pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 1, pp. 21~27 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.1.21

**Journal of Food Hygiene and Safety**
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

# *Vibrio parahaemolyticus*에 대한 단클론성 항체 개발과 고감도 면역선택여과법의 개발

김정숙[1] · 최영동[2] · 심원보[1,3]*
[1]경상대학교 농업생명과학연구원, [2]경상대학교 응용생명과학부, [3]경상대학교 농화학식품공학과

# Production of Monoclonal Antibodies against *Vibrio parahaemolyticus* and Development of High Sensitive Immuno-Selective Filtration Method

Jeong-Sook Kim[1], Young-Dong Choi[2], and Won-Bo Shim[1,3]*
[1]*Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea*
[2]*Division of Applied Life Science, Graduate School, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea*
[3]*Department of Agricultural Chemistry and Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea*
(Received January 8, 2016/Revised January 19, 2016/Accepted January 25, 2016)

**ABSTRACT** - The objectives of this study are to produce monoclonal antibodies (MAbs) against *Vibrio parahaemolyticus* and to develop an immuno-selective filtration (ISF) method for the rapid and sensitive detection of *V. parahaemolyticus*. The characterization of the MAb produced from HKVP 4H9-9 hybridoma cell was validated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and western blot. The produced MAb was specific to *V. parahaemolyticus* and showed weak cross-reaction to *V. alginolyticus, V. vulnificus* and *Staphylococcus aureus.* After optimization of the method, $5 \times 10^1$ cell/mL of *V. parahaemolyticus* in a pure culture could be detectable. Although weak cross-reactivity to *V. vulnificus, V. alginolyticus* and *Staphylococcus aureus* was observed, the ISF was confirmed to be highly specific to *V. parahaemolyticus*. Especially, the ISF showed the most sensitivity compared to the immunoassays currently reported is easier to perform and quicker than ID-ELISA.

**Key words :** *Vibrio parahaemolyticus*, monoclonal antibody, ELISA, immuno-selective filtration

*Vibrio parahaemolyticus*는 우리나라에서 뿐만 아니라 국외에서도 식중독을 일으키는 주요 원인균으로[1,2], 최적 생장 조건 하에서의 세대시간이 *Escherichia coli*나 *Staphylococcus aureus*보다 훨씬 짧은 10분 정도로 단시간(3~4시간)에 식중독을 일으킬 수 있는 균체 수(약 10만~1,000만 개)로 급격히 증식할 수 있다[3,4].

식품의약품안전처에서 발표한 우리나라의 연도/원인균별 식중독 발생현황을 보면 *V. parahaemolyticus*의 발생건수가 2007년에 최고점을 찍은 후 점차 줄어드는 추세이긴 하나, 다른 식중독균인 *S. aureus*와 비슷한 발생 건수를 나타내고 있다[5]. *V. parahaemolyticus*는 생선, 조개, 오징어 등의 표피, 아가미, 내장 등에 주로 존재하며, 조리과정에서 충분히 제거되지 못하거나, 칼, 도마, 행주 등의 조리도구를 통해 음식으로 오염되어 식중독을 일으킨다[6].

국내의 1인당 연간 수산물 소비량은 2001년 42.2 kg에서 2013년에 53.8 kg으로 지속적으로 증가 추세에 있다. 또한 1인 1일당 어패류 소비량(2011년도 기준)도 국내는 159 g으로 일본 147 g, 중국 90 g, 프랑스 95 g, 뉴질랜드 71 g, 노르웨이 146 g, 스페인 116 g, 미국 59 g과 비교 시 높은 수준에 해당 된다[7]. 이와 같이 소비량이 높은 만큼 수산물과 관련된 식품안전사고에 대한 대책마련이 필요하며, 그 중의 하나가 현장에서 신속하게 검출할 수 있는 검사방법의 개발이다.

*V. parahaemolyticus*의 신속 분석을 위해 개발된 검사방법으로 특이 단클론성 항체를 이용한 효소면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)[8,9]과 면역크로마토그래피법(Immunochromatograhy; ICG)[10,11] 등의 면역분석법이 있다. 이들 분석법은 기존의 선택배지법, 생화학적 분석법 및 polymerase chain reaction (PCR)법 등에

*Correspondence to: Won-Bo Shim, Department of Agricultural Chemistry and Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea
Tel: 82-55-772-1902, Fax: 82-55-772-1909
E-mail: wbshim@gnu.ac.kr

비해 분석 시간이 절약되고 특정 장비 없이 현장에서도 분석이 가능한 장점이 있어 지속적으로 연구되어 오고 있다. 하지만 식품에 적용 시 단백질이나 지방 성분 등에 의한 방해 작용이 존재할 가능성이 높고, 민감도가 낮다는 단점이 있다[10,12,13]. 분석법에 있어 민감도는 중요한 요건으로 ELISA법과 ICG법의 낮은 민감도를 개선하기 위해 최근에는 면역자석입자분리법(Immuno-magnetic separation; IMS)[14]의 원리를 응용한 면역선택여과법(Immuno-selective filtration; ISF)에 대한 연구가 이루어지고 있다. ISF법은 magnetic bead에 항체를 결합시켜 자성을 이용해 시료속의 목표균을 회수한 다음 최종단계에서 배지에 도말하는 대신 감압장치를 이용해 membrane filter를 통과 후 나타나는 spot signal 형성 유무로 결과를 확인하는 방법이다. 이 분석법은 분석시간이 짧고 측정감도가 높아 최근 식중독균의 빠른 검출에 이용되고 있다[15,16]. 따라서 본 연구에서는 *V. parahaemolyticus*에 대한 특이 단클론성 항체를 개발하여 일반적인 ELISA법을 개발하고, ELISA법의 낮은 민감도를 보완할 수 있는 ISF법을 개발하였다.

## Materials and Methods

### 균주 및 배지

본 연구를 위해 *Vibrio*속 균주는 *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802), *V. vulnificus* (KCTC 2959), *V. alginolyticus* (KCCM 40513), *V. cincinnatiensis* (KCCM 41683), *V. fluvialis* (KCCM 40287) 및 *V. mimicus* (KCCM 42257)를 사용하였고, 주요 식중독균 균주는 *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 14458), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Bacillus cereus* (ATCC 40136) 및 *Salmonella* Typhimurium (ATCC 19586) 등을 사용하였다. 이상의 균주들을 배양하기 위한 배지로는 trypic soy agar (TSA, Difco, Laboratories, Detroit, MI, USA) 및 tryptic soy broth (TSB, Difco)를 사용하였고, *Vibrio* 속 균주 배양 시에는 2% NaCl을 첨가하여 사용하였다.

### 면역항원 준비

*V. parahaemolyticus*에 대한 단클론성 항체를 개발하기 위해 heat killed *V. parahaemolyticus* (HKVP)를 면역원으로 사용하였다. HKVP는 류 등[13]의 방법에 따라 다음과 같이 준비하였다. 먼저 *V. parahaemolyticus*를 2% NaCl이 첨가된 TSB 500 mL에 접종하여 37°C에서 18시간 진탕배양한 후 100°C에서 1시간 동안 열처리하여 하였다. 열처리된 HKVP를 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 멸균 0.05 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.8)으로 3회 원심수세 하였으며, 세척된 각 균체는 멸균 PBS를 이용하여 $1 \times 10^9$ cell/mL로 조정한 후 −70°C에 보관하면서 면역원 및 항원으로 사용하였다.

### 단클론성 항체 생산

준비된 항원인 HKVP를 complete freund's adjuvant (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 1:1(v/v)로 유화시켜 생후 7주된 암컷 BALB/C mouse (Hyochang Science, Korea)에 마리당 $1 \times 10^8$ cell/200 μL씩 복강에 주입하여 1차 면역을 실시하였다. 1차 면역 후 2주 간격으로 1차 면역과 동일한 면역원을 incomplete freund's adjuvant와 동량 혼합하여 2회 추가 면역을 실시하였고, 세포융합 4일 전에 2배 정도의 면역원만을 복강 내 주사하여 최종 면역시켰다. 최종 면역 후 mouse의 꼬리 정맥에서 5 μL의 혈청을 채취하여 효소면역분석법으로 항체의 역가를 측정하였다. 그 중 높은 역가를 갖는 mouse로부터 spleen cell를 분리한 후 myeloma cell (Sp2/0-Ag14)을 사용하여 Kohler and Milstein[17]의 방법으로 세포융합을 실시하였고, McKearn 등[18]의 무한대 희석법으로 cloning을 실시하여 단일클론의 hybridoma cell을 획득하였다. 획득한 hybridoma cell 중 특이성이 높은 항체를 생산하는 cell을 선택하기 위해 western blot으로 *Vibrio* 속 균주인 *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus, V. alginolyticus, V. cincinnatiensis, V. fluvialis, V. mimicus*와 주요 식중독균인 *E. coli, S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus, Sal.* Typhimurium 과의 교차반응성을 확인한 후 *V. parahaemolyticus*에 대한 특이성이 높은 hybridoma cell을 선택하였다. 선택된 hybridoma cell은 대량 배양한 후 mouse의 복강에 $1 \times 10^7$ cell/200 μL를 주입하여 복수액을 생산하였으며, 1주일 후 생산된 복수액을 채취하여 ammonium sulfate 침전법으로 정제한 후, PBS를 이용하여 3일 동안 투석하였다. 정제된 항체들을 1 mg/mL의 농도가 되도록 조정한 후 동결 건조하여 −20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 간접효소면역분석법(Indirect Enzyme-linked immunosorbent assay: ID-ELISA)

생산된 단클론성 항체를 이용하여 *V. parahaemolyticus* 분석을 위한 최적의 ID-ELISA법을 다음과 같이 확립하였다. 즉, HKVP를 0.1 M carbonate buffer (pH 9.4)로 $10^8$-$10^1$ cell/100 μL 농도 범위로 희석하여 96-well microplate (Nunc Inc., Roskilde, Denmark)에 분주한 후 4°C에서 12시간 동안 코팅시킨 다음 PBS-0.05% Tween 20 (PBST, pH 7.4)으로 3회 세척하였다. 비특이적인 반응을 방지하기 위해 1% BSA로 37°C에서 1시간 동안 blocking (200 μL/well) 시킨 후 PBST로 well을 4회 세척하였다. 세척된 well에 *V. parahaemolyticus* MAb를 PBS buffer로 1/500배 희석하여 100 μL씩 분주하고, 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 PBST로 5회 세척하였다. 이후 goat anti-mouse IgG-HRP (Sigma)를 1/1000배 희석하여 100 μL씩 세척된 well에 분주하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBST로 6회 세척하고, 마지막으로 기질용액인 2,2'-azino-di-3-ethyl-

benzthiazoline-sulfonate (ABTS, Sigma)를 각 well에 100 μL씩 첨가하여 37°C에서 30분 반응시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 또한 개발된 ID-ELISA법의 특이성을 확인하기 위해 *V. parahaemolyticus*를 비롯한 *V. vulnificus, V. alginolyticus, V. cincinnatiensis, V. fluvialis, V. mimicus* 등의 *Vibrio* 속 균과 주요 식중독 균인 *E. coli, B. cereus, S. aureus, Sal.* Typhimurium, *L. monocytogenes* 등과의 교차반응 여부를 확인하였다.

### 면역선택여과법(Immuno-selective filtration: ISF)의 확립

ISF법은 magnetic nanoparticle(MNP)-MAb 복합물을 이용하여 target 물질을 검출하는 방법으로 분석법의 확립에 앞서 MNP-MAb 복합물을 다음과 같이 합성하였다. 먼저 0.15 mL의 3차 증류수에 10 mg의 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC, Thermo Fisher Scientfic Inc., Rockford, IL, USA)를 녹인 용액을 magnetic nanoparticle (Chemicell Inc., Berlin, Germany) 10 mg에 첨가하여 혼합하였다. 혼합액에 NAb™ Protein G Spin Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Meridian, Rockford, USA)를 이용하여 2차 정제한 *V. parahaemolyticus* MAb를 50 μg 첨가한 후 2시간 동안 실온에서 교반 반응시켜 MNP-MAb 복합물을 합성하였다. 합성된 MNP-MAb 복합물은 magnetic particle concentrator (Invitrogen Inc., Grand Island, NY, USA)를 이용하여 분리한 후 1 mL의 PBS로 3회 세척하였다. 이렇게 합성된 MNP-MAb 복합물을 이용하여 다음과 같이 ISF법을 확립하였다. 즉, PBS (containing 1% BSA) buffer로 10배 희석한 MNP-MAb 복합물 10 μL를 $10^6$-$10^1$ cell/200 μL로 준비한 각 시료에 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 magnetic particle concentrator를 이용해 MNP-MAb 복합물을 회수하였다. 회수한 MNP-MAb 복합물은 멸균된 PBS로 2회 세척하고 membrane에 분주 후 감압장치를 이용해 filtration시켜 membrane 상의 spot signal 형성 유무를 확인하였고(Fig. 1), Image J 프로그램(Java image processing program)을 이용하여 spot signal insensity를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. ELISA법과 마찬가지로 확립된 분석법의 특이성을 확인하기 위해 *V. parahaemolyticus*를 비롯한 *V. vulnificus, V. alginolyticus, V. cincinnatiensis, V. fluvialis, V. mimicus*등의 *Vibrio* 속 균과 주요 식중독 균인 *E. coli, B. cereus, S. aureus, Sal.* Typhimurium, *L. monocytogenes* 등과의 교차반응성을 확인하였다.

## Results and Discussion

### 단클론성 항체 생산 및 반응성 확인

HKVP와 FKVP를 면역원으로 하여 면역시킨 mouse 중 HKVP로 면역시킨 마우스에서 항체 생성역가가 대체적으로 높았으며(data not shown), 이들 마우스의 spleen cell을 이용하여 세포융합을 실시한 결과 총 13종의 융합세포를 획득하였고, 이들을 cloning하여 총 22종의 hybridoma cell을 획득하였다. 그 중에서 *V. parahaemolyticus*에 대해 특이성이 높은 hybridoma cell을 선택하기 위해 western blot을 이용하여 *Vibrio*속 및 다른 식중독균과의 교차반응성을 확인하였다. 그 결과 목표균에 높은 항체역가를 나타내는 HKVP 4H9-9와 16번 hybridoma cell을 선택하였고 western blot을 통해 특이성을 확인하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 HKVP 4H9-9번 항체의 경우 *Vibrio*속에 대해서는 *V. vulnificus* 및 *V. alginolyticus*와 약한 반응을 보였고, 다른

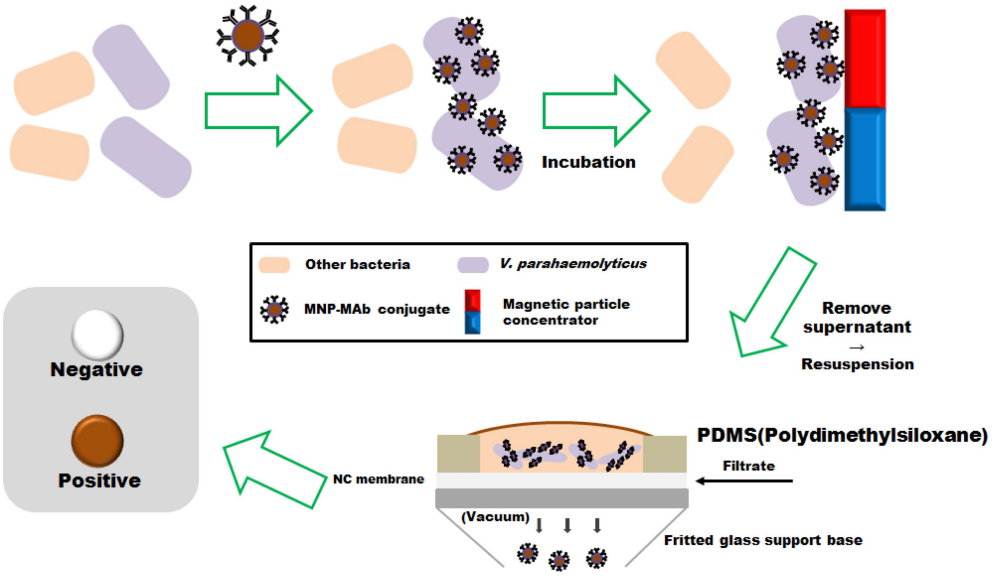


**Fig. 1.** Schematic diagram of an immuno-selective filtration for *Vibrio parahaemolyticus*.

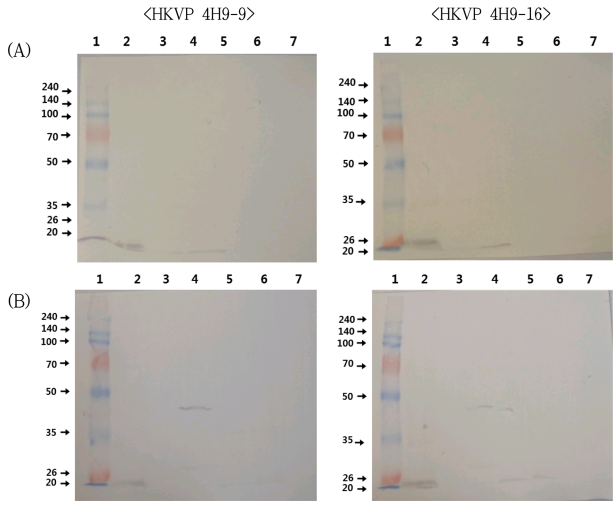


**Fig. 2.** Characterization of monoclonal antibodies produced from cloned cells by Western blot. (A) Lane 1: Marker, 1ane 2: *Vibrio parahaemolyticus*, 1ane 3: *V. vulnificus*, 1ane 4: *V. alginolyticus*, 1ane 5: *V. cincinnatiensis*, 1ane 6: *V. fluvialis*, 1ane 7: *V. mimicus.* (B) Lane 1: Marker, lane 2: *V. parahaemolyticus*, lane 3: *Bacillus cereus*, lane 4: *Staphylococcus aureus*, lane 5: *Escherichia coli*, lane 6: *Salmonella* Typhimurium, lane 7: *Listeria monocytogenes.*

식중독균은 *S. aureus*에만 교차반응을 보였다. 반면 HKVP 4H9-16번 항체의 경우 *Vibrio*속은 *V. alginolyticus*에만 약한 반응을 보였으나, 다른 식중독균은 *S. aureus* 외에도 *E. coli*와 *Sal.* Typhimurium에도 교차반응을 나타내는 것으로 확인되었다. Ryu 등[13]의 연구에서도 *E. coli* O157:H7에 대한 특이 단클론성 항체가 *S. aureus*에 반응하는 것으로 확인되었고, Siragusa와 Johnson[19]은 대부분의 진단용 항체가 *S. aureus*가 세포벽에 발현시키는 protein A 단백질과 친화성이 높은 IgG 항체타입 이므로 교차반응을 나타낸다고 보고하고 있어 개발된 항체의 *S. aureus*에 대한 교차반응은 우려할 만한 문제는 아니라고 판단된다. 따라서 *Vibrio* 속과는 교차반응 정도가 비교적 높지만 식중독 균과는 교차반응을 거의 하지 않는 HKVP 4H9-9번 hybridoma cell을 선택하여 mouse 복강에 주입한 후 복수액을 대량 생산하였고, ammonium sulfate 침전법으로 정제하여 *V. parahaemolyticus*에 특이적인 단클론성 항체를 생산하였다.

### 간접효소면역분석법(ID-ELISA)

생산된 HKVP 4H9-9 항체를 사용하여 *V. parahaemolyticus*를 분석하기 위해 개발된 ID-ELISA법의 표준곡선은 Fig. 3과 같았으며, $10^6$ cell/mL까지 검출이 가능한 것으로 확인되었다. 또한, 개발된 ID-ELISA법의 다른 *Vibrio*속 균에 대한 교차반응성을 확인한 결과 *V. alginolyticus*와 교차반응성이 높은 것으로 확인되었고, $10^7$ cell/mL 이상의 농도에서는 *V. vulnificus, V. fluvialis* 및 *V. mimicus*와도 약한 교차반응성을 보였다(Fig. 4A). 높은 농도에서의 교차반응

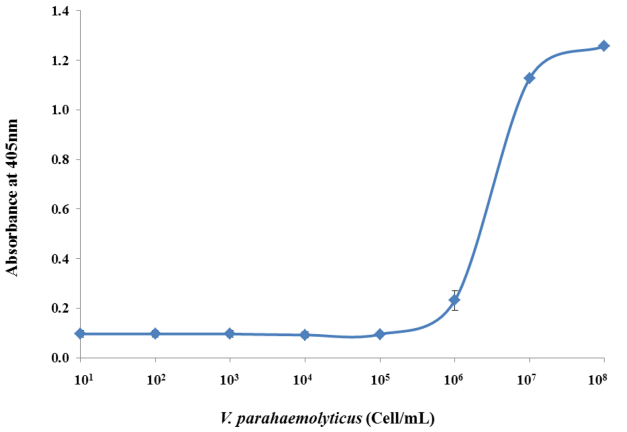


**Fig. 3.** Standard curve for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method.

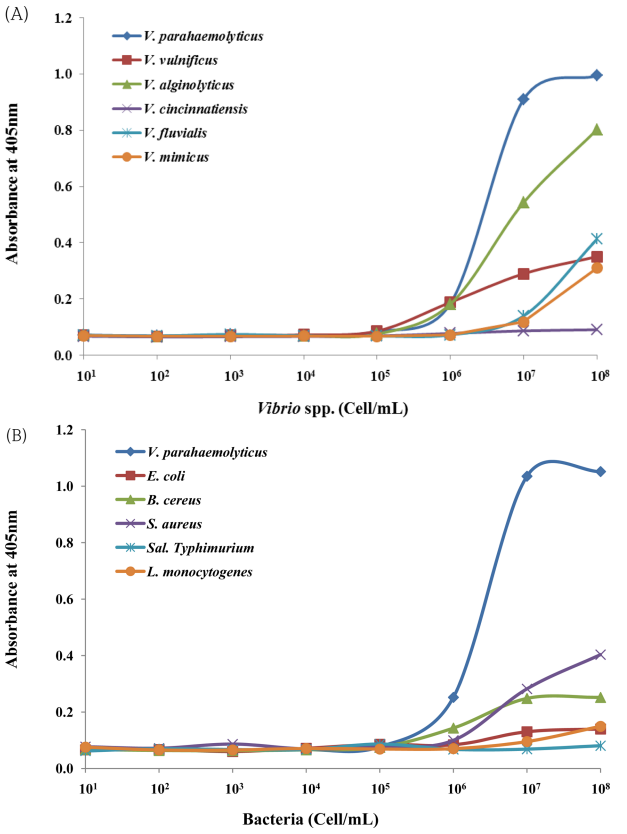


**Fig. 4.** Specificity study by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method with *Vibrio* spp. (A) and other food pathogens (B) in PBS.

은 항원-항체의 비특이적인 반응에 의한 것이라 생각되며, 특히 *V. alginolyticus*는 *V. parahaemolyticus*와 생리학적 및 화학적 특성이 매우 유사하기 때문에[20] 교차반응성이 높게 나타난 것으로 판단된다. 다른 식중독균에 대한 교차반응성을 확인한 결과 *S. aureus*와 약한 교차반응성을 나타내었다(Fig. 4B). *S. aureus*는 앞서 단클론성 항체생산

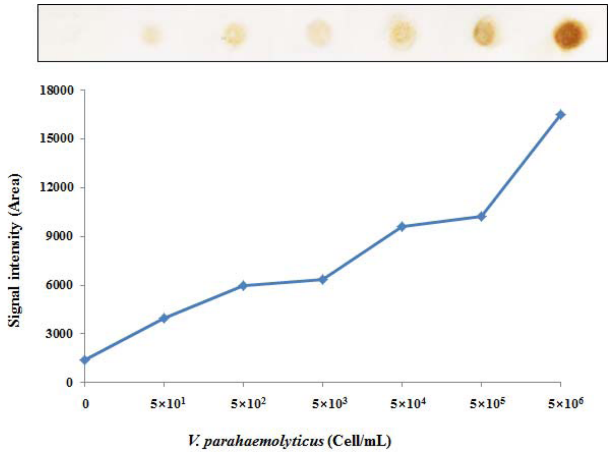


**Fig. 5.** Standard curve for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* by immuno-selective filtration method.

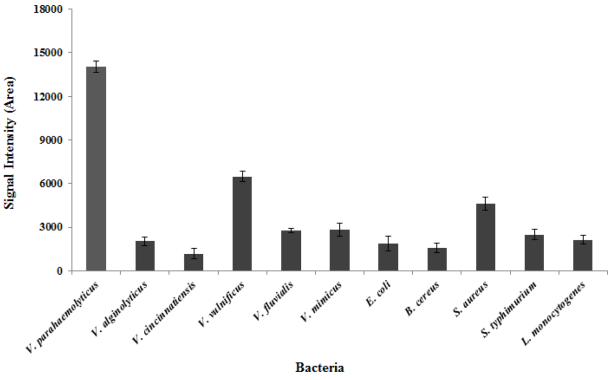


**Fig. 6.** Specificity study by the immuno-selective filtration method with *Vibrio* spp. and other food pathogens at $10^6$ cells in PBS (containing 1% BSA).

결과에서 설명한 바와 같이 세포벽에 발현되는 protein A와 IgG 타입의 단클론성 항체가 반응하기 때문인 것으로 생각된다. 본 연구에서 개발된 ID-ELISA법은 일부 *Vibrio* 속 및 *S. aureus*와 교차반응성을 나타내지만 *V. parahaemolyticus*에 보다 강한 반응을 나타내기 때문에 시료 속에 *V. parahaemolyticus*나 *Vibrio* 속을 효과적으로 분석할 수 있는 분석법인 것으로 판단된다.

### 면역선택여과법(ISF)

Shim등[16]의 연구에서 ISF법의 경우 ELISA법 보다 민감도 측면에서 ISF의 민감도가 매우 향상된 것이 보고되었기 때문에 본 연구에서도 ID-ELISA의 낮은 민감도를 보완하여 고감도로 *V. parahaemolyticus*를 분석하기 위해 ISF법을 개발하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 $5 \times 10^1$ cell/mL까지 검출이 가능한 고감도 분석법으로 확인되었다. 또한, 교차반응성을 확인한 결과 *Vibrio*속 균에 대해서는 ID-ELISA법과는 달리 *V. vulnificus*와 교차반응성이 있는 것으로 확인되었고, 다른 식중독균에 대해서는 ID-ELISA법과 동일하게 *S. aureus*와 약한 교차반응성을 나타내었다(Fig. 6). 일부 *Vibrio*속과 *S. aureus*에 교차반응성을 나타내기는 하나 ID-ELISA법과 마찬가지로 *V. parahaemolyticus*에 강한 반응을 하기 때문에 시료 속에 존재하는 *V. parahaemolyticus*의 분석에 효과적으로 사용할 수 있는 분석법이라 판단된다.

### 간접효소면역분석법과 면역선택여과법의 비교

개발된 ISF법과 ID-ELISA법에 대해 민감도와 특이성, 소요시간, 실험에 사용되는 분석과정 등을 비교 분석하였다. 개발된 ISF법과 ID-ELISA법의 검출한계는 각각 $5 \times 10^1$ cell/mL과 $10^6$ cell/mL로 ISF법의 민감도가 매우 높은 것으로 확인되었다. 그리고 두 분석법 모두 일부 *Vibrio* spp. (ID-ELISA법: *V. alginolyticus*, ISF법: *V. vulnificus*)과 *S. aureus*에 교차반응을 보이지만 *V. parahaemolyticus*에 반응성이 강하기 때문에 특이성은 높은 것으로 판단된다. 분석에 소요되는 시간은 ELISA법의 경우 96 well을 코팅하는 단계부터 결과를 확인하기까지 총 16시간이 소요되는 반면, ISF법은 MNP-MAb conjugate와 균을 반응시키는 30분을 포함하여 1시간 이내에 분석을 완료할 수 있는 것으로 확인되었다. 분석과정 또한 ELISA법은 세척단계를 포함하여 9단계의 과정을 거쳐야 하지만 ISF법은 세척단계를 포함하여 3단계의 과정을 통해 분석결과를 확인할 수 있고, 분석소요시간 내에 처리할 수 있는 시료양은 두 분

**Table 1.** Analytical parameters of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immuno-selective filtration (ISF)

| Analytical parameter | ELISA | ISF |
|---|---|---|
| Marker | Anti-mouse IgG-HRP conjugate | MNP-MAb conjugate |
| Detection limit (cell/mL) in buffer | $10^6$ | $5 \times 10^1$ |
| Dynamic range (cell/mL) | $10^8$-$10^6$ | $5 \times 10^6$ - $5 \times 10^1$ |
| Specificity | Cross-reaction to *V. alginolyticus* & *S. aureus* | Cross-reaction to *V. vulnificus* & *S. aureus* |
| Assay steps | 9 | 3 |
| Assay time | 16 h | 1 h |
| Sample throughput in assay time | A few hundred samples | A few hundred samples |

석법 모두 다수의 시료를 분석할 수 있는 것으로 평가되었다(Table 1). 이상의 결과 민감도와 소요시간, 분석과정 등 모든 면에서 ISF법이 ID-ELISA법 보다 효율성이 뛰어나고 신속하게 *V. parahaemolyticus*를 검출할 수 있는 분석법인 것으로 판단된다.

또한 최근 개발되어진 *V. parahaemolyticus* 검출용 면역분석법의 검출한계와 비교해 보면 Guo 등[10]의 연구에서는 $10^5$ cfu/mL, Zhong등[21]의 연구에서는 $2.5 \times 10^4$ cfu/mL, Liu 등[22]의 연구에서는 $1.58 \times 10^2$ cfu/g 까지 검출이 가능한 것으로 보고하고 있어, 본 연구에서 개발된 ISF법은 수산물이나 수산물 환경에 오염/존재하는 *V. parahaemolyticus*을 신속하고 고감도로 분석하는데 유용할 것으로 확인되었다.

## Acknowledgement

이 논문은 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(수산물 유해미생물 신속분리기술과 등온비색 PCR 기반 확립).

## 국문요약

본 연구에서는 *V. parahaemolyticus*를 신속정확하게 고감도로 검출하기 위해 단클론성 항체를 개발하고 이를 이용하여 일반적인 효소면역분석법(ELISA)과 효소면역분석법의 낮은 민감도를 보완할 수 있는 면역선택여과법(ISF)을 개발하여 민감도 및 효율성을 비교분석 하였다. 먼저 heat killed *V. parahaemolyticus* (HKVP)를 준비하여 7주령 BALB/c mouse에 면역한 후 세포융합 및 클로닝을 통해 HKVP 4H9-9번 및 16번 2종의 hybridoma cell을 확보하였다. Western blot을 통해 보다 특이성이 높은 것으로 확인된 HKVP 4H9-9번 항체를 대량 생산정제하여 분석법을 확립한 결과 검출한계가 ID-ELISA법은 $10^6$ cell/mL, ISF법은 $5 \times 10^1$ cell/mL로 나타나 ISF법의 민감도가 매우 높은 것으로 확인되었다. 분석효율성은 ID-ELISA법의 경우 분석을 위해 9단계의 과정을 거쳐 총 16시간의 분석시간이 소요된 반면, ISF법의 경우 3단계의 과정을 거쳐 1시간 이내에 분석을 완료할 수 있는 것으로 확인되었다. 교차반응성의 경우 두 분석법 모두 일부 *Vibrio* spp. (ID-ELISA법: *V. alginolyticus*, ISF법: *V. vulnificus*)과 *S. aureus*에 반응성이 있는 것으로 확인되었지만 *V. parahaemolyticus*에 보다 강한 반응성을 나타내었기 때문에 *V. parahaemolyticus*에 특이적인 분석법인 것으로 확인되었다. 특히 ISF법은 ELISA법 보다 민감도가 높고 분석에 소요되는 시간도 짧아 *V. parahaemolyticus*를 신속하게 분석하는데 활용이 가능할 것으로 판단된다.

## References

1. Joseph, S.W., Colwell, R.R. and Kaper, J.B.: *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. *Crit. Rev. Microbiol*. **10**, 77-123 (1983).
2. Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McGaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. and Tauxe, R.V.: Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis*. **5**, 607-625 (1999).
3. Han, A,R., Yoon, Y.J. and Kim, J.W.: Antibiotic resistance and plasmid profile of *Vibrio parahaemolyticus s*trains isolated from Kyunggi-Incheon coastal area. *Kor. J. Microbiol*. **48**, 22-28 (2012).
4. Martinez, J.L. and Baquero, F.: Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1771-1777 (2000).
5. Available from http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoning Stat.do?menu_no=519&menu_grp=MENU_GRP02, Accessed Nov. 12 (2015).
6. Available from http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=675&seq=28027&cmd=v, Accessed Nov. 12 (2015).
7. Available from http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=13 17, Accessed Nov. 12 (2015).
8. Chen, C.H. and Chang, T.C.: An enzyme-linked immunosorbent assay for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Prot.* **8**, 873-878 (1995).
9. Kumar, B.K., Raghunath, P., Devegowda, D., Deekshit, V.K., Venugopal, M.N. and Karunasagar, I.: Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Int. J. Food Microbiol.* **145**, 244-249 (2011).
10. Guo, A., Sheng, H., Zhang, M., Wu, R. and Xie, J.: Development and evaluation of a colloidal gold immunochromatography strip for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food. *J. Food Qual.* **35**, 366-371 (2012).
11. Kawatsu, K., Ishibashi, M. and Tsukamoto, T: Development and evaluation of a rapid, simple, and sensitive immunochromatographic assay to detect thermostable direct hemolysin produced by *Vibrio parahaemolyticus* in enrichment cultures of stool specimens. *J. Clin. Microbiol*. **44**, 1821-1827 (2006).
12. Shim, W.B., Choi, J.G., Kim, J.Y., Yang, Z.Y., Lee, K.H., Kim, M.G., Ha, S.D., Kim, K.S., Kim K.Y., Kim, C.H., Ha, K.S., Eremin, S.A. and Chung, D.H.: Production of monoclonal antibody against *Listeria monocytogenes* and its application to immunochromatography strip test. *J. Microbiol. Biotechnol*. **17**, 1152-1161 (2007),
13. Ryu, H.J., Kim, J.S., Kim, K.Y., Nam, B.R., Nam, M.J., Shim, W.B., Kim, N.S., Cho, Y.J. and Chung, D.H.: Production of monoclonal antibody against *Escherichia coli* O157:H7 and development of enzyme linked immunosorbent assay. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**, 329-334 (2010).
14. Liu, Y., Che, Y. and Li, Y.: Rapid detection of *Salmonella typhimurium* using immunomagnetic separation and immuno-

optical sensing method. *Sens. Actuator B-Chem.* **72**, 214-218 (2001).
15. Sung, Y.J., Suk, H.J., Sung, H.Y., Li, T. Poo, H. and Kim, M.G.: Novel antibody/gold nanoparticle/magnetic nanoparticle nanocomposites for immunomagnetic separation and rapid colorimetric detection of *Staphylococcus aureus* in milk. *Biosens. Bioelectron.* **43**, 432-439 (2013).
16. Shim, W.B. Song, J.E. Mun, H.Y., Chung, D.H. and Kim, M.G.: Rapid colorimetric detection of *Salmonella typhimurium* using a selective filtration technique combined with antibody-magnetic nanoparticle nanocomposites. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 859-866 (2014).
17. Kohler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells producing antibody of predefined specificity. *Nature*. **256**, 495-501 (1975).
18. McKearn, T.J., Weiss, A., Stuart, F.P. and Fitch, F.W.: Selective suppression of humoral and cell-mediated immune responses to rat alloantigens by monoclonal antibodies produced by hybridoma cell lines. *Transplant P.* **11**, 932-935 (1979).
19. Siragusa, G.R. and Johnson, M.G.: Monoclonal antibody specific for *Listeria monocytogenes, Listeria innocua, Listeria welshimeri*. *Appl. Environ. Microb.* **56**, 1897-1904 (1990).
20. Sakazaki, R.: Propsal of *Vibrio alginolyticus* for the biotype 2 of *Vibrio parahaemolyticus*. *Japan. J Med. Sci. Biol.* **21**, 359-362 (1968).
21. Zhong, Q., Dong, Y., Wang, L. and He B.: Development of IgY-based sandwich enzyme linked immunosorbent assay for the detection of *Vibrio parahaemolyticus.* In Information Technology and Agricultural Engineering. Springer Berlin Heidelberg, pp. 517-524 (2012).
22. Liu, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Zhao, Y., Lu, Y., Xu, X., Yan, J. and Pan, Y.: A highly sensitive and flexible magnetic nanoprobe labeled immunochromatographic assay platform for pathogen *Vibrio parahaemolyticus. Int. J. Food Microbiol.* **211**, 109-116 (2015).