한국농약과학회지 제5권 제2호(2001)
The Korean Journal of Pesticide Science
Vol. 5, No. 2, pp.1~12(2001)

ELISA에 의한 유기인계 살충제 Acephate 잔류물 분석법 개발

이재구* · 안기창 · Donald W. Stoutamire[1] · Shirley J. Gee[1] and Bruce D. Hammock[1]

충북대학교 농과대학 농화학과, [1]Department of Entomology and Cancer Research Center, University of California, U.S.A.

요약 : 다클론항체를 이용하여 환경 시료중 유기인계 살충제 acephate를 분석할 수 있는 경합적 간접효소면역측정법 (competitive indirect ELISA)을 개발하기 위하여 분석물과 화학구조가 유사하며 hexanoic acid를 지닌 3종의 hapten을 합성하였다. 이들 hapten을 active ester 방법으로 담체단백질인 keyhole limpet hemocyanin과 접합시켜 면역원으로 사용하였고, bovine serum albumin과 접합시켜 homologous 혹은 heterologous ELISA를 위한 코팅항원으로 사용하였다. 생산된 항체들과 코팅항원을 최종선발하여 acephate 잔류분석을 위한 ELISA를 위하여 최적화하였다. 단백질의 농도가 1 μg/mL인 코팅항원 (hapten-3-BSA)과 다클론항체 #8377를 16000배로 희석한 heterologous ELISA에서 최적화된 acephate의 IC_{50} 값은 110 ng/mL이었고, 분석범위와 최소검출한계는 각각 10~1000과 4 ng/mL 이었다. Acephate의 주분해산물이고 살충제로 사용되는 methamidophos을 위시한 몇몇 유기인계 살충제의 항체에 대한 교차반응은 모두 0.02%이하였다. 이와 같은 결과는 본 ELISA가 농산물 및 환경시료중의 acephate 잔류분석을 위하여 편리한 방법이 될 수 있음을 시사한다.(2001년 3월 6일 접수, 2001년 6월 2일 수리)

Key words : acephate, ELISA, polyclonal antibody, heterologous, optimization, cross-reactivity.

서 론

농산물 증수와 품질향상을 위하여 농약의 적절한 사용은 유익하나 수확한 농산물의 표면이나 내부에 필요이상의 농약이 잔류할 수 있으므로 이들의 섭취 이전에 농약의 잔류량을 신속히 측정할 수 있는 분석법이 절실히 요구되고 있다. 더욱이 농산물 수입의 개방화로 농약으로 오염된 농산물이 다량으로 유입될 가능성이 있으므로 간편하고 신속한 잔류농약의 분석법 개발은 시급하고 중요한 과제라 할 수 있다. 최근 엽채류나 과일 등에 잔류하는 농약을 간편하고 신속하게 검사할 수 있는 효소분석법의 일종인 간이속성검사법은 국립농산물 검사소, 대형 농산물 도매시장 등에서 주로 사용되고 있다. 그러나 acetylcholinesterase 저해율을 평가하는 이 방법은 유기인계와 카바메이트계 살충제에만 극히 제한되며, 이들 농약중 어떤 농약이 잔류하고 있는지 그리고 교차반응성 여부에 관하여는 한계점을 보이고 있다 (진성유니텍, 2000).

관행적인 농약의 분석은 일정량의 시료를 마쇄하고 적당한 유기용매로 추출하고 정제한 후 주로 가스크로마토그래피 (GC)나 고속액체크로마토그래피 (HPLC)에 의존하고 있다. 이 방법으로는 분석물의 잔류량을 정확히 알 수 있지만 분석까지의 소요시간이 길고, 값비싼 장치 및 숙련된 기술이 요구되며 더욱이 함께 추출된 간섭물질을 제거하기 위하여 분석 전에 정제과정이 필수적이다. 반면에 면역학적 방법 (immunoassay)을 잔류농약 분석에 이용하는 효소면역학적 분석법 (enzyme-linked immunosorbent assay, 이하 ELISA)은 저렴한 비용과 노련한 숙련도를 요구하지 않아 간이속성분석법의 장점과 관행적인 분석법의 모든 장점을 지니고 있다. 또한 ELISA는 일상적인 환경모니터링 혹은 스크리닝에 적용할 때 다른 방법보다 많은 시료 수를 분석할 수 있는 이점을 지니고 있다 (Hammock 등, 1986).

Acephate (*O,S*-dimethyl acetylphosphoramidothioate)는 다른 유기인계 살충제처럼 대상해충의 acetylcholinesterase 저해제로 작용하는 살충제로서 세계 유기인계 살충제 시장에서 10위내의 판매량을 보유하고 있다 (Voss 등, 1995). 국내에서는 진딧물, 배추흰나비, 나방류, 총채벌레 등의 방제를 위하여 배추, 담배, 사과, 고추, 뽕나무, 국화, 그리고 벼 재배지에서 주로 사용 (농약사용지침서, 2000)하고 있다. Acephate의 잔류량은 시료를 유기용매인 ethyl acetate로 추출하고 silica gel column chromatography로 정제한 전처리 시료를 질소인검출기 (NPD)나 불꽃광도검출기 (FPD)가 장착된 GC를 사용하여 주로 분석하고 있다 (정 등, 1992; 농약잔류분석연구반, 1995).

본 연구는 토끼의 면역계에서 acephate 유사화합물에 의하여 생산된 다클론항체를 사용하여 환경시료 및 농산물중 acephate 잔류량을 모니터링하고 정량하기 위하여 경합적 간접효소면역분석법 (competitive indirect ELISA)을 개발하는 데 목적이 있다.

재료 및 방법

Hapten의 합성

분석대상 농약인 acephate의 분자량(M. W.=183)은 너무 작아 그 자체로는 면역원이 될 수 없기 때문에 적당한 hapten을 합성한 후 keyhole limpet hemocyanin (KLH)와 같은 분자량이 큰 담체단백질과 접합시킨 후 토끼에 주사하여 항체생성을 유도해야 한다. 따라서 합성한 hapten은 담체단백질과의 접합이 용이한 관능기와 적당한 linker

*연락저자

를 지니고 있어야 하고 그 구조가 분석하고자 하는 대상 화합물의 구조와 유사하여 생산된 항체가 분석대상 화합물과 특이적인 친화력을 가지고 반응해야만 한다(Szurdoki 등, 1995). ELISA에서 중요한 것은 역가가 높은 항체를 만들 수 있도록 hapten을 과학적이고 합리적으로 잘 설계하여 합성한 후 면역원으로 사용하여 분석물에 대하여 특이성이 있는 항체를 만드는 일이다. 본 연구에서는 항체생산을 위하여 분석대상농약인 acephate와 유사한 화학구조를 가지며 또한 carboxyl기를 지닌 3종의 hapten을 합성하였다.

Hapten-1의 합성

***O,O*-Dimethyl phosphoramidothioate (1)** : 100 mL의 benzene에 dimethyl chlorothiophosphate (21.595 g, 134 mmol)을 녹이고 ice bath에서 0℃로 냉각시킨 후 NH_3 가스를 2시간 동안 주입하였다. 이 반응물의 온도를 10-15℃로 올려 남아있는 NH_3 가스를 제거하고 감압으로 용매를 제거하여 화합물 **1**을 얻었다: TLC (benzene/methylene chloride=7:3, v/v) R_f 0.19; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.74 (d, J=13.8 Hz, 3H, OCH_3), 3.91 (d, J=16.1 Hz, 2H, NH_2).

***O,O*-Dimethyl acetylphosphoramidothioate (2)** : 상기 화합물 **1** (16.5 g, 0.12 mol)과 acetic anhydride (12.25 g, 0.12 mol)를 반응용기에 넣고 0.3 mL의 phosphoric acid를 가하여 80℃에서 1시간 동안 반응시켜 화합물 **2**를 얻었다.

***O*-Methyl *S*-sodio acetylphosphoramidothioate (3)** : 화합물 **2** (0.366 g, 2 mmol)에 1-propanethiol (0.1676 g, 2.1 mmol)과 50% NaOH 함유 methanol 용액을 가하고 3시간 동안 reflux한 후 반응혼합물을 55℃에서 방치시켜 화합물 **3**을 합성하였다: TLC (0.5% acetic acid in methanol/methylene chloride (1:9, v/v)) R_f 0.08; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.07 (d, J=1.3 Hz, 3H, CH_3CO), 3.63 (d, J=13.14 Hz, 3H, CH_3O).

6-(*N*-Acetyl-*O*-methyl-phosphonamidothioyl)hexanoic acid (4) : 화합물 **3** (191.8 mg, 1 mmol)과 6-bromohexanoic acid (195.9 mg, 1 mmol)를 0.5 mL의 물에 녹이고 70℃에서 3시간 동안 반응시킨 후 감압농축하여 용매를 제거하였다. 농축잔류물은 silica gel flash column chromatography로 분리정제 (3% → 15% methanol in methylene chloride containing 1.5% acetic acid)하여 hapten-**1**을 얻었다: TLC (0.5% acetic acid in methanol/methylene chloride (1:9, v/v)) R_f 0.5; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.46 (m, 2H, CH_2), 1.65 (q, J=7.7 Hz, 2H, CH_2), 1.73 (q, J=7.6 Hz, 2H, CH_2), 2.17 (d, J=1.3 Hz, 3H, CH_3CO), 2.34 (t, J=7.3 Hz, 2H, CH_2) 2.93 (ddt, J=2.7 Hz, 2H, CH_2,) 3.85 (d, J=13.1 Hz, 3H, CH_3O), ~9.21 (b, 1H, COOH); FAB-MS, m/z 284 $[M+H]^+$.

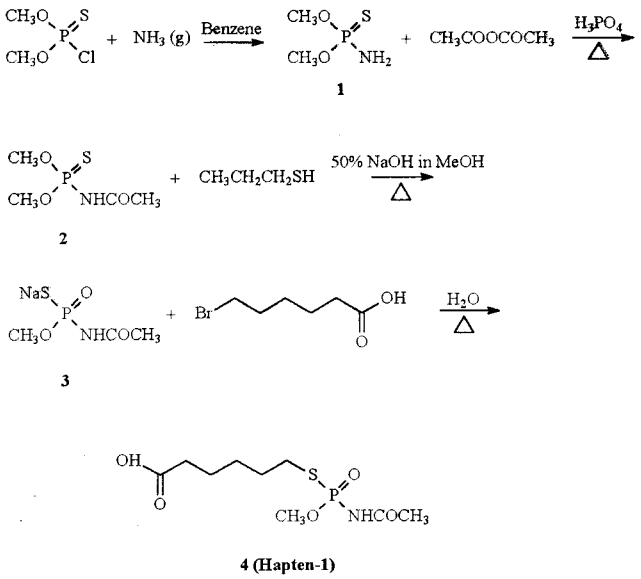


Fig. 1. Synthetic process of hapten-1.

Hapten-2의 합성

t-Butyl 6-(*O,S*-dimethylthiophosphoramido)-6-oxohexanoate (5) : Methamidophos (200 mg, 1.42 mmol), adipic acid *mono-t*-butyl ester (300 mg, 1.48 mmol), 그리고 4-dimethylaminopyridine (DMAP, 10 mg)을 4 mL의 methylene chloride에 녹여 0℃로 냉각한 후 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 336 mg, 1.63 mmol)를 넣고 10분간 반응시켰다. 이 반응액을 6일간 상온에 방치시킨 후 침전된 dicyclohexylurea (DCU)를 제거하기 위하여 여과하고 여액을 농축하였다. 이 농축액은 silica gel flash column chromatography로 분리정제 (10% → 30% ether in methylene chloride로 용출 후 2% → 10% isopropyl alcohol in methylene chloride)하여 화합물 **5**를 함유한 분획을 농축 후 다시 thin layer chromatography (TLC)로 분리정제 (methanol/methylene chloride=1:9, v/v; 1.5% acetic acid)하여 300 mg (65%)의 에스테르의 유상화합물 **5**를 얻었다: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.44 (s, 9H, CH_3), 1.65 (m, 4H, CH_2), 2.24 (t, J=7.0 Hz, 2H, CH_2), 2.39 (d, J=16.1 Hz, 3H, CH_3S), 2.40 (t, J=6.7 Hz, 2H, CH_2), 3.85 (d, J=13.2 Hz, 3H, CH_3O), 8.44 (bd, 1H, NH).

6-(*O,S*-Dimethylthiophosphoramido)-6-oxohexanoic acid (6) : 에스테르 화합물 **5** (150 mg, 0.46 mmol)에 0.5 mL의 trifluoroacetic acid (TFA)를 넣고 상온에서 5분간 반응시킨 후 감압농축한 다음 잔류 TFA를 제거하기 위하여 10 mL의 ethyl acetate를 반복하여 넣고 감압농축으로 용매를 제거하였다. 이 농축액은 silica gel (6 g) flash column chromatography로 분리정제 (3% → 15% methanol in methylene chloride containing 1.5% acetic acid)하여 화합물 **6**를 함유한 분획을 농축한 후 다시 TLC로 분리정제 (methanol/methylene chloride=1:9, v/v; 1.5% acetic acid)하여 115 mg (92%)의 유상의 hapten-**2**

를 얻었다: TLC (methanol/methylene chloride=1:9, v/v; 1.5% acetic acid) R_f 0.40; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.71 (m, 4H, CH_2), 2.39 (m, 4H, CH_2), 2.38 (d, J=16.4 Hz, 3H, CH_3S), 3.86 (d, J=13.3 Hz, 3H, CH_3O), 9.14 (bd, 1H, NH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 12.0 (d, J=3.6 Hz), 23.88, 23.93, 33.4, 36.2 (d, J=6.9 Hz), 53.7 (d, J=6.6 Hz), 174.7, 177.6.

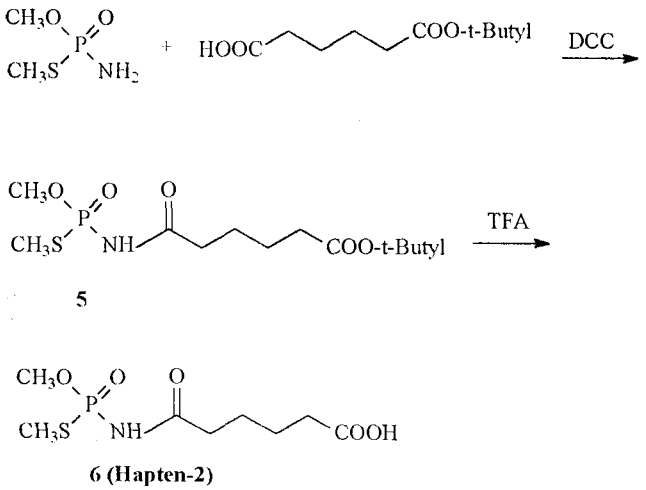


Fig. 2. Synthetic process of hapten-2.

Hapten-3의 합성

***N*-Benzyloxycarbonyl-6-aminohexanoic acid (7)** : 물 (15 mL)에 6-aminohexanoic acid (6.56 g, 50 mmol)를 녹이고 0℃로 냉각하여 격렬하게 교반시키면서 benzyloxycarbonyl chloride (8 mL)와 5 N NaOH 용액 (10 mL)을 조금씩 나누어 가하여 반응물의 pH를 10 정도로 유지시켰다. 1시간 30분 동안 반응물을 더 교반한 후 미반응물을 제거하기 위하여 ether로 세척하여 버리고 수용액층은 묽은 염산용액으로 산성화시킨 다음 methylene chloride (50 mL)로 두 번 추출하였다. 유기층은 무수 $MgSO_4$로 수분을 제거하고 농축시켰다. 농축잔류물은 ether로 -70℃에서 재결정시킨 후 11.8 g (89%)의 화합물 **7**을 얻었다: m. p. 52-55℃; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.37 (m, 2H, CH_2), 1.52 (q, J=7.2 Hz, 2H, CH_2), 1.64 (q, J=7.3 Hz, 2H, CH_2), 2.34 (t, J=7.3 Hz, 2H, CH_2), 3.19 (q, J=6.4 Hz, 2H, CH_2), 4.8 (bs, 1H, NH), 5.09 (s, 2H, CH_2Ar), 7.3-7.4 (m, 5H, Ar).

t-Butyl 6-(benzyloxycarbonylamino)hexanoate (8) : 85 mL의 methylene chloride에 상기화합물 **7** (11.8 g, 44.5 mmol)을 녹이고 dry ice에 acetone을 넣은 용기 상에서 교반 냉각시키면서 isobutylene gas (약 40 g)를 서서히 주입하였다. 다시 0.5 mL의 진한 황산을 가하고 반응물을 교반시키면서 3시간에 걸쳐 반응물을 상온으로 온도를 높였다. 과량의 isobutylene gas를 제거한 후 반응물용기는 마개로 밀봉하고 4일 동안 실온에 방치시켰다. 그 반응물은 소량의 n-hexane으로 emulsion을 방지시키기 위하여 희석한 다음 sodium bicarbonate 용액으로 추출하였다. 중성의 유기상은 무수 $MgSO_4$로 수분을 제거한 후 감압농축하여 용매를 제거한 다음 12.3 g (86%)의 유상의 화합물 **8**을 얻었다: TLC (ether) R_f 0.68; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.3-1.65 (m, 6H, CH_2), 1.43 (s, 9H, CH_3), 2.20 (t, J=7.4 Hz, 2H, CH_2), 3.19 (q, J=6.6 Hz, 2H, CH_2), 4.78 (bs, 1H, NH), 5.09 (s, 2H, CH_2Ar), 7.3-7.36 (m, 5H, Ar).

t-Butyl 6-aminohexanoate (9) : 10 mL의 ethanol에 녹은 상기화합물 8 (2.08 g. 6.47 mmol)의 용액에 carbon 촉매 (35 mg)에 첨가한 10% palladium을 넣고 수소 조건하의 대기압에서 24시간 교반하였다. 반응혼합물을 여과한 후 여액은 감압농축하여 용매를 제거하였다. 농축잔류물은 다시 ethyl acetate에 용해시켜 감압농축한 후 1.28 g의 유상화합물 **9**를 얻었다: ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.36 (m, 2H, CH_2), 1.44 (s, 9H, CH_3), 1.4-1.5 (m, 2H, CH_2), 1.60 (m, 2H, CH_2), 1.65 (s, 2H, NH_2), 2.21 (t, J=7.4 Hz, 2H, CH_2), 2.67 (t, J=6.9 Hz, 2H, CH_2).

t-Butyl 6-(*O,O*-dimethylthiophosphoramido)hexanoate (10) : 3 mL의 ether에 녹인 상기화합물 9와 triethyl amine (0.757 g, 7.5 mmol)을 10-15℃에서 교반하면서 5 mL의 ether에 녹인 *O,O*-dimethylchlorothiophosphate (1.15 g, 7.2 mmol)를 조금씩 가하였다. 10분 후에 반응혼합액의 온도를 올려 reflux하고 다시 냉각하여 물과 sodium bicarbonate 용액으로 세척하였다. 유기층은 무수 $MgSO_4$로 수분을 탈수시킨 후 감압농축하였다. 감압농축된 유상의 조화합물은 silica gel (25 g) flash column chromatography로 분리정제 (20% → 100% methylene chloride in n-hexane으로 용출 후 1% → 2% ether in methylene chloride)하여 화합물 **10**을 함유한 분획을 농축 후 다시 TLC로 분리정제 (ether/methylene chloride=1:9, v/v)하여 1.38 g (65%)의 유상화합물을 얻었다: TLC (ether/methylene chloride=1:9, v/v) R_f 0.63; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.35 (m, 2H, CH_2), 1.44 (s, 9H, CH_3), 1.4-1.6 (m, 4H, CH_2), 2.21 (t, J=7.4 Hz, 2H, CH_2), 2.93 (m, 2H, CH_2), 3.68 (d, J=13.7 Hz, 6H, CH_3O).

6-(O,S-Dimethylthiophosphoramido)hexanoic acid (11) : 상기 화합물 10 (230 mg, 0.739 mmol)에 3 mL의 methyl iodide을 넣고 65℃에서 20시간동안 reflux하였다. 반응혼합물은 silica gel (15 g)으로 flash column chromatograph로 분리정제 (30 mL의 methylene chloride 용출 후 1% → 5% isopropyl alcohol in methylene chloride)하여 화합물 **11**을 함유한 분획을 농축 후 다시 TLC로 분리정제 (isopropyl alcohol/methylene chloride=1:19, v/v)하여 218 mg (94%)의 유상화합물을 얻었다: TLC (isopropyl alcohol/methylene chloride=1:19, v/v) R_f 0.3; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.36 (m, 2H, CH_2), 1.44 (s, 9H, CH_3), 1.52 (m, 2H, CH_2),

1.58 (m, 2H, CH_2), 2.21 (t, J=7.3 Hz, 2H, CH_2), 2.25 (d, J=14.7 Hz, 3H, CH_3S), 2.99 (m, 2H, CH_2), 3.75 (d, J=12.4 Hz, 3H, CH_3O).

이 화합물 **11**은 상기 6과 동일한 방법을 사용하여 TFA로 가수분해시켜 hapten-**3**를 얻었다: TLC (methanol/methylene chloride=1:9, v/v) R_f 0.45; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.40 (m, 2H, CH_2), 1.55 (m, 2H, CH_2), 1.65 (m, 2H, CH_2), 2.25 (d, J=14.7 Hz, 3H, CH_3S), 2.34 (t, J=7.3 Hz, 2H, CH_2), 2.96 (m, 2H, CH_2), 3.76 (d, J=12.5 Hz, 3H, CH_3O).

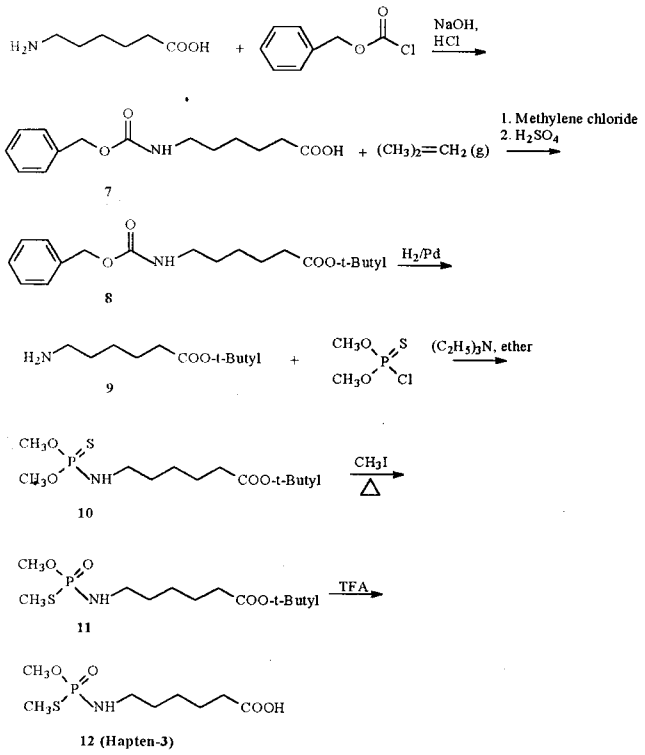


Fig. 3. Synthetic process of hapten-3.

Hapten의 활성 ester 합성 및 담체 단백질과의 접합

합성한 hapten을 코팅항원과 면역원으로 사용하기 위하여 각각 BSA 및 KLH와 접합을 잘 형성하게 하도록 그림 4-A와 같이 활성 ester hapten을 합성하였다 (Langone과 Van Vunakis, 1975). 즉 0.04 mmol hapten, 0.04 mmol *N*-hydroxysuccinimide, 그리고 0.044 mmol DCC를 0.2 mL의 무수 dimethylformamide (DMF)에 넣고 실온에서 5시간 동안 교반한 후 여과하여 생성된 DCU를 제거하여 활성 ester hapten 여액을 얻은 다음 이것을 그림 4-B에서 보는 바와 같이 단백질 용액에 첨가하여 hapten-단백질 conjugate를 조제하였다. 단백질 용액은 1 mL의 0.05 M borate buffer (sodium borate · $10H_2O$, pH 8.0)에 10 mg의 BSA (Fraction V, Sigma A-6773) 또는 KLH (Type Ⅷ, Sigma H-1757)를 각각 녹이고 격렬히 교반하면서 위에서 얻은 활성화 hapten 여과액 약 200 μL를 약 20분에 걸쳐 서서히 첨가하였다. 이 hapten-단백질 혼합물을 4℃에서 하룻밤 교반하여 반응시킨 후 투석막 (6000-8000 MW cutoff)을 이용하여 약 10배 용량의 완충액 (0.2 M phosphate-buffered saline, pH 7.5) 속에서 교반하면서 4일간 투석하여 미반응의 저분자물질들을 제거하였다. 투석이 종료되면 투석막내의 용액을 polypropylene vial에 넣은 후 -70℃ 이하에서 사용 전까지 보관하였다. Hapten-단백질 conjugate는 Bradford 법 (1976)에 토대를 둔 Bio-Rad사 지침의 단백질 정량법에 준하여 측정하였다. Hapten-KLH conjugate들과 hapten-BSA conjugate들의 단백질 함량은 각각 4~6과 4~5 mg/mL 이었으며, 접합된 단백질 함량을 기준으로 시험할 코팅항원의 농도와 토끼에 주사할 면역원의 농도를 계산하였다.

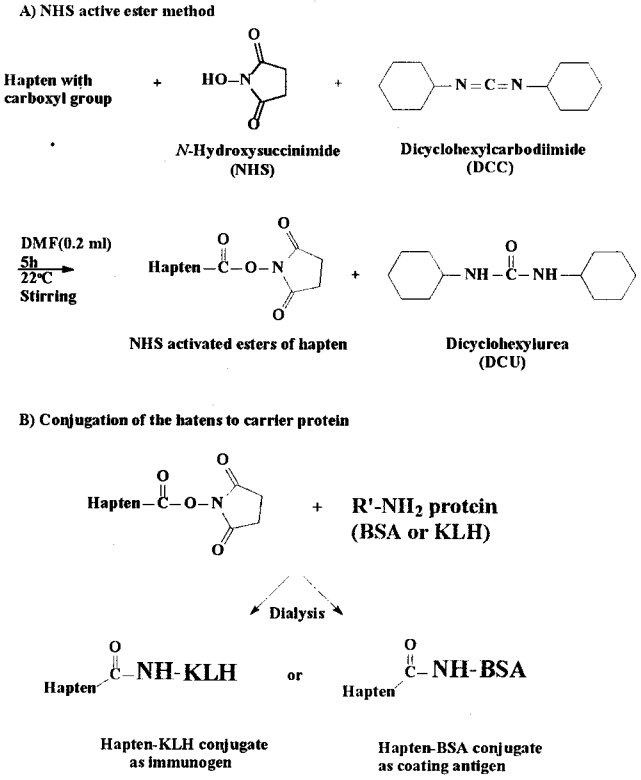


Fig. 4. Formation of the *N*-hydroxysuccinimide active esters of the haptens, and the conjugation of haptens to carrier proteins.

면역화

다클론항체 생산을 위하여 각 면역원에 대하여 3마리씩 생후 3개월이 경과한 암컷의 New Zealand 흰토끼 (2-4 kg)에 hapten-**1**-KLH conjugate, hapten-**2**-KLH conjugate, hapten-**3**-KLH conjugate (100 μg protein/토끼) 각각을 0.85% 멸균식염수 1.5 mL에 용해시킨 후 1.5 mL의 Freund's complete adjuvant와 완전히 유화한 다음 토끼당 유탁액 1 mL씩을 뒷목과 등에 다섯 부위 이상 피하 주사하였다. 면역촉진 주사는 최초 면역주사 후 매 3주 간격으로 각각의 면역원을 Freund's incomplete adjuvant와 상술한 바와 같이 동일한 방법으로 유화하여 6회 주사하였으며, 면역주사 1주일 후에 토끼의 이정맥으로부터 약 10 mL의 혈액을 채취하여 항혈청의 역가를 검정한 다음

다클론항체가 어느 정도 형성되었다고 판단된 때 즉 최초 면역주사 후 20주에 토끼의 심장부에 vacutainer® needle을 꽂아 혈액을 완전히 채취하였다. 채취한 혈액은 약 4℃에서 10시간 이상 보존한 후 그 상징액을 취하여 800×g에서 10분간 원심분리하여 혈장을 제거하고 상징액인 혈청을 취하여 cryogenic vial에 나누어 넣고 사용할 때까지 -70℃이하에서 보관하였다. 각각의 면역원에 대한 항체의 역가는 indirect ELISA 방법으로 측정하였다. 면역원 hapten-3-KLH conjugate에 대한 항체의 생산은 hapten의 합성이 지연되어 항체가 형성 중에 있어 본 ELISA 개발을 위하여 사용할 수 없었다.

ELISA를 위한 buffer의 조제

ELISA를 위하여 사용한 buffer는 EPA Guideline (Gee 등, 1994)에 준하여 다음과 같이 조제하였다.

- 코팅 buffer의 조제 : Na_2CO_3 0.795 g과 $NaHCO_3$ 1.465 g을 약 500 mL의 초순도 증류수에 녹이고 pH를 9.6으로 맞춘 후 최종부피를 정확히 500 mL로 하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다.
- 10×PBS (phosphate buffered saline)의 조제: 640 g NaCl, 16 g KH_2PO_4, 91.96 g Na_2HPO_4, 그리고 16 g KCl을 약 7 L의 초순도 증류수에 서서히 교반하면서 녹이고 pH를 7.5로 맞춘 후 최종부피를 8 L로 하여 실온에서 보관하면서 사용하였다.
- 1×PBS의 조제 : 100 mL의 상기 10×PBS를 초순도 증류수로 10배 희석하고 필요하다면 pH를 8로 맞춘 후 실온에 보관하면서 사용하였다.
- 1×PBST (0.05% Tween 20)의 조제 :100 mL의 상기 10×PBS와 400 μL의 Tween 20을 용기에 넣은 후 거품이 생기지 않도록 주의하면서 초순도 증류수로 1 L가 되도록 부피를 맞춘 후 실온에 보관하면서 사용하였다.
- Washing buffer (0.1×PBS + 0.05% Tween 20)의 조제 : 80 mL의 상기 10×PBS와 4 mL의 Tween 20을 용기에 넣은 후 거품이 생기지 않도록 주의하면서 초순도 증류수로 최종부피를 8 L가 되도록 하였다.
- Horseradish peroxidase 실험용 citrate-acetate buffer의 조제: 13.61 g의 sodium citrate (100 mM)를 약 1 L 초순도 증류수에 녹인 후 acetic acid로 pH를 5.5로 조절하고 1 L로 맞추었다.
- 1% H_2O_2 용액의 조제: 30% H_2O_2 1 mL을 29 mL 초순도 증류수에 넣고 플라스틱용기에 담아 냉장고에 저장하였다.
- 0.6% 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)의 조제: 60 mg의 tetramethylbenzidine을 10 mL의 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 실온의 암소에 저장하였다.
- 최종 substrate buffer의 조제 : DMSO에 녹인 0.6% TMB 용액 0.4 mL과 1% H_2O_2 0.1 mL을 상기의 citrate-acetate buffer 25 mL에 가하여 잘 섞은 후 바로 사용하였으며 이 경우 buffer와 TMB의 온도는 실온이어야 한다.

항혈청 및 코팅항원의 screening과 선발

각각의 면역원 (hapten-1-KLH conjugate, hapten-2-KLH conjugate)에 의하여 생산된 6개의 다클론항체가 acephate 잔류분석을 위한 항체로 적합한 지를 시험하기 위하여 Abad와 Montoya (1994)의 방법으로 코팅항원과 분석물인 acephate (10과 100 μg/mL)를 경합시켜 다클론항체와의 반응을 검정하였으며 이때 acephate가 없는 대조구와 함께 competitive homologous와 heterologous ELISA를 동시에 수행하여 비교하였다. 각 코팅항원 농도는 5 μg/mL, 각 항혈청은 15000배로 희석하였고 2차 항체는 10000배로 희석하였다. ELISA 결과 대조구의 흡광도와 두 농도의 acephate에서의 흡광도 차이는 아래와 같은 방법으로 계산하여 저해율 (% Inhibition = $(A_{control}-A_{acephate})$ / $A_{control}\times 100$)이 가장 큰 항혈청과 코팅항원의 조합을 선발하여 이후 acephate ELISA의 최적화를 위하여 사용하였다.

Checkerboard titration에 의한 ELISA 시약농도의 최적화 및 competitive indirect ELISA

간접적 ELISA는 checkerboard titration을 위하여 그리고 acephate 분석을 위한 ELISA는 solid phase immunoassay (Voller 등, 1976)에 의한 경쟁적 간접 ELISA (그림 5)로 하였으며, 코팅항원의 농도와 다클론항체의 희석비는 checkerboard titration (Gee 등, 1994)에 의하여 흡광도가 0.5-1.0 범위에서 선정하였다.

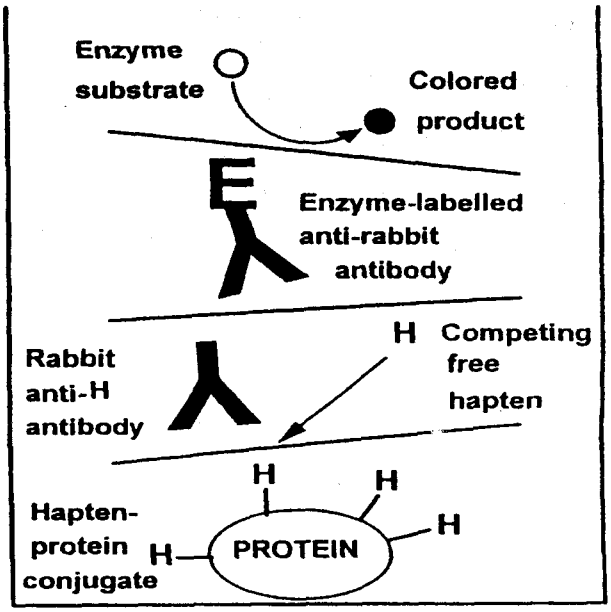


Fig. 5. Schematic of the antigen-coated plate ELISA format. The lines represent washing steps.

간접적 ELISA는 먼저 96-well microtiter plate (Nunc-Immuno plate, Maxisorp surface, Roskilde, Denmark)를 pH 9.6의 코팅 buffer로 희석한 코팅항원을 각 well에 100 μL (단백질 농도: 1 μg/mL)씩을 주입하여 4℃에서 하룻밤 방치한 후 0.1×PBST로 5회 세척하여

plate에 코팅이 안된 항원을 제거하였다. 코팅이 안된 well 부위를 blocking하기 위하여 각 well에 200 μL씩 skim milk (3% in 1×PBS)를 가하고 37℃에서 1시간 incubation하였으며 다시 상기방법으로 plate를 세척하였다. 그런 다음 코팅 plate에 1×PBST에 희석한 다클론항체 100 μL를 코팅 plate에 가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 다시 세척하고 다클론항체의 항체로서 효소가 표지된 이차 항체인 goat anti-rabbit IgG-Horseradish peroxidase 희석액 (1:10000 diluted with 1×PBST)을 100 μL 씩 가한 후 실온에서 1시간 반응한 다음 세척하고 substrate buffer 100 μL 씩을 각 well에 가해 파란색으로 발색시켰다. 약 15분 후에 각 well에 4 N-H_2SO_4 50 μL씩 가하여 반응을 정지시켜 황색으로 변한 plate를 dual wavelength mode (450-655 nm)에서 흡광도를 측정 (Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad) 하였다.

경쟁적 간접 ELISA는 acephate의 분석과 또한 분석물의 유사화합물의 다클론 항체에 대한 교차반응을 평가하기 위하여 이용되었다. 먼저 코팅 plate의 well에 항체와 농도별 분석물을 넣기 전 이들을 동량으로 혼합하여 실온에서 1시간 preincubation시켰다. 경합을 위하여 이 혼합액중 100 μL를 코팅 plate에 가하고 실온에서 1시간 반응시킨 후 코팅 plate를 세척하였다. 나머지 과정은 상기의 간접 ELISA 방법과 동일하였다. 표준용액에 의한 표준곡선은 S 자형으로 fitting되었고, four parameter logistic equation [$Y=(A-D)/(1+(x/C)^B)+D$]에 의하여 표준곡선식을 얻었다. 이 곡선의 상하점근선은 acephate의 최대 (A) 및 최소 (D) 농도에 따른 흡광도이며, 이 곡선의 IC_{50} (C)를 중심으로 한 직선범위 (IC_{20} - IC_{80})가 실질적인 acephate의 분석범위가 되고, 직선의 기울기는 B가 된다. 분석 감도의 예측은 분석물을 함유하지 않은 시료의 흡광도를 50% 저해하는 acephate의 농도 (IC_{50})로 표시할 수 있다. 그러므로 이 수치가 작은 S자 표준곡선이 acephate의 분석에 예민한 ELISA 방법이라고 할 수 있다.

Acephate 유사화합물에 대한 다클론항체의 교차반응성은 최적화된 acephate ELISA의 분석조건을 이용하여 측정하였다.

Acephate 표준용액의 조제

Acephate 분석법 최적화를 위하여 조제된 표준용액은 methanol에 용해된 10000 μg/mL의 acephate 표준용액을 1×PBST (pH 7)로 11가지 수준 (0-500000 ng/mL) 혹은 7가지 수준으로 (1.28-20000 ng/mL)으로 5배씩 단계적으로 희석하여 사용하였다.

ELISA 분석법의 최적화 (assay optimization)

Acephate 잔류분석을 위해서는 최적의 감도를 지닌 ELISA를 개발하는 것이 중요하기 때문에 분석감도를 비교하고 개선시켜야만 한다. 이를 위하여 먼저 코팅항원으로 96-well microplate에 피복 시킨 후 남아 있는 자리를 blocking하여 antibody의 비특이적인 흡착을 줄이기 위하여 몇 가지 단백질 시약을 시험하였고, 다클론항체와 분석물의 혼합액을 코팅항원의 plate에 넣기 전의 preincubation 효과, assay buffer의 최적조건을 위하여 세제효과로는 buffer내 Tween 20의 존재유무로, 유기용매효과로는 methanol과 acetone 함유량으로, 그리고 서로 상이한 pH 효과를 시험하여 acephate ELISA을 최적화하였다.

결과 및 고찰

Hapten의 합성 및 접합

감도가 좋은 acephate ELISA의 개발은 가능한 한 분석물의 구조와 흡사한 hapten을 합성하는 것에 달려있다. 이는 면역 hapten에 의하여 생산된 항체가 분석물에 대하여 특이성과 친화도가 좋아야 분석감도가 양호하고 선택성이 있는 ELISA를 만들 수 있기 때문이다. 이런 목적을 위하여 acephate 구조의 서로 다른 위치를 target으로 하여 그림 1~3에서 보는 바와 같이 hapten을 합성하였다. Hapten의 합성을 위한 첫번째 방법으로 acephate의 methylthio group에 linker로서 hexanoic acid를 도입시켜 hapten-**1**을 합성하였고, 두 번째 방법으로는 acephate의 amine group에 oxohexanoic acid와 hexanoic acid를 각각 도입시켜 hapten-**2**와 hapten-**3**를 합성하였다. 비교적 단순한 합성과정을 통하여 합성된 hapten-**1**과 hapten-**2**와는 달리 hapten-**3**는 여러 경로를 통하여 합성되었다. Hapten과 담체단백질을 연결하는 linker arm으로는 탄소수가 6개인 hexanoic acid를 사용하였다. 이 linker arm은 면역원으로 쓰일 hapten-단백질 conjugate에서 고분자 담체단백질이 hapten을 가로막지 않도록 두 화합물간의 거리를 유지시켜 hapten의 epitope에 특이적인 항체를 유도하기 위함이었다 (Karu 등, 1994; Schneider 등, 1994). 이들 hapten은 여러 접합방법 중 *N*-hydroxysuccinimide active ester 법을 사용하여 항체 생산을 위한 담체단백질인 KLH와 접합시켜 면역원으로 사용하였고, 코팅항원으로 사용하기 위하여 BSA와 접합시켜 homologous 혹은 heterologous ELISA를 수행하였다.

다클론 항체의 형성

Acephate ELISA를 위하여 사용한 다클론항체는 최종 채혈하여 얻은 항혈청을 사용하였다. 모든 항혈청은 그림 6에서 보는 바와 같이 hapten-**1**-BSA에 대하여 높은 역가를 보여 친화도 있는 항체를 보유하고 있었다. 그리고 모든 항체는 코팅항원의 담체단백질로 사용한 BSA에서는 교차반응을 보이지 않는 것으로 보아 hapten에 대한 특이성도 있었다 (data 생략).

코팅항원과 항체의 검정 및 선발

감도가 좋은 acephate ELISA 개발에 적합한 항체와 코팅항원을 선발하기 위하여 항체와 코팅항원을 조합으로 하여 homologous와 heterologous ELISA를 이용하여 코팅항원과 항혈청을 screening하였다. Acephate의 농도는 10과 100 μg/mL로 하여 항혈청에 의하여 저해되는 흡광도와 acephate가 없는 대조구의 흡광도 차이로부터 저해율을 계산하였다. 표 1에서 보는 바와 같이 항혈청과 코팅항원을 위하여 동일한 hapten을 사용하는 homologous immuno-

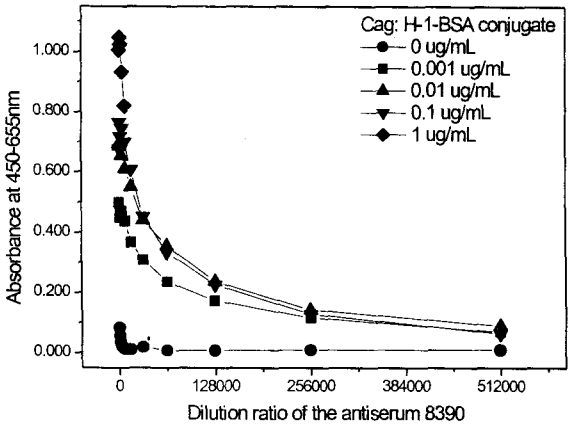


Fig. 6. Titer of the antiserum 8390 raised against hapten-1-KLH conjugate.

assay는 상기의 농도에서 acephate의 저해율이 거의 없었다. 이러한 결과는 환경 중 미량으로 잔류할 가능성이 높은 acephate를 분석하기에는 감도가 낮아 유용한 면역분석법이 될 수 없음을 시사한다. 그러나 항혈청을 생산한 면역·hapten과 코팅항원으로 사용한 hapten을 다르게 조합하여 수행한 heterologous immunoassay에서는 hapten-3로 조제된 코팅항원과 hapten-1으로 면역하여 생산된 항혈청 8377을 사용한 heterology에서 10 μg/mL의 acephate 농도에서 50% 이상의 저해율을 보였기에 이후 acephate ELISA를 최적화하기 위하여 이들 코팅항원과 항체를 사용하였다. 또한 ELISA 최적화를 위한 시약농도로 코팅항원과 항체의 농도는 checkerboard titration에 의하여 가장 이상적인 발색범위인 0.5-1.0 사이의 범위를 지닌 1 μg/mL의 hapten-3-BSA 코팅항원과 16000배 희석한 항체 8377를 사용하였다.

분석법의 최적화

Acephate 잔류분석을 위해서는 먼저 환경 중에 미량으로 잔류하는 acephate를 정성 및 정량할 수 있는 최적의 분석감도를 지닌 ELISA를 개발하는 것이 필수적이다. 그러므로 분석감도를 비교하여 개선시키기 위하여 코팅항원으로 피복된 plate의 blocking reagent의 선발, 코팅항원이 피복된 plate에 넣기 전 분석물과 항체의 혼합효과 그리고 항체와 acephate가 반응하는 buffer에서의 세제효과, 유기용매효과 및 pH 효과를 조사하여 ELISA를 최적화하였다.

Blocking reagent : 코팅항원으로 96-well microplate에 피복시킨 후 남아 있는 자리를 blocking하여 항체의 비특이적인 흡착을 줄이기 위하여 몇 가지 단백질 시약을 plate에 blocking 시킨 후 ELISA를 수행하여 비교하였다. 이는 모든 immunoassay를 위한 최적의 blocking 시약이 없으므로 acephate ELISA를 위하여 blocking 시약을 탐색하기 위함이었다. 그림 7-A에서 보는 바와 같이 blocking을 하지 않고 수행한 ELISA보다 blocking을 한 ELISA에서 IC_{50} 값을 낮추어 분석감도가 더 좋았다. 그 중 3% skim milk는 다른 blocking 시약보다 분석시 background signal을 가장 효율적으로 낮췄고 최대흡광도와 최소흡광도 (A/D 값)의 차이가 ovalbumin보다 컸기에 acephate ELISA의 blocking 시약으로 사용하였다.

세제 효과 : 항원과 항체간 비특이적인 반응을 줄이기 위하여 buffer에는 계면활성제를 첨가하고 있다. 이중 비이온성의 계면활성제인 Tween 20이 가장 일반적으로 사용되고 있다 (Vanderlaan 등, 1988; Chiu 등, 1995; Shan 등, 1999). 그러나 몇몇 비극성 분석화합물과 Tween 20간에 소수성의 비특이적인 상호작용으로 분석대상의 감도를 낮춘다는 부정적인 면이 보고되고 있다 (Manclús와 Montoya, 1996; Abad와 Montoya, 1997; Sugawara 등, 1998). 또한 수용해도가 있는 비교적 극성의 분석화합물인 sulfonylurea계 제초제인 metsulfuron-methyl와 bensulfuron-methyl, 그리고 neonicotinoid계 살충제 imidacloprid의 immunoassay (Strahan 등, 1998; Knopp 등, 1999, 이 등, 2000; Lee 등, 2001) 에서도 계면활성제가 첨가되지 않은 assay buffer를 사용하여 분석감도를 좋게 하였다. 본 연구에서 Tween 20이 acephate ELISA에 미치는 영향을 살펴보면 assay buffer에 Tween 20의 무첨가가 IC_{50} 값을 약 1.3배 낮추었다 (그림 7-B). 그러나 Tween 20

Table 1. Screening of the antisera from the test rabbits and coating antigens by competitive indirect homologous or heterologous ELISA

Polyclonal antibody		Concentration of acephate (μg/mL)					
		Coated with hapten-1-BSA[a]		Coated with hapten-2-BSA		Coated with hapten-3-BSA	
Immunogen	Rabbit	10	100	10	100	10	100
Hapten-1-KLH	8377	0[b]	0	0	0	54	66
	8390	0	0	34	35	36	59
	8391	0	0	5	3	16	25
Hapten-2-KLH	11425	0	0	0	0	0	0
	11426	0	0	0	0	0	0
	11427	0	0	0	0	0	0

[a]No titer was observed using BSA alone as coating antigen. [b]% Inhibition = $[1-(A_{acephate}/A_{control})]\times 100$.

을 첨가한 assay buffer와 비교할 때 Tween 20이 배제된 assay buffer에서의 IC_{50} 값은 작았지만 분석물의 검출범위에는 큰 차이가 없었고 오히려 분석에 적합한 발색정도 및 최대흡광도와 최소흡광도의 차이 (A/D 값)는 컸고 낮은 표준편차와 변동계수 (coefficients of variation)를 보여 assay buffer에 Tween 20을 첨가하는 편이 본 연구를 위하여 바람직하였다.

유기 용매효과 : 대부분의 농약은 수용해도가 낮아 유기용매를 함유한 assay buffer를 사용하므로 생산된 항체에 대한 유기용매의 영향을 확인할 필요가 있다. Methanol 및 acetone을 함유한 assay buffer가 acephate의 분석감도와 흡광도에 미치는 영향은 그림 7-C와 7-D에서 보는 바와 같이 assay buffer 중 유기용매를 함유하지 않는 buffer에서 보다는 유기용매의 양이 많아질수록 IC_{50} 값이 높아지고 발색정도는 낮아졌다. 이는 assay buffer 중 많은 양의 유기용매의 존재로 항체와 분석물 및 코팅항원과의 결합반응을 저해시킴을 시사한다. Acephate의 수용해도가 790 g/L (Tomlin, 2000)임을 감안할 때 분석감도와 흡광도를 낮추는 유기용매를 분석완충용액에 사용할 필요성은 없다고 본다.

분석물과 항체 혼합물의 preincubation : 코팅항원이 피복된 plate에 분석물과 항체를 동시에 넣어 경합을 시킨 경우와 분석물과 항체 혼합물을 mixing plate에서 미리 1시간 동안 반응시킨 후 이 혼합물을 코팅항원이 있는 plate에 넣고 경합시킨 경우간의 차이가 어떻게 acephate의 분석감도에 영향을 끼치는 지 시험하였다. 그림 7-E에서 보는 바와 같이 분석물과 항체를 미리 반응시킨 후 코팅항원이 피복된 plate에 넣고 경합시킨 경우가 IC_{50} 값을 낮추어 약 1.6배의 분석감도를 높였다. 이는 항체가 분석물과 미리 반응하여 코팅항원과의 친화도를 높여 상대적으로 그렇지 않

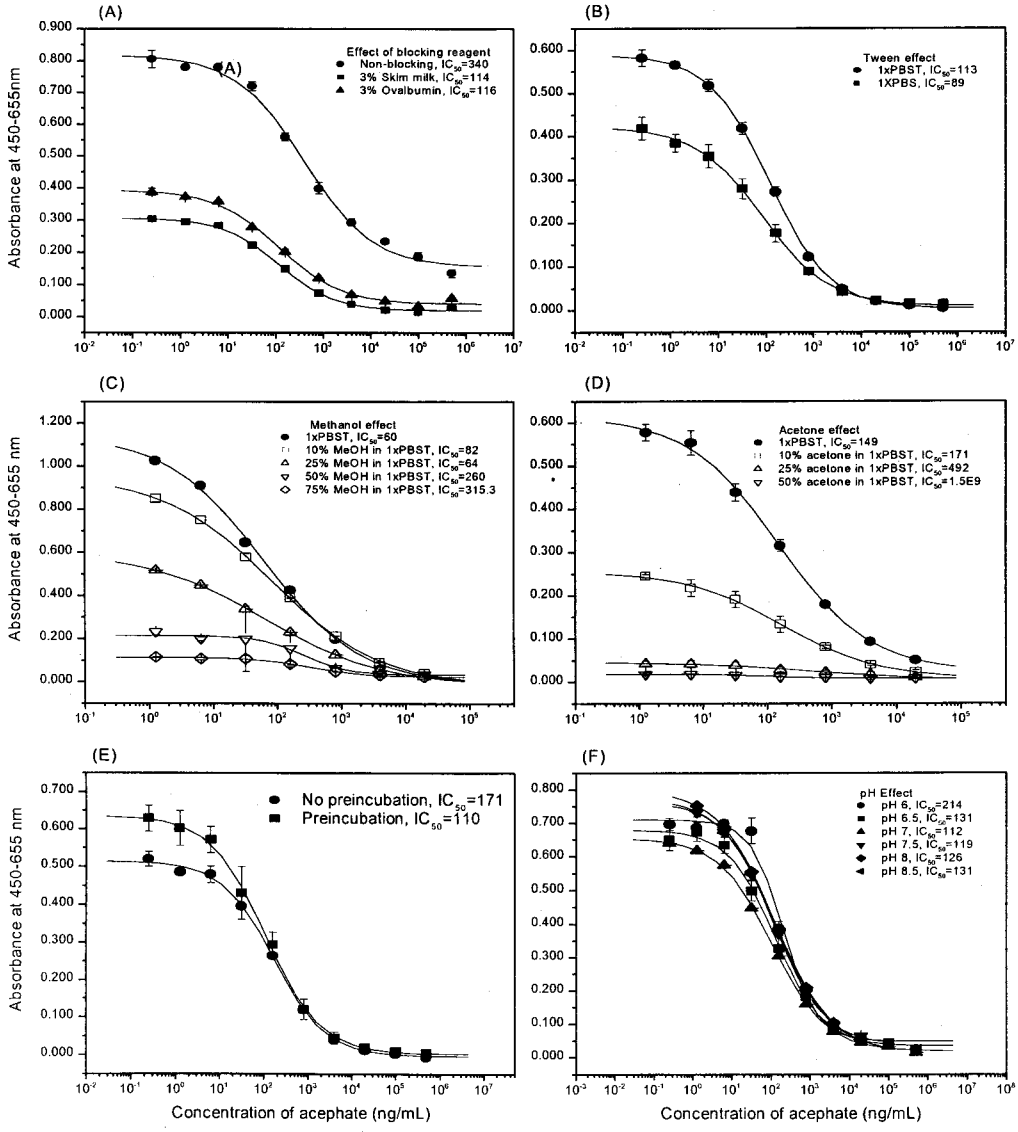


Fig. 7. Optimization of the acephate ELISA. (A) blocking effect, (B) Tween 20 effect, (C-D) organic solvent effects, (E) preincubation of the mixture of the analyte and antiserum, and (F) pH effect in the assay buffer.

Table 2. Optimized conditions for the acephate ELISA

Immunogen	Coating antigen	Blocking reagent	Antiserum(dilution)	Assay buffer
Hapten-1-KLH	1 μg/mL of hapten-3-BSA	3% skim milk in 1×PBS at 37℃	Rabbit 8377 (1:16000)	pH 7 of 1×PBST

은 대조구보다 분석감도를 높였음을 시사한다.

pH 효과 : Assay buffer의 pH 조건이 바뀔 때 ELISA에 미치는 영향을 아는 것은 중요하다. 그림 7-F에서 보는 바와 같이 assay buffer의 pH가 7-7.5의 범위를 벗어날수록 그 차이가 크지는 않았지만 흡광도와 분석감도의 지표가 되는 IC_{50} 값은 증가하였다. Acephate는 pH 5-7의 범위에서 가수분해되는 반감기가 약 50일 (Tomlin, 2000) 정도로서 본 ELISA 개발을 위한 분석물을 함유하고 있는 buffer의 최적 pH는 7이라 할 수 있겠다.

Homologous ELISA와 heterologous ELISA

미량의 농약잔류물을 분석하기 위하여 ELISA 방법 중 competitive inhibition에서 homologous ELISA보다 heterologous ELISA 방법이 많이 소개되고 있다 (Harrison 등, 1991; Schneider와 Hammock, 1992; Schlaeppi 등, 1994; Schneider 등, 1994). 항체를 생산하기 위한 면역 hapten과 피복항원으로 사용하는 hapten이 동일한 homologous ELISA는 분석물을 모방하여 만든 hapten으로 부터 만들어진 항체가 코팅항원의 hapten과 너무 잘 결합됨으로 분석물에 의한 저해정도가 낮아서 감도가 낮은 ELISA가 개발될 수 있다. Homologous ELISA에 의한 방법으로 환경중 잔류하는 농약과 같은 미량의 분석대상 물질을 정량하기에 어려움이 있을 때 heterologous ELISA는 항체를 만든 hapten과 분석물과 구조가 다른 hapten을 합리적으로 설계하고 합성하여 이를 피복항원으로 사용하면 항체가 분석대상물과의 결합을 선호하여 homologous ELISA보다 분석감도를 높일 수 있다. 본 연구에서

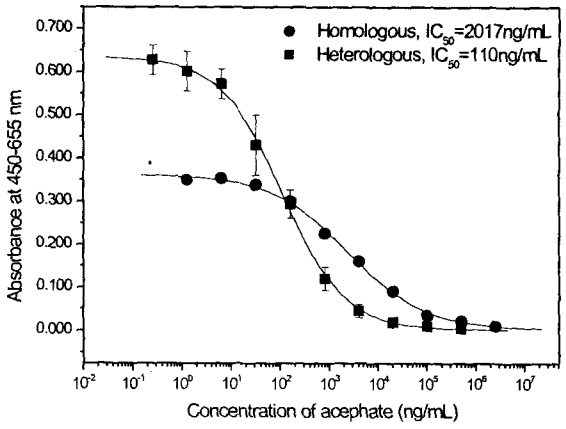


Fig. 8. Comparison between homologous ELISA and heterologous ELISA in the acephate competitive standard curve.

도 acephate의 분석감도는 homologous ELISA보다 heterologous ELISA에서 분석감도가 민감한 것으로 확인되었다. 그림 8에서 보는 바와 같이 homologous ELISA에서 acephate에 의한 IC_{50} 값은 2017 ng/mL 이었고, heterologous ELISA에서의 IC_{50} 값은 110 ng/mL로서 homologous ELISA보다 약 18배 이상 분석감도를 높였다.

Acephate 분석을 위해 개발한 본 ELISA의 최적조건은 표 2에서 보는 바와 같이 다클론항체를 생산하기 위한 면역원 hapten-1-KLH conjugate와 코팅항원을 위하여 사용한 hapten-3-BSA conjugate의 heterologous ELISA에서 코팅항원을 1 μg/mL의 농도로 plate를 피복하고 3% skim milk로 microplate를 37℃에서 blocking시킨 다음 분석 buffer로 Tween 20이 첨가되고 이온강도가 1인 pH 7의 phosphate buffer saline에서 다클론항체 (16000배 희석)와 분석물을 미리 반응시켜 항체의 코팅항원에 대한 친화도를 약하게 할 때 acephate의 분석감도를 증가시켰다. 이때의 IC_{50} 값은 110 ng/mL 였고 검출 범위는 10-1000 ng/mL와 최소검출한계는 4 ng/mL 이었다 (그림 13). 그러나 보다 민감한 분석감도를 지닌 ELISA 개발을 위하여 acephate에 대해 특이적인 다클론항체의 생산과 더불어 코팅항원을 위한 hapten의 연구가 진행 중에 있다.

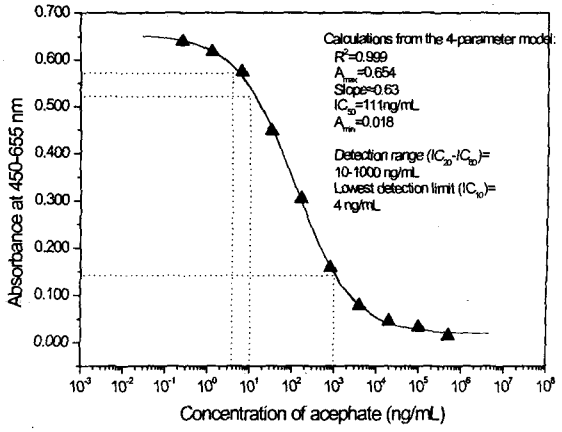
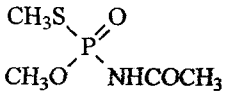
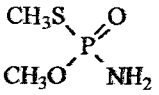
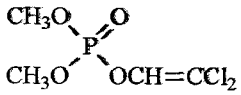
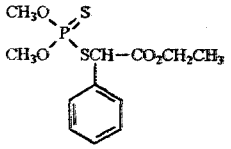


Fig. 9. Standard curve of acephate under the optimized conditions of the acephate ELISA.

교차반응성

Acephate ELISA의 개발은 생성된 항체가 acephate에 대하여만 특이적으로 반응하고 다른 유사화합물에 대하여 친화력이 낮아야 분석물의 정확한 정성 및 정량이 가능할 것이다. 항체가 acephate에 대하여 특이성이 있는 가는 acephate와 구조적으로 유사한 유기인계 살충제와의 교차

Table 3. The cross-reactivities of the antiserum 8377 to structurally related organophosphorus insecticides and a metabolite of acephate in the ELISA

Compond	Chemical structure	IC_{50} (ng/mL)	Cross-reactivity (%)
Acephate		114.5	100
Methamidophos		5.9×10^{3}	0.02
Dichlorvos		5.5×10^{6}	< 0.02
Phenthoate		3.9×10^{6}	< 0.02

[a]Cross-reactivity (%)= (IC_{50} of acephate/IC_{50} of other compounds)×100

반응으로부터 알 수 있다. 항혈청에 대한 교차반응성은 표 3에서 보는 바와 같이 acephate의 주분해산물임과 동시에 살충제로 쓰이는 methamidophos에서도 0.02%로 아주 작았고 기타 유기인계 살충제에서도 이보다 더 낮은 교차반응을 보인 것을 감안할 때 본 연구의 ELISA가 acephate 분석에 특이성이 있음을 시사하였다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 충북대학교 발전기금재단의 연구비에 의하여 지원되었음.

참고문헌

Abad, A. and A. Montoya (1994) Production of monoclonal antibodies for carbaryl from a hapten preserving the carbamate group. J. Agric. Food Chem. 42:1818~1823.

Abad, A. and A. Montoya (1997) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to carbaryl. 2. Assay optimization and application to the analysis of water samples. J. Agric. Food Chem. 45:1495~1501.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the determination of microgramme quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248~254.

Chiu, Y. W., R. E. Carlson, K. L. Marcus, and A. E. Karu (1995) A monoclonal immunoassay for coplanar polychlorinated biphenyls. Anal. Chem. 67: 3829~3839.

Gee, S. J., B. D. Hammock, and J. M. Van Emon (1994) A user's guide to environmental immunochemical analysis. EPA/540/R-94/509, U. S. EPA, Office of Research and Development, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, U.S.A.

Hammock, B. D., S. J. Gee, P. Y. K. Cheung, T. Miyamoto, M. H. Y. Goodrow, J. Van Emon and J. N. Seiber (1986) Utility of immunoassay in pesticides trace analysis. *In* Pesticide Science and Biotechnology (ed. Greenhalgh, R. and Roberts T. R.), Proceedings of the Sixth International Congress of Pesticide Chemistry, Ottawa, Canada, 10-15 Blackwell Scientific Publications, London.

Harrison, R. O., M. H. Goodrow, and B. D. Hammock (1991) Competitive inhibition ELISA for the s-triazine herbicides: assay optimization and antibody characterization. J. Agric. Food Chem. 39:122~128.

Langone, J. J. and H. Van Vunakis (1975) Radioimmunoassay for dieldrin and aldrin. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 10:163~171.

Lee, J. K., K. C. Ahn, O. S. Park, S. Y. Kang, and B. D. Hammock (2001) Development of an ELISA for the detection of the residues of the insecticide imidacloprid in agricultural and environmental samples. J. Agric. Food Chem. 49:2159~2167.

Karu, A. E., M. H. Goodrow, D. J. Schmidt, B. D. Hammock, and M. W. Bigelow (1994) Synthesis of haptens and derivation of monoclonal antibodies for immunoassay of the phenylurea herbicide diuron. J. Agric. Food Chem. 42:301~309.

Knopp, A., D. Knopp, and R. Niessner (1999) ELISA determination of the sulfonylurea herbicide metsul-

furon-methyl in different water types. Environ. Sci. Technol. 33:358~361.

Manclús, J. J. and A. Montoya (1996) Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide chlorpyrifos. 2. Assay optimization and application to environmental waters. J. Agric. Food Chem. 44:4063~4070.

Schlaeppi, J. A., A. Kessler, and W. Föry (1994) Development magnetic particle-based automated chemiluminescent immunoassay for triasulfuron. J. Agric. Food Chem. 42:1914~1919.

Schneider, P. and B. D. Hammock (1992) Influence of the ELISA format and the hapten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for *s*-triazine herbicides using monoclonal antibodies. J. Agric. Food Chem. 40:525~533.

Schneider, P., M. H. Goodrow, S. J. Gee, and B. D. Hammock (1994) A highly sensitive and rapid ELISA for the arylurea herbicides diuron, monuron, and linuron. J. Agric. Food Chem. 42:413~422.

Shan, G., D. W. Stoutamire, I. Wengatz, S. J. Gee, and B. D. Hammock (1999) Development of an immunoassay for the pyrethroid insecticide esfenvalerate. J. Agric. Food Chem. 47:2145~2155.

Strahan, J., C. Rankin, and M. Duffy (1998) Trace level quantitation of sulfonylurea herbicides in soil by an ultrasensitive ELISA assay. 9th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry on August 2-7, London, U.K.

Sugawara, Y., S. J. Gee, J. R. Sanborn, S. D. Gilman, and B. D. Hammock (1998) Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay based on polyclonal antibodies for the detection of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins. Anal. Chem. 70: 1092~1099.

Szurdoki, F., H. K. M. Bekheit, M. Marco, and B. D. Hammock (1995) Important factors in hapten design and enzyme-linked immunosorbent assay development. pp.39~63, *In* New Frontiers in Agrochemical Immunoassay (ed. Kurtz, D. A., J. H. Skerritt and L. Stanker), AOAC International, U.S.A.

Tomlin, C. (ed.) (2000) Acephate. pp.6~7, *In* The Pesticide Manual-Incorporating the agrochemicals handbook. Crop Protection Publications, British Crop Protection Council, The Royal Society of Chemistry, U.K.

Vanderlaan, M., L. H. Stanker, and B. E. Watkins (1988) Improvement and application of an immunoassay for screening environmental samples for dioxin contamination. Environ. Toxicol. Chem. 7:859~870.

Voller, A., D. E. Bidwell and A. Bartlett (1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine; theory and practice. Bull. W. H. O. 53:55~64.

Voss, G., R. Neumann, W. Kobel (1995) Economy-society-environment: how fit are organophosphorus insecticides? pp.31~41, *In* Progress and prospects of organophosphorus agrochemicals (ed. M. Eto and J. E. Casida), Kyushu University Press, Fukuoka, Japan.

농약사용지침서 (2000) 아시트. pp.356~357, 농약공업협회.

농약잔류분석연구반 (1995) Acephate. 최신 농약의 잔류분석법. pp.27~28, 중앙법규출판주식회사, 일본.

이재구, 안기창, 고영관, 김대황, 박외숙 (2000) 제초제 bensulfuron-methyl 잔류물의 immunoassay 개발. 학술진흥재단 1999년 자유공모과제 보고서.

정영호, 송병훈, 최주현, 임건재, 김찬섭, 임양빈 (1992) Acephate. pp.106~107, 농약잔류성시험법, 농촌진흥청 농약연구소, 문영당, 한국.

진성유니텍 (2000) 잔류농약 간이속성검사 키트.

ELISA Development for the residue of the organophosphorus insecticide acephate

Jae Koo Lee*, Ki Chang Ahn, Donald W. Stoutamire[1], Shirley J. Gee[1], and Bruce D. Hammock[1](*Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea, and* [1]*Department of Entomology and Cancer Research Center, University of California, Davis, California 95616, U.S.A.*)

Abstract : A competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ci ELISA) for the organophosphorus insecticide acephate, *O,S*-dimethyl acetylphosphoramidothioate, was developed using a polyclonal antibody. Three different haptens mimicking the analyte and containing hexanoic acid moiety as a linker were synthesized, and then conjugated with the carrier proteins bovine serum albumin and keyhole limpet hemocyanin by the *N*-hydroxysuccinimide active ester method. Polyclonal antibodies raised against hapten-KLH conjugates in rabbits and the hapten-BSA conjugates as coating antigens were screened and selected for the assay in the homologous and/or heterologous ELISA system. The effects of various assay conditions, including blocking reagents, detergent content, organic solvents, pH, and preincubation of the mixture of the polyclonal antibody and the analyte on the sensitivity were evaluated. The IC_{50} value of acephate of 110 ng/mL was obtained in an optimized heterologous system using hapten-3-BSA as a coating antigen and a polyclonal antibody 8377, showing the detection range of 10-1000 ng/mL and the lowest detection limit of 4 ng/mL. The cross-reactivities of the structurally related insecticides, including methamidophos were less than 0.02%. These results indicate that the ELISA could be a convenient and alternative tool for monitoring acephate residues in agricultural products and environmental samples.

*Corresponding author (Fax : +82-43-271-5921, E-mail : jklee@cbucc.chungbuk.ac.kr)