

# 병원성 미생물 검출을 위한 항체 기반 바이오센서

## Antibody-Based Biosensors for Detection of Pathogens

고성호 | 바이오제론연구단  
Sung-ho Ko | Biogeron Research Group

병원성 박테리아, 곰팡이(진균), 바이러스들은 자연 상에 널리 존재하고 있으며 인간과 동물의 건강 및 농작물에게 해를 끼칠 수 있다. 그러므로 이들 미생물의 모니터링은 병원균의 감염 예방, 공공의 건강 및 삶의 질 향상에 매우 중요하다. 특별히 유통기한이 짧은 식품의 분석이나 잠재적으로 죽은 병원균이 포함되어져 있어 비병원균에 대한 등록을 허가 받아야 하는 경우 병원균의 빠른 검출 및 식별은 매우 필수적이다. 병원균들이 적은 수로 존재하는 경우 이들을 특이적으로 높은 민감도를 통해 검출해 낼 수 있어야 할 것이다. 정확하고 빠르며 민감한 분석은 병원균의 분포를 모니터링하기 위해 필수적이며 무엇보다 고객 및 환자의 안전을 보장하기 위해 중요하다.

병원균을 모니터링 하기 위한 기존의 방법은 크게 2가지로 생각해 볼 수 있다. 미생물을 배양하여 수를 증대시켜 정량적 분석을 한다든가 미생물별로 자라나는 배지의 특성이 달라 이들을 이용하여 미생물을 식별해 내었다. 이러한 방법은 복잡하고

결과를 얻는데 있어 1~2주간의 긴 시간이 필요하다는 단점이 있다. 이에 따라 병원균을 식별하기 위한 대안적 방법이 PCR이었다. 하지만 이 방법은 외적 요소로부터 완벽하게 병원균을 검출해 내는 방법이 충족 되어야만 한다. 예를 들어 식품 내의 병원균을 분석하고자 할 때 높은 함량의 지방 및 탄수화물로부터 샘플을 완벽하게 순수한 상태로 뽑아내야 하는 어려움이 있다. 만약 병원균의 검출을 위한 DNA 외의 외부 DNA가 샘플에 존재할 경우 이들을 주형으로 하여 PCR을 하게 되면 전혀 다른 결과가 나올 수 있다. 그러므로 이들에 대안적인 병원균 분석 방법이 절실하다.

항체는(monoclonal, polyclonal, recombinant antibody) 면역진단과 biomarkers 검출을 포함하는 넓은 범위의 적용분야에서 선택되어진다. 항체는 쥐, 토끼, 양 또는 조류의 면역 시스템을 이용하여 생산되어진다. 특정 항체를 생산하기 위한 숙주는 면역력을 갖고 있을 수도 있고, 열처리를 하였을 경우 그렇지 않을 수도 있다. 이들 항체는 전형적으로

로 적합한 애주벤트(adjuvant : 항체를 얻으려고 할 때 항원을 혈액 중에 장기간 보존시킴으로써 항원성을 높이려고 항원과 혼합하여 항체의 형성과 지속성을 증가시키는 물질의 총칭) 내에 보관하며, 숙주는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 통해 항원을 인지하는 것으로 입증된 것을 예방접종 방식을 통해 면역 반응을 유도하게 된다. 다클론항체(polyclonal antibodies, pAb)는 하나의 세포에서 다른 epitopes들을 인지하는 항체이다. 높은 특이성을 원할 때에는 단클론(monoclonal) 또는 재조합(recombinant) 항체를 이용하는 것이 좋다. 융합세포 기술과 쥐를 숙주로 사용하여 만든 항체는 일반적으로 예방접종 방식을 통해 선택되어진다. 골수, 일차 림프절, 지라는 항체 생산을 하는 B cell의 자원으로써 선택되어지며 골수 세포에 융합되어지고 배양되어진다. 그 결과 융합세포는 full length의 항체를 생산해 내며 이들은 하나의 epitope를 갖는다. 재조합 항체는 다양한 단백질, 항원, 합텐(hapten), 탄수화물의 일부를 선택적으로 검출할 수 있다. 재조합 항체는 파지(phage) 디스플레이 기술과 항체 라이브러리 내의 관심 있는 항체와의 친화력을 통해 만들어진다. 재조합 항체는 다양한 heavy chain과 light chain으로 융합하여 증폭할 수 있으나 이들은 라이브러리 상에서  $10^7 \sim 10^{10}$ 의 확률로 다른 항체를 코딩하는 유전자 서열과 결합하게 되는 단점이 있다. 본 글에서는 면역센서를 기반으로 하는 병원균 검출에 단클론과 다클론 항체를 사용하는 경우에 대해 좀 더 자세히 살펴보고자 하겠다.

병원균 검출을 위한 단클론, 다클론, 재조합 recombinant 항체의 특징 분석은 매우 중요하다. 첫 번째로 항체는 적은 세포의 양을 검출 및 수량화

할 수 있어야 하며 이것은 식중독균과 관련해 자주 논의 되어지는 부분이다. 두 번째로 항체는 특이 종류를 식별해 낼 수 있어야 한다. 그래서 병원균의 높은 특이성을 갖는 epitope의 선택은 매우 중요하다. 마지막으로 항체는 관심 있는 검출 물질과의 높은 친화력을 가져야 한다. 항체 후보들 가운데 원하는 항체를 찾는 것은 ELISA를 기본으로 하는 분석 방법에 의해 쉽게 얻어낼 수 있으며 이를 통해 센서에 활용할 수 있는 검출 물질과의 친화력이 높은 항체 후보를 선정할 수 있다. 그림 1은 단클론, 다클론, 재조합 항체 생산 과정을 보여준다.

항체는 분석샘플의 볼륨이 크고 세포의 수가 적을 때도 병원균의 선별을 성공적으로 이루어 내야 한다. 병원균에 대한 특이 항체가 표면에 코팅되어져 있는 마그네틱 비드를 이용하는 immunomagnetic separation(IMS) 방법은 다양한 물질이 들어있는 샘플에서 병원균 외 다른 물질을 효과적으로 분리, 제거하고 병원균의 농도를 올려주어 민감도를 증가시킨다. 위의 방법을 통해 검출된 세포들은 다른 배양액에서 번식시킬 수 있다. 이 기술은 비드에 코팅되어져 있는 항체와 결합한 병원균을 2차 항체를 이용하여 비직접적 검출 방법으로 치즈 및 생고기 내의 병원균을 검출 할 수 있다.

ELISA 기반 기술은 직접적으로 식중독균들을 검출할 수 있다. Brooks와 그의 동료들은 ELISA 기반 기술을 이용하여 소의 포피와 질점액 내의 *C. fetus*를 검출해 내었다. Kerr은 sandwich assay 형태의 검출 방법을 이용하여 사람과 동물의 난관체 섬모를 항원으로 인지하는 단클론 항체를 사용하여 *E. coli* O157:H7을 검출하였으며 검출한도는 Brooks와 그의 동료들의 ELISA 기반 분석 기술과 동일한 100,000 cells/ml 였다. 하지만 이들 검출 방법은 시

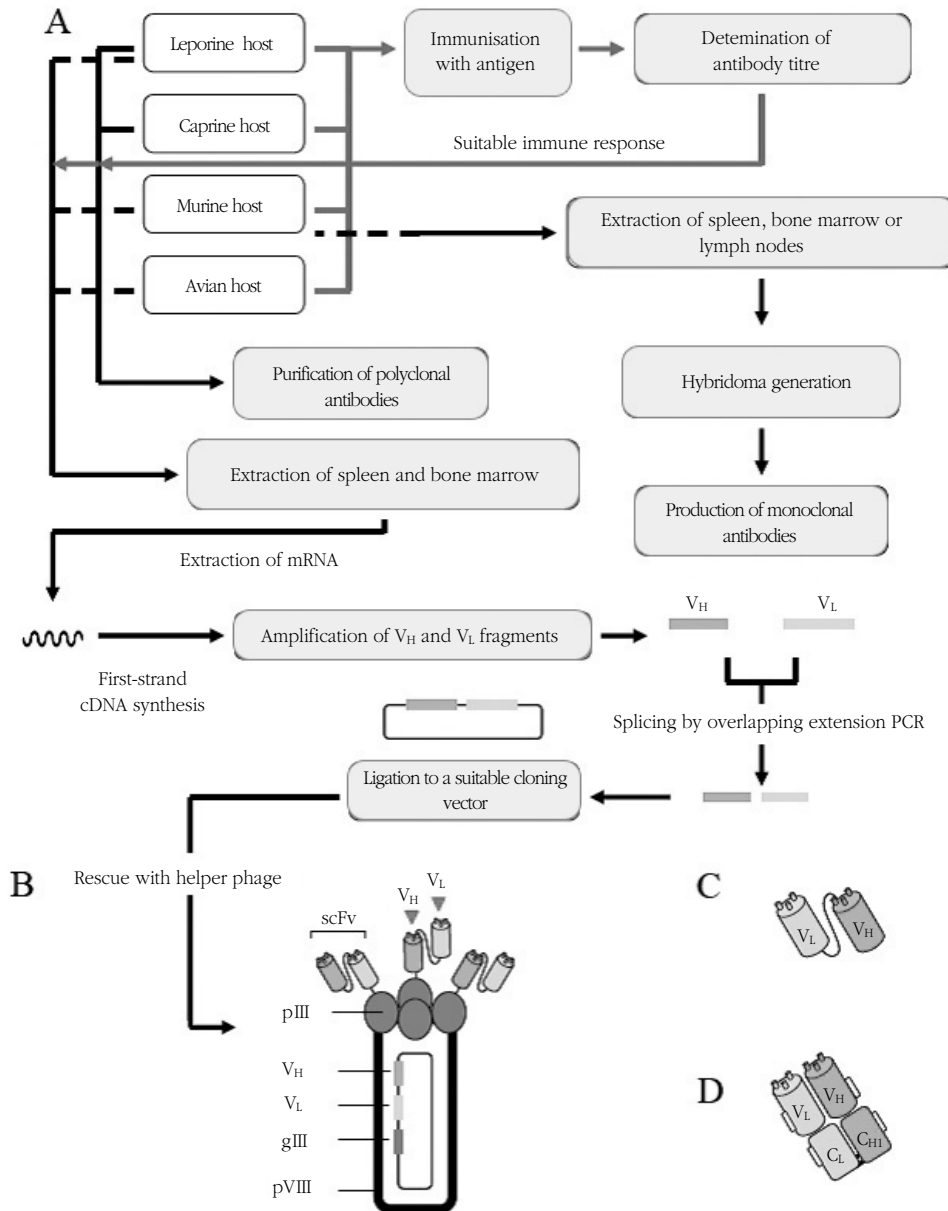


그림 1. 단클론, 다클론, 재조합 항체 생산 과정(A). scFv 항체 단편과 두개의 재조합 항체 단편(B). scFv(C). Fab(D). pIII/pVIII-protein 3/8,  $V_H$ -variable heavy,  $V_L$ -variable light.

간이 오래 걸리며 blocking, washing, 항체와 항원들 간의 incubation step 등 복잡한 과정을 거쳐야 한다는 단점이 있어 빠른 검출 결과를 요구할 시 좋은 방법이 될 수 없다.

바이오센서란 특정 물질과 선택적으로 반응할 수 있는 효소, 항체, 핵산, 세포, hormone-receptor 등의 생체감지물질(bioreceptor)이 전기 또는 광학적 신호변환기(signal transducer)에 고정화되어 생물학적 인식반응을 전기적 또는 광학적 신호로 변환함으로써 분석하고자 하는 물질을 선택적으로 검출할 수 있는 계측기를 통틀어 지칭한다. 분석물질은 효소, 항체와 같은 생체물질뿐만 아니라 곰팡이 독소, 잔류농약과 같은 화학물질도 포함된다. 생체감지물질과 분석물질 사이의 특이적 반응은 전기화학(electrochemical), 형광, 발색, SPR(surface plasmon resonance), FET(field-effect transistor), QCM(quartz crystal microbalance) 등 다양한 물리·화학적 방법에 의해서 궁극적으로 전기적 신호로 변환되고 그 신호는 분석물질의 농도와 비례하여 정성, 정량 분석이 가능하다. 그림 2는 바이오센서의 모식도를 보여준다.

유용한 바이오센서는 짧은 응답시간(response time), 특정물질에만 반응하는 높은 선택도(sel-

ectivity), 소량의 물질과도 결합하는 민감도(sensitivity), 열적 혹은 화학적 안정도(stability) 및 저비용 등의 조건들을 충족시켜야한다. 현재에도 다양한 바이오센서가 개발되고 있으나 역시 다들 한계성을 갖고 있는 실정이다. 이들 분석 방법의 민감도는 변환기의 특성 및 항체의 질에 의존적이다. 본 지에서는 각 센서를 타입별로 살펴보고 어떻게 항체들이 병원균의 검출을 위해 사용되어 지는지를 설명하고자 한다.

전기화학적 센서는 특정 항체가 전극 변환기와 연결되어 있으며 이들은 일반적으로 전류측정(amperometric), 임피던스(impedimetric), 전위차(potentiometric), conductometric 센서로 변환기의 4가지 타입에 따라 나누어진다. 전류측정 바이오센서는 효소(enzyme) 기반 시스템으로 전극상에서 일어나는 산화환원 반응을 인지하게 된다. 그 결과 발생한 전류를 통해 생체 물질을 검출할 수 있는 센서이다. 전류측정 바이오센서의 장점은 일회용으로 사용할 수 있으며 소비자가 보기 쉽게 화면 상으로 전기적 신호를 확인할 수 있고 경제적인 시스템으로 감도를 높이기 위해 iodine이나 ferrocenedicarboxylic acid(FEDC)와 같은 매개체들과 결합시켜 민감도를 증폭시킬 수 있어 시스템을 최소화시

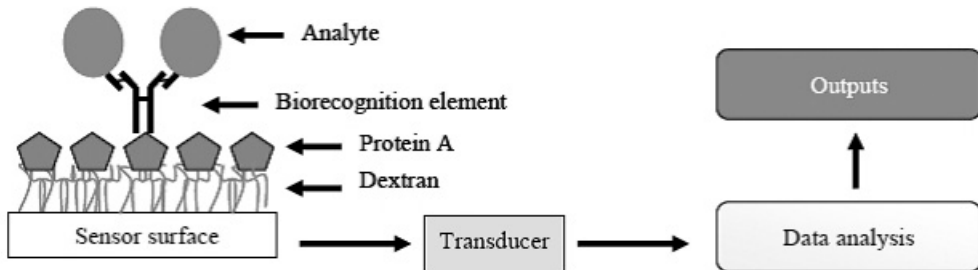


그림 2. 바이오센서의 모식도

킬 수 있으며 적은 샘플 양으로도 검출이 용이하다. Impedimetric 바이오센서는 미생물들의 생체대사 산화환원 반응을 통해 병원균을 검출할 뿐만 아니라 정량적 분석을 할 수 있다. 전도도와 정전 용량이 증가되고 그 결과 임피던스가 줄어들게 된다. 그 한 예로 Tully와 그의 동료들은 최근 탄소 전극에 코팅된 avidin에 biotin이 표지된 다클론 항체를 고정화하여 *L. monocytogenes*의 세포 표면 단백질인 internakin B(InB)를 4.1 pg/ml까지 검출할 수 있는 바이오센서를 개발하였다. Potentiometric 바이오센서는 항원-항체 결합과 같은 생물학적 인식작용을 기계적으로 변환시킨 센서로써 reference 전극을 통해 생체물질을 검출한다. Conductometric 바이오센서는 생물학적 신호를 폴리아세틸렌, 폴리피롤 또는 폴리아닐린 등 전도성의 폴리머를 이용하여 전기적 신호로 변환하는 전기화학적 센서이다. Muhammad Tahir와 Alocilja는 다클론 항체에 폴리아닐린을 표지하고 sandwich assay를 통해 *E. coli* O157:H7과 *Salmonella*를 각각 79 CFU/ml와 83 CFU/ml의 높은 검출한도를 갖는 센서를 개발하였으며, 이들 방법은 상추와 딸기에서도 *E. coli* O157:H7을 검출할 수 있었다. 그뿐만 아니라 검출 시간이 6분밖에 되지 않아 신속한 검출이 가능하였다.

질량 기반 면역센서는 항체와 검출 물질 간의 상호작용에 의한 질량 변화를 인지하여 생체물질을 검출하는 센서이다. QCM은 가장 대표적인 질량 기반 면역센서로 Fung과 Wong은 EDC와 NHS를 이용하여 protein A를 기관에 고정시킴으로써 항체의 orientation을 증대시켜 민감도와 선택성을 높였으며, *S. paratyphi*를  $1.7 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 검출하는데 성공하였다. Pohanka는 다클론 항

체를 글루타르알데하이드를 이용하여 piezoelectric crystal 표면에 고정시켜 *E. coli*를 검출해 내는 면역 센서를 개발하였으며 이 면역센서는 검출 시간이 10분밖에 걸리지 않고 재계량과 표지가 필요 없는 센서이다.

Thermometric 면역센서는 온도 변환기에 의해 선택적 생체물질을 검출하는 센서이고 magnetic 면역센서는 마그네틱 비드에 항체와 같은 ligand를 코팅하여 전기장 내에서 검출하는 센서이다. 마그네틱 센서는 분석샘플에 어떠한 오염물질도 포함되지 않아 비특이적 신호가 매우 낮게 나타난다는 장점이 있다. Mujika에 의해 만들어진 마그네틱 센서는 기관이 실리콘 나이트라이드로 제작되어지고 손안에 들어가는 작은 크기로 *E. coli* O157:H7을 검출하였다. 이와 같이 전기화학적, 압전기적 마그네틱 면역센서들은 식중독균 검출에 성공적으로 적용되어질 수 있었다.

광학(optical) 센서의 경우 병원균을 표지 없이 실시간으로 관찰할 수 있다는 장점이 있다. Surface plasmon resonance(SPR)는 단색광원인 가시광선 또는 근적외선이 반구 프리즘을 통해 금과 같은 금속 표면에 도달하고 다시 굴절되어진 빛이 그들의 굴절률에 따라 검출기에 인지되어지는 현상이다(그림 3). 그 결과 자유 전자들의 진동은 표면 플라즈몬을 형성하게 되고 칩의 표면과 칩 표면의 질량비에 따라 그 굴절률이 변화되어진다. 질량의 변화는 기질의 고정화와 칩의 표면에서 일어나는 여러 상호작용들을 유발시키는 물질들에 의해 일어나게 되고 이에 따라 빛의 파장은 장파장으로 변화되어지고 굴절률이 변하게 된다.

SPR 면역센서의 장점은 병원균 검출에 직접적인 적용뿐만 아니라 실시간으로 모니터링 할 수 있

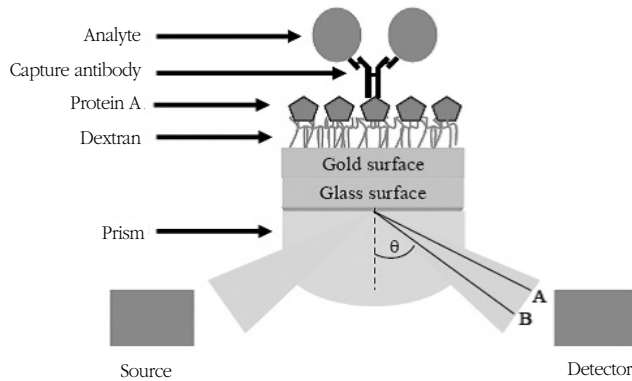


그림 3. SPR의 모식도. 단백질 A는 IgG 항체를 포획하고, 질량의 변화는 검출하고자 하는 물질(동그라미)의 결합으로부터 일어나 굴절각의 변화(A to B)를 통해 검출기(detector)가 인지하게 되고 이를 소프트웨어가 분석하여 보여주게 된다.

다는데 있다. Wei는 Spreeta™(texas instruments) SPR system을 사용하여 biotin 표지를 단 레포린(leporine) 다클론 항체를 센서의 기판에 직접적으로 고정화시킨 뒤 *Campylobacter jejuni*를  $1 \times 10^5$  CFU/ml 농도로 검출하였으며, Barlen과 그의 동료들은 SPR 장치(plasmonic biosensor)를 사용하여 *S. typhimurium*( $2.5 \times 10^5$  CFU/ml)과 *S. enteritidis*( $2.5 \times 10^8$  CFU/ml)를 검출하였다. 또한 한국 식품연구원의 Ko와 그의 동료들은 센서의 민감도

증가를 위해 금 나노입자를 SPR 칩 표면에 흡착시키고 항체를 칩 표면에 간단하고 신속히 고정시키기 위해 유전공학 기법으로 새로운 융합단백질을 개발하여 항체 고정화를 위한 바이오링커로 사용하였다. 모식도가 그림 4에서 보여진다. SPR의 경우 다른 면역센서들과는 다르게 상용화되어져 있는 제품군들이 많이 있으며 그 중 대표적인 것이 BIAcore에서 출시된 제품들이다. 항체를 이용한 sandwich assay를 통한 분석도 가능하다는 장점을

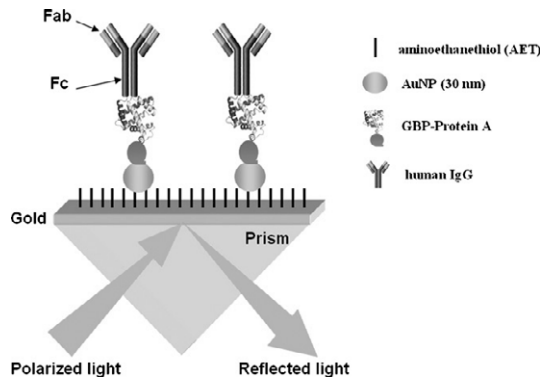


그림 4. 항체 고정화를 위해 새로운 바이오링커를 이용한 나노입자 기반 SPR 바이오센서의 모식도

가지고 있을 뿐만 아니라 분당 1 $\mu$ l의 매우 느린 유  
속을 일정하게 유지함으로써 항체와 병원균의 결

합력을 높일 수 있다는 장점을 가지고 있다. 그림 5  
는 병원성 미생물 검출을 위한 전략적 방법들을 도

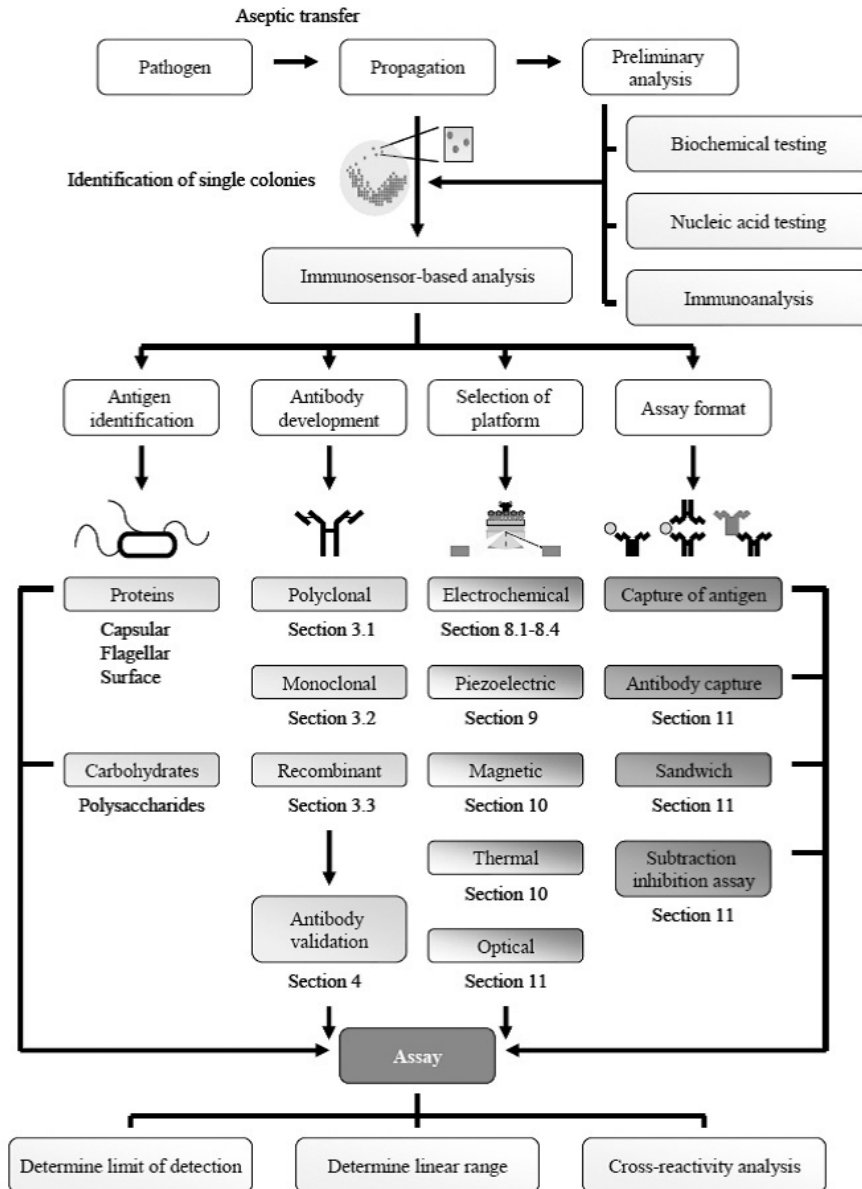


그림 5. 병원균 검출을 위한 전략적 방법

식적으로 보여주고 있다.

지금까지 우리는 여러 병원균들을 검출할 수 있는 다양한 면역 센서들에 대해 논의하였다. 상용화 되어진 센서들도 있으며, 병원균을 매우 민감하게 검출할 수 있는 기술들도 볼 수 있었다. 센서 기반 기술들의 장점이 매우 많음에도 불구하고 단점들도 볼 수 있었다. 앞으로의 센서 기술의 발전 방향을 모색하고자 본 연구지는 몇 가지 문제들을 되짚어 보고자 한다. 앞서 언급한 분석 방법들의 몇몇은 특정 항원에 초점을 두고 있다. 이들은 또한 대부분이 특이성에 집중되어 있기 때문에 검출하고자 하는 병원균들이 삼투압, pH, 온도에 의한 스트레스에 노출되거나 알맞지 않은 배지에서 항원-항체 반응을 하게 된다. Hahm과 Bhunia는 *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *E. coli* O157:H7을 다양한 스트레스 조건에서 항원-항체 반응을 실시하여 본 결과, 반응성이 모두 줄어드는 것을 확인한 바 있다. 이 외에도 *L. monocytogenes*를 단클론 항체가 고정된 BIAcore SPR 기관에 흘려주고 10분 동안 60℃의 고온에서 반응시켰을 때 세포벽의 변형이 일어나 그 반응성이 매우 줄어든 것을 확인하였다. 이들 실험적 결과에 따르면 병원균 검출의 민감도는 외부 요인에 의해 상당한 영향을 받게 되므로 병원균의 생육환경 조건을 잡아주는 것은 매우 중요하다. 따라서 병원균의 크기와 칩의 면적, 칩의 높이를 맞추어 주는 것도 센서 기술의 발전을 위해 고려해야할 것이다.

#### ● 참고문헌 ●

1. Torensma R, Visser MJC, Aarsman CJM, Poppelier MJG, Fluit AC, Verhoef J, Monoclonal antibodies that react with live *Listeria spp.*, Appl Environ Microbiol, **59**, 2713-2716, 1993
2. Wang L, Li Y, Mustaphai A, Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation, J Food Prot, **70**, 1366-1372, 2007
3. Uyttendaele M, Van Hoorde I, Debevere J, The use of immuno-magnetic separation(IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese, Int J Food Microbiol, **54**, 205-212, 2000
4. Chapman PA, Ashton R, An evaluation of rapid methods for detecting *Escherichia coli* O157 on beef carcasses, Int J Food Microbiol, **87**, 279-285, 2003
5. Brooks BW, Devenish J, Lutze-Wallace CL, Milnes D, Robertson RH, Berlie-Surujballi G, Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Campylobacter fetus* in bovine preputial washing and vaginal mucus samples, Vet Microbiol, **103**, 77-84, 2004
6. Kerr P, Chart H, Finlay D, Pollock DA, MacKie DP, Ball HJ, Development of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of animal and human *Escherichia coli* O157 strains, J Appl Microbiol, **90**, 543-549, 2001
7. Tully E, Higson SP, O' Kennedy R, The development of a 'labelless' immunosensor for



- the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface protein, Internalin B, Biosens Bioelectron, **23**, 906-912, 2008
8. Muhammad-Tahir Z, Alocilja EC, A conductimetric biosensor for biosecurity, Biosens Bioelectron, **18**, 813-819, 2003
  9. Fung YS, Wong YY, Self-assembled monolayers as the coating in a quartz piezoelectric crystal immunosensor to detect *Salmonella* in aqueous solution, Anal Chem, **73**, 5302-5309, 2001
  10. Pohanka M, Skládál P, Pavlis O, Label-free piezoelectric immunosensor for rapid assay of *Escherichia coli*, J Immunoassay Immunochem, **29**, 70-79, 2008
  11. Mujika M, Arana S, Castaño E, Tijero M, Vilares R, Ruano-López JM, Cruz A, Sainz L, Berganza J, Magnetoresistive immunosensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 including a microfluidic network, Biosens Bioelectron, **24**, 1253-1258, 2009
  12. Wei D, Oyarzabal OA, Huang TS, Balasubramanian S, Sista S, Simonian AL, Development of a surface plasmon resonance biosensor for the identification of *Campylobacter jejuni*, J Microbiol Methods, **69**, 78-85, 2007
  13. Barlen B, Mazumdar SD, Lezrich O, Kämpfer P, Keugsen M, Detection of *Salmonella* by surface plasmon resonance, Sensors, **7**, 1427-1446, 2007
  14. Ko B, Park TJ, Kim HS, Kim JH, Cho YJ, Directed self-assembled of gold binding polypeptide-protein A fusion proteins for development of gold nanoparticle-based SPR immunosensors, Biosens Bioelectron, **24**, 2592-2597, 2009
  15. Hahm BK, Bhunia AK, Effect of environmental stresses on antibody-based detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* and *Listeria monocytogenes*, J Appl Microbiol, **100**, 1017-1027, 2006

고 성 호 공학박사

소 속 : 한국식품연구원 바이오제론연구단

전문분야 : 바이오센서

E-mail : shko7@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9320