CNU Journal of Agricultural Science Vol. 40, No. 2, pp. 139-146, June 2013
DOI: http://dx.doi.org/10.7744/cnujas.2013.40.2.139

# 황색포도상구균 신속 검출용 간이 진단키트

김기영* · 박샛별 · 문지혜 · 이상대 · 이새롬 · 장윤정

국립농업과학원 농업공학부

# Rapid Detection Kit for *Staphylococcus aureus*

**Gi-Young Kim*, Saet-Byeol Park, Ji-Hea Moon, Sang-Dae Lee, Sea-Rom Lee, Youn-Jung Jang**

*Department of Agricultural Engineering, National Academy of Agricultural Sciences, Suwon 442-707, Korea*

Received on 1 April 2013, revised on 14 May 2013, accepted on 15 May 2013

**Abstract :** This study was performed to develop a rapid test kit for pathogenic *Staphylococcus* in various samples. The rapid detection kit has been fabricated based on nitrocellulose lateral-flow strip. Colloidal gold and *Staphylococcus* antibodies were used as a tag and a receptor, respectively. Manually spotted *Staphylococcus* antibody and anti-mouse antibody on the surface of nitrocellulose membrane were used as test and control lines, respectively. Feasibility of the rapid kit to detect *Staphylococcus* aureus in samples were evaluated. The intensity of the color of the test line started to increase with the samples in which higher concentration of the cells were contained. The sensitivity of the sensor was $10^6$ cfu/mL *Staphylococcus* spiked in PBS. Also, the rapid test kit could detect $10^5$ cfu/mL of *Staphylococcus* in chicken meat extract.

***Key words*** **:** Rapid test kit, *Staphylococcus aureus*, Lateral flow

## I. 서 론

*Staphylococcus aureus*는 포도송이 모양의 구균으로 곡류 및 가공품, 복합조리식품, 유제품 등에서 많이 발생하는 대표적인 독소형 식중독균이다. *Staphylococcus aureus*에 의한 식중독은 내열성 장독소(enterotoxin)에 의한 식중독이기 때문에 다른 식중독에 비해 잠복기가 매우 짧은 특징이 있으며, 메스꺼움, 구토, 복통, 설사 등의 증상을 동반한다(MFDS 2013a). 식품의약품안전청에서 발표한 2002~2011년 사이 우리나라에서 발생한 식중독 사고의 원인물질 통계자료에 따르면, *Staphylococcus aureus*에 의한 식중독 발생건수가 노로바이러스, 병원성 대장균, 살모넬라균 다음으로 높은 것으로 나타났다(MFDS 2013b).

*Staphylococcus aureus*는 제조과정에서 조리식품, 김밥, 샌드위치 등의 즉석 섭취식품에서 빈번히 발견되고 있으며, 식품안전성 향상을 위한 노력에도 불구하고 황색포도상구균에 의한 식중독 사고가 지속되고 있다. *Staphylococcus aureus*를 검출하기 위한 전통적인 방법은 증균배양, 분리배양, 그리고 확인시험에 3일 이상의 분석시간이 소요되며, 이 때문에 식중독 사고 발생 이후 식중독 원인균을 분리·동정할 목적으로 사용될 뿐 조기에 세균을 검출하여 식중독을 차단하는 것은 매우 어렵다. 식생활 패턴의 변화에 기인한 대량급식 및 외식의 증가와 가공 농산물의 대규모 유통으로 인한 대형 식중독 사고의 방지와 오염 농산물의 회수에 따른 막대한 비용의 낭비를 막기 위해서는 기존 분석방법의 단점을 보완할 수 있는 신속한 식중독균 검출기술의 개발이 시급하다.

식중독균 신속 검출을 가능케 하는 기술로는 의료용으로 상용화된 측방유동 면역크로마토 방법을 이용한 간이 진단키트기술이 있다. 측방유동 면역크로마토그래피 방법을 이용한 간이 진단키트는 사용이 쉽고 신속하게 결과를 분석할 수 있는 장점 때문에 임신 진단이나 혈당 측정과 같은 현장검사용 목적으로 널리 사용되고 있다. 측방유동 간이 진단키트는 액상의 시료가 다공질의 니트로셀룰로오스 막을 모세관 힘에 의해 이동하는 현상을 이용한다. 분석물질에 특이적으로 반응하는 항체를 니트로셀룰로오스 막 위에

***Corresponding author:** Tel: +82-31-290-1899
E-mail address: giyoung@korea.kr

고정시키고, 또 다른 항체를 색 변화를 나타내는 입자에 결합시킨 다음 분석물질과 반응하도록 하면 분석물질과 반응한 색입자가 니트로셀룰로오스 막의 항체 띠에 포획된다. 시료에 검출하고자하는 분석물질이 들어 있으면, 항체 띠에 포획된 분석물질과 이에 결합되어 있는 색 입자로 인해 짙은 색의 선이 나타나 분석물질의 포함 여부를 알 수 있게 된다. 측방유동 간이 진단키트는 일정 기준 이상의 분석물질이 포함되어 있는지를 분석하는 정성분석뿐만 아니라, 색의 강도를 측정할 수 있는 광학측정기기를 이용할 경우 정량분석도 가능하다.

측방유동 간이 진단키트는 분석비용이 저렴하고 값비싼 측정기기나 전문적인 인력을 필요로 하지 않기 때문에 반려동물의 건강(Oh et al., 2006; Kang et al., 2007), 식품안전성(Sithigorngul et al., 2007; Hossain et al., 2009), 가축의 질병(Cui et al., 2008), 환경 오염(Tang et al., 2010) 등을 신속하게 검사하는 방법으로도 개발되고 있다.

농식품 분야에서는 Hossain 등(2009)이 우유나 사과 주스 등의 식품에 들어있는 말라티온과 파라옥손 같은 잔류농약을 5분 이내에 검사할 수 있는 간이 진단키트를 개발한 바 있다. Martín-Hernández 등(2009)은 가짜 치즈에 들어가는 응유효소 유청을 기존검사 방법인 고성능 액체크로마토그래피를 이용한 결과와 유사한 성능으로 검사할 수 있는 측방유동 간이 진단키트를 개발하였다. 또한, 식중독 원인물질인 살모넬라균을 신속하게 검사할 수 있는 진단키트 (Kim et al., 2011; Park et al., 2012)와 곰팡이 독소인 Aflatoxin B1을 경쟁법을 이용하여 검사하는 진단키트(Moon et al., 2012)가 개발된 바 있다.

본 연구는 식중독 사고의 주요 원인균인 *Staphylococcus aureus*의 오염 여부를 신속하게 진단할 수 있는 측방유동 면역방법 기반의 간이 진단키트를 개발하기 위하여 수행되었다. 간이 진단키트는 니트로셀룰로오스 막과 항체를 이용하여 제작하였으며, 키트의 검출 성능은 표준버퍼 또는 식품 추출물에 오염된 *Staphylococcus aureus*을 이용하여 검증하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 측방유동 간이 진단키트 제작

식중독균 신속검출을 위한 측방유동 간이 진단키트는 네 개의 다공질 막 또는 패드로 이루어진다(Fig. 1). 네 개의 막은 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 흡수패드이며, 결합패드와 니트로셀룰로오스 막은 항체와 금입자 결합물, 분석 물질, 시료 등의 이동이 원활하도록 버퍼 등으로 미리 처리한다. 결합패드는 시료의 식중독균과 반응하여 색 변화 등으로 확인이 가능한 항체-색 입자의 결합물을 포함한다. 니트로셀룰로오스 막은 시료의 식중독균을 포획하는 항체로 이루어진 검사점과 실험이 정상적으로 수행되었는지를 나타내는 컨트롤점을 포함한다. 흡수패드는 니트로셀룰로오스 막을 통과하여 흘러온 시료의 저장소 역할을 한다.

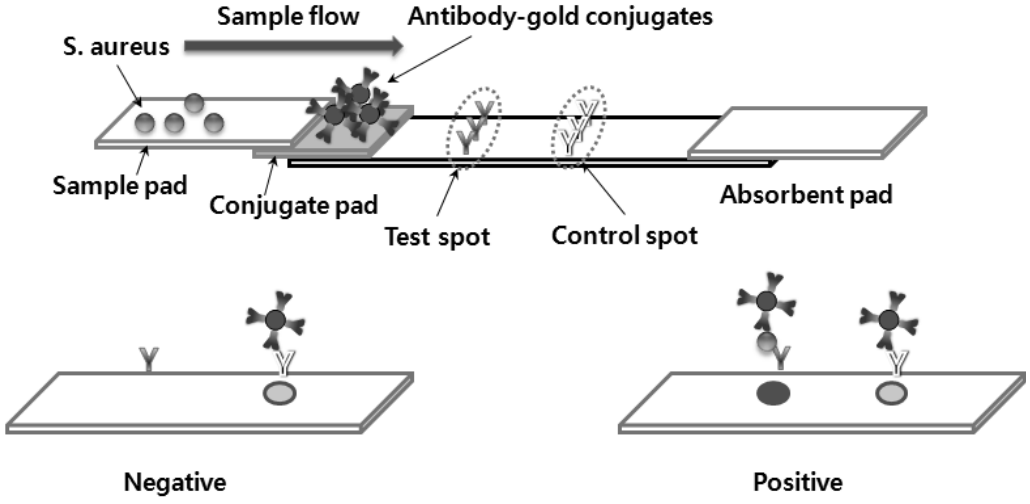


**Fig. 1.** Schematic diagram of a rapid detection kit for *Staphylococcus aureus*.

간이 진단키트를 이용한 식중독균 검사 결과는 Fig. 1의 아래와 같이 해석된다. 검사점과 컨트롤점 모두 짙은 색의 점이 형성되면 시료에 검출한계 이상의 식중독균이 포함된 것으로 진단되며, 컨트롤점만 짙은 색이 형성되면 시료에 포함된 식중독균의 농도가 낮거나 없는 것으로 진단된다. 검사점과 컨트롤점 어느 곳에서도 짙은 색이 형성되지 않으면 항원·항체 결합 실패 등의 이유로 실험이 잘못된 것으로 진단된다.

간이 진단키트는 플라스틱 지지막 위에 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 흡수패드를 붙여서 제작하였다. 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 흡수패드는 시료 용액이 끊이지 않고 흐를 수 있도록 각각의 끝부분이 서로 3 mm씩 겹치도록 조립하였다. 조립된 키트는 길이 6 cm, 폭 5 mm로 절단하여 냉장 보관한 뒤 이후 실험에 사용하였다.

니트로셀룰로오스 막의 검사점과 컨트롤점은 금입자에 결합시킨 항체와 다른 종류의 *Staphylococcus aureus* 항체와 금입자에 결합된 항체를 포획하는 anti-mouse 항체를 각각 도포한 다음 37℃ 에서 1시간 건조하여 형성시켰다. *Staphylococcus aureus*의 포획을 위한 검사점은 결합패드의 가장자리에서 1 cm 떨어진 니트로셀룰로오스 막의 중심선 근처에 위치하며, 마이크로피펫을 이용해 1 μL의 *Staphylococcus aureus* 항체를 떨어뜨리는 방식으로 제작하였다. *Staphylococcus aureus* 항체는 표준인산버퍼에 용해된 1 mg/mL 농도의 것을 사용하였다. 컨트롤점은 표준인산버퍼 용액에 1 mg/mL 농도로 용해시킨 anti-mouse 항체 용액을 검사점에서 흡수패드 쪽으로 5 mm 떨어진 위치에 도포하여 제작하였다.

## 2. 간이 진단키트 구성부의 전처리

간이 진단키트를 이용한 *Staphylococcus aureus* 검출 시 시료 및 시약의 원활한 유동을 위하여 각 구성부의 전처리를 수행하였다. 시료패드와 결합패드의 전처리는 2% BSA (Bovine serum albumin) 및 10% 자당(Sucrose)이 첨가된 0.2 M 표준인산버퍼(pH 7.4)에 패드를 담가 버퍼용액을 충분히 흡수시킨 다음 37℃에서 4시간 건조시키는 방법으로 수행하였다. 니트로셀룰로오스 막의 전처리는 표준인산버퍼(pH 7.4)에 막을 담갔다가 꺼내어 37℃ 에서 1시간 건조 하는 방법을 사용하였다. 전처리를 거친 결합패드는 다시 항체-금입자 결합물이 녹아있는 용액에 담가 패드에 항체-금입자 결합물이 포함되도록 하였다. 결합패드에 항체-금입자 용액을 처리한 다음 건조시킬 때 농도 불균형으로 항체-금입자 결합물이 모서리에 집중되는 효과를 줄이기 위해 37℃ 에서 1시간 이내에 신속히 건조하였다.

## 3. 금입자-항체 결합을 위한 최적 조건 구명

식중독균이 검출되었을 때 표시를 위해 사용하는 색입자로는 콜로이드 형태의 40 nm 금입자를 사용하였다. 금입자와 항체의 결합은 금입자 제조사에서 제공된 결합 방법을 따랐으며, 금입자와 항체의 최적 결합을 위해 반응 버퍼의 적절한 pH 값은 실험을 통해 구명한 다음 이후 검출 실험에 사용하였다.

금입자와 항체의 결합과정은 우선 10개의 시험관에 금입자 현탁액을 잘 흔들어준 다음 0.5 mL씩 옮겨 담는다. 그다음 시험관에 1~10까지 표지를 붙이고 제조사로부터 제공되는 시약들을 조합하여 pH값이 5.4에서 10.1까지 10단계가 되도록 적정한다. 서로 다른 pH값의 버퍼가 담겨있는 10개의 시험관에 1 mg/mL 농도의 항체 14 μL를 한 방울씩 천천히 첨가하고 저속의 교반기를 이용하여 교반한 다음 30분간 실온에서 반응시킨다. 금입자와 항체의 정상적인 결합은 혼합액이 진보라색이나 검은색으로 변하지 않고 반응 초기의 색을 유지하는 경우이며, 이때의 pH값을 적정 pH값으로 하여 이후 실험에 이용하였다. 최종적으로 50 μL 안정화 시약을 첨가하여 결합반응을 종료시켰다.

## 4. 시약 및 박테리아

식중독균 검출 실험은 식중독 사고 발생 빈도가 높은 *Staphylococcus aureus*을 대상으로 하여 수행하였다. *Staphylococcus aureus* 균주는 한국미생물보존센터 KCCM (Korean Culture Center of Microorganisma, Korea)에서 분양받은 KCCM 12103를 사용하였으며, 세균 군락을 Brain Heart Infusion (BHI)(Difco, USA) 배지에 계대 배양하여 이용하였다. *Staphylococcus aureus* 균수는 표준인산버퍼를 사용하여 단계적으로 희석 한 후 Mannitol Salt agar(Difco, USA) 배지를 사용하여 표준평판법으로 측정하였다. 배양 시 조건은 액체배양의 경우 37℃에서 18~24시간 동안, 평판배양의 경우 37℃에서 24시간 배양하였다.

검사 결과를 색으로 나타내는 금입자는 40 nm의 직경을 갖는 것(Gold-in-a-box, Bioassay works, USA)을, 이 금입자와 결합되는 표지항체와 *Staphylococcus aureus* 포획을 위한 검사점의 *Staphylococcus aureus* 항체는 Abcam(Cambridge, UK), Virostat Inc(ME, USA), Fitzgerald Industries International (MA, USA) 사로부터 구입하여 사용하였다. 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 흡수패드는 Millipore사(Hi-Flow Plus, MA, USA), 컨트롤 점 제작을 위한 anti-mouse 항체는 KPL사(MD, USA)와, 그 외 PBS 등의 시약은 Sigma사(MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 5. *Staphylococcus aureus* 검출 실험방법

간이 진단키트를 이용한 *Staphylococcus aureus* 검출 실험은 *Staphylococcus aureus*을 표준인산용액에 $10^4$~$10^8$CFU/mL로 희석시킨 시료를 이용하여 수행하였다. 실제 농식품 시료에 대한 간이 진단키트의 적용 가능성은 닭고기 세척 버퍼에 $10^4$~$10^8$CFU/mL의 농도로 접종한 *Staphylococcus aureus* 시료를 이용하여 수행하였다. 닭고기 세척 버퍼는 시중에서 구입한 닭 가슴살 부위 25 g을 225 mL의 표준인산버퍼에 넣고 교반하는 방법으로 제조하였다. 또한, *Staphylococcus aureus* 검출용 간이 진단키트의 다른 세균에 대한 선택성은 다른 종의 식중독균인 *Campylobacter jejuni* $10^9$CFU/ml을 이용하여 조사하였으며, 키트의 검출 성능 향상을 위하여 키트의 폭을 2 mm로 줄여서 검출 실험을 수행하였다.

간이 진단키트의 *Staphylococcus aureus* 검출성능 향상 가능성은 균일한 조명이 가능하도록 자체 제작한 영상획득 시스템을 이용하여 조사하였다. 영상획득 시스템의 CCD 카메라를 이용하여 검출 실험에 사용된 간이 진단키트의 영상을 획득한 다음 색변화가 발생한 검사점의 밝기를 영상처리 프로그램(Image Tool 3.0, The University of Texas, USA)을 이용하여 측정하였다. 밝기 측정은 검사점에서 가장 진한 색변화를 나타내는 부위에 대하여 일정 면적의 평균값을 구하는 방법으로 수행하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 항체-금입자 결합을 위한 버퍼의 최적 pH값 선정

식중독균의 검출 여부 표시를 위한 금입자와 항체의 결합은 버퍼의 pH 값에 크게 영향을 받기 때문에, 금입자와 항체의 최적 결합을 위해 반응 버퍼의 적절한 pH 값을 실험을 통해 구명하였다. 항체-금입자 결합을 위한 최적 pH 선정을 위한 실험 결과는 Fig. 2와 같이 결합 단계에서 금입자가 항체와 정상적으로 결합할 경우 혼합용액의 색변화가 없었으나, 항체의 농도가 적어 불완전 결합한 금입자는 응집되어 처음의 붉은색에서 짙은 보라색 또는 검은색으로 변하였다. 보라색으로 변색된 항체-금입자 혼합용액은 항체의 등전점에서 금입자 끼리의 교차결합을 유도하여 서로 응집됨으로써 *Staphylococcus aureus*과 반응할 수 없게 되어 면역분석에 사용하기에 부적합하였다. *Staphylococcus aureus* 항체 (Ab20920, Abcam)의 최적 pH값 선정 실험에서 육안으로 혼합용액의 색변화를 관찰한 결과 pH 5.4~8.4 용액에서는 색변화가 일어나지 않고 응집현상도 없었지만, pH 8.8~10.1 용액에서는 금입자가 응집하여 푸른색으로 변했다.

이후 실험에서는 색변화를 보이지 않은 pH 값 중에서 pH 6.6을 이용해 항체와 금입자를 결합하는데 사용하였다.

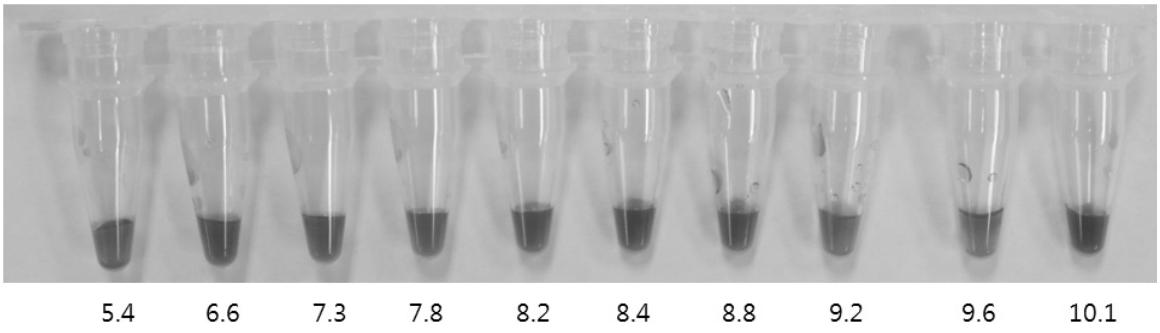


**Fig. 2.** Images of titrated gold particle and antibody buffer solutions from pH 5.5, to 10.1.

### 2. 간이 진단키트의 최적 항체 조합 선정

간이 진단키트의 검출 성능은 사용하는 항체에 따라 크게 영향을 받는다. 예비 실험 결과 표지항체를 Abcam사의 ab20920, 그리고 포획항체를 Abcam사의 ab68954로 하였을 때 *Staphylococcus aureus*이 검출되지 않았다. *Staphylococcus aureus* 진단키트 제작을 위한 최적의 항체 조합을 선정하기 위하여 Table 1과 같은 항체 조합으로 진단키트를 제작한 다음 표준인산용액에 $10^9$CFU/mL의 농도로 희석된 *Staphylococcus aureus* 시료를 이용하여 검출 실험을 수행하였다. 실험결과 18가지 항체 조합 중 C 조합 (표지항체 ab20920, 포획항체 ab20002) 에서만 *Staphylococcus aureus*이 검출되었다. 이후 실험에서는 이들 항체를 이용하여 제작한 진단키트를 이용하여 성능 검증 실험을 수행하였다.

### 3. 간이 진단키트를 이용한 표준인산버퍼에서의 황색포도상구균 검출

제작된 간이 진단키트의 *Staphylococcus aureus* 검출 성능은 농도가 다른 *Staphylococcus aureus*($10^4$~$10^8$CFU/mL)이 포함된 표준인산버퍼 시료를 이용하여 조사하였다. 간이 진단키트를 이용한 *Staphylococcus aureus* 검출은 100 μL의 시료 용액을 시료패드에 주입하는 방식으로 수행하였다. 시료패드에 시료가 주입되면 이 시료용액은 모세관현상에 의해 결합패드로 이동하여 결합패드에 건조된 상태로 포함되어 있는 *Staphylococcus aureus* 항체-금입자 결합을 수화시킨다. 시료에 포함되어 있는 *Staphylococcus aureus*은 황색포도상구균 항체-금입자 결합물과 항원-항체 반응을 일으켜 *Staphylococcus aureus*-*Staphylococcus aureus* 항체-금입자의 결합물을 형성한다. 이 결합물은 모세관현상에 의해 계속 이동하여 결합패드를 빠져나와 니트로셀룰로오스 막으로 흐른다. 이 결합물이 검사점에 이르면 검사점의 또 다른 종류의 *Staphylococcus aureus* 항체에 포획되어 1차 항체-*Staphylococcus aureus*-2차 항체-금입자의 고리를 형성하고, 금입자로 인해 육안으로 식별 가능한 붉은색 점이 형성되었다. 시료용액의 계속적인 이동에 따라 *Staphylococcus aureus*과 반응하지 않은 *Staphylococcus aureus* 항체-금입자는 컨트롤점 방향으로 계속 이동하였고, 컨트롤점의 anti-mouse 항체와 결합하여 또 하나의 붉은색 점을 생성하였다. 반응을 마친 시료

**Table 1.** Combinations of a nano-gold conjugated and a capture antibody for the rapid detection kit.

| | Antibody | |
|---|---|---|
| | Nano-gold conjugated | Capture |
| A | Abcam ab20920 | Abcam ab68954 |
| B | | Virostat 6881 |
| C | | Abcam ab20002 |
| D | | Abcam ab20976 |
| E | | Abcam ab35192 |
| F | | Abcam ab20920 |
| G | Fitzgerald 10-S30A | Abcam ab68954 |
| H | | Virostat 6881 |
| I | | Abcam ab20002 |
| J | | Abcam ab20976 |
| K | | Abcam ab35192 |
| L | | Abcam ab20920 |
| M | Abcam ab21028 | Abcam ab68954 |
| N | | Virostat 6881 |
| O | | Abcam ab20002 |
| P | | Abcam ab20976 |
| Q | | Abcam ab35192 |
| R | | Abcam ab20920 |

용액은 니트로셀룰로오스 막을 따라 흡수패드 쪽으로 이동하여 흡수패드에 저장되었다.

실험 결과 Fig. 3과 같이 *Staphylococcus aureus*의 농도 증가에 따라 검사점의 색이 짙어 졌으며, *Staphylococcus aureus*의 농도가 $10^8$CFU/mL일 때 가장 짙은 색을 나타내어 개발된 간이 진단키트가 효과적으로 *Staphylococcus aureus*을 검출하는 것으로 나타났다. 육안으로 관찰된 검출한계는 $10^6$CFU/mL인 것으로 조사되었다. 또한, *Campylobacter jejuni* 균을 반응시켰을 때 검사점에 색변화가 일어나지 않아 개발된 진단키트가 *Staphylococcus aureus* 균에만 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었다.

## 4. 간이 진단키트를 이용한 식품시료에서의 황색포도상구균 검출

간이 진단키트의 식품시료 적용 가능성을 조사하기 위하여, 닭고기 세척 버퍼에 $10^4$~$10^8$CFU/mL의 농도로 접종된 *Staphylococcus aureus*을 대상으로 검출 실험을 수행하였다. 닭고기 세척 버퍼를 이용한 간이 진단키트의 *Staphylococcus aureus* 검출 실험 결과도 표준인산버퍼에서의 *Staphylococcus aureus* 검출 실험과 마찬가지로, 세균의 농도 증가에 따라 시험선에 형성된 띠의 색이 짙어 졌으며, *Staphylococcus aureus*의 농도가 $10^8$CFU/mL일 때 가장 짙은 색을 나타내었다(Fig. 4). 닭고기 시료에 포함된 여러

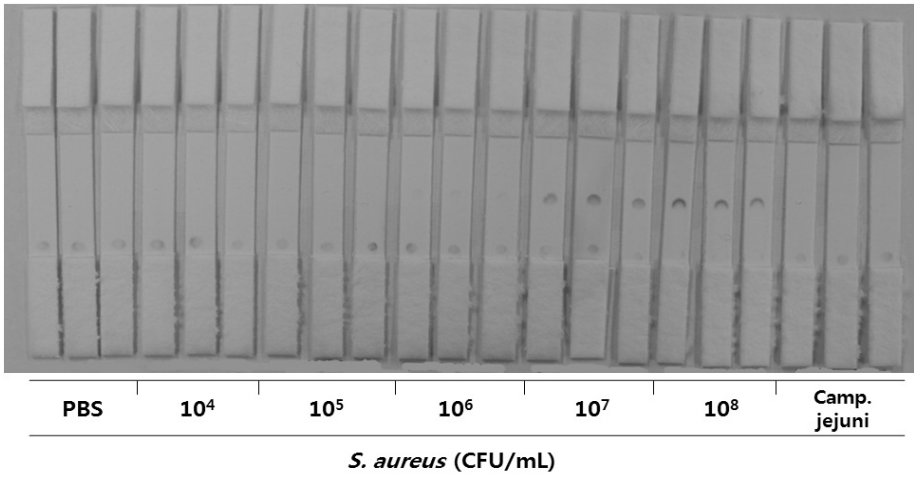


**Fig. 3.** Detection results of *Staphylococcus aureus* cells in PBS buffer with the rapid test kit. Concentrations of *Staphylococcus aureus* cells were 0~$10^8$CFU/mL and concentration of *Campylobacter jejuni* cells were $10^9$CFU/mL.

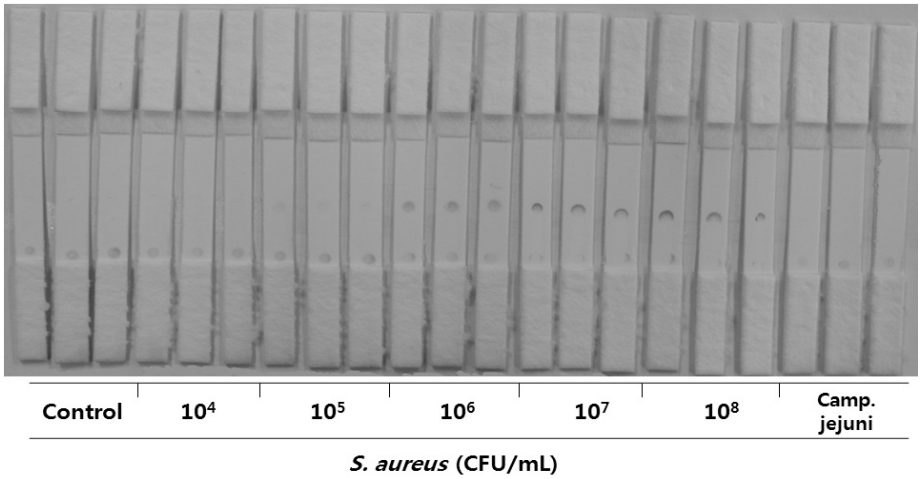


**Fig. 4.** Detection results of *Staphylococcus aureus* cells in chicken extract buffer with the rapid test kit. Concentrations of *Staphylococcus aureus* cells were 0~$10^8$CFU/mL and concentration of *Campylobacter jejuni* cells were $10^9$CFU/mL.

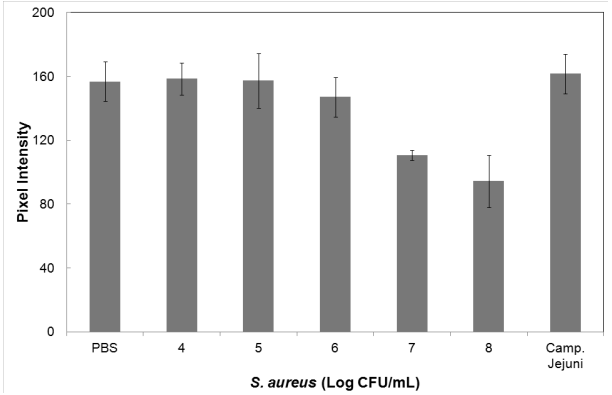


**Fig. 5.** Pixel intensity of *S. aureus* cells detected by the lateral flow rapid detection kit (PBS buffer).

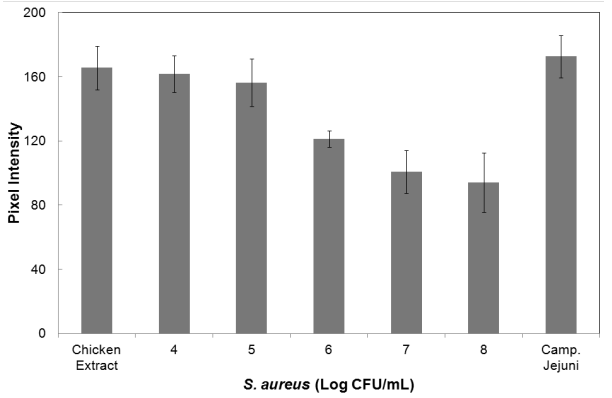


**Fig. 6.** Pixel intensity of *Staphylococcus aureus* cells detected by the lateral flow rapid detection kit (Chicken buffer).

가지 다른 물질들의 간섭으로 인한 검출 성능 저하는 나타나지 않았으며, 오히려 검출 신호가 더 선명하게 나타나는 것으로 조사되었다. 육안으로 확인한 닭고기 시료에 대한 진단키트의 *Staphylococcus aureus* 검출한계는 표준인산버퍼에서의 검출한계보다 우수한 $10^5$CFU/mL였다. 표준인산버퍼에서의 검출 실험에서와 마찬가지로, *Campylobacter jejuni* 에 대해 검사점의 색변화가 일어나지 않아 개발된 진단키트가 닭고기 시료에서도 *Staphylococcus aureus* 에만 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었다.

### 5. 간이 진단키트의 영상분석

간이 진단키트의 검출성능 향상을 위하여 영상획득시스템을 이용하여 진단키트의 검출 결과를 분석하였다. 황색포도상구균이 검출된 간이 진단키트의 영상분석 결과 Fig. 5와 같이 검출되는 황색포도상구균의 농도가 높을수록 화소의 평균밝기가 감소하는 것으로 나타났다. 화소의 평균밝기는 256 단계로 표시했을 때 황색포도상구균이 포함되지 않은 시료의 기준신호 157 ± 12에서 $10^6$CFU/mL일 때 147 ± 12로 감소하여, 기준신호와의 평균 밝기차이는 10이었다.

닭고기 세척 버퍼를 이용한 간이 진단키트의 *Staphylococcus aureus* 검출 실험 결과도 *Staphylococcus aureus* 의 농도 증가에 따라 검사점의 밝기 신호가 감소하였으며, *Staphylococcus aureus*의 농도가 $10^8$CFU/mL일 때 가장 낮은 밝기 신호를 나타내었다(Fig. 6). 화소의 평균 밝기는 *Staphylococcus aureus*가 포함되지 않은 닭고기 세척 버퍼의 기준신호 165 ± 13에서 $10^5$ CFU/mL일 때 156 ± 14로 감소하여, 기준신호와의 평균 밝기차이는 9였다. *Staphylococcus aureus*의 농도가 $10^8$CFU/mL일 때 밝기 신호는 94 ± 14로 기준신호보다 71만큼 밝기 차이가 크게 나타났다. 간이 진단키트의 선택성을 나타내는 *Campylobacter jejuni* 검출 실험에서는 밝기 신호가 기준신호 보다 감소하지 않아 개발된 진단키트가 *Staphylococcus aureus*만 선택적으로 검출하는 것을 확인할 수 있었다.

## IV. 결 론

본 연구는 농식품의 *Staphylococcus aureus* 오염 여부를 신속하게 진단할 수 있는 측방유동 면역방법 기반의 간이 진단키트를 개발하기 위하여 수행되었다. 간이 진단키트는 니트로셀룰로오스 막과 항체를 이용하여 제작하였으며, 키트의 검출 성능은 *Staphylococcus aureus*이 포함된 표준인산버퍼 시료와 닭고기 세척 버퍼 시료를 이용하여 검증하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 금입자와 항체의 최적 결합을 위한 반응 버퍼의 적절한 pH 값은 6.6인 것으로 조사되었다.
2. 표준인산버퍼에 대한 *Staphylococcus aureus* 검출 실험결과 간이 진단키트를 이용하여 10분 이내에 시료의 *Staphylococcus aureus*을 검출할 수 있었으며, 검출한계는 $10^6$CFU/mL였다.
3. 닭고기 시료에 대한 간이 진단키트의 *Staphylococcus aureus* 검출한계는 $10^5$CFU/mL인 것으로 조사되었다.

# 참 고 문 헌

MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2010. Assessed in http://www.foodnara.go.kr/foodnara/downManager?a=series&b=1309221903295&c=1&d=sub06 on 29 March 2013a.

MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2012. Assessed in http://www.kfda.go.kr/e-stat/index.do?nMenuCode=33 on 29 March 2013b.

Cui S, Tong G. 2008. A chromatographic strip test for rapid detection of one lineage of the H5 subtype of highly pathogenic avian influenza. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 20:567-571.

Hossain ZSM, Luckham RE, McFadden MJ, Brennan JD. 2009. Reagentless bidirectional lateral flow bioactive paper sensors for detection of pesticides in beverage and food samples. Analytical Chemistry 81:9055-9064.

Kang BK, Oh JS, Lee CS, Park BK, Park YN, Hong KS, Lee KG, cho BK, Song DS. 2007. Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for rabies virus. Journal of Virological Methods 145:30-36.

Kim GY, Yang GM, Park SB, Kim YH, Lee KJ, Son JY, Kim HJ, Lee SR. 2011. Rapid Detection Kit for *Salmonella typhimurium*. Journal of Biosystems Engineering 36:140-146.

Martín-Hernández C, Muñoz M, Daury C, Weymuth H, Kemmers-Voncken AEM, Corbatón V, Toribio T, Bremer MGEG. 2009. Immunochromatographic lateral-flow test strip for the rapid detection of added bovine rennet whey in milk and milk power. International Dairy Journal 19: 205-208.

Moon JH, Kim GY, Lee SD. 2012. A Gold Nanoparticle and Aflatoxin B1-BSA Conjugates Based Lateral Flow Assay Method for the Analysis of Aflatoxin B1. Materials 5:634-643.

Oh JS, Ha GW, Cho YS, Kim MJ, An DJ, Hwang KK, Lim YK, Park BK, Kang BK, Song DS. 2006. One-Step Immunochromatography assay kit for detecting antibodies to canine parvovirus. Clinical and Vaccine Immunology 13:520-524.

Park SB, Kim GY, Moon JH. 2012. Improvement of Lateral Flow Assay for the rapid detection of *Salmonella*. Food Engineering Progress 16:333-339.

Sithigorngul W, Rukpratanporn S, Sittidilokratna N, Pecharaburanin N, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Sithigorngul P. 2007. A convenient immunochromatographic test strip for rapid diagnosis of yellow head virus infection in shrimp. Journal of Virological Methods 140:193-199.

Tang Y, Zhai YF, Xiang JJ, Wang H, Liu B, Guo CW. 2010. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of lead ions in water samples. Environmental Pollution 158:2074-2077.