

발간등록번호

11-1541000-001385-01

최 종 보 고 서

자성나노 기술을 활용한 축·수산물 내 병원성 미생물 진단제 및 자동화 장비 개발

(The development of the diagnostics and automatic
equipment for pathogenic microbe detection
with magnetic nano tech)

(주) 중검

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “자성나노 기술을 활용한 축·수산물 내 병원성 미생물 진단제 및 자동화 장비 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 4월 9일

주관연구기관명 : (주) 중 겹

주관연구책임자 : 김 준 만

세부연구책임자 : 김 준 만

협동연구기관명 : (주) 중 겹

협동연구책임자 : 임 명 운

협동연구기관명 : (주) 비전과학서울

협동연구책임자 : 정 창 민

요 약 문

I. 제목: 자성나노 기술을 활용한 축·수산물 내 병원성 미생물 진단제 및 자동화 장비 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

가. 축·수산물 오염 병원성 미생물 검사의 신속·용이·정확성을 보장하는 검사·제어시스템을 개발함으로써 상시적 검사체계 구축.

나. 자성나노기반의 원천기술 개발을 통한 브루셀라, 조류인플루엔자 등 산업동물질환 진단 체계 구축.

다. 축·수산물 HACCP 적용 작업장에 대한 미생물 검사 방법 표준화.

라. HACCP 및 질병방역 등 정부시책의 효율적인 시행에 필요한 기반기술 제공.

2. 연구개발의 필요성

가. 식중독 발생에 의한 사회경제적 손실이 연간 약 1조 3000억원으로 추정되고 있으며, 단 체급식과 외식증가, 기후변화 등으로 2003년 이후 식중독 발생 증가 추세

나. 국내 분리주의 자원화 미비 및 원인체별 연구의 한계로 현장 적용 통합 진단체계 구축에 한계

다. 국내 실태조사에 근거한 광범위 바이오 마커를 동시 적용하는 효율적인 검출 시스템 개발 시급

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 국내 분리균주 수집분석 및 자원화

2. 국내 분리균주 대표 특이 바이오 마커 개발

3. 바이오마커 (BT-병원체 특이성), 자성나노입자 (NT-병원체 농축을 통한 민감성), 자동화 장비 (IT-사용의 편리성) 기술을 접목한 제어기술 확보

4. HACCP 적용 시 생산 및 유통과정 단계별 병원성 세균의 오염 현황 파악 및 이를 활용한 체계적 위해요소 중점관리 메뉴얼 개발 (현장 적용)

IV. 연구개발결과

1. 주요 오염지침 미생물 및 주요 병원성 미생물의 분리, 오염현황 파악 분리된 미생물의 특성분석 및 역학적 특징 분석

가. 병원성대장균 검출율: 약 2.0%(70/5046)

나. 살모넬라 검출율: 약 10.5%(532/5046)

다. 리스테리아 검출율: 약 17.8%(92/518)

라. 비브리오 검출율: (22/124)

2. 주요 병원성 미생물에 대한 단/다클론 항체 개발(병원성 대장균, 살모넬라, 리스테리아, 브루셀라)
3. 진단시스템에 적용할 complex 구성성분 개발
 - 가. multi-protein G/A 개발, 재조합 multi-protein G 발현 및 정제조건 최적화
 - 나. 자성나노입자의 개발, 자성나노입자 성상 최적화 및 pG-nano particle-Ab 복합체 완성
4. 진단제제의 유통기한 설정 및 품질관리를 위한 시험 평가
5. 진단제제 생산 및 평가 관련 균주와 단클론 항체 분비 세포주의 효율적 관리를 위한 관리 시스템 구축
6. 선진국 장비의 기본 사양 분석 및 방향 설정
7. 자동화 단계별 요구·충족 조건 설정
8. 축·수산물 오염 병원성 미생물 고감도 검출 진단제제의 현장 적용을 위한 자동화 장비 개발
9. 위해요소중점관리기준(HACCP)의 적용방안 검토

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 인수공통 병원체 진단제제 및 장비 개발 및 상품화
2. 국내외 특허 확보
 - 가. multi-protein G complex 개발을 통한 국내외 특허 출원 및 등록
 - 나. 자동화 장비 원천기술에 대한 국내외 특허 출원 및 등록
3. 자성나노입자-protein G multimer 복합체의 활용성 확대/극대화를 통한 연계 연구 활성화
4. 축/수산물 미생물검사의 신속, 용이, 정확성 확보 및 보편화/상시화를 통한 국민 신뢰도 제고 및 축/수산식품 생산 수준의 질적 도약
5. 축/수산물 생산/유통 단계별 효율적 위해요소 중점관리체계 구축

SUMMARY

I. Title: The development of the diagnostics and automatic equipment for pathogenic microbe detection with magnetic nano tech.

II. The purpose and necessity of R & D

1. Purpose

A. Establishment of rapid, easy and accuracy monitoring system to detect pathogenic microorganism in livestock and fishery products.

B. Establishment of animal disease diagnostic system including Brucella, avian influenza, etc through development of magnetic nano-based technology

C. Standardization of detect microorganism in livestock and fishery product processing plant.

D. Provide the based technology to effective implementation of government policy of HACCP and disease prevention etc.

2. Necessity

A. Social and economic losses due to foodborne illness per year is estimated at 1.3 trillion won, and foodborne illness are increasing since 2003 due to climate change, increasing catering and eating out.

B. Limitation of integrated diagnostic system due to lack of domestic isolates and research for various pathogens

C. Urgent of develop efficient detect system applying extensive biomarker imultaneously based on national survey.

III. Contents and scope of R & D

1. Collection, analysis and utilization of isolates collected in Korea

2. Development of specific biomarkers representing domestic strains

3. Acquisition of control technology that combines Biomarkers (BT-pathogen specificity), magnetic nanoparticles (NT-pathogen susceptibility through enrichment), and automation equipment (IT-ease of use) technology that combines secure control technology

4. Developing systemic Hazard Analysis Critical Control Manual for control pathogenic bacteria in production and distribution process

IV. Result

1. Detection and identifying major indication and pathogenic microorganisms and

characterization of isolated microorganisms.

A. Prevalence of pathogenic *E. coli*: 2.0%(70/5046)

B. Prevalence of *Salmonella* spp.: 10.5%(532/5046)

C. Prevalence of *Listeria* spp.: 17.8%(92/518)

D. Prevalence of *Vibrio* spp.: 17.7% (22/124)

2. Developing monoclonal/polyclonal antibodies of major pathogenic micro-organisms (pathogenic *E. coli*, *Salmonella* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., etc)

3. Development of complex components to apply diagnostic system

A. Development of multi-protein G/A, Optimizing expression and purification conditions of recombinant multi-protein G

B. The development of magnetic nanoparticles, magnetic nanoparticles optimization, and pG-nano particle-Ab complex

4. Setting and the shelf life of about diagnostic reagents for quality control assessment

5. Establishment of management system for control of hybridoma cell lines and diagnostic reagents production and evaluation-related strain

6. Analysis and direction setting of equipment of advanced countries

7. Setting the demand-meet condition of automation step

8. The development of the diagnostics and automatic equipment for pathogenic microbe

9. Review of Hazard Analysis Critical Control (HACCP) application plan

V. Plans to take advantage of research results and achievements

1. Development and commercialization of diagnostic agents and equipment for detecting zoonotic pathogens

2. domestic and international patents

A. Application and registration domestic/international patents of developing multi-protein G complex technology

B. Application and registration domestic/international patents of automation equipment technology

3. Activation of related research for magneticnanoparticles-protein G multimer complex

4. Improve the hygiene quality and people credibility through quick, easy, accurate test for pathogenic microorganisms in livestock/fishery products

5. Establishment of effective Hazard Analysis Critical Control Systems for livestock and fishery products

CONTENTS

Chapter 1. Overview of the study.....	8
Chapter 2. Status of research and development.....	16
Chapter 3. Contents and Results.....	19
Chapter 4. Conclusion and contribution to the related fields.....	184
Chapter 5. Applications of the study.....	192
Chapter 6. Informations from other international institutes.....	201
Chapter 7. References.....	201

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	19
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	184
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	192
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	201
제 7 장 참고문헌.....	202

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

1. 축·수산물 오염 병원성 미생물 검사의 신속·용이·정확성을 보장하는 검사·제어시스템을 개발함으로써 상시적 검사체계 구축.
2. 자성나노기반의 원천기술 개발을 통한 브루셀라, 조류인플루엔자 등 산업동물질환 진단체계 구축.
3. 축·수산물 HACCP 적용 작업장에 대한 미생물 검사 방법 표준화.
4. HACCP 및 질병방역 등 정부시책의 효율적인 시행에 필요한 기반기술 제공.

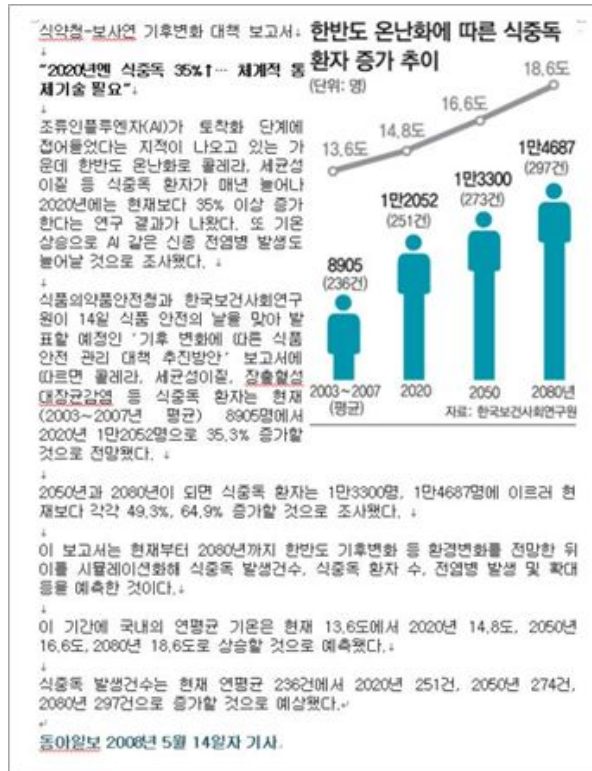


그림 2. 기후 온난화에 따른 식중독 발생 증가 예상 언론보도 (동아일보, 2008년)

나. 국내현황

국내에서는 살모넬라의 경우 전체적으로 2,000여 종 가운데 20여종이 다발하고 있으며, 병원성 대장균의 경우 180여 종 중 35종 정도가 다발하고 있는 것으로 알려져 있다. 리스테리아의 경우, 전세계적으로 1/2a, 1/2b, 그리고 4b 등 3종 정도가 인체에 병원성을 나타내면서 다발하고 있는 것으로 알려져 있으나 현재 국내에서는 검출 및 진단 시스템의 미비로 말미암아 보고된 사례가 희귀하다. 이러한 점은 기술적인 문제로 말미암은 것으로 추정되며, 보다 정밀하고 신속한 진단방법이 확립될 경우 그 발생 건수는 큰 폭으로 증가할 것으로 예상된다. 앞서 그림에서 확인할 수 있는 바와 같이 각종 식중독 발생 원인체 중 대부분이 매년 증가추세에 있으며 이러한 요인은 언급한 바와 같이 다양한 요인들에 의한 것으로 추정된다.

다만, 주목되는 점은 원인체 불명도 아울러 큰 폭의 증가가 보고된다는 점인데, 이는 해외에서 다양한 병원체들이 유입됨에도 기인한 바 있으나, 주로 국내에서 진단할 수 있는 효율적인 시스템의 부재가 주 원인이라고 판단된다. 이러한 효율적인 시스템에는 보다 다양한 진단 바이오마커의 개발이 늦어지고 있고, 또한 다양한 과학자들에 의해 개발된 마커들이 통합적으로 연계되어 사용될 수 있는 효과적인 체계가 구축되지 않은 것에도 상당히 기인한다고 판단된다. 현재 식품산업에 있어서 현장에서 효과적으로 활용될 수 있는 진단 및 검출 시스템은 아직 개발된 바 없다. 현장에서의 효율적인 활용성을 극대화 하기 위해서는 비전문가에 의한 경제적인 활용성을 갖춘 시스템이어야 한다는 점에는

많은 연구자들이 공감하는 바일 터이다.

다. 제품 및 시장분석 측면

국내 및 국외시장 분석결과 혈청형 진단제제의 경우 민간부문 및 공공부문의 상당부분이 수입품에 의존하고 있어, 본 연구과제를 통해 국내 분리주 중심으로 진단제제를 개발하여 국내 시장을 신규 개척하는 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단되며, 또한 자동화 장비의 경우, 핵산추출용으로만 활용될 수 있도록 국내외에서 개발되어 판매되고 있으나, 다양한 병원체에 공통적으로 적용할 수 있는 장비는 세계적으로 아직 개발된 바 없고, 이는 비단 장비의 개발의 문제에 국한된 것이 아니라 장비와 함께 연동되는 중간 매개진단시약의 미비로 말미암은 측면이 크다고 판단된다. 따라서 본 연구과제를 통해 진단시약 및 이와 함께 연동되는 자동화 장비를 개발함으로써 상당한 상호 상승효과를 거둘것으로 기대되며, 이를 국내외에 판매할 계획이다.

라. 국외 제품생산 및 시장 현황

일본의 경우, Denka-Seiken사에서 독점적으로 생산하고 있으며, 이 회사의 매출현황이 곧 일본의 매출 현황이라고 판단된다 (일본 Denka-Seiken사의 2002-2006년 매출현황).

일본만 약 160억원, 전세계적으로 3000억원으로 평가

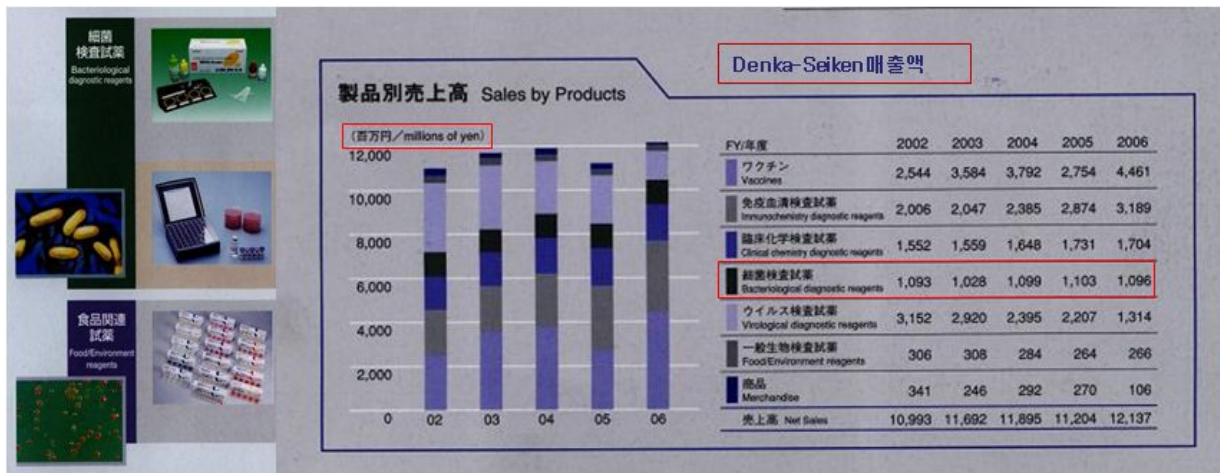


그림 3. 일본 Denka-Seiken사의 매출현황

위 표에서 보는 바와 같이 연간 평균 10억엔 정도의 매출로 약 167억원 정도의 시장을 형성하고 있다. 또한 미국 및 캐나다 등 북미의 경우 약 940억원 (Bio-rad사, Becton-Dickinson사 등), 유럽의 경우 800억원, 그리고 관련 질환이 다발하는 동남아시아와 아프리카의 경우 1,200억원 정도의 시장 규모를 형성하고 있는 것으로 추정되고 있다.

2. 기술적 측면의 필요성 (특히, 논문 등)

가. 국내 현황

앞서 언급된 바와 같이 다양한 연구자들에 의해 각기 연구되어 효과적인 현장 적용성을

갖춘 시스템의 구축에는 원천적으로 한계를 가지며, 이러한 다양한 연구결과물들을 융합할 수 있는 포용적인 시스템의 개발이 이루어진 바 없었다. 또한 국내의 식품오염 병원체에 대한 실태조사도 지엽적으로 이루어져 전국적인 규모에서의 파악에 한계를 가지며, 또한 전국적인 조사사업의 결과물로서의 국내 분리주 수집/분석 연구 또한 미비하여 이를 활용한 자원화 단계에도 진입하고 있지 못한 실정이다. 최근에 농림수산식품부와 식품의약품안전청을 중심으로 HACCP 체계의 보급이 원활히 이루어져 식품관리 측면에서 높은 위생수준을 확보하고 있다고 판단되나, 특히 축산물의 경우 병원성 대장균과 살모넬라에 의한 오염은 광범위할 것으로 추정되어 본 연구와 같은 실제적인 조사결과를 확보하는 것이 향후 식품안전관리에 관한 기술적/정책적 기반제공에 기초가 될 것으로 사료된다.

인체보건관련 진단체계는 보건복지부와 질병관리본부를 중심으로 전국적인 조직과 아울러 효율적인 병원체별 진단체계구축 및 다양한 고가의 장비와 전문인력 확보 등 식품분야에 비해 높은 수준으로 발전하고 있다고 판단되나, 농식품분야의 경우 식품의 유통기한이 짧고 빠르게 소비되는 점, 대량으로 유통되는 점 등에 기인하여 보건분야에 비해 보다 효율적인 진단/검출 시스템의 개발이 요구된다고 하겠다. 또한 다양한 식품산업분야에 종사하는 인력들 중 이와 관련된 전문가가 매우 적다는 점도 현장적용성을 높이 갖춘 시스템의 개발이 필수적이라는 점을 뒷받침한다고 하겠다.

나. 특히 분석의 측면

기존 특허는 자성나노입자와 단백질이나 유전자를 단순히 결합시켜 특정 분야에 치중되어 활용될 수 있도록 함으로써 활용도가 낮고, 시장 형성에 있어서도 좁은 보호범위에 있으므로, 삼중합체를 이용하여 국내외 여러 연구자들에 의해 개발된 다양한 바이오마커를 활용할 수 있도록 함으로써 이러한 한계를 극복할 수 있다.

또한 자동화 장비의 자동화율을 현저히 높여 선진국의 장비 수준보다 높임으로써 중간 매개체와 아울러 활용도를 높일 수 있을 것으로 기대된다.

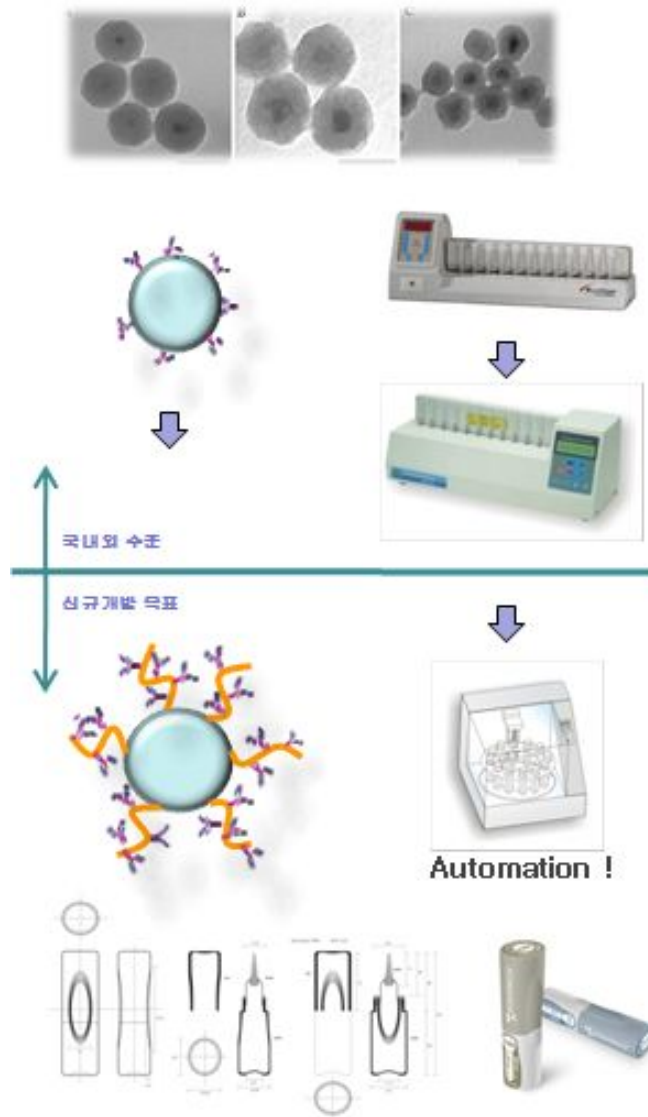


그림 4. 기존 장비와 자동화를 통한 삼중복합체의 효율화 비교 개념 모식도

○ 기존진단 방법 및 신규 검출시스템 비교

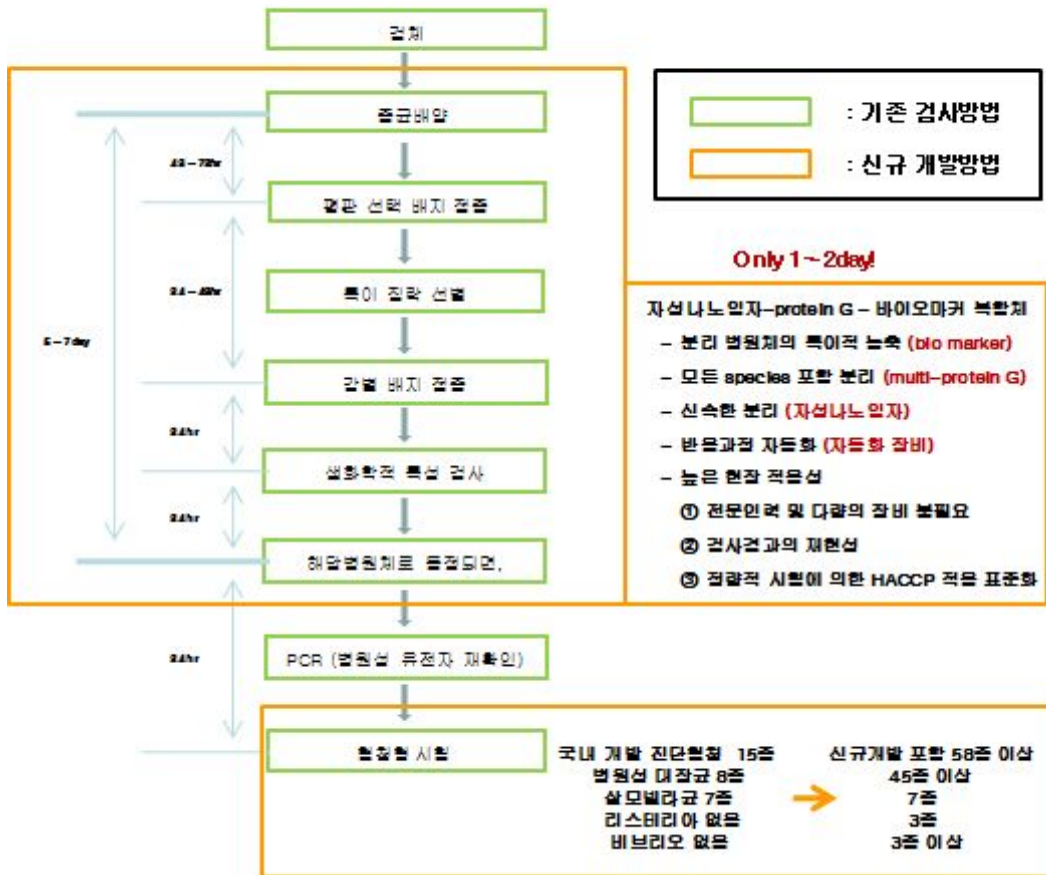


그림 5. 기존 검사방법과 본연구과제를 통해 개발된 신규 검사법의 절차 비교 모식도

제 3 절 연구개발의 범위

1. 국내 분리균주 수집분석 및 자원화

- 가. 축·수산물 생산부터 판매의 전 과정에서 존재하는 국내 유행 인수공통 병원체 오염실태·현황분석 및 분리주 확보.
- 나. 혈청형 및 역학적 특징 분석.
- 다. 표준주와의 비교분석을 통한 그룹화 및 분류.

2. 국내 분리균주 대표 특이 바이오 마커 개발

- 가. 축산물 (병원성 대장균, 살모넬라균, 리스테리아균), 수산물 (비브리오균)의 주요 병원성 미생물에 대한 항체균 개발 및 진단제 표준화.
- 나. 표준 진단제 개발 및 국내 분리주 중심의 조성 결정.
- 다. 진단용 바이오 마커 개발 및 진단제 적용.

3. 바이오마커 (BT-병원체 특이성), 자성나노입자 (NT-병원체 농축을 통한 민감성), 자동화장비 (IT-사용의 편리성) 기술을 접목한 제어기술 확보

- 가. 바이오마커와 나노입자의 결합효율성 증진시키는 효과적 매개체 개발 (triple complex), 나노입자의 크기 및 결합 방향성 최적화.
- 나. 단위 나노입자 당 결합 마커의 양·질적 향상을 통한 최적의 조합 구성.
- 다. 생산 공정 단축기술 (단백질 정제과정 축소 등) 및 바이오마커/나노입자 대량생산 공정 개발을 통한 경제성 확보.
- 라. 시료와 triple complex 적용과정의 장비자동화를 통한 분석 표준화.
- 마. 개발된 제품의 현장시범적용 및 평가.
- 바. 시제품 제작 및 산업화.

4. HACCP 적용 시 생산 및 유통과정 단계별 병원성 세균의 오염 현황 파악 및 이를 활용한 체계적 위해요소 중점관리 메뉴얼 개발 (현장 적용).

- 가. feed-back 통한 사용자 중심의 편리성 확보.
- 나. 최적화, 평가 후 SOP 기반 현장 적용 프로토콜 확립.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 병원체 진단용 바이오 마커개발 현황

가. 살모넬라

살모넬라의 경우 7종의 다클론 항체가 개발된 바 있고, 닭 등 조류에서 특히 문제가 되는 serogroup D에 속하는 *S. gallinarum* 및 *S. pullorum* 등에 대한 지표물질이 집중적으로 개발된 바 있으나 살모넬라의 LPS의 종류에 따른 항원성 인자 (antigenic factor)별 단클론 항체의 개발은 이루어진 바 없으며, 본 연구과제를 통해 최초로 개발 완료되었다.

나. 리스테리아

리스트리아의 경우도 인체에서 주요 병원성을 일으키는 주요 혈청형 3종 (1/2a, 1/2b, 4b)에 대한 단클론 항체도 국내외적으로 개발된 바 없어 본 과제를 통한 주요 성과로 꼽힌다고 할 수 있다.

다. 병원성 대장균

일본에서 56종, 유럽에서 180여종 등 선진국들을 중심으로 진단 및 검출용 마커가 개발된 바 있으나 국내에서는 본 연구소에서 본 연구과제 전에 3종을 개발한 바 있고, 본 과제를 통해 주요 병원성 대장균 45종에 대한 항체를 개발 완료하였다.

라. 브루셀라

이 역시 선진국들을 중심으로 이미 개발되어 활용되고 있으며, 본 과제를 통해 선진국과 유사한 수준의 바이오 마커를 확보했다고 할 수 있겠다.

마. 기타

전세계적으로 가장 대표적인 바이오 마커 회사는 일본의 Denka-Seinken사이다. 이 회사에서만 수백종의 항체군들이 생산되며, 이는 잘 조직된 균주관리 시설 및 인원, 그리고 체계적인 생산시설에 기인한다고 평가된다. 다음 그림에서와 같이 생산되는 품목의 종류가 매우 다양하며, 이러한 한계를 국내 연구진들이 극복하는데는 상당한 시일이 소요될 것으로 판단된다. 따라서 이러한 한계를 극복하면서 새로운 시장을 창출하는데는 protein G와 같은 기능성 단백질을 활용하여 기존에 다수 개발되어 있는 항체군들조차 모두 포용할 수 있는 진단시스템의 구축이 더욱 바람직할 것이며, 이러한 목표에 본 과제의 성과물이 부합된다고 판단된다.



Denka Seiken사의 항혈청 진단제 생산목록

Shigella Antisera
Escherichia coli Antisera
 Toxigenic *Escherichia coli* Pili Antisera
Salmonella Antisera
Vibrio parahaemolyticus Antisera
 Hemolytic *Streptococcus* Grouping and Typing Antisera
Pseudomonas aeruginosa Antisera
 Coagulase Antisera
 Alkaescens-Dispar Antisera
Vibrio cholerae Antisera
Yersinia enterocolitica O Antisera
Klebsiella Antisera
 Serratia O Antisera
Bordetella pertussis Antisera
Haemophilus influenzae Antisera
Legionella Antisera
Yersinia pseudotuberculosis Antisera
Flavobacterium meningosepticum Antisera
Campylobacter Antisera
Listeria Antisera
Streptococcus pneumoniae Antisera

그림 6. 일본 Denka-Seiken사의 생산 진단제 및 목록

2. 자성나노입자 개발 현황

자성나노입자 소재는 철산화물계 구형입자만 국내외적으로 개발되고 있으며, 기능성 발현을 위하여 자성입자 표면에 작용기를 치환시키는 연구가 주를 이루고 있다. 그러나 본 연구의 주 목적인 다양한 연구자들에 의해 개발된 바이오 마커와의 높은 호환성을 가지는 자성나노입자를 개발하기 위해 multi-protein G/A 등을 활용한 예는 없으며, 이를 활용할 경우 본 연구를 통해 개발된 바이오 마커 뿐만 아니라 거의 모든 종류의 항체를 활용할 수 있는 고연동형 소재를 개발할 수 있다는 점에서 앞선다고 평가할만 하겠다.

선진 대기업 (Roche, Promega, Invitrogen 등)에서 철산화물계 자성나노입자에 고분자 코팅이나 유기 작용기가 치환된 기능성 자성나노입자가 상용화되고 있으나 소재간 반발력 등에 의한 효율저하 문제가 발생되고 있다. 이를 해결하기 위한 대안으로 새로운 자성나노입자 개발에 관심을 가지고는 있으나 아직 대안소재로 보고된 예는 없다.

3. 자동화 장비 개발 현황

자성나노입자 기반 자동화장비는 3억원이 넘는 고가의 장비가 선진국에서 개발된 바 있으나 이는 식품산업 전반에 걸쳐 활용될 수 있을 만큼의 경제성을 갖추고 있지 못할 뿐만 아니라, 고도의 전문적인 지식을 기반으로 구동되기 때문에 현장적용성 측면에서 한계를 가진다고 판단된다.

따라서, 본 과제의 결과물과 같이 비전문가에 의해서도 일정부분의 작동 교육이수만을 통해 손쉽게 구동될 수 있는 장비의 수요가 매우 클 것으로 예상된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절

병원성 미생물 특성 분석/진단시스템 현장적용·평가 및 HACCP 적용 모델 구축 (1세부과제)

1. 업종별, 축종별 공정 분석 및 발생가능 위해 조사

가. 도축장

- (1) 장내용물(분변) 등에 의한 식육에의 병원성미생물 교차오염 가능성
 - 내장적출 시 파열로 인한 식육의 오염 가능성
 - 내장반이통의 오염으로 인한 식육부산물물의 오염 가능성
- (2) 칼, 갈고리 등을 통한 교차오염의 가능성
- (3) 예냉실내 도체간의 접촉으로 인한 교차오염 가능성

나. 도계장

- (1) 내장적출시 파열로 인한 계육의 분변 오염 가능성
- (2) 냉각수에 의한 교차오염 가능성
- (3) 도계 작업 후 계육 저장단계에서의 교차오염 가능성

다. 식육가공장

- (1) 칼, 도마, 장갑 등 작업환경으로부터의 교차오염 가능성
- (2) 완제품 보관시 저장온도 부적절로 인한 미생물 증식 가능성

라. 판매장

- (1) 가공장에서 작업이 끝난 후 보관, 운반, 전시 등의 공정에서 미생물이 증식하거나 교차오염 가능성
- (2) 유통단계의 마지막 단계인 판매장에서 식육(우육, 돈육)과 계육에 대한 미생물 위해도 조사

마. 소, 돼지, 닭에서의 업종별, 공정별 미생물학적 오염도 조사 및 분석

바. 어시장

- (1) 각 지역별 어시장 3곳 이상 방문
 - (가) 수온이 높은 서해와 남해를 중심으로 비브리�균 오염위험이 높은 7~9월 사이 방문
 - (나) 기온이 높아 수조의 온도 관리 미흡시 세균 번식 가능성
 - (다) 지역별 검출율에 차이가 있는지의 여부
- (2) 수조의 물을 통한 교차오염의 가능성
- (3) 타 어종과의 접촉으로 인한 교차오염 가능성

사. 횡집

- (1) 어시장에 비해 비교적 장기간 보관할 경우 관리 소홀로 인한 세균 증식 가능성(수온,

수조의 청소상태 미흡 등)

- (2) 보관용 수조의 물에 의한 교차오염 가능성
- (3) 사용하는 칼, 도마로 인한 교차오염 가능성

아. 어류

- (1) 아가미 및 비늘 (비브리오가 많이 서식하는 것으로 알려짐) 과 기타 식용 부위 분리 채취
- (2) 어종별 비브리오균 검출 여부에 차이가 있는지의 여부

자. 패류

- (1) 지역별, 종류별 비브리오균 검출을 조사

2. 주요 오염지침 미생물 및 주요 병원성 미생물의 분리, 오염현황 파악 분리된 미생물의 특성분석 및 역학적 특징 분석

가. 살모넬라와 대장균의 분리, 특성 분석 및 역학적 분석

(1) 개요

본 연구과제의 최종 목적은 기존 미생물 검사법 즉, 증균 배양 및 선택배지 등을 사용하는 복잡한 일련의 과정을 거치지 않고 특이적인 바이오마커, multi protein G, 그리고 nano bead의 triple complexes를 적용하는 자동화 장비를 개발하여 4-5일 정도 소요되는 시간을 1일 이내로 단축하는 것이다. 물론 기존의 방법은 분석자의 주관적인 기술이 개입되어 식품공진 및 제반 규정에 기반한 동일한 방법을 사용하더라도 다양한 편차가 날 수 있으므로 시간의 단축뿐만 아니라 개연성 있는 결과 즉, 비전문가에 의해 수행되더라도 보다 특이적이고 목표한 병원성 미생물의 신속한 검사가 가능하게 하는 것이 최종 목표라 하겠으며 병원성 미생물인 살모넬라와 대장균 조사사업은 다음에 기술된 방법대로 진행되었다.

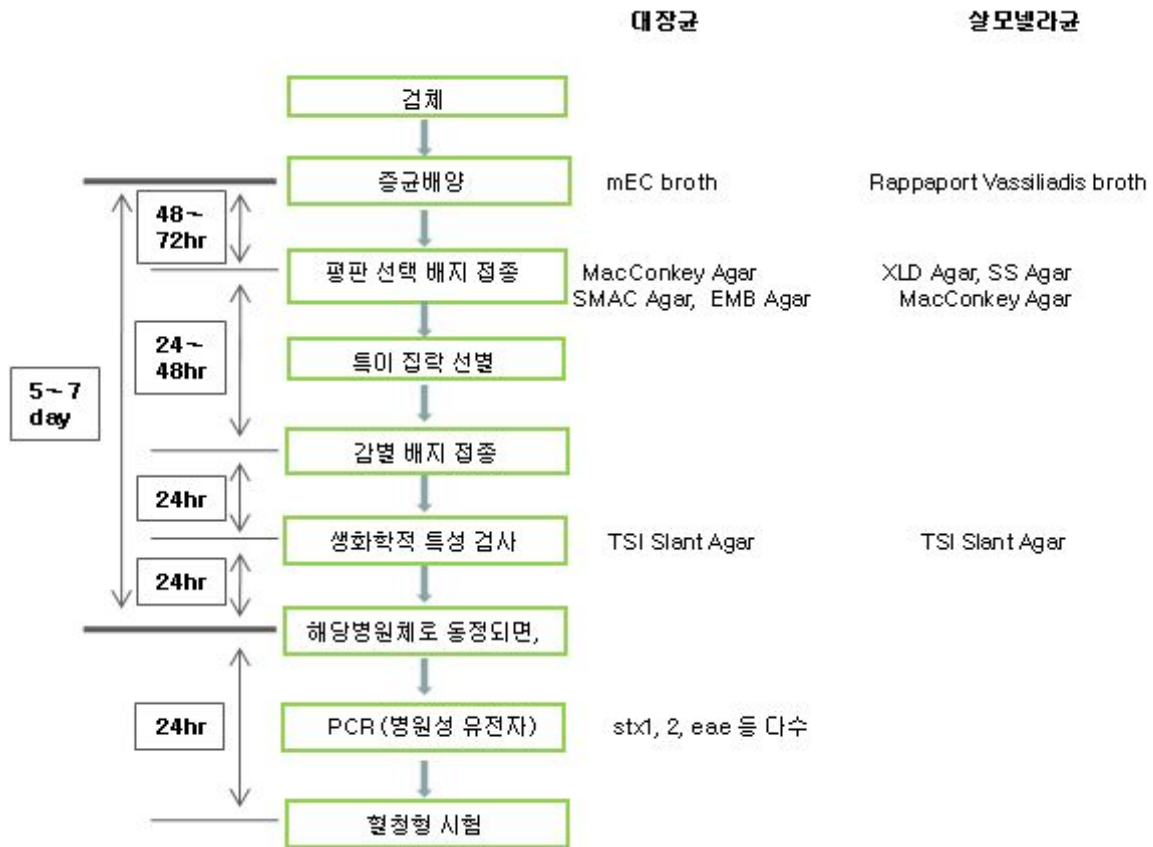


그림 7. 대장균과 살모넬라의 역학적 분석 모식도

상기와 같은 전형적인 과정을 거쳐 강원도에서 제주도에 이르기까지 전국적으로 도축장, 육가공장, 판매장에서의 각기 정한 종류의 샘플을 수거하여 검체 전처리를 실시한 후, 목표 균의 분리 및 동정을 실시하였다. 리스테리아의 경우 냉장 상태의 유통과정에서 증식하는 특성을 고려 판매장의 샘플들을 대상으로 조사를 실시하였으며, 도계장의 샘플들도 분석대상에 포함시켰다. 그리고 본 조사는 특히 하절기 즉, 8월에서 11월까지 조사사업을 집중적으로 수행하였다. 그 결과는 다음과 같다.

(2) 전국적 조사사업의 검체 채취 대상 기관과 기관별 검체 종류 및 검체수

아래와 같은 농림수산식품부 안전위생과의 공문협조를 받아 수행하였다. 동시에 다수의 검체가 실험에서 매일 접수되어야 하는 관계로 혼란을 방지하기 위하여 바코드 시스템을 활용하였으며, 조사원들을 각 기관에 파견하여 직접 검체를 수거하는 것을 원칙으로 하였다. 다만, 도축장과 도계장의 경우 해당 검사관 (수의사)의 협조를 얻어 택배를 활용함으로써 검체를 수거하였다. 그 분류 및 내용은 다음과 같다.



농림수산식품부

수신자 수신자 참조
(경유)

제목 2009년도 농림기술개발 사업과 관련한 시료채취 등 협조 요청

1. 우리부가 외부 전문기관을 통해 시행 중인 2009년도 농림기술개발사업 중 ‘자성나노 기술을 활용한 축·수산물 내 병원성 미생물 진단제 및 자동화 장비 개발’에 관한 것입니다.

2. 이 사업은 국내 유행 세균주를 전국적으로 조사, 분리·동정하고 이들 분리균주(특히, 병원성 대장균, 살모넬라균, 리스테리아균 및 비브리오균)에 대한 특이 바이오마커 및 신속검사 방법 등을 개발함으로써 축·수산식품의 안전성 검사 및 HACCP 등 위해 예방프로그램에 활용할 수 있도록 하기 위해 추진되고 있습니다.

3. 축산분야에 대하여는 도축장, 가공장 및 식육판매장에서 시료를 채취하여 오염 지표 미생물(Total bacterial count, Coliform) 및 병원성 미생물(대장균, 살모넬라균, 리스테리아균) 등을 조사할 계획으로 있는 바, 각 시·도에서는 동 기술개발 사업이 효과적으로 시행될 수 있도록 아래 사항에 대하여 협조하여 주시기 바랍니다.

- 아 래 -

가. 도축장에서의 시료채취 및 송부(검사관 또는 자체검사원)

- o 대상 도축장 : 포유류 및 가금류 도축장 전체
- o 시료채취 시기 : 1~2차례 (8월~11월)
- o 시료채취 장소 : 식육, 분변, 작업환경에서 채취
- o 시료채취 및 송부방법
 - 시료채취에 관한 세부요령은 채취도구 배포 시 별도로 알릴 예정
 - 시료는 배포된 시료용기에 담아 다음 주소로 택배(착불) 송부 :
 - (우) 425-110,
 - 주소: 경기도 안산시 단원구 성곡동 688 시화공단 5바 701호 (주)중검
 - 수취인 : 김현규
 - 연락처 : 김현규 (전화) 031-434-2184 (팩스) 031-434-2185

* 시료채취·송부를 위한 도구와 용기는 연구사업단에서 각 도축장에 사전 연락 후 송부할 계획(시료채취 최소 1주전)

(가) 전국적 조사 대상 기관선정 및 분포

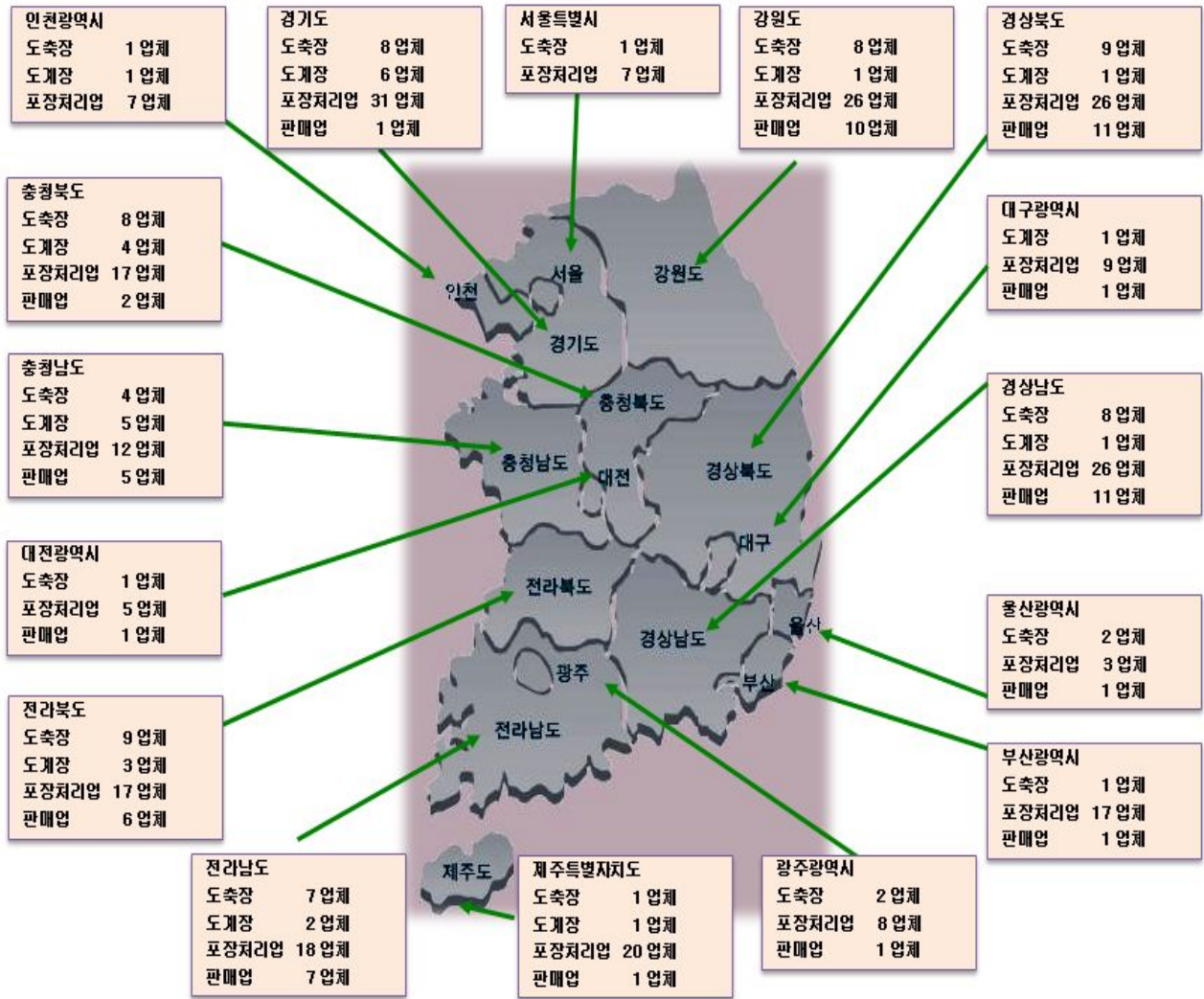


그림 8. 전국적 조사 대상 분포도

(나) 기관별 검체 종류 및 검체수

- ① 도축장 : 샘플채취대상 총 22개
 - ㉠ 소식육 5개
 - ㉡ 돼지식육 5개
 - ㉢ 소내장받이통 2개
 - ㉣ 돼지내장받이통 2개
 - ㉤ 소분변 2개
 - ㉥ 돼지분변 2개
 - ㉦ 소 칼 및 갈고리 각 1개
 - ㉧ 돼지 칼 및 갈고리 각 1개
- ② 도계장 : 샘플채취대상 총 14개

- ㉠ 계육 6개
- ㉡ 냉각수 4개
- ㉢ 분변 4개
- ③ 식육포장처리업체
 - ㉠ 식육 6개
 - ㉡ 장갑 2개
 - ㉢ 칼 2개
 - ㉣ 도마 2개

(다) 전국 및 시도별 기관 분포 및 채취 샘플수

표 1. 전국 및 시도별 기관별 채취 샘플수

전국	도축장	70	소식육(5)	350
			돼지식육(5)	350
			소분변(2)	140
			돼지분변(2)	140
			소갈고리(1)	70
			돼지갈고리(1)	70
			소칼(1)	70
			돼지칼(1)	70
			소내장받이통(2)	140
			돼지내장받이통(2)	140
	포장처리업	249	식육(6)	1494
			장갑(2)	498
			칼(2)	498
			도마(2)	498
	도계장	26	계육(6)	156
			냉각수(4)	104
			분변(4)	104
	판매점	59	식육	97
			계육	57
	합계	404	합계	5046

강원 도	도축장	8	소식육(5)	40
			돼지식육(5)	40
			소분변(2)	16
			돼지분변(2)	16
			소갈고리(1)	8
			돼지갈고리(1)	8
			소칼(1)	8
			돼지칼(1)	8
			소내장받이통(2)	16
			돼지내장받이통(2)	16
			포장처리업	26
	장갑(2)	52		
	칼(2)	52		
	도마(2)	52		
	도계장	1	계육(6)	6
			냉각수(4)	4
			분변(4)	4
	판매점	10	식육	21
			계육	10
	합계	45	합계	533

경상 남도	도축장	8	소식육(5)	40
			돼지식육(5)	40
			소분변(2)	16
			돼지분변(2)	16
			소갈고리(1)	8
			돼지갈고리(1)	8
			소칼(1)	8
			돼지칼(1)	8
			소내장받이통(2)	16
			돼지내장받이통(2)	16
			포장처리업	26
	장갑(2)	52		
	칼(2)	52		
	도마(2)	52		
	도계장	1	계육(6)	6
			냉각수(4)	4
			분변(4)	4
	판매점	11	식육	22
			계육	11
	합계	46	합계	535

부산 광역시	도축장	1	소식육(5)	5
			돼지식육(5)	5
			소분변(2)	2
			돼지분변(2)	2
			소갈고리(1)	1
			돼지갈고리(1)	1
			소칼(1)	1
			돼지칼(1)	1
			소내장받이통(2)	2
			돼지내장받이통(2)	2
			포장처리업	17
	장갑(2)	34		
	칼(2)	34		
	도마(2)	34		
	도계장	0	계육(6)	0
			냉각수(4)	0
			분변(4)	0
	판매점	1	식육	2
			계육	1
	합계	19	합계	229

인천 광역시	도축장	1	소식육(5)	5
			돼지식육(5)	5
			소분변(2)	2
			돼지분변(2)	2
			소갈고리(1)	1
			돼지갈고리(1)	1
			소칼(1)	1
			돼지칼(1)	1
			소내장받이통(2)	2
			돼지내장받이통(2)	2
			포장처리업	7
	장갑(2)	14		
	칼(2)	14		
	도마(2)	14		
	도계장	1	계육(6)	6
			냉각수(4)	4
			분변(4)	4
	판매점	0	식육	0
			계육	0
	합계	9	합계	120

경기도	도축장	8	소식육(5)	40		
			돼지식육(5)	40		
			소분변(2)	16		
			돼지분변(2)	16		
			소갈고리(1)	8		
			돼지갈고리(1)	8		
			소칼(1)	8		
			돼지칼(1)	8		
			소내장받이통(2)	16		
			돼지내장받이통(2)	16		
			포장처리업	31	식육(6)	186
					장갑(2)	62
	칼(2)	62				
	도마(2)	62				
	도계장	6	계육(6)	36		
			냉각수(4)	24		
			분변(4)	24		
	판매점	1	식육	0		
			계육	1		
	합계	46	합계	633		

서울특별시	도축장	1	소식육(5)	5		
			돼지식육(5)	5		
			소분변(2)	2		
			돼지분변(2)	2		
			소갈고리(1)	1		
			돼지갈고리(1)	1		
			소칼(1)	1		
			돼지칼(1)	1		
			소내장받이통(2)	2		
			돼지내장받이통(2)	2		
			포장처리업	7	식육(6)	42
					장갑(2)	14
	칼(2)	14				
	도마(2)	14				
	도계장	0	계육(6)	0		
			냉각수(4)	0		
			분변(4)	0		
	판매점	0	식육	0		
			계육	0		
	합계	8	합계	106		

경상북도	도축장	9	소식육(5)	45		
			돼지식육(5)	45		
			소분변(2)	18		
			돼지분변(2)	18		
			소갈고리(1)	9		
			돼지갈고리(1)	9		
			소칼(1)	9		
			돼지칼(1)	9		
			소내장받이통(2)	18		
			돼지내장받이통(2)	18		
			포장처리업	26	식육(6)	156
					장갑(2)	52
	칼(2)	52				
	도마(2)	52				
	도계장	1	계육(6)	6		
			냉각수(4)	4		
			분변(4)	4		
	판매점	11	식육	18		
			계육	9		
	합계	47	합계	551		

대구광역시	도축장	0	소식육(5)	0		
			돼지식육(5)	0		
			소분변(2)	0		
			돼지분변(2)	0		
			소갈고리(1)	0		
			돼지갈고리(1)	0		
			소칼(1)	0		
			돼지칼(1)	0		
			소내장받이통(2)	0		
			돼지내장받이통(2)	0		
			포장처리업	9	식육(6)	54
					장갑(2)	18
	칼(2)	18				
	도마(2)	18				
	도계장	1	계육(6)	6		
			냉각수(4)	4		
			분변(4)	4		
	판매점	1	식육	2		
			계육	1		
	합계	11	합계	125		

울산광역시	도축장	2	소식육(5)	10		
			돼지식육(5)	10		
			소분변(2)	4		
			돼지분변(2)	4		
			소갈고리(1)	2		
			돼지갈고리(1)	2		
			소칼(1)	2		
			돼지칼(1)	2		
			소내장받이통(2)	4		
			돼지내장받이통(2)	4		
			포장처리업	3	식육(6)	18
					장갑(2)	6
	칼(2)	6				
	도마(2)	6				
	도계장	0	계육(6)	0		
			냉각수(4)	0		
			분변(4)	0		
	판매점	1	식육	2		
			계육	1		
	합계	6	합계	83		

전라남도	도축장	7	소식육(5)	35		
			돼지식육(5)	35		
			소분변(2)	14		
			돼지분변(2)	14		
			소갈고리(1)	7		
			돼지갈고리(1)	7		
			소칼(1)	7		
			돼지칼(1)	7		
			소내장받이통(2)	14		
			돼지내장받이통(2)	14		
			포장처리업	18	식육(6)	108
					장갑(2)	36
	칼(2)	36				
	도마(2)	36				
	도계장	2	계육(6)	12		
			냉각수(4)	8		
			분변(4)	8		
	판매점	7	식육	12		
			계육	7		
	합계	34	합계	417		

광주광역시	도축장	2	소식육(5)	10		
			돼지식육(5)	40		
			소분변(2)	4		
			돼지분변(2)	16		
			소갈고리(1)	2		
			돼지갈고리(1)	8		
			소칼(1)	2		
			돼지칼(1)	8		
			소내장받이통(2)	4		
			돼지내장받이통(2)	16		
			포장처리업	8	식육(6)	48
					장갑(2)	4
	칼(2)	16				
	도마(2)	16				
	도계장	0	계육(6)	0		
			냉각수(4)	0		
			분변(4)	0		
	판매점	1	식육	2		
			계육	1		
	합계	11	합계	197		

전라북도	도축장	9	소식육(5)	45		
			돼지식육(5)	45		
			소분변(2)	18		
			돼지분변(2)	18		
			소갈고리(1)	9		
			돼지갈고리(1)	9		
			소칼(1)	9		
			돼지칼(1)	9		
			소내장받이통(2)	18		
			돼지내장받이통(2)	18		
			포장처리업	17	식육(6)	102
					장갑(2)	34
	칼(2)	34				
	도마(2)	34				
	도계장	3	계육(6)	18		
			냉각수(4)	12		
			분변(4)	12		
	판매점	6	식육	8		
			계육	6		
	합계	35	합계	458		

충청남도	도축장	4	소식육(5)	20		
			돼지식육(5)	20		
			소분변(2)	8		
			돼지분변(2)	8		
			소갈고리(1)	4		
			돼지갈고리(1)	4		
			소칼(1)	4		
			돼지칼(1)	4		
			소내장받이통(2)	8		
			돼지내장받이통(2)	8		
			포장처리업	12	식육(6)	72
					장갑(2)	24
	칼(2)	24				
	도마(2)	24				
	도계장	5	계육(6)	30		
			냉각수(4)	20		
			분변(4)	20		
	판매점	5	식육	6		
			계육	5		
	합계	26	합계	313		

대전광역시	도축장	1	소식육(5)	5		
			돼지식육(5)	5		
			소분변(2)	2		
			돼지분변(2)	2		
			소갈고리(1)	1		
			돼지갈고리(1)	1		
			소칼(1)	1		
			돼지칼(1)	1		
			소내장받이통(2)	2		
			돼지내장받이통(2)	2		
			포장처리업	5	식육(6)	30
					장갑(2)	10
	칼(2)	10				
	도마(2)	10				
	도계장	0	계육(6)	0		
			냉각수(4)	0		
			분변(4)	0		
	판매점	1	식육	0		
			계육	1		
	합계	7	합계	83		

충청북도	도축장	8	소식육(5)	40
			돼지식육(5)	40
			소분변(2)	16
			돼지분변(2)	16
			소갈고리(1)	8
			돼지갈고리(1)	8
			소칼(1)	8
			돼지칼(1)	8
			소내장받이통(2)	16
			돼지내장받이통(2)	16
	포장처리업	17	식육(6)	102
			장갑(2)	34
			칼(2)	34
			도마(2)	34
	도계장	4	계육(6)	24
			냉각수(4)	16
			분변(4)	16
	판매점	2	식육	0
			계육	2
	합계	31	합계	438

제주특별자치도	도축장	1	소식육(5)	5		
			돼지식육(5)	5		
			소분변(2)	2		
			돼지분변(2)	2		
			소갈고리(1)	1		
			돼지갈고리(1)	1		
			소칼(1)	1		
			돼지칼(1)	1		
			소내장받이통(2)	2		
			돼지내장받이통(2)	2		
			포장처리업	20	식육(6)	120
					장갑(2)	40
	칼(2)	40				
	도마(2)	40				
	도계장	1	계육(6)	6		
			냉각수(4)	4		
			분변(4)	4		
	판매점	1	식육	2		
			계육	1		
	합계	23	합계	279		

충청북도	도축장	8	소식육(5)	40	제주특별자치도	도축장	1	소식육(5)	5
			돼지식육(5)	40				돼지식육(5)	5
			소분변(2)	16			소분변(2)	2	
			돼지분변(2)	16			돼지분변(2)	2	
			소갈고리(1)	8			소갈고리(1)	1	
			돼지갈고리(1)	8			돼지갈고리(1)	1	
			소칼(1)	8			소칼(1)	1	
			돼지칼(1)	8			돼지칼(1)	1	
			소내장받이통(2)	16			소내장받이통(2)	2	
			돼지내장받이통(2)	16			돼지내장받이통(2)	2	
	포장처리업	17	식육(6)	102		포장처리업	20	식육(6)	120
			장갑(2)	34				장갑(2)	40
			칼(2)	34				칼(2)	40
			도마(2)	34				도마(2)	40
	도계장	4	계육(6)	24		도계장	1	계육(6)	6
			냉각수(4)	16				냉각수(4)	4
			분변(4)	16				분변(4)	4
	판매점	2	식육	0		판매점	1	식육	2
			계육	2				계육	1
	합계	31	합계	438		합계	23	합계	279

(라) 바코드 시스템 활용을 위한 정보별 번호 부여 및 통계처리

① 정보별 바코드 번호 부여

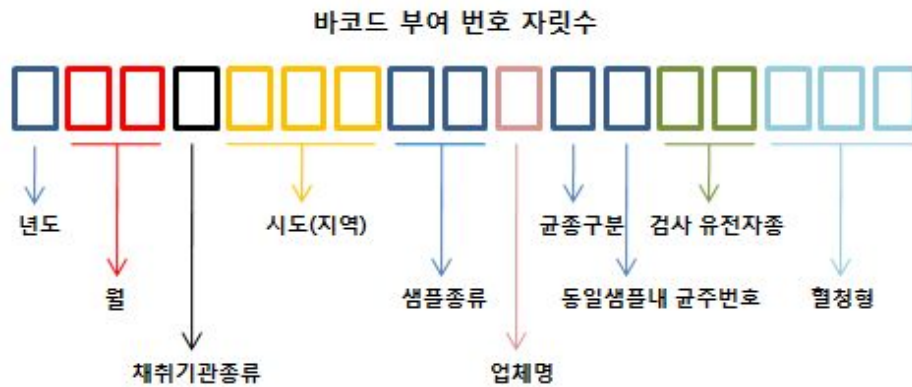


그림 9. 정보별 바코드 번호 부여

상기 내용과 같이 모든 분리 균주에는 실험 단계별로 바코드 매 자릿수마다 아래와 같은 원칙에 입각한 특정 숫자를 부여함으로써 실험의 진행시 균주 간 혼동을 피하고 최종 결과 획득 후, 자료 정리에 있어서 지역별, 채취 기관별, 축종별, 기관내 샘플별, 균주별, 유전자별 등 다양한 관점에서의 통계처리가 가능하도록 설계하였다.

예) 9 09 1 601 35 1 1 2 13 157

: 2009년도, 9월, 도축장, 서울광역시, 소식육 5, 농협서울축산물공판장, 대장균, 2번 균주, stx1 및 stx2 동시검출, 혈청형 O157

② 번호부여 원칙

㉠ 년도

1차년도는 2009년이므로 모두 9번 부여

㉡ 월

8월부터 11월에 실시하여, 08, 09, 10, 11번 부여

㉢ 채취기관종류

도축장 1번, 도계장 2번, 식육처리가공업 3번, 식육판매업 4번 부여

㉣ 시도(지역)

표 2. 시도별 바코드 부여 번호

특별시/ 광역시	부산광역시1	301
	부산광역시2	302
	인천광역시	401
	서울특별시	601
	대구광역시	801
	울산광역시	901
	광주광역시	251
	대전광역시	551
제주특별 자치도	제주시	751
	제주시(면,읍)	752
	서귀포시	753

강원도	원주시	101	경상남도	밀양시	201
	횡성군	102		양산시	202
	삼척시	103		창녕군	203
	동해시	104		김해시	204
	강릉시	105		창원시	205
	양양군	106		마산시	206
	속초시	107		진해시	207
	화천군	108		고성군	208
	평창군	109		하동군	209
	홍천군	110		진주시	210
	정선군	111		사천시	211
	춘천시	112		함양군	212
	철원군	113		합천군	213
	태백시	114		거창군	214
고성군	115				

경기도	김포시	501	경상북도	경산시	701
	광주시	502		상주시	702
	안성시	503		군위군	703
	파주시	504		포항시	704
	동두천시	505		경주시	705
	용인시	506		영천시	706
	양주시	507		청도군	707
	화성시	508		구미시	708
	시흥시	509		김천시	709
	안산시	510		의성군	710
	부천시	511		고령군	711
	성남시	512		안동시	712
	수원시	513		영주시	713
	안양시	514		문경시	714
	이천시	515		예천군	715
	평택시	516			
	포천시	517			
	남양주시	518			

전라북도	정읍시	351	전라남도	여수시	151
	남원시	352		순천시	152
	완주군	353		광양시	153
	김제시	354		목포시	154
	순창시	355		해남군	155
	전주시	356		나주시	156
	군산시	357		화순군	157
	무주군	358		무안군	158
	익산시	359		함평군	159
	임실군	360		담양군	160
	장수군	361		장성군	161
	부안군	362			

충청남도	논산시	451	충청북도	옥천군	651
	부여군	452		청주시	652
	연기군	453		충주시	653
	홍성군	454		제천시	654
	서산시	455		증평군	655
	천안시	456		음성군	656
	아산시	457		진천군	657
	예산군	458		청원군	658
	당진군	459			
	보령군	460			

㉓ 샘플종류의 번호부여

표 3. 샘플종류별 바코드 부여 번호

도 축 장	소식육 1	31	도 계 장	계육 1	61	식 육 처 리 가 공 업	식육 1	11
	소식육 2	32		계육 2	62		식육 2	12
	소식육 3	33		계육 3	63		식육 3	13
	소식육 4	34		계육 4	64		식육 4	14
	소식육 5	35		계육 5	65		식육 5	15
	돼지식육 1	36		계육 6	66		식육 6	16
	돼지식육 2	37		냉각수 1	67		장갑 1	17
	돼지식육 3	38		냉각수 2	68		장갑 2	18
	돼지식육 4	39		냉각수 3	69		칼 1	19
	돼지식육 5	40		냉각수 4	70		칼 2	20
	소분변 1	41	분변 1	71	도마 1	21		
	소분변 2	42	분변 2	72	도마 2	22		
	돼지분변 1	43	분변 3	73				
	돼지분변 2	44	분변 4	74				
	소갈고리	45						
	돼지갈고리	46						
	소칼	47						
	돼지칼	48						
	소내장받이통 1	49						
	소내장받이통 2	50						
돼지내장받이통 1	51							
돼지내장받이통 2	52							

㉔ 업체명

각 시/군/구 내에서 선정된 기관을 중복되지 않은 번호로 부여

㉕ 균종구분

대장균 1번, 살모넬라균 2번

㉠ 동일샘플내 균주번호

한 샘플에서 3개의 균주를 선정하는 것을 원칙으로 하여 1, 2, 3번 부여

㉡ 검사 유전자종

일반대장균과 병원성 대장균을 구분하기 위해 병원성 유전자의 유무를 PCR을 통해 검사하였으며, 다음과 같은 유전자종류별 번호를 부여

표 4. 유전자종류별 바코드 부여 번호

	Group	코드번호	유전자 분류
병원성 대장균 분류 및 유전자 번호	EHEC	11	stx1
		12	stx2
		13	stx1, stx2
		14	stx1,eae
		15	stx2,eae
		16	stx1, 2, eae
	EPEC	21	eae
		22	bfp
		23	eae, bfp

	Group	코드번호	유전자 분류
병원성 대장균 분류 및 유전자 번호	ETEC	31	lt
		32	st11
		33	lt, st11
	EIEC	41	virF
		42	ipaH
		43	virF, ipaH
	DAEC	51	daaE
	EAEC	61	aaf11

㉢ 혈청형

대장균의 O-serotype은 001번부터 181까지 부여. 살모넬라균의 경우 001부터 006까지 부여

다. 병원성 대장균 조사 결과

(1) 전국 통계 결과

병원성 대장균을 전국적으로 저사하여 통계처리한 결과는 다음과 같다.

표 5. 전국 기관별 병원성 대장균 조사 결과

지역	기관별	기관 수	샘플구분	전체 샘플 수	대장균 검출 샘플 수		총 분리대장균 균주 수	병원성대장균	
					샘플 수	%		샘플 수	%
전국	도축장	70	소식육(5)	350	158	45.1	270	10	3.7
			돼지식육(5)	350	106	30.3	170	9	5.3
			소분변(2)	140	72	51.4	146	14	9.6
			돼지분변(2)	140	89	63.6	153	3	2.0
			소갈고리(1)	70	24	34.3	39	1	2.6
			돼지갈고리(1)	70	19	27.1	30	1	3.3
			소칼(1)	70	28	40.0	44	2	4.5
			돼지칼(1)	70	23	32.9	37	0	0.0
			소내장받이통(2)	140	61	43.6	99	2	2.0
			돼지내장받이통(2)	140	73	52.1	128	2	1.6
	포장처리업	249	식육(6)	1494	667	44.6	1071	10	0.9
			장갑(2)	498	152	30.5	246	0	0.0
			칼(2)	498	145	29.1	239	1	0.4
			도마(2)	498	178	35.7	289	4	1.4
	도계장	26	계육(6)	156	87	55.8	155	2	1.3
			냉각수(4)	104	40	38.5	63	0	0.0
			분변(4)	104	73	70.2	143	4	2.8
	판매점	59	식육	97	50	51.5	80	5	6.3
			계육	57	33	57.9	57	0	0.0
	합계	404	합계	5046	2078	41.2	3459	70	2.0

- 전체 총 검사 샘플수는 5046개로 이중 70개의 샘플에서 병원성 대장균이 검출되었다. 즉, 평균 2.0%의 검출율을 보였다.
- 도축장의 경우 소분변에서 가장 높은 검출율(9.6%)를 보여 소사육단계에서부터 병원성대장균이 감염되어 있을 확률이 높은 것으로 나타났으며, 소식육(3.7%)과 돼지식육(5.3%)에서도 병원성대장균이 분리되었음을 알 수 있다. 특히 소식육의 경우 유회로 섭취하거나 완전히 조리하지 않고 섭취하는 경우가 많아 특히 주의가 필요하다고 보여진다. 그 외 칼, 갈고리, 내장받이통에서도 평균 3% 내외의 검출율을 보였다. 도계장에서는 계육 1.3%, 분변2.8%의 검출율로 도축장에 비해서는 상대적으로 낮은 검출율을 보였다.
- 식육가공장의 경우 1.4% 이내로 도축장이나 도계장에 비해서는 낮은 검출율을 보였다.
- 하지만 판매장의 경우 계육에서는 병원성 대장균이 검출되지 않았으나 식육(우육, 돈육)에서는 6.3%의 검출율을 보였다. 이는 도축장이나 가공장에서보다 높은 검출율을 보인 것으로 보관, 운송단계 또는 판매장에서 교차오염되거나 온도관리불량으로 미생물이 증식된 것으로 보여지며 이에대한 자세한 추가 조사가 필요하다고 볼 수 있다.

(2) 시도별 통계 결과

시도별 통계 처리 결과는 다음과 같다.

표 6. 각 시도 기관별 병원성 대장균 조사 결과

기관별	샘플구분	강원도		경상남도		부산광역시		인천광역시		경기도		서울특별시	
		샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%
도축장	소식육(5)	0	0.0	0	0.0	2	100	0	0.0	0	0.0	1	16.7
	돼지식육(5)	0	0.0	3	30.0	0	0.0	0	0.0	1	5.3	0	0.0
	소분변(2)	0	0.0	2	25.0	0	0.0	0	0.0	1	3.3	0	0.0
	돼지분변(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	소갈고리(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지갈고리(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	14.3	0	0.0
	소칼(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지칼(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	소내장받이통(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지내장받이통(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
포장처리업	식육(6)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	장갑(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	칼(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	도마(2)	0	0.0	0	0.0	2	6.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0
도계장	계육(6)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	냉각수(4)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	분변(4)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	11.1	0	0.0
판매점	식육	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	계육	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
합계		0	0.0	5	2.3	4	2.0	0	0.0	6	1.7	1	2.8

기관별	샘플구분	경상북도		대구광역시		울산광역시		전라남도		광주광역시		전라북도	
		샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%
도축장	소식육(5)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	6.9	0	0.0	5	9.8
	돼지식육(5)	2	11.8	0	0.0	0	0.0	2	10.5	0	0.0	1	2.8
	소분변(2)	2	8.7	0	0.0	0	0.0	3	17.6	0	0.0	3	11.1
	돼지분변(2)	1	5.6	0	0.0	0	0.0	1	5.9	0	0.0	1	4.2
	소갈고리(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	12.5
	돼지갈고리(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	소칼(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	25.0	0	0.0	1	16.7
	돼지칼(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	소내장받이통(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	6.3
	돼지내장받이통(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	9.5
포장처리업	식육(6)	3	2.1	0	0.0	0	0.0	1	1.3	0	0.0	1	1.3
	장갑(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	칼(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	5.3
	도마(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
도계장	계육(6)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	7.1
	냉각수(4)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	분변(4)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
판매점	식육	2	8.0	0	0.0	1	33.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	계육	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
합계		10	2.4	0	0.0	1	1.6	10	3.2	0	0.0	19	4.8

기관별	샘플구분	충청남도		대전광역시		충청북도		제주특별자치도	
		샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%
도축장	소식육(5)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지식육(5)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	소분변(2)	3	42.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지분변(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	소갈고리(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지갈고리(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	소칼(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지칼(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	소내장받이통(2)	0	0.0	0	0.0	1	16.7	0	0.0
	돼지내장받이통(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
포장처리업	식육(6)	0	0.0	0	0.0	4	3.0	1	1.1
	장갑(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	칼(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	도마(2)	1	4.2	0	0.0	1	2.6	0	0.0
도계장	계육(6)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	냉각수(4)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	분변(4)	1	2.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0
판매점	식육	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	40.0
	계육	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
합계		5	1.6	0	0.0	6	1.6	3	1.5

- 지역별로 결과를 분석한 결과, 서울특별시, 경상남도, 경상북도, 전라남도, 전라북도에서 전국 평균(약 2.0%) 보다 높은 검출율을 보였다. 특히 우육, 소분변, 소칼 등에서 높은 검출율을 보인 전라남도와 전라북도의 경우 생고기(우육)의 소비량이 많은 지역으로써 이에 대한 모니터링과 대책이 시급하다고 할 수 있다.

(3) 병원성 유전자 조사 결과

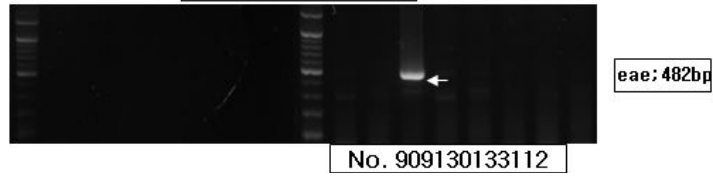
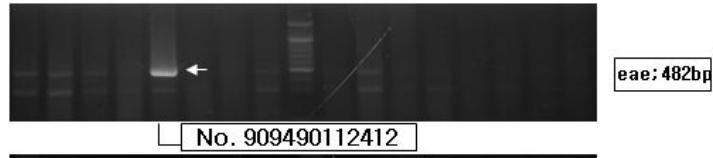
조사사업을 통해 분리동정된 국내 분리 대장균주들에 대한 병원성 유무는 절대적이지 않으나 다수의 샘플을 처리해야하는 상황으로 multiplex PCR 방법을 사용하였다. 이에 사용된 primer set 및 PCR 조건은 아래와 같다.

표 7. 병원성 유전자 PCR 조건 및 primer

primer mixture (premix)	
표적유전자	primer sequence
stx1	F (3.3 pmole/ul): CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG
	R (3.3 pmole/ul): CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG
stx2	F (3.3 pmole/ul): ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G
	R (3.3 pmole/ul): GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C
eae	F (3.3 pmole/ul): TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TT
	R (3.3 pmole/ul): GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC TG
bfp	F (3.3 pmole/ul): GGA AGT CAA ATT CAT GGG GGT AT
	R (3.3 pmole/ul): GGA ATC AGA CGC AGA CTG GTA GT
It	F (3.3 pmole/ul): GCA CAC GGA GCT CCT CAG TC
	R (3.3 pmole/ul): TCC TTC ATC CTT TCA ATG GCT TT
stII	F (3.3 pmole/ul): AAA GGA GAG CTT CGT CAC ATT TT
	R (3.3 pmole/ul): AAT GTC CGT CTT GCG TTA GGA C

PCR 조건	
1 cycle	94℃ 10min
35 cycle	94℃ 1min 30sec
	65.2 ℃ 1min 30sec
	72 ℃ 1min 30sec
1 cycle	72 ℃ 5min
hold	4 ℃

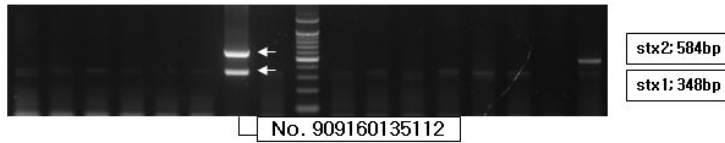
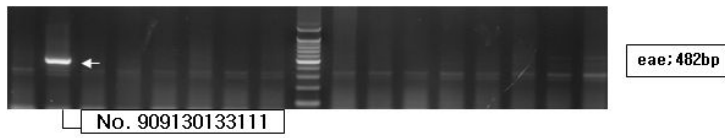
다음과 같은 일련의 결과를 확인할 수 있었다.



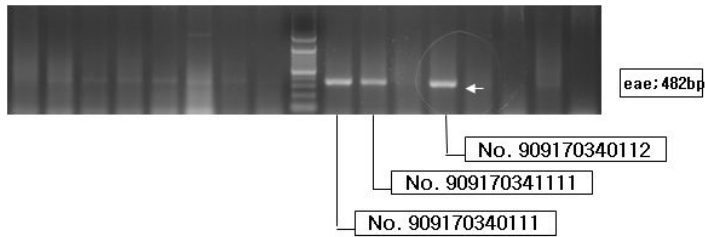
909490112412 2009년 9월 울산광역시 정육점 식육
 909130133112 2009년 9월 부산광역시 D도축장 소식육



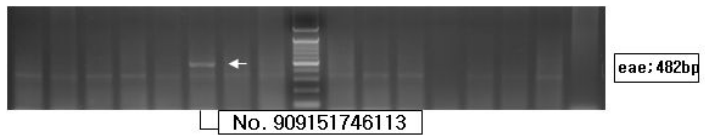
911235475111 2009년 11월 전라북도 김제시 A도계장 계육



909130133111 2009년 9월 부산광역시 D도축장 소식육
 909160135112 2009년 9월 서울특별시 N도축장 소식육



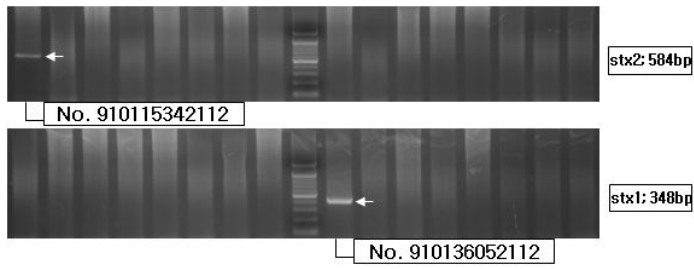
909170340111 2009년 9월 경상북도 군위군 D도축장 돼지식육
 909170341111 2009년 9월 경상북도 군위군 D도축장 소분변
 909170340112 2009년 9월 경상북도 군위군 D도축장 돼지식육



909151746113 2009년 9월 경기도 포천시 P도축장 돼지갈고리

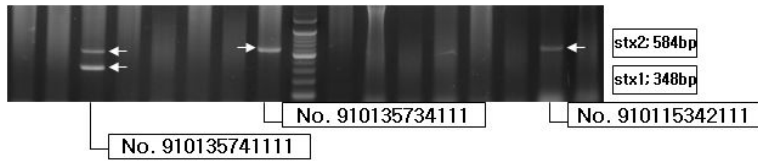


909470812411 2009년 9월 경상북도 구미시 정육점 식육



910115342112 2009년 10월 전라남도 광양시 D도축장 소분변

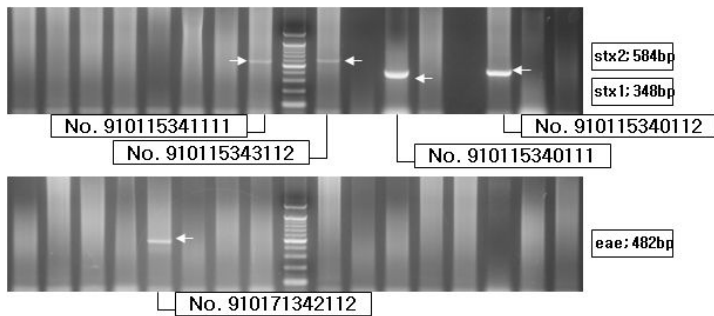
910136052112 2009년 10월 전라북도 임실군 S도축장 돼지내장받이통



910135741111 2009년 10월 전라북도 군산시 G도축장 소분변

910135734111 2009년 10월 전라북도 군산시 G도축장 소식육

910115342111 2009년 10월 전라남도 광양시 D도축장 소분변

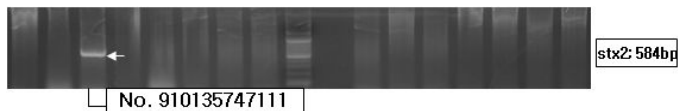


910115341111 2009년 10월 전라남도 광양시 D도축장 소분변

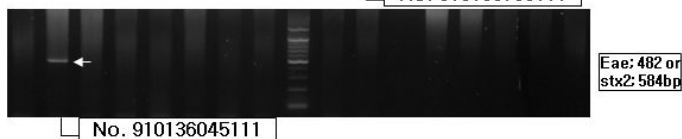
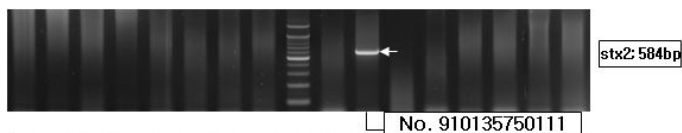
910115343112 2009년 10월 전라남도 광양시 D도축장 돼지분변

910115340111 2009년 10월 전라남도 광양시 D도축장 돼지식육

910115340112 2009년 10월 전라남도 광양시 D도축장 돼지식육

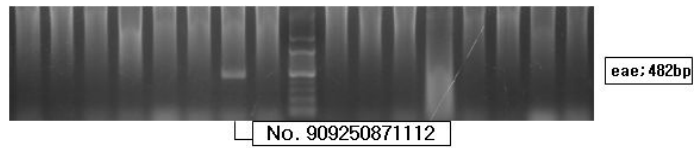


910135747111 2009년 10월 전라북도 군산시 G도축장 소칼

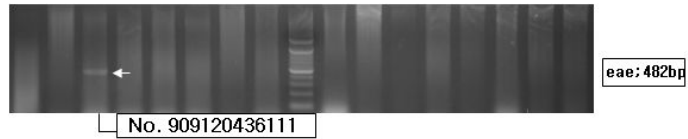


910135750111 2009년 10월 전라북도 군산시 G도축장 소내장받이통

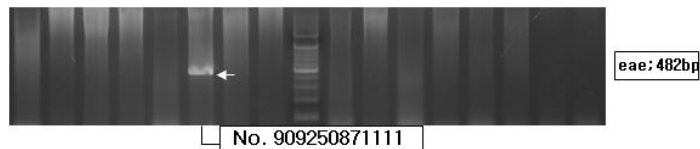
910136045111 2009년 10월 전라북도 임실군 S도축장 소갈고리



909250871112 2009년 9월 경기도 화성시 H도계장 분변



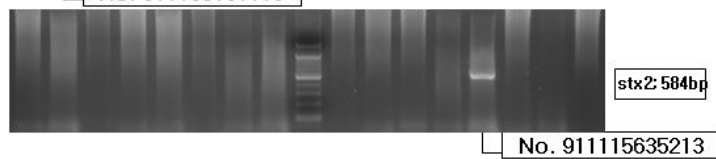
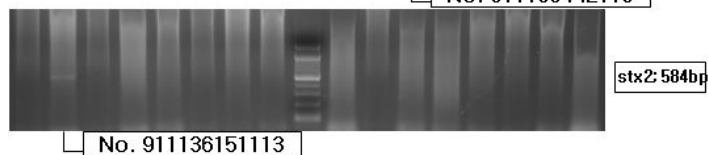
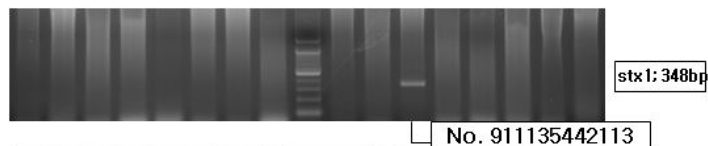
909120436111 2009년 9월 경상남도 김해시 K도축장 돼지식육



909250871111 2009년 9월 경기도 화성군 H도계장 분변



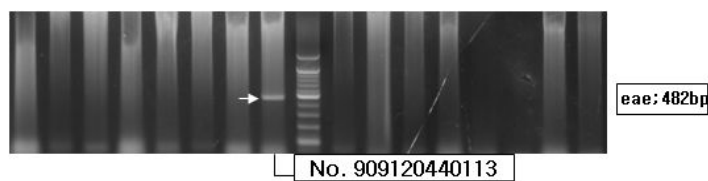
909121442111 2009년 9월 경상남도 거창군 D도축장 소분변



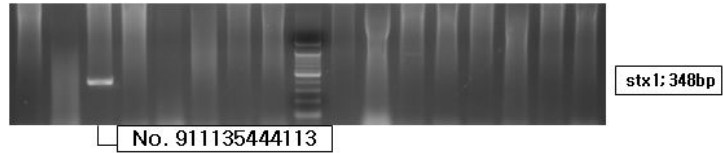
911135442113 2009년 11월 전라북도 김제시 B도축장 소분변

911136151113 2009년 11월 전라북도 장수군 C도축장 돼지내장받이통

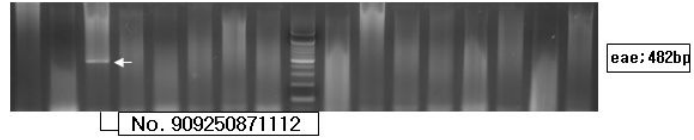
911115635213 2009년 11월 전라남도 나주시 N도축장 소식육



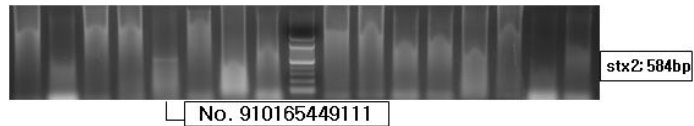
909120440113 2009년 9월 경상남도 김해시 K도축장 돼지식육



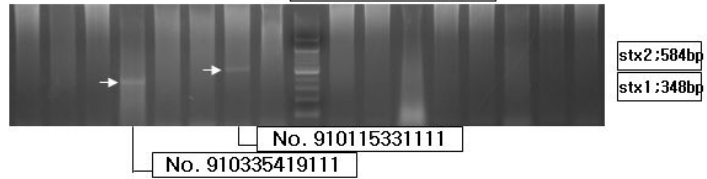
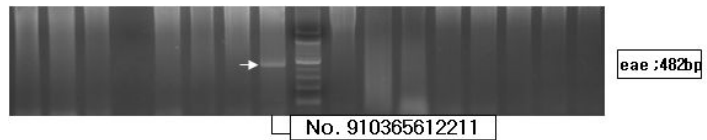
91113544113 2009년 11월 전라북도 김제시 B도축장 돼지분변



909250871112 2009년 9월 경기도 화성시 H도계장 분변



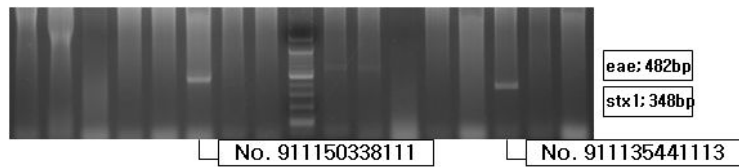
910165449111 2009년 10월 충청북도 제천시 B도축장 소내장받이통



910365612211 2009년 10월 충청북도 음성군 N포장처리업 칼

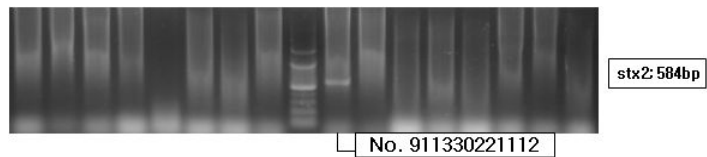
910335419111 2009년 10월 전라북도 진안군 M포장처리업 칼

910115331111 2009년 10월 전라남도 광양시 D도축장 소식육

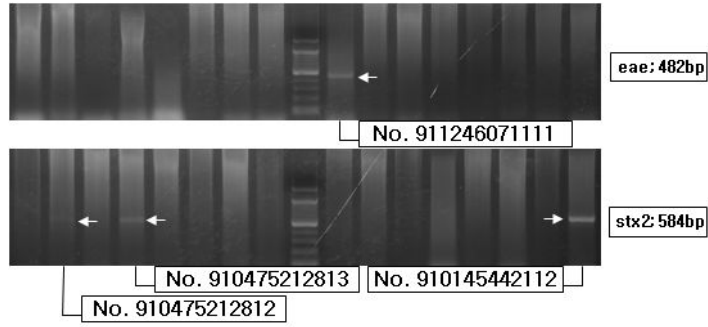


911150338111 2009년 11월 경기도 안성시 D도축장 돼지식육

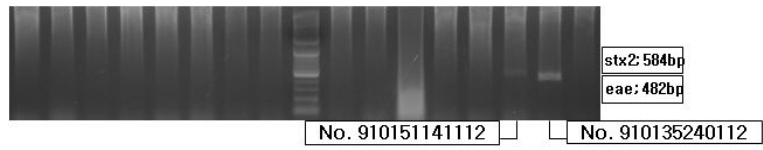
911135441113 2009년 11월 전라북도 김제시 B도축장 소분변



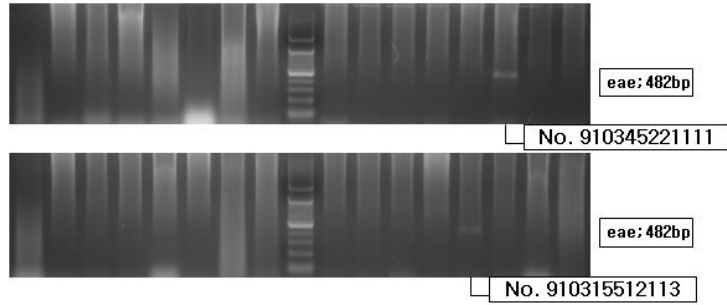
911330221112 2009년 11월 부산광역시 B포장처리업 도마



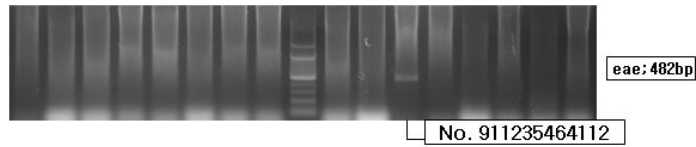
911246071111 2009년 11월 충청남도 보령시 Y도계장 분변
 910475212812 2009년 10월 제주특별자치도 제주시 정육점 식육
 910475212813 2009년 10월 제주특별자치도 제주시 정육점 식육
 910145442112 2009년 10월 충청남도 홍성군 H도축장 소분변



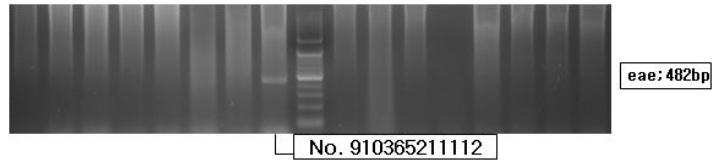
910151141112 2009년 10월 경기도 부천시 N도축장 소분변
 910135240112 2009년 10월 전라북도 남원시 D도축장 돼지식육



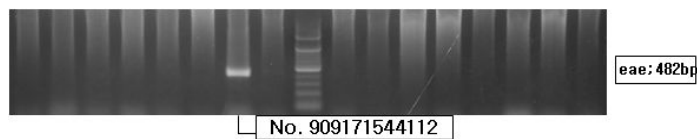
910345221111 2009년 10월 충청남도 부여군 B포장처리업 도마
 910315512113 2009년 10월 전라남도 해남시 K포장처리업 식육



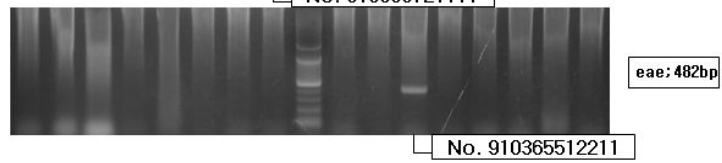
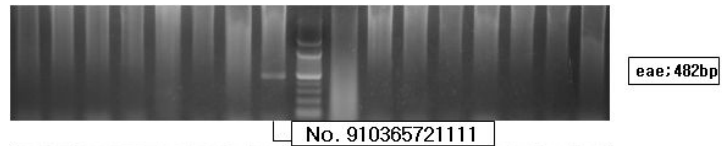
911235464112 2009년 11월 전라북도 김제시 A도계장 계육



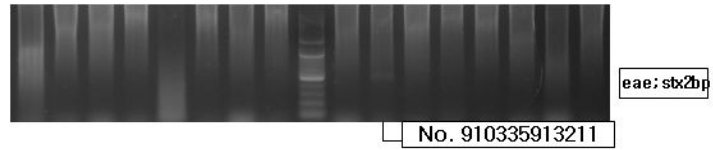
910365211112 2009년 10월 충청북도 청주시 N포장처리업 식육



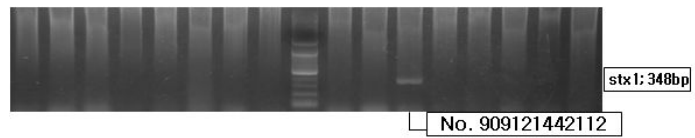
909171544112 2009년 9월 경상북도 예천시 Y도축장 돼지분변



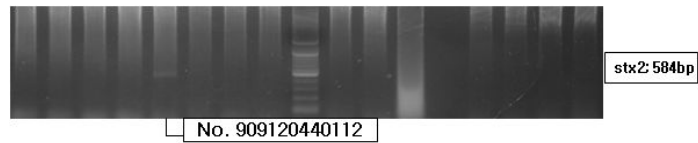
910365721111 2009년 10월 충청북도 진천시 C포장처리업 도마
 910365512211 2009년 10월 충청북도 증평군 D포장처리업 식육



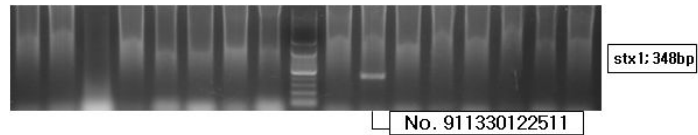
910335913211 2009년 10월 전라북도 익산시 H포장처리업 식육



909121442112 2009년 9월 경상남도 거창군 D도축장 소분변



909120440112 2009년 9월 경상남도 김해시 K도축장 돼지식육



911330122511 2009년 11월 부산광역시 K포장처리업 도마

그림 10. 병원성 유전자 PCR 결과

(4) 살모넬라균 조사 결과

(가) 전국적 조사 통계

표 8. 전국 기관별 살모넬라 조사 결과

지역	기관별	기관 수	샘플구분	전체 샘플 수	살모넬라균 검출 샘플 수	
					샘플 수	%
전국	도축장	70	소식육(5)	350	11	3.1
			돼지식육(5)	350	22	6.3
			소분변(2)	140	7	5.0
			돼지분변(2)	140	36	25.7
			소갈고리(1)	70	3	4.3
			돼지갈고리(1)	70	2	2.9
			소칼(1)	70	3	4.3
			돼지칼(1)	70	3	4.3
			소내장받이통(2)	140	6	4.3
			돼지내장받이통(2)	140	24	17.1
	포장처리업	249	식육(6)	1494	139	9.3
			장갑(2)	498	43	8.6
			칼(2)	498	19	3.8
			도마(2)	498	35	7.0
	도계장	26	계육(6)	156	72	46.2
			냉각수(4)	104	25	24.0
			분변(4)	104	41	39.4
	판매점	59	식육	97	16	16.5
			계육	57	25	43.9
	합계	404	합계	5046	532	10.5

- 병원성 대장균에 비하여 전국적으로 높은 검출율을 보였다(10.5%).
- 도축장에서 채취한 샘플보다 도계장에서 채취한 샘플에서 예상되는 바대로 상대적으로 높은 검출율을 보였다.
- 도축장에서는 돼지분변(25.7%), 돼지내장받이통(17.1%)에서 가장 높은 검출율을 보였다.
- 식육가공장에서는 4%에서 9% 사이의 검출율을 보였으며, 특히 식육에서의 높은 검출율이 향후, 감시 대상 선정 등의 대책 마련 시 중요하게 주시해야할 점이라고 판단된다.
- 판매장 샘플조사 결과 식육(우육, 돈육)에 비해(16.5%) 계육에서 높은 검출율(43.9%)을 보였다.
- 병원성대장균의 경우와 같이 식육포장처리업에서의 검출율보다 판매장에서의 검출율이 높은 것으로 보아 보관, 운반 판매공정 등에서 교차오염이 발생하거나 온도관리가 적절치 않아 미생물이 증식한 것으로 추정된다.

- 전 업종에 걸쳐 계육에서 우육이나 돈육보다 높은 검출율을 보였다.

(나) 시도별 통계 결과

표 9. 시도 기관별 살모넬라 통계 결과

기관별	샘플구분	강원도		경상남도		부산광역시		인천광역시		경기도		서울특별시	
		샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%
도축장	소식육(5)	4	10.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	5.0	0	0.0
	돼지식육(5)	6	15.0	1	2.5	0	0.0	0	0.0	5	12.5	1	20.0
	소분변(2)	1	6.3	2	12.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지분변(2)	2	12.5	1	6.3	0	0.0	0	0.0	6	37.5	0	0.0
	소갈고리(1)	1	12.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지갈고리(1)	0	0.0	0	0.0	1	100	0	0.0	1	12.5	0	0.0
	소칼(1)	1	12.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지칼(1)	1	12.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	12.5	0	0.0
	소내장받이통(2)	1	6.3	1	6.3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	50.0
	돼지내장받이통(2)	2	12.5	2	12.5	1	50.0	0	0.0	2	12.5	1	50.0
포장처리업	식육(6)	10	6.4	10	6.4	10	9.8	12	28.6	22	11.8	5	11.9
	장갑(2)	5	9.6	7	13.5	2	5.9	5	35.7	4	6.5	2	14.3
	칼(2)	2	3.8	2	3.8	1	2.9	0	0.0	2	3.2	1	7.1
	도마(2)	2	3.8	2	3.8	3	8.8	1	7.1	6	9.7	1	7.1
도계장	계육(6)	2	33.3	1	16.7	0	0.0	6	100	18	50.0	0	0.0
	냉각수(4)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	75.0	4	16.7	0	0.0
	분변(4)	0	0.0	3	75.0	0	0.0	1	25.0	6	25.0	0	0.0
판매점	식육	5	23.8	4	18.2	1	50.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	계육	3	30.0	5	45.5	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
합계		48	9.0	41	7.7	19	8.3	28	23.3	79	12.5	12	11.3

기관별	샘플구분	경상북도		대구광역시		울산광역시		전라남도		광주광역시		전라북도	
		샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%
도축장	소식육(5)	1	2.2	0	0.0	0	0.0	1	2.9	0	0.0	2	4.4
	돼지식육(5)	1	2.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	5	11.1
	소분변(2)	1	5.6	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	25.0	2	11.1
	돼지분변(2)	4	22.2	0	0.0	2	50.0	5	35.7	2	50.0	3	16.7
	소갈고리(1)	1	11.1	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지갈고리(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	소칼(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	11.1
	돼지칼(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	소내장받이통(2)	1	5.6	0	0.0	1	25.0	0	0.0	1	25.0	0	0.0
	돼지내장받이통(2)	3	16.7	0	0.0	1	25.0	3	21.4	2	50.0	0	0.0
포장처리업	식육(6)	13	8.3	3	5.6	7	38.9	10	9.3	5	10.4	7	6.9
	장갑(2)	3	5.8	4	22.2	2	33.3	2	5.6	0	0.0	1	2.9
	칼(2)	1	1.9	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	5.9
	도마(2)	5	9.6	1	5.6	2	33.3	4	11.1	1	6.3	1	2.9
도계장	계육(6)	1	16.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	8	44.4
	냉각수(4)	0	0.0	2	50.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	16.7
	분변(4)	1	25.0	0	0.0	0	0.0	4	50.0	0	0.0	3	25.0
판매점	식육	1	5.6	0	0.0	1	50.0	1	8.3	1	50.0	1	12.5
	계육	4	44.4	0	0.0	1	100	5	71.4	0	0.0	2	33.3
합계		41	7.4	10	8.0	17	20.5	35	8.4	13	9.1	40	8.7

기관별	샘플구분	충청남도		대전광역시		충청북도		제주특별자치도	
		샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%	샘플 수	%
도축장	소식육(5)	0	0.0	0	0.0	1	2.5	0	0.0
	돼지식육(5)	1	5.0	0	0.0	2	5.0	0	0.0
	소분변(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지분변(2)	5	62.5	0	0.0	6	37.5	0	0.0
	소갈고리(1)	0	0.0	0	0.0	1	12.5	0	0.0
	돼지갈고리(1)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	소칼(1)	0	0.0	0	0.0	1	12.5	0	0.0
	돼지칼(1)	0	0.0	0	0.0	1	12.5	0	0.0
	소내장받이통(2)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	돼지내장받이통(2)	2	25.0	1	50.0	4	25.0	0	0.0
포장처리업	식육(6)	5	6.9	2	6.7	4	3.9	14	11.7
	장갑(2)	1	4.2	0	0.0	3	8.8	2	5.0
	칼(2)	0	0.0	0	0.0	6	17.6	2	5.0
	도마(2)	1	4.2	0	0.0	2	5.9	3	7.5
도계장	계육(6)	18	60.0	0	0.0	17	70.8	1	16.7
	냉각수(4)	8	40.0	0	0.0	6	37.5	0	0.0
	분변(4)	12	60.0	0	0.0	8	50.0	3	75.0
판매점	식육	1	16.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0
	계육	2	40.0	1	100	1	50.0	1	100
합계		56	17.9	4	4.8	63	14.4	26	9.3

- 시도별 살모넬라 검출율은 인천광역시, 울산광역시, 충청남도, 경기도, 서울특별시 순으로 높은 검출율을 보였다.

(5) 리스테리아균 조사 결과

(가) 전국적 조사 통계

표 10. 전국 기관별 리스테리아균 조사 결과

지역	기관별	기관 수	샘플구분	전체 샘플 수	리스트리아균 검출 샘플 수	
					샘플 수	%
전국	도계장	26	계육(6)	156	11	7.1
			냉각수(4)	104	5	4.8
			분변(4)	104	21	20.2
	판매점	59	식육	97	32	33.0
			계육	57	23	40.4
	합계	85	합계	518	92	17.8

나. *Vibrio parahaemolyticus*의 분리, 특성 분석 및 역학적 분석

(1) 개요

본 연구과제의 최종 목적이 기존 미생물 검사법 즉, 증균 배양 및 선택배지 등을 사용하는 복잡한 일련의 과정을 거치지 않고 특이적인 바이오마커, multi protein G, 그리고 nano bead의 triple complexes를 적용하는 자동화 장비를 개발하여 4-5일 정도 소요되는 시간을 1일 이내로 단축하는 것이다. 물론 기존의 방법은 분석자의 주관적인 기술이 개입되어 식품공전 및 제반 규정에 기반한 동일한 방법을 사용하더라도 다양한 편차가 날 수 있으므로 시간의 단축뿐만 아니라 개연성 있는 결과 즉, 비전문가에 의해 수행되더라도 보다 특이적이고 목표한 병원성 미생물의 신속한 검사가 가능하게 하는 것이 최종 목표이며 병원성 미생물인 *Vibrio parahaemolyticus* 조사사업은 다음에 기술된 방법대로 진행되었다.

(2) *Vibrio parahaemolyticus*의 검출방법

*V. parahaemolyticus*의 검출방법은 아래의 그림과 같이 실시하였다.

증균배양

검체 25g 혹은 25ml + BPW 225 ml

37°C, 18-24시간



분리배양

TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar)

37°C, 18-24시간



생화학실험

Urease test, oxidase test

37°C, 18-24시간



유전학적 동정

multiplex PCR

그림 11. *V. parahaemolyticus* 검출방법

상기와 같은 전형적인 과정을 거쳐 강원도, 충청북도와 경상북도를 제외한 6개도, 27개 지역에서 각기 정한 종류의 샘플을 수거하여 검체 전처리를 실시한 후, 목표 균의 분리 및 동정을 실시하였다. 2차년도 과제 기간 중 특히 하절기 즉, 7월에서 9월까지 조사사업을 집중적으로 수행하였다. 그 결과는 다음과 같다.

(3) 비브리오균 검체 조사결과

각 지역에서 채집된 어류와 패류 및 수거된 시료의 서식처인 해수에 BPW(Peptone 10g, NaCl 5g, Na₂HPO₄ 3.5g/L) + 4% NaCl이 함유된 broth를 각 시료당 10ml씩 첨가하여 35±2°C 배양기에서 약 20시간 배양한 후 TCBS agar (Difco) 평판배지에서 계대 한 후 TCBS agar 배지에서 전형적인 *Vibrio* spp. colony 특징인 노란색~녹색의 colony를 동일 배지에서 계대하여 순수 분리 하였다(35±2°C, 20시간 배양). 그리고 생화학적 실험으로 Urease test와 oxidase test를 실시하였다.

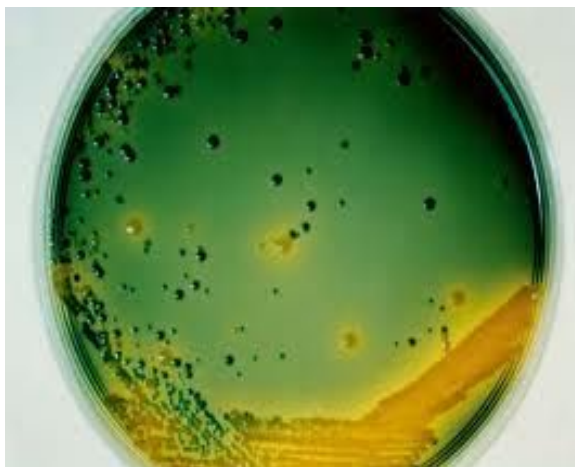


그림 11. TCBS배지에서의 *V. parahaemolyticus*



그림 12. Urease test 양성반응

그리고 총 124개의 시료 중에서 TCBS agar에서 성장한 122개의 균주를 선발하였으며 아래와 같은 PCR primer들을 활용하여 multiplex PCR을 실시함으로써 비브리오균의 species를 판별하였다. 이에 사용된 primer set 및 PCR 조건은 아래와 같다.

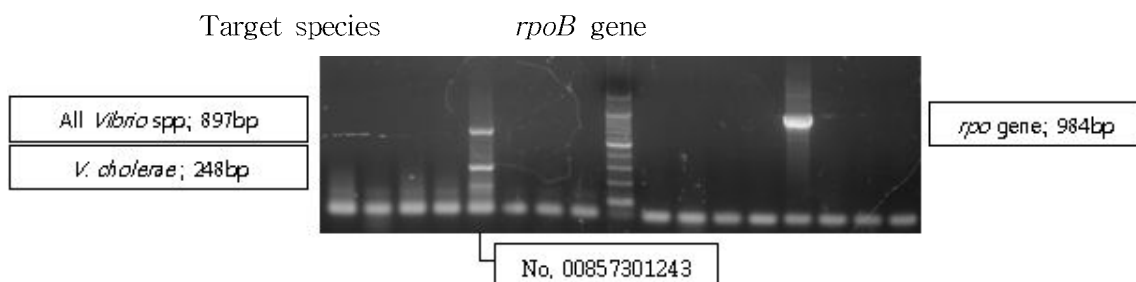
표 11. *Vibrio* spp.의 PCR 조건 및 primer set

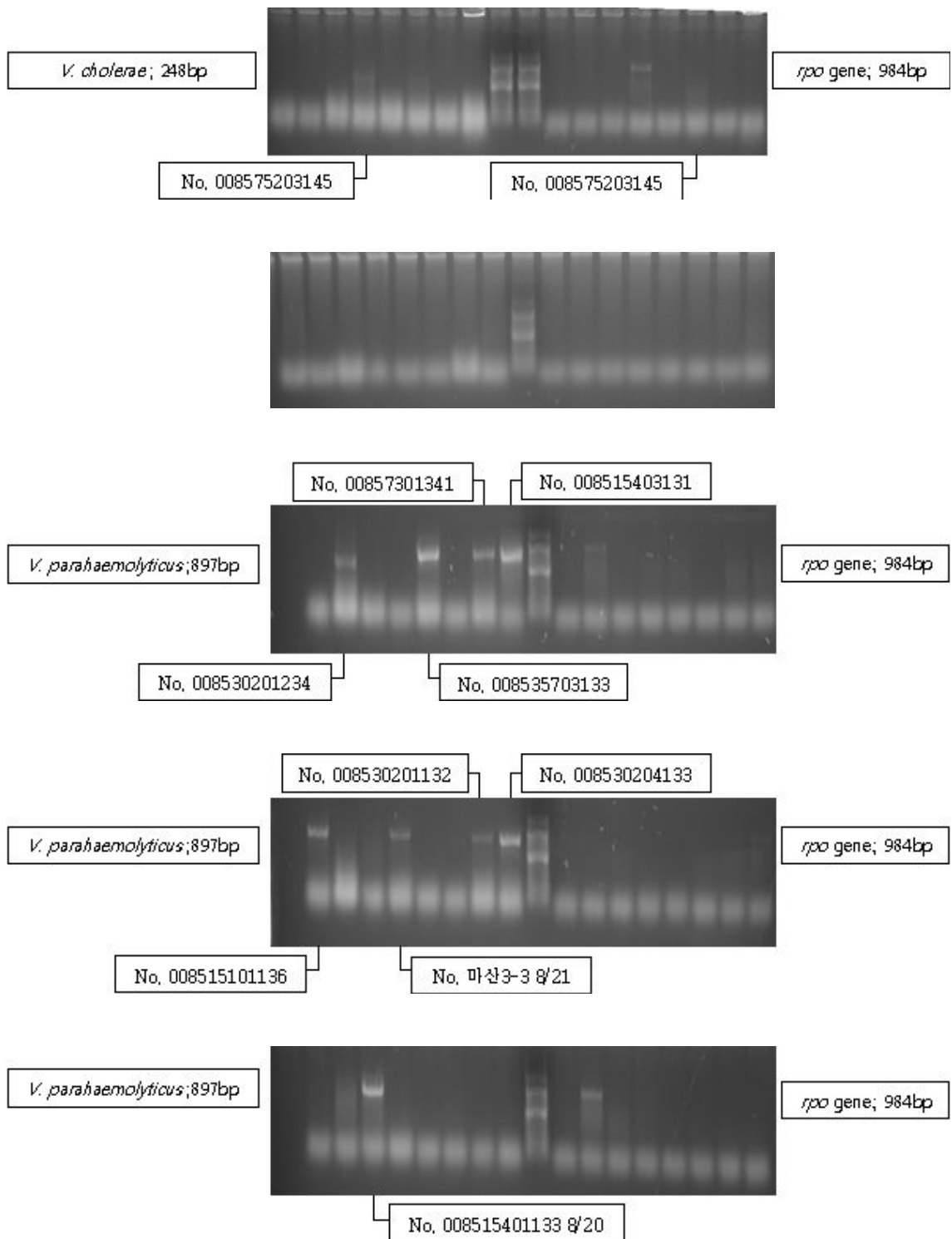
primer mixture (premix)		
Taget species	primer sequence	size (bp)
<i>V. cholerae</i>	F (10 pmole/ul): AAG ACC TCA ACT GGC GGT A	248
	R (10 pmole/ul): GAA GTG TTA GTG ATC GCC AGA GT	
<i>V. mimicus</i>	F (15 pmole/ul): CAT TCG GTT CTT TCG CTG AT	121
	R (15 pmole/ul): GAA GTG TTA GTG ATT GCT AGA GAT	
<i>V. parahaemolyticus</i>	F (20 pmole/ul): GCA GCT GAT CAA AAC GTT GAG T	897
	R (20 pmole/ul): ATT ATC GAT CGT GCC ACT CAC	
<i>V. vulnificus</i>	F (5 pmole/ul): GTC TTA AAG CGG TTG CTG C	410
	R (5 pmole/ul): CGC TTC AAG TGC TGG TAG AAG	
All <i>Vibrio</i> spp.	F (1 pmole/ul): CGG TGA AAT GCG TAG AGA T	663
	R (1 pmole/ul): TTA CTA GCG ATT CCG AGT TC	

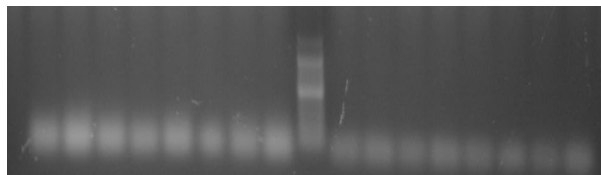
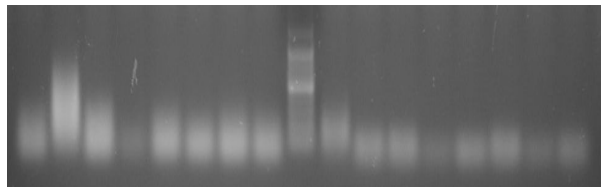
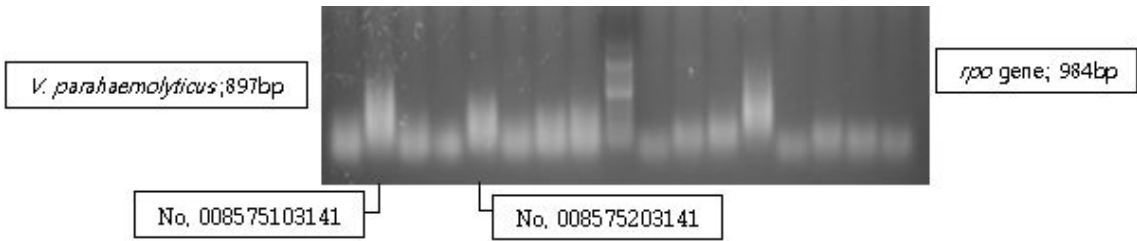
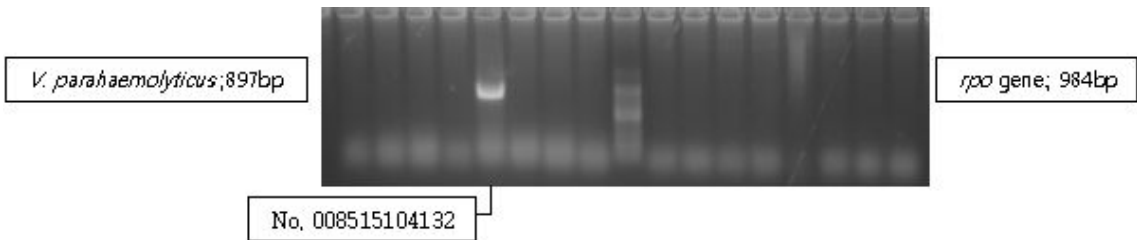
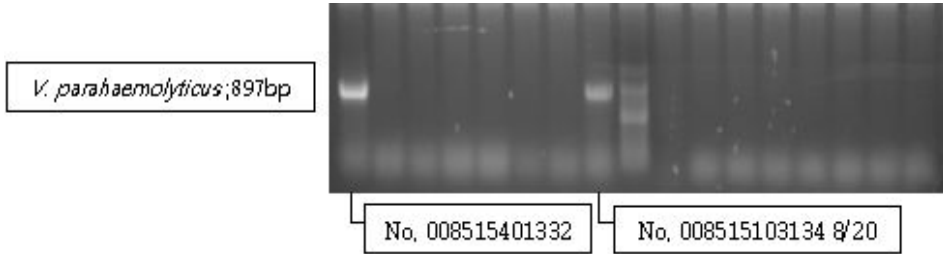
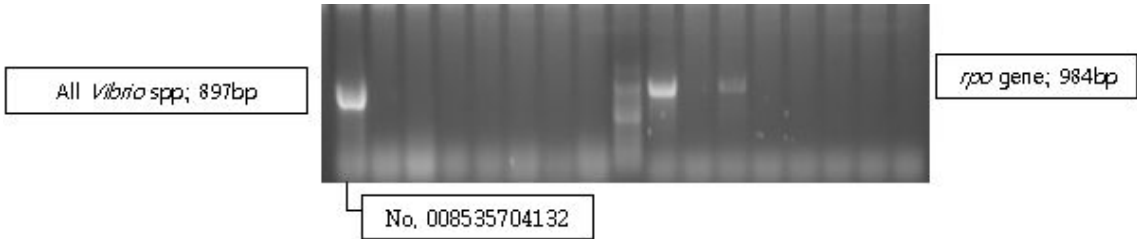
primer mixture (premix)		
Taget gene	primer sequence	size (bp)
<i>rpoB</i> gene	F (20 pmole/ul): CGG AAC GGC CTG ACG TTG CAT	890
	R (20 pmole/ul): GTA GAA ATC TAC CGC ATG ATG	

PCR 조건	
1 cycle	93℃ 15min
35 cycle	92℃ 40sec
	57℃ 1min
	72 ℃ 1min 30sec
1 cycle	72 ℃ 7min
hold	4 ℃

다음과 같은 일련의 결과를 확인할 수 있었다.







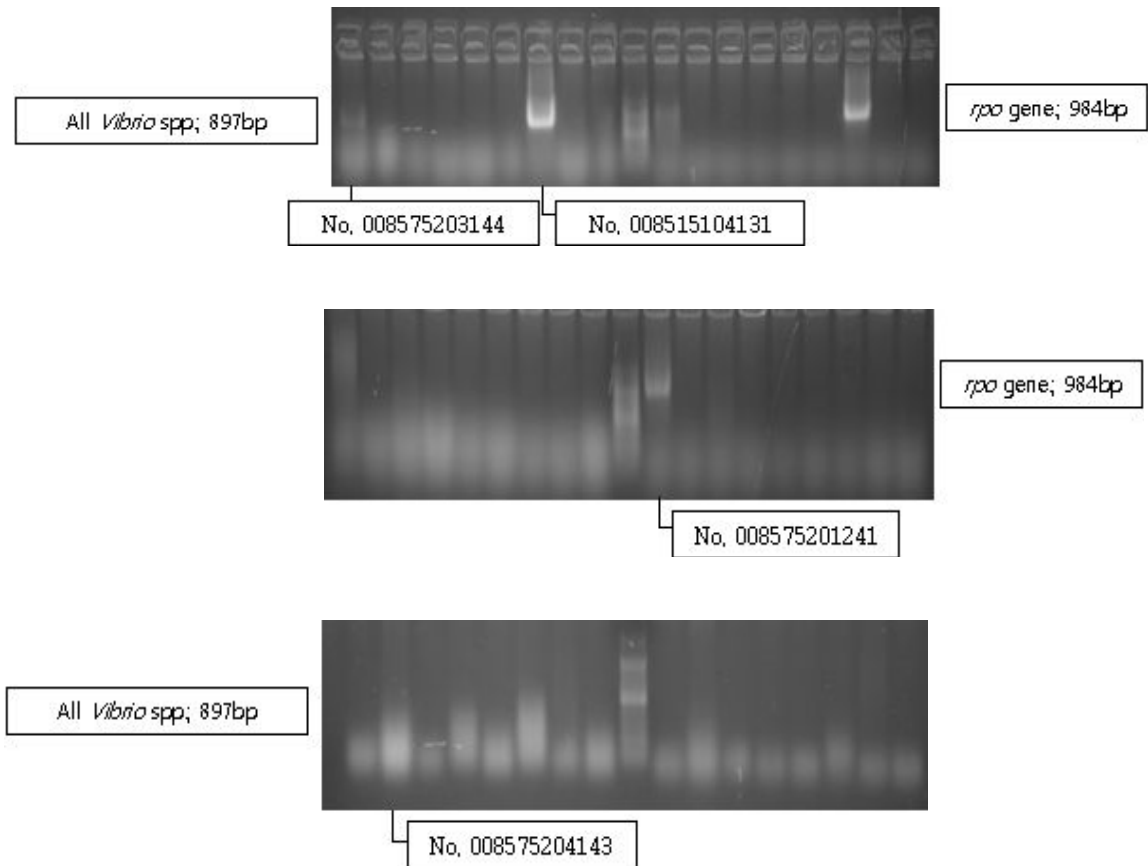
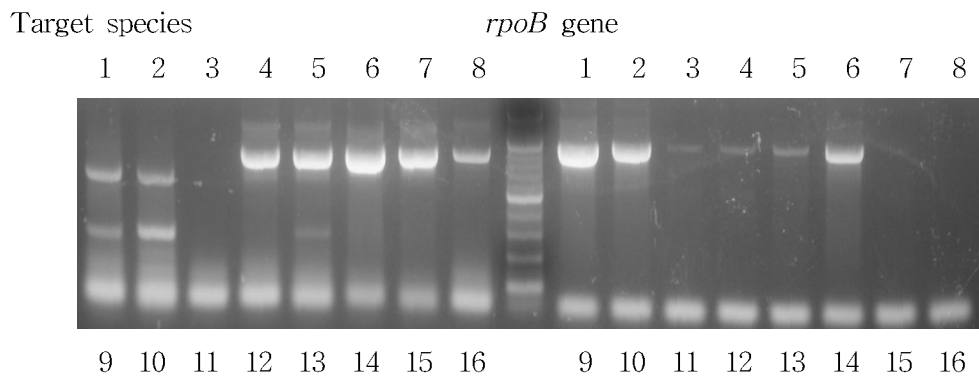


그림 13. *Vibrio* spp.의 PCR 결과

위에서 PCR 밴드를 확인한 sample들을 보다 정확하게 결과를 판단하기 위하여 gel running 을 재실행 하였다.



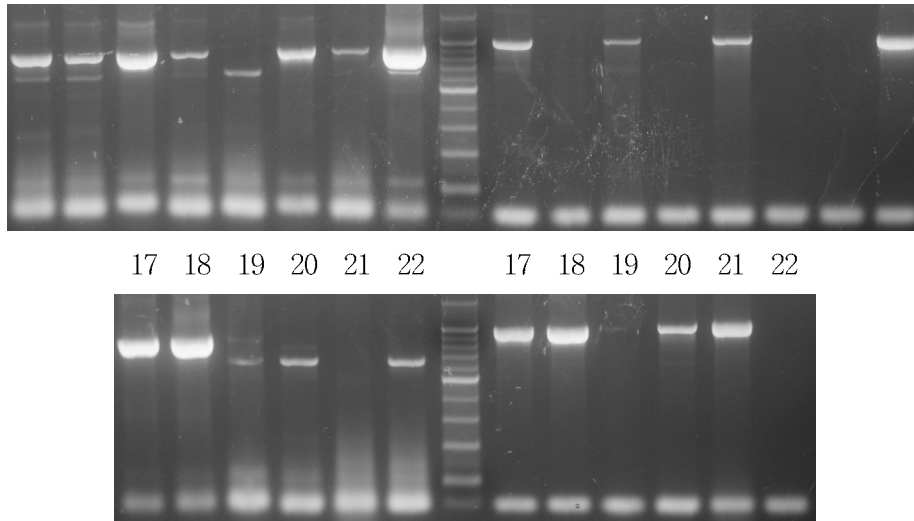


그림 14. *Vibrio* spp.의 PCR 결과

총 122 균주 중 22종이 PCR에 의해 증폭되었으며 아래와 같다.

표 12. 샘플 출처 별 *Vibrio* spp. 의 동정 및 *rpoB* 유전자 확인

No.	샘플출처	Species	rpoB gene
1	제주동문어시장패류	<i>V. cholerae</i>	+
2	제주서귀포시장횃집어류아가미	<i>V. cholerae</i>	+
3	전남목포횃집어류회		+
4	전남여수어시장패류	<i>V. parahaemolyticus</i>	+
5	전남목포횃집어류회	<i>V. parahaemolyticus</i>	+
6	제주모슬포어시장수조	<i>V. parahaemolyticus</i>	+
7	경남다대포횃집어류회	<i>V. parahaemolyticus</i>	-
8	경남자갈치어시장어류회	<i>V. parahaemolyticus</i>	-
9	경남 어시장 패류	<i>V. parahaemolyticus</i>	+
10	전남여수어시장어류회	<i>V. parahaemolyticus</i>	-
11	전남여수횃집어류회	<i>V. parahaemolyticus</i>	+
12	경남다대포어시장어류회	<i>V. parahaemolyticus</i>	-
13	전남목포횃집어류회	<i>Vibrio</i> spp.	+
14	경남다대포어시장수조	<i>V. parahaemolyticus</i>	-
15	경남자갈치시장횃집어류회	<i>V. parahaemolyticus</i>	-
16	경남자갈치시장횃집어류회	<i>V. parahaemolyticus</i>	+
17	제주서귀포시장횃집어류아가미	<i>V. parahaemolyticus</i>	+
18	제주서귀포시장횃집어류아가미	<i>V. parahaemolyticus</i>	+
19	제주서귀포시장횃집어류아가미	<i>Vibrio</i> spp.	-
20	경남자갈치횃집어류회	<i>Vibrio</i> spp.	+
21	제주서귀포어시장패류		+
22	제주서귀포시장횃집어류아가미	<i>Vibrio</i> spp.	-

(가) 지역별 검출율

22개 군주중 제일 많은 수의 샘플에서 비브리오가 검출된 지역은 경남과 제주로써 각각 8개의 샘플에서 비브리오가 분리되었다. 그 다음은 전남의 5개 샘플에서 비브리오가 분리되었다. 그 외의 경기, 충남, 충북지역에서는 비브리오균이 검출되지 않았다. 따라서 비교적 수온이 높은 남해안을 중심으로 비브리오균이 검출되는 것으로 나타났다.

(나) 샘플별 검출율

어류, 패류, 수조(물)의 세가지로 분류했을 때 어류에서 16개의 비브리오가 분리되어 월등히 높은 검출율을 나타내었으며, 패류에서 4개, 수조에서 2개의 샘플에서 비브리오가 분리되었다.

어류에서는 횃감에서 11군주, 아가미에서 5개의 군주가 분리됨으로써 문헌상과 달리 횃감에서 아가미보다 높은 숫자의 분리율을 보였다. 또한 수조(물)에서도 비브리오균이 검출되어 교차오염의 위험성이 있다고 판단되었다.

(다) 샘플채취장소

어시장에서 채취한 샘플에서 9개, 횃집에서 채취한 샘플에서 13개의 비브리오 군주가 분리되었다.

이는 소비자에게 바로 조리되어지는 어류나 패류에서의 오염도가 조금 더 높게 나타난 것으로 주의가 요구되며, 조리자의 칼이나 도마 등에서는 비브리오가 검출되지 않았다.

다. 제 1협동과제 생산 표준균주 유래 혈청과 분리균주와의 반응성 검토를 통한 평가

(1) 대장균의 표준균주와 국내분리균주의 바이오 마커 (항체, 혈청)과의 반응성

아래 결과에서 보는 바와 같이 1차년도 사업에서 분리된 병원성 대장균들의 경우 앞서 PCR결과에서 확인할 수 있듯이 VTEC/STEC와 EPEC만이 검출되었다. 이들의 경우 혈청형이 아래의 표와 같은 혈청형에 속하므로 국내 병원성 분리주도 이들 혈청형에 반응하는 것으로 판단하여 제작된 이들 혈청과 반응성을 평가하였다. 국내에서 분리된 모든 병원성 대장균들이 이들 혈청 중 한가지와 성공적으로 반응하는 것으로 보아 표준주와 국내 분리주 사이의 항체와의 반응성에서는 차이가 없는 것으로 판단하였다.

표 13. VTEC/STEC 및 EPEC에 속한 대장균주들의 혈청형

VTEC/STEC 및 EPEC에 속한 대장균주들의 혈청형
O2, O5, O8, O26, O55, O74, O76, O84, O86, O88, O91, O103, O104, O111, O113, O114, O117, O118, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O145, O146, O157, O158, O174, O176, O177

(2) 살모넬라균의 표준균주와 국내분리균주의 바이오 마커 (항체, 혈청)과의 반응성

대장균의 경우와 마찬가지로 표준균주를 활용하여 제작한 혈청과 국내 분리주와의 반응성이 매우 좋은 것으로 나타났다. 다만 분리주의 수가 많은 관계로 분리/동정시 생화학적 분석이 끝나고 살모넬라 polyvalent serum (Group A, B, C, D, E 포함)과만 반응시킴으로써 살모넬라균임을 재차 확인하였다. 따라서 표준주와 국내 분리주 사이의 항체와의 반응성에서는 차이가 없는 것으로 판단하였다.

라. 자성나노입자 - protein G trimer - 특이항체 삼중복합체의 평가

(1) 살모넬라균과 대장균의 검출

Protein G trimer 단백질이 결합되어 있는 자성나노입자 10mg에 살모넬라 각 항원인자들에 대한 단클론 항체 혼합액을 넣고 자성나노입자 자동화 장비(제 2협동과제 제작 장비)에서 30분간 400rpm으로 반응시켰다. 그 후 자력으로 자성나노입자들을 tube 벽쪽으로 모은 후 saline solution을 제거하였다. 그 후 멸균된 saline solution 1ml를 넣고 5분간 400rpm으로 2회 세척하였다. 세척 후 자성나노입자를 1mg씩 분주하고 *Salmonella* S-3(B type)균주와 *Escherichia coli* O157 두 균을 OD 600nm에서 0.6으로 맞추어 동량을 혼합한 후 첨가하였다. 첨가 후 5분간 반응 후 solution을 제거하였다. 그 후 세척은 saline

soultion과 PBST (0.5% Tween-20이 첨가된 PBS 완충액)로 각각 2회 세척한 후 XLD 선택배지에 도말하였다. Control은 혈청을 결합시키지 않은 자성나노입자에 같은 방법으로 진행하여 도말하였다. 아래 그림에서 확인할 수 있는 바와 같이 살모넬라 항체가 결합된 자성나노입자를 활용한 경우 99% 이상의 콜로니들이 살모넬라 균임을 확인할 수 있었다.

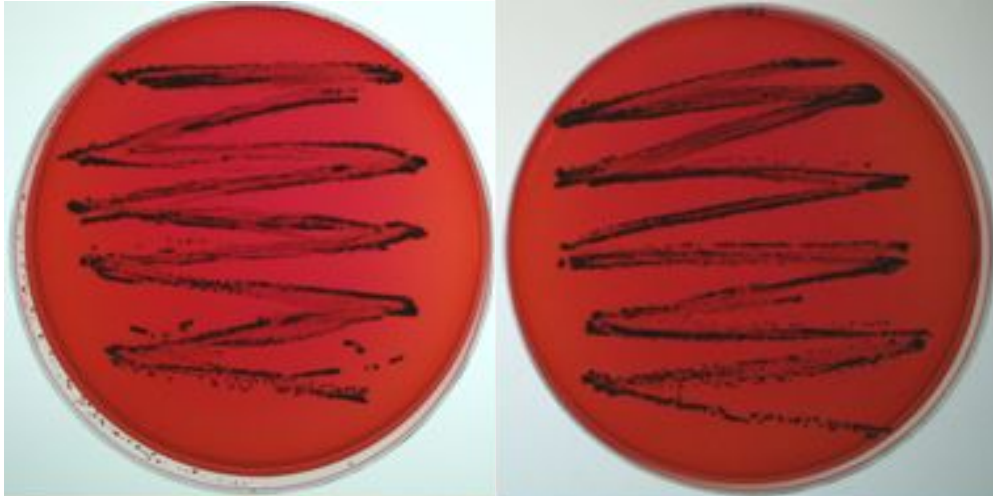


그림 15. magnetic bead를 통해 검출된 plate

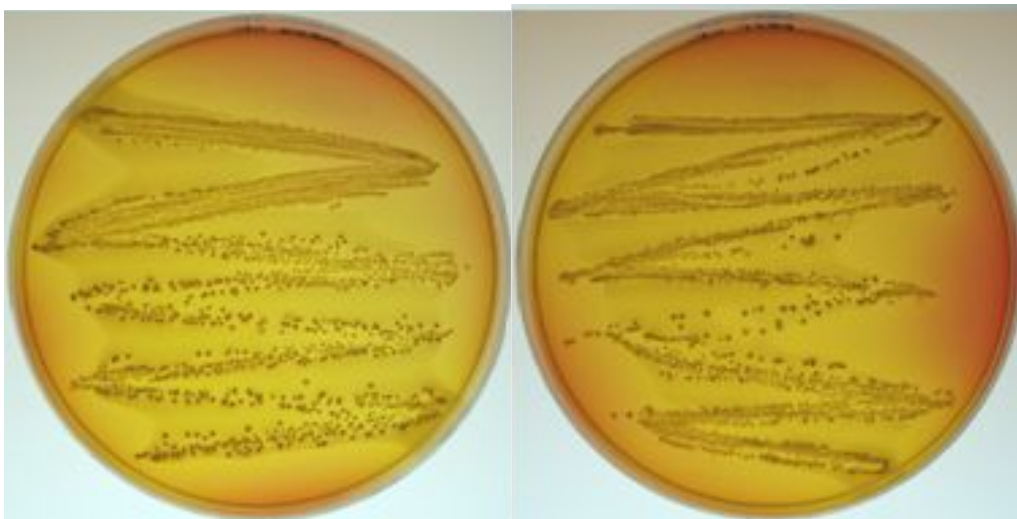
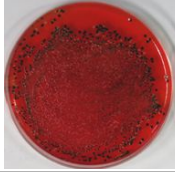
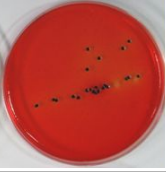
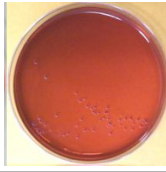
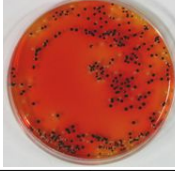
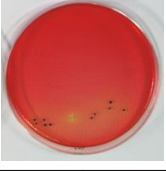

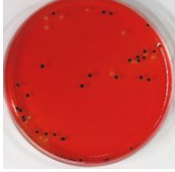

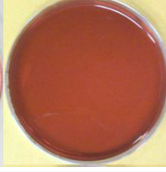
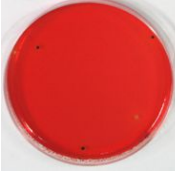
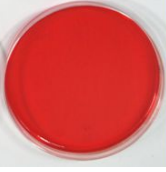
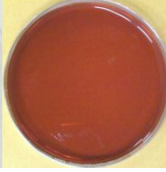


그림 16. control plate

살모넬라 단클론 항체균과 대장균 혈청 혼합액을 protein G trimer 단백질이 결합되어 있는 자성나노입자가 10mg씩 분주되어 있는 tube에 각각 혼합하여 결합시켰다. 역시 자성나노입자 자동화 장비에서 30분간 400rpm으로 반응시켰다. 그 후 자력으로 자성나노입자를 tube 벽으로 모은 후 solution을 제거하였다. 그 후 멸균된 PBS solution을 1ml씩 넣고 5분간 400rpm으로 2회 세척하였다. 세척 후 magnetic bead는 0.5mg씩 분주하고 *Salmonella* S-3(B type)균주와 *Escherichia coli* O157 두 균을 OD 600nm에서 0.6으로 맞춘 후 희석하여 각각의 균주가 10,

10², 10³, 10⁴이 되게 섞은 후 첨가하였다. 5분간 반응 후 solution을 제거하였다. PBST로 각각 2회씩 세척한 후에 XLD 선택배지에 도말하였다. 첨가한 균주도 plate에 도말하여 실제 균수를 측정하였다. 위의 실험은 1.5ml용과 50ml용 두 가지의 bio micro processor에서 진행하였으며 에서 불륨을 1ml과 30ml에서 시행하였으며 결과는 아래와 같다.

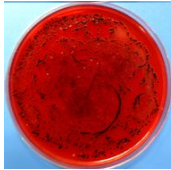



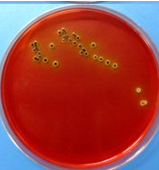

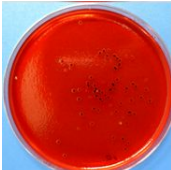

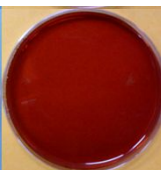
첨가한 균수		검출된 균수 살모넬라 단클론 항체군		검출된 균수 대장균 혈청혼합액	
<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>
TNTC	TNTC	25	2	0	54
					
326	158	10	1	0	3
					
33	15	3	0	0	0
					
3	1	0	0	0	0
					

TNTC : too numerous to count

그림 17. 1.5ml용 자성나노입자 자동화 장비 이용 결과

1.5ml용 자성나노입자 자동화 장비를 활용한 경우 적은 용량만을 처리할 수 있을 뿐만 아니라 살모넬라균의 경우 시료 내에 30개 이상의 균수가 존재할 때 균의 검출이 가능하고, 대장균의 경우에는 150여개 이상의 균이 존재할 때 검출이 가능한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 3회 이상 반복하여 얻은 결과이며, 재현성 있게 결론되었다. 또한 살모넬라 항체군이 결합된 자성나노입자를 활용한 경우 대장균의 검출은 거의 되지 않았으며, 대장균 항체군이 결합된 자성나노입자를 결합시킨 경우에도 살모넬라균의 검출은 거의 없어 특이도에서도 매우 우수한 결

과를 도출할 수 있었다.

첨가한 균수		검출된 균수		검출된 균수	
<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>
TNTC	TNTC	63	1	0	8
					
1224	104	36	0	0	6
					
75	4	0	0	0	0
					

TNTC : too numerous to count

그림 18. 50ml용 자성나노입자 자동화 장비 이용 결과

50ml용 자성나노입자 자동화 장비를 활용한 경우 적은 용량만을 처리할 수 있을 뿐만 아니라 살모넬라균의 경우 시료 내에 약 1000개 이상의 균수가 존재할 때 균의 검출이 가능하고, 대장균의 경우에는 약 100여개 이상의 균이 존재할 때 검출이 가능한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 3회 이상 반복하여 얻은 결과이며, 재현성 있게 결론되었다. 또한 1.5ml 자성나노입자 자동화 장비를 활용한 경우와 마찬가지로, 살모넬라 항체균이 결합된 자성나노입자를 활용한 경우 대장균의 검출은 거의 되지 않았으며, 대장균 항체균이 결합된 자성나노입자를 결합시킨 경우에도 살모넬라균의 검출은 거의 없어 특이도에서도 매우 우수한 결과를 도출할 수 있었다.

그리고 1차년도 조사사업에서 결과를 고찰한 결과, 대장균이 검출된 시료에서 동시에 살모넬라균이 검출된 예가 전혀 없었다. 이는 기존의 검출방법 상에서 전배양 시 대장균과 살모넬라균

이 동시에 존재하더라도 대장균이 분비하는 bacteriocin에 의해 살모넬라균이 사멸되는 것으로 판단되며, 이러한 현상은 기존의 검출방법이 동일 시료에서 대장균과 살모넬라균의 동시 검출에 한계가 있음을 보여주는 결과라고 판단된다. 다시 말해, 샘플 중에 비병원성 대장균과 살모넬라가 동시에 존재할 경우, 전배양과정을 거치는 기존의 검사방법을 사용할 경우 살모넬라가

샘플에 존재함에도 검사결과는 음성으로 판단되어질 수 있다. 실제 인공적으로 *Salmonella* S-3(B type)균주와 *Escherichia coli* O157 두 균주를 BPW배지에 같은 양을 접종하여 하루 동안 전배양한 후에 앞서와 같이 본 과제를 통해 신규 개발된 방법으로 자성나노입자를 이용하여 salmonella 균주를 검출했지만 분리되지 않았으며, BPW에 하루 배양된 동일한 배양액을 살모넬라 선택배지인 XLD 배지에 도말한 결과 *Salmonella* 균주가 검출되지 않음을 확인할 수 있었으며 이러한 결과가 앞서의 1차년도 조사사업 결과를 뒷받침하는 것이라고 판단된다.

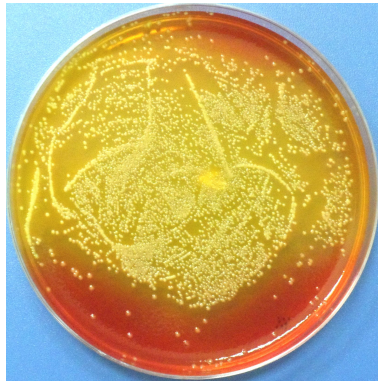


그림 19. 대장균과 살모넬라균의 동시 전배양 후 XLD 선택배지에 도말 후의 결과

(2) 기존 병원성 대장균의 검출에 있어서의 문제점 및 IMS 이용에

기존 magnetic bead (IMS, immuno-magnetic separation)를 이용한 대장균의 분리동정은 O157, O26, O103, O111, O145만 가능함 (아래 관련 원리 및 장비, 결과 참고).

총론에서 언급된 바와 같이 본 과제를 통해 개발되는 자성나노입자-protein G multimer 복합체는 어떠한 종류의 항체들도 결합시킬 수 있으므로 이러한 한계를 명백히 극복할 수 있는 큰 장점이 있음. 또한 장출혈성 대장균의 실험실 진단의 문제점으로 가장 많이 지적되는 사항이 아래와 같이 5가지 정도이며, 이러한 한계를 극복하는데 상당한 기여를 할 것으로 판단됨.

(가) 장출혈성 대장균 실험실 진단의 문제점 -

- ① 현재 진단법이 O157 위주로 되어 있음
: 여타 원인체의 감별이 이루어지고 있지 않음
- ② non-O157 균주의 경우 선택감별배지가 없음
- ③ 일선 시도 보건검사기관의 Shiga toxin 검사능력 부재
- ④ VT-PCR 양성인 검체로부터 원인병원체의 분리가 쉽지 않음
- ⑤ 검체 채취 후 최종 동정까지 7일 소요됨

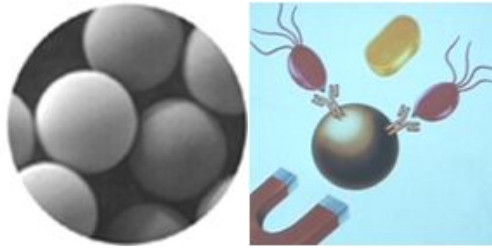
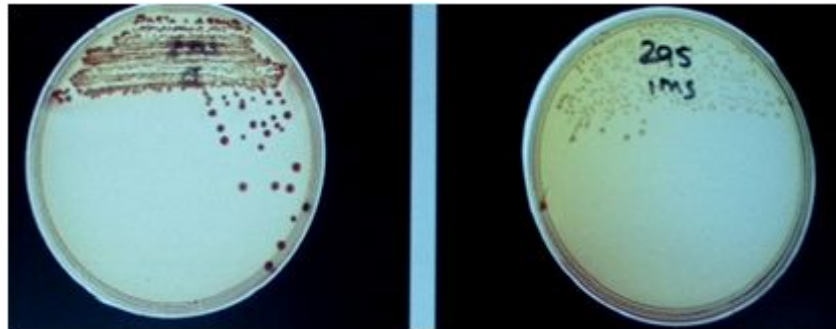


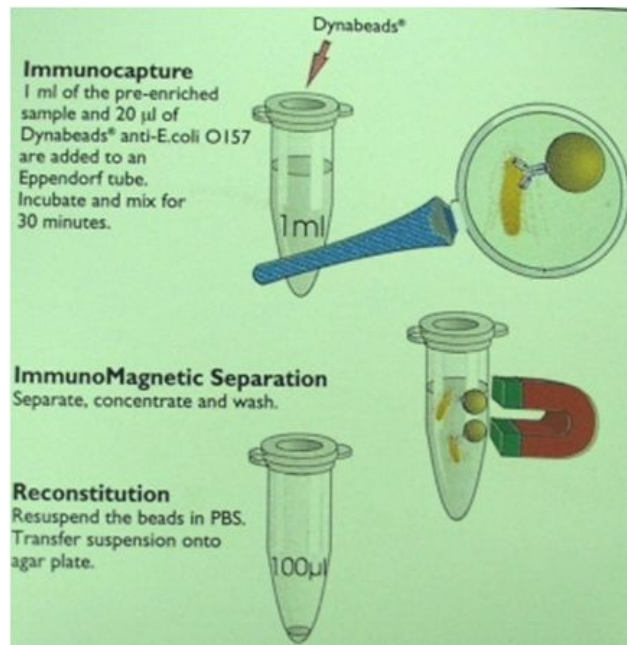
그림 20. magnetic bead 및 IMS 결합 모식도



IMS 처리 전

IMS 처리 후

그림 21. IMS를 통한 대장균의 분리 전후 결과 (기존 방식)



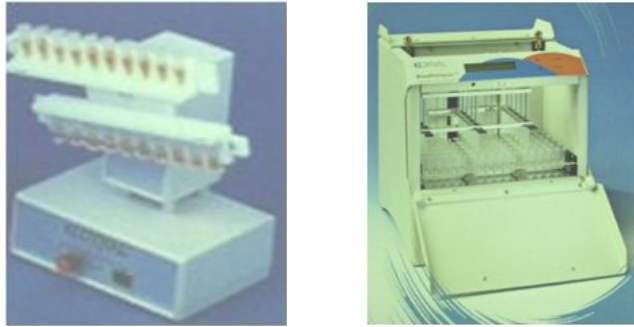


그림 22. IMS 원리 및 기준 장비

3. 위해요소중점관리기준(HACCP)의 적용

가. HACCP 적용 관련 문헌 및 연구내용 검토

- (1) “위해요소중점관리기준”(Hazard Analysis Critical Control Point, 이하 “HACCP”라 한다)이란 가축의 사육, 축산물의 원료관리·처리·가공·포장·유통 및 판매까지 전 과정에서 위해물질이 해당 축산물에 혼입되거나 오염되는 것을 사전에 방지하기 위하여 각 과정을 중점적으로 관리하는 기준을 말한다.
- (2) 위해요소(Hazard)”이란 법 제33조제1항제1호 내지 제4호까지에 따른 해당하는 생물학적·화학적 또는 물리적 인자로서 자연독소·병원성미생물·화학물질·농약·축산물에 잔류되는 동물약품·인수공통전염병의 병원체·가축의 대사과정 또는 축산물에서 생성될 수 있는 유해분해산물·기생충·축산물에 사용할 수 없는 식품첨가물 또는 색소·털, 먼지, 쇠붙이 등 축산물에 혼입되거나 부착될 수 있는 이물질 등을 말한다.
- (3) HACCP system의 위해요소는 생물학적, 화학적, 물리적 위해요소로 구성되어 있음
- (4) 생물학적 위해요소는 각종 병원성 미생물, 바이러스, 곰팡이 등을 규정하고 있음
- (5) HACCP system의 관리 목적은 각 공정별 위해요소를 열거, 분석, 평가하여 발생가능한 위해를 사전에 예방하는 것임
- (6) 업종별, 축종별, 공정별 생물학적 위해요소의 분석을 통해 현재 축산물에 존재하고 있는 위해요소들을 평가하여 실제 현황을 파악하는 것이 중요
- (7) 현재 축산물에서 주로 검출되고 있는 병원성 미생물은 pathogenic *E. coli*(EHEC, EPEC, ETEC, EAEC 등), *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* 등이 있음

나. HACCP관리제도의 병원성 미생물 control

- (1) 생물학적 위해요소 중 가장 빈번하게 발생이 되고 인체에 위해를 가할 수 있는 요소로는 병원성미생물이 있으며, 실제 작업장마다 온도관리 및 보관관리 등의 미흡으로 인해 병원성미생물이 증식하고 이에 따른 식중독 사고에 대한 우려 또한 증대되고 있다. 특히 미생물의 경우 증식이 양호한 조건에서는 doubling time이 15분가량으로써 완제

품 뿐만 아니라 공정별 반제품에 대한 철저한 검사관리가 필요한 실정이다.

- (2) 현재 축산물의 가공기준 및 성분규격(검역검사본부 고시 제2012-69호)에 따른 병원성 미생물에 대한 검사방법은 검사배지를 이용한 배양법에 따른 것으로서 검사결과가 나오기까지는 1주일 이상이 걸리는 단점이 있으며, 검사법에 숙련된 인원이 아닐 경우 실험이 어렵고, 결과 또한 정확하지 않을 수 있다.
- (3) 그러나 실제로는 대다수의 축산물이나 수산물 처리 작업장은 영세한 작업장이 대부분이며, 이러한 곳에서는 검사관리에 필요한 전문인력의 부족, 장비의 부족 등으로 인해 실제적인 검사가 이루어지지 않고 있는 실정으로, 신속정확한 병원성미생물 검사용 자동화장비의 보급이 시급하다고 할 수 있겠다.
- (4) 본 연구과제에서 개발된 자동화장비는 일반 배양법을 이용한 검사방법보다 민감도, 특이도의 증가는 물론 검사시간의 획기적인 감소와 자동화장비 시스템으로 인해 검사의 용이성을 확보하였다고 할 수 있다.
- (5) 따라서 본 연구과제에서 개발된 자동화장비를 이용하게 되면 축, 수산물에서 발생하는 대표적인 병원성 미생물인 *pathogenic E. coli*(EHEC, EPEC, ETEC, EAEC 등), *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*를 쉽고 빠르게 검출할 수 있어 공정별 위해요소관리기준인 HACCP의 취지에 부합할 뿐만 아니라 현장에서 보다 정확한 검사관리를 통해 축, 수산물의 안전성 향상에 기여할 수 있을 것이다.
- (6) 각 작업장 형태별 미생물 관리기준 및 HACCP 평가항목
: [농림수산검역검사본부 고시 제2011-111호] 축산물위해요소중점관리기준
* 각 평가표에 개발된 자동화장비를 활용하여 평가할 수 있는 항목 추가

(가) 도축장

- ① 도축장의 경우는 국가에서 지정된 검사관이 상주하고 있으며, 검사원과 함께 작업 전반에 대한 생산감독과 동시에 축산물 위생관리법 제9조에 명시된 미생물학적 검사를 함께 수행하고 있다.
- ② 도축장의 상황에 따라 차이는 있지만, 각 도축장에 소속된 검사실의 검사장비가 노후된 것이 많고 인력의 부족으로 검사관리에 어려움을 겪고 있는 곳이 많다.
- ③ 지육에 대한 검사결과가 나올 때 썸이면 지육이 모두 출하되어 가공장으로 모두 이동하여 작업이 완료되었을 시점이므로, 회수절차에 큰 어려움이 예상된다.

- 따라서 본 연구과제에서 개발된 자동화장비를 도축장에 적용한다면, 예냉실에서 예비검사를 통해 신속하게 병원성 미생물의 오염결과를 확인할 수 있다. 그리하여 오염의심도체의 경우에는 출하를 연기하고 정밀검사를 실시할 수 있다.
- 또한 인력 및 시간의 절약, 그리고 지육의 부위별 교차오염에 대한 포괄적인 검사가 가능함으로써 도축장에서 발생할 수 있는 생물학적위해(병원성미생물)을 제어하는데 크게 기여할 수 있을 것이다.

<별첨>

도축장의 미생물학적 검사요령

1. 목적

이 검사요령은 축산물위생관리법 제9조 그리고 이 고시 제7조 및 제9조에 따라 도축장에서 HACCP가 효율적으로 운용되고 있는지 여부를 검증하고자 함을 목적으로 한다.

2. 적용대상

이 검사요령은 도축장을 대상으로 적용한다.

3. 미생물검사 항목

도축장에 대한 미생물검사항목은 대장균(*Escherichia coli* Biotype I) 및 살모넬라균(*Salmonella* spp.)으로 한다.

4. 미생물검사 주체

가. 도축장의 영업자는 도축장에서 처리하는 식육에 대하여 대장균(*Escherichia coli* Biotype I) 검사를 실시하여야 한다.

나. 시·도지사는 축산물위생관리법 제20조 및 같은법 시행규칙 제27조에 따른 소속 축산물 위생검사기관으로 하여금 도축장별로 도축장에서 처리하는 식육에 대하여 살모넬라균(*Salmonella* spp.) 검사를 실시토록 하여야 한다.

5. 검사주기

미생물검사는 소 300 도체, 돼지 1,000 도체 및 닭·오리 22,000 도체마다 각 1건의 시료를 채취하여 검사를 실시하되, 1주 도축두수가 이에 미달하는 도축장의 경우는 최소한 1주에 축종별로 1건의 시료를 채취하여 검사를 실시한다.

6. 시료채취 및 검사방법

축산물위생관리법 제4조제2항에 따라 농림수산검역검사본부장이 정하여 고시한 축산물의가 공기준및성분규격의 제3.축산물 시험방법 9. 미생물시험법에 의한다.

7. 미생물검사 실행기준

가. 대장균수의 실행기준은 아래와 같다.

표 14. 대장균수의 실행기준표

도축장	허용기준치 (CFU/cm ² , ml)	최대허용한계치 (CFU/cm ² , ml)	대장균수 평가기준	
			검사시료수	허용기준치 이상에서 최대허용한계치 이하 까지 최대 허용 시료수
소	5 미만	100	13	3
돼지	10 미만	10,000	13	3
닭·오리	100 미만	1,000	13	3

나. 살모넬라균의 실행기준은 아래와 같다 .

표 15. 살모넬라의 실행기준표

도축장	살모넬라균 검출 허용기준		살모넬라균 검출율(년간)
	검사시료수	최대허용 검출 시료수	
소	26	1	2.5% 이내
돼지	26	2	7% 이내
닭·오리	26	5	18% 이내

8. 검사결과 판정기준

가. 축산물위생검사기관의 장은 해당 도축장에 대한 미생물검사 결과가 나올 때마다 “7. 미생물검사 실행기준”에 의거 적합여부를 판정하여야 한다.

나. 대장균수 검사에 의한 판정기준은 다음 각 호와 같다.

- 1) 최근 13회 검사중 1회 이상에서 대장균수가 최대허용한계치를 초과하는 경우에는 부적합으로 판정한다.
- 2) 최근 13회 검사중 허용기준치 이상이면서 최대허용한계치 이하인 시료가 3회를 초과하는 경우에는 부적합으로 판정한다.

다. 살모넬라균 검사의 경우 최근 26회 검사시료 중 소는 1회, 돼지는 2회 및 닭·오리는 5회를 초과하여 살모넬라균이 검출될 경우 부적합으로 판정한다. 다만, 도축장에서 연간 살모넬라 검출율이 소는 2.5%, 돼지는 7%, 닭·오리는 18%를 초과하는 경우 부적합으로 판정한다.

라. 대장균수와 살모넬라균에 의해 동시에 부적합 판정을 받은 경우에는 1회 부적합으로 간주한다.

9. 검사기록

이 요령에 따라 미생물검사를 실시한 도축장의 영업자 및 시·도 축산물위생검사기관의 장은 검사와 관련한 기록을 작성하고 이를 최종기재일로부터 2년간 보관하여야 한다.

10. 검사결과 조치사항

- 가. 도축장의 영업자는 대장균 검사결과 부적합으로 판정되었거나, 시·도 축산물위생검사기관의 장으로부터 살모넬라균검사 결과 부적합으로 통보를 받은 경우 즉시 부적합 원인을 조사하고 적절한 시정조치를 하여야 한다.
- 나. 도축장의 영업자는 이 고시에 의한 미생물검사 결과 부적합 판정 후 1년이내에 다시 부적합 판정이 있는 경우에는 도축장의 HACCP 계획을 재평가하고 수정·보완하여야 한다.
- 다. 시·도 축산물위생검사기관의 장은 살모넬라균 검사결과 부적합으로 판정되는 경우 그 세부내역을 시·도지사에게 보고하고 해당 도축장의 영업자에게 즉시 통보하여야 한다.
- 라. 시·도 축산물위생검사기관의 장으로부터 살모넬라균 검사결과 부적합 통보를 받은 도축장의 영업자는 원인 분석, 시정조치, HACCP계획 재검토 등의 살모넬라균 재오염을 예방하기 위한 적절한 조치를 실시하고 그 결과를 조치 완료일로부터 1주일 이내에 관할 지역 시·도지사 및 시·도 축산물위생검사기관의 장에게 제출하여야 한다.
- 마. 시·도지사는 이 검사요령에 의한 살모넬라균검사 결과 2회 연속 또는 최근 1년 동안 3회 이상 부적합 판정이 있는 도축장에 대하여는 당해 영업자로 하여금 외부 전문가 1명과 당해 도축장의 HACCP팀이 도축장 HACCP 계획을 재검토하고 HACCP 계획 변경, 시설보완 등의 적절한 시정조치를 하도록 하여야 하며, 축산물위생관리법 제27조에 따라 행정처분의 조치를 하여야 한다.

11. 검사결과 통보(보고)

- 가. 시·도 축산물위생검사기관의 장은 이 요령에 의한 미생물검사 결과를 매월 관할 시·도지사 및 해당 도축장에 보고(통보)하여야 한다. 다만, 검사시료 중 살모넬라균이 검출된 경우에는 즉시 그 결과를 시·도지사 및 해당 도축장에 통보하여야 한다.
- 나. 시·도지사는 소속 축산물위생검사기관의 장으로부터 보고 받은 미생물검사 결과 및 부적합 도축장의 시정조치내역을 분기별로 농림수산검역검사본부장에게 다음 양식에 따라 보고(통보)하여야 한다.

표 16. 검사 결과 서식표

대장균·살모넬라균 검사 결과

회사명	적용 축종	대 장 균					살모넬라균			
		검 사 시료수	허용기준치 미만 판정건수	허용기준치 이상에서 최대허용한계치 이하	최대허용한계치 초과 건수	13회 검사중 부적합 판정건수	검 사 시료수	검 출 시료수	26회 검사중 부적합판정건수	검출률(%)

□ 부적합 도축장의 시정조치내역

회사명	부적합사항	시정조치내역	비고

(나) 축산물 가공업

- 축산물 가공업의 경우는 분쇄가공, 염지가공 등 별도의 공정을 거치게 된다. 따라서 여러 가지 부재료 및 가공장비에 노출되는 빈도가 높기 때문에 cross contamination이 발생할 가능성이 상대적으로 높을 수 있다.
- 따라서 축산물 가공업에서는 완제품에 대한 검사 뿐 만 아니라 공정별 반제품 및 각 공정별 첨가되는 부재료 등에 대한 병원성 미생물 검사를 실시함으로써 위해를 사전에 예방할 수 있다.
- 현 위해요소중점관리 기준에서의 병원성 미생물에 대한 관리항목 및 한계기준은 별도로 설정되어 있지 않으나, 본 검사장비를 적용한다면, 각 공정별 생물학적 위해의 관리항목을 추가할 수 있을 것이며, 한계기준 또한 Risk analysis를 거쳐 설정 할 수 있을 것이다.
- 축산물 가공장에서는 pathogenic *E. coli*(EHEC, EPEC, ETEC, EAEC 등), *Salmonella* spp.의 검사가 수행되어야 할 것이라고 생각되며, 즉석조리식품과 같은 냉동식품에서는 *Listeria monocytogenes*에 대한 검사에 대한 기준이 설정되고 수행되어야 할 것이다.
- 현 위해요소중점관리기준에서의 선행요건관리 프로그램 중 검사관리에 대한 평가항목 : [농림수산검역검사본부 고시 제2011-111호] 축산물위해요소중점관리기준
* 59~61번 평가항목은 새로 추가한 항목

표 17. 평가항목서식

검사관리			
53	제품검사에 필요한 시설 및 기구를 갖추고 있는가?		
54	시설 및 기구는 정기적으로 점검하여 검사에 지장이 없도록 관리·유지되고 있으며, 점검·정비기록이 되어 있는가?		
55	원료·자재, 반제품 및 완제품에 대하여 검사기록서가 작성되어 있는가?		
56	검사시료를 채취할 때에는 오염 또는 변질되지 아니하도록 채취하고 있는가?		
57	검사종사자에 대하여 정기적으로 교육 훈련을 실시하고 있는가?		
59	각 부재료 및 원재료에 대한 병원성 미생물 검사를 실시하고 있는가?		
60	각 공정별 반제품에 대한 병원성 미생물 검사를 실시하고 있는가?		
61	완제품에 대한 병원성 미생물 검사를 실시하고 있는가?		
62	<p>검사기준서에는 아래사항을 구체적으로 작성 비치하고 있는가?</p> <p>(1) 제조번호 및 제조연월일</p> <p>(2) 검사번호 및 검사시료명</p> <p>(3) 접수 및 검사연월일</p> <p>(4) 검사항목, 검사기준 및 검사성적</p> <p>(5) 판정결과 및 판정연월일</p> <p>(6) 검사자 및 판정자의 서명날인</p> <p>(7) 검체의 채취방법</p> <p>(8) 검사결과의 통지방법</p> <p>(9) 기타 필요한 사항</p>		

(다) 축산물 식육포장처리업

- 식육포장처리업의 경우는 단순 발골, 포장 등의 작업을 거치게 되므로 축산물 가공업에 비해 cross contamination의 가능성은 낮은 편이다.
- 그러나 작업장의 온도, 각 공정별 대기시간 등의 관리가 소홀하게 될 경우 병원성 미생물의 증식에 대한 우려가 상재하고 있다.
- 또한 냉장, 냉동실의 온도관리 또한 중요하여 실시간 온도관리와 함께 미생물학적 검사도 세밀하게 이루어져야 한다.
- 본 검사장비를 활용하여 원료육의 입고검사, 공정별 반제품 검사, 출하전 완제품검사를 실시함으로써 공정별 생물학적위해도 검사를 실시할 수 있다.
- 공정별 반제품 및 출하전까지 완제품에 대한 병원성 미생물에 대한 세밀한 모니터링이 이루어진다면 포장처리업에서 발생할 수 있는 생물학적 위해를 상당부분 예방할 수 있을 것이다.

- 현 위해요소중점관리기준에서의 선행요건관리 프로그램 중 검사관리에 대한 평가항목
: [농림수산검역검사본부 고시 제2011-111호] 축산물위해요소중점관리기준
* 47~49번 항목은 새로 추가한 평가항목

표 18. 평가항목서식

검사 관리			
46	축산물의 안전성 및 작업장 시설 등의 위생관리를 위하여 원료육, 부자재 및 완제품 등에 대하여 정기적인 검사가 실시되고 있는가?		
47	원료육은에 대한 병원성 미생물검사를 실시하고 있는가?		
48	공정별 반제품에 대한 병원성 미생물검사를 실시하고 있는가?		
49	출하전 완제품에 대한 병원성 미생물검사를 실시하고 있는가?		
50	검사에 필요한 시설 및 기구는 정기적으로 점검하여 검사에 지장이 없도록 관리·유지되고 있으며, 그 기록이 유지되고 있는가?		
51	배지, 시약 등 검사에 필요한 소모품관리대장이 적합하게 작성되고 있는가?		
52	검사관리 사항을 구체적으로 정하여 관리되고 있는가? (1) 검사항목·방법·기준 (2) 검사주기 (3) 시료채취 방법 (4) 검사시설 및 기구(위탁검사 시 제외) (5) 판정기준 (6) 검사자 및 판정자 (7) 기타 필요한 사항		
53	검사성적서는 다음 사항을 포함하여 작성되어 있는가? (단, 축산물위생검사기관과 협약에 의하여 검사를 실시할 경우에는 검사기관의 검사성적서 비치) (1) 룯트번호 및 제조연월일, (2) 검사시료명 (3) 시료채취 및 검사연월일 (4) 검사항목, 검사법 및 검사성적 (5) 판정결과 및 판정연월일 (6) 기타 필요한 사항		
54	검사시료를 채취 및 운반할 때에는 시료가 오염 또는 변질되지 아니하도록 위생적으로 채취되고 있는가?		
55	검사결과 관리기준 이탈시 적절한 조치를 취하고 그 기록이 유지되고 있는가?		
56	계측기구 등에 대하여 정기적으로 검·교정을 실시하고 그 기록이 유지되고 있는가?		

(라) 식육판매업

- 식육판매업의 경우는 소비자에게 전달되기 직전의 업종으로써 이부분에서의 위해관리가 소홀하게 되면 크나큰 위해가 발생하게 된다.
- 식육판매업의 HACCP 적용 업소는 크게 증가하고 있는 추세이며, 특히 백화점, 대형마트 등 물량이 많이 유통되는 곳의 지정업소가 대부분을 차지하고 있다.
- 판매업장에서 간단하게 절단 작업 등이 이루어지는 곳이 많으며, 소비자에게 보여지기 위한 공간인 매대(진열공간)에 대한 관리 또한 중요하다고 할 수 있다.
- 입고 된 이후부터 매대에 진열되어 소비자에게 전달되기 직전까지의 시간에 대한 지속적인 모니터링이 필요하다.
- 대규모 판매업장을 제외하고는 별도의 실험공간이나 전문인력을 활용하기 어려운 실정이다.
- 바로 소비자에게 전달되는 과정이므로 일단 판매된 이후에는 회수가 어려우므로 검사 결과를 최대한 빨리 확인할 수 있어야 한다.
- 주요 병원성 미생물인 pathogenic *E. coli*(EHEC, EPEC, ETEC, EAEC 등), *Salmonella* spp.에 대한 검사와 함께 특히 저온성미생물인 *Listeria monocytogenes*에 대한 세밀한 모니터링이 이루어져야 할 것이다.
- 소비자에게 진열되어지는 공간에서의 외부온도와 노출되는 경우가 많으므로, 특히 저온성미생물에 대한 검사가 필요하다.
- 작업장에 머무는 시간이 짧을 수 있으므로 실시간으로 모니터링하고 즉시 결과를 확인할 수 있는 시스템이 필요하다.
- 본 연구과제를 통해 개발된 자동화시스템을 통해 판매된 제품의 병원성 미생물에 대한 screening 검사를 실시하고 결과를 즉시 확인하여 판매가능 여부를 확인할 수 있다.
- 현 위해요소중점관리기준에서의 선행요건관리 프로그램 중 검사관리에 대한 평가항목 : [농림수산검역검사본부 고시 제2011-111호] 축산물위해요소중점관리기준
* 45~47 평가항목은 새로 추가한 항목

표 19. 검사관리 서식

검사 관리			
43	축산물의 안전성 및 작업장 시설 등의 위생관리를 위하여 원료육, 부자재 및 완제품 등에 대하여 정기적인 검사가 실시되고 있는가?		
44	검사에 필요한 시설 및 기구는 정기적으로 점검하여 검사에 장애가 없도록 관리·유지되고 있으며, 그 기록이 유지되고 있는가?		
45	입고제품에 대한 병원성미생물 검사를 실시하고 있는가?		
46	가공공정이 있을 경우 반제품에 대한 병원성 미생물 검사를 실시하고 있는가?		
47	주기적으로 판매제품에 대한 병원성 미생물 검사를 실시하고 있는가?		
45	배지, 시약 등 검사에 필요한 소모품관리대장이 적합하게 작성되고 있는가?		
46	검사관리 사항을 구체적으로 정하여 관리되고 있는가? (1) 검사항목·방법·기준 (2) 검사주기 (3) 시료채취 방법 (4) 검사시설 및 기구(위탁검사시 제외) (5) 판정기준 (6) 검사자 및 판정자 (7) 기타 필요한 사항		
47	검사성적서는 다음 사항을 포함하여 작성되어 있는가? (단, 축산물위생검사기관과 협약에 의하여 검사를 실시할 경우에는 검사기관의 검사성적서 비치) (1) 로트번호 및 제조연월일, (2) 검사시료명 (3) 시료채취 및 검사연월일 (4) 검사항목, 검사법 및 검사성적 (5) 판정결과 및 판정연월일 (6) 기타 필요한 사항		
48	검사시료를 채취 및 운반할 때에는 시료가 오염 또는 변질되지 아니하도록 위생적으로 채취되고 있는가?		
49	검사결과 관리기준 이탈시 적절한 조치를 취하고 그 기록이 유지되고 있는가?		
50	계측기구 등에 대하여 정기적으로 검·교정을 실시하고 그 기록이 유지되고 있는가?		

제 2 절

IT/NT/BT 복합기술을 이용한 인수공통 병원체 진단시스템 개발(1협동과제)

1. 주요 병원성 미생물에 대한 단/다클론 항체 개발

가. 단·다클론 항체 개발을 위한 항원 준비

(1) 병원성 세균의 항원준비

초저온 냉동고에 보관중인 균주를 꺼내어 heart infusion agar 평판배지에 접종하여 37℃에서 하룻밤(18~24시간) 배양한 후 잘 자란 plate를 선택하여 colony가 광택이 있으면서 형태가 원형인 것들을 다수 골라 표준품(질병관리본부에서 제공한 표준혈청)과 슬라이드 응집반응을 실시하였다. 그 후 적정한 응집반응을 보이는 colony를 선택하여 37℃에서 하룻밤(18~24시간) 재배양한 후 슬라이드 응집반응을 재 실시하여 그 성상의 양호함을 다시 확인한 후 heart infusion broth에 접종한 후 37℃에서 6시간 배양한 것을 식균용 균주로 사용하였다. 각각의 균주별로 배양된 균액을 배양병을 이용하여 3~5ml씩 분주한 후 배지 전체에 퍼지도록 하여 37℃에서 18-24시간 배양한다. 이후 saline을 이용하여 균을 배지에서 부유시킨 뒤 균 부유액을 모았다.

H항원을 불활성화하기 위해 100℃에서 2시간 동안 가온한 후 식힌다. 이후 8,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 99.5% 이상의 ethyl alcohol을 이용하여 균 pellet을 부유시켰다. 이후 water bath를 이용하여 37℃에서 4시간 동안 정치시킨 후 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 재차 이러한 알코올을 이용한 고정화 과정을 한차례 더 반복하였다.

원심 분리하여 모은 균 pellet에 acetone 50ml을 첨가하여 부유시킨 후 8,000rpm에서 30분간 원심 분리하였다. 이후 상층액을 제거하고 이와 같은 과정을 재차 반복하였다. 얻어진 균 pellet에 10ml정도의 acetone을 가하여 부유시킨 뒤 적절한 용기에 부어 37℃ 진공 건조기를 이용하여 건조시켰다.

건조된 균 항원은 그 항원성을 평가/검증하기 위해 분말로 만든 후, 표준품(표준 혈청)을 이용하여 응집반응을 실시하며 높은 반응성을 보인 것만을 수집하여 분주 보관하였다. 보관된 항원은 정량하여 가토면역화 및 마우스면역화를 위해 사용되었으며, 생산된 항체의 평가시 활용되었다.

(2) 병원성 세균의 LPS 추출

앞서 언급한 듯이 heart infusion agar 평판배지에서 배양하고 형태가 양호하면서 항원

성이 높은 균주를 배양하고 세균을 열처리 한 후, 준비된 cell pellet에 cell lysis buffer를 첨가하여 세포를 완전히 풀어준 후, chloroform을 첨가하여 섞어준 후, 5분간 상온에 방치한 후 원심분리를 하면 세가지 층으로 구분되는데 가장 윗층을 조심스럽게 모은 후 에틸알콜을 첨가하여 침전 후 같은 방법으로 세척하고 말렸다. 얻어지니 LPS pellet을 PBS buffer를 첨가하여 녹인 후 항원으로 사용하려하였으나, LPS의 독성이 큰 관계로 실제 가토와 마우스에 투여할 항원은 열처리를 통한 H 항원을 불활화한 후, 이를 1% formalin으로 처리하여 고정한 뒤 이를 직접투여하여 항체의 생성을 유도하였으며, 이후 생산된 항체의 평가시 추출된 LPS를 활용하였다.

특히, 관련 실험을 수행하는데 있어서 아래와 같은 실험실 생물안전 확보 규정을 준수하였다.

본 연구소에 소속된 모든 실험실(1층- 동물실험실, 2층- 중앙실험실, 동물세포 배양실, 세균 배양실, 전처리실, 청정실 등)은 생물안전밀폐실험실 운영에 있어 다음과 같은 준수 사항을 이행함을 확인한다.

- 책임연구원의 책임 하에 모든 실험실 근무자에게 생물안전에 필요한 사항에 대해 정기적인 교육을 실시하며, 실험실 출입자들에 대해 체계적인 안전관리를 도모한다.
- 모든 실험실 근무자들은 실험 전 안전작업 요령, 사고발생시 응급조치 등에 관한 사항을 충분히 숙지하며, 실험실 책임자가 안전을 위해 정하는 기타 사항을 준수한다.
- 밀폐 수준에 따라 지정된 구역에서 해당 실험을 실시한다.
- 실험실의 출입문은 모두 닫아 두고 허가자 이외의 출입을 통제한다.
- 모든 실험조작은 에어리졸 발생을 최대한 줄일 수 있는 방법으로 실시한다.
- 피펫은 반드시 기계적인 것만을 사용한다.
- 실험이 끝난 후 실험대의 소독을 실시하며, 실험의 진행중 오염 발생시 즉시 소독을 실시한다.
- 실험이 종료되고 실험실을 나올 때 반드시 손을 씻도록 한다.
- 지정된 실험구역에서의 음식섭취, 식품의 보존, 흡연, 화장 행위는 금지한다.
- 병원성 미생물 취급/보존 장소에 생물재해(biohazard) 표시를 부착한다.
- 모든 폐기물은 폐기전 멸균처리하며, 오염된 유리기구 등은 멸균 후 세척처리한다.
- 고압멸균기 또는 소각로 처리 전 오염 폐기물은 별도의 안전장소 또는 용기에 보관하도록 한다.
- 곤충이나 설치류에 대한 관리 프로그램을 마련한다.
- 모든 실험실 근무자에 대한 정상 혈청을 보관한다.
(매년 1회 정기적으로 채취하여 보관하고 신입사원의 경우 채용과 동시에 채혈 보관한다.)
- 명백하게 오염에 노출된 경우 실험실 책임자에게 즉시 보고하고 의학적 판단과 진단, 조사 및 이에 따른 처리를 실시 한 후 기록을 보존한다.

※ 본사 실험실의 감염성 폐기물 처리 업체 계약

:1층 폐기물 보관실에 보관하며, 사체의 경우 냉동보관을 원칙으로 하고 주기적으로 처리업체에 위탁하여 배출/관리한다.

나. 단 · 다클론 항체(바이오 마커)의 생산

(1) 살모넬라균 다클론 항체 생산

살모넬라균의 진단혈청 생산 대상은 주로 동물에게서 사람에게서 다발하여 파라티푸스, 장티푸스 등의 살모넬라 유래 질환을 유발하는 균을 모두 검출할 수 있는 혈청을 제작하는 것을 목표로 하였으며, 혈청의 제작 시 Group A, B, C, D, E, 및 Vi에 포함되는 살모넬라균을 각기 검출할 수 있는 혈청과 이들 모두의 항원에 반응할 수 있는 polyvalent 혈청을 제작하였다.

이 또한 가토를 이용하여 혈청생산에 활용하였다. 혈청 중 항체의 평가는 슬라이드 응집반응을 기준으로 하여 4+ 이상이 나올 수 있는 혈청의 희석배수로서 평가하였다.

그 결과는 다음과 같다.

살모넬라 진단혈청(바이오 마커)을 생산하기 위한 균주는 아래와 같이 선정하였다.

표 20. 살모넬라 진단혈청 생산균주명

<p><i>Salmonella paratyphi A, Salmonella paratyphi B,</i> <i>Salmonella thompson, Salmonella newport,</i> <i>Salmonella typhi, Salmonella typhi, Salmonella london,</i> <i>Salmonella newington, Salmonella senftenberg,</i> <i>Citrobacter freundii ballerup Bethesda</i></p>
--

상기 선정된 균주를 활용한 살모넬라 진단혈청의 자가역가는 모두 50X 이상으로 매우 양호한 결과를 얻었으며 아래와 같이 교차 응집소를 모두 제거하여 정확한 진단 결과를 얻을 수 있는 제품화 수준의 혈청을 제작하였다.

표 21. 살모넬라 진단혈청 자가역가

혈청형 구분	혈청형 균주명	Poly	Gr A	Gr B	Gr C	Gr D	Gr E	Vi	Remarks
Gr. A	<i>S. paratyphi A</i>	4+ (10sec)	4+ (10sec)	-	-	-	-	-	1. 역가 시험 판정 : 적합 1분 이내 강한 반응.(++++) 2. 비특이 응집 소가 검사 : 적합 다른 그룹의 균 주로 3분 이내 명 확한 반응이 없 음. 3. 물리적 정상 판정 : 적합 투명하고 이물질 없음.
Gr. B	<i>S. paratyphi B</i>	4+ (10sec)	-	4+ (10sec)	-	-	-	-	
Gr. C	<i>S. thompson</i>	4+ (10sec)	-	-	4+ (10sec)	-	-	-	
	<i>S. newport</i>	4+ (10sec)	-	-	4+ (10sec)	-	-	-	
Gr. D	<i>S. typhi</i>	4+ (10sec)	-	-	-	4+ (10sec)	-	-	
	<i>S. Typhi</i>	4+ (10sec)	-	-	-	4+ (10sec)	-	-	
	<i>S. typhi</i>	4+ (10sec)	-	-	-	4+ (10sec)	-	-	
Vi	<i>S. typhi</i>	-	-	-	-	-	-	4+ (10sec)	
Gr. E	<i>S. london</i>	4+ (10sec)	-	-	-	-	4+ (10sec)	-	
	<i>S. newington</i>	4+ (10sec)	-	-	-	-	4+ (10sec)	-	
	<i>S. senftenberg</i>	4+ (10sec)	-	-	-	-	4+ (10sec)	-	

(2) 살모넬라균 단클론 항체 생산

가토를 이용한 다클론 항체 제작과 더불어 살모넬라균의 경우 단클론 항체의 제작을 병행하였는데, 이는 각 살모넬라균이 가지고 있는 LPS의 항원 factor가 아래에서 보는 바와 같이 공통항원 및 특이 항원을 다양하게 가지고 있기 때문이며, 이를 활용하여 각 항원 factor에 대한 단클론 항체를 제작하여 살모넬라의 진단에 있어서 높은 특이성을 가지는 효율화를 확보하기 위함이며, 또한 triple complex (bio marker - multi protein G - nano bead)를 제작함에 있어 가장 적절한 조성을 이룰 수 있도록 하는데 상당히 기여할 것으로 판단되기 때문이다.

표 22. 살모넬라 균주별 항원인자

	O-group	확인된 항원형, 항원 factor	비 고
<i>S. paratyphi A</i>	A	1, 2,12	ATCC 11511
<i>S. paratyphi B</i>	B	4,5,12	국내 분리주
<i>S. thompson</i>	C	6,7	ATCC 10256
<i>S. newport</i>	C	6(P),8	ATCC 6962
<i>S. typhi</i>	D, Vi	9,12,Vi	국내 분리주
<i>S. typhi</i>	D	9,12	ATCC 19430
<i>S. typhi</i>	Vi[D]	Vi	국내 분리주
<i>S. london</i>	E	3,10	ATCC 8389
<i>S. newington</i>	E	3,15	ATCC 29628
<i>S. senftenberg</i>	E	1,3,19	ATCC 8400

각 세균주 별로 제작된 항원을 마우스에 투여한 뒤 유도된 세포주들(평균 700-800개의 후보 세포주군)에게서 얻어진 세포 배양액을 투여한 항원에 대해 먼저 특이성을 ELISA 방법을 통해 평가한 후, 이를 위에서 확인할 수 있는 바와 같은 공통 혹은 특이 항원 factor를 가지고 있는 세균주에 대한 교차반응성 확인 ELISA를 2차로 실시하여 간접적으로 단클론 항체가 가지는 특이적 반응성을 보이는 항원 factor를 결정하였다. 예를 들면 *S. paratyphi A*를 투여하여 얻은 후보 세포주들의 경우 *S. paratyphi A*에 대한 특이성을 1차 확인한 후, 확인된 세포주들의 경우 항원 factor 1, 2, 12에 대한 것일 수 있으므로, 아래 표와 같이 *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, 그리고 *S. senftenberg*에 대한 교차반응성 여부를 확인하면 특정 single factor에 대한 특이성을 명확히 할 수 있는 원리를 활용하였다.

표 23. 살모넬라 single factor별 반응성

	확인된 항원형, 항원 factor	single factor 1에 대한 균주별 반응성	single factor 2에 대한 균주별 반응성	single factor 12에 대한 균주별 반응성
<i>S. paratyphi A</i>	1	○	○	○
	2			
	12			
<i>S. paratyphi B</i>	4	X	X	○
	5			
	12			
<i>S. senftenberg</i>	1	○	X	X
	3			
	19			

제작된 단클론 항체 분비 세포주는 아래와 같다.

표 24. 살모넬라 단클론항체 분비 세포주명

	항원 factor	생산된 세포주명
<i>S. paratyphi</i> A	1	S1A2B4-1, S1A4F12-1, S1A9G4-1, S87E4C6-1
	2	S1A3C6-2, S1A4D3-2, S1A5E11-2
	12	S1A1D9-12, S1A4F2-12, S3B4D2-5
<i>S. paratyphi</i> B	4	S3B4H2-4, S3B7A12-4
	5	S3B6G3-5, S3B7B6-5, S3B8F5-5
	12	S12A1D9-12, S1A4F2-12, S3B4D2-5
<i>S. thompson</i>	6	S40C4F5-6
	7	S40C3F9-7, S40C6H7-7
<i>S. newport</i>	6	S40C4F5-6
	8	S51C6A3-8, S51C6A5-9, S51C6A7-8, S51C4A8-8, S51C11A5-8, S51C2A2-8, S51C3A11-8, S51C3A9-8, S51C7A8-8, S51C1B-8, S51C6D8-8, S51C7D2-8, S51C8D2-8, S51C11G10-8, S51C11E4-8, S51C10H-12, S51C11H4-8, S51C11H8-8, S51C4G12-8,
<i>S. typhi</i>	9	-
	12	S1A1D9-12, S1A4F2-12, S3B4D2-5
	Vi	S57Vi4B11-Vi
<i>S. london</i>	3	S76E4F5-3, S76E7B4-3, S84E7A8-3
	10	-
<i>S. newington</i>	3	S76E4F5-3, S76E7B4-3, S84E7A8-3
	15	S76E4G5-15, S76E7E11-15
<i>S. senftenberg</i>	1	S1A2B4-1, S1A4F12-1, S1A9G4-1, S87E4C6-1
	3	S87E3F4-3, S87E7H9-3
	19	-

위의 결과에서 확인할 수 있듯이 상당수 single factor에서만 특이적인 단클론 항체를 분비하는 세포주를 확보할 수 있었으며, 다만, factor 9, 10, 19에 특이적인 항체를 분비하는 세포주의 경우 확보되지 않아 추가 항원 투여 후 확보할 계획으로 실험을 진행중에 있다. 이들 확보한 세포주들은 마우스 복수 채취를 위해 Balb/C strain 마우스에 hybridoma 세포주를 투여하여 상당수 세포주들에서 복수를 채취하였으며, 채취된 복수를 활용하여 가토에서 얻은 다클론 혈청과 함께 최적의 조합을 이루는 triple complex 제작에 활용될 예정이다.

(3) 살모넬라균 신규 바이오 마커 개발

(가) 살모넬라 혈청형 항원성 인자 (antigenic factor) 별 단클론 항체 제작

살모넬라균 각 혈청형에 대한 다클론 항체를 제작하여 평가한 결과 아래 기술한 바와 같이 혈청형 별 항원성 인자의 단독 발현 및 중첩으로 인해 다클론 항체에서의 항원성 인자별 항체구성이 일부 편중되는 현상이 관찰되었다. 따라서 본 연구진은 항체를 제작하는데 있어서 단클론 항체를 각기 항원성 인자별로 제작하여 이들의 최적의 조합을 찾는 것이 현장에서의 분리주 검출에 있어서 훨씬 효과적일 것으로 판단하였으며, 이에 따른 판단에 근거하여 아래와 같이 다수의 단클론 항체를 제작하게 되었다.

살모넬라균의 혈청형은 serogroup A, B, C, D, E와 serotype Vi로 나뉘며, 이는 각기 균체 표면에 발현된 LPS (lipopolysaccharide)의 종류에 따른다. 이를 상세히 기술하면, serogroup A에 속한 살모넬라균은 항원인자 (antigenic factor) 1, 2, 12를 발현하고, serogroup B에 속한 살모넬라균은 항원인자 (antigenic factor) 1, 4, 5, 12, 27을 다양한 조합으로 발현하며, serogroup C에 속한 살모넬라균은 항원인자 (antigenic factor) 6, 7, 8, 14를 발현하고, serogroup D에 속한 살모넬라균은 항원인자 (antigenic factor) 9, 12를 발현하며, serogroup E에 속한 살모넬라균은 항원인자 (antigenic factor) 1, 3, 10, 15를 다양한 조합으로 발현한다. 또한 serotype Vi는 항원인자 (antigenic factor) Vi를 발현한다.

따라서 살모넬라균의 효과적인 검출을 위한 면역센서를 개발하기 위하여 필요한 단클론 항체를 제작하기 위해서는 상기와 같이 기술한 다양한 항원인자들에 대한 각각의 단클론 항체를 제작하여 이들의 적절한 조합을 통해 구현될 수 있다. 본 연구에서 사용된 구체적인 균주들의 목록 및 분류는 아래와 같다. 각 균주들의 발현 항원인자 (antigenic factor)를 함께 병기하였다.

표 25. Serogroup A 살모넬라균주 및 분류

혈청형	균주구분	항원인자
A	S-1	2,12
A	A-1	1,2,12
A	A-2	1,2,12
A	A-3	1,2,12
A	A-4	1,2,12

표 26. Serogroup B 살모넬라균주 및 분류

혈청형	균주구분	항원형	혈청형	균주구분	항원형
B	S-3	4,5,12	B	B-13	1,4,12
B	B-1	4,5,12	B	B-14	4,12
B	B-2	1,4,5,12	B	B-15	4,12
B	B-3	1,4,5,12	B	B-16	1,4,5,12
B	B-4	1,4,5,12	B	B-17	4,12
B	B-5	1,4,5(w),12	B	B-18	4,12
B	B-6	1,4,5(w),12	B	B-19	1,4,12,27
B	B-7	1,4,12	B	B-20	4,5,12
B	B-8	1(w),4,5,12	B	B-21	1,4,12
B	B-9	1(w),4,5,12	B	B-22	4,5,12
B	B-10	1,4,12	B	B-23	4,12
B	B-11	1,4,5(W),12	B	B-24	4,12,27
B	B-12	1,4,5(W),12			

표 27. Serogroup C 살모넬라균주 및 분류

혈청형	균주구분	항원형	혈청형	균주구분	항원형
C	S-40	6,7	C	C-11	6,7
C	S-50	6(P),8	C	C-12	6,7
C	C-1	8	C	C-13	6,7
C	C-2	8	C	C-14	6,7
C	C-3	8	C	C-15	6,7,14(P,W)
C	C-4	6,7	C	C-16	6,7,14
C	C-5	6,7	C	C-17	6,7,14
C	C-6	6,7	C	C-18	6,7
C	C-7	6,7	C	C-19	6(P),8
C	C-8	6,7	C	C-20	6(P),8
C	C-9	6,7	C	C-21	6(P),8
C	C-10	6,7	C	C-22	6(P),8, 20(P)

표 28. Serogroup D 및 serotype Vi 살모넬라균주 및 분류

혈청형	균주구분	항원형	혈청형	균주구분	항원형
D, Vi	S-57	9,12,Vi	D	D-13	Vi
D	S-58	9,12	D	D-14	Vi
Vi[D]	S-Ty2	Vi	D	D-15	9,12
D	D-1	9,12	D	D-16	9,12,Vi
D	D-2	1,9,12	D	D-17	9,12,Vi
D	D-3	9,12	D	D-18	9,12,Vi
D	D-4	9,12	D	D-19	9,12,Vi
D	D-5	1,9,12	D	D-20	9,12,Vi
D	D-6	9,12	D	D-21	9,12,Vi
D	D-7	9,12	D	D-22	9,12,Vi
D	D-8	9,12	D	D-23	Vi
D	D-9	9,12	D	D-24	9,46(W)
D	D-10	9,12	D	D-25	1(w,P),9,12(S)
D	D-11	1(S),9(W),12	D	D-26	9,12
D	D-12	9,12			

표 29. Serogroup E 살모넬라균주 및 분류

혈청형	균주구분	항원형	혈청형	균주구분	항원형
E	S-76	3,10	E	E-4	3,10
E	S-84	3,15	E	E-5	3,10
E	S-87	1,3,19	E	E-6	3,10
E	E-1	1,3,19	E	E-7	3,10
E	E-2	1,3,19	E	E-8	3,10
E	E-3	3,10	E	E-9	3,10

혈청형에 속한 균들 중 대표적인 균주를 선별하여 단클론 항체를 제작하기 위한 항원 제작에 활용하였으며, 이를 구체적으로 기술하면, 항원제작에 활용된 균주는 S-3 (serogroup B), S-40 (serogroup C), S-50 (serogroup C), C-2 (serogroup C), S-58 (serogroup D), S-Ty2 (serotype Vi), S-76 (serogroup E), S-84 (serogroup E), S-87 (serogroup E)이다. 단클론 항체의 제작 과정은 아래 그림과 같다.

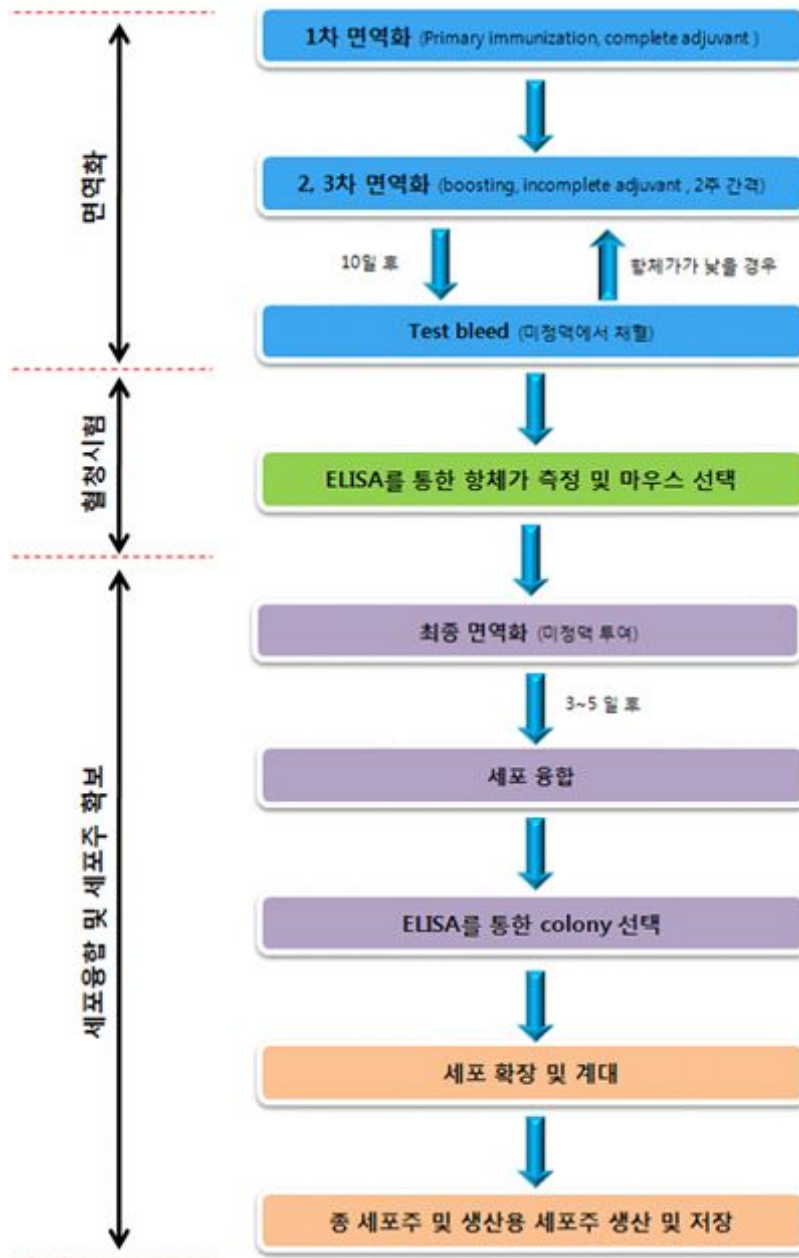


그림 23. 단클론 항체 제작과정 모식도

상기에 기술된 균주들을 활용하여 단클론 항체를 제작하는데 있어서 혈청형간에 공통으로 혹은 단독으로 가지는 항원인자의 분포를 응용하여 각 항원인자에 대한 단클론 항체의 특이성을 평가하였으며 이러한 평가결과에 근거하여 단클론 항체를 분류하였다.

아래 그림 24에서 확인할 수 있는 바와 같이, 항원성 인자 6과 8을 발현하는 살모넬라균인 S-50을 항원으로 하여 제작된 단클론 항체들을 S-50 (lane A)와 항원성 인자 6과 7을 발현하는 살모넬라균인 S-40 (lane B)과의 ELISA 반응성을 동시 분석한 결과, S-50-3A2, S-50-5E10, S-50-5G11, S-50-6C2, S-50-7E4, S-50-7H7, S-50-10B5, S-50-10G11, S-50-10H11 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-50균주에

만 면역반응하고 S-40균주에는 반응하지 않아 항원인자 8에만 특이성을 가지며, S-50-1A11, S-50-5H11 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-50균주와 S-40균주 두 가지 모두에 면역반응하여 항원인자 6에만 특이성을 갖는 것으로 판단된다. 또한 S-ty2-2A1, S-ty2-2A8, S-ty2-4H10, S-ty2-5C1, S-ty2-5H1, S-ty2-5H5, S-ty2-6D6, S-ty2-6H1, S-ty2-6H2, S-ty2-7B2, S-ty2-7H5, S-ty2-8A1, S-ty2-8B12, S-ty2-8B9, S-ty2-9A5, S-ty2-10A8, S-ty2-10C2, S-ty2-10E12, S-ty2-10F8, S-ty2-10F12 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-ty2균주에만 면역반응하여 항원인자 Vi에 특이성을 갖는 것으로 판단하였다.

마우스 투여 항원 균주명		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	색상별 특이 항원인자
S-50	A	3A2	10H 11	5H 11	5E 10	7H7	10G 11	7E4	1A 11	6C2	5G 11	10B 5		:6
	B	3A2	10H 11	5H 11	5E 10	7H7	10G 11	7E4	1A 11	6C2	5G1 1	10B 5		:8
S-ty2	C	6D6	5H5	7B2	9A5	10F 12	10F 8	8B 12	7H5	5C1	6H1	6H2	5H1	:Vi
	D	2A8	2A1	4H 10	10C 2	10A 8	8B9	8A1	10E 12					
	E													
	F													
	G													
	H													

immuno plate에 코팅된 균주항원 (항원인 자)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S-50(6,8)	A	2.059	1.877	1.953	1.922	1.963	1.93	1.973	1.963	1.925	2.096	1.864	
S-40(6,7)	B	0.054	0.071	1.365	0.065	0.074	0.07	0.07	1.275	1.38	0.072	0.068	
S-ty2 (Vi)	C	1.88	1.906	1.843	1.768	1.744	1.63	1.662	1.588	1.912	1.731	3.255	1.864
	D	1.925	1.891	1.796	1.714	1.688	1.714	1.61	1.588				
	E												
	F												
	G												
	H												

그림 24. S-50 균주 및 S-ty2 균주를 항원으로 하여 제작된 하이브리도마 세포주에서 분비된 단클론 항체들 평가 결과

아래 그림 25에서 확인할 수 있는 바와 같이, 항원성 인자 4, 5, 12를 발현하는 살모넬라균인 S-3을 항원으로 하여 제작된 단클론 항체들의 특이 항원성 인자를 결정하기 위해 S-3 뿐만 아니라 항원성 인자 4, 12를 발현하는 살모넬라균인 B-17과 아울러 항원성 인자 2, 12를 발현하는 살모넬라균인 S-1과의 교차반응성 여부를 평가하였다. 이러한 방법을 사용하여 S-3 및 B-17균과 동시 반응할 경우 항원성 인자 4에 특이적인 단클론 항체로 판별할 수 있고, S-3, B-17, S-1 모두에 특이적으로 반응할 경우 항원성 인자 12에 대한 단클론 항체로 판별할 수 있으며, 또한 S-3에만 반응할 경우 항원성 인자 5에 대한 특이적 단클론 항체로 판별할 수 있을 것으로 예상되기 때문이다.

실제 결과에서 확인할 수 있듯이, S-3-2B12, S-3-2C11, S-3-3A10, S-3-3E8, S-3-3F10, S-3-4B2, S-3-7H12, S-3-8B6, S-3-8C1, S-3-8C2, S-3-9B6 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-3균주에만 면역반응하고 S-1균주와 B-17 균주에는 반응하지 않아 항원인자 5에만 특이성을 가지며, S-3-1A5, S-3-9B5, S-3-1H2, S-3-3H5 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-1균주와 S-3균주 그리고 B-17균주에 모두에 면역반응하여 항원인자 12에만 특이성을 갖는 것으로 판단되었다. 그러나 항원성 인자 4에만 특이적인 단클론 항체는 검출되지 않아 추가적인 실험이 필요할 것으로 판단된다.

마우스 투여 항원 균주명													색상별 특이 항원인자		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
S-3	A	8B6	8C1	8C2	1H2	1A5	9B5	3A 10	3E8	3H5	3F 10	9B6	7H 12		:12
	B	4B2	2C 11	2B 12											:5
	C	8B6	8C1	8C2	1H2	1A5	9B5	3A 10	3E8	3H5	3F 10	9B6	7H 12		
	D	4B2	2C 11	2B 12											
	E	8B6	8C1	8C2	1H2	1A5	9B5	3A 10	3E8	3H5	3F 10	9B6	7H 12		
	F	4B2	2C 11	2B 12											
	G														
	H														

immunoplate에 코팅된 균주항원 (항원인자)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S-3 (4, 5, 12)	A	1.485	1.545	1.509	1.553	1.578	1.525	1.52	1.536	1.523	1.533	1.474	1.492
	B	1.479	1.53	1.491									
B-17 (4, 12)	C	0.067	0.078	0.076	1.066	1.169	1.125	0.074	0.076	1.111	0.076	0.073	0.07
	D	0.068	0.078	0.077									
S-1 (2, 12)	E	0.063	0.066	0.064	1.166	1.355	1.862	0.062	0.063	1.009	0.06	0.06	0.062
	F	0.064	0.069	0.069									
	G												
	H												

그림 25. S-3 균주를 항원으로 하여 제작된 하이브리도마 세포주에서 분비된 단클론 항체들 평가 결과

아래 그림 26에서 확인할 수 있는 바와 같이, 항원성 인자 8을 발현하는 살모넬라균인 C-2를 항원으로 하여 제작된 단클론 항체들, 항원성 인자 3과 10을 발현하는 살모넬라균인 S-76을 항원으로 하여 제작된 단클론 항체들, 항원성 인자 6과 7을 발현하는 살모넬라균인 S-40을 항원으로 하여 제작된 단클론 항체들, 항원성 인자 9와 12를 발현하는 살모넬라균인 S-57을 항원으로 하여 제작된 단클론 항체들, 그리고 항원성인자 1, 3 및 19를 발현하는 살모넬라균인 S-87을 항원으로 하여 제작된 단클론 항체들의 특이 항원성 인자를 결정하기 위해 아래 그림과 같이 다양한 살모넬라균을 활용하여 역시 교차반응성 여부를 평가한 후, 각기 단클론 항체들의 특이 항원성 인자를 판별하는데 활용하였다.

C-2-1C5, C-2-1D7, C-2-2H8, C-2-3H8, C-2-4H11, C-2-5H12 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 C-2균주와 C-19균주 모두에 면역반응하여 항원인자 8에 특이적이며, S-76-2H11, S-76-3A9, S-76-5B1, S-76-7D12, S-76-7H5, S-76-9G5 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-76균주에만 면역반응하고 S-84균주에는 반응하지 않아 항원인자 10에 특이적이다. 또한 S-76-7H8 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-76균주와 S-84균주 모두에 면역반응하여 항원인자 3에 특이적이고, S-40-10A11, S-40-5A1 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-40균주와 S-50균주 모두에 면역반응하여 항원인자 6에 특이적이다. 그리고 S-40-1A4, S-40-3A4, S-40-6D11, S-40-7C3, S-40-7F11, S-40-8A12, S-40-9B4 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-40균주에만 면역반응하고 S-50균주에는 반응하지 않아 항원인자 7에 특이적이며, S-58-1E5, S-58-2D12, S-58-3E11, S-58-3H4, S-58-4H12, S-58-6A4, S-58-6F12 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-58균주에만 면역반응하고 S-1균주에는 반응하지 않아 항원인자 7에 특이적이고,

S-58-3E1, S-58-6F9 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-58균주와 S-1균주 모두에 면역반응하여 항원인자 12에 특이적이다. S-87-8B11 하이브리도마 세포주가 분비하는 단클론 항체는 S-87균주와 A-1균주에만 면역반응하고 S-76균주에는 반응하지 않아 항원인자 1에 특이적이고, S-87-1E4, S-87-3H7, S-87-5H6 하이브리도마 세포주가 분비하는 단클론 항체는 S-87균주에만 면역반응하고 A-1균주와 S-76균주에는 반응하지 않아 항원인자 19에 특이적인 것으로 판단하였다.

마우스 투여 항원 균주명		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	색상별 특이 항원인자
C-2	A	2H8	1D7	5H12	3H8	1C5	4H11	2H8	1D7	5H12	3H8	1C5	4H11	:8
S-76	B	2H11	5B1	7H8	7D12	3A9	9G5	7H5						:3
	C	2H11	5B1	7H8	7D12	3A9	9G5	7H5						:10
S-40	D	9B4	10A11	6D11	7C3	3A4	1A4	5A1	7F11	8A12				:6
	E	9B4	10A11	6D11	7C3	3A4	1A4	5A1	7F11	8A12				:7
S-58	F	2D12	3E1	6F9	6A4	6F12	1E5	3E11	3H4	4H12				:12
	G	2D12	3E1	6F9	6A4	6F12	1E5	3E11	3H4	4H12				:9
S-87	H	3H7	5H6	8B11	1E4	3H7	5H6	8B11	1E4	3H7	5H6	8B11	1E4	:1
														:19

immunoplate에 코팅된 균주항원 (항원인자)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C-2(8) : 1 번부터 6번 well까지 /C-19(6,8) : 7번부터 12번 well 까지	A	1.423	2.182	2.226	2.174	2.213	2.247	1.008	1.081	1.016	1.073	1.055	1.092
S-76 (3,10)	B	1.88	1.849	2.289	2.342	1.828	1.79	1.842					
S-84 (3,15)	C	0.07	0.072	1.384	0.074	0.07	0.078	0.075					
S-40 (6,7)	D	2.11	2.088	1.849	2.135	2.108	2.088	2.152	2.211	2.134			
S-50 (6,8)	E	0.069	1.494	0.079	0.076	0.078	0.083	1.362	0.081	0.086			
S-58	F	2.13	2.173	2.136	2.169	2.166	2.113	2.132	2.187	2.116			

(9,12)													
S-1(2,12)	G	0.065	1.508	1.44	0.063	0.063	0.067	0.084	0.073	0.066			
S-87(1,3,19)): 1번부터 4번 well까 지/A-1(1,2, 12) : 5번 부터 8번 well까지 /S-76(3, 10) : 9번 부터 12번 well까지	H	2.222	1.978	2.084	2.141	0.082	0.077	2.371	0.067	0.09	0.088	0.086	0.088

그림 26. C-2, S-76, S-40, S-58, S-87 균주를 항원으로 하여 제작된 하이브리도마 세포주에서 분비된 단클론 항체들 평가 결과

아래 그림 27에서 확인할 수 있는 바와 같이, 항원성 인자 3과 15를 발현하는 살모넬라 균인 S-84를 항원으로 하여 제작된 단클론 항체들의 특이 항원성 인자를 결정하기 위해 항원성 인자 3과 10을 발현하는 살모넬라균인 S-76과의 교차반응성 여부를 확인하였다. 두 가지 균에 모두 반응성을 보일 경우 항원성 인자 3에 특이적인 것으로 판단할 수 있으며 S-84에만 특이적인 경우 항원성 인자 15에 특이적인 단클론 항체로서 판별할 수 있기 때문이다. 아래 결과에서 확인할 수 있듯이, S-84-2F8, S-84-2F12, S-84-2H6, S-84-7G5, S-84-10C6 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-76균주와 S-84 균주 모두에 면역반응하여 항원인자 3에 특이성을 가지며, S-84-1B12, S-84-1F5, S-84-1F10, S-84-1H4, S-84-1H10, S-84-2C6, S-84-3B4, S-84-3F5, S-84-3F6, S-84-3F12, S-84-3G9, S-84-3H1, S-84-3H2, S-84-3H3, S-84-4A5, S-84-4G11, S-84-5E10, S-84-5G2, S-84-7A5, S-84-7C12, S-84-7E4, S-84-7E6, S-84-7E8, S-84-7H1, S-84-7H4, S-84-8C6, S-84-8C12, S-84-8D9, S-84-8F9, S-84-8H1, S-84-8H4, S-84-8H10, S-84-9H9, S-84-10C10, S-84-10E12, S-84-10G5, S-84-10G11, S-84-10H11 하이브리도마 세포주들이 분비하는 단클론 항체는 S-84균주에만 면역반응을 나타내 항원인자 15에만 특이성을 갖는 것으로 판단하였다.

마우스 투여 항원 균주명		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	색상별 특이 항원인자	
S-84	A	1B 12	1F5	1F 10	2C6	3H1	3H2	7E4	7H4	10C 10	10G 11	10C 6	4G 11		:3
	B	3F5	8H4	3B4	4A5	9H9	7A5	8H1	7G5	3H3	3F6	3F1 2	5E 10		:15
	C	8D9	8C 12	2F8	2H6	10G 5	10E 12	8H 10	8F9	7E8	2F 12	7C1 2	8C6		
	D	7E6	1H 10	1H4	5G2	3G9	10H 11	7H1							
	E	1B 12	1F5	1F 10	2C6	3H1	3H2	7E4	7H4	10C 10	10G 11	10C 6	4G 11		
	F	3F5	8H4	3B4	4A5	9H9	7A5	8H1	7G5	3H3	3F6	3F1 2	5E 10		
	G	8D9	8C 12	2F8	2H6	10G 5	10E 12	8H 10	8F9	7E8	2F 12	7C1 2	8C6		
	H	7E6	1H 10	1H4	5G2	3G9	10H 11	7H1							

immunopl ate에 코팅된 균주항원 (항원인자)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S-84 (3, 15)	A	1.649	1.494	1.443	1.303	1.499	1.791	1.784	1.737	1.702	1.814	1.785	1.797
	B	1.013	1.607	1.023	1.002	1.242	1.672	1.71	1.214	1.716	1.853	1.689	1.675
	C	1.649	1.283	1.144	1.072	1.654	1.693	1.639	1.271	1.763	1.793	1.794	1.866
	D	1.64	1.602	1.094	1.624	1.658	1.698	1.667					
S-76 (3, 10)	E	0.117	0.109	0.094	0.105	0.104	0.115	0.105	0.102	0.092	0.102	1.377	0.122
	F	0.12	0.096	0.099	0.103	0.11	0.105	0.104	1.343	0.121	0.116	0.103	0.093
	G	0.11	0.103	1.376	1.128	0.105	0.097	0.102	0.099	0.093	1.392	0.101	0.102
	H	0.105	0.096	0.095	0.104	0.092	0.103	0.109					

그림 27. S-84 균주를 항원으로 하여 제작된 하이브리도마 세포주에서 분비된 단클론 항체들 평가 결과

상기와 같이 제작된 다수의 단클론 항체를 정리하면 아래 표 30과 같다.

표 30. 각 살모넬라균 항원성 인자별 제작된 단클론 항체 분비 하이브리도마 세포주 분류결과

항원인자	단클론 항체 생산 하이브리도마 세포주명
1	S-87-8B11 이상 1종

3	S-76-7H8, S-84-2F8, S-84-2F12, S-84-2H6, S-84-7G5, S-84-10C6 이상 6종
5	S-3-2B12, S-3-2C11, S-3-3A10, S-3-3E8, S-3-3F10, S-3-4B2, S-3-7H12, S-3-8B6, S-3-8C1, S-3-8C2, S-3-9B6 이상 11종
6	S-40-5A1, S-40-10A11, S-50-1A11, S-50-5H11 이상 4종
7	S-40-1A4, S-40-3A4, S-40-6D11, S-40-7C3, S-40-7F11, S-40-8A12, S-40-9B4 이상 7종
8	C-2-1C5, C-2-1D7, C-2-2H8, C-2-3H8, C-2-4H11, C-2-5H12, S-50-3A2, S-50-5E10, S-50-5G11, S-50-6C2, S-50-7E4, S-50-7H7, S-50-10B5, S-50-10G11, S-50-10H11 이상 15종
9	S-58-1E5, S-58-2D12, S-58-3E11, S-58-3H4, S-58-4H12, S-58-6A4, S-58-6F12 이상 7종
10	S-76-2H11, S-76-3A9, S-76-5B1, S-76-7D12, S-76-7H5, S-76-9G5 이상 6종
12	S-3-1A5, S-3-9B5, S-3-1H2, S-3-3H5, S-58-3E1, S-58-6F9 이상 6종
15	S-84-1B12, S-84-1F5, S-84-1F10, S-84-1H4, S-84-1H10, S-84-2C6, S-84-3B4, S-84-3F5, S-84-3F6, S-84-3F12, S-84-3G9, S-84-3H1, S-84-3H2, S-84-3H3, S-84-4A5, S-84-4G11, S-84-5E10, S-84-5G2, S-84-7A5, S-84-7C12, S-84-7E4, S-84-7E6, S-84-7E8, S-84-7H1, S-84-7H4, S-84-8C6, S-84-8C12, S-84-8D9, S-84-8F9, S-84-8H1, S-84-8H4, S-84-8H10, S-84-9H9, S-84-10C10, S-84-10E12, S-84-10G5, S-84-10G11, S-84-10H11, 이상 38종
19	S-87-1E4, S-87-3H7, S-87-5H6 이상 3종
Vi	S-ty2-2A1, S-ty2-2A8, S-ty2-4H10, S-ty2-5C1, S-ty2-5H1, S-ty2-5H5, S-ty2-6D6, S-ty2-6H1, S-ty2-6H2, S-ty2-7B2, S-ty2-7H5, S-ty2-8A1, S-ty2-8B12, S-ty2-8B9, S-ty2-9A5, S-ty2-10A8, S-ty2-10C2, S-ty2-10E12, S-ty2-10F8, S-ty2-10F12 이상 20종

(나) 살모넬라균 단클론 항체군의 최적의 조성 설정

살모넬라균의 경우 최근 5년간의 질병관리본부 통계에 따르면 주로 serogroup B와 D가 많으나 여타 혈청형의 균들도 다발하고 있어 각 항원성 인자에 대해 특이적인 단클론 항체들 중 가장 반응성이 높은 것을 선택하여 동등하게 혼합하는 것이 바람직할 것으로 판단됨. 또한 각 항원성 인자에 대한 다수의 단클론 항체들 중 가장 반응성이 높은 대표주를 골라 혼합하는 것이 가장 특이도 높은 단클론 항체의 조합을 완성할 수 있었다.

표 31. 살모넬라 각 항원인자에 특이적인 대표적 단클론 항체 선별

항원인자	대표 단클론 항체 생산 세포주명
1	S-87-8B11
3	S-84-2F12
5	S-3-8C1
6	S-50-5H11
7	S-40-7F11
8	S-50-5G11
9	S-58-6F12
10	S-76-7D12
12	S-3-1A5
15	S-84-4G11
19	S-87-3H7
Vi	S-ty2-2A8

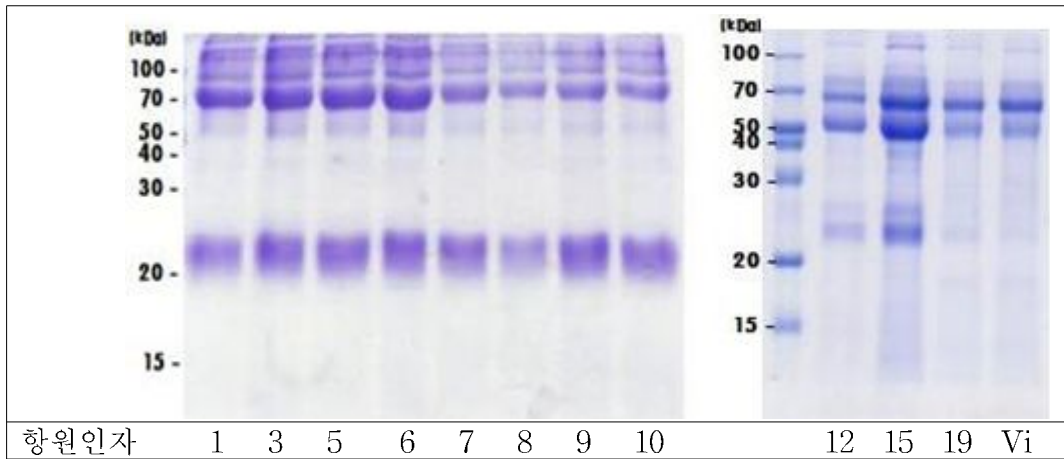


그림 28. 살모넬라 각 항원인자에 특이적인 단클론항체 정제물 SDS-page 사진

(4) 병원성 대장균 다클론 항체(바이오 마커)의 생산

(가) 병원성 대장균 다클론 항체 제작

병원성 대장균의 진단혈청 생산 대상은 주로 동물에게서 다발하여 설사를 유발하는 대장균을 우선적으로 아래 표와 같이 선정하여 가토를 이용하여 혈청생산에 활용하였다. 혈청 중 항체가의 평가는 슬라이드 응집반응을 기준으로 하여 4+ 이상이 나올 수 있는 혈청의 희석배수로서 평가하였다.

표 32. 병원성 대장균 진단혈청 자가역가 및 혈청량

혈청형 구분	자가역가	혈청량
O2	100X	58ml
	70X	60ml
O5	30X	53ml
	150X	58ml
O8	20X	50ml
	30X	51ml
O17	30X	68ml
O20	10X	44ml
	15X	62ml
O22	20X	76ml
	20X	72ml
O26	80X	76ml
	20X	72ml
O55	20X	88ml
	30X	48ml
O74	30X	58ml
	70X	60ml
O76	40X	60ml
	50X	83ml
O84	40X	43ml
	40X	47ml
O85	30X	58ml
	10X	58ml
O86	40X	70ml
O88	50X	48ml
	5X	120ml
O91	30X	62ml
	20X	51ml
O103	40X	50ml
	40X	40ml
O111	60X	70ml
	20X	73ml
O113	30X	70ml
	10X	73ml
O117	15X	65ml
	15X	80ml
O118	10X	70ml
	15X	55ml
O119	10X	75ml
	15X	68ml

혈청형 구분	자가역가	혈청량
O120	50X	48ml
	25X	120ml
O121	30X	62ml
	20X	51ml
O123	40X	50ml
	70X	40ml
O125	60X	70ml
	20X	73ml
O126	30X	70ml
	10X	73ml
O127	45X	65ml
	15X	80ml
O128	10X	70ml
	15X	55ml
O129	60X	70ml
	30X	73ml
O134	30X	70ml
	30X	73ml
O132	25X	65ml
	15X	80ml
O133	10X	70ml
	15X	55ml
O136	50X	70ml
	50X	73ml
O138	20X	58ml
	10X	70ml
O138	20X	58ml
	10X	70ml
O142	40X	62ml
	50X	66ml
O145	20X	58ml
	10X	71ml
O146	10X	46ml
O147	40X	48ml
	30X	60ml
O149	50X	78ml
	50X	58ml
O157	50X	78ml
	70X	58ml

혈청형 구분	자가역가	혈청량
O158	50X	78ml
	50X	58ml
O174	50X	65ml
	30X	52ml
O176	50X	58ml
	20X	60ml
O177	100X	70ml
	30X	62ml

위 표에서 확인할 수 있듯이, O2, O17, O86, O146 자가 역가가 낮은 혈청들의 경우 재차 항원을 제작하여 가토에 투여하였으며, 그 결과는 아래와 같다.

표 33. 병원성 대장균 진단혈청 추가투여 후 자가역가 및 혈청량

혈청형 구분	자가역가	혈청량
O2	20X	50ml
	30X	60ml
O17	40X	46ml
	50X	55ml
O86	10X	25ml
	20X	47ml
O146	10X	80ml
	50X	53ml

상기와 같이 생산된 혈청들은 대장균군 내에서 서로간의 교차반응성을 평가한 뒤 교차반응이 나오는 균주에 대하여 흡수를 진행하였으며, 다른 혈청형의 균주에 대하여 교차반응이 없음을 확인한 후, 이를 진단제제화 하여 국내분리주 및 표준주에 대한 추가 평가를 위해 사용하였다. 만일 국내 분리주에서 혈청형이 구분되지 않는 균주가 발견될 시 이에 대한 추가적인 항혈청을 생산하는 것이 필요할 것으로 판단된다.

대략적인 혈청량의 생산으로 판단할 때, 1vial 당 40만원을 상회하는 외국산 제품에 비해 비교할 수 없을 정도의 저렴한 가격을 가지는 진단제제의 생산이 가능할 것으로 판단된다. 현재 소요된 대장균 진단제제를 생산하는데 소요된 비용을 감안할 때 본 사업을 통해 1 vial 당 4만 5천원 정도의 생산원가를 가질 것으로 평가되며, 국산화의 최대 장점을 살릴 수 있는 부분이라 생각된다.

(나) 병원성 대장균 다클론 항체군의 최적의 조성 설정

대장균의 경우 국내 인체에서 발생하는 주요 혈청형으로는 아래 표 (질병관리본부)와 같으므로 이들을 구성하는 다클론 항체들의 혼합을 통해 조합을 구성하였다.

1997년부터 2007년까지의 질병관리본부의 STEC 분리동정 현황을 보면 아래와 같이

O157, O26, O91, O111, O55, O103, O104 등이 주로 국내에서 문제시되며, 이외에 다수의 여타 혈청형도 분리되는 것으로 보고되어, 이들 혈청형 균주를 활용하여 제작한 가토의 혈청을 혼합하여 사용하는 것이 바람직하다고 판단하였다.

표 34. 병원성 대장균 혈청형별 분리 현황 (질병관리본부)

인체분리 주요 혈청군
O2, O4, O5, O16, O26, O46, O48, O55, O91, O98, O103, O111, O113, O117, O118, O119, O121, O125, O126, O128, O145, O146, O153, O157, O172
가축분리 주요 혈청군
O2, O4, O5, O6, O8, O16, O20, O22, O26, O39, O41, O45, O46, O64, O74, O77, O82, O91, O103, O105, O109, O113, O116, O126, O128, O136, O141, O145, O146, O157, O162, O163, O168, O171, O172, O174, O177

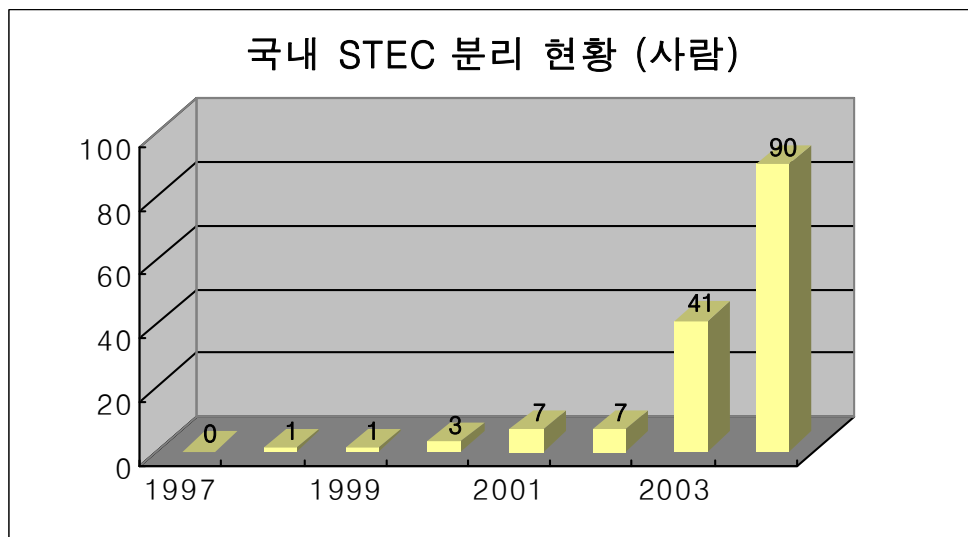


그림 29. 국내 STEC 분리현황 (질병관리본부)

(5) 리스테리아균 단클론 항체(바이오 마커)의 생산

(가) 리스테리아균 혈청형 1/2a, 1/2b, 4b 별 단클론 항체 제작

리스트테리아(Listeria)는 그람 양성이며, 아포를 형성하지 않고 운동성이 있는 세균이다. 리스트테리아는 7가지의 종으로 분류된다. (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. murrayi*, *L. grayi*) 이 중 리스트테리아 모노사이토제네스는 유일하게 사람에게 병원성을 나타내며 listeriosis 증상을 나타내는 식중독 원인균으로 알려져 있다. 이 세균은 척추동물의 세포내에 침입하여 증식하는 세포내기생 세균이며, 4 °C에서도 증식이 가능한 저온성 세균이다. 이 세균은 신생아나 면역이 결핍된 환자, 노인에게서 뇌수막염나 패혈증과 같은 심각한 감염증을 일으킬 수 있으며 임신부에서는

유산이 일어날 수 있다. 하지만 최근의 보고에서는 정상적인 성인에게 열성 장염을 일으킬 수 있는 것으로 나타나 공중보건학적 위협이 되고 있다. 식품에 의해서 발병하는 listeriosis는 미국, 일본, 영국, 스위스, 스페인, 프랑스 등에서 다수 보고되고 있다. 혈청형으로 나누어 보았을 때, 미국에서는 1/2b 형이, 유럽이나 일본에서는 1/2a 형과 4b형이 주로 분리되고 있다. 전세계적으로 1/2a, 1/2b, 4b의 세 가지 혈청형이 listeriosis 환자에게서 분리된 리스테리아 모노사이토제네스 혈청형의 95% 이상을 차지하고 있다. 또한 리스테리아 모노사이토제네스에 대한 항생제 내성을 또한 증가하고 있는 상황이다.

따라서 리스테리아균 혈청형 1/2a, 1/2b, 4b 별 단클론 항체 제작을 통해 사람에게 유해한 리스테리아균 중 95% 이상을 검출 할 수 있는 바이오 마커의 제작이 가능하리라 판단하여 아래와 같이 단클론 항체의 제작을 수행하였다.

리스테리아균 혈청형		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/2a 특이 단클론 항체	A	1C11	2C3	2D5	4B4	4F8	4H6	5C11	7B8	7H1	8A2	8A6	8E6
	B	9B2	9C5	9H5	10G2								
1/2b 특이 단클론 항체	C	1A5	1B11	1C12	2D11	2H9	2H12	3C8	3C9	4A7	4H2	6C9	6D4
	D	6H6	7A2	7A7	7D2	7G5	8E12	8H3	9D1	9E9	10B12	10C2	10C5
	E	10G10											
4b 특이 단클론 항체	F	1D4	1H4	2C10	2F10	3E1	5C6	5E8	7D5	8C7	8C9	9B7	9G6
	G	10G7											
	H												

그림 30. ELISA plate 상에 배치된 1차 항체로서의 각 단클론 항체들의 배치도

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.102	0.102	0.103	0.104	0.104	0.101	0.105	0.104	0.103	0.103	0.101	0.098
B	0.103	0.103	0.109	0.107	0.049	0.048	0.048	0.052	0.05	0.048	0.049	0.052
C	0.058	0.059	0.06	0.055	0.057	0.054	0.056	0.056	0.055	0.055	0.055	0.056
D	0.056	0.055	0.058	0.055	0.057	0.063	0.055	0.057	0.055	0.055	0.055	0.055
E	0.055	0.048	0.051	0.048	0.049	0.049	0.049	0.048	0.049	0.048	0.049	0.049
F	0.054	0.055	0.055	0.056	0.053	0.055	0.055	0.055	0.055	0.054	0.055	0.058
G	0.055	0.051	0.049	0.049	0.049	0.048	0.049	0.048	0.047	0.048	0.048	0.049
H	0.213	0.049	0.05	0.049	0.047	0.051	0.05	0.048	0.048	0.048	0.048	0.047

그림 31. 리스테리아균 혈청형 1/2a를 항원으로 코팅한 후 그림 6의 1차 항체 배치에 따른 ELISA 결과

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.054	0.056	0.054	0.055	0.054	0.055	0.052	0.054	0.054	0.056	0.053	0.054
B	0.054	0.055	0.054	0.053	0.048	0.047	0.048	0.045	0.047	0.046	0.047	0.046
C	0.107	0.105	0.105	0.105	0.103	0.108	0.105	0.103	0.108	0.109	0.108	0.107
D	0.100	0.101	0.103	0.103	0.101	0.104	0.106	0.101	0.100	0.100	0.101	0.106
E	0.104	0.049	0.049	0.048	0.046	0.047	0.045	0.048	0.047	0.047	0.046	0.046

F	0.054	0.056	0.055	0.052	0.053	0.052	0.054	0.054	0.053	0.055	0.056	0.054
G	0.054	0.047	0.046	0.047	0.046	0.047	0.046	0.047	0.046	0.047	0.046	0.049
H	0.215	0.046	0.047	0.047	0.048	0.046	0.047	0.048	0.046	0.047	0.047	0.047

그림 32. 리스테리아균 혈청형 1/2b를 항원으로 코팅한 후 그림 6의 1차 항체 배치에 따른 ELISA 결과

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.058	0.056	0.057	0.057	0.059	0.055	0.057	0.057	0.056	0.055	0.056	0.057
B	0.057	0.062	0.057	0.056	0.050	0.053	0.055	0.051	0.050	0.052	0.051	0.050
C	0.059	0.056	0.059	0.058	0.059	0.056	0.058	0.058	0.057	0.059	0.058	0.056
D	0.056	0.061	0.057	0.059	0.054	0.057	0.075	0.060	0.056	0.056	0.057	0.058
E	0.061	0.049	0.057	0.050	0.050	0.052	0.059	0.051	0.052	0.053	0.053	0.052
F	0.119	0.115	0.117	0.117	0.117	0.119	0.122	0.122	0.121	0.120	0.118	0.116
G	0.120	0.051	0.050	0.051	0.048	0.055	0.048	0.051	0.054	0.048	0.053	0.053
H	0.212	0.049	0.050	0.050	0.049	0.057	0.051	0.052	0.058	0.049	0.050	0.048

그림 33. 리스테리아균 혈청형 4b를 항원으로 코팅한 후 그림 6의 1차 항체 배치에 따른 ELISA 결과

따라서 리스테리아균 혈청형 1/2a에 특이적인 단클론 항체들은 16가지로서 Lis1/2a1C11, Lis1/2a2C3, Lis1/2a2D5, Lis1/2a4B4, Lis1/2a4F8, Lis1/2a4H6, Lis1/2a5C11, Lis1/2a7B8, Lis1/2a7H1, Lis1/2a8A2, Lis1/2a8A6, Lis1/2a8E6, Lis1/2a9B2, Lis1/2a9C5, Lis1/2a9H5, Lis1/2a10G2이고, 리스테리아균 혈청형 1/2b에 특이적인 단클론 항체들은 25가지로서 Lis1/2b1A5, Lis1/2b1B11, Lis1/2b1C12, Lis1/2b2D11, Lis1/2b2H9, Lis1/2b2H12, Lis1/2b3C8, Lis1/2b3C9, Lis1/2b4A7, Lis1/2b4H2, Lis1/2b6C9, Lis1/2b6D4, Lis1/2b6H6, Lis1/2b7A2, Lis1/2b7A7, Lis1/2b7D2, Lis1/2b7G5, Lis1/2b8E12, Lis1/2b8H3, Lis1/2b9D1, Lis1/2b9E9, Lis1/2b10B12, Lis1/2b10C2, Lis1/2b10C5, Lis1/2b10G10이고, 리스테리아균 혈청형 4b에 특이적인 단클론 항체들은 13가지로서 Lis4b1D4, Lis4b1H4, Lis4b2C10, Lis4b2F10, Lis4b3E1, Lis4b5C6, Lis4b5E8, Lis4b7D5, Lis4b8C7, Lis4b8C9, Lis4b9B7, Lis4b9G6, Lis4b10G7임을 확인할 수 있었다.

(나) 리스테리아균 단클론 항체군의 최적의 조성 설정

리스트리아균의 경우 혈청형 1/2a, 1/2b, 4b 3종의 균이 리스테리아 유래 식중독의 95% 이상을 차지한다는 보고에 근거하여 이들 3종에 각기 가장 반응성이 좋은 아래와 같은 단클론 항체들을 선발하여 항체 개발에 활용하였다.

표 35. 리스테리아 각 혈청형에 특이적인 대표적 단클론 항체 선별

혈청형	대표 단클론 항체 생산 세포주명
1/2a,	Lis1/2a9H5
1/2b	Lis1/2b4H2
4b	Lis4b7D5

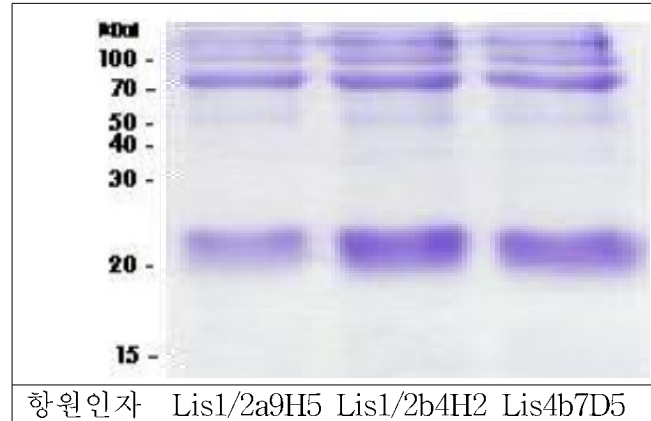


그림 34. 리스테리아 각 항원인자에 특이적인 단클론항체 정제물 SDS-PAGE 사진

(6) 브루셀라균 단클론항체 (바이오 마커) 생산

브루셀라균의 특이 항원 생산은 재조합 단백질의 대장균 발현 시스템을 활용하여 제작된 단백질을 항원으로 하는 방법과 포르말린 처리한 whole cell을 항원으로 활용하여 대장균이나 살모넬라균과 같이 LPS에 대한 단클론 항체를 제작하는 두가지 방법을 병행하였다. 이러한 이유는 인수공통전염병을 유발하는 브루셀라균의 아종이 *B. canis*, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis* 등으로 다양하여 이들 모두를 검출할 수 있는 단클론 항체를 제작하기 위함이다.

(가) 재조합 단백질 발현 및 정제

재조합 단백질을 제작하기 위한 표적 유전자는 Osvaldo L 등이 1996년에 Journal of clinical microbiology지에 발표한 논문을 기간으로 하여 동일한 재조합 단백질을 제작하기로 하였으며, 다만 해당 논문에서 표적으로 삼은 단백질의 N-terminal 부위의 hydrophobicity가 지나치게 높아 발현 및 항원성 확보에 있어서 제한이 있을 것으로 사료되어 이들 부분을 제거한 후 수용성이 높은 부분에 대한 유전자만을 선별하여 재조합 단백질을 제작하였다.

설정된 표적유전자는 아래와 같다.

```
ATGAACACTCGTGCTAGCAATTTTCTCGCAGCCTCATTTTCCACAATCATGCT
CGTCGGCGCTTTTCAGCCTGCCCGCTTTCGCACAGGAGAATCAGATGACGACGCA
GCCCGCGGCATCGCCGTCACCGGGGAAGGCATGATGACCCCTCGCCCGATAT
```

```

GGCCATTCTCAATCTCTCGGTGCTACGCCAGGCAAAGACCGCGCGCGAAGCCAT
GACCGCGAATAATAATGAAGCCATGACCGCGAATAATAATGAAGCCATGAGAAAA
GTGCTCGATGCCATGAAGAAGGCCGGCATCGAAGATCGCGATCTCCAGACAGG
CGGCATCGATATCCAGCCGATTTATGTCTATCCTGACGACAAGAACAACCTGA
AAGAGCCTACCATCACCGGCTATTCTGTATCCACCAGTCTCACGGTTCGCGTG
CGCGAACTGGCCAATGTTGGAAAAATTTTGCATGAATCCGTCACGCTCGGTGT
TAATCAGGGCGGTGATTTCAACCTGGTCAATGATAATCCCTCCGCCGTGATCA
CGAGGGGCAAGCGCGCAGTGGCCAATGCCATTGCCAAGCCGAAGACGCTTGCCG
ACGCTGCAGGCGTGGGGCTTGGCCGTGTGGTGGAAATCAGTGAACCTGAGCCGC
CCGCCATGCCGATGCCGATGCCAATTGCGCGCGGACAGTTCAGAACCATGCTA
GCAGCCGCACCGGACAATTCCGTGCCGATTGCCGCAGGCGAAAACAGCTATAA
CGTATCGGTCAATGTTCGTTTTTGAAATCAAGTAA

```

그림 35. 브루셀라 표적 유전자 서열

위에서 보는 바와 같은 유전자 서열 중 붉은색으로 표시된 부위 앞쪽의 N-terminal 부분은 앞서 언급된 바와 같이 hydrophobicity가 다음 그림에서 보는 바와 같이 지나치게 높아 이들 부분을 제거하고 수용성이 높은 부분만 (705 base pairs)을 발현하였다.

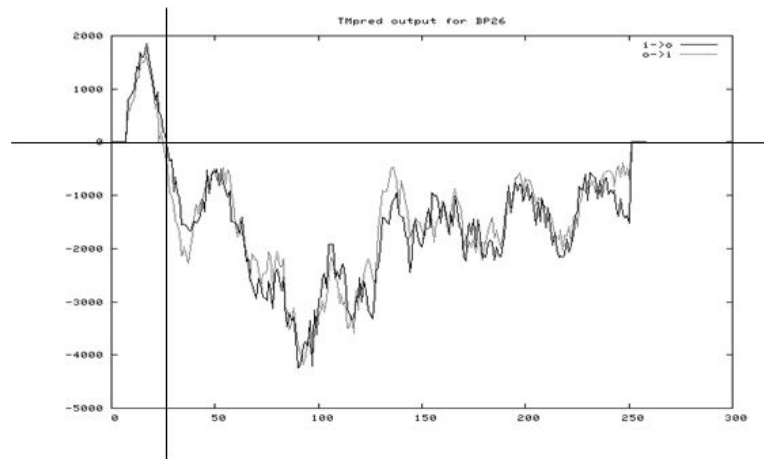


그림 36. 브루셀라 표적 유전자의 hydrophobicity 분포도

제조합 단백질의 제작관련 일련의 과정은 아래와 같다 (pET28a 발현벡터 활용).

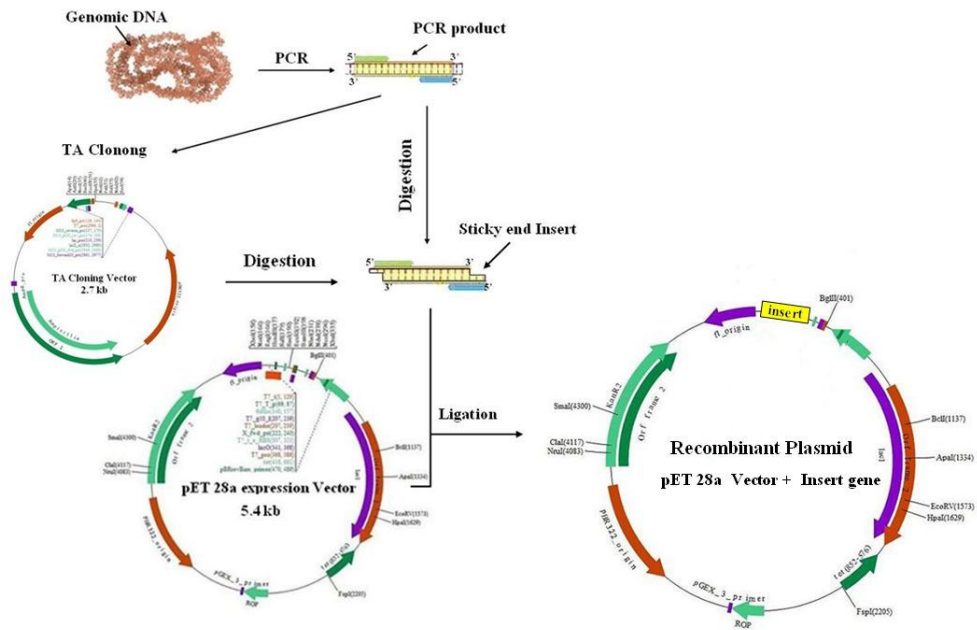
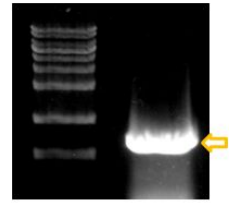


그림 37. 유전자 클로닝 모식도

선정된 표적유전자를 클로닝하기 위한 primer는 다음과 같으며, 이를 활용하여 표적 유전자 (7058 bp)의 PCR 결과를 아래와 같이 획득하였다.

- >BP26-EcoR-F 5'-GGGAATTCGCTTTCGCACAGGAGAATCAG-3'
- >BP26-Sal-R 5'-CCGTCGACTTACTTGATTTCAAAAACGAC-3'



PCR products

그림 38. 표적유전자 PCR 전기영동 사진

얻어진 PCR product를 T vector에 클로닝하여 이를 제한효소를 활용하여 확인한 후, 서열 분석 결과 일치함을 확인하였으며, insert를 발현 vector인 pET vector에 클로닝한 후, 또한 제한효소를 활용하여 표적유전자의 삽입을 확인한 후, 재조합 단백질의 발현을 확인하기 위해 발현 유도를 실시하였다.

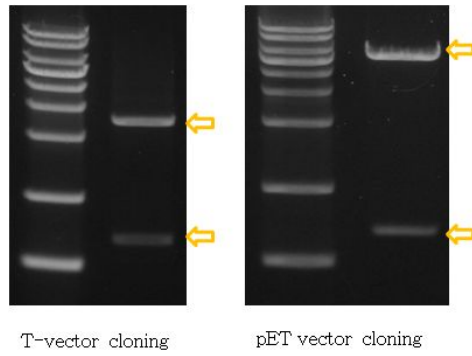


그림 39. 표적유전자 클로닝 전기영동 사진

상기와 같이 브루셀라균 표적유전자인 BP26클로닝하고 BL21에 형질전환하여 얻은 균주를 아래와 같은 2가지 조건에서 표적 단백질의 발현을 유도하였다.

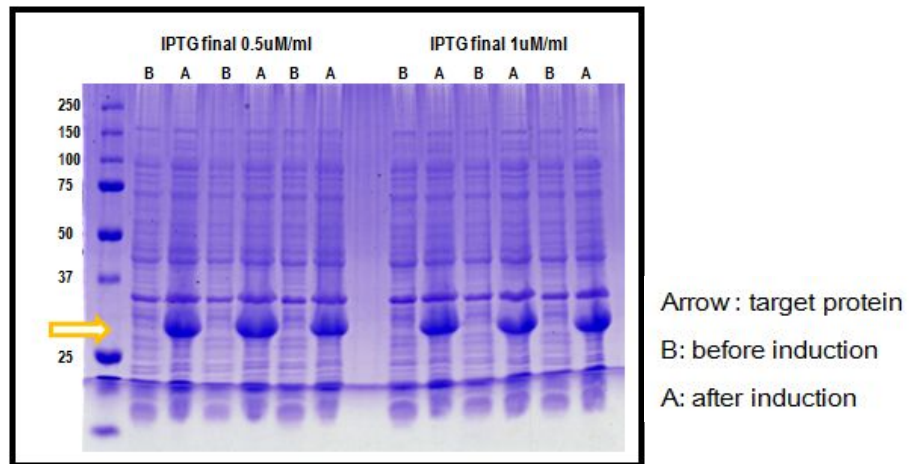


그림 40. 표적유전자 재조합단백질 발현 SDS-page 사진

발현 확인된 표적 단백질을 affinity chromatography법을 활용하여 정제를 진행하였으며 그 결과는 아래와 같다.

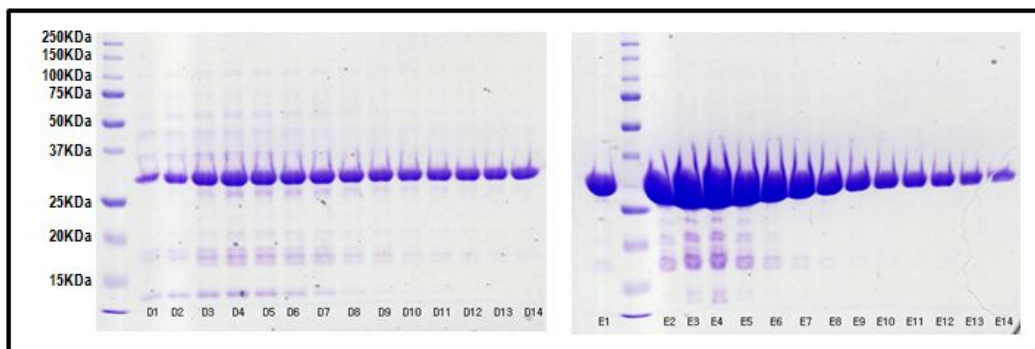
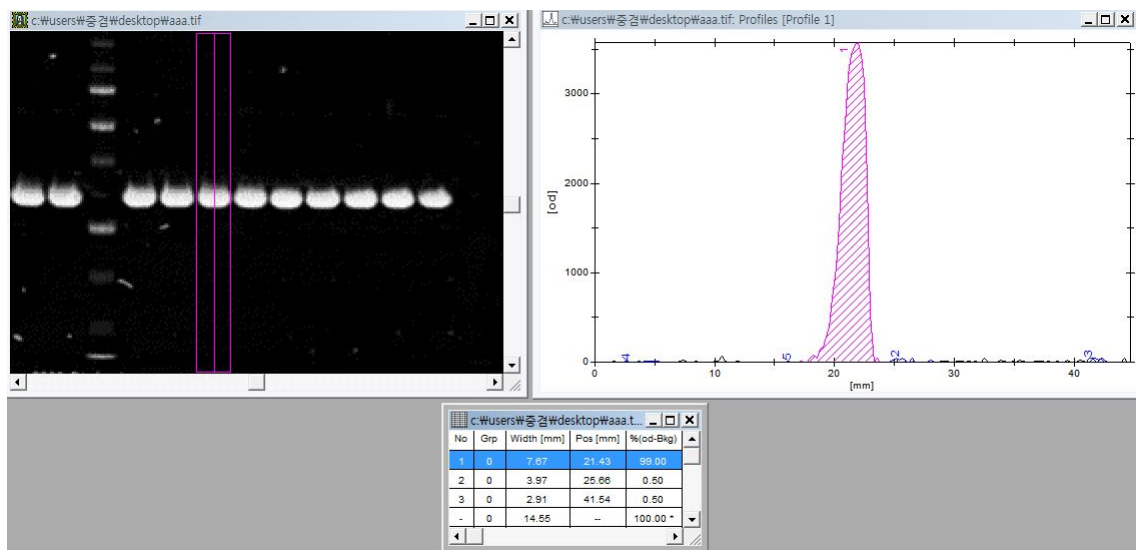
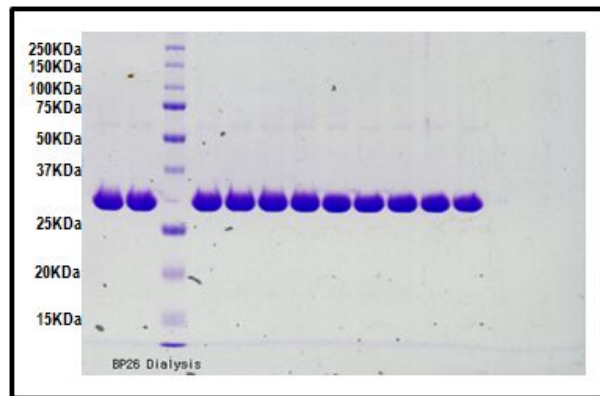


그림 41. 표적유전자 재조합단백질 정제물 SDS-page 사진

정제가 완료된 단백질 샘플들을 혼합한 후, 이들을 PBS에 투석하여 다시 SDS-PAGE 확인한 결과는 아래와 같다. 아울러 순도분석을 실시하였다.



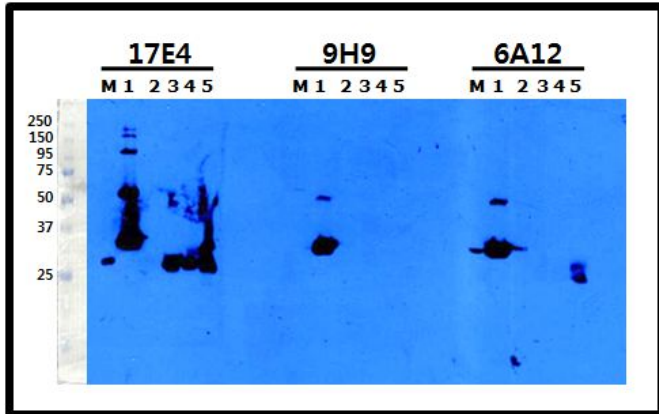
No	Grp	Width [mm]	Pos [mm]	%(od-Bkg)
1	0	7.67	21.43	99.00
2	0	3.97	25.66	0.50
3	0	2.91	41.54	0.50
-	0	14.55	-	100.00 *

그림 42. 표적유전자 재조합단백질 정제물 순도평가

위와 같이 투석된 단백질 분획의 순도가 100%임을 확인할 수 있었으며,

(나) 재조합 단백질을 이용한 단클론 항체의 제작 및 평가

정제가 완료된 단백질을 항원으로 활용하여 단클론 항체를 제작하였으며, 대표적인 3가지 세포주 (아래)를 배양하여 얻은 배양액을 원액 그대로 활용하여 Western blot을 각 브루셀라 균주에 대하여 실시한 결과는 아래와 같다.



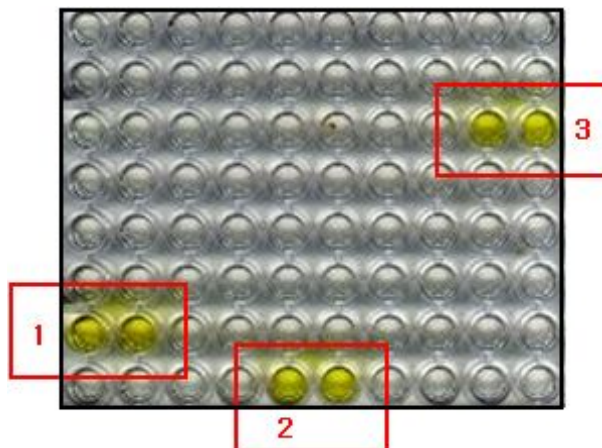
M : molecular marker (미표시)
 1 : Purified BP26
 2 : B.ovis
 3 : B.melintensis 802
 4 : B.abortus 2308
 5 : B.suis 23444

그림 43. 표적제조합단백질 단클론항체 Western blot 사진

따라서, brucella 17E4 단클론 항체 세포주의 특이성이 제조합 단백질 뿐만 아니라 실제 병원체에도 우수하게 반응함으로써 브루셀라의 검출에 활용도가 높을 것으로 사료된다.

(다) whole cell을 이용한 단클론 항체의 제작 및 평가

포르말린으로 처리된 whole cell을 항원으로 하여 단클론을 제작한 후 ELISA에서 높은 OD값을 가지는 단클론 항체 분비 세포주 3가지를 아래와 같이 선별할 수 있었다.



0.07	0.061	0.062	0.059	0.057	0.06	0.062	0.067	0.063	0.065
0.066	0.064	0.062	0.06	0.064	0.062	0.059	0.066	0.068	0.06
0.071	0.063	0.059	0.055	0.062	0.062	0.062	0.07	0.693	0.735
0.066	0.061	0.06	0.056	0.062	0.073	0.075	0.067	0.057	0.053
0.069	0.06	0.061	0.057	0.061	0.065	0.064	0.064	0.058	0.063
0.074	0.073	0.062	0.061	0.059	0.068	0.058	0.06	0.065	0.061
1.447	1.305	0.062	0.067	0.06	0.067	0.06	0.061	0.059	0.063
0.075	0.072	0.065	0.071	0.84	0.822	0.064	0.066	0.068	0.074

그림 44. Whole cell 단클론 항체 ELISA 결과

상기와 같이 3가지 세포주 즉, BA4A4, BA13G6, BA18B11의 특이적인 단클론 항체를 분비하는 세포주를 확립하였으며, 추출된 LPS에 대한 Western blotting 결과는 아래와 같다. 따라서 BA4A4와 BA13G6 세포주만이 LPS에 특이적으로 반응하는 세포주임을 확인 할 수 있었다.

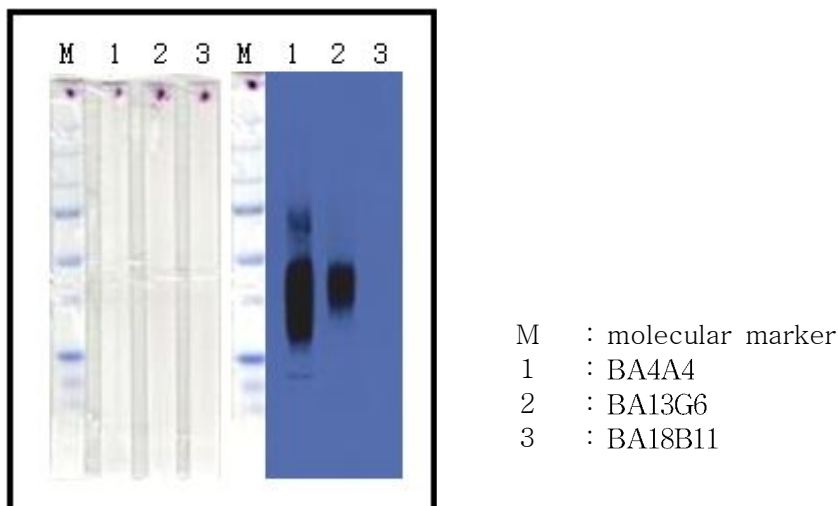


그림 45. LPS에 대한 단클론 항체 Western blot 사진

2. multi-protein G/A의 개발

가. multi-protein G/A의 유전자 클로닝, 발현 및 정제

multi-protein G/A의 개발은 하나의 protein G 또는 A 분자가 두 개의 항체 또는 세 개의 항체와 결합하므로 이를 연속적 또는 교차적으로 연결하여 재조합 단백질로 개발함으로써 하나의 nano bead에 다수의 항체를 결합시키는데 목적이 있다. multi-protein G/A에 대한 발현 과정은 다음과 같다.

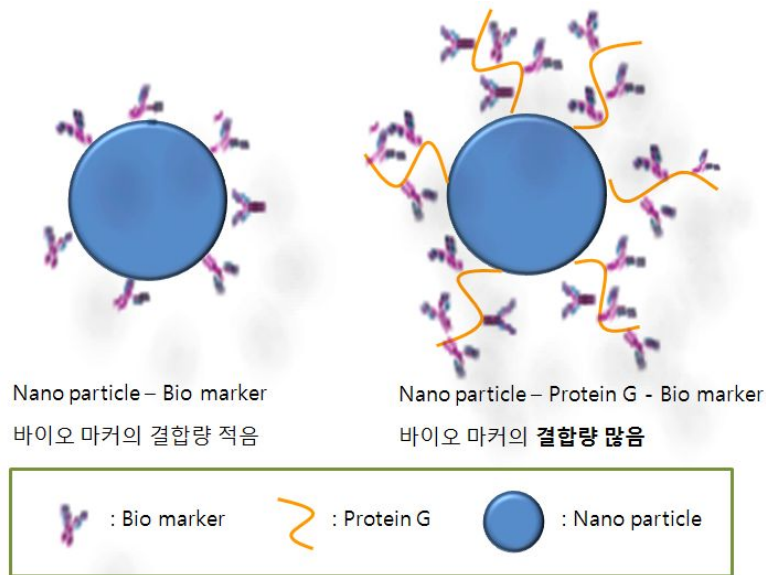


그림 46. 나노비드 삼중 복합체 모식도

(1) Protein G monomer의 유전자 클로닝, 발현 및 정제

Protein G 유전자는 *Streptococcus* sp.에 있으며 서열의 길이는 약 1.8kb이다. 그중 표적으로 잡은 곳은 immunoglobulin binding site로 서열의 길이는 381bps이다.

```

ACTGACACTTACAAATTAGTTGTTAAAGGTAACACTTTCTCAGGCGAAACAAC
ACTAAAGCCATCGATACTGCAACTGCGGAAAAAGAATTCAAACAATACGCAACA
GCTAACAATGTTGACGGTGAGTGGTCTTATGACGATGCAACTAAAACCTTTACA
GTTACTGAAAAACCAGCAGTGATTGACGCACCTGAATTAACACCAGCATTGACA
ACCTACAACTTGTTATCAATGGTAAAACATTGAAAGGCGAAACAACACTACTAAA
GCAGTAGACGCAGAACTGCAGAAAAAGCCTTCAAACAATACGCTAACGAAAAC
GGTGTGATGGTGTGTTGGACTTACGATGATGCGACTAAGACCTTTACGGTAACT
GAA
  
```

그림 47. Protein G 유전자 서열

이러한 표적유전자를 증폭하고 클로닝하는데 사용된 primer는 다음과 같다.

표 36. Protein G 유전자 클로닝을 위한 primer 서열

F- <i>Nde</i> I PG	5'-ACC ATA TGA CTG ACA CTT ACA AAT TA-3'
R-PG <i>Bsp</i> EI <i>Xho</i> I	5'-ACC TCG AGA CCG CCT CCG GAT TCA GTT ACC GTA AAG GT-3'

앞의 primer에서 F-*Nde*I PG와 R-PG *Bsp*EI *Xho*I primer로 *Streptococcus* sp.에서 분

리된 genomic DNA를 PCR하였다. PCR의 조건은 94°C에서 1분, 58°C에서 30초, 72도에서 1분간 30cycle 진행하였으며 증폭된 DNA fragment는 TA-vector에 cloning 한 후 E. coli DH5a에 transformation하였다. Cloning 된 유전자를 sequencing하여 삽입된 insert의 서열이 본래의 서열과 일치함과 PCR에 의해 합성된 linker의 서열이 정확히 만들어졌는지를 sequencing을 통하여 확인하였다.

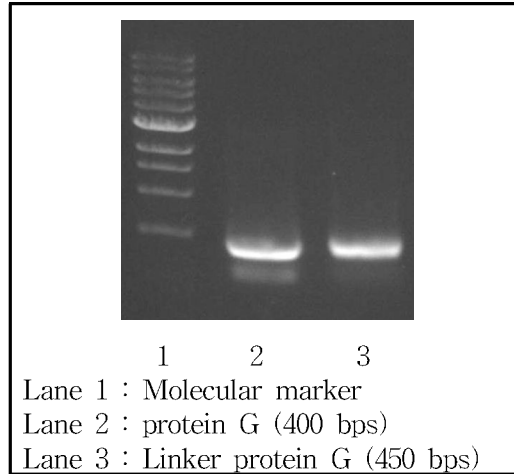


그림 48. Protein G 유전자의 전기영동 사진

앞서 얻은 PCR product를 T vector에 삽입한 후 얻을 수 있는 다수의 colony를 직접 PCR하는 방법인 colony PCR을 실시하여 insert의 삽입여부를 아래와 같이 확인하였다.

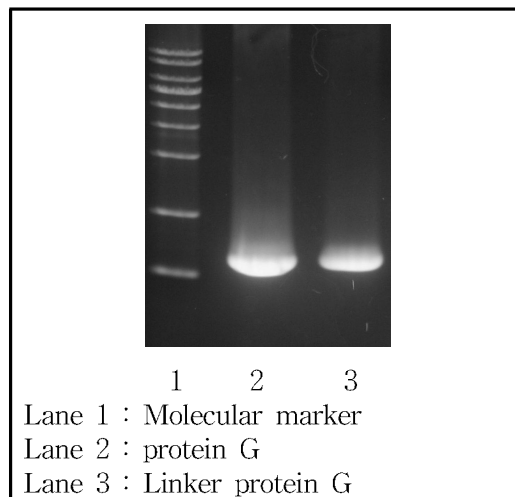


그림 49. Protein G/TA의 colony PCR 전기영동 사진

서열이 확인된 mono protein G/TA vector는 NdeI과 XhoI으로 제한효소 처리하고 같은 효소로 처리된 pET28a vector와 ligation하였다. ligation은 insert : plasmid 의 몰비율 3:1로 하여 16°C에서 overnight 반응 시켰다. ligation된 재조합 plasmid는 DH5a에 transformation하고 그 transformant로부터 얻은 plasmid를 같은 제한효소로 처리하여 insert의 size를 확인한 결과 약 400 bps였다. 그 결과는 다음과 같다.

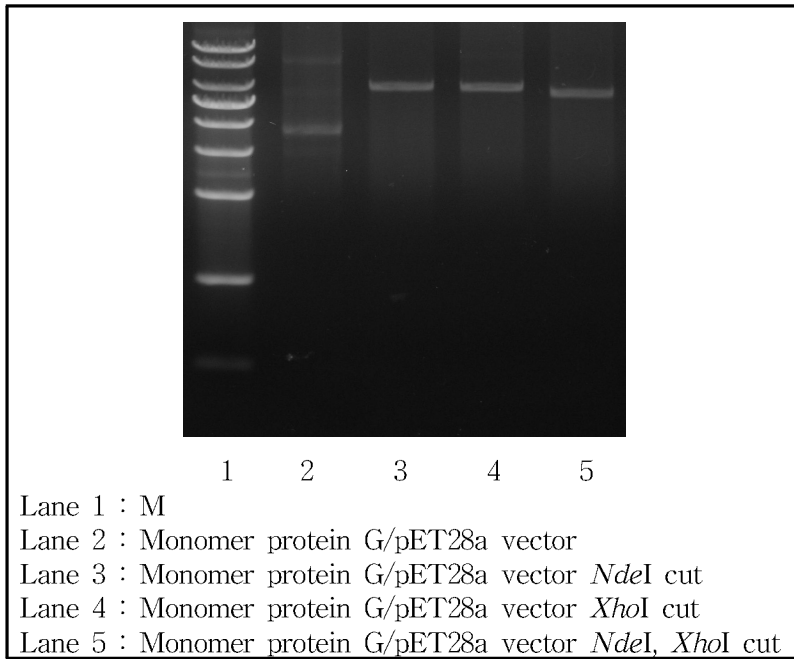
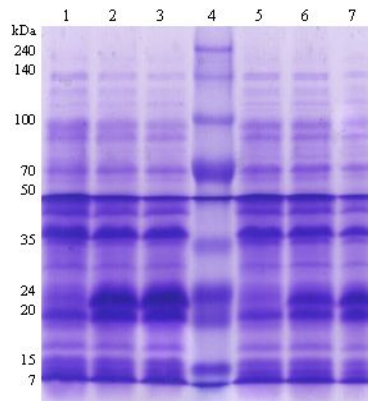


그림 50. Protein G/pET28a의 전기영동 사진

발현 벡터인 pET28a에 cloning된 monomer protein G는 발현 호스트은 Rosetta2 DE3, pLysS에 transformation하여 발현여부를 확인하였다. 발현은 transformation된 균주를 OD₆₀₀에서 0.5까지 배양하고 이후 IPTG를 활용하여 표적 단백질의 발현을 유도하였으며, 그 결과는 아래와 같다. 이 결과에서 볼 수 있듯, pET/Rosetta2 DE3 IPTG 0.8mM에서 가장 발현이 활발히 일어난 것을 확인할 수 있었다.

Monomer protein G/pET28a/Rosetta2 DE3, pLysS (이론적 molecular weight : 22kDa)



- Lane 1 : Monomer protein G/pET/Rosetta2 DE3 IPTG 0mM (control)
- Lane 2 : Monomer protein G/pET/Rosetta2 DE3 IPTG 0.2mM
- Lane 3 : Monomer protein G/pET/Rosetta2 DE3 IPTG 0.8mM
- Lane 4 : Protein marker
- Lane 5 : Monomer protein G/pET/Rosetta2 pLysS IPTG 0mM (control)
- Lane 6 : Monomer protein G/pET/Rosetta2 pLysS IPTG 0.2mM
- Lane 7 : Monomer protein G/pET/Rosetta2 pLysS IPTG 0.8mM

그림 51. 발현된 protein G monomer의 SDS-PAGE 사진

이후, 해당 균주를 대량 배양하여 이를 정제한 결과는 다음과 같다.

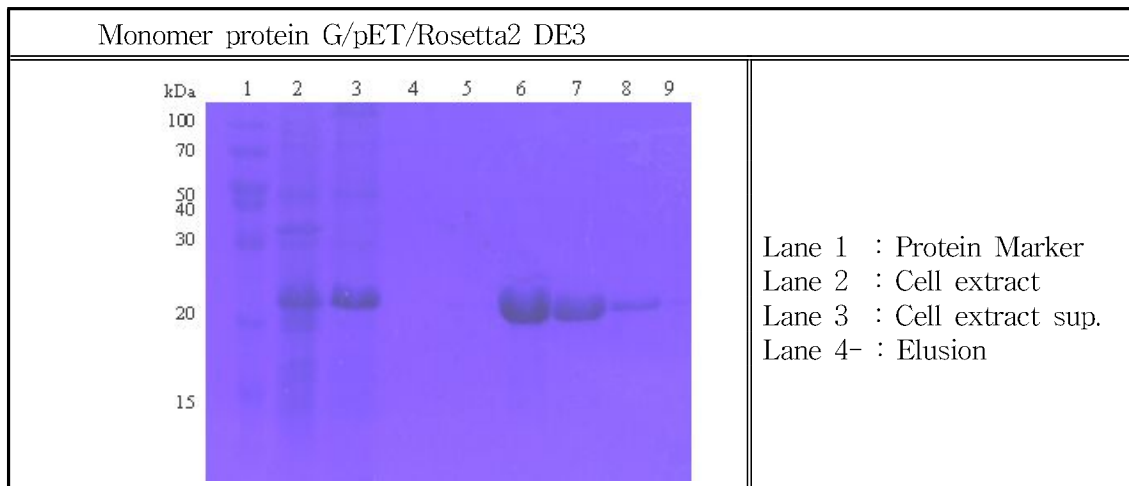


그림 52. 정제된 protein G monomer의 SDS-PAGE 사진

정제한 monomer protein G의 순도는 아래와 같이 98% 이상의 고순도를 보였다.

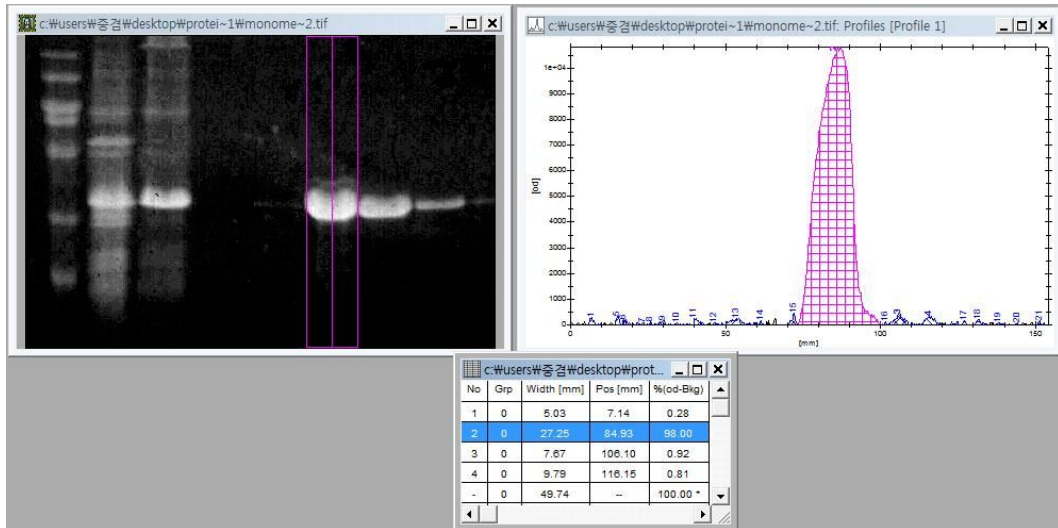


그림 53. 정제된 protein G monomer의 순도 평가

(2) Protein G homodimer의 유전자 클로닝, 발현 및 정제

Dimer 이후의 재조합 단백질의 발현은 monomer를 연결하기 위한 linker protein이 필요로 하며, 이를 위해 아래와 같이 serine과 glycine이 반복되는 서열을 가진 linker primer를 추가로 활용하여 PCR을 진행하였다.

표 37. protein G multimer를 위한 primer 서열

F- <i>Nde</i> I PG	5'-ACC ATA TGA CTG ACA CTT ACA AAT TA-3'
R-PG <i>Bsp</i> EI <i>Xho</i> I	5'-ACC TCG AGA CCG CCT CCG GAT TCA GTT ACC GTA AAG GT-3'
F-LinkerPG	5'-ATA CCG GTG GAG GCG GTT CAG GCG GAG GTG GCT CTG GCG GTG GCG GAT CGA CTG ACA CTT ACA AAT TA-3'

이들을 활용한 multimer protein G의 발현 개념은 다음의 모식도에서 보는 바와 같다.

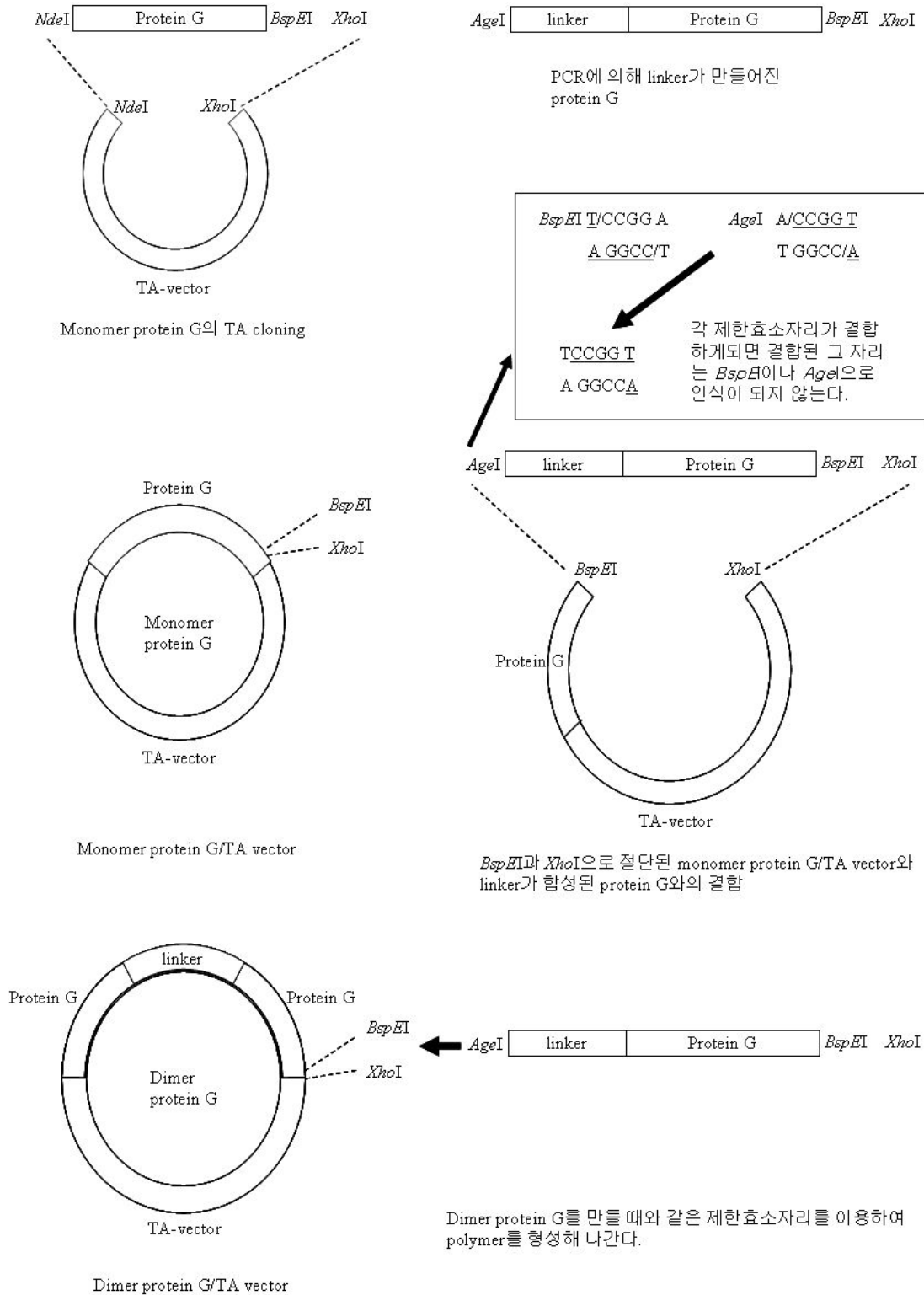


그림 54. Protein G의 multimer를 위한 vector construction의 개념

위의 primer를 활용하여 얻은 PCR product를 T vector에 삽입한 후 colony PCR을 실시하여 insert의 삽입여부를 아래와 같이 확인하였다. insert의 삽입이 확인된 균주의 벡터는 다시 정제하여 서열분석을 실시하였으며, 예상되는 서열과 정확히 일치함을 확인하

였다.

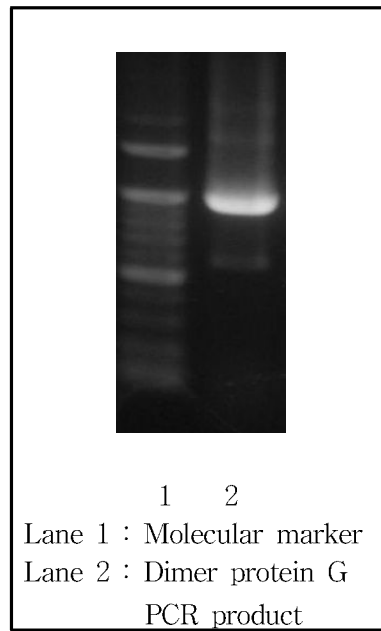


그림 55. Protein G homodimer/TA의 colony PCR 전기영동 사진

이를 앞서와 마찬가지로 발현 벡터에 삽입한 후 제한효소 처리하여 insert 삽입여부를 확인하였다. 발현 벡터에서의 서열확인도 TA vector에서 이미 확인한 바 있어, 별도로 실시하지 않았다.

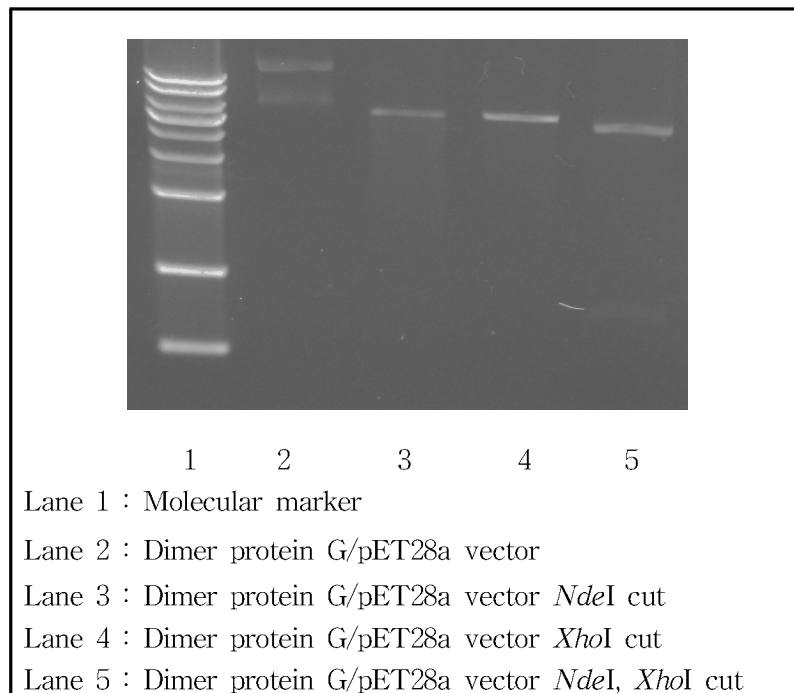


그림 56. Protein G의 homodimer/pET28a의 전기영동 사진

클로닝이 완료된 벡터를 아래와 같이 각기 발현균주에 형질전환시켜 해당 단백질의 발현을 유도하였으며, 모든 균주에서 성공적으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

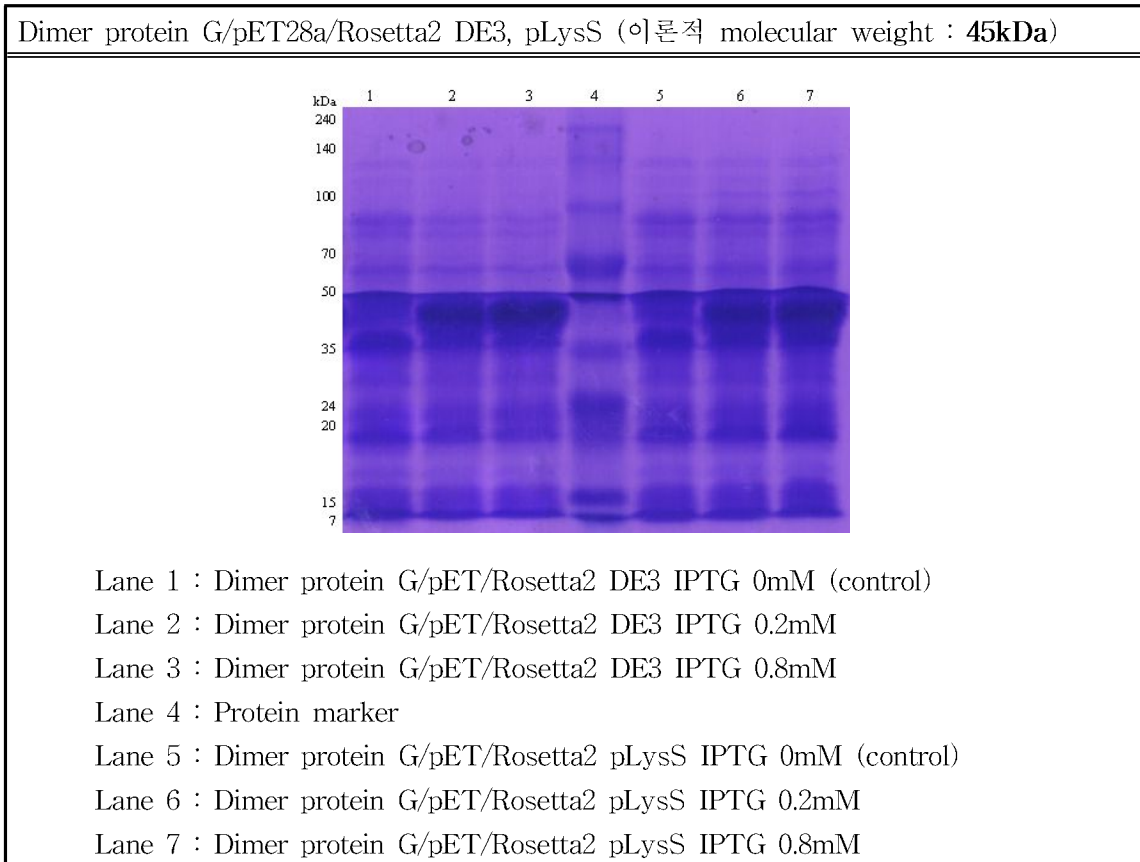


그림 57. 발현된 protein G homodimer의 SDS-PAGE 사진

그리고 이를 affinity chromatography 방법을 활용하여 아래와 같이 정제하였다.

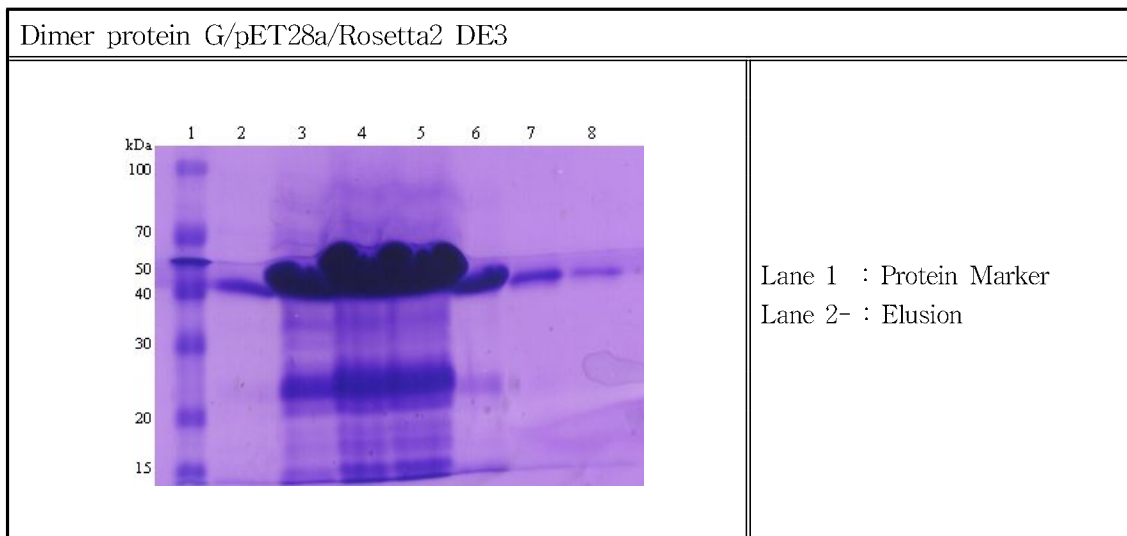


그림 58. 정제된 protein G homodimer의 SDS-PAGE 사진

정제한 dimer protein G의 순도는 아래와 같이 약 70% 정도의 순도를 보여 2차 정제가 필요할 것으로 사료된다. 2차년도에 실제 사용될 trimer의 경우 추가적인 반복 정제를 통해 80% 이상의 고순도를 확보하는 것이 필요하다고 판단된다.

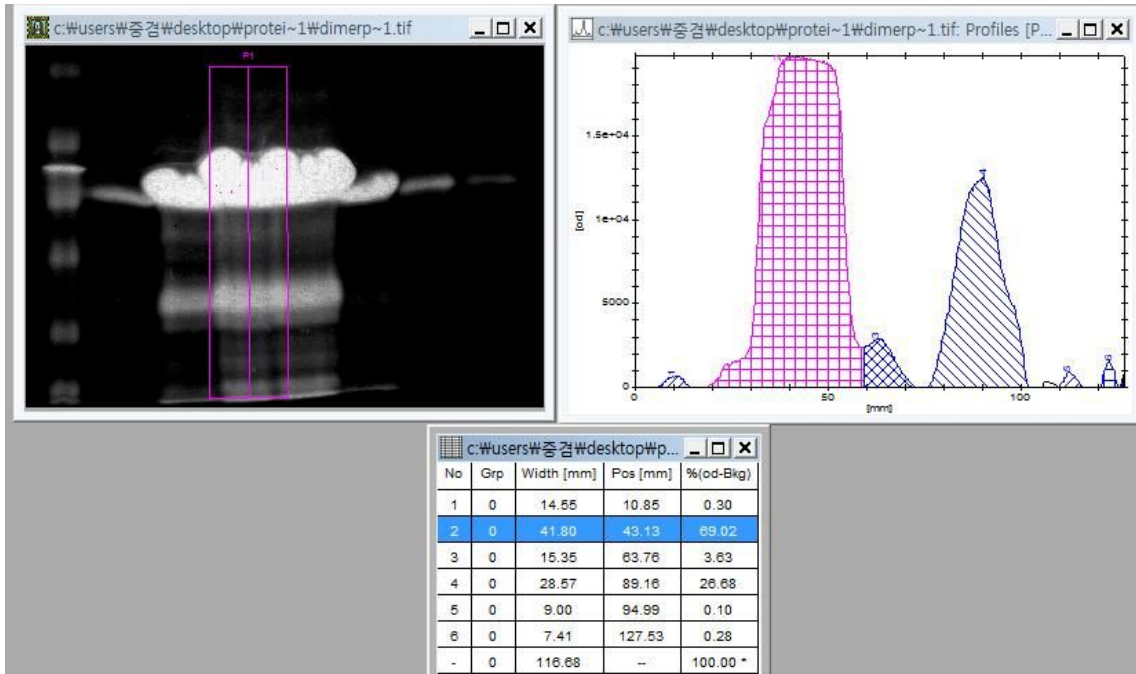


그림 59. 발현된 protein G homodimer의 순도평가

(3) Protein G homotrimer의 유전자 클로닝, 발현 및 정제

Dimer protein G의 경우와 마찬가지로 해당 primer를 활용하여 PCR을 실시한 후, 이를 protein G/TA vector에 삽입하여 colony PCR을 실시하여 insert의 삽입을 확인하였다.

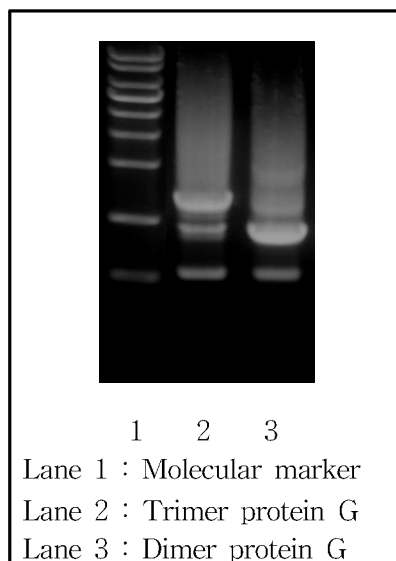


그림 60. Protein G homotrimer/TA의 colony PCR 전기영동 사진

또한 발현 벡터에 다시 insert를 삽입한 후 제한효소를 처리하여 insert을 삽입을 확인하였다.

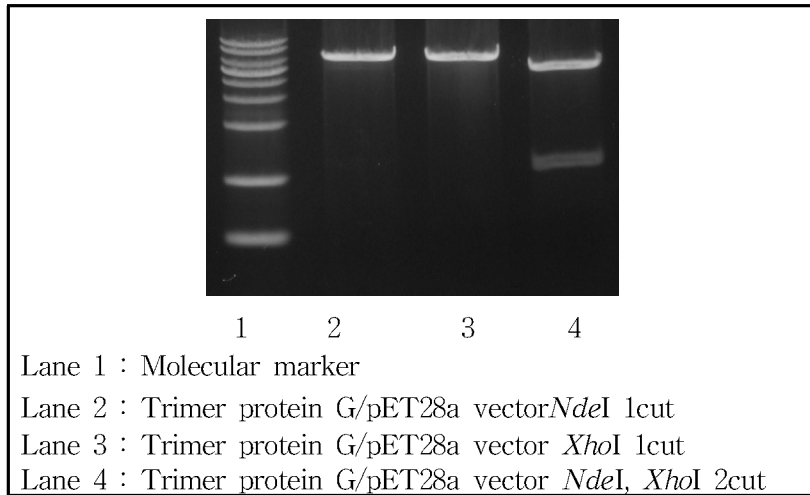


그림 61. Protein G homotrimer/pET28a의 전기영동 사진

앞서와 같이 다양한 조건에서 표적 단백질의 발현을 유도하였으며, 그 결과는 아래와 같다.

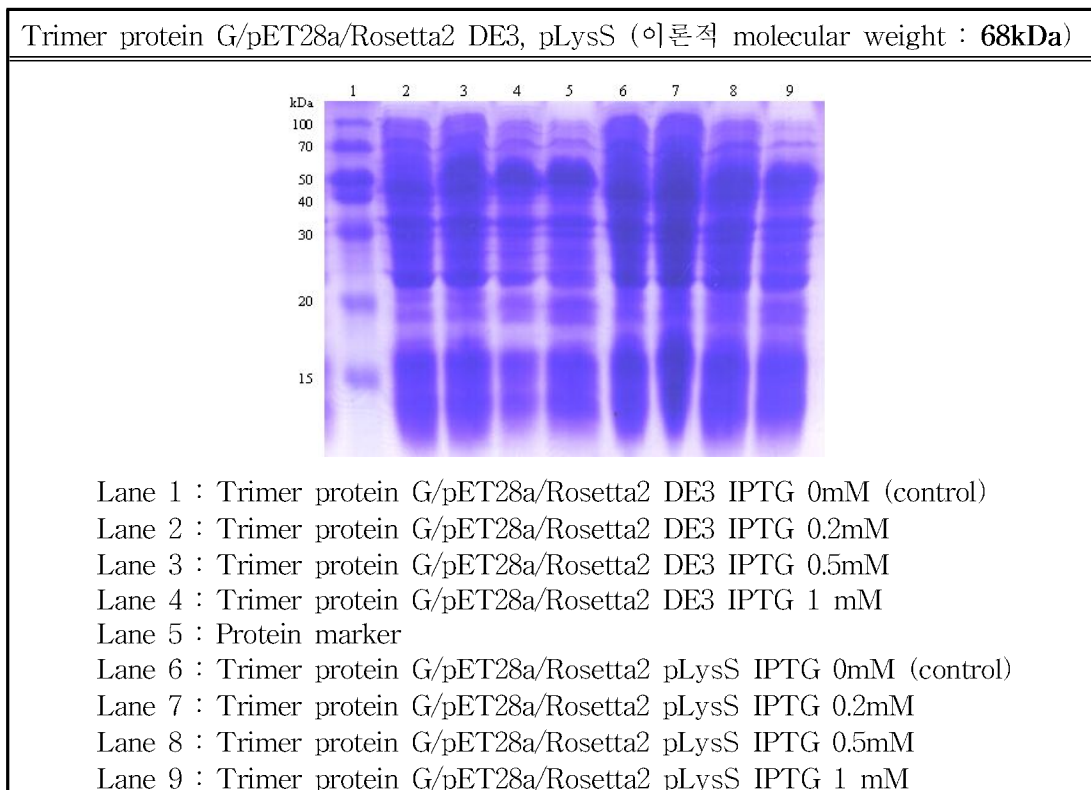


그림 62. 발현된 protein G homotrimer의 SDS-PAGE 사진

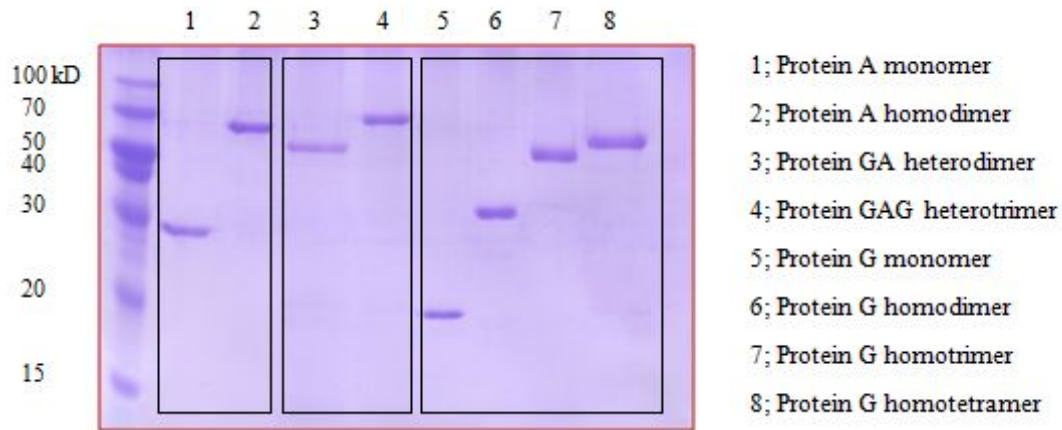
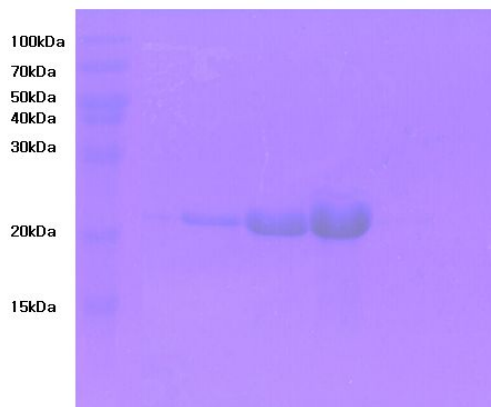


그림 63. Protein G/A multimer의 발현 SDS-PAGE 결과

나. 재조합 multi-protein G의 정제조건 최적화

(1) protein G monomer 발현 및 정제조건

Protein G homomonomer/pET28a/BL21 DE3



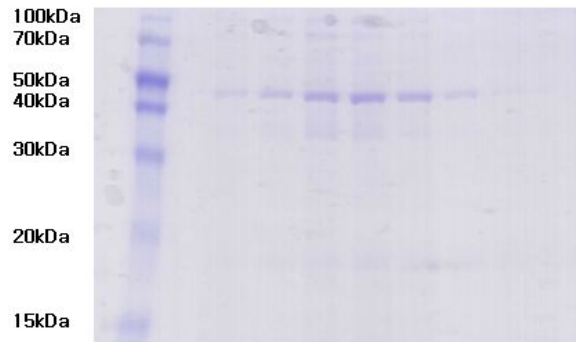
purification	Native condition		
IPTG conc	0.5mM	Temperature	37°C
Induction time	4hrs	RPM	250

Cell lysis	French press	
Purification	Lysis buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM imidazole pH8.0
	Wash buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 50mM imidazole pH8.0
	Elution buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM imidazole pH8.0

그림 64. Protein G monomer 발현 및 정제조건

(2) protein G homodimer 발현 및 정제조건

Protein G homodimer/pET28a/BL21 DE3

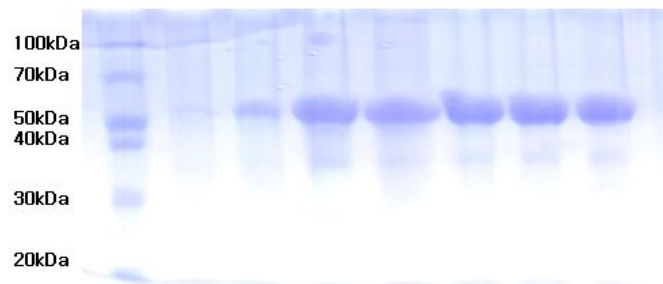


purification	Native condition		
IPTG conc	0.5mM	Temperature	37°C
Induction time	4hrs	RPM	250
Cell lysis	French press		
Purification	Lysis buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM imidazole pH8.0	
	Wash buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 50mM imidazole pH8.0	
	Elution buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM imidazole pH8.0	

그림 65. Protein G homodimer 발현 및 정제조건

(3) protein G homotrimer 발현 및 정제조건

Protein G homotrimer/pET28a/BL21 DE3



purification	Native condition		
IPTG conc	0.5mM	Temperature	37°C
Induction time	4hrs	RPM	250
Cell lysis	French press		
Purification	Lysis buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM imidazole pH8.0	
	Wash buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 50mM imidazole pH8.0	
	Elution buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM imidazole pH8.0	

그림 66. Protein G homotrimer 발현 및 정제조건

(4) protein G homotetramer 발현 및 정제조건

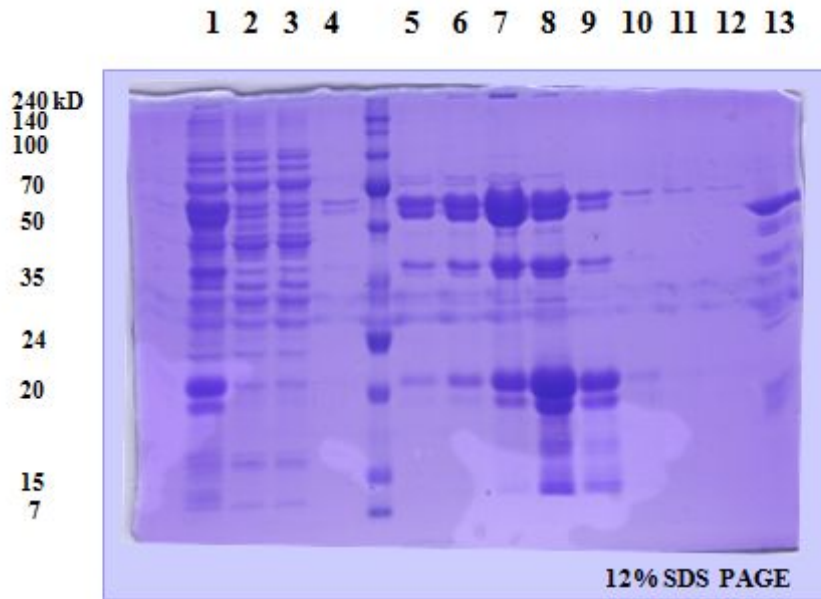


Purification	Native condition		
IPTG conc	0.5mM	Temperature	37°C
Induction time	4hrs	RPM	250

Cell lysis	French press	
Purification	Lysis buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM imidazole pH 8.0
	Wash buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 50mM imidazole pH 8.0
	Elution buffer	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM imidazole pH 8.0

그림 67. Protein G homotetramer 발현 및 정제조건

위 그림에서 확인할 수 있듯이 protein G trimer까지는 고순도의 재조합 단백질의 정제가 용이하게 이루어 졌으나 아래 그림 11와 같이 protein G tetramer의 정제 후 결과는 재조합 단백질이 잘라지는 현상이 발견되어 사용하기에 문제가 있는 것으로 판단되었다.



- 1; Cell extract supematant(souble)
- 2; Loading
- 3; Washing(20mM Imidazole, 50mM Sodium phosphate buffer, pH8.0)
- 4; Washing(50mM Imidazole, 50mM Sodium phosphate buffer, pH8.0)
- 5~12; Elution(250mM Imidazole, 50mM Sodium phosphate buffer, pH8.0)
- 13; TrimerPG

그림 68. Protein G homotetramer 발현 및 정제 SDS-PAGE 사진

그러나 이러한 연구결과에도 불구하고 아래 그림 16에서 확인할 수 있듯이, 재조합 단백질의 N-terminal에는 His tag이 배치되어 정제과정에서의 표지로 작용하고 아미노기로 치환된 실리카나노입자와의 결합에는 가교결합시약인 sulfo-SMCC에 의해 재조합 단백질의 C-terminal에 위치한 의도적 장치인 cystein의 sulfhydryl group이 사용되므로 multimer의 중간 부위가 잘리더라도 1단계 His tag에 의한 정제와 2단계 cystein에 의한 자성나노입자와의 결합을 통해 잘린 재조합 단백질은 최종적으로 자성나노입자에 결합하지 않을 것이라고 판단하였으나 이후의 실험에서 tetramer의 자성나노입자 결합성은 현저히 떨어지는 것으로 나타나 중지하였다.



그림 69. Protein A/G multimer에서의 His tag과 cystein 배치도

다. 재조합 multi-protein G의 항체 결합량 평가

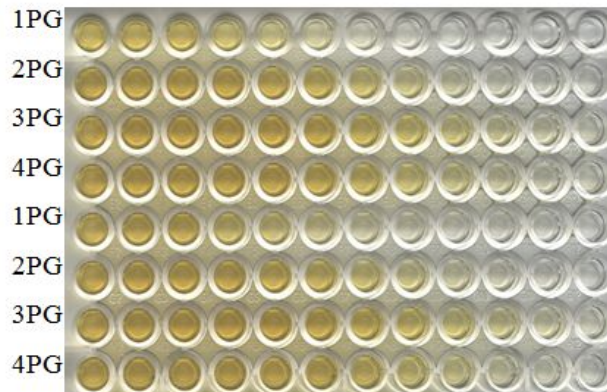
Protein G monomer, dimer, trimer, tetramer의 각기 마우스 혹은 토끼 항체의 결합량을

비교환산하기 위해 다음과 같은 공식을 활용하여 단위 개수 (동일 개수)의 protein G monomer, dimer, trimer, tetramer의 재조합 단백질을 ELISA plate에 코팅한 후 마우스 단클론 항체 및 토끼 다클론 항체를 농도별로 희석하여 1차 항체로 활용하고 그 값을 비교하였다.

1kDa protein 1kg이 1mol로 정의되므로 각 protein G의 1nmol은 아래와 같이 환산될 수 있다.

Protein G monomer	MW 19kDa	1mg = 52.6 nmol,	1nmol = 19.01ug
Protein G dimer	MW 35kDa	1mg = 28.57 nmol,	1nmol = 35.00ug
Protein G trimer	MW 51kDa	1mg = 19.22 nmol,	1nmol = 52.02ug
Protein G tetramer	MW 67kDa	1mg = 14.928 nmol,	1nmol = 66.99ug

ELISA 코팅시 각 재조합 단백질은 37.6pmol/100ul (최적의 조건으로 예비실험을 통해 결정함)에서 시작하여 2배씩 단계희석하여 진행하였다. 또한 아래 그림과 같이 동일한 시험을 동일한 plate 상에서 2회 실시하였다.



0.901	0.736	0.755	0.5	0.398	0.193	0.099	0.069	0.065	0.058	0.051	0.051
0.958	0.901	0.958	0.869	0.773	0.653	0.412	0.265	0.153	0.103	0.077	0.074
1.039	0.987	0.947	0.927	0.959	0.806	0.656	0.472	0.354	0.19	0.133	0.104
1.018	1.006	0.945	0.859	0.841	0.838	0.702	0.421	0.251	0.16	0.102	0.104
0.794	0.751	0.748	0.481	0.377	0.219	0.125	0.088	0.066	0.066	0.059	0.058
0.969	0.934	1.024	0.961	0.815	0.688	0.481	0.299	0.162	0.113	0.083	0.065
1.004	0.947	0.998	1.024	1.017	0.964	0.787	0.595	0.438	0.273	0.174	0.12
0.939	1.015	0.968	0.941	0.886	0.833	0.684	0.482	0.285	0.174	0.111	0.083

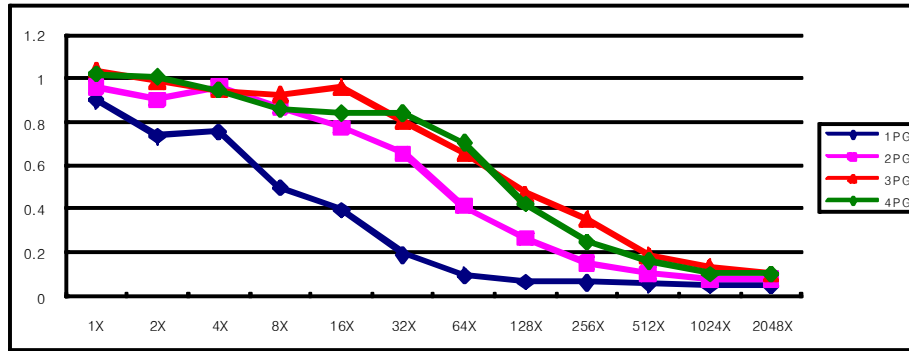


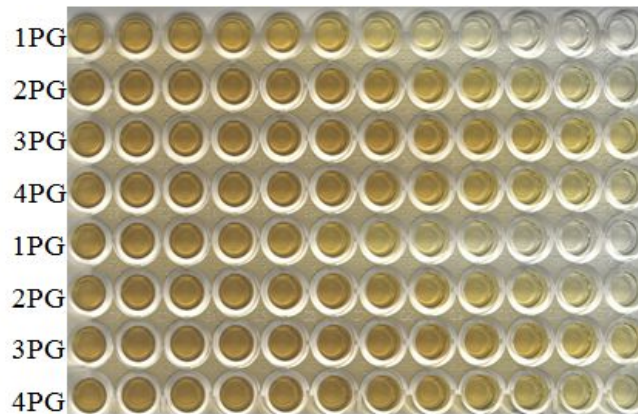
그림 70. 마우스 단클론 항체를 활용한 각 protein G 별 단계희석에 따른 ELISA 결과

1PG : protein G monomer

2PG : protein G dimer

3PG : protein G trimer

4PG : protein G tetramer



1.354	1.48	1.439	1.409	1.292	0.96	0.549	0.335	0.193	0.112	0.084	0.07
1.513	1.482	1.441	1.624	1.369	1.518	1.291	1.066	0.729	0.523	0.346	0.172
1.529	1.435	1.457	1.563	1.473	1.524	1.344	1.355	1.153	0.928	0.716	0.52
1.433	1.308	1.363	1.234	1.422	1.314	1.365	1.219	0.847	0.663	0.4	0.262
1.482	1.35	1.329	1.24	1.255	1.079	0.684	0.371	0.195	0.129	0.101	0.077
1.388	1.424	1.322	1.148	1.448	1.319	1.31	1.021	0.706	0.481	0.331	0.178
1.461	1.597	1.38	1.378	1.405	1.473	1.289	1.371	1.148	0.972	0.743	0.467
1.444	1.483	1.521	1.38	1.432	1.462	1.393	1.207	0.965	0.711	0.519	0.287

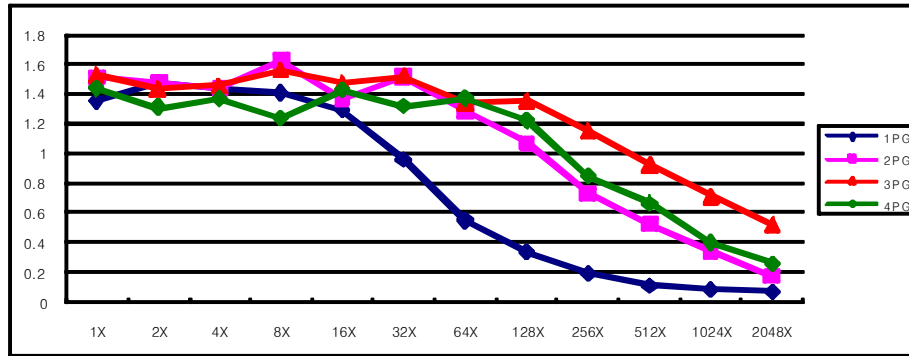


그림 71. 토끼 다클론 항체를 활용한 각 protein G 별 단계희석에 따른 ELISA 결과

- 1PG : protein G monomer
- 2PG : protein G dimer
- 3PG : protein G trimer
- 4PG : protein G tetramer

상기 ELISA 결과에서 볼 수 있듯이 마우스 단클론 항체와 토끼 다클론 항체 모두에 있어서 protein G monomer 보다는 dimer가 또한 이보다 trimer가 높은 항체결합량을 확인할 수 있었으나 tetramer의 경우 dimer보다는 높으나 trimer보다 낮은 결과를 얻을 수 있었다. 이는 재조합 단백질의 tetramer가 잘리는 현상으로 기인한 것으로 판단되며 따라서 protein G trimer를 활용하여 자성나노입자와 복합체를 형성시키는 것이 가장 바람직한 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단하였다.

3. 자성나노입자의 개발

가. 자성나노입자 성장 개발

아래 그림과 같은 과정을 거쳐 자성나노입자를 제작한 뒤에 silica로 코팅하여 multiple protein G가 결합할 수 있는 잔기를 유도하였다.

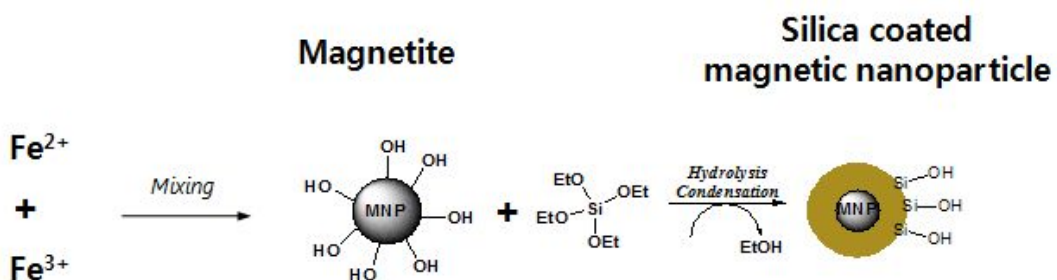


그림 72. 자성나노입자 잔기 유도 과정 사진

각 제작 단계별 전자현미경 사진은 아래와 같다.

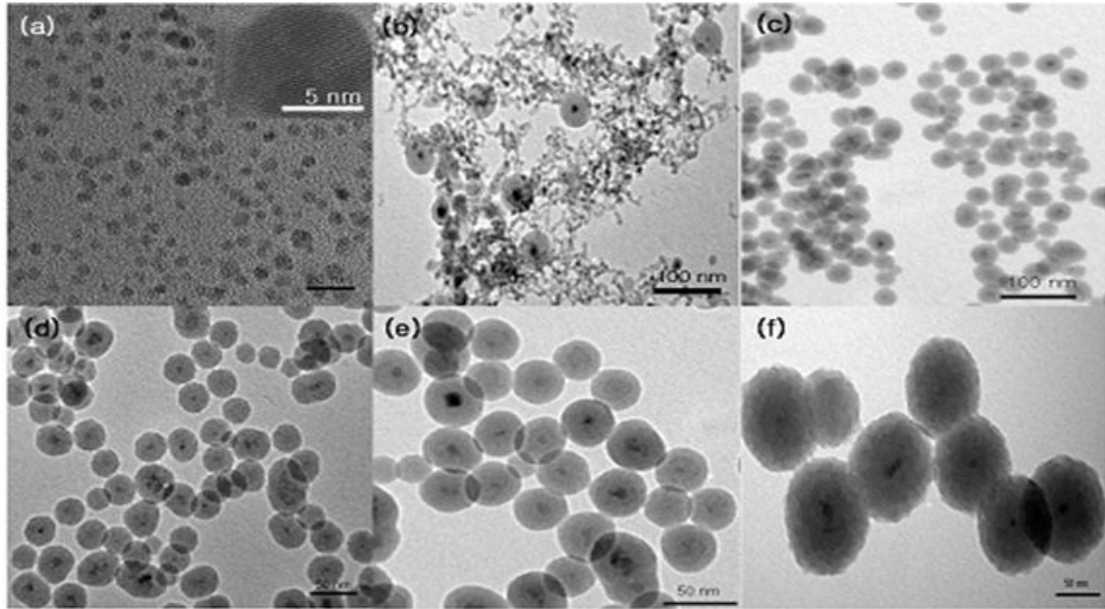


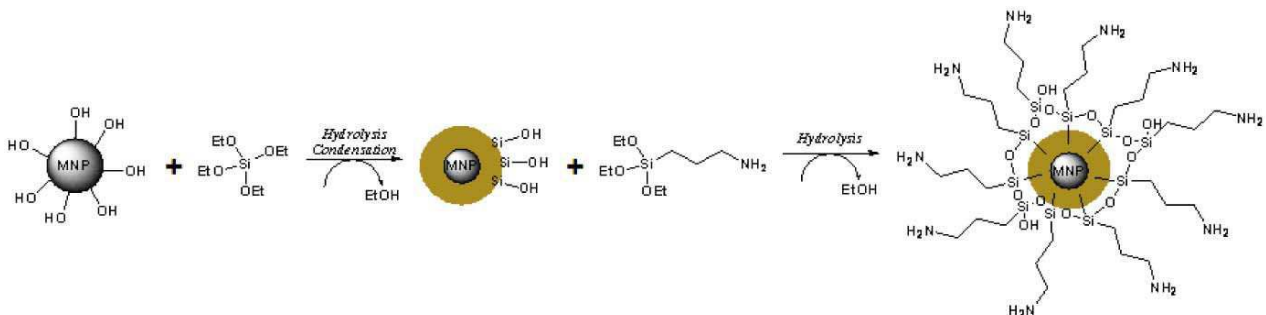
그림 73. 자성나노입자 잔기 유도 과정 현미경 사진

(a)는 magnetite를 촬영한 사진이고, (b)와 (c)는 washing 전후의 debris의 제거 과정에 나타난 결과 사진이다. 그리고 silica로 코팅하고 나서의 사진이 (d), (e), (f)로서 3가지 크기의 자성나노입자를 제작하였다.

나. 자성나노입자 성장 최적화 및 pG-nano particle-Ab 복합체 개발

(1) protein G multimer가 고정된 Fe₃@SiO₂ 입자제작

아미노그룹이 발현된 실리카코팅 자성나노입자의 제작과정은 아래 그림과 같다.



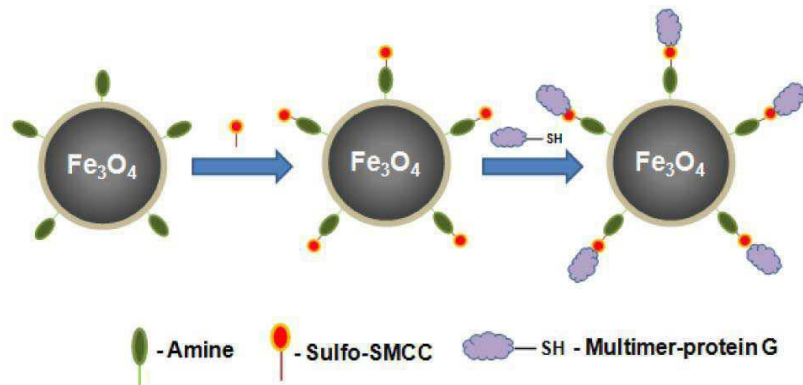


그림 74. 자성나노입자의 제작과정 도시

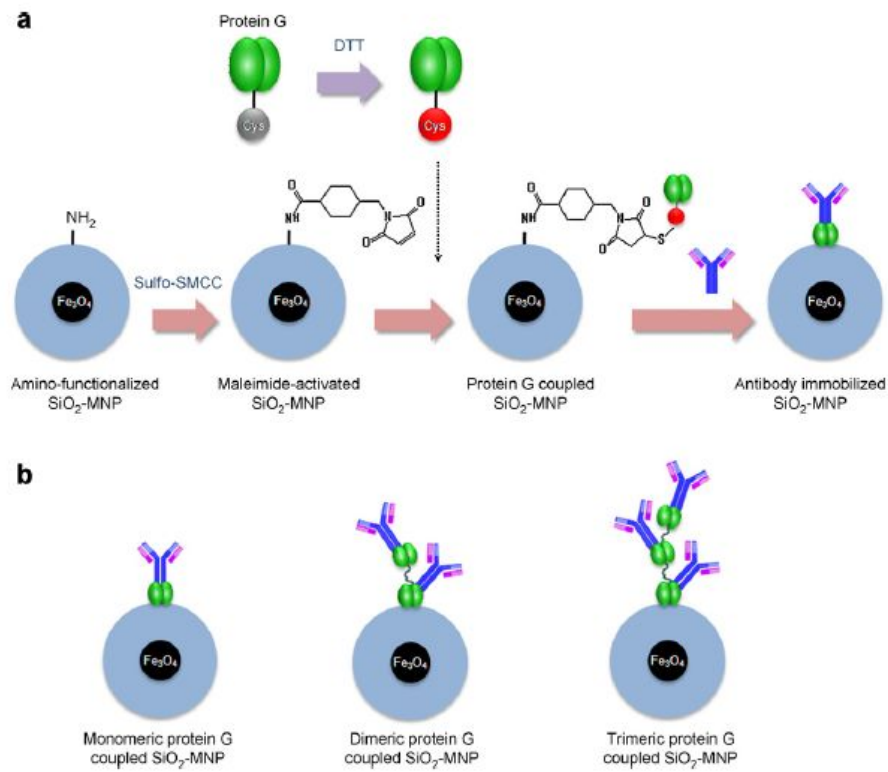


그림 75. 삼중복합체의 제작과정 도시

a: 아미노그룹이 활성화된 자성 실리카 나노입자의 생성과정, b: protein G monomer, dimer, trimer의 결합 모식도

자성실리카 나노입자는 중심핵 (core)으로 나노자성체 산화물에 실리카 코팅된 자성실리카 나노입자의 표면에 아미노그룹이 도출되어 치환시킨 후, 아미노그룹이 치환된 자성나

노입자의 표면을 쌍방결합시약 (cross linking reagent)에 침지시켜 아미노그룹에 아마이드결합을 형성하고, 아마이드결합이 형성된 자성실리카 나노입자의 아미노그룹에 protein G multimer를 결합시켜 수행하였다.

나노자성체는 자철광(magnetite; Fe_3O_4), 헤마타이트(hematite; $\alpha-Fe_2O_3$), 마그헤마이트(maghemite; $\gamma-Fe_2O_3$), 니켈, 코발트 및 그들의 화합물로부터 이루어진 군에서 자성에 반응하는 물질이면 어느 것을 사용하여도 좋으나 본 연구과제에서는 자철광을 사용하였으며, 100nm의 지름을 가지도록 설계하였다. 또한 쌍방결합시약으로는

SPDP; N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate,
SMPT; succinimidyl-oxycarbonyl- α -methyl- α -(2-pyridyldithio)toluene,
Sulfo-LC-SMPT; Sulfosuccinimidyl-6-[α -methyl- α -(2-pyridyldithio) toluamido] hexanoate,

Sulfo-SMCC; Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate,

MBS; m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimide ester,

SIAB; N-succinimidyl(4-iodoacetyl)-aminobenzoate,

SMPB; Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate,

GMBS; N- γ -Maleimidobutyryl-oxysuccinimide ester,

SIAX; Succinimidyl-6-[6(((iodoacetyl)amino)-hexanoyl)amino]hexanoate,

NPIA; p-Nitrophenyl iodoacetate 등으로 이루어진 군에서 어느 것을 사용해도 무방하나 본 과제에서는 Sulfo-SMCC를 선택하여 사용하였다.

쌍방가교시약에 protein G multimer가 결합할 수 있게 하려면 재조합 단백질의 말단에 cysteine을 장착하여 설퍼하이드릴기 (sulfhydryl group)이 발현되도록 하였다. 구체적인 제작 방법은 아래와 같다.

자성 나노입자를 제작하기 위하여 계면활성제인 Igepal C0-520 0.22g을 사이클로헥산 4.5ml에 녹인 용액을 준비한 후, magnetite와 oleic acid를 사이클로헥산 용액에 넣고 1시간 가량 초음파 처리를 하여 분산시킨 후 기 준비된 Igepal이 들어 있는 사이클로헥산 용액에 넣고 교반시켰다. 이때 수산화암모늄, APTEOS를 첨가한 후 추가적으로 20분 동안 더 교반시킨 후 메탄올을 넣어서 세척하여 최종적으로 아미노기가 치환된 실리카 코팅 자철광나노입자를 확보하였다.

이후 아미노치환 $Fe_3@SiO_2$ 를 200mM 염화나트륨 (pH7.2)과 100mM 인산염완충액으로 이루어진 용액 1.5ml에 넣어 10초간 교반시킨 후, 30분간 초음파분산기를 이용하여 분산을 시켰다. 자석을 이용하여 자성나노입자를 분리해 낸 후, 아미노기로 기능화된 자성나노입자와 sulfo-SMCC가 잘 결합하기 위해 계면활성제로 사용한 0.1% Tween-20을 포함한 분산용 완충액 160ul를 이용하여 자성나노입자를 풀어주었다. 가교결합시약인 50mM sulfo-SMCC 시약을 DMSA (dimethylsulfoxide) 용매에 용해시킨 후 40ul를 분산된 자성나노입자 용액에 첨가하였다. 약 10초간 혼합된 혼합물을 교반한 후, 상온에서 한 시간 동안 흔들어주면서 반응시켰다.

아미노치환 $Fe_3@SiO_2$ 의 활성동안 말단에 cysteine이 결합된 protein G multimer (30mM)를 상온에서 30분간 10.91mM DTT로 sulfhydryl group이 반응할 수 있도록 한

원시켰다. 환원된 protein G multimer는 탈염 스피ن 컬럼을 사용하여 완충액을 활용하여 정제하였다. 자성을 띤 활성화된 아미노치환 $Fe_3@SiO_2$ 는 10mM PBS 완충액으로 5회 세척한 다음 상기 환원된 protein G multimer를 최종농도 100ug/ml이 되도록 추가하여 0.1% Tween-20을 최종농도로 하여 10mM PBS 완충액으로 재현탁하였다. 이를 교반하고 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 자석을 이용하여 protein G multimer가 고정된 $Fe_3@SiO_2$ 입자를 정제하고 10mM PBS 완충액을 활용하여 3회 세척함으로써 완성하였다.

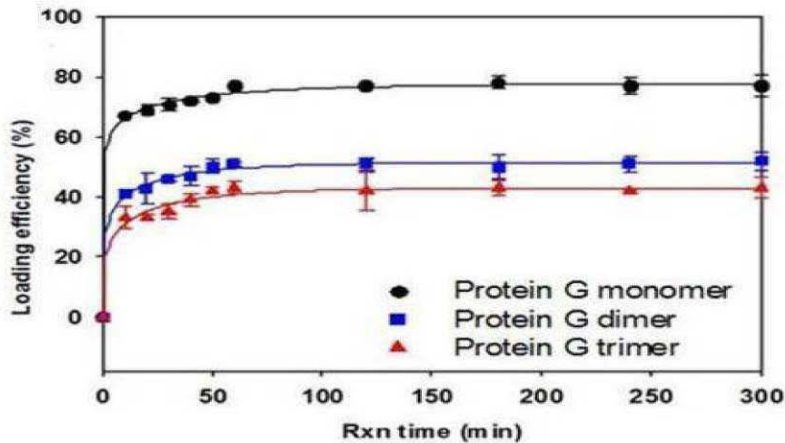


그림 76. Protein G monomer, dimer, trimer의 각 농도에 따른 결합효율

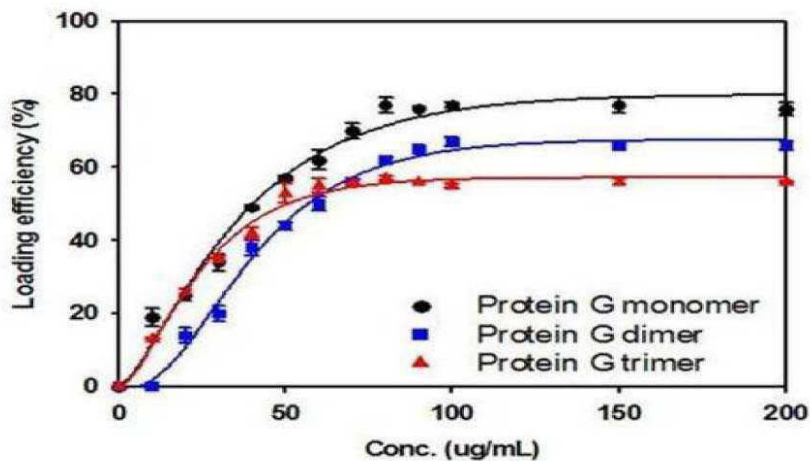


그림 77. Protein G monomer, dimer, trimer와 아미노그룹으로 표면치환된 실리카코팅 자성입자와의 반응시간에 따른 결합효율

(2) 마우스항체와 protein G multimer가 고정된 $Fe_3@SiO_2$ 입자의 결합

마우스 면역글로블린 G의 최종농도를 200ug/ml이 되도록 0.1% Tween-20이 들어 있는 10mM PBS 완충액을 이용한 희석한 후 protein G multimer가 고정된 $Fe_3@SiO_2$ 입

자에 200ul를 첨가하여 상온에서 2시간 동안 흔들면서 반응시켰다. 이러한 혼합물을 자석을 이용하여 분리한 후, 10mM PBS 완충액을 이용하여 3회 세척하였다.

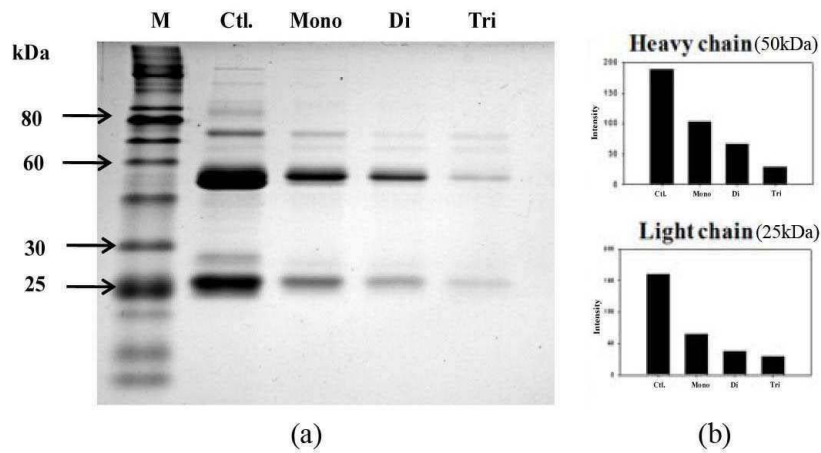


그림 78. Protein G monomer, dimer, trimer와 mouse IgG와의 결합 효율의 SDS-PAGE 결과

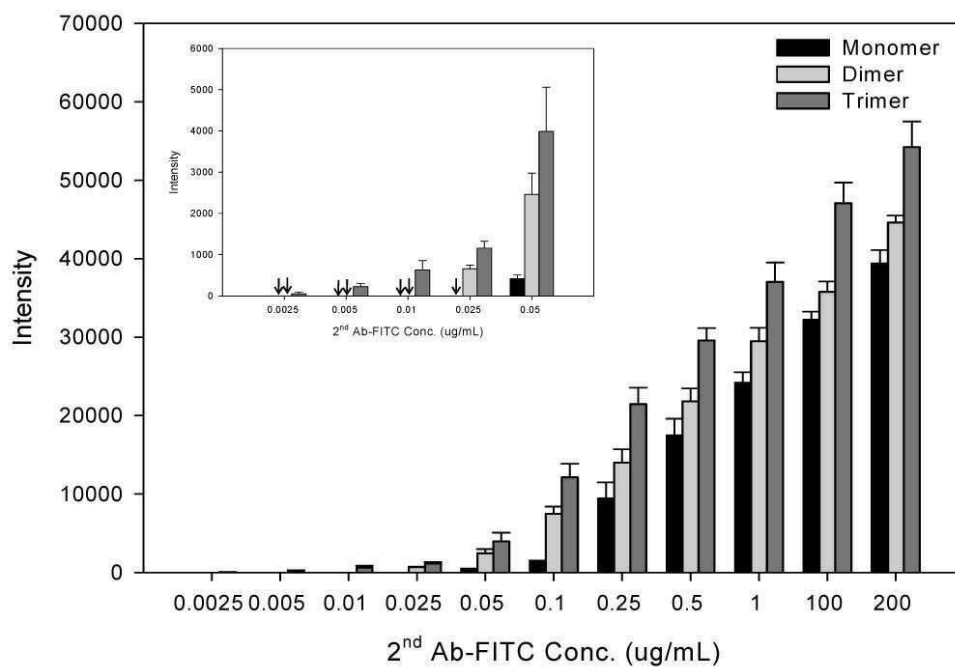


그림 79. 최적 조건에 의해 결합된 protein G multimer를 통해 결합된 mouse IgG와 결합한 anti-mouse FITC Ab 농도에 따른 형광값

4. 진단혈청의 표준화, 제형화 및 유통기한 검사

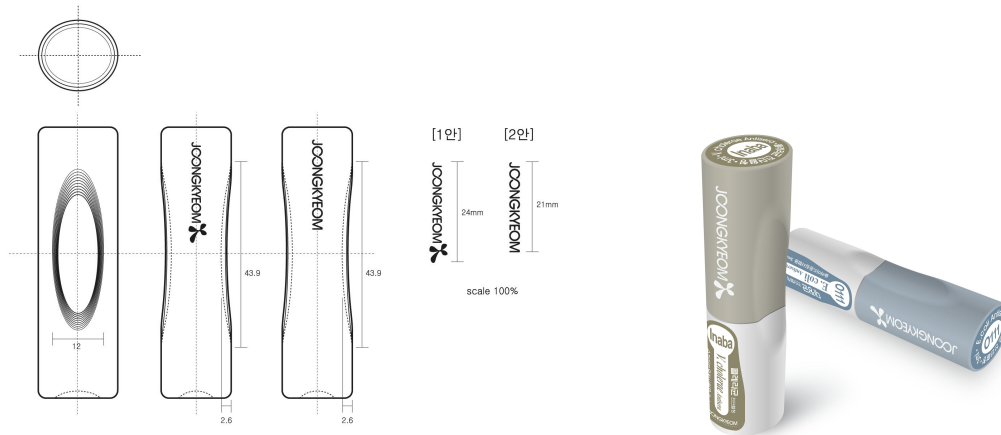


그림 80. 진단제제 용기 제형화를 위한 디자인

가. 살모넬라 혈청 진단제제의 표준화 및 제형화

살모넬라균 각 혈청형에 대한 다클론 항체의 평가 결과 혈청형 별 항원성 인자의 단독 발현 및 중첩으로 인해 다클론 항체에서의 항원성 인자별 항체구성이 일부 편중되는 현상이 관찰된 바 있다. 따라서 항체를 제작하는데 있어서 각기 항원성 인자별로 단클론 항체를 제작하여 이들의 최적의 조합을 찾는 것이 현장에서의 분리주 검출에 있어서 훨씬 효과적일 것으로 판단하였으며, 이에 따른 판단에 근거하여 다수의 단클론 항체를 제작하였다. 이들 다클론 항체와 단클론 항체의 조합을 통해 다양한 살모넬라균의 검출에 능동적으로 대처할 수 있는 각 혈청형별 최적의 조합을 구성하였고, 또한 이들 항체의 역가 표준화를 실시하였으며, 이를 제형화하였다.

이미 앞서 기술한 바와 같이, 살모넬라균의 혈청형은 serogroup A, B, C, D, E와 serotype Vi로 나뉘며, 이는 각기 균체 표면에 발현된 LPS (lipopolysaccharide)의 종류에 따른다. 이를 상세히 기술하면, serogroup A에 속한 살모넬라균은 항원인자 (antigenic factor) 1, 2, 12를 발현하고, serogroup B에 속한 살모넬라균은 항원인자 (antigenic factor) 1, 4, 5, 12, 27을 다양한 조합으로 발현하며, serogroup C에 속한 살모넬라균은 항원인자 (antigenic factor) 6, 7, 8, 14를 발현하고, serogroup D에 속한 살모넬라균은 항원인자 (antigenic factor) 9, 12를 발현하며, serogroup E에 속한 살모넬라균은 항원인자 (antigenic factor) 1, 3, 10, 15를 다양한 조합으로 발현한다. 또한 serotype Vi는 항원인자 (antigenic factor) Vi를 발현한다.

따라서 살모넬라균의 효과적인 검출을 위한 면역센서를 개발하기 위하여 필요한 단클론 항체를 제작하기 위해서는 상기와 같이 기술한 다양한 항원인자들에 대한 각각의 단클론 항체를 제작하여 이들의 적절한 조합을 통해 구현될 수 있다.

각 혈청형에 속한 균들 중 대표적인 균주를 선별하여 단클론 항체를 제작하기 위한

항원 제작에 활용하였으며, 이를 구체적으로 기술하면, 항원제작에 활용된 균주는 S-3 (serogroup B), S-40 (serogroup C), S-50 (serogroup C), C-2 (serogroup C), S-58 (serogroup D), S-Ty2 (serotype Vi), S-76 (serogroup E), S-84 (serogroup E), S-87 (serogroup E)이다. 다클론 항체를 제작하여 각 혈청그룹 혹은 혈청형에 대한 자가역가 및 교차역가를 평가해보면, 이미 예상되는 바와 같이 항원성 인자 (antigenic factor) 1의 경우 혈청형 A와 B에 공통적으로 존재하여 각기 특이적인 항혈청을 구성하기 위해서는 각 혈청에 대해 상대 균을 활용한 비특이응집소 제거과정 (비특이응집소 흡수과정)을 거쳐 슬라이드 응집반응을 통한 확인시 3분 이내에 비특이적 반응이 나타나지 않는 수준으로 비특이 응집소의 제거를 수행하여야 한다. 물론 모든 항원성 인자들을 포함한 항혈청을 활용하여 자성나노입자와 multi-protein G 복합체와의 반응을 통한 삼중복합체를 제작하여 이를 활용하여 검체에서 모든 살모넬라균이 흡착/검출될 수 있도록 한 후, 분리/동정된 균에 대한 확인을 위해 각 혈청형을 구분할 수 있는 항혈청을 활용하여 최종적으로 혈청형까지 확인하게 된다. 이러한 과정은 다른 혈청형의 살모넬라균들에서도 동일하며, 앞서 언급한 대로 예상할 수 있는 바와 같이 항원성 인자 12번의 경우 혈청형 A, B, D에 공통인자인 관계로 역시 상호간의 비특이응집소의 제거 및 흡수과정이 필수적이다.

(1) 살모넬라 poly 항혈청의 제작

전체적으로 자성나노입자와 결합할 항체성 인자가 다수이고, 각 균주에 있어 혈청형별로 존재하는 항원성 인자의 다양성으로 인해 다클론 항체를 혼합하여 제작할 경우 1번 항원성인자 혹은 12번 항원성 인자에 대한 항체의 역가가 지나치게 높아질 수 있는 요인이 존재하여 이를 활용하면, 항혈청의 표준화가 원천적으로 제한을 받게 된다고 판단하였다. 따라서 자성나노입자와 결합시킬 (즉, 삼중복합체의 제작에 활용될) 항체는 단클론 항체를 활용하는 것을 원칙으로 하여 각 항원성 인자에 특이적인 단클론 항체를 동일역가로 조합하여 제작하였다.

이는 비단 각 항원성 인자에 대한 동등한 역가의 항체 조합을 제작하는 데에만 목적을 둔 것이 아니라 ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay) 방법에서 활용되듯이 자성나노입자에 결합한 항체 (이를 1차항체라고 설정하면)와 효소가 결합한 detector (이를 2차항체라 설정) 항체의 유래 동물 species가 다를 경우 신속한 검출이 더욱 용이해지므로 아래와 같은 각 그룹별 다클론항체의 조합을 이용하면 향후 ELISA 혹은 형광을 이용한 보다 신속한 검출법의 개발 및 확립을 위해 매우 유용할 것이라는 판단도 작용하였다.

각 항원성 인자에 대해 특이적인 단클론 항체들 중 가장 반응성이 높은 것을 선택하여 동등하게 혼합하는 것이 바람직할 것으로 판단되었으며, 각 항원성 인자에 대한 다수의 단클론 항체들 중 가장 반응성이 높은 대표주를 골라 혼합하는 것이 가장 특

이도 높은 단클론 항체의 조합을 완성할 수 있었다.

표 38. 살모넬라 각 항원인자에 특이적인 대표적 단클론 항체 선별

항원인자	대표 단클론 항체 생산 세포주명
1	S-87-8B11
3	S-84-2F12
5	S-3-8C1
6	S-50-5H11
7	S-40-7F11
8	S-50-5G11
9	S-58-6F12
10	S-76-7D12
12	S-3-1A5
15	S-84-4G11
19	S-87-3H7
Vi	S-ty2-2A8

(2) 살모넬라 serogroup A 항혈청의 제작 및 표준화

혈청형 A를 투여하여 제작한 혈청을 동일한 항원성인자 1 및 12를 가지는 혈청형 B 균주를 활용하여 비특이 응집소를 제거한 후 제작하였으며 (이는 원칙일 뿐 아래 표의 결과와 같이 다른 혈청형의 균주와도 교차반응을 확인하여 교차반응이 나타나는 경우 모두 흡수과정을 거치는 과정을 수행하였다. 혈청형 A의 항혈청 뿐만 아니라 다른 여타 혈청형의 경우도 동일한 과정을 수행하여 항혈청을 제작하였다), 일련의 표준화 과정 (계획서에 기술)을 이용하여 아래와 같이 제작 Lot별 역가가 동등한 항혈청을 제작하였다 (기타 항혈청 동일).

표 39. Serogroup A 항혈청의 자가/교차역가 확인 및 흡수과정 결과

혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
A	S-1	2,12	4+	4+	4+	4+
A	A-1	1,2,12	4+	4+	4+	4+
A	A-2	1,2,12	4+	4+	4+	4+
A	A-3	1,2,12	4+	4+	4+	4+
A	A-4	1,2,12	4+	4+	4+	4+
B	S-3	4,5,12	3+	-	-	-
B	B-1	4,5,12	3+	-	-	-
B	B-2	1,4,5,12	4+	2+	-	-
B	B-3	1,4,5,12	4+	2+	-	-
B	B-4	1,4,5,12	4+	2+	-	-
B	B-5	1,4,5(w),12	4+	2+	-	-
B	B-6	1,4,5(w),12	4+	2+	-	-
B	B-7	1,4,12	4+	2+	-	-
B	B-8	1(w),4,5,12	4+	2+	-	-
B	B-9	1(w),4,5,12	4+	2+	-	-
B	B-10	1,4,12	4+	2+	-	-
B	B-11	1,4,5(W),12	4+	2+	-	-
B	B-12	1,4,5(W),12	4+	2+	-	-
B	B-13	1,4,12	4+	2+	-	-
B	B-14	4,12	2+	-	-	-
B	B-15	4,12	2+	-	-	-
B	B-16	1,4,5,12	4+	3+	2+	-
B	B-17	4,12	2+	-	-	-
B	B-18	4,12	2+	-	-	-
B	B-19	1,4,12,27	3+	1+	1+	-
B	B-20	4,5,12	2+	-	-	-
B	B-21	1,4,12	3+	1+	1+	-
B	B-22	4,5,12	2+	-	-	-
B	B-23	4,12	2+	-	-	-
B	B-24	4,12,27	2+	-	-	-
C	S-40	6,7	-	-	-	-
C	S-50	6(P),8	-	-	-	-
C	C-1	8	-	-	-	-
C	C-2	8	-	-	-	-
C	C-3	8	-	-	-	-
C	C-4	6,7	-	-	-	-
C	C-5	6,7	1+	1+	-	-
C	C-6	6,7	-	-	-	-
C	C-7	6,7	-	-	-	-
C	C-8	6,7	-	-	-	-
C	C-9	6,7	1+	1+	-	-
C	C-10	6,7	-	-	-	-
C	C-11	6,7	-	-	-	-
C	C-12	6,7	-	-	-	-
C	C-12	6,7	-	-	-	-

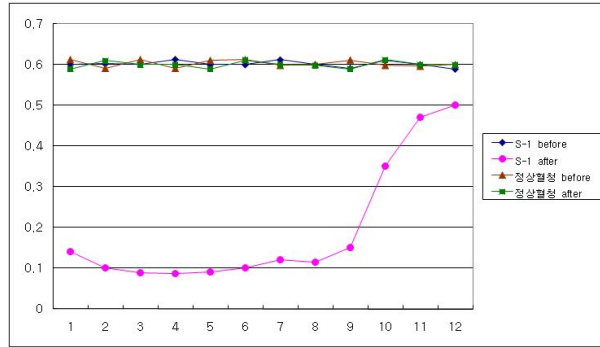
혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
C	S-40	6,7	-	-	-	-
C	S-50	6(P),8	-	-	-	-
C	C-1	8	-	-	-	-
C	C-2	8	-	-	-	-
C	C-3	8	-	-	-	-
C	C-4	6,7	-	-	-	-
C	C-5	6,7	1+	1+	-	-
C	C-6	6,7	-	-	-	-
C	C-7	6,7	-	-	-	-
C	C-8	6,7	-	-	-	-
C	C-9	6,7	1+	1+	-	-
C	C-10	6,7	-	-	-	-
C	C-11	6,7	-	-	-	-
C	C-12	6,7	-	-	-	-
C	C-12	6,7	-	-	-	-

혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
C	C-13	6,7	-	-	-	-
C	C-14	6,7	1+	1+	1+ (자가응집)	-
C	C-15	6,7,14(P,W)	-	-	-	-
C	C-16	6,7,14	-	-	-	-
C	C-17	6,7,14	-	-	-	-
C	C-18	6,7	-	-	-	-
C	C-19	6(P),8	-	-	-	-
C	C-20	6(P),8	-	-	-	-
C	C-21	6(P),8	-	-	-	-
C	C-22	6(P),8, 20(P)	-	-	-	-
D, Vi	S-57	9,12,Vi	3+	-	-	-
D	S-58	9,12	3+	-	-	-
Vi[D]	S-Ty2	Vi	-	-	-	-
D	D-1	9,12	4+	-	-	-

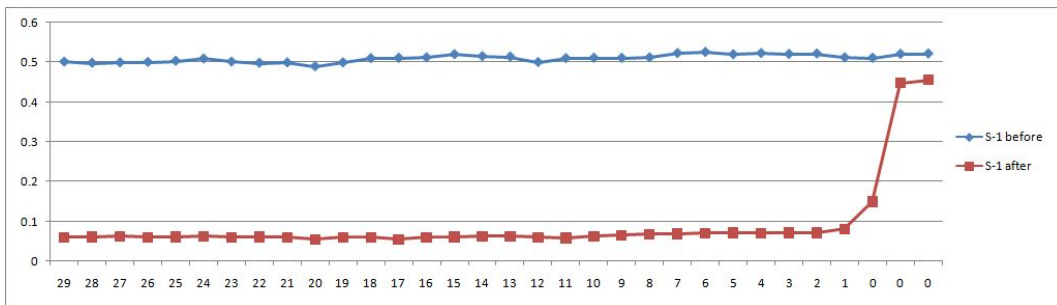
혈청형	군주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
D	D-2	1,9,12	4+	2+	1+	-
D	D-3	9,12	4+	-	-	-
D	D-4	9,12	4+	-	-	-
D	D-5	1,9,12	4+	2+	1+	-
D	D-6	9,12	3+	-	-	-
D	D-7	9,12	4+	-	-	-
D	D-8	9,12	3+	-	-	-
D	D-9	9,12	3+	-	-	-
D	D-10	9,12	3+	-	-	-
D	D-11	1(S),9(W),12	4+	2+	1+	-
D	D-12	9,12	3+	-	-	-
D	D-13	Vi	-	-	-	-
D	D-14	Vi	-	-	-	-
D	D-15	9,12	3+	-	-	-
D	D-16	9,12,Vi	3+	-	-	-
D	D-17	9,12,Vi	3+	-	-	-
D	D-18	9,12,Vi	3+	-	-	-
D	D-19	9,12,Vi	3+	-	-	-
D	D-20	9,12,Vi	3+	-	-	-
D	D-21	9,12,Vi	3+	-	-	-
D	D-22	9,12,Vi	3+	-	-	-
D	D-23	Vi	-	-	-	-
D	D-24	9,46(W)	2+	-	-	-
D	D-25	1(w,P),9,12(S)	4+	1+	-	-
D	D-26	9,12	2+	-	-	-

혈청형	군주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
E	S-76	3,10	3+	1+	-	-
E	S-84	3,15	-	-	-	-
E	S-87	1,3,19	3+	2+	-	-
E	E-1	1,3,19	3+	2+	-	-
E	E-2	1,3,19	3+	2+	-	-
E	E-3	3,10	3+	1+	-	-
E	E-4	3,10	2+	1+	-	-
E	E-5	3,10	2+	1+	-	-
E	E-6	3,10	3+	1+	-	-
E	E-7	3,10	2+	1+	-	-
E	E-8	3,10	2+	1+	-	-
E	E-9	3,10	2+	1+	-	-

w: weak reaction, p: potent reaction



1차 test tube 침전 반응 결과



2차 test tube 침전 반응 결과

희석분획		20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
30sec	개시	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	12"	15"	20"	25"	30"
	도달	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (5")	4+ (8")	4+ (10")	4+ (13")	4+ (17")	4+ (20")	4+ (25")	3+	2+	2+w	2+w	1+w	1+w	1+ww	1+ww
1min	개시	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	12"	15"	20"	25"	30"
	도달	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+w	3+	2+s	2+	1+	1+	1+w	1+ww

* 유색 block : 최종 표준혈청가를 가지는 희석 분획
희석분획별 슬라이드 응집반응시험 결과

그림 81. serogroup A의 표준화 결과

(3) 살모넬라 serogroup B 항혈청의 제작 및 표준화

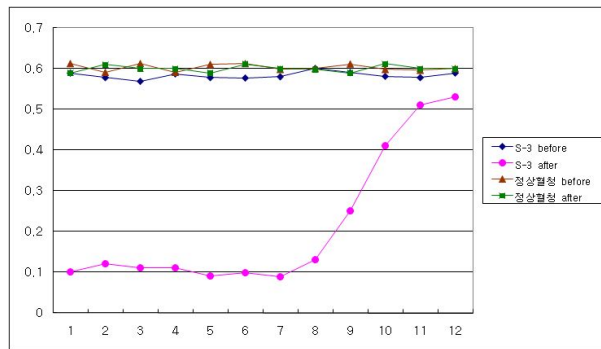
표 40. Serogroup B 항혈청의 자가/교차역가 확인 및 흡수과정 결과

혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
A	S-1	2,12	1+	1+	-	-
A	A-1	1,2,12	3+	2+	-	-
A	A-2	1,2,12	2+	1+	-	-
A	A-3	1,2,12	1+	1+	-	-
A	A-4	1,2,12	-	-	-	-
B	S-3	4,5,12	4+	4+	4+	4+
B	B-1	4,5,12	4+	4+	4+	4+
B	B-2	1,4,5,12	4+	4+	4+	4+
B	B-3	1,4,5,12	4+	4+	4+	4+
B	B-4	1,4,5,12	4+	4+	4+	4+
B	B-5	1,4,5(w),12	4+	4+	4+	4+
B	B-6	1,4,5(w),12	4+	4+	4+	4+
B	B-7	1,4,12	4+	4+	4+	4+
B	B-8	1(w),4,5,12	4+	4+	4+	4+
B	B-9	1(w),4,5,12	4+	4+	4+	4+
B	B-10	1,4,12	4+	4+	4+	4+
B	B-11	1,4,5(W),12	4+	4+	4+	4+
B	B-12	1,4,5(W),12	4+	4+	4+	4+
B	B-13	1,4,12	4+	4+	4+	4+
B	B-14	4,12	4+	4+	4+	4+
B	B-15	4,12	4+	4+	4+	4+
B	B-16	1,4,5,12	4+	4+	4+	4+
B	B-17	4,12	4+	4+	4+	4+
B	B-18	4,12	4+	4+	4+	4+
B	B-19	1,4,12,27	4+	4+	4+	4+
B	B-20	4,5,12	4+	4+	4+	4+
B	B-21	1,4,12	4+	4+	4+	4+
B	B-22	4,5,12	4+	4+	4+	4+
B	B-23	4,12	4+	4+	4+	4+
B	B-24	4,12,27	4+	4+	4+	4+
C	S-40	6,7	2+	-	-	-
C	S-50	6(P),8	4+	4+	2+	-
C	C-1	8	4+	4+	2+	-
C	C-2	8	4+	4+	2+	-
C	C-3	8	4+	4+	2+	-
C	C-4	6,7	-	-	-	-
C	C-5	6,7	-	-	-	-

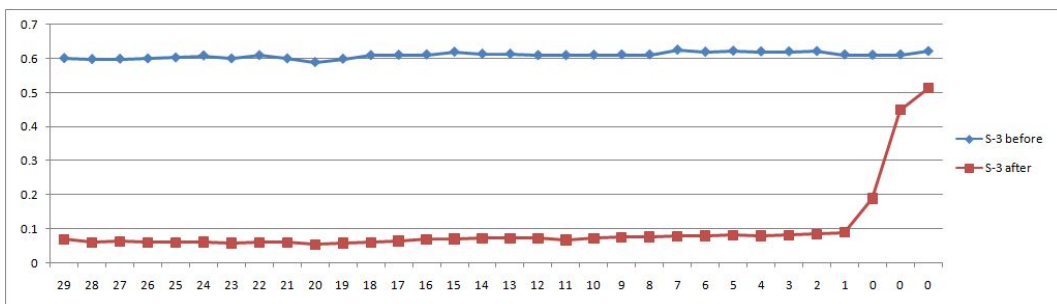
혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
C	C-6	6,7	-	-	-	-
C	C-7	6,7	1+	-	-	-
C	C-8	6,7	1+	-	-	-
C	C-9	6,7	-	-	-	-
C	C-10	6,7	1+	-	-	-
C	C-11	6,7	-	-	-	-
C	C-12	6,7	1+	-	-	-
C	C-13	6,7	1+	-	-	-
C	C-14	6,7	-	-	-	-
C	C-15	6,7,14(P,W)	2+	-	-	-
C	C-16	6,7,14	1+	-	-	-
C	C-17	6,7,14	1+	-	-	-
C	C-18	6,7	-	-	-	-
C	C-19	6(P),8	4+	4+	2+	-
C	C-20	6(P),8	4+	4+	2+	-
C	C-21	6(P),8	4+	4+	2+	-
C	C-22	6(P),8, 20(P)	4+	4+	2+	-
D, Vi	S-57	9,12,Vi	1+	1+	-	-
D	S-58	9,12	4+	3+	1+	-
Vi[D]	S-Ty2	Vi	1+	1+	-	-
D	D-1	9,12	-	-	-	-
D	D-2	1,9,12	-	-	-	-
D	D-3	9,12	-	-	-	-
D	D-4	9,12	-	-	-	-
D	D-5	1,9,12	1+	-	-	-
D	D-6	9,12	1+	-	-	-
D	D-7	9,12	2+	-	-	-
D	D-8	9,12	-	-	-	-
D	D-9	9,12	-	-	-	-
D	D-10	9,12	-	-	-	-
D	D-11	1(S),9(W),12	-	-	-	-
D	D-12	9,12	-	-	-	-
D	D-13	Vi	1+	-	-	-
D	D-14	Vi	4+	2+	-	-
D	D-15	9,12	1+	-	-	-
D	D-16	9,12,Vi	4+	2+	-	-
D	D-17	9,12,Vi	4+	2+	-	-
D	D-18	9,12,Vi	1+	-	-	-
D	D-19	9,12,Vi	4+	2+	-	-
D	D-20	9,12,Vi	1+	-	-	-
D	D-21	9,12,Vi	1+	-	-	-
D	D-22	9,12,Vi	1+	-	-	-

혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
D	D-23	Vi	1+	-	-	-
D	D-24	9,46(W)	-	-	-	-
D	D-25	1(w,P),9,12(S)	1+	-	-	-
D	D-26	9,12	1+	-	-	-
E	S-76	3,10	-	-	-	-
E	S-84	3,15	-	-	-	-
E	S-87	1,3,19	-	-	-	-
E	E-1	1,3,19	-	-	-	-
E	E-2	1,3,19	-	-	-	-
E	E-3	3,10	-	-	-	-
E	E-4	3,10	-	-	-	-
E	E-5	3,10	-	-	-	-
E	E-6	3,10	-	-	-	-
E	E-7	3,10	-	-	-	-
E	E-8	3,10	-	-	-	-
E	E-9	3,10	-	-	-	-

w: weak reaction, p: potent reaction



1차 test tube 침전 반응 결과



2차 test tube 침전 반응 결과

회석분획		20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
30sec	개시	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	12"	15"	20"	25"	30"
	도달	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (5")	4+ (8")	4+ (10")	4+ (12")	4+ (17")	4+ (20")	4+ (25")	3+	2+	2+w	2+w	1+w	1+w	1+ww	1+ww
1min	개시	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	12"	15"	20"	25"	30"
	도달	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+w	3+	2+s	2+	1+	1+	1+w	1+ww

* 유색 block : 최종 표준혈청가를 가지는 희석 분획
 희석분획별 슬라이드 응집반응시험 결과

그림 82. serogroup B의 표준화 결과

(4) 살모넬라 serogroup C 항혈청의 제작 및 표준화

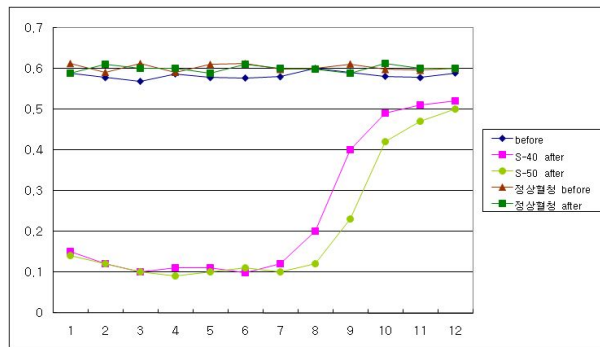
표 41. Serogroup C 항혈청의 자가/교차역가 확인 및 흡수과정 결과

혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
A	S-1	2,12	1+	-	-	-
A	A-1	1,2,12	1+	-	-	-
A	A-2	1,2,12	1+	-	-	-
A	A-3	1,2,12	1+	-	-	-
A	A-4	1,2,12	-	-	-	-
B	S-3	4,5,12	3+	2+	1	-
B	B-1	4,5,12	2+	2+	-	-
B	B-2	1,4,5,12	-	-	-	-
B	B-3	1,4,5,12	2+	2+	-	-
B	B-4	1,4,5,12	2+	2+	-	-
B	B-5	1,4,5(w),12	-	-	-	-
B	B-6	1,4,5(w),12	-	-	-	-
B	B-7	1,4,12	-	-	-	-
B	B-8	1(w),4,5,12	2+	2+	-	-
B	B-9	1(w),4,5,12	-	-	-	-
B	B-10	1,4,12	-	-	-	-
B	B-11	1,4,5(W),12	-	-	-	-
B	B-12	1,4,5(W),12	-	-	-	-
B	B-13	1,4,12	-	-	-	-
B	B-14	4,12	2+	2+	-	-
B	B-15	4,12	2+	2+	-	-
B	B-16	1,4,5,12	3+	3+	1	-
B	B-17	4,12	-	-	-	-
B	B-18	4,12	2+	2+	-	-
B	B-19	1,4,12,27	-	-	-	-
B	B-20	4,5,12	-	-	-	-
B	B-21	1,4,12	-	-	-	-
B	B-22	4,5,12	1+	1+	1+ (자가응집)	-
B	B-23	4,12	-	-	-	-
B	B-24	4,12,27	-	-	-	-

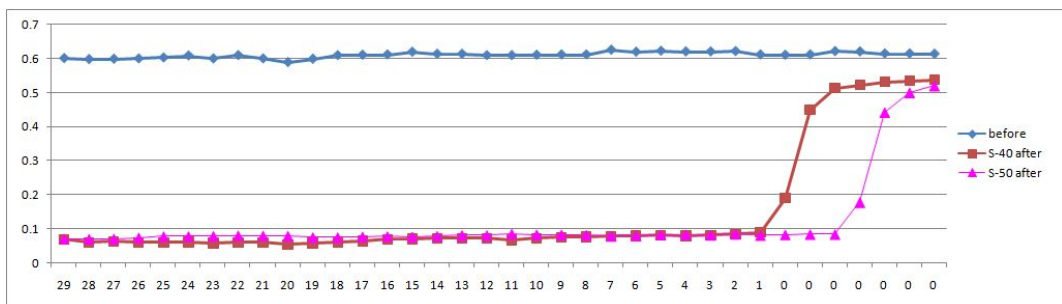
혈청형	군주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
C	S-40	6,7	4+	4+	4+	4+
C	S-50	6(P),8	4+	4+	4+	4+
C	C-1	8	4+	4+	4+	4+
C	C-2	8	4+	4+	4+	4+
C	C-3	8	4+	4+	4+	4+
C	C-4	6,7	4+	4+	4+	4+
C	C-5	6,7	4+	4+	4+	4+
C	C-6	6,7	4+	4+	4+	4+
C	C-7	6,7	4+	4+	4+	4+
C	C-8	6,7	4+	4+	4+	4+
C	C-9	6,7	4+	4+	4+	4+
C	C-10	6,7	4+	4+	4+	4+
C	C-11	6,7	4+	4+	4+	4+
C	C-12	6,7	4+	4+	4+	4+
C	C-13	6,7	4+	4+	4+	4+
C	C-14	6,7	4+	4+	4+	4+
C	C-15	6,7,14(P,W)	4+	4+	4+	4+
C	C-16	6,7,14	4+	4+	4+	4+
C	C-17	6,7,14	4+	4+	4+	4+
C	C-18	6,7	4+	4+	4+	4+
C	C-19	6(P),8	4+	4+	4+	4+
C	C-20	6(P),8	4+	4+	4+	4+
C	C-21	6(P),8	4+	4+	4+	4+
C	C-22	6(P),8, 20(P)	4+	4+	4+	4+
D, Vi	S-57	9,12,Vi	2+	-	-	-
D	S-58	9,12	-	-	-	-
Vi[D]	S-Ty2	Vi	-	-	-	-
D	D-1	9,12	-	-	-	-
D	D-2	1,9,12	2+	-	-	-
D	D-3	9,12	-	-	-	-
D	D-4	9,12	-	-	-	-
D	D-5	1,9,12	2+	-	-	-
D	D-6	9,12	-	-	-	-
D	D-7	9,12	-	-	-	-
D	D-8	9,12	-	-	-	-
D	D-9	9,12	-	-	-	-
D	D-10	9,12	-	-	-	-
D	D-11	1(S),9(W),12	-	-	-	-
D	D-12	9,12	2+	-	-	-
D	D-13	Vi	-	-	-	-
D	D-14	Vi	-	-	-	-
D	D-15	9,12	-	-	-	-
D	D-16	9,12,Vi	-	-	-	-
D	D-17	9,12,Vi	-	-	-	-
D	D-18	9,12,Vi	-	-	-	-
D	D-19	9,12,Vi	-	-	-	-
D	D-20	9,12,Vi	-	-	-	-
D	D-21	9,12,Vi	-	-	-	-
D	D-22	9,12,Vi	-	-	-	-

혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
D	D-23	Vi	-	-	-	-
D	D-24	9,46(W)	-	-	-	-
D	D-25	1(w,P),9,12(S)	1+	-	-	-
D	D-26	9,12	1+	-	-	-
E	S-76	3,10	-	-	-	-
E	S-84	3,15	-	-	-	-
E	S-87	1,3,19	1+	-	-	-
E	E-1	1,3,19	1+	-	-	-
E	E-2	1,3,19	-	-	-	-
E	E-3	3,10	1+	-	-	-
E	E-4	3,10	1+	-	-	-
E	E-5	3,10	1+	-	-	-
E	E-6	3,10	1+	-	-	-
E	E-7	3,10	1+	-	-	-
E	E-8	3,10	-	-	-	-
E	E-9	3,10	1+	-	-	-

w: weak reaction, p: potent reaction



1차 test tube 침전 반응 결과



2차 test tube 침전 반응 결과

희석분획		20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
30sec	개시	S-40	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	12"	15"	20"	25"	30"
		S-50	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	13"	15"
	도달	S-40	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (5")	4+ (8")	4+ (10")	4+ (12")	4+ (17")	4+ (20")	4+ (25")	3+	2+	2+w	2+w	1+w	1+w	1+ww	1+ww
		S-50	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (5")	4+ (8")	4+ (10")	4+ (12")	4+ (17")	4+ (20")	4+ (25")	3+	2+	2+w	2+w	1+w
1min	개시	S-40	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	12"	15"	20"	25"	30"
		S-50	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	9"	12"	15"
	도달	S-40	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+w	3+	2+s	2+	1+	1+	1+w	1+ww
		S-50	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+w	4+w	3+w	2+s	2+	1+

* 유색 block : 최종 표준혈청가를 가지는 희석 분획
희석분획별 슬라이드 응집반응시험 결과

그림 83. Serogroup C의 표준화 결과

(5) 살모넬라 serogroup D 항혈청의 제작 및 표준화

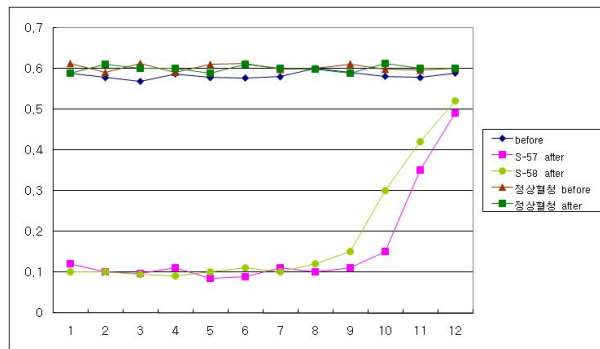
표 42. Serogroup D 항혈청의 자가/교차역가 확인 및 흡수과정 결과

혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
A	S-1	2,12	2+	1+	-	-
A	A-1	1,2,12	2+	1+	-	-
A	A-2	1,2,12	1+	1+	-	-
A	A-3	1,2,12	1+	1+	-	-
A	A-4	1,2,12	1+	1+	-	-
B	S-3	4,5,12	-	-	-	-
B	B-1	4,5,12	1+	-	-	-
B	B-2	1,4,5,12	1+	1+	-	-
B	B-3	1,4,5,12	1+	1+	-	-
B	B-4	1,4,5,12	-	-	-	-
B	B-5	1,4,5(w),12	2+	1+	-	-
B	B-6	1,4,5(w),12	2+	1+	-	-
B	B-7	1,4,12	2+	-	-	-
B	B-8	1(w),4,5,12	1+	1+	-	-
B	B-9	1(w),4,5,12	-	1+	-	-
B	B-10	1,4,12	2+	1+	-	-
B	B-11	1,4,5(W),12	1+	1+	-	-
B	B-12	1,4,5(W),12	2+	1+	-	-
B	B-13	1,4,12	2+	1+	-	-
B	B-14	4,12	2+	1+	-	-
B	B-15	4,12	2+	1+	-	-
B	B-16	1,4,5,12	3+	1+	-	-
B	B-17	4,12	2+	1+	-	-
B	B-18	4,12	3+	1+	-	-
B	B-19	1,4,12,27	2+	-	-	-
B	B-20	4,5,12	3+	1+	-	-

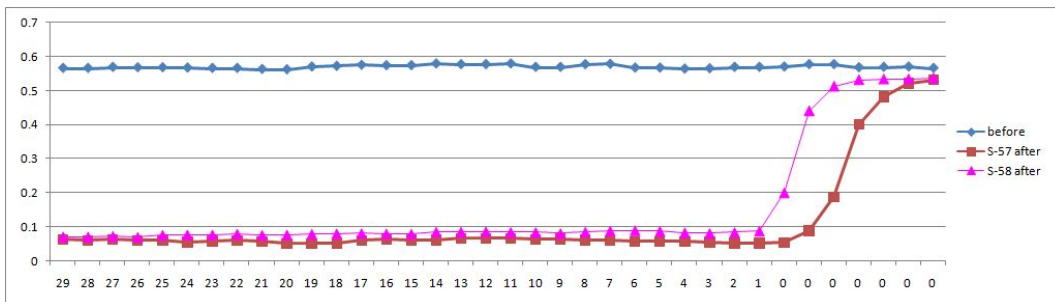
혈청형	군주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
B	B-20	4,5,12	3+	1+	-	-
B	B-21	1,4,12	-	-	-	-
B	B-22	4,5,12	1+	1+	-	-
B	B-23	4,12	2+	-	-	-
B	B-24	4,12,27	-	-	-	-
C	S-40	6,7	1+	-	-	-
C	S-50	6(P),8	-	-	-	-
C	C-1	8	-	-	-	-
C	C-2	8	-	-	-	-
C	C-3	8	2+	2+	-	-
C	C-4	6,7	1+	1+	-	-
C	C-5	6,7	2+	2+	-	-
C	C-6	6,7	2+	2+	1+	-
C	C-7	6,7	-	-	-	-
C	C-8	6,7	3+	2+	1+	-
C	C-9	6,7	-	-	-	-
C	C-10	6,7	3+	3+	1+	-
C	C-11	6,7	3+	2+	1+	-
C	C-12	6,7	2+	2+	-	-
C	C-13	6,7	1+	1+	-	-
C	C-14	6,7	2+	2+	1+ (자가응집)	-
C	C-15	6,7,14(P,W)	-	-	-	-
C	C-16	6,7,14	-	-	-	-
C	C-17	6,7,14	-	-	-	-
C	C-18	6,7	-	-	-	-
C	C-19	6(P),8	-	-	-	-
C	C-20	6(P),8	1+	-	-	-
C	C-21	6(P),8	-	-	-	-
C	C-22	6(P),8, 20(P)	1+	-	-	-
D, Vi	S-57	9,12,Vi	4+	4+	4+	4+
D	S-58	9,12	4+	4+	4+	4+
Vi[D]	S-Ty2	Vi	-	-	-	-
D	D-1	9,12	4+	4+	4+	4+
D	D-2	1,9,12	4+	4+	4+	4+
D	D-3	9,12	4+	4+	4+	4+
D	D-4	9,12	4+	4+	4+	4+
D	D-5	1,9,12	4+	4+	4+	4+
D	D-6	9,12	4+	4+	4+	4+
D	D-7	9,12	4+	4+	4+	4+
D	D-8	9,12	4+	4+	4+	4+
D	D-9	9,12	4+	4+	4+	4+
D	D-10	9,12	4+	4+	4+	4+
D	D-11	1(S),9(W),12	4+	4+	4+	4+
D	D-12	9,12	4+	4+	4+	4+
D	D-13	Vi	-	-	-	-
D	D-14	Vi	-	-	-	-
D	D-15	9,12	4+	4+	4+	4+
D	D-16	9,12,Vi	4+	4+	4+	4+
D	D-17	9,12,Vi	4+	4+	4+	4+

혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	3차 흡수
D	D-18	9,12,Vi	4+	4+	4+	4+
D	D-19	9,12,Vi	4+	4+	4+	4+
D	D-20	9,12,Vi	4+	4+	4+	4+
D	D-21	9,12,Vi	4+	4+	4+	4+
D	D-22	9,12,Vi	4+	4+	4+	4+
D	D-23	Vi	-	-	-	-
D	D-24	9,46(W)	4+	4+	4+	4+
D	D-25	1(w,P),9,12(S)	4+	4+	4+	4+
D	D-26	9,12	4+	4+	4+	4+
E	S-76	3,10	-	-	-	-
E	S-84	3,15	-	-	-	-
E	S-87	1,3,19	2+	1+	-	-
E	E-1	1,3,19	1+	-	-	-
E	E-2	1,3,19	2+	1+	-	-
E	E-3	3,10	1+	1+	-	-
E	E-4	3,10	-	-	-	-
E	E-5	3,10	-	-	-	-
E	E-6	3,10	-	-	-	-
E	E-7	3,10	-	-	-	-
E	E-8	3,10	-	-	-	-
E	E-9	3,10	-	-	-	-

w: weak reaction, p: potent reaction



1차 test tube 침전 반응 결과



2차 test tube 침전 반응 결과

희석분획			20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
30sec	개시	S-40	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	12"	15"	20"	25"	30"
		S-50	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	13"	15"	21"	27"
	도달	S-40	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (5")	4+ (8")	4+ (10")	4+ (12")	4+ (17")	4+ (20")	4+ (25")	3+	2+	2+w	2+w	1+w	1+w	1+ww	1+ww
		S-50	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (5")	4+ (8")	4+ (10")	4+ (12")	4+ (17")	4+ (20")	4+ (25")	3+	2+	2+w	2+w	1+w	1+w	1+ww	1+ww
1min	개시	S-40	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	12"	15"	20"	25"	30"
		S-50	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	9"	12"	17"	22"	28"
	도달	S-40	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+w	3+	2+ _s	2+	1+	1+	1+w	1+ww
		S-50	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+w	4+w	3+w	2+ _s	2+	1+	1+	1+

* 유색 block : 최종 표준혈청가를 가지는 희석 분획
희석분획별 슬라이드 응집반응시험 결과

그림 84. Serogroup D의 표준화 결과

(6) 살모넬라 serogroup E 항혈청의 제작 및 표준화

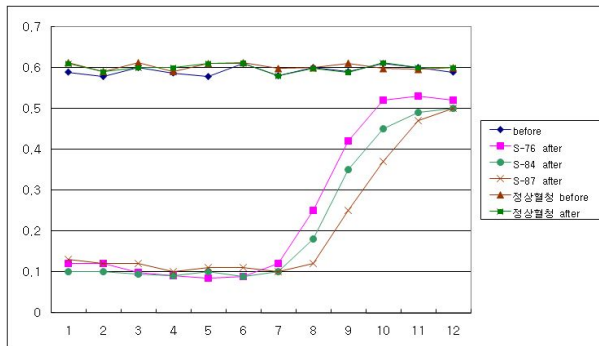
표 43. Serogroup E 항혈청의 자가/교차역가 확인 및 흡수과정 결과

혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수
A	S-1	2,12	-	-	-
A	A-1	1,2,12	1+	1+ (자가응집)	-
A	A-2	1,2,12	2+	2+	-
A	A-3	1,2,12	1+	1+	-
A	A-4	1,2,12	1+	1+	-
B	S-3	4,5,12	-	-	-
B	B-1	4,5,12	-	-	-
B	B-2	1,4,5,12	1+	-	-
B	B-3	1,4,5,12	1+	-	-
B	B-4	1,4,5,12	1+	-	-
B	B-5	1,4,5(w),12	-	-	-
B	B-6	1,4,5(w),12	-	-	-
B	B-7	1,4,12	-	-	-
B	B-8	1(w),4,5,12	-	-	-
B	B-9	1(w),4,5,12	-	-	-
B	B-10	1,4,12	-	-	-
B	B-11	1,4,5(W),12	1+	1+	-
B	B-12	1,4,5(W),12	1+	-	-
B	B-13	1,4,12	-	-	-
B	B-14	4,12	-	-	-
B	B-15	4,12	-	-	-

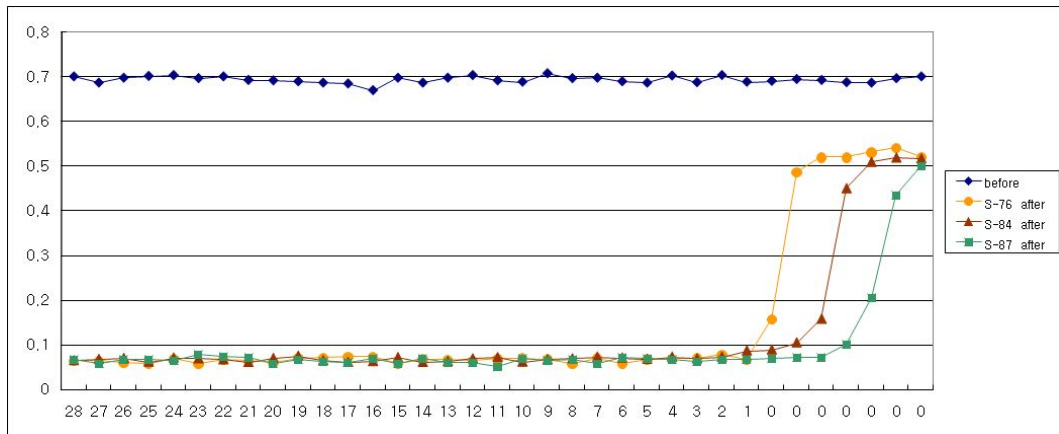
혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수
B	B-16	1,4,5,12	1+	1+	-
B	B-17	4,12	-	-	-
B	B-18	4,12	-	-	-
B	B-19	1,4,12,27	1+	1+	-
B	B-20	4,5,12	-	-	-
B	B-21	1,4,12	-	-	-
B	B-22	4,5,12	-	-	-
B	B-23	4,12	-	-	-
B	B-24	4,12,27	-	-	-
C	S-40	6,7	1	-	-
C	S-50	6(P),8	1	-	-
C	C-1	8	1	-	-
C	C-2	8	1	-	-
C	C-3	8	1	-	-
C	C-4	6,7	1	-	-
C	C-5	6,7	1	-	-
C	C-6	6,7	1+	-	-
C	C-7	6,7	1+	-	-
C	C-8	6,7	1+	-	-
C	C-9	6,7	1+	-	-
C	C-10	6,7	1+	-	-
C	C-11	6,7	1+	-	-
C	C-12	6,7	1+	-	-
C	C-13	6,7	1+	-	-
C	C-14	6,7	1+	1+ (자가응집)	-
C	C-15	6,7,14(P,W)	1+	-	-
C	C-16	6,7,14	1+	-	-
C	C-17	6,7,14	1+	-	-
C	C-18	6,7	1+	-	-
C	C-19	6(P),8	1+	-	-
C	C-20	6(P),8	1+	-	-
C	C-21	6(P),8	1+	-	-
C	C-22	6(P),8, 20(P)	1+	-	-
D, Vi	S-57	9,12,Vi	-	-	-
D	S-58	9,12	-	-	-
Vi[D]	S-Ty2	Vi	-	-	-
D	D-1	9,12	-	-	-
D	D-2	1,9,12	-	-	-
D	D-3	9,12	-	-	-
D	D-4	9,12	-	-	-
D	D-5	1,9,12	-	-	-
D	D-6	9,12	-	-	-
D	D-7	9,12	-	-	-
D	D-8	9,12	-	-	-
D	D-9	9,12	-	-	-
D	D-10	9,12	-	-	-

혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수
D	D-11	1(S),9(W),12	-	-	-
D	D-12	9,12	-	-	-
D	D-13	Vi	-	-	-
D	D-14	Vi	-	-	-
D	D-15	9,12	-	-	-
D	D-16	9,12,Vi	-	-	-
D	D-17	9,12,Vi	-	-	-
D	D-18	9,12,Vi	-	-	-
D	D-19	9,12,Vi	-	-	-
D	D-20	9,12,Vi	-	-	-
D	D-21	9,12,Vi	-	-	-
D	D-22	9,12,Vi	-	-	-
D	D-23	Vi	-	-	-
D	D-24	9,46(W)	-	-	-
D	D-25	1(w,P),9,12(S)	-	-	-
D	D-26	9,12	-	-	-
E	S-76	3,10	4+	4+	4+
E	S-84	3,15	4+	4+	4+
E	S-87	1,3,19	4+	4+	4+
E	E-1	1,3,19	4+	4+	4+
E	E-2	1,3,19	4+	4+	4+
E	E-3	3,10	4+	4+	4+
E	E-4	3,10	4+	4+	4+
E	E-5	3,10	4+	4+	4+
E	E-6	3,10	4+	4+	4+
E	E-7	3,10	4+	4+	4+
E	E-8	3,10	4+	4+	4+
E	E-9	3,10	4+	4+	4+

w: weak reaction, p: potent reaction



1차 test tube 침전 반응 결과



2차 test tube 침전 반응 결과

회석분획			20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
30sec	개시	S-76	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	12"	15"	20"	25"	30"
		S-84	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	13"	15"	21"	27"
		S-87	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	13"	15"
	도달	S-76	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (5")	4+ (8")	4+ (10")	4+ (12")	4+ (17")	4+ (20")	4+ (25")	3+	2+	2+w	2+w	1+w	1+w	1+ww	1+ww
		S-84	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (5")	4+ (8")	4+ (10")	4+ (12")	4+ (17")	4+ (20")	4+ (25")	3+	2+	2+w	2+w	2+w	1+w	1+w	1+ww
		S-87	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (5")	4+ (8")	4+ (10")	4+ (12")	4+ (17")	4+ (20")	4+ (25")	3+	2+	2+w	2+w	1+w
1min	개시	S-76	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	10"	12"	15"	20"	25"	30"
		S-84	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	9"	12"	17"	22"	28"
		S-87	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	1"	2"	2"	3"	3"	4"	6"	7"	7"	9"	12"	15"
	도달	S-76	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+w	3+	2+s	2+	1+	1+	1+w	1+ww
		S-84	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+w	3+w	2+s	2+	1+	1+	1+w
		S-87	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+w	3+w	2+s	2+	1+	

* 유색 block : 최종 표준혈청가를 가지는 회석 분획
회석분획별 슬라이드 응집반응시험 결과

그림 85. Serogroup E의 표준화 결과

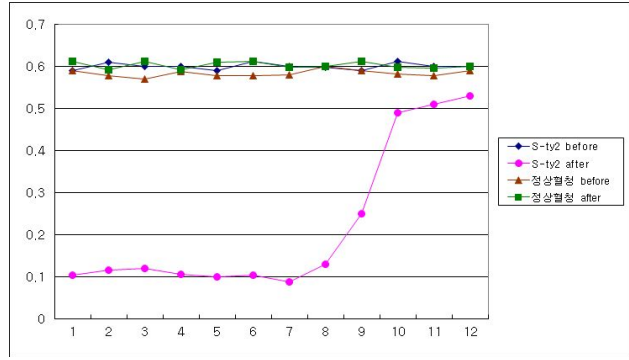
(7) 살모넬라 serotype Vi 항혈청의 제작

표 44. Serogroup Vi 항혈청의 자가/교차역가 확인 및 흡수과정 결과

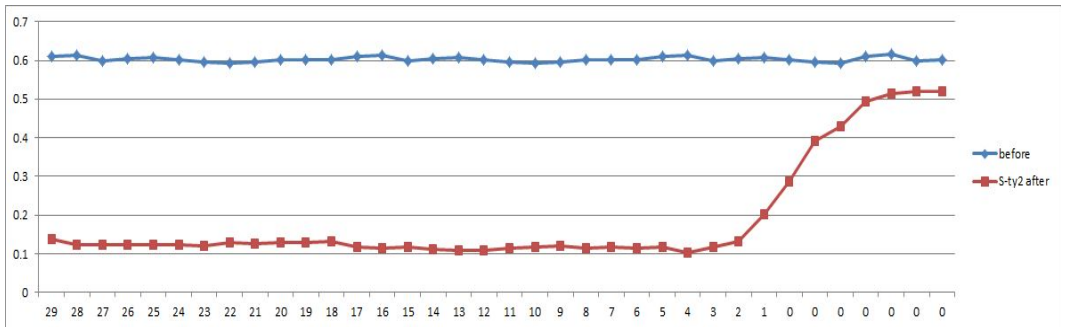
혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수
A	S-1	2,12	-	-	-
A	A-1	1,2,12	-	-	-
A	A-2	1,2,12	-	-	-
A	A-3	1,2,12	-	-	-
A	A-4	1,2,12	-	-	-
B	S-3	4,5,12	-	-	-
B	B-1	4,5,12	-	-	-
B	B-2	1,4,5,12	-	-	-
B	B-3	1,4,5,12	-	-	-
B	B-4	1,4,5,12	-	-	-
B	B-5	1,4,5(w),12	-	-	-
B	B-6	1,4,5(w),12	-	-	-
B	B-7	1,4,12	-	-	-
B	B-8	1(w),4,5,12	-	-	-
B	B-9	1(w),4,5,12	-	-	-
B	B-10	1,4,12	-	-	-
B	B-11	1,4,5(W),12	-	-	-
B	B-12	1,4,5(W),12	-	-	-
B	B-13	1,4,12	-	-	-
B	B-14	4,12	-	-	-
B	B-15	4,12	-	-	-
B	B-16	1,4,5,12	-	-	-
B	B-17	4,12	-	-	-
B	B-18	4,12	-	-	-
B	B-19	1,4,12,27	2+	1+	-
B	B-20	4,5,12	2+	-	-
B	B-21	1,4,12	-	-	-
B	B-22	4,5,12	-	-	-
B	B-23	4,12	-	-	-
B	B-24	4,12,27	-	-	-
C	S-40	6,7	-	-	-
C	S-50	6(P),8	-	-	-
C	C-1	8	-	-	-
C	C-2	8	-	-	-
C	C-3	8	-	-	-
C	C-4	6,7	-	-	-
C	C-5	6,7	-	-	-
C	C-6	6,7	-	-	-
C	C-7	6,7	-	-	-
C	C-8	6,7	-	-	-
C	C-9	6,7	-	-	-
C	C-10	6,7	-	-	-
C	C-11	6,7	-	-	-
C	C-12	6,7	3+	1+	-
C	C-13	6,7	-	-	-
C	C-14	6,7	-	-	-
C	C-15	6,7,14(P,W)	-	-	-

혈청형	균주구분	항원형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수
C	C-16	6,7,14	-	-	-
C	C-17	6,7,14	-	-	-
C	C-18	6,7	-	-	-
C	C-18	6,7	-	-	-
C	C-19	6(P),8	-	-	-
C	C-20	6(P),8	-	-	-
C	C-21	6(P),8	-	-	-
C	C-22	6(P),8, 20(P)	-	-	-
D	S-58	9,12	-	-	-
Vi[D]	S-Ty2	Vi	4+	4+	4+
D	D-1	9,12	-	-	-
D	D-2	1,9,12	2+	-	-
D	D-3	9,12	-	-	-
D	D-4	9,12	-	-	-
D	D-5	1,9,12	4+	1+	-
D	D-6	9,12	-	-	-
D	D-7	9,12	-	-	-
D	D-8	9,12	-	-	-
D	D-9	9,12	-	-	-
D	D-10	9,12	-	-	-
D	D-11	1(S),9(W),12	-	-	-
D	D-12	9,12	-	-	-
D	D-13	Vi	4+	4+	4+
D	D-14	Vi	4+	4+	4+
D	D-15	9,12	-	-	-
D	D-16	9,12,Vi	-	-	-
D	D-17	9,12,Vi	-	-	-
D	D-18	9,12,Vi	-	-	-
D	D-19	9,12,Vi	-	-	-
D	D-20	9,12,Vi	-	-	-
D	D-21	9,12,Vi	-	-	-
D	D-22	9,12,Vi	-	-	-
D	D-23	Vi	4+	4+	4+
D	D-24	9,46(W)	-	-	-
D	D-25	1(w,P),9,12(S)	-	-	-
D	D-26	9,12	-	-	-
E	S-76	3,10	-	-	-
E	S-84	3,15	-	-	-
E	S-87	1,3,19	-	-	-
E	E-1	1,3,19	-	-	-
E	E-2	1,3,19	-	-	-
E	E-3	3,10	-	-	-
E	E-4	3,10	-	-	-
E	E-5	3,10	-	-	-
E	E-6	3,10	-	-	-
E	E-7	3,10	-	-	-
E	E-8	3,10	-	-	-
E	E-9	3,10	-	-	-

w: weak reaction, p: potent reaction



1차 test tube 침전 반응 결과



2차 test tube 침전 반응 결과

희석분획		20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
30sec	개시	1"	1"	1"	1"	2"	2"	2"	2"	3"	3"	6"	7"	9"	9"	11"	16"	19"	21"	28"	35"
	도달	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (2")	4+ (3")	4+ (5")	4+ (7")	4+ (11")	4+ (15")	4+ (20")	4+ (22")	4+	3+	2+	2+w	1+	1+w	1+w	1+ww	1+ww
1min	개시	1"	1"	1"	1"	2"	2"	2"	2"	3"	3"	6"	7"	9"	9"	11"	16"	19"	21"	28"	35"
	도달	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+w	1+	1+w	1+w	1+ww	1+ww

* 유색 block : 최종 표준혈청가를 가지는 희석 분획
희석분획별 슬라이드 응집반응시험 결과

그림 86. serogroup Vi의 표준화 결과

(8) 살모넬라 진단혈청의 제형화



그림 87. 살모넬라 진단혈청 7종

나. 리스테리아균 혈청 진단제제의 표준화 및 제형화

리스트테리아(*Listeria*)는 그람 양성이며, 아포를 형성하지 않고 운동성이 있는 세균이다. 리스트테리아는 7가지의 종으로 분류된다. (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. murrayi*, *L. grayi*) 이 중 리스트테리아 모노사이토제네스는 유일하게 사람에게 병원성을 나타내며 listeriosis 증상을 나타내는 식중독 원인균으로 알려져 있다. 이 세균은 척추동물의 세포내에 침입하여 증식하는 세포내기생 세균이며, 4 °C에서도 증식이 가능한 저온성 세균이다. 이 세균은 신생아나 면역이 결핍된 환자, 노인에게서 뇌수막염나 패혈증과 같은 심각한 감염증을 일으킬 수 있으며 임신부에서는 유산이 일어날 수 있다. 하지만 최근의 보고에서는 정상적인 성인에게 열성 장염을 일으킬 수 있는 것으로 나타나 공중보건학적 위협이 되고 있다. 식품에 의해서 발병하는 listeriosis는 미국, 일본, 영국, 스위스, 스페인, 프랑스 등에서 다수 보고되고 있다. 혈청형으로 나누어 보았을 때, 미국에서는 1/2b 형이, 유럽이나 일본에서는 1/2a 형과 4b형이 주로 분리되고 있다. 전세계적으로 1/2a, 1/2b, 4b의 세 가지 혈청형이 listeriosis 환자에게서 분리된 리스트테리아 모노사이토제네스 혈청형의 95% 이상을 차지하고 있다. 또한 리스트테리아 모노사이토제네스에 대한 항생제 내성을 또한 증가하고 있는 상황이다.

따라서 리스트테리아균 혈청형 1/2a, 1/2b, 4b 별 단클론 항체 제작을 통해 사람에게 유해한 리스트테리아균 중 95% 이상을 검출 할 수 있는 바이오 마커의 제작이 가능하리라 판단하여 2차년도에 이들에 대한 단클론 항체를 제작한 바 있으며, 이를 활용하여 진단제를 구성하였다.

이들 3종에 각기 가장 반응성이 좋은 아래와 같은 단클론 항체들을 선발하여 진단제 개발에 활용하였다.

표 45. 리스테리아 각 혈청형에 특이적인 대표적 단클론 항체 선별

혈청형	대표 단클론 항체 생산 세포주명
1/2a,	Lis1/2a9H5
1/2b	Lis1/2b4H2
4b	Lis4b7D5

다. 대장균 혈청 진단제제의 표준화 및 제형화

대장균의 경우 국내 인체에서 발생하는 주요 혈청형으로는 아래 표 (질병관리본부)와 같으므로 이들을 구성하는 다클론 항체들의 혼합을 통해 조합을 구성하였다.

1997년부터 2007년까지의 질병관리본부의 STEC 분리동정 현황을 보면 아래와 같이 O157, O26, O91, O111, O55, O103, O104 등이 주로 국내에서 문제시되며, 이외에 다수의 여타 혈청형도 분리되는 것으로 보고되어, 이들 혈청형 균주를 활용하여 제작한 가토의 혈청을 혼합하여 사용하는 것이 바람직하다고 판단하였다.

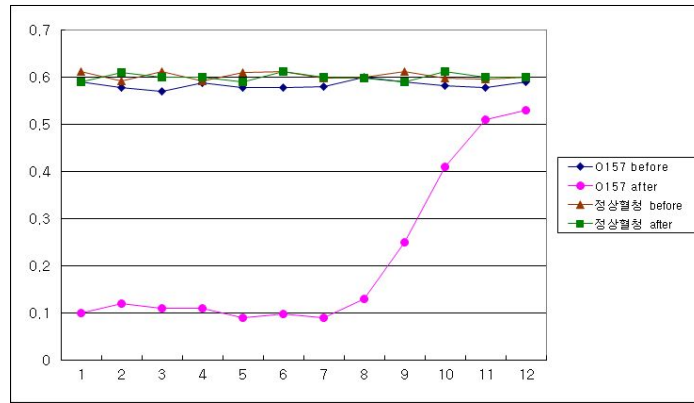
(1) 대장균 O157 항혈청의 제작 및 표준화

표 46. 대장균 O157 항혈청의 자가/교차역가 확인 및 흡수과정 결과

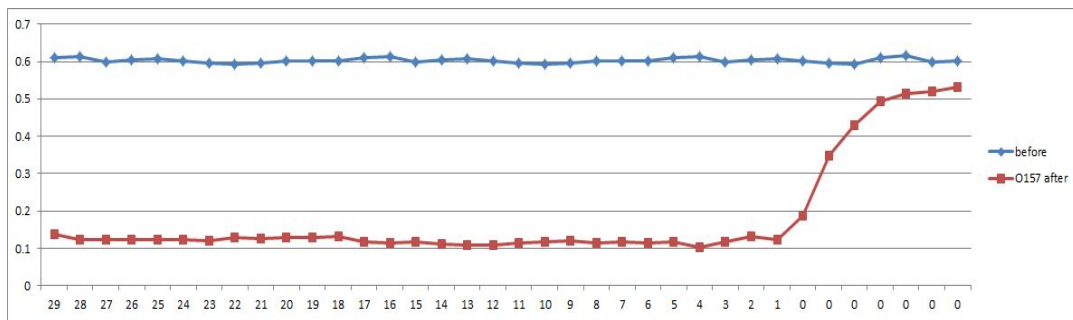
혈청형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	혈청형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수
O1	-	-	-	O48	-	-	-
O2	-	-	-	O49	-	-	-
O3	-	-	-	O50	-	-	-
O4	-	-	-	O51	-	-	-
O5	-	-	-	O52	-	-	-
O6	-	-	-	O53	-	-	-
O7	-	-	-	O54	-	-	-
O8	-	-	-	O55	-	-	-
O9	-	-	-	O56	-	-	-
O10	-	-	-	O57	-	-	-
O11	-	-	-	O58	-	-	-
O12	-	-	-	O59	-	-	-
O13	-	-	-	O60	-	-	-
O14	-	-	-	O61	-	-	-
O15	-	-	-	O62	-	-	-
O16	-	-	-	O63	-	-	-
O17	-	-	-	O64	-	-	-
O18	-	-	-	O65	-	-	-
O19	-	-	-	O66	-	-	-
O20	-	-	-	O67	-	-	-
O21	-	-	-	O68	-	-	-
O22	-	-	-	O69	-	-	-
O23	-	-	-	O70	-	-	-
O24	-	-	-	O71	-	-	-
O25	-	-	-	O72	-	-	-
O26	-	-	-	O73	-	-	-
O27	-	-	-	O74	-	-	-
O28	-	-	-	O75	-	-	-
O29	-	-	-	O76	-	-	-
O30	-	-	-	O77	-	-	-
O31	-	-	-	O78	-	-	-
O32	-	-	-	O79	-	-	-
O33	-	-	-	O80	-	-	-
O34	-	-	-	O81	-	-	-
O35	-	-	-	O82	-	-	-
O36	-	-	-	O83	-	-	-
O37	-	-	-	O84	-	-	-
O38	-	-	-	O85	-	-	-
O39	-	-	-	O86	-	-	-
O40	-	-	-	O87	-	-	-
O41	-	-	-	O88	-	-	-
O42	-	-	-	O89	-	-	-
O43	-	-	-	O90	-	-	-
O44	-	-	-	O91	-	-	-
O45	-	-	-	O92	-	-	-
O46	-	-	-	O93	-	-	-
O47	-	-	-	O94	-	-	-

혈청형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수	혈청형	원혈청	1차 흡수	2차 흡수
O95	-	-	-	O146	-	-	-
O96	-	-	-	O147	-	-	-
O97	-	-	-	O148	-	-	-
O98	-	-	-	O149	-	-	-
O99	1+	-	-	O150	-	-	-
O100	-	-	-	O151	-	-	-
O101	-	-	-	O152	2+	2+	-
O102	-	-	-	O153	-	-	-
O103	-	-	-	O154	-	-	-
O104	-	-	-	O155	-	-	-
O105	-	-	-	O156	-	-	-
O106	-	-	-	O157	4+	4+	4+
O107	-	-	-	O158	-	-	-
O108	-	-	-	O159	-	-	-
O109	-	-	-	O160	-	-	-
O110	-	-	-	O161	-	-	-
O111	-	-	-	O162	-	-	-
O112	-	-	-	O163	-	-	-
O113	2+	1+	-	O164	-	-	-
O114	-	-	-	O165	-	-	-
O115	-	-	-	O166	-	-	-
O116	-	-	-	O167	-	-	-
O117	-	-	-	O168	-	-	-
O118	-	-	-	O169	-	-	-
O119	-	-	-	O170	-	-	-
O120	-	-	-	O171	1+	-	-
O121	-	-	-	O172	1+	-	-
O122	-	-	-	O173	-	-	-
O123	-	-	-	O174	-	-	-
O124	-	-	-	O175	-	-	-
O125	-	-	-	O176	1+	1+	-
O126	1+	-	-	O177	-	-	-
O127	-	-	-	O178	-	-	-
O128	-	-	-	O179	-	-	-
O129	-	-	-	O180	-	-	-
O130	1+	-	-	O181	-	-	-
O131	-	-	-				
O132	2+	-	-				
O133	-	-	-				
O134	-	-	-				
O135	-	-	-				
O136	-	-	-				
O137	-	-	-				
O138	-	-	-				
O139	3+	1+	-				
O140	-	-	-				
O141	-	-	-				
O142	-	-	-				
O143	-	-	-				
O144	-	-	-				
O145	-	-	-				

w: weak reaction, p: potent reaction



1차 test tube 침전 반응 결과



2차 test tube 침전 반응 결과

희석분획		20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
30sec	개시	1"	2"	2"	2"	2"	2"	2"	3"	3"	3"	5"	6"	7"	9"	10"	11"	13"	22"	30"	30"
	도달	4+ (2")	4+ (3")	4+ (3")	4+ (4")	4+ (4")	4+ (5")	4+ (8")	4+ (12")	4+ (15")	4+ (17")	4+ (20")	4+ (25")	3+	2+	2+w	1+w	1+w	1+w	1+ww	1+ww
1min	개시	1"	1"	1"	1"	2"	2"	2"	3"	3"	3"	4"	6"	7"	9"	11"	12"	18"	22"	25"	30"
	도달	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+w	3+	2+s	2+	1+	1+w	1+w	1+ww

* 유색 block : 최종 표준혈청가를 가지는 희석 분획
희석 분획별 슬라이드 응집반응시험 결과

그림 88. 대장균 O157의 표준화 결과

상기 병원성 대장균 O157의 표준화와 같이 다른 혈청도 시행하였다. 다른 혈청들도 흡수과정을 통해 교차응집반응을 제거 하였으며 그 데이터 내용은 생략하였음.

(2) 대장균 진단혈청의 제형화



그림 89. 대장균 진단혈청 45종

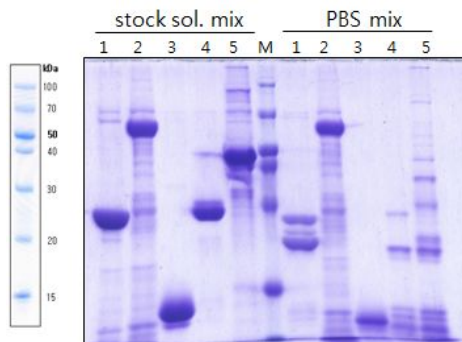
라. 진단제제의 유통기한 설정 및 품질관리를 위한 시험 평가

(1) 진단혈청 유통기한 설정

각 진단혈청을 1년간 4°C에서 보관하면서 1개월마다 자가역가를 평가한 결과 자가역가의 양상변화는 관찰할 수 없었음. 이는 항체 자체의 안정성에 기인한 바 크나, 또한 10%의 glycerol 및 0.02% sodium azide 등의 첨가물에 의한 보존 및 방부효과로 기인한 것으로 판단된다.

(2) protein G trimer의 보관 안정성 평가

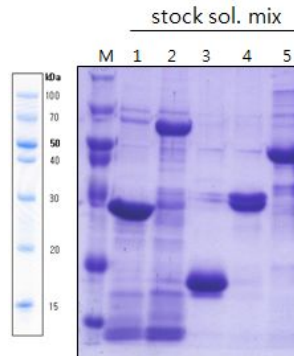
protein G multimer 중에서 가장 발현성이 우수하며, 발현 내지 보관 단계에서 절편이 생성되지 않는 trimer를 냉장고에 보관하면서 1개월에 한번씩 절편의 생성 여부와 기능성을 평가하였음. 아래 그림과 같이 보관 중에 기능성 저하와 절편 생성이 관찰되지 않아 향후 제형화에 가장 적합하게 사용될 수 있음을 확인하였음.



1 : protein A monomer (33kD), 2 : protein A dimer (60kD), 3 : protein G monomer(19kD),
 4 : protein G dimer (35kD), 5 : protein G trimer(51kD)

그림 90. Protein A multimer와 protein G multimer의 보관안정성평가-3개월 경과

상기 그림에서 확인할 수 있듯이, protein G multimer의 경우 보관 3개월이 경과하면 서 보존제를 넣지 않은 실험군(glycerol 10%, sodium azide 0.01%로 구성된 보존제 없이 PBS 완충액에 단독 보관)에서 표적 단백질 band가 사자리고 분해되는 결과를 얻었다. 그러나 보존제 처리 하에 4℃ 보관할 경우 10개월이 경과해도 안정성에는 문제가 없음을 확인하였고 (다음의 그림), 따라서 보존제와 함께 냉장보관하는 것이 가장 바람직한 안정성을 확보할 수 있는 방법임이 확인되었다.



1 : protein A monomer (33kD), 2 : protein A dimer (60kD), 3 : protein G monomer(19kD),
 4 : protein G dimer (35kD), 5 : protein G trimer(51kD)

그림 91. Protein A multimer와 protein G multimer의 보관안정성평가-10개월 경과

(3) 물리 및 화학적 성상 평가 및 표준품질 (자가역가) 기준 설정

최종 제품의 사용자가 자신이 원하는 항체를 활용하여 자성나노입자-protein G multimer 복합체와 함께 삼중복합체를 제작하게 되므로 사용자가 직접 확보하여 사용하는 항체를 제외하고, 본 과제를 통해 제작 생산되는 제형화 진단제 (항혈청)의 물리/화학적 성상 평가는 아래와 같은 기준으로 설정하였으며, 모든 제형화된 진단제는 보존제 및 방부제로서의 sodium azide와 glycerol이 첨부되는 바, 미생물의 분리/동정을 위해 삼중복합체를 형성시킨 이후에는 세척과정을 통해 이러한 보존제 및 방부제의 제거가 필수적인 과정이 된다.

(가) 물리/화학적 성상 기준

맑고 투명한 액상이며, 이물질이 발견되지 않아야 함.

제형화된 모든 진단혈청이 이러한 기준을 충족함을 기확인함.

(나) 자가역가 시험 성적

표 47. 살모넬라 진단혈청 자가역가 시험 성적표

혈청형	균주구분	항원형	poly	Gr. A	Gr. B	Gr. C	Gr. D	Gr. E	Gr. Vi
A	S-1	2,12	4+	4+	-	-	-	-	-
A	A-1	1,2,12	4+	4+	-	-	-	-	-
A	A-2	1,2,12	4+	4+	-	-	-	-	-
A	A-3	1,2,12	4+	4+	-	-	-	-	-
A	A-4	1,2,12	4+	4+	-	-	-	-	-
B	S-3	4,5,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-1	4,5,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-2	1,4,5,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-3	1,4,5,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-4	1,4,5,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-5	1,4,5(w),12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-6	1,4,5(w),12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-7	1,4,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-8	1(w),4,5,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-9	1(w),4,5,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-10	1,4,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-11	1,4,5(W),12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-12	1,4,5(W),12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-13	1,4,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-14	4,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-15	4,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-16	1,4,5,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-17	4,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-18	4,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-19	1,4,12,27	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-20	4,5,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-21	1,4,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-22	4,5,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-23	4,12	4+	-	4+	-	-	-	-
B	B-24	4,12,27	4+	-	4+	-	-	-	-
C	S-40	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-
C	S-50	6(P),8	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-1	8	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-2	8	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-3	8	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-4	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-5	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-

혈청형	균주구분	항원형	poly	Gr. A	Gr. B	Gr. C	Gr. D	Gr. E	Gr. Vi
C	C-6	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-7	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-8	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-9	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-10	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-11	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-12	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-13	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-14	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-15	6,7,14(P,W)	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-16	6,7,14	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-17	6,7,14	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-18	6,7	4+	-	-	4+	-	-	-
C	C-19	6(P),8	4+	-	-	4+	-	-	-
D, Vi	S-57	9,12,Vi	4+	-	-	-	4+	-	-
D	S-58	9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
Vi[D]	S-Ty2	Vi	-	-	-	-	-	-	4+
D	D-1	9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-2	1,9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-3	9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-4	9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-5	1,9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-6	9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-7	9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-8	9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-9	9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-10	9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-11	1(S),9(W),12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-12	9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-13	Vi	-	-	-	-	-	-	4+
D	D-14	Vi	-	-	-	-	-	-	4+
D	D-15	9,12	4+	-	-	-	4+	-	-
D	D-16	9,12,Vi	4+	-	-	-	4+	-	4+
D	D-17	9,12,Vi	4+	-	-	-	4+	-	4+
D	D-18	9,12,Vi	4+	-	-	-	4+	-	4+
D	D-19	9,12,Vi	4+	-	-	-	4+	-	4+
D	D-20	9,12,Vi	4+	-	-	-	4+	-	4+
D	D-21	9,12,Vi	4+	-	-	-	4+	-	4+
D	D-22	9,12,Vi	4+	-	-	-	4+	-	4+

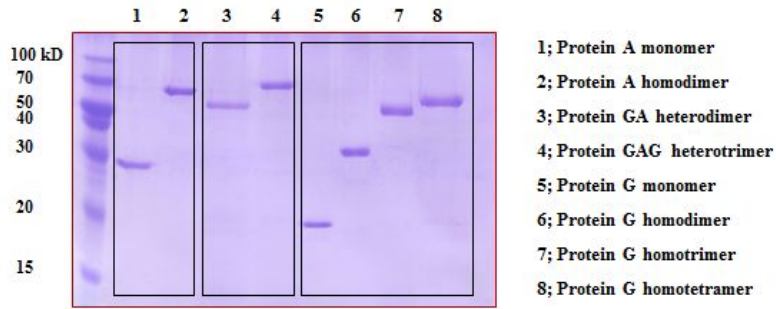


그림 92. 재조합 multi-protein G/A 제작 모식도 및 발현 결과

- 또한, 다음과 같은 그림의 모식도와 같은 삼중복합체 (자성나노입자-protein G multimer-다양한 항체군)를 기반으로 하여 작동한다.

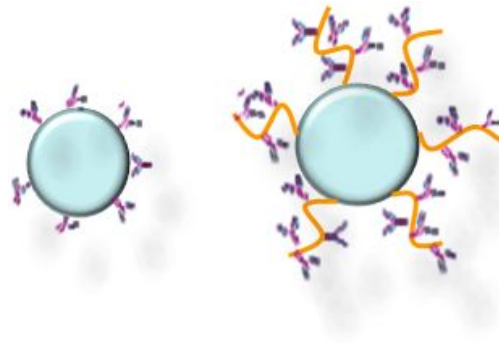
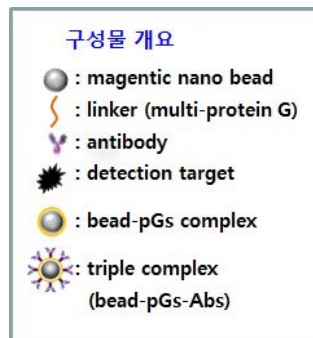
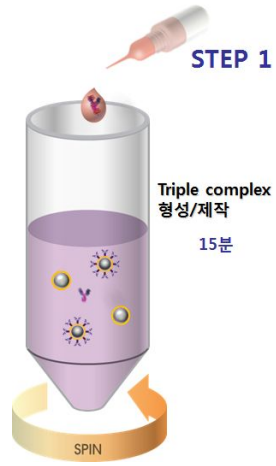


그림 93. 삼중복합체의 모식도

(2) 반응과정 (도식화된 프로토콜)

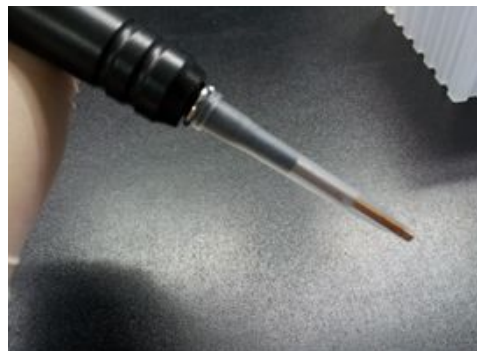






1. Direct PCR : bead complex를 PCR mixture에 넣어 표적유전자 검출
3-4시간 내에 결과 도출
2. 배지 접종 : 검출하고자하는 미생물에 선택성이 있는 agar 혹은 broth에 접종하여 overnight 배양으로 결과 도출

그림 94. 미생물 검출 모식도 (프로토콜)



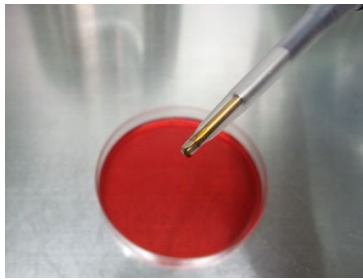
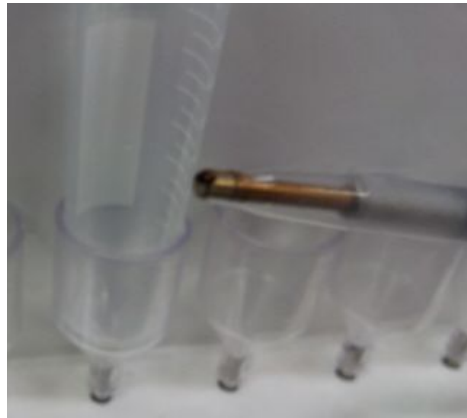


그림 95. 자성펜 및 tip을 활용한 선택배지에 균접종 과정
(tip은 실리콘으로 제작되어 agar 배지에 부드럽게 접촉되도록 됨)

나. 기존 주요 병원성 미생물의 검출에 있어서의 문제점 및 IMS 이용시 장점

(1) 기존 병원성 대장균의 검출에 있어서의 문제점 및 IMS 이용시 장점

기존 magnetic bead (IMS, immuno-magnetic separation)를 이용한 대장균의 분리동정은 O157, O26, O103, O111, O145만 가능함.

앞서 1, 2년차 보고서에서 언급된 바와 같이 본 과제를 통해 개발되는 자성나노입자-protein G multimer 복합체는 어떠한 종류의 항체들도 결합시킬 수 있으므로 이러한 한계를 명백히 극복할 수 있는 큰 장점이 있음. 또한 장출혈성 대장균의 실험실 진단의 문제점으로 가장 많이 지적되는 사항이 아래와 같이 5가지 정도이며, 이러한 한계를 극복하는데 상당한 기여를 할 것으로 판단됨.

- 장출혈성 대장균 실험실 진단의 문제점 -

- ① 현재 진단법이 O157 위주로 되어 있음
: 여타 원인체의 감별이 이루어지고 있지 않음

- ② non-O157 균주의 경우 선택감별배지가 없음
- ③ 일선 시도 보건검사기관의 Shiga toxin 검사능력 부재
- ④ VT-PCR 양성인 검체로부터 원인병원체의 분리가 쉽지 않음
- ⑤ 검체 채취 후 최종 동정까지 7일 소요됨

아울러, 2011년 독일 등 유럽에서 발생한 병원성 대장균에 대한 신증후군(*E. coli* O104)의 대규모 발생으로 말미암아 선진국에서조차 이러한 변형 신종 병원체에 의해 다수의 사망사건이 발생하고 있어 이에 대한 대응책 마련이 시급할뿐더러, 실제 선진국들에서도 식품에서의 원인체 규명이 신속히 되지 않아 원인식품에 대한 역학조사 보고가 미진하여 지속적인 발병 촉진에 한 원인으로 지목되고 있는 형편임. 따라서 저농도로 존재하고 있을 수 있는 원인체에 대한 신속한 농축과 배양을 통해 보다 정확한 분리/동정에 기여할 것으로 판단됨.

(2) 기존 살모넬라균의 검출에 있어서의 문제점 및 IMS 이용시 장점

기존 magnetic bead (IMS, immuno-magnetic separation)를 이용한 살모넬라균의 분리 동정은 일부 혈청형에 국한되어 있고, 살모넬라균의 항원인자가 매우 다양한 관계로 이에 대한 최적의 바이오 마커가 부재하여 본 과제를 통해 개발된 마커들 (단/다클론 항체군)을 활용할 경우 용이하게 분리될 것으로 판단됨.

- 살모넬라균 실험실 진단의 문제점 -

- ① 일부 항원성 인자에 대한 바이오마커만이 개발되어 활용 중
- ② 살모넬라 진단방법에 대한 이해가 깊지 않음
- ③ 일선 시도 보건검사기관의 검사능력 부재
- ④ 살모넬라균에 의한 문제점을 심각하게 인지하고 있지 않음
- ⑤ 검체 채취 후 최종 동정까지 7일 소요됨

(3) 기존 살모넬라균/대장균의 검출에 있어서의 문제점 및 IMS 이용시 장점

검체에서 증균배양 과정 중 살모넬라균과 대장균이 동시에 존재하는 경우 서로 경쟁하여 타균을 배척하며 증식하므로 1차년도 조사결과와 같이 한 검체에서 두 가지 균이 동시에 검출되는 경우가 거의 부재함. 이는 검사방법의 심각한 오류를 유도할 수 있는 점으로 향후에 본 과제를 통해 개발된 시스템을 통해 현장에서 많은 시험자들에 의해 검증되어야 할 부분이기도 하나 실제 식품에 오염되어 있는 두 가지 균에 대한 보다 정확한 검출에 상당히 기여할 것으로 기대됨.

2차년도 보고서 내용: 실제 인공적으로 *Salmonella* S-3(B type)균주와

Escherichia coli O157 두 균주를 BPW배지에 같은 양을 접종하여 하루 동안 전배양한 후에 앞서와 같이 본 과제를 통해 신규 개발된 방법으로 자성나노입자를 이용하여 *salmonella* 균주를 검출했지만 분리되지 않았으며, BPW에 하루 배양된 동일한 배양액을 살모넬라 선택배지인 XLD 배지에 도달한 결과 *Salmonella* 균주가 검출되지 않음을 확인할 수 있었으며 이러한 결과가 앞서의 1차년도 조사사업 결과를 뒷받침하는 것이라고 판단된다.

또한, 이를 검증하기 위해 다음과 같은 다양한 실험을 통해 현재 본 연구소가 보유하고 있는 살모넬라균과 대장균들 간의 길항적인 성장성 등을 확인하였다.

(4) *Salmonella* spp. 와 *E. coli*의 동시 배양시 성장길항성 시험

살모넬라균과 대장균은 종류, 환경조건 등에 따라서 서로 경쟁을 하면서 성장을 억제하기도 하는 것으로 알려져 있으며, 이런 특징들로 인해서 육류 등에 존재하는 미생물의 검출결과가 다양한 전처리 과정에 따라 달라질 수 있으며 이점들은 실제 유통되고 있는 여러 농수산물에 존재하는 병원성 미생물 검출방법을 달리해야 함을 의미할 수도 있을 것이라 사료된다.

(가) *Salmonella* sp.와 *E. coli*를 혼합하여 배양한 경우

Salmonella S-1, S-3과 *E. coli* O125, O138 각각을 TSA(Tryptic Soy Agar)에서 37°C, 20시간 배양한 후 TSB를 이용하여 OD₆₀₀=0.5로 맞추어서 *Salmonella*: *E. coli* = 1:1, 1:2, 2:1로 현탁하여 12시간 배양한 후에 XLD plate에 도달하여 확인하였다.

Salmonell sp. = *E. coli* 배양한 경우

Salmonell sp. > *E. coli* 배양한 경우

Salmonell sp. < *E. coli* 배양한 경우



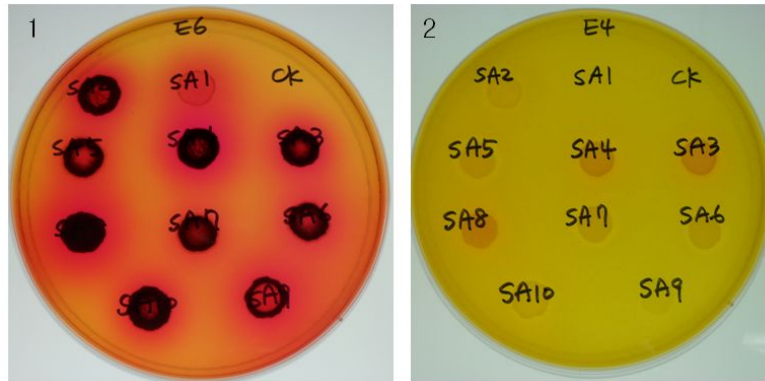
그림 96. 살모넬라와 대장균의 균종에 따른 성장양상 비교

그 결과 salmonella S-3과 *E. coli* O138 혼합 배양 시 salmonella S-3 이 *E. coli* O138 보다 우세하게 성장하였으며 salmonella S-1과 *E. coli* O125 혼합 배양 시 *E. coli* O125 이 salmonella S-1 보다 우세하게 성장하는 것을 관찰하였는데 이를 통해 세균의 종류에 따라서 서로 성장을 억제하는 패턴이 다양하게 나타날 수 있음

을 확인할 수 있었다.

(나) *E. coli*에 대한 *Salmonell* sp.의 길항력 검정

각각의 *E. coli* 현탁액을 (A600=0.6) XLD agar와 혼합하여(*E. coli* 현탁액 25 μ l/배지 25ml) petridish에 분주한 후 각각의 salmonella 현탁액 (A600=0.6) 5 μ l를 떨어뜨린 후 건조 후 37 $^{\circ}$ C에서 배양하여 관찰하였다.



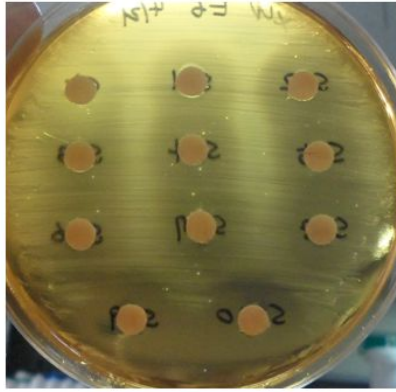
(E4; *E. coli* O112, E6; *E. coli* O138, SA1; *S. paratyphi* S-1, SA2; *S. paratyphi* S-3, SA3; *S. thompson* S-40, SA4; *S. newport* S-50, SA5; *S. typhi* S-57, SA6; *S. typhi* S-58, SA7; *S. typhi* S-Ty2, SA8; *S. london* S-76, SA9; *S. newington* S-84, SA10; *S. senftenberg* S-87, CK; TSB)

그림 97. 대장균의 종류에 따른 살모넬라 성장패턴 결과

위 그림과 같이 E6 (*E. coli* O138)에 대해서는 실험한 salmonella 10종 모두가 *E. coli* O138에 대해 길항작용을 하여 *E. coli* O138의 성장을 억제하는 것을 관찰할 수 있었으나 *E. coli* O112에 대해서는 salmonella가 *E. coli*에 대해 길항작용을 전혀 하지 못해 성장에 아무런 영향을 미치지 못하는 것을 확인하였다.

(다) *E. coli*(O138)에 대한 *Salmonell* sp.의 배양액 검정

충분히 배양한(약 20시간) 살모넬라 현탁액을 원심분리하여 얻은 상등액을 filter(0.45 μ m) 한 후 살균한 filter paper disk에 충분히 적시고 건조시켜(4회 반복) *E. coli* 현탁액을 바른 XLD plate위에 올린 후 37 $^{\circ}$ C 에서 배양하면서 관찰하였다. 그 결과 *E. coli* O138에 대해서 살모넬라균들의 배양액(길항물질)이 *E. coli* O138 성장을 억제하는 것을 관찰 할 수 있었으며 이 결과의 위의 균 현탁액에 대한 실험 결과와 일치함을 보였다.



(E6; *E. coli* O138, SA1; *S. paratyphi* S-1, SA2; *S. paratyphi* S-3, SA3; *S. thompson* S-40, SA4; *S. newport* S-50, SA5; *S. typhi* S-57, SA6; *S. typhi* S-58, SA7; *S. typhi* S-Ty2, SA8; *S. london* S-76, SA9; *S. newington* S-84, SA10; *S. senftenberg* S-87, CK; TSB)

그림 98. *E. coli*(O138)에 대한 *Salmonell* sp.의 배양액 검정 결과

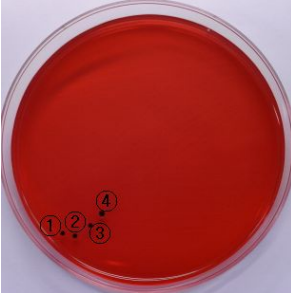
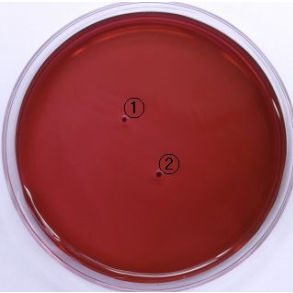
다. 자성 나노입자와 신속 검출 장비의 현장 적용

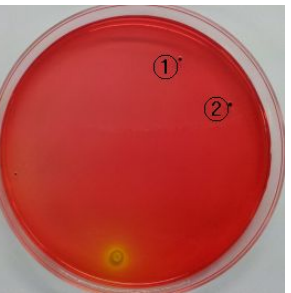
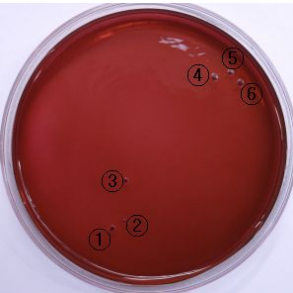
자성 나노입자와 신속 검출 장비를 현장 적용하여 조사하는 것은 실제 조사로 인한 업체들의 반발을 반영하여 유통회사의 제품을 구매하여 테스트 하였다. 제품 구매는 다양한 지역의 판매점에서 우육제품과 돈육제품 20가지를 구매하여 연구실에서 조사하였다.

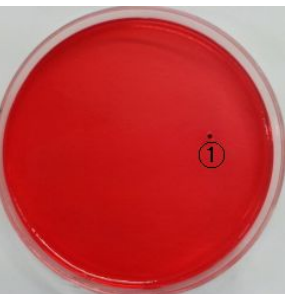

구입한 sample은 식염수 25ml로 씻어준 후 살모넬라균혈청과 병원성대장균혈청이 결합된 자성나노입자와 신속 검출 장비에서 반응시켜 시행하였으며, 그 과정은 다음과 같다.

- (1) sample 25ml이 들어있는 50ml conical tube에 각각의 자성입자를 넣어준 후 신속 검출 장비에서 400rpm으로 반응시켜준다.
- (2) 장비에 탑재되어있는 자력으로 자성나노입자를 끌어당긴 후 상등액을 제거하였다.
- (3) 비특이적으로 결합된 균을 제거해주기 위하여 멸균된 PBST 20ml로 위의 방법으로 3회 씻어준다.
- (4) 장비의 자력으로 붙어있는 자성입자를 자성펜으로 수거하여 해당되는 선택배지에 발라서 배양한다.
- (5) 선택배지에서 선별된 colony의 혈청형을 확인한다.

우육제품과 돈육제품을 살모넬라균혈청과 대장균혈청이 결합된 자성나노입자를 이용하여 조사한 결과 다음과 같다.

우육제품 No.1			
살모넬라균혈청	serotyping	대장균혈청	serotyping
	1. D		1. O55
	2. B		2. O55
	3. B		
	4. B		

우육제품 No.2			
살모넬라균혈청	serotyping	대장균혈청	serotyping
	1. A		1. O8 6. O128
	2. A		2. O8
			3. O55
			4. O128
			5. O8

우육제품 No.3			
살모넬라균혈청	serotyping	대장균혈청	serotyping
	1. B		1. O22
			2. O119

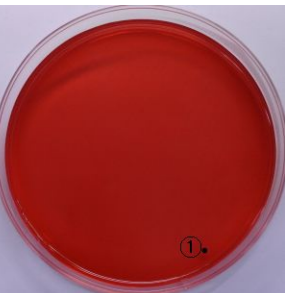

우육제품 No.4			
살모넬라균혈청	serotyping	대장균혈청	serotyping
	1. D		1. O111
			2. O111

그림 99. 우육제품의 자성 신속 검출 결과

위의 결과처럼 조사된 우유제품과 같이 여러샘플에서의 검출된 조사결과는 다음과 같다.

표 48. 우유제품에서 검출된 병원성 미생물

우유제품 No.	살모넬라		대장균	
	검출수	혈청형	검출수	혈청형
1	4	D, B, B, B	2	O55, O55
2	2	A, A	6	O8, O8, O55, O128, O8, O128
3	1	B	2	O2, O119
4	1	D	2	O111, O111
5	2	D, D	0	
6	4	C, C, C, C	0	
7	0		3	O125, O76, O76
8	2	B, B	2	O119, O119
9	1	Vi	0	
10	1	Vi	2	O86, O86
11	0		4	O174, O158, O174, O128
12	0		3	O8, O8, O22
13	1	A	0	
14	0		0	
15	0		0	
16	2	B, B	2	O111, O111
17	0		0	
18	2	C	1	O55
19	0		0	
20	1	D	4	O123, O119, O123, O123

표 49. 돈육제품에서 검출된 병원성 미생물

돈육제품 No.	살모넬라		대장균	
	검출수	혈청형	검출수	혈청형
1	3	B, B, Vi	3	O149, O149, O120
2	2	D, D	3	O8, O20, O20
3	0		0	
4	0		2	O84, O91
5	0		0	
6	4	A, A, A, B	5	O103, O133, O133
7	0		2	O142, O142, O120
8	2	B, B	3	O132, O132, O119
9	0		2	O74, O74
10	0		0	
11	1	D	1	O22
12	0		2	O20, O20
13	0		0	
14	2	C, C	2	O91, O91
15	1	B	1	O149
16	0		2	O91, O91
17	0		0	
18	0		0	
19	2	B, B	3	O138, O138, O111
20	2	D, D	4	O119, O119, O119, O120

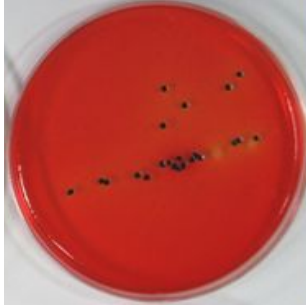


검출대상 균	선택배지	검출예
살모넬라균 검출	XLD agar	
대장균	EMB agar	
비브리오	TCBS agar	

그림 100. 선택배지별 미생물 검출결과 예

6. 진단제제 생산 및 평가 관련 균주와 단클론 항체 분비 세포주의 효율적 관리를 위한 관리시스템 구축

가. 세균주와 세포주의 관리 필요성

살모넬라균과 관련하여 제작되는 다클론 항체균 및 단클론 항체균의 지속적인 생산과 평가를 위해 균주의 정확한 관리는 매우 필수적이다. 실제 본 실험실에서 연구자들 간의 혼동과 계대수에 따른 균주 성장변화에 능동적으로 대처하기 위해 이러한 시스템의 구축은 필연적이며, 이는 단순히 살모넬라만의 문제가 아니라 병원성 대장균(181종)의 관리와 다양한 세포주의 관리에 있어서도 매우 중요하다. 본 실험실에서의 이러한 시스템 구축은 비단 일개 실험실만의 문제가 아니라 향후 이를 업그레이드하고 실제 오랜기간의 활용을 통한 시스템 안정화를 통해 국내 여타 실험실에도 적용할 수 있도록 함으로써 본 연구과제의 결과물로서 새로운 시장확보에도 크게 기여할 것으로 판단된다.

(1) RFID

아래 그림과 같은 메모리칩이 내장되어 있어, vial을 담은 박스에 부착될 경우 소프트웨어에서 읽는 순간 해당 박스 속에 있는 내용물의 정보와 그 위치를 손쉽게 연구자로 하여금 파악할 수 있도록 도와주는 시스템이다. 이는 물류회사 및 인천공항 등 다양한 물류관련 시스템에 적용되어 왔으며, 최근에 가격적인 면에서 경쟁력을 갖추고, 또한 초저온 환경 (-185℃)에서도 견딜 수 있는 제품이 상용화되어 우리 바이오 분야에서 적극활용될 수 있는 여건이 갖추어졌다.



그림 101. 샘플 박스에 부착하는 RFID tag 사진

(2) 2차원 바코드 시스템

아래 그림과 같이 각 vial에 붙이는 스티커의 경우 2차원 바코드를 부여하여 각 vial의 고유성을 확보한다. RFID의 가격이 상당히 낮아진 것은 사실이나 개당 500-600원 정도로 2차원 바코드에 비해 고가이며, vial과 같이 작고 곡면이 있는 것에 적용하는데 한계가 있어, 2차원 바코드로 처리하는 것이 가장 적합하다고 판단하였다. 또한 저렴한 인쇄기를 이용하여 다량의 인쇄가 가능하고, 고유번호 부여에 있어서도 관리가 용이하여 이를 채택하였다.



그림 102. 2차원 바코드 reader 및 부착 vial 사진

나. 소프트웨어 개발

세균주, 바이러스주, 단클론 항체, 다클론 항체, 재조합 단백질, LMO 등 각 실험실에서 분류할 수 있는 각종 생물자원들을 여러 단계로 분류하고 손쉽게 입고/출고할 수 있도록 기획하였다. 또한 각 vial에 있는 내용물의 특성을 메모 혹은 그림파일 등으로 특정화할 수 있도록 기능을 갖추었으며, 입/출고한 연구자의 신원과 일시 등이 자동으로 기록되고, 해당 품목의 재고량이 일정 수준 이하로 될 경우 알람이 작동되어 많은 연구자들에 의해 공동으로 사용되는 균주 등이 관리 부실로 유실되지 않도록 장치하였다. 또한 동일한 균주일지라도 생산된 Lot별로 관리되게 하여 이상이 발견될 경우 즉각 실험실에서 제거할 수 있도록 하였으며, 각 샘플 박스의 공란도 검색하여 초저온 냉동고 등의 효율적인 관리도 기할 수 있도록 하였다.

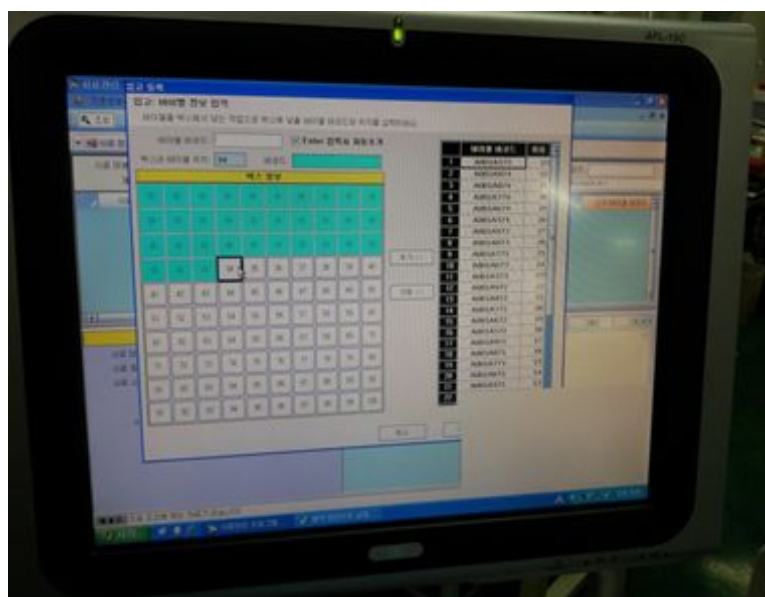


그림103 . 소프트웨어 구축 화면캡처 사진

다. 하드웨어 구축

아래 사진과 같이 터치형 모니터를 갖춘 컴퓨터와 RFID를 자동으로 인식하는 장치 그리고 2차원 바코드를 인식할 수 있는 부분 등으로 구성하였다. 이를 통해 실험실-냉장/동고-샘플 박스-vial로 이어지는 분류체계에 능동적으로 대응하는 매우 효율적인 관리 시스템을 구축할 수 있었다.

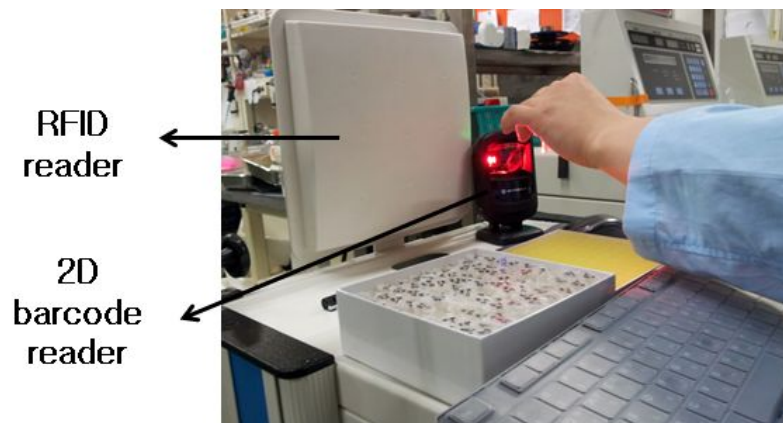


그림 104. 하드웨어 구성 사진

제 3절

축·수산물 오염 병원성 미생물 고감도 검출 진단제제의 현장 적용을 위한 자동화 장비 개발 (2협동과제)

1. 선진국 장비의 기본 사양 분석 및 방향 설정

자성나노입자를 생명공학관련 연구 및 분석 등에 활용할 수 있는 장비는 선진국을 중심으로 외국 관련 업체들에서 최근 5년 동안 활발히 개발하여 시판하고 있다. 그러나 이러한 장비들을 실제 확보하여 그 기본 사양 및 활용 분야에 대한 관련 연구를 진행한 결과, 대부분이 DNA와 RNA 같은 유전자의 순수 분리 및 정제를 수행하여 유전자의 클로닝이나 사람 혹은 동물들의 질환 진단 분야에 있어서의 효율성을 높이고자 하는 것으로 구성되어 있는 것으로 분석되었다.

이러한 자성나노입자를 활용한 분야 외에 기존의 유전자 분리/정제 관련 소모품 내지는 장비에 있어서 활발한 개발 및 연구가 진행되어온 것은 사실이나 대개, 연구자의 손으로 일일이 이루어지던 실험의 전반적인 과정을 장비가 대신해주는 경우이며, 이 또한 resin 등의 column을 이용하는 것이 대부분이라, 과정이 복잡하고 자동화 장비를 사용함에도 시간의 소요가 많아 대규모 질환 발생이나 보다 신속한 유전자의 추출이 필요할 시에는 한계가 있어 왔다.

그러나 자성나노입자 기반의 유전자 추출 관련 시약과 장비 시스템은 다수의 샘플을 신속히 추출할 뿐만 아니라 기존의 column 체계가 가지고 있는 세척기능을 수반하고 있어 stool과 같은 초기 샘플에서 PCR 억제 성분의 세척도 가능하므로 장점이 있어 시장을 확대해 나가는 추세라고 분석된다.

이뿐만 아니라 다양한 단백질들과 줄기세포와 같은 특정 세포들의 순수 분리 및 농축을 위해 사용되는 경우도 종종 발견된다. 이러한 분야에서 선도적으로 진입하여 시장을 확대하는 외국회사의 제품으로는 BioMerieux, Thermo사 등 외국계 회사들을 대표적으로 꼽을 수 있다. 이들 회사에서 다양한 모델들을 출시하고 있으나 장비자체가 대단히 고가이고, 기본적으로 유전자 및 소량의 단백질, 그리고 특정주의 세포들을 미량으로 분석(20ul -5000ul)하는 솔루션이며, 각 회사별로 특별히 디자인된 전용 vessel 및 소모품을 사용하게 기획되어 있어 개별 테스트비용이 고가이고, 특정영역에서만 사용되고 있으며, 각종특허에 의해 보호되고 있다. 또한 관련 연구에 종사하는 과학자들이 전문적으로 활용할 수 있게 관련 소프트웨어나 장비의 구동이 구현되도록 설계되어 있어 도축장, 식육포장처리업, 식품 유통업 등 대부분의 식품 생산 관련 현장에서 적용되기엔 현실성이 없다고 판단된다.

제1협동과제 연구진들에 의해 개발된 관련 시약 및 소모품과 본 과제인 제2협동과제에서 개발되어야 하는 자동화장비의 연계성을 최대한 확보하면서 긴밀한 협조가 이루어지고 있어, 기존 관련 장비들과는 차별화된 시장 개척이 가능할 것으로 결론지었다.

2. 자동화 단계별 요구·충족 조건 설정

가. 자동화 전단계에 있어서의 구동방법 설정

구현하고자 하는 장비는 nano bead와 multi protein G와의 바인딩 및 디바인딩, 그리고 이러한 nano bead - multi protein G와 다양한 바이오 마커들과의 바인딩 및 디바인딩을 통한 triple complex의 구현과정 뿐만 아니라 이후, triple complex와 다양한 식품, 사람과 동물의 검체 등 시료 내에 존재하는 병원성 미생물과의 바인딩 및 디바인딩이 단순화한 과정속에서 반복적으로 이루어지는 솔루션을 갖추도록 하여야 한다. 따라서 적절한 사이즈의 튜빙 체계 구축 및 상기 다양한 시약 및 시료와 세척과정 중에 사용되는 buffer의 용량 설정을 결정하고, 이상적인 결합 및 해리 운동을 위한 믹싱방법을 강구한다. 우선 검토하고 있는 운동방법 으로서는 Shaking behavior, Rotating behavior, Vortexing behavior, Rolling behavior, Stirring behavior, Spin behavior 등을 꼽을 수 있는데 기존 외국계 회사들의 제품이 Rotating behavior를 채용하고 있어 이를 채용할 시 특히 부분에 있어서의 중복성을 피하는 연구가 아울러 진행되어야 한다고 판단된다.

나. 예비 실험 결과

- (1) 농축산물의 검체에서 병원성미생물을 신속검출을 위해 전처리과정을 최소화하기 위한 검체의 용량을 1ml, 5ml, 10ml, 25ml등 다양한 용량을 실험 하였는바, 범용vessel을 사용하고 자력의 영향을 효율적으로 적용할 수 있으며, 병원성미생물을 검출하기 용이한 검체량을 25ml정도로 설정하고 이에 적합한 50ml Tube를 표준으로 결정하였다.
- (2) 기존에 가장 많이 범용되는 50ml cornical Tube에서 자성나노물질을 Collect할 수 있는 적절한 자속을 가지면서도, 기계적 가공성과 적합한 성형이 가능한 물질을 선정하기 위해 알리코, 네오디움, 페라이트 제품들을 시험하였고, 효율적으로 Collecting하기 위한 적절한 마그네트의 형상, 배열방법 등을 검토하여 결정하였다.
- (3) 튜브 내에서 자성나노입자와 병원성미생물을 Binding하기 위해 필요한 운동에너지를 검토한 결과, 외산장비에서는 Shaft를 이용한 Stirring방식, 왕복 Piston 방식, 튜브자체를 회전시키는 Spin방식 등이 사용 중이나, 기기 가동 중 오염 등의 문제가 우려되어, 이를 최소화 되는 Spin방식 또는 Vortexing방식을 적용하기로 하고, 자유자재로 프로그래밍이 가능한 Stepping Motor를 구동장치로서 사용하기로 하였다.

- (4) 외산장비는 대부분 회전이 단방향으로 구동하는 특징을 보이고 있으나, 본 과제의 장비는 Tube용량(50ml) 및 검체용량이 크기 때문에, Stepping Motor와 Programmable Controller로 다양한 구동동작을 시험한 결과, RPM은 100-500RPM으로 하고, 회전방향을 연속운전, Step운전 및 왕복운동도 가능하도록 설정한 결과가 세척력의 다양한 옵션을 줄 수 있어 앞으로 세척과정 설정 연구에서 결정될 다양한 buffer들의 활용도에 있어 최적을 조건을 부여할 수 있을 것으로 판단하였다.
- (5) 자성나노물질의 혼합과정과 바인딩, 디바인딩과정을 수행하는 장비에 washing 기능을 추가하기 위하여 buffer 등의 용액을 분주하고 회수하는 작업을 자동화할 수 있는 기본설계를 수행하였다.
- (6) 본 장비를 통해 분리/검출된 미생물을 동정하기 위해 별도의 전용 배양기를 활용하는 추가적인 부담을 줄이기 위해 장비 자체의 incubating 기능이 확보될 수 있도록 관련 부품의 크기 등도 최소화 할 수 있는 방향으로 고려하였다.
- (7) 시약 및 소모품, 그리고 시료와의 구동성 평가를 위해 개발된 예비 장비의 사양
- (가) 시료의 용량을 15ml 또는 50ml Tube를 사용하여 6개의 시료를 동시에 처리할 수있음.
 - (나) 믹싱방법은 고속 Rotating 으로 50-500RPM으로 다양한 조건이 구현될 수 있도록설정.
 - (다) 외산 장비 변형 시, 구동효율을 높이기 위해 연속회전 , 단계회전, 왕복회전이 가능하도록 일부 체계를 전환함.

이상과 같은 다양한 옵션들에 대한 구동 조건을 사전에 탐색하기 위하여 기존 외국산 장비를 아래 그림과 같이 변형하여 실제 nano bead와 샘플간의 물리적인 작용조건 탐색을 위한 예비 장비를 개발 완료하였다.

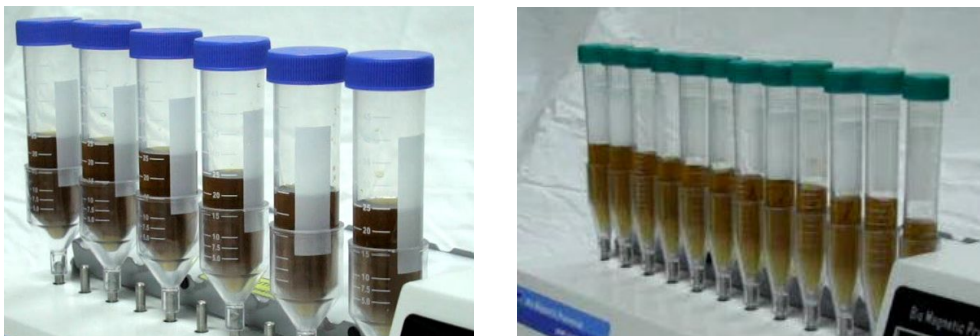


그림 105. 자동화 예비장비 사진

3. 단계별 사양 설비 및 규격 설정 및 시제품 제작

가. 자동화 장비 구동 방법론 확립

: 자동화장비는 아래와 같은 조건을 충족시킬 것을 원칙으로 하여 기획되었다.

(1) 식품과 같이 샘플의 양이 많은 경우에 사용될 수 있어야 한다.

: volume과 number 두 가지 모두에서 충족되어야 함.

따라서 범용 실험관련 용기들에 대한 경제성 등을 평가하여 식품 분야에 적용될 수 있는 기존의 저렴한 시장 제품들이 구동될 수 있도록 하여야 할 뿐만 아니라 한 대의 장비에서 다수의 샘플 분석이 동시에 이루어지도록 설계되어야 한다고 판단함.

⇒ 1.5ml eppendorff tube뿐만 아니라 50ml cornical tube를 활용할 수 있도록 하였다.

또한 동시에 12개의 시료를 분석할 수 있도록 제작되었다.

(2) 식품 관련 현장에서 전문적인 지식 없이도 구동될 수 있는 적용성을 갖추어야 한다.

: 총괄과제의 최종결과 도출 시 구현될 시스템의 적용 매뉴얼 개발에 있어서 단순한 샘플 적용성 및 세척 과정 등의 자동화를 통하여 간단한 교육만으로 장비가 구동될 수 있도록 설계되어야 함. 또한 전문적인 실험실에만이 갖출 수 있는 여타 다수의 분석기기 등이 동시에 수반되어야 검사가 진행될 수 있는 기존의 외국계 제품들의 단점을 극복할 수 있어야 함.

⇒ 표준화된 프로토콜을 선택하여 작동버튼만을 누름으로써 세척과정이 자동으로 구동되도록 제작하였다.

(3) 전용 vessel 및 소모품이 아닌 기존 시장에서 다수 사용되는 체계를 수용할 수 있어야 한다.

: 앞서 언급된 범용 용기 뿐만 아니라 관련 소모품들의 수용할 수 있어야 함.

장비 뿐만 아니라 상당히 고가의 분석관련 소모품도 모두 수입에 의존하고 있는 실정임.

⇒ 앞서 언급한대로 용기의 한계는 극복하였고, 본 과제를 통해 제공되는 자성나노입자, 항혈청 뿐만 아니라 다양한 소모품 (소비가가 직접 제작 및 확보한 항체 등의 활용성 극대화)의 적용도 동시에 가능하도록 제작되었다.

이러한 특성은 비단 식품뿐만 아니라 다양한 인체, 산업동물 등에서 유래한 검체의 진단 및 검사용으로 활용성이 매우 클 것으로 판단되며, 실제 이후 언급될 경우와 마찬가지로 수입 곡물 내의 독소 검사, 우결핵 검사 등 활용성이 점차 넓어지고 있는 것을 확인할 수 있었다.

(4) 기존 선진국 회사들에서 보유하고 있는 특허를 극복할 수 있어야 한다.

: 분석 과정에서, 특히 세척과정에서의 구동 방식을 새로이 전환하여 신규 특허를 확보함으로써 시장개척에 있어 기존 제약을 극복하여야 함.

⇒ 50ml conical tube를 활용한 자동 세척 장치는 세계 최초로 개발되었으며, 이에 대한 특허를 출원할 계획이다.

(5) 자동화 장비의 국내 자체 생산 및 판매를 통해 저렴한 경제성을 확보하여야 한다.

: 수천만원을 넘나드는 기존 장비들은 현장에서 적용하기에 현실적으로 상당한 무리가 있음.

⇒ 본 과제를 통해 개발된 장비의 경우 원가계산을 통한 가격의 책정 과정이 남아 있기는 하나 대체적으로 수백만원 이상이 될 것으로 판단되지는 않으며, 이는 현재 개발된 본 장비보다 낮은 수준의 외산 장비에 비해서도 10배 이상 낮은 가격으로 판단된다.

(6) 상기와 같은 장점들을 활용하여 개별 시험 비용의 경제성 또한 아울러 확보하여 관련 검사 시장에서의 확대를 통해 시장의 영역을 넓혀야 한다.

⇒ 관련 학회 및 일반 바이오 시장에서의 적극적인 홍보와 마케팅을 통해 병원성 대장균, 살모넬라, 그리고 리스테리아 등 이외에 독소, 바이러스, 다양한 세균들에 대한 적용성을 널리 알려 본 개발 시스템의 광범위한 활용성을 극대화함으로써 넓은 시장성과 산업화 성과를 거둘 수 있을 것으로 충분히 기대된다.

4. 자성나노기반 복합체와의 상호 구동성 평가 및 개선

가. 자성나노기반 복합체의 구동성 평가

구현하고자 하는 장비는 nano bead와 multi protein G와의 바인딩 및 디바인딩, 그리고 이러한 nano bead - multi protein G와 다양한 바이오 마커들과의 바인딩 및 디바인딩을 통한 triple complex의 구현과정 뿐만 아니라 이후, triple complex와 다양한 식품, 사람과 동물의 검체 등 시료 내에 존재하는 병원성 미생물과의 바인딩 및 디바인딩이 단순화한 과정속에서 반복적으로 이루어지는 솔루션을 갖추도록 하여야 한다. 따라서 적절한 자력의 세기 및 세척단계 설정을 위한 회전수/및 방향 등을 분석하여 자성나노입자의 회수 할 수 있는 최적의 조건을 찾는 연구가 진행되어야 된다고 판단된다.

나. 예비 실험 결과

자력의 세기 및 세척단계에서의 회전수/방향 따른 자성나노입자의 회수율을 알아보기 위해 회전수는 100-500RPM으로 하고, 회전방향을 연속운전, step운전 및 왕복운동으로 설정하여 실험한바, 자성나노입자를 회수하기 위한 최적의 조건은 자력은3,250가우스(G)이상, 회전수는 400RPM 왕복운동으로 결정하였다.

5. 식품 검체를 통한 종합 평가

protein G trimer 단백질이 결합되어 있는 자성나노입자 10mg에 살모넬라 각 항원인자들에 대한 단클론 항체 혼합액을 넣고 자성나노입자 자동화 장비에서 30분간 400rpm으로 반응시켰다. 그 후 자력으로 자성나노입자들을 tube 벽쪽으로 모은 후 saline solution을 제거하였다. 그 후 멸균된 saline solution 1ml를 넣고 5분간 400rpm으로 2회 세척하였다.

1.5ml용 자성나노입자 자동화 장비를 활용한 경우 적은 용량만을 처리할 수 있을 뿐만 아니라 살모넬라균의 경우 시료 내에 30개 이상의 균수가 존재할 때 균의 검출이 가능하고, 대장균의 경우에는 150여개 이상의 균이 존재할 때 검출이 가능한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 3회 이상 반복하여 얻은 결과이며, 재현성 있게 결론되었다. 또한 살모넬라 항체균이 결합된 자성나노입자를 활용한 경우 대장균의 검출은 거의 되지 않았으며, 대장균 항체균이 결합된 자성나노입자를 결합시킨 경우에도 살모넬라균의 검출은 거의 없어 특이도에서도 매우 우수한 결과를 도출할 수 있었다.

50ml용 자성나노입자 자동화 장비를 활용한 경우 적은 용량만을 처리할 수 있을 뿐만 아니라 살모넬라균의 경우 시료 내에 약 1000개 이상의 균수가 존재할 때 균의 검출이 가능하고, 대장균의 경우에는 약 100여개 이상의 균이 존재할 때 검출이 가능한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 3회 이상 반복하여 얻은 결과이며, 재현성 있게 결론되었다. 또한 1.5ml 자성나노입자 자동화 장비를 활용한 경우와 마찬가지로, 살모넬라 항체균이 결합된 자성나노입자를 활용한 경우 대장균의 검출은 거의 되지 않았으며, 대장균 항체균이 결합된 자성나노입자를 결합시킨 경우에도 살모넬라균의 검출은 거의 없어 특이도에서도 매우 우수한 결과를 도출할 수 있었다.

6. 종합 구동성 평가 결과 기반 완성품 제작

자동화장비는 다음과 같은 조건을 충족시킬 것을 원칙으로 하여 제작되었다. 샘플이 많은 경우에도 사용될 수 있게 하기 위하여 volume과 number 두가지 모두 충족되어야 한다. 따라서 1.5ml eppendorff tube뿐만 아니라 50ml conical tube를 활용할 수 있게 제작되었으며 식품 관련 현장에서 전문적이 지식이 없이도 구동 될수 있게 표준화된 프로토콜을 선택하여 작동버튼만을 누름으로써 세척과정이 자동으로 구동되도록 하였다.

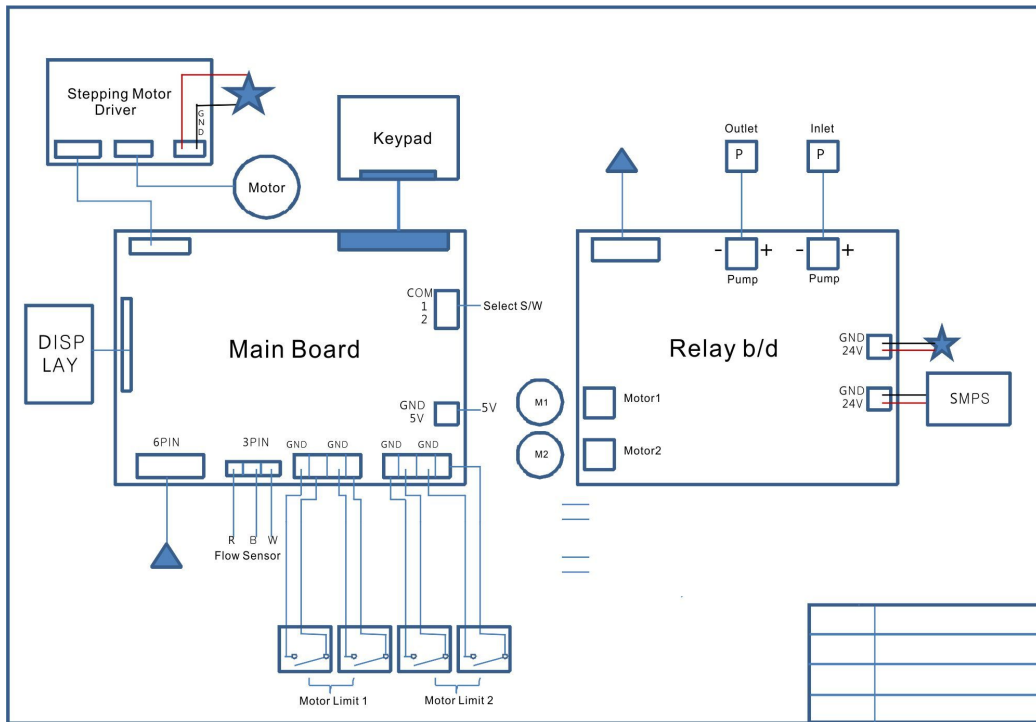


그림 106. 프로그래머블 콘트롤러 계통도

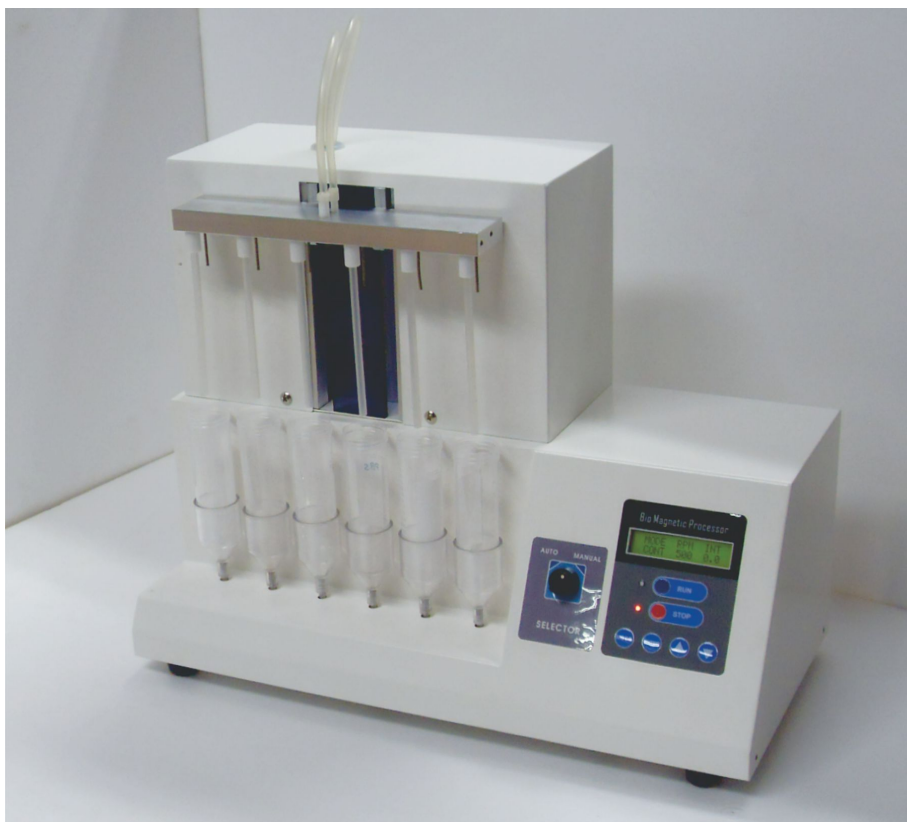
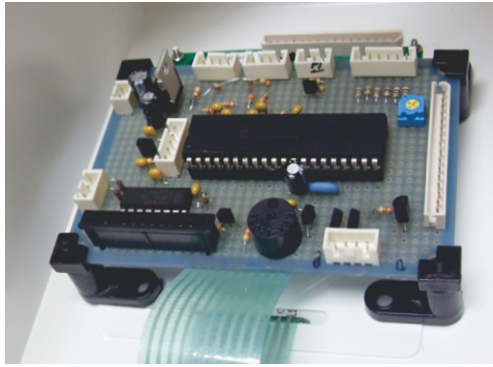
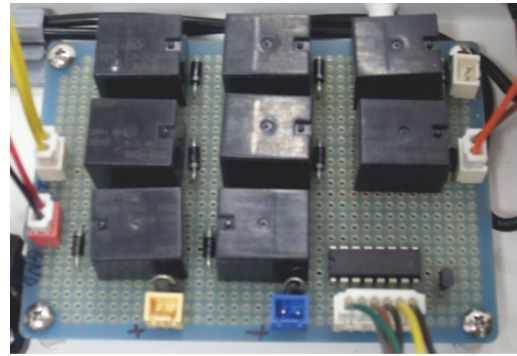


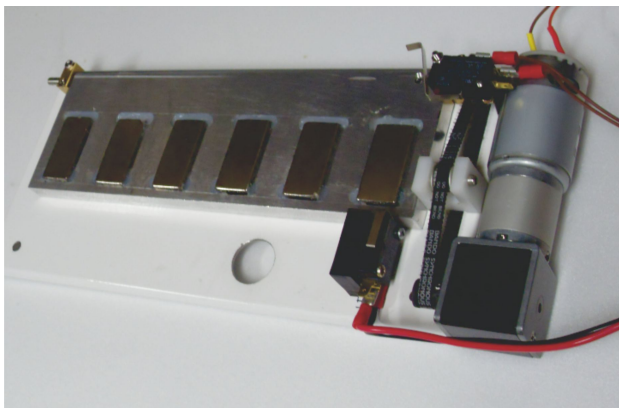
그림 107. 최종 개발완료 제품



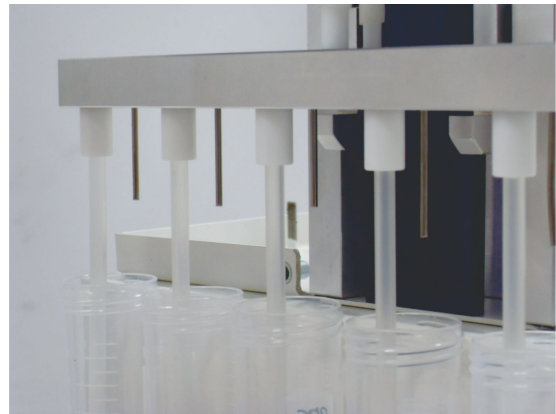
마이크로프로세서 콘트롤러(메인 PCB)



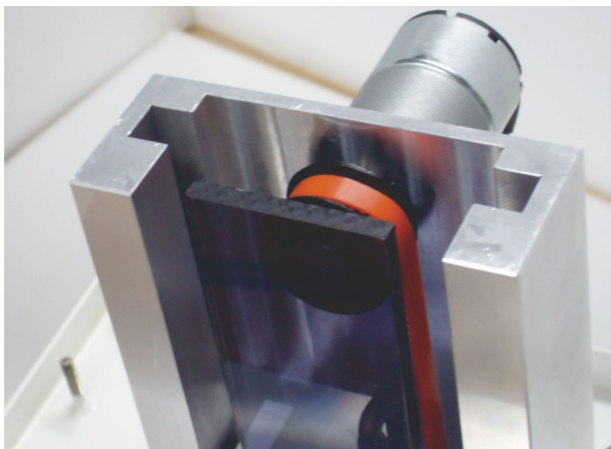
릴레이 보드 (구동PCB)



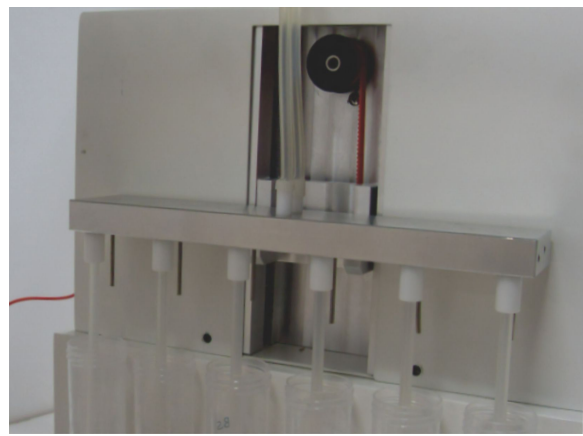
자력판 구동 장치



위싱장치 (흡입튜브& 버퍼공급튜브)



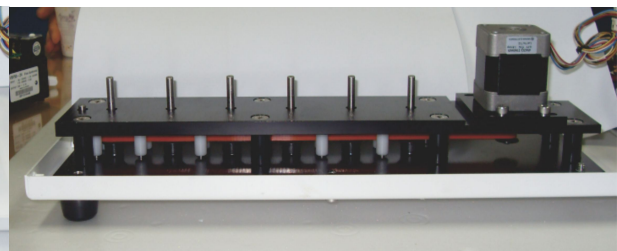
위싱장치 구동장치부1



위싱장치 구동장치부2



혼합장치 구동부1



혼합장치 구동부 2

그림 108. 주요 장치 부품

7. 자동화 장비 구동 방법론 확립 및 품질 평가 기준 설정

가. 자동화 장비 구동 방법 프로토콜

- (1) 전원은 220V의 전력을 이용하며, 전원스위치를 켜다.
- (2) 기기에 이상이 없으면 display창에 현재 상태가 표시된다.
- (3) MODE에서 RECP(왕복), STEP(단계), CONT(연속)을 위, 아래 버튼으로 설정할 수 있다.
- (4) MODE에서 RPM의 속도를 50~500rpm을 위, 아래 버튼으로 설정할 수 있다.
- (5) MODE에서 INT(회전단계delay시간)의 시간을 위, 아래 버튼으로 설정할 수 있다.
- (6) 내용물을 넣은 50ml cornical tube를 소켓에 장착한다.
- (7) RUN 버튼으로 반응을 시작할 수 있으며 STOP 버튼으로 멈출 수 있다.
- (8) 일정 시간 반응 후 자력 버튼을 눌러 마그네틱 비드를 벽면으로 끌어 모은다.
- (9) Suction기능으로 상층액을 제거 할 수 있다.

나. 자동화 장비 품질 평가 기준설정

자동화 장비 제품의 품질 평가는 KS규정에 의하며 시험 및 규정이 없는 것은 KS규정을 준용하였다.

- (1) 시퀀스시험- Micro processor와 부속장치에 의한 입출력 및 작동이 정확하게 목적대로 이루어지는 지 확인
- (2) 경보확인 - 시스템안전, 경보, 경광등에 대한 시험
- (3) I/O 확인 - 설정에 대한 input과 설정에 따라 작동되는 output이 정확한지에 대한 시험
- (4) 논리확인 - 입력값에 따른 출력에 대한 validation 범위에 대한 시험
- (5) 기타 - 전원의 전력값에 따른 시험

다. 제품의 시험 및 검사

(1) 일반사항

제품의 외형 및 내부 부속품들의 결속, 회로의 연결 등의 일반적인 외관상의 이상유무를 검사하였다.

(2) 모터

자력관 구동모터 상하 모터 2종류 사용하였으며 전류누설시험, 안전장치의 동작 시험, 소음 및 진동에 대한 시험에 합격한 것을 사용하여야 하며 전압 및 전류측정 시험에 합격한 것을 사용하여야 한다.

(3) 펌프

흡입펌프와 배출펌프가 있으며 누설시험을 실시하여야 하며 튜브는 실리콘 튜브를 사용하며 결합부위는 누설되거나 빠지지 않도록 적절한 클램프 설치되어야 한다. 안정장치의 동작유무를 확인 하여야 하며 소음, 진동에 대한 시험 및 검사에 합격한 것으로 하여야 한다.

(4) 자석

neodium 자석을 사용하며 자속이 500이상 유지되는 것을 사용하여야 하며 자력에 대한 주의문구를 삽입하여야 한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절

병원성 미생물 특성 분석/진단시스템 현장적용·평가 및 HACCP 적용 모델 구축 (1 세부과제)

1. 1차년도 목표 및 달성도

가. HACCP 적용 관련 문헌 및 연구내용 검토 및 종합

: 90% 달성

- 관련 법령 및 제도 검토
- [농림수산검역검사본부 고시 제2011-111호] 축산물위해요소중점관리기준
- 농림수산검역검사본부 고시 제2012-118호] 축산물의 가공기준 및 성분규격
- 축산물위생관리법(법률 제11358호) 개정(2012.8.23 시행)

나. 업종별, 축종별 공정 분석 및 발생가능 위해 조사

: 90% 달성

다. 주요 오염지침 미생물 (Indicative microorganisms; Total bacterial count, Coliform) 및 주요 병원성 미생물(*Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*)의 분리, 오염 현황 파악, 분리된 미생물의 특성분석 및 역학적 특징 분석

: 250% 달성

- 전국 도축장 및 가공장에서의 샘플 채취 및 분석

라. 표준균주와 국내분리균주와의 특성비교, 제 1협동과제 생산 표준균주 유래 혈청과 분리균주와의 반응성 검토를 통한 평가

: 90% 달성

2. 2차년도 목표 및 달성도

가. HACCP 적용 관련 문헌 및 연구내용 검토 및 종합

: 90% 달성

- 관련 법령 및 제도 검토
- [농림수산검역검사본부 고시 제2011-111호] 축산물위해요소중점관리기준
- 농림수산검역검사본부 고시 제2012-118호] 축산물의 가공기준 및 성분규격
- 축산물위생관리법(법률 제11358호) 개정(2012.8.23 시행)

나. 업종별, 축종별 공정 분석 및 발생가능 위해 조사

: 90% 달성

다. 주요 오염지침 미생물 (Indicative microorganisms; Total bacterial count, Coliform) 및 주요 병원성 미생물(*Vibrio parahaemolyticus*)의 분리 및 오염현황 파악, 분리된 미생물의 특성분석 및 역학적 특징 분석

: 100% 달성

- 전국 어시장 및 횃집에서의 샘플 채취 및 분석

라. 표준균주와 국내분리균주와의 특성비교, 제 1협동과제 생산 표준균주 유래 혈청과 분리균주와의 반응성 검토를 통한 평가

: 90% 달성

- 분리균주의 특성비교 완료 및 반응성 검토 결과 토대로 항체 제작에 활용

3. 3차년도 목표 및 달성도

가. 제 1협동과제개발 HACCP 관련 주요 병원성 미생물 (pathogenic *E. coli*, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*) 진단시스템의 현장적용 및 유효성 평가

: 90% 달성

- 현장적용을 위한 프로토콜 확립(향후 유효성 평가 예정)

나. 신속측정기법에 의한 국내 적정오염수준한계 설정

: 90% 달성

- 개발된 자동화장비를 사용 미검출 기준 확립

다. HACCP 생물학적 오염방지 현장 적용 기법 확립

: 90% 달성

- 각 작업장별 평가기준 분석 및 작업장 특징에 따른 공정별 평가기준 마련

4. 관련분야 기여도

가. 국내 분리균주 특성 분석

- 2년간에 걸쳐 전국의 도축장, 가공장, 어시장 등에서 병원성 미생물을 분리, 분석함으로써 국내 현황파악 및 분리균주 자원화

나. 국내 분리균주를 표준균주와 비교분석하고 특성을 분석함으로써 제 1협동과제의 항체개발에 필요한 항원제공의 토대 마련

다. 위해요소중점관리기준(HACCP)을 운용하는 현장에 적용할 수 있는 방안 모색 및 평가항목의 기준 마련

제 2 절

IT/NT/BT 복합기술을 이용한 인수공통 병원체 진단시스템 개발(1 협동과제)

1. 1차년도 목표 및 달성도

가. 단·다클론 항체 개발을 위한 항원 개발 및 평가

: 100% 달성

- 살모넬라, 병원성 대장균, 리스테리아 항원균주를 확보하고 이를 활용하여 표면 O 항원 (LPS) 등에 대한 항원 제작을 완료하여 정량 및 평가하였음.
- 브루셀라균에 대한 재조합 단백질을 유전자 재조합 기법을 활용하여 발현/정제 후 순도 및 성상을 평가하였음.

나. 단·다클론 항체 개발 및 평가

: 100% 달성

- 다수의 살모넬라균 (모든 혈청형 포함)과 병원성 대장균 50여종에 대한 다클론 항체를 생산 후 평가하였음.
- 브루셀라균 유래 재조합 단백질을 활용하여 단클론 항체를 제작하고 이를 평가하였음.

다. 자성나노입자 multi-core 방식의 개발

: 100% 달성

- 실리카 코팅 자성나노입자를 개발하여 전자현미경법 등을 통해 평가하였음.

라. multi-protein G 개발

: 100% 달성

2. 2차년도 목표 및 달성도

가. 표준균주 기반 바이오마커에 낮은 민감도/특이도를 보이는 분리주에 대한 신규 바이오마커 개발

: 100% 달성

- 자가역가가 상대적으로 낮은 병원성 대장균 유래 다클론 항체에 대한 재제작을 완료하고 이를 평가하였음.

나. 국내 분리주 중심의 최적의 조성 설정

: 90% 달성

- 국내에서 다발하는 분리주 중심으로 대장균의 진단혈청의 조합을 최적화하였으며, 살모넬라의 경

우 serogroup B와 D가 다발하는 것으로 보고되고 있지만 주요 축산물이 외국으로부터 수입되는 상황을 감안하여 모든 살모넬라균이 검출될 수 있도록 항원성 인자들이 모두 반영되는 방향으로 최적화하였음.

다. 재조합 multi-protein G 발현 및 정제조건 최적화

: 100% 달성

- protein G trimer까지 발현에 성공하고 (tetramer 이상은 대장균 발현 시스템에서 분해되는 등의 문제를 야기할 뿐만 아니라 재조합 단백질의 크기가 지나치게 커져 발현양 등에 한계를 보임에 따라 이상의 연장실험은 의미가 없는 것으로 판단함) 이들의 발현조적 최적화 및 정제조건을 최적화하였음.

라. 자성나노입자 성상 최적화 및 pG-nano particle-Ab 복합체 완성

: 100% 달성

- 실리카 코팅 자성나노입자를 활용하여 protein G trimer를 성공적으로 융합시켰으며, 이를 활용하여 항체와의 삼중복합체가 성공적으로 형성됨을 확인하였음.

마. 살모넬라균의 주요 항원성 인자들에 대한 단클론 항체 개발

: 100% 초과달성

- 계획에 없는 것으로 가장 효과적으로 모든 살모넬라균을 검출하기 위해서는 각 혈청형별로 중첩되는 항원성 인자의 패턴이 다양하다는 특수성을 감안하여 다양한 균주들의 항원성 패턴을 분석하고 이를 활용한 항원성 인자 특이 단클론 항체를 개발 완료하였음. 이는 가장 이상적인 단클론항체군의 최적 조합을 구성하는데 필수적이라 판단함.

3. 3차년도 목표 및 달성도

가. 표준 진단혈청의 제형화

: 100% 달성

- 각 진단혈청의 자가역가를 표준화하고 (수치화) 비특이반응이 완전히 제거되었음을 확인하였음. 또한 이를 정량 분주가 가능한 용기에 넣어 제형화하였으며, 이에 따른 평가를 완료하였음.

나. 현장적용 프로토콜 확립

: 100% 달성

- 현장에서 손쉽게 적용할 수 있는 방법론을 정립하였으며, 이는 자동화 장비와 연동되어 구동함.

다. 진단제제의 유통기한 설정 및 품질관리를 위한 시험 평가

: 100% 달성

- 각 진단제제를 구성하는 성분들에 대한 주기적인 평가를 통해 1년간의 유통기한 동안 정상적으로 작동함을 확인하였음.

4. 관련분야 기여도

가. 바이오마커개발

- 살모넬라균에 대한 단클론 항체균을 국내외적으로 최초 개발하여 보다 효율적인 검출을 유도할 뿐만 아니라 향후 수출에 높은 기여를 할 것으로 기대됨.
: 살모넬라균들에 다양한 패턴으로 존재하는 항원성 인자군들에 대한 단클론 항체 및 이들에 대한 평가는 본 과제를 통해 최초로 모든 항원성 인자군들에 대해 완성되었다고 판단됨.
- 병원성 대장균에 대한 진단혈청의 규모가 확대되어 국내 식품안전 뿐만 아니라 보건의료 분야에서의 활용성도 매우 클 것으로 판단됨.

나. 자성나노입자-protein G multimer-antibody 삼중복합체

- 삼중복합체를 multimer protein G를 활용하여 구성한 것 또한 세계 최초이며, 가장 많은 수의 항체를 단위 자성나노입자에 결합할 수 있는 방법이라고 평가됨. 또한 항체를 결합시키지 않은 이중복합체를 시장에 공급할 경우 다양한 연구자들에 의해 개발된 다양한 항체들의 활용성이 매우 높게 극대화될 것으로 판단함.
실제 농림수산검역검사본부에서 우결핵에 대한 항체를 활용하여 삼중복합체를 만들어 평가해보니 매우 우수한 결과를 얻을 수 있었으며, 곡물에서의 주요 3종 곰팡이 독소에 대한 단클론 항체균과의 작용성도 매우 우수하여 여타 분야에서의 활용성 극대화가 기대됨 (제 5장 연구개발 성과 및 성과 활용계획에서 자세히 언급).

제 3 절

축·수산물 오염 병원성 미생물 고감도 검출 진단제제의 현장 적용을 위한 자동화 장비 개발(2 협동과제)

1. 1차년도 목표 및 달성도

가. 선진국 장비의 기본 사양 분석 및 방향 설정

: 100% 달성

- 기 외국에서 시판되고 있는 장비를 확보하여 사양을 분석하고 향후 자동화를 위한 방향 설정을 완료하였음.

나. 자동화 단계별 요구·충족 조건 설정

: 100% 달성

- 자동화를 위한 개발과정에 있어 현장적용성을 극대화하기 위한 단계별 요구 및 충족조건을 설정하고 이를 평가하였음.

다. 단계별 사양 설비 및 규격 설정 및 시제품 제작

: 100% 달성

- 각 제작 공정상 사양 설비 및 규격을 설정하고 실험실 수준의 시제품의 제작을 완료하였음.

2. 2차년도 목표 및 달성도

가. 자성나노기반 복합체와의 상호 구동성 평가 및 개선

: 100% 달성

- 자성나노입자와의 연동성을 평가하기 위해 자력의 세기 및 세척단계 설정을 위한 회전수/방향 등을 분석하여 이를 반영하였음.

나. 식품 검체를 통한 종합 평가

: 100% 달성

- 육류 등에서 유래한 검체와 자성나노입자 복합체를 활용하여 자동화 장비 시제품에서의 작동성을 평가하였음.

다. 종합 구동성 평가 결과 기반 완성품 제작

: 100% 달성

- 시제품의 평가 결과를 기반으로 하여 완성품을 제작하였음.

3. 3차년도 목표 및 달성도

가. 자동화 장비 구동 방법론 확립 및 품질 평가 기준 설정

: 100% 달성

- 장비를 구동하는데 있어서의 방법론 분석 및 대량생산을 위한 품질 평가 기준을 설정하였음.

4. 관련분야 기여도

가. 30ml 내외의 검체를 활용하여 자동화 과정을 거쳐 식품위해 병원체를 검출하는 최초의 장비라고 평가됨.

나. 또한, 선진국에서 시판되고 있는 고가의 장비에 비해 높은 경제성을 갖추어 다방면의 식품산업에 있어서 현장 활용도를 극대화하였다고 판단됨.

* 계획대비 실적 및 달성도 요약

목표		성과	달성도
제 1 세 부	HACCP 적용 관련 문헌 및 연구내용 검토 및 종합	관련 법령 및 제도 검토	90
	주요 오염지침 미생물의 분리, 오염 현황 파악, 분리된 미생물의 특성분석 및 역학적 특징 분석	전국 도축장 및 가공장, 어시장 등에서의 샘플 채취 및 분석 (계획대비 2.5배 이상의 샘플 분석: 5000샘플 이상)	250
	표준균주와 국내분리균주와의 특성비교, 제 1협동과제 생산 표준균주 유래 혈청과 분리균주와의 반응성 검토를 통한 평가	분리균주의 특성비교 완료 및 반응성 검토 결과 토대로 항체 제작에 활용	90
	신속측정기법에 의한 국내 적정오염수준한계 설정	개발된 자동화장비를 사용 미검출 기준 확립(양념육 등 다양한 식품군에서의 한계 설정 예정)	90
	HACCP 생물학적 오염방지 현장 적용 기법 확립	각 작업장별 평가기준 분석 및 작업장 특징에 따른 공정별 평가기준 마련 (업종에 따른 현장적용 매뉴얼 작성 예정)	90
제 1 협 동	단·다클론 항체 개발을 위한 항원 및 항체 개발 및 평가	살모넬라, 병원성 대장균, 리스테리아 항원균주를 확보하고 이를 활용하여 표면 O 항원 (LPS) 등에 대한 항원 제작을 완료하고 단, 다클론 항체 개발 및 평가 완료	100
	표준균주 기반 바이오마커에 낮은 민감도/특이도를 보이는 분리주에 대한 신규 바이오마커 개발	자가역가가 상대적으로 낮은 병원성 대장균 유래 다클론 항체에 대한 재제작을 완료하고 이를 평가	100
	재조합 multi-protein G 발현 및 정제조건 최적화	protein G trimer까지 발현에 성공하고 이들의 발현조각 최적화 및 정제조건을 최적화하였음.	100
	자성나노입자 성상 최적화 및 pG-nano particle-Ab 복합체 완성	실리카 코팅 자성나노입자를 활용하여 protein G trimer를 성공적으로 융합시켰으며, 이를 활용하여 항체와의 삼중복합체가 성공적으로 형성됨을 확인함	100
	표준 진단혈청의 제형화 및 현장적용 프로토콜 확립	자가역가를 표준화하고 정량 분주가 가능한 용기에 넣어 제형화함	100
	진단체제의 유통기한 설정 및 품질관리를 위한 시험 평가	주기적인 평가를 통해 1년간의 유통기한 동안 정상적으로 작동함을 확인	100
제 2 협 동	선진국 장비의 기본 사양 분석 및 방향 설정	시판되고 있는 장비를 확보하여 사양을 분석하고 향후 자동화를 위한 방향 설정을 완료	100
	자동화 단계별 요구·충족 조건 설정	현장적용성을 극대화하기 위한 단계별 요구 및 충족조건을 설정하고 이를 평가	100
	단계별 사양 설비 및 규격 설정 및 시제품 제작	사양 설비 및 규격 설정 후 실험실 수준의 시제품의 제작을 완료	100
	자성나노기반 복합체와의 상호 구동성 평가 및 개선	자력의 세기 및 세척단계 설정을 위한 회전수/방향 등을 분석	100
	종합 구동성 평가 결과 기반 완성품 제작	시제품의 평가 결과를 기반으로 하여 완성품을 제작	100
	자동화 장비 구동 방법론 확립 및 품질 평가 기준 설정	방법론 분석 및 대량생산을 위한 품질 평가 기준 설정	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

※ 특허 및 논문은 본 연구사업에 의해 도출된 성과이며, 첨부된 국가기관 연구용역사업은 본 연구사업을 통해 개발된 원천기술에 기반한 확장된 응용기술을 바탕으로 한 것임을 명시합니다.

1. 진단제제 개발 성과 및 시장확보

가. 농림수산검역검사본부 병원성 대장균 진단혈청 개발 및 생산 연구용역 수행 중
 : 작년 (2011년)부터 2년간에 걸쳐 병원성 대장균 (181종 전체) 진단혈청 개발/생산하는 용역을 수행 중에 있음. 이 연구용역의 결과물이 향후 병원성 대장균 전체의 분리/검출에 보다 적극적으로 활용되어 국내 뿐만 아니라 해외 수출에 매우 큰 기여를 할 것으로 예상됨.

[별지 제4호서식]

용역연구 표준계약서		
계	발 주 처	경기도 안양시 만안구 안양6동 480번지 국립수의과학검역원
약	계약상대자	<ul style="list-style-type: none"> 상호 또는 법인명칭 : (주) 중검 사업자등록번호 : 134-8199407 주소 : 경기도 안산시 단원구 성곡동 688 시화공단 5바 701호 대표자 : 임 명 운 · 전화번호 : 031) 434-2184
계	용역연구과제명	
	계약금액	금 구천만원 (₩ 90,000,000)
약	총용역부기금액	금 일억팔천만원 (₩ 180,000,000)
	계약보증금	금 구백만원 (₩ 9,000,000) 계약금의 10%이상
내	지체상금율	천분의 이점오(2.5/1,000%)
	계약기간	11. 4. 6~12. 11. 30(총 1년 8개월간)
용	당해연도	11. 4. 6~11. 11. 30까지
	결과보고서 제출기일	2012년 11월 30일
기 타 사 항		
<p>계약담당공무원과 계약상대자는 상호 대등한 입장에서 위 용역연구과제에 대한 도급계약을 체결하고 신의에 따라 성실히 계약상의 의무를 이행할 것을 확약하며 이 계약의 증거로서 계약서를 작성하여 당사자가 기명 날인한 후 각각 1통씩 보관한다.</p> <p>붙임서류 : 1. 용역연구계약 특수조건 1부. 2. 용역연구사업계획서</p> <p style="text-align: right;">2011년 4월 6일</p> <ul style="list-style-type: none"> 계약담당공무원 <ul style="list-style-type: none"> - 국립수의과학검역원 재무관 김 부 친 (인) - 용역과제담당자 : 소속 질병진단센터 직위 연구관 성 명 정병열 (인) 계약상대자 <ul style="list-style-type: none"> - 주관연구기관장 : (주) 중검 대표자 임명운 (인) - 주관연구책임자 : 소속 (주) 중검 직위 대표이사 성 명 임명운 (인) 		

[별지 제4호서식]

용역연구 표준계약서		
계	발 주 처	경기도 안양시 만안구 안양6동 480번지 농림수산검역검사본부
약	계약상대자	· 상호 또는 법인명칭 : (주) 중검 · 사업자등록번호 : 134-81-99407 · 주소 : 경기도 안산시 단원구 성곡동 688 시화공단 5바 701호 · 대표자 : 임명운 · 전화번호 : 031-434-2184
내 용	용역연구과제명	Single 및 poly로 구성된 대장균(181종) 표준항혈청 셋트 제작
	계약금액	금 구천만원 (₩ 90,000,000)
	총용역부기금액	금 일억팔천만원 (₩ 180,000,000)
	계약보증금	금 구백만원 (₩ 9,000,000) 계약금의 10%이상
	지체상금율	천분의 이점오(2.5/1,000%)
	계약기간	2011. 4. 6 ~ 2012. 11. 30(총 1년 8개월간)
	당해년도	2012. 2. 3 ~ 2012. 11. 30 까지
	결과보고서 제출기일	2012년 11월 30일
	기타사항	해당사항 없음
<p>계약담당공무원과 계약상대자는 상호 대등한 입장에서 위 용역연구과제에 대한 도급계약을 체결하고 신의에 따라 성실히 계약상의 의무를 이행할 것을 확약하며 이 계약의 증거로서 계약서를 작성하여 당사자가 기명 날인한 후 각각 1통씩 보관한다.</p> <p>붙임서류 : 1. 용역연구계약 특수조건 1부. 2. 용역연구사업계획서</p> <p style="text-align: center;">2012년 2월 3일</p> <p>· 계약담당공무원 - 농림수산검역검사본부 재무관 김부천 (인)</p> <p>· 용역과제담당자 : 소속 질병진단센터 직위 연구관 성 명 정병열 (인)</p> <p>· 계약상대자 - 주관련기관장 : (주) 중검 대표자 임명운 (인) - 주관련연구책임자 : 소속 (주) 중검 직위 대표이사 성 명 임명운 (인)</p>		

나. 질병관리본부 진단혈청 공급

: 살모넬라균, 장출혈성 대장균 등에 대한 슬라이드 응집반응용 진단혈청의 공급
2012년 4월 중 납품예정, 기대 매출 (6억5천만원-7억원).
전국의 시도보건환경연구원 및 보건소 등 540여개 기관에 배포예정.



그림 109. 질병관리본부 납품 병원성 대장균 진단혈청과 살모넬라 진단혈청 제품 사진

2. 자성나노입자-protein G multimer 복합체의 활용성 확대/극대화를 통한 연계 연구 활성화

가. 농림수산검역검사본부와의 산업체 공동연구 수행

: 자성나노입자를 활용한 수입 곡물에서 3종의 곰팡이 독소 신속정제키트를 개발하고 있음.

3종의 곰팡이 독소- Aflatoxin B1, Zeralenone, Dioxirivalenone

공동연구 협약서

- **과제명** : 나노물질과 곰팡이독소 특이항체 이용 곰팡이 독소(3종) 신속정제 키트 산업화 연구
 - 세부과제 1. 곰팡이독소 3종 특이항체 생산세포 산업체 이전 및 마그네틱 나노물질 생산 및 표준화 (국립수의과학검역원)
 - 세부과제 2. 정제키트 시제품 생산 및 현장적용성 평가 (중검)
- **협약공동연구비(총액)** : 총 일억원정 (₩ 100,000,000원)
 - 검역원 연구비 : 금 오천만원정 (₩ 50,000,000원)
 - 공동연구기관 연구비 : 금 오천만원정 (₩ 50,000,000원)
- **협약연구기간** : 2011년 6월 1일 ~ 2012년 11월 30일 (1년6개월)
- **협약당사자**
 - (갑) : 국립수의과학검역원장 이주호
 - (을) : ㈜중검 대표이사 임명운



상기의 공동연구사업 연구과제의 수행에 관하여 (갑)과 (을)은 다음과 같이 공동연구 협약을 체결한다.

제1조(연구과제의 목표 및 내용)

별첨 연구계획서의 연구목표 및 내용과 동일함

제2조(연구과제의 수행)

(갑)과 (을)은 별첨의 연구계획서에 따라 성실하게 수행하여야 한다.

제3조(연구비의 출자확인 등)

- ① (갑)과 (을)은 협약에 따라 과제의 착수시기, 연구비 소요액 등을 고려하여 연구비를 상호 출자한다.
- ② (을)은 연구계획서 상에 연구비의 출자를 확인할 수 있는 서류를 (갑)에게 제출하여야 한다.
- ③ 연구수행상 부득이한 경우 (을)은 연구비 부담액의 일부를 현물로 출자할 수 있다.

나. Mycobacterium (우결핵) 진단 효율화를 위한 연구지원 (농림수산검역검사본부)

소의 stool에서 신속히 우결핵 원인균의 검출 및 동정을 위해 본 과제를 통해 개발된 자성나노입자-protein G multimer 복합체를 활용하여 연구하고 있음.

자성나노입자를 활용하는 것은 검체 내에 존재하는 병원체의 농축 뿐만 아니라 직접 자성나노입자에 결합된 병원체를 자성나노입자와 함께 PCR을 실시할 수 있는 장점이 있을 뿐만 아니라 stool 내에 존재하는 PCR 방해 내지 억제 성분을

washing 과정을 거쳐 제거하는 기능이 있어 신속한 검출에 적극적으로 활용될 수 있는 장점이 존재하기 때문이다.

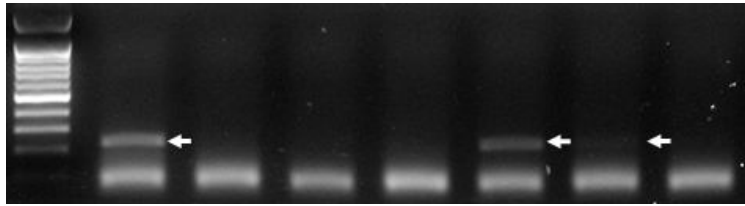


그림 110. 자성나노입자-protein G multimer 복합체를 이용한 우결핵균의 직접 PCR결과

다. 유방염 젖소에서 유래한 원유 중 오염 미생물 검출을 위한 연구 수행 중 이화여자대학교와 함께 유방염 젖소의 원유 중 미생물 검출기법 확립 연구 중에 있음. 향후 국내외 젖소 유방염 관리에 높은 기여를 할 것으로 예상된다.

협동과제 연구계약서

연구 과제명:
세균침습성 안티센스 펩타이드핵산 복합체를 이용한 젖소 유방염 및 항생제 내성제어 신기술 개발

계약 금액: 일금 300,000천원 정(정부출연연구개발비)

계약 기간: 2011. 9. 23 ~ 2014. 9. 22(당해연도 2011. 9. 23 ~ 2012. 9. 22)

연구계약당사자
(갑) 이화여자대학교 산학협력단장 (연구책임자 : 윤장원 연구교수)
(을) (주) 중결 대표이사 (연구책임자 : 임명운)

위 연구에 있어서 (갑)과 (을)은 다음 조항을 약정한다.

제1조 (목적)
본 계약은 (갑)과 (을)간의 "세균침습성 안티센스 펩타이드핵산 복합체를 이용한 젖소 유방염 및 항생제 내성제어 신기술 개발" 연구에 관한 전반적인 사항과 업무를 규정하고 상호 신의에 따라 계약을 성실히 수행하고자 함에 그 목적이 있다.

제2조 (연구의 범위 및 방법)
본 연구의 범위와 방법은 농림수산식품기술기획평가원에 제출한 최종계획서(협약)와 농림수산식품 연구개발사업 운영규정에 따른다.

제3조 (계약기간)
본 계약의 기간은 2011년 9월 23일부터 2014년 9월 22일까지로 한다.

제4조 (연구비 지급조건)
본 계약에 따른 총 연구비는 총 300,000천원으로 하며, 매해 다음과 같이 정부출연 연구개발비를 지급한다.

- 다 음 -

구분	정부출연연구비
1차년도	100,000천원
2차년도	100,000천원
3차년도	100,000천원

다만, 정부의 예산 및 협약이 변경 또는 해약되었을 경우에는 이를 변경할 수 있다.

- 1 -

3. 보다 신속한 검출을 위한 기반연구 구축

가. 나노항체와 형광단백질의 융합을 통한 신속한 검출기법 기반 연구 수행

본 연구과제를 통해 5-7일 정도 소요되는 병원성 미생물의 검출 기간을 1일 이내로 단축시켰으나, 농림수산식품부 해당부서에서는 우리나라 국민들의 식습관 (특히 소고기와 닭고기를 생식하는 경우가 늘고 있음. 소고기의 경우 유통시장이 급속히 늘고 있고, 2011년 약 1200억원 정도로 시장이 확대된 것으로 추산됨)을 고려하여 2시간 이내에 보다 신속히 검출 및 스크리닝할 수 있는 방법의 개발 필요성이 있으며, 이는 비단 육회 뿐만 아니라 빠르게 소비되는 식품의 특성상 보다 신속한 검출기술의 개발은 향후 산업화에 있어 높은 기여를 할 것으로 사료되는 바, 본 연구결과에 만족하지 않고, 자체 연구역량 강화를 통해 아래와 같은 보다 신속한 검출기법 확립을 위한 기반 기술개발이 상당히 진척되어 있으며, 향후 이를 완성하여 본 연구과제결과물과의 시너지 효과 증진에 매진할 예정이다. 이러한 효과를 거두기 위해서는 형광신호에 의한 즉각적인 검출 체계의 구축이 필요하며 아래와 같은 개념에 따른 박테리오파지에 대한 나노항체의 개발이 완료되었으며 이들 나노항체와 형광단백질 유전자와의 융합단백질 개발이 현재 진행 중에 있다.

보다 효과적인 신호증폭 시스템의 개발 필요

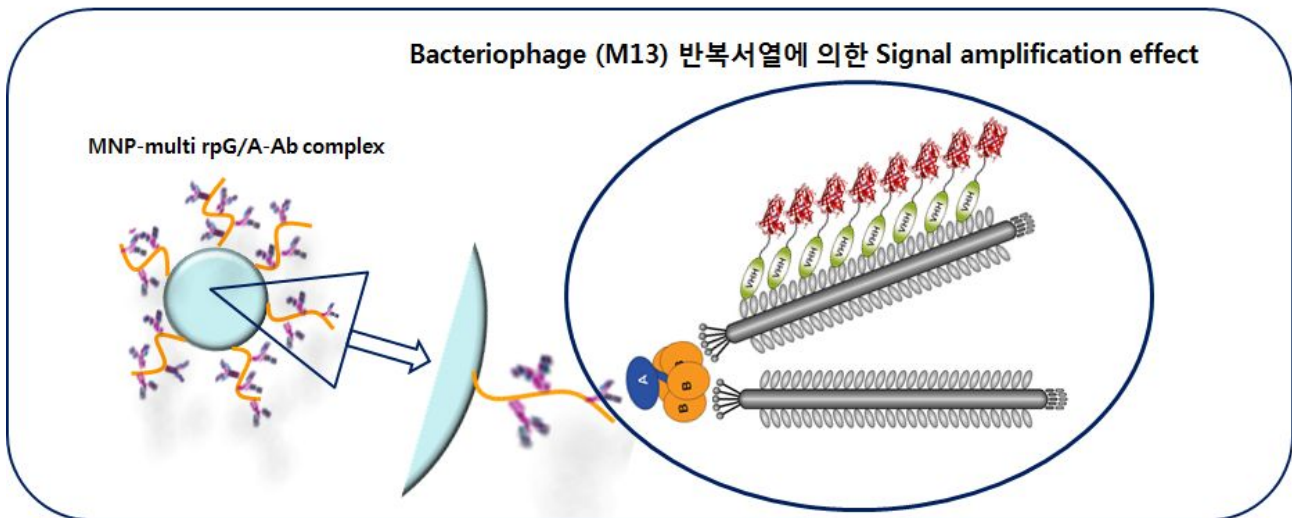
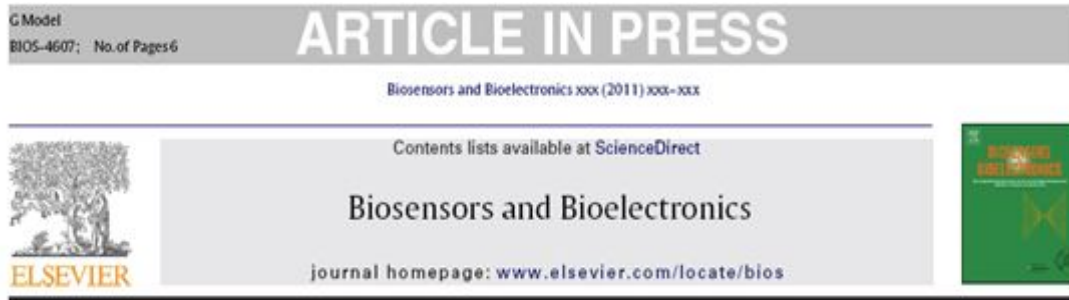


그림 111. 형광단백질과 bacteriophage를 활용한 효과적인 신호증폭 시스템 개발의 모식도

4. 논문 및 특허출원

가. 논문 1건 게재 (Enhancing immunoassay detection of antigens with multimeric protein Gs, Biosensors and Bioelectronics, 2011, IF: 5.3)



Enhancing immunoassay detection of antigens with multimeric protein Gs

Jin Hyung Lee^{a,*}, Hong Kyung Choi^a, Soo Youn Lee^a, Myung-Woon Lim^b, Jeong Ho Chang^{a,**}

^a Korea Institute of Ceramic Engineering and Technology (KICET), Seoul, Republic of Korea

^b Joong Kyoom Co., Kyonggi-do, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 April 2011
Received in revised form 6 July 2011
Accepted 8 July 2011
Available online xxx

Keywords:

Multimeric protein G
Antibody immobilization
Silica-coated magnetic nanoparticle
Immunoassay
Hepatitis B antigen
Magnetic immunosensor

ABSTRACT

This paper describes a method for the effective and self-oriented immobilization of antibodies on magnetic silica-nanoparticles using a multimeric protein G. Cysteine-tagged recombinant dimers and trimers of protein G were produced in *Escherichia coli* BL21 by repeated linking of protein G monomers with a flexible (GGGGS)₃ linker. Amino-functionalized silica-coated magnetic nanoparticles (SiO₂-MNPs, Fe₃O₄@SiO₂) were prepared and coupled to the protein G multimers, giving the final magnetic immunosensor. The optimal conditions for the reaction between the protein Gs and the SiO₂-MNPs was a time of 60 min and a concentration of 100 µg/mL, resulting in coupling efficiencies of 77%, 67% and 55% for the monomeric, dimeric and trimeric protein Gs, respectively. Subsequently, anti-hepatitis B surface antigen (HBsAg) was immobilized onto protein G-coupled SiO₂-MNPs. The quantitative efficiency of antibody immobilization found the trimeric protein G to be the best, followed by the dimeric and monomeric proteins, which differs from the coupling efficiencies. Using all three protein constructs in an HBsAg fluoroimmunoassay, the lowest detectable concentrations were 500, 250 and 50 ng/mL for the monomeric, dimeric and trimeric protein G-coupled SiO₂-MNPs, respectively. Therefore, multimeric protein Gs, particularly the trimeric form, can be employed to improve antibody immobilization and, ultimately, enhance the sensitivity of immunoassays. In addition, the multimeric protein Gs devised in this study can be utilized in other immunosensors to bind the antibodies at a high efficiency and in the proper orientation.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

나. 특허 2건 출원

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음.

제 7 장 참고문헌

- Akerstrom, B., Brodin, T., Reis, K., and Bjorck. L. 1985. Protein G: A powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.* 135:2589-2592.
- Albert, B. 1991. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. American society for Microbiology. Washington. DC.
- Allerberger, F., Rossboth, D., Dierich, M. P., Aleksic, S., Schmidt, H., and Karch, H. 1996. Prevalence and clinical manifestations of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Austrain children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15:545-550.
- Anker, H. S. 1970. A solubilizable acrylamide gel for electrophoresis. *FEBS Lett.* 7:293
- Atassi, M. Z. and Webster, R. G. 1983. Localization, synthesis, and activity of an antigenic site on influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:840-844.
- Austin, F. J. 1954. A study on the haemagglutinin of the Nakayama strain of Japanese B encephalitis virus. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 32:885-92.
- Avranmeas, S. and Ternynck, T. 1969. The crosslinking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry* 6:53-66.
- Baay, M. F. and in't Veld, J. H. J. 2000. Alternative antigens reduce cross-reactions in an ELISA for the detection of *Salmonella enteritidis* in poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 74:243 - 247.
- Batteiger, B., Newhall, W. J., and Jones, R. B. 1982. The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J. Immunol. Methods* 55:297-307.
- Baumgarten, J. H.(Eds.) 1992. *Monoclonal Antibodies*. Springer-Verlag. New York. USA.
- Beisiegel, U. 1986. Review: Protein blotting. *Electrophoresis* 7:1-18.
- Belanger, L., Sylvestre, C., and Dufour, D. 1973. Enzyme-linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures. *Clin. Chim. Acta* 48:15-18.
- Benenson A. S. 1985. *Control of communicable disease in man*. 13th ed. pp 331-340. The American Public Health Association. Washington.
- Bjorck, L. and Kronvall, G. 1984. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J. Immunol.* 133:969-974.
- Bochkova, N. G. and Pogodina, V. V. 1980. Immunotyping of Japanese encephalitis viral strains. *Vopr Virusol.* 35:318-22.
- Boyle, D. B., Marshall, I. D., Dickerman, R. W. 1983. Primary antibody responses of herons to experimental infection with Murray Valley encephalitis and Kunjin viruses. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 61:665-74.
- Carlson, S. A., Bolton, L. F., Briggs, C. E., Hurd, H. S., Sharma, V. K., Fedorka-Cray, P. J., and Jones, B. D. 1999. Detection of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104

- using multiplex and fluorogenic PCR. *Mol. Cell. Probes* 13:213 - 222.
- Carter, A. O., Borczyk, A. A., Carlson, J. A. K., Hrvey, B., Hockin, J. C. Karmail, M. A., Krishnan, C., Korn, D. A., and Lior, H. 1987. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N. Engl. J. Med.* 317:1496-150
- Casin, I., Breuil, J., Brisabois, A., Moury, F., Grimont, F., and Collates, E. 1999. Multidrug-resistant human and animal *Salmonella typhimurium* isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and intern-encoded beta-lactamase PSE-1. *J. Infect. Dis.* 179:1173 - 1182.
- Cha, T.W., Guo, A., and Zhu, X. 2005. Enzymatic activity on a chip: The critical role of protein orientation. *Proteomics* 5:416 - 419.
- Colan, J. W., KuLee, R., Webb, A., and Perry, M. B. 1999. *Salmonella landau* as a live vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 investigated in a mouse model of intestinal colonization. *Can. J. Microbiol.* 45:723-731.
- Cordovez, A., Prado, V., Maggi, L., Cordero, J., Martinez, J., Misraji, A., Rios, R., Soza, G., Ojeda, A., and Levine, M. M. 1992. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. *J. Clin. Microbiol.* 30:2153-2157.
- Cowan, S. T. 1974. *Cowan & Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* 2nd ed. pp 100-102. Cambridge University press London. New York, Melbourne.
- Darwish, M. A., Hammon, W. M., 1966. A high titered hemagglutinin in tissue culture prepared from Japanese B encephalitis virus. *Proc Soc Exp Biol Med.* 122:809-13.
- Dean-Nystrom, E. A., Bosworth, B. T., Cray, W. C., and Moon. H. W. 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect. Immun.* 65:1842-1848.
- Della-Porta, A. J., Westaway, E. G., 1977. Immune response in rabbits to virion and nonvirion antigens of the Flavivirus kunjin. *Infect Immun.* 15:874-82.
- Diano, M., Le Bivic, A., and Hirn, M. 1987. A method for the production of highly specific polyclonal antibodies. *Anal. Biochem.* 166:224-229.
- Ellouz, F., Adam, A., Ciorbaru, R., and Lederer, E. 1974. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59:1317-1325.
- Ewing, W. H. 1986. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae.* 4th ed. pp 137-172, 181-246. Elsevier press. New York.
- Fowler, J. M., Stuart, M. C., and Wong, D. K. Y., 2007. Self-assembled layer of thiolated protein g as an immunosensor scaffold. *Anal. Chem.* 79:350 - 354.
- Freeman, B. A. 1979. *Burrows Testbook of Microbiology.* 21st ed. pp 552-567. W. B. Saunders Co. Philadelphia.
- Freund, J. 1956. The mode of action of immunologic adjuvants. *Adv. Tuberc. Res.*

7:130-148.

- Fujita, N., Karabatsos, N., Shope, R. E. 1978. Effects of protamine sulfate on dengue type 1 viral activities. *Microbiol Immunol.* 22:315-23.
- Gefter, J. L., Margulies, D. H., and Scharff, J. D. 1977. A simple method for polyethylene glycol promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic Cell Genet.* 3:231-236.
- Gershoni, J. M. and Palade. G. E. 1982. Electrophoretic transfer of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter. *Anal. Biochem.* 124:396-405.
- Ghanekar, S. A., Cecilia, D., Kutubuddin, M., Goverdhan, M. K., Dandawate, C. N., Banerjee, K., Ghosh, S. N. 1991. Characterization of & induction of immune response to anti-idiotypic antibodies for JE virus. *Indian J Med Res.* 93:131-9.
- Gresikova, M., Rada, B. 1972. Studies on arbovirus haemagglutinin: differential inhibition of haemagglutinin formation by 6-azauridine and uridine kinase-containing cell-free extract. *Acta Virol.* 16:239-43.
- Griffin, P. M. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Pages 739-761 in: *Infections of the Gastrointestinal Tract.* M. J. Blaser, P. D. Smith, J. I. Ravdin, H. B. Greenberg, and R. L. Guerrant ed. Raven Press, New York, USA.
- Gunasegaran, K., Lim, T. W., Ahmed, A., Aaskov, J. G., Lam, S. K., Pang, T. 1986. Hemadsorption immunosorbent technique for the detection of dengue immunoglobulin M antibody. *J Clin Microbiol.* 23:170-174.
- Helenius, A. and Simons, K. 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 415:29-79.
- Higgs, S., Gould, E. A. 1991. Differences in fusogenicity and mouse neurovirulence of Japanese encephalitis viruses. *Arch Virol.* 119:119-33.
- Hoyle, B. 2000. Renewed concerns over *E. coli* O157:H7 in Ground beef. *ASM News.* 66(6):331-332.
- Hsu, U.-M. and Soban, E. 1982. Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 30:1079-1082.
- Huppertz, H. I., Busch, D., Schmidt, H., Aleksic, S., and Karch, H. 1996. Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin. *J. Pediatr.* 128:341-346.
- Ihnot, A. M., Roaring, A. M., Wierzba, R. K., Faith, N. G., and Luchansky, J.B. 1998. Behavior of *Salmonella typhimurium* DT104 during the manufacture and storage of pepperoni. *Int. J. Food Microbiol.* 40:117 - 121.
- Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council. 1996. Animal Environment, Housing, Management. Pages 21-55 in: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* The National Academic Press. Washington, D.

C. USA

- Ishikawa, T., Konishi, E. 2006. Mosquito cells infected with Japanese encephalitis virus release slowly-sedimenting hemagglutinin particles in association with intracellular formation of smooth membrane structures. *Microbiol Immunol.* 50:211-23.
- James G. F., Bennett J. C. 1984. Laboratory animal medicine. Pages 91-120 in : *Biology and Disease of rat.* Academic Press, USA.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., and Adelbe, E. A. 1987. Review of medical microbiology. pp 243-245. Appleton & lange. Norwalk. USA.
- Jones, B. D. and Falkow, S. 1996. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu. Rev. Immunol.* 14:533 - 561.
- Jung, Y., Lee, J. M., Jung, H., Chung, B. H., 2007. Self-directed and oriented immobilization of antibody by protein G-DNA conjugate. *Anal. Chem.* 79: 6534 - 6541.
- Jung, Y. J., Hong, B. J., Zhang, W., Tendler, S. J. B., Williams, P. M., Allen, S., and Park, J. W. 2007. Dendron arrays for the force-based detection of DNA hybridization events. *J. Am. Chem. Soc.* 129:9349 - 9355.
- Kang, K., Choi, J., Nam, J. H., Lee, S. C., Kim, K. J., Lee, S., and Chang, J. H. 2009. Preparation and characterization of chemically functionalized silica-coated magnetic nanoparticles as a DNA separator. *J. Phys. Chem. B.* 113:536 - 543.
- Karmali, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:15-38.
- Khan, A. A., Nawaz, M. S., Khan, S. A. and Cerniglia, C. E. 2000. Detection of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* 182: 355 - 360.
- Kimura, T. 1994. Characterization of binding and entry process of Japanese encephalitis virus infection to high-susceptibility and low-susceptibility cell lines. *Hokkaido Igaku Zasshi.* 69:857-65.
- Kimura T, Kimura-Kuroda, J., Nagashima, K., Yasui, K. 1994. Analysis of virus-cell binding characteristics on the determination of Japanese encephalitis virus susceptibility. *Arch Virol.* 139:239-51.
- Kitano, T, Suzuki, K., Yamaguchi, T. 1974. Morphological, chemical, and biological characterization of Japanese encephalitis virus virion and its hemagglutinin. *J Virol.* 14:631-9.
- Kohler, G. and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
- Kundin, W. D., Diercks, F. H. 1960. Demonstration of Japanese encephalitis virus hemagglutinin in hamster kidney cell culture fluids. *Virology.* 10:153-5.
- Laconcha, I., Lopez-Molina, N., Rementeria, A., Audicana, A., Perales, I., and Garaizar,

- J. 1998. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 40:27 - 34. 1998.
- Laegreid W. W., Elder, R. O. J., and Keen, E. 1999. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in range beef calves at weaning. *Epidemiol Infect.* 123:291-298.
- Lane, D. P. and Lane, E. B. 1981. A rapid antibody assay system for screening hybridoma cultures. *J. Immunol. Methods* 47:303-307.
- Lee, G. C. 1970. Application of cell culture to production of Japanese encephalitis virus hemagglutinin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 135:237-41.
- Li, Y., Frey, E., Mackenzie, A. M., and Finlay. B. B. 2000. Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. *Infect. Immun.* 68:5090-5095.
- Lin, P., Chen, S., Wang, K., Chen, M., Adak, A. K., Hwu, J. R., Chen, Y., and Lin, C. 2009. Fabrication of oriented antibody-conjugated magnetic nanoprobe and their immunoaffinity application. *Anal. Chem.* 81:8774 - 8782.
- MacFaddin, J. F. 1976. *Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria.* pp 35-399, 103-141, 187-308. The Williams & Wilkins Company Baltimore. USA. 1976.
- Mcintyre, L. 1999. *Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera.* pp 41-51. Centers for Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia. USA.
- Mason, P. W., Pincus, S., Fournier, M. J., Mason, T. L., Shope, R. E., Paoletti, E. 1991. Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. *Virology.* 1991 180:294-305.
- National Animal Ethics Advisory Committee. 1999. *Use of Animals in Research, Testing and Teaching.* Pages 14-18 in: *Guide to the Animal Welfare Act 1999.* Ministry of Agriculture and Forestry. Wellington. New Zealand.
- Neubert, H., Jacoby, E. S., Bansal, S. S., Iles, R. K., Cowan, D. A., Kicman, A. T., 2002. Enhanced affinity capture MALDI-TOF MS: Orientation of an immunoglobulin G using recombinant protein G. *Anal. Chem.* 74:3677 - 3683.
- Nilsson, K. and Mosbach, K. 1987. Tressyl chloride activated supports for enzyme immobilization. *Methods Enzymol.* 135:65-78.
- Okuno, T., Kondo, A., Suzuki, M., and Ito, T. 1965. Adsorption of Japanese encephalitis virus hemagglutinin on to goose red cells. *Jpn J Med Sci Biol.* 18:239-47.
- Paoletti, E. 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci.* 93:11349-11353.
- Pincus, S., Mason, P. W., Konishi, E., Fonseca, B. A., Shope, R. E., Rice, C. M., and Paoletti, E. 1992. Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of

- yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis. *Virology*. 187:290–297.
- Porter, T. and Whelan, J.(Eds.) 1986. Synthetic peptides as an antigen. John Wiley and Sons, Avon, England.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., and Cohen, M. L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681–685.
- Roy, D., Kwak, J., Maeng, W. J., Kim, H., Park, J. W. 2008. Dendron–modified polystyrene microtiter plate: Surface characterization with picoforce AFM and influence of spacing between immobilized amyloid beta proteins. *Langmuir* 24:14296 - 14305.
- Sabin, A. B. and Buescher, E. L. 1950. Unique physico–chemical properties of Japanese B encephalitis virus hemagglutinin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 74:222–230.
- Sedmak, J. J., Dixon, M., Schoenherr, C., Sabran, J. L., Grossberg, S. E. 1983. Interferon and antibody titrations using haemagglutinating Togaviridae and trypsinized human erythrocytes. *J Virol Methods.* 6:99–105.
- Shimizu, A., Nishimura, C., Kitaoka, M. 1975. Origin of heavy hemagglutinin of Japanese encephalitis virus. *Arch Virol.* 47:399–401.
- Springer, T. A. 1985. Hybridoma technology in the biosciences and medicine. Plenum Press, New York. USA.
- Susmel, S., Guilbault, G. G., and Sullivan, K. O. 2003. Demonstration of labelless detection of food pathogens using electrochemical redox probe and screen printed gold electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 18:881 - 889.
- Synge, B. A. 2000. Verocytotoxin–producing *Escherichia coli*: a veterinary view. *J. Appl. Microbiol.* 88:31–37.
- Tamura, K., Sakazaki, R., Murase, M., and Kosako, Y. 1996. Serotyping and categorisation of *Escherichia coli* strains isolated between 1958 and 1992 from diarrhoeal diseases in Asia. *J. Med. Microbiol.* 45:353–358.
- Tan, W. and Shelef, L. A. 2000. Automated detection of *Salmonella* spp. in foods. *J. Microbiol. Meth.* 37:87 - 91.
- Tani, T., Okubo, T. 1954. Studies on the hemagglutination reaction of Japanese B encephalitis virus, especially on the regaining of once lost hemagglutinin. *Jpn J Med Sci Biol.* 7:259–64.
- Thomas, A., Cheasty, T., Frost, J. A., Chart, H., Smith, H. R., and Rowe, B. 1996. Vero cytotoxin–producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in England and Wales. *Epidemiol. Infect.* 117:1–10.
- Threlfall, E. J., Angulo, F. J., and Wall, P. G. 1988. Ciprofloxacin–resistant *Salmonella*

- typhimurium* DT104. Vet. Rec. 142: 255.
- Trinh, R., Gurbaxani, B., Morrison, S. L., Seyfzadeh, M. 2004. Optimization of codon pair use within the (GGGS)₃ linker sequence results in enhanced protein expression. Mol. Immunol. 40:717 - 722.
- Valat, C., Limoges, B., Huet, D., Romette, J.L., 2000. A disposable protein A based immunosensor for flow injection assay with electrochemical detection. Anal. Chim. Acta 404:187 - 194.
- Van der Wolf, P. J., Bongers, J. H., Elbers, A. R. W., Franssen, F. M. C., Hunneman, W.A., van Exsel, A. C. A., and Tielen, M. J. M. 1999. Salmonella infections in finishing pigs in the Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. Vet. Microbiol. 67:263 - 275.
- Wang, H., Liu, Y., Yang, Y., Deng, T., Shen, G., Yu, R., 2004. A protein A based orientation controlled immobilization strategy for antibodies using nanometer sized gold particles and plasma polymerized film. Anal. Biochem. 324:219 - 226.
- Wells, J. G., Davis, B. D., Wachsmuth, I. K., Riley, L. W., Remis, R. S., Sokolow, R., and Morris, G. K. 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. J. Clin. Microbiol. 18:512-520.
- Whipp S.C., Rasmussen, M. A., and Cray, Jr. W. C. 1994. Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. J. Am. Vet. Med. Assoc. 204:1168-1175.
- Wu, C. J., Huang, H. W., and Tao, M. H. 2003. Induction of cross-protection against two wild-type Taiwanese isolates of Japanese encephalitis virus using Beijing-1 strain DNA vaccine. Vaccine 21:3938-3945.
- Yang, Z., Nielsen, R., Goldman, N., and Pedersen, A. M. 2000. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. Genetics. 155:431-49.
- Yakovleva, J., Davidsson, R., Bengtsson, M., Laurell, T., Emnéus, J., 2003. Microfluidic enzyme immunosensors with immobilised protein A and G using chemiluminescence detection. Biosens. Bioelectron. 19:21 - 34.
- Zimbro, M. J. and Power, D. A.(Eds.) 2003. Difco and BBL Manual. Manual of microbiological culture media. Becton, Dickinson and Company. Maryland.
- 이수해, 김용규, 강태석, 황진희, 황태연, 임채형, 서수진, 조정식. 2002. 실험동물 품질 표준화에 관한 연구. 식품의약품안전청연구보고서. 2002 Pages 435-442 in: 식품의약품안전청연구보고서.
- 이수해, 김용규, 강태석, 황진희, 황태연, 임채형, 서수진, 조정식. 2002. 국가 실험동물관리 선진화 프로그램을 위한 기초연구. Pages 443-450 in: 식품의약품안전청연구보고서.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.