

축산물 품질향상을 위한 잔류 설파제 검출용 ELISA kit 개발

김우택* · 김성희** · 한 옹** · 김영주*** · 임윤규****

(*제주도 축산진흥원 · **제주대학교 수의학과 대학원생 · ***제주 보건환경연구원 연구사
· ****제주대학교 농과대학 수의학과 교수)

Development of an ELISA kit for the Detection of Residual Sulfonamides in Edible Animal Products

Woo-Taek Kim* · Seong-Hee Kim** · Woong Han** · Yung-Ju Kim*** · Yoon-Kyu Lim****

* Cheju Livestock Institution Promoting Center, Cheju 690-180 Korea

****** Dept. of Veterinary Medicine, Cheju Natl. Univ. Cheju 690-756, Korea

적 요

축산식품에 잔류하는 합성항균제의 신속, 간편한 검출법인 ELISA법을 개발하고자 돼지혈청 중의 잔류 sulfadimethoxine(SDM)을 대상으로 검출법의 제반조건을 조사하였다. 추가적으로, 다양한 설파제 종류를 광범위하게 측정할 수 있는 single ELISA 개발의 가능성을 알아보기 위하여 sulfanilamide(SA)에 대한 항혈청의 작성을 시도하였다.

개발된 SDM에 대한 경쟁적 효소면역측정법(competitive ELISA)의 검출한계는 1.0ppb 이하로 측정되었으며, 회수율은 100ppb 및 500ppb 농도의 SDM을 가하였을 때 110.7%~128.9%의 범위를 나타내었다. SDM 유도체 8종을 사용하여 항SDM 항체의 특이성을 검사한 결과 sulfamonomethoxine 외에는 유의할 만한 교차반응을 보이지 않았다. Sulfamonomethoxine의 EC-50값은 3.5ppm으로 나타났다.

Single ELISA를 위하여, 설파제의 기본적인 구조로 구성되어 있는 SA와 이종단백질간의 접합체를 합성한 후 이에 대한 항혈청을 작성하였다. 경쟁적 ELISA는 SA에 대해서만 0.5ppm의 EC-50값을 보였으며, sulfamethazine, sulfamerazine, sulfadimethoxine, sulfadiazine, sulfaguanidine, sulfamonomethoxine, sulfisoxazol, sulfametoxazol, sulfaquinoxaline, sulfisomidine 등 실험에 사용한 여타의 설파제와 교차반응을 보이지 않았다. 그러므로 single ELISA의 개발을 위해서는 para-amino benzene sulfonamide가 효율적으로 노출된 면역원이 합성되도록 설파제의 선정과 접합방법의 개선을 고려하여야 할 것으로 사료되었다.

1. 서론

다양한 종류의 설파제는 질병예방을 위한 동물의 약품과 사료효율의 향상을 위하여 사료첨가제로 많이 사용되어 왔다. 그러나 치료용 항균물질의 사료첨

가로 인하여 증대되는 가축유래 내성인자 보유 장내 세균의 문제와 항균물질의 부적절한 사용에 의한 축산식품의 잔류문제로 말미암아 그 위험이 새로운 논점으로 부각되고 있으며, 이에 대한 규제가 필요하다고 인식되고 있어, 국가에 따라서는 축산식품 중의 최대허용한계 (Maximum Residue Limit: MRL)와 안

전휴약기간을 설정하여 운용하고 있다⁸⁾.

Sulfadimethoxine (SDM)은 sulfonamide계열의 합성 항균제로서 여러 종류의 병원성 미생물에 대한 항균 작용을 가지며³⁾ 상온에서도 비교적 안정된 화학구조를 가지고 있으므로 동물의 질병 치료 또는 성장촉진의 목적으로 널리 이용되는 등 그 적용 범위가 매우 다양하다^{2,3,10,16)}. 또한 양어에 있어서는 *Edwardsiella ictaluri*에 의한 장폐혈증을 예방하기 위하여 사용되기도 하는데, ormethoprim이나 trimethoprim과 같이 병용하여 세균성 감염의 예방에 사용되기도 한다⁶⁾. 또한 육계의 콕시듐 치료제로 종종 사용되므로 계육에서의 SDM 잔류문제를 일으킬 수 있다고 하였다^{12,22)}.

Sulfadimethoxine의 잔류를 검사하기 위한 방법으로는 최근까지 bioassay⁹⁾가 널리 응용되고 있는데, 비교적 많은 양의 시료를 한꺼번에 검사할 수 있다는 장점이 있으나 결과의 판정에 많은 시간이 소요되고, 다른 항생제가 혼입되어 있을 경우 결과판정에 영향을 줄 수 있을 뿐 아니라 비교적 민감도도 낮은 것으로 보고되어 있다¹⁸⁾. 공정검사법으로서 HPLC법은 높은 민감도를 보이나 비용이 많이 들고, 기기분석시 많은 시간이 소요되며, 제한된 공간에서 실시해야만 한다는 단점이 있어 다량의 시료를 신속히 검사하기에는 부적절하다고 생각된다. 그 외의 방법 중 Radio-immunoassay는 감도가 높고 신속한 검사가 가능한 방법이나, 방사선 동위원소를 사용하는데 대하여 부차적인 위험이 따른다는 단점이 있다. 근래에 microbial receptor assay를 이용한 Charm II test 방법이 개발되어 사용되고 있으나,⁷⁾ 이 검사법은 계열별 검사로서 sulfonamide의 정성분석이 불가능하므로 기기분석을 통한 확인시험이 필요하다.

이에 반하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법은 매우 민감한 검출법으로서 재현성과 특이성이 높으며, 무엇보다도 다량의 시료를 일시에 처리할 수 있다는 장점이 있다¹¹⁾. Ram 등¹⁵⁾은 sulfamethazine 검출을 위한 ELISA 방법을 개발하여 8시간에 2,400건의 혈청시료를 검사할 수 있었다고 보고하였으며, ELISA 방법은 정량도 가능하기 때문에 도축장에서의 잔류물질 screening 방법으로 활용도가 높을 것이라 하였다.

국내의 연구자들에 의해서도 sulfamethazine검출용 ELISA의 개발^{1,4,14)}과 ELISA kit의 품질비교에 대한 연구¹³⁾가 이루어져 있으나 SDM에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

축산식품 중의 합성항균제 잔류를 방지하기 위해서는 기본적으로 위생적인 생산과정이 중요하겠으나, 최종 출하단계에서 도축대상동물 개체별의 잔류검사를 통하여 합성항균제의 잔류를 보이는 동물의 도축을 금지시켜 오염된 식육의 유통을 막는 것이 근원적인 방지책이 될 것이다. 또한, 생축의 상태로 근육내의 잔류물을 직접 측정하기란 현실적으로 곤란하나, 대상동물의 혈액을 채취하여 검사하고 그 결과에 따라 근육내의 잔류량을 추정하는 것은 가능할 것으로 사료된다. 따라서, 본 연구의 목적은 돼지혈액 중의 잔류 SDM을 검출하는 ELISA법을 개발하는 것이며, 이를 이용하여 출하 전 돈육에서의 잔류 SDM을 screening함에 적용이 가능할 것인가를 알아보기 위하여 수행하였다.

한편, ELISA법으로 sulfonamides를 screening할 때 여러종류의 sulfonamides와 교차반응을 보이는 항체를 작성한다면 1회의 검사로 다수의 sulfonamides 잔류를 검출할 수 있는 편리한 single ELISA법의 개발이 가능할 것으로 생각되어, 이러한 목적의 single ELISA 개발을 위한 기초적인 실험도 아울러 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

외관상 건강한 약 8주령의 암컷 토끼(New Zealand White) 2두를 실험 전기간 동안 상수와 사료(미원사슴사료, 미원사료)를 자유로이 급여하였으며, 입고 후 2주간의 검역을 필한 후 SDM 및 SA에 대한 항혈청 생산을 위한 면역실험에 사용하였다.

2. 면역원 및 ELISA plate 흡착용 항원

가. SDM 면역원(SDM-BSA)

SDM을 bovine serum albumin(BSA)에 접합하여

합성하였다. 접합은 Dixon-Holland와 Katz¹⁰⁾의 방법에 의하여 실시하였다. 즉, SDM(Sigma, USA) 350mg과 BSA(Sigma, USA) 600mg을 75ml의 접합완충액 (0.1M phosphate buffer, pH 7.2, 2 volume과 dioxane, 1 volume을 혼합한 액)에 용해하고 25%의 glutaraldehyde (Sigma, USA) 0.35ml를 추가하여 실온에 3시간 동안 magnetic stirrer로 교반하여 접합시켰다. 이후 0.1M phosphate buffer (pH7.0)로 6일간 매일 2회씩 외액을 교환하며 충분히 투석하였으며, 투석이 완료된 접합체 용액은 제균여과(pore size 0.22 μ m)하여 냉장보관하며 토끼의 면역에 사용하였다.

나. SDM흡착항원 (SDA-Gel)

Microtiter well에 흡착시킬 항원은 SDM 350mg과 gelatin(Difco, USA) 600mg을 사용하여 면역원 제조의 과정과 동일한 방법으로 합성하였다.

다. SA 면역원(SA_BSA)

Two-step glutaraldehyde법⁵⁾을 응용하여 SA와 BSA를 접합시켰다. 즉, 1.25% glutaraldehyde가 포함된 0.1M phosphate buffer(pH 5.0) 2ml에 BSA(Sigma, USA) 100mg을 용해시키고 실온에서 하룻밤 정치시킨 후 생리식염수에 투석하였다. 투석 후 생리식염수를 가하여 1ml로 맞추고, SA 0.1g을 1N HCl에 완전히 녹인액 1.4ml과 섞은 다음, 즉시 1M carbonate-bicarbonate(pH 9.6) 0.1ml를 가하여 4°C에서 하룻동안 반응시켰다. 이후 0.2M lysine 0.1ml를 가하고 실온에 2시간 반응시킨 다음 PBS(pH 7.2)에 일주일간 매일 2회씩 외액을 교환하며 투석하였다. 충분히 투석한 후 제균여과(pore size 0.22 μ m)하여 냉장 보관하며 항혈청 생산에 사용하였다.

라. SA 흡착항원(SA_Gel)

Gelatin 100mg과 SA 100mg을 SA-BSA 접합과 동일한 방법으로 합성하여 ELISA plate 흡착용 항원으로 사용하였다.

3. Protein A와 horse radish peroxidase (HRP) 접합체 (Prot. A-HRP)

Wilson과 Nakane²⁰⁾의 방법을 응용하여 효소접합체를 합성하였다. 즉, HRP(RZ=3이상, Sigma, USA) 6mg을 2차증류수 1ml에 녹인 후 0.1M NaIO₄ 0.3ml를 가하여 실온에서 20분간 가볍게 흔들어주며 반응시켰다. 반응액은 4°C에서 1mM sodium acetate buffer (pH 4.4)에 20시간 투석시킨 후 0.2M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5)를 20 μ l를 가하고, 미리 증류수에 용해하여 준비해 놓은 protein A(Sigma, USA) 5mg과 섞었다. 이후 즉시 0.01M carbonate buffer(pH 9.5) 1ml를 가하고 실온에 2시간 동안 교반시키며 접합반응을 시켰다. 접합반응이 완료된 후 0.4% sodium borohydride를 0.1ml 넣고 4°C에서 2시간 정치시킨 후 phosphate buffered saline(PBS)에 2회 투석하였다. 투석이 완료된 액에는 BSA가 1%가 되게 가하고 제균여과(pore size 0.22 μ m)한 후 소분하여 -20°C에 보관하여 ELISA에 사용하였다.

4. 항혈청 생산

가. SDM에 대한 항혈청 (anti-SDM)

SDM-BSA 0.5ml를 Freund's complete adjuvant (Sigma, USA) 1ml와 섞어 유탁액을 만든 후, 두 마리의 토끼에 0.75ml씩 피하접종하였다. 추가면역을 위하여 SDM-BSA 0.3ml와 Freund's incomplete adjuvant(Sigma, USA) 0.5ml와 섞은 유탁액을 약 2주간격으로 0.4ml씩 피하로 접종하였다. 면역 전기간을 통하여 추가접종 직전에 이정맥으로부터 소량의 혈액을 채취하여 항체형성 여부를 측정하였다. 최종접종 10일후에 전체혈을 하고 혈청을 분리하여 ELISA에 사용하였다.

나. SA에 대한 항혈청 (anti-SA)

SA-BSA 0.5ml와 Freund's complete adjuvant (Sigma, USA) 1ml의 유탁액을 만들어 2마리의 토끼의 피하에 접종하였다. 이정맥을 통하여 항체형성 여부를 측정하며 임의의 간격으로 추가접종을 하였다. 추가접종은 접합체 0.25ml와 Freund's incomplete adjuvant 0.5ml의 유탁액을 사용하였다. 만족할 만한 항체가의 상승을 확인 후 심장을 통하여 전체혈하고

혈청을 분리하였으며, 분리한 혈청은 소분하여 -70°C 에 보관하며 ELISA에 사용하였다.

5. 항체가 측정

항체형성 정도를 측정하기 위한 ELISA는 다음과 같이 실시하였다. 즉, SDM-Gel 및 SA-Gel 용액을 0.1M carbonate buffer(pH 9.6)로 각각 10,000배 및 2000배 희석하여 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 4°C 의 냉장고에 하룻밤 정치시켜 흡착시킨 후 0.05% Tween 20(Showa, Japan)이 용해된 PBS(PBS-T)로 4회 세척하였다. 이 후 0.2%의 gelatin이 용해된 PBS (Gel-PBS) 용액 $200\mu\text{l}$ 씩을 각 well에 넣고 4°C 에 30분간 정치하여 blocking을 실시한 후 PBS-T로 4회 세척하여 항혈청의 역가 측정용 ELISA microplate를 준비하였다. 시료혈청은 PBS-T로 500배 및 100배 희석하여 준비된 ELISA plate의 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 가하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS-T로 4회 세척하였다. Protein A-HRP를 1000배 희석하여 $100\mu\text{l}$ 씩 각 well에 가하여 실온에 30분간 반응시켰다. PBS-T로 4회 세척한 후 발색제로 0.1% ABTS(2-2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) 용액 $100\mu\text{l}$ 를 가하고 30분간 반응시킨 후 2차 증류수 $100\mu\text{l}$ 를 가하여 반응을 정지시켰다. 발색반응 결과는 ELISA reader (SLT-Labinstrument W. German)를 사용하여 파장 405nm의 filter를 사용하였으며 대조파장은 492nm의 filter를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

6. ELISA system의 최적조건 결정

Plate의 각 well(Costar 3590, USA)에 SA-Gel 또는 SDZ-Gel접합체 용액을 50mM carbonate(pH 9.6)로 희석하여 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 37°C 에서 2시간 및 4°C 의 냉장고에서 하룻밤 정치시켜 흡착시켰다. 흡착된 plate는 PBS-T로 4회 세척한 후, 0.2% Gel-PBS를 $200\mu\text{l}$ 씩 가하고 4°C 에 30분간 정치시켜 봉쇄(blocking)한 후 PBS-T로 4회 세척하고 건조시켜 ELISA에 사용하였다.

표준농도의 SA 또는 SMZ를 각 well에 $50\mu\text{l}$ 씩 가한

뒤 anti-SA 또는 anti-SDZ가 희석된 PBS-T 용액 $50\mu\text{l}$ 넣고 잘 섞은 후 실온에 1시간 반응시킴으로써 plate 표면에 흡착된 항원과 시료내의 항원이 항혈청과 경쟁적으로 반응하도록 하였다. 반응이 종료된 여액을 제거하고, PBS-T로 4회 세척하고, Protein A-HRP 용액을 $100\mu\text{l}$ 가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 이후 PBS-T로 4회 세척하고, 0.1M citrate-phosphate (pH4.0)에 0.1% ABTS 및 0.02% H_2O_2 를 용해한 액을 $100\mu\text{l}$ 씩 각 well에 가하고 실온에서 30분간 발색반응시켰다. 반응정지를 위하여 2차증류수 $100\mu\text{l}$ 를 가한 즉시 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 SA용액 또는 표준 SDZ로 얻어진 흡광도 값은 SA 농도 또는 SDZ 농도 0 ppb의 흡광도 값으로 나눈 Percent binding치의 백분율을 구하여 (B/B0%) 표준곡선을 작성하였으며, 시료의 값들은 표준곡선에 대입하여 sulfonamides의 유도체들과 SA농도 또는 SDZ농도를 산출하였다.

7. 돼지혈청 중의 잔류 SDM 측정

결정된 최적조건으로 돼지혈청 중의 잔류SDM을 측정하였다. 돼지혈청은 PBS-T로 20배 희석한 것을 실험에 사용하였다. 이때 돼지 혈청의 Immunoglobulin G (IgG)이 plate벽에 흡착되어 일어날 수 있는 비특이적인 발색반응을 배제하기 위하여, 희석된 시료혈청을 100°C 에 5분간 중탕하였으며, 이러한 가열에 의한 시료혈청내의 SDM의 안정성 변화를 확인하였다.

8. Anti-SDM 혹은 anti-SA의 교차반응 조사

Anti-SDZ 또는 anti-SA가 SDZ 혹은 SA 이외의 다른 설파제들과도 교차반응을 보이는가 알아보기 위해 sulfamerazine, sulfadiazine, sulfisomidine, sulfaguandine, sulfadimethoxine, sulfamethazine, sulfamonomethoxine, sulfisoxazol, sulfametoaxol, sulfaquinoxaline과 반응시켜 보았다. 교차반응의 정도는 blank well의 발색반응을 50% 저해하는 농도(EC-50)를 구하여 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

1. SDM에 대한 항체형성

SDM은 분자량이 작기 때문에 그 자체만으로는 동물에서 항체생산을 유도하기가 어렵기 때문에, 본 연구에서는 BSA 혹은 gelatin과 접합시킨 합성체로 SDM에 대한 항체형성을 유도하였다.

적절한 면역이 형성되었는지를 관찰하기 위하여 전기간을 통하여 약 2주 간격으로 추가접종하며 혈액을 채취하여 항체가 변동을 살펴보았다. Fig. 1은 전채혈시까지 채취한 혈청을 500배 희석하여 동시에 ELISA를 실시하여 혈청내 항체의 변동추이를 나타낸 것이다. 제1번의 토끼는 흡광도 3.0이상의 높은 항체형성을 보였으므로 면역 120일 경에 전채혈하였다. 제2번 토끼에서는 항체의 뚜렷한 상승을 보이지 않았으며 전 실험기간 중 추가접종에 의한 특기할 만한 상승을 보이지 않아, SDM-BSA에 대한 면역형성의 개체차이가 있음을 확인하였다.

2. SDM측정 ELISA system의 최적조건

항원흡착 및 항혈청의 적정 희석배수를 결정하기

위하여 기본적인 checker board titration을 실시하였다 (Fig. 2-1, 2-2). SDM-Gel을 1,000, 2,000, 4,000 및 8,000 배로 희석하여 흡착시키고, anti-SDM을 200, 400, 800 및 1,600배로 희석시켜 반응시켰다. Fig. 2-1은 각 흡착항원의 단계별로 희석된 anti-SDM이 반응한 정도를 나타낸 곡선이며, anti-SDM의 농도변화에 따른 반응의 상관관계를 적절히 나타내 줄 수 있는 SDM-

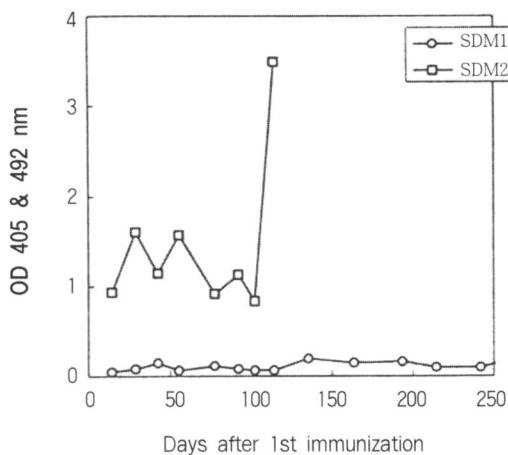


Fig. 1. Antibody evolutions of the rabbits dosed with SDM conjugated bovine serum albumin

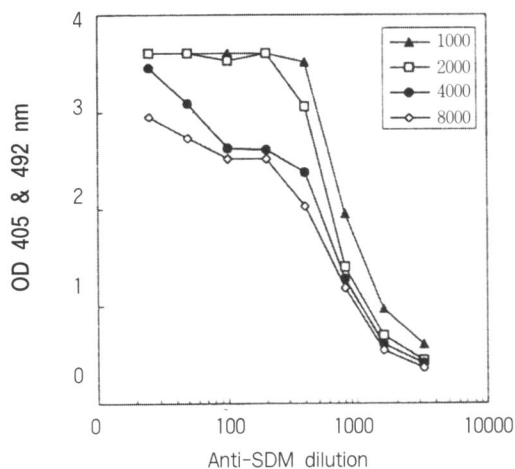


Fig. 2-1. Determination of optimal SDM-Gel concentration for competition ELISA

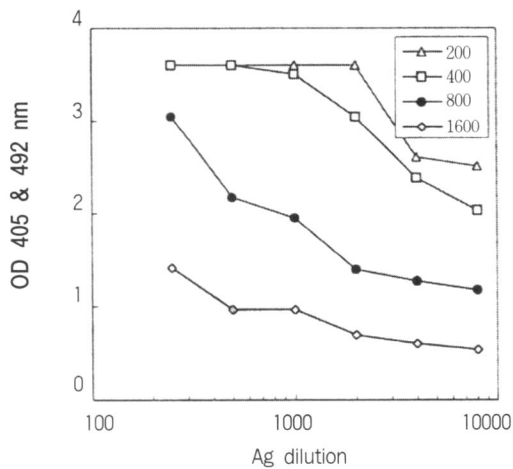


Fig. 2-2. Determination of optimal anti-SDM concentration for competition ELISA

Gel 흡착의 최소 희석배수는 4,000배임을 알 수 있었다. 또한 Fig. 2-2에서와 같이 흡착된 SDM-Gel의 농도변화에 따른 반응의 상관관계를 적절히 나타내 줄 수 있는 anti-SDM의 최소 희석배수는 약 500배 이상이었다.

3. Micro ELISA plate의 선택

ELISA용 microplate는 Nunc사의 Polysorb 및 Costar사의 plate (code no: 3580)를 사용하였으며, 이들 제품들의 적절한 항원흡착능과 그에 따른 ELISA 실시의 조건을 비교하여 보았다.

가. 항원흡착능 비교

각사의 microplate에 SDM-Gel을 10,000, 20,000 및 40,000배로 희석하여 흡착시킨 후, anti-SDM을 단계별로 희석하여 반응시켜 보았다. 동일한 조건에서 항원의 흡착능은 Fig. 3-1 및 3-2에서와 같이 Costar사의 것이 더 양호한 것으로 나타났으며, 1,000배에서 8,000배까지 반응의 곡선도 용량에 비례하여 직선상에 근접하여 나타났다.

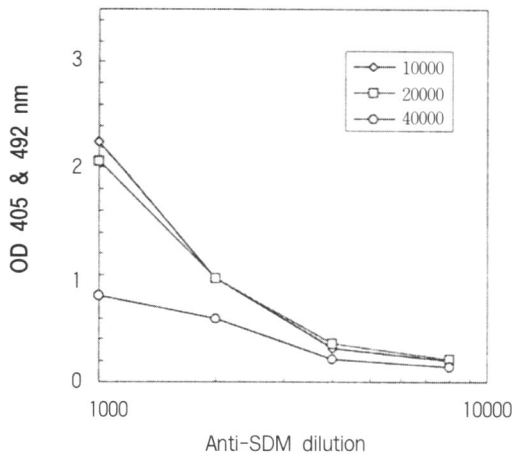


Fig. 3-1. Optical density curve according to the concentration of SDM-Gel coation in Nunc plate

나. 민감도 조건의 비교

한편, SDM 농도 0 및 5ppb의 시료를 사용하여 반응율 (B/B0%)을 비교한 결과 Fig. 4-1 및 4-2에 나타난 바와 같이 Nunc사 microplate의 경우는 SDM-Gel을 10,000배로 희석하여 흡착시키고, anti-SDM을 1,000배로 희석하여 반응시켰을 경우 54%로 가장 낮게 나타났다. 반면에 Costar사의 microplate를 사용하였을 때는 SDM-Gel을 40,000배로 희석하여 흡착시키고, anti-SDM을 8,000배로 희석하여 반응시켰을 때 45%의 결과를 보였을 뿐 아니라, anti-SDM의 희석배수 2,000배 이상에서는 대부분 60% 미만의 값을 나타내었으므로 (Table 1), 이후의 ELISA는 Costar사의 plate를 사용하여 실시하였다. 항원과 항혈청의 희석은 B/B0%의 값이 50% 이하인 값을 나타내는 조건 즉, SDM-Gel 20,000배 및 anti-SDM 4,000배의 조건을 임의로 결정하여 ELISA를 실시하였다.

Competitive ELISA는 한정된 well의 표면에 물질이 흡착되고 흡착된 물질과 시료의 반응이 일어나는 정도를 측정하는 원리이므로 이를 위한 plate의 선정기준은 각각의 흡착물질을 강하게 결합시켜주는 동시에 편차가 적은 성질의 재질이어야 한다. 본 실험의 결과와 같이 흡착시키고자 하는 물질에 따른 plate의

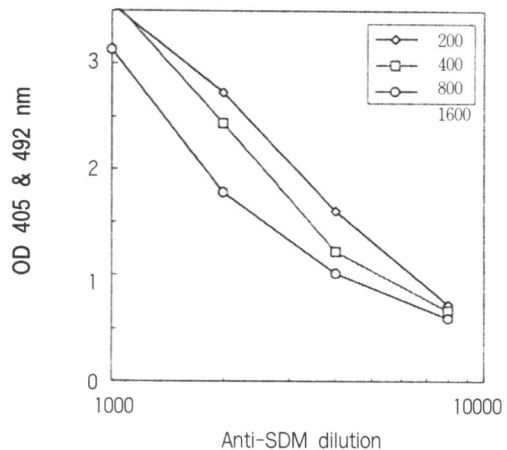


Fig. 3-2. Optical density curve according to the concentration of SDM-Gel coation in Costar plate

차이는 있을 것으로 생각되며, 이에 따라 각종의 ELISA를 실시할 때 먼저 흡착용 plate의 선정이 고려되어야 할 것이다.

4. SDM 검출용 ELISA 법의 민감도

상기의 흡착항원 및 항혈청의 희석조건으로 표준 농도 SDM 시료를 ELISA 분석하여 민감도를 관찰한

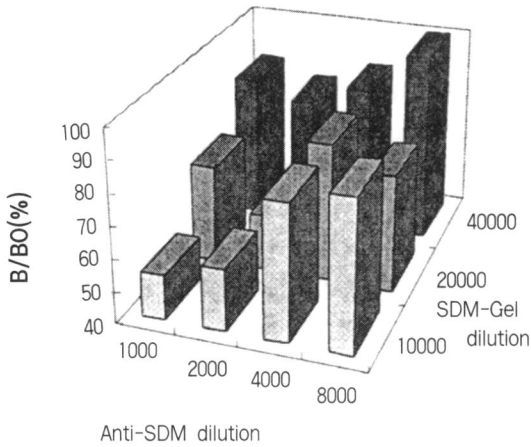


Fig. 4-1. Optimum concentration of SDM-Gel and anti-SDM in Nunc microplate

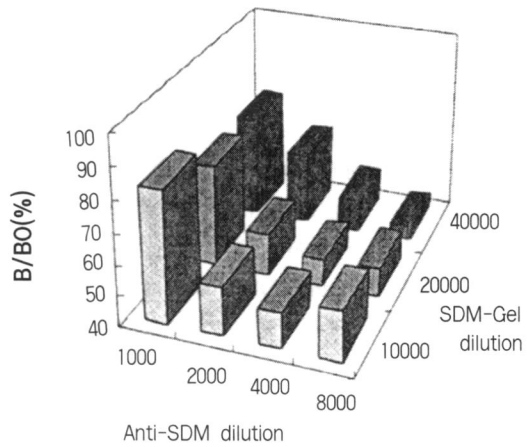


Fig. 4-2. Optimum concentration of SDM-Gel and anti-SDM in COSTAR plate

Table 1. Optimum dilution of SDM-Gel and anti-SDM · BSA in the ELISA for the detection of Sulfadimethoxine

coating SDM-Gel dil.	anti-SDM dil.			
	X 1,000	X 2,000	X 4,000	X 8,000
X 10,000 (82.7%) ³⁾	2.941/3.562 (55.6%)	1.51/2.72 (51.6%)	0.82/1.59 (56.0%)	0.40/0.72
X 20,000 (72.8%)	2.62/3.6 (53.4%)	1.30/2.44 (48.7%)	0.59/1.23 (49.2%)	0.32/0.66
X 40,000 (73.1%)	2.29/3.13 (63.1%)	1.12/1.77 (50.8%)	0.52/1.02 (44.7%)	0.26/0.59

1) OD at 5ppb of SDM

2) OD at 0ppb of SDM

3) percent binding : (B/B0)% = $\frac{\text{OD of 5 ppb}}{\text{OD of 0 ppb}} \times 100$

결과는 Fig. 5에 나타내었다. ELISA microtiter well 당 검출할 수 있는 최소농도는 5pg 혹은 그 이하의 농도에서도 가능하였다.

5. 돼지혈청시료를 측정하기 위한 ELISA의 검출범위 조정

SDM의 식육내 잔류허용 농도는 0.1ppm으로서 혈청내의 농도 환산치는 0.4ppm에 해당된다. 그러므로 돈육의 혈청을 대상으로 측정하여 허용기준치의 초과 여부를 판정하기 위해서는 혈청농도 1.0~0.1ppm의 범위에서 직선상(linearity)을 나타낼 수 있도록 조건을 맞추어야 한다. 이를 위하여 Fig. 6-1, 2, 3, 4에 나타낸 것과 같이 anti-SDM의 희석배수를 2,000배로 고정하고, SDM-Gel 흡착액을 10,000, 20,000, 40,000 및 80,000배 희석하여 흡착시킨 후 ELISA를 실시하여 보았다. 흡착항원의 희석배수가 증가함에 따라 적정 검출 범위는 낮은 농도 범위로 이동을 하였다. Fig. 6-1의 경우, 1.0부터 0.1ppm 값 사이에서의 용량대비상관곡선이 직선에 가깝게 나타났으므로 돈육중

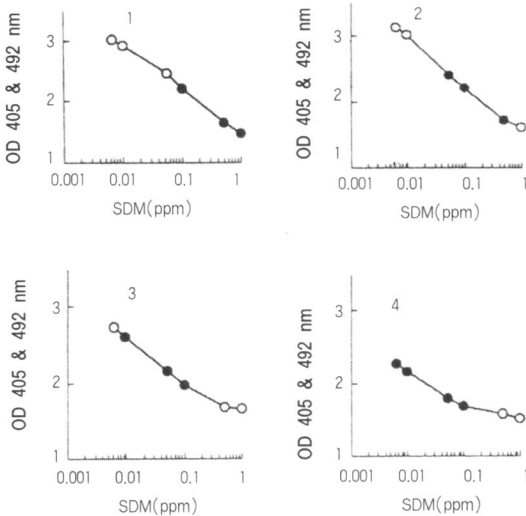


Fig. 6. Modification of detectable ranges by changing concentration of coating SDM-Gel (SDM dilution: 1:×10,000; 2:×20,000; 3:×40,000; 4:×80,000)

SDM검출을 위한 ELISA system의 조건은 SDM-Gel 희석배수를 10,000배로 희석하여 흡착시키고 anti-SDM의 희석배수는 2,000배인 조건으로 결정하였다.

6. SDM 검출을 위한 검사혈청 전처리

본 연구에서 개발한 competitive ELISA법은 잔류 SDM에 의한 경쟁반응을 측정하는 probe로 protein A를 사용한 독특한 방법으로 구성되어 있다. Protein A는 토끼의 anti-SDM뿐만 아니라 대부분 포유류의 IgG와도 결합반응을 일으키므로 만일 시료 돼지혈청의 IgG가 plate의 표면에 비특이적인 반응으로 결합한다면 protein A는 이와도 역시 반응하여 결합하게 되므로, 이러한 바람직하지 않은 반응을 배제시키려면 혈청시료 중의 IgG를 불활화시켜야 할 필요가 있었다.

이를 위하여 돼지혈청 중의 Immunoglobulin을 열변성시켜 실험에 사용하였다. 즉, 각각 0ppm 및 10ppm의 농도로 SDM을 가하여 준비된 혈청 및 PBS-T를 100°C에 5분간 중탕한 후 즉시 실온의 수조에 담가 식히고, 열처리하지 않은 시료와 같이 ELISA를 실시하여 비교한 결과는 Fig. 7과 같다. 시료를 열처리한 후 측정된 혈청의 경우는 처리한 시료에 비하여 높은 흡광도를 나타내었으므로 실제로

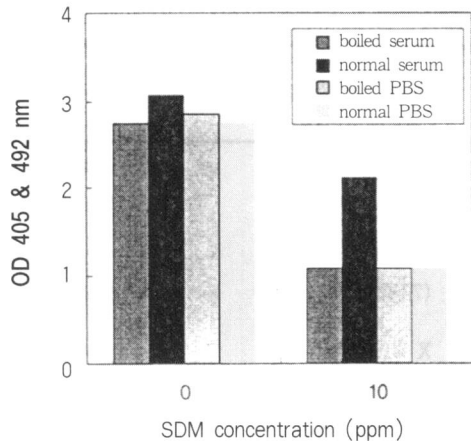


Fig. 7. Effect of heating on competition of sulfadimethoxine solubilized pig serum and PBS

잔류하는 SDM의 값보다 낮은 것으로 표현되었다. 열처리한 시료는 혈청이나 PBS-T에 희석한 것 모두 동일한 흡광도를 나타내었으므로, 열처리에 의하여 비특이반응이 배제되었으며 이에 따른 SDM의 변성은 나타나지 않았다.

7. SDM 회수율

임의로 선정한 돼지혈청에 SDM이 100 및 500ppb 이 되게 가하고 ELISA를 실시하여 회수율을 조사한 결과, 110%~128%의 회수율을 보였다(Table 2).

Table 2. Recovery of sulfadimethoxine spiked in swine serum at the concentration of 100 and 500ppb by ELISA

Sulfadimethoxine, added (ppb)	Recovered	% Recovery
0	0.78±0.34	
100	111.5±12.8	110.7
500	645.6±65.0	128.9

8. Anti-SDM과 기타 합성항균제와의 교차반응

Anti-SDM이 다른 합성항균제에도 교차반응을 일으키는 지 알아보기 위해 8종의 다른 설파유도체 (sulfamerazine, sulfadiazine, sulfaguanidine, sulfamethoxazol, sulfamethazine, sulfamonomethoxine, sulfisoxazol, sulfaquinoxaline)를 PBS-T에 단계별 농도로 희석하여 항혈청과 섞고 ELISA를 실시하였다. 그 결과 Table 3과 같이 sulfamonomethoxine을 제외하고 실험에 사용된 다른 합성항균제들과는 교차반응을 보이지 않았다. 이는 SDM의 para amino benzoic acid 가 BSA와 결합함에 따라 노출된 항원결정기가 다른 설파제와는 상이할 것이기 때문으로 생각된다.

9. Anti-SA 생산

설파제를 공통적으로 검출하기 위한 single ELISA

Table 3. Cross reactivity of rabbit anti-sulfadimethoxine antibodies toward sulfadimethoxine analogues

Compounds	EC-50 ¹⁾ (ppm)
Sulfadimethoxine	0.006
Sulfamonomethoxine	3.5
Sulfamethazine	-
Sulfamerazine	-
Sulfadiazine	-
Sulfaguanidine	-
Sulfisoxazol	-
Sulfaquinoxaline	-
Sulfamethoxazol	-

1) Concentration causing 50% inhibition in color development of sample wells compared with blank.

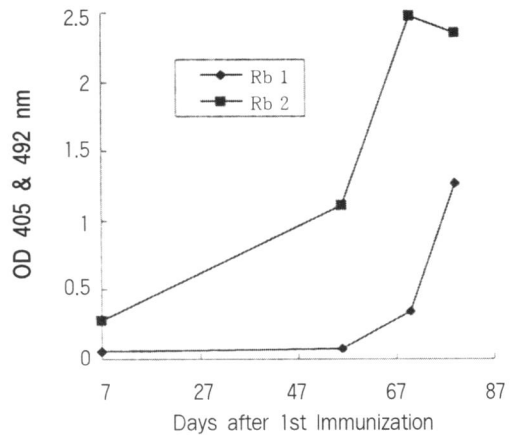


Figure 8. Antibody evolutions of the rabbits dosed with sulfanilamide conjugated bovine serum albumin

의 개발에서는 설파제 공통구조인 PABS의 반대편에 amino기를 갖는 sulfanilamide를 glutaraldehyde를 이용하여 carrier protein과 접합시킨다면, PABS에 대한 항혈청을 생산할 수 있을 것으로 생각하여 SA에 대한 흡착용 항원 및 면역원을 합성하여 ELISA를 실시하

었다. 토끼에 초회 면역후 약 50일 후부터 추가접종 하며 항체의 변동을 조사한 결과를 Fig. 8에 나타내 었다. 2회의 추가접종 후 만족할 만한 항체의 상승을 보였으므로 80일째에 전체혈하고 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다.

10. 흡착항원 및 항혈청 희석의 최적조건

Microplate에 흡착항원과 항혈청의 적정조건을 알아 보기 위해 checker board titration을 실시하였다. 각 혈청희석액에 SA를 0과 10ppm이 되게 가하고, 항혈 청과 함께 50μ씩 각 well에 분주하고 1시간 동안 실 온에서 반응시켰다(Table 4). B/B0% 값은 흡착항원 20,000배 희석과 항혈청 800배 희석의 조건에서 가장 큰 경쟁반응을 보였으나, 이때 EC-50의 값은 80% 정 도로서 미미한 수준을 나타내었다.

Table 4. Optimum dilution of SA-Gel and anti-SA

Coating SA-Gel. dil	Anti-SA dil.		
	× 800	× 1,600	× 3,200
× 10,000	1.38 ¹⁾ /1.22 ²⁾ (87.9) ³⁾	0.75/0.69 (91.5)	0.41/0.39 (94.4)
× 20,000	0.92/0.78 (84.8)	0.55/0.48 (87.1)	0.32/0.27 (85.1)
× 40,000	0.61/0.58 (94.3)	0.37/0.31 (84.4)	0.24/0.21 (87.5)

1) OD at 1ppm of SA
2) OD at 0ppm of SA

3) percent binding: $(B/B_0)\% = \frac{\text{OD of 1 ppm}}{\text{OD of 0 ppm}} \times 100$

11. Anti-SA와 기타 합성항균제와의 교차반응

Anti-SA가 다른 합성항균제에도 교차반응을 일으키는지 알아보기 위해 sulfamerazine, sulfadiazine, sulfisomidine, sulfaguanidine, sulfadimethoxine,

sulfamethazine, sulfamonomethoxine, sulfisoxazol, sulfametoxazol, sulfaquinolaxine을 PBS-T로 희석하고 ELISA를 실시하였다. Anti-SA는 Table 5에서와 같 이 실험에 사용된 11종의 합성항균제와 교차반응을 보이지 않았으며, 이때 EC-50은 0.5ppm이었다.

이러한 맥락의 연구는 Sheth와 Sporns¹⁷⁾에 의해 시 도된 바 있다. 즉, N1-[4-(carboxymethyl)-2-thiazolyl] sulfanilamide와 BSA를 접합시킨 면역원으로 항체를 생산하고, N1-(4-Nitrophenyl)sulfanilamide와 ovalbumin 접합체를 항원으로 이용한 ELISA법으로 다수의 설 과제 (sulfapyridine, sulfamethizole, sulfadiazine, sulfamethoxazol, sulfamoxole, sulfadimethoxine, sulfa- thizole, sulfacetamide)의 잔류를 측정할 수 있었다고 하였다.

Table 5. Cross reactivity of sulfanilamide and other chemicals to anti-SA used in ELISA

Compounds	EC-50 ¹⁾ (ppm)
Sulfanilamide	0.5
Sulfamethazine	-
Sulfamerazine	-
Sulfadimethoxine	-
Sulfadiazine	-
Sulfaguanidine	-
Sulfamonomethoxine	-
Sulfisoxazol	-
Sulfametoxazol	-
Sulfaquinolaxine	-
Sulfisomidine	-

1) Concentration causing 50% inhibition in color development of sample wells compared with blank.

그러나, 본 연구에서 작성한 anti-SA는 sulfa- nilamide 이외의 설과제들과는 유의할 만한 교차반응 을 보이지는 않았다. 이러한 이유는 항체를 생산하기 위해 SA와 BSA를 접합하는 과정에서 2가지 형태의 분자에 대한 항체가 형성될 것으로 예상되었는데 그

중, SA의 R group의 아미노기와 BSA가 접합된 형태보다 반대편의 아미노기에 접합된 면역원이 대부분이었다면 이에 대한 항체가 상대적으로 많이 생성될 것이고, 이 항혈청과 다른 설파제와의 결합 반응도 나타내지 않을 것으로 생각할 수도 있었다. 혹은, Vallejo 등¹⁹⁾이 arm effect에 관해 지적한 것과 같이 SA-BSA 자체의 길이가 짧아 항원인 SA-Gel의 항원 결정기(epitope)에 충분히 노출되지 못했을지도 모르며, 이는 추후의 확인실험이 요구되었다. 입체적인 구조의 관점에서 보면, 요구되는 면역원(H₂N-benzen-SO₂N=CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH=NH₂-BSA)의 경우는, SA가 carrier protein의 표면과 접합하여 이루는 각도가 수직을 이루지 못하고 경사를 이루며 접합되므로 항원결정기가 SA의 측면으로 구성될 것으로 여겨지며, 이러한 형태라면 SA와는 상이한 구조가 연결된 다른 설파제와 반응할 때 중대한 구조적인 불일치가 일어났을 수도 있었을 것으로 추측되나, 본 실험에 적용한 설파제의 제한으로 말미암아 추가적인 확인이 어려웠다.

이러한 여러 가능성을 확인하고 개선된 방법을 개발하려면 먼저 다양한 설파제와의 반응을 고찰할 필요가 있을 것으로 사료되며, 또한 arm을 노장시킬 수 있는 방법¹⁷⁾의 도입이나, 아미노기가 손상되지 않는 접합방법에 의한 합성체로 항혈청을 생산하는 방법²¹⁾을 고려해 보아야 할 것으로 생각된다.

IV. 결론

돼지혈청 중의 SDM 잔류를 도축장의 출하전에 스크리닝하기 위한 경쟁적 효소면역측정법(competitive ELISA)을 개발하기 위하여 제반조건을 조사한 결과는 다음과 같다.

개발된 ELISA법으로 검출가능한 SDM농도는 1.0ppb 이하의 값이었다. 돼지혈청 유래의 IgG에 의한 비특이적인 발색반응은 PBS-T로 10배 희석한 시료 혈청을 끓는 물에 5분간 증탕하여 배제시켰으며 이러한 열처리 조건에도 SDM은 변성되지 않았다. SDM을 100ppb 및 500ppb를 가지고 회수율을 조사한 결과 110.7%~128.9%의 범위를 나타내었다.

SDM 유도체 8가지를 사용하여 특이성 검사를 한 결과 sulfamonomethoxine을 제외하고는 유의할만한 교차반응을 보이지 않았으며, 이때 Sulfamonomethoxine의 EC-50값은 3.5ppm으로 나타났다.

설파제에 대한 single ELISA법은 rabbit anti-SA와 SA-Gel을 사용하여 실시하였다. 흡착용항원인 SA-Gel과 면역원인 SA-BSA는 two-step glutaraldehyde방법으로 접합시켜 합성하였다. 경쟁적 ELISA는 SA에 대해서만 0.5ppm의 EC-50값의 검출감도를 보였으며, sulfamethazine, sulfamerazine, sulfadimethoxine, sulfadiazine, sulfaguandine, sulfamonomethoxine, sulfisoxazol, sulfametoaxazol, sulfaquinoxaline, sulfisomidine 등 실험에 사용한 설파제와는 교차반응 보이지 않았다.

인용문헌

- 1) 김성희, 임윤규, 1995, 잔류 Sulfamethazine 검출용 ELISA 개발에 관한 실험적 연구, J. Fd Hyg. Safety, 10(4): pp.213-217.
- 2) 신광순, 1989, 축산물중의 항균성물질 잔류문제에 대한 고찰(상), 대한수의사회지, 25: 161-167
- 3) 이장락, 1988, 숄폰아미드계 수의약리학, 서울대학교 출판부, pp.363-370.
- 4) 임윤규, 김성희, 이경갑, 김우택, 김성훈, 김영주, 양재혁, 박재학, 이영순, 1996, 잔류 Sulfamethazine 검출을 위한 직접 및 간접 ELISA 방법의 비교 연구, Kor. J. Vet. Publ. Hlth, 20(3): pp.195-201.
- 5) Avrameas, S. and Ternyck, T., 1971, Peroxidase labelled antibody and Fab conjugate with enhanced intracellular penetration, *Immunochem.* 8: pp.1175-1179.
- 6) Boison, J. O. and Keng, L. J.-Y., 1995, Determination of sulfadimethoxine and sulfamethazine residues in animal tissue by liquid chromatography and thermospray mass spectrometry, J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intl., 78(3): pp.651-658.

- 7) Charm, S. E., 1988, Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk. collaborative study. *J. Assoc. Off Anal. Chem. Intl.*, 71: pp.304-316.
- 8) Codex Alimentarius Commission, 1993, Maximum residue limits, Residues of veterinary drugs in foods, Codex Alimentarius, 3, p.8.
- 9) Davis, W. W. and Stout, T. R., 1971, Disc plate method of microbiological antibiotic assay. Factors influencing variability and error. *Appl. Microbiol.*, 22: p.629.
- 10) Dixon-Holland, D. E. and Katz, S. E., 1989, Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intl.*, 71(6): pp.1137-1140.
- 11) Dixon-Holland, D. E. and Katz, S. E., 1991, Competitive direct enzyme-linked immunosorbent screening assay for the detection of sulfamethazine contamination of animal feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intl.*, 74(5): pp.784-789.
- 12) Mitrovic, M., Schildknecht, E. G., Fusiek, G., 1971, Anticoccidial activity of sulfadimetoxine potentiated mixture (Rofenaïd) in turkey. *Poultry Sci.*, 50: pp.517-525.
- 13) Park, J. H., 1997, Comparison of enzyme-linked immunoassay kits for sulfamethazine. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 37(3) appn.: p.131, pp.190-191.
- 14) Park, J. H. and Lim, Y. K., 1996, Enzyme Immunoassay for the sulfamethazine residues in pork tissue. *J. Fd Hyg. Safety.* 11(4): pp.287-290.
- 15) Ram, B. P., Sigh, P., Martins, L., Brock, T., Sharkov, N. and Allison, D., 1991, Drug residues in animal tissues. High-volume enzyme immunoassay test for sulfamethazine in swine. *J. Asso. Off. Anal. Chem.*, 74(1), pp.43-46.
- 16) Rosenberg M. C., 1985, Update on the sulfonamide residue problem, *JAVMA*, 187: pp.704-705.
- 17) Sheth, H. B. and Sporns, P., 1991, Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. *J Agric Food Chem.* 39: pp.1696-1700.
- 18) Smither, R., 1978, Bacterial inhibitors formed during the adventitious growth of microorganisms in chicken liver and pig kidney. *J. Appl. Microbiol.*, 45: p.267.
- 19) Vallejo, R. P., Bogus, E. R. and Mumma, R. O., 1982, Effect of hapten structure and bridging groups on antisera specificity in parathion immunoassay development. *J Agric Food Chem.* 30: pp.572-580.
- 20) Wilson, M. B. and Nakane, P. K., 1978, 'recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies' In Knapp, W., Holubar, K. and Wick, G. (eds), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp.215-224.
- 21) Würzburger, R. J., Miller, R. L., Boxenbaum, H. G. and Spector, S., 1977, Radioimmunoassay of atropine in plasma. *J Pharm. & Exe. Thera.* 203(2): pp.435-441.
- 22) Yuji, T., Ahmed abdu Said, Masami, H. and Yasumasa, K., 1991, Sulfadimetoxine residue in broile-chiken skin. *J. Vet. Med. Sci.* 53(1): pp.33-36.