J. Fd Hyg. Safety 10(4), 213 - 217(1995)

잔류 Sulfamethazine 검출용 ELISA 개발에 관한 실험적 연구

김성희 · 임윤규†
제주대학교 농과대학 수의학과

Experimental Study on Development of ELISA Method for the Detection of Sulfamethazine Residues

Seong-Hee Kim and Yoon-Kyu Lim†
Department of Veterinary Medicine, Cheju National University

ABSTRACT — A screening method has been developed for detecting sulfamethazine(SMZ) contamination of meat or feeds by using horseradish peroxidase (HRP) labeled protein A (Prot A-HRP)and an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The assay is based on competitive binding of guinea pig anti-SMZ with SMZ in sample and SMZ-gelatin conjugate(SMZ.GEL) followed by the uptake of prot A-HRP onto polystyrene microwell plate coated with SMZ.GEL. Percent binding (B/Bo × 100) was calculated from the absorbance in the absence (B0) and presence (B) of SMZ. By the sandard curve prepared by plotting log(SMZ) *vs* percent binding of each known reference solution, the detection limit was 1.0 ppb or less. Cross reaction with sulfadimethoxine, sulfaguaniding, sulfamerazine, sulfamthoxypyridazine, sulfanilamide, sulfisomidine and sulfisoxazole were not observed. But sulfamerazine cross-reacted in the test. The EC-50 value (concentration causing 50% inhibition of color development compared with blank) of sulfamerazine was 2.0 ppm. Further quality control will make the ELISA system ideal for the detection of SMZ in meat or feeds.

Key words □ Sulfamethazine, ELISA, Protein A

질병의 예방과 치료 및 성장촉진을 목적으로 사용되고 있는 항생제 및 항균성물질은 오용 및 남용에 의하여 식육이나, 우유, 계란에 이행 잔류될 위험이 있으며, 이를 섭취한 사람에게는 과민반응을 일으키거나 내성균을 유발시킬 가능성 등 공중위생상의 문제를 유발시키고 있음이 주지의 사실이다.[1)]

시료 첨가제로 많이 사용되는 SMZ 같은 설파제는 앨러지반응 유발과 백혈구감소증, 호산구증다증, 혈소판감소증, 무과립백혈구증, 골수이형성, 용혈성빈혈 등의 조혈기능의 이사아과 발암성, 갑상선 기능 실조, 면역체 형성저해와 관절염, 신장질환이 있는 경우 간질성 신염을 유발시켜 결정뇨를 일으키는 등 많은 부작용이 알려져 있다.[2-4)]

이와 같은 유해성 때문에 각 국가에서는 축산식품내의 최대잔류허용기준을 정하여 이의 섭취에 의한 국민보건 위행의 방지를 도모하고 있다. 또한 무분별하게 도입될 가능성이 있는 수입축산물의 규제와 수출용 축산물의 품위보증을 위해서도 항생물질의 잔류에 대한 규제를 엄격히 할 필요성이 있다. 우리나라에서도 일본에 수출한 돈육에서 SMZ의 잔류가 문제되어 수출품이 반품된 경험이 있다.

축산물의 잔류설파제를 검출키 위한 분석법으로는 비색법과 thin-layer chromatography(TLC), gas chromatography (GC), gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS), high-performance liquid chromatography(HPLC) 등이 있으나, 비교적 민감도가 낮거나 대부분의 경우 많은 시간을 필요로 하며 전처리가 복잡한 단점을 안고 있다.

본 연구는 식육 및 사료에 잔류하는 합성항균제 SMZ를 검출하기 위한 방법으로서, 가장 간단히 준비될 수 있는 재료 즉, HRP와 protein A의 접합체, geleatin과 SMZ의 접합체 및 정제하지 않은 기니픽 유래의 SMZ에 대한 항혈청(guinea pig anti-SMZ serum)만을 이용하여 실시할 수 있는 competition ELISA법을 실험하여, 이 방법이 잔류 SMZ검출에 유용한가 여부를 알아보기 위하여 시도하였다.

† To whom correspondence should be adressed.

재료 및 방법

SMZ와 BSA의 접합체(SMZ.BSA) 합성

Dixon-Holland와 Katz[5]의 방법에 따랐다. 즉, SMZ (Sigma, USA) 350 mg과 BSA(sigma, USA) 600 mg을 75 m*l*의 접합액 (0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, 2 volume: dioxane, 1 volume)에 용해하고 25%의 glutaraldehyde 0.35 m*l*를 가하여 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 이 후 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)으로 매일 2회 외액을 교환하며 6일간 투석하였다. 얻어진 접합체액(SMZ.BSA)은 제균여과 (pore size 0.22 μm)하여 냉장보관하며 실험에 사용하였다.

SMZ와 Gelatin의 접합체(SMZ.GEL) 합성

SMZ 350 mg과 Gelatin(Difco, USA) 600 mg을 SMZ · BSA 제조시와 동일한 방법으로 준비하였다.

Protein A와 Hpp의 접합체 합성

Wilson과 Nakane[6]의 방법에 준하여 제조하였다. 즉 HRP(RZ=3이상, Sigma USA) 6 mg을 2차증류수 1 m*l*에 녹인 후 0.1 M $NaIO_4$ 0.3 m*l*를 가하여 실온에서 20분간 흔들어 주었다. 이후 0.001 M acetate buffer(pH 4.4)를 사용하여 4 °C에서 20시간 투석시킨 다음, 0.2 M sodium carbonbate-bicarbonate buffer(pH 9.5)를 20 μ*l* 첨가하고, 0.01 M sodium acetate buffer(pH 9.5) 1 m*l*에 녹인 protein A 5 mg과 즉시 섞어 실온에서 2시간 반응시켰다. 이 후 0.4% sodium borohydride를 0.1 m*l* 넣고 4 °C에서 2시간 정치시킨 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 투석하였다.

Anti-SMZ 생산

위에서 합성한 SMZ.BSA 1.5 m*l*를 Freund's complete adjuvent 3 m*l*와 섞어 유탁액을 만들어 체중 약 350 g의 Hartley 계통의 기니픽 5수의 복강내로 약 9 m*l*씩 접종하였다. 추가접종은 초회접종 15일, 35일 및 52일에 초회와 동일한 방법을 사용하여 실시하였다. 매 추가접종 직전에 심장채혈로 약 1 m*l*씩 취하여 항체가를 검사하고, 최종접종 후 10일째에는 심장을 통하여 전채혈하고 항체가를 ELISA로 측정하였다.

ELISA용 plate 제조

ELISA plate의 각 well(Nunc-Immuno Module, Polysorb U16, Denmark)에 SMZ.GEL 접합체 용액을 50 mM carbonate buffer(pH 9.6)로 계단희석하여 100 μ*l*식 분주하고 37 °C에서 2시간 정치한 후 4 °C의 냉장고에서 하룻밤 정치하여 흡착시켰다. 흡착된 plate는 2차 증류수(DDW)로 4회 세척한 후, 0.2%의 gelatin이 용해된 PBS-T(tween 20이 0.05% 함유된 PBS)를 well당 200 μ*l*씩 가하고 냉장온도에서 1시간 정치시켜 봉쇄(blocking)하였다. DDW로 4회 세척하고 건조시킨 plate는 desicator에서 냉장보관하며 ELISA에 사용하였다.

ELISA

적당한 농도의 anti-SMZ가 희석된 PBS-T 용액에 표준농도의 SMZ를 가하고 잘 썩은 혼합액을 100 μ*l*씩 각 well에 가하여 60분간 반응시킨 후 DDW로 세척하고, Prot A-HRP 용액을 100 μ*l* 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 이후 4회 세척하고, 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 4.0)에 0.1% ABTS (2-2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) 및 0.02% H_2O_2를 용해한 액을 100 μ*l*씩 각 well에 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응정지액은 0.005% NaN_3를 사용하였으며 흡광도는 405 nm에서 측정하였다. 표준 SMZ용액을 측정하여 얻어진 흡광도 값은 SMZ 농도 0 ppb의 흡광도 값으로 나눈 Percent binding치 (B/B0%)를 환산하여 표준곡선을 구하고 시료의 B/B0% 치를 대입하여 SMZ농도를 산출하였다.

기타 합성항균제와의 교차반응

생산한 guinea pig anti-SMZ가 여타의 합성항균제에 대하여 혈청학적인 교차반응을 보이는가 알아보기 위하여, 적당한 농도의 anti-SMZ가 희석된 PBS-T액에 sulfadimethoxine, sulfaguanidine, sulfamerazine, sulfamerazine, sulfamethoxypyridazine, sulfanilamide, sulfapyridine, sulfisomidine, sulfisoxazole을 비교적 높은 농도인 10 ppm이 되게 용해하고 각 weel당 100 μ*l*씩 가하여 ELISA를 실시하였으며, 교차반응을 보이는 물질에 대해서는 blank well의 발색반응을 50% 저해하는 농도(EC-50)[7]를 구하여, 각 well에 흡착된 SMZ와 guinea pig anti-SMZ와의 결합반응에 경쟁을 보이는가의 여부를 관찰하였다.

결 과

Anti-SMZ 역기

각 추가접종 직전에 채혈한 혈청은 PBS-T로 500배 희석하여 SMZ.GEl이 흡착된 well에 반응시켜 분석한 결과는 Table 1과 같이 접종횟수의 추가에 따라 항체가의 순조로운 상승이 관찰되었다.

흡착항원 및 항혈청의 적정조건

각 well의 흡착항원의 적정농도와 항혈청의 적정 희석배

수를 결정하기 위한 예비시험에서 SMZ.GEL액의 흡착농도를 ×2,500, ×5,000 ×10,000 및 ×20,000배로 결정하고, 항혈청은 ×200, ×400, ×800, ×1,600, ×3,200 및 ×6,400배로 희석하였다. 각 혈청 희석액에 SMZ를 0 및 2 ppb되게 넣고 분석한 결과는 Table 2와 같다. B/B0% 값 중 흡광도가 2.0이상을 보이며 70%대의 낮은 값을 보이는 조건을 선택하였는데 SMZ.GEL농도 ×10,000으로 흡착하여 항혈청 ×400배로 반응시키는 조건이 가장 양호한 결과를 보였다

SMZ 검출한계

상기 조건에 따라 PBS-T액에 SMZfmf 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 alc 100 ppb로 농도를 변화시키면서 ELISA를 실시한 결과는 Fig. 1에서와 같이 1.0 ppb 이하의 낮은 농도까지도 검출이 가능하였다.

기타 합성항균제와의 교차반응

Guinea pig anti-SMZ.BSA는 Table 2의 결과와 같이 sulfamerazine 외에는 다른 합성항균제와 뚜렷한 교차반응을 보이지 않았다. Sulfamerazine의 EC-50값은 2.0 ppm이었다. 또한 SMZ 자체의 EC-50값은 20 ppb였다.(Table 3)

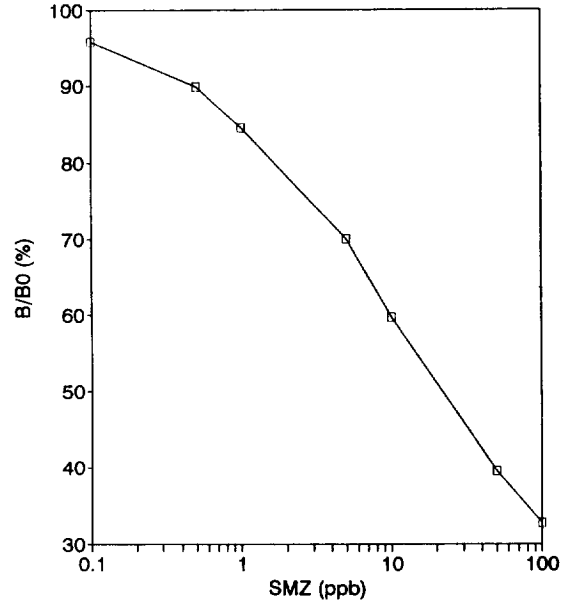

Fig. 1. Percent binding of Prot A-ELISA on reference SMZ.

Table 1. Anti-SMZ titer changes of guinea pig sera as immunization progressed

Guinea pig no.	days after first inoculation		
	d15	d35	d52
1	0.212[1)]	0.363	D[2)]
2	0.225	0.553	0.720
3	0.222	0.245	0.814
4	0.244	0.894	1.165
5	0.190	D	-

1) Optical density at 405 & 492 nm

2) Animals died

Table 3. Cross reactivity of sulfamethazine and other chemicals to guinea pig-SMZ

Compounds	EC-50[1)](ppm)
sulfamethazine	0.020
sulfamerazine	2.0
sulfadimethoxine	–[2)]
sulfaguanidine	–
sulfamethoxypyridazine	–
sulfanilamide	–
sulfapyridine	–

1) Concentration causing 50% inhibition in color development of sample wells compared with blank.

2) EC-50 greater than 10 ppm or no reactivity up to 10 ppm

Table 2. Optimum dilution of SMZ.GEL and guinea pig anti-SMZ

Coating SMZ. GEL dil.	Anti-SMZ dil.					
	×200	×400	×800	×1,600	×3,200	×6,400
×2,500	3.50/3.50[1)](100)[2)]	3.50/2.50 (100)	3.50/3.50 (100)	2.65/2.85 (92.4)	1.55/1.59 (103.8)	0.74/0.74 (100)
×5,000	3.50/3.50 (100)	3.50/3.50 (100)	3.20/3.52 (91.0)	1.95/2.21 (88.1)	0.95/1.09 (87.2)	0.49/0.56 (88.3)
×10,000	3.07/3.50 (87.8)	3.37/3.38 (99.7)	2.12/2.73 (77.4)	1.45/1.76 (82.3)	0.83/0.98 (84.5)	0.48/0.55 (87.2)
×20,000	1.83/1.99 (92.1)	1.60/1.78 (89.8)	1.10/1.49 (73.4)	0.91/1.18 (76.8)	0.55/0.69 (79.9)	0.34/0.43 (79.9)

1) optical density at 405 and 492 nm

2) percent binding: $(B/B0)\% = \frac{\text{OD of 2.0 ppb}}{\text{OD of 0.0 ppb}} \times 100$

고 찰

이 연구에서는 식육 등에 잔류할 가능성이 있는 SMZ 검출용 ELISA법을 개발하기 위한 기초적인 실험을 실시하였다.

Prot A-HRP를 사용한 이 방법은 기니픽 혈청중의 anti-SMZ를 따로 정제해야 하는 과정이 필요치 않으며, 다만 적당한 농도로 희석하여 사용하면 된다는 방법상의 편리함이 잇점이다. 또한 Prot A-HRP의 제조방법은 단순하며, 일반적인 ELISA에 광법위하게 사용되는 효소결합체이므로 상품화된 것을 구매하여 사용할 수도 있다는 편리함이 있다. SMZ와 gelatin 및 SMZ와 BSA의 접합과정도 비교적 간단하다. 그 정제과정도, SMZ가 분자량이 작은 물질이므로 단지 투석만으로도 이루어질 수 있다. 그러므로 이러한 방법의 ELISA법은 즉각 실시가 가능하였으므로, 이의 실험적인 방법론을 이용한 분석을 수행하여 보았다.

실험의 결과, 이 ELISA방법의 SMZ검출한계는 적어도 1.0 ppb이었는데, 이 값은 동물의 혈청을 대상으로 측정하는 경우, 검사혈청은 50배로 희석하여 측정한다고 가정하더라도 그에 해당하는 factor를 공하면 50 ppb 즉 0.05 ppm에 해당한다. 정육의 SMA농도는 특히 돈육의 경우 혈청내 농도의 1/4 값에 해당하므로[8] 가장 까다로운 규제를 하고 있는 일본의 가이드라인(0.05 ppm) 내외의 값을 갖는 시료를 측정 비교함에도 충족되는 성능이다.

각 sufa제와의 교차반응은 sulfamerazine을 제외하면 뚜렷하지 않았으며, 특히 10 ppm이라는 비교적 높은 농도의 시료로 검사하였으므로 교차반응에 관련된 문제점은 심각하지 않을 것으로 생각된다.

교차반응을 보인 sulfamerazine은 SMZ의 pyrimidinyl기에서 6번의 methyl기가 없는 상태이며, 전혀 교차반응을 보이지 않은 설파제중 sulfisomidine은 SMZ와 유사하나 pyrimidinyl의 N의 -위치만 상이한 것으로 미루어보아, 이 실험에서 사용된 기니픽 항 SMZ의 항원결정기(epitope)는 pyrimidinyl기의 4, 6번의 methyl기의 존재와 그 사이에 있는 N의 위치가 중요한 요소를 이루고 있는 것으로 생각된다.

SMZ를 측정하기 위한 competetion ELISA의 방법은 이 연구에서의 경우와 같이 항원(SMZ.GEl)을 고형상에 흡착시키고 항혈청(anti-SMZ)과 시료(SMZ)를 경쟁적으로 반응시키는 방법과, 항체(anti-SMZ)를 흡착시키고 시료(SMZ) 및 효소 접합체(SMZ.HRP)를 경쟁적으로 반응시키는 방법[5,9]이 이용가능 하다. 전자의 경우를 보면, 면역글로불린은 항원과의 결합부위(Fab)가 적어도 2개이므로 고형상의 SMZ와 결합한 항체가 시료속의 SMZ와 경쟁이 없이 동시에 결합될 가능성이 있으므로, 이론적으로는 후자의 방법론이 더욱 높은 민감도를 지닐 수 있을 것으로 생각된다.

그러므로 제조한 기니픽 anti-SMZ를 순수정제하고, HRP를 SMZ와 접합시켜 후자의 병법을 실시하여 각 방법론을 상호 비교하여 더욱 양호한 방법론을 추구하여야 할 것이며, 이후 다양한 검사시료 즉, 혈청, 뇨, 젖, 고기 및 사료 등을 대상으로 실험을 실시하고 여타의 측정방법과의 비교검토도 이루어져야 할 것으로 생각된다.

감사의글

*이 연구는 1995년도 한국과학재단 연구비 지원에 의한 결과임(#951-0612-206-1).

국문요약

잔류 Sulfamethazine(SMA)을 검출하기 위하여 HRP가 접합된 protein A (Prot A-HRP)를 이용한 새로운 ELISA법의 이용 가능성을 시험하였다. Microplate 흡착항원은 glutaraldehyde를 사용하여 gelatin과 접합한 SMZ(SMZ.GEL)과 접합하였으며, SMZ에 대한 항혈청은 gllutaraldehyde를 사용하여 bovine serum alblumin(BSA)과 접합시킨 SMZ(SMZ.BSA)를 기니픽에 복강내에 접종하여 얻었다. Prot A-HRP는 sodium periodate를 이용하여 접합시켰다. SMZ를 검출하기 위한 경쟁적 ELISA는 SMZ.GEL을 흡착시킨 microplate의 well에 검사를 위한 SMZ의 각 단계별 희석액을 기니픽 anti-SMZ가 희석 투입된 phosphate buffered saline(PBS)와 섞어서 100 μl씩 가하여 반응시켰다. 이후 세척하고 Prot A-HRP를 가하여 반응시켰다. 반응은 2-2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)(ABTS)를 사용하여 발색시킨 후 과장 405 nm에서 측정하였다. ELISA의 SMZ의 검출한계는 1.0 ppb 이하이었다. 제조한 기니픽 anti-SMZ와 다른 합성항균제와의 교차반응을 조사한 결과, sulfapyridine, sulfisoxazole, sulfadimethoxine, sulfamethoxypyridazine, sulfanilamide, sulfamerazine, sulfaguanidine, sulfisomidine 등과는 교차반응을 보이지 않았고 sulfamerazine와는 교차반응을 보였다. (B/B0=6.0 ppm). 이 방법은 추가의 공정관리가 수행된다면 식육 혹은 사료 등의 잔류하는 SMZ 검출을 위한 ELISA kit로서 실용화도 가능할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Smither R, Lott AF, Dalziel RW, et al. Antibiotic residues in meat in the United Kingdom; an assassment of specific tests to detect and identify antibiotic resideus. *J. Hyg. Camb.*, **85**, 359-369 (1980).
2. Bevill RF. Sulfonamides in Vet. phar. Theraph 6ed lowa State University Press pp. 785-795 (1988).
3. Mandel GL, Sandae MA. Antimicrobial agents. Goodman and Gilman. The pharmacological Basis of Therapeueics. 6thed, Macmillan Publishing Co, Inc, New York. pp. 1106 (1980).
4. WHO Techinical Report Series 788: Thirty-fourth Report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain veteninary drug 1989 residues in food. *WHO, Geneva*. pp. 32 (1989).
5. Dixson-Holland DE, Katz SE. Competitive direct Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**,: 1137-1140(1988).
6. Wilson Mb, Nakane PK. 'Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antobodies' In Knapp, W., Holusbar, K. and Wick, G. (eds), Immunofluorescence and Related Staining Techniques. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. pp. 215-224 (1978).
7. Walker CC, Barker SA. Extration and enzyme immunoassay of sulfamethoxine residues in Channel catfish (Ictalurus punctatus) muscle. *J. AOAC.*, **77**, 908-916 (1994).
8. Randeker VW, Reagan JA, Engel RE, Soderberg DL, Mcneal JE: Serum and urine as predictor of sulfamethazine levels in swine muscle, liver and kidney. *J. Food protection.*, **50**, 115-122 (1987).
9. Ram BP, Singh P, Martins L, Brock T, Sharkov N, Allison D. High-volume enzyme immunoassay for sulfamethazine in swin. *J. Assoc. Anal. Chem.*, **74**, 43-46 (1991).