

Escherichia coli O157:H7의 단클론성 항체 생산과 효소면역분석법의 개발

류희정 · 김정숙¹ · 김경열 · 남보람 · 남민지 · 심원보^{1*} · 김남수² · 조용진² · 정덕화
경상대학교 응용생명과학부(BK 21 program), ¹경상대학교 농업생명과학연구원,
²한국식품연구원 바이오나노연구단

Production of Monoclonal Antibody against *Escherichia coli* O157:H7 and Development of Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Hee-Jeong Ryu, Jeong-Sook Kim¹, Kyeongyeol Kim, Bo-Ram Nam, Minji Nam, Won-Bo Shim^{1*},
Namsoo Kim², Yong-Jin Cho², and Duck-Hwa Chung

Division of Applied Life Science (BK21 program), Gyeongsang National University

¹Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

²Food Bio-nano Technology Research Group, Korea Food Research Institute

Abstract *Escherichia coli* O157:H7 causes hemolytic uremic syndrome and hemorrhagic colitis in humans. The objectives of this study were to produce monoclonal antibody(MAb) against *E. coli* O157:H7 and to develop an enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) for the rapid detection of *E. coli* O157:H7 in agri-stockbreeding. The characterization of MAb produced from hybridoma cell (HKEC 4G8-5) was validated by ELISA and Western blot. The produced MAb was specific to *E. coli* O157:H7 and showed weak cross-reaction to *Staphylococcus aureus*. The detection limit of ELISA based on 4G8-5 MAb was 10⁵ cell/mL. Although the ELISA could not detect *E. coli* O157:H7 in the meat and sprout samples inoculated with 1×10¹ cell/10 g without enrichment, the same samples after enrichment for 6 hr were confirmed to be positive by ELISA. These results indicated that the ELISA combined with short enrichment (6 hr) is useful tool for rapid screening of *E. coli* O157:H7 in various samples.

Key words: *E. coli* O157:H7, monoclonal antibody, ELISA

서 론

Escherichia coli O157:H7은 장관출혈성 대장균으로 잠복기는 평균 3-8일이며, 약 10-100여개의 적은 균량으로도 감염될 수 있는 것으로 알려져 있다(1). 그리고 감염자의 건강상태에 따라 복통 및 비혈성 또는 혈성 설사 증상을 보이면서 자발적으로 회복되기도 하지만, 심각한 경우 *E. coli* O157:H7이 생산하는 verotoxin으로 인해 용혈성 요독증후군, 출혈성 대장염 및 혈전성 혈소판 감소증 등의 증상으로 진행되어 사망에 이르기도 한다(2-4). 주로 덜 익힌 고기, 비살균 우유나 유제품, 가축 분변에 오염된 육제품, 과일, 채소 및 물 등에 의해 사람에게 감염될 수 있으며, 사람과 사람간의 전파로도 발생할 수 있는 것으로 보고되고 있다(5-8).

국내에서는 1998년 *E. coli* O157:H7으로 인한 1명의 감염 환자가 최초로 보고된 이후 현재까지 감염 발생 건수가 매년 점차

증가하는 경향을 보이고 있으며, 최근 식품의약품안전청의 5년간('04-'08) 식중독 발생 동향 분석 자료에 의하면 *E. coli* O157:H7으로 인한 감염환자가 1,278명에 이르렀고 현재까지 지속적으로 발생되고 있는 것으로 보고되고 있다(9). 국외의 경우는, *E. coli* O157:H7에 의한 감염환자가 빈번하게 발생되고 있고, 특히 미국에서는 2005년 샐러드에 사용된 야채, 과일 및 분쇄육의 오염으로 인해 370명의 환자가 발생하였으며, 일본의 경우 1996년 식중독 발생현황에서 *E. coli* O157:H7에 오염된 채소 샐러드가 원인이 되어 5,727명의 대규모 집단 식중독사건이 발생하여 일부 사망자가 발생하는 등 국내외적으로 공중위생상의 심각한 문제로 대두되고 있다(10-13).

현재까지 사용되고 있는 *E. coli* O157:H7의 검출방법은 시료를 증균배지에서 1차 배양하고, sorbitol MacCokey agar(SMA)에서 2차 분리 배양한 후, 다수의 무색 집락을 확인·동정검사를 실시하는 전통미생물 배양법이 이용되고 있다(14). 전통 배양법은 다수의 시료를 분석할 경우 많은 시간과 노동력이 필요하고, 결과 확인을 위해 약 3-5일이 소요되며, 특히 생균만을 분석할 수 있다는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 polymerase chain reaction(PCR)법으로 균주의 특정 DNA 서열을 증폭하여 진단하는 방법이 널리 이용되고 있으나, 단일 target으로 분석할 경우 위양성이 나올 가능성이 있고, 추가 확인실험을 거쳐야 하는 등의 전문적인 분석기술이 요구되는 어려움이 있다(15-18). 이러한 문제점을 해결하기 위해 최근에는 면역학적 기법을 이용하여 신속·정확하게 검출할 수 있는 분석법에 대한 연구가 진행되고 있

*Corresponding author: Won-Bo Shim, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea

Tel: 82-55-751-5480

Cel: 82-19-474-3918

Fax: 82-55-757-5485

E-mail: wbschim75@gmail.com

Received January 11, 2010; revised February 10, 2010;

accepted February 10, 2010

다. 특히, 항원에 특이적으로 반응하는 항체를 이용하는 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)은 현재 단백질, 호르몬, 의약품을 비롯해 잔류농약, 항생물질 및 mycotoxin 등 유해물질의 분석에 널리 이용되고 있으며, 병원성미생물의 검출을 위해서도 전 세계적으로 많은 연구가 수행되고 있다. 효소면역분석법은 배지를 이용한 재래식 방법보다 간편하고, 감도가 우수하며, 선택성이 탁월하여 방해물질을 제거하기 위한 복잡한 전처리 과정이 필요 없어 저비용으로 다수의 시료를 분석할 수 있을 뿐만 아니라, 분석시간이 짧아 효율적인 분석을 할 수 있는 장점이 있어 현재 다양한 분야에서 활발히 연구가 진행되고 있다(19-23).

따라서 본 연구에서는 *E. coli* O157:H7에 특이적인 단클론성 항체를 개발하고, *E. coli* O157:H7을 신속하게 분석할 수 있는 간접효소면역분석법(indirect ELISA, ID-ELISA)을 개발하여 다양한 시료에 대하여 적용가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주로는 본 연구실에서 육류에서 분리시킨 *Escherichia coli* O157:H7과 표준균주로는 *E. coli* K-12(ATCC 15490), *E. coli* T-3(ATCC 15490), *E. coli* O1:K1:H7(ATCC 11775), 그리고 *E. coli* O78:K80:H12(ATCC 43896)와 *Staphylococcus aureus*(ATCC 27664), *Listeria monocytogenes*(ATCC 19115), *Bacillus cereus*(ATCC 21366) 및 *Salmonella* Typhimurium(ATCC 29629)등을 사용하였다. 이상의 표준 균주들을 계대배양하기 위해 tryptic soy agar(Difco, Laboratories, Detroit, MI, USA) 및 tryptic soy broth(Difco)를 사용하였다.

면역항원

E. coli O157:H7에 대한 단클론성 항체를 개발하기 위해 lipopolysaccharide(LPS), heat killed *E. coli* O157:H7(HKEC) 및 formalin killed *E. coli* O157:H7(FKEC)을 면역원으로 사용하였다. *E. coli* O157:H7의 LPS는 List Biological Laboratories사(Campbell, CA, USA)에서 상업적으로 판매하고 있는 제품을 구입하였고, HKEC와 FKEC는 본 연구에서 다음과 같은 방법으로 각각 준비하였다. 먼저 HKEC는 *E. coli* O157:H7을 TSB 500 mL에 접종하여 37°C에서 12시간 동안 배양한 후 100°C에서 1시간 동안 열처리하여 준비하였고, FKEC는 HKEC와 동일하게 37°C에서 12시간 동안 배양 한 후 1% formalin을 첨가하여 12시간 동안 처리하였다. 각각 처리된 HKEC와 FKEC를 8,000 rpm에서 10분간

원심분리하여 상층액을 제거한 후 0.05 M phosphate buffer saline(PBS, pH 7.8)로 3회 원심수세 하였으며, 세척된 각 균체는 PBS를 이용하여 10⁹ cell/mL로 조정된 후 -70°C에 보관하면서 본 연구의 면역원으로 사용하였다.

단클론성항체 생산

준비된 면역항원인 LPS, HKEC 및 FKEC는 PBS를 이용하여 complete freund's adjuvant(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 1:1(v/v)로 유화시켜 생후 6주된 BALB/C mouse(Hyosung Science, Korea)에 마리당 200 µL씩 복강에 1차 면역을 실시하였다. 1차 면역 후 14일과 28일 후 1차 면역과 동일한 면역원을 incomplete freund's adjuvant와 동량 혼합하여 2회 추가 면역을 실시하였고, 세포융합 4일 전에 2배 정도의 면역원만을 복강 내 주사하여 최종 면역시켰다. 최종 면역 후 항체 생성여부를 확인하기 위해서 mouse의 꼬리 정맥에서 5 µL의 혈청을 채취하여 효소면역분석법으로 항체의 역가를 측정하였다. 그 중 높은 역가를 갖는 mouse로부터 spleen cell를 분리하여 myeloma cell(V653)과 Kohler 등(24)의 방법으로 세포융합을 실시하였고, McKearn 등(25)의 무한대 희석법으로 cloning을 실시하여 단일클론의 hybridoma cell을 획득하였다. 획득한 hybridoma cell 중 특이성이 높은 cell을 선택하기 위해 Western blot으로 *E. coli* O157:H7을 비롯하여 주요 식중독균인 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* 및 *Sal. Typhimurium*과의 교차반응성을 확인한 후 *E. coli* O157:H7에 대한 특이성이 높은 hybridoma cell을 선택하였다. 선택된 hybridoma cell을 대량 배양하여 mouse의 복강에 1×10⁷ cell/200 µL를 주입하고, 1주일 후 복수액을 생산하였으며, 생산된 복수액을 ammonium sulfate침전법으로 정제한 후, PBS를 이용하여 3일 동안 투석하였다(26). 생산된 항체들을 동결 건조하여 -20°C에서 보관하였으며, ELISA법을 이용하여 *E. coli* O157:H7에 대한 역가를 측정하였다.

간접 효소면역분석법(Indirect enzyme-linked immunosorbent assay) 확립

앞서 생산된 단클론성 항체를 이용하여 *E. coli* O157:H7 분석을 위한 최적의 indirect enzyme-linked immunosorbent assay(ID-ELISA)법을 다음 Table 1과 같은 조건으로 확립하였다. 간단히 설명하면, *E. coli* O157:H7은 0.1 M carbonate buffer(pH 9.4)로 10⁸-10¹ cell/100 µL로 96-well microplate(Nunc, Roskilde, Denmark)에 분주하고, 1시간 동안 37°C에서 코팅시킨 후 PBS-0.05% Tween 20 (PBST, pH 7.4)으로 3회 세척하였으며, 비특이적인 반응을 방지하기 위해 1% skim milk로 1시간 동안 37°C에서 block-

Table 1. Optimum conditions of ID-ELISA for the detection of *E. coli* O157:H7

	Parameters	Conditions
Reagents	Coating buffer	0.1 M carbonate buffer
	Blocking solution	1% skim milk
	Monoclonal antibody	HKEC 4G8-5 (1:2,000 in PBS)
	Second antibody	Goat anti-mouse IgG-HRP (1:10,000 in PBS)
	Substrate	ABTS containing 0.02% H ₂ O ₂
	Washing buffer	PBS containing 0.05% Tween 20
Incubation time	Coating step of <i>E. coli</i> O157:H7	1 hr at 37°C
	Blocking step of 1% skim milk	1 hr at 37°C
	Monoclonal antibody step	1 hr at 37°C
	Second antibody step	1 hr at 37°C
	Color developing step	20 min at 37°C

ing시킨 후 PBST로 4회 세척하였다. 세척된 well에 HKEC 4G8-5 항체를 PBS로 1/2000배 희석하여 각 well에 100 µL씩 분주하고, 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 다시 PBST로 5회 세척하였다. 세척된 well에 goat anti-mouse IgG-HRP(2차 항체, Sigma)를 100 µL씩 분주하여 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 PBST로 6회 세척하고, 기질용액인 2,2'-azino-di-3-ethyl-benzthiazoline-sulfonate (ABTS, Sigma)를 각 well에 100 µL씩 첨가하여 37°C에 20분 반응시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

또한 개발된 ID-ELISA의 특이성을 확인하기 위해 E. coli K-12, E. coli T-3, E. coli O1:K1:H7, E. coli O78:K80:H12 등의 대장균과 S. aureus, L. monocytogenes, B. cereus, Sal. Typhimurium 등의 주요 식중독균에 대한 교차반응성을 확인하였다.

시료의 matrix effect 확인

E. coli O157:H7은 주로 육류와 채소 등 농축산물에 오염될 가능성이 높고, 이러한 식품에 대하여 면역분석법을 적용할 경우, 식품 속 구성성분들이 matrix effect로 작용하는 것으로 알려져 있다. 또한 육류와 채소 속에 존재하는 식중독 균들은 일반적으로 시료에 고착상태로 존재하기 때문에 면역분석법에 그대로 적용하기에는 많은 어려움이 따른다고 보고되어 있다(27). 따라서 본 연구에서는 돼지고기, 소고기, 닭고기 등의 육류와 새싹채소 등 4종의 시료를 대상으로 다음과 같이 matrix effect를 확인하였다. 즉, 각 시료 1g에 E. coli O157:H7을 약 10⁸-10⁴ cell/g 수준으로 임의로 오염시키고, 1시간 동안 실온에 방치한 후 멸균된 0.85% 생리식염수 10 mL를 첨가하여 균질화 하였다. 균질화된 각 시료액 1 mL를 취하여 멸균 PBS로 3회 세척한 후, 개발된 ID-ELISA 법에 적용하여 각 시료의 matrix effect를 확인하였다.

ID-ELISA 분석을 위한 증균법 확립

식품공전에 등재된 E. coli O157:H7 검출법은 육류시료의 경우 EC broth를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 증균 배양시켜 배양액을 sorbitol MacCokey agar(Difco)에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 분리 배양한 후, 생성되는 특정 colony를 분리하여 API kit (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)로 동정·확인하는 것이다. 그러나 이 검출법은 증균에서부터 균의 검출까지 약 3.5일이 소요되기 때문에 E. coli O157:H7의 신속한 분석과 다량의 시료의 분석에는 어려움이 있다. 따라서, E. coli O157:H7의 신속한 분석을 위해 기존에 이용되고 있는 식품공전상의 E. coli O157:H7 증균

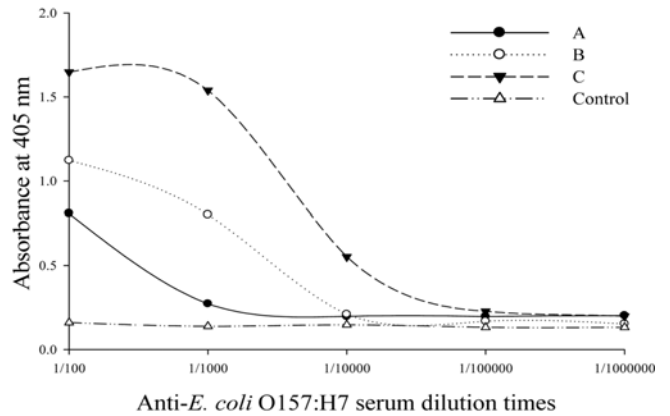


Fig. 1. Titration of anti-sera from mice immunized with E. coli O157:H7. A, anti-LPS of E. coli O157:H7 serum; B, anti-formalin killed E. coli O157:H7 serum; C, anti-heat killed E. coli O157:H7 serum.

법을 바탕으로 ID-ELISA 분석을 위한 최소 증균시간을 다음과 같이 확인하였다. 즉, 4종의 각 시료들을 1시간동안 자외선으로 처리한 뒤에 각 시료를 10g씩 정확히 칭량하고, E. coli O157:H7 10 cell/100 µL를 시료에 임의로 오염시켜 1시간 동안 고착시킨 후 EC broth 90 mL를 첨가하여 균질화한 다음, 37°C에서 24시간 동안 배양시키면서 2시간 간격으로 1 mL씩의 증균액을 취해 4°C에서 보관하면서 개발된 ID-ELISA로 각 시료의 최소 증균 시간을 확인하였다.

결과 및 고찰

단클론성 항체 생산 및 특성확인

LPS, HKEC 및 FKEC를 면역원으로 mouse에 면역시킨 후 항체 생산여부를 확인하기 위해 ELISA로 항혈청역가를 측정 한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 HKEC로 면역한 mouse의 항혈청역가가 FKEC와 LPS로 면역한 mouse의 역가 보다 높은 것으로 나타나 항체 생성정도가 가장 높은 것으로 확인되었다. 그러므로 역가가 가장 높게 나타난 HKEC로 면역된 mouse를 이용하여 세포융합과 cloning을 실시하여 총 20종의 hybridoma cell을 획득하였고, 그 중에서 역가와 특이성이 높은 hybridoma cell을 선택하

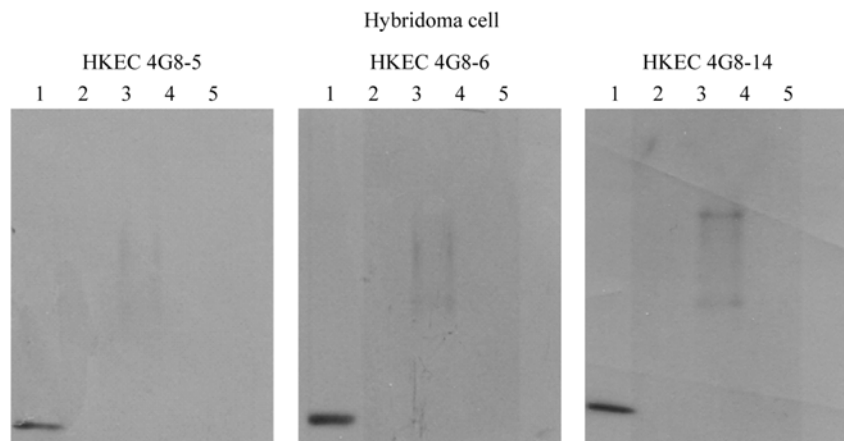


Fig. 2. Characterization of monoclonal antibodies produced from cloned cells by Western blot. Lane1, E. coli O157:H7; lane2, L. monocytogenes; lane3, S. aureus; lane4, B. cereus; lane5, Sal. Typhimurium.

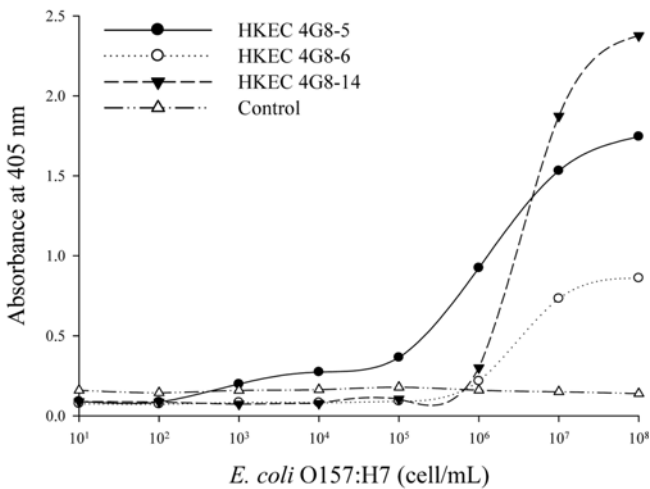


Fig. 3. ELISA titration of monoclonal antibodies selected for *E. coli* O157:H7.

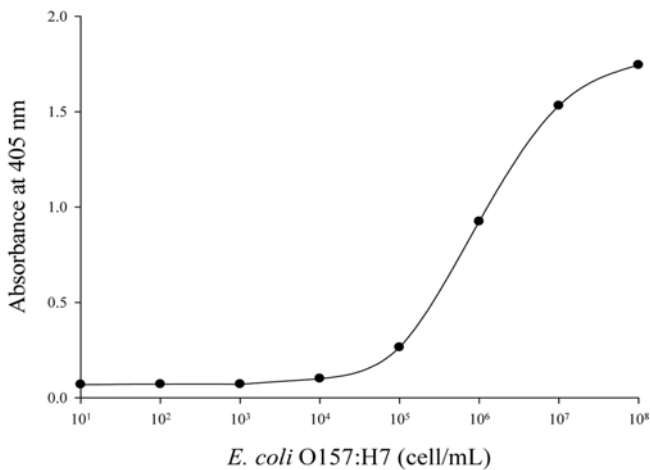


Fig. 4. Standard curve for the detection of *E. coli* O157:H7 by ID-ELISA.

기 위해 Western blot을 이용하여 다른 식중독균과의 교차반응성을 확인하였다. 그 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 HKEC-4G8-5, 6 및 14번이 *E. coli* O157:H7 단클론성 항체를 생산하는 것으로 확인되었고, 3종의 hybridoma cell 모두 *S. aureus*와 약간의 교차반응성을 보였으나, *E. coli* O157:H7과 보다 강한 반응성을 보여 *E. coli* O157:H7에 특이성이 높은 것으로 확인되었다. Siragusa 등(28)에 의하면 *S. aureus*의 세포벽에서 발현되는 단백질인 protein A가 immunoglobulin G와 친화성이 높기 때문에 단클론성 항체와 교차반응성을 일으키는 것으로 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 생산된 3종의 hybridoma cell(HKEC 4G8-5, 6, 14)을 mouse 복강에 주입한 후 복수액을 대량 획득하였고, ammonium sulfate 침전법으로 정제하여 *E. coli* O157:H7에 특이적인 단클론성 항체를 생산하였다.

간접 효소면역분석법(Indirect ELISA, ID-ELISA)

생산된 HKEC 4G8-5, 6 및 14 등 3종의 항체를 이용하여 ID-ELISA법 개발에 사용할 항체를 선택하기 위해 각 항체의 역가를 측정 한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 HKEC 4G8-5 항체가 10^5 cell/mL까지 분석이 가능한 것으로 확인되었을 뿐만 아니라, 다른 항체에 비해 높은 역가를 나타내어 ID-ELISA법 개발에

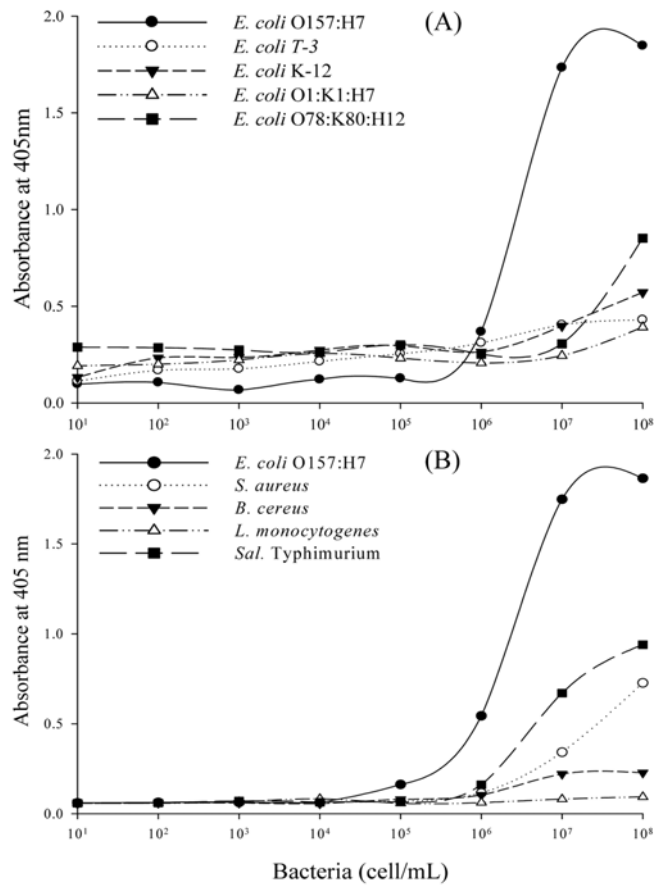


Fig. 5. Cross-reactivity patterns of HKEC 4G8-5 MAb for *E. coli* spp. (A) and other pathogen (B) by ID-ELISA.

사용하였다. 선택된 HKEC 4G8-5 항체를 사용하여 *E. coli* O157:H7을 분석하기 위해 개발된 ID-ELISA의 표준곡선은 Fig. 4와 같았고, 표준곡선에서 검출한계는 10^5 cell/mL이었다. 또한, 개발된 ID-ELISA법과 다른 대장균속에 대한 교차반응성을 확인한 결과, *E. coli* O157:H7을 제외한 *E. coli* O78:K80:H12에서만 약간의 교차반응성을 보였을 뿐 다른 대장균 속들과는 교차반응성이 없는 것으로 확인되었고(Fig. 5A), 그 원인으로서는 *E. coli* O157의 O-항원 합성 유전자인 *rfbE* gene으로 인한 O형질학적 반응 때문인 것으로 판단된다(29,30). 또한 다른 식중독균에 대한 교차반응성을 확인한 결과, *S. aureus*와 *Sal. Typhimurium*과의 약한 교차반응성을 나타내었다(Fig. 5B). *S. aureus*는 앞서 단클론성 항체 생산 결과에서 설명한 바와 같이 protein A와 IgG 타입의 단클론성 항체와 반응이 원인인 것으로 판단되고, *Sal. Typhimurium*의 경우는 Gram 음성균의 세포벽에만 존재하는 lipopolysaccharide 층과의 반응 때문인 것으로 생각된다(31). 비록 본 연구에서 개발된 ID-ELISA는 *S. aureus*와 *Sal. Typhimurium*과 약한 교차반응성을 나타내지만 *E. coli* O157:H7에 보다 강한 반응을 나타내기 때문에 시료 속에 *E. coli* O157:H7을 효과적으로 분석할 수 있는 효소면역분석법인 것으로 판단된다.

시료의 matrix effect 확인

본 연구에 적용된 육류와 채소는 그 구성성분들로 인한 matrix effect뿐만 아니라 *E. coli* O157:H7이 시료 속에 고착상태로 존재하기 때문에 증균없이 분석하는데 어려움이 있다. 따라서 matrix

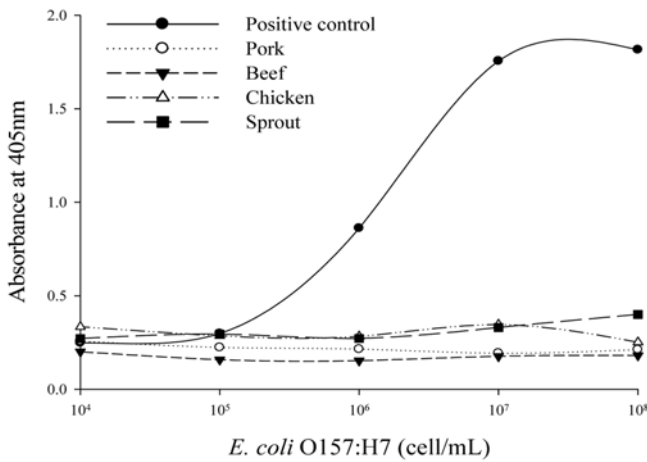


Fig. 6. Determination of the matrix effect for four samples artificially inoculated with *E. coli* O157:H7 to ID-ELISA.

effect를 확인하기 위해 각 시료에 *E. coli* O157:H7을 인위적으로 접종하여 배양과정 없이 바로 ID-ELISA법으로 분석하였다. 그 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 모든 시료에서 강한 matrix effect가 존재하는 것으로 확인되었고, 특히, 돼지고기, 소고기 및 닭고기 등의 육류시료에서 매우 낮은 검출률을 보여 새싹채소보다 강한 matrix effect가 확인되었다. 이상의 결과를 통해서 선정된 4종의 시료 속에 존재하는 *E. coli* O157:H7을 개발된 ID-ELISA법으로 효과적으로 분석하기 위해서는 시료를 분석하기에 앞서 검출률을 향상시키기 위해 증균과정이 필요한 것으로 판단되었다.

ELISA 분석을 위한 시료별 신속 증균법

앞서 각 시료의 matrix effect를 확인한 결과, 대부분 시료에서 강한 matrix effect가 확인 되어 개발된 ID-ELISA법으로 *E. coli* O157:H7을 검출하기 위해서는 추가적인 증균과정이 필요한 것으로 판단되었다. 따라서 식품공전상의 증균법을 응용하여 ID-ELISA법에 적용한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 육류인 돼지고기, 소고기 및 닭고기의 경우 증균 후 약 6시간 이후부터 ID-ELISA에 의해 *E. coli* O157:H7이 검출되었으며, 새싹채소는 증균 배양 2시간 이후부터 모든 시간대에서 양성으로 확인되었다. 그러므로 시료 속에 *E. coli* O157:H7이 약 1×10¹ cell/g의 낮은 수준으로 오염되어 있더라도 6시간 이상의 증균과정을 거쳐 ID-ELISA법으로 분석한다면, *E. coli* O157:H7을 기존의 분석법보다 신속하게 검출할 수 있을 것으로 판단되고, 더욱이 본 연구에서 확립된 ID-ELISA법은 분석에서 소용되는 시간이 최대 8시간이며, 기존 식품공전상의 검출법(96시간)보다 약 12배 이상 분석시간이 단축되

는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서 개발된 증균법과 ID-ELISA법을 이용한다면 시료 속에 오염된 *E. coli* O157:H7을 최소 8시간 이내에 신속·정확하게 분석할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 최근 식품이나 농축산물 등에서 빈번하게 검출되고 있는 장관출혈성 대장균인 *E. coli* O157:H7에 대한 단클론성 항체를 생산하고, 신속·정확하게 검색할 수 있는 간접효소면역분석법을 개발한 후 시료적용가능성을 확인하였다. 먼저 LPS, HKEC 및 FKEC를 *E. coli* O157:H7의 면역원으로 준비하여 mouse 면역에 사용하였고, 세포융합과 cloning을 실시하여 단클론성 항체를 생산하였으며, 생산된 항체 중 높은 역가를 나타낸 HKEC 4G8-5 항체로 ID-ELISA법을 개발하였다. 개발된 ID-ELISA법의 최저검출한계는 10⁵ cell/mL이었고, *S. aureus*와 *Sal. Typhimurium*에 대해서 약간의 반응성을 나타내었지만 *E. coli* O157:H7에 대해 보다 강한 반응성을 나타내었기 때문에 *E. coli* O157:H7에 매우 특이적인 분석법인 것으로 확인되었다. 개발된 ID-ELISA법을 이용하여 돼지고기, 소고기, 닭고기 및 새싹채소에 대한 검출률 향상을 위해 각 시료를 증균한 결과, 3종의 육류와 새싹채소는 각각 증균 6시간과 2시간부터 검출이 가능한 것으로 나타나 기존의 증균법보다 신속하게 시료 속 *E. coli* O157:H7을 분석할 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서 개발된 ID-ELISA법을 적용하여 농축산물 중에 존재하는 *E. coli* O157:H7을 분석한다면 보다 신속하고 간편하게 분석할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2007년 한국식품연구원으로부터 각종 식중독 세균의 신속면역검색을 통한 특이항체 개발에 관한 연구 사업을 수탁 받아 이루어졌으며, 류희정과 김경열은 교육과학기술부 BK 21 프로그램의 장학금을 수혜 받았음.

문 헌

- Kim WJ. *E. coli* O157:H7. Medical Postgraduates 31: 313-318 (2003)
- Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. Lancet 352: 1207-1212 (1998)
- Novello A. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter* among attendees of the Washington Country Fair-New York. MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 48: 803-805 (1999)
- Mohawk KL, Melton-Celsa AR, Zangari T, Carroll EE, O'Brien AD. Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 strain 86-24 following oral infection of BALB/c mice with an intact commensal

Table 2. Analysis of the samples artificially inoculated with *E. coli* O157:H7 by ID-ELISA during enrichment for 24 hr

Samples	<i>E. coli</i> O157:H7 enrichment time (hr)												
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Pork	- ¹⁾	-	-	± ²⁾	±	+ ³⁾	+	+	+	+	+	+	+
Beef	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chicken	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sprout	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹⁾-: Negative (<0.3; The cut-off value calculated from the negative control at 405 nm)
²⁾±: Suspect (0.3-0.5; The cut-off value calculated from the suspect control at 405 nm)
³⁾+: Positive (>0.5; The cut-off value calculated from the positive control at 405 nm)

- flora. Microb. Pathogenesis 1-12 (2010)
5. Eaton KA, Friedman D, Francis GJ, Tyler JS, Young VB, Haeger J, Abu-Ali G, Whittam TS. Pathogenesis of renal disease due to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in germ-free mice. Infect. Immun. 76: 3054-3063 (2008)
 6. Besser RE, Leff SM, Weber JT, Doyle MP, Barrett TJ, Wells JG, Griffin PM. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. J. Am. Med. Assoc. 269: 2217-2220 (1993)
 7. Swedlew DL, Woodruff BA, Brady RC, Griffin PM, Donnell HD, Geldreich EB, Payne J, Meyer A, Wells JG, Green KD, Bright M, Bean NH, Blake PA. A water-borne outbreak in missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. Ann. Intern. Med. 117: 812-819 (1992)
 8. Ina K, Kusugami K, Ohta M. Bacterial hemorrhagic enterocolitis. J. Gastroenterol. 38: 111-120 (2003)
 9. Korea Food and Drug Administration. What is pathogens. Available from: <http://kfda.go.kr>. Accessed July 23, 2009
 10. Yoon SH, Park IJ, Lee WG. A case of *Escherichia coli* O157 hemorrhagic colitis. Korea J. Clin. Microbiol. 11: 66-68 (2008)
 11. National Institute of Health and Infectious Diseases Control Division, Ministry of Health and Welfare of Japan. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (entero-hemorrhagic *E. coli*) infections, Japan, 1996-June 1997. Infectious Agents Surveillance Report 18: 153-154 (1997)
 12. Nauschuetz W. Emerging foodborne pathogens: Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Clin. Lab Sci. 11: 298-304 (1998)
 13. Kim HH. The present world status and epidemiology of *E. coli* O157:H7 human infection. Medical Postgraduates 26: 15-20 (1998)
 14. Hithins AD, Peng P, Watkins WD, Rippey SR, Chandler LA. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. pp. 4.1-4.29. In: Bacteriological Analytical Manual 8th Ed. AOAC International Publ. USA (1995)
 15. Deisingh AK, Thompson M. Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food. J. Appl. Microbiol. 96: 419-429 (2004)
 16. Kwak HS, Cha J, Kwang KJ, Kim H, Park SH, Kim CM. Characterization of verotoxin - producing *Escherichia coli* isolated from domestic foods. J. Food Hyg. Safety 15: 241-247 (2000)
 17. Al-Ajmi D, Padmanabha J, Denman SE, Gilbert RA, Al Jassim RAM, Mc Sweeney CS. Evaluation of a PCR detection method for *Escherichia coli* O157:H7/H-bovine fecal samples. Appl. Microbiol. 42: 386-391 (2006)
 18. Lim JS, Yoon JH, Min BK, Hong KW. Detection and identification of shiga-like toxin production *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. Food Eng. Prog. 12: 8-14 (2008)
 19. Jung BY, Jung SC, Kweon CH. Development of a rapid immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* O157. J. Food Prot. 68: 2140-2143 (2005)
 20. Chiao DJ, Shyu, RH, Hu CS, Chiang HY, Tang SS. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B. J. Chromatogr. B 809: 37-41 (2004)
 21. Gryko R, Sobieszczanska BM, Stopa PJ, Bartoszcze MA. Comparison of multiplex PCR, and an immunochromatographic method sensitivity for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef. Acta Microbiol. Pol. 51: 121-129 (2002)
 22. Muller JD, Wilks CR, O'Riley KJ, Condron RJ, Bull R, Mateczun A. Specificity of an immunochromatographic test for anthrax. Aust. Vet. J. 82: 220-222 (2004)
 23. Park CH, Kim HJ, Hixon DL, Bubert A. Evaluation of the duopath verotoxin test for detection of Shiga toxins in cultures of human stools. J. Clin. Microbiol. 41: 2650-2653 (2003)
 24. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells producing antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-501 (1975)
 25. McKearn TJ, Weiss A, Stuart FP, Fitch FW. Selective suppression of humoral and cell-mediated immune responses to rat alloantigens by monoclonal antibodies produced by hybridoma cell lines. Transplant P. 11: 932-935 (1979)
 26. George CW, Susott RA. Effects of ammonium phosphate and sulphate on the pyrolysis and combustion of cellulose. USDA Forest Service INT-90 (1971)
 27. Lauchlin MC, Ridley JAM, Tylor AG. The use of monoclonal antibodies against *Listeria monocytogenes* in direct immunofluorescence technique for the rapid presumptive identification and direct demonstration of *Listeria* in food. Acta Microbiol. Hung. 36: 467-471 (1989)
 28. Siragusa, GR, Johnson MG. Monoclonal antibody specific for *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*. Appl. Environ. Microb. 56: 1897-1904 (1990)
 29. Bertrand R. Evaluation of enrichment-free PCR-based detection on the *rfbE* gene of *Escherichia coli* O157-application to municipal waste water. Water Resour. Res. 41: 1280-1286 (2006)
 30. Hu Y, Zhang Q, Meizler JC. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. J. Appl. Microbiol. 87: 867-876 (1999)
 31. Padhye NV, Doyle MP. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serotypes O157:H7 and O26:H11. J. Clin. Microbiol. 29: 99-103 (1991)