
碩士學位論文

축산식품중의 잔류 설파제 검색을 위한
새로운 효소면역측정법의 개발

濟州大學校 大學院

獸醫學科



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

金 聖 熙

1998年 2月

축산식품중의 잔류 설파제 검색을 위한
새로운 효소면역측정법의 개발

指導教授 林 允 圭

金 聖 熙

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함.

1997年 12月



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

金聖熙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

축산식품중의 잔류 설파제 검색을 위한 새로운 효소면역측정법의 개발

(지도교수 : 임윤규)

김 성 희

제주대학교 대학원

수의학과

축산식품에 잔류하는 설파제를 검출하기 위한 새로운 효소면역측정법 (ELISA)을 개발하였다. 잔류설파제를 검출하기 위한 경쟁적 ELISA는 설파제와 gelatin을 접합시킨 항원을 microplate의 well에 흡착시키고 검사를 위한 설파제를 항혈청과 경쟁시킨 후 protein A-HRP 접합체를 가하고 ABTS를 사용하여 발색시킨 후 파장 405nm에서 흡광도를 측정함에 기초하였다. 이 방법으로 돼지혈청, 노 혹은 인산염완충액에 잔류된 sulfamethazine (SMZ) 혹은 sulfanilamide (SA)를 정량하였다. SMZ측정을 위한 ELISA의 경우 0.1~100ppb의 범위에서 용량에 비례하는 반응곡선이 구성되었다. 돼지혈청에 SMZ가 2ppb와 20ppb가 되게 가하고 회수율을 측정한 결과 각각 87.4%에서 102.5%의 회수율을 보였다. 기니픽 anti-SMZ는 비교시험한 기타의 8종류 합성항균제 중 sulfamerazine과 교차반응을 보였으며 EC-50값은 2.0ppm이었다. SA 측정을 위한 ELISA의 경우는 10~10,000ppb의 범위에서 반응곡선이 구성되었으며, 비교한 다른 10개의 합성항균제와 교차반응을 보이지 않았다. 개발된 protein A-HRP 접합체를 이용한 경쟁적 ELISA방법은 농장이나 도축장에서 간편하고 신속하게 축산식품에 잔류하는 설파제를 screening할 수 있는 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

중심어 : sulfamethazine(SMZ), sulfanilamide(SA), 경쟁적 효소면역측정법,
Protein A, 잔류항생물질

목 차

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법	4	
III. 결	과	9
IV. 고	찰	21
V. 결	론	25
VI. 참고 문헌	26	
영문 초록	30	



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

I. 서 론

축산업의 생산성을 높이는데 기여한 중요한 요소 중의 하나로 각종 동물의약품 및 사료첨가제의 개발과 적용을 지적할 수 있다. 항생제 및 합성항균제는 가축질병의 치료와 예방의 목적으로 사용되고 있으며, 더 나아가 집단사육에 따른 질병발생과 손실을 방지하고 증체를 향상을 위한 사료첨가제로도 널리 사용되고 있다. 그러나 치료용 항생물질의 사료첨가로 인하여 증대되는 가축유래의 내성인자보유 장내세균 문제와 항생물질의 부적정 사용에 의한 축산물질에의 잔류로 인한 알러지반응 유발 및 백혈구감소증 등과 같은 다양한 부작용이 중요한 문제점으로 인식되고 있다 (Smither 등, 1980; Booth and McDonald, 1988).

합성항균제인 설파제는 모든 나라에서 잔류검사대상 물질로 선정된 주요 항생물질이며, 휴약 후에도 상당기간 동안 조직내에 잔류가 가능하기 때문에 미국을 비롯한 많은 나라에서 이 약제의 휴약기간을 15일로 규정하고 있으며 (Singh 등, 1989), 설파제에 대한 잔류허용한계치 (Minimal Residue Level; MRL)를 0.1ppm으로 설정하고 있다 (Bui, 1993). 설파제 중 가장 빈번히 축산식품에의 잔류문제를 일으키는 것은 sulfamethazine (SMZ)으로 알려져 있다 (Singh 등, 1989; Ram 등, 1991). SMZ도 여타의 설파제들과 마찬가지로 조혈기능의 이상과 발암성, 신장질환이 있는 경우 간질성 신염을 유발시켜 결정뇨 등을 일으키는 부작용이 있다 (Goth, 1974).

각종의 설파제는 활성에 따른 구조적 다양성 때문에 잔류를 확인하기 위해서는 정확한 분석법이 요구된다. 측정방법으로는 high performance liquid chromatography (HPLC) (Bauduret and Andre, 1997; Boison and Keng, 1995; Bui, 1993; Carignan and Carrier, 1991; 정 등, 1994; 박 등, 1994; Tasi and Kondo, 1995), gas chromatography (GC) (Mooser and Koch, 1993) 등의 기기분석방법과 thin layer chromatography (TLC) (Unruh 등, 1993)의 원리를 이용한 Sulfa on site (SOS) kit (Boison and Keng, 1995; 이, 1997), 미생물학적 방법인 EEC 4-plate, Swab test on premises (STOP), Live animal swab test (LAST),

Calf antibiotic & sulfa test (CAST) (남, 1995; 손, 1996), 미생물의 항균성 물질에 대한 수용체를 이용하여 분석하는 CHARMII test kit (Brunner 등, 1994; 이, 1997) 등이 있다. 면역학적인 분석방법으로 효소면역분석법 (ELISA)이 제시되어 있으며 (Flecker and Lovett, 1985; Singh 등, 1989; Dixon-Holland 등, 1991; Ram 등, 1991; Walker and Baker, 1994), 상품화된 kit들이 미국의 Idetek사, Editek사, Randox사 등에서 생산되고 있다 (Walker and Baker, 1994; Park and Lim, 1996). 공정시험법으로는 HP-TLC, GC/MS 방법을 미국, 일본, 캐나다, 호주 등지에서 활용하고 있으며, 우리나라에서는 HPLC법이 수육 중 잔류물질공정 검사법으로 고시되어 있다 (보건복지부고시 제96-10호, 96. 9. 5).

잔류검사에 사용되는 다양한 검사법들은 각각의 장단점을 갖고 있다. 기기분석 방법은 민감도와 특이도가 높고 정량적인 분석이 가능하므로 공정검사법으로 널리 이용되고 있으나, 시료의 전처리과정이 복잡하며 긴시간이 소요되고 일시에 많은 시료의 처리가 어려울 뿐만 아니라 고가의 장비와 운영비가 소요되는 단점이 있다 (정, 1993). 미생물학적인 방법은 다양한 미생물 발육억제물질을 검출할 수 있으나 잔류물질의 개별적인 정성 및 정량분석이 어렵다 (손, 1996). TLC법을 이용하는 경우에는 HPLC법에 비하여 많은 수의 시료를 비교적 간편하고 신속하게 screening할 수 있으나, 이 역시 검사 시료 처리 수량에는 한계가 있으며 개별적인 정량법으로는 부적합하다고 하였다 (박, 1994).

ELISA방법은 공정시험법에 비하여 사용법이 간편하고, 다수의 시료를 일시에 신속히 측정할 수 있으며, 감도와 특이도도 높은 방법으로서 screening과 정량의 목적으로 유용하게 사용될 수 있다 하였으며 (Walker and Baker, 1994), ELISA를 이용하여 식용동물의 식육, 혈청 또는 뇨에 잔류하는 설파제를 측정한 연구도 다수 보고되었다 (Singh 등, 1989; Dixon-Holland 등, 1991; Ram 등, 1991; Flecker and Lovett, 1985).

항균물질이 잔류된 축산식품의 유통을 방지하기 위한 1차적인 단계로서, 농장에서 출하시나 도축전에 동물개체의 혈청이나 뇨 등을 채취하여 신속하게 잔류를 screening하고, 추가적인 확인이 요구되는 개체의 시료는 공정시험법을 통

해 확인하는 절차상의 제도화가 필요하다고 사료되며, 이를 위한 screening 검사
법으로는 실시가 간편하고 신속하며 민감도도 높은 ELISA법의 적용이 적합할
것으로 생각된다.

그러므로, 본 연구는 축산식품 잔류 문제가 가장 빈번한 것으로 알려진 SMZ
(Ashworth 등, 1985)을 검출하는 ELISA법의 개발을 목표로 실시하였으며, 추가
적으로, 설파제의 가장 기본적인 구조로 구성된 sulfanilamide (SA)에 대한 항혈
청을 생산하고 이 항혈청을 이용하여 다양한 설파유도체를 동시에 screening할
수 있는 single ELISA가 가능할 것인가를 알아보기 위한 기초적인 실험을 수행
하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험동물

삼육실험동물 (화성군, 경기도)에서 구매한 체중 약 350g의 Hartley 계통 기니픽 암컷 5마리를 기니픽용 사료 (삼양사료)와 상수를 자유로이 급여하며 사육하였다. 기니픽은 SMZ에 대한 항체 생산실험에 사용하였다. 상수에는 Vitamin C (Hayashi, Japan)를 약 50mg/L 되게 용해하여 급여하였다.

SA에 대한 항체생산을 위하여 미생물학적인 컨트롤이 되지 않은 건강한 8주령의 토끼 (New Zealand White) 암컷 2마리를 사용하였으며, 상수와 사료 (미원 사슴사료)를 자유 급여하며 실험에 사용하였다.

2. 면역원 및 ELISA plate 흡착용 항원의 제조

2-1. Bovine serum albumin (BSA)과 SMZ의 접합체 (SMZ-BSA)

Dixon-Holland와 Katz (1991)의 방법에 따라 합성하였다. SMZ (Sigma, USA) 350mg과 BSA (Sigma, USA) 600mg을 75ml의 접합완충액 (0.1M phosphate buffer, pH 7.2, two volume : dioxane, one volume)에 용해한 후 25% glutaraldehyde 0.35ml을 추가하여 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 접합체는 0.1M phosphate buffer (pH 7.0)로 6일간 매일 2회 투석외액을 교환하며 충분히 투석한 후 제균여과 (pore size 0.22 μ m)하여 냉장보관하며 기니픽의 면역에 사용하였다.

2-2. Gelatin과 SMZ의 접합체 (SMZ-Gel)

SMZ (Sigma, USA) 350mg과 gelatin (Difco, USA) 600mg을 SMZ-BSA 접합과 동일한 방법으로 합성하였다. 얻어진 접합체는 냉장보관하며 ELISA plate 흡착용 항원으로 사용하였다.

2-3. BSA과 Sulfanilamide (SA)의 접합체 (SA-BSA)

Two-step glutaraldehyde법 (Avrameas, 1971)을 응용하여 SA와 BSA를 접합시켰다. 즉, 1.25% glutaraldehyde가 포함된 0.1M phosphate buffer (pH 5.0) 2 ml에 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) 0.1ml을 가하여 4℃에서 하룻동안 반응시켰다. 이 후 0.2M lysine 0.1ml를 가하고 실온에 2시간 반응시킨 다음 PBS (pH 7.2)에 일주일간 매일 2회씩 외액을 교환하며 투석하였다. 투석이 끝난 접합체액은 제균여과 (pore size 0.22 μ m)하여 냉장 보관하며 항혈청 생산에 사용하였다.

2-4. Gelatin과 SA의 접합체 (SA-Gel)

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

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

Wilson과 Nakane (1978)의 방법을 응용하여 합성하였다. 즉 HRP (RZ=3이상, Sigma Co.) 6mg을 2차중류수 1ml에 녹인 후 0.1M NaIO₄ (Sigma, USA) 0.3ml를 가하고 서서히 진탕시키며 실온에서 20분간 반응시켰다. 반응액은 4℃에서 1mM sodium acetate (pH 4.4)에 20시간 투석시킨 후 0.2M sodium carbonate-bicarbonate (pH 9.5)를 20 μ l를 가하고, 미리 0.01M carbonate (pH 9.5) 1ml에 protein A 5mg을 용해하여 준비해 둔 액과 섞고 실온에 2시간 교반시켰다. 이 후 0.4% sodium borohydride를 0.1ml 넣고 4℃에서 2시간 정치시킨 다음 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 투석하였다. 투석이 완료된 효소 접합체액은 BSA가 1% 되게 가하고 제균여과 (pore size 0.22 μ m)한 후 소분하여 -20℃에 보관하며 ELISA에 사용하였다.

4. 항혈청 생산

4-1. SMZ에 대한 항혈청 (anti-SMZ)

SMZ-BSA 1.5ml와 Freund's complete adjuvant (Sigma, USA) 3ml의 유탁액을 만들어 기니피프 복강내로 접종하였으며 추가접종은 15일, 35일, 52일에 초희의 방법과 동일하게 실시하였다. 매 추가접종 직전에 심장채혈로 약 1ml씩 취하여 항체를 검사하고, 최종접종 10일후에 전체혈을 하고 혈청을 분리하여 ELISA에 사용하였다.

4-2. 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 7일, 50일, 70일, 80일 간격으로 추가접종을 하였다. 추가접종은 접합체 0.25ml와 Freund's incomplete adjuvant 0.5ml의 유탁액을 사용하였다. 항체의 상승을 확인 후 심장을 통하여 전체혈하고 혈청을 분리하였으며, 분리한 혈청은 소분하여 -70℃에 보관하며 ELISA에 사용하였다.

5. 항체 측정

ELISA용 microplate (Polysorb U16, Nunc, Denmark)에 흡착용항원으로 제조한 SA-Gel 및 SMZ-Gel을 0.1M carbonate buffer (pH 9.6)로 2,000배 희석하여 각 well당 100 μ l씩 분주하고 37℃에 2시간 정치시킨 후 4℃에 하룻밤 정치시켜 흡착시켰다. 0.05% Tween 20이 용해된 PBS (PBS-T)로 4회 세척 후 gelatin이 0.2% 용해된 PBS (PBS-Gel)용액을 200 μ l씩 각 well에 넣고 4℃에서 30분간 blocking시켰다. 항혈청은 PBS-T 100배부터 2배수 계단희석하여 각 well에 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 여액은 제거하고 PBS-T로 4회 세척한 다음 Prot. A-HRP를 1,000배 희석하여 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. PBS-T로 4회 세척한 후 발색제는 0.1% ABTS (2-2'-azino-di-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid) 100 μ l를 첨가, 30분간 반응시킨 후 2차 증류수로 반응을 정지시키고 automatic reader (SLT-Labinstrument, Columbus, Austria)에 파장 405nm (495nm의 대조파장)의 filter를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

6. 경쟁적 효소면역 측정법 (Competitive ELISA)

Plate의 각 well (Costar 3590, USA 와 Nunc Polysorb, Denmark)에 SA-Gel 또는 SMZ-Gel 접합체 용액을 50mM carbonate (pH 9.6)로 희석하여 100 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 및 4 $^{\circ}$ C의 냉장고에서 하룻밤 정치시켜 흡착시켰다. 흡착된 plate는 PBS-T로 4회 세척한 후, 0.2% Gel-PBS를 200 μ l씩 가하고 4 $^{\circ}$ C에 30분간 정치시켜 봉쇄 (blocking)한 후 PBS-T로 4회 세척하고 건조시켜 ELISA에 사용하였다.

검사시료 및 표준농도의 SA 또는 SMZ를 각 well에 50 μ l씩 가한 뒤 anti-SA 또는 anti-SMZ가 희석된 PBS-T 용액 50 μ l 넣고 잘 섞은 후 실온에 1시간 반응시켜 plate에 고정된 항원과 시료속의 항원이 항원청과 경쟁적으로 반응하도록 하였다. 반응이 종료된 여액은 제거하고, PBS-T로 4회 세척한 후, Protein A-HRP 용액을 100 μ l 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 이후 PBS-T로 4회 세척하고, 0.1M citrate-phosphate (pH 4.0)에 0.1% ABTS 및 0.02% H₂O₂를 용해한 액을 100 μ l씩 각 well에 가하고 실온에서 30분간 발색반응시켰다. 반응정지를 위하여 2차증류수 100 μ l를 가한 즉시 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 SA용액 또는 표준 SMZ로 얻어진 흡광도 값은 SA 농도 또는 SMZ 농도 0ppb의 흡광도 값으로 나눈 Percent binding치의 백분율을 구하여 (B/B0%) 표준곡선을 작성하였으며, 시료의 값들은 표준곡선에 대입하여 sulfonamides의 유도체들과 SA농도 또는 SMZ농도를 산출하였다.

7. Anti-SMZ 혹은 anti-SA의 교차반응 조사

Anti-SMZ 또는 anti-SA가 SMZ 혹은 SA 이외의 다른 설파제들과도 교차반응을 보이는가 알아보기 위해 sulfamerazine, sulfadiazine, sulfisomidine, sulfaguanidine, sulfadimethoxine, sulfamethazine, sulfamonomethoxine, sulfisoxazol, sulfametoxazol, sulfaquinoxaline과 반응시켜 보았다. 교차반응의 정도는 blank well의 발색반응을 50% 저해하는 농도 (EC-50) (Waker and Baker, 1994)를 구하여 나타내었다.

8. 공정시험법과 비교

돈육 중의 잔류 SMZ을 ELISA로 측정한 결과를 공정시험법인 HPLC의 결과와 비교하여 연관성을 조사하였다. 한편, 돈뇨를 대상으로 ELISA를 실시하고 그 결과를 TLC법에 의한 결과와도 비교하여 보았다.

III. 결 과

1. Anti-SMZ 생산

각 추가접종 직전에 채혈한 기니피그 혈청을 PBS-T액으로 500배 희석하여 SMZ-Gel이 흡착된 well에 반응시켜 ELISA로 분석한 결과는 Fig. 1과 같이 나타났다. 접종횟수의 추가에 따라 항체가 순조로운 상승이 관찰되었다. 최종 접종 후 10일에 심장을 통하여 전채혈하고, 혈청을 분리하여 ELISA에 사용하였다.

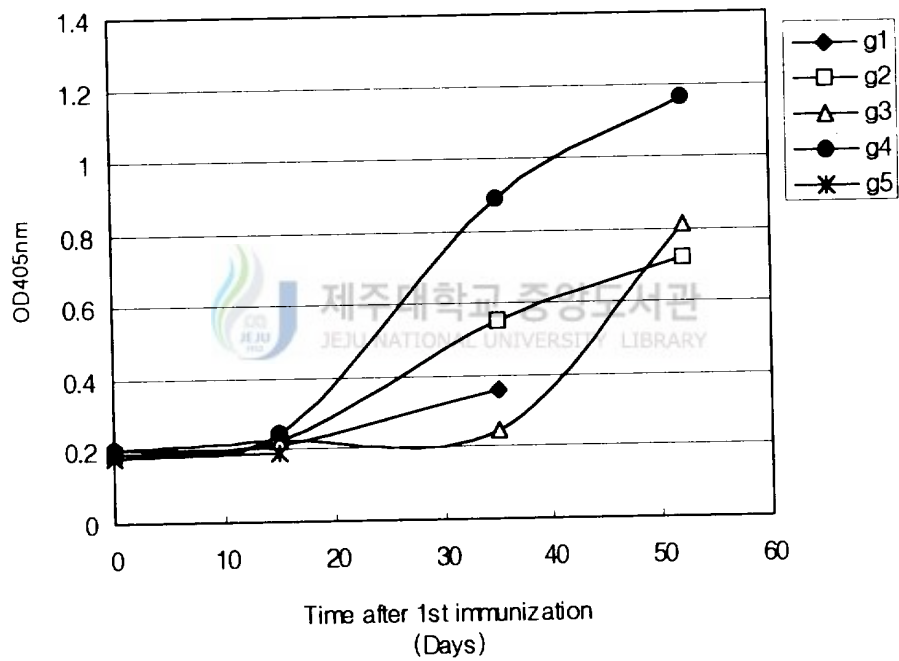


Figure 1. Development of anti-sulfamethazine antibody titers in SMZ-BSA immunized guinea pigs

2. SMZ 검출 ELISA의 최적조건

각 well의 흡착항원의 적정농도와 항혈청의 적정희석배수를 결정하기 위한 chekerboard titration의 결과 SMZ-Gel농도를 10,000배로 희석하여 흡착시키고 항혈청은 400배로 희석시켜 반응시켰을때 흡광도가 2.0이상의 값을 보였으며, 시료중의 SMZ에 의한 경쟁반응의 결과도 77.7%로 뚜렷하게 나타났다 (Table 1). 이 조건으로 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100ppb의 SMZ를 측정하여 ELISA를 실시한 결과를 Fig. 2에 나타내었으며, 1.0ppb이하의 낮은 농도까지도 검출이 가능하였다.

Table 1. Result of chekerboard titration using sulfamethazine-gelatin conjugate and guinea pig anti-sulfamethazine antibodies

coating SMZ-Gel. dil	anti-SMZ dil.			
	× 400	× 800	× 1,600	× 3,200
× 2,500	3.50 ¹⁾ /3.50 ²⁾ (100) ³⁾	3.50/3.50 (100)	2.65/2.85 (92.4)	1.55/1.59 (103.8)
× 5,000	3.50/3.50 (100)	3.20/3.52 (91.0)	1.95/2.21 (88.1)	0.95/1.09 (87.2)
× 10,000	3.37/3.38 (99.7)	2.12/2.73 (77.4)	1.45/1.76 (82.3)	0.83/0.98 (84.5)
× 20,000	1.60/1.78 (89.8)	1.10/1.49 (73.4)	0.91/1.18 (76.8)	0.55/0.69 (79.9)

1) OD at 2ppb of SMZ

2) OD at 0ppb of SMZ

3) percent binding : $(B/B_0)\% = \frac{\text{OD of 2 ppb}}{\text{OD of 0 ppb}} \times 100$

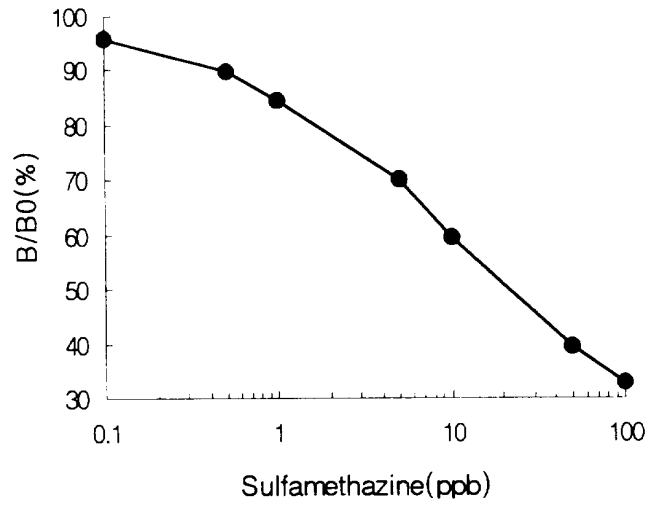


Figure 2. ELISA standard curve for sulfamethazine prepared using standards in PBS



3. Anti-SMZ와 다른 합성항균제간의 교차반응

Guinea pig에 면역시켜 얻은 anti-SMZ가 각종의 합성항균제에 대하여 혈청화적인 교차반응을 보이는가 알아보기 위하여 ELISA를 실시한 결과는 Table 2와 같다. Guinea pig anti-SMZ는 sulfamerazine외에는 다른 합성항균제와 유의한 교차반응을 보이지 않았다. 교차반응을 보인 sulfamerazine이 blank well의 발색반응을 50% 저해하는 농도(EC-50)는 2.0ppm였다. 또한, SMZ 자체의 EC-50값은 20ppb였다.

Table 2. Cross reactivity of guinea pig anti-sulfamethazine antibodies toward sulfamethazine analogues

Compounds	EC-50 ¹⁾ (ppm)
Sulfamethazine	0.020
Sulfamerazine	2.0
Sulfadimethoxine	- ²⁾
Sulfaguanidine	-
Sulfamethoxyridazine	-
Sulfanilamide	-
Sulfapyridine	-
Sulfisomidine	-
Sulfisoxazole	-

1) Concentration causing 50% inhibition in color development of sample wells compared with blank when using standard solutions

2) EC-50 greater than 10ppm or no reactivity up to 10ppm

4. 회수율

돼지 혈청을 대상으로 SMZ가 2.0ppm 및 0.2ppm이 되게 가하고 PBS-T로 50배 희석하여 ELISA를 실시하였으며, 조사한 결과는 87.4~102.5%의 회수율을 나타내었다 (Table 3).

Table 3. Recovery of sulfamethazine spiked in swine serum at the concentration of 2.0 and 0.2ppm by ELISA

Sera no.	SMZ added (ppm)	SMZ found (ppm)	% Recovery
CJ327	0.0	1.43	
	2.0	3.48	102.5
	0.2	1.66	101.8
KZ013	0.0	0.24	
	2.0	1.99	87.4
	0.2	0.43	92.5

5. 검출법 간의 결과 비교

돈육을 대상으로 실시하였으며, HPLC에 의한 결과와 비교하였을 때, Fig. 3과 같이 상관계수 r 값이 0.797로 나타났으므로 t -검정의 결과 99%의 유의수준에서 의미를 갖는 것으로 판단되어 두가지 방법에 의한 결과간의 상관관계는 매우 밀접한 것으로 나타났다.

(상수=0.1248, Y 추측값의 표준오류=0.763, $R=0.797$, 관측수=9, 자유도=7, X 계수=0.929, 계수값의 표준오류=0.266)

대일 수출용 돼지 30마리의 노를 대상으로 TLC법의 결과와 비교한 예를 Table 4에 나타내었다. TLC법으로 분석하였을 때는 8건에서 양성, 21건은 의양성, 1건은 음성으로 판정되었으며 정량적인 분석이 가능하지 않았으나, ELISA법으로 측정하였을 때 모든 돼지에서 0.05ppm이하로 나타났다.

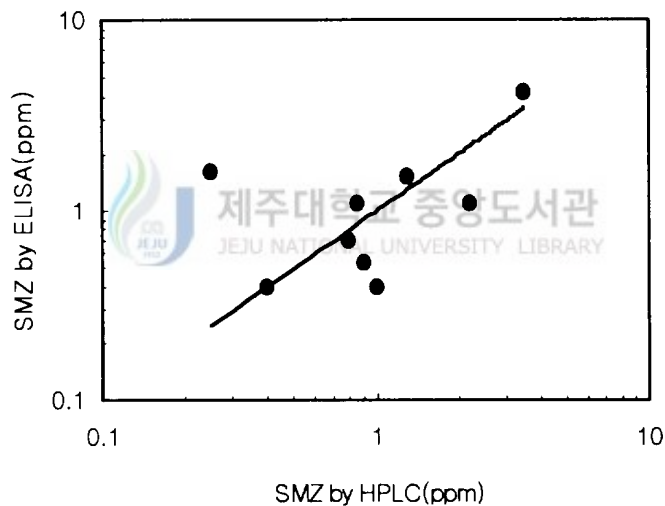


Figure 3. Correlation between ELISA and HPLC methodology in the determination of sulfamethazine in swine tissue (N=9, Slope=0.929, $R=0.797$)

Table 4. Sulfamethazine concentration in swine urine determined by ELISA and TLC

		O.D.	B/BO(%)	ELISA result	TLC result ²⁾ (ppm)	Estimated ¹⁾ conc. in Meat (ppm)
	0.2	0.753	48.1			2.5
Ref.	0.1	0.868	55.5			1.25
SMZ	0.05	0.923	59.1			0.625
(ppm)	0.025	0.988	63.2			0.3125
	0.00	1.563	100.0			0.00
	1	1.435	91.8	<0.05	D	
	2	1.233	78.9	<0.05	D	
	3	1.212	77.5	<0.05	D	
	4	1.074	68.7	<0.05	D	
	5	1.188	76.0	<0.05	P	
	6	1.282	82.0	<0.05	D	
	7	1.343	85.9	<0.05	D	
	8	1.483	94.9	<0.05	D	
	9	1.432	91.6	<0.05	P	
	10	1.452	92.9	<0.05	P	
	11	1.495	95.6	<0.05	P	
Urine	12	1.316	84.2	<0.05	P	
no.	13	1.306	83.6	<0.05	P	
	14	1.392	89.1	<0.05	P	
	15	1.437	91.9	<0.05	D	
	16	1.801	115.2	<0.05	D	
	17	1.422	91.0	<0.05	D	
	18	1.452	92.9	<0.05	D	
	19	1.373	87.8	<0.05	D	
	20	1.376	88.0	<0.05	D	
	21	1.291	82.6	<0.05	D	
	22	1.351	86.4	<0.05	D	
	23	1.312	83.9	<0.05	D	
	24	1.608	102.9	<0.05	P	
	25	1.443	92.3	<0.05	D	
	26	1.285	82.2	<0.05	N	
	27	1.293	82.7	<0.05	D	
	28	1.409	90.1	<0.05	D	
	29	1.118	71.5	<0.05	D	
	30	1.232	78.8	<0.05	D	

1) A level of 0.625ppm in urine has been shown to indicate a concentration of 0.050ppm in meat

2) P: positive; N: negative; D: dubious

6. Anti-SA 생산

SA-BSA를 토끼에 초회 면역후 약 50일 후부터 추가접종하며 항체의 변동을 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 2회째 추가접종 이후 항체가의 급속한 상승을 보였으며, 초회 면역후 80일째에는 심장을 통하여 전채혈하여 실험에 사용하였다.

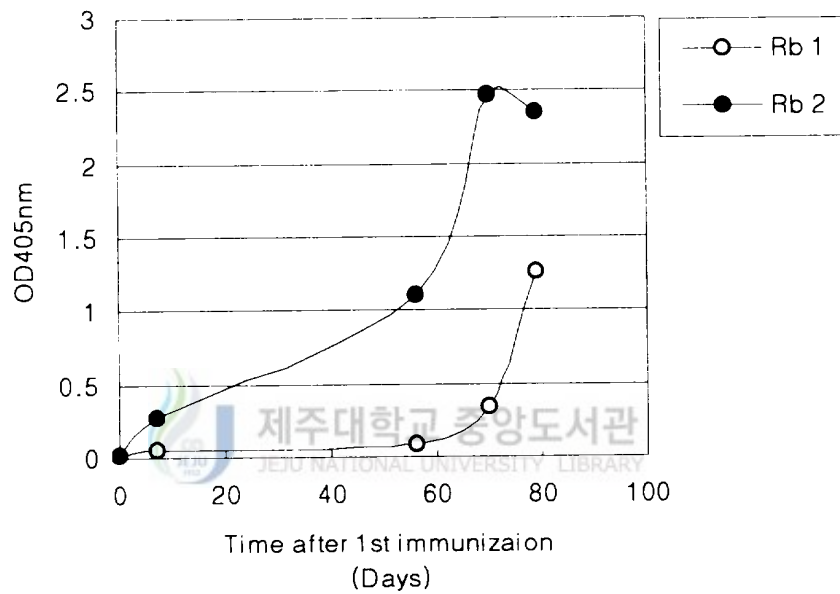


Figure 4. Development of anti-sulfanilamide antibody titers in SA-BSA immunized rabbits

7. SA 검출 ELISA의 최적조건

흡착항원과 항혈청의 적정 희석조건을 조사하기 위해 checker board titration 을 실시하였다. 각 혈청희석액에 SA를 0과 10ppm이 되게 가하고, 항혈청과 함께 50 μ l씩 각 well에 분주하고 1시간 동안 실온에서 반응시켰다 (Table 5). B/B0% 값 중 가장 낮은 80%값을 보이는 조건을 선택하였는데, 흡착항원을 20,000배 희석하고 항혈청은 800배 희석한 조건에서 84.8%로 경쟁반응이 가장 뚜렷하였다. 이 조건으로 1, 10, 100, 1000, 10000ppb의 표준 SA를 사용하여 ELISA를 실시한 결과는 Fig. 5와 같이 약 10ppb부터 10ppm의 범위에서 용량대 반응곡선이 형성되었다.

Table 5. Result of chekerboard titration using sulfanilamide-gelatin conjugate and rabbit anti-sulfanilamide antibodies

Coating SA-Gel. dil	Anti-SA dil.		
	$\times 800$	$\times 1,600$	$\times 3,200$
$\times 10,000$	1.38 ¹⁾ /1.22 ²⁾ (87.9) ³⁾	0.75/0.69 (91.5)	0.41/0.39 (94.4)
$\times 20,000$	0.92/0.78 (84.8)	0.55/0.48 (87.1)	0.32/0.27 (85.1)
$\times 40,000$	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 : $(B/B0)\% = \frac{\text{OD of 1 ppm}}{\text{OD of 0 ppm}} \times 100$

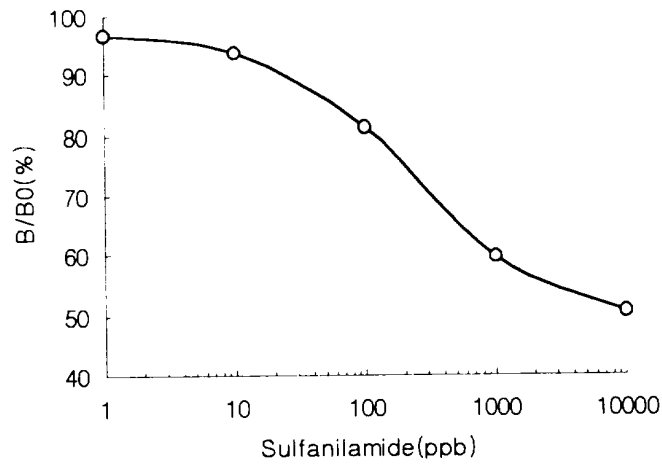


Figure 5. ELISA standard curve for sulfanilamide prepared using standards in PBS



8. 기타 합성항균제와의 교차반응

Anti-SA가 다른 합성항균제에도 교차반응을 일으키는지 알아보기 위해 10종의 다른 설파유도체 (sulfamerazine, sulfadiazine, sulfisomidine, sulfaguanidine, sulfadimethoxine, sulfamethazine, sulfamonomethoxine, sulfisoxazol, sulfametoxazol, sulfaquinoxaline)를 PBS-T에 단계별 농도로 희석하여 항혈청과 섞고 ELISA를 실시하였다. 그 결과 Table 6과 같이 SA를 제외하고 실험에 사용된 다른 합성항균제들과는 교차반응을 보이지 않았다.

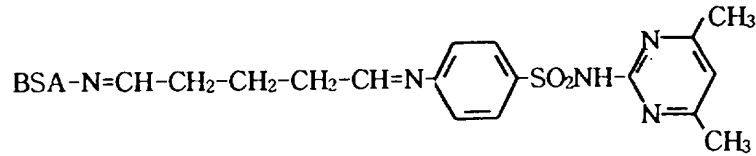
Table 6. Cross reactivity of rabbit anti-sulfanilamide antibodies toward sulfanilamide analogues

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

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

Figure 6. Structure of sulfamethazine-BSA conjugate and sulfanilamide-BSA conjugate

1. SMZ-BSA



2. SA-BSA

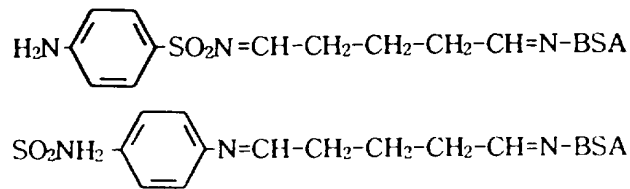
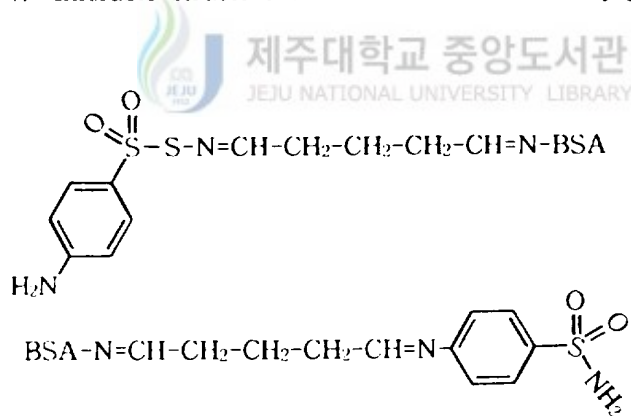


Figure 7. Inferable structure of Sulfanilamide-BSA conjugate



IV. 고 찰

SMZ검출을 위한 ELISA법의 개발에는 SMZ에 대한 항체의 생산이 필수적이거나 SMZ는 분자량 (MW: 278.32)이 작기 때문에 단독으로 면역원이 되기 어려우므로 BSA와 같은 단백물질을 carrier로 사용하여 접합시킨 면역원을 사용하였다. 면역원인 SMZ-BSA 및 흡착용 항원인 SMZ-Gel의 접합과정은 Dixon-Holland and Katz (1991)가 사용한 one-step glutaraldehyde법을 이용하였는데, 비교적 간단하며 정제과정상에도 SMZ이 분자량이 작은 물질이므로 단지 투석만으로도 이루어질 수 있었다. 또한 Protein A-HRP를 tracer로 사용하였기 때문에 직접 ELISA의 경우처럼 기니픽이나 토끼 혈청중의 anti-SMZ를 따로 순수분리해야 하는 과정이 필요치 않았으며, 다만 항혈청을 적당한 농도로 회석하여 사용하면 된다는 방법상의 편리함이 있었다. 또한, 제조방법이 단순하며 일반 ELISA에서도 광범위하게 사용되는 효소결합체이므로 상품화된 것을 구매하여 사용할 수도 있다는 장점이 있다.

면역원인 SMZ-BSA는 Fig. 6과 같이 SMZ의 NH₂기와 BSA의 아미노기를 glutaraldehyde에 의해 접합시킨 구조로 생각되며, 면역된 기니픽 개체간의 정도 차이는 있었으나, 항체가 상층이 순조로운 혈청을 택하여 실험에 사용하였다. 항원과 항혈청의 적정회석 조건으로 standard curve를 작성해 보았을 때 SMZ의 농도 1.0ppb의 수준까지 검출이 가능하였다. 이는 검사혈청을 50배로 회석하여 측정한다고 가정하더라도 그에 해당하는 factor를 환산하면 50ppb 즉 0.05ppm에 해당하게 되므로, Ranker 등 (1987)이 보고한 바 혈청에서 0.4ppm, 뇨에서 1.3 ppm 수준 이상일 때 근육에서 잔류기준치인 0.1ppm에 해당됨을 감안하면, 만족할 만한 민감도를 갖는다고 생각되었다. 이러한 값은 Singh 등 (1989)의 직접경쟁 ELISA 결과인 10.0ppb수준의 민감도 보다 더 우수한 결과로 사료된다.

각 설파제와의 교차반응을 조사해 본 결과 Dixon-Holland and Katz (1991), Fleeker and Lovett (1985), Prithipal 등 (1989)의 결과와 같이 sulfamerazine을 제외한 다른 설파제들과는 뚜렷하지 않았으며, 10ppm 수준까지의 높은 농도의

시료를 검사하였으므로 특이성에 관련한 문제점은 심각하지 않을 것으로 생각되었다. Anti-SMZ과 유일하게 교차반응을 보인 sulfamerazine은 SMZ의 pyrimidinyl기에서 6번의 methyl기가 배제된 구조의 물질이다. 그러므로 sulfamerazine의 경우 항원항체 결합력은 상대적으로 적었으나, 입체적인 방해현상 (steric hinderence)은 일어나지 않았으므로 교차반응이 일어났던 것으로 생각된다. 한편, sulfadimethoxine의 경우는 pyrimidinyl기의 N의 위치가 각각 4, 6번이라는 차이를 제외하고 SMZ과 동일한 구조임에도 anti-SMZ과 반응을 일으키지 않은 점으로 미루어 보아 단일 N원자 위치의 상이함이라 할지라도 항원항체 결합 반응에는 중대한 steric hinderence를 일으킬 수 있었던 것으로 생각된다.

본 연구의 ELISA법으로 돼지혈청 중의 SMZ 회수율을 조사하였을 때 87.4~102.5%의 범위를 나타내었다. 또한, 돈육내의 SMZ잔류량을 검사하여 HPLC 방법과 분석결과를 비교하였을 때 밀접한 상관관계를 나타내고 있어 본 ELISA방법은 공정시험법에 못지 않은 특이도와 민감도를 갖는 것으로 생각되었다.

Sulfonamides 유도체들은 화학구조상 sulfonamide ($\text{SO}_2 \cdot \text{NH}_2$) 혹은 para 위치의 amino기 (NH_2)가 여러화합물로 치환된 것으로, 이러한 설파제들은 세균의 성장에 필수적인 엽산 (folic acid)의 구성성분인 ρ -aminobenzoic acid (PABA)와 경쟁적으로 반응을 일으켜 항균효과를 나타낸다 (Warren, 1983). SA는 모든 설파유도체들의 공통구조인 PABS (ρ -amino benzene sulfonamide)로 구성된 분자이므로 SA에 대한 항체는 다른 설파제를 공통적으로 검출하기 위한 single ELISA에 중요한 요점이 될 것이다. 따라서, 설파제의 공통구조인 PABS의 radical로서 amino기를 갖는 sulfanilamide를 carrier protein과 접합시킨다면, PABS에 대한 항혈청을 생산할 수 있을 것으로 생각하여 SA에 대한 흡착용 항원 및 면역원을 합성하였다. 면역원인 SA-BSA를 접종한 토끼에서는 항체가의 순조로운 상승을 보였으며, 얻어진 anti-SA를 사용하여 ELISA를 실시한 결과, SA농도 10.0ppb 수준의 검출한계를 나타내었다. 또한, SA ELISA가 다른 설파제와도 교차반응을 보이는지를 조사하여 보았다. 즉, 실험에 사용한 10가지의 설파유도체들을 1ppb에서 100ppm까지의 농도로 계단회석하여 ELISA를 실시하였다.

이러한 맥락의 연구는 Sheth and Sporns (1991)에 의해서도 시도된 바 있다. 즉, N^1 -[4-(carboxymethyl)-2-thiazolyl]sulfanilamide와 BSA를 접합시킨 면역원으로 항체를 생산하고, N^1 -(4-Nitrophenyl)sulfanilamide와 ovalbumin 접합체를 항원으로 이용한 ELISA법을 개발하였으며, 이 접합체들과 반응성을 갖는 다수의 설파제 (sulfapyridine, sulfamethizole, sulfadiazine, sulfamethoxazol, sulfamoxole, sulfadimethoxine, sulfathizole)의 잔류를 측정할 수 있었다고 하였다. 그러나, 본 연구의 결과로는 유의할 만한 교차반응을 보이는 것은 없었다. Anti-SA가 설파제들과 반응을 보이지 않은 이유는 다음과 같이 3가지 경우를 추정할 수 있겠다. 첫째, 항체를 생산하기 위해 SA와 BSA를 접합하는 과정에서 Fig. 6과 같이 2가지 형태의 분자에 대한 항체가 형성될 것으로 예상하였는데 그 중, SA의 R group인 아미노기가 BSA와 접합된 형태보다 반대편의 PABS 쪽의 아미노기에 접합된 면역원이 대부분이었다면 이에 대한 항체가 상대적으로 많이 생성될 것이고, 이러한 항형청은 다른 설파제와의 결합 반응을 나타내지 않고 오로지 SA와만 반응하였을 것이다. 그 다음으로는 Vallejo 등 (1982)이 arm effect에 관해 지적한 것과 같이 SA-BSA 자체의 길이가 짧아 항원인 SA-Gel의 항원결정기 (epitope)가 충분히 노출되지 못했을지도 모르지만, SMZ에 대한 항체 형성의 경우를 볼때 이러한 가능성은 희박하다고 생각된다. 입체적인 구조의 관점에서 보면, 요구되는 면역원 (H_2N -benzene- $SO_2N=CH-CH_2-CH_2-CH_2-CH=NH_2$ -BSA)의 경우는, SA가 carrier protein의 표면과 접합하여 이루는 각도가 수직을 이루지 못하고 경사를 이루며 접합되므로 (Fig. 7), 항원결정기가 SA의 측면으로 구성될 것으로 여겨지며, 이러한 형태라면 SA와는 상이한 구조가 연장된 다른 설파제와 반응할 때 중대한 steric hinderence가 일어났을 수도 있었을 것으로 추측되나, 본 실험에 적용한 설파제의 제한으로 말미암아 추가적인 확인이 어려웠다.

본 연구에서 개발한 SMZ 및 SA ELISA방법이 Kit로 실용화된다면 SMZ 과 SA의 검출을 위한 유용한 screening방법이 될 것으로 생각된다. 한편, 다수의 설파제를 screening 할 수 있는 ELISA 방법을 개발하기 위해서는, 금번 실험에서 조사하지 않았던 다양한 설파제와의 반응을 추가적으로 고찰할 필요가 있을 것

으로 생각되며, 아미노기가 손상되지 않은 접합방법에 의한 합성체로 항혈청을 생산하는 방법 (Würzburger 등, 1977)도 고려해 보아야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

축산물 중의 설파제 잔류를 검출하기 위한 경쟁적 ELISA법을 개발하여 돼지의 근육, 혈청 혹은 PBS 용액 중의 SMZ와 SA를 측정하였다.

SMZ ELISA의 경우 표준용액 0.1~100ppb 사이에서 용량에 비례하는 반응곡선이 구성되었다. 2~20ppb의 spike sample로 조사한 회수율은 87.4~102.5%를 보였다. 교차반응 시험에 사용된 8 종류의 설파제 중 sulfamerazine만이 2.0ppm의 EC-50 값을 보이며 교차반응을 나타내었다.

SA ELISA의 경우 SA 표준용액 10~10,000ppb 사이에서 용량에 비례하는 반응곡선이 구성되었다. SA에 대한 항혈청은 교차반응 시험에 사용된 10 종류의 설파제와 교차반응을 나타내지 않았다.

본 연구에서 개발한 protein A-HRP 접합체를 이용한 새로운 방법의 경쟁적 ELISA는 도축전 돼지의 근육 혹은 혈청 중의 설파제 잔류 검출을 위한 스크리닝 목적으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.



VI. 참고 문헌

- Ashworth, R.B., Epstein, R.L., Thomas, M.H. and Frobish, L.T. 1985. Sulfamethazine blood/tissue correlation study in swine. *Am J Vet Res.* 47: 2596~2603
- Avrameas, S. and Ternyck, T. 1971. Peroxidase labelled antibody and Fab conjugate with enhanced intracellular penetration. *Immunochem.* 8: 1175~1179
- Boison, J.O. and Keng, L.J.-Y. 1995. Determination of sulfadimethoxine and sulfamethazine residues in animal tissues by liquid chromatography and thermospray mass spectrometry. *J Assoc OFF Anal Chem.* 78(3): 651~658
- Booth, N.H. and McDonald, L.E. 1988. Sulfonamides. *Veterinary pharmacology and therapeutics*, 6th ed, Iowa State University Press. pp. 785~795
- Le Boulaire, S., Bauduret, T.C. and Andre, F. 1997. Veterinary drug residues survey in meat: An HPLC method with a matrix solid phase dispersion extraction. *J Agri Food Chem.* 45: 2134~2142
- Brunner, D., Lenherr, F. and Seiler, M.W. 1994. Charm-II test as a valuable screening method to detect sulfonamide residues in slaughter Pigs. 222~225
- Bui, L.V. 1993. Liquid chromatographic determination of six sulfonamide residues in animal tissues using postcolumn derivatization. *J Assoc OFF Anal Chem.* 76(5): 966~976

Carignan, G. and Carrier, K. 1991. Quantitation and confirmation of sulfamethazine residues in swine muscle and liver by LC and GC/MS. *J Assoc OFF Anal Chem.* 74(3): 335~341

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.* 74(5): 784~789

Dixon-Holland, D.E. and Katz, S.E. 1988. Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue. *J Assoc OFF Anal Chem.* 71(6): 1137~1140

Fleeker, J.R. and Lovett, L. 1985. Enzyme immunoassay for screening sulfamethazine residues in swine blood. *J Assoc OFF Anal Chem.* 68(2): 172~174

Goth, A. 1974. Sulfonamides. *Medical Pharmacology.* 7th ed. The C. V. Mosby Company. pp. 562~574

Mooser, A.E. and Koch, H. 1993. Confirmatory method for sulfonamide residues in animal tissues by gas chromatography and pulsed positive ion-negative ion-chemical ionization mass spectrometry. *J Assoc OFF Anal Chem.* 76(5): 976~982

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

Ram, B.P., Singh, P., Martins, L., Brock, T., Sharkov, N. and Allison, D. 1991. High-volume enzyme immunoassay for sulfamethazine in swine. *J*

Assoc Anal Chem. 74(1): 43~46

Randeker, V.W., Reagan, J.A., Engel, R.E., Soderberg, D.L. and Mcneal, J. E. 1987. Serum and urine as predictor of sulfamethazine levels in swine muscle, liver and kidney. *J Food protection.* 50: 115~122

Sheth, H.B. and Sporns, P. 1991. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. *J Agric Food Chem.* 39: 1696~1700

Singh, P., Ram, B.P. and Sharkov, N. 1989. Enzyme immunoassay for screening of sulfamethazine in swine. *J Agric Food chem.* 37(1): 109~114

Smither, R., Lott, A.F. and Dalziel, R.W. 1980. Antibiotic residues in meat in the United Kingdom; An assessment of specific tests to detect and identify antibiotic residues. *J Hyg Camb.* 85: 359~369.

Tsai, C.E. and Fusao, K. 1995. Liquid Chromatographic determination of fluorescent derivatives of six sulfonamides in bovine serum and milk. *J Assoc OFF Anal Chem.* 78(3): 674~678

Unruh, J., Schwartz, D.P. and Barford, R.A. 1993. Quantitation of sulfamethazine in pork tissue by thin-layer chromatography. *J Assoc. OFF Anal Chem.* 76(2): 335~341

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: 572~580

Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A. 1979. Setting up ELISA. *The Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)*. Dynatech Laboratory, Inc. pp. 37~40

Walker, C.C. and Barker, S.A. 1994. Extraction and enzyme immunoassay of sulfadimethoxine residues in channel catfish(*Ictalurus punctatus*) muscle. *J Assoc OFF Anal Chem.* 77(4): 908~916

Warren, R.G. 1983. Sulfonamides. *Principles of Pharmacology*. The C. V. Mosby Company. pp. 147~153

Würzburger, R.J., Miller, R.L., Boxenbaum, H.G. and Spector, S. 1977. Radioimmunoassay of atropine in plasma. *J Pharm. Exp. Thera.* 203(2): 435~441

박준조, 이규춘, 고흥범. 1994. 고속액체크로마토그래피에 의한 식육중 설파제 잔류량 분석에 관한 연구. *J Vet Publ Helth.* 18(4): 317~325

보건복지부고시 제96-10호. 1996. 9. 5.

손성완, 조병훈, 진남섭, 이혜숙, 윤순학, 김재학, 이재진, 이영순. 1996. 식육중 잔류 항균물질의 검출을 위한 *Bacillus megaterium* 디스크 검사키트 개발. *J Fd Hyg Safety.* 11(4): 315~321

이은섭. 1997. 돈육중 잔류설파제의 Screening 검사법에 관한 고찰. *J Kor Vet Med Assoc.* 33(3): 163~169

정규생, 채명식, 김창동, 김종배. 1993. 액체 크로마토그래피를 이용한 동물 근육조직 중의 합성항균제 동시 분석. *J Fd Hyg Safety.* 8(1): 25~35

남상현. 1995. 미국의 축산물 검사제도. *J Kor Vet Med Assoc.* 31(7): 457~473

Development of a Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Residual Sulfonamides in Animal Products

Seong-Hee Kim

Department of Veterinary Medicine, Graduate School

Cheju National University

Cheju, Korea

(Supervised by Professor Yoon-Kyu Lim)

Abstract

A novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to screen animal products for residual sulfonamides. ELISA was based on the limited binding of sulfonamide gelatin conjugates immobilized on microtiter wells to anti-sulfonamide antibodies in competition with residual sulfonamides and followed by the uptake of protein A peroxidase conjugate.

According to the principle, residues of sulfamethazine (SMZ) and sulfanilamide (SA) in swine serum, urine or in phosphate buffered saline were measured. In SMZ ELISA, standard curves were

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

constructed over 0.1 to 100ppb of SMZ. Recoveries of SMZ in spiked samples between 2ppb and 20ppb ranged from 87.4% to 102.5%. Among 8 sulfonamide analogues tested for specificity, only sulfamerazine showed significant cross-reactivity. The EC-50 value (concentration causing 50% inhibition of color development of sample wells compared with blank wells when using standard solutions) of sulfamerazine was 2.0ppm. In SA ELISA, standard curves were constructed over 10 to 10,000ppb of SA. Anti-SA antibodies did not show cross-reactivity with tested 10 derivatives of sulfonamides.

This competitive ELISA using protein A-HRP conjugate could be applied as a convenient and rapid slaughter house screening method for residual sulfonamides in edible products.



Keywords : Sulfamethazine (SMZ), Sulfanilamide (SA), Competitive enzyme-linked immunosorbent assay, Protein A, Drug residues

감사의 글

대학생활 동안 먼발치에서 지켜봐 주셨던 모든 분들께 감사의 글을 전합니다. 늘 부족한 저에게 오랜기간 동안 아낌없는 사랑과 가르침을 베풀어 주신 임윤규 교수님께 가슴깊이 감사드립니다.

그리고, 석사과정동안 많은 조언을 아끼지 않으셨던 신태균교수님과 박전홍교수님을 비롯한 모든 교수님께 감사의 마음을 드립니다. 또한, 바쁘신 가운데 정성으로 논문을 심사해 주신 보건환경연구원의 고용구원장님께도 감사드립니다.

실험하는 동안 많은 도움을 주신 공중보건학교실의 김우택계장님, 김영주선생님, 양재혁선배, 후배들에게도 다시 한번 감사를 전합니다.

아울러, 한결같은 염려와 사랑으로 뒷바라지 해주신 부모님과 가족들 그리고 친구들과 이 기쁨을 함께하고자 합니다.

