

Escherichia coli O157 : H7 탐지용 면역센서스트립 제작 조건 최적화

박소정¹ · 김영기^{1,2*}

¹한경대학교 생물환경정보통신전문대학원 바이오융합기술전공, ²화학공학부

Optimization of Fabrication Conditions for Immunosensor Strip to Detect *Escherichia coli* O157 : H7

Sojung Park¹ and Young-Kee Kim^{1,2*}

¹Program of Integrated Biotechnology, Graduate School of Bio-and Information Technology,

²Department of Chemical Engineering, Hankyong National University, Anseong, Kyonggi-Do 456-749, Korea.

Abstract In this study, the optimization of fabrication conditions was accomplished to make immuno-strip biosensor by the combination of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immuno-chromatographic strip techniques for the detection of *Escherichia coli* O157 : H7. Optimal fabrication conditions of capture antibody concentration, detection antibody concentration, and additive composition of running buffer solution were determined. Optimal concentration was determined as 1.0 mg/mL for both of capture antibody and detection antibody. A composition of 0.5% Tween20 and 3% BSA were selected as optimal additive for buffer solution to prevent non-specific binding.

Keywords: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Escherichia coli* O157:H7, immunosensor, optimization

서 론

오염된 식품 섭취에 따른 식중독 발생이 전 세계적으로 증가하고 있다. 식품 매개성 질병의 일반적 원인으로 병원성 세균을 들 수 있으며, 그 중에서도 *Escherichia coli* O157:H7은 식중독을 일으키는 중요한 병원체 중 하나이다(1). *E. coli* O157:H7은 육류와 사과주스, 요구르트, 마요네즈, 우유 등 다양한 식품을 매개로 하며, 물을 통해서도 감염을 일으킬 수 있고 사람 간의 전이가 가능한 특징을 갖는다(2). 이 균에 감염되면 용혈성 요독증후군, 출혈성 대장염과 설사, 신장 부전, 발작 등을 유발하며 심한 경우에는 사망에 이르기도 한다(3). *E. coli* O157 : H7에 의한 식중독 발생 건수는 미국에서만 한 해에 약 73000

건에 이르며, 이 중 61 건은 사망으로 연계된 것으로 추정된다(4). 우리나라에서도 *E. coli* O157 : H7 감염증은 제 1군 전염병으로 지정되어 있으며 지속적으로 발병 사례가 보고되고 있어, 식중독 발생을 사전에 예방하고 원인을 파악하기 위한 신속, 정확한 탐지 시험법의 개발 필요성은 절대적이다(5).

E. coli O157 : H7 탐지를 위한 보편적인 분석 방법은 선택배지에서의 배양 및 계수, 형태학적인 동정법과 생화학적 분리 등이 있다(6). 식품 및 임상 시료와 같은 정의 되지 않은 혼합 시료에서 병원성 세균을 탐지하는 이러한 기본 분석법들은 높은 선택성과 특이성 때문에 오랜 시간 신뢰성 있는 탐지기법으로 사용되어져 왔다(7). 그러나, 이러한 기존 방법들은 전문적 기술을 가진 인력과 결과를 얻기까지 장시간이 소요된다는 단점을 가지고 있다(8).

이와같은 문제점을 해결하기 위해 면역분석법과 핵산을 이용한 분석방법이 개발되었다(9). 핵산을 이용한 미생물 탐지기법은 높은 특이성과 시료의 증폭이 가능한 장점을

*Corresponding author

Tel: +82-31-670-5206, Fax: +82-31-670-5445

e-mail: kim@hknu.ac.kr

가지고 있지만, 세포 추출, 핵산 정제, 증폭과 측정을 포함한 다단계의 연속적 조작이 요구되는 단점을 가지고 있어 사용 편리성을 가지는 저가의 일회용 바이오센서로 개발하기 어려운 한계를 가지고 있다. 면역학적 탐지 방법으로 특이적인 항원-항체 반응을 기초로 하여 병원성 미생물을 탐지하는 기술이 대안으로 개발되었으며(10), 이 방법은 핵산을 이용한 탐지방법에서 요구되는 시료 추출과 정제, 증폭의 과정없이 항원에 특이적인 결합력을 가지는 항체를 멤브레인에 고정화하여 항원과 반응시키는 하나의 조작만이 필요한 분석단계의 단순화가 가능한 이점을 가지고 있다. 따라서, 복잡한 시스템이 없이 병원성 세균을 측정할 수 있는 스트립 형태의 간단한 바이오센서의 개발을 가능하게 만든다.

전형적인 방법으로는 항원 또는 항체와 같은 특정의 분석대상을 인식하는 분자들을 니트로 셀룰로오스 멤브레인 위에 고정화시킨 형태가 있다. 일반적인 광학 신호 발생의 경우, 발생된 신호는 육안 및 탐지기에 의해 감지 될 수 있으며, 수십분 이내의 분석소요시간을 가진다(11-13). 병원균 탐지 분야에 면역-크로마토그래피 스트립 형태의 바이오센서를 적용하기 위해서는, 핵산을 이용한 측정법과는 달리 시료를 증폭하는 조작이 없기 때문에 탐지 능력의 향상을 위해 신호 증폭 기술의 도입이 필요하다. 신호 증폭 방법으로는 효소(14), 나노입자(15), 염료 특성을 가지는 리포솜(16) 등의 다양한 표지물질을 수용체 프로브에 결합하여 사용하는 방법이 있다. 효소를 이용한 신호 증폭 기술인 효소면역분석법(ELISA)은 효과적인 증폭 기술로 면역분석법에 광범위하게 적용되고 있다.

현재 면역-크로마토그래피법에 의해 개발되어 병원성 세균 측정용으로 상용화된 키트가 몇가지 있다. Microfast *E. coli* O157 (Zeu-Inmunotec, Spain)은 8~18시간 증균 배양한 샘플을 이용하여 5분 이내 결과 확인이 가능하고(2, 18), VIP for EHEC (Biocontrol system, USA)는 18시간 증균 배양 후 10분 이내의 결과 확인이 가능하다(2, 19). Reveal for *E. coli* O157 : H7 (Neogen, USA)은 8~20시간 증균 배양한 샘플을 이용하여 15분 이내에 검출하고, MC Consortium (MC Consortium, USA)은 사전 증균 과정없이, 60분 이내에 검사 완료가 가능하다. 하지만 상용화되어 있는 키트들은 모두 10^4 CFU/mL의 검출 한계를 가지고 있다(2, 20, 21).

본 연구에서는, *E. coli* O157 : H7 측정을 위한 방법들 중 ELISA와 면역-크로마토그래피 분석법이 결합된 면역 스트립을 만들기 위한 제작 및 사용 조건을 최적화하였다. 면역 스트립을 제작하기 위한 핵심 조건으로 포획항체의 농도와 탐지항체의 농도를 선정하여 최적조건을 결정하였으며, 스트립을 사용할 때 단백질 및 미생물의 비특이적 결합을 방지하기 위해 시료에 사용되는 첨가제의 최적 조성을 결정하였다. 결정된 최적조건 하에서 면역 스트립을 제작하고 이를 *E. coli* O157 : H7 검출에 적용하였다.

재료 및 방법

재료

E. coli O157 : H7 (ATCC 43895)은 American Type Culture Collection (Washington DC, USA)에서 구입하였다. 포획 항체인 *E. coli* O157 : H7에 대한 단일클론항체 (mouse IgG3, ab20976)와 탐지 항체인 *E. coli* O157 : H7에 반응 특이성을 가지는 horseradish peroxidase (HRP)가 중합된 다클론항체 (rabbit IgG, ab20425), 기준신호 발생을 위해 rabbit IgG에 특이성을 가지는 다클론항체 (duck IgY, ab31193)는 Abcam plc. Ltd. (Cambridge, UK)에서 구입하였다. 스트립 제작을 위한 멤브레인으로 니트로셀룰로오스 (NC) 멤브레인 (10 μ m pore size, CNPE-SN12), 셀룰로오스 멤브레인 (AP045), 두 종류의 유리섬유 멤브레인 (PT-R5와 GFB-R4)은 Advanced Microdevices Pvt. Ltd. (Ambala, India)에서 구입하였다. 5% casein 용액, ascorbic acid, trehalose 용액, 혈청알부민 (BSA)과 Tween 20은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HRP 반응을 위한 발색 기질인 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 용액은 BioFX laboratories (Owings Mills, MD, USA) 제품을 사용하였다.

면역-크로마토그래피 스트립 제작

신호발생 패드의 포획 항체농도 최적화

탐지 결과를 확인하는 신호발생 패드로는 니트로 셀룰로오스 멤브레인 (0.4cm \times 2.5cm)을 사용하였다. *E. coli* O157 : H7에 특이성을 지니며 탐지신호 발생위치에 고정화되어 분석대상인 미생물과 반응할 포획항체의 최적 농도를 결정하기 위하여 항체용액을 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL의 농도로 PBS 완충용액을 이용하여 희석하였다. 희석된 항체용액은 신호발생 패드 아래에서부터 1cm에 위치한 곳에 마이크로 피펫을 이용하여 1 μ L를 분주하여 항체의 고정화를 유도하였다. 면역 스트립의 유효한 작동 여부를 확인하기 위한 기준신호 발생을 위하여 0.1 mg/mL 농도의 2차 다클론항체 (duck IgY)를 멤브레인 아래에서 1.7cm에 위치한 곳에 1 μ L 주사한 후, 배양기에서 37°C로 1시간 동안 배양시켰다.

중합체 패드의 탐지항체 농도 최적화

HRP와 중합된 탐지항체 용액은 40% trehalose 용액과 40 mM ascorbic acid를 함유한 5% casein 용액에 HRP가 중합된 다클론 항체(ab20425)를 혼합하여 준비하였다. 최적의 탐지항체 농도를 결정하기 위해, 항체 용액은 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL의 농도로 PBS 완충용액에 희석하여 사용하였다. 소수성의 플라스틱 기판 위에 준비한 용액을

분주한 후, 유리섬유 멤브레인 (PT-R5, 0.4cm × 0.5cm)에 전체적으로 흡수시키고, 건조하였다.

멤브레인 스트립 제작

준비된 신호발생 패드는 플라스틱 필름 (범용 OHP 필름 용, 0.4cm × 5.7cm)에 접착테이프를 이용하여 고정하였다. 중합체 패드는 신호발생 패드 하단에 0.1-0.2cm 겹치도록 부착하였다. 흡수 패드인 셀룰로오스 멤브레인 (0.4cm × 1.5cm)은 모세관 현상을 지속적으로 유도하여 시료 흐름 방향을 유지시키는 기능을 하며 신호발생 패드 상단과 0.1-0.2cm 겹치게 하였고, 시료주입 패드 (0.4cm × 1.5cm)는 스트립의 가장 아래에 위치하여 중합체 패드와 겹치도록 접착시켰다.

면역스트립을 이용한 분석

시료 희석용 완충용액 첨가제 조성 최적화

완충용액으로는 PBS용액을 사용하였으며 비특이적 결합을 방지하기 위한 첨가제로는 bovine serum albumin (BSA)과 Tween 20을 적용하였다. BSA는 1, 2, 3, 4, 5%의 조성을 적용하여 비특이적 결합을 최소화할 수 있는 농도를 찾았다. Tween 20은 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0%의 농도로 첨가하여 최적 농도를 결정하였다. 결정된 BSA 및 Tween 20의 농도에 대하여 BSA만 첨가한 경우, Tween 20만 첨가한 경우, 두가지 첨가제를 혼합한 경우의 비특이적 결합 방지와 발생신호 크기를 비교하여 최적 첨가제 조성을 결정하였다.

면역스트립을 이용한 병원성 세균 분석

시료는 완충용액을 이용하여 희석시켜 준비하였다. 준비된 시료 용액 100 μL를 시험관에 넣고 스트립의 시료주입 패드를 담근 후, 스트립 끝부분의 시료흡수패드까지 시료가 도달할 수 있도록 15-20분 간 방치한다. 효소기질 주입 패드인 유리섬유 멤브레인 (GFB-R4, 1.2cm × 1.5cm)과 효소기질 흡수 패드인 셀룰로오스 멤브레인 (1.2cm × 1.5cm)은 신호발생 패드의 양쪽 측면으로 0.1cm씩 겹치도록 배열하였다. TMB 기질 용액을 기질주입 패드에 분주한 후 효소기질 흡수 패드 방향 흐름에 의하여 신호발생패드 상에서 충분한 효소반응이 일어나도록 5-10분간 방치한다. 이 반응에 의해 생성된 발색 신호는 디지털 카메라를 이용하여 이미징화하고 자체 제작된 이미지분석 소프트웨어를 사용하여 RGB 신호로 변환시켜 수치화하였다.

Fig. 1은 면역 스트립을 이용한 분석방법의 전체적인 흐름을 보여준다. *E. coli* O157:H7을 함유한 시료를 시료주입 패드에 유도시킨 후, 시료는 스트립을 따라 세로 방향으로 흐르며, 중합체 패드에서 HRP와 중합된 탐지 항체와 *E. coli* O157:H7 간의 항원-항체 반응에 의해 면역 복합체를 형성

한다. 이 면역복합체는 흐름에 의해 신호발생 패드에서 포획 항체와 2차 샌드위치 결합 면역복합체를 형성하며, 시료내 *E. coli* O157:H7과 반응하지 않은 탐지 항체는 스트립이 잘 작동하는지 확인하기 위한 기준 신호 발생을 위해 고정화시킨 2차 항체와 반응한다. 면역반응이 완료된 후, 효소기질 용액을 신호 발생 패드에 가로 방향으로 흘려주어 포획항체 및 2차 항체와 결합된 탐지항체의 HRP와 반응시켜 *E. coli* O157:H7의 농도에 비례하는 탐지신호와 기준신호를 발생시켜 분석대상의 정성적, 정량적 측정을 가능하게 한다(13).

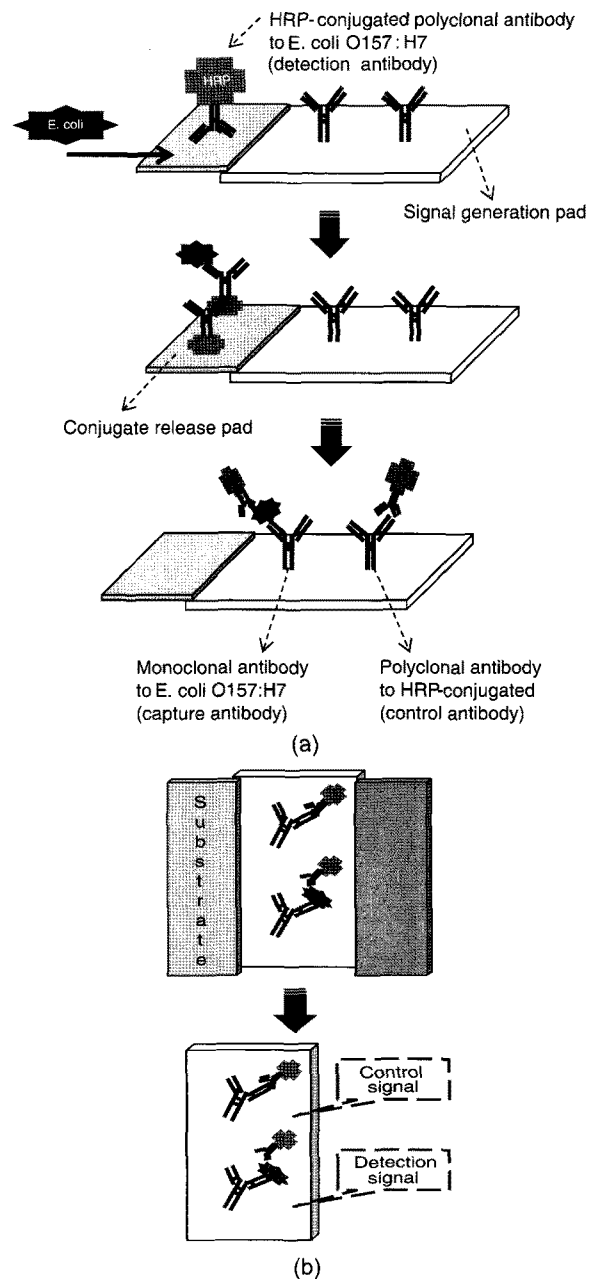


Fig. 1. Scheme of analytical procedure of immuno-chromatographic strip sensor. (a) immuno-reaction and (b) enzyme reaction.

결과 및 고찰

포획 항체 농도 최적화

신호발생 패드에 고정화된 단일클론항체 (포획항체)의 최적 농도조건을 결정하는 실험을 수행하였다. Fig. 2와 3은 포획항체의 최적 농도 결정 실험 결과를 보여주고 있다. 포획항체의 농도가 0.1 mg/mL인 경우는 *E. coli* O157:H7 시료에 대한 신호가 전혀 발생하지 않아 실험결과를 표시하지 않았다. 포획항체농도 (0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL)에 따른 네 종류의 스트립을 제작하여 병원균을 포함하지 않는 증류수와 1.3×10^8 CFU/mL 농도의 *E. coli* O157:H7을 포함하는 시료에 대해 각각 측정을 수행하였으며, 그 결과 이미지는 Fig. 2(a)-(h)에 표시하였다. Fig. 2(a)-(d)는 증류수를 시료로 한 결과이며, Fig. 2(e)-(h)는 *E. coli* O157:H7을 포함한 시료를 사용한 결과이다. 증류수를 사용한 실험 결과에서는 사용된 모든 포획항체 농도에서 기준신호는 유효하게 나타나지만, 탐지 신호는 전혀 나타나지 않는 것을 확인하였다.

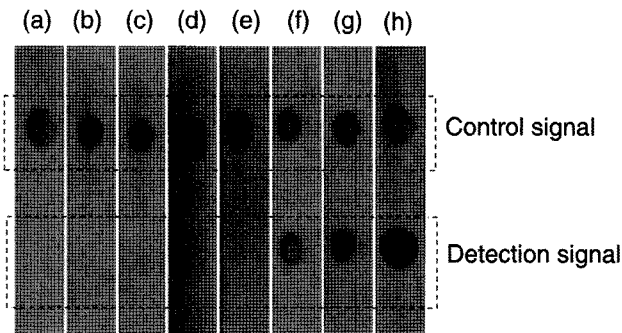


Fig. 2. Images of experimental results for optimization of capture antibody concentration. Detection antibody concentration of 1 mg/mL was used for all experiments. Capture antibody concentrations were (a), (e) 0.25 mg/mL, (b), (f) 0.5 mg/mL, (c), (g) 0.75 mg/mL, and (d), (h) 1.0 mg/mL. Images of (a), (b), (c), and (d) were obtained by using sample without *E. coli* O157:H7, and those of (e), (f), (g), and (h) were obtained by using sample with *E. coli* O157:H7 in a concentration of 1.3×10^8 CFU/mL.

병원균이 존재하는 시료를 사용한 Fig. 2(e)-(h)의 결과에서 포획항체 농도가 0.25 mg/mL인 경우 유효한 탐지신호가 검출되지 않았다. 0.5 mg/mL 이상의 탐지항체 농도를 사용한 실험결과에서는 유효한 탐지신호의 발생을 확인하였으며, 자체 제작된 이미지분석 소프트웨어에 의해 짙은 청색의 발색신호를 RGB 삼원색으로 분리하고 각각의 원색의 세기를 수치화하는 과정을 통해 얻은 발색신호의 color intensity를 표시한 Fig. 3에서는 포획항체 농도에 따른 탐지신호의 변화를 명확히 구분할 수 있었다. Fig. 3의 포획항체 농도 대 탐지신호 발색 세기의 그래프를 보면 증류수를 사용한 실험의 발색세기는 포획농도와 무관하게 크게 변화하지 않지만,

분석대상 항원인 *E. coli* O157:H7이 존재하는 시료를 사용한 경우 포획항체 농도가 증가함에 따라 선형적으로 발색 세기의 변화가 일어나는 것을 확인할 수 있다. 따라서 병원균 시료에 대해 가장 큰 신호발생을 유도할 수 있는 포획항체 1.0 mg/mL의 농도를 최적조건으로 결정하였다.

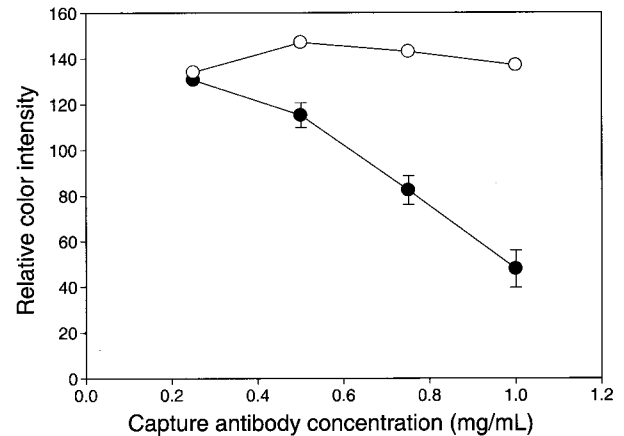


Fig. 3. Colorimetric signal intensity change with capture antibody concentration. (○: experimental results using distilled water, ●: those using sample with *E. coli* O157:H7).

탐지 항체 농도 최적화

발색신호 발생을 위해 일반적으로 효소면역분석에는 HRP, 알칼리성 인산가수분해효소 (alkaline phosphatase), β -갈락토시다아제 (β -galactosidase), *arthromyces ramosus* peroxidase (ARP) 등 여러종류의 효소가 사용된다(17). 본 연구에서는 발색신호 발생을 위한 효소로 HRP를 선정하고, 기질로는 TMB 용액을 선택하였다. HRP와 중합된 탐지항체는 *E. coli* O157:H7에 대응하는 다클론항체 (polyclonal antibody)인 rabbit IgG를 사용하였으며, 탐지항체의 농도 최적화를 위해 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL의 농도 조건을 사용하였다. 탐지항체 농도에 따라 네 종류의 스트립을 제작하여 증류수와 1.3×10^8 CFU/mL 농도의 *E. coli* O157:H7을 포함하는 시료에 대해 각각 측정을 시도하였으며, 실험 결과로부터 얻은 이미지를 Fig. 4(a)-(h)에 표시하였다. Fig. 4(a)-(d)는 증류수를 시료로 한 실험 결과이며, Fig. 4(e)-(h)는 *E. coli* O157:H7을 포함한 시료를 대상으로 한 실험 결과이다. 증류수를 사용한 실험결과에서는 모든 탐지항체 농도에서 기준신호는 유효하게 나타나지만, 탐지 신호는 나타나지 않는 것을 확인하였다. 분석대상인 *E. coli* O157:H7이 전혀 없으므로 *E. coli* O157:H7-탐지항체 간의 면역복합체가 형성되지 않으며 포획항체와의 2차 샌드위치결합 면역복합체도 형성되지 않는다. 기준신호가 모든 탐지항체 농도에 대해 유효하게 발생하는 것으로 관찰되었는데 사용된 탐지항체의 최저농도라도 기준신호발생이 가능함을 보여주고 있다. 이는 병원균이 존재하는 시료를 사용한 실험에서 최소의 탐지항체 농도 (0.25 mg/mL)를 사용한 결과(Fig. 4(e))도 관찰 가능

한 탐지신호를 발생시키는 것에서도 확인할 수 있었다.

Fig. 4(e)-(h)의 이미지로부터 탐지항체 농도가 0.25 mg/mL에서 1.0 mg/mL로 증가함에 따라 발생된 탐지신호의 발색 정도가 증가함을 확인할 수 있다. 이 결과는 발색정도를 수치화하여 비교한 Fig. 5에서 더욱 확실하게 확인할 수 있으며, 탐지항체 농도가 증가함에 따라 수치화된 탐지신호의 세기가 선형적으로 변하는 것을 확인할 수 있다. 다만, 중류수를 이용한 실험에서도 1 mg/mL의 탐지항체 농도를 사용한 경우 탐지신호의 약한 발생이 생기는 현상을 보였으며 이는 탐지항체의 농도가 높을 경우 탐지항체의 비특이적 결합 (non-specific binding)에 의해 약간의 탐지신호가 형성되는 것으로 여겨진다. 탐지항체 농도 최적화의 목적이 탐지신호 발생의 최대화에 있고, 항체의 비특이적 결합문제는 첨가제 조성 최적화에 의해 완화될 수 있으므로 본 연구에서는 동일 병원균 시료에 대해 가장 큰 탐지신호발생을 나타내는 탐지항체 1.0 mg/mL의 농도를 최적조건으로 결정하였다.

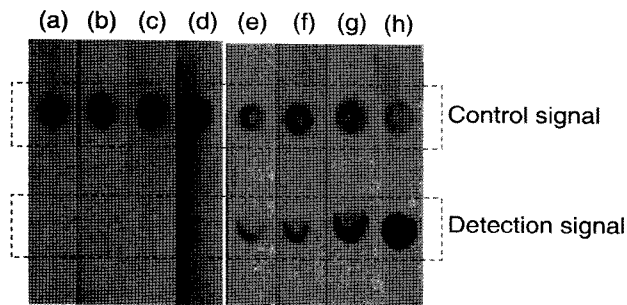


Fig. 4. Images of experimental results for optimization of detection antibody concentration. Capture antibody concentration of 1 mg/mL was used for all experiments. Detection antibody concentrations were (a), (e) 0.25 mg/mL, (b), (f) 0.5 mg/mL, (c), (g) 0.75 mg/mL, and (d), (h) 1.0 mg/mL. Images of (a), (b), (c), and (d) were obtained by using sample without *E. coli* O157:H7, and those of (e), (f), (g), and (h) were obtained by using sample with *E. coli* O157 : H7 in a concentration of 1.3×10^8 CFU/mL.

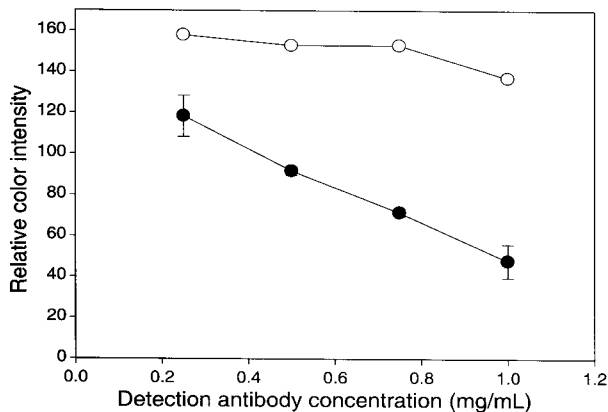


Fig. 5. Colorimetric signal intensity change with detection antibody concentration. (○ : experimental results using distilled water, ● : those using sample with *E. coli* O157 : H7).

시료 희석용 완충용액의 첨가제 조성 최적화

시료를 희석하는 완충용액의 첨가제 조성은 면역바이오 센서의 고민감도에 장애물로 작용하는 단백질의 비특이적 결합을 제어할 수 있는 수단으로써 면역바이오센서시스템의 중요 운전인자이다. BSA와Tween 20은 멤브레인 위에 생물 분자의 비특이적 결합을 억제하기 위한 첨가제로 알려져 있다. 두개의 첨가제 성분은 각각 다른 형태로 비특이적 결합을 방해하는 것으로 알려져 있다. BSA는 비특이적 결합이 가능한 부위를 블로킹하는 효과가 있으며 Tween 20은 계면활성제로서 단백질 (항체)이나 병원균을 분산시키는 효과가 있다. 본 연구에서는 완충용액으로는 PBS용액을 사용하였으며 여기에 BSA 및 Tween 20를 단독 또는 혼합 첨가하여 비특이적 결합을 억제하는 것을 관찰하였다. 각각의 첨가제들은 다양한 농도범위에서 실험을 수행하였으나 본 논문에서는 BSA와 Tween 20 각각의 첨가제의 최적 농도 인 3%와 0.5%의 결과들만을 데이터로 실었다. Fig. 6은 완충용액의 첨가제 조성별 발색신호의 변화를 보여준다. 첨가제를 넣지 않은 완충용액을 사용한 경우 스트립의 background가 상당히 발생하였으며 따라서 발생된 탐지신호는 선명하지 않다(Fig. 6(a)). *E. coli* O157:H7과 결합한 HRP중합 탐지항체가 비특이적 결합으로 스트립의 신호발생부위 외에 부착되어 발색신호발생을 유도하기 때문인 것으로 여겨진다. Fig. 6(b)와 (c)는 각각 0.5% Tween 20와 3% BSA를 단독으로 첨가한 실험 결과이며 첨가제를 사용하지 않은 경우보다는 비특이적 결합이 완화된 발색 신호를 보였으나 background 발색이 효과적으로 제거되지는 못했다. 0.5% Tween 20와 3% BSA를 모두 첨가한 실험결과인 Fig. 6(d)에서는 첨가제를 전혀 사용하지 않은 경우는 물론이고 Tween 20이나 BSA를 단독으로 사용한 경우보다 훨씬 개선된 신호발생 및 비특이적 결합 억제에 의한 background 발색 제거효과를 보였으며, 따라서 완충용액의 최적 첨가제 조성으로 0.5% Tween 20과 3% BSA의 혼합사용 조건을 선정하였다.

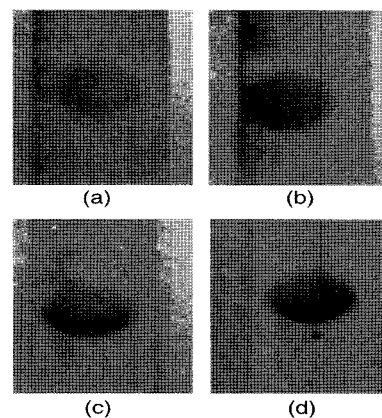


Fig. 6. The optimal composition of additives for running buffer solution to minimize non-specific binding. (a) without additive, (b) 0.5% Tween 20, (c) 3% BSA, (d) 3% BSA and 0.5% Tween 20.

요 약

본 연구에서는 ELISA와 면역-크로마토그래피 스트립 기술을 결합하여 *E. coli* O157:H7을 탐지할 수 있는 면역 스트립 센서를 제작 하기 위한 제작조건 최적화 연구를 수행하였다. 포획항체 농도, 탐지항체 농도, 완충용액 첨가제 조성의 면역스트립 제작 또는 운전인자들의 최적화 조건을 결정하였다. 포획항체의 농도는 1 mg/mL를 최적 조건으로 선정하였고, 탐지항체의 최적 농도도 1 mg/mL로 결정하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위한 시료 희석용 완충용액의 첨가제 조성으로는 0.5% Tween 20와 3% BSA 혼합 사용을 선정하였다.

감 사

본 연구는 2007년도 한경대학교 교비 해외파견 연구비의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 3월 26일, 게재승인 : 2009년 5월 8일

REFERENCES

1. Lee, Hu-Jang (2008), Pathogenic agents and outbreak of foodborne diseases at home and abroad, *Korean Journal of Veterinary Public Health* **32**, 81-89.
2. Kwak, H.-S, D.-H. Lee, H.-S. Moon, J.-S. Park, G.-J. Woo, and C.-M. Kim (2003), Evaluation of the efficiency of *E. coli* O157:H7 rapid detection kit using immunochromatography, *Journal of Food Hygiene and Safety* **18**, 118-124.
3. Park, S., H. Kim, S.-H. Paek, J. W. Hong, and Y.-K. Kim (2008), Enzyme-linked immuno-strip biosensor to detect *Escherichia coli* O157:H7, *Ultramicroscopy* **108**, 1348-1351.
4. Chen, Chien-Sheng and R. A. Durst (2006), Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* with an array-based immunosorbent assay using universal protein G-liposomal nanovesicles, *Talanta* **69**, 232-238.
5. Lim, Ji Su, J. H. Yoon, B. Min, and K. W. Hong (2008), Detection of identification of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR, *Food Engineering Progress* **12**, 8-14.
6. Leonard, P., S. Hearty, J. Brennan, L. Dunne, J. Quinn, T. Chakraborty, and R. O. Kennedy (2003), Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water, *Enzyme Microb. Technol.* **32**, 3-13.
7. Lazcka, O., F. Javier Del Campo, and F. Xavier Mun(~)oz (2007), Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors, *Biosens. Bioelectron.* **22**, 1205-1217.
8. Dudak, F. C. and I. H. Boyaci (2007), Development of an immunosensor based on surface plasmon resonance for enumeration of *Escherichia coli* in water samples, *Food Res. Int.* **40**, 803-807.
9. Yang, L. and R. Bashir (2008), Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria, *Biotech. Adv.* **26**, 135-150.
10. Tokarsky, O. and D. L. Marshall (2008), Immunosensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7-perspectives for use in the meat processing industry, *Food Microbiol.* **25**, 1-12.
11. Pattarawarapan, M., S. Nangola, T. R. Cressey, and C. Tayapiwatana (2007), Development of a one-step immunochromatographic strip test for the rapid detection of nevirapine (NVP), a commonly used antiretroviral drug for the treatment of HIV/AIDS, *Talanta* **71**, 462-470.
12. Inoue, K., P. Ferrante, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, and T. Matsue (2007), A competitive immunochromatographic assay for testosterone based on electrochemical detection, *Talanta* **73**, 886-892.
13. Paek, S.-H., C.-W. Lee, C.-S. Lee, and S.-H. Yook (1996), Development of one-step immuno-chromatography assay system for *Salmonella typhimurium*, *Korean Journal Biotechnology and Bioengineering* **11**, 420-430.
14. Han, S.-M., J.-H. Cho, I.-H. Cho, E.-H. Paek, H.-B. Oh, B.-S. Kim, C. Ryu, K. Lee, Y.-K. Kim, and S.-H. Paek (2007), Plastic enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)-on-a-chip biosensor for Botulinum Neurotoxin A, *Anal. Chim. Acta* **587**, 1-8.
15. Varshney, M., Y. Li, B. Srinivasan, and S. Tung (2007), A label-free, microfluidics and interdigitated array microelectrode-based impedance biosensor in combination with nanoparticles immunoseparation for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples, *Sensor. Actuat. B-Chem.* **128**, 99-107.
16. Ho, J. A., H.-W. Hsu, and M.-R. Huang (2004), Liposome-based microcapillary immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Anal. Biochem.* **330**, 342-349.
17. Peak, S.-H., J.-H. Cho, and S. H. Kim, Korean patent, 10-2004-0028440 (2004).
18. <http://www.zeu-immunotec.com/> (2009).
19. <http://www.biocontrolsys.com/> (2009).
20. <http://www.neogen.com/> (2009).
21. <http://www.sangrokmrdical.com/> (2009).