

축산물 잔류 sulfadimethoxine 검출용 ELISA kit 개발

김우택* · 김성희 · 윤병수** · 임윤규

제주대학교 농과대학 수의학과
제주도 축산진흥원* · 경기대학교 이과대학 생물학과**
(2000년 8월 3일 계재승인)

Development of an ELISA kit for the detection of residual sulfadimethoxine in edible animal products

Woo-tae Kim*, Seong-hee Kim, Byoung-su Yoon**, Yoon-kyu Lim

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University

Cheju Institute for Livestock Promotion*

Department of Biology, College of Natural Science Kyonggi University**

(Accepted by Aug 3, 2000)

Abstract : An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to screen residues of sulfadimethoxine (SDM) in edible animal products. An indirect competitive ELISA was allowed to compete with rabbit anti-SDM for binding to a limited amount of SDM-gelatin conjugate and SDM in serum samples. Sera was diluted 20 times with phosphate buffered saline (PBS) and boiled for 5 minutes to destructure immunoglobulins of serum. Detection limit of this competitive ELISA for SDM was 0.1 ppb or less. Among eight sulfonamide analogues tested for specificity, only sulfamonomethoxine showed significant cross-reaction in the assay. The EC-50 value for sulfamonomethoxine was 3.5 ppm. Recovery of SDM in spiked serum samples between 100 ppb and 500 ppb ranged from 110.7% to 128.9%.

Key words : sulfadimethoxine, ELISA, swine serum.

서 론

Sulfadimethoxine(SDM)은 sulfonamide 계열의 합성 항균

제로서 여러 종류의 병원성 미생물에 대한 항균작용을 가지며¹ 상온에서도 비교적 안정하므로 동물의 질병치료는 물론 성장촉진 등 그 적용범위가 매우 다양하여^{1~4} 축산식품에서의 잔류문제를 일으킬 가능성이 크다.

이 연구는 대산농촌문화재단의 1998년도 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Yoon-kyu Lim, Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Cheju, 690-756, Republic of Korea.

SDM의 축산물에의 잔류를 검사하기 위한 방법으로는 최근까지 bioassay가 널리 응용되고 있는데 비교적 많은 양의 시료를 한꺼번에 검사할 수 있다는 장점이 있으나 결과의 판정에 많은 시간이 소요되고, 다른 항생제가 혼입되어 있을 경우 결과판정에 영향을 줄 수 있을 뿐 아니라 비교적 민감도가 낮은 것으로 보고되어 있다^{5,6}. 공정검사법으로서 HPLC 법은 높은 민감도를 보이나 비용이 많이 들고, 기기분석시 많은 시간이 소요되며, 제한된 공간에서 실시해야만 한다는 단점이 있어 다량의 시료를 신속히 검사하기에는 부적절하다고 생각된다. 그 외의 방법 중 radioimmunoassay는 감도가 높고 신속한 검사가 가능한 방법이나 방사선 동위원소를 사용하는데 대하여 부차적인 위험이 따른다는 단점이 있다. 근래에 microbial receptor assay를 이용한 Charm II 방법이 개발되어 사용되고 있으나⁷ 이 검사법은 계열별 검사로서 sulfonamide계의 정성분석이 불가능하므로 기기분석을 통한 확인시험이 필요하다.

Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)는 매우 민감한 검출법으로서 재현성과 특이성이 높으며, 무엇보다도 다량의 시료를 일시에 처리할 수 있다는 장점이 있다⁸. Ram *et al*⁹의 보고에 의하면 sulfamethazine 검출을 위한 ELISA 방법을 개발하여 8시간에 2,400건의 혈청시료를 검사할 수 있었다고 하였으며, ELISA 방법은 정량도 가능하기 때문에 도축장에서의 잔류물질 screening 방법으로 활용도가 높을 것이라 하였다.

국내의 연구자들에 의해서도 sulfamethazine 검출용 ELISA의 개발¹⁰⁻¹²과 ELISA kit의 성능비교에 대한 연구¹³가 이루어져 있으나 SDM에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

축산식품중의 합성항균제 잔류를 방지하기 위해서는 기본적으로 위생적인 생산과정이 중요하겠으나 최종 출하단계에서 도축대상동물 개체별의 잔류검사를 통하여 합성항균제의 잔류를 보이는 동물의 도축을 금지시켜 오염된 식육의 유통을 막는 것이 근원적인 방지책이 될 것이다. 또한 생축의 상태로 근육내의 잔류물을 직접 측정하기란 현실적으로 곤란하나 대상동물의 혈액을 채취하여 검사하고 그 결과에 따라 근육내의 잔류량을 추정하는 것은 가능할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구의 목적은 돼지혈액 중의 잔류 SDM을 검출하는 ELISA 법을 개발하는 것이며 이를 이용하여 출하전 돈육에서의 잔류 SDM을 screening함에 적용이

가능할 것인가를 알아보기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 외관상 건강한 약 8주령의 암컷 토끼(New Zealand White) 2두를 실험 전기간동안 상수와 사료(미원사슴사료, 미원사료)를 자유로이 급여하였으며 실험전 2주간의 검역을 필한 후 SDM에 대한 항혈청 생산을 위한 면역실험에 사용하였다.

면역원 및 ELISA plate 흡착용 항원 :

SDM 면역원(SDM-BSA) : SDM을 bovine serum albumin (BSA)과 접합시켜 합성하였다. 접합은 Dixon-Holland와 Katz⁴의 방법에 의하여 실시하였다. 즉, SDM(Sigma, USA) 350mg과 BSA(Sigma, USA) 600mg을 75ml의 접합완충액(0.1M phosphate buffer, pH 7.2, 2 volume과 dioxane, 1 volume을 혼합한 액)에 용해하고 25%의 glutaraldehyde(Sigma, USA) 0.35ml을 추가하여 실온에 3시간 동안 교반하여 접합시켰다. 이후 0.1M phosphate buffer (pH 7.0)로 6일간 매일 2회씩 외액을 교환하며 충분히 투석하였으며, 투석이 완료된 접합체 용액은 제균여과(pore size 0.22μm)하여 냉장보관하며 토끼의 면역에 사용하였다.

SDM 흡착항원(SDM-Gel) : Microtiter well에 흡착시킨 항원은 SDM 350mg과 gelatin(Difco, USA) 600mg을 사용하여 면역원 제조의 과정과 동일한 방법으로 합성하였다.

Protein A와 horse radish peroxidase(HRP) 접합체(Prot. A-HRP) : Wilson과 Nakane¹⁴의 방법을 응용하여 효소접합체를 합성하였다. 즉, HRP(RZ = 3이상, Sigma, USA) 6mg을 2차 중류수 1ml에 녹인 후 0.1M NaIO₄ 0.3ml를 가하여 실온에서 20분간 가볍게 혼들어주며 반응시켰다. 반응액은 4℃에서 1mM sodium acetate buffer(pH 4.4)에 20시간 투석시킨 후 0.2M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5)를 20μl를 가하고, 미리 중류수에 용해하여 준비해놓은 protein A(Sigma, USA) 5mg과 섞었다. 이후 즉시 0.01M carbonate buffer(pH 9.5) 1ml를 가하고 실온에 2시간동안 교반시키며 접합반응을 시켰다. 접합반응이 완료된 후 0.4% sodium borohydride를 0.1ml 넣고 4℃에서 2시간 정치시킨 후 phosphate buffered saline(PBS)에 2회 투석하였다. 투석이 완료된 액에는 BSA를 1%가 되게 하고 제균여과(pore size 0.22 μm)한 후 소분하여 -20℃에 보관하여 ELISA에 사용하였다.

항혈청 생산(anti-SDM) : SDM-BSA 0.5ml를 Freund's

complete adjuvant(Sigma, USA) 1ml와 섞어 유탕액을 만든 후, 두 마리의 토끼에 0.75ml씩 피하접종하였다. 추가 면역을 위하여 SDM-BSA 0.3ml와 Freund's incomplete adjuvant(Sigma, USA) 0.5ml와 섞은 유탕액을 약 2주 간격으로 0.4ml씩 피하로 접종하였다. 면역 전기간을 통하여 추가접종 직전에 이정맥으로부터 소량의 혈액을 채취하여 항체형성 여부를 측정하였다. 최종접종 10일후에 전채혈을 하고 혈청을 분리하여 ELISA에 사용하였다.

항체가 측정을 위한 ELISA : 항체형성 정도를 측정하기 위한 ELISA는 다음과 같이 실시하였다. 즉, SDM-Gel 용액을 0.1M carbonate buffer(pH 9.6)로 10,000배 회석하여 각 well에 100 μ l씩 분주하고 4°C의 냉장고에 하룻밤 정치시켜 흡착시킨 후 0.05% Tween 20(Showa, Japan)이용해된 PBS(PBS-T)로 4회 세척하였다. 이후 0.2%의 gelatin이 용해된 PBS(Gel-PBS) 용액을 각 well에 넣고 4°C에 30분간 정치하여 봉쇄를 실시한 후 PBS-T로 4회 세척하여 항혈청의 역가 측정용 ELISA microplate를 준비하였다. 시료혈청은 PBS-T로 500배 회석하여 준비된 ELISA plate의 각 well에 100 μ l씩 가하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 4회 세척하였다. Protein A-HRP를 1000배 회석하여 100 μ l씩 각 well에 가하여 실온에 30분간 반응시켰다. 발색제로 0.1% 2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid(ABTS) 용액 100 μ l를 가하고 30분간 반응시킨 후 2차 중류수 100 μ l를 가하여 반응을 정지시켰다. 발색 반응 결과는 ELISA reader(SLT-Labinstrument W. German)를 사용하여 과장 405nm의 filter를 사용하였으며 대조파장은 492nm의 filter를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

ELISA system의 최적조건 결정 : Plate의 각 well(Costar 3590, USA)에 SDM-Gel 접합체 용액을 50mM carbonate(pH 9.6)로 회석하여 100 μ l씩 분주하고 37°C에서 2시간, 4°C에서 하룻밤 정치시켜 흡착시켰다. 흡착된 plate는 PBS-T로 4회 세척한 후, 0.2% Gel-PBS를 200 μ l씩 가하고 4°C에 30분간 정치시켜 봉쇄한 후 PBS-T로 4회 세척하고 건조시켜 ELISA에 사용하였다. 표준농도의 SDM를 각 well에 50 μ l씩 가한 뒤 anti-SDM이 회석된 PBS-T 용액 50 μ l 넣고 잘 섞은 후 실온에 1시간 반응시킴으로써 plate 표면에 흡착된 항원과 시료내의 항원이 항혈청과 경쟁적으로 반응하도록 하였다. 반응이 종료된 여액은 제거하고, PBS-T로 4회 세척하고, Protein A-HRP 용액을 100 μ l 가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 이후 PBS-T로 4회 세척하고, 0.1M citrate-phosphate(pH 4.0)

에 0.1% ABTS 및 0.02% H₂O₂를 용해한 액을 100 μ l씩 각 well에 가하고 실온에서 30분간 발색반응시켰다. 반응정지를 위하여 2차 중류수 100 μ l를 가한 즉시 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 SDM으로 얻어진 흡광도 값은 SDM 농도 0 ppb의 흡광도 값으로 나눈 경쟁적반응의 백분율을 구하여(B/B0%) 표준곡선을 작성하였으며, 시료의 값들은 표준곡선에 대입하여 sulfonamides의 유도체들과 SDM 농도를 산출하였다.

돼지혈청중의 잔류 SDM 측정 : 결정된 최적조건으로 돼지혈청중의 잔류 SDM을 측정하였다. 돼지혈청은 PBS-T로 20배 회석한 것을 실험에 사용하였다. 이때 돼지 혈청의 Immunoglobulin G(IgG)가 plate 벽에 비특이적으로 흡착되어 일어날 수 있는 발색반응을 배제하기 위하여 회석된 시료혈청을 100°C에 5분간 중탕하였으며 이러한 가열에 의한 시료혈청내의 SDM의 안정성 변화를 확인하였다.

Anti-SDM의 교차반응 조사 : Anti-SDM가 SDM 이외의 다른 살파제들과도 교차반응을 보이는지 알아보기 위해 sulfamerazine, sulfadiazine, sulfisomidine, sulfaguanidine, sulfadimethoxine, sulfamethazine, sulfamonomethoxine, sulfisoxazol, sulfametoxazol, sulfaquinoxaline과 반응시켜 보았다. 교차반응의 정도는 대조군의 발색반응을 50% 저해하는 농도(EC-50)를 구하여 나타내었다.

결 과

SDM에 대한 항체형성 : 적절한 면역이 형성되었는지를 관찰하기 위하여 전기간을 통하여 약 2주 간격으로 추가접종하며 혈액을 채취하여 항체가의 변동을 살펴보았다. Fig 1은 전채혈시까지 채취한 혈청을 임의로 500배 회석하여 동시에 ELISA를 실시하여 혈청내 항체가의 변동추이를 나타낸 것이다. 제1번의 토끼는 흡광도 3.0 이상의 높은 항체형성을 보였으므로 면역 120일경에 전채혈하였다. 제2번 토끼에서는 항체의 뚜렷한 상승을 보이지 않았으며 전실험기간중 추가접종에 의한 특기할 만한 상승을 보이지 않아 SDM-BSA에 대한 면역형성의 개체차이가 있음을 확인하였다.

SDM 측정 ELISA system의 최적조건 : 항원흡착 및 항혈청의 적정 회석배수를 결정하기 위하여 기본적인 checker board titration을 실시하였다(Fig 2-1, 2-2). SDM-Gel을 1,000, 2,000, 4,000 및 8,000배로 회석하여 흡착시

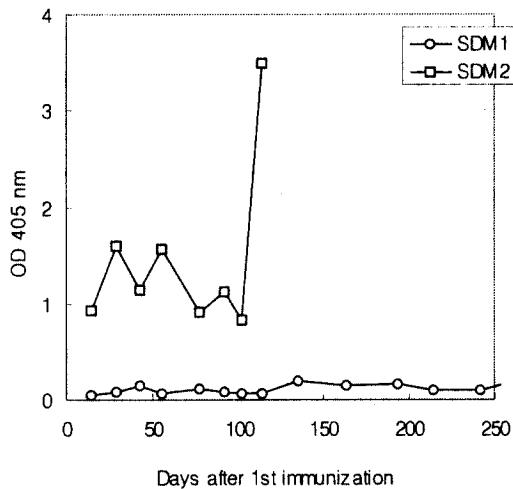


Fig 1. Antibody evolutions of the rabbits dosed with SDM conjugated bovine serum albumin.

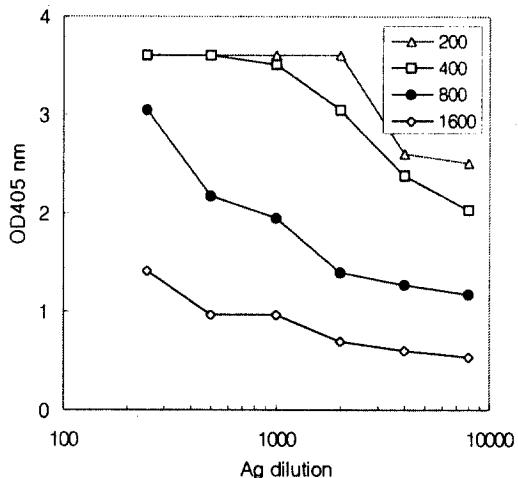


Fig 2-2. Determination of optimal anti-SDM concentration for competition ELISA.

키고, anti-SDM을 200, 400, 800 및 1,600배로 회석시켜 반응시켰다. Fig 2-1은 각 항원의 단계별로 회석된 anti-SDM이 반응한 정도를 나타낸 곡선이며 anti-SDM의 농도변화에 따른 반응의 상관관계를 적절히 나타내 줄 수 있는 SDM-Gel 흡착의 최소 회석배수는 4,000배임을 알 수 있었다. 또한 Fig 2-2에서와 같이 흡착된 SDM-Gel의 농도변화에 따른 반응의 상관관계를 적절히 나타내

줄 수 있는 anti-SDM의 최소 회석배수는 약 500배 이상 이었다.

항원흡착능 비교 : ELISA용 microplate는 Nunc사의 Polysorb 및 Costar사의 plate를 사용하였으며 이들 제품들의 적절한 항원흡착능과 그에 따른 ELISA 실시의 조건을 비교하여 보았다. 각사의 microplate에 SDM-Gel을 10, 000, 20,000 및 40,000배로 회석하여 흡착시킨 후 anti-SDM을 단계별로 회석하여 반응시켜 보았다. 동일한 조건에서 항원의 흡착능은 Fig 3-1 및 3-2에서와 같이 Cos-

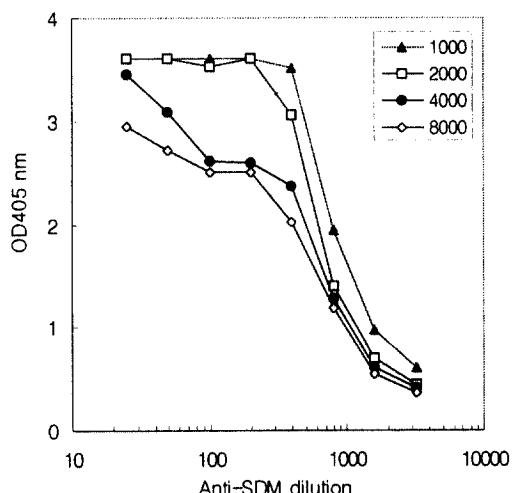


Fig 2-1. Determination of optimal SDM-Gel concentration for competition ELISA.

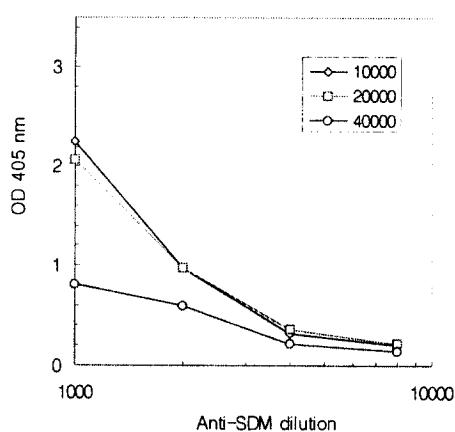


Fig 3-1. Optical density curve according to the concentration of SDM-Gel coating in Nuncplate.

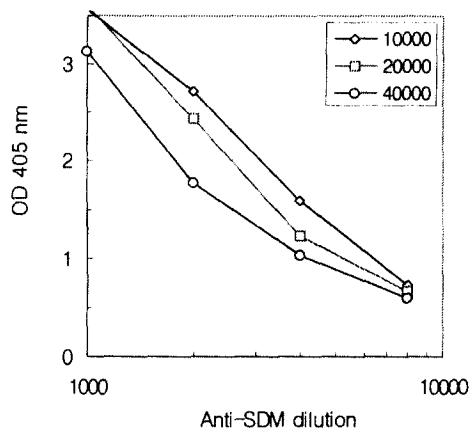


Fig 3-2. Optical density curve according to the concentration of SDM-Gel coating in Costar plate.

tar사의 것이 더 양호한 것으로 나타났으며 1,000배에서 8,000배까지 반응의 곡선도 용량에 비례하여 직선상에 근접하여 나타났다.

민감도 조건의 비교 : SDM 농도 0 및 5ppb의 시료를 사용하여 반응율(B/B0%)을 비교한 결과 Fig 4-1 및 4-2에 나타낸 바와 같이 Nunc사 microplate의 경우는 SDM-Gel 을 10,000배로 회석하여 흡착시키고, anti-SDM을 1,000배로 회석하여 반응시켰을 경우 54%로 가장 낮게 나타났다. 반면에 Costar사의 microplate를 사용하였을 때는 SDM-Gel을 40,000배로 회석하여 흡착시키고 anti-SDM 을 8,000배로 회석하여 반응시켰을 때 45%의 결과를 보였을 뿐 아니라 anti-SDM의 회석 배수 2,000배 이상에서 는 대부분 60% 미만의 값을 나타내었으므로(Table 1), 이

Fig 4-2. Optimum concentration of SDM-Gel and anti-SDM in COSTAR plate.

Table 1. Optimum dilution of SDM-Gel and anti-SDM · BSA in the ELISA for the detection of Sulfadimethoxine

| Coating SDM-Gel dil. | Anti-SDM dil. | | | |
|----------------------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|
| | × 1,000 | × 2,000 | × 4,000 | × 8,000 |
| × 10,000 | 2.94 ¹⁾ /3.56 ²⁾ (82.7%) | 1.51/2.72 (55.6%) | 0.82/1.59 (51.6%) | 0.40/0.72 (56.0%) |
| × 20,000 | 2.62/3.6 (72.8%) | 1.30/2.44 (53.4%) | 0.59/1.23 (48.7%) | 0.32/0.66 (49.2%) |
| × 40,000 | 2.29/3.13 (73.1%) | 1.12/1.77 (63.1%) | 0.52/1.02 (50.8%) | 0.26/0.59 (44.7%) |

¹⁾ OD at 5ppb of SDM.

²⁾ OD at 0ppb of SDM.

$$\text{3) percent binding : } (B/B_0) \% = \frac{\text{OD of 5ppb}}{\text{OD of 0ppb}} \times 100$$

후의 ELISA는 Costar사의 plate를 사용하여 실시하였다. 항원과 항혈청의 회석은 B/B0%의 값이 50% 이하인 값을 나타내는 조건 즉, SDM-Gel 20,000배 및 anti-SDM 4,000배의 조건을 임의로 결정하여 ELISA를 실시하였다.

SDM 검출용 ELISA 법의 민감도 : 상기의 흡착항원 및 항혈청의 회석조건으로 표준농도 SDM 시료를 ELISA 분석하여 민감도를 관찰한 결과는 Fig 5에 나타내었다. ELISA microtiter well당 검출할 수 있는 최소농도는 5pg 혹은 그 이하의 농도에서도 가능하였다.

돼지혈청시료를 측정하기 위한 ELISA의 검출범위 조정 : SDM의 식육내 잔류허용 농도는 0.1ppm으로서 혈청 내의 농도 환산치는 0.4ppm에 해당된다. 그러므로 돈육의 혈청을 대상으로 측정하여 허용기준치의 초과여부를

Fig 4-1. Optimum concentration of SDM-Gel and anti-SDM in Nunc microplate.

판정하기 위해서는 혈청농도 1.0~0.1ppm의 범위에서 직선상(linearity)을 나타낼 수 있도록 조건을 맞추어야 하므로 Fig 6-1, 2, 3, 4에 나타낸 것과 같이 anti-SDM의 회

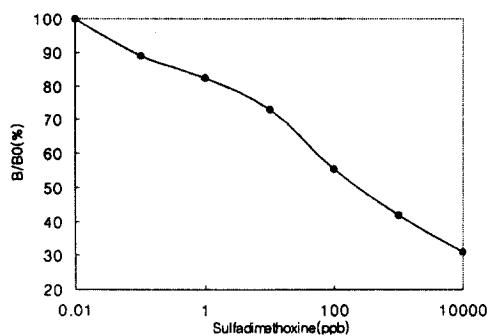


Fig 5. Standard curve of Sulfadimethoxine.

석 배수는 2,000배로 고정하고, SDM-Gel 흡착액을 10,000, 20,000, 40,000 및 80,000배 회석하여 흡착시킨 후 ELISA를 실시하여 보았다. 흡착항원의 회석배수가 증가함에 따라 적정검출 범위는 낮은 농도 범위로 이동을 하였다. Fig 6-1의 경우, 1.0부터 0.1 ppm 값 사이에서의 용량대비 상관곡선이 직선에 가깝게 나타났으므로 돈육중 SDM 검출을 위한 ELISA system의 조건은 SDM-Gel 회석 배수를 10,000배로 회석하여 흡착시키고 anti-SDM의

회석배수는 2,000배인 조건으로 결정하였다.

SDM 검출을 위한 검사혈청 전처리 : 검사할 돈혈청 유래의 IgG type의 면역글로불린이 비특이적으로 microplate에 흡착될 경우 tracer로 사용되는 prot. A-HRP와 반응하여 발색되므로 실재보다 낮은 농도의 SDM 값으로 표현될 수가 있다. 이를 방지하기 위하여 돼지혈청중의 면역글로불린을 열변성시켜 실험에 사용하였다. 즉, 각각 0ppm 및 10ppm의 농도로 SDM을 가하여 준비된 혈청 및 PBS-T를 100℃에 5분간 중탕한 후 즉시 실온의 수조에 담가 식히고, 열처리하지 않은 시료와 같이 ELISA를 실시하여 비교한 결과는 Fig 7과 같다. 시료를 열처리한 후 측정한 혈청의 경우는 처리한 시료에 비하여 높은 흡광도를 나타내었으므로 실재로 잰류하는 SDM의 값보다 낮은 것으로 표현되었다. 열처리한 시료는 혈청이나 PBS-T에 회석한 것 모두 동일한 흡광도를 나타내었으므로 열처리에 의하여 비특이반응이 배제되었으며 이에 따른 SDM의 변성은 나타나지 않았다.

SDM 회수율 : 임의로 선정한 돼지혈청에 SDM이 100 및 500 ppb이 되게 가하고 ELISA를 실시하여 회수율을 조사한 결과, 110~128%의 회수율을 보였다 (Table 2).

Anti-SDM과 기타 합성항균제와의 교차반응 : Anti-SDM이 다른 합성항균제에도 교차반응을 일으키는지 알아보기 위해 8종의 다른 설파유도체(sulfamerazine, sul-

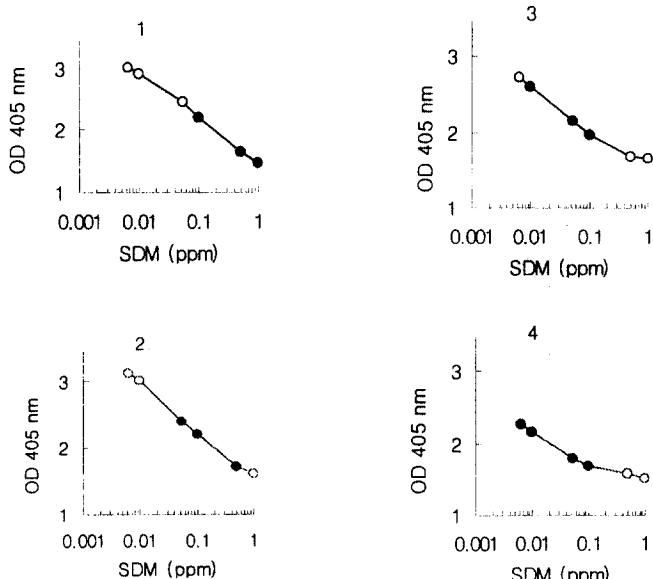


Fig 6. Modification of detectable ranges by changing concentration of coating SDM-Gel.
(SDM dilution : 1 × 10,000 ; 2 : × 20,000 ; 3 : × 40,000 ; 4 : × 80,000).

sulfamonomethoxine, sulfisoxazol, sulfaquinoxaline)를 PBS-T에 단계별 농도로 희석하여 항혈청과 섞고 ELISA를 실시하였다. 그 결과 Table 3과 같이 sulfamonomethoxine을 제외하고 실험에 사용된 다른 합성 항균제들과는 교차반응을 보이지 않았다.

고 칠

SDM검출을 위한 ELISA법 개발을 위해서는 SDM을 이종단백과 접합시킨 합성체와 그에 대한 항체가 필요하다. SDM은 분자량이 작기 때문에 그 자체만으로는 동물에서 항체생산을 유도하기가 어렵기 때문에 본 연구에서는 BSA 혹은 gelatin과 접합시킨 합성체로 SDM에 대한 항체형성을 유도하였다.

얻어진 anti-SDM은 준비된 다른 종류의 살파제와 교차반응이 없음을 확인하였다. 이것은 SDM의 para amino benzoic acid기가 BSA와 결합함에 따라 노출된 항원결정기가 다른 살파제와는 상이할 것이기 때문으로 생각된다.

Competitive ELISA는 한정된 well의 표면에 물질이 흡착되고 흡착된 물질과 시료의 반응이 일어나는 정도를 측정하는 원리이므로 이를 위한 plate의 선정기준은 각각의 흡착물질을 강하게 결합시켜주는 동시에 편차가 적은 성질의 재질이어야 한다. 본 실험에서는 Nunc사의 polysorb plate와 Costar사의 plate(code no ; 3590)를 비교실험하여 SDM ELISA의 실시에 좀더 적합한 plate를 선택하였다. 결과적으로 흡착시키고자 하는 물질에 따른 plate의 차이는 있을 것으로 생각되었으며 이에 따라 각종의 ELISA를 실시할 때 먼저 흡착용 plate의 선정이 고려되어야 할 것으로 생각되었다.

본 연구에서 개발한 SDM ELISA는 각 well당 5pg 수준의 낮은 농도의 잔류 SDM 까지도 검출할 수 있었다. 그러나 실제로 측정하여야 할 검사시료는 0.1부터 1.0ppm 수준의 농도에서 잔류허용한계가 결정된다. 그러므로 제시된 실험방법에 따라 시료를 희석하여 분석한다면 0.1ppb의 수준까지도 검출이 가능할 것이나 잔류검사의 목적으로는 너무 낮은 범위의 농도이기 때문에 의미가 없게 된다. 그러므로 원하는 수준의 농도에서 값의 비교가 가능하도록 ELISA system의 감도를 조절할 필요가 있었다. 이를 위하여 plate에 흡착시킨 SDM-Gel의 농도를 높임으로써 경쟁적 반응의 값 차이의 비를 상대적으로 둔화시킬 수 있었으며 상대적으로 높은 농도의 시료

Fig 7. Effect of heating on competition of sulfadimethoxine solubilized in pig serum and PBS.

Table 2. Recovery of sulfadimethoxine spiked in swine serum at the concentration of 100 and 500ppb by ELISA

| Sulfadimethoxine, added (ppb) | Recovered | % Recovery |
|-------------------------------|------------|------------|
| 0 | 0.78±0.34 | |
| 100 | 111.5±12.8 | 110.7 |
| 500 | 645.6±65.0 | 128.9 |

Table 3. Cross reactivity of rabbit anti-sulfadimethoxine antibodies toward sulfadimethoxine analogues

| Compounds | EC-50 ¹⁾ (ppm) |
|--------------------|---------------------------|
| Sulfadimethoxine | 0.006 |
| Sulfamonomethoxine | 3.5 |
| Sulfamethazine | - |
| Sulfamerazine | - |
| Sulfadiazine | - |
| Sulfaguanidine | - |
| Sulfisoxazol | - |
| Sulfaquinoxaline | - |
| Sulfamethoxazol | - |

¹⁾ Concentration causing 50% inhibition in color development of sample wells compared with blank.

fadiazone, sulfaguanidine, sulfamethoxazol, sulfamethazine,

간의 반응비교가 용이하였다.

본 연구에서 소개된 competitive ELISA 법은 잔류 SDM에 의한 경쟁반응을 측정하는 probe로 protein A를 사용한 독특한 방법으로 구성되어 있다. Protein A는 토끼의 anti-SDM 뿐 아니라 대부분 포유류의 IgG와도 결합반응을 일으키므로 만일 시료 돼지혈중의 IgG가 plate의 표면에 비특이적인 반응으로 결합한다면 protein A는 이와도 역시 반응하여 결합하게 되므로 이러한 바람직하지 않은 반응을 배제시키려면 혈청시료중의 IgG를 불활화시켜야 할 필요가 있었다. 이를 위하여 100℃의 수조에 5분간 중탕한 시료를 사용하였으며 이 결과 SDM은 이러한 열처리에 전혀 변성되지 않았으나 돼지혈청 IgG는 완전히 비동화되어 ELISA시 비특이적인 반응을 없앨 수 있었다.

본 연구는 출하전 도축대상 동물에서의 잔류 SDM을 측정하여 기준치 이상의 잔류가 확인된 동물을 사전에 도축에서 제외시키기 위한 검사방법을 개발하고자 함이 중요한 목표였다. 개발된 competitive ELISA는 kit로 제조한다면 이용이 간편하며 무엇보다도 다량의 시료를 짧은 시간에 측정할 수 있다는 장점이 있으므로 이 방법을 사용하여 비용과 인력을 절감하면서도 식육에 공여되는 가축 개체에 대한 잔류 SDM 여부를 빠짐없이 검사할 수가 있을 것으로 생각된다. 특히 출하전 단계에서 신속한 검사가 가능하기 때문에 도축후 검사시 발견된 도체는 폐기할 수밖에 없는 경제적 손실을 방지할 수도 있을 것으로 사료된다.

결 론

돼지혈청중의 SDM 잔류를 도축장의 출하전에 스크리닝 하기 위한 경쟁적 효소면역측정법(competitive ELISA)을 개발하기 위하여 제반조건을 조사한 결과는 다음과 같다.

개발된 ELISA법으로 검출가능한 SDM 농도는 1.0ppb 이하의 값이었다. 돼지혈청 유래의 IgG에 의한 비특이적인 발색반응은 PBS-T로 10배 회석한 시료혈청을 끓는 물에 5분간 중탕하여 배제시켰으며 이러한 열처리 조건에도 SDM은 변성되지 않았다. SDM을 100ppb 및 500 ppb를 가하고 회수율을 조사한 결과 110.7~128.9%의 범위를 나타내었다.

SDM 유도체 8가지를 사용하여 특이성 검사를 한 결

과 sulfamonomethoxine을 제외하고는 유의할만한 교차반응을 보이지 않았으며 이 때 Sulfamonomethoxine의 EC-50 값은 3.5ppm으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. 이장락. 슬픈아미드제 수의약리학. 서울대학교 출판부, 서울:363-370, 1988.
2. Rosenberg MC. Update on the sulfonamide residue problem. *JAVMA*, 187:704-705, 1985.
3. 신광순. 축산물중의 항균성물질 잔류문제에 대한 고찰(상). 대한수의사회지, 25:161-1671, 1989.
4. Dixon-Holland DE, Katz SE. Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue. *J Assoc Off Anal Chem Intl*, 71(6):1137-1140, 1989.
5. Davis WW, Stout TR. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. Factors influencing variability and error. *Appl Microbiol*, 22:629, 1971.
6. Smith R. Bacterial inhibitors formed during the adventitious growth of microorganisms in chicken liver and pig kidney. *J Appl Microbiol*, 45:267, 1978.
7. Charm SE. Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk. collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem Intl*, 71:304-316, 1988.
8. Dixon-Holland DE, Katz SE. Competitive direct enzyme-linked immunosorbent screening assay for the detection of sulfamethazine contamination of animal feeds. *J Assoc Off Anal Chem Intl*, 74(5):784-789, 1991.
9. Ram BP, Sigh P, Martins L, Brock T, Sharkov N, Allison D. Drug residues in animal tissues. High-volume enzyme immunoassay test for sulfamethazine in swine. *J Assoc Off Anal Chem*, 74(1):43-46, 1991.
10. 김성희, 임윤규. 잔류 Sulfamethazine 검출용 ELISA 개발에 관한 실험적 연구. *J Fd Hyg Safety*, 10(4): 213-217, 1995.
11. 임윤규, 김성희, 이경갑, 김우택, 김성훈, 김영주, 양재혁, 박재학, 이영순. 잔류 Sulfamethazine 검출을 위한 직접 및 간접 ELISA 방법의 비교 연구. *Kor J Vet Publ Hlth*, 20(3):195-201, 1996.

12. Park JH, Lim YK. Enzyme Immunoassay for the sulfa-methazine residues in pork tissue. *J Fd Hyg Safety*, 11(4):287-290, 1996.
 13. Park JH. Comparision of enzyme-linked immunoassay kits for sulfamethazine. *Kor J Vet Publ Hlth*, 37(3) appn.: P-131, 190-191, 1997.
 14. Wilson MB, Nakane PK. 'recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HPRO) to antibodies' In Knapp, W., Holubar, K. and Wick, G.(eds), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*, pp.215-224. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978.
-