

살모넬라 식중독균 신속 검출용 간이 진단키트

김기영 양길모 박선태별 김용훈 이강진 손재용 김혁주 이새롬

Rapid Detection Kit for *Salmonella typhimurium*

G. Kim G. Yang S. B. Park Y. H. Kim K. J. Lee J. Y. Son H. J. Kim S. R. Lee

Abstract

This study was performed to develop a rapid test kit for pathogenic *Salmonella* in various samples. The rapid detection kit has been fabricated based on nitrocellulose lateral-flow strip. Colloidal gold and biotin conjugated *Salmonella* antibodies were used as a tag and a receptor, respectively. Manually spotted *Salmonella* antibody and Neutravidin on nitrocellulose membrane were used as test and control lines, respectively. Feasibility of the rapid kit to detect *Salmonella typhimurium* in samples were evaluated. The intensity of the color of the test line started to increase with the samples in which higher concentration of the cells were contained. The sensitivity of the sensor was 10^6 cfu/mL *Salmonella* spiked in PBS. Also, the rapid test kit could detect 10^6 cfu/mL of *Salmonella* in chicken meat extract.

Keywords : Rapid test kit, Salmonella, Lateral flow

1. 서론

살모넬라는 막대모양의 그람(Gram) 음성 간균으로 편모를 지녀 운동성이 있으며, 식수나 달걀 및 닭고기와 같은 식품 등을 통하여 인체에 질병을 유발시키는 대표적인 병원성 세균이다. 살모넬라는 농식품의 안전성을 위협하는 대표적인 위해요소로서 전 세계적으로 식중독 사고를 가장 많이 일으키는 원인균으로 알려져 있다. 최근 미국에서는 살모넬라에 감염된 토마토에 의해 발생한 식중독사고의 여파로 대형 식품업체에서 토마토 제품을 회수 시키는 등 살모넬라로 인한 피해가 매년 발생하고 있다. 우리나라의 경우도 식품안전성 향상을 위한 노력에도 불구하고 살모넬라(*Salmonella* spp.)에 의한 식중독 사고가 증가하고 있다. 살모넬라균을 검출하기 위한 전통적인 방법은 증식배양, 선택배양 및 생화학검사에 3~5일의 분석시간이 소요되며, 이 때문에 식중독 사고 발생 이후 식중독 원인균을 분리·동정할 목적으로 사용될 뿐 조기에 세균을 검출하여 식중독을 차단하는 것은 매우 어렵

다. 식생활 패턴의 변화에 기인한 대량급식 및 외식의 증가와 가공 농산물의 대규모 유통으로 인한 대형 식중독 사고의 방지와 오염 농산물의 회수에 따른 막대한 비용의 낭비를 막기 위해서는 기존 분석방법의 단점을 보완할 수 있는 신속한 식중독균 검출기술의 개발이 시급하다.

식중독균 신속 검출을 가능케 하는 기술로는 바이오센서와 측방유동 면역크로마토 방법을 이용한 간이 진단키트가 있다. 바이오센서는 생물학적 감지물질을 이용하여 특정 물질에 대한 선택성과 측정 감도를 높일 수 있는 장점 때문에 농식품 분야에서도 위해물질의 신속검출기술 개발을 가능케 할 기술로서 많은 기대를 받고 있다. 식중독 사고를 많이 일으키는 살모넬라균을 신속하게 검출할 목적으로 압전형 바이오센서(Babacan et. al., 2002), 마이크로 전극어레이를 기반으로 한 임피던스 바이오센서(Kim et. al., 2009), 그리고 표면플라즈몬공명 바이오센서(Cho et. al., 2010) 등 다양한 바이오센서 관련 연구가 수행되었다.

측방유동 면역크로마토그래피 방법을 이용한 간이 진단키

The article was submitted for publication on 2011-03-11, reviewed on 2011-03-28, and approved for publication by editorial board of KSAM on 2011-04-05. The authors are Giyoung Kim, senior researcher, KSAM member, Gil-Mo Yang, Junior Researcher, Saet Byeol Park, Research Assistant, Yung Hwun Kim, Junior Researcher, Kang Jin Lee, Senior Researcher, Jae Yong Son, Senior Researcher, Hyuck Joo Kim, Junior Researcher, and Sae Rom Lee, Research Assistant, National Academy of Agricultural Science, RDA. Corresponding author: G. Kim, Senior Researcher, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, 441-100, Korea; Fax: +82-31-290-1900; E-mail: <giyoung@korea.kr>.

트는 사용이 쉽고 신속하게 결과를 분석할 수 있는 장점 때문에 임신 진단이나 혈당 측정과 같은 현장검사용 목적으로 널리 사용되고 있다. 측방유동 간이 진단키트는 액상의 시료가 다공질의 니트로셀룰로오스 막을 모세관 힘에 의해 이동하는 현상을 이용한다. 분석물질에 특이적으로 반응하는 항체를 니트로셀룰로오스 막 위에 고정시키고, 또 다른 항체를 색 변화를 나타내는 입자에 결합시킨 다음 분석물질과 반응하도록 하면 분석물질과 반응한 색입자가 니트로셀룰로오스 막의 항체 띠에 포획된다. 시료에 검출하고자하는 분석물질이 들어 있으면, 항체 띠에 포획된 분석물질과 이에 결합되어 있는 색 입자로 인해 짙은 색의 선이 나타나 분석물질의 포함 여부를 알 수 있게 된다. 측방유동 간이 진단키트는 일정 기준 이상의 분석물질이 포함되어 있는지를 분석하는 정성분석뿐만 아니라, 색의 강도를 측정할 수 있는 광학측정기기를 이용할 경우 정량분석도 가능하다. 측방유동 간이 진단키트는 분석비용이 저렴하고 값비싼 측정기기나 전문적인 인력을 필요로 하지 않기 때문에 반려동물의 건강(Oh et al., 2006; Kang et al., 2007), 식품 안전성(Sithigorngul et al., 2007; Hossain et al., 2009), 가축의 질병(Cui et al., 2008), 환경 오염(Tang et al., 2010) 등을 신속하게 검사하는 방법으로도 개발되고 있다.

농식품 분야에서는 Hossain 등(2009)이 우유나 사과 주스 등의 식품에 들어있는 잔류농약을 검사할 수 있는 간이 진단키트를 개발한 바 있다. 연구자들은 양방향 사용이 가능한 측방유동 센서를 이용하여 말라티온과 파라옥손 같은 잔류농약을 5분 이내에 각각 10 nM과 1 nM의 높은 감도로 검출할 수 있었다. Martín-Hernández 등(2009)은 가짜 치즈에 들어가는 옹유효소 유청을 신속하게 검사할 수 있는 측방유동 간이 진단키트를 개발하였다. 연구결과 측방유동 간이 진단키트를 이용하여 4% 이상의 옹유효소 유청이 들어있는 우유를 정확하게 판정할 수 있었고, 이 결과는 기존검사 방법인 고성능액체크로마토그래피를 이용한 결과와 유사하였다.

본 연구는 농식품의 식중독균 오염 여부를 신속하게 진단할 수 있는 측방유동 면역방법 기반의 간이 진단키트를 개발하기 위하여 수행되었다. 간이 진단키트는 니트로셀룰로오스 막과 항체를 이용하여 제작하였으며, 키트의 검출 성능은 식중독 유발 원인균 중 하나인 *Salmonella typhimurium*를 이용하여 검증하였다.

2. 재료 및 방법

가. 측방유동 간이 진단키트 제작

식중독균 신속검출을 위한 측방유동 간이 진단키트는 네 개의 다공질 막 또는 패드로 이루어진다(Fig. 1). 네 개의 막은 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 흡수패드이며,

시료패드에는 버퍼시약 등을 미리 처리한다. 결합패드는 시료의 식중독균과 반응하여 색 변화 등으로 확인이 가능한 항체-색 입자의 결합물을 포함한다. 니트로셀룰로오스 막은 시료의 식중독균을 포획하는 항체로 이루어진 검사선과 실험이 정상적으로 수행되었는지를 나타내는 컨트롤선을 포함한다. 흡수패드는 니트로셀룰로오스 막을 통과하여 흘러온 시료의 저장소 역할을 한다.

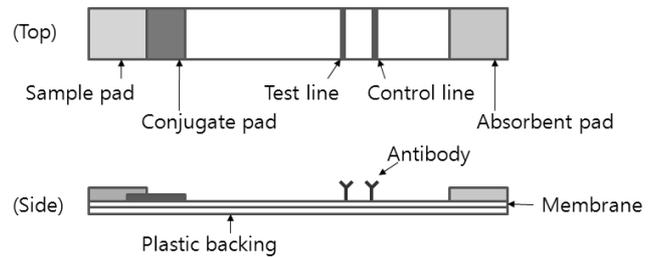


Fig. 1 Schematic diagram of a lateral flow immuno assay test kit.

간이 진단키트를 이용한 식중독균 검사 결과는 그림 2와 같이 해석된다. 검사선과 컨트롤선 모두 짙은 색의 띠가 형성되면 시료에 검출한계 이상의 식중독균이 포함된 것으로 진단되며, 컨트롤 선에만 짙은 색 띠가 형성되면 시료에 포함된 식중독균의 농도가 낮거나 없는 것으로 진단된다. 검사선과 컨트롤선 어느 곳에서도 짙은 색 띠가 형성되지 않으면 항원-항체 결합 실패 등의 이유로 실험이 잘 못된 것으로 진단된다.

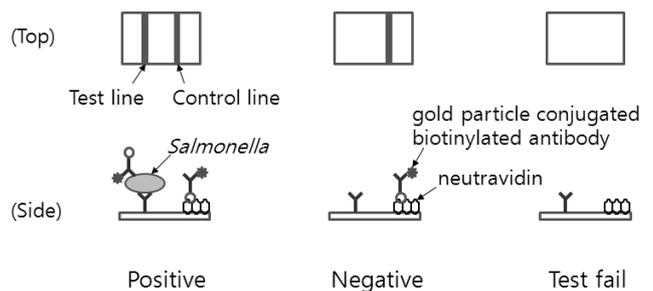


Fig. 2 Test result interpretation of the lateral flow immuno assay test kit.

간이 진단키트는 플라스틱 지지막 위에 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 흡수패드를 붙여서 제작하였다. 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 흡수패드는 시료 용액이 끊이지 않고 흐를 수 있도록 각각의 끝부분이 서로 3 mm씩 겹치도록 조립하였다. 조립된 키트는 길이 6 cm, 폭 5 mm로 절단하여 냉장 보관한 뒤 이후 실험에 사용하였다.

니트로셀룰로오스 막의 검사선과 컨트롤선은 금입자에 결합시킨 항체와 다른 종류의 살모넬라 항체와 뉴트라아비딘을 각각 도포한 다음 37°C에서 1시간 건조하여 형성시켰다. 살

모델라균의 포획을 위한 검사선은 니트로셀룰로오스 막의 가장자리에서 1 cm 되는 위치에 얇고 단단한 종이의 모서리를 이용해 살모넬라 항체를 찍는 방식으로 제작하였다. 살모넬라 항체는 표준인산버퍼에 용해된 1 mg/mL 농도의 것을 사용하였다. 컨트롤선은 표준인산버퍼 용액에 1 mg/mL 농도로 용해시킨 뉴트라비딘 용액을 검사선에서 흡수패드 쪽으로 5 mm 떨어진 위치에 도포하여 제작하였다.

나. 간이 진단키트 구성부의 전처리

간이 진단키트를 이용한 식중독균 검출 시 시료 및 시약의 원활한 유동을 위하여 각 구성부의 전처리를 수행하고 그 효과를 분석하였다. 시료패드와 결합패드의 전처리는 2% BSA (Bovine serum albumin) 및 10% 자당(Sucrose)이 첨가된 0.2 M 표준인산버퍼(pH 7.4)에 패드를 담가 버퍼용액을 충분히 흡수시킨 다음 37°C에서 4시간 건조시키는 방법으로 수행하였다. 니트로셀룰로오스 막의 전처리는 표준인산버퍼(pH 7.4)에 막을 담갔다가 꺼내어 37°C에서 1시간 건조 하는 방법을 사용하였다. 전처리를 거친 결합패드는 다시 항체-금입자 결합물이 녹아있는 용액에 담가 패드에 항체-금입자 결합물이 포함되도록 하였다. 결합패드에 항체-금입자 용액을 처리한 다음 건조시킬 때 농도 불균형으로 항체-금입자 결합물이 모서리에 집중되는 효과를 줄이기 위해 37°C에서 1시간 이내에 신속히 건조하였다.

다. 금입자-항체 결합을 위한 최적 조건 구명

식중독균이 검출되었을 때 표시를 위해 사용하는 색입자로는 콜로이드 형태의 금입자나 고무입자를 사용하는데 이 연구에서는 살모넬라균 검출 시 색을 나타내는 표시물질로서 나노미터 크기의 금입자를 사용하였다. 금입자와 항체의 결합은 금입자 제조사에서 제공된 결합 방법을 따랐으며, 금입자와 항체의 최적 결합을 위해 반응 버퍼의 적절한 pH 값은 실험을 통해 구명한 다음 이후 검출 실험에 사용하였다.

금입자와 항체의 결합과정은 그림 3과 같다. 우선 10개의 시험관에 금입자 현탁액을 잘 흔들어준 다음 0.5 mL씩 옮겨 담는다. 그다음 시험관에 1~10까지 표지를 붙이고 제조사로부터 제공되는 시약들을 조합하여 표 1과 같이 pH값이 5.4에서 10.1까지 10단계가 되도록 적정한다. 서로 다른 pH값의 버퍼가 담겨있는 10개의 시험관에 1 mg/mL 농도의 항체 14 µL를 한 방울씩 천천히 첨가하고 저속의 교반기를 이용하여 교반한 다음 30분간 실온에서 반응시킨다. 금입자와 항체의 정상적인 결합은 혼합액이 진보라색이나 검은색으로 변하지 않고 반응 초기의 색을 유지하는 경우이며, 이때의 pH값을

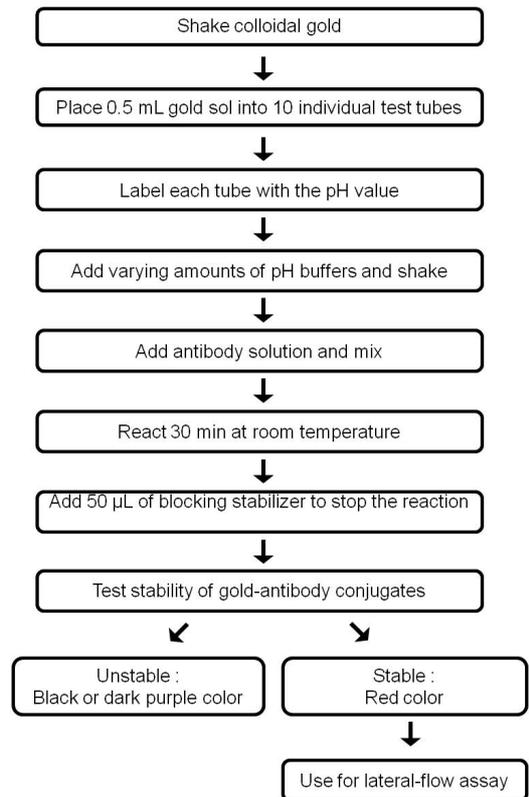


Fig. 3 Gold particle and antibody conjugation procedure.

Table 1 pH chart and amount of required buffers for optimal coating of gold particle

Tube number	pH	Amount of buffer A (µL)	Amount of buffer B (µL)
1	5.4	9	1
2	6.6	8	2
3	7.3	6	4
4	7.8	4	6
5	8.2	2	8
6	8.4	10	0
7	8.8	8	2
8	9.2	6	4
9	9.6	4	6
10	10.1	2	8

적정 pH값으로 하여 이후 실험에 이용하였다. 최종적으로 50 μL 안정화 시약을 첨가하여 결합반응을 종료시켰다.

라. 시약 및 박테리아

식중독균 검출 실험은 가장 많은 식중독 사고를 일으키는 원인균인 살모넬라균을 대상으로 하여 수행하였다. 살모넬라균주는 생명공학연구원 유전자은행 KCTC(Korea Collection for Type Cultures, Korea)에서 분양받은 *Salmonella typhimurium* KCTC 12401(*S. typhimurium*)을 사용하였으며, 세균 균락을 Brain Heart Infusion(BHI)(Difco, USA) 배지에 계대 배양하여 이용하였다. 살모넬라 균주는 표준인산버퍼를 사용하여 단계적으로 희석 한 후 XLD4 agar(Difco, USA) 배지를 사용하여 표준평판법으로 측정하였다. 배양 시 조건은 액체배양의 경우 37°C에서 18~24시간 동안, 평판배양의 경우 37°C에서 24시간 배양하였다.

검사 결과를 색으로 나타내는 금입자는 40 nm의 직경을 갖는 것(Gold-in-a-box, Bioassay works, USA)을, 이 금입자와 결합되는 살모넬라 항체는 바이오틴이 부착된 것(707, ViroStat, USA)을, 살모넬라 포획을 위한 검사선의 살모넬라 항체는 토끼에서 생성된 다클론항체(20-SR11, Fitzgerald, MA, USA)를 제조사로부터 구입하였다. 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 흡수패드는 Millipore사(Hi-Flow Plus, MA, USA), 컨트롤선 제작을 위한 뉴트라이비딘은 Pierce사(31000, IL, USA), 그 외 PBS 등의 시약은 Sigma사(MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

마. 살모넬라균 검출 실험방법

간이 진단키트를 이용한 살모넬라 검출 실험은 살모넬라균을 표준인산용액에 $10^4 \sim 10^7$ cfu/ml로 희석시킨 시료를 이용하여 수행하였다. 또한, 간이 진단키트의 살모넬라균 검출 성능 향상을 위하여 키트를 구성하는 시료패드와 결합패드의 전처리에 따른 영향도 10^7 cfu/ml 농도의 살모넬라균 시료를 이용하여 함께 조사하였다. 실제 농식품 시료에 대한 간이 진단키트의 적용 가능성은 닭고기 세척 버퍼에 $10^5 \sim 10^8$ cfu/ml의 농도로 접종한 살모넬라균 시료를 이용하여 수행하였다. 닭고기 세척 버퍼는 시중에서 구입한 닭 가슴살 부위 25 g을 225 mL의 표준인산버퍼에 넣고 교반하는 방법으로 제조하였다.

간이 진단키트의 살모넬라균 정량분석 가능성은 평면 스캐너(LIDE 200, Canon, Japan)를 이용하여 검출 실험에 사용된 간이 진단키트의 영상을 획득한 다음 색변화가 발생한 검사선의 밝기를 영상처리 프로그램(Image Tool 3.0, The University of Texas, USA)을 이용하여 측정하였다. 밝기 측정은 검사선에서 가장 진한 색변화를 나타내는 부위에 대하여 일

정면적의 평균값을 구하는 방법으로 수행하였다.

간이 진단키트를 이용한 살모넬라균 검출한계는 살모넬라균이 접종되지 않은 시료로 측정된 기준신호의 3배 측정값으로부터 표준편차를 구하고, 이 표준편차의 3배수를 기준신호 값에서 빼준 값보다 작은 밝기 신호값을 갖는 세균 농도로 정하였다.

3. 결과 및 고찰

간이 진단키트를 이용한 살모넬라균 검출은 100 μL 의 시료 용액을 시료패드에 주입하는 방식으로 수행하였다. 시료 패드에 시료가 주입되면 이 시료용액은 모세관현상에 의해 결합패드로 이동하여 결합패드에 건조된 상태로 포함되어 있는 살모넬라항체-금입자 결합을 수화시킨다. 시료에 포함되어 있는 살모넬라균은 살모넬라항체-금입자 결합물의 항체와 항원-항체 반응을 일으켜 살모넬라-살모넬라항체-금입자의 결합물을 형성한다. 이 결합물은 모세관현상에 의해 계속 이동하여 결합패드를 빠져나와 니트로셀룰로오스 막으로 흐른다. 이 결합물이 검사선에 이르면 검사선의 항체에 포획되어 1차 항체-식중독균-2차 항체-금입자의 고리를 형성하고, 금입자로 인해 육안으로 식별 가능한 붉은색 띠가 생성되었다. 시료용액의 계속적인 이동에 따라 살모넬라균과 반응하지 않은 살모넬라항체-금입자는 컨트롤선 방향으로 계속 이동하였고, 컨트롤선의 뉴트라이비딘과 결합하여 또 하나의 붉은색 띠를 생성하였다(Fig. 4). 반응을 마친 시료용액은 니트로셀룰로오스 막을 따라 흡수패드 쪽으로 이동하여 흡수패드에 저장되었다. 컨트롤선에 생성된 붉은색 띠를 통해 간이 진단키트가 제대로 동작하는 것을 확인할 수 있었으며, 검사선에 생성된 붉은색 띠를 통하여 살모넬라균 검출이 가능함을 확인하였다.

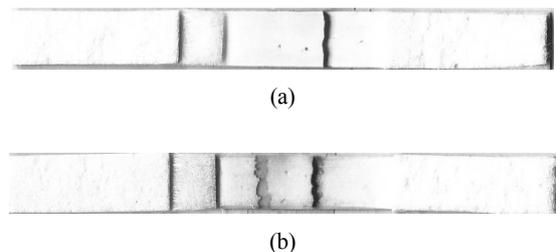


Fig. 4 Images of the rapid detection kit in the presence of (A) 0 cfu/mL *Salmonella*, and (B) 10^7 cfu/mL *Salmonella*.

가. 항체-금입자 결합을 위한 버퍼의 최적 pH값 선정

식중독균의 검출 여부 표시를 위한 금입자와 항체의 결합은 버퍼의 pH 값에 크게 영향을 받기 때문에, 금입자와 항체의 최적 결합을 위해 반응 버퍼의 적절한 pH 값을 실험을 통

해 구명하였다. 항체-금입자 결합을 위한 최적 pH 선정에 관한 실험 결과는 그림 5와 같이 결합 단계에서 금입자가 항체와 정상적으로 결합할 경우 혼합용액의 색변화가 없었으나, 항체의 농도가 적어 불안정한 결합한 금입자는 응집되어 처음의 붉은색에서 짙은 보라색 또는 검은색으로 변하였다. 보라색으로 변색된 항체-금입자 혼합용액은 항체의 등전점에서 금입자 끼리의 교차결합을 유도하여 서로 응집됨으로써 살모넬라균과 반응할 수 없게 되어 면역분석에 사용하기에 부적합하였다. 최적 pH값 선정 실험에서 육안으로 혼합용액의 색변화를 관찰한 결과 pH 5.4, 6.6, 7.3 세 가지 용액에서는 색변화가 일어나지 않고 응집현상도 없었지만, pH값 7.8, 8.2, 8.4, 8.8, 9.2, 9.6, 10.1 용액에서는 그림 5의 pH 9.2 용액에 서처럼 금입자가 응집하여 짙은색으로 변했다.

이후 실험에서는 색변화를 보이지 않은 세 가지 pH 값의 중간값인 pH 6.6을 이용해 항체와 금입자를 결합하는데 사용하였다. 살모넬라균을 이용한 검출 실험에 앞서 pH 6.6 버퍼를 이용하여 결합시킨 바이오틴 부착 항체와 금입자 결합물을 결합패드에 포함시키고, 뉴트라아비딘으로 컨트롤선을 형성시킨 간이 진단키트를 이용한 사전 실험 결과 붉은색의 컨트롤선이 생성되어 간이 진단키트가 잘 동작하는 것을 확인할 수 있었다.

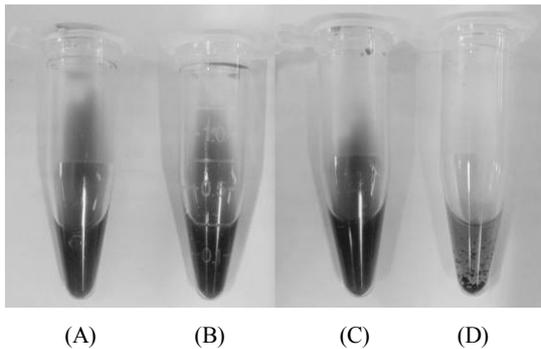


Fig. 5 Images of titrated gold particle and antibody buffer solutions at (A) pH 5.5, (B) pH 6.6, (C) pH 7.3, and (D) pH 9.2.

나. 간이 진단키트 구성부의 전처리 효과

간이 진단키트 각 구성부에서의 시료 이동과 시약끼리의 반응을 향상시킬 목적으로 수행한 전처리 효과 비교 실험은 살모넬라균이 포함되지 않은 표준인산용액을 이용하여 수행하였다. 비선택적 반응을 최소화하기 위해 실시한 BSA 처리는 살모넬라항체-금입자 결합물이 살모넬라균 이외의 물질이나 키트 표면에 부착되는 것을 효과적으로 차단하는 것으로 나타났다. 그림 6(A)에서 보듯이 시료패드와 결합패드에 BSA 처리를 하지 않은 경우 시료가 흘러가는 도중에 살모넬라항체-금입자 결합물이 니트로셀룰로오스 막 표면 전체에 걸쳐 붉은색 얼룩을 남겼다. 하지만 그림 6(B)의 영상에서 보

듯이 전처리를 한 경우 대부분의 살모넬라항체-금입자 결합물이 시료와 함께 이동하여 니트로셀룰로오스 막 표면에 얼룩을 거의 남기지 않았다. 또한, 자당을 이용한 전처리를 하지 않았을 때 결합패드에 도포되었던 살모넬라항체-금입자 결합물이 모두 빠져나오지 못하고 주입했던 시료 용액이 다 흘러간 이후에도 많이 남아있었지만, 전처리를 한 경우 대부분의 살모넬라항체-금입자 결합물이 시료를 따라 흡수패드 쪽으로 이동한 것으로 나타났다.

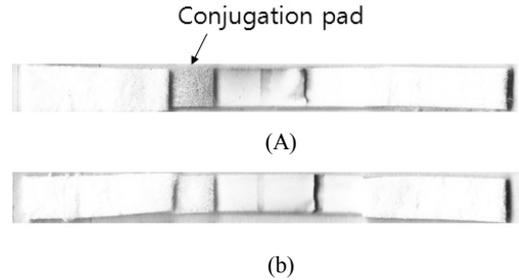


Fig. 6 Effect of pretreatment of rapid kit.

다. 간이 진단키트를 이용한 표준인산버퍼에서의 살모넬라균 검출

제작된 간이 진단키트의 살모넬라균 검출 성능은 농도가 다른 살모넬라균($10^4 \sim 10^7$ cfu/mL)이 포함된 표준인산버퍼 시료를 이용하여 조사하였다. 준비된 시료 100 μ L를 간이 진단키트의 시료패드에 주입하였을 때 시료용액은 모세관 현상에 의해 결합패드로 이동하는 것이 관찰되었다. 시료에 포함된 살모넬라균은 결합패드의 살모넬라항체-금입자와 반응하여 살모넬라균-항체-금입자의 결합물을 형성한 뒤 니트로셀룰로오스 막을 따라 이동하였다. 실험 결과 그림 7과 같이 살모넬라균의 농도 증가에 따라 시험선에 형성된 띠의 색이 짙어졌으며, 살모넬라균의 농도가 10^7 cfu/mL일 때 가장 짙은

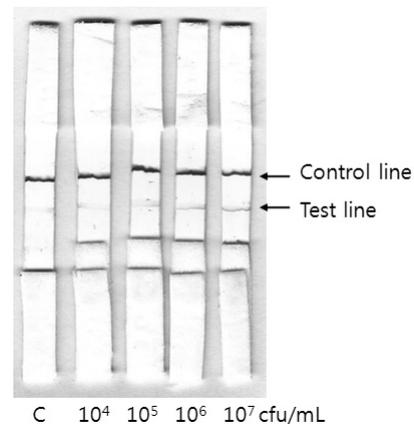


Fig. 7 Detection results of *Salmonella* cells in PBS buffer with rapid test kit.

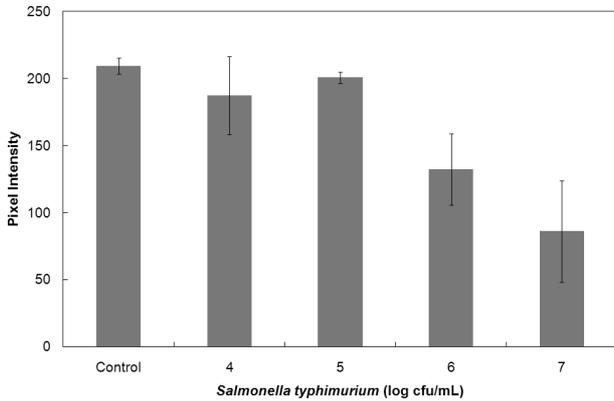


Fig. 8 Pixel intensity of *S. typhimurium* cells detected by the lateral flow rapid detection kit (PBS buffer).

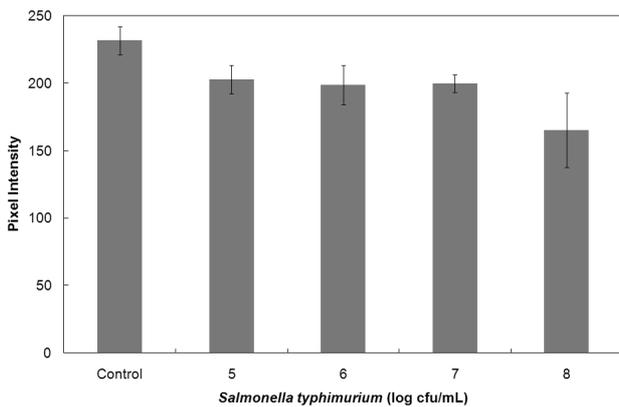


Fig. 9 Pixel intensity of *S. typhimurium* cells detected by the lateral flow rapid detection kit (Chicken buffer).

색을 나타내어 개발된 간이 진단키트가 효과적으로 살모넬라균을 검출하는 것으로 나타났다. 그림에서 컨트롤 시료에 대한 검사선의 약한 색변화는 검사선 항체의 수작업 도포와 항체의 비특이적 결합으로 인해 발생한 것으로 보인다.

살모넬라균이 검출된 간이 진단키트의 영상분석 결과 그림 8과 같이 검출되는 살모넬라균의 농도가 높을수록 화소의 평균밝기가 감소하는 것으로 나타났다. 화소의 평균 밝기는 256 단계로 표시했을 때 살모넬라균이 포함되지 않은 시료의 기준신호 209 ± 6 에서 10^7 cfu/mL일 때 86 ± 38 로 감소하였다. 밝기 정보 분석을 통하여 구해진 간이 진단키트의 살모넬라균 검출한계는 10^6 cfu/mL였고 기준신호와의 평균 밝기차이는 77이었다.

닭고기 세척 버퍼를 이용한 간이 진단키트의 살모넬라균 검출 실험 결과도 살모넬라균의 농도 증가에 따라 시험선에 형성된 띠의 색이 짙어 졌으며, 살모넬라균의 농도가 10^8 cfu/mL일 때 가장 짙은 색을 나타내었다(Fig. 9). 닭고기 시료에 대한 진단키트의 살모넬라균 검출한계는 표준인산버퍼에서와 마찬가지로 10^6 cfu/mL였고 닭고기 세척 버퍼만의 기준신호와의 평균 밝기차이는 33이었다. 표준인산버퍼와 비교

하여 신호차이가 감소한 원인은 닭고기 시료에 포함된 여러 가지 다른 물질들이 항원-항체 반응을 방해하기 때문인 것으로 판단된다.

간이 진단키트를 이용한 살모넬라균의 검출한계는 Kim 등 (2009)이 수행한 임피던스 바이오센서를 이용한 *S. typhimurium* 검출 연구의 10^7 cfu/mL와 Babacan 등(2002)의 압전형 바이오센서를 이용한 검출 한계인 10^7 cfu/mL 보다 우수한 것으로 나타났다. 또한, Cho 등(2010)의 표면플라즈몬공명 바이오센서를 이용한 살모넬라 검출 한계인 10^6 cfu/mL와, Kim 등(2010)이 나노양자점 결합을 이용한 살모넬라균 검출 연구의 검출한계인 10^6 cfu/mL와 유사한 결과를 나타내었다.

4. 요약 및 결론

본 연구는 농식품의 식중독균 오염 여부를 신속하게 진단할 수 있는 측방유동 면역방법 기반의 간이 진단키트를 개발하기 위하여 수행되었다. 간이 진단키트는 니트로셀룰로오스 막과 항체를 이용하여 제작하였으며, 키트의 검출 성능은 식중독 유발 원인균 중 하나인 *Salmonella typhimurium*를 이용하여 검증하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

- (1) 금입자와 항체의 최적 결합을 위한 반응 버퍼의 적절한 pH 값은 6.6인 것으로 조사되었다.
- (2) 시료패드와 결합패드에 실시한 2% BSA 및 10% 자당을 이용한 전처리는 살모넬라항체-금입자의 비선택적 반응을 방지하고 니트로셀룰로오스 막을 통한 이동 특성을 향상시키는 것으로 나타났다.
- (3) 표준인산버퍼에 대한 살모넬라균 검출 실험결과 간이 진단키트를 이용하여 10분 이내에 시료의 살모넬라균을 검출할 수 있었으며, 검출한계는 10^6 cfu/mL였다.
- (4) 닭고기 시료에 대한 간이 진단키트의 살모넬라균 검출한계는 10^6 cfu/mL인 것으로 조사되었다.

참고 문헌

1. Babacan, S., P. Pivarnik, S. Letcher and A. Rand. 2002. Piezoelectric flow injection analysis biosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*. Journal of Food Science 67(1): 314-320.
2. Cho, H. K., G. Y. Kim, W. H. Kim and M. S. Sung, 2010. Detection of Pathogenic *Salmonella* Using a Surface Plasmon Resonance Biosensor. Journal of Biosystems Engineering 35(2):116-123 (In Korean)
3. Cui, S., G. Tong. 2008. A chromatographic strip test for rapid detection of one lineage of the H5 subtype of highly pathogenic

- avian influenza. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20:567-571.
4. Hossain, Z. S. M., R. E. Luckham, M. J. McFadden and J. D. Brennan. 2009. Reagentless bidirectional lateral flow bio-active paper sensors for detection of pesticides in beverage and food samples. *Anal. Chem* 81:9055-9064.
 4. Kang, B. K., J. S. Oh, C. S. Lee, B. K. Park, Y. N. Park, K. S. Hong, K. G. Lee, B. K. Cho and D. S. Song. 2007. Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for rabies virus. *Journal of Virological Methods* 145:30-36.
 5. Kim, G., J. H. Moon, A. S. Om, G. M. Yang, C. Y. Mo, S. W. Kang and H. K. Cho. 2009. Evaluation of Antibody Immobilization Methods for Detection of *Salmonella* using Impedimetric Biosensor. *Journal of Biosystems Engineering* 34(4):254-259. (In Korean)
 6. Kim, G., G. M. Yang, Y. H. Kim, C. Y. Mo and S. B. Park. 2010. Detection of Pathogenic *Salmonella* with a Composite Quantum Dot. *Journal of Biosystems Engineering* 35(6): 458-463. (In Korean)
 7. Martín-Hernández, C., M. Muñoz, C. Daury, H. Weymuth, A. E. M. Kemmers-Voncken, V. Corbatón, T. Toribio and M. G. E. G. Bremer. 2009. Immunochromatographic lateral-flow test strip for the rapid detection of added bovine rennet whey in milk and milk powder. *International Dairy Journal* 19:205-208.
 8. Oh, J. S., G. W. Ha, Y. S. Cho, M. J. Kim, D. J. An, K. K. Hwang, Y. K. Lim, B. K. Park, B. K. Kang and D. S. Song. 2006. One-Step Immunochromatography assay kit for detecting antibodies to canine parvovirus. *Clinical and Vaccine Immunology* 13(4):520-524.
 9. Sithigorngul, W., S. Rukpratanporn, N. Sittidilokratna, N. Pecharaburanin, S. Longyant, P. Chaivisuthangkura and P. Sithigorngul. 2007. A convenient immunochromatographic test strip for rapid diagnosis of yellow head virus infection in shrimp. *Journal of Virological Methods* 140:193-199.
 10. Tang, Y., Y. F. Zhai, J. J. Xiang, H. Wang, B. Liu and C. W. Guo. 2010. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of lead ions in water samples. *Environmental Pollution* 158:2074-2077.