

Immuno-Chromatography 방법을 이용한 식중독균(*Salmonella typhimurium*) 1단계 분석시스템의 개발

†백 세 환 · 이 창 우 · 이 창 섭 · *육순학

고려대학교 생명공학원 및 자연과학대학 생물공학과, *두산기술원 생물산업분야

Development of One-Step Immuno-Chromatography Assay System for *Salmonella typhimurium*

Se-Hwan Paek[†], Chang-Woo Lee, Chang-Seop Lee, and Soon-Hack Yook*

Graduate School of Biotechnology and Department of Biotechnology, College of Natural Sciences and Technology, Korea University, Chochiwon, Chungnam 339-900, Korea

*Biotechnology Group, Doosan Technical Center, Yongin, Kyonggi 449-840, Korea

ABSTRACT

One-step immuno-chromatography assay system for heat-killed *Salmonella typhimurium* antigens was developed. Three major components used were a glass fiber membrane (placed at the bottom of the system) with an antibody (specific to the analyte; detection antibody)-gold conjugate deposited in a dry state on the surface, a nitrocellulose membrane (middle) with an antibody (also, specific to the analyte but recognized different epitope; capture antibody) and anti-detection antibody immobilized in spatially separated areas, and a cellulose membrane (top) as absorption pad. These membranes were partially superimposed such that a wicking of aqueous solution containing sample can continuously take place through membranes. Variables that affected the system performance were the concentration of capture antibody, the location on the membrane, inert protein used for blocking of the membrane and for carrying the sample, and the concentration of the gold conjugate. Under optimal conditions, within 15 minutes after absorption of a sample solution from the bottom of the system antigen-antibody complexes of sandwich type were formed on the membrane surface area with immobilized capture antibody and a color signal was generated in proportion to the analyte concentration. The minimum detection limit of the analyte was 1×10^6 *Salmonella* cells/mL.

서 론

오염된 식품의 섭취에 의해 발병되는 식중독은 일반적으로 세균의 감염과 분비된 독소에 의해 발병된

다. 식중독을 일으키는 주요 미생물로서 *Salmonella typhimurium* 등 *Salmonella* 균종의 일부, *Listeria monocytogene*, *Vibrio parahaemolyticus*, 그리고 병원성 대장균 등이 포함된다(1-2). 감염경로를 살펴보면, *Salmonella* 균종은 주로 육류나 축산가공품에 의해, *Listeria* 균종은 채소 그리고 우유나 크림과

† Corresponding Author

같은 유가공 제품에 의해, *Vibrio* 균종은 어패류 등 해산물을 통해 이루어진다. 국내 식품 유통시장의 개방과 식료품 체인점 등의 확산에 의한 유통시장의 광역화에 따라 다양한 식품들의 정밀검사 등 관리체계의 과학화는 국민의 건강보존과 직결되어 있다.

식품 내 존재할 수 있는 식중독균의 측정법은 일반적으로 콜로니 측정법, DNA probe법, 그리고 면역측정법으로 구분될 수 있다(3-4). 콜로니 측정법의 경우, 선택된 식품으로부터 채취된 시료 내 식중독균은 선택적 증식 배양된 후 특정 반고체배지 상에서 배양되어 형성된 콜로니 수를 측정함으로써 분석된다. 이 방법은 식품시료의 종류에 관계없이 측정결과와 재현성이 유지될 수 있지만 총 분석수행을 위해 비교적 장시간(5~10일)이 소요된다는 단점을 갖는다(5-6). 분석 수행시간은 polymerase chain reaction(PCR)에 의한 nucleotide 증폭과정과 DNA probe법을 결합함으로써 현저히 단축될 수 있다(7). 그러나 시료에 따라 비병원성 미생물 혹은 polymerase 활성억제체가 포함될 경우 위음성 결과가 초래될 수 있다(8). 더욱이, PCR 과정은 다른 미생물에 의한 오염도가 낮은 실험실 등 전문시설 내에서는 수행이 간편한 반면에 식품창고와 음식점과 같은 현장에서의 수행은 과정상 오류뿐만 아니라 위양성 결과의 확률이 증대된다. 상기한 콜로니 측정법과 DNA probe법에서 발생하는 단점들은 면역측정법을 선택함으로써 보완될 수 있다. 식품시료 내 식중독균을 2일간 증식배양 후 배지를 100°C에서 10분 동안 열처리시킴으로써 분석시료가 준비되고 면역분석수행은 2시간 이내에 완료될 수 있다(5).

면역분석 수행시간과 편리성의 증감은 사용된 분석원리에 의해 변화될 수 있다. 일반적으로 널리 사용되는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)에서는 분석시료를 분석물질 특정항체(포획항체)가 고정화된 plastic microwell(5-6) 혹은 dip stick 형태의 membrane(9)이 포함된 시험관에 가하여 반응시키고 비반응 성분들을 제거한 후 특정항체(감지항체)-효소 중합체를 첨가하여 다시 반응시킨다. 세척 후 기질용액을 첨가하여 효소반응을 유도함으로써 발생된 발색신호는 spectrophotometer로 측정된다. 이와 같은 수행과정은 3번의 용액 첨가 및 반응단계와 2번의 세척단계로 구성되며 총 수행시간은 최소 2시간이 소요된다. 식중독균 측정을 위한 전 과정 중 증식배양과정에서는 배지에 시료를 접종 후 단지 기계적 혼합만이 요구되는 반

면에 ELISA 과정에서는 노동력과 전문성뿐만 아니라 비교적 고가의 신호측정기기가 요구된다. 좀 더 간편한 면역분석법으로써 agglutination 방법이 보고된 바 있다(10). 분석물질 특정 복합클론 항체가 고정화된 유색 Latex bead와 분석시료를 cone-bottom microwell 내에 가하여 혼합시킨 후 방치하면, 분석물질이 존재하는 경우 항원-항체 반응에 의해 bead는 상호 응집되어 microwell 바닥에 매트형태로 침전되지만, 분석물질이 존재하지 않는 경우 반응이 일어나지 않으므로 bead는 침전되어 한 점에 모이게 됨으로써 분석물질의 유무를 육안으로 쉽게 구분할 수 있다. 분석수행과정은 비교적 단순한 반면에 수행시간은 30분~1시간 소요되고 또한 일반적으로 민감도가 낮은 단점을 나타낸다. 이와 같은 단점의 보완을 위해 포획항체가 일정지역에 고정화된 membrane strip을 이용한 immuno-chromatography 방법이 사용될 수 있다(11-12). 분석시료와 감지항체-표지물질 중합체를 혼합하여 반응된 면역결합체가 포함된 수용액을 membrane strip의 하단으로부터 흡수시키면 결합체는 유체의 흐름에 따라 상부로 이동되어 고정화된 항체지역에서 포획된다. 포획된 결합체는 표지물질을 포함하므로 분석물질 농도에 비례한 발색이 신호로써 생성된다. 발생된 신호는 육안으로 감지될 수 있을 뿐만 아니라 분석수행은 15분 이내에 완료될 수 있다.

본 논문에서는 식품을 취급하는 현장에서 비전문인이 단시간 내에 분석수행이 가능하도록 immuno-chromatography 방법을 이용하여 단지 시료만을 첨가하는 1단계 분석시스템이 개발되었다. 분석물질은 열처리된 *Salmonella typhimurium* 시료가 선택되었고 그 특정항체로써 염소 복합클론 항체가 사용되었다. 항체의 고정화모체로써 모세관현상에 의한 유체의 흐름을 조절할 수 있는 nitrocellulose membrane이 이용되었고 또한 표지물질로써 효소와 비교하여 안정성이 우수한 뿐만 아니라 항체와의 중합이 용이한 colloidal gold가 선택되었다.

재료 및 방법

재료

열처리된 *Salmonella typhimurium* 표준시료와 그에 대한 복합클론 항체(염소로부터 생산) 그리고 항염소 복합클론 항체(토끼로부터 생산)가 Kirkegaard & Perry Laboratories사(미국)로부터 구입되었다. Colloidal gold(직경 20nm, 0.01%)와 casein(sodi-

um salt 형태, 우유로부터 추출) 그리고 bovine serum albumin(heat shock 공정에 의한 정제, fraction V, BSA)은 Sigma사(미국)로부터 공급되었다. Nitrocellulose membrane(세공크기 $5\mu\text{m}$)과 glass fiber membrane(G6 grade) 그리고 cellulose membrane(qualitative grade 1 및 3MM chromatography grade)은 Millipore사(미국)와 Fisher Scientific사(미국) 그리고 Whatman사(미국)로부터 각각 구입되었다. 그 외 다른 모든 시약들은 분석용급으로 사용되었다.

Colloidal gold-항체 중합체 합성

중합체 합성을 위해 표준방법에 따라 다양한 반응액의 산성도와 항체농도를 시험하였고 결정된 최적조건하에서 중합체를 제조하였다(13-14). 최적 산성도의 결정을 위해, colloidal gold 용액 1mL에 적정량의 0.1M Na_2CO_3 용액을 가하여 산성도를 pH 7.5~10.5 범위로 조절하였다. *Salmonella* 항원 특정항체 용액은 10mM phosphate(pH 7.4) 완충용액에 대해 투석된 후 $0.2\mu\text{m}$ filter로 여과된 탈이온수를 가하여 $150\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 조절되었다. 이 항체용액 $100\mu\text{L}$ 을 각 시험관에 분주하였고 적절한 산성도로 조절된 gold 용액을 가한 후 실온에서 15분간 반응시켰다. 각 반응액에 10% NaCl 용액 $100\mu\text{L}$ 을 추가하였고, 용액의 색 변화를 감지하기 위해 580nm에서 흡광도를 측정하였다(13). 적정 항체농도를 결정하기 위해, 최적 산성도(pH 9.0, Fig. 3 참조)로 조절된 gold 용액을 $5\sim 200\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도범위의 항체용액에 가하여 반응시킨 후 위에서와 같이 색 변화를 측정하였다.

중합체의 합성은 위에서 제시된 과정에 의해 결정된 최적조건하에서 수행되었다. 산성도 9.0으로 조절된 gold 용액 8mL을 투석에 의해 준비된 $150\mu\text{g}/\text{mL}$ 항체용액 0.8mL에 가한 후 30분간 반응시켰다. 이 용액에 140mM NaCl을 포함하는 10mM phosphate 완충용액(pH 7.4, PBS)에 용해시켜 제조된 10% BSA 용액(BSA-PBS) 1mL을 추가한 후 30분 동안 반응시켰다. 반응액은 ultracentrifuge(Beckman Model L7, 미국)를 이용하여 100,000g에서 30분간 초원심분리된 후 상등액이 제거되었다. 분리된 gold 침전물에 0.5% casein-PBS 8mL을 넣어 혼합한 후 15분 동안 초원심분리시켰다. 상등액을 다시 제거한 후 0.5% casein-PBS를 가하여 중합체의 최종부피를 0.4mL으로 조절하였고 사용 시까지 4°C 에서 보관하였다.

Nitrocellulose membrane 상에 항체 고정화

Nitrocellulose membrane 상에 항체 고정화는 물리 흡착방법을 이용하여 수행하였다. Membrane strip ($0.5\times 4\text{cm}$) 하단으로부터 $1\sim 2.5\text{cm}$ 지역에 $0.2\sim 1\text{mg}/\text{mL}$ 항체용액 $1.5\mu\text{L}$ 을 피펫을 사용하여 가한 후 100% 습도가 유지되는 상자 내에 넣어 37°C 에서 30분 동안 반응시켰다. 항체가 고정화된 strip은 0.5% casein-PBS 용액 내에 담가 1시간 동안 잔여 표면 처리된 후 PBS로 3번 세척되었고 실온에서 건조되었다. 항체 고정화 효율을 점검하기 위해, microwell내에 합성된 gold-항체 중합체 $0.5\sim 1.5\mu\text{L}$ 과 *Salmonella* 표준시료(5×10^8 cells/mL) $8\mu\text{L}$ 그리고 시료반응액으로 선택된 2.5% casein-PBS $31\mu\text{L}$ 을 가하였고 항체가 고정화된 strip의 하단을 꽂아 세워 용액을 membrane내로 흡수시켰다. 수용액은 15분 이내에 상단 끝에 도달되었고 항체가 고정화된 영역에서 발색된 신호는 video image analyzer를 이용하여 정량되었다. 발색된 strip을 video(CCD camera)사진기 아래에 놓고 monitor(Hi-tron, 한국) 화면을 보면서 위치와 초점을 조절한 다음 personal computer에 내장된 scanning board와 software(Biomed Instruments, 미국)를 이용하여 membrane image를 포착하였다. 포착된 image상의 발색부분은 image 분석 프로그램(2D Archive Programs, Advanced American Biotechnology, 미국)을 이용하여 발색부분이 모두 포함되도록 선택한 후 발색세기에 비례하는 적분치인 optical density로 전환되었다.

중합체 자동공급

중합체와 시료를 혼합하는 과정이 생략된 1단계 분석시스템을 고안하고자 중합체의 자동공급방법들이 비교되었다. Nitrocellulose membrane strip 하단으로부터 1.5cm 지역에 $1\text{mg}/\text{mL}$ 항체용액을 가하여 위에서 설명된 바와 같이 항체 고정화를 수행하였다. 항체가 고정화된 strip 상으로 중합체의 자동공급을 성취하기 위해 다음과 같은 3가지 중합체 축적방법들이 시험되었다. 첫째로, 합성된 중합체 $1\mu\text{L}$ 과 50% sucrose 용액 $1\mu\text{L}$ 을 혼합한 후 strip 하단으로부터 0.75cm 부분에 가한 후 건조시켰다. 둘째로, cellulose membrane(qualitative grade 1, $0.5\times 0.5\text{cm}$) 조각에 같은 방식으로 혼합된 중합체를 가하여 건조시킨 후 이 조각을 strip 하단으로부터 $0.5\sim 1\text{cm}$ 지역에 테이프를 이용하여 접착시켰다. 마지막으로, 길이가 2배 긴 cellulose mem-

brane(0.5×1 cm) 상에 중합체 2 μ L과 50% sucrose 용액 2 μ L의 혼합액을 가하여 건조시켰고 이 조각을 strip 하단과 0.2cm 겹치도록 위치시킨 다음 양면을 테이프로 접착시켰다. 중합체 자동공급 효율을 점검하기 위해, 2.5% casein-PBS로 희석된 *Salmonella* 표준시료들을 각 microwell내에 가한 후 중합체가 축적된 각 strip의 하단을 씻어 세워 용액을 membrane 내로 흡수시킴으로써 분석을 수행하였고, 발색된 신호는 위에서 언급된 과정에 의해 optical density로 전환되었다.

1단계 분석시스템 제조 및 중합체 농도 최적화

최적 중합체 축적방법을 선택하여 다음과 같이 3부분으로 구성된 1단계 분석시스템을 제조하였다 (Fig. 6 참조). 시스템 하단 부분에 위치될 glass fiber membrane(0.5×2cm)은 탈이온수로 세척된 후 1% casein-PBS를 가하여 적신 상태로 건조시켰으므로써 전처리되었고 이 membrane의 위쪽 끝으로부터 0.5cm 부분에 gold-항체 중합체와 동일한 부피의 1% casein-PBS의 혼합용액 4~16 μ L을 가하여 실온에서 건조시켰다. 중단 부분의 nitrocellulose membrane(0.5×2cm) 상에는 아래쪽 끝으로부터 0.8cm 지역에 *Salmonella* 특정항체(1mg/mL) 그리고 1.2cm 지역에 항 염소 토끼항체(0.5mg/mL)가 각각 고정화되었다. 각 항체 고정화 시, microsyringe pump(KD Scientific, 미국)를 이용하여 미량 용액(총 0.75 μ L)을 일정속도(2 μ L/min)로 분출시키므로써 항체가 고정화된 지역을 가는 선 형태로 구성시킨 것을 제외하고는 위에서와 동일한 과정이 사용되었다. 상단 부분에 위치될 cellulose membrane(grade 3MM chromatography, 0.5×3cm)은 과량의 시료를 신속히 흡수시켜 분석 시스템 내에서의 모세관현상에 의한 유체의 흐름을 지속시키기 위해 사용되었다. 이와 같은 3종류의 membrane들은 길이로 0.2cm 겹쳐 배열되도록 양면 테이플를 이용하여 plastic film(overhead projection 용)과 접착되었다. 이와 같이 제조된 시스템을 사용한 분석수행 및 신호발생 과정은 위에서 제시된 바와 동일하다.

농도 응답

최적조건하에서 제조된 1단계 분석시스템의 성능을 시험하기 위해 열처리된 *Salmonella typhimurium* 표준시료의 농도변화에 대한 시스템의 응답을 구하였다. 같은 부피의 1% casein-PBS로 희석된 gold-

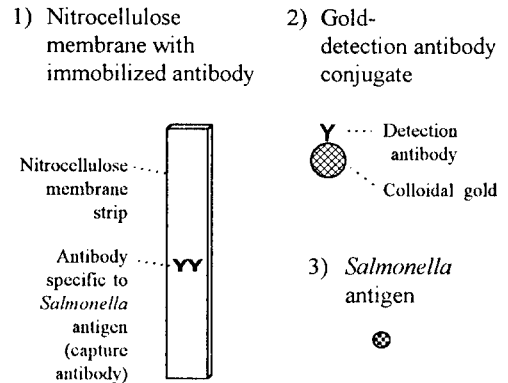


Fig. 1. Major components of membrane strip assay system for *Salmonella* antigen.

항체 중합체 8 μ L을 위에서와 같이 glass fiber membrane에 축적시킨 1단계 분석시스템을 제조하였고 0.5% casein-PBS로 희석된 표준시료를 이용하여 분석을 수행하였다. 결과의 수치화는 위에서 설명된 바와 같다.

결과 및 고찰

시료 내 식중독균(분석물질: *Salmonella typhimurium* 항원)의 존재여부는 분석물질 특정항체들이 적절히 결합된 세공성 membrane strip과 표지물질 (Fig. 1)을 이용한 면역 크로마토그래피 방법에 의해 간편하게 결정될 수 있다. 분석물질에 대한 특정항체들로서 일반적으로 항원(분석물질) 분자상의 인지부위가 다른 두 종류의 단일클론 항체가 사용된다 (11). 한 종류의 항체(포획항체)는 nitrocellulose membrane 표면의 일정지역에 고정화됨으로써 분석물질을 포획하는 기능을 담당하고, 다른 항체(감지항체)는 colloidal gold와 중합됨으로써 신호발생에 관여한다. 본 연구에서는 이와 같은 구성성분들의 준비를 위해 단일클론 항체들 대신에 유사한 결과를 유도시킬 수 있는 복합클론 항체를 사용하였다. 분석 특이성을 유지하기 위해 *Salmonella typhimurium* 항원이 부동화된 칼럼을 이용하여 면역친화 크로마토그래피 방법에 의해 정제된 항체를 선정하였다.

제조된 주요 두 구성성분 즉, 포획항체가 고정화된 membrane strip(면역 strip)과 gold-감지항체 중합체를 이용한 분석원리는 다음과 같다(Fig. 2). 첫째로, 시료 내 분석물질인 *Salmonella* 항원과 중합

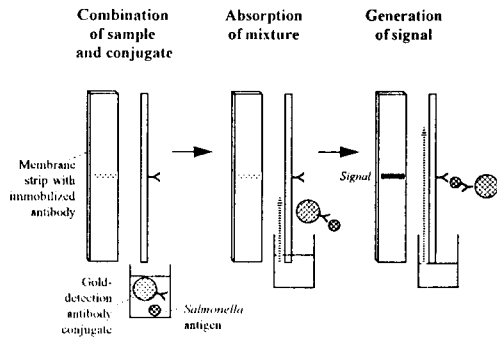


Fig. 2. Principle of membrane strip immuno-chromatographic assay for *Salmonella* antigen.

체를 혼합함으로써 제1차 항원-항체 부착반응에 의한 면역결합을 유도한다. 둘째로, 이 결합체가 포함된 수용액을 면역 strip의 하단으로부터 흡수시키면 수용액은 모세관현상에 의해 strip의 상단으로 이동된다. 셋째로, 수용액이 포획항체가 고정화된 자리에 도달되면 제2차 부착반응에 의해 결합체는 고체표면에 포획되고 나머지 성분들은 유체의 흐름에 따라 분리된다. 포획된 결합체는 표지물질인 colloidal gold를 포함하므로 분석물질의 농도에 비례한 신호가 발생된다. 이 신호는 육안으로 발색여부의 확인이 가능하므로, 사용된 분석시스템은 분석물질의 존재 유무를 판별하는 정성분석에 적합하다. 이와 같은 총 분석과정에 필요한 수행시간은 일반적으로 15분을 초과하지 않도록 조절된다.

위에서 설명된 구성성분과 분석원리를 이용하여 시료 내 *Salmonella* 항원을 간편하게 정성측정할 수 있는 분석시스템을 개발하고자 구성성분들의 제조조건 최적화를 수행하였고, 또한 시료만을 첨가하는 1단계 수행과정에 의한 분석이 가능하도록 시스템을 고안하였다.

구성성분 최적화

분석시스템의 측정성능은 각 구성성분들의 특성에 의해 조절되므로 중합체의 합성과 항체의 고정화를 위한 최적조건을 다음과 같이 결정하였다. 또한 비특정신호의 발생을 억제시키고 이동물질의 이동성을 향상시키고자 항체가 고정화된 membrane의 잔여표면 및 시료반응액의 화학적 조성을 최적화하였다.

Colloidal gold-항체 중합체 합성

본 연구에서 신호발생을 위한 표지물질로써 선정

된 colloidal gold(평균 약 20nm 입자크기)는 합성이 비교적 용이할 뿐만 아니라 항체와의 중합과정이 간단하므로 효소와 Latex beads 등과 같은 전통적인 표지물질의 효과적인 대체물질로써 인정된다(13-14). Gold 입자는 $[AuCl_2]$ 결합체로부터 유래되는 음전하가 그 표면에 분포되어 있으므로 용액 내 이온농도가 낮을 경우 입자간의 전하 반발력에 의해 각개 입자로 존재한다. 그러나 용액 내 이온농도가 증가되면 각 입자표면상의 이온층을 압축시켜 gold 입자들이 근접되고 결국 London-van der Waals 친화력이 전하 반발력보다 크게 되어 응집반응이 일어난다(13-14). 응집이 진행될수록 용액은 붉은색에서 파란색으로 변색되므로 그 정도는 흡광도 580nm(A_{580})에서 흡광량지될 수 있고, 응집이 심할 경우 gold는 침전된다. 그러나 항체를 gold 입자와 중합시키면 입자간의 친화력이 차단되어 응집반응이 억제될 수 있을 뿐만 아니라 gold 입자를 표지물질로써 이용할 수 있다. 그 중합효율은 gold의 응집정도를 대표하는 A_{580} 의 수치에 반비례한다(13).

이와 같은 중합효율 결정방법을 이용하여, gold-항체 중합체를 합성하기 위한 반응용액의 산성도와 항체농도에 대한 최적조건을 시험하였다. 사용된 항체(염소 항체)의 경우, 중합반응용액의 산성도가 pH 9.0인 조건에서 A_{580} 최소치(즉, 중합효율 최대치)에 도달되었고, 그보다 낮거나 높은 산성도 영역에서 증가하였다(Fig. 3, 상단). Gold 입자와 항체간의 결합은 주로 London-van der Waals 친화력과 소수성 상호작용에 의해 야기되고 그 작용력은 일반적으로 항체분자 상의 순수전하(net charge)가 소멸되는 등전기점 혹은 약간 높은 산성도 영역에서 최대가 된다(13-14). 다양한 종으로부터 유래된 항체의 중합을 위한 최적 산성도는 pH 8-9 범위인 것으로 보고되었고(14) 결정된 중합반응 최적 산성도는 이 범위 내에 존재하였다. 또한, 항체농도를 변화시킨 결과를 보면(Fig. 3, 하단), 그 농도가 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하에서는 중합효율이 낮아 gold 입자 간 응집에 의해 파란색으로 변색되는 것이 관찰된($A_{580} > 0.5$) 반면에 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서는 중합효율이 현저히 증가되어 변색이 최소화되었다($A_{580} < 0.3$). 두 농도범위 사이에서 A_{580} 값이 급격하게 감소되는 것은 gold 입자와 항체분자 간의 친화력에 대한 항체의 임계농도가 존재하기 때문으로 해석된다. 이와 같은 결과로부터 안전인자를 고려할 때 최적 항체농도는 $120\sim 150\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위인 것으로 판단된다.

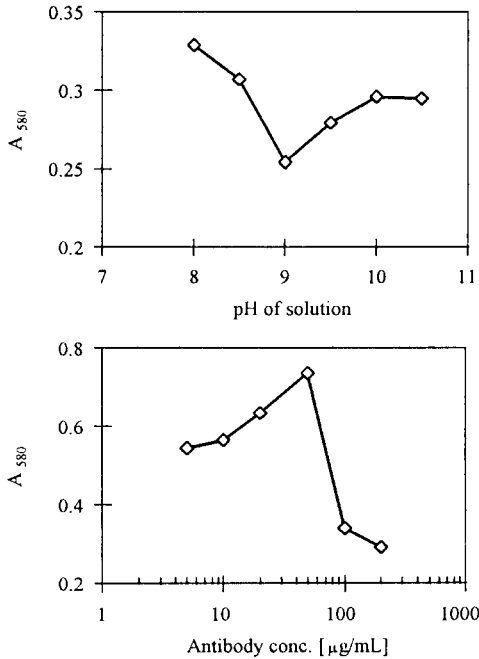


Fig. 3. Determination of optimal conditions for the conjugation between colloidal gold and goat antibody to *Salmonella* antigen. Variable conditions for the pH (top) of solution and the concentration of antibody (bottom) were tested in selected ranges. Optimal conditions were determined by measuring the color change of solution at the absorbance at 580nm (A₅₈₀; see text for details).

항체 고정화

Membrane 상에 항체가 고정화된 면역 strip을 제조하기 위해 nitrocellulose membrane(5µm 세공크기)을 고정화모체로 사용하여 고정화 조건 특히, 선택된 복합클론 항체의 농도와 strip상의 고정화 위치를 시험하였다. 각 조건하에서 제시된 분석 원리(Fig. 2)를 이용하여 최적화 실험을 수행하였고, 실험결과로써 strip 상의 포획항체가 고정화된 자리로부터 발색된 신호는 image digitization 과정에 의해 optical density로 변환되었다. 사용된 항체 농도 범위에서 발색신호는 항체농도에 비례하여 증가하는 것으로 나타났으므로(Fig. 4, 상단) 경제적으로 사용 가능한 최대농도인 1mg/mL을 최적조건

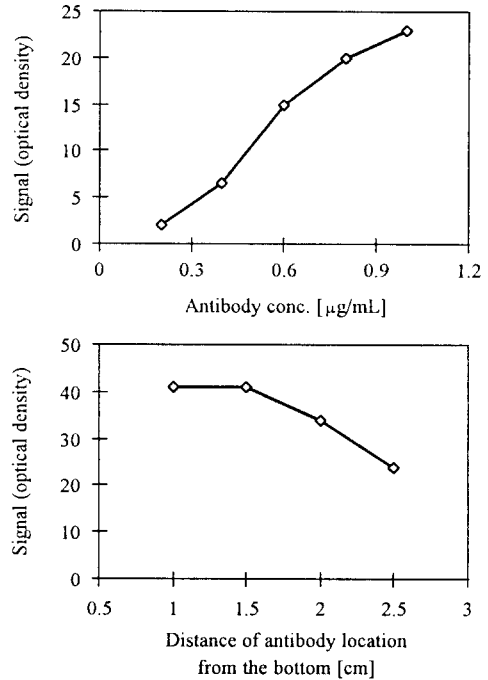


Fig. 4. Determination of optimal conditions for the immobilization of antibody on nitrocellulose membrane strip. Antibody in various concentrations was immobilized by physical adsorption on the area of 1.5 cm from the bottom of the membrane (top). 1mg/mL of antibody was used for the immobilization at different locations (bottom). The amounts of gold conjugate used for each experiments were 0.5µL (top) and 1.5 µL (bottom) per assay, respectively.

으로 선택하였다. 또한, 사용된 항체의 strip상 고정화 위치가 하단으로부터 1.5cm 이하일 경우 신호세기에 대한 위치의 영향이 최소로 나타났지만 그보다 높은 범위에서 신호는 거리에 반비례하여 현저히 감소되었다(Fig. 4, 하단). 분석 시, 면역 strip의 하단으로부터 흡수된 분석물질-중합체 면역결합체가 membrane 세공을 통해 이동됨에 따라 세공표면과의 충돌과 마찰에 의한 결합체의 길이확산(longitudinal diffusion)이 일어난다. 이러한 확산은 이동 거리에 반비례하여 용액의 단위부피 당 결합체의 평균 농도를 저하시키므로 포획항체의 고정화 위치는 strip 하단으로부터 최소거리를 유지시켜야 할 것

로 판단된다. 참고로, Fig. 4 상단과 하단에 나타난 최대 신호세기의 차이는 사용된 gold-감지항체 중합체 농도의 변화에 기인된다.

잔여표면 처리 및 시료운반용액 선택

Nitrocellulose membrane strip 세공을 통한 분석물질과 gold-항체 중합체의 이동성 및 고체표면상의 비특정부착은 고체상 및 액체상의 화학적 성질에 의해 영향을 받는다. Membrane의 일정지역에 항체를 고정화시킨 후 잔여부분은 강한 소수성 성질을 지니므로(15) 이동물질과의 비특정 상호작용을 최소화하기 위해 비반응성 단백질(주로, BSA와 casein) 등으로 잔여표면처리(blocking)를 수행한다(16-17). 표면처리에 사용된 비반응성 단백질의 성질이 이동물질과의 소수성 혹은 이온 상호작용이 강할 경우 이동물질의 이동속도는 현저히 감소되고 더욱이 비특정부착에 의한 비특정신호(noise)가 발생될 수 있다. 이와 같은 분석저해현상은 적절한 표면처리물질을 선택함으로써 부분적으로 조절될 수 있고 또한 시료운반용액 내에 포함된 성분들의 화학적 특성에 따라 증감될 수 있다. 운반용액 내에 비반응성 단백질이 추가될 경우 이 물질은 고체표면상에 고정화된 단백질 그리고 이동물질 분자들과의 상호작용에 의해 비특정 반응을 억제 혹은 유발시킬 수 있다.

제조된 구성성분들을 이용한 분석시스템의 측정성을 향상시키고자 표면처리와 시료운반용액에 사용될 수 있는 비반응성 단백질들을 특정/비특정 신호비(signal-to-noise ratio)와 유속에 대해 최적화하였다(Table 1). 비반응성 단백질들로서 면역분석 시 일반적으로 표면처리에 사용되는 casein 혹은 BSA를 선택하였다. 먼저, 표면처리효과를 시험하기 위해 면역 strip들을 각 단백질로 처리한 후 casein 용액을 동일하게 시료운반에 사용하였다(Table 1A, B). 특정/비특정 신호비는 큰 차이를 보이지 않은 반면에 BSA로 표면처리 시 유속은 2배 이상 현저하게 감소되는 것으로 나타났다. 다음으로, membrane의 표면처리를 casein 용액으로 동일하게 수행한 후 각 단백질 용액을 시료운반에 사용하였다(Table 1A, C). 이 경우, 유속은 크게 변화되지 않았지만 BSA를 포함한 운반용액의 사용시 비특정신호가 증가되어 특정/비특정 신호비가 매우 저하되었다. 마지막으로, 표면처리와 시료운반을 위해 모두 BSA를 사용하면 유속과 특정/비특정 신호비가 모두 현저하게 낮았다(Table 1D). 이러한 결과들로부터 casein은

Table 1. Effect of inert proteins used for blocking and elution on the performance of immuno-strip assay.

Test criteria	Blocking /Elution	(A)	(B)	(C)	(D)
	Casein /Casein	Casein /Casein	BSA /Casein	Casein /BSA	BSA /BSA
Signal-to-noise ratio		High	Intermediate	Low	Low
Elution flow rate		Fast	Slow	Intermediate	Slow

표면흡착 능력이 우수하여 이동물질들의 일정유속을 유지시키고 또한 gold-항체 중합체 등의 비특정반응을 차단시키는 것으로 판단된다. 반면에, BSA는 흡착능이 낮아 그것에 의한 표면처리는 상대적으로 불완전하며 더욱이 중합체의 비특정반응을 매개하는 것으로 추정된다.

부가하여, 유속과 특정/비특정 신호비를 향상시킬 수 있는 표면처리 후보물질들을 탐색하기 위해 위에서 언급된 두 비반응성 단백질 외에 polyvinyl alcohol(PVA), gelatin, 그리고 계면활성제가 시험되었다(제시되지 않은 자료). PVA를 사용할 경우 비특정신호의 증가가 현저하였으며, gelatin을 사용할 경우 유속이 매우 저하되었다. 또한, 계면활성제로서 Tween-20을 다른 단백질과 혼합하거나 단독으로 사용하면 유속은 증가되었으나 신호세기가 감소되는 것으로 나타났다. 신호세기의 감소는 소수성 상호작용에 의해 고체표면에 고정화되었던 항체가 계면활성제 분자에 의해 탈착됨으로써 야기되는 것으로 판단된다. 실제로, 계면활성제는 소수성 부분과 친수성 부분으로 구성되며 특히 분자크기가 작아 단백질과 같은 거대분자를 표면으로부터 유리시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(18). 이와 같이 추가로 시험된 성분들의 효과는 casein의 경우와 비교하여 낮은 것으로 나타났다.

1단계 분석시스템 고안

상기한 바와 같이, 분석시스템 성능을 조절할 수 있는 기초변수들의 최적화를 위해 편의상 분석물질이 포함된 시료와 gold-항체 중합체를 혼합한 후 membrane strip의 하단으로부터 흡수시키는 2단계 측정과정이 사용되었다(Fig. 2 혹은 Fig. 5A 참조). 이러한 과정 중 일정부피의 시료와 중합체용액을 옮겨 혼합하는 단계는 실험실에서 피펫 등을 사용하여 비교적 쉽게 수행될 수 있지만 전문 시설이나 지식이 없는 일반인에게는 번거로울 뿐만 아니라

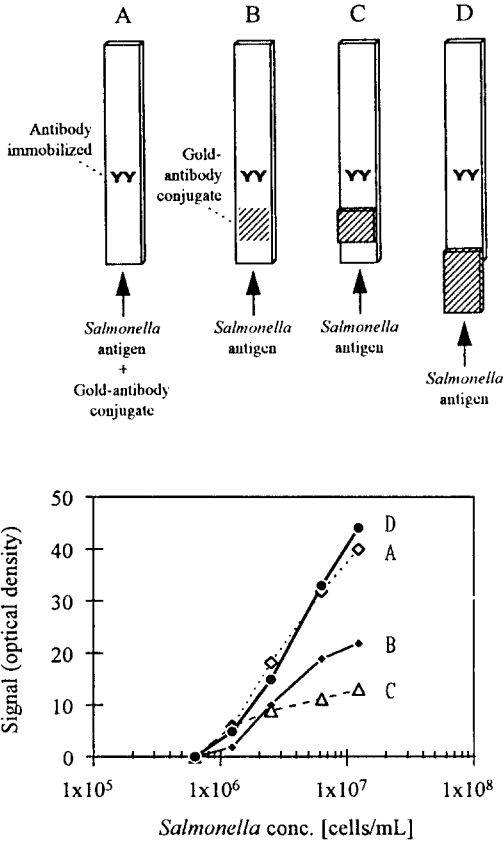


Fig. 5. Methods of gold-antibody conjugate deposition on immuno-strip (top) and comparison of their performances (bottom). To develop one-step assay system, gold conjugate was combined with the strip by directly depositing on the surface (B), by placing on a separate membrane piece to be completely superimposed on the strip (C), or partially on the strip (D). The assay results were compared with that of control (A).

식중독균에 의한 오염도 배제될 수 없다. 사용자의 편의와 안전을 도모하기 위해 membrane strip의 하단을 시료 내에 단지 담금으로써 수행이 완료되는 시스템, 즉 1단계 분석시스템을 개발하였다. 이 경우 gold-항체 중합체는 시료 첨가 시 자동공급되어야 하므로 이를 위한 공급방법 설정실험을 선행하였고 그 결과를 반영한 분석시스템의 설계 및 변수 최

적화를 수행하였다.

Gold-감지항체 중합체 자동공급

분석 시 시료와 중합체를 혼합시키는 과정의 생략은 membrane strip 제조시 중합체를 미리 분석시스템 내에 축적시킴으로써 달성될 수 있다(Fig. 5, 상단 참조). 일정량의 중합체 용액을 membrane 상의 정해진 부위에 가한 후 건조시키면 중합체는 부동상태로 존재하지만 시료를 첨가하면 수용액에 다시 용해되어 자동적으로 항원-항체 반응에 참여하게 된다. 이와 같은 중합체의 축적은 항체가 고정화된 strip 표면에 직접 중합체를 가하거나(Fig. 5B, 상단) 혹은 별도의 membrane에 가하여 건조시킨 후 면역 strip과 결합시킴으로써 수행될 수 있다(5C와 5D, 상단).

가능한 중합체 축적방법들 중 자동공급의 효율성을 평가하기 위해 Fig. 5 상단(B-D)에 도식된 바와 같이 1단계 분석이 수행되었고 그 결과는 조절인자로 사용된 2단계 분석(A)에 의한 측정치와 비교되었다(Fig. 5, 하단). 중합체를 직접 항체가 고정화된 membrane strip 표면에 축적시킬 경우(Fig. 5B) 발색된 신호세기는 조절인자(Fig. 5A)와 비교하여 현저히 감소되었다. 이러한 신호감소는 축적되었던 중합체가 흡수된 시료수용액에 의해 일시에 용해된 후 유체의 흐름에 따라 상부로 이동되는 세척효과에 의해 초래되었을 뿐만 아니라 더욱이 용해된 중합체는 strip의 가로단면에 고르게 분포되지 않는 것으로 관측되었다. 이와 같은 단점들을 보완하기 위해 중합체를 별도의 cellulose membrane 조각에 축적시켰고 이 조각을 strip 표면 위에 올려 접촉시키는 방법을 시도하였다(Fig. 5C). 이 방법에 의해 제조된 면역 strip으로부터 발생된 신호는 strip 상에 직접 축적된 경우보다 더욱 감소되는 것으로 나타났다. 이것은 별도의 membrane에 축적된 중합체의 유출이 불완전하기 때문으로 해석된다. 그러나 용해된 중합체는 strip의 가로와 세로방향으로 비교적 고르게 분산되어 이동하는 것으로 관찰되었다. 중합체가 축적된 별도의 membrane 조각을 사용하는 방법은 이 조각을 면역 strip의 하단에 부분적으로 포개어 결합시킴으로써 개선되었다(Fig. 5D). 개선된 시스템의 신호발생 성능은 조절인자의 경우와 유사하였을 뿐만 아니라 중합체의 이동도 일정하게 분산되어 일어났다. 이와 같은 시스템 구조에서는 시료의 유입이 중합체가 축적된 membrane을 통해 이루어지므로 용해된 중합체와 분석물질 간의 면역반응이 우

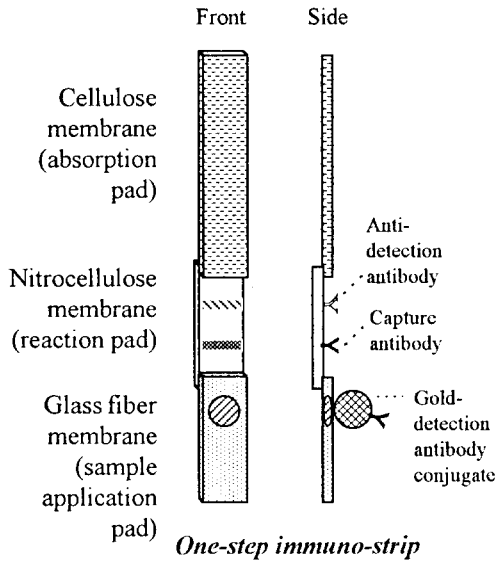


Fig. 6. Design of one-step immuno-strip system for *Salmonella* antigen.

선적으로 야기되고 반응결합체는 면역 strip으로 이동되어 고정화된 항체에 의해 포획됨으로써 2단계 분석에서와 매우 유사한 순차적 반응이 유도되는 것으로 판단된다. 또한 중합체 축적을 위해 선택된 membrane은 면역 strip의 제조에 사용된 nitrocellulose membrane과 비교하여 수용액의 흡수속도가 빠르므로 중합체가 용해된 후 일정시간 동안 정체되어 분석물질과의 반응기회는 증대될 수 있다.

분석시스템 설계

위에서 결정된 gold-감지항체 중합체의 최적 자동 공급 조건을 반영하여 1단계 과정에 의해 수행이 완료될 수 있는 분석시스템이 설계되었다(Fig. 6). 고안된 시스템은 하부로부터 중합체가 축적된 glass fiber membrane과 항체가 고정화된 nitrocellulose membrane 그리고 과량의 수용액을 흡수하는 cellulose membrane들의 끝부분이 접촉되어 상호간에 연결된 형태로 구성된다. 하단에 위치한 glass membrane은 Fig. 5에서 사용된 cellulose membrane과 비교하여 흡습력이 더욱 높아 단시간 내에 시료를 흡수할 수 있을 뿐만 아니라 용해된 중합체가 상부에 연결된 면역 strip으로 이동되기 전에 정체시간을 연장시킴으로써 분석물질과 중합체간의 효율적인 반응을 유도할 수 있다. 중단의 면역 strip

상에는 분석물질 특정항체(아래선)와 gold 입자에 중합된 감지항체에 특이한 항체(항 염소 토끼항체, 윗선)를 공간적으로 분리하여 고정화시킴으로써 분석물질에 비례하여 발생하는 특정신호와 분석물질의 농도에 무관하게 항상 발생하는 조절신호로 이원화하였다. 두 항체의 고정화 위치는 위에서 결정된 최적조건(Fig. 4, 하단 참조)을 반영하여 용해된 중합체가 nitrocellulose membrane 내로 유입되는 시점으로부터 1.5cm가 초과되지 않도록 조절되었다. 면역 strip의 상단에 위치한 cellulose membrane은 크로마토그래피용 재질로 선택됨으로써 과량의 시료가 신속히 흡수될 수 있도록 고려하였다.

중합체 축적조건 최적화

위에서 설계된 1단계 분석시스템의 구성성분 중 중합체가 축적된 glass membrane을 제조하기 위한 최적조건을 결정하고자 membrane의 전처리조건 및 중합체의 축적농도를 시험하였다. 전처리조건 선택은 membrane의 일정부위에 축적된 중합체가 수용액과 접촉 시 즉시 용해되어야 하며 또한 신속히 이동되어야 하는 요구에 부합되도록 수행되었다. 중합체를 처리되지 않은 membrane 표면에 축적시킬 경우 중합체 분자와 고체표면 간의 상호작용에 의해 중합체의 용해 및 이동이 매우 불량한 것으로 나타났다(제시되지 않은 자료). 이러한 상호작용에 의해 야기되는 문제점을 해결하고자 중합체 축적 전에 sucrose 용액 혹은 비반응성 단백질인 casein 용액을 가하여 건조시킴으로써 완충물질이 삽입되었다. 용해속도에 대한 효과적인 두 물질의 농도범위에서 sucrose는 시료수용액의 점도를 상승시켜 이동속도를 감소시킨 반면에 casein은 위에서 언급된 요구들을 모두 충족시키는 것으로 나타났다.

이와 같이 casein으로 전처리된 glass membrane 표면에 축적될 중합체의 최적량을 결정하기 위해, 축적 총량은 농도가 일정한 중합체의 부피에 의해 조절되었고 각 조건하에서 1단계 분석을 수행하였다(Fig. 7). 분석시스템으로부터 발생된 특정신호 세기는 사용된 중합체의 양에 비례하여 증가되었다. 그러나 과량으로 사용되면 분석물질 농도가 비교적 낮은 영역에서 비특정신호가 증가되어(Fig. 7, $16\mu\text{L}$) 특정/비특정 신호비가 현저히 감소될 뿐만 아니라 또한 위양성 결과가 초래된다. 이러한 중합체 농도범위에서 발생된 신호로부터 비특정신호를 감하여 계산된 순수 특정신호는 중합체 농도에 관계없이 일정하게 된다. 사용될 수 있는 중합체의 적정량은 본

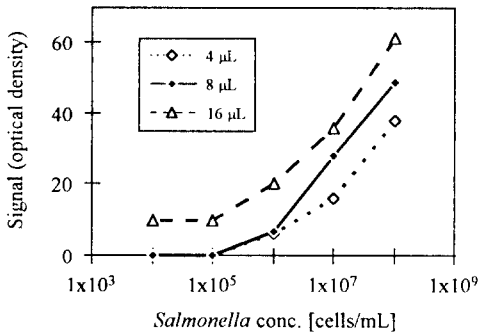


Fig. 7. Determination of optimal amount of gold-antibody conjugate used for deposition on glass membrane of one-step immuno-strip assay system.

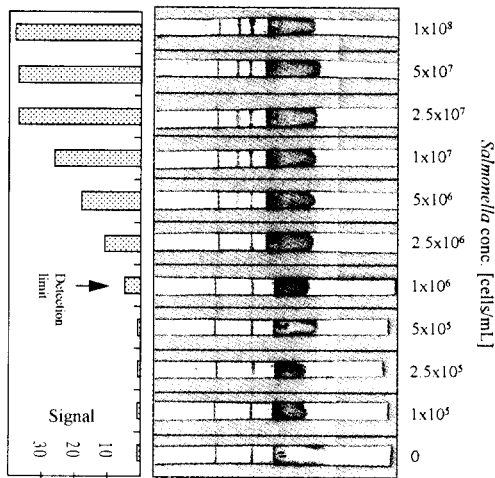


Fig. 8. Dose-response of one-step immuno-strip assay system to the concentration of *Salmonella* cells.

시스템의 경우 약 8µL인 것으로 판단되지만 구성성분이 다른 시스템의 경우 일반적으로 중합된 감지항체와 분석물질 간의 부착평형상수에 반비례하여 변화된다.

농도 응답

위에서 결정된 최적조건 하에서 제조된 1단계 분석시스템의 측정성능을 시험하고자 다양한 농도범위의 분석물질에 대한 시스템의 농도응답을 결정하였다(Fig. 8). 분석물질 농도에 반응하여 발생된 특정

신호(중단 membrane 상의 아래 신호) 세기는 비교적 높은 농도범위($2.5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ cells/mL)에서 농도에 정비례하였고 탐지하한농도(detection limit)는 약 1×10^6 cells/mL인 것으로 나타났다. 이와 같은 분석성능은 2단계 분석방법을 이용한 결과와 동일하였다. 분석과정 상의 이상유무를 점검할 수 있는 조절신호(윗 신호) 세기는 분석물질 농도에 관계없이 일정하였다. 개발된 분석시스템을 이용한 식품 검사 시, 일정량의 시료 내에 포함될 수 있는 최소 1개의 *Salmonella* 균세포가 탐지하한농도까지 증식 되도록 배양조건을 설정하고 이 조건하에서 배양된 균세포를 열처리 후 분석시스템에 가하여 균에 의한 오염여부를 결정한다.

결론으로써, 시료 내 식중독균인 *Salmonella typhimurium*의 존재여부를 간편하게 정성분석할 수 있는 1단계 측정시스템이 nitrocellulose membrane을 포획항체의 고정화매체로 그리고 colloidal gold-감지항체 중합체를 신호발생원으로 이용하여 개발되었다. 시스템의 성능은 포획항체의 고정화조건(농도 및 위치), membrane 표면 및 시료온반응액의 화학적 성질, 그리고 중합체의 공급방법과 축적조건에 의해 조절되었다. 각 인자의 최적조건하에서 고안된 시스템의 분석물질 탐지하한농도는 약 1×10^6 cells/mL인 것으로 나타났다.

요 약

열처리된 *Salmonella typhimurium* 항원을 모델 분석물질로 선택하여 단지 시료만을 첨가함으로써 측정을 수행할 수 있는 1단계 immuno-chromatography 분석시스템이 개발되었다. 개발된 시스템은 분석물질 특정항체(감지항체)-gold 중합체가 건조된 상태로 축적된 glass fiber membrane(하단), 분석물질의 다른 epitope를 인지하는 항체(포획항체)와 항 감지항체 특정항체들이 공간적으로 분리되어 고정화된 nitrocellulose membrane(중단), 그리고 흡수대로 선택된 cellulose membrane(상단)들로 구성된다. 이와 같은 구성성분들은 분석물질을 포함한 시료수용액이 모세관현상에 의해 연속적으로 이동되도록 부분적으로 포개어 배열되었다. 분석시스템의 성능을 조절하는 변수들은 포획항체의 농도 및 membrane 상의 고정화 위치, membrane 표면처리와 시료온반응액에 사용된 비반응성 단백질의 종류, 그리고 중합체의 농도로서 확인되었다. 최적조건하에서, 시스템의 하부로부터 시료수용액을 흡수 후

15분 이내에 포획항체가 고정화된 membrane 상의 지역에 샌드위치 형상의 항원-항체 면역결합체가 형성되었고 이로부터 발생된 발색신호는 분석물질의 농도에 비례하는 것으로 나타났다. 분석물질의 측정 하한농도는 1×10^6 *Salmonella* cells/mL인 것으로 나타났다.

감 사

본 연구는 두산기술원의 재정지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 신호선, 신광순, 정영채, 이용욱(1987), 최신식품위생학, p. 97, 신광출판사, 서울.
2. 정동관(1993), *Kor. J. Food Hygiene*, **8**, S1.
3. J. M. Jay(1986), *Modern Food Microbiology*, 3rd ed., p. 95, Van Nostrand Reinhold Co., New York.
4. F. C. Tenover(1989), *DNA Probes for Infectious Diseases*, p. 53, CRC Press, Boca Raton.
5. J. A. Mattingly, B. T. Butman, M. C. Plank, and R. J. Durham(1988), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 679.
6. W. Schippers(1992), *Scand. Dairy Inform.*, **4**, 72.
7. C. Soumet, G. Ermel, P. Boutin, E. Boscher, and P. Colin(1995), *BioTechniques*, **19**, 792.
8. R. Torensma, M. J. C. Visser, C. J. M. Aarsman, M. J. J. G. Poppelier, A. C. Fluit, and J. Verhoef(1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2713.
9. R. Torensma, M. J. C. Visser, C. J. M. Aarsman, M. J. J. G. Poppelier, R. van Beurden, A. C. Fluit, and J. Verhoef(1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3868.
10. W. Hansen and J. Freney(1993), *J. Microbiol. Meth.*, **17**, 227.
11. S. Birnbaum, C. Uden, C. G. M. Magnusson, and S. Nilsson(1992), *Anal. Biochem.*, **206**, 168.
12. S. C. Lou, C. Patel, S. Ching, and J. Gordon(1993), *Clin. Chem.*, **39**, 619.
13. R. M. Albrecht, S. R. Simmons, and J. B. Pawley(1993), *Immunocytochemistry, A Practical Approach*, (J. E. Beesley, ed), p.151, Oxford University Press, New York.
14. J. Roth(1983), *Techniques in Immunocytochemistry*, (G. R. Bullock and P. Petrusz, eds), Vol. 2, 217, Academic Press, London.
15. J. M. Gershoni and G. E. Palade(1983), *Anal. Biochem.*, **131**, 1.
16. J. G. Kenna, G. N. Major, and R. S. Williams(1985), *J. Immunol. Meth.*, **85**, 409.
17. V. K. Vijayan and S. M. Zingde(1995), *BioTechniques*, **18**, 430.
18. W. L. Hoffman and A. A. Jump(1986), *J. Immunol. Meth.*, **94**, 191.