

Development of Capture ELISA Using a Biotinylated Monoclonal Antibody for Detection of Botulinum Neurotoxin Type A

Yun Jeong Kim, Na-Ri Shin, Jeong-Hee Kim, So-Yeon Yoon, Gi-eun Rhie,
Bong Su Kim and Hee-Bok Oh*

Center for Infectious Diseases, National Institute of Health, 5-Nokbun-dong, Eunpyung-gu,
Seoul 122-701, Republic of Korea

Received : June 20, 2008

Revised : August 4, 2008

Accepted : August 18, 2008

A capture enzyme-linked immunosorbent assay (capture ELISA) was developed to detect *Clostridium botulinum* neurotoxin type A (BoNT/A) in assay buffer and human serum. The assay is based upon affinity-purified rabbit polyclonal and biotinylated monoclonal antibodies directed against the BoNT/A complex purified from *C. botulinum* ATCC19397. For the capture ELISA, the optimized amount (2 µg/ml) of rabbit polyclonal antibody was immobilized on ELISA plates to detect BoNT/A (ranging from 0 to 500 ng/ml), which was recognized by 2 µg/ml of the monoclonal antibody. From three independent repeated experiments, standard curves were linear over the range of 0~31.25 ng/ml BoNT/A and the coefficients (r^2) ranged from 0.9951~0.9999 for all assays. The inter-variations were typically 0.50~6.93% and the specificity was confirmed by showing no cross-reactivity against BoNT/B and /E. The detection limit of capture ELISA was 0.488 ng/ml, which was close to mouse LD₅₀. In addition, application with BoNT/A-spiking human sera showed a possibility to detect BoNT/A with capture ELISA from the contaminated human sera. Taken together, the newly developed capture ELISA could serve as a rapid and sensitive screening tool for detecting BoNT/A simultaneously from massive specimens.

Key Words: BoNT/A, Capture ELISA, Biotinylated monoclonal antibody

서 론

보툴리눔 독소 (Botulinum neurotoxin)는 절대 혐기성 세균인 *Clostridium botulinum*에서 생성되는 독소로 A-G의 7가지 혈청형으로 구분되며, 인체 노출시 심각한 신경성 이완성 마비를 야기시킴으로써 보툴리눔 중독증을 일으킨다 (3). 보툴리눔 독소는 음식물에 *C. botulinum* 포자가 오염, 발아하여 독소를 생성함으로써 자연적인 보툴리눔

중독증을 야기할 수 있을 뿐만 아니라 전쟁이나 생물테러 발생시 공기 중으로 보툴리눔 독소를 인위적으로 분사함으로써 inhalational outbreak를 야기할 수도 있다. 보툴리눔 독소는 자연계에서 생성되는 독소 중 가장 강력한 독성을 지니고 있을 뿐만 아니라 심각한 사회적 과급효과를 야기할 수 있는 특성으로 인해 미국 CDC에서 생물테러 가능물질 category A로 분류하였으며, 실제 생물테러 사용시 다수의 사람들이 동시에 독소에 노출될 수 있어 이에 대한 신속하고 정확한 탐지가 중요하다 (8).

보툴리눔 독소는 100 kDa의 heavy chain과 50 kDa의 light chain으로 구성되어 있으며, 이를 둘러싼 accessory protein과 함께 독소 복합체를 형성하고 있다. 독소 작용 기작은 체내흡수시 표적부위인 근신경접합부의 신경말단에서 아세틸콜린의 방출을 억제함으로써 근육마비를

*Corresponding author: Hee-Bok Oh. Center for Infectious Diseases, National Institute of Health, 5-Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul 122-701, Republic of Korea.

Phone: +82-2-380-2980, Fax: +82-2-780-3132
e-mail: hboh@nih.go.kr

**This study was financially supported by an intramural grant from National Institute of Health, Korea.

일으킨다 (15). 보툴리눔 독소의 작용은 비가역적 반응이기 때문에 보툴리눔 중독증에 대한 진단은 보툴리눔 독소가 완전히 결합하기 전인 임상증상 발현 초기 단계에 이루어져야 적절하고 효과적인 임상적 대처가 가능하므로 신속하고 민감한 진단법의 개발이 필수적이다. 보툴리눔 중독증에 대한 국제적 표준법은 mouse bioassay로서 민감도 및 특이도가 높아 현재까지 전세계적으로 사용해 오고 있으나, 여러 동물의 희생을 요구하고 실험결과를 얻기까지 오랜 시간 (3~4일)이 소요된다는 단점이 있다 (14). 따라서 이러한 단점을 보완하기 위하여 보툴리눔 독소 탐색을 위한 새로운 기법 연구가 지속적으로 이루어지고 있으며 (2), 이를 방법 중 면역학적 기법을 바탕으로 개발한 진단법은 생물테러 발생시 환경 혹은 인체유래 가검물을 이용한 massive testing이 가능하고 스크리닝이 용이하다는 이점이 있다. 면역학적 기법을 바탕으로 하여 개발된 탐지법 중 indirect ELISA법은 간단하지만 mouse assay 보다는 민감도가 낮으며 (14), enzyme-linked coagulation assay (ELCA)법의 경우 민감도는 높지만, snake venom coagulation factor 및 고가의 시약들이 필요하고 실험이 매우 복잡하다는 단점이 있다 (6). 최근에는 Food and Drug Administration (FDA)에서 보툴리눔 독소 ABEF 형을 동시진단할 수 있는 polyclonal antibody를 이용한 capture ELISA법을 개발하였으며 (13), Szilagyi 등은 horse polyclonal antibody를 이용한 capture ELISA법을 개발하여 보고한 바 있다 (16).

따라서 본 연구에서는 국내에서 처음으로 보툴리눔 A형 독소 탐지법을 *in vitro* 상에서 개발하고자 하였으며, 민감도 및 특이도 향상을 위하여 기존의 보고에서 시도되지 않은 토끼 polyclonal antibody와 biotin-conjugated monoclonal antibody의 조합으로 capture ELISA법을 개발하였다. 또한 보툴리눔 독소를 normal human serum에 직접 spiking하여 검사하거나 mouse bioassay와의 민감도 비교를 통해 본 연구에서 개발된 방법을 검증함으로써 향후 생물테러와 관련된 다양한 샘플을 동시에 스크리닝할 수 있는지의 여부를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 보툴리눔 A형 독소 (BoNT/A) 정제

토끼 항체 제작 및 마우스 단클론항체 제작을 위한 BoNT/A는 Malizio (11) 등이 제시한 방법에 의해 정제하

여 사용하였다. 간단히 기술하면, *C. botulinum* ATCC-19397을 독소 생성용 배지 (2% casein acid, 1% yeast extract, 0.5% glucose)에 37°C에서 48시간 동안 혼기 배양한 후 *C. botulinum* 배양액에 3 N sulfuric acid를 처리하였으며, 침전물에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.0)를 첨가하여 독소를 용출한 후 원심 상층액을 60% ammonium sulfate로 재침전하였다. 침전물을 다시 수거하여 0.05 M sodium citrate buffer (pH 5.5)로 용해시키고, 동일한 buffer에서 투석하여 염을 제거한 후 anion exchange column (Pharmacia, Uppsala, Sweden)에 적용함으로써 BoNT/A를 분리정제하였다. 정제 독소는 SDS-PAGE 및 Western blot을 실시한 후, 마우스에서의 LD₅₀를 결정함으로써 BoNT/A의 생물활성도를 확인하였다. LD₅₀는 2-fold dilutions된 5가지 서로 다른 농도의 BoNT/A를 ICR 마우스 (4주령, female)에 그룹당 8마리씩 복강내 접종한 후 그 생존 여부를 Reed and Muench법에 의해 분석하여 결정하였다 (12).

2. 토끼유래 anti-BoNT/A polyclonal antibody (PAb)의 준비

Capture ELISA를 위한 PAb는 BoNT/A toxoid에 대하여 면역한 토끼 항혈청으로부터 정제하여 사용하였다. 먼저, BoNT/A를 formalin을 0.4%가 되도록 첨가하여 37°C에서 shaking 상태로 5일간 방치하여 무독화시킨 후, BoNT/A toxoid 0.5 mg을 Freund's adjuvant (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 흡착시켜 토끼 대퇴부 근육에 2주 간격으로 3회 면역하였다. 토끼 항혈청은 최종면역 2주 후 심장 채혈을 통해 확보하였으며, mouse bioassay법 (1)을 이용하여 중화능을 확인하였다. 즉, 250 µl의 BoNT/A (10,000LD₅₀)를 동량의 gelatin phosphate buffer (pH 6.2) 혹은 동량의 토끼 항혈청과 혼합하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 2마리 ICR mouse의 복강 내에 각각 접종하여 마우스 생존 여부를 확인하였다. Capture ELISA를 위한 PAb는 중화능이 확인된 토끼 항혈청으로부터 protein A affinity column (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 이용하여 정제하여 준비하였다. 즉, 혈청과 binding buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.0)를 1:1의 비율로 혼합하여 column에 loading한 후 10 ml의 binding buffer를 이용하여 세척하였으며 (1 ml/min), column에 결합한 IgG는 elution buffer (0.1 M glycine-HCl, pH 2.7)를 사용하여 분리한 후 SDS-PAGE gel에 전기영동함으로써 정제도를 확인하고

최종적으로 PBS (pH 7.2)로 투석·농축하여 -20°C에 보관하였다.

3. Monoclonal antibody (MAb)의 준비 및 biotinylation

MAb는 *C. botulinum* ATCC19397로부터 정제한 BoNT/A 복합체를 항원으로 사용하여 (주)중겸 (안산, 대한민국)에 의뢰하여 제작하였다. MAb 제조를 위한 clone을 결정하기 위하여 hybridoma cell 중 BoNT/B 및 BoNT/E에 대한 반응 없이 BoNT/A에만 결합하는 12개의 clone을 indirect ELISA를 이용하여 먼저 스크리닝한 후, 이를 Western blot analysis에 적용하여 BoNT/A-binding efficacy가 높은 3개의 clone (16F9, 24D1 및 28B3)을 선별하였다. 선별된 3개의 clone에 대한 마우스 복수액을 제조한 후 이를 capture ELISA에 적용하여 각각의 antigen capture ability를 조사하였다. Capture ELISA를 위한 MAb는 가장 높은 antigen capture ability를 가진 마우스 복수액 (16F9)으로부터 protein G affinity column (Amercham Biosciences)을 이용하여 정제한 후 monoclonal antibody isotyping kit (HRP/ABTS) (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 MAb의 IgG subclass를 결정하였다.

민감도 개선을 위한 biotinylation은 1.5 mg의 MAb를 1 ml의 PBS에 용해시킨 후 0.02 ml의 10 mM NHS-biotin (Pierce)과 혼합하여 ice에서 2시간 방치함으로써 수행하였으며, 20 mM ammonium acetate로 투석하여 결합하지 않은 biotin을 제거한 다음 biotinylated antibody를 0.1 mg 씩 aliquot하여 -20°C에 보관하였다.

4. Capture ELISA

BoNT/A에 대한 capture ELISA법은 토끼 PAb를 capture antibody로, biotinylated MAb를 detection antibody로 사용하여 개발하였다. 먼저, 토끼 PAb를 coating buffer (0.1 M sodium carbonate, pH 9.6)에 2 µg/ml이 되도록 희석하여 well당 100 µl씩 분주하여 4°C에 하룻밤 방치한 후, PAb-coated plate를 tween 20°이 첨가된 PBS (tween 20-PBS)로 3회 세척하였다. 1% BSA를 well당 200 µl씩 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 다음, tween 20-PBS로 다시 3회 세척하였다. BoNT/A는 tween 20-PBS 또는 10% normal human serum에 2-fold dilutions하여 100 µl를 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. BoNT/A의 탐지를 위하여 biotinylated MAb (2 µg/ml) 및 neutravidin-linked alkaline phosphatase (2,000:1, Pierce)를 순서대로 well 당 100 µl씩

분주하여 37°C에서 1시간 반응시킨 다음, 2 mg/ml 2-NPP (Sigma)를 이용하여 30분간 발색시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. BoNT/A에 대한 detection limit은 [대조군 평균값 (3 human sera (10%)) + 2 standard deviation]를 cut-off로 하여 결정하였으며, 본 실험은 intra-day 및 inter-day에 각각 3회 이상 반복하여 재현성 및 반복성을 확인하였다.

Capture ELISA법의 보툴리눔 독소 B형 (BoNT/B) 및 E형 (BoNT/E)에 대한 cross-reactivity는 BoNT/A 대신 Wako사 (Osaka, Japan)에서 구입한 BoNT/B 및 BoNT/E를 2-fold dilutions하여 적용함으로써 확인하였으며, 실제 사람 혈청에서의 독소 탐지 여부는 3명의 서로 다른 10% human normal serum에 독소를 31.25, 3.906, 0.4883 ng/ml이 되도록 첨가한 후 본 방법에 적용함으로써 확인하였다. 마지막으로 LD₅₀와의 독소 탐지능 비교를 위하여 Wako사에서 구입한 독소, ATCC19397 및 ATCC3502로부터 정제한 독소를 재료 및 방법 1에서 제시한 방법과 같이 LD₅₀를 결정한 다음 본 방법에 적용하여 detection limit를 비교하였다.

결 과

1. Capture ELISA를 위한 standard curve 및 detection limit 결정

BoNT/A 탐지를 위한 capture ELISA는 토끼 PAb를 capture antibody로, biotin-conjugated MAb를 detection antibody로 사용하여 개발하였다. 토끼 PAb를 정제하기 위한 토끼 항혈청의 경우 mouse bioassay를 통해 BoNT/A에 대한 중화능을 보유하고 있음을 확인하였다. Detection antibody로 사용된 MAb는 BoNT/A 복합체 중 약 38 kDa의 accessory protein에 결합하였으며, IgG isotyping test 결과 IgG1 subclass로 분류되었다. 또한 PAb 및 MAb에 대한 Western blot 결과 BoNT/B 및 BoNT/E에 대한 교차반응 없이 BoNT/A에 특이적으로 결합함을 확인하였다.

본 연구에서 개발한 capture ELISA는 BoNT/A의 농도 범위 0~500 ng/ml에 대하여 적정곡선을 나타냈으며 (Fig. 1A) 특히, 0에서 31.25 ng/ml 범위에서는 직선회귀곡선 (상관계수 (r^2)=0.9951~0.9999)을 나타냄으로써 보툴리눔 독소량에 대하여 비례적으로 반응함을 확인하였다 (Fig. 1B). 또한 BoNT/A (5.0×10^5 mouse i.p. LD₅₀/mg)에 대한 detection limit은 [대조군 평균값 (3 human sera (10%)) + 2

standard deviation]를 cut-off로 하여 결정한 결과 0.488 ng/ml의 독소를 탐지할 수 있었다.

2. Inter- 및 intra-assay variation

새로 개발한 capture ELISA법의 독소 탐지에 대한 실험 반복성 (repeatability) 및 재현성 (reproducibility)을 확인하기 위하여 BoNT/A에 대하여 1회 실험 당 3 replicates (intra-day)으로 3회 (inter-day) 실험을 반복 실시하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다. 즉, BoNT/A의 농도 0부터 31.25 ng/ml에 대한 inter- 및 intra-assay variation은 흡광도 (OD₄₀₅) 절대값의 1~11% 범위로 매우 안정적인 결과를 나타내었다.

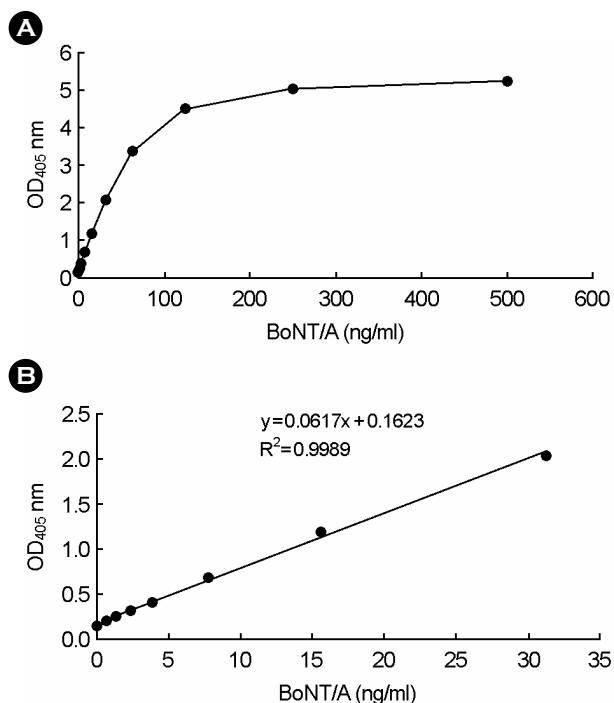


Figure 1. Capture ELISA for detection of BoNT/A. The ELISA was performed with a serial of 2-fold dilutions of BoNT/A ranging from 0 to 500 ng/ml (**A**) and 0 to 31.25 ng/ml (**B**), which were recognized by 2 µg/ml of a biotinylated anti-BoNT/A MAb.

Table 1. Intra-(reproducibility) and inter-assay variability (repeatability) of the BoNT/A ELISA's. Results are expressed as OD₄₀₅ (\pm standard deviation)

	31.25 ng/ml	15.63 ng/ml	7.813 ng/ml	3.906 ng/ml	1.953 ng/ml	0.977 ng/ml	0.488 ng/ml	0.000 ng/ml	mean r^2 ^c
Intra-variability ^a	2.1470 (\pm 0.0513)	1.1700 (\pm 0.0312)	0.6520 (\pm 0.0531)	0.4067 (\pm 0.0486)	0.2773 (\pm 0.0070)	0.2063 (\pm 0.0227)	0.1767 (\pm 0.0029)	0.1507 (\pm 0.0049)	0.9999 (\pm 0.0004)
Inter-variability ^b	2.0656 (\pm 0.1431)	1.1697 (\pm 0.0245)	0.6680 (\pm 0.0151)	0.4044 (\pm 0.0020)	0.2760 (\pm 0.0038)	0.2111 (\pm 0.0043)	0.1807 (\pm 0.0050)	0.1521 (\pm 0.0040)	0.9989 (\pm 0.0026)

^aTo measure intra-assay variability, three independent assays were performed by the same operator in a single day.

^bTo measure inter-assay variability, three independent assays were performed on separate days by the same operator.

^cCorrelation coefficients (r^2) describe the linear regression lines to the standard curves

3. BoNT/B 및 BoNT/E에 대한 cross-reactivity

BoNT/A에 대한 capture ELISA가 다른 혈청형의 독소에 대해서 cross-reactivity가 있는지 조사하였다. Cross-reactivity는 사람 보툴리눔 중독증과 주로 관련된 독소 혈청형인 BoNT/B 및 BoNT/E에 대하여 확인하였으며, 0~31.25 ng/ml의 각각의 독소 농도 범위에 대한 흡광도 (OD₄₀₅)값은 0.1290~0.1640 범위로서 보툴리눔 A형 독소 0 ng/ml에서 분석된 흡광도값인 0.1458~0.1561과 차이가 없었다 (Fig. 2). 즉, 보툴리눔 A형 독소만을 특이적으로 탐지할 수 있는 것으로 확인하였다.

4. BoNT/A-spiking human serum을 이용한 capture ELISA

Capture ELISA법이 환자 혈청으로부터의 독소 탐지능이 있는지 확인하기 위하여 10% normal human serum에 인위적으로 보툴리눔 A형 독소 31.25, 3.91, 0.488, 0 ng/ml

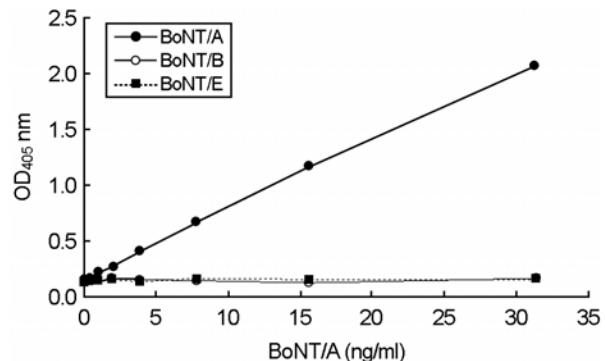


Figure 2. Specificity of the capture ELISA for BoNT/A detection. The ELISA was performed with a serial of 2-fold dilutions of BoNT/X (A, B, and E) ranging from 0 to 31.25 ng/ml.

Table 2. Comparison of the sensitivity between capture ELISA and mouse LD₅₀ for BoNT/As prepared from various origins

BoNT/A originated from	Mouse i.p. LD ₅₀ /mg	Detection limit by capture ELISA (ng/ml)	Conversion of sensitivity of capture ELISA to LD ₅₀
Wako Co. (commercial)	2.00 * 10 ⁷	0.122	2.441 LD ₅₀
ATCC3502 (in this study)	2.70 * 10 ⁶	0.061	0.165 LD ₅₀
ATCC19397 (in this study)	5.00 * 10 ⁵	0.488	0.244 LD ₅₀

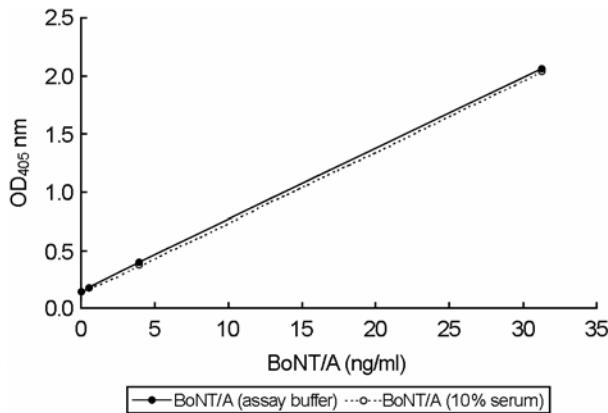


Figure 3. Detection of BoNT/A in 10% human serum by capture ELISA. Three different 10% human serum in assay buffer was spiked with BoNT/A at final concentrations of 32.25, 3.906 and 0.488 ng/ml. Results are expressed as OD₄₀₅ (\pm standard deviation). Correlation coefficients (r^2) describe the linear regression lines to the standard curves. The r^2 value was determined as 0.9989 (\pm 0.0026) and 0.9998 (\pm 0.0002) for assay buffer and 10% human serum, respectively.

를 각각 첨가하여 capture ELISA를 수행하였으며, 그 결과 assay buffer만으로 실험하여 설정한 standard curve와 매우 유사한 양상을 나타내었다 ($p<0.05$) (Fig. 3).

5. Capture ELISA와 mouse bioassay의 비교

Capture ELISA와 mouse bioassay 간 민감도를 비교하기 위하여 Reed and Muench법 (12)에 의해 LD₅₀를 결정한 2 가지의 서로 다른 origin의 A형 독소 및 상업적으로 판매하는 보툴리눔 독소 (Wako사)를 사용하여 detection limit을 결정하였다. 이들 독소에 대한 detection limit은 0.061~0.488 ng/ml로서, 마우스에서의 생물활성도와 유사한 민감도를 나타내었다 (0.165~2.441 LD₅₀) (Table 2).

고 찰

보툴리눔 독소는 자연계에서 생성되는 가장 강력한 독소로서 역사적으로 생물학적 무기로 적용하기 위한

시도가 여러 차례 이루어진 바 있다 (7). 현재 보툴리눔 중독증에 대한 국제적인 표준 진단법은 mouse bioassay이며, 이 방법은 보툴리눔 독소 탐지에 대한 민감도 (sensitivity) 및 특이도 (specificity)가 매우 우수하나 하나의 샘플에 대하여 많은 수의 마우스가 요구되고 결과를 얻기까지 오랜 시간 (3~4일 이상)이 소요된다는 점에서 생물테러 발생시 적용하기에 한계가 있다. 따라서 본 연구에서는 다양한 사람 혈청으로부터 보툴리눔 A형 독소를 신속정확하게 탐지할 수 있는 *in vitro* 독소 스크리닝 법을 개발하고자 하였으며, 이를 위하여 면역학적 기법에 바탕을 둔 capture ELISA법을 적용하고자 하였다.

보툴리눔 A형 독소 탐지용 capture ELISA법은 토끼 혈중 IgG를 capture antibody로, biotin-conjugated monoclonal antibody를 detection antibody로 사용함으로써 개발하였다. 새로 개발한 capture ELISA법을 실제 보툴리눔 중독증 환자의 혈청에 적용하기 위해서는 standard curve를 기준으로 하여 BoNT/A에 대한 특이적 탐지능을 보유하고 있어야 하며, 실험데이터가 안정적으로 재현 (reproducibility)되어야 하고, 인체유래 가검물로부터 독소 검출 (detectability)이 가능하여야 한다. 이와 더불어 현재 이용되고 있는 mouse bioassay와 유사한 민감도 (sensitivity)를 보유하고 있어야만 capture ELISA를 독소 스크리닝을 위한 수단으로서 사용할 수 있다.

본 연구에서 새로 개발한 capture ELISA법이 위와 같은 조건을 충족시키는지 확인하기 위하여 먼저 capture ELISA의 민감도를 조사한 결과, BoNT/A에 대한 detection limit은 0.488 ng/ml로서 Chiao 등 (4)이 보고한 capture ELISA의 detection limit (5 ng/ml)보다 약 10배 이상 우수한 민감도를 나타내었으며, Szilagyi 등 (16)이 보고한 capture ELISA와는 유사한 detection limit (0.5 ng/ml)를 나타내었다. 또한 detection antibody인 monoclonal antibody에 biotin을 결합시킴으로써 capture ELISA의 민감도가 약 4 배 증가하였으며, 이는 biotin을 결합시킨 항체를 사용할 경우 민감도가 증가된다는 이전 보고 (9)와 동일한 결과

이다. 또한 본 capture ELISA법의 독소 탐지에 대한 반복 실험결과, BoNT/A의 농도 0부터 31.25 ng/ml에 대한 intra-variation 및 inter-variation은 흡광도 (OD_{405}) 절대값의 1~11%로 Szilagyi 등 (16)이 보고한 capture ELISA의 variation 범위와 유사한 것으로 나타났다.

본 연구에서 개발한 capture ELISA는 BoNT/A의 농도 0~31.25 ng/ml 범위에서 직선회귀곡선 ($r^2=0.9951\sim0.9999$)을 나타냄으로써 보툴리눔 독소량에 대하여 비례적으로 반응함을 확인하였다 (Fig. 1B). 즉, 이는 capture ELISA의 실험결과값 (OD_{405})으로부터 미지의 샘플에 포함되어 있는 BoNT/A의 양을 예측할 수 있음을 의미한다. 또한 capture ELISA는 실험결과를 얻기까지 약 8시간 정도 소요되며, 따라서 검사당일 샘플내 보툴리눔 A형 돒소 존재 여부 스크리닝이 가능하므로 mouse bioassay의 결과를 얻기까지 소요되는 기간을 단축할 수 있다는 장점이 있다.

사람에서는 7가지 보툴리눔 돒소 혈청형 중 A, B 및 E형이 주로 보툴리눔 중독증을 유발하며 (15), 한국의 경우 A형 및 B형 돒소에 의한 보툴리눔 중독증 확진 환자가 발생한 바 있다 (5,17). 이들 혈청형 간에는 30~60%의 sequence homology가 존재하나 (10) 각 혈청형에 따라서 다른 항원성을 나타내기 때문에 환자에서의 돒소 혈청형을 알아야 적절한 항독소 처치가 가능하므로 혈청형을 확인하는 것이 중요하며, 따라서 개발된 보툴리눔 A형 돒소 탐지법은 A형 돒소에 대한 specificity를 보유하고 있어야 한다. 본 연구에서 확립한 capture ELISA법은 0에서 31.25 ng/ml의 농도 범위에 대하여 보툴리눔 돒소 B 및 E형에 대한 교차반응 없이 보툴리눔 A형 돒소만을 탐지함으로써 (Fig. 2) 보툴리눔 돒소 A형만을 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

보툴리눔 중독증에 대한 outbreak 혹은 생물테러가 발생하였을 경우 가장 일반적으로 의심환자의 분변, 혈청 및 발생 역학적 관련성을 나타내는 음식물이 주요 실험실 진단 가검물로 사용된다 (16). 따라서 capture ELISA법이 환자 가검물로부터의 돒소 탐지능이 있는지 확인하기 위하여 인체유래 혈청이 첨가된 assay buffer에 인위적으로 BoNT/A를 첨가하여 실험을 수행하였으며, 그 결과 assay buffer만으로 실험하여 설정한 standard curve와 유사한 양상을 나타내었다 ($p<0.05$) (Fig. 3). 이는 본 capture ELISA법이 생물테러 발생시 영향받은 사람의 혈청으로부터 극미량의 보툴리눔 A형 돒소를 용이하게 탐지할

수 있음을 보여 주는 결과라 할 수 있다. 마지막으로 capture ELISA와 mouse bioassay 간 민감도를 3가지의 서로 다른 origin의 돒소에 대하여 비교한 결과, 이들 돒소에 대한 detection limit은 0.061~0.488 ng/ml로서 마우스에서의 생물활성도와 유사한 민감도를 나타내었다 (0.165~2.441 LD₅₀) (Table 2).

결론적으로, 본 연구에서는 토끼 polyclonal antibody 및 biotinylated monoclonal antibody를 이용한 보툴리눔 A형 돒소 탐지용 고감도 스크리닝법을 개발하여 반복성, 재현성, 특이성 및 사람 혈청에서의 돒소 탐지능을 확인함으로써 검증하였다. 또한 새로 개발한 capture ELISA법이 mouse bioassay와 유사한 민감도를 나타냄으로써 향후 생물테러 발생시 mouse bioassay에 대한 대체수단으로서 다양한 사람 혈청에 대한 보툴리눔 A형 돒소 동시 스크리닝에 매우 유용하게 활용할 수 있을 것으로 판단된다. 나아가 보툴리눔 돒소증 의심환자 발생시 초기 단계에 신속정확한 결과를 도출해 냄으로써 실험실 진단에 대한 중요한 supportive data로서도 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Boroff D, Fleck U: Statistical analysis of a rapid *in vivo* method for the titration of the toxin of *Clostridium botulinum*. *J Bacteriol* **92**: 1580-1581, 1966.
- 2) Cai S, Singh BR, Sharma S: Botulism diagnostics: from clinical symptoms to *in vitro* assays. *Crit Rev Microbiol* **33**: 109-125, 2007.
- 3) Center for Disease Control and prevention: Botulism in the United States, pp 1899-1996. Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta GA. 1998.
- 4) Chiao DJ, Wey JJ, Tang SS: Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detection of botulinum neurotoxin type A. *Hybridoma* **27**: 43-47, 2008.
- 5) Chung GT, Kang DH, Yoo CK, Choi JH, Seong WK: The first outbreak of botulism in Korea. *Korean J Clin Microbiol* **6**: 160-163, 2003.
- 6) Doellgast GJ, Triscott MX, Beard GA, Bottoms JD, Cheng T, Roh BH, Roman MG, Hall PA, Brown JE: Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification.

- fication via enzyme-linked coagulation assay. *J Clin Microbiol* **31**: 2402-2409, 1993.
- 7) **Geissler E, Moon JE van Courtland:** Biological and toxin weapons: Research, development and use from the middle ages to 1945. Sipri Chemical & Biological Warfare Studies No. 18. Oxford University Press Inc, New York, 1999.
- 8) **Greenfield RA, Brown BR, Hutchins JB, Iandolo JJ, Jackson R, Slater LN, Bronze MS:** Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. *Am J Med Sci* **323**: 326-340, 2002.
- 9) **Heckels JE, Virji M:** Separation and purification of surface components. pp 67-135. In Bacterial cell surface techniques, Hancock IC, Poxton IR (Ed), John Wiley & Sons, Chichester, England, 1988.
- 10) **Lacy DB, Stevens RC:** Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol* **291**: 1091 -1104, 1999.
- 11) **Malizio CJ, Goodnough MC, Johnson EA:** Purification of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin. pp 27-39, Bacterial toxins: methods and protocols, Vol. 145, Holst O (Ed), Humana Press, Totowa, NJ, 2000.
- 12) **Reed LJ, Muench H:** A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg* **27**: 493-497, 1938.
- 13) **Sharma SK, Ferreira JL, Eblen BS, Whiting RC:** Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1231-1238, 2006.
- 14) **Shone C, Wilton-Smith P, Appleton N, Hambleton P, Modi N, Gatley S, Melling J:** Monoclonal antibody-based immunoassay for type A *Clostridium botulinum* toxin is comparable to the mouse bioassay. *Appl Environ Microbiol* **50**: 63-67, 1985.
- 15) **Simpson LL:** Botulinum neurotoxin and tetanus toxin. Academic Press, San Diego, 1989.
- 16) **Szilagyi M, Rivera VR, Neal D, Merrill GA, Poli MA:** Development of sensitive colorimetric capture elisas for *Clostridium botulinum* neurotoxin serotypes A and B. *Toxicon* **38**: 381-389, 2000.
- 17) **Yi HA, Lim JG, Lee JB, Her JH, Kim HA, Shin YE, Cho YW, Lee H, Yi SD:** A familial outbreak of food-borne botulism. *J Korean Neurol Assoc* **22**: 670-672, 2004.