KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 39, No. 3, pp. 299~303 (2007)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

Listeria monocytogenes 신속 검출을 위한 면역크로마토그래피법의 개발

최진길* · 심원보 · 제정현 · 김지영 · 이규호[1] · 김민곤[2] · 하상도[3]
김근성[3] · 김광엽[4] · 김철호[5] · 정덕화

경상대학교 대학원 응용생명과학부(BK21), [1]한국외국어대학교 환경학과, [2]한국생명공학연구원,
[3]중앙대학교 식품공학과, [4]충북대학교 식품공학과, [5]성균관대학교 생명과학과

Development of Immunochromatography for the Rapid Detection of *Listeria monocytogenes*

Jin-Gil Choi*, Won-Bo Shim, Jung-Hyun Je, Ji-Young Kim, Kyu-Ho Lee[1], Min-Gon Kim[2], Sang-Do Ha[3], Keun-Sung Kim[3], Kwang-Yup Kim[4], Cheol-Ho Kim[5], and Duck-Hwa Chung

Division of Applied Life Science(BK21), Graduate School of Gyeongsang National University
[1]Environmental Science, Hankuk University of Foreign Studies
[2]Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
[3]Department of Food Science & Technology, Chung-Ang University
[4]Department of Food Science & Technology, Chung-Ang University
[5]Department of Biological Sciences, Sungkyunkwan University

Abstract The objective of this study was the development of immunochromatography (ICG) for the rapid and accurate detection of *Listeria monocytogenes*. Here, monoclonal antibodies (MAb) were conjugated with 40 nm colloidal gold particles, where the conjugate was used as the detection reagent in the ICG. The ICG was composed of three pads (sample, conjugate, and absorbance pads) and one nitrocellulose membrane. The colloidal gold-MAb conjugate was applied to the conjugate pad, and the test line and control line on the membrane were treated with MAb (FKLM-3B12-37) and anti-mouse IgG, respectively. The detection limit of the ICG was 10^5 cell/mL and it showed no cross-reaction to food borne pathogens. We inoculated meat and lettuce samples with various counts of *L. monocytogenes*, and analyzed them by ICG. All the inoculated meat samples gave positive results after enrichment for 24 h in LEB. These results indicate that ICG was able to serve as a primary screening tool for *L. monocytogenes* in various foods and agricultural products within 20 min after enrichment.

Key words: *Listeria monocytogenes,* immunochromatography (ICG), colloidal gold, monoclonal antibody

서 론

*Listeria monocytogenes*는 Gram 양성, 무포자 간균으로 ß-hemolysin을 생성하고 식중독을 발생시켜 공중보건과 식품위생상에서 관리되어야할 중요한 균이다. 특히 저온에서도 증식이 가능하기 때문에 일반식품 뿐만 아니라 냉동식품과 유제품 등의 저온보장 식품에서도 빈번히 검출되고 있으며, 이러한 점은 최근의 냉장유통 제품의 급격한 증가에 따라 문제시 되고 있다(1). 또한 사람과 가금류뿐만 아니라 물, 공기, 목초, 하수 등의 자연계와 우유, 육류, 채소류, 수산물 가공식품, 냉동식품 등 거의 대부분의 식품에서 검출되고 있다(2). *L. monocytogenes* 1980년대에 들어와 이 균에 의한 집단 식중독이 유럽과 북미대륙에서 발생하여 주목을 받기 시작했다. 1981년 캐나다에서 양배추 샐러드인 coleslaw 섭취에 의한 환자발생과, 1983년 미국 메사추세스주에서 저온살균 우유에 의한 환자발생(3), 그리고 1987년 덴마크, 스위스, 영국 등의 유럽지역에서도 리스테리아증(Listeriosis)이 발생하는 등 *L. monocytogenes*에 의한 식중독사고는 전 세계적으로 증가 추세에 있다(4).

식품 중 *L. monocytogenes*의 검출에 주로 사용되는 방법으로는 선택배지법, 생화학적 분석법, 그리고 혈청학적 분석법 등이 있다. 그러나 이러한 방법들은 실험완료시점까지 3~5일 정도로 시간의 소비가 많이 요구되며, 다량의 시료에 대해서는 시간과 노동력을 많이 필요로 하고, 마지막으로 오직 살아있는 균에 대해서 분석이 가능한 단점들이 있다.

많은 연구자들이 이러한 문제점들을 극복하기 위해 신속분석법을 개발, 보고하고 있으며 특히 1980년대부터 면역분석법(immunoassay)이 식중독 균 분석에 소개되어 널리 이용되고 있다. 그 중 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay)은 특이성, 민감성, 신속성, 그리고 응용성이 높기 때문에 실험실이나 상용화된 키트로서 가장 많이 이용되고 있다(5-7). 그러나 이 분석법 또한 발색된 신호세기는 spectrophotometer를 이용하여야 하므로 실험실 내에서만 가능하며, 훈련된 분석자, 세척 및 반응 등의 복잡한 과정을 필요로 하는 단점이 대두되었다. 그러므로 최

*Corresponding author: Duck-Hwa Chung, Division of Applied Life Science. Graduate School of Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea
Tel: 82-55-751-5480
Fax: 82-55-753-4630
E-mail: dhchung@gnu.ac.kr
Received March 22, 2007; accepted May 2, 2007

근에는 분석법에 대한 전문지식이 없는 일반인이라 하더라도 사용이 가능하도록 조작이 쉽고, 빠른 시간 내에 결과를 얻을 수 있을 뿐만 아니라, 특별한 기기의 사용이 요구되지 않는 분석방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

최근 개발된 면역크로마토그래피법은 효소면역분석법을 기초로 한 분석방법으로서 부대장비나 시약을 필요로 하지 않고 육안적으로 10분 이내에 결과를 판정할 수 있는 방법으로 의학분야에서 질병 진단을 하기위한 방법으로 많이 연구되고 있다(8-11). 면역크로마토그래피법은 colloidal gold입자의 표면에 항체가 반델발스의 인력과 소수성 상호작용에 의해 결합된 colloidal gold-항체를 marker로 이용하며, sample pad에 시료용액을 떨어뜨리면 conjugate pad, nitrocellulose(NC) membrane, 그리고 absorbent pad로 시료가 전개되면서 항원항체반응을 유발한다. 이러한 면역크로마토그래피법을 식중독 균 분석에 응용하는 연구가 시도되고 있으며 정 등(11)은 살모넬라 균을 5.2×10^6 cell/mL 까지 분석할 수 있는 면역크로마토그래피법을 보고하였다. 또한 몇몇 진단 키트회사들에 의해서 *L. monocytogenes*를 분석할 수 있는 시판 키트는 판매되고 있는 실정이나 면역크로마토그래피법 개발에 관한 연구는 현재까지 국내외적으로 보고된 바는 없다.

따라서, 본 연구에서는 *L. monocytogenes*에 대한 단크론성 항체를 생산하고, 면역크로마토그래피법을 개발하였으며, 이를 임의로 접종시킨 식품시료 분석에 응용하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

면역항원준비

L. monocytogenes ATCC 19115를 trypic soy broth(TSB, Difco, Ann Arbor, MI, USA)배지 500 mL에 접종한 후 37°C에서 16시간 동안 진탕배양하고, 37% formalin 용액을 최종농도가 0.5%가 되도록 균을 배양한 배양액에 첨가하여 16시간 동안 약하게 진탕하며 처리하였다. 처리된 액을 5,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액은 버리고 균체는 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.8)로 3회 원심수세 하였다. 세척된 균체는 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)를 이용하여 10^9 cell로 희석한 후 -70°C에 보관하면서 면역원으로 사용하였다.

단크론성 항체 생산

Formalin으로 처리된 *L. monocytogenes*(formailn killed *L. monocytogenes*, FKLM)를 PBS에 10^9 cell/mL로 준비하고 complete Freund's adjuvant(Sigma, St. Louis, MO, USA)와 1 : 1(v/v)로 유화시켜 생후 7~8주된 BALB/C 마우스(Hyochang Science, Daegu, Korea)에 마리당 10^8 cell/200 μL씩 복강에 1차 면역을 실시하였다. 1차 면역 2주와 4주 후 각각의 면역원과 incomplete Freund's adjuvant로 동량 혼합한 유화액으로 2회 추가 접종을 실시하고, 세포융합 3일 전에 2배량의 면역원만을 복강 내 주사하여 최종 면역하였다. 최종 면역 후 항체 생성여부를 확인하기 위하여 마우스의 꼬리정맥에서 혈청을 채취하여 간접 비경쟁 효소면역분석법(indirect non-competitive ELISA)을 실시하여 항체의 역가를 측정하였다. 높은 역가를 가지는 마우스의 비장세포와 myeloma cell(V653)을 Kohler 등(12)의 방법에 따라 융합을 실시하였고, Mckearn 등(13)의 무한대 희석법으로 cloning한 후 단크론성 항체를 생산하는 hybridoma를 개발하였다. 확보된 hybridoma를 대량 배양한 후 마우스의 복강에 이식하여 1주일 후 복수액을 생산하였고, 생산된 복수액을 ammonium sulfate 침전법으로 1차 정제한 후 protein G agrose(Bioprogen, Daejeon, Korea)로 2차 정제한 것을 PBS에 3일 동안 투석하였으며, 동결건조 시킨 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

Colloidal gold와 항체 결합체 준비

효소면역분석법의 경우 주로 효소를 marker또는 tracer로 사용하고 있다. 그러나 면역크로마토그래피법에서는 colloidal gold를 marker로 사용하고 있다. 먼저 직경 40 nm의 colloidal gold 용액을 Frens(15)의 방법으로 본 연구실에서 직접 준비하였다. Colloidal gold와 항체를 결합시키기에 앞서 colloidal gold를 안정화 시키는 항체의 량을 결정하였다. 먼저 동결 건조된 단크론성 항체를 0.1 mg/mL의 농도가 되도록 2 mM borax buffer에 녹여 준비하였고 colloidal gold 용액을 0.1 M K_2CO_3를 이용하여 pH 8.5로 맞춘 후 E-tube에 1 mL 씩 분주하였다. 각각의 E-tube에 단크론성 항체용액을 0, 10, 20, 30-150 μL를 넣고 2 mM borax buffer로 각 E-tube의 volume을 1150 μL로 맞춘 후 교반하여 5분간 방치하였다. 시간이 경과 후 10%(w/v) NaCl 용액을 각 E-tube에 50 μL씩 넣어 교반하고 1분 후 흡광도를 540 nm에서 관찰하여 colloidal gold를 안정화시키는 항체의 량을 측정하였다(14).

Colloidal gold를 안정화 시키는 항체의 양이 결정되면 pH를 8.5로 맞춘 colloidal gold 용액 20 mL에 항체용액(0.1 mg/mL in 2 mM borax) 700 μL을 한 방울씩 천천히 점적하고 15분간 교반하였다. 교반 후 10% bovine serum albumin(BSA)용액을 최종 농도가 1%가 되도록 첨가한 후 다시 실온에서 교반하면서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후 10,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet을 2 mM borate buffer(pH 7.2) 10 mL로 재부유한 후 상기 조건으로 원심분리하여 상층액을 제거하는 과정을 3회 반복 실시하였다. 최종 원심분리 후 BSA가 1%첨가된 2 mM borate buffer(pH 7.2) 2 mL에 pellet을 부유시켜 냉장보관하였다. Colloidal gold 입자와 항체의 결합을 확인하기 위해 항체, colloidal gold 용액, colloidal gold-antibody 용액을 fluorescence spectroscopy LAMBDA-900(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)로 확인하였다.

면역크로마토그래피법 개발

면역크로마토그래피법은 3종의 pad와 하나의 nitrocellulose(NC) membrane으로 구성되어 있다. 먼저 sample pad는 1% BSA, 0.5% Tween 20, 5% sucrose, 5% dextrane, 0.05% sodium azide가 첨가된 50 mM borate buffer(pH 7.4)에 30분간 담궜다가 꺼내어 60°C에 1시간 동안 건조시켜 사용하였다. Conjugate pad는 colloidal gold-antibody conjugate 용액을 BSA, sucrose가 각각 1%씩 포함된 20 mM borate buffer(pH 7.4)로 5배 희석하여 conjugate pad에 뿌린 후 37°C에서 30분간 건조 후 실험에 사용하였다. 마지막으로 실험의 결과가 나타나는 NC membrane은 test line과 control line을 앞서 생산된 단크론성 항체와 anti-mouse IgG로 각각 처리하여 37°C에서 30분간 건조 후 사용하였다. Absorbent pad는 다른 처리 없이 바로 사용하여 면역크로마토그래피를 개발하였다.

개발된 면역크로마토그래피에 대한 시료 전개용액의 영향을 확인하였다. 즉, *L. monocytogenes* 배양액에 대하여 세척과정 없이 바로 면역크로마토그래피에 적용이 가능한지, 세척이 필요하다면 면역크로마토그래피에 가장 영향을 적게 미치는 세척용액의 종류를 선택하는 실험을 실시하였다. 간략히 설명하면, *L. monocytogenes* ATCC 19115를 *Listeria* enrichment broth(LEB, Difco) 배지 5 mL에 한백금이 접종한 후 37°C에서 24시간 배양한 배양액을 3개의 E-tube에 1 mL씩 옮긴 후 13,000 rpm에서 5분간 원심

분리하여 생성된 pellet을 재부유하는 용액을 PBS (pH 7.4), 0.1 M Tris-HCl(pH 7.2), 그리고 3차 증류수 등 3종류로 하여 3회 원심수세하여 준비하였고, 세척과정을 거치지 않은 배양액을 각각 개발된 면역크로마토그래피에 200 μL씩 분주하였다. 또한 면역크로마토그래피의 특이성을 확인하기 위해 *L. monocytogenes* ATCC 19115와 다른 병원성미생물인 *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 40138, *Staphylococcus aureus* ATCC 14458을 면역크로마토그래피법으로 분석하여 교차반응성을 확인하였으며 검출한계를 측정하기 위해 *L. monocytogenes* 배양액을 10진 단계희석법을 이용하여 10^8~10^0 cell/mL로 희석하고 각 희석배수별 배양액을 200 μL씩 취해 면역크로마토그래피에 적용하였다.

L. monocytogenes 양성 시료 분석

소고기와 상추 각 25 g에 10^8 cell, 10^6 cell, 그리고 10^4 cell로 오염시킨 후 1시간 동안 고정화 시키고 LEB 125 mL를 첨가하여 2분간 stomach하였다. Stomach한 각 시료의 상층액을 1 mL 취하여 3회 원심수세하고 최종 볼륨을 200 μL 조정한 후 면역크로마토그래피법에 적용하였다. 또한 각각의 stomach한 시료를 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 각 배양 상등액을 1 mL취하여 3회 원심수세하고 최종볼륨을 200 μL 조정한 후 면역크로마토그래피법에 적용하였다.

결과 및 고찰

단크론성 항체의 특성

항체 역가가 높은 마우스를 이용하여 세포융합을 실시한 후 단크론성 항체를 생산하는 hybridoma(FKLM-3B12-37)를 확보하였다. FKLM-3B12-17 hybridoma로부터 생산된 항체를 대량 생산하였고, 그 특성을 Western blot으로 확인하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보는바와 같이 개발된 단크론성 항체는 *L. monocytogenes* 뿐만 아니라 *S. aureus*에도 반응하는 것으로 확인되었다. 그러나 다른 병원성 균에 대해서는 교차반응을 보이지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 Siragusa 등(16)의 *L. monocytogenes*의 항

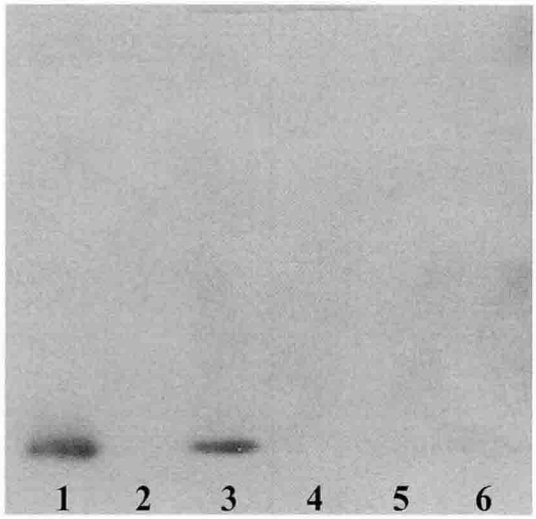

Fig. 1. Reaction pattern of anti-*L. monocytogenes* FKLM-3B12-41-21 to various pathogenic bacteria by Western blot. Lane 1: *L. monocytogenes*, Lane 2: *V. vulnificus*, Lane 3: *S. aureus*, Lane 4: *E. coli*, Lane 5: *B. cereus*, and Lane 6: *S. typhimurium*.

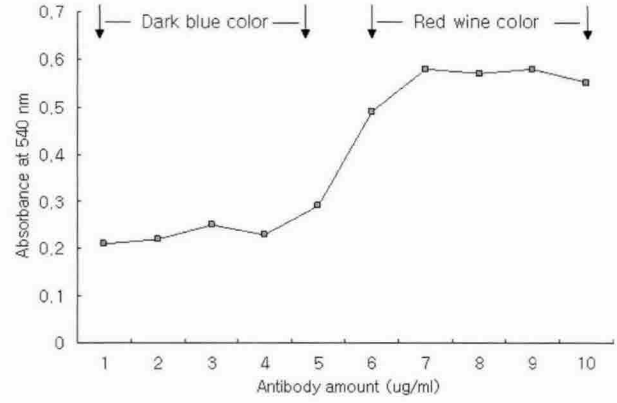

Fig. 2. Determination of anti-*Listeria* MAb amount to stabilize gold particle.

체생산 실험에서 *S. aureus* 등 다른 병원균과 교차반응성을 보이는 결과와 유사하였다. 이러한 이유는 *S. aureus*는 일반적으로 세포벽에 Protein A라는 단백질을 발현하는데 이 단백질은 면역글로블린(immunoglobulin, Ig)와 친화성이 높은 단백질로서 본 연구에서 생산된 단크론성 항체(isotype IgG)와 *S. aureus*가 세포벽에 발현한 Protein A에 반응하는 것으로 생각되었다.

Colloidal gold와 항체 결합체 확인

Colloidal gold는 일반적으로 그 자체는 불안정한 상태이나 단백질이나 항체 등과 결합하여 안정화된 상태를 유지한다. 그러므로 충분한 항체의 의해 안정화된 colloid gold용액의 경우 10% NaCl을 첨가하였을 때 적색이 유지되지만 안정화되지 않은 경우에는 암청색으로 변하게 된다. 앞서 설명한 바와 같이 10% NaCl을 이용하여 colloidal gold를 안정화 시키는 항체의 양을 측정한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 anti-*Listeria* MAb 항체는 colloidal gold 1 mL당 7 μg 이상 첨가하였을 때 적색을 유지하여 colloidal gold를 안정화 시키는 것으로 나타났다. 그러나 7 μg의 항체량은 합성 시 colloidal gold의 응집현상을 나타내는 경우가 생겨 실제 합성에서는 colloidal gold 1 mL당 7.7 μg의 항체를 첨가하여 실시하였다. 또한, 항체와 colloidal gold의 합성 여부를 확인하기위해 항체, colloidal gold 용액, 그리고 colloidal gold-antibody conjugation을 fluorescence spectroscopy로 확인한 결과 항체만 존재하는 용액에서는 250~320 nm 사이에서 피크가 발생하였고 colloidal gold용액에는 480~600 nm 사이에서, 마지막으로 colloidal gold-antibody conjugation에서는 250~320 nm 사이, 480~600 nm 사이 모두에서 피크가 발생하여 항체와 gold입자가 결합된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

면역크로마토그래피의 최적화

면역크로마토그래피는 시료의 전개용매에 따라 영향을 크게 받을 가능성이 높다. 따라서 최적의 전개용매를 선택하기 위해 *L. monocytogenes*를 면역크로마토그래피에 적용 시 PBS, 0.1 M Tris-HCl, 3차 증류수, 마지막으로 LEB를 사용하여 면역크로마토그래피에 적용하였다. 그 결과 3차 증류수의 경우 음성과 양성시료 모두에서 control과 test line에 적색선이 형성되지 않았고, LEB배지의 경우 양성, 음성시료 모두 test line에 선이 생성되어 분석하는데 있어 부적합한 것으로 판단되었다. 반면에 PBS와 Tris-HCl 용액은 양성시료에서 control과 test line에 적색선이 형성되었고 음성시료에서는 control line에만 적색선이 형성되어 면역크로마

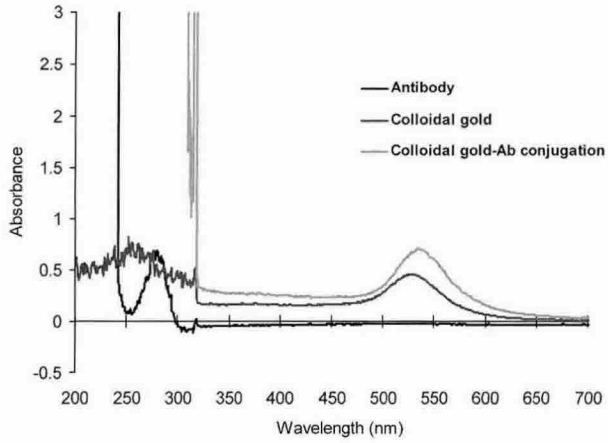

Fig. 3. Fluorescence spectra of antibody, colloidal gold and colloidal gold-Ab conjugation solution.

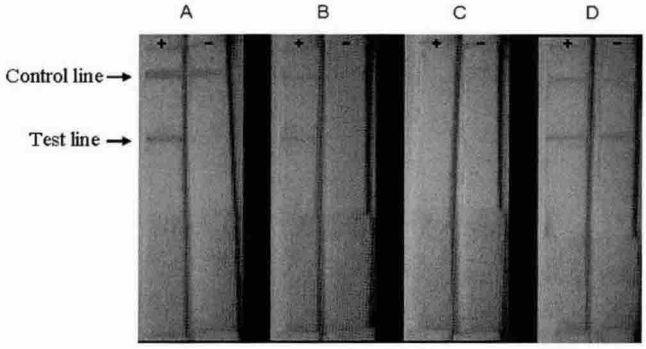

Fig. 4. Influence of working solution for the development of immunochromatography. A: PBS, B: Tris-HCl, C: 3°DW, D: LEB, +: positiv sample, and -: negative sample.

토그래피에 사용이 적합한 용액으로 확인되었다. 그러나 적색선의 색 강도가 PBS용액을 처리한 면역크로마토그래피에서 더 선명하였기 때문에 PBS를 최적 전개용매로 선택하였다(Fig. 4).

교차반응과 검출한계

일반적으로 육류를 비롯한 식품 시료의 경우 *L. monocytogenes* 뿐만 아니라 다른 식중독 균에 오염되어 있을 가능성이 높다. 따라서 다른 식중독균과의 교차반응을 확인한 결과 *L. monocytogenes* 대해서는 test와 control line에 선명한 적색선을 확인할 수 있었으나, *E. coli* 와 *S. typhimurium*에는 control line에만 적색선이 형성되어 교차반응이 없는 것으로 확인되었다. 그러나 *B. cereus*와 *S. aureus*에서는 test line에만 적색선이 생성되었고 control line에

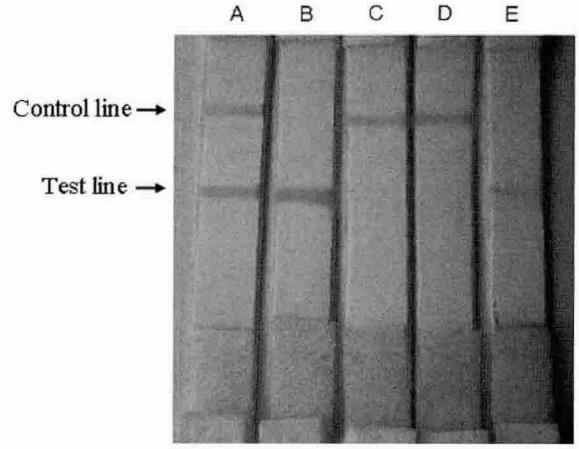

Fig. 5. Cross-reactivity of immunochromatography for other food-borne pathogens. A: *L. monocytogenes*, B: *B. cereus,* C: *E. coli,* D: *S. typhimurium,* and E: *S. aureus.*

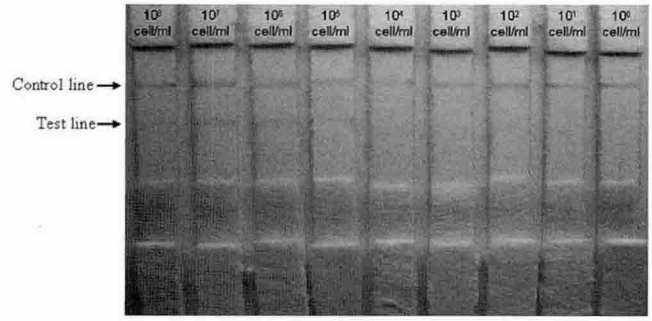

Fig. 6. The result for lower detection limit of completed immunochromatography for the detection of *L. monocytogenes.*

는 적색선이 형성되지 않았다. 2차례 추가적인 실험에서도 같은 현상을 나타내었으며, 이는 교차반응에 의한 것이 아니라 *B. cereus* 와 *S. aureus*가 gold입자와 항체 접합체와 반응 후 거대 분자화되어 항체가 처리된 test line을 통과하지 못하고 침착되어 야기된 결과로 판단되었다(Fig. 5). 따라서 개발된 면역크로마토그래피는 *L. monocytogenes*에 대해서만 특이하게 반응하는 것으로 확인되었다. 또한 10진 단계희석으로 *L. monocytogenes*를 10^8~10^0 cell/mL로 희석하여 면역크로마토그래피에 적용한 결과 검출한계는 10^5 cell/mL 수준이였다(Fig. 6). 현재 개발되어 사용되고 있는 효소면역분석법의 평균 검출한계가 10^5 cell/mL이므로 본 연구에서 개발된 면역크로마토그래피의 민감도는 현재 시판되고 있는 키트와 비슷한 수준으로 확인되었다(17).

Table 1. The results of spiked *L. monocytogenes* to beef and lettuce samples by immunochromatography

Sample		Spiked bacteria count (cell/mL)					
		Beef			lettuce		
		10^8	10^6	10^4	10^8	10^6	10^4
Without enrichment	Control line	+[1)]	+	+	+	+	+
	Test line	-[2)]	-	-	+	-	-
Enrichment for 24 h	Control line	+	+	+	+	+	+
	Test line	+	+	+	+	+	+

1) +: red line was appeared, 2): red line was not appeared

임의로 오염시킨 시료의 분석

소고기와 상추 시료 각 25 g에 *L. monocytogenes*를 10^8 cell, 10^6 cell, 10^4 cell로 임의로 오염시켜 앞서 설명한 방법과 동일하게 균을 배양한 후 면역크로마토그래피에 적용한 결과는 Table 1과 같다. 배양하지 않고 바로 면역크로마토그래피에 적용한 경우 상추시료에 *L. monocytogenes*를 10^8 cell 오염시킨 시료에서만 검출되었으나 24시간 증균한 후 면역크로마토그래피에 적용한 경우는 모두 양성으로 검출이 되었다. 이와 같은 결과로 볼 때 일반적으로 시료 속에 오염되어 있는 균수의 경우가 10^5 cell 이하이며, 특히 소고기시료의 경우 시료에 고정되어 분리되지 않아 측정할 수 없을 가능성이 높을 것으로 사료된다. 따라서 개발된 면역크로마토그래피로 식품 속의 *L. monocytogenes*를 검출하기위해서는 24시간 이상의 증균 과정이 필요한 것으로 나타났다.

요 약

본 연구에서는 *L. monocytogenes*를 신속하게 분석할 수 있는 면역크로마토그래피법을 개발하고자 하였다. 먼저 *L. monocytogenes*에 대한 단크론성 항체(FKLM-3B12-37)를 개발하여 직경 40 nm로 제작된 colloidal gold와 합성한 후 conjugate pad에 처리하였고 nitrocellulose membrane 상의 test line과 control line에 단크론성 항체와 anti-mouse IgG를 각각 처리하여 면역크로마토그래피법을 개발하였다. 개발된 면역크로마토그래피법의 검출한계는 10^5 cell/mL 수준까지 검출이 가능했으며 다른 식중독 세균과는 교차반응이 없는 것으로 나타났다. 임으로 오염시킨 식품시료의 경우 증균과정 없이 10^4 cell/25 g까지 바로 분석하는데 어려움이 있으며 24시간의 증균과정을 거친 후에는 10^4 cell/25 g까지 검출할 수 있었다. 본 연구에서 개발된 면역크로마토그래피법은 24시간의 증균 만으로 식품에 오염되어있는 *L. monocytogenes*를 검출할 수 있는 것으로 사료되었고, 기존의 식중독균 진단방법에 비해 신속하고 간편하게 그 결과를 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것이며(03-PJ1-PG1-CH11-0003) 최진길은 교육인적자원부 제2단계 BK21 사업의 장학금을 수혜 받았음.

참고문헌

1. Bahk JR, Marth EH. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. 17: 634-644 (1989)
2. Farber JM, Johnston MA, Purvis U, Loit A. Surveillace of soil and semi-soft cheese or the presence of *Listeria* spp. Int. J. Food Microbiol. 5: 157-163 (1987)
3. Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL, Brondum J, Hayes PS, Plikaytis BD, Holmes MB, Audurier A, Broome CV, Reingold AL. Pasteurized milks a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. New Engl. J. Med. 312: 404-407 (1985)
4. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. 55: 476-511 (1991)
5. Sewell AM, Warburton DW, Boville A, Daley EF, Mullen K. The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria* spp. from foods. Int. J. Food Microbiol. 81: 123-129 (2003)
6. Kerdahi KF, Istafanos PF. Rapid determination of *Listeria monocytogenes* by automated enzyme-linked immunoassay and nonradioactive DNA probe. J. Assoc. Off. Ana. Chem. Int. 83: 86-88 (2000)
7. Hahm BK, Bhunia AK. Effect of environmental stresses on antibody-based detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol. 100: 1017-1027 (2006)
8. Chiao DJ, Shyu RH, Hu CS, Chiang HY, Tang SS. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B. J. Chromatogr. B 809: 37-41 (2004)
9. Paek SH, Lee SH, Cho JH, Kim YS. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. Methods 22: 53-60 (2000)
10. Jung BY, Jung SC, Kim JM. Development of the immunochromatographic strip for the rapid detection of *Listeria* spp. Korean J. Vet. Res. 45: 169-177 (2005)
11. Jung BY, Jung SC. Development of the rapid detection kit for *Salmonella* spp. using immunochromatographic assay. Korean J. Vet. Res. 45: 191-197 (2005)
12. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells producing antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-501 (1975)
13. Mckearn TJ, Weiss A, Stuart FP, Fitch FW. Selective suppression of humoral and cell-mediated immune responses to rat alloantigens by monoclonal antibodies produced by hybridoma cell lines. Transplant. P. 11: 932-935 (1979)
14. Geoghegan WD, Ackerman GA. Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. J. Histochem. Cytochem. 25: 1187-1200 (1977).
15. Frens G. Preparation of gold dispersions of varying particle size: controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. Nature-Phys. Sci. 241: 20-22 (1973)
16. Siragusa GR and Johnson MG. Monoclonal antibody specific for listeria monocytogenes, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*. Appl. Environ. Microb. 56: 1897-1904 (1990)
17. Kim SH, Park MK, Kim JY, Chuong PD, Lee YS, Yoon BS, Hwang KK, Lim YK Development of a sandwich ELISA for the detection of *Listeria* spp. using specific flagella antibodies. J. Vet. Sci. 6: 41-46 (2005)