Development of Geno-chromatographic Assay System for *Salmonella* species

김석하, 오홍일, 조정환, 백세환
고려대학교 생명공학원 바이오센서 시스템공학 연구실
전화 (02) 3290-3438, FAX (02) 927-2797

Abstract

We developed a geno-chromatographic assay system based on hybridization between target DNA (e.g., amplified product from PCR) and a capture probe immobillized on a predetermined site of membrane. This system can offer a rapid detection of a gene sequence specific to a certain type of cells as well as simplicity of the analytical procedure. Such performances were demonstrated by utilizing *Salmonella typhimurium* as model analyte.

서론

인간에게 질병을 일으키는 bacteria나 virus에 특이한 DNA sequence의 유무를 파악하는 것은 질병이 일어나기 전 그리고 질병이 일어난 후에도 유용하게 사용할 수 있다는 점에서 여러 가지 분석방법에 응용되고 있다[1]. 여기서는 PCR을 이용하여 식중독 균의 하나인 *Salmonella* 균에 특이한 gene을 증폭한 후 그것에 특이하게 반응하도록 제작된 capture probe가 고정화된 membrane에 모세관 현상을 이용하여 강제이동 시켜 probe 고정부위에서 hybridization이 일어나도록 고안하였다. 또한 이것을 Gold-antibody conjugate를 이용하여 hybridization 결합체의 농도에 비례한 신호를 발생하였다. 이것은 실험실 밖에서도 손쉽게 수행할 수 있는 현장진단용 분석시스템으로 발전이 가능할 것이다.

재료 및 방법

분석시스템은 다음과 같은 세 종류의 membrane pad strip으로 구성되었다. 하단으로부터 시료첨가 pad로써 glass fiber membrane을 사용하였고 그 위쪽으로 DNA probe 고정화모체로써 nylon membrane을 위치시켰고 마지막으로 맨 상단에는 membrane pore를 통한 모세관현상의 지속을 위해 흡수 pad로써 cellulose membrane을 선택하였다. 신호발생원으로써 gold colloids에 중합된 anti-FITC IgG를 제조하였고 이것을 20배로 농축한 후 glass fiber membrane의 한 부분에 하여 10 $\mu\ell$ 가한 뒤 37℃에서 말렸다. 이와 같이 제조된 pad들을 플라스틱 필름 상에 부분적으로 포개어 배열한 후 양면 테이프를 이용하여 고정시켰다.

Salmonella 종에 특이한 것으로 알려진 *stx* gene을 PCR (primers: L-InvA, FITC-labeled R-InvA)을 통하여 증폭하였다. 이와 같이 준비된 PCR product는 denaturation 후 분석시스템의 첨가 pad에 가하였고 Tris buffer를 medium으로 이용하여 chromatography 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

Geno-chromatography 분석의 결과로 PCR products가 존재하지 않을 때에는 nylon membrane 상의 hybridization zone에서의 신호는 나타나지 않았다 (Fig 1, 0 cfu/mL). 그러나 분석시료에 10^7 cfu/mL의 *Salmonella* 균이 포함되었을 경우에는 hybridization zone에서 gold의 붉은 발색이 나타남으로써 분석물질이 존재하고 있음을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 결과에 근거하여, 특이 유전자 서열을 인지하는 hybridization 반응이 일어났음을 간편하게 확인 할 수 있는 분석시스템을 개발하였다.

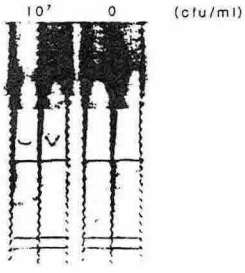

Fig 1. Geno-chromatography 결과 (10^7, 0 cfu/mL, PCR 증폭 비정제 산물이용 실험)

요약

이 실험은 특정 DNA를 검출 할 수 있는 새로운 방법을 제시하고 개발하려는 것이다. 이것은 geno-chromatography 분석방법이라고 하여 DNA capture probe를 membrane상에 고정하고 PCR을 통하여 증폭된 특정 유전자를 hybridization 반응을 이용하여 탐지하는 것이다. 이러한 개념을 식중독균의 일종인 *Salmonella* 균의 탐지에 적용하여 그 분석시스템의 성능을 확인 할 수 있었다.

참고문헌

1) Stuart M. Wilson. "Application of nucleic acid-based technologies to the diagnostic and detection of disease" *(1993), Tran R Soc Trop Med Hyg 87, 609-611*

2) Shaorong Zhang *et al.*, "Paper chromatography hybridization: A rapid method for detection of *Onchocerca Volvulus* DNA amplified by PCR" *(2000), ASTMH, vol. 63, No. 1, 85-89*

3) Avraham Reinhartz *et al.* "A novel rapid hybridization technique : paper chromatography hybridization assay (PACHA)" *(1993), GENE, 136, 221-226*

4) Se-Hwan Paek *et al.*, "Performance control strategies of one-step immuno-chromatographic assay system for *Salmonella typhimurium*" *(1999), Anal. Letters, 32(2), 335-336*