

제초제내성 유전자재조합 콩의 검출을 위한 면역분석법 개발

곽보연 · 고승희 · 박춘욱 · 손대열¹ · 손동화*

한국식품개발연구원 식품기능연구본부, ¹성균관대학교 의과대학

Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Glyphosate-Tolerant Soybeans

Bo-Yeon Kwak, Seung-Hee Ko, Chun-Wuk Park, Dae-Yeul Son¹ and Dong-Hwa Shon*

Food Function Research Division, Korea Food Research Institute

¹School of Medicine, Sungkyunkwan University

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for assaying the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. CP4 (CP4 EPSPS) in genetically modified soybeans was developed. Polyclonal and monoclonal antibodies (Pab, Mab) specific to the CP4 EPSPS were produced. When using the Pab, the detection limit of sandwich ELISA toward CP4 EPSPS (0.03 µg/mL) was better than that of competitive indirect ELISA (ciELISA) (1 µg/mL). It was found that 2 of 3 monoclonal antibodies, Mab1 and Mab2, recognized the same antigenic determinant on CP4 EPSPS, but Mab3 recognized different antigenic determinant when competitive ELISA was performed using the Mabs. On the other hand, when the sensitivity of sandwich ELISA using combination of Pab and/or Mabs was determined, the sandwich ELISA using Mab2 as a capture antibody and Pab-HRP as a secondary antibody showed the lowest detection limit of CP4 EPSPS (0.02 µg/mL). The sandwich ELISA developed in this study could be applied to detect glyphosate-tolerant soybeans.

Key words: ELISA, glyphosate-tolerant soybeans, CP4 EPSPS, polyclonal antibody, monoclonal antibody

서 론

유전자재조합농산물(GMO, genetically modified organism)은 미국 몬산토사가 1995년 제초제 저항성 유전자재조합 콩을 상품화하면서 일반에게 알려지기 시작하였다. 당시 유전자재조합농산물의 재배면적은 120만 ha였는데, 1998년에는 2,780만 ha, 1999년에는 3,990만 ha로 급격히 늘어났다. 현재까지 미국에서 시판이 허용된 유전자재조합농산물은 옥수수, 콩, 토마토, 감자 등 39개 품목으로 주요 작물별, 특성별 재배면적을 보면, 제초제저항성 콩이 54%로 가장 많고, 해충저항성 옥수수 19%, 제초제저항성 카놀라 9%, 해충저항성 및 제초제저항성 옥수수 5%, 제초제저항성 면화 4%, 제초제저항성 옥수수 4%, 해충저항성 면화 3%, 해충저항성 및 제초제저항성 면화 2%의 순이다.

이와 같이 유전자재조합 콩의 대부분은 제초제저항성 콩으로 glyphosate에 대해 저항성을 가지고 있다. 이 제초제는

대부분의 잡초에 대해 효과가 높고 환경 친화적이며 동물, 조류 및 어류에 대해 독성이 낮다^(1,2). 그러나 glyphosate가 작물자체에도 영향을 주어 식물의 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(EPSPS)를 저해해서 방향족 아미노산의 합성을 방해하기 때문에^(3,4) 제초제저항성 식물이 개발되기 바로 전까지는 제초제로 그다지 많이 사용되지 않고 있었다. 이후 분자생물학의 발달로 *Agrobacterium* sp. CP4 유래 EPSPS(CP4 EPSPS)를 재조합하여 glyphosate에 대해 저항성을 가지는 여러 가지 작물들이 개발되었고⁽⁵⁻⁷⁾ 이로써 잡초만을 효과적으로 제거할 수 있게 되어 농산물 생산 증대가 가능하게 되었다. 따라서 CP4 EPSPS를 이용한 유전자재조합농산물의 생산이 늘어나게 되었다.

우리 나라에서도 유전자재조합 농산물의 수입이 증가되어 제초제저항성농산물 유무에 대한 검출방법이 긴급히 필요하게 되었다. 이 중에서 제초제저항성 콩의 감별여부는 유전자 조작된 CP4 EPSPS가 좋은 검출대상으로 되고 있다. 현재까지 제초제 저항성 콩의 검출 방법은 크게 두 가지가 있는데, 하나는 삽입된 유전자를 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 검출하는 방식^(8,9)과 항체의 특이성을 이용한 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 방식이 있다⁽¹⁰⁾. 일반적으로 ELISA 방식은 기기 분석보다 시료 중 검출감도가 높고 시료분석 시간이 짧으며 많은 시료를 동

*Corresponding author : Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea
Tel: 82-31-780-9133
Fax: 82-31-709-9876
E-mail: dhs95@kfri.re.kr

시에 분석할 수 있는 장점을 가지고 있다. 제조제 저항성 콩의 경우 외국에서 ELISA에 의한 검출한 연구 보고가 있으나 우리나라에서는 아직 ELISA에 의한 검출 보고가 없다.⁽¹¹⁾

본 연구에서는 제조제 저항성 콩에 형질 전환된 CP4 EPSPS를 검출대상으로 제조제 저항성 콩 여부를 판단하기 위한 ELISA를 개발하고자 하였다. CP4 EPSPS를 면역원으로 하여 다클론항체 및 단클론항체를 생산하고 단클론항체의 일부 특성을 밝혔으며 신속, 정확하고, 효율적이며, 경제적으로 CP4 EPSPS를 검출할 수 있는 다클론항체와 단클론항체를 서로 조합한 샌드위치 효소면역측정법을 개발하였다.

재료 및 방법

재료

Thimerosal(mercury[(carboxyphenyl) thio]ethyl sodium salt), NaIO₄, anti-rabbit IgG-HRP conjugate, sodium *m*-periodate (NaIO₄), 코팅 완충액으로 TRIZMA[®] PRE-SET CRYSTALS [tris(hydroxymethyl)-aminomethane, 0.05 M, pH 9.0], 수세 완충액으로 phosphate buffered saline with Tween 20(PBST: 0.01 M phosphate buffer, 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.05% Tween 20), 기질 완충액으로 phosphate-citrate buffer tablets(0.05 M phosphate-citrate buffer, pH 5.0, 1 tablet/100 mL), 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride(TMB), DEAE anion exchange resin, horseradish Peroxidase, goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate, goat anti-mouse polyvalent immunoglobulins(IgG, A, M)-HRP conjugate 등을 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, 항체 정제용 Protein A column(ImmunoPure plus IgG Purification Kit(#44679)), Avidin Biotin Complex(ABC; immunopure[®] ultra-sensitive ABC anti-rabbit mouse IgG staining kit)은 Pierce사(Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. 96 well plate는 Nunc사(Roskilde, Denmark)의 것을 사용하였고, 흡광도 측정기는 THERMOmax[™](Molecular Devices사, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하였다. 토끼(New Zealand White)와 생쥐(BALB/cAnN)는 한림실험동물연구소(수원, 한국)로부터 구입하여 각각 다클론항체 및 단클론항체의 생산에 이용하였다.

5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(CP4 EPSPS)의 정제

CP4 EPSPS의 생산은 Son 등⁽¹²⁾이 제조한 (CP4 EPSPS 유전자를 함유하는 pETBlue-1 AccepTor[™]) 벡터가 들어있는 *E. coli* Tumer[™](DE3)pLacI(Novagen, Darmstadt, Germany)를 제공 받아 이들의 생산 방법에 따라 생산하였다. 간략하면, 유전자 재조합 *E. coli*를 ampicillin 첨가 LB배지에서 배양한 후 최종 농도가 1 mM이 되게 isopropyl-D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 처리하고 30°C에서 6시간 발현을 유도하였다. 배양액에서 회수한 균체를 용해시키기 위하여 lysis buffer (5 mM EDTA와 0.5 mg/mL lysozyme을 함유한 PBS) 10 mL에 현탁시켰다. MgCl₂와 Benzonase(Merck, Darmstadt, Germany)를 최종농도가 0.1 M, 5 U/mL이 되게 첨가한 후 상온에서 20분 정도 배양한 후 4°C에서 20,000×g, 1.5시간 원심분리하여 상정액을 분리하였다. 분리된 상정액을 Macro-

Prep[®]DEAE Support(Biorad, Hercules, CA, USA)에 부착시킨 다음 PBS로 세 번 세척하였다. 용출버퍼(50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl)로 부착된 단백질을 용출시키고 이를 50 mM Tris/HCl 버퍼(pH 7.5)로 1:5로 희석하여 두 번째로 Macro-Prep[®]DEAE Support에 부착시켰다. 용출버퍼(50 mM Tris/HCl pH 7.5, 70 mM NaCl)로 CP4 EPSPS를 용출하여 정제하였다. 분리 정제된 것을 SDS-PAGE를 통해서 확인하여 PBS로 투석하여 이를 -20°C에 냉동 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.

단백질 정량

Bradford법에⁽¹³⁾ 의해 단백질 정량을 하였고 시약은 상업적으로 생산되는 Bio-Rad사의 단백질정량 kit(Hercules, CA, USA)를 사용하여 단백질정량을 하였다.

항 CP4 EPSPS 다클론항체의 생산

앞서 정제한 CP4 EPSPS를 PBS에 1 mg/mL로 희석한 다음 Freund's complete adjuvant(Sigma사, St. Louis, USA)와 1:1로 섞어 Micro-mate[®] interchangeable syringe를 이용하여 유탁액을 만들었다. 2마리의 토끼 발바닥에 유탁액 1 mL 씩을 피하주사하여 1차 면역을 실시하였다. 이후 2주 간격으로 Freund's incomplete adjuvant로 유탁액을 만들어 토끼의 등에 4차까지 면역하였다. 면역 1주일 후에 토끼 귀 정맥에서 채혈한 후 항혈청을 분리하였다. 항혈청 중 2번 토끼의 3차 항혈청이 가장 높은 항체가를 나타내어 이를 1 mL씩 분주하여 NaN₃를 최종농도가 0.02%가 되게 첨가하여 -70°C에 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

항 CP4 EPSPS 단클론항체의 생산

융합세포의 생산은 Coyle⁽¹⁴⁾의 방법을 변형하여 생산하였다. 간략하면, CP4 EPSPS를 PBS에 1 mg/mL로 희석하고 Freund's complete adjuvant와 함께 1:1로 유탁액을 만들어 생후 7주 가량 된 생쥐에 100 μL씩 복강주사를 2주 간격으로 3회 면역하고 최종적으로 adjuvant 없이 정맥주사 하였다. 정맥주사 2일 후에 비장을 적출하고 이를 잘게 부수어 단세포화 한 후 골수종 세포(myeloma cell)와 융합하였다. 96 well plate에서 융합세포를 분리한 후 CP4 EPSPS에 대한 반응성이 양호한 융합세포의 상정액에서 비경합 간접 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법에 의해 CP4 EPSPS에 반응성이 양호한 5개의 클론을 선발하였다. 이들 융합세포를 생후 6~8주된 생쥐의 복강에 pristane을 0.5~1 mL 주사하고 10일 후 생쥐 복강에 마리당 107 가량의 융합세포주를 각각 주입하였다. 2주 후 각 마리당 10 mL 가량의 복수액을 채취하고 1,500×g에서 15 분간 원심분리하여 단클론항체를 생산하였다.

항체의 정제

항혈청 중의 특이항체를 제조자의 방법에 따라 Protein A column을 이용하여 정제한 후 Sephadex G-25 column으로 탈염하였다. 정제된 항체를 pool한 후 NaN₃를 최종농도가 0.02%가 되게 첨가하고 1 mL씩 분주하여 -70°C에 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.

단클론항체의 isotyping

정제된 단클론항체의 class를 조사하기 위해 isotyping을 실시하였다. Rat anti-mouse purified mAb(kit)를 코팅 완충액에 2 µg/mL로 희석한 다음 microplate의 각 well 당 50 µL 씩 분주하여 냉장고에서 하룻밤 코팅하였다. 수세 완충액으로 3회 세척한 다음, 정제된 항체를 각 well 당 100 µL씩 첨가한 후 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 수세 완충액으로 3회 세척하고 HRP-labelled rat anti-mouse Ig mAb를 각 well 당 100 µL씩 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 수세 완충액으로 3회 세척한 후 기질 용액 (kit상의 시약 A, B를 혼합) 100 µL 씩을 넣고 3~10분간 발색시켰다. 2 M H₂SO₄ 50 µL씩을 각 well에 넣어 발색 반응을 중지시킨 후, 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

항체-peroxidase 접합체(Ab-HRP conjugate) 제조

Horseshoe peroxidase(HRP)와 NaIO₄를 각각 농도가 2 mg/mL, 21.4 mg/mL로 되게 한 후 같은 양 섞은 후 10분간 실온에서 방치하여 HRP를 활성화시켰다. 이를 5 mM Na-carbonate buffer(pH 4.0)으로 투석한 후 다시 200 mM Na-carbonate buffer(pH 9.5)로 투석하였다. 정제된 다클론 및 단클론항체를 10 mM Na-carbonate(pH 9.0)으로 투석한 후 8 mg/mL로 농도로 맞추었다. HRP와 항체를 1:1로 혼합하고 상온에서 2시간 동안 반응 후 신선한 0.1 M NaBH₄를 1/10 부피로 첨가하고 4°C에서 2시간 동안 방치한 후 PBS buffer로 투석한 후 최종농도가 0.02%가 되게 thimerosal을 첨가하여 -70°C에서 보관하여 필요시 꺼내어 사용하였다.

경합 간접 효소면역측정법(cELISA)

다클론항체의 검출한계를 확인하기 위해 경합간접 효소면역측정법(competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay, ciELISA)을 수행하였다. CP4 EPSPS를 코팅 완충액에 2 µg/mL로 희석하여 microplate well에 100 µL씩 분주한 다음 4°C에서 하룻밤 정지하여 코팅하였다. 수세 완충액으로 3회 세척한 다음, 생산된 항체와 수세 완충액으로 단계별로 희석한 CP4 EPSPS를 1:1로 혼합하여 각 well 당 100 µL 씩 첨가하여 상온에서 1시간 반응 시켰다. 다시 수세 완충액으로 3회 세척한 다음 2차 항체로 anti-rabbit IgG-HRP conjugate를 수세 완충액으로 일정배수 희석하여 각 well 당 100 µL씩 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 수세 완충액으로 3회 세척 한 후 기질용액(0.01% 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine(TMB) in phosphate-citrate buffer, pH 5.0, 0.05% H₂O₂ 사용직전에 준비)을 각각의 Well에 100 µL씩 넣고 30분간 방치한 뒤 2 M H₂SO₄ 반응정지액 50 µL씩을 첨가한 후 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다클론항체 및 단클론항체의 항체가 측정시 비경합 간접 ELISA를 수행하였는데, 위의 과정 중 2차 항체 처리할 때 경합을 하지 않았다. 즉, 다클론항체의 경우 goat anti-rabbit IgG-HRP를, 단클론항체의 경우 goat anti-mouse polyvalent immunoglobulins(IgG, A, M)-HRP conjugate를 사용하였다.

샌드위치 효소면역측정법(sandwich ELISA)

정제된 항체를 코팅 완충액에 2 µg/mL로 희석하여 micro-

plate well에 100 µL씩 분주하여 4°C에서 하룻밤 정지하여 코팅하였다. 수세 완충액으로 3회 세척 후 CP4 EPSPS를 농도별로 수세 완충액에 희석하여 100 µL씩 첨가한 후 상온에서 1시간 동안 반응 시켰다. 다시 수세 완충액으로 3회 세척한 후 항체-HRP conjugate를 각 well 당 100 µL씩 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 수세 완충액으로 3회 세척한 후 발색과정은 위의 ciELISA와 동일하게 처리하였다.

결과 및 고찰

5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(CP4 EPSPS)의 정제

Macro-Prep®DEAE Support로 정제된 CP4 EPSPS의 SDS-PAGE를 실시한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 2차 column 통과 후 분자량 5만 가량의 단백질 밴드가 보였고 다른 불순물이 많이 없이 약 90% 이상의 정제도를 확인하였다. 이들 분획분을 모아 PBS에 대해 투석한 후 다음 실험에 사용하였다.

다클론항체를 이용한 ciELISA 및 sandwich ELISA

CP4 EPSPS를 코팅하여 다클론항체를 이용해 ciELISA를 수행했을 때, 이의 표준곡선을 Fig. 2(A)에 나타내었다. 표준곡선에서 검출한계는 0.3 µg/mL로 나타났다. 한편 sandwich ELISA의 검출한계는 항체-HRP conjugate 희석배수를 1/5K로 했을 때 0.03 µg/mL로 나타나서 검출한계가 ciELISA보다 더 나은 결과를 보여주고 있다(Fig. 2(B)). 광 등⁽¹⁵⁾의 연구에서 곰팡이의 exopolysaccharide를 토끼에 면역하여 다클론항체를 생산하여 ciELISA와 sandwich ELISA를 비교했을 때 검출한계가 0.03 µg/mL에서 0.003 µg/mL로 약 1 order의 향상을 보이고 있어 일반적으로 경합이 필요한 ciELISA보다는 경합이 없는 sandwich ELISA가 더 좋은 검출한계를 가지는 것과 잘 일치한다.

단클론항체의 특성

3개의 단클론항체가 CP4 EPSPS에 특이성이 높은 항체가

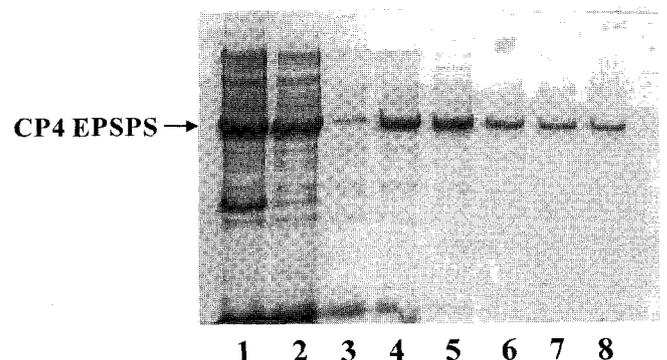


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of CP4 EPSPS fractionated on Macro-Prep®DEAE Support. CP4 EPSPS was produced by cultivation of *E. coli* transformed with pETBlue-1 Acceptor™ recombinant vector harboring the CP4 EPSPS gene.

lane 1: cell lysis supernatant, lane 2: cell lysis supernatant after first DEAE column passage, lane 3: flowthrough after loading the second DEAE column, lane 4-8: fraction No. 1-5 obtained with eluting buffer after second DEAE column binding.

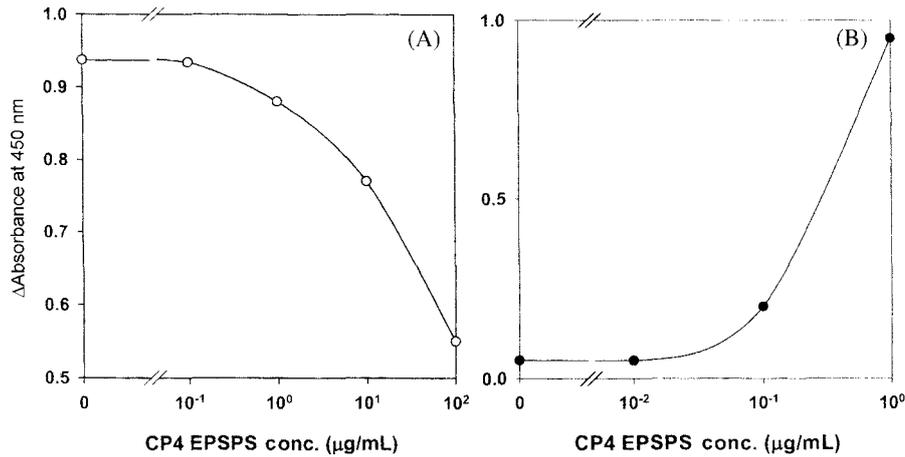


Fig. 2. Standard curve of ELISA's for CP4 EPSPS using anti-CP4 EPSPS polyclonal antibody.

(A) Competitive indirect ELISA, (B) Sandwich ELISA. Competitive indirect ELISA was done as follows: A 1:1 mixture of serially diluted CP4 EPSPS and anti-CP4 EPSPS polyclonal antibody was added to the anti-CP4 EPSPS polyclonal antibody-coated plate. After 1 hr, the plate was washed with PBST and goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate was treated. After 1 hr, the plate was washed with PBST, substrate solution (H₂O₂/TMB) was added, developed for 30 min, and finally the absorbance at 450 nm was measured. Sandwich ELISA was performed as follows: polyclonal antibody was coated onto microplate and serially diluted CP4 EPSPS was reacted for 1 hr. And polyclonal antibody-HRP conjugate was reacted. After 1 hr, the plate was washed with PBST, and subsequent conditions for coloring reaction and so on were same as above.

를 나타내었다(Mab1~Mab3). 단클론항체의 isotyping은 mouse Mab isotyping kit(Pierce사, Rockford, IL, USA)를 사용하였다. 3종류 모두 heavy chain은 IgG₁ type이었으며, light chain은 κ type으로 확인되었다. 각각의 항체와 각각의 항체-HRP conjugate를 경합하여 ciELISA를 수행했을 때의 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Mab1, Mab2, Mab3 모두 단클론항체 자신끼리는 서로 잘 경합하는 것으로 나타났으며 Mab1과 Mab3를 서로 경합하였을 때 단클론항체의 농도가 높아짐에 따라 경합을 보이고 있다(Fig. 3(A), (B)). 이는 항원결정기가 같거나 또는 항원결정기를 공유할 것으로 생각된다. 한편, Mab3은 Mab1 및 Mab2과는 경합을 보이지 않아서 이들은 서로 다른 항원결정기를 가지는 것으로 나타났다(Fig. 3(C)).

다클론 및 단클론 항체의 조합에 의한 Sandwich ELISA

다클론항체의 경우 ciELISA보다는 sandwich ELISA의 감도가 뛰어났기 때문에 단클론항체의 경우에도 ciELISA는 수행하지 않고 sandwich ELISA만을 비교하였다. CP4 EPSPS에 대한 각기 다른 항체를 서로 조합하여 sandwich ELISA를 실시하는 경우, 각 조합의 검출감도를 비교함으로써 가장 좋은 sandwich ELISA 조건을 찾고자 하였다. 즉, 단클론항체 3종과 다클론항체를 microplate에 코팅하여 항원을 포획하는 데 이용하고 2차항체로 각 항체-HRP conjugate를 이용하여 sandwich ELISA를 실시한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 각각의 그림으로부터 sandwich ELISA의 검출한계를 Table 1에 표시하였다. 각각의 검출한계가 각 조합마다 약간의 차이가 있었지만 그들 중에서 다클론항체를 코팅하고 2차 항체로 Mab2-HRP를 이용한 것과 Mab2항체를 코팅하고 2차항체를 다클론항체-HRP로 사용한 것의 검출감도가 가장 양호하게 나타나 CP4 EPSPS의 검출이 0.02 µg/mL 이상에서 가능한 것으로 나타났다. 이는 앞서 보여준 다클론항체를 이용한

sandwich ELISA의 검출감도보다 약간 좋은 것으로 나타났다. 한편 검출감도가 좋은 두 가지 조합 중 어느 쪽의 검출감도가 더 나은가를 비교하여 두 가지 조합의 표준곡선을 Fig. 5에 나타내었다. 두 가지 조합 중 단클론항체 Mab2를 코팅하고 다클론항체-HRP를 이용하여 수행한 sandwich ELISA가 다클론항체를 코팅하고 단클론항체 Mab2-HRP를 이용하여 수행한 sandwich ELISA보다 약간 검출 감도가 좋은 것으로 나타났다. Rogan 등⁽¹¹⁾이 CP4 EPSPS 검출을 위해 biotin-avidin system을 이용하여 sandwich ELISA를 개발하였는데, 실제 이번 연구에서 biotin-avidin system을 이용하여 검출한계를 측정한 결과 흡광도는 증가하나 검출감도는 그다지 개선되지 않았다(자료생략). 이들이 확립한 ELISA의 검출한계가 더 좋은 것으로 나타났다. 이러한 차이는 생산된 단클론항체 및 다클론항체의 CP4 EPSPS에 대한 친화도(affinity)의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 그러나 이들이 단클론항체 및 다클론항체의 생산에 사용한 면역원에 대한 구체적인 서술을 하지 않았을 뿐만 아니라 항체생산시 면역 schedule, adjuvant의 종류나 양 등에 대해서도 정보가 부족하였다. 또한 단클론항체 선발시 어느 정도의 친화도를 가지는 클론을 선발하였는 지에 대한 정보도 없었다. 이는 이들 기업체의 노하우라 사료된다. 근본적으로 검출한계의 개선을 위해서는 친화도가 더 높은 특이항체의 생산이 필요하다고 생각된다.

본 연구에서 확립한 단클론항체 Mab2를 항원 포획 단계로 이용하고 CP4 EPSPS 특이 다클론항체-HRP를 이용한 sandwich ELISA를 수행한다면 CP4 EPSPS의 농도 0.02 µg/mL 이상에서 검출이 가능하므로, 앞으로 제초제 저항성 콩과 같은 CP4 EPSPS의 유전자가 조합된 농산물이나 그 가공품에서 CP4 EPSPS 검출에 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

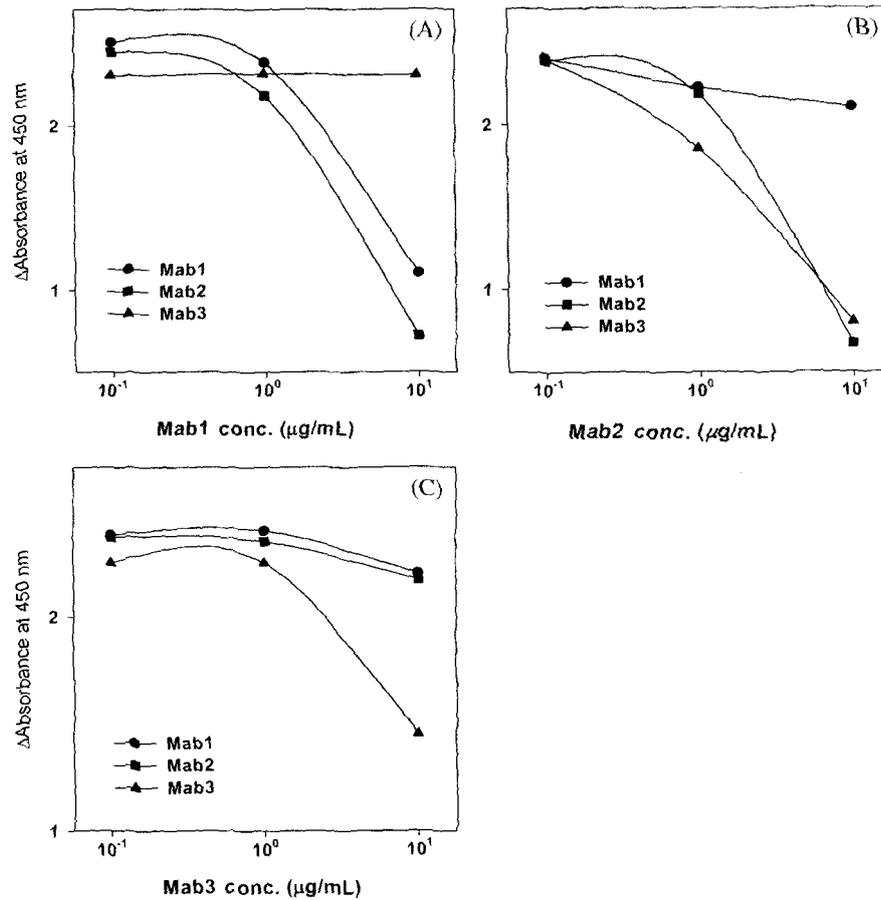


Fig. 3. Inhibition analyses of monoclonal antibodies Mab1, Mab2 and Mab3 by ciELISA.

(A) Mab1, (B) Mab2, and (C) Mab3 were used for the competition. CiELISA was done as follows: A 1:1 mixture of each monoclonal antibody and indicated monoclonal antibody-HRP was added to the CP4 EPSPS-coated plate. After 1 hr, the plate was washed with PBST and goat anti-mouse polyvalent immunoglobulins (IgG, A, M)-HRP conjugate was treated. After 1 hr, the substrate solution (H₂O₂/TMB) was added, developed for 30 min, and finally the absorbance at 450 nm was measured.

Table 1. Detection limits of sandwich ELISAs for CP4 EPSPS at various combinatory applications of polyclonal and/or monoclonal antibodies for coating and HRP conjugate¹⁾

Coating Ab	HRP-conjugates			
	Mab1	Mab2	Mab3	Pab
Mab1	0.3 ²⁾	0.05	0.05	0.1
Mab2	0.3	0.1	0.05	0.02
Mab3	0.2	0.05	0.2	0.2
Pab	0.05	0.02	0.05	0.03

¹⁾Sandwich ELISA was performed as follows: each monoclonal or polyclonal antibody was coated onto microplate and serially diluted CP4 EPSPS were reacted for 1 hr at R.T. And each monoclonal antibody or polyclonal antibody-HRP conjugate was reacted. After 1 hr, the plate was washed with PBST, the substrate solution (H₂O₂/TMB) was added, developed for 30 min, and finally the absorbance in 450 nm was measured.

²⁾μg/mL.

요 약

유전자재조합 콩의 *Agrobacterium* sp. CP4 유래 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(CP4 EPSPS)를 편리하고 경제적으로 검출하고자 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 개발하였다. CP4 EPSPS에 대해 특이적인 다클론 및 단클론항체를 생산하였다. 다클론항체의 경우 sandwich ELISA(검출한계, 0.03 μg/mL)는 competitive indirect ELISA(1 μg/mL)보다 CP4 EPSPS의 검출감도

가 낮았다. 생산된 단클론항체 3종의 CP4 EPSPS에 대한 인식부위는 Mab1과 Mab2는 서로 같은 부위를, Mab3는 다른 부위를 인식하는 것으로 나타났다. 한편, 다클론항체 및 단클론항체를 조합하여 실시한 sandwich ELISA의 검출감도를 서로 비교하였다. 그 결과, 항원 포획단계에서 단클론항체 Mab2를 코팅하고 다클론항체-horseradish peroxidase(HRP) conjugate를 사용하였을 때 가장 양호한 검출감도(검출한계, 0.02 μg/mL)를 나타내었다. 본 연구에서 개발한 sandwich ELISA는 제조제 저항성 유전자재조합 콩의 분석에 적용가능

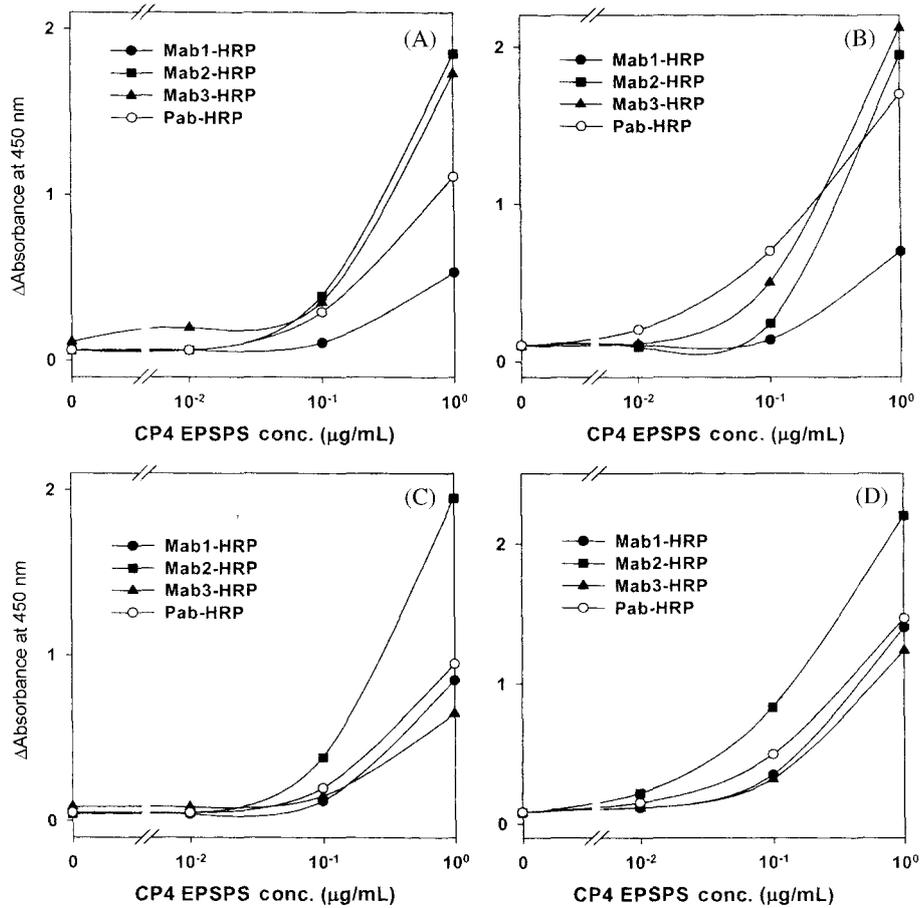


Fig. 4. Comparison of sandwich ELISA for CP4 EPSPS with combinatory application of polyclonal or monoclonal antibodies for coating and HRP conjugates.

(A) Mab1, (B) Mab2, (C) Mab3, and (D) anti-CP4 EPSPS polyclonal antibody was coated. Sandwich ELISA was performed as follows: each monoclonal or polyclonal antibody was coated onto microplate and serial diluted CP4 EPSPS was reacted for 1 hr. And monoclonal or polyclonal antibody-HRP conjugate were reacted. After 1 hr, the plate was washed with PBST, the substrate solution (H_2O_2/TMB) was added, developed for 30 min, and finally the absorbance in 450 nm was measured.

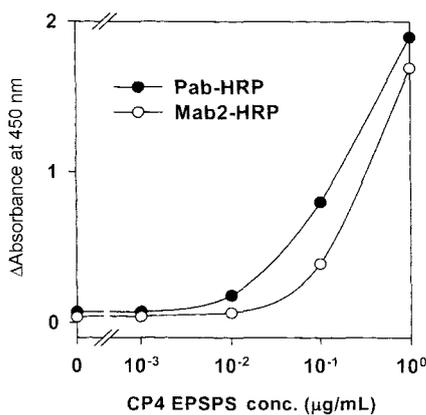


Fig. 5. Comparison of sandwich ELISA between coating and secondary antibody-HRP using anti-CP4 EPSPS polyclonal antibody and Mab2.

Sandwich ELISA was performed according to the same procedure as in Fig. 3. -●-, Mab2 was coated and polyclonal antibody-HRP was used as a secondary antibody; -○-, polyclonal antibody was coated and Mab2-HRP was used as a secondary antibody.

할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건 의료 기술 연구 개발 사업(01-PJ1-PG3-212000-0041)의 지원에 의하여 이루어진 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문헌

1. Baird, D.D. Introduction of a new broad spectrum postemergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. North Central Weed Control Conf. 26: 64-68 (1971)
2. Malik, J., Barry, G. and Kishore, G. The herbicide glyphosate. Biofactors 2: 17-25 (1989)
3. Steinruken, H.C. and Amrhein, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimic acid-3-phosphate synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 94: 1207-1212 (1980)
4. Haslam, E. Shikimic acid: Metabolism and Metabolites. p. 184. John Wiley & Sons, Chichester, England (1993)

5. Barry, G., Kishore, G., Padgett, S., Taylor, M., Kolacz, K., Weldon, M., Re, D., Eichholtz, D., Fincher, K. and Hallas, L. Strategies for imparting glyphosate-tolerance to crop plants. pp. 139-145. In: *Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*. Singh, B.K., Flores, H.E. and Shannon, J.C. (eds.). American Society of Plant Physiologists, Madison, Wisconsin USA (1992)
6. Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., Lavallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B. and Kishore, G.M. Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 35: 1451-1461 (1996)
7. Padgett, S.R., Taylor, N.B., Nida, D., Bailey, M.R., MacDonald, J., Holden, L. R. and Fuchs, R.L. Safety assessment of glyphosate-tolerant soybeans: The composition of the seeds is equivalent to conventional soybeans. *J. Nutr.* 126: 702-716 (1996)
8. Wurz, A., Bluth, A., Zeltz, P., Pfeifer, C. and Willmund, R. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. *Food Control* 10: 385-389 (1999)
9. Meyer, R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in foods. *Food Control* 10: 391-399 (1999)
10. Brett, G.M., Chambers, S.J., Huang, L. and Morgan, M.R.A. Design and development of immunoassays for detection of proteins. *Food Control* 10: 401-406 (1999)
11. Rogan, G.J., Dudin, Y.A., Lee, T.C., Magin, K.M., Astwood, J.D., Bhakta, N.S., Leach, J.N., Sanders, P.R. and Fuchs, R.L. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready[®] soybeans. *Food Control* 10: 407-414 (1999)
12. Son, D.Y., Ahn, K.M. and Lee, S.I. Sequencing, cloning and expression of CP4EPSPS roundup ready soybean insert. *Food Sci. Biotechnol.* 12: 133-136 (2003)
13. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
14. Coly, P.V., Wyatt, D., McCaughey, C. and O'Neill, H.J. A simple standardised protocol for the production of monoclonal antibodies against viral and bacterial antigens. *J. Immunol. Meth.* 153: 81-84 (1992)
15. Kwak, B. Y., Kim, S. Y. and Shon, D. H. Detection of molds by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 764-772 (1999)

(2003년 2월 15일 접수; 2003년 6월 16일 채택)