pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 32, No. 1, pp. 75~81 (2017)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2017.32.1.75

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

고등어 어육 중 열안정성 단백질에 특이한 단클론성 항체 개발과 특성 확인

이정은[1] · 김정숙[1] · 정덕화[2,3] · 심원보[2,3]*

[1]경상대학교 응용생명과학부, [2]경상대학교 농업생명과학연구원, [3]경상대학교 농화학식품공학과

Production of A Monoclonal Antibody (MAb) Against a Thermal Stable-Soluble Protein in Mackerel and Confirmation of the Properties for the MAb

Jeong-Eun Lee[1], Jeong-Sook Kim[1], Duck-Hwa Chung[2,3], and Won-Bo Shim[2,3]*

[1]*Division of Applied Life Science, Graduate School, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea*
[2]*Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea*
[3]*Department of Agricultural Chemistry and Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea*

(Received October 11, 2016/Revised October 28, 2016/Accepted November 9, 2016)

ABSTRACT - For people who have a food allergy the only way to manage the allergy is to avoid the food allergen. The mackerel is one of the major food allergens, but no immunoassay for the rapid and simple detection of mackerel has been reported. The objectives of this study are to develop and characterize monoclonal antibodies (MAbs) specific to mackerel using thermal stable-soluble proteins (TSSP) as an immunogen and to characterize the MAbs by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA). The mice immunized with mackerel TSSP and showing high titer were used for cell fusion and cloning. The characterization of MAbs produced from hybridoma cells obtained was confirmed by indirect ELISA and western blot. Four MAbs were confirmed to be specific to mackerel without cross-reaction to other marine products and livestock products in the both methods. The iELISA and western blot based on the MAbs can sensitively detect 1% mackerel protein in other marine products. These results support that immunochemical methods based on the MAb produced could be used as rapid means to detect low levels of mackerel and to identify mackerel adulterated in food.

Key words : Mackerel, monoclonal antibody, ELISA, western blot

식품 알레르기란 일반 사람에게는 무해한 식품이나 특정 개인에게 식품성분이 알레르겐으로 신체의 면역체계에 관여하여 이상반응을 나타내는 것을 말한다. 식품 알레르기를 가지는 사람들은 특정한 식품을 섭취하면 식품알레르겐에 의하여 면역체계가 자극을 받아 특이 항체인 IgE 항체를 생산하게 된다. 무수히 생산된 IgE 항체는 혈액 중에 돌아다니다 호염기성세포(basophil)와 결합하고 체세포에서 비만 세포(mast cell)과 결합하게 되어 식품 알레르겐과 표면의 IgE항체가 접촉하면 알레르기 반응을 유발시키는 히스타민 등의 염증매개물질을 분비한다. 이러한 이상 현상은 주로 영유아에게 문제를 야기하며, 드물기는 하지만 신체의 여러 부위가 동시에 알레르기 반응을 일으키는 과민증(anaphylaxis)이 나타나면서 심한 경우 사망에까지 이를 수 있다[1,2]. 특히 이러한 IgE 매개성 식품알레르기는 발생 빈도와 중증도가 증가하고 있어 반응을 유발하는 특정 알레르겐에 대한 관심 또한 증가하고 있다[3]. 식품알레르기를 유발하는 식품 항목과 성별을 조사한 설문조사에 의하면 식품 알레르기의 유병률은 남성의 경우 고등어가 6.6%로 가장 높았고 그 다음으로 돼지고기 5.9%, 호프 5.1%, 복숭아 5.0%, 닭고기 3.6% 순으로 나타났으며, 여성의 경우 복숭아가 7.4%로 가장 높았고, 그 다음으로 고등어 7.2%, 돼지고기 6.8%, 닭고기 3.7%, 호프 2.6% 순으로 나타났다[4].

이와 같이 높은 식품 알레르기 유병률을 나타내는 고등어는 그동안 이렇다 할 특화 제품으로 가공되지 못하였지만 최근 연근해 고등어로 부산어묵을 만드는 고등어의 어묵 원료화가 추진되고 있어 고등어의 시장규모는 현재 점점 확대되는 추세이다. 또한 미국 내 21개 주의 식료품점, 음식점, 초밥점을 상대로 조사를 실시한 결과에서도 식품 알

*Correspondence to: Won-Bo Shim, Department of Agricultural Chemistry and Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 52828, Korea
Tel: 82-55-772-1902, Fax: 82-55-772-1909
E-mail: wbshim@gnu.ac.kr

레르기 사고로 이어질 수 있는 알레르겐인 고등어를 값비싼 수산물인 참치로 둔갑시켜 의도적으로 판매하는 등 어종 바꿔치기 문제가 빈번하게 발생하고 지속적으로 증가하는 것으로 나타났다[5]. 고등어와 같이 알레르기를 유발하는 대부분의 식품들은 수용성 당단백(glycoprotein)으로, 10-70 kDa의 분자량(molecular weight)을 가지며 단백질 분해효소나 열, 산 등의 처리에도 항원성을 유지하는 경우가 많기 때문에[4,6] 극소량의 식품 알레르겐 혼입만으로도 사망에까지 이를 수 있는 식품 알레르기 부작용의 심각성을 감안하면 식품 내에 의도적으로 혼입 또는 고가의 어종으로 둔갑된 고등어를 검출하기 위한 분석방법은 그 수요가 증가될 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 고등어 어육 중 존재하는 열안정성 수용성 단백질(thermal stable-soluble protein; TSSP)을 추출하였고, 추출된 crude TSSP 추출액을 면역원으로 사용하여 단클론성 항체를 개발하였다. 또한 개발된 항체의 특성을 확인하기 위해 생선과 다른 알레르겐에 대한 교차반응성과 민감도를 효소면역분석법과 western blot을 통해 확인하였다.

Materials and Methods

시료 및 실험재료

실험에 사용된 고등어는 대형마트에서 판매하고 있는 국내산 고등어를 구입하였으며, 그 외 교차반응 확인을 위해 사용한 꽁치, 삼치, 우럭, 오징어, 새우 등도 대형마트에서 시판되고 있는 제품을 구입하여 실험에 사용하였다. 단백질 추출을 위해 사용된 0.15 M sodium chloride, 0.5 M sodium chloride, carbonate buffer (pH 9.6), 25 mM tris-buffered saline (pH 7.4, TBS), 20 mM tris-HCl (pH 6.8), 0.05 M phospahte-buffered saline (pH 7.4, PBS)는 실험실에서 준비하여 사용하였고, 단백질 정량을 위한 시약으로는 Quick start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)를 구입하여 사용하였다.

TSSP의 추출

고등어 중 TSSP를 추출하기 위해 고등어는 생 고등어와 조리된 고등어를 준비하였고, 조리된 고등어는 어육을 유리 tube에 넣어 끓는 물에 15분간 중탕하여 준비하였다. 준비된 어육 시료를 유리 tube에 각각 5 g 씩 취하고 10 mL의 0.15 M sodium chloride를 첨가한 후 vortex를 사용하여 30초 동안 균질화 하였다. 균질화된 시료의 추출은 4°C에서 15분 동안 추출하는 비열처리(non-heating) 추출법과 100°C 끓는 물에서 15분 동안 가열하여 추출하는 열처리(heating) 추출법을 사용하였으며, 추출물은 50 mL의 conical tube로 옮겨 3,221 × g에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 분리하여 실험에 사용하였다. 고등어 어육 중 TSSP를 확인하기 위하여 Laemmli[7,8]의 방법에 준하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시하였다. 먼저 5%의 농축 겔과 12%의 분리 겔을 준비하고, 고등어 어육 추출물을 2 × SDS sample buffer[0.25 M tris-HCl buffer (pH 6.8), containing 10% SDS, 4% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.05% bromophenol blue, and 10 mM EDTA]로 희석한 후, 끓는 물에서 5분간 열처리하였다. 열처리된 샘플은 전기영동장치(Bio-Rad)를 사용하여 150 V에서 90분 동안 전기영동 하였고, 겔은 염색액(Ez-Gel Staining Solution, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 1시간 동안 염색한 후, 3차 증류수를 이용하여 1시간 동안 탈색하였다. 추가로 고등어 어육 추출물의 단백질 정량을 위해 BSA를 표준물질로 하여 Bio-Rad사의 kit를 사용한 Bradford 방법으로 단백질을 정량하였다.

Buffer에 따른 TSSP 추출효율 확인

고등어의 어육으로부터 TSSP의 추출효율을 최적화하기 위해 단백질 추출과 단백질 반응에 주로 사용되고 있는 buffer를 이용하여 TSSP를 추출하고 그 추출정도를 비교하였다. 간단히 말하면, 5 g의 생 고등어 어육에 0.15 M NaCl, 0.5 M NaCl, carbonate buffer (pH 9.6), 25 mM tris-buffered saline (pH 7.4, TBS), 20 mM tris-HCl (pH 6.8), 0.05 M phosphate-buffered saline (pH 7.4, PBS)을 각각 10 mL 씩 넣고 열처리 방법으로 추출한 후 SDS-PAGE와 Bradford법을 통해 TSSP의 추출효율을 비교 확인하였으며 실험방법은 앞서 실시한 방법과 동일하다.

면역 항원 준비

고등어 어육 중 TSSP을 이용하여 고등어에 대한 단클론성 항체를 개발하기 위해 생 고등어 어육을 열처리 추출법으로 추출하여 항원으로 사용하였다. 먼저, 생 고등어 어육 5 g에 carbonate buffer (pH 9.6) 10 mL을 분주하고 끓는 물에서 15분 동안 열처리한 후, 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리한 상층액은 0.05 M PBS로 3일 동안 투석하고 −70°C에 보관하면서 면역원 및 항원으로 사용하였다.

단클론성 항체 생산

준비된 항원을 complete freund's adjuvant (Sigma Chemical Co.)와 1:1 (v/v)로 유화시켜 생후 6주된 암컷 BALB/C mouse (Hyochang Science, Korea)에 마리당 200 μL씩 복강에 주입하여 1차 면역을 실시하였고, 1차 면역 후 2주 간격으로 동일한 면역원을 incomplete freund's adjuvant (Sigma Chemical Co.)와 동량 혼합하여 추가 면역을 2회 실시하였으며, 세포 융합 4일 전에 2배의 면역원만을 복강 내 주사하여 최종 면역시켰다. 3차 면역 일주일 후

mouse의 꼬리 정맥에서 1 μL의 혈액을 채취하여 간접 효소면역분석법(indirect enzyme-linked immunosorbent assay; iELISA)으로 항체의 역가를 측정하였다. 그 중 가장 높은 역가를 갖는 mouse로부터 spleen cell을 분리한 후 myeloma cell (SP2)을 사용하여 Kohler and Milstein[9]의 방법으로 세포융합을 실시하였고, Mckearn[10] 등의 무한대 희석법으로 cloning을 실시하여 단일클론의 hybridoma cell을 획득하였다. 선택된 hybridoma cell은 대량 배양한 후 mouse 복강에 200 μL를 주입하여 복수액을 생산하였으며, 1주일 후 생산된 복수액을 채취하여 ammonium sulfate 침전법[11]으로 정제한 후, PBS를 이용하여 3일 동안 투석하였다. 정제된 항체들은 1 mg/mL의 농도가 되도록 조정한 후 동결건조하여 −20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

단클론성 항체 특성 확인

개발된 항체의 민감도 및 특이성을 알아보기 위하여 western blot법과 간접효소면역분석법을 실시하였다. 먼저 교차반응성을 확인하기 위해 고등어, 꽁치, 삼치, 우럭, 새우, 오징어를 앞서 TSSP를 추출하는 방법과 동일하게 추출하여 두 방법으로 특이성을 확인하였다. 먼저, western blot은 Towbin[12]등의 방법에 준하여 실시하였다. SDS-PAGE 후 단백질은 PVDF membrane (Millipore, USA)에 transfer buffer (25 mM tris, 192 mM glycine and 5% methanol)와 전사장치(Bio-Rad)를 이용하여 전사시킨 후 PVDF membrane은 TBST (0.05% Tween 20 in tris-buffered saline buffer) 를 이용하여 3회 세척하고 3% skim milk를 이용하여 37°C에서 1시간 blocking 하였다. 이후 blocking 처리된 막은 TBST를 이용하여 3회 세척한 후 hybridoma cell 배양액을 이용하여 37°C에서 1시간 반응시키고 TBST로 4차례 세척 후 희석률 1:6000의 2차 항체인 goat anti-mouse alkaline phosphate conjugate (Bio-Rad)로 37°C에서 1시간 반응시켰다. TBST로 5차례 세척 후, AP conjugate substrate Kit (Bio-Rad, 를 이용하여 발색시켜 PVDF membrane 상에서 확인하였다. iELISA은 고등어 어육 추출액 및 교차반응 확인을 위한 시료 추출액을 carbonate buffer (pH 9.4)로 희석한 후 96-well microplate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 분주하고 1시간 동안 37°C에서 코팅시킨 후 0.05% Tween 20이 포함된 PBS (PBST, pH 7.4)로 3회 세척하였다. 비 특이적인 반응을 방지하기 위해 1% skim milk로 1시간 동안 37°C에서 blocking 시킨 후 PBST로 4회 세척하였고, 세척된 well에 hybridoma cell 배양액을 100 μL씩 분주하고, 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 다시 PBST로 5회 세척하였다. 세척된 well에 2차 항체 goat anti-mouse IgG-HRP (Sigma Chemical Co.)를 100 μL씩 분주하여 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 PBST로 6회 세척하고, 기질용액인 2,2'-azino-di-3-ethyl-benzthiazoline-sulfonate (ABTS, Sigma Chemical Co.)를 각 well에 100 μL씩 첨가하여 37°C에 30분 반응시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Results and Discussion

고등어 어육 중 TSSP의 확인

고등어 어육 중 TSSP의 존재를 확인하기 위해 고등어 생육(raw)과 조리육(cooked)을 대상으로 비열처리(non-heating)와 열처리(heating) 추출법을 이용하여 단백질을 추출하였다. 각 시료 상태와 전처리법에 따른 추출액 내 TSSP를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 이용하여 단백질 패턴을 확인하고, 단백질 정량을 실시하였다. 그 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 생육을 비열처리(raw mackerel-nonheating)로 추출한 경우는 다양한 단백질이 추출된 것이 확인되었고, 단백질의 농도도 다른 추출액보다 높은 것으로 확인되었다. 그러나 조리된 어육의 열처리(cooked mackerel-heating)와 비열처리(cooked mackerel-nonheating)로 추출한 시료액과 생 어육을 열처리(raw mackerel-heating)로 추출한 시료액은 유사한 패턴의 단백질 전기영동 결과를

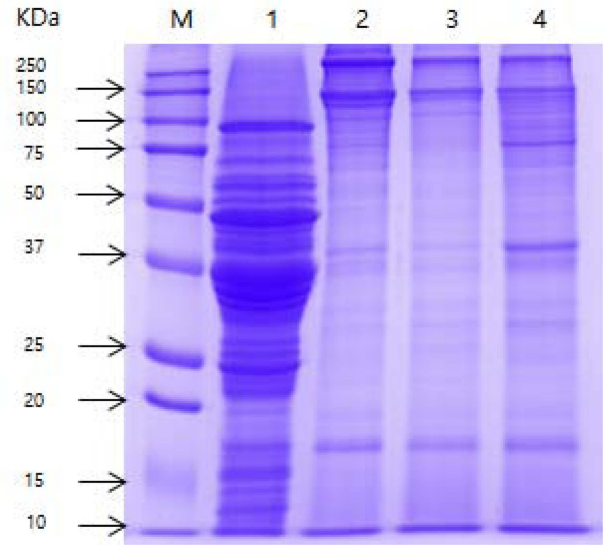

Fig. 1. SDS-PAGE pattern of mackerel protein extracts using 0.15 M NaCl buffer. Lane M: marker, Lane 1: raw mackerel/non-heating, Lane 2: raw mackerel/heating, Lane 3: cooked mackerel/non-heating, Lane 4: cooked mackerel/heating.

Table 1. Protein concentration of different shapes of mackerel samples extracted by 0.15 M NaCl buffer with heating and non-heating methods

Sample	Protein concentration (mg/mL)			
	Non-heating extraction		Heating extraction	
	Raw	Cooking	Raw	Cooking
Mackerel	25.61 ± 0.76	0.99 ± 0.004	1.30 ± 0.01	1.84 ± 0.06

보인 반면 앞서 언급한 raw mackerel-nonheating 추출액과는 크게 다른 단백질 패턴을 보였다. 특히 열에 안정한 단백질이라고 알려진 37 kDa의 단백질이 존재하는 것을 확인할 수 있었다[13]. 또한 Table 1에서 보는바와 같이 시료상태와 전처리법을 달리하여 추출한 시료액 중 단백질을 정량한 결과 raw mackerel-nonheating 시료액은 25 mg/mL로 가장 높은 단백질 농도를 보였다. 생 어육에 대해 비열처리법으로 추출한 경우 열에 안정하지 않은 수용성 단백질이 대부분 추출되기 때문에 다른 조리 어육 및 열처리 추출에 의한 시료액에 비해 단백질의 농도가 높게 나오는 것은 당연한 결과로 보인다. 반면에 cooked mackerel-heating (1.8 mg/mL), cooked mackerel-nonheating (0.99 mg/mL), raw mackerel-nonheating (1.3 mg/mL) 시료액의 경우는 raw mackerel-nonheating (25 mg/mL) 시료액에 비해 1/14에서 1/25 수준으로 낮은 단백질 량을 보였다. Hughes[14] 등의 연구에서 어육 가열 시 단백질이 주로 당-아미노산 반응에 기인하여 갈변물질 형성에 관여하기 때문에 단백질의 양적 변화가 나타나는 것을 확인하였고, 식품 내 단백질은 가열처리 시 단백질의 변성에 의해 전체 수용성 단백질의 양은 감소하나 열안정성 수용성 단백질은 남아있는 것으로 보고되고 있다[15].

이상의 결과로 볼 때 고등어를 조리 및 가열하면 대부분의 단백질을 수용성에서 불용성으로 변성시켜 전체 수용성 단백질량은 감소하나 열에 안정한 수용성 단백질은 존재하는 것으로 확인되었다. 특히 조리된 어육의 경우는 비열처리(0.99 mg/mL)보다 열처리(1.8 mg/mL)를 이용하여 단백질을 추출하였을 경우 약 2배 정도로 더 많은 량의 단백질이 추출되는 것을 확인할 수 있었고, 이러한 결과는 고등어 어육 중 TSSP가 상당량 존재한다는 것을 의미한다.

TSSP 추출법 최적화

앞의 실험결과에서 고등어 어육 중에 TSSP가 존재하는 것을 확인하였고, 이를 추출하는 데에는 생 어육뿐만 아니라 조리된 어육에 대해서도 열처리하는 방법이 효율적인 추출방법으로 확인되었기 때문에, 이를 바탕으로 TSSP의 추출효율을 향상시키기 위해 추가로 단백질 추출에 주로 사용되는 버퍼의 종류에 따른 추출법 효율을 확인하였다. 고등어 생 어육을 0.15 M과 0.5 M NaCl, carbonate buffer, 25 mM TBS, 20 mM Tris-HCl, 0.05 M PBS를 사용하여 추출한 후 SDS-PAGE와 protein assay로 추출효율을 확인한 결과는 Fig. 2와 Table 2에서 보는 바와 같다. SDS-PAGE 결과에서는 모든 버퍼에서 100 kDa 이상과 37 kDa 부근에서 공통적으로 선명한 단백질 밴드를 확인할 수 있었고, 특히 0.5 M NaCl, carbonate, PBS로 추출하였을 때 많은 양의 열 안정성 단백질이 추출되는 것으로 확인되며, 단백질 정량 결과에서도 동일한 결과를 확인할 수 있었다. 그러나 이들 세 가지 버퍼에 의해 추출된 단백질의 패턴은 30 kDa에서 15 kDa 사이에서 상이한 단백질 패턴

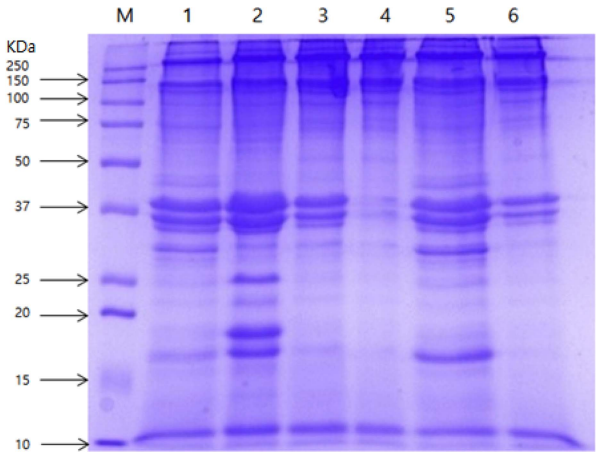

Fig. 2. SDS-PAGE pattern of mackerel protein extracts with various buffers. Lane M: Marker, Lane 1: 0.5 M sodium chloride, Lane 2: carbonate (pH 9.6), Lane 3: 25 mM Tris-buffered saline (pH 7.4), Lane 4: 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), Lane 5: 0.05 M phosphate-buffered saline (pH 7.4), Lane 6: 0.15 M sodium chloride.

Table 2. Protein concentration of mackerel samples extracted with various buffers

Extract buffers	Concentration of protein (mg/mL)
0.5M NaCl buffer	2.60 ± 0.30
Carbonate buffer (pH 9.6)	8.53 ± 0.92
25 mM TBS buffer (pH 7.4)	1.41 ± 0.16
20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)	0.92 ± 0.10
0.05M PBS buffer (pH 7.4)	2.21 ± 0.15
0.15M NaCl buffer	1.19 ± 0.10

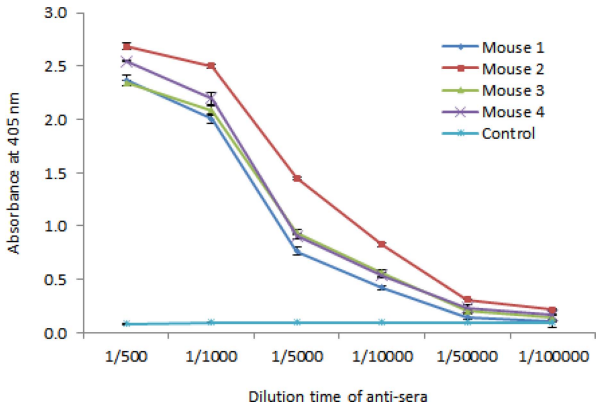

Fig. 3. Anti-sera titration for immunized mice with mackerel extracts by indirect ELISA. Four mice (mouse 1~4) mean that mice were immunized with mackerel TSSP. Control mouse means that a mouse was not immunized.

이 확인되어 버퍼에 따라 추출되는 단백질의 차이를 확인할 수 있었다. 모든 버퍼에서 TSSP로 추측되는 37 kDa 부근의 밴드 형성을 확인하였고, 밴드의 선명함과 굵기를 육안으로 비교한 결과 carbonate buffer로 추출하였을 때 밴드가 가장 두드러지게 형성된 것을 확인하였으며, protein assay결과 Table 2에서 보는 바와 같이 carbonate buffer를 이용한 추출물의 단백질 농도가 가장 높은 것을 확인하였다. 따라서 고등어 어육은 carbonate buffer로 TSSP를 추출하여 실험에 사용하였다.

단클론성 항체 생산 및 반응성 확인

고등어로부터 추출한 TSSP를 면역원으로 mouse에 면역시킨 후 항체 생성여부를 확인하기 위해 iELISA로 항혈청역가를 측정한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 면역한 모든 마우스에서 고등어 TSSP에 대한 항체가 생성된 것이 확인되었다. 항혈청역가를 보인 마우스로부터 비장을 적출하여 세포융합과 클로닝을 통해 hybridoma cell을 획득하였고 iELISA법을 통해 hybridoma cell이 생산하는 항체의 특이성을 확인하였다. 교차반응성 확인을 위해 고등어의 TSSP 추출방법과 동일한 방법으로 수산물(꽁치, 삼

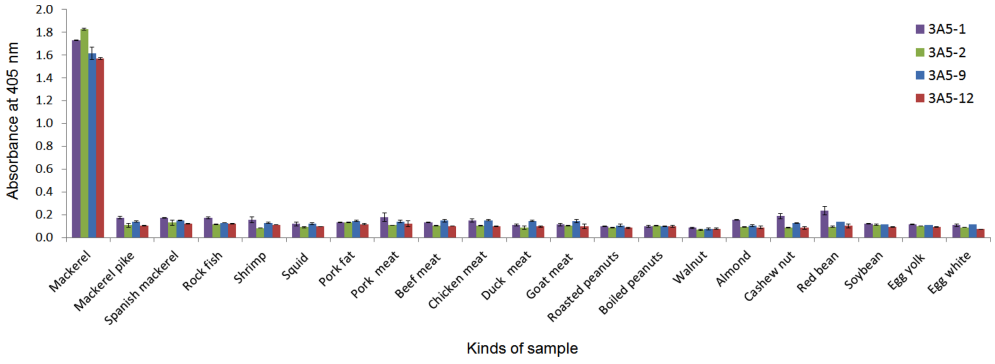

Fig. 4. Cross-reactivity of four MAbs to other food samples.

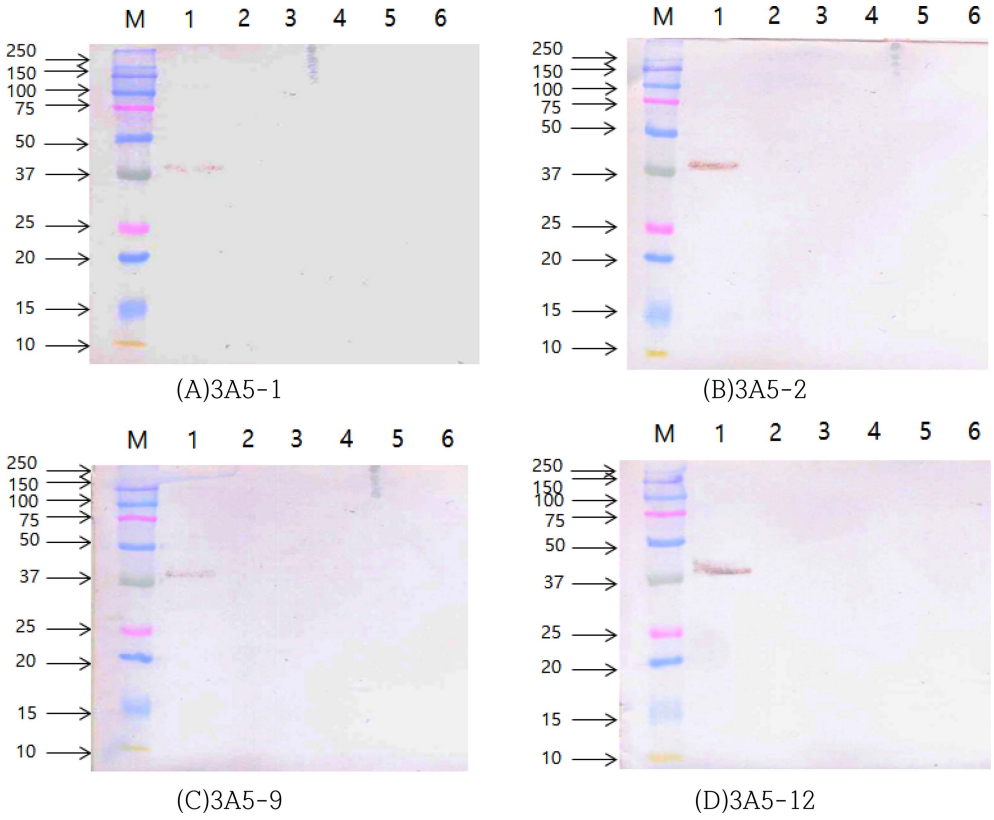

Fig. 5. Western blot results of thermal stable-soluble proteint extracted from mackerel using four MAbs (3A5-1, 2, 9, 12). Lane M: protein marker, Lane 1: mackerel, Lane 2: mackerel pike, Lane 3: spanish mackerel, Lane 4: rock fish, Lane 5: shrimp, Lane 6: squid.

치, 우럭, 새우, 오징어), 축산물(돼지고기 및 지방, 소고기, 닭고기, 오리육, 사슴육, 난백), 그리고 농산물(볶은 땅콩, 삶은 땅콩, 호두, 아몬드, 캐슈넛, 팥, 콩)의 TSSP를 추출하고 이를 iELISA로 항체의 반응성 여부를 확인한 결과, Fig. 4에서 보는바와 같이 4종(3A5-1, 3A5-2, 3A5-9, 3A5-12)의 hybridoma cell에서 생산된 항체가 고등어 단백질에만 특이적으로 반응하는 것으로 확인되었다. 추가로 western blot을 이용하여 4종의 hybridoma cell이 생산하는 항체의 특이성을 확인한 결과 Fig. 5에서 보는바와 같이 다른 수산물에는 반응하지 않고 고등어 열 안정성 단백질에만 특이하게 반응하는 것으로 최종 확인되었다.

이상의 결과에서 고등어 어육 내에 TSSP의 존재를 확인하였고, 이들 단백질이 고등어에 특이적인 항체를 생산하는데 유용한 항원으로서의 가치를 확인할 수 있었다. 확보된 4종의 hybridoma cell을 대량 배양한 후 마우스 복강에 주입하여 복수액을 획득하였고, 이를 ammonium sulfate 침전법으로 정제하여 고등어에 특이적인 항체를 대량 확보하여 이후의 정량 ELISA법과 western blot에 사용하였다.

생산된 항체를 이용한 효소면역분석법과 western blot의 검출한계 확인

본 연구에서 생산된 항체를 이용하여 앞서 항혈청과 배양상등액 역가에 사용된 iELISA를 실시하여 고등어 단백질의 검출한계를 측정하였다. 먼저 고등어 추출액을 0, 1, 5, 10, 15, 30, 100%로 carbonate buffer에 준비한 후 96-well microplate에 분주하고 1시간 동안 37°C에서 코팅시킨 후 앞서 실시한 iELISA로 민감도를 확인하였다. Fig. 6에서 보는바와 같이 개발된 4종의 항체 모두 1% 수준의 고등어 추출액을 검출할 수 있는 것으로 확인되었고, 그 중 3A5-2와 3A5-9 두 항체는 1%에서도 높은 흡광도를 나타내어 민감도가 매우 높은 항체로 확인되었다. 두 항체 중 3A5-9 항체를 이용하여 western blot으로 다양한 농도의 고등어 추출액에 대해서 검출한계를 측정한 결과에서도

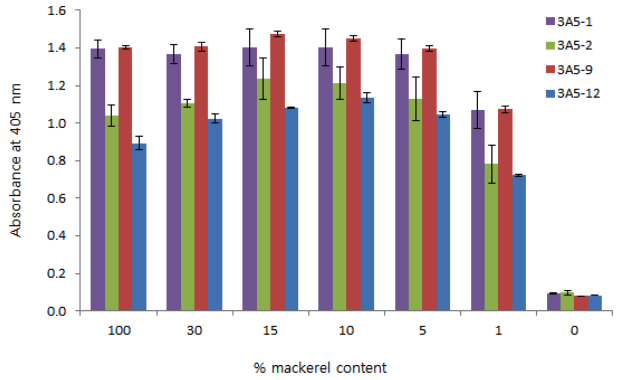

Fig. 6. Detection limit for mackerel protein by Results of iELISA analysis based on four MAbs.

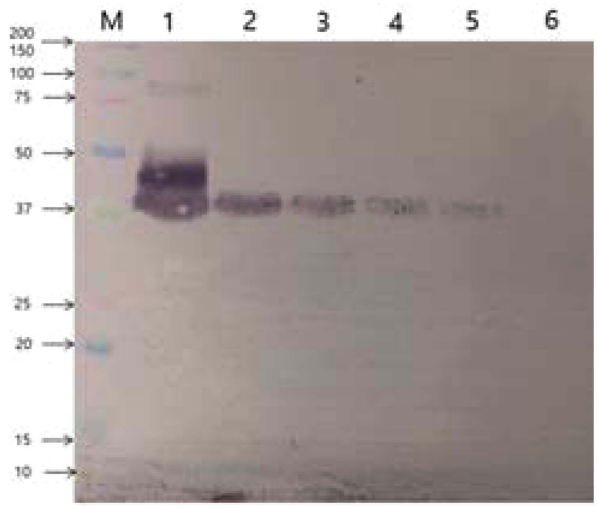

Fig. 7. Detection limit for mackerel protein by the Mab 3A5-9 based-western blot analysis. Lane M: protein marker, Lane 1: 100% mackerel, Lane 2: 30% mackerel in mackerel pike, Lane 3: 15% mackerel in mackerel pike, Lane 4: 5% mackerel in mackerel pike, Lane 5: 1% mackerel in mackerel pike, Lane 6: 0% mackerel in mackerel pike(100% mackerel pike).

iELISA법과 동일하게 1%까지 검출이 가능한 것으로 확인되었다. 이상의 iELISA법과 western blot법 결과를 종합해 볼 때 개발된 고등어 특이항체는 1% 수준의 고등어 추출액을 검출할 수 있었다.

그러므로, 개발된 고등어 열안정성 수용성 단백질 특이항체를 이용한 iELISA법과 western blot은 TSSP에 친화성이 높은 항체를 이용한 특이성이 높은 분석법으로 nuiversal primer나 species specific primer를 이용한 PCR과 같은[16] 기존의 분석법보다 보다 수산물 및 그 가공품에 혼입될 수 있는 식품 알러젠 고등어를 신속하고 민감하게 분석할 수 있는 분석 도구로서 활용이 가능할 것으로 판단된다. 또한 개발된 항체는 면역분석법 뿐만 아니라 고감도 바이오센서 개발에 충분히 활용이 가능한 바이오인지 인자로 확인이 되었다.

Acknowledgement

이 논문은 2015년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(수산물 유해미생물 신속분리기술과 등온비색 PCR 기반 확립).

국문요약

본 연구에서는 고등어 어육을 고감도로 보다 신속하게 검출하기 위하여 고등어 어육 중 TSSP를 이용해 단클론성 항체를 개발하고 이를 이용하여 간접 효소면역분석법(iELISA)과 western blot의 검출한계를 확인하였다. 먼저

비 열처리와 열처리를 한 고등어 어육 중 존재하는 TSSP를 확인하고, 단백질 추출에 주로 사용되는 버퍼의 종류에 따른 추출법 효율을 확인하기 위하여 전기영동과 단백질 정량을 실시하였다. 그 결과 열처리한 추출물은 비 열처리한 추출물보다 TSSP가 2배 정도 많이 추출되었으며, TSSP로 추측되는 37 kDa 부근에 형성된 밴드의 선명함과 굵기를 육안으로 비교한 결과 carbonate buffer로 추출하였을 때 밴드가 가장 두드러지게 형성되었고, 단백질 정량 결과에서도 carbonate buffer를 이용한 추출물의 단백질 농도가 가장 높은 것을 확인하였다. 이후, 생 고등어 어육을 열처리법으로 추출하여 항원을 준비하고 6주령 BALB/c mouse에 면역한 후 세포융합 및 클로닝을 통해 3A5-1번, 2번, 9번 및 16번 4종의 hybridoma cell을 확보하였다. 이렇게 개발된 항체는 수산물, 축산물, 농산물과의 교차반응성확인을 통하여 고등어 단백질에만 특이성을 가지는 것을 확인하였다. iELISA와 western blot법의 검출한계를 확인한 결과 고등어가 1% 첨가된 수준까지 검출할 수 있으며, 특히 3A5-2와 3A5-9번 항체는 1%에서도 높은 흡광도를 나타내어 민감도가 매우 높은 항체로 확인되었다. 따라서, 개발된 고등어 TSSP 특이항체를 이용한 iELISA법과 western blot법은 가공품에 혼입될 수 있는 식품 알레르겐인 고등어를 보다 신속하고 민감하게 분석할 수 있는 분석 도구로서 활용이 가능할 것으로 판단되며, 개발된 항체는 고감도 바이오센서 개발에 충분히 활용이 가능한 바이오인자로 확인되었다.

References

1. Jo, Y.H., Hwang, S.O. and Lee, H.J.: Understanding Food Allergy. Food Industry, **168**, 120-128 (2002).
2. Shon, D.H., Slutsker. and Kim, M.H.: Development of sandwich ELISA for the detection of mackerel in processed foods. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **44**, 1-7 (2012).
3. Lee, S.J.: IgE mediated food allergy: severe food allergy and food allergens. Food Science and Industry, **48**, 10-16 (2015).
4. Lee, K.H.: An analysis on prevalence and allergen of food allergies. *J Agric Med Community Health,* **39**, 14-24 (2014).
5. Available from http://biz.chosun.com/site/data/html_dir/, Accessed Feb. 22 (2013).
6. The korean academy of asthma allergy clinical immunology. Asthma and Allergic Diseases. Yeomungag Press, 445-469 (2012).
7. Han, G.D., Fan, J.P. and Suzuki, A.: Changes of SDS-PAGE pattern and allergenicity of BSA and BGG in beef extract treated with heat and high pressure. *J Korean. Soc Food. Sci Nutr.,* **35**, 594-599 (2006).
8. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature,* **15**, 680-685 (1970).
9. Kohler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells producing antibody of predefined specificity. *Nature,* **256**, 495-501 (1975).
10. Mckearn, T.J., Weiss, A., Stuart, F.P. and Fitch, F.W.: Selective suppression of humoral and cell-mediated immune responses to rat alloantigens by monoclonal antibodies produced by hybridoma cell lines. *Transplant,* **11**, 932-935 (1979).
11. George, C.W. and Susott, R.A.: Effects of ammonium phosphate and sulphate on the pyrolysis and combustion of cellulose. *USDA Forest Service INT*-90 (1971).
12. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* **76**, 4350-4354 (1979).
13. Shanti, K.N., Martin, B.M., Nagpal, S., Metcalfe, D.D. and Rao, P.V.: Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *The Journal of Immunology,* **151**, 5354-5363 (1993).
14. Oh, K.S. and Kim, J.G.: Changes in Composition of Fish Meat by Thermal Processing at High Temperatures. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **23**, 459-464 (1991).
15. Hsieh, Y.H.P., Zhang, S., Chen, F.C. and Sheu, S.C.: Monoclonal antibody-based ELISA for assessment of endpoint heating temperature of ground pork and beef. *J. Food Sci*., **67**, 1149-1154 (2002).
16. Park, Y.C., Kim, M.R., Shin, J.H., Kim, K.H., Lee, J.H., Cho, T.Y., Lee, H.J., Lee, S.J. and Han, S.B.: Development of PCR Method for Rapid Detection of Allergic Materials in Foods. *J. Fd Hyg. Safety*, **28**, 124-129 (2013).