

## Aflatoxin-DNA Adduct의 화학합성에 관한 연구

최상경·김성영\*·강진순\*\*·정덕화\*

경상대학교 일반외과, 경상대학교 식품공학과\*, 진주전문대학 가정학과\*\*

### Studies on the Chemical Synthesis of Aflatoxin-DNA Adduct

Sang-Kyung Choi, Sung-Young Kim\*, Jin-Soon Kang\*\* and Duck-Hwa Chung\*

National University

\*\*Department of Home Economics, Jinju Junior College

#### Abstract

Aflatoxins are highly carcinogenic agents consistently found as contaminants in human food supplies in many areas of the world and epidemiologically linked to incidence of human liver cancer. To examine the carcinogenic action of aflatoxin B<sub>1</sub>, aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adducts were chemically synthesized with the reaction of 20 mg calf thymus DNA, and 8 mg standard aflatoxin B<sub>1</sub>. Since DNA molecule was too large for analysis, it was fragmented by acid hydrolysis and heat. The fragmented aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adducts were selectively concentrated by immunoaffinity column procedure and confirmed by HPLC method. The main component was aflatoxin B<sub>1</sub>-guanine adduct, which was quantitatively measured as 5.2 mg aflatoxin B<sub>1</sub>.

Key words: aflatoxin B<sub>1</sub>, cancer, immunoaffinity column, aflatoxin B<sub>1</sub>-guanine adduct

## 서 론

Aflatoxin B<sub>1</sub>은 강력한 간 독소로, 최기형성 및 간암 유발물질로 알려져 있으며 *Aspergillus flavus* 및 *Aspergillus parasiticus* 같은 균류가 생산한다. 이 독소는 여러 가지 농작물에 오염되는 것으로 알려져 있으며, 일차적인 간암 유발 화학물질에 의한 발암기작의 연구에 중요한 model이 되고 있다<sup>(1,2)</sup>. 국내에서의 aflatoxin에 관한 연구는 극히 미비한 실정이며 최근에 농산물 수입을 개방하면서 수입 농산물의 오염문제가 대두되어 이에 대한 연구들이 활성화되고 있으나 주로 식품학자들에 의해 이루어져 왔고 의학자들의 주요 관심사는 아니었던 것이 사실이다. 그 이유는 여러가지가 있으나 aflatoxin의 측정법이 매우 어려웠기 때문인 것이 가장 큰 문제였다고 생각된다. 종래의 aflatoxin 등의 mycotoxin 측정방법은 thin layer chromatography<sup>(3)</sup>, high pressure liquid chromatography 등<sup>(4)</sup>의 방법에 의존해 왔는데 이들 방법은 많은 시간과 넓은 공간 그리고 다량의 시료를 요구하므로 인체에서 채취하는 소량의 시료를 대상으로 mycotoxin을 측정한다는 것은 불가능하였다.

1981년 Pestka 등<sup>(5)</sup>이 radioimmunoassay법을 개발하여 소량시료의 aflatoxin 정량검출이 가능하게 되었으나 방사성물질의 관리, 폐기물 처리의 문제 등과 scintilla-

tor의 비용이 매우 비싸 극히 일부의 연구소에서만 이용이 가능하였다. 그 후 Warner<sup>(6)</sup>가 곰팡이 독소의 일종인 zearalenone을 검색하기 위해서 enzyme-linked immunosorbent assay를 개발하여 mycotoxin의 측정에 이용함으로써 종전의 여러 검사법들이 가졌던 문제점들을 해소하게 되었고, 이러한 mycotoxin에 대한 면역분석기법의 활용은 인체에서 채취되는 소량의 시료에서 극미량의 정량이 가능하게 되고 개인적 수준에서의 aflatoxin의 정량추적까지도 바라볼 수 있게 되었다<sup>(7,8)</sup>.

종래의 방식으로는 어떤 물질에 발암성이 있는지를 확인하기 위해서는 감수성이 있는 실험동물에 그 물질을 투여하고 동물의 생존기간 동안에 종양이 발생하는 것을 관찰하는 방법이 많이 이용되어 왔으나 이 방법은 시간이 많이 걸리며, 비싸고, 윤리적인 문제와 사람에게도 적용되어질 수 있는가 하는 점이 문제로 대두되어 왔다. 일찌기 Miller 등<sup>(9)</sup>은 발암물질인 polycyclic aromatic hydrocarbon들이 표적조직의 단백질과 결합하고 이 결합체가 많을수록 종양의 발생이 증가하는 것과 발암물질과 유전정보를 간직한 핵산과의 결합체를 발견하였는데, 이것이 화학적 발암물질의 궁극적 현상이라고 주장한 바 있다<sup>(10)</sup>.

이와같이 대부분의 화학적 발암물질들은 체내 대사와 정중에 생성된 중간대사산물이 DNA와 결합함으로써 발암성전이의 시발이 되며 단백질과 핵산의 nucleophilic center와 결합하기 위해 중간대사과정에서 강력한 electrophilic로 전환되어야만 하는데 aflatoxin의 경우 간내

Corresponding author: Duck-Hwa Chung, Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea

에서 cytochrome-450을 포함한 mixed function oxydase (MFO)에 의하여 8,9-dihydroxyafatoxin으로부터 8,9-epoxide aflatoxin이 만들어지고<sup>(11)</sup>, 이 epoxide형이 guanine의 N-7 위치에 aflatoxin의 C-8이 결합되어 aflatoxin-guanine adduct가 생긴다고 알려져 있다<sup>(12,13)</sup>. 이러한 외국의 활발한 연구와는 달리 국내에서는 aflatoxin DNA adduct의 생성여부와 함량검색에 관한 연구는 전혀없는 실정으로 새로운 기술도입과 응용으로 이 분야의 연구 활성화가 절실히 요구되고 있다. 특히 곡류를 주식으로 하고 발효식품을 상용하며 특히 여름철 낮과 밤의 기온차가 심하고 고온다습하여 aflatoxin 생성 곰팡이의 오염이 클 뿐만 아니라 우리나라 국민의 간암발생빈도가 높은 것과 관련하여 aflatoxin에 대한 연구의 필요성이 절실하지만 aflatoxin 생성균의 screening을 비롯한 기초적 실험이 있을 뿐<sup>(14,15)</sup> 이 분야에 대한 연구가 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 aflatoxin B<sub>1</sub>에 대한 발암과정의 한 단계와 한국인의 간암 발생에 aflatoxin B<sub>1</sub>의 역할을 규명하기 위한 연구의 일환으로 aflatoxin B<sub>1</sub>을 DNA와 화학적으로 반응시켜 aflatoxin-DNA adducts를 합성하고 이를 확인하는 방법을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

## 실험재료 및 방법

### 실험재료

실험에 사용된 aflatoxin B<sub>1</sub>과 DNA 표준품은 Sigma사 제품을 사용하였고 정제품으로 사용한 immunoaffinity column(EASI column)은 Biocode사 제품이였으며 그 외 사용된 유기용매와 시약은 특급시약의 수준이었다.

### Aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adducts 조제

표준으로 사용한 aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct는 Gary 등의 방법<sup>(16)</sup> 참고하여 합성하였다. 먼저 실험에 사용되는 calf thymus DNA stock solution을 조제하여 농도를 spectrophotometer로 측정된 결과 44.7 mg/ml였으며, 그 중 일정량의 DNA를 취해 25 mM, NaOAc(pH 6.0)에 녹여 용기에 첨가하고 다시 dry dichloromethane 10 ml에 8 mg의 aflatoxin B<sub>1</sub>을 녹인 액에 혼합하였다. 여기에 15 mg의 3-chloroperoxybenzoic acid가 함유된 dichloromethane 1 ml를 첨가한 후 알루미늄 호일로 용기를 싸서 교반기로 암실의 안전 후드내에서 격렬히 교반하면서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 시료는 2000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 액층을 취하고 3배의 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1) 혼합액으로 3번 추출하여 반응하지 않고 남아있는 유리 aflatoxin B<sub>1</sub>을 제거하였다. 다시 3 M NaOAc와 70% ethanol(1 : 3) 혼합액 0.1 ml를 가하고 -20°C에서 하룻밤 방치하여 DNA가 aflatoxin B<sub>1</sub>과 결합되어 침전되게 하였다. 이것을 2600 rpm으로 0°C에서 25분간 원심분리해 DNA pellet을

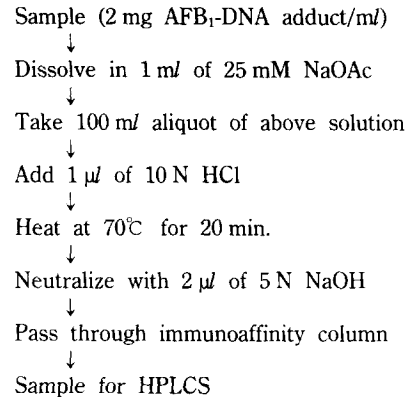


Fig. 1. Sample preparation of aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct for HPLC

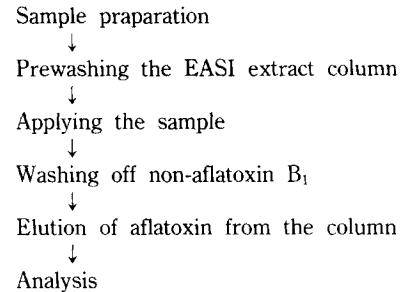


Fig. 2. Affinity column chromatography procedure for aflatoxin detection

취하고 다시 70% ethanol과 100% ethanol로 순차적으로 씻은 다음 감압농축시키고 25 ml NaOAc(pH 6.0)에 녹여 보관하면서 실험에 사용하였다.

### Aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA의 산 가수분해

앞서 합성한 aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct의 경우 DNA 분자가 너무 크므로 거대한 DNA 속에 aflatoxin B<sub>1</sub>이 파묻혀 항체의 AFB<sub>1</sub> 인지능력이 저하되므로 Gary의 방법<sup>(16)</sup>에 의해 DNA와 aflatoxin B<sub>1</sub>을 항체가 인지할 수 있도록 전처리를 시행하였다. 즉 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 2 mg의 aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct를 25 mM NaOAc 1 ml에 녹이고 이 중 100 µl를 취해 10 N HCl을 가하여 반응액의 pH가 1이 되도록 한 후 70°C에서 20분간 반응시켜 aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA 사슬을 잘게 썰은 후 여기에 5 N의 NaOH를 가해 pH를 7.0으로 조절하고 362 nm에서 함량을 결정한 다음 -20°C에 보관하였다.

### Aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct의 정제 및 확인

표준 aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct를 산 가수분해한 후 DNA 사슬에서 분리된 aflatoxin B<sub>1</sub>-guanine adduct를 추출해내기 위하여 Groopman 등<sup>(12)</sup>이 고안한 immunoa-

**Table 1. HPLC conditions for the determination of AFB<sub>1</sub>**

Column	ODS 1 (Reverse phase)
Detector	UV, 360 nm
Flow	0.8 ml/min
Mobile phase	water/acetonitrile/methanol (50:30:20)
Integration time	25 min.

**Table 2. Recovery rate of standard aflatoxins from the EASI column**

Aflatoxins	Recovery ratio (%)
Aflatoxin B <sub>1</sub>	97
Aflatoxin B <sub>2</sub>	97
Aflatoxin G <sub>1</sub>	86
Aflatoxin G <sub>2</sub>	87

finity column(Biocode Co. EASI Extract Column)을 사용하였다. 즉 Fig. 2와 같이 sepharose 4B에 항체를 부착시켜 충전시킨 immunoaffinity column을 활성화시킨 다음 10 ml의 PBS 용액을 3 ml/min.의 속도로 흘리면서 column을 씻은 후 시료를 column에 통과시키고 다시 column을 10 ml의 증류수로 씻었다. 완전히 씻은 column은 methanol 2 ml를 0.3 ml/min.의 속도로 흘려 항체에 붙어있는 aflatoxin B<sub>1</sub>을 용출시켰다. 용출된 용액에는 단백질이 aflatoxin B<sub>1</sub>을 둘러싸고 있을 가능성이 있으므로 물속에서 10분간 끓여 단백질을 분해시킨 후 HPLC의 시료로 사용하였다.

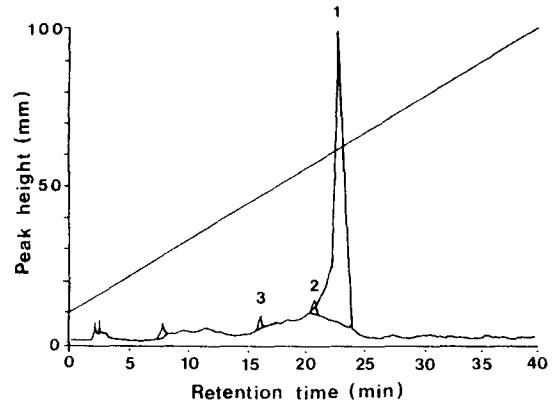
이상의 실험에서 합성하여 immunoaffinity column을 통과시켜 정제한 aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct의 확인을 위해 Table 1과 같은 조건에서 HPLC를 시행하였다.

## 결과 및 고찰

### Aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct의 합성

Aflatoxin B<sub>1</sub>의 간암을 유발하는 기전을 규명하기 위한 노력의 일환으로 aflatoxin B<sub>1</sub>과 DNA를 화학적으로 처리하여 aflatoxin-DNA adduct 합성에 대한 실험을 행하였다. 그러나 합성된 aflatoxin DNA adduct는 DNA 분자가 너무 크므로 먼저 거대한 DNA 속에 aflatoxin B<sub>1</sub>의 결합구조 중 비교적 결합력이 약한 부분을 끊어 aflatoxin B<sub>1</sub>을 항체가 인지할 수 있도록 전처리를 한 후 산분해된 시료로부터 aflatoxin B<sub>1</sub>-adduct를 정제하기 위해 immunoaffinity column을 사용하였다.

이때 사용된 immunoaffinity column의 각종 표준 aflatoxin에 대한 회수율을 조사한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 aflatoxin B<sub>1</sub>은 97%로 매우 높은 회수율을 보였는데, 특히 immunoaffinity column의 사용은 소량 시료에서 aflatoxin B<sub>1</sub>을 효과적으로 검출할 수 있을 뿐만 아니라 시료정제에 소모되었던 많은 시간을 단축하였고

**Fig. 3. HPLC chromatography of aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct**

- peak 1: AFB<sub>1</sub>-guanine adduct
- peak 2: AFE<sub>1</sub>-FAPY (formamidopyrimidine)
- peak 3: other not-well-defined AFB<sub>1</sub> derivatives

그 회수율도 높아 앞으로 그 활용도가 크게 기대되었다.

### Aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct 확인

이상과 같이 정제한 시료를 HPLC에 의해 확인한 결과 Fig. 3과 같은 chromatogram을 얻을 수 있었으며 그 함량은 aflatoxin B<sub>1</sub>으로 5.2 mg에 해당하였다. 일반적으로 DNA와 aflatoxin B<sub>1</sub>-guanine 복합체는 같은 과정에서 나타나지 않으며 DNA는 260 nm, aflatoxin B<sub>1</sub>-guanine 복합체는 362 nm에서 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 본 연구에서 얻은 chromatogram을 Gray 등<sup>(16)</sup>의 결과와 비교해본 결과 peak 1이 aflatoxin B<sub>1</sub>-guanine adduct, peak 2는 aflatoxin FAPY(formamidopyrimidine)이며 peak 3은 다른 대사산물이었는데, 대부분이 산 가수분해 후 aflatoxin B<sub>1</sub>-guanine의 형태로 바뀌었음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 aflatoxin B<sub>1</sub>이 DNA와 결합되어 나타나는 대사산물 중 대부분이 aflatoxin B<sub>1</sub>-guanine 복합체를 형성한다는 Garner 등<sup>(17)</sup>의 보고와 일치하였다.

최근 세계 여러나라, 특히 아프리카와 아시아의 일부 나라에서는 원발성 간암의 빈도가 높은 지역에서 음식물 속의 aflatoxin 함량과 간암과의 관계 및 체액에서 aflatoxin을 검출하여 간암과의 관계에 대한 상당한 보문을 발표하였고<sup>(18)</sup>, 원발성 간암이 많은 지역에서 그 지역 음식물과 그 지역주민의 체액에서도 무시할 수 없는 수준의 aflatoxin이 검출되어 aflatoxin이 간암유발의 중요한 인자라는 상당한 근거가 제시되기도 하였다. 이러한 외국에서의 현실을 감안하여 볼 때 다른 나라에 비해 높은 간암발생율을 기록하고, 곡물 및 다양한 발효식품을 사용하고 있는 우리들의 경우 이 분야의 체계적인 연구가 더욱 절실히 요망된다.

## 요 약

Aflatoxin은 세계 여러 곳에서 식품에 오염되어 발견되며 증가하는 인간의 간암발생과 빈번히 역학적으로 관련하여 보고되는 발암물질이다. 이러한 aflatoxin의 발암성 규명에 대한 연구의 일환으로 20 mg calf thymus DNA와 8 mg 표준 aflatoxin B<sub>1</sub>을 반응시켜 화학적으로 aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct를 합성하였다. 합성된 aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct는 산가수분해와 열처리에 의해 거대한 DNA 분자를 절단하였고, immunoaffinity column을 통과시켜 aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA adduct만 선택적으로 정제한 후 HPLC법으로 정량하였다. 그 결과 반응생성물의 대부분은 aflatoxin B<sub>1</sub>-guanine adduct였으며, 그 함량은 aflatoxin B<sub>1</sub>으로 5.2 mg이었다.

## 감사의 말

본 연구는 1991년도 문교부 유전공학분야 학술연구 조성비 지원으로 이루어진 결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Linsell, C.A., Peer, F.G.: Aflatoxin and liver cell cancer. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71, 471(1977)
2. Cullen, J.M., Ruebner, B.H. Hsieh, L.S.: Carcinogenicity of dietary aflatoxin M<sub>1</sub> in male Fisher rats compared to aflatoxin B<sub>1</sub>. *Cancer Res.*, 47, 1913(1987)
3. Tucksess, M.w., Follid, M.T. and Page, S.N.: Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in processed grain product. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69, 35(1986)
4. Schmidt, R., Monadani, J., Ziegengagen, E. and Dose, K.: High-performance liquid chromatography of the mycotoxin sterigmatocystin and its application to the analysis of mouldy rice for sterigmatocystin. *J. Chromatog.*, 207, 435(1981)
5. Pestka, J.J., Lee Y.K., Harder, W.O. and Chu, F.S.: Comparison of a radio-immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64, 294(1981)
6. Warner, R., Ram, B.P., and Hart, L.P.: Screening for

zearalenone in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Agr. Food Chem.*, 34, 714(1986)

7. Wilkinson, A.P., Denning, D.W. and Morgan, M.R.A.: An ELISA method for rapid determination of aflatoxin in human serum. *Food additives and Contaminant*, 5, 609(1988)
8. Ram, B.P., Hart, R.J. and Pestka, J.J.: Application of ELISA to retail survey of aflatoxin B<sub>1</sub> in peanut butter. *J. Food Prot.*, 49, 792(1986)
9. Miller, E.C. and Miller, J.A.: *In vivo* combination between carcinogens and tissue constituents and possible role in carcinogenesis. *Cancer Research*, 12, 547(1952)
10. Miller, E.C.: Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals. *Cancer Research*, 38, 1479(1978)
11. Lin, J.K., Miller, E.G. and Miller, J.A.: 2,3-dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy aflatoxin B<sub>1</sub>, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B<sub>1</sub>-DNA or ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome-mediated reaction in rat liver *in vivo*. *Cancer Research*, 37, 4430(1977)
12. Groopman, J.D., Donahue, P.R. and Zhu, J.: Aflatoxin metabolism in human; Detection of metabolites and nucleic acid adduct in urine by immunoaffinity chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 6492(1985)
13. Lehmann, A.R. and Dean, S.W.: Cancer prone human disorders with defects in DNA repair. In *Handbook of experimental pharmacology*. Carcinogenesis and mutagenesis, Springer, Berlin(1989)
14. 김용화, 황보정숙, 이서래: 몇가지 한국식품중 aflatoxin의 검출. *한국식품과학회지*, 9, 73(1977)
15. 정덕화, 김찬조: Aflatoxin 생성균의 분리 및 초기 pH. *한국산업미생물학회지*, 14, 9(1986)
16. Gary, S.J.: Comparison of the mutagenic potencies of DNA adduct in plasmid-mediated bacterial assay. A thesis for the degree of doctor of philosophy, University of York, United Kingdom(1990)
17. Garner, R.C. and Wright, C.M.: Induction of mutation in DNA repair deficient bacteria by a liver microsomal metabolite of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Br. J. Cancer*, 28, 544(1973)
18. Setlow, R.C., Wogan, G.N. and Gibson, J.B.: Dietary aflatoxin and liver cancer. Toxicogenic moulds in foods and feedstuffs of tropical Southeast Asia. *Food and Cosmet. Toxicol.*, 10, 51(1972)

(1992년 5월 1일 접수)