Appl. Chem. Eng., Vol. 22, No. 5, October 2011, 522-525

강두환 교수님 헌정논문

Staphylococcus aureus 신속 검출을 위한 효소면역측정 스트립 센서

박소정 · 김영기†

한경대학교 화학공학부

(2011년 7월 29일 접수, 2011년 9월 19일 심사, 2011년 9월 21일 채택)

Enzyme-linked Immunosorbent Assay Strip Sensor for Rapid Detection of *Staphylococcus aureus*

So Jung Park and Young-Kee Kim†

Department of Chemical Engineering, Hankyong National University, Anseong, Gyeonggi-Do 456-749, Korea
(Received July 29, 2011; Revised September 19, 2011; Accepted September 21, 2011)

본 연구에서는, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)와 면역크로마토그래픽 기법을 결합하여 *Staphylococcus aureus* 검출을 위한 면역스트립을 제작하였다. 면역스트립은 4개의 서로 다른 기능을 가진 멤브레인을 이용하여 만들어졌다. 니트로셀룰로오스 멤브레인은 항체와의 결합력이 높기 때문에, 포획항체를 고정화하였고, 다공성 멤브레인들을 통하여 모세관 현상으로 인해 시료흐름을 유도하였다. 효소반응에 의해 생성된 발색신호는 디지털카메라와 자체 제작된 소프트웨어를 이용하여 정성, 정량분석 하였다. 최적의 분석조건 하에서 30 min 이내에 2.7×10^4~2.7×10^7 CFU/mL 범위의 *S. aureus* 농도를 측정할 수 있었다.

In this study, an established enzyme-linked immunosorbent assay and immuno-chromatography technique are combined to fabricate an immuno-strip sensor for the detection of *S. aureus*. The immuno-strip is manufactured by using four different functional membranes. The capture antibody is immobilized on the nitrocellulose membrane due to the high affinity and the capillary action through porous membranes induces a flow of sample. A colorimetric signal is appeared according to the enzyme reaction and is analyzed by the digital camera (qualitative analysis) and home-made image analysis software (quantitative analysis). Under the optimal conditions, samples with *S. aureus* in the range of 2.7×10^4~2.7×10^7 CFU/mL can be detected by the colorimetric method within 30 min.

Keywords: *Staphylococcus aureus, immuno-strip sensor, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immuno-chromatographic assay*

1. 서 론

최근 유럽의 농식품 오염문제에서 볼 수 있듯이 식품의 안전성 문제는 국제교역의 증가와 더불어 더욱 중요한 문제로 부각되고 있다[1]. 오염된 식품에 잔류하는 병원성 미생물에 의한 식중독 발생이 증가하고 있으며[1,2], 바이러스, 박테리아, 곰팡이, 기생충 등을 포함한 병원성 미생물에 의해 발생된 질병은 250종 이상이 알려져 있다[3]. *Staphylococcus aureus*는 식중독 발생 유발 빈도가 높은 병원성 미생물로 전세계적으로 많은 나라에서 살모넬라 및 가스괴저 식중독과 함께 3대 주요 식중독 발생 원인균으로 여겨지고 있다[4]. 한국식품의약품안전청에서 발표한 자료에 따르면 2003~2007년 식중독 발생 전체 건수 중 *S. aureus*에 의한 연간 식중독 발생률은 노로바이러스, *Salmonella*, 병원성 대장균과 더불어 가장 높게 나타나고 있으며, 매년 식중독 발생은 증가하는 양상을 보이고 있다[5].

† 교신저자 (e-mail: kim@hknu.ac.kr)

*S. aureus*는 일반적으로 환경에 저항성이 강하여 건강한 성인의 비강, 피부, 구강 등에도 존재하고 자연계에도 널리 분포되어 있어 동물의 상처부위를 통한 전염이나 취급자에게 식품 오염을 일으킬 수 있다[6]. 식중독 매개 식품으로는 어패류, 가공식품, 야채류, 곡류 등이 보고되고 있으며[5], *S. aureus*가 생산하는 내열성 장독소(enterotoxin)로 인해 오염된 음식을 섭취한 경우 2~6 h 이내에 구토, 복통 및 설사를 포함한 증상을 유발한다[7,8]. 따라서 *S. aureus*에 의한 식중독 예방 및 진단을 위해 신속하고 정확한 분석검출 방법의 개발은 매우 중요하다.

식품 내 존재하는 식중독 균의 측정을 위해 일반적으로 널리 이용되는 방법은 선택배지에서의 배양 및 colony 계수, 형태학적 동정법과 생화학적 분리방법 등이 있다[9,10]. 선택배양 및 colony 측정법은 미생물 검정의 가장 기본적인 방법으로, 높은 선택성과 특이성 때문에 오랜 시간 동안 신뢰할 수 있는 방법으로 사용되어 왔으나, 결과를 얻기까지 2~7일 정도의 시간이 소요되고 전문 기술을 지닌 인력이 필요한 단점을 가지고 있다[10,11]. 형태학적 동법과 생화학적 분리법도 고가의 장비와 전문인력이 요구되는 단점이 있다. 따라서 병원성 세

균을 현장에서도 정밀하고 신속하게 검출할 수 있는 간단한 측정법의 개발은 매우 시급하다[12].

분석 시간단축을 위해 헥산에 기초한 분석방법, 항체를 기반으로 한 측정방법과 자동화 분석시스템 등에 대한 수많은 연구가 수행되어 졌다[19]. 그 중에서 신속검출을 위해 가장 많이 연구된 분석방법은 DNA probe법과 면역분석법이다[13]. 대부분의 DNA probe 방법은 polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 적은 양의 유전자를 증폭한 후 전기영동법을 통하여 확인하거나 특정 헥산서열을 인식할 수 있는 probe와 결합반응 여부를 확인하는 것이다[14]. PCR을 이용한 헥산분석 기법은 분석 시간을 5~24 h으로 단축할 수 있고, 높은 특이성과 적은 양의 시료로 측정 가능한 장점을 가진다. 하지만, 죽은 세포의 DNA증폭과 복잡한 데이터 해석 방법으로 인해 잘못된 분석 결과가 얻어질 수 있고 다단계의 연속적 조작이 요구되며, 전문 인력을 필요로 하는 단점을 가진다[15].

이에 대한 대안으로 개발된 면역분석법은 생물학적 표지 분자들과 항체 사이의 특이적인 친화 반응에 기초하여 측정하는 기술로 임신진단, 약물 검사, 진단분야와 유해 환경물질 분석에 응용되고 있다[16,17]. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)는 면역분석법 중 가장 많이 사용되는 분석도구이며[18] 연구도 활발히 이루어져왔다. ELISA 기법은 반응의 민감도, 특이성, 신속성 및 재현성이 매우 뛰어나고 항원이나 항체를 달리할 경우 동일 조작으로 다양한 종류의 항원, 항체 검출에 이용될 수 있는 범용성의 장점을 지니고 있지만[19], 여러 가지 단계의 조작이 필요하여 복잡하고 전문인력에 의한 최소 2 h 이상의 분석 시간이 요구되는 단점을 가지고 있다[13].

ELISA의 단점을 극복하기 위해, 면역 크로마토그래피 분석법이 최근 개발되었으며[8], 이 기법은 항원-항체간의 반응 특이성을 기초로 하여, 항체에 대한 결합력이 높은 니트로 셀룰로오스 멤브레인에 항체를 고정화시키고, 다공성 멤브레인을 통한 모세관현상에 의해 수용액상 시료 흐름을 유도하여 분석물질인 항원과 결합된 항체의 이동을 일으킨다[20,21]. 이 분석법은 헥산을 이용하는 방법과 달리 시료의 증폭단계가 없기 때문에 효소, 나노입자, 리포솜 등의 표지 물질을 수용체 프로브에 결합시켜 탐지 능력을 향상시키는 방법이 개발되고 있다[22-24]. 이 중 효소표지에 의한 신호증폭방법은 발색 또는 화학발광반응을 유도하여 보다 신속하고 정확한 분석을 가능하게 하도록 개발되고 있다[25]. 소량의 시료 요구량, 휴대성, 비용대비 높은 성능, 검사결과를 육안으로 10 min 내에 확인할 수 있는 등의 장점을 가지고 있다[21,26].

본 연구에서는, 면역 크로마토그래피 분석법과 ELISA를 혼합한 측정 기법을 이용하여 식중독 관련 병원성 미생물인 *S. aureus*를 신속하게 검출할 수 있는 면역스트립을 제작하고 이를 이용하여 시료 중 *S. aureus*의 분석을 수행하고자 하였다.

2. 실 험

2.1. 시약 및 재료

S. aureus (KCCM 41294)는 한국미생물보존센터에서 구입하여 사용하였다. 포획(capture) 항체로 *S. aureus*에 반응성을 가지는 다클론항체(ab20976), 탐지(detection) 항체로 *S. aureus*에 반응 특이성을 가지는 horseradish peroxidase (HRP)가 중합된 다클론항체(ab20425), control 신호발생을 위해 rabbit IgG에 특이적 반응성을 가지는 다클론항체(ab31193)는 Abcam plc. Ltd. (Cambridge, UK)에서 구입하여 사용하였다.

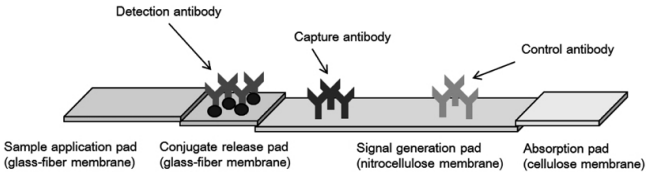


Figure 1. Configuration scheme of immunochromatographic strip.

스트립 제작을 위한 멤브레인으로는 니트로셀룰로오스 멤브레인(10 μm pore size, CNPE-SN12), 셀룰로오스 멤브레인(AP045), 두 종류의 유리섬유 멤브레인(PT-R5와 GFB-R4)을 Advanced Microdevices Pvt. Ltd. (Ambala, India)에서 구입하여 사용하였다. 5% casein 용액(C4765), ascorbic acid (A2343), trehalose 용액(T5251), 혈청알부민(BSA, B4782)과 Tween 20 (P1379) 등의 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HRP 반응을 위한 발색기질인 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidene (TMB) 용액은 BioFX laboratories (Owings Mills, MD, USA) 제품을 사용하였다.

2.2. 면역 크로마토그래피 스트립 제작

신호발생패드는 니트로셀룰로오스 멤브레인(0.4 cm × 2.5 cm)을 사용하였고, 1차 면역복합체와 포획항체와의 면역반응으로 발색측정신호를 일으키는 영역이다. 1 mg/mL의 포획항체용액은 신호발생패드 아래에서부터 1 cm에 위치한 곳에 1 μL를 분주하여 그 위치에 고정화시켰다. 면역센서 스트립의 작동여부를 확인하기 위한 control 신호발생을 위하여 0.1 mg/mL 농도의 control 다클론항체를 멤브레인 아래에서 1.7 cm에 위치한 곳에 1 μL 분주한 후, 37 ℃ 배양기에서 1 h 동안 배양하여 고정화시켰다.

유리섬유 멤브레인(0.4 cm × 0.5 cm)으로 이루어진 중합체패드에는 HRP가 중합된 탐지항체를 분주하여 잔류하게 함으로써 시료 내의 *S. aureus*와 1차 면역복합체를 형성하게 되는 곳이다. 분주를 위한 탐지항체용액은 탐지항체, 40% trehalose 용액, 40 mM ascorbic acid와 5% casein 용액을 혼합하여 제조하였다. 준비된 탐지항체용액은 유리섬유 멤브레인에 일정량을 흡수시키고 55 ℃에서 30 min 간 건조하여 준비하였다.

스트립 센서는 범용 OHP 필름(0.4 cm × 5.7 cm)을 기판으로 사용하였으며, 신호발생 패드는 필름 하단에서 1.4 cm 위에 위치하도록 고정하였다. 중합체 패드는 신호발생 패드 아래 쪽으로 0.1~0.2 cm 겹쳐 부착하고, 모세관 현상을 유도하여 시료의 흐름을 유지시키는 역할을 하는 흡수 패드인 셀룰로오스 멤브레인(0.4 cm × 1.5 cm)은 신호발생 패드와 0.1~0.2 cm 겹쳐서 필름의 가장 상단에 위치시켰다. 유리섬유 멤브레인을 사용한 시료주입 패드(0.4 cm × 1.5 cm)는 중합체 패드와 0.1~0.2 cm 겹치도록 필름 가장 하단에 고정하였다. Figure 1에 완성된 스트립 센서의 구성 개략도를 나타내었다.

2.3. 면역스트립을 이용한 분석

Figure 2는 면역스트립을 이용한 분석의 전체적인 흐름을 나타낸다. *S. aureus*를 포함한 시료용액 100 μL가 담긴 시험관에 시료주입패드가 잠기도록 면역스트립을 놓는다. 스트립을 따라 시료 주입패드에서 흡수 패드 방향으로 흐르는 시료에 존재하는 *S. aureus*는 항원-항체 반응에 의해 중합체패드의 탐지항체와 1차 면역복합체를 형성한다. 그 후, 신호발생 패드에서 포획항체와 2차 면역복합체를 형성하고, 반응하지 않은 항체는 control 항체와 반응한다(Figure 2(a)). 15~20 min 간 면역반응을 위한 시료흐름이 완료된 후, 효소기질 주입 패드인 유

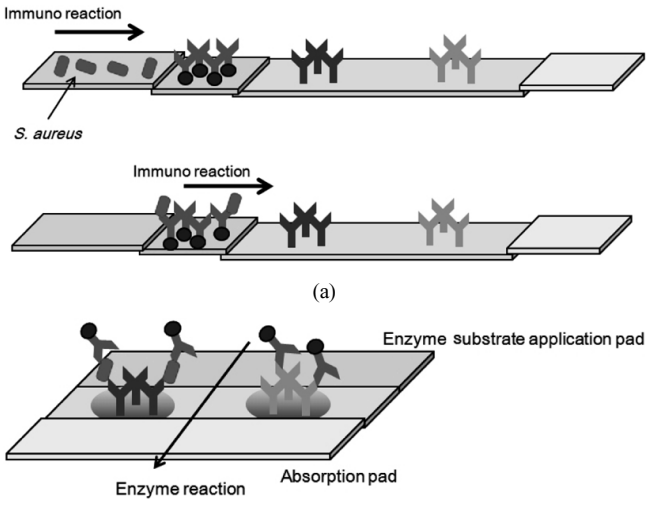


Figure 2. Scheme of analytical procedure of immunostrip sensor. (a) Immuno-reation and (b) enzyme reaction.

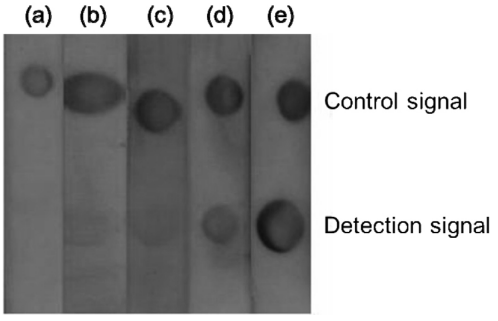


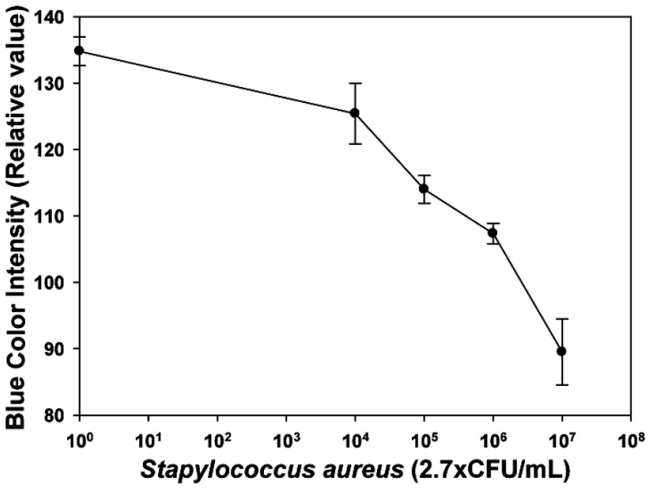
Figure 3. Images of signal change with concentration of *S. aureus*. (a) Control sample (without *S. aureus*), (b) 2.7 × 10^4 CFU/mL, (c) 2.7 × 10^5 CFU/mL, (d) 2.7 × 10^6 CFU/mL, and (e) 2.7 × 10^7 CFU/mL.

리섬유 멤브레인(GFB-R4, 1.2 cm × 1.5 cm)과 셀룰로오스 멤브레인 (1.2 cm × 1.5 cm) 흡수패드를 신호발생 패드의 양쪽 측면으로 0.1 cm 씩 겹쳐 고정시켰다. 효소반응의 기질용액인 TMB 용액을 기질주입 패드에 분주한 후 흡수패드로의 흐름에 의한 효소반응을 충분히 일으키도록 5~10 min 간 방치한다(Figure 2(b)). 효소 반응에 의해 생성된 발색 신호는 육안으로 정성적 측정이 가능하였으며, 정량적 분석을 위해 디지털 카메라를 이용하여 이미지를 얻은 후, 자체 제작된 이미지분석 소프트웨어를 이용하여 발색신호를 RGB 삼원색의 세기로 수치화하였다.

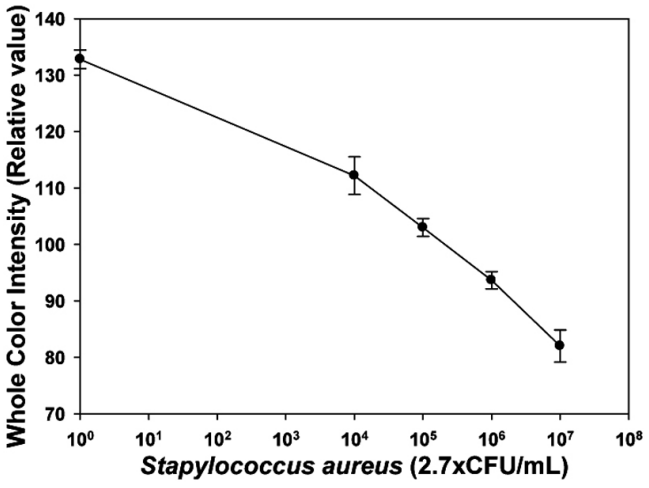
3. 결과 및 고찰

3.1. 면역스트립의 성능

시료 중 *S. aureus* 농도에 따라 얻어진 발색신호의 발색 세기변화는 Figure 3과 같이 얻을 수 있었다. 이미지 하단의 탐지 발색신호는 시료 안에 존재하는 *S. aureus*와 면역반응을 일으킨 HRP 중합 탐지항체의 발색 효소반응에 의해 생성된 것이고, 상단의 control 발색신호는 *S. aureus*와 반응하지 못한 HRP 중합 탐지항체의 발색 효소반응에 의해 생성된 것으로 스트립의 정상작동 여부를 확인하기 위한 것이다. 최적의 분석 조건 하에서, 사용된 *S. aureus* 시료의 농도 범위는 2.7 × 10^4~2.7 × 10^7 CFU/mL였으며, 농도가 증가함에 비례하여 더 짙은 발색신호를 정성적으로 관찰할 수 있었다.



(a)



(b)

Figure 4. Calibration curve of colorimetric signal change with concentration of *S. aureus*. (a) Blue color intensity and (b) Whole color intensity.

제안된 면역스트립의 정량적 분석성능을 평가하기 위하여, 디지털 카메라로 얻어진 이미지는 자체 제작된 이미지 분석 소프트웨어를 이용하여 해석하였다. 이미지의 발색 부위는 색도는 RGB 삼원색으로 분리하여, blue색의 크기를 수치화하였다. 각 원색의 세기는 0~255 사이의 값으로 상대적인 세기를 표현하였으며, 수치는 색의 짙음에 반비례하므로 색이 짙을수록 상대적 수치는 작은 값을 나타낸다. 시료의 다양한 *S. aureus* 농도범위에서의 수치화 된 값들을 그래프화 하였고, 얻어진 검량곡선은 Figure 4(a)와 같다. 각각의 삼원색의 수치화 된 세기를 평균하여 전체 발색 세기를 농도변화에 따라 그래프로 표현한 결과는 Figure 4(b)와 같다. 검량곡선의 선형성과 표준편차를 고려하였을 때, 전체 발색세기를 이용한 검량곡선이 유용한 것으로 판단되었다. 개발된 면역스트립은 *S. aureus*를 정성적 및 정량적으로 분석하는데 유용하며, 이미지 분석방법에 의한 정량적 분석의 유효성을 확인할 수 있었다.

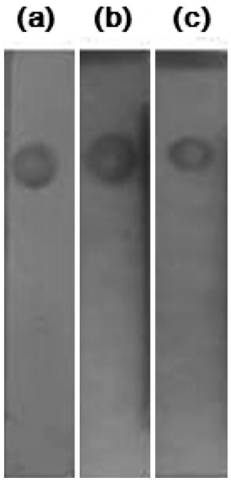


Figure 5. Image of experimental result for cross reaction. (a) *Salmonella typhimurium*, (b) *Escherichia coli* O157:H7, (c) *Listeria monocytogenes*.

3.2. 면역스트립의 교차 반응성 검증

식품의 경우, *S. aureus*뿐만 아니라 다양한 병원성 미생물에 의한 오염 가능성이 있기 때문에, *S. aureus* 검출용 면역스트립의 타 미생물 군과의 반응 특이성이 없음을 검증하는 교차반응성의 확인은 매우 중요하다. 본 연구에서는 교차반응성을 검증하기 위한 실험을 수행하였으며, 교차반응성을 관찰하기 위해 실험에 사용된 병원성 미생물은 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytegenes*로 모두 식중독을 유발할 수 있는 병원성 미생물이다. *S. aureus* 측정을 위해 제작된 면역스트립에 다른 종류의 병원성 미생물이 존재하는 시료용액을 흘려주어 반응시킨 후, 발색신호의 발생여부를 관찰하였다(Figure 5). 교차반응성 실험 결과를 분석해 보면 사용된 세 종류의 병원성 미생물은 *S. aureus*와 특이적 결합을 하는 포획항체, 탐지항체와 반응하지 않으므로 제작된 면역스트립에 대한 positive false 신호의 발생이 일어나지 않는 것을 확인하였다. 따라서 개발된 면역스트립은 다양한 병원성 미생물의 존재 가능성이 있는 시료에서 *S. aureus*에 대해서만 선택적 특이성을 가지고 분석할 수 있음을 확인하였다.

4. 결 론

본 연구에서는 ELISA와 면역크로마토그래피 분석법을 이용하여 *S. aureus* 측정용 면역스트립을 개발하였다. 개발된 분석방법은 *S. aureus*의 정성적, 정량적 검출에 성공적으로 적용되었다. HRP에 의한 발색 효소반응으로 센서의 민감도가 향상되어, *S. aureus*의 측정 가능 범위는 $2.7 \times 10^4 \sim 2.7 \times 10^7$ CFU/mL 였으며, 30 min 이내 분석이 가능하였다. 개발된 분석 시스템은 사용하기 쉽고, 저가의 제조비용, 육안으로 신호의 정성분석이 가능하다는 장점을 가진다. 개발된 센서시스템은 식품산업, 환경, 의학 분야에서 간단한 분석방법의 개발을 위해 쉽게 응용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. H. J. Lee, *Korean Journal of Veterinary Public Health*, **32**, 81 (2008).
2. J.-M. Chang, and T. J. Fang, *Food Microbiology*, **24**, 745 (2007).
3. L. Yang and R. Bashir, *Biotechnology Advances*, **26**, 135 (2008).
4. S. G. Park, Y. O. Hwang, J. H. Jung, and K. M. Lee, *J. Food Hyg. Saf.*, **16**, 159 (2001).
5. J.-H. Lee, K.-Y. Song, J.-Y. Hyeon, I.-G. Hwang, H.-S. Kwak, J.-A Han, Y.-H. Chung, and K.-H Seo, *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **30**, 410 (2010).
6. J. Y. Moon, E. J. Lee, and Y. B. Kim, *Journal of Bacteriology and Virology*, **34**, 91 (2004).
7. V. L. M. Rall, F. P. Vieira, R. Rall, R. L. Vieitis, Fernandes Jr., J. M. G. Candeias, K. F. G. Cardoso, and J. P. Araujo Jr., *Veterinary Microbiology*, **132**, 408 (2008).
8. S.-H. Huang, *Sensors and Actuators B*, **127**, 335 (2007).
9. E. C. Alocilja and S. M. Radke, *Biosensors and Bioelectronics*, **18**, 841 (2003).
10. O. Lazcka, F. J. D. Campo, and F. X. Munoz, *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 1205 (2007).
11. A. D. Taylor, J. Ladd, Q. Yu, S. C. J. Homola, and S. Jiang, *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 752 (2006).
12. P. D. Skottrup, M. Nicolaisen, and A. F. Justesen, *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 339 (2008).
13. S.-H. Paek, C.-W. Lee, C.-S. Lee, and S.-H. Yook, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 42 (1996).
14. S. H. Kim, W. S. Jung, and S.-H. Paek, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 190 (2003).
15. S. Ko and S. A. Grant, *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 1283 (2006).
16. J.-K. Park, *The Magazine of the Institute of Electronics Engineers of Korea*, **28**, 56 (2001).
17. J. H. Lee, S. S. Yang, B. W. Kim, S. J. Sim, H. Chae, and H. C. Yoon, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **313-314**, 509 (2008).
18. D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, and E. Wilkins, *Biosensor and Bioelectronics*, **14**, 599 (1999).
19. C.-H Chang and S.-J. Kim, *Korean J. Vet. Res.*, **29**, 503 (1989).
20. C.-H. Yoon, J.-H. Cho, H.-I. Oh, M.-J. Kim, C.-W. Lee, J.-W. Choi, and S.-H. Peak, *Biosensors and Bioelectronics*, **19**, 289 (2003).
21. K. Inoue, P. Ferrante, Y. Hirano, T. Yasukawa, H. Shiku, and T. Matsue, *Talanta*, **73**, 886 (2007).
22. J. A. Ho, H.-W. Hsu, and M.-R. Huang, *Analytical Biochemistry*, **330**, 342 (2004).
23. M. Varshney, Y. Li, B. Srinivasan, and S. Tung, *Sensors and Actuators B*, **128**, 99 (2007).
24. S.-M. Han, 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, *Analytica Chemica Acta*, **587**, 1 (2007).
25. C. Fernandez-Sanchez, C. J. Mcneil, K. Rawson, O. Nilsson, H. Y. Leung, and V. Gnanapragasam, *Journal of Immunological Methods*, **307**, 1 (2005).
26. J.-G. Choi, W.-B. Shin, J.-H. Je, J.-Y. Kim, K.-H. Lee, M.-G. Kim, S.-D. Ha, K.-S. Kim, K.-Y. Kim, C.-H. Kim, and D.-H. Chung, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **39**, 299 (2007).