

Aflatoxin B₁의 검출을 위한 효소면역측정법의 개발

손동화* · 박애란 · 서병철 · 김진철 · 이인원 · 남영중¹ · 허우덕¹

농업생물신소재연구센터, 서울대학교 농업생명과학대학

¹한국식품개발연구원 이화학연구부

Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Aflatoxin B₁

Shon, Dong-Hwa*, Ae-Ran Park, Byung-Cheol Seo, Jin-Cheol Kim,
Yin-Won Lee, Young-Jung Nam¹ and S. Woo Derck Hawer

Research Center for New Bio-Materials in Agriculture,

College of Agriculture and Life Sciences,

Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

¹Division of Food Science, Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea

Abstract — In order to develop an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for detecting aflatoxin B₁(AFB₁), we produced and purified antibodies, thereafter established and evaluated methods of direct and indirect competitive ELISA. Anti-AFB₁ antisera, produced by immunizing rabbits with AFB₁-1-(O-carboxymethyl)oxime-bovine serum albumin conjugate (AFB₁-BSA), were removed of anti-BSA antibodies by quantitative precipitation reaction and further purified by ammonium sulfate precipitation and DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography. Purified IgG fractions were used as anti-AFB₁ antibodies. The antibodies, whose titer was determined extremely high above 2×10^6 , showed low cross-reactivity of 3~34% against AFB₁ analogues such as G₂, B₂, and G₁. From the standard curves of direct and indirect competitive ELISA for AFB₁, the detection ranges were found 0.2~20 and 1~10,000 ng/ml(ppb) respectively. In their sensitivity, stability, simplicity, and rapidity, the direct method was more suitable than the indirect method for practical use.

진균독소는 사람이나 가축에 급·만성의 질병이나 생리적 이상을 유발하는 저분자 화합물로 인류의 식량자원의 손실 뿐아니라 보건 위생상 심각한 문제를 야기시키기도 한다. 그 중에서 *Aspergillus flavus*와 *A. parasiticus*가 생산하는 aflatoxin은 옥수수, 땅콩, 면실 등의 각종 농산물에서 자주 검출되는 간독소(liver toxin)로, 천연물 중에서 가장 강력한 발암물질로

알려져 있다(3). Aflatoxin의 종류는 B₁, B₂, G₁, G₂ 그리고 B₁, B₂의 체내대사물로 우유 중에서 검출되는 M₁, M₂ 등이 있다(2). Aflatoxin의 허용치는 나라마다 조금씩 차이가 있으나 우리나라의 경우 식품에서 10 ppb, 배합사료에서 20 ppb, 원료사료에서 50 ppb 이하로 설정하고 있으며, 구미나 일본 등에서는 5~20 ppb 이하로 규제하고 있다(14).

한편 aflatoxin 등의 진균독소 검출을 위한 기존의 방법은 주로 물리화학적인 방법에 의존한 thin-layer chromatography(TLC), high performance liquid chromatography(HPLC), 또는 gas chromatography(GC) 등을 이용하고 있다(11). 그러나, 이들 방법은

Key words: Aflatoxin B₁, antibody purification, direct and indirect competitive ELISA.

*Corresponding author

Present address: Division of Food Science, Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea

독소를 검출함에 있어서 검출감도가 낮거나 고가의 장비나 시약을 필요로 하며, 시료중에 함유된 방해물질의 제거를 위하여 전처리를 하여야 하고 한꺼번에 다량의 곡물시료로부터 독소를 검출하는 것은 쉬운 일이 아니다(10). 그러므로, 최근에는 항원·항체반응의 면역화학기법을 이용하여 감도가 높고 신속·정확·간편하면서 경제적으로 검출할 수 있는 분석법이 개발되어 점차 실용화 되고 있는 실정이다(12, 16).

면역화학기법에 의한 독소 등 미량성분의 정량분석에는 높은 감도의 radio immunoassay(RIA)가 활용되기도 하나 방사성 물질의 안정성이나 폐기물 처리 등의 문제가 있어, 분석의 안정성이나 안전성에서 뛰어난 enzyme immunoassay(EIA)나 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)가 널리 활용되고 있다(15). 이중 ELISA에는 대체로 두 가지 방법의 경합적 효소면역정량법(competitive ELISA)이 활용되고 있다. 즉, 직접법(direct competitive ELISA)과 간접법(indirect competitive ELISA)이다. 전자는 microplate의 well에 부착된 항체에 시료중의 독소와 일정량의 독소-효소 접합체(toxin-enzyme conjugate)가 경합적으로 결합하는 방식이며, 후자는 well에 부착시킨 항원(독소)과 시료중의 독소가 일정량의 항체에 경합적으로 결합하므로써 시료중의 독소량에 반비례하여 항체가 well의 표면에 부착되며 이 항체에 대한 2차 항체-효소 접합체(antibody-enzyme conjugate)를 처리하는 방식이다(12). 최종적으로는 양자 공히, 효소에 의한 첨가기질의 분해로 발색되는 정도(흡광도)를 microplate reader에 의하여 측정하므로써 시료중의 독소를 정량하게 된다.

본 연구에서 aflatoxin B₁(AFB₁)의 정량을 위하여 항체를 생산·정제하고 직접법 및 간접법을 확립하였다. 또한 이들 방법의 특성 및 문제점을 검토하였으므로 다음과 같이 보고한다.

재료 및 방법

재료

AFB₁, B₂, G₁, G₂, bovine serum albumin(BSA), AFB₁-1-(O-carboxymethyl)oxime-BSA(AFB₁-BSA), Freund complete adjuvant(FCA), Freund incomplete adjuvant(FIA), horseradish peroxidase(HRP),

carboxymethylamine hemihydrochloride, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDPC), Tween 20, goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)(ABTS) 등은 Sigma사의 제품을 사용하였고, methanol (MeOH) 등 기타의 시약은 GR을 사용하였다.

Microtiter plate는 Nunc사의 MaxiSorp[®]를, microplate reader는 Flow Lab사의 Multiskan MCC/340 P를 사용하였다.

특이항체 생산

AFB₁에 대한 특이항체를 생산하기 위하여 실험 동물로 체중 2~3 kg의 웅성 New Zealand white 토끼를 3마리 사용하였다. AFB₁-BSA를 멸균한 phosphate buffered saline(PBS; 1.9 mM NaH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl, pH 7.2)에 용해시켜 FCA와 함께 동량비로 emulsion을 잘 만들어 토끼의 뒷 발바닥에 마리당 500 µg씩의 면역원을 피하주사(s.c.)하였다(6). 이후 2~3주일 간격으로 FIA와 함께 500 µg씩 토끼의 등 또는 대퇴부에 피하주사 또는 근육주사(i.m.)로 4회 추가면역하고, 면역 1주일 후에 각각 귀의 정맥으로부터 마리당 50 ml/가량씩 채혈하였다. 채혈후 3시간 가량 실온에 방치하여 혈액이 응고된 다음, 원심분리(3,000×g, 10분)하여 항혈청을 분리하고 0.02% NaN₃를 첨가하였다(17). 항혈청중 특별히 항체가가 높은 lot를 모아서 각각 100 ml로 하여 다음 실험에 사용하였다.

이중면역확산시험

특이항체의 항체가를 측정하기 위하여 이중면역확산시험(double immunodiffusion test)을 행하였다(17). 즉, PBS에 1.2% agar와 3% PEG 4000을 첨가하여 두께 3 mm 가량의 gel을 형성시키고 직경 1.5~3 mm의 구멍을 뚫어 항원 및 항혈청을 채운 후 37°C에서 하룻밤 방치하여 형성된 침전(precipitin)을 관찰하였다.

정량침강반응

항혈청 중에 존재하는 항BSA항체가 항원(BSA)과 결합하여 최대의 침전을 형성하는 BSA의 첨가비율을 구하기 위하여 정량침강반응(quantitative precipitation reaction)을 행하였다(17). 각각의 항혈청 200

μ 에 각기 다른 양의 BSA와 PBS를 첨가하여 전체 용량을 1 ml로 한 다음, 37°C, 1시간 처리후 4°C에서 하룻밤 방치하고서 10,000×g, 10분간 원심분리하여 얻은 침전을 2회 세척후 침전에 0.1 N NaOH 1 ml을 가하여 녹인 다음, 흡광도(A_{280})를 측정하였다. 첨가한 항원에 대한 흡광도를 plot하여 봄으로써, 일정량의 항체와 최대의 침전을 형성하는 항원(BSA)의 양을 구하였다. 이때 첨가항원은 전량 침전한 것으로 간주하였다.

항체의 분리 및 정제

항BSA항체의 제거 : 항AFB₁항혈청 100 ml에 10 mg의 BSA와 PBS를 첨가하여 용량을 2배로 한 다음 잘 교반하고서, 정량침강반응시와 같은 방법으로 처리하여 상침액을 회수함으로써 항혈청 중의 항BSA항체를 제거하였다.

항체의 분리 : 황산암모늄 침전법에 의하여 항체를 분리하였다(7). 즉 항BSA항체를 제거한 항AFB₁항혈청에 포화황산암모늄 용액을 4°C에서 서서히 첨가하여 포화농도가 50%되게 한 다음 4°C에서 1시간 방치 후 원심분리(10,000×g, 20분간)하여 침전을 회수하고, 50% 포화황산암모늄 용액으로 세정후 1 M Tris-Cl buffer(pH 8.0)에 용해시킨 후 0.05 M Tris-Cl buffer(pH 8.0)에 투석하였다.

항체의 정제 : DEAE-Sephadex A-50에 의한 이온 교환 크로마토그래피로 항체(IgG)를 정제하였다. Bed의 크기는 $\phi 2.5 \times 21$ cm, buffer는 0.05 M Tris-Cl (pH 8.0), NaCl의 농도구배는 0~0.3 M로 하였다. 약 300 mg의 단백질을 column에 주입하였다. 분리가 끝난 다음, Laemmli의 방법(8)에 준하여 12.5% gel에서 SDS-PAGE를 행하여 주요 peak의 성분을 확인한 후 IgG획분을 모아 0.05 M Tris-Cl buffer에 투석하였다. 또한 투석이 끝난 IgG획분을 FPLC(Pharmacia사의 Superose 12 column)로 순도검정을 하였고, 이후 이를 항AFB₁항체로 사용하였다.

AFB₁-HRP의 제조

직접법(ELISA)으로 AFB₁을 분석할 때 필요한 AFB₁-HRP를 Chu 등의 방법(4, 5)에 준하여 만들었다. 간단히 설명하면, 유기용매중에서 AFB₁에 carboxymethoxylamine을 처리하여 -COOH기를 부착시킨 다음, silica gel column을 통과 시켜 AFB₁의 1번

탄소위치에 oxime이 형성된 AFB₁-1-(O-carboxymethyl)oxime를 TLC로 확인후 회수하였다(4). 이를 효소인 HRP의 -NH₂기에 부착시키기 위하여 EDPC를 처리함으로써 peptide bond를 형성시킨 후 탈염하여 AFB₁-HRP를 준비하였다(5).

경합적 효소면역측정법(Competitive ELISA)

직접법 : Coating buffer(0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 9.0)에 1/5,000로 희석한 항AFB₁항체를 100 μ l를 microtiter plate의 well에 채우고 4°C 하룻밤 또는 37°C, 3시간 방치하여 coating시킨 후, wash buffer(0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 180 μ l로 3회 세척한 다음 wash buffer에 1/50으로 희석한 AFB₁-HRP와 시료용액(70% MeOH에 용해된 AFB₁용액)의 1:1 혼합액을 100 ml씩 well에 넣고 상온에서 1시간 방치하여 경합적인 항체 항원 반응을 시켰다. Wash buffer로 5회 세척한 후 기질용액(0.1% ABTS, 0.1 M citric acid-phosphate buffer, pH 4.0, H₂O₂를 사용직전에 0.02% 첨가) 100 μ l를 첨가하여 상온에서 20분간 방치하여 녹색으로 발색시킨 다음, 반응정지액(0.1% NaN₃) 100 μ l를 첨가하였다. Microplate reader로 파장 405 nm(대조파장 492 nm)에서 각 well의 흡광도(A_{405})를 측정하였다. 동일 시료에 대하여 각각 3개씩의 well을 사용하여 얻어진 흡광도의 평균값으로 분석하였다.

간접법 : Coating buffer에 용해시킨 AFB₁-BSA(2 μ g/ml) 100 μ l를 well에 채우고 직접법에서와 같이 coating한 다음, wash buffer 180 μ l로 3회 세척후 시료용액(wash buffer에 용해된 AFB₁용액)과 항AFB₁항체(0.1% BSA를 포함한 wash buffer로 1/30,000 희석)의 1:1 혼합액을 10 μ l 넣고 27°C, 1시간 경합적인 항원 항체 반응을 시켰다. Wash buffer로 4회 세척 후, 2차 항체인 goat anti-rabbit IgG-HRP(wash buffer로 1/4,000 희석)를 넣고 37°C, 1시간 방치하였다. Wash buffer로 5회 세척 후 기질용액을 넣고 상온, 30분간 방치하여 발색시킨 다음 반응정지액 100 μ l를 첨가하고 A_{405} 를 측정하였다. 각 시료당 3개씩의 well을 사용하여 분석하였다.

항AFB₁항체의 교차반응

유사독소에 대한 항AFB₁항체의 교차반응을 직접법으로 분석하였다. 즉, 70% MeOH에 농도별로 희

석한 유사독소를 AFB₁ 대신에 사용하였다. 교차반응의 정도는 항AFB₁항체에 대한 AFB₁-HRP의 결합을 50% 저해하는 AFB₁의 농도를, AFB₁-HRP의 결합을 50% 저해하는 유사독소의 농도로 나눈 %값으로 나타내었다.

결 과

특이항체 생성의 확인

ELISA에 의한 정량에는 대상물질에 대하여 특이성과 결합력이 뛰어난 항체가 필요하다. AFB₁은 분자량이 302 dalton으로 매우 작기 때문에 단독으로는 항체생산을 유도할 수 없으므로 이를 hapten으로 하여 carrier protein인 BSA에 공유결합시킨 AFB₁-BSA를 면역원으로 사용하였다. 특히 AFB₁의 C-1 위치에 BSA를 부착시킨 AFB₁-BSA를 면역원으로 사용함으로써 B₁만을 강하게 인식하는 항체의 생성을 유도하였다(4). 이는 실험실적으로 준비할 수도 있으나 면역효과의 극대화를 위하여 잘 제조되고 정제된 Sigma사 제품을 사용하였다. 토끼에 면역후 AFB₁에 대한 특이항체(항AFB₁항체)의 생성정도를 이중면역확산시험(double immunodiffusion test)으로 알아본 결과, 최초의 면역으로부터 3회 이상 면역하여 얻은 항혈청은 면역원에 대한 강한 침전을 형성함으로써 높은 항체가를 갖고 있음을 확인할 수 있었다(data 생략). 또한 AFB₁-BSA 및 BSA를 항원으로 한 이중 확산시험에서 spur의 형성으로부터 항혈청중에는 항BSA항체 및 높은 역가의 항AFB₁항체가 생성되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

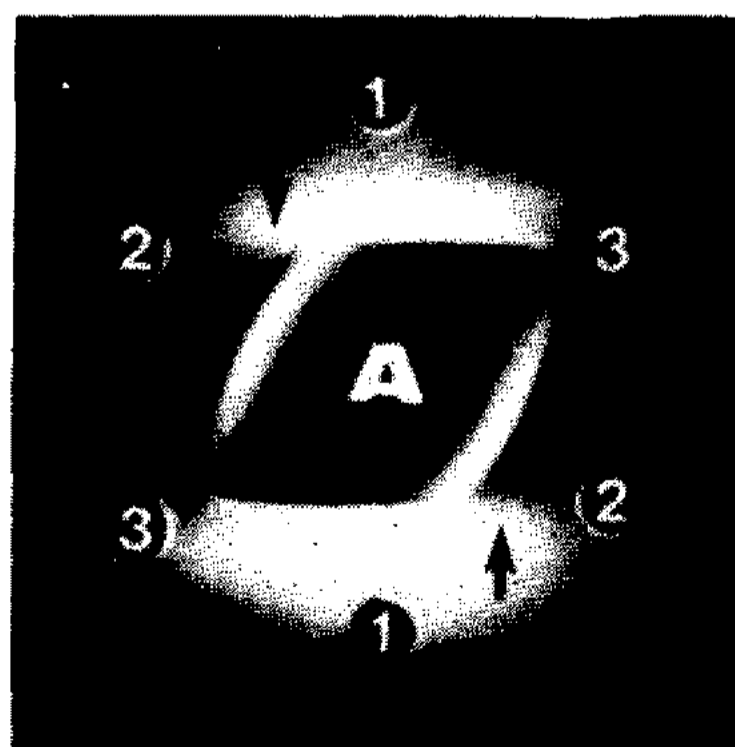


Fig. 1. Double immunodiffusion patterns of antisera(A) against AFB₁-BSA(1) and BSA(2).

Spur(↓) indicates that the antisera contain large amount of anti-AFB₁ antibodies as well as anti-BSA antibodies. Lysozyme(3) was used as a negative control.

항체의 정제

항BSA항체의 제거: AFB₁의 정량에 항체대신 정제하지 않은 항혈청을 사용할 수도 있다. 그러나 항혈청은 본 연구에서 AFB₁-BSA를 coating 항원으로 이용하는 간접법에는 사용할 수 없는 점과, 항체 이외에 혼입되어 있는 혈청성분이 분석시 방해 요인이 될 수도 있기 때문에, 가능하면 항체를 정제하여 사용함이 바람직하다. 따라서 이를 위하여 항혈청으로부터 항BSA항체의 제거 및 항체의 정제를 행하였다.

정량침강반응에 의하여 항BSA항체를 제거하였다. 즉, 일정 비율의 항체와 항원이 반응할 때 항원·항체 복합체의 형성에 의한 최대 침전을 형성하므로, 우선 일정량의 항BSA항체가 최대한 결합할 수 있는 BSA의 양을 구하였다. 그 결과 항AFB₁항혈청 200 μl는 20 μg의 BSA와 최대의 침전을 형성함을 알 수 있었다(Fig. 2). 이 조건을 참고하여 항혈청 중의 항BSA항체를 침전시키고 원심분리하여 제거하였다. 항BSA항체가 제거된 각각의 항혈청은 이중면역확산시험에서 BSA와 침전을 전혀 형성하지 않았다.

항체의 분리 및 정제: 위에서 처리한 항혈청에 포화 황산암모늄 용액을 처리하여 항체를 분리하였다. 그 다음 DEAE-Sephadex A-50에 의한 크로마토그래피로 정제하였다(Fig. 3). 여기서 주요 분획을 전기영동한 결과, 첫번째의 큰 peak 구성성분이 SDS-PAGE에서 항체의 heavy chain과 light chain 으로 해리된 band로 나타났고(Fig. 3의 (A)), 8~25% gradient gel의 non-dissociating system에서 매우 큰 분자량의 band로 나타난 점으로 미루어 항체성분을

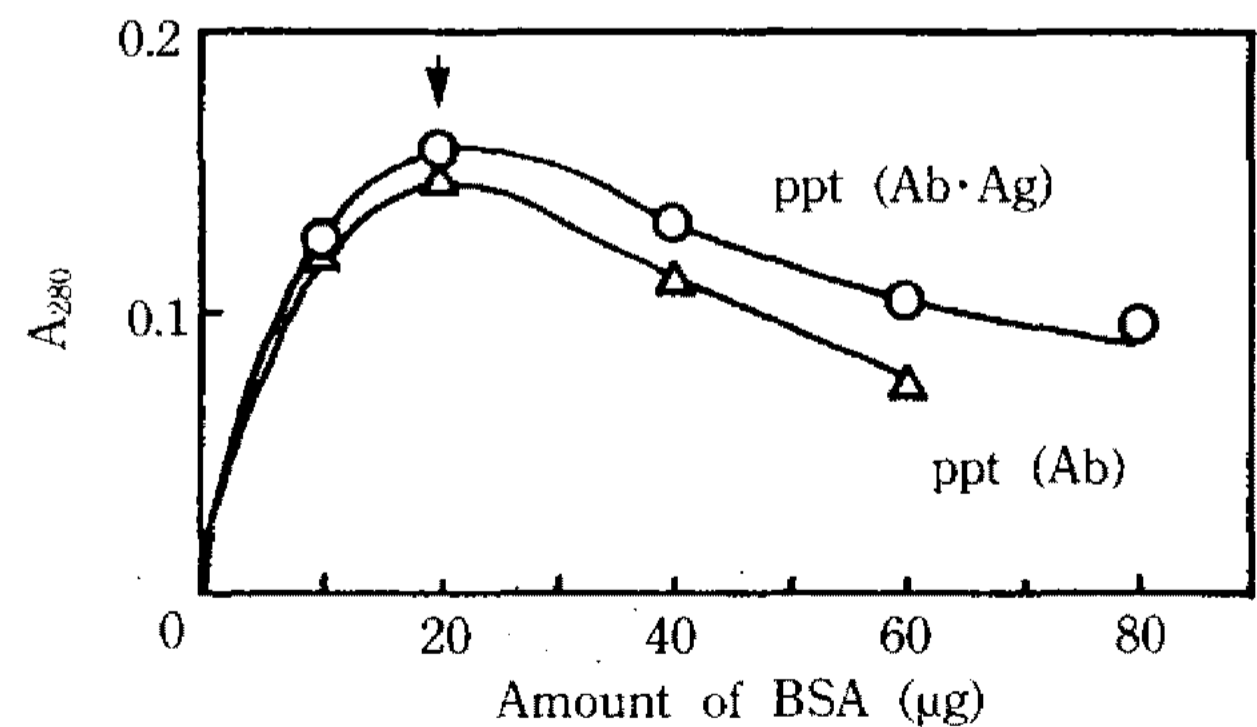


Fig. 2. Quantitative precipitation pattern of BSA and antisera raised against AFB₁-BSA.

The amounts of precipitated antibodies and antibody-antigen complexes were shown as absorbances at 280 nm. Maximum precipitation was obtained at 100 μl of the antiserum and 20 μg of BSA.

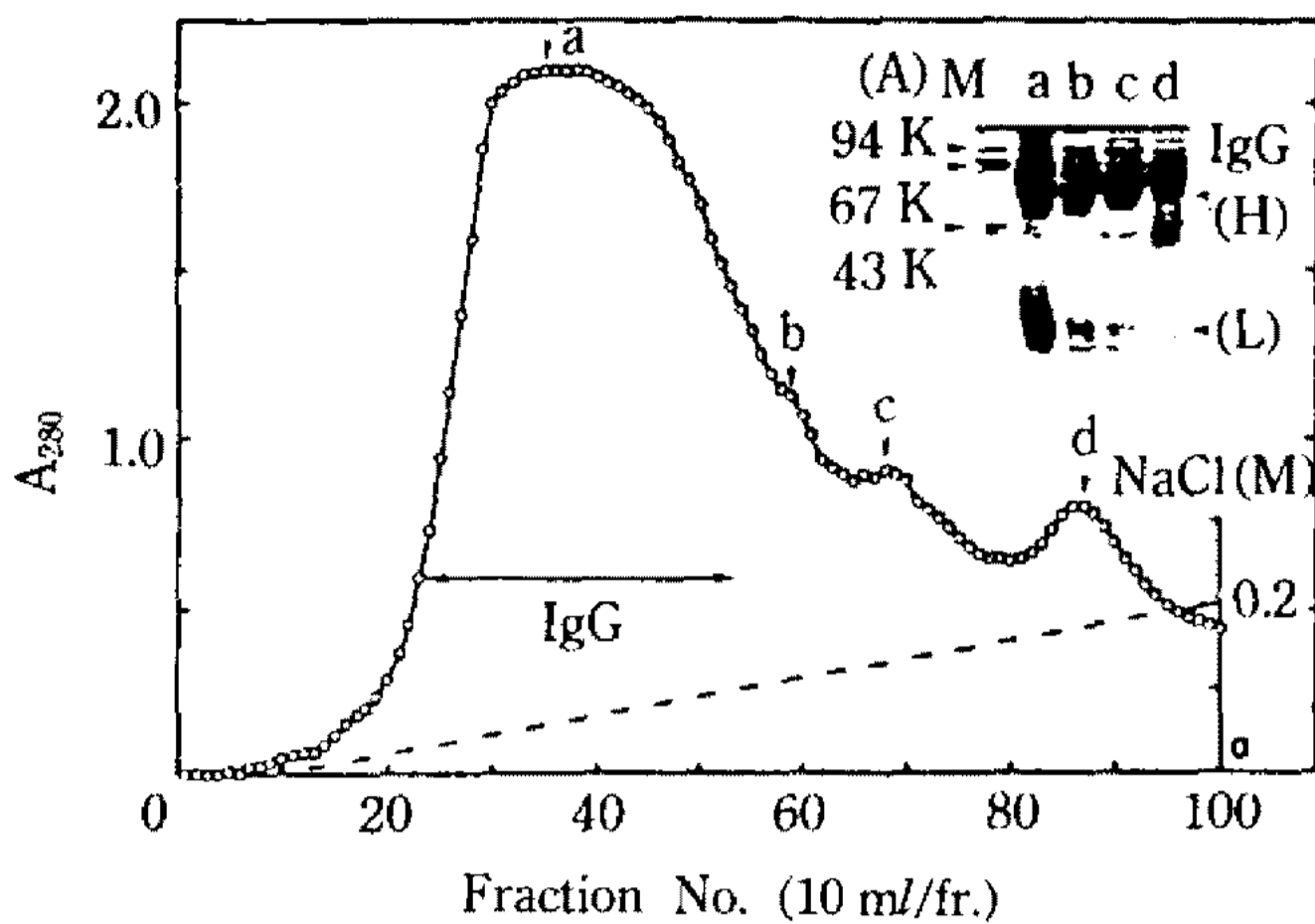


Fig. 3. DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatogram of antisera removed of anti-BSA antibodies. Bed size, $\phi 2.5 \times 21$ cm; elution buffer, 0.05 M Tris-Cl buffer (pH 8.0) with linear NaCl gradient (0.0~0.3 M). In order to identify IgG fractions, a, b, c, and d were applied to SDS-PAGE (A).

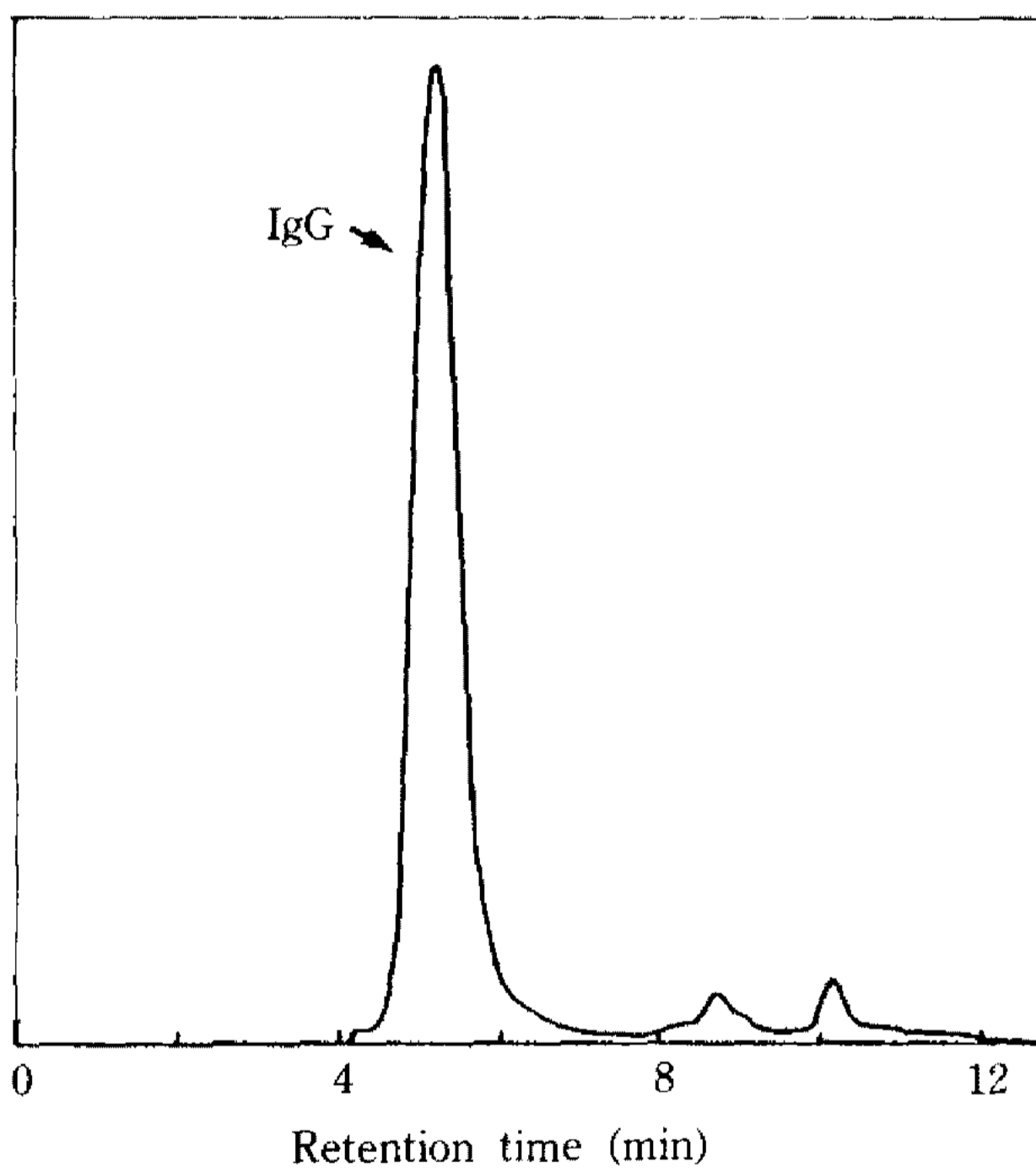


Fig. 4. Gel filtration pattern of the IgG fractions from the ion exchange chromatography. Sample was applied to Superose 12 column of FPLC and detected at 280 nm.

포함하고 있음을 알 수 있었다(data 생략). 또한 이는 각 분획을 coating한 ELISA에 의하여도 확인되었다. 한편, 첫번째 peak에 해당하는 분획(Fig. 3의 가로 화살표 '↔')을 모아 FPLC의 Superose 12 column으로 겔투과 크로마토그래피를 하였을 때의 pattern으로부터, 이 분획들은 높은 순도의 항체(IgG)를 함

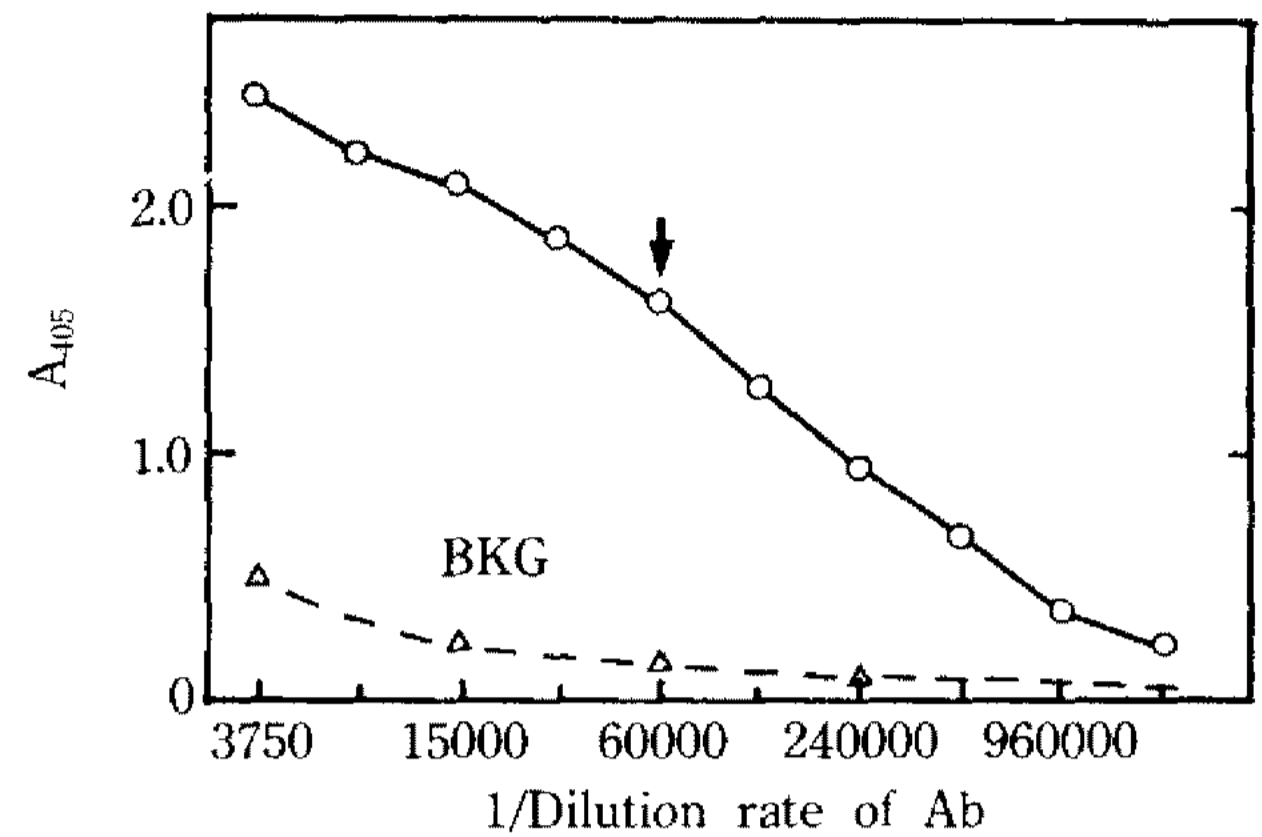


Fig. 5. Titration curve of anti-AFB₁ antibodies. Arrow (↓) indicates optimum final dilution rate of the antibodies for indirect competitive ELISA.

유하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

경합적 효소면역측정법의 검토

간접법에 의한 분석: 우선 ELISA를 행하기 위한 기본조건을 검토하였다. 즉, microplate에 coating시키는 항원으로서 AFB₁-BSA의 농도, coating 조건, coating 후 blocking 방법, 1차 항체인 항AFB₁항체의 희석배율 및 희석시의 사용완충액, 2차 항체-효소 접합체의 희석배율, 기질의 종류 등을 각각 독립적으로 검토하였다. 특히 1차 항체의 희석배율을 결정하기 위해, AFB₁ 용액을 사용하지 않은 간접법(비경합적 ELISA)에 의하여 titration curve를 작성하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 농도에 따른 흡광도의 변화율이 가장 높은 항AFB₁항체의 최종 희석배율(1/60,000)을 최적 희석배율로 결정하였다. 이는, 분석시 과량의 항체가 존재하면 시료중 AFB₁의 농도 차에 의한 흡광도의 차이가 직선적으로 나타나지 않는 현상을 가능한 피하기 위함이었다. 이상의 제반 문제를 검토한 결과, 설정한 분석조건 및 과정은 실험 방법에 명기한 바와 같다.

그 조건하에서 AFB₁ 표준품을 wash buffer에 각 농도별로 희석하여 분석하였을 때, 작성한 표준곡선(standard curve)은 Fig. 6과 같다. 여기서 각 독소별로 측정가능한 농도는 1~10,000 ng/ml(ppb)로 그 범위가 상당히 넓게 나타났다.

직접법에 의한 분석: Coating 항체의 희석농도, blocking 유무, AFB₁-HRP의 희석농도, 각 단계별 처리온도 및 시간 등 제반조건을 검토한 결과, 설정한 AFB₁의 분석조건 및 과정은 실험방법에 명시한 바와

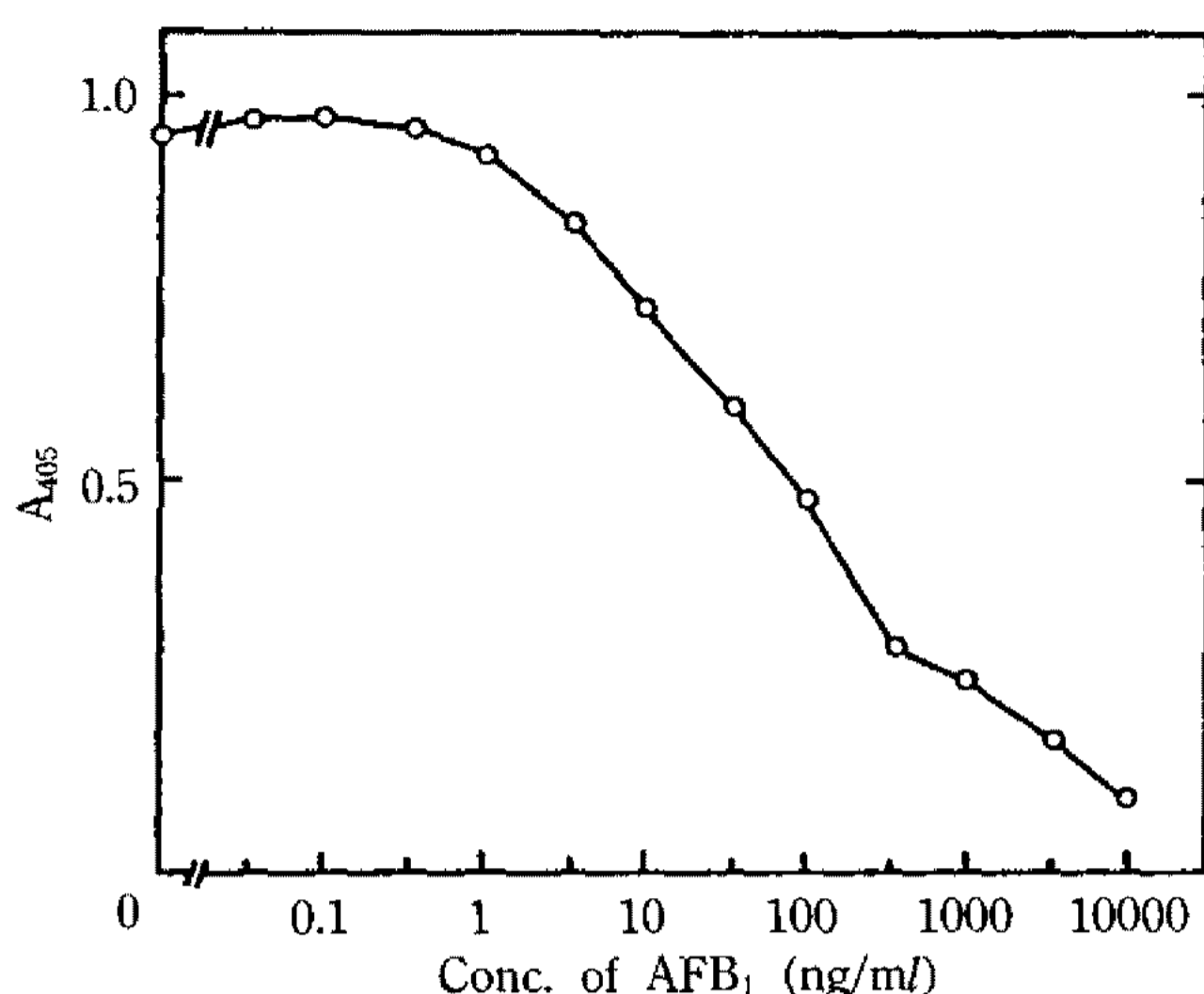


Fig. 6. Standard curve by indirect competitive ELISA for AFB₁.

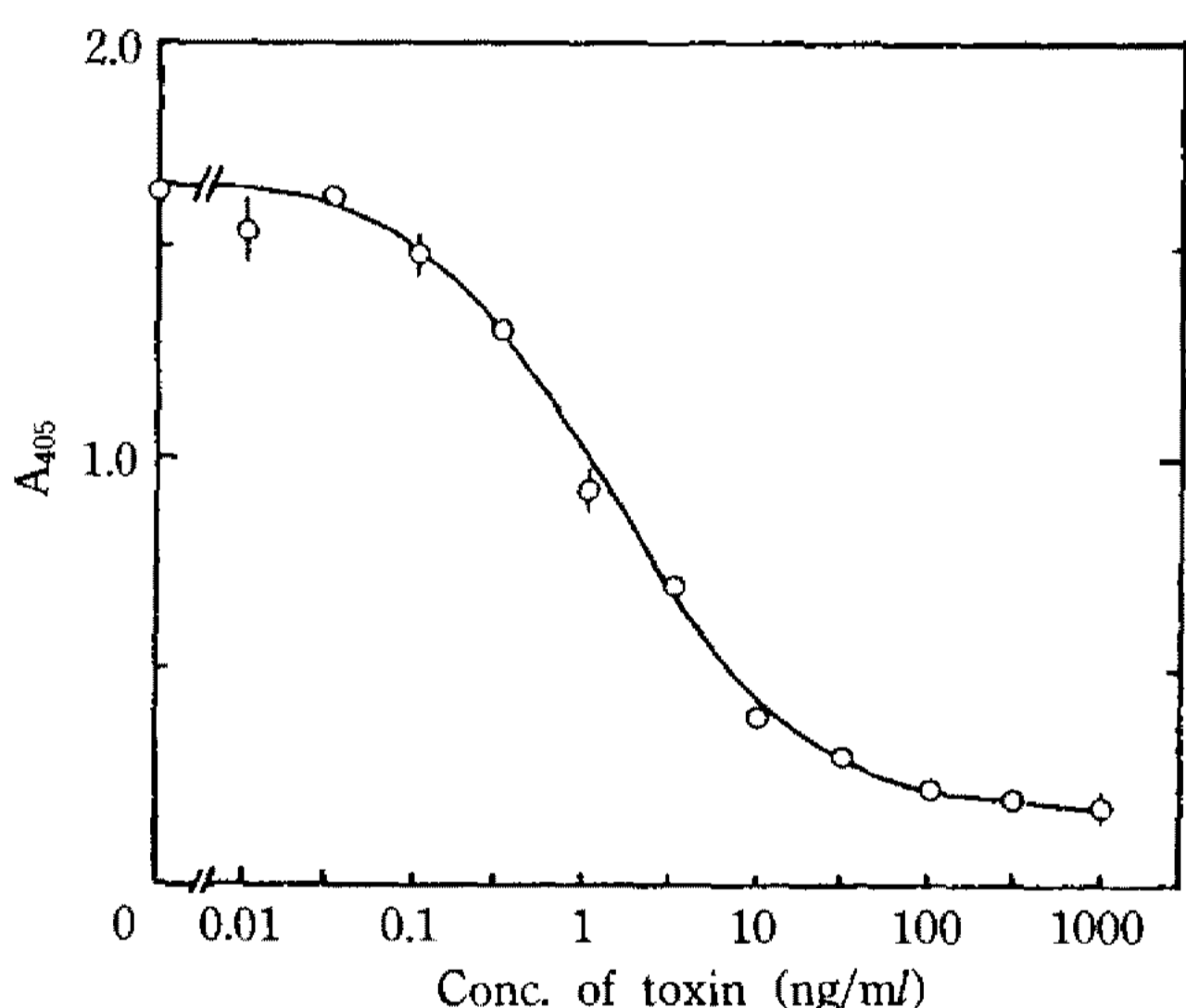


Fig. 7. Standard curve by direct competitive ELISA for AFB₁.

Each point and bar represents an average and standard deviation of 3 determinations.

같다. 그 조건하에서, 곡물시료의 추출용매로 흔히 사용되는 70% MeOH에 독소표준품을 각 농도별로 희석하여 분석하였을 때 작성한 AFB₁의 표준곡선은 Fig. 7과 같다. 여기서 측정 가능한 AFB₁의 농도는 0.2~20 ng/ml로 간접법보다 검출범위는 좁으나 감도가 높게 나타났다.

항AFB₁항체의 교차반응

항AFB₁항체는 AFB₁과 구조가 비슷한 유사독소와도 결합이 가능하므로, 그 교차반응을 직접법에 의하여 검토하였다. 그 결과, Fig. 8에 나타난 바와 같이

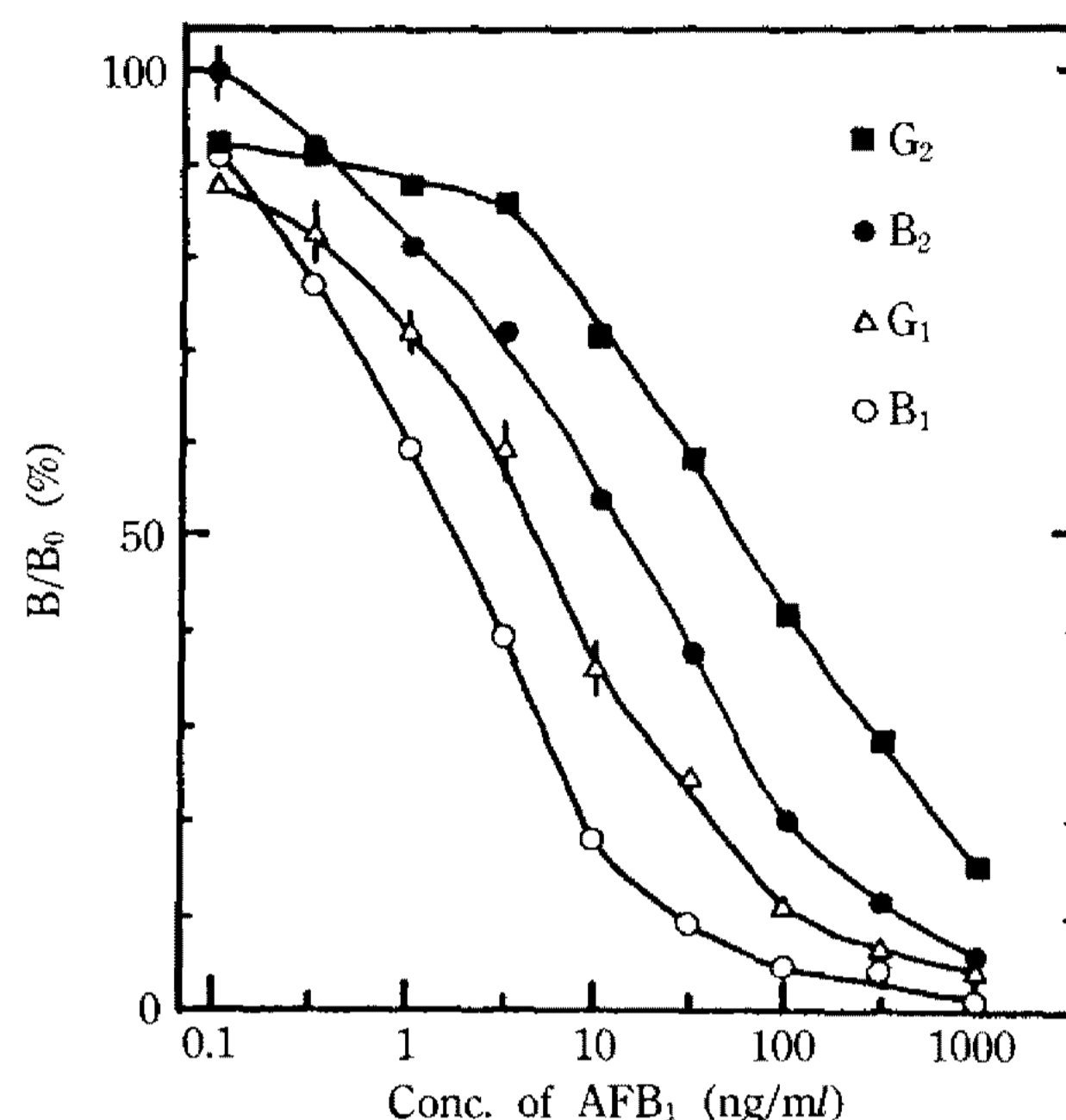


Fig. 8. Effect of different aflatoxins on the binding of AFB₁-HRP to anti-AFB₁ antibodies.

Table 1. Cross-reaction of AFB₁ and its derivatives with AFB₁-HRP binding to antibodies

Toxin	Toxin displacing 50% of AFB ₁ -HRP, ng/ml	Cross-reactivity* %
AFB ₁	1.7	100
G ₁	5.0	34
B ₂	12.9	13
G ₂	55.0	3

AFB₁>G₁>B₂>G₂의 순으로 항AFB₁항체와 잘 결합할 수 있음을 알 수 있다. 또한 교차반응의 정도는 항체에 대한 AFB₁-HRP의 결합을 50% 저해하는 독소의 농도로부터 계산한 결과, 각각 100%, 34%, 13%, 3%로 나타났다(Table 1).

고 찰

특이항체의 특성

본 실험에서 생산한 항혈청을 정제하여 얻은 항 AFB₁항체는 역가(titer)가 상당히 높아서 2×10⁶ 이상임을 알 수 있다(Fig. 5). 이렇게 높은 항체가를 유도할 수 있었던 것은 BSA 하나당 16개 가량의 AFB₁가 부착된 AFB₁-BSA를 면역원으로 사용하였고, 이를 Freund adjuvant와 함께 W/O형의 양호한 emulsion을 만들어 면역하였으며, 면역부위(발바닥, 등 및 대퇴부)와 방법(s.c., i.m.)을 바꿔가면서 여러 차례 추

가면역(boost)하였기 때문으로 생각된다.

또한, 항AFB₁항체는 다클론 항체임에도 불구하고 유사독소인 B₂, G₁, G₂와의 교차반응이 3~34%로 나타났다(Table 1). 이 교차반응의 정도는, ³H-labelled AFB₁을 사용한 평형투석법(equilibrium dialysis study)으로 구한 Chu 등(5)의 결과(1-11%)보다는 다소 높았으나, Pestka 등(13) 또는 김(1)의 결과(각각 10~133% 및 28~118%)보다는 상당히 양호하였다. 따라서 본 연구에서의 항AFB₁항체는 그 특이성도 상대적으로 높은 것을 알 수 있었다.

한편, 이와 같은 특이성을 갖는 항AFB₁항체는 독성을 고려한 aflatoxin의 분석에 매우 유용하게 활용될 수 있다. 즉, 곡물시료중에는 여러 종류의 aflatoxin이 존재하므로 이들을 AFB₁에 대한 상대적인 독성당량으로 나타내기도 하는데(9), 이는 본 연구에서 항AFB₁항체의 교차반응성을 고려한 aflatoxin의 분석당량과 비슷하였다:

Aflatoxin toxicity equivalent

$$= B_1 + 0.464G_1 + 0.215B_2 + 0.106G_2$$

Aflatoxin assay equivalent

$$= B_1 + 0.34G_1 + 0.13B_2 + 0.03G_2.$$

따라서, 본 연구에서 확립한 직접법으로 곡물시료중에 오염된 aflatoxin을 분석할 경우 그 분석치는 대체로 독성당량과 유사한 수치를 나타냄을 알 수 있다.

ELISA에서의 고려사항

직접법과 간접법에 의한 독소의 분석시 고려사항 및 문제점을 비교 검토하여 보면 다음과 같다.

공통사항 : ELISA에 의한 분석과정에서 항체나 독소-단백질을 well에 coating한 다음 1% BSA, 1% ovalbumin이나 0.5% gelatin 용액 등으로 흔히 blocking을 한다. 그러나 본 연구에서는 blocking을 하지 않았는데 이는 coating이 끝난 후, 항원과 항체의 경쟁적 결합시에 Tween 20이 존재하면 well 표면 등에서 비특이적 결합으로 인한 문제가 전혀 없었기 때문이다. 또한 항원의 경쟁적 결합을 위해 well에 넣어 주는 AFB₁-HRP와 AFB₁(직접법), 또는 항AFB₁항체와 AFB₁(간접법)의 동량 혼합액을 사전에 충분히 혼합하여야만 안정된 분석치를 얻을 수 있었다. 발색을 위해 첨가하는 기질로 ABTS(1 mg/ml)와 TMB-d(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, 0.1

mg/ml)를 비교하였을 때, 후자는 HRP에 대하여 매우 민감하게 발색하나 일정농도 이상의 효소가 존재하면 쉽게 포화발색도를 나타냄으로써 발색의 정도를 안정되게 측정하기 힘든 점이 있었기 때문에 본 연구에서는 ABTS를 기질로 사용하였다.

간접법 : 본 연구에서 항원의 경쟁적 결합시 0.1% (최종 0.05%)의 BSA를 첨가하였다. 이는 항AFB₁항체중에 미량이나마 정량침강반응에서 제거되지 않은 항BSA항체가 존재하여 분석시 background(BKG)를 높이기 때문에 항BSA항체를 BSA에 흡수시킴으로써 방해요인을 제거하기 위함이었다. 통상의 간접법에서는 microplate에 coating하는 항원으로 AFB₁-keyholelymphet hemocyanin 또는 AFB₁-ovalbumin을 사용하여 항BSA항체의 영향을 배제시키나, 위와 같은 조건에서는 면역원으로 사용한 AFB₁-BSA를 직접 microplate에 coating하여도 간접법으로 분석이 가능하였다. 한편 곡물시료로부터 독소를 추출하기 위하여 흔히 사용되는 70% MeOH에 용해시킨 AFB₁을 사용하였을 때는 용매의 영향으로 발색은 높아지나 농도차이에 따른 발색의 변화가 작아지므로 분석에 다소 문제가 있었다.

직접법 : 본 연구에서 AFB₁ 분석시 표준곡선을 중심으로 직접법과 간접법을 비교하였을 때 독소의 검출농도는 각각 1~10,000 및 0.2~20 ng/ml(ppb)로 나타나(Fig. 6, 7), 직접법이 간접법보다 검출농도의 범위는 좁으나 검출감도는 5배 이상 높았다. 또한 직접법은 분석시 한 과정(2차 항체의 처리)을 덜 거치고 70% MeOH(최종 35%)의 존재하에서 분석에 문제가 없었으므로 간접법보다 간편하고 신속하게 곡물시료로부터 aflatoxin을 분석할 수 있는 방법으로 나타났다.

결론적으로 본 연구를 통하여 개발한 AFB₁의 분석방법(직접법)은 신속·간편하며 검출감도가 매우 높아, 다량의 시료를 분석할 때에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 앞으로 본 분석법에 의하여 실제 곡물이나 사료 시료중에 존재하는 aflatoxin을 정량하고, 기기분석에 의한 결과 등과 비교하여 그 유효성을 검증할 필요가 있다고 생각한다.

요 약

효소면역측정법에 의한 aflatoxin B₁(AFB₁)의 정

방법을 개발하기 위하여, 항체를 생산·정제하여 분석법을 확립하고 직접법과 간접법(direct/indirect competitive ELISA)의 특성 및 문제점을 비교·검토하였다. Bovine serum albumin(BSA)을 carrier protein으로 한 AFB₁-1-(O-carboxymethyl)oxime-BSA를 토끼에 면역하여 항AFB₁항혈청을 생산하였다. 정량침강반응에 의하여 항혈청으로부터 항BSA항체를 제거하고 황산암모늄 침전법 및 DEAE-Sephadex A-50 이온교환 크로마토그래피를 통하여 순도 높은 IgG항체를 정제하여 항AFB₁항체로 사용하였다. 이 항체는 2×10^6 이상의 높은 항체가를 갖고 있었으며, AFB₁의 유사독소인 G₂, B₂, G₁에 대하여는 3~34%의 낮은 교차반응성을 보여 특이성이 비교적 높았다. 직접법 및 간접법의 분석조건을 확립한 후, AFB₁ 표준품에 대하여 작성한 표준곡선으로부터 각 방법에 의한 AFB₁의 검출농도는 각각 0.2~20 및 1~10,000 ng/ml(ppb)로 나타나, 직접법이 간접법보다 검출농도의 범위는 좁으나 감도가 더 높았다. 직접법은 분석의 안정성, 간편성, 신속성 등의 면에서 간접법보다 실용화에 적합한 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 1990년 과학기술처의 UR대응 농업개발 기술과제로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김종규. 1991. Aflatoxin B₁에 대한 항체생산 및 ELISA법을 이용한 쌀의 aflatoxin B₁ 오염에 관한 연구. 서울대학교 보건대학원 박사학위논문.
2. Bullerman, L.B. 1986. Mycotoxins and food safety. *Food Technol.* **40**(5): 59-66.
3. Busby, W.F., Jr. and G.N. Wogan. 1979. Food-borne mycotoxins and alimentary mycotoxicoses. Pp. 519-610. In Riemann, H. and F.L. Bryan (eds.), *Food-bore Infections and Intoxification*, 2nd ed., Academic Press, New York.
4. Chu, F.S., M.T.S. Hsia, and P.S. Sun. 1977. Preparation and characterization of aflatoxin B₁-1-

- (O-carboxymethyl)oxime. *JAOAC* **60**: 791-794.
5. Chu, F.S. and I. Ueno. 1977. Production of antibody against aflatoxin B₁. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1125-1128.
6. Cooper, H.M. and Y. Paterson. 1991. Production of antibodies, Pp. 2.4.1-2.4.7. In Coligan, J.E., A. M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, and W. Strober(eds.), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, New York.
7. Fulton, S.P. 1989. *The Art of Antibody Purification*. Pp. 32-33. Amicon Division, W.R. Grace & Co., Conn.
8. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
9. Lee, S.R. and Y.H. Kim. 1983. Changes of aflatoxin content in Korean-style soybean paste. *J. Korean Res. Inst. Better Living* (Ewha Womans Univ.) **31**: 201-205.
10. Park, D.L. and A.E. Pohland. 1986. Foodborne microorganisms and their toxins. In Pierson, M. D. and N.J. Stern(eds.), *Developing Methodology*. Pp. 425-438. Marcel Dekker, New York.
11. Pathre, S.V. and C.J. Mirocha. 1976. Assay methods for trichotecenes and review of their natural occurrence. Pp.229-253. In Rodricks, J.V., et al. (eds.), *Mycotoxins in human and animal health*. Pathotox. Park Forest South, IL.
12. Pestka, J.J. 1988. Enhanced surveillance of food-borne mycotoxins by immunochemical assay. *JAOAC* **71**: 1075-1081.
13. Pestka, J.J., P.K. Gaur, and F.S. Chu. 1980. Quantitation of aflatoxin B₁ and aflatoxin B₁ antibody by an enzyme-linked immunosorbent microassay. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 1027-1031.
14. Smith, J.E. and M.O. Moss. 1985. *Mycotoxins, formations significance*. John Wiley & Sons, New York.
15. Van Vunakis, H. and J.J.Langone. 1980. Immunochemical techniques. *Methods Enzymol.* **70**: 1-525.
16. WHO Expert Committee on Biological Saturation. 1981. Requirements for immunoassay kits. *World Health Organization technical report*, Series No. 658. WHO, Geneva.
17. 日本生化学會 編. 1986. 免疫生化学研究法, Pp. 1-83. 續生化学实验讲座: Vol. 5, 東京化学同人, 東京.

(Received March 7, 1982)