

Fusarium sp.가 생성하는 zearalenone에 대한 단클론성 항체생산

강성조 · 정덕화* · 강진순**

경상대학교 농어촌개발연구소, *식품공학과, **진주전문대학 가정과

Production of Monoclonal Antibody against Zearalenone Produced by *Fusarium* sp.

Sung-Jo Kang, Duck-Hwa Chung* and Jin-Soon Kang**

Institute of Agriculture and Fishery Development,

*Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University,

**Department of Home Economic, Chinju Technical college

Abstract

To develop zearalenone-specific monoclonal antibodies, hybridoma cells were produced by fusion of myeloma cells (P3×63Ag.V653) and spleen cells from BALB/c female mice immunized with zearalenone-oxime coupled to bovine serum albumin (BSA). After screening of antibody titer of them with a sandwich type enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), 5 hybridomas which could produced monoclonal antibodies with a high affinity for zearalenone were selected. The monoclonal antibody produced by Z-2-M26 hybridoma exhibited the high sensitivity to zearalenone and a little cross-reactivity to α -zearalenol (11%), but did not react with β -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalanol and DON. In conclusion, the developed monoclonal antibody appeared to be a very promising immunoreagent for the future development of a specific and sensitive quantitative ELISA for zearalenone.

Key words: monoclonal antibody, zearalenone, hybridoma, myeloma cell

서 론

Zearalenone [6-(10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl)- β -resorcylic acid lactone]은 *Fusarium*속 곰팡이가 생산하는 2차 대사산물로서 분자량이 318인 흰 결정체이며 물에는 녹지않는 반면 ether, benzene, methanol 및 chloroform 등의 유기용매에 잘 녹으며 petroleum ether 에는 조금 녹는 성질을 가지고 있다^(1,2). Zearalenone은 UV영역에서 푸른형광성을 나타내며 유도물질로는 α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol 및 β -zearalanol 등이 대표적으로 알려져 있고 옥수수, 밀, 쌀, 우유 그리고 땅콩과 같은 농산물에 널리 존재한다고 보고되고 있다^(3,7).

이러한 zearalenone은 사료와 식품에 오염되어 포유동물의 생식체계에서 발정효과(estrogenic effects)를 일으키며 돼지와 같은 동물들이 과잉섭취하면 과에스

트로젠증(hyperestrogenism)이 유발되어 그 결과 자궁확대, 불임증 및 유선확대 등의 증후를 나타낸다고 보고된 바가 있다^(8,10).

Zearalenone를 검색하는 종래의 방법은 TLC, HPLC 등이 있으나 분석에 많은 시료와 복잡한 전처리가 필요하고, 전문인력과 많은 유기용매의 사용으로 실험자의 안전성이 문제되어 새로운 분석법의 필요성이 강하게 대두되었다⁽¹¹⁻¹³⁾.

위와 같은 문제점을 해소하기 위하여 Dixon 등⁽⁴⁾, Roscoe 등⁽⁵⁾은 동물체내에서 zearalenone에 대한 항체를 생성시킨 다음 식품이나 사료에 오염된 zearalenone 분석에 응용하는 면역학적 분석방법을 시도하였다. 이를 위해 RIA (Radioimmunoassay)와 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)가 시도되었으나 RIA법은 방사성 폐기물의 위험성이 문제되어 현재는 주로 ELISA법을 활용함으로써 종래의 분석방법에서 나타났던 단점들을 어느 정도 극복할 수 있게 되었다⁽¹⁶⁾.

본 연구에서도 zearalenone의 분석방법을 개발하기 위하여 우선 zearalenone에 대한 항원성을 부여하고

Corresponding author: Duck-Hwa Chung, Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju, Gyeongnam 660-701, Korea

단크론성 항체생산을 위한 hybridoma cell line을 개발하여 zearalenone에 대한 단크론성 항체를 생산한 다음 특성을 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 실험재료는 다음과 같다. 먼저, Bovine serum albumin (BSA: fatty acid free and fraction V), ovalbumin (OVA: crude and fraction VII), polyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20), 2,2'-azino bis (3-ethylbenzthiazoline)sulfonic acid (ABTS), hydrogenperoxide, horseradish peroxidase (HRP), 1,3'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), N-hydroxysuccinimide (NHS), antimouse-IgG-horseradish peroxidase conjugate, zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalanol, deoxinivalenol (DON), fetal calf serum, hypoxanthine, aminopterin, thymidine, erythrocytes, glutamine, polyethyleneglycol (PEG) 등은 Sigma사로 부터, Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant 등은 Aldrich사 제품을 구입하여 사용하였다.

또한 microculture plate (96 well과 24 well), microtiter plate는 Dynatech사에서 구입하여 사용하였으며, ELISA Reader는 Dynatech MR 700을 사용하였다.

세포융합에 사용한 형질세포종세포는 서울대학교 의과대학 미생물학교실이 미국 국립보건원으로부터 분양받은 P3×63Ag8.V653 세포주를 계대배양하여 사용하였다.

Zearalenone-oxime-protein conjugate 합성

Zearalenone에 대한 단크론항체를 생산하기 위해 분자량이 적어 항원성이 결핍되어 있는 zearalenone에 coupling site를 부여하고 다시 단백질을 결합시켜 항원성을 증폭시켰다. 먼저 zearalenone의 유도체의 합성은 Thouvenot 등⁽⁷⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 100 mg의 표준 zearalenone을 pyridine에 녹이고 200 mg의 carboxymethylamine을 첨가한 다음 실온에서 24시간 교반하면서 반응시킨후 진공하에서 건조시켰다. 다시 증류수에 녹인 후 반응하지 않은 zearalenone을 증류수로부터 분리하기 위해, 50 mL의 benzene을 첨가하여 약하게 교반한 후 benzene층을 제거하였다. 반응액에 0.1 N HCl을 첨가하여 zearalenone-oxime을 침전시키고 물층을 제거한 후 ethyl acetate 100 mL를 첨가하여 Na₂SO₄가 들어있는 Whatman No. 4 filter에 여과한 후 진공건조기로 건조시켰다.

합성된 zearalenone oxime과 protein의 conjugate 형성은 Liu의 방법⁽⁸⁾에 준했다. 즉, 0.5 mL의 dimethylformamide (DMF)에 zearalenone-oxime을 녹이고(A액), DCC 300 μ M과 NHS 600 μ M을 DMF에 녹인 다음(B액) 250 mg의 protein (BSA, OVA, HRP)을 10 mL의 0.1 M NaHCO₃ 용액에 녹였다(C액). 먼저 A액과 B액을 천천히 섞은 다음 24°C에서 30분간 교반하면서 반응시키고 침전물을 원심분리해서 제거한 후 상청액에 C액을 첨가하여 4°C에서 2시간 반응시켰다. 이것을 0.05 M Na₂HPO₄ (pH 8.0)를 사용하여 2일동안 4°C에서 투석한 다음 동결 건조시켜 -70°C에 보관하였다.

면역

면역을 위하여 사용한 BALB/C mouse는 서울대학교 동물사육센터에서 계대 및 보존중인것을 구입하여 사용하였다.

생후 6주된 BALB/C mouse (암컷)에 zearalenone-oxime-BSA conjugate와 Freund's complete adjuvant의 혼합액을 마리당 200 μ g씩 복강에 주사하였다. 면역 4주후 같은 방법으로 zearalenone-oxime-BSA conjugate와 Freund's complete adjuvant의 혼합액으로 추가접종을 실시하였다. 3주후에 phosphate buffered saline (PBS)로 희석한 동량의 zearalenone-oxime-BSA conjugate를 복강에 주사하여 최종 면역하였다.

Mouse 항혈청 titer 검정

최종 면역 후 2일이 경과된 BALB/C mouse로부터 안구정맥에서 혈청을 분리하여 PBS로 단계별 희석한 후 Roscoe 등의 방법⁽⁵⁾을 참고로 indirect competitive ELISA로 antibody titer를 측정하였다. 즉 carbonate-bicarbonate 완충용액(pH 9.6)에 1:500의 농도로 희석한 anti-mouse IgG를 96 well polystyrene microplate에 well당 50 μ L씩 첨가하고 4°C에서 하룻밤동안 부착시켰다. 부착후 세척액(PBS-Tween20)으로 세척하고 1% bovine serum albumin (BSA) 용액을 300 μ L/well씩 첨가하여 37°C에서 1시간 처리하여 blocking하였다.

그 다음 세척액으로 세척하고 희석한 혈청을 50 μ L/well씩 첨가하고 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 세척액으로 세번 세척하고 1:1000으로 희석한 zearalenone-horse radish peroxidase를 50 μ L/well씩 첨가해서 1시간 반응시켰다. 그런 다음 세척액으로 7회 세척하고 발색제가 첨가된 기질용액을 50 μ L/well씩 넣어 효소 반응을 유도하였다. 기질용액은 citrate 완충액(pH 4.0) 11 mL, 30% 과산화수소 4 μ L, ABTS 용액(2'-azino-di-

3-ethyl-benzthiazoline-sulfonate) 1 mL을 넣어 만들었다. 실온에서 30분간 효소반응을 유지시킨후 반응정지액 50 μ L을 첨가하여 효소반응을 중단시킨 다음 발색반응 정도를 410 nm에서 측정하였다.

세포융합

최종면역 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 원심세척하여 세포수를 1×10^6 /mL로 조정하여 사용하였다.

세포융합은 Dixon 등의 방법⁽¹⁶⁾을 참고로 하여 준비한 형질세포종 세포와 비장세포를 1:10의 비율로 혼합하고, 2회에 걸쳐 원심세척한 다음, 37°C로 보온시킨 혼합 세포침전물에 50% (w/v) polyethylene glycol 1,500 1 mL을 1분간 점적하여 세포를 융합시켰다. 점적후 즉시 37°C의 DMEM 1 mL을 흔들면서 1분동안에 첨가하였고 계속해서 DMEM 15 mL을 5분간에 걸쳐 첨가하였다. 융합이 끝난 혼합 세포액을 400gx에서 5분간 원침하고 20% 우태아 혈청, 10% NCTC, 그리고 gentamicin (50 μ g/mL)이 첨가된 DMEM에 부유시킨 다음 96-well 배양판에 well당 50 μ L씩 분주하여 37°C, 6% CO₂에서 배양하였다.

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

융합세포의 선택과 단세포군 배양

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

Cloning은 Mckearn의 무한대 희석법⁽¹⁷⁾으로 실시하였다. 24-well에서 성장하는 세포를 DMEM으로 희석하여 최종 10~30 cell/mL의 농도로 조정하여 well당 100 μ L씩 분주하여 배양하였다. 이 때 사용한 배지는 aminopterin이 첨가되지 않은 배지를 이용하였다. 5일

배양 후 역위상차 현미경으로 1개의 세포집락이 형성된 well을 선택하고 항체생산 여부를 효소 면역측정법으로 검색하였다. 항체의 역가가 높은 hybridoma를 최종 선택하여 증식시켰다.

Zearalenone에 대한 단크론성 항체 생산

최종선택된 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 mL를 주입한 mouse에 대량증식한 hybridoma cell을 수거하여 세포수가 1.0×10^7 /0.2 mL 되도록 조절하여 mouse의 복강에 주입하였다. 약 7~8일후 복강으로부터 복수액을 채취하여 원심분리한 후 상층액에 대하여 역가를 검정한 다음 실험에 사용하였다.

항체의 정제 및 특성조사

채취한 복수액을 ammonium sulfate법⁽¹⁵⁾으로 정제하여 항체의 특성을 조사하였다. 단크론성항체의 특이성은 zearalenone과 유사한 구조를 가진 화합물에 대한 교차반응성으로 조사하였다. 즉, zearalenone과 α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol 및 β -zearalanol 등의 이성체들과 DON의 농도를 달리하여 흡착항원에 결합된 항체를 50% 유리시키는 농도를 산출하여 교차반응성(CR₅₀)을 다음과 같이 계산하였다.

$$CR_{50} = \frac{\text{항체의 반응을 50\% 억제할 수 있는 Zearalenone의 농도}}{\text{항체의 반응을 50\% 억제할 수 있는 이성체의 농도}} \times 100$$

결과 및 고찰

Zearalenone에 대한 항원합성

Zearalenone은 분자량이 적어 항원성이 없으므로 먼저 단백질과 결합할 수 있는 coupling site를 부여하기 위해 앞서 언급된 바와 같이 Thouvenot 등⁽¹⁷⁾의 방법에 따라 zearalenone-oxime 유도체를 합성하였다. 합성한 zearalenone-oxime을 확인하기 위해 CHCl₃: MeOH (97:3) 혼합액을 전개용매로 하여 TLC를 실시한 결과 Fig. 1과 같이 365 nm UV하에서 표준 zearalenone보다 낮은 Rf 값을 가지는 유도체를 관찰할 수 있었다.

이때 만들어진 zearalenone-oxime을 단백질과 결합시켜 항원을 합성하였다.

반응을 보였으며 Table 1에서와 같은 역가를 나타내었다. 특히 mouse No. Z-12, Z-36의 경우는 상당히 양호한 titer를 보였으며 이 결과는 Dixon 등⁽¹⁴⁾이 보고한 항혈청 titer와도 유사하였다.

세포융합 및 cloning

앞서 zearalenone에 특이한 항체를 생산하는 BALB/c mouse로 부터 비장세포를 추출하여 단클론성 항체를 생산하는 hybridoma를 얻기위한 세포융합을 실시하였다. 세포융합에는 면역시킨 40마리의 BALB/c mouse중 양성반응을 보인 3마리를 사용하였다. 세포융합 결과 융합후 분주한 1590 well중 1230 well에서 세포가 성장하여 75%의 성장율을 보였다. 이러한 성장율은 다른 연구에서 보다는 낮으며, 이는 실험테크닉의 부족에 원인이 있으며, 실험의 반복과 더불어 개선 될 것으로 생각된다.

앞서 얻은 융합주로부터 zearalenone에 대해 특이적 항체를 지속적으로 생산하는 hybrid를 얻기 위해 cloning한 결과 zearalenone과 선택적 반응을 하는 5 세포주를 확보할 수 있었다.

Fig. 1. TLC chromatogram of zearalenone-oxime conjugate. A: standard zearalenone, B: zearalenone-oxime conjugate.

Mouse 항혈청 titer

Zearalenone 단클론성 항체 생산을 하는 hybridoma cell line 개발을 위해 먼저 BALB/c mouse에 항원을 면역시키고 zearalenone에 대한 특이한 항체 생산여부와 역가를 측정하였다. Zearalenone에 대한 역가검정을 indirect competitive ELISA법으로 수행했을때 40마리의 실험동물중 3마리가 zearalenone에 대해 특이한

Zearalaenone에 대한 단클론성항체의 생산과 특성

Zearalenone에 대한 단클론성항체를 생산하기위해서 확보한 hybridoma중 가장 역가 높은 항체 생성능이 있는 Z-2-M26을 mouse의 복강에 주사한 후 복수를 채취하여 ammonium sulfate법으로 정제하였다. 복수액의 단백질 함량은 25.6 mg/mL이었고 역가는 Table 2에서와 같이 1:100,000에서도 positive 반응을 보였으며, 이때 생성된 항체는 Table 3에서 보는 바와같이 zearalenone에만 특이하게 반응하였고 α -zearalenol과도 약간의 교

Table 1. ELISA titration of zearalenone antisera developed in mouse

(Unit: O.D.)

Dilution Mouse	10	100	1,000	5,000	10,000	50,000	100,000
Normal ¹⁾	0.199	0.193	0.201	0.197	0.198	0.191	0.193
Z-12 ²⁾	> 2.0	> 2.0	1.172	0.542	0.202	0.201	0.198
Z-15 ²⁾	1.278	0.752	0.427	0.195	0.198	0.201	0.196
Z-36 ²⁾	> 2.0	> 2.0	1.653	0.814	0.382	0.196	0.206

¹⁾Normal mouse.

²⁾No. of mouse which showed a positive antibody titer.

Table 2. Titration of anti-zearalenone ascites fluid as determined by indirect competitive ELISA

(Unit: O.D.)

Dilution Hybridoma	10	100	1,000	5,000	10,000	50,000	100,000	500,000	1,000,000
Normal	0.005	0.001	0.007	0.006	0.001	0.005	0.009	0.000	0.007
Z-2-M26 ¹⁾	> 2.0	> 2.0	> 2.0	> 2.0	1.372	1.126	0.327	0.108	1.007

¹⁾No. of hybridoma which showed the highest titer of produced monoclonal antibody.

Table 3. Cross reactivity of different zearalenone analogues with produced monoclonal antibody against zearalenone

Analogues	Cross-reactivity (%)
Zearalenone	100
α -zearalenol	11
β -zearalenol	0
α -zearalanol	2
β -zearalanol	0
DON	0

차반응을 보였으나 다른 이성체와는 거의 반응하지 않았다.

한편 Dixon 등⁽¹⁴⁾, Roscoe 등⁽¹⁵⁾도 zearalenone에 대한 단클론성 항체를 생산하였으며, 그 역가는 본 연구 결과보다 다소 낮았다. 그러나 이들이 개발한 항체는 70% methanol에서 정상적인 역가를 나타내는 것이 특이하였으며, 본연구에서 개발한 항체는 20% methanol 이하에서만 반응하는 문제점을 지니고 있는 것으로 나타나 ELISA 조건을 보완하는 연구를 계속하고 있다.

요 약

Zearalenone에 특이한 단클론성 항체를 개발하기 위하여 형질세포종세포인 myeloma cell (P3×63Ag.V 653)과 zearalenone-oxime-bovine serum albumin (BSA) 결합체를 항원으로 면역시킨 BALB/c female mice의 비장세포를 융합시켜 hybridoma cell을 생산하였다. 그들의 항체를 indirect competitive ELISA법으로 측정 한 결과 zearalenone에 대하여 높은 친화력을 갖는 5 세포주를 얻었다. 그중 Z-2-M26 hybridoma cell line이 생산하는 단클론성 항체는 특히 zearalenone과 민감하게 반응하였고, α -zearalenol과도 약간의 교차반응을 보였으나 β -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalanol 및 DON과는 거의 반응하지 않았다. 따라서 본 실험에서 개발된 항체는 앞으로 zearalenone에 대한 민감하고 정량적인 효소면역측 정법의 개발을 위한 중요한 면역시약으로 사용될 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구비(KOSEF 941-0600-054-2) 지원에 의해 수행된 연구의 결과이며 지원에 감사드립니다.

문 헌

- Hagler, W.M., Mirocha, C.J., Pathre, S.V. and Behrens, J.C.: Identification of the naturally occurring isomer of zearalenone produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum' in rice culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 849-853 (1979)
- Ichinze, M. and Kurata, H.: Trichothecenes-chemical, biological and toxicological aspects. Ed. by Y. Ueno, Elsevier Science Publishers Amsterdam, p. 73-90 (1983)
- Moller T.E. and Josefsson, E.: High pressure liquid chromatography of zearalenone in cereals. *J. AOAC.*, **61**, 789-791 (1978)
- Devries, J.W. and Chang, H.L.: Comparison of rapid high pressure liquid chromatographic CB methods for determination of aflatoxins in corn and peanuts. *J. AOAC.*, **67**, 597-600 (1984)
- Tanaka, T., Hasegawa, A. and Matuski, Y.: A limited survey of *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in 1984 UK- harvested wheat and barley. *Food Addit. Contam.*, **3**, 247-252(1986)
- Mirocha, C.J., Beth, S. and Pathre, S.V.: Isolation, detection and quantitation of zearalenone in maize and barley. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **57**, 1104-1110 (1974)
- Egon B., Josefsson, G. and Moller, T.E.: Screening method for the detection of aflatoxin, ochratoxin, patulin, sterigmatocystin, and zearalenone in cereals. *J. AOAC.*, **60**, 1369-1371 (1977)
- Blaney, B.J. and Dodman, L.: Production of the mycotoxins zearalenone, 4-deoxynivalenol and nivalenol by isolates of *Fusarium graminearum* group 1 and 2 form cerwals in queensland. *J. Agric. Res.*, **39**, 21-29 (1988)
- Mirocha, C.J., Pathre, S.V., Christensen, C.D., Rodricks, J.V., Hesselstine, C.W. and Mehlman, M.A.: Mycotoxins in human and animal health. *Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, IL*, p. 345-364 (1977)
- Lafarge, F.C., Lespinates, G., Lafont, P., Loisillier, F., Mousset, S., Rosenstein, Y. and Frayssinet, C.: Immunosuppressive effects of *Fusarium* extracts and trichothecenes. Blastogenic response of murine splenic and thymic cells to mitogens. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **160**, 302-311(1979)
- Ware, G.M. and Thorpe, C.W.: Determination of zearalenone in corn by high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**, 1058-1062 (1978)
- Renee, W.B., Jean, A. and Ware, G.M.: Liquid chromatographic determination of zearalenone and zearalenol in animal feeds and grains, using fluorescence detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 894-897 (1986)
- Gimeno, A.: Rapid thin layer chromatographic determination of zearalenone in corn, sorghum and wheat. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 565-569 (1983)
- Dixon, D.E., Hart, R.L.P. and Pestka, J.J.: Hybridoma cell line produces a specific monoclonal antibody to the mycotoxin zearalenone and α -zearalenone. *J. Agr. Food Chem.*, **33**, 122-126 (1987)
- Roscoe, L.W. and Pestka, J.J.: ELISA survey of retail grain-based food products for zearalenone and aflatoxin

- B₁. *J. Food protection*. **50**, 502-503 (1987)
16. Dixon, D.E., Roscoe, L.W., Ram, B.P., Hart, L.P. and Pestka, J.J.: Hybridoma cell line production of a specific monoclonal antibody to the mycotoxins zearalenone and α -zearalenol. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 122-126 (1987)
17. Thouvenot, D.R. and Morfin, R.F.: Radioimmunoassay for zearalenone and zearalenol in human serum: Production, properties and use of porcine antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 16-22 (1983)
18. Liu, M.T., Ram, B.P., Hart, L.P. and Pestka, J.J.: Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 332-336 (1985)
19. McKearn, J.J.: Cloning of hybridoma cells limiting dilution in fluid phase. In *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A new dimension in biological analysis*, Plenum press, New York and London, p. 374-389 (1980)

(1998년 5월 25일 접수)