

효소면역 측정법에 의한 방사선 조사 계란의 검출

이경애* · 최윤정 · 양재승*

순천향대학교 식품영양학과

*한국원자력연구소

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Identification of Irradiated Eggs

Kyong-Ae Lee[†], Yoon-Jong Choi and Jae-Seung Yang*

Dept. of Food Science and Nutrition, Soonchunhyang University, Asan 337-600, Korea

*Korea Atomic Energy Research Institute, Food Irradiation Lab., Taejon 305-353, Korea

Abstract

The ovalbumin, a most sensitive egg white protein to irradiation was purified from irradiated hen's eggs. Eggs were irradiated in their shells to 0~7 kGy. To investigate for a practical use in identifying of irradiated eggs, competitive ELISA using ovalbumin was performed. The binding activity of ovalbumin to anti-ovalbumin IgG was reduced in a dose-dependent manner by irradiating up to 7 kGy, and considerably lowered after irradiating at 7 kGy. The concentration of 50% inhibition of ovalbumin to IgG was increased to 1.5~3.7 times in an irradiation dose-dependent relationship. SDS-PAGE of ovalbumin showed that the partial breakdown of ovalbumin was induced by irradiation. The lowering of binding activity was probably due to the partial breakdown of ovalbumin by irradiation. These results demonstrated that the ELISA should be quite useful and effective methods for the identification of irradiated eggs.

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay, hen's egg, ovalbumin, irradiation

서 론

조사식품의 안전성과 영양학적 타당성이 Codex 표준 규격에 의해 인정되었고, 최근 선진국에서는 방사선이 식품의 저장성 향상을 위해 사용되고 있는 기존의 화학제를 대신할 수 있는 대체물질로 각광받고 있다(1). 현재 선진국과 개발도상국을 포함한 30여개국에서 상업적 식품 조사가 허용되고 있으며, 국내에서도 감자, 양파, 마늘 등의 신선식품류와 건조식육, 어패류분말 등 20여개 품목이 허가되어 있다. 식품산업에서 방사선 조사기술의 이용은 주로 발아억제 및 속도지연 등에 의한 저장성 향상을 목적으로 사용되어 왔는데, 최근 각 나라에서 식품에 대한 화학제 처리의 규제가 강화되고 있어 수입식품에 대해 실시되는 엄격한 위생 검사를 통과할 수 있는 효과적인 방법으로서 방사선 조사 기술의 이용은 앞으로 더욱 확대될 전망이다. 국내에서도 일부 식품에 방사선 조사가 허용되어 실용화되고 있는 실정으로 조사식품의 국제 교역 확대, 조사식품에 대한 확실한 표시를 원하는 소비자의 욕구에 따라 신속하고 정확한 검지법의 개발이 시급한 실정이다(2-5).

식품은 방사선 조사에 의해 유리기의 생성, 점도저하,

탄화수소의 생성, DNA의 변화 등이 일어난다고 알려져 있으며, 이와 같은 식품 특성의 변화에 기초한 다양한 검지법이 연구되고 있으나 ESR, 화학발광측정법, 열발광측정법과 같은 화학적 검출 방법은 과정이 복잡하고 많은 시간을 요하며 비용이 많이 드는 단점이 있다(6-9). 그러나 이러한 문제점은 항원항체반응을 이용하는 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)에 의해 간단히 해결될 수 있다. ELISA는 반응이 매우 빠르고 특이성이 높으며 nmole과 같은 농도에서도 차이를 식별할 수 있는 감도가 뛰어난 우수한 검출방법이다. 또한 일회에 수백개의 시료를 동시에 분석할 수 있어 시료의 수가 많은 조사식품에 효율적인 분석방법이다(10,11).

항원항체반응을 이용한 조사식품 검출에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다. Hamilton 등(12)은 2-alkylcyclobutanone에 대한 항체를 이용하여 지질을 함유한 식품의 검출 가능성을 검토하였으며, Kume(13)은 난백 단백질에 대한 항체를 이용한 immunoblotting 법에 의해 계란의 방사선 조사여부의 판별이 가능하다고 하였으나, 아직 실용화되기에는 많은 연구를 필요로 한다. 식품의 조사과정에서 생성되는 일차산물인 유리기는 이차적으로 식품 성분에 많은 변화를 일으키는데 단백질 성분이

[†]To whom all correspondence should be addressed

매우 민감한 것으로 알려져 있다. 단백질의 구조적 변화는 동일한 항체에 대해 미변성 단백질과는 다른 특이성과 친화력을 나타내므로 ELISA법을 사용한 검지 시스템의 개발은 단백질 식품의 조사여부 판별에 매우 효과적인 방법이 될 것이다. 그러므로 본 연구는 ELISA법이 조사 식품을 효과적으로 검출할 수 있는지를 알아보기 위하여 방사선 조사에 가장 민감한 계란 단백질인 오브알부민을 조사 계란에서 분리하여 항 오브알부민 IgG에 대한 반응성의 변화를 ELISA에 의해 검토하였다.

재료 및 방법

재료

계란은 천안시 소재의 양계장에서 닭(Isabrown)이 산란한 당일에 구입하여 본 실험에 이용하였다. 오브알부민(ovalbumin, OA), 오보뮤코이드(ovomucoid, OM), 콘알부민(conalbumin, CA), rabbit anti-OA IgG, goat anti-rabbit IgG conjugate 등은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

방사선 조사

계란의 방사선 조사는 한국원자력연구소의 10만 Ci Co-60 감마선 조사시설을 이용하여 일정한 선량률로 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 및 7 kGy의 흡수선량(±5.0%)이 되도록 하였으며, 흡수선량은 ceric cerous dosimeter(USA)로 확인하였다.

오브알부민(OA)의 분리

계란에서 난백을 분리한 후 체에 걸러 알끈을 제거하고 수양 난백과 농후 난백을 잘 혼합한 후 OA의 분리에 사용하였다. 난백 50 mL에 포화 (NH₄)₂SO₄ 50 mL를 혼합하여 1시간 방치한 후 원심분리(8000 rpm, 20 min)한 후 상등액을 취하였다. 상등액에 포화 (NH₄)₂SO₄ 3.5 mL를 첨가하여 잘 혼합하고 3.8 N H₂SO₄를 이용하여 pH를 4.8로 조절한 후 1시간 방치하여 OA를 침전시켰다. 원심분리(8000 rpm, 20 min)하여 얻은 침전물을 증류수 15 mL에 용해시켜 투석한 후 동결건조하여 OA 분말을 제조하였다.

경합효소면역측정법(competitive ELISA, cELISA)

Rabbit anti-OA IgG의 특이성 및 방사선 조사 계란에서 분리한 OA와의 반응성을 검토하기 위해 cELISA를 실시하였다. cELISA는 Lee의 방법(14)을 수정하여 사용하였으며, 모든 반응은 실온에서 실시하였다.

96 well microtiter plate(Nunc, Maxisorp)에 0.01% 미변성 OA 용액을 100 µL/well 첨가하여 2시간 coating한

후 0.02% Tween을 함유한 PBS(PBS-T)로 well을 씻었다. Competing 항원(OA, OM, CA)을 PBS-T로 적당한 농도로 희석하여 50 µL/well 첨가한 후 일정 농도의 rabbit anti-OA IgG 용액을 50 µL/well 첨가하여 2시간 동안 반응시켰다. PBS-T로 well을 씻은 후, alkaline phosphatase rabbit anti-chicken IgG conjugate를 100 µL/well 첨가하여 2시간 반응시키고 다시 well을 씻은 후, 0.1% sodium p-nitrophenyl phosphate를 100 µL/well 첨가하여 30분간 반응시켰다. 5 N NaOH를 사용하여 반응을 정지시킨 다음, microtiter plate reader (Molecular devices, Emax, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Competing 항원이 well에 coating된 항원과 anti-OA IgG와의 결합을 저해하는 저해율은 competing 항원이 존재하지 않을 때의 흡광도를 competing 항원이 존재할 때의 흡광도로 나눈 값을 %로 나타내었다. 한편 그래프 상에서 50% 저해율을 보이는 competing 항원의 농도(IC₅₀)를 구하였다.

Anti-OA IgG의 교차반응(cross-reactivity)

Anti-OA IgG의 특이성을 조사하기 위해 난백 단백질인 OM, CA과의 교차반응 정도를 cELISA로 검토하였다. 교차반응의 정도는 50% 저해율을 보이는 미변성 OA의 농도를, 50% 저해율을 보이는 OM 또는 CA의 농도로 나눈 값을 %로 나타내었다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Weber와 Osborn의 방법(15)에 따라 12.5%의 gel을 사용해서 실시하였다. 전기영동 후, 0.01% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250으로 염색했으며 10%(v/v) 초산용액으로 탈색하였다. Broad range molecular weight marker(Bio-Rad)와 시판 OA를 전기영동 마커로 사용하였다.

결과 및 고찰

오브알부민의 분리

계란에서 분리한 OA의 SDS-PAGE 패턴을 검토한 결과(Fig. 1), 표준품으로 사용한 시판되고 있는 OA와 마찬가지로 분자량 4,500에서 주 밴드가 나타나 비교적 순도가 높은 OA가 정제되었음을 알 수 있었다.

조사 계란에서 분리한 오브알부민의 SDS-PAGE 패턴

흡수선량이 0~7 kGy가 되도록 조사한 계란의 난백에서 분리한 OA의 SDS-PAGE 패턴을 Fig. 2에 나타내었다. 방사선 조사에 따라 OA의 양이 감소되는 경향을 보

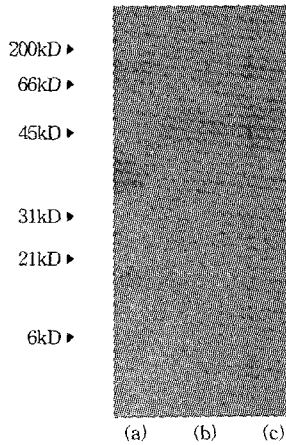


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of purified ovalbumin. (a) molecular weight marker (b) ovalbumin (purchased) (c) native ovalbumin purified from non-irradiated egg

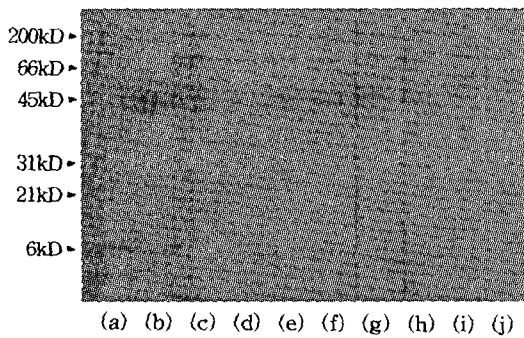


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of ovalbumin from egg irradiated at 0-7kGy. (a) molecular weight marker (b) ovalbumin (purchased) (c) ovalbumin from egg irradiated at 0 kGy (d) ovalbumin from egg irradiated at 0.5 kGy (e) ovalbumin from egg irradiated at 1 kGy (f) ovalbumin from egg irradiated at 2 kGy (g) ovalbumin from egg irradiated at 3 kGy (h) ovalbumin from egg irradiated at 4 kGy (i) ovalbumin from egg irradiated at 5 kGy (j) ovalbumin from egg irradiated at 7 kGy

였다. Le Maire 등(16)은 방사선 조사에 의해 생성된 유리기에 의해 식품 단백질은 저분자화 또는 고분자화된다고 보고하였는데, 본 실험에서는 저선량 조사를 실시하였으므로 OA의 저분자화가 일어난 것으로 사료된다. 또한 Kume(13)은 방사선 조사에 의해 난백 단백질의 일부가 분해되었으며, OA가 조사에 대해 가장 불안정하다고 하였다. OA의 분해는 조사선량이 증가됨에 따라 분해가 더 많이 일어나 흡수선량 7kGy의 계란에서 분리한 OA의 저분자화가 가장 많이 일어난 것으로 사료된다.

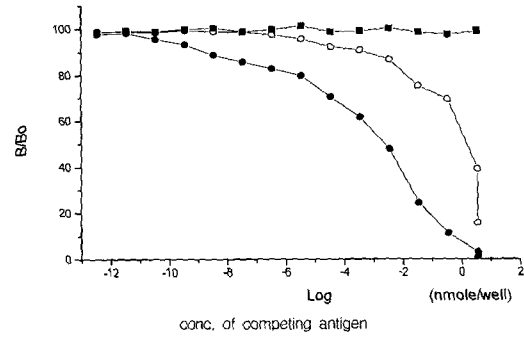


Fig. 3. Competitive binding curves of anti-ovalbumin IgG to egg white proteins. Competitive ELISA was performed using ovalbumin (●), ovomucoid(■), or conalbumin(O) as a competing antigen.

$$B/B_0 = \frac{\text{absorbance with a competing antigen}}{\text{absorbance without a competing antigen}}$$

Table 1. Cross-reactivities of egg white proteins with anti-ovalbumin IgG

Egg white protein	IC ₅₀ ¹⁾ (nmole)	Cross-reactivity (%)
Ovalbumin	3.1	100.0
Ovomucoid	1257.0	0.2
Conalbumin	-	0

¹⁾Concentration of competing antigen to inhibit 50% anti-ovalbumin IgG binding

항 오브알부민 IgG의 교차반응성

본 실험에 사용한 항 오브알부민 IgG가 다클론항체이므로 특이성을 알아보기 위해 난백에 존재하는 단백질인 OM 및 CA와 cELISA를 실시하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었고, 교차반응 정도를 산출하여 Table 1에 나타내었다. 난백 단백질의 교차반응 정도는 OA에 대한 결합정도를 100%로 하였을 때, OM은 0.2%, CA는 0%로 나타났다. 따라서 본 실험에 사용한 항 오브알부민 IgG는 다클론항체임에도 불구하고 난백 단백질인 OM 및 CA와는 교차반응을 나타내지 않아 OA에 특이성이 매우 높은 항체로 사료된다.

오브알부민의 항 오브알부민 IgG에 대한 반응성

방사선 조사 유무에 따라 계란에서 분리한 OA의 항체에 대한 반응성이 변화되는지를 cELISA에 의해 검토하였다(Fig. 4). 또한 Fig. 4로부터 측정된 IC₅₀과 반응성의 감소 정도를 Table 2에 나타내었다. 반응성의 감소 정도는 조사 계란에서 분리한 OA의 IC₅₀을, 비조사 계란에서 분리한 OA의 IC₅₀으로 나눈 값을 %로 나타내었다. OA의 항 오브알부민 IgG에 대한 반응성은 조사선량이 증가됨에 따라 감소하는 경향을 보였으며, IC₅₀의 농도는 조사선량이 증가함에 따라 고농도로 이동하였는데, 반응성과 IC₅₀의 농도는 조사선량 의존적으로 변화되었다. OA

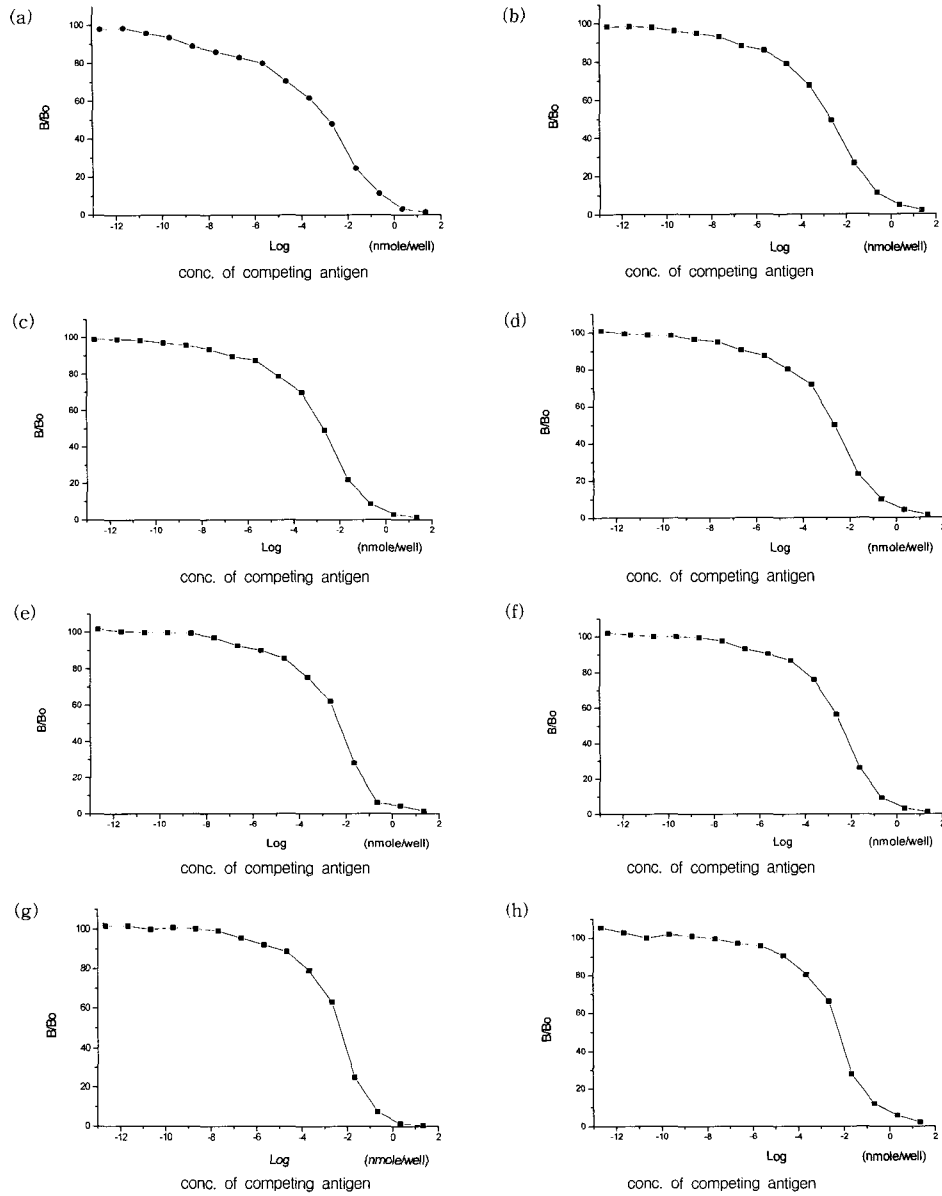


Fig. 4. Competitive binding curves of ovalbumin to anti-ovalbumin IgG.

Ovalbumins were purified from irradiated eggs. The shell eggs were irradiated at 0 kGy(a), 0.5 kGy(b), 1.0 kGy(c), 2.0 kGy(d), 3.0 kGy(e), 4.0 kGy(f), 5.0 kGy(g), or 7.0 kGy(h).

$$B/B_0 = \frac{\text{absorbance with a competing antigen}}{\text{absorbance without a competing antigen}}$$

의 항체에 대한 반응성의 감소 정도는 조사 선량이 0.5 kGy인 경우 1.5배, 3 kGy에서는 2.1배, 7 kGy에서는 3.7 배였다. 이와 같이 조사선량이 가장 낮은 0.5 kGy에서도 반응성의 감소를 측정할 수 있었으므로 다클론항체를 이용한 ELISA에 의해 방사선 조사 여부의 판별이 가능하다고 사료된다. 계란에 방사선을 조사함에 따라 OA의 항체에 대한 반응성이 감소되는 것은 방사선 조사에 의해 OA의 구조적 변화가 일어났음을 시사하는 것으로

OA는 난백의 특성에 영향을 미치므로 방사선 조사에 의한 OA의 구조적 변화에 대해서는 이 후 자세히 검토되어야 할 것이다. Clark 등(17)은 건조된 난백 단백질에 16 kGy의 방사선을 조사했을 때 2차구조의 부분적 변화가 관찰되었다고 하였으며, Wong 등(18)은 방사선 조사한 난백의 점도가 저온살균한 난백에 비해 낮았는데, 이는 방사선 조사에 의해 단백질이 분해되었기 때문이라고 하였다. 본 실험에서도 조사 계란에서 분리한 난백의 점도

Table 2. Changes of binding activities of ovalbumin to anti-ovalbumin IgG by irradiation

Irradiation dose (kGy)	IC ₅₀ ¹⁾ (nmole)	Reduction rate of binding activity
0	3.1	-
0.5	4.6	1.5
1	4.8	1.6
2	6.0	1.7
3	7.7	2.1
4	7.7	2.1
5	8.6	2.4
7	11.5	3.7

¹⁾Concentration of competing antigen to inhibit 50% anti-ovalbumin IgG binding

가 낮은 것이 관찰되었는데(data not shown), 이는 OA의 분해가 일어났기 때문으로 사료된다.

요 약

계란의 방사선 조사 여부를 효소면역측정법에 의해 판별 가능한지를 검토하기 위해, 방사선에 대해 가장 민감한 것으로 알려진 오브알부민의 항 오브알부민 IgG에 대한 반응성을 경합효소면역측정법(cELISA)에 의해 검토하였다. 계란은 난각이 있는 상태에서 조사선량은 0~7 kGy로 조사하였다. 항 오브알부민 IgG에 대한 오브알부민의 반응성은 조사선량이 증가함에 따라 감소하였는데, 감소 정도는 조사선량 의존적으로 변화되어 7 kGy에서 가장 크게 감소하였다. 방사선 조사에 의한 반응성 감소 정도는 1.5배(0.5 kGy)~3.7배(7 kGy)이었다. 가장 조사선량이 낮은 0.5 kGy에서도 반응성의 감소가 측정 가능했기 때문에 cELISA는 저선량 조사된 계란의 검출에 유용한 방법으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 방사선 조사에 의한 오브알부민의 반응성 감소는 오브알부민의 부분적 분해에 의해 구조적 변화가 일어났기 때문으로 사료된다.

문 헌

1. FAO/WHO : Codex general standard for irradiated foods. Codex alimentarius commission. Vol. 15, Rome, Italy (1984)
2. Loeharanu, P. : Acceptance and trading on irradiated foods-international developments of food irradiation and

consumer acceptance of irradiated food. Paper presentation at the 4th CAFST Seminar, Korea Univ., Seoul, Korea (1998)

3. Korea ministry of health and welfare : Food sanitation law (1996)
4. Korea woman's association : Consumer survey on food irradiation, Seoul (1988)
5. Titlebaum, I.F., Dubin, E.Z. and Doyle, M. : Will consumers accept irradiated foods. *J. Food Safety*, **5**, 219-228 (1992)
6. Glidewell, S.M., Deighton, N., Goodman, B.A. and Hillman, J.R. : Detection of irradiated food. *J. Sci. Food Agric.*, **61**, 281-300 (1993)
7. Chung, H.W. and Kwon, J.H. : Detection of irradiated potato and garlic by thermoluminescence measurement. *Korean J. Food Sci. Tech.*, **30**, 283-287 (1998)
8. Yang, J.S., Kim, C.K. and Lee, H.J. : Detection of irradiated chicken, pork and beef by ESR spectroscopy. *Korean J. Food Sci. Tech.*, **31**, 606-611 (1999)
9. Stevenson, H. : Identification of irradiated foods. *Food Tech.*, **48**, 141-149 (1994)
10. Warner, R., Ram, B.P., Hart, I.P. and Pestka, J.J. : Screening for zearalenone in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 714-717 (1986)
11. Hu, W.J., Woychick, N. and Chu, F.S. : ELISA for picogram quantities of aflatoxin M1 in urine and milk. *J. Food Prot.*, **47**, 126-131 (1984)
12. Hamilton, L., Elliott, C., McCaughey, W.J., McEvoy, J. and Stevenson, M. : The use of cyclobutanones in the development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of irradiated foods. *Food Sci. Tech. Today*, **8**, 100-101 (1994)
13. Kume, T. : Immunochemical identification of irradiated chicken eggs. *J. Sci. Food Agric.*, **65**, 1-4 (1994)
14. Lee, K.A. : Changes of antigen binding activities of hen's egg yolk immunoglobulins after proteolysis. *Korean J. Soc. Food Sci.*, **13**, 168-172 (1997)
15. Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determined by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412 (1969)
16. Le Maire M., Thauvette, L., De Foresta, B., Biel, A., Beauregard, G. and Totier, M. : Effect of ionizing radiations on proteins. *Biochem. J.*, **267**, 431-438 (1990)
17. Clark, D.C., Kiss, I.F., Wilde, P.J. and Wilson, D.R. : The effect of irradiation on the functional properties of spray-dried egg white protein. *Food Hydrocolloids*, **5**, 541-548 (1992)
18. Wong, Y.C., Herald, T.J. and Hachmeister, K.A. : Comparison between irradiation and thermally pasteurized liquid egg whites on functional, physical, and microbiological properties. *Poultry Sci.*, **75**, 803-808 (1996)

(2000년 8월 25일 접수)