

636.089446
L 2936
19

GOVP1200201372

최 종
연구보고서

우육 및 유제품의 Listeria 오염방지를 위한
신속검출법의 개발

서울대학교

농림부

[별지 제7호 서식]

최 종 보 고 서

190mm × 268mm

1998 년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한

우유 및 유제품의 Listeria 오염방지를 위한 신속검출법의 개발에 관한

연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2001 년 10 월 20 일

주관연구기관 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 이 영 순 (인)

주관연구기관장 :

농 립 부 장 관 귀 하

직 인

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “우유 및 유제품의 Listeria 오염방지를 위한 신속 검출법의 개발에 관한 연구” 과제 의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 10 월 20 일

주관연구기관명 : 서 울 대
총괄연구책임자 : 이 영 순
세부연구책임자 : 이 영 순
협동연구기관명 : 경 기 대
협동연구책임자 : 윤 병 수
협동연구기관명 : 제 주 대
협동연구책임자 : 임 윤 규
협동연구기관명 : 수 과 검
협동연구책임자 : 조 남 인

요 약 문

I. 제 목

우유 및 유제품의 *Listeria* 오염방지를 위한 신속 검출법의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

*Listeria monocytogenes*는 인간과 동물에서 발생하는 리스테리아증의 원인균으로, 이병의 사회적 중요성은 노령인구의 증가 및 냉장 즉석식품의 증가에 비례하여 높아만 지고 있다.

이 세균은 Gram양성, 비포자생성 세균으로 *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* 와 함께 분류학적으로 리스테리아 속에 속한다. 최신 조사 결과(신광순, 1997)를 보면, *Listeria*의 발견율(발견된 시료수/검사 시료수)은 우유에서 14.0%, 돈육에서 10.5%, 계육에서 23.2%로 나타나, 이 세균이 국내에 광범위하게 존재하며, 국내산 식육류에 대한 *Listeria*오염율은 이미 매우 위험한 수준임을 보여준다. 이 세균들 중 *Listeria monocytogenes* 만이 인간과 동물에 대한 병원균이며, 동물의 병원균인 *L. ivanovii*,를 제외한 나머지 세균은 비병원성 세균이다.

사람의 리스테리아증은 최근 주요한 식품유래성 전염병으로 인식되고 있다. 미국의 질병통제방제센터(CDC)는 리스테리아증의 발병빈도를 연간 인구 백만명당 7.4 예이며, 이는 모두 리스테리아로 오염된 음식을 섭취한 것과 관련이 있었다고 보고하고 있다. 이 병은 고열, 기침 그리고 유산 등의 증상을 보이며, 보통 30-40%의 치사율을 보인다. 이런 높은 치사율 때문에 리스테리아로 오염된 식품이 소비자에 이르기 전에

리스테리아를 검색하는 것은 매우 중요하다 하겠다.

미생물학적 배양법에 의한 기존의 식품에서 *L. monocytogenes* 의 검색법은 많은 시간이 소요되며, 어렵고 결과의 판독 또한 불분명한 경우가 많았다. 또한 이미 다른 연구자에 의해 개발되었던 PCR 또는 ELISA와 같은 면역학적 방법을 사용하는 진보된 검사법들은 병원균인 *L. monocytogenes* 와 다른 비병원성 리스테리아균들을 구별하는데 이르지 못하고 있다. 더욱이 이들 진보된 검사법들도 식품에서 *Listeria*의 오염 정도를 직접 정량하는 것은 기대할 수 없는 수준이었다.

따라서 본 연구에서는 우유 및 유제품에서 리스테리아 오염을 방제하기 위한 일련의 리스테리아 신속 검색 키트들을 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서 *Listeria* 신속검출법들을 4가지 다른 용도에 적용될 수 있도록 각각 연구개발을 집중하였다. 즉, 1) 오염된 시료로부터 *Listeria* 6종 모두를 검색할 수 있는, 높은 민감도를 가진, 간단한 실험의 PCR실험법, 2) *Listeria* 6개 종을 각각 종 동정할 수 있는, 높은 정확성을 가진, 간단한 실험의 PCR 실험법, 3) 많은 수의 시료를 한번에 검사할 수 있는 쉽고 간단한 ELISA실험법, 4) 현장실험에서 즉시 결과를 판독할 수 있는 간단한 래피드 실험법 (lateral flow rapid kit 또는 면역클로마토그라피법) 등이다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 일반 리스테리아 검사용 및 *L. monocytogenes*를 비롯한 다른 *Listeria*의 종동정용으로, 다중 검사 PCR (multiplex PCR)법을 사용하여, 빠르고, 간단하며 민감도가 높은 *Listeria* PCR 검사법을 개발하였다 (*Listeria monocytogenes* PCR detection kit, *Listeria ivanovii* detection kit and *Listeria* PCR detection kit). 또한 리스테리아 특유의 항원인 p60과 섬모 항원을 재조합 DNA기법으로 생산한 후, 이들 항원을 이용하여 항 리스테리아 특이 항체 (단클론 및 다클론 항체)를 생산하

였다. 생산된 항체들을 조합하여 우선 다수의 시료를 검사할 수 있는 리스테리아 검사용 ELISA 키트를 개발하였으며, 현장에서 바로 결과를 판독할 수 있는 빠르고 간단한 래피드 키트(*Listeria rapid detection kit*)를 개발하였다.

이들 새로운 실험법들을 일반적인 리스테리아 검사에 도입하기 위하여는 키트들의 성능에 대한 폭넓은 검증이 있어야 하기에, 지리적으로 격리되어 있는 수많은 나라 (한국, 일본, 중국, 타이, 미국, 캐나다, 멕시코, 뉴질랜드, 헝가리, 덴마크, 벨기에, 독일)에서 분리된 수많은 리스테리아 균주들을 대상으로 개발된 키트들의 성능을 검증하였다. 또한 이미 개발되어 상업적으로 판매되고 있는 PCR, ELISA, Rapid kit들을 입수하여 본 연구에 의해 개발된 키트들과 그 성능을 정확성, 민감성, 간편성, 신속성의 측면에서 비교 분석하였다. 비교실험의 결과는 본 연구에서 개발된 PCR kit들 (*Listeria monocytogenes* PCR detection kit, *Listeria ivanovii* detection kit and *Listeria* PCR detection kit)이 정확성의 면에서 가장 우수한 것으로 판명되었으며, 본 연구에서 개발된 ELISA 및 래피드 키트(*Listeria detection ELISA kit*, *Listeria rapid detection kit*) 들도 기존 판매되고 있는 동종의 키트들과 비교하여 상대적으로 우수하며, 최소한, 동등의 검색력을 가지고 있는 것으로 나타났다.

본 연구에 의해 개발된 리스테리아 검색키트들은 그 우수한 성능 및 저렴한 생산비를 인하여 향후 우육 및 유제품의 리스테리아 오염방지를 위한 중요한 도구가 될 것이다.

SUMMARY (영문 요약문)

Listeria monocytogenes is the etiologic agent of human-and animal listeriosis. Its social significance is increasing in parallel with the expansion of elder population and the expansion of refrigerated ready-to-eat foods.

This bacteria belongs taxonomically to Genus *Listeria* that comprises a heterogenous group of gram-negative, non-spore forming six bacteria species including *Listeria ivanovii*, *Linnocua*, *L.seeligeri*, *L.welshmeri* and *L.grayi*. In recent study, *Listeria* species have been isolated from meat-samples of cattle, swine and chicken in Korea, and the isolation rates (detection/samples) were showed as 14.0%, 10.5% and 23.2%, respectively (Shin, KS, 1997). It is indicating that it is wide-spread in Korea and that the contamination-rate of *Listeria* in meats is already reaches to high level of risk. Among these species only *L. monocytogenes* is pathogenic bacterium for human and animal, and other species are known as non-pathogenic bacteria except *Listeria ivanovii* for animal-listeriosis.

Human listeriosis has been recognized as a significant foodborne outbreak in recent years. Centers for Disease Control and prevention USA reported that the frequency of listerial outbreak was about 7.4 cases per million population, and most of these cases were associated with the consumption of contaminated foods. The disease is characterized by septicemia, meningitis and abortion, often causing 30-40% mortality. Because of the high mortality rate, it is very important to detect

this microorganism before the contaminated food reaches the consumer.

The detection of *L.monocytogenes* in food by standard microbiological techniques is time consuming, complicated, and variable. The advanced methods that were already developed by using PCR or immunological principle like ELISA were not reached to differ between *L.monocytogenes* and other non-pathogenic listerial species. In addition, it does not provide a means for direct enumeration of the organism in food,

Therefore, we developed a series of listerial detection kits for the prevention of listerial contamination from meat and milk product. The development of listerial detection kits was intended for the 4 different kinds of usage; 1) high sensitive and simple PCR that could detect all 6 listerial species from contaminated samples, 2) high accuracy and simple PCR that could species-identify each 6 listerial species, 3) easy and simple ELISA that could test the large numbers of samples, 4) simple lateral flow rapid test that could determinate in field test.

In this study, multiplex PCR methods for the listerial detection and the confirmation of *L. monocytogenes* and other listerial species have been developed as rapid, simple and sensitive method (*Listeria monocytogenes* PCR detection kit, *Listeria ivanovii* detection kit and *Listeria* PCR detection kit). After the production of listerial specific antigen, p60 and flagella antigen, by using recombinant DNA technique, anit-listerial specific antibodies (polyclonal and monoclonal) were produced. In addition, with these antibodies *Listeria* detection ELISA kit have also been developed for the large numbers of samples. And Lateral flow rapid kits using specific antibodies against *Listeria* (*Listeria* rapid detection kit) have also been developed as rapid, simple and easy handling.

Because general acceptance of a new method will only be realized after extensive testing, we have tested as possible as many different *Listeria* strains that were isolated from environmental and food samples of geographically isolated countries

(Korea, Japan, China, Thailand, USA, Canada, Mexico, New Zealand, Hungary, Denmark, Belgium and Germany). Also, the PCR, ELISA and Rapid kits that were developed in this study were compared with other commercially available kits, in the point of view as accuracy, sensitivity, easy handling and rapidity with hundreds of strains. The results have shown that the developed PCR kit (*Listeria monocytogenes* PCR detection kit, *Listeria ivanovii* detection kit and *Listeria* PCR detection kit) in this study were scored as the best in the point of accuracy. And, ELISA kit and Rapid kit that were developed in this study (*Listeria* detection ELISA kit, *Listeria* rapid detection kit) were also shown, at least, equal quality as the best one of commercially available kits.

Because of the high quality and low production-cost, the *Listeria* detection kits that were developed in this study could be very valuable tools for the control of listerial contamination in meat and milk products.

.CONTENTS (영 문 목 차)

Summary (Korean).....	2
Summary (English).....	5
Contents (English).....	8
Contents (Korean).....	13
Chapter 1. Introduction.....	18
Section 1. Purpose and the details of research.....	18
1. Purpose of project.....	18
2. The details of project.....	19
A. The development of Listeria rapid detection by using PCR.....	19
B. The development of Listeria species confirmation detection by using PCR.....	19
C. The production of Listeria specific antigen protein by using recombinant DNA technique.....	19
D. The production of polyclonal antibody for the Listeria ELISA test.....	19
E. The production of monoclonal antibody for the Listeria ELISA test.....	20
F. The development of Listeria ELISA system for lab-scale.....	20
G. The development of immunochromatographic method for the field test.....	20
H. Standard method for the isolation of Listeria spp. and the comparative test between developed kits and imported kits.....	20
Section2. Background of development.....	21
1. Technical views in listerial detection.....	21
2. Economic and industrial views in listerial detection.....	26

3. Social and cultural views in listerial detection.....	27
Section 3. Listeria detection kits in land and imported.....	29
1. Technical levels of listerial detection in land.....	39
2. Aspects and now what?.....	31
Chapter 2. Listeria spp. PCR detection kit.....	33
Section 1. Introduction	33
Section 2. The development of Listeria PCR detection kit	33
1. Listeria strains.....	33
2. Oligonucleotide primers.....	34
3. The efficiency of detection of <i>Listeria</i> Multiplex PCR with type strains.....	36
4. SIWIII Multiplex PCR for the detection of <i>L.ivanovii</i> , <i>L.seeligeri</i> , <i>L.welshimeri</i>	37
5. The best condition of <i>L.ivanovii</i> detection using Gradient PCR.....	38
6. The comparative test of chromosomal DNA isolation Methods for the <i>Listeria</i> Multiplex PCR	40
7. The efficiency of detection using multiplex PCR in food-samples.....	42
8. PCR detection in milk-samples.....	43
A. The efficiency of detection using PCR in milk-samples.....	43
B. The recovery-rate of <i>L.monocytogenes</i> from milk using centrifugation.....	44
C. The PCR detection limit of <i>L. monocytogenes</i> in milk	45
D. Optimal conditions for the best PCR detection	46
Chapter 3. Antigen production of Listeria spp.....	47
Section 1. Introduction	47
Section 2. The recombinant p60 antigen of Listeria.....	48
1. Molecular cloning of p60 protein.....	48
A. Culture of <i>Listeria spp.</i> and purification of genomic DNA.....	48
B. Amplification of <i>iap</i> gene using PCR and T-vector cloning.....	49
C. Subcloning into pMAL-c2 expression vector.....	50
2. Expression of recombinant Listeria spp. p60 protein.....	54
A. Comparative test for expression-condition of recombinant p60 protein.....	54
1) Expression of MBP-p60/mono.....	54

a) IPTG concentration in expression of MBP-p60/mono	54
b) Induction time in expression of MBP-p60/mono	55
2) Expression of MBP-p60/grayi	56
3) Expression of other <i>Listeria</i> p60 recombinant proteins	58
3. Mass production of recombinant p60 protein and its purification	61
A. Purification of MBP-p60/mono and MBP-p60/iva proteins	61
B. Purification of MBP-p60/grayi proteins	62
4. Protein concentration	64
5. Concentration of extracellular protein	64
Section 3. Flagella antigen production of <i>Listeria</i> spp.	64
1. Culture	64
2. Isolation of flagella	65
3. Identification of antigen	65
A. SDS-PAGE	65
1) flagella protein in SDS-PAGE	65
B. Expression of flagella	66
1) SEM(Scanning Electron Microscope)	66
2) TEM(Transmission Electron Microscope)	68
a) Purification of flagella using ultracentrifuge	68
Chapter 4. Anti- <i>Listeria</i> antibody production and the production of ELISA kit and rapid kit	69
Section 1. Introduction	69
Section 2. The production of anti-p60 monoclonal antibody	70
1. Monoclonal antibody of <i>Listeria monocytogenes</i> anti-p60	70
A. Immunization of <i>Listeria monocytogenes</i> recombinant p60 antigen	70
B. ELISA test	71
C. Animal cell culture	72
1) Storage of Cell	72
2) Recovery of Cell	72
3) Cell counting (Hemocytometer)	73
4) Subculture of cell line	73

D. Cell fusion of B-Lymphocyte and myeloma cell.....	73
E. Screening of hybridoma cell produced anti-MBP/p60 IgG.....	75
1) ELISA using hybridoma supernatent.....	78
2) Western blotting using hybridoma supernatent for p60 detection.....	79
3) ELISA using hybridoma supernatent for p60 detection.....	81
F. Screening of anti-MBP-p60/mono antibody using limit dilution.....	83
2. Titer test of <i>Listeria monocytogenes</i> specific antibody.....	84
A. ELISA test of <i>L. monocytogenes</i> extracellular p60 protein.....	84
B. ELISA test of <i>L. monocytogenes</i> and other species.....	86
C. Western analysis of <i>L. monocytogenes</i> and other species.....	89
D. Production of ascite fluid.....	91
Section 3. The production of anti-listerial flagella antibody	92
1. Polyclonal antibody.....	92
A. Rabbit polyclonal antibody.....	92
B. Production and isolation of Chick yolk antibody(IgY).....	92
1) Titer change of IgY.....	93
2) IgY in SDS-PAGE.....	93
2. Production of monoclonal antibody.....	94
A. Production of mAB against flagella from <i>Listeria monocytogenes</i> 4B.....	94
B. ELISA for the estimation of titer.....	95
C. Production of ascite fluid.....	95
D. Purification of antibody.....	96
3. The development of Sandwich ELISA.....	96
A. Cross-reaction.....	96
B. HRP labelled antibody (detectorAB).....	97
1) Titer of Detector antibody.....	97
C. Combination between Capture AB and detector AB.....	98
1) Combination between Capture AB and detector AB.....	98
D. Soecificity.....	99
E. Sensitivity.....	100
4. Development of Lateral flow rapid kit.....	102

A. Colloidal gold	102
B. Production of Colloidal gold-antibody polymer	102
C. Construction of Lateral flow rapid kit	102
1) Construction of Lateral flow rapid kit	103
D. Combination-conditions between Capture AB and detector AB	103
E. Cross-reaction	104
F. Specificity	105
G. Sensitivity	106
Chapter 5. Comparative test between developed kits and commercial kits	108
Section 1. Introduction	108
Section 2. Standard test and collection of strains	108
1. Sample collection	108
2. test methods	108
A. Isolation and storage of strains	108
Section 3. Comparative test between developed kits and commercial kits	115
1. Comparative test between developed kits and commercial kits	115
A. Detection limit of commercial kits	116
B. Species-identification of <i>L. monocytogenes</i> using commercial kits	117
2. Application test of developed kits with strains isolated from over the world	117
Reference	119

목 차

- 요 약 문.....2
- SUMMARY (영문요약문).....5
- CONTENTS (영 문 목 차).....8
- 목 차.....13
- 제 1 장 서 론.....18
- 제 1 절 연구개발 목적 및 범위.....18
 - 1. 연구개발의 목적.....18
 - 2. 연구개발의 내용.....19
 - 가. PCR방법에 의한 Listeria신속검출법의 개발.....19
 - 나. PCR방법에 의한 Listeria 확정검사법의 개발.....19
 - 다. 재조합 DNA방법에 의한 Listeria 특이항원단백질의 생산.....19
 - 라. Listeria효소면역검사법을 위한 polyclonal 항체의 생산.....19
 - 마. Listeria효소면역검사법을 위한 monoclonal 항체의 생산.....20
 - 바. Listeria효소면역검사법에 의한 실험실적 검사법의 개발.....20
 - 사. Listeria효소면역검사법에 의한 야외간이 검사법의 개발.....20
 - 아. 공인 표준검사법 및 수입 검출키트들과 개발된 신속검출법의 비교실험.....20
- 제 2 절 연구개발 배경.....21
 - 1. 리스테리아 검색의 기술적 측면.....21
 - 2. 리스테리아 검색의 경제·산업적 측면.....26
 - 3. 리스테리아 검색의 사회·문화적 측면.....27
- 제 3 절 국내외 리스테리아 검색키트들.....29
 - 1. 국내외 리스테리아 검색기술의 수준.....29
 - 2. 앞으로의 전망.....31

제 2 장 <i>Listeria</i> spp. PCR 검출 kit.....	33
제 1 절 서설.....	33
제 2 절 <i>Listeria</i> PCR 검출 kit의 제조.....	33
1. 공시균주.....	33
2. oligonucleotide primers.....	34
3. <i>Listeria</i> Multiplex PCR의 표준균주에서의 효율성 확인	36
4. <i>L. ivanovii</i> , <i>L. seeligeri</i> , <i>L. welshimeri</i> 의 검출을 위한 SIWIII Multiplex PCR.....	37
5. Gradient PCR을 이용한 <i>L. ivanovii</i> 의 최적 검출 조건 검사	38
6. <i>Listeria</i> Multiplex PCR 반응을 위한 Chromosomal DNA isolation Method 비교.....	40
7. 식품에 대한 multiplex PCR 검출법의 효율성 검사.....	42
8. 우유에서의 PCR 검출법.....	43
가. 우유에서의 PCR 검출 효율성 검사.....	43
나. 우유로부터 원심분리 rpm에 따른 <i>L. monocytogenes</i> 의 회수율 검사.....	44
다. 우유에서 <i>L. monocytogenes</i> 의 균수에 따른 PCR 반응 검출의 한계.....	45
라. PCR 반응조건.....	46
제 3 장 <i>Listeria</i> spp. 항원 생산.....	47
제 1 절 서설.....	47
제 2 절 <i>Listeria</i> spp. 재조합 p60 단백질 항원 생산.....	48
1. p60단백질 유전자 클로닝.....	48
가. <i>Listeria</i> spp. 균주의 배양 및 genomic DNA 순수분리.....	48
나. <i>iap</i> gene PCR 증폭 및 T-vector cloning.....	49
다. pMAL-c2 발현 vector에 subcloning.....	50
2. <i>Listeria</i> spp. 재조합 p60 단백질의 발현.....	54
가. 재조합 p60 단백질 발현조건 비교.....	54
1) MBP-p60/mono의 발현	54
가) IPTG 농도에 따른 MBP-p60/mono의 발현 조건비교.....	54
나) Induction 시간에 따른 MBP-p60/mono의 발현 조건.....	55
2) MBP-p60/ <i>grayi</i> 의 발현.....	56

3) 그 밖의 <i>Listeria</i> p60 재조합 단백질의 발현.....	58
3. 재조합 p60 단백질 대량생산 및 정제.....	61
가. 재조합 DNA로부터 얻어진 MBP-p60/mono와 MBP-p60/iva 단백질의 정제.....	61
나. 재조합 DNA로부터 얻어진 MBP-p60/grayi 단백질의 정제.....	62
4. 단백질 농축.....	64
5. 세포의 단백질 농축.....	64

제 3 절 *Listeria* Flagella 항원생산.....64

1. 배양.....	64
2. 편모분리.....	65
3. 항원의 확인.....	65
가. SDS-PAGE.....	65
1) flagella의 SDS-PAGE.....	65
나. flagella의 발현.....	66
1) SEM(Scanning Electron Microscope).....	66
2)TEM(Transmission Electron Microscope).....	68
가)초원심분리를 이용한 flagella의 정제.....	68

제 4 장 *Listeria* 항체 생산 및 ELISA, Rapid Kit 제작.....69

제 1 절 서설.....69

제 2 절 *Listeria monocytogenes* anti-p60 단일클론 항체 제작70

1. <i>Listeria monocytogenes</i> anti-p60 단일클론 항체 선별.....	70
가. <i>Listeria monocytogenes</i> 재조합 p60 항원 단백질 면역 주사.....	70
나. ELISA test.....	71
다. 동물세포 배양.....	72
1) Cell의 보관	72
2) Cell의 해빙	72
3) Cell counting(Hemacytometer)	73
4) 세포의 유지배양.....	73
라. B-Lymphocyte와 myeloma cell의 융합.....	73

마. anti-MBP/p60 IgG를 생산하는 hybridoma cell의 선별	75
1) 선별된 hybridoma cell의 상등액을 이용한 ELISA	78
2) Hybridoma의 상등액을 이용한 재조합 p60단백질의 Western detection	79
3) 선별된 hybridoma의 상등액을 이용한 재조합 p60 단백질의 ELISA	81
바. 제한 희석법을 통한 anti-MBP-p60/mono 단일클론항체의 선별	83
2. 단일클론항체의 <i>Listeria monocytogenes</i> 특이적 역가 test	84
가. hybridoma를 이용한 <i>L. monocytogenes</i> 의 세포외 단백질 p60의 ELISA	84
나. hybridoma를 이용한 <i>Listeria spp.</i> 에 대한 p60단백질의 ELISA	86
다. hybridoma를 이용한 <i>Listeria spp.</i> 에 대한 p60단백질의 Western blot	89
라. ascite fluid 제작	91
제 3 절 <i>Listeria</i> Flagella 항체제조	92
1. 다클론항체	92
가. Rabbit polyclonal antibody	92
나. Chick yolk antibody(IgY)의 생산 및 분리	92
1) IgY 역가 변화	93
2) IgY의 SDS-PAGE	93
2. 단클론항체의 생산	94
가. <i>Listeria monocytogenes</i> 4B의 flagella에 대한 Mabs의 생산	94
나. 항체가 측정을 위한 ELISA	95
다. 단클론항체의 복수생산	95
라. 항체의 정제	96
3. Sandwich ELISA의 개발	96
가. 교차반응 조사	96
나. HRP labelled 항체(detector항체)의 제작	97
1) Detector항체 역가	97
다. Capture항체와 detector항체의 조합조건	97
1) Capture항체와 detector항체의 조합조건	98
라. 특이도 조사	99
마. 민감도 조사	100
4. Lateral flow rapid kit의 개발	102

가. Colloidal gold	102
나. Colloidal gold-항체 중합체 제작	102
다. Lateral flow rapid kit의 구성	102
1) Lateral flow rapid kit의 구성	102
라. Capture항체와 detector항체의 조합조건	103
마. 교차반응	104
바. 특이도	105
사. 민감도	106
제 5 장 개발된 검색키트와 표준검사법 및 상용키트와의 비교실험	108
제 1 절 서설	108
제 2 절 표준검사법 및 균주의 확보	108
1. 시료 채취	108
2. 검사방법	108
가. 균분리 및 보관	108
제 3 절 개발된 키트들과 수입키트간의 비교검사	115
1. 개발된 키트와 수입키트간의 비교검사	115
가. 수입키트들의 검출한계 조사	116
나. 수입키트들의 <i>L. monocytogenes</i> 종동정 성능	117
2. 세계 각국에서 유래된 <i>Listeria</i> 균주들에 대한 개발 키트의 적용실험	117
참고자료 및 문헌	119

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발 목적 및 범위

1. 연구개발의 목적

본 연구의 연구개발 목적은 우육 및 유제품의 *Listeria monocytogenes*의 오염방지를 위한 신속검사방법의 국산화 개발이다. 이 연구목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 세부 목표를 정하고 연구를 추진하였다. 즉

- 1) PCR방법에 의한 *Listeria*신속검출법의 개발
- 2) PCR방법에 의한 *Listeria* 확정검사법의 개발.
- 3) 재조합 DNA방법에 의한 *Listeria* 특이항원단백질의 생산.
- 4) *Listeria*효소면역검사법을 위한 polyclonal 항체의 생산.
- 5) *Listeria*효소면역검사법을 위한 monoclonal항체의 생산
- 6) *Listeria*효소면역검사법에 의한 실험실적 검사법의 개발
- 7) *Listeria*효소면역검사법에 의한 야외간이 검사법의 개발
- 8) *Listeria* 분리동정에서 공인 표준검사법 및 수입 검출키트들과 개발된 신속검출법의 비교실험.

이런 다양한 *Listeria*검색방법 개발의 추구로 본 연구는 3종의 PCR 키트, 즉 리스테리아 검색용 PCR 키트, 리스테리아 모노사이토게네스 검색용 PCR 키트, 리스테리아 종 동정용 PCR 키트 등 개발하게 하였고, 다수의 항원과 다수의 항체를 생산하게 하였으며, 다수의 시료를 검사할 수 있는 리스테리아 검색용 ELISA 키트의 개발과 현장에서 바로 판정이 가능한 리스테리아 검색용 래피드 키트 들을 개발하게 되었다.

본 과제에서 개발된 다수, 다종의 검색키트들은 각기 정확성, 민감성, 신속성, 간편성을 추구하는 검색법의 다양한 요구를 충족시키려는 것 뿐 아니라, 다수의 시료를 처리할 수 있는 또는 현장에서 바로 판정이 가능한가 하는 용도에 맞추어 리스테리아 검색방법을 개발하고자 하였기 때문이다.

이러써 본 연구에 의해 개발된 다양한 검색법은 본 연구개발의 또 다른 면의 목적인 국가적인 리스테리아 제거정책의 주요 도구를 만들겠다는 목표를 달성하였고, 이로써 작게는 국내 유제품의 위생품질향상을 통한 경쟁력 강화에, 또한 크게는 국민건강 증진의 도구로써 사용되기를 기대한다.

2. 연구개발의 내용

가) PCR방법에 의한 *Listeria* 신속검출법의 개발

PCR방법에 의한 *Listeria* 신속검출법은 *iap* gene based *Listeria* PCR방법을 실용화한 것이다. 이는 민감도와 정확성을 높이는 방향으로 개발되었으며, 보다 광범위한 변종도 검색할 수 있는 검출키트로 완성하였다.

나) PCR방법에 의한 *Listeria* 확정검사법의 개발.

Listeria 확정검사법은 Multiplex PCR방법과 함께 보다 민감성이 높은 *Listeria* spp. detection PCR방법을 기본으로 사용하여, 새로이 확정실험용 PCR-primer를 설정하고, 1차 PCR-product를 재PCR하여 정확성을 보다 향상시켰었다. 이 방식의 키트는 배양된 독립균락을 대상으로 하는 것으로 선택배양 후 생화학검사를 수행하는 표준검사법과 비교하여 시간과 전문성이 요구되는 생화학검사에 대신할 수 있는, 보다 신속하고도 정확한 검출키트로 개발하였다.

다) 재조합 DNA방법에 의한 *Listeria* 특이항원단백질의 생산.

Iap (invasion associated protein)-gene은 *Listeria*속 고유이며, 체외분비 단백질인 p60을 coding하고 있으며, 이 단백질은 속내 각 종간 약간의 차이를 보이고 있다. 이 유전자를 재조합 DNA방법으로 molecular cloning하여 단백질 p60을 생산하여 단일 및 복합클론 항체제조에 항원으로 사용하였다. 이 방식은 쉽게 원하는 돌연변이 단백질을 제조할 수 있으며 민감도 높은 항체제조에 유용하게 사용될 수 있었다.

라) *Listeria* 효소면역검사법을 위한 polyclonal 항체의 생산.

리스테리아 고유의 섬모를 대량배양하여 항체제조에 사용되는 항원으로 이용하였다.

생산된 섬모항원은 우수한 항원결정력을 가졌으며, 단클론 항체의 제조 및 다클론 항체의 제조에 사용되었다.

따) *Listeria* 효소면역검사법을 위한 monoclonal 항체의 생산

상기 다) 및 라)의 결과로써 생산된 p60 단백질과 섬모항원들은 단일 및 복합클론항체의 생산에서 항원으로 사용되었다. 선별된 항체 중 민감도와 정확성을 고려하여 여러 용도의 검사법 Kit에 적용하였다.

바) *Listeria* 효소면역검사법에 의한 실험실적 검사법의 개발

상기 라) 와 마)의 결과에서 얻어진 항체 중 정확성이 뛰어난 또는 민감성이 뛰어난 항체를 선별하여 ELISA 방법에 의한 실험실적 검사법 키트를 개발하였다. 이들 검사법은 가)과 나)의 PCR 검사법 및 표준 검사법과 비교 시험을 수행하여, 개발 개선하였으며 실용적인 Kit로 완성하였다.

사) *Listeria* 효소면역검사법에 의한 야외 간이 검사법의 개발

상기 라) 와 마)의 결과에서 얻어진 항체 중 정확성이 뛰어난 또는 민감성이 뛰어난 항체를 선별하여 막 소재에 의한 야외 간이 검사법 키트(Lateral flow rapid kit)를 개발하였다. 이들 검사법은 가)과 나)의 PCR 검사법 및 표준 검사법 그리고 실험실적 효소면역검사법과 비교 시험을 수행하며, 개발 개선하여 가장 간편한 Kit로 완성하였다. 이 키트는 산업 현장에서 *Listeria*의 오염을 1차 monitoring하는 데 목적이 있다.

아) *Listeria* 분리동정에서 공인 표준 검사법 및 수입 검출 키트들과 개발된 신속 검출법의 비교 실험.

L. monocytogenes 검출에서 공인 검사 방법인 표준 실험법과 본 연구 과제에서 개발된, 그리고 현재 시판되고 있는 검출 키트들과 비교 실험을 실시하여, 산업 현장 및 국내 검사 기관에 적용 가능성을 확인하였다.

제 2 절 연구개발 배경

1. 리스테리아 검색의 기술적 측면

*Listeria monocytogenes*는 우리의 환경에 널리 분포되어 있는 인수공통전염병균으로, 선택적 저온성장의 특징을 가진다. 이는 주로 축산제품을 통하여 저항성이 약한 어린이와 산모, 노인 그리고 면역성이 약화된 환자에게 감염되어 높은 치사율(약 30%), 유산, 집단발병을 야기시킨다. 구미 선진제국에서도 이 *Listeria*가 “넓은 분포를 가지나 낮은 발병율을 보이는 약한 병원균”으로만 인식되다가, 그 잠재적 위험성을 처음 인지한 것은 *Listeria*중 집단발병사고가 증가되던 1985년 이래이다. 이는 사고 다발의 이유가 서구사회가 *Listeria*의 특성과 잘 일치되는, 즉 인구의 고령화(주 감염대상), 식생활의 높은 육류 및 유제품 의존성(주감염경로), 즉석냉장식품의 급격한 증가(저온성장) 등으로 분석되었기 때문이며, 국가적 제어가 없을 시, 이 *Listeria* 중은 차세대에 가장 위험한 선진국형 식품유래전염병으로 대두될 것임이 또한 예측되었기 때문이다.

따라서 구미 선진 제국에서는 “Zero tolerance”정책, - 즉 식품에서 *Listeria monocytogenes*의 검출은 그 식품의 전량폐기를 명령-을 1989년(USDA) 이래 시작하였고, 이로써 1990년 이후부터 해당기업들의 자구노력이 시작되어, *Listeria*의 오염경로를 차단하려는 노력이 여러 단계에서 경주되었다. 이러한 노력들의 결과로써 1990년 이래 식품에서 *Listeria*의 오염율과 리스테리아중의 발병율을 급격히 낮아지고 있어 Zero tolerance정책은 *Listeria*의 제어에 매우 효과적이었음을 증명하였다(B. Swaminathan; CDC, USA, 1995).

한편 국내의 식육 유통과정 개선을 위한 최신 조사 결과(신광순, 1997)를 보면, *Listeria*의 발견율은 우육에서 14.0%, 돈육에서 10.5%, 계육에서 23.2%로 나타나, 국내산 식육류에 대한 *Listeria*오염율은 매우 위험한 수준이며, 전혀 인위적 제어가 되지 않은 상태의 것으로 나타났다. 이는 국민보건의 위해뿐 아니라, 냉동육 등 수입축산제품과 국내산간의 품질경쟁 및 소비경쟁에서 매우 심각한 문제로 대두될 것이 예상된다.

선진제국에서도 지난 10년간 *Listeria*의 식품오염을 차단하기 위한 노력은 신속 간편한 검출방법의 개발(검사용 kit화)로 나타났으며, 이러한 신속검출법은 그 간편성으로 인하여 식품에서 *Listeria* 오염을 제거하는 데 큰 성과를 거두어 왔다. 이는 1) 리스테리아 특유 선택배지의 개발, 2) 리스테리아 특이항원을 이용한 검사키트의 개발, 3) 리스테리아 고유 핵산 염기서열을 이용하는 hybridization 또는 PCR검사법으로 대별되며 각각의 장단점을 개선 보완하면서 현재 계속 발전되고 있다.

*Listeria*에 대한 구미제국의 국가적 제어노력이 이루어지기 전까지는, *Listeria*

의 오염정도는 최고 60%까지 닭고기식품에서(Pini & Gilber,1988), 수육 및 수육가공 식품(Schwartz et al.,1988) 그리고 우유 및 우유가공식품에서(Linnan et al.,1988; Terplan et al.,1986) 높은 비율로 검출된 바 있다. 그러나 국가차원에서 Zero tolerance 정책 등 식품에 대한 규제가 강화된 1990년이래, Listeria오염율은 확실히 감소하였음을 구미제국의 자료들은 보여주고 있다(Gilbert, R.J., 1995; PHLS, 1995, Tappero et al., 1995).

이런 성공적인 Listeria의 제어는 국가주도의 정책이 민간기업에 제거의무를 부여 하고, 이에 따른 민간기업들의 자구적 노력이 촉발되었기 때문이라 사료된다. 특히 Listeria의 주감염경로인 축산산업과 축산물 가공 산업 현장에서, 각기 유입과 배출 시 이를 차단하려는 노력들이 가장 효과적임이 입증된 바 있으며, 각국의 특성에 따른 즉석식품(ready-to-eat food)에 대하여는 특별한 규제가 요구되었다.

성공적 정책수행의 중심이 된 민간기업의 자구적 노력은 당연히 효과적이며 신속한 Listeria검출법의 수요를 크게 촉발시켰다. 이는 국가 검사가 가장 확실한 방법인 선택배양에 의한 Listeria의 검출법을 채택한 것과는 별도로, 전문가 및 실험설비를 유지하기 힘든 민간기업에서는 신속성과 간편성을 앞세운 Listeria검출방법이 기업내 자체 검사를 위하여 많은 수요를 가지게 되었기 때문이다. 이러한 수요에 맞추어 실제 많은 신속검출법이 개발되고, 상업적으로 시판되었으며, 현재 개발이 계속 진행되고 있다. 이러한 신속검출법의 개발은 1) 리스테리아 특유 선택배지의 개발, 2) 리스테리아 특이항원을 이용한 검사키트의 개발, 3) 리스테리아 고유 핵산 염기서열을 이용하는 hybridization 또는 PCR검사법 등으로 대별되며 이들 방법은 각각의 장단점을 개선 보완하면서 현재 발전되고 있다고 사료된다.

최근 소위 래피드 키트(Lateral flow rapid kit)라 불리는 방식의 검색법은 변역크로마토그래피 방식의 실험법으로, 특별한 측정장비 없이 일회용으로 사용되며, 현장에서 시료 주입후 10분 이내에 결과를 판독할 수 있다는 신속성 및 간편성을 장점으로 급속한 발전을 이루고 있다. 이 방법은 수년전만 하더라도 간이 검사법의 수준을 넘어서지 못하였으나 근래 급격한 기술적 발전으로 실험실적 검사법의 수준에 많이 근접하여 그 간편성과 신속성으로 여러 병원균, 신체 징후 등의 검사에 활용되고 있으며, 기술개발과 더불어 신속히 그 용도를 넓히고 있다.

1) 리스테리아 특유 선택배지의 개발: 새로운 Listeria의 선택배지의 개발은 상기의 검사방법 중 Listeria균주를 순수 분리할 수 있는 가장 확실한 방법으로, 단기 배양으로 Listeria monocytogenes를 순수분리 할 수 있다면 가장 이상적인 방법이라 할 것이다. 현재 Listeria의 선택배양에서 가장 많이 사용되고 있는 선택배지는 UVM 1, 2 (University of Vermont Broth 1, 2, Listeria selective enrichment broth), PALCAM-broth (L-PALCAM Listeria selective enrichment broth), Fraser Broth, BLEB(buffered Listeria enrichment broth), Oxford Broth등이며, 이들의 수많은 변종이 Merck 등 제약회사를 중심으로 생산, 공급되고 있다. 그러나 이들 Listeria의 선택배지는 계속 개발 및 개선되고 있으나, 아직 혼합 감염된 시료에서 Listeria

monocytogenes만을 선택적으로 배양할 수 있는 선택배지는 존재하지 않는다. 따라서 USDA-FSIS (The U. S Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service)나, FDA(The U. S. Food and Drug Administration), IDF(International Dairy Federation)에서는 상기의 선택배지를 사용하여 균 집락을 1차 선별한 후 생화학적인 검사방법으로 확정 판결하도록 하고 있다. 그러나 선택 배양법을 사용하면, 균 집락을 확인하여야 1차 선별이 가능하다는 이유로 미량 존재하는 시료 중 *Listeria*균을 집락으로 배양해 내기 위해서 비교적 숙달된 기술 및 경험이 요구된다. 우선 *Listeria*는 저속 성장 균이므로 고속 성장 균과 함께 배양되면 고속 성장 균의 집락에 압도되어 *Listeria*균의 집락이 발견되지 않을 수도 있으며, 배양 후 생화학적 확정검사까지 수행하여야 종 동정이 가능하므로 비교적 긴 시간을 요한다는 것(확정까지 적어도 6일)등의 문제점이 있다. 따라서 선택배양에 의한 신속 검출법은 이 확정검사의 시간을 줄이는 방향으로 제품이 개발되어 있으며, *Listeria*의 hemolysis를 이용하는 방법(EHA: Enhanced Hemolysis agar), 면역학적 확정검사법(Microscreen latex test), DNA probe를 이용한 확정검사키트(Accuprobe, Gene-Trak), 생화학적 방법을 사용한 확정검사 키트(API, Micro-ID)등이 사용되고 있다. 선별된 균주에서 이들 키트들을 확정검사로 비교한 결과(Beumer et al, 1995)는 DNA probe방법과 생화학적 방법을 사용한 것이 *Listeria monocytogenes*까지 종 확정에 우수하였으며, 정확성은 전자가 100%, 후자가 95%로 간편성은 후자가 우수한 것으로 나타났다.

2) 리스테리아 특이항원을 이용한 검사키트의 개발: *Listeria*의 고유항원에 대한 면역학적 방법들은 검출키트화가 가장 간편하고, 일반 축산현장에서 간이검사용으로 가장 적당하다는 장점이 있다. 이들은 거의 모두 극소수로 시료 내에 존재하는 *Listeria*균주의 특성상 1차 증균배양 (보통 UVM, Modified Fraser Broth을 사용하여 단기 배양) 후, 키트를 사용하는 형식으로 되어 있으며, 보통 ELISA나 strip방식을 사용하고 있다. 현재 이 면역학적 방법에 의한 다수의 제품들이 시판되고 있으며, 가장 많이 사용되고 있는 키트들은 *Listeria* IE. detection kit (Transia사), *Listeria* Vis.IA kit (Tecra사), Clearview(Oxoid사), *Listeria* Tek (Organon T사), USDA L.mono Kit 등이다. 면역학적 방법에 의한 *Listeria*검출 키트들의 가장 큰 단점은 검출의 정확성이 부족한 것으로 시판되는 키트들에 대한 비교실험 결과(Beumer et al, 1995)는 제품에 따라 32%-92%의 정확성을 가지는 것으로, 그리고 다수의 제품이 *Listeria*속을 검출할 뿐, *Listeria monocytogenes*에 이르는 종 판정이 불가하다는 문제가 아직도 남아 있다.

3) 리스테리아 고유 핵산 염기서열을 이용하는 hybridization 또는 PCR검사법의 개발: 리스테리아 고유 핵산 염기서열을 이용하는 방법은 PCR방법, RT-PCR방법, Hybridization방법 등이 있으며, 특히 PCR방법은 판정의 정확성, 간편성과 검출 민감성 등에서 가장 우수한 것으로 인정되고 있다(Datta et al., 1995). 이 방법은 극소수로 존재하는 리스테리아의 특성 상 필요한 1차 배양이 비교적 단기간만 요구되며, 시료에 따른 판정오류가 가장 작게 발생하는 장점이 있다. 고유 염기서열을 이용한

PCR검출법은 *Listeria*의 유전자 중 hly (Bessensen et al., 1990), iap (Bubert et al., 1992), prfA(Wernars et al., 1992), plcB(Cooray et al., 1994), lmaA (Johnson et al., 1992), inlA(Bejamin et al., 1995), 16sRNA(Wang et al., 1992), flaA(Susan et al., 1995) 등 다수의 *Listeria* 유전자의 고유 염기서열을 이용하여 많은 specific primer들이 고안되었으며, 상기한 판정의 정확성과 검출 민감성의 장점으로 다수의 제품이 시판되고 있다. 현재 PCR방법의 민감성은 1 cfu/ml 을 검출할 수 있다는 보고도 여럿 있으나, 약 10^3 균/ml정도 이상의 *Listeria*가 존재 할 때 무난히 이를 검출할 수 있다고 보편적으로 인정되고 있다. 그러나 그 민감성을 더욱 향상시킬 수 있는 여지가 매우 높고, 따라서 시료내 극소수로 존재하는 *Listeria*균의 오염에도 시료에서 바로 검사가 가능한(중균배양이 필요 없이) 가장 유력한 방법이 될 것으로 생각되고 있다. 실제로, PCR검출법은 특정 유전자의 다수 mRNA copy를 template로 사용하여 민감도를 높이는 RT-PCR방법으로, 또는 PCR-product를 T7 RNA polymerase를 이용하여 in vitro transcription한 후, 항체를 사용하는 면역학적 방법과의 연결로 (immuno-PCR), 또는 specific probe를 사용하는 hybridization방법과 연결하여 (hybridization-PCR) 더욱 민감성과 간편성을 높이는 것으로 발전되고 있으나, 아직은 전세계적으로 어느 방법이 최선의 것이라 선택되지는 못하고 있다.

한편 리스테리아 고유 염기서열을 이용한 hybridization방법을 이용한 Kit들도 다수 시판(Accuprobe, Gene-Trek 등)되고 있으며, 면역학적 방법들에 비해 우수한 정확성을 보이는 것으로 인정되고 있다.

구미 선진국에서 이런 *Listeria*검출법에 관한 시약산업과 이에 관한 연구가 매우 경쟁적으로 발전되고 있는 이유는 거의 모든 식품(식육, 육가공, 우유, 유가공, 야채 등)에 오염이 가능한 *Listeria*의 특징과 특히 가장 위험한 것으로 추측되는 “ready-to-eat” 냉장식품의 대중화로 인하여 식품검사등 다량의 시료를 검사하는 검출키트 수요의 폭발적 증가에 대비하고자 하는 것이다. 따라서 이미 거의 모든 *Listeria*검출키트 제품은 특허화되어, 고가의 상품(예: 호주 Tecra사의 *Listeria* ELISA kit, 96well, 88만원, 시료당 약 9,200원, 1998.3 현재, 수입대행 Korea Media 사: 미국 Neogen사의 Immuno-chromatography, 20test/284,700원 등)으로 전세계를 겨냥하고 있다. 현재 국내 수입이 가능한 외국산 *Listeria*검출키트의 가격은 1시료당 약 1만원 선이며, 그나마 상기의 논의와 같이 그 품질을 보증할 수 없는 실정이다. 이런 고가의 검사비용은 국내에서 추진하고 있는 *Listeria*의 국가적 제어정책에 필수적인 축산인의 적극적인 호응을 가로막는 주요 걸림돌로 작용하리라 쉽게 예상된다. 이러한 관점이 바로 본 과제에서 연구의 필요성으로 강조하고자 하는 바로, 국내기술에 의한 *Listeria*검출키트 개발은 국가적 *Listeria*제어 정책에 필요 불가결하다 할 것이다.

또한, 리스테리아 검출방법의 기술적 문제는, 이 *Listeria*속의 7종(*Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*,

L. murrayi) 중 *L. monocytogenes*만이 인간에 대한 병원균이며, *L. monocytogenes*의 13-17로 분류되는 혈청형(serotype)중 1/2a, 1/2b, 4b가 특히 강한 병원성을 보인다는 것 그리고 일반적 선택배양 방법(FDA법, USDA법, 유럽의 AFNOR, ISO법; Hitchins, 1992; McClain et al., 1989; NF EN ISO 11290-1, 1997.)이 다른 병원성 미생물의 배양과는 달리 매우 까다롭다는 것이다. 우선, 자연환경에 존재하는 *Listeria spp.*는 일반적으로 비병원성균인 *L. innocua*가 우점종(*Listeria spp.*중 약 40-90%)으로, 식육 등 식품검사에서 *Listeria spp.*의 발견은 종 확정실험 즉, *L. monocytogenes*의 검출확정(또는 비병원성 *Listeria spp.*의 확정)까지 계속되어야만 하며, 또한 위협시되는 혈청형 1/2a, 1/2b, 4b에 속하는지를 분명히 검사되어야 할 것이다.

따라서 시판되고 있는 많은 *Listeria*에 대한 면역학적 방법에 의한 검출키트들은 이런 종 판정이 불가하거나, 많은 오류를 보이고 있기 때문에(Beumer et al., 1995) 그 사용이 제한될 수밖에 없으며, 중립적 기관에 의해 수행된 정확성 측정에 따라 간이 검사용 또는 확정시험용으로 구분되어 사용되어야 할 것이다. 그러나 이 경우 국내 생산되는 *Listeria*검출키트가 없는 현 국내상황에서 수입제품에 대한 품질검사는 의미가 있을 수 없으며, 국내 축산산업 및 식품산업 전반을 위하여 국내기술에 의한, 그리고 국내에서 충분한 품질검사가 가능한 *Listeria*검출용 키트를 생산할 수 있어야만 국내기술에 의한 품질검사 및 사용용도 지정을 피할 수 있을 것이다.

현재 *Listeria spp.* 선택배양에 이은 종 확정검사는 생화학적 방법에 의하는 것이 표준실험법으로 받아들여지고 있다. 그러나 *Listeria monocytogenes*는 20℃내외에서 다수의 편모를 가지고 활발한 운동성을 보이지만, 37℃에서는 보통 편모가 한 개로 배양온도 등에 따른 형태 변이성이 나타나고, 또한 그람염색에서 탈색이 용이하여 그람음성균으로 오인되기도 하며, 일부의 *Listeria spp.*는 생화학적 실험을 완료하고도 종 확정의 결론을 내리지 못하고 재시험 또는 추가실험이 필요한 경우가 많이 나타난다. 특히 다른 세균과 고도로 혼합 오염되어 있을 경우, 증균배양과정 중 타 균에 의하여 발육이 억제되거나, 성장속도가 느린 관계로 작은 콜로니를 형성하고, 쉽게 고속 성장되는 다른 균의 집락에 덮여 버림으로 순수분리가 용이하지 않은 문제점이 있다.(Cassiday 와 Brackett, 1989)

선택배양에 이은 생화학적 검사에 의한 종 동정은 상기의 이유로 잘 훈련된 전문가(일반 미생물 전문가의 수준보다는 상당한 경험을 요구함)를 요구하게 되며, 이는 실험기술의 보급과 확정판정의 객관성유지에 큰 문제가 된다. 이에 반하여 *Listeria* 핵산특이서열을 이용한 PCR방법 등은 근래 널리 보급된 PCR기법을 이용하는 것으로 상대적으로 낮은 숙련도를 요구하며 확정판정에서 객관성을 유지할 수 있다. 사실 PCR-detection방법은 생화학적 판정에서 판정 보류된 균주들을 쉽게 판정하는 예를 많이 보여주고 있으나, 아직은 하나의 PCR-detection만으로 모든 *Listeria monocytogenes*를 확정판결하기에는 실험 예가 부족하다고 판단되며(비록 인지된 *L. monocytogenes* 207균주에 대한 다른 실험방법과의 비교실험결과는 100% 정확성을 보였으나; Beumer et al., 1995), 당분간 생화학적 판정의 보조수단으로 활용하면서

더욱 많은 실험 예에 따른 신뢰도를 높여야 한다고 사료된다.

2. 리스테리아 검색의 경제·산업적 측면

*Listeria monocytogenes*는 이미 국민보건에만 관계되는 사안을 떠나, 국내 축산식품관련산업 전반(육류, 우유, 유가공, 육가공, 유통, 판매 등)에 걸친 경쟁력의 문제로 크게 대두되고 있다. WTO체제하의 국제 협약에 따라 국내 축산물 시장은 98년 7월 1일부터 쇠고기를 제외한 전 품목에서 전면적 수입개방이 되었으며, 외국산 축산물은 국내시장에서 국내산 축산물과 경쟁력에 의한 시장 확보의 피나는 경쟁을 벌이게 되었다.

축산식품의 경쟁력 중 위생 안전성의 문제는 국제 식품 교역시 반드시 준수해야만 하는 SPS 협정문(Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures)에서 국제교류의 기준과 규격으로 이 위생안전성을 크게 부각시키고 있을 뿐 아니라(Codex, 1993, Farber, 1993) 국내의 소비자가 가장 민감해 하는 부분이라는 것은 주지의 사실이다. 따라서 국내시장을 넘볼 수입축산물과 국내산 축산물의 경쟁에서 이 *Listeria*의 오염에 따른 위생 안전성의 격차는 국내산 축산물의 생존력에 가장 심각한 문제로 떠오를 수 있을 것이다 최근에 수행된 국내산 식육 유통과정 개선을 위한 조사 결과(신광순, 1997)는 국내산과 수입식육류 간의 *Listeria*오염도 격차를 잘 보여 주고 있으며, 수입식육류(수입원: 미국, 캐나다, 호주, 뉴질랜드, 덴마크)는 총 시료 1,160건 중 6건에서 *L. monocytogenes*가 검출된 반면, 국내산의 경우, 우육에서 14.0%, 돈육에서 10.5%, 계육에서 23.2%에서 *Listeria spp*가 발견된 것으로 나타났다. 이는 국내산 식육류에 대한 *Listeria*오염율은 매우 위험한 수준이며, 전혀 인위적 제어가 되지 않은 상태의 것으로, 국민보건의 위해 뿐 아니라, 냉동육 등 수입축산제품과 국내산간의 품질경쟁 및 소비경쟁에서 매우 심각한 문제로 대두될 것임을 동 보고서는 지적하고 있다. 축산식품 위생관리행정이 보건복지부에서 농림부로 일원화되는 축산물가공처리법이 지난 11월 18일 국회를 통과되어 1998년 7월부터 시행을 앞두고 있는 현시점에서, 농림부에서 고시한 “98 육류중 유해성잔류물질검사요령 및 98육류중미생물검사요령”은 상기의 Zero tolerance정책의 일환으로써, 식육에서 *Listeria*의 표준검출법을 개선 제시한 것과 수의과학연구소, 가축위생연구소 등에 전국적인 조사를 지시한 것은 국내산 육류의 위생수준향상과 안전성 확보를 위하여 매우 시의 적절하며, 시급한 사업이라 아니 할 수 없다. 그러나 이런 안전기준의 강화 같은 정책적 노력은 궁극적으로 *Listeria*의 오염경로를 철저히 차단하기 위한 해당 축산인들 자구적 노력이 필수적으로 요구되며, 이 자구적 노력의 현실적인 monitoring 수단으로 *Listeria*의 오염에 대한 자체 검사능력을 갖추 수 있도록 하여야 달성될 수 있을 것으로 사료된다. 이는 모든 식품검사를 관이 수행할 수 없기에, 단위 공정에서 *Listeria*오염을 즉각적으로 monitoring할 수 있는 자체검사시스템으로 점검해 나가는 노력이 경주되어야 하기 때문이다. 이런 자체검사를 현재 고시되어 있

는 선택배양에 의한 생화학적 검사 방법으로 수행하기에는 기술적으로 까다롭기에 훈련된 전문가 및 시설을 요구하게 된다. 영세한 국내의 민간기업에게 이 인원과 시설을 요구하는 것은 큰 무리로써 선진제국에서 수행한 바와 같은 간편한 키트로써 리스테리아의 오염을 monitoring하고, 이를 제거 할 수 있도록 지도하여야 할 것이나, 현실적으로 간편한 신속 Listeria검출법 키트로 국내 생산품은 나와 있지 않다. 외국의 시약회사에서 제조된 다수의 수입 신속검출법키트들은 모두 고가(1검사 당 약 1만원)인 점은 본 연구과제의 시급한 예상 수입대체효과를 이해할 수 있게 할 것이다.

이런 고가의 검사비용은 우리의 Listeria제어 정책을 수립할 때부터 크게 부담이 되는 금액으로, 도축되는 소 1두 당 (1997년 현재 Listeria spp.는 14%의 발견율을 보이고 있음; 신광순, 1997) 1만원씩의 검사비용(재료비 만)을 수 차례 자체 검사비로 지출할 것을 민간기업에 요구한다면, 우선 높은 검색비용으로 검색의 양 자체를 줄여 형식적인 검사로 나아가게 될 수 있으며, 결코 성공적인 Listeria제어 정책은 수행될 수 없을 것이다. 또한 상기의 기술적인 면에서 논의한 바와 같이 그 수입 검출법키트들의 품질은 국내기관 어디서도 보증할 수 없다는 문제가 있기에, 이를 국내 축산 산업에 주도적으로 보급할 수도 없을 것이다.

그러므로, 본 연구과제에서 개발된 간편한 Listeria 신속 검출법키트들은 떨리는 국가적인 Listeria의 제어 정책에, 가까이는 시급한 국내 육류 등 축산제품의 위생 안전성 면에서 경쟁력 향상에 필수적이며 직접적인 도구로 사용되어야 할 것이다.

3. 리스테리아 검색의 사회·문화적 측면

국민식생활 형태는 이미 선진국형으로 급격히 진행되고 있으며, 동물성 단백질 식품인 식육류, 유제품, 육가공 및 유가공제품의 소비는 계속 증가되고 있다. 또한 근대에 발달되고 있는 즉석식품들(ready-to-eat-foods)과 국민의 노령화 증가 추세는 리스테리아중 집단발병사고가 증가되기 시작하던 1985년경의 구미제국과 매우 유사한 상황이라 하겠다.

Listeria monocytogenes에 의하여 야기되는 리스테리아중의 위험집단으로는 임산부, 신생아, 면역능의 저하자 (AIDS환자, 장기이식 및 암환자 등), 노인들이며 (Rocourt, 1997; Schuchat et al, 1991; Low et al., 1997), 특히 임산부는 L. monocytogenes에 대한 감수성이 가장 높은 것으로 알려져 있다. 임산부가 감염될 경우 태반을 통한 감염이 이루어 지며, 신생아는 감염시 폐혈증, 화농성 수막염, 간농양 등에 의한 치명율이 높아 이 병에 대한 영향을 가장 많이 받는 것으로 알려져 있다.

Listeria monocytogenes가 인간에 이르는 주요 감염경로는 바로 이 병원균에 오염된 축산제품(육류, 우유, 유가공, 육가공제품)을 통해서 이며, 다수 유제품 및 유제품의 보관 방법인 냉장상태에서도 성장되는 저온성장의 특징은 육류 및 유제품의 유

통과정을 재검토하게 하고, 국민의 노령화는 바로 *Listeria monocytogenes*의 주 감염 대상이 더욱 많아지게 한다. 많은 유가공 또는 육가공 식품들은 냉장 또는 상온에서 유통되며, 유통과정에서 일반 미생물에 의한 변질 징후가 없이도 *Listeria*의 증식이 일어날 수 있기에 철저한 위생 품질검사가 요구된다.

또한 바로 지금부터 역사가 일천한 국내의 유가공, 육가공식품기업과 국외의 유명 기업간의 시장경쟁이 시작되기에 이런 위생안전성에 대한 신뢰구축은 축산산업기반의 생존의 문제와 직결될 수 있다. 더욱이 구미선진국에 비하여 리스테리아의 오염도가 매우 높은 우리의 1차 축산제품은 축산 가공품에게 더 높은 *Listeria*오염의 위험성을 야기시키며, 수입물과 경쟁할 수밖에 없을 불리한 환경을 조성하고 있다. 사실 국민의 정서에 호소하여도 위생적인 면에서 신뢰가 되지 않는 식품은 국내산이라는 이유로 선택되지는 않을 것이며, 이는 또한 발병이 되면 매우 높은 치사율을 보이는 *Listeria*에 대한 인식이 퍼진 후에는 자칫 국내 축산산업 전반에 더욱 심각한 영향을 끼치리라 생각된다.

특히, 즉석식품은 바쁜 현대인의 식생활 패턴에 따라, 가급적 냉장상태에서 유통되어 1-2분의 짧은 시간에 데워서 먹는 식품들로 구미뿐 아니라 국내에서도 급속도로 개발, 성장되고 있는 식품들이다. 구미에서도 유제품이 첨가된 샐러드(드레싱이 된 prepared salad)는 가장 *Listeria*오염의 위험도가 높은(high risk)식품으로 분류되며, 특히 *Listeria*에 감염시 치사율이 높은 임신부에게는 사회적으로 금지된 식품이다. 국내 시판되고 있는 여러 즉석식품 중 유가공 및 육가공 식품이 첨가된 것은 매우 위험도가 높은 상태에서 판매되고 있다고 추측되며, 한 번의 집단 발병사고가 발생되어, 그 원인에 대하여 일반인의 주목을 받게 되면 해당 산업의 기반이 흔들릴 정도로 국민들이 외면할 수 있음이 우려된다.

본 연구과제의 결과물들은 이제 시작이라 할 수 있는 축산물의 안정성확보를 위하여, 특히 선진국형 식중독으로 일컬어지는 이 *Listeria*의 국가적 제어사업을 위하여 시급히 사용되어야 할 것이다. 주지하는 바와 같이 *Listeria*의 제어는 국가적 사업이며, 정부의 강력한 규제정책과 전체 민간기업의 자구적 노력이 합쳐질 때 만족스러운 결과를 얻을 수 있는 것이며, 요청되는 각 개별기업의 자구노력에서 본 과제의 결과인 *Listeria* 신속 검출법키트들은 효과적인 오염검색의 도구로써 큰 기여를 할 수 있을 것으로 확신한다.

제 3 절 국내외 리스테리아 검색키트들

1. 국내외 리스테리아 검색기술의 수준

현재 시판되고 있는 신속검출키트들은 용도에 따라 두 가지로, 또 검출방법에 따라 3가지 정도로 요약될 수 있으며, 각기 장단점에 따라 용도가 다르게 사용되고 있다. 먼저 용도에 따라서 *Listeria*의 선택배양 후 순수분리된 집락에 대한 종 동정을 할 수 있는인 확정판정용과 시료로부터 직접(중균배양 후) *L. monocytogenes*의 오염을 검출하는 방법으로 나누어지며, 검출방법에 따라서는 *Listeria* 고유 항체에 의한 면역학적 방법과 *Listeria* 고유 핵산의 염기서열을 이용한 PCR 또는 hybridization방법들이 그것이다.

USDA-FSIS (The U. S Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service)나, FDA(The U. S. Food and Drug Administration), IDF(International Dairy Federation)등이 추천하는 방법은 표준검출법으로 원인균을 확보할 수 있기 때문에 거의 모든 국가기관에서 공인 검출 및 판정방법으로 사용하고 있다. 각국별로 보면, 한국은 식품공전법, 미국은 USDA/FSIS법, 덴마크는 UDC/NCFA법, 일본은 후생성법이며, 모두 FDA법과 유사한 선택배양에 의한 방법으로, 일차 선택배양에 의한 집락의 확보 후, 생화학적 검사방법으로 확정 판결하도록 하고 있다. 이 확정판결의 보조 수단 또는 시료에서 일차 검색의 과정에서 기관에 따라 신속 또는 간이 검출법을 사용하고 있다.

선택배양법 및 생화학적 검사를 사용하는 표준 검출법은 균 집락을 확인하여야 1차 선별이 가능하다는 이유로, 극소수로 존재하는 시료중 *Listeria*균을 집락으로 배양해 내기 위해서 그리고 생화학적 확정검사까지 수행하여야 하기에 비교적 긴 시간을 요한다는 것(확정까지 6일), 까다로운 배양기술 등의 문제점이 있다. 따라서 선택배양에 이은 확정검사법 키트들은 이 확정검사의 시간을 줄이며, 간편한 검사방법의 방향으로 제품이 개발되어 있으며, 주로 병원의 검사실에서 많은 수요를 가지고 있었다. 이들 중 *Listeria*의 hemolysis를 이용하는 방법(EHA; Enhanced Hemolysis agar), 면역학적 확정검사법(Microscreen latex test), DNA probe를 이용한 확정검사(Accuprobe, Gene-Trak), 생화학적 방법을 사용한 확정검사 키트(API, Micro-ID)등이 이 확정검사용키트로 가장 많이 사용되고 있다. 선별된 균주에서 이들 키트들을 확정검사로 비교 실험한 결과(Beumer et al, 1995)는 DNA probe방법과 생화학적 방법을 사용한 것이 *Listeria monocytogenes*까지 종 확정에서 가장 우수하였으며, 정확성은 전자가 100%, 후자가 95%로 나타났고, 간편성은 후자의 키트가 보다 우수한 것으로

나타났다.

*Listeria*의 고유항체에 의한 면역학적 방법들(효소면역분석법)은 검출키트화가 가장 간편하고, 일반 가공업체 등에서 간이검사용으로도 가장 적당하다는 장점이 있어, 식품중의 미생물 혹은 독소의 검출방법론으로 가장 널리 사용되고 있는 방법이다 (Hartman 등, 1992).

이들은 거의 모두 극소수로 시료내에 존재하는 *Listeria*균주의 특성상 1차 증균배양 (보통 UVM, Modified Fraser Broth을 사용하여 단기 배양 또는 집락 형성)후, Kit를 사용하는 형식으로 되어 있으며, 보통 ELISA나 strip방식을 사용하고 있다. 이 방식은 일반적으로 96well plate를 사용하고 있으며, 용도에 맞는 분광분석기와 부수되는 세척기 자동화 자료처리 system이 갖추어진 실험실이 필요하다. 이러한 면역학적 방법에 의한 실험실 검사용 키트는 다수의 제품들이 시판되고 있으며, 가장 많이 사용되고 있는 키트들은 *Listeria* IE. detection kit (Transia사), *Listeria* Vis.IA kit (Tecra사), Clearview(Oxoid사), *Listeria* Tek (Organon T사), USDA L. mono Kit 등이 있다. 면역학적 방법에 의한 *Listeria*검출 키트들의 가장 큰 단점은 검출의 정확성이 약한 것으로 시판되는 키트들에 대한 비교실험 결과(Beumer et al, 1995)는 제품에 따라 32%-92%의 정확성을 가지는 것으로, 그리고 다수의 제품이 *Listeria*속을 검출할 뿐, *Listeria monocytogenes*에 이르는 중 판정이 불가하다는 문제가 있었다.

또한 면역학적 방법에 의한 Kit의 개발에서 주목되는 것은 막 소재를 이용한 효소면역분석법으로, 이는 kit의 구성성분만으로도 실험실외 현장에서 검출하고자 하는 물질의 screening 검사가 가능하여 다른 검출방법이 가질 수 없는 간편성을 가지고 있다. 이런 형식의 키트는 비록 고가이나, 현재 그 민감성을 보다 높이기 위한 노력이 치열하게 경주되고 있다.

리스테리아 고유 핵산 염기서열을 이용하는 방법은 PCR방법이 주종을 이루고 있으며, 판정의 정확성, 간편성과 검출 민감성 등에서 가장 우수한 것으로 인정되고 있다 (Datta et al., 1995). 이 방법도 실험실의 구비는 필수이며, 최소한 PCR-machine과 부수되는 전기영동장치를 필요로 한다. 그러나 근래에 보급된 저가의 Personal PCR기와 PCR후 ELISA방법을 사용하는 Immuno-PCR방법, Hybridization-PCR방법들은 정규 실험실이 아닌 PCR기기만의 설치로도 이 방법에 의한 실험이 가능하게 하였다. PCR 방법은 극소수로 존재하는 리스테리아의 특성 때문에 필요한 1차 증균 배양이 가장 단기간 필요하며, 시료에 따른 판정오류가 가장 작게 발생하는 장점이 있기에, 증균 배양 없이 시료로부터 바로 검출시험에 들어가 10-24시간 내에 판정이 가능하도록 하는 방법을 목표로 연구가 계속 진행중이다.

고유 염기서열을 이용한 PCR검출법은 *Listeria*의 유전자 중 hly (Bessensen et al., 1990), iap (Bubert et al., 1992), prfA(Wernars et al., 1992), plcB(Cooray et al., 1994), lmaA (Johnson et al., 1992), inlA(Bejamin et al., 1995), 16sRNA(Wang et al., 1992), flaA(Susan et al., 1995) 등 다수의 *Listeria* 유전자의 고유 염기서열을 이용하여 많은 specific primer들이 고안되었으며, 상기한 판정의

정확성과 검출 민감성의 장점으로 다수의 제품이 역시 시판되고 있다.

국내의 현황을 살펴보면, 식품매개 *Listeriosis*에 대한 기초 연구 및 식품 및 가축에의 오염상황에 관한 연구들이 국내에서도 다수 이루어졌으며 (강호조 등, 1991; 이용우 등, 1992; 강호조 등, 1993; 이제용 등, 1994; 강호조 등, 1995; 손원근 등, 1995; 손원근 등, 1995; 손원근 등, 1995; 허정호 등; 1997), 국내의 육류의 *Listeria*오염에 관한 종합적 연구가 최근에 발표되었다(신광순, 1997). 특히 신광순(1997)의 보고는 국내산과 수입식육류 간의 *Listeria*오염도 차이를 잘 보여주는 것으로, 수입식육류(수입원: 미국, 캐나다, 호주, 뉴질랜드, 덴마크)는 총 시료 1,160건 중 6건에서 *L. monocytogenes*가 검출된 반면, 국내산의 경우, 우육에서 14.0%, 돈육에서 10.5%, 계육에서 23.2%에서 *Listeria spp*가 발견된 것으로 나타나, 국내산 식육류에 대한 *Listeria*오염율은 매우 위험한 수준이며, 전혀 인위적 제어가 되지 않은 상태의 것으로 밝히고 있다.

*Listeria*검출방법에 관한 연구는 *Listeria* 특이 염기서열을 이용한 Hybridization 방법(김창민 등, 1993)과 *Listeria*고유의 유전자인 *iap* gene 특이 염기서열을 이용한 PCR검출법 (Yoon et al, 1996; 윤병수 등, 1995), *Listeria hly* gene을 이용한 PCR검출법(Ryu et al., 1996)등이 수행되었다. 그러나 이들은 모두 실용화되지 않은 연구 실적 업적으로, *Listeria*오염제어가 시급한 국내의 현 상황에서 실용화를 위한 연구를 거쳐 바로 산업현장에서 이용될 수 있어야 할 것이다.

2. 앞으로의 전망

*Listeria*신속검출법의 상품들(Kit)은 *Listeria*가 식품매개 병원균이라는 커다란 시장수요가 있는 한, 국제적인 신규 개발 노력이 지속될 것이며, 고부가가치산업으로 존재하리라 생각된다. 따라서 이 검출키트 생산에 관한 모든 연구는 계속 특허화될 것으로 예상되며, 특허화에서 밀린 국가는 결국 자국의 축산물생산에서 많은 부분을 선진국의 기술료로 부담하게 될 것이며, 이는 바로 생산원가의 차이를 보여 점차 격차를 크게 할 것으로 예측된다. 문제는 이 검출키트의 가격이 이미 모두 고가의 상품으로 판매되고 있으며(예; 호주 Tecra사의 *Listeria* ELISA kit, 96well, 88만원, 1998.3 현재, 수입대행 Korea Media사; 미국 Neogen사의 Immuno-chromatography, 20test/284,700원 등), 향후 더욱 간편하고 신속한 제품으로 연구 개발되고 있으며, 그 연구개발비를 충당하기 위하여 더욱 고가화 되어 전세계를 겨냥할 것으로 생각된다. 아직은 이 특허화 장벽을 우리 기술로 돌파할 수 있으리라 사료되나, 이런 검사 키트에 대한 우리의 관심이 늦어졌을 시, 더욱 더 완벽한 특허들 및 제도는 우리의 기술을 더욱 사용 제한시킬 것이라 전망된다.

기술적인 면에서 현재 PCR방법에 의한 *Listeria*검출의 민감성은 1 cfu/ml 를 검출할 수 있다는 보고도 여럿 있으나, 약 10^3 균/ml정도 이상의 *Listeria*가 존재 할 때 무난히 이를 검출할 수 있다고 보편적으로 인정되고 있다. 그러나 그 민감성을 더욱 향상시킬 수 있는 여지가 매우 높고, 따라서 극소수로 존재하는 *Listeria*균의 특성에도 불구하고 시료에서 바로 검사가 가능한(중균배양이 필요 없이) 가장 유력한 방법이 될 것으로 생각되고 있다. 실제로, PCR검출법은 특정 유전자의 다수 mRNA copy를 template로 사용하여 민감도를 높이는 RT-PCR방법으로, 또는 PCR-product를 T7 RNA polymerase를 이용하여 in vitro transcription한 후, 항체를 사용하는 면역학적 방법과의 연결로(immuno-PCR), 또는 specific probe를 사용하는 hybridization방법과 연결하여 (hybridization-PCR) 더욱 민감성과 간편성을 높이는 것으로 발전되고 있으며, 시료로부터 중균배양 없이 바로 10시간 내에 확정판정이 완료될 수 있는 방법을 목표로 개발이 진행되고 있다.

현재 판매되고 있는 실험실적 방법을 위한 키트들은 나름의 시장을 가지나, 우리가 주목하여야 할 것은 단연 래피드키트(Lateral flow rapid kit)의 발전이라 생각된다. 래피드키트는 면역클로마토그래피방식의 실험키트로, 일회용이며, 별도의 측정기구가 필요없고, 현장에서 10분이내에 결과를 판정할 수 있다는 신속성, 간편성을 가지고 있다. 종래 이 종류의 키트들은 간이키트의 수준에 머물러 있었으나, 근래 전문기술의 급속한 발전으로 실험실적 방식의 정확성과 민감성을 갖춘 래피드키트가 다른 검색 분야, 즉 임신진단, AIDS진단 및 B형 간염의 진단 등에서 등장하고 있다. 따라서 본 연구에서 개발된 리스테리아 검색용 래피드 키트도 현재보다 적확성과 민감성에서 뛰어난 검사법이 되도록 검색 능력의 향상에 노력을 경주하여야 할 것이다.

*Listeria*의 국가적 제어는 지금이 시작이며, 최소 10여년 이상 계속되어야 할 사업이다. 구미제국에서 현재 *Listeria*의 오염이 제어된 상태로 나타나는 것은 이미 10년 이상의 노력의 결과이며, 제어의 노력을 하지 않는 한 자연환경에서 생존이 가능한 *Listeria*는 계속 가축 등 동물에 감염되어 증식되고 결국은 통제불능의 상태에 이를 것으로 전망된다.

우선 시급한 국내산 축산물의 위생 안전성을 지켜내어, 수입산 축산물과 경쟁하기 위해서는 높은 수준의 규제정책을 지속하여야 하며, 이를 위하여 민간기업의 자구적 노력을 이끌어 내야만 할 것이다. 이런 노력들은 국가 전체의 *Listeria*오염도를 낮추는 데 크게 기여될 것이며, 이에 따라 낮아진 *Listeria*오염 환경에서 *Listeria*의 제어는 보다 쉬워질 것이다. 본 연구과제의 결과물인 *Listeria* 신속검출키트들은 이런 민간기업의 자체검사, 공정간 오염의 monitoring에 유용하게 사용될 것이며, 이는 소비자가 가장 민감해 하는 위생 안전성 면의 품질에서 국내산 축산물의 경쟁력을 유지하는 데 크게 기여하리라 예상된다.

제 2 장 *Listeria* spp. PCR 검출 kit

제 1 절 서설

리스테리아 고유 핵산 염기서열을 이용하는 방법은 PCR방법(Bubert *et al.*, 1992; Bubert *et al.*, 1997; Bubert *et al.*, 1999; Yoon *et al.*, 1995), RT-PCR방법(Herman, 1997), Hybridization방법(Cocolin *et al.*, 1997; Rijpens *et al.*, 1995) 등이 있으며, 특히 PCR방법은 판정의 정확성, 간편성과 검출 민감성 등에서 가장 우수한 것으로 인정되고 있다(Datta *et al.*, 1995). 이 방법은 극소수로 존재하는 리스테리아의 특성상 필요한 1차 배양이 비교적 단기간만 요구되며, 시료에 따른 판정 오류가 가장 적게 발생하는 장점이 있다. 고유 염기서열을 이용한 PCR 검출법은 *Listeria*의 유전자 중 *iap* (Bubert *et al.*, 1992), *prfA*(Wernars *et al.*, 1992), *plcB*(Cooray *et al.*, 1994), 16sRNA(Wang *et al.*, 1992), *flaA*(Strachan NJ. and Gray DI. 1995) 등 다수의 *Listeria* 유전자의 고유 염기서열을 이용하여 많은 specific primer들이 고안되었으며, 상기한 판정의 정확성과 검출 민감성의 장점으로 다수의 제품이 시판되고 있다. 현재 PCR방법의 민감성은 1 cfu/ml을 검출할 수 있다는 보고도 여럿 있으나, 약 10³cfu/ml정도 이상의 *Listeria*가 존재할 때 무난히 이를 검출할 수 있다고 보편적으로 인정되고 있다(석주명, 1998). 그러나 그 민감성을 더욱 향상시킬 수 있는 여지가 매우 높고, 따라서 시료내 극소수로 존재하는 *Listeria* 균의 오염에도 시료에서 바로 검사가 가능한(중균배양이 필요 없이) 가장 유력한 방법이 될 것으로 생각되고 있다.

제 2 절 *Listeria* PCR 검출 kit의 제조

1. 공시균주

본 연구에서 사용된 공시균주는 모두 독일의 Würzburg 대학으로부터 제공받았으며, 식품에서 분리한 균주는 모두 수입 축산물 및 축산가공품으로부터 수집한 것으로서

국립수의과학검역원에서 생화학적 동정을 마친 총 69개의 균주를 이용하였다 (Table 2-1, Table 2-2).

Table 2-1. Number of *Listeria spp.* isolated from foods.

<i>Listeria Spp.</i>	number
<i>Listeria monocytogenes</i>	59
<i>Listeria innocua</i>	3
<i>Listeria ivanovii</i>	2
<i>Listeria welshimeri</i>	5
Total	69

Table 2-2. List of standard culture of *Listeria spp* and biochemical reaction.

(+ : Positive reaction, - : Negative reaction)

List	Spp. <i>L.monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i> SV6b	<i>L.welshimeri</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.grayi</i>	<i>L.ivanovii</i>
Beta Hemolysis	+	-	-	+	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-
Urea Hydrolysis	-	-	-	-	-	-
Methly red	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	+	+	+	+	+	+
SIM motility	+	+	+	+	+	+
Dextrose	+	+	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	+	-
Xylose	-	-	+	+	-	+

2. oligonucleotide primers

본 실험에 사용된 primer는 *Listeria iap* 유전자에서 유래된 것으로 각기 Mugra, MonoA, Ino, Siwi, IVA, IVA2, IVA3, SEE, SEL2, SEL3, WEL, LisB라 명명 되었으며

그 염기 서열은 Table 2-3와 같다.

또한 *Listeria* Multiplex PCR에 사용된 Lis-mix는 Mugra, MonoA, Ino, Siwi, LisB를 일정 비율로 혼합하여 사용하였으며, Lis-mix를 이용한 multiplex PCR에서 동일한 size의 PCR product가 나타나는 병원성균인 *L. ivanovii*와 비병원성균인 *L. seeligeri*, *L. welshimeri* 의 detection을 위해 IVA3, SEL3, WEL, LisB를 일정 비율로 혼합한 Siw-mixIII로 명명한 primer를 사용하였다. UnilisA 와 LisB primer는 종 공통 Primer이기에 2차 PCR을 사용하는 확정실험법에서 1차 PCR용 Primer로 사용하였다. 그러나 거의 모든 경우 Lis-mix를 이용한 1차 PCR에서 확정실험은 완료되었기에 실험법의 간편성을 위하여 2차의 PCR을 사용하는 방법은 지양되었다. Lis-mix는 위의 표 중 UnilisA를 제외한 primer들을 합한 것으로 *Listeria* 모든 종의 종동정에 사용하였다.

Lis-mix의 조성은 100pmol/ml의 각 primer 용액들을 아래의 비율로 혼합하였다. 이 비율은 각 표준균주를 공시균주로 사용하여 최상의 PCR결과를 보인 것으로 현장 적용 실험에서도 최선의 결과를 보였다.

$$\text{Lis-mix} = \text{MonoA} : \text{Siwi} : \text{Mugra} : \text{Ino} : \text{LisB} = 1 : 1 : 0.7 : 1.5 : 2$$

Table 3-3. Sequence of oligonucleotide used multiplex PCR for detection of *Listeria Spp.*

Oligonucleotide name	Sequence(5' → 3')	Specific binding <i>Listeria spp.</i>
Mugra	CCA GCA GTT TCT AAA CCT GCT(21)	<i>L.grayi</i>
MonoA	ACT AGC ACT CCA GTT GTT AAA C(22)	<i>L.monocytogenes</i>
Ino	CAA ACT GCT AAC ACA GCT ACT(21)	<i>L.innocua</i>
Siwi	TAA CTG AGG TGC AAG CGA A(19)	<i>L.ivanovii</i> , <i>L.seeligeri</i> , <i>L.welshimeri</i>
IVA	TAC TAC TGT AAC AAG TGC CCC(21)	<i>L.ivanovii</i>
IVA2	TAC AAA CTC TAA TGC TAG CC(20)	<i>L.ivanovii</i>
IVA3	AAC AAG TGC CCC TGC ACC(18)	<i>L.ivanovii</i>
SEE	GAA ACT AAA ACA ACT GCT CC(20)	<i>L.seeligeri</i>
SEL2	GCA ACT ACT GAA AAA GAT GCA G(22)	<i>L.seeligeri</i>
SEL3	TGC AAG TGC AAT CAT TGC C(19)	<i>L.seeligeri</i>
WEL	GAA ACT TCT ACT CCA GTG GT(20)	<i>L.welshimeri</i>
LisB	TTA TAC GCG ACC GAA GCC AA(20)	Reverse primer for all <i>Listeria spp.</i>

3. *Listeria* Multiplex PCR의 표준균주에서의 효율성 확인

SDS/Phenol treatment/Ethanol precipitation법을 이용하여 Chromosomal DNA isolation하여 획득한 DNA 1 μ l를 template로 하여 본 실험실에서 제조한 primer(Lis-mix) 2 μ l(20pM/ μ l), dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 0.5 μ l(2.5mM each), 10 \times PCR buffer 10 μ l(MgCl₂ 15mM), *Taq* polymerase 1 μ l(1.25unit/ μ l)를 가하여 멸균한 3차 증류수로 총량이 100 μ l가 되게 하고 GeneAmp PCR system 9600(PERKIN ELMER, U.S.A)으로 PCR 반응을 실시하여 Lis-mix에서의 *Listeria* 균주 6종의 PCR detection 효율성을 확인하였다.

PCR 분석 조건은 denaturation 94 $^{\circ}$ C 30초, annealing 50 $^{\circ}$ C 30초, extention 72 $^{\circ}$ C 1분의 순서로 30cycle 반응을 진행하고 최초 pre-denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 3분, 최종 extention 72 $^{\circ}$ C에서 5분 진행하였다. 위의 PCR product를 1.2% agarose gel로 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator 상에서 PCR 반응 결과를 확인 하였다.

Fig.2-1. 에서와 같이 Lis-mix를 primer로 사용한 multiplex PCR 반응에서 480bp의 *L. grayi*, 660bp의 *L. monocytogenes*, 870bp의 *L. innocua*의 PCR product를 확인할 수 있고, 동일한 size인 1.2kb의 *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*의 PCR product를 확인할 수 있었다. 따라서 Lis-mix를 이용한 *Listeria* 6종의 PCR detection의 효율성은 높은 것으로 나타났다.

그러나 Fig 2-1. 에서 확인할 수 있듯이 Lis-mix를 이용한 multiplex PCR 반응에서는 *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*를 동정할 수 없었다.

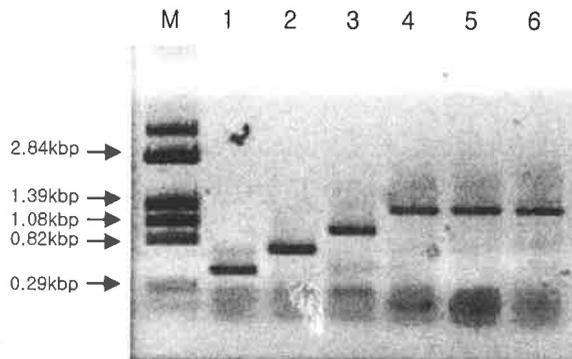


Fig. 2-1. A detection of *Listeria spp.* by multiplex PCR in *Listeria* standard culture in electrophoresis used for 1.2% agarose gel, 1XTAE buffer.

lane M is the marker that PS44 digested by *Bam*HI and *Hind*III. lane 1 is multiplex PCR product of *L.grayi*(0.48kbp), lane 2 is multiplex PCR product of *L.monocytogenes* (0.66kbp), lane 3 is multiplex PCR product of *L.innocua*(0.87kbp), lane 4 is multiplex PCR product of *L.ivanovii*(1.2kbp), lane 5 is multiplex PCR product of *L.seeligeri*(1.2 kbp), lane 6 is multiplex PCR product of *L.welshimeri*(1.2kbp).

4. *L.ivanovii*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri*의 검출을 위한 SIWIII Multiplex PCR

L.ivanovii, *L.seeligeri*, *L.welshimeri*는 Lis-mix를 사용한 *Listeria* multiplex PCR을 수행할 경우 같은 size의 PCR product로 확인 되기 때문에 검출을 할 수 없다. 따라서 본 연구에서는 병원성균인 *L.ivanovii*와 비병원성균인 *L.seeligeri*, *L.welshimeri*를 검출하기 위하여 Siw-mixIII를 이용하여 PCR을 통해 *L.ivanovii* 검출 실험을 수행하였다.

PCR에 사용된 template는 열처리를 통해 분리하여 그 중 1 μ l를 사용하였으며, primer로는 Lis-mix 2 μ l(20pM/ μ l), dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 0.5 μ l(2.5mM each), 10 \times PCR buffer 10 μ l(MgCl₂ 15mM), *Taq* polymerase 1 μ l(1.25unit/ μ l)를 가하여 멸균한 3차 증류수로 총량이 100 μ l가 되게 하고 PCR 반응을 실시하여 1.2kb의 PCR product로 확인된 sample의 경우 PCR product 1 μ l를 template로 하여 Siw-mixIII 2 μ l(10pM/ μ l), dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 0.5 μ l(2.5mM each), 10 \times PCR buffer 10 μ l(MgCl₂ 15mM), *Taq* polymerase 1 μ l(1.25unit/ μ l)를 가하여 멸균한 3차 증류수로 총량이 100 μ l가 되게 하고 GeneAmp PCR system 9600(PERKIN ELMER, U.S.A)으로 PCR 반응을 실시하여 *L.ivanovii*와 *L.seeligeri*, *L.welshimeri*의 검출을 비교하였다.

PCR 분석 조건은 denaturation 94 $^{\circ}$ C 30초, annealing 50 $^{\circ}$ C 30초, extention 72 $^{\circ}$ C 1분의 순서로 30cycle 반응을 진행하고 최초 pre-denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 3분, 최종 extention 72 $^{\circ}$ C에서 5분 진행하였다. 위의 PCR product를 1.2% agarose gel로 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator 상에서 PCR 반응 결과를

확인 하였다.

L. ivanovii, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*의 검출 실험은 Lis-mix를 이용하여 1차 검출을 한 후 Siw-mixIII를 이용하여 PCR을 수행한 결과 1.1kb의 *L. ivanovii* PCR product, 477bp의 *L. seeligeri* PCR product, 779bp의 *L. welshimeri* PCR product를 확인 할 수 있었다(Fig 2-2).

Siw-mixIII를 이용한 PCR에 사용되는 template는 Lis-mix를 이용한 PCR에서 얻어진 PCR product이기 때문에 Siw-mixIII를 이용한 PCR 결과에서 1.2kb의 template band를 확인할 수 있다.

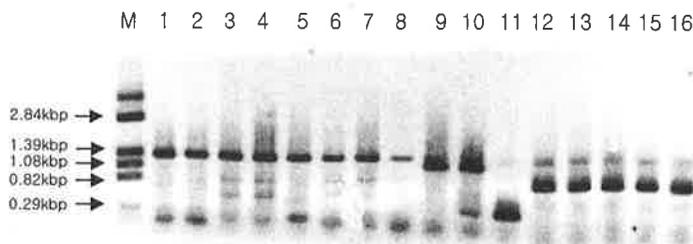


Fig. 2-2. A detection of *L. ivanovii* by SIWIII multiplex PCR used Siw-mixIII in electrophoresis used for 1.2% agarose gel, 1X TAE buffer.

lane M is the marker that PS44 digested by *Bam*HI and *Hind*III, lane 1 and 2 is PCR product of *L. ivanovii*(1.2kbp) used Lis-mix, lane 3 is PCR product of *L. seeligeri*(1.2kbp) used Lis-mix, lane 4~8 is PCR product of *L. welshimeri*(1.2kbp) used Lis-mix, lane 9 and 10 is PCR product of *L. ivanovii*(1.1kbp) used Siw-mixIII, lane 11 is PCR product of *L. seeligeri*(477bp)used Siw-mixIII, lane 12~16 is PCR product of *L. welshimeri*(779bp) used Siw-mixIII.

5. Gradient PCR을 이용한 *L. ivanovii*의 최적 검출 조건 검사

*Listeria*균주중 *L. ivanovii*만을 특이적으로 검출 하기 위한 PCR 조건을 확립하기 위하여 Gradient PCR을 이용하여 PCR을 수행하였다.

본 실험에서는 Gradient PCR 조건 중 annealing 온도 조건을 49℃~70℃로 설정 후 PCR을 수행하였다. PCR 반응에 사용된 template는 열처리를 통해 분리하여 그 중 0.5

μl 를 사용하였으며, primer로는 *L. ivanovii*에 대한 특이적 primer인 forward primer IVA3 $0.5\mu\text{l}(20\text{pM}/\mu\text{l})$, reverse primer(LisB) $0.5\mu\text{l}(20\text{pM}/\mu\text{l})$, dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), $0.5\mu\text{l}(2.5\text{mM each})$, $10\times\text{PCR buffer } 5\mu\text{l}(\text{MgCl}_2 \text{ } 15\text{mM})$, *Taq polymerase* $1\mu\text{l}(1.25\text{unit}/\mu\text{l})$ 를 가하여 멸균한 3차 증류수로 총량이 $50\mu\text{l}$ 가 되게 하고 Mastercycler gradient(Eppendorf사, Germany)로 PCR 반응을 실시하여 PCR 최적 조건을 확립하고자 하였다.

PCR 분석 조건은 denaturation 94°C 30초, annealing $49^\circ\text{C}\sim 70^\circ\text{C}$ 1분 30초, extension 72°C 1분의 순서로 30cycle 반응을 진행하고 최초 pre-denaturation 94°C 에서 3초, 최종 extension 72°C 에서 5분으로 진행하였다. 위의 PCR product를 1.2% agarose gel로 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator 상에서 PCR 반응 결과를 확인 하였다. *Listeria*균주중 *L. ivanovii*만을 특이적으로 검출하기 위한 PCR 조건을 확립하기 위하여 Gradient PCR을 이용하여 PCR을 수행하였다.

본 실험에서는 Gradient PCR 조건 중 annealing 온도 조건을 $49^\circ\text{C}\sim 70^\circ\text{C}$ 로 설정 후 PCR을 수행한 결과 65°C 의 annealing 온도 조건에서 가장 specific한 PCR product를 확인할 수 있었다(Fig 2-3).



Fig. 2-3. A detection of *L. ivanovii* by Gradient PCR used IVA3 and LisB in electrophoresis used for 1.2% agarose gel, 1X TAE buffer.

lane M is the marker that PS44 digested by *Bam*HI and *Hind*III, lane 1 is PCR product of *L. ivanovii*(1.1kbp) that annealing temperature of PCR is 49.2°C . lane 2 is 51.5°C , lane 3 is 54.1°C , lane 4 is 56.8°C , lane 5 is 59.5°C , lane 6 is 62°C , lane 7 is 64.1°C , lane 8 is 65.7°C , lane 9 is 66.5°C , lane 10 is 68.1°C , lane 11 is 69.7°C , lane 12 is 70.5°C .

6. *Listeria* Multiplex PCR 반응을 위한 Chromosomal DNA isolation Method 비교

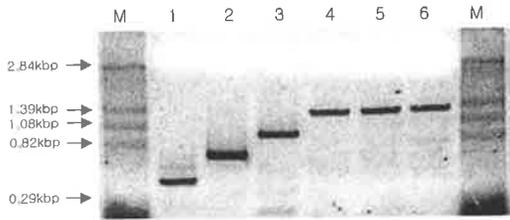
열처리를 통한 DNA 분리 방법으로는 각각의 균주 1.5ml를 E-tube에 담아서 2분간 12000rpm으로 원심분리 후 상등액을 제거하고, 100 μ l 1XPCR buffer(MgCl₂ 15mM)를 넣고 부유하여 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 cell을 파괴 시킨 후 12000rpm으로 5분간 원심분리후 즉시 ice에 정치하여 상등액을 DNA template로서 각각 1 μ l를 사용하여 PCR 반응을 실시하였다. 또한 각각의 균주를 SDS/Phenol treatment/Ethanol precipitation법을 2가지 방법으로 변형시켜 Chromosomal DNA isolation하여 DNA template로서 1 μ l를 사용하여 PCR 반응(PERKIN ELMER 9600)을 실시함으로써 첫 번째 방법과 효율성에 대한 비교 실험을 실시하였다.

SDS/Phenol treatment/Ethanol precipitation법의 변형 실험은 첫째, SDS/Phenol treatment/ Ethanol precipitation법 전 과정을 수행하였고 둘째, SDS처리 후 Phenol treatment 과정 중 saturate phenol처리만을 한 후 원심분리하여 상등의 solution을 3분간 재 원심분리하고 상등의 solution을 DNA template로 사용하여 비교 실험을 하였다.

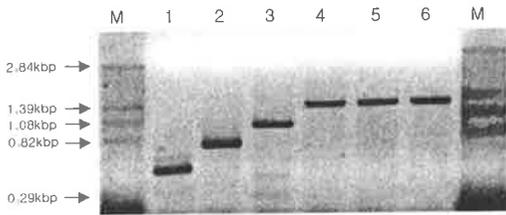
*Listeria*에 대한 multiplex PCR 검색에 사용하는 DNA template를 보다 간단하게 추출하기 위해 3가지 방법을 비교 실험하였다(Fig 2-4). 3가지 방법에서 약간의 차이는 볼 수 있으나, 모든 실험에서 *Listeria*를 PCR 반응을 통해서 무리 없이 검출할 수 있었다.

Fig 2-4의 (a)의 경우 SDS/Phenol treatment/Ethanol precipitation법 전 과정을 수행하여 DNA를 회수한 후 multiplex PCR 반응을 수행 한 결과이다. (b)의 경우 SDS처리 후 Phenol treatment 과정 중 saturate phenol처리만을 한 후 원심분리하여 상등의 solution을 3분간 재 원심분리하고 상등의 solution을 DNA template로 사용하여 multiplex PCR을 수행 한 결과이며, (c)의 경우는 균주를 원심분리를 통해 수거한 후 열처리를 통하여 DNA를 회수한 후 multiplex PCR을 수행 한 결과이다.

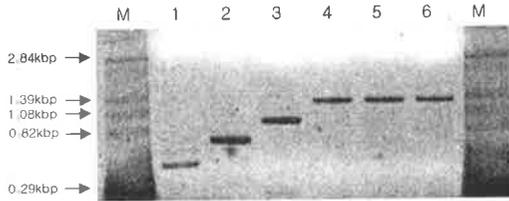
따라서, 검출하려는 sample에서 PCR 반응에 사용하는 DNA template를 보다 빠른 시간에 간단히 추출하기 위한 방법으로 열처리와 원심분리를 통한 DNA isolation 방법을 식품에서 *Listeria*를 검출하는 실험에 사용하였다.



(a)



(b)



(c)

Fig. 2-4. Result of electrophoresis in 1.2% agarose gel, 1X TAE buffer that multiplex PCR product of *Listeria spp.* according to modified chromosomal DNA isolation.

lane M is the marker that PS44 digested by *Bam*HI and *Hind*III. (a) Multiplex PCR product of *Listeria spp.* that DNA template isolated used for SDS/Phenol/Et-OH method, lane 1 is *L.grayi*(0.48kbp), lane 2 is *L.monocytogenes*(0.66kbp), lane 3 is *L.innocua*(0.87kbp), lane 4 is *L.ivanovii*(1.2kbp), lane 5 is *L.seeligeri*(1.2kbp), lane 6 is *L.welshimeri*(1.2kbp). (b) Multiplex PCR product of *Listeria spp.* that DNA template isolated used for modified SDS/Phenol/Ethanol method, lane 1 is *L.grayi*(0.48kbp), lane 2 is *L.monocytogenes*(0.66kbp), lane 3 is

L. innocua(0.87kbp), lane 4 is *L. ivanovii*(1.2kbp), lane 5 is *L. seeligeri*(1.2kbp), lane 6 is *L. welshimeri*(1.2kbp). (c) Multiplex PCR product of *Listeria spp.* that DNA template isolated used for Bolling method, lane 1 is *L. grayi*(0.48kbp), lane 2 is *L. monocytogenes*(0.66kbp), lane 3 is *L. innocua*(0.87kbp), lane 4 is *L. ivanovii*(1.2kbp), lane 5 is *L. seeligeri*(1.2kbp), lane 6 is *L. welshimeri*(1.2kbp).

7. 식품에 대한 multiplex PCR 검출법의 효율성 검사

유가공품 및 육가공품등에서 추출한 sample을 이용하여 *Listeria* multiplex PCR 검출법과 SIWIII multiplex PCR 검출법의 효율성을 검사하였다.

국립수의과학검역원에서 수입 육류 및 육류 가공제품으로부터 채취한 균주들에 대해 생화학적 검사를 마치고 *L. monocytogenes*로 판정된 총 69개의 균주를 표준균주와 같은 조건하에서 배양하여 chromosomal DNA를 순수분리하고 그중 1 μ l를 template로 사용하여 1차적으로 *Listeria* multiplex PCR을 수행한 후 1.2kb의 PCR product가 확인된 sample은 1차 PCR의 product를 template로 하여 SIWIII multiplex PCR을 수행하였다. 생성된 PCR product는 1.2% agarose gel을 사용한 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator상에서 그 결과를 확인하였다. 최적의 온도조건인 50 $^{\circ}$ C에서 표준균주 6종과 함께 PCR반응에 들어간 총 69개의 sample들 중 *L. monocytogenes*로 검출된 것은 59종류, *L. innocua*로 검출된 것은 3종류, *L. ivanovii*로 검출된 것은 2종류, *L. welshimeri*로 검출된 것은 5종류로서 생화학적으로 *L. monocytogenes*로 검출된 것은 총 69개의 sample 중 10종류가 다른 균주로 검출되었다(Fig 2-5).

생화학적 종 동정이 일차 테스트를 거친 것이었기는 하나 본 결과는 본 PCR 종동정법이 생화학적 방법에 비해 매우 신속하며, 아울러 정확하다는 것을 확실히 증명한 것이라 하겠다. PCR검사에 의해 타 종으로 재 동정된 균주를 p60 염기서열 결정법에 의하여 검사한 결과도 PCR검사의 결과가 정확함을 입증하였다.

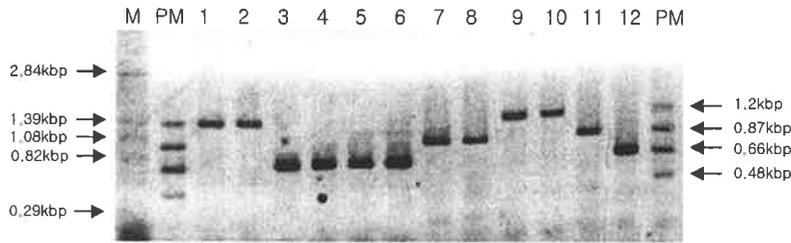


Fig. 2-5. A detection of *Listeria* spp. by multiplex PCR in Foods in electrophoresis used 1.2% agarose gel, 1X TAE buffer.

lane M is the marker that PS44 digested by *Bam*HI and *Hind*III, lane PM is the PCR product mix of *L. grayi*(0.48kbp), *L. monocytogenes*(0.66kbp), *L. innocua*(0.87kbp), *L. ivanovii*(1.2kbp). lane 1~12 is the multiplex PCR product used primer as Lis-mix of the MAF samples. Sample is lane 3,4,5,6,12 that detected as *L. monocytogenes*(0.66kbp), Sample is lane 7,8,11 that detected as *L. innocua*(0.87kbp), Sample is lane 1,2,9,10 that detected as *L. ivanovii* or *L. seeligeri* or *L. welshimeri*(1.2kbp).

8. 우유에서의 PCR 검출법

가. 우유에서의 PCR 검출 효율성 검사

임의로 구입한 우유에 *Listeria* 균주중 *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*를 10^4 cells/ml 로 주입하고, 10000rpm으로 원심분리하여, 상등액을 100℃ 10분간 열처리 한 후 12000rpm으로 원심분리 5분간 수행 후 상등액을 DNA template로 사용하여 PCR 반응을 수행하였다(Fig 2-6). DNA 1 μ l를 template로 하여 본 실험실에서 재조한 primer(Lis-mix) 2 μ l(20pM/ μ l), dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 0.5 μ l(2.5mM each), 10 \times PCR buffer 5 μ l(MgCl₂ 15mM), *Taq.* polymerase 1 μ l(1.25unit/ μ l)를 가하여 멸균한 3차 증류수로 총량이 100 μ l가 되게 하고 PCR 반응을 실시 하였다. PCR반응 조건은 denaturation 94℃, 30초, annealing 50℃, 30초, extention 72℃, 1분의 순서로

30cycle 반응을 진행하고 최초 pre-denaturation 94℃에서 3분, 최종 extension 72℃에서 5분으로 PCR 반응(PERKIN ELMER 9600)을 진행하였다.

위의 PCR product를 1% agarose gel로 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator 상에서 PCR 반응 결과를 확인 하였다(Fig.2-6).

임의적으로 구입한 우유에 *Listeria*를 인공감염시킨 후 확립된 PCR을 이용한 *Listeria*의 신속검출법을 적용한 결과, 본 PCR실험법은 일반 시판 우유에 대하여 바로 검출법으로 적용될 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다.

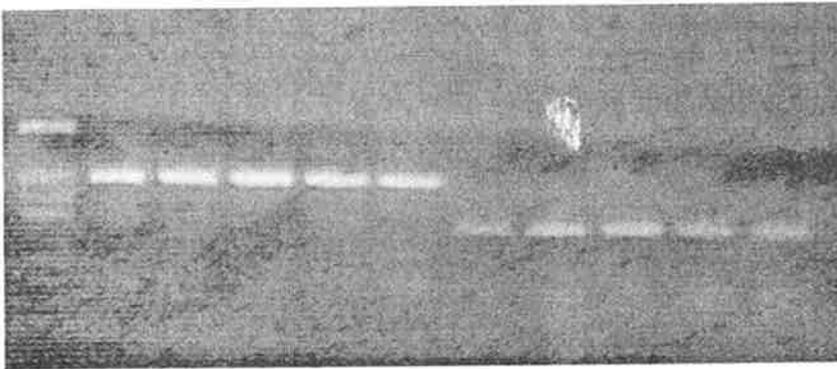


Figure 2-6. Result of PCR detection in milk.

lane 1 : M : PS44 (BamHi/HindIII), lane 2~6 : *L. ivanovii*, lane 7~12 :
L. monocytogenes

나. 우유로부터 원심분리 rpm에 따른 *L. monocytogenes*의 회수율 검사

위에서 제시한 바와 같이 우유에는 milk fat, milk sugar, milk protein등 PCR 반응시 저해물질들이 다량 포함되어 있기 때문에 원심분리에 의해 이러한 물질들을 침전시키고 상등의 액체상태에서 균체의 회수율을 높이기 위해 공시균주 $10^2 \text{ cell}/100 \mu\text{l}$ 를 시료 $900 \mu\text{l}$ 와 희석하여 원심분리 rpm 조건을 1000rpm, 2000rpm, 4000rpm, 6000rpm으로 18℃에서 10분간 원심분리하여 원심분리 rpm에 따른 상등액에서의 균 회수율을 비

교 실험하였다.

우유 900 μ l에 10²cell/100 μ l의 균을 희석하여 원심분리 rpm을 1000rpm, 2000rpm, 4000rpm, 6000rpm으로 10분간 18℃에서 원심분리하여 원심분리 rpm에 따른 균 회수율 결과가 다음과 같다(Table 2-4). 이 결과로써 인공감염시킨 우유에서 microcentrifuge 원심분리에 의한 *Listeria*균의 회수율은 2000 rpm에서 약 80%임을 알 수 있었다.

Table 2-4. Collection rate of *L.monocytogenesis* in supernatant according to centrifugal force (rpm in microcentrifuge) in the milk.(%)

rpm	1000rpm	2000rpm	4000rpm	6000rpm
plate No.				
1	86	83	32	23
2	79	80	36	23
3	81	75	30	25
average	82.0	79.3	32.7	23.7

다. 우유에서 *L. monocytogenes*의 균수에 따른 PCR 반응 검출의 한계

어느 정도의 균수까지 PCR 검출이 가능한지 알아보기 위하여 10⁴ cell/100 μ l~10 cell/100 μ l의 균을 우유 900 μ l에 희석하고 1000rpm으로 18℃에서 10분간 원심분리하여 균을 회수한 후에 PCR 반응을 실시하였다. 우유로부터 *L.monocytogenesis*의 균수에 따른 PCR 검출한계를 알아보기 위하여 우유 900 μ l에 *L.monocytogenesis* 공시균주 100 μ l(10⁴~10cell/ μ l)를 각각 희석하고 위에서 언급한 방법으로 PCR반응을 한 실험 결과에 의한 PCR 반응결과가 다음과 같다(Table 2-5).

실험은 인공감염시킨 우유 1ml에서 각 1/1000 또는 1/100을 사용하였으므로 결과적으로 검출한계는 PCR반응액에 10개의 *Listeria*균이 혼합되어 있을 경우도 본 실험방법으로는 검출할 수 있음을 증명할 수 있었다.

Table 2-5. The detection of *L.monocytogenes* by the direct PCR method which inoculated in milk . The PCR template is used from DNA by heating(100℃,10 min.) or Alkali lysis/Phenol extraction.

+ : positive reaction - : negative reaction

Method Inoculum (cell No.)	Heating method		Alkali lysis/ Phenol method	
	1 μ l	10 μ l	1 μ l	10 μ l
1.0 \times 10 ⁴	+	+	+	+
1.0 \times 10 ³	-	+	-	+
1.0 \times 10 ²	-	-	-	-
1.0 \times 10	-	-	-	-
0	-	-	-	-

라. PCR 표준 반응조건

시료(우유) 1.5 ml를 2000 rpm의 원심분리(microcentrifuge)후, 상등액 1 ml를 채취하여 가열 또는 Phenol extraction의 방법으로 DNA 용액을 얻는다. 이 용액 10 μ l를 PCR tube에 취하고 primer (Lis-mix) 2 μ l(20pM/ μ l), dNTP(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 0.5 μ l(2.5mM each), 10 \times PCR buffer 5 μ l(MgCl₂ 15mM), *Taq* polymerase 1 μ l(1.25unit/ μ l)를 가하여 멸균한 3차 증류수로 총량이 50 μ l가 되게 하고 mineral oil 50 μ l를 용액 위에 덮어준 후 PCR 반응을 실시한다.

PCR 분석 조건은 denaturation 94℃ 1분, annealing 50℃ 1분, extention 72℃ 1분의 순서로 30cycle 반응을 진행하고 최초 pre-denaturation 99℃에서 10분, 최종 extention 72℃에서 10분간 진행한다.

위의 PCR product를 1% agarose gel로 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator 상에서 PCR 반응 결과를 확인한다.

제 3 장 *Listeria* spp. 항원 생산

제 1 절 서설

*L. monocytogenes*의 병원성에 영향을 미치는 다양한 인자(세포내 증식력, 철 성분, 카탈라아제, superoxide dismutase, 표면 성분, 용혈소)는 병원성의 복잡함을 가리키고 있다.

*inlA*에 의해 암호화된 세포표면단백질 internalin은 장내세포와 같은 상피세포계 Caco-2에 침입하는데 있어서 필수적이며(Gaillard *et al.*, 1991), 다른 상응하는 표면단백질 InlB는 간세포를 내면화하기 위해 필요하고(Dramsı *et al.*, 1995), Vero, HaLa, HEp-2처럼 약간의 섬유아세포와 같은 세포계를 내면화하기 위해 필요하다고 여겨진다(Braun *et al.*, 1998; Gaillard *et al.*, 1996). 또한 actin 중합에 관계하는 ActA 단백질은 세포침입에 관여하며(Altarez-Dominguez *et al.*, 1997; Kocks *et al.*, 1992), *inlC*와 *inlF*와 같은 internalin 유전자계의 다른 구성요소에 관여한다(Dramsı *et al.*, 1997).

리스테리아 특이의 *iap* gene은 p60단백질을 생산하며(Köhler *et al.*, 1991), Figure 3-1에서와 같이 *Listeria* 7종이 서로 다른 삽입서열과 반복서열을 갖는 특징이 있다(Bubert *et al.*, 1992; Bubert 1993). 더구나 3T6 마우스 섬유아세포에 침투할 수 있는 능력을 상실한 자연적 변이 종의 발견은 숙주세포에 성공적으로 침투하기 위해서 주요 세포의 단백질인 p60을 필요로 함을 확인하였다(Köhler *et al.*, 1990; Kuhn and Goebel, 1989). p60 또는 침투 관련 단백질(*iap*)로 칭하여지는 이 단백질 산물은 돌연변이 된 *L. monocytogenes* 종들에서는 손상되고, p60이 murein hydrolase 활성을 갖는 것은 세포가 긴 사슬을 형성하는 경향이 없어진 다음에 보여지며, 각각의 세포들 간에 격막 형성은 원형 그대로 있었지만 세포들은 분리되지 않았다(Kuhn and Goebel, 1989). p60 단백질의 이런 물리적 결핍뿐만 아니라 실제상으로 부족은 세포 침투성의 기능을 잃게 하였다(Kuhn and Goebel, 1989; Ruhland *et al.*, 1993). 또한 그 후 배양배지에서 정제된 p60의 추가는 이들 변이 세포의 세포내면화 능력을 회복시켰을 뿐만 아니라 *Salmonella typhimurium*에서 발현시켰을 때 증가된 세포유입의 증가를 보였고(Hess *et al.*, 1995), *E. coli*에서 발현된 *L. monocytogenes*의 p60단백

질의 Caco-2 세포에서의 결합은 p60이 식세포가 아닌 숙주세포에 침투함에 있어 필수 인자임을 명백하게 했다(Park *et al.*, 2000). 그렇지만 이런 압도하고 있는 증거에도 불구하고 내면화에 관련된 다른 세균인자와는 달리, p60에 대한 작용 기작이 아직 대부분 연구되어 있지는 않다.

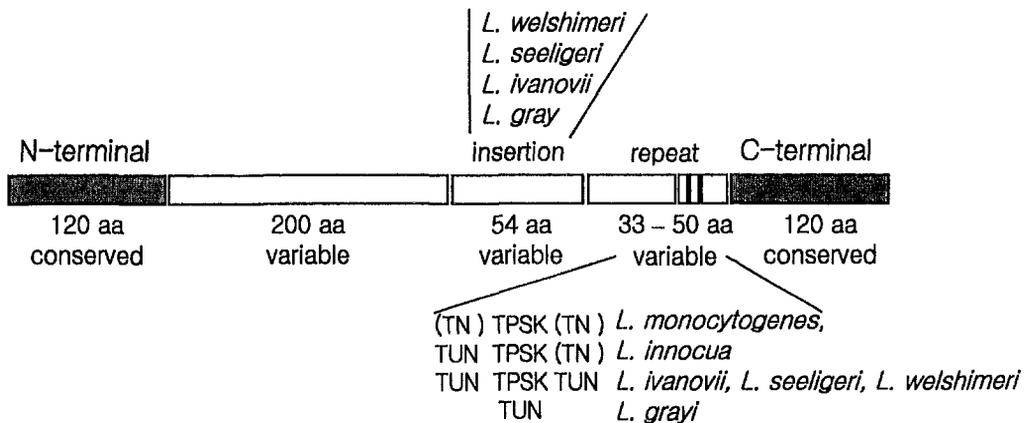


Figure 3-1. Conserved and variable regions in the p60 protein

제 2 절 *Listeria spp.* 재조합 p60 단백질 항원 생산

1. p60단백질 유전자 클로닝

가. *Listeria spp.* 균주의 배양 및 genomic DNA 순수분리

Listeria genus(*L. monocytogenes* R1, *L. ivanovii*, *L. innocua* sv6b, *L.*

seeligeri, *L. welshimeri I*, *L. welshimeri II*, *L. grayi*)는 Würzburg대학에서 분양 받은 것으로, *iap* (invasion associated protein) gene을 genome DNA로부터 증폭하기 위한 균주로 사용하였다. 이 균주를 BHI(brain heart infusion, Difco) 배지에 접종하여 18시간 진탕 배양(37°C, 150rpm)한 후에, Proteinase K/phenol/chloroform 법(윤병수, 1999)으로 genomic DNA를 추출하였고 *iap* gene PCR 증폭에 template로 사용하였다.

나. *iap* gene PCR 증폭 및 T-vector cloning

iap 유전자의 증폭을 위하여 template로 *Listeria* 균주의 genomic DNA 10ng을 사용하였는데, *L. monocytogenes RI*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri I*, *L. welshimeri II*의 경우에는 N-terminal primer는 UnilisA-EcoRI를, *L. grayi*, *L. innocua sv6b*에서는 Lis1A-EcoR I 을 사용하였으며, C-terminal primer는 LisB-XbaI를 각각 50pmoles을 이용하였다(Table 3-1). PCR 반응 조건은 PCR buffer (20mM Tris/HCl (pH 8.3 at 20°C), 50mM KCl), 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 2.5units *Taq* polymerase로 하여 GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER, U.S.A.)를 사용하여 94°C 3분 동안 predenaturalization과 92°C 30초, 52°C 30초, 72°C 1분 30초를 30회 수행하고 final elongation을 72°C로 5분을 더 주어 증폭시켰다.

Table 3-1. Primers used for amplification and sequences

Primer name	Sequence (5' →3')
UnilisA-EcoR I (forward)	TATGAATTCGCTACAGCTGGGATTGCGGT
Lis1A-EcoR I (forward)	ATAGAATTCATGAATATGAAAAAAGCAAC
LisB-Xba I (reverse)	ATATCTAGATTATACGCGACCGAAGCCAA

그 결과 각각의 균주에서 *L. monocytogenes*는 1.43kbp와 *L. ivanovii*는 1.57kbp, *L. innocua*는 1.46kbp, *L. grayi*는 1.536kbp, *L. welshimeri* I는 1.57kbp, *L. welshimeri* II는 1.57kbp의 PCR product를 얻을 수 있었고 이 PCR product는 pGEM-T vector(promega)와 pBlueXcm vector(윤병수, 1999)를 사용하여 재조합 DNA를 만들었다. pBlueXcm vector는 ammonium acetate plasmid isolation 법으로 순수분리한 뒤 XcmI(NEB) restriction enzyme으로 절단후 GeneClean kit II로 2.9kb의 vector DNA를 elution 하여 T-vector로 이용하였다. PCR product와 T-vector를 3:1, 16°C, 0/N으로 ligation 하였고, competent cell에 Heat shock transformation method로 형질전환 시켰다. 형질전환 시킨 균을 X-gal plate에서 blue/white로 일차선별을 하였고, 백색 균락을 접종하여 mini-prep하고 제한효소(*EcoRI*과 *XbaI*)로 절단하여 vector(pGEM-T vector : 3.00kbp, pBlueXcm : 2.95kb)와 insert(1.43kbp ~ 1.57kbp)로 나뉘는 것을 clone으로 선별하였다.

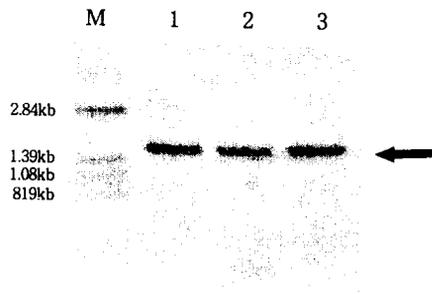


Figure 3-2. Amplification of *L. grayi* *iap* gene by PCR. 1% agarose gel and 1 × TAE buffer were used in electrophoresis. M represents DNA size marker. On the right, the arrow indicates *iap* gene. Their size are 1,536bps.

다. pMAL-c2 발현 vector에 subcloning

Listeria 균주(*L. monocytogenes* RI, *L. ivanovii*, *L. innocua* sv6b, *L. welshimeri* I, *L. welshimeri* II)의 특이 단백질인 invasion associated protein(iap) p60을 재조합 단백질로 *E. coli*에서 발현시키기 위해 발현 vector pMAL-c2를 이용하였다. pMAL-c2 vector는 maltose-binding protein(MBP)에 융합된 재조합 단백질을 생산할 수 있도록 이루어져 있으며(Maina *et al.*, 1988), 이 발현계는 다양한 단백질의 과발현에서 효율이 있는 것으로 확인되었고(Park *et al.*, 1998; Sachdev *et al.*, 1998), amylose resin을 이용한 MBP-융합 단백질의 정제 protocol은 간편성과 순수성에서 뛰어난 모습을 보였다(Hering *et al.*, 1996; Lo-Man *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1998; Rhyum *et al.*, 1994). pMAL system의 이런 특징을 이용하여 *Listeria spp.*의 iap 유전자를 Molecular cloning하여 p60 단백질을 발현하기 위한 재조합 plasmid의 구조는 Figure 3-3과 같다.

T-vector에서 cloning하여 선별된 각각의 clone을 제한효소 *EcoRI*과 *XbaI*으로 절단하여 insert(iap gene)부위를 pMAL-c2 vector와 재조합하여 형질전환 시켜 X-gal plate에 도말하였다. 여기서 백색 균락을 선별하여 배양하였고, 이들의 plasmid 추출하여 *EcoRI*과 *XbaI*으로 절단하여 6.63kbp의 pMAL-c2 vector와 각 *Listeria* 균주로부터 얻어진 iap gene의 insert의 크기(*L. monocytogenes* RI ; 1.43kbp, *L. ivanovii* ; 1.57kbp, *L. innocua* sv6b ; 1.46kbp, *L. welshimeri* I ; 1.57kbp, *L. welshimeri* II ; 1.56kbp, *L. grayi* ; 1536bp)로 분리되는 것을 1.2% agarose TAE gel에서 확인하여 이를 최종의 clone으로 선별하였다(Figure 3-4). 이들 clone의 이름을 pMAL-iap/momo, pMAL-iap/iva, pMAL-iap/inn, pMAL-iap/wel I, pMAL-iap/wel II, pMAL-iap/grayi로 하였다.

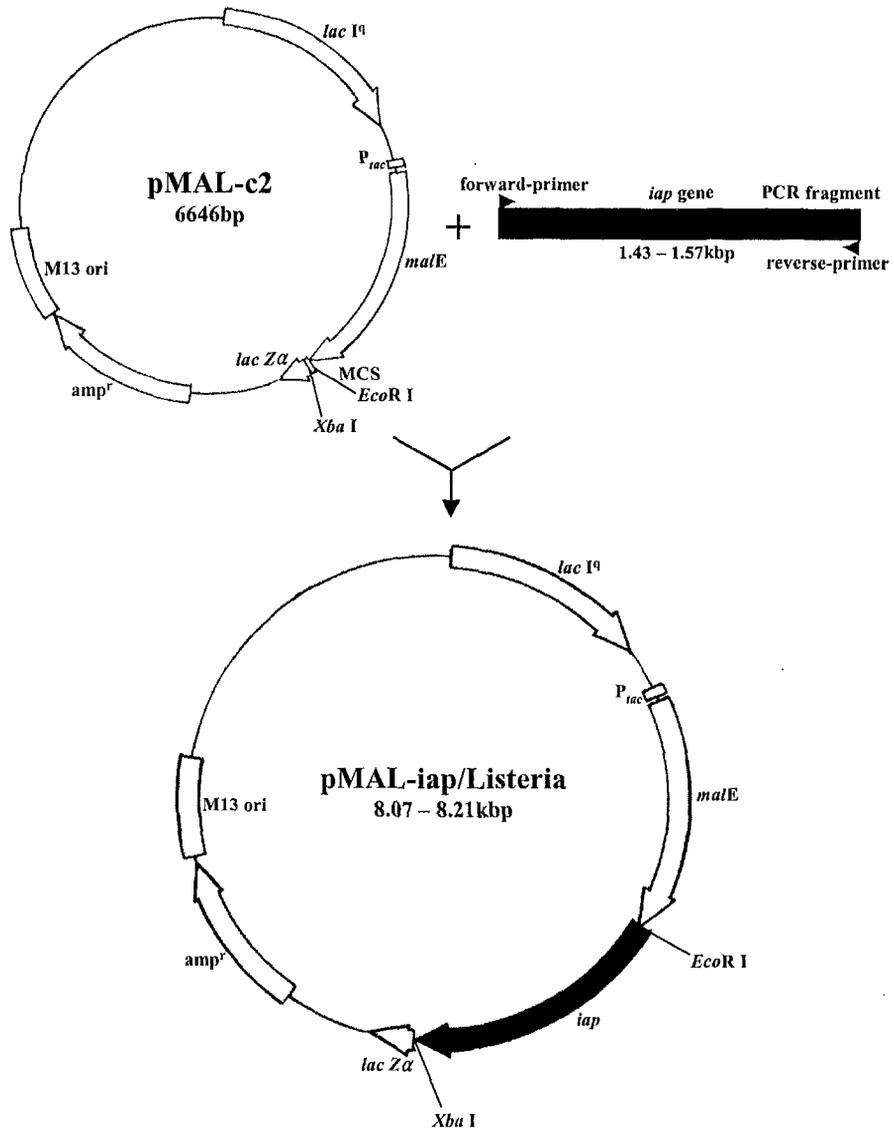


Figure 3-3. Schematic presentation of the recombinant pMAL-iap vector construction

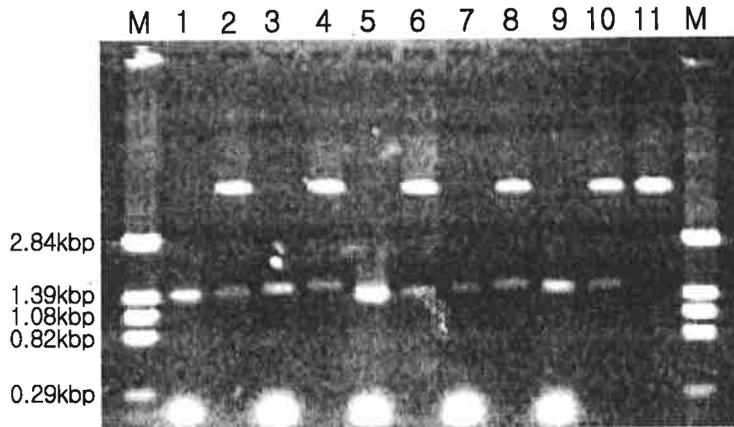


Figure 3-4. Restriction analysis of recombinant DNA in 1.2% agarose gel. Lane M is the marker that PS44 digested by *Bam*HI and *Hind*III. Lanes 1, 3, 5, 7, 9 are PCR product of *iap* gene using same primers-pair with genomic DNA from *Listeria*. 1 : *L. monocytogenes*(1.43kbp), 3 : *L. ivanovii*(1.57kbp), 5 : *L. innocua*(1.46kbp), 7 : *L. welshimeri* I(1.57kbp), 9 : *L. welshimeri* II(1.57kbp). Lanes 2, 4, 6, 8, 10 are recombinant DNA fragment digested by restriction enzymes (*Eco*RI and *Xba*I). Lane 11 is pMAL-c2 digested by *Eco*RI and *Xba*I. The size is 6.64kb.

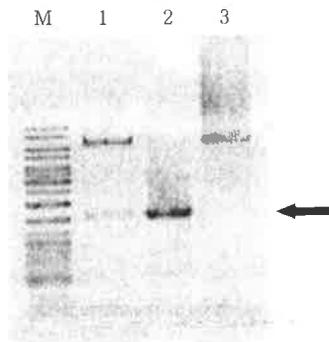


Figure 3-5. Restriction analysis of recombinated pMAL-*iap/gryai*. Except of lane M, each sample was digested with restriction enzyme *Eco*R I and *Xba* I. In electrophoresis, 1% agarose gel and 1×TAE buffer were used. M represents

DNA size marker. Lane 1 is recombinated pMAL-iap/grayi. Lane 2 is a isolated iap from pBX-iap. Lane 3 is pMAL-c2. The arrow indicates grayi/iap fragment. The recombinated pMAL-iap/grayi was used in expression of recombinant MBP-p60 fusion protein.

2. *Listeria spp.* 재조합 p60 단백질의 발현

가. 재조합 p60 단백질 발현조건 비교

1) MBP-p60/mono의 발현

가) IPTG 농도에 따른 MBP-p60/mono의 발현 조건비교

pMAL-c2에 재조합된 *iap* 유전자의 IPTG 농도에 따른 발현된 재조합 단백질의 발현 정도를 관찰하기 위해 pMAL-iap/mono clone을 LB배지(50 μ g/ml ampicillin)에서 overnight 배양(37 $^{\circ}$ C, 180rpm) 후, 100 μ g/ml ampicillin이 든 LB 배지 20ml에 overnight 배양 균액 1ml을 넣고 2시간 30분 배양(37 $^{\circ}$ C, 180rpm, OD₆₀₀=0.6)하고 IPTG의 농도(0mM, 0.1mM, 0.3mM, 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM)를 달리하여 4시간 동안 발현 유도하여 각 sample에서 1.5ml의 배양액을 취하고 15,000rpm에서 1분 원심분리하여 cell pellet을 PBS 300 μ l로 부유시키고 초음분쇄기(40%, 0.5초 pulse, 1분)로 분쇄하여 cell lysate 2 μ l를 사용하여 12% SDS-PAGE에서 확인하였다(Figure 3-6)

M은 Molecular weight marker이고, 1은 noninduced, 2는 0.1mM IPTG, 3은 0.3mM IPTG, 4는 0.5mM IPTG, 5는 1.0mM IPTG, 6은 1.5mM IPTG를 넣고 induction시킨 것으로 IPTG 농도에 따른 발현양상은 큰 차이를 보이지 않았으며, IPTG를 넣어주지 않은 실험군에서는 발현 양을 거의 볼 수 없었다.

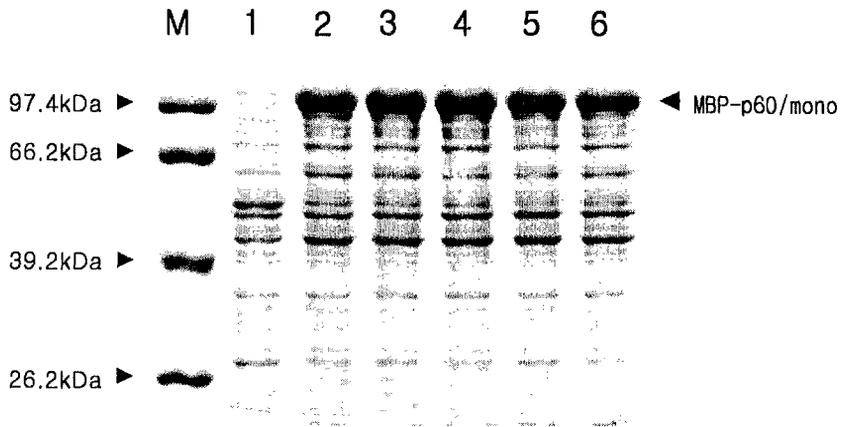


Figure 3-6. Effect of the IPTG concentration on p60 expression in *E. coli*.

E. coli cells bearing the *iap* expression vector, pMAL-*iap*/mono, were induced for 4 hours with different concentrations of IPTG. Total cell lysate from different induction conditions were separated in a 12 % SDS-PAGE. Equal amounts of sample corresponding to 30 μ l of the original culture were loaded in all the lanes. IPTG concentration was as the following. M ; Molecular weight marker, 1 ; uninduced, 2 ; 0.1mM IPTG, 3 ; 0.3mM IPTG, 4 ; 0.5mM IPTG, 5 ; 1.0mM IPTG, 6 ; 1.5mM IPTG.

나) Induction 시간에 따른 MBP-p60/mono의 발현 조건

pMAL-c2에 재조합된 *iap* 유전자의 0.3mM IPTG 농도에서 induction 시간에 따라 발현된 재조합 단백질의 발현 정도를 관찰하기 위해 pMAL-*iap*/mono clone를 LB배지(50 μ g/ml ampicillin)에서 overnight 배양(37 $^{\circ}$ C, 180rpm) 후, 100 μ g/ml ampicillin이 든 LB 배지 20ml에 overnight 배양 균액 1ml을 넣고 2시간 30분 배양(37 $^{\circ}$ C, 180rpm, OD₆₀₀=0.6)하고 0.3mM IPTG를 넣고 0, 1, 2, 4, 6, 8, 16시간 동안 발현 유도하여 각 sample에서 1.5ml의 배양액을 취하고 15,000rpm에서 1분 원심분리하여 cell pellet을 PBS 300 μ l로 부유시키고 초음파분쇄기(40%, 0.5초 pulse, 1분)로 분쇄하여 cell lysate

2 μ l를 사용하여 12% SDS-PAGE에서 확인하였다(Figure 3-7).

0.3mM IPTG 농도에서 induction시킨 시간이 길수록 발현되는 정도가 증가함을 볼 수 있었으며, 그 중 6, 8, 16시간 동안 induction시킨 실험군에서 발현양이 많았으며 이들 간에는 양적인 큰 차이를 보이지 않았으며, IPTG를 넣어주지 않은 실험군에서는 발현 양을 거의 볼 수 없었다.

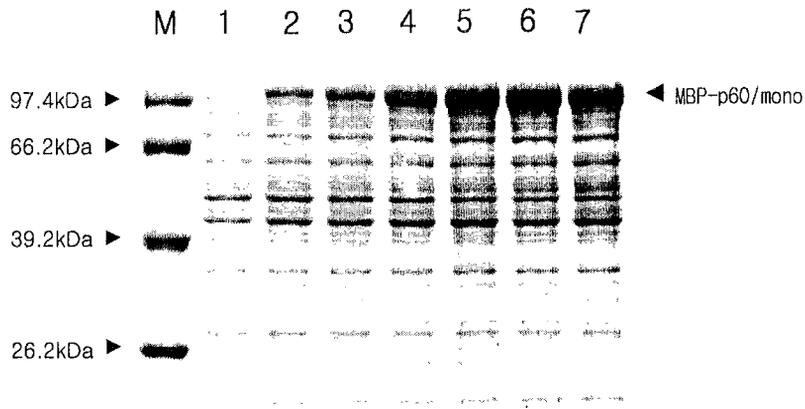


Figure 3-7. Time course of p60 expression in *E. coli*. Total cell lysate of *E. coli* carrying the *iap* expression vector and induced with 0.3mM IPTG for different time values were loaded and separated in a 12% SDS-PAGE. Equal amounts of cell lysates corresponding to 30 μ l of the original culture were loaded per lane. Time values are indicated as the corresponding time point after induction with IPTG at OD=0.6. M : molecular weight marker, 1 : 0 min, 2 : 1 hour, 3 : 2 hour, 4 : 4 hours, 5 : 6 hours, 6 : 8 hours, 7 : overnight.

2) MBP-p60/grayi의 발현

제한효소를 이용한 분석결과 클로닝이 확인된 pMAL-grayi/iap는 항생제를 첨가한 LB 배지에서 37 $^{\circ}$ C, 0/N shaking culture하고 배양액 1ml를 24ml의 LB배지에 넣고 2시간

동안 다시 계대배양한 후 IPTG를 첨가하고 4시간 동안 같은 배양조건으로 더 배양하여 과발현을 유도하였다. 배양이 끝난 배양액을 1,3000rpm으로 1분간 원심분리하여 균체를 침전시키고 상등의 배지를 제거한 후 1ml의 멸균 증류수로 2회 세척하고 원심분리하여 상등액을 제거한 후 300 μ l의 멸균 증류수로 침전된 균체를 부유시켰다. 세포 부유액은 초음파 분쇄기를 사용하여 세포를 파괴하였다. 준비된 cell lysate를 0.1% SDS를 포함한 12% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 Coomassie Brilliant Blue(CBB) 염색 용액에서 30분간 염색하고 증류수로 간단히 gel을 세척한 후 단백질을 제외한 gel부분이 투명해질 때까지 수 회 탈염색 용액으로 탈염색을 실시하였다. 탈염색이 완료된 polyacrylamide gel은 사진 촬영한 후 발현 여부 분석에 사용하였다 (Figure 3-8). 제조합 p60의 분자량은 염기서열분석을 통해 밝혀진 자료에 의해 PCGENE으로 분석한 결과 약 53.3kDa이며 pMAL-c2의 MBP와 multiple cloning site 내의 몇 개의 염기가 첨가됨으로서 PCGENE에 의한 분자량은 약 105.6kDa의 제조합 MBP-p60 단백질로 대장균내에서 발현하게 된다.

전기영동은 12% SDS-polyacrylamide gel을 사용하였고, running buffer는 1 \times TGS(Tris/Glycine/SDS, pH8.3) buffer를 사용하였다. 전기영동시 stacking gel상에서는 15mA, separating gel에서는 30mA의 전류조건으로 40~60분간 전기영동하였다. 전기영동이 완료된 gel을 CBB staining solution에서 30분간 염색시킨 후, 다시 destaining solution에서 탈 염색하여 사진촬영 하였다. Figure 18의 SDS-polyacrylamide gel 사진은 IPTG의 발현 유도 시간에 따른 제조합 p60 단백질의 발현양상을 본 실험으로 시간이 증가함에 따라 p60 단백질의 발현량도 증가하는 것을 볼수 있다. 각각의 sample은 3시간동안의 계대배양 후 최종농도가 0.5mM이 되도록 IPTG를 첨가하고 각각 0, 2, 4, 6, 8 시간동안 발현을 유도하였다. 결과 사진에서 보는 바와 같이 8시간동안 발현을 유도한 sample에서 가장 많은 양의 제조합 p60 단백질이 발현된 것을 관찰할 수 있다. 또한 lane 6의 negative control로 사용된 pMAL-c2 vector는 동일한 IPTG 농도하에서 8시간동안 발현을 유도한 것으로서 pMAL-grayi/iap clone 상에서관찰되는 제조합 p60 단백질의 밴드는 관찰되지 않는다. 6번 lane에서 관찰되는 가장 강한 signal의 밴드는 MBP 로써, 상대적으로 삽입된 iap 유전자에 의한 p60의 발현은 높은 수준으로 발현되지 않음을 알수 있다. 이는 pQE-gfp clone에서의 초기 높은 수준의 발현을 더욱 부각시키는 결과로 후속 실험의 진행이 요구되는 부분이다. 본 SDS-PAGE의 결과로 pMAL-c2 vector에 삽입된 *L. grayi*의 iap 유전자가 대장균내에서 성공적으로 발현되었음을 보여준다.

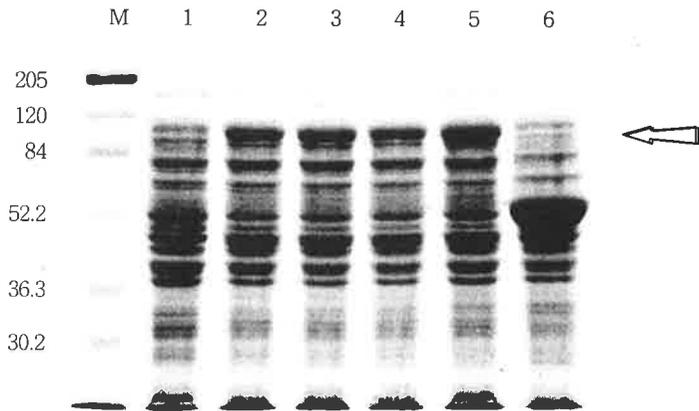


Figure 3-8. Expression patterns of recombinant MBP-p60/grayi in *E. coli* by induction time course. SDS-PAGE was performed with 12% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS and 1×TGS(Tris/Glycine/SDS) running buffer. Lane M represents molecular size marker. The numbers on the left edge show sizes of each band and a unit is KilloDalton(Kda). All sample was loaded after sonication and heat denaturation. Lane 1 to 5 are total lysates of pMAL-grayi/iap. They were cultured for 2 hours under condition of 50µg/ml ampicillin added and then induced for 0, 2, 4, 6, 8 hours on 0.5mM IPTG final concentration. Lane 6 is total lysate of pMAL-c2 as a negative control. The sample was cultured for 8 hours and induced under same IPTG concentration of pMAL-grayi/iap clones. The Arrow on the right indicates a location of MBP-p60/grayi fusion protein. In result, expression quantities of recombinant MBP-p60/grayi increase by time course and successfully expressed in *E. coli*.

3) 그 밖의 *Listeria* p60 재조합 단백질의 발현

Listeria 균주가 암호화하고 있는 *iap* 유전자의 발현 단백질인 p60의 molecular weight는 translation된 아미노산을 이용한 computer 분석을 통해 *L. monocytogenes* RI ; 50.0kDa, *L. ivanovii* ; 54.1kDa, *L. innocua sv6b* ; 50.5kDa, *L. welshimeri* I ; 54.1kDa, *L. welshimeri* II ; 54.1kDa, *L. seeligerii* ; 53.8kDa, *L. grayi* ; 53.2kDa 정도의 크기를 갖는 것으로 계산되었다. *MaIE* 유전자가 암호화하고 있는 maltose-binding protein(MBP ; 42.5kDa)에 융합된 p60을 발현하게 되며, 이 MBP-*iap/Listeria*의 molecular weight는 92.5kDa ~ 96.6kDa 정도의 크기를 갖는 것으로 예상되었다. 그러나 SDS-PAGE에서 확인된 결과는 protein molecular weight marker를 사용하여 비교해보았을 때 97.4kDa보다 큰 size에서 확인되었는데 이것은 pMAL-c2 vector의 *MaIE* 유전자 뒤편에 105bp의 polylinker를 지니고 있기 때문에 *iap* 유전자는 *MaIE* 유전자와 polylinker의 일부 염기서열을 포함한 재조합 DNA를 형성하기 때문에 p60단백질은 *MaIE* 유전자 뒤쪽에 존재하는 polylinker 부분을 포함하는 MBP-p60단백질을 발현함으로써 예상했던 molecular weight 보다 큰 단백질을 발현하게 되었다.

*Listeria*의 p60 단백질을 *E. coli*에서 발현시키기 위해 pMAL-*iap/momo*, pMAL-*iap/iva*, pMAL-*iap/inn*, pMAL-*iap/wel I*, pMAL-*iap/wel II* clone과 대조군으로 pMAL-c2를 LB 배지(50 μ g/ml ampicillin)에서 overnight 배양하여 20ml LB배지(100 μ g/ml ampicillin)에 overnight 배양균액 1ml를 접종하여 OD₆₀₀=0.6(2시간 30분)에 이르면 0.3mM IPTG로 4시간 배양하여 단백질의 발현시켰다. 그리고 대조군으로는 induction을 시키지않고 배양시킨 것과 pMAL-c2를 사용하였다. 이들 재조합 단백질의 발현을 확인하기 위해 배양액 1.5ml를 취하여 15,000rpm에서 cell을 harvest하여 cell pellet을 PBS 150 μ l로 부유하여 초음파 처리하여 4 μ l를 10% SDS-PAGE에 이용하였는데, 이는 배양액 40 μ l를 전기영동에 사용한 것과 동일하다(Figure 3-9).

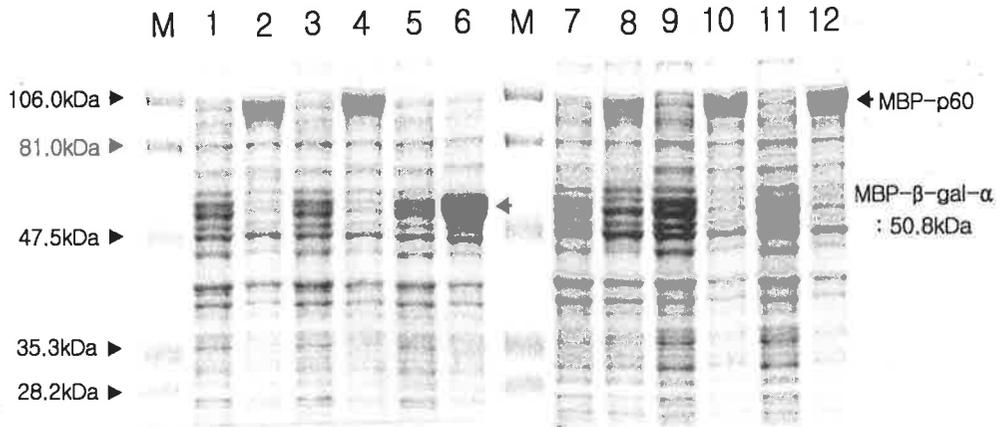


Figure 3-9. Expression of recombinant p60 in *E. coli*. Total cell lysates of *E. coli* incubated with 0.3mM IPTG for 4 hours were loaded and separated in 10% SDS-PAGE. Equal amounts of cell lysates corresponding to 40 μ l of the original culture were loaded into each of lane. M : Molecular weight marker, 1 : total lysate pMAL-iap/mono cells without IPTG induction, 2 : total lysate pMAL-iap/mono cells induced with IPTG, 3 : total lysate pMAL-iap/iva cells without IPTG induction, 4 : total lysate pMAL-iap/iva cells induced with IPTG, 5 : total lysate pMAL-c2 cells without IPTG induction, 6 : total lysate pMAL-c2 cells induced with IPTG, 7 : total lysate pMAL-iap/inn cells without IPTG induction, 8 : total lysate pMAL-iap/inn cells induced with IPTG, 9 : total lysate pMAL-iap/wel I cells without IPTG induction, 10 : total lysate pMAL-iap/wel I cells induced with IPTG, 11 : total lysate pMAL-iap/wel II cells without IPTG induction, 12 : total lysate pMAL-iap/wel II cells induced with IPTG.

발현을 유도하기 위해 IPTG를 사용하여 induction하지 않은 것과 induction한 재조합 DNA pMAL-iap/mono(lane 1, 2), pMAL-iap/iva(lane 3, 4), pMAL-iap/inn(lane 7, 8), pMAL-iap/wel I (lane 9, 10), pMAL-iap/wel II(lane 11, 12)와 pMAL-c2 vector는 유도작용에 의한 확연한 발현 양상을 보이며 재조합 단백질 MBP-p60단백질(90 - 100kDa)과 vector의 발현 단백질인 MBP- β -gal- α (50.8kDa)를 확인할 수 있었다. 이

는 pMAL-c2 vector의 *lacI*^q 유전자가 강력한 repressor를 만들어 induction 없이는 단백질의 발현을 강하게 억제시키고 있는 것으로서 다른 독성이 있는 단백질을 생산하기 위한 vector로 용이하게 사용할 수 있을 보여주었다.

3. 재조합 p60 단백질 대량생산 및 정제

iap 유전자와 pMAL-c2 vector로 재조합된 clone을 LB 배지(50 μ g/ml ampicillin)에서 18시간 배양(37 $^{\circ}$ C, 180rpm)후, LB 배지 500ml, 100 μ g/ml ampicillin에 overnight 배양균액 5ml을 넣고 4시간 배양(37 $^{\circ}$ C, 180rpm)하여, 0.3mM의 Isopropyltio- β -D-galactoside (IPTG)가 되도록 100mM IPTG를 1,500 μ l를 넣어 6시간을 배양하였다. 각각의 배양균을 500ml centrifuge tube에 넣고 7,000rpm, 4 $^{\circ}$ C로 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 균체에 100ml의 PBS를 넣어 부유시켜 세척하였으며, 다시 7,000rpm, 4 $^{\circ}$ C로 20분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전된 균체를 30ml의 column buffer(20mM Tris/HCl pH7.4, 200mM NaCl, 1mM EDTA pH8.0)로 현탁하여 초음파 분쇄기(VCX-400, Sonics & Materials inc.)를 이용하여 Amplitude 40%, Pulse 0.5초로 1분 동안 초음파분해처리를 하고, 1분간 ice에서 정지를 4회 수행하여 세포를 분쇄하였으며, 이 cell lysate를 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 amylose resin이 든 50ml tube에 옮겨 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 shaking mix 시켰다. 이 혼합액을 column에 충전시키고 column buffer로 세척(약 150ml 소요)을 하였다. 그리고 다시 0.1%의 Tween 20이 함유된 column buffer를 25ml를 사용하여 세척하고 여기에 다시 column buffer를 이용하여 세척하였으며, 세척된 용출물(20 μ l)을 Bradford protein assay reagent (80 μ l)에 1 : 4로 반응시켜 column buffer 값과 일치 또는 변화가 없을 때까지 세척을 하였다(약 150ml 소요). 단백질의 분리는 20mM maltose가 든 column buffer를 사용하여 추출하였으며, 추출액은 1.5ml tube로 1ml씩 fraction된 것을 Bradford protein assay 방법을 사용하여 595nm의 파장에서 값을 나타내는 tube를 선별하여 단백질을 회수하였다.

가. 재조합 DNA로부터 얻어진 MBP-p60/mono와 MBP-p60/iva 단백질의 정제

재조합 단백질을 대량으로 정제하기 위해 500ml의 LB 배지(100 μ g/ml)에 overnight 배양균액을 5ml 접종하고 OD₆₀₀=0.6(180rpm 37 $^{\circ}$ C에서 4시간)일때 0.3mM IPTG를 넣고 6시

간 배양하여 MBP-p60/mono와 MBP-p60/iva 단백질을 발현시켰다. 발현된 단백질을 얻고자 cell을 harvest하여 cell pellet을 PBS로 세척하고 초음파분해 처리하여 상청액만을 취하여 amylose resin(15ml)을 이용하여 재조합된 단백질(MBP-p60/mono, MBP-p60/iva)을 정제하였는데, 1 l의 배양액에서 2.5mg의 단백질을 정제해 낼 수 있었다. 이는 NEB Inc.에서 제시했던 정제량(10 ~ 40mg/liter culture) 보다는 적은 양을 얻었지만 농축하여 immunization에 사용할 수 있도록 하였다. 10% SDS-PAGE에서 결과를 확인하였다

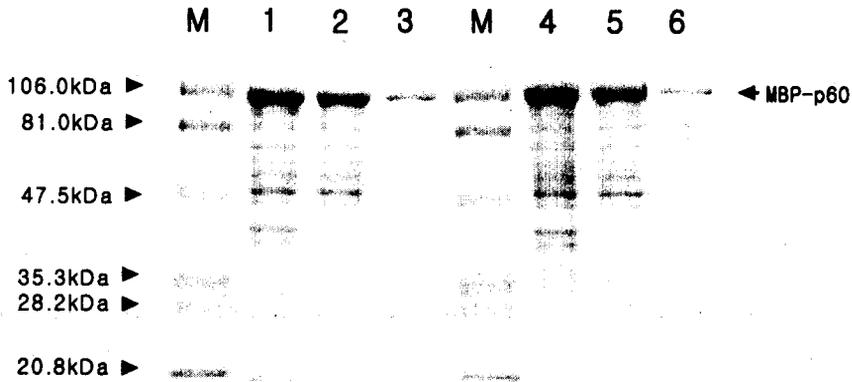


Figure 3-10. Expression and purification of p60 in *E. coli*. For the quantitative preparation of MBP-p60/mono and MBP-p60/iva, large scale culture up to 1 liter was induced for expression and then subjected to purification using amylose resins. The 10% SDS-polyacrylamide gel shows the result of the purification. M : molecular weight marker, 1 : Total lysate pMAL-iap/mono cells, 2 : Supernatant of total lysate pMAL-iap/mono cells, 3 : Purified MBP-p60/mono protein; Arrow indicate the position of the induced recombinant protein, 4 : Total lysate pMAL-iap/iva cells, 5 : Supernatant of total lysate pMAL-iap/iva cells, 6 : Purified MBP-p60/iva protein; Arrow indicate the position of the induced recombinant protein.

나. 재조합 DNA로부터 얻어진 MBP-p60/grayi 단백질의 정제

iap 유전자와 pMAL-c2 vector로 재조합된 clone을 LB 배지(50 μ g/ml ampicillin)에서 18시간 배양(37 $^{\circ}$ C, 180rpm)후, LB 배지 500ml, 100 μ g/ml ampicillin에 overnight한 배양균액 5ml을 넣고 4시간 배양(37 $^{\circ}$ C, 180rpm)하여, 0.3mM의 Isopropyltio- β -D-galact-oxide (IPTG)가 되도록 100mM IPTG를 1,500 μ l를 넣어 6시간을 배양하였다. 각각의 배양균을 500ml centrifuge tube에 넣고 7,000rpm, 4 $^{\circ}$ C로 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 균체에 100ml의 PBS를 넣어 부유시켜 세척하였으며, 다시 7,000rpm, 4 $^{\circ}$ C로 20분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전된 균체를 30ml의 column buffer(20mM Tris/HCl pH7.4, 200mM NaCl, 1mM EDTA pH8.0)로 현탁하여 초음파 분쇄기(VCX-500, Sonics & Materials inc.)를 이용하여 Amplitude 40%, Pulse 0.5초로 1분 동안 초음파분해처리를 하고, 1분간 ice에서 정치를 4회 수행하여 세포를 분쇄하였으며, 이 cell lysate를 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 amylose resin이 든 50ml tube에 옮겨 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 shaking mix시켰다. 이 혼합액을 column에 충전시키고 column buffer로 세척(약 150ml 소요)을 하였다. 그리고 다시 0.1%의 Tween 20이 함유된 column buffer를 25ml를 사용하여 세척하고 여기에 다시 column buffer를 이용하여 세척하였으며, 세척된 용출물(20 μ l)을 Bradford protein assay reagent (80 μ l)에 1 : 4로 반응시켜 column buffer 값과 일치 또는 변화가 없을 때까지 세척을 하였다(약 150ml 소요). 단백질의 분리는 20mM maltose가 든 column buffer를 사용하여 추출하였으며, Bradford protein assay 방법을 사용하여 595nm의 파장에서 값을 나타내는 tube를 선별하여 단백질을 회수하였다.

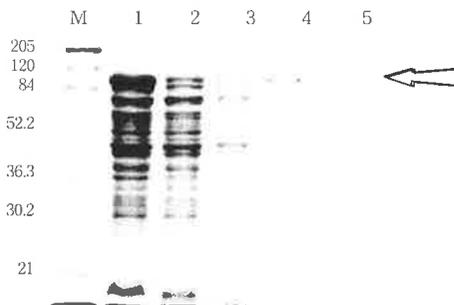


Figure 3-11. A Purification of MBP-p60 fusion protein by affinity Chromatography. Lane M : Marker, Lane 1 : total lysate, Lane 2 : Supplement of total lysate, Lane 3 : Filtration of supplement, Lane 4 : Purified of total lysate MBP-p60/grayi.

4. 단백질 농축

Amicon Centricon system을 이용하여 정제된 MBP-p60 단백질을 농축하였다. 초기의 최대 sample의 부피는 2ml이며 대략 30분 동안 원심분리를 하여 50 μ l보다 적은 부피로 농축할 수 있다. 이용할 수 있는 모델은 Centricon-3, 10, 30, 50, 100이며 단백질 분리의 차단범위는 각각 3, 10, 30, 50, 100kDa이다. 적절한 최대원심력은 Centricon-3은 7,500xg이며 Centricon-10, 30, 50은 5,000xg이고, Centricon-100은 1,000xg를 갖는다(Bollag, 1996).

Centricon Microconcentrator를 조립하고 여기에 정제된 MBP-p60 단백질 2ml을 넣고 retentate cup을 덮어, 2,500rpm, 4 $^{\circ}$ C로 30분 동안 원심분리(HRT-60IV, 반경 17cm, Hanil)하였다. filtrate cup을 제거하고 조립된 sample reservoir와 retentate cup을 뒤집어서 filtrate cup에 연결하여 2,500rpm, 4 $^{\circ}$ C로 30분 동안 원심분리한다. 농축된 단백질을 회수하여 냉장보관 하였다.

5. 세포외 단백질 농축

*Listeria*의 성장시 분비되는 세포외 단백질(특히 p60 단백질)을 얻기 위하여 TCA (Trichloroacetic acid)로 농축하였다(Bollag, 1996, Bubert, 1993).

Listeria 균주를 BHI(brain heart infusion, Difco) 배지에 접종하여 18시간 진탕배양(37 $^{\circ}$ C, 150rpm)한 후에, 1.5ml의 microtube에 옮기고 12,000rpm으로 1분간 원심분리하여 상등액 1ml를 1.5ml 새 tube에 옮겼다. 여기에 100%TCA를 100 μ l 첨가하고 ice에서 1시간 30분 동안 정치시켰다. 15,000rpm 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고 차가운 acetone 1ml로 세척하고 15,000rpm 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 원심분리한 후 상등액을 제거하여 건조시켰다. 건조된 단백질은 증류수 15 μ l와 2N NaOH 1 μ l, 5 \times sample buffer 4 μ l를 넣고 녹여낸 다음, SDS-PAGE에 사용하였다.

제 3 절 *Listeria* Flagella 항원생산

1. 배양

L. monocytogenes 4b(ATCC 19115) 종균을 Tryptic soy agar(Difco, USA)에 0.2% glucose와 0.6% yeast extract를 첨가한 평판배지에 도말하여 20℃ 및 37℃의 조건에서 각 24시간 배양시켰다.

2. 편모분리

Tryptic soy agar(Difco, USA)에 0.2% glucose와 0.6% yeast extract가 포함된 평판배지에 *Listeria monocytogenes* 4b를 도말 후 24시간 20℃에서 배양하였다. colony가 보이면 이를 0.2% glucose와 0.6% yeast extract를 첨가한 Tryptic soy broth(Difco, USA) 2L에 접종한 후 20℃에서 24시간 배양하였다. 이들 세포의 세척은 Phosphate buffered saline(PBS, pH7.2)로 5000g, 4℃에서 15분간 3번 실시하였다. 세척된 cell은 1L broth당 PBS 5ml로 부유시킨 후 준비해 두었던 glass bead(2mm diameter) 30개를 첨가하여 30분간 실온에서 세계 흔들었으며, 이후 5000g로 4℃, 15분간 원심분리를 하였다. 이때 상층액은 보관하여 두었고, 침전물은 PBS로 세계 흔든 후 원심분리하여 상층액을 회수하여 보관해 두었던 액과 섞어 14,000g에서 4℃로 40분간 원심분리를 하였다. 마지막으로 flagella를 얻기 위해 상층액은 다시 200,000g로 4℃, 90분간 초원심하여 분리하였다. 이는 Transmission Electron Microscope와 12% separating gel과 4% stacking gel을 이용한 전기영동으로 확인하였다.

3. 항원의 확인

가. SDS-PAGE

초원심분리로 부터 얻은 flagella를 1.2mg/ml로 희석 후 100℃에서 3분간 끓인 후 전기영동하였다. 12% separating gel과 4% stacking gel을 이용하여 50V와 100V에서 각각 30분, 2시간 전기영동 하였으며 marker는 low range(sigma)로 단백질분자량을 계산하였다.

1) flagella의 SDS-PAGE

초원심분리로 나온 flagella를 전기영동한 결과 Figure 3-12 와 같이 32kDa의

flagellin을 나타내었다.



Figure 3-12. SDS-PAGE of flagella

나. flagella의 발현

20℃와 37℃에서 *L. monocytogenes* 4b를 배양했을 때 명확한 flagella발현 양상을 비교할 수 있었다. Figure 3-13의 (a)는 20℃에서 배양했을 경우로 긴 간균인 cell 주변에 일률적이진 않지만 몇 개의 긴 flagella를 볼 수 있었다, (b)의 37℃인 경우는 관찰되지 않았다. (c)는 flagella를 분리하기 위해 glass bead를 이용하여 같은 후의 cell의 모습이다. cell 표면에 잘리고 남은 짧은 flagella를 볼 수 있었다.

1) SEM(Scanning Electron Microscope)

20℃와 37℃에서 각각 24시간 배양시킨 *Listeria monocytogenes* 4b (ATCC 19115)를 준비하였다. 전고정은 2% glutaraldehyde로 4℃에 하룻밤 정치시킨 후 phosphate buffer (pH7.4)로 3회 세척하였다. 후고정은 1% OsO₄로 4℃에서 2시간 고정하였으며, 시료중의 수분을 제거하기 위한 탈수조작은 50%, 75%, 90%, 100% ethanol용액으로 단계적으로 실온에서 40분간 탈수시킨 다음 80%와 100% isoamyl acetate용액으로 실온에서 40분간 정치시켰다. 시료에 포함되어 있는 isoamyl acetate용액의 건조는 임계 점건조를 하였다. 금으로의 coating은 20mA, 130초간 실시하였으며, scanning electron microscope (HITACHI 2460N)으로 관찰하였다.

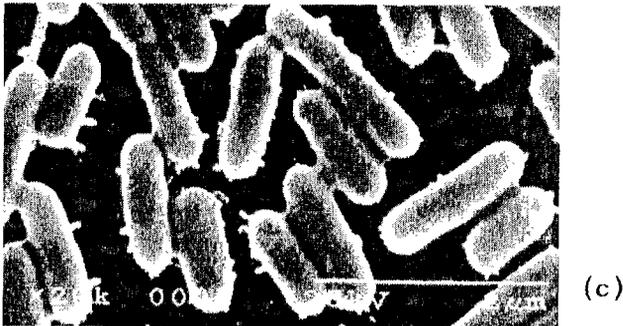
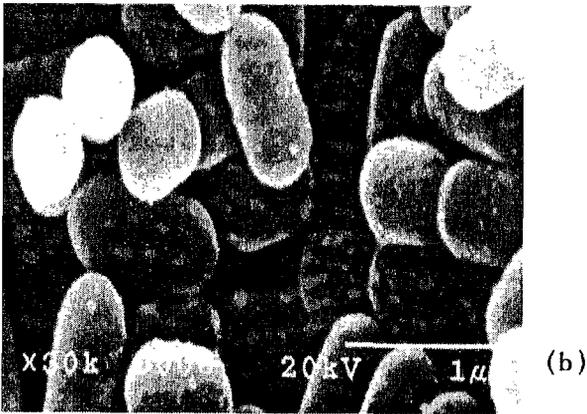
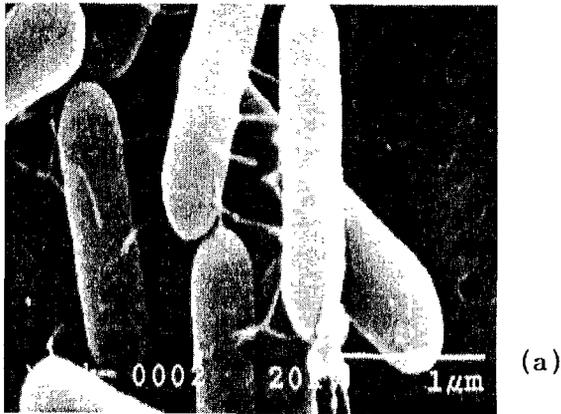


Figure 3-13. Scanning electron micrographs of cells of *I. monocytogenes* 4b at 20°C(a), 37°C(b), and deflaginated cells(c)

2)TEM(Transmission Electron Microscope)

절단된 Flagella의 잘린 정도를 보기 위해, negative staining을 실시하였다. glass bead로 자른 균체와 초원심으로 얻은 flagella를 4% paraformaldehyde에 하루밤, 냉장에서 고정시켰다. 이 액은 다시 2% phosphotungstic acid(SPI-CHEM, USA, pH7.2)와 동량으로 섞고 400mesh grid를 얹어 5분간 정치한후 실온에서 2시간 자연건조 시켰다. 관찰은 transmission electron microscope(JEOL 1200EX II, JAPAN)을 사용하였다.

가)초원심분리를 이용한 flagella의 정제

glass bead를 이용하여 잘라낸 flagella를 200,000g로 초원심하여 얻은 pellet을 투과전자현미경으로 관찰하였다 (Figure 3-14).



Figure 3-14. Transmission electron micrograph of a negatively-stained ultracentrifuged pellet of flagella of *L. monocytogenes* 4b.

제 4 장 *Listeria* 항체 생산 및 ELISA, Rapid Kit 제작

제 1 절 서설

국가 검사가 가장 확실한 방법인 선택배양에 의한 *Listeria*의 검출법을 채택한 것과는 별도로, 전문가 및 실험설비를 유지하기 힘든 민간기업에서는 기업내 자체 검사를 위하여 신속성과 간편성을 앞세운 *Listeria*검출방법의 수요를 크게 촉발시켰다. 이는 이러한 수요에 맞추어 실제 많은 신속검출법이 개발되고, 상업적으로 시판되었으며, 현재 개발이 계속 진행되고 있다. 이러한 신속검출법의 개발은 리스테리아 특유 선택 배지의 개발, 리스테리아 특이항원을 이용한 검사키트의 개발, 리스테리아 고유 핵산 염기서열을 이용하는 hybridization 또는 PCR검사법 등이 각각의 장단점을 개선 보완하면서 현재 발전되고 있다.

*Listeria*의 고유항원에 대한 면역학적 방법들(Kerr *et al.*, 1990, Mattingly *et al.*, 1988)은 검출키트화가 가장 간편하고, 일반 축산현장에서 간이검사용으로 가장 적당하다는 장점이 있다. 이들은 거의 모두 극소수로 시료 내에 존재하는 *Listeria*균주의 특성상 1차 증균배양 (보통 UVM, Modified Fraser Broth을 사용하여 단기 배양) 후, 키트를 사용하는 형식으로 되어 있으며, 보통 ELISA나 strip방식을 사용하고 있다. 현재 이 면역학적 방법에 의한 다수의 제품들이 시판되고 있으며, 가장 많이 사용되고 있는 키트들은 *Listeria* IE. detection kit (Transia사), *Listeria* Vis. IA kit (Tecra사), Clearview(Oxoid사), *Listeria* Tek (Organon T사), USDA L. mono Kit 등이다. 면역학적 방법에 의한 *Listeria*검출 키트들의 가장 큰 단점은 검출의 정확성이 부족한 것으로 시판되는 키트들에 대한 비교실험 결과(Beumer *et al.*, 1995)는 제품에 따라 32%-92%의 정확성을 가지며, 다수의 제품이 *Listeria*속을 검출할 뿐 *Listeria monocytogenes*에 이르는 종 판정이 불가하다는 문제가 아직도 남아 있다.

*Listeria*속의 7종(*Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. murrayi*) 중 *L. monocytogenes*만이 인간에 대한 병원균이며, *L. monocytogenes*의 13-17로 분류되는 혈청형(serotype)중 1/2a, 1/2b, 4b가 특히 강한 병원성을 보이고(Farber and Peterkin, 1991; Gellin and

Broome, 1989), 일반적 선택배양 방법(Hitchins, 1992; McClain *et al.*, 1989)이 다른 병원성 미생물의 배양과는 달리 매우 까다롭기 때문에 리스테리아 검출방법의 개발에 어려움을 갖고 있다. 자연환경에 존재하는 *Listeria spp.*는 일반적으로 비병원성 균인 *L. innocua*가 우점종(*Listeria spp.*중 약 40-90%)으로, 식육 등 식품검사에서 *Listeria spp.*의 발견은 종 확정실험 즉, *L. monocytogenes*의 검출확정(또는 비병원성 *Listeria spp.*의 확정)까지 계속해야만 하며, 또한 위험시되는 혈청형 1/2a, 1/2b, 4b에 속하는지를 분명히 검사해야 한다. 따라서 시판되고 있는 많은 *Listeria*에 대한 면역학적 방법에 의한 검출키트들은 이런 종 판정이 불가하거나, 많은 오류를 보이고 있기 때문에(Beumer *et al.*, 1995) 그 사용이 제한될 수밖에 없으며, 중립적 기관에 의해 수행된 정확성 측정에 따라 간이 검사용 또는 확정시험용으로 구분되어 사용되어야 할 것이다.

제 2 절 *Listeria monocytogenes* anti-p60 단일클론 항체 제작

1. *Listeria monocytogenes* anti-p60 단일클론 항체 제작

가. *Listeria monocytogenes* 재조합 p60 항원 단백질 면역 주사

단백질(MBP-p60/mono)용액과 같은 부피의 complete Freund's adjuvant (BRL, U.S.A)를 dispenser에 연결하여 emulsion으로 만들었는데, 단백질의 상황 즉 농도, 총량은 mouse당 2 ~ 3 μ g의 단백질이 주입되도록 Freund's adjuvant mixture 250 μ l를 생후 6 - 8주의 BALB/c 마우스 복강에 주사하여 면역을 시작하였다(1차).

complete Freund's adjuvant mixture를 복강에 주사한 후 2주 간격으로 면역시켰는데, 이때는 incomplete Freund's adjuvant mixture를 이용하여 면역을 시키는데 2주 간격으로 2회 복강에 주사하였다(2차, 3차). 면역이 잘되고 있는가를 확인하기 위하여 antigen을 주입한지 3 - 4일 후에 꼬리에서 채혈을 하였으며, 채혈 및 혈청 채취는 고정틀에 mouse를 고정시키고 mouse의 꼬리를 70% ethanol로 소독하고 꼬리에서 200 μ l의 pipette을 이용하여 채혈을 하였으며, 상온에서 2시간 방치 후, 4 $^{\circ}$ C 냉장보

관 overnight 정치시켰다. 이를 11,000rpm으로 5분 동안 원심분리하여 혈장과 혈청을 분리하고, 상층의 혈청을 취하여 antibody titer를 측정하였다. 이 결과를 토대로 하여 면역기간을 정하였는데, 이때 IgG가 필요로 하였기에 면역기간을 최소한 6주 이상 (IgM을 얻으려면 면역기간을 4주 내외)으로 하였다. 면역시킨 후 antibody titer의 최고점에 이르렀을 때(마지막 복강주사 후 일주일), booster 주사(세포융합을 하기 3-4일전)를 하였다. Booster 주사는 마우스 꼬리정맥에 하였으며, 항원 (MBP-p60/mono)은 phosphate-buffered saline (PBS)이나 생리식염수에 녹여 사용하였다.

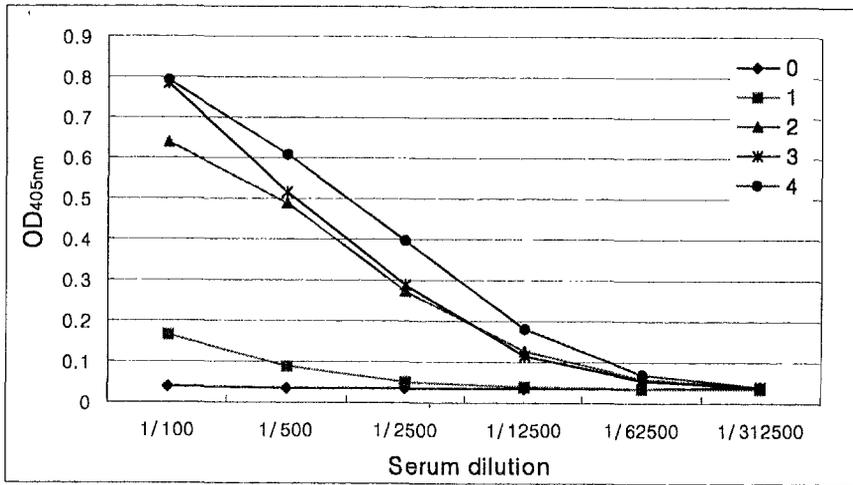


Table 4-1. Anti-MBP-p60/mono antibody titer of BALB/c mouse serum immunized with MBP-p60/mono. The capture antigen used for ELISA titration were MBP-p60/mono (25ng/well). 0 ; pre-immunization serum, 1 ; serum after first immunization, 2 ; serum after second immunization, 3 ; serum after third immunization, 4 ; serum after finish immunization.

나. ELISA test

면역시킨 항원에 대한 면역성 여부와 monoclonal antibody의 제작을 위한 fusion후 hybridoma의 선별을 위해 96-well(flat form) plate에 coating Buffer로 희석시킨 항원단백질 용액을 50 μ l/well씩 가하고 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다(또는 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 incubation). 이후 그 용액을 흡입 제거하고 well의 나머지 표면을 blocking하기 위

하여 blocking solution(0.1%BSA-PBS) 100 μ l를 각 well에 가하고 1시간동안 4 $^{\circ}$ C incubation하였다. 그 후 plate를 엮어서 blocking solution을 제거하고, PBS용액으로 3번 세척하였다. Hybridoma배양 상층액 또는 mouse 혈청을 PBST로 희석하여 50 μ l를 한 well에 가하고 room temperature에서 30분 동안 incubation한 후 제거하고, PBS용액으로 3회 세척하였다. HRP0 conjugated anti-mouse immunoglobulin (anti-mouse IgG)을 PBST로 희석한(1/10,000) 용액 50 μ l를 각 well에 가하였다. 이를 room temperature에서 30분간 incubation한 후, 그 용액을 제거하고, PBS용액으로 3회 세척하였다. 기질효소반응을 시키기 위해 0.04% OPD 기질용액을 well에 50 μ l를 넣고 상온에서 15 ~30분 정치하고, 반응을 정지시키기 위해 2.5N H₂SO₄ 50 μ l를 가하였으며, 이때 반응하여 발색된 정도를 흡광도 492nm에서 측정하였다. 또는 0.1% ABTS (2-2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) 기질용액을 well에 50 μ l를 넣어 상온에서 15 ~30분 정치하고, 반응 정지는 1% SDS를 사용하여 발색된 정도를 흡광도 405nm에서 측정하였다.

다. 동물세포 배양

세포의 융합 및 냉동 또는 그 외에 세포를 대량 배양할 목적으로 mid-log phase로 증식시켰다.

1) Cell의 보관

세포의 보관은 Sp2/0-Ag14 및 hybridoma cell 모두 배양한 cell을 MF80(Hanil co., Korea)에서 1,300rpm 25 $^{\circ}$ C로 10분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하고, 침전된 세포를 5 \times 10⁶ ~ 2 \times 10⁷cells/ml이 되도록 DMEM에 부유 시킨 후, 2 \times Banking medium (DMEM : DMSO : FBS = 34 : 16: 50, v/v/v)과 1:1로 혼합하여 liquid nitrogen (LN₂) tank의 상부(액면 위 5cm)에 위치시켰으며, 이를 24시간 후 액면 이하로 넣어 보관하였다.

2) Cell의 해빙

세포의 해빙 방법은 세포 생존율에 큰 영향을 미치는 중요한 요소이므로, 냉동 보관

된 cell의 재생은 빠른 해빙과 희석 그리고 배양액의 교환으로, DMSO의 세포 파괴 효과를 줄이는데 있는데, 먼저 15ml 멸균 tube에 10ml DMEM을 넣고, 37°C water bath에서 10분 정치한 후, 냉동 보관된 cell을 꺼내어 37°C water bath에서 1분간 녹였다. 두 개 tube를 함께 clean bench로 옮기고, 5ml pipette을 사용하여 cryovial의 세포액을 DMEM이 들어 있는 tube로 옮겼다. Invert mix로 세포액을 완전히 부유 시킨 후, 즉시 원심분리(MF80, Hanil) 10분, 1,300rpm으로 세포를 침전시켰다. 수거된 cell은 바로 2ml DMEM에 부유 시킨 후 cell counting 및 배양에 들어갔다.

3) Cell counting(Hemacytometer)

세포의 생체수 측정을 위해 hemacytometer(Thomacounter)를 이용하였으며, 0.4% Trypan blue를 세포 용액과 1: 1 (또는 1 : 4 ⇒ 1/5) 혼합하여, 약1분 경과 후 100배의 배율에서 보통 2개의 16square를 관찰하였다. 100cells/16square이하라면 정확한 판정을 위하여 4개의 16square를 모두 관찰하였다. 이때 cell counting은 염색되지 않은 cell만을 계산하며 희석비를 감안하여 다음과 같이 계산하였다.

예로 0.4% Trypan blue와 세포용액을 1:1(v/v)로 사용하여 16square당 세포수의 평균이 200 cells/16square라면 실제 세포 용액의 농도는 $200 \times 2 \times 1 \times 10^4$ (측정세포수 \times 희석비 $\times 1 \times 10^4$) = 4×10^6 cells/ml로 계산하였다.

4) 세포의 유지배양

Cell line을 장기간 보존하기 위하여서는 이를 냉동시켜 보관하지만 단 시간 내에 cell line을 유지하기 위해서는 cell line을 T-25 flask에서 배양하였으며 세포의 성장속도가 late-log phase에 이르면 세포를 잘 suspend 한 후, 세포수를 줄이기 위하여 대부분의 cell suspension을 흡입한 후에 신선한 DMEM+FBS를 가하고, CO₂ 배양기에 넣어 배양하였다.

라. B-Lymphocyte와 myeloma cell의 융합

세포융합을 하기 전에 면역시킨 BALB/c mouse를 70% ethanol로 체혈부위를 소독하고 1ml 주사기로 심장에서 얻을 수 있는 만큼 최대한 채혈하여 상온에서 2시간 방치 후,

4°C 냉장보관 overnight 정치시켰다. 이를 11,000rpm 5분 원심분리하여 혈장과 혈청을 분리하고, 상층의 혈청을 취하여 screening에 사용하였다.

세포융합에 사용할 면역시킨 BALB/c mouse spleen을 적출하기 위해 mouse를 고정틀에 고정하고 70% ethanol로 소독하고 가위와 forceps를 사용하여 spleen을 적출하였다. 적출한 spleen을 37°C에서 incubation 시켜두었던 washing media가 들어있는 직경 5.5cm petridish에 옮기고, clean bench내에서 spleen에 붙어있는 지방성분의 조직을 제거시켰다. 불에 달궈 멸균시킨 mesh(200또는 300목)를 얹은 50ml conical tube 위에 spleen을 얹고, washing media 10ml을 부어주면서 forceps을 이용하여 spleen을 부수어 cell이 tube에 떨어하도록 하였다. 얻어진 spleen cell을 pipette으로 6~7번을 부유하였다.

Spleen을 적출하기 전에 1개의 15ml conical tube에 FBS를 2.5ml를 부어놓고 resuspension된 spleen cell을 15ml conical tube에 FBS의 gradient가 깨지지 않도록 서서히 부어 층을 만들고 15분간 방치하여 무거운 결재조직 등을 가라앉혀 제거하였다. 이때 맨 위의 지방층은 제거하고 상등액을 회수하여 50ml conical tube로 옮긴 다음, 1,600rpm, room temperature에서 10분 원심분리(MF80, Hanil)하고 상등액을 제거하였다. 침전된 spleen cell에 15ml의 washing media를 넣어 천천히 부유하였고, 1,600rpm, room temperature에서 10분 원심세척한 후, 상등액을 제거하였다. 위의 과정을 3회 수행하였으며, spleen cell을 2회 세척할 때 키우던 myeloma cell을 50ml conical tube에 담아서 원심분리하였다. 원심분리한 myeloma culture 상등액은 냉동 보관하여 Hybridoma cloning시 conditioned medium으로 사용하였다. 원심한 spleen cell과 myeloma cell의 pellet 크기가 같은지 비교하였는데, 이때 myeloma : spleen = 1×10^7 : $5 \sim 6 \times 10^7$ 의 비율이 되도록 하였다. Spleen cell 3회 세척시 pellet 크기를 같게한 myeloma cell도 washing media로 1회 원심 세척하였다. Pellet 크기를 같게 한 spleen cell과 myeloma cell에 각 10ml씩 W.M.을 넣고 부유한 후 섞어 원심세척하였다. 이들 cell pellet을 Washing media 20ml로 원심세척을 2회 수행하였으며, 세척 중에 PEG액과 washing media를 37°C로 데웠다. 마지막 washing후, W.M.를 제거하고 cell pellet을 tapping하여 cell을 tube 바닥에 골고루 퍼주었다.

PEG 처리는 세포융합 과정에서 매우 중요한 과정으로 본 실험에서는 1분 동안 PEG를 전체적으로 골고루 cell 양에 따라 0.8~1ml dropping 하였으며, 30초 정치 후, 1분 동안 W.M. 1ml를 추가해주었고, 30초 정치하였다. 다시 W.M.를 2ml 1분 동안 가해주고 W.M. 8ml을 30초 동안 가해준 다음, 30초 정치하였다. 여기에 W.M. 10ml를 30초

동안 첨가하고 천천히 resuspend하였다. 이 과정은 5분 30초가 소요되었다.

원심하고 상층을 빨아낸 후에 제조해 둔 1×HAT media로 cell pellet을 부유하였으며, 이때 충분히, 조심스럽게 pipette up and down하여 뭉쳐 있는 cell들이 최대한 풀어지게 하여, 96-well flat bottom plate에 200 μ l씩 분주하였다. 다음날에(d1) well의 꼭대기까지 1×HAT media를 주입(약 50 μ l/well) 하였다. 격일로 1×HAT을 교환하여 주었으며(d3: 50-70, d5: 70-100, d7: 100-150, d9: 100-150), 10일이 지나면 HT media로 바꿔주었다(d11, d13, d15: 100-150). 며칠 후 Colony를 많이 형성하며 자라는 hybridoma가 있는 well의 상층액으로 ELISA를 하여 screening하였다.

마. anti-MBP/p60 IgG를 생산하는 hybridoma cell의 선별

세포융합하기 전에 채혈한 면역시킨 BALB/c mouse의 혈청을 이용하여 hybridoma cell의 screening에 용이하도록 checkerboard titration을 수행하였다.

MBP-p60/mono 단백질(100 μ g/ml)을 Carbonate-bicarbonate pH9.6 혼합하여 96 well flat bottom plate에 250ng/well, 50ng/well, 10ng/well, 2ng/well씩을 분주하여 4℃에서 overnight 시키고 blocking solution(0.1%BSA-PBS) 100 μ l/well을 넣고 4℃에서 1시간 동안 incubation하고 면역시킨 BALB/c mouse의 혈청을 PBST(0.05% Teen20-PBS)에 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400으로 희석하여 50 μ l/well씩 넣고 상온에서 30분 incubation하였다. 그리고 HRP conjugated anti-mouse-IgG를 1/10000으로 사용하여 상온에서 30분 동안 incubation하고 OPD 기질용액 50 μ l/well을 사용하여 15분 동안 반응시킨 후, 2.5N H₂SO₄를 사용하여 반응을 정지시키고 490nm에서 측정된 OD 값을 이용하여 적정 coating protein 양을 분석하였다(Table 4-2).

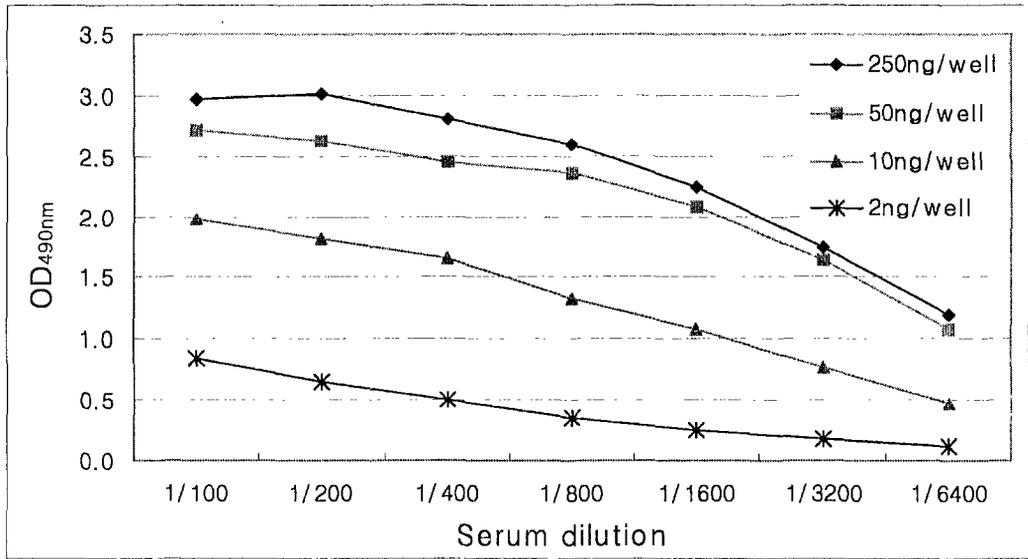


Table 4-2. Comparison through checkerboard titration with various concentrations of MBP-p60/mono and BALB/c mouse serum immunized MBP-p60/mono. The reagents used for ELISA titration were as follows : capture antigen diluted MBP-p60/mono with carbonate-bicarbonate pH9.6 (250ng/well, 50ng/well, 10ng/well, 2ng/well), serum diluted with PBST (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400), anti-mouse IgG-HRPO diluted 1:10000 with PBST, substrate : 0.04% OPD + 0.012% hydrogen peroxide and stopping solution ; 2.5N H₂SO₄.

위의 실험을 통해 MBP-p60/mono를 10ng/well에 coating 하여 BALB/c mouse의 혈청을 1/1600로 희석하여 ELISA 수행 시에 OD_{490nm} 값을 1 이상을 나타내었다. 단백질을 최소로 사용하여 hybridoma를 선별하기 위하여 coating 단백질(MBP-p60/mono)은 10ng/well을 사용하였다.

세포융합 한 세포를 96-well flat bottom plate에 200 μ l씩 분주하였다. 다음날에 (d1) well의 꼭대기까지 1 \times HAT media를 주입(약 50 μ l/well)하였으며, 격일 간격으로 1 \times HAT을 교환하여 주었으며, 10일이 지나서 HT media로 바꿔주었다. fusion 후 10일 정도 지나면 Colony가 많이 형성되어 well을 덮게 되었으며, 매일 HT media를 교환해 주어야 했다. 그리고 모든 well에서 세포융합율은 상당히 높아 hybridoma가 있었으며

well의 상등액과 이를 PBST(0.05% Tween20-PBS)로 희석한 것을 이용하여 ELISA하여 screening하였다.

선별은 MBP-p60/mono 단백질(100 μ g/ml)을 Carbonate-bicarbonate pH9.6 혼합하여 96 well flat bottom plate에 10ng/well을 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 시키고 blocking solution(0.1%BSA-PBS) 100 μ l/well을 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 incubation하고 세포 융합시킨 hybridoma cell이 존재하는 well의 상등액 또는 상등액을 PBST(0.05% Tween20-PBS)로 1/2로 희석하여 50 μ l/well씩 넣고 상온에서 30분 incubation하였다. 그리고 HRP0 conjugated anti-mouse-IgG를 1/10000으로 사용하여 상온에서 30분 동안 incubation하고 OPD 기질용액 50 μ l/well을 사용하여 15분 동안 반응시킨 후, 2.5N H₂SO₄를 사용하여 반응을 정지시키고 490nm에서 측정하고 상등액 또는 상등액을 희석한 것에 반응하는 well을 24-well plate에 옮겨 배양하였다.

24-well plate에 옮겨 배양한 hybridoma의 상등액을 사용하여 재선별 하였다. MBP-p60/mono을 Carbonate-bicarbonate pH9.6 혼합하여 96-well flat bottom plate에 10ng/well을 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight시키고 blocking solution(0.1%BSA-PBS) 100 μ l/well을 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 incubation하고 hybridoma cell의 상등액과 상등액을 PBST(0.05% Tween20-PBS)로 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32로 희석하여 50 μ l/well씩 넣고 상온에서 30분 incubation하였다. 그리고 HRP0 conjugated anti-mouse-IgG를 1/10000으로 사용하여 상온에서 30분 동안 incubation하고 OPD 기질용액 50 μ l/well을 사용하여 15분 동안 반응시킨 후, 2.5N H₂SO₄를 사용하여 반응을 정지시키고 490nm에서 측정하여 희석비를 일률적으로 지니면서 높은 항체 역가를 갖는 hybridoma well(1D5, 1D12, 1H3, 2G11)을 얻을 수 있었다(Table 4-3).

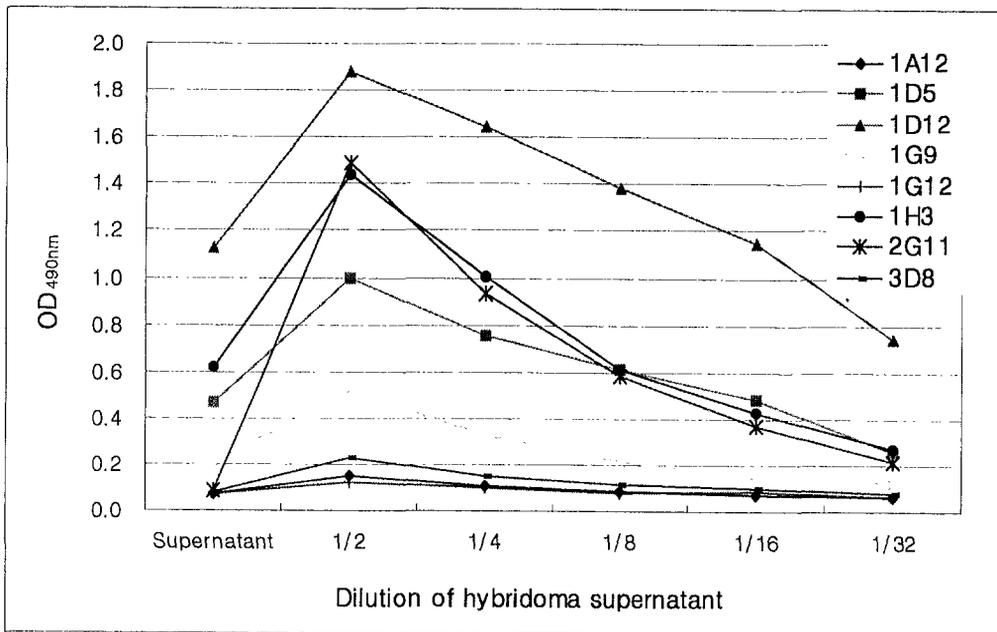


Table 4-3. Comparison of hybridomas with ELISA titration at various concentrations of hybridoma serum. The reagents used for ELISA titration were as follows : capture antigen ; MBP-p60/mono of 10ng/well, serum diluted with PBST (supernatant, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32), anti-mous IgG-HRPO diluted 1:10000 with PBST, substrate ; 0.04% OPD + 0.012% hydrogen peroxide and stopping solution ; 2.5N H₂SO₄.

선별된 anti-MBP-P60/mono를 생성하는 hybridoma을 T25 flask에 옮겨 증식배양 시키고 이를 다시 T75 flask로 옮겨 증식배양 하여 LN₂에 냉동보관 하였다. 냉동보관된 hybridoma cell의 상등액은 회수하여 ELISA 및 Western blotting에 사용하였다.

1) 선별된 hybridoma cell의 상등액을 이용한 ELISA

MBP-p60/mono 단백질이 10ng/well과 2ng/well씩 coating된 96 well flat bottom plate에, 선별된 1D5와 1D12, 1H3 상등액을 PBST(0.05% Tween20-PBS)로 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560로 희석하여 항원 농도에 따른 항체의 역가를 측정하였다. 그 결과 checkerboard titration을 했던 면역시킨 BALB/c mouse의

serum에 대한 희석비를 비교하여 보았을 때, 약 10 ~ 20배의 약한 항원-항체반응을 보였으나, 항원 단백질이 10ng/well인 농도에서 선별된 hybridoma의 상등액 1/80 ~ 1/160까지 희석하였을 때도 OD_{490nm}에서도 1.0대에 값을 유지하였다(Table 4-4).

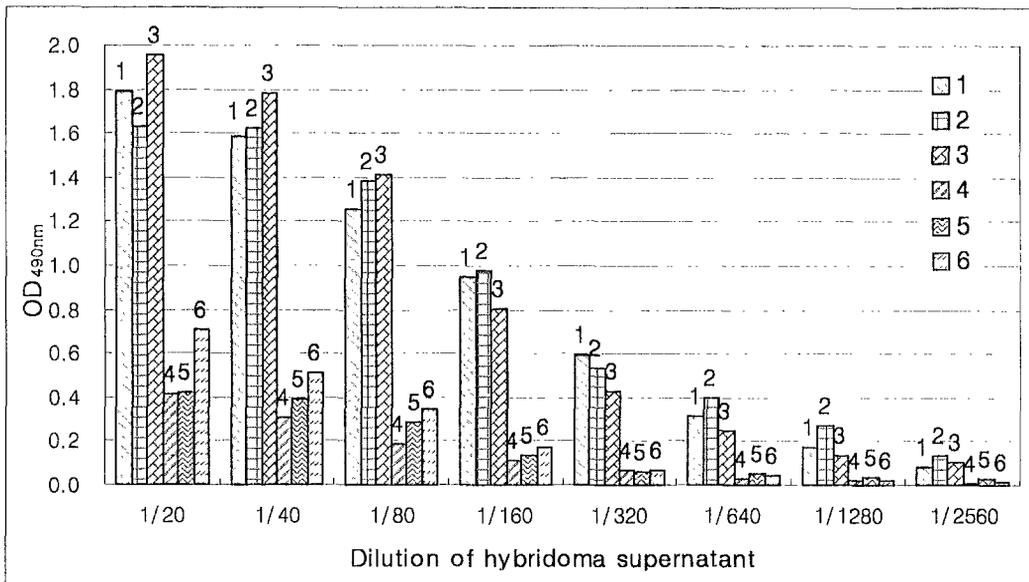


Table 4-4. ELISA of MBP-p60/mono antigen at various concentrations of hybridoma serum. The reagents used for ELISA titration were as follows : capture antigen ; MBP-p60/mono of 10ng/well and 2ng/well, hybridoma serum diluted with PBST (1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560), anti-mous IgG-HRPO diluted 1:10000 with PBST, substrate ; 0.04% OPD + 0.012% hydrogen peroxide and stopping solution ; 2.5N H₂SO₄. 1 ; antigen 10ng/well + hybridoma serum(1D5), 2 ; antigen 10ng/well + hybridoma serum(1D12), 3 ; antigen 10ng/well + hybridoma serum(1H3), 4 ; antigen 2ng/well + hybridoma serum(1D5), 5 ; antigen 2ng/well + hybridoma serum(1D12), 6 ; antigen 2ng/well + hybridoma serum(1H3).

2) Hybridoma의 상등액을 이용한 재조합 p60단백질의 Western detection

pMAL-iap/momo, pMAL-iap/iva, pMAL-iap/inn, pMAL-iap/wel I, pMAL-iap/wel II clone과 대조군으로 pMAL-c2를 LB 배지(50 μ g/ml ampicillin)에서 overnight 배양하여 20ml LB배지(100 μ g/ml ampicillin)에 overnight 배양균액 1ml를 접종하여 OD₆₀₀=0.6(2시간 30분)에 이르면 0.3mM IPTG로 4시간 배양하여 단백질의 발현시켰다. 재조합 단백질을 얻기 위해 배양액 1.5ml를 취하여 15,000rpm에서 cell을 harvest하여 cell pellet을 PBS 150 μ l로 부유하여 초음파 처리하여 4 μ l를 10% SDS-PAGE에 이용하였으며 (Figure 4-1, A), 이는 배양액 40 μ l를 전기영동에 사용한 것과 동일하다. 이렇게 전기영동한 gel을 PVDF membrane에 blotting하여 blocking solution(3% Skim milk-TBS)에 넣고 room temperature에서 흔들며 30분을 incubation한 후에 TBST로 room temperature에서 흔들면서 5분씩 3회 세척하였다. MBP-p60/mono에 대한 항체를 생성하는 hybridoma 1D5 (Figure 4-1, B)와 1D12 (Figure 4-1, C)의 상청액을 3% Skim milk-TBST로 1 : 100으로 희석하여 각각 넣고 room temperature에서 30분 동안 흔들며 incubation한 후, TBST로 room temperature에서 흔들면서 5분씩 3회 세척하였다. Secondary antibody reaction은 anti-mouse-IgG를 3% Skim milk-TBST에 1 : 10,000으로 희석하여 room temperature에서 30분 동안 흔들며 incubation하였으며, TBST로 room temperature에서 흔들면서 5분씩 3회 세척하였다. DAB solution을 사용하여 발색을 확인하였으며, 수돗물을 이용하여 세척함으로써 반응 종결시키고, 건조 후 보관하였다.

위의 결과에서 1D5와 1D12는 pMAL-c2를 발현시킨 MBP- β -gal- α 에는 전혀 반응하지 않았으며, *L. ivanovii*의 p60의 재조합 DNA인 MBP-p60/iva에는 1D5와는 상반되게 1D12의 경우에는 반응하지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 두 hybridoma가 발현시키는 항체가 MBP-p60/mono의 서로 다른 epitope를 인지하여 만들어진 B-lymphocyte로부터 유래하였을 것으로 사료되며, 특히 1D12의 경우에는 *L. monocytogenes*와 *L. ivanovii*의 p60과는 다른 부분을 epitope으로 하여 항체를 생성하는 B-lymphocyte의 유래하였거나 재조합 단백질로부터 얻어진 항체와 단백질이기에 Western detection에서의 차이를 나타내는 것으로 생각된다.

그러나 1D5와 1D12의 경우 *L. monocytogenes*의 p60 유래의 재조합 단백질로부터 항체를 생성하는 hybridoma임에도 불구하고 *L. innocua*, *L. welshimeri* I, *L. welshimeri* II 유래의 p60 재조합 단백질은 Western detection되었다. 또한 특이사항은 1D12의 경우 MBP-p60/inn는 1D5에 비해 상당히 약하게 반응하였다.

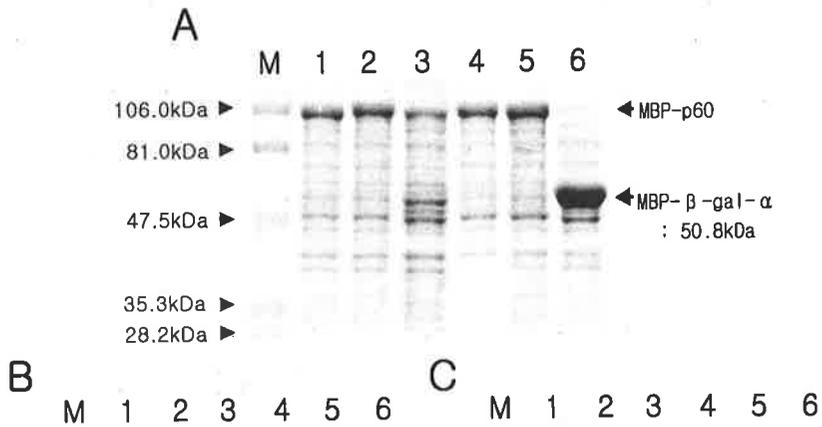


Figure 4-1. SDS-PAGE and Western blotting analysis of recombinant p60 expressed in *E. coli* with hybridoma serum of anti-MBP-p60/mono. Total cell lysates of *E. coli* incubated with 0.3mM IPTG for 4 hours were analyzed in 10% SDS-PAGE (panel A). Otherwise the gel was blotted onto PVDF membrane and detected with hybridoma serum of anti-MBP-p60/mono (panel B : 1D5 supernatant, panel C : 1D12 supernatant). Equal amounts of cell lysates corresponding to 40 μ l of the original culture were loaded into each of lane. M ; Molecular weight marker, 1 ; total lysate pMAL-iap/mono cells induced IPTG, 2 ; total lysate pMAL-iap/iva cells induced IPTG, 3 ; total lysate pMAL-iap/inn cells induced IPTG, 4 ; total lysate pMAL-iap/wel I cells induced IPTG, 5 ; total lysate pMAL-iap/wel II cells induced IPTG. 6 ; total lysate pMAL-c2 cells induced IPTG,

3) 선별된 hybridoma의 상등액을 이용한 재조합 p60 단백질의 ELISA

Western blotting에 이용된 단백질은 변성시킨 상태에서 사용하기 때문에 항원-항체 반응에서 불변성 된 단백질을 사용한 것과 상당한 차이를 보일 수 있기에 이들의 차이를 알아보기 위해 *Listeria* 균주의 p60 재조합 단백질을 항원으로 하여 hybridoma 1D5와 1D12의 상등액을 이용하여 ELISA를 수행하였다(Table 4-5).

Listeria p60의 재조합 단백질(MBP-p60/mono, MBP-p60/iva, MBP-p60/inn, MBP-p60/wel I, MBP-p60/wel II) 5ng/well로 coating하여 hybridoma 1D5의 상등액을 1/50과 1/100 희석하여 ELISA하였을 때, *Listeria* 각 균주 사이에 cross-reaction이 상당히 많이 일어나는 것이 관찰 되었으며, 특히 MBP-p60/inn만 다른 재조합 p60 단백질에 비하여 상대적으로 낮은 detection 값을 나타내었지만 96 well plate 상에서 확연히 반응정도를 눈으로 확인할 수 있었다.

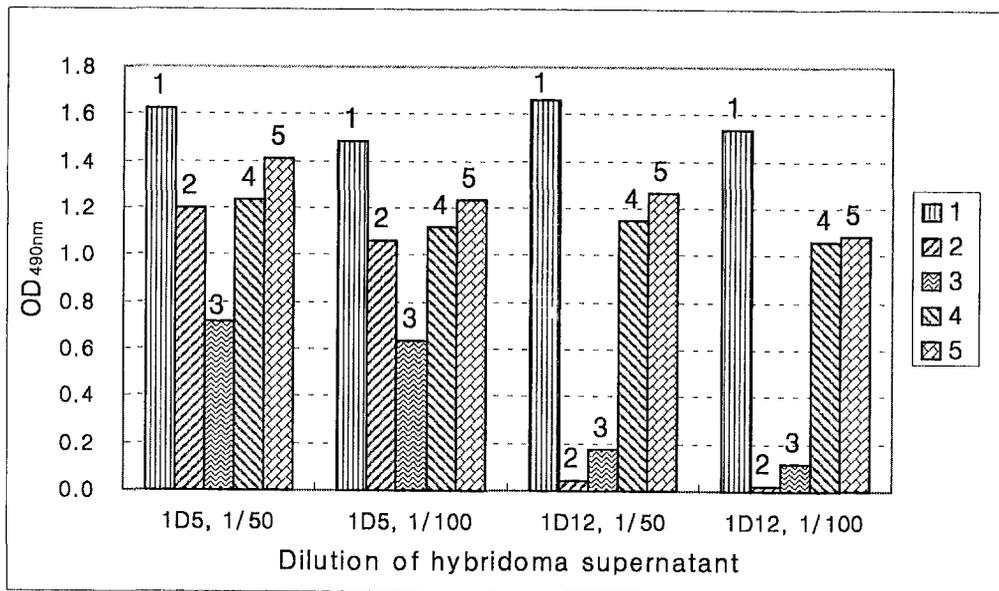


Table 4-5. ELISA of recombinant p60 antigen using hybridoma serum of anti-MBP-p60/mono. The reagents used for ELISA titration were as follows : capture antigen ; recombinant p60 antigen of 5ng/well, hybridoma serum(1D5, 1D12) diluted with PBST (1/50, 1/100), anti-mouse IgG-HRPO diluted 1:10000 with PBST, substrate ; 0.04% OPD + 0.012% hydrogen peroxide and stopping solution ;

2.5N H₂SO₄. 1 : MBP-p60/mono, 2 : MBP-p60/iva, 3 : MBP-p60/inn, 4 : MBP-p60/wel I, 5 : MBP-p60/wel II.

그러나 1D12의 상등액을 1/50과 1/100 희석하여 ELISA하였을 때에는 1D5와는 다른 양상으로 나타내었다. MBP-p60/iva에는 거의 반응 값을 나타내지 않았으며, MBP-p60/inn는 약한 반응 값을 나타내었다. MBP-p60/iva와 MBP-p60/inn well상에서도 반응정도를 확연하게 판단할 수 없었다. 이는 위의 Western detection에서 얻은 결과에서 1D12를 사용하였을 경우에 MBP-p60/iva는 반응하지 않았으며, MBP-p60/inn에는 다른 재조합 p60 단백질에 비하여 반응정도가 약한 것과 일치하는 결과를 얻었다.

재조합 p60 단백질에 대하여 ELISA 결과와 Western blotting 결과가 일치성을 보였으며 이는 얻어진 hybridoma 1D5와 1D12가 MBP-p60/mono의 재조합 단백질의 서로 다른 epitope를 인지하여 항체를 생성하는 B lymphocyte에서 유래한 것임을 나타내며, *Listeria*의 original p60 단백질에 대한 항원-항체 반응 시에도 위의 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상되었다.

바. 제한 희석법을 통한 anti-MBP-p60/mono 단일클론항체의 선별

ELISA에 의하여 항원에 양성 반응을 나타내는 hybridoma cell 1D5와 1D12를 해빙하여 증식배양 시키고 well당 200 μ l(0.5cell/well)씩 96-well plate(flat form)에 분주하여 5% CO₂ incubator에서 배양하는 제한희석법을 사용하여 cloning을 하였다. 배양하는 과정에서 well을 관찰하여 단일 cell로부터 증식하는지를 관찰하였고, flat form 96 well plate의 바닥의 가장자리 부위에서 대부분 단일 colony로 시작하여 cell이 증가되어 나가는 것이 관찰되며, 대략 7일 후면 육안으로도 colony의 관찰이 가능하였다. 8 - 9일 후에 HT medium을 가하고 11 - 12일이 지난 후 배양액이 적색에서 황색으로 변색되었을 때, 상청액을 취하여 ELISA로 antibody를 만드는 hybridoma가 존재하는 well을 screening하였다. screening 하였을 때 positive well에서의 ELISA titer는 제한 희석을 가하기 전의 titer값의 차이는 없는 것으로 확인되었다.

2. 단일클론항체의 *Listeria monocytogenes* 특이적 역가 test

가. 선별된 hybridoma를 이용한 *L. monocytogenes*의 세포외 단백질 p60의 ELISA

*Listeria monocytogenes*의 37°C, 180rpm, overnight 배양액을 1.5ml의 tube에 넣고 15,000rpm, room temperature, 1분 동안 원심분리하여 상등액을 Carbonate-bicarbonate pH9.6와 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160으로 혼합하여 96 well flat bottom plate에 50 μ l/well씩 분주하여 4°C에서 overnight시키고 coating액을 제거하고 blocking solution(0.1%BSA-PBS) 100 μ l/well을 넣고 4°C에서 1시간 동안 incubation하고 선별된 hybridoma 1D5(Table 4-5)와 1D12(Table 4-6)의 상등액을 PBST(0.05% Tween20-PBS)에 각각 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640으로 희석하여 50 μ l/well씩 넣고 상온에서 30분 incubation하였다. 그리고 HRP0 conjugated anti-mouse-IgG를 1/10000으로 사용하여 상온에서 30분 동안 incubation하고 OPD 기질용액 50 μ l/well을 사용하여 20분 동안 반응시킨 후, 2.5N H₂SO₄를 사용하여 반응을 정지시키고 490nm에서 측정하였다(Table 4-6, Table 4-7).

Table 4-6는 1D5의 상등액을 사용하여 ELISA 검사하였을 때 *L. monocytogenes*의 overnight 배양액을 maximum 1/20까지 희석했을 때 1D5의 상등액은 1/20까지 희석하여도 OD_{490nm}에서 1.0이상을 나타내었으며, minimum antigen 희석비가 1/5일 때 항체의 희석비는 1/160에서도 OD_{490nm}에서 1.0이상을 나타내었다.

Table 4-7은 1D12의 상등액을 사용하여 ELISA 검사하였을 때 *L. monocytogenes*의 overnight 배양액을 maximum 1/40까지 희석했을 때 1D12의 상등액은 1/40까지 희석하여도 OD_{490nm}에서 1.0에 가까운 값을 나타내었으며, minimum antigen 희석비가 1/5일 때 항체의 희석비는 1/320에서도 OD_{490nm}에서 1.0이상을 나타내었다.

위의 1D5와 1D12 hybridoma의 상등액을 이용한 *Listeria monocytogenes*의 검출에서 배양균의 상등액의 원액을 사용하지 않았던 것은 예비실험에서 항원을 coating buffer와 희석(원액, 4/5, 3/5, 2/5, 1/5, 1/10)시켜 반응도를 실험해 본 결과 희석비가 높아질수록 반응값이 높아졌는데 1/5을 정점으로 하여 항원-항체 반응값이 분포하였다. 이는 항원이 coating buffer에 의해 희석되었음에도 coating buffer의 작용으로 96 well plate에 항원이 붙을 수 있는 능력이 상대적으로 높기 때문에 나타난 결과로 판단되었다. Blank 값으로는 균 배양에 사용하였던 BHI 배지를 같은 방법으로 희석하여 사용하였는데, 이 경우 항체의 희석도에 관계없이 OD값의 변화를 보이지 않

있다.

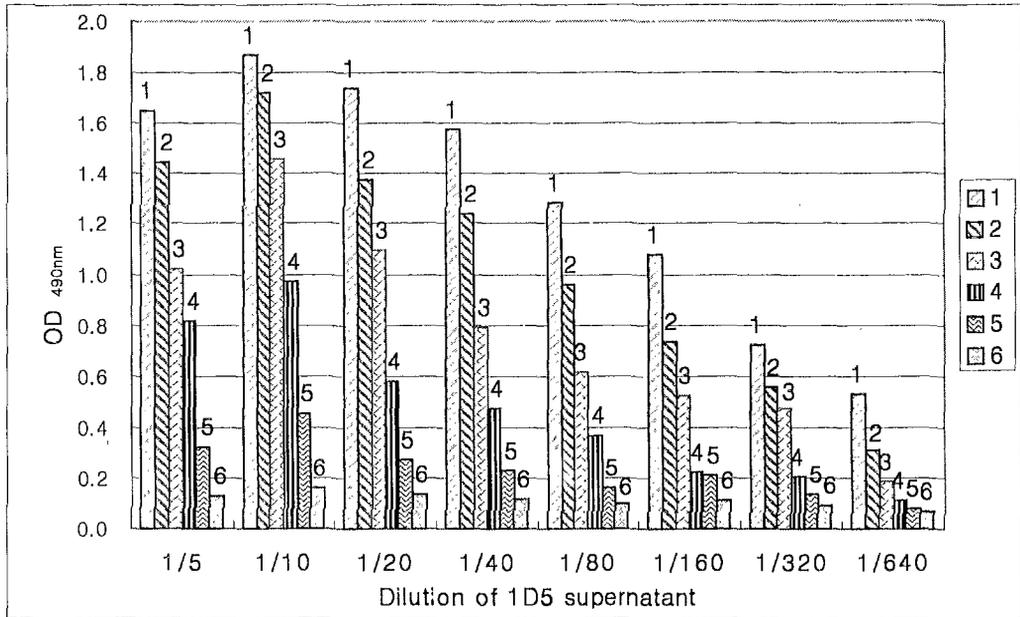


Table 4-6. Comparison through checkerboard titration with various concentrations of supernatant cultured *L. monocytogenes* and hybridoma serum(1D5). The reagents used for ELISA titration were as follows : capture antigen ; supernatants of *L. monocytogenes* culture diluted 1:20 with carbonate-bicarbonate pH9.6, hybridoma serum(1D5) diluted with PBST (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640), anti-mous IgG-HRPO diluted 1:10000 with PBST, substrate ; 0.04% OPD + 0.012% hydrogen peroxide and stopping solution ; 2.5N H₂SO₄. 1 ; antigen diluted 1/5, 2 ; antigen diluted 1/10, 3 ; antigen diluted 1/20, 4 ; antigen diluted 1/40 5 ; antigen diluted 1/80, 6 ; antigen diluted 1/160.

1D5와 1D12의 유효 적정농도는 두 항체가 갖는 항원반응의 공통으로 들어있는 항원 희석 1/5 ~ 1/20에서 결정되었으며, 항체의 희석농도비는 1/5 ~ 1/160에서 결정되었다.

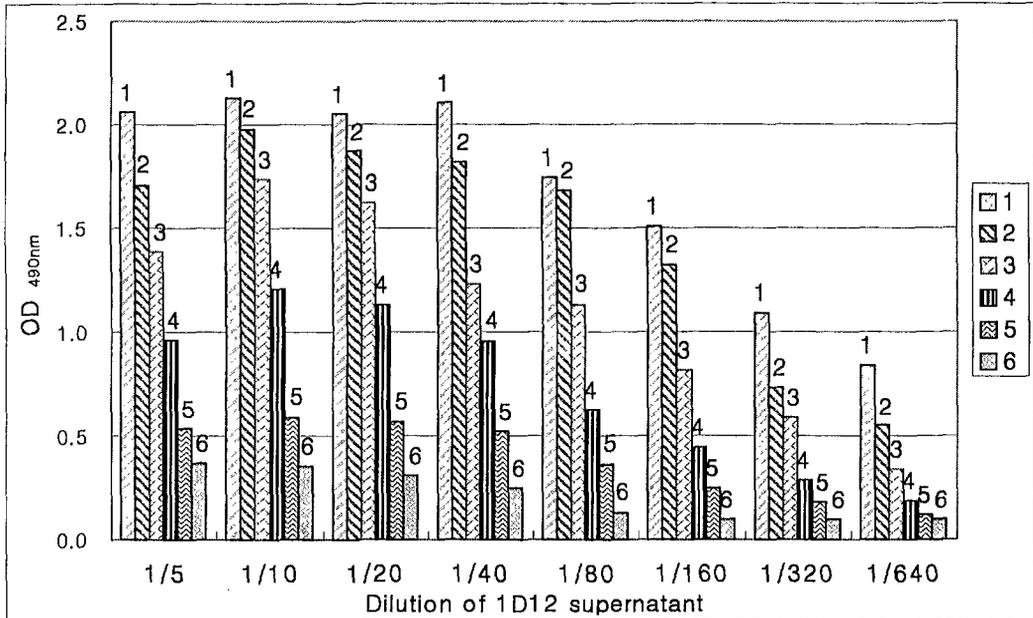


Table 4-7. Comparison through checkerboard titration with various concentrations of supernatant cultured *L. monocytogenes* and hybridoma serum(1D12). The reagents used for ELISA titration were as follows : capture antigen ; supernatants of *L. monocytogenes* culture diluted 1:20 with carbonate-bicarbonate pH9.6, hybridoma serum(1D12) diluted with PBST (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640), anti-mous IgG-HRPO diluted 1:10000 with PBST, substrate ; 0.04% OPD + 0.012% hydrogen peroxide and stopping solution ; 2.5N H₂SO₄. 1 ; antigen diluted 1/5, 2 ; antigen diluted 1/10, 3 ; antigen diluted 1/20, 4 ; antigen diluted 1/40 5 ; antigen diluted 1/80, 6 ; antigen diluted 1/160.

나. 선별된 hybridoma를 이용한 *Listeria spp.*에 대한 p60단백질의 ELISA

위의 data를 토대로 *Listeria spp.* (*L. monocytogenes* R1, *L. ivanovii*, *L. innocua* sv6b, *L. welshimeri* I, *L. welshimeri* II, *L. seeligeri*, *L. grayi*)와 대조균

Paenibacillus larvae ATCC9545를 BHI에서 키운 상등액을 선별에 알맞은 유효 항원 희석농도(coating buffer와 1/20로 희석한 것)로 coating 하였으며 4℃에서 4시간 정치한 후, 37℃ 1시간 30분 정치하였으며, coating액을 제거하고 blocking solution (0.1%BSA-PBS) 100 μ l/well을 넣고 4℃에서 1시간 동안 incubation하고 선별된 hybridoma 1D5(Table 4-8)와 1D12(Table 4-9)의 상등액을 PBST(0.05% Tween20-PBS)에 각각 1/5, 1/10, 1/50, 1/150로 희석하여 50 μ l/well씩 넣고 상온에서 30분 incubation하였다. 그리고 HRP0 conjugated anti-mouse-IgG를 1/10000으로 사용하여 상온에서 30분 동안 incubation하고 OPD 기질용액 50 μ l/well을 사용하여 20분 동안 반응시킨 후, 2.5N H₂SO₄를 사용하여 반응을 정지시키고 490nm에서 측정하였다(Table 4-8, Table 4-9).

Table 4-8은 *L. monocytogenes* R1, *L. ivanovii*, *L. innocua* sv6b, *L. welshimeri* I, *L. welshimeri* II, *L. seeligeri*, *L. grayi*와 대조균 *Paenibacillus larvae* ATCC9545를 BHI에서 키운 배양 상등액을 1/20희석하여 coating한 well에 대한 선별된 hybridoma 1D5 항체의 희석비를 1/5에서 1/10, 1/50, 1/150으로 높임으로서 *Listeria* 종간의 반응차이로 *L. monocytogenes*만을 선별적으로 검출함에 있어서, *L. grayi*, *Paenibacillus larvae* ATCC9545에는 반응을 보이지 않았지만 그 밖의 *Listeria* 속에 대하여서는 cross-reaction이 약하게 일어났으며 희석도가 높아지면서 cross-reaction 정도가 현저하게 약해짐을 관찰할 수 있었지만, *L. innocua* sv6b의 경우에는 희석비에 부관하게 *L. monocytogenes*와 비슷한 값에서 검출되어 *L. monocytogenes*만을 구별하기에는 어려운 점을 나타내었다.

Table 4-9은 *L. monocytogenes* R1, *L. ivanovii*, *L. innocua* sv6b, *L. welshimeri* I, *L. welshimeri* II, *L. seeligeri*, *L. grayi*와 대조균 *Paenibacillus larvae* ATCC9545를 BHI에서 키운 배양 상등액을 1/20희석하여 coating한 well에 대한 확립된 세포주 1D12가 분비하는 항체의 희석비를 1/5에서 1/10, 1/50, 1/150으로 높임으로서 *Listeria* 종간의 반응차이로 *L. monocytogenes*만을 선별적으로 검출함에 있어서, *L. grayi*, *Paenibacillus larvae* ATCC9545에는 반응을 보이지 않았지만 그 밖의 *Listeria* 속에 대하여서는 cross-reaction이 약하게 일어났으며 희석도가 높아지면서 cross-reaction 정도가 현저하게 약해짐을 관찰할 수 있었으며, 특히 1D5를 사용하였을 때와는 달리 *L. innocua* sv6b도 다른 *Listeria* 종과 같이 희석비를 높임으로서 cross-reaction율이 현저히 낮아졌으며, 1D12의 항체 희석비가 1/50과 1/150 일때는 시각적으로도 확연히 96 well plate 상에서 다른 *Listeria* 종들과 *L. monocytogenes*

를 쉽게 구별할 수 있었다. 선별된 세포주 1D12는 재조합 p60단백질에 의해 생성된 항체를 만드는 세포주에서 출발하였지만 *L. monocytogenes*에 대한 특이적 반응을 나타내는 항체로 판단되지만, cross-reaction이 있는 것으로 보아 *Listeria* 속의 공통 epitope에 반응하는 항체를 생산하는 세포주인 것으로 생각된다. 그렇지만 이 세포주는 *L. monocytogenes*만을 검출하는 ELISA를 수행함에 좋은 항체를 생산하는 세포주이다.

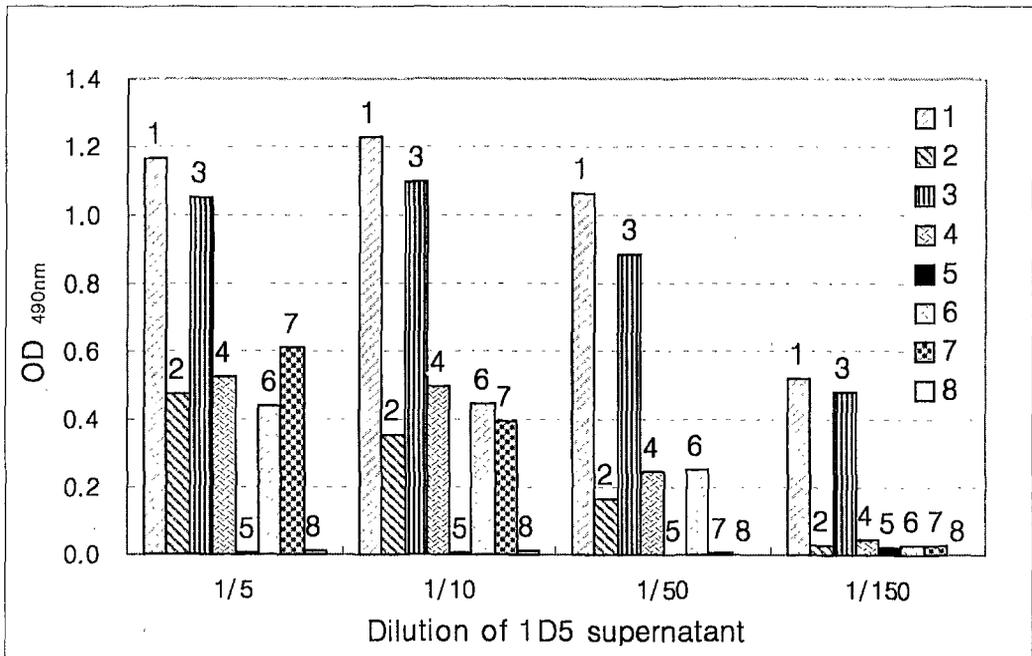


Table 4-8. ELISA of p60 in cultured *Listeria spp.* supernatant with hybridoma serum(1D5). The reagents used for ELISA titration were as follows : capture antigen : supernatants of *Listeria spp.* and *Paenibacillus larvae* diluted 1:20 with carbonate-bicarbonate pH9.6, hybridoma serum(1D5) diluted with PBST (1/5, 1/10, 1/50, 1/150), anti-mouse IgG-HRPO diluted 1:10000 with PBST, substrate : 0.04% OPD + 0.012% hydrogen peroxide and stopping solution : 2.5N H₂SO₄. 1 ; *L. monocytogenes* R1, 2 ; *L. ivanovii*, 3 ; *L. innocua* sv6b, 4 ; *L. welshimeri* I, 5 ; *L. grayi*, 6 ; *L. welshimeri* II, 7 ; *L. seeligeri*, 8 ; *Paenibacillus larvae* ATCC9545.

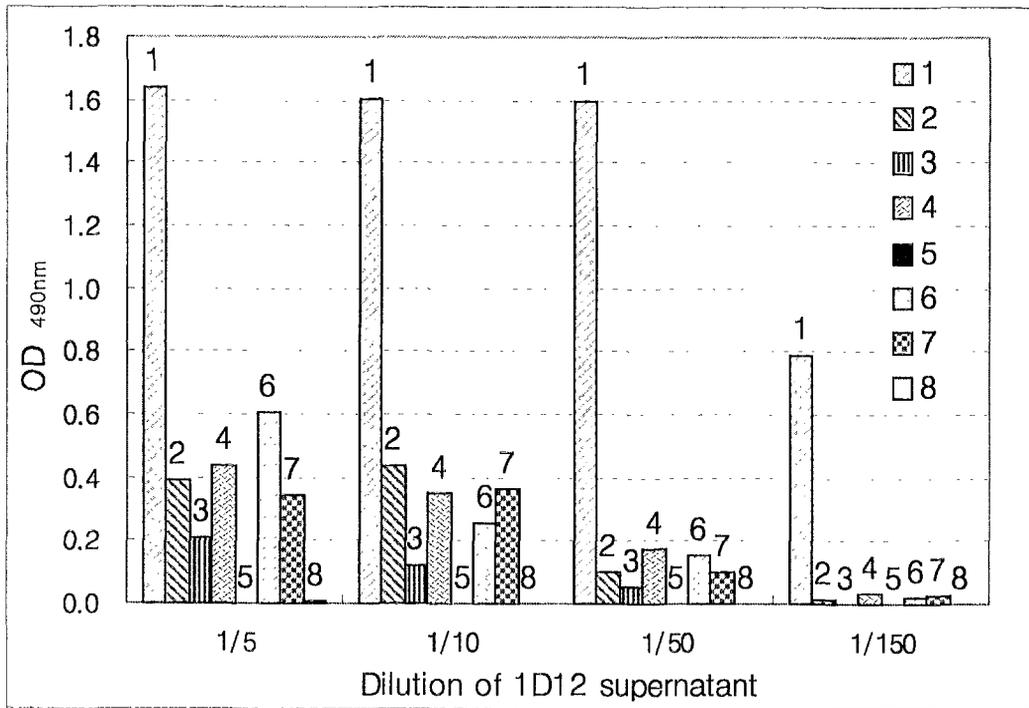


Table 4-9. ELISA of p60 in cultured *Listeria spp.* supernatant with hybridoma serum(1D12). The reagents used for ELISA titration were as follows : capture antigen ; supernatants of *Listeria spp.* and *Paenibacillus larvae* diluted 1:20 with carbonate-bicarbonate pH9.6, hybridoma serum(1D12) diluted with PBST (1/5, 1/10, 1/50, 1/150), anti-mouse IgG-HRPO diluted 1:10000 with PBST, substrate ; 0.04% OPD + 0.012% hydrogen peroxide and stopping solution ; 2.5N H₂SO₄. 1 ; *L. monocytogenes* R1, 2 ; *L. ivanovii*, 3 ; *L. innocua* sv6b, 4 ; *L. welshimeri* I, 5 ; *L. grayi*, 6 ; *L. welshimeri* II, 7 ; *L. seeligeri*, 8 ; *Paenibacillus larvae* ATCC9545.

다. 선별된 hybridoma를 이용한 *Listeria spp.*에 대한 p60단백질의 Western blot

제조합 vector로 발현된 MBP-iap/mono 융합 단백질로부터 얻어진 BALB/c mouse 유래의 anti-p60 monoclonal antibody 중 1D5를 Western detection을 통해 original p60단백질과 동일한 epitope을 갖는지 분석하였다. SDS-acrylamide gel상에서 분리된 제조합

단백질은 PVDF membrane에 옮겨진 후 3% BSA로 blocking을 행하고, 1D5의 상등액과 3% Skim milk-TBST로 1 : 2로 희석하여 각각 넣고 room temperature에서 30분 동안 흔들며 정치한 후, TBST로 room temperature에서 흔들면서 5분씩 3회 세척하였다.

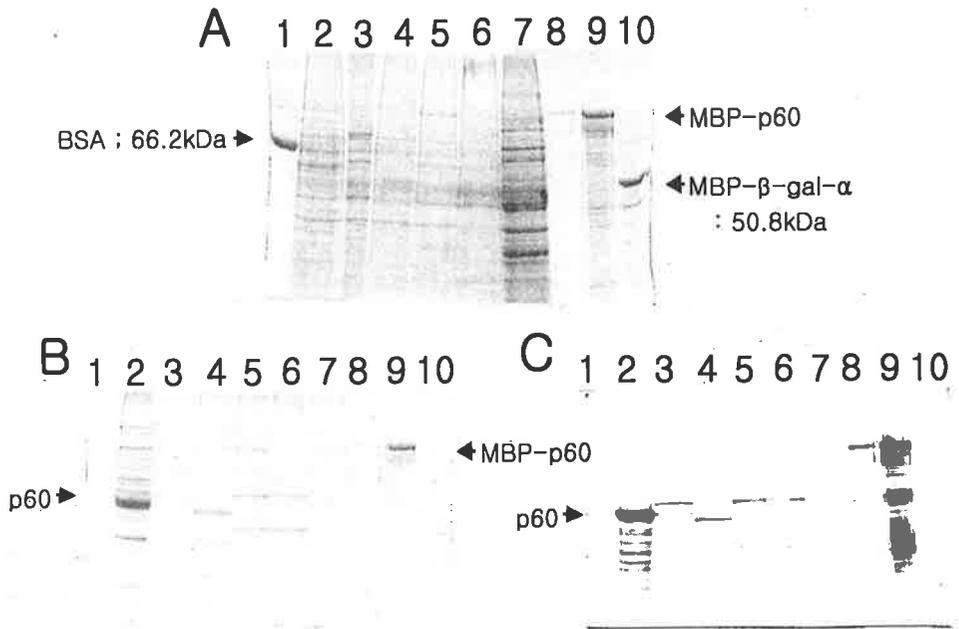


Figure 4-2. Identification of *Listeria spp.* p60 to hybridoma serum(1D5) in Western blot. The panels represent 10% SDS-polyacrylamide gel stained Coomassie Brilliant Blue (A), SDS-polyacrylamide gel stained Coomassie Brilliant Blue after transfer to PVDF (B) and Western blot stainings with a monoclonal anti-p60(1D5)serium(C). 1 ; BSA(662kDa), 2 ; concentrated extracellur protein of *L. monocytogenes*, 3 ; concentrated extracellur protein of *L. ivanovii*, 4 ; concentrated extracellur protein of *L. innocua*, 5 ; concentrated extracellur protein of *L. welshimeri* I, 6 ; concentrated extracellur protein of *L. seeligeri*, 7 ; concentrated extracellur protein of *L. grayi*, 8 ; purified MBP-iap/mono protein, 9 ; total lysate pMAL-iap/mono cells induced IPTG, 10 ; total lysate of induced pMAL-c2.

Secondary antibody reaction은 anti-mouse-IgG를 3% Skim milk-TBST에 1 : 10,000으로 희석하여 room temperature에서 30분 동안 흔들며 incubation하였으며, TBST로 room temperature에서 흔들면서 5분씩 3회 세척하였다. DAB solution을 사용하여 발색을 확인하였으며, 수돗물을 이용하여 세척함으로써 반응 종결시키고, 건조 후 보관하였다. monoclonal anti-p60 antibody를 1 : 2의 희석비로 하여 primary antibody로 사용하였고, anti-mouse IgG antibody를 1 : 10,000의 희석비로 반응시키고 DAB를 이용하여 membrane 상에서 시각화하였다. 재조합 DNA로부터 얻어진 MBP-iap/mono 용합 단백질과 *Listeria* 속의 세포외 단백질인 p60단백질로 예상되는 molecular weight size에서 반응을 보였으며 Figure 1 에서의 재조합 p60단백질에 반응했던 결과와 같이 *L. grayi*를 제외한 모든 종에서 detection되었다(Figure 2).

세포주 1D5가 분비하는 항체는 BSA(66.2kDa), *E. coli* strain JM109 in pMAL-c2, 정제된 MBP-iap/mono(pMAL-iap/mono)의 total lysate 그리고 *Listeria spp.* 6종 (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* I, *L. seeligeri*, *L. grayi*)의 농축 배양액 및 total lysate에 대한 Western detection에서 BSA와 MBP- β -gal- α 에 대해서는 detection되지 않았지만 그리고 *Listeria* 속 6종의 배양액과 total lysate에 대하여서도 약하지만은 반응성을 보였으며, *Listeria* 속 이외의 균에서는 반응을 보이지 않았다. 이들 선별된 세포주들은 *L. monocytogenes*에 대한 특이적 반응을 나타내는 항체는 아니지만, *Listeria* 속의 공통 epitope에 반응하는 항체인 것으로 생각되며, 이는 *Listeria* 속의 검출법에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

라. Ascite fluid 제작

Ascite fluid는 선별된 단일클론 항체들을 대량으로 생산하기 위해서 Hybridoma cell을 마우스의 복강에서 키운 것으로 그 복수액을 뜻한다. Sp2/0 cell은 BALB/c mouse 유래의 myeloma cell이기 때문에 그 용합세포도 이식거부없이 동종의 마우스 복강에서 성장할 수 있다. BALB/c mouse 복강에 복수액을 발생시키기 위하여 0.5ml Freund incomplete adjuvant를 복강주사하였고 7~10일 정도 복수액이 차오르는 것을 관찰하였다. Hybridoma cell은 발생시킨 복수액 내에 주입되어야 성장이 쉬우며, 복수액이 발생되지 않은 mouse에 그대로 주사하면 성장이 어렵다. Ascite fluid 생산을

위해서는 12주령 이상의 mouse를 사용해야 많은 복수를 생산할 수 있고, 조기절명하지 않는다. 복수가 차올랐을 때 hybridoma cell 10^7 씩을 복수가 발생한 mouse의 복강에 주사하였고 1~2주 동안 복수가 늘어나는 것을 관찰하였다. 복수가 가득 차올랐을 때 mouse의 복강에서 복수를 채취하였다.

채취한 복수를 상온에서 2시간, 4°C에서 O/N 정치한 뒤 원심분리하여 맑은 복수 상청액만을 회수하였고, ELISA test 및 역가 test를 수행하였다. 1000/1 희석비까지 재조합 p60단백질서 검출확인하였다.

제 3 절 *Listeria* Flagella 항체제조

1. 다클론항체

가. Rabbit polyclonal antibody

whole cell과 flagella에 대한 다클론항체를 얻기 위해 16주령의 New Zealand White Rabbit을 항원에 따라 각각 2마리씩을 준비하였다. whole cell은 10^8 cell/ml을, flagella는 $100\mu\text{g/ml}$ 이 되게 Freund's complete adjuvant(FCA, sigma)와 1:1로 섞어 유탁액을 만들어 피하접종을 하였으며 그 후로는 2주간격으로 Freund's incomplete adjuvant(FIA, sigma)를 사용하여 10주간 접종하였다. 역가는 접종전에 이정맥으로 채혈하여 확인하였으며 마지막 접종 후 10일 후에 심장에서 채혈하여 분리한 혈청으로 polyclonal antibody로 사용하였다.

Newzealand white rabbit에 *L. monocytogenes* 4b의 whole cell과 flagella를 접종한 결과 항체역가가 시험기간 동안 증가하는 경향을 보였다.

나. Chick yolk antibody(IgY)의 생산 및 분리

IgY생산을 위한 산란계는 제주도 김녕에 위치한 양계장으로부터 10수를 구입하여 사용하였다. flagella를 단백질량이 $50\mu\text{g}$, $200\mu\text{g}$, $400\mu\text{g}$ 이 되게 Freund's complete adjuvant(Sigma)와 동량으로 섞어 유탁액을 만들었으며, 28주령의 산란계 3군, 각 3

마리씩 근육에 초회 면역하였으며, 나머지 1수는 대조군으로 키웠다. 이후의 면역도 같은 방법으로 2주 간격으로 면역하였으며, 계란은 초 회 접종 일주일 후부터 채취하였다.

난황으로부터 IgY의 분리는 이 등(1996)의 방법에 따라 실시하였다. 난황부피의 4배 비율로 3.5% polyethylene glycol 6000(PEG)을 첨가한 후 실온에서 20분간 정치하였고 10,000g에서 20분간 원심분리하였다. 침전물은 제거하고 상층액 부피에 PEG가 12% 되게 첨가한 후 다시 12,000g, 10분간 실온에서 원심분리 하였다. 상층액은 제거하였고 최종 침전물은 PBS에 부유시킨 후 투석하였고, 제균여과하여 냉장에 보관하면서 사용하였다.

1) IgY 역가 변화

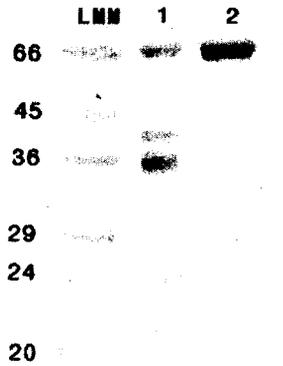
항원 단백량을 50 μ g을 접종하였으며 접종 후 90일까지는 높은 수준의 항체가를 볼 수 있었다.

2) IgY의 SDS-PAGE

Affinity chromatography을 통과한 IgY 분획을 SDS-PAGE를 실시한 결과 Figure 4-3에서 보는 바와 같이 친화성 크로마토그래피를 통한 경우 다른 불필요한 단백질들이 제거된 명확한 정제양상을 볼 수 있었으며 66kDa의 중쇄와 24kDa의 경쇄를 확인할 수 있었다.

Affinity chromatography을 통과한 IgY 분획을 12% gel을 이용한 SDS-PAGE를 통해 확인 하였다.

Figure 4-3. Purification of IgY by affinity chromatography. Lane 1 : low molecular marker. Lane 2 : supernatant of egg york extract. Lane 2 : fraction of affinity chromatography. In lane 2, 6 μ g of protein was loaded, in 3 lane, 11 μ g.



2. 단클론항체의 생산

가. *Listeria monocytogens* 4b의 flagella에 대한 Mabs의 생산

BALB/c마우스 6주령 2마리에 flagella를 50 μ g/ml이 되게 Freund's complete adjuvant(sigma)와 1:1로 섞어 유탁액을 만들어 복강접종을 하였으며 그 후로는 2주간격으로 3번 incomplete Freund's adjuvant(sigma)를 사용하여 접종하였으며 fusion 전 3일간은 미정맥으로 접종하였다. 역가를 측정한 후 심장을 통해 전체혈을 하였으며 fusion직전에 무균적으로 비장을 적출하였다. fusion 일주일 전부터 myeloma cell(sp2/0)을 10% fetal bovine serum(FBS)가 들어있는 DMEM배지에서 키웠으며 fusion은 PEG method 즉 Kohler와 Milstein방법으로 만들었다. 37 $^{\circ}$ C에 미리 데워 두었던 washing media 즉 DMEM에 혈청이 들어있지 않은 배지 10ml를 이용하여 400목 mesh 위에 면역한 마우스의 비장을 적출하여 얻어 놓고 mesh표면에서 갈았다. 같은 비장은 washing media로 1600rpm에서 5분간 2번 세척하였다. 마지막 세척시 키우고 있던 myeloma cell도 함께 세척하였다. 세척한 비장세포와 myeloma cell을 섞은 후

다시 2번 세척하는데 마지막 세척 후 침전을 tapping하여 cell이 튜브바닥에 골고루 퍼지게 하였고, 여기에 polyethylene glycol(PEG, 1500) 처리를 하였다. 처리순서는 1분간 PEG를 1ml 적하하고 30초간 정치-->1분간 washing media를 1ml 첨가 후 30초간 정치-->1분간 washing media 2ml 첨가-->30초간 washing media 8ml 첨가 후 30초간 정치-->다시 30초간 washing media를 10ml 첨가하였다. 원심한 후 상층액을 제거하였고, cell pellet은 10% FBS가 포함된 DMEM에 최대한 풀어지게 섞고 96well culture plate에 분주하였다. 다음날 1×HAT media를 10일간 2일 간격으로 첨가하였고, 이후 5일간은 HT media로 첨가하였다. Colony형성이 많이된 well은 상층액을 PBS-T으로 5배 희석한 액으로 항체여가를 측정하였고, 흡광도가 2이상인 well은 제한희석법으로 cloning을 실시하였다.

나. 항체가 측정을 위한 ELISA

Flagella 및 whole cell을 0.1M carbonate buffer (pH 9.6)로 각각 1 μ g/ml 및 1 \times 10⁷ cells/ml 되게 희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주하고 4℃의 냉장고에 하룻밤 정치시켜 흡착시킨 후 PBS로 4회 세척하였다. 이 후 0.2%의 Bovine serum albumin(BSA)이 용해된 PBS (BSA-PBS) 용액 200 μ l씩을 각 well에 넣고 4℃에 30분간 정치하여 blocking을 실시한 후 PBS로 4회 세척하여 항혈청의 여가 측정용 ELISA microplate를 준비하였다. 시료혈청은 0.05% Tween 20 (Showa, Japan)이 용해된 PBS로 1000배 희석하였고, IgY인 경우 2000배로 희석하여 ELISA 플레이트의 각 well에 100 μ l씩 가하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 4회 세척하였다. Rabbit IgG-horse radish peroxiase(HRP)를 1000배 희석, IgY-HRP는 PBS-T로 10,000배 희석하여 100 μ l씩 각 well에 가하여 실온에 30분간 반응시켰다. PBS로 4회 세척한 후 발색제로 0.1% ABTS (2-2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) 용액 100 μ l를 가하고 30분간 반응시킨 후 2차 증류수 100 μ l를 가하여 반응을 정지시켰다. 발색반응 결과는 ELISA reader (SLT-Labinstrument W. German)를 사용하여 파장 405nm, 대조파장은 492nm를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

다. 단클론항체의 복수생산

6주령의 BALB/c 수컷 및 암컷 각 2마리에 pristane(sigma)를 500 μ l 씩 복강에 접종

하고 일주일 뒤 단클론항체를 분비하는 클론을 1×10^9 을 각 마우스에 접종하고 일주일 혹은 이주일 후에 복수를 채취하였고, 원심분리 후 냉동보관 하였다.

라. 항체의 정제

3g의 CNBr-activated sephrose 4B를 1mM HCl 10ml에서 15분간 swelling시켰고, 이후 500ml 정도의 HCl으로 충분히 세척하였다. 이 때 항원인 flagella(약 1.5mg/ml)는 SDS가 1%, 2-mercaptoethanol이 2%가 되게 첨가한 후 3분간 끓여 준비하였다. 위의 gel과 항원을 섞은 후 0.1M NaHCO₃(pH8.3, 0.5M NaCl)를 즉시 첨가하고 2시간 동안 실온에서 약하게 흔들여 준 후 컬럼에 충전시켰다. 복강에 접종하여 얻은 단클론항체의 복수와 1차 분리한 IgY 40ml(60mg/ml)를 CNBr-activated sephrose 4B-flagella가 충전된 컬럼에 흘려 보냈으며 이 후 세척은 PBS로, 항체 용출은 3M NaSCN을 사용하였다. 분리된 IgY는 PBS로 2회 투석하였다.

3. Sandwich ELISA의 개발

가. 교차반응 조사

다른 세균과의 교차반응을 알아보기 위해 *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* K88ab, *pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* O175:H7, *Streptococcus mastitis strain 1*, *Streptococcus mastitis strain 2*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus aureus 1*, *Staphylococcus aureus 2*, *Bacillus subtilis*를 약 10^8 정도가 되게 희석하여 indirect ELISA를 실시하였다.

-단클론항체 및 다클론항체의 특이도 조사를 위한 교차반응-

본 실험에서 생산한 6개의 단클론항체들과 IgY, rabbit polyclonal antibody가 리스테리아 이외의 세균들과도 반응하는지 알아보기 위해 1×10^8 으로 희석하여 100℃에서 20분간 끓인 액으로 ELISA를 실시한 결과 12개의 여타의 세균들과 특이반응을 보이지 않았다.

Table 4-10. Specificity analysis of antibodies by ELISA with different bacterial species.

Bacterial strains	Monoclonal antibodies						Polyclonal Abs	
	4F12	6F3	3B7	2B1	7A3	13A1	IgY	Rb
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> K88ab	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 0175:H7	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mastitis strain 1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mastitis strain 2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus 1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus leutus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

나. HRP labelled 항체(detector항체)의 제작

Wilson과 Nakane(1978년)의 방법에 따랐다. 우선 horse radish peroxidase(HRP) 5mg을 1.2ml 증류수에 녹인후 0.1M NaIO₄ 300 μ l를 첨가하고 실온에서 20분간 약하게 흔들어서 주었다. 이후 MAb가 10mg/ml을 첨가하고 2시간 동안 실온에서 약하게 흔들어서 준후 NaBH₄ (4mg/ml)을 100 μ l를 넣어 주었다. 냉장에서 2시간 반응시킨 후 PBS를 이용하여 투석 한 후 냉장에 보관하면서 사용하였다.

1) Detector항체 역가

Periodate법으로 제작한 HRP가 접합된 항체의 역가는 Table 4-11에 나타내었다. 흡광도가 2이상인 조건의 희석배수를 정하여 sandwich ELISA에 사용하였다. 즉 2B1 conjugate는 2000배, 7A3 conjugate는 1000배, IgY conjugate는 50배, rabbit polyclonal antibody conjugate는 250배로 정하였다.

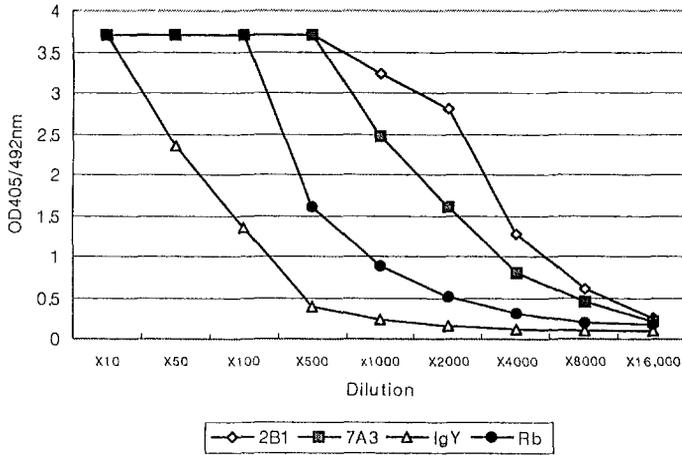


Table 4-11. Titration of HRP conjugate of antibodies

다. Capture항체와 detector항체의 조합조건

Listeria 검출을 위한 가능성을 알아보기 위해 capture항체로는 Mab 2B1, 7A3과 IgY, rabbit polyclonal 항체를 10 μ g/ml이 되게 희석하여 흡착시켰고, blocking 용액으로는 0.2% bovine serum albumin(BSA)이 첨가된 PBS를 사용하였고 이 후의 세척은 PBS로 3회 실시하였다. 항원으로는 flagella를 10 μ g/ml이 되게 0.2% BSA가 첨가된 PBS-T에 희석하여 40분간 실온에서 반응시켰고, detector 항체로는 HRP를 접합시킨 단클론항체 2B1, 4F12, 7A3를 리스테리아 희석액과 같은 용액으로 희석하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 후의 반응은 항체가 측정을 위한 ELISA와 동일조건으로 실시하였다.

1) Capture항체와 detector항체의 조합조건

Capture항체로는 단클론항체 2B1, 7A3과 IgY, rabbit polyclonal 항체를 10 μ g/ml이 되게 희석하여 흡착시켰고, detector 항체 또한 단클론항체 2B1, 7A3과 IgY, rabbit polyclonal 항체를 사용하여 반응시켰으며, 항원으로는 flagella를 첨가한 것(+)과 첨가하지 않은 control(-)과 비교하여 비특이 반응을 보이지 않는 적정조합을 알아

본 결과 capture항체가 단클론항체 7A3 혹은 다클론인 IgY 와 rabbit 항체와는 상관 없이 detector항체가 단클론인 2B1인 경우 비특이 반응이 없이 적정반응을 보여 이후의 sandwich ELISA를 위한 capture항체로는 단클론항체 7A3과 IgY, rabbit polyclonal 항체로 정하였으며 detector항체로는 단클론항체 2B1인 조건으로 ELISA system을 결정하였다.

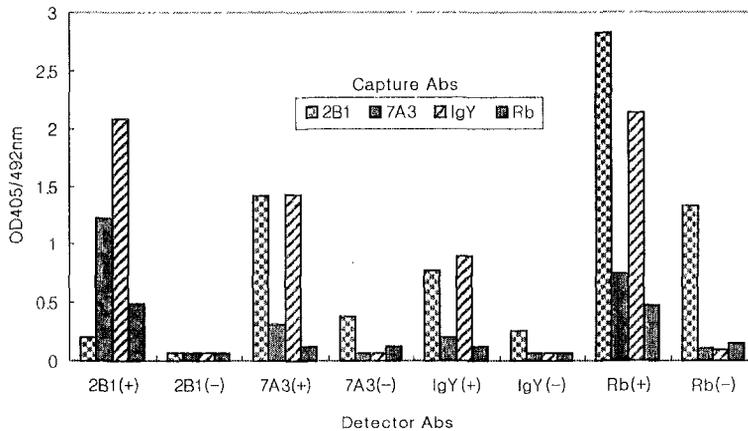


Table 4-12. Optimization of the antibody pairs

라. 특이도 조사

L. grayi, ATCC 19120, *L. innocua* ATCC 33090, *L. ivanovii* ATCC 19119, *L. monocytogenes* 1/2a HPB 410, *L. monocytogenes* 1/2b HPB 503, *L. monocytogenes* 1/2c HPB 12, *L. monocytogenes* 3a ATCC 19113, *L. monocytogenes* 4a ATCC 19114, *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, *L. monocytogenes* 4c ATCC 19118, *L. monocytogenes* 4d ATCC 19117, *L. murrayi* ATCC 25401, *L. seeligeri* ATCC 35967, *L. welshimeri* ATCC 35897와 같이 리스테리아 전 종을 대상으로 특이도를 비교하였다. 이 또한 세균

수가 약 10^8 정도가 되게 희석하여 sandwich ELISA를 실시하였다.

위의 조건으로 리스테리아 전 종에 대한 특이도를 알아보기 위해 capture항체를 2B1으로 사용하여 sandwich ELISA를 실시하였다. 이 결과 모든 리스테리아 종에 특이반응을 보였으며, 이에따라 위의 sandwich ELISA system이 리스테리아 screening용 목적으로 사용이 가능함을 시사하였다. 특히 capture항체로 단클론항체 4F12는 모든 리스테리아 종을 골고루 검출할 수 있었지만 복수형성시 yield가 낮아 이후에 ELISA system에서는 단클론항체 4F12는 제외시켜 ELISA를 수행하였다.

Table 4-13. Characteristics of some antibodies produced against serovars of the genus *Listeria*.

Species	Serotype	H antigens	Reaction with capture antibodies using 2B1-HRP				
			2B1	4F12	7A3	IgY	Rb
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a(HPB#410)	AB	-	+++	+	++	++
<i>L. monocytogenes</i>	1/2b(HPB#503)	ABC	-	+++	++	+++	+++
<i>L. monocytogenes</i>	1/2c(HPB#12)	BD	-	++	+	+++	+
<i>L. monocytogenes</i>	3a(ATCC19113)	AB	-	++	+++	+++	+++
<i>L. monocytogenes</i>	4a(ATCC19114)	ABC	-	++	+	+	++
<i>L. monocytogenes</i>	4b(HPB#3)	ABC	-	++	+	+	++
<i>L. monocytogenes</i>	4c(ATCC19118)	ABC	-	++	++	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	4d(ATCC19117)	ABC	-	++	++	+++	++
<i>L. grayi</i>	(ATCC19120)	E	-	++	++	+++	++
<i>L. innocua</i>	(ATCC33090)	ABC	-	++	++	++	++
<i>L. ivanovii</i>	5(ATCC19119)	ABC	-	++	+	+++	+
<i>L. murrayi</i>	(ATCC25401)	E	-	++	++	++	+
<i>L. seeligeri</i>	(ATCC35967)	ABC	-	++	+	+	+
<i>L. welshimeri</i>	(ATCC35897)	ABC	-	++	+	+++	+

마. 민감도 조사

우선 *L. monocytogenes* 4b를 flagella형성정도에 따른 민감도 차이를 조사하기 위해 26℃와 축산물공인시험법(농림부고시 제 1998-34호)에서 제시한 30℃에서 0.2% glucose, 0.6% yeast extract이 첨가된 Tryptic soy broth(TSB, Gibco211825)를 이용하여 배양한 후 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 이 되게 희석하여 sandwich ELISA를 실시하였다. 반응시 모든 cell들은 100℃, 20분간 가열하였다.

우선 *L. monocytogenes* 4b를 flagella형성정도에 따른 민감도 차이를 조사하기 위해 26℃와 축산물공인시험법(농림부고시 제 1998-34호)에서 제시한 30℃에서 배양한 후 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 이 되게 희석하여 sandwich ELISA를 실시하였다. 26℃로 배양한 경우 capture항체를 단클론항체 7A3로 한 경우 1×10^5 cell/ml까지 검출이 가능하였으며 이외의 다클론항체들은 1×10^6 cell/ml의 검출 감도를 보였다. 이에반해 26℃보다 flagella형성이 적을것으로 예상되는 30℃에서의 배양시 capture항체를 단클론항체 7A3로 한 경우 1×10^5 cell/ml, 다클론항체들은 1×10^7 cell/ml의 26℃보다 10배 정도 낮은 검출감도를 보였다. 따라서, 위의 ELISA system의 감도를 더욱 높이기 위해서는 26℃이하의 온도중 flagella의 형성이 많아지는 배양조건을 선택해야 할 것으로 사료되었다.

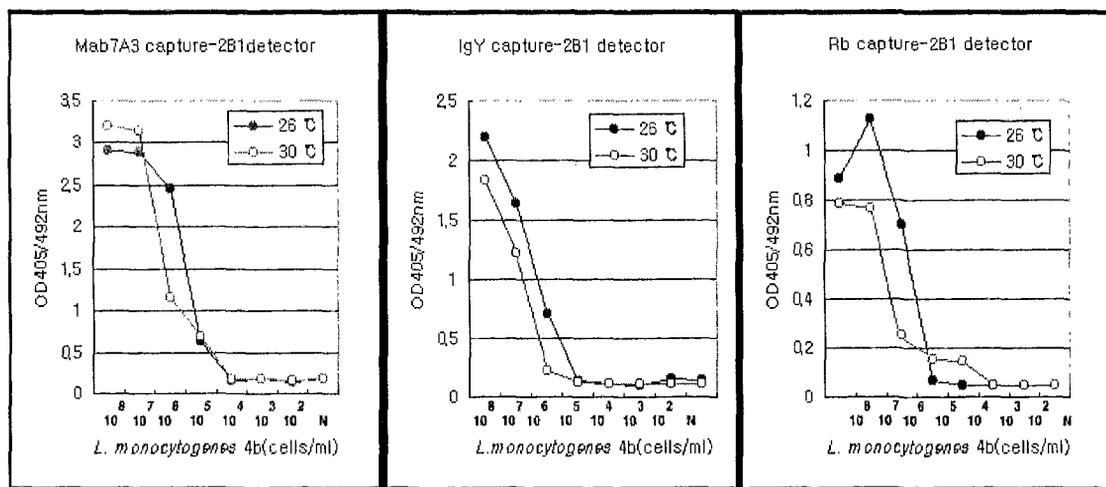


Fig. 4-14. Sensitivity study of sandwich ELISA

4. Lateral flow rapid kit의 개발

가. Colloidal gold

40nm colloidal gold(BioDom, Korea Inc.)를 사용하여 detector항체를 제작하였다.

나. Colloidal gold-항체 중합체 제작

위의 40nm gold용액 120ml를 pH가 7.5가 되게 맞춘다. 2배 계단희석을 한 50 μ l 항체에 gold용액 1ml, 10% NaOH 40 μ l를 첨가하여 골드색깔이 변하는 시점의 단백질량을 정하여 이후의 접합조건을 설정하였다. 골드 10ml에 적정단백농도의 항체를 천천히 첨가하고 30분간 정치하였다. 10% NaOH를 이용하여 다시 pH를 9로 올리고 BSA 500 μ l를 첨가한 후 10분간 반응시켰다. 0.1N HCl로 pH7.5로 조정하여 10,000rpm에서 1시간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 침전물에 100mM phosphate buffer(2% Tween-20, 2% BSA, 6% sucrose) 5ml을 첨가하여 부유시켰다.

다. Lateral flow rapid kit의 구성

Lateral flow test는 항체와 gold가 결합된 중합체가 건조된 상태로 NC membrane에 부분적으로 부착되어 있어 리스테리아를 sample pad에 적하하면 gold중합체 용해되면서 리스테리아의 한 epitope에 결합하면서 1차 항원-항체의 면역결합체가 형성되며 모세관현상에 의해 흡수되면서 고정화된 capture항체와 2차로 결합됨으로써 sandwich 방식의 결합체가 형성된다. 붉은색의 발색은 리스테리아의 농도에 따라 달라지며, 본 실험에서는 15분간 반응시킨 결과를 데이터화 하였다.

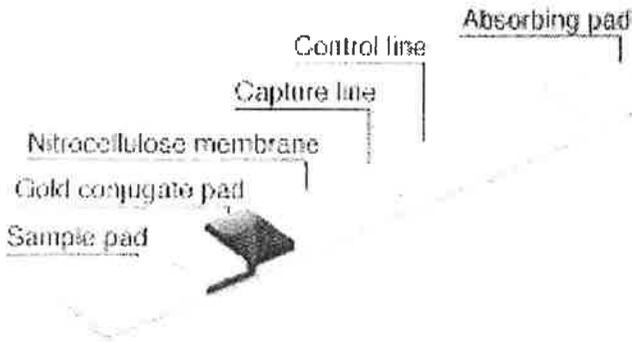


Figure 4-4. Lateral flow test for *Listeria* based on immunochromatographic method

1) Lateral flow rapid kit의 구성

Nitrocellulose membrane(NC, 0.4mm×2.2cm) 아래쪽으로부터 1.6cm 부분에 단클론항체 2B1, IgY, rabbit polyclonal 항체를 단백질량 1.5mg/ml이 되게 긋고, 2cm 부분에는 goat anti-mouse IgG 또한 단백질량 1.5mg/ml되게 고정화하여 1시간동안 건조하였다. NC membrane 위쪽에는 adsorbing pad(0.4mm×1.8cm)를 장착하였으며 아래쪽에는 MAb 2B1-gold 중합체가 흡수된 gold conjugate pad인 glass fiber membrane(0.4mm×0.7mm)은 50℃에서 1시간 건조시켰으며 sample pad(0.4mm×2cm)와 부분적으로 겹치도록 rapid kit를 구성하였다. 검사용 리스테리아 시료는 1×10^8 cells/ml로 배양된 배양액 50 μ l로 측정하였다.

라. Capture항체와 detector항체의 조합조건

Listeria 검출을 위한 가능성을 알아보기 위해 capture항체로는 Mab 2B1, 4F12, 7A3 과 IgY, rabbit polyclonal 항체를 1.5mg/ml이 되게 희석하여 흡착시켰고, control

line에 사용된 항체는 goat anti-mouse IgG로 1.5mg/ml이 되게 그었다. gold가 접합된 항체인 detector항체로는 MAb 2B1과 7A3을 사용하였다.

Listeria 검출을 위한 가능성을 알아보기 위해 capture항체로는 Mab 2B1, 4F12, 7A3과 IgY, rabbit polyclonal 항체를 1.5mg/ml이 되게 희석하여 흡착시켰고, control line에 사용된 항체는 goat anti-mouse IgG로 1.5mg/ml이 되게 그었다. gold가 접합된 항체인 detector항체로는 Mab 2B1과 7A3을 사용하였다.

마. 교차반응

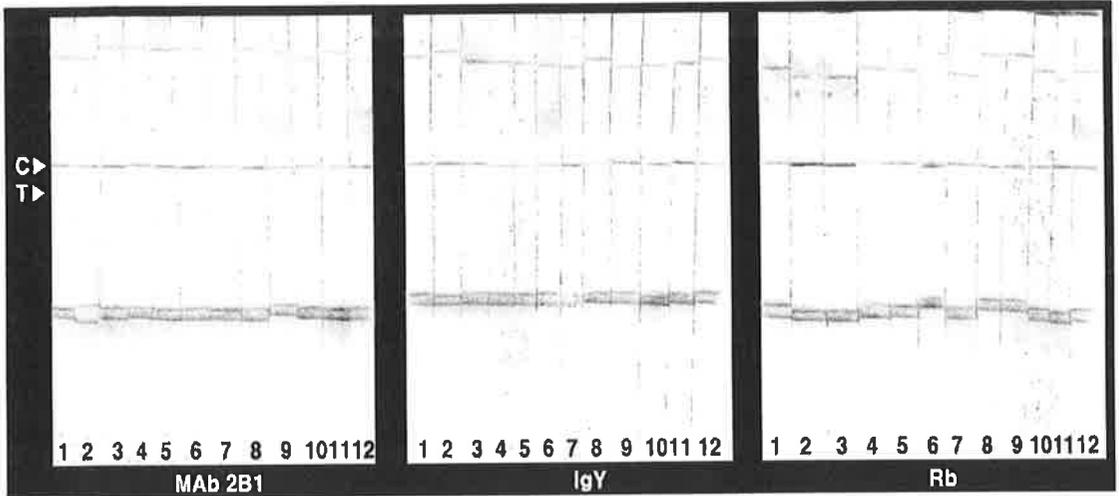
다른 세균과의 교차반응을 알아보기 위해

Salmonella enteritidis, *Salmonella typhimurium*, *E.coli* K88ab, *pseudomonas aeruginosa*, *E.coli* O175:H7, *Streptococcus mastits strain 1*, *Streptococcus mastits strain 2*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus aureus 1*, *Staphylococcus aureus 2*, *Bacillus subtilis*를 약 10^8 정도가 되게 희석하여 rapid kit에 점적하였다.

다른 세균과의 교차반응은 capture항체가 MAb 2B1과 rabbit항체에서는 나타나지 않았으나 IgY인 경우 약간의 엷은 line을 나타내고 있으나 이는 IgY를 NC membrane에 부착하는 과정에서 나타난 굵직한 자국에 gold가 고여있거나 혹은 항체의 정제가 충분히 되지 않았을 경우에도 비특이 반응이 나타날 수 있으므로 이는 추후에 재실험이 필요할 것으로 생각되었다.

Figure 4-5. Specificity analysis of lateral flow test by MAbs, IgY and rabbit polyclonal antibody with different bacterial species

1: *Salmonella enteritidis*, 2: *Salmonella typhimurium*, 3: *E.coli* K88ab, 4: *pseudomonas aeruginosa*, 5: *E.coli* O175:H7, 6: *Streptococcus mastits strain 1*, 7: *Streptococcus mastits strain 2*, 8: *Rhodococcus*, 9: *Staphylococcus aureus 1*, 10: *Staphylococcus aureus 2*, 11: *Bacillus subtilis* 12: PBS



바. 특이도

L. grayi, ATCC 19120, *L. innocua* ATCC 33090, *L. ivanovii* ATCC 19119, *L. monocytogenes* 1/2a HPB 410, *L. monocytogenes* 1/2b HPB 503, *L. monocytogenes* 1/2c HPB 12, *L. monocytogenes* 3a ATCC 19113, *L. monocytogenes* 4a ATCC 19114, *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, *L. monocytogenes* 4c ATCC 19118, *L. monocytogenes* 4d ATCC 19117, *L. murrayi* ATCC 25401, *L. seeligeri* ATCC 35967, *L. welshimeri* ATCC 35897와 같이 리스테리아 전 종을 대상으로 세균수가 약 10^8 정도가 되게 희석한 후 100°C , 20분간 가열한 다음 rapid kit에 점적하였다.

특이도 조사를 위해 2가지 항체를 pair를 비교하여 보았다. 하나의 pair로는 Capture항체로 MAb 2B1, gold중합체로 MAb 7A3을 사용하였고, 다른 하나의 pair는 반대로 실시하였다. 그 결과 특이도 면에서는 별 차이 없이 모든 리스테리아 종을 감지하는 것으로 나타났다. *L. mono.* 3a(ATCC19113), *L. mono.* 4b(HPB#3), *L. mono.* 4c(ATCC19118)인 경우 test line이 약하게 나타났는데 이는 capture 항체를 MAb 2B1으로 부착시킬 때 골고루 단백질이 붙지 못한 결과로 생각되며 따라서, 단백을 NC membrane에 갖는 즉 부착시키는 방법의 문제로 spray식의 장비를 사용한다면 이러한 비특이 반응은 줄일 수 있을 것으로 생각되며, 이에 제품생산으로도 가능할 것으로 예상된다.

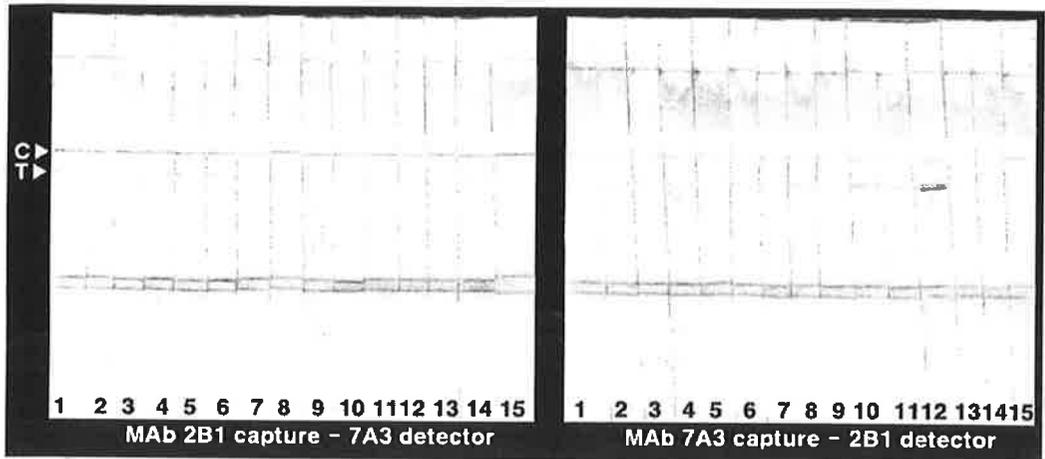


Fig. 4-6. Specificity study of lateral flow test

1: *L. grayi*(ATCC19120), 2: *L. innocua*(ATCC33090), 3: *L. ivanovii*(ATCC19119), 4: *L. mono. 1/2a*(HPB#410), 5: *L. mono. 1/2b*(HPB#503), 6: *L. mono. 1/2c*(HPB#12), 7: *L. mono. 3a*(ATCC19113), 8: *L. mono. 4a*(ATCC19114), 9: *L. mono. 4b*(HPB#3), 10: *L. mono. 4c*(ATCC19118), 11: *L. mono. 4d*(ATCC19117), 12: *L. murrayi*(ATCC25401), 13: *L. seeligeri*(ATCC35967), 14: *L. welshimeri*(ATCC35897) 15: PBS

사. 민감도

L. monocytogenes 4b를 flagella형성정도에 따른 민감도 차이를 조사하기 위해 26℃와 축산물공인시험법(농림부고시 제 1998-34호)에서 제시한 30℃에서 0.2% glucose, 0.6% yeast extract이 첨가된 Tryptic soy broth(TSB, Gibco211825)를 이용하여 배양한 후 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 이 되게 희석하여 100℃, 20분간 가열한 후 rapid kit에 점적하였다.

26℃로 배양한 경우 capture항체를 단클론항체 2B1으로 한 경우 1×10^6 cells/ml까지, rabbit polyclonal 항체인 경우도 1×10^6 cells/ml의 검출감도를 보였다. 이에 반

해 30°C에서의 배양시 capture항체를 단클론항체 2B1으로 한 경우 1×10^7 cells/ml까지 검출이 가능하였으며 rabbit polyclonal 항체인 경우는 1×10^8 cells/ml 에서도 아주 약하게 반응하는 결과를 보였다. 이는 sandwich ELISA에서와 같이 26°C의 배양이 30°C의 배양보다 10배 정도 높은 감도를 보여주는 결과이며, sandwich ELISA와 rapid kit의 검출감도 면에서 비교해 본다면 sandwich ELISA가 10배정도 높은 검출 민감도를 보이는 것으로 나타났다.

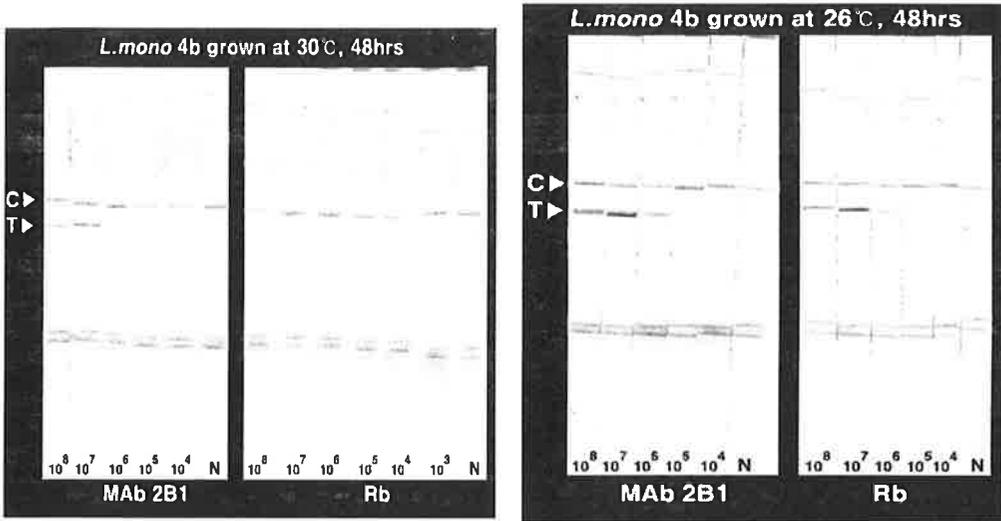


Figure 4-7. Sensitivity study of lateral flow tests for *Listeria monocytogenes* 4b

제 5 장 개발된 검색키트와 표준검사법 및 상용키트와의 비교실험

제 1 절 서설

리스테리아의 검사에서 가장 기본적인 실험은 균주를 확보할 수 있는 표준검사법(배양검사법)이다. 본 연구에서는 표준검사법에 의한 균주 확보와 함께 본 연구에서 개발된 검색키트들 및 상품으로 판매되고 있는 수입 리스테리아 검색키트들을 입수하여 다양한 균주로써 이들의 비교실험을 수행하였다.

제 2 절 표준검사법 및 균주의 확보

1. 시료 채취

리스테리아균 분리를 위한 시료로는 수입검역시 제공되는 시료(식육, 축산물가공품)와 국내산 도축장 탐색조사용 시료 등을 사용하였다.

2. 검사방법

가. 균분리 및 보관

농림부고시 제 1998-34호에 의한 리스테리아균을 분리법을 사용하였으며, 그 배양법과 사용배지등은 제공된 시료를 약 25g정도 채취하여 225ml의 *Listeria enrichment broth*(Difco사)에서 37°C/18hr 배양하고 그 배양액 1ml를 9ml *Fraser broth*(Difco사)에 접종하여 37°C/18hr 배양하여 *Aesculin* 분해능을 확인하고 분해한 경우 선택배지인 *Oxford* 배지(Difco사)에 획선도말하여 37°C/18hr 배양하여 의심균집락을 혈액배지

(코메드사)에 획선도말하여 배양하고 용혈능을 확인하였다.

혈액배지에서 용혈이 확인된 균집락을 BHI 배지(Difco사)에 순수배양하여 생화학적 검사에 사용하였다. 생화학적 성장검사로 catalase test, CAMP test등을 실시하고 Vitek 32(Biomerieux사)를 이용하여 리스테리아균을 확인하였다. 혈청학적검사로는 Difco사 혈청을 이용하여 O type을 확인하고 확증된 리스테리아균은 균보관용 용기(Microbank사)에 넣어 냉동보관하며 실험에 이용하였다. 본 연구에 사용된 균주는 아래의 표에 정리하였다.

Table 5-1 본 연구에 사용된 균주의 출처

균주명	종명	수량	분리원/수집원
SLCC	<i>L. monocytogenes</i>	24	독일 Wuerzburg대
	<i>L. ivanovii</i>	4	
	<i>L. innocua</i>	12	
	<i>L. seligeri</i>	1	
	<i>L. welshimeri</i>	3	
	<i>L. grayi</i>	1	
TMRL	<i>L. monocytogenes</i>	21	일본동경공중보건연구소
	<i>L. ivanovii</i>	1	
	<i>L. innocua</i>	3	
	<i>L. seligeri</i>	3	
	<i>L. welshimeri</i>	2	
NVRQS	<i>L. monocytogenes</i>	100	한국수의과학검역원
	<i>L. innocua</i>	18	
	<i>L. welshimeri</i>	4	

Table 5-2. NVRQS균주 목록

NVRQS: National Veterinary Research and Quarantine Service

본 균주는 국립수의과학 검역원에서 검역과정등에서 분리한 것임. 이 균주의 종명은 생화학 검사결과로 동정된 것이며, 본 연구과제에 의하여 PCR 방법등에 의하여 재동정된 것은 내용 중에 기재하였음.

균주 번호	균 종	분리원	
		품명	국명
2	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	멕시코
3	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	캐나다
4	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	미국
5	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	캐나다
6	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	덴마크
7	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	벨기에
9	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
10	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	중국

균주 번호	균 종	분리원	
		품명	국명
11	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
12	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	중국
13	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	중국
14	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	영국
16	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
19	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	뉴질랜드
20	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
21	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	중국
22	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	미국
24	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	덴마크
25	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	덴마크
26	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
28	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	한국(충북)
29	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	한국(강원)
30	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	한국(인천)

Table 5-2. NVRQS균주 목록

31	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	한국(경기)
32	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	한국(전북)
33	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	한국(경남)
34	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	덴마크
35	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
36	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	덴마크
37	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
38	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	벨기에
41	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	덴마크
43	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
44	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	중국

균주 번호	균종	분리원	
		품명	국명
45	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
46	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	중국
47	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	덴마크
48	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
50-1	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	뉴질랜드
53-1	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
55-4	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	덴마크
56-2	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	중국
57-1	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	중국
57-3	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
59-3	<i>Lmonocytogenes</i>	돈육	벨기에
61	<i>Lmonocytogenes</i>		미국
62	<i>Lmonocytogenes</i>		미국
68	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	한국
69	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	한국
70	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	한국

Table 5-2. NVRQS균주 목록(계속)

균주 번호	균종	분리원	
		품명	국명
100	<i>L.monocytogenes</i>	계육	한국(경기)
101	<i>L.monocytogenes</i>	계육	한국(경기)
102	<i>L.monocytogenes</i>	계육	한국(경기)
103	<i>L.monocytogenes</i>	계육	한국(경기)
104	<i>L.monocytogenes</i>	계육	한국(경기)
105	<i>L.monocytogenes</i>	계육	한국(경기)
106	<i>L.monocytogenes</i>	계육	한국(충남)
107	<i>L.monocytogenes</i>	덴마크돈육	원료육
108	<i>L.monocytogenes</i>	베이컨	한국(제당)
109	<i>L.monocytogenes</i>	소시지	미국
111	<i>L.monocytogenes</i>	우육	미국
112	<i>L.monocytogenes</i>	우육	미국
113	<i>L.monocytogenes</i>	우육	미국
114	<i>L.monocytogenes</i>	돈육	헝가리
115	<i>L.monocytogenes</i>	돈육	프랑스
116	<i>L.monocytogenes</i>	돈육	프랑스

균주 번호	균종	분리원	
		품명	국명
200	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	한국 전북 남원
201	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	한국 전북 남원
202	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	한국 전북 남원
203	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	한국 전북 남원
204	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	한국 전북 남원
205	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	한국 전북 남원
206	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	한국 전북 남원
207	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	한국 전북 남원
208	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	한국 전북 남원
209	<i>Lmonocytogenes</i>	돼지	한국 전북 임실
210	<i>Lmonocytogenes</i>	돼지	한국 전북 임실

Table 5-2. NVRQS균주 목록(계속)

균주 번호	균 종	분리원	
		품명	국명
211	<i>L.monocytogenes</i>	돼지	한국 전북 임실
212	<i>L.monocytogenes</i>	돼지	한국 전북 임실
213	<i>L.monocytogenes</i>	소	한국 전남 순천
214	<i>L.monocytogenes</i>	돼지	한국 전남 보성
215	<i>L.monocytogenes</i>	돼지	한국 전남 보성
216	<i>L.monocytogenes</i>	돼지	한국 전남 보성
217	<i>L.monocytogenes</i>	돼지	한국 전남 보성
218	<i>L.monocytogenes</i>	돼지	한국 전남 보성
219	<i>L.monocytogenes</i>	돼지	한국 전남 보성
220	<i>L.monocytogenes</i>	돼지	한국 전남 보성
221	<i>L.monocytogenes</i>	돼지	한국 전남 보성

균주 번호	균종	분리원	
		품명	국명
300	<i>L. innocua</i>	우육	미국
301	<i>L. innocua</i>	돈육	캐나다
302	<i>L. innocua</i>	돈육	헝가리
303	<i>L. innocua</i>	돈육	프랑스
304	<i>L. innocua</i>	돈육	한국
305	<i>L. innocua</i>	돈육	한국
306	<i>L. innocua</i>	돈육	한국
307	<i>L. innocua</i>	돈육	한국
308	<i>L. innocua</i>	돈육	덴마크
309	<i>L. innocua</i>	돼지	헝가리

Table 5-2. NVRQS균주 목록(계속)

균주 번호	균종	분리원	
		품명	국명
310	<i>L. innocua</i>	돼지	한국 전북 임실
311	<i>L. innocua</i>	소	한국 전북 임실
312	<i>L. innocua</i>	소	한국 전북 남원
313	<i>L. innocua</i>	소	한국 전북 남원
314	<i>L. innocua</i>	돼지	한국 전북 남원
315	<i>L. innocua</i>	돼지	한국 전북 남원
316	<i>L. innocua</i>	돼지	한국 전북 남원
317	<i>L. innocua</i>	돼지	한국 전북 남원
318	<i>L. innocua</i>	돼지	한국 전북 남원
319	<i>L. innocua</i>	돼지	한국 전북 남원
320	<i>L. innocua</i>	돼지	한국 전남 나주
321	<i>L. innocua</i>	돼지	한국 전남 나주
322	<i>L. innocua</i>	돼지	한국 전남 나주
323	<i>L. innocua</i>	돼지	한국 전남 나주
324	<i>L. innocua</i>	돼지	한국 전남 나주
325	<i>L. innocua</i>	소	한국 전남 나주
326	<i>L. innocua</i>	소	한국 전남 함평

균주 번호	균종	분리원	
		품명	국명
400	<i>L.welshimeri</i>	돈육	네델란드
401	<i>L.welshimeri</i>	돈육	덴마크
402	<i>L.welshimeri</i>	돈육	한국
403	<i>L.welshimeri</i>	돈육	한국
404	<i>L.welshimeri</i>	돈육	한국
405	<i>L.welshimeri</i>	돈육	벨기에

Table 5-2. NVRQS균주 목록(계속)

균주 번호	균 종	분리원	
		품명	국명
P-1	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	중국
P-2	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	태국
P-3	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
P-4	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	중국
P-5	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
P-6	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	중국
P-7	<i>Lmonocytogenes</i>	오리	중국
P-8	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	태국
P-9	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국
P-10	<i>Lmonocytogenes</i>	계육	미국
P-11	<i>Lmonocytogenes</i>	소시지	미국
P-12	<i>Lmonocytogenes</i>	우육	미국

*참고: NVRQS는 국립수의과학검역원의 약자임

제 3 절 개발된 키트들과 수입키트간의 비교검사

1. 개발된 키트와 수입키트간의 비교검사

본 연구에 의하여 개발된 키트들과 와 제품화된 수입 키트와의 비교실험을 아래와 같은 키트들을 사용하였다.

Table 5-31. 본 비교실험에 사용된 수입 키트들의 종류 및 검색 특성

제 품 명	제 조 사	제조국	비고
Tecra Unique kit	TECRA	호주	<i>Listeria spp.</i>
Tecra Visual immunoassay Listeria	TECRA	호주	<i>L. monocytogenes</i>
VIDAS Listeria monocytogenes	BioMerieux	프랑스	<i>L. monocytogenes</i>
Visual Immunoprecipitate assay listeria(VIP)	Biocontrol	미국	<i>Listeria spp.</i>
Listeria Rapid kit	Oxoid	영국	<i>Listeria spp.</i>
Dynabead-anti Listeria	Dynal	노르웨이	<i>L. monocytogenes</i>

본 연구과제에서 분리하여 보관중인 NVRQS균주 중 *Listeria monocytogenes* 10주와 *Listeria innocua* 5주, *Listeria welshmeri* 3주등을 선별하여 BHI broth에서 37°C/18hr 배양하여 BHI배지를 이용하여 균수 측정과 동시에 각 Kit에 접종하여 그 특이성을 확인하였다. BHI broth에서 37°C/18hr 배양한 경우 Macfarland No. 4(1.2×10^9 cfu/ml) 수준으로 나타났으며, BHI agar을 이용한 SPC 균수 측정에서도 이와 동일한 성적을 나타냈다.

가. 수입키트들의 검출한계 조사

Table 5-4. 수입 Kit들의 검출한계.

제 품 명	제 조 사	검출한계 (cfu/ml)	비고
Tecra Unique kit	TECRA	1×10^7	명확한 양성 Band 확인 균체수
Tecra Visual immunoassay Listeria	TECRA	1×10^6	
VIDAS Listeria monocytogenes	BioMerieux	1×10^6	
Visual Immunoprecipitate assay listeria(VIP)	Biocontrol	1×10^9	
Listeria Rapid kit	Oxoid	1×10^6	

연구조사결과와 같이 Biocontrol사의 VIP kit는 검출한계가 1×10^9 cfu/ml로 상대적으로 민감도가 떨어졌으며 제품화된 시판 Kit류는 일반적으로 1×10^6 cfu/ml의 검출한계를 갖는 것으로 나타났다. 본 연구과제에서 개발된 Kit의 경우 1×10^5 cfu/ml까지 검출이 가능하여 시판 Kit보다 우수한 것으로 나타났다.

나. 수입키트들의 *L. monocytogenes* 종동정 성능

병원성균주인 *L. monocytogenes*의 종동정은 Tecra Visual immunoassay Listeria, VIDAS Listeria monocytogenes, Dynabead-anti Listeria의 제조자 지시사항에 가능한 것으로 기재 (또는 암시)하였으나, 본 실험의 결과에서 모두 *L. innocua*와 *L. weshimeri*를 *L. monocytogenes*로 동정하여 전혀 동종정의 기능을 할수 없는 Listeria 검색키트임을 나타내었다. 따라서 본 연구에 의해 개발된 리스테리아 PCR 키트만이 종동정이 정확함을 입증할 수 있었다.

2. 세계 각국에서 유래된 Listeria 균주들에 대한 개발 키트의 적용실험

본 연구에 의해 개발된 각종 kit들은 그 유용성을 검사하기 위하여 1차 생화학적 검사가 끝난 균주에 대하여 개발된 키트들의 적용실험을 수행하였다. 개발된 키트들 중 PCR kit들은 종동정 및 검색한계 등에서 매우 우수한 성적을 보였으나, ELISA kit 및 rapid kit는 종동정에서 보다 항원/항체 적합성에 대한 개발이 필요할 것으로 판정되었다.

Table 5-5. 생화학적 검사에 의해 동정된 균주의 Listeria PCR 동정

종명	균주수		Error Rate(%)
	PCR test 결과	생화학 테스트 결과	
<i>Listeria monocytogenes</i>	98	100	
<i>Listeria innocua</i>	27	27	34.29%
<i>Listeria weshimeri</i>	3	3	
미검출된 균주	2	0	

* 미검출된 균주는 Listeria가 아닌 것으로 판정되었으며, 생화학적 실험결과는 98%의 정확성을 PCR결과는 100%의 정확성을 보인 것으로 판명됨.

Table 5-6. 실험에 사용된 국외 유래 균주 들

국가명	균주명	균주수
멕시코	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
캐나다	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
	<i>Listeria innocua</i>	1
미국	<i>Listeria monocytogenes</i>	19
	<i>Listeria innocua</i>	4
덴마크	<i>Listeria monocytogenes</i>	5
	<i>Listeria innocua</i>	3
	<i>Listeria welshimeri</i>	
벨기에	<i>Listeria monocytogenes</i>	2
	<i>Listeria welshimeri</i>	
중국	<i>Listeria monocytogenes</i>	10
	<i>Listeria innocua</i>	2
영국	<i>Listeria monocytogenes</i>	
	<i>Listeria innocua</i>	1
뉴질랜드	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
	<i>Listeria innocua</i>	1
한국	<i>Listeria monocytogenes</i>	45
	<i>Listeria innocua</i>	7
	<i>Listeria welshimeri</i>	
헝가리	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
	<i>Listeria innocua</i>	
프랑스	<i>Listeria monocytogenes</i>	2
	<i>Listeria innocua</i>	
태국	<i>Listeria monocytogenes</i>	2
네덜란드	<i>Listeria monocytogenes</i>	1
	<i>Listeria welshimeri</i>	
미분류 지역	<i>Listeria monocytogenes</i>	5
		1

제 6장 참고자료 및 문헌

Beumer, RR., Giffel, TE., Kok, MTC., Cox, LJ., Rombout, FM. 1995 A comparison of rapid methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. ISOPOL 12:53-56.

Bille J et al. 1989. Anatomy of a listeriosis outbreak. In: Foodborne listeriosis. Proceeding of a symposium: 29-36. Hamburg, B. Behr GmbH & Co.

Bubert, A., S. Koehler, W. Goebel. 1992. The homologous and heterologous regions within the iap gene allow genes- and species-specific identification of *Listeria spp.* by polymerase chain reaction. *Appl. Env. Microbiol.* 58:2625.

Bubert, A., W. Goebel, B.S. Yoon, 1995. Rapid species-specific identification of various *Listeria* strains by a single PCR containing 5 different primers. ISOPOL 12:492.

Cassiday, PK and Brackett, RE. 1989. Methods and media to isolate and enumerate *Listeria monocytogenes*, a review. *J. Food Prot.* 52, 599.

Curtis, G.D.W., R.G. Mitchell, A.F. King, E.J. Griffin. 1989. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Letters Appl. Microbiol.* 8:95.

Datta, AR., Benjamin, MA. 1995. Advances in nucleic acid-based techniques for detection of *Listeria monocytogenes*. ISOPOL 12:71-83.

Farber JM. 1993. Current research on *Listeria monocytogenes* in foods: an overview. *J Food Prot* 7, 640-643.

Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL et al. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N Engl J Med* 312, 404-407.

Fraser J. 1988. Rapid detection of *Listeria spp.* in food and environmental samples by esculin hydrolysis. *J Food Protec* 10, 762-765.

Gentschev, I., Z. Sokolovic, S. Koehler, G. F. Krohne, H. Hof, J. Wagner, W. Goebel. 1992. Identification of p60 antibodies in human sera and presentation of this listerial antigen on the surface of attenuated *Salmonella* by the HlyB-HlyD secretion system. *Infec. Immun.* 60:5091.

Gilbert, R. J., P. N. Pini. 1988. Listeriosis and food-borne transmission. *Lancet* 1:472.

Gray ML, Stafseth HJ, Thorp F et al. 1948. A new technique for isolating listerellae from the bovine brain. *J Bacteriol* 55, 471-476.

Hartman PA, Swaminathan B, Curiale MS et al. 1992. Rapid methods and automation. Chapter 39. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3ed. Vanderzant C, Splittstoesser DF (eds). *American Public Health Association*, 665-746.

Hitchins AD. 1992. *Listeria monocytogenes*. In: FDA Bacteriological Analytical Manual. 7ed, 141-151.

Inoue, S., T. Iida, T. Tanikawa, T. Maruyama, C. Morita. 1991. Isolation of *Listeria* from roof rats (*Rattus rattus*) in buildings in Tokyo. *J. Vet. Med. Sci.* 53, 521.

Inoue, S., T. Tanikawa, J. Kawaguchi, T. Iida, C. Morita. 1992. Prevalence of *Listeria* (spp.) in wild rats captured in the Kanto area of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 54:461.

Jun-Hong Park and Yoon-Kyu Lim. 1996. Enzyme Immunoassay for the sulfamethazine residues in pork Tissue. *J. Fd. Hyg. Safety*, 11(4), 287-290, KOSEF 961-0606-056-2.

Kim, C. M., L. M. Graves, B. Swaminathan, L. W. Mayer, R. E. Weaver. 1991a. Evaluation of hybridization characteristics of a cloned pRF106 probe for *Listeria monocytogenes* detection and development of a nonisotopic colony hybridization assay. *Appl. Env. Microbiol.* 57:289.

Kim, C. M., B. Swaminathan, P. Cassidy, L. W. Mayer, B. P. Holloway. 1991b. Rapid confirmation of *Listeria monocytogenes* isolation from foods by a colony blot

assay using a dioxigenin-labelled synthetic oligonucleotide probe. *Appl. Env. Microbiol.* 57:1609.

Kim, Chang-Min, Sung-Sik Yoon. 1993. Development of a chemiluminescent DNA probe assay for identifying of *Listeria monocytogenes*. *Food, Biotech.* 2:68.

Klinger, J.D. 1988. Isolation of *Listeria*: a review of procedures and future prospects. *Infection* 16: suppl.2, 98.

Kobubo, Y., T. Iida, S. Kaneko, T. Maruyama. 1990. Evaluation of enrichment and plating media for isolating *Listeria monocytogenes* from raw meat. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 31:51.

Linnan MJ, Mascola L, Lou XD et al. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Engl J Med* 319, 823-828.

Loessner, M. J., R.H. Bell, J.M. Jay, L.A. Shelef. 1988. Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria spp.* *App. environm. Microbiol.* 54:3003.

Lovett J, Francis DW, Hunt JM. 1987. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. *J Food Protect* 50, 188-192.

Low JC, Donache W. 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Vetr J* 153, 9-29.

Mattingly, J.A., B.T. Butman, M.C. Plank, R.J. Durham, B.J. Robinson. 1988. Rapid monoclonal antibody based enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Listeria* in food products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71:679.

McClain D, Lee WH. 1989 Method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from meat and poultry products. Laboratory Communication No. 57, revised May 24

Meer R, Park DL. 1995. Immunochemical detection methods for *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in foods. *Rev Environ Cont Toxicol* 142, 1-12.

- Molle, G. 1988. A plasmid extraction procedure on a miniprepscale. *Focus* 11:7.
- Murray, E.G.D., R.E. Webb, M.B.R. Swann. 1926. A disease of rabbits characterized by a large monocleular leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*(n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29:407.
- Nakane, P. K. and Kawaoi, A. : Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem.* 22, 1084-1091
- NF EN ISO 11290-1. 1997. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: detection method.
- Pini, P.N., R.J. Gilbert. 1988. The occurrence in the United Kingdom of *Listera* species in raw chickens and soft cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 6:317
- Rocourt J, Bille J. 1997. Foodborne listeriosis. *Wld Hlth Statist Quart* 50, 67-73.
- Saito, A., M. Tokumaru, H. Masaki, T. Itaya, A. Aoki. 1991. Evaluation of enrichment and plating media for the isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk and the state of contamination of raw milk by *Listeria*. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 44:378.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Purification of plasmid DNA. In: *Molecular cloning*. 2nd Ed. 1.2.0. CSH.
- Schwarz, B., 1988. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. *Lancet* 2:779
- Seeliger, H.P.R. 1988. Listeriosis-history and actual development. *Infection* 16:82.
- Selden, R.D. (Ed.), 1988. Removal of polysaccharides from existing genomic DNA preparations. In: *Current protocols in Molecular biology*. 2.4.2.
- Sizmur, K., C.W. Walker. 1988. *Listeria* in prepacked salads. *Lancet* 1:1167

Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi RA et al. 1983. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. *N Engl J Med* 308, 203-206.

Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 2, 169-183.

Swaminathan B. 1994. Rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 48, 401-426.

Takagi, K., K. Kishida, K. Koiwai, M. Uchimura, Y. Tsuruoka. 1989. Isolation of *Listeria monocytogenes* from commercial meats. *Ann. Rep. Public Health Lab. Chiba Prefec.* 13:1.

Takai, S., F. Orii, K. Yasuda, S. Inoue, S. Tsubaki. 1990. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk and its environment at dairy farms in Japan. *Microbiol. Immunol.* 34:631.

Terplan, G., R. Schoen, W. Springmeyer, I. Degle, H. Becker. 1986. Vorkommen, Verhalten und Bedeutung von Listerien in Milch und Milchprodukten. *Arch. Lebensmittelhyg.* 37:129.

van Netten P et al. 1989. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. *Int J Food Microbiol* 8, 299-316.

Wood, L and Woodbine, VM. 1979. Low temperature virulence of *Listeria monocytogenes* in the avian embryo. *Zentralbl. Bakteriolog. Hyg., Abt. Orig. A* 245, 74

Yoon, ByoungSu, HoJo Kang, Akiko Nakama, Andreas Bubert, Werner Goebel. 1996. Applications of multiplex PCR for the species-specific detection of *Listeria* strains. *Kor. Bas. Med. Sci.* 3:215-217.

강호조, 손원근, 이제용, 박종일. 1991. 동물유래 생식품, 사료 및 동물분변 중 *L. monocytogenes*의 분포와 분리균의 특성에 관한 연구 1. 원유, 우유, 계육 및 동물분변에서 *L. monocytogenes*의 분포. *한국수의공중보건학회지.* 15:231.

강호조, 손원근, 이제용, 박종일. 1992. 동물유래 생식품, 사료 및 동물분변 중 *L. monocytogenes*의 분포와 분리균의 특성에 관한 연구 2. 우체표 및 silage에서 *L. monocytogenes*의 분리. 한국수의공중보건학회지, 16:179.

강호조 손원근 김광식 등. 1993 동물유래 생식품, 사료 및 분변중 *Listeria monocytogenes*의 분포와 분리균의 특성에 관한 연구. 4. 초생추에 있어서 *Listeria monocytogenes*의 장관정착성. 한국수의공중보건학회지, 17(1), 45

강호조 이철현 손원근 김용환. 1995. 원유로부터 *Listeria monocytogenes*의 분리방법에 대한 비교시험. 한국수의공중보건학회지, 19(2), 131-138

김성희 임윤규. 1995. 잔류 sulfamethazine 검출용 ELISA 개발에 관한 실험적 연구. 한국식품위생. 안전성학회지, 10(4), 213-217.

김철규, 강태석, 김미경, 김재연, 임윤규. 1990. 실험동물의 바이러스성 질환의 진단액 제조에 관한 연구. I. 효소면역학적 방법에 의한 마우스 감염진단액 제조에 관한 연구. 국립보건안전원보, 3, 419-432.

손원근 강호조. 1995. 마우스에서 *Listeria monocytogenes*의 장관정착과 그 결정요인. III 장관정착에 미치는 요인시험. 한국수의공중보건학회지, 19(2), 155-1162.

손원근 강호조. 1995. 마우스에서 *Listeria monocytogenes*의 장관정착과 그 결정요인. I *Listeria monocytogenes*의 장관정착성. 한국수의공중보건학회지, 19(2), 138-148.

손원근 강호조 송근석 문운경 조성근. 1995. 마우스에서 *Listeria monocytogenes*의 장관정착과 그 결정요인. II 면역조직화학적 및 투과전자현미경적관찰. 한국수의공중보건학회지, 19(2), 149-154.

이용우, 김봉수, 이기홍, 김현경, 이영선, 박영진, 동미란, 한왕수. 1992. 한국에서 분리된 *Listeria*군속에 대한 세균학적 조사연구. 국립보건원보 29:49.

이우원, 강호조. 1992. Effects of preservatives on behavior of *Listeria monocytogenes*. 한국수의공중보건학회지, 16:185.

이제용 강호조. 1994. 가열손상된 *Listeria monocytogenes*의 회복을 위한 선택증균배지의 효과. 한국수의공중보건학회지, 18(1), 9.

임윤규, 이영순. 1988. ELISA법에 의한 센다이 바이러스 감염의 진단. 한국실험동물학회지, 4(1), 11-19.

임윤규 김성희 이경갑 김우택 김성훈 김영주 양재혁 박재학 이영순. 1996. 잔류 Sulfamethazine 검출을 위한 직접 및 간접 ELISA 방법의 연구. 한국수의공중보건학회지 20(3), (Kor. J. Vet. Publ. Hlth., 20 (3)).

임윤규 양기천 이경갑 박전홍 이두식 박용호 강승원 목지원 이영순. 1995. SDS 처리한 브루셀라 항원과 *Yersinia enterocolitica* 0:9주의 혈청학적 교차반응 연구. 대한수의학회지 35(1), 143-148.

임윤규 양기천 이경갑 박전홍 이영순. 1995. Affinity chromatography법을 이용한 Protein G-HRP 효소접합체의 정제. 한국수의공중보건학회지 19(4), 337-342.

임윤규 우희종 이영순. 1991. Protein G 효소면역반응법에 의한 Sendai Virus 항체 검출. 한국실험동물학회지. 7(2), 53-61.

임윤규 이두식 박전홍 양기천 김승호 김공식 현관종 김우택 이영순. 1993. 축우 브루셀라병의 ELISA 진단법에 관한 연구. 대한수의학회지, 33(1), 131-135.

윤병수. 1998. 분자생물학연구방법론. 86-390. 경기대학교 출판부.

윤병수, A. Bubert, W. Goebel. 1995. 단일 PCR (Polymerase Chain Reaction) 방법에 의한 *Listeria* 종의 빠른 동정법 및 그 응용에 관하여. 기초의학학술대회 초록집. 3: 409-412.

황호춘 조도현 임윤규. 1996. ELISA법을 이용한 정제백일해백신의 역가검정. 한국실험동물학회지 12(1), 135-139.