

## Metalaxyl의 다클론 항체생산과 최적 ELISA 조건

이강봉 · 임건재\* · 정영호\* · 서용택

### Production of Polyclonal Antibody and Optimum Conditions in ELISA for Metalaxyl

Kang-Bong Lee, Geon Jae Im\*, Young Ho Jung\*, Yong Tack Suh

#### Abstract

A competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was developed to detect and quantify levels of the fungicide metalaxyl in crops. Antiserum against metalaxyl was demonstrated in rabbits immunized with metalaxyl-human serum albumin(HSA) conjugate. Metalaxyl-protein conjugate was prepared by mixed anhydride and peptide coupling method with EDC. In this assay, metalaxyl-ovalbumin(OA) was coated(8 $\mu$ g/ml) on the microtiter plate, which was incubated for 1 hr at 4 $^{\circ}$ C or 4 hr at 37 $^{\circ}$ C with diluted antiserum(1:2,000). The optimum volume ratio of antigen and antibody mixture was 0.5 : 1, which was incubated for 1 hr at 20 $^{\circ}$ C. The detection of metalaxyl bound on the surface of wells was determined by the reaction(30 min) of antirabbit Ig G-peroxidase conjugate with its substrate.

#### 서 론

농작물 재배를 위해 필수적으로 사용되는 농약은 농용관개수를 통하여 하천으로 유입되거나 토양에 침투되고 혹은 곡물, 과일, 야채류 등에 잔류함으로써 환경을 오염시키거나 인체에 해를 끼칠 가능성이

있다. 이로 인해 환경과 식품에 대한 관심이 증대되고 이들의 잔류분석이 확대 실시되고 있는 실정이다. 이러한 기존의 농약 잔류분석법들은 GLC나 HPLC, spectrophotometer를 이용한 기기분석에 의존하고 있다.

하지만 최근 들어서는 면역학적 기법을 이용한

전남대학교 농과대학 농화학과(Dept. of Agric. Chemistry, College of Agriculture, Chonnam University).

\* 농촌진흥청 농약연구소(Institute of Agricultural Chemicals).

잔류분석법이 개발되어<sup>1)</sup> 많은 농약이 이 방법에 의해 분석 되어지고 있다. ELISA(Enzyme Linked-Immunosorbent Assay)라고 하는 이 기법은 특이 외부화합물(항원; 농약)에 대해 친화력을 가지는 다양한 항체를 생산할 수 있는 면역체계와 항체 자체의 특이한 감식력을 이용하고 아울러 항체와 항원 사이의 반응뿐만 아니라 반응물에 표지된 효소를 이용하는 것에 그 기초를 둔 방법이라 할 수 있겠다. 그래서 이 방법은 민감도와 검출능, 특이성이 높고 분석이 신속 간단하며 응용범위가 넓다는 장점을 가진다<sup>2)</sup>.

Metalaxyl(methyl N-(2-methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-alaninate)은 우리나라에서 노균병, 역병 등의 방제를 위해 배추, 참깨, 감자, 담배, 고추 등의 작물에 널리 사용되는 침투이행성 살균제이다. 이 약제의 기존 분석법은 GLC-NPD를 이용한 방법으로 silica gel column chromatography로 정제하는 과정을 포함하고 있다<sup>3,4)</sup>.

본 연구에서는 metalaxyl을 기기분석법이 아닌 ELISA 기법을 이용하여 metalaxyl의 잔류분석을 실시하고자 다클론 항체(polyclonal antibody)를 생산하고 ELISA를 위한 최적조건을 결정하여 그 분석법을 확립하였다.

## 재료 및 방법

### 가. 재료

Microwell plate는 Nunc 96F(flat bottom)를 사용하였고 ELISA reader는 Titertek MC multiscan spectrometer를, multichannel pipette는 Titertek digital pipette를 사용하였다. 본 실험에 사용된 HSA(human serum albumin), EDC(1-[3-dimethylamino propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride IBCF(isobutyl chloroformic acid), tri-*n*-butylamine dioxane, OA(ovalbumin), BSA(bovine serum albumin), antirabbit Ig G-peroxidase conjugate, *o*-phenylenediamine dihydrochloride, Tween 20 등은 Sigma 제품을 사용하였으며 그 밖의 시약은 GR

급이나 HPLC 용을 사용하였다. Coating buffer는 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)를 사용하고 PBS-t(phosphate buffered saline with 0.1 % Tween 20, pH 7.4)는 NaCl(150 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(1.4 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (50 mM)의 조성으로 조제하였으며 기질용액은 0.1 M citrate-phosphate buffer(pH 5.0)에 *o*-phenylenediamine(2.5 mM)과 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.5 μl/ml)를 첨가하여 사용 직전에 조제하였다. 또한 항체의 회석액은 0.1 % BSA를 포함한 PBS buffer를 사용하였다. 면역에 이용된 토끼는 흰색가토로 체중 4.5-6 kg의 생후 4주 이상된 암컷이었으며 사료는 토끼전용사료를 몰과 함께 공급하여 사육하였다.

### 나. 방법

#### 1) Immunogen(metalaxyl-HSA conjugate)의 조제

Metalaxyl 표준품(1.116 g, 2 meq)에 1N NaOH 용액(10 ml)을 가하여 2시간 동안 환류시키면서 가수분해시키고 이 반응액에 1N HCl 용액을 첨가하여 산성화(pH 3.4)시켰다. 산성화된 반응액은 dichloromethane(100 ml)으로 2회 교반추출하여 수분을 제거한 후 감압농축하였다. 용매가 완전히 제거된 반응물은 desiccator상에서 고화될 때까지 방치하고 건조된 후에는 용점을 측정하였다. 이때 얻어진 결

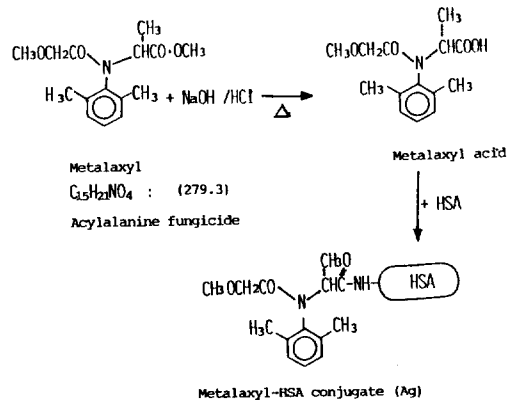


Fig. 1. Synthetic route to metalaxyl-protein conjugate.

정체는 IR과 NMR로 그 구조를 확인하였으며 생성된 metalaxyl acid(22.4mg, 84 $\mu$ mol)는 담체 단백질로 사용된 HSA(56 mg)와 EDC(382 mg, 2mmol)가 용해되어 있는 0.2 M 인산완충용액(pH 7.2, 8 ml)에 적가하면서 교반하여 conjugate를 조제하였다. 교반은 25 °C에서 8시간 동안 진행하였고 반응이 완료된 후 conjugate는 증류수에 대해 3일간 투석하였다. 생성물은 투석 후 동결 건조하여 -20°C에 보관하였다. 이 반응경로는 Fig. 1과 같다.

### 2) 항체(polyclonal antibody)의 생산

Metalaxyl-HSA conjugate(1 mg)를 0.14 N NaCl 용액(1 ml)에 녹여 Freund's complete adjuvant(1 ml)와 1:1의 비율로 잘 혼합한 뒤 토끼의 뒷목과 등 부분의 8-10 곳에 피하주사하였다. 이때 토끼는 4마리를 사용하였다. 면역촉진 주사는 최초주사 3주 후에 immunogen과 Freund's incomplete adjuvant를 동일한 방법으로 피하주사하였고 이후 매 3주마다 총 4회의 면역촉진주사를 실시하였다. 면역촉진 주사 기간중에는 매 주사 1주 후에 토끼의 이정맥으로부터 채혈하여 항체의 생성과 역가를 조사하였으며 최종 면역촉진주사 2주 후에 본 실험에 사용할 항혈청을 채혈하였다. 채혈된 항혈청은 4 °C에서 하룻밤 방치하여 혈장과 분리시키고 다시 원심분리(10,000g, 15분)하여 상등액을 0.1 ml씩 유리 vial에 넣어 -20 °C에 보관하였다. 분리된 항혈청의 역가검사는 indirect ELISA에 의하여 실시하였다.

### 3) Coating antigen(CAg)의 조제

ELISA를 위한 CAg의 조제는 Hammock 등의 mixed anhydride 방법<sup>5)</sup>에 따라 실시하였다. Metalaxyl acid(40mg, 150  $\mu$ mol)를 dry dioxane(2ml)에 용해시킨 후 교반하면서 IBCF(25  $\mu$ l)와 tri-n-butylamine(50 $\mu$ l)를 첨가하여 30분간 25 °C에서 반응시켰다. 반응 후 OA(130 mg, 3  $\mu$ mol)를 용해시킨 0.2 M NaHCO<sub>3</sub>(pH 9.3, 9 ml)수용액을 적가하고 6시간 동안 25 °C에서 방치하였다. 반응이 완료된 후 증류수에 대해 3일간 투석하고 동결건조하여 -20 °C에 보관하였다.

### 4) Microwell plate의 전처리

96 well microtiter plate를 10 % ethyl ether/ethanol로 각 well당 250  $\mu$ l씩 첨가하여 2회 세척하고 자연건조시킨 후 다시 2차 증류수로 30분간 초음파 세척하였다. 세척된 plate는 desiccator에서 건조 후 ELISA에 사용하였다.

### 5) Indirect ELISA에 의한 항체의 역가검정

생성된 항체에 대한 역가의 검정은 이 등의 방법<sup>6)</sup>에 따라 microwell plate에 coating buffer로 희석된 metalaxyl-OA conjugate(8 mg/L) 용액 200  $\mu$ l씩을 첨가하여 4 °C에서 하룻밤 배양하여 항원을 고정시켰다. 배양 후 PBS-t로 3회 세척하고 metalaxyl의 항혈청액을 10, 100, 1,000, 2,000, 4,000, 8,000, 16,000, 32,000 배로 연속희석하여 이들 희석액 200  $\mu$ l씩을 각 well에 첨가하였다. 희석된 항혈청액이 첨가된 plate는 37 °C에서 2시간 배양하고 항혈청액을 제거한 후 PBS-t로 3회 세척하였다. 세척 후 anti-rabbit Ig G - peroxidase conjugate 희석액(1:1000)을 200  $\mu$ l씩 첨가하고 37 °C에서 30분간 배양하였다. 배양 후 PBS-t로 3회, 증류수로 2회 세척한 plate는 기질용액을 첨가하여 암 조건하의 실온에서 30분 방치하고 60 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 50  $\mu$ l로 반응을 정지시켰다. 반응이 완료된 plate는 492 nm에서 흡광도를 측정하여 항체의 역가를 결정하였다.

### 6) Metalaxyl의 잔류분석을 위한 competitive indirect ELISA의 최적조건 조사

Microwell plate에 고정시킬 CAg의 정확한 양을 결정하기 위하여 coating buffer에 metalaxyl-OA conjugate를 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 20, 40, 80  $\mu$ g/ml 농도로 희석하여 각 well당 180  $\mu$ l씩 첨가하고 ELISA 반응을 시켜 그 흡광도를 측정하였다. 또한 CAg의 plate 첨가 후 0.5, 1, 2, 3, 4, 8 시간의 배양시간과 배양온도(4, 20, 37 °C)에 따른 최적조건도 결정하고자 하였다. 항체 희석배수에 따른 최적 흡광도의 설정을 위해 5가지의 희석배수(1:2,000, 4,000, 8,000, 16,000, 32,000)로 희석된 희석액을 첨가하여 ELISA 분석하고 Ag-Ab(항원-항체) 혼합의

비율을 결정하기 위하여 Ag과 Ab 각각을 부피별 (25, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000  $\mu$ l)로 반응시켰다. 이때 반응시간에 대한 흡광도 값도 함께 조사하였다. 최종적으로 anti-rabbit Ig G-peroxidase conjugate의 배양시간을 조사하여 ELISA 수행의 최적 조건을 결정하였다.

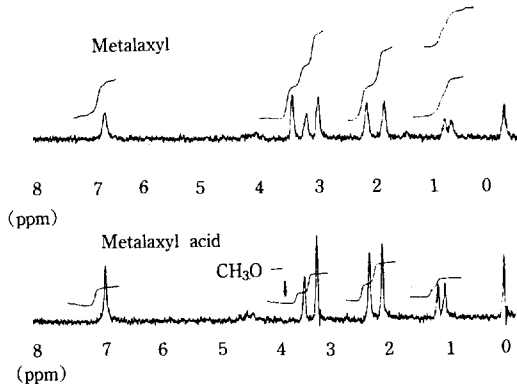


Fig. 2. Confirmation of metalaxyl acid by  $^1\text{H-NMR}$ .

결과 및 고찰

합성한 metalaxyl acid의 융점은 140-141  $^{\circ}\text{C}$ 였으며 합성수율은 49.3 % 였다. 합성된 metalaxyl acid는 IR과 NMR로 확인하였는데 Fig. 2의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서 보는 바와 같이  $\delta$  3.6 ppm의 methoxy ether( $\text{CH}_3\text{O-}$ ) group의 소멸을 보였다. 또한 IR에 의한 분석결과를 살펴보면(Fig. 3) 파장 3,000  $\text{cm}^{-1}$  부근에서 수소파의 단일결합( $\text{OH-}$ )에 의한 신축진동을 나타내는 것을 볼수 있었다. 이로 미루어 metalaxyl acid가 합성되었다고 판단되었고 이를 이용해 HSA나 OA와 conjugation시켜 항원으로 사용하였다. 최종적으로 생성된 항체에 대한 역가(titer)는 indirect ELISA에 의해서 4마리의 토끼로부터 조사한 결과 각각 1:8,000, 16,000, 16,000, 12,000으로 나타났다. 본 실험에서는 1:16,000의 역가를 지닌 항혈청액을 사용하였다.

Metalaxyl의 잔류분석을 위한 ELISA는 modified (또는 competitive) indirect ELISA 방법을 이용하여

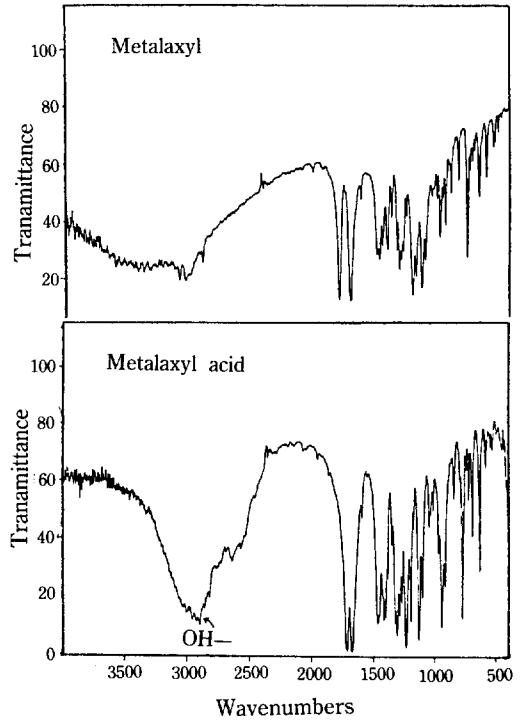


Fig. 3. Confirmation of metalaxyl acid by IR.

최적조건을 설정하였는데 우선적으로 microwell plate에 피복하는 CAg의 최적농도를 구하였다. 각 농도별로 희석된 CAg를 사용하여 시험을 수행한 결과(Fig. 4), 0.5-8  $\mu\text{g/ml}$  농도까지는 그 흡광도 값이 현저히 증가하였으나 8  $\mu\text{g/ml}$  농도 이상부터는 그 값에 큰 차이가 없었다. 이로 미루어 보아 8  $\mu\text{g/ml}$  농도 이상의 CAg는 microwell plate의 well 내부에서 더 이상 결합하지 못하고 세척되어 나간다고 생각되었다. 이러한 결과는 Voller 등<sup>7)</sup>이나 Marvin 등<sup>8)</sup>이 s-triazine계 제초제의 ELISA 분석시 사용한 결과와 유사한 농도로 일반적으로 1-10  $\mu\text{g/ml}$ 의 CAg 농도가 유효함을 알 수 있다. 또한 CAg의 배양시간과 배양온도에 대한 조사(Fig. 5)에서 4  $^{\circ}\text{C}$ 의 배양온도로 1시간의 배양시간까지는 그 흡광도가 증가를 보였으며 20  $^{\circ}\text{C}$ 와 37  $^{\circ}\text{C}$ 의 경우에는 4시간까지 꾸준한 증가를 보였다. 이들의 흡광도 값

에 대한 민감도는 4 °C와 20 °C에서 높게 나타났으며 37 °C에서는 약 30 % 정도의 낮은 흡광도 값을 보였다. 그래서 CAg의 배양을 위한 최적시간은 4 °C에서는 1-4시간으로 20 °C와 37 °C의 온도조건에서는 4시간으로 결정할 수 있었다. 이러한 배양온도와 시간은 Gee 등(9)이나 Wie 등(10)의 4 °C 하룻밤 배양이나 Singh 등(11)의 4 °C 5시간 배양, Niewola 등(12)의 20 °C 2시간, Dixon-Holland 등(13)의 40 °C 4시간 등과 비교할때 유사한 배양조건이라고 볼 수 있었다.

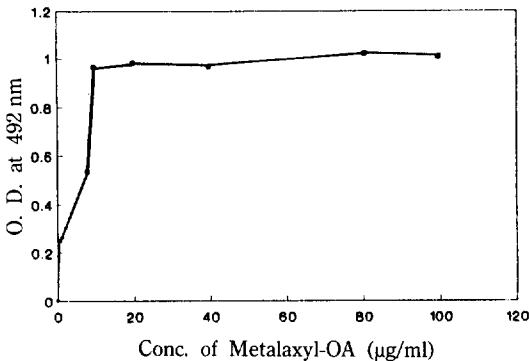


Fig. 4. The effect of varying the coating concentration of metalaxyl-OA conjugate on the binding of a fixed amount Ab.

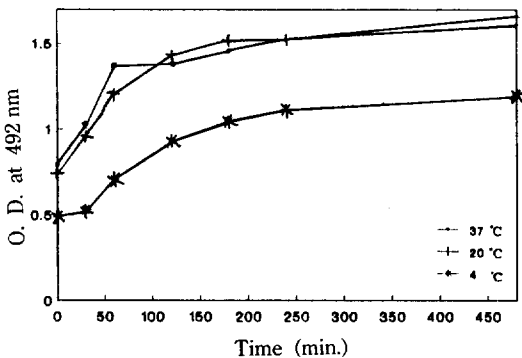


Fig. 5. The effect of time and temperature on the coating antigen.

토끼로부터 metalaxyl-HSA에 대해 생성된 항체의 최적 희석배수는 Fig. 6에 나타난 바와 같이 희석

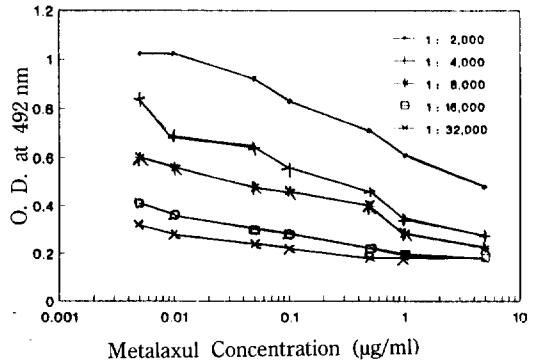


Fig. 6. Comparison of antibody binding capacity for metalaxyl in varying the dilution concentration.

배수가 높아질수록 낮은 흡광도를 보였다. 이 결과에서 1:8,000의 희석배수부터는 기울기가 낮고 metalaxyl 농도변화에 따른 흡광도 값의 변화가 크지 않아 본 실험을 위한 최적조건으로는 1:2,000의 희석배수(기울기 0.88, 최대 흡광도 % : 84.3)를 택하였다. 항체를 1:2,000으로 희석한 뒤 competitive indirect ELISA 과정에서 항원과의 혼합반응시 혼합비율을 결정한 결과는 Fig. 7에 나타났다. Ag(metalaxyl) 1 ppm과 5 ppm을 각 1 ml씩 사용하여 Ab의 최적부피를 조사하였으며 Ab 희석액(1:2000) 1 ml에 대하여 Ag의 최적부피를 확인하였는데 Ag 1 ml에 대한 Ab의 최적부피에 대한 흡광도는 Ab 함량의 증가와 비례관계를 나타냈고 Ab 희석액 1

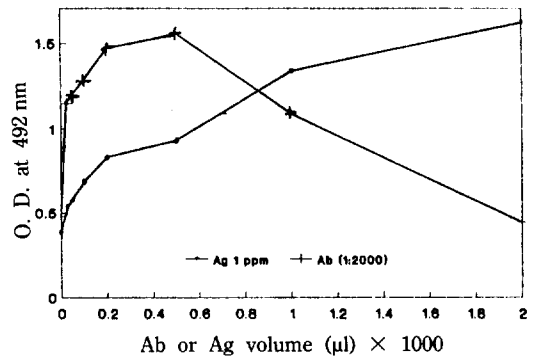


Fig. 7. The effect of varying the amount of Ab and Ag.

ml에 대한 Ag의 부피변화에 따른 흡광도는 0.5 ml까지는 증가하다가 함량이 증가됨에 따라 다시 감소하는 경향을 보였다. 이 결과에서 Ag 500  $\mu$ l와 Ab 1 ml를 혼합하였을때 최적부피의 혼합이 이뤄짐을 알수 있었다.

상기 혼합한 Ag-Ab 혼합액과 다음단계에서 사용하는 antirabbit Ig G-peroxidase conjugate(1:1,000)의 최적 배양시간은 Fig. 8에 나타났다. Ag-Ab 혼합액은 배양시간 1시간까지는 흡광도가 급격히 저하되고 1시간 이후부터 3시간까지는 거의 변동이 없었다. 이는 Ag과 Ab가 배양 후 1시간까지는 상호 결합반응을 하여 제거됨으로써 나타나는 결과이고 1시간 이후로는 Ag-Ab 결합이 완료됨을 나타내고 있다. 한편, secondary Ab-peroxidase conjugate의 최적 배양시간은 30 분까지의 흡광도는 증가하였고 30분 이후 3시간까지는 큰 변동이 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과는 농약에 대한 ELISA에서 널리 사용되는 과정들과 큰 차이는 없지만 CAg의 배양온도와 항체 희석배수, 항원-항체 혼합비율 등은 기존의 방법들과는 차이가 있는 metalaxyl 자체만의 ELISA 조건으로 생각되었다.

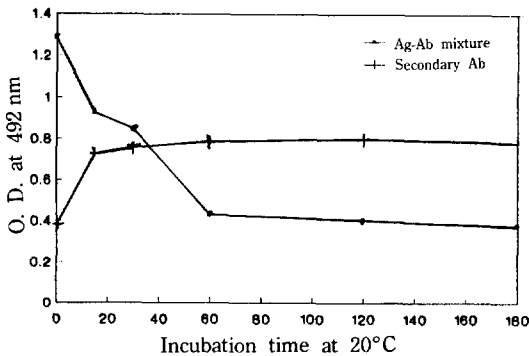


Fig. 8. The effect of incubation time on the Ag-Ab mixture and antirabbit Ig G-peroxidase conjugate.

요 약

Metalaxyl을 ELISA기법을 이용하여 분석하기 위

하여 metalaxyl-HSA를 합성하고 이에 대한 항체를 생산하여 competitive indirect ELISA를 위한 최적 조건을 조사하였다. Metalaxyl-protein conjugate는 metalaxyl을 가수분해시켜 생성된 metalaxyl acid에 단백질(HSA, OA)을 mixed anhydride방법이나 EDC 첨가방법으로 조제하였고 생성된 항체의 역가는 1:16,000으로 나타났다. Coating Ag의 최적농도는 8  $\mu$ g/ml, 배양시간은 4  $^{\circ}$ C에서 1시간 이상, 20  $^{\circ}$ C와 37  $^{\circ}$ C에서는 4시간으로 나타났으며 항체의 희석배수는 1:2,000이 최적으로 나타났다. 항원과 항체의 혼합비율은 0.5 ml의 항원에 대해 1 ml의 항체가 최적이었으며 이 혼합액의 배양시간은 1시간, antirabbit Ig G-peroxidase conjugate의 배양시간은 30분이 최적으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Hammock, B. D., Mumma, R. O.(1980) : In "Recent Advances in Pesticide Analytical Methodology", Harvey,J.Jr., Zweig,G.,Eds., American Chemical Society, Washington DC, ACS Symp. Ser. No. 136, p. 321.
2. Tijssen,P., Burdon, R. H. and van Knippenberg, P. H.(1985) : Practice and Theory of Enzyme Immunoassays In "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier, vol. 15, pp. 1-20.
3. Speck, M., Dirr, E.(1980) : Gas chromatographic determination of metalaxyl (Ridomil) residues in tobacco, *J. Chromatography*, **200**, 313-316.
4. Tafuri, F., Marucchini, C., Patumi, M., Businelli, M.(1981) : Gas Chromatographic Determination of Metalaxyl in Soil and Sunflower, *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 1298-1301.
5. Wie, S. I. and Hammock, B. D.(1982) : Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Residue of Diflubenzuron and BAY

- SIR 8514, *J. Agric. Food Chem.*, 30, 949-957.
6. Lee, K. B., Shim, J. H. and Suh, Y. T.(1992) : Development and Application of Enzyme Immunoassay for Endosulfan Residue Analysis, *Korean J. Environ. Agric.*, 11(1), 59-66.
  7. Voller, A., Bidwell, D. E. and Bartlett, A.(1979) : In "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA), A guide with abstracts of microplate applications", Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, pp. 35-43.
  8. Goodrow, M. H., Harrison, R. O. and Hammock, B. D.(1990) : Hapten Synthesis, Antibody Development, and Competitive Inhibition of Enzyme Immunoassay for s-Triazine Herbicides, *J. Agric. Food Chem.*, 38(4), 990-996.
  9. Gee, S. J., Miyamoto, T., Goodrow, M. H., Buster, D. and Hammock, B. D.(1988) : Development of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Analysis of the Thiocarbamate Herbicide Molinate, *J. Agric. Food Chem.*, 36(4), 863-870.
  10. Wie, S. I. and Hammock, B. D.(1984) : Comparison of Coating and Immunizing Antigen Structure on the Sensitivity and Specificity of Immunoassays for Benzoylphenyurea Insecticides, *J. Agric. Food Chem.*, 32(6), 1294-1301.
  11. Singh, P., Ram, B. P. and Sharkov, N.(1989) : Enzyme Immunoassay for Screening of Sulfamethazine in Swine, *J. Agric. Food Chem.*, 37(1), 109-114.
  12. Niewola, Z., Benner, J. P. and Swaine, H.(1986) : Determination of Paraquat Residues in Soil by an ELISA, *Analyst*, 111, 399-403.
  13. Dixon-Holland, D. E. and Katz, S. E.(1991) : Competitive Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Screening Assay for the Detection of Sulfamethazine Contamination of Animal Feeds, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74(5), 784-789.