

Review

## CRISPR/Cas 시스템 기술을 활용한 고위험성 식중독 세균 신속 검출을 위한 바이오센서 개발

조선영 · 박종필\*  
중앙대학교 식품공학과

### Development of Biosensors for Rapid Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria using CRISPR/Cas

Seon Yeong Jo, Jong Pil Park\*

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong, Korea

(Received July 25, 2023/Revised August 11, 2023/Accepted August 11, 2023)

**ABSTRACT** - Rapid and accurate detection of pathogenic bacteria is crucial for various applications, including public health and food safety. However, existing bacteria detection techniques have several drawbacks as they are inconvenient and require time-consuming procedures and complex machinery. Recently, the precision and versatility of CRISPR/Cas system has been leveraged to design biosensors that offer a more efficient and accurate approach to bacterial detection compared to the existing techniques. Significant research has been focused on developing biosensors based on the CRISPR/Cas system which has shown promise in efficiently detecting pathogenic bacteria or virus. In this review, we present a biosensor based on the CRISPR/Cas system that has been specifically developed to overcome these limitations and detect different pathogenic bacteria effectively including *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*. This biosensor takes advantage of the CRISPR/Cas system's precision and versatility for more efficiently accurately detecting bacteria compared to the previous techniques. The biosensor has potential to enhance public health and ensure food safety as the biosensor's design can revolutionize method of detecting pathogenic bacteria. It provides a rapid and reliable method for identifying harmful bacteria and it can aid in early intervention and preventive measures, mitigating the risk of bacterial outbreaks and their associated consequences. Further research and development in this area will lead to development of even more advanced biosensors capable of detecting an even broader range of bacterial pathogens, thereby significantly benefiting various industries and helping in safeguard human health

**Keywords:** CRISPR/Cas, Pathogenic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, Biosensor

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)는 1987년 *Escherichia coli* (*E. coli*) 에서 처음 발견된 유전자 서열을 일컫는다<sup>1)</sup>. 고세균과 박테리아에는 존재하지만 진핵생물과 바이러스에는 없는 반복적인 서열로 알려져 있다<sup>2)</sup>. CRISPR 과 CRISPR-associated (Cas) 단백질은 박테리아가 가진 면역 시스템이며 guide RNA

(gRNA) 와 CRISPR RNA (crRNA)에 의해 외부로부터 들어온 DNA 를 분해한다<sup>3-6)</sup>. RNAs는 표적을 인식하고 Cas 단백질이 외래 DNA 서열을 찾고 절단하는 활성을 가지고 있다<sup>6)</sup>. 몇몇 연구에서는 이러한 CRISPR가 유전자 프로그래밍 도구로서 사용되어 유전자 진단 능력을 향상시킬 수 있고, 동시에 바이러스 RNA를 사멸할 수 있다는 것을 발견하여 보고한 바 있다<sup>7)</sup>. 이는 인간 유전병 치료, 신약 개발 및 질병의 신속한 진단에 CRISPR가 적용 가능함을 제시하였다<sup>8)</sup>.

2019년 코로나 판데믹(COVID-19)이 발생하여 전세계적으로 확산됨으로써 신속, 정확하게 질병의 유무를 확인하고 진단할 수 있는 바이오센서 개발에 대한 관심이 크게

\*Correspondence to: Jong Pil Park, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea  
Tel: +82-31-670-4703, Fax: +82-31-675-1381  
E-mail: jppark@cau.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

증가하고 있다. 바이오센서를 이용하여 코로나(COVID-19) 바이러스의 진단 뿐만 아니라 음식을 통해 감염되는 다른 질병과 그 원인균을 기존의 검출 방법에 비해 보다 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 기술이 개발되고 있다. 병원성 박테리아 및 세균의 신속하고 민감하게 현장에서 검출하는 것은 임상적 진단, 치료, 식품을 통한 질병의 감염 및 진단법 개발에 매우 중요한 부분이다<sup>9,11</sup>).

식품을 통해 감염될 수 있는 원인균을 검출하기 위해서 PCR, qPCR, RT-PCR, 등은 증폭(isothermal nucleic acid amplification), next-generation sequencing 등, 유전자 분석법을 기반으로 한 많은 검출 방법이 보고되고 있다<sup>12,14</sup>. 이외에도 민감도, 경제성, 신속성, 정확성 등을 향상시키기 위해 다양한 기술을 활용하는 연구가 진행되고 있다. 그 중에서도 CRISPR/Cas 은 많은 관심을 받고 있는 기술 중의 하나이며, 이 시스템의 민감도 향상을 위해서 PCR 과 등은 증폭과 같은 핵산 증폭 기술을 활용되고 있다<sup>15</sup>.

CRISPR/Cas 시스템의 작동 원리는 세 단계로 구분된다. 첫번째는 적응 또는 spacer 획득(adaptation or spacer-acquisition), 두번째는 crRNA 조립(crRNA processing or biogenesis), 세번째는 간섭(Interference) 단계로 구분될 수 있다<sup>16,17</sup>. 첫번째 단계인 적응 또는 spacer 획득 단계에서는 외부 DNA/RNA가 박테리아 안으로 들어왔을 경우에 이루어진다. 외부 DNA/RNA를 protospacer라고 하며 protospacer는 Cas1/Cas2의 복합체에 의해 절단되고, 절단된 spacer를 자신의 DNA에 삽입하여 spacer를 획득하게 된다<sup>18</sup>. 이렇게 획득된 spacer는 보통 20-58 bp의 크기를 가지며, 이로 인하여 CRISPR 서열이 분리되게 된다<sup>19</sup>.

두번째 단계인 crRNA 조립 단계에서는 CRISPR영역에 있는 spacer 영역을 RNA polymerase (RNAP)에 의해 pre-CRISPR RNA (pre-crRNA)로 전사된 다음 특정한 endo-ribonucleases에 의해 완전한 crRNA로 절단되는 것을 말한다. 각 crRNA는 하나의 spacer에 대한 상보적인 서열을 포함한다<sup>20,22</sup>.

마지막 단계인 간섭은 crRNA의 spacer 서열과 상보적인 protospacer를 가진 외부 DNA/RNA의 서열 특이적인 표적화 및 절단을 동반한다. 그러나, crRNA-DNA 결합을 위해서는 protospacer adjacent motif (PAM) 서열이 protospacer 서열 근처에 위치하고 있어야 한다<sup>17,23</sup>. crRNA는 외래 DNA/RNA의 고유한 상보적인 서열을 인식하여 crRNA-DNA 결합을 하게 되고 이로 인해 절단 과정을 활성화시킨다<sup>8,24,25</sup>).

CRISPR/Cas 시스템은 Cas 단백질의 특성과 간섭(interference)의 방법에 따라 분류된다. 현재 2개의 Classes (Class 1, Class 2)에 각각 3개의 types (Class 1: type I, III, IV ; Class 2: type II, V, VI) 로 구분된다<sup>24,26</sup>. 각 type 은 다양한 특성의 단백질을 포함한 개별 effector 모듈 구성으로 구분되어진다<sup>27</sup>. Class 1 시스템은 약 90%를 차지

하며, 이는 DNA와 RNA를 표적으로 삼아 역할을 수행하는 것으로 알려져 있으며, type I, III, IV으로 구성된 Class 1 중 I과 III 은 고세균에서 더 흔하게 발견되고 표적화와 DNA 절단을 촉진할 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>9,28</sup>.

핵산 검출을 위해서 가장 많이 사용되는 도구로는 Cas9, Cas12, Cas13, Cas14가 포함되어 있는 Class 2 이다. Cas9 과 Cas12는 DNA를, Cas14는 ssDNA를 표적으로 삼는 반면, Cas13은 RNA를 표적으로 삼는다<sup>17,29</sup>. 이러한 연구 결과를 토대로 Class 2는 DNA 또는 RNA를 검출하는 연구에 많이 사용되기 시작하였다. 특히, Cas12와 Cas13이 가지고 있는 특수한 절단 기능을 “collateral cleavage”라고 부르며, 이 기능은 표적 또는 reporter DNA또는 RNA가 있을 때 활성화되고 주변에 있는 모든 single-strand DNA 또는 RNA를 비특이적으로 절단할 수 있다<sup>30,31</sup>. 이러한 특수한 절단 기능을 이용하여 핵산 검출이 가능하게 하는 새로운 바이오센서 기술이 연구되고 있는 실정이다<sup>32</sup>. Cas12 와 Cas13 단백질이 비특이적 절단 기능을 가지고 있어 이를 통한 DNA endonuclease-targeted CRISPR trans report (DETECTR) 와 specific high-sensitivity enzymatic reporter unlocking (SHERLOCK) 두 가지의 신개념 진단법이 개발되었다<sup>31,33,34</sup>. 이러한 기술을 이용하여 병원성 박테리아 및 바이러스를 검출하기 위한 바이오센서에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으나, 몇몇 병원성 박테리아 및 바이러스를 검출하는 바이오센서만 활용되어져 오고 있다. 이 논문에서는 CRISPR/Cas 시스템 기반으로 대표적 위해인자로 알려진 병원성 박테리아 검출이 가능한 바이오센서 개발에 대해 소개하려고 한다.

### CRISPR/Cas 시스템을 활용한 *Vibrio parahaemolyticus* 검출이 가능한 바이오센서 개발

1854년 이탈리아 의사인 Filippo Pacini는 Florence에서 질병을 일으키는 병원균을 연구하던 중 최초로 콜레라의 원인균인 *V. cholerae*를 발견하였고, 현재 총 582개의 종의 많은 유전자형이 보고되었다<sup>35,37</sup>. *Vibrios* (Vibrionaceae strains) 는 보통 운동성 간균이며, 중온성 및 화학유기영양 생물인 Gammaproteobacteria에 속하는 그람 음성균이다<sup>35</sup>. 주로 담수, 하구 및 해양 환경에서 많이 발견되고 몇 가지의 생물학적, 유전적 특징을 공유하고 있다<sup>38</sup>. 비브리오 균 중에서 *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*는 음식을 통해 감염되어 질병을 일으키는 병원균이다<sup>36,38</sup>. 감염은 주로 계절에 영향을 받으며, 온도가 따뜻해지는 시기에 해산물을 통해 많이 감염된다<sup>38</sup>. 특히, *V. parahaemolyticus*는 해산물 관련 질병의 주요한 원인균으로서 장염, 구토, 열, 설사 등을 일으키는 것으로 알려져 있고, 무엇보다도 안전한 음식 섭취와 추가적인 합병증을 막기 위해서는 빠른 검출이 매우 중요하다. *V. parahaemolyticus* 을 검출하기 위한 바이오센서에 CRISPR/Cas 시스템을 이용하고 있다(Fig. 1).

신속하고 편리하게 검출하기 위해 여러 샘플을 사용할 수 있는 양면 사용이 가능한 벨브칩과 CRISPR/Cas12a를 이용하여 시각적 검출이 가능한 기술을 개발한 바 있다. CRISPR/Cas12a를 사용하기 위하여 *parahaemolyticus* 특이적 유전자인 thermolabile haemolysin (*tlh*)를 Loop mediated isothermal amplification (LAMP) 기법으로 증폭시켰다. 동결 건조된 LAMP 시약을 마이크로 칩과 연결된 반응 튜브에 미리 첨가해두고 추출한 핵산을 반응 튜브에 넣어 시약을 반응시켰다. 이후 반응 튜브가 들어있는 마이크로 칩을 일반 열 블록으로 옮겨 LAMP 반응을 수행하여 핵산을 증폭시켰다. 증폭 이후 CRISPR/Cas12a 검출 시약을 추가하고 원심분리를 진행한 후, 활성화된 Cas12a 단백질은 형광 프로브를 절단하고 시각적으로 결과를 확인할 수

있도록 휴대용 카트리지를 사용하여 감지 결과를 분석하였다. 양성 증폭은 녹색을 띄고 음성 증폭은 형광신호가 없도록 설계되어 있어 50분 안에 결과를 확인할 수 있으며, 30 copies/reaction (600  $\mu$ L samples) 의 검출 한계(limit of detection)를 보여주었다. 또한, 동결 건조된 핵산 증폭 시약을 교체할 수 있다는 장점이 있어 다른 핵산 증폭 기법을 도입될 수 있는 가능성을 제시하였다<sup>39)</sup> (Table 1).

*V. parahaemolyticus*를 검출하는 또 다른 방법은 CRISPR/Cas12a 를 활성화시켜 G-quadruplex 구조를 절단하도록 설계하고 절단된 조각들이 색을 나타내도록 하여 시각적으로 검출 여부를 확인할 수 있도록 제작한 방법이 있다. 해당 기술 또한 LAMP기술을 통하여 특이적 유전자인 *tlh* 를 증폭하여 병원성 박테리아를 검출한 바 있다. 이 기술

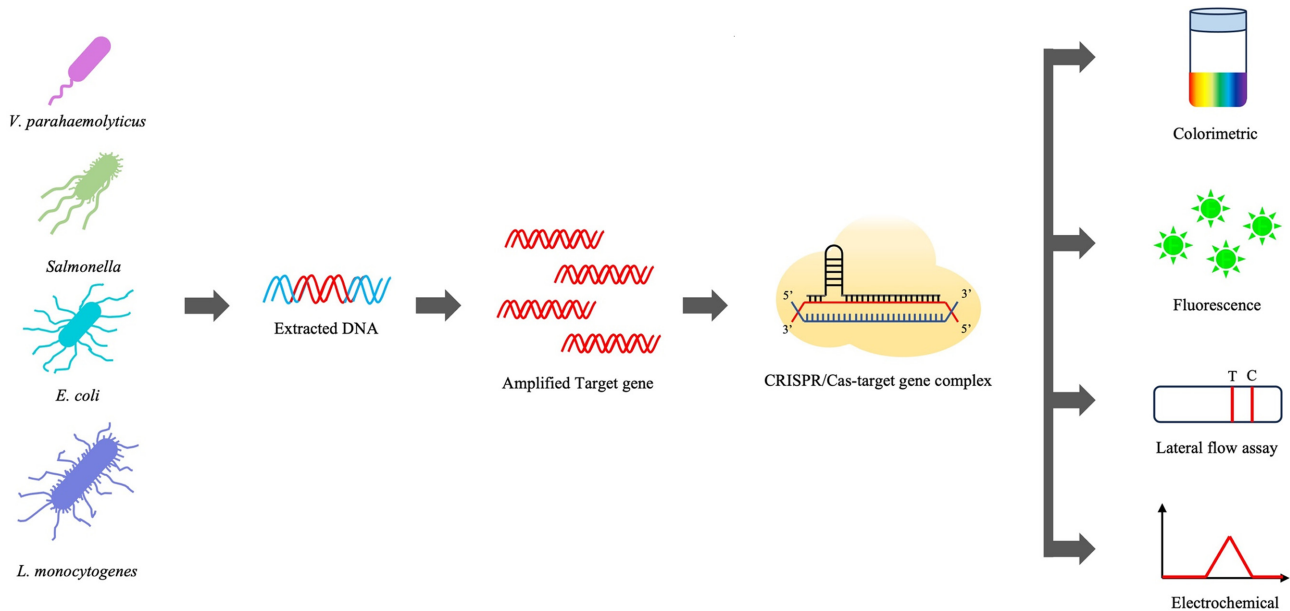


Fig. 1. Schematic illustration of CRISPR/Cas system for development of biosensor.

Table 1. List of CRISPR/Cas systems used for detection of pathogenic bacteria

Bacteria	Target gene	Amplification	Sensitivity	Detection method	Ref.
<i>V. parahaemolyticus</i>	Thermolabile haemolysin ( <i>tlh</i> )	LAMP	30 copies/600 $\mu$ L reaction	Colorimetric	40)
<i>V. parahaemolyticus</i>	Thermolabile haemolysin ( <i>tlh</i> )	LAMP	9.8 CFU/reaction	Fluorescence	41)
<i>V. parahaemolyticus</i>	Thermolabile haemolysin ( <i>tlh</i> )	PCR	$1.02 \times 10^2$ copies/ $\mu$ L	Fluorescence	42)
<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	RAA	2 CFU/mL	Fluorescence	45)
<i>Salmonella</i>	-	-	8 CFU/mL	Fluorescence	46)
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>rfbE</i>	RAA	$1 \times 10^3$ CFU/mL - 1 CFU/mL	Lateral flow assay Fluorescence	52)
<i>E. coli</i> O157:H7	Shiga-like toxin ( <i>stx2</i> )	LAMP	$1.22 \times 10^0$ CFU/mL	Fluorescence	56)
<i>L. monocytogenes</i>	LMOSLCC2755_0900	RAA	26 CFU/mL	Electrochemical	59)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>hly</i> , <i>prfA</i> , hypothetical protein gene	RPA	4.4 CFU/mL	Fluorescence	60)

LAMP: loop mediated isothermal amplification; PCR: polymerase chain reaction; RAA: recombinase-aided amplification; RPA: recombinase polymerase amplification

은 앞서 소개했던 기술과 비슷한 방법을 통하여 핵산 증폭을 진행하였으나 다른 검출 방법을 활용하였다. G-quadruplex 구조는 염기서열 4개 중 G (guanine)을 가장 많이 포함하는 구조로 되어 있고, CRISPR/Cas12a가 활성화가 됨으로써 절단하게 된다. 절단된 조각들은 ABTS<sup>2-</sup>와 반응하여 색깔을 나타내도록 설계한 후, 현장에서 바로 사용이 가능할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 또한, 순수한 균을 배양하여 검출하였을 때는 9.8 CFU/reaction 그리고 새우에서 검출하였을 때는 6.1×10<sup>2</sup> CFU/g의 검출 한계를 보여주었다<sup>40</sup>.

마지막으로, 현장에서도 사용이 가능할 수 있는 바이오센서의 예도 보고된 적이 있다. 다른 연구들과 마찬가지로 대상 균을 검출하기 위해서 *tlh* 유전자를 PCR 기술을 통하여 증폭하였다. 증폭된 서열과 Cas12a가 만나 절단 기능을 활성화하고 이로 인하여 형광 프로브가 부착된 ssDNA를 최종적으로 절단하게 된다. 서열의 양쪽 끝에는 형광을 띠는 물질과 형광을 띠지 못하게 하는 물질이 결합되어 있고 절단 활성화로 인하여 절단되게 되면 형광을 띠게 되고 UV 빛을 조사했을 때 반응의 유무를 확인할 수 있다. 양성 결과는 녹색 형광을 띠고 음성 결과는 무색으로 나타나게 된다. 이 기술은 1.02×10<sup>2</sup> copies/μL의 검출 한계를 나타내었다<sup>41</sup>.

### CRISPR/Cas 시스템을 활용한 *Salmonella* 검출이 가능한 바이오센서 개발

*Salmonella*는 위장염과 장티푸스를 일으키는 그람 음성균으로 1839년 Sohlerin에 의해 처음 발견되었다<sup>42,43</sup>. 식품을 통해서 감염되는 병원성 세균 중에서 가장 자주 분리되는 유해한 미생물 중 하나이다. Enterica 아종은 *Salmonella* 감염의 대부분을 차지하고 있고, 대부분의 *Salmonella* 혈청형은 잠재적으로 병원성을 가지고 있어 산발적 감염과 사망자의 발생을 유발하게 된다. 일부의 경우에는 병원성이 낮고 인간과 대부분의 동물 중 모두에서 경미한 감염을 유발한다<sup>42</sup>. 그럼에도 불구하고 대부분의 *Salmonella*가 병원성을 가지고 있기 때문에 공중보건 측면에서 위협적인 인자로 인식되고 있다<sup>43</sup>. 따라서, 쉽고 빠르고 정확하게 검출하기 위한 연구가 이루어지고 있다. 이에 대한 해결책의 일환으로 CRISPR/Cas 시스템을 이용한 검출 방법을 소개하고자 한다(Fig. 1).

회전이 가능한 Halbach 실린더 마그넷과 마그네틱 실리카 비드가 있는 망을 사용하여 DNA의 추출하고 정제한 후 recombinase-aided amplification (RAA) 방법을 이용하여 증폭시킨 산물을 CRISPR/Cas12a 단백질과 결합하도록 하였고, 최종적으로 형광 신호로 검출 여부를 확인할 수 있도록 설계하였다. RAA-CRISPR/Cas12a 시스템은 crRNA에 따라 특이성이 달라지게 되어 표적 서열에 상보적인 crRNA와 비 상보적인 crRNA를 설계하여 형광 강도 비교

를 통해서 적합한 서열을 사용하였다. 또한, 100 nM의 농도와 45°C의 반응 온도가 가장 좋은 반응 효율을 나타냄을 확인하였다. 그 결과 순수 배양된 샘플의 경우, 2 CFU/mL, 스파이킹된 우유 샘플에서는 6 CFU/mL의 검출 한계를 보여주었다<sup>44</sup>.

흥미로운 연구로서 *Salmonella*를 사면체 DNA 나노 구조 매개 하이퍼브랜치(hyperbranched)된 교잡(hybridization) 연쇄 반응에 기초하여 검출하는 방법이 있다. 이 연구에서 사용된 기술은 두 세트의 헤어핀 분자 사이의 인식 및 혼성화를 통해서 연쇄 반응을 일으키는 기술이며 효소 없이 증폭되며 이는 DNA 서열의 신속한 검출을 위한 방법이다<sup>45</sup>. 사면체의 DNA 나노구조 매개의 하이퍼브랜치의 HCR (tetrahedral DNA nanostructure-mediated hyperbranched HCR, TDN-hHCR)을 사용할 경우 기존의 HCR 방법보다 약 70배 더 빠른 속도로 반응이 이루어질 수 있다<sup>46</sup>. 따라서, 이 연구에서는 TDN-hHCR과 CRISPR/Cas12a 시스템을 이용하여 *Salmonella*를 검출할 수 있다. 표적인 *Salmonella*의 신호를 DNA 신호로 전달하고 증폭하기 위해서 바이오바코드 DNA로 표지된 AuNP를 이용하여 특이적으로 검출할 수 있도록 제작하였다. 바이오바코드는 CRISPR/Cas12a 단백질의 절단 활성화를 유도하여 형광 신호를 읽을 수 있도록 만들었다. 검출 플랫폼의 감도와 안정성을 향상시키기 위해서 TDN-hHCR 기반 비율 측정 형광 분석을 도입하여, *Salmonella*가 없는 경우에는 CRISPR/Cas12a는 활성화 될 수 없고 개시 서열이 손상되지 않아 TDN-hHCR 프로세스를 촉매하여 포스터 에너지 전이 (föster resonance energy transfer, FRET)를 촉진한다. 따라서, TDN-hHCR 기반의 형광 신호에 따라 *Salmonella*의 유무를 판별할 수 있다. 이 기술은 높은 면역 자가 분리 효율, CRISPR/Cas12a와 TDN-hHCR의 효과적인 신호 증폭을 통해 8 CFU/mL의 *Salmonella*를 검출할 수 있음이 보고된 바 있다. 또한, 이를 이용하여 *Salmonella*균이 인위적으로 오염된 우유 샘플과 계란 흰자 샘플에서도 각각 17-25 CFU/mL의 검출 능력을 보여주어 실제 샘플에서도 활용될 가능성을 보여주었다<sup>47</sup> (Table 1).

### CRISPR/Cas 시스템을 활용한 *E. coli* 검출이 가능한 바이오센서 개발

대장균(*Escherichia coli*)은 다수의 생리적 및 대사적 다양성을 나타내며 인간과 온혈동물의 정상적인 장내 세균총에 속하는 다양한 비병원성 공생 변이체를 포함한다<sup>48</sup>. 공생 대장균 균주의 경우에는 면역력이 약화되거나 위장벽 파괴된 경우를 제외하고는 질병을 거의 일으키지 않는다. 그러나 몇몇의 대장균들은 특이적 독성 특징을 가지고 있어 다양한 질병을 유발할 수 있는 위해 미생물로 분류되고 있다. 질병을 유발하는 장내 병원균은 장관병원성 대장균(enteropathogenic *E. coli*, EPEC), 장관출혈성 대장균(enterohaemorrhagic *E. coli*,

EHEC), 장관독소원성 대장균(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), 장응집성 대장균(enteroaggregative *E. coli*, EAEC), 장관침습성 대장균(enteroinvasive *E. coli*, EIEC), 장관확산부착성 대장균(diffusely adherent *E. coli*, DAEC)의 총 6가지 범주로 나눌 수 있다. 모든 병원형은 다른 연령대의 사람들에게 발생하는 다양한 종류의 설사병과 관련 있고 장관출혈성 대장균(EHEC)의 하위 유형인 Shiga toxin *E. coli* (STEC)는 모든 연령대에서 발생할 수 있는 급성 설사의 가장 흔한 원인 인자로 알려져 있다. O157:H7은 STEC의 주요 병원성 대장균 중 하나이며 전 세계 식중독의 20%를 차지한다. 초기 발병은 덜 익힌 햄버거의 섭취와 관련이 있었으며 이후 소시지, 살균하지 않은 우유 등 다양한 식품에서도 감염될 수 있음이 밝혀졌다<sup>49,50</sup>. 따라서 식품 및 음용수에서 *E. coli* O157:H7을 식별할 수 있는 특이적 검출 방법이 필요한 실정이다<sup>51</sup>.

*E. coli* O157:H7을 육안으로 검출 결과를 확인할 수 있도록 하는 방법으로서 RAA와 CRISPR/Cas12a를 도입하여 해당 혈청형을 검출할 수 있는 결과가 보고된 바 있다. RAA는 핵산을 증폭하기 위하여 사용되며, 등온에서 증폭이 가능하다는 장점이 있어 현장에서 많이 쓰이고 있다. *E. coli* O157:H7을 검출하기 위하여 균 특이적 유전자인 *rfbE*를 사용하여 등온 증폭(RAA)을 시행하였다. *rfbE*는 O157 항원의 생합성을 담당하는 유전자로 RAA로 증폭된 뒤 CRISPR/Cas12a 단백질과 혼합되어 Cas12a를 활성화시킨다<sup>52</sup>. 활성화된 Cas12a 단백질은 형광 프로브와 결합하고 있는 ssDNA를 비특이적으로 절단하여 형광을 쫓아낼 수 있게 제작되고, ssDNA가 절단됨에 따라 형광을 띄게 되어 표적 균의 유무를 확인할 수 있도록 하였다. 또한, 시각적으로 확인할 수 있는 방법인 간이검사키트(lateral flow assay, LFA)를 사용하여 결과를 확인하였다<sup>52</sup>. 간이검사키트는 1960년대 말 혈청단백질을 모니터링하기 위하여 처음 사용되었는데, 이후 처음으로 만들어진 간이검사키트는 소변을 이용하여 사람 융모 생식샘자극호르몬(human chorionic gonadotropin, hCG)을 검출하여 임신여부를 확인할 수 있도록 하였다. 이 기술은 항원-항체 특이적 상호작용이 기본 원리이며 종양표지자, 미생물 등과 같은 다양한 분자들을 검출하는데 널리 사용되고 있다<sup>53</sup>. 일반적인 LFA의 결과와 마찬가지로 T 라인(test line)과 C라인(control line)에 띠가 나타나면 양성, C 라인에만 띠가 나타나면 음성의 결과를 나타낸다. 최종적으로 *E. coli* O157:H7을 1 CFU/mL (fluorescence method),  $1 \times 10^2$  CFU/mL (lateral flow assay)까지 검출할 수 있는 바이오센서를 개발하였다<sup>52</sup>.

또한, *E. coli* O157:H7을 배양하는데 소요되는 시간을 줄이기 위하여 여러 방법을 사용한 시도가 보고된 바 있는데, 필터 기반 배양 및 시료 농축을 위한 방법으로서 다른 연구결과에 비해 시간을 단축시키고 감도를 증가시킬 수 있는 장점을 보고한 바 있다. 농축된 시료에서 DNA를 분

리하고 추출한 후, 균 특이적 유전자를 LAMP 방법으로 증폭하였다. 증폭된 산물은 CRISPR/Cas12a의 절단을 활성화 시키기 위하여 사용된다. LAMP 방법으로 증폭시킨 유전자는 *E. coli* O157:H7의 Shiga-like toxin 2 (*stx2*)이다. *Stx2*는 Shiga Toxin (*stx*)의 한 종류로서 *stx*는 생물학적 독소로 알려져 있다<sup>54</sup>. 따라서 대장균을 검출하기 위한 유전자로 선택하고 이를 LAMP 방법을 통하여 증폭시킨 후, 증폭된 DNA와 CRISPR/Cas12a를 혼합하여 반응시킨 뒤 비특이적 절단 기능을 활성화시켜 추가적으로 형광을 띄게 하는 ssDNA를 절단하도록 하였다. 균이 존재할 경우 절단된 ssDNA의 말단에 부착된 형광 발현 물질이 형광을 띄게 하여 양성의 결과를 나타낸다. 이 검사법은 일반 순수 배양에서  $1.22 \times 10^0$  CFU/mL을 나타내고 로메인 상추에서는  $4.8 \times 10^0$  CFU/g의 검출 한계를 나타내었다<sup>55</sup>.

#### CRISPR/Cas 시스템을 활용한 *Listeria monocytogenes* 검출이 가능한 바이오센서 개발

*Listeria*는 짧은 사슬에서 발생하는 작은 막대 모양의 간균이며, 운동성이 있고 포자를 형성하지 않는 조건성 혐기성 균이다. 대식세포와 호중구 내에 상주할 수 있는 병원균으로 알려져 있다. 1891년 초에 환자의 조직 절편에서 처음 발견되었으며 1911년 스웨덴의 토끼 간에서 처음 분리되었다. 북미와 유럽에서 식중독 리스테리아 증의 여러 발생 원인 물질로 생각되어져 병원성 매커니즘에 대한 이해도가 급속히 증가하였다<sup>56</sup>. *Listeria*의 여러 종류 중 *L. monocytogenes*는 수막염, 뇌수막염, 산모-태아 그리고 출산 전후 감염을 특징으로 하는 심각한 식품 매개 질병의 원인이다. 특히, 오염된 식품을 섭취하게 되면 위장염을 일으키고 면역이 약화된 경우에 쉽게 질병을 일으킨다<sup>57</sup>. 따라서 식품의 *L. monocytogenes* 오염의 유무를 확인하기 위한 여러 방법들이 개발되고 있으며, CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 검출하는 방법을 소개하고자 한다(Fig. 1).

*L. monocytogenes*을 전기화학 바이오센서를 이용하여 검출하는 연구가 보고된 바 있다. 균을 검출하기 위하여 *L. monocytogenes*의 특이적 유전자인 LMOSLCC2755\_0900을 RAA를 사용하여 증폭시켰고, 증폭을 위한 primer는 각각 35, 34개의 뉴클레오타이드로 설계하여 260 bp의 amplicon을 수득하였다. 이후, 증폭된 핵산을 이용하여 CRISPR/Cas12a와 반응시켜 비특이적 절단 기능을 활성화 하였다. 검출방법으로는 전기화학 바이오센서를 사용하였다. 금 전극판 위에 ssDNA-MB (methylene blue) 복합체를 결합하고 전극을 흘려주었을 때 전극의 변화를 확인하여 검출 여부를 확인할 수 있다. 음성일 경우 Cas12a의 비특이적 절단이 활성화 되지 못하여 전류를 흐르게 되고, 반대로 양성일 경우 Cas12a의 비특이적 절단이 활성화되어 ssDNA를 절단하게 되고 methylene blue (MB)가 떨어져

나가고 전류가 흐르지 못하게 된다. 이러한 RAA를 기반으로 E-CRISPR 기술은 0.68 aM의 DNA와 순수 배양에서는 26 CFU/mL, 인위접종된 시료에서는 940 CFU/g의 검출 한계를 가지는 것으로 보고되었다<sup>58)</sup>.

CRISPR/Cas12a를 이용하여 *L. monocytogenes*을 검출하는 또 다른 기술로써, micro-amplification 방법을 사용한 연구가 보고된 바 있다. 이 연구에서는 핵산 증폭에 3가지 유전자를 사용하였는데, 사용된 유전자는 *L. monocytogenes*의 특이적 유전자로 알려진 *hly*, *prfA*와 가설 단백질 유전자가 사용되었다. 증폭된 유전자와 CRISPR/Cas12a는 하나의 반응 튜브에서 반응이 이루어지도록 설계하였다. 최종적으로 균의 유무를 판단하기 위해서 형광 물질의 발현을 통하여 눈으로 확인할 수 있도록 제작하였다. RT-PCR과 비교했을 때 검출 성능의 차이는 없었으며, 최종적으로 인위접종된 시료에서 4.4 CFU/g까지의 검출 한계를 보였다<sup>59)</sup>.

## Conclusion

CRISPR/Cas 시스템 발견과 Cas 효소의 특성 연구를 통해 유전자 편집 기술 및 분자 진단 기술개발에 많은 기여를 하였다. 특히, Cas12a, Cas13a는 핵산에 대한 높은 선택성과 특이성을 가지고 있어 바이오센서 분야에서 많이 활용되고 있다. Cas12a와 Cas13a는 비특이적 절단 활성을 가지고 있다는 점에서 새로운 핵산 검출 기술인 SHERLOCK, DETECTR이 개발되었고<sup>60)</sup>, 2019년 코로나 팬데믹을 겪으면서 CRISPR/Cas 시스템이 분자 진단 기술에 사용될 수 있다는 가능성이 확인되었다. 코로나 바이러스 뿐만 아니라 다른 병원성 미생물들을 검출하기 위한 연구들이 지속적으로 증가하고 있을 뿐만 아니라, 현장에서 쉽고 빠르게 검출할 수 있도록 새로운 핵산 증폭 기술을 CRISPR/Cas 시스템에 응용하는 연구들이 진행되고 있다. 향후에는 값싸고 짧은 시간 내에 병원균을 검출할 수 있는 바이오센서가 개발될 것으로 사료된다. 이러한 바이오센서가 상용화되기 위해서는 다양한 종류의 병원균을 검출할 수 있도록 병원균에 대한 연구가 추가적으로 필요하고 상대적으로 긴 시간이 소요되는 핵산 증폭 기술 과정을 대체할 수 있는 방법을 개발하여 검출 시간을 단축시킬 수 있도록 하는 등의 체계적인 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

## Acknowledgments

이 연구는 2023년 식품의약품안전처 지원 과제(21153MF DS605)에 의해 수행됐으며, 이에 감사드립니다.

## Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

## ORCID

Seon Yeong Jo <https://orcid.org/0009-0007-6937-7235>  
Jong Pil Park <https://orcid.org/0000-0002-4119-1574>

## References

- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A., Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.*, **169**, 5429-5433 (1987).
- Jansen, R., Embden, J.D.V., Gaastra, W., Schouls, L.M., Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.*, **43**, 1565-1575 (2002).
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E., A programmable dual-RNA-guided DNA Endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**, 816-821 (2012).
- Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C.S., García-Martínez, J., Soria, E., Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.*, **60**, 174-182 (2005).
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P., CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**, 1709-1712 (2007).
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Kaplan, M., Iavarone, A.T., Charpentier, E., Nogales, E., Doudna, J.A., Structures of Cas9 Endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, **343**, 1247997 (2014).
- Lou, J., Wang, B., Li, J., Ni, P., Jin, Y., Chen, S., Xi, Y., Zhang, R., Duan, G., The CRISPR-Cas system as a tool for diagnosing and treating infectious diseases. *Mol. Biol. Rep.*, **49**, 11301-11311 (2022).
- Lee, S., Kim, Y.Y., Ahn, H.J., Systemic delivery of CRISPR/Cas9 to hepatic tumors for cancer treatment using altered tropism of lentiviral vector. *Biomaterials*, **272**, 120793 (2021).
- Qiao, Z., Fu, Y., Lei, C., Li, Y., Advances in antimicrobial peptides-based biosensing methods for detection of foodborne pathogens: A review. *Food Control*, **112**, 107116 (2020).
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C., An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnol. Adv.*, **28**, 232-254 (2010).
- Sassolas, A., Leca-Bouvier, B.D., Blum, L.J., DNA Biosensors and Microarrays. *Chem. Rev.*, **108**, 109-139 (2008).
- Wolcott, M.J., Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clin. Microbiol. Rev.*, **5**, 370-386 (1992).
- Scheler, O., Glynn, B., Kurg, A., Nucleic acid detection technologies and marker molecules in bacterial diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **14**, 489-500 (2014).
- Zhao, Y., Chen, F., Li, Q., Wang, L., Fan, C., Isothermal

- amplification of nucleic acids. *Chem. Rev.*, **115**, 12491-12545 (2015).
15. Chakraborty, J., Chaudhary, A.A., Khan, S.U.D., Rudayni, H.A., Rahaman, S.M., Sarkar, H., CRISPR/Cas-based biosensor as a new age detection method for pathogenic bacteria. *ACS omega*, **7**, 39562-39573 (2022).
  16. Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadan, A.H., Moineau, S., The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, **468**, 67-71 (2010).
  17. Hille, F., Charpentier, E., CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.*, **371**, 20150496 (2016).
  18. McGinn, J., Marraffini, L.A., Molecular mechanisms of CRISPR-Cas spacer acquisition. *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 7-12 (2019).
  19. Ishino, Y., Krupovic, M., Forterre, P., History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *J. Bacteriol.*, **200**, 10-1128 (2018).
  20. Carte, J., Wang, R., Li, H., Terns, R. M., Terns, M.P., Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev.*, **22**, 3489-3496 (2008).
  21. East-Seletsky, A., O'Connell, M.R., Burstein, D., Knott, G.J., Doudna, J.A., RNA targeting by functionally orthogonal type VI-A CRISPR-Cas enzymes. *Mol. Cell*, **66**, 373-383 (2017).
  22. Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., Van Der Oost, J., Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, **321**, 960-964 (2008).
  23. Karvelis, T., Gasiunas, G., Young, J., Bigelyte, G., Silanskas, A., Cigan, M., Siksnys, V., Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements. *Genome Biol.*, **16**, 1-13 (2015).
  24. Liu, T.Y., Doudna, J.A., Chemistry of class 1 CRISPR-Cas effectors: binding, editing, and regulation. *J. Biol. Chem.*, **295**, 14473-14487 (2020).
  25. Murugan, K., Babu, K., Sundaresan, R., Rajan, R., Sashital, D.G., The revolution continues: newly discovered systems expand the CRISPR-Cas toolkit. *Mol. Cell*, **68**, 15-25 (2017).
  26. Mohanraju, P., Makarova, K.S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E.V., Van der Oost, J., Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science*, **353**, aad5147 (2016).
  27. Koonin, E.V., Makarova, K.S., Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.*, **374**, 20180087 (2019).
  28. Hidalgo-Cantabrana, C., Barrangou, R., Characterization and applications of type I CRISPR-Cas systems. *Biochem. Soc. Trans.*, **48**, 15-23 (2020).
  29. Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Scott, D., Shah, S.A., Siksnys, V., Terns, M.P., Venclovas, Č, White, M.F., Yakunin, A.F., Yan, W., Zhang, F., Garrett, R.A., Backofen, R., Van der oost, J., Barrangou, R., Koonin, E. V., Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.*, **18**, 67-83 (2020).
  30. Wang, M., Zhang, R., Li, J., CRISPR/Cas systems redefine nucleic acid detection: principles and methods. *Biosens. Bioelectron.*, **165**, 112430 (2020).
  31. Li, Y., Li, S., Wang, J., Liu, G., CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. *Trends Biotechnol.*, **37**, 730-743 (2019).
  32. Mukama, O., Wu, J., Li, Z., Liang, Q., Yi, Z., Lu, X., Liu, Y., Liu, Y., Hussain, M., Makafe, G.G., Liu, J., Xu, N., Zeng, L., An ultrasensitive and specific point-of-care CRISPR/Cas12 based lateral flow biosensor for the rapid detection of nucleic acids. *Biosens. Bioelectron.*, **159**, 112143 (2020).
  33. Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Kellner, M.J., Joung, J., Collins, J.J., Zhang, F., Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, **360**, 439-444 (2018).
  34. Kellner, M.J., Koob, J.G., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Zhang, F., SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat. Protoc.*, **14**, 2986-3012 (2019).
  35. Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J., Biodiversity of *Vibriosis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**, 403-431 (2004).
  36. Donovan, T.J., Van Netten, P., Culture media for the isolation and enumeration of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.*, **26**, 77-91 (1995).
  37. Parte, A.C., Carbasse, J.S., Meier-Kolthoff, J.P., Reimer, L.C., Göker, M., List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **70**, 5607-5612 (2020).
  38. Baker-Austin, C., Oliver, J.D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M.K., Qadri, F., Martinez-Urtaza, J., *Vibrio* spp. Infections. *Nat. Rev. Dis. Primers.*, **4**, 1-19 (2018).
  39. Wu, H., Chen, Y., Yang, Q., Peng, C., Wang, X., Zhang, M., Qian, S., Xu, J., Wu, J., A reversible valve-assisted chip coupling with integrated sample treatment and CRISPR/Cas12a for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biosens. Bioelectron.*, **188**, 113352 (2021).
  40. Chen, X., Wang, L., He, F., Chen, G., Bai, L., He, K., Zhang, F., Xu, X., Label-free colorimetric method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* by trimming the G-quadruplex DNAzyme with CRISPR/Cas12a. *Anal. Chem.*, **93**, 14300-14306 (2021).
  41. Zhang, M., Liu, C., Shi, Y., Wu, J., Wu, J., Chen, H., Selective endpoint visualized detection of *Vibrio parahaemolyticus* with CRISPR/Cas12a assisted PCR using thermal cycler for on-site application. *Talanta*, **214**, 120818 (2020).
  42. Rahman, H.S., Mahmoud, B.M., Othman, H.H., Amin, K., A review of history, definition, classification, source, transmission, and pathogenesis of salmonella: a model for human

- infection. *JZS-A.*, **20**, 11-19 (2018).
43. Ohl, M.E., Miller, S.I., *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Med.*, **52**, 259-274 (2001).
  44. Wu, S., Yuan, J., Xu, A., Wang, L., Li, Y., Lin, J., Yue, X., Xi, X., A lab-on-a-tube biosensor combining recombinase-aided amplification and CRISPR-Cas12a with rotated magnetic extraction for *Salmonella* detection. *Micromachines*, **14**, 830 (2023).
  45. Evanko, D., Hybridization chain reaction. *Nat. Methods*, **1**, 186 (2004).
  46. Wang, J., Wang, D.X., Ma, J.Y., Wang, Y.X., Kong, D.M., Three-dimensional DNA nanostructures to improve the hyperbranched hybridization chain reaction. *Chem. Sci.*, **10**, 9758-9767 (2019).
  47. Cai, Q., Shi, H., Sun, M., Ma, N., Wang, R., Yang, W., Qiao, Z., Sensitive detection of *Salmonella* based on CRISPR-Cas12a and the tetrahedral DNA nanostructure-mediated hyperbranched hybridization chain reaction. *J. Agric. Food Chem.*, **70**, 16382-16389 (2022).
  48. Köhler, C.D., Dobrindt, U., What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?. *Int. J. Med. Microbiol.*, **301**, 642-647 (2011).
  49. Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 123-140 (2004).
  50. Rani, A., Ravindran, V.B., Surapaneni, A., Mantri, N., Ball, A.S., Trends in point-of-care diagnosis for *Escherichia coli* O157:H7 in food and water. *Int. J. Food Microbiol.*, **349**, 109233 (2021).
  51. Zhu, L., Liang, Z., Xu, Y., Chen, Z., Wang, J., Zhou, L., Ultrasensitive and rapid visual detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on RAA-CRISPR/Cas12a system. *Biosensors*, **13**, 659 (2023).
  52. Bertrand, R., Roig, B., Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157—Application to municipal wastewater. *Water Res.*, **41**, 1280-1286 (2007).
  53. Bahadır, E.B., Sezgintürk, M.K., Lateral flow assays: Principles, designs and labels. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **82**, 286-306 (2016).
  54. Melton-Celsa, A.R., Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol. Spectr.*, **2**, 2-4 (2014).
  55. Lee, S.Y., Oh, S.W., Filtration-based LAMP-CRISPR/Cas12a system for the rapid, sensitive and visualized detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Talanta*, **241**, 123186 (2022).
  56. Wehr, M.H., *Listeria monocytogenes*—a current dilemma. *JAOAC.*, **70**, 769-772 (1987).
  57. Cossart, P., Toledo-Arana, A., *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect.*, **10**, 1041-1050 (2008).
  58. Li, F., Ye, Q., Chen, M., Zhou, B., Zhang, J., Pang, R., Xue, L., Wang, J., Zeng, H., Wu, S., Zhang, Y., Ding, Y., Wu, Q., An ultrasensitive CRISPR/Cas12a based electrochemical biosensor for *Listeria monocytogenes* detection. *Biosens. Bioelectron.*, **179**, 113073 (2021).
  59. Xiao, Y., Ren, H., Wang, H., Zou, D., Liu, Y., Li, H., Hu, P., Li, Y., Liu, Z., Lu, S., A rapid and inexpensive nucleic acid detection platform for *Listeria monocytogenes* based on the CRISPR/Cas system. *Talanta*, **259**, 124558 (2023).
  60. Bonini, A., Poma, N., Vivaldi, F., Kirchhain, A., Salvo, P., Bottai, D., Tavanti, A., Di Francesco, F., Advances in biosensing: The CRISPR/Cas system as a new powerful tool for the detection of nucleic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **192**, 113645 (2021).