Food Engineering Progress
Vol. 16, No. 4. pp. 333~339 (2012.11)

산업식품공학
Food Engineering Progress

Salmonella 신속 검출용 간이진단키트의 성능 개선 연구

박샛별 · 김기영* · 문지혜
국립농업과학원 농업공학부

Improvement of Lateral Flow Assay for the rapid detection of *Salmonella*

Saetbyeol Park, Giyoung Kim*, and Jihea Moon
Department of Agricultural Engineering, National Academy of Agricultural Sciences

Abstract

In this study, a rapid immuno-chromatographic assay was developed to detect *Salmonella Typhimurium*. This assay was based on the lateral flow immunoassay. Two different anti-*Salmonella* polyclonal antibody (Pab) are used in this strip assay for the double antibody sandwich immunoassay method. The strip sensor was composed of sample pad, conjugation pad, membrane, and absorbent pad. For the optimal conjugation between nano-gold and anti-*Salmonella* Pab, the pH value of colloidal gold solution was determined to 8.4. To prevent non-specific binding between nano gold and anti-*Salmonella* Pab, sample pad and membrane was treated with PBS buffer, included 2% BSA and 10% sucrose. The control and detection zones were visually detected according to antigen-antibody binding. The detection limit of the developed strip assay was 10^5 CFU/mL within 10 min, and improved until 10^4 CFU/mL after 12 hr.

Key words: lateral flow immunoassay, strip sensor, *salmonella*

서 론

살모넬라균은 식품의 안전성을 저해하는 대표적인 병원성 세균으로 인간과 동물의 장에 서식한다(Campioni et al., 2012). 주요 감염 식품으로는 육류, 가금류의 알 또는 채소 및 과일 등과 같은 비가열 식품을 들 수 있다(Duggan et al., 2012). 그 외에도 살모넬라 식중독균 감염의 매개체로 알려진 식품은 초콜릿, 토마토, 계란, 원유, 마요네즈, 아이스크림, 시리얼 등 그 종류가 매우 다양하다. 살모넬라균은 자연 환경에도 광범위하게 분포되어 있어 손, 발 등의 피부 접촉을 통해 일상에서도 쉽게 감염 될 수 있는 균이다(Beuchat, 1996; Korea Food & Drug Administration, Accessed on 4 October 2012a).

살모넬라균에 의한 식중독 발병은 매년 발생하고 있으며, 한국 식품의약품안정청(Korea Food & Drug Administration)에 보고된 식중독 발생 현황에 따르면 한국에서 2007-2011 년까지 살모넬라균이 원인으로 보고된 식중독은 전체의 10%로 장염 비브리오(7%), 황색포도상구균(7%)보다 큰 비율을 차지하고 있다(Korea Food & Drug Administration, Accessed on 4 October 2012b). 2010년 미국에서는 살모넬라균에 감염된 계란으로 인해 5 억 만개 이상의 계란이 회수 조치 되었으며 미질병통제예방센터(Centers for Disease Control and Prevention)와 식품의약청(Food and Drug Administration)에서는 살모넬라균 감염이 26 개 주로 확산되었으며 1900 여명의 감염자가 발생했다고 보고하였다(Centers for Disease Control and Prevention, Accessed on 4 October 2012). 살모넬라균에 의한 식중독 사고와 같이 대규모 집단 발병의 위험도가 높은 전염병은 감염을 확인하고 원인균을 판정할 때까지의 시간이 피해를 줄이는데 매우 중요하다. 하지만 기존의 살모넬라균 분석법은 5-7 일의 시간이 소요되어 질병 발생 시 신속한 조기 진단 및 예방에 어려움이 있다(Kim et al., 2010).

최근에는 분석 시간을 줄이면서 살모넬라균만을 특이적으로 분석할 목적으로 polymerase chain reaction(PCR), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 등의 분석법을 활용한 검출 방법의 연구가 진행 중이다(Park et al., 2010; Jeyasekaran et al., 2011). Kim et al.(2005)는 기존의 혈청학적 검사방법과 PCR 진단방법을 병행하여 일주일이 소요되던 검사시간을 3-5 일로 단축하였으며, 국내에서 발견되는 살모넬라균 혈청형을 보다 신속하게 확인할 수 있

*Corresponding author: Giyoung Kim, Department of Agricultural engineering, National Academy of Agricultural Sciences, Suin-ro, 126th, Gwonseon-gu, Suwon, 442-707, Korea
Tel: +82-31-290-1899; Fax: +82-31-299-1900
E-mail: giyoung@korea.kr
Received August 28, 2012; revised October 12, 2012; accepted October 12, 2012

다고 보고하였다. Joo et al.(2009)는 PCR 진단법을 이용하여 단시간 내에 오염된 식품으로부터 살모넬라균만을 선택적으로 검출할 수 있는 프라이머를 개발하였으며, 최소 하나의 세포에서도 PCR 분석이 가능하여 검출감도가 매우 우수한 것으로 보고하였다. 이들은 기존의 분석방법보다 분석 시간을 줄이면서 미량의 시료로도 분석이 가능하고 분석물질(analyte)에 대한 높은 감도와 특이성을 가진다는 장점이 있지만 고가 장비와 전문인력이 필요하고 현장에서 사용이 어렵다는 단점이 있다(Posthuma-Trumpie et al., 2009).

측방유동형 면역분석법을 이용한 간이진단키트는 효소면역측정법과 측방유동 분석법을 결합한 기술로 항원-항체의 특이적 반응에 기반을 두어 높은 선택도와 민감도를 갖는다(Park et al., 2011). 이러한 장점으로 인해 B형 간염, 임신 진단, 혈당 측정, HIV, 식품이나 사료 중 포함된 독성물질, 병원성균, 잔류 농약 등 다양한 분야에서 자가 진단이나 현장 진단용으로 상용화되어 사용되고 있다(Brooks et al., 1999; Stephenson, 2005; Von Lode, 2005; Ricci et al., 2007). 또한 1 회용으로 사용이 편리하고 휴대가 용이하며, 고가의 장비나 전문 인력 없이 취급할 수 있는 특징을 가지고 있다(Kim, 2000). 이러한 특징으로 식중독균의 신속검출을 가능하게 할 목적으로 Zhao et al.(2010)는 금나노입자를 사용하여 대장균 검출용 간이진단키트의 개발에 관한 연구를 보고한 바 있으며 Park et al.(2010)은 대장균, 포도상구균, 리스테리아균, 살모넬라균을 다중 검출할 수 있는 간이진단키트의 개발에 관한 연구를 보고 한 바 있다.

본 연구에서는 식중독균의 원인균 중 하나인 살모넬라균을 정성적 · 정량적으로 검출하기 위한 측방유동형 간이진단키트의 성능 향상 방법을 조사하였다. 이를 위해 이중항체겹면역분석법(double antibody sandwich immunoassay) 원리를 이용하는 간이진단키트의 핵심 구성품인 결합패드와 니트로셀룰로오스 막의 전처리 조건을 구명하고 살모넬라균과 특이적으로 결합하는 항체와 금나노입자를 이용하여 현장 진단용 측방유동형 간이진단키트를 개발하고 살모넬라균 검출 성능을 평가하였다.

재료 및 방법

측방유동형 간이진단키트의 구조

측방유동형 간이진단키트는 샘플패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 흡수패드로 구성된다. 시료가 주입되는 샘플패드와 반응이 종료된 시료를 흡수하는 흡수패드는 동일한 셀룰로오스 섬유 재질(Cellulose Fiber sample pad, Millipore, Billerica, USA)을 사용하였으며 시료 중에 포함되어 있는 살모넬라균과 금나노입자가 반응하여 결합되는 결합패드는 유리섬유재질(Glass Fiber conjugate pads, Millipore, Billerica, USA)을 사용하였다. 그리고 검출점(test zone)과 표준점(control zone)이 나타나는 검출부분은 니트로셀룰로오스 막(Hi-flow Plus 240 membrane cards, Millipore, Billerica, USA)을 사용하였다. 전처리된 각 구성품은 니트로셀룰로오스 막을 기준으로 한 쪽 끝은 샘플패드와 결합패드를, 다른 쪽 끝은 흡수패드를 부착하여 조립하였다. 제작된 측방유동형 간이진단키트는 폭 4 mm 간격으로 절단하여 실험에 사용하였다.

결합패드와 니트로셀룰로오스 막의 전처리 조건

결합패드와 니트로셀룰로오스 막의 전처리에 사용된 용액은 Table 1과 같은 조건으로 제작되었다. 결합패드 전처리에는 자당(sucrose)과 Bovine Serum Albumin(BSA) (Thermo scientific, Rockford, IL, USA)을 사용하였으며 농도는 선행의 연구결과를 참고하여 결정하였다(Kim et al., 2011). 니트로셀룰로오스 막의 전처리에는 Phosphate Buffered Saline(PBS)(10 mM PBS, 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, pH 7.4, Sigma, MD, USA)와 Tris 버퍼(25 mM Tris-HCl, pH 7.4), Tris-HCl 버퍼(25 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.2), Borate 버퍼(50 mM Borate, pH 8.4) (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하였다. 결합패드와 니트로셀룰로오스 막은 전처리 용액에 담근 후 37°C에서 각각 4 시간과 1 시간씩 건조시켜 사용하였다.

살모넬라균 검출점과 표준점 제작

측방유동형 간이진단키트에서 살모넬라균을 검출하는 부분은 니트로셀룰로오스 막 위의 검출점과 표준점이다. 검출점과 표준점은 각각 살모넬라균 항체(*Salmonella* antibody 20-SR11, Fitzgerald, MA, USA)와 면역글로불린 항체(anti-goat IgG(H+L) antibody, KPL, MD, USA)를 사용하여 제작하였다. 니트로셀룰로오스 막 위에 5 mm 간격으로 1 μL씩 살모넬라균 항체와 면역글로불린 항체를 점적하고 37°C에서 1 시간 동안 건조한 후 사용하였다.

Table 1. Conditions of pretreatment for conjugate pad and Nitrocellulose membrane.

	Conjugate pad	Nitrocellulose membrane
A	PBS (pH 7.4, 2% BSA, 10% sucrose)	PBS (pH 7.4)
B	PBS (pH 7.4, 2% BSA, 10% sucrose)	Tris-HCl buffer (pH 7.2)
C	Borate buffer (pH 8.4, 2% BSA, 10% sucrose)	PBS (pH 7.4)
D	Borate buffer (pH 8.4, 2% BSA, 10% sucrose)	Borate buffer (pH 8.4)
E	Tris buffer (pH 7.4, 2% BSA, 10% sucrose)	Tris buffer (pH 7.4)
F	Tris buffer (pH 7.4, 2% BSA, 10% sucrose)	PBS (pH 7.4)

측방유동형 간이진단키트의 검출 원리

제작된 측방유동형 간이진단키트의 검출 원리는 다음과 같다. 샘플패드에 흡수된 시료는 모세관 현상에 의해 결합패드와 니트로셀룰로오스 막을 거쳐서 흡수패드까지 이동하게 된다. 샘플패드에 흡수된 시료에 포함되어 있는 살모넬라균은 결합패드로 이동하면서 금나노입자-살모넬라균 항체 결합물에 선택적으로 결합되고 금나노입자-항체-살모넬라균 복합체를 형성한다. 이 복합체와 결합물은 모세관 현상에 의해 멤브레인을 지나게 되고, 이 때 금나노입자-항체-살모넬라균 복합체는 검출점의 살모넬라균 항체에 포획되어 2 차 항원-항체 반응을 일으키며 이중항체겹면역분석법(double antibody sandwich immunoassay) 원리에 의해 결합하게 된다. 살모넬라균과 결합하지 못한 금나노입자-살모넬라균 항체 결합물은 흡수패드 방향으로 계속해서 흐르게 되고 표준점의 면역글로불린 항체와 결합하게 된다.

금나노입자-살모넬라균 항체 결합을 위한 최적 pH값 검색

본 연구에서는 금나노입자를 살모넬라균 검출용 표지자로 사용하였으며, 살모넬라균만을 포획하기 위해 금나노입자와 살모넬라균 항체를 결합하여 사용하였다. 선행의 연구결과(Kim et al., 2011)를 참고하여 금나노입자와 살모넬라균 항체의 결합을 위한 최적 pH 조건을 찾기 위해 Fig. 1과 같은 방법을 사용하였다. pH 5.4-pH 10.1까지 10 단계로 조정된 40 nm 금나노입자(Bioassay works, Ijamsville, USA)에 살모넬라균 항체(anti-*salmonella* CSA-1 antibody, KPL, MD, USA)를 첨가한 후 실온에서 30분간 교반하면서 반응시켰다.

금나노입자와 살모넬라균 항체 결합물의 안정성을 평가하기 위해 1 M NaCl을 첨가하여 금나노입자-살모넬라균 항체와의 반응을 관찰하였다. 그 다음 금나노입자의 변색이나 교차결합이 일어나지 않은 결합물을 대상으로 Spectra Max 190(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였고, 흡광도가 가장 높게 측정된 pH 조건을 금나노입자와 살모넬라균 항체의 최적 결합조건으로 선정하였다. 반응이 끝난 결합물은 BSA Blocking Stabilizer 용액(Bioassay works, MD, USA)에 넣어 4ºC에서 3 시간 동안 Blocking 한 후 사용하였다.

살모넬라균

본 실험에 사용된 *Salmonell*a *Typhimurium*은 생명공학연구원 유전자은행(Korean Collection for Type Culture, KCTC 12041)에서 분양받은 것을 Brain Heart Infusion broth(BHI)(BD, MD, USA)에 37ºC에서 15 시간 배양 후 사용하였다. 생균수는 표준평판법에 따라 XLT4 선택배지(BD, NJ, USA)를 이용하여 37ºC에서 24 시간 배양 후 형성된 검은색 군락을 계수하여 측정하였으며, 분양받은 균주는 배양 후 10% 글리세롤과 함께 -30ºC 냉동고에서 보관하였다.

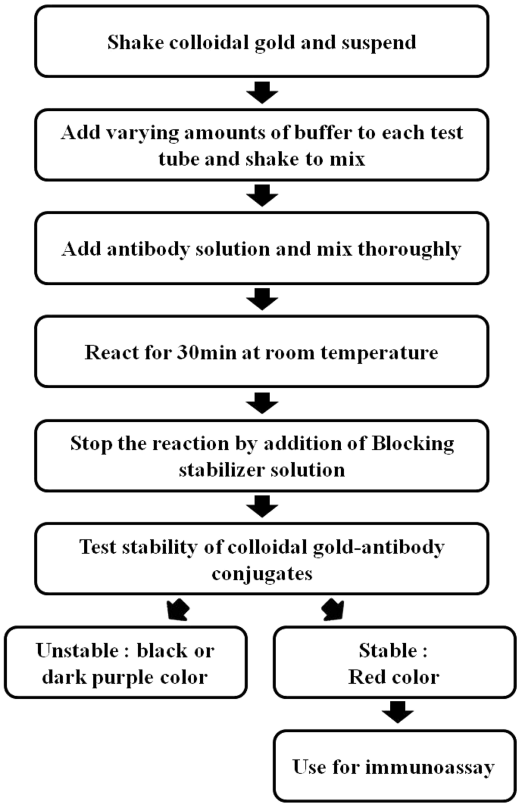

Fig. 1. Colloidal gold and antibody conjugate procedure.

개발된 측방유동형 간이진단키트의 검출 성능을 시험하기 위해 PBS(pH 7.4)를 이용해 10^3-10^8 CFU/mL로 순차 희석한 살모넬라균 시료를 100 μL씩 간이진단키트에 주입하였다.

결과 및 고찰

측방유동형 간이진단키트 결과 해석

개발된 측방유동형 간이진단키트의 결과 해석은 Fig. 2와 같다. 니트로셀룰로오스 막 위의 검출 부분은 살모넬라균 항체가 고정되어 있는 검출점과 면역글로불린이 고정되어 있는 표준점이다. 금나노입자-살모넬라 항체-살모넬라균 복합체는 검출점에서 또 다른 살모넬라균 항체에 포획되어 금나노입자-살모넬라균 항체-살모넬라균-살모넬라균 항체 형태의 샌드위치 결합을 한다. 금나노입자-살모넬라균 항체 결합물에 포획되는 살모넬라균이 증가할수록 검출점의 살모넬라균 항체에 포획되는 살모넬라균도 증가한다. 검출점은 금나노입자의 증가로 발색이 진하게 되고 이를 이용하여 살모넬라균의 정량적 분석이 가능하게 된다. 살모넬라균과 결합하지 못한 금나노입자-살모넬라균 항체는 표준점

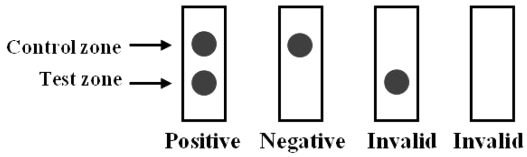

Fig. 2. The illustrations of lateral flow immunoassay (LFIA) strip sensor test results.

의 면역글로불린과 결합하여 발색된다. 양성 반응은 검출점과 표준점 2 개의 붉은점의 존재로 판단하게 되며, 음성반응은 표준점만의 존재로 판단된다. 만약 표준점이 존재하지 않거나 검출점만 존재한다면 그 실험은 잘못된 것으로 효력이 없다.

금나노입자-살모넬라균 항체 결합의 최적 pH값 검색

선행의 연구(Kim et al., 2011)에서 수행한 금나노입자-살모넬라균 항체 결합에 사용된 항체(Biotin conjugate *Salmonella* antibody, Virostat, Portland, Maine, USA)는 토끼의 혈청에서 얻은 것으로 바이오틴(Biotin)이 결합되어 있는 것을 사용하였다. 표준점에 뉴트라아비딘(Neutravidin)을 고정하여 아비딘-바이오틴 결합력을 이용하여 표준점의 검출을 유도하여 음성반응을 사료된다.

본 실험에서 금나노입자-살모넬라균 항체 결합에 사용된 항체는 염소의 혈청에서 얻은 항체(1 차 항체)로 아비딘-바이오틴에 의한 비특이적 결합력을 최소화하기 위해 바이오틴이 결합되지 않은 항체를 사용하였다. 또한 표준점에는 염소 유래 면역글로불린을 특이적으로 인식할 수 있는 토끼 유래 항염소 면역글로불린(2 차 항체)을 사용하였고 1 차 항체를 특이적으로 인식하는 2 차 항체의 특징을 이용하여 살모넬라균 항체의 비특이적 결합을 줄여 살모넬라균 검출의 감도를 높이고자 하였다.

금나노입자-살모넬라균 결합 시 최적 pH는 토끼 유래 살모넬라균 항체가 6.6, 염소 유래 살모넬라균 항체가 8.4로 본 실험에서 최적이라 판단된 pH 값이 Kim et al.(2011)이 수행한 연구 결과보다 높은 pH값이 관찰되었으며, 금나노입자-살모넬라균 항체 결합 시 다른 종류의 항체를 사용하면 최적 pH 값은 달라질 수 있다고 생각된다.

금나노입자는 콜로이드 형태로 존재하며 각 입자간의 정전기적 반발력과 인력(London-van der Waals)이 작용하여 균형을 이루고 있다. 그러나 이온 물질(예: NaCl)을 첨가하면 붉은색에서 보라색으로 색변화를 동반하는 응집(aggregation) 반응을 일으킨다. 이러한 불안정한 상태는 항체나 면역글로불린 등의 단백질 분자로 금나노입자 표면을 코팅하여 막을 수 있다. 단백질 또는 항체로 완전히 코팅된 금나노입자는 코팅된 단백질의 특성과 비슷해지면서 고농도의 이온용액에서도 매우 안전한 상태를 유지하게 된다(Paek et al., 2000; Jung & Jung, 2005). 금나노입자-살모넬라균 항체 결합체의 안정성을 확인하기 위해 NaCl 용액을 이용하였다.

살모넬라균 항체는 금나노입자 표면에 인력과 소수성 상호작용에 의해 흡착하게 된다(Paek et al., 2000; Jung & Jung, 2005). 금나노입자와 살모넬라균 항체가 결합하는 과정에서 불안정하게 코팅된 금나노입자-살모넬라균 항체 결합물은 버퍼 내에 비활성화된 상태로 존재하게 되면 분산되어 있는 금나노입자는 응집되어 침전되거나 검정색으로 바뀌고, 살모넬라균 항체로 완전히 코팅된 금나노입자들은 빨간색으로 안정된 상태를 유지하게 된다(Wong & Tes, 2009). 짙어진 보라색 또는 검정색의 침전은 항체 또는 단백질의 자체 등전점보다 버퍼의 pH가 낮다는 것을 의미하고, 이 때 금나노입자 사이에 교차결합이 발생하여 면역분석에 사용할 수 없게 된다(Kim et al., 2011).

1 M NaCl과 금나노입자-살모넬라균 항체 결합물의 반응을 관찰한 결과 Fig. 3과 같이 pH 8.4, pH 8.8에서만 색변화 없이 선명한 붉은색을 보였고 이를 제외한 pH용액에서는 보라색 또는 검정색으로의 변색 또는 침전이 관찰되었다. NaCl과의 반응 후 용액의 변색이 관찰된 실험군은 면역분석에 적합하지 않다고 판단되어 배제하였다. 선정된 pH 8.4와 pH 8.8용액 중에서 금나노입자-살모넬라균 항체 결합에 더 안정적인 pH조건을 결정하기 위해 흡광도를 비교하였다. 측정결과 pH 8.4에서 흡광도는 0.0016이고 pH 8.8에서는 0.0012로 pH 8.4에서 더 높은 흡광도를 나타내었다.

결합패드, 니트로셀룰로오스 막 전처리 방법에 따른 간이 진단키트 성능 향상

결합패드에서의 금나노입자-살모넬라균 항체와 살모넬라

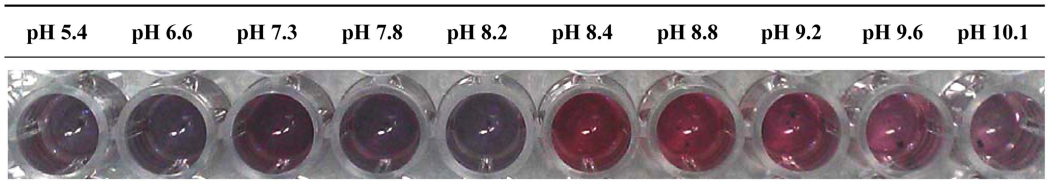

Fig. 3. Influence of pH solution in degree of conjugation between colloidal gold and *Salmonella* antibody. The pH optimum is noted from color change of the solution. The red color shows optimum, but pink or purple color does not.

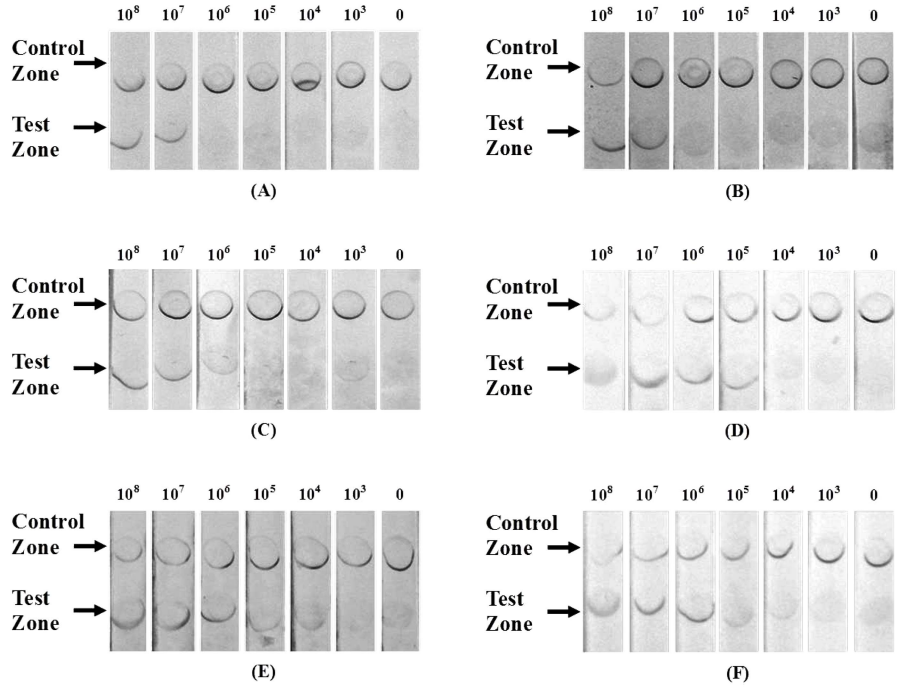

Fig. 4. Detection of *Salmonella Typhimurium* using lateral flow immunoassay (LFIA) strip sensor (unit: 1.0°ø CFU/mL). Pretreatment conditions of conjugate pad (CP) and nitrocellulose membrane (M): (A) CP: PBS(pH 7.4, 2% BSA, 10% sucrose), M: PBS(pH 7.4) (B) CP: PBS(pH 7.4, 2% BSA, 10% sucrose), M: Tris-HCl buffer(pH 7.2) (C) CP: Borate buffer(pH 8.4, 2% BSA, 10% sucrose), M: PBS(pH 7.4) (D) CP: Borate buffer(pH 8.4, 2% BSA, 10% sucrose), M: Borate buffer(pH 8.4) (E) CP: Tris buffer(pH 7.4, 2% BSA, 10% sucrose), M: PBS(pH 7.4) (F) CP: Tris buffer(pH 7.4, 2% BSA, 10% sucrose), M: Tris buffer(pH 7.4).

균 사이의 결합을 용이하게 하고 시료가 니트로셀룰로오스 막으로 원활하게 전개되어 검출점과 표준점의 선명한 발색이 나타나도록 하기 위해 Table 1과 같은 방법으로 결합패드와 니트로셀룰로오스 막의 전처리를 수행하였으며 그 결과는 Fig. 4와 같다.

결합패드 전처리에 사용된 버퍼에는 자당과 BSA를 처리하였다. Chiao et al.(2004)는 전처리 용액에 사용되는 자당은 건조과정에서 금나노입자 주변에 층을 형성하여 금나노입자를 안정화시키고 금나노입자의 색을 붉은색으로 안정화시키는 역할을 할 뿐만 아니라 BSA와 함께 시료에 의해 재용해 될 때 흐름이 원활하게 전개되도록 하여 샘플패드에 주입된 시료가 원활하게 니트로셀룰로오스 막으로 이동하도록 도와준다고 보고한 바 있다. 결합패드의 전처리에 사용된 버퍼용액이 PBS로 같았던 Fig. 4(A)와 4(B)는 검출한계가 10^7 CFU/mL로 같게 관찰되었다. 그러나 멤브레인이 PBS로 전처리 된 Fig. 4(A)보다 Tri-HCl로 전처리된 Fig. 4(B)에서 검출점이 더 선명하게 나타났다. 결합패드가 Borate 버퍼로 전처리된 Fig. 4(C)와 4(D)의 경우 PBS로 니트로셀룰로오스 막을 전처리 한 Fig. 4(C)의 검출한계는 10^6 CFU/mL이고, Borate 버퍼로 전처리한 Fig. 4(D)의 경우 10^5 CFU/mL로 Fig. 4(D)의 검출 한계가 더 낮게 관찰되었다. 결합패드가 Tris 버퍼로 전처리된 Fig. 4(E)와 4(F)의 경우 니트로셀룰로오스 막이 Tris 버퍼로 전처리된 Fig. 4(F)와 PBS로 전처리된 Fig. 4(E)에서 모두 10^5 CFU/mL의 검출한계가 관찰되었으며, Fig. 4(E)에서 가장 진한 검출점의 발색이 관찰되었다. 또한 Fig. 4(E)의 경우 살모넬라균 시료를 전개한 후 반응 12 시간 경과 후의 검출 한계는 10^4 CFU/mL로 관찰되었다. Kim et al.(2011)이 보고한 결합패드, 니트로셀룰로오스 막의 전처리 조건은 Fig. 4(A)와 같았으며 검출한계는10^6 CFU/mL이었고, 본 연구의 Fig. 4(A)보다 우수한 검출한계가 관찰되었다. 이는 항체의 종류와 금나노입자-살모넬라균 결합 pH 값이 측방유동형 간이진단키트의 검출 한계에 영향을 미치는 요인으로 판단되었다. 또한 결합패드와 니트로셀룰로오스 막에 사용된 버퍼의 염농도가 높을수록 높은 검출 한계가 관찰되었는데, 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl이 포함되어 있었던 PBS를 전처리 용액으로 사용했던 Fig. 4(A)가 가장 높은 검출 한계를 보였다. 수질, 환경 등의 분야에서 사용할 수 있는 간이진단키트를 개발하여 시판중인 Millipore사는 간이진단키트 제작 시 주의사항으로 버퍼의 염 함유량을 예로 들었고, 높은 염 함유량은 항체와 분석물질간의 정전기적 인력을 저하시켜 결합을 방해하여 검출 한계에 영향을 줄 수 있으므로 낮은 염농도의 버퍼를 사용해야 한다고 보고한 것과 유사한 결과를 나타내었다. 또한 금나노입자-살모넬라균 항체 결합에 사용된 pH값과 유사한 pH의 Borate 버퍼를 사용하여 결합패드를 전처리한 Fig.

4(C), 4(D)의 경우 염농도가 상대적으로 높았던 Fig. 4(A), 4(B)보다 낮은 검출 한계가 관찰되었다.

본 실험에서 개발된 측방유동 간이진단키트의 살모넬라균에 대한 선택성을 조사하기 위하여 순수배양된 대장균 시료를 순차희석하여 간이진단키트에 전개하였다. 교차실험을 진행한 결과 데이터는 음성을 나타내었으며 교차반응은 없는 것으로 관찰되었다.

측방유동 간이진단키트 검출 결과

본 연구는 결합패드와 니트로셀룰로오스 막의 전처리 용액에 따른 살모넬라균 검출용 간이진단키트의 성능 향상을 위해 실행하였으며, 10^3-10^8 CFU/mL로 순차희석된 살모넬라균을 시료로 사용하여 검출 결과를 비교하였다. 결합패드, 니트로셀룰로오스 막 전처리 방법에 따른 살모넬라균 검출 결과 결합패드는 Tris 버퍼(pH 7.4, 2% BSA, 10% sucrose) 용액을 사용하고 니트로셀룰로오스 막은 PBS(pH 7.4)를 사용하여 전처리 하였을 때 검출 감도가 가장 높은 것으로 관찰되었고 이 때의 검출 한계는 10^5 CFU/mL으로 Kim et al.(2011)이 수행한 아비딘-바이오틴 결합을 이용한 살모넬라균 검출 한계 10^6 CFU/mL보다 더욱 향상된 감도의 검출한계가 관찰되었다.

또한 본 실험의 검출한계는 Kim et al.(2010)이 수행한 나노 양자점 결합을 이용한 살모넬라균 검출 연구의 10^6 CFU/mL과 Jung & Jung(2005)이 수행한 금나노입자를 이용하여 개발한 간이진단키트의 살모넬라균 검출 결과 돈육에 살모넬라균 시료를 접종한 경우의 검출 한계 10^6 CFU/mL보다 낮은 검출 한계를 나타내었다. 그리고 Preechakasedkit et al.(2012)이 수행한 항원-항체 면역반응을 이용한 살모넬라균 검출 연구의 10^5 CFU/mL과 유사한 검출 한계를 나타내었다.

결 론

본 연구는 대표적인 식중독균인 살모넬라균을 신속하게 검출할 수 있는 측방유동형 간이진단키트를 개발하기 위하여 수행되었다. 살모넬라균 검출 표지자로는 금나노입자를 선정하였고, 간이진단키트 구성부의 전처리 용액에 따른 살모넬라균 검출의 최적 조건을 구명하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

금나노입자와 살모넬라 항체의 최적 결합을 위한 반응 버퍼의 적절한 pH 값은 8.4인 것으로 조사되었다.

결합패드와 니트로셀룰로오스 막에 실시한 2% BSA 및 10% 자당을 이용한 전처리는 금나노입자-살모넬라 항체의 비특이적 결합을 방지하며, 니트로셀룰로오스 막을 통한 시료의 이동 특성을 향상시키는 것으로 나타났다.

PBS에 희석된 살모넬라균을 시료로 사용하여 개발된 간이진단키트를 이용하여 살모넬라균을 검출할 수 있었으며, 검출한계는 10^5 CFU/mL이었고, 12 시간 경과 후에는 10^4 CFU/mL까지 검출되었다.

본 연구에서 관찰된 신속진단키트를 이용한 살모넬라균의 검출 한계는 10^5 CFU/mL 이었으나 시간 경과 시에는 검출 한계가 향상되는 현상이 관찰되었다. 이러한 검출 한계 향상은 기존에 개발된 긴단키트 구성물에 대한 전처리를 통하여 가능하였다. 이후 연구에서는 본 연구를 토대로 검출 성능과 검출 시간을 동시에 향상시켜 식품에서 살모넬라를 정량적으로 검출하기 위한 연구를 수행하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(PJ008440)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

Brooks DE, Devine DV, Harris PC, Harris JE, Miller ME, Olal AD. 1999. RAMP(TM): A Rapid, Quantitative Whole Blood Immunochromatographic Platform for Point-of-Care Testing. CLIN CHEM. 45: 1676-1678.

Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services, http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis/archive/082310.html., Accessed on 4 October 2012

Campioni F, Moratto Bergamini AM, Falcão JP. 2012. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella Enteritidis* isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. Food Microbiol. 32: 254-64.

Chiao DJ, Shyu RH, Hu CS, Chiang HY, Tang SS. 2004. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of *Botulinum* neurotoxin type B. J. Chromatogra. B. 809: 34-41.

Duggan S, Jordan E, Gutierrez M, Barrett G, Obrien T, Hand D, Kenny K, Fanning J, Leonard N, Egan J. 2012. *Salmonella* in meats, water, fruit and vegetables as disclosed from testing undertaken by Food Business Operators in Ireland from 2005 to 2009. Ir Vet J. 65: 17.

Jeyasekaran G, Raj K, Shakila R, Thangarani A, Sukumar D, Jailani V. 2011. Rapid detection of *Salmonella enterica* serovars by multiplex PCR. World J. Microb. Biot. 27: 953-959.

Joo JW, Hong KP, Kim YH, Cho SB. 2009. Selective Detection of Salmonella sp. and *Salmonella typhimurium* in Meat by Polymerase Chain Reaction. J. East Asian Soc Dietary Life. 19: 295-300.

Jung BY, Jung SC. 2005. Development of the rapid detection kit for *Salmonella* spp. using immunochromatographic assay. Korean J. Vet. Res. 45: 191-197.

Korea Food & Drug Administration. http://safefood.kfda.go.kr/safefood/user/db/riskReadDetail.jsp?revri=/afefood/ser/db/riskList.jsp&board_code=28&id=58, Accessed on 5 October 2012a.

Korea Food & Drug Administration. http://www.kfda.go.kr/e-stat/index.do?nMenuCode=33 , Accessed on 4 October 2012b

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

Kim GY, Yang GM, Park SB, Kim YH, Mo CY, Park SB. 2010.

Detection of Pathogenic *Salmonella* with a Composite Quantum Dot. J. of Biosystems Eng. 35: 458-463.

Kim SH, Kim SH, Lee SW, Kang YH, Lee BK. 2005. Rapid Serological Identification for Monophasic *Salmonella* Serovars with a hin Gene-Specific Polymerase Chain Reaction. J. Bacteriol. Virol. 35: 291-297.

Kim UR. 2000. Biosensor. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 15: 423-427.

Paek SH, Lee SH, Cho JH, Kim YS. 2000. Development of Rapid One-Step Immunochromatographic Assay. Methods. 22: 53-60.

Park JN, Park SJ, Kim YK. 2010. Multiplex detection of pathogens using an immunochromatographic assay strip. BioChip J. 4: 305-312.

Park SJ, Kim YT, Kim YK. 2010. Optical enzyme-linked immunosorbent assay on a strip for detection of *Salmonella* typhimurium. BioChip J. 4: 110-116.

Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. 2009. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. Anal. Bioanal. Chem. 393: 569-582.

Preechakasedkit P, Pinwattana K, Dungchai W, Siangproh W, Chaicumpa W, Tongtawe P, Chailapakul O. 2012. Development of a one-step immunochromatographic strip test using gold nanoparticles for the rapid detection of *Salmonella typhi* in human serum. Biosens. Bioelectron. 31: 562-566.

Ricci F, Volpe G, Micheli L, Palleschi G. 2007. Areview on novel developments and applications of immunosensors in foodanalysis. ANAL CHIM ACTA. 605: 111-129.

Stephenson J.2005. RAMP anthrax test cartridge. J AOAC Int. 88: 202-203.

Von Lode P. 2005. Point-of-care immunotesting: Approaching the analytical performance of central laboratory methods. CLIN BIOCHEM. 38: 591-606.

Wong RC, Tes HY. 2009. Lateral Flow Immunoassay. pp. 78-82.

Zhao X, He X, Li W, Liu Y, Yang L, Wang J. 2010. Development and evaluation of colloidal gold immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* O157. Afr. J. Microbiol. Res. 4: 663-670.