

살충제 이미다크로프리트 잔류물의 실시간 측정용 효소면역분석법

Enzyme Immunoassay for On-line Sensing of the Insecticide Imidacloprid Residues

송석진 조한근

 정희원

S. J. Song H. K. Cho

ABSTRACT

In Korea, due to its broad efficacy as a systemic insecticide, imidacloprid has been widely used in rice paddies to control sucking insects, soil insects, and some chewing insects and in apple orchards to control various insects pests. To quantify the imidacloprid residue concentrations, samples are assayed *in vitro* using enzyme-linked immunosorbent assays(ELISA). These assays generally require several hours to perform. As a biosensor, a competitive imidacloprid ELISA was modified to measure insecticide concentrations. It was found that a total assay time of 15 min(10-min antibody-antigen binding, and 5-min substrate development) is sufficient for monitoring imidacloprid concentrations. Further work is needed to improve the sensitivity of the measurement protocol.

Keywords : Biosensor, ELISA, Antibody, Antigen, Imidacloprid, Insecticide.

1. 서 론

환경 농업에 대한 인식 확대로 단위 면적당 농약 사용량이 점차 감소하고 있는 추세이지만, 대부분의 국내 농가에서는 농산물의 품질과 생산성 향상을 위해 농약 사용을 피할 수 없는 실정이다. 농지, 지하수 및 수확 농산물의 표면 혹은 내부에 잔류하는 농약은 환경오염은 물론 국민 보건에 큰 위협을 초래하므로 잔류량을 신속히 측정할 수 있는 장비 혹은 분석법이 절실히 요구되고 있다(박, 2003).

이미다크로프리트(imidacloprid)는 신니코틴(neonicotinoid)계 살충제로서 해충 등에 살포되었을 때 전신마비, 이완, 활동성 저하 등을 일으켜 이를 박멸한다. 국내에서는 굴굴나방, 조팝나무 진딧물, 벼멸구, 굽벵이류 등의 방제를 위해 감귤, 사과, 고추, 배, 장미, 복숭아 및 벼농사에 광범위하게 사용되고 있다(Bayer CropScience-Korea, 2002).

관행적인 잔류농약 분석은 주로 가스크로마토그래피(gas chromatography, GC)나 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)에 의존하고 있는데, 분석을 위해 일정량의 시료를 마쇄하고 적당한 유기용매로 추출하고 정제한다. 이 방법들은 감도와 정확도가 높다는 장점을 갖는 반면 많은 경비와 시간, 노력, 고가의 장비 및 숙련된 기능을 필요로 한다. 최근 살충제 이미다크로프리트 잔류물의 검출을 위해 관행적인 분석법이 지니는 단점을 보완하기 위해 보다 신속하고 감도가 예민하며, 특이성과 선택성을 가지는 동시에 분석비용이 저렴한 효소면역분석법(ELISA) 개발에 관한 연구가 수행되었다(이 등, 2001 ; Lee 등, 2001 ; Li 등 2000). 면역분석법은 기존의 분석법으로 정량화하기 어려운 화합물들에도 응용할 수 있고, 저 농도의 잔류량을 지닌 다량의 시료를 높은 신뢰도로 분석할 수 있는 기법이다. 그러나 최근 개발된 효소면역분석법은 관

This study was supported by Agricultural Research and Development Center(ARPC). The article was submitted for publication in October 2003, reviewed in November 2003, and approved for publication by the editorial board of KSAM in December 2003. The authors are S. J. Song, Graduate Research Assistant and H. K. Cho, Professor, Chungbuk National University. The corresponding author is H. K. Cho, Department of Agricultural Machinery Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea. Fax:+82-431-271-4413. E-mail : <hkcho@chungbuk.ac.kr>

행적인 대형기기에 의한 분석방법에 비해 경비, 시간 및 노력 등은 단축하였으나, 현장에 사용하기에는 경제 및 기술적인 문제점을 갖고 있다. 실험실로 시료를 이동해야 하며, 최소 2시간 이상의 분석시간이 요구되어 신속한 검출을 위해서는 바이오 센서와 같은 실시간 측정장비가 필요하다.

바이오센서는 선택성이 탁월하고 전처리가 간편하며 현장에서의 실시간 측정이 가능하기 때문에 보건·의료 및 국방 분야를 중심으로 선진국에서는 개발에 대한 관심이 급증하고 있으며, 최근 들어 농업 생명과학 분야에서도 많은 연구개발이 진행되고 있다(Claycomb 등, 1996 ; Delwiche 등, 2000). 본 논문에서는 농산물에 잔류하는 농약의 신속한 검출을 위한 바이오센서 개발의 1차년도 결과로서 기존에 실험실용으로 개발된 효소면역분석법을 기초로 하여 살충제 이미다크로플리드의 잔류물을 신속하게 검출할 수 있는 실시간 측정용 효소면역분석법을 개발하고 측정 감도를 평가하였다.

2. 재료 및 방법

가. 효소 면역 분석법(ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay)

효소면역 분석법은 농약과 같이 분자량이 작고 농도가 낮은 분석물의 측정을 위해 많이 사용된다(Crowther 등, 2001). 분석에 필요한 대부분의 시약이 시판되고 있고, 신니코틴계 살충제인 이미다크로플리드 분석을 위한 프로토콜이 최근 발표되어(Lee, 2001), 부분적인 수정을 통해 바이오 센서용으로 사용이 가능하게 되었다. 일반적인 간접 효소면역 분석법의 경우, 항원을 실험용 셀 표면에 고정시킨 후(Fig. 1a) 항체와 분석 시료인 이미다크로플리드의 농도별 용액을 첨가한다(Fig. 1b). 이때 코팅항원과 분석시료는 항체와의 결합을 위해 서로 경쟁하게 된다(Fig. 1b). 결합을 위한 충분한 시간(binding time)이 지난 후, 반응되지 않은 항체와 분석물을 세척해 낸 후(Fig. 1c) 효소가 표지된 이차항체를 추가한다(Fig. 1d). 그 다음 기질 버퍼를 가하면 효소에 의해 산화가 촉진되어 청색으로 발색된다(development time, Fig. 1e). 이러한 반응에 대한 광 변화를 읽기 위해 마이크로플레이트 판독기(microplate Reader)로 흡광도를 측정하며 이때 시료의 농도는 광 변화에 반비례하게 된다.

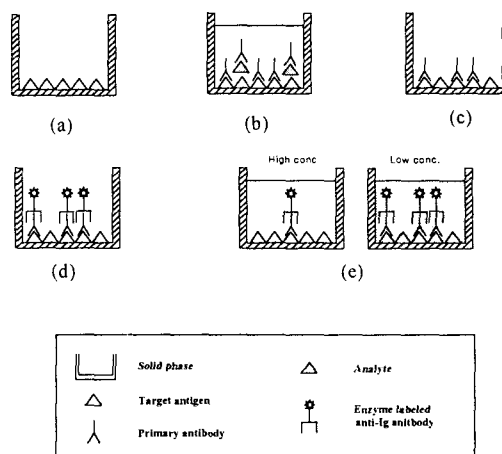


Fig. 1 ELISA in which (a) antigen is immobilized on to a test cell, (b) sample solution and 1st antibody are added, then sample and antigen compete for 1st antibody, (c) excess solution is washed away, (d) 2nd antibody with enzyme label is added, and (e) substrate solution is added and the absorbance is measured.

나. 표준 효소면역분석법

살충제 이미다크로플리드 잔류물을 검출하기 위해 충북대학교 농화학과 농약학 실험실에서 개발된 표준 효소면역분석법은 다음과 같다(이 등, 2001 ; Lee 등, 2001 ; Li 등 2000).

먼저 96-well microtiter plate(Nunc-Immuno plate, Maxisorp surface, Roskilde, Denmark)의 각 반응조(well)에 pH 9.6의 코팅 버퍼로 희석한 코팅항원(단백질 농도: 5 µg/ml)을 100 µl씩 주입한다. 그 후, 4℃에서 하룻밤 방치한 후 세척 완충액(0.1 × PBST)으로 5회 세척하여 플레이트에 코팅이 되지 않은 항원을 제거하고, 반응조의 코팅되지 않은 부위를 블로킹(blocking)하기 위하여 각 반응조에 무지유(3% skim milk in 1 × PBS)를 200 µl씩 추가한다. 그 후 37℃에서 1시간 배양한 다음 다시 상기 방법으로 반응조 플레이트를 세척한다. 그 다음 코팅된 플레이트에 1 × PBS에 1:16000로 희석한 다클론 항체와 분석 대상 시료인 이미다크로플리드의 농도별 용액을 50 µl씩 첨가하고 잘 혼합하여 실온에서 1시간 반응시킨다. 반응 후 다시 세척하고, 이차항체에 효소가 표지된 goat anti-rabbit IgG-Horseradish peroxidase 희석액(1:

10000 diluted with 1 × PBST)을 100 μl씩 추가한다. 실온에서 1시간 반응 후 세척하고 기질 완충액 100 μl 씩을 각 반응조에 추가해 파란색으로 발색시킨다. 약 15분 후에 각 반응조에서의 발색반응을 정지시키기 위해 4N-H₂SO₄을 50 μl씩 추가한다. 황색으로 변한 플레이트를 450 ~ 655 nm 범위의 dual wavelength mode에서 마이크로플레이트 판독기(Model 550, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 흡광도를 측정한다(Lee 등, 2001 박, 2003).

이미다크로프리드 표준용액의 농도는 25000ng/ml에서 0.0128ng/ml로 희석하여 사용하였다. 표준용액에 의한 표준곡선은 Fig. 2와 같이 S자형으로 맞추고(fitting), 4개의 계수를 갖는 지수 식으로 식 (1)과 같이 표시된다(Rodbard, 1981). 이 곡선의 IC₅₀(C)를 중심으로 한 직선범위 IC₂₀ - IC₈₀가 실질적인 이미다크로프리드의 측정범위가 된다. 측정감도의 예측은 분석물을 함유하지 않은 시료의 흡광도를 50% 저해하는 이미다크로프리드의 농도 IC₅₀로 표시할 수 있다. 그러므로 IC₅₀ 값이 작은 시그모이드 표준곡선이 예민한 방법이라고 할 수 있다.

$$y = D + \frac{A-D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} \quad (1)$$

- 여기에서 y : 흡광도(absorbance)
 x : 이미다크로프리드 농도 (ng/ml)
 A : 이미다크로프리드의 최대 흡광도
 B : 직선구간의 기울기
 C : 공시료의 흡광도를 50% 저해하는 이미다크로프리드의 농도(ng/ml), IC₅₀(ng/ml)
 D : 이미다크로프리드의 최소 흡광도

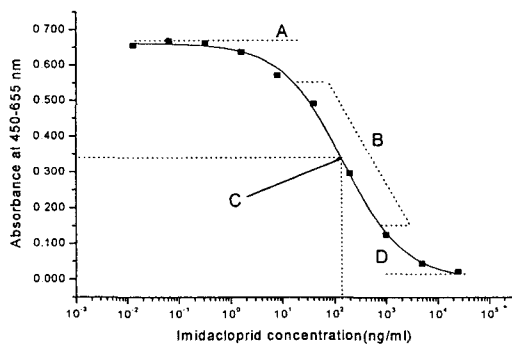


Fig. 2 Four parameter log-logistic curve fitting model.

다. 실시간 측정용 효소면역분석법

표준 효소면역분석법을 기초로 한 바이오센서 개발의 중요인자는 측정에 소요되는 시간을 단축하는 것이다. 분석에 소요되는 시간은 측정감도와 정확도를 저하시키지 않는 범위에서 짧을수록 좋을 것이다. 소요시간을 단축하기 위해서 반응시간과 발현시간을 최소화하는 기초실험을 실시하였다. 표준방법에서 1시간 소요되는 배양(Table 1, 단계 7과 10) 시간을 30분, 15분, 5분으로 단축하여 실험을 하였다. 배양 시간만의 축소에는 한계가 있으므로, 코팅 항원과 항체의 농도에 따른 시간 감소를 측정하였다. 코팅 항원농도를 5 μg/ml에서 50 μg/ml으로 증가시키고, 항체의 희석비를 1:16000에서 1:8000과 1:4000으로 각각 증가시켰다. 또한 배양 시간을 30분, 15분, 5분(Table 1, 단계 7과 10)으로 변화시키며 감도측정을 수행하였다. Table 1은 변형된 방법을 나타낸다. 항체와 분석물인 이미다크로프리드의 각 농도별 용액을 각각 50 μl씩 첨가하고 난 뒤에 반응을 위한 배양시간과 2차 항체를 첨가한 뒤의 배양시간을 1시간에서 30분, 15분, 5분으로 변경하여 과정을 반복한 후 흡광도를 측정하였다.

Table 1. Modified procedure for imidacloprid ELISA

Immobilization of antigen	
1.	Immobilize antigen on plates(100 μl, 5 μg/ml, 50 μg/ml, 12h, 4°C)
2.	Washing plate(1 × PBS + 0.05% Tween 20, 5 times)
3.	Blocking plate(200 μl, 1 × PBS + 3% skim milk, 2h, 37°C)
4.	Washing plate(1 × PBS + 0.05% Tween 20, 5 times)
Binding	
5.	Add 50 μl of standard or sample solution.(25000, 5000, 1000, 200, 40, 8, 1.6, 0.32, 0.064, 0.0128 ng/ml)
6.	Add 50 μl of the dilute polyclonal antibody(1:16000, 1:8000, 1:4000)
7.	Incubate for 30, 15, 5 minute at 25°C
8.	Washing plate(1 × PBS + 0.05% Tween 20, 5 times)
9.	Add 100 μl of 2nd-antibody(goat anti-rabbit IgG-Horseradish peroxidase, 1:10000)
10.	Incubate for 30, 15, 5 minute at 25°C
11.	Washing plate(1 × PBS + 0.05% Tween 20, 5 times)
Development	
12.	Add 100 μl of substrate buffer(citrate buffer, 0.6% TMB, 1% H ₂ O ₂)
13.	Incubate for 15, 5 minute at 25°C
14.	Add 50 μl of stop solution(4N-H ₂ SO ₄)
15.	Read optical density on microplate reader.

라. 시약 및 재료

표준 효소면역분석법의 수정을 통한 바이오 센서용 실시간 효소면역분석법의 개발에 필요한 코팅 항원과 항체로는 각각 충북대학교 농화학과 농약학 실험실에서 제조된 hapten-1-BSA과 hapten-2-KLH를 면역원으로 하여 생산한 항혈청을 사용하였다. 2차 항체인 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG와 기질인 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine(TMB)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO., U.S.A.)로부터 구입하였다.

마이크로플레이트(microplate)는 Maxisorp 96-well microtiter plate(Nunc-Immuno plate, Maxisorp surface, Roskilde, Denmark)를 사용하였고, 마이크로플레이트 판독기는 Bio-Rad Model 550(Hercules, CA, USA)를 사용하였다.

마. 효소면역분석법을 위한 완충액의 조제

효소면역분석법을 위한 완충액은 EPA Guideline(Lee 등 2001, 이 등 2001, 박 2003)에 따라 Table 2와 같이 제조하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 배양시간 변화에 따른 측정 감도

Fig. 3과 Fig. 4는 배양 시간을 각각 30분, 15분으로 했을 때의 흡광도 측정 결과이다. 배양시간이 30분일 때와 15분일 때의 IC₅₀ 값은 각각 38 ng/ml와 45 ng/ml로 측정되었다. 이 값은 표준 방법의 IC₅₀ 값

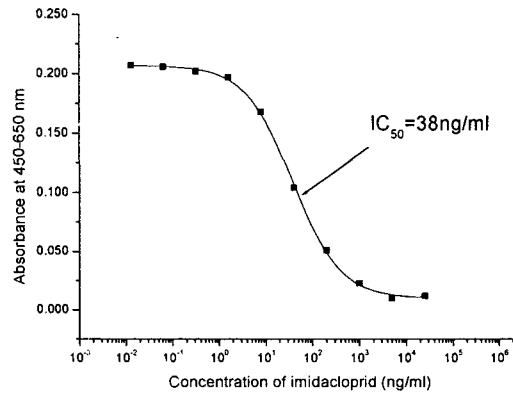


Fig. 3 The standard curve of the incubation for 30 minute.

Table 2. Buffers used and their preparation procedures

Buffers	Preparation procedure
Coating buffer	0.795g Na ₂ CO ₃ , 1.465g NaHCO ₃ , 500ml high purity water pH 9.6, store at 4°C
10 × PBS (phosphate buffered saline)	640g NaCl, 16g KH ₂ PO ₄ , 91.96g Na ₂ HPO ₄ , 16g KCl were mixed with 7ℓ high purity water at pH 7.5, last volume 8ℓ, store at room temperature
1 × PBS	100ml 10 × PBS, 900ml high purity water at pH 8, store at room temperature
1 × PBST(0.05% Tween 20)	100ml 10 × PBS, 400 μℓ Tween 20 were mixed with high purity water about 1ℓ, store at room temperature.
Washing buffer (0.1 × PBS + 0.05% Tween 20)	80ml 10 × PBS, 4ml Tween 20 were mixed with high purity water about 8ℓ.
Horseradish peroxidase citrate-acetate buffer	13.61g sodium citrate(100 mM), 1ℓ high purity water were controlled with acetic acid to pH 5.5
1% H ₂ O ₂	1ml 30% H ₂ O ₂ , 29ml high purity water store at 4°C
0.6 % 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine(TMB)	60mg tetramethyl-benzidine, 10ml dimethyl sulfoxide(DMSO) store in dark room at room temperature.
Substrate buffer	0.1ml 1% H ₂ O ₂ and 0.4ml 0.6 % 3,3', 5,5'-tetramethyl benzidine(TMB) in dimethyl sulfoxide(DMSO) were added to 25ml of citrate-acetate buffer. store at room temperature.

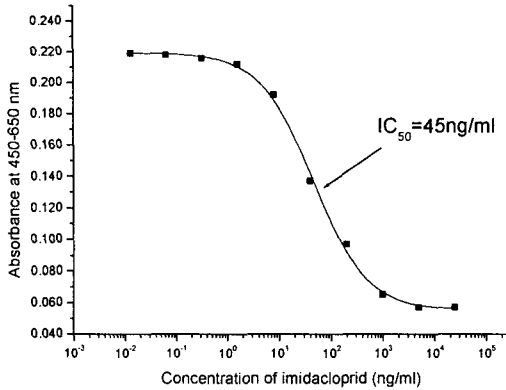


Fig. 4 The standard curve of the incubation for 15 minute.

17 ng/ml(Lee 등, 2001) 보다는 큰 값이지만, 국내의 작물별 이미다크로프리트 잔류 허용량(국립 농산물 품질관리원 농약잔류허용기준)이 0.05~6.0 ppm인 것을 고려하면 최소 검출한계가 30분과 15분일 때 각각 0.038ppm와 045ppm으로 확인되어, 이미다크로프리트의 검출에 사용될 수 있는 충분한 감도를 갖는 것으로 나타났다.

나. 코팅항원의 농도변화에 따른 측정 감도

Fig. 5와 Fig. 6은 배양 시간이 5분, 코팅 항원농도가 50 µg/m, 그리고 항체의 희석비가 각각 1:8000과 1:4000일 때의 흡광도 측정결과이다. 그림에서 보는 것처럼 흡광도는 급격히 감소하였으나 IC50 값은 표준방법과 비교할 때 큰 차이가 없으며, 항체의 희석비가 1:4000일 때가 더 낮게 측정되었다.

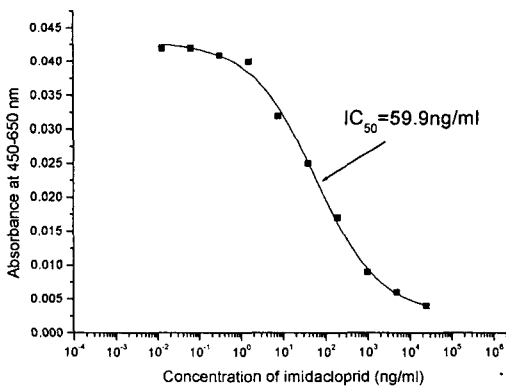


Fig. 5 The standard curve of the coating antigen at 50 µg/ml and the dilution of the antiserum at 1:8000.

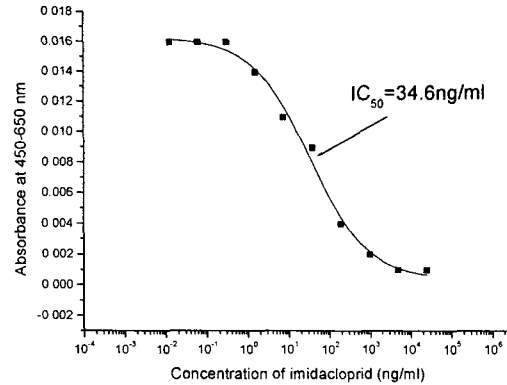


Fig. 6 The standard curve of the coating antigen at 50 µg/ml and the dilution of the antiserum at 1:4000.

4. 결론 및 요약

본 연구는 살충제 이미다크로프리트 잔류물의 실시간 검출을 위한 바이오센서 개발의 선행 연구로서 바이오센서용 효소면역분석법을 개발하기 위해 실행되었다. 이미 개발된 실험실용 효소면역분석법은 HPLC나 GC에 비해 노력과 분석시간을 절약할 수 있다. 그러나 측정에 소요되는 시간이 최소 2시간 이상이므로 실시간 측정에 사용하기에는 적합하지 않다. 분석시간의 단축을 위해 배양시간을 단축하고 이에 따른 감도의 변화를 관측한 결과 IC50값이 38 ng/ml과 45 ng/ml로 실험실용 효소면역분석법의 IC50 값인 17 ng/ml 보다 높게 나타났으나, 국내 작물별 이미다크로프리트의 허용 잔류량의 최소 검출한계인 0.05 ~ 6.0 ppm 보다 낮은 값을 가지므로 현장 적용에 문제가 없다고 판단된다. 실험실용 효소면역분석법의 코팅항원 농도인 5 µg/ml에서의 배양시간의 단축에는 한계가 있어 코팅항원의 농도를 50 µg/ml로 하고 항체의 희석비를 1:8000과 1:4000으로 증가시켜 흡광도를 측정하였다. 분석에 소요되는 시간을 2시간에서 15분으로 단축할 수 있었으며, 이때의 IC50 값은 59.9 ng/ml과 34.6 ng/ml로서 비교적 낮은 값이므로 측정감도에는 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 마이크로플레이트는 반응조의 수량이 96개이며, 350 µl의 용량으로 제한되어 있어 바이오 센서용에는 적합하지 않을 뿐 아니라 코팅항원의 농도를 높이는 데 한계가 있다. 향후 마이크로플레이트가 아닌 흡착성이 높고, 교체 사용이 용이한 일회용 폴리스티렌 큐벳(polystyrene cuvetts)을 이용하여 감도를 유지하면서

동시에 반응시간을 더 단축하기 위한 연구와 함께 바이오센서로서의 재 사용성과 교차 반응성 등에 대한 연구가 지속될 예정이다.

참 고 문 헌

1. Bayer CropScience-Korea. 2002. 수도작용 살충제 코니도.
2. Claycomb, R. W., M. J. Delwiche, C. J. Munro and R. H. BonDurant. 1996. Enzyme Immunoassay for on-line sensing of milk progesterone. *Trans. of the ASAE* 39(2):729-734.
3. Crowther, J. R. 2001. *The ELISA Guidebook*. Humana Press Totowa, New Jersey.
4. Delwiche, M. J., E. Cox, B. Goddeeris, C. Van Dorpe, J. De Baeremaeker, E. Decuypere and W. Sansen. 2000. Biosensor to detect Penicillin residues in food. *Trans. of the ASAE* 43(1):153-159.
5. Lee, J. K., K. C. Ahn, O. S. Park, S. Y. K 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.
6. Li, Kai and Qing X. Li. 2000. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide imidacloprid. *J. Agric. Food Chem.* 48:3378-3382.
7. Rodbard, D. 1981. Mathematics and statistics of ligand assay: an illustrated guide. In *Ligand Assay: Analysis of international developments on isotopic and nonisotopic Immunoassay*; Langen, J. and Clapp, J. J., Eds. Masson Publishing Co. New York, 45-99.
8. 박선화. 2003. 살균제 Fenarimol 잔류물 검출을 위한 효소면역분석법 개발. 충북대학교 석사학위논문.
9. 이재구, 안기창, D.W. Stoutamire, S. J. Gee and B. D. Hammock. 2001. ELISA에 의한 유기 인계 살충제 Acephate 잔류분석법 개발. *농약과학회지* 5(2): 1-12.