 있다(Hara-Kudo *et al.,* 2005; Mori *et al.,* 2001). 또한 유전자 증폭 반응이 60-65°C의 등온 조건 하에 수행되기 때문에 고가의 장비가 필요 없이 항온수조와 같은 장비만 있으면 분석이 가능하다는 장점이 있다(Hara-Kudo *et al.,* 2007).

Ye 등(2009)은 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS), *ompA* gene, α-1,4-glucosidase gene(*gluA*) 세 가지 유전자를 검출할 수 있는 PCR로 243개의 조제분유의 *C. sakazakii* 오염도를 조사하였고, 그 결과 *ompA* gene에 대한 PCR이 민감도와 특이도가 가장 높은 것으로 보고하였다. Liu 등(2009)은 ITS를 타겟으로 디자인된 4개의 primer를 사용하여 LAMP를 수행하였으며 분유에 오염된 *C. sakazakii*를 10^1 CFU/mL 수준까지 검출하였다고 보고하였다(Liu *et al.,* 2009). 본 연구에서 개발한 *C. sakazakii* LAMP 검출법

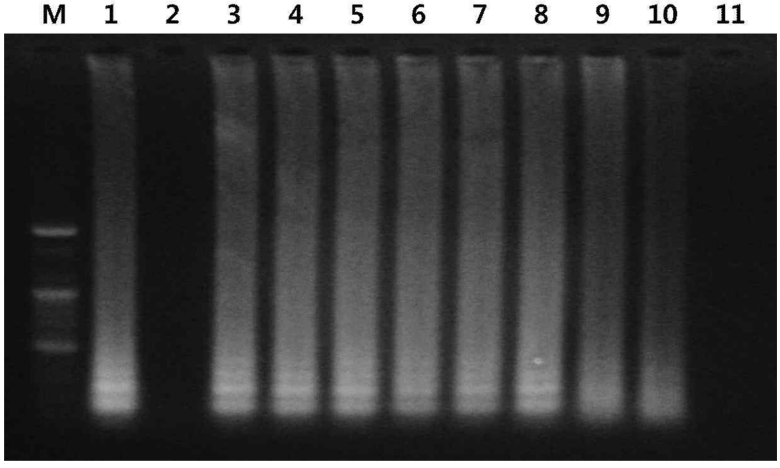

Fig. 3. Sensitivity of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of *C. sakazakii* in milk powder. M: 100-bp DNA ladder, Lane 1: positive control, Lane 2: negative control, Lane 3: 7 Log_{10} CFU/mL *C. sakazakii* in milk powder, Lane 4: 6 Log_{10} CFU/mL *C. sakazakii* in milk powder, Lane 5: 5 Log_{10} CFU/mL *C. sakazakii* in milk powder, Lane 6: 4 Log_{10} CFU/mL *C. sakazakii* in milk powder, Lane 7: 3 Log_{10} CFU/mL *C. sakazakii* in milk powder, Lane 8: 2 Log_{10} CFU/mL *C. sakazakii* in milk powder, Lane 9: 1 Log_{10} CFU/mL *C. sakazakii* in milk powder, Lane 10: 0 Log_{10} CFU/mL *C. sakazakii* in milk powder, Lane 11: -1 Log_{10} CFU/mL *C. sakazakii* in milk powder.

은 10^0 CFU/g까지 검출되어 Liu 등의 연구에 비해 더 높은 민감도를 나타내었다. Hu 등(2009)은 *C. sakazakii* 16S-23S rRNA gene를 증폭할 수 있는 LAMP 검출법을 개발하고, 조제분유에 인위적으로 오염된 *C. sakazakii*를 검출하였다. Hu 등(2009)은 PCR의 검출한계가 10^3 CFU/mL인 데 반하여, LAMP법의 검출한계는 1.1 CFU/mL로 민감도가 1,000배 높은 것으로 보고하였다. Hu 등(2009)의 선행연구는 본 연구에서 개발한 LAMP 검출법의 검출한계인 10^0 CFU/g과 동등한 수준이었으나, 16S-23S rRNA gene은 *Cronobacter* species와 *Enterobacter* species 간의 상동성이 높아 특이도와 민감도가 떨어지는 제한점이 있었다. 이와 대조적으로 본 연구는 *C. sakazakii* 특이도가 높은 *ompA* gene을 표적으로 선정하여 민감도와 특이도가 높은 LAMP 검출법을 개발하였다는 장점이 있다.

본 연구에서 개발한 *C. sakazakii* LAMP 검출법은 민감도와 특이도가 높을 뿐만 아니라 분유에 오염된 병원체 검출에도 적용이 가능하였다. 특히 1시간 이내 오염된 병원체의 유전자를 증폭할 수 있는 LAMP 검출법은 *C. sakazakii*를 포함하여 병원성 미생물에 의한 식중독 사고 발생 시 신속하고 쉽게 원인체를 규명할 수 있는 현장적용이 용이한 효과적인 도구로 사용될 것으로 기대된다.

요 약

본 연구에서는 영유아에게 치명적인 감염을 일으키는 *C. sakazakii*에 대하여 LAMP 검출법을 개발하였다. LAMP법에 의한 *C. sakazakii*의 검출율은 100%였으며 13개의 음성 지표군에 대해서는 모두 음성 반응을 보여 특이도가 매우 높은 것으로 판단되었다. 또한, *Hha*I과 *Nru*I 두 개의 제한효소를 LAMP product에 반응시킨 결과, 유전자의 특정 염기서열이 절단되는 것을 확인하였으며, 이를 통해 LAMP 검출법에 의해 증폭된 DNA가 *C. sakazakii*-specific *ompA* 임을 확인하였다. 조제분유에 오염 된 *C. sakazakii*를 LAMP법으로 검출 시 검출한계는 10^0 CFU/mL이었으며 이는 기존의 PCR법이나 real-time PCR법에 비해 100-10,000배 높은 수준으로 민감도가 매우 높은 것으로 판단되었다. 이와 같이 높은 특이도와 민감도를 가진 LAMP 검출법은 *C. sakazakii*와 같은 급성 기회 감염균이나 병원성 미생물에 의한 식중독 발생시 현장에서 병원체를 간편하고 신속하게 검출할 수 있는 기술로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림수산식품기술기획평가원 수산실용화연구사업(#112089-3) 지원에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. Alex, P. and Georg, E. S. (1998) Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1013-1017.
2. Arad, I., Baras, M., Gofin, R., Bar-Oz, B., and Peleg, O. (2001) Does parity affect the neonatal outcome of very low birth weight infants. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **94**, 283-288.
3. Derzelle, S., Dilasser, F., Maladen, V., Soudrie, N., Leclercq, A., Lombard, B., and Lafarge, V. (2007) Comparison of three chromogenic media and evaluation of two molecular-based identification systems for the detection of *Enterobacter sakazakii* from environmental samples from infant formulae factories. *J. Food Prot.* **70**, 1678-1684.
4. Enosawa, M., Kageyama, S., Sawai, K., Watanabe, K., Notomi, T., Onoe, S., Mori, Y., and Yokomizo, Y. (2003) Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4359-4365.
5. Farmer, J. J., Asbury, M. A., Hickman, F. W., and Brenner, D. J. (1980) *Enterobacter sakazakii*: A new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 569-584.
6. Friedemann, M. (2007) *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int. J. Food Microbiol.* **116**, 1-10.
7. Guillaume-Gentil, O., Sonnard, V., Kandhai, M. C., Marugg, J. D., and Joosten, H. (2005) A Simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J. Food Prot.* **68**, 64-69.
8. Hara-Kudo, Y., Nemoto, J., Ohtsuka, K., Segawa, Y., Takatori, K., Kojima, T., and Ikedo, M. (2007) Sensitive and rapid detection of vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Med. Microbiol.* **56**, 398-406.
9. Hara-Kudo, Y., Yoshino, M., Kojima, T., and Ikedo, M. (2005) Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**, 155-161.
10. Hu, L., Zhang, W., Zhang, X., Yuan, Y., Zhang, Y., Zhang, H., Ma, X., and Su, X. (2009) Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* **49**, 378-382.
11. Iversen, C. and Forsythe, S. J. (2003) Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Tech.* **14**, 443-454.
12. Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B. D., and Lehner, A. (2008) *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus sp*. nov., *Cronobacter turicensis sp*. nov., *Cronobacter muytjensii sp*. nov., *Cronobacter dublinensis sp.* nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and

Cronobacter dublinensis subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1442-1447.
13. Liu, C., Zheng, W., Zhang, H., Hou, Y., and Liu, Y. (2009) Sensitive and rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula by loop-mediated isothermal amplification method. *J. Food Safety* **29**, 83-94.
14. Liu, Y., Cai, X., Zhang, X., Gao, Q., Yang, X., Zheng, Z., Luo, M., and Huang, X. (2006) Real time PCR using TaqMan and SYBR Green for detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Microbiol. Meth.* **65**, 21-31.
15. Mohan Nair, M. K. and Venkitanarayanan, K. (2007) Role of bacterial *OmpA* and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. *Pediatr. Res.* **62**, 664-669.
16. Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., and Notomi, T. (2001) Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 150-154.
17. Nagamine, K., Hase, T., and Notomi, T. (2002) Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probe.* **16**, 223-229.
18. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, E63.
19. Orlandi, P. A., and Lampel, K. L. (2000) Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic *protozoa*. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2271-2277.
20. Saito, R., Misawa, Y., Moriya, K., Koike, K., Ubukata, K., and Okamura, N. (2005) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.* **54**, 1037-1041.
21. Singh, S. P., Williams, Y. U., Miller, S., and Nikaido, H. (2003) The C-terminal domain of *Salmonella enterica serovar typhimurium ompA* is an immunodominant antigen in mice but appears to be only partially exposed on the bacterial cell surface. *Infect. Immun.* **71**, 3937-3946.
22. Yamazaki, W., Taguchi, M., Ishibashi, M., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N., and Inoue, K. (2008) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Med. Microbiol.* **57**, 444-451.
23. Ye, Y., Wu, Q., Yao, L., Dong, X., Wu, K., and Zhang, J. (2009) A comparison of polymerase chain reaction and international organization for standardization methods for determination of *Enterobacter sakazakii* contamination of infant formulas from Chinese mainland markets. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**, 1229-1234.
24. Yoshida, A., Nagashima, S., Ansai, T., Tachibana, M., Kato, H., Watari, H., Notomi, T., and Takehara, T. (2005) Loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2418-2424.

(Received 2013.4.26/Revised 2013.8.17/Accepted 2013.8.22)