

회석에 의한 우유 중 Aflatoxin M₁의 효소면역측정법

손동화 · 임선희* · 이인원*

한국식품개발연구원

*농업생물신소재연구센터, 서울대학교 농업생명과학대학

An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Aflatoxin M₁ in Cow's Milk without a Cleanup Procedure

Dong-Hwa Shon, Sun-Hee Lim* and Yin-Won Lee*

Korea Food Research Institute

*Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University

Abstract

A simple and rapid detection system for aflatoxin M₁ (AFM₁) in cow's milk by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed. Specific antibodies against AFM₁ conjugated to bovine serum albumin (AFM₁-BSA) were raised in rabbits and purified. The cross-reactivities of the antibodies against aflatoxin analogs were less than 29.9%. When a competitive direct ELISA (cdELISA) for AFM₁ established by use of the antibodies was applied to the spike test of AFM₁ onto uncontaminated cow's milk, the assay recovery was unstable unless cow's milk was diluted to 40% (2:3) with phosphate buffered saline (PBS). In that condition of sample dilution, the mean ELISA recovery of AFM₁ from the cow's milk was 113% (coefficient of variation (CV) of each recovery percentage, 8.2%) in the range of 0.3-3.0 ppb. These results showed that the ELISA system could be a convenient tool to monitor the contamination of AFM₁ more than 0.5 ppb in cow's milk (FDA allowance limit) easily.

Key words: aflatoxin M₁, ELISA, cow's milk, without cleanup

서 론

Aflatoxin은 *Aspergillus flavus*와 *A. parasiticus*가 생성하는 매우 강력한 발암물질로서 고온, 다습한 열대 및 아열대에서 생산되는 농산물에서 흔히 검출된다⁽¹⁾. 그중에서도 자연오염도와 독성이 가장 높은 aflatoxin B₁ (AFB₁)을 가축 등 동물이 섭취하면 체내대사에 의하여 M₁ (AFM₁)으로 전환되는데, 그래도 여전히 비교적 강한 독성을 나타낸다⁽²⁾. 독소에 민감한 유아의 경우, AFM₁에 오염된 우유 등의 축산물을 섭취하면 치명적일 수도 있다. 국내에서는 아직 그 기준치가 설정되지 않았으나, 국가별로 우유 중의 AFM₁ 오염허용치를 살펴보면, 스위스의 경우 0.01 ppb, 네델란드 0.05 ppb, 미국 (FDA) 0.5 ppb로 AFB₁보다 훨씬 엄격하다⁽³⁾. 본보에서는 우유 중의 발암성 진균독소, AFM₁을

효율적으로 검출할 수 있는 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 개발하고자 하였다. 즉, 기존의 ELISA 분석법에서 우유 중의 방해물질을 제거하기 위한 정제과정(cleanup)은, 조작 단계의 증가 및 그로 인한 시간연장으로 분석의 효율성을 떨어뜨려, 수 많은 시료를 분석하기에 이 ELISA는 여전히 적합하지 않다^(4,5). 따라서, 이를 개선하기 위하여 우유를 완충액으로 회석함으로써 신속, 간편하게 AFM₁의 분석이 가능한 ELISA system을 개발하였다.

실험 방법

재료

Aflatoxin M₁, M₂, B₁, B₂, G₁, G₂, B_{2a}, G_{2a} 등 표준독소 및 bovine serum albumin (BSA), horseradish peroxidase (HRP), carboxymethylamine hemihydrochloride, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDPC), Tween 20, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline sulfonic

Corresponding author: Dong-Hwa Shon, Food Chemistry & Physics Division, Korea Food Research Institute, Songnam, Kyunggi-do 463-420, Korea

acid) (ABTS) 등은 Sigma사의 제품을 사용하였다. Freund's complete adjuvant와 incomplete adjuvant, 단백질 정량용 micro BCA kit (#23235), 항체정제용 protein A column (ImmunoPure Plus IgG Purification Kit, #44679)은 Pierce사로부터 구입하였으며, 기타의 시약과 유기용매는 GR 급이나 그 이상을 사용하였다. Microtiter plate는 Nunc사의 Maxisorp (#4-48812)을, microplate reader는 미국 BioTek사의 EL307C를 사용하였다. 실험동물로 사용한 2.5 kg가량의 New Zealand White 토끼 암컷은 한국실험동물연구원(경기도 수원시)에서 구입하였다.

면역원의 준비 및 항체의 생산

면역원인 AFM₁-BSA은 AFM₁에 carboxymethylamine을 처리하여 1번 탄소위치에 =CO기를 -COOH기로 변환시켜 AFM₁-oxime을 만들었다. 다음으로 이를 EDPC의 존재하에서 BSA과 함께 반응하여 AFM₁-BSA conjugate를 얻었다^{6,8)}. 이를 토끼에 마리당 500 µg씩 Freund's adjuvant와 함께 2-3주일 간격으로 수차례 피하주사하였다. 면역 1주일 후에 귀정맥으로부터 채혈하여 항혈청을 분리하였다. Protein A column을 이용하여 항체를 정제하였다⁹⁾. 경합ELISA에 기준 표식물로 사용하기 위한 AFB₁-HRP의 준비는 앞의 AFM₁-BSA의 경우에 준하였다.

효소면역측정법 (ELISA)

AFM₁의 분석을 위하여 확립한 직접법에 의한 경합 ELISA (competitive direct ELISA; cdELISA)의 조건은 다음과 같았다. 항체를 coating buffer (0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 9.0)에 10 µg/ml로 희석한 액 100 µl씩을 96 well microplate의 well에 채우고 4°C에서 하룻밤 방치하여 coating한 후, wash buffer (수세용 완충액; 0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 150 µg/ml로 3 회 세척하였다. 이어서, 앞의 AFB₁-HRP (horse raddish peroxidase)를 수세용 완충액에 1/10로 희석한 것과 시료용액을 1:1로 혼합한 후 각 well에 100 µg/ml씩 넣고 상온에서 한 시간 처리하였다. 3회 세척후, 기질 용액 (0.1% ABTS, 0.06 M citric acid, 0.077 M Na₂HPO₄, pH 4.0, 0.02% hydrogen peroxide 사용전 첨가) 100 ml를 넣고 상온에서 30분간 발색시킨 다음 반응정지액 (0.1% sodium azide) 100 ml를 첨가하였다. 흡광도는 microplate reader로 405 nm의 파장에서 측정하였다¹⁰⁾.

항AFM₁항체의 교차반응

항체의 특이성을 조사하기 위하여 유사독소에 대한 항AFM₁항혈청의 교차반응(cross-reactivity)을 ELISA로 분석하였다. 즉 각각 수세용 완충액에 농도별로 희석한 aflatoxin 유도체를 AFM₁대신에 사용하여 ELISA를 행하였다. 교차반응의 정도는 항AFM₁항체에 대한 AFB₁-HRP의 결합을 50% 저해하는 AFM₁의 농도를, AFB₁-HRP의 결합을 50% 저해하는 유사독소의 농도로 나눈 %값으로 나타내었다.

ELISA에 의한 AFM₁의 회수율 분석

우유중 AFM₁의 회수율을 조사하기 위하여 spike test를 실시하였다. 오염되지 않은 우유에 일정농도의 AFM₁을 인위적으로 첨가한 후, 이것과 PBS (phosphate buffered saline; 1.9 mM NaH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl, pH 7.2)를 2:3 (v/v)의 비율로 혼합하여 희석한 다음 ELISA를 실시하였다. 이때 검정곡선의 작성을 위한 표준용액으로서 PBS에 용해한 AFM₁을 사용하였다.

결과 및 고찰

항체의 특성

AFM₁-BSA로 면역하여 얻은 항AFM₁항체의 aflatoxin 주요유도체에 대한 교차반응을 ELISA로 조사하였다. 그 결과, 이 항체의 AFB₁-HRP에 대한 결합을 50% 저해하는 AFM₁, AFM₂, AFB₁, AFB₂, AFG₁, 및 AFG₂의 농도는 각각 0.35, 1.17, 1.4, 13.0, 2.7, 및 54.0 ppb (ng/ml)이었다 (data 생략). 이로부터 구한 특이항체의 각 유도체에 대한 교차반응율은 각각 100, 29.9, 25.0, 2.7, 13.0, 0.65%로서 이 항체는 AFM₁을 특이적으로 인식하였다. 또한 Fig. 1의 검정곡선으로부터, 이 항체 및 AFB₁-HRP에 의한 ELISA는 0.1 ppb (최고 발색치의 80%가량을 나타내는 AFM₁의 농도)가 검출한 계임을 알 수 있었다.

우유의 회색에 따른 표준곡선의 변화

앞에서 확립한 ELISA로 우유중 AFM₁을 직접 분석할 수 있는 가능성을 조사하였다. 그러나, 우유에는 지방, 단백질, 탄수화물, 염 등 다양한 성분이 함유되어 있어 우유시료를 완충액으로 희석하지 않고 직접 분석에 사용하는 것은, 분석회수율이 매우 낮거나 불안정하여 불가능하였다 (data 생략). 또한, 우유시료를 PBS로 희석하는 경우에는, ELISA의 기준으로 활용할 검정곡선이 우유의 농도에 따라 어떻게 변화하는지를 미리 검토할 필요가 있었다. 따라서, AFM₁을 (1) PBS

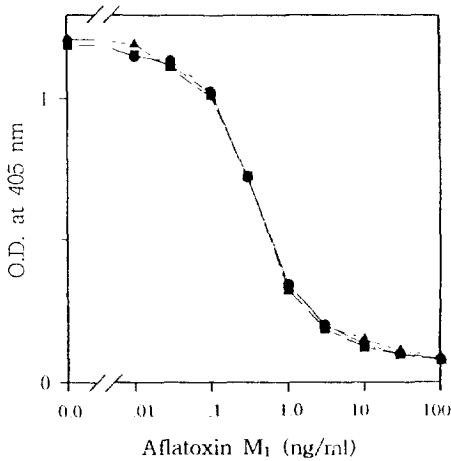


Fig. 1. Effect of cow's milk on the calibration curve of competitive direct ELISA (cdELISA) for aflatoxin M₁ (AFM₁) Standard AFM₁ was dissolved in phosphate buffered saline (PBS, 0% milk) (●), 10% milk (■), or 40% milk (▲)

100%, (2) 우유 10% + PBS 90%, (3) 우유 40% + PBS 60%에 각각 농도별로 용해하여 검정곡선을 구하였다. 그 결과, Fig. 1에 나타난 바와 같이 우유농도 40% 이하에서는 검정곡선의 유형이 크게 변화하지 않음을 확인하였다. 따라서, 이들 조건하에서 AFM₁의 분석을 위한 ELISA의 회수율을 검토하였다.

우유의 희석에 의한 ELISA 회수율

Spike test를 위하여 0.1-3.0 ppb의 농도범위에서 인위적으로 오염시킨 우유 중의 AFM₁을 ELISA로 분석하였다. 이때 시료를 PBS로 희석하여 우유의 농도를 10%로 조절하고 ELISA를 행한 경우, 검정곡선상에서 AFM₁의 농도를 구할 수 없을 정도로 발색이 높게 나타났다. 하지만, 우유의 농도를 40%로 조절한 경우에는 Table 1에서 나타난 바와 같이 양호한 결과를 얻었다. 즉, 0.1 ppb에서의 회수율이 215%로 매우 크게 나타났으나, 0.3-3.0 ppb의 농도범위에서는 농도별 회수율의 평균값이 113%, 변이계수(CV)가 8.2%로 나타났다.

이는 정제과정을 거친 후 행한 ELISA의 결과와 비교시, 시료 중 AFM₁의 검출감도가 대체로 비슷하거나⁽¹⁾ 다른 보고의 경우보다 다소 낮은 것^(4,12,13)으로 나타났다. 그러나, 본 연구에서 개발한 ELISA system은, 정제과정없이 희석한 우유시료를 바로 분석할 수 있어, 많은 수의 우유시료 중 0.5 ppb이상(미국, FDA허용기준치)으로 오염된 AFM₁을 한꺼번에 손쉽게 검출함으로써 1차적인 분석에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각한다.

Table 1. Recovery of AFM₁ from artificially contaminated cow's milk without a cleanup procedure as determined by cdELISA

Added, pg/ml	Detected, pg/ml ¹⁾	Recovery, %
100	215 ± 30.8 (14.3)	215
300	330 ± 29.4 (8.9)	110
1,000	1,040 ± 73.5 (7.0)	104
3,000	3,766 ± 368 (9.8)	126
Mean of CV, %	10.0 [8.6] ²⁾	
Overall recovery, %		139 [113] ²⁾
SD		44.8 [9.3] ²⁾
CV, %		32.2 [8.2] ²⁾

¹⁾Mean of interassay (n=3) ± SD (CV, %)

Milk samples were diluted to 40% with PBS

²⁾Calculated between 300 and 3,000 pg/ml levels

요 약

우유 중에 존재할 수 있는 발암성 진균독소의 하나인 aflatoxin M₁ (AFM₁)을 신속, 간편하게 분석할 수 있는 효소면역측정법(ELISA)을 개발하고자 하였다. 소혈청알부민에 공유결합한 AFM₁ (AFM₁-BSA)을 토끼에 면역하여 항체를 생산하고 정제하였다. 이 항체의 유사독소와의 교차반응율은 29.9% 이하의 비교적 낮은 교차율을 나타냈다. AFM₁의 검출을 위하여 확립한 직접경합ELISA (cdELISA)로 우유에 인위적으로 오염시킨 AFM₁을 정제과정없이 ELISA로 분석하는 경우, 우유를 PBS로 40%되게(2:3) 희석하였을 때 양호한 회수율을 보였다. 이 조건하에서 행한 ELISA의 AFM₁분석 회수율은 0.3-3.0 ng/ml의 오염농도 범위에서 농도별 회수율로 평균 113%, 그 분산은 8.2%였다. 본 연구에서 개발한 ELISA system은 우유 중의 0.5 ppb이상의 AFM₁을 정제과정없이 손쉽게 분석하는데 유용할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처의 '94 국책연구개발사업(UR 대응농업기술개발사업)으로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Busby, Jr., W.F. and Wogan, G.F.: Mycotoxins and mycotoxicoses. In *Food-born Infections and Intoxications*, 2nd ed., Riemann, H. and Bryan, F.L. (Ed.), Academic Press, New York, p.519 (1979)
2. Stoloff, L.: Aflatoxin M₁ in perspective. *J. Food Prot.*,

- 43, 226 (1980)
3. Qian, G.S., Yasei, P. and Yang, G.C.: Rapid extraction and detection of aflatoxin M₁ in cow's milk by high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay. *Anal. Chem.*, **56**, 2079 (1984)
 4. 손동화, 임선희, 이인원 : 효소면역측정법에 의한 우유 중의 Aflatoxin M₁의 분석. 한국산업미생물학회지, **24**(5), 인쇄중 (1996)
 5. Park, D.L. and Pohland, A.E.: Developing methodology. In *Foodborne Microorganisms and Their Toxins*, Pierson, M.D. and Stern, N.J. (Ed.), Marcel Dekker, p.425 (1986)
 6. Chu, F.S., Hsia, M.T.S. and Sun, P.S.: Preparation and characterization of aflatoxin B₁-1-(O-carboxymethyl)oxime. *JAOAC*, **60**, 791 (1977).
 7. Chu, F.S. and Ueno, I.: Production of antibody against aflatoxin B₁. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1125 (1977)
 8. Harder, W.O. and Chu, F.S.: Production and characterization of antibody against aflatoxin M₁. *Experientia*, **35**, 104 (1979)
 9. Hjeln, H., Hjein, K. and Sjoquist, J.: Protein A from *Staphylococcus aureus*-its isolation by affinity chromatography and its use of an immunosorbent for the immunoglobulin. *FEBS Letters*, **28**, 73 (1972)
 10. Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A.: *A Guide with Abstracts of Microplate Applications*. Dynatech Europe, Guernsey (1979)
 11. Pestka, J.J., Li, Y.K., Harder, W.O. and Chu, F.S.: Comparison of radioimmunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of aflatoxin M₁ in milk. *JAOAC*, **64**, 294 (1981)
 12. Hu, W.J., Woychick, N. and Chu, F.S.: ELISA of picogram quantities of aflatoxin M₁ in urine and milk. *J. Food Prot.*, **47**, 126 (1984)
 13. Maertlbauer, E. and Terplan, G.: Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunologischer Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Mulchpulver. *Arch. Lebensmittelhyg.*, **36**, 53 (1985)

(1996년 8월 21일 접수)