

碩士學位論文

잔류 Sulfadimethoxine 검출을 위한
ELISA법 개발

濟州大學校 大學院



金 祐 澤

1998年 2月

잔류 Sulfadimethoxine 검출을 위한
ELISA법 개발

指導教授 林 允 圭

金 祐 澤

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함.

1997年 12月

金祐澤의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長 _____
委 員 _____
委 員 _____

濟州大學校 大學院

1998年 2月

초 록

잔류 Sulfadimethoxine 검출을 위한 ELISA법 개발

(지도교수 : 임윤규)

김 우 택

제주대학교 대학원

수의학과

돼지혈청 중의 SDM 잔류를 도축장의 출하전에 스크리닝하기 위한 경쟁적 효소면역측정법 (competitive ELISA)을 개발하기 위하여 제반조건을 조사하였다. 돼지혈청 유래의 IgG에 의한 비특이적인 발색반응은 PBS-T로 10배 희석한 시료혈청을 끓는 물에 5분간 중탕하여 배제시켰으며 이러한 열처리 조건에도 SDM은 변성되지 않았다. SDM을 100ppb 및 500ppb를 가하고 회수율을 조사한 결과 110.7% ~ 128.9%의 범위를 나타내었다. SDM 유도체 8가지를 사용하여 특이성 검사를 한 결과 sulfamonomethoxine을 제외하고 유의할 만한 교차반응을 보이지 않았다. Sulfamonomethoxine의 EC-50값은 3.5ppm으로 나타났다. 이 ELISA조건에서의 감도는 SDM농도 1.0ppb이하였다.

Protein A를 이용한 competitive ELISA는 감도가 우수한 screening법으로 생각되며 kit로 개발하여 실용화 시킬 가능성을 제시하였다.

중심어 : sulfadimethoxine(SDM), 경쟁적 효소면역측정법, 돼지혈청, Protein A

목 차

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법	5	
III. 결	과	9
IV. 고	찰	20
V. 결	론	22
VI. 참 고 문 헌	23	
영 문 초 록	27	



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Lists of Abbreviation

ABTS : 2-2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid

BSA : bovine serum albumin

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

Gel : gelatin

Gel-PBS : gelatin in phosphate buffered saline

HRP : horse radish peroxidase

IgG : Immunoglobulin G

PBS : phosphate buffered saline

prot. A : protein A

prot A-HRP : protein A-horse radish peroxidase conjugate

SDM : sulfadimethoxine

SDM-BSA : sulfadimethoxine- bovine serum albumin conjugate

SDM-Gel : sulfadimethoxine-gelatin conjugate

Lists of Table

- Table 1. Optimum dilution of SDM-Gel and anti-SDM · BSA
- Table 2. Recovery of sulfadimethoxine spiked in swine serum
at concentration of 100 and 500ppb by ELISA
- Table 3. Cross reactivity of rabbit anti-sulfadimethoxine
antibodies toward sulfadimethoxine analogues

Lists of Figure

- 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
- Fig. 3-1. Optical density curve according to the concentration of SDM-Gel coating in Nunc plate
- Fig. 3-2. Optical density curve according to the concentration of SDM-Gel coating in Costar plate
- 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 microplate
- Fig. 5. Percent binding of competition ELISA on reference SDM
- Fig. 6. Modification of detectable ranges by changing concentration of coating SDM-Gel (dilution-1: x10,000; 2: x20,000; 3: x40,000; 4: x80,000)
- Fig. 7. Comparison of effect of heating on competition between SDM samples solubilized in pig serum and PBS

I. 서 론

축산식품의 안전성 저해요인으로서 가장 빈번히 발생하는 사항은 생산 과정에서 첨가, 투약 또는 오염된 물질이 가축체내에 잔류되어 축산물의 섭취와 함께 사람에게로 이행하여 유해하게 작용하는 것을 예로 들 수 있다 (Felig 등, 1968; Garland 등, 1980). 이 중 sulfonamide는 항생제, 호르몬제, 농약, 방부제 그리고 곰팡이독 등과 더불어 축산물에 잔류하여 사람의 건강을 위협하는 위해물질이다.

다양한 종류의 설파제는 질병을 예방하고 사료효율을 높이기 위하여 사료첨가제로도 많이 사용되고 있다. 그러나 치료용 항균물질의 사료첨가로 인하여 증대되는 가축유래 내성인자 보유 장내세균의 문제와 항균물질의 부적절한 사용에 의한 축산식품의 잔류문제가 새로운 논점으로 부각되고 있으며, 이에 대한 규제가 필요하다고 인식되고 있어, 국가에 따라서는 축산식품 중의 최대허용한계 (Maximum Residue Limit; MRL)와 안전휴약기간을 설정하여 운용하고 있다 (Codex Alimentarius Commission, 1993).

선진 외국에서는 각종 법규로 축산물내의 sulfonamide 잔류를 규제하고 있으며 (박, 1988), 우리 나라에서도 1988년 11월에 대일 수출돈이 sulfamethazine 잔류위반으로 반송된 사건 이후, 1989년 3월에 대일 수출돈육 유해물질 지정검사제도의 수립이 있었으며, 농림부 고시 89-33호 (1989. 5. 22)에 의하여 축산물중 잔류물질 분석법 및 허용기준이 제정 고시되었다. 동년 12월에는 보사부고시 89-67호 (1989. 12. 23)인 '식육의 항생물질기준'이 제정되어 40종의 약품에 대한 잔류허용기준이 설정되었으며, 1996년 2월에는 농림부고시 1996-11호에 의하여 육류중 유해성 잔류물질 검사요령이 고시되어 이를 기준으로 각 검사 기관에서 축산물 위생처리법의 규정에 따라 식육에 대한 검사를 수행하고 있다.

Sulfonamide는 1938년의 sulfamine (sulfanilamide)을 시작으로 1938년

sulfadiazine, 1942년 sulfathiazole, sulfisomidine, 1955년 sulfisoxazole, sulfadimethoxine이 연이어 합성되었으며 (수의과학연구소, 1989), 약 20여 종이 동물용 합성항균제로서 현재 국내에서 생산되고 있다. 이 중 sulfamethazine, sulfamonomethoxine, sulfamerazine, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline은 보건복지부 고시 제 96-10호 (1996. 9. 5)에 의하여 잔류물질 검사대상 합성항균제로 지정되어 있다.

Sulfadimethoxine (SDM)은 sulfonamide계열의 합성항균제로서 여러 종류의 병원성 미생물에 대한 항균작용을 가지며 (Weber 등, 1988; 이, 1988) 상온에서도 비교적 안정된 화학구조를 가지고 있으므로 동물의 질병 치료 또는 성장촉진의 목적으로 널리 이용되는 등 그 적용 범위가 매우 다양하다 (이, 1988; Rosenberg, 1985; 신, 1989; Dixon-Holland and Katz, 1989). 또한 양어에 있어서는 *Edwardsiella ictaluri*에 의한 장패혈증을 예방하기 위하여 사용되기도 하는데, ormethoprim이나 trimethoprim과 같이 병용하여 세균성 감염의 예방에 사용되기도 한다 (Boison and Keng; 1995). 또한 육계에서 콕시듐 치료제로 종종 사용되므로 계육에서의 SDM 잔류문제를 일으킬 수 있다고 하였다 (Yuji 등, 1990; Mitrovic, 1971)

SDM은 양과 돼지의 경우 경구투여시 위장관에 빠르게 흡수되어 혈중에 들어가 체내순환을 하며, 흡수된 SDM은 혈청단백 알부민과 90%이상 광범위하게 결합한다. 돼지, 양, 말에서의 혈청중 반감기는 각각 14, 15, 113 시간이다. 그러나 SDM은 뇨의 pH와 밀접한 관계가 있어 돼지의 경우 반추수나 말보다 배설되는 시간이 오래 걸려 근육내 축적을 야기하게 되고 돈육에 잔류되어 이를 섭취한 사람에게 조혈계 이상, 무과립증, 간 변성, 황달, 청색증, 신경염 등의 이상을 초래할 수 있다 (Nicholas, 1988).

Sulfadimethoxine의 잔류를 검사하기 위한 방법으로는 최근까지 bioassay가 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 있다 (Davis and Stout, 1971; Smither, 1978). 공정검사법으로 HPLC법이 개발되어, 보고자에 따라 계육에서 0.05 ug/g (Nagata 등, 1988), 마육에서 0.05 ug/g (Horie 등, 1992), 우육에서는 조직에서 0.05ug/g, 혈액에서 0.05 ug/g (Weiss 등, 1987) 수준의 검출이 가능하여 높은 민감도를 보이거나 비용이 많이 들고, 기기분석시 많은 시간이 소요되며, 제한된 공간에서 실시해야만 한다는 단점이 있어 다량의 시료를 신속히 검사하기에는 부적절하다고 생각된다. 그 외의 방법 중 Radioimmunoassay는 감도가 높고 신속한 검사가 가능한 방법이나, 방사선 동위원소를 사용하는데 대하여 부차적인 위험이 따른다는 단점이 있다 (Lewis 등, 1972; Mahon 등, 1973). 최근에 microbial receptor assay를 이용한 Charm II test 방법이 개발되어 사용되고 있으나 (Charm, 1988), 이 검사법은 제열별 검사로서 sulfonamide의 정성분석이 불가능하므로 기기분석을 통한 확인시험이 필요하다.

한편, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법은 매우 민감한 검출법으로서 재현성, 특이성도 높으며, 무엇보다도 다량의 시료를 일시에 처리할 수 있다는 장점이 있다 (Dixon and Katz, 1991). Ram 등 (1991)은 sulfamethazine 검출을 위한 ELISA 방법을 개발하여 8시간에 2,400건의 혈청시료를 검사할 수 있었다고 보고하였으며, ELISA 방법은 정량이 가능하기 때문에 도축장에서의 잔류물질 screening 방법으로 활용도가 높을 것이라 하였다.

국내의 연구자들에 의해서도 sulfamethazine검출용 ELISA의 개발 (김과 임, 1995; 임 등, 1996; Park and Lim, 1996)과 ELISA kit의 품질비교에 대한 연구 (Park, 1997)가 이루어져 있으나 SDM에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다.

축산식품 중의 합성항균제 잔류를 방지하기 위해서는 무엇보다 위생적

인 생산과정이 중요하겠으나, 최종 출하단계에서 도축대상동물 개체별의 잔류검사를 통하여 합성항균제의 잔류를 보이는 동물의 도축을 금지시켜 오염된 식육의 유통을 막는 것이 기본적인 방법이라 할 수 있다. 만일 도축직전의 대상동물을 검사하여 잔류 허용한계치를 넘는 가축이 발견된다면 기준치 이내의 규격에 들어올 때까지 단순히 출하만 연기하면 될 것으로 생각된다. 또한, 생축의 상태로 근육내의 잔류물을 직접 측정하기란 현실적으로 매우 곤란하나, 대상동물의 혈액을 채취하여 검사하고 그 결과에 따라 근육내의 잔류량을 추정하는 것은 가능할 것으로 사료된다.

본 연구의 목적은 돼지혈액 중의 잔류 SDM을 검출하는 ELISA법을 개발하는 것이며, 출하전 돼지에서의 잔류 SDM screening으로의 적용 가능성을 알아보기 위한 실험을 수행하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험동물

외관상 건강한 약 8 주령의 암컷 토끼 (New Zealand White) 2두를 실험 전기간 동안 상수와 사료 (미원사슴사료, 미원사료)를 자유로이 급여 하였으며, 입고 후 2주간 검역을 실시한 후 SDM에 대한 항혈청 생산을 위한 면역실험에 사용하였다.

2. 면역원 및 ELISA plate 흡착용 항원

면역원은 SDM을 bovine serum albumin (BSA)에 접합하여 합성하였다 (SDM-BSA). 접합은 Dixon-Holland와 Katz (1988)의 방법에 의하여 실시하였다. 즉, SDM (Sigma, USA) 350mg과 BSA (Sigma, USA) 600mg을 75ml의 접합완충액 (0.1M phosphate buffer, pH 7.2, 2 volume 과 dioxane, 1 volume을 혼합한 액)에 용해하고 25%의 glutaraldehyde (Sigma, USA) 0.35ml을 추가하여 3시간 동안 magnetic stirrer로 교반하여 접합시켰다. 이 후 0.1M phosphate buffer (pH7.0)로 6일간 매일 2회 씩 외액을 교환하며 충분히 투석하였으며, 투석이 완료된 접합체 용액은 제균여과(pore size 0.22 μ m)하여 냉장보관하며 토끼의 면역에 사용하였다.

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

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

Wilson과 Nakane (1978)의 방법을 응용하여 효소접합체를 합성하였다. 즉, HRP (RZ=3이상, Sigma, USA) 6mg을 2차중류수 1ml에 녹인 후 0.1M NaIO₄ 0.3ml를 가하여 실온에서 20분간 가볍게 흔들어주며 반응시

켰다. 반응액은 4℃에서 1mM sodium acetate buffer (pH4.4)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. 이 후 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℃에서 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℃에 보관하여 ELISA에 사용하였다.

4. 항혈청 (anti-SDM) 생산

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 2주 간격으로 0.4ml씩 피하로 접종하였다. 면역 전기간을 통하여 추가접종 직전에 이정맥으로부터 소량의 혈액을 채취하여 항체형성 여부를 측정하였다. ELISA를 실시하여 만족할 만한 항체가 상승을 확인 후에는 심장을 통하여 전채혈하고 혈청을 분리하였으며, 분리된 혈청은 적당한 양으로 소분하여 -70도의 초저온냉동고에 보관하였다. ELISA에 사용하는 분획은 0.1%되게 sodium azide를 가한 후 냉장 보관하며 실험에 사용하였다. 항체형성 정도를 측정하기 위한 ELISA는 다음과 같이 실시하였다. 즉, SDM-Gel용액을 0.1M carbonate buffer (pH 9.6)로 10,000배 희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주하고 4℃의 냉장고에 16시간 정치시켜 흡착시킨 후 0.05% Tween 20 (Showa, Japan)이 용해된 PBS (PBS-T)로 4회 세척하였다. 0.2%의 gelatin이 용해된 PBS (Gel-PBS) 용액 200 μ l씩을 각 well에 넣고 4℃에 30분간 정치하여 blocking을 실시한 후 PBS-T로 4회 세척하여 항혈청

의 역가측정용 ELISA microplate를 준비하였다. 시료혈청은 PBS-T로 500배 희석하여 각 well에 100 μ l씩 가하고 실온에서 30분간 반응시킨 후 PBS-T로 4회 세척하였다. Microtiter well에 고정된 SDM-BSA와 반응하여 결합한 anti-SDM을 측정하기 위하여 prot. A-HRP를 100 μ l씩 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 μ l를 가하고 30분간 반응시킨 후 2차 증류수 100 μ l를 가하여 반응을 정지시켰다. 발색반응의 정도는 ELISA reader (SLT-Labinstrument W. German)에 파장 405nm의 filter를 사용하였으며 대조파장은 492nm의 filter를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

5. ELISA system의 최적조건 결정

Microtiter well에 흡착 고정된 SDM-Gel과 돼지혈청 중의 잔류 SDM이 anti-SDM과 경쟁적으로 반응하는 원리를 응용한 경쟁적 효소면역 측정법 (competitive ELISA)의 최적조건을 조사하였다. Anti-SDM 항혈청을 측정하기 위한 ELISA의 방법과 동일하게 실시하되, checkerboard titration의 방법으로 흡착용 SDM-Gel 및 anti-SDM의 최적 희석배수를 조사하였다. 즉, SDM-Gel액을 0.1M carbonate buffer (pH 9.6)로 계단희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C의 항온기에 2시간 정치하여 충분한 흡착반응이 일어나게 한 후 4 $^{\circ}$ C의 냉장고에 16시간 정치시켜 안정화 시켰으며 또한, Gel-PBS 200 μ l로 blocking시켰다. 각 농도별로 SDM-Gel이 흡착된 microtiter well을 다시 PBS-T에 용해된 0 및 5ppb의 SDM을 50 μ l씩 가한 2개의 군으로 구분하였다. 구분된 microtiter well에 계단희석한 anti-SDM을 각각 50 μ l씩 가하고 실온에 1시간 경쟁 반응시켰다. 이 후, Prot. A-HRP 및 ABTS를 100 μ l씩 넣고 각각 30분간 반응시켰다. 흡광도를 측정하여 0ppb의 경우에 비하여 5ppb의 SDM을 가하였을 때의 SDM-Gel과 anti-SDM의 반응을 저해한 비율과 가장 높

은 회석 조건을 조사하였다.

6. 돼지혈청 중의 잔류 SDM 측정

결정된 최적조건으로 돼지혈청 중의 잔류SDM을 측정하였다. 돼지혈청은 PBS-T로 20배 회석한 것을 실험에 사용하였다. 이때 microtiter well에 비특이적으로 결합한 돼지 혈청유래의 Immunoglobulin G (IgG)에 의한 이상반응을 배제하기 위하여 회석된 시료혈청을 100℃에 5분간 증탕하였으며, 가열에 의한 시료혈청 IgG 및 SDM의 안정성의 변화를 확인하였다.



III. 결 과

1. Anti-SDM의 항체형성 추이

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

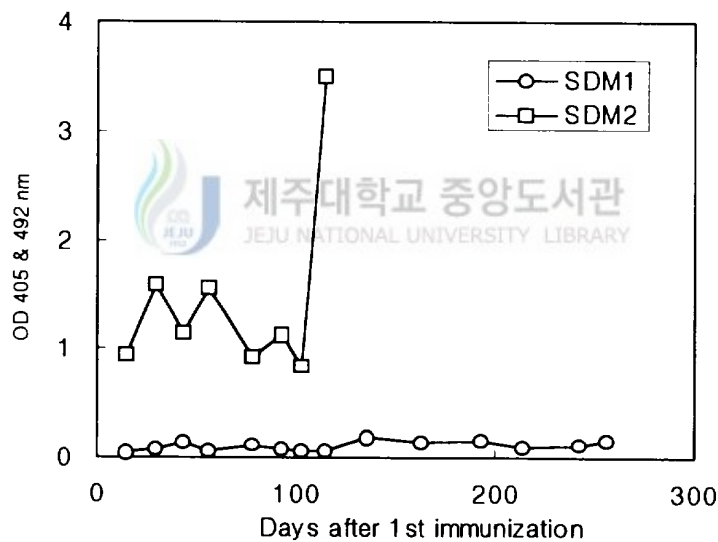


Figure 1. Antibody evolutions of the rabbits dosed with SDM conjugated bovine serum albumin

2. ELISA system의 최적조건

항원흡착 및 항혈청의 적정농도를 결정하기 위한 기본적인 checkerboard titration을 실시하였다 (Fig. 2-1, 2-2). SDM-Gel을 1,000, 2,000, 4,000 및 8,000배로 희석하여 흡착시키고, anti-SDM을 200, 400, 800 및 1,600배로 희석시켜 반응시켰다. Fig. 2-1은 각 흡착항원의 희석농도별로 계단희석된 anti-SDM이 반응한 정도를 나타낸 곡선이며, anti-SDM의 농도변화에 따른 반응의 상관관계를 적절히 나타내 줄 수 있는 SDM-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

실험에 사용한 ELISA용 microplate는 Nunc사의 Polysorb 및 Costar사의 plate를 사용하였으며, 이들 제품간에 적절한 항원흡착능과 그에 따른 ELISA 실시의 조건을 비교하여 보았다.

1) 항원흡착능 비교

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



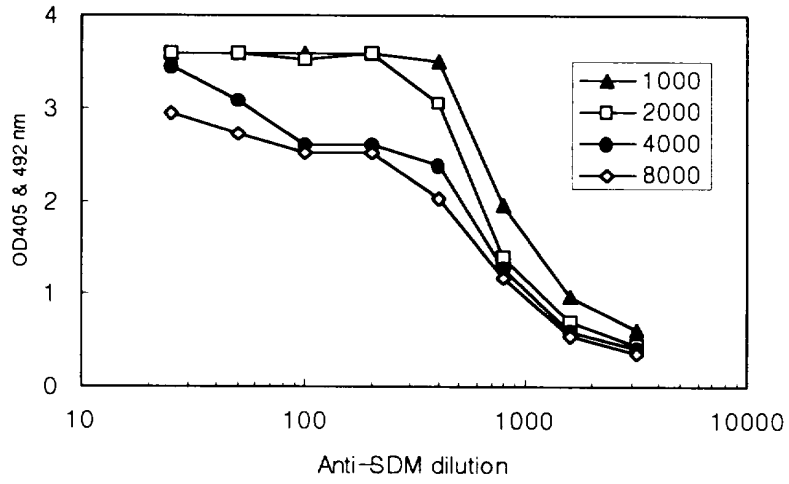


Figure 2-1. Determination of optimal SDM-Gel concentration for competition ELISA

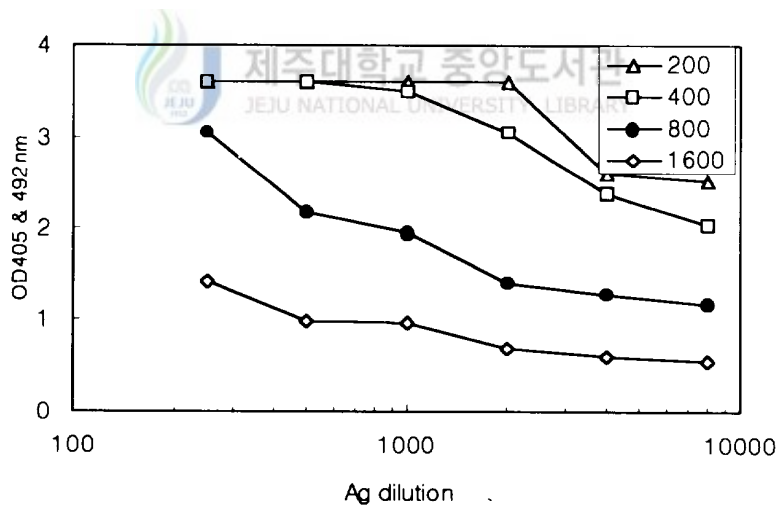


Figure 2-2. Determination of optimal anti-SDM concentration for competition ELISA

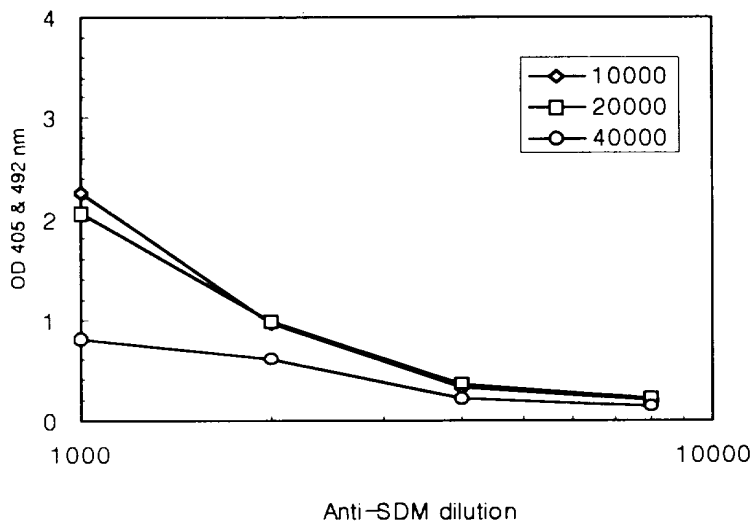


Figure 3-1. Optical density curve according to the concentration of SDM-Gel coating in Nunc plate

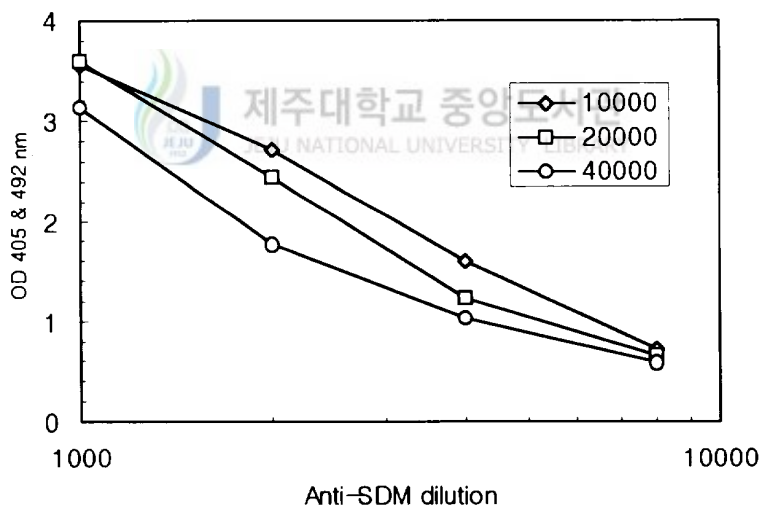


Figure 3-2. Optical density curve according to the concentration of SDM-Gel coating in Costar plate

2) 민감도 조건의 비교

한편, SDM 농도 0 및 5ppb의 시료를 사용하여 반응율 (B/B0%)을 비교한 결과 Fig. 4-1 및 4-2에 나타낸 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 보였으며, 그 외에도 anti-SDM의 희석배수 2,000배 이상에서는 대부분 60% 미만의 값을 나타내었으므로 (Table 1), 이 후의 ELISA는 육안적인 판독도 편리하고 B/B0%의 값이 50% 이하인 값을 나타내는 조건 즉, SDM-Gel 20,000배 및 anti-SDM 4,000배의 희석조건을 임의로 결정하여 실시하였다.

Table 1. Optimum dilution of SDM-Gel and anti-SDM · BSA

coating SDM-Gel dil	anti-SDM dil.			
	X 1,000	X 2,000	X 4,000	X 8,000
X 10,000	2.94 ¹⁾ /3.56 ²⁾ (82.7%) ³⁾	1.51/2.72 (55.6%)	0.82/1.59 (51.6%)	0.40/0.72 (56.0%)
X 20,000	2.62/3.6 (72.8%)	1.30/2.44 (53.4%)	0.59/1.23 (48.7%)	0.32/0.66 (49.2%)
X 40,000	2.29/3.13 (73.1%)	1.12/1.77 (63.1%)	0.52/1.02 (50.8%)	0.26/0.59 (44.7%)

1) OD at 5ppb of SDM

2) OD at 0ppb of SDM

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

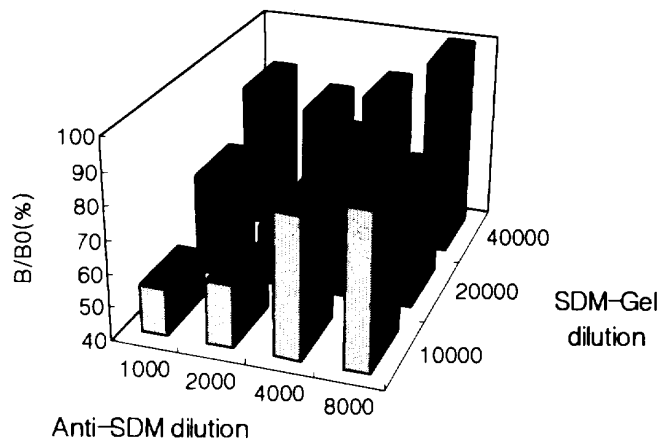


Figure 4-1 Optimum concentration of SDM-Gel and anti-SDM in Nunc microplate

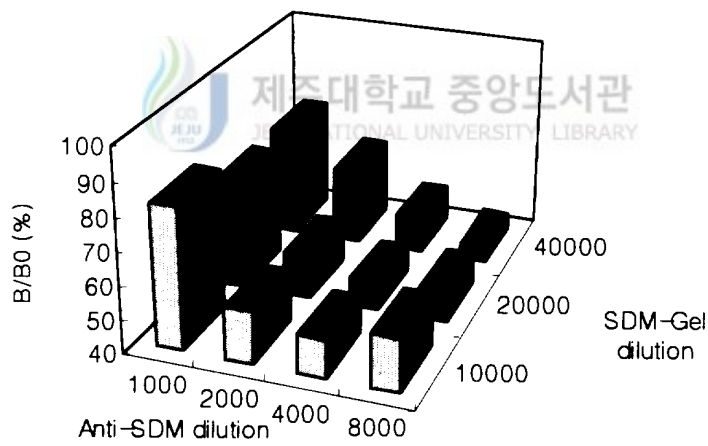


Figure 4-2. Optimum concentration of SDM-Gel and anti-SDM in COSTAR plate

4. ELISA system의 민감도

상기의 흡착항원 및 항혈청의 회석조건으로 표준농도 SDM 시료를 ELISA 분석하여 민감도를 관찰한 결과는 Fig. 5에 나타내었다. ELISA microtiter well 당 검출할 수 있는 최소농도는 5pg 혹은 그 이하였다.

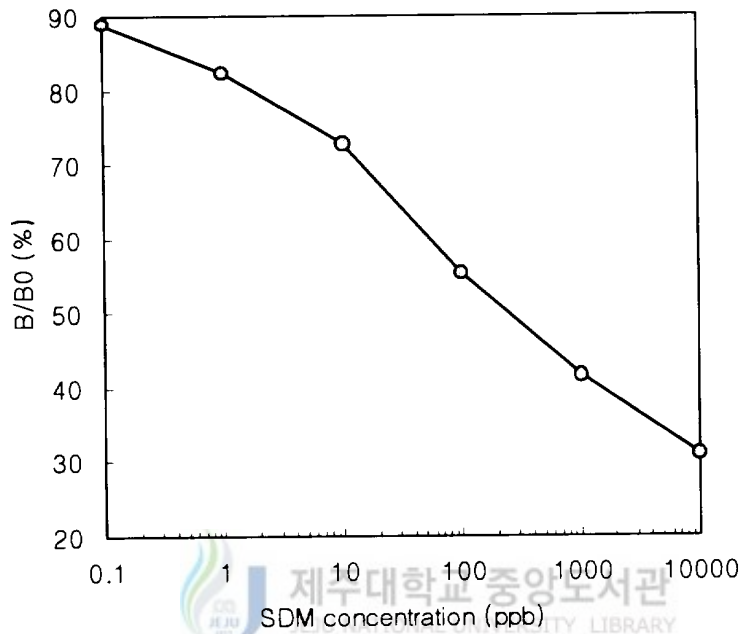


Figure 5. Percent binding of competition ELISA on reference SDM

5. 돼지혈청시료를 측정하기 위한 ELISA의 민감도의 조정

SDM의 식육내 잔류허용 농도는 0.1ppm으로서 혈청내의 농도 환산치는 0.4ppm에 해당된다. 그러므로 돈육의 혈청을 대상으로 측정하여 허용 기준치의 초과 여부를 판정하기 위해서는 혈청농도 1.0 - 0.1ppm의 범위에서 직선상 (linearity)을 나타낼 수 있도록 조건을 맞추어야 하므로, Fig. 6-1, 2, 3, 4에 나타낸 것과 같이 anti-SDM의 회석배수는 2,000배로 고정하고, SDM-Gel 흡착액을 10,000, 20,000, 40,000 및 80,000배 회석하

여 흡착시킨 후 ELISA를 실시하여 보았다. Fig. 6-1의 경우, 1.0부터 0.1ppm 값 사이의 용량대비 상관곡선이 직선에 가깝게 나타났으므로 돈육중 SDM검출을 위한 ELISA system의 조건은 SDM-Gel회석배수를 10,000배로 회석하여 흡착시키고 anti-SDM의 회석배수는 2,000배로 결정하였다.

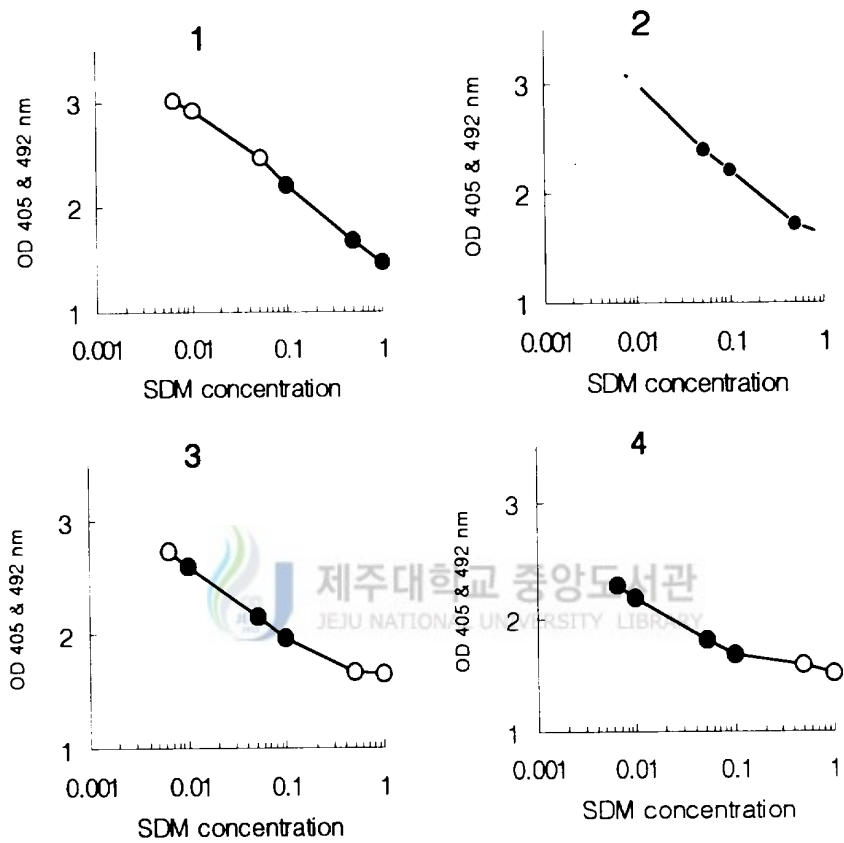


Figure 6. Modification of detectable ranges by changing concentration of coating SDM-Gel (dilution-1: x10,000; 2: x20,000; 3: x40,000; 4: x80,000)

6. SDM 검출을 위한 검사혈청 전처리

검사할 돈혈청 유래의 Immunoglobulin이 비특이적으로 microplate에 흡착될 경우 tracer로 사용되는 prot. A-HRP와 반응하여 발색되므로 실제보다 낮은 농도의 SDM값으로 표현될 수가 있다. 시료 중의 Immunoglobulin을 변성시키기 위하여 준비된 혈청을 100℃에 5분간 증탕하고 즉시 실온의 수조에 담가 식힌 후 ELISA를 실시한 결과는 Fig. 7과 같다, 혈청시료를 열처리하지 않고 측정할 경우는 전 농도에서 흡광도가 높게 나타나서 실제 존재하는 SDM의 값보다 낮은 농도로 표현되었다. 반면에 PBS-T에 희석한 SDM은 열처리에 관계없이 동일한 흡광도를 나타내었으며, 열처리한 혈청시료의 경우도 PBS-T에 희석한 시료의 값과 동일하게 표현되었다.

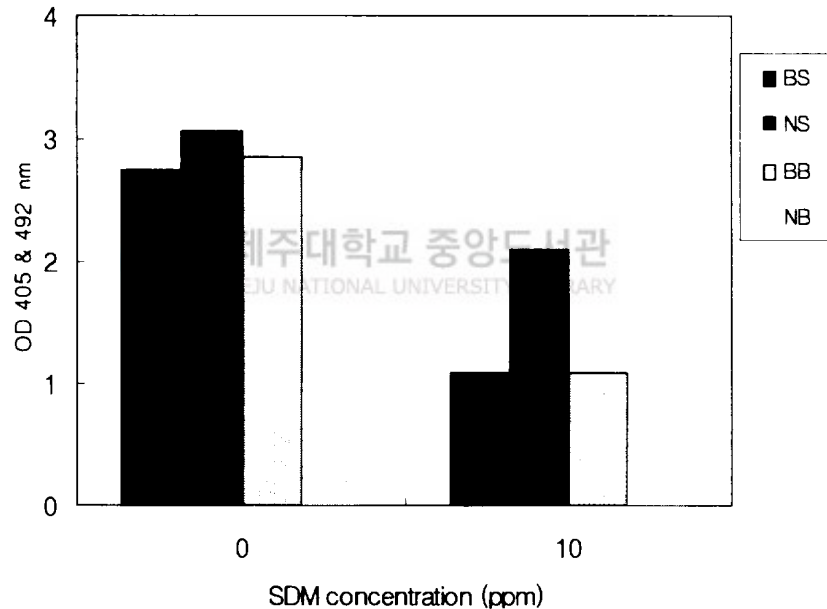


Figure 7. Comparison of effect of heating on competition between SDM samples solubilized in pig serum and PBS

7. SDM 회수율

임의의 돼지혈청을 대상으로 SDM이 100 및 500ppb이 되게 가하고 ELISA를 실시하였으며 회수율을 조사한 결과는 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, (ppb) added	Recovered	% Recovery
0	0.78 ± 0.34	
100	111.5 ± 12.8	110.7
500	645.6 ± 65.0	128.9

8. 기타 합성항균제와의 교차반응

Anti-SDM이 다른 합성항균제에도 교차반응을 일으키는지 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.

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.

IV. 고 찰

본 연구는 SDM을 carrier protein에 접합시킨 합성체와 그 항체를 이용하여 식품 중의 잔류 SDM을 검출하기 위한 ELISA법의 개발을 위하여 실시하였으며, 특히 돼지혈청 중의 잔류SDM의 검출에 초점을 맞추었다.

SDM은 분자량이 작기 때문에 그 자체만으로는 동물에서 항체생산을 유도하기가 어렵다. 본 연구에서는 BSA 혹은 gelatin을 glutaraldehyde를 이용하여 간단히 접합시킨 합성체로 SDM에 대한 항체형성을 유도하였다. 두 마리의 토끼에 면역시킨 결과 항체형성의 정도는 개체차가 뚜렷하였으며 다만, 만족한 수준의 항체형성이 된 동물의 혈청을 이용하여 ELISA를 실시할 수 있었다.

얻어진 anti-SDM은 준비된 다른 종류의 설파제와 교차반응이 없음을 확인하였다. 이것은 SDM의 para amino benzoic acid기가 BSA와 결합함에 따라 노출된 항원결정기가 다른 설파제와는 상이할 것이기 때문으로 생각된다.

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 실험에서는 Nunc 사의 polysorb plate와 Costar사의 plate (code no; 3590)를 비교실험하여 SDM ELISA의 실시에 좀더 적합한 plate를 선택하였다. 결과적으로 흡착시키고자 하는 물질에 따른 plate의 차이는 있을 것으로 생각되었으며, 이에 따라 각종의 ELISA를 실시할 때 먼저 흡착용 plate의 선정이 고려되어야 할 것으로 생각되었다.

본 연구에서 개발한 SDM ELISA는 각 well당 5pg수준의 낮은 농도의 잔류 SDM까지도 검출할 수 있었다. 그러나 실제로 측정하여야 할 검사

시료는 0.1부터 1.0ppm 수준의 농도에서 잔류허용한계가 결정된다. 그러므로 본 연구에서 결정한 실험방법에 따라 시료를 희석하여 분석한다면 0.1ppb의 수준까지도 검출이 가능할 것이나, 잔류검사의 목적으로는 너무 낮은 범위의 농도이기 때문에 의미가 없게 된다. 그러므로 원하는 수준의 농도에서 값의 비교가 가능하도록 ELISA system의 감도를 조절할 필요가 있었다. 이를 위하여 plate에 흡착시킨 SDM-Gel의 농도를 높임으로써 경쟁적 반응의 값차이의 비를 상대적으로 둔화시킬 수 있었으며, 상대적으로 높은 농도의 시료간의 반응 비교가 용이하였다.

본 연구에서 개발한 competitive ELISA법은 잔류 SDM에 의한 경쟁 반응을 측정하는 probe로 protein A를 사용한 독특한 방법으로 구성되어 있다. Protein A는 토끼의 anti-SDM뿐 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 100℃의 수조에 5분간 중탕한 시료를 사용하였으며, 이 결과 SDM은 이러한 열처리에 전혀 변성되지 않았으나 돼지혈청 IgG는 완전히 불활화되어 ELISA시 비특이적인 반응을 없앨수 있었다.

본 연구는 출하전 도축대상 동물에서의 잔류 SDM을 측정하여 기준치 이상의 잔류가 확인된 동물을 사전에 도축에서 제외시키기 위한 검사방법을 개발하고자 함이 중요한 목표였다. 개발된 competitive ELISA는 kit로 제조한다면, 이용이 간편하며 무엇보다도 다량의 시료를 짧은 시간에 측정할 수 있다는 장점이 있으므로 이 방법을 사용하여 비용과 인력을 절감하면서도 식육에 공여되는 가축 개체에 대한 잔류 SDM여부를 빠짐없이 검사할 수가 있을 것으로 생각된다. 특히 출하전 단계에서 신속한 검사가 가능하기 때문에 도축 후 검사시 발견된 도체는 폐기할 수 밖에 없는 경제적 손실을 방지할 수도 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

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

돼지혈청 유래의 IgG에 의한 비특이적인 발색반응은 PBS-T로 10배 희석한 시료혈청을 끓는 물에 5분간 중탕하여 배제시켰으며 이러한 열처리 조건에도 SDM은 변성되지 않았다. SDM을 100ppb 및 500ppb를 가하고 회수율을 조사한 결과 110.7% ~ 128.9%의 범위를 나타내었다.

SDM 유도체 8가지를 사용하여 특이성 검사를 한 결과 sulfamonomethoxine을 제외하고 유의할 만한 교차반응을 보이지 않았다. Sulfamonomethoxine의 EC-50값은 3.5ppm으로 나타났다. 이 ELISA조건에서의 감도는 SDM농도 1.0ppb이하였다.



VI. 참고 문헌

- 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): 651-658
- 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: 304-316
- Codex Alimentarius Commission. 1993. Maximum residue limits. Residues of veterinary drugs in foods. *Codex Alimentarius*. 3. p. 8.
- Davis, W.W. and Stout, T.R. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. Factors influencing variability and error. *Appl. Microbiol.*, 22: 629
- 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): 1137~1140
- 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): 784-789

Felig, J. and Westheimer, J. 1971. Determination of sulfadimethoxine in animal tissues. *J. Agri. Food Chem.* 16: 738-740

Garland, W., Miwa, B., Weiss, G., Chen, G., Saperstein, R. and MacDonald, A. 1980. Determination of sulfadimethoxine in the liver and kidneys of swine cattle by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry and stable isotope dilution. *Anal. Chem.* 52: 842-846

Masakazu, H., Koichi, S. and Norihide, N. 1992. Simultaneous determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intl.*, 75(5): 786~789

Mitrovic, M., Schildknecht, E.G., Fusiek, G. 1971. Anticoccidial activity of sulfadimethoxine potentiated mixture (Rofenaid) in turkey. *Poultry Sci.*, 50: 517-525

Park, J.H. 1997. Comparison of enzyme-linked immunoassay kits for sulfamethazine. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 37(3) appn.: P-131, 190-191

Park, J.H. and Lim, Y.K. 1996. Enzyme Immunoassay for the sulfamethazine residues in pork tissue. *J. Fd Hyg. Safety.* 11(4): 287-290

Rosenberg M.C. 1985. Update on the sulfonamide residue problem,

JAVMA, 187: 704-705

Smither, R. 1978. Bacterial inhibitors formed during the adventitious growth of microorganisms in chicken liver and pig kidney. *J. Appl. Microbiol.*, 45: 267

Tomoko, N. and Masanobu, S. 1988. Simultaneous determination of 17 antibacterials in chicken tissues by high performance liquid chromatography, *食衛誌*, 29(1): 13-20

Weiss, G., Duke, P.D. and Gonzales, L. 1987. HPLC method for the simultaneous analysis of sulfadimethoxine and ormetoprim in tissues and blood of cattle, chickens, and catfish. *J. Agric. Food Chem.* 35: 905~909

Yuji, T., Ahmed abdu Said, Masami, H. and Yasumasa, K. 1991. Sulfadimethoxine residue in broiler-chicken skin. *J. Vet. Med. Sci.* 53(1): 33-36

김성희, 임윤규. 1995. 잔류 Sulfamethazine 검출용 ELISA 개발에 관한 실험적 연구. *J. Fd Hyg. Safety.* 10(4): 213-217

박종명. 1988. 축산식품중의 잔류물질 검사법. 서울 상록출판사. pp. 27~83

신광순. 1989. 축산물중의 항균성물질 잔류문제에 대한 고찰(상), *대한수의사회지*, 25: 161-167

이장락. 1988. 술폰아미드제 수의약리학. 서울대학교 출판부. pp. 363-370

임윤규, 김성희, 이경갑, 김우택, 김성훈, 김영주, 양재혁, 박재학, 이영순.
1996. 잔류 Sulfamethazine 검출을 위한 직접 및 간접 ELISA 방법
의 비교 연구. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 20(3): 195-201



**Development of competitive enzyme-linked
immunosorbent assay for the detection of
sulfadimethoxine residues**

Woo-Taek Kim

**Department of Veterinary Medicine
Graduate School, Cheju National University
Cheju, Korea
(Supervised by Professor Yoon-Kyu Lim)**

Abstract

Screening for sulfadimethoxine (SDM) in slaughter house is essential for preventing its residues in edible animal products. For this purpose, a competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) detecting sulfadimethoxine (SDM) in swine serum was developed. ELISA was based on the limited binding of SDM gelatin conjugates immobilized on microtiter wells to rabbit anti-SDM antibodies in competition with residual SDM and followed by the uptake of protein A peroxidase conjugate. Bound enzyme was detected with chromogenic substrate (2-2'-azino-di-3-ethyl benzthiazoline sulfonic acid). Non-specific reaction from the pig originated immunoglobulin G could be eliminated by cooking 10 fold diluted serum samples in a boiling water bath for 5 minutes. SDM was not destroyed by this treatment. Recoveries of SDM in spiked samples between 100ppb and 500 ppb ranged from 110.7% to 128.9%. Among 8 sulfonamide analogues tested for specificity,

A thesis submitted to the Committee of the Graduate School of Cheju National University in partial fulfillment of the requirements for the degree of the master of veterinary medicine

only sulfamonomethoxine showed significant cross-reactivity. The EC-50 value (concentration causing 50% inhibition of color development compared with the blank) of sulfamonomethoxin was 3.5ppm. The ELISA was able to detect at least 1.0ppb levels of SDM in swine serum. If the ELISA system be developed as a kind of kit, it could be applied for screening residual SDM in the pork tissue before slaughter step.



Keyword : Sulfadimethoxine (SDM), Competitive enzyme-linked immunosorbent assay, Swine serum, Protein A