J. Fd Hyg. Safety 9(3), 123-131(1994)

축산식품 중에 잔류하는 Gentamicin 검사를 위한 ELISA 개발에 관한 연구 I. Gentamicin에 대한 항체생산 및 특성조사

김재명 · 이문한† · 이 항 · 류판동 · 조명행 · 박종명*
서울대학교 수의과대학 *가축위생연구소

Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Gentamicin Residues in Edible Animal Products

Jae-Myung Kim, Mun-Han Lee†, Hang Lee, Pan-Dong Ryu, Myung-Haing Cho and Jong-Myung Park*
College of Veterinary Medicine, Seoul National University
**Veterinary Research Institute, RDA*

ABSTRACT—An enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was developed for the detection of residual gentamicin(GM) in edible animal products. The immunogen(GM-KLH conjugate) and coating antigen(GM-BSA conjugate) were prepared by coupling GM sulfate to keyhole limpet hemocyanin(KLH) and bovine serum albumin(BSA) in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, respectively. Polyclonal antibody to GM was produced in rabbits(New Zealand White, female) by using the immunogen and the antibody titer was measured by indirect ELISA. A competitive ELISA was developed using GM-bovine serum albumin conjugate as a coating antigen, GM(as standards or sample), polyclonal antibody to GM, secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase as an enzyme, and H_2O_2 and o-phenylenediamine dihydrochloride as a substrate and a chromophore, respectively. The detection limit of GM was 10 ng/ml and the standard curve of GM(n=26) was linear up to 10 μg/ml in this competitive ELISA system. There were no cross-reactivities of the partially purified antibody between GM and the various antibiotics such as amikacin, benzyl-penicillin, chloramphenicol, erythromycin, furazolidone, kanamycin, neomycin, oleandomycin, streptomycin, sulfathiazole and thiamphenicol(CR_{50}<0.05%).

Keywords □ Gentamicin(GM), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), drug residues

Gentamicin(GM)은 방사선균인 *Micromonospora purpurea*의 배양액에서 생산되는 항생물질로써 Weinstein 등에 의해 처음 발견되었고(1963), 이후 Rooseot 등(1964)에 의하여 분리 · 정제되었다. 가축에 있어서 GM은 *Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus, Pseudomonas aeruginosa, Serratia, Salmonella, Shigella* 등에 의하여 유발되는 질병에 유효하다. 가금 질병으로는 대장균증, 포도상구균증, 괴양성 피부염에 유효하며, 개나 고양이에 있어서는 요도, 기도, 소화기, 피부 감염증의 치료에 사용된다.[1]

GM을 비롯한 다양한 종류의 항생 · 항균제가 가축의 질병을 예방하거나 사료효율을 높임으로써 생산성을 향상시키기 위하여 국내에서 널리 사용되고 있다. 이들 약제는 그 고유한 독성이 있을 뿐만 아니라 내성균 유발의 위험성이 있기 때문에 축산식품 생산 동물에는 사용을 엄격히 제한해야 한다. 따라서 국가에 따라서 축산식품 중의 잔류 허용한계와 안전

† To whom correspondence should be addressed.

휴약기간을 설정하여 운용하고 있다.

GM을 검사하기 위하여 최근까지 bioassay가 널리 응용되고 있는데, 일상적으로 적용하기에는 시간이 많이 소요되고, 검출감도가 낮으며 다른 항생제가 혼합되어 있을 경우 분석결과에 영향을 받을 수 있다. 이외의 방법으로 HPLC법이 개발되어 보고자에 따라 0.3~1 ppm의 감도를 보이나,[2,3] 추출과정이 복잡하고 기기분석시 많은 시간을 소요하는 단점이 있다. 또한 radioimmunoassay는 신속하고 감도가 좋은 방법이나 비용이 많이 들고 방사선 동위원소를 사용하는데 따른 위험의 단점이 있다.[4,5] Standefer 등이 1978년 토끼에서 생산한 polyclonal antibody를 사용한 competitive ELISA를 보고한 후[6] 1986년 David 등은 Standefer와 Saunder의 방법에 기초하여 2.3 ng/ml의 최소검출한계를 갖는 ELISA로 도축장에서 돼지 혈청 중의 GM을 검사하기 위한 ELISA를 개발하였다.[7] 이 방법으로 하루에 한명의 실험자가 200~400건의 시료를 검사할 수 있었다고 한다.

현재 Environmental Diagnotics사의 EZ-SCREEN kit, IDEXX사의 Citre probe Gentamicin kit, Idetek사의 LacTek Milk Gentamicin Screening kit 등 다수의 GM 잔류검사용 kit가 시판되고 있는데[8] 이는 신속하게 대량의 시료를 검사할 수는 있으나, 비용이 많이 들어 축산식품의 잔류검사에 활용할 ELISA의 국내개발이 시급히 요구되고 있다.

ELISA는 매우 민감한 검출법으로 좋은 특이성을 가지고 있으며 단시간내에 다량의 시료를 처리할 수 있고 정량 또한 가능한 장점이 있기 때문에 축산식품 등의 잔류검사법으로 활용도가 높을 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 축산식품에 잔류하는 GM을 검출하기 위하여 GM에 대한 polyclonal antibody를 생산하고 이의 특성(감도 및 특이성)을 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 실험에서 면역원을 접종하여 항체를 생산하는 데에는 10주령의 토끼(New Zealand White, female)를 한국실험동물연구소에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 자연조명하에서 수돗물과 실험동물용 사료(삼양사)를 자유로이 급식시키면서 3주간 적응 사육한 후 실험에 사용하였다.

면역원 및 흡착용 항원의 제조 및 정제

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDC)를 이용한 면역원 및 흡착용 항원의 제조—Gentamicin sulfate(GM, Sigma Co.) 65 mg과 keyhole limpet hemocyanin(KLH) 20 mg을 0.1% sodium azide가 포함된 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.5) 2 ml에 녹였다. EDC 620 mg을 2 ml의 증류수에 녹여 2N NaOH로 pH 7.5로 조절한 후 GM과 KLH의 혼합액에 천천히 저으면서 10분간에 걸쳐 가한 다음 실온에서 1시간 방치시켰다. 이후 4℃에서 3일간 방치 후 겔 여과법에 의하여 GM-KLH 접합체를 정제하여 면역원으로 사용하였다.

Bovine serum albumin(BSA)에 대해서도 위와 같은 방법으로 GM-BSA 접합체를 합성, 정제한 다음 ELISA 흡착용 항원으로 사용하였다.

면역원 및 흡착용 항원의 정제—위의 방법으로 제조한 면역원(GM-KLH)과 흡착용 항원(GM-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 분획을 흡광도를 280 nm의 파장에서 측정하였고, 분광광도법으로 단백질을 정량하였다.

면역

앞서 방법으로 제조한 GM-KLH 접합체를 동량의 Freund's complete adjuvant(Sigma Co.)로 emulsion화 한 다음 단백질량으로 1 mg 상당량을 토끼(New Zealand White, female) 피하의 여러 부위에 나누어 주사하였다. 이로부터 21일과 41일 후에 500 μg의 면역원을 Freund's incomplete adjuvant로 emulsion화 하여 피하에 주사하였다.

간접 효소면역측정법(ELISA)에 의한 항체 역가 측정

면역된 토끼 혈청에서 항체를 검출하기 위해 간접 ELISA를 실시하였다. 먼저 ELISA plate 흡착용 항원으로 제조한 GM-BSA 접합체 용액을 0.1 M carbonate buffer(pH 9.6)에 적정농도(1~5 μg/ml)로 희석하여 100 μl를 plate의 각 well에 분주하여 4℃에서 하루밤(또는 37℃에서 2시간) 동안 흡착시킨 후 세척완충액(0.02% Tween 20, 0.15 M NaCl)으로 5회 세척하였다. 여기에 BSA 0.5% 용액을 150 μl씩 각 well에 가한 후 37℃에서 1시간 정치하여 빈자리를 봉쇄하였다. 이후 가검 항혈청을 단계별로 희석하여 20 μl씩 각 well에 넣고 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이 plate를 5회 세척한 다음 goat anti-rabbit IgG hor-

seradish peroxidase(HRP) conjugate (Pierce Co.)를 5,000배 희석한 용액 100 μl씩을 가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 5회 세척하였다. 여기에 기질액(0.04% o-phenylenediamine dihydrochloride in citrate-phosphate buffer, pH 5.2)에 과산화수소를 0.01%되게 가하여 즉시 100 μl씩을 각 well에 가하고 실온에서 20분간 반응시킨 다음 3N HCl 25 μl를 가해 반응을 정지시키고 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

항혈청의 정제

면역개시 50일에 실험동물로부터 혈청을 얻어 50% ammonium sulfate로 침전시킨 다음 원심분리하여 얻은 침전물을 pH 7.2의 phosphate buffered saline (PBS)으로 부유하였다. 이 부유액을 10 mM Tris-Cl (pH 8.5)로 평형시킨 PD-10 column에 통과시켜 ammonium sulfate를 제거하고 protein A column(Pharmacia Co.)을 사용하여 항체를 정제하였으며, 용출되어 나온 분획중의 항체는 간접 ELISA로 확인하였다.

경쟁적 효소면역 측정법(CELISA)

CELISA 조건 설정－GM-BSA 접합체 용액을 간접효소면역측정법과 동일한 방법으로 다양한 농도로 희석하여 흡착시킨 후 빈자리를 봉쇄하였다. 이후 PBS로 희석한 표준 GM 용액 50 μl와 항체 희석액 50 μl를 동시에 가한 후 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 여기에 2차 항체와 기질액의 반응은 간접효소면역측정법과 동일하게 시행하였다. 이때 흡착항원의 양(300～700 ng/ml), 항체의 양(60,000～100,000배), 2차 항체의 양(2,500～10,000배) 등을 조사하여 최적조건을 찾았다.

재현성 및 표준곡선의 작성－표준 GM을 10, 100, 1,000, 10,000 및 100,000 ng/ml로 되게 희석한 용액과 정제한 항체를 사용하여 위에서와 같은 방법으로 CELISA를 실시하여 ELISA plate내 well간의 재현성과 plate간의 재현성을 조사하였다. 그리고 CELISA에 사용한 시약을 새로이 제조하여 시약조제 batch간에 재현성이 있는지의 여부도 조사하였다. Batch I의 경우 두개의 plate를 사용하여 12번 반복 실험하였다. 시약을 새로 제조하여 시행한 batch II의 경우는 두개의 plate에 대해 14번 반복 실험하였다.

총 26반복 실험한 위의 결과를 토대로 하여 표준곡선을 작성하였고, 5% 유의 수준에서 0 μg/ml 농도와 특정 GM 농도와의 흡광도 차이를 student's t-test에 의하여 최소검출한계를 설정하였다.

다클론 항체의 특이성 조사

생산된 항체의 특이성을 조사하기 위하여 GM과 유사한 구조를 가진 aminoglycoside계 항생제 4종 즉, amikacin, kanamycin, neomycin 및 streptomycin을 비롯한 benzylpenicillin, chloramphenicol, erythromycin, furazolidone, oleandomycin, oxytetracycline, sulfathiazole, tetracycline, thiamphenicol 등에 대해 교차반응성을 조사하였다. 즉, 각 물질들의 농도를 달리하여 흡착 항원에 결합된 항체를 50% 유리시키는 농도를 산출하여 교차반응성(CR_{50})을 다음과 같이 계산하였다.

$$CR_{50} = \frac{\text{흡착항원과 항체의 반응을 50\% 억제할 수 있는 GM의 농도}}{\text{흡착항원과 항체의 반응을 50\% 억제할 수 있는 항생물질 및 화합물질의 농도}} \times 100$$

결 과

면역 토끼 항혈청의 항체역가

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDC)법에 의하여 합성한 gentamicin (GM)-keyhole limpet hemocyanin(KLH) 접합체를 면역원으로 사용하여 토끼를 면역시킨 다음 각 면역단계마다 접종 10일 후에 혈청을 분리하여 항체역가를 조사하였다. 이때 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate 흡착용 항원으로는 EDC를 사용하여 합성한 GM-BSA 접합체 용액을 1 μg/ml의 농도로 흡착시켜 항혈청을 250배에서부터 2진 희석하여 항체 역가를 조사한 결과, 1차 면역 후에는 항체의 생성이 미약하였으나, 1차 boosting과 2차 boosting 후에는 약 30,000배 정도에서도 정상혈청에 비해 높은 흡광도를 보였다(Fig. 1). 1차 boosting과 2차 boosting간에 역가 차이가 크게 없고 또한, 2차 boosting 후 높은 항체역가를 보여 7일 후에 혈액을 채취하여 항체를 정제하였다.

또한 간접 ELISA시 흡착용 항원으로 사용한 GM-bovine serum albumin(BSA) 접합체의 BSA가 GM에 특이적으로 생산된 항혈청과 교차반응하는지의 여부를 조사하였다. GM-BSA 접합체, BSA, GM, KLH를 각각 1 μg/ml씩 흡착시킨 후 희석 항혈청을 20 μl씩

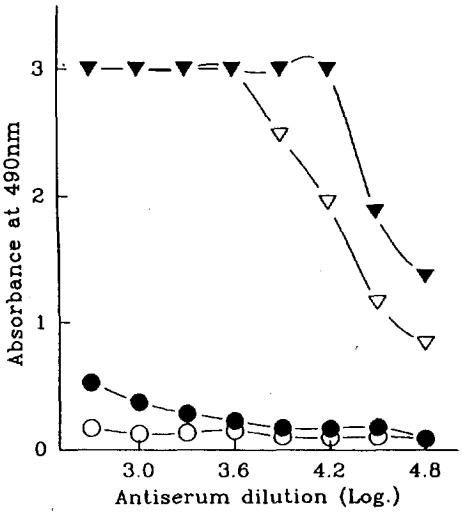

Fig. 1. Titers of antisera detected by indirect ELISA after immunization.
Sera were collected after first immunization (●), first boosting (▽), second boosting (▼) and unimmunized normal serum (○).

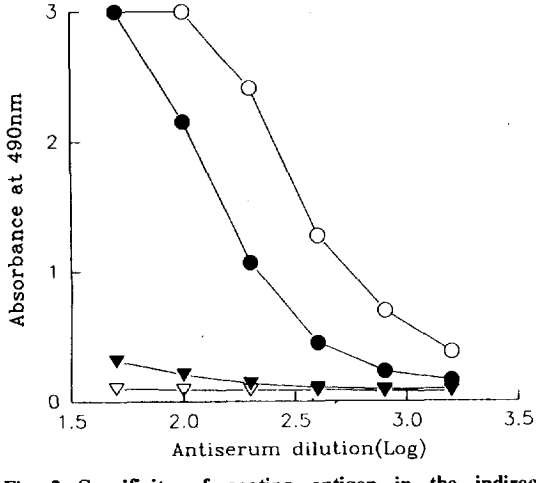

Fig. 2. Specificity of coating antigen in the indirect ELISA.
Each well was coated with 1 μg/ml of gentamicin-bovine serum albumin conjugate(GM-BSA, ○), keyhole limpet hemocyanin(KLH, ●), gentamicin (GM, ▼), bovine serum albumin(BSA, ▽). Serially diluted antiserum against gentamicin, secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase and substrate were reacted sequencially.

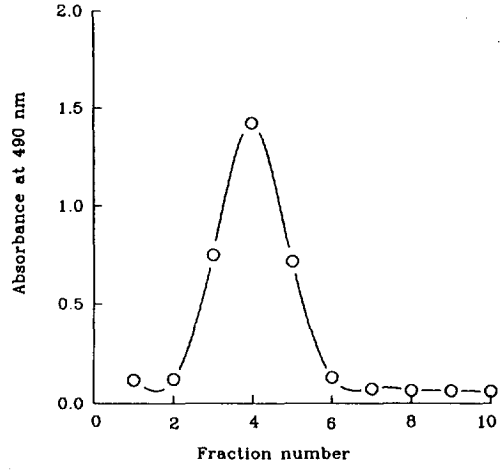

Fig. 3. Protein A affinity chromatographic profile of anti-gentamicin immunoglobulin detected by indirect ELISA.

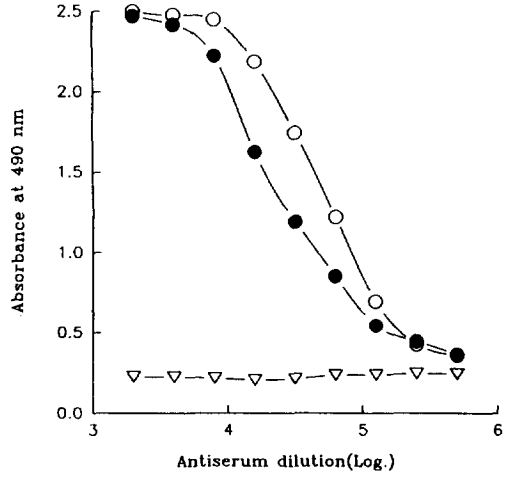

Fig. 4. Titers of the purified immunoglobulin.
Each well was coated with 500 ng/ml of GM-BSA, reacted with antibody against GM (1 : 80,000) and secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (1 : 5,0000). ○, antiserum; ●, purified antiserum; ▽, unimmunized normal serum.

반응시킨 결과 BSA와 반응하는 항체는 존재하지 않음을 알 수 있었다(Fig. 2). 그러나, KLH를 흡착시켰을 때 흡광도가 혈청희석배수가 높아짐에 따라 감소하는 경향을 보여 KLH에 대한 항체는 존재하는 것으로 추정된다.

생산된 항혈청의 정제와 항체역가

생산된 항혈청을 포화 ammonium sulfate를 동량 가해 얻은 침전물을 phosphate buffered saline(PBS)으로 부유한 후 protein A affinity chromatography를 실시하였다. 각 분획 0.5 ml씩을 받아 간접 ELISA로 항체 용출 유무를 확인한 결과 3, 4, 5번 분획에 항체가 용출되었음을 확인하였다(Fig. 3).

정제 혈청의 항체역가를 확인하기 위해 정제하지 않은 혈청을 양성 control로, 면역시키지 않은 토끼의 혈청을 음성 혈청으로 하여 간접 ELISA로 항체역가를 비교하였다(Fig. 4). 그 결과 희석하지 않은 항혈청에 비하여 역가는 다소 낮았으나 비교적 높은 역가의 정제 항체를 얻을 수 있었다.

경쟁적 ELISA(CELISA) 조건설정 및 재현성

정제한 항체를 이용하여 CELISA의 감도(표준곡선)와 재현성을 다음과 같이 조사하였다.

CELISA의 조건 설정－먼저 ELISA plate 흡착항원의 적정농도를 구하기 위해 위해 GM-BSA 접합체 용액을 700, 600, 500, 400 및 300 ng/ml되게 하여 흡착시킨 후 정제 혈청을 80,000배 희석하여 GM 농도를 변화시키면서 경쟁적 ELISA를 실시한 결과 500 ng/ml의 농도에서도 현저한 흡광도의 차이와 직선성을 보였다(Fig. 5).

결과로 제시하지는 않았으나 흡착항원 농도를 500 ng/ml되게 한 것을 plate에 흡착시킨 다음 정제한 항체의 농도를 40,000, 60,000, 80,000배 되게 희석하여 GM 농도를 달리하면서 CELISA를 실시한 결과 80,000배 희석액에서도 직선성을 보였다.

표준곡선 작성 및 CELISA의 재현성－CELISA의 plate간 그리고 plate내 well간의 재현성과 각각 따라 조제한 ELISA 시약간의 재현성을 조사하기 위하여 흡착항원 500 ng/ml 농도와 정제항체 80,000배 희석액을 사용하고 GM 농도를 10, 100, 1,000 및 100,000 ng/ml되게 조절하여 두개의 plate에서 CELISA를 실시한 결과, 시약 batch I과 batch II간에 그리고 plate와 well간에 비교적 낮은 편차를 보여 본 CELISA가 GM 검출용으로 활용 가능함을 보여 주었다(Table 1).

그리고, batch I과 batch II를 평균한 결과의 각 GM 농도의 흡광도를 0 μg/ml GM 농도에서의 흡광도와 비교해서 유의성 있는 차이가 있는지 알아보기 위해 student's t-test를 실시한 결과 10 ng/ml 즉, 10 ppb를 최소 검출한계로 정하였다. 또한 이 결과를 토대로 표준곡선을 작성한 결과 Fig. 6에서와 같은 결과를 얻었다.

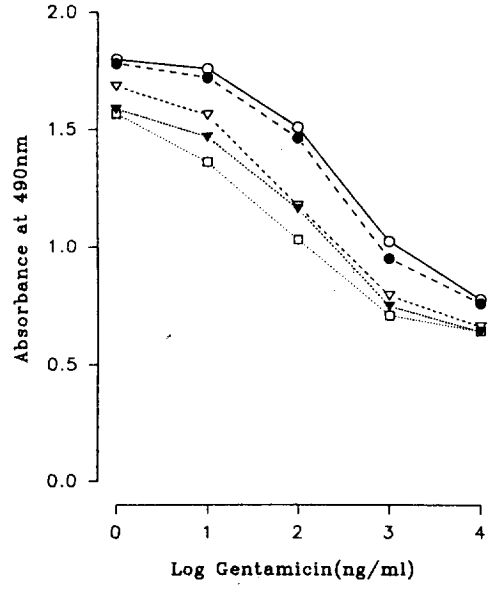

Fig. 5. Effect of GM-BSA coating antigen concentrations on the CELISA standard curve.
Each well was coated with GM-BSA at the concentrations(ng/ml) of 700(○), 600(●), 500(▽), 400(▽), 300(□). The reagents were than sequencially added as follows; standard GM, antiserum(1 : 80,000) and secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase(1 : 5,000).

Table 1. Precision and reproducibility of the CELISA by analysis of variance of enzyme activity (absorbance)

GM conc.	Mean of absorbance (Standard deviation)		
(ng/ml)	Batch I	Batch II	Batch (I+II)
0	1.703 (0.051)	1.494 (0.105)	1.584 (0.137)
10	1.544 (0.089)	1.310 (0.122)	1.409 (0.161)
10^2	1.402 (0.087)	1.213 (0.054)	1.300 (0.119)
10^3	0.950 (0.867)	0.812 (0.051)	0.868 (0.093)
10^4	0.686 (0.056)	0.635 (0.031)	0.653 (0.053)
10^5	0.668 (0.051)	0.569 (0.068)	0.615 (0.078)

Replication in batch I: n=12.
Replication in batch II: n=14.

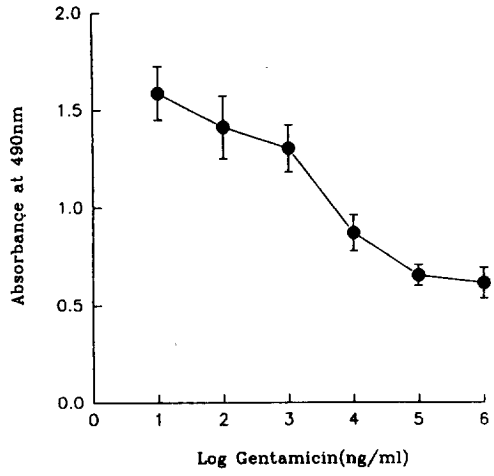

Fig. 6. Gentamicin competitive ELISA standard curve (n=26).
Each well was coated with 500 ng/ml of GM-BSA. Standard GM, antiserum(1 : 80,000), secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase (1 : 5,000) were sequentially reacted. Error bar indicates standard deviation.

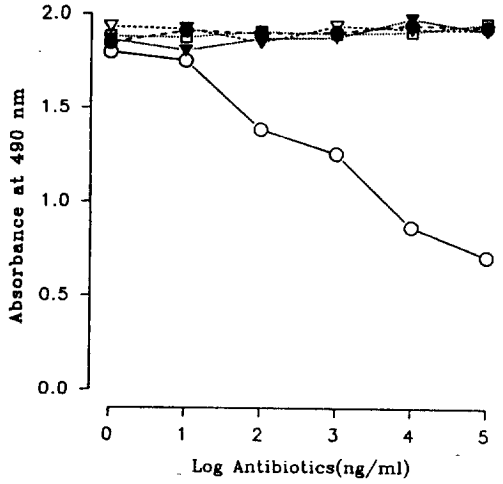

Fig. 7. Cross-reactivities of partially purified immunoglobulin against gentamicin(○), amikacin(●), kanamycin(▽), streptomycin(▼), and neomycin(□).

항체의 특이성

생산된 항체의 특이성을 조사하기 위하여 GM과 구조가 비슷한 화합물인 aminoglycoside계 항생제와

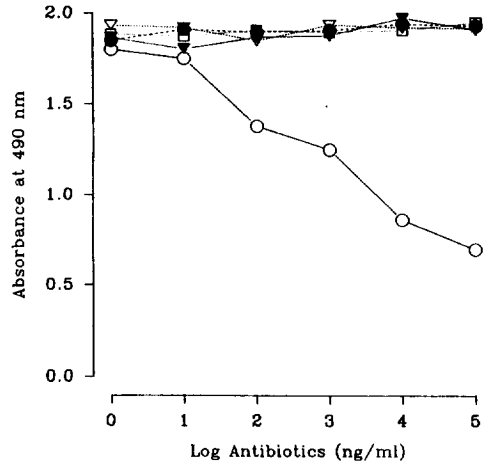

Fig. 8. Cross-reactivities of partially purified immunoglobulin against with gentamicin(○), chloramphenicol (●), erythromycin(▽), oleandomycin(▽), and thiamphenicol(□).

다른 화합물에 대해 CELISA를 실시하였다. 그 결과 amikacin, benzylpenicillin, chloramphenicol, erythromycin, furazolidone, kanamycin, neomycin, oleandomycin, oxytetracycline, streptomycin, sulfathiazole, tetracycline, thiamphenicol 등에 대한 교차반응은 Fig. 7 및 8에서와 같이 매우 낮은 것으로 나타났고 이 결과를 바탕으로 교차반응성(CR_{50})을 계산한 결과 모두 0.05% 이하였다.

고 찰

1970년대 초반부터 미국과 다른 여러 나라에서 세균성 질병의 치료나 예방 뿐만 아니라 성장촉진 목적으로 항생제나 화학요법제를 널리 사용하고 있다. 따라서 항생제를 투여한 동물에서 생산된 우유나 식육에 이들 약제가 잔류할 가능성이 크다.[9] 특히 gentamicin(GM)의 경우 조직과의 친화성이 높기 때문에 잔류의 가능성이 더 크다.[10] GM은 젖소의 경우 신장에 축적되는 정도가 혈청보다 1,500배가 높으며,[11] 신장의 수직이나 피질에서 GM의 반감기는 약 50~105시간 정도이다. 또한 간장조직도 GM과의 친화성이 크기 때문에 혈청보다 약 10배 농도가 높다. 또한 신장피질, endolymph, 귀의 perilymph에 높은 농도로 존재하여 이에 의한 신장독성과 청각독성을 유발한다.[12,13]

현재 미국에서 GM의 휴약기간은 3일령의 돼지에서는 5 mg을 근육주사했을 때 40일로 정해져 있고, 1~3일령의 돼지에 음수로 5 mg/lb를 투여시 14일로 되어 있다. 닭의 경우는 피하로 1 mg/ml의 양을 투여했을 때, 휴약기간을 35일로 정하고 있다. 1988년 미국 FDA 조사에 의하면 잔류가 문제시 되는 약물에 GM이 포함되고, 잔류원인 중 휴약기간을 제대로 지키지 못한 것이 잔류원인의 61%를 차지하고 있다고 한다.[14] 실제로 미국에서는 1983년 돼지에서의 사용이 허용된 이후 GM의 잔류빈도가 증가하였음이 보고되었다.[15]

GM은 분자량이 작아서(MW 450~477) 단독으로는 항체를 생성하지 못하기 때문에 분자량이 큰 단백질, 즉 carrier와 결합시켜 면역원으로 사용하여 hapten 특이항체를 생산하였다. 일반적으로 carrier로는 다양한 동물의 혈청 알부민, keyhole limpet hemocyanin(KLH), thyroglobulin 등이 사용되고 있다.[16] 본 실험에서 carbodiimide 반응에 의하여 GM의 primary amine기를 carrier 단백질의 carboxyl기에 결합시키는 방법을 이용하여 GM-KLH 접합체를 합성하여 면역원으로 사용하였으며, GM-bovine serum albumin (BSA) 접합체를 합성하여 ELISA plate 흡착용 항원으로 사용하였다.

본 실험에서 응용한 Lewis 등이 개발한 방법인 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDC)의 carbodiimide 반응에 의해 합성한 접합체의 결합몰비율(carrier : GM)은 1 : 25-1 : 50인 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 접합몰비율을 측정하지는 않았으나, GM-KLH 접합체를 면역원으로 사용하여 4마리의 토끼에서 면역시킨 결과, 모두 높은 항체가를 보였다.

Polyclonal antibody는 면역시킨 개체간에 항원, 항체간의 친화성과 항원 특이성 등에 있어서 차이를 보일 수 있으나,[17] 본 실험에서 면역 단계마다 개체별로 항체역가를 측정해 본 결과(결과 생략) 개체간에 항체가의 차이가 크게 나타나지 않았다. 또한, immunoglobulin G에 친화력이 높은 protein A column을 이용하여 면역글로블린만을 정제함으로써, 혈청 중의 방해요인을 제거한 다음 ELISA에 사용하였다.

본 실험에서 실시한 경쟁적 ELISA는 항원과 항혈청을 동시에 경쟁적으로 반응시켰으며, displacement 정도는 2차 항체인 goat anti-rabbit IgG HRP를 사용하여 측정하였다. 1978년 Standefer는 GM에 peroxidase를 붙여서 free GM과 경쟁적으로 반응시키는 방법을 제시하였고, 1979년 Wills와 Wise는 Standefer (1978)와 같은 방법의 ELISA에 glucose-6-phosphate dehydrogenase를 효소로 사용하였는데,[18] 이때는 GM-enzyme conjugate의 활성이나 결합정도가 ELISA에 변수로 적용할 수 있다고 하였다. 이와 달리 2차 항체를 사용하였을 때는 ELISA 술식이 복잡해지는 단점이 있으나, 상품화되어 판매되는 것을 쉽게 얻을 수 있고, GM에 효소를 붙이는 복잡한 과정을 생략하여도 되는 잇점이 있다. 또한, 2차 항체가 항체의 heavy chain이나 light chain 모두에 결합하기 때문에 반응도도 GM enzyme conjugate를 바로 반응시키는 것보다는 높을 것으로 사료된다. 실제로 본 실험의 최소검출한계가 10 ppb인데 비하여, Standefer (1978)는 40 ppb, Wills와 Wise(1979)는 100 ppb라고 보고하여 2차 항체를 사용한 본 실험에서 검출한계가 우수한 결과를 보였다.

본 실험의 예비실험에서 흡착항원을 1, 5 및 10 μg/ml의 농도로 하고 항혈청을 60,000배, goat anti-rabbit IgG HRP conjugate를 5,000배 희석하여 ELISA를 실시한 결과(결과 생략) 표준 GM 5 μg/ml 이상의 농도에서는 0 μg/ml GM 농도에 비해 흡광도가 유의성 있게 감소하지 않아 GM을 검출할 수 없었다. 따라서, 흡착 항원 농도를 1, 0.5, 0.25, 0.125 μg/ml로 낮추고, goat anti-rabbit IgG HRP conjugate를 5,000배로 실시하여 흡광도의 변화를 비교하였을 때 흡착항원 500 ng/ml일 때 표준 GM 10~10,000 ng/ml의 농도에서 흡광도가 의미있게 감소하여 이 조건에서는 낮은 농도의 GM을 검출할 수 있었다.

GM과 같은 aminoglycoside계에 대한 교차반응을 조사한 결과 amikacin, kanamycin, neomycin, streptomycin 등과는 0.05% 이하의 낮은 교차반응성을 보였다. Place 등은 monoclonal antibody를 생산하여, substrate-labeled fluorescent immunoassay를 실시한 결과, amikacin, kanamycin, tobramycin 등과는 교차반응이 없었으나, GM과 구조가 매우 유사한 netilmicin과 sisomycin은 각각 102%와 107%의 교차반응성을 보임을 보고하였다.[19] 또한 Wills와 Wise는 amikacin, kanamycin, neomycin, streptomycin, tobramycin 등과 교차반응이 일어나지 않음을 보고하였다. Aminoglycoside계의 구조적인 측면에서 살펴보면, GM의 구조 중 garamine 부위가 immunodominant로 작용할 것으로 예상된다. 그러나, 다른 aminoglycoside계 항생제 중에서 streptomycin은 streptamine을

함유하여, GM과는 다른 group으로 구분되고, neomycin은 GM과 같은 deoxystreptamine을 포함하나 hydroxyl기가 치환된 위치가 달라 다른 group으로 분류된다.[20] 또한 kanamycin은 GM과 같은 deoxystreptamine을 포함하나, 이와 연결된 kanasamine이 GM과는 다른 구조를 띈다. 따라서 본 실험에서 얻은 항체는 이러한 구조적인 차이로 인해 다른 aminoglycoside계 항생제와 교차반응을 일으키지 않았던 것으로 사료된다.

항체 및 plate 흡착용 항원과 GM의 적정반응시간을 찾기 위해 반응시간을 1시간과 2시간으로 하여 시행한 결과(결과 생략) 2시간 반응시켰을 때 더욱 linear하고 기울기가 큰 표준 curve를 얻을 수 있었다. 이는 경쟁적 반응에 충분한 시간을 주는 것이 필요하다는 사실을 보여 주고 있다.

본 실험에서 Campbell 등이 제안한 방법을 이용하여 최소 검출한계를 산출하였다.[21] 즉, O μg/ml 농도의 GM과 일정농도의 GM에서 얻은 흡광도를 student's t-test에 의하여 유의성($p<0.01$) 있는 차이가 인정될 경우 그 농도를 검출할 수 있는 최소농도로 설정하였다. 본 실험에서는 10 ng/ml의 농도에서 유의성 있는 차이가 있어, 이 농도를 최소검출한계치로 정하였다.

이제까지의 실험 결과를 요약하면 생산된 혈청은 높은 감도와 특이성을 가지고 있기 때문에 GM 잔류검사에 이용 가능할 것이다. 그러나 앞으로 혈청뿐 아니라 조직에서 신속·간편하게 GM을 추출하는 방법과 보다 단순화된 ELISA 술식을 개발해야 할 것으로 사료된다.

국문요약

축산식품 중에 잔류하는 gentamicin(GM)을 검출하기 위하여 GM에 특이적인 항체를 생산하고 이를 사용하여 효소면역측정법을 개발하였다. Gentamicin sulfate를 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride를 사용하여 keyhole limpet hemocyanin(KLH)과 결합시켜 면역원(GM-KLH)으로, 그리고 bovine serum albumin(BSA)과 결합시켜 흡착용 항원으로 사용하였다. 면역원을 토끼(New Zealand White, female)의 피하에 접종하여 면역시킨 후 간접 ELISA로 혈청 중에서 항체를 확인하였다. 항체의 역가가 충분히 높다고 여겨질 때 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 protein A column을 이용하여 정제하였다. GM을 검출하기 위하여 흡착항원으로 GM-BSA, 시료(혹은 GM 표준액), 정제한 GM에 대한 항체, horseradish peroxidase(HRP)로 표지된 2차 항체 그리고 기질로는 o-phenylenediamine dihydrochloride-H_2O_2를 순차적으로 반응시키는 경쟁적 ELISA를 개발하였다. 경쟁적 ELISA로 표준곡선을 작성한 결과 ($n=26$) 검출한계는 GM 농도 10 ng/ml 수준이었으며, GM 표준품의 직선범위는 10 μg/ml 이하였다. 생성된 항체의 다른 항생·항균제에 대한 교차반응을 조사한 결과 amikacin, kanamycin, neomycin, streptomycin 등의 aminoglycoside계 항생 물질 그밖의 chloramphenicol, erythromycin, oleandomycin 등의 항생제와 furazolidone, sulfathiazole, thiamphenicol 등의 항균물질에서 0.05% 이하의 낮은 교차반응성을 보였다. 이상의 결과로 볼 때 시료 중의 잔류 GM을 추출 정제하는 방법만 고안된다면 개발된 ELISA로 잔류물질을 신속·정확하게 검출할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Booth, N.H. and Mcdonald, L.E.: Veterinary pharmacology and therapeutics, 6th ed, Iowa State University Press, p. 827 (1988).

2. Getek, T.A., Haneke, A.C. and Selzer, G.B.: Determination of gentamicin sulfate C_{1a}, C_2 and C_1 components by ion pair liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 172 (1983).

3. Peng, G.W., Gadalla, M.A.F., Peng, A., Smith, V. and Chiou, W.L.: High-pressure liquid chromatographic method for determination of gentamicin in plasma, *Clin. Chem.*, **23**, 1838-1844 (1977).
4. Lewis, J.E., Nelson, J.C. and Elder, H.A.: Radioimmunoassay of an antibiotics: gentamicin, *Nature New biology, 239, 216-217 (1972).*
5. *Mahon, W.A., Ezer, J. and Wilson, T.W.: Radioimmuoassay for measurement of gentamicin in blood, Antimicro. Agents. Chemother.*, **3**, 585-589 (1973).
6. Standefer, J.C. and Saunders, G.C.: Enzyme immunoassay for gentamicin, *Clin. Chem.*, **24**, 1903-1907 (1978).
7. David, B. and Donald, W.: Enzyme immunoassay-based survey of prevalence of gentamicin in serum of marketed swine, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 437-441 (1986).
8. Sundlof, S.F., Riviere, J.E. and Craigmill, A.L.: The food animal residue avoidance databank, 9th ed, University of Florida, pp. 170-172 (1992).
9. Shaiki, B. and Allen, E.: Overview of physical-chemical methods for determining aminoglycoside antibiotics in tissuesand fluids of food-producing animals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 1007-1013 (1985).
10. Riviere, J.E.: Reports form the symphosium on prevention of unwanted drug residues. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **198**, 809-816, (1991).
11. Haddal, N.S., Ravis, W.R., Pedersoli, W.M. and Carson, R.L.: Pharmacokinetics and tissue residues of gentamicin in lactating cows after multiple intramuscular doses are administered, *Am. J. Vet. Res.*, **48**, 21-27, (1987).
12. Tran ba huy, P., Meulemans, A., Wassef, M., Sterkers, M.O. and Amiel, C.: Gentamicin persistence in rat endolymph and perilymph after a two-day constant infusion, *Antimicro. Agents. Chemother.*, **23**, 344-346 (1983).
13. Friedrich, C.L. and Stuart, A.K.: Renal parenchymal accumulation of aminoglycoside antibiotics in rats. *J. Infet. Dis.*, **130**, 650-659 (1974).
14. Guest, G.B. and Paige, J.C.: The magnitude of the tissue residue problem with regard to consumer needs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **5**, 805-808, (1991).
15. David, B. and Donald, W.: Enzyme immunoassay-based survey of prevlence of gentamicin in serum of marketed swine, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 437-441, (1986).
16. Harlow, E. and Lane, D.: Antibodies-a laboratory manual, New York, p. 129 (1988).
17. Dunbar, B.S. and Schwoebel, E.D.: Preparation of polyclonal antibodies, *Methods in Enzymology*, **182**, 663-670 (1990).
18. Wills, P.J. and Wise, R.: Rapid, simple enzyme immunoassay for gentamicin, *Antimicro. Agents. Chemother.*, **16**, 40-42 (1979).
19. Place, J.D., Thompson, S.G., Clements, H.H., Ott, A. and Jensen, F.C.: Gentamicin substrate-labeled fluorescent immunoassay containing monoclonal antibody, *Antimicro. Agents. Chemother.*, **24**, 246-251 (1983).
20. Kenneth, L., Rinegart, J. and Ronald, M.S.: Biosyntheis of amino-cyclitol. *J. Antibiotics*, **xxix**, 319-351 (1976).
21. Campbell, G., Megeau, R.P., Schwab, B. and Johnston, R.: Detection and quantitation of chloramphenicol by competitive enzyme-linked immunoassay, *Antimicro. Agents. Chemother.*, **25**, 205-211 (1984).