

색인어

병원성 미생물 검출, 효소-면역 바이오센서, 반도체 광지시형 전위차계 센서

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 자성(磁性)비드-항체 집합체 제조과정을 간략히 도시한 것이다.

도 2는 유레아제 표지된 항체 제조과정을 간략히 도시한 것이다.

도 3은 본 발명의 LAPS를 이용한 병원성 미생물 검출 원리를 도시한 것이다.

도 4는 LAPS 및 LAPS 시스템 도식도이다:

1: 카운터 전극 2: 레퍼런스 전극

3: 반응 챔버 4: 완충액 또는 시료

5: 반도체 층 6: 광전류

7: LED

도 5는 전해질의 pH에 따른 광전류 곡선을 나타낸 것이다.

도 6은 도 5의 미분 곡선이다.

도 7a는 유레아제 표지된 항체의 정제과정 중 세파텍스 G-25 여과단계에서 수득한 크로마토그래피 및 각 분획 수득 위치를 표시한 것이고, 7b는 각 분획의 SDS-PAGE 사진이다.

도 8a 및 8b는 병원성 미생물 생균(a) 또는 사균(b) 검출시 ELISA 방법의 검출한계를 도출한 그래프이다.

도 9a 내지 c는 LAPS 시스템을 이용한 병원성 미생물 검출결과는 나타낸 것으로, a는 pH 0.5에서 6.8까지 pH 0.2 간격의 PBS(phosphate buffered saline) 용액을 이용하여 얻은 표준곡선(standard curve)이고, b는 실제 병원성미생물(살모넬라)을 0 내지 10^8 cfu/ml까지 단계적으로 희석한 후 LAPS 시스템에서 측정된 결과이며, c는 b의 그래프에서 얻은 결과를 바탕으로 병원성 미생물의 검출한계를 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

[발명이 속하는 기술분야]

본 발명은 광지시형 전위차계 센서를 이용한 병원성 미생물 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 항원-항체 반응을 이용한 미생물 검출방법과 광지시형 전위차계 센서 시스템을 융합시키므로써, 다양한 병원성 미생물을 검출할 수 있으며 검출시간이 짧고 검출한계가 현저히 향상된 병원성 미생물 검출방법에 관한 것이다.

[종래기술]

종래에 사용되는 병원성 미생물 진단 방법은, 색 변화를 탐색하는 대사산물을 진단하거나, 세균배양 또는 전자 현미경을 사용하여 세균종을 동정하는 것이다. 그러나 이러한 방법은 토양, 지표수 또는 임상 시료로부터 다량의 생균을 확보하기 위한 세포 배양 단계가 요구되어, 진단가능한 미생물은 배양가능한 미생물 중에 한정되는 문제점이 있다.

상기한 문제점을 해결하기 위하여 제시된 방법은, 프로브를 이용한 방법 예컨대 핵산 탐지, 항원-항체반응 및 리간드/수용체간 결합반응이 있다. 상기 핵산 탐지법은 병원성 미생물에 특이적인 핵산에 상보적인 DNA 또는 RNA를 탐지자로 사용하는 방법으로, 특이성이 높고 수천개의 콜로니 형성 유닛(CFU)을 탐지할 수 있는 장점이 있는 반면에 민감도가 떨어지고 검색 시간이 많이 소요되며 시료를 얻는 과정이 까다로운 단점이 있다. 또한 근래에는 빠른 시간 내에 다수의 시료를 동정할 수 있는 DNA 어레이 기술이 개발되어 적용되고 있다. 상기 항원-항체반응은, 표지된 항체를 이용하여 항원을 탐색하는 방법으로 특이성이 매우 높으나, 단클론 항체에 시간 및 노력이 많이 소요되며 항체의 안정성이 다른 시스템에 비하여 상대적으로 낮은 단점이 있다. 상기 리간드/수용체간 결합반응은 병원성 미생물 예컨대, *B. anthracis*, *C. botulinum*, *S. aureus* 이 분비하는 독소에 직접 결합하는 펩티드성 물질을 탐지자로 사용하는 것이나, 병원성 미생물들이 분비하는 독소의 종류가 40종에 지나지 않으며 비특이성, 비연속적인 결과 도출이라는 단점이 있다.

병원성 미생물을 진단하기 위한 또다른 방법으로, 바이오센서가 있다. 바이오센서는 대개 효소 또는 항체와 같은 결합 단백질로 구성되는 생물학적 인식시스템과 그것을 고정하는 트랜스듀서(transducer)로 이루어진다. 바이오센서는 목적하는 조사대상과 그에 상응하는 생체인식 층(biorecognition layer)에서의 생리화학적 변화를 유발하여, 이를 트랜스듀서를 통하여 감지 및 측정한다. 측정은 대개는 전기화학, 광학, 질량 또는 온도 변화를 감지하는 것으로, 그 외 여러 형태일 수 있다. 트랜스듀서의 예로는 유리 전극, pH-민감성 ISFETs(ion-sensitive field effect transistors) 또는 광지시형 전위차계 센서(light addressable potentiometric sensors: LAPS) 등이 있다.

LAPS는 공간 해상도(spatial resolution)를 포함하는 표면-전위차 센서(surface-potential sensor)로써, pH 변화에 따른 전위차를 측정한다. LAPS는 전해질-절연체-반도체 층 시스템(Electrolyte-Insulator-Semiconductor (EIS) layer system)으로 구성되어 있으며, 전(前)면은 절연체인 실리콘으로 코팅되어 있으며 조사하려고 하는 대상을 포함한 용액과 접촉하고 있고, 검출층은 Si_3N_4 로 구성되며 변환기 전면의 광원에 대한 전류의 흐름을 감지한다. LAPS는 특히 ISFET에 비하여 다음과 같은 장점을 가진다. 첫째, LAPS의 감지 표면은 평면이며 금속 접합이 없어서 측정용 챔버(measurement chamber)에도 사용될 수 있다. ISFET의 뒷판에도 평면이 존재하긴 하지만 LAPS에 비해 견고하지 않다. 둘째, ISFET에 비하여 생산이 간단하고 가격단가가 낮다. 셋째, LAPS 사용수명이 상대적으로 길다.

한편, Molecular Devices사에서는 "한계 시스템(Threshold system, Immuno-ligand assay)"를 제공하고 있다. 상기 시스템은 막(membrane)에 바이오틴(biotin)을 결합시킨 후 스트렙타비딘(streptavidin)을 이용해서 바이오틴에 결합된 다른 병원성 미생물이나 DNA 등을 검출하는 방법(Hafeman et al. Science 240, 1182 (1988))으로, 동시에 많은 샘플을 한꺼번에 분석가능한 것이 장점인 있는 반면에 시스템과 시약 및 유지비가 비싼 단점이 있다. 또한 상기 방법은 다량의 미생물 균체를 얻기 위한 배양단계가 요구되는 문제점이 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 병원성 미생물에 대한 항원-항체 반응성을 전기적 신호로 감지할 수 있는 병원성 미생물 검출방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한 본 발명은 쉽고 간편하며 검출감도가 우수한 LAPS를 이용한 병원성 미생물 검출방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 (a) 미생물이 함유된 시료에, 자성비드가 접합된 상기 미생물 특이 항체(자성비드-항체 접합체)를 가하여 항원-항체 반응시키는 단계, (b) 상기 (a)의 항원-항체 반응물에, 상기 미생물에 특이적이며 유레아제 표지된 항체를 가하는 단계, (c) 상기 (b)의 혼합물을 자기력이 존재하는 기관에 가하여 자성비드를 상기 기관에 고정시키는 단계, (d) 상기 자성비드 및 기관을 유레아 용액에 접촉시키는 단계, (e) 상기 유레아 용액에 전압을 가하고 동시에 기관에 LED를 조사하여, 기관 표면에서의 광전류를 측정하는 단계 및 (f) 상기 광전류를, 정량된 미생물 균수를 시료로 사

용하여 상기 (a) 내지 (e) 단계를 동일하게 실시하여 수득한 미생물 균수에 대한 광전류 변화를 나타낸 표준곡선에 대입하여 시료내 함유된 미생물의 균수를 확인하는 단계를 포함하는 광지시형 전위차계 센서 시스템을 이용한 병원성 미생물 검출방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 병원성 미생물 검출방법에 관한 것으로, 시료내 함유된 미생물 또는 이의 일부에 효소 표지된 항체를 가하여 항원-항체 반응물을 수득하고, 여기에 효소에 대한 기질을 가한 후 항체에 결합된 효소에 의한 기질 반응을 측정하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 효소-기질 반응은, 통상의 효소 및 이에 반응하는 기질일 수 있으며, 일례로는 효소로는 유레아제, 베타-D-갈락토시다제, 글루코스 옥시다제 또는 알칼린 포스파제가 있다(*Eiji Ishikawa et al, Journal of Immunoassay, 4(3), 209-327 (1983)*). 바람직하기로는 유레아제와 이의 기질인 유레아이다. 유레아제는 다른 효소들에 비해 안정하고(열, pH 등) 기질을 분해하면서 pH를 변화시킴으로서 LAPS에서 전환 및 측정하기 용이한 형태의 신호를 제공한다.

본 발명의 병원성 미생물 검출방법은

- (a) 미생물이 함유된 시료에, 자성비드가 접합된 상기 미생물 특이 항체(자성비드-항체 접합체)를 가하여 항원-항체 반응시키는 단계;
- (b) 상기 (a)의 항원-항체 반응물에, 상기 미생물에 특이적이며 유레아제 표지된 항체를 가하는 단계;
- (c) 상기 (b)의 혼합물을 자기력이 존재하는 기관에 가하여 자성비드를 상기 기관에 고정시키는 단계;
- (d) 상기 자성비드 및 기관을 유레아 용액에 접촉시키는 단계;
- (e) 상기 유레아 용액에 전압을 가하고 동시에 기관에 LED를 조사하여, 기관 표면에서의 광전류를 측정하는 단계; 및
- (f) 상기 광전류를, 정량된 미생물 균수를 시료로 사용하여 상기 (a) 내지 (e) 단계를 동일하게 실시하여 수득한 미생물 균수에 대한 광전류 변화를 나타낸 표준곡선에 대입하여 시료내 함유된 미생물의 균수를 확인하는 단계를 포함한다.

상기 (a) 단계 및 (c) 단계후 세척과정을 더욱 포함한다. (a) 단계후 세척은 병원성 미생물과 자성비드 결합물 이외의 것을 제거하기 위함이고, (c) 단계 후 자성비드-병원성 미생물-유레아제 표지된 미생물 특이항체 결합물 이외의 비결합성 물질(유레아제 표지된 미생물 특이 항체)을 제거하기 위함이다. 상기 세척은 pH 7.0의 PBST(PBS + 0.05% Tween 20)으로 실시한다.

본 발명의 미생물은, 통상의 모든 종류의 미생물일 수 있으며, 바람직하기로는 사람 또는 동물에 감염성 또는 병원성을 갖는 미생물이다. 대표적인 것으로는 살모넬라 균주가 있다.

본 발명의 항체는, 특정 미생물 또는 특정 미생물의 일부에 특이성을 갖는 단클론항체 또는 다클론항체이다. 상기 자성비드에 접합시키는 항체와 유레아제로 표지시키는 항체는 동일 미생물에 대한 특이성을 가지는 것으로 바람직하게는 서로 다른 항원결정기(epitope)를 갖는 것일 수 있으며 또한 자성비드에는 다클론항체를, 유레아제에는 단클론항체를 결합시킬 수 있다. 상기 항체는 통상의 제조방법으로 용이하게 제조가능하며, 또는 통상의 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다.

본 발명의 자성비드는, 금속으로 제조된 것일 수 있다. 또한 자성비드는 표면에 에폭시기 또는 토실기(Tosyl group)가 코팅된 것일 수 있다.

자성비드는 시판되는 제품을 구입하여 사용할 수 있다. 일례로 본 발명에서는 자성비드로 초자성(superparamagnetic)-폴리스티렌 비드에 폴레우레탄 층이 코팅된 것을 사용하였다. 자성비드에 항체를 접합시키는 방법은, 통상의 방법으로 실시가능하며, 예컨대 도 1의 방법으로 실시가능하다. 도 1은 에폭시기 또는 토실기(Tosyl group)가 코팅된 자성비드를 항체에 결합시키는 방법을 나타내고 있다. 자성비드에 코팅된 토실기 또는 에폭시기는 항체의 SMCC(Succinimidyl 4-[M-maleimidomethyl]-cyclohexane carboxylate)를 처리하여 활성화시킨 아민기에 결합된다.

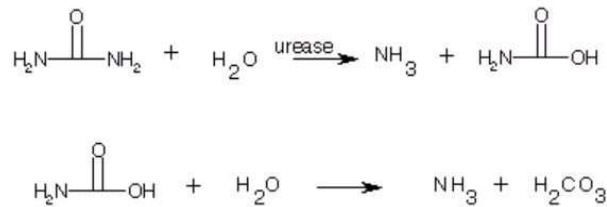
본 발명의 유레아제는 시판되는 제품을 구입하여 사용할 수 있다. 유레아제 표지된 항체는 도 2에 도시한 공정에 의하여 제조할 수 있으며, 예컨대 유레아제에 DTT 처리를 처리하여 시스테인기를 가수분해시켜 SH기를 제조한 후 이를 항체의 활성화된 아민기와 결합시켜, 최종 유레아제 표지된 항체를 제조할 수 있다.

상기 (c) 단계는, 자성비드 및 이에 결합된 반응물(자성비드에 접합된 항체, 상기 항체에 결합된 항원, 상기 항원에 결합된 유레아제 표지된 항체)을 자기장을 이용하여 고정하는 단계이다. 사용되는 기관은 절연체층이 상단에 존재하는 반도체층으로, 반도체층 하부에 자기력을 갖는 물질이 장착된다. 상기 절연체 및 반도체를 이루는 물질은 통상의 물질이다. 상기 자기력을 갖는 물질은 탈착이 가능하도록 반도체 하부에 설치된다.

상기 (d) 단계에서, 유레아 용액은 50 내지 200 mM 농도이며, 용매는 pH 5.0 의 PBST(PBS + 0.05% Tween 20) 또는 pH 5.0 내지 7.0의 PBS일 수 있다.

상기 (e) 단계는 자성비드 접합된 항체 - 항원 - 유레아제 표지된 항체 및 기관을 유레아 용액에 침지한 후, 유레아제의 효소반응에 의한 용액내 수소이온의 변화를 측정한다. 이를 간략히 도시하면 도 3과 같다. 즉 유레아제는 유레아를 가수분해하여 수소이온을 방출하며(반응식 1), 이에 따라 용액내 pH 감소하게 된다. 이때 pH 감소정도는 항원의 양에 비례한다.

(반응식 1)



상기 pH 변화는 통상의 방법으로 용이하게 측정가능하나, 바람직하게는 광지시형 전위차계 센서 시스템(Light-Addressable Potentiometric Sense: 이하 "LAPS"라 함)으로 광전류를 측정하는 것이다. LAPS는 공지된 기술이나, 본 발명의 이해를 돕기 위해 이하 구체적인 설명을 기재한다.

LAPS는 전해질-절연체-반도체 구조의 센서로 지시광의 위치에 따른 표면 전위의 변화에 의해 pH의 변화를 검출할 수 있다. 이의 개략적인 구조는 도 4에 나타낸다. LAPS 시스템은 한 개 또는 다수의 LED(Light Emitting diode, 도 4A-7)가 센서의 반도체 쪽 표면 바로 밑에 위치하고, 전해질 부분(도 4A-4)에는 바이어스 전압을 걸어주는 레퍼런스 전극(도 4A-2)과 전류를 공급해주는 카운터 전극(도 4A-1)이 있다. 센서 뒷면에는 광전류로 나오는 신호를 검출하기 위한 옴접촉(ohmic contact)부가 있다. 반도체 상층에는 절연체가 있으며, 여러 화학물질을 절연체부분에 서로 떨어지게 올림으로써 국소 표면 전위의 변화를 일으키게 되고 한 개 또는 다수의 광조사에 의해 측정하고자 하는 지역을 결정한다. 측정하는 변수는 광전류이다. 광조사가 없을 경우, LAPS 소자는 MOS 캐패시터(Capacitor)처럼 작동한다. p-type의 반도체의 경우, 음전압을 걸어주면 축적상태(accumulation state)에 들어가서 다수 캐리어(holes)가 절연체와의 접촉면을 제외하고는 균일하게 퍼지게 된다. 반도체와 절연체의 접촉면에는 소수 캐리어(전자)가 균형을 이루며 퍼져있다. 양전압을 걸어주면 정공(hole)이 반도체-절연체 계면에서 벌어지면서 공핍 영역을 이루게 된다. 공핍 영역의 넓이는 전압이 증가함에 따라 최대값에 이를때까지 증가한다. LAPS 소자의 반도체 부분에 적외선 광을 조사하면 전자장 내에서 분리되고 확산 재결합할 수 있는 전자-정공 쌍이 나타난다. 일정한 광도의 빛이 조사되는 경우, 공핍 영역 안에서 발생된 정공-전자 쌍의 전하 분리는 공핍 영역을 붕괴시키고 절연체를 차지하는 과도 전류를 발생시킨다. 이 전류는 공핍 영역이 새로운 안정상태에 이를 때까지 흐르게 된다. 적외선 광이 꺼지면 원래의 안정상태로 공핍 영역의 넓이는 돌아가고 그 과정에서 반대의 극성을 지닌 과도 전류가 흐르게 된다. 빛의 강도를 과도 전류의 지연(decay) 시간보다 짧은 주기로 변조시키면 공핍 영역의 넓이를 크게 변화시킬 만큼의 전하가 흐르지 않기 때문에 ac 전류가 발생한다. 바이어스 전압이 음전압에서 양전압으로 점차 증가하면 축적상태에서 소모상태(depletion state)로 변화함에 따라 광전류가 시그모이드 곡선을 그리면서 증가한다. 전해질-절연체 계면에 모여있는 H⁺ 이온이 줄어들어 따라 같은 넓이의 소모지역(depletion region)을 유지하는 데 필요한 전기장의 크기가 줄어들어서 바이어스 전압-광전류 시그모이드 곡선의 변곡점이 변한다. 이 변곡점의 위치는 pH에 따라 변하므로 변곡점의 위치를 검출하면 pH를 검출할 수 있게 된다. 검출한 광전류 신호는 바이어스 전압에 따라서 다른 곡선을 나타내게 되는데, 일례로 pH5 내지 7에 따른 곡선은 도 5에 나타내었으며, 이의 미분한 곡선은 도 6과 같다. 즉, 측정된 데이터를 일차 미분하여 최대값을 구하고 최대값이 나오는 바이어스 전압의 DA값을 보면 pH의 변화를 알 수 있다.

LAPS는 통상의 제품을 사용할 수 있으며, 전극, 절연체-반도체-자석층이 내장된 반응챔버, 상기 반도체와 연결된 LED 및 광전류 측정기를 포함할 수 있다. 상기 전극은 카운터 전극 및 레퍼런스 전극으로, pt 또는 Ag/AgCl로 구성되며, 반응챔버내 용액에 접촉되도록 설치된다. 반응챔버는 용액을 담을 수 있는 용기로 한 면에 위에서 아래 순으로 절연체 층, 반도체 층 및 자석층이 연이어 설치되어 있으며, 상기 자석층은 탈착이 가능하다. 개략적인 구조는 도 4의 A와 같다. LAPS를 이용하여 pH 변화를 측정하는 경우, 감지된 pH 변화에 따른 광전류의 변화를 인식하고 데이터화 시키는 LAPS 시스템 및 프로그램을 이용한다.

상기 (f) 단계는, 정량된 미생물 균수를 시료로 사용하여 상기 (a) 내지 (e) 단계를 동일하게 실시하여 수득한 미생물 균수에 대한 pH 변화를 나타낸 표준곡선에, 상기 (e) 단계에서 측정된 시료를 이용한 경우의 pH 변화를 대입하여 시료내 함유된 미생물의 균수를 확인한다. 본 발명에서 살모넬라 균에 대한 표준곡선을 일실시예로 구하였으며, 그 결과는 도 9a 내지 9c에 나타낸다.

본 발명의 병원성 미생물 검출방법은, 미생물 검출한계가 약 10^2 내지 10^3 cfu/ml로 기존의 방법에 비하여 검출 감도가 매우 우수하며, 쉽고 간편하게 사용할 수 있으며, 검출시간이 단축되고 신속하게 결과를 확인할 수 있다. 또한 LAPS 시스템의 구조가 간단하므로 휴대하기 쉬운 크기로 제작이 할 수 있어, 필드(실험실 밖)에서 간단하게 측정할 수 있으며 다양한 분야, 특히 환경 분야, 병원성 세균에 대한 역학 검사에 적용 가능하다.(신속성, 휴대성, 검출시간 단축)

이하 본 발명의 실시예를 기재한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 자성비드-항체 접합체 및 유레아제 표지된 항체 제조

자성비드에 다클론 항체가 결합되어 있는 것을 구입하여 사용하였고 (DYNAL, Dynabeads anti-Salmonella, Prod. No.710.01-이것에 붙여져 있는 항체는 다클론 항체임), 살모넬라를 측정하기 위한 다클론 항체는 "BIODESIGN"사의 토끼 항-살모넬라(Catalog,B65701R)을 구입하여 실험하였고 단클론항체는 BIODESIGN"사의 MAb to Salmonella typhimurium (Catalog,C65336M)을 사용하였다.

1-1. 항체 준비

살모넬라 항체(rabbit anti-Salmonella antibody dissolved in PBS pH 7.0 plus 0.2% sodium azide)에서 소듐 아지드를 제거하기 위하여 세파텍스 G-25 컬럼(APB co, PD-10)상에서 pH 7.0 PBS로 여과한다. 여과한 분획은 단백질 정량(BCA 법, PIERCE, Prod # 232)하여 항체가 포함된 분획만을 회수한다. 여기에 SMCC(succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexane carboxylate, Pierce Co. ; 0.9mg/ml in N,N-Dimethyl formamide) 50 μ l를 항체 1.5 mg 비율로 첨가한다. SMCC는 헤테로크로스링커로 작용하여 항체와 단백질을 접합시킬 수 있는 항체의 아민기를 활성화시키는 작용을 한다. 30 °C 에서 30 - 60분간 100 rpm으로 회전 반응시키고, 잔류 SMCC를 제거하기 위하여 세파텍스 G-25 컬럼을 통과시킨다. 동일한 방법으로 항체가 포함된 분획만을 회수하고 최종 농도를 정량한다. 상기 항체는 사용전까지 4 °C에서 보관한다.

1-2. 자성비드-항체 접합체 제조

Dynabeads M-450 Tosylactivated(DYNAL, Prod. No. 140.0)를 피펫팅 또는 교반하여 1-2분간 충분히 혼합시킨다. 자석의 자력을 이용하여 1-2 분간 반응시킨 후 상등액을 제거하고, 하기 완충액 A 내지 C중 하나의 완충액을 동량으로 첨가하여 세척한다. 이때 완충액은 항체 또는 단백질에 따라 선택한다.

완충액A: 0.1M phosphate buffer pH 7.4 , 2.62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99), 14.42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (MW 177.99), 증류수에 용해시켜 총 1000 mL 제조

완충액B: 0.1M borate buffer pH 9.5, 6.183 g H_3BO_3 (MW 61.83), 증류수 800 mL에 용해시킨 후 5M NaOH로 pH 9.5로 적정한 다음 총 1000 mL이 되도록 증류수 첨가.

완충액C: 0.1M acetate buffer pH 4.0, 2.86 ml acetic acid, 증류수 900 mL에 용해시킨 후 5M NaOH로 pH 4.0로 적정한 다음 총 1000 mL이 되도록 증류수 첨가.

세척한 Dynabeads M-450 Tosylactivated를 피펫팅 또는 교반하여 1-2분간 충분히 혼합시킨다. 자석의 자력을 이용하여 1-2 분간 반응시킨 후 상등액을 제거하고, 항체를 가한다. 이때 항체 5 μg 에 10^7 개의 Dynabeads를 혼합한다. 이후 가볍게 회전시키면서 37 °C에서 16-24시간 둔 다음, 자석의 자력을 이용하여 1-2 분간 반응시킨 후 상등액을 제거한다. 자성비드 접합된 항체는 완충액D(PBS pH 7.4 with 0.1% (w/v) BSA(HAS), 0.88g NaCl (MW 58.4), 0.1% (w/v) BSA or HAS to 80ml 0.01M phosphate buffer pH 7.4. Mix thoroughly and adjust volume to 100ml with 80ml 0.01M phosphate buffer pH 7.4)를 이용하여 4 °C에서 5분간 반응시킨 후 상등액을 제거하며 이 단계를 2회 실시한다. 또한 여기에 완충액E(0.2M Tris pH 8.5 with 0.1% (w/v) BSA(HAS), Dissolve 2.42g Tris in 80ml distilled water. Adjust pH to 8.5 using 1M HCl. Add 0.1% BSA/HAS and adjust volume to 100 ml)를 가하여 20 °C에서 24시간 또는 37 °C에서 4 시간 반응시킨 후 상등액을 제거하였다. 여기에 다시 완충액 D를 가하고, 4 °C에서 5분간 반응시킨 다음 상등액을 제거하였다. 세척한 자성비드 표지된 항체는 4 °C에서 보관하며, 0.02% (w/v) 소듐 아자드를 첨가할 경우 몇 달간 보관가능하다.

1-3. 유레아제 준비

유레아제(Urease, Sigma Co. urease type x from Jack bean; ~800 unit/mg)는 1mg/100ul 농도로 유레아제 리하이드레이션 완충액(urease rehydration buffer: 50mM ($\text{Na}_2\text{H}/\text{NaH}_2$) PO_4 , 150mM NaCl pH 7.0 and 10mM DTT)에 녹이고 상온에서 1시간동안 가볍게 교반시켰다. 이때 유레아제의 시스테인기가 완충액에 포함된 DTT에 의해 자유 SH기로 전환되어, 이후 항체의 아민기와 결합된다. 반응후, 0.1M 소듐 포스페이트 (pH 6.5) 및 5mM EDTA을 포함하는 디솔팅 완충액상에서 세파텍스 G-25 컬럼을 통과시켜 염 및 DTT를 제거하였다. 컬럼을 통과한 분획은 단백질 정량하여 유레아제가 포함된 분획만을 회수하고, 최종 유레아제 농도를 정량하였다. 유레아제는 0.1M 소듐 포스페이트 완충액(pH 6.5) 1% BSA 및 0.2% 소듐 아자드를 포함하는 완충액에 현탁하여 보관하였다.

1-4. 항체에 유레아제 표지 반응

상기에서 준비한 항체 1.25 mg에 유레아제 1.34 mg(분자비 8.3 nmol : 2.8 nmol로 약 3:1)로 혼합하였다. 4 °C에서 20시간동안 가볍게 상하 회전시킨 후, 0.1M 소듐 포스페이트 완충액(pH 6.5) 1% BSA 및 0.2% 소듐 아자드를 포함하는 완충액에 희석하여 4 °C에서 보관하였다.

실시예 2: LAPS 시스템

통상의 LAPS 장비를 사용하였다.

실험예 1: 유레아제 표지된 항체 검증

실시예 1에서 제조된 유레아제 접합된 효소를 확인하기 위하여, 전기영동을 실시하였다. 10% SDS(sodium dodecyl sulfate)가 함유된 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 만들고, 실시예 1의 유레아제 접합된 효소를 로딩한 후 120 V, 200 mA로 1시간동안 전기영동하였다. 젤(gel)을 조심스럽게 회수한 후 코마시블루(coomassie blue)로 염색하여 확인하였다.

도 7a는 유레아제 표지된 항체의 정제과정 중 세파텍스 G-25 여과단계에서 수득한 크로마토그래피 및 각 분획 수득 위치를 표시한 것이고, 도 7b는 각 분획의 SDS-PAGE 사진이다. 도 7a 및 7b에서, 라인 1은 사이즈마커(Molecular weights)이고, 라인 2는 항 토끼-살모넬라 항체이고, 라인 3은 유레아제이고, 라인 4-8은 각 분획 F1 내지 F5이다. 세파텍스G-25를 통과시켜 수득한 분획들(F1, F2 및 F3)은 SDS-PAGE에서 라인2 및 라인3의 단백질 밴드에 비하여 높은 분자량을 갖는 약 120 kDa 이상의 단백질 밴드로 확인되어 항체와 유레아제가 결합되었음을 알 수 있다. 고 분자량은 사용하는 항체와 유레아제에 따라 달라질 수 있습니다.

실험예2: 병원성 미생물 검출

(1) ELISA 검출

살모넬라 티피무리움은 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC; *Salmonella typhimurium* 1925, 2515)에서 분양받아 사용하였다. 상기 균주는 트립신 소이 배양액(thyptic soy broth, DIFCO)으로 37°C에서 250rpm으로 교반하면서 12-16 시간 액체 배양하고, 400-600 ml 트립신 소이 배양액에서 배양한 균체를 pH 7.0 PBS(phosphate buffered saline) 용액

으로 적당히 희석하고, 이를 트립신 소이 배양액에 아가(agar)를 첨가한 고형 배지에 도말 및 배양하여 균체수(colony forming unit; cfu/ml)를 측정하였다. 항체와 관련한 실험에는 살아있는 균체(live cell) 또는 끓여서 죽인 균체(heat killed cell)를 단계적으로 희석(serial dilution; $10^2 \sim 10^8$)하여 사용하였다.

살모넬라 티피뮤리움을 0 내지 10^8 cfu/ml로 단계적으로 희석한 시료 각각 500 μ l를 취하고 여기에 자성비드-항체 접합체 용액(anti-*Salmonella* antibody conjugated magnetic bead solution; 2×10^7 bead particle/ml) 10 μ l를 첨가한 후 상온에서 30분간 잘 섞어주었다. PBST(phosphate buffered saline with 0.05% tween 20) 1 ml을 가한 후 자력을 3분간 주어 상층액을 제거하였다. 유레아제 표지된 항체는 PBST 및 1% BSA(bovine serum albumin)가 포함된 용액 1 ml에 14 μ g로 희석하고, 상기 세척한 균주/자성비드-항체 접합체 반응물에 가하여 상온에서 1시간 교반반응시켰다. 이후 PBST로 세척하여 반응하지 못한 유레아제 표지된 항체를 제거하고, 100 mM 유레아가 포함된 BCP(bromocresol purple) 0.2 ml을 첨가하여 상온에서 30분간 섞은 다음 96 웰 플레이트에 이동시켜 O.D 588 nm에서 흡광도를 측정하였다.

도 8a 및 8b는 병원성 미생물 생균(a) 또는 사균(b) 검출시 ELISA 방법의 검출한계를 도출한 그래프이다. ELISA로 병원성 미생물을 검출하는 경우 검출한계가 약 10^4 cfu/ml으로 확인되었으며, 이는 생균 및 사균 모두에서 유사하였다.

(2) LAPS 시스템을 이용한 검출

상기 ELISA 검출과 동일한 방법으로 반응시킨 후, 실시하고 96웰 플레이트가 아닌 LAPS 시스템을 이용하여 살모넬라 균을 검출하였다.

자성비드-항체 접합체-항원 복합체에 유레아제 표지된 항체를 반응시킨 후, 전자석을 이용하여 자성비드를 고정하고 2-3회 세척하였다(pH 7.0 PBS-0.05% Tween 20). 최종 부피 250 내지 500 μ l로 조정된 다음 LAPS 시스템이 장착된 챔버로 이동시켰다. 챔버에서 자력을 이용하여 자성비드를 고정시킨 후 100 mM 유레아 용액을 첨가하였고, 30분 후 광전류를 측정 후 실험치를 출력하였다.

도 9a 내지 c는 LAPS 시스템을 이용한 병원성 미생물 검출결과는 나타낸 것으로, a는 pH 0.5에서 6.8까지 pH 0.2 간격의 PBS(phosphate buffered saline) 용액을 이용하여 얻은 표준곡선(standard curve)이고, b는 실제 병원성미생물(살모넬라)을 0 내지 10^8 cfu/ml까지 단계적으로 희석한 후 LAPS 시스템에서 측정한 결과이며, c는 b의 그래프에서 얻은 결과를 바탕으로 병원성 미생물의 검출한계를 나타낸 그래프이다. 상기 결과로, LAPS 시스템을 이용하는 경우 검출한계가 약 10^3 cfu/ml임을 확인할 수 있다.

실시에 3: LAPS를 이용한 병원성 미생물 검출

실시에 2의 LAPS 시스템은 하기의 방법으로 구동한다.

A. 표준 완충액으로 캘리브레이션

표준 완충액으로 PBS(pH7.0)를 캘리브레이터 펌프에 넣어 작용시켜 샘플링, 플루이딕(fluidics), 세척 및 LAPS 시스템에 각각 흘려보내어, 전체적으로 시스템을 세척하였고, 동시에 표준 완충액으로 LAPS 시스템을 캘리브레이션한다.

B. 샘플 전처리 과정(Micro tube)

i) 냉면의 경우 큰 덩어리(면 등)를 피하고 점성이 강한 시료의 경우 적당한 농도로 희석하며, 실험 범위 내의 pH를 벗어난 경우나 과량의 salt가 포함 되었다고 예상되면 표준 완충액으로 1-2회 세척한다.

ii) 시료는 1회 검사에 500 μ l가 소요되며, 여기에 자성비드-항체 접합체 10 μ l ($10^7 \sim 10^8$ bead particle / ml)를 첨가하고 약하게 혼합한 후 주입기에 장착한다.

C. 주입기

i) 시퍼 튜브(Sipper tube)와 주입 펌프를 이용하여 주입기내 반응물을 반응 챔버로 이동시킨다(약 550 μ l를 제어할 수준)

ii) 반응 챔버는 주입기와 연결되어 있으며 자체 교반 시스템을 구축하고 있어 반응조 자체가 회전한다. 반응조엔 전자석이 있어 항원과 자성비드-항체 접합체의 반응 이후 미반응 항체를 제거하는 세척과정(PBST; pH7.0 PBS-0.05% Tween 20)시 자성비드를 고정시킨다. 반응챔버에서 상온(25 ℃)로 30분간 교반 반응시킨다.

iii) 반응 챔버에 유레아제 표지된 항체(in PBST or PBST-1% BSA solution) 100 내지 200 μ l를 첨가하고 약하게 교반하면서 상온에서 1시간 반응시킨다.

iv) PBST 또는 PBST-1% BSA로 2 내지 3회 세척한다.

v) 최종 250 내지 500 μ l으로 조정된 후 LAPS 시스템으로 이동시킨다.

D. LAPS 시스템

i) 자력을 이용하여 자성비드를 고정한 후, 50 내지 200mM 유레아 용액 첨가한다.

ii) 광전류 측정하고, LAPS 프로그램을 이용하여 시료내 함유된 미생물 수를 계산한다.

발명의 효과

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명의 병원성 미생물 검출방법은 다양한 종류의 병원성 미생물을 검출할 수 있으며, 검출시간이 짧고 검출한계가 현저히 우수하다. 또한 상기 병원성 미생물 검출방법을 이용한 LAPS 시스템은 구조가 간단하고 휴대성이 우수하여 다양한 분야에 적용할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) 미생물이 함유된 시료에, 자성비드가 접합된 상기 미생물 특이 항체(자성비드-항체 접합체)를 가하여 항원-항체 반응시키는 단계;

(b) 상기 (a)의 항원-항체 반응물에, 상기 미생물에 특이적이며 유레아제 표지된 항체를 가하는 단계;

(c) 상기 (b)의 혼합물을 자기력이 존재하는 기관에 가하여 자성비드를 상기 기관에 고정시키는 단계;

(d) 상기 자성비드 및 기관을 유레아 용액에 접촉시키는 단계;

(e) 상기 유레아 용액에 전압을 가하고 동시에 기관에 LED를 조사하여, 기관 표면에서의 광전류를 측정하는 단계; 및

(f) 상기 광전류를, 정량된 미생물 균수를 시료로 사용하여 상기 (a) 내지 (e) 단계를 동일하게 실시하여 수득한 미생물 균수에 대한 광전류 변화를 나타낸 표준곡선에 대입하여 시료내 함유된 미생물의 균수를 확인하는 단계;

를 포함하는 광지시형 전위차계 센서 시스템을 이용한 병원성 미생물 검출방법.

청구항 2.

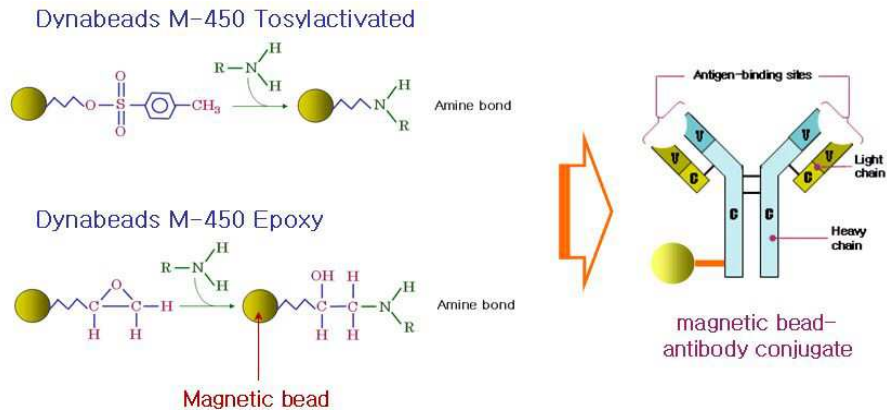
제 1항에 있어서, 상기 기관은 광지시형 전위차계 센서인 방법.

청구항 3.

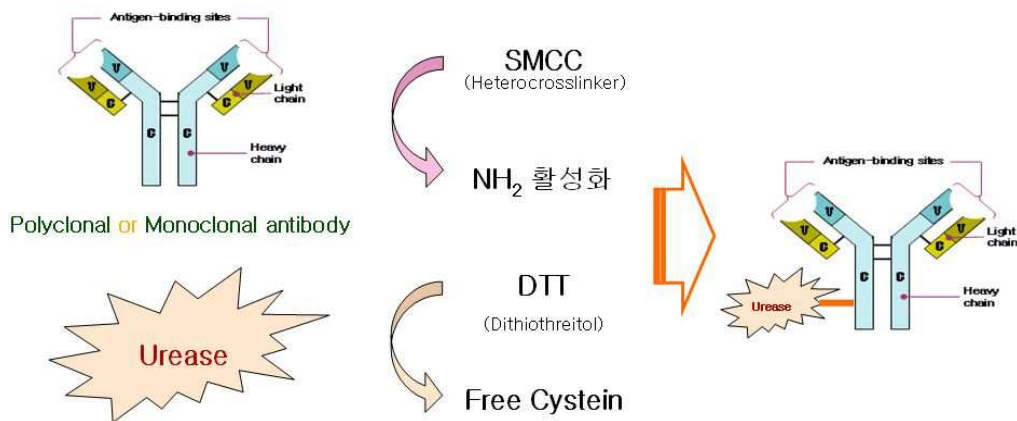
제 1항에 있어서, 상기 항체는 단클론성 항체 또는 다클론성 항체인 방법.

도면

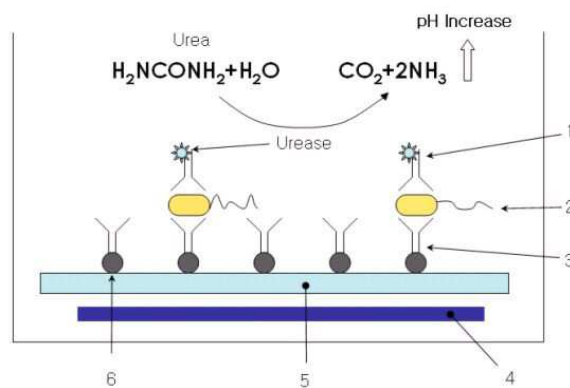
도면1



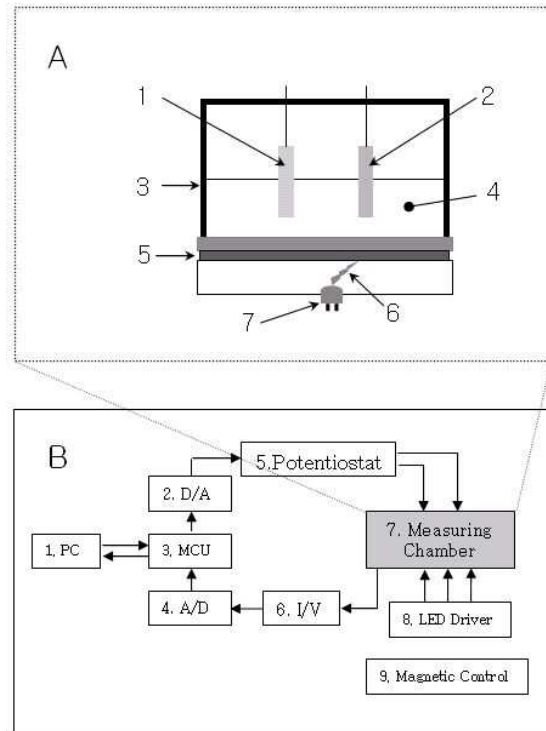
도면2



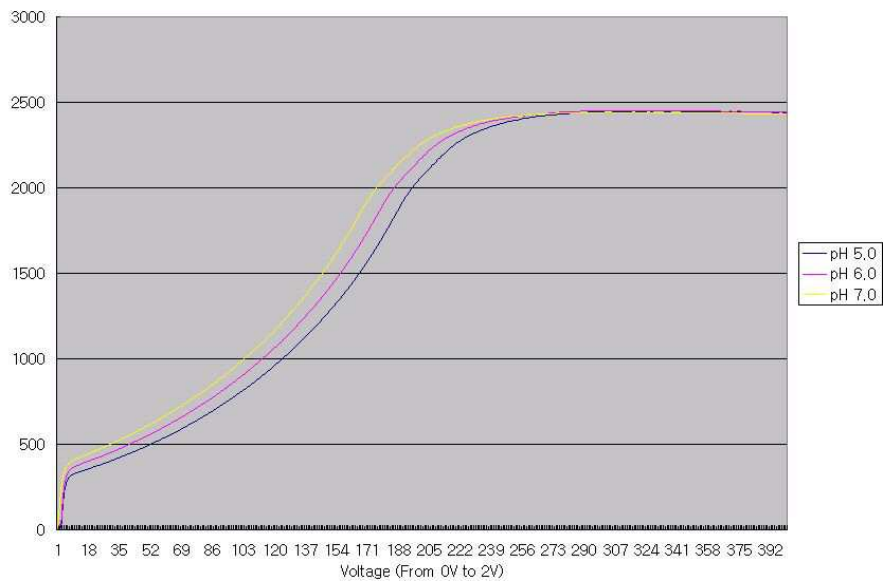
도면3



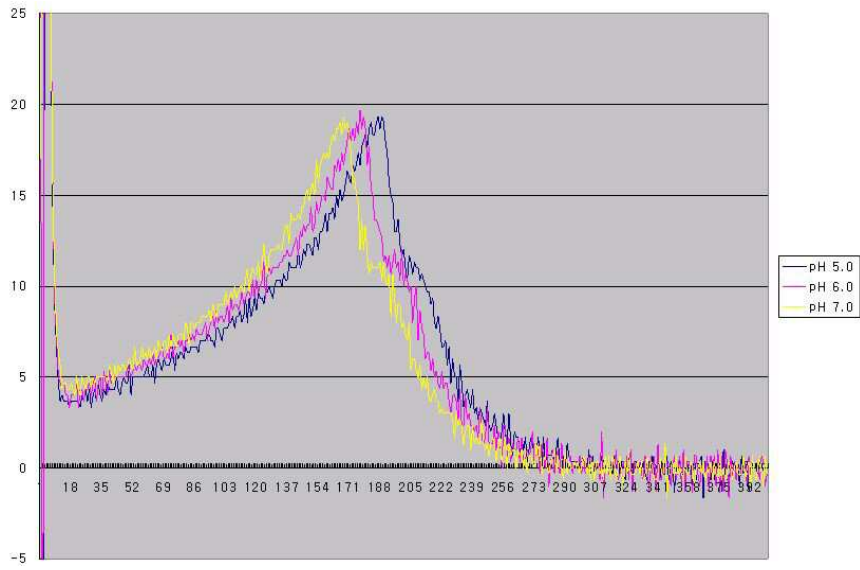
도면4



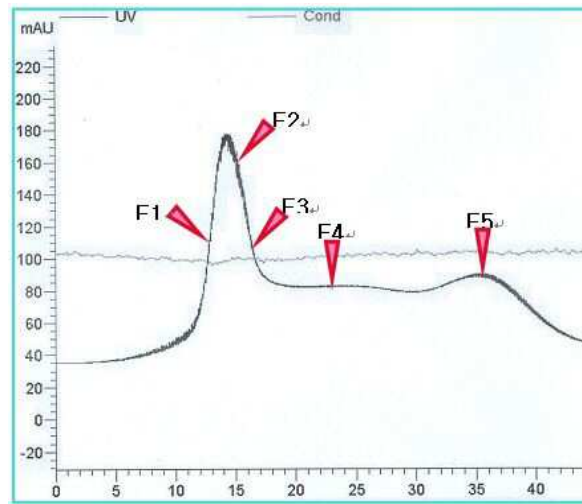
도면5



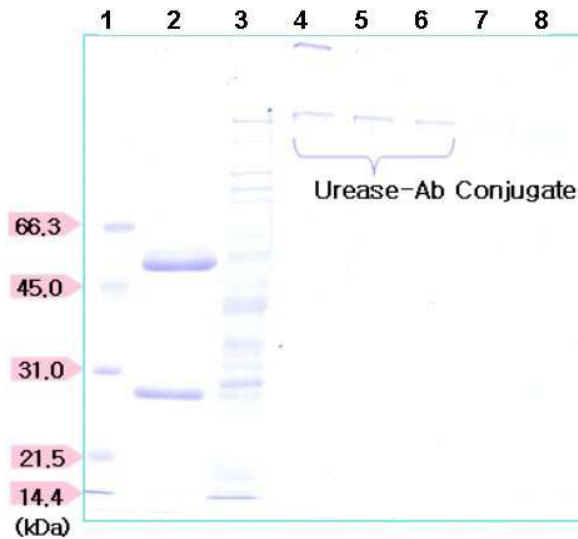
도면6



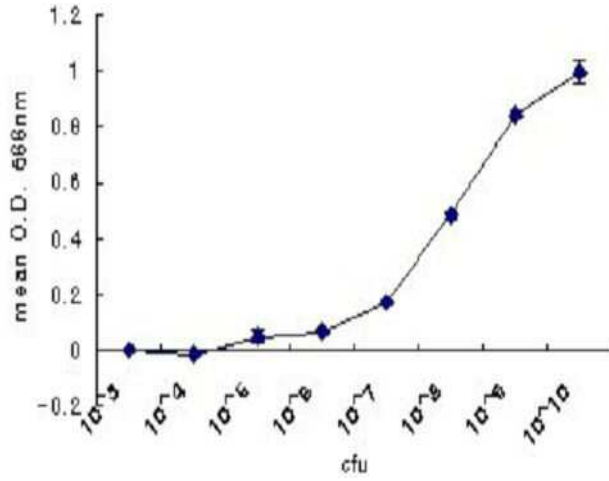
도면7a



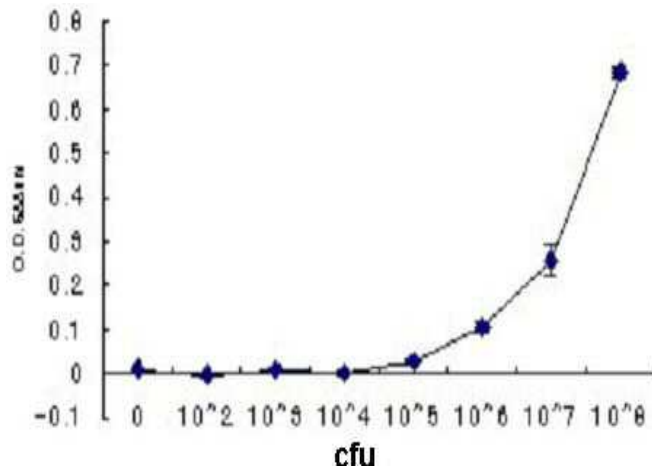
도면7b



도면8a

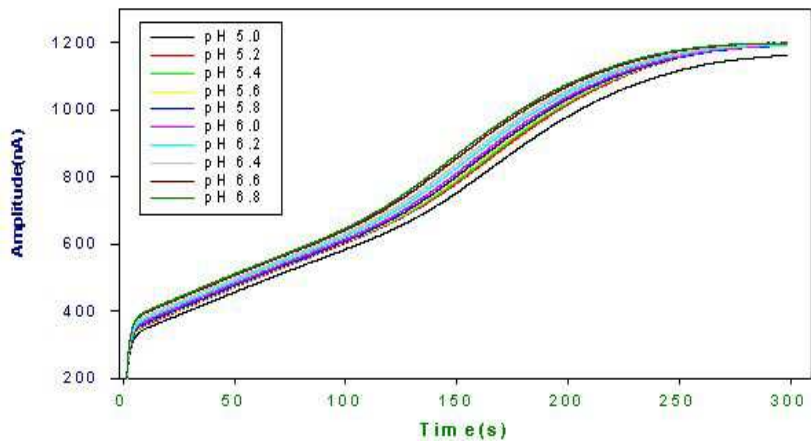


도면8b

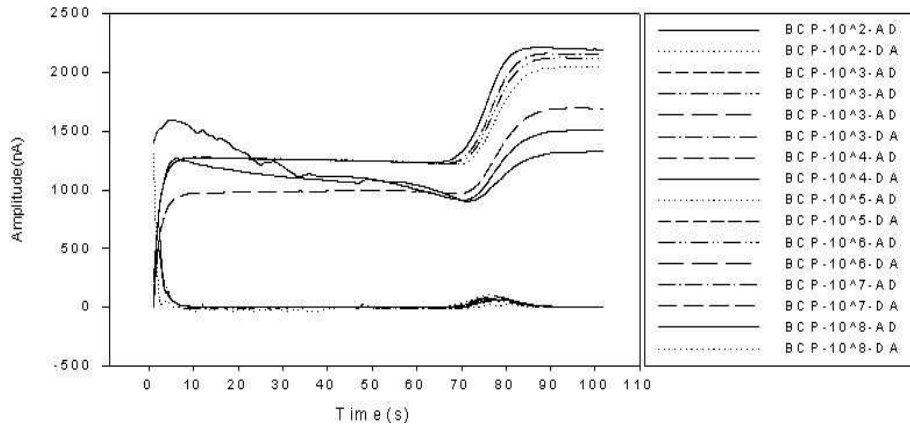


도면9a

PBS - intervals of pH 0.2



도면9b



도면9c

