



## Anti-Outer Membrane Protein 면역단백질을 이용한 Sandwich ELISA 방법에 의한 우유 내 *Salmonella*의 검출

최 석 호

상지대학교 생명공학과

### Detection of *Salmonella* in Milk by Sandwich ELISA using Anti-Outer Membrane Protein Immunoglobulins

Suk-Ho Choi

Department of Biotechnology, Sangji University

#### Abstract

The specificity of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect *Salmonella* in milk was determined in this study. The antibodies used in sandwich ELISA were egg yolk immunoglobulin G (IgY) obtained after immunization of hen with outer membrane protein (OMP) fraction from *Salmonella typhimurium* and rabbit IgG obtained after immunization of rabbit with the purified OMP with the molecular weight of 40,000. The immunoblot assay showed that the IgY reacted strongly with OMP with the molecular weight of 6,000 and the rabbit IgG reacted strongly with OMP with the molecular weights of 40,000, 35,000, and 6,000 from the bacteria including *Salmonella* which belongs to Enterobacteriaceae. The IgY and rabbit IgG also reacted with other proteins from *Salmonella typhimurium* in immunoblot assay. Competitive ELISA showed that IgY showed specificity to react with two strains of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella cholerasuis* but not with *Escherichia coli* and *Yersinia enterocolitica*. Two strains of *Salmonella typhimurium* added to UHT milk showed the highest absorbance of all the bacteria used in the sandwich ELISA. Some strains of *Salmonella cholerasuis* showed higher absorbances than non-*Salmonella* bacteria.

Key words : *Salmonella*, outer membrane protein, ELISA, milk

#### 서 론

*Salmonella*는 자연에 널리 분포하고 있으며 식품에 오염되어 식중독을 유발하는 중요한 세균이다. *Salmonella*에 의한 식중독을 방지하기 위하여 생산자와 소비자는 식품의 위생적인 관리에 유의하여야 한다. 우유를 비롯한 축산 식품의 오염을 방지하고 공중보건을 유지하기 위한 수단으로서 오염을 조기에 검출할 수 있는 방법이 필요하다.

특히 시유가 제조되는 공정 중에는 원유 또는 충전기와 같은 유가공 기계에 의해 살균 후에 2차 오염이 일어날 수

있다. 2차 오염에 의해 시유의 저장성이 감소될 뿐만 아니라 *Salmonella*와 같은 식중독균에 의해 안정성이 위협될 수 있다. 실제로 오염된 시유에 의해 미국 Illinois 주에서 16,000명의 salmonellosis 식중독 환자가 발생하였다(Phillips와 Griffiths, 1989). 또한 *Salmonella*에 감염된 젖소는 패혈증, 설사 및 유산을 유발하여 우유 생산성을 떨어뜨릴 뿐만 아니라 위생적인 우유의 생산에 장애 요인이 될 수 있다(Morisse와 Cotte, 1994).

*Salmonella*를 검출하기 위한 전통적인 방법은 증식배양, 선택배양 및 생화학검사를 이용하여 분리하고 동정되므로 3~5일이 소요되어 조기에 검출하여 식중독을 차단하는 것이 불가능하다. 반면에 증식배양 후에 면역학적 방법을 사용하여 *Salmonella*를 검출함으로서 하루만에 검출이 가능하다. 그러나 면역학적 방법은 세균의 사멸 여부에 관계없이 세균

\* Corresponding author : Suk-Ho Choi, Department of Biotechnology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea. Tel: 82-33-730-0543, Fax: 82-33-730-0503, E-mail: shchoi@mail.sangji.ac.kr

의 항원을 검출하는 방법이기 때문에 세균 검출의 확정적 증거로서 인식되지 못하고 있다. 따라서 면역학적 방법을 세균 분리를 위한 시료를 선별하는 중간단계로서 이용하면 모든 시료로부터 전통적인 방법에 따라 세균을 분리할 필요성을 감소시킬 수 있다.

ELISA(Wyatt et al., 1996; Thorns et al., 1996; Ng et al., 1996), dot blot immunoassay(Yoshimasu와 Zawistowski, 2001) 및 colony blot assay(Hoszowski et al., 1996)를 이용하여 *Salmonella*를 검출하기 위한 면역학적 방법으로서 개발되었으며 다가항체 또는 단가항체가 검출시약으로서 이용되었다.

Outer membrane protein(OMP)들은 그람음성세균의 외막에 존재하는 단백질들로서 친수성 분자들을 통과시키는 생리학적으로 중요한 역할을 한다. 이 단백질들의 발현은 세균의 생장 환경에 따라 다르다(Nikaido, 1994). *Salmonella*의 OMP들을 이용하여 백신을 개발할 수 있으며 임상진단법에 응용할 수 있다고 보고된 바 있다(Udhayakumar와 Muthukarrppan, 1987; Isibasi et al., 1988). Arockilamy와 Krishnaswamy(2000)은 *Salmonella typhi*의 OMP 중에서 다수를 차지하며 세균의 외벽에 노출되어 있는 porin 단백질인 OmpC를 순수분리하였다.

본 연구는 *Salmonella typhimurium*으로부터 분리한 OMP 단백질들을 닭과 토끼와 면역주사하여 얻은 난황 immunoglobulin G(IgY)과 토끼 immunoglobulin G의 특이성을 조사하여 *Salmonella* 검출을 위한 ELISA 방법으로서의 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 우유 시료

연구에서 사용한 KCTC 균주들과 ATCC 균주들은 각각 생명공학연구원 유전자은행과 American Type Culture Collection에서 구입하였다(Table 1). 각 세균은 Tryptic soy agar와 Tryptic soy broth에서 배양하였다. 우유 내에 함유된 *Salmonella*를 검출하는 sandwich ELISA 실험에서 시중에서 구입한 UHT 우유를 사용하였다.

### Outer Membrane Protein(OMP) 분획의 분리

*Salmonella typhimurium* KCTC 2421을 1 L의 Tryptic soy broth에 접종하여 37℃에서 18시간 배양하였다. 3,000×g에서 30분간 원심하여 침전된 세균을 20 mM Tris, pH 7.4에 분산시킨 후 Vibra cell(Sonic & Materials Inc., USA)을 사용하여 37% amplitude에서 3분간 sonicate하여 분해하였다. 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 분해되지 않은 균체를

**Table 1. Sandwich ELISA to determine specificity of antibodies in detecting *Salmonella* in milk**

Bacteria	Strain number	Absorbance at 405nm
<i>Salmonella typhimurium</i>	KCTC 2421	2.49±0.06
<i>Salmonella typhimurium</i>	KCTC 2514	2.25±0.04
<i>Salmonella cholerasuis</i>	KCTC 2425	1.26±0.02
<i>Salmonella cholerasuis</i>	KCTC 2930	1.51±0.04
<i>Salmonella cholerasuis</i>	KCTC 2931	0.99±0.03
<i>Salmonella cholerasuis</i>	KCTC 2932	0.69±0.03
<i>Salmonella cholerasuis</i>	KCTC 2933	1.48±0.09
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 43895	0.57±0.03
<i>Escherichia coli</i>	KCTC 2441	0.29±0.01
<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 2009	0.43±0.20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KCTC 2208	0.46±0.01
<i>Citrobacter freundii</i>	KCTC 2006	0.13±0.01
<i>Enterobacter sakazakii</i>	KCTC 2949	0.29±0.03
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 23715	0.31±0.01
<i>Listeria monocytogenes</i>	KCTC 1945	0.57±0.03
<i>Enterococcus faecalis</i>	KCTC 3512	0.59±0.01

제거하고 상등액을 45,000×g에서 1시간 원심분리하였다. 침전물을 1.5% sodium N-lauroyl sarcosinate(pH 7.4)를 첨가하여 분산시킨 다음 상온에서 30분간 반응시켰다. 45,000×g에서 원심분리하여 침전된 OMP 분획을 20 mM Tris, pH 7.4에서 분산시킨다.

### Gel Filtration Chromatography

OMP 분획을 50 mM Tris, 2% SDS, pH 7.7에 분산시켜 37℃에서 18시간 반응시켰다. 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, pH 7.7으로 평형화된 Sephadryl S-400-HR gel filtration column(2.5 cm×48 cm)을 사용하여 outer membrane proteins을 chromatography하였다. 용출액을 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 분획을 채취하여 SDS-PAGE로 단백질의 분포를 조사하였다.

### 면역주사

동량의 Freund complete adjuvant를 OMP 단백질 시료에 첨가하여 제조한 유화액을 닭과 토끼에 피하주사하였으며 매 2주 간격으로 Freund incomplete adjuvant를 가한 유화액을 2주일에 1회씩 4회 주사하였다.

### 면역단백질의 분리

Akta와 Nakai(1992)의 방법에 따라 난황의 lipoprotein을 침전시켜 얻은 수용성 분획으로부터 IgY를 분리하였다. 토

끼의 면역단백질은 Johnstone과 Thorpe(1987)의 방법에 따라 sodium sulfate를 혈청에 가하여 면역단백질을 침전시켜 분리하였다.

### Competitive ELISA

Microplate(96 well)에 OMP 분획(1 ug/mL) 100uL를 넣어 하룻밤 냉장온도에서 놔두어 coating된 well을 0.05% Tween 을 함유하는 phosphate-buffered saline(PBST)으로 3회 세척하였다. 세균들을 Tryptic soy broth에서 24시간 배양한 후 7,000×g에서 10분간 원심분리하고 침전된 세균을 phosphate-buffered saline(PBS) 용액에 분산시켜 McFarland nephelometer를 이용하여 1 mL당  $2 \times 10^{10}$ 이 되게 만든 후 이를 10배 씩 회석하였다. 회석된 세균분산액과 PBST 용액에 회석한 IgY(1:500)의 1:1 혼합액을 well에 가한 후 37°C에서 1 시간 반응하였다. 반응액을 버리고 PBST로 3회 세척한 후 100 $\mu$ L의 rabbit anti-IgY immunoglobulin G alkaline phosphatase conjugate(1:10,000)을 가한 후 37°C에서 1시간 반응하였다. 반응액을 버리고 PBST로 3회 세척 후 p-nitrophenyl phosphate 용액을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 3N NaOH를 50 uL를 사용하여 반응을 정지한 다음 405nm의 파장에서 ELISA reader(Bio-Rad, USA)로 흡광도를 측정하였다.

### Sandwich ELISA

Mircroplate(96 well)에 PBS에 회석된 토끼 IgG를 100 uL 씩 분주한 후 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 토끼 IgG를 제거한 후 well을 PBST로 3회 세척하였다. 시중에서 구입한 UHT 멸균유에 세균을 분산시켜 100 uL씩 분주한 다음 37°C에서 1시간 반응하였다. 우유를 제거한 후 PBST로 3회 세척하였다. PBST에 회석된 IgY를 각각 100 uL 씩 well에 가한 후 37°C에서 24시간 반응하였다. IgY 용액을 제거한 후 PBST로 3회 세척하였다. PBST에 회석된 rabbit anti-IgY immunoglobulin G alkaline phosphatase conjugate(1:10,000)를 well에 가한 후 37°C에서 1시간 배양하였다. p-nitrophenyl phosphate 용액을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 3N NaOH를 50 uL를 사용하여 반응 정지시킨 다음 405 nm의 파장에서 ELISA reader(Bio-Rad, USA)로 흡광도를 측정하였다.

### 전기영동과 Immunoblot

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 는 Laemmli(1970)의 방법에 따라 실시하였다. 분리된 단백질을 100V에서 2시간 전기영동하여 nitrocellulose에 옮겼다. Nitrocellulose를 2% bovine serum albumin을 함유한 PBS 용

액에 1시간 반응시키고 PBST로 세척하였다. 1:2000으로 회석한 IgY 또는 토끼 항체를 함유한 PBST에서 1시간 반응시킨 후 PBST로 4회 세척하였다. Rabbit anti-IgY immunoglobulin G alkaline phosphatase conjugate 또는 goat anti-rabbit IgG immunoglobulin G alkaline phosphatase conjugate를 함유한 PBST 용액으로 1시간 반응시킨 후 PBST로 4회 세척하였다. 세척된 nitrocellulose를 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate p-toluidine salt)/NBT(p-nitro blue tetrazolium chloride)(Bio-Rad, USA)에서 반응시켜 발색시킨 후 중류수에 넣어 발색을 중단시켰다.

### 결과 및 고찰

#### OMP의 분리 및 면역주사

*Salmonella typhimurium* KCTC2421으로부터 sodium lauroyl sarcosinate을 가하여 원심분리한 OMP 분획에는 분자량이 40,000, 35,000, 17,000, 6,000인 4종의 OMP(40K-OMP, 35K-OMP, 17K-OMP, 6K-OMP)를 함유하였다(Fig 1, B). 이 OMP 분획을 닦에 면역주사하여 난황으로부터 IgY를 얻었다. OMP 분획을 Sephadryl S-400-HR 겔여파크로마토그래피로 4 분획으로 분리하여 SDS-PAGE로 분석하였다(Fig. 1의 C, D, E, F). 분자량이 40K-OMP(Fig. 1의 C)가 겔여파크로마토그래피에 주된 분획이었다. 이 40K-OMP를 토끼에 면역주사하여 얻은 항혈청으로부터 면역단백질을 분리하였다.

#### 항체의 Immunoblot에서의 특성

*Salmonella typhimurium* KCTC 2421, *Escherichia coli* ATCC 43895, *Shigella sonnei* KCTC 2009, *Enterobacter sakazaki* KCTC 2949, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Citrobacter freundii* KCTC 2006의 세균 추출물에 대한 IgY 와 토끼 IgG의 면역반응 특성을 조사하였다. 각 세균을 SDS-



Fig 1. SDS-PAGE of OMP fractions obtained from gel filtration chromatography.

A; Marker proteins, B; crude OMP fraction, C-E; OMP fractions isolated from gel filtration chromatography.

PAGE에 의해 전기영동하여 nitrocellulose로 blotting한 후 immunoblot하였다(Fig. 2). IgY는 *Salmonella typhimurium* KCTC 2421의 6K-OMP와 함께 고분자량의 단백질들에 강하게 반응하였다. 다른 그람음성세균에서는 분자량이 6K-OMP에 주로 반응하였다. 토끼 항체는 *Salmonella typhimurium*에서 분자량이 40K-OMP, 35K-OMP 및 6K-OMP에 강하게 반응하였을 뿐만 아니라 다른 단백질들에도 반응하였다.

다른 그람음성세균에서는 분자량이 40K-OMP, 35K-OMP, 및 6K-OMP에 대해서 주로 반응하였다. 따라서 IgY와 토끼 항체가 상대적으로 *Salmonella typhimurium*에 대해 반응성이 높음을 알 수 있었으나 다른 그람음성세균에도 상당히 반응력을 알 수 있었다. 또한 OMP 분획과 40K-OMP를 항원으로 사용하여 각각 얻은 IgY와 토끼 항체에 *Salmonella typhimurium*의 다른 단백질들에 대한 항체도 상당히 존재함을 알 수 있었다. SDS-PAGE와 겔여파크로마토그래피에서 OMP 분획에서 40K-OMP가 주 단백질인데도 immunoblot에서 IgY가 분자량이 40K-OMP보다도 6K-OMP에 더 강하게 반응하므로 분자량이 6K-OMP가 40K-OMP보다도 항원으로서의 활성이 상대적으로 더 강함을 알 수 있었다. 또한 토끼 항체를

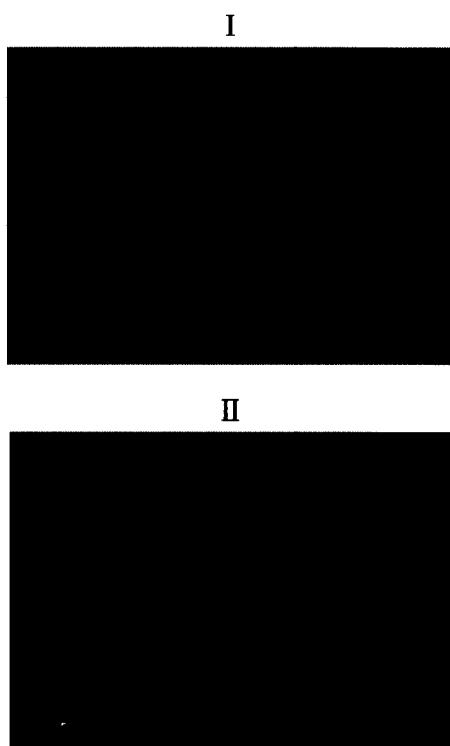


Fig. 2. Immunoblots of bacterial extracts reacted with IgY and rabbit antibody.

A; marker proteins, B; *Salmonella typhimurium* KCTC 2421, C; *Escherichia coli* ATCC 43895, D; *Shigella sonnei* KCTC 2009, E; *Enterobacter sakazaki* KCTC 2949, F; *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, G; *Citrobacter freundii* KCTC 2006.

얻기 위하여 사용한 40K-OMP는 gel filtration에 의하여 분리되었으나 35K-OMP와 8K-OMP를 비롯한 다른 단백질에 의해 오염되었던 것으로 생각된다(Fig. 3).

### Competitive ELISA

*Salmonella typhimurium* KCTC 2421의 OMP 분획에 대한 IgY의 반응의 특이성을 조사하기 위하여 competitive ELISA를 하였다. Microplate의 well의 표면에 흡착된 OMP 분획에 대해 *Salmonella typhimurium* KCTC 2421, *Salmonella cholerasuis* KCTC 2930, *Escherichia coli* KCTC 2441 및 *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715의 균체가 IgY가 OMP 분획에 결합하는 것을 억제하는지 각각 1 mL 당  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ 의 세균을 IgY와 함께 well에 가하였다. *Salmonella typhimurium* KCTC 2421와 *Salmonella cholerasuis* KCTC 2930은 세균수가 증가함에 따라 흡광도가 감소하였으나 *Escherichia coli* KCTC 2441와 *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715은 세균수의 증가에 따라 흡광도의 변화가 없었다. 따라서 두개의 *Salmonella* 균주가 IgY가 OMP 분획에 결합하는 것을 특이적으로 억제하는 것을 알 수 있었다. *Salmonella*가 1 mL 당  $10^7$  이상이 되어야 흡광도의 감소가 나타나 민감도가 낮았다.

### Sandwich ELISA를 이용한 우유 내 *Salmonella*의 검출

*Salmonella*를 UHT 우유에 첨가하여 sandwich ELISA에 사용하였다. UHT 우유는 135°C 이상의 열처리로 처리되어 대부분의 단백질이 변성되어 세균의 항원을 상당히 파괴시키므로 sandwich ELISA에서 반응이 낮았다.

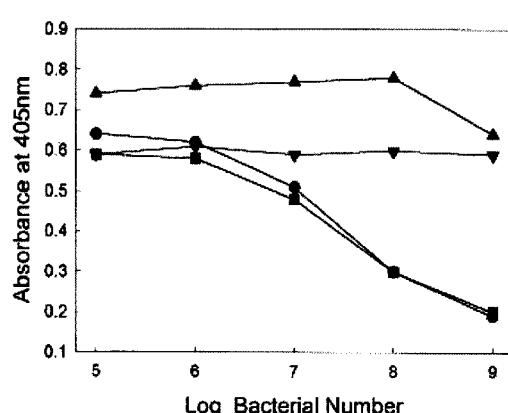


Fig. 3. Competitive ELISA of *Salmonella typhimurium* KCTC 2421(●), *Salmonella cholerasuis* KCTC 2930(■), *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715(△), *Escherichia coli* KCTC2441(▽) in binding of anti-OMP IgY to OMP fraction coated on the well.

토끼 항체를 well에 흡착시키고 UHT 우유에 첨가된 *Salmonella* 7균주를 비롯한 총 16개의 세균들의 반응을 측정하였다. IgY와 토끼 anti-IgY alkaline phosphatase conjugate를 이용하여 결합한 세균을 검출하였다(Table 1). *Salmonella typhimurium* 2 균주가 2.0 이상의 높은 흡광도를 보였다. *Salmonella cholerasuis* 균주들은 0.69~1.51의 흡광도를 보여 상대적으로 낮았다. 특히 *Salmonella cholerasuis* KCTC 2932는 0.69로 매우 낮았다. 이는 그람양성세균인 *Enterococcus faecalis* KCTC 3512의 0.59에 비해 차이가 적었다.

이는 토끼 항체와 IgY 항체를 생산하기 위하여 *Salmonella typhimurium* KCTC 2421을 사용하였기 때문에 상대적으로 *Salmonella cholerasuis*에 대한 항체들의 반응이 낮게 나타났다 생각된다. *Salmonella* 전체에 대해 민감도가 높은 항체를 생산하기 위하여 여러 계통의 균주들을 면역주사에 이용하는 것이 바람직한 것으로 생각된다. 또한 민감도를 증가시키기 위해 OMP를 담체에 결합하여 친화 크로마토그래피를 하여 항체의 역가를 높이려고 시도하였으나 OMP 분획과 분자량이 40K-OMP가 불용성이어서 cynogen bromide-activated Sepharose에 결합되지 않아 친화 크로마토그래피를 하지 못하였다.

본 연구에서 *Salmonella typhimurium*의 OMP 분획과 40K-OMP를 각각 면역주사하여 얻은 IgY와 닭과 토끼의 다가항체를 이용하여 *Salmonella*를 검출할 수 있는 면역방법을 개발하고자 시도하였다. 그러나 OMP 분획의 주 단백질인 40K-OMP가 닭과 토끼에서 항체를 형성하는 능력이 낮았다. 이는 IgY를 사용한 immuno blot에서 40K-OMP에 대한 반응을 볼 수 없었던 결과에서 알 수 있었다. 반면에 분자량이 6K-OMP는 immuno blot에서 IgY와 토끼 항체를 결합하는 것을 보면 6K-OMP의 항체 형성 능력이 높은 것이 나타났다. IgY와 토끼 항체가 *Salmonella*가 아닌 다른 세균에도 결합하는 것을 보아 40K-OMP와 6K-OMP는 그람음성세균에 공통적으로 존재하는 것으로 보였다. Competitive ELISA와 sandwich ELISA가 *Salmonella*를 부분적으로 특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다. Competitive ELISA에서 시료 내 세균수가  $10^7$  이상일 때에 검출 가능하였으며 Sandwich ELISA에서 *Salmonella typhimurium*에는 민감도가 높으나 일부 *Salmonella cholerasuis*에 대해서 반응이 상대적으로 약하고 균주간에 차이가 많았다.

*Salmonella typhi*를 비롯한 그람음성세균은 환경의 변화에 적응하기 위하여 OmpC와 OmpF와 같은 외막단백질의 발현이 조절된다고 보고되었다(Martinez-Flores et al., 1999). *S. typhi*는 환경의 삼투압의 변화에 관계없이 OmpC를 동일한 수준에 발현하나 대장균은 높은 삼투압 환경에서만 OmpC를 발현한다. Arockiasamy와 Krishnaswamy(2000)가 *S. typhi*으

로부터 OmpC를 순수하게 분리하였다. 순수 분리하기 전 단계의 OMP 분획에서는 lipopolysaccharide가 부분적으로 오염되어 전기영동한 후 silver staining하면 저분자량 부위에서 염색된다고 보고하였다. OmpC의 분자량이 본 연구의 40K-OMP와 유사하였다. 6K-OMP와 lipopolysaccharide는 SDS-PAGE 겔에서 이동 위치가 상호간에 유사한 것으로 보인다. 따라서 immunoblot(Fig 2, A)에서 6K-OMP 위치에서 강한 반응은 6K-OMP 뿐만 아니라 lipopolysaccharide로 인한 것으로 사료된다.

Anti-OMP 면역단백질을 이용한 Sandwich ELISA를 이용하여 우유에 존재하는 *Salmonella typhimurium*를 검출할 수 있음을 알 수 있다. 그러나 Immunoblot assay에서 본 바와 같이 항체가 다른 세균에도 부분적으로 교차반응을 할 수 있었다. 친화 크로마토그래피를 이용하거나 또는 단가항체를 이용하여 민감도를 높이고 특이성이 높은 방법을 개발할 필요가 있다. OMP가 outer membrane과 결합되어 있는 막단백질이기 때문에 소수성 단백질로 생각되며 이 때문에 항원으로서 활성이 약한 것으로 사료된다.

*Salmonella*를 검출할 수 있는 항체를 생산하기 위한 항원으로써 열처리한 세균체(Liu et al., 2001), fimbriae (Sojka et al., 1998), flagellin (McDonough et al., 1998) 등을 사용하여 연구된 바 있다. Outer core lipopolysaccharide에 대한 단가항체를 이용한 ELISA 방법을 이용하여 높은 특이성과 민감도로 *Salmonella*를 검출하였다(Ng et al., 1996). 본 연구에서 보고한 *Salmonella*의 OMP 뿐만 아니라 다른 항원에 대해 특이적으로 반응하는 다가항체 또는 단가항체를 개발하기 위하여 추가적인 연구가 필요하다.

## 요 약

우유내 *Salmonella*를 검출하기 위한 Sandwich ELISA의 특이성을 조사하였다. Sandwich ELISA에 사용한 항체들은 OMP 분획을 닭에 면역주사하여 얻은 IgY와 OMP 분획을 gel filtration하여 얻은 분자량 40,000의 OMP를 토끼에 면역주사하여 얻은 토끼 IgG를 사용하였다. Immunoblot assay에서 IgY는 분자량 6,000의 OMP에 강하게 반응하였으며 토끼 IgG는 분자량 40,000, 35,000과 6,000의 OMP들에 강하게 반응하였다. IgY와 토끼 IgG는 *Salmonella typhimurium*의 다른 단백질에도 반응하였다. Competitive ELISA에서 IgY가 *Salmonella*의 두 개 균주에 대해 특이성을 나타냈으며 *Escherichia coli*와 *Yersinia enterocolitica*에 의하여서는 반응을 나타내지 않았다. 우유에 세균을 첨가하여 실시한 sandwich ELISA에서 *Salmonella typhimurium* 2균주가 가장 높은 흡광도를 보였다. *Salmonella cholerasuis* 균주들은 상대적으로

흡광도가 낮았으며 이루 일부 *Salmonella cholerasuis*균주들  
은 비 *Salmonella* 균주들과 차이가 없었다.

## 감사의 글

본 연구는 2001학년도 상지대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

## 참고문헌

1. Akita, E. M. and Nakai, S. (1992) Immunoglobulin from egg yolk: Isolation and purification. *J. Food Sci.* **57**, 629-634.
2. Arocklasamy, A. and Krishnaswamy, S. (2000) Purification of integral outer-membrane protein OmpC a surface antigen from *Salmonella typhi* for structure function studies: a method applicable to enterobacterial major outer- membrane protein. *Anal. Biochem.* **283**, 64-70.
3. Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Pantagua, J., Gonzalez, C., Moreno, J., and Kumate, J. (1988) Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins from *Salmonella typhi*. *Vet. Infect. Immun.* **56**, 2953-2959.
4. Johnstone, A. and Thorpe, R. (1987) Immunochemistry in Practice 2nd ed. Blackwell Scientific Publications.
5. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
6. Liu, J.-L., Benson, C. E., Munro, D. S., and Wolf, B. (2001) Sensitive and rapid immunoassays for *Salmonella enteritidis*. *J. Clin. Lab. Anal.* **15**, 165-170.
7. Martinez-Flores, I., Cano, R., Bustamante, V. H., Calva, E., and Puente, J. L. (1999) The *ompB* operon partially determines differential expression of OmpC in *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 556-562.
8. McDonough, P. L., Jacobson, R. H., Timoney, J. F., Mutualib, A., Kradel, D. C., Chang, Y. F., Shin, S. J., Lein, D. H., Trock, S., and Wheeler, K. (1998) Interpretation of antibody responses to *Salmonella enterica enteritidis* gm flagellin in poultry flocks are enhanced by a kinetics-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* **5**, 550-555.
9. Morisse, J. P. and Cotte, J. P. (1994) Evaluation of some risks factors in bovine salmonellosis. *Vet. Res.* **25**, 185-191.
10. Ng, S. P., Tsui, C. P., Roberts, D., Chen, P. Y., and Ng, M. H. (1996) Detection and serogroup differentiation of *Salomonella* 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.
11. Nikaido, H. (1994) Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 3905-3908.
12. Phillips, J. D. and Griffiths, M. W. (1989) Pasteurized dairy products-the constraints imposed by environmental bacterial contamination. In *Food Contamination from Environmental Sources, Advances in Environmental Science and Technology*. Nriagu, J. O. and Simmons, M. S.(eds.), pp. 387. John Wiley and Sons, NY.
13. Sojka, M. G., Carter, M. A., and Thorns, C. J. (1998) Characterization of epitopes of type I fimbriae of *salmonella* using monoclonal antibodies of SEF21 fimbriae of *Salmonella enteritidis*. *Vet. Microbiol.* **59**, 149-170.
14. Thorns, C. J., Bell, M. M., Sojka, M. G., and Nicholas, R. A. (1996) Development and application of enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella enteritidis* infections in chickens based on antibodies to SEF14 fimbrial antigen. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 792-797.
15. Udhayakumar, V. and Muthukkaruppan, V. R. (1987) Protective immunity induced by outer membrane proteins of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* **55**, 1583-1587.
16. Wyatt, G. M., Lee, H. A., Dionysiou, S., Morgan, M. R. A., Stokely, D. J., Al-hajji, A. H., Richards, J., Sillis, A. J., and Jones, P. H. (1996) Comparison of a microtitration plate ELISA with a standard cultural procedure for the detection of *Salmonella* spp. in chicken. *J. Food Prot.* **59**, 238-243.
17. Yoshimatsu, M. A. and Zawistowski, J. (2001) Application of rapid dot blot immunoassay for detection of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in eggs, poultry, and other foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 459-461.