

# 돼지 음진드기 감염증의 신속한 진단을 위한 바이오센서 A Biosensor for Rapid Diagnosis of Swine Sarcoptic Mange

조한근\*           지차호\*\*

정희원

H. K. Cho           C. H. Jee

## 1. 서론

돼지 음진드기는 개선충과에 속하는 음벌레로서 원형이고 직경 400 $\mu$ m 정도이며, 색깔은 흰색 또는 적색이다. 돼지 음진드기는 돼지 피부 속에 굴을 파고 왕성한 활동으로 심한 가려움증이 나타나고 피부염증을 만들어 삼출물이 응고되어 딱지를 형성하게 한다. 피부의 과도한 각피화와 결합조직의 증식이 진행되면 피부는 대단히 비후되고 추벽이 생기며 동시에 탈모현상이 확대되며, 세균에 의한 2차적 감염을 일으키기도 한다. 이러한 병원성으로 양돈 산업에서 돼지 음진드기는 생산성 저하에 의한 경제적 피해에 심각한 영향을 주는 것으로 국외는 물론 국내에서도 잘 알려져 있는 중요한 외부기생충이다.

본 연구의 목적은 돼지 음진드기 감염증을 신속히 진단할 수 있는 바이오센서를 개발하고, 그 진단 성능을 검사한다. 이 바이오센서는 ELISA에 기초하여 정확한 진단이 가능하고, 운반이 간편하며 비전문가도 사용 가능한 휴대형으로 개발된다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 효소면역흡착법(ELISA)

지 등(2001)이 발표한 돼지 음진드기 감염증 진단을 위한 실험실용 ELISA를 수정하여 진단에 소요되는 처리시간을 단축하였다. 준비된 돼지 음진드기 체항원을 도포 완충액(carbonate- bicarbonate buffer pH 9.6)으로 5  $\mu$ g/ml가 되도록 희석하여, 효소면역흡착용 플레이트의 각 반응조(well)에 100 ml 분주하였다. 항원이 분주된 플레이트를 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 1시간 반응시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 18시간 감작시켰다. 감작 후 항원액을 제거한 다음 인산완충액(phosphate buffer saline(PBS)-Tween 20, pH 7.4)으로 3회 세척하고 0.05% PBS-Tween 20을 완전히 제거하였다. 항원 블로킹(blocking)은 5% 탈지분유가 함유된 PBS-Tween 20을 항원 흡착 플레이트의 각 반응조에 100  $\mu$ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 2시간동안 반응시킨 후, 0.05% PBS-Tween 20으로 3회 세척하였다. 혈청 희석배수는 여러 번의 실험을 통해 흡광도(OD, optical density)값이 가장 효율적으로 반응하는 50배로 PBS-Tween 20과 희석하여 각 반응조에 100  $\mu$ l씩 분주하고 24 $^{\circ}$ C 배양기에 15분간 반응시킨 후, 0.05% PBS-Tween 20으로 3회 세척하였다. 2차 항체(alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-swine IgG,

\* 충북대학교 농업생명환경대학 바이오시스템공학과

\*\* 충북대학교 수의과대학 수의학과

Sigma)는 PBS-Tween 20으로 50배 희석하여 각 반응조에 100  $\mu$ l씩 첨가하여 24°C에서 15분간 반응시킨 후에 세척액으로 3회 세척하며, 기질을 각 반응조에 100  $\mu$ l씩 첨가한 후 빛을 차단시켜 실온에서 10분 반응 후 ELISA reader(ELx808, BIO-TEK)를 사용하여 645 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

## 나. 집 먼지 진드기 체 항원

진단법의 개발을 위해서는 많은 양의 돼지 음진드기 체항원 시료가 필요하지만, 돼지 생체에서 회수하기 어렵기 때문에 인공배양이 가능한 집먼지 진드기로부터 돼지 음진드기의 공통체항원을 연속적 용출법으로 분리하여 만든 용출 단백질(eluted proteins)로 돼지 음진드기 체항원을 대체하여 사용하였다(김과 지, 2003).

## 다. 실험장치

돼지 음진드기의 신속한 진단용 바이오센서 개발을 위해, 임과 조(2005)가 잔류농약 측정 연구에서 개발한 바이오센서를 기본 모델로 하여 제작하였다. 그림 1은 바이오센서의 제어용 블록선도를 보여준다.

## 라. 실험 방법

### 1) ELISA 소요시간의 단축

신속한 음진드기 진단이 가능하도록 실험실용 ELISA(지 등, 2001)을 수정하여 소요시간의 단축 가능성을 조사하였다. ELISA에서 많은 시간을 차지하는 반응과정과 배양과정에 소요되는 시간을 최소화하는 실험을 실시하였다. 이를 위해 1차 항체의 희석비를 100배, 50배, 및 25배로 증가하면서 실험하였다. 또한 항체 농도 증가에 따라 배양시간을 15분, 10분, 및 5분으로 변화하면서 실험하였다.

최종 단계로 양성 또는 음성 혈청에 대한 출력 값은 액정표시장치(LCD)에 의해 출력전압으로 결과를 읽는다. 액정표시장치에 출력된 전압을 식(1)에 대입하여 흡광도 값을 계산한다. 여기서 A는 흡광도이며  $V_{out}(0)$ 는 흡광도 측정을 위한 대조액으로 증류수를 사용하여 측정한 입사광의 세기를 나타내며,  $V_{out}(t)$ 는 큐벳을 투과한 투과광의 세기를 나타낸다.

$$A = \log \left( \frac{V_{out}(0)}{V_{out}(t)} \right) \quad (1)$$

### 2) 기초 성능 평가

바이오센서의 생물반응부에 사용된 펌프의 성능평가를 위해 증류수를 이용하여 정밀저울(XT220A, Precisa instrument corp., Switzerland)로 측정하였다. 계측제어부의 정확도와 표류를 측정하기 위해 증류수를 이용하여 반복측정 및 시간에 따른 출력 값의 변화를 조사하였다(임과 조, 2005).

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. ELISA 소요시간의 단축

그림 2는 1차 항체의 희석비 변화와 배양시간 변화에 따른 음성반응 대 양성반응의 흡광도 비를 나타낸다. 흡광도 비율이 높아지면 양성과 음성의 구별이 명확해지므로, 음진드기 진단을 위해서는 흡광도 비율이 높은 조합을 선택하는 것이 바람직하다. 전반적으로 1차 항체의 농도가 증가할 때 흡광도 비는 높아지는 것으로 나타났고, 반면 배양시간이 짧아질 때 흡광도 비는 낮아지는 것으로 나타났다. 따라서 진단을 위한 희석비와 배양시간으로 각각 1:100과 15분이 적절한 것으로 확인되었다.

#### 나. 기초 성능평가

각 펌프별로 운반되는 양을 정밀저울로 10회 측정된 결과 0.3%의 정확도를 나타냈다. 표 2의 순서에 의해 증류수를 운반한 결과 시료 운반하는데 3분, 큐벳을 세척하는데 5분, 배양시간 15분으로 전체 검출 시간은 45분 정도 소요되었다.

흡광도 측정 시스템의 재현성(reproducibility)과 유효성(validity)을 조사하기 위해 1ml의 증류수를 넣은 큐벳을 블록에 삽입과 제거를 반복하며 연속 측정된 흡광도 값 20개의 평균 값을 30회 반복 실시한 결과, 출력전압은 3.4 V, 표준편차는 0.003 V로 정밀도가 99.9%로 나타났다. 계측 시스템으로부터 시간변화에 따라 일정한 전압이 출력되었으며 160분 이후에 0.3%의 감소현상이 나타났다.

### 4. 요약 및 결론

본 연구의 목적은 돼지 음진드기의 신속한 진단을 위해 실험실에서 시행되어 오던 효소면역분석법을 기본으로 한 바이오센서의 개발에 있으며 기존의 ELISA는 돼지 음진드기의 진단을 위해 최소 2시간 이상이 소요된다. 따라서 시간을 단축시키기 위해 일차 항체를 높이고(희석비 1:100), 배양시간을 15분으로 한 경우, 검출시간을 45분으로 단축하여 신속한 진단이 가능한 것으로 판단되며, 진단성능의 추가 실험이 계속될 것이다.

### 5. 참고문헌

1. 김재원, 지차호. 2004. 연속적 용출법을 이용한 개음과 집먼지 진드기의 공통항원의 분리. J. of Veterinary medicine and Biotechnology (5):1: 69-78
2. 임종근, 조한근. 2005. 살충제 Imidacloprid 잔류물의 신속한 측정을 위한 생물반응 및 계측제어 시스템 개발. 바이오시스템공학. 30,2:114-120
3. 지차호, 이삼선, 장래훈. 2001. ELISA를 이용한 돼지 음진드기 감염증의 진단. 대한수의학회지. 41,4:565-570

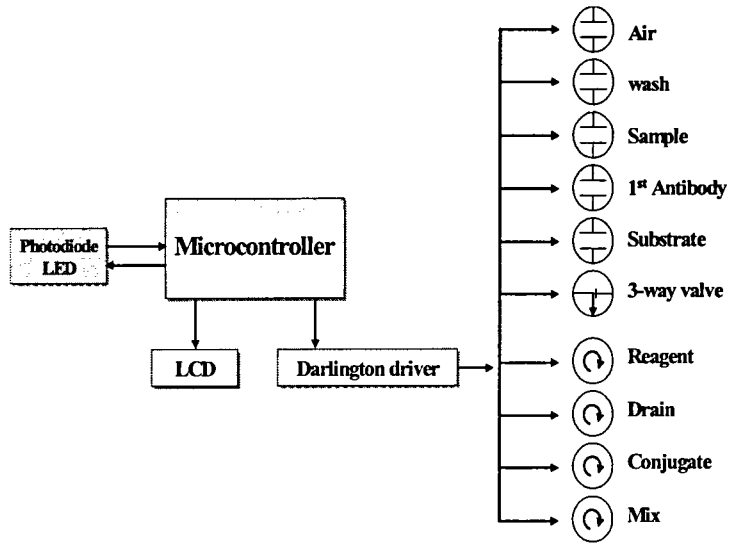


Figure 1. Control block diagram for the biosensor.

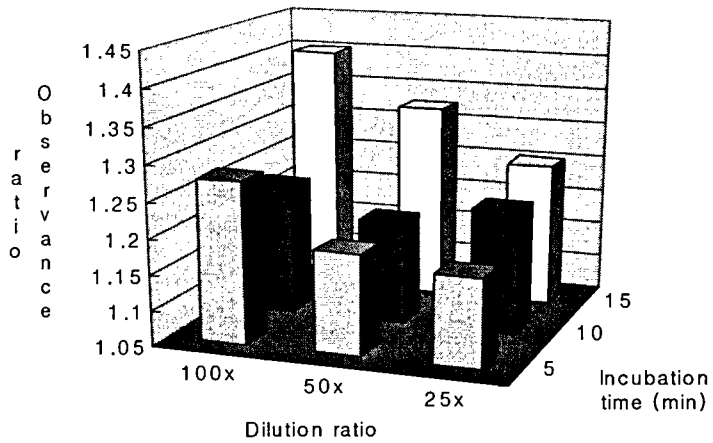


Figure 2. Observance ratio for the various dilution ratio of 1st antibodies and the various incubation times.