J. Fd Hyg. Safety 13(4), 419 - 424(1998)

*Fusarium*속이 생성하는 zearalenone 측정을 위한 Indirect Competitive ELISA의 확립

강성조 · 정덕화*†

*경상대학교 농어촌개발연구소, *식품공학과*

Establishment of Indirect Competitive ELISA for the Detection of Zearalenone Produced by *Fusarium* sp.

Sung-Jo Kang and Duck-Hwa Chung*†

The Institute of Agriculture and Fishery Development, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

**Dept. of Food Science and Technology, Gyeong Sang National University, Chinju 660-701, Korea*

ABSTRACT—An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was established for the detection of zearalenone by using monoclonal antibodies produced by Z-M-26 hybridoma cells when injected into a mouse and zearalenone-oxime-OVA conjugate. Zearalenone-oxime-OVA conjugates were diluted with carbonyl buffer, coated to 96 well microtiter plates at 4°C overnight and blocked with 1% BSA overnight. One thousand times diluted antibody solution together with standard zearalenone or sample was added to 96-well microtiter plates and stood overnight. A secondary antibody conjugated with HRP was added and an hour later, enzyme substrate (TMBZ) solution was added for color develpment. After 30 minutes, coloring reaction was terminated by adding 2 N H_2SO_4 and the O.D. was measured at 450 nm. Detection range of this method was about 0.1~100 ppb. The established indirect competitive ELISA method was suitable for a rapid and effective analysis of zearalenone in agricultural products.

Key words □ Zearalenone, Hybridoma cell, Monoclonal antibody, ELISA

Zearalenone[6-(10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl)-β-resorcylic acid lactone]은 *Fusarium*속 곰팡이가 생산하는 2차 대사산물로서 분자량이 318인 흰 결정체로서 물에는 녹지않는 반면 ether, benzene, methanol 및 chloroform 등의 유기용매에 아주 잘 녹으며, 옥수수, 밀, 쌀 그리고 땅콩과 같은 농산물에 널리 존재한다고 보고되고 있다.[1-3]

*Fusarium*속 곰팡이는 자연계에 널리 분포하며, aflatoxin을 생산하는 *Aspergillus*속 곰팡이와 비교할 때 5~20°C의 저온에서도 zearalenone을 분비할 수 있고 저산소의 환경에서도 생육할 수 있다.[4,5] 그러므로 우리나라 농산물에서도 *Fusarium*속 mycotoxin인 zearalenone의 오염가능성이 예견된다.

돼지에 zearalenone이 오염된 사료를 먹이면 zearalenone은 소화기 계통으로 흡수되어 전신적인 순환을 거치게 된다. 그 중에서도 간에서 α-zearalenol과 β-zearalenol 또는 glucuronide 형태로 대사되며, zearalenone과 zearalenol 모두 혈액을 거쳐서 estrogenic 효과를 나타내는 기관인 자궁, 유선, 시상하부 등과 같은 민감한 주위의 조직으로 분산되며, 이러한 부적당한 exogenic estrogen의 유입은 돼지에서 생식장애의 원인과 깊은 관계가 있다고 보고되고 있다.[6,7] 이와 같은 증상외에도 zearalenone의 중독으로 인하여 설사, 구토, 식욕감퇴, 체중감소 그리고 출혈현상 등이 보고되고 있다.[8,9]

농산물에 오염된 mycotoxin을 확인하고 정량하는 방법에는 비교적 그 절차가 간단하고 비용이 적게드는 thin layer chromatography(TLC)가 많이 이용되어 왔다.[10] 그러나 TLC법은 검출감도가 낮은 문제점이 있어 gas chromatography(GC), gas chromatography-mass spectrometer(GC-MS) 및 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용한 방법들이 사용되고 있다.[11-13] 일반적으로 mycotoxin은 미량으로 존재하기 때문에 많은 양의 시료가 필요하고 분석전의 전처리 조작들이 복잡하다. 더우기 이러한 기기가

† Author to whom correspondence should be addressed.

고가이고 넓은 공간과 전문인력을 필요로 하며 많은 유기용매를 사용하므로 실험자의 안전성이 문제가 되어 새로운 분석방법의 필요성이 강력히 대두되고있다.

이를 위해 aflatoxin 등 일부 mycotoxin에 대하여 신속, 정확하고 안전한 방법으로 농산물 중 오염여부를 검색하기 위하여 항체를 개발하여 이를 이용한 ELISA법을 확립하는 연구가 활발히 이루어지고 있으나[14-17] zearalenone에 대한 연구는 미흡하다. 따라서 국내 농산물 뿐만 아니라 수입 농산물의 안전성을 확보하기 위하여 *Fusarium*속이 생성하는 mycotoxin중 zearalenone 분석방법을 확립하여 오염현황을 조사하고 오염방지 및 규제대책의 수립이 대단히 시급하다고 볼 수 있다.

본 연구에서는 신속하고 감도가 높은 zearalenone 분석방법을 확립하기 위하여 본 실험실에서 개발한 hybridoma cell line을 이용하여 zearalenone에 대한 단크론성 항체를 생산한 다음 이를 이용하여 indirect competitive ELISA법을 확립하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 재료는 다음과 같다. Bovine serum albumin(BSA: fatty acid free and fraction V), ovalbumin (OVA: crude and fraction VII), N-hydroxysucciniimide(NHS), polyethylene sorbitan monolaurate(Tween 20), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMBZ), hydrogenperoxide, antimouse-IgG-horse radish peroxidase conjugate, zearalenone등은 Sigma사로 부터, dimethylformamide(DMF), 1,3-dicyclohexylcarbodimide(DCC) 등은 Aldrich사 제품을 구입하여 사용하였다. 또한, microtiter plate는 Dynatech사에서, ELISA Reader는 Dynatech MR 700을 사용하였다.

항체의 생산

본 실험실에서 개발하여 보관중인 Z-M-26번 hybridoma cell을 T-75 flask에서 대량 배양한 후 mouse의 복강에 이식하여 복수액을 생산하였다. 즉, 1주일전 복강에 pristane(2,4,10,14-tetramethylpentadecane)을 0.5 m*l*를 주입한 mouse에 대량증식한 hybridoma cell을 수거하여 세포수가 1.0×10^7/0.2 m*l* 되도록 조절하여 mouse의 복강에 주입하였다. 약 7~8일후 복강으로부터 복수액을 채취하여 원심분리한 후 상등액을 취하여 ammonium sulfate법으로 정제하여 사용하였다.

Coating conjugate의 합성

Indirect competitive ELISA법을 확립하기 위하여 coating conjugate로 사용하기 위한 zearalenone-OVA는 zearalenone에 유도체를 만들어 coupling site를 부여한 다음 다시 ovalbumin을 결합시켜 합성하였다. 즉, 10 mg의 표준 zearalenone을 pyridine에 녹이고 20 mg의 carboxymethoxylamine을 첨가한 다음 실온에서 24시간 교반하면서 반응시키고 진공하에서 건조시켜 증류수에 녹인 후 반응하지 않은 zearalenone을 증류수로 부터 분리하기 위해 50 m*l*의 benzene으로 추출하였다. 반응액에 0.1 N-HCl을 첨가하여 zearalenone-oxime을 물층으로 침전시키고 Whatman No. 4 filter에 $(NH_4)_2SO_4$를 첨가한 후 ethyl acetate 10 m*l*로 zearalenone-oxime을 여과한 후 진공건조기로 건조시켜 다시 ethyl acetate로 1 m*l*되게 정용하였다.

합성된 zearalenone-oxime과 OVA의 conjugate 형성은 Liu 등[18]의 방법에 따라서 행하였다. dimethylformamide (DMF)의 0.1 m*l*에 zearalenone-oxime를 36 uM로 되게 녹이고(A액), 30 uM DCC와 60 uM NHS을 DMF 0.1 m*l*에 혼합한 후(B액) 25 mg의 OVA을 1 m*l*의 0.1 M $NaHCO_3$용액에 녹였다(C액). 먼저 A액과 B액을 천천히 섞은 다음 실온에서 30분간 교반하면서 반응시키고 침전물을 원심분리해서 제거하였다. 상등액에 OVA solution(C액)을 첨가하여 4°C에서 2시간 반응하여 zearalenone-oxime-OVA conjugate를 합성하였다. 이것을 pH 8.0의 0.05 M-Na_2HPO_4 용액을 사용하여 3일동안 투석한 후 일정량으로 정용한 다음 동결 건조시켜 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

ELISA법의 확립

항체의 희석배수 설정—Indirect competitive ELISA법을 확립하기 위하여 앞서 정제하여 보관중인 단크론성 항체를 ELISA 수행시 적절한 사용희석배수를 결정하기 위해 PBS에 정제 항체를 1 mg/ml로 조절하여 100~12,800배 희석한 다음 ELISA를 행하여 항체의 희석배수를 설정하였다.

Coating conjugate의 coating 농도 설정—Microtiter plate에 coating 하는 coating conjugate의 적당한 함량을 조사하였다. 앞서 합성한 ZEN-OVA conjugate를 희석하여 1,000 ng/well, 200 ng/well, 100 ng/well, 20 ng/well, 10 ng/well 및 1 ng/well 농도로 coating한 다음 ELISA를 행하였다.

Coating conjugate의 coating 시간 설정—ELISA를 위한 coating conjugate의 효과적인 coating 시간을 조사하였다. 즉, ZEN-OVA conjugate 100 ng/well을 주입하고 4°C에서 1, 2, 3, 6, 12, 24시간 동안 반응시키고 blocking을 한 후 4°C에 보관하면서 효과적인 ELISA 수행을 위한 coating 시간을 시험하였다.

Coating buffer 및 기질의 발색시간—Coating conjugate의

coating buffer를 결정하기 위해 carbonyl buffer(pH 9.6), PBS(pH 7.2) 및 PBS-Tween을 비교실험을 하였고, 아울러 최적의 발색시간을 조사하기 위하여 기질을 첨가하여 10분 간격으로 O.D.치를 측정하여 조사하였다.

Methanol이 ELISA에 미치는 영향조사—추출용매로 사용되는 methanol 자체가 항체나 효소활성에 영향을 미칠 것으로 예측되어 methanol을 농도별(0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%)로 첨가하여 그 영향을 조사하였다.

결과 및 고찰

항체의 생산 및 특성

본 실험실에서 생산한 Z-M-26번 hybridoma를 T-75 flask에서 대량 배양한 다음 단크론성항체를 생산하기위해 mouse의 복강에 이식하여 복수액을 생산하였다. 복수액을 채취하여 원심분리한 상등액을 ammonium sulfate법으로 정제한 결과 단백질 함량은 25.6 mg/ml이었고 isotype을 조사한 결과 IgG_1을 생산하였다. 또한 생산된 항체의 특성은 zearalenone에 특이하게 반응하였고 zearalenone 외의 물질과는 거의 반응하지 않는 성질을 나타내었다. 이렇게 생산한 항체를 이용하여 indirect competitive ELISA법을 검토하였다.

Indirect competitive ELISA법의 확립

먼저, 위에서 정제한 항체를 well에 100 μl씩 주입하기 위한 최적 희석농도를 조사하였다. 즉, PBS에 정제 항체를 1 mg/ml로 조절하여 100~12,800배 희석한 다음 well당 100 μl씩 첨가하여 indirect competitive ELISA법을 행하였다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 1,600배 희석용액에서도 대체로 실험 가능한 반응치를 보였다.

또한, microtiter plate에 coating 하는 coating conjugate의 적당한 함량을 조사하였다. 즉, 앞서 합성한 ZEN-OVA conjugate를 희석하여 1,000 ng/well, 200 ng/well, 100 ng/well, 20 ng/well, 10 ng/well 및 1 ng/well 농도로 coating한 다음 ELISA를 행하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 100 ng/well에서 안정한 실험결과가 나왔으며 그 이상 희석은 어려웠고 반면 200 ng/well도 실험결과는 안정하였지만 coating conjugate 소비가 많아 비경제적이므로 바람직하지 못하여 이후의 coating량은 100 ng/well로 고정하였다. Kawamura 등[19]도 T-2 toxin 분석을 위한 indirect competitive ELISA에서 T-2-hemiglutrate-BSA conjugate를 100 ng coating하여 사용하고 있으며, 연구자들의 실험조건에 따라 상이할 수 있으나 100~300 ng/well 농도의 coating conjugate가 일반적으로 coating에 사용되고 있다.

Coating conjugate의 coating 시간이 하룻밤 동안은 비효율적이라고 판단하여 효과적인 coating 시간을 조사하였다. 즉, ZEN-OVA conjugate 100 ng/well을 주입하고 4°C에서 1, 2, 3, 6, 12, 24시간 동안 반응시키고 coating conjugate 희석액을 제거한 다음 blocking을 한 후 4°C에 보관하면서 모든 실험구간이 준비되면 동시에 ELISA를 수행하였다. 그 결과 Table 3에서 보는바와 같이 coating 시간이 1시간 이후가 되면 ELISA 수행에 이상이 없었으며, 2시간 이상으로

Table 2. Effect of coating conjugate content per well on indirect competitive ELISA of zearalenone

(unit : O.D.)

Zearalenone (ppb) \ ZEN-OVA (ng/well)	1,000	200	100	20	10	1
0	1.969*	1.712	1.606	0.493	0.284	0.180
100	0.433	0.326	0.285	0.138	0.126	0.160

*Values represent the mean of three independent determinations

Table 3. Effect of coating time of ZEN-OVA conjugate on indirect competitive ELISA of zearalenone

(unit : O.D.)

Zearalenone (ppb) \ Coating time (hr)	1	2	3	6	12	24
0	1.186*	1.532	1.603	1.617	1.623	1.699
100	0.138	0.225	0.229	0.233	0.241	0.249

*Values represent the mean of three independent determinations

Table 1. Dilution of Z-M-26 as determined by indirect competitive ELISA of zearalenone (unit : O.D.)

Zearalenone (ppb) \ Dilution	100	200	400	800	1,600	3,200	6,400	12,800
0	over*	over	1.924	1.711	1.323	0.654	0.465	0.323
100	0.422	0.386	0.316	0.280	0.198	0.176	0.123	0.102

*Values represent the mean of three independent determinations

coating한 plate는 대단히 안정하였다. 그렇지만 coating conjugate를 4°C에서 coating한 후 하룻밤이 경과한 후 실험에 따라 필요시 plate를 사용하는 것이 편리할 것으로 생각되었다.

Coating 용액으로 지금까지 coating buffer(carbonyl buffer, pH 9.6)를 사용해 왔으나 PBS와 PBS-Tween을 사용하는 문헌[14,15]이 있어 비교실험을 하였다. 그 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 PBS와 carbonyl buffer의 반응결과가 매우 비슷하게 나타났으나 PBS-Tween은 반응하지 않았다. 따라서 실험수행을 위해 carbonyl buffer를 coating용액으로 사용하며, 필요한 경우 PBS도 coating에 함께 사용해도 문제가 없음을 확인할 수 있었다.

그리고 기질의 최적발색시간을 설정하기 위하여 10분 간격으로 발색정도를 측정한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 시간이 경과할수록 높은 반응치를 나타내었으나 통상적으로 ELISA에서 사용하는 시간인 30분에서 O.D치의 차이가 1.3 이상으로 나타나 이 시간이 적당할 것으로 생각되었다.

실제 시료에서의 zearalenone 정량시 시료중의 zearalenone을 추출하기 위해 methanol이 가장 일반적으로 사용되고 있다. 그런데 ELISA 수행 시는 추출용매로 사용되는 methanol 자체가 항체나 효소활성에 영향을 미칠 것으로 예측되어 methanol을 농도별로 첨가하여 그 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 methanol 농도 30% 이상에서부터 급격히 반응치가 줄어드는 것으로 나타났다. 본 실험에서는 실험의 안정한 결과를 위하여 시료를 methanol로 추출한 후 methanol의 농도를 PBS로 희석하여 10%로 조절하여 실험에 사용하였다. Ohtani 등[16]도 T-2 toxin에 대한 단크론성 항체를 생산한 다음 indirect competitive ELISA를 확립하였는데 이 단크론성 항체도 30% 이하의 methanol 농도에서는 항체의 반응에 영향이 적었지만 30% 이상의 농도에서는 급격히 반응이 감소하는 것으로 나타나 실제 실험시 10% methanol을 실험에 사용하고 있다.

이상과 같이 zearalenone 분석을 위한 indirect competitive ELISA 조건은 다음과 같이 정리할 수 있다. 즉, ZEN-OVA를 완충액(coating buffer)에 녹여 microtiter plate에 100 μl씩 주입한 다음 4°C에서 하룻밤 방치하여 코팅한 후 세척용 완충액으로 4회 세척한다. 항체의 비 특이적인 반응을 방지하기 위해 PBS에 녹인 1% bovine serum albumin을 가하여 하룻밤 4°C에 방치한 후 세척용 완충액으로 4회 세척한다. 세척한 plate에 표준 zearalenone 또는 시료추출물과 zearalenone 항체를 적당히 희석하여(1:1,000) 각각 50 μl씩 well에 주입하고 다시 4°C에서 하룻밤 반응시킨다. 반응시킨 plate를 세척용 완충액으로 5회 세척하고 1:1,000으로 희석한 2차 항체(anti-mouse IgG-HRP, Sigma)를 100 μl씩 분주한 다음 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 세척용 완충액으로 다시 6회 세척하고 기질용액(TMBZ: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 100 μl를 분주하여 실온에서 30분간 발색시킨 후 2 N H_2SO_4을 50 μl씩 가해 반응을 정지시킨다. 이것을 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 zearalenone 함량을 계산한다.

Table 4. Effect of coating solution on indirect competitive ELISA of zearalenone (unit : O.D.)

Coating solution \ Zearalenone (ppb)	0	0.01	0.1	1	10	100
PBS	1.544*	1.521	1.403	0.748	0.320	0.213
PBS-Tween 20	0.322	0.312	0.226	0.219	0.204	0.227
Carbonyl buffer	1.636	1.595	1.402	0.756	0.344	0.251

*Values represent the mean of three independent determinations

Table 5. Effect of incubation time of substrate on indirect competitive ELISA of zearalenone (unit : O.D.)

Zearalenone (ppb) \ Time (min.)	10	20	30	40	50	60
0	0.728*	1.448	1.632	1.824	1.859	1.884
0.1	0.692	1.124	1.398	1.458	1.458	1.692
1	0.492	0.510	0.754	0.767	0.945	1.274
10	0.176	0.215	0.354	0.478	0.496	0.436
100	0.152	0.165	0.261	0.279	0.298	0.321

*Values represent the mean of three independent determinations

Table 6. Effect of methanol on indirect competitive ELISA of zearalenone (unit : O.D.)

Zearalenone (ppb) \ MeOH (%)	0	10	20	30	40	50	70	90
0	1.636*	1.576	1.475	1.184	0.649	0.328	0.245	0.192
100	0.242	0.219	0.198	0.181	0.102	0.175	0.156	0.106

*Values represent the mean of three independent determinations

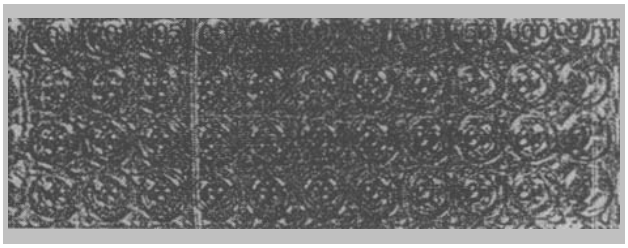

Fig. 1. Photogram of microtiter plate of zearalenone by indirect competitive ELISA.

이러한 실험결과를 토대로 ELISA를 행한 결과 Fig. 1과 같이 농도에 따라 반응결과가 분명하였고 그 발색정도를 ELISA reader로 O.D.값을 측정하여 표준곡선을 만들었을 때 Fig. 2와 같았으며 0.1~100 ng/ml 수준이 측정가능하였다.

Pestka 등[20]도 돼지에 zearalenone-oxime-BSA를 면역시켜 항체를 생산하고 coating antigen으로 zearalenone-6'-carboxymethyloxime-poly-L-lysine을 사용하여 indirect competitive ELISA법을 확립한 결과 검출감도가 10 ppb이었으며, Touichi 등[21]도 carbonyl buffer로 zearalenone-OVA을 200 ng coating하고 단크론성 항체를 이용하여 indirect competitive ELISA법을 확립하였는데 검출범위가 0.5~50 ppb이었다고 보고한 바 있다. 본 실험에서 확립한 indirect competitive ELISA법도 많은 시료의 농산물 중 미량 오염되어 있는 zearalenone을 간단히 검색할 수 있는 효과적인 방법으로 생각된다.

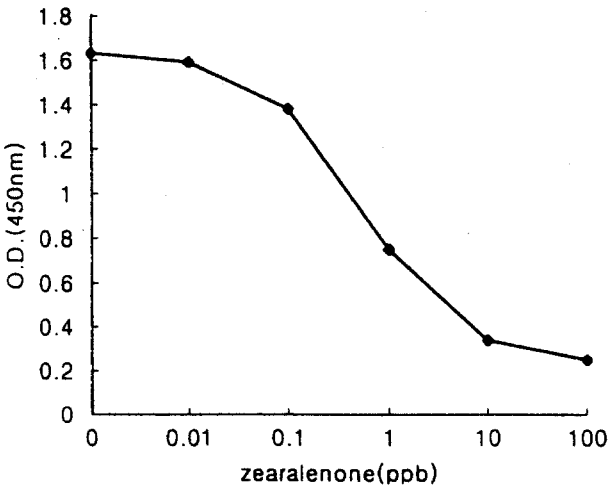

Fig. 2. Indirect competitive ELISA standard curve for zearalenone.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구비(KOSEF 941-0600-054-2) 지원에 의해 수행된 연구의 결과이며 지원에 감사드립니다.

국문요약

Zearalenone 검출을 위하여 Z-M-26 hybridoma cell을 mouse의 복강에 투여한 후 생산, 정제한 항체와 합성한 zearalenone-oxime-OVA conjugate를 이용하여 ELISA법을 확립하였다. Carbonyl buffer로 희석한 zearalenone-oxime-OVA conjugate를 4°C에서 하룻밤 coating하고 1% BSA용액으로 하룻밤 blocking한 다음 1,000배 희석한 항체를 zearalenone 또는 시료와 혼합하여 하룻밤 반응시키는 것이 효과적이었다. 또한 2차 항체와 기질용액의 반응시간은 각각 1시간, 30분이 적당하였고, 발색된 반응액은 450 nm에서 측정하였다. 이 분석법의 결과 0.1~100 ppb의 zearalenone이 측정 가능하였으며, 본 실험에서 확립한 indirect competitive ELISA법은 농산물 중 zearalenone 분석에 효과적으로 활용할 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

1. Bottalico, A.: Toxigenic Fusarium species and their mycotoxins in pre-harvest cereals in Europe. *Ins. Com. Agri. Sci., Kinki Univ.,* **5**, 47 (1997).
2. Yuwai, K.E., Rao, K.S., Tanaka, T. and Ueno, Y.: Occurrence of nivalenol, deoxynovalenol and zearalenone in imported cereals in Papua, New Guinea. *Natural Toxins.,* **2**, 19 (1994).
3. Bosch, U. and Mirocha, C.J.: Toxin production by Fusarium species from sugar beets and natural occurrence of zearalenone in beets and beet fibers. *Applied and Environmental Microbiology,* **58**, 3233 (1992).
4. Bhat, R.V., Beeddu, S.R., Ramakrishna, Y. and Munshi,

K.: Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat products in Kashmir Valley, *India. Lancet*, pp. 35-38 (1989).
5. Hussein, H.M., Franich, R.A., Baxter, M. and Andrew, I. G.: Naturally occuring Fusariumn toxins in New Zealand maize. *Food Addit. Contam*, **6**, 49 (1989).
6. Cole, R.J. and Cox, R.H.: Handbook of toxic fungal metabolites. *New York, London, San Francisco, Academic Press*, pp. 152-263 (1981).
7. Ito, Y. and Ohtsubo, K.I.: Effects of neonatal administration of zearalenone on the reproductive physiology of female mice. *J. of Veterinary Medical Science*, **56**, 1155 (1994).
8. Lafarge, F.C., Lespinates, G., Lafont, P., Loisillier, F., Mousset, S., Rosenstein, Y. and Frayssinet, C.: Immunosuppressive effects of Fusarium extracts and trichothecenes. Blastogenic response of murine splenic and thymic cells to mitogens. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **160**, 302 (1979).
9. Nowicke, J.W. and Meselson, M.: Yellow rain-a physiological analysis. *Nature*, **309**, 205 (1984).
10. Gimeno, A.: Rapid thin layer chromatographic determination of zearalenone in corn, sorghum and wheat. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 565 (1983).
11. Thouvenot, D.R. and Morfin, R.F.: Quantitation of zearalenone by gas liquid chromatography on capillary glass columns. *J. of Chromatography*, **170**, 165 (1979).
12. Collins, G.J. and Rosen, J.D.: Gas-liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for T-2 toxins in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 1274 (1979).
13. Narong, C., Coss, W.Y., Latimer, G.W., Salinas, C. and Clement, B.A.: Liquid chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxin A, and Zearalenone in grains, oilseeds, and animal feeds by post-column derivatization and on-line sample clean up. *J. AOAC*, **72**, 336 (1989).
14. Ohtani, K., Kawamura, O., Kajii, H., Chiba, J. and Ueno, Y.: Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for T-2 toxin using monoclonal antibodies. *Proc. Japan Assoc. Mycotoxicol*, **22**, 31 (1985).
15. Haugen, A.A., Groopman, J.D., Goodrich, G.R. and Wogan, G.N.: Monoclonal antibody to aflatoxin B_1-modified DNA detected by enzyme immunoassay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4124 (1981).
16. Pestka, J.J., Gaur, P.K. and Chu, F.S.: Quantitation of aflatoxin B_1 and aflatoxin B1 antibody by an enzyme-linked immunosorbent microassay. *Appl. Environ. Microbiol*, **40**, 1027 (1980).
17. Dixon, D.E., Pestka, J.J., Casale, W.L., Warner, R.L., Ram, B.P. and Hart, L.P.: Production of semisitive monoclonal antibodies to aflatoxin B1 aflatoxin M_1 and their application to ELISA of naturally contaminated foods. *J. Food. Protec*, **51**, 201 (1988).
18. Liu, Y. and Chu, F.S.: Production and characterization of antibody against sterigmatocystin. *J. Food Safety*, **6**, 119 (1984).
19. Kawamura, O., Nagayama, S., Sato, S., Ohtani, K. and Ueno, Y.: Survey of T-2 toxin in cereals by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Food and Agricultual Immunology*, **2**, 173 (1990).
20. Pestka, J.J., Liu, M.T., Knudson, B.K. and Hogberg, M. G.: Immunization of swine for production of antibody aginst zearalenone. *J. of Food protection*, **48**, 953 (1985).
21. Touichi, T., Reiko, T., Hideharu, I., Junichi, S. and Masakatsu, I.: Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone in barley and Job's-tears. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 946 (1995).