

표면플라즈몬공명과 효소면역분석법을 이용한 살충제 카보후란 잔류물 검출

양길모 조남홍

Sensing of the Insecticide Carbofuran Residues by Surface Plasmon Resonance and Immunoassay

G. M. Yang N. H. Cho

Abstract

The pesticide is raising public interest in the world, because it causes damage to an environmental pollution and the human health remaining agricultural products and an ecosystem, in spite of the advantages. Particularly, each country restricts the residual pesticide and induces observance about the safety and usage standard so that they can control the amount of pesticide used and defend the safety of agricultural products. The habitual practice for the analysis of the residual pesticide depends on GC (gas chromatography), HPLC (high performance liquid chromatography) and GC/MS (gas chromatography/mass spectroscopy), which triturate the fixed quantity of samples, abstract and purify as a suitable organic solvent. These methods have the highly efficient in aspects of sensitivity and accuracy. On the other hand, they need the high cost, time consuming, much effort, expensive equipment and the skillful management. Carbofuran is highly toxic by inhalation and ingestion and moderately toxic by dermal absorption. As with other carbamate compounds, it is metabolized in the liver and eventually excreted in the urine. The half-life of carbofuran on crops is about 4 days when applied to roots, and longer than 4 days if applied to the leaves. This research was conducted to develop immunoassay for detecting carbofuran residue quickly on the basis of surface plasmon resonance and to evaluate the measurement sensitivity. Gold chip used was CM5 spreaded dextran on the surface. An applied antibody to immunoassay was GST (glutathione-s-transferase). The association and the dissociation time were 176 second and 215 second between GST and carbofuran. The total analysis time using surface plasmon resonance was 13 minutes including regeneration time, on the other hand HPLC and GC/MS was 2 hours usually. The minimum detection limit of a permissible amount for carbofuran in the country is 0.1 ppm. The immunoassay method using surface plasmon resonance was 0.002 ppm.

Keywords : Surface plasmon resonance, SPR, Immunoassay, Carbofuran, Biosensor, Pesticide

1. 서론

농약은 그 이점에도 불구하고 농산물과 생태계에 잔류하여 환경오염과 사람의 건강을 위협하기 때문에 세계적으로 잔류농약에 대한 관심이 고조되어 있는 실정이다. 특히, 농산물에 존재하는 잔류농약은 국내·외적인 큰 관심사항으로 각 국가마다 농산물 중 농약의 잔류량을 규제함으로써 농약의 안전사

용기준 준수를 유도하여 농약 사용량을 억제함으로써 농산물의 안전성을 사전에 확보하고 있다.

관행적인 잔류농약 분석은 주로 가스크로마토그래피(gas chromatography, GC)나 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC), GC/MS(gas chromatography/mass spectroscopy)에 의존하고 있는데, 분석을 위해 일정량의 시료를 마쇄하고 적당한 유기용매로 추

The article was submitted for publication in October 2005, reviewed and approved for publication by editorial board of KSAM in December 2005. The authors are G. M. Yang and N. H. Cho, KSAM member and researcher National Institute of Agricultural Engineering. The corresponding author is G. M. Yang, Researcher, Agricultural Safety Evaluation Lab., NIAE 249 Seodundong, Kwonsun-gu, Suwoncity, 441-100, Korea; Fax : +82-31-290-1931; E-mail : <bestmomo@rda.go.kr>

출하고 정제한다. 이 방법들은 감도와 정확도가 높다는 장점을 갖는 반면 많은 경비와 시간, 노력, 고가의 장비 및 숙련된 기능을 필요로 한다(Song and Cho, 2003).

농산물의 안전성 확보를 위한 검사는 유통특성상 신속한 검사기술이 요구된다. 따라서 잔류농약 성분을 정확하고, 신속하게 측정할 수 있으며, 조작이 간단하여 누구나 손쉽게 측정할 수 있는 소형, 경량의 경제성 있는 장비 혹은 바이오센서 개발 기술의 습득이 절실히 요구된다.

바이오센서는 “측정 대상물로부터 정보를 얻을 때 생물학적 요소를 이용하거나, 측정 대상물이 생물체이거나 또는 생물학적 요소를 모방하는 것을 사용하여 색, 형광, 전기적 신호 등과 같이 인식 가능한 유용한 신호로 변환시켜주는 시스템”으로 전처리가 간편하고 현장에서의 실시간 측정이 가능하기 때문에 보건, 의료 및 국방 분야를 중심으로 선진국에서는 개발에 대한 관심이 급증하고 있다.

이와 같은 필요에 의해 국내에서 바이오센서를 이용한 잔류농약에 관한 연구는 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase)를 흡착시킨 디스크 형식의 검출 키트(Bu and Kim, 2002), 흡광도를 이용하여 이성분 동시 측정용 광바이오 센서 연구(Choi and Lee, 2002) 그리고 분광광도계를 이용하여 EBDC계 살균제 잔류량 검출 연구(Shim and Ji, 2003) 등이 수행되었다. 국외에서는 압전효과를 이용한 방법(Abad et al., 1998), 표면플라즈몬공명을 이용한 방법(Weller et al., 1999), 광열바이오센서 방법(Lea Pogac̆nik and Franko, 2003)에 의한 잔류농약 검출 연구가 수행되었다.

카보후란은 카바메이트계 살충제, 살선충제로서 토양 서식충 및 잎가식 곤충을 죽이는 신경독성 침투성 농약이다. 산중성에 안정하나 알칼리에 불안정하며 녹는점은 150~153℃이며 분자량은 221.26이다. 인체에 과다 축적될 경우 혈액, 신경계통 또는 생식계통에 이상을 일으키며 벼, 참나물, 들깨잎 등에 사용되고 있다.

본 논문에서는 농산물에 잔류하는 농약의 신속한 검출을 위한 바이오센서 개발의 1차년도 결과로서 표면플라즈몬공명과 효소면역분석법을 기초로 하여 살충제 카보후란의 잔류물을 신속하게 검출할 수 있는 효소면역분석법을 개발하고 측정 감도를 평가하였다.

2. 재료 및 방법

가. 표면플라즈몬공명(SPR, surface plasmon resonance)

1) 표면플라즈몬공명 현상

표면플라즈몬은 그림 1에서처럼 금속박막 표면에서 일어나는 전자들의 집단적 진동이며 이에 의해 발생한 표면플라즈몬파는 금속과 이에 인접한 유전물질의 경계면을 따라 진행하는 표면전자기파이다. 표면플라즈몬의 여기(excitation)는 외부에서 서로 다른 유전함수를 갖는 두 개의 매질의 경계면 즉, 금속과 유전체의 경계면에 전기장을 인가하면 경계면에서의 전기장의 수직성분의 불연속성 때문에 표면전하가 유도되고 이 표면전하의 진동이 표면플라즈마파로 나타난다. 이 표면플라즈마파는 자유공간에서의 전자기파와는 달리 입사면에 평행하게 진동하는 파로서 p-편광(p-polarization) 성분을 가진다. 따라서 편광된 전자기파에 의해서만 표면플라즈몬을 여기시킬 수 있다(K-MAC, 2000).

만일 그림 2에서처럼 두 매질 사이가 매우 얇은 금속으로 코팅되어 있고, 입사광이 편광이며 단색광일 경우, 특정한 입사각도에서 반사되는 광은 그 광 밀도가 현저히 줄어드는 SPR 현상이 발생한다. 이때 입사각을 SPR각이라 부른다. SPR각은 전자기파가 파고드는 용액의 굴절률에 따라 달라진다. 굴절률은 버퍼가 바뀔 때 따라 변하지만, 센서칩 표면의 질량 변화에 따라서도 달라진다. 따라서 센서칩 표면에 고정화된 물질(ligand)과 분석물질(analyte)이 결합하면 질량의 변

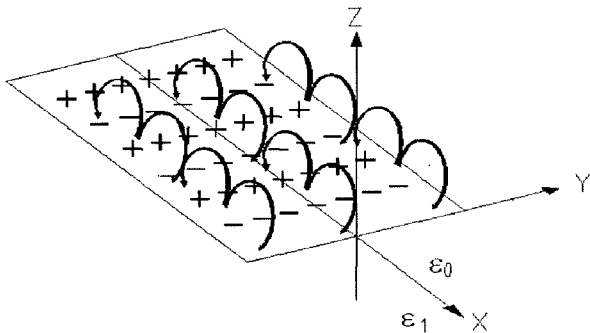


Fig. 1 A phenomenon of SPR.

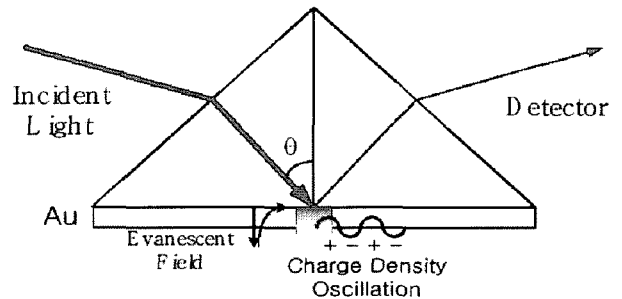


Fig. 2 Principal of SPR sensor.

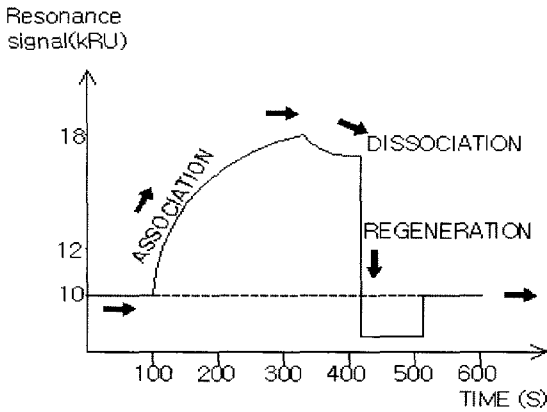


Fig. 3 The sensorgram.

화를 가져오고 따라서 SPR각이 처음과 달라지게 된다. 이러한 SPR각의 변화를 연속적으로 기록한 데이터를 센서그램(sensorgram)이라 부른다. 실제의 센서그램에서는 SPR각을 RU(resonance unit)로 전환하여 표시하여 준다. 이때 1,000RU는 1 ng/mm², SPR각 변화는 0.1°에 해당된다.

그림 3은 SPR 현상에 의해 나타나는 센서그램을 도시한 개략도이다. Association 구간은 항체와 항원이 반응하는 구간, Dissociation 구간은 항원이 항체로부터 해리되는 구간, Regeneration 구간은 항원이 항체로부터 완전히 해리되고 영점을 준비하는 구간을 의미한다. 이때 그래프는 시간에 대한 RU 값으로 표현된다.

2) SPR 센서시스템의 구조

SPR 센서시스템은 그림 4와 같이 크게 SPR을 여기시키는 광학부, 측정시료의 전처리부, 신호처리부로 나눌 수 있다. 광학부는 다시 SPR을 여기시키는 데 필요한 광원부, SPR 변환부, 광검지부로 나뉘며 측정시료의 전처리부는 금속막이 증착된 유리기판을 중심으로 시료 챔버, Flow Unit, 프리즘

등으로 구성되어 있고 신호처리부는 측정된 반사도를 컴퓨터에 연결해서 실시간으로 측정할 수 있는 회로 및 소프트웨어를 말한다. 특히 SPR 변환부는 각도변환형, 파장가변형과 같은 여러 가지 측정방식이나 소자의 형태에 따라 달라질 수 있는데 그것은 각기 그 사용목적이나 감지대상에 따라 달라질 수 있다.

나. 효소면역분석법(ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay)

효소면역분석법은 특정 화학물질이나 미생물 항원에 대해 특이성이 있는 항체를 결합시키는 원리를 이용하여 유해물질의 정성, 정량분석을 하는 면역분석법으로 농약과 같이 분자량이 작고 농도가 낮은 분석물의 측정을 위해 유용한 분석법이다. 본 연구에서는 SPR 원리를 이용해 개발된 BIACORE 3000(BIACORE, Sweden)장비를 살충제 카보후란 잔류물 분석에 이용하였다. 항체는 GST(Glutathione-S-transferase), 항원은 카보후란, 버퍼는 PBS(phosphate buffered saline)를 사용하였다. 사용한 센서칩은 텍스트란(dextran)이 도포되어있는 CM5칩을 사용하였고 이때 SPR 현상을 일으키는 파장은 760 nm이다. 그림 5는 효소면역분석법의 프로토콜을 나타낸 것이다. 첫 단계는 텍스트란이 도포된 금박막 칩상에 EDC(N-hydroxysuccinimide)와 NHS N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodimide)를 흘려주어 항체가 붙을 수 있도록 활성화 시켜준다. 두 번째 단계는 GST 항체를 칩에 고정화시킨 후 에탄올아민으로 안정화 시킨다. 이후 항원항체면역 반응 실험을 실시하며 카보후란 항원을 해리 시킬 때는 NaOH를 사용하였다. 상세한 분석 절차는 다음과 같다.

1) 고정화 조건 실험(Preconcentration test)

고정화 할 GST가 센서칩 표면(negative charged)에 쉽게

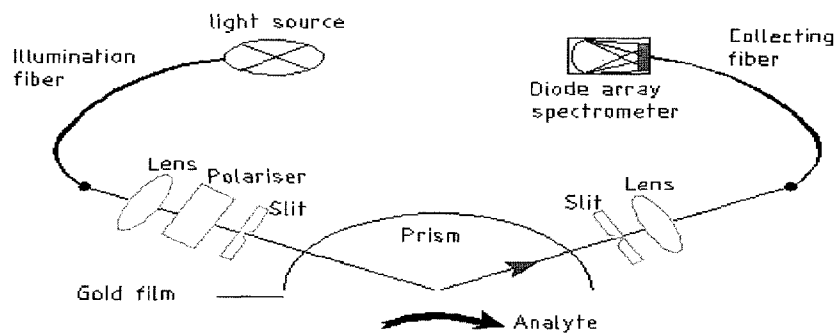


Fig. 4 A structure of SPR sensor system.

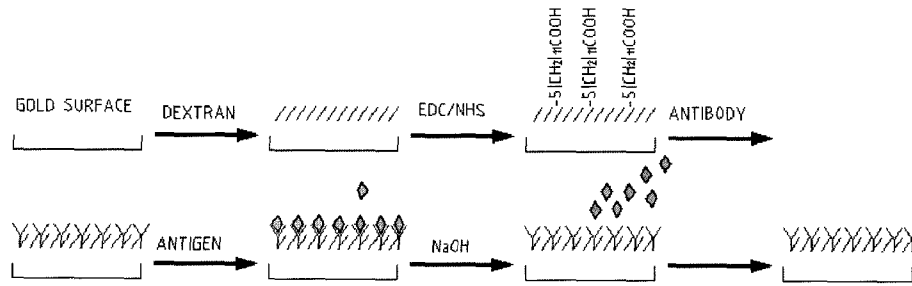


Fig. 5 Protocol about antigen-antibody immobilization.

접근할 수 있도록 최적 pH 버퍼 선택을 위한 pre-concentration test를 하였다. 이를 위해 10 mM sodium acetate를 pH 7.0~3.5의 범위 안에서 각각 1,000 μ l씩을 준비하였다. 각 pH별로 50 μ g/ml GST와 희석하여 최적의 pH 값 측정실험을 실시하였다. pre-concentration test 후 50 mM NaOH를 1분간 흘려주어 항체 고정화 준비를 하였다.

2) 고정화(Immobilization)

리간드로 사용될 생체 물질을 센서칩 CM5에 고정화하는 방법은 매우 다양하다. 이 중 가장 널리 사용되는 방법은 아민커플링법이다. 이는 EDC와 NHS로 센서칩을 활성화시킨 다음 분자 구조 내 일차 아민그룹을 가지고 있는 물질을 흘려

줌으로써 간단히 고정화시키는 방법이다. 구체적인 고정화 절차는 표 2와 같다. 센서칩 표면에 EDC와 NHS를 각각 50 μ l씩 섞어 유속 5 μ l/min로 흘려주어 약 30~40%의 카르복실 그룹(carboxyl group)을 활성화 하여 단백질의 아민(amine)기가 공유결합 될 수 있도록 하였다. pre-concentration test에서 채택된 pH의 버퍼에 리간드인 GST를 희석하여 흘려주었다. 실험에 사용된 GST의 농도는 50 μ g/ml였으며 200 μ l를 준비하였다. 끝으로 고정화된 GST를 안정화시키기 위해 1M의 에탄올아민(ethanolamine) 35 μ l를 흘려주었다.

3) 효소면역반응 실험

효소면역반응 실험을 위해 카보후란을 표 3에서처럼 농도

Table 1 Procedure for pre-concentration test

Procedure	Sample	Concentration	Flow rate (μ l/min)	Volume	Remarks
Preparation	10 mM sodium acetate at various pH	20~200 μ g/ml of Ligand concentration	5	10	pH 7.0~3.5
Dilution	GST	50 μ g/ml	5	10	
Washing	NaOH	50 mM	5	5	

Table 2 Procedure for Binding

Procedure	Sample	Concentration	Flow rate (μ l/min)	Volume (μ l)	Remarks
Activation	EDC + NHS that makes carboxyl group	0.4 M/0.1 M	5	35	Higher than 5,000 RU
Immobilize ligand	GST + pH buffer	50 μ g/ml GST + pH buffer which is choosed	5	-	
Blocking	Ethanol amine	1 Mole	5	35	

Table 3 Concentration levels at each sample

Samples	Concentrations (ppm)
1	20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2
2	2, 1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1
3	0.2, 0.18, 0.16, 0.14, 0.12, 0.10, 0.08, 0.06, 0.04, 0.02
4	0.02, 0.018, 0.016, 0.014, 0.012, 0.010, 0.008, 0.006, 0.004, 0.002

별로 41개의 시료를 준비하였다. 이때 농도별 희석에 사용된 버퍼는 러닝버퍼(running buffer)를 이용하였다. 실험은 재현성을 확인하기 위해 시료당 5반복 205회를 하였다. 이때 유속은 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, 유량은 90 μl (180 sec)를 적용하였다. 재생단계(regeneration step)에서는 10 mM NaOH를 사용하였다. 이 과정은 면역반응이 끝난 후 결합된 리간드와 효소를 인위적으로 분리함으로써 초기화하는 작업이다. 국내의 경우 카보후란 잔류물의 허용한계치는 0.1 ppm이지만 검출한계를 규명하기 위해 0.002 ppm까지 저농도의 시료를 준비하여 실험하였다.

다. 시약 및 재료

효소면역분석법에 사용된 GST(glutathiones-transferase) 항체는 Schistosoma japonicum라고 하는 일본주혈흡충에서 추출한 것으로 Sigma-aldrich사(U.S.)에서 구입하여 사용하였다. Preconcentration test를 위해 사용한 완충액은 Sodium acetate buffer(Sigma-aldrich, Cat. No. S5636, U.S.)를 사용하였고 Running buffer는 Phosphate Buffered Saline(Sigma-aldrich, Cat. no. P4417)를 사용하였다. 항체를 금박막 칩에 고정화하기 위해 사용된 EDC와 NHS는 Biacore사(Sweden)에서 구입하여 사용하였다.

표면플라즈몬공명(SPR)은 Biacore 3000(Biacore Co, Sweden) 장비를 이용하였으며 측정한계는 1 nM 이하까지 측정이 가능하다. 금박막 칩은 텍스트란(dextran)이 도포되어있는 CM5 chip(Biacore Co. Sweden)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 고정화 조건 실험

GST가 센서칩 표면(negative charged)에 쉽게 접근할 수

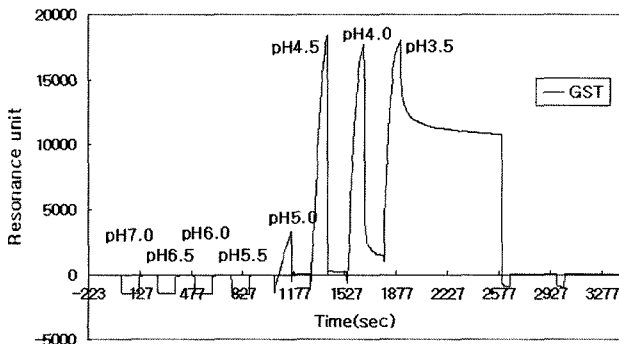


Fig. 6 Results of preconcentration test at various pH of sodium acetate buffer.

있는 pH 값을 찾기 위해 그림 6에서처럼 sodium acetate buffer와 GST 혼합액을 pH 7.0에서 pH 3.5까지 pH를 달리하며 실험을 하였다. 실험결과 pH 4.5, 4.0, 3.5에서 높은 피크의 RU(resonance unit) 값을 보였다. 이중 pH 4.5는 반응할 때와 해리될 때의 RU 값이 뚜렷이 구분되었다. 반면 pH 4.0과 pH 3.5는 반응은 잘 되지만 해리구간에서 완전히 해리 되지 못하여 칩 표면에서 GST 잔류물에 의한 RU 값이 계속 측정되어 과도한 네거티브 전하를 가지는 것을 알 수 있다. 이 같은 결과는 pH 4.5 sodium acetate buffer가 칩 표면에서 적당한 네거티브 전하를 가지면서 GST의 활성을 가장 좋게 해 준다는 것을 의미한다.

나. 카보후란의 농도별 반응 및 해리

그림 7과 그림 8은 카보후란을 고농도에서 저농도까지 희석을 하여 검출실험을 한 결과이다. GST항체에서 농도별 카보후란 반응성이 활발하게 일어나는 것을 알 수 있다. 식약청의 잔류농약 허용기준에 의하면 카보후란은 최저 0.1 ppm까지 관리되어 지고 있다. 그러나 본 실험에서는 카보후란 허용기준치의 약 100배 이하인 0.002 ppm까지 검출 실험을 실시하여 표면플라즈몬공명의 유용성을 증명해 보았다. GST가

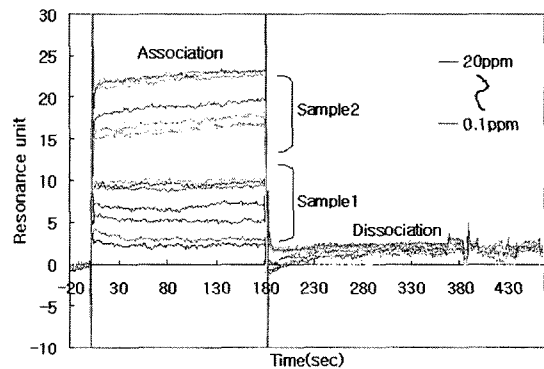


Fig. 7 SPR curves at various concentrations (sample1, sample2).

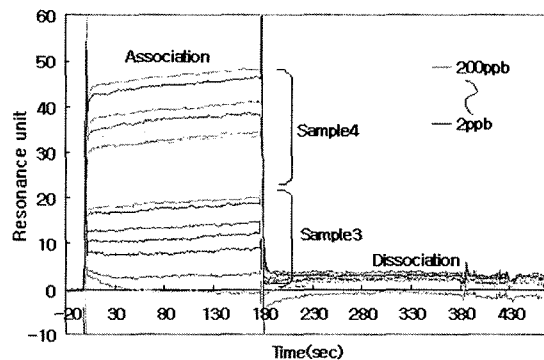


Fig. 8 SPR curves at various concentrations (sample3, sample4).

카보후란과 충분히 반응하는데 소요되는 시간(association)은 176초였으며 완전히 해리되는데 소요되는 시간(dissociation)은 215초로 나타났다. 보통 분석시간이 HPLC나 GC/MS로 할 경우 2시간이 소요되는데 반해 표면플라즈몬공명을 이용한 분석결과에서는 준비단계에서 초기화를 위한 실험(regeneration)을 포함해 결과값을 구하는데 까지 총 13분이 소요되어 빠른 반응특성을 보이는 것을 알 수 있었다.

다. 농도변화에 따른 측정 감도

그림 9와 그림 10은 카보후란의 농도변화에 따른 SPR 값 변화를 측정한 결과이다. 그래프는 고농도에서 저농도 까지 로그함수 변화를 보여주었으며 0.002 ppm까지 검출할 수 있는 충분한 성능을 가지고 있는 것으로 나타났다. 이때 결정계수(R²)는 약 0.97의 실험결과를 보였다. 한편, 농도별 RU 값의 오차는 항체와 항원이 해리될 때 NaOH에 의해 항체가 미세하게 항원과 함께 해리되기 때문에 나타나는 현상이다. 이 같은 현상을 최소화 하기 위해서는 지금보다 정확한 농도 및 유량의 NaOH의 사용과 보다 적합한 regeneration buffer 적용을 위한 실험이 추가로 필요할 것으로 사료된다.

라. 재현성 실험

카보후란 농도별로 재현성을 실험한 결과는 그 내용이 너

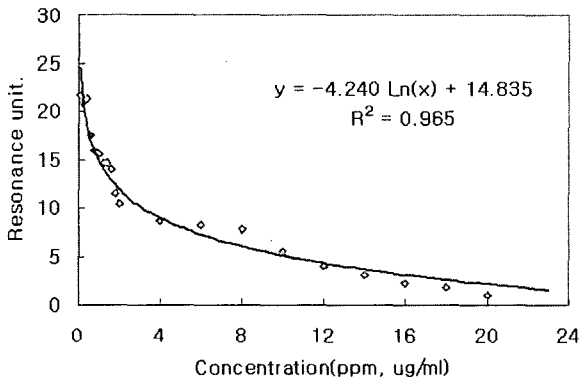


Fig. 9 Plot for resonance unit v.s. high concentration of carbofuran (20 to 0.1 ppm)

무 많아 표 4에서처럼 0.1 ppm의 경우만 예로서 나타내었다. 실험은 20 ppm에서 0.002 ppm까지 각 농도별로 5회씩 반복하여 실험을 하였다. 실험횟수는 총 205회를 실시하였으며 통계처리를 한 결과 카이제곱 값이 0.11에서 1.75까지 분포를 보였으며 전체평균은 1.52로 양호한 실험결과를 보였다. 보통 카이제곱 값(Chi value)은 10 이하로 나와야 하며 이 수치는 수학적으로 계산하는 값과 실제 실험에서 나온 데이터가 얼마나 차이가 나는지를 말해주는 값이다.

4. 요약 및 결론

본 연구는 표면플라즈몬공명을 이용하여 살충제 카보후란 잔류물의 실시간 검출을 위한 바이오센서 개발의 선행 연구로서 바이오센서용 효소면역분석법을 개발하기 위해 수행되었으며 그 결과는 다음과 같이 요약된다.

- (1) 실험에 사용된 항체는 GST를 사용하였으며 GST를 침표면에 고정화하기 위해 EDC와 NHS를 혼합한 아민커플링법을 사용하였다.
- (2) 적절한 pH 값은 pre-concentration test를 통해 pH 4.5가 가장 좋은 것으로 판명되었으며 이때 사용한 완충액은 Sodium Acetate Buffer였다.

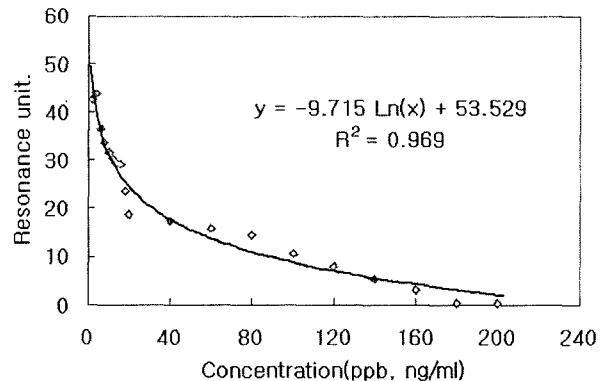


Fig. 10 Plot for resonance unit v.s. low concentration of carbofuran (0.2 to 0.002 ppm)

Table 4 Example for the average of x² (Chi value) in case of 0.1 ppm

Times	Mole (n)	RU	S.E. (RU)	x ² (Chi value)
0.1ppm-1	451.96	20.3	0.0347	0.17
0.1ppm-2	451.96	20.6	0.0347	
0.1ppm-3	451.96	20.5	0.0347	
0.1ppm-4	451.96	21.2	0.0347	
0.1ppm-5	451.96	21.3	0.0347	

- (3) 표면플라즈몬공명에 사용한 금박막 칩은 텍스트란이 표면에 도포되어있는 CM5 칩을 사용하였으며 GST가 카보후란과 충분히 반응하는데 걸린시간(association)은 176 초였으며 완전히 해리되는데 걸리는 시간(dissociation)은 215초가 소요되었다.
- (4) 총 분석시간은 HPLC나 GC/MS로 할 경우 보통 2시간이 소요되는데 반해 표면플라즈몬공명을 이용한 분석결과에서는 13분으로 실시간에 가깝게 노력과 분석시간을 절약할 수 있음을 증명하였다. 그리고 국내 카보후란의 허용잔류량의 최소 검출한계인 0.1 ppm보다 약 100배 이하 값을 검출할 수 있으므로 소형 바이오센서로 개발할 경우 현장에서 충분히 사용할 수 있으리라 판단된다.
- (5) 카보후란 농도별로 재현성을 실험한 결과 카이제곱 값이 전체평균 1.52로 양호한 실험결과를 보였다.

참고 문헌

1. Abad J. M., F. Pariente, L. Hernandez, H. D. Abruna, and E. Lorenzo. 1998. Determination of Organophosphorus and Carbamate Pesticides Using a Piezoelectric Biosensor, *Anal. Chem.* 70:2848-2855.
2. Bu, K. S. and S. I. Kim. 2002. Development of a diagnosis kit for detecting residual pesticides using insect enzyme and field test, ARPC final report.
3. Choi, J. W. and W. H. Lee. 2002. The development of fiber-optic biosensor for simultaneous detection of the pesticide residues in agricultural products, ARPC final report.
4. K-MAC. 2000. Development of surface plasmon resonance sensor system, K-MAC report.
5. Lea Pogac̣nik *, Mladen Franko. 2003. Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetable samples by a photothermal biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 18:1-9.
6. Shim, J. H and Y. T. Ji. 2003. Microorganism selection and kit development for detection of the germicide EBDC pesticide residues in agricultural products, ARPC final report.
7. Song, S. J. and H. K. Cho. 2003. Enzyme immunoassay for on-line sensing of the insecticide imidacloprid residues, *KSAM* 28(6):505-510.
8. Weller, M. G., J. S. Andreas, M. Winklmail and R. Niessner. 1999. Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water. *Snal. Chim. Acta*, 393: 29-41.