Kor. J. Food Hygiene 8(4), 205-214(1993)

잔류 Chloramphenicol 검사용 효소 면역측정법의 개발에 관한 연구

I. Chloramphenicol에 대한 단클론 항체의 생산 및 특성 조사

윤동호 · 이문한

서울대학교 수의과대학

Study on Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Screening of Chloramphenicol Residues

I. Production and charaterization of Monoclonal Antibody against Chloramphenicol

Dong-Ho Yun, Mun-Han Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

ABSTRACT—The monoclonal antibody to chloramphenicol(CAP) was produced to develop an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for residual CAP. An immunogen(CAP-BSA) was prepared by coupling succinyl CAP to BSA with EDC reagent. After immunization of BALB/c mice with the immunogen, antibody titer was measured by indirect ELISA. Spleen cells from the immunized mouse were fused with SP2/0Ag14 myeloma cells. Among hybridomas selected in HAT media, 6 clones shown high antibody titer to CAP were subjected to cloning by limit dilution, and all of the monoclonal antibodies(MCA1, 2, 3, 4, 5, 7 and 9) produced by each clone were identified as IgG1 by ELISA isotyping analysis. Competitive ELISA condition was established by using the purified monoclonal antibody MCA1 as primary antibody and CAP-HSA conjugate as coating antigen. Standard curve of CAP(n=28) showed that the lowest detection limit of CAP is 20 ng/ml level. The cross-reactivities of the 6 monoclonal antibodies showed that CAP sodium succinate. CAP base, *p*-nitrophenol, and *p*-nitrobenzyl alcohol were 89~178, 0.050~2.237, 0.056~0.794 and 0.013~7.939%, respectively. No cross-reactivities were observed with phenylalanine, tyrosine, glutamine, thiamphenicol, neomycin, streptomycin, gentamicin, sulfamethazine, sulfathiazole, chlortetracycline and *p*-aminobenzoic acid.

Keyword □ Chloramphenicol, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), monoclonal antibody, cross reactivity

Chloramphenicol(CAP)은 토양 미생물인 *Streptomyces venezuelae* 배양액으로부터 처음 분리되어[1,2] 그 구조가 밝혀짐에 따라[3] 합성이 가능하게 된 항생물질로서 사람에 있어서는 장티푸스 치료를 위해 그리고 수의임상에서는 가금의 살모넬라증과 만성 호흡기 질병, 소의 전신성 살모넬라증, 송아지의 호흡기 감염증 등 다양한 세균성 질병의 예방과 치료목적으로 널리 이용되어 왔다.[4] 그러나, chloramphenicol은 특이체질을 가진 사람에 있어서 투여용량에 관계없이 재생불량성 빈혈 혹은 백혈구 감소증을 유발한다고 보고되었으며,[5] 과민반응을 보일 뿐만 아니라 간장 마이크로좀 효소인 cytochrome P-450 복합체를 억제함으로써 이 효소에 의하여 대사되는 각종 약물의 대사를 지연시키고 생체내에

Received for publication December 15, 1993
Reprint request: M.-H. Lee at the above address

서 분비되는 호르몬의 대사 이상을 초래하는 등 다양한 부작용을 일으키는 것으로 보고되었다. 따라서, 외국의 경우 오래전부터 가축에 대한 CAP의 사용을 엄격히 제한해 왔다. 미국의 경우 FDA의 CVM(Center for Veterinary Medicine)과 FSIS (Food Safety and Inspection Service)에서는 매년 축산식품 중의 유해잔류물질에 대한 조사를 실시하고 있는데 CAP은 무잔류원칙을 적용하고 있다. EC 역시 마찬가지로 식품생산을 목적으로 하는 동물에는 CAP의 사용이 금지되어 있으며 잔류허용량은 10 ppb로 설정하여 엄격히 규제하고 있다. 국내에서는 1991년 농림수산부령에 의하여 가축과 어패류 양식에 질병치료와 예방목적으로 널리 사용되던 CAP의 사용을 전면 금지하고 축산식품 중에 검출되지 않아야 하는 것으로 규정하였으며 수의사의 처방에 의하여 엄격한 감시하에 제한된 범위내에서 애완 혹은 관상동물 치료용으로만 사용할 수 있게 조치하였다. 그러나, 1989년에 조사된 박 등[6]의 보고에 의하면 돼지 177두에서 조사한 근육 및 신장 354시료 중 신장 2건에서 CAP이 검출되고 있다. 이 보고에서는 현재 국내에서 식육 중 잔류 CAP 공정시험법인 bioassay법으로 검색한 후 양성으로 나타난 시료를 HPLC법으로 정량하였던 바, 각각 3.16 ppm 및 0.91 ppm 수준으로 잔류한 것으로 보고하였다. CAP 잔류검사법으로 bioassay는 경제적이고 수행하기 쉬운 장점을 가지고 있으나, 감도가 낮고 특이성이 부족한 단점이 있다. 그리하여 최근에는 GC, HPLC와 같은 chromatograph 방법과 ELISA, RIA와 같은 면역화학적인 방법들이 이용되고 있다. Chromatograph 방법은 보고자에 따라서 1~10 ppb에 달하는 높은 검출감도와 76~97%의 회수율을 보이고 있으나[7,8,9] 추출과정이 복잡하고 기기분석시 많은 시간을 소요하는 단점이 있다. 면역화학적인 방법은 최근 약 10년전부터 시도되어 왔는데, Campbell 등[10]은 1984년 토끼에서 생산한 polyclonal antibody를 사용한 competitive ELISA법을 보고하였고, 1987년 네덜란드의 Water[11] 등과 1989년 독일의 Hack 등[12]은 CAP에 대한 monoclonal antibody를 생산하여 식육시료에서 CAP을 검출하기 위해 이를 이용할 수 있음을 보여 주었다. 그리고 1990년 네덜란드의 Water와 Haagsma[13]는 돼지고기 중의 잔류 CAP 검색과 정량에 응용 가능한 감도 높은 streptavidin biotin enzyme-linked immunosorbent assay에 의한 방법을 개발하여 보고하였다. 현재 CAP의 정성적 검출을 위하여는 Environmental Diagnostics사의 EZ-SCREEN^R kit를 상업적으로 이용할 수 있다. 이는 polyclonal antibody를 이용한 card test로써 오줌에서는 5 ppb, 혈청에서는 10 ppb, 그리고 고기에서는 20 ppb의 검출한계를 보이는 검출시간이 빠른 매우 감도 높은 kit이나 고가인 단점이 있다.[14]

따라서, 본 실험은 매우 민감한 검출법으로 좋은 특이성을 가지고 있으며 단시간내에 다량의 시료를 처리할 수 있고 정량 또한 가능한 장점이 있는 ELISA법을 개발하기 위하여 CAP에 대한 monoclonal antibody를 생산하고 이의 특성(감도 및 특이성)을 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에서 면역원의 접종, feeder cell의 분리 및 복수생산을 위해 4주령의 BALB/c 마우스를 농촌진흥청 가축위생연구소에서 분양받아 사용하였다. 실험동물은 자연조명하에서 수돗물과 실험동물용 시료(삼양사)를 자유로이 급식시키면서, 2주간 적응 사육한 후 실험에 사용하였다.

면역원의 제조 및 정제

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(이하 EDC)를 이용한 면역원의 제조－CAP sodium succinate(Sigma Co.) 1.517 g (CAP 1.0 g에 해당)을 증류수 10 ml에 녹인 다음 5 N HCl을 천천히 가하여 pH 2.1이 되게 조절하였다. 이때 생성되는 monosuccinyl CAP 침전물을 동결건조하여 분말을 얻었다. Monosuccinyl CAP 10 mg을 dioxane 1 ml에 녹이고 2% EDC 수용액 1 ml를 가한 다음 1 N NaOH로 pH를 8.0~8.5되게 조절하여 5분간 실온에서 정치시켰다. 여기에 5 mg의 bovine serum albumin(이하 BSA)을 5 ml의 증류수에 녹여 신속히 가한 다음, 잘 섞고 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. 1.2 M sodium acetate액 (pH 4.2) 1 ml를 가하여 반응을 정지시키고 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 겔 여과법에 의하여

CAP-BSA 접합체를 정제하여 면역원으로 사용하였다. Human serum albumin(이하 HSA)에 대하여도 위에서와 같은 방법으로 CAP-HSA conjugate를 합성, 정제한 다음 ELISA용 흡착 항원으로 사용하였다.

면역원의 정제－위의 방법으로 제조한 면역원(CAP-BSA)은 증류수(pH 8.0)로 평형된 PD-10 column(Sephadex G-25, bead Vol: 9.1 ml, bead height: 5 cm, Pharmacia Co.)에 주입한 다음 증류수로 용출하면서 각 분획의 흡광도를 280 nm의 파장에서 측정하였고, 아울러 Lowry법[15]에 의해 단백질을 정량하였다. CAP-BSA 접합체를 정제한 다음 CAP의 접합비율을 조사하고 면역용 항원으로 사용하였다. 그리고 CAP-HSA는 ELISA용 흡착 항원으로 사용하였다.

CAP/BSA 몰비율의 결정－CAP-BSA와 CAP-HSA 접합체의 몰비율은 succinyl CAP이 280 nm 부근에서 높은 흡광도를 보이는 성질을 이용하여 계산하였다. 즉 정제한 CAP-BSA 접합체 수용액의 단백질 농도를 Lowry법[15]에 의해 측정한 후 같은 농도의 BSA 용액을 제조하여 이 용액보다 증가된 CAP-BSA 접합체 수용액의 흡광도와 monosuccinyl CAP의 흡광계수를 이용하여 접합 몰비율을 구하였다.

면역

앞서 제조한 CAP-BSA 접합체를 동량의 Freund's complete adjuvant(Sigma Co.)로 emulsion화한 다음 단백질량으로 100 μg 상당량을 BALB/c 마우스의 복강내로 주사하였다. 3주간격으로 Freund's incomplete adjuvant(Sigma Co.)로 emulsion화한 항원을 복강내에 2회 boosting 접종하였다. 매 접종시마다 1주 후에 실험동물로부터 혈청을 분리하여 간접 ELISA법으로 항체 역가를 조사하였다. 최종 boosting 접종은 세포융합 5일전에 200 μg 상당량을 adjuvant없이 그대로 복강내에 주사하였다.

효소면역측정법(ELISA)

면역된 마우스 혈청 또는 융합잡종세포 배양액에서 항체를 검출하기 위하여 간접 ELISA를 실시하였다. 먼저 ELISA plate 흡착항원으로 제조한 CAP-HSA 접합체 용액을 0.1 M carbonate buffer(pH 9.6)에 적정농도로 희석하여 100 μl를 plate의 각 well에 분주하여 37℃ 에서 2시간(또는 4℃ 에서 하룻밤)동안 흡착시킨 후 세척 완충액(0.02% Tween 20, 0.15 M NaCl)으로 4회 세척하였다. 여기에 PBS(1.7 mM K_2 K_2HPO_4, 7.1 mM Na_2HPO_4, 137 mM KCl, 2.7 mM KCl, 0.4 mM KCl, 0.4 mM $CaCl_2$, 5.0 mM $MgCl_2$, pH 7.2)에 Tween 20을 0.02%되게하여 만든 용액을 15 μl씩 각 well에 가한 후 실온에서 1시간 정치하여 빈자리를 봉쇄하였다. 이후 희석된 가검 항혈청 또는 융합잡종세포 배양액 20 μl(경쟁적 효소면역측정법의 경우 PBS로 희석한 표준 CAP 용액 50 μl와 단클론 항체 희석액 50 μl)를 각 well에 가하고 37℃ 에서 1시간 반응시켰다. 이 plate를 4회 세척한 다음 goat anti-mouse IgG-peroxidase conjugate(Sigma Co.)를 20,000배(경쟁적 효소면역측정법의 경우 2,500배)희석한 용액 100 μl씩을 가하여 37℃ 에서 50분간 반응시킨 후 4회 세척하였다. 여기에 기질액(0.04% O-phenylenediamine dihydrochloride in citrate-phosphate buffer, pH 5.2)에 과산화수소를 0.01%되게 가한 후 즉시 100 μl씩을 각 well에 가하고 37℃ 에서 30분간 반응시킨 다음 3 N HCl 25 μl를 가해 반응을 정지시키고 나서 492 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

세포 배양

면역 비장세포와의 융합에 사용한 골수종세포는 SP2/O-Ag14 cell line으로서 서울대학교 수의과대학 조류질병학 교실로부터 분양받아 배양기(37℃, 10% CO_2, 98% 상대습도)에서, 열처리한 소태아혈청(Hyclone Co.) 10%, 항생제 혼합액(10IU penicillin G, 100 μg streptomycin, 0.25 μg amphotericin B/ml; Sigma Co.), 그리고 44 mM sodium bicarbonate를 함유한 DME(Hyclone Co.) 배지에 8-azaguanine (20 μg/ml, Sigma Co.)을 첨가하여 배양하였다. 세포융합시에는 8-azaguanine이 제거된 배지에서 1주일 정도 배양한 후 사용하였다. 잡종세포의 선택배지(HAT 배지)는 20% 소태아혈청을 함유한 DME에 HAT 혼합액(Boeringer Mannheim Co.)을 첨가(hypoxanthin 100 μM, aminopterin 0.4 μM, thymidine 16 μM)하여 제조하였다.

융합잡종세포의 생산

융합잡종세포는 Galfre와 Milstein의 방법[16]을 변형하여 생산하였으며 그 과정은 다음과 같다.

면역된 마우스로부터 혈청을 채취하여 ELISA에 의한 단클론 항체 역가검정시 양성대조군으로 하였으며, 이후 마우스를 경추탈구로 희생시키고 70% 알코올로 피부를 소독하였다. 복강을 열어 비장을 적출하여 세척배지(DME, 10 mM HEPES)가 들어 있는 petri dish에 취하고 비장 주위의 결제조직을 제거하였다. 200목의 mesh을 이용하여 비장세포 부유액을 얻어 1,200 ppm으로 5분간 원심분리하여 침전하였다. 침전된 세포에 0.83% ammonium chloride(in 10 mM HEPES)를 처리하여 적혈구를 파괴하였다. 적혈구가 제거된 세포를 5 ml의 세척배지에 부유한 다음 0.4% trypan blue로 염색하고 hemacytometer로 생존 세포수를 계산하였다. 마찬가지로 대수증가기에 있는 골수종 세포를 원심분리하여 10 ml 세척배지에 부유한 다음 세포수를 측정하여 골수종세포와 비장세포의 비율이 1 : 5에서 1 : 6이 되게 조절하여 혼합한 다음 원심분리하였다. 세포를 융합하기 위하여 침전시킨 세포에 37℃로 유지된 50% polyethylene glycol 1500(PEG 1500, Boeringer Mannheim Co.) 1.2~1.5 ml를 천천히 가하고 세척배지 1, 2, 8 및 10 ml로 서서히 단계적으로 PEG를 희석하였다. 이를 1,100 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전된 세포를 골수종세포 배양액에 서서히 부유하였다. 여기에 2×HAT media 20 ml를 가한 후 96 well plate에 분주하여 배양하였다. 그 후 2~3일 간격으로 1×HAT media로 feeding하였다. 10일 후 HT media(HAT배지에서 aminopterin이 제거된 배지, Boeringer Mannheim Co.)로 바꾸고 3~4일 후 세포집락을 형성한 well의 배양액에서 항체 분비 여부를 위에서 기술한 간접 ELISA로 조사하였다.

클로닝 및 마우스 복강내 배양

Feeder 세포를 준비하기 위해 면역되지 않은 마우스 복강을 4℃의 0.34 M sucrose로 세척하여 얻은 복강세포를 HT배지에 부유한 다음 96 well plate에 분주하였다. 또한 위에서 얻은 융합잡종 세포군 중에서 간접 ELISA에 의해 양성으로 나타난 well의 세포를 24 well plate에서 배양한 세포를 0.5 cell/well이 되도록 HT배지에 부유하여 전날 준비한 feeder 세포가 함유한 96 well plate의 각 well에 분주하였다. 이 세포를 8~9일간 배양한 다음 하나의 집락을 형성한 well의 배양액을 취해 항체 생성 여부를 간접 ELISA로 조사하였다. 필요에 따라 1차 클로닝한 세포를 1~2회 더 클로닝하였다. 클로닝 후 항체를 대량으로 얻기 위하여 하루전에 복강내로 0.5 ml의 Freund's incomplete adjuvant가 이미 주입된 BALB/c 마우스에 융합잡종세포 6×10^5 cells를 복강내에 주사하였다. 7일 후에 복수를 채취하여 원심분리한 후 상청액에 대해여 간접 ELISA로 역가를 검정한 다음 소량씩 분주하여 −70℃에서 보관하면서 다음의 실험에 사용하였다.

Isotype조사

각 융합잡종세포가 분비하는 단클론항체의 isotype을 조사하였다. 항체의 isotype 결정은 goat anti-mouse IgG_1, G_{2a}, G_{2b}, G_3, IgA 및 IgM 항혈청(Sigma Co.)을 사용하여 Sigma사에서 제시한 ELISA 방법(capture ELISA)에 따라 실시하였다. 즉 각 isotype에 대한 항혈청을 PBS(10 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH 7.4)에 1,000배 희석하여 ELISA plate의 각 well에 100 μl씩을 가한 후 37℃에서 1시간 흡착시킨 후 세척완충액(0.05% Tween 20 in PBS)으로 3회 세척하였다. 여기에 클로닝한 융합잡종세포 복강내 배양액 100 μl를 가하여 실온에서 1시간 반응시키고 3회 세척하였다. 그리고 나서 goat anti-mouse IgG(Fab specific)-peroxidase conjugate를 세척완충액에 600배 희석하여 100 μl를 가하여 실온에서 30분 반응시켰다. 3회 세척한 후 간접 ELISA에서와 같이 0.04% OPD 용액으로 30분 반응시키고 3 N HCl 25 μl를 가하여 반응을 정지시킨 후 발색을 관찰하였다.

단클론 항체의 정제

융합잡종세포를 BALB/c 마우스에 투여하여 얻은 복수를 50% ammonium sulfate로 침전시킨 다음 원심분리하여 얻은 침전물을 pH 7.2의 PBS로 부유하였다. 이 부유액을 10 mM Tris-Cl(pH 8.5)로 평형시킨 PD-10 column을 통과시켜 ammonium sulfate를 제거하고 DEAE Sephacel anion exchange chromatography(bead Vol: 10 ml, bead height: 5 cm, flow rate: 0.5 ml/min, temperature: 4℃)를

실시하여 항체를 정제하였다. 용출은 10 mM Tris-Cl(pH 8.5) 완충액에 50, 100, 150 mM 및 200 mM NaCl을 각각 함유한 용액을 사용하여 단계별로 실시하였다. 용출되어 나오는 분획의 흡광도를 280 nm에서 측정하고, 각 peak의 분획을 모아 간접 ELISA로 항체가 존재하는 peak를 확인하였다.

단클론 항체의 특이성 조사

생산된 단클론 항체의 특이성을 조사하기 위하여 CAP과 유사한 구조를 가진 화합물 4종(CAP sodium succinate, CAP base, *p*-nitrophenol, *p*-nitrobenzyl alcohol), 아미노산 3종(phenylalanine, tyrosine, glutamine), *p*-aminobenzoic acid, 항균성물질 7종(thiamphenicol, neomycin, streptomycin, gentamicin, sulfamethazine, sulfathiazole, chlortetracycline) 등 15종에 대해 교차반응성을 조사하였다. 즉, 각 물질들의 농도를 달리하여 흡착 항원에 결합된 항체를 50% 유리시키는 농도를 산출하여 교차반응성(CR_{50})을 다음과 같이 계산하였다.

CR_{50}=(흡착 항원과 항체의 반응을 50% 억제할 수 있는 CAP의 농도/흡착 항원과 항체의 반응을 50% 억제할 수 있는 항생물질 및 화합물의 농도)×100

결 과

항원의 정제와 접합 몰비율

Succinyl CAP을 EDC을 이용하여 BSA(또는 HSA)와 반응시킨 다음 Sephadex G-25 gel filtration하여 CAP-BSA 접합체를 정제하였던 바 Fig. 1에서와 같은 결과를 얻었다. 즉, 280 nm에서의 흡광도와 Lowry법에 의하여 계산된 단백질 농도를 살펴볼 때 free succinyl CAP은 대개 용출액 3 ml 이후에 용출되었다. 따라서 처음 3 ml의 용출액을 모아서 항원으로 사용하였다. 3 ml 용출액, 즉 CAP-BSA 접합체 용액의 CAP/BSA 몰비율을 계산하기 위하여 Lowry법에 의한 단백질 정량을 실시하였다. 이렇게 하여 계산된 단백질 농도로 BSA를 녹인 후 280 nm에서 접합체 용액과의 흡광도 차이를 계산하고 succinyl CAP의 흡광계수($\varepsilon = 1.3 \times 10^4$ cm^2/mole)를 이용하여 CAP/BSA 몰비율을 측정하였던 바, BSA에 결합시킨 경우는 7.6, HSA에 결합시킨 경우는 8.1로 나타났다(Table 1).

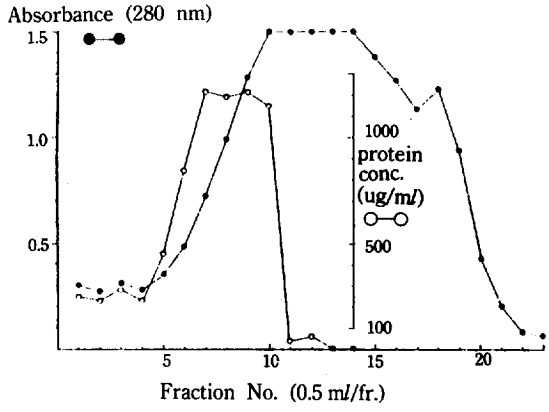

Fig. 1. Sephadex G-25 gel fitration profile of CAP-BSA conjugate synthesized by EDC method.

융합잡종세포의 생산

간접 ELISA에 의해 면역이 확인된 마우스의 비장세포로 융합을 실시한 결과 6개의 양성 clone을 얻을 수 있었다. 이 6개의 clone을 제한희석법에 의하여 cloning한 후 각 융합잡종세포가 분비하는 단클론 항체의 isotype을 확인하기위하여 복수를 대상으로 Sigma사에서 제시한 capture ELISA를 실시한 결과 isotype은 모두 IgG1으로 나타났다(Fig. 2).

항체의 정제와 역가

BALB/c 마우스에서 대량으로 얻은 복수에 포화 ammonium sulfate를 동량 가해 얻은 침전물을 인산완충액으로 부유한 후 DEAE Sephacel anion exchange chromatography를 실시하였다. 각 분획 4 ml씩을 받아 280 nm에서 흡광도를 측정한 결과 100 mM과 150 mM NaCl 용출액에서 두개의 peak를 얻었다(Fig. 3). 두 peak 중 CAP에 특이적인 항체를

Table 1. Mlolar ratio of chloramphenicol to carrier of immunogen (CAP-BSA conjugate) and ELISA plate coating antigen (CAP-HSA conjugate) synthesized by EDC

	Immunogen (CAP/BSA)	ELISA plate coating antigen (CAP/HSA)
EDC	7.6	8.1

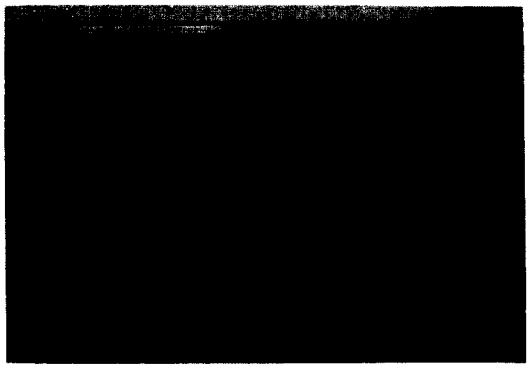

Fig. 2. Isotypes of monoclonal antibodies by capture ELISA. G1, 2a, 2b, 3, M and A: Goat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM and IgA. 1, 2, 3, 5, 7 and 9: MCA1, MCA2, MCA3, MCA5, MCA7 and MCA9.

확인하기 위하여 간접 ELISA를 실시하였다. 이때 융합을 위해 희생한 마우스에서 얻은 혈청을 양성 control로, 면역시키지 않은 마우스의 혈청을 음성 control로 하여 정제하지 않은 복수, 100 mM 및 150 mM NaCl 용출 분획을 40배에서부터 2진 희석하여 측정한 결과 100 mM NaCl 용출 분획에 CAP에 특이적인 단클론 항체가 존재함을 확인하였다 (Fig. 4).

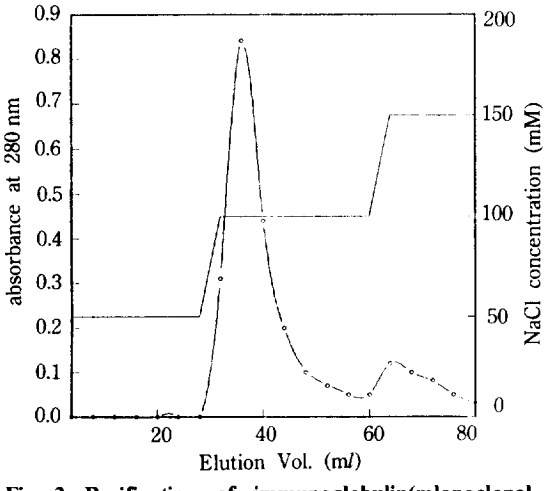

Fig. 3. Purification of immunoglobulin(mlonoclonal antibody) in ascitic fluid by NaCl gradient DEAE Sephacel anion exchange chromatography. The immunoglobulin was detected in 100 mM NaCl eluent.

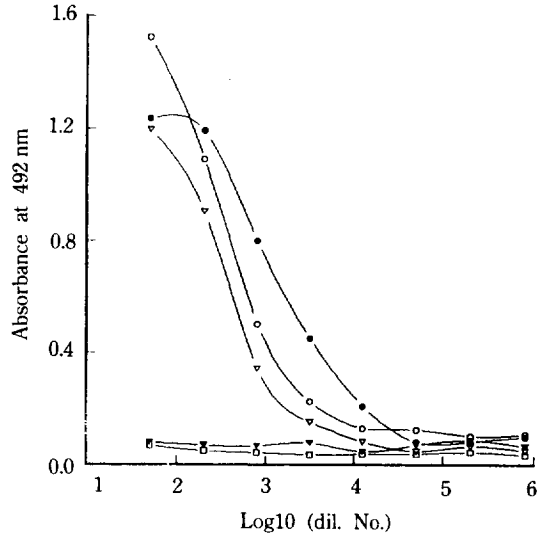

Fig. 4. Titer of immunoglobulin in ascitic fluid purified by DEAE-sephacel anion exchange chromatography.
○: Positive control(antiserum). ●: Whole ascitic fluid. ▽: Fraction eluted with 10 mM Tris(pH 8.5) containing 100 mM NaCl. ▼: Fraction eluted with 10 mM Tris(pH 8.5) containing 150 mM NaCl. □: Negative control (unimmunized serum).

경쟁적 ELISA(CELISA)의 재현성

CELISA의 재현성을 조사하기 위하여 흡착 항원 30 ng/ml 농도와 단클론 항체 MCA1의 600배 희석액을 사용하고 CAP 농도를 20, 40, 80, 100, 150, 1000 및 10000 ng/ml되게 조절하여 CELISA를 실시한 결과, batch I과 batch II내에서는 낮은 표준편차를 보여 well 및 plate간에는 재현성이 좋음을 확인할 수 있었다. 그리고 batch I과 batch II를 합한 결과는 비교적 높은 편차를 보여 본 CELISA방법이 batch내, 즉 plate간, well간의 변이보다 batch간의 변이가 상대적으로 크다는 사실을 알 수 있었다(Table 2). 그리고 batch I과 batch II를 평균한 결과의 각 CAP 농도의 흡광도를 0 CAP 농도에서의 흡광도와 비교해서 유의성 있는 차이가 있는지를 알아보기 위해 Student's t test를 실시한 결과 200 ng/ml 이상의 CAP 농도에서 유의성 있는 차이가 인정되어 ($p<0.01$) 20 ng/ml 즉 20 ppb를 최소검출한계로 설정하였다. 또한 이 결과를 토대로 20 ng/ml에서 150 ng/ml 사이의 흡광도를 % total O.D. 값[(표준 CAP

Table 2. Precision and reproducibility of the CELISA by analysis of variance of enzyme activity

CAP conc. (ng/ml)	Mean of O.D. (standard deviation)		
	batch I	batch II	mean (I+II)
0	1.369 (0.098)	1.842 (0.045)	1.639 (0.249)
20	1.191 (0.072)	1.678 (0.059)	1.470 (0.253)
40	1.160 (0.081)	1.525 (0.067)	1.369 (0.197)
80	1.091 (0.077)	1.503 (0.063)	1.326 (0.219)
100	1.041 (0.068)	1.415 (0.070)	1.255 (0.200)
150	0.990 (0.050)	1.296 (0.053)	1.165 (0.162)
1000	0.552 (0.038)	0.622 (0.032)	0.592 (0.049)

Replications in batch I: 12 wells/2 plates.
Replications in batch II: 16 wells/2 plates.

농도의 O.D./maximum O.D.-minimum O.D.)×100, maximum O.D.=0 μg/ml CAP의 O.D.값 평균에 표준오차값을 3배하여 합한 값, minimum O.D.=가장 높은 CAP 농도의 O.D.값 평균에 표준오차값을 3배하여 감한 값]으로 나타내어 linear regression curve를 작성한 결과 linearity가 인정($r=-0.988$, $p<0.01$)되어 이 범위에서 CAP 정량이 가능함을 보여주었다(Fig. 5).

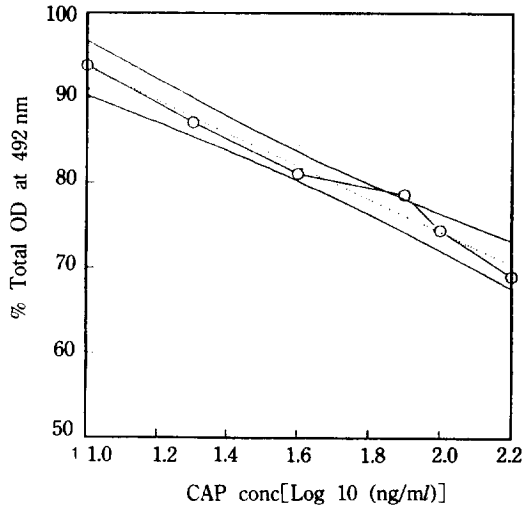

Fig. 5. Linear regression curve of CAP by CELISA ($r=-0.988$, $n=28$).

단클론 항체의 특이성

단클론 항체의 특이성을 조사하기 위하여 CAP과 구조가 비슷한 화합물과 항균성물질 등의 화합물에 대해 CELISA를 실시하였다. 그 결과 단클론 항체에 따라서 다소 차이는 있었으나 MCA1의 경우 CAP sodium succinate 174%, CAP base 0.093%, *p*-nitrophenol 0.020%, *p*-nitrobenzyl alcohol 0.020%, 그리고 phenylalanine, tyrosine, glutamine, thiamphenicol, neomycin, streptomycin, gentamicin, sulfamethazine, sulfathiazole, chlortetracycline, *p*-aminobenzoic acid는 0.005% 이하로 나타났다(Table 3).

고 찰

CAP은 분자량이 작아서(MW 323) 단독으로는 항체를 생성치 못하기 때문에 분자량이 큰 단백질, 즉 carrier와 결합시켜 면역원으로 사용하여 hapten 특이 항체를 생산하였다. CAP은 여러가지 방법으로 거대분자와 결합시키는데 sodium dithionite를 가하여 nitro기를 amino기로 환원시킨 다음 sodium nitrite를 가해 diazo화 시켜 carrier 단백질의 histidine, tyrosine, tryptophan 잔기에 결합시키는 방법[17-20]과 carbodiimide 반응에 의하여 CAP의 succinyl 유도체의 carboxyl기를 carrier 단백질의 amino기에,[10,11,20] 또는 CAP base의 amino기를 carrier 단백질의 sulfhydryl기에 결합시키는 방법[12,21]을 이용할 수 있다. 이들 방법 중 carbodiimide 반응을 이용한 방법은 방향족 nitro기가 노출되어 있어 이것이 항체 생산과 생산된 항체의 반응성에서 immunodominant group으로 작용할 수 있기 때문에 더 유리한 점이 있다. 본 실험에서는 EDC를 이용한 carbodiimide 반응에 의해 CAP와 BSA 또는 HSA를 결합시켜 면역원 또는 흡착 항원으로 사용하였다. 이때 CAP와 BSA 또는 HSA의 몰비율, 즉 결합율은 280 nm에서의 흡광도의 차이를 이용[22]하여 계산하였는데 면역원은 7.6이었다. Catty[23]는 좋은 항체반응을 유도하기 위해 바람직한 몰비율은 carrier 단백질 100 kd당 10~30이라고 하였는데 본 실험에서 합성한 면역원은 이 범위에 포함되었다. Hack 등[12]은 MBS를 이용하여 합성한 면역원으로 단클론 항체를 생산하여 Water 등[11]이 EDC를 이용하여 합성한 면역원으로 생산한 단클론 항체보다 더 높은 감도의 결과를 얻었다고 보고하였다. 그러나, Water 등[13]은

Table 3. Cross-reactivities(CR_{50}) of the monoclonal antibodies with chemically related compounds and other antimicrobial agents

MCA / Compound	MCA1	MCA2	MCA3	MCA5	MCA7	MCA9
CAP	100	100	100	100	100	100
CAP sod. succinate	174	126	126	89	355	178
CAP base	0.093	0.067	0.089	0.126	2.237	0.056
p-nitrophenol	0.l020	0.020	0.100	0.354	0.794	0.056
p-nlitrobenzyl alcohol	0.200	0.158	0.013	0.706	0.9o39	0.282
Phenylalanine	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Tyrosine	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Glutamine	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Thiamphenicol	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Neomycin	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Streptomycin	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Gentamicin	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Sulfamethazine	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Sulfathiazole	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
Chlortetracycline	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
p-aminobenzoic acid	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005

CR_{50}=(ng of CAP displacing 50% of Antibody/ng of compound displacing 50% of Antibody)×100.

1987년에 보고된 단클론 항체를 이용하여 streptavidin-biotin ELISA방법을 개발하여 더 감도 높은 결과를 얻었다고 보고하였다. 따라서 CAP 검출감도를 높이기 위하여는 면역원을 달리 제조하여 이용하는 것보다 ELISA검출방법을 개선하는 것이 더 주효할 것으로 본다.

본 실험의 예비실험에서 흡착 항원을 각각 1, 2, 4, 6, 8 μg/m*l*의 농도로 하고 단클론 항체 MCA1을 600배, goat anti-mouse lgG-peroxidase conjugate를 20,000배 희석하여 실시한 결과(결과 생략) 표준 CAP 1 μg/m*l* 이하의 농도에서는 0 μg/m*l* CAP 농도에 비해 흡광도가 유의성 있게 감소하지 않아 CAP을 검출할 수 없었다. 그래서 흡착 항원 농도를 20, 30, 40 및 50 ng/m*l*로 goat anti-mouse IgG-peroxidase conjugate를 2,500배로 실시하여 흡착 항원 30 ng/m*l*일 때 표준 CAP 20-150 ng/m*l*의 농도에서 흡광도가 의미있게 감소하여 이 조건에서는 낮은 농도의 CAP을 검출할 수 있음을 예상하였다. 항체와 plate 흡착 항원과 CAP의 적정반응시간을 찾기 위해 1시간 30분과 2시간으로 하여 시행한 결과(결과 생략) 2시간 반응시켰을 때 더욱 linear하고 기울기 큰 curve를 얻을 수 있었다. 이는 경쟁적 반응에 충분한 시간을 할애하는 것이 필요하다는 사실을 보여주고 있다.

생산된 단클론 항체는 감도와 특이성을 살펴봄으로써 그 특성을 조사하였다. 최소검출한계가 감도를 나타내주는데 이는 Campbell 등[10]이 사용한 방법을 이용하였다. 즉 0 μg/m*l* 농도의 CAP와 일정농도의 CAP에서 얻은 흡광도를 평균하여 Student's t test를 하여 유의성($p<0.01$) 있는 차이가 인정될 경우 그 농도를 검출할 수 있는 최소농도로 설정하는 방법이다. 본 실험에서는 20 ng/m*l*의 농도에서 유의성 있는 차이가 있었으며 5, 10 ng/m*l*의 농도에서는 흡광도가 감소되기는 하였으나 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. 특이성은 6 clone 모두에 대해 조사되었다(Table 3). 이 결과와 각 화합물들의 구조(Fig. 6)를 서로 관련지어 살펴보면 nitrobenzene 고리를 가지고 있는 화합물은 가지고 있지 않은 화합물에 비해 더 높은 교차반응성을 보임을 알 수 있었다. 그 대표적인 예는 thiamlphenicol과 *p*-nitro-

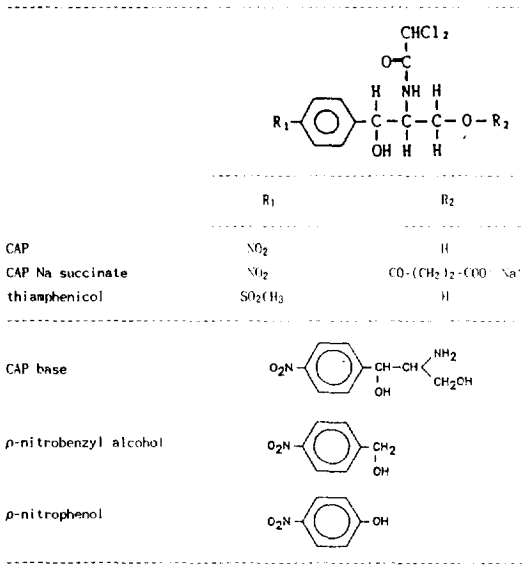

Fig. 6. Structures of CAP and some other chemical compounds which are structurally similar.

benzyl alcohol의 경우이다. 즉, thiamphenicol은 nitro기 대신 $-SO_3$가 붙어 있는 것만 다른데 0.005% 이하의 교차반응성을 보인 반면, nitrobenzene ring외의 부분은 결손되어 있는 *p*-nitrobenzyl alcohol은 0.013~7.939%의 교차 반응성을 보여주었다. 하지만, 전반적으로 낮은 교차반응성을 보여 단클론 항체들이 특이성면에서는 우수한 사실을 알 수 있다. 이 결과에서 면역원 조제에 사용한 CAP sodium succinate가 CAP보다 항체에 대해 더 높은 반응성을 보여 항원에 대한 특이성이 큼을 보여주었다.

지금까지 살펴본 바와 같이 단클론 항체는 높은 감도와 특이성을 가지고 있어 잔류물질 검사에 이용된다면 많은 잇점을 가져다 줄 것이다. 그러나 앞으로 조직에서 신속 간편하게 CAP을 추출하는 방법과 보다 단순화된 ELISA술식을 개발하여야 할 것이다.

국문요약

EDC를 이용하여 합성한 CAP-BSA로 면역시킨 BALB/c 마우스 비장세포와 SP2/O-Ag14 골수종세포를 융합하여 CAP에 대한 단클론 항체를 얻었다. HAT 선택배지에서 자란 융합잡종세포군 중 역가가 큰 항체를 생산하는 6개의 융합세포군을 선별하여, 제한희석법으로 cloning 후 ELISA 방법을 이용하여 isotype한 결과 모두 IgG1이었다. 이중 높은 항체 역가를 보이는 MCA1의 특성을 조사한 결과, CAP에 대한 검출 감도는 20 ppb(20 ng/m*l*, 1 ng/assay, $p<0.005$)이었으며, CAP standard solution 10 ng/m*l*에서 150 ng/m*l* 범위에서 linearity ($r=-0.988$)를 보여 이 범위에서 CAP 정량이 가능함을 보여주었다. 본 실험에서 얻은 6종의 각 단클론항체에 대해 교차반응성을 조사한 결과, CAP sodium succinate 89~178%, CAP base 0.050~2.237%, *p*-nitrophenol 0.056~0.794%, *p*-nitrobenzyl alcohol 0.013-7.939%, 그리고 phenylalanine, tyrosine, glutamine, thiamphenicol, neomycin, streptomycin, gentamicin, sulfamethazine, sulfathiazole, chlortetracycline, *p*-aminobenzoic acid 등은 0.005% 이하로 나타났다.

참고문헌

1. Ehrlich, J. Bartz, O,R. Smith, R.M. *et al.*: Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science,* **106**, 417-419 (1947).
2. Bartz, O.R.: Isolation of characterization of chloromycetin. *J. Biol. Chem.*, **98**, 540-548 (1948).
3. Rebstock, M.C. Crooks H.M. Jr, Controulis, J. *et al.*: chloramphenicol (chloromycetin). IV. Chemical studies. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2458-2462 (1949).
4. 이장락: 수의 약리학. 서울대학교 출판부, 399-401 (1987).
5. Settepani, J.A.: The hazard of using chloramphenicol in food animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **184** (8), 930-931 (1984).
6. 박종명, 손성완, 조태행 등: 국내산 돈육 및 계육중의 항생물질 잔류조사. 한국수의공중보건학회지, **14**(1), 61-68 (1990).
7. Allen E.H.: Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues from food-producing animals. *J. Assoc. Off.*

Anal. Chem., **68**(5), 990-999 (1985).

8. Arnold, D. Somogyi, A.: Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs, milk and meat: comlparison of gas chromatography and radioimmunoassay. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**(5), 984-999 (1985).
9. Aerts, R.M.L. Keukens, H.J. Werdmuller, G.A.: Liquid chromatographic determination of chloramphenicol residues in meat: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**(4), 550-576 (1989).
10. Campbell, S.C. Mageau, R.P. Schwab, B. *et al.*: Detection and Quantitation of chloramphenicol by competitive enzyme-linked immunoassay. *Ant imicrob. Agents and Chemother.*, **25**(2), 205-211 (1984).
11. Water, Cvd. Haagsma, N. Kooten, P.J.S. *et al.*: An enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of chloramphenicol using a monoclonal antibody. *Z. Lebenam. Unters. Forsch.*, **185**, 202-207 (1987).
12. Hack, R. Ma¨rtlbauer, E. Terplan, G.: Production and characterization of a monoclonal antibody to chloramphenicol. *Food and Agricul. Immunol.*, **1**, 197-201 (1989)
13. Water, Cvd. Haagsma, N.: Sensitive streptavidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of chloramphenicol residues in swine muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**(4), 534-540 (1990).
14. Keukens, H.J. Aerts, M.M.L. Traag, W.A.: Analytical strategy for the regulatory control of residues of chloramlphenicol in meat: preliminary studies in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **75**(2), 245-256 (1992).
15. Lowry, O.H, rosenbrough, A.L. *et al.*: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
16. Galfre`, G. Howe, S.C. Milstein, C.: Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature*, **266**, 550-552 (1977).
17. Hamlburger, R.N.: Chloramphenicol-specific antibody. *Science*, **152**, 203-205 (1966).
18. Williams, C.A, Chase, M.W.: *Methods in immunology and immunochemistry*, Vol. I, 120-126 (1987).
19. Hamburger, R.N. Douglass, J.H.: Chloramphenicol-specific Antibody. II. Reactivity to analogues of chloramphenicol. *Immunology*, **17**, 587-591 (1969).
20. Erlanger, B.F.: The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: A survey, *Meth. Enzymol.*, **70**, 85-104 (1990).
21. Madison, L.D. Rosenzweing, S.A. Jamlieson, J.D.: Use of the heterobifunctional cross-linker m-maleimidobenzoyl N-hydroxysuccin imide ester to affinity label cholecystokinin binding proteins on rat pancreatic plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, **259**(23), 12818-14823 (1984).
22. Erlanger, B.F. Borek, F. Beiser, S.M. *et al.*: Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. *J. Biol. Chem.*, **228**, 713-727 (1957).
23. Catty, D.: *Antibodies*. Vol. 1; A practical approach. IRL press, England, 26-31 (1988).