Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 24, No. 1, 119-125 (1996)

효소면역측정법을 이용한 Fumonisin의 검출법 개발

손동화* · 한성민[1] · 임선희[1] · 이인원[1] · 조선희[2] · 강신영[2] · 이경애
한국식품개발연구원, 이화학연구부, [1]농업생물신소재연구센터,
서울대학교 농업생명과학대학, [2]충북대학교, 수의학과

Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Fumonisins. Dong-Hwa Shon*, Seong-Min Hahn[1], Sun-Hee Lim[1], Yin-Won Lee[1], Sun-Hee Cho[2], and Shin-Young Kang[2] and Kyung-Ae Lee. *Food Chemistry and Physics Division, Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea, [1]Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea, [2]Department of Vertanary, Chungbuk National University, Cheungju 360-763, Korea* — In order to develop enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for fumonisins, production of specific antibodies, establishment of ELISA conditions, and quantitation of the toxin from spiked corns by ELISA were performed. Fumonisin B_1 (FB_1) conjugated to cholera toxin (CT) with or without Freund's adjuvant was subcutaneously injected into 2 groups of rabbits. When the titer of the antisera produced by each rabbit was tested, higher titer was observed in case of the immunization with the adjuvant. By use of the antiserum showing the highest titer (1 : 16,000) and its purified antibodies, competitive indirect and direct ELISA's (ciELISA and cdELISA) were established, respectively. When the cross-reactivity of the antibody against fumonisin analogs was investigated by the ciELISA, it was very low against B_3 (2%) but high against fumonisin B_2 (179%). The sensitivity of the ELISAs was also very high, because the detection limit for FB_1 was 0.03 ppb in ciELISA and 0.3 ppb in cdELISA. When the ELISA's were applied to the spiked corns after extraction with 75% methanol, the assay recovery of FB_1 was too unstable to assay. However, when cleanup by strong anion exchange (SAX) cartridge was introduced to remove interfering materials, the mean ELISA recovery of FB_1 from corns spiked to 3~10 ppm was found to be 34.0% and stable (mean of CV, 8.2%).

곰팡이가 생산하는 저분자의 2차 대사산물인 진균독소 중 비교적 최근에 그 구조가 밝혀진 fumonisin은 사람의 식도암 및 말의 뇌백연화증(equine leukoencepha-lomalacia, ELEM)을 유발하는 독소로 알려져 있다(1-3). Fumonisin의 주요 생성균주인 *Fusarium moniliforme*는 다양한 종류의 식물을 기주로 삼으며 전세계적으로 광범위하게 존재한다. 또한 호냉성 곰팡이로 8~15℃의 비교적 서늘한 상태에서 가장 잘 자라서, 옥수수, 밀, 보리 등의 재배지역에서 이들 작물을 심하게 오염시키는 것으로 알려져 있다(4).

현재까지 밝혀진 fumonisin은 B_1, B_2, B_3, B_4, A_1, A_2의 여섯 가지이다(1). 이들은 icosane 골격의 14, 15번 탄소에 2개의 propanetricarboxylic acid가 diester 결합을 하고 있는 구조를 하고 있으며 2번 탄소의 amino기에 acetyl기의 유무에 따라 A와 B group으로 나뉘며 5, 10번 탄소의 −OH기와 −H기에 따라 세분화된다. 이 중 자연발생된 것으로 보고된 fumonisin은 B_1, B_2, B_3(FB_1, FB_2, FB_3) 뿐이며 나머지는 배양체에서만 생성되며, 그 중에서도 FB_1(분자량, 721.8)이 가장 독성이 강하며 오염 빈도도 높은 것으로 보고되고 있다(11).

Fumonisin의 작용기작에 관해서는 아직까지 상세히 밝혀져 있지는 않은 상태이나 1991년 Wang 등(6)은 fumonisin이, 말에서 neurotoxicity를 나타내고 그 구조가 sphingosine과 비슷한 점을 들어 fumonisin이 sphingolipid 대사에 영향을 미칠 것이라고 제안하였고, sphingosine의 합성에 관여하는 효소인 *N*-acetyl transferase를 저해한다고 보고하였다.

농산물중의 fumonisin 오염도를 HPLC로 분석한 Sydenham 등(5)의 보고에 의하면, 브라질에서 가축에 진균독소 중독증을 보이거나 그런 의심이 가는 *F. moniliforme* 오염시료 21개중 20개에서 FB_1의 오염치가 0.2~38.5 ppm으로 매우 높게 나타나고 있다.

본 연구에서는 무차별적으로 대량유입이 예상되는 수입농산물 및 국내산 농산물에 오염되었을 소지가 높은 발암성 진균독소, fumonisin을 TLC나 기기분석에 의한 기존의 방법보다 효율적으로 검출할 수 있는 새로운 방법으로서 효소면역측정법(ELISA)을 개발하고자 하였다. 이를 위하여 특이항체의 생산 및 효소면역측정법의 조건확립, 그리고 인위적으로 오염시킨 FB_1의 회수율을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

표준독소인 FB_1, FB_2 및 bovine serum albumin(BSA),

*Corresponding author.
Key words: Fumonisins, ELISA, corn

cholera toxin(CT), Tween 20, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid)(ABTS), sodium borohydride, glutaraldehyde, goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate 등은 Sigma사의 제품을 이용하였고 Freund's complete adjuvant와 Freund's incomplete adjuvant, periodate activated horseradish peroxidase(HRP), 단백질 정량용 micro BCA kit(#23235), 항체정제용 protein A column (ImmunoPure *Plus* IgG Purification Kit, #44679)은 Pierce사로부터 구입하였으며, 기타의 시약과 유기용매는 GR 이상을 사용하였다. 교차반응에 사용한 FB_3은 Cawood 등(13)의 방법에 의하여 FB_1을 정제하는 과정에서 얻어지는 부산물을 정제하여 사용하였다. Microtiter plate는 Nunc사의 Maxisorp(#446612)을, microplate reader는 Bio-Tek사의 Bio-Tek Instruments EL307C를 사용하였다. HPLC는 Shimadzu사의 LC-6A를 사용하였다. Strong anion exchange(SAX) cartridge는 Supelco사의 Supelclean LC-SAX를 사용하였다. 실험동물로 사용한 체중 2~3 kg의 New Zealand White 토끼 암컷은 한국실험동물연구소(경기도 수원시)에서 구입하였다.

FB_1-protein conjugate 제조

Azcona-Olivera 등(8)의 방법을 참고하여 준비한 FB_1-CT와 FB_1-BSA는 각각 면역원과 ELISA시 coating용 항원으로 사용하였다. 반응은 10℃, 0.01M phosphate buffered saline(PBS ; 1.9 mM NaH_2PO_4, 8.1 mM Na_2HPO_4, 154 mM NaCl, pH 7.2)에서 행하였다. FB_1과 CT의 몰비가 50 : 1이 되도록 각각 1.8 mg, 4 mg을 2 ml의 PBS에 혼합용해한 후, 10℃에서 같은 부피의 glutaraldehyde(2% vol/vol)을 점적하여 교반하였다. FB_1과 BSA의 경우는 각각 1 mg, 2 mg을 2 ml의 PBS에 혼합용해한 후, 같은 처리를 하였다. 10℃에서 한 시간 반응 후 10 mg/ml이 되도록 sodium borohydride를 첨가하여 반응을 중지시키고 PBS에 대해 투석하고 FB_1-protein conjugate를 얻었다. Conjugate의 단백질 농도는 BCA kit를 이용하여 구하였다. 단백질의 amino기에 FB_1이 얼마나 결합되었는 지를 알아보기 위한 amino기의 정량은 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid(TNBS) 법으로 행하였다(9).

FB_1-enzyme conjugate 제조

Competitive direct ELISA에 사용하기 위한 FB_1-HRP를 다음과 같이 준비하였다. Imagawa 등(10)의 방법을 참조하여 0.4 mg의 FB_1과 1 mg의 periodate activated HRP를 0.5 ml의 PBS(pH 7.2)에 용해하여 상온에서 1시간 반응시킨 다음, 여기에 10 μl의 환원제(5M sodium borohydride in M NaOH)를 첨가하여 상온에서 15분간 반응시키고, 이어서 20 μl의 quenching buffer(3M의 ethanolamine, pH 9.0)를 첨가하여 다시 상온에서 15분간 처리하였다. 반응이 끝난 용액을 PBS에 투석하여 회수하였다.

특이항체의 생산

네 마리의 토끼를 두 마리씩 두 군으로 나누어, 한 군(A군)은 FB_1-CT와 Freund's adjuvant를 함께 면역하였고 다른 한 군(B군)은 FB_1-CT만을 단독 면역하였다. A군은 FB_1-CT conjugate를, 멸균한 PBS에 용해시켜 Freund's complete adjuvant와 함께 동량비로 유탁액을 만들어 토끼의 뒷발바닥에 마리당 100 μg씩 피하주사하였다. 첫 면역 3, 5주후에는 FB_1-CT를 Freund's incomplete adjuvant와 함께 100 μg씩 토끼의 등이나 대퇴부에 피하주사 또는 근육주사로 면역하였고 다시 첫 면역일을 기준으로 7주, 14주후 PBS에 녹인 FB_1-CT를 토끼의 귀에 정맥주사하였다. B군의 경우에는 PBS에 녹인 FB_1-CT 단독으로, A군의 경우와 같은 일정으로 정맥주사 및 피하주사를 번갈아 실시하였다. 매번 면역 1주일후 토끼 귀의 정맥으로부터 채혈하였으며 5차 면역 후에는 일 주일 간격으로 두 번 채혈하였다. 분리한 항혈청은 sodium azide를 0.02% 되게 첨가하여 실험전까지 냉동보관하였다.

항체의 정제

항체의 정제는 protein A column을 이용하여 Pierce사의 설명서에 따라 행하였다. 간단히 설명하면, 항혈청 또는 복수액을 Binding buffer와 1 : 1로 혼합한 용액 8 ml을, binding buffer 5 ml로 평형화한 protein A column에 주입한 후 다시 binding buffer 15 ml을 흘려서 불순물을 씻어낸 다음, column에 결합된 IgG 항체를 5 ml의 elution buffer로 용출시키면서 1 ml씩 분획하였다. 280 nm에서의 흡광도로 확인된 항체 분획을 Excellulose column으로 용액중의 염을 PBS로 교체하여 다음 실험에 사용하였다.

효소면역측정법(ELISA)

non-competitive ELISA 항체역가의 측정을 위해 다음과 같이 비경합적 효소면역측정법(non-competitive ELISA)을 실시하였다. Coating buffer(0.02M Tris, 0.15M NaCl, pH 9.0)에 용해시킨 FB_1-BSA(2 μg/ml) 100 μl을 well에 채우고 4℃에서 하룻밤 방치하여 coating하고, wash buffer(0.02M Tris, 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 150 μl로 3회 세척한 후 희석한 항 FB_1 항혈청을 100 μl 넣고 상온에서 한 시간 동안 항원-항체반응을 시켰다. Wash buffer로 3회 세척 후 2차항체인 goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate를 단계별로 희석하여 100 μl 넣고 상온에서 한 시간 방치하였다. Wash buffer로 3회 세척한 후 기질 용액(0.1% ABTS, 0.06M citric acid, 0.077M Na_2HPO_4, pH 4.0, 0.02% hydrogen peroxide 사용전 첨가) 100 μl를 넣고 상온에서 30분간 방치하여 발색시킨 다음 반응정지액(0.1% sodium azide) 100 μl를 첨가하였다. Microplate reader로 파장 405 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. 각 시료당 3개씩의 well을

사용하여 얻은 흡광도의 평균값으로 분석하였다.

competitive indirect ELISA(ciELISA) 시료중 fumonisin의 농도 측정을 위하여 확립한 ciELISA(간접법에 의한 경합적 효소면역측정법)의 과정은 위의 비경합적 ELISA와 유사하나, 항원의 coating후 항혈청과 fumonisin 용액의 혼합액을 각 well에 처리하여 항원-항체 반응시 항체가 well 표면에 coating 된 항원과 시료용액 중의 항원간에 경합하는 점이 다르다. 즉 항혈청과 시료용액의 1 : 1 혼합액을 각 well에 100 μl씩 넣고 상온에서 한 시간 처리후 상기의 기질용액을 처리하고 흡광도를 측정하였다.

competitive direct ELISA(cdELISA) 시료중 fumonisin의 농도 측정을 위하여 확립한 cdELISA(직접법에 의한 경합적 효소면역측정법)는 ciELISA에서와는 달리 coating시 정제한 항체를 carbonate buffer(0.1M, pH 9.6)에 1/500로 희석한 용액을 사용하였으며, wash buffer로서 tris buffer 대신에 PBS(pH 7.2)를 사용하였다. 또한, 경합시 wash buffer에 1/100로 희석한 FB_1-HRP와 fumonisin 용액을 1 : 1로 혼합후 각 well에 100 μl씩 넣고 상온에서 한 시간 처리하였다.

항 FB_1 항혈청의 교차반응

항체의 특이성을 조사하기 위하여 유사독소에 대한 항 FB_1 항혈청의 교차반응(cross-reactivity)을 ciELISA 및 cdELISA로 분석하였다. 즉 각각 wash buffer에 농도별로 희석한 유사독소(FB_2, FB_3)를 FB_1 대신에 사용하여 ELISA를 행하였다. 교차반응율은 항 FB_1 항체에 대한 FB_1-BSA의 결합을 50% 저해하는 FB_1의 농도를, FB_1-BSA의 결합을 50% 저해하는 유사독소의 농도로 나눈 % 값으로 나타내었다.

인위적으로 오염시킨 FB_1의 회수율 분석

Fumonisin이 가장 흔하게 오염되는 것으로 보고되고 있는 옥수수를 실험의 시료로 사용하였다(5, 7). 오염되지 않은 분쇄시료에, acetonitrile에 녹인 FB_1을 일정량 첨가하고 상온에서 하룻밤 방치한 후 75%의 acetonitrile 또는 75%의 methanol(MeOH)로 추출하여 경합적 ELISA로 회수율을 분석하였다. 추출액은 필요에 따라 wash buffer로 적당배율 희석하여 ELISA 분석에 사용했다. 이때 표준곡선의 작성을 위한 FB_1 용액은 기본적으로 오염되지 않은 옥수수 추출물의 희석액(시료의 희석정도에 따라 그와 같은 희석액)에 여러 농도별로 FB_1을 용해하여 사용하였다.

추출물의 세척(cleanup)을 위하여 Sydenham(11)의 방법에 따라 SAX cartridge를 사용하였다. 0.1에서 10 ppm까지 FB_1을 오염시킨 각 시료(20 g)에 75% MeOH, 40 ml를 넣고 Osterizer homogenizer로 2분간 균질화한 후 추출액을 4℃에서 500×g로 10분간 원심분리하여 상징액을 여과지(Whatman No.2)로 걸렀다. 여과액 pH를 측정하여 5.8 이하인 경우 5.8~6.5가 되도록 조정하였다. SAX cartridge에 MeOH 4 ml와 75% MeOH 4 ml을 차례로 흘려 세척한 후, 유속이 2 ml/min을 넘지 않게 조절하면서 여과액 8 ml을 주입하였다. 다시 75% MeOH 6.4 ml와 MeOH 2.4 ml롬 세척하고 MeOH-acetic acid(99 : 1) 8 ml로 용출하였다. 이 때의 유속은 1 ml/min 이하로 유지하였으며 용출액을 질소로 건조한 다음 wash buffer에 재용해시키고 ciELISA 분석에 사용하였다.

결과 및 고찰

FB_1-protein conjugate의 준비

FB_1에 대한 특이항체의 생산시 면역원의 carrier protein으로서 BSA는 좋은 결과를 보이지 않아 CT를 사용하였는데, 이는 CT가 carrier protein으로서의 기능 이외에 adjuvant 기능을 동시에 갖춰 특이항체의 유기가 용이하였기 때문이다(8).

Glutaraldehyde를 써서 만든 FB_1-CT와 FB_1-BSA(ciELISA의 coating용 항원) conjugate의 단백질 농도를 micro BCA kit로 각각 정량하였으며, FB_1과 단백질간의 결합비율을 구하기 위해 Habeeb 등(9)의 방법을 활용하여 TNBS 법으로 free amino group의 수를 분석하여 각 conjugate 분자에 결합된 FB_1의 평균 갯수를 구하였다. CT 한 분자당 free amino group의 갯수는 BSA와 거의 같으므로(12), FB_1과 반응할 수 있는 단백질의 amino기를 30개로 간주하였을 때 FB_1-CT의 경우에는 약 24개의 amino기가, FB_1-BSA의 경우에는 약 12개의 amino기가 FB_1과 결합된 것을 알 수 있었다(data 생략).

특이항체의 항체역가

FB_1-CT를 4차례 면역하고 각 면역 1주일후에 얻은 항혈청으로 ELISA를 행한 결과 모든 토끼에서 FB_1에 대해 특이적으로 결합하는 항 FB_1 IgG 항체가 생성되었으며 대체로 4차 면역후 가장 높은 항체역가를 나타내었다(Fig. 1). Freund's adjuvant의 효과를 검토하였을 때 Freund's adjuvant를 FB_1-CT와 함께 면역한 A군(1, 2번)이 FB_1-CT만을 면역한 B군(3, 4번)보다 항체역가가 대체로 4배 이상 높았다.

본 연구에서 항혈청의 항체역가는 1번 토끼의 4차 항혈청의 경우가 가장 높게 나타났으며, 이를 완충충액으로 1/16,000 희석하여 ciELISA에 사용했는데 이러한 항체역가는 Azcona-Olivera 등(8, 13)이 Freund's adjuvant를 사용하지 않고 FB_1-CT만을 생쥐에 면역하여 얻은 항체의 역가(1/100)보다 약 160배나 뛰어난 것이다. 또한 본 연구에서는 토끼에 면역하므로써 다량의 항체를 생산할 수 있었던 잇점이 있었다.

항 FB_1 항체의 교차반응

항 FB_1 항체의 특이성을 조사하기 위하여 FB_2와 FB_3에

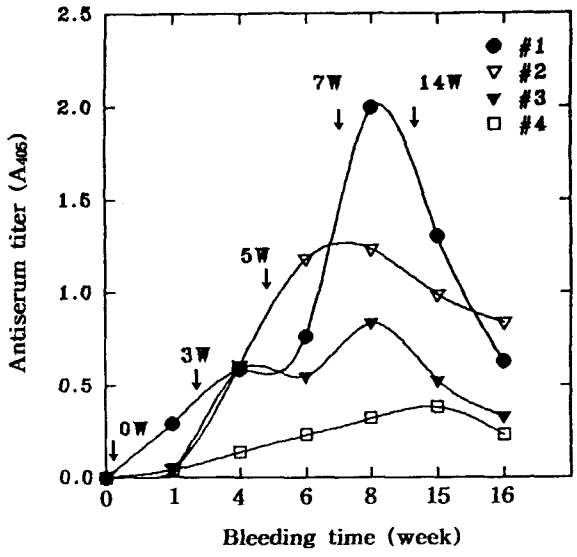

Fig. 1. Production of anti-FB_1 antibodies by four rabbits. Rabbits #1 and #2 were immunized with FB_1-CT and Freund's adjuvant and #3 and #4 with FB_1-CT only. Each rabbit immunized on weeks 0, 3, 5, 7, and 14 (↓) was bled 1 week after each immunization, and the titer of each serum was shown as ELISA value.

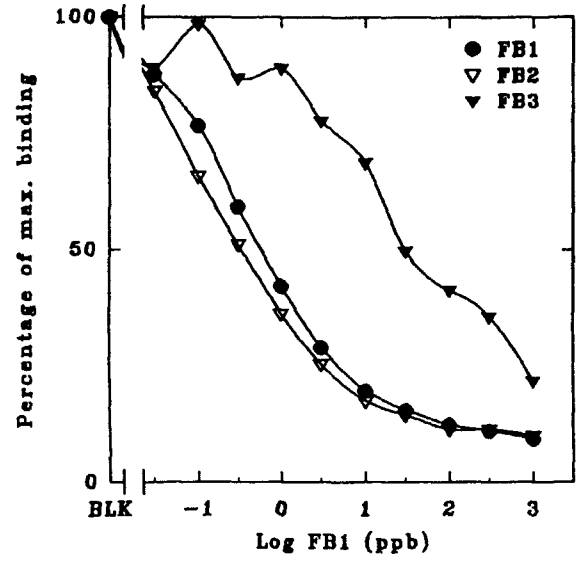

Fig. 2. Reactivity of antiserum towards fumonisins as determined by ciELISA.

Table 1. Cross-reactivity of FB_1 and its derivatives with anti-FB_1 antibody as determined by ciELISA

Toxin Toxin	Toxin to inhibit 50% Ab binding (ng/ml)	Cross-reactivity* (%)
FB_1	0.59	100.0
FB_2	0.33	178.8
FB_3	29.4	2.0

* $\frac{\text{Conc. of } FB_1 \text{ inhibiting 50\% of anti-}FB_1 \text{ Ab binding}}{\text{Conc. of toxin inhibiting 50\% of anti-}FB_1 \text{ Ab binding}} \times 100$

대한 교차반응을 ciELISA로 알아보았다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 FB_2가 FB_1보다 항 FB_1 항체와 더 잘 결합하였다. FB_1-BSA에 대한 항체의 결합을 50% 저해하는 FB_1, FB_2, FB_3의 농도는 0.59, 0.33, 29.4 ng/ml이었다. 이로부터 구한 FB_2와 FB_3에 대한 교차반응율은 1번 토끼의 4차 항혈청의 경우 각각 179%, 2%이었다(Table 1). 한편, B군 3번 토끼의 4차 항혈청은 경합반응이 효과적으로 일어나지 않을 뿐 아니라 교차반응율도 위의 경우보다 심하였다(각각 436%, 18%).

정제한 1번 토끼의 4차 항체의 교차반응을 cdELISA로 조사하였을 때는, 항체에 대한 FB_1-HRP의 결합을 50% 저해하는 FB_1, FB_2, FB_3의 농도가 각각 4.77, 2.31, 74.5 ng/ml이었다(data 생략). 이로부터 구한 FB_2와 FB_3에 대한 교차반응율은 각각 207% 및 6.4%로, ciELISA에 의한 항혈청의 경우와 비슷한 정도를 나타내었다.

이 결과는 Azcona-Olivera 등(8, 13)이 생쥐의 항혈청을 이용해 ciELISA로 분석한 교차율이 FB_2, FB_3에 대해 각각 87, 40%, 단클론항체를 이용해 cdELISA로 분석한 경우엔 각각 38, 33%이었던 점과 비교시 FB_2를 더 잘 인식하는 문제가 있었다. 그 차이는 면역원에서 기인하는 것으로 생각된다. 즉, 본 연구에서 실험동물을 토끼이외에 생쥐를 사용하였을 때에도 같은 현상이 나타났고(미발표 자료), Freund's adjuvant의 사용과는 무관한 것임을 앞에서 알 수 있었으므로, glutaraldehyde를 이용한 FB_1과 CT간의 conjugation시 FB_1의 10번 탄소위치의 $-OH$기가 $-H$기로 변환되었기 때문인 것으로 추측된다. 하지만 이에 대하여는 더 검토할 필요가 있다고 생각한다.

표준곡선상에서의 검출감도

4차 항혈청을 사용하여 ciELISA로 경합의 정도를 조사한 결과, 두 군간에 뚜렷한 차이가 나타나지 않았으나 A군 1번 항혈청의 항 FB_1 IgG 항체가 가장 경합이 잘 일어났다(data 생략). 따라서 이후의 실험에서는 항체역가가 가장 높고 교차반응이 가장 낮으며, 경합반응도 가장 우수한 1번 토끼의 4차 항혈청을 사용하였다.

FB_1 표준독소를 wash buffer에 농도별로 희석하여 최적조건에서 행한 ciELISA의 표준곡선은 Fig. 3과 같으며, 이때 1차항체와 2차항체의 희석 배율은 각각 1/16,000, 1/8,000이었다. FB_1의 검출 가능범위는 0.03~10 ppb로 비교적 넓었으며 검출감도가 매우 뛰어남을 알 수 있었다.

cdELISA로 독소를 분석하는 경우에는 먼저 microplate에 항체를 coating하게 되는데 이때 항혈청보다 정제된 항체가 분석에 효과적이므로(미발표 자료), 1번 토끼의 4차 항혈청을 protein A column 및 Excllulose column으로 정제 및 탈염하였다. 이때 정제된 항체의 농도는 BCA kit로 정량한 결과 3.1 mg/ml이었으며 이 항체와 FB_1-HRP를 사용한 cdELISA의 표준곡선은 Fig. 4와

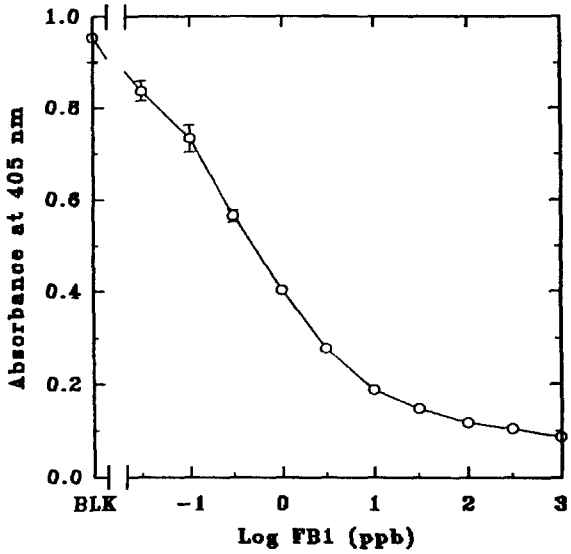

Fig. 3. Standard curve by ciELISA for FB_1.

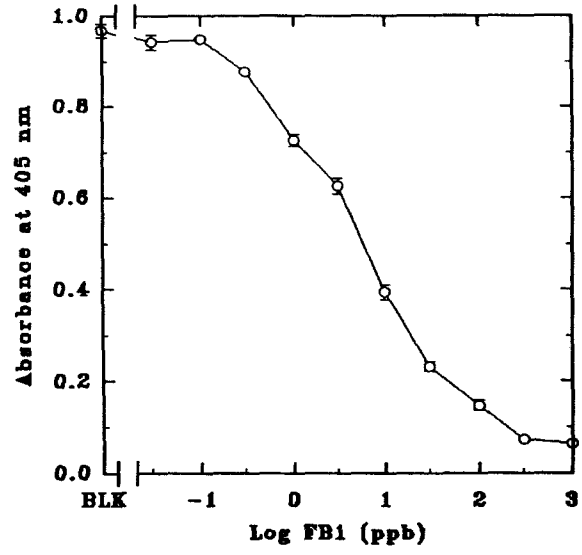

Fig. 4. Standard curve by cdELISA for FB_1 with the purified polyclonal antibody.

같다. 이 경우 FB_1의 검출 가능범위는 0.3~100 ppb이었다.

Azcona-Olivera 등(8, 13)은 생쥐로부터 얻은 다클론 항체를 이용한 ciELISA 분석시의 검출한계가 100 ppb, 단클론항체를 이용한 cdELISA 분석시의 검출한계가 50 ppb이었던 점을 감안하면, 본 연구에서 생산한 항혈청의 항체는 ELISA 분석시 최고 3000 이상의 매우 우수한 검출감도를 나타냄을 알 수 있었다.

ELISA에 의한 FB_1의 회수율 분석

FB_1의 ELISA 분석시 옥수수 추출물의 방해작용

ELISA로 FB_1의 분석 회수율 실험을 행하였다. 먼저 ciELISA에 의하여 검토하였다. ciELISA의 경우는 추출용매가 경합반응시 항체의 작용에 영향을 미치므로 통상 추출액을 완충액으로 희석하여 분석에 사용하는데, 본 연구에서 먼저 acetonitrile-water(3 : 1)로 추출하고 wash buffer로 1/10 희석하여 분석하였다(11). 그러나, 이 경우 인위적으로 오염시킨 FB_1의 회수율은 여러 조건을 바꾸어 검토하였음에도 불구하고, 매 분석시마다 매우 불안정한 결과를 보였다(data 생략).

다음으로 cdELISA에 의하여 검토하였다. 옥수수시료를 75% MeOH로 추출한 다음 추출액 또는 wash buffer로 희석한 액에 대하여 cdELISA를 행하였다. 그 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 cdELISA에서도 오염시킨 농도별로 일관성 있는 양호한 회수율을 나타내지 않아, 실제의 오염곡물의 분석에는 활용할 수 없는 것으로 나타났다.

이상과 같이 ELISA에 의한 옥수수시료의 분석이 매우 불안정하고 회수율도 일정하게 나타나지 않는 현상은, fumonisin이 다른 진균독소와는 달리 $-COOH$기가 넷, $-NH_2$기가 하나로 비교적 전하를 많이 띠고 있어(1),

Table 2. Recovery of FB_1 from spiked corn after 75% MeOH extraction and subsequent dilution with PBS wash buffer as determined by cdELISA

Added (ng/g)	Detected, ng/ml[1]		
	Undiluted	Diluted to 1/2	Diluted to 1/5
10	0 (0.0%)	6.2(62%)	7.6(76%)
100	0.43(0.4%)	22.8(23%)	45.9(46%)
1,000	4.77(0.5%)	34.0(3.4%)	77.4(7.7%)

[1]The concentration of diluted or undiluted extracts were determined with reference to the each standard curve of unspiked corn extracts.

추출액중 방해물질과의 정전기적인 작용에 의한 흡착 등에 기인하는 것으로 추측된다. Aflatoxin 등의 경우에는 이런 문제가 전혀 없었던 점을 고려할 때(14, 15), fumonisin은 다른 진균독소와 구별되는 특성을 가진 것으로 생각된다.

방해물질의 제거후 ELISA에 의한 회수율 옥수수 추출물 중의 방해물질을 제거하기 위한 방안으로서, Sydenham(11)의 방법에 따라 SAX cartridge를 사용한 세척 과정을 도입하여 ciELISA에 의하여 회수율을 검토하였다. 이 경우 옥수수 유래의 방해물질이 제거되었을 것으로 간주하고 wash buffer에 표준독소를 첨가하여 작성한 표준곡선을 기준으로 회수율을 구하였다. 그 결과 회수율이 28.0~39.0%로 낮은 편이기는 하지만 정제하지 않은 경우에 비하여 양호하게 나타났으며(Table 3), 각 농도별 coefficient of variation(CV)의 평균값은 45.7%로 나타나 회수율이 불안정하였음을 알 수 있다. 그러나 3~10 ppm으로 FB_1을 오염시킨 시료의 회수율과 CV의 평균값은 각각 34%. 8.2%로 나타나, 오염농도가 높아짐에

Table 3. Recovery of FB_1 from spiked corn after extraction and subsequent SAX cartridge treatment as determined by ciELISA

Added, ng/g	Detected, ng/g[1]	Recovery, %
100	28.0± 27.5 (98.2)	28.0
300	119.8± 77.7 (64.9)	39.9
1,000	364.8± 178.6 (49.0)	36.5
3,000	1,023.3± 91.8 (9.0)	34.1
10,000	3,385.0± 245.9 (7.3)	33.9
Mean of CV, %	45.7 [8.2][2]	
Overall recovery, %		34.5 [34.0][2]
SD		3.9 [0.1][2]
Mean CV		11.3 [0.3][2]

[1]Mean of interassay (n=3) ±SD (CV, %).
[2]Calculated between 3,000 and 10,000 ng/g.

따라 안정된 회수율을 보였다.

또한, 본 연구에서와 같이 SAX cartridge를 사용하여, 옥수수 추출액을 세척한 후 HPLC로 분석한 Sydenham 등(11)의 경우에는 그 회수율이 80% 이상이었던 점과는 대조적으로 본 연구에서 ciELISA로 구한 회수율이 전체적으로 매우 낮게 나타났는데(Table 3), 이에 대하여는 구체적인 검토를 더 요한다.

한편, Azcona-Olivera 등은(13) FB_1을 5 ppm 이상의 높은 농도로 오염시킨 옥수수 추출물을 세척않고 cdELISA로 분석하여 100% 전후의 양호한 회수율을 보고하였다. 그러나, 그들은 옥수수 유래의 방해물질에 의한 영향을 무시한 채 단순히 희석한 유기용매와 PBS로 작성한 표준곡선이 비슷하다는 이유로 PBS로 작성한 표준곡선을 기준삼아 회수율을 구하였으므로, 방법상에 문제가 있다고 생각한다.

결론적으로, 본 ciELISA로 옥수수에 오염된 FB_1의 오염도를 측정할 경우 옥수수 추출액을 SAX cartridge에 통과시킨 후 ciELISA로 구한 오염도를 보정인자, 0.34로 나누어 준다면 3 ppm 이상의 fumonisin이 오염된 옥수수 시료의 분석이 가능할 것으로 생각된다.

요 약

Fumonisin에 대한 효소면역측정법(ELISA)을 개발하기 위하여 특이항체를 생산하고, 분석조건을 확립하여, 인위적으로 오염시킨 옥수수 시료의 분석을 행하였다. Fumonisin B_1(FB_1)을 cholera toxin(CT)에 결합시킨 FB_1-CT conjugate를 면역원으로 하여 Freund's adjuvant와 함께, 또는 단독으로 두 군의 토끼에 면역하고 특이항체를 생산하였다. 항혈청을 ELISA로 분석한 결과 그 adjuvant와 함께 면역한 경우 항체역가(titer)가 높게 나타났다. 가장 높은 항체역가(1 : 16,000)를 나타낸 항혈청 및 그로부터 정제한 항체를 이용하여 간접법 및 직접법에 의한 경합적 ELISA(ciELISA 및 cdELISA)를 각각 확립하였다. 이 항체의 유사독소와의 교차반응을 ciELISA로 조사하였을 때, FB_3에 대한 교차반응율은 2%로 매우 낮았으나, FB_2에 대한 것은 179%로 다소 높았다. FB_1의 검출한계는 ciELISA에서 0.03 ppb, cdELISA에서 0.3 ppb로 각각 나타났다. 실제 곡물시료의 분석에 ELISA 활용가능성을 조사하기 위하여 인위적으로 FB_1을 오염시킨 옥수수를 75%의 methanol로 추출하고 그 회수율을 측정한 결과, 분석이 불안정하여 회수율이 일정하게 나타나지 않았다. 그러나 방해물질의 제거를 위하여 시료 추출액을 strong anion exchange(SAX) cartridge를 거쳐 세척한 다음 분석하였을 때, 3~10 ppm 범위의 FB_1 오염 옥수수에서 평균 34%(CV의 평균, 8.2%)의 안정된 회수율을 보였다.

참고문헌

1. Bezuidenhout, S.C., W.C.A. Gelderblom, C.P. Gorst-Allman, R.M. Horak, and W.F.O. Marasas, G. Spiteller, and R. Vleggaar. 1988. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **88**: 743-745.
2. Gelderblom, W.C.A., K. Jaskiewicz, W.F.O. Marasas, P.G. Thiel, R.M. Horak, R.V. Liggaar, and N.P.J. Kriek. 1988. Fumonisin-Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1806-1811.
3. Marasas, W.F.O., F.C. Wehner, S.J. van Rensburg, and D.J. Van Schalkwyk. 1981. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Trankei, southern Africa. *Phytopathology* **71**: 792-796.
4. Anderegg, J. and J.W. Guthrie. 1981. Seedborne *Fusarium moniliforme* and see-dling infection in hybrid sweet corn. *Phytopathol.* **71**: 1196-1198.
5. Sydenham, E.W., W.F.O. Marasas, G.S. Shephard, P.G. Thiel, and E.Y. Hirooka. 1992. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 994-997.
6. Wang, E., W.P. Norred, C.W. Bacon, R.T. Riley, and A. Merrill. Jr. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J. Biol. Chem.* **266**: 1486-1490.
7. Sydenham, E.W., W.C.A. Gelderblom, P.G. Thiel, and W.F.O. Marasas. 1990. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B_1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. *J. Agric. Food Chem.* **38**: 285-290.
8. Azcona-Olivera, J.I., M.M. Abouzied, R.D. Plattner, W. P.Norred, and J.J. Pestka. 1992. Generation of antibodies reactive with fumonisins B_1, B_2, and B_3 by using cholera toxin as the carrier-adjuvant. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 169-173.
9. Habeeb, A.F.S.A. 1966. Determination of amino groups

in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. biochem.* **14**: 326-336.
10. Imagawa, M., S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, E. Ishikawa, Y. Niitsu, I. Urushizaki, R. Kanazawa, S. Tachibana, N. Takazawa, and H. Ogawa. 1982. Characteristics and evaluation of antibody-horse radish peroxidase conjugates prepared by using a maleimide compound, glutaraldehyde, and periodate. *J. Appl. Biochem.* **4**: 41-57.
11. Sydenham, E.W., G.S. Shephard, and P.G. Thiel. 1992. Liquid chromatographic determination of fumonisins B_1, B_2, and B_3 in foods and feeds. *J. AOAC Int.* **75**: 313-318.
12. Abouzied, M.M, J.J. Azcona-Olivera, T. Yoshizawa, and J.J. Pestka. 1993. Production of polyclonal antibodies to the trichothecene mycotoxin 4,15-diacetylnivalenol with the carrier-adjuvant cholera toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1264-1268.
13. Azcona-Olivera, J.I., M.M. Abouzied, R.D. Plattner, and J.J. Pestka. 1992. Production of Monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B_1, B_2, and B_3. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 531-534.
14. 손동화, 박애란, 이인원. 1992. 수입곡물 중의 Aflatoxin B_1 검출을 위한 효소면역측정법의 평가. 한국산업미생물학회지 **20**: 355-361.
15. 손동화, 한성민, 임선희, 이인원, 강신영. 1994. 옥수수 중의 Zearalenone 분석을 위한 효소면역측정법. 한국산업미생물학회지 **22**: 430-435.

(Received 20 August 1995)