KFAS 한국수산과학회지 Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences
한수지 48(2), 158-167, 2015

Original Article
Korean J Fish Aquat Sci 48(2),158-167,2015

# 어류 중 4계열 잔류 항생물질 검출을 위한 Lateral Flow Immunoassay Kit 개발

조미라* · 손광태 · 권지영 · 목종수[1] · 박홍제[2] · 김현용[2] · 김경동[2] · 김지회 · 이태식

국립수산과학원 식품안전과, [1]국립수산과학원 남동해수산연구소, [2](주)메덱스

# A Lateral Flow Immunoassay Kit for Detecting Residues of Four Groups of Antibiotics in Farmed Fish

Mi Ra Jo*, Kwang Tae Son, Ji Young Kwon, Jong Soo Mok[1], Hong Jae Park[2], Hyun Yong Kim[2], Gyung Dong Kim[2], Ji Hoe Kim and Tae Seek Lee

*Food Safety Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea*
*[1] Southeast Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Tongyoung 650-943, Korea*
*[2] Medexx Co., Ltd, Korea Bio Par, Seongnam 463-400, Korea*

A lateral flow immunoassay kit based on antigen-antibody interactions was developed to detect residues of beta-lactams, quinolones, tetracyclines, and sulfonamides in farmed fish. Group-specific antibodies showing cross-reactivity with other antibiotics in the same group were produced in rabbits. The rabbits were immunized eight times to obtain the maximum titers. Antibodies were extracted from the antisera collected from the immunized rabbits and produced group-specific reactions with antibiotics from the four groups. A kit was prepared that optimize conditions for the antigen-antibody reaction, using colloidal gold conjugated antibodies, and was designed to detect the four groups of antibiotics simultaneously. The kit enabled the detection of antibiotics in the four groups at below maximum residue limits (MRLs), which were 200 μg/kg for tetracyclines, 100 μg/kg for sulfonamides, 50 μg/kg for beta-lactams, and 100 μg/kg for quinolones. The cross-reactivity of the antibodies ranged from 10-80% for the sulfonamides, 20-100% for tetracyclines, 38-100% for quinolones, and 20-100% for the beta-lactams, confirming that the antibodies were group specific. The test kit was used 30 times to examine spiked antibiotics at the limits of detection (LODs) and all produced positive results, indicating high sensitivity. The LODs for the assay ranged from 4-20 ng/mL for beta-lactams, 25-50 ng/mL for sulfonamides, 20-100 ng/mL for tetracyclines, and 30-80 ng/mL for quinolones, and there were no false negative reactions at above these LODs. In addition, all of the LODs of the developed kit were correlated with high-performance liquid chromatography (HPLC) data. Our lateral flow immunoassay kit can simultaneously detect antibiotic residues from a large number of fish samples rapidly, strengthening the safety of domestic farmed and imported fish.

Key words: Lateral flow immunoassay, Beta-lactams, Sulfonamides, Tetracyclines, Quinolones

## 서 론

항생제는 인간뿐만 아니라 축산 및 수산업 분야에서도 널리 사용되고 있으며, 특히 수산용 동물용 의약품은 어류의 질병치료나 예방의 목적으로 이용되고 있다(Balizs et al., 1994; Boison et al., 1995; Gehring et al., 1996). 우리나라는 수산용 동물용 의약품으로 약 20종이 동물약품협회에 등록되어 사용되고 있으며, 그 중에 테트라싸이클린계(tetracyclines) 항생제가 약 70% 가량 차지하고 있고, 다음으로 베타-락탐계(beta-lactams) 및 퀴놀론계(quinolones), 나머지는 마크로라이드계(macrolides), 설폰아미드계(sulfonamides) 항생제 등이 소량 판매되고 있다.

http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0158

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Licens (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/)which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Korean J Fish Aquat Sci 48(2) 158-167, April 2015**

**Received** 5 November 2014; **Revised** 1 March 2015; **Accepted** 30 March 2015

***Corresponding author:** Tel: +82. 51. 720. 2621 Fax: +82. 51. 720. 2619

E-mail address: mirajo@korea.kr

이러한 항생제를 일부 양식장에서 오·남용하게 되면 식품으로 전이되어 이것을 사람이 섭취할 경우 인체에 축적되어 항생제에 대한 내성이 생기거나 만성중독증을 일으키는 등 여러 가지 문제를 일으킬 수 있다(Heo et al., 1992; Martinez, 2009). 그러므로 미국을 비롯한 여러 나라에서는 동물용 항생제에 대하여 최대잔류허용기준을 설정하여 관리하고 있고(FDA, 2009; EMEA, 2001) 우리나라도 역시 식품 중 잔류허용기준을 설정하여 규제하고 있다(KFDA, 2013a). 따라서 안전한 수산물 관리를 위하여 이들 항생제의 신속, 정확한 분석방법 개발이 필요하다.

수산물 내 항생제 잔류에 대한 신속분석법 개발과 사용 항생제의 정성 및 정량 모니터링은 수산물 안전관리차원에서 매우 중요하다. 현재까지 가장 일반적인 항생제 잔류검사 방법으로는 간이시험법으로 *Micrococcus luteaus*, *Bacillus subtilis, B. stearothemophilus, Escherichia coli*와 같은 미생물의 발육저하 특성을 이용한 미생물학적 검사법이다(Nouws et al., 1999; Pikkenmaat et al., 2009). 이 방법은 여러 항생제를 동시에 검출할 수 있으며 경제적이나 검출감도가 낮으며 검사체 내에 함유된 미생물 억제물질에 의한 비특이적인 양성반응이 나타날 뿐만 아니라 분석시간이 많이 분석 소요시간이 긴 단점이 있다. 이와 같은 단점을 보완하기 개발된 방사선 동위원소를 이용한 radioimmunoassay는 1 μg/kg 이하까지 측정이 가능한 방법이지만 방사선 동위원소를 취급해야 하는 어려움이 있다(Faraj and Ali, 1981; Meyer et al., 2000; Al-Mazeedi et al., 2010). 최근 들어 항생제의 정량분석을 위하여 검출감도나 특이성이 높은 HPLC 및 LC-MS를 이용한 기기분석법이 널리 사용되고 있으나, 이 방법 역시 고가의 분석장비가 필요하며 시료 전처리 시간이 많이 소요되어 여러 계열의 항생제를 동시에 신속하게 분석하는데 이 또한 어려움이 있다(Ueno and Aoki, 1996; Furusawa, 1999; McDonald et al., 2009). 따라서 식품 내 잔류하는 항생제를 신속하며 정확한 분석기법의 개발이 필요하게 되었다. 그 대표적인 분석기법이 항원-항체반응 원리를 이용한 면역분석법이며 다량의 시료를 신속하고 정확하게 분석할 수 있다. 면역분석법으로는 ELISA (enzyme- linked immunosorbent assay), LFIA (lateral flow immunoassay) 등이 있다(Franek et al., 1999; Duan and Yuan, 2001; Douglas et al., 2012, O'Keeffe et al., 2003). 이들 방법은 감도가 매우 좋고 간편하며 신속하게 적은 비용으로 결과를 도출할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 또한 항원-항체의 특이적 선택성이 매우 우수하여 분석에 방해되는 물질을 제거하기 위한 전처리 과정이 많이 필요하지 않다. 특히, LFIA방법은 ELISA방법보다 전처리 시간과 간편성이 매우 뛰어나서 누구라도 쉽게 결과를 판별할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 이미 개발된 LFIA방법의 높은 신속성, 고 검출감도, 그리고 경제성에도 불구하고 단일 항생제나 단일 계열의 항생제만 검출할 수 있는 한계를 갖고 있다. 이는 LFIA방법의 장점을 토대한 다종 항생제 분석 기법의 개발이 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 수산물 내 4 계열 잔류항생물질을 동시에 스크리닝 할 수 있는 항원-항체 반응을 이용한 lateral flow immunoassay kit를 개발하였다. 4 계열의 항체는 토끼에 면역하여 개발되었으며 그 항체들은 colloidal gold와의 최적 결합조건을 확인하였다. 다종항생제 분석을 위하여, kit는 한 strip에 항생제를 2 계열씩 구성하여 총 4 계열이 분석 가능하도록 디자인하였다. 개발된 kit는 어류를 대상으로 다종 항생제에 대한 검출감도를 확인하였으며 HPLC 결과와 비교 분석하였다. 마지막으로 개발된 kit가 실제로 양식어류에 대한 다종 항생제 검출기법으로 적용 가능할지 논의하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기구

Bovine Serum Albumin (BSA), Sephadex G-25, Keyhole limpet hemocyanin (KLH), sulfanilamide, oxytetracycline hydrochloride, norfloxacin, ovalbumin, Freund's adjuvant complete (FAC), Freund's adjuvant incomplete (FAIC) 및 gold chloride trihydrate는 Sigma (St. Louis, USA)사에서 구입하였고, EDC (1-ethyl-3-(-3-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride), DCC (dicyclohexylcarbodiimide) 및 NHS (N-hydroxysuccinimide)는 Thermofisher (Rockford, IL USA)사를 사용하였다. Protein G sepharose 4 Fast Flow는 GE Healthcare (Uppsala, Sweden)사 및 BCA (Bicinchoninic acid) kit는 Pierce (Rockford, USA)사를 사용하였다. 그 외 실험에 사용한 시약은 Sigma사에서 ACS 등급으로 구입하여 사용하였다.

항원-항체 반응 및 합성에 사용한 UV spectrophotometer는 Shimadzu (Tokyo, Japan)사로 측정하였고, WELLWASH 4MK 2 Washer를 사용한 ELISA는 Thermo Electron (Shanghai, China)사 및 microplate 리더기는 Zenyth 3100 리더기 (Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria)를 사용하였다. 또한, 항생제 검출 kit 리더기는 Medexx (Bundang, Korea)사로부터 제공받아서 사용하였으며, 어류에 잔류하는 항생제를 정량하기 위해 사용한 HPLC system은 Thermo surveyor (Thermo Electron, San Jose, CA, USA)로 분석하였다.

### 면역항원합성

항체개발을 위하여 각 계열의 항생제에 대한 항원을 Fig. 1과 같이 준비하였다.

Beta-lactam 항원은 beta-lactam 계열의 공통된 부분인 beta-lactam ring부분을 포함한 hapten을 합성하였다. 합성된 20 mg의 hapten과 10 mg EDC를 넣고 실온에서 1시간 반응 시킨 후 10 mg BSA를 첨가하여 실온에서 60분간 반응 시켰다. Sephadex G-25 column을 이용하여 hapten-BSA conjugate를 정제한

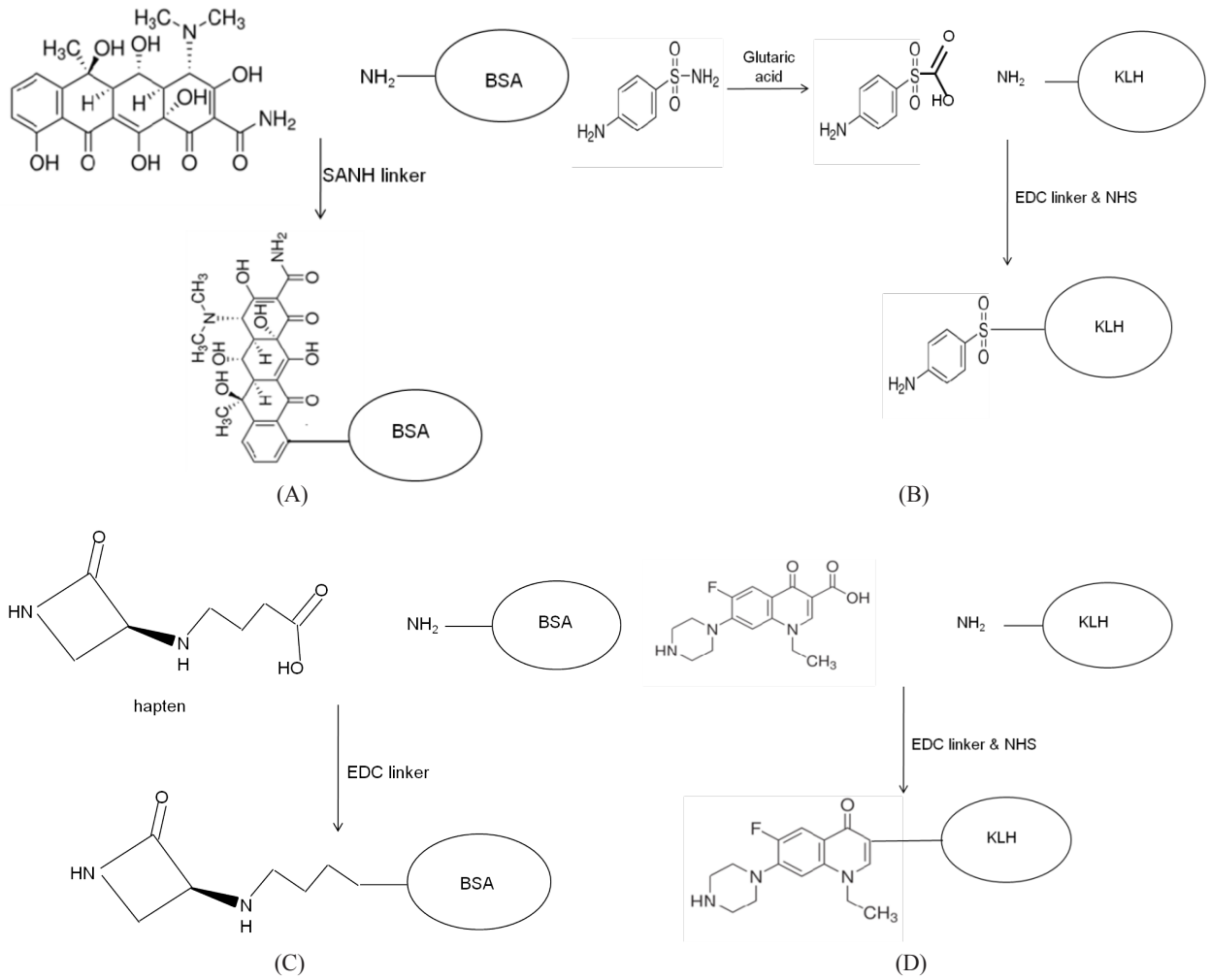



Fig. 1. Conjugation of hapten and carrier protein. A, Oxytetracycline-BSA conjugate; B, Sulfanilamide- KLH conjugate; C, Beta-lactam-BSA conjugate; D, Norfloxacin- KLH conjugate.

후 BCA assay kit를 이용하여 단백질 정량 후 beta-lactam계열 항생제의 항체개발을 위한 항원으로 사용하였다.

Sulfonamide 항원은 sulfanilamide 항생제의 amine기를 glutaric acid를 이용하여 carboxyl residue로 변형시킨 후 KLH carrier protein과 결합시켜 항원으로 사용하였다. 그 다음 20 mg sulfanilamide-GA와 10 mg DCC 그리고 5 mg NHS를 넣고 실온에서 1시간 반응시킨 후, 10 mg KLH를 첨가하여 실온에서 60분간 반응시켰다. SephadexG-25 column을 이용하여 sulfanilamide-KLH conjugate를 분리하고 BCA assay kit를 이용하여 단백질 정량 후 sulfonamide계열 항체개발을 위한 항원으로 사용하였다.

Tetracycline 항원은 carrier 단백질 1분자당 결합하는 항생제 ratio를 높이기 위해서 항생제와 carrier 단백질의 molar ratio를 20:1로 하여 결합시켰다. 50 mg oxytetracycline과 SANH 5 mg을 50 mM carbonate buffer (pH 9.2)에 녹여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 10 mg BSA를 첨가하여 실온에서 120분 반응시켰다. Sephadex G-25 column을 이용하여 oxytetracycline-BSA conjugate를 분리하고 BCA assay kit를 이용하여 단백질 정량 후 tetracycline계열 항체개발을 위한 항원으로 사용하였다.

Quinolone 항원은 norfloxacin-BSA 결합체를 Preston (1986)의 방법으로 변형하여 준비하였다. 10 mg EDC, 5 mg NHS 그리고 20 mg KLH를 20 mM PBS에 잘 녹인 후, 실온에서 60분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 gel-filtration column를 이용하여 activated KLH를 순수 분리하고, activated KLH와 동량의 norfloxacin을 잘 혼합하여 실온에서 2시간 반응시킨 다음 gel-filtration column을 이용하여 norfloxacin-KLH conjugate를 분리하였다. 이를 BCA assay kit를 이용하여 단백질 정량 후 quinolone계열 항생제의 항체개발을 위한 항원으로 사용하였다.

## 항체생산 및 역가 확인

토끼(New zealand white rabbit)에서 항체개발을 위해 Liu (1981)가 실시한 방법을 응용하여 면역하였다. 4종류의 제조된 항원 conjugate의 각 400 μL (1 mg/mL)와 면역보조제인 Freund's Adjuvant Complete (FAC)를 1:1로 섞어 토끼 피하에 1차 접종하였다. 2주 후 Freund's Adjuvant Incomplete (FAIC) 면역보조제와 섞어 추가 접종하고, 2주 간격으로 8차 동안 면역을 실시하였으며 면역을 실시할 때 토끼의 혈청을 얻었다. 4종류의 각 항생제에 대한 특이항체를 확인하기 위해서 96-well microplate에 carrier 단백질로서 KLH을 결합시킨 beta-lactam-KLH, BSA를 결합시킨 sulfonamide-BSA, neutravidin (NAV)을 결합시킨 oxytetracycline-NAV, Ovalbumin (OVA)을 결합시킨 norfloxacin-OVA를 well당 10 μg/mL로 코팅한 후 하룻밤 동안 정치시켰다. Skim milk 용액으로 블록킹 한 후, 확보된 혈청을 희석하여 37℃ 에서 1시간 반응시켰다. 세척용액(PBS)으로 3번 세척하고, Goat anti-rabbit IgG:HRP를 반응시킨 후 substrate로 발색시켜 450 nm에서 판독하여 역가를 확인하였다.

항혈청 정제를 위하여 항혈청을 binding buffer로 5배 희석한 후, 0.45 μm syringe filter로 여과하였다. 준비된 항혈청을 binding buffer로 평형화된 Protein G Sepharose 4 Fast Flow column에 적용하였다. Washing buffer로 충분히 column을 세척한 후, 결합된 immunoglobulin을 elution buffer를 이용하여 용출하였다. 용출한 immunoglobulin을 20 mM phosphate buffer (pH 7.2)로 투석한 후 다음 사용할 때까지 -80℃에 보관하였다.

## 콜로이드 금 결합체 생산

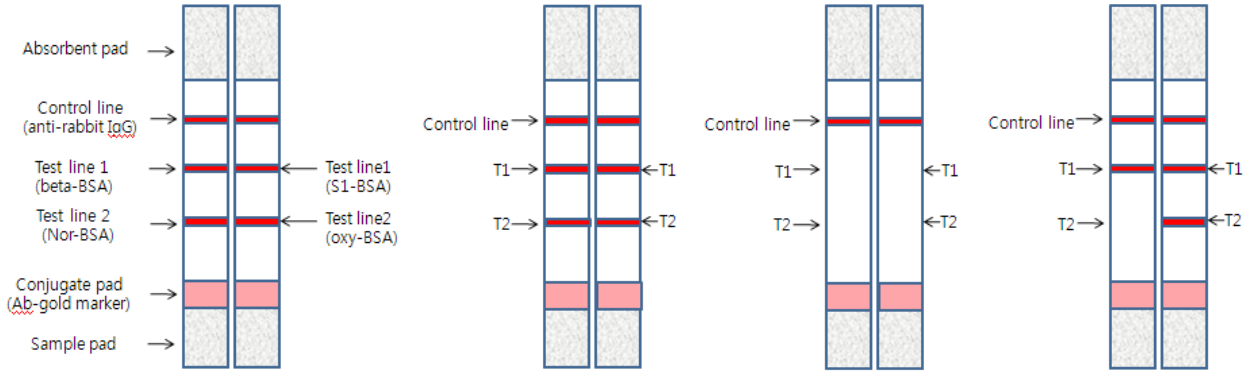
Colloidal gold (콜로이드 금)의 제조는 Hayat (1989)의 방법에 따라 제조하였다. $HAuCl_4$를 3차 증류수에 1% 농도가 되게 잘 녹인 후, 0.22 μm 필터로 여과하였다. 3차 증류수 100 mL을 깨끗하게 세척된 삼각플라스크에 넣고 교반하면서 끓였다. 플라스크의 물이 끓으면 최종 농도가 0.01%가 되게 $HAuCl_4$ 용액을 첨가하고 10분 동안 수증기가 증발하지 않게 끓였다. 1% sodium citrate 2 mL을 첨가하여 무색→보라색→붉은색으로 색변화를 관찰 후 5분 더 끓인 후 colloidal gold 입자크기와 균질성을 전자현미경 사진으로 확인하였다. 항체와 40 nm colloidal gold 입자를 Frens (1973)의 방법을 이용하여 결합하였다.

## 항체와 콜로이드 금과의 결합 최적화

Colloidal gold의 용액을 0.1 M $K_2CO_3$를 이용하여 pH 9.0으로 맞춘 후 각 tube에 1 mL씩 분주하고 정제된 각 4계열 항생제에 대한 특이적 IgG를 3 mg/mL의 농도가 되도록 2 mM borate buffer에 녹였다. 항체용액을 colloidal gold에 0, 10, 20-150 μL씩 넣고 2 mM borate buffer로 모든 tube를 1.15 mL로 맞춘 후 5분간 실온에 반응시켰다. 반응이 끝난 tube에 10% NaCl 50 μL씩을 넣고 vortex하고 1분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 colloidal gold를 안정화시키는 항체의 양을 측정하였다. 최적 항체의 양이 결정되면 pH 9.0으로 맞춘 100 mL colloidal gold 용액을 빠르게 교반시키면서 10% 많은 양의 항체를 첨가한 후 실온에서 1시간 동안 교반시킨 후 최종 1%가 되게 10% BSA blocking 용액 10 mL을 첨가하여 1시간 더 반응시켰다. 반응이 끝난 후 10,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 다시 2 mM borate buffer (pH 7.2)로 antibody-gold conjugate를 세척하는 과정을 3회 반복 하고 최종 원심분리 후 2 mM borate buffer (contained 1% BSA; pH 7.2)로 초기 colloidal gold의 1/10 volume을 첨가하여 재 혼탁 시켜 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

## 멤버레인 코팅

Beta-lactams과 quinolones을 1 strip에 구성하였고 tetracyclines과 sulfonamides를 1 strip으로 구성하여 Table 1과 같이 준비하여 membrane에 분주하여 코팅하고 37℃에서 2시간 동




T1: beta-lactam/sulfonamide
T2: quinoline/tetracyclines

T1:-/-
T2: -/-

T1:+/+
T2:+/+

T1:-/-
T2:+/-

Fig. 2. Principles of strip design for Combo kit.

Table 1. LOD values obtained with lateral flow assay kit and cross-reactivity in each group and sensitivity

| Kit | Antibiotic | Cross-reactivity | Sensitivity | | LOD[1] | MRL |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | (%) | Ratio (AVE) | % | | |
| Beta-lactams | Amoxicillin | 20 | 1.32 | 100 | 20 | 50 |
| | Ampicillin | 100 | 1.63 | | 4 | 50 |
| | Penicillin G | 33 | 1.58 | | 12 | - |
| Sulfonamides | Sulfathiazole | 50 | 1.57 | 100 | 40 | Sum 100 |
| | Sulfamethoxypyridazine | 80 | 2.42 | | 25 | |
| | Sulfamethoxazole | 80 | 1.94 | | 25 | |
| | Sulfamonomethoxine | 40 | 1.61 | | 50 | |
| | Sulfachlorpyrazine | 40 | 1.26 | | 50 | |
| | Sulfadimethoxine | 40 | 1.45 | | 50 | |
| | Sulfadiazine | 40 | 1.6 | | 50 | |
| | Sulfamerazine | 40 | 1.71 | | 50 | |
| | Sulfadoxine | 40 | 1.79 | | 50 | |
| | Sulfapenazole | 80 | 2.24 | | 25 | |
| Quinolones | Norfloxacin | 100 | 1.48 | 100 | 30 | ND |
| | Enrofloxacin | 60 | 1.47 | | 50 | Ciprofloxacin Sum 100 |
| | Oxolinic acid | 38 | 1.45 | | 80 | 100 |
| | Ciprofloxacin | 42.8 | 1.54 | | 70 | - |
| | Pefloxacin | 100 | 1.38 | | 30 | ND |
| Tetracyclines | Tetracycline | 50 | 1.88 | 100 | 40 | 200 |
| | Oxytetracycline | 100 | 1.74 | | 20 | 200 |
| | Chlortetracycline | 20 | 1.69 | | 100 | 200 |
| | Doxycycline | 50 | 1.55 | | 40 | - |

[1]LOD, limit of detection (μg/kg); AVE, averages of 30 times repeat; MRL, maximum of residue limits; ND, Not detected.

안 건조시킨 후 사용하였다.

### Kit 제작

Sample pad, gold pad, membrane 및 absorbent pad (SM-18150, 4×30 cm, Millipore)를 오른쪽부터 왼쪽으로 차례대로 서로 중첩하였으며 총 길이는 60.8 mm가 되게 하여 플라스틱 카드(Adhesive card)에 조립하였다. Sample pad (2×30 cm)는 sample pad buffer (5 mL 20×PBS, 5 mL 10% BSA, 2.5 mL 10% tween 20, 37.5 mL water) 50 mL로 처리한 후 37℃에서 건조시켜 제습상태로 보관하고 사용하였다. 이렇게 조립된 것을 cutter기로 4 mm 되게 정확하게 세절하여 strip을 제작하였다. 각각의 strip을 kit device 하판에 넣고 상판을 압착기를 이용하여 눌러 시제품 kit를 조립하였다.

### Kit 평가

Beta-lactams, quinolones, tetracyclines 그리고 sulfonamides 항생제의 검출한계(limit of detection)를 결정하였다. 각 항생제의 농도 별 표준용액을 반응시킨 kit를 antibiotic detection kit 리더기를 이용하여 결과를 판독하였다. 결과 판독기는 ratio값이 1 이상일 때 양성으로 결과가 나오게 되고 1 미만일 때는 음성으로 결과가 나오게 된다.

민감도 테스트를 위해 음성 넙치 근육 1 g을 추출용액을 이용하여 균질기에 균질화하였다. 균질화한 시료를 microtube에 넣고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액에 각 계열의 검출한계 농도의 항생제를 spiking하여 30번 반복 실험하여 양성결과가 나오는 정도를 확인하였다.

개발한 각 계열 특이적 항체의 그룹내 항생제와의 교차반응 정도를 McCaughey (1990) 법을 토대로 하여 평가하였다. 교차반응값은 아래의 계산방법에 의해 얻었다.

Cross-reactivity (%) = $IC_{50}$ value of antibiotics/ $IC_{50}$ value of other compound × 100

### 어류에 대한 항생제 경구투여

질병에 감염되지 않고 항생물질 투여치료를 받은 적이 없는 건강한 넙치(Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, 500±50 g)를 각각 원형수조(지름 150 cm×높이 75 cm)에 넣어서 사용

하였다. 실험어는 각각 무게를 달고 수조에 10일간 순치시켰으며, 실험 전날에는 사료를 주지 않았다.

항생제 혼합사료는 일반 사료를 가루로 만들어 물과 함께 반죽한 다음 oxytetracycline은 어체중 당 200 mg/kg body weight, amoxicillin은 80 mg/kg body weight, sulfadimethoxine은 10 mg/kg body weight 및 oxolinic acid는 60 mg/kg·body weight를 계산하여 그 속에 넣었다. 항생제 투여용량은 실제로 양식장에서 과량 투여를 하는 경우를 감안하여 제조사의 권고용량과 이미 보고되어진 용량(Treves-Brown, 2000; Jung et al., 2008; Son et al., 2011)보다 높은 농도로 정하였다. 이와 같이 만들어진 사료는 -30℃이하에서 보관하였고, 일주일 이내에 사용하였다.

어류의 항생제 사료 투여를 위하여 원형수조에서 각 실험어를 마취시킨 후 핀셋을 이용하여 사료를 강제적으로 위까지 밀어 넣었다. 투여된 실험어는 다시 원형수조로 옮겨서 토해내는지의 여부와 마취에서 완전히 깨어나는지에 대해 확인한 후 임하였다.

경구투여한 넙치는 체내의 항생제 잔류량을 파악하기 위하여 24, 72시간 경과 후에 실험실로 가져와서 즉살시킨 후 근육만을 채취하여 잔류 농도 변화를 HPLC로 측정하였다. 채취한 근육은 균질기에 균질화시킨 후 전처리 실험 전까지 -20℃이하에 보관하였다.

### 어류시료에 대한 kit와 HPLC 비교

어류시료를 개발한 kit로 분석하기 위해 다음과 같이 전처리하여 분석하였다. 균질화된 넙치시료 1 g을 정밀히 취하여 추출용액 5 mL을 가하고 homogenizer로 6,000 rpm에서 3분간 균질화시켰다. 이 균질액을 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하고 40℃ heating block에 올려놓은 lateral flow assay kit의 시료 점적 부위에 120 μL 점적 후 cover를 닫고 10분간 반응시켰다. 반응이 완료된 kit를 리더기에 삽입하여 결과를 분석하였다.

어류시료에 대한 정량분석은 HPLC를 이용하여 tetracyclines, sulfonamides, beta-lactams 및 quinolones을 Korean Food Code (2013) 방법에 따라 아래와 같이 실시하였다.

Tetracyclines 계열은 어류시료에 EDTA가 함유된 trichloroacetic acid (TCA)을 가하여 균질화한 후 원심분리하고 여기에 hexane을 가해 추출하여 농축한 다음 Sep-pak $C_{18}$ 카트리지에 흘려 흡착 및 용출시켜 HPLC로 분석하였다. Beta-lactam 계열 시료 중의 amoxicillin과 ampicillin을 물로 추출하여 TCA로 불순물을 침전시키고 diethyl ether로 추출한 다음 유도체화하여 HPLC로 분석하였다. Sulfonamide 계열은 어류시료 중 잔류하는 sulfonamide계를 acetonitrile로 추출한 후 $C_{18}$ 충진제로 정제하여 HPLC로 분석하였다. Quinolone계열 어류시료에 TCA 용액을 가한 후 acetonitrile로 추출하고 액-액 분배하여 LC-MS/MS로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 항체생산

4 계열 항생제의 항원을 결합시켜 토끼에 2주 간격으로 면역하여 8차까지 면역하였다. 2차 면역시부터 귀정맥으로부터 채혈한 혈청을 1,000배부터 2진희석(2-fold dilution)법으로 256,000배까지 희석하여 역가를 확인한 결과 4 계열의 항체모두 최소 7차 이상을 면역시켜야만 최대역가를 갖는 항혈청을 얻을 수 있었다(자료미제시). 이는 일반적으로 분자량이 큰 항원에 비해 더 많은 면역횟수와 시간이 필요하다는 것을 알 수 있었다. 따라서 Fig. 3은 8차까지 면역시킨 다음 2주 후에 심장 전 채혈을 통해 항혈청을 확보하였을 시 최적 역가가 나타남을 보여주었다.

### 항체와 콜로이드 금의 결합

Colloidal gold는 40 nm의 입자크기가 일반적으로 colloidal gold probe의 생산에 사용되고 있어서 본 연구에서도 40 nm의 크기를 선택하였고, 그 균질성을 Fig. 4와 같이 전자현미경 사진으로 확인한 후 사용하였다. Chandler et al. (2000)도 IgG 결합체 제작 시, 최소한의 입체장애를 일으키는 입자크기가 40 nm 크기로 가장 양호하다고 보고하였다. 4 계열의 항체와 colloidal gold 입자에 결합 시킬 최적 항체량을 결정하기 위해 salt titration을 실시하였다. 항체를 농도별로 첨가하여 반응시킨 후 10% NaCl을 첨가했을 때 색깔 변화가 없는 최소 항체량을 결정하였다. Beta-lactam 항체는 gold 1 mL 당 5 μg, quinolone 항체는 7.5 μg, sulfonamide 항체는 7.5 μg 그리고 tetracycline 항체는 10 μg을 첨가하여 결합시켜야 안정된 antibody-gold 결합체를 얻을 수 있었다.

최적화한 항체의 양을 gold 입자에 붙여 antibody-gold 결합체의 활성을 dip-stick 형태의 kit를 제작하여 음성으로 추출버

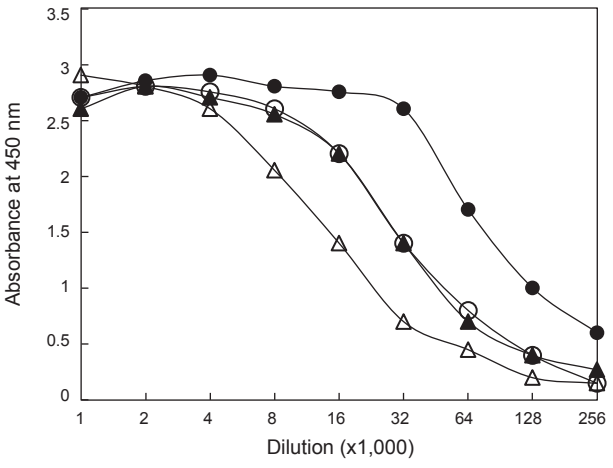



Fig. 3. Maximum titration of anti-serum by ELISA ($8^{th}$). △, Tetracyclines; ●, Sulfonamides; ○, Quinolones; ▲, Beta-lactams.

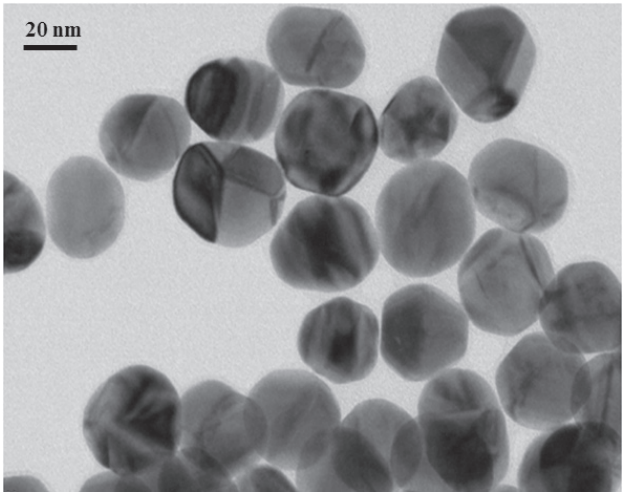



Fig. 4. Colloidal gold observed by transmission electron microscope. The diameter of those particles was calculated with 35-40 nm.

퍼 그리고 각 계열의 대표적인 항생제의 2 농도를 적용하여 테스트 라인의 밴드 진하기를 확인하였다. 4 종류의 antibody-gold 모두 항생제의 농도가 증가할수록 밴드가 약해지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

## Kit 제작 및 평가

4계열 항생제의 동시 검사 kit를 디자인하기 위해서 2개의 strip에 각 2계열의 항생제 검출 결과를 얻을 수 있는 strip을 한 디바이스에 구성하는 것으로 디자인 하였다. Beta-lactam과 quinolone 계열을 한 strip에 구성하였고 sulfonamides와 tetracyclines을 다른 한 strip에 구성하였다. 샘플 패드, 결합체 패드, 멤버레인을 각각의 최적화된 조건으로 전처리 한 후 각 패드가 서로 겹쳐지도록 조립하여 4 mm로 strip을 절단하고 kit 디바이스에 넣어 Fig. 6과 같이 kit를 제작하였다. 대부분 이전의 보고서(Kandimalla et al., 2007, 2008; Zhu et al., 2008; ; Le et al., 2011; Douglas et al., 2012)들은 1 개 또는 한 계열의 항생제로 strip을 제조하여 분석하였고, 동시에 여러 항생제를 검출하지 못하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 kit는 간편하면서도 다른 4 계열의 항생제를 동시에 분석할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

이렇게 제작된 kit에 beta-lactams, quinolones, tetracyclines 그리고 sulfonamides 항생제의 농도별 표준용액을 반응시켜 100% 양성으로 판독 가능한 농도를 검출한계(LOD, Limit of Detection)로 결정하였고, 반응시킨 kit는 리더기를 이용하여 결과를 판독하였다. 리더기의 결과는 ratio값이 1 이상일 때 positive, 1 미만일 때는 negative의 결과가 나오게 되며, 같은 농도를 10번 반복실험하여 평균 ratio값을 얻은 결과를 Table 2에 나타내었다.

각 계열 항생제의 최대잔류허용기준(MRL)은 tetracyclines은 200 μg/kg, sulfonamides은 100 μg/kg, beta-lactams은 50 μg/kg, quinolones는 100 μg/kg으로 검출한계 이하까지 검출이 가능하였다. 또한, 정제한 각 계열-특이적 항체와 그룹내 항생제 간의 교차반응 정도를 확인한 결과, beta-lactams 항체는 amoxicillin, ampicillin 그리고 penicillin G와 20-100%, quinolines 항체는 enrofloxacin을 포함한 5개의 quinolones 항생제에 대해 38-100%, sulfonamides 항체는 sulfathiazole 을 포함한 15종의 항생제와 10-80% 그리고 tetracyclines 항체는 oxytetracycline을 포함한 4종의 항생제와 20-100%의 교차반응이 있는 항생제 그룹 특이적 항체임을 확인할 수 있었다. 또한 각 개발 kit의 민감도를 확인하기 위해 음성 시료를 전처리하여 kit 검출한계

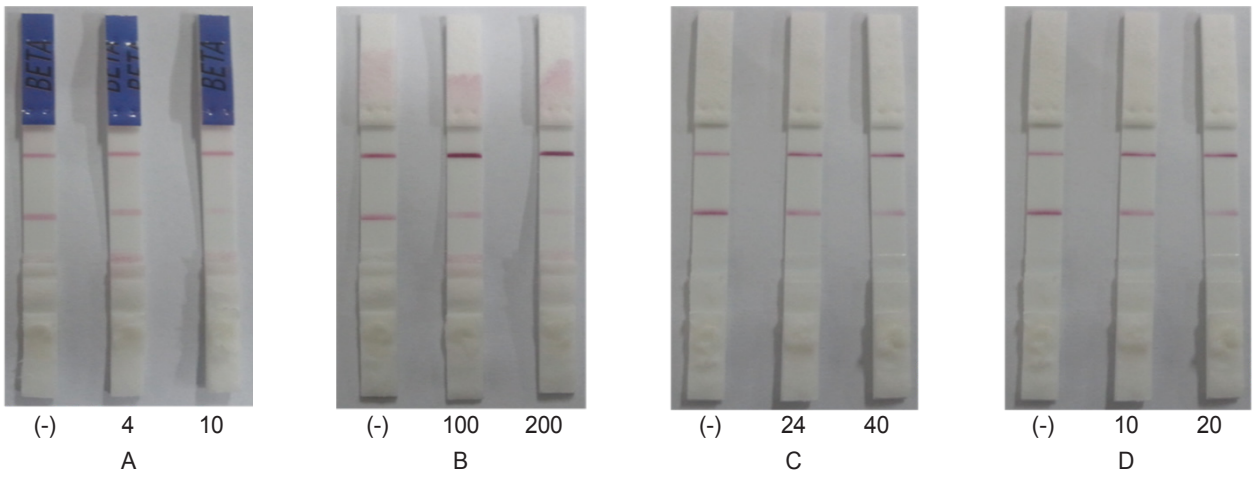



Fig. 5. The strip test for the detection of 4 antibiotics. A, beta-Lactam kit, amipicillin 4, 10 ng/mL; B, Sulfonamide kit, sulfadimethoxine 100, 200 ng/mL; C, Tetracyclins kit, oxytetracycline 20, 40 ng/mL; D, Quinolone kit, Norfloxacine 10, 20 ng/mL.

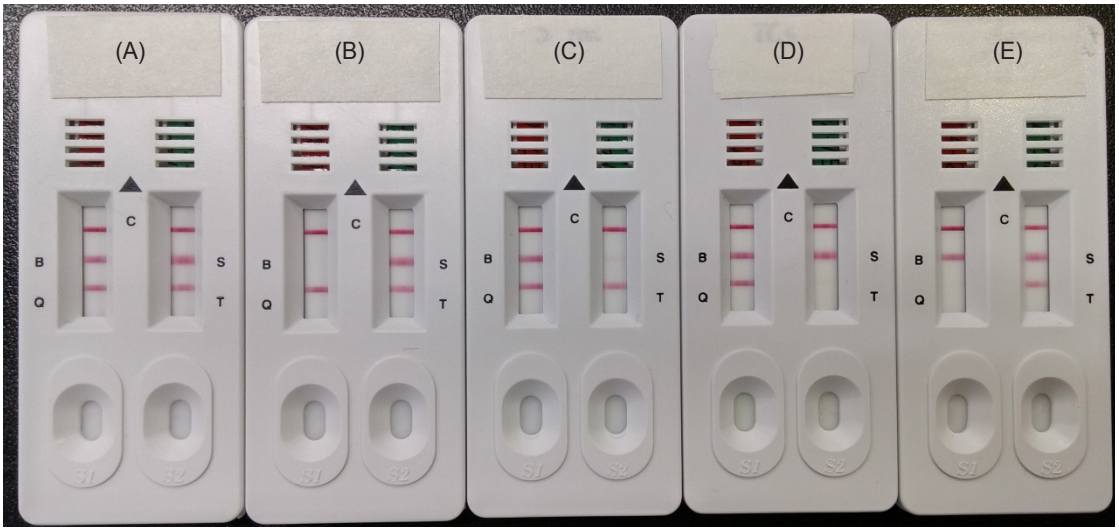



Fig. 6. Lateral flow immunoassay of fish samples. A, (-) Control sample; B, (+) Beta-lactams; C, (+) Sulfonamides; D, (+) Tetracyclines; E, (+) Quinolones.

Table 2. Concentration of antibiotics detected in feed samples. Comparison of results obtained by lateral flow assay kit and HPLC

| Sample | Oxytetracycline | | Sulfadimethoxine | | Amoxicillin | | Oxolinic acid | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | HPLC | Kit P/N | HPLC | Kit P/N | HPLC | Kit P/N | HPLC | Kit P/N |
| Control | 0.0 | N | 0.0 | N | 0.0 | N | 0.0 | N |
| After 24 h | | | | | | | | |
| 1 | 0.104 | P | 4.901 | P | 0.253 | P | 0.164 | P |
| 2 | 0.343 | P | 6.289 | P | 0.319 | P | 0.504 | P |
| 3 | 0.148 | P | 3.845 | P | 0.178 | P | 0.240 | P |
| 4 | 0.248 | P | 6.288 | P | 0.291 | P | 0.164 | P |
| 5 | 0.079 | P | 8.245 | P | 0.704 | P | 0.148 | P |
| 6 | 0.048 | P | 0.555 | P | 0.197 | P | 0.156 | P |
| After 72 h | | | | | | | | |
| 7 | 0.018 | N | 0.035 | N | 0.017 | N | 0.052 | N |
| 8 | 0.017 | N | 0.020 | N | 0.039 | P | 0.030 | N |
| 9 | 0.018 | N | 0.025 | N | 0.015 | N | 0.032 | N |
| 10 | 0.014 | N | 0.030 | N | 0.028 | P | 0.012 | N |

P/N, positive or negative.

농도의 항생제를 spiking하여 30번 반복 실험하여 양성결과가 나오는 정도를 확인하였다. Tetracyclines, sulfonamides, beta-lactam 및 quinolones kit 모두 검출한계 농도를 100% 양성으로 검출할 수 있었다(Table 1).

Jeon et al. (2008) 및 Chafer-Pericas et al. (2011)은 ELISA의 방법으로 항생제를 검출하였으며, 이 ELISA방법들은 세미정량을 할 수 있는 장점을 가지고 있으나, 하나의 특정 항생제를 검출하기 위한 방법이며 같은 계열의 항생제에 대한 반응은 아주 낮은 값(<10%)들은 갖는다(Zhang et al., 2007; Jeon et al., 2008). O'Keeffe et al. (2003)도 sulphamethazine 항생제를 단독 kit로 제작하여 urine 시료를 스크리닝한 결과 cross-reactivity가 sulphamethazine만 100%이었고, 나머지 14종 sulfonamide계는 <59%이하였다. 반면 Zhu et al. (2008)은 12 fluoroquinolone계열 항생제를 strip test를 한 결과, cross-reactivity와 검출한계(Limits of detection)가 각각 >50% 및 >5 ng/mL (fluoroquinolone계열 중의 pefloxicin)으로 본 연구와 항생

제 종류는 다르지만, 결과는 유사하였다.

Duan and Yuan (2001)는 ciprofloxacin를 ELISA 방법으로 분석하였고 Zhu et al. (2008)은 quinolones 항생제를 immunochromatography strip으로 분석하였다. 이들 보고된 방법들은 MRL 수준 이하까지 잔류항생물질을 검출할 수 있었으나 하나의 특정 항생제나 한 계열의 항생제를 검출한 방법이며 가축이나 우유에 잔류하는 항생물질을 검출하였다.

본 연구에서 개발한 strip kit 방법은 정확한 정량분석은 할 수 없지만, 동일한 계열의 여러 항생제들을 최대잔류허용량(MRL) 이하의 농도까지 검출함으로써 분석시간을 단축시키고 빠른 결과를 얻을 수 있다는 것이 중요하다.

### Kit와 HPLC의 비교

4종류의 항생물질을 투여한 넙치 시료에서 HPLC를 이용하여 잔류항생물질을 정량분석하고 lateral flow assay를 이용한 kit에 대한 검출 결과를 Table 2와 같이 비교 분석하였다.

항생제 사료가 투여된 어류시료를 HPLC로 이용한 정량분석 결과, oxytetracycline은 0.079-0.348 mg/kg, sulfadimethoxine은 0.555-8.245 mg/kg, amoxicillin은 0.178-0.704 mg/kg 그리고 oxolinic acid은 0.148-0.504 mg/kg로 확인되었다. 개발된 kit에 동일한 시료를 적용하여 비교한 결과, 검출한계 수준보다 높은 값들의 시료는 positive를 나타내었고 그 이하 수준의 값들은 negative로 나타내어 검출한계 이상의 농도에서는 kit와 HPLC의 결과가 양호한 상관성이 있었다. O'Keeffe et al.(2003) 보고에서는 urine 시료에서 sulfonamide계열인 sulphamethazine에 대하여 LC-MS/MS로 비교한 결과 검출한계치(LOD)인 100 ng/mL에 가까운 농도에서 반응을 보였으나, 본 연구에서는 sulphamethazine은 해당되지 않았으나, sulfonamide계열 10종에 대하여 O'Keeffe et al. (2003)보다는 감도(sensitivity)가 좀더 뛰어난 것으로 확인되었다. Zhao et al. (2008)은 enrofloxacin을 먹인 chicken의 muscle에 잔류하는 enrofloxacin을 lateral flow colloidal gold immunoassay strip으로 분석하고 LC-MS의 분석 결과와 비교하였다. 두 분석 방법의 결과 잔류 enrofloxacin의 양이 비슷하게 검출되어 이들 방법의 결과와 상관성이 있는 것으로 나타났다. 따라서 정량을 목적으로 하는 HPLC나 LC-MS/MS 장비로 항생제들을 분석하기 전에 다량의 시료들을 kit를 통하여 스크리닝한 결과값만 축출하여 정량분석한다면 시간적이나 경제적인 측면에서 도움이 될 것으로 사료된다.

이러한 연구결과를 종합해 볼 때 개발된 kit는 어류 시료뿐만 아니라 양식산 수산물에 잔류 가능성이 많은 tetracyclines, sulfonamids, beta-lactmas 및 quinolones 항생제에 대해서도 간편하면서도 신속하게 분석이 가능할 것으로 사료된다. 또한, 향후 최적화된 kit로 개발된다면 양식장 및 시판용 어류에 직접 적용하여 신속하고 저렴하면서도 동시에 많은 양의 시료를 스크리닝이 가능한 kit로서 상용화 될 것으로 기대된다.

## 사 사

본 연구는 국립수산과학원의 지원(RP-2015-FS-002)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## References

Al-Mazeedi HM, Abbas AB, Alomirah HF, Al-Jouhar WY, Al-Mufty SA, Ezzelregal MM and Al-Owaish RA. 2010. Screening for tetracycline residues in food products of animal origin in the state of Kuwait using Charm II radioimmunoassay and LC/MS/MS methods. Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. Food Addit Contam 27, 291-301.

Balizs G, Benesch-Girke L, Borner S and Hewitt SA. 1994. Comparison of the determination of four sulphonamides and their $N^4$-acetyl metabolites in swine muscle tissue using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectral detection. J Chromatogr B 661, 75-84.

Boison JO and Keng LJ. 1995. Determination of sulfadimethoxine and sulfamethazine residues in animal tissues by liquid chromatography and thermospray mass spectrometry. J AOAC Int 78, 651-658.

Chandler J, Gurmin T and Robinson N. 2000.The place of gold in rapid tests. IVD Technol 6, 37-49.

Cháfer-Pericás C, Maquieira Á, Puchades R, Miralles J and Moreno A. 2011. Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS. Food Contl 22, 993-999.

Douglas D, Banaszewski K, Juskelis R, Al-Taher F, Chen Y, Cappozzo J, McRobbie L and Salter RS. 2012. Validation of a rapid lateral flow test for the simultaneous determination of β-lactam drugs and flunixin in raw milk. J Food Prot 75, 1270-1277.

Duan J and Yuan Z. 2001. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. J Agric Food Chem 49, 1087-1089.

EMEA. 2001. Available at:http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/080301en/ -

Faraj BA and Ali FM. 1981. Development and application of a radioimmunoassay for tetracycline. J Pharmacol Exp Ther 217, 10-14.

Franek M, Kolar B, Deng A and Crooks S. 1999. Determination of sulphadimidine residues in milk, plasma, urine and edible tissues by sensitive ELISA. Food Agric Immuno 11, 339-349.

Frens G. 1973. Preparation of gold dispersions of varying particle size: Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspension. Nat Phys Sci 241, 20-22.

Furusawa N. 1999. High-performance liquid chromatographic determination/identification of oxytetracycline and sulphad-

imidine in meat and eggs. Chromatographia 49, 369-373.
Gehring TA, Tushing LG and Churchwell MI. 1996. HPLC determination of sulfadiazine residues in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with confirmation by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. J Agric Food Chem 44, 3164-3169.
Hayat MA. 1989. Colloidal Gold: Principles, Methods and Application. Academic Press, New York, USA, P421.
Heo GJ, Shin KS and Lee MH. 1992. Diseases of aquaculture animals and prevention of drug residues. Kor J Food Hygiene 7, S7-S19.
Jeon M, Kim J, Paeng KJ, Park SW and Paeng IR. 2008. Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk. Microchem J 88, 26-31.
Jung SH, Choi DL, Kim JW, Jo MR, Seo JS and Jee BY. 2008. Pharmacokinetics of oxytetracycline in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by dipping and oral administration. J Fish Patho 21, 107-117.
Kanddkimalla VB, Kandimalla N, Hruska K and Franek M. 2007. Detection of sulfamethazine in water, milk and pig manure by dipstick immunoassay. Veterinarni Medicina 52, 445-450.
Korea Food and Drug Administration. 2013a. Maximum residue levels of levels of veterinary drug in foodstuffs of animal origin. Korea Food Code. Annex Ⅶ. 1-29.
Korea Food and Drug Administration. 2013b. Veterinary drug method in foodstuffs of animal origin. Korea Food Code. Article 9.5, 1-185.
Liu MB, Blackstock R and Hyde RM, 1981. A rapid method to produce anti-gentamicin antibody. J Antibiot 34, 898-901.
Martinez JL, 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environm Pollut 157, 2893-2902.
McCaughey WJ, Elliott CT and Crooks SRH. 1990. Determination of sulphadimidine in animal feedstuffs by an enzyme-linked immunoassay. Food Addit Contam 7, 259-264.
McDonald M, Mannion C and Rafter P. 2009. A confirmatory method for the simultaneous extraction, separation, identification and quantification of tetracycline, sulphonamide, trimethoprim and dapsone residues in muscle by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry according to Commission Decision 2002/657/EC. J Chromatogr A 1216, 8110-8116.
Meyer MT, Bumgarner JE, Varns JL, Daughtridge JV, Thurman EM and Hostetler KA, 2000. Use of radioimmuoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry. Sci Total Environ 248, 181-187.
Nouws JFM, H van Egmond, Loeffen G, Schouten J, Keukens H and Smulders I. 1999. A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels. Internat Dairy J 9, 85-90.
O'Keeffe M, Crabbe P, Salden M, Wichers J, Van Peteghem C, Kohen F, Pieraccini G and Moneti G. 2003. Preliminary evaluation of a lateral flow immunoassay device for screening urine samples for the presence of sulphamethazine. J Immuno Meth 278, 117-126.
Pikkenmaat MG, Rapallini ML, Oostra-van Kijk S and Elferink JWA. 2009. Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routin monitoring sample. Anal Chim Acta 637, 298-304.
Preston JF and Hencin R. 1986. Carbodiimide-mediated conjugation of hippuric acid to concanavalin A: retention of ligand binding and hemagglutinating activities. Biochem Cell Biol 6, 1366-1371.
Son KT, Jo MR, Oh EG, Mok JS, Kwon JY, Lee TS, Song KC, Kim PH and Lee HJ. 2011. Residues of ampicillin and amoxicillin in Olive Flounder Paralichthys olivaceus following oral administration. Kor J Fish Aquat Sci 44, 464-469. http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2011.0464.
Treves-Brown KM. 2000. Applied Fish Pharmacology, Part II. Antibacterial drugs. Chapter 5. Tetracyclines and 8. Sulfonamides.Kluwer Academic Publishers. Boston, London, 64-105.
Ueno R and Aoki T. 1996. High-performance liquid chromatographic method for the rapid and simultaneous determination of sulfamonomethoxine, miloxacin and oxolinic acid in serum and muscle of cultured fish. J Chromatogr B 682, 179-181.
U.S. FDA. 2009. Food and Drug., U.S. FDA code of Federal Regulations. Title 21, Part 556, Washington DC. U.S. 372-389.
Zhang Y, Lu S, Liu W, Zhao C and Xi R. 2007. Preparation of anti-tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk. J Agric Food Chem 55, 211-218.
Zhao Y, Zhang G, Liu Q, Teng M, Yang J and Wang J. 2008. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of enrofloxacin residues. J Agric Food Chem 56, 12138-12142.
Zhu Y, Li L, Wang Z, Chen Y, Zhao Z, Zhu L, Wu X, Wan Y, He F, and Shen J. 2008. Development of an immunochromatography strip for the rapid detection of 12 fluoroquinolones in chicken muscle and liver. J Agric Food Chem 56, 5469-5474.