

Dot-Blotter 진공 포획방식에 의한 미생물세포 면역분석시스템의 개발

목 락 선 · ¹하 연 철 · ¹윤 희 주 · †백 세 환
고려대학교 생명공학원, ¹국방과학연구소
(접수 : 1998. 11. 4, 게재승인 : 1999. 1. 4.)

Development of Immuno-Analytical System for Microbial Cells by using Dot-Blotter

Rak-Sun Mok, Yeon-Chul Ha¹, Hee-Ju Youn¹, and Se-Hwan Paek[†]
Graduate School of Biotechnology, Korea University, 1, 5-ka, Anam-dong, Seoul 136-701, Korea;
¹Agency for Defense Development, Taejon 305-600, Korea
(Received : 1998. 11. 4., Accepted : 1999. 1. 4.)

In order to eventually fabricate an analytical system for infectious microorganisms, we synthesized major immunochemical components, utilized them for the construction of model system, and investigated an assay concept for bacterial whole cells. For the preparation of system components, a polyclonal antibody, against *Salmonella thompson* as model analyte, purified by immuno-affinity chromatography was used to chemically link to streptavidin or an enzyme, horseradish peroxidase(HRP). The antibody and streptavidin was modified with sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate and N-succinimidyl-3-[2-pyridyldithio]propionate(subsequently activated by dithioerthol), respectively. The modified components were reacted to synthesize antibody-streptavidin conjugates which were then purified on a two-layer chromatography column of diaminobiotin gel and Sephadex G-100. For antibody-HRP conjugates, HRP molecules were activated by NaIO₄ oxidation and then coupled to immunoglobulin. After stabilizing with NaCNBH₃, the conjugates were purified by size exclusion chromatography on Biogel A5M column. To devise a model system, such produced components were combined with a dot-blotter in which a nitrocellulose membrane(12 μm pore size) with immobilized biotin was already located. The analyte (*S. thompson* cells) was reacted with the both antibody conjugates in a liquid phase, and the complexes formed were captured on the membrane surfaces by applying vacuum in the bottom compartment of the blotter to invoke biotin-streptavidin reaction. Under optimal conditions, the system enabled to identify the analytical concept for bacterial whole cells, and the lower limit of detection was approximately 1 μg/mL(10⁵-10⁶ cells/mL). The controlling factors were the concentrations of each antibody conjugate that caused agglutination in the presence of analyte as they increased.

Key words : Horseradish peroxidase-antibody conjugate, Streptavidin-antibody conjugate, Membrane filtration immunoassay, Dot-blotter, Bacterial whole cells

서 론

전반적으로 경제 여건이 향상되고 인간의 기본적인 욕구가 충족됨에 따라 보다 쾌적한 환경에서 오래 살려는 욕구가 날로 증대되어 가고 있으며 병이 난 후에 이를 치료하기보다는 조기에 발견하여 효과적으로 치료받는 것이 근래의 추세이다(1). 따라서 각 종 질병의 원인 요소인 병원성 미생물을 사전에 감지하는 것

이 필요하며 다양한 환경(예: 식수, 대기)에 존재하는 미생물에 대한 탐지방법 개발의 중요성이 부각되고 있다. 일반적으로 화학물질은 물리화학적 방법에 의해 비교적 간편하게 측정될 수 있는 반면에 생물학적 성분(병원성 미생물, 독소물질, 바이러스 등)에 대한 분석을 위해서는 민감하게 성분을 감지하고 반응하는 생물화학 반응계가 추가 도입되어야 한다. 이와 같은 반응계에 사용될 수 있는 감응물질로써 큰식물질 수용체 특히 전형적으로 항체가 사용되며, 항원-항체 반응에 기초를 둔 면역분석법에 의해 미생물의 탐지가 성취될 수 있다(2). 또한, 면역분석법은 높은 분석민감도와 특이성을 제공하므로 매우 낮은 농도에서 유효한 생물학적 독소물질의 측정에도 유용하다.

면역분석법은 분석물질과 이를 인지할 수 있는 특이항체간의 면역부착반응을 이용하고 분석원리에 따라 다양한 형태로 수행

† Corresponding Author ; Graduate School of Biotechnology, Korea University, 1, 5-ka, Anam-dong, Seoul 136-701, Korea
Tel : 0415-860-1414, Fax : 0415-864-2665
e-mail : shpaek@tiger.korea.ac.kr

될 수 있으며 전형적으로 microwell을 항체의 고정화모체로 사용하는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법이 널리 사용되고 있다. 이러한 고상 면역분석은 분석물질이 단백질인 경우 그에 대한 측정민감도가 높고 또한 비교적 짧은 시간 내에 정확한 결과를 얻을 수 있는 장점을 제공하는 것으로 알려져 있다(2) 그러나, 미생물과 같이 크기가 매우 크고 용액 내에서 쉽게 침전되는 성분은 상호 접근성이 떨어지기 때문에 고상에서의 항원-항체 반응에 의한 결합체 형성이 매우 어렵고 따라서 측정민감도의 저하가 초래될 수 있다(3).

다른 미생물 측정방법으로는 배양검사법과 DNA probe법을 들 수 있다(4-6). 배양검사법은 특정 배지에서 균을 증식시키고 이때 생성되는 콜로니의 특성을 직접 관찰하므로 분석시료의 종류에 관계없이 측정결과와 재현성이 높지만, 결과를 얻기 위한 균 배양시간이 종류에 따라 수일에서 수주가 소요된다는 단점이 있다(7) 이와 같이 오랜 분석시간이 소요되는 측정법은 긴급을 요하는 병원성 미생물 분석방법으로써 부적합하다. 이러한 단점은 polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 짧은 시간 내에 증폭된 특정 미생물의 nucleotide를 검출하는 DNA probe법에 의해 보완될 수 있다(8) 그러나, 시료 내에 유사한 유전정보를 갖는 미생물이나 혹은 polymerase 활성억제 물질이 포함될 경우 분석 오류가 초래될 수 있고 더욱이 분석수행을 위해 시료의 전처리 및 전문지식이 요구된다(9, 10).

위에서 논의된 바와 같이 미생물 세포의 측정을 위해 비교적 간편하고 짧은 시간 내에 측정할 수 있는 면역분석방법을 선택하였고 항원-항체 반응에 의한 측정민감도가 증가될 수 있도록 분석시스템을 개발하여 왔다. 항체와 세포 간 부착반응을 액상에서 수행함으로써 그 상호 접근성이 향상될 수 있도록 매려하였고, 그 항원-항체 결합체를 membrane 하부의 진공에 의해 세공을 통과시키 그 표면에서 포획함으로써 분석물질 농도에 비례한 신호가 발생되도록 시스템을 고안하였다. 더욱이, membrane 표면상의 결합체로부터의 신호발생은 반도체센서인 light-addressable potentiometric sensor(LAPS) 시스템을 이용할 경우 기존의 ELISA 결과와 비교하여 100배 더 높은 측정민감도를 나타낼 수 있다(11, 12) 본 연구에서는 진공 포획방식의 면역분석시스템을 구성하기 위한 반응성분들의 제조공정을 개발하였고, 이 성분들과 기존의 dot-blotter를 결합하여 모델시스템을 고안함으로써 그 분석원리를 규명하였으며 또한 측정민감도에 대한 조건최적화를 수행하였다.

재료 및 방법

재료

모델 분석물질인 *Salmonella* 균(*Salmonella thompson*, 유기용매로 처리되고 건조된 상태)과 그에 대한 감응물질로써 특정 복합클론 항체가 함유된 항 *Salmonella* 토끼혈청이 국방과학연구소로부터 공급되었다. Sulfosuccinimidyl 4-[N-maleimido-methyl] cyclohexane-1-carboxylate(SMCC), N-succinimidyl-3-[2-pyridylidithio]propionate(SPDP), dithiothentol(DTT), 그리고 NHS-LC-biotin은 Pierce 사(미국)로부터 구입되었다. Sodium cyanoborohydride(NaCNBH_3), sodium m-periodate(NaIO_4), 그리고 diaminobenzidine(DAB)은 Sigma 사(미국)로부터 공급되었다. Streptavidin은 Calbiochem 사(미국)에서 그

리고 horseradish peroxidase(HRP)는 Boehringer Mannheim 사(독일)에서 구입되었다 다른 세공크기를 갖는 nitrocellulose(NC) membrane들이 Sigma 사(세공크기 0.45 μm , 미국), Millipore 사(세공크기 8 μm , 미국), 그리고 Schleicher & Schuell 사(세공크기 12 μm , 독일)로부터 각각 공급되었다. 명시되지 않은 다른 모든 시약들은 분석용급으로 사용되었다.

복합클론 항체 정제

Salmonella 균에 대한 특이항체를 얻기 위해 그 균에 대한 막단백질이 고정화된 젤 칼럼을 이용하여 면역친화 크로마토그래피를 수행하였다. 막단백질의 추출을 위해, 10 mg의 균 세포를 1 mL의 추출용액(1 M NaCl, 2 mM EDTA, 그리고 1% SDS가 포함된 10 mM phosphate 완충용액, pH 7.4)에 가한 후 실온에서 10시간 동안 반응시켰고, 반응혼합용액을 35,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 시켰다 그 상등액에 잔존하는 과량의 SDS는 저온에서 KCl 침전법에 의해 제거되었다(13). 추출된 막단백질은 0.5 M NaCl이 포함된 0.1 M NaHCO_3 (pH 8.3) 용액 내에서 투석된 후 약 3 mg/mL 농도로 조절되었다. 단백질 용액 CNBr 활성화된 Sepharose 4B 겔 표면에 고정화시키기 위해 제조회사로부터 제공된 실험방법에 따라 수행되었고, 준비된 겔은 유리 칼럼에 채워진 후(겔 부피 = 0.5 mL) 140 mM NaCl이 포함된 10 mM phosphate 완충용액(PBS, pH 7.4)으로 세척된 후 보관되었다.

제작된 겔 칼럼을 이용하여 토끼혈청 내 *Salmonella* 균 특이항체를 정제하기 위해 면역친화 크로마토그래피가 수행되었다. 칼럼 내 겔 상부에 0.25 mL 항혈청을 가한 후 PBS로 세척하였고(유속: 0.55 mL/h). 유출 누적부피가 10 mL에 도달하였을 때 유출용액을 100 mM glycine 완충용액(pH 2.5)으로 교체하였다. 산성조건에서 수집된 특이항체용액은 1 M carbonate 완충용액(pH 9.6)을 가하여 중화되었고 한의 여과막을 이용하여 농축되었으며 액체질소 내에서 얼린 후 -20°C 에서 보관되었다.

항체-HRP 중합체 제조

0.3 M bicarbonate(pH 8.1) 완충용액에 용해된 HRP에 5% (v/v) 2,4-dinitrofluorobenzene을 부피비로 최종 10%가 되도록 첨가한 뒤 반응시켜 그 분자 표면상의 amino 그룹을 비활성화시켰다. 이 용액에 NaIO_4 를 가하여(최종 30 mM) HRP 분자를 1시간 동안 산화시킨 후 ethylene glycol을 넣어(최종 160 mM) 1시간 동안 반응 시킴으로써 aldehyde 기를 활성화하였다. 이렇게 활성화된 HRP와 *Salmonella* 균 특이항체를 10 mM sodium carbonate 완충용액(pH 9.5)에 각각 투석시킨 후 5.6:1 몰비로 혼합하여 상온에서 3-4 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 항체와 효소 간 화학결합은 NaCNBH_3 를 첨가하여(최종 16 mM) 밤새 반응시켜 안정화되었고, 그 반응혼합물은 PBS 내에서 투석되었다. 비환원 SDS-PAGE 분석(8%)을 수행하여 중합체의 합성여부를 확인한 후, 그 생성물을 미반응물질들로부터 분리시키기 위해 BioGel A5M 겔 칼럼(1.5 \times 100 cm)을 이용하여 size exclusion 크로마토그래피를 수행하였다(유속: 0.5 mL/h PBS, pH 7.4). 유출액 내 총 단백질 농도는 Bradford 방법(14)에 의해 측정되었고 또한 중합체는 고정화된 세포를 이용한 고상 면역분석방법에 의해 탐지되었다. 면역분석과정을 간략히 소개하면, 세포가 고정화된 microwell에 용출된 각 시료를 1/10로 희

석하여 침가하였고, 37 °C에서 1시간 동안 반응시키고 세척하였으며 HRP에 대한 발색기질을 침가함으로써 신호발생을 수행하였다. 최종 정제된 중합체는 10% bovine serum albumin(BSA) 용액과 혼합(최종 1%)된 후 4 °C에서 보관되었다

항체-streptavidin 중합체 제조

Salmonella 균 특이항체는 150 mM NaCl이 포함된 100 mM phosphate 완충용액(반응용액, pH 7.0)으로 투석된 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해된 20배 몰 과잉농도의 SMCC와 4 °C에서 4시간 동안 반응됨으로써 활성화되었다. 과량의 SMCC는 Sephadex G-15 젤 크로마토그래피에 의해 제거되었고, 이것을 아래와 같이 활성화된 streptavidin과 바로 중합반응 시켰다. Streptavidin의 활성화를 위해, 그 단백질은 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid가 함유된 반응용액에 용해되었고 몰농도가 2배 더 높은 SPDP와 상온에서 1시간 동안 반응되었다. 그 분자 상에 sulfhydryl 반응을 생성시키기 위해 DTT(최종 100 mM)를 반응 혼합액에 첨가하여 37 °C에서 2시간 동안 다시 반응시켰다. 과량의 시약들은 Sephadex G-15 칼럼을 이용하여 제거되었다. 두 종류의 활성화된 반응물질 즉, 항체와 streptavidin은 그 몰 비가 1:3이 되도록 혼합되었고 4 °C에서 밤새 반응되었다. 합성된 항체-streptavidin 중합체의 정제는 diaminobiotin-agarose 젤 층(1×2 cm)과 Sephadex G-100 젤 층(1×10 cm)의 이종으로 구성된 칼럼을 이용하여 수행되었다. 반응혼합물 1 mL를 칼럼 내에 주입하였고 시료가 겔 내로 모두 스며든 뒤 PBS로 세척하였다(유속: 1 mL/h). 유출부피가 10 mL에 도달했을 때 50 mM acetate 완충용액(pH 3.5)으로 교체하였고 그 용액이 5 mL 유출된 후 다시 PBS를 운반용액으로 사용하였다. 각 유출액 내 단백질은 Bradford 분석방법에 의해 측정되었고, 중합체 합성 및 정제는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE(8% gel) 분석에 의해 확인되었다.

BSA-biotin이 고정화된 NC membrane 제조

BSA를 150 mM NaCl이 포함된 100 mM phosphate 완충용액(pH 7.0)에 용해하여 준비하였고 같은 완충용액에 용해된 NHS-LC-biotin을 40배 몰로 첨가하여 상온에서 2시간 동안 반응하였다. 그리고 미반응된 과량의 NHS-LC-biotin은 투석과 size exclusion 크로마토그래피를 이용하여 제거되었다. 고정화 모체인 NC membrane을 0.5% (v/v) glutaraldehyde 용액에 담그어 1시간 동안 반응시킨 다음 탈이온수로 1분씩 5번 세척하였다. 공기 중에서 건조된 membrane의 일정 지역에 위에서 제조된 BSA-biotin 중합체를 첨가한 후 다시 건조하였다. 잔여표면은 PBS에 용해된 1% BSA로 상온에서 1시간 동안 처리되었고, 반응 잔기는 0.1 M Tris-HCl 완충용액 (pH 7.6)에 담가 동일한 조건하에서 제거되었다. 중합체가 고정화된 membrane은 PBS로 3번 세척된 후 공기 중에서 건조됨으로써 준비되었다.

NC membrane 최적 세공크기 결정

측정시스템의 분리공정에 사용할 NC membrane을 결정하기 위해 다른 크기의 세공(0.45, 8, 그리고 12 μm)을 갖는 membrane을 선택하여 시험하였다. 이를 위해 일정농도의 균 세포 시료(5, 10 μg/mL)와 위에서 제조된 항체-HRP 중합체를 반응시킨 후 BSA-biotin이 고정화된 membrane이 장착된 dot-blotter(모델

Bio-Dot. 96 well, Bio-Rad 사, 미국)의 각 well 내에 100 μL 씩 가하였다. 다음으로 syringe pump(모델: KDS210, kd-Scientific 사, 미국)를 이용하여 blotter 하단에 진공을 형성시켜 약 15분 간 여과한 후 membrane을 꺼내어 기질용액에 담가 HRP 효소 반응에 의한 발색신호를 발생시켰다(15). 기질용액은 200 μL DAB 용액 (25 mg/mL)과 200 μL Cobalt와 Nickel 혼합용액 (2%), 그리고 335 μL H₂O₂ 용액(3%) 을 10 mL 50 mM acetate 완충용액(pH 5.1)에 첨가하여 제조되었다. 발색신호를 정량화하기 위해, 발색된 membrane의 이미지는 스캐너를 사용하여 포착되었고 그 이미지 상의 발색부분은 분석 프로그램(2D Archive programs, Advanced American Biotechnology, 미국)을 이용하여 발색세기에 비례하는 적분치인 optical density로 전환되었다. 동일한 실험과정이 항체-streptavidin 중합체를 추가한 후 혹은 단지 항체-HRP 중합체의 존재 하에서 반복되었다

구성성분 최적농도 결정

위에서 언급된 바와 같이 여러 다른 농도로 희석된 BSA-biotin 중합체(0-5 mg/mL)를 일정 세공크기의 NC membrane (12 μm) 표면에 가하여 고정화 시킨 후 dot-blotter에 설치하였다. NC membrane 상에 고정화된 BSA-biotin 농도에 대한 최적조건을 결정하기 위해, 일정농도의 항체-HRP 중합체(0.5 μg/mL)와 항체-streptavidin 중합체(0-10 μg/mL) 그리고 균 세포(5 μg/mL)를 혼합하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 이 용액을 준비된 blotter에 가하여 위에서와 같이 진공 포획 시킴으로써 분석이 수행되었다. 항체 중합체의 최적농도를 결정하기 위해, 다양한 농도의 항체-HRP 중합체(0.01-1 μg/mL)와 항체-streptavidin 중합체(0-2 μg/mL) 그리고 균 세포 (5 μg/mL)를 혼합하여 반응시킨 후 위에서와 동일한 과정이 반복되었다.

성능 측정

결정된 최적조건 하에서 시스템의 성능을 시험하기 위해, 1 mg/mL BSA-biotin이 고정화된 12 μm NC membrane을 dot-blotter에 장착하였고, 0.5 μg/mL 항체-HRP 중합체와 1 μg/mL 항체-streptavidin 중합체 그리고 다른 농도의 분석물질(0-40 mg/mL *Salmonella thompson*)을 혼합하여 1시간 동안 반응시킨 다음 이를 blotter 상의 membrane에 가하여 위에서와 동일한 과정에 의해 시료의 농도변화에 대한 시스템의 응답을 구하였다. Membrane 표면에 잔존한 HRP로부터 효소반응에 의해 발색을 유도하였고 이 신호를 상기한 바와 같이 optical density로 전환시킨 후 농도응답곡선을 작성하였다

결과 및 고찰

전연성 미생물은 극히 낮은 농도에서도 작용하거나 혹은 그로부터 증식할 수 있으므로 미량의 미생물세포를 탐지할 수 있도록 항원-항체 반응을 이용하여 분석시스템을 고안하였다. 면역분석은 일반적으로 높은 측정민감도를 제공하지만, 고체표면에 고정화된 항체를 이용할 경우 면역반응에 의해 형성된 항원(즉, 분석물질)-항체 결합체 농도는 항원의 크기에 반비례하여 감소된다(3) 이것은 분석물질이 클수록 그 인지부위(epitope)가 항체분자 상의 상대적으로 작은 항원부착자리(paratope)에 대해

접근하기 어렵게 되기 때문이며, 이와 같은 현상은 고정화된 항체의 밀집된 형태(콜로니 형성)와 고체표면에 의한 분자간 상호작용의 방해에 기인한다 따라서 세포와 같이 초대형 크기의 분석물질을 고정화된 항체를 사용하여 분석을 수행할 경우 항원-항체 간 결합밀도는 매우 낮게 되고 결국 분석민감도의 저하를 초래한다(16).

기존 면역분석방법을 이용할 경우 발생하는 미생물세포에 대한 측정민감도의 감소는 항원-항체 반응을 액상에서 수행 후 고체표면에 포획함으로써(예: biotin-streptavidin 반응 이용) 극복될 수 있다. 이를 위해 항원인지 특정성이 다른 두 항체들을 신호발생원인 효소 (HRP) 그리고 포획기능의 streptavidin과 각각 화학결합 시켰고, 합성된 두 중합체들을 먼저 세포 (즉, 분석물질)와 액상에서 반응시켰다(Figure 1, 왼쪽). 미반응성분들의 분리 제거를 위해 BSA-biotin 중합체가 고정화된 NC membrane을 dot-blotter에 장착하였고, 각 well 내에 반응 혼합액을 가한 후 진공 포획시켜 면역결합체를 biotin-streptavidin 반응에 의해 고체표면에 포획하였고 반면에 미반응물들을 여과액과 함께 분리 제거하였다(오른쪽). 마지막으로, 면역결합체가 부착된 membrane을 blotter에서 꺼내어 효소 특징기질액(DAB)에 담가 효소반응으로부터 발생된 발색신호를 측정함으로써 미생물세포의 존재를 탐지하였다.

본 연구에서는 원형질이 제거된 *S. thompson*을 모델 분석물질로 선정하였고 그 막단백질을 특이하게 인지하도록 친화결합된 복합클론 항체를 사용하여 HRP 그리고 streptavidin과의 별개 중합체를 합성한 후 이들을 구성성분으로 이용한 면역분석시스템에 대한 최적 물리 및 화학적 조건들을 결정하였다.

항체-HRP 중합체

화학반응 : 다른 단백질과의 다양한 HRP 중합반응(17-20) 중 비교적 수율이 높고 응집 부반응이 낮은 것으로 알려진 HRP 분자상의 carbohydrate 그룹을 이용하는 방법이 채택되었다(21). 이 그룹의 periodate 산화과정에 의해 생성된 aldehyde 반응기를 항체분자 상의 amino 그룹과 반응시킴으로써 중합체를 합성하였다. 이와 같은 화학결합에 의한 단백질 간 중합을 확인하기

위해 반응혼합물을 β -mercaptoethanol이 배제된 비환원조건 하에서 SDS-PAGE 분석을 수행하였다(Figure 2). 반응혼합물에 대한 PAGE 자료(Figure 2M)를 보면 미반응된 HRP와 항체(Ab) 밴드들 외에 항체 위쪽으로 새로운 밴드가 추가된 것을 확인할 수 있었다. 그 생성된 물질의 분자량 위치로 비루이 이 물질은 항체 한 분자에 효소가 반응된 중합체(Co)인 것으로 판단된다. 합성된 중합체는 상업적으로 시판되고 있는 goat anti-human IgG-HRP 중합체(Figure 2C)와 비교하여 중합 수율과 순도 측면에서 훨씬 우수한 것으로 나타났다.

정제 : 반응혼합물 내에는 미반응된 HRP와 항체가 포함되어 있으며(Figure 2M 참조) 이 물질들은 중합체의 항원-항체 반응을 방해하거나 혹은 비특정부착에 의해 분석민감도와 특이성의 감소를 초래하므로 중합체의 분리를 위한 size exclusion 크로마토그래피가 시행되었다 (Figure 3). 칼럼에서 유출된 각 분획들에 대해 총 단백질 분포(Bradford 분석)를 측정한 결과 유출부피 39 mL과 85 mL 사이에서 여러 개의 peak들이 형성되었고 항원에 대한 반응성과 연관된 효소활성 즉, 중합체 활성(고정화된 세포를 이용한 고상 면역분석에 의해 측정)을 고려하여 분획 A-E로 구분하였다. 단백질 양과 비교한 중합체 활성은 앞쪽의 분획 A와 B에서 높게 나타났고 중간에 위치한 분획 C에서 감소하였으며 뒤쪽의 분획 D와 E에서는 매우 낮게 나타났다. 이와 같은 결과로부터, 분획의 크기가 비교적 거대한 중합체 (MW 200K)가 칼럼으로부터 먼저 유출되고 중간에서는 중합체와 크기가 비슷한 미반응 항체 (MW 155K)가 함께 유출되는 것으로 추정되며 마지막으로 뒤쪽에서는 주로 소량의 중합체가 혼합된 미반응 성분들이 유출되는 것으로 예측된다.

정제 분획 A-E 내에 포함된 항체-HRP 중합체에 대한 기능성 비교를 수행함으로써 신호발생원을 결정할 목적으로, 위에서 언급된 바와 같은 고상 면역분석에 의해 각 분획 내 중합체를 이용하여 표준곡선을 구하였다(제시되지 않은 자료). 그 결과 앞에 유출된 분획 A와 B에서 가장 높은 활성이 측정되었고 그 후에 유출된 것일수록 비례하여 낮아지는 것으로 나타났다 이로부터 분획 A와 B에는 중합체 이외의 성분이 적게 포함되어 있고 뒤에 유출된 분획 내에는 미반응물질이 많이 섞여 있는 것

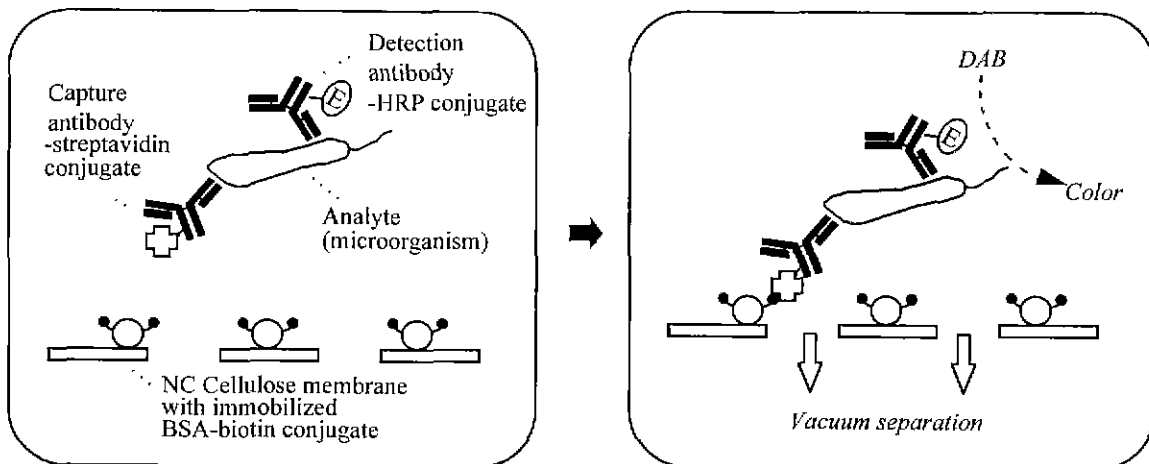


Figure 1 Construction of an immuno-analytical svstem for microbial cells based on membrane filtration. Two different antibody conjugates, chemically lnked to HRP and streptavidin, were reacted with the analyte in a liquid phase (left). The reaction mixture was then transferred into wells of a dot-blotter with biotin immobilized-NC membrane and, upon vacuum filtration of the solution, the antigen-antibody complexes were captured on the surfaces via biotin-streptavidin reaction (right).

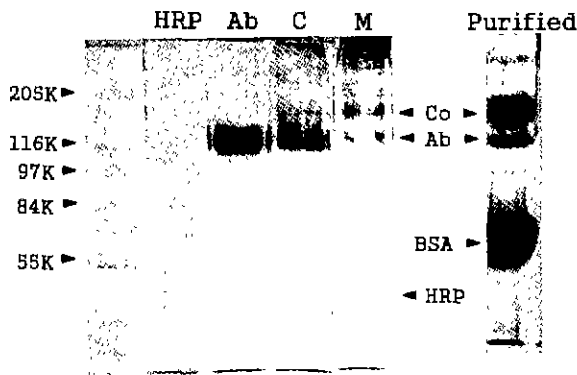


Figure 2. SDS-PAGE analyses of antibody-HRP conjugates under non-reducing conditions. M, the conjugate (Co) between antibody (Ab) and HRP, C: a commercially purchased goat anti-human IgG-HRP conjugate, and Purified, a purified pool of the conjugate (M) by means of size exclusion chromatography and stored in the presence of BSA.

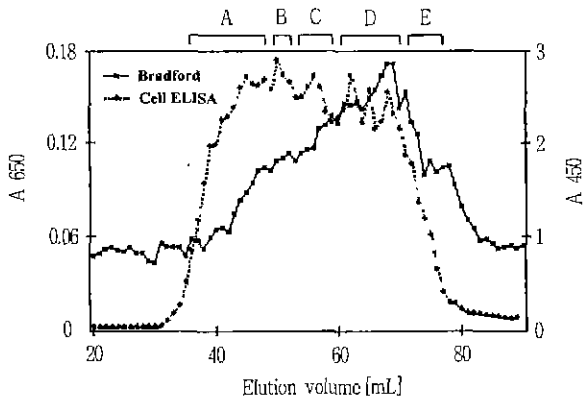


Figure 3. Size exclusion chromatography of antibody-HRP conjugation mixture by using a Biogel A5M gel column. Each fraction eluted from the column were analyzed by using Bradford assay for total protein (detected at the absorbance of 650 nm, A650) and cell ELISA for conjugates (monitored at A450).

로 판단되며 위 chromatogram 상에서 예측했던 분획 별 유출 성분들의 조성과 일치되었다. 따라서 측정시스템 구성을 위해 분획 A와 B의 혼합물을 신호발생원으로 선정하였고 활성 안정화를 위해 BSA 용액을 첨가한 후 4 °C에서 보관하였다. 그 보관액 내 중합체 농도를 예측하기 위해 비환원 SDS-PAGE를 수행한 결과(Figure 2, Purified) 정제 전과 비교하여 불순물이 상당히 제거되었으며 BSA를 제외한 밴드들의 면적을 비교함으로써 중합체 순도가 약 65%인 것으로 확인되었다.

항체-Streptavidin 중합체

화학반응 : 두 단백질 분자간 화학반응에 의한 중합 시 화학 결합될 기능성 그룹이 다수 존재할 경우 중합도가 매우 높아져 결국 침전과 같은 부정적 효과를 초래하므로, 분자 당 기능성 그룹의 수를 조절하고자 cross-linker를 사용하는 방법이 도입되었다(22). 또한, 이 방법은 항체와 streptavidin과 같이 크기가

큰 분자간의 중합거리를 일정하게 유지시켜 주므로 각 단백질 반응활성을 비교적 높게 유지시킬 수 있는 장점을 부여할 것으로 예측된다. 화학적 그리고 기능적인 요구에 따라 잘 고안된 중합체를 합성하기 위해, 항체와 streptavidin 분자 상의 amino 그룹이 SMCC과 SPDP에 의해 각각 적절한 수의 maleimidyl 기와 sulfhydryl 반응기로 전환되었다 이와 같이 활성화된 두 단백질들은 상호 반응되었고 그 중합을 확인하기 위해 상기한 바와 같이 비환원 SDS-PAGE에 의해 분석되었다(Figure 4). 반응혼합물의 밴드(Figure 4M)를 각 반응성분의 것들(항체: Ab, streptavidin: SA)과 비교한 결과로부터, 혼합물에는 항체 밴드 상단으로 새로운 물질(즉, 중합체: Co)이 합성된 것을 확인할 수 있었고 또한 미반응물질들도 진존한 것으로 나타났다.

정제, 합성된 중합체를 정제하고 또한 반응수율을 산출할 수 있도록 미반응물질들을 순차적으로 제거하는 공정이 개발되었다(Figure 5, 왼쪽) 첫 분리과정으로, daminobiotin이 고정화된 agarose 칼럼을 이용한 streptavidin 친화 크로마토그래피 방법에 의해 미반응된 항체가 먼저 제거되었다. 이 과정에 의해 부분 정제된 혼합물에 포함된 미반응 streptavidin과 항체-streptavidin 중합체의 분리는 분자크기에 기초를 둔 Sephadex G-100 젤 크로마토그래피 방법에 의해 수행되었다. 이와 같은 2단계 분리과정은 유리칼럼의 하부에 Sephadex G-100 젤을 채운 다음 그 상부에 daminobiotin-agarose 겔을 채움으로써 단일공정으로 고안되었다.

이와 같이 제작된 젤 칼럼을 통하여 유출된 용액 각각의 분획 시료에 대해 총 단백질 정량(Bradford 분석)을 수행한 결과 잘 분리된 3개의 peak a-c가 얻어졌다(Figure 5, 오른쪽). 미반응 항체는 daminobiotin과 상호작용하지 않고 맨 먼저 유출되므로 peak a 내에 포함될 것으로 예측된다. 반면에 친화력을 갖으며 pH 변화에 의해 유출된 물질 중 중합체는 그 분자크기가 Sephadex G-100 젤 분리범위를 초과하므로 먼저 이동되고 (peak b) 미반응 streptavidin은 뒤늦게 유출된다(peak c). 비환원 SDS-PAGE 분석결과를 보면, 예측한 바와 같이 미반응 항체와 중합체가 잘 분리되어 peak a와 b 내에 각각 포함된 것이 탐지되었지만(Figure 4, Purified), peak c 내 단백질은 그 양이

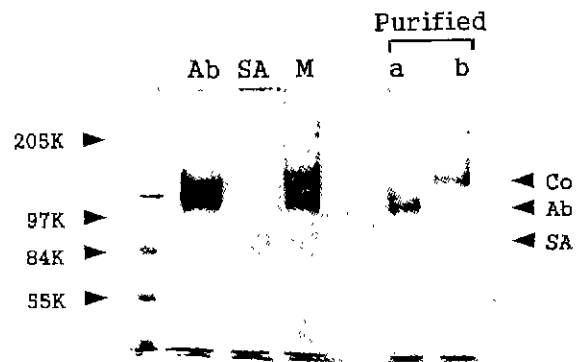


Figure 4. Non-reducing SDS-PAGE of antibody-streptavidin conjugates. The mixture after reaction (M) contained the conjugates as well as the two reactants, antibody (Ab) and streptavidin (SA). By using chromatography (refer to Fig. 5), the conjugates (Co in lane b, Purified) were separated from the unreacted components (see lane a).

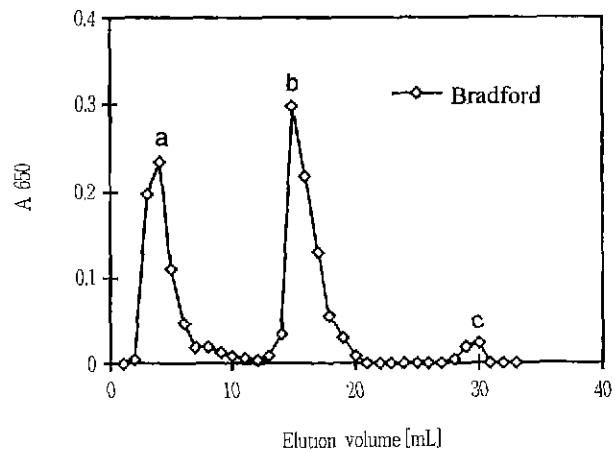
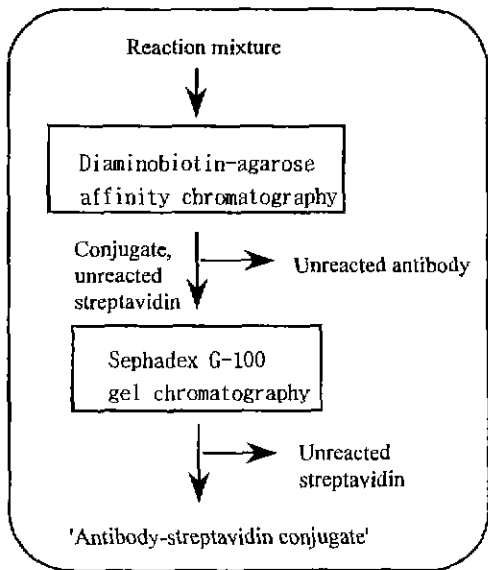


Figure 5 Purification processes designed for separating antibody-streptavidin conjugates from unreacted components (left) and the result by using them combined in a single chromatographic procedure (right)

매우 적어 분석되지 않았다. 정제된 중합체에 대한 PAGE 분석 결과로부터(Figure 4, Purified, lane b), 하단의 두 밴드 면적비를 계산하여 산출된 순도는 약 85%이었고, 각 밴드들은 그 분자량에 근거하여 항체 한 분자 당 중합된 streptavidin의 수가 각각 1과 2인 중합체를 포함하는 것으로 추정된다.

이와 같이 정제된 중합체 내 항체의 균 세포에 대한 면역반응성과 streptavidin의 biotin에 대한 부착반응성을 시험하였다(제시되지 않은 자료). 단백질 농도를 변화시켜 각 반응성에 대한 표준곡선을 구한 결과 각 곡선의 모양과 위치가 거의 일치되었고 그 따라서 중합체의 두 기능 모두 보존된 것으로 판단된다.

미생물세포 면역분석시스템

진공 포획방식을 이용한 미생물세포 측정시스템의 성능은 주로 각 중합체의 농도 그리고 NC membrane 표면에 존재하는 biotin 밀도에 의해 조절된다(Figure 1 참조). 특히, 두 중합체 항체-HRP와 항체-streptavidin은 각각 신호발생과 포획에 관여하므로 그 성분간의 농도균형이 유지되지 않을 경우 측정민감도(측정하한농도로 정의)가 저하될 수 있다. 또한, 측정하고자하는 분석물질이 균 세포로써(*Salmonella*; 1-5 μm 크기, (23)) 매우 거대하기 때문에 세포가 투과될 수 있도록 biotin 고정화모체로써 사용되는 membrane의 세공크기가 고려되어야 한다. 그러므로 본 절에서는 분석민감도에 대한 각 성분들의 최적조건을 결정하고자 포획 및 반응에 영향을 주는 물리적 그리고 화학적 변수들이 시험되었다.

진공 포획용 membrane 세공크기 : 포획공정을 이용한 균 세포의 경량분석 시 biotin 고정화모체로 사용되는 membrane의 세공크기에 따라 측정민감도가 변화될 수 있다. Membrane 세공이 세공크기 보다 작을 경우 그 분석물질과 반응된 면역결합체는 세공 내로 확산되지 못하고 표면에 잔존하게 되므로 세척시 유실되어 신호발생에 기여하지 못한다. 반대로, 그 세공이 지나치게 클 경우 면역결합체의 포획을 위한 표면적이 감소되고 또한 유속이 매우 빠르게 되므로 포획효율이 저하된다. 이와

같은 세공크기의 효과를 시험하기 위해 비교적 균일한 세공을 제공하는 NC membrane을 선택하였다 따라서 선택된 membrane은 균 세포의 투과여부를 결정하기 용이한 장점을 제공할 뿐만 아니라 소수성 표면을 지니므로 단백질을 쉽게 고정화시킬 수 있다(24)

측정시스템의 분리공정에 사용할 NC membrane을 결정하기 위해 다른 세공크기를 갖는 membrane들을 대상으로 박테리아 투과성시험이 수행되었다(Figure 6). 이를 위해 일정 농도의 균 세포 시료와 항체-HRP 중합체를 반응시킨 후 biotin이 고정화된 membrane을 통하여 진공 포획하였고 그 표면에 잔존한 HRP로부터 발색신호를 발생시켰다(Figure 6, Cells) 그 결과로부터, 세공크기가 비교적 작은 membrane(0.45 μm와 8 μm)을 사용한 경우 균 세포의 투과가 원활치 않아 표면에 여파된 세포-중합체 면역결합체로부터 발색이 발생되며 이러한 비투과성은 세공크기에 반비례하는 것으로 나타났다 반면에, 12 μm membrane을 사용하면 발색이 전혀 나타나지 않은 점으로 미루어 세포-중합체 면역결합체가 모두 membrane을 투과하여 제거된 것으로 판단된다. 만일, 위 시험에서 세포를 제외시킨 후 반복할 경우 membrane의 종류에 관계없이 발색이 나타나지 않았으므로(Figure 6, Neg) 신호발생에 대한 비특정 효과는 배제될 수 있다. 반면에, 항체-streptavidin 중합체를 추가하여 반응시킨 membrane의 세공크기에 관계없이 모두 발색이 형성되었으므로(Figure 6, Pos.) membrane 세공 내 표면에서의 biotin-streptavidin 반응에 의한 면역결합체의 포획이 신호발생에 추가로 기여하는 것으로 판단된다. 이와 같은 결과들에 근거하여 12 μm NC membrane으로부터의 신호발생은 단지 면역결합체의 포획에 의해 수행될 수 있으므로 이를 biotin 고정화모체로 선택하였다.

고정화된 BSA-biotin 밀도 : BSA-biotin 중합체가 고정화된 membrane 표면에서 분석물질을 중심으로 형성된 샌드위치 형태의 면역결합체를 biotin-streptavidin 반응을 이용하여 포획하고자 시도하였다(Figure 1 참조). 그 포획효율은 반응에 참여

하는 고정화된 biotin 밀도와 중합체 내 streptavidin 농도에 비례하므로 이 두 변수의 변화에 대한 분석시스템의 응답을 구하였다(Figure 7). 일정 농도의 항체-streptavidin 중합체를 사용한 경우, 발생된 신호세기는 membrane에 고정화된 BSA-biotin 중합체의 밀도가 낮은 범위에서 그 밀도에 비례하여 증가하지만 고정화 밀도가 대략 1 mg/mL 이상일 경우 현저히 증가하지 않는 것으로 나타났으므로 이 농도를 최적조건으로 선택하였다 이와 같은 신호변화 양상은 항체-streptavidin 중합체의 농도변화에 관계없이 유사하였다 그러나 biotin 밀도의 변화에 대한

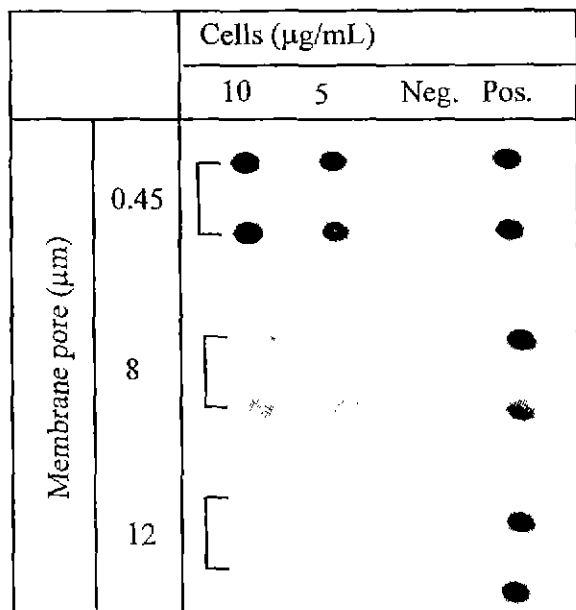


Figure 6 Determination of optimal pore size of NC membrane for vacuum filtration immunoassay for microbial cells. The cells reacted with antibody-HRP conjugate were added onto various membranes with immobilized biotin and, after filtration, a color was generated from the enzyme remained on the surfaces (Cells in the figure). The identical procedure was repeated in the absence of cells (Neg.) or in the presence of an additional component (Pos), i.e., antibody-streptavidin conjugate.

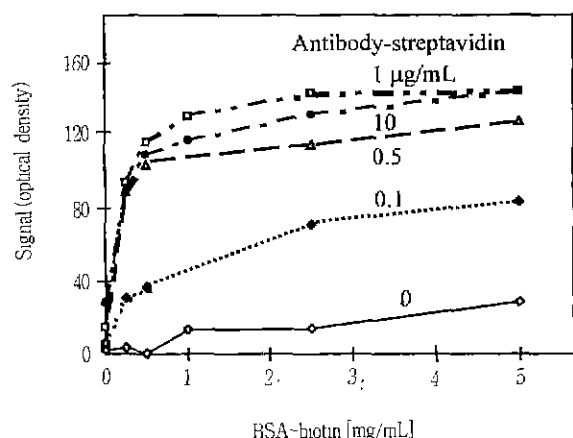


Figure 7 Determination of optimal concentration of BSA-biotin conjugate used for immobilization on NC membrane.

최대신호는 중합체 농도가 낮은 범위에서 그 농도에 비례하여 증가하였지만 1 µg/mL 이상에서는 오히려 감소하는 현상이 일어났다. 이것은 streptavidin 중합체와 HRP 중합체가 균 세포 표면상의 반응자리에 대해 부착경쟁을 할 수 있으므로 한 성분의 농도가 높아지게 되면 신호발생과 포획의 균형이 깨지기 때문으로 해석된다(중합체 최적농도는 아래 참조).

항체 중합체 농도 : 신호발생과 고체표면 상의 포획에 각각 관여하는 항체-HRP 그리고 항체-streptavidin 두 중합체는 분석물질에 대한 부착 경쟁관계에 있으므로 그 최적 농도 비의 결정이 요구되며 또한 중 중합체 농도가 분석민감도에 영향을 줄 것으로 예측된다 여러 다른 농도로 희석된 두 중합체와 일정농도의 균(10 µg/mL)을 혼합하여 반응시킨 후 이 반응액을 biotin이 최적밀도로 고정화된 NC membrane을 통하여 일정시간 포획하였고 발색신호를 발생시킴으로써 실험이 수행되었다(Figure 8) 신호세기는 전체적으로 두 중합체의 농도에 비례하여 신호가 증가되는 것으로 나타났다 그러나 일정 HRP 중합체 농도에서 항체-streptavidin 중합체 1 µg/mL 이상을 반응시켰을 때 신호세기가 현저히 변화되지 않는 것으로 나타났고 이와 같은 포화농도는 membrane 상에 고정화된 biotin 밀도에 따라 결정되는 것으로 추정된다. HRP 중합체의 경우, 분석물질의 농도가 낮을 때 신호세기는 그 중합체 농도에 비례하여 증가하지만 균 세포의 농도가 높게 되면 그 중합체의 임계농도(약 0.5 µg/mL)에서 비특정신호가 현저히 상승하는 것으로 나타났다(제시되지 않은 자료). 이러한 결과는 사용된 복합클론 항체의 특성으로 나타나는 응집현상에 기인하며 반응하지 않은 항체-HRP 중합체가 이 응집체와 함께 여과됨으로써 발생하는 것으로 판단된다. 따라서 분석물질과 반응되어질 항체-streptavidin 중합체와 항체-HRP 중합체의 최적 반응농도를 각각 1 µg/mL 그리고 0.5 µg/mL로 결정하였다.

성능평가 : 위에서 결정된 각 변수들의 최적조건 하에서 dot-blotter를 이용한 모델시스템을 구성하였고 그 측정민감도를 평가하기 위해 표준 분석물질에 대한 농도응답을 구하였다(Figure 9). 분석물질 농도에 따라 발생된 membrane 상의 신호를 보면(Figure 9, 왼쪽), 균 세포 농도 0.5-40 µg/mL 범위에서 육안으로 구분 가능한 발색이 발생되었을 뿐만 아니라 그

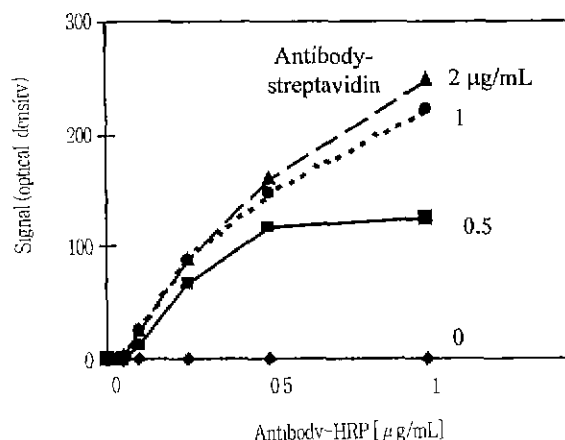


Figure 8 Determination of optimal antibody conjugates to HRP and streptavidin toward signal-to-noise ratio. See text for details.

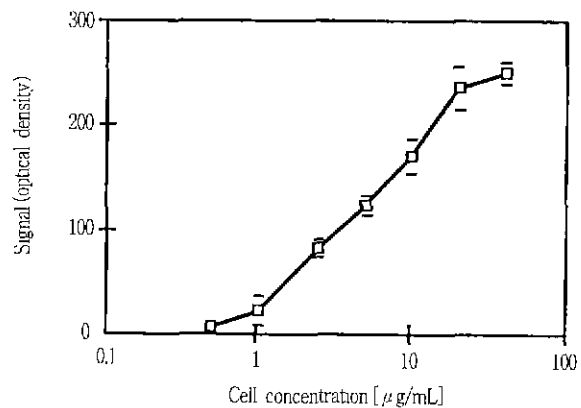
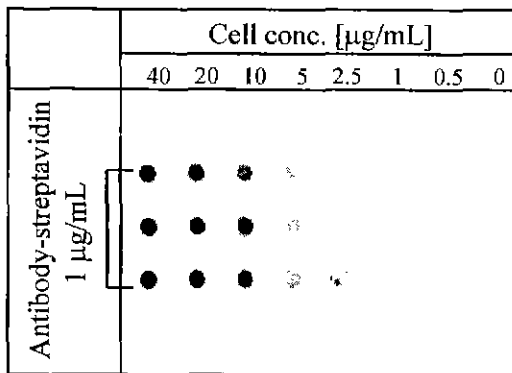


Figure 9. Dose responses of the membrane filtration immunoassay system for *S. thompson* (left) and a semi-logarithmic plot to determine its sensitivity and the dynamic range of detection (right). The upper and lower bars in the plot indicate standard deviation from the mean of triplicate measurements.

세기는 분석물질 농도에 비례하는 것으로 나타났다. 발색세기를 optical density로 전환하여 그 값을 균 세포 농도의 함수로 표현한 농도응답곡선(Figure 9, 오른쪽)으로부터, 발생된 신호량과 균 세포 농도는 분석물질 1-20 µg/mL 범위에서 대략적으로 선형관계를 나타냈으며 측정가능한 농도는 약 1 µg/mL로 결정되었고 세포수로 환산하면 약 10⁵-10⁶ cells/mL인 것으로 계산되었다.

미생물세포의 정량분석에 있어서, 위에서 얻은 dot-blotter 측정시스템의 성능을 기존 분석방법인 microwell을 형체 고정화모체로 사용하는 고상 면역분석시스템(ELISA)에서의 결과와 비교하였다. 단일클론 항체를 부착단백질로 사용하는 microwell 시스템의 경우 일반적으로 10⁵-10⁸ cells/mL 범위의 균을 검출할 수 있고 그 측정가능한 농도는 *Salmonella*의 종에 따라 다르게 나타나지만 평균적으로 약 10⁶ cells/mL이다(25). 이와 유사한 성능이 본 연구에서의 복합클론 항체를 사용한 dot-blotter 시스템으로부터 얻어졌고, dot-blotter 분석 수행시간이 약 2배 빠른 점을 감안하면 그 측정능력이 상대적으로 우수한 것으로 판단된다. 더욱이 본 연구에서 구현된 진공 포획방식의 측정원리(Figure 1 참조)를 특별히 설계된 반도체센서(light-addressable potentiometric sensor, LAPS) 시스템(26)과 결합시키면 현재의 측정민감도의 향상이 실현될 수 있을 것으로 예측된다. 이 LAPS 시스템은 단백질 분석 시 ELISA의 경우와 비교하여 약 100-1000배 높은 분석성능을 나타내는 것으로 보고되고 있다(27).

결론으로써, 미생물 세포를 직접 탐지할 수 있도록 그 표면항원에 특이한 복합클론 항체를 포획성분인 streptavidin과 신호발생원인 HRP와 별도로 각각 화학중합시켰고 세포에 대한 면역분석을 수행하기 위해 biotin이 고정화된 NC membrane이 장착된 dot-blotter를 이용하여 모델시스템을 구성하였다. 각 구성성분의 최적조건하에서 분석수행시간은 기존의 microwell 분석시스템에서의 결과와 비교하여 그 분석수행시간은 상당히 단축된 반면에 그 측정민감도는 현저히 향상되지 않은 것으로 나타났다. 민감도가 기대치보다 낮은 원인으로서는 우선 낮은 항원농도를 탐지하기 위해 비교적 많은 형체량이 요구되지만 이 조건은 사용된 복합클론 항체의 응집반응에 의해 결합체의 침전을 일으키므로 사용될 수 없었다. 항체농도를 증가시키고 또한 용

집현상을 최소화하기 위해 적절한 단일클론 항체의 도입이 필요하다(28, 29). 또한, 측정민감도는 면역결합체를 포획하는 membrane의 표면적에 의해 제한될 수 있으므로 미생물 균의 포획 방식 대신에 세공크기가 작은 membrane을 이용한 세포의 여과 방식(30)을 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

병원성 미생물을 측정할 수 있는 분석시스템을 구성하기 위해 면역학적 성분들을 합성하였고, 이를 이용하여 모델 시스템을 구성함으로써 균 세포 분석원리가 연구되었다. 구성성분을 준비하기 위해, *Salmonella thompson*에 대한 복합 클론항체를 면역친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였고, 이렇게 정제된 항체를 streptavidin과 horseradish peroxidase에 화학결합시켰다. 항체와 streptavidin은 각각 SMCC와 SPDP에 의해 활성화되었고 두 물질을 반응시킴으로써 중합체가 합성되었다. 중합체는 diaminobiotin 젤과 sephadex G-100 젤을 이중 층으로 쌓은 컬럼을 이용하여 정제되었다. 항체-HRP 중합체의 합성을 위해, HRP를 NaIO₄를 이용하여 활성화시킨 후 항체와 반응시킴으로써 결합되었고, NaCNBH₃ 처리에 의해 안정화된 중합체는 Biogel A5M을 이용한 size exclusion 크로마토그래피로 정제되었다. 이렇게 준비된 중합체들과 dot-blotter 그리고 biotin이 고정화된 nitrocellulose membrane(12 µm pore size)을 이용하여 모델시스템을 구성하였다. 분석물질(*S. thompson* cells)은 먼저 액상에서 두 중합체와 반응되었고 반응막을 membrane이 장착된 blotter에 옮긴 후 하부에 진공을 걸어 면역복합체를 biotin-streptavidin 반응에 의해 membrane 표면에 포획하였다. 최적조건 하에서 시스템의 균 세포 분석원리를 확인하였으며 측정가능한 농도는 약 1 µg/mL(10⁵-10⁶ cells/mL)인 것으로 나타났다. 이러한 측정능력의 주요조절인자는 두 형체 중합체들의 농도인 것으로 나타났고 분석물질의 존재 하에서 중합체 농도의 증가는 항원-항체 응집반응을 초래하는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. 정규철 (1987), 지역사회보건학, p. 34, 수문사, Korea.

2. Crowther, J. R. (1995), ELISA, p. 1, Humana Press Inc., Singapore.
3. Schramm, W. and S.-H. Paek (1992), Antibody-Antigen Complex Formation with Immobilized Immunoglobulins, *Anal. Biochem.*, **205**, 47-56.
4. 이종훈 (1987), 병원미생물학, p. 356. 수문사, Korea.
5. Jaradat, Z. W. and J. Zawistowski (1996), Production and characterization of monoclonal antibodies against the O-5 antigen of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1-5.
6. Muramatsu, Y., T. Yanase, T. Okabayashi, H. Ueno, and C. Morita (1997), Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay combined with a novel sample preparation method, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2142-2146.
7. Mattingly, J. A., B. T. Butman, M. C. Plank, R. J. Durham, and B. J. Robison (1988), Rapid Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Listeria* in Food Products, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 679-681.
8. Reif, T. C., M. Johns, S. D. Pillai, and M. Carl (1994), Identification of Capsule-Forming *Bacillus anthracis* Spores with the PCR and a Novel Dual-Probe Hybridization Format, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1622-1625.
9. Bereswill, S., P. Bugert, I. Bruchmuller, and K. Geider (1995), Identification of the Fire Blight Pathogen, *Erwinia amylovora* by PCR Assay with Chromosomal DNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2636-2642.
10. Hartley, J. L. and A. Rashchian (1995), Enzymatic Control of Carryover Contamination in PCR. PCR primer (C. W. Dieffenbach and G. S. Dveksler, eds.), pp. 23, Cold Spring Harbor Laboratory press, USA.
11. Choi, K. B., H. J. Youn, S. H. Cha, and J. D. Choi (1997), Measuring characteristics of mouse-IgG immunoassay with light addressable potentiometric sensor, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 396-401.
12. Libby, J. M. and H. G. Wada (1989), Detection of *Neisseria meningitidis* and *Yersinia pestis* with a Novel Silicon-Based Sensor, *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1456-1459.
13. Suzuki, H. and T. Terada (1988), Removal of dodecyl sulfate from protein solution, *Anal. Biochem.*, **172**, 259-263.
14. Bollag, D. M., M. D. Rozycki, and S. J. Edelman (1996), Protein Concentration Determination, Protein Methods (eds.), pp. 62-65, Wiley Liss Inc., USA.
15. Pinon, J. M., T. D. Puygauthier, H. Lapan, C. Marx, A. Bonhomme, J. Boulant, R. Geers, and H. Dupont (1990), Rapid Detection of proteins by Enzyme-Linked Immunofiltration Assay after Transfer onto Nitrocellulose membranes, *Electrophoresis*, **11**, 41-45.
16. Challacombe, S. J. (1988), Application of ELISA to Microbiology. ELISA and Other Solid Phase Immunoassays (D. M. Kemeny and S. J. Challacombe, eds.), pp. 319-340, John Wiley & Sons, New York.
17. Kerr, M. A., L. M. Loomes, and S. J. Thorpe (1994), Enzyme-Conjugated Antibodies Preparation and Use. Immunochemistry (M. A. Kerr, eds.), pp. 128-129, Bios scientific publishers, San Diego.
18. Kurobe, M., Y. Takei, T. Fukatsu, A. Kato, and K. Hayashi (1993), Peroxidase-Linked anti-Basic Fibroblast Growth Factor Monoclonal antibody Fab' conjugates : Application for Two-Site Enzyme Immunoassay and Immuno-histochemical Detection, *Bioconjugate Chem.*, **4**, 134-138.
19. Nygren, H. (1982), Conjugation of Horseradish Peroxidase to Fab Fragments with Different Homobifunctional and Heterobifunctional Cross-linking reagents, *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 407-412.
20. Weemen, B. K. V. and A. H. W. M. Schuur (1971), Immunoassay using Antigen-Enzyme Conjugates, *FEBS Letters* **15**, 232-236.
21. Nakane, P. K. and A. Kawaoi (1974), Peroxidase-Labeled Antibody A new method of conjugation, *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1084-1091.
22. Mok, R.-S., Y.-I. Lee, and S.-H. Paek (1997), Chemical Coupling of Recombinant gp41' to Monoclonal Antibody for AIDS Diagnosis, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 515-521.
23. Singleton, P. and D. Sainsbury (1987), Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, p. 787, A Wiley-Interscience publication, New York.
24. Gershoni, J. M. and G. E. Palade (1983), Protein blotting principles and applications, *Anal. Biochem.*, **131**, 1-15.
25. Ng, S. P., C. O. Tsui, D. Roberts, P. Y. Chau, and M. H. Ng (1996), Detection and Serogroup Differentiation of *Salmonella* spp. in Food within 30 Hours by Enrichment-Immunoassay with a T6 Monoclonal Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2294-2302.
26. Rogers, K. R., J. C. Fernando, R. G. Thompson, J. J. Valdes, and M. E. Eldefrawi (1992), Detection of Nicotinic Receptor Ligands with a Light Addressable Potentiometric Sensor, *Anal. Biochem.*, **202**, 111-116.
27. Panfil, P. R., K. Dill, and J. D. Olson (1994), Immunochemical Detection using the Light Addressable Potentiometric Sensor, *Current Opinion in Biotechnology* **5**, 60-64.
28. Colston, J. T., P. Kumar, E. D. Real, A. T. C. Tsin, J. J. Valdes, and J. P. Chambers (1993), Detection of Subnanogram Quantities of Mojave Toxin via Enzyme Immunoassay with Light Addressable Potentiometric Detector, *Biosensor & Bioelectronics*, **8**, 117-121.
29. Coulepis, A. G., M. F. Veale, A. MacGregor, M. Kornitschuk, and I. D. Gust (1985), Detection of Hepatitis A Virus and Antibody by Solid-Phase Radioimmunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Monoclonal Antibodies, *J. Clin. Microbiol.*, **22**, 119-124.
30. Paffard, S. M., R. J. Miles, C. R. Clark, and R. G. Price (1997), Amplified enzyme-linked-immunofilter assay enable detection of $50-10^5$ bacterial cells within 1 hour, *Anal. Biochem.*, **248**, 265-268.