GOVP1200102831

최 종
연구보고서

식품의 안전성 확보를 위한 첨단면역분석기술개발

Development of Advanced Immuno-Analytical Technology for the Safety of Foods

주관연구기관
경 상 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "식품의 안전성 확보를 위한 첨단면역분석기술개발" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000 년 12 월 20 일

주관연구기관명 : 경상대학교
총괄연구책임자 : 정 덕 화
연 구 원 : 강 진 순
연 구 원 : 송 재 영
연 구 원 : 강 성 조
연 구 원 : 박 정 현
연 구 원 : 이 종 철

요 약 문

I. 제목 : 식품의 안전성확보를 위한 첨단면역분석기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

음용수를 포함한 식품에서의 유해잔류물질의 오염은 중요한 환경문제로 오래 전부터 대두되어왔다. 그 중 잔류농약, 잔류항생물질 및 잔류곰팡이독소 등은 세계적으로 널리 문제가 제기되고 있는 유해잔류물질로서 최근 지하수나 토양 및 식품에의 오염으로 인해 환경 또는 건강에 미치는 해로움 때문에 많은 관심을 끌어왔다.

식품과 사료에서의 잔류농약, 항생물질 및 곰팡이독소 등의 유해물질의의 잔류는 사람이나 동물의 건강에 잠정적으로 유해하며 이러한 유해물질에 사람이 노출되는 위험을 줄이기 위한 많은 연구가 수행되었다. 이러한 유해물질의 분석을 위해서는 보다 민감하고 신속하며 정확한 방법이 요구되지만 이러한 유해물질이 식품이나 사료 중에 지극히 소량으로 있기 때문에 실제 식품에서의 유해물질분석은 어려움에 직면하게 되었다. 간단한 시료의 정제과정과 새로운 크로마토그래피방법, 특히 HPLC와 다른 화학적 방법들이 최근 수년동안에 개발되었지만 이들 방법은 너무 복잡하거나 민감하지 않을 뿐만 아니라 부대장치가 필요하고 측정 전에 광범위한 정제과정이 필요하였다. 이러한 어려움을 해결하기 위한 노력으로 각종유해잔류물질에 민감하고 특이한 radioimmunoassay법이 응용되었으나 폐기물의 처리 및 방사성 시약의 보관 등과 관련한 안정성이 문제가 되었다. 최근에는 이를 대체하는 간단한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법이 미국을 비롯한 외국에서 소개되었다. 우리나라에서는 식품에

서의 이들 잔류농약, 항생물질 및 곰팡이독소등의 오염이 농산물의 수출입과정에서 식품의 안정성 확보를 위한 중요한 검색 대상이 되고있다.

그러나 저분자 화학물질은 실험동물의 면역체계가 인지하지 못하므로 항체 생산을 위한 면역반응을 일으키기위해 분자량이 큰 단백질을 인위적으로 결합시켜 항원성을 부여하는 일이 필요하다. 최근 본 연구자들도 농약과 같은 환경에 잔류하는 유해물질을 측정하기 위한 신속한 검색방법을 개발하기 위한 연구를 계속해왔다.

Ⅲ. 연구개발내용 및 범위

본 실험에서는 잔류농약(atrazine), 항생물질(sulfamethazine) 및 곰팡이독소(vomitoxin)등의 유해잔류물질을 모니토링하는 신속하고 감도높은 첨단면역기술 개발을 하여 식품의 안전성 확보를 하고자 다음과 같은 연구를 수행하고자 한다.

1) 유해잔류농약(atrazine), 항생물질(sulfamethazine) 및 곰팡이독소(vomitixin)에 대한 항원합성
2) 유해잔류물질에 대한 항체 생산을 위한 hybridoma cell line 개발
3) 단크론성항체의 생산과 특성
4) 효소면역측정법의 확립
5) Immunoaffinity column 제작
6) ELISA KIT의 실험제작
7) 유해잔류물질의 모니토링 시스템의 확립
8) 모니토링 시스템의 응용

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구결과

가. 식품 중 잔류농약(atrazine)의 첨단면역분석기술 개발

1) 단크론성항체를 개발하기위해 우선 atrazine을 atrazine-hapten으로 전이시키고 이들을 BSA, OVA, KLH등과 결합시켜 항원 또는 coating conjugate를 합성하였다.
2) 형질세포종세포(p3×63Ag8. v653)와 atrazine-BSA conjugate를 면역시킨 암컷 BALB/c 마우스의 비장세포를 융합시켜 atrazine에 대한 단크론성항체를 생산하는 hybridoma cell line을 확보하였다.
3) Hybridoma cell을 mouse복강에 주사하여 생산한 단크론성 항체를 이용하여 atrazine을 측정하기위해 direct competitive ELISA법을 개발하였다. 이 분석법은 매우 민감하게 시료 1㎖당 0.05-10ppb의 atrazine을 분석할 수 있었다. 또한 생성된 단크론성항체는 simazine과는 11%의 교차반응을 보였으나 parathion, bromacil, ebntazone 및 2,4-D와는 교차반응을 나타내지 않았고, atrazine 분석을 위한 ELISA 수행에는 약 1시간이 소요되었다.
4) Immunoaffinity column을 실험적으로 조제하여 식품 시료 중의 atrazine을 정제하기 위해 우선 항체를 gel-(affi-gel 10)에 결합시켰다. Column은 먼저 10㎖ PBS로 씻고 난 뒤 시료용액을 충진했으며 그리고 10㎖의 증류수와 10 ㎖의 PBS로 충진한 시료용액을 씻은 후 5㎖의 methanol로 column에 결합되어있는 atrazine을 용출시켰다. 이때 atarzine의 immunoaffinity column에 의한 회수율은 92%이었다.

5) Atrazine 분석을 위한 실험적 ELISA kit 한셋트에는 다음과 같은 것이 포함되었다. 즉, 항체가 coating된 microtiter well이 35줄(12well/줄), 1000ppb농도의 표준 atrazine용액(A용액), 1㎎ HRP를 1㎖ PBS에 녹인 HRP 용액 100㎕(B용액), 5㎖의 ABTS 용액(C용액), 25㎖의 citrate buffer(D용액), 25㎖의 정지용액(E용액) 등이다.
6) 개발된 모니토링 시스템으로 96개의 농산물과 18개의 수입옥수수를 대상으로 atrazine을 분석하였으며 그 결과 분석한 시료 중 atrazine에 오염된 시료는 없는 것으로 나타났다.

나. 식품중 잔류항생물질(sulfamethazine)의 첨단면역분석기술 개발

1) 단크론성 항체를 개발하기위해 우선 sulfamethazine을 hapten 조제없이 바로 bovine serum albumin(BSA) 또는 ovalbumine(OVA)과 결합시켜 immunogen 또는 coating conjugate로 사용하였다.
2) 형질세포종세포(p3×63Ag8. v653)와 sulfamethazine-BSA를 면역시킨 암컷 BALB/c 마우스의 비장세포를 융합시켜 cloning 한 결과 sulfamethazine에 대한 단크론성항체를 생산하는 hybridoma cell 3주를 확보하였고, 개발된 hybridoma세포주(SMT-1-M5)를 mouse복강에 주입하여 얻은 복수의 항체역가를 조사한 결과 1: 100,000의 희석액에서도 역가를 나타내었다.
3) 생성된 sulfamethazine에 대한 단크론성 항체는 sulfamethazine에 매우 특이성을 보여 penicillin G, streptomycin, chrolampenicol, gentamycin 그리고 kanamycin과는 교차반응을 나타내지 않았으나 다른 물질에 대한 항체와 비교할 때 역가가 낮았다. 이 항체를 이용하여 sulfamethazine을 측정하기 위한 indirect competitive ELISA법을 확립하였고 50ppb-10ppm 수준의 sulfamethazine분석이 가능하였다.

4) Immunoaffinity column을 실험적으로 조제하여 식품 시료 중의 sulfamethazine을 정제하기 위한 조건을 확립하였다. Column은 먼저 10㎖ PBS로 씻고난 뒤 시료용액을 충진했으며 10㎖의 증류수와 10㎖의 PBS로 다시 column을 씻은 후 5㎖의 methanol로 처리시키면 대부분 column에 결합되어있는 sulfamethazine이 대부분 용출되었다. Immunoaffinity column으로 전처리한 시료를 ELISA 및 HPLC법으로 측정하여 회수율을 구한 결과 sulfamethazine의 경우 사료에서는 각각 50.9%, 54.7%를 보여 atrazine경우보다 낮은 회수율을 보였다.

5) Sulfamethazine분석을 위한 실험적 ELISA kit 한셋트에는 다음과 같은 것이 포함되었다. 즉, 항체가 coating된 microtiter well이 35줄(12well/줄), 10ppm 농도의 표준sulfamethazine용액(A용액), 5㎖의 ABTS 용액(B용액), sulfamethazine에 대한 항체 5ml(C액), 2차항체-HRP희석액 5ml(D액), 25㎖의 citrate buffer(E용액), 25㎖의 정지용액(F용액) 등이다.

6) 개발된 모니토링 시스템으로 54개의 국내시료와 26개의 수입사료를 대상으로 sulfamethazine을 분석한 결과 국내생산 우유시료 2점에서 각각 0.37, 0.52ppm의 sulfamethazine이 잔류되어 있는 것으로 나타났다.

다. 식품중 잔류곰팡이독소(vomitoxin)의 첨단면역분석기술 개발

1) 분자량이 작은 vomitoxin에 항원성을 증폭시키기 위해 vomitoxin-HG-protein-conjugate를 합성하였으며, 형질세포종세포(p3×63Ag8. v653)와 vomitoxin-BSA conjugate를 면역시킨 암컷 BALB/c 마우스의 비장세포를 융합시켜 vomitoxin에 대한 단크론성항체를 생산하는 4 세포주를 개발하였다.

2) Hybridoma로부터 생산한 단크론성 항체의 특성을 조사한 결과 vomitoxin과 특이성이 있었고, 3-acethylvomitoxin 및 T-2 toxin과도 27%, 38%의 교차반응을 보였으나 nivalenol, deacetoxyscipenol, zearalenone 및 fumonisin과는 반응하지 않았다. 이 항체를 이용하여 vomitoxin을 측정하기 위한 indirect competitive ELISA법을 확립하였고 50ppb-10ppm 수준의 vomitoxin 분석이 가능하였다.

3) 시료중의 vomitoxin의 간단한 정제를 위해 CNBr-actibated sepharose 4B에 항체를 흡착시켜 실험적으로 immunoaffinity column을 제작하였다.

Column의 처리방법은 우선 10㎖ PBS로 column을 washing한 후 시료 액을 loading하고, vomitoxin이외의 물질은 10㎖ 증류수로 2회 씻어 제거한 다음 항체에 결합된 vomitoxin을 3㎖의 methanol로 용출시킨다. 이 때 immunoaffinity column의 vomitoxin이 회수율은 평균 90%이상이었다.

4) Vomitoxin분석을 위해 실험적으로 제작한 ELISA kit의 경우 30개 시료를 처리하는 재료를 1set로 포장할 경우 다음의 것들이 필요하였다. 즉 coating, blocking된 microtiter well 35line(12well/line), 표준 vomitoxin용액 5㎖ (10ppm: A액), vomitoxin에 대한 항체 5ml(C액), 2차항체-HRP희석액 5ml(D액), 25㎖의 citrate buffer(E용액), 25㎖의 정지용액(F용액) 등이다. 단, B, C액은 -20℃에 coating된 well과 A액은 4℃, 그리고 D, E액은 상온에 보관케 한다.

5) 개발된 모니토링 시스템으로 99개의 국내곡류시료 23개의 수입옥수수를 대상으로 vomitoxin을 분석하였다. 그 결과 쌀에서는 오염된 시료가 보이지 않은 반면, 보리시료에서는 40.8%가 오염되었고 그 중의 한 시료는 1.16ppm의 높은 vomitoxin 오염을 보였으며, 옥수수의 경우는 30.4%가 vomitoxin에 오염되었다. 한편 수입 옥수수의 경우는 23개 시료 중 4개의 시료가 vomitoxin에 오염되었고, 그 중에서 0.71ppm의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다.

6) ELISA의 민감도를 높이기 위하여 enzyme amplification method를 확립하였고, 민감도는 5ppb수준으로 증가하였다. 확립된 Enzyme amplification method법으로 vomitoxin 생성균주의 vomitoxin 생성량을 조사한 결과 분리균 32-D-3이 1.21ug/ml로 가장 많은 량의 vomitoxin을 생성하는 것으로 나타났다.

2. 활용방안에 대한 건의

농산물의 수입화와 더불어 늘어나는 농산물의 수입에 능동적으로 대처하는 방법의 하나로 안전성이 보장된 농산물의 확보와 국민보건 차원에서 수입 농산물에 대한 엄격한 검역, 검사를 위한 제도적 장치와 이들 법적 규제를 뒷받침하는 검사기술의 축적이 무엇보다 필요하다. 따라서 각종 농약을 비롯한 유해잔류물질에 대한 감도 높은 항체를 이용한 면역분석법의 확립으로 농산물에 오염된 각종 잔류유해물질의 분석이 용이해지고 이 기법을 활용함으로서 지금까지 까다로웠던 다른 잔류유해물질 분석법의 개발에도 응용할 수 있다. 분자량이 매우 낮은 잔류유해물질에 대한 면역분석법은 항원성이 없는 저분자 물질의 경우도 단일크론 항체생산이 가능해 관련된 각종 물질의 기초연구에 활용 및 농산물 분석에 새로운 계기를 마련할 수 있다.

아울러 면역분석법의 확립은 새롭고 안정된 기법으로 언제 어디서나 누구라도 사용이 가능하여 막대한 외화절약 효과를 가져올 수 있다. 고도의 첨단기술로 국내 식품에 대한 잔류농약의 오염정도를 국가적으로 체계적인 모니터링 체계에 의해 지속적으로 조사할 수 있고, 아울러 수입 농산물의 유해농약 오염여부를 현장에서 신속히 까다롭게 판정하는 검사 system의 확립으로 농산물 수입개방에 능동적으로 대처할 수 있다.

각종 농산물의 잔류농약 함유여부를 신속 정확히 분석하는 면역분석체계의

확립은 지금까지 매우 복잡한 분석과정을 거치는 다른 저분자화합물질 즉, vitamin, 식물호르몬, 식물성 알카로이드 등의 분석에도 활용 가능하고, 이에 대한 기술의 축적은 분석시스템의 실제 생산체제로 까지 연결되어야 할 것이다.

SUMMARY

Ⅰ. Title : Development of advanced immuno-analytical technology for the safety of foods.

Ⅱ. Objects and Necessities of the Study

The contamination of residual hazardous materials in foods including drinking water became a major environmental problem. The presence of hazardous materials such as residual pesticide, antibiotics and mycotoxin in groundwater, soil, foods and feeds is potentially hazardous to human and animal health. So many studies to decrease the risk of human exposure to those hazardous materials has been done. There is a need for more sensitive, rapid and accurate methods of hazardous material analysis. However, because only trace amounts of those are present in the sample, analysis of hazardous materials in foods becomes a difficult task. Nevertheless, rapid progress in the area of hazardous material analysis has been made during last few years. Simplified sample cleanup protocols and new chromatographic methods, especially HPLC and other chemical methods have been developed in recent years. These methods are too complicated or less sensitive and require elaborate equipments or extensive cleanup procedures prior to determination. To overcome there difficulties, attempts

were made to employ a radioimmunoassay, Which is sensitived specific for hazardous materials , but still possesses problems related to the disposal and storage of radioactive reagents. Recently a simpler alternative method, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) has been introduced to the assay of hazardous materials in other countries including USA.

Since small molecules materials such as pesticide, antibiotics and mycotoxin can not be recognized by the immune system, the target compound must be attached to a large carrier protein to effect the immune response for the antibody production of the host animals. Recently, we also have studied to develop the rapid screening system including immunoassay of environmental residual, hazard materials such as mycotoxin and pesticides in food.

Ⅲ. Contents of the Study

In this study, we will attempt to develop a high advanced immunochemical technique for monitoring of residual hazardous materials including pesticide(atrazine), antibiotics(sulfamethazine) and mycotoxin(vomitoxin). For this purpose, we will conduct works as follows.

1) Synthesis of immunogen of hazardous materials including pesticide (atrazine), antibiotics(sulfamethazine) and mycotoxin(vomitoxin).
2) Development of hybridoma for the production of monoclonal antibodies
3) Mass production and purification of monoclonal antibodies.

4) Development of enzyme-linked immunosorbent assay.

5) Development of immunoaffinity column.

6) Development of experimental ELISA KIT

7) Development of monitoring system of hazardous materials

8) Application ot that system to samplerbent assay

Ⅳ. Results of the study

1. Development of advanced immuno-analytical technology for the determination of pesticide, atrazine in foods.

1) For the production of monoclonal antibody, atrazine were first converted to atrazine-hapten. then it was conjugated to protein such as BSA, OVA and KLH for use as immunogen or coating conjugate.

2) Monoclonal antibody against atrazine was produced from the hybridoma cell developed by fusing myeloma cells(P3x63Ag8.V653) with spleen cells of BALB/c female mice immunized with atrazine-BSA conjugate.

3) Using these antibodies, direct competitive enzyme-linkede immunosorbent assay(ELISA) was developed for detecting and quantifing atrazine. This assay was sensitive and had a linear range from 0.05-10ppb atrazine. The produced monoclonal antibodiy was cross reacted with simazine(11%), but not with parathion, bromacil, bentazone and 2,4-D. It took only 1 hour to do whole ELISA procedure for the analysis of atrazine.

4) Experimental immunoaffinity column was made with coupling of antibody to affii-gel 10 for the purification of atrazine in samples. Column was

initially washed with 10㎖ PBS and loaded sample solution, ans washed column 10㎖ distilled water and 10㎖ PBS, and then atrazine bound to antibody was eluted with 5㎖ methanol. Mean recovery of atrazine with developed immunoaffinity column was 92%.

5) One set of experimental ELISA kit for the analysis of atrazine was contained as follow: 35 lines(12wells/line) of coated microtiter well, 5㎖ of standard solution of atrazine(1000ppb: A solution), 100㎕ of HRP solution(1mg HRP/㎖ PBS: B solution), 5㎖ ABTS solution(C solution), 25 ㎖ citrate buffer (D solution), 25㎖ stopping solution(E solution).
6) Developed monitoring system was applied to 96 samples of agricultural products and 18 samples of imported corn. But there was no positive samples contaminated to atrazine.

2. Development of advanced immuno-analytical technology for the determination of antibiotics, sulfamethazine in foods.

1) For the production of monoclonal antibody, sulfamethazine was directly conjugated to bovine serum albumin(BSA) or ovalbimin(OVA) for use as a immunogen or coating conjugate.
2) Hybridoma cell lines which could produce monoclonal antibodies against sulfamethazine were developed by fusing myeloma cells(P3x63Ag8.V653) with spleen cells of BALB/c female mice immunized with sulfamethazine-BSA conjugate. The hybridoma cell line produced monoclonal antibody specific for sulfamethazine was grown in tissue

culture and as an ascites tumour. Antibody titers of above ascite fluid were shown 1: 100,000 more on sulfamethazine.

3) Produced monoclonal antibody against sulfamethazine shown a very specificity to sulfamethazine, but did not reacted with penicillin G, streptomycin, chrolampenicol, gentamycin and kanamycin. For analysis of sulfamethazine, indirect competitive ELISA was established with that monoclonal antibody, and detection limit was 0.05-10ppm level of sulfamethazine

4) Iimmunoaffinity column was experimentally made with coupling of antibody to affii-gel 10, and condition of sample purification of sulfamethazine was set up. Column was initially washed with 10㎖ PBS and loaded 5ml sample solution. The sample loaded column was washed with 10㎖ distilled water and 10㎖ PBS.

   And then sulfamethazine bound to antibody could be eluted only with 5㎖ methanol. Recovery ratio of sample pretreated by immunoaffinity column was studied with ELISA and HPLC method, and was showed 50.9%(ELISA) and 54.7% respectively, in feed sample.

5) One set of experimental ELISA kit for the analysis of sulfamethazine was contained as follow: 35 lines(12wells/line) of coated microtiter well, 5㎖ of standard solution of sulfamethazine(10ppm: A solution), 5㎖ ABTS solution(B solution), 5ml of antibody solution to sulfamethazine(C solution), 5ml of second antibody-HRP solution(D solution), 25㎖ citrate buffer (E solution), 25㎖ stopping solution(F solution).

6) Developed monitoring system was applied to 54 samples of domestic products and 26 samples of imported feed for the determination of

sulfamethazine. Among them, only 2 samples of feed showed positive as a level of 0.37, and 0.52ppm respectively.

3. Development of advanced immuno-analytical technology for the determination of mycotoxin, vomitoxin in foods.

1) Vomitoxin having small molecule should be conjugated with protein such as BSA and OVA to increase the immunogenisity for use as a immunogen or coating conjugate. By fusing myeloma cells(P3x63Ag8.V653) with spleen cells of BALB/c female mice immunized with vomitoxin-BSA conjugate, 4 hybridoma cells which could produce monoclonal antibody against vomitoxin were developed.

2) The produced monoclonal antibodiy was cross reacted with 3-acethylvomitoxin(27%), T-2 toxin(38%) , but not with nivalenol, deacetoxyscipenol, zearalenone and fumonisin. For analysis of vomitoxin, indirect competitive ELISA was established with that monoclonal antibody, and detection limit of that method was 0.05-10ppm level of vomitoxin.

3) Expermantal immunoaffinity column was made with compling of antibody to CNBr-activated sepharose 4B for the purification of vomitoxin in sample. Column was initially washed with 10ml PBS, and loaded sample solution, and washed column twice with 10ml distilled water and PBS, and then the vomitoxin bound to antibody were eluted with 3ml acetonitrile. Mean recovery ratio of vomitoxin with immunaffinity column was above 92.2%.

4). One set of experimantal ELISA kit for the analysis of vomitoxin was contained as follow: 35 lines(12wells/line) of coated microtiter well, 5ml of standard solution of vomitoxin(10ppm: A solution), 5㎖ ABTS solution(B solution), 5ml of antibody solution to vomitoxin(C solution), 5ml of second antibody-HRP solution(D solution), 25㎖ citrate buffer (E solution), 25㎖ stopping solution(F solution). Especially, B and C solution should be kept at -20C, but A solution and coated wells at 4C, and D, E and F solution at room temperature, respectively.

5) Developed monitoring system was applied to 99 samples of domestic products and 23 samples of imported corn for determination of vomitoxin. Among domestic samples, all the rice samples did not contaminated to vomitoxin, but barley and corn samples were contaminated with 40.8% and 30.4% respectively. Meanwhile, 17.4% of imported corn samples were cotaminated, and the maximum level of vomitixon was 1.16ppm

6) Enzyme amplification method was established to increase the sensitivity of ELISA for vomitoxin. the sensitivity of that method was remarkably increased , and detection limit was 5ppbas. The enzyme amplification method was applied to examined the vomitoxn production of isolated strains. Among isolated strains, the strain 32-D-3 showed maximum level of vomitoxin (1.21ppm).

Contents

목 차

제1장 서 론

제1절 연구개발의 배경과 필요성

1. 연구의 배경

일반적으로 식품의 안전성에 문제가 되는 요인으로는 공장폐기물, 생활하수 등에 의한 환경오염과 잔류농약, 잔류항생물질 등에 의한 유해화학물질을 비롯하여, *Listeria*, *Salmonella* 및 *Botulinus*균 등의 각종 식중독균과 aflatoxin, ochratoxin, T-2 toxin등의 각종 곰팡이독소(이하 mycotoxin)을 생성하는 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* 및 *Fusarium graminerium*등의 곰팡이를 포함한 각종 미생물에 의한 원인을 들 수 있다.

그 중에서도 최근 들어 국민경제수준과 식생활의 향상으로 잔류농약, 잔류항생물질 및 mycotoxin과 같은 유해미량잔류 물질이 식품의 안전성과 관련하여 크게 관심의 대상이 되고 있다. 특히 수입 개방으로 많은 외국산 농산물과 식품이 범람하고 있는 이때에 이러한 유해잔류물질이 오염되지 않은 건전한 식품을 확보하기 위한 노력이 확대되고 있으며, 이를 위해 무엇보다도 잔류농약, 잔류항생물질 및 mycotoxin등의 신속 정확한 분석 기술의 개발이 국민 건강 보호는 물론, 수입 개방에 능동적으로 대처하기 위해 매우 절실한 실정이다.

지금까지 분석 수단으로서 항체의 이용이 1960년대에 이미 밝혀졌음에도 불구하고 잔류농약이나 잔류항생물질을 비롯한 식품위생에 관련된 미량유해화학물질 등의 분석에는 면역학적 기법의 이용이 거의 없었다. 이같은 식품과 관련

한 분야에서 면역기법의 이용이 뒤떨어진 이유는 gas chromatograph(GLC)나 high performance liquid chromatograph (HPLC)에 의하여 잔류항생물질이나 유해화학물질들을 적절히 분석할 수 있었기 때문이다. 하지만 국민경제 수준의 향상으로 식품위생에 대한 관심의 증대로 이들 유해미량물질에 대한 모니터링의 필요성이 확대되고 있지만 기기를 이용한 기존의 분석프로그램에서는 반복되는 대량의 시료에 대한 부담이 많은 어려움을 주게 된다. 이러한 기기를 이용한 분석은 시간과 노동력, 비용 등이 많아 소모되는 단점 때문에 간단하고 신뢰성이 있으며 저렴한 비용으로 분석할 수 있는 새로운 방법이 필요하게 되었다. 면역기법(Immunoassay)은 이러한 장점을 지니는 방법으로 1980년대부터 본격적으로 잔류항생물질, 잔류농약 및 mycotoxin등의 잔류물질분석에 응용이 되어 왔다. 이러한 면역기법에 의한 분석은 특이성, 민감성, 정확성, 신속성, 간편성, 경제성, 응용성 같은 장점이 있다. 그러나 모든 기법이 그러하듯이 이 기법 역시 table에서 보는 바와 같이 생소한 기법이라는 점과 시약을 쉽게 구할 수 없다는 점, GLC나 HPLC 기법과 같은 비특이적 간섭물질로 인해 GC-MS 같은 보다 정확한 방법에 의해 확인이 필요하다는 것, 다성분 동시분석에 쉽게 응용할 수 없다는 단점도 있다.

Table. Advantages and disadvantages of Immunochemical technology

Advantages	Disadvantages
Generally applicable	New technology in environmental labs
Highly sensitive	Too sensitive
Highly specifi	Hard to apply to multianalyte problems
Highly precise	Cross reactivity and interference
Very rapid	Reagent not available
Cost effective	Confusing terminology
Highly adaptable	Large sample load required

그렇지만 면역분석법은 비록 감도 높은 항혈청 또는 단일 클론항체 생산을 위해 저분자인 잔류저해물질을 hapten으로 하고 단백질과 결합체를 만드는 복잡한 과정을 필요로 하나 microplate를 이용한 competitive direct ELISA의 경우는 많은 시료를 단시간에 분석할 수 있으며 폐기물의 처리 문제가 없고 사용되는 시약의 대부분은 안정하고 독성이 없어, 앞서 언급한 바와 같이 안정성이 보장된 방법으로 평가되고 있다. 따라서 항체생산가가 낮고 쉽게 항체를 얻을 수 있는 기술의 축적으로 누구나 쉽게 유해잔류물질의 분석이 가능한 실용적인 ELISA kit의 국내개발을 촉진하여 수입식품 뿐만 아니라 국내의 식품이나 농산물 중 유해잔류물질의 모니터링을 위한 체계적 연구가 이루어져야 하겠다. 그 결과 이러한 분석기술은 잔류농약, 잔류항생물질 및 잔류 mycotoxin 뿐만 아니라 식품성분 등의 분석기술에도 그 활용도가 꾸준히 확대되어야 할 것이다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

각종 잔류농약을 비롯한 항생물질, mycotoxin등에 대한 감도 높은 항체를 생산하고, 이를 이용한 면역분석 기술의 확립으로 농산물이나 식품에 오염된 각종 잔류유해물질의 분석이 용이해지고 이 기법을 활용함으로서 지금까지 까다로웠던 다른 잔류유해물질 분석법의 개발에도 응용해야한다.. 이러한 기술의 축적으로 분자량이 매우 낮은 잔류유해물질에 대한 면역분석법은 항원성이 없는 저분자 물질의 경우도 단일크론항체 생산이 가능해 관련된 각종 물질의 기초연구에 활용 및 농산물 분석에 새로운 계기를 마련할 필요가 있다.

나. 경제 산업적 측면

면역분석법의 확립은 새롭고 안정된 기법으로 언제 어디서나 누구라도 사용이 가능하여 특히 kit의 국내 개발로 막대한 외화절약 효과를 가져올 수 있다. (현재 수입 kit의 경우 시료 10점 분석에 kit 비용이 30만원이나, 국산화가 되면 3만원) 고도의 첨단기술로 식품 중 잔류유해물질의 오염정도를 국가적으로 체계적인 모니터링 체계에 의해 지속적으로 조사할 수 있고, 아울러 수입 농산물의 유해물질 오염여부를 현장에서 신속히 까다롭게 판정하는 검사 system의 확립으로 농산물이나 식품 수입 개방에 능동적으로 대처할 필요가 있다.

다. 사회적 측면

지난 1월 출범한 WTO가 각국의 보건관련규정이 과학적인 근거없이 농산물 수입을 가로막는 무역방벽으로 활용되어서는 안된다는 규정때문에 미국을 비롯한 농산물 수출국이 자국의 식품류 수출 확대를 위한 절호의 기회로 활용하여 자몽이나 오렌지 등의 농산물은 물론 팝콘, 초코렛 등의 가공식품까지 서서히 수입확대 압력을 가하고있다.

이러한 실정을 감안할때 농산물이나 식품 중에 잔류 가능성이 큰 유해농약, 잔류항생물질 및 잔류곰팡이독소 등을 신속 정확히 분석할 수 있는 첨단 분석기술을 개발한 다음 국산 분석kit를 보급하고, 이들 기술과 장비로 유해 잔류물질을 체계적으로 모니터링하는 시스템을 개발함으로서 국내 농산물이나 식품에서의 잔류농약등의 유해 물질의 오염예방 대책을 수립하고, 아울러 수입농산물의 국내 반입을 엄격히 규제함으로서 국민보건 향상을 도모할 필요가 있다.

3. 지금까지의 연구개발실적

최근, 세계 각국에서는 농산물을 비롯한 식품에서의 잔류농약, 항생물질 및 mycotoxin 오염문제를 심각하게 취급하고, 이에 대한 강력한 법적 허용 규제 한도를 설치하여 식품의 수입 수출시 안전성 check의 중요한 대상으로 지목하고 철저한 검색을 실시하고 있다. 그러나 10여년 전까지만 해도 이러한 유해잔류물질의 분석이 TLC, GC 및 HPLC 등의 방법에 의존하여 실제 분석 data를 얻기에는 회수율과 분석 한계수준의 차이로 미량 오염의 경우 검색하기가 어려웠으며, 무엇보다도 안정성의 결핍 등으로 실험의 한계성이 노출되어 새로운 분석방법의 필요성이 강력히 대두되었다. 그 결과 최근에 이르러 Chu, Pestka 및 Morgan등이 저

분자 물질인 항생물질, 잔류농약 및 mycotoxin에 대하여 항원성을 부여하기 위해 단백질을 인위적으로 결합시킨 conjugate 합성이 성공함으로서 면역기법을 도입한 새로운 분석법을 고안하게 되어 저분자 유해물질 분석의 새로운 돌파구를 찾게 되었고 그 이후 관련된 활발한 연구가 진행되어 오고 있다.

국내에서도 최근에 이르러 저분자물질분석을 위한 면역기법활용에 점차 관심을 갖기 시작하여 손 등은 aflatoxin B1, zearalenone에 대한 면역기법을 발표하였으며 이 등도 chloramphenicol 등의 항생물질에 대한 보문을, 그리고 서 등은 endosulfan 등의 농약의 면역분석법을 발표하였거나 지금도 연구를 진행하고 있으나 아직도 외국에 비하면 지속적이고 체계적인 연구가 이루어지지 않고 있다. 본 연구자도 오래전부터 잔류유해물질 분석법의 개선에 많은 관심을 가지고 기존의 HPLC등의 기존방법의 문제점을 인식하고, 80년대 후반부터 면역기법을 도입하여 과거의 기기분석에서의 문제점의 해결을 위해 노력하고 있다. 이를 위해 유해물질의 면역분석법 개발의 선구자의 역할을 해온 미국 미시간대학의 Dr. Peska, 영국 식품연구소의 Dr. Morgan등의 연구실을 방문한 후 ELISA법의 개선과 Immunoaffinity chromatograpy법의 개발에 대한 기술 교환 및 필요한 문헌과 자료를 상호 교환하고 있고 최근에는 일본 동경 이과대학 Dr. Ueno연구실에서 잔류유해물질의 분석기법의 개선에 대한 연구를 한 바 있다.

4. 현 기술상태의 취약성

- 항생물질, 잔류농약을 비롯한 잔류유해물질에 대한 항체생산을 위한 항원합성법에 대한 이론과 기술축적이 체계적으로 이루어지지 않고 있음
- 외국과는 달리 아직도 vitamin등의 식품성분 분석에 필요한 이론이나 기술축적이 되어있지 않음

- 폴리클론항체 외에 안정된 단크론성 항체 생산을 위한 hybridoma cell line 개발에 필요한 기초이론과 기술이 부족한 실정임
- 생산된 항체를 활용하는 안정된 ELISA system의 확립이나 immunoaffinity column의 개발기술과 보급이 부족함
- 이러한 부족한 점을 보완할 수 있는 지속적인 연구와 이를 위한 지원이 필요함

5. 앞으로 전망

- 국민의 식생활 향상과 더불어 건전한 식품재료의 확립을 위해 유해잔류물질의 분석기술 축적이 절실히 요구되고 있음
- 수입식품이나 재료의 증가로 이들 유해잔류물질의 검색을 위한 첨단분석 kit의 요구가 급증할 것으로 예상됨
- 잔류유해물질 뿐만 아니라 식품성분의 분석에도 면역분석 기술의 활용이 활발해지리라 전망되며, 이를 위해 안정한 기술축적이 절실할 것으로 전망됨

제2절 연구개발 목표 및 내용

본 연구는 단일과제로 구성되어있으며 단일 과제속에 위탁과제 1과제를 포함하고 있다. 아울러 본 과제는 유해 잔류물질 중 잔류농약(atrazine), 항생물질(sulfamethazine) 및 곰팡이독소(vomitoxin)에 대한 단크론성 항체를 개발하여 첨단면역분석법을 확립한다. 또한 간단하고 신속한 면역분석KIT를 실험적으로 제작하고 보급하기 위한 목적으로 다음과 같은 연구를 수행하고자한다.

유해잔류물질에 대한 hapten합성
잔류농약(atrazine)에 대한 항원 합성
잔류항생물질(sulfamethazin)에 대한 항원합성
잔류곰팡이독소(vomitoxin)에 대한 항원합성
면역
Mouse titer 검정
Cell fusion 및 Cloning
Hybridoma cell line개발
항체 생산과 정제
항체의 특성확인
ELISA 확립
식품별 ELISA분석조건의 검토
Immunoaffinity column 제작
Immunoaffinity column-ELISA 분석시스템 확립
Immunoaffinity column-HPLC 분석시스템 확립
유해잔류물질의 면역분석 kit의 제작
검색 시스템의 확립과 응용

(연차별 연구개발목표 및 내용)

구분	연 구 개 발 목 표	연구개발내용 및 범위
1차 년도 (1996년도)	Hapten 유도체, Immunogen 합성 및 면역	식품중 잔류물질에 대한 기기분석법 확립 Hapten 유도체 및 Immunogen합성 . 잔류농약(atrazine) . 항생물질(sulfamethazine) . Myotoxin(vomitoxin) 합성물질의 확인 Immunogen의 면역 항혈청 titer Cell fusion
2차 년도 (1997년도)	단크론성 항체 생산을 위한 hybridoma cell line개발 (atrazine,sulfamethazine, vomitoxin)	Cell fusion Cloning 항체의 생산 항체의 특성 ELISA법의 확립
3차 년도 (1998년도)	시료별 면역분석 조건 및 Immunoaffinity column개발	동, 식물성 식품별 시료조제 식물성 식품별 분석조건 검토 동물성 식품별 분석조건 검토 Immunoaffinity column (IC)개발
4차 년도 (1999년도)	각종 면역분석 시스템 확립 및 kit의 개발	IC-ELISA 분석조건검토 IC-ELISA 분석시스템 확립 IC-HPLC 분석조건 검토 IC-HPLC 분석시스템 확립 유해잔류물질의 면역분석 kit 개발
5차 년도 (2000년도)	면역분석시스템을 이용한 유해잔류물질의 검색과 대책	국내식품에 대한 유해잔류물질의 검색 수입식품에 대한 유해잔류물질의 검색 오염현황의 통계처리 및 분석 면역분석 kit에 대한 워크샵

제3절. 추진전략 및 방법

o 본 연구는 신규연구로서 경상대학교가 주관연구기관이 되며 진주전문대학에는 아직 연구가 되지 않은 항목의 mycotoxin(vomitoxin)에 대한 과제를 위탁하고, 관련연구소, 기업과의 현안문제를 적극의논한다.

o 연구대상항목 (잔류농약, 항생물질 및 mycotoxin)에 따라 연구팀을 구성한 후 전문기술 업무에 따라 연구업무를 분담하고 연구책임자는 연구원들의 연구업무를 유기적으로 조정, 관리한다.

o 공동으로 필요한 전문인력 및 기기(ELISA reader, 세포배양실, HPLC, 동물사육실)등은 공동으로 이용할 수 있도록 사전조정을 하며, 위탁과제의 경우 필요한 시설과 기구를 필요한 때에 사용하는데 불편함이 없게 조정한다.

o 3년째 부터 참여예정인 기업(대기과학상사)은 현재 ELISA kit 개발에 상당히 관심을 많이 가지고 있으므로 연구의 진행에 따라 사전에 필요한 지식과 정보를 교환한다.

o 본연구의 효율적인 진행을 위해 보건환경연구원, 국립보건원등과 시료의 의뢰와 전문적 분석기술에 대한 정보를 교환할 예정이다.

o 연구의 진행 과정에 따라 유해잔류물질외에 protein, vitamin등의 면역분석법에 관한 사항도 적극적으로 조사, 응용할 계획이며 본 연구의 효과적인 수행으로 식품분석에 활용될 수 있는 이론과 기초지식을 축적할 예정이다.

제4절 참고문헌

1. Kemp, H. A., Mills, E.N.C. & Morgan, M.R.A.(1986) Enzyme-linked immunosorbent assay of 8-acetyl-deoxynivalenol applied to rice. Journal of the Science of Food and Agriculture, 37, 888-894.

2. Robins, R.J., Morgan, M.R.A., Rhodes, M.J.C. & Furze, J.M.(1984a). Determination of quassin in picogram quantities by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytochemistry*, 23, 1119-1123.

3. Lee, K.G., Shim, J.H. & Suh, Y.T., Development of radioimmunoassay for endosulfan in fish tissues, Korean *J. Environ. Agric.*, 1993,(unpublished).

4. Gee, S.J., Miyanoto, T., Goodrow, M.H., Buster, D. & Hammock, B.D., Evaluation of an ELISA for the direct analysis of molinate in rice field water, *Food and Agricultural Immunology*, 1989, 1, 37-51.

5. Harrison, R. O.; Goodrow, M. H.; Hammock, B. D. Competitive Inhibition ELISA for the s-Triazine Herbicides: Assay Optimization and Antibody Characterization. J. Agric. Food Chem. 1991, 39, 122-128.

6. Niewola, Z., Walsh, S.T. & Davies, G.E.(1983) ELISA for paraquat. *International Journal of immunopharmacology*, 5, 211-218.

7. Windemann, H.(1982) Enzyme-linked immunosorbent assay for wheat alphagliadin and whole gliadin. *Biochimica Biophysica Acta*, 709, 110-121.

8. Ercegovich, C. D., Vallejo, R. P., Russell, R. G., Woods, L., Bogus, E. R., and Mumma, R. O. (1981) Development of radio immunoassay for parathion. *J. Agric. Food Chem*. 29 : 559.

9. Duffy, M. J. and Reicl, R. S. 1993. Measurement of the stability of T-2 toxin in aqueous solution. *Chem. Res. Toxicol* 6(4) : 524-529.

10. Bamburg, J. R., Riggs, N.V. and Strong, F. M. 1968. Structures of toxins from two strains of *Fusarium tricinctum*. Tetrahedron 24 : 3329-3336.

11. Burmeister, H. R. 1971. T-2 toxin production by *Fusarium tricinctum* on solid substrate. *Appl. Microbiol.* 21 : 739-742.

12. Gilgan, M. W., Smalley, E. B. and Strong, F. M. 1966. Isolation and partial characerization of a toxic from *Fusarium tricinctum* on moldy corn. *Arch. Biochem. Biophys*. 114 : 1-3.

13. Pestka, J. J. and Bondy, G. S. 1990. Alteration of immune function following dietary vomitoxin exposure. Can. *J. Physiol. Pharmacol.* 68: 1009-1016.

14. Ueno, Y. Lee, U. S. Tanaka, T. Hasegawa, A. and Matusuki, Y. 1986. Examination of chinese and U.S.S.R. cereals for the *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicon.* 24(6) : 618-621.

15. Tanaka, T., Matsuda, Y., Toyasaki, N., Cgawa, Y. M., and Ueno, Y. 1977. Screening of trichothecene-producing *Fusarium* species from river sediments by manmarian cell culture techniques. Proc. *Jap. Assoc. Mycotoxicol.* 5(6) : 50-53.

16. Chi, M. S., Micocha, C. J., Kurtz, H. J., Weaver, G., Bates, F., Shimoda, W. and Burmeister, H. R. 1977. Acute toxicity of T-2 toxin on broiler chicks and laying hens. *Poultry Science*. 56 : 103-106.

17. Chi, M. S., Micocha, C. J., Kurtz, H. J., Weaver, G., Bates, F., Shimoda, W. and Burmeister, H. R. 1977. Subacute toxicity of T-2 toxin in broiler chicks. *Poultry Science* 56 : 306-313.

18. Maron, D. M. and Ames, B. N. 1983. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. Mut. Res. 113 : 173-215.

19. Goodrow, M. H.; Harrison, R. O.; Hammock, B. D. Hapten synthesis, antibody development, and competitive inhibition enzyme immunoassay for s-trazine herbicides. *J.Agfic. Food Chem*. 1990, 38, 990-996.

20. Hemilton, P.B.; Jackwon,G.S.; Kaushik,N.K.; Solomon, K.R.; Strphenson, G.L. The impact of two applocations of atrazine on the plankton communities of in situ enclosures. *Aquat. Toxicol.* 1988, 13, 123-140.

21. Rohner, P., Schallibaum, M. & Nicolet, J.(1985) Detection of Penicillin G and its benzylpenicilloyl derivatives in cow milk and serum by means of an ELISA. Journal of Food Protection, 48, 59-62.

22. Kemp, H. A., Mills, E.N.C. & Morgan, M.R.A.(1986) Enzyme-linked immunosorbent assay of 8-acetyl-deoxynivalenol applied to rice. Journal of the Science of Food and Agriculture, 37, 888-894.

23. Dunbar, B.; Riggle, B.; Niswender, G. Development of Enzyme Immunoassas for the Detection of Triazine Herbicides. *J. Agric. Food Chem*. 1990, 38, 433-437.

24. Wittmann, C.; Hock, B. Improved enzyme immunoassay for the analysis of s-triazine in water samples. *Food. Agfic. Immunol.* 1989, *1,* 211-224.

25. Wittmann, C.; Hock, B. Evaluation and performance characteristics of a novel ELISA for the quantitative analysis of atrazine in water, plants and soil. *Food. Agric. Immunol.* 1990, *2,* 65-74.

26. Clare Mills, E. N.; Alcock, S. M.; Lee, H. A.; Morgan, M. R. A. AN Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Deoxynivalenol in Wheat,

Utilisiar Novel Hapten Derivatisation Procedures. *Appl. Biochem. and Food Sci.* 1988.

27. Wilkinson, A. P.; Ward, C. M.; Lee, H. A.; Morgan, M. R. A. Antibodies to the Pesticide Interaction Sites of Parathion Hydrolase and Cutinase. *J. Food & Agric. Immunology*. 1995, 7, 273-281.

28. Walker, C. C.; Barker S. A. Extraction and Enzyme Immunoassay of Sulfamethoxine Residues in Channel catfish(Ictalurus punctatus) Muscle. J. AOAC. 1994, 77, 908-916.

29. Randeker, V. W.; Reagan, J. A.; Engel, R. E.; Soderberg, D. L.; Mcnel, J. E. Serum and Urine Predictor of Sulfamethazine levels in swine Muscle, Liver and Kidney. *J. Food Protection.* 1987, 50, 115-122.

30. Gee, S. J.; Miyamoto, T.; Goodrow, M. H.;Buster,D.;Hammock, B. D. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the analysis of the Thiocarbamate Herbicide Molinate. *J. Agric. Food Chem*. 1988, 36, 836-870.

31. Ram, B. P.; Shngh, p.; Martins, L.; Brock, T.; Sharkov, N.; Allison, D. High-volumn Enzyme Immunoassay for Sulfamethazine in Swine. J. Assoc. Anal. Chem. 1991, 74, 43-46.

32. Everett, A.W., Prior, G., Clark, W.A. & Zak, R.(1983) Quantization of myosin in muscle(RIA). Analytical Biochemistry, 130, 102-107.

33. Infurana, R.; Levy, B.; Meng,C.; Yau,E.; Tri\ania, V.; Rolofsen, G.; Stevens, J.;Branett, J. Teratological evaluations of atrazine techical, a tiazine herbicide in rats and rabbits. *J. Toxicol Environ. Health* 1988, *24*, 559-563.

34. Casale, W.L.; Pestka, J.J.; Hart, L.P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Employing Monoclonal Antibody Specific for Deoxynivalenol(Vomitoxin) and Several Analogues. *J. Agric. Food Chem*. 1988, 36, 663-668.

35. Czerkinsky, C.L.; Nilson, A.; Nygren, H. A Solid-phase Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Enumeration of Specific Antibody Secreting Cells. *J. of Immunol. Methods*. 1993. 65, 109-121

36. Bushway, R. J.; Perkins, B.; Savage, S.A.;Lekousi, S.J.;Ferg, B.S. Determination of atrazine residues in water by enzyme immunoassay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1988, *40*, 647-654.

37. Bushway, R.J.; Perkins, B.; Savage, S.A.;Lekousi, S.J.;Ferg, B.S.Determination of atrazine residues in food by enzyme immunoassay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1989, *42*, 899-904

38. Aronold, D. & Somogyi, A.(1985) Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs, milk and eat : comparison of gas chromatography and radioimmunoassay, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 68, 984-990.

제2장 식품 중 잔류농약(atrazine)의 첨단면역분석 기술개발

제1절 서론

s-Triazine 유도체의 하나인 atrazine은 지난 수십년 간 제초제의 활성성분으로서 광범위하게 사용되어왔다. Atrazine은 수확 전후의 제초제로 사용되고 있으며 옥수수, 아스파라거스, 핵과 및 포도 재배지의 목초와 잡초 제거에 사용되고 있다[1, 2]. 또한 다른 살충제 및 성장조절제와 함께 도로 뿐만 아니라 농업지역 및 경작되지 않은 지역에 걸쳐 광범위하게 사용된다.[3] 식물의 경우 주로 뿌리를 통해 흡수되어지고 부분적으로 잎을 통해 흡수된다[4,5]. 즉, *s*-triazine은 단백질에 결합한 후 광시스템 I과 II사이의 전자 전달을 차단함으로서 광합성을 저해한다. 미국 등에서는 지하수 오염여부에 대한 잠재적 논란 때문에 허용한계가 설정된 제초제로 분류되고 있다[6,7].

이러한 atrazine은 Fig. 2-1과 같은 구조를 가지며, atrazine은 토양 속에서 화학적으로 분해되어 hydroxyatrazine으로 되며 토양미생물에 의해서 분해된다. 가수분해속도는 산성, 알카리성 조건하에서 분해, 휘발되나 물에는 잘 녹지 않는다[5,8,9]. 유도물질로는 propazine, simazine 등이 알려져 있다.[4] 분자량이 215,68로서 끓는점이 173 175℃이며 NOAEL 농도는 0.75 ppm이고, 음용수 내의 lifetime health advisory(LHA)는 3 ppb로 보고되고 있다[10,11]. 또한 chloroform, diethyl ether, dimethyl sulfoxide, ether, ethyl acetate, methanol, N-pentane등

유기 용매에는 잘 녹으나, 물에는 잘 녹지 않는 것으로 보고되었다[12, 13].

Atrazine은 구강, 피부, 호흡기를 통해 혈액으로 흡수되며 독성의 증상으로는 비정상적인 고통, 설사, 구토, 안구염증, 점막 염증, 피부 홍반 등을 나타낸다[15]. 쥐의 경우 고농도에 노출되면 우울, 호흡 곤란, 운동 실조증, 나약함, 저운동증, 호흡장애, 피로, 쇠약, 경련 등을 보이고 더 나아가 사망까지도 유발하는 것이 알려져 있다[16]. 사람 및 다른 동물 등에는 독성이 약한 것으로 알려져 있으나,[14] 한편으로 atrazine은 피부 염증을 유발하는데 atrazine이 섞인 재 등에 눈이 노출되면 심각한 염증을 일으킬 수 있고 고농도의 입자나 방울에 노출되어 있을 경우 점막에 염증을 일으킬 수 있다[15,17].

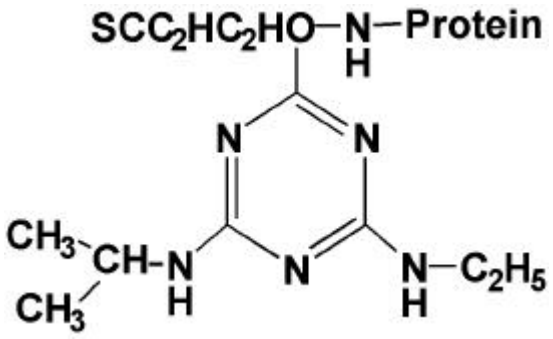


Fig. 2-1. Structure of atrazine[18].

쥐의 LD_{50}는 672 3,000 ㎎/㎏, 생쥐는 850 1,750 ㎎/㎏, 토끼 750 ㎎/㎏, 햄스터는 1000 ㎎/㎏인 것으로 보고되고 있다[16,19]. 또한 공기나 물 중의 LC_{50}은 쥐의 경우 1시간 흡입에 700 ㎎/㎥, 4시간 흡입에 5200 ㎎/㎥을 나타내었다. 6개월간 하루에 20 ㎎/㎏을 구강 투여한 쥐의 경우, 호흡장애와 손발기형의 증세를 나타내었고 생태학적, 생화학적 변화를 살펴보면 두뇌, 간, 심장, 폐, 신장, 난소, 내분비 기관 등에도 변화를 유발하는 것으로 보고되고 있다. 6개월간 매일 5 25 ㎎/㎏을 먹인 쥐의 경우 성장이 저해되는 것으로 보고되었으나 조직상의 장애는 발견되지 않았다. 0, 0.75, 7.5, 75 ㎎/㎏의 atrazine을 매일 2년간 쥐에게 투여한 실험에서 NOAEL치는 0.75 ㎎/㎏이었고, 7.5 ㎎/㎏군에서는 사료 섭취 감소와 간과 심장의 중량이 증가되는 것이 확인되었다. 75 ㎎/㎏군에서는 사료 섭취량 감소, 체중 증가, 신장중량 증가, 혈액 세포수 저하, 간혹 뒷다리의 떨림과 같은 경직 현상이 발생하는 것으로 보고되었다[9,17]. 그리고 쥐에게 치사량에 해당하는 800 ㎎/㎏의 atrazine을 임신 3, 6, 9일에 매일 피하주사 하였을 때 실험쥐 태아는 사망과 분화조직의 흡수 등을 일으켰다. 또한 임신 중 어미 쥐에게 14일에 걸쳐 46.4 ㎎/㎏을 매일 투여하면 태아에서의 유발기형은 관찰되지 않았으나, 치명적인 돌연변이를 일으키는 것으로 보고되어 있다[20]. 동물실험 결과, atrazine은 급성 장기간 투여 시 유방암이 관찰하였으며 EPA는 고농도의 atrazine을 장기간 투여한 쥐에 암을 유발한다고 것을 보고하였으며, 사람에게도 발암성이 있는 것으로 추정되고 있다. 실험동물에 치사량을 투여하였을 때 폐, 신장, 간, 신장, 뇌, 심장 등에서 출혈과 용혈의 형태로 심각한 손상을 일으키는 것을 관찰될 수 있었다[9]. 아울러 조류인 새와 수상생물인 물고기 등에 비교적 약한 독성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 물고기에서는 뇌, 간, 창자 등에 atrazine이 축적되며 주위의 물보다 11배 많은 양이 농축되어 있다고 보고되어 있다[19].

한편 atrazine 검출을 위한 분석방법은 GLC(gas liquid chromatograph)나

HPLC(high performance liquid chromatograph), MS 등이 있고, 이를 이용한 음용수나 토양에서의 검출 사례가 많이 보고되고 있다. 특히 GLC나 HPLC에 의하여 적절히 분석할 수 있었다[2,3,51]. 하지만, 최근 작물과 환경에 대한 모니터링의 필요성이 확대되고 장기적 저농도 노출에 의한 가역적 영향에 대한 관심이 증대되고 있으나 기기를 이용한 기존의 분석방법은 대량의 시료 처리가 쉽지 않다. 즉, 기기를 이용한 분석은 시간과 노동력, 비용 등이 많이 소모되는 단점이 있어 이를 대처할 수 있는 간단하고 신뢰성이 있으며 저렴한 비용으로 분석할 수 있는 방법이 필요하게 되었다. 면역분석법(Immunoassay)은 이러한 측면에서 장점을 지니는 방법으로 1980년대부터 본격적으로 농약의 잔류분석에 응용 되어왔다. 면역기법에 의한 분석은 특이성, 민감성, 정확성, 간편성 경제성, 신속성, 응용성이 뛰어난 장점이 있다.

면역기법에 의해 지금까지 분석되어진 농약들을 살펴보면, 살균제로는 benomyl과 그 대사체인[27,28], metalaxyl, fenpropimorph등과 살충제로는 benzoylphenylurea계 약제[29]와 parathion, aldrin, dieldrin, endosulfan, fenitrothion, permethrin, pyrimifos-methyl 등이 분석되었으며[30-32] 제초제로 paraquat, 2,4-D, atrazine, chlorsulfuron, metolachlor, picloram, bentazon등이 분석되었다[33-35]. 이 밖에도 IA A, ABA, GA와 같은 식물 생장조절제와 살비제 avermectin, *Bacillus thuringiensis* 독소[36]나 aflatoxin B1과 같은 곰팡이 독소 분석[37] 등이 시도되었다[26].

식물 특히 옥수수, 과일에서의 atrazine 분석방법은 주로 TLC, GC, HPLC 등을 이용하고 있으나[16,20,38-41] 이들 방법은 추출과 정제의 과정인 시료 전처리에 많은 시간과 유기용매가 소비되고 넓은 공간 많은 기구 그리고 전문인력을 필요로 하며 비싼 장비가 필요하고 처리과정에서 수반되는 안전성의 문제가 제기된다. 이에 반해 면역분석법은 값싸고[3] 다량의 시료를 동시에 복잡한 추출 없이 적은 양으로 측정할 수 있으며[1,23,42] 분석시간이 빠르다[16,43-44]. 단점으로는

만들어진 항체가 다른 유사한 화합물과의 교차 반응을 일으킬 가능성이 있으나 이를 극복하면 보다 간편하고 정확한 분석을 할 수 있을 것으로 사료된다[24, 45-52].

본 연구는 국내식품을 비롯한 수입 농산물의 안전성 확보를 통한 국민 보건 증진이라는 궁극적 목표를 달성하기 위한 연구의 일환으로 현재 세계 각국에서 문제가 제기되고 있는 유해잔류농약의 식품내 잔류량 측정을 위한 신속검색방법을 개발하기 위하여 atarzine을 실험대상농약으로 하여 먼저 항원성을 인위적으로 부여하고 단일크론 항체 생산을 위한 hybridoma cell 의 개발과 이들 단일크론 항체를 이용한 첨단분석 방법의 확립과 이를 바탕으로 실제 간편한 분석 kit를 개발하여 국내에 보급함으로서 체계적인 유해 잔류농약 오염 현황을 모니터링하여 식품의 안전성을 도모하기 위하여 다음과 같은 연구를 수행하였다.

제2절 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 실험재료는 다음과 같다. Tween 20(polyethylene sorbitan monolaurate), keyhole limpet hemocyanin(KLH), bovine serum albumin(BSA), ovalbumin(OVA), 2,2'-azino-di-3-ethyl benzthiazoline sulfonic acid(ABTS), N-hydroxysuccinimide(NHS), horseradish peroxidase(HRP), 3-mercaptopropionic acid, antimouse-IgG-horseradish peroxidase conjugate, phosphate buffer saline(PBS)는 Sigma사로 부터, Freund's complete adjuvant(FCA), Freund's incomplete adjuvant(FIA), 3,3'-diaminobenzidine, dimetylfonamide(DMF) 및 표준 atrazine은 Aldrich사로부터 구입하여 사용하였고, 폴리클론항체생산을 위해서는 Newzealand female white rabbit를 단클론성 항체생산을 위해서는 BALB/c mouse를 실험동물로 사용하였다. 또한 분석을 위한 기구로 microtiter plate는 Dynatech사에서, 분석기기인 ELISA Reader는 *BIO-RAD* ELISA Reader model 550을 사용하였다.

시료 중 atrazine 추출을 위한 유기용매로 hexane, ethyl acetate, methanol, ethanol, acetonitrile 등은 HPLC급을 사용하였고, 그 외 화학약품은 분석용 특급시약을 사용하였다.

2. Atrazine에 대한 antigen합성

가. Atrazine-hapten 합성

항원성이 결핍된 atrazine의 항원성을 높이기 위하여 유도체를 만들어 coupling site를 부여하고 다시 단백질을 결합시켜 항원성을 증폭시켰다. Atrazine의 유도체의 합성은 Marvine 등[3]의 방법에 준하였다. 즉, 3개의 가지 달린 flask에 100 ㎖의 ethanol에 녹인 atrazine 2.16 g(10 mmol)넣고 SH기를 가진 3-mercaptopropionic acid 0.834 ㎖ (20.8 mmol) 와 0.88 g NaOH(20.8 mmol)을 첨가하여 질소 gas하에서 70℃이상의 온도로 reflux시켰다. 이 반응물의 ethanol을 vacuum pump를 이용하여 제거 한 후 celite로 여과하고 다시 물을 가해 100 ㎖로 맞춘 다음 진한 염산으로 pH를 4.0 이하로 산성화시키면서 합성된 atrazine-haptan을 결정체화 시켰다. 이것을 filter paper를 funnel에 깔고 여과한 다음 ice bath에서 washing하여 깨끗한 결정을 얻고, 이것을 vacuum desiccator에 넣어 하룻밤 동안 정치시켜 완전한 결정을 얻었다.

나. Atrazine-protein conjugate 합성

합성된 atrazine-hapten과 단백질의 결합도 Marvine 등[3]의 방법에 따라 행하였다. 즉, atrazine-protein conjugate 합성은 30.2 ㎎의 atrazine hapten(0.1 mmol)을 1 ㎖의 dry DMF에 녹이고 0.1 mmol의 N-hydroxysuccinimide와 0.11mmol cyclohexylcarbodiimide를 첨가한 후 3.5시간 실온에서 반응시켰다. 이때 침전된 dicyclohexyl urea는 원심 분리하여 제거하였고 DMF 상등액을 준비하였다. 미리 준비해 둔 protein용액(BSA, HRP, KLH)을 stirring하면서 앞서 제조한 DMF 상등액의 1/4씩을 protein용액에 첨가하였다. 합성된

atrazine-protein conjugate는 4℃에서 3일간 투석을 하여 정제하였고, 투석 후 2 ㎖씩 plastic vial에 넣고 -20℃에 보관하면서 사용하였다.

3. Atrazine에 대한 폴리클론항체생산

가. 면역

Atrazine에 대한 항체생산을 위해 앞서 합성한 atrazine-KLH 1,000 ㎍을 1.0 ㎖의 식염수에 녹이고 1 ㎖ complete Freund's adjuvant와 섞어 유화시켜 토끼 피하에 1차 면역(500㎍/rabbit)을 실시한 다음, 3주 간격으로 incomplete Freund's adjuvant로 유화시켜 booster injection을 행하였다. 1차 injection후 2주 간격으로 채혈하여서 항체 역가를 측정하였고, 항체가 높은 것은 황산암모늄 침전법으로 정제하였다. 즉 상징액 반정도의 포화 황산암모늄 용액을 자석 교반기로 교반하면서 1방울씩 떨어뜨려 혈청단백질을 침전시켜 원심분리의 과정을 3번 이상 반복하여 항체를 분리하였다. 분리한 항체는 원래와 같은 부피의 0.01M phosphate buffer saline(PBS)로 녹이고 4℃에서 3일간 투석시킨 다음 원심분리하여 침전물을 버리고 상징액을 취하여 역가를 측정한 다음 1 ㎖씩 분주하여 동결건조 시킨 후 -70℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

나. 항혈청 역가 측정

정제한 항체의 역가를 측정은 indirect ELISA법을 행하였다. Fig. 2-2에서 보는 바와 같이 앞에서 합성한 atrazine-BSA를 완충액(coating buffer)에 녹여 microtiter plate에 100 ng/100 ㎕/well씩 분주한 다음 4℃에서 하룻밤 방치하여 코팅한 후 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 항체의 비특이적인 반응을 방지

하기 위해 PBS에 녹인 0.2% ovalbumin을 200 ㎕가하여 하룻밤 방치하여 blocking을 한 후 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 항혈청을 단계적으로 희석한(10 100,000) 항혈청을 100 ㎕씩 well에 주입하고 다시 37℃에서 1시간 반응시켰다. 세척용 완충액으로 5회 세척하고 1 : 1,000으로 희석한 2차 항체(goat anti-rabbit IgG-HRP, Sigma)를 100 ㎕씩 분주하고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 다시 세척용 완충액으로 6번 세척하고 기질용액(ABTS) 100 ㎕를 분주하여 실온에서 30분간 발색시킨 후 반응정지용액을 50 ㎕씩 넣어 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA Reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 역가를 검정하였다.

Coating plates 500 ng atrazine-BSA with coating buffer

↓

Place at 4℃ for overnight

↓

Washing plates with PBS-tween(4 times)

↓

Add 200㎕ 0.2% ovalbumin/PBS, 4℃ overnight

↓

Washing plates with PBS-tween(4 times)

↓

Add antibody and Incubation at 37℃ for 1hr

↓

Washing plates with PBS-tween(5 times)

↓

Add 100㎕ 2nd antibody solution(Goat anti-rabbit IgG-HRP)

↓

Incubation at 37℃ for 1hr

↓

Washing plates with PBS-tween(5 times)

↓

Add 100 ㎕ substrate and incubation at 37℃ for 30min

↓

Add 50 ㎕ stopping-reagent

↓

Reading at 405 nm

Fig. 2-2. Procedure of indirect ELISA for titration of anti-atrazine antibody in rabbit.

다. 항체의 특이성조사

생산된 폴리클론 항체의 특이성을 조사하기 위하여 atrazine과 유사한 구조를 가진 화합물에 대한 교차반응성을 조사하였다. 즉, 2,4-D., parathion, malathion, bromacil, bentazone 등의 농도를 달리하여 이들 농약에 대한 항체의 교차반응의 정도를 구하였다. Atrazine 폴리클론 항체에 대한 atrazine-HRP의 결합을 50% 저해하는 atrazine의 농도를 atrazine-HRP의 결합을 50% 저해하는 이성체의 농도로 나눈 %값으로 나타내었다.

라. Direct competitive ELISA법 확립

황산암모늄 첨전법으로 정제하여 얻은 항체를 이용하여 direct competitive ELISA(dcELISA)법을 확립하였다. ELISA법을 확립하기 위하여 반응의 조건을 항체의 coating 농도, 항체의 coating buffer, 항체 coating 온도, 항체의 coating 배양시간, atrazine-HRP 결합체의 반응농도 등을 조사하여 반응의 조건을 설정하였고 이러한 조건들이 ELISA 반응에 미치는 영향을 조사하였다.

4. Atrazine에 대한 hybridoma 개발

가. 면역

실험동물인 생후 6주된 BALB/c mouse(암컷)에 atrazine-KLH와 Freund's complete adjuvant의 혼합액을 마리당 100㎕씩 복강으로 면역하였으며 3주 간격으로 같은 방법으로 3회 추가접종을 실시하고 있다. 마지막으로 fusion 3일 전에 phosphate buffered saline(PBS)으로 희석한 동량의 atrazine-KLH conjugate를 복강내로 주사하여 최종면역 하였다.

나. 항혈청 titer 측정을 위한 ELISA법 확립

Atrazine에 대한 항혈청 titer 측정은 앞서 폴리클론항체에 대한 titer측정에서와 같이 indirect competitive ELISA법으로 실시하였다.

다. Cell fusion

Atrazine에 대한 단크론성항체를 생산하는 hybridoma cell line을 개발하기 위하여 먼저 atrazine등에 특이한 항체를 생산하는 mouse의 spleen cell과 myeloma cell을 융합시켰 다. 세포융합에 사용한 형질세포종세포는 P3x63Ag8.V653 세포주로서 경상대학교 의과대 학 미생물학 교실에서 분양받아 계대한 것을 사용하였다. 이 세포는 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase(HGPRT)가 음성이어서 8-azaguananine에 내성이며 면역글로부린을 생산하지 못한다. 이 세포주를 8-azaguananine (20ug/ml), 10%우테아혈청, 10% NCTC-135(GIBCO), 그리고 gentamicin (50ug/ml)이 함유된 RPMI 1640 (GIBCO)로 배양하며 2-4일에 한번씩 원침세척하여 새로운 배지로 갈아주면서 37℃, 6% CO_2에서 배양 계대하였다. 세포융합에 사용할 형질세포종 세포는 새로운 배지로 18시간 배양한후 RPMI1640으로 3회 세척하고 세포수를 1X10⁶/ml로 조정하여 사용하였다.

최종면역 후 3일이 경과된 BALB/c마우스로부터 비장을 적출하여 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM,GIBCO)내에서 핀셍으로 비장세포를 분리하였다. 비장 세포액을 실온에서 적당하게 정치시켜 비장 결합조직을 가라 앉혀 제거하고 DMEM으로 원심세척하였다. 비장세포액을 우태아 혈청에 중층하여 280g에서 5분간 원심분리함으로써 비장 세포액내의 혈소판을 제거하

였다. DMEM으로 원심세척한 다음 비장 세포액을 Tris-NH_4Cl용액으로 처리하여 적혈구를 용혈시켜 백혈구 성분을 분리하였다. 그런 다음 RPMI1640 으로 3회 세척하여 세포수를 1x10⁷/ml로 조정하여 사용하였다.

세포융합방법은 Kohler과 Milstein의 방법으로 실시하였다. 즉 위에서 준비한 형질세포종 세포와 비장세포를 1:10의 비율로 혼합하여 2회에 걸쳐 원침세척하였다. 37℃로 보온시킨 혼합 세포침전물에 50%(W/V) polyethylene glycol 1,000 1ml을 1분간 점적하여 세포를 융합시켰다. 점적후 즉시 37℃의 DEME 1ml을 흔들면서 1분동안에 첨가하였고 계속해서 DMEM 15ml을 5분간에 걸쳐 첨가하였다.

융합이 끝난 혼합 세포액을 400gx에서 5분간 원침하고 20% 우태아 혈청, 10% NCTC,그리고 gentamicin(50ug/ml) 첨가된 DMEM에 부유시킨 다음 96-well배양판에 well당 50ug씩 분주하여 37℃,6% CO_2에서 배양하였다.

융합된 세포만을 선택하기 위하여 Littlefield가 고안한 HAT(50uM hypoxanthine, 0.4uM aminopterin, 16uM thymidine)배지를 융합후 1,3,5,및 7일에 well당 50ul씩 첨가하고, 10일에는 150ul씩 배지를 교환하여 15일까지 융합세포의 증식 유무를 역위상차 현미경으로 관찰하였다.

라. Cloning

융합 후 10일 내지 15일 사이에 융합된 세포가 well 바닥의 1/3이상 성장하였을 때 배양상층액을 채취하여 효소 면역측정법으로 항체를 분비하는 지의 여부를 검색하였다. 항체를 생산하는 well의 세포를 24 well plate에 옮겨 배양한 후 항체역가가 계속 유지되고 세포의 증식이 활발한 hybrid를 선택하여 cloning

을 실시하였다.

Cloning은 Mckearn의 무한대 희석법으로 실시한다. 24 well에서 성장하는 세포를 DMEM으로 희석하여 최종 10 30 cell/㎖의 농도로 조정하여 well당 100㎕씩 분주하여 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 aminopterin이 첨가되지 않은 배지를 이용하였다. 7-10일 배양 후 역위상차 현미경으로 1개의 세포집락이 형성된 well을 선택하고 항체생산 여부를 효소 면역측정법으로 검색하였다. 항체의 역가가 높은 hybridoma를 최종 선택하여 증식시키고, 106 cell/㎖로 조절된 배양세포를 cryo tube에 1㎖씩 분주하여 -70℃에서 급속동결한 후 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

5. 항체의 생산과 특성

가. 항체의 생산

확보한 hybridoma중 항체생산능이 가장 안정한 hybridoma를 T-75 flask에서 대량배양한 후 mouse의 복강에 이식하여 복수액을 생산하였다. 즉, 1주일 전 복강에 pristane (2,4,10,14-tetramethylpentadecane, sigma co.)을 0.5㎖를 주입한 mouse에 대량증식한 hybeidoma cell을 수거하여 세포수가 1.0×10⁷/0.2㎖ 되도록 조절하여 mouse의 복강에 주입하였다. 약 7-8일후 복강으로부터 복수액을 채취하여 원심분리한 후 상징액에 대하여 역가를 검정한 다음 실험에 사용하였다. 또한 각 융합잡종세포가 분비하는 단크론성의 항체 isotype을 조사하였다. 항체의 isotype결정은 Boehriner mannheim사의 mouse monoclonal antibody isotyping Kit를 사용하여 Boehriner mannheim사에서 제시한 방법에 따라 시행하였다.

나. 항체의 특성

채취한 복수액을 ammonium sulfate법으로 정제하여 항체의 반응성 및 특성을 조사하는데 사용하였다. 즉, 복수액을 2배량의 PBS용액에 희석한 후 포화 ammonium sulfate용액을 동량 가하여 30분간 실온에서 반응시킨다음 10,000xg의 원심분리를하여 침전물을 회수하였다. PBS용액에 침전물을 재용해 한다음 다시 45% ammonium sulfate용액을 동량가하여 실온에서 30분간 반응시키고 다시 10,000xg의 원심분리를하여 침전물을 회수하였다. 한번더 45% ammonium sulfate용액으로 반복한 다음 PBS용액에 투석을 3일동안 3회 반복하였다. 투석이 끝난 용액의 단백질량을 정량한 다음 항체의 반응성 및 특성을 조사하는데 사용하였다. 생산된 단크론성항체의 특이성을 조사하기 위하여 각 유해물질과 유사한 구조를 가진 화합물에 대한 교차반응성을 조사한다. 이성체들의 농도를 달리하여 흡착항원에 결합된 항체를 50% 유리시키는 농도를 산출하여 교차반응성(CR□)을 다음과 같이 계산한다. CR□=(흡착 항원과 항체의 반응을 50% 억제할 수 있는 atrazine의 농도/ 흡착항원과 항체의 반응을 50% 억제할 수 있는 이성체의 농도)×100

6. ELISA법의 확립

가. ELISA 조건조사

앞서 생산한 단크론성항체를 정제한다음 이를 이용하여 ELISA법을 확립하는 실험을 실시하였다. Atrazine분석을 위한 direct competitive ELISA법 또는 direct competitive ELISA법을 확립하기 위해 coating법과 coating 시간. pH, 각

종유기용매와의 반응, 항체의 농도, 기질의 농도 및 반응시간이 ELISA법에 미치는 영향을 조사하였다.

나. Rapid direct ELISA법의 확립

실제 현장에서는 빠른 검색을 필요로 하고 있으므로 앞서의 direct competitive ELISA법을 개량하여 신속히 검색하는 방법을 모색하였다. 이를 위해 coating antibody의 희석배수와 trace로 사용하는 zearalenone-HRP의 희석배수를 조절하여 10분 반응, 10분 발색하여 현장에서 신속히 검출하는 rapid direct competitive ELISA 방법을 확립하였다.

7. ELISA분석용 시료조제법

가. 각종시료의 수집

개발한 hybridoma를 이용하여 얻은 단크론성항체로서 확보한 ELISA 조건을 실제 시료에 적용하기 위해 제초제 atrazine의 경우는 현재 미국 등지에서 오염문제가 되고 있는 토양과 물을 실험대상시료로 수집하였고, 동물성 시료로는 사람의 urine과 혈액을 제공받아 ELISA 분석을 위한 시료조제에 사용하였다.

나. 식물성 시료조제

미국 등지에서 제초제로 사용되고 있는 atrazine의 문제는 물, 토양이 주가 되므로 이들을 분석하는 시료 중에 조건을 실험하였고, 아울러 사과, 포도 등의 과일도 취하여 시료 조제를 하여 분석조건으로 조사하였다.

1) 물 시료의 조제

Lucas 등[51]의 방법을 참조하여 시료를 조제하였다. 즉, 경남 진주의 진양호 물을 1L 삼각플라스크에 채취하여 냉장고에 보관한 다음 실험에 시료로 사용하였다. 즉, 500mL의 시료를 Whatman No.1로 여과하여 오염물을 제거한 다음 pH를 7.4로 조절하였다(0.1N NaOH 또는 0.1N HCl). 이 액의 일부분을 2개의 15mL 원심분리관에 5mL씩 넣어 보관하면서 ELISA를 실시하였다.

2) 토양시료의 조제

토양시료의 경우는 물과는 약간 달리 FDA/WHO 방법에 준하여 실험하였다. 즉 5g씩의 토양시료 2개를 각각 삼각플라스크에 넣고 25ml의 30% MeOH(in PBS)과 혼합한 후 실온에서 하룻밤 진탕시켰다. 이것을 13,000rpm에서 30분 원심분리하고 상등액을 Whatman No.1로 여과하였다. 이때 여액을 시료로하여 ELISA를 실시하였다.

3) 농산물의 시료조제

농산물의 경우 사과와 포도를 취하여 시료 조제를 하여 회수율을 구한 다음 ELISA 실시 가능여부를 검토하였다. 즉, FAO/WHO 방법에 준하여 사과 및 포도 10g씩을 천칭하여 비이커에 넣고 50mL의 30% MeOH(in PBS)을 가한 다음 waring blender로 blending 하였다. 시료를 13,000rpm에서 30분 원심분리하고, 상층액을 Whatman No.1 여과지로 여과하여 여액은 pH 7.4로 조절하고, 이 액 일부분을 15mL 원심분리관에 취하여 ELISA를 실시하였다.

다. 동물성 시료조제

Atrazine 분석을 위한 동물성 시료는 거의 없으나 물에 오염되었던 유해물질이 urine이나 혈액에 2차 오염될 가능성이 있어 이들을 시료로 ELISA 조건 확립을 위한 실험을 실시하였다.

1) Urine시료의 조제

Urine 시료의 ELISA 분석조건을 조사하기 위하여 경상대학병원 일반외과에서 제공받은 urine을 먼저 50mL 원심분리관에 넣고, 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 4℃에 보관하면서 ELISA 시료로 직접 사용하였다.

2) 혈액시료의 조제

경상대학교 의과대학 일반외과에서 제공받은 혈액에 EDTA를 1mg/mL 농도로 첨가하고 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장만을 취하여 4℃에서 보관하면서 ELISA시료로 사용하여 회수율을 비롯한 ELISA 분석을 위한 실험조건을 확립하는데 사용하였다.

8. Affinity column(IC)의 제작법

가. 항체의 대량생산

Atrazine에 대한 항체의 대량생산은 지금까지의 BALB/c mouse 복수를 이

용한 방법에서 달리하여 T-75 flask에서 대량 증식한 hybridoma cell을 Fig. 2-3과 같은 모양의 Integra celline CL 350 flask에서 항체를 생산하였다. 즉 15% fetal calf serum(FCS)이 함유된 DMEM배지로 hybridoma cell을 1.0 x 10⁶/㎖로 조절한 다음 5㎖을 (A)에 주입하고 serum이 포함되지 않은 DMEM배지 350㎖을 (B)에 주입하여 37℃, 5% CO2 배양기에서 1주일동안 배양한 후 (A)을 통하여 2.5㎖의 항체가 포함된 cell 용액을 취하고 다시 15% FCS이 함유된 DMEM배지 2.5㎖을 보충하고 serum이 함유되지 않은 DMEM배지 350㎖로 교체하여 계속적으로 배양하였다. 이 후 3일 간격으로 반복조작하여 항체를 생산하였다. 항체가 포함된 세포용액은 3,000rpm으로 원심분리하여 cell을 제거한 다음 항체 역가를 측정하고, 4℃에 보관 하면서 Affinity column(IC) 및 분석용 ELISA kit의 실험제작에 사용하였다.

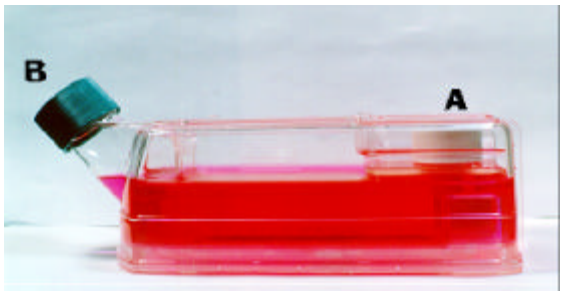


Fig. 2-3. Potogram of Integra celline CL 350 flask for monoclonal antibody production with hybridoma cell.

나. Affinity column의 제작

시료에 극히 미량으로 오염되어 있는 atrazine을 정제, 농축하기 위한 목적으로 affinity column을 제작하였다. immunoaffinity column에 의한 atrazine의 정제원리는 Fig. 2-4와 같다.

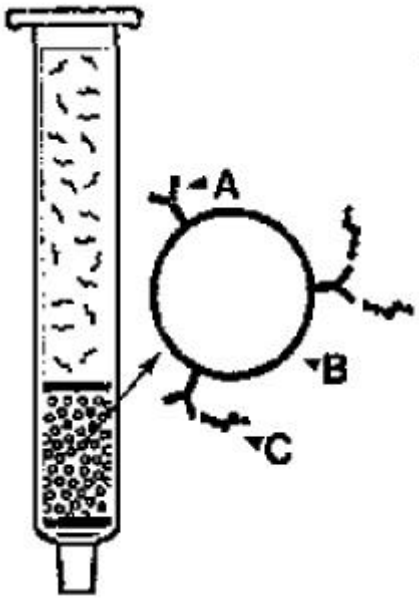


Fig. 2-4. Principle of developed immunoaffinity column chromatography

A: Monoclonal antibody B: Support Bead

C: Atrazine Molecule

먼저 유리병에 들어있는 gel 25㎎을 감압장치가 부착되어있는 유리 funnel에 옮기고 gel 10배량의 ice-cold water로서 gel을 세척하였다. 세척 전 gel을 25 ㎖의 차가운 단크론성항체가 들어있는(1㎎항체 및 5㎎항체/㎖ PBS) 50㎖ 원심분리관에 넣고 천천히 흔들어 덩어리가 없는 혼합액이 되게한 다음 4℃에서 하룻밤동안 천천히 교반시켰다. 이 때 항체와 gel의 결합을 조사하였다. 즉, 소량의 결합액을 취하여 증류수로 40배 희석한 후 280nm에서 O.D.를 측정하여 비교하였다. 특히 결합물에 유리되는 N-hydroxysuccinimide의 방해를 감소시키기 위해 전체량의 1/100에 해당하는 1M HCl을 첨가하여 pH를 낮춘다음 O.D.를 측정하였다.

항체와 gel의 결합이 확인되면 항체의 잔여 active side를 없애기 위해 2.5㎖의 1M ethanolamine-HCl을 첨가한 다음 배양을 1시간 더 계속하였다. 단크론성항체와 결합된 gel을 glass filter가 부착된 funnel에 옮기고 250㎖의 물과 500 ㎖의 PBS로 gel을 감압세척하였다. 세척이 끝난 gel cake는 적당한 유리병이나 시험관에 넣고 25 50㎖의 PBS를 첨가한 다음 덩어리가 생기지 않도록 충분히 교반시켰다. 이것에 0.1% sodium azide를 첨가하고 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

또한, 시료의 조제 및 정제는 다음과 같이 수행하였다. 즉, 시료 6g을 50㎖ 원심분리관에 넣고 70% methanol 18㎖을 가한다음 10분간 진탕기에서 100rpm의 속도로 추출하였다. 진탕이 끝난 시료는 3,000rpm에서 5분간 원심분리하고 상징액 6㎖을 취하여 PBS 36㎖로 희석시켜 column 정제용 시료로 사용하였다. 정제에 앞서 우선 항체가 결합된 gel 1㎎을 minicolumn에 넣고 10㎖의 증류수와 PBS로 각각 세척하고 항체와 결합한 atrazine을 methanol로 용출시킨다. HPLC에 의한 atrazine의 gel과 결합여부에 관한 실험을 하기 위한 기기분석 조건은 Table 2-1과 같았다.

Table 2-1. HPLC condition for atrazine analysis.

HPLC Type	Waters Model 590
Column	μBondapak C18(3.9mm ×300mm steel column)
Detecter	UV 230nm
Flow rate	1㎖/min
Mobile phase	methanol:water(80:20, v/v)

다. IC-ELISA

시료에 극히 미량인 atrazine의 오염정도를 추적해야할 필요가 있을 경우 일단 시료를 전처리하고 immunoaffinity column으로 시료 중의 atrazine을 gel에 흡착된 항체에 고정시킨 후 메탄올로 용출시켜 ELISA용 시료로 사용하는 IC-ELISA 분석조건을 검토하였다.

즉 IC로 정제된 시료는 direct competitive ELISA와 결합시켜 IC-ELISA 분석시스템을 확립하였다. 즉 atrazine에 대한 단크론성 항체를 PBS에 희석한 다음 well에 100㎕씩 첨가하고 4℃에서 하룻밤 coating 하였다. coating plate는 PBS와 3번 이상 PBS-tween 용액으로 washing하고 앞서 정제한 시료 100㎕와 atrazine-HRP conjugate 희석액을 100㎕을 혼합한 액 100 ㎕씩을 well에 주입하였다. 반응액이 든 plate는 다시 37℃에서 30분간 반응시킨 다음 PBS-tween으로 6회 washing하고 기질(ABTS) 희석액을 100㎕씩 well에 주입하여 10분간 발색시켜 ELISA reader로 읽어 미리 준비한 표준곡선과 비교하여 시료 속의 atrazine 함량을 구하는 IC-ELISA system을 확립하였다.

라. IC-HPLC

IC를 이용하여 조제한 시료를 HPLC에 연결하여 분석하기 위한 IC-HPLC 분석조건에 대한 실험을 하였다. 지금까지의 결과는 시료를 앞서 IC-ELISA와 같이 MeOH로 용출시키고 질소 gas로 농축한 후 4℃에 보관하면서 MeOH 100 ㎕에 녹여 여과한 다음 HPLC 분석용 시료로 사용하고 있다. 이때 HPLC 분석조건은 column은 uBondapak C18(3.9mm X 300mm steel column)을 사용하였고 Detector는 UV 230 nm, Flow rate는 2 ml/min, Mobile phase는 methanol : water (80:20, v/v)를 사용하였다.

IC로 정제된 시료는 HPLC로 쉽게 분석할 수 있는 IC-HPLC 분석시스템을 확립하였다.

9. ELISA분석 KIT의 실험제작

각종 시료 중에 잔류하는 atrazine의 신속한 분석을 위한 kit를 다음과 같이 실험 제작하였다. 즉 기존의 direct competitive ELISA법을 활용하여 실제 현장에서 간단히 분석할 수 있는 kit를 조제하기 위해 다음과 같은 것을 시험하였다. 즉, ELISA 조건의 kit에서의 적합 여부, kit의 보관방법, kit 사용기간, 그리고 kit 1set당 포장될 각종 시액의 함량 및 kit의 사용 protocol에 대한 내용을 검토한 후 kit로 제작하였다

10. 시료중 atrazine의 검색

가. 시료의 수집

실제 시료에 atrazine 잔류유무를 조사하기위해 구내시료로는 물, 사과와 포도를 대상으로 각각 26점, 33점 및 37점을 분석시료로 수집하였고, 수입시료의 경우는 옥수수를 대상으로 18점을 분석시료로 수집하였다.

나. 시료조제

1) 물시료의 조제

물의 경우 경남 진주의 진양호 물을 1L 삼각플라스크에 채취하여 냉장고에 보관한 다음 실험에 시료로 사용하였다. 즉, 500mL의 시료를 Whatman No.1로 여과하여 오염물을 제거한 다음 pH를 7.4로 조절하였다(0.1N NaOH 또는 0.1N HCl). 이 액의 일부분을 2개의 15mL 원심분리관에 5mL씩 넣어 보관하면서 ELISA를 실시하였다.

2) 농산물의 시료조제

농산물 시료로서 사과와 포도를 취하여 시료 조제를 하여 회수율을 구한 다음 ELISA 실시 가능여부를 검토하였다. 즉, FAO/WHO 방법에 준하여 사과 및 포도 100g씩을 천칭하여 비이커에 넣고 200mL PBS를 가한 다음 waring blender로 blending 하였다. 시료를 13,000rpm에서 30분 원심분리하고, 상층액을 Whatman No.1 여과지로 여과하여 여액은 pH 7.4로 조절하고, 이 액 일부분을 2개의 15mL 원심분리관에 5mL씩 취하여 ELISA를 실시하였다.

다. Atrazine의 면역분석

Atrazine의 면역분석은 앞서 실험제작한 ELISA kit로서 분석하였다. 즉, 조제한 시료용액의 atrazine 분석을 위한 direct competitive ELISA조건을 정리하면 다음과 같다. 먼저 coating해놓은 well을 washing buffer로 3회 세척하였다.. 표준 atrazine과 atrazine-HRP 최적희석액을 같은 양으로 혼합한 후 100㎕씩 well에 주입하여 37℃에서 30분간 배양하였다. Washing buffer로 다시 6회 씻은 plate는 100㎕의 기질 (2'-azino-di-3-ethyl- benzthiazoline-sulfonic acid)용액을 첨가하여 결합된 atrazine oxime-HRP를 발색시키고 15분 후 반응정지액 100㎕씩을 가해 반응을 정지시켜 ELISA reader(Dynatech, Lab. MR 600, U.S.A)로서 흡광도(410nm)를 측정하여 미리 작성한 표준 곡선과 비교하여 atrazine의 함량을 계산하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. Antigen의 합성

가. Hapten 합성 및 확인

항체 생산에 앞서 분자량이 적어 항원성이 결핍되어 있는 atrazine에 항원성을 부여하기 위하여 atrazine hapten을 만들어 coupling site를 부여하고 다시 단백질과 결합시켜 항원성을 증폭시켰다. 먼저 atrazine의 hapten 조제는 Marvin 등[18]의 방법에 따라 조제하였고 이때의 수율(%)은 b/a × 100 (a: end product의 이론적인 량, b: 실제 end product의 량)으로 계산한 결과 82%였으며 그때의 합성원리는 Fig. 2-5와 같았다. 또한 합성된 atrazine-hapten은 Marvin 등[18]의 방법에 따라 TLC로 확인한 결과 R_f치는 표준 atrazine이 0.75, 반응액은 0.39로 나타나 atrazine이 새로운 유도체로 전환되었음을 확인할 수 있었다. 아울러 hexane : ethyl acetate (1:1) + 2% acetic acid 혼합액으로 전개한 표준 atrazine과 atrazine hapten의 TLC chromatogram은 Fig. 2-6와 같았다.

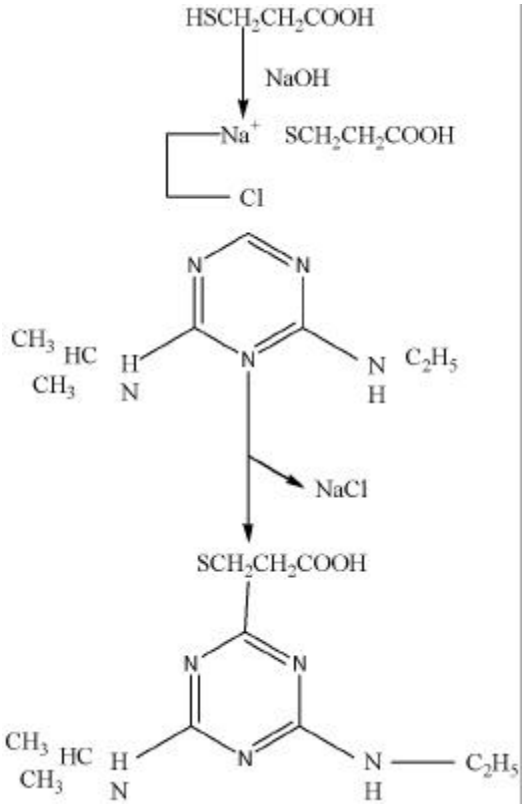


Fig. 2-5. Schematic diagram for the systhesis of atrazine-hapten.

Fig. 2-6. TLC chromatogram of atrazine-hapten conjugate

(A) Standard atrazine (Rf : 0.75)

(B) Atrazine-hapten conjugate (Rf : 0.39)

나. Antigen 합성

Antigen으로 사용될 atrazine-hapten과 단백질 결합체도 Marvine 등(53)의 방법에 준하였다. 즉, Atrazine-protein conjugate 합성은 atrazine hapten 30.2 ㎎ (0.1 mmol)을 dry dimethylformamide(DMF) 1 ㎖에 녹이고 같은 몰농도의 N-hydroxy succinimide와 10% 많은 량의 cyclohexylcarbodiimide를 첨가한 후 3.5시간 실온에서 반응시켰다. 이때 침전된 dicyclohexyl urea는 원심분리하여 제거하여 DMF 상등액을 얻고, 미리 준비해 둔 protein용액(BSA, HRP, KLH)

을 stirring하면서 앞서 제조한 DMF 상등액을 3등분으로 나누어 각각의 protein 용액을 첨가하여 atrazine-protein conjugate를 합성하였으며 그 합성원리는 Fig. 2-7과 같았다. 조제된 합성액을 4℃에서 3일간 투석을 하여 정제한 후 2 ㎖씩 정용하여 plastic vial에 넣고 동결 건조시켜 -70℃에 보관하면서 사용하였다.

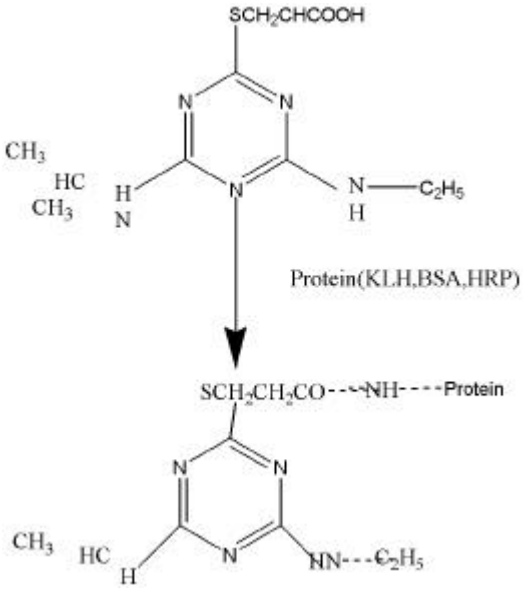


Fig. 2-7. Schematic diagram for the preparation of atrazine-protein conjugate.

2. Atrazine에 대한 폴리크론 항체생산

가. 면역

앞서 얻어진 atrazine-KLH conjugate를 사용하여 Newzealand white 암컷 토끼에 면역시켜 폴리크론항체생산을 시도하였다. 먼저 1,000 ㎍을 1.0 ㎖의 PBS에 녹이고 1㎖ complete Freund's adjuvant와 1:1로 섞어 유화시켜 토끼에 1차 면역(500 ㎍/rabbit)을 실시한 다음, 3주 간격으로 PBS에 녹인 atrazine-KLH conjugate와 incomplete Freund's adjuvant와 1:1로 섞어 유화시켜 2차, 3차, 4차면역을 실시한 다음 마지막(5차)은 PBS에 녹인 atrazine-KLH conjugate를 면역시켰다. 1차 injection후 2주일 간격으로 채혈하면서 항체 생성 여부를 조사한 결과, Fig. 2-8에서 나타난 것과 같이 그 중 한 마리의 토끼(rabbit-1)가 12주에 역가가 나타났다. 이때 최종면역을 실시하고 7일 후 심장채혈하여 항체 역가를 측정하였다.

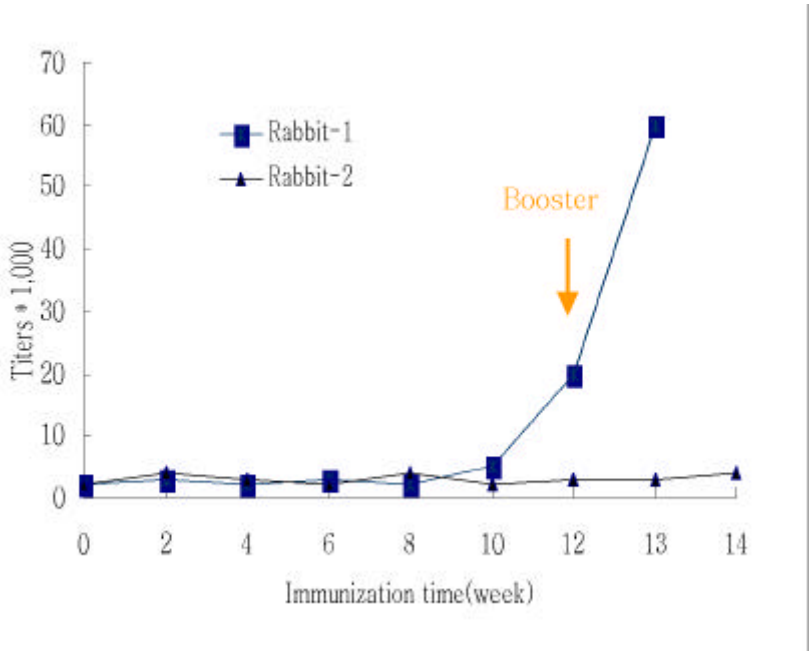


Fig. 2-8. Antibody titer of rabbit-derived anti-atrazine antibody.

나. 항혈청의 역가

13주 째의 채혈한 토끼혈청의 역가를Indirect ELISA법에 의해 측정한 결과는 Fig. 2-9와 같았다. 100,000 배의 희석에서도 항체의 역가가 나타났다. 채취한 혈청을 황산암모늄 침전법으로 정제하여 역가가 높은 항체를 얻었다. 즉, 혈청을 2배량의 0.05M phosphate buffer saline(PBS)용액에 희석한 후 동량의 포화 황산암모늄 용액을 자석 교반기로 교반하면서 1방울씩 떨어뜨려 30분간 실온에서 반응시킨 다음 10.000 xg, 4℃로 원심 분리하여 침전물을 회수하였다.

다시 PBS용액에 침전물을 용해 한 다음 포화 황산암모늄 용액을 동량 가하여 실온에서 30분간 반응시키고 원심분리하는 과정을 2번 반복하여 침전물을 수거한 다음 3 L의 PBS용액으로 4℃에서 3일간 투석한 다음 3,000 xg에서 원심 분리하여 불순물인 침전물을 버리고 용액의 단백질량을 정량한 다음 동결 건조시켜 -70℃에서 보관하면서 항체의 반응성 및 특이성을 조사하는 실험에 사용하였다.

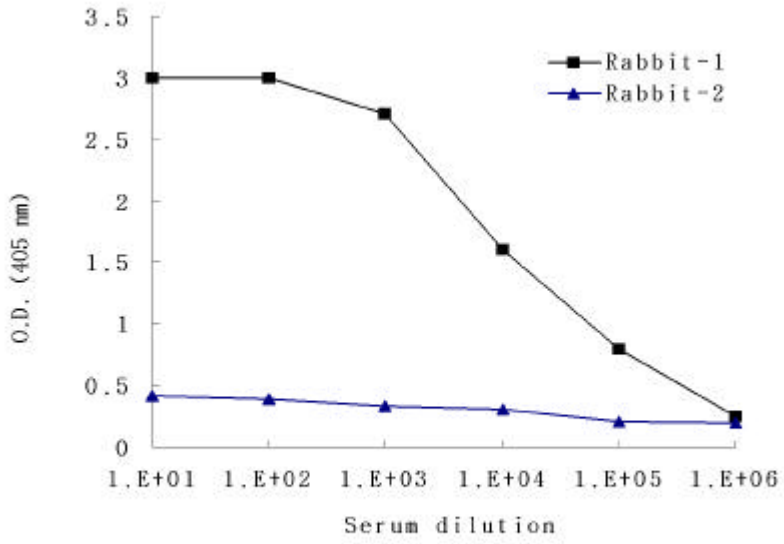


Fig. 2-9. ELISA titration of rabbit anti-atrazine serum after 13 weeks.

다. 항체의 특이성

정제된 항체의 반응조건을 살펴보기 위해 앞서 확립한 방법에 준하여 atrazine-BSA, 2,4-D, parathion, malation, bromacil, bentazone 등의 물질과의 교차 반응을 조사한 결과 Table 2-2와 같이 나타났다. Atrazine을 100%로 나타내고 농약 analogue의 교차 반응을 상대적인 %로 환산하여 비교하였다. 그 결과, Table 2-2에서 와 같이 atrazine-BSA은 115%로 atrazine보다 큰 교차반응을 나타내었으며, 그 외 2,4-D, parathion, malation, bromacil, bentazone은 교차반응을 나타내지 않았다.

Table 2-2. Cross reactivity of different atrazine analogues with anti-atazine Ab by indirect ELISA

Analogue	Cross reactivity(%)
Atrazine	100
Atrazine-BSA	115
2,4-D	0
Parathion	0
Malation	0
Bromacil	0
Bentazone	0

라. ELISA법의 확립

토끼에서 얻은 다량의 항체를 활용하여 direct competitive ELISA(dcELISA)법을 확립하였다. ELISA법을 확립하기 위하여 먼저 항체(1 ㎎/㎖)를 100배, 200배, 400배, 800배, 1,600배, 3,200배, 6,400배, 12,800배, 25,600배 등으로 희석하여 dcELISA를 실시하여 항체의 희석배수에 따른 O.D.값의 변화를 조사하였다. 그 결과 Fig. 2-10에서 보는 바와 같이 6,400배 희석까지는 O.D.치가 큰 차이 없이 높게 나타났다. 즉, 항체의 희석을 6,400배 이상으로 하였을 때 안정된 결과를 얻을 수 있었다. 아울러 10,000배 이상의 희석에서도 atrazine을 첨가하지 않은 것과 100 ppb 첨가한 것의 O.D.의 차이가 1이상을 나타났다. 그러므로 본 실험에서는 항체의 량도 절약할 수 있고 실험의 결과치도 안정되게 얻을 수 있는 농도인 10,000배로 항체를 희석하여 사용하였다.

또한, 코팅에 사용하는 buffer를 조사하였는데 Ueno 등()은 대체로 pH 9.6인 carbonate buffer를 사용하였다. 그러므로 본 실험에서는 실험실에서 주로 항체 coating buffer로 사용하고 있는 PBS를 Ueno 등이 사용한 pH 9.6 carbonate buffer와 비교하였다. 앞선 실험에서 얻은 항체의 희석배수로 항체를 PBS buffer와 carbonate buffer에 10,000배로 코팅하여 4℃에서 overnight시킨 후 atrazine을 1 1,000 ppb 농도로 희석하여 atrazine-HRP를 1,000배 희석한 액과 동량으로 섞은 100㎕씩 넣어 37℃에서 30분간 반응시키고, 기질(ABTS)을 가하여 30분간 반응시켜 O.D.값을 측정하여 비교하였다.

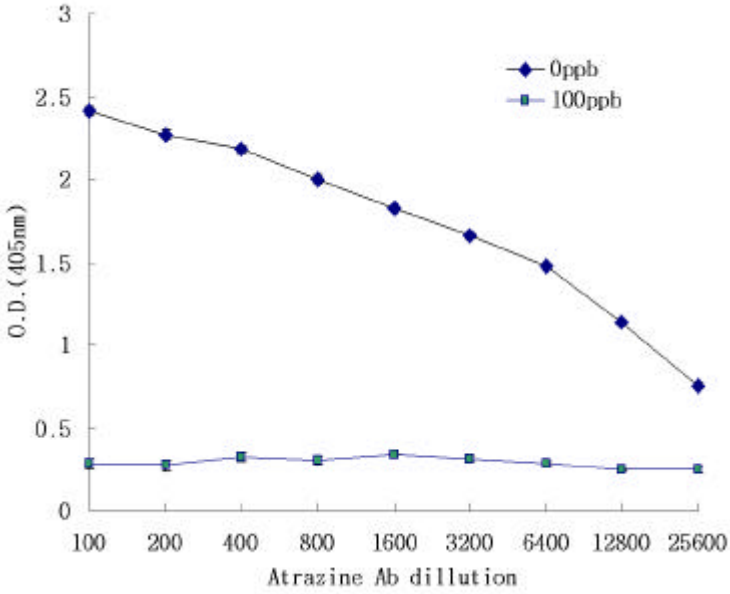


Fig. 2-10. Comparison of antibody dilution concentration by direct competitive ELISA for atrazine detection.

그 결과 Fig. 2-11에 나타내고 있는 바와 같이 본 실험에서도 PBS buffer로 코팅한 것보다 carbonate buffer로 코팅한 경우가 항체의 희석에 따른 O.D.값의 차이가 뚜렷하였으며 반응이 양호하였다. Carbonate buffer 사용 시 반응 결과는 atrazine의 농도가 0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.2, 5.0, 10, 20, 50, 100, 1,000 ppb에서 1.22, 1.20, 1.13, 1.03, 0.92, 0.83, 0.75, 0.65, 0.57, 0.50 및 0.40으로 나타났고, PBS buffer 사용 시는 0.83, 0.80, 0.77, 0.76, 0.68, 0.62, 0.60, 0.51, 0.44, 0.41 및 0.32로 carbonate buffer 사용 시 O.D.값이 보다 양호하게 나타나 본 실험에서는 코팅 buffer로 carbonate buffer를 사용하였다.

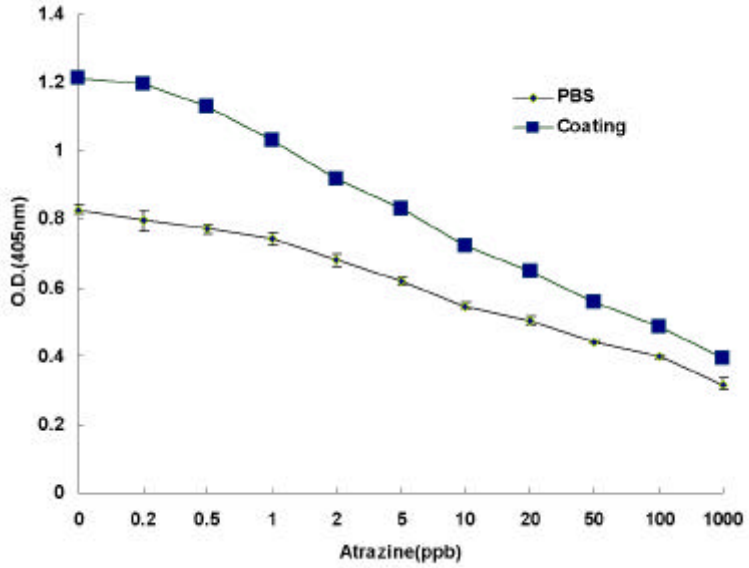


Fig. 2-11. Comparison of antibody coating buffers in direct competitive ELISA for Atrazine detection.

기존의 실험실 방법인 항체 coating 온도가 4℃에서 overnight하는 것이 적절한 지를 알아보기 위하여 앞선 실험에서 얻은 항체 희석배수와 항체 coating buffer에 따라 항체를 carbonate buffer에 10,000배 희석하여 100 ㎕씩 coating하여 준비한 두 개의 plate중 하나는 기존의 방법대로 4℃에서 overnight시키고, 다른 하나는 40℃에서 overnight시켜 coating buffer가 완전 건조되게 하여 각 plate에 각각 atrazine을 0 100 ppb로 희석하여 atrazine-HRP를 1,000배 희석한 용액과 동량으로 혼합한 용액을 plate well당 100 ㎕씩 넣고 37℃에서 30분간 반응시키고 기질을 첨가하여 반응시킨 후 O.D.를 측정한 결과 Fig. 2-12에서 보는 바와 같이 4℃의 경우가 40℃보다 atrazine의 농도에 따른 O.D.값의 변화가 뚜렷하게 나타났다. 이 결과에 의해 atrazine의 coating 온도는 기존에 해왔던 방법대로 4℃에서 overnight 시켰다.

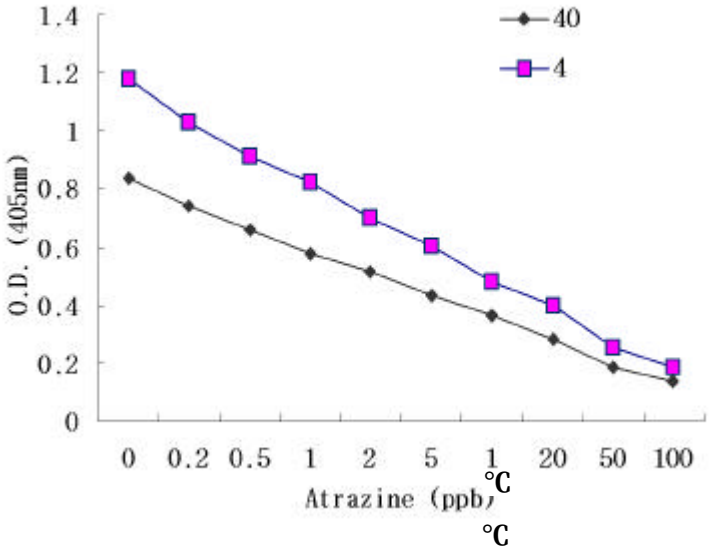


Fig. 2-12. Comparision of antibody coating temperatures on direct competitive ELISA for atrazine detection.

한편, atrazine-HRP 결합체의 적정 희석배수를 조사하고자 동결 건조시켜 보관 중인 atrazine-HRP 1 ㎎을 1 ㎖의 PBS에 녹인 다음 100, 200, 400, 800, 1,600, 3,200, 6,400 및 12,800배로 희석하여 표준 atrazine 0 ppb와 1,00 ppb 희석액과 동량 혼합한 용액을 plate well당 100 ㎕씩 첨가하여 반응시킨 결과 Fig. 2-13에서 보는 같은 결과를 얻었다. 합성된 atrazine-HRP의 활성이 대단히 우수하여 적어도 3,200배 이상으로 희석에서도 높은 O.D. 값을 나타내었다. 실험결과의 안정성을 위하여 본 실험에서는 2,000배로 정하였다.

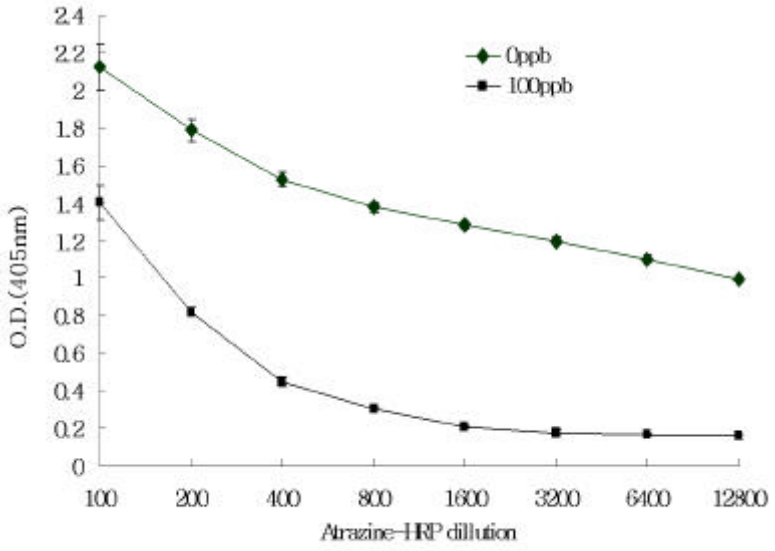


Fig. 12-13. Comparision of different dilutions of atrazine-HRP on direct competitive ELISA for atrazine detection.

항체를 plate에 coating할 때의 코팅시간이 ELISA반응에 미치는 영향을 조사하여 보았다. 즉, carbonate buffer에 항체를 희석한 후 100 μℓ씩 well에 주입하고 4℃에서 1, 2, 3, 6, 12, 24시간 정치시켰다가 well 속에 항체 희석액을 시간별로 washer로 제거하고 냉장고에 보관하였다가 동시에 ELISA를 행하였다. 그 결과 Fig. 2-14에서 보는 바와 같이 12시간 이상에서 O.D.값이 1.0이상으로 나타나 12시간 이상으로 항체를 coating시켜야 만이 충분히 항원-항체의 반응이 일어난다고 볼 수 있었고 반응시간이 길수록 더욱 안정적인 발색이 나타났다. 따라서, 일반 적인 방법과 같이 항체 coating 시간은 overnight 하는 것이 좋은 것으로 나타났다.

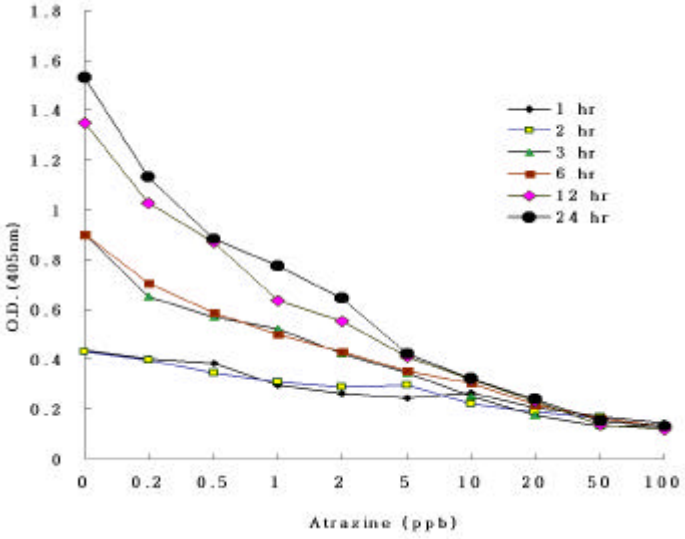


Fig. 2-14. Effect of coating time on direct competitive ELISA of atrazine.

한편, 시료 중 오염된 atrazine을 추출하기 위해 사용하는 유기용매가 ELISA 반응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 methanol, ethanol, acetonitrile 등의 유기용매를 0 100%까지 농도별로 희석하고 atrazine-HRP를 2,000배 희석하여 동량으로 혼합하고 100 μℓ씩 넣어 ELISA 실험을 행하여 유기용매와 유기용매 농도가 ELISA에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2-15에서 보는 바와 같이 유기용매의 농도가 높아질수록 O.D.치가 현저하게 낮아졌는데, methanol이 다른 유기용매에 비하여 ELISA 반응에 영향을 적게 미치는 것으로 나타났다. Methanol의 희석은 40% 희석까지는 ELISA 반응시 O.D.가 1.0 이상으로 나타났다. 따라서 atrazine 추출을 위한 유기용매의 농도는 40%이하로 하는 것이 좋다.

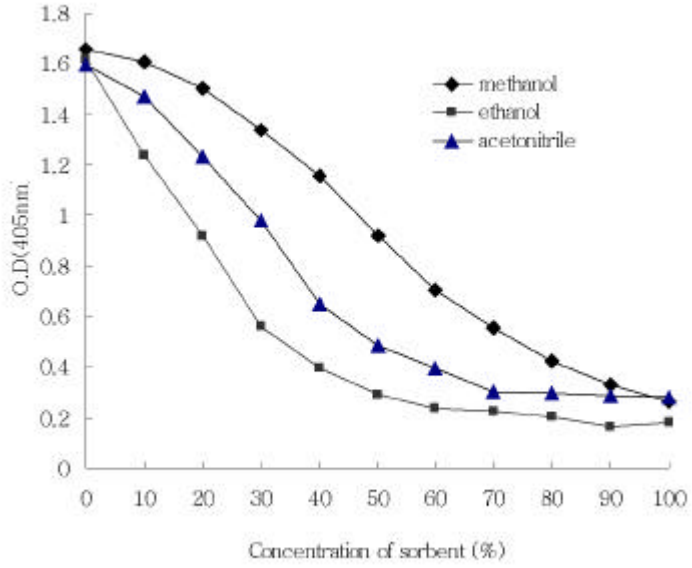


Fig. 2-15. Comparison of various organic solvents on direct competitive ELISA.

이상의 atrazine의 coating 희석배수, buffer, 온도와 atrazine-HRP의 희석배수와 기질반응시간과 추출 유기용매의 종류 및 농도 등의 ELISA분석조건을 종합하여 direct competitive ELISA법을 확립한 반응과정은 Fig. 2-16과 같다.

Plate coating with 1:10,000 diluted
anti-atrazine Ab/carbonate buffer(pH9.6)
↓
Placing at 4℃ for overnight
↓
Washing plates with PBS-tween(4 times)
↓
Add atrazine standard and atrazine-HRP(1:2,000) mixing solution 100 ㎕ and incubation at 37℃ for 30 min
↓
Washing plates with PBS-tween(6 times)
↓
Add 100 ㎕ substrate and incubation at 37℃ for 30 min
↓
Add 50 ㎕ stopping-reagent
↓
Reading at 405 nm

Fig. 2-16. Flow chart of direct competitive ELISA for atrazine detection.

즉, carbonate buffer에 항체를 1:10,000으로 희석하여 microtiter well에 100 ㎕씩 주입한 다음 4℃에서 하룻밤 방치하여 coating한 후 washing buffer로 4회 세척하였다. Atrazine-HRP 2,000배 희석액과 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ppb의 표준 atrazine에 같은 양으로 혼합한 후 100 ㎕씩 well에 주입하여 37℃에서 30분간 배양하였다. Washing buffer로 다시 6회 씻은 후 plate에

100 ㎕의 기질 ABTS를 첨가하여 결합된 enzyme을 발색시키고, 30분 후 반응 정지액 50 ㎕씩 가해 반응을 정지시켰을 때 atrazine의 농도가 높아짐에 따라 발색의 정도는 적어졌다. 이것을 ELISA reader(*BIO-RAD* Co. model 550)로 405 nm에서 흡광도를 측정한 결과 Fig. 2-17과 같은 결과를 얻었고 atrazine의 농도가 높아짐에 따라 O.D.값의 수치가 상대적으로 적어지는 경향으로 나타나 전형적인 면역분석법에서의 표준곡선을 나타내었다.

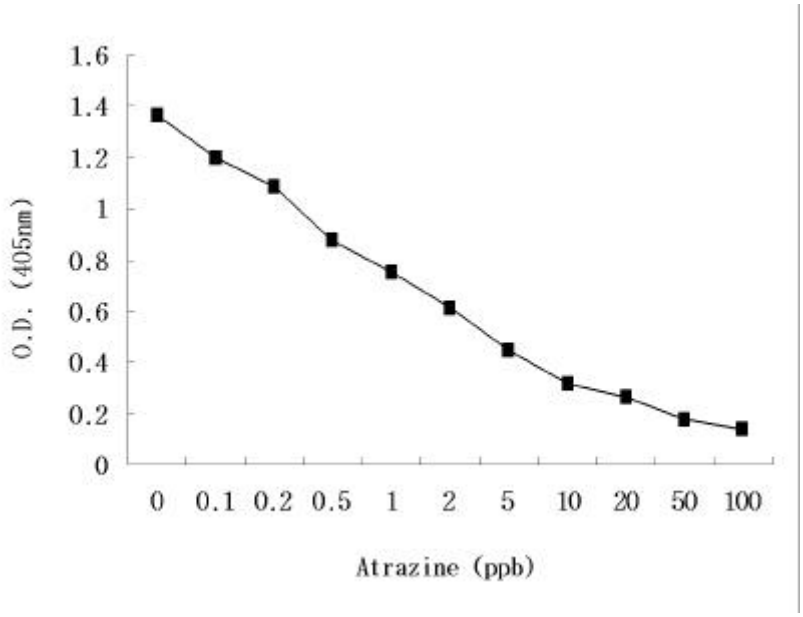


Fig. 2-17. Standard curve of atrazine by direct competitive ELISA.

3. Atrazine에 대한 단크론성항체생산

가. 면역

Atrazine에 대한 항혈청 titer측정을 위한 ELISA법을 먼저 확립하였다. 즉, Atrazine-BSA를 완충액(coating buffer)에 녹여 microtiter plate에 100㎕씩 주입한 다음 4℃에서 하룻밤 방치하여 코팅한 후 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 그런 다음 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위해 PBS에 녹인 0.1% ovalbumin을 가하여 하룻밤 방치한 후 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 세척한 plate에 표준 atrazine과 항혈청을 단계적으로 희석하여(100-1,000,000) 50㎕씩 well에 주입하고 다시 4℃에서 하룻밤 반응시켰다. 반응시킨 plate는 세척용 완충액으로 5회 세척하고 1 : 1,000으로 희석한 2차 항체(goat anti-mouse IgG-HRP, Sigma)를 100㎕씩 분주하고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 세척용 완충액으로 다시 6회 세척한 후 기질용액(ABTS) 100㎕를 분주하여 실온에서 30분간 발색시킨 후 반응정지용액을 50㎕씩 넣어 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader로 410nm에서 흡광도를 측정하여 titer을 검정 하고있다. 상기의 ELISA법에 의해 mouse 항혈청의 titer를 측정한 결과 Table 2-3과 같았다.

Table 2-3. ELISA titeration of atrazine antisera developed in mouse.

(Unit:O.D)

Dilution	10	100	1,000	5,000	10,000	50,000	100,000
Normal	0.145	0.139	0.134	0.124	0.132	0.137	0.136
AT-2	over	over	1.372	0.742	0.302	0.223	0.198
AT-8	over	0ver	1.453	0.782	0.389	0.202	0.196
AT-11	over	over	1.553	0.823	0.452	0.296	0.206

나. 세포융합 및 cloning

앞서 atrazine**에 특이한 항체를 생산하는** BALB/c mouse**로 부터 비장세포를 추출하여 단크론성 항체를 생산하는** hybridoma**를 얻기위한** cell fusion**을 실시하였다.** atrazine**의 경우는 면역시킨** 20**마리의** BALB/c mouse**중 양성반응을 보인** 8**마리를** cell fusion**에 사용하였다.** Table 2-4**에서 보는 바와같이 융합후 분주한** 2050 well**중** 1852 well**에서 세포가 성장하여** 90.3%**의 성장율을 보였다. 그중에서** atrazine**에 특이한 항체를 계속적으로 생산하는** hybrid**가 있어** cloning**을 실시하였다.**

Table 2-4. Fusion and frequency of hybrids selected by HAT medium.

Fusion	Number of mice titer	Number of mice used in fusion	Number of mice wells seeded	Number of growth in HAT medium	Fusion rate (%)
4 times	20	8	2050	1852	90.3

이때 fusion된 세포군이 있는 well이 보이는 plate 모양은 Fig. 2-18과 같이 관찰할 수 있었으며, 이 well의 cell을 cloning하여 atrazine에 대한 단크론성 항체를 선택적으로 생산하는 hybridoma cell을 개발하였다.

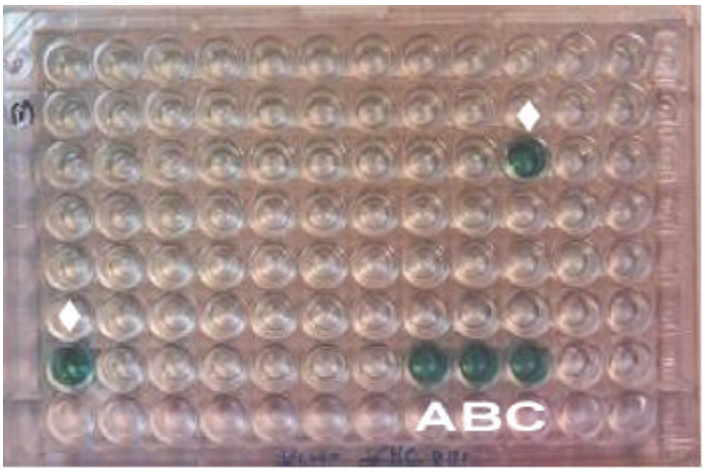


Fig. 2-18. Photogram of titerplate on fused cell culture supernant by noncompetitive ELISA.

한편, atrazine에 대해 특이적 항체를 지속적으로 생산하는 hybrid를 얻기위해 cloning한 결과 atrazine과 선택적 반응을 하는 4세포주를 확보할 수 있었다. 또한 이들의 isotype을 조사한 결과 Table 2-5과 같이 모두 IgG1을 생산하였다.

hybridoma cell No.	class	light chain
AT-1-M3	IgG1	κ
AT-1-M8	IgG1	κ
AT-2-M1	IgG1	κ
AT-3-M15	IgG1	κ

Table 2-5. Immunoglobulin classes of production antibody of hybridoma cell

다. 단크론성항체의 생산과 특성

Atrazine에 대한 단크론성항체를 생산하기위해 mouse의 복강에 hybridoma를 주사한 후 mouse의 복강에서 얻은 복수의 단백질 함량은 AT-1-M3의 경우 24.2㎎/㎖이었고 역가는 Table 2-6에서와 같이 1:100,000에서도 positive 반응을 보였다.

Table 2-6. Dilution titre of anti-atrazine ascites fluid as determined by sandwich (Unit : O.D)

Dilution	10	100	1,000	5,000	10,000	50,000	100,000	500,000	1,000,000
Normal	0.012	0.009	0.005	0.004	0.004	0.003	0.004	0.004	0.003
AT-1-M3	over	over	over	over	1,472	1.226	0.424	0.119	0.009

이때 생성된 항체는 Table 2-7**에서 보는 바와같이** atrazine**에 특이하게 반응하였고** simazine**만** 11%**의 교차반응을 보였으나 다른 농약과는 거의 반응하지 않았다**.

Table 2-7. Cross reactivity of different atrazine analogues with anti-atrazine McAb in the direct ELISA

Analogues	Cross-reactivity(%)
atrazine	100
parathion	< 1
bromacil	< 1
simazine	11
bentazon	< 1
2,4-D	< 1

라. ELISA법의 확립

1) 항체의 최적 coating농도

Mouse의 복강에서 얻은 다량의 항체를 정제하여 direct competitive ELISA 법을 확립하였다.

먼저 항체의 농도별 coating 효과를 알아보기위해 1㎎/㎖로 조절된 항체를 원액 100, 200, 400, 800배 등으로 25,600배까지 계단희석하여 coating한 다음 반응시켜 결과를 비교하였다. 그 결과 Table 2-8에서 보는 바와같이 AT-1-M3의 경우 1600배와 3200배 사이의 농도에서 over, 1.421로 나타나 실험 가능한 O.D. 값을 보였다.

Table 2-8. Effect of coating for antibody dilution on direct competitive ELISA of atrazine (Unit : O.D.)

Antibody \ dilution	0	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600
AT-1-M3	over	over	over	over	over	over	1.421	0.643	0.323	0.194
AT-3-M15	over	over	over	over	over	over	1.001	0.324	0.204	0.112

또한 일정하게 희석한 항체액을 coating할 때 그 양이 ELISA에 미치는 영향을 조사하기위해 50, 75, 100, 125 및 150㎕씩 well에 주입하여 4℃에서 하룻밤 coating한 후 실험을 실시하였다. 즉, Table 2-9에서 보는 바와같이 50㎕ 첨가한 경우 1.128로 O.D.값이 줄어들었으나 100㎕, 125㎕ 주입시는 1.452, 1.454로 안정한 O.D.값을 나타내었다.

Table 2-9. Effect of antibody contents for the coating in microtiter well

(Unit : O.D.)

Contents(μℓ/well) / atrazine(ppb)	50	75	100	125	150
0	1.222	1.236	1.452	1.454	1.461
500	0.273	0.342	0.297	0.301	0.311

2) Coating 온도

한편 microtiter plate에 항체를 coating시키기 위해 1㎎/㎖로 조절된 항체를 PBS로 100배 희석하여 100μℓ씩 well에 주입후 환풍기가 부착된 40℃ dry oven과 4℃ 냉장고에서 하룻밤 coating한 후 coating 온도가 ELISA 반응에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 2-10에서 보는 바와같이 40℃에서 하룻밤 coating한 경우 대체로 4℃에서 coating한 것보다 반응 O.D.값이 낮게 나타났다. Pestka 등의 경우는 대체로 direct ELISA를 위해서는 항체의 coating을 40℃에서 하룻밤 coating할 때 가장 반응결과가 양호하였는데 이처럼 결과가 본 실험과 다른 것은 사용한 항체가 다르기 때문으로 사료된다.

Table 2-10. Effect of temperature for antibody coating on direct competitive ELISA of atrazine (Unit : O.D.)

Temp.	atrazine(ppb)		
	0	50	500
40℃	1.211	0.732	0.232
4℃	1.433	0.898	0.317

3) Coating buffer

또한, coating에 사용하는 buffer를 Ueno 등은 대체로 pH 9.6인 carbonyl buffer (coating buffer)를 사용했으나 본 실험에서는 보통의 PBS로 coating시 사용하여 기존의 coating buffer와 비교하였다. 그 결과 Table 2-11에서 보는 바와같이 본 실험에서는 coating buffer보다 PBS로 coatinf할 경우 항체의 반응이 양호한 결과를 보였다. 즉, PBS 사용시 반응결과 atrazine의 농도가 0, 50, 500 ppb에서 1.624, 1.053 및 0.236으로 carbonyl buffer(pH 9.6)사용시의 1.423, 0.897 및 0.224보다 O.D.값이 높게 나타나 이후의 본 실험에서는 coating buffer로 PBS를 사용하였다.

Table 2-11. Effect of coating buffer for antibody coating on direct competitive ELISA of atrazine (Unit : O.D.)

Coating buffer	atrazine(ppb)		
	0	50	500
carbonyl buffer (pH9.6)	1.423	0.897	0.224
PBS (pH7.4)	1.634	1.053	0.236

4) **유기용매의 영향**

효과적인 atrazine**의 추출을 위한 유기용매의 선정과 농도의 조사가 필요하였다. 이에 각종 유기용매 즉** MeOH, EtOH, hexane, chloroform, acetone, benzene, DMF **등을 가지고 실험하였다 우선 각 유기용매를 사용하여 시료를 추출한 다음 이 액을 질소** gas**로 건조시키고, 다시** 100 500㎕**의 동일 유기용매로 용해시켜 용매의 농도가** 10%, 30% **및** 50%**가 되게** PBS**로 희석하여 전체액량을** 1mL**로 조정하고, 여기에** atrazine**을** 0ppb, 100ppb**되게** spike**한 후** ELISA **를 실시하였다. 그 결과** Table 2-12**에서 보는바와 같이** 0ppb**의 경우** 10% MeOH, EtOH **농도하에서의** ELISA **결과가** PBS**로 용해시킨 결과와 유사하였고, 그 외의 높은 농도와** hexane, chloroform, acetone **및** benzene**은** atrazine**에서와 같이** ELISA **결과에 나쁜 영향을 주는 것으로 나타났다.**

Table 2-12. Effects of various solvent on direct competitive ELISA of atrazine (Unit: O.D.)

solvent / Cconc(%)	MeOH	EtOH	Hexane	Acetone	Benzene	DMF
0	1.434	1.434	1.434	1.434	1.434	1.434
10	1.425	1.207	1.372	1.326	1.278	0.531
30	1.352	0.692	0.861	0.538	over	0.115
50	0.834	0.209	1.275	0.206	0.216	0.007

이상에서 시료를 추출하는데 가장 효과적인 methanol**을 사용할 경우** methanol **자체가 항체나 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과** Table 2-13**에서 보는바와 같이 같이** 30% methanol**의 농도이상에서부터 급격히 반응치가 줄어드는 것으로 나타나 실제 추출시** 30%**농도로 조절하여 사용하였다.**

Table 2-13. Effect of methanol on indirect competitive ELISA of atrazine (Unit : O.D.)

MeOH(%) / atrazine (ppb)	0	10	20	30	40	50	70	90
0	1.434	1.425	1.411	1.352	1.054	0.834	0.621	0.536
500	0.237	0.228	0.224	0.281	0.341	0.385	0.419	0.511

5) Coating 시간

일반적으로 carbonyl buffer나 PBS로 coating할 경우 하룻밤동안 coating시킨다. 그러나 실제시간을 절약하기위해 coating시간이 ELISA반응에 미치는 영향을 조사하기위해 PBS에 항체를 희석한 후 100㎕씩 well에 주입하고 4℃에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24시간 정치시켰다가 well 속에 항체희석액을 washer로 빼어내고 냉장고에 보관하면서 동시에 ELISA를 행하였다. 그 결과 Table 2-14에서 보는 바와같이 대체로 coating시간이 6시간 정도 이상되면 실험수행이 가능할 정도로 충분히 coating이 되었다고 생각할 수 있고 그 이상은 발색정도에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 실험을 일관성있게 또는 효율적으로 수행하기위해 하루밤 정치시키는 경우가 대부분이며 실제 필요에 따라 coating시간도 4시간 이후가 되면 자율적으로 조정해도 실험에 크게 문제가 않되는 것으로 생각되었다.

Table 2-14. Effect of coating time at 4℃ on direct competitive ELISA of atrazine

(Unit : O.D.)

Coating time(hr) / atrazine(ppb)	1	2	3	4	5	6	9	12	18	24
0	0.421	0.888	1.032	1.134	1.353	1.483	1.488	1.532	1.485	1.483
500	0.254	0.253	0.242	0.284	0.297	0.284	0.303	0.311	0.307	0.293

6) pH의 영향

ELISA 용액의 pH를 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9로 조절한 다음 ELISA를 실시하여 pH가 ELISA에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 2-15에서 보는바와 같이 pH가 7, 7.5, 8에서는 안정한 ELISA 결과를 보였다. 따라서 ELISA반응시 pH는 PBS로 조절하여 사용하였다.

Table 2-15. Effects of sample pH on ELISA reaction of atrazine

(Unit:O.D.)

pH / Atrazine	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9
0	1.258	1.263	1.431	1.428	1.431	1.316	1.327
100	0.323	0.258	0.246	0.236	0.265	0.317	0.246

7) HRP conjugate의 농도

한편 tracer로 사용되는 HRP의 적정농도를 조사하고자 동결건조시켜 보관중인 atrazine-horseradish peroxidase(HRP) 1㎎을 1㎖의 PBS에 녹인 다음 100, 200, 400, 800, 1,600, 3,200 및 6,400배로 희석하고 Table 2-16에서 보는 바와같이 표준 atrazine과 동량 희석수 100㎕/well씩 첨가하여 반응결과를 조사하였다. 그 결과 Table에서 보는 바와 같이 합성된 atrazine-HRP의 반응은 800-1,600에서 실험결과치를 구분하는 것이 가능하였다. 본 실험에서는 보통 atrazine-HRP 원액을 PBS로 1,000배를 희석하여 사용하고 있다.

Table 2-16. Effect of atrazine-HRP content on direct competitive ELISA of atrazine (Unit : O.D.)

atrazine (ppb) \ HRP dilution	100	200	400	800	1,600	3,200	6,400
0	over	over	over	1.474	1.32	0.742	0.312
500	0.436	0.384	0.304	0.284	0.281	0.254	0.183

지금까지 얻은 atrazine 분석을 위한 direct competitive ELISA조건을 정리하여 확립한 반응과정은 다음과 같다. 먼저 100㎖ PBS용액에 1% BSA를 100㎕ 첨가한 다음 atrazine에 대한 단크론성 항체를 100㎕ 혼합하고 100㎕씩 well에 주입하여 4℃에서 하룻밤 방치한 후 washing buffer로 3회 세척했다. 표준 atrazine과 atrazine-HRP 최적희석액을 같은 양으로 혼합한 후 100㎕씩 well에 주입하여 37℃에서 30분간 배양하였다. Washing buffer로 다시 6회 씻은 plate는 100㎕의 기질 (2'-azino-di-3-ethyl- benzthiazoline-sulfonic acid)용액을 첨가하여 결합된 atrazine oxime-HRP를 발색시키고 15분 후 반응정지액 100㎕씩을 가해 반응을 정지시켜 ELISA reader(Dynatech, Lab. MR 600, U.S.A)로서 흡광도(410nm)를 측정하여 미리 작성한 표준 곡선과 비교하여 atrazine의 함량을 계산하였다. 이상의 실험조건을 종합하여 보면 Fig. 2-19과 같다.

Wash coated plates × 3 by filling with PBS-tween

↓

Add 100㎕ mixed solution with sample
and atrazine-HRP(1:1)

↓

Incubate for 1 hr at 37℃

↓

Wash plate × 6 by filling with PBS-tween

↓

Add 100㎕ substrate

↓

Incubate substrate for 30min at 37℃

↓

Add 100㎕ stopping-reagent

↓

Read on ELISA reader at 410nm

Fig. 2-19. Procedure of direct competitive ELISA of atrazine.

8) 표준곡선

한편, 표준곡선을 작성하기 위해 atrazine 표준물질과 atrazine-HRP 최적 희석액을 동일량 혼합하여 100㎕씩 well에 주입한 후 37℃에서 1시간 배양하였다. Washing buffer로 다시 씻은 plate는 일정량의 기질을 첨가하여 결합된 atrazine-HRP를 발색시키고 30분 후 반응정지액 100㎕씩을 가해 반응을 정지시킨 결과는 Fig. 2-20와 같았으며 그 결과를 ELISA reader(410nm)로써 흡광도를 측정한 결과를 계산하여 Fig. 2-21과 같은 표준곡선을 얻었다

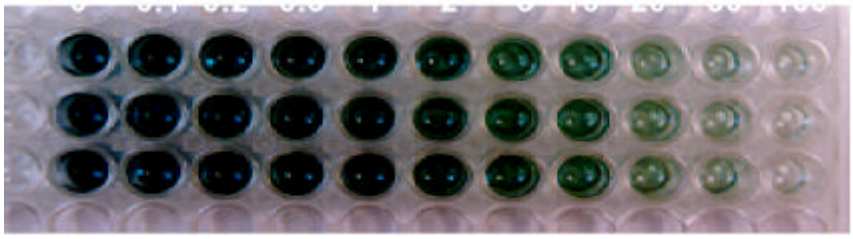


Fig. 2-20. Microtiter plate after ELISA of atrazine by direct competitive ELISA.

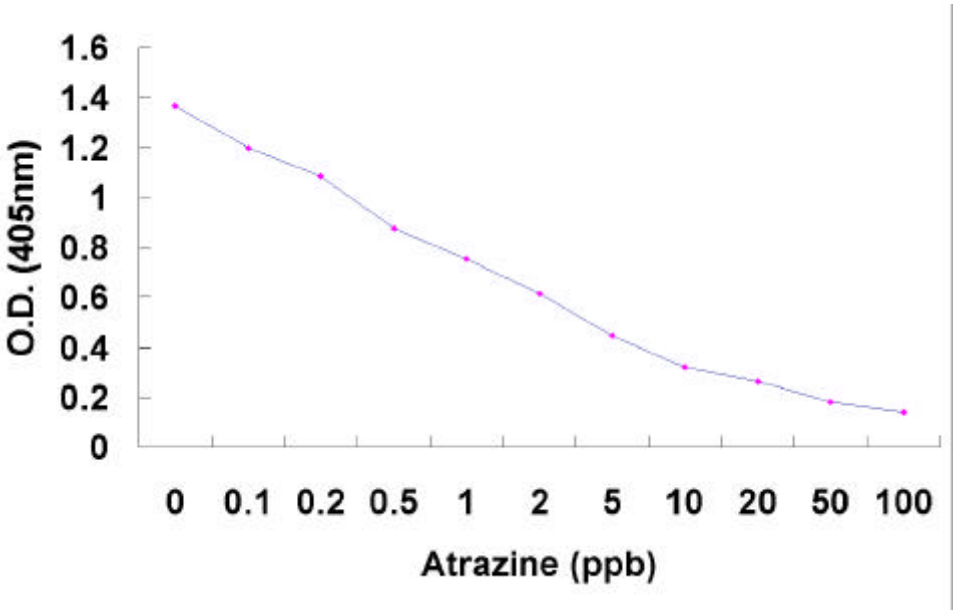


Fig. 2-21. Competitive direct ELISA standard curve for atrazine.

9) Rapid direct competitive ELISA법

실제 현장에서는 빠른 검색을 필요로 하고 있으므로 앞서의 direct competitive ELISA법을 개량하여 신속히 검색하는 방법을 확립하기 위하여 direct competitive ELISA법을 개량하였다. coating antibody의 희석배수와 trace로 사용하는 atrazine-HRP의 희석배수를 조절하여 10분 반응, 10분 발색하여 신속히 검출하는 rapid direct competitive ELISA방법을 확립하였다.

먼저, Table 2-17에서 보는바와 같이 항체의 농도를 100배, 200, 400, 600, 800 및 1,000배로 희석하여 4℃에서 12시간 coating한 다음 atrazine-HRP 의 농도를 1:1,000으로 10분간 반응시킨 다음 기질용액으로 10분간 발색하였다. 그 결과 항체의 농도를 800배 이하로 하였을 때 O.D.치이 차이가 1.0 이상으로 나타났다.

Table 2-17. Effect of coating for antibody dilution on rapid direct competitive ELISA (Unit : O.D.)

antibody dilution / Atrazine(ppb)	100	200	400	600	800	1,000
0	over	over	over	1.602	1.410	1.136
100	0.621	0.587	0.327	0.275	0.247	0.238

다시 항체의 농도를 800배로 하여 4℃에서 하룻밤 coating한 다음 atrazine-HRP의 농도를 달리하여 반응실험을 하였다. 즉, HRP의 농도를 100, 200, 400, 800, 1,600 및 3,200으로 하여 10분간 반응시킨 후 기질용액을 가해 10분간 발색하였다. 그 결과 Table 2-18에서와 같이 HRP의 농도가 400에서 800배 사이에서 0ppb와 500ppb 사이의 O.D.치의 차이가 1.0 이상으로 나타났다.

Table 2-18. Effect of atrazine-HRP content on rapid direct competitive ELISA of trazine (Unit : O.D.)

Atrazine-HRP dilution / Atrazine(ppb)	100	200	400	800	1,600	3,200
0	over	over	1.671	1.264	0.708	0.486
100	0.578	0.428	0.281	0.263	0.254	0.217

이러한 실험의 결과로 항체의 농도를 800배로 하여 coating하고 HRP의 농도를 500로 하여 10분간 반응시키고 10분간 기질용액으로 발색시킨 결과 실험 전체 소요시간이 약30분 정도로서 현장에서 간편하게 측정이 가능한 신속면역분석kit 개발을 위한 예비결과로서 앞으로 더욱 실험을 계속할 예정이다.

4. ELISA분석용 시료조제

가. 각종시료의 수집

앞서 개발한 hybridoma에서 얻은 단크론성항체를 이용하여 확립한 ELISA 조건을 실제 시료에 적용하기 위해 물, 토양, 사과 및 포도 그리고 사람의 urine과 혈액을 수집하여 전처리하였다.

나. 식물성 시료조제

1) 물 시료의 조제

물의 경우 경남 진주의 진양호 물을 1L 삼각플라스크에 채취하여 냉장고에 보관한 다음 실험에 시료로 사용하였다. 즉, 500mL의 시료를 Whatman No.1로 여과하여 오염물을 제거한 다음 pH를 7.4로 조절하였다(0.1N NoaH 또는 0.1N HCl). 이 액의 일부분을 2개의 15mL 원심분리관에 5mL씩 넣고 표준 atrazine을 10ppb, 100ppb로 spiking한 후 ELISA를 실시하여 회수율을 검정하였으며 그 결과 Table 2-19에서 나타난 바와 같이 회수율은 95% 이상을 나타내었다.

Table 2-19. Amounts of atrazine recovered from water and soil samples by direct competitive ELISA

Sample	Atrazine added (ppb)	Recovery	
		ppb	(%)
Water	10	12.6	126
	100	95.5	95
Soil	10	10.1	101
	100	97.3	97

2) 토양시료의 조제

토양시료의 경우는 물과는 약간 달리 FAD/WHO 방법에 준하여 실험하였다. 즉 5g씩의 토양시료 2개를 각각 삼각플라스크에 넣고 표준atrazine을 10ppb, 100ppb로 spiking하여 25ml의 30% MeOH과 혼합한 후 실온에서 하룻밤 진탕시켰다. 이것을 13,000rpm에서 30분 원심분리하고 상등액을 Whatman No.1로 여과하였다. 이때 여액을 ELISA 시료로 하여 ELISA를 실시한 결과 위 Table 2-19에서 보는 바와 같이 회수율은 물시료와는 달리 101%, 97%를 각각 나타내었다.

3) 농산물의 시료조제

농산물 시료로서 사과와 포도를 취하여 시료 조제를 하여 회수율을 구한 다음 ELISA 실시 가능여부를 검토하였다. 즉, FAO/WHO 방법에 준하여 사과 및 포도 10g씩을 천칭하여 비이커에 넣고 50ml의 30% MeOH을 가한 다음 waring blender로 blending 하였다. 시료액 5ml에 표준 atrzine을 10, 100ppb씩 첨가한 다음 13,000rpm에서 30분 원심분리하고, 상층액을 Whatman No.1 여과지로 여과하여 여액은 pH 7.4로 조절하여 ELISA를 실시하였다. 그 결과 Table 2-20에서 보는 바와 같이 회수율은 91%를 상회하게 나타났다.

Table 2-20. Amounts of atrazine recovered from apple and grape samples by direct competitive ELISA

Sample	Atrazine added (ppb)	Recovery	
		ppb	(%)
Apple	10	10.6	106
	100	96.1	96
Grape	10	9.9	99
	100	92.6	92

.

다. 동물성 시료조제

1) Urine시료의 조제 및 회수율

먼저 urine은 경상대학병원 일반외과에서 제공받아 먼저 50mL 원심분리관에 넣고, 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 4℃에 보관하면서 ELISA 시료로 직접 사용하여 ELISA 실시하여 회수율을 구한 결과 Table 2-21에서 보는 바와 같이 10, 100ppb첨가한 경우 각각 72, 89%의 회수율을 나타내었다.

Table 2-21. Amounts of atrazine recovered from human urine and serum samples by direct competitive ELISA

Sample	Atrazine added (ppb)	Recovery	
		ppb	(%)
Urine	10	7.2	72
	100	89.1	89
Serum	10	13.2	132
	100	91.6	91

.

2) 혈액시료의 조제

한편, 경상대학교 의과대학 일반외과에서 제공받은 혈액에 EDTA를 1mg/mL 농도로 첨가하고 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장만을 취하여 4℃에서 보관하면서 ELISA분석을 위한 시료를 조제하였다. 즉 혈청 200㎕를 microcentrifuge tube에 취하고 0.5㎕ acetic acid를 첨가하여 용액을 pH4.0정도로 산성화한 다음 chloroform 200㎕를 넣고 1분간 vortex하였다. 혼합액을 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 다음 chloroform층 100㎕를 취하여 질소gas하에서 건조시켜 다시 100㎕의 10% methanol-PBS 용액에 녹여 ELISA 시료로 하였하여 회수율을 구한 결과 위 Table 2-20에서 보는 바와 같이 10ppb, 100ppb첨가시 각각 132, 91%의 회수율을 보였다.

5. Immunoaffinity column의 제작 및 응용

가. Immunoaffinity column의 제작

시료에 소량 오염되어 있는 atrazine을 특이적으로 정제하기 위해 앞서 설명한 바와같이 immunoaffinity column을 Fig. 2-22와 같은 모양으로 실험제작하였다. 앞서의 방법으로 gel에 atrazine에 대한 Integra celline CL 350 flask에서 배양한후 항체를 1㎎ 항체/㎎ gel 및 5㎎ 항체/㎎ gel의 농도로 부착시키고 column에 packing하여 gel에 항체가 효과적으로 흡착되었는지의 여부를 실험하였다. 먼저 gel용액과 항체용액을 각각 100㎕씩 취한 후 1900㎕의 PBS로 10배 희석한 후 1N HCl 20㎕을 가하고 pH를 낮추었다. 이 용액을 200 400nm에서 spectrophotometer로 scanning을 하였다. 그 결과 Fig. 2-23에서 보는 바와 같

이 항체용 희석용액에서만 280nm에서 흡광치를 보여 용액 중에 항체 단백질이 존재함을 알 수 있었다. 한편, 1㎎ 항체와 5㎎ 항체를 1㎎ gel에 흡착시킨 다음 항체와 gel이 혼합된 상등액을 200㎕ 취하고 1800㎕의 PBS와 20㎕의 1N HCl을 혼합하여 위와같은 방법으로 scanning을 실시한 결과 Fig. 2-24와 같이 용액 중에는 대부분의 항체 단백질의 gel에 효과적으로 결합되었음을 확인할 수 있었다.

Fig. 2-22. Photogram of immunoaffinity column.

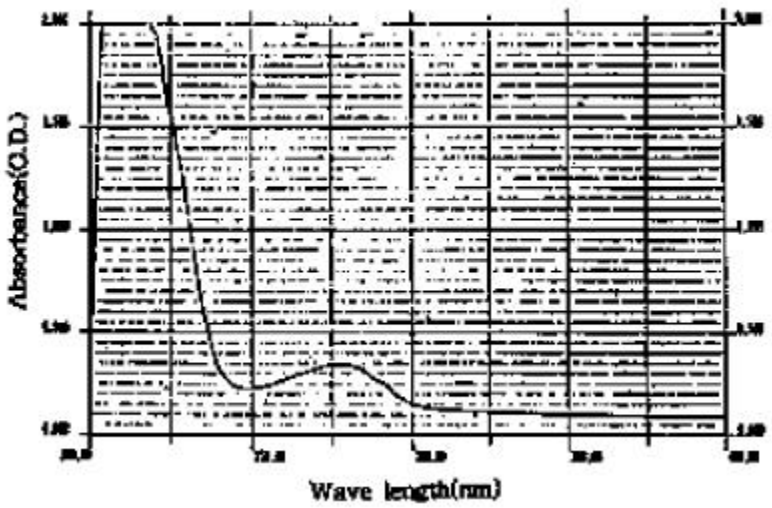


Fig.. 2-23. Abscrption spectra of antibody solution(5mg antibody/ 1mg gel)before coupling to Affi-Gel 10.

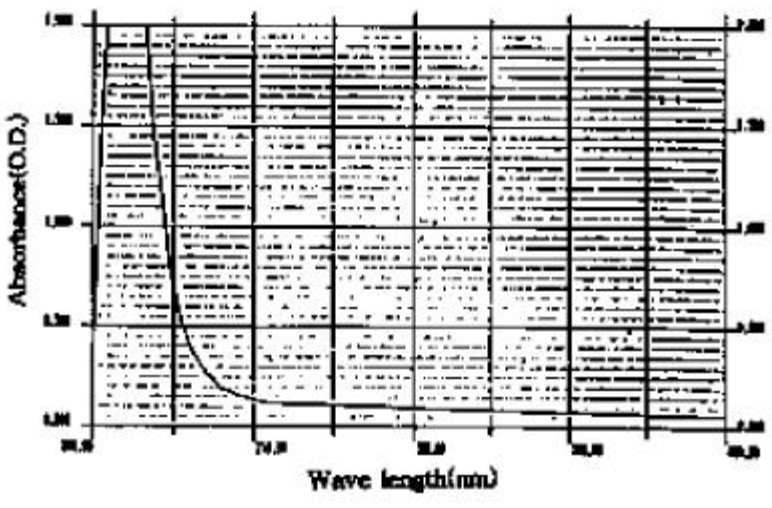


Fig.. 2-24. Abscrption spectra of antibody solution (5mg antibody/ 1mg gel)after coupling to Affi-Gel 10.

한편, 시료정제시 column의 gel에 부착되어 있는 유리 atrazine을 metanol로 용출한 경우, 그때 사용되는 methanol의 적당량을 결정하기위한 실험을 실시하였다. 즉, 10㎍의 atrazine을 5㎎항체/ 1㎎ gel로 제작한 immunoaffinity column에 흡착시킨 후 상법에 따라 10㎖의 PBS와 증류수로 세척하고 매 tube에 1㎖씩 10개의 tube에 methanol 용출액을 모아 ELISA로 측정하여 최적 용출액의 양을 결정하였다. 그 결과 Fig. 2-25에서 나타난 바와같이 대부분이 4번째 tube까지 용출되어 나왔으나 5번째 tube에서도 소량 함유되어 있음을 알 수 있었다.

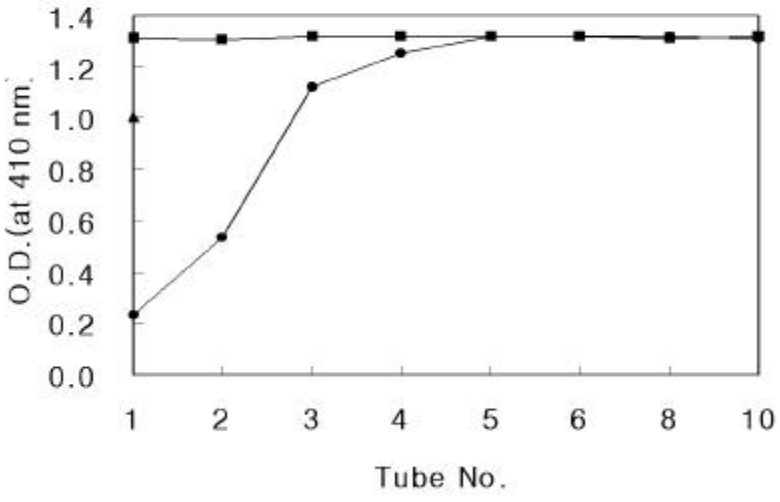


Fig. 2-25. Effective volumn for elution of 10㎍ atrazine in different immunoaffinity column.

■ : Control (non atrazine loaded)

● : Column packing 1㎎ gel binded 5㎎ antibody

한편, 10㎍ 및 1㎍의 표준 atrazine을 spiking한 immunoaffinity column에 회수율을 구하기 위하여 실험하였다. 즉 affinity column에 흡착된 atrazine을 5 ㎖의 methanol로 용출시켜 질소 gas로 농축시킨 시료를 100㎕의 methanol에 녹여 ELISA로 분석하였다. 이들 immunoaffinity column의 회수율은 Table 2-22에서와 같이 1㎍의 atrazine을 spiking시켰을 때 78%의 회수율을 보였고, 10㎍의 atrazine을 spiking 시켰을 때 70%의 회수율을 보였다. Groopman 등도 단크론성 항체로 immunoaffinity column을 제작하여 회수율을 시험해본 결과 aflatoxin에 대한 회수율이 97%로서 본실험보다 상당히 양호한 결과를 보였으며 앞으로 실용화를 위한 연구를 계속할 예정이다.

Table 2-22. Recovery of atrazine created with immunoaffinity column

Atrazine(㎍)	Recovery(%)
10㎍	70
1㎍	78

나. Immunoaffinity column의 조건개선

전년도에 실험제작 했던 Immunoaffinity column의 경우 충분한 사용조건을 조사하지 않아 실제 표준 atrazine의 회수율이 10㎍ 첨가한 구간에서 70%를 나타내서 매우 낮았다. 따라서 실험 제작한 Immunoaffinity column의 회수율을 높이고 사용조건을 개선하기 위하여 몇 가지 실험을 행하였다.

1) Binding capacity

실험제작한 Immunoaffinity column의 atrazine에 대한 column 내에서 결합 능력 정도를 알아보기 위하여 실험하였다. 즉, 10%MeOH 10㎖(in PBS)속에 500 ng, 1000 ng, 2000 ng, 4000 ng, 8000 ng, 및 10000 ng의 atrazine을 함유하게 한 다음 column에 loading하고, Methanol로 column에 흡착된 atrazine을 유리시키고, 20%MeOH로 희석하여 잔류 atrazine을 측정하였다.

Table 2-23에서 보는바와 같이 대체로 750ng의 atrazine을 column이 흡착할 수 있는 것으로 나타났다.

Table 2-23. Binding capacity of atrazine by immunoaffinity column

Loaded atrazine on column (ng)	Amount of atrazine (ng)	Recovery ratio (%)
250	258	103
500	496	99
1,000	753	75
2,000	763	38
4,000	748	19
8,000	758	9
10,000	742	7

2) Loading solution의 pH

한편 immunoaffinity column의 loading solution의 pH를 조사 하기 위해 pH 4, 5, 6, 7, 8, 9로 조절된 solution에 표준 atrazine을 50 ppb 첨가하여 column에 loading하여 elution된 것의 atrazine 활성을 조사하였다.

그 결과 Table 2-24에서 보는 바와 같이 pH 4 8 사이에서 대체로 96%이상의 회수율을 보여 우리가 사용하고 있는 PBS를 loading solution으로 사용하거나 유기용매의 희석에 사용하는 것이 큰 문제가 없는 것으로 나타났다

Table 2-24. Effect of loading solution pH onto immunoaffinity column of atrazine

Loaded atrazine (ng)	pH	Atrazine recovered (ng)	Recovery ratio (%)
50	4	44.1	88.2
	5	48.0	96.0
	6	52.7	105.4
	7	50.3	100.6
	8	51.5	103.0
	9	41.2	82.4

3) 용출액의 량이 회수율에 미치는 영향

한편 immunoaffinity column에 흡착된 atrazine을 용출 시키는데 필요한 methanol의 함량을 조사하기 위하여 용출액 1, 2, 3, 4, 5 ㎖별로 각 ㎖에 함유된 atrazine의 함량을 점검하였다. 그 결과 Table 2-25에서 나타난 바와 같이 2 ㎖의 methanol 용출액에 거의 100%의 atrazine이 용출되어 나오는 것으로 나타났다.

Table 2-25. Elution pattern of atrazine from immunoaffinity column with methanol

Loaded atrazine (ng)	Flow rate (㎖/min)	Recovered atrazine (ng)	Recovery ratio (%)
50	0 - 1.0	46.1	92.2
	1.0 - 2.0	3.2	6.4
	2.0 - 3.0	-	-
	3.0 - 4.0	-	-
	4.0 - 5.0	-	-

4) 용출액 유속의 영향

그리고 immunoaffinity column에 흡착된 atrazine을 methanol로 용출시 용출액의 유속이 회수율에 미치는 영향을 조사하였다.

그 결과 Table 2-26에서 나타난 바와 같이 10 mL/min의 속도로 빠르게 용출 시킬 경우 약 13% 이상의 atrazine이 소실되는 것으로 나타나 실제 immunoaffinity column의 사용 시 유속을 1 mL/min을 조절하여 atrazine의 손실 없이 실험이 진행되도록 유도하였다.

Table 2-26. Effects of flow rate of loading solution to immunoaffinity column

Loading atrazine (ng)	Flow rate (ml/min.)	Recovered atrazine (NG)	Recovery ratio (%)
50	1	53.2	106.4
	5	46.7	93.4
	10	43.7	87.4

5) Immunoaffinity column-ELISA

각종 농산물의 전처리를 위해 지금까지 화학분석법에서 행하여 오던 복잡한 정제과정을 생략하고 면역분석법으로 분석할 경우 대체로 다음과 같은 간단한 처리과정과 분석과정으로 요약할 수 있다. 본 실험실에서 제작한 immunoaffinity column과 ELISA법으로 연결시켜 실험방법을 확립한 immunoaffinity column - ELISA법은 다음과 같다.

10ml of treated sample

Load sample on prewashed IC

Wash IC with 10ml *D.W*. and PBS

Elute with 3ml MeOH

Dry with N2 gas

Redisolve with 100ul MeOH

Dilute to 10% MeOH

Sample for ELISA

Direct competitive ELISA

Fig. 2-26. Step for immunoaffinity column(IC)-ELISA for atrazine.

즉 각실험방법에 따라 처리한 시료 10ml을 미리 활성화 시켜둔 immuoaffinity column에 loading하고 10 ml 증류수와 10ml PBS로 column을 씻었다. 다시 gel에 흡착된 항체와 binding된 atrazine을 3ml methanol로 용출시킨다음 질소gas 하에서 농축시키고 100 ul methanol로 다시 녹인 다음 10%methanol농도로 희석하여 direct competitive ELISA의 시료로 사용하였다.

ELISA는 앞서 설명한 바와 같이 coating plate를 먼저 PBS용액으로 3번 washing하고 시료용액과 표준곡선용 표준 atrazine용액 100 ㎕씩을 ependrof tube에 넣고 곧 PBS용액으로 희석시킨 atrazine-HRP용액 100 ㎕씩을 넣어 시험관 교반기에서 혼합하고 그 중 100㎕씩을 coating된 well에 주입시켜 well에 coating된 항체와 30분간 반응시킨다. 반응 후 다시 washing buffer로 7회 well을 세척하여 반응하지 않고 남은 물질을 제거시킨다. 그리고 peroxidase와 반응

할 기질인 ABTS용액(2,2`-azino-di-3-ethylbenz thiazoline-6-sulfonate) 100 ㎕씩을 첨가시켜 15분간 발색시켜 반응정지액 100 ㎕씩을 가한 후 발색정도를 ELISA Reader로 흡광도(410nm)를 측정하여 먼저 표준곡선을 작성하고 시료의 atrazine 함량여부를 비교 조사한다. 이러한 과정은 필요한 자료와 kit가 준비되어 있는 경우 많은 시료를 단시간에 추출하여 atrazine 오염정도를 판별하는데 효율적으로 적용할 수 있으리라고 생각된다.

6) Immunoaffinity column-HPLC

많은 시료를 빠른 시간에 정확히 분석하고자 할 때 정제된 시료가 얻어진다면 ELISA법에 의한 분석법보다 정제된 시료를 기기에 loading시켜 자동적으로 분석할 필요가 있다. 따라서 앞서의 방법과 같이 immunoaffinity column chromatography법으로 시료를 정제한 다음 정제된 시료를 HPLC에 일정량 injection시켜 시료 속의 atrazine 오염정도를 확인하는 혼합 분석방법을 확립하였다.

10ml of treated sample
Load sample on prewashed IC
Wash IC with 10 ml D.W. and PBS
Elute with 3 ml MeOH
Dry under N2 gas
Redisolve 100 ul MeOH
Sample for HPLC
Analysis atrazine with HPLC

Fig. 2-27. Step for immunoaffinity column(IC)-HPLC for atrazine.

즉, Fig. 2-27에서 나타난 바와 같이 앞서 얻은 ELISA용 시료 20㎕를 HPLC에 주입하고 분석하였다. 이렇게 처리한 시료를 ELISA 및 HPLC로 분석한 결과의 회수율은 다음과 같았다. 즉 Table 2-27에서 보는 바와 같이 ELISA의 경우는 약 75%의 회수율을 보였고 HPLC는 약 65%의 회수율을 나타내었다. 따라서 회수율향상을 위한 실험을 계속해야할것으로 생각된다.

Table 2-27. Amount of atrazine recovered from drinking water by IC-ELISA, HPLC

Method	Spiked atrazine (ng)	Recovered atrazine (ng)	Recovery (%)
ELISA	50	52.3	104.6
HPLC	50	43.7	87.4

6. ELISA kit의 실험제작

가. 실험제작준비

Atrazine의 분석을 위해 면역분석 kit를 지금까지 얻은 실험결과를 토대로 제작하였다.

이때 사용되는 ELISA원리를 다음과 같이 간단히 표현하여 사용자들의 이해를 도울 수 있게 하였다.

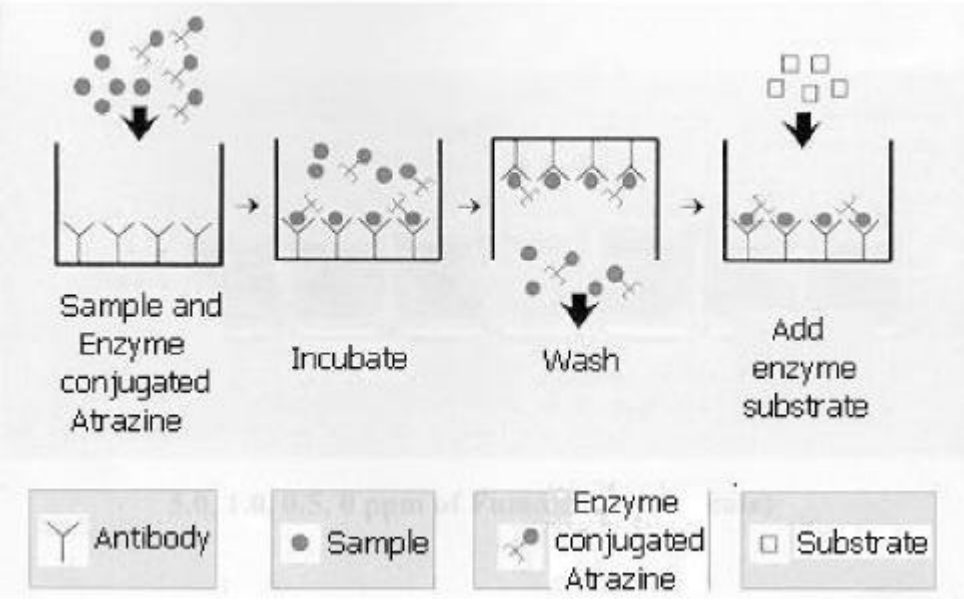
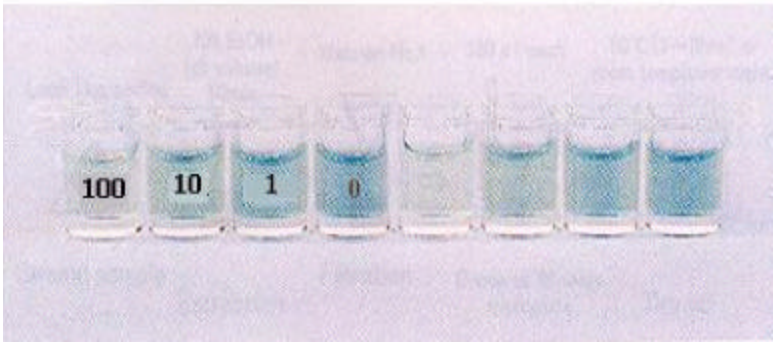


Fig. 2-28. Analytical theory for Atrazine.

즉 microtiter plate에 atrazine에 대한 항체를 500배 희석하여 100㎕씩 주입 후 4℃에서 하룻밤 coating 시켜 사용하였다. 실험에 사용된 항체는 250배정도 희석했을 경우는 반응 후 O. D값이 너무 높아 결과를 얻기가 어려웠고, 1000배까지도 괜찮은 결과를 보였다. 그러나 여기서 적용하는 ELISA법에서는 500배나 750배로 희석한 항체를 100㎕씩 coating한 경우가 정당하며 그 중에서 750배로 희석한 경우 실험에 사용되는 항체를 절약은 할 수 있으나 사용 kit의 항체활성의 보존을 위해 오히려 500배 희석한 구간이 더욱 효과적이라고 생각되었다.

그리고 HRP conjugate는 1㎎을 포장하여 공급하며, 1㎖의 PBS에 녹여 4℃에서 보관하면서 희석하여 사용하도록 연구할 예정이다. 본 실험에 사용된 atrazine-HRP conjugate는 대단히 안정하므로 크게 어려움이 없을 것으로 생각되나 저온포장수송에 필요하므로 주의해야 할 것이다.

그 외 실험에 사용되는 기질(ABTS)용액은 30 ㎎ ABTS를 90 ㎖ H_2O에 녹인 다음 포장하여 -20℃에 보관토록 하고 기질용액을 희석할 citrate buffer 및 반응정지시약 역시 각각 포장하여 실온에 보관토록 하며 특히 본 실험에 사용되는 표준 atrazine의 경우 methanol에 녹인 표준 atrazine을 PBS에 1000 ppb로 희석한 용액을 일정량씩 포장해서 -20℃에 보관케 하며 실제 실험시 PBS 용액에 희석해서 0, 1, 10, 100 ppb로 농도별로 나누어 표준용액을 만들 수 있다.



100, 10, 1, 0 ppb of atrazine (duplication)

Fig. 2-29. Comparing the color differences of analytical ELISA kit.

그 결과 Fig. 2-29에서 보는 바와 같이 색깔의 차이로 간단하게 atrazine의 오염정도를 판별할 수가 있었으며 실제 육안으로 는 10 ppb수준에서도 control 구와 판별이 가능하였다.

나. 포장내역

Kit를 제작하여 포장했을 경우 시료 30개를 처리할 재료를 1 kit로 해서 포장할 경우 1 kit당 다음과 같은 것이 필요하다.

* Coating된 microtiter well 35 line (8well/line)
* 표준 atrazine용액(1000 ppb 5 ㎖ : A액)
* 동결 atrazine-HRP(1㎎)
* ABTS용액(C액) 5 ㎖
* Citrate buffer 25 ㎖(D액)
* 반응 정지액 25 ㎖(E액)

(Coating 된 well, A, B, C액은 -20℃에 보관, D액과 E액은 상온 보관)

다. 실험용 kit 사용 protocol

1) 실험 준비 : 전처리된 시료용액과 표준 atrazine용액 준비(A액을 0.1N PBS에 희석), HRP용액 준비 (B액을 PBS 용액에 500배 희석)
2) Coating 된 well 을 증류수로 washing ×3
3) 표준 atrazine용액, 시료용액 100 ㎕씩을 ependrof tube에 각각 넣은 다음 HRP용액 100㎕씩을 혼합 →시험관 교반기로 섞은 후 100㎕씩 well에 주입 →20분 incubation.

4) **기질 용액 조제** : C**액** 1ml + D**액** 10 ml + H_2O_2 4㎕**을 혼합**.

5) Well washing ×6

6) **기질용액** 100㎕**씩** well**에 주입** → 10**분** incubation.

7) E**액** 100㎕**씩** well**에 주입** → **반응정지**.

8) **결과를 육안으로 비교한다**. (**단** ELISA Reader**있을 경우** 410 nm**에서 측정**)

*실험에 사용하는 재료는 모두 1회용으로 할 것이며 모든 사용한 기구나 물건은 반드시 detoxification 할 것)

7. **면역분석법의 응용**

가. 국내시료의 분석

본 연구에서 얻은 atrazime**에 대한 면역분석** kit**를 사용하여 국내에서 수집한 시료인 물** 26**점, 사과** 33**점, 및 포도** 37**점을 시험방법에서와 같이 전처리하여 분석한 결과는** Table 2-28**와 같았다**. Table**에서 보는바와 같이 분석한 시료 모두가 음성으로 나타났고 실제** atrazine**에 오염되어있는 시료를 찾아볼수없었다**.

Table 2-28. Detection of atrazine from various samples by direct competitiveELISA

Sample	Number of sample	Positive sample	Incidence(%)
water	26	0	0
Apple	33	0	0
Grape	37	0	0

나. 수입산 옥수수에서의 atrazine 검색

한편 수입된 시료로는 원산지가 Table 2-29과 같은 옥수수 18점을 분석하였다.시료를 직접 분석하기에 앞서 먼저 표준 atrazine을 100 ppb, 10 ppb, 1 ppb, 0 ppb로 atrazine에 오염되지 않은 국산 옥수수에 첨가시켜 회수율을 조사하였다. 그 결과 Table 2-30에서 보는 바와 같이 83%에서 89%의 회수율을 나타냈고 평균 회수율은 84%로 나타났다.

Table 2-29. Recovery yield of atrazine from spiked corn as determined by a direst competitive ELISA

Atrazine(ppb)	Recovery(Ratio:%)
0	0
1	0.86(86)
10	8.3(83)
100	89(89)

이상의 실험방법을 이용하여 실험실에 보관중인 수입옥수수시료 18점을 여 검색한 결과 Table 2-30**에서 보는 바와 같이 모두 음성으로 나타났다. 수입산 옥수수에서는 양성을 기대했으나 양성시료가 없었다.**

Table 2-30. Detection of atrazine from imported corn samples by ELISA

Source	No. of sample	Positive
U.S.A	16	-
Canada	1	-
China	1	-
Total	18	-

제4절 결론

1. 단크론성항체를 개발하기위해 우선 atrazine을 atrazine-hapten으로 전이시키고 이들을 BSA, OVA, KLH등과 결합시켜 항원 또는 coating conjugate를 합성하였다. 또한 형질세포종세포(p3×63Ag8. v653)와 atrazine-BSA conjugate를 면역시킨 암컷 BALB/c 마우스의 비장세포를 융합시켜 atrazine에 대한 단크론성항체를 생산하는 hybridoma cell line을 확보하였다.
2. Hybridoma cell을 mouse복강에 주사하여 생산한 단크론성 항체를 이용하여 atrazine을 측정하기위해 direct competitive ELISA법을 개발하였다. 이 분석법은 매우 민감하게 시료 1㎖당 0.05-10ppb의 atrazine을 분석할 수 있었다. 또한 생성된 단크론성항체는 simazine과는 11%의 교차반응을 보였으나 parathion, bromacil, ebntazone 및 2,4-D와는 교차반응을 나타내지 않았고, atrazine 분석을 위한 ELISA 수행에는 약 1시간이 소요되었다.
3. Immunoaffinity column을 실험적으로 조제하여 식품 시료 중의 atrazine을 정제하기 위해 우선 항체를 gel-(affi-gel 10)에 결합시켰다. Column은 먼저 10㎖ PBS로 씻고 난 뒤 시료용액을 충진했으며 그리고 10㎖의 증류수와 10㎖의 PBS로 충진한 시료용액을 씻은 후 5㎖의 methanol로 column에 결합되어있는 atrazine을 용출시켰다. 이때 atarzine의 immunoaffinity column에 의한 회수율은 92%이었다.
4. Atrazine 분석을 위한 실험적 ELISA kit 한셋트에는 다음과 같은 것이 포함되었다. 즉, 항체가 coating된 microtiter well이 35줄(12well/줄), 1000ppb농도의 표준 atrazine용액(A용액), 1㎎ HRP를 1㎖ PBS에 녹인 HRP 용액 100㎕

(B용액), 5㎖의 ABTS 용액(C용액), 25㎖의 citrate buffer(D용액), 25㎖의 정지용액(E용액) 등이다. 개발된 모니토링 시스템으로 96개의 농산물과 18개의 수입옥수수를 대상으로 atrazine을 분석하였으며 그 결과 분석한 시료 중 atrazine에 오염된 시료는 없는 것으로 나타났다.

제5절 참고문헌

1. Greenhalgh, R., and Roberrts, T. R. 1986. Pesticide Science and Biotechnology. International Union of Pure and Applied Chemistry. 1-140

2. Wittmann, C., and Hock, B. 1993. Application and performance characteristics of a novel ELISA for the quantitative analysis of the atrazine metabolite deethylatrazine. *J. Agric. Food Chem*. 41, 1795-1799.

3. Schlaeppi, J. M., Fory, W., and Ramsteiner, K. 1989. Hydroxyatrazine and atrazine determination in soil and water by enzyme-linked immunosorbent assay using specific monoclonal antibodies. *J. Agric. Food Chem*. 37, 1532-1538.2.

4. Kearney, P. C. and Kaufman, D. D. (eds.). 1975. Herbicides : chemistry, degradation, and mode of action. 2nd Ed. Vol. 12. New York : M. Dekker.

5. WSSA Herbicide Handbook Committee. Herbicide handbook of the weed science society of america, 6th Ed. WSSA, Champaign, IL. 1989.

6. Lopez-Avila, V., Hirata. P., Kraska, S., Flanagan, M. and Taylor. J. H. 1985. Determination of atrazine, lindane, pentachlorophenol,. and diazinon in water and soil by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 57, 2797-2801.

7. Newsome, W. H. 1985. An enzyme-linked immunosorbent assay for metalaxyl in foods. *J. Agric. Food Chem*. 33, 528-530.

8. Howard, P. H. (ed.). 1989. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals, Vol. **III** : Pesticides. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan.

9. US EPA 1988. (August). Atrazine : Health Advisory. Office of drinking water, US EPA, Washington, DC,

10. Engler, R. and Levy, R. 1991. Comparison of conventional risk assessment with cancer risk assessment, in Pesticide Residues and Food Safety, ACS Symposium Series (Tweedy, B. G., Dishburger, H. J., Ballantine, L. G. & Mccarthy, J., Eds) American Chemical Society, Washington, DC, pp. 226-234.

11. WSSA Herbicide Handbook Committee. 1983. Herbicide handbook of the weed science society of america, 5th Ed. WSSA, Champaign, IL.

12. USDA SCS. 1990 (Nov). SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database : Version 2.0 (Summary). USDA-Soil Conservation Service, Syracuse, NY.

13. Windholz, M. (ed.). 1976. The Merck Index : an encyclopedia of chemicals and drugs. 9th Ed. Rackway, NJ : Merck.

14. Hallenbeck, W. H., and Cunningham-Burns.K. M. 1985. Pesticides and human health. New York : Springer-Verlag.

15. Hayes, W. J. and E. R. Laws (ed.). 1990. Handbook of Pesticide Toxicology, Vol. 3, Classes of Pesticides, Academic Press, Inc., New York.

16. Wittmann, C. and Hock, B. 1991. Development of an ELISA for the analysis of atrazine metabolites deethylatrazine and deisopropyl atrazine. *J. Agric. Food Chem*. 39, 1194-1200.

17. USGS. 1991 (Nov.20). Spring sampling finds herbicides throughout Mississippi River and tributaries. U.S. Gealogic Survey, Dept. of the Interior, Reston, Virginia.

18. Bekheit, H. Lucas, K. M., Szurdoki, A. D., Gee, F., and Hammock, B. D. 1993. An enzyme immunoassay for the environmental monitoring of the herbicide bromacil. *J. Agri. Food Chem*.

19. Meister, R. T. (ed.). 1992. Farm Chemicals Handbook '92. Meister Publishing Company, Willoughby, Ohio.

20. Koudela, S. A. 1970. Modified detection of triazine herbicide residues and their hydrozy-derivatives on thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr.*, 53, 589-591.

21. Dunbar, B., Riggle, B. and Niswender, G. 1990. Development of enzyme immunoassay for the detection of triazine herbicides, *J. Agri. Food Chem.*, 38, 433-437.

22. Ramsteiner, K. 1989. Automated on-line trace enrichment and determination of organic compounds in ground and tap water by HPLC. *J. Chromatogr.*, 465, 410-416.

23. Bushway, R. J., Perkins, B., Savage, S. A., Lekousi, S. L., and Ferguson, B. S. 1989. Determination of atrazine residues in food by enzyme immunoassay. *Bull. Environ. Comtam. Toxicol.* 42, 899-904.

24. Bushway, R. J., Perkins, B., Savage, S. A., Lekousi, S. J., and Ferguson, B. S. 1988. Determination of atrazine residues in water and soil by enzyme lmmunoassay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 647-654.

25. Ramsteiner, K. A., and Hormann, W. D. 1979. High-pressure liquid chromatographic determination of hydrozy-s-triazine residues in plant material. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 934-938.

26. Kang Bong Lee and Yong Tack Suh. 1993. Use of ELISA for the residue Analysis of Pesticides. *Korean J. Environ. Agric.* 12(3), 298-308.

27. Newsome, W. H. and Shields, J. B. 1981. A radioimmunoassay for benomyl and metyl 2-benzimidazole carbamate on food crops, *J. Agric. Food Chem.*, 29, 220-222.

28. Newsome, W. H. and Collins, P. G. 1987. Enzyme-linked immunosorbent assay of benomyl and thiabendazole in some foods, *J. Assoc. Off. Anal. Chem*,. 70, 1025-1027.

29. Wie, S.I. and Hammock, B. D. 1984. Comparison of coating and immunizing antigen structure on the sensitivity and specificity of immunoassays forbenzoylphenylurea insecticides, *J. Agric. Food Chem.*, 32, 1294-1301.

30. Ercegovich, C. D., Vallejo, R. P., Gettig, R. R.. Woods, L., Bogus, E. R. and Mumma, R. O. 1981. Development of a radioimmunoassay for parathion, *J. Agric. Food Chem*, 29, 559-563.

31. Langone, J. and Van Vunakis, H. 1975. Development of enzyme immunoassay for organochlorine insecticides aldrin and dieldrin, *Res. Comm. chem. Pathol. Pharmacol.*, 10, 163-171.

32. Niewola, Z., Walsh, S.T. and Davis, G. E. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for paraquat, *Int. J. Immunosorbent assay for paraquat*, 5(3), 211-218.

33. Goh, K. S., Hernandez, J., Powell, S. J., Garretson, C., Troiano, J., Ray, M., and Greene, C. D. 1991. Enzyme lmmunoassay for the determination of atrazine residues in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 30-36.

34. Niewola, Z., Benner, J.P. and Swaine, H. 1986. Determination of paraquat residues in soil by an enzyme-linked immunosorbent assay, *Analys* , 111, 399-403.

35. Van Emon, J., Hammock, B.D. and Seiber, J.N. 1986. ELISA for paraquat and its application to exposure analysis, *Anal. Chem.*, 58, 1866-1876.

36. Li, Q. X., Hammock, B. D. and Seiber, J. N., 1991. Development of an enzyme linked immunosorbent assay for the herbicide bentazon. *J. Agric. Food. Chem.*, 39, 1537-1544.

37. Hastings, K. L., Tulis, J. J. and Dean, J. H., 1988. Production and characterization of a monoclonal antibody to aflatoxin B. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 404-408.

38. Hurter, J. 1966. Abbauprodukte von simazin in gramineen. experientia 22, 741- 742.

39. Huang, L. Q. 1989. Simultaneous determination of alachlor, metolachlor, atrazine, and simazine in water and soil by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, 72, 349- 354.

40. Jordan, L.S. Farmer, W. J. Goodin, J. R., and Day, B.E. 1970. Nonbiological detoxication of the s- triazine herbicides. *Residue Rev*. 32, 267- 286.

41. Kelly, M. M., Zahnow, E. W., Petersen, W. C. and Toy, S.T. 1985. Chlorsulfuron deternination soil extracts by enzyme immunoassay. J. *Agric. Food Chem*, , 33, 962- 965.

42. Lucas, A. D., Schneider, P., Harrison, R. O., Seiber, J. N., Hammock, B. D., Biggar, J. W., and Rolston, D. E. 1991. Determination of atrazine and simazine in water and soil using polyclonal and monoclonal antibodies in enzyme- linked immunosorbent assays. *Food and Agri. Immunol.* 3, 155- 167.

제3장. 식품 중 잔류항생물질(sulfamethazine)의 첨단면역분석기술개발

제1절 서 론

질병의 예방과 치료 및 성장촉진의 목적으로 사용되고 있는 항생제 및 항균성물질은 오용 및 남용에 의하여 식육이나, 우유, 계란에 이행 잔류될 위험이 있으며, 이를 섭취한 사람에게는 과민반응을 일으키거나 내성균을 유발시킬 가능성 등 공중위생상의 문제를 유발시키고 있다.[1)]

시료 첨가제로 많이 사용되는 sulfamethazine(SMT) 같은 설파제는 앨러지 반응 유발과 백혈구감소증, 호산구증다증, 혈소판감소증, 무과립백혈구증, 골수이형성, 용혈성빈혈 등의 조혈기능의 이상과 발암성, 갑상선 기능 실조, 면역체형성저해와 관절염, 신장질환이 있는 경우 간질성 신염을 유발시켜 결정뇨를 일으키는 등 많은 부작용이 알려져 있다.[2-4)]

이와 같은 유해성 때문에 각 국가에서는 축산식품내의 최대잔류허용기준을

정하여 이의 섭취에 의한 국민보건 위해 방지를 도모하고 있다. 또한 무분별한 하게 도입될 가능성이 있는 수입축산물의 규제와 수출용 축산물의 품위보증을 위해서도 항생물질의 잔류에 대한 규제를 엄격히 할 필요성이 있다. 우리나라에서도 일본에 수출한 돈육에서 SMT의 잔류가 문제되어 수출품이 반품된 경험이 있다. 그러므로 잔류허용농도(tolerance)/안전수준(safe level)또는 최대잔류허용한계(maximum residue limit)가 설정되어 있는 약물별로 확실한 검증을 하기 위해서는 정확한 정량분석이 요구된다. 현재 잔류허용에 관한 기준은 Table 3-1에 나타난 바와 같이 미국의 경우 잔류허용농도와 안전수준으로 구분되어 설정되어 있으며, 두 가지 모두 우유의 안정성을 평가하는 객관적 기준으로 사용되고 있으나 잔류허용농도는 법적 구속력을 가진다는 차원에서 지도기준으로 사용되는 안전수준과는 의미를 달리하며, 유럽연합(EU)의 경우는 FAO/WHO의 MRL을 적용하고 있다.[5] 최근 이에 따라 이들 국가에서는 기기분석에 의한 원유 중 잔류약물의 확인 정량방법이 활발하게 이루어지고 있다.

축산물 중의 잔류설파제를 비롯한 유해잔류물질을 검출하기 위한 분석법으로는 비색법과 thin-layer chromatography(TLC), gas chromatography(GC), gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS), high-performance liquid chromatography(HPLC)등이 있으나. 비교적 민감도가 낮거나 대부분의 경우 많은 시간을 필요로 하며 전처리가 복잡한 단점을 안고 있다[6-47].

그러나 기존 항생물질 검출방법인 TLC 방법으로는 거의 검출되지 않기 때문에 최근 들어 낙농가에서 유방염 치료제로 많이 사용되고 있는 sulfamethazine은 일종의 발암물질로서 인체에 매우 유해하며 Krienke[48]은 0.001g/㎖(100ppm)이상의 농도에서는 젖산균생육이 저해되어 배양이 되지 않는다고 보고하였다. TTC방법으로는 0.001g/㎖(1000ppm)까지도 검출되지 않았으며 그 이상의 농도에서는 우유 자체가 응고되는 현상을 보였다. 반면에 sulfamethazine screening test는 감도가 아주 높아 1.0×10^{-10} g/㎖(0.1ppb)까지

신속 정확하게 검출되었다. Read등[49]은 우유 내의 sulfa drugs와 antibiotics를 다섯 종류의 세균을 이용한 disc assay 방법으로 검출하였는데 sulfamethazine의 최소 검출농도는 5μg/disc로 이것은 FDA 기준인 10ppb에는 훨씬 못 미치는 높은 농도이고 배양시간도 4 10시간으로 장시간 소요되었다. 또한 Sezer[50]와 Tishler등[51]도 sulfamethazine 검출 연구를 하였으나 검출 가능 농도가 ppm 수준으로 감도가 낮았다. 외국의 경우 Multi-residue HPLC analysis 만이 sulfamethazine을 분리 분석할 수 있다고 보고되었고 Delvo test, Penzyme test, Charm test 등의 속성검출방법으로도 검출할 수 없는 물질이기 때문에 원유의 항생물질 검출시험 시 β-lactam screening test와 더불어sulfamethazine screening test를 실시함으로써 기존의 방법들이 검출하지 못하는 sulfamethazine의 검출에 큰 역할을 하리라 기대된다. 이들 속성검출법의 장점은 5개 시료를 15분만에 검출할 수 있는 신속성(fastness), 면역학적인 방법을 이용한 반응특이성(specificity), 아주 미량의 저 농도도 검출되는 민감도(sensitivity), 정확도(precision), 실험하기 용이한 간편함(easy handling), 그리고 kit 한 개의 단가로 따지면 약간 비싸지만 품질향상과 제품폐기 방지 등 전체적인 측면에서 경제성(inexpensiveness) 등이 있음이 실험결과 나타났다. 우유 및 유제품의 소비가 계속적으로 증가되고 있는 현시점에서 이러한 항생물질의 검출방법을 면역학적기법을 이용하여 개선하는 것이 시급한 과제라고 사료되는 바이다.

일반적으로 면역학적 분석방법에서 이용되는 항체는 다클론성항체와 단클론성항체가 있다. 다클론성항체는 면역원을 주로 토끼에 면역시켜 한번에 많은 양을 얻을수 있는 장점이 있으나 여러 가지 특이성을 갖는 항체들의 집합체임으로 유사한 물질과 교차반응의 문제가 있다. 단클론성항체는 이를 생산하기 위하여 동물세포 배양시설 등이 갖추어져 있어야 하고 clone을 분리 하는데 많은 노력과 시간이 소요되는 단점이 있으나 한번 확립된 clone에 의하여 생산되는 항

체는 한 종류의 특이 항체를 생산하기 때문에 sulfamethazine를 분석하기 위해서는 다클론성항체보다 단클론성항체를 이용하는 것이 바람직하다고 본다.

Table 3-1. Safe/Tolerance level for residues of antimicrobials in milk.

Descriprion (ppb) / Antimicrobials	Korea (tolerance)	USA (tolerance/safe level)
Penicillin G	4	0/5
Oxytetracycline	100	0/30
Sulfamethazine	10	0/10
Sulfadimethoxine	10	10/10
Sulfadiazine	10	0/10
Sulfathiazole	10	0/10
Sulfamerazine	10	0/10
Sulfaquinoxaline	10	_/10
Sulachlorophyridazine	10	_/10

* CFR 21 and CVM correspondence

따라서 본 연구는 신속하고 감도가 높은 sulfamethazine 분석방법을 확립하기 위하여 sulfamethazine에 단백질을 결합시켜 인위적으로 항원성을 부여한 다음 mouse에 면역시킨 후 hybridoma cell line을 개발하고 sulfamethazine에 대한 단클론성 항체를 생산하여 이를 이용한 면역학적 방법을 확립하고자 한다.

제2절 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 실험재료는 다음과 같다.

실험을 위한 sulfamethazine 표준품은 Sigma 제품을 사용하였고, 면역항원 및 코팅항원을 합성하기 위하여 사용한 단백질은 bovin serum albumin(BSA : fatty acid free, fraction V), ovalbumin(OVA : crude, fraction Ⅶ)을 Sigma 사에서 구입하여 사용하였다. 그 외 효소면역분석법에 사용된 시약은 polyethylene sorbitan monolaurate(Tween 20), 2, 2'-azinobis (3-ethlbenz-thiazoline) sulfonic acid(ABTS), hydrogenperoxide, horseradish peroxidase (HRP), antimouse-IgG-horseradish peroxidase conjugate등은 Sigma사에서 구입하였다. 또한 면역에 사용한 Freuns's complete adjuvant와 Freuns's incomplete adjuvant등은 Aldrich사, 제품을 구입하여 사용하였고, fusion에 사용한 polyethyleneglycol(PEG)은 Sigma 제품을 사용하였다. 또한 microculture plate(96 well과 24 well) microtiter plate는 Dynatech사에서, 그리고 ELISA Reader는 BIO-RAD 550을 사용하였다.

세포융합에 상용한 형질세포종 세포는 서울대학교 의과대학 미생물학교실에서 미국 국립 보건원으로부터 분양 받은 P3X63Ag8.V653 세포주를 경상대학교 의과대학 미생물학 교실로부터 재 분양받아 사용하였다.

2. 항원합성

Sulfamethazine의 분자량은 278.32로 단독으로는 항원의 역할을 할 수 없으므로 항체를 생산하기 위해서는 담체(carrier protein)와 결합시켜 항원성을 부여하여야 한다. 따라서 sulfamethazine에 단백질을 결합시켜 항원성을 부여하였다. 단백질 결합은 Dixon-Holland와 Katz의 방법6)에 따랐다. 즉, sulfamethazine 350 mg과 BSA 600 mg을 75㎖의 접합액 (0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, 2 volume: dioxane, 1 volume)에 용해하고 25%의 glutaraldehyde 0.35㎖를 가하여 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 이 후 0.1M phosphate buffer(pH 7.0/)으로 매일 2회 외액을 교환하며 6일간 투석하였다. 얻어진 접합체액은 제균여과(pore size 0.22㎛)하여 냉장보관하며 실험에 사용하였다.

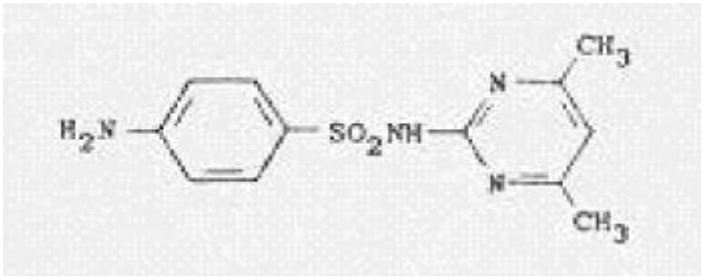


Fig. 3-1. Structure of sulfamethazine

3. Hybridoma cell line 개발

가. 면역

Sulfamethazine에 대한 단클론성항체 생산을 위한 hybridoma cell line을 개발 하기 위해 생후 6주된 BALB/c mouse(암컷)에 SMT-BSA conjugate와 Freund's complete adjuvant의 동량 혼합액을 마리당 100 ㎍/200 ㎕씩 복강으로 1차 면역을 하였다. 첫 면역 후 2주 간격으로 SMT-BSA conjugate와 Freund's incomplete adjuvant의 동량 혼합액으로 2회 추가접종을 실시하였다. 추가접종 3주 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 희석한 2배의 SMT-BSA conjugate를 복강 내에 주사하여 최종 면역하였다.

나. Mouse 항혈청 역가 검정 방법

최종 면역 후 2일이 경과된 BALB/c mouse로부터 꼬리에서 혈액을 채취하여 3,000 rpm에서 원심분리한 후 혈청을 회수하고 PBS로 단계별 희석하여 항혈청의 역가를 비경쟁적 ELISA에 의하여 검정하였다.

먼저 SMT-BSA를 완충액(coating buffer)에 녹여 microtiter plate에 100 ㎕(100 ng/well)씩 주입한 다음 4℃에서 하룻밤 방치하여 coating한 후 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 여기에 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위해 PBS에 녹인 1%BSA를 가하여 하룻밤 4℃에 방치한 후 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 세척한 plate에 희석한 혈청을 50 ㎕씩 well에 주입하고 다시 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응시킨 plate를 세척용 완충액으로 5회 세척한 후 1 : 10.000으로 희석한 2차 항체(goat anti-mouse IgG-HRP)를 100㎕씩 분주하고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 세척용 완충액으로 다시 6회 세척한 다음 기

질용액(ABTS) 100㎕를 분주하여 실온에서 30분간 발색시킨 후 이것을 ELISA reader로 405㎚에서 흡광도를 측정하여 항체 역가를 측정하였으며 그 중 역가가 높은 mouse를 선택하여 세포융합에 사용하였다.

다. 형질세포종 세포의 준비

세포융합에 사용한 형질세포종 세포는 P3X63Ag8.V653 세포주를 사용하였다. 이 세포는 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase(HGPRT)가 음성이어서 8-azaguanine에 내성이며 면역 글로불린을 생산하지 못한다. 이 세포주를 8-azaguanine (20 ㎍/㎖), 10% 우태아 혈청과 gentamicin(50 ㎍/㎖) 이 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 배양하였으며 2-4일에 한번씩 원심 세척하여 새로운 배지로 갈아주면서 37℃, 7% CO2 incubator에서 배양 계대하였다. 세포융합 5일전부터는 8-azaguanine이 없는 신선한 배지로 배양하면서 형질세포종 세포를 준비하였다. 세포융합시 RPMI 1640으로 3회 세척하고 세포수를 1×10⁷/㎖로 조절하여 사용하였다.

라. 비장세포의 준비

최종 면역 후 3일이 경과된 BALB/C 마우스로부터 비장을 적출하여 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)내에서 핀셋으로 비장세포를 분리하였다. 비장 세포액을 실온에서 15분간 정치시켜 비장 결합조직을 가라 앉혀 제거하고 DMEM으로 원심 세척하였다. 비장 세포액을 우태아 혈청에 중층하여 280×g에서 5분간 원심분리하여 비장 세포액내의 혈소판을 제거 하였다. DMEM으로 원심 세척한 다음 비장 세포액을 Red blood cell lysing buffer로 적혈구를 용혈시키고 백혈구 성분을 분리하였다. 다시 RPMI 1640으로 3회 세척하여 세포수를 1×10⁷/㎖로 조절하여 융합에 사용하였다.

마. 세포융합

세포융합은 Kohler의 방법[7]에 따라 실시하였다. 형질 세포종 세포와 비장세포를 1 : 10의 비율로 혼합하여 2회에 걸쳐 원침세척하였다. 37℃로 보온시킨 후 혼합 세포침전물에 50%(W/V) polyethylene glycol 1,500용액 1㎖을 1분간 점적하여 세포를 융합시켰다. 점적 후 즉시 37℃의 DMEM 1㎖를 흔들면서 1분 동안에 첨가하였고 계속하여 DMEM 15㎖을 5분간에 걸쳐 첨가하였다. 융합이 끝난 혼합 세포액을 400×g에서 5분간 원침하고 20% 우태아 혈청, gentamicin(50 ㎍/㎖)이 첨가된 DMEM에 부유시킨 다음 96 well 배양판에 well 당 50 ㎕씩 분주하여 37℃, 7% CO2 incubator에서 배양하였다. 융합된 세포만을 선택하기 위하여 HAT (50 μM hypoxanthine, 0.4 μM aminopterin, 16 μM thymidine)가 들어 있는 20% DMEM 배지를 융합후 1, 3, 5 및 7일에 well당 50㎕/씩 첨가하였고, 10일에는 150㎕ 배지를 교환하여 15일까지 융합세포의 증식 유무를 역위상차 현미경으로 관찰하였다.

바. 융합세포의 선택과 단세포군 배양(Cloning)

융합 후 10일 내지 15일 사이에 융합된 세포가 well 바닥의 1/3이상 성장하였을 때 배양상층액 50 ㎕를 채취하여 비경쟁적 효소면역측정법으로 SMT-BSA에 대한 항체를 분비하는지를 검색하였다. 항체를 생산하는 well의 세포를 24 well plate에 옮겨 배양한 후 항체역가가 계속 유지되며 BSA에 대한 반응이 없고, 세포의 증식이 활발한 hybrid를 선택하여 cloning을 실시하였다.

Cloning은 Mckearn[8]의 무한대 희석법으로 실시하였다. 24 well에서 성장하는 세포를 DMEM으로 희석하여 최종 10 - 30 cell/㎖의 농도로 조정하여 well

당 100 μℓ씩 분주하여 배양하였다. 5-7일 배양 후 역위상차 현미경으로 1개의 세포집락이 형성된 well을 선택하고 항체생산 여부를 비경쟁적 효소면역측정법으로 검색하였다. 항체의 역가가 높은 hybridoma를 최종 선택하여 24 well plate, T-25 flask T-75 flask순으로 증식시키고, cryo-media로 106 cell/㎖로 조절된 배양세포를 cryo-tube에 1㎖씩 분주하여 -70℃에서 급속 동결한 후 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

4. 항체의 생산과 특성

가. 항체의 생산

이미 얻은 hybridoma를 T-75 flask에서 대량배양한 후 mouse의 복강에 이식하여 복수액을 생산하였다. 즉, 1주일전 복강에 pristane (2,4,10,14-tetramethylpentadecane, sigma co.)을 0.5㎖를 주입한 mouse에 대량 증식한 hybeidoma cell을 수거하여 세포수가 1.0×107/0.2㎖ 되도록 조절하여 mouse의 복강에 주입한다. 약 7-8일후 복강으로부터 복수액을 채취하여 원심분리한 후 상징액에 대하여 역가를 검정한 다음 실험에 사용하였다. 또한 각 융합잡종세포가 분비하는 단크론성의 항체 isotype을 조사하였다. 항체의 isotype결정은 Boehriner mannheim사의 mouse monoclonal antibody isotyping Kit를 사용하여 Boehriner mannheim사에서 제시한 방법에 따라 시행하였다.

나. 항체의 특성

채취한 복수액을 ammonium sulfate법으로 정제하여 항체의 반응성 및 특성을 조사하는데 사용하였다. 즉, 복수액을 2배량의 PBS용액에 희석한 후 포화

ammonium sulfate용액을 동량 가하여 30분간 실온에서 반응시킨다음 10,000xg의 원심분리를하여 침전물을 회수하였다. PBS용액에 침전물을 재용해 한다음 다시 45% ammonium sulfate용액을 동량가하여 실온에서 30분간 반응시키고 다시 10,000xg의 원심분리를하여 침전물을 회수하였다. 한번더 45% ammonium sulfate용액으로 반복한 다음 PBS용액에 투석을 3일동안 3회 반복하였다. 투석이 끝난 용액의 단백질량을 정량한 다음 항체의 반응성 및 특성을 조사하는데 사용하였다. 생산된 단크론성항체의 특이성을 조사하기 위하여 각 유해물질과 유사한 구조를 가진 화합물에 대한 교차반응성을 조사한다. 이성체들의 농도를 달리하여 흡착항원에 결합된 항체를 50% 유리시키는 농도를 산출하여 교차반응성(CR□)을 다음과 같이 계산하였다. CR□=(흡착 항원과 항체의 반응을 50% 억제할 수 있는 sulfamethazine의 농도/ 흡착항원과 항체의 반응을 50% 억제할 수 있는 이성체의 농도)×100

5. ELISA법의 확립

융합잡종세포를 BALB/c 마우스에 투여하여 얻은 정제된 단크론성 항체를 이용하여 ELISA법을 확립하는 실험을 실시하였다. 유해잔류물질의 indirect competitive ELISA법 또는 indirect competitive ELISA법을 확립하기 위해 coating법과 coating 시간. pH, 유기용매와의 반응, 항체의 농도, 기질의 농도 및 반응시간이 ELISA법에 미치는 영향을 조사하였다.

6. 각종시료의 전처리법

가. 각종시료의 수집

개발한 hybridoma를 이용하여 얻은 단크론성항체로서 확보한 ELISA 조건을 실제 시료에 적용하기 위해 최근 문제가 되고 있는 것 중 식물성 시료로는 사료를 동물성 시료로는 우유 및 chicken tissue를 시료로 수집하였으며 우유는 그대로 시료용액 조제에 사용하였고 사료나 chicken tissue는 분쇄 혹은 마쇄하여 시료용액조제에 사용하였다.

나. 식물성 시료조제

Sulfamethazine의 경우 문제가 되는 식물성시료는 사료뿐이다. 따라서 시중에서 사료를 구입하여 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

즉, 사료 5g을 원심분리관에 취하고, 10%NaCl 5mL, dichloromethane 10mL을 가해 초음파 추출기로 10분간 추출한 다음 3,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. Dichloromethane 층에서 2mL을 소형 시험관에 옮기고 질소가스하에서 건조시켰다. 이것에 hexane 1mL와 물 2mL을 사용하여 녹인 다음 물층을 취하고 여기에 dichloromethane 2mL을 가하여 혼합한 다음 dichloromethane 층만 취해서 질소가스 하에서 건조시키고, DMF 50㎕로 재용해 후 950㎕의 PBS를 첨가해서 ELISA의 시료로 사용하였다. 이 방법으로 사료에 50ppb, 500ppb 농도로 첨가한 다음 sulfamethazine의 회수율을 구하였다.

한편 최근 직접 사료를 가지고 실험한 경우는 보다 간편하게 시료5g을 취하여 50ml tube에 넣고 30% methanol 25ml을 첨가한 다음 65C water bath에서 30

분 방치한후 진탕기에서 30분 혼합시키고 1,200rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하여 바로 ELISA시료로 사용한후 히수율검정시험을 하여 앞ㅍ에서 실험한 조제방법과 비교하였다.

다. 동물성 시료조제

1) 우유시료 조제

우유시료 5mL을 원심분리관에 취하고 10% NaCl 5mL, dichloromethane 10mL을 가해 초음파 추출기로 10분간 추출한 다음 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 dichloromethane 층을 증류flask에 옮겨 감압농축하였다. 이것을 100㎕ DMF에 녹이고 다시 4.9mL PBS에 녹이고 ELISA용 시료로 하였으며 이때 회수율을 구하기 위해 우유시료 5mL에 DMF에 보관중인 표준 sulfamethazine을 50, 500ppb농도로 첨가하여 ELISA를 실시하여 회수율을 구하였다.
한편 우유시료의 경우에도 우유원액 5ml를 50 ml Tube에 취하고 20ml의 30%MeOH(in PBS)를 첨가한후 65C에서 30분간 방치한 다음 진탕기에서 30분 진탕후 1200rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 ELISA시료로 사용하여 앞에서의 시료조제방법과 비교하였다.

2) Chicken tissue의 시료조제

Chicken tissue에 잔류하는 sulfamethazine을 조사하기위해 시료를 앞서의 kang 등의 방법을 참조하여 조제하였다. 즉 앞서 구입해서 보관중인 시료 5g을 원심분리관에 취하고, 10%NaCl 5mL, dichloromethane 10mL을 가해 초음파 추출기로 10분간 추출한 다음 3,000rpm으로 10분간 원심분리하였다.

Dichloromethane 층에서 2mL을 소형 시험관에 옮기고 질소가스하에서 건조시켰다. 이것에 hexane 1mL와 물 2mL을 사용하여 녹인 다음 물층을 취하고 여기에 dichloromethane 2mL을 가하여 혼합한 다음 dichloromethane 층만 취해서 질소가스 하에서 건조시키고, DMF 50㎕로 재용해 후 450㎕의 PBS를 첨가해서 ELISA의 시료로 사용하였다. 이 방법으로 사료에 50ppb, 500ppb 농도로 첨가한 다음 sulfamethazine의 회수율을 구하였다. Chicken tissue의 경우에도 사료에서와 같은 간편한 시료조제법으로 시료를 조제하여 회수율 실험을 병행하였다.

7. Affinity column의 실험제작

가. 항체의 대량생산

Sulfamethazine은 다른 물질(atrazine 이나 vomitoxin)과는 달리 항체의 역가가 낮고 불안정하여 전반적으로 실험이 늦게 진행되고 있다. 본 실험에서 항체의 대량생산은 mouse를 이용한 일반적인 방법으로 실시하였다. 따라서 항체의 함량이 적으나 본 실험을 하는 데는 불편함이 없었으며 이러한 재료를 기초로 하여 실험조건이 안정화되면 technomouse를 이용한 항체제작을 할 예정이다. 생산된 항체는 일반적인 방법과 같이 50㎖ tube에 모아 유안침전법으로 다시 정제하여 실험에 사용하였다. 즉, 상등액 절반 정도의 포화(NH4)2SO4 용액을 magnetic stirrer로 교반하면서 1방울씩 떨어뜨려서 혈청을 침전시켜 분리하는 조작을 3회 이상 반복하였다.

수거한 혈청을 처음 량의 0.01M 인산완충용액 (phosphast buffered saline : PBS, pH 7.3)에 녹이고 3일간 4℃에서 투석시킨 다음 원심 분리하여 침전물을 버리고 항체 역가를 측정하고, 4℃에 보관 하면서 IC-ELISA 및 ELISA 분석용 kit의 실험제작에 사용하였다.

나. Affinity column의 제작법

Sulfamethazine을 모니토링 하기위해 우선 immunoaffinity column을 실험 제작하였다. 즉, minicolumn에 항체를 흡착시킨 affi-gel 10을 충진시켜 column 을 제작하였고, 제작된 immunoaffinity column의 sulfamethazine의 정제원리와 흡착여부에 대한 실험은 는 atrazine의 경우와 같았다.

다. Immunoaffinity column사용조건

Sulfamethazine의 IC정제는 여러 가지 factor에 의하여 영향을 받는다. 본 실험에서는 IC사용조건을 개선하기 위하여 Loading capacity, loading solution 의 pH, loading solution의 volumn, elution 용액의 유속, elution 용액의 적정량 등에 대하여 조사함으로서 Sulfamethazine의 immunoaffinity column에 의한 사용조건을 개선하였다. 아울러 IC를 ELISA 및 HPLC법과 결합시킨 IC-ELISA 및 IC-HPLC시스템을 확립하는 실험을 실시하였다.

8. 면역분석 kit 실험제작

각종 시료 중에 잔류하는 sulfamethazine의 면역분석을 위한 kit를 다음과 같이 실험 제작할 예정이다. 즉 기존의 indirect competitive ELISA법을 활용하여 실제 현장에서 간단히 분석할 수 있는 kit를 조제하기 위해 다음과 같은 것을 시험할 예정이다. 기존의 ELISA 조건의 kit에서의 적합 여부, kit의 보관방법, kit 사용기간, 그리고 kit 1set당 포장될 각종 시액의 함량 및 kit의 사용 protocol에 대한 내용을 검토한 후 kit로 제작하였다.

9. 면역분석법의 응용

가. 시료의 수집 및 면역분석

식품에 오염가능성이 있는 잔류유해물질중 sulfamethazine의 오염정도를 실제측정하기위하여 국내시료의경우는 사료와 우유를 대상으로 각각 18점, 36점씩을 ,수입시료의 경우는 사료 26점을 수집하였다.

먼저 사료에 대한 전처리밥법을 살펴보면 다음과 같다. 즉 사료5g을 취하여 50ml tube에 넣고 30% methanol 25ml을 첨가한 다음 65C water bath에서 30분 방치한후 진탕기에서 30분 혼합시키고 1,200rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하여 바로 ELISA시료로 사용하였다.

우유시료의 경우에도 우유원액 5ml를 50 ml Tube에 취하고 20ml의 30%MeOH(in PBS)를 첨가한후 65℃에서 30분간 방치한 다음 진탕기에서 30분 진탕후 1200rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 ELISA시료로 사용하였다. 시료중의 sulfamethazine의 함량은 Indirect competitive ELISA법을 근거로하여 제작한 면역분석 KIT를 사용하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 항원합성

가. Sulfamethazine에 대한 기기 분석

기존의 sulfamethazine을 분석하는 기기분석조건을 조사, 확인하였다 그 결과 확립된 HPLC분석조건을 조사한 결과 Table 3-2과 같았으며 이때 이 조건으로 얻은 표준 HPLC chromatogram은 Fig.3-2와 같았다.

Table 3-2. The analytical condition of HPLC for determination of sulfamethazine.

HPLC Type	Waters Model 590
Detecter	UV 260nm
Column	μBondapak C18 (3.9mm×300mm steel column)
Flow rate	1.0㎖/min
Mobile phase	Methanol : Water (14 : 86, v/v)

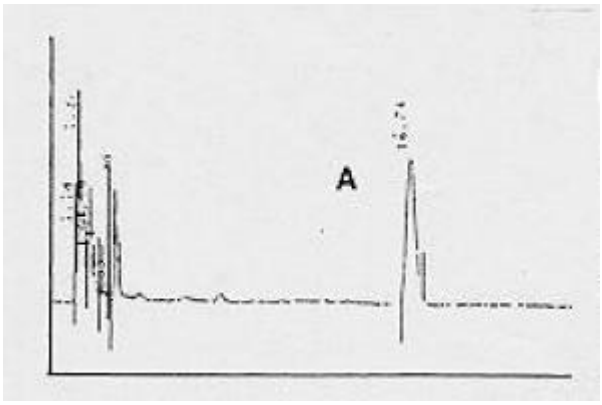


Fig.3-2 HPLC chromatogram of standard sulfamethazine

나. Sulfamethazine의 항원합성

Sulfamethazine의 경우 이미 coupling site가 있으므로 단백질과 직접결합시켜 항원을 합성하였다. 즉, SMZ(sigma, USA) 350㎎과 BSA(sigma, USA) 600㎎을 dioxane 25㎖와 phosphate buffer(0.1M, pH 7.2) 50㎖을 섞은 용액에 용해하고 25% glutaraldehyde 0.35㎖을 가하여 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 이후 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)로 매일 2회 외액을 교환하며 6일간 4℃에서 투석(M. W. cutoff: 6,000-8,000)하였다. 투석이 끝난 용액을 spectrophotometor로 단백질량을 측정한 일정량씩 분주하여 -20℃에 보관하면서 실험시 사용하였다. 한편, ELISA용 plate의 흡착용으로 사용할 conjugate는 SMZ 350㎎과 OVA(sigma, USA) 600㎎을 사용하여 SMZ-BSA 제조와 동일한 방법으로 준비하였다.

합성된 항원을 확인하기 위해 sulfamethazine의 경우 우선 sulfamethazine-BSA를 25% NH_4OH로서 24시간 가수분해한 다음 HPLC로 분석하였다. 그 결과 Fig. 3-3에서 보는 바와같이 표준 sulfamethazine은 retention time이 16.74이나 가수분해물은 24.76이었다.

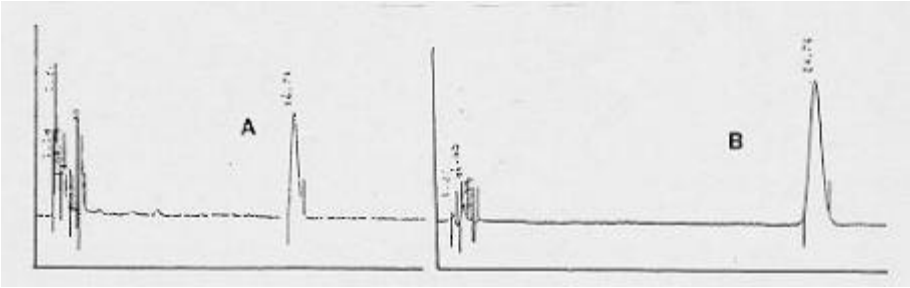


Fig. 3-3. HPLC chromatogram of standard sulfamethazine(A) and converted.
sulfamethazine(B) by hydrolysis of SMZ-BSA .

다. 항혈청 titer 측정을 위한 ELISA법 확립 및 titer 검정

면역시킨 mouse의 sulfamethazine에 대한 항혈청 titer 측정을 위해서 SMZ-RSA를 완충액(coating buffer)에 녹여 microtiter plate에 100㎕씩 주입한 다음 4℃에서 하룻밤 방치하여 코팅한 후 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 그런 다음 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위해 PBS에 녹인 0.1% ovalbumin을 가하여 하룻밤 방치한 후 세척용 완충액으로 4회 세척하였다. 세척한 plate에 표준 SMZ와 항혈청을 단계적으로 희석하여(100-1,000,000배) 50㎕씩 well에 주입하고 다시 4℃에서 하룻밤 반응시켰다. 반응시킨 plate를 세척용 완충액으로 5회 세척하고 1 : 1,000으로 희석한 2차 항체(anti-mouse IgG-HRP, Sigma)를 100㎕씩 분주하고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 세척용 완충액으로 다시 6회 세척한 후 기질용액(ABTS) 100㎕를 분주하여 실온에서 30분간 발색시킨 후 반응정지용액을 50㎕씩 넣어 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader로 410nm에서 흡광도를 측정하여 titer을 검정하고 있다. 그 결과는 Table 3-3과 같았으며 이때 sulfamethazine에 특이한 항체를 생산하는 mouse의 spleen cell과 myeloma cell을 앞서의 방법대로 cell fusion하고 있으나 바람직한 결과를 얻기가 처음에는 매우 어려웠다.

Table 3-3. ELISA titeration of sulfamethazine antisera developed in mouse.

(Unit:O.D)

Dilution	10	100	1,000	5,000	10,000	50,000	100,000
Normal	0.219	0.213	0.201	0.198	0.197	0.194	0.197
SMZ-3	over	over	1.459	0.795	0.298	0.201	0.213
SMZ-9	over	over	over	1.127	0.352	0.201	0.211
SMZ-13	over	over	1.653	1.234	0.452	0.296	0.221

2. Hybridoma cell line 개발

가. 세포융합 및 cloning

한편 sulfamethazine의 경우는 sulfamethazine-BSA conjugate로 면역시킨 20마리의 BALB/c mouse 중 6마리가 sulfamethazine에 양성 반응을 보이는 항혈청을 생산하여 모두 cell fusion을 실시하였다. Table 3-4에서 보는 바와같이 융합후 분주한 1820 well중 1640 well에서 융합된 세포가 성장하여 90.1%의 융합률을 보였다.

Table 3-45. Fusion and frequency of hybrids selected by HAT medium.

Fusion	Number of mice titer	Number of mice used in fusion	Number of mice wells seeded	Number of growth in HAT medium	Fusion rate (%)
3 times	20	6	1820	1640	90.1

이때 cell fusion**에 사용된** spleen cell**과** myeloma cell(V653)**의 모양과** fusion**된 세포군의 모양은** atrazine**의 실험결과와 같이 관찰되었다**.

(a) (b)

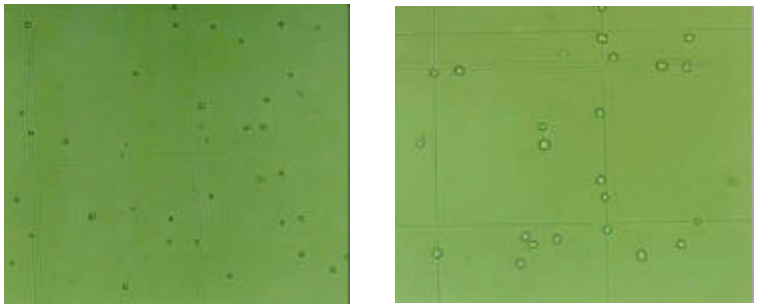


Fig. 3-4. Spleen cell(a) and P3x63Ag.V653(b)

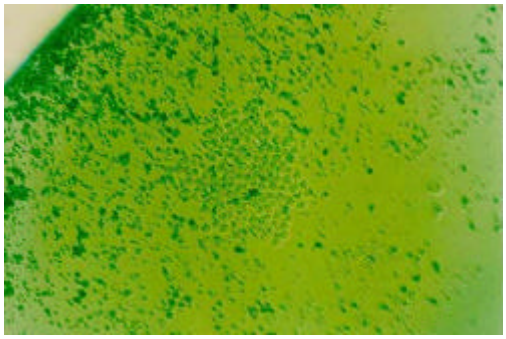


Fig. 3-5. Fused cell

sulfamethazine 특이한 항체를 지속적으로 생산하는 hybridoma를 얻기 위해 cloning한 결과 sulfamethazine과 선택적으로 반응하는 3세포주 얻어, 이들이 생산한 단크론성항체의 의 isotype을 조사한 결과 Fig.3-6과 Table3-5에서 보는 바와 같이 앞서의 atrazine과 처럼 모두 IgG1을 생산하였고 light chain은 모두 κ형으로 나타났다.

Fig.3-6 Photogram of isotype kit for determining the subclass of immunoglobulins produced by hybridoma cell.
A: SMT-1-M5, B: SMT-2-M8, C:SMT-4-M1

Table 3-5. Immunoglobulin classes of production antibody of hybridoma cell

hybridoma cell No.	class	light chain
SMT-1_M5	IgG1	κ
SMT-2-M8	IgG1	κ
SMT-4-M1	IgG1	κ

그때 cloning된 세포군의 모양은 Fig. 3-7과 같으며 항체생산력이 우수한 세포군을 각각 24 well plate, T-25 flask T-75 flask순으로 증식시키고, cryo-media로 106 cell/㎖로 조절된 배양세포를 cryo-tube에 1㎖씩 분주하여 -70℃에서 급속 동결한 후 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

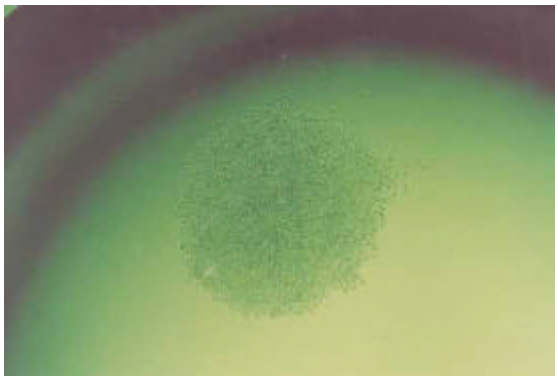


Fig. 3-7. Cloned cell.

나. 단크론성 항체의 생산과 특성

또한 sulfamethazine에 대한 단크론성항체를 얻기 위해 앞서 확보된 cell line을 BALB/c mouse의 복강에 주사하여 sulfamethazine에 특이한 항체를 얻었다. SMT-1-M5의 경우 mouse의 복강에서 얻은 복수의 단백질 함량은 20.6mg/㎖이었고 역가는 Table 3-6에서와 같이 1:500,000에서도 positive 반응을 보였으며, 항체의 특성을 조사한 결과 Table 3-7과 같이 sulfamethazine에 특이적으로 반응하였고 다른 항생물질과는 교차반응성은 나타나지 않았다.

Table 3-6. Dilution titer of anti-sulfamethazine ascites fluid as determined by indirect ELISA (Unit : O.D.)

Dilution	10	100	1,000	5,000	10,000	50,000	100,000	500,000	1,000,000
Normal	0.114	0.113	0.109	0.103	0.102	0.104	0.105	0.101	0.103
SMT-1-M5	over	over	over	over	1.242	0.804	0.268	0.204	0.118

Table 3-7. Cross-reactivity of sulfamethazine analogues in indirect competitive ELISA

Analogue	Cross-reactivity(%)
sulfamethazine	100
penicillin G	< 1
streptomycin	< 1
chlorampenicol	< 1
gentamicin	< 1
kanamycin	< 1

3. Indirect competitive ELISA

Mouse의 복강에서 얻은 다량의 항체를 정제하여 시료중의 sulfamethazine 오염 여부를 조사하기 앞서 indirect competitive ELISA법을 확립하였다. 먼저 SMT-1-M5의 경우 실험전체를 통해 가장 안정한 반응을 보여 이후의 실험수행에 사용하였으며 이때의 ELISA법의 반응원리는 Fig.3-8과 같았다.

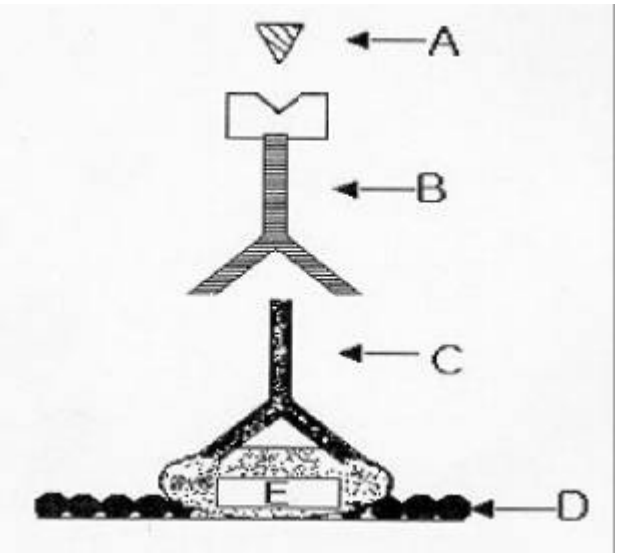


Fig. Principle of indirect competitive ELISA for sulfamethazine

A : Substrate, B : Enzyme anti-antibody conjugate

C : Sulfamethazine antibody, D : BSA,

E : Sulfamethazine-protein conjugate

가. 항체의 희석농도

우선, 사용한 SMT-1-M5 항체의 좁은 범위의 역가측정을 위해 PBS에 정제항체를 1㎎/㎖로 조절하여 100 1000배 희석한 다음 앞서 설정된 indirect competitive ELISA법을 행하였다. 그 결과 Table 3-8에서 보는 바와같이 500배 희석용액에서도 대체로 실험 가능한 반응치를 보였다. 그러나 보다 안정한 결과를 얻기위해 몇가지 ELISA 조건을 개선하는 실험을 실시하였다.

Table 3-8. Dilution of SMT-1-M5 as determined by indirect competitive ELISA of sulfamethazine (Unit: O.D).

Dilution / sulfa-methazine(ppb)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1,000
0	over	over	1.642	1.216	1.123	0.910	0.822	0.564	0.476	0.318
100	0.306	0.279	0.226	0.224	0.232	0.222	0.223	0.202	0.188	0.182

나. Coating conjugate**함량**

Indirect competitive ELISA **실시를 위해** microtiter plate**에** coating **하는** coating conjugate**의 적당한 함량을 조사하였다**. **즉**, sulfamethazine-BSA conjugate**를 희석하여** 500ng/well, 200ng/well, 100ng/well, 50ng/well, 20ng/well **및** 10g/well **농도로** coating**한 다음** ELISA**를 행하였다**. **그 결과** Table 3-9**에서 보는 바와같이** 100ng/well**에서 안정한 실험결과가 나왔으며 그 이상 희석은 어려웠고 반면** 200ng/well**도 실험결과는 안정하였지만** coating conjugate **소비가 많아 비경제적이므로 바람직하지 못하여 이후의** coating**량은** 100ng/well**로 고정하였다**.

Table 3-9. Effect of coating conjugate content per well on indirect competitive ELISA of sulfamethazine (Unit : O.D.)

SMT-BSA (ng/well) / sulfa-methazine (ppb)	500	200	100	50	20	10
0	1.369	1.214	1.178	0.676	0.214	0.198
100	0.421	0.214	0.204	0.184	0.136	0.124

다. 반응액의 pH

앞서 atrazine과 마찬가지로 실제 면역분석을 실시할 경우 분석결과에 가장 많은 영향을 미치는 pH의 영향을 조사하였다. 즉 시료용액의 pH를 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9로 조절한 다음 ELISA를 실시하여 pH가 ELISA에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 3-10에서 보는바와 같이 atrazine에서와 같이 pH 6.5-8.0까지 대체로 ELISA결과가 안정하였다.

Table 3-10. Effects of sample pH on ELISA reaction of sulfamethazine.

(Unit: O.D.)

Sulfa-methazine (ppm) \ pH	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9
0	0.932	1.007	1.102	1.069	1.072	0.932	0.972
10	0.203	0.199	0.213	0.215	0.231	0.242	0.187

라. Coating 시간

또한, coating conjugate의 coating 시간이 하룻밤동안은 너무 길다고 느껴 효과적인 coating 시간을 조사하였다. 즉, sulfamethazine-BSA conjugate 100ng/well을 주입하고 4℃에 1, 2, 3, 6, 12, 24시간 동안 반응시켰다가 끄집어내어 coating conjugate 희석액을 뺀 다음 blocking을 바로하고 난뒤 4℃에 보

관하면서 모든 실험구간이 준비되면 동시에 ELISA를 수행하였다. 그 결과 Table 3-11에서 보는바와 같이 coating 시간이 2시간 이후가 되면 ELISA 수행에 이상은 없었으나 3시간 coating한 plate는 대단히 안정하다고 생각되었다. 그러나 실험을 일률적으로 수행하기 위해서는 coating을 시킨후 하룻밤 반응시키면서 다른 실험을 준비하는것도 실험의 효율상 바람직하다고 생각되었다.

Table 3-11. Effect of coating time of sulfamethazine-BSA conjugate on indirect competitive ELISA of sulfamethazine (Unit : O.D.)

Coating time(hr) / sulfa-methazine (ppb)	1	2	3	6	12	24
0	1.046	1.172	1.213	1.221	1.294	1.295
100	0.164	0.171	0.209	0.219	0.206	0.211

이러한 실험결과를 토대로 ELISA를 행하였고 이때의 O.D.값을 ELISA reader로 읽어 표준곡선을 작성하여 Fig. 3-9과 같은 전형적인 표준곡선을 얻을 수가 있었고, 검출한계는 50ppb 수준이었다.

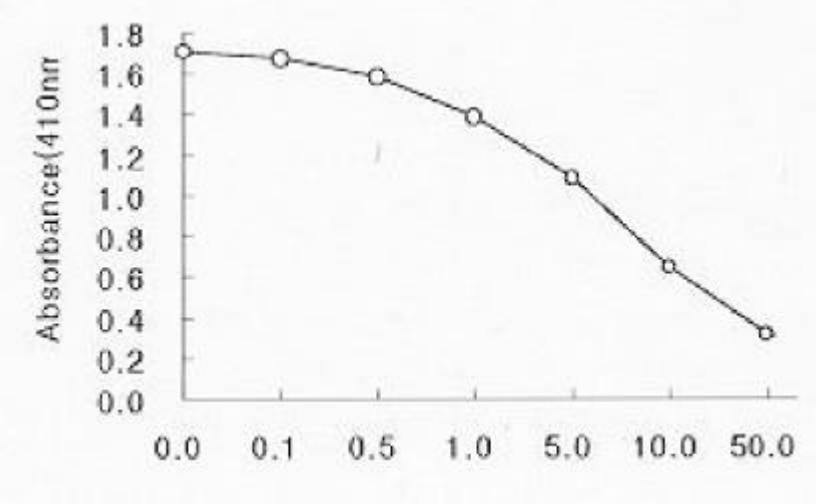


Fig. 3-9. Standard curve of sulfamethazine by indirect competitive ELISA.

4. 각종시료의 전처리

가. 각종시료의 수집

개발한 hybridoma에서 얻은 단크론성항체를 이용하여 확립한 ELISA 조건을 실제 시료에 적용하기 위해 사료, 우유 및 chicken tissue를 시료로 수집하여 시료용액조제에 사용하였다.

나. 식물성 시료조제

앞서 언급했듯이 sulfamethazine의 경우 문제가 되는 식물성시료는 사료뿐이다. 따라서 시중에서 사료를 구입하여 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

즉, 사료 5g을 원심분리관에 취하고, 표준 sulfamethzine을 50, 500ppb농도로 첨가한 다음 10%NaCl 5mL, dichloromethane 10mL을 가해 초음파 추출기로 10분간 추출한 다음 3,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. Dichloromethane 층에서 2mL을 소형 시험관에 옮기고 질소가스하에서 건조시켰다. 이것에 hexane 1mL와 물 2mL을 사용하여 녹인 다음 물층을 취하고 여기에 dichloromethane 2mL을 가하여 혼합한 다음 dichloromethane 층만 취해서 질소가스 하에서 건조시키고, DMF 50㎕로 재용해 후 950㎕의 PBS를 첨가해서 ELISA의 시료로 하여 회수율을 구한 결과 Table 3-12에서 보는바와 같이 61%, 54%의 낮은 회수율을 보여 조건을 개선하기 위한 연구를 계속하고 있다.

Table 3-12. Amounts of sulfamethazine recovered from feed by indirect competitive ELISA

Sample	Sulfamethazine added (ppb)	Recovery	
		ppb	(%)
Feed	50	30.5	61
	500	270.5	54

그러나 최근에는 시료5g을 취하여 50ml tube에 넣고 30% methanol 25ml을 첨가한 다음 65C water bath에서 30분 방치한후 진탕기에서 30분 혼합시키고 1,200rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하여 바로 ELISA시료로 사용하였다. 그때의 회수율은 Table과 같았다. Table3-13에서 보는바와 같이 100ppb의 경우는 67.5%로 회수율이 약간 상승했으나 500ppb의 경우는 오히려 약간 낮아져 51.6%를 보였다. 그러나 실험과정이 훨씬 간단하여 실제 응용시는 이실험과정에 따랐다.

Table 3-13. Amounts of sulfamethazine recovered from feed by indirect competitive ELISA

Sample	Sulfamethazine added (ppb)	Recovery	
		ppb	(%)
Feed	100	67.5	67.5
	500	258.0	51.6

다. 동물성 시료조제

1) 우유시료조제

우유시료 5mL을 원심분리관에 취하고 표준sulfamethzine을 50, 500ppb농도로 첨가하고 10% NaCl 5mL, dichloromethane 10mL을 가해 초음파 추출기로 10분간 추출한 다음 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 dichloromethane 층을 증류flask에 옮겨 감압농축하였다. 이것을 100㎕ DMF에 녹이고 다시 4.9mL PBS에 녹이고 ELISA용 시료로 하여 회수율을 구하였다. 그 결과 Table 3-14에서 보는바와 같이 회수율은 각각 78, 82%를 보였다.

Table 3-14 Amounts of sulfamethazine recovered from milk samples by indirect competitive ELISA

Sample	Atrazine added (ppb)	Recovery	
		ppb	(%)
Milk	50	39.2	78
	500	410.7	82

그러나 우유시료의 경우에도 우유원액 5ml**를** 50 ml Tube**에 취하고** 20ml**의** 30%MeOH(in PBS)**를 첨가한후** 65C**에서** 30**분간 방치한 다음 진탕기에서** 30**분 진탕후** 1200rpm**에서** 10**분간 원심분리하여 상등액을 바로** ELISA**시료로 사용하였다. 그결과** Table3-15**에서 보는바와 같이 회수율은 다소 낮았으나 실험과정이 간단하여 앞으로 이과정을 모델로 한 시료조제과정을 개발하도록 노력하고 있다.**

Table 3-15. Amounts of sulfamethazine recovered from milk samples by indirect competitive ELISA

Sample	Atrazine added (ppb)	Recovery	
		ppb	(%)
Milk	100	63.9	63.9
	500	288.0	57.6

2) Chicken tissue의 시료조제

Chicken tissue에 잔류하는 sulfamethazine을 조사하기위해 시료를 앞서의 kang 등의 방법을 참조하여 조제하였다. 즉 앞서 구입해서 보관중인 시료 5g을 원심분리관에 취하고, 표준sulfamethzine을 50, 500ppb농도로 첨가하고 10%NaCl 5mL, dichloromethane 10mL을 가해 초음파 추출기로 10분간 추출한 다음 3,000rpm으로 10분간 원심분리하였다. Dichloromethane 층에서 2mL을 소형 시험관에 옮기고 질소가스하에서 건조시켰다. 이것에 hexane 1mL와 물 2mL을 사용하여 녹인 다음 물층을 취하고 여기에 dichloromethane 2mL을 가하여 혼합한 다음 dichloromethane 층만 취해서 질소가스 하에서 건조시키고, DMF 50㎕로 재용해 후 450㎕의 PBS를 첨가해서 ELISA를 실시하여 회수율을 구하였다. 그 결과 Table 3-16에서 보는바와 같이 65%, 72%의 낮은 회수율을 보였다.

Table 3-16. Amounts of sulfamethazine recovered from chicken tissue by indirect competitive ELISA

Sample	Sulfamethazine added (ppb)	Recovery	
		ppb	(%)
Chchken tissue	50	32.5	65
	500	360.2	72

한편 chicken tissue의 경우에도 앞서의 methanol 추출법으로 시료를 조제하여 ELISA법으로 정량한결과 Table3-17에서 나타난 바와 같이 100ppb와 500ppb모두 회수율이 약간씩 떨어졌으나 실험조건을 개선하면 훨씬 간편한 방법이 만들어질수있으리라 생각되어 현재 실험을 계속하고있다.

Table 3-17. Amounts of sulfamethazine recovered from chicken tissue by indirect competitive ELISA

Sample	Sulfamethazine added (ppb)	Recovery	
		ppb	(%)
Chchken tissue	100	59.7	59.7
	500	309	61.9

5. Immunoaffinity column의 실험제작

가. Immunoaffinity column의 제작

Sulfamethazine이 시료에 소량 오염되어 있을 경우 Sulfamethazine을 특이적으로 정제하기 위해 앞서 설명한 바와 같이 immunoaffinity column을 atrazine의 경우와 같이 실험제작 하였다. 앞서의 방법으로 gel에 sulfamethazine에 대한 항체를 1㎎ 항체/㎎ gel 및 5㎎ 항체/㎎ gel의 농도로 부착시킨 후 column에 packing하고 gel에 항체가 효과적으로 흡착되었는지의 여부를 실험하였다. 먼저 gel용액과 항체용액을 각각 100㎕씩 취한 후 1900㎕의 PBS로 10배 희석한 후 1N HCl 20㎕을 가하고 pH를 낮추었다. 이 용액을 200 400nm에서 spectrophotometer로 scanning을 하였다. 그 결과 항체용 희석용액에서만 280nm에서 흡광치를 보여 용액 중에 항체 단백질이 존재함을 알 수 있었다. 한편, 1㎎ 항체와 5㎎ 항체를 1㎎ gel에 흡착시킨 다음 항체와 gel이 혼합된 상등액을 200㎕ 취하고 1800㎕의 PBS와 20㎕의 1N HCl을 혼합하여 위와 같은 방법으로 scanning을 실시한 결과 역시 용액 중에는 대부분의 항체 단백질의 gel에 효과적으로 결합되었음을 확인할 수 있었다.

실험적으로 제작한 immunoaffinity column의 사용을 위한 몇 가지 실험을 아울러 행하였으며 그 내용은 다음과 같다.

나. Immunoaffinity column**의 조건개선**

Sulfamethazine**의 경우에도** atrazine**처럼 회수율이 매우 낮았다**. **따라서 실험 제작한** Immunoaffinity column**의 회수율을 높이고 사용조건을 개선하기 위하여 몇 가지 실험을 행하였다**.

1) Binding capacity

실험 제작한 Immunoaffinity column**의** sulfamethazine**에 대한** column **내에서 결합능력 정도를 알아보기 위하여 실험하였다**.

Table 3-18. Binding capacity of sulfamethazine by immunoaffinity column.

Loaded sulfamethazine on column (ng)	Amount of sulfamethazine (ng)	Recovery ratio (%)
100	93	93
250	242	97
500	511	102
1,000	649	65
3,000	657	33
5,000	642	12

즉, 10%MeOH 10㎖(in PBS)속에 100 ng, 500 ng, 1000 ng, 3000 ng, 5000 ng의 sulfamethazine을 함유하게 한 다음 column에 loading하고, Methanol로 column에 흡착된 sulfamethazine을 유리시키고, 20%MeOH로 희석하여 잔류 량을 측정하였다. 그 결과 column의 binding capacity는 약 650 ng정도로 나타났고, 그 이상은 소비되는 것으로 나타났다.

2) Loading solution의 pH

앞서 atrazine에서와 같이 loading solution의 pH가 column에 흡착된 sulfamethazine의 회수에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 3-19에서 보는바와 같이 대체로 pH6-8에서는 회수율에 별다른 차이를 나타내지 않았다.

Table 3-19. Effect of loading solution pH onto immunoaffinity column of sulfamethazine

Loaded sulfamethazine (ng)	pH	Sulfamethazine recovered (ng)	Recovery ratio (%)
300	4	132	44.0
	5	219	73.0
	6	282	94.0
	7	296	98.6
	8	304	101.3
	9	292	97.3

3) Loading 량의 영향

Sulfamethazine을 300 ng을 여러 부피에 spike시킨 다음 용량이 sulfamethazine의 회수율에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 3-20에서 보는바와 같이 용량이 30 ml 이상이 되면 오히려 sulfamethazine의 회수율이 떨어지는 것으로 나타났다.

Table 3-20. Effects of loading volume of sulfamethazine extract onto immunoaffinity column

Spiked sulfamethazine (ng)	Loaded volumn (㎖)	Recovered sulfamethazine (ng)	Recovery ratio (%)
300	10	305	101.6
	20	276	92.0
	30	298	99.3
	40	231	77.0
	50	217	72.3
	60	185	61.6

4) 용출액의 부피가 회수율에 미치는 영향

Column속의 sulfamethazine을 용출시키는 데 필요한 methanol의 적정량을 조사하였다. 그 결과 Table 3-21에서 보는 바와 같이 2ml의 methanol로서 대부분의 sulfamethazine이 용출되어 나오는 것을 확인할 수 있었다

Table 3-21. Elution pattern of sulfamethazine from immunoaffinity column with methanol

Loaded sulfamethazine (ng)	Elution (㎖)	Recovered sulfamethazine (ng)	Recovery ratio (%)
100	0-1	97.2	97.2
	1.0-2.0	9.3	9.3
	2.0-3.0	-	-
	3.0-4.0	-	-
	4.0-5.0	-	-

5) **유속이 회수율에 미치는 영향**

Column**속의** sulfamethazine**을 용출시키는 데 필요한** methanol**의 유속이** Column**속의** sulfamethazine**이 회수되는데 영향을 줄 것으로 생각하고 유속을** 1,5,10ml**로 조정하여 실험하였다. 그 결과** 1-5ml/min.**의 유속으로 용출시키는 것이 바람직하게 생각되었다.**

Table 3-22. Effects of flow rate of loading solution to immunoaffinity column

Loading sulfamethazine (ng)	Flow rate (㎖/min)	Recovered sulfamethazine (ng)	Recovery ratio (%)
250	1	248.2	99.2
	5	236.7	94.6
	10	212.7	85.1

다. IC-ELISA, IC-HPLC

한편 영국을 중심으로한 구라파에서의 곡류중 mycotoxin을 비롯한 각종유해잔류물질의 정량법은 대체로 immunoaffinity를 사용한 시료정제과정과 정제된 시료를 이용한 ELISA 또는 HPLC법에의한 정량방법이 주를 이루고 있다. 그중에서도 IC-HPLC 시스템이 더욱 보편화 되어있었으며, 실험에서의 결과가 훨신 안정적이고 신뢰가 높게 나타났다. 비록 아직은 시작의 단계지만 우리나라의 경우도 농산물의 지속적인 검색시스템은 영국과 같은 시스템을 도입하는 것이 바람직하다고 생각된다. 이러한 목적의 일환으로 sulfamethazine에 대한 항체를 이용한 immunoaffinity column을 만든다음 시료를 정제하고 정제된 시료를 ELISA용 시료로하여 indirect competitive-ELISA를 실시하는 시스템을 구축하는 실험을 실시하여 Fig.3-10과 같은 시스템을 구축하였다.

5㎖ Supernant of treated sample

↓

Dillute with 36㎖ PBS

↓

Prewash the column with 10㎖ PBS

↓

Application of column with 3㎖/min

↓

Wash with 10㎖ D.W. and PBS

↓

Elution with 5㎖ MeOH

↓

Dry under N2 gas

↓

Redisolve with 10%MeOH

↓

Sample for ELISA

↓

Indirect competitive ELISA for of sulfamethazine

Fig. 3-10. Step for IC-ELISA of of sulfamethazine.

아울러 많은 시료를 빠른 시간에 정확히 분석하고자 할 때 정제된 시료가 얻어진다면 ELISA법에 의한 분석법보다 정제된 시료를 기기에 loading시켜 자동적으로 분석할 필요가 있다. 따라서 앞서의 방법과 같이 immunoaffinity column chromatography법으로 시료를 정제한 다음 정제된 시료를 HPLC에 일정량 injection시켜 시료 속의 vomitoxin 오염정도를 확인하는 IC-HPLC법을 Fig.3-11과 같이 확립하였다.

5㎖ Supernant of treated sample
↓
Dillute with 20㎖ PBS
↓
Prewash the column with 10㎖ PBS
↓
Application of column with 3㎖/min
↓
Wash with 10㎖ D.W. and PBS
↓
Elution with 5㎖ MeOH
↓
Dry under N2 gas
↓
Redisolve with MeOH
↓
Sample for HPLC

Fig. 3-11. Steps for IC-HPLC analysis of sulfamethazine

Table 3-23. Amount of vomitoxin recovered from feed by IC-ELISA, HPLC

Method	Spiked vomitoxin (ng)	Recovered vomitoxin (ng)	Recovery (%)
ELISA	500	254	50.9
HPLC	500	273	54.7

확립된 IC-ELISA 및 IC-HPLC시스템으로 사료에 500ppb의 sulfamethazine을 첨가하여 회수율을 실험한 결과는 다음과 같았다. 즉 Table 3-23에서 보는 바와 같이 ELISA의 경우는 약 50%의 회수율을 보인 반면 HPLC는 약 54%의 회수율을 나타내었다. 비록 회수율은 낮으나 실험과정이 간편하고 신속하여 앞으로 회수율 향상을 위한 실험을 계속해야할 것으로 생각된다.

이러한 원인으로는 immunoaffinity column에 binding된 항체의 안전성과 결합력, 그리고 용출 시스템에서의 문제점등을 예측할 수 있다. 따라서 좀더 시간을 두고 새로운 항체를 준비하여 immnoaffinity column을 제조하고 immunoaffinity column이 안전성과 회수율을 증가시켜야 할 것으로 생각된다. 본 연구자의 경험에 비추어볼 때에도 많은 시료를 안정되게 정제하고 분석하는 시스템은 효과적인 정제 column의 개발과 결합된 IC-HPLC시스템으로 농산물에 오염되거나 잔류되어있는 잔류항생물질을 분석하는 것이 가장 바람직한 방향으로 생각되며 이에 대한 연구를 계속 할 예정이다.

6. ELISA kit의 실험제작

비록 감도가 다른 물질에 대한 항체보다 낮았지만 지금 까지의 ELISA결과를 토대로 ELISA분석 KIT를 실험적으로 제작하였다. 기초가 된 ELISA방법은 indirect competitive ELISA시스템으로서 vomitoxin의 ELISA시스템과 유사한 점이 많았다.

즉 microtiter plate에 sulfamethazin-BSA conjugate를 100ng/well 씩 4C에서 하룻밤 coating 시키고 1%BSA용액으로 blocking시킨 다음 ELISA용 kit로 포장하였다. 실험에 사용된 항체는 500배로 희석한 다음 100㎕씩 첨가해야하기 때문에 100배로 희석하여 포장하는 것이 좋지만 실제로는 동결건조하여 포장하여둔 1mg포장단위가 취급하기에 훨씬 용이하기 때문에 포장항체는 1mgeksdnl로하여 실제 실험하는 연구자 스스로가 필요한분량대로 나누어 PBS에 녹여 쓰는 것이 매우바람지하다고 권유할 예정이다. 그러나 2차항체-HRP conjugate는 1000배로 희석시켜 포장하여 공급하며, 4C에서 보관하면서 사용하도록 안내할 예정이지만 저온포장수송에 필요하므로 주의해야 할 것이다.

그 외 실험에 사용되는 기질(ABTS)용액은 30 ㎎ ABTS를 90 ㎖ H_2O에 녹인 다음 포장하여 -20℃에 보관토록 하고 기질용액을 희석할 citrate buffer 및 반응정지시약 역시 각각 포장하여 실온에 보관토록 하며 특히 본 실험에 사용되는 표준 sulfamethazin의 경우 DMF나 methanol에 녹인 표준물질을 일정량씩 포장해서 -20℃에 보관케 하며 실제 실험시 PBS용액에 희석해서 0, 0.1, 1ppm로 농도별로 나누어 표준용액을 만들 수 있다.

가. Kit의 포장단위

본연구팀이 준비한 1 kit를 시료 30개를 처리하는 것을 기준으로하여 포장할 경우 다음과 같은 물질이 필요하게된다.

* coating, blocking된 microtiter well 35 line (8well/line)
* 표준 sulfamethazin용액(10ppm 5 ㎖:A액)
* ABTS용액(B액)
* sulfamethazin에 대한 항체(C액) 5 ㎖
* 2차 항체-HRP(D액:1000 배 희석액 5ml)
* Citrate buffer 25 ㎖(E액)
* 반응 정지액 25 ㎖(F액)

(coating 된 well, A, B, 액은 -20℃에 보관, C액,D액,E액과 F액은 상온에 보관)

나. 실험조작 protocol

실험용 kit 사용의 전체 과정을 간단히 요약하면 다음과 같이 요약할 수 있다.

㉠시료조제: 시료5g(ml) in 50ml tube- 30% MeOH(in PBS) 25ml과 65C water bath에서 30분간 방치- 진탕기에서 30분 혼합- 1,200rpm에서 10분간원심분리-상층액 -ELISA시료

㉡ 실험 준비 : 전처리된 시료용액과 표준sulfamethazine 용액 5 ㎖준비(A액)
*0.1N PBS에 희석

㉢ Coating, blocking 된 well 을 증류수로 washing ×3

㉣ 표준 용액(A액) 또는 시료용액 50 ㎕ 씩을 well에 각각 넣음

㉤ sulfamethazine에 대한 항체희석액(C액 50ul 씩well에 첨가

㉤ 37C, 2시간 반응- 2차 항체- HRP conjugate희석용액(D액) 50 μl/well →37C에 3분간 incubation.

㉥ 기질 용액 조제 : B액 1 ml + E액 10 ml + H_2O_2 4 μl을 혼합.

㉦ Well washing ×6

㉧ 기질용액 100μl씩 well에 주입 → 15분 incubation.

㉨ F액 100μl씩 well에 주입 → 반응정지.

㉩ 결과를 육안으로 비교 (단 *ELISA Reader있을 경우 410 nm에서 측정 비교, *실험에 사용하는 재료는 모두 1회용)

7. 면역분석법의 응용

가. 국내시료에 대한 분석

이상의 실험에서 얻은 결과를 바탕으로 실험적으로 제작한 면역분석 kit를 이용하여 국내에서 수집한 사료와 우유시료 각각 18점 및 36점에 대한 sulfamethazine분석을 하여 sulfamethzine의 잔류정도를 실험하였다. 표에서 보는 바와 같이 실제 시료 54점 중 우유2점만이 positive로 나타났고, 나머지는 모두 음성으로 확인되었다. 양성의 경우에도 그 함량이 각각 0.37, 0.52ppm으로 나타났다. 이러한 실험결과는 2가지 측면에서 생각해볼 수 있다. 그중 하나는 실험에 사용된 사료나 우유시료에 sulfamethazine이 2점의 시료외는 잔류하지 않고 깨끗한 시료였다고 생각할 수 있고 또 다른 관점에서 볼 때 비록 소량의 sulfamethazine이 잔류했을지라도 본 분석시스템의 감도가 낮아 잔류하는 sulfamethazine을 검색하지 못했기 때문으로도 생각할 수 있기 때문에 앞으로 보다 감도 높은 면역분석 시스템을 구축할 수 있도록 계속적인 연구가 요청된다.

Table 3-24. Detection of sulfamethazine from feed and milk samples by indirect competitive ELISA

Sample	Number of sample	Positive sample	Incidence(%)	Levels(ug/g)
Feed	18	0	0	0
Milk	36	2	5.5	0.37, 0.52
Total	54	2	1.8	0.37, 0.52

나. 수입시료에 대한 분석

한편 수입사료의 경우에도 26점의 시료 모두 음성으로 나타났다. 이는 앞서 국내시료에서 언급한바와 같이 시료중의 잔류 sulfamethazine의 없거나 혹은 본 면역분석시스템의 측정가능한 범위이하의 sulfamethazine이 있었을 경우 본실험에서 검색하기 어려웠을지도 모른다고 예측할수 있기 때문에 보다 민감도가 높은 면역분석 시스템을 구축하기 위한 계속적인 노력을 할 예정이다.

Table 3-25. Detection of sulfamethazine from imported feed by indirect competitive ELISA

Source	Number of sample	Positive sample	Incidence(%)
USA	21	0	0
China	5	0	0
Total	26	0	0

제4절 결론

1. 단크론성 항체를 개발하기위해 우선 sulfamethazine을 hapten 조제없이 바로 bovine serum albumin(BSA) 또는 ovalbumine(OVA)과 결합시켜 immunogen 또는 coating conjugate로 사용하였다.
2. 형질세포종세포(p3×63Ag8. v653)와 sulfamethazine-BSA를 면역시킨 암컷 BALB/c 마우스의 비장세포를 융합시켜 cloning 한 결과 sulfamethazine에 대한 단크론성항체를 생산하는 hybridoma cell 3주를 확보하였고, 개발된 hybridoma세포주(SMT-1-M5)를 mouse복강에 주입하여 얻은 복수의 항체역가를 조사한 결과 1: 100,000의 희석액에서도 역가를 나타내었다.
3. 생성된 sulfamethazine에 대한 단크론성 항체는 sulfamethazine에 매우 특이성을 보여 penicillin G, streptomycin, chrolampenicol, gentamycin 그리고 kanamycin과는 교차반응을 나타내지 않았으나 다른 물질에 대한 항체와 비교할 때 역가가 낮았다. 이 항체를 이용하여 sulfamethazine을 측정하기 위한 indirect competitive ELISA법을 확립하였고 50ppb-10ppm 수준의 sulfamethazine분석이 가능하였다.
4. Immunoaffinity column을 실험적으로 조제하여 식품 시료 중의 sulfamethazine을 정제하기 위한 조건을 확립하였다. Column은 먼저 10㎖ PBS로 씻고난 뒤 시료용액을 충진했으며 10㎖의 증류수와 10㎖의 PBS로 다시 column을 씻은 후 5㎖의 methanol로 처리시키면 대부분 column에 결합되어있는 sulfamethazine이 대부분 용출되었다. Immunoaffinity column으로 전처리한 시료를 ELISA 및 HPLC법으로 측정하여 회수율을 구한 결과 sulfamethazine의 경우 사료에서는 각각 50.9%, 54.7%를 보여 atrazine경우보

다 낮은 회수율을 보였다.

5. Sulfamethazine분석을 위한 실험적 ELISA kit 한셋트에는 다음과 같은 것이 포함되었다. 즉, 항체가 coating된 microtiter well이 35줄(12well/줄), 10ppm 농도의 표준sulfamethazine용액(A용액), 5㎖의 ABTS 용액(B용액), sulfamethazine에 대한 항체 5ml(C액), 2차항체-HRP희석액 5ml(D액), 25㎖의 citrate buffer(E용액), 25㎖의 정지용액(F용액) 등이다.
6. 개발된 모니토링 시스템으로 54개의 국내시료와 26개의 수입사료를 대상으로 sulfamethazine을 분석한 결과 국내생산 우유시료 2점에서 각각 0.37, 0.52ppm의 sulfamethazine이 잔류되어 있는 것으로 나타났다.

제5절 참 고 문 헌

1. Smither R, Lott AF, Dalziel RW, et al. Antibiotic residues in meat in the United Kingdom; an assassment of specific tests to detect and identify antibiotic resideus. *J. Hyg. Camb*, 85, 359-369(1980)

2. Bevill RF. Sulfonamides in Vet. phar. Theraph 6ed lowa State University press pp. 785-795(1988)

3. Mandel GL, Sandae MA. Antimicrobial agents. Goodman and Gilman. The pharmacological Basis of Therapeueics. 6thed, Macmillan Publishing Co, Inc, New York. pp. 1106(1980)

4. WHO Techinical Report Series 788: Thirty- fourth Report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain veteninary drug 1989 residuds in food. *WHO, Geneva.* pp. 32(1989)

5. Heeschen, W. H., and Sheldon, G.: Principles of and practical experiences with an integrated system for the detection of antimicrobials in milk. *Milchwissenschaft*, 51, 154(1996)

6. Dixson-Holland DE, Katz SE. Competitive direct Enzyme linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*, 71,: 1137-1140(1988)

7. Kohler, G. and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells producing antibody of predefined specificity. *Nature(London)*.256 : 495-501.

8. McKearn J. 1980. Cloning of hybridoma cells by limiting dilution in fluid phase. *Monoclonal antibodies, Hybridoma* : 374-430.

9. Candlish, A. A. G. Stimson, W. H. and Smith, J. E. 1985. A monoclonal antibody to aflatoxin B1 : detection of the mycotoxin by enzyme immunoassay. *Letters in Applied Microbiology*. 1 : 57-61.

10. Schiffman, A. P., Schütz, P. and Wiesner, H. U.: False negativi and positive results in testing for inhibitory substances in milk. 1. The influence of antibiotic residues in bulk milk on lactic acid production of starter cultures. *Milchwissenschaft*, 47, 712(1992)

11. Boison, J. O., Korsrud, G. O., Papich, M. G. and MacNeil, J. D.: Comparison of four commercially available rapid test kits with liquid chromatography for detecting PenicillinG residues in bovine plasma. *J. AOAC International*, 78, 1144.

12. McGrane, P., Rowe, M. T. and Anger, S.: Evaluation of Delvotest SP and Charm AIM-96 for the detection of a range of antibiotics in milk. *Milchwissenschaft*, 51, 330(1996).

13. Cham, S. E.: An integrated system monitoring milk for FDA "safe level" using Charmtest methods. *J. the Association of Food and Drug Officials*, 58, 17(1994).

14. Littlefield, N. A., Sheldon, W. G., Allen, R. and Gaylor, D. W.: Chronic toxicity/carcinogenecity studies of sulfamethazine in Fisher 344/N rats: two-generation exposure. *Food Chem. Toxicol.*, 28. 157(1990).

15. Heeschen, W. H., and Suhren, G.: Principles of and practical experiences with an integrated system for the detection of antimicrobials in milk. *Milchwissenschaft*, 51, 154(1996)

16. Thomas, M. H., Soroka, K. E. and Thomas, S. h.: Quantitative thin layer chromatographic multi-sulfonamide screening procedure. *J. Assoc. Chem.*, 66, 881(1983)

17. **김교준, 김상근, 강오동** : sulfadimethoxine**의 계육 및 계란내 이행잔류에 관한 연구. 농업기술연구소보**. 12, 349(1985)

18. Matusik, J. E., Sternal, R. S., Barnes, C. J. and Spone, J. A.:Conformation of identify by gas chromatography/tendom mass spectrometry of sulfathiazole, sulfamethazine, sulfachloropyridazine and sulfadimethoxine from bovine or swine liver extracts after quantitation by gas chromatography/electron-capture detection. 1991. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73, 529(1991)

19. **류재천, 양종순, 서자원, 김명수, 박종세: 식육중의 잔류항생 항균제의 검정에 관한 연구(II). 한국식품위생학회지**, 8, 9(1991).

20. Walker, L. V., Walsh, J. J.: High performance liquid chromatography of sulfonamides extracted from bovineand porcine muscle by solid-phase disperation. *J. Chromatography*, 595, 179(1992)

21. Takeda, M., and Akiyama, Y.: Rapid determination of sulfonamides in milk using liquid chromatographic separation and fluoreamine derivatization. *J. Chromatography*, 607, 31-?(1992).

22. Kitts, D. D.: Zhwng, M., Flett, E. B. and McErlane, K. M.: Comparison of sulfadimethoxine residue analyses insalmon muscle using HPLC and Charm II test. *J. Food Protec.*, 58, 678(1995).

23. **김은아, 곽해수, 박정남, 정충일: 우유에 내재하는 항생물질 검출방법의 비교. 한국낙농학회지**, 13, 110(1991).

24. Garden, S. W., and Sporns, P. Development and evaluation of an enzyme immunoassay for sulfamerazine in milk. J. Agric. Food Chem., 42, 1379(1994)

25. Korsrud, G. O., Papich, M. G. Fesser, A. C. E., Salisbury, C. D. C. and Macneil, J. D.: Laboratory testing of the Charm test II reseptor assay and the Charm farm test with tissues and fluids from hogs fed sulfamethazine, chlortetracycline, and penicillin G. *J. Food Protec.*, 59, 161(1996).

26. Charm, S. E., Zomer, E. and Salter, R.: Conformation of widespread sulfonamide contamination in northrast U.S. market milk. J. Food Protec., 51, 920(1998)

27. **정규생, 채명식, 김창동, 김종배: 액체 크로마토그라피를 이용한 동물 근육조직 중의 합성항균제 동시분석. 한국식품위생학회지**, 8, 25(1993)

28. Chrlsson, A., and bjœrck, L.: Liquid chromatography vertification of tetracycline residues in milk and influence of milk fat lipolysis on the detection of antibiotic residues by microbial assays and the Charm II test. *J. Food Protec.*, 55, 374(1992).

29. Deschamps, R.J., Hall, J.C. & McDermott, M.R., Polyclonal and monoclonal enzyme immunoassays for picloram detection in water, soil, plants, and urine, J. Agric. Food Chem., 1990, 38, 1881-1886.

30. Tishler. F., J.L. Sutler, J.N. Bathish, and H. E. Hagman, 1968. Improved method for determination of sulfonamide in milk and tissues. J. Agr. Food Chem. 16 : 50.

31. Morgan, M.R.A., McNerney, R., Matthew, J.A., Coxon, D.T. & Chan, H.W.S.(1983a) An enzyme-linked immunosorbent assay for total glycoalkalods in potato tubers. Journal of the Science of Food and Agriculture, 34, 593-598.

32. Gee, S.J., Miyanoto, T., Goodrow, M.H., Buster, D. & Hammock, B.D., Evaluation of an ELISA for the direct analysis of molinate in rice field water, Food and Agricultural Immunology, 1989, 1, 37-51.

33. Hall, J.C., Raymond, J.A. & Krieg, K.K., Immunoassays for the detection of 2,4-D and picloram in river water and urine, J. Agric. Food Chem., 1989, 37, 981-984.

34. Deschamps, R.J., Hall, J.C. & McDermott, M.R., Polyclonal and monoclonal enzyme immunoassays for picloram detection in water, soil, plants, and urine, J. Agric. Food Chem., 1990, 38, 1881-1886.

35. Aronold, D. & Somogyi, A.(1985) Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs, milk and eat : comparison of gas chromatography and radioimmunoassay, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 68, 984-990.

36. Hunter K. W., Brimfield, A.A., Miller, M., Finkelman, F.D. & Chu, F.S.(1985) Preparation and characterisation of monoclonal antibodies to the tricothecene mycotoxin T-2. Applied and Environmental Microbiology, 49, 168-172.

37. Kemp, H. A., Mills, E.N.C. & Morgan, M.R.A.(1986) Enzyme-linked immunosorbent assay of 8-acetyl-deoxynivalenol applied to rice. Journal of he Science of Food and Agriculture, 37, 888-894.

38. Arnold, D., VOM Berg, D., Boerts, A. K., Mallick, U. & Somogyi, A. (1984) Radioimmunological determination of chloramphenicol residues in musculature, milk and eggs. Archiv fur Lebensmittelhygiene, 35, 131-136.

39. Rohner, P., Schallibaum, M. & Nicolet, J.(1985) Detection of Penicillin G and its benzylpenicilloyl derivatives in cow milk and serum by means of an ELISA. Journal of Food Protection, 48, 59-62.

40. Robins, R.J., Morgan, M.R.A., Rhodes, M.J.C. & Furze, J.M.(1984a). Determination of quassin in picogram quantities by an enzyme-linked immunosorbent assay. Phytochemistry, 23, 1119-1123.

41. Selzer, G.B., and D. Banes. 1963. The detection and estimation of sulfonamide residues in milk. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 46 : 703

42. Harrison, R. O.; Goodrow, M. H.; Hammock, B. D. Competitive Inhibition ELISA for the s-Triazine Herbicides: Assay Optimization and Antibody Characterization. J. Agric. Food Chem. 1991, 39, 122-128.

43. Niewola, Z., Walsh, S.T. & Davies, G.E.(1983) ELISA for paraquat. International Journal of immunopharmacology, 5, 211-218.

44. Read, R.B., Jr., J.G. Bradshaw, A.A. Swartzentruber, and A.R. Brazis. 1971. Detection of sulfa drugs and antibiotics in milk. J. Appl. Microbiol. 21(5) : 806-808. detection of sulfa drugs and antibiotics in milk. J. Appl. Microbiol. 21(5) : 806-808

45. Krienke, W.A. 1950. Effects on acid production by lactic starters of various "Drugs" in milk from mastitis treated cows. Milk Plant Monthly. 39(4) : 32.

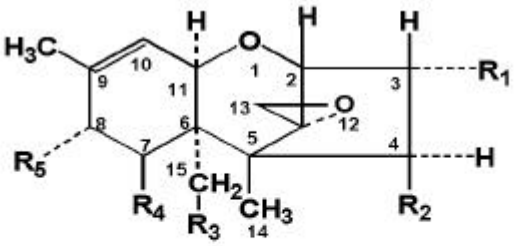
제4장 식품 중 곰팡이 독소(vomitoxin)의 첨단 면역분석기술 개발

제1절 서론

자연계에는 수많은 미생물이 함께 공존하고 있고, 이들 미생물 중 곰팡이는 큰 부분을 차지하고 있으면서 인류의 생활에 직접, 간접으로 영향을 미치고 있다[1]. 그 중 곰팡이가 생성하는 독소[2-4]는 식품 등의 안전성에 영향을 미치는 식품 위해 요소로 인식되면서 큰 사회문제로 대두되고 있으며, 세계 각국에서는 농산물의 수출입 과정에서 식품 속의 mycotoxin 오염 문제를 중요하게 취급하고 이에 대한 법적 허용규제 한도를 설정하여 수입 규제를 강화하고 있다[5-8]. 이러한 곰팡이 독소는 *Aspergillus, Penicillium* 및 *Fusarium*속 등의 곰팡이가 생산하는 2차 대사산물로 인간 및 가축에게 위해를 주는 물질이다. 이 중에서도 *Fusarium*속 곰팡이는 비교적 저온에서도 생육이 양호하며 저장 또는 가공중의 곡류 및 채소류의 부패에 관여하여 많은 독성물질을 생성한다[9-12]. 이러한 *Fusarium*속 곰팡이가 생성하는 독성물질을 *Fusarium* toxin이라 하며 이 중에서 가장 많은 비중을 차지하는 것이 trichothecene계 독소이다. trichothecene은 현재 180여종의 유도체가 알려져 있으며[13] 그 중에서도 농작물에서 빈번히 vomitoxin, T-2 toxin이 검출되고 있으며, T-2 toxin이 독성이 가장 강한 것으로 알려져 문제가 되고 있다[14-16].

Trichothecene은 Fig. 4-1에서와 같이 9, 10번 탄소에 이중결합을 가지고 있고 12, 13번 탄소에 epoxy환을 가지며 sesquiterpenoid 구조가 특징적인 화합

물로서[17] 기본형인 A-type, 8번 탄소에 carbonyl기가 있는 B-type, 2개의 epoxy환을 가진 C-type 및 macrocyclic 환이 있는 D-type이 있으나[18], 오염된 곡물이나 사료에서 검출되고 있는 것은 A-type(T-2 toxin)과 B-type(vomitoxin)이 대부분이다[19-21].



Trichothecene	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
DON	OH	H	OH	OH	=O
T-2 toxin	OH	CH_3COO	CH_3COO	H	$(CH_3)_2CHCH_2COO$

Fig. 4-1. Structure of trichothecene.

T-2 toxin(12, 13-epoxytrichothec-9-ene-3α, 4β, 8α, 5-tetrol, 4, 15-diacetate -8-isovalerate)은 융점이 151-152℃인 백색의 결정체로서 아세톤, 클로로포름, 에틸아세테이트 등과 같은 유기용매에 녹으며, 자외선 흡수성질이 없고, 자외선 하에서 형광성도 없으며 고체상태에서는 안정하나 알칼리에서는 HT-2 toxin, T-2 triol을 거쳐 T-2 teraol로 가수분해된다[22-24].

T-2 toxin을 생성하는 곰팡이로 동정된 것은 *Fusarium tricinctum*, *Fusarium poea*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium nivale*, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium acuminatum* 등이 있다. 이 중 옥수수로

부터 T-2 toxin을 생성하는 균으로 가장 먼저 보고되었다[25-27].

T-2 toxin이 물리, 화학적으로 안정하므로 곡류 등의 농작물에 일단 오염되면 제거하기 어렵고 가공, 조리 후에도 잔존하며 또한 오염된 사료를 섭취한 가축의 조직이나, 우유, 계란 등에 전이되어 이를 섭취한 인축에게 급성 또는 만성적인 건강장애를 유발하는 것으로 보고되고 있다. 실험동물에 대하여 사료의 섭취량 감소, 성장률 저해, 피부괴사, 구토, 설사, 신경장애, 면역기능의 억제[28,29], 조혈기관의 장애[14], 빈혈, 생식기관의 기능 억제작용을 하는 것으로 보고되어 있다. 특히 동물세포에서 단백질의 생합성 작용억제[30], 백혈구 감소증, 급성 혈관 손상, 강력한 피부점막 손상을 비롯하여 소장점막, 골수, 생식장기와 같은 증식성 세포의 핵 붕괴와 세포괴사 그리고 임파절, 비장, 흉선, 등의 면역조직에서 임파구의 핵 농축 및 감소에 의한 질병방어능력 저하, 태아기형, 위장염, 홍반 및 수종의 피부독성이 있다고 보고되어 있으나[31,32] 변이원성은 없는 것으로 알려지고 있다[33].

한편, vomitoxin은 DON이라는 명칭으로도 통용되고 있으며 그 화학식은 3α, 7α, 15-trihydroxy-12, 13-epoxytrichothec-9-en-8-one으로서 *Fusarium* 속 중 *Fusarium graminearum(Gibberella zeae)*과 *Fusarium sporotrichioides*가 생성하는 mycotoxin이다[34]. 1970년대 초 *Fusarium* 속에 감염된 곡류를 섭취한 가축이 구토를 일으키는 사례가 발생하였으며, Vesonder 등[36]에 의해 최초로 vomitoxin이 분리, 동정되었다[10,35-37].

특히, vomitoxin은 *Fusarium* 속이 생성하는 trichothecene계 독소 가운데 자연계에서 가장 많이 분리되는 독소로서 지역에 따라 다소의 차이는 있으나 vomitoxin 생성 균주는 세계적으로 널리 분포하고 있음을 알 수 있다[38]. vomitoxin과 인간의 보건 및 가축의 구토와 사료거부, 면역억제 등으로 생겨나는 잠정적 농업손실[39] 등 vomitoxin이 존재하는 곡물에 대한 위험이 심각한 문제로 대두되어, 많은 나라에서 vomitoxin에 대한 법적 허용수준 등에 관한 규제

법 등을 정해놓고 있는데 캐나다의 경우 연질밀 2 ppm, 유아식품 1 ppm 수준을, 그리고 미국 FDA의 경우 밀 완제품 1 ppm, 사료 5 ppm 수준을 규제치로 정해놓고 있으며, 소련의 경우 보건성의 규제치는 경질밀 1 ppm, 기타밀 0.5 ppm으로 상당히 엄격하다[10,40]. 그러나 우리나라의 경우 vomitoxin 등의 허용 기준치 등이 아직 설정되어 있지 않은 실정이어서 이에 대한 관심과 연구가 더욱 필요하다. vomitoxin이 오염된 곡물을 섭취한 사람이나 가축에 대한 공통적인 증상은 설사, 구토, 발열, 피부손상, 백혈구 감소 등을 나타내었다[15,36,39].

농산물에 오염된 곰팡이 독소를 확인하고 정량하는 방법에는 비교적 그 절차가 간단하고 비용이 적게드는 thin layer chromatography(TLC)가 많이 이용되어 왔다[41,42]. 그러나 TLC법은 검출감도가 낮은 문제점이 있어, gas chromatography(GC), high performance liquid chromatography(HPLC), gas chromatography-spectrometry(GC-MS)를 이용한 방법들이 정량을 위해 사용되고 있다. 일반적으로 곰팡이 독소는 미량으로 존재하기 때문에 많은 양의 시료가 필요하고 분석전의 전처리 조작들이 복잡하다. 또한 이러한 기기가 고가이고 넓은 공간과 전문인력을 필요로 하며 많은 유기용매를 사용하므로 실험자의 안전에 해로운 문제점들이 있어 새로운 분석방법의 필요성이 강력히 대두되었다[43,44].

이와 같은 문제점을 해소하기 위하여 동물체내에서나 세포융합에 의해 곰팡이 독소에 대한 항체를 생산하여 이를 농산물에 오염된 곰팡이 독소를 면역학적 분석법을 시도하고 있다. 면역학적 분석법에는 몇 가지 방법이 있으나 그 중 대표적인 것으로 방사선 동위원소를 표식(marker)으로 이용하는 방법으로 방사선 면역분석법(radioimmunoassay : RIA)과 효소를 이용한 효소 면역 분석법(enzyme linked immunosorbent assay : ELISA)을 들 수 있다. 그리고 특이 항체를 지지체인 bead에 부착시킨 소형의 immunoaffinity column을 이용하는 방법이 있다. RIA법을 이용한 곰팡이 독소 분석은 감도는 높으나 방사선 폐기

물의 위험성, 방사선 물질의 취급에 필요한 고가 장비나 위험에 대비한 취급 등의 문제점으로 인해 최근에는 이용이 편리하고 경제적 이점이 있는 ELISA법이 곰팡이 독소 분석에 이용되고 있다. ELISA법은 다량의 시료를 동시에 분석할 수 있으며, 복잡한 추출이나 정제과정이 없으며, 적은 양으로도 측정이 가능하며 분석 시간이 빠르다[40]. 이[16]는 T-2 toxin에 대하여 가장 민감한 ELISA법을 확립하여 0.1-100 ppb 수준까지 측정 가능하다고 보고하였으며, 강[44]은 zearalenone의 신속 검출을 위한 ELISA법을 확립하여 0.5-100 ppb 수준까지 측정 가능하였음을 보고한 바 있다. 그러나 vomitoxin의 경우에는 이 정도로 민감한 ELISA법을 확립하기가 어렵다[43-45].

본 연구는 국내식품을 비롯한 수입 농산물의 안전성 확보를 통한 국민 보건 증진이라는 궁극적 목표를 달성하기 위한 연구의 일환으로 현재 세계 각국에서 문제가 제기되고 있는 mycotoxin의 식품 내 오염량 측정을 위한 면역분석방법을 개발하기 위하여 지금까지 국내에서는 연구가 안된 *Fusarioum* mycotoxin중 vomitoxin을 실험대상으로 우선 vomitoxin에 대한 항원성을 인위적으로 부여하고 단일크론 항체 생산을 위한 hybidoma cell의 개발과 이들 단일크론 항체를 이용한 첨단분석 방법의 확립하고 이를 바탕으로 체계적인 vomitoxin 오염 현황을 모니터링하여 식품에의 vomitoxin 오염예방대책을 수립할 예정이다.

제2절 실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 실험재료는 다음과 같다. Polyethylene sorbitan monolaurate(Tween 20), 2,2'-azinobis(3-thylbenz-thiazoline) sulfonic acid(ABTS), hydrogenperoxide, Vomitoxin(DON), T-2 toxin, nivalenol, 3-Acetylvomitoxin, Deacetoxyscirpenol, Diethanolamine, p-Iodonitrotetrazolium violet(INT-violet) 등은 Sigma사로부터, antimouse-IgG-horseradish peroxidase conjugate, antimouse-IgG-Alkaline phosphatase conjugate는 Jacson사에서, Diaphorase, β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(β-NADH), alcohol dehydrogenase는 Boehringer mannheim사에서 TLC plate는 Merck사에서 No. 5553을 구입하여 사용하였으며, 그 외 사용한 시약과 유기용매는 특급을 사용하였다.

또한 microtiter plate 96well은 Dynex technologies사에서, ELISA Reader는 Bio Rad Model 550을 사용하였으며, HPLC는 Water Co. U.S.A.를 사용하였다.

2. 실험방법

가. Vomitoxin에 대한 기존의 분석법

기존의 vomitoxin분석법을 확립하기 위하여 먼저 TLC를 행하였다. 사용된 전개용매는 toluene : acetone : methanol(5 : 3 : 2, v/v) 혼합용액을 사용하였으며, 20% aluminum chloride anhydrous(20 g/60% ethanol 100 ㎖)용액을 분무하고 110 ℃에서 10분간 발색시킨 후 365 nm의 UV lamp하에서 관찰하였다. TLC법에서 1차적으로 확인된 spot는 시료의 경우 acetonitrile : water(84 : 16, v/v)용매로 추출하여 speed vacuum concentrator로 농축시켰다. HPLC 측정을 위하여 methanol 1 ㎖를 넣어 용해시킨 후 직경 2 ㎛ membrane filter(millipore filter)로 여과하여 여액을 주입하고 표준 vomitoxin과 비교 및 확인하였다. 이때의 HPLC 분석조건은 Table 4-1과 같았다.

Table 4-1. Analytical conditions of HPLC for determination of vomitoxin.

Column	μBondapak C18(3.9mm x 300mm steel column)
Mobile phase	methanol:water(14:86,v/v)
Flow rate	1.5ml/min
Pressure	1,800psi
detector	UV 222nm

3. Vomitoxin에 대한 immunogen 합성

가. Vomitoxin의 hapten 합성

항원을 체계적으로 합성하기 위하여 Ohtani 등의 방법에 준하여 먼저 vomitoxin 유도체를 다음과 같이 조제하였다. 즉, 0.5㎖ pyridine에 10㎎의 vomitoxin과 69㎎의 glutaric anhydride를 녹이고 95℃에서 3.5시간 방치한 후 0.5㎖의 증류수를 가하고 95℃에서 다시 30초간 반응시켰다. 반응물을 얼음으로 냉각시킨 다음 1.0㎖의 chloroform을 가하여 교반하고 1,500rpm에서 3분간 원심분리한 후 chloroform층만 취하여 건조시켜 vomitoxin-hemiglutarate를 얻었다.

나. Vomitoxin-hapten protein conjugate 합성

합성한 유도체 5㎎을 취하고 4㎖의 1% BSA와 80㎎ 1-ethyl-3-(3-diethyl aminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDPC)를 첨가하여 실온에서 하룻밤 방치한 후 반응물을 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 다음 0.05M PBS(pH 7.0)가 들어있는 1ℓ beaker에서 3일간 투석을 행하고 15,000rpm으로 10분간 원심분리한 후 280nm에서 단백질 농도를 측정하여 표준단백질(BSA, 분자량 66,000)과 처음 반응시 시작한 단백질의 양을 통하여 유도체 조제 시 vomitoxin(분자량 296)과의 반응비를 결정하여 최종 vomitoxin-BSA conjugate를 생산하였다.

4. Hybridoma의 개발

가. Immunization

Vomitoxin의 면역 역시 생후 6주된 BALB/c mouse(암컷)에 vomitoxin-BSA와 Freund's complete adjuvant의 혼합액을 마리당 100㎕씩 복강으로 면역하였다. 초기 면역 후 3주 간격으로 같은 방법으로 3회 추가접종을 실시하고 있으며, indirect competitive ELISA법으로 혈청의 antibody 형성이 양성으로 나타난 mouse에 대해서만 fusion 3일전 PBS으로 희석한 동량의 vomitoxin-HG-BSA conjugate를 복강 내로 주사하여 최종면역 하였다.

나. 항혈청 titer 측정을 위한 ELISA법 확립

Vomitoxin에 대한 mouse 항혈청 titer를 측정, 역시 competitive indirect ELISA법으로 진행하였다.

다. Cell fusion

Mycotoxin인 vomitoxin에 대한 단크론성항체생산을 위한 hybridoma cell line 개발을 위한 세포융합 역시 앞서의 실험방법에 따라 수행하였다,

융합이 끝난 혼합 세포액을 400gx에서 5분간 원침하고 20% 우태아 혈청, 10% NCTC,그리고 gentamicin(50ug/ml) 첨가된 DMEM에 부유시킨 다음 96-well 배양판에 well당 50ug씩 분주하여 37℃,6% CO_2에서 배양하였다.

융합된 세포만을 선택하기 위하여 Littlefield가 고안한 HAT(50uM hypoxanthine, 0.4uM aminopterin, 16uM thymidine)배지를 융합 후 1,3,5,및 7일에 well당 50ul씩 첨가하고, 10일에는 150ul씩 배지를 교환하여 15일까지 융합세포의 증식 유무를 역위상차 현미경으로 관찰하였다.

라. Cloning

융합 후 10일 내지 15일 사이에 융합된 세포가 well 바닥의 1/3이상 성장하였을 때 배양상층액을 채취하여 효소 면역측정법으로 항체를 분비하는 지의 여부를 검색하였다. 항체를 생산하는 well의 세포를 24 well plate에 옮겨 배양한 후 항체역가가 계속 유지되고 세포의 증식이 활발한 hybrid를 선택하여 cloning을 실시하였다.

Cloning은 Mckearn의 무한대 희석법으로 실시하였다. 24 well에서 성장하는 세포를 DMEM으로 희석하여 최종 10 30 cell/㎖의 농도로 조정하여 well당 100㎕씩 분주하여 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 aminopterin이 첨가되지 않은 배지를 이용하였다. 10일 배양 후 역위상차 현미경으로 1개의 세포집락이 형성된 well을 선택하고 항체생산 여부를 효소 면역측정법으로 검색하였다. 그 결과 항체의 역가가 높은 새로운 hybridoma 2세포주를 최종 선택하여 증식시키고, 106 cell/㎖로 조절된 배양세포를 cryo tube에 1㎖씩 분주하여 -70℃에서 급속동결한 후 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2년 동안의 실험에서 얻은 hybridoma가 생산하는 단크론성 항체가 불안정하여 계속해서 보다 안정하며 역가높은 항체를 생산하는 새로운 hybridoma 개발, 시료조제, 분석조건 개선 및 immunoaffinity column제작에 관한 실험을 다음과 같이 수행하였다.

5. 항체의 생산과 특성

가. 항체의 생산

개발한 hybridoma를 T-75 flask에서 대량 배양한 후 mouse의 복강에 이식하여 복수액을 생산하였다.

즉, 1주일전 복강에 pristane (2,4,10,14-tetramethylpentadecane, sigma co.)을 0.5㎖를 주입한 mouse에 대량 증식한 hybeidoma cell을 수거하여 세포수가 1.0×10⁷/0.2㎖ 되도록 조절하여 mouse의 복강에 주입하였다. 약 7-8일후 복강으로부터 복수액을 채취하여 원심분리한 후 상징액에 대하여 역가를 검정한 다음 실험에 사용하였다. 또한 각 융합잡종세포가 분비하는 단크론성의 항체 isotype을 조사하였다. 항체의 isotype결정은 Boehriner mannheim사의 mouse monoclonal antibody isotyping Kit를 사용하여 Boehriner mannheim사에서 제시한 방법에 따라 시행하였다.

나. 항체의 특성

채취한 복수액을 ammonium sulfate법으로 정제하여 항체의 반응성 및 특성을 조사하는데 사용하였다. 즉, 복수액을 2배량의 PBS용액에 희석한 후 포화 ammonium sulfate용액을 동량 가하여 30분간 실온에서 반응시킨 다음 10,000 xg에서 원심분리를하여 침전물을 회수하였다. PBS용액에 침전물을 재용해 한 다음 다시 45% ammonium sulfate용액을 동량가하여 실온에서 30분간 반응시키고 다시 10,000xg의 원심분리를하여 침전물을 회수하였다. 한번 더 45% ammonium sulfate용액으로 반복한 다음 PBS용액에 투석을 3일동안 3회 반복

하였다. 투석이 끝난 용액의 단백질량을 정량한 다음 항체의 반응성 및 특성을 조사하는데 사용하였다. 생산된 단크론성항체의 특이성을 조사하기 위하여 각 유해물질과 유사한 구조를 가진 화합물에 대한 교차반응성을 조사하였으며, 그 결과 생산된 항체는 vomitoxin에 특이성이 크고 다른 mycotoxin과는 교차반응을 보이지 않았다. 교차반응은 이성체들의 농도를 달리하여 흡착항원에 결합된 항체를 50% 유리시키는 농도를 산출하여 교차반응성(CR50)을 다음과 같이 계산하였다. CR50=(흡착 항원과 항체의 반응을 50% 억제할 수 있는 mycotoxin의 농도/ 흡착항원과 항체의 반응을 50% 억제할 수 있는 이성체의 농도)×100

6. ELISA법의 확립

융합잡종세포를 BALB/c 마우스에 투여하여 얻은 정제된 단크론성 항체를 이용하여 ELISA법을 확립하는 실험을 실시하였다. 유해잔류물질의 indirect competitive ELISA법을 확립하기 위해 coating법과 coating 시간. 유기용매와의 반응, 항체의 농도, 기질의 농도 및 반응시간이 ELISA법에 미치는 영향을 조사하고, 보다 개선된 ELISA법을 확립하였다.

7. ELISA분석을 위한 시료조제

가. 각종시료의 수집

*Fusarium*속 균주가 생성하는 vomitoxin의 경우 새로이 생성한 단크론성 항체를 이용한 ELISA법에 직접 적용하기 위한 실험을 실시하였다. 우선 식물성 시료로는 vomitoxin이 오염문제가 되는 곡류시료를 중심으로 수집하였다. 즉 쌀, 보리, 옥수수를 시중에서 구입하여 분쇄한 다음 ELISA용 시료조제에 사용하였고, .동물성 시료로는 urine과 혈액을 선택하여 ELISA 분석조건을 확립하는 실험에 사용하였다.

나. 식물성 시료조제

미세하게 분쇄한 쌀, 보리, 옥수수 시료 5g을 50mL 원심분리관에 취하고 5배의 60% MeOH를 가해 10분간 진탕시켰다, 이것을 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 PBS로 희석한후 ELISA용 시료로 사용하였다. 이때 회수율을 구하기위해 쌀, 보리, 밀, 옥수수 등의 시료에 100ppb, 1ppm의 농도의 vomitoxin을 첨가한 후 같은 방법으로 추출하여 ELISA를 행하였다.

다. 동물성 시료조제

1) Urine시료 조제

Vomitoxin 오염여부를 urine 시료에서 진단할 수 있는 ELISA 조건을 확립하기 위해 앞서 atrazine에서와 같이 제공받은 urine을 50mL 원심분리관에 취한 다음 urine을 먼저 10,000rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액의 ELISA 분석조건을 조사하였다.

2) 혈액시료 조제

제공받은 혈액을 50mL 원심분리관에 넣고 먼저 EDTA을 1mg/mL blood 농도로 첨가하여 1,500rpm에서 10분간 원심분리해서 혈장만 취한 다음 ELISA 분석을 위한 실험조건 확립에 사용하였고, 남은 시료는 4℃에 보관하면서 필요에 따라 실험에 사용하였다.

8. Imminoaffinity column 제작과 활용

가. 항체의 대량생산과 정제

Vomitoxine에 대한 항체의 대량생산 역시 지금까지의 BALB/c mouse 복수를 이용한 방법에서 달리하여 T-75 flask에서 대량 증식한 hybridoma cell을 Integra celline CL 350 flask에서 항체를 생산하였다. 즉 15% fetal calf serum(FCS)이 함유된 DMEM배지로 hybridoma cell을 1.0 x 10⁶/㎖로 조절한 다음 5㎖을 (A)에 주입하고 serum이 포함되지 않은 DMEM배지 350㎖을 (B)에 주입하여 37℃, 5% CO2 배양기에서 1주일동안 배양한 후 (A)를 통하여 2.5㎖의 항체가 포함된 cell 용액을 취하고 다시 15% FCS이 함유된 DMEM배지 2.5㎖을 보충하고 serum이 함유되지 않은 DMEM배지 350㎖로 교체하여 계속적으로 배양하였다. 이 후 3일 간격으로 반복 조작하여 항체를 생산하였다. 항체가 포함된 세포용액은 3,000rpm으로 원심분리하여 cell을 제거한 다음 실험에 사용하였다. 생산된 항체는 50㎖ tube에 모아 유안침전법으로 다시 정제하여 실험에 사용하였다. 즉, 상등액 절반 정도의 포화$(NH_4)_2SO_4$ 용액을 magnetic stirrer로 교반 하면서 1방울씩 떨어뜨려서 혈청을 침전시켜 분리하는 조작을 3회 이상 반복하였다.

수거한 혈청을 처음 량의 0.01M 인산완충용액 (phosphast buffered saline : PBS, pH7.3)에 녹이고 3일간 4℃에서 투석시킨 다음 원심 분리하여 침전물을 버리고 항체 역가를 측정하고, 4℃에 보관 하면서 IC-ELISA 및 ELISA 분석용 kit의 실험제작에 사용하였다.

나. Immunoaffinity column의 제작

농산물에 극히 미량으로 오염되어 있는 vomitoxin을 정제, 농축하기 위한 목적으로 affinity column을 제작하였다. Immunoaffinity column에 의한 vomitoxin의 정제원리는 앞서의 atrazine과 sulfamethazine의 경우와 같다. 이때 affinity column의 gel과 vomitoxin과의 결합 여부는 HPLC로 확인하였다.

다. IC-ELISA 분석 조건검토

각종 시료의 전처리를 위해 지금까지 화학분석법에서 행하여 오던 복잡한 정제과정을 생략하고 면역분석법으로 분석할 경우 다음과 같은 간단한 처리과정으로 정제하여 ELISA로 분석할 수 있는 조건을 확립하는 실험을 실시하였다. 즉, 시료 5 g을 50 ml 원심분리관에 넣고 25ml씩의 60% methanol과 혼합한 후, 표준 vomitoxin을 1ppm씩 spiking하여 실온에서 1시간 진탕시켰다. 이것을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 Whatman No.1로 여과하여 얻은 상징액을 5ml 취하고 15ml의 PBS로 희석한 것을 immunoaffinity column 에 loading 시켰다. 시료를 column에 loading 시키기 전 제작한 column을 10ml PBS로 씻고 시료를 3ml/min 속도로 loading 시켰다. 시료속의 vomitoxin을 gel에 흡착된 항체에 흡착시킨 후 다시 불순물을 10ml 증류수와 PBS로 세척한 다음 항체에 binding된 vomitoxin은 100% MeOH 3ml로서 용출시키고 질소 gas로 건조시켰다. 건조시료는 4℃에 보관하면서 필요에 따라 10% MeOH 1ml에 다시 녹여 ELISA용 시료로 사용하였다.

라. IC-HPLC 분석조건 검토

IC를 이용하여 조제한 시료를 HPLC에 연결하여 분석하기 위한 IC-HPLC 분석조건에 대한 실험을 하고 있다. 많은 시료를 빠른 시간에 정확히 분석하고자 할 때 정제된 시료가 얻어진다면 기기에 주입시켜 자동적으로 분석할 수 있다. 지금까지의 결과는 시료를 앞서 IC-ELISA와 같이 MeOH로 용출시키고 질소 gas로 농축한 후 4℃에 보관하면서 MeOH 100㎕에 녹여 여과한 다음 HPLC 분석용 시료로 사용하고있다. 이때의 HPLC 조건은 column은 uBondapak C18(3.9mm X 300mm steel column)을 사용하였고 Detector는 UV 222nm, Flow rate는 1.5 ml/min, Mobile phase는 methanol : water (14:86, v/v)이었다.

9. 잔류 vomitoxin의 면역분석 kit 실험제작

각종 시료 중에 잔류하는 vomitoxin의 면역분석을 위한 kit를 앞서 확립한 indirect competitive ELISA법을 활용하여 실험 제작하였다.

이를 위하여 확립된 ELISA 조건의 kit에서의 적합 여부, kit의 보관방법, kit 사용기간, 그리고 kit 1set당 포장될 각종 시액의 함량 및 kit의 사용 protocol에 대한 내용을 검토하였다.

10. 식품 중 vomitoxin의 검색

가. 시료의 수집

국내 및 수입식품 중에 오염가능성이 있는 vomitoxin의 검색을 위하여 지금까지 개발한 hybridoma를 이용하여 얻은 단크론성항체로서 확보한 ELISAkit를 이용한 분석을 실시하였다. 실제 시료에 적용하기 위해 국내시료의 경우 vomitoxin은 쌀, 보리 및 옥수수를 각각 27점, 49점 및 23점씩을 분석용 시료로 수집하였고, 수입식품의 경우 옥수수시료 23점 수집하여 실험에 사용하였다.

나. vomitoxin분석을 위한 시료조제 및 분석

미세하게 분쇄한 쌀, 보리, 옥수수 시료 5g을 50mL 원심분리관에 취하고 5배의 60% MeOH를 가해 10분간 진탕시켰다, 이것을 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 PBS로 희석한후 ELISA용 시료로 사용하였다. 이때 회수율을 구하기위해 쌀, 보리, 옥수수 등의 시료에 100ppb, 1ppm의 농도의 vomitoxin을 첨가한 후 같은 방법으로 추출하여 ELISA를 행하였다. 시료중의 면역분석은 앞서 indiredt competitive ELISA를 기초하여 실험적으로 제작한 면역분석 kit로 분석하였다.

11. Amplification method 확립과 응용

가. Amplification method 확립

Vomitoxin의 경우 항체를 이용한 ELISA를 확립한 결과 항체의 항원(vomitoxin)에 대한 민감도가 다른 mycotoxin에 비하여 상당히 낮았다. 따라서 민감도를 높이기 위하여 enzyme amplification ELISA법을 응용하였으며 그 반응원리는 Fig. 4-2와 같았다.

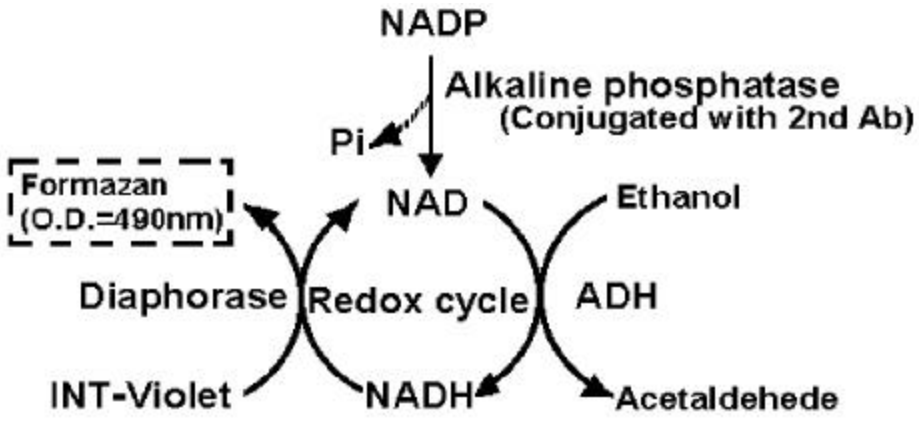


Fig. 4-2. The principle of an enzyme amplification system.

나. Amplification method의 응용

Enzyme amplification ELISA법을 실제 응용하기 위하여 vomitoxin 생성 균주 8개를 가지고 vomitoxin 생성정도를 확인하는 실험을 하였다. 먼저 이들균주를 배양하여 conidia를 생성한 다음, YES배지에서 배양하여 ethyl acetate로 추출한 후 유기용매층 1 mL을 취해 농축시킨 다음, 1 mL의 10% MeOH/PBS에 재 용해하여 amplification ELISA 실시하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. Vomitoxin의 기기분석

*Fusarium*속 곰팡이가 생성하는 mycotoxin인 vomitoxin의 기존의 분석법인 TLC 및 HPLC 분석법을 확립하여 필요한 경우 기기분석에 의한 vomitoxin의 분석을 행하여 개발된 면역분석법과 비교 할 수 있도록 조사확인하였다.

우선 vomitoxin의 TLC에 사용된 전개용매는 toluene : acetone : methanol (5 : 3 : 2, v/v) 혼합용액이 효과적이었고, 20% aluminium chloride anhydrous(20g/60% ethanol 100㎖) 용액으로 발색시킨 다음 100 110℃에서 10분정도 건조시킨 후 UV(365nm)하에서 관찰하였으며, 이때 얻은 표준 vomitoxin의 TLC chromatogram은 Fig. 4-3과 같이 나타났다.

Fig. 4-3. TLC chromatogram of standard vomitoxin.
(Developing solvent=toluene: acetone: methanol=5:3:2,v/v)

또한 표준물질의 HPLC chromatogram은 Fig. 4-4와 같이 나타났다.

Fig. 4-4. HPLC chromatogram of standard vomitoxin.

2. Immunogen의 합성

가. Hapten의 합성 및 확인

Vomitoxin을 비롯한 대부분의 mycotoxin은 분자량이 적어 동물의 체내에서 항원성이 없어 항체형성이 불가능하다.

따라서 이들 저분자물질에 대한 항체생산을 위해서는 vomitoxin과 단백질을 결합시켜 분자량을 인위적으로 증폭시켜 항원성을 부여하는 일이 매우중요하다.

그러나 vomitoxin은 단백질과 직접 결합할 수 있는 coupling site가 없어 단백질과 결합할 수 있는 hapten을 합성하는 것이 우선과제이다. Hapten의 합성은 앞서 언급한 바와 같이 Ueno 등의 방법에 따랐고, 합성된 vomitoxin hapten의 확인은 위의 TLC 조건으로 standard vomitoxin과 함께 전개하여 확인하였다. 그 결과 Fig. 4-5에 나타난바와 같이 표준 vomitoxin은 Rf치가 0.36인데 비해 vomitoxin hapten은 0.15로 나타나 vomitoxin이 유도체로 전환되었음을 확인할 수 있었다.

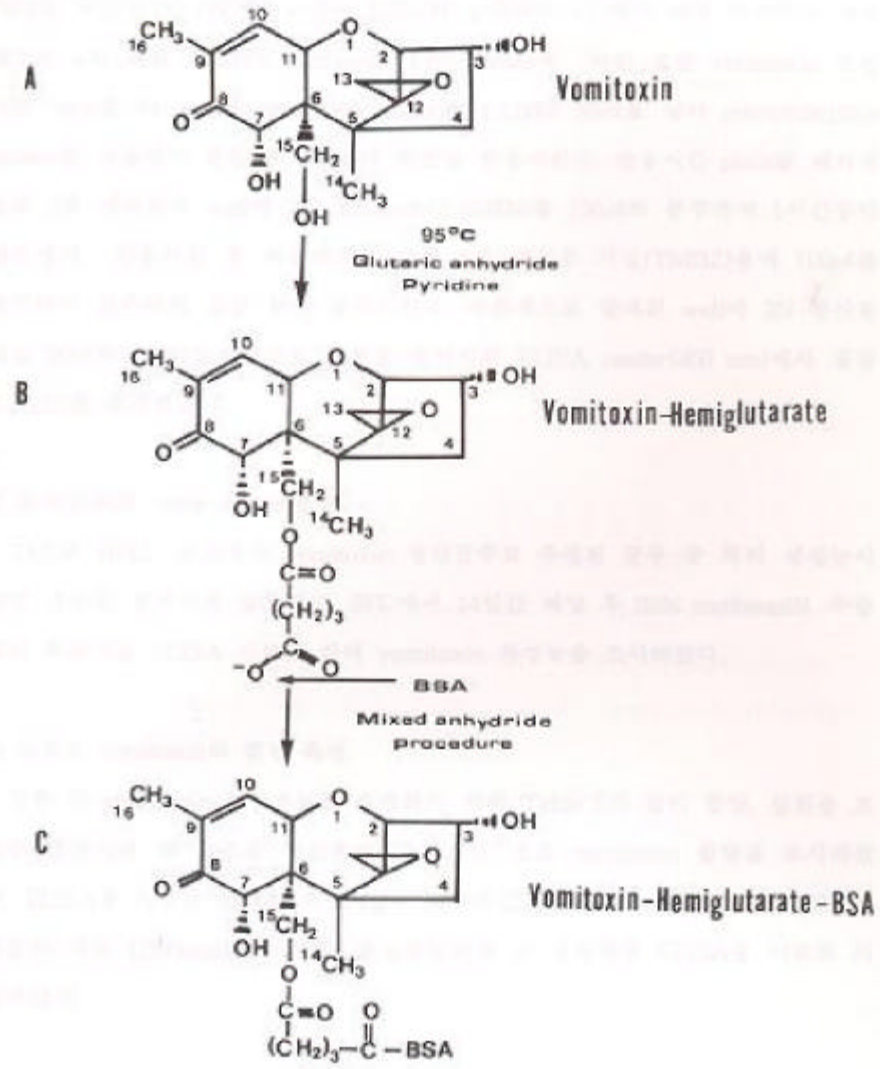


Fig. 4-5. Synthetic scheme for the procuction of the vomitoxin immunogen.

A : Vomitoxin, B: Vomitoxin-Hemiglutrate

C : Vomitoxin-Hemiglutrate-BSA

나. Vomitoxin-HG-BSA conjugate의 합성

합성한 vomitoxin-hemiglutarate 5㎎을 취하고 4㎖의 1% BSA와 80㎎ 1-ethyl-3-(3-diethyl aminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDPC)를 첨가하여 실온에서 하룻밤 방치시키면서 vomitoxin-HG-BSA conjugate를 합성하였다.

합성된 vomitoxin-HG-BSA conjugate의 확인은 우선 100ul conjugate를 7N 암모니아용액 100㎕과 섞은 다음 실온에서 하루 방치하면서 가수분해하여 BSA와 vomitoxin을 가수분해하였다. 가수분해가 끝난 시료는 질소가스로 건조시키고 더운 methanol 1㎖을 첨가하여 상징액을 취해 반응이 안된 BSA protein을 제거하고 다시 CHCl3 1㎖을 가하여 조용히 흔든 후 상징액만 취해 질소 가스하에서 건조하는 과정을 3회 반복하여 GC용 시료로 사용하였다. 건조된 시료에 TMS(N,O-bis(trimethylsilyl) acetamide : trimethylchlorosilane : trimethylsilylimidazole = 3 : 2 : 3) 처리 시약 100㎕을 첨가하고 교반기로 혼합한 후 그 중 2㎕를 GC에 주입하여 분석하였다. 이와 같은 방법으로 분석한 결과 처음 사용한 vomitoxin의 함량과 BSA가 결합된 vomitoxin은 가수분해하므로 분석된 vomitoxin량과 vomitoxin과 결합된 BSA 단백질량을 알아 본 결과 그 BSA 한분자에 vomitoxin 8.06분자가 결합된 것으로 나타났다.

3. 면역 및 항혈청 titer 측정

실험방법에 따라 hapten-BSA conjugate를 BALB/c mouse에 면역시키고, 면역된 mouse의 vomitoxin에 대한 항혈청 titer를 측정하였다. Titer의 측정은 indirect competitive ELISA법으로 실시하였다.

즉, 앞에서 합성한 vomitoxin-HG-BSA를 1㎖당 1㎍의 농도로 조절한 후 96well microplate에 100㎕씩 분주하여 4℃에서 하루 방치하여 coating시킨 후 세척액(PBS-tween)으로 4회 씻었다. PBS에 녹인 0.1% OVA를 well에 125㎕씩 분주하여 4℃에서 하루 방치하여 세척액으로 4회 세척 후 20% methanol PBS-tween에 녹인 표준 vomitoxin 과 희석한 혈청용액 50㎕를 각 well에 넣고 microtiterplate shaker를 사용하여 혼합 후 4℃에서 하룻밤 반응시켰다. 반응시킨 plate를 세척액으로 5회 세척하여 well에 2차 antibody(1:10,000)를 100㎕씩 분주하여 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 세척액으로 다시 6회 세척 후, 기질(TMBZ)용액 100㎕를 분주하여 실온에서 30분동안 발색시켰다. 푸른색으로 발색된 well에 2N-황산용액을 50㎕씩 넣어 노란색으로 반응을 정지시켜 ELISA reader(450nm)에서 흡광도(O.D.)를 측정하였다. 그 결과는 Table 4-2와 같았으며, 이때 vomitoxin에 특이한 항체를 생산하는 mouse의 spleen cell과 myeloma cell을 앞서의 방법대로 cell fusion하였다.

Table 4-2. ELISA titeration of vomitoxin antisera developed in mouse

(Unit:O.D)

Dilution	10	100	1,000	5,000	10,000	50,000	100,000
Normal	0.194	0.192	0.181	0.187	0.184	0.187	0.183
DON-4	1.340	1.114	0.659	0.342	0.212	0.191	0.188
DON-16	over	over	1.543	0.743	0.575	0.353	0.206

4. Hybridoma cell line 개발

가. 세포융합 및 cloning

Vomitoxin-HG-BSA conjugate로 면역시킨 20마리의 BALB/c mouse 중 7마리가 vomitoxin에 양성 반응을 보이는 항혈청을 생산하여 모두 세포융합을 실시하였다. Table 4-3에서 보는 바와 같이 융합 후 분주한 2380 well중 2023 well에서 융합된 세포가 성장하여 85%의 융합률을 보였다. 그러나 cloning 실험까지 끝내고 얻은 hybridoma의 항체 생성능이 양호하지 못하여 cloning을 계속하여 바람직한 hybridoma를 얻기 위한 실험을 하였다.

Table 4-3. Fusion and frequency of hybrids selected by HAT medium

Number of mice titer	Number of mice used in fusion	Number of mice wells seeded	Number of growth in HAT medium	Fusion rate (%)
20	7	2380	2023	85

융합 후 well상에 1/3 이상을 자란 세포가 보일 경우 상징액 50㎕을 취하여 비경쟁적 ELISA를 실시하여 항체의 생성여부를 관찰한 결과 총 43개의 well에서 반응을 나타내었다. 이 양성 반응을 보인 well의 모든 세포를 24 well plate에 옮겨 계속적인 배양하여 상징액 50㎕를 취해 이것을 10배 희석하여 비경쟁적 ELISA를 실시하여 양성 반응을 보이는 4개의 세포주를 일단계로 선택하여 cloning하였다.

Cloning은 24 well에서 성장하는 세포를 DMEM으로 희석하여 최종 10 30 cell/㎖의 농도로 조정하여 well당 100㎕씩 분주하여 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 aminopterin이 첨가되지 않은 배지를 이용하였다. 5-7일 배양 후 역위상차 현미경으로 1개의 세포집락이 형성된 well을 선택하고 항체생산 여부를 비경쟁적 효소면역측정법으로 검색하였다. 항체의 역가가 높은 hybridoma를 최종 선택하여 24 well plate, T-25 flask, T- 75 flask 순으로 증식시키고, cryo media로 106 cell/㎖로 조절된 배양세포를 cryo tube에 1㎖씩 분주하여 -70℃에서 급속동결한 후 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

나. 단크론성 항체의 생산 및 특성

1) Hybridoma개발

앞서 얻은 vomitoxin에 대한 항체생산이 가능한 4개의 hybidoma는 매우 불안정하여 지속적인 실험을 실시하는데 문제점이 많았다.. 따라서 안정된 성질을 가진 새로운 hybridoma를 얻기 위한 실험을 계속하였다. 그 결과 추가로 3개의 세포주를 확보하였으며 그 중에서도 DON-7-M3 hybridoma가 가장 안정하고 지속적인 연구수행에 적합한 세포주로 나타났다. 이들 hybridoma는 24 well plate, T-25 flask, T- 75 flask 순으로 증식시키고, cryo media로 106 cell/㎖로 조절된 배양세포를 cryo tube에 1㎖씩 분주하여 -70℃에서 급속동결한 후 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 단크론성 항체의 생산 및 특성

새로이 얻은 hybridoma인 DON-7-M3으로부터 vomitoxin에 대한 항체를 얻기 위하여 앞서 설명한 바와 같이 T-75 flask에서 대량 배양한 후 mouse의 복강에 이식하여 복수액을 생산하였다. 즉, 1주일전 복강에 pristane(2,4,10,14-tetramethylpentadecane)을 0.5㎖씩 주입한 mouse에 대량 증식한 hybridoma cell을 수거하여 세포수가 1.0×10⁷/0.2㎖ 되도록 조절하여 mouse의 복강에 주입하였다. 약 7-8일후 복강으로부터 복수액을 채취하여 원심분리한 후 상징액에 대하여 역가를 검정하였다 그 결과, mouse의 복강에서 얻은 복수의 역가는 Table 4-4에서와 같이 1 : 10,000에서 ELISA수행에 가능한 반응치를 보였다.

Ammonium sulfate법으로 정제한 복수액의 단백질함량은 21.3mg/ml이었으며 단크론성 항체의 isotype을 조사한 결과 IgG1을 생산하였으며 light chain은 κ형으로 나타났다.

Table 4-4. Dilution titer of anti-vomitoxin ascites fluid as determined by indirect competitive ELISA (Unit : O.D.)

Dilution	10	100	1,000	10,000	100,000	1,000,000
Normal	0.194	0.129	0.121	0.132	0.134	0.119
DON-4-M7	over	over	0.789	0.546	0.236	0.132

이렇게 얻은 vomitoxin 에 대한 단크론성 항체의 특성을 vomitoxin외에도 nivalenone, 3-acethylvomitoxin, deacetoxyscipenol, zearalenone, T-2 toxin 및 fumonisin등과의 교차반응으로 조사하였다. 그 결과 Table 4-5에서 보는 바와 같이 vomitoxin외에도 3-acethylvomitoxin,및 T-2 toxin과 약간의 교차반응을 보였으나 실험을 수행하는 데는 큰 문제가 없었으며 앞으로도 보다 나은 세포주 개발을 계속해 나갈 것이다.

Table 4-5. Cross-reactivity of vomitoxin analogues in indirect competitive ELISA

Analogue	Cross-reactivity(%)
vomitoxin	100
nivalenone	< 1
3-acethylvomitoxin	27
T-2 toxin	38
deacetoxyscipenol	< 1
zearalenone	< 1
fumonisin	

면역학적 방법에서 이용되는 항체는 다클론성항체와 단클론성항체 2종류가 있다.

다클론성항체는 500μg 전후의 면역원을 실험동물로서 주로 토끼에 면역시켜 얻는데 한번에 많은 양을 얻을 수 있는 장점이 있으나 여러 가지 특이성을 갖는 항체들의 집합체임으로 유사한 mycotoxin과 교차반응의 문제가 있어 특이성 감소로 mycotoxin분석에 장애요인이 되는 것이 대부분이다. 이러한 관계로 단클론성항체을 이용하는 연구가 되고 있다. 이 항체를 생산하기 위하여서는 동물세포 배양시설이 갖추어져 있어야 하고 clone을 분리하는데 많은 노력과 시간이 소요되는 단점이 있으나 한 번 확립된 clone 에 의하여 생산되는 항체는 한 종류의 특이항체를 생산하기 때문에 vomitoxin을 비롯한 mycotoxin을 분석하기 위하여 계속 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

5. 면역분석법의 확립

Vomitoxin에 대한 면역분석 조건을 몇 가지 조사하는 실험을 실시하였다. 즉 Mouse의 복강에서 얻은 다량의 항체를 정제하여 시료중의 vomitoxin 오염 여부를 조사하기 앞서 indirect competitive ELISA법을 확립하였다.

가. 항체의 희석

먼저, 본 실험실에서 제조한 항체의 최적 희석배수를 조사하였다. PBS에 항체를 1 mg/mL로 조절하여 100-25,600배 희석한 다음 well당 100 μℓ씩 첨가하여 icELISA법을 행하였다. 그 결과 Fig. 4-6에서 보는 바와 같이 300배 정도 희석하였을 경우 실험 가능한 반응치를 보였다.

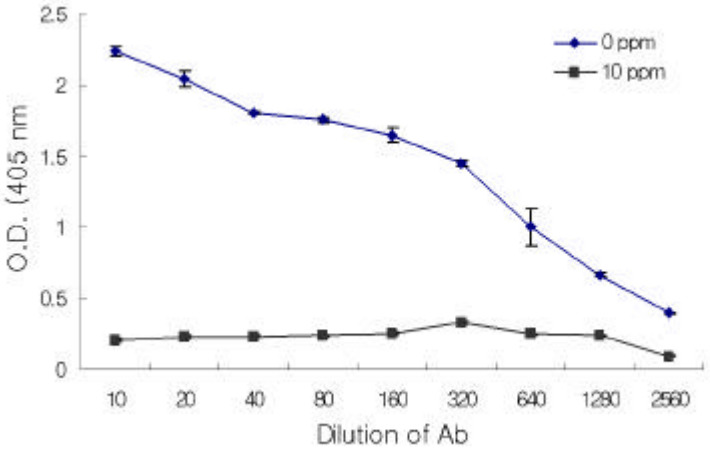


Fig. 4-6. Determination of optimum ratio of antibody dilution for ELISA for vomitoxin detection.

나. Coating **방법**

또한 coating conjugate**를** well**에 얼마나** coating**할 것인가를 조사하였다**. **우선 항체의 농도를** 1: 300**으로 희석한 다음** Indirect competitive ELISA **실시를 위해** microtiter plate**에** coating **하는** coating conjugate**의 적당한 함량을 조사하였다**. **즉**, vomitixin-HG-BSA conjugate**를 희석하여** 1,000ng/well, 200ng/well, 100ng/well, 20ng/well, 10ng/well **및** 1ng/well **농도로** coating**한 다음** ELISA**를 행하였다**. **그 결과** Table 4-6**에서 보는바와 같이** 100ng/well**에서 안정한 실험결과가 나왔으며 그 이상 희석은 어려웠고 반면** 200ng/well**도 실험결과는 안정하였지만** coating conjugate **소비가 많아 비경제적이므로 바람직하지 못하여 이후의** coating**량은** 100ng/well**로 고정하였다**.

Table 4-6. Effect of coating conjugate content per well on indirect competitive ELISA of vomitoxin (Unit : O.D.)

DON-HG-BSA (ng/well) / vomitixin(ppb)	1,000	200	100	20	10	1
0	1.343	1.312	1.212	0.417	0.296	0.118
100	0.334	0.228	0.219	0.178	0.156	0.104

일반적으로 coating conjugate의 coating 시간이 하룻밤동안은 너무 길다고 느껴 효과적인 coating 시간을 조사하였다. 즉, vomitoxin-HG-BSA conjugate 100ng/well을 주입하고 4℃에 1, 2, 3, 6, 12, 24시간 동안 반응시키고 coating conjugate 희석액을 뺀 다음 blocking을 하고 난 뒤, 4℃에 보관하면서 모든 실험구간이 준비되면 동시에 ELISA를 수행하였다. 그 결과 Fig.4-7에서 보는바와 같이 coating 시간이 1시간 이후가 되면 ELISA 수행에 이상은 없었으나 2시간 coating한 plate는 대단히 안정하다고 생각되었다. 그러나 실험을 일률적으로 수행하기 위해서는 coating을 시킨 후 하룻밤 반응시키면서 다른 실험을 준비하는 것도 실험의 효율상 바람직하다고 생각되었다.

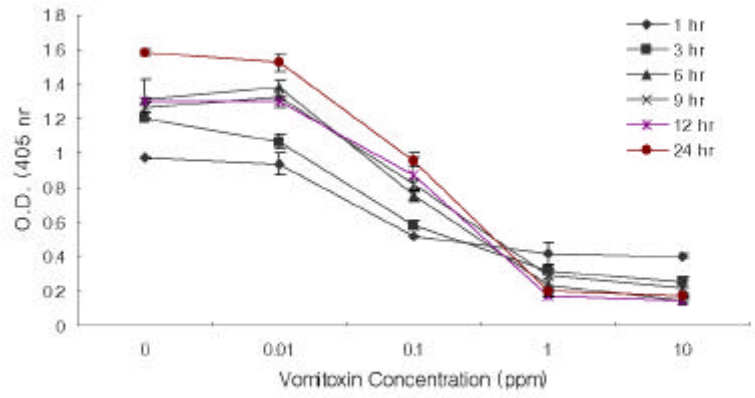


Fig. 4-7. Comparison of coating time of vomitoxin-BSA conjugate in ELISA for vomitoxin detection.

또한, coating 용액으로 coating buffer(carbonyl buffer, pH 9.6), PBS, PBS-tween을 사용하여 비교실험을 하였다. 그 결과 Fig. 4-8에서 보는바와 같이 PBS와 carbonyl buffer의 반응결과가 매우 비슷하게 나타났으나 PBS-tween은 반응하지 않았다. 따라서 실험수행을 위해 carbonyl buffer를 coating용액으로 사용하며, 필요한 경우 PBS도 coating에 함께 사용해도 문제가 없음을 확인할 수 있었다.

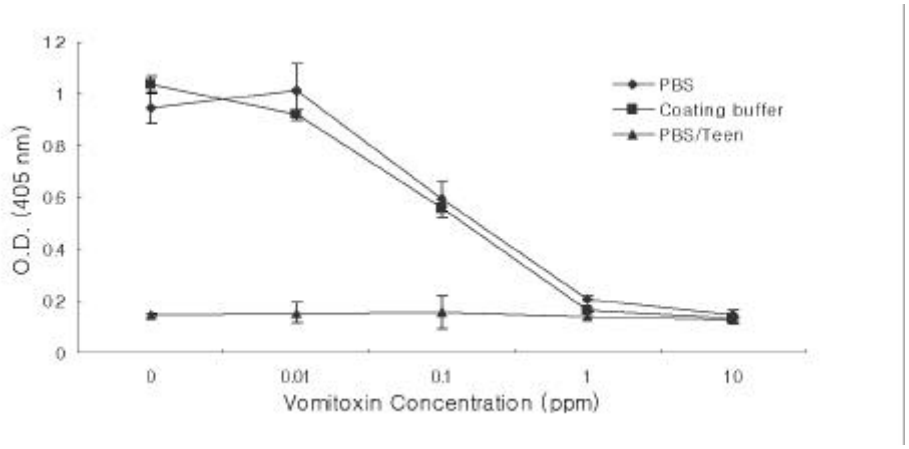


Fig. 4-8. Comparison of coating buffers in ELISA for vomitoxin detection.

다. pH의 영향

먼저 pH의 경우는 vomitoxin이 0ppb 및 100ppb가 spiking된 ELISA 시료 용액의 pH를 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9로 조절한 다음 ELISA를 실시하여 pH가 ELISA에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 4-7에서 보는바와 같이 pH 6.5- 8까지 대체로 ELISA 결과가 안정하였다.

Table 4-7. Effects of sample pH on ELISA reaction of vomitoxin.

Vomitoxin(ppb) \ pH	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9
0	2.121	2.042	2.121	2.196	2.082	2.175	1.961
100	1.613	1.740	1.782	1.725	1.771	1.631	1.725

라. 유기용매의 영향

효과적인 vomitoxin**의 추출을 위한 유기용매의 선정과 농도의 조사가 필요하였다. 이에 각종 유기용매 즉** MeOH, EtOH, hexane, chloroform, acetone, benzene, DMF **등을 가지고 실험하고 있다. 우선 각 유기용매를 사용하여 시료를 추출한 다음 이 액을 질소** gas**로 건조시키고, 다시** 100 500㎕**의 동일 유기용매로 용해시켜 용매의 농도가** 10%, 20%, 30%, 40% **및** 50%**가 되게** PBS**로 희석하여 전체액량을** 1mL**로 조정하고, 여기에** vomitoxin**을** 0ppb, 100ppb**되게** spike**한 후** ELISA**를 실시하였다. 그 결과** Table 3-8**에서 보는바와 같이** MeOH **와** EtOH**의 경우** 30%**까지 실험이 가능한 것으로 나타났으나 그 외의 농도와** hexane, chloroform, acetone **및** DMF **등은** vomitoxin**에 나쁜 영향을 주는 것으로 나타났다. 그러나 전반적으로** vomitoxin**의 경우 감도가 낮고 불안정하여 조건을 개선하기 위한 실험을 계속할 것이다.**

Table 4-8. Effects of organic solvents on ELISA reaction of vomitoxin

Solvent / Conc(%)	MeOH	EtOH	Hexane	Chloroform	Acetone	Benzene	DMF
10	2.117	2.107	1.812	1.925	1.402	Over	0.792
20	2.101	1.962	1.682	1.872	0.924	Over	0.426
30	1.421	1.274	1.526	1.826	0.725	Over	0.292
40	0.845	0.926	1.387	1.872	0.425	2.212	0.229
50	0.426	0.439	1.245	0.809	0.302	Over	0.226

한편, 실제 시료에서의 vomitoxin 정량시 시료중의 vomitoxin을 추출하기 위해 여러 가지 추출용매를 사용해야 하며 대체로 vomitoxin의 경우 methanol이나 acetonitrile에 쉽게 용해되므로 이들을 추출용매로 사용하고 있으며 본 실험에서는 methanol을 사용하고 있다. 그런데 ELISA 수행시는 추출용매로 사용되는 methanol 자체가 항체나 효소활성에 영향을 미칠 것으로 예측되어 methanol을 농도별로 첨가하여 그 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 4-9에서 보는 바와 같이 30% methanol의 농도이상에서부터 급격히 반응치가 줄어드는 것으로 나타났다.

Table 4-9. Effect of methanol on indirect competitive ELISA of vomitoxin

(Unit : O.D.)

MeOH(%) / Vomitixin (ppb)	0	10	20	30	40	50	70	90
0	1.177	1.175	1.172	1.152	1.032	0.927	0.842	0.636
1,000	0.117	0.118	0.121	0.132	0.246	0.292	0.356	0.511

마. 발색시간의 영향

또한 최적의 발색시간을 설정하기 위하여 10분 간격으로 발색정도를 측정한 결과 Table 4-10에서 보는바와 같이 시간이 경과할수록 높은 반응치를 나타내었으나 통상적으로 ELISA에서 사용하는 시간인 30분에서 O.D치의 차이가 1.0이상으로 나타나 이 시간이 적당할 것으로 생각되었다.

Table 4-10. Effect of incubation time of substrate on indirect competitive ELISA of vomitoxin. (Unit : O.D.)

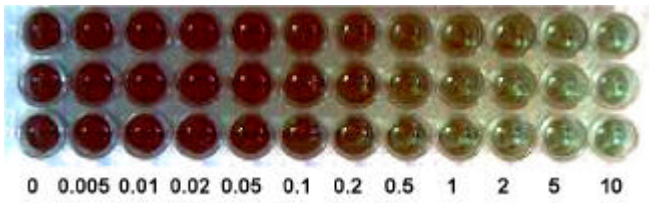
Time(min) / vomitixin (ppb)	10	20	30	40	50	60
0	0.726	0.827	1.117	1.225	1.327	1.472
1	0.678	0.875	1.031	1.149	1.318	1.392
10	0.392	0.454	0.569	0.754	0.945	1.274
100	0.132	0.157	0.211	0.236	0.263	0.301
1,000	0.084	0.109	0.118	0.079	0.107	0.174

이상과 같이 vomitoxin 분석을 위한 icELISA 조건을 정리하여 확립한 과정은 Fig. 3-9과 같다. 즉 vomitoxin-BSA를 완충액(coating buffer)에 녹여 microtiter plate에 100 ㎕씩 주입한 다음 4 ℃에서 하룻밤 방치하여 코팅한 후 세척용 완충액으로 3회 세척한다. 항체의 비 특이적인 반응을 방지하기 위해 PBS에 녹인 0.5% skim milk를 가하여 하룻밤 4℃에 방치한 후 세척용 완충용액으로 3회 세척한다. 세척한 plate에 표준 vomitoxin 또는 배양물과 vomitoxin-Ab를 300배 희석하여 각각 50 ㎕씩 well에 주입하고 다시 4℃에서 하룻밤 반응시킨다. 반응시킨 plate를 세척용 완충액으로 5회 세척하고 1 : 2,000으로 희석한 2차 항체(anti-mouse IgG-HRP)를 100 ㎕씩 분주한 다음 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 세척용 완충액으로 다시 6회 세척하고 기질용액(ABTS) 100 ㎕를 분주하여 실온에서 30분간 발색시킨 후 stopping reagent를 50 ㎕씩 가해 반응을 정지시킨다. 이것을 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 vomitoxin 함량을 계산한다.

이러한 실험결과를 토대로 ELISA를 행한 결과 Fig. 4-9와 같이 농도에 따라 반응결과가 분명하였고 그 발색정도를 ELISA reader로 O.D. 값을 측정하여 표준곡선을 만들었을 때 Fig. 4-10와 같았으며 0.05-10 μg/mL 수준으로 측정 가능하였다.

Coat plates with 100 ng of vomitoxin-BSA/100 μℓ coating buffer
↓
Stand at 4℃ overnight
↓
Wash plate 3 times with PBS-Tween
↓
Block with 0.5% skim milk
↓
Wash plate 4 times with PBS-Tween
↓
Add DON standard or test sample extract
Add 300 times diluted anti-vomitoxin Ab solution with PBS
↓
Incubate at 4℃ overnight
↓
Wash plate 5 times with PBS-Tween
↓
Add 2000 times diluted anti-mouse-IgG-HRP solution
↓
Incubate at 37℃ for 1 hr.
↓
Wash plate 6 times with PBS-Tween
↓
Add 100 μℓ substrate (ABTS)
↓
Color development at room temperature for 30 min.
↓
Add stopping-reagent
↓
Read by ELISA reader at 405 nm

Fig. 4-9. Flow chart of indirect competitive ELISA for vomitoxin detection.



Vomitoxin concentration (ppm)

Fig. 4-10. Microtiter plate for detection of vomitoxin by indirect competitive ELISA (HRP/ABTS Method).

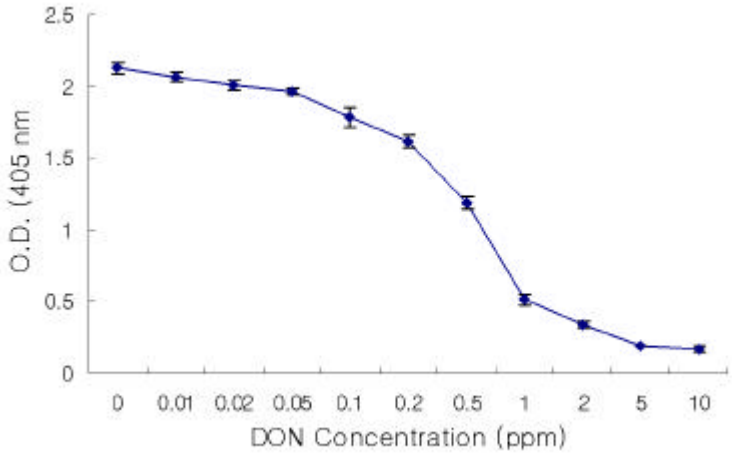


Fig. 4-11. Standard curve of vomitoxin by competitive indirect ELISA.

6. ELISA분석을 위한 시료조제

가. 각종시료의 수집

식품 속의 유해 잔류물질 중 vomitoxin과 같은 곰팡이독소는 쌀을 비롯한 전분질 식품원료나 이를 동물이나 사람이 섭취하였을 urine이나 serum에 잔존할 가능성이 높으며 그 잔류량과 곰팡이독소중독증(mycotoxicosis)의 발생빈도와 밀접한 상관관계를 가지는 것으로 보고되고 있다. 따라서 vomitoxin의 분석법을 확립하기 위한 시료의 수집을 식물성시료로는 쌀, 보리, 옥수수를 시중에서 구입하여 분쇄한 다음 시료조제에 이용하였고, 동물성시료로는 urine과 혈액을 경상대학교 일반외과학교실에서 제공받아 ELISA 분석을 위한 시료조제에 사용하였다.

나. 식물성 시료조제

미세하게 분쇄한 쌀, 보리, 옥수수 시료 5g을 50mL 원심분리관에 취하고 5배의 60% MeOH를 가해 10분간 진탕시켰다, 이것을 3,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 PBS로 희석한다음 ELISA용 시료로 사용하였다. 이때 회수율을 구하기 위해 쌀, 보리, 옥수수 등의 시료에 100ppb, 1ppm, 10ppm의 농도의 vomitoxin을 첨가한 후 같은 방법으로 추출하여 ELISA를 행한 다음 회수율을 구한 결과 는 Table 4-11과 같았다.

Table 4-11. Recovery of vomitoxin from rice and barley samples by indirect competitive ELISA.

Sample	Vomitoxin added (ppm)	Recovery			
		ppm	±SD	(%)	CV(%)
Rice	0.1	0.201	0.031	201	15
	1.0	1.072	0.029	107	2.7
	10.0	9.842	0.937	98	9.5
Barely	0.1	0.183	0.042	183	22.9
	1.0	1.102	0.106	110	9.6
	10.0	10.227	1.003	102	9.8

Table 4-12. Recovery of vomitoxin from corn samples by indirect competitive ELISA

Sample	Vomitoxin added (ppm)	Recovery			
		ppm	±SD	(%)	CV(%)
Corn	0.1	0.092	0.037	92	40.2
	1.0	0.894	0.213	89	23.8
	10.0	8.274	1.003	102	12.1

다. 동물성 시료조제

1) Urine시료 조제

Vomitoxin 오염여부를 urine 시료에서 진단할 수 있는 ELISA 조건을 확립하기 위해 앞서 atrazine에서와 같이 제공받은 urine을 50mL 원심분리관에 취한다음 urine을 먼저 10,000rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 ELISA시료로 하였다. 한편 urine에 표준 vomitoxin을 0.1- 100ppm까지 spiking한 다음 상기와 같이 원심분리 하여 상등액으로 표준곡선을 작성하여 PBS에서 작성한 표준곡선과 비교한 결과는 다음과 같았다. Table 4-13에서 보는 바와 같이 대체로 PBS에서 작성한 표준곡선에 비하여 O.D.값이 높게 나타났으며 실제 시료 적용시 측정 가능한 범위는 0.5ppm에서부터였다. 한편 FDA에서의 곡류에서의 vomitoxin권고수준은 1ppm으로서 본실험의 적용이 가능하였으나 보다 감도높은 분석조건이 필요한 것으로 생각되어 실험을 계속하고 있다.

Table 4-13. ELISA results of standard vomitoxin spiked on urine.

Vomitoxin(ppm)	0	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10
PBS	2.117	2.061	2.025	1.959	1.782	1.546	0.888	0.553	0.337	0.195	0.180
Urine	2.201	2.215	2.209	1.832	1.538	1.538	0.982	0.982	0.491	0.238	0.216

2) 혈액시료 조제

혈액에 잔류하는 vomitoxin의 함량을 측정하기 위한 시료의 조제는 앞서 설명한 바와 같이 혈액을 50mL 원심분리관에 넣고 먼저 EDTA을 1mg/mL blood 농도로 첨가하여 1,500rpm에서 10분간 원심분리해서 혈장만 취한 다음 ELISA분석을 위한 시료를 조제하였다. 즉 혈청 200㎕를 microcentrifuge tube에 취하고 0.5㎕ acetic acid를 첨가하여 용액을 pH4.0정도로 산성화한 다음 chloroform 200㎕를 넣고 1분간 vortex하였다. 혼합액을 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 다음 chloroform층 100㎕를 취하여 질소gas하에서 건조시켜 다시 100㎕의 10% methanol-PBS 용액에 녹여 ELISA 시료로 하였다. 이때 표준 vormitoxin을 농도별로 첨가하여 표준곡선을 작성하여 본 결과는 Table 4-14에서와 같이 대체로 O.D 값이 높게 나타났고 혈청의 경우 50ppb부터 분석이 가능한 것으로 나타났다.

Table 4-14. ELISA results of standard vomitoxin spiked on serum

Vomitoxin(ppm)	0	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10
PBS	2.117	2.061	2.025	1.959	1.782	1.546	0.888	0.553	0.337	0.195	0.180
Serum	2.104	2.113	2.161	2.006	1.923	1.627	0.925	0.638	0.412	0.203	0.193

7. Immunoaffinity column의 제작과 활용

가. Immunoaffinity column의 제작

농산물을 비롯한 시료에 소량 오염되어 있는 vomitoxin을 특이적으로 정제하기 위해 앞서 설명한바와 같이 immunoaffinity column을 실험 제작하였고, 사용한 항체는 실험방법에서 언급한 바와 같이 Integra celline CL 350 flask에서 배양한 것이었다. 앞서의 방법으로 gel에 vomitoxin에 대한 항체를 1㎎ 항체/㎎ gel 및 5㎎ 항체/㎎ gel의 농도로 부착시킨 후 column에 packing한 후 먼저 gel에 항체가 효과적으로 흡착되었는지의 여부를 실험하였다. 먼저 gel용액과 항체용액을 각각 100㎕씩 취한 후 1900㎕의 PBS로 10배 희석한 후 1N HCl 20㎕을 가하고 pH를 낮추었다. 이 용액을 200 400nm에서 spectrophotometer로 scanning을 하였다. 그 결과 atrazine에서와 같이 280nm에서 흡광치를 보여 용액 중에 항체 단백질이 존재함을 알 수 있었다. 한편, 1㎎ 항체와 5㎎ 항체를 1㎎ gel에 흡착시킨 다음 항체와 gel이 혼합된 상등액을 200㎕ 취하고 1800㎕의 PBS와 20㎕의 1N HCl을 혼합하여 위와 같은 방법으로 scanning을 실시한 결과 용액 중에는 대부분의 항체 단백질의 gel에 효과적으로 결합되었음을 확인할 수 있었다.

한편, 시료 정제시 column의 gel에 부착되어 있는 유리 vomitoxin이 결합되어 이를 metanol로 용출한 경우, 그때 사용되는 methanol의 적당량을 결정하기 위한 실험을 실시하였다. 즉, 10㎍의 vomitoxin을 제작한 immunoaffinity column에 흡착시킨 후 상법에 따라 10㎖의 PBS와 증류수로 세척하고 매 tube에 1㎖씩 10개의 tube에 methanol 용출액을 모아 ELISA로 측정하여 최적 용출

액의 양을 결정하였다. 그 결과 Fig. 4-12에서 나타난 바와 같이 대부분이 4번째 tube까지 용출되어 나왔으나 실험의 안정성을 위하여 5번째 tube까지 용출시켜 실험에 사용하였다.

이들 column의 vomitoxin 정제 정도를 알아보기 위해 먼저 10㎖의 PBS로 column을 세척한 다음 표준 vomitoxin을 10㎍씩 PBS에 녹이고 (이때 methanol 농도가 10%이하가 되게함.) 5㎖/min의 유속으로 전처리 column에 흡착시키고 다시 10㎖의 증류수와 PBS로 세척하였다. 항체와 결합된 vomitoxin은 5㎖의 methanol로서 유출시키고 이를 질소 gas하에서 농축시켰다. 이를 4℃에 보관하면서 필요에 따라 소량의 methanol로 재용해시켜 ELISA 및 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 한편, 10㎍ 및 1㎍의 표준 vomitoxin을 spiking한 immunoaffinity column에 회수율을 구하기 위하여 실험하였다. 즉 affinity column에 흡착된 vomitoxin을 5㎖의 methanol로 용출시켜 질소 gas로 농축시킨 시료를 100㎕의 methanol에 녹여 ELISA법으로 분석하였다. 이들 immunoaffinity column의 회수율은 Table 4-15와 같이 1㎍의 vomitoxin을 spiking시켰을 때 81%의 회수율을 보였고, 10㎍의 vomitoxin을 spiking시켰을 때 74%의 회수율을 보였으며 이를 이용한 immunoaffinity column-ELISA 및 immunoaffinity column-HPLC 시스템 확립을 위한 연구를 하였다.

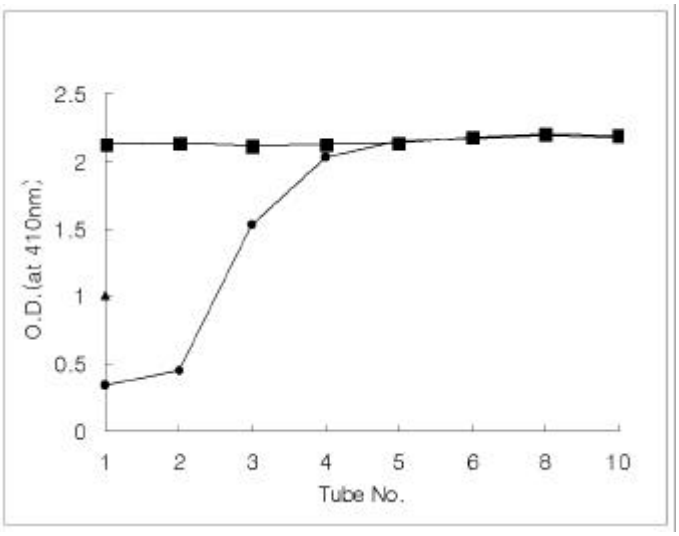


Fig. 4-12. Effective volumn for elution of 10㎍ vomitoxin in different immunoaffinity column.

■ : Control (non vomitoxin loaded)

● : Column packing 1㎎ gel binded 5㎎ antibody

Table 4-15. Recovery of vomitoxin created with immunoaffinity column.

vomitoxin(㎍)	Recovery(%)
10㎍	74
1㎍	81

나. Immunoaffinity column의 조건개선

Vomitoxin은 atrazine 보다도 단크론성항체생산을 위한 hybridoma의 개발이 늦었다. 그러나 상당한 노력으로 ELISA실험조건을 개선하고 있다. Immunoaffinity column의 경우도 충분한 사용조건을 조사하지 않아 실제 회수율이 매우 낮았다. 따라서 실험 제작한 Immunoaffinity column의 회수율을 높이고 사용조건을 개선하기 위하여 다른 유해물질과 같이 몇 가지 실험을 행하였다.

1) Immunoaffinity column의 binding capacity

실험 제작한 Immunoaffinity column의 vomitoxin에 대한 column 내에서 결합능력 정도를 알아보기 위하여 실험하였다. 즉, 10%MeOH 10㎖(in PBS)속에 500ng, 1000ng, 2000ng, 3000ng, 4000ng, 및 5000ng의 vomitoxin을 함유하게 한 다음 column에 loading하고, methanol로 column에 흡착된 vomitoxin을 유리시키고, 20%MeOH로 희석하여 잔류 vomitoxin을 측정하였다.

Table 4-16. Binding capacity of vomitoxin by immunoaffinity column

Loaded vomitoxin on column (ng)	Amount of vomitoxin (ng)	Recovery ratio (%)
500	512	102
1000	984	98
2000	1012	50
3000	980	33
4000	1103	27
5000	1285	25

2) Loading solution의 pH

한편 immunoaffinity column의 loading solution의 pH를 조사하기 위해 pH 4, 5, 6, 7, 8, 9로 조절된 solution에 표준 vomitoxin을 500 ppb 첨가하여 column에 loading하여 elution된 것의 vomitoxin 활성을 조사하였다. 그 결과 Table 4-17에서 보는 바와 같이 pH 6 8 사이에서 대체로 96% 이상의 회수율을 보여 우리가 사용하고 있는 PBS를 loading solution으로 사용하거나 유기용매의 희석에 사용하는 것이 큰 문제가 없는 것으로 나타났다.

Table 4-17. Effect of loading solution pH onto immunoaffinity column of vomitoxin.

Loaded vomitoxin (ng)	pH	vomitoxin recovered (ng)	Recovery ratio (%)
500	4	173	34.6
	5	267	53.4
	6	519	103.8
	7	482	96.4
	8	521	104.2
	9	374	74.8

3) Loading solution의 함량이 회수율에 미치는 영향

Vomitoxin을 500ng을 여러 부피에 spike시킨 다음 용량이 vomitoxin의 회수율에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 4-18에서 보는 바와 같이 용량이 40ml이상이 되면 오히려 sulfamethazine의 회수율이 떨어지는 것으로 나타났다.

Table 4-18. Effects of loading volume of vomitoxin extract onto immunoaffinity column.

Spiked vomitoxin (ng)	Loaded volumn (ml)	Recovered vomitoxin (ng)	Recovery ratio (%)
500	10	470	94.0
	20	491	98.2
	30	512	102.4
	40	503	100.6
	50	456	91.2
	60	479	95.8

4) 희석 용출량

한편 immunoaffinity column에 흡착된 vomitoxin을 용출 시키는데 필요한 methanol의 함량을 조사하기 위하여 용출액 1, 2, 3, 4, 5 ㎖별로 각 ㎖에 함유된 vomitoxin의 함량을 점검하였다. 그 결과 Table 4-19에서 나타난 바와 같이 3㎖의 methanol 용출액에 거의 대부분의 vomitoxin이 용출되어 나오는 것으로 나타났다.

Table 4-19. Elution pattern of vomitoxin from immunoaffinity column with methanol.

Loaded vomitoxin (ng)	Elution (ml)	Recovered vomitoxin (ng)	Recovery ratio (%)
300	0-1.0	282.3	94.1
	1.0-2.0	48.7	16.2
	2.0-3.0	10.6	3.5
	3.0-4.0	-	-
	4.0-5.0	-	-

5) **용출액 유속의 영향**

그리고 immunoaffinity column**에 흡착된** vomitoxin**을** methanol**로 용출시 용출액의 유속이 회수율에 미치는 영향을 조사하였다**. **그 결과** Table 4-20**에서 나타난 바와 같이** 10 ml/min**의 속도로 빠르게 용출시킬 경우 약** 30% **정도의** vomitoxin**이 소실되는 것으로 나타나 실제** immunoaffinity column**의 사용 시 유속을** 1 ml/min**을 조절하여** vomitoxin**의 손실 없이 실험이 진행되도록 유도하였다**.

Table 4-20. Effects of flow rate of loading solution to immunoaffinity column.

Loading vomitoxin (ng)	Flow rate (ml/min)	Recovered vomitoxin (ng)	Recovery ratio (%)
300	1	287.7	95.9
	5	269.7	80.9
	10	213.6	71.2

다. Immunoaffinity column-ELISA

각종 농산물의 전처리를 위해 지금까지 화학분석법에서 행하여 오던 복잡한 정제과정을 생략하고 면역분석법으로 분석할 경우 대체로 다음과 같은 간단한 처리과정과 분석과정으로 요약할 수 있다. 본 실험실에서 제작한 immunoaffinity column**과** ELISA**법으로 연결시켜 실험방법을 확립한** immunoaffinity column chromatography - ELISA**법은 다음과 같다.**

Ground cereal sample 5g

↓

25ml 60% MeOH

↓

Extract for 30min

↓

Centrifuge at 3000rpm for 5min.

↓

5 ml subtenant

↓

Dilute with 15ml PBS

↓

Load sample on prewashed IC

↓

Wash IC with 10ml D.W. and PBS

↓

Elute with 3ml MeOH

↓

Dry under to N2 gas

↓

Redissolve with 100 μl MeOH

↓

Dilute to 20% MeOH

↓

Sample for ELISA

↓

Indirect competitive ELISA

Fig. 4-12. Step for immunoaffinity column(IC)-ELISA for vomitoxin.

즉 쌀 등의 곡류 5 g을 25 ml의 60% methanol과 함께 50 ml 시험관에 넣고 30분간 진탕 추출한 다음 3000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액 5 ml을 취하여 다시 15 ml의 PBS와 혼합하여 methanol농도를 낮추고 미리 활성화시켜둔 immunoaffinity column에 loading하고 10 ml증류수와 10 ml PBS로 column을 씻었다. 다시 gel에 흡착된 항체와 binding된 vomitoxine을 3 ml methanol로 용출시킨 다음 질소gas 하에서 농축시키고 100 μl methanol로 다시 녹인 다음 10%methanol농도로 희석하여 indirect competitive ELISA의 시료로 사용하였다.

정제한 시료는 앞서 설명한 indirect competitive ELISA법으로 분석을 행함으로서 시료중의 vomitoxin의 함량을 쉽게 정량 하는 것이 가능하게되었다.

라. Immunoaffinity column- HPLC

많은 시료를 빠른 시간에 정확히 분석하고자 할 때 정제된 시료가 얻어진다면 ELISA법에 의한 분석법보다 정제된 시료를 기기에 loading시켜 자동적으로 분석할 필요가 있다. 따라서 앞서의 방법과 같이 immunoaffinity column chromatography법으로 시료를 정제한 다음 정제된 시료를 HPLC에 일정량 injection시켜 시료 속의 vomitoxin 오염정도를 확인하는 혼합 분석방법을 아래와 같이 확립하였다.

Ground cereal sample 5g

↓

25ml 60% MeOH

↓

Centrifuge at 3000rpm for 5min.

↓

5 ml subtenant

↓

Dilute with 15 ml PBS

↓

Load sample on prewashed IC

↓

Wash IC with 10 ml D.W. and PBS

↓

Elute with 3 ml acetonitrile

↓

Dry under to N2 gas

↓

Redissolve with 100 μl MeOH

↓

Sample for HPLC

↓

Analysis vomitoxin with HPLC

Fig. 4-13. Step for immunoaffinity column(IC)-HPLC method for analysis of vomitoxin.

Table 4-21. Amount of vomitoxin recovered from rice by IC-ELISA, HPLC

Method	Spiked vomitoxin (ng)	Recovered vomitoxin (ng)	Recovery (%)
ELISA	300	216	72.0
HPLC	300	198	66.6

즉, Fig. 4-13에서 나타난 바와 같이 처리한 시료를 ELISA 및 HPLC로 분석한 결과의 회수율은 다음과 같았다. 즉 Table 4-21에서 보는 바와 같이 ELISA의 경우는 약 72%의 회수율을 보였고 HPLC는 약 66%의 회수율을 나타내어 그 결과가 양호하지 못하였고 회수율 향상을 위한 실험을 계속해야할 것으로 생각된다.

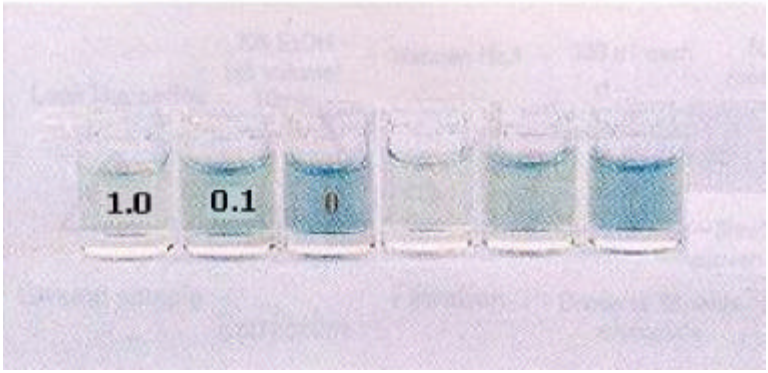
8. ELISA kit의 실험제작

Vomitoxin의 면역분석을 위하여 지금까지 얻은 실험결과를 토대로 indirect competitive ELISA법을 토대로 하여 ELISA kit의 실험적 제작을 시도하였다.

즉 microtiter plate에 vomitoxin-BSA conjugate를 100ng/well 씩 4℃에서 하룻밤 coating 시키고 1%BSA용액으로 blocking시킨 다음 ELISA용 kit로 포장하였다. 실험에 사용된 항체는 500배로 희석한 다음 100㎕씩 첨가해야하기 때문에 100배로 희석하여 포장할 예정이지만 실제는 실험을 많이 수행할 경우 항체를 1 mg단위로 포장하여 공급하는 것이 오히려 안정하다고 생각되었다. 2차 항체-HRP conjugate는 1000배로 희석시켜 포장하여 공급하며, 4℃에서 보

관하면서 사용하도록 안내할 예정이지만 저온포장수송에 필요하므로 주의해야 할 것이다.

그 외 실험에 사용되는 기질(ABTS)용액은 30 ㎎ ABTS를 90 ㎖ H_2O에 녹인 다음 포장하여 -20℃에 보관토록 하고 기질용액을 희석할 citrate buffer 및 반응정지시약 역시 각각 포장하여 실온에 보관토록 하며 특히 본 실험에 사용되는 표준 vomitoxin의 경우 methanol에 녹인 표준물질을 일정량씩 포장해서 -20℃에 보관케 하며 실제 실험시 PBS용액에 희석해서 0, 0.1, 1ppm로 농도별로 나누어 표준용액을 만들 수 있다.



1.0, 0.1, 0 ppm of vomitoxin (duplication)

Fig. 4-14. Comparing the color differences of analytical ELISA kit.

그 결과 Fig. 4-14에서 보는 바와 같이 색깔의 차이로 간단하게 vomitoxin의 오염정도를 판별할 수가 있었으며 실제 육안으로 는 100ppb 수준에서도 control구와 판별이 가능하였지만 다른 유해물질보다 민감도가 떨어져 이를 개선하기 위한 연구를 계속하고있다.

즉 시료 30개를 처리할 재료를 1 kit로 해서 포장할 경우 1 kit당 다음과 같은 것이 필요하다.

* coating, blocking된 microtiter well 35 line (8well/line)
* 표준 vomitoxin용액(10ppm 5 ㎖:A액)
* ABTS용액(B액) Vomitoxin에 대한 항체(C액)
* 5 ㎖, 2차 항체-HRP(D액:1000 배 희석액 5ml)
* Citrate buffer 25 ㎖(E액)
* 반응 정지액 25 ㎖(F액)

(coating 된 well, A, B, 액은 -20℃에 보관, C액,D액,E액과 F액은 상온에 보관)

실험용 kit 사용의 전체 과정을 간단히 요약하면,

가. 실험 준비 : 전처리된 시료용액과 표준 vomitoxin 용액 준비(A액을 0.1N PBS에 희석),

나. Coating, blocking 된 well 을 증류수로 washing ×3

다. 표준 vomitoxin용액(A액) 또는 시료용액 50 μl 씩을 well에 각각 넣은 다음 vomitoxin에 대한 항체희석액(C액 50ul 씩well에 첨가-37C 2시간 반응- 2차 항체-HRP conjugate희석용액(D액) 50 μl씩을 well에 첨가 →37C에 3분간 incubation.

라. 기질 용액 조제 : B액 1 ml + E액 10 ml + H_2O_2 4 μl을 혼합.

마. Well washing ×6

바. 기질용액 100㎕씩 well에 주입 → 15분 incubation.

사. F액 100㎕씩 well에 주입 → 반응정지.

자. 결과를 육안으로 비교 (단 *ELISA Reader있을 경우 410 nm에서 측정 비교,
*실험에 사용하는 재료는 모두 1회용으로 할 것이며 모든 사용한 기구나 물건은 detoxification 요망)

9. 식품에 대한 vomitoxin의 검색

가. 국내식품에 대한 분석

식품에 오염가능성이 있는 잔류곰팡이독소 중 vomitoxin에 대한 오염여부를 조사하기 위하여 지금까지 개발한 hybridoma를 이용하여 얻은 단크론성항체로서 확보한 ELISA 방법을 이용하여 vomitoxin의 분석을 실시하였다. 분석용 시료는 국내에서 1998년과 1999년에 생산되었으며 Table 4-22에서 보는바와 같이 쌀, 보리 및 옥수수를 각각 27점, 49점 및 23점씩을 경남과 강원지방에서 수집하여 실험에 사용하였다.

Table 4-22. Detection of vomitoxin from various samples by indirect competitive ELISA.

Sample	Number of sample	Positive sample	Incidence(%)
Rice	27	0	0
Barley	49	20	40.8
Corn	23	7	30.4

특히 쌀의 경우 분석한 27점 모두 vomitoxin이 검출되지 않은 것으로 나타나 분석한 시료모두가 vomitoxin과 같은 mycotoxin으로부터 매우 안정한 시료로 나타났다. 이는 벼의 수확기에 날씨가 좋고, 무엇보다도 계절적으로 그 환경이 곰팡이의 오염으로부터 다소 안전하여 mycotoxin생성곰팡이의 오염이 둔화되었을 수도 있을 것으로 사료되는 바이나 아직도 관련된 실험이 매우 필요한 실정이다.

그러나 보리와 옥수수의 경우 분석한 시료 중 각각 20점, 7점이 vomitoxin에 오염된 것으로 나타났고, 특히 보리의 경우는 전체의 40.8%가 오염되어 1998년 및 1999년에 문제가 되었던 붉은 곰팡이병의 결과와 일치하는 경향을 나타내었다.

지역에서의 vomitoxin분포도를 살펴보면 오염된 20개의 시료 중 14개가 경남에서 수집한 시료였으며 그 중에는 1.16ug/g의 vomitoxin을 함유한 시료가 있어 가장 높은 함량을 보였다.

옥수수의 경우 시료의 65%인 15점을 강원지방에서 수집하였으나 4개만이 vomitoxin에 오염되었다. 그러나 경남에서는 8개의 수집시료 중 3개가 vomitoxin에 오염되어있는 것으로 나타났으며, 이는 지역적인 영향에 기인한 것으로 사료되어진다.

한편 보리와 옥수수시료의 분석결과를 자세히 살펴보면 Table 4-23와 Table 4-24에서 보는 바와 같다. 즉 보리의 경우 vomitoxin에 오염이 되지 않은 시료가 전체의 59.2%인 29점이었고, 10ppb이하인 시료가 2개, 10ppb-100ppb사의 시료가 5개 100-1000ppb수준으로 오염된 시료가 11개로서 가장 많이 나타났고 1ppm이상인 시료는 2개였다. 특히 경남에서 수집된 1개 시료에는 1.16ppm의 높은 vomitoxin이 오염되어 있는 것으로 나타났다.

한편 옥수수의 경우 10ppb이하의 vomitoxin이 오염된 시료는 없었고,

10ppb-100ppb사이의 시료가 2점 100-1000ppb의 vomitoxin이 오염된 시료가 5점으로 그 중에서도 강원지방에서 수집된 한 시료에서 0.47ppm의 높은 량의 vomitoxin이 오염되어있는 것으로 나타났다

Table 4-23. Distribution level of total vomitoxin found in barley by ELISA

Sample	Vomitoxin levels (ppb)	Number of sample	Incidence(%)
Barley	0	29	59.2
	>10	2	4.1
	10-100	5	10.2
	100-1000	11	22.4
	1000-1160	2	4.1

Table 4-24. Distribution level of total vomitoxin found in corn by ELISA

Sample	Vomitoxin levels (ug/g)	Number of sample	Incidence(%)
Corn	0	16	69.5
	>10	0	0
	10-100	2	8.7
	100-1000	5	21.8

나. 수입옥수수에 대한 분석

특히 외국에서 수입한 시료로는 옥수수만이 국립검역소에서 23점을 분양받아 실험에 사용하였고, 이들 중 미국에서 수입된 시료가 16점으로 가장 많았으며 중궁에서 3점 그리고 카나다에서 수입된 4점의 시료를 실험에 사용하였다. 그 결과 Table 4-25에서 보는 바와 같이 미국에서 수입된 시료에서 3점이 그리고 중국에서 수입된 시료1점이 각각 vomitoxin에 오염되었고, 카나다에서 수입된 시료에서는 양성반응을 보인 시료가 없었다.

양성반응을 보인 이들 시료의 vomitoxin 오염정도를 보면 미국산 시료한점이 78ppb의 vomitoxin 오염을 보였고 그 외 100-710 ppb사이의 vomitoxin이 오염된 시료가 3점으로 그 중 중국산 시료한점은 0.29ppm, 나머지 미국산 시료에서 각각 0.14, 0.71ppm의 vomitoxin오염을 나타내었다.

이와 같은 분석자료는 국내 곡류의 mycotoxin오염정도가 생각보다는 높은 것으로 나타나 앞으로 국민의 건강과 안전을 위해 더욱 지속적인 연구가 요청되며 이를 위해 보다 안전하고 신속한 분석시스템이 보강되어야 할 것으로 생각된다.

이러한 의미에서 볼 때 본 연구에서 얻은 연구결과가 vomitoxin의 안전하고 신속한 분석을 위해 널리 활용되리라고 생각된다.

Table 4-25. Sample source of imported corn for the detection of vomitoxin by ELISA

Source	Number of sample	Positive sample	Incidence(%)
USA	16	3	18.8
China	3	1	33.3
Canada	4	0	0
Total	23	4	17.4

Table 4-26. Distribution level of total vomitoxin found in imported corn by ELISA.

Sample	Vomitoxin levels (ug/g)	Number of sample	Incidence(%)
Corn	0	19	82.6
	> 0	0	0
	10-100	1	4.3
	100-1000	3	13.1

10. Enzyme amplification Immunoassay

가. Enzyme amplification ELISA

앞서 확립한 icELISA법이 민감도가 낮아 좀 더 민감한 분석방법을 얻기 위하여 enzyme amplification ELISA법을 시도하였다. 즉 Fig. 4-15과 같이 먼저 vomitoxin-BSA conjugate를 coating buffer에 녹여 microtiter plate에 100ng/well씩 주입하여 4℃에서 하루밤 방치하여 coating한 후 세척용 완충용액으로 3회 세척하고 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위하여 0.5% skim milk를 200ul/well씩 가하여 하룻밤 4℃에서 blocking하고, 다시 세척용 완충용액으로 3회 세척하였다. 세척한 plate는 표준 vomitoxin 또는 sample 그리고 이미 개발해 놓은 vomitoxin에 대한 항체를 희석하여 50ul씩 well에 주입하고 다시 4C에서 하룻밤 반응시켰다. 반응시킨 plate는 세척용 완충용액으로 4회 세척하고 1:5000으로 희석시킨 2차항체(ALP-labeled goat anti-mouse IgG)를 100ul씩 분주하여 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 세척용액으로 5회 세척하고, 기질용액(NADP; 0.1nMNADP in 50mM diethanolamine buffer(pH 9.5) with 1mM MgCl2,and NaN3)100ul를 분주하여 1시간동안 실온에서 반응시킨후 enzyme amplifier solution 100ul를 분주하여 실온에서 30분간 발색시킨 후, ELISA reader로 490nm에서 흡광도를 측정하고 Bio-Rad사에서 제공한 소프트웨어를 사용하여 vomitoxin함량을 계산하였다.

그 결과 Fig. 4-16과 같이 농도에 따라 반응결과가 분명하였고 그 발색정도를 ELISA reader로 O.D. 값을 측정하여 표준곡선을 만들었을 때 Fig. 4-17과 같이 0.005-10 μg/mL 수준으로 측정 가능하였다.

Coat plates with 100 ng of vomitoxin-BSA/100 μℓ coating buffer

↓

Stand at 4℃ overnight

↓

Wash plate 3 times with PBS-Tween

↓

Block with 0.5% skim milk

↓

Wash plate 3 times with PBS-tween

↓

Add vomitoxin standard or test sample extract

Add 300 times diluted anti-vomitoxin Ab solution with PBS

↓

Incubate at 4℃ overnight

↓

Wash plate 4 times with PBS-Tween

↓

Add 5,000 times diluted ALP-labeled goat anti-mouse Ig's

↓

Incubate at room temperature for 1 hr.

↓

Wash plate 5 times with PBS-Tween

↓

Add substrate solution(NADP)

↓

Incubate at room temperature for 1 hr.

↓

Add enzyme amplifier

↓

Read by ELISA reader at 490 nm

Fig. 4-15. Flow chart enzyme amplification immunoassay for vomitoxin detection.

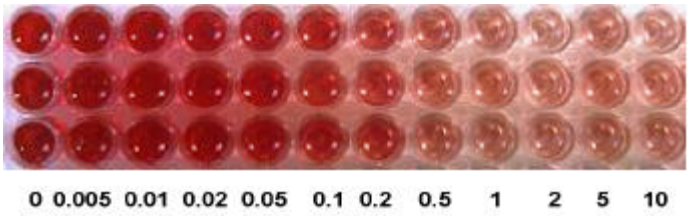


Fig. 4-16. Microtiter plate for detection of vomitoxin by enzyme amplification ELISA.. (ALP/NADP Method)

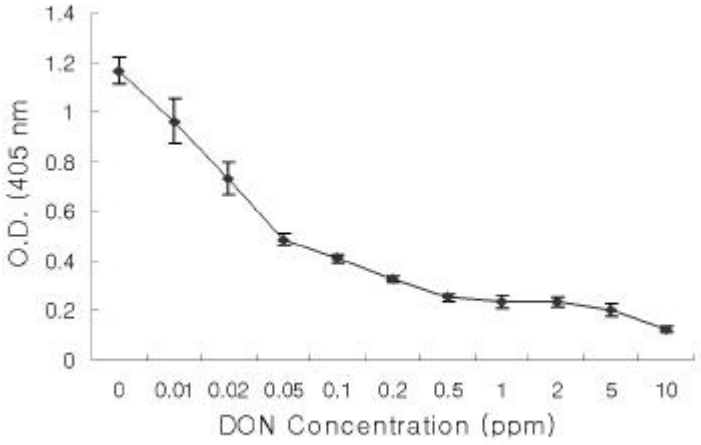


Fig. 4-17. Standard curve of vomitoxin by enzyme amplification ELISA.

앞서 확립한 두 ELISA법의 검출한계를 비교한 결과 Table 4-27에서와 같이 2차 Ab HRP가 결합된 HRP/ABTS는 50 ppb, 2차 Ab ALP가 결합된 ALP/NADP 방법은 5 ppb의 검출한계를 나타낸다. ALP/NADP 방법이 훨씬 민감하다는 것을 알 수 있다.

Table 4-27. Comparison of detection limits of ELISA and amplification ELISA.

ELISAs	Detection limits(ng/mL)
HRP/ABTS method	50
ALP/NADP method	5

Kosaka[43]도 coating buffer로 vomitoxin-BSA 100 ng을 well에 코팅하고 단크론성 항체를 이용하여 ELISA법을 확립하였는데, HRP/ABTS법은 검출한계가 100 ppb, ALP/NADP법은 5 ppb이었다고 보고한 바 있다.

나. Enzyme amplification ELISA의 응용

Enzyme amplification ELISA법을 실제 응용하기위하여 vomitoxin 생성균주 8개를 가지고 vomitoxin 생성정도를 확인하는 실험을 하였다. 먼저 이들 균주를 배양하여 conidia를 생성한 다음, YES배지에서 배양하여 ethyl acetate로 추출한 후 유기용매층 1 mL을 취해 농축시킨 다음, 1 mL의 10% MeOH/PBS에 재 용해하여 amplification ELISA 실시하였다.

민감도가 뛰어난 enzyme amplification ELISA에 의해 vomitoxin 생성 균주를 정량한 결과는 Table 4-28에서 보는 바와 같이 분리균 32-D-3가 1.21 μg/mL로 가장 높았다.

Table 4-28. Concentration of vomitoxin from the culture media by enzyme amplification ELISA.

Sample source	No. of strains isolated	Vomitoxin (μg/mL medium)
Soil	32-D-3	1.21±0.02
Soil	57-G-2	0.55±0.16
Soil	36-D-3	0.87±0.08
Soil	91-B-2	1.12±0.05
Soil	58-G-1	0.80±0.02
Soil	32-D-4	1.1±0.19
Soil	88-E-5	0.21±0.03

B: San-chung, D: Nam-hae, E: Ham-an, G: Ko-sung, H : Ham-yang,

아울러 앞서의 결과를 토대로 가장 많이 vomitoxin을 생성하는 균주를 재배양하여 HPLC로 TLC의 결과 및 ELISA 결과를 확인하는 실험을 행하였다. 순수 분리한 것을 YES배지에 접종하여 배양한 후 ethyl acetate로 추출하여 유기용매층 1 mL을 취하여 농축하였다. 농축한 것을 이동상 용매에 용해하여 memberane filter로 여과한 후 HPLC에 주입하였다. 그 결과 Fig. 4-18에서와

같이 vomitoxin 생성을 확인할 수 있었다. A는 vomitoxin의 HPLC 크로마토그램이며, B는 시료(32-D-3)의 HPLC 크로마토그램이다. C는 시료(32-D-3)의 HPLC용 시료에 표준 vomitoxin을 첨가한 다음 HPLC로 분석하여 얻은 크로마토그램이다. 그러나 HPLC로는 미량 함유된 vomitoxin의 량은 검출하지 못하는 단점이 있었다. 그러므로 민감한 정량을 위한 한계점을 극복하는 방법으로 enzyme amplification system을 도입한 정성·정량 모두 우수한 결과를 얻을 수 있었다.

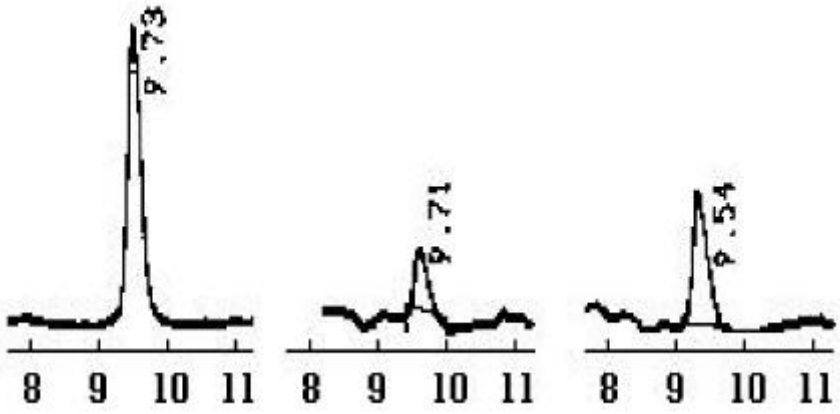


Fig. 4-18. HPLC chromatogram of medium extract from strains 32-D-3 isolated.

A : Standard vomitoxin, B : 32-D-3,

C : 32-D-3 + standard vomitoxin

일반적으로 vomitoxin의 경우 다른연구자들의 결과에서도 매우 낮게 나타났다. 뿐만 아니라 aflatoxin을 비롯한 다른 mycotoxin의 immunoassay 실험 결과들 보다도 민감도가 낮아 이를 개선하기위한 상당한 노력이 있었다.

따라서 비록 관련효소들의 가격이 비싼 단점들이 있지만 본연구에서처럼 enzyme amplification으로 감도를 10배이상으로 증가시킬 수 있는 상당한 의미가있다. 따라서 이 시스템을 다른 민감도가 낮은 면역분석체계에 응용함으로서 감도를 증가시키는 연구에 응용할 수 있다는 점은 흥미로운 일이다. 예를 들면 앞서 본 연구에서 민감도가 낮은 sulfamethazine의 immunoassay system에 응용하여 그 감도를 증가시켜볼 필요가 있다. 무엇보다도 면역분석시스템은 신속하고 정확함에 그 장점이 있기 때문에 앞으로 일반적인 면역분석실험시스템에 enzyme amplification 시스템을 도입하는 것도 신중히 검토해볼 필요가 있다.

제4절 결론

1. 분자량이 작은 vomitoxin에 항원성을 증폭시키기 위해 vomitoxin-HG-protein-conjugate를 합성하였으며, 형질세포종세포(p3×63Ag8. v653)와 vomitoxin-BSA conjugate를 면역시킨 암컷 BALB/c 마우스의 비장세포를 융합시켜 vomitoxin에 대한 단크론성항체를 생산하는 4 세포주를 개발하였다.
2. Hybridoma로부터 생산한 단크론성 항체의 특성을 조사한 결과 vomitoxin과 특이성이 있었고, 3-acethylvomitoxin 및 T-2 toxin과도 27%, 38%의 교차반응을 보였으나 nivalenol, deacetoxyscipenol, zearalenone 및 fumonisin과는 반응하지 않았다. 이 항체를 이용하여 vomitoxin을 측정하기 위한 indirect competitive ELISA법을 확립하였고 50ppb-10ppm 수준의 vomitoxin분석이 가능하였다.
3. 시료중의 vomitoxin의 간단한 정제를 위해 CNBr-actibated sepharose 4B에 항체를 흡착시켜 실험적으로 immunoaffinity column을 제작하였다.
   Column의 처리방법은 우선 10㎖ PBS로 column을 washing한 후 시료 액을 loading하고, vomitoxin이외의 물질은 10㎖ 증류수로 2회 씻어 제거한 다음 항체에 결합된 vomitoxin을 3㎖의 methanol로 용출시킨다. 이 때 immunoaffinity column의 vomitoxin이 회수율은 평균 90%이상이었다.
4. Vomitoxin분석을 위해 실험적으로 제작한 ELISA kit의 경우 30개 시료를 처리하는 재료를 1set로 포장할 경우 다음의 것들이 필요하였다. 즉 coating, blocking된 microtiter well 35line(12well/line), 표준 vomitoxin용액 5㎖(10ppm: A액), vomitoxin에 대한 항체 5ml(C액), 2차항체-HRP희석액 5ml(D액), 25㎖의 citrate buffer(E용액), 25㎖의 정지용액(F용액) 등이다. 단, B, C액은 -20℃에 coating된 well과 A액은 4℃, 그리고 D, E액은 상온에 보관케 한다.

5. 개발된 모니토링 시스템으로 99개의 국내곡류시료 23개의 수입옥수수를 대상으로 vomitoxin을 분석하였다. 그 결과 쌀에서는 오염된 시료가 보이지 않은 반면, 보리시료에서는 40.8%가 오염되었고 그 중의 한 시료는 1.16ppm의 높은 vomitoxin 오염을 보였으며, 옥수수의 경우는 30.4%가 vomitoxin에 오염되었다. 한편 수입 옥수수의 경우는 23개 시료 중 4개의 시료가 vomitoxin에 오염되었고, 그 중에서 0.71ppm의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다.
6. ELISA의 민감도를 높이기 위하여 enzyme amplification method를 확립하였고, 민감도는 5ppb수준으로 증가하였다. 확립된 Enzyme amplification method법으로 vomitoxin 생성균주의 vomitoxin 생성량을 조사한 결과 분리균 32-D-3이 1.21ug/ml로 가장 많은 량의 vomitoxin을 생성하는 것으로 나타났다.

제5절 참고문헌

1. **박정현**. 1999. **마우스에서** ochratoxin A **유발 산화적 손상 및 항산화 비타민에 의한 저독효과**. **경상대학교 식품공학과 석사학위논문**.

2. Merewe, K., Vaner, P. S. and Fourie, L. 1995. Mycotoxins. part **II**:The consituatuin of *Aspergillus ochraceous* with. *J. Chem. Soc.* Part **V**. 7083-7088.

3. Scott, De B., 1965. Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products. *Mycropathol. Mycol. Appl.* 25 : 213-222.

4. **이인원**, **김진철**. 1993. **곡류에서의** *Fusarium* **속 곰팡이 독소의 오염**. *J. Food Hygiene*. 8(2) : 23-32.

5. JECJA 1991 Joint FAO/WHO Export committee on food addities, 37th Meeting, 1990 (Geneva; WHO)

6. Rotter, B. A., Prelusky, D. B and Pestka, J. J. 1996. Review : Toxicology of deoxynivalenol. *J. of Toxicology and Environmental Health*, 48: 1-34.

7. Lee H. B., Shon D. H., Kunio, K. and Ueno, Y. 1997. **옥수수 중** Deoxynivalenol**의 검출을 위한 효소면역측정법의 개발**, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol,* 24(4): 414-419.

8. Clare mills, E. N. Sandra, A. Heather A. L. and Michael R. A. Morgan. 1990. An Enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in wheat, utilizing novel hapten derivatization. *Food & agricultural immunology*, 2: 109-118.

9. Forsell, J. H., Witt, M. F., Tai, J. H., Jensen, R. and Pestka, J. J. 1986. Effects of 8-weeks exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol(vomitoxin) and zearalenone. *Fd Chem. Toxic.* 24(3) : 213-219.

10. **이향범, 손동화**. 1997. **옥수수 중** Deoxynivalenol**의 검출을 위한 효소면역측정법의 개발**, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol,* 24(4): 414-419.

11. Bhat, B. V., Beedoi, S. R., Ramakrishna, Y. and Munshi, K. 1989. Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat in Kashmir valley, India. Lancet: 35-38.

12. Scott, P. M. 1989. The natural occurrence of trichothecenes in trichothecene mycotoxicoses. Ed Beasley, V. R., CRC Press Inc., Boca roton: 10-25.

13. Ueno, Y. 1987. Mycotoxins. In; Toxicological Aspects of Food, Miller, K. Ed. : 139, Elsevier, Amsterdam.

14. Massin, D. P., and Thouvenot, D. 1995. In vitro toxicity of trichothecenes on rat haematopoietic progenitors. *Fd. Additives and contaminants*. 12(1) : 41-49.

15. **이웅수**. 1987. Studies on the pollution of Korean cereals by *Fusarium* mycotoxins. Science University of Tokyo. **박사학위논문**.

16. **이종옥**. 1998. *Fusarium*속 균이 생성하는 T-2 toxin에 대한 단크론성항체 생산. **경상대학교 박사학위논문**.

17. Ueno, Y., Sato, N., Ishii, K., Sakai, K., Tsunoda, H. and Enomoto, M. 1973. Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of *Fusarium* species. *Appl. Microbiol.* 35 : 699-704.

18. Ueno, Y., Sato, N., Ishii, K., Sakai, K. and Enomoto, M. 1972. Toxicological approches to the metabolites of Fusaria. V. Neosolaninol, T-2 toxin and butenolide toxin metabolites of *Fusarium sporotrichioides* NRRL 3510 and *Fusarium poae* 3280. *Japan J. Exp. Med*. 42 : 461-472.

19. Ellison, R. A. and Kotsonis, F. N. 1973. T-2 toxin as and emetic factor in mouldy corn. *Appl. Microbiol.* 26 : 540-543.

20. Eppley, R. M. 1979. Trichothecenes and their analysis. *J. The American Oil Chemist' Society*. 56 : 467-488.

21. **박봉정**. 1998. **시설원예산물에서 분리한 곰팡이의** ochratoxin A **생성균 검색. 경상대학교 식품공학과 석사학위논문**.

22. Krough, P. 1987. Mycotoxin in Food Academic press : 131-132.

23. Duffy, M. J. and Reicl, R. S. 1993. Measurement of the stability of T-2 toxin in aqueous solution. *Chem. Res. Toxicol* 6(4) : 524-529.

24. Bamburg, J. R., Riggs, N.V. and Strong, F. M. 1968. Structures of toxins from two strains of *Fusarium tricinctum*. Tetrahedron 24 : 3329-3336.

25. Burmeister, H. R. 1971. T-2 toxin production by *Fusarium tricinctum* on solid substrate. *Appl. Microbiol.* 21 : 739-742.

26. Gilgan, M. W., Smalley, E. B. and Strong, F. M. 1966. Isolation and partial characerization of a toxic from *Fusarium tricinctum* on moldy corn. *Arch. Biochem. Biophys.* 114 : 1-3.

27. Pestka, J. J. and Bondy, G. S. 1990. Alteration of immune function following dietary vomitoxin exposure. Can. *J. Physiol. Pharmacol.* 68: 1009-1016.

28. Ueno, Y. Lee, U. S. Tanaka, T. Hasegawa, A. and Matusuki, Y. 1986. Examination of chinese and U.S.S.R. cereals for the *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicon*. 24(6) : 618-621.

29. Tanaka, T., Matsuda, Y., Toyasaki, N., Cgawa, Y. M., and Ueno, Y. 1977. Screening of trichothecene-producing *Fusarium* species from river sediments by manmarian cell culture techniques. Proc. *Jap. Assoc. Mycotoxicol.* 5(6) : 50-53.

30. Chi, M. S., Micocha, C. J., Kurtz, H. J., Weaver, G., Bates, F., Shimoda, W. and Burmeister, H. R. 1977. Acute toxicity of T-2 toxin on broiler chicks and laying hens. *Poultry Science*. 56 : 103-106.

31. Chi, M. S., Micocha, C. J., Kurtz, H. J., Weaver, G., Bates, F., Shimoda, W. and Burmeister, H. R. 1977. Subacute toxicity of T-2 toxin in broiler chicks. *Poultry Science* 56 : 306-313.

32. Maron, D. M. and Ames, B. N. 1983. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. Mut. Res. 113 : 173-215.

33. **김형갑**. 1993. *Fusarium* **속 균주가 생성하는** Vomitoxin **이 계배의 면역체계에 미치는 영향**. **경상대학교 식품공학과 박사학위논문**.

34. Clare mills, E. N. Sandra, A. Heather A. L. and Michael R. A. Morgan. 1990. An Enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in wheat, utilizing novel hapten derivatization. *Food & agricultural immunology*, 2: 109-118.

35. Vesonder, R.F., Ciegler, A. and Fensen, A. H. 1973. Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. *Applied Microbiology*, 26: 1008-1010.

36. Yoshizawa, T and Morooka, N. 1973. Deoxynivalenol and its monoacetate : new mycotoxin from *Fusarium roseum* and mouldy barley. *Agricultural Biological Chemistry*, 37: 2933-2934.

37. Abouzied, M. M. Azcona, J. I. Braselton, W. E. and Pestka. J. J. 1991. Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: evidence for deoxynivalenol(vomitoxin) contamination. *Applied and Environ. Microbiology*. 57(3) : 672-677.

38. Pestka, J. J. 1988. Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *J. Assoc. of Anal. Chem*. 71(6) : 1075-1081.

39. **이계호**, **박성오**. 1982. **우리 나라에서 시판되고 있는 각종 가축사료에 대한 위생학적 연구. 제 1보, 유해 곰팡이에 의한 피해 및 분포상황연구. 한국농화학회지**. 25: 189-196.

40. Trucksess, M. W., Flood, M. T., Mossoba, M. M. and Page, S. W. 1987. High-Performance thin-layer chromatographic determination of deoxynivalenol, fusarenon-X and nivalenol in barley, corn, and wheat. *J. Agric. Fd. Chem*. 35(4) : 445-448.

41. Kosaka, K. 1994. Development of a high sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol by an introduction of enzyme amplification system. Science university of Tokyo. **석사학위논문**

42. **강성조**. 1999. Zearalenone **측정을 위한 면역분석법의 확립과 농산물에의 응용. 경상대학교 식품공학과 박사학위논문**.

43. Yi, C. X., Guang, S. Z. and Fun, S. C.. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in corn and wheat. *J. Assoc. c|f. anal. chem*. 71(5) : 945-949.

44. Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. 1983. Fusarium species: and illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Park, Pennsylvania. 1-193.

45. Romer, T. R. 1985. Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feeds.

46. **고춘명**, **최태루**, **류준**. 1972. **각종 식품중의 유독성 진균에 관한 연구(II)**. **대한미생물학회지**. 7: 55-58.

47. Kawamura, O., Nagayama, S., Sato, S., Ohtani, K and Ueno, Y. 1990. Survey of T-2 toxin in cereals by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Food and Agricultural Immunology*. 2: 173-180.