

사료검정기관에서 PCR의 활용



곽 성 식
본회 사료기술연구소
연구원

사료검정기관에서 사료를 분석하는데 있어 분자생물학적 테크닉이 점차 중요한 역할을 하고 있다. 분석화학적 방법, 배양법, 생화학적 방법, 면역학적 방법과 같은 전통적인 방법이 여전히 널리 사용되고 있지만 최근 몇 년 사이 중합효소연쇄반응(이하 PCR)을 필두로 하는 분자생물학적 방법이 전통적인 분석법을 대체할 수 있는 분석법으로 사용되고 있다. PCR법의 장점으로서는 신속성, 높은 특이성(specificity)과 민감성(sensitivity)을 들 수 있다. 가공과정에서 고도의 변성이 일어난 사료의 경우 단백질을 분석하는 방법으로는 검출할 수 없지만 DNA를 기반으로 하는 PCR의 경우 단지 몇 copy만 있으면 검출이 가능하다.

살모넬라 같은 병원성 미생물 검출에 있어서 PCR을 기반으로 하는 분자생물학적 방법은 보통 초기에 스크리닝 용도로 사용한다. 이후 전통적인 배양법으로 보완해서 신뢰할 수 있는 결과를 얻을 수 있을 것이다. 오랜 시간이 걸리는 전통적인 배양법을

PCR법이 완전히 대체할 수는 없지만 다양한 사료 분석에 있어서 초기에 스크리닝 용도로 자리를 잡아가고 있다. 본 고에서는 살모넬라와 같은 병원성 미생물 검사, BSE와 관련된 동물종 검사에 대한 PCR활용방안에 대해 정리하였으며, GMO검출과 관련한 PCR방법은 추후에 소개하고자 한다.

1. PCR을 활용한 살모넬라 검출

축산물에 대한 HACCP제도를 시행하면서 농림부에서는 농장에서 식탁까지(farm to table)라는 식품위생정책의 기본적인 취지에 따라 농장사육단계부터 식품위생체계를 정착시키고자 축산물생산의 기초가 되는 사료에 대한 위생관리방안을 마련키 위해 연구 끝에 2004년 12월 31일, 사료공장 위해요소중점관리기준(HACCP)을 고시하였다.

사료 품질관리 담당자들과 사료검정기관

은 HACCP과 관련해서 위험요소(risk)를 모니터링 해 왔고 이 과정에서 신속하고 믿을 수 있는 병원성 미생물의 검출방법을 찾으려 해왔다. 사료관리법에서는 살모넬라 D그룹을 관리하고 있고 (사료공정서 [별표 9] 사료 중 특정성분의 함량제한기준, 사료 검사요령 제10조 2항 6호 참조) D그룹에는 S.sendai, S.typhi, S.enteritidis, S.gallinarum, S.pullorum 등이 있다. 살모넬라는 감염에 의해 급성 또는 만성 소화기 전염병을 일으키고 소의 경우 주로 송아지에 다발하며 발열, 장염 및 패혈증상을 주증으로 하고 폐렴, 뇌염, 관절염, 유산 및 유방염도 일으킬 수 있다. 돼지의 경우 주로 비육기에, 일명 돼지 파라티포이드(paratyphoid)라 불리며 위장염 및 패혈증을 특징으로 한다. 살모넬라 중 D그룹이 가장 문제가 되고 있으나, 혈청형 분석절차가 번거롭기 때문에 일반배양법과 PCR에 의한 검출만으로 신속하게 오염여부를 판단할 수 있게 하려면 살모넬라균 전체를 관리하고 PCR법을 살모넬라 검출을 위한 사료표준분석방법에 넣는 것이 필요하다 할 것이다. 사료 내 유해미생물에 관한 허용기준은 국가마다 다르나, 대부분의 국가는 살모넬라균에 한하여 관리하고 있다.

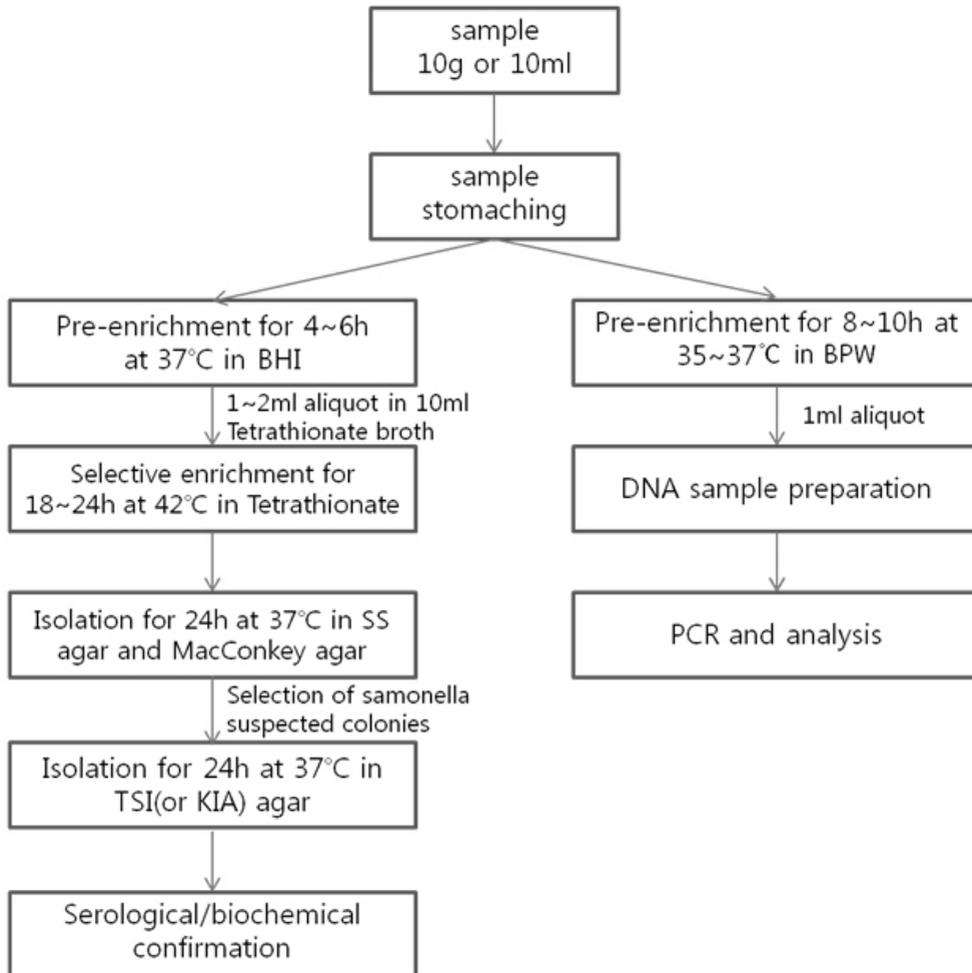
PCR을 이용한 분석법의 가장 큰 장점은 전통적인 분석법에 비해 빠르고 특이적이고 민감하다는 점이다. 그러나 배합사료의 경우 매트릭스가 복잡하기 때문에 PCR을 바로 할 수는 없고 8~10시간 정도의 예비증균(pre-enrichment) 시간이 필요하다.

PCR법에서 신뢰할 만한 분석을 위해서는 교차오염(cross contamination) 여부를 알아보기 위한 적절한 음성대조군(negative control)이 포함되어야 한다. DNA추출단계에서는 샘플없이 DNA를 추출한 추출대조군(extraction control), PCR단계에서는 DNA없이 마스터믹스만 들어간 대조군(master mix control)이 음성 대조군으로 포함되어야 한다. 추가적으로 PCR반응을 저해하는 억제인자(inhibitor)를 모니터링하는 것도 필수적이다. PCR 억제인자의 존재여부를 확인하기 위해 내부 증폭대조군(internal amplification control)을 넣어 사용하고 있고, ISO(International Standard Organization)와 CEN(European Standardization Committee)에서 식품분석을 위한 PCR법에서 일반 지침으로 규정하고 있다.

전통적인 배양법을 기반하는 하는 방법은 아래 [그림 1]에서 보는 바와 같이 5일 정도가 소요된다. 그리고 때로는 다른 미생물이 우점하는 경우 강하게 백그라운드로 작용해서 살모넬라의 검출을 어렵게 만든다. 대조적으로 PCR을 이용한 검출방법은 예비증균(pre-enrichment)을 하더라도 2일도 채 걸리지 않는다. 1900여가지 원료와 완제품을 가지고 정성분석을 한 논문들을 참조해 보면 일반적으로 평균 28시간 정도 소요되는 것으로 보인다.

최근 발전방향은 real-time PCR을 이용한 정량분석으로 가고 있다. 절대 정량법 중 2가지 정도의 정량법이 사용될 수 있다.

첫번째는 균총형성단위(CFU, Colony

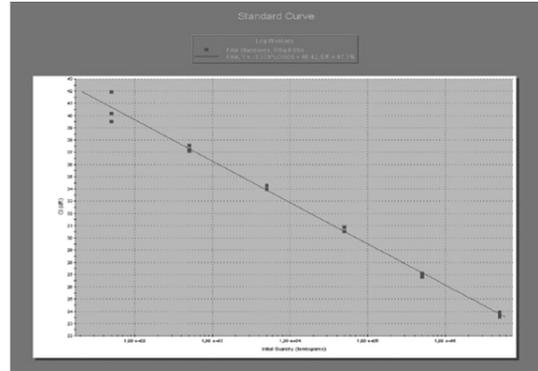
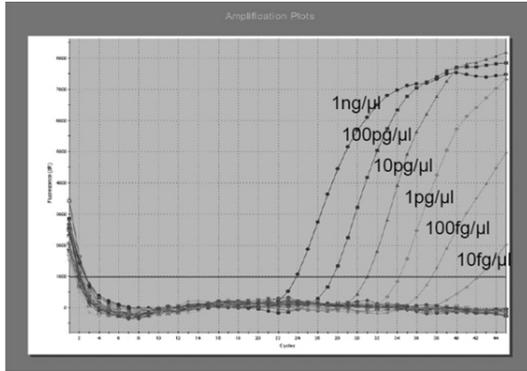


[그림 1] 배지법(사료표준분석방법)과 PCR법 비교

Forming Unit)를 가지고 표준곡선(검량선)을 그려서 정량하는 방법이다. 검출하려는 병원성미생물을 배양해서 연속희석(serial dilution)해서 10¹~10⁸ CFU/ml 정도 범위에서 PCR을 해서 얻은 Ct(Threshold cycle, 형광을 관측할 수 있는 최소 사이클 수)값과 연관시켜 표준곡선(검량선)을 그린다. 이 표준곡선을 이용해서 농도를 알 수 없는 미지의 샘플에 대해서 검출농도를 알

수 있다.

두 번째는 추출한 살모넬라의 DNA를 연속 희석해서 PCR을 통해 얻은 Ct(Threshold cycle)값과 연관시켜 표준곡선(검량선)을 그리는 방법이다. [그림 2] Real-time PCR을 이용해서 병원성 미생물에 대해 정성분석 뿐만 아니라 정량분석을 하려는 실험실이 증가하고 있고 현재 많은 상용화된 real-time PCR kit가 개발되어 판매 중이다.



[그림 2] real-time PCR을 이용한 정량법과 그 원리

PCR법은 병원성미생물 검출에 있어서 매우 효과적인 분석법으로 자리잡아 가고 있지만, 죽은 세포도 검출한다는 한계도 가진다. PCR법은 검출하려는 해당 미생물의 상태와 상관없이 해당 미생물의 DNA를 증폭한다. 그 결과로 죽거나 불활성화된 미생물의 경우는 역학적으로나 위생학적으로 그리 중요하지 않지만 정성이나 정량분석 결과에 포함되어 나오게 된다. 이를 막기 위해 죽은 세포와 살아있는 세포를 구분하기 위한 PMA(Propidium monoazide)같은 DNA 삽입염료(DNA intercalating dye)를 사용할 수 있다.

PMA는 선택적으로 세포막이 허물어진 죽은 세포에만 침투한다. 온전한 세포막을 가진 살아있는 세포는 침투할 수 없다. PMA는 아자이드 그룹(azide group)을 가지고 있어서 강한 가시광선을 받은 후 DNA에 교차결합(cross linking)한다. PMA가 처리된 죽은 세포의 DNA는 화학적으로 구조가 바뀌어서 PCR에 의해 증폭되지 않는다. 이를 통해 죽은 세포와 살아있는 세포를 구분할 수

있게 된다.

2. PCR을 활용한 동물종 검사

BSE와 관련된 동물성단백질 검출방법은 전에(2011년 11,12월호) 다루었기 때문에 여기서는 PCR과 관련된 사항만 간단히 다루고 가공되거나 열처리된 시료와 PCR효율을 다룬 논문을 소개하고자 한다.

현재 국내에서는 현미경법, ELISA법, PCR법을 모두 표준분석방법으로 인정하고 있다. 위 3법은 모두 장단점이 있기 때문에 서로 조합해서 사용하는 것이 좋다. 사료검사의 현물검정을 담당하는 국립농산물품질관리원은 3가지 방법을 모두 사용해서 검사를 하고 있고, 사료검사기관에서 동물유래 단백질의 함유여부에 대한 종합판정은 현미경 검정, ELISA, PCR 검정 중 2가지 이상의 방법에서 나타난 경우에 제조공정에서 실제 사용여부를 조사하여 위배여부를 최종판정 하도록 되어있다.

<표 1> 열처리가 PCR에 미치는 영향

Min	Mean Ct			Estimated DNA concentration (%)		
	Bos	Sus	Gallus	Bos	Sus	Gallus
0	11.5	12	12.05	102	106	100
10	11.91	12.31	12.32	81.5	83.2	87
30	13.42	13.55	13.3	30	38.6	46.2
60	14.12	14.33	13.92	19.5	23.4	32.5
90	15.48	15.45	15.12	8.9	10.9	13.7
120	16.65	16.28	15.95	4.2	7.4	8.98
150	17.02	16.41	16.07	3.31	6.25	7.92
180	18.68	17.92	17.62	1.29	2.64	3.31
210	20.07	19.32	18.9	0.52	1.22	1.51
240	21.3	20.85	20.32	0.21	0.41	0.67
Ntc	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Ntc: negative template control; ND: not detected.

Amplicon size : 소(Bos, 374bp), 돼지(Sus, 290bp), 닭(Gallus, 183bp)

(출처 : “Effect of Heat Processing on DNA Quantification of Meat Species” by Ergün Sakalar, 2012, *Journal of Food Science*)

다른 분석방법과 비교했을 때 PCR을 이용한 방법의 장점은 고도로 가공처리(열처리)된 시료에서도 사용이 가능하다는 것이다. 단백질의 경우 변성이 되어 검출할 수 없는 형태로 바뀌기 때문에 상대적으로 안정한 DNA를 검출하는 PCR법이 상대적으로 우위에 있다. 그러나 이는 일반적인 이론이고, 반추동물유래단백질을 검출하는 사료표준분석방법의 ELISA법에서는 통용이 되지 않는다.

반추동물유래단백질을 검출하는 사료표준분석방법의 ELISA법은 열에 안정한 항원인 Troponin I를 타겟으로 한다. 이 항원의 경우는 138°C까지 안정하기 때문에 고도로 열처리가 된 육골분(133°C, 20분)이나 기타

사료원료, 배합사료에서도 검출이 가능하다. 단지 ELISA법은 특정 항원만을 검출하므로 조직특이성을 가져서 해당 종의 모든 단백질을 검출하지는 못한다. Troponin I같은 경우도 근육단백질이기에 때문에 근육조직의 특이단백질만 검출이 가능하다. PCR법은 이에 비해 종 특이적인 DNA사슬(DNA sequence)를 타겟으로 하기 때문에 조직특이성을 가지지는 않으며, 검출한계는 낮고, 검출효율은 ELISA법 보다 더 좋다.

DNA의 경우 상대적으로 열에 안정해서 PCR법이 단백질을 타겟으로 하는 검출법에 비해 우위를 가지지만 이는 상대적인 것이고 DNA도 열처리에 의해 분해(degradation)되어 검출될 수 있는 주형 DNA(template

DNA)의 양이 점점 줄어든다. <표 1> 다음의 표는 100°C에서 끓여서 열처리를 했을 때 처리시간에 따라 검출할 수 있는 주형 DNA 양이 점차 분해(degradation)되어 줄어들고 있음을 보여주고 있다.

사료에서 단백질을 열처리(121°C, 15분)를 하도록 되어있는데 이 정도의 열처리에는 DNA가 안정하다는 것을 알 수 있다. 그러나 열처리의 시간이 증가되어 3~4시간에 가까워지면 검출할 수 있는 거의 모든 DNA가 분해(degradation)되는 것을 알 수 있다. 그리고 증폭산물(amplicon) 사이즈가 짧을수록 열처리에 덜 민감하다는 것도 보여주고 있다. <표 1> 열처리된 시료에서 종 특이적 DNA를 검출하기 위한 프라이머(primer)를 짧게 하는 증폭산물(amplicon) 사이즈를 짧게 하는 것이 유리하다.

3. 결론

사료검정기관이나 사료검정인정기관에서는 위와 같이 크게 3가지 분야에 PCR을 활용할 수 있을 것이다. 현재 PCR법은 동시에 여러 타겟을 한번에 분석하고 정량하는 다중 분석법(multiplex assay)으로 발전하고 있고, 다중 실시간 PCR(multiplex real-time PCR)이 대세를 이루고 있다. 다중 분석법은 시간과 비용을 절약하게 해주고 고속 대량 스크리닝(High Throughput Screening)을 가능하게 한다. 원래 PCR이 가지고 있던 간편하고 빠르고 특이성과 민감성이 높다는 장점은 다중 분석법의 장점과 합쳐져서 PCR법은 보다 널리 이용되고 활용도가 커질 것이다. ☞