

설파메타진에 단클론성 항체를 이용한 직접경쟁효소면역분석법의 개발과 우유 시료 적용 조건 확립

심원보 · 문춘선¹ · 김정숙 · 최주미 · 김지훈² · 박선자 · 강성조 · 정덕화*

경상대학교 응용생명과학부, ¹식품의약품안전청 유해물질관리단 위해기준팀, ²농촌진흥청 농업과학기술원

Development of Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using Monoclonal Antibody (MAb) against Sulfamthazine (SMZ) and Establishment of Application Condition for Milk Sample

Won-Bo Shim, Chun-Sun Mun¹, Jung-Sook Kim, Ju-Mi Choe, Ji-Hun Kim²,
Seon-Ja Park, Sung-Jo Kang, and Duck-Hwa Chung*

Division of Applied Life Science(Brain Korea 21 program), Graduate School of Gyeongsang National University

¹Food & Risk Standardization Team, The Bureau of Risk Management, KFDA

²National Institute of Agricultural Science and Technology, Rural Development Administration

Abstract Sensitive and specific monoclonal antibody (MAb) was produced from hybridoma (1H11-5) obtained by fusion of myeloma cell (V653) and spleen cell isolated from mouse immunized sulfamthazine (SMZ)-HG-KLH. Direct competitive ELISA was developed for rapid detection of SMZ in milk samples using MAb against SMZ with optimized conditions between MAb and SMZ-HG-HRP conjugate, and applicable conditions for analysis of milk samples were established. Detection range of immunoassay was 0.1 to 100 ppb. Recoveries from spiked raw milk and processed milk samples averaged 82.1-120.7 and 82.1-97.1%, respectively.

Key words: sulfamethazine, antibiotic, monoclonal antibody, ELISA, milk

서 론

최근 식육 및 육제품, 유가공 식품에 대한 수요가 점차 증가함에 따라 가축의 사육 규모도 기업화, 대규모화가 이루어지고 있다. 국내의 축산업계의 경우 좁은 면적을 이용한 밀집 사육의 형태로 가축의 세균성질병의 예방과 치료 및 성장촉진을 위해 항생물질 및 합성항균제의 사용은 피할 수 없는 실정이다. 그러나 이들 항생물질 및 합성항균제의 가축에 대한 오용 및 남용은 식육, 우유 및 계란에 축적 및 잔류될 위험을 내재하고 있으며, 이를 섭취하는 사람에게 전이되어 과민반응을 일으키거나 항생제 내성균을 유발시킬 수 있는 여러 가지 문제를 야기하게 되므로 미국을 비롯한 여러 나라에서는 사용가능한 항생물질류와 합성항균제의 종류 및 최대잔류허용한계 등을 법으로 정하여 국민 건강을 보호하는 적극적인 정책을 수행하고 있다. 국내에서도 마찬가지로 식품공전 상에 사용가능한 항생물질의 종류와 식육, 어패류, 그리고 우유 중 잔류 허용기준을 설정하여 실행 중에 있다(1).

설파계 항생제인 설파메타진(sulfamethazine, SMZ)은 가축의 감염증 치료 및 예방목적과 성장촉진을 위하여 사용되고 있는 대

표적인 합성항균제의 하나이다. 다른 항균제와는 달리 가열 시에도 거의 분해가 되지 않으며(2) 흡수는 빠르고 배설은 느리기 때문에 조직 내 축적을 야기시켜 사람의 체내로 이행되어 항생제 내성균 유발, 조혈기능의 이상, 암의 유발, 면역체 형성저해와 관절염, 신장질환이 있는 경우 간질성 신염을 유발시켜 결정뇨를 일으키는 등 많은 부작용이 나타나는 것으로 알려져 있다(3). 이에 여러 국가에서는 식육을 도축하기 전 약전 휴약기간 및 잔류 최대 허용량을 법으로 정하여 이를 규제하고 있으며, 특히 FDA와 FAO/WHO의 합동 국제식품 규격위원회에서는 우유를 포함한 식육에서의 잔류 최대 허용량을 0.1 ppm으로 규정하고 있다(4). 우리나라에서도 식품공전 상에 식육은 0.1 ppm, 우유는 0.01 ppm으로 규정하고 있다(5).

현재 축산물이나 유가공품에서 SMZ를 검출하기 위한 정량분석법으로는 gas chromatography, gas chromatography-mass spectrometry 그리고 high performance liquid chromatography법을 사용하고 있으며, 정성분석법으로는 bioassay와 TLC법을 사용하고 있다(1). 그러나 이러한 분석법들은 고가의 기기를 필요로 하고 장시간의 전처리 과정 및 분석 시간을 요구하므로 다량의 시료를 분석하는데 어려움이 있으며 검출한계가 높아 축산물이나 유가공품에 미량 잔류하는 SMZ를 효율적으로 분석할 수 없는 단점을 가진다(6,7).

반면 항원-항체의 특이적인 반응을 이용한 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)은 검출감도 및 특이성이 매우 높고 저비용으로 분석이 가능하며 다수의 시료를 동시에 분석할 수 있다는 이점을 가지므로(8,9) 미량의 잔류 SMZ

*Corresponding author: Duck Hwa Chung, Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea

Tel: 82-55-751-5480

Fax: 82-55-757-5485

E-mail: dhchung@nongae.gnsu.ac.kr

Received January 7, 2006; accepted March 2, 2006

를 검색 하는데 효율적으로 사용될 수 있다. 일반적으로 항생물질과 같은 저분자 물질을 분석하기 위한 효소면역분석법은 간접경쟁효소면역분석법(indirect competitive ELISA)과 직접경쟁효소면역분석법(direct competitive ELISA)이 주로 사용되는데 이들의 가장 큰 차이점은 간접면역분석법의 경우 항체가 시료 또는 표준물질과 경쟁하는 원리이고, 직접경쟁면역분석법의 원리는 입의 목적으로 하는 물질에 효소를 결합시킨 효소표지물질이 시료 또는 표준물질과 경쟁하는 원리이다. 간접경쟁효소면역분석법의 경우 항원코팅, blocking, 시료 또는 표준물질과 항체의 경쟁반응, 2차 항체 반응, 기질 반응 등의 복잡한 단계와 시간이 1일 이상 소요되는데 직접경쟁효소면역분석법은 항체코팅, 시료 또는 표준물질과 효소표지물질의 반응, 기질 반응 등으로 과정이 매우 간편하며, 소요되는 시간이 1시간 이내이다.

효소면역분석법에 주로 사용되는 항체는 다클론성 항체(polyclonal antibody, PAb)와 단클론성 항체(monoclonal antibody, MAb) 등이 주로 사용되고 있으며 단클론성항체는 다클론성항체에 비해 분석하고자 하는 물질에 대해 특이성이 높은 장점이 있기 때문에 축산물 또는 유가공품에 미량으로 잔류 가능성이 높은 SMZ를 분석하기에 적합한 것으로 사료된다. 국내에서 Kim 등(10)이 다클론성항체를 이용한 간접경쟁효소면역분석법이 보고된 바 있으나 단클론성 항체에 대한 연구와 이를 이용한 직접경쟁효소면역분석법에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우유에 잔류가능성이 높은 항생물질 SMZ를 간편하고 신속하게 분석하기 위한 수단으로 SMZ에 단백질을 결합하여 항원을 합성한 후 mouse를 이용하여 hybridoma cell line을 개발하고 단클론성 항체를 생산하여 면역학적 분석법인 직접경쟁 효소면역분석법(direct competitive ELISA, DC-ELISA)을 확립한 후 원유 및 시판우유에 적용할 수 있는 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

면역항원합성

Sulfamethazine(SMZ)의 분자량은 278.32로 면역계에 인지되지 않고 체내에 축적 및 배설의 과정을 거치기 때문에 단독으로는 항원의 역할을 할 수 없으므로 항체를 생산하기 위해서는 담체(carrier protein)와 결합시켜 항원성을 부여하여야 한다. 따라서 hapten을 Thouvenot(11)의 방법으로 유도한 후 유도된 hapten에 Sergei 등(12)와 Langone 등(13)의 방법을 응용하여 담체단백질로 주로 사용되는 keyhole limpet hemocyanin(KLH, Sigma, St. Louis, USA), soybean trypsin inhibitor(STI, Sigma, St. Louis, USA)을 결합시켜 면역항원을 준비하였다. 먼저 hapten의 유도를 위해 10 mg씩의 표준 SMZ(Sigma, St. Louis, USA)를 pyridine (TEDIA Company INC., Ohio, USA)에 각각 녹이고 hemisuccinate(HS, Sigma, St. Louis, USA)와 hemiglutarate(HG, Sigma, St. Louis, USA)를 20 mg씩 각각 첨가한 다음 실온에서 24시간 교반하면서 반응시키고 진공하에서 건조시켜 증류수에 녹인 후 반응하지 않은 SMZ를 분리하기 위해 50 mL의 benzene(Merck, Darmstadt, Germany)으로 추출하였다. 이 반응액에 0.1 N HCl (Kanto Chemical Co., Tokyo, Japan)을 첨가하여 SMZ-HG와 SMZ-HS hapten을 침전시키고 여과지(Toyo Roshi Kaisha, N0. 4, Japan)로 여과한 후 건조시켰다. 유도된 SMZ-HG와 SMZ-HS hapten 각각 39 mg과 38 mg을 2 mL의 dimethylformamide(DMF, Sigma, St. Louis, USA)에 녹인 후 N-hydroxysuccinimide(NHS, Sigma, St. Louis, USA) 14 mg을 넣고 N,N-dicyclohexylcarbodi-

imide(DCC, Sigma, St. Louis, USA) 31 mg을 첨가한 다음, 반응용액을 실온에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이때 침전된 urea는 원심분리(SUPRA 22K, Hanil Science Industrial, Korea)하여 제거 후 DMF 상등액을 얻었고 단백질 KLH와 STI 각 15 mg, 20 mg을 50 mM carbonate buffer(pH 9.6) 2 mL에 각각 녹여 앞서 제조한 DMF 상등액을 방울방울 떨어뜨려 실온에서 2시간 반응 후, 4°C에서 하룻밤 교반하며 반응시킨 후 phosphate buffer saline(PBS, pH7.4) 2 L로 4°C에서 3일 동안 투석하여 단백질 정량 후 -20°C에서 보관하였고 면역에 사용하였다.

단클론성항체 생산

준비된 면역항원 SMZ-HG-KLH, SMZ-HG-STI, SMZ-HS-KLH 및 SMZ-HS-STI를 PBS에 1 mg/mL로 준비하고 complete Freund's adjuvant(Sigma, St. Louis, USA)를 1:1(v/v)로 유화시켜 생후 7-8주된 BALB/C 마우스(Hyosung Science, Daegu, Korea)에 마리당 100 µg/200 µL씩 복강으로 1차 면역을 실시하였다. 첫 면역 2주, 4주 후 각각의 면역원과 incomplete Freund's adjuvant (Sigma, St. Louis, USA)의 동량혼합한 유화액으로 2회 추가 접종을 실시하고, 세포융합 3일 전에 2배량의 면역원만을 복강 내 주사하여 최종 면역하였다. 최종 면역 후 항체 생성여부를 확인하기 위하여 마우스의 꼬리정맥에서 혈청을 채취하여 간접비경쟁 효소면역분석법(indirect non-competitive ELISA)을 실시하여 항체의 역가를 측정하였고 높은 역가를 가지는 마우스의 비장세포와 myeloma cell(V653)을 Kohler 등(14)의 방법에 따라 융합을 실시하고, Mckearn 등(15)의 무한대 희석법으로 cloning한 후 단클론성항체를 생산하는 hybridoma를 확보하였다. 확보된 hybridoma를 대량 배양한 후 마우스의 복강에 이식하여 1주일 후 복수액을 생산하였고, 생산된 복수액을 ammonium sulfate 침전법으로 정제한 후 PBS를 이용하여 3일 동안 투석하였고, 동결건조 시킨 후 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

정제된 항체의 특이성을 조사하기 위하여 SMZ와 구조적으로 유사한 구조 이성체(sulfachloropyridazine, sulfamerazine, sulfamethizole, sulfaquinolaxin, sulfadiazine, sulfapyridine, sulfamonomethoxine)와 다른 항생물질(thiabendazole, albendazole, thiamphenicol, oxytetracycline, olaquinoxid)에 대하여 간접경쟁 효소면역분석법(indirect competitive ELISA)을 실시 후 각각 표준곡선을 작성하여 IC₅₀ 값을 구한 후 아래의 식을 이용하여 교차반응성을 계산하였다.

$$\text{Cross-reactivity (\%)} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ value of sulfamethazine}}{\text{IC}_{50} \text{ value of other compound}} \times 100$$

효소표지물질 합성

직접경쟁 효소면역분석법(direct competitive ELISA)에 marker로 사용되는 효소표지물질을 합성하기 위해 면역항원 합성과정과 동일한 방법으로 SMZ-HS와 SMZ-HG hapten을 유도한 후 DMF 2 mL에 녹이고 50 mM carbonate buffer(pH 9.6) 1 mL에 4 g의 horse radish peroxidase(HRP, Sigma, St. Louis, USA)을 녹인 용액에 한 방울씩 천천히 첨가하였다. 첨가 후 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 4°C에 하룻밤 방치한 다음 Sephadex G-50(Sigma, St. Louis, USA)으로 정제하였고, 앞서 설명한 것과 같은 방법으로 투석을 실시한 후 항체와의 친화도 및 경쟁자로서의 기능여부를 확인하였다. 앞서 정제된 항체를 50 mM carbonate buffer(pH 9.6)에 1/100, 1/200, 1/400 및 1/800로 희석 후 96 well micro plate(Nunc, Roskilde, Denmark)에 100 µL/well씩 첨가하여 코팅한

Table 1. Summary of optimum conditions for direct competitive ELISA

Parameters		Conditions
Reagents	Coating Antibody	Anti-SMZ MAb 1H11-5 (1 : 400 in 50 mM carbonate buffer)
	Working solution for SMZ standard	10% MeOH/PBS (50 mM, pH 7.4)
	Enzyme conjugate	SMZ-HG-HRP ²⁾ (1 : 8000 in 1% BSA ³⁾)
	Substrate	ABTS containing 0.02% H ₂ O ₂
	Stopping solution	2 M H ₂ SO ₄
	Washing solution	PBS containing 0.05% Tween 20
Incubation time	Coating step of MAb	Overnight at 4°C
	Competition step between SMZ ¹⁾ and SMZ-HG-HRP	30 min at RT ⁶⁾
	Color developing step	20 min at RT

¹⁾SMZ: sulfamethazine.

²⁾SMZ-HG-HRP: sulfamethazine-enzyme conjugate.

³⁾BSA: bovine serum albumin.

⁴⁾ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline) sulfonic acid (Substrate for ELISA).

⁵⁾PBS: phosphate buffer saline.

⁶⁾RT: room temperature.

다음 4°C에서 하룻밤 동안 정치시켰고, 세척용액(PBS contained 0.02% Tween 20, PBST)으로 3회 세척 후 각각 1/1,000, 1/2,000, 1/4,000, 1/6,000, 1/8,000 및 1/10,000로 희석된 효소표지 물질 용액을 SMZ 0과 1 ppm의 표준용액과 각각 동량 혼합하여 well당 100 µL씩 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 세척용액으로 6회 세척 후 기질용액(ABTS, Sigma, St. Louis, USA)을 세척된 well에 100 µL씩을 첨가하여 실온에서 30분 반응하고 반응정지액(2 M H₂SO₄, Kanto Chemical Co., Tokyo, Japan)을 각각의 well에 50 µL씩 첨가하여 반응을 중지시켜 ELISA Reader(Model 550K, BIO-RAD, California, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최적의 항체와 효소표지물질의 희석배수는 SMZ 0과 1 ppm의 흡광도 차가 1.3에서 1.5인 항체와 효소표지물질의 희석배수 조건을 선택하여 direct competitive ELISA법을 확립하였다.

직접경쟁 효소면역분석법(direct competitive ELISA) 확립

앞서 확인된 항체의 희석배수를 이용하여 Table 1과 같이 최적의 direct competitive ELISA를 확립하였다. 간단히 설명하면 carbonate buffer(pH 9.6)를 이용하여 1/400 희석한 항체용액을 100 µL/well씩 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰고, 세척용액으로 3회 세척 후 1% BSA용액에 1/8,000 희석한 효소표지 물질 용액을 SMZ 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 ppb의 다양한 농도의 표준용액과 각각 동량 혼합하여 well당 100 µL씩 첨가한 후 실온에서 30분간 반응시켰다. 세척용액으로 6회 세척하고 기질용액을 세척된 well에 100 µL씩을 첨가하여 실온에서 30분 반응하고 반응정지액을 각각의 well에 50 µL씩 첨가하여 반응을 중지시켜 ELISA Reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Microplate Manager 4.0(BIO-RAD, California, USA) 프로그램을 이용하여 각 표준물질의 농도별 흡광도 치의 표준곡선을 구하고 시료의 흡광도를 표준곡선에 대입하여 시료의 SMZ 농도를 산출하였다.

시료 분석조건

Direct competitive ELISA법을 이용하여 SMZ의 잔류 가능성이 높은 원유 및 시판우유를 분석하는 조건을 확립하기 위해 시료 전처리법을 확립하고 회수율을 확인하였다. 먼저 원유 및 시판우유를 acetone(Duksan Chemical Co., Ansan, Korea)과 각각 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 비율로 혼합한 뒤 1분간 vortex 시킨 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 회수하였다. 이를 질소가스로 acetone을 완전히 제거시킨 후 10% MeOH/PBS를 원시료의 부피만큼 첨가하여 재용해하고 추출물이 direct competitive ELISA법에 미치는 영향 정도를 확인하였다.

또한 선택된 시료 전처리법에 대한 신뢰도를 확인하기 위하여 SMZ에 오염되어 있지 않은 각각의 원유와 시판우유 시료에 SMZ (1 mg/mL MeOH)을 1, 5, 10 및 50 ng/mL이 되도록 임의로 첨가한 것을 SMZ 양성 시료로 사용하였고, SMZ를 첨가하지 않은 시료를 SMZ 음성 시료로 사용하여 회수율을 확인하였다.

결과 및 고찰

단클론성항체 생산

면역항원을 마우스에 면역 후 항체생성 여부를 확인한 결과 STI로 합성한 면역항원으로 면역한 마우스 보다 KLH로 합성한 면역항원으로 면역한 마우스가 항체 생성도가 높았고, SMZ-HS hapten 보다 SMZ-HG hapten으로 합성한 면역항원이 항체 생성도가 높은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 역가가 가장 높게 나타난 SMZ-HG-KLH를 면역한 마우스를 이용하여 세포융합과 cloning을 실시하여 15종의 클로닝된 hybridoma를 획득하였고, 획득된 15종의 클로닝된 hybridoma 중 역가와 특이성이 높은 hybridoma를 선택하기 위해 각각의 hybridoma 배양상등액을 이용하여 SMZ 표준용액 0, 1, 10, 100, 1000 ppm에 대하여 indirect competitive ELISA를 실시한 후 표준곡선으로부터 IC₅₀값을 확인하였

Table 2. IC₅₀ values for selected hybridoma cell line by indirect competitive ELISA

IC ₅₀ Value (ppb)	Number of hybridoma										
	1H11									6A5	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	3
	12.64	24.54	13.24	7.84	95.63	9.245	8.524	10.89	7.752	77.16	39.08

Table 3. Cross-reactivity of MAb to sulfamethazine and related compound in direct competitive ELISA

Compound	Structure	IC ₅₀	Cross reactivity (%)
Sulfamethazine		1.304	100
Sulfachloropyridazine		∞ ¹⁾	<0.1
Sulfadiazine		∞	<0.1
Sulfapyridine		∞	<0.1
Sulfamerazine		2.414	54
Sulfamethizole		∞	<0.1
Sulfamonomethoxine		∞	<0.1
Sulfaquinolaxine		∞	<0.1
Thiabendazole		∞	<0.1
Albendazole		∞	<0.1
Thiamphenicol		∞	<0.1
Oxytetracycline		∞	<0.1
Olaquinox		∞	<0.1

¹⁾∞: IC₅₀ value was too high or not calculable.

고 가장 낮은 IC₅₀값을 나타내는 hybridoma를 선택하였다. 그 결과 Table 2에서 보는바와 같이 1H11-5 hybridoma의 배양상등액을 이용하여 실시한 indirect competitive ELISA 표준곡선의 IC₅₀값이 5.63 ppb를 나타내어 가장 민감도가 좋은 항체를 생산하는 hybridoma로 확인되었다. 따라서 1H11-5 hybridoma를 대량 배양하여 마우스 복강에 주입 후 복수액을 얻어 항체를 대량 생산하였다.

또한 생산된 단클론성항체 1H11-5가 다른 설파계 항생제와 반응하는지의 여부를 측정한 결과 sulfamerazine에 대한 54%의 교차반응을 보였고, 다른 설파계 항생제 및 합성항균제와는 반응을 보이지 않아 본 연구에서 생산된 SMZ에 대한 항체는 특이성이 높음을 확인하였다(Table 3). Sulfamerazine에 대한 교차반응은 SMZ와 구조를 비교해 볼 때 다른 설파계 항생제와는 달리 pyrimidinyl기에 6번 탄소 위치에 methyl기만 없는 상태로 가장 유

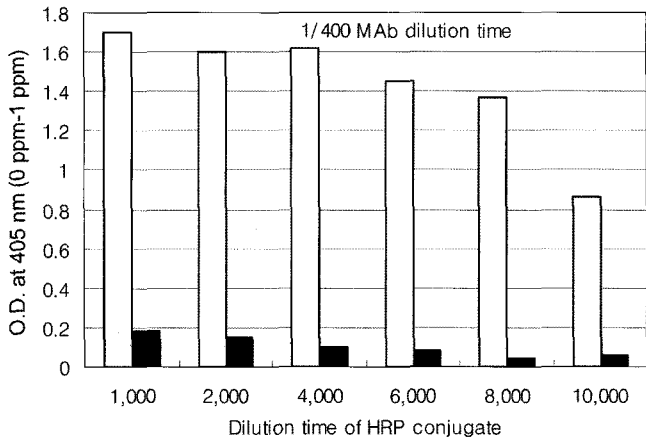


Fig. 1. Checkerboard titration between MAb and HRP conjugate in direct competitive ELISA. □: SMZ-HG-HRP, ■: SMZ-HS-HRP.

사한 구조를 가지고 있기 때문에 판단된다. Milan 등(6)에 의해 보고된 연구에서도 SMZ에 대하여 생산한 항체가 sulfamerazine 과 교차반응성이 나타나는 것으로 보고하였다.

효소표지물질 합성

Direct competitive ELISA는 일반적으로 사용되고 있는 indirect competitive ELISA법보다 실험과정이 간단하며 분석시간의 상당한 단축 등의 장점이 있다. Direct competitive ELISA를 확립하기 위해서는 먼저 marker로 사용되는 효소표지물질이 필요로 하며, 효소표지물질을 확보하더라도 사용되는 항체와 효소표지물질의 최적조합을 찾아내어야만 검출감과 특이성이 높은 면역분석법의 확립이 가능하다. 일반적으로 경쟁적 효소면역분석법의 확립에서는 목적으로 하는 물질의 최저 농도와 최대 농도의 흡광도차가 1.2 이상에서 1.5이하의 항체 및 효소표지물질의 희석배수를 선택한다. 본 연구에서도 앞서 생산된 항체와 효소표지물질의 최적조합을 확인하는 실험을 하였다. 항체 희석배수 1/100과 1/200의 경우 SMZ 0과 1ppm 흡광도 차가 1.5 이상이었고 많은 량의 항체를 필요로 하였고 희석배수 1/800의 경우 0과 1ppm 흡광도 차가 1.2 이상 1.5 이하 정도로 적합하였으나 많은 량의 효소표지물질을 필요로 하여 위의 3가지 항체 희석배수는 direct competitive ELISA법을 확립하는데 적합하지 않았다. 그러나 1/400의 항체희석배수를 사용했을 때 Fig. 1에서 보는바와 같이 SMZ-HG-HRP는 1/8,000 희석배수에서 0과 1ppm 흡광도 차가 1.351로 가장 양호한 것으로 나타났다. 또한 SMZ-HG-HRP 1/6,000 희석배수도 사용할 경우도 최대 O.D.치가 1.504이고 O.D.치의 차이가 1.450 사이로 양호한 결과를 얻을 수 있었으나 효소표지물질을 많이 소비하여 비경제적인 것으로 판단되었다. 반면 SMZ-HS-HRP의 경우 흡광도가 전체적으로 0.3 이하로 나타나 항체와의 친화력이 매우 낮았으며 경쟁자로서의 기능 또한 하지 못하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 앞서 SMZ-HS-protein으로 면역한 마우스에서 항체 생성정도가 미흡했던 결과와 유사한 경향을 보였다. 따라서 면역항원과 효소표지물질의 합성에 사용되는 SMZ hapten의 유도시 hemiglutarate를 이용하는 것이 바람직한 것으로 사료되었다.

직접경쟁 효소면역분석법(direct competitive ELISA)

확립된 실험결과를 토대로 SMZ를 분석하기 위해 확립한 direct competitive ELISA의 표준곡선은 Fig. 2와 같았고, 표준곡선 상의

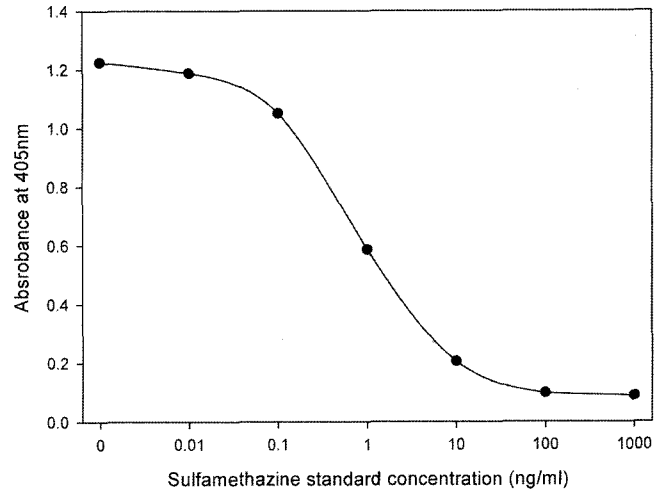


Fig. 2. Standard curve of sulfamethazine by direct competitive ELISA.

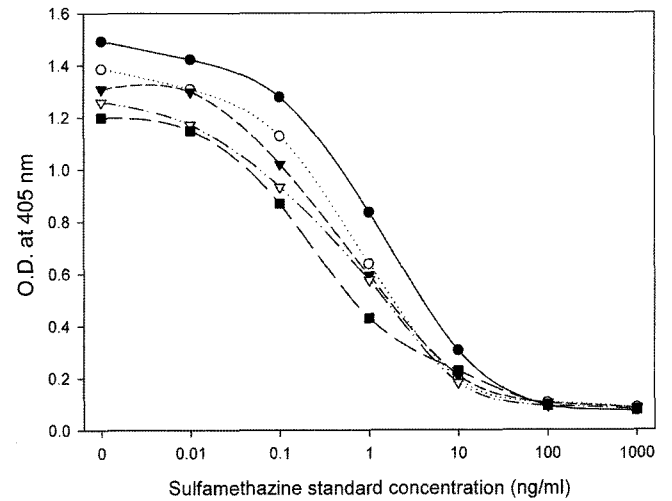


Fig. 3. Determination of matrix effect of extracted milk in direct competitive ELISA. ●: Buffer, ○: Milk and acetone mixed equal volume, ▼: Milk and acetone mixed 1:2 volume, ▽: Milk and acetone mixed 1:3 volume, ■: Milk and acetone mixed 1:4 volume.

최저 검출한계는 0.1 ppb였으며, 검출범위는 0.1-100 ppb 수준으로 측정가능 하였고 항체 코팅 시간을 제외한다면 항체와 효소표지물질의 반응시간 30분, 기질 반응시간 20분으로 1시간 이내로 시료의 분석결과를 확인할 수 있는 신속한 분석법으로 확인되었다. 현재까지 국내에서는 다량의 시료 중 SMZ 분석 시 외국에서 생산하여 수입되고 있는 ELISA kit를 구입하여 스크리닝에 사용하고 있고 Kim 등(10)이 토끼로부터 생산한 다클론성 항체를 이용하여 확립한 indirect competitive ELISA법을 확립하여 보고한 것 이외에 단클론성항체를 이용한 direct competitive ELISA법의 확립은 보고되고 있지 않다. 또한 다클론성 항체를 이용한 indirect competitive ELISA법의 검출한계는 최대 1 ppb로 단클론성항체를 이용한 direct competitive ELISA법 보다는 민감도가 좋지 않았다. 따라서 본 연구에서 확립된 direct competitive ELISA법은 외국에서 생산하여 수입되고 있는 ELISA kit와 동등한 수준의 검출감과 많은 양의 시료(48 시료)를 1시간 이내에 정량적으로 분석할 수 있는 분석법으로 확인되었고 안정화 조건을 확인하고 이들 조건을 응용한다면 외국에서 생산하여 수입되는 고가의 ELISA

Table 4. Sulfamethazine recovery rates from SMZ-spiked milk samples by direct competitive ELISA

Spiked sulfamethazine (ng/mL)	Recovery (%)	
	Raw Milk	Market Milk
1	120.7	82.1
5	82.1	86.910
10	2.8	89.9
50	98.5	97.1

kit와 동등한 수준의 저가형 국산 ELISA kit의 개발이 가능할 것으로 사료되었다.

시료분석 조건 확립

확립된 direct competitive ELISA를 이용하여 SMZ이 잔류 가능성이 높은 원유 및 시판우유를 분석하기 위한 조건을 확인하고자 하였다. Milan 등(6)과 Hiroo 등(16)도 우유 속에 잔류하는 항생물질을 ELISA법을 이용하여 검출하는 연구에서 우유 시료를 buffer에 직접 100배 희석하여 적용이 가능한 것으로 보고하였다. 하지만 예비 연구에서 우유를 buffer에 직접 희석하기 위해서는 1,000배 이상 희석 시에 적용이 가능한 것으로 나타나 확립된 direct competitive ELISA법을 이용하여 SMZ의 최대 허용한계치인 10 ppb를 검출하기에는 어려움이 있는 것으로 판단되었다. 따라서 우유에 다량 존재하는 수용성 단백질을 제거하기 위해 단백질 응고제로 주로 사용되는 acetone의 첨가량을 달리하여 시료 추출을 실시하여 matrix effect를 측정된 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 우유와 acetone을 동량 첨가하여 추출한 경우 matrix effect가 가장 적은 것으로 나타났고 첨가량이 많을수록 matrix effect가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

또한 실제 시료 적용가능 여부를 조사하기 위해 임의의 농도로 SMZ를 오염시킨 양성시료를 사용하여 회수율을 측정된 결과 Table 4에서와 같이 원유의 경우는 82-121%까지 회수가 되는 것으로 나타났으며, 시판우유의 경우는 82-97%까지 회수가 되는 것으로 확인되었다. 그러므로 확립된 시료 전처리법으로 원유나 시판우유를 처리하여 direct competitive ELISA로 분석한다면 미량 잔류하는 SMZ를 신속하고 정확하게 분석할 수 있을 것으로 확인되었다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 본 실험에서 생산한 단크론성 항체를 이용하여 확립한 direct competitive ELISA는 우유뿐만 아니라 축산물 중 미량 오염되어 있는 SMZ를 검색에 효과적인 방법으로 사용될 수 있을 것으로 생각되었다.

요 약

본 연구는 축산농가에서 가축의 세균성 질병의 예방과 치료 및 성장촉진을 목적으로 주로 사용되고 있으며, 축산물과 유가공품에 잔류 가능성이 높은 sulfamethazine(SMZ)을 검출할 수 있는 직접경쟁 효소면역분석법(direct competitive ELISA)의 개발과 이를 원유 및 시판우유 분석에 이용하는 것을 목적으로 하였다. 면역항원의 합성은 hemiglutarate와 hemisuccinate를 이용하여 SMZ-hemiglutarate(SMZ-HG)와 SMZ-hemisuccinate(SMZ-HS) hapten을 유도한 후 단백질 KLH와 STI를 결합시켜 마우스 면역에 사용하였고, SMZ-HG-KLH를 이용하여 면역한 마우스에서 가장 높은 항체 생성정도를 나타내었다. 세포융합과 cloning을 실시하여 총 15종의 hybridoma cell line을 확보하였고 그 중 가장 경쟁성이 뛰

어나고 민감도가 높은 1H11-5 hybridoma를 선택하고 대량 생산하였다. 생산된 항체는 sulfamethazine에만 54%의 교차 반응성을 나타내었고, 다른 설파계 항생제와는 반응을 하지 않는 특이성이 높은 항체로 확인되었고 이를 이용하여 확립된 direct competitive ELISA법은 검출범위가 0.1-100 ppb 수준으로 기존에 보고된 ELISA보다 민감도가 높았다.

민감도와 특이성이 높은 direct competitive ELISA를 이용하여 원유와 시판우유를 분석하기 위한 전처리법을 확립하여 회수율을 확인한 결과 원유의 경우 82-121%까지 회수가 되는 것으로 나타났으며, 시판우유의 경우는 82-97%까지 회수가 되는 것으로 나타나 우유 샘플 중에 미량 잔류하는 SMZ를 신속하고 정확하게 분석할 수 있을 것으로 사료되었다.

이러한 연구결과를 종합해 볼 때 확립된 direct competitive ELISA법은 우유 시료뿐만 아니라 모든 축산물에 잔류 가능성이 높은 SMZ의 분석을 신속하고 정확하게 분석이 가능할 것으로 사료되었고 확립된 direct competitive ELISA법의 안정화 조건을 확립하고 응용한다면 외국으로부터 생산 및 수입되는 ELISA kit을 대체할 수 있는 저가형 국산화 ELISA kit의 상용화가 가능할 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 (주)삼성에버랜드의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 심원보는 교육부 Brain Korea 21 사업에 의해 지원되었습니다.

문 헌

- Kim CH, Baick SC, Moon JW. Determination of sulfamethazine using high performance liquid chromatography and several screening methods. *J. Food Hyg. Safety* 12: 71-77 (1997)
- Park JH, Lee MH. Screening for sulfamethazine residue in pork. *Korean J. Anim. Sci.* 32: 715-717 (1990)
- Bhanu PR, Prithipal S, Lorelei M, Brock T, Nikolai S, David A. High-volume enzyme immunoassay test system for sulfamethazine in swine. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 43-46 (1991)
- Suhren G, Heeschen W. Detection of inhibitors in milk by microbial tests. A review. *Nahrung* 40: 1-7 (1996)
- KFDA. Korean Food Code. Korea Food and Drug Administration. Seoul, Korea (2002)
- Milan F, Vladimir K, Anping D, Steven C. Determination of sulphadimidine (sulfamethazine) residues in milk, plasma, urine and edible tissues by sensitive ELISA. *Food Agric. Immunol.* 11: 339-349 (1999)
- Unruh J, Schwartz DP, Barford RA. Quantitation of sulfamethazine in pork tissue by thin-layer chromatography. *J. AOAC Int.* 76: 335-341 (1993)
- Park JH. Immunochemical detection of sulfamethazine residues in pork tissue. *Korean J. Anim. Sci.* 41: 129-134 (1999)
- Fortune K, Batya Gr, Yehudith AZ, Michael O. Generation of an anti-idiotypic antibody as a surrogate ligand for sulfamethazine in immunoassay procedures. *Food Agric. Immunol.* 12: 193-201 (2000)
- Kim SH, Lim YK. Experimental study on development of ELISA method for the detection of sulfamethazine residues. *J. Food Hyg. Safety* 10: 213-217 (1995)
- Thouvenot DR, Morfin RF. Radioimmunoassay for zearalenone and zearalenol in human serum: Production, properties and use of porcine antibodies. *App. Environ. Microbiol.* 45: 16-22 (1983)
- Sergei AE, Landon J, Smith DS, Jackman R. Development of a Polarization fluoroimmunoassay for sulphamethazine using an Automated Analyzer. *Analyst* 119: 2723-2726 (1994)
- Langone JJ, Van VH. Radioimmunoassay of nicotine, cotinine, and -(3-piridyl)-roxo-N-methylbutyramide. *Methods Enzymol.* 84: 628-640 (1982)

14. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells producing antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-501 (1975)
15. McKearn TJ, Weiss A, Stuart FP, Fitch FW. Selective suppression of humoral and cell-mediated immune responses to rat alloantigens by monoclonal antibodies produced by hybridoma cell lines. *Transplant. Proc.* 11: 932-935 (1979)
16. Hiroo W, Atsuko S, Yasumasa K, Akio T. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for dihydrostreptomycin in milk. *Anal. Chim. Acta.* 472: 45-53 (2002)