J. Fd Hyg. Safety 13(3), 206 - 212(1998)

고정화법을 달리하여 제조한 압전류적 항체센서에 의한 *Salmonella* spp.의 신속 검출

박인선 · 김우연* · 김남수†
*한국식품개발연구원, *중앙대학교 생물공학과*

Rapid Detection of *Salmonella* spp. by Antibody-Immobilized Piezoelectric Crystal Biosensor

In-Seon Park, Woo-Yeon Kim* and Namsoo Kim†
Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea
**Dept. of Biotechnology, Choong-Ang University, Ansung 456-756, Korea*

ABSTRACT—An improved antibody-coated sensor system based on quartz crystal microbalance was developed for the detection of *Salmonella* spp. An antibody against *Salmonella* common structural antigen was immobilized onto one gold electrode of the piezoelectric quartz crystal surface by various immobilization procedures. The best results in sensitivity and stability were obtained with the thin layers of protein A and 3,3'-dithiopropionimidate · 2HCl (DTBP), a homobifunctional thiol-cleavable crosslinker. After the addition of a *S. typhimurium* suspension into a reaction cell with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, the resonant frequency owing to *S. typhimurium* adsorption decreased conspicuously. The antibody-immobilized crystals prepared by the gold-protein A complex formation and DTBP thiolation showed the frequency shifts of 80 and 283 Hz, respectively. The time required for maximum frequency shift was about 30~60 min. The antibody-coated crystal could be reused for 6~8 consecutive assays.

Key words □ Antibody-coated sensor, Quartz crystal microbalance, Gold-protein A complex formation, DTBP thiolation, Rapid detection, *Salmonella* spp.

식품 중에서 식중독균을 신속히 검출할 수 있는 기술개발은 국민 보건상의 건전성 확보를 위하여 매우 시급한 과제로서 수입식품의 급증, 국내식품의 오염 가능성 증가 등에 따라 최근 연구수요가 급증하고 있다. 미국의 경우 1993년 *Escherichia coli* O:157:H7에 의한 식중독 발생 이후 육류 및 가금류 가공공장에서 위해요소중점관리기준(HACCP)을 적용할 것을 권유하여 매일 *Salmonella* 등의 검사가 행해지고 있는 실정이다.[1,2] 우리나라에서도 1997년에 수입육류 및 아이스크림에서 *Salmonella*와 *Listeria*균이 발견되어 사회문제화된 바 있다. 이와 같은 전례에 미루어 보더라도 식중독 발생 시 나타날 국민 보건상에 미치는 위해 가능성과 경제 · 사회적인 영향은 매우 심대할 것으로 예상되며, 이의 예방에 기여할 수 있는 식중독균 신속 검출 기술은 시급히 정립되어야 할 과제 중의 하나이다. 최근 미생물을 검출하는 방법으로 면역학적 특성, 핵산중합법, 발광, 대사열 및 전기전도도 변화 등을 이용한 신속 검출법이 선진국을 중심으로 하여 연구되고 있다.[3] 현재 국내에서의 미생물 검출은 4~5일 정도의 기간이 소요되고 처리과정도 비교적 복잡한 배양법에 주로 의존하고 있으며, 아울러 배지조성을 최적화하여 선택성을 높이는 연구가 이루어지고 있다.[4-6] 그러나, *Salmonella, Listeria*와 같은 식중독균은 부패한 채소, 농축수산물, 각종 저장식품, 식품제조공정 등을 통하여 인체에 감염되면 72시간 정도 경과후 집단 식중독을 일으킬 수 있으므로[7] 4~5일이 소요되는 기존의 배양법을 이용하는 것보다 식중독균을 조기에 검출할 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다. 최근 미생물을 검출하는 한 방법으로서 바이오센서에 의한 식중독균 검출법은 그 중요성이 점증하여 활발한 연구가 이루어지고 있는 분야이다.[8-10] 바이오센서는 전극 표면 위에 고정화된 생물요소와 계측대상물질 또는 미생물간의 선택적 특이반응 결과에 의해 나타나

† Author to whom correspondence should be addressed.

는 전류, 빛, 질량변화 및 발열량 등의 차이를 검출기에 의하여 감지하고 이를 특정한 신호로 표시하는 장치로서 선택적이고 신속한 신호처리가 가능하여 식품 및 의료분야 등에 응용 가능성이 높은 분석장치이다.[11] 바이오센서기법에 의한 식중독균의 검출기술의 하나로 최근 항체와 DNA probe를 이용하는 압전류적(piezoelectric, PZ) 바이오센서가 개발되고 있는데, 이의 원리는 AT-cut 수정결정(예로 9 MHz의 고유진동수 보유)을 가공한 PZ 결정에 앞서 언급한 생물요소를 고정화하고 여기에 식중독균 자체 혹은 추출 DNA 등이 결합하게 되면 수정결정의 질량이 변화되어 나타나는 진동수의 변화를 측정하는 것이다.[8-10,12,13] PZ 센서를 이용할 경우 동위원소나 발색단 등을 사용하는 것과 같은 번거롭고 복잡한 전처리 과정이 필요없고 각종 착색물질에 의한 측정저해 현상이 거의 없다. 따라서, 시료 분석처리과정이 간편하여 매우 신속하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라 항체 및 DNA를 이용하므로 측정미생물에 대한 선택성이 뛰어난 장점이 있다.[8] 그러므로, 미생물 검출을 위해 PZ 센서를 이용하기 위해서는 우선 수정결정에 보다 재현성있고 감도가 높게 생물요소를 고정화하는 기술의 개발이 필요하다.

본 연구에서는 최근 발생빈도가 높은 식중독균의 하나로 식품가공시 안전성 증진을 위한 관리의 필요성이 제기되고 있는 *Salmonella*균을 보다 신속하게 측정할 수 있는 방법의 하나로서 PZ 항체센서 시스템을 개발하였다. 또한, 수정결정에 식중독균에 대한 항체를 여러가지 방법으로 고정화하여 제조한 PZ 항체센서를 이용하여 *Salmonella*균을 효율적으로 검출하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 항체

PZ 센서의 수정결정은 AT-cut 결정(Ti층 위에 Au 전극이 증착된 것)으로서 가로 8 mm, 세로 8 mm, 두께 0.18 mm의 크기(전극면적 0.2 cm^2)인 것을 Seiko EG&G사(QA 9RP-50, Japan)에서 구입하여 변환기(transducer)로 사용하였다. 수정결정에 고정화하는 *Salmonella* 구조항원(common structural antigen)에 대한 anti-*Salmonella* antibody(1.0 mg/m*l*)는 KPL(Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., IL, U.S.A.)에서 구입하였다. 항체 고정화를 위하여 사용한 시약으로 polyethyleneimine(PEI), bovine serum albumin(BSA), 3-aminopropyltriethoxysilane(3-APTES), protein A, dimethyl 3,3'-dithiopropionimidate · 2HCl(DTBP), dithiothreitol(DTT) 및 2.5% glutaraldehyde는 Sigma사(MO, USA)에서 구입하였다. 계측대상 균주로서 사용된 *S. typhimurium* ATCC 14028은 tryptic soy broth(Difco) 10 m*l*에 접종하여 37°C에서 18시간 2회 계대 배양하였다.

PZ 항체센서 시스템

수정결정 혹은 식중독균 항체가 고정화된 수정결정을 dip holder(QA-CL3, Seiko EG&G, Japan)에 O-ring으로 고정하여 끼운후(Fig. 1), 발진모듈(oscillator module, model QCA 917-11, Seiko EG&G)에 연결하고, 수정결정 진동측정기(quartz crystal analyzer, Model QCA 917)에 연결한 후 수정결정을 반응 cell내에 넣었다. 반응 cell내에는 reference 전극과 counter전극을 수정결정의 양쪽 옆에 두고 이것을 potentiostat(EG&G, Model 283)와 연결하여 일정한 전류가 반응 cell내에 가해지도록 하였다. 반응 cell을 완충용액으로 채우고, 순환 수욕조(Cole Parmer Inc. Co., IL, USA)를 이용하여 항체반응을 위해 35°C로 유지하였다(Fig. 2). 반응 cell내에 주입된 시료의 균일한 확산을 위하여 stirring

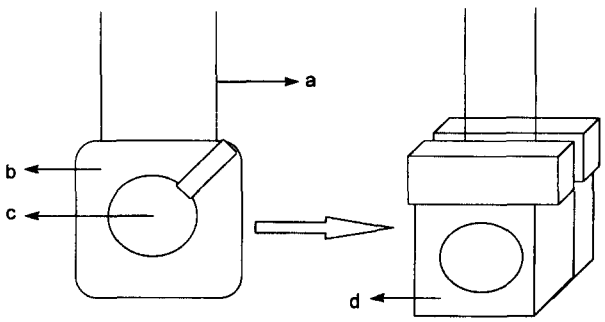

Fig. 1. Schematic diagram of the quartz crystal. (a) lead wire, (b) quartz crystal, (c) gold electrode; (d) dip holder.

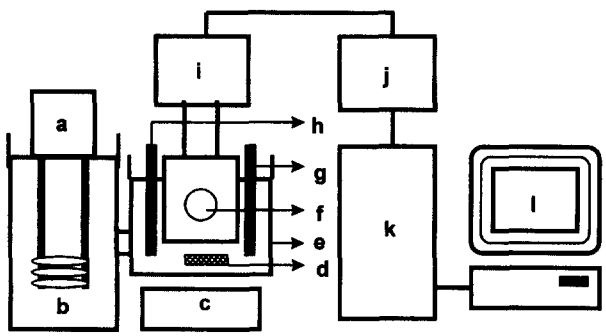

Fig. 2. Schematic diagram of the apparatus for antibody-immobilized PZ sensor system. (a) circulator, (b) water bath, (c) stirrer, (d) magnetic bar, (e) reaction cell, (f) gold electrode (quartz crystal), (g) reference electrode, (h) counter electrode, (i) oscillator, (j) quartz crystal analyzer, (k) potentiostat, (l) PC.

bar의 회전속도를 일정하게 유지하면서, 진동수(resonant frequency)의 변화량을 Echem 소프트웨어 프로그램(version 4.3)에 의해 전송받아 분석하였으며 본 시스템은 0.1 Hz의 낮은 진동수 변화까지 측정할 수 있었다.

항체의 고정화

수정결정상으로의 항체의 고정화는 다음과 같이 행하였다.

PEI pre-coating - 수정결정 표면에 methanol에 용해된 2% PEI 3 μl를 가하여 coating한 후 실온에서 건조시켰다. 2.5% glutaraldehyde(pH 7.0) 용액에 30분간 담가 반응시킨 후 증류수로 씻어내고 anti-*Salmonella* antibody(1.5 mg/ml)를 5 μl 취하여 수정결정의 한쪽 면에 가하고 wet chamber에서 고정화시켰다. 1시간후 미반응 aldehyde기를 모두 제거하기 위하여 수정결정을 0.1 M glycine이 용해되어 있는 20 mM phosphate buffered saline(PBS, pH 7.0)으로 처리하고, PBS와 증류수로 연속하여 씻어준 후 실온에서 건조시켰다.[14]

BSA를 이용한 가교화 - BSA 용액(1.5 mg/ml, pH 7.0) 3 μl, 항체 5 μl, 2.5% glutaraldehyde 용액 12 μl를 수정결정의 한쪽 면에 차례로 가하고 wet chamber에서 30분간 반응시킨 후 공기 중에서 2시간 동안 건조시키면서 고정화하였다. 이후 수정결정을 증류수로 씻어준 후 20 mM PBS(pH 7.0, 0.1 M glycine)로 처리하고, PBS와 증류수로 연속하여 씻어준 후 실온에서 건조시켰다.[14]

3-APTES silanization - Dry acetone에 5% 농도로 용해된 3-APTES 5 μl를 수정결정에 가하고 50°C의 oven에서 1시간 동안 반응시킨 후 공기 중에서 건조시키고 5% glutaraldehyde 용액에서 3시간 반응시켰다. 곧 바로 수정결정을 20 mM PBS(pH 7.0)로 씻어준 후 항체를 수정결정의 한쪽 표면에 5 μl 가하여 wet chamber에서 1시간 동안 고정화시켰다. 이것을 PBS(pH 7.0, 0.1 M glycine)로 처리하여 미반응 aldehyde기를 제거하고 공기중에서 건조시켰다.[14]

Protein A를 이용한 고정화 - 수정결정을 1.2 M NaOH 용액에 20분간 담그고 증류수로 씻어낸 후 1.2 M HCl 용액에 5분간 담가 수정결정을 활성화시켰다. Conc. HCl 20 μl를 수정결정의 중앙에 위치한 gold 표면에 가하고, 2분이 경과한 후 반대쪽 면에 다시 가하였다. 이것을 증류수와 95% ethanol로 씻어낸 후 100°C의 oven에서 20분간 건조시켰다. 50 mM 인산 완충용액(pH 7.0)에 용해된 protein A(1.0 mg/ml) 5 μl를 수정결정 한쪽 면에 가하고 항체 5 μl를 가한 후 실온에서 건조시켰다.[15]

DTBP thiolation - 항체 5 μl와 DTBP 5 μl를 20 mM bicarbonate 완충용액(pH 9.0)에서 용해시킨 후 50분간 실온에서 반응시키고, 0.1 M DTT 2 μl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이 용액을 수정결정의 gold 부분에 바른 후 완전히 마를 때까지 실온에서 건조시켰다.

항체의 고정화 효율 측정

수정결정상에 항체를 고정화한 방법에 따른 고정화 효율을 알아보기 위하여 peroxidase가 label된 항체를 수정결정에 고정화하고 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB)을 발색제로 사용하는 비색법에 의하여 다음과 같이 분석하였다. 50 mM phosphate citrate 완충용액(pH 5.0)에 methanol에 용해된 TMB와 30% H_2O_2를 가하여 TMB와 H_2O_2의 농도가 각각 0.01%와 0.02%인 기질용액을 제조하였다. 위의 고정화방법에 의하여 항체가 고정화된 수정결정을 well에 넣고 기질용액 3 ml를 가하여 25°C에서 30분간 발색시켰다. 반응정지액으로서 25% H_2SO_4 1.5 ml를 첨가한 후 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다.

수정결정의 기본진동수 측정

항체를 고정화하지 않은 수정결정을 dip holder에 끼운 후 매질을 공기, 증류수, 인산 완충용액, 식염용액 및 에탄올로 바꾸면서 매질에 따라 수정결정이 나타내는 기본진동수를 측정하였다. 또한, *Salmonella*에 대한 항체를 수정결정에 각각의 방법으로 고정화한 후 고정화방법에 따른 수정결정의 기본진동수를 측정하였다.

PZ 항체센서의 감응도 측정

항체를 고정화한 수정결정을 인산 완충용액을 채운 반응 cell에 넣고 수정결정의 진동수 변화량를 측정하였다. 이때, cell내의 완충용액의 부피는 25 ml로 일정하게 유지하였으며, 일정한 진동수를 나타내어 센서 시스템이 안정하게 유지되었는지를 확인한 후 2.5 ml의 *Salmonella*균을 반응 cell내에 가하여 고정화 항체와 식중독균간의 결합반응에 의하여 변화된 진동수 감소량을 측정하였다. 항체 고정화 수정결정이 갖는 고유진동수를 F_1이라 하고, 미생물 주입후 항체 고정화 수정결정이 나타내는 고유진동수를 F_2라고 하였을 때, 항체-미생물 결합반응에 의한 진동수의 변화량(ΔF)은 이들의 차이 값(F_1-F_2)으로 표현할 수 있었다.[15]

PZ 항체센서의 안정성 평가

한번 고정화한 수정결정의 고정화 효율 및 재사용 여부를 알아 보기 위하여 5가지 방법으로 고정화한 수정결정이 식중독균과 반응하여 변화된 진동수 감소량을 측정 비교하였다. 항체 고정화 수정결정의 연속적인 재사용을 위하여 한번 고정화한 수정결정은 1회 분석이 끝나면 8 M urea 용액을 수정결정의 gold 부분에 떨어 뜨리고 2분후 증류수로 깨끗이 씻어준 후 다시 분석에 이용하였다.

결과 및 고찰

매질에 따른 수정결정의 기본진동수 측정

수정결정의 진동수는 수정결정의 주위환경 즉, 공기, 완충용액 등의 매질 및 이들 매질의 전도도, 점도, 밀도 및 질량 축적 등에 의해 복합적으로 영향을 받는 것으로 보고되고 있다.[16-19] 그리하여, 항체를 고정화하지 않은 수정결정을 반응 cell내에 넣고 각각의 매질에서의 고유진동수를 측정하였다. 공기 중에서 8837800 Hz로 다른 매질에서보다 높은 반면, 에탄올, 인산 완충용액, 증류수 및 NaCl 용액에서는 이보다 다소 낮은 기본진동수를 보여 주었다(Fig. 3). 전체적으로 공기와 액체 매질사이에서의 진동수는 1600~3800 Hz의 차이를 나타내었다. 또한, 인산 완충용액의 몰농도를 달리하였을 때, 완충용액의 몰 농도가 증가할수록 기본 진동수는 높아짐을 알 수 있었다(Fig. 4).

항체 고정화 방법에 따른 PZ 센서의 특성

여러가지 방법에 따라 항체가 고정화된 수정결정의 고유진동수를 측정하여 본 결과 각각의 고유진동수는 다르게 나타났다(Table 1). 0.1 M 인산 완충용액에서 항체를 고정화하지 않은 수정결정이 갖는 고유진동수에 비하여 고정화한 후의 수정결정의 진동수는 낮게 나타났다. 3-APTES를 이용한 silanization에 의한 고정화방법의 경우가 가장 낮은 진동수를 나타낸 반면, protein A 및 DTBP를 이용한 고정화방법의 경우가 가장 높은 진동수를 나타내었다. 이것은

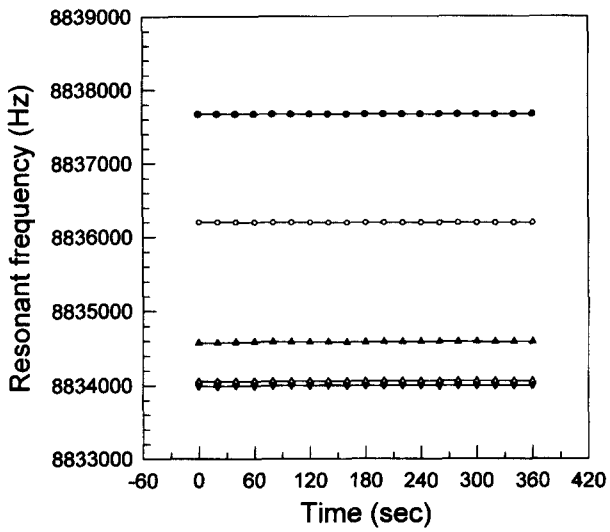

Fig. 3. Resonant frequency responses of the quartz crystals in various phases.
●: air, ○: ethanol, ▲: 0.2 M phosphate buffer, △: distilled water, ▼: NaCl.

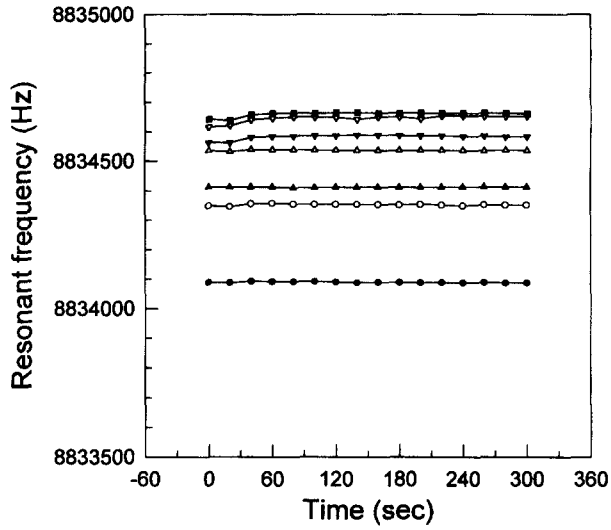

Fig. 4. Resonant frequency responses of the quartz crystals in phosphate buffers.
●: distilled water, ○: 0.05 M, ▲: 0.1 M, △: 0.2 M, ▼: 0.25 M, ▽: 0.4 M, ■: 0.5 M.

수정결정의 고정화에 사용하는 중합체의 차이와 항체의 고정화 효율이 다르기 때문에 발생하는 것으로 여겨진다.[9]

수정결정에 *Salmonella*에 대한 항체를 고정화하고 그 효율을 검토하기 위하여 TMB 비색법에 의하여 확인하였다(Table 2). 먼저, 각각의 고정화방법에서 사용되는 중합체 등의 시약을 사용하지 않고 항체만을 수정결정에 coating한 후의 흡광도를 측정하였다. 이 때 나타난 값은 약 0.045 정도로 매우 낮았는데, 이 사실은 수정결정에 항체가 비특이적으로 흡착될 가능성이 거의 없음을 보여준다. 5가지의 고

Table 1. Characteristic resonant frequencies of the quartz crystals coated by different immobilization methods. The data represent the average values of eight measurements

Immobilization method	Resonant Frequency (Hz)
Bare Au surface	8834400.0± 256.8
PEI[1]	8817892.3±5412.2
BSA[2]	8815284.8±5721.4
3-APTES[3]	8805107.6±3710.1
Protein A[4]	8830556.9±1449.3
DTBP[5]	8831021.4±6533.2

[1]The antibody was precoated by covalent binding with PEI.
[2]The antibody was immobilized by cross-linking with glutaraldehyde and BSA.
[3]The antibody was immobilized by silanization with 3-APTES.
[4]The antibody was immobilized by van der Waals binding with gold-protein A comlplex.
[5]The antibody was immobilized by thiolation with DTBP.

Table 2. Effects of the immobilization methods on binding efficiencies of a peroxidase-labeled anti-*Salmonella* antibody onto the gold surface of the crystals. The data represent the average values of eight measurements

Immobilization methods	$\Delta A4_{50}$[1]
without cross-linker	0.045±0.008
PEI	3.233±0.131
BSA	1.973±0.183
3-APTES	1.242±0.148
Protein A	1.154±0.009
DTBP	1.166±0.094

[1] A_{450} of the treated crystal - A_{450} of the crystal itself.

Table 3. Frequency shifts and reproducibility according to the different immobilization methods. The number of *S. typhimurium* cells in the sample was 7.45×10^7 CFU/ml. The data represent the average values of six measurements

Immobilization method	Frequency shift (Hz)	CV[1] (%)
PEI	744.7±164.8	22.13
BSA	341.9± 79.1	23.13
3-APTES	224.5± 89.3	39.79
Protein A	79.8± 11.6	14.54
DTBP	283.3±100.8	15.72

[1] Coefficient of variability (SD/Mean×100, %).

정화방법 중에서 PEI를 중합체로 사용한 방법이 흡광도 값이 가장 높았고, DTBP를 이용한 thiolation법도 비교적 높게 나타났으나, 항체 고정화시 보편적으로 사용되며 수정결정 표면의 hydroxyl기와 반응하여 항체를 결합시키는 3-APTES silanization 방법의 경우 항체의 고정화 효율이 낮게 나타났다. 수정결정에 부착된 gold 전극은 발진력이 가장 크기 때문에 이 곳에 항체를 고정화시키면 큰 감응도를 얻을 수 있을 것으로 기대된다. 항체를 gold에 고정화하는 방법으로서 가장 많이 이용되는 것이 sulfydryl기(-SH)를 가진 중합체를 사용하는 것이다.[20,21] Gold-protein A complex 형성에 의한 고정화 시 van der Waals 힘에 의하여 항체가 수정결정에 결합되며, PEI나 3-APTES를 사용한 고정화 방법보다 coating된 수정결정의 감응도와 재현성이 뛰어나다고 보고되고 있다.[9,15] 즉, protein A는 gold 표면과 항체 사이의 spacer로 작용하여 항체가 수정결정과의 결합을 유지하는데 중요한 역할을 하며, 이는 protein A에 존재하는 -SH기에 기인하는 것으로 여겨진다. 또한, DTBP의 disulfide기도 항체와 결합된 후 -SH기로 환원되어 항체와 수정결정의 gold를 결합시키게 된다.

PZ 항체센서의 반응 감응도 측정

각각의 고정화방법에 의해 고정화된 수정결정을 반응 cell에 넣으면 일정한 고유진동수가 유지된다. 이 때, *S. typhimurium*을 반응 cell내에 주입하고 이 후 식중독균과 고정화 항체사이의 결합반응에 의하여 나타나는 진동수의 변화를 측정하였다. 7.45×10^8 CFU/ml의 *Salmonella*균을 반응 cell에 주입하여 PZ 항체센서의 반응 감응도를 측정해 본 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 고정화방법에 따라 진동수의 감소량은 차이가 나타났다. PEI를 이용하여 고정화한 경우 진동수의 감소가 가장 크고, protein A를 이용한 경우가 가장 작게 나타났다. 그러나, PEI, BSA, 3-APTES를 이용한 경우는 진동수 변화량의 변이계수 값이 22~40%이내로 매우 크므로 이들을 사용할 경우 수정결정의 반복사용에 따른 재현성의 문제가 대두될 수 있었다. 한편, protein A 및 DTBP를 이용한 경우는 진동수 변화량의 변이계수의 값이 15% 이내로 안정하기 때문에 수정결정의 안정성이나 재현성면에서는 유효하다고 할 수 있었다. 이는 -SH기의 결합반응을 이용한 thiolation방법이 매우 효과적임을 보여 주는 것이다.

PZ 항체센서의 안정성

항체 고정화 수정결정은 생물요소 및 분석대상물질의 성질에 따라 재사용이 가능하다.[15] 항체가 고정화된 수정결정으로 얼마동안 미생물을 검출할 수 있는지 알아 보기 위하여 100분 동안 미생물과 항체 고정화 수정결정과의 반응을 연속적으로 진행시키면서 관찰하였다. 한번 분석에 사용한 수정결정은 8 M urea 용액에 담가 수정결정 표면에 결합되어 있는 미생물을 제거한 후에 다시 측정에 이용하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 항체를 수정결정에 고정화한 후 처음 측정한 경우가 진동수의 감소량이 가장 컸고 이후의 진동수 변화량이 크게 감소되어 재현성이 매우 떨어지는 것을 보여 주었다. 그러나, protein A나 DTBP thiolation법으로 고정화한 경우 2회 측정 시 1회의 감응도에 비해 14% 정도 감소하였으나 비교적 그 활성이 유지되었음을 보여 주었고, 8회까지 항체의 활성이 유지되어 분석에 무리가 없음을 보여 주었다.

Salmonella spp.의 검출

항체센서 시스템의 안정성이나 재현성이 우수한 고정화 방법으로서 protein A와 DTBP를 사용하여 항체를 고정화하고 반응 cell내에 *S. typhimurium*을 주입한 후 미생물과 항체 수정결정사이에서 일어나는 반응을 살펴 보았다. 7.45×10^7 CFU/ml의 균을 주입하였을 경우 항체-미생물 결합반응이 일어나면서 진동수가 감소하기까지의 유도기간

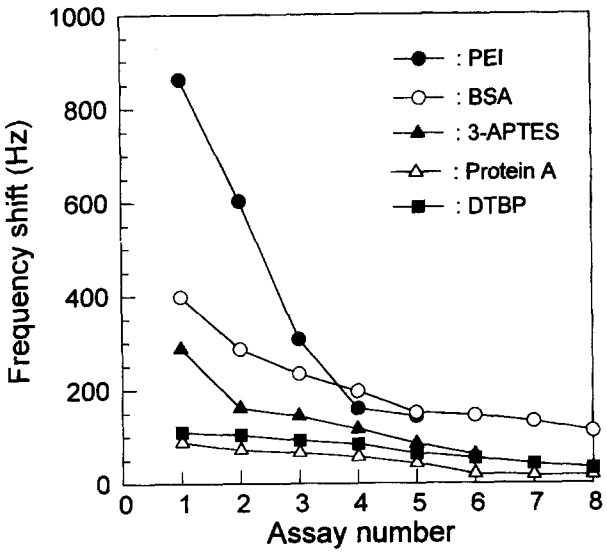

Fig. 5. Detection sensitivity of the antibody-immobilized PZ sensor for repeated uses.

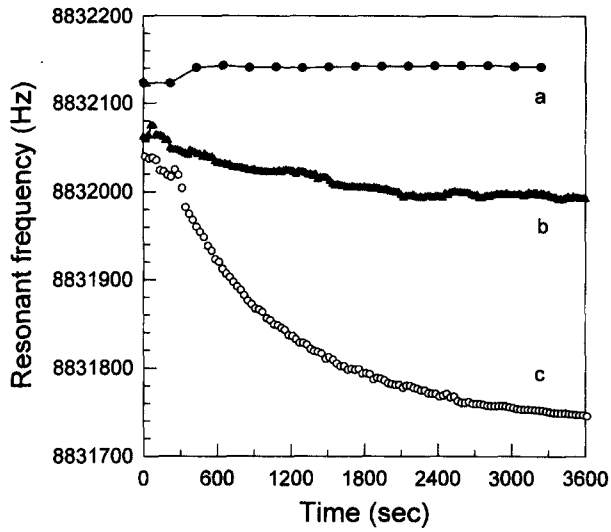

Fig. 6. Resonant frequency shifts of the quartz crystals immobilized with protein A (b) and DTBP (c). The *Salmonella* suspension was added in the concentration of 7.45×10^7 CFU/ml. Line (a) represents the resonant frequency shift of the quartz crystal without *Salmonella* addition.

(induction period)에 해당하는 시간은 약 5분 정도가 소요되었고, 이 후 진동수는 점차로 감소하면서 약 30~40분 정도가 지나면 정지기(stationary phase)에 도달하여 진동수 변화가 거의 없는 일정한 값에 도달하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6). 이 때의 진동수는 약 80~283 Hz의 감소를 나타내었다. 기존의 배양법에 의해 미생물을 검출하는 데 4~5일 정도가 소요되고[4,5] 핵산 중합법을 이용하는 경우 27~53시간이 소요되는 것[3]과 비교해 볼 때, 이 사실은 PZ 항체센서로 식중독균을 신속하게 검출할 수 있는 가능성을 보여 주는 것이다. 그리하여, 이 후 수정결정에 항체를 고정화하는 우수한 방법을 선택하여 *Salmonella*균의 보다 신속한 검출을 위하여 요구되는 조건들에 관한 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 '96년도 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임.

국문요약

Salmonella spp.의 신속한 검출을 위하여 엷은 박막형태의 수정결정을 사용하는 압전류적(piezoelectric) 항체센서 시스템을 개발하고 증류수, 완충용액, 식염용액 등의 여러 매질 중에서 보여주는 진동 특성을 검토하였다. *Salmonella*균 구조항원(common structural antigen)에 대한 항체를 수정결정에 PEI pre-coating, BSA 가교화, 3-APTES silanization, protein A와 DTBP thiolation의 5가지 방법에 의해 고정화한 후 항체센서의 안정성을 살펴 보았다. *Salmonella*균을 주입하였을 때 *Salmonella*균과 수정결정에 고정화한 항체와의 결합반응에 의해 수정결정의 질량증가와 이에 따른 진동수 감소가 나타났다. 고정화방법 중 protein A와 DTBP를 이용하여 고정화하는 방법이 센서반응을 가장 안정적이고 재현성있게 나타내줌을 알 수 있었다. 7.45×10^7 CFU/ml의 *Salmonella*균을 반응 cell내에 주입하였을 때 protein A를 이용한 고정화의 경우 80 Hz, DTBP를 이용한 고정화의 경우 283 Hz의 진동수 감소가 나타났으며, 압전류적 항체센서를 이용할 경우 40분이내에 *Salmonella* spp.의 검출이 가능하였다.

참고문헌

1. Karmali, M.A.: Infection of verotoxin-producing *Escherichia coli. Clin. Microbiol. Reviews,* **2**, 15-38 (1989).
2. Bean, N.H., Goulding, J.S., Lao, C. and Angulo, F.J.: Surveillance for foodborne-disease outbreaks in United States, 1988~1992, *MMWR,* **45**, 1-66 (1996).
3. Fung, D.Y.C: What's needed in rapid detection of foodborne pathogens. *Food Technol.,* **49**, 64-70 (1995).
4. Ryu, C.H., Cho, S.H., Inoue, S., Igimi, S. and Kumagai, S.: The most specific primers for the identification of *Listeria monocytogenes* by the polymerase chain reaction method. *Food Biotechnol.,* **5**, 30-33 (1996).
5. 조성관, 김기옥, 정진환, 류충호: 농축수산물 식품원료 및 그 가공식품에 대한 *Listeria*균주의 오염실태 조사와 Listeriosis 발생억제법. 한국식품위생안정성학회지, **9**, 191-198 (1994).
6. 한지숙, 신동화, 윤세억, 김문숙: *Listeria monocytogenes* 의 증식을 억제하는 식용가능한 식물추출물의 검색. 한국식품과학회지, **26**, 545-551 (1994).
7. Heisick, J.E., Wagner, D.E., Nierman, M.L. and Peeler, J. T.: *Listeria* spp. found on fresh market produce. *Appl. Environ. Microbiol.,* **55**, 1925-1927 (1989).
8. Guilbault, G.G. and Luong, J.H.T.: Piezoelectric immunosensors and their applications in food analysis. In Wagner, G. and Guilbault, G.G. (ed.), Food biosensor analysis, Marcel Dekker, pp. 151-172 (1994).
9. Guilabault, G.G., Hock, B. and Schimid, R.: A piezoelectric immunosensor for atrazine in drinking water. *Biosensors & Bioelectronics,* **7**, 411-419 (1992).
10. Ngeh-Ngwainbi, J., Suleiman, A.A. and Guilbault, G.G.: Piezoelectric crystal biosensors. *Biosensors & Bioelectronics,* **5**, 13-26 (1990).
11. Wagner, G.: The state of the art. In Wagner, G. and Guilbault, G.G. (ed.), Food biosensor analysis, Marcel Dekker, pp. 219-252 (1994).
12. Ischimori, Y., Karube, I. and Suzuki S.: Determination of microbial populations with piezoelectric membranes. *Appl. Environ. Microbiol.,* **42**, 632-636 (1981).
13. Guilbault, G.G. and Jordan, J.M.: Analytical uses of piezoelectric crystals. A review. *CRC Cric. Rev. Anal. Chem.,* **19**, 1-28 (1988).
14. Prusak-Sochaczewski, E. and Luong J.H.T.: Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium. Enzyme Microb. Technol.,* **12**, 173-177 (1990).
15. Plomer M., Guilbault G.G. and Hock B.: Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of enterobacteria. *Enzyme Microb. Technol.,* **14**, 230-235 (1992).
16. Muramatsu, H., Dicks, J.M., Tamiya, E. and Karube, I.: Piezoelectric crystal biosensor modified with protein A for determination of immunoglobulins. *Anal. Chem.,* **59**, 2760-2763 (1987).
17. Yao, S.-Z. and Zhou, T.-A.: Dependence of the oscillation frequency of a piezoelectric crystal on the physical parameters of liquids. *Anal. Chim. Acta,* **212**, 61-72 (1988).
18. Zhou, T., Nie, L. and Yao, S.: On equivalent circuits of piezoelectric quartz crystals in a liquid and liquid properties. Part 1. Theoretical derivation of the equivalent circuit and effects of density and viscosity of liquids. *J. Electroanal. Chem.,* **293**, 1-18 (1990).
19. Shana, Z.A., Zong, H., Josse, F. and Jeutter, D.C.: Analysis of electrical equivalent circuit of quartz crystal resonator loaded with viscous conductive liquids. *J. Electroanal. Chem.,* **379**, 21-33 (1994).
20. Nuzzo, R.G., Zegarski, B.R. and Dubois, L.H.: Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on Au(III). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.,* **109**, 733-740 (1987).
21. Rickert, J., Weiss, T., Krass, W., Jung, G. and Göpel, W.: A new affinity biosensor: Self-assembled thiols as selective monolayer coatings of quartz crystal microbalances. *Biosensors & Bioelectronics,* **11**, 591-598 (1996).