

잔류 살충제 이미다크로프리드의 신속한 검출

Rapid Detection of the Residues of the Insecticide Imidacloprid

송석진*

조한근*

이재구**

정희원

S. J. Song

H. K. Cho

J. K. Lee

1. 서론

농산물의 품질 향상과 생산성 증대를 위해 농약의 적절한 사용이 필요하다. 그러나 농약을 적절히 사용해도 수확 농산물의 표면이나 내부에는 농약이 잔류할 가능성이 항상 있다. 농약의 과다한 잔류는 국민 보건상 커다란 문제가 될 수 있으므로 농약의 잔류량을 신속히 측정할 수 있는 분석법이 절실히 요구되고 있다(박, 2003).

살충제 Imidacloprid는 유기인계 살충제로 해충에 전신마비, 이완, 활동성 저하 등을 일으켜 박멸한다. 국내에서는 굴굴나방, 조팝나무 진딧물, 벼멸구, 굽벙이 류 등의 방제를 위해 감귤, 사과, 고추, 배, 장미, 복숭아 및 벼 농사에 광범위하게 사용되고 있다(Bayer CropScience-Korea, 2002).

관행적인 잔류농약 분석은 주로 가스 크로마토그래피(GC)나 고속액체 크로마토그래피(HPLC)에 의존하고 있는데, 분석을 위해 일정량의 시료를 마쇄하고 적당한 유기용매로 추출하고 정제한다. 따라서 이 방법들은 많은 경비와 시간, 노력, 고가의 장비 및 숙련된 기능을 필요로 한다. 최근에 잔류 살충제 Imidacloprid의 검출을 위해 관행적인 분석법이 지니는 단점을 보완하기 위해 기존 방법보다 신속하고 감도가 예민하며, 특이성과 선택성을 가지는 동시에 가격이 저렴한 효소면역분석법(ELISA) 개발에 관한 연구가 수행되었다(이 등, 2001). 면역기법은 기존의 분석법에 의해 정량하기 어려운 화합물들에도 응용할 수 있고, 저 농도의 잔류량을 지닌 다량의 시료를 높은 신뢰도로 분석할 수 있는 기법이다. 그러나 최근 개발된 효소면역분석법은 관행적인 대형기기에 의한 농약분석법보다는 경비, 시간 및 노력 등은 단축하였으나, 여전히 실험실로 시료를 이동해야 하며, 최소 2시간 이상의 분석시간이 요구되어, 신속한 검출을 위해서는 현장에서 사용 가능한 실시간 측정장비가 필요하다.

바이오 센서는 현장에서의 실시간 측정을 가능하게 하여 보건 의료 및 국방 분야를 중심으로 개발에 대한 관심이 급증하고 있으며, 최근 들어 농업 생명과학 분야에서도 많은 연구 개발이 진행되고 있다. 본 연구는 농산물에 잔류하는 농약의 신속한 검출을 위한 바이오센서 개발의 선행연구로서 기존에 실험실용으로 개발된 효소면역기법을 기초로 하여 살충제 Imidacloprid를 신속히 검출할 수 있는 방법을 개발하고 평가하는데 있다.

* 충북대학교 농과대학 농업기계공학과

** 충북대학교 농과대학 농화학과

2. 재료 및 방법

가. 시약 및 재료

Imidacloprid의 최적화 효소면역법을 위한 코팅 항원으로 haptent-1-BSA을 사용했으며 항체로는 haptent-2-KLH를 사용하였다. 이들 항원과 항체는 충북대학교 농화학과 실험실에서 제조하였다. 그리고 secondary antibody인 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG와 기질인 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine(TMB)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO., U.S.A)로부터 구입하였다.

Microplate는 Maxisorp 96-well microtiter plate(Nunc-Immuno plate, Maxisorp surface, Roskilde, Denmark)를 사용하였고, microplate reader는 Bio-Rad Model 550(Hercules, CA)를 사용하였다.

나. 효소면역분석법을 위한 완충용액의 조제

효소면역분석법을 위한 완충용액은 EPA Guideline(Lee 등 2001, 이 등 2001, 박 2003)에 따라서 제조하였다.

- **Coating buffer:** Na_2CO_3 0.795g과 NaHCO_3 1.465g을 약 500ml의 초순도 증류수에 녹이고 pH를 9.6으로 맞춘 후 최종부피를 500ml로 하여 4℃냉장고에 보관 사용하였다.
- **10×PBS (phosphate buffered saline):** NaCl 640g, KH_2PO_4 16g, Na_2HPO_4 91.96g, KCl 16g을 약 7L의 초순도 증류수에 서서히 교반하면서 녹이고 pH를 7.5로 맞춘 후 최종부피를 8L로 하여 실온에서 보관 사용하였다.
- **1×PBS :** 100ml의 상기 10×PBS를 초순도 증류수로 10배 희석하고 필요하다면 pH를 8로 맞춘 후 실온에 보관 사용하였다.
- **1×PBST(0/05% Tween 20):** 100ml의 상기 10×PBS 와 400 μl 의 Tween 20을 용기에 넣은 후 거품이 생기지 않도록 주의하면서 초순도 증류수로 1L가 되도록 부피를 맞춘 후 실온에 보관 사용하였다.
- **Washing buffer(0.1×PBS + 0.05% Tween 20):** 80ml의 상기 10×PBS와 4ml의 Tween 20을 용기에 넣은 후 거품이 생기지 않도록 주의하면서 초순도 증류수로 최종부피를 8L가 되도록 하였다.
- **Horseradish peroxidase 실험용 citrate-acetate buffer:** 13.61g의 sodium citrate(100 mM)를 약 1L 초순도 증류수에 녹인 후 acetic acid로 pH를 5.5로 조절하고 1L로 맞추어 사용하였다.
- **1 % H_2O_2 용액:** 30% H_2O_2 1ml을 29ml 초순도 증류수에 넣고 플라스틱용기에 담아 냉장고에 저장하였다.
- **0.6 % 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB):** 60mg의 Tetramethyl-benzidine을 10

ml의 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹인 후 실온의 암소에 저장하였다.

- 최종 substrate buffer: DMSO에 녹인 0.6 % TMB 용액 0.4ml과 1 % H₂O₂ 0.1 ml을 상기의 citrate-acetate buffer 25ml에 가하여 잘 섞은 후 바로 사용. 이 경우 buffer와 TMB의 온도는 실온이어야 한다.

다. 경쟁적 간접 효소면역분석법(Competitive indirect ELISA)

그림 1은 본 연구의 기초가 된 경쟁적 간접 효소면역분석법을 간략하게 보여준다. 경쟁적 간접 효소면역 분석법은 먼저 96-well microtiter plate(Nunc-Immuno plate, Maxisorp surface, Roskilde,Denmark)의 각 well에 pH 9.6의 코팅 buffer로 희석한 코팅항원을 100 μ l (단백질 농도: 5 μ g/ml)씩 주입한다. 그후, 4 °C에서 하룻밤 방치한 후 washing buffer(0.1 \times PBST)로 5회 세척하여 plate에 코팅이 안된 항원을 제거하고, 코팅이 안된 well 부위를 blocking 하기 위하여 각 well에 200 μ l씩 skim milk(3% in 1 \times PBS)를 추가한다. 그후 37 °C에서 1시간 incubation하고 다시 상기방법으로 plate를 세척한다. 다음으로 코팅된 plate에 1 \times PBS로 희석한(1:16000) 다클론 항체와 분석 시료인 Imidacloprid의 각 농도별 용액을 50 μ l씩 첨가하고 잘 혼합하여 실온에서 1시간 반응시킨다. 반응 후 다시 세척하고, 이차항체에 효소가 표지된 goat anti-rabbit IgG-Horseradish peroxidase 희석액 (1:10000 diluted with 1 \times PBST)을 100 μ l씩 추가한다. 실온에서 1시간 반응 후 세척하고 substrate buffer 100 μ l씩을 각 well에 가해 파란색으로 발색시킨다. 약 15분 후에 각 well에 발색반응을 정지시키기 위해 4N-H₂SO₄을 50 μ l씩 추가한다. 황색으로 변한 plate를 dual wavelength mode(450-655 nm)에서 흡광도를 측정(Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad)한다(Lee등, 2001 박, 2003).

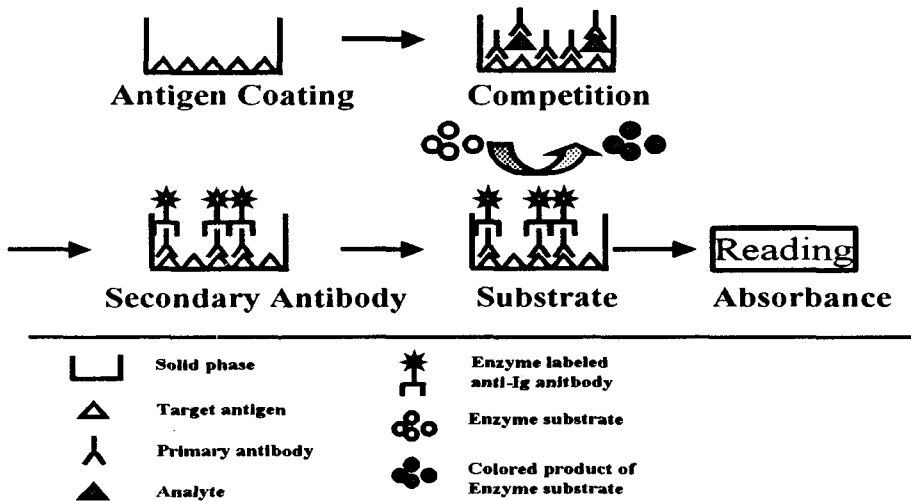


Fig. 1 Scheme of competitive indirect ELISA.

Imidacloprid 표준용액의 농도는 25000ng/ml 에서 0.0128ng/ml로 희석하여 사용하였다. 표준용액에 의한 표준곡선은 그림 2와 같이 S자형으로 fitting 되고, 4개의 계수를 갖는 지수식으로 식 1과 같이 표시된다(Lee등 2001, 이동 2001, 박 2003).

$$Y = (A - D)/(1+(X/C)^B)+D \quad (\text{Eq. 1})$$

여기에서 A : Imidacloprid의 최대 농도에 따른 흡광도

B : 직선구간의 기울기

C : 공시료의 흡광도를 50%를 저해하는 Imidacloprid의 농도(ng/ml), IC₅₀

D : Imidacloprid의 최소 농도에 따른 흡광도

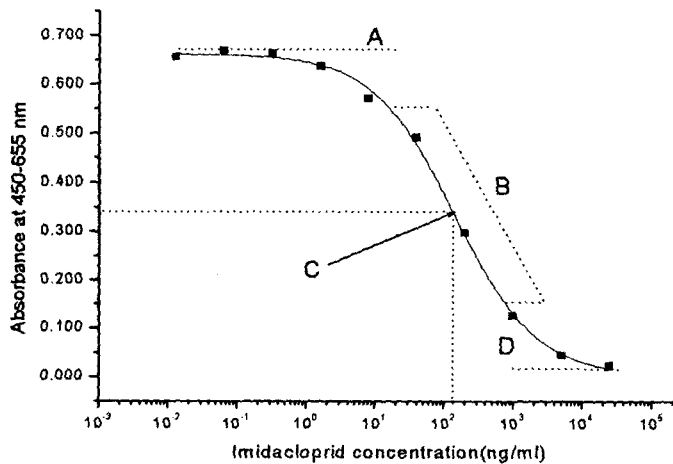


Fig. 2 Four parameter log-logistic curve fitting model

라. 수정된 경쟁적 간접 효소면역분석법

이미 개발된 경쟁적 간접 효소면역분석법은 소요시간을 단축하기 위해 다음과 같은 변화를 주었다. 표준방법에서 1시간 소요되는 incubation(표 1, 단계 7과 10) 시간을 30분, 15분, 5분으로 단축하여 실험을 하였다. Incubation 시간만의 축소에는 한계가 있으므로, 코팅 항원과 항체의 농도에 따른 시간 감소를 측정하였다. 코팅 항원농도를 5 µg/ml에서 50 µg/ml로 증가시키고, 항체의 희석비를 1:16000에서 1:8000과 1:4000으로 각각 증가시켰다. 또 incubation 시간을 30분, 15분, 5분(표 1, 단계 7과 10)으로 변화시키며 감도측정을 수행하였다. 표1은 개선된 방법을 나타낸다. 항체와 분석물인 Imidacloprid의 각 농도별 용액을 각각 50µl씩 첨가하고 난 뒤에 반응을 위한 incubation 시간과 2차 항체를 첨가한 뒤의 incubation 시간을 1시간에서 30분, 15분, 5분으로 변경하여 과정을 반복한 후 흡광도를 측정하였다

Table 1. Modified method for imidacloprid ELISA

Immobilization of Antigen
1. Immobilize antigen on plates(100 μ l , 5 μ g/ml , 50 μ g/ml, 12h, 4 $^{\circ}$ C)
2. Washing plate(1 \times PBS + 0.05% Tween20, 5 times)
3. Blocking plate(200 μ l , 1 \times PBS + 3% skim milk, 2h ,37 $^{\circ}$ C)
4. Washing plate(1 \times PBS + 0.05% Tween20, 5 times)
Binding
5. Add 50 μ l of standard or sample solution.(25000, 5000, 1000, 200, 40, 8, 1.6, 0.32, 0.064, 0.0128 ng/ml)
6. Add 50 μ l of the dilute polyclonal antibody(1:16000 , 1:8000, 1:4000)
7. Incubate for 30, 15, 5 min at 25 $^{\circ}$ C
8. Washing plate(1 \times PBS + 0.05% Tween20, 5 times)
9. Add 100 μ l of 2nd-antibody(goat anti-rabbit IgG-Horseradish peroxidase, 1:10000)
10. Incubate for 30, 15, 5 min at 25 $^{\circ}$ C
11. Washing plate(1 \times PBS + 0.05% Tween20, 5 times)
Development
12. Add 100 μ l of substrate buffer (citrate buffer, 0.6% TMB, 1% H ₂ O ₂)
13. Incubate for 15, 5 min at 25 $^{\circ}$ C
14. Add 50 μ l of stop solution(4N-H ₂ SO ₄)
15. Read optical density on microplate reader.

3. 결과 및 고찰

가. Incubation 시간 변화에 따른 결과

그림 3과 그림 4는 incubation 시간을 각각 30분, 15분으로 했을 때의 흡광도 측정 결과이다. Incubation 시간이 30분일 때와 15분일 때의 IC₅₀값은 각각 38 ng/ml 와 45 ng/ml로 측정되었다. 이 값은 표준 방법의 IC₅₀ 값 17 ng/ml 보다는 큰 값이지만, 국내의 작물별 Imidacloprid 잔류허용량이 0.05~6.0 ppm인 것을 볼 때 최소검출한계가 30분일 때 0.038ppm, 15분 일 때 0.045ppm으로 좋은 감도를 가지므로, 검출에 사용될 수 있는 것으로 나타났다.

나. 코팅항원의 농도변화에 따른 결과

그림 5와 그림 6은 incubation 시간을 5분으로 하고, 코팅 항원농도는 50 μ g/ml이고 항체의 희석비가 각각 1:8000과 1:4000일 때의 흡광도 측정결과이다. 그림에서 보는 것처럼 흡광도는 급격히 감소하였으나 IC₅₀ 값에는 표준방법과 비교할 때 큰 차이가 없으며, 항체의 희석비가 1:4000일 때가 더 낮게 측정되었다.

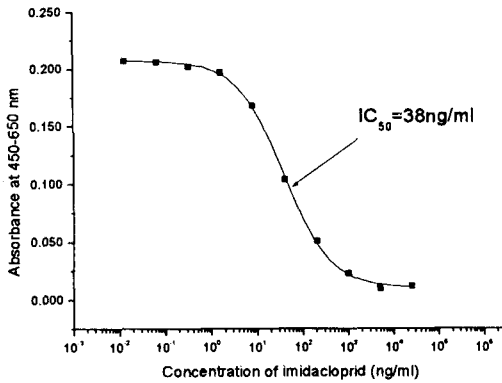


Fig. 3 The standard curve of the incubation for 30 minute.

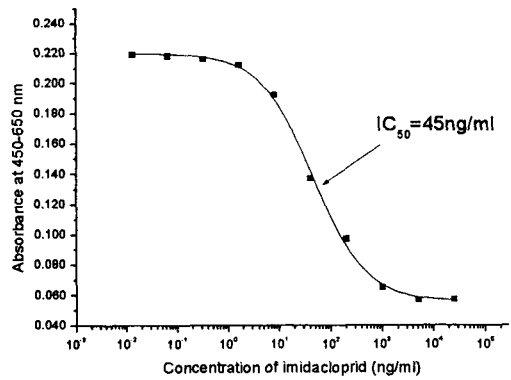


Fig. 4 The standard curve of the incubation for 15 minute.

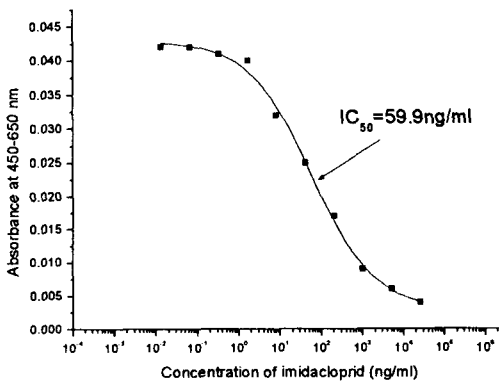


Fig. 5 The standard curve of the coating antigen at 50 $\mu\text{g/ml}$ and the dilution of the antiserum at 1:8000.

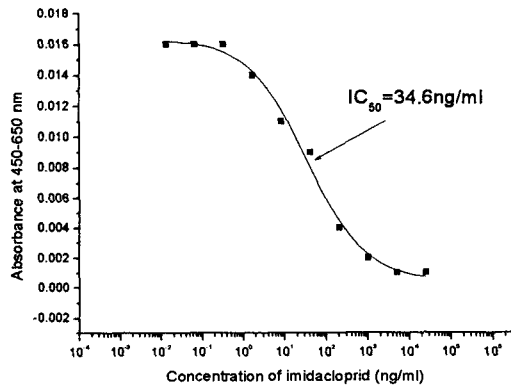


Fig. 6 The standard curve of the coating antigen at 50 $\mu\text{g/ml}$ and the dilution of the antiserum at 1:4000.

4. 결론 및 요약

본 연구는 잔류 Imidacloprid의 실시간 검출을 위한 바이오 센서 개발의 선행 연구로서 실시간 효소면역분석법을 개발하기 위해 실행되었다. 이미 개발된 실험실용 효소면역분석법은 HPLC나 GC에 비해 노력과 분석시간을 절약할 수 있다. 그러나 측정에 최소 2시간 이상이 소요되므로 실시간 측정에 사용하기는 부적합하다. 총 분석시간의 단축을 위해 incubation 시간을 단축하고 이에 따른 감도의 변화를 관측한 결과 IC_{50} 값이 38 ng/ml과 45

ng/ml로 실험실용 효소면역분석법의 IC₅₀값인 17 ng/ml 보다 높게 나타났으나, 국내 작물별 imidacloprid의 허용 잔류량의 최소 검출한계인 0.05 ~ 6.0 ppm보다 낮은 값을 가지므로 현장적용에 문제가 없다고 판단된다. 실험실용 효소면역분석법의 코팅항원농도인 5 μl/ml에서의 incubation시간 단축에는 한계가 있어 코팅항원농도를 50 μl/ml으로하고 항체의 희석비를 1:8000과 1:4000으로 증가시켜 흡광도를 측정하였다. 총 분석 시간을 2시간에서 15분으로 단축할 수 있었으며, 이때의 IC₅₀ 값은 59.9 ng/ml과 34.6 ng/ml 로서 비교적 낮은 값이므로 감도에는 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. Microplate는 반응조의 수량이 96개이며, 용량이 350 μl로서 용량도 제한되어 있어 현장용에는 적합하지 않을 뿐 아니라 코팅항원의 농도를 높이는데 한계가 있다. 향후 microplate가 아닌 흡착성이 좋은 일회용 멤브레인이나 일회용 polystyrene cuvetts 등을 이용해서 감도도 유지하면서 반응시간을 보다 단축하기 위한 연구가 계속될 예정이다.

5. 참고 문헌

1. Claycomb, R.W., M. J. Delwiche, C. J. Munro and R. H. BonDurant. 1996. Enzyme Immunoassay for On-line sensing of milk progesterone. Trans. of the ASAE 39(2):729-734
2. Crowther, J. R. 2001. The ELISA Guidebook. Humana Press Totowa, New Jersey.
3. Delwiche, M. J., E. Cox, B. Goddeeris, C. Van Dorpe, J. De Baerdemaeker, E. Decuypere and W. Sansen. 2000. Biosensor to detect Penicillin residues in food. Trans. of the ASAE 43(1):153-159
4. Lee, J. K., K. C. Ahn, O. S. Park, S. Y. K and B. D. Hammock. 2001. Development of an ELISA for the Detection of the Residues of the Insecticide Imidacloprid in Agricultural and Environmental Samples. J. Agric. Food Chem. 49: 2159-2167
5. Li, Kai and Qing X. Li. 2000. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Insecticide Imidacloprid. J. Agric. Food Chem. 48: 3378-3382
6. 박선화. 2003. 살균제 Fenarimol 잔류물 검출을 위한 효소면역분석법 개발. 충북대학교.
7. 이재구, 안기창, D.W. Stoutamire, S.J.Gee and B.D.Hammock. 2001. ELISA에 의한 유기 인계 살충제 Acephate 잔류분석법 개발. 농약과학회지 제5권 2호:1-12