

육류 및 새싹채소에 오염된 *Escherichia coli* O157:H7의 신속검출을 위한 면역크로마토그래피법의 개발

이원경 · 류희정 · 송정언 · 김경열 · 정도영¹ · 김정숙² · 심원보^{2*} · 정덕화

경상대학교 응용생명과학부(BK21 program), ¹경상대학교 식품공학과, ²경상대학교 농업생명과학연구원

Development of Immunochromatography for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Contaminated in Meats and Sprouts

Won-Gyeong Lee, Hee-Jeong Ryu, Jeong-Un Song, Kyeong-Yeol Kim, Do-yeong Chung¹,
Jeong-Sook Kim², Won-Bo Shim^{2*}, and Duck-Hwa Chung

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

¹Department of Food Science & Technology, Gyeongsang National University

²Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

Abstract *Escherichia coli* O157:H7 has been considered as a significant food-borne pathogen since its role in causing hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in humans was recognized. In this study, we developed an immunochromatography (ICG) assay for the detection of *E. coli* O157:H7. *E. coli* O157:H7 monoclonal antibody (EC MAb) and colloidal gold were conjugated and its specificity was determined by the ICG treated with EC MAb and anti-mouse IgG at test and control lines, respectively. The detection limit of the ICG was 1×10^5 CFU/mL, and no cross-reactivity was observed to other *E. coli* strains and major food-borne pathogens. To determine the minimum enrichment time for the ICG, meats and sprouts were inoculated with 1×10 CFU/100 μ L of *E. coli* O157:H7. After enrichment time of 10 and 2 h for meats and sprouts, respectively, up to 1×10 CFU/100 μ L of *E. coli* O157:H7 could be detected by ICG.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, immunochromatography, meat, sprout

서 론

Escherichia coli O157:H7은 1982년 미국의 Oregon주와 Michigan주에서 햄버거를 매개로 발생한 집단 식중독으로 인해 처음 인간에 대한 감염원으로 인식되었고(1,2), 이 균에 오염된 식품 섭취에 따른 식중독 발생이 전 세계적으로 증가하여 우리나라에서도 제1군 전염병으로 지정된 주요한 병원체 중 하나이다(3). *E. coli* O157:H7의 주된 감염원은 소고기, 돼지고기 등의 육류와 요구르트, 마요네즈 및 사과주스 등 다양한 식품 및 물을 통해 사람에게 감염되며 사람에서 사람으로의 전이가 가능한 것으로 보고되고 있다(4,5). 이와 같은 *E. coli* O157:H7은 10-100 CFU/mL의 균량만으로 감염될 수 있고, 감염되면 *Shigella dysenteriae* type 1이 생산하는 shiga 독소와 동일하거나 유사한 독소를 만들어 내어 혈관 내피세포를 손상시켜 용혈성 요독증후군(hemolytic uremic syndrome, HUS), 혈전성 혈소판감소성자반병(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP), 출혈성 대장염, 설사 및 발작 등을 유발하며 계속 진행되어 사망에 이르기기도 한다(6,7).

국내에서는 *E. coli* O157:H7으로 인한 대규모의 발병 사례는 없으나 최근에 지속적으로 발병 사례가 보고되고 있어(8), 식중독 발생을 미연에 방지하거나 이들을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 분석법이 필요하다. 현재 사용되고 있는 *E. coli* O157:H7 표준분석법은 시료를 증균배양하여 sorbitol-MacConkey agar(SMA)에 도말한 다음 무색의 집락을 확인하고 생화학적 시험으로 동정하는 방법이다(9). 식품 및 임상 시료와 같은 정의되지 않은 혼합시료에서 병원체를 검출하는 이러한 기본 분석법은 높은 특이성 및 선택성 때문에 신뢰성 있는 검출법으로 사용되어 왔으나, 전문적인 기술을 가진 사람과 결과를 도출하기 위해 많은 시간이 소요되는 단점을 지니고 있다(10). 이러한 단점을 보완하기 위해 최근 *E. coli* O157:H7 균주가 생산하는 shiga 독소 또는 기타 표지자의 유전자를 polymerase chain reaction(PCR)이나 real-time PCR을 이용하여 확인하는 방법(11-13), *E. coli* O157:H7 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 효소면역분석법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 등이 연구되어 왔으나, PCR과 real-time PCR은 DNA 추출, 전기영동 등의 절차와 효소면역분석법은 코팅, 세척, blocking, 항체 및 기질 분주 등 여러 복잡한 단계를 거쳐야만 결과를 도출할 수 있어 식품 등에 오염된 *E. coli* O157:H7을 현장에서 신속·정확하게 검출하기 위한 분석법으로 부적합하다고 알려지고 있다(14).

최근 면역크로마토그래피법은 사용법이 특별한 절차를 거치지 않고, 증균 후 또는 바로 시료에 적용이 가능하며 단시간 내에 결과를 도출할 수 있어 의약 및 식품 등의 다양한 분야에서 활발히 연구가 진행되고 있다. 특히 식중독균의 신속·정확한 검

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

Tel: 82-55-772-1903

Fax: 82-55-757-5485

E-mail: dbqlrhd@hanmail.net

Received April 21, 2011; revised June 13, 2011;

accepted June 29, 2011

출을 위해 여러 병원체에 대한 면역크로마토그래피 키트로 개발되어 시판되고 있고, Jung 등(15)의 연구에서는 *E. coli* O157:H7을 검출하기 위한 면역크로마토그래피법을 개발하여 돼지고기 및 소고기 등에 적용한 연구가 보고되었다. 하지만 대부분 *E. coli* O157:H7은 식품에 적은 농도로 오염되어 있기 때문에 현재까지 보고된 연구들은 이들의 검출을 위해 하루밤 정도의 증균이 요구되며, 육류를 제외한 다른 시료의 적용이 이루어지지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 *E. coli* O157:H7의 검출을 위한 면역크로마토그래피법을 개발하고 돼지고기, 소고기 및 닭고기 등의 육류와 최근 많이 섭취되고 있는 새싹채소를 대상으로 최소 증균 시간을 확인하여 *E. coli* O157:H7을 보다 신속하게 검출하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 시약

본 연구에 사용된 균주는 본 연구실에서 육류로부터 분리한 *Escherichia coli* O157:H7(16)을 사용하였고, 교차반응성 확인을 위해 *E. coli* T-3(ATCC 15490), *E. coli* K-12(ATCC 15490), *E. coli* O1:K1:H7(ATCC 11775) 및 *E. coli* O78:K80:H12(ATCC 43896)와 *Salmonella* Typhimurium(ATCC 29629), *Staphylococcus aureus*(ATCC 27664), *Bacillus cereus*(ATCC 21366) 및 *Listeria monocytogenes*(ATCC 19115) 등을 사용하였다. 이상의 균주들을 계대 배양하기 위해 tryptic soy agar(TSA, BD, Franklin Lakes, NJ, Difco, USA)와 tryptic soy broth(TSB, BD)를 사용하였고, 시료의 증균에 modified EC broth(BD)를 사용하였다.

면역크로마토그래피법의 확립을 위한 antibody-colloidal gold conjugate의 합성에 사용된 항체는 본 연구실에서 생산된 *E. coli* O157:H7 monoclonal antibody(EC MAb)(16)를 사용하였다.

Protein G agarose를 이용한 항체 정제

면역크로마토그래피법에 사용되는 antibody-colloidal gold conjugate를 제작하기에 앞서 EC Mab를 protein G agarose로 정제하여 순수항체인 anti-mouse IgG 분획만을 획득하여 sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 확인하였고, 정제된 항체는 0.05 M phosphate buffer saline(PBS; pH 7.4) 용액으로 투석 후 동결 건조시켜 -20°C 에 보관하면서 합성에 사용하였다.

Colloidal gold의 제작

면역크로마토그래피법의 개발에 앞서 colloidal gold의 제작은 sodium citrate 환원법(17)에 따라 실시하였다. 먼저 tetrachloroauric acid(HAuCl_4)를 0.22 μm filter로 여과된 3차 증류수에 0.01% 농도가 되도록 용해시켜 100 mL을 취하여 깨끗하게 세척 및 건조된 유리용기에 넣고 교반하면서 가열하였다. 용액이 끓기 시작하면 1% sodium citrate 1 mL를 신속히 첨가하여 무색의 용액이 보라색에서 적포도주색으로의 단계적인 변화를 관찰한 후 추가로 5분간 가열하였고, 반응이 끝난 용액은 냉각시켜 냉장 보관하여 항체와의 합성에 사용하였다.

Antibody-colloidal gold conjugate의 준비

Antibody-colloidal gold conjugate를 준비하기 위해 앞서 정제된 EC MAb와 제작된 colloidal gold를 Roth(18)의 방법에 따라 합성하였다. 일반적으로 colloidal gold는 제조할 때마다 직경과 형태

에서 차이가 나타날 수 있고, 그 자체는 불안정한 상태이나 항체 등의 단백질과 결합하면 안정한 상태를 유지하므로(19), 먼저 colloidal gold를 안정화할 수 있는 항체의 양을 결정하였다. EC MAb는 2 mM borax buffer로 농도가 0.1 mg/mL이 되도록 용해시켜 준비하였고, colloidal gold용액은 0.1 M K_2CO_3 를 이용하여 pH 9.0으로 조정 후 E-tube에 1 mL씩 분주하였다. Colloidal gold(pH 9.0)가 분주된 용액에 EC MAb를 0, 10, 20 및 30-150 μL 씩 넣고, 2 mM borax buffer로 각 반응액의 양을 1.15 mL로 동일하게 맞춘 후 실온에서 5분간 방치하였다. 반응이 끝난 반응액에 10%(w/v) NaCl 용액을 50 μL 씩 첨가하고 강하게 교반하여 1분 후 540 nm에서 흡광도를 관찰함으로써 colloidal gold를 안정화시키는 EC MAb의 양을 결정하였다.

안정화시키는 항체의 양이 결정되면 pH 9.0으로 조정된 colloidal gold 용액 20 mL에 EC MAb 용액을 천천히 점적하여 실온에서 30분간 교반 후 10% bovine serum albumin(BSA)용액을 최종농도가 1%가 되도록 첨가하여 다시 실온에서 1시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝나면 10,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 상등액을 제거하여 침전물을 2 mM borate buffer(pH 7.2)로 다시 부유시키는 세척과정을 3 회 반복하고 최종 원심분리 후 1% BSA가 포함된 2 mM borate buffer(pH 7.2)를 초기 colloidal gold 용액의 1/10만큼 첨가한 다음 재혼탁시켜 4°C 에 보관하였다.

면역크로마토그래피법의 개발

면역크로마토그래피법은 3 종의 pad(sample, 1.5 cm \times 0.5 cm; absorption, 1.5 cm \times 0.5 cm; conjugate pad, 1.5 cm \times 0.5 cm)와 nitrocellulose membrane(2.5 cm \times 0.5 cm)이 polyethylene판에 부착되며, 각 pad의 처리 방법은 다음과 같다. Conjugate pad는 EC MAb-colloidal gold conjugate용액을 1% BSA 및 1% sucrose가 포함된 20 mM borate buffer(pH 7.4)와 1:1(v/v)의 비율로 혼합한 후 5 μL 씩 처리하여 37°C 에서 30분간 건조하였고, sample pad는 1% BSA, 0.5% tween 20, 5% sucrose 및 5% dextrose가 포함된 50 mM borate buffer(pH 7.4)에 30분간 침지시킨 후 dry oven(60°C)에서 1시간 동안 건조시켜 사용하였다. Nitrocellulose membrane상에 처리되는 control line은 absorbent pad로부터 0.5 cm 아래에 anti-mouse IgG 양성여부를 판정하는 test line은 absorbent pad에서 1.0 cm 아래에 EC MAb(1 mg/mL)를 PBS용액으로 두 배 희석하여 각각 1 μL 씩 처리하고 37°C 에서 30분간 건조시켜 사용하였으며, absorbent pad는 다른 처리없이 바로 사용하여 개발하였다.

E. coli O157:H7에 대한 최적화된 면역크로마토그래피법의 민감도를 확인하기 위해, *E. coli* O157:H7을 선택증균배지인 mEC broth에 18시간동안 진탕배양 후 원심분리하여 멸균된 PBS로 3 회 세척하고 10진 단계희석법으로 10^8 - 10^1 CFU/mL로 희석하여 각각 200 μL 씩 취해 검출한계를 확인하였다. 또한 특이성 조사를 위해 *E. coli* O157:H7을 비롯한 *E. coli* K-12, *E. coli* T-3 및 *E. coli* O78:K80:H12 등의 대장균과 주요 식중독균인 *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Sal. Typhimurium* 및 *B. cereus*와의 교차반응을 확인하였다.

면역크로마토그래피법에 의한 시료분석

개발된 면역크로마토그래피법을 이용하여 실제 시료에서의 분석가능여부를 확인하기 위해 육류와 새싹채소를 대상으로 *E. coli* O157:H7을 임의로 오염시킨 후 식품공전상의 증균법으로 증균하여 분석하였으며, 동시에 검출 가능한 최소 증균시간을 확인하였

다. 먼저, 육류(돼지고기, 소고기, 닭고기)와 새싹채소를 각각 25 g씩 칭량하여 UV하에 1시간동안 처리하여 준비하였고(16,20,21), mEC broth에서 18시간 배양시킨 *E. coli* O157:H7 배양액의 배지 성분을 제거하여 배지로 인한 균의 생육을 최소화 하기 위해 멸균 PBS로 13,000 rpm에서 5분간 원심수제 후, 약 1×10^8 CFU/100 μ L 농도로 멸균 PBS로 희석하여 희석액을 100 μ L 취해 UV처리하여 살균한 시료에 전체적으로 오염시킨 후 1시간동안 고착시켜 시료를 준비하였다. 준비된 시료를 멸균된 균질화 팩에 넣고 선택증균배지인 mEC broth 225 mL을 첨가하여 stomacher로 균질화한 다음, 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 2시간 간격으로 증균액을 1 mL씩 취하여 앞서 언급한 방법과 동일하게 PBS로 3회 원심수제한 후 최종 볼륨을 200 μ L로 조정하여 면역크로마토그래피법에 적용하였다.

결과 및 고찰

EC MAb의 정제도 비교

Ammonium sulfate 침전법으로 정제된 EC MAb는 순수항체 이외에도 다양한 수용성단백질을 다량 함유하고 있기 때문에 면역크로마토그래피법의 marker로 사용되는 colloidal gold에 항체를 합성하기 위해서는 정제도가 높은 항체가 필요하였다. 따라서 protein G agarose를 이용하여 EC MAb를 정제하고 SDS-PAGE를 이용하여 정제도를 확인한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 ammonium sulfate 침전법으로 정제된 항체에는 항체 이외의 여러 종류의 단백질이 존재함을 확인할 수 있었고(lane B), protein G agarose를 이용하여 정제된 항체의 경우(lane D)는 heavy chain과 light chain만이 존재하는 면역글로불린 G(IgG)임을 확인할 수 있었다. 정제된 항체의 총 양은 10 mg의 ammonium sulfate 침전법에 의해 정제된 항체를 protein G agarose로 정제했을 때 약 1 mg의 순수 면역글로불린이 회수되었다.

Antibody-colloidal gold conjugate의 반응성 확인

EC MAb와 합성될 colloidal gold를 제작하여 전자현미경(transmission microscope, TEM)을 이용하여 gold particle의 직경을 조사한 결과, 직경이 35-40 nm 크기의 colloidal gold가 제작된 것이 확인되었다(Fig. 2). Chaudhuri와 Raychauduri(22)는 가시성 및 입체장에 때문에 면역크로마토그래피법의 개발을 위한 colloidal gold의 최적 직경이 약 40 nm로 보고하고 있어 본 연구에서 제작된 colloidal gold은 약 40 nm로 면역크로마토그래피법의 개발에 적합한 것으로 판단된다.

제작된 colloidal gold와 EC MAb의 합성에 앞서 colloidal gold를 안정화시키는 EC MAb의 양을 확인한 결과, colloidal gold 1mL당 EC MAb를 7 μ L 이상 첨가하였을 때 고유의 색인 적포도주색을 유지하였으며(Fig. 3), 실제 합성에서는 충분한 안정화를 위하여 10% 많은 7.7 μ L를 첨가하여 합성을 실시하였다. 합성된 EC MAb-gold conjugate를 control line과 test line에 각각 처리된 anti-mouse IgG 및 EC MAb와의 반응여부를 확인한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 EC MAb-gold conjugate는 *E. coli* O157:H7 양성(A)의 경우에 control line과 test line 모두 적색선을 형성하였고, *E. coli* O157:H7 음성(B)에서는 control line에서만 적색선이 나타났으며, 대조군으로 사용한 bovine serum albumin(BSA)-gold conjugate(C)는 control line과 test line에서 적색선을 형성하지 않는 것으로 나타났다. 합성된 EC MAb-gold conjugate는 *E. coli* O157:H7과의 결합에 의한 상호작용이 일어나는 것을 육안으로 관찰할 수 있었다.

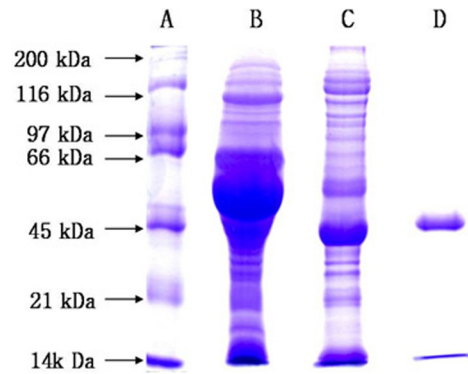


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of EC MAb purified by protein G agarose. lane A: protein marker, lane B: EC MAb precipitated with ammonium sulfate, lane C: unbound fraction, lane D: bound fraction

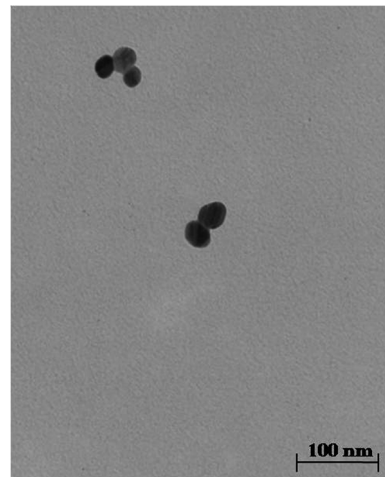


Fig. 2. Photograph of colloidal gold produced by transmission electron microscopy (TEM)

면역크로마토그래피의 민감도 및 특이성 확인

앞서 합성된 EC MAb-colloidal gold conjugate를 이용하여 Table 1과 같이 면역크로마토그래피법을 최적화하였고, 검출한계를 확인한 결과 1.0×10^5 CFU/mL로 나타났다(Fig. 5). 이러한 검출한계는 Jung 등(15)의 연구에서 개발된 면역크로마토그래피법의 검출한계인 1.8×10^5 CFU/mL와 유사한 수준으로 확인되었다. 또한 특이성 조사를 위해 다른 대장균속인 *E. coli* T-3, *E. coli* K-12, *E. coli* O1:K1:H7 및 *E. coli* O78:K80:H12와 주요 식중독 원인균인 *Sal. Typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus* 및 *L. monocytogenes*와의 교차반응성을 확인한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 *E. coli* O157:H7에 대해서는 nitrocellulose membrane상의 control line과 test line에서 선명한 적색선을 확인할 수 있었고, 다른 대장균속에서는 test line에 적색선이 나타나지 않아 교차반응이 없는 것으로 확인되었다.

주요 식중독균에 대해서는 *B. cereus*와 *L. monocytogenes*에서 control line만 적색선이 형성되어 교차반응이 없는 것으로 확인되었고, *Sal. Typhimurium*과 *S. aureus*는 균수가 1×10^7 CFU/mL 이상일 경우 test line에 약간의 적색선이 확인되었으나, 균수가 1×10^6 CFU/mL이하일 경우에는 *E. coli* O157:H7을 제외한 모든 균에서 교차반응성을 나타내지 않아 본 연구에서 개발된 면역크로마토그래피법은 *E. coli* O157:H7을 특이적으로 검출할 수 있는 것으로 판단된다.

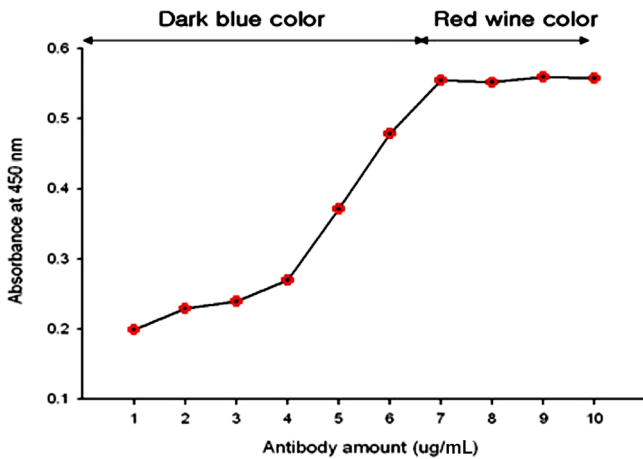


Fig. 3. Determination of EC MAb amount for stabilizing the colloidal gold particle.

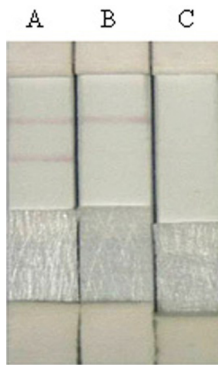


Fig. 4. Confirmation of EC MAb-gold conjugate. A: EC MAb-gold conjugate in conjugate pad (*E. coli* O157:H7 positive), B: EC MAb-gold conjugate in conjugate pad (*E. coli* O157:H7 negative), C: BSA-gold conjugate in conjugate pad

E. coli O157:H7 양성시료의 분석

돼지고기, 소고기 및 닭고기 등의 육류와 새싹채소를 대상으로 각 시료에 약 1×10⁸ CFU/100 μL의 *E. coli* O157:H7을 임의로 오염시켜 24시간 동안 배양하면서 2시간 간격으로 배양액을 취해 분석한 결과는 Table 3과 같다. 돼지고기와 닭고기는 최소 6시간 이상, 소고기는 최소 10시간 이상 배양 시 *E. coli* O157:H7의 검출이 가능한 것으로 나타났다. 그러나 임의로 오염시킨 새싹시료의 경우 2시간 이상 증균시 면역크로마토그래피법을 이용하여 *E. coli* O157:H7을 검출할 수 있었다. 이는 단백질과 지방으로 구성되어 있는 육조직과 다량의 섬유질로 구성되어 있는 채소 조직 내 균 고착 정도의 차이 때문인 것으로 생각된다. 특히 육류 중 소고기의 경우 균 고착 정도가 가장 심하여 검출 가능한 범위의 균수를 확보하기 위해서는 돼지고기와 닭고기에 비해 배양시간이 더 요구되는 것으로 확인되어 Jung 등(15)의 연구에서 확인된 증균시간과 유사하였으나, 현재까지 면역크로마토그래피법의 적용이 보고되지 않은 새싹채소의 경우 단 2시간 이상의 증균만으로 *E. coli* O157:H7의 검출이 가능한 것으로 나타났다. 이는 분석시간을 고려하면 최대 3시간 이내 분석이 가능하여 상업화 된다면, 새싹채소에 오염된 *E. coli* O157:H7으로 인한 식중독의 확산을 예방하는데 유용한 분석법이 될 것이라 생각된다. 또한 육류 및 새싹채소 분석의 경우 식품공전에 등재된 분석법은 증균 및 분리배양 등 최소 96시간 이상의 시간을 필요로 하지만, 개

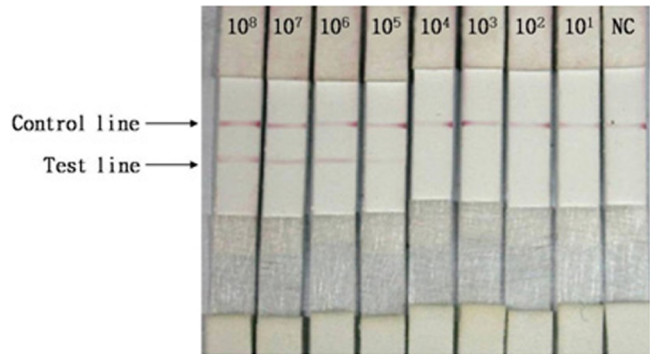


Fig. 5. Sensitivity of the ICG for the detection of *E. coli* O157:H7. NC: negative control, numbers on figure mean amount of *E. coli* O157:H7

Table 1. Conditions of the ICG for detection of *E. coli* O157:H7

Parameters	Treatments
Sample pad	50 mM borate buffer containing 1% BSA, 0.5% Tween 20, 5% sucrose, 5% dextran and 0.05% sodium azide (pH 7.4)
Conjugate pad	5 μL of EC MAb-gold conjugate diluted 1/2 in buffer
Test line	0.5 mg/mL EC MAb
Control line	0.01 mg/mL goat anti-mouse IgG
Absorbent pad	Without treatment
Working solution	PBS

발된 면역크로마토그래피법은 최대 10배 및 32배의 시간단축 효과를 기대할 수 있을 것이라 생각된다. 그 외 Kerr 등(23)이 개발한 *E. coli* O157의 분석을 위한 효소 면역분석법은 증균시간을 제외하고 4시간 이상의 분석시간과 분석자의 숙련도가 필요 요구되며, real-time PCR의 경우는 DNA추출 등의 복잡한 절차 및 값 비싼 장비를 갖추어야 하는 번거로움이 있는 반면, 개발된 면역크로마토그래피법은 신속성, 정확성 및 간편성을 갖추고 있어 많은 시료의 분석에도 용이한 것으로 확인되었다.

따라서 본 연구에서 개발된 면역크로마토그래피법은 시료에 따라 검출이 가능한 증균 배양시간에는 차이가 있으나, 최소한의 증균만을 거쳐 누구나 쉽게 최대 10시간 이내에 분석이 가능한 것으로 나타나 실제로 분석에 이용된다면, 많은 시료의 분석 등에서 분석시간 단축 및 노동력 절감의 이점을 가질 것으로 판단 된다.

요 약

E. coli O157:H7은 요독증후군, 출혈성 대장염 및 설사 등을 유발하는 원인균으로, 전세계적으로 이들의 오염에 따른 식중독 발생이 증가하고 있어, 본 연구에서는 *E. coli* O157:H7을 신속·정확하게 분석할 수 있는 면역크로마토그래피법을 개발하였고, 보다 신속한 검출을 위하여 육류와 새싹시료를 대상으로 최소 증균시간을 확인하였다.

먼저, 면역크로마토그래피법의 개발을 위해 colloidal gold와 EC MAb를 합성하여 EC MAb-gold conjugate를 제작한 다음, 접합여부를 확인한 결과, test line과 control line에 각각 처리되는 EC MAb와 anti-mouse IgG에 특이적으로 반응하였다. 제작된 EC MAb-gold conjugate를 이용하여 개발된 면역크로마토그래피법의

Table 2. Specificity of the ICG to *E. coli* spp. and other bacteria

Bacteria	Number of Bacteria (CFU/mL)					
	1×10 ⁵		1×10 ⁶		1×10 ⁷	
	Control line	Test line	Control line	Test line	Control line	Test line
<i>E. coli</i> O157:H7	+ ¹⁾	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> O1:K1:H7	+	-	+	-	+	-
<i>E. coli</i> O78:K80:H12	+	-	+	-	+	-
<i>E. coli</i> K-12	+	-	+	-	+	-
<i>E. coli</i> T-3	+	-	+	-	+	-
<i>B. cereus</i>	+	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	+	± ³⁾
<i>Sal. Typhimurium</i>	+	-	+	-	+	±
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+	-

¹⁾Appear red band²⁾No appear red band³⁾Suspect (weakly appear band)**Table 3. Determination of minimum enrichment time for the detection of *E. coli* O157:H7 contaminated in meats and sprouts by the ICG**

Samples ¹⁾		Enrichment time (h)												
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
Pork	Control line	+ ²⁾	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Test line	- ³⁾	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Beef	Control line	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Test line	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Chicken	Control line	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Test line	-	-	-	-	± ⁴⁾	±	+	+	+	+	+	+	+
Sprout	Control line	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Test line	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹⁾All samples were inoculated with 1×10⁵ CFU/100 μL²⁾Appear red band³⁾No appear red band⁴⁾Suspect (weakly appear band)

검출한계는 1×10⁵ CFU/mL 수준까지 검출이 가능한 것으로 확인되었고, 다른 대장균속 및 주요 식중독균과의 교차반응성은 나타나지 않았다. 개발된 면역크로마토그래피법을 이용하여 임의로 *E. coli* O157:H7을 오염시킨 돼지고기, 소고기, 닭고기 및 새싹채소를 증균하는 동안 분석한 결과, 돼지고기와 닭고기는 6시간, 소고기는 10시간, 특히 새싹채소는 2시간 후부터 1×10⁵ CFU/100 μL 수준까지 검출이 가능한 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 개발된 면역크로마토그래피법을 이용하여 육류와 채소 등에 오염된 *E. coli* O157:H7을 최대 10시간 이내로 신속히 분석할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구의 저자인 이원경, 류희정, 송정언 및 김경열은 교육과학기술부 BK21 프로그램의 장학금을 수혜받았음.

문 헌

- Johnson WM, Liar H, Bezanson GS. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* 1: 76-80 (1983)
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake RA, Cohen M. Hemorrhagic colitis associated with a rare *E. coli* serotype. *New Engl. J. Med.* 308: 681-685 (1982)
- Lee HJ. Pathogenic agents and outbreak of foodborne diseases at home and abroad. *Korean J. Vet. Public Health* 32: 81-89 (2008)
- Doyle MP. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 12: 289-302 (1991)
- Novello A. Outbreak of *E. coli* O157:H7 and *Campylobacter* among attendees of the Washington County Fair-New York. *MMWR* 48: 803-805 (1999)
- Park S, Kim H, Paek SH, Hong JW, Kim YK. Enzyme-linked immuno-strip biosensor to detect *E. coli* O157:H7. *Ultramicroscopy* 108: 1349-1351 (2008)
- Morrison DM. Colony biopsy in verotoxin-induced hemorrhagic colitis and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Am. J. Clin. Pathol.* 86: 108-112 (1985)
- Lim JS, Yoon JH, Min BK, Hong WK. Detection and identification of shiga-like toxin producing *E. coli* O157:H7 by multiplex PCR. *Food Eng.* 12: 8-14 (2008)
- Paul L, Stephen H, Joanne B, Lynsey D, John Q, Trinad C, Richard OK. Advances in biosensor for detection of pathogens in food and water. *Enzyme Microb. Tech.* 32: 3-13 (2003)
- Dudak FC, Ismail HB. Development of an immunosensor based on surface Plasmon resonance for enumeration of *E. coli* in water samples. *Food Res. Int.* 40: 803-807 (2007)
- Sharma VK, Dean-Nystrom EA, Casey TA. Semiautomated fluorescent PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *E. coli* O157:H7 and other Shiga toxinigenic *E. coli*. *Mol. Cell. Prob.* 13:

- 291-302 (1999)
12. Kwak HS, Cha J, Kwang KJ, Kim H, Park SH, Kim CM. Characterization of verotoxin-producing *E. coli* isolated from domestic foods. *J. Fd. Hyg. Safety* 15: 241-247 (2000)
 13. Fortin NY, Mulchandani A, Chen W. Use of real-time PCR and molecular beacons for the detection of *E. coli* O157:H7. *Anal. Biochem.* 289: 281-288 (2001)
 14. Park S, Durst RA. Immunoliposome sandwich assay for the detection of *E. coli* O157:H7. *Anal. Biochem.* 280: 151-158 (2000)
 15. Jung BY, Jung SC, Kweon CH. Development of a rapid immunochromatographic strip for detection of *E. coli* O157. *J. Food Protect.* 68: 2104-2143 (2005)
 16. Ryu HJ, Kim JS, Kim KY, Nam BR, Shim WB, Kim NY, Jo YJ, Chung DH. Production of monoclonal antibody against *E. coli* O157:H7 and development of enzyme linked immunosorbent assay. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42: 329-334 (2010)
 17. Frens G. Preparation of gold dispersions of varying particle size: Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys.* 241: 20-22 (1975)
 18. Roth J. The preparation of protein A-gold complexes with 3 nm and 15 nm gold particles and their use in labelling multiple antigens on ultrathin sections. *Histochem. J.* 14: 791-801 (1982)
 19. Choi JG, Shim WB, Je JH, Kim JJ, Lee KH, Kim MG, Ha SD, Kim KS, Kim KY, Kim CH, Chung DH. Development of immunochromatography for the rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 299-303 (2007)
 20. Jue Z, Vijay K, Bin H, Brij M, Ben K. Effect of UVA irradiance on photocatalytic and UVA inactivation of *Bacillus cereus* spores. *J. Photoch. Photobio. B.* 94: 96-100 (2009)
 21. Lee OM, Kim HY, Kim TH, Lee MJ, Yu SH. Inactivation of pathogenic microorganisms by UV -C, VUV, Ozone and Gamma radiation. *Appl. Chem.* 13: 109-112 (2009)
 22. Chaudhuri B, Raychauduri S. Manufacturing high-quality gold solution. Vol. 7, pp. 46-57, IVD Technology, Los angles, CA, USA (2001)
 23. Kerr P, Chart H, Finlay D, Pollock DA, Mackie DD, Ball HJ. Development of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of animal and human *E. coli* O157 strains. *J. Appl. Microbiol.* 90: 543-549 (2001)