

## 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 in Meat and Feeds

Seong-hee Kim, 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 feed by using horseradish peroxidase(HRP) labeled protein A(Prot A - HRP) and 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( $B/B_0 \times 100$ ) was calculated from the absorbance in the absence( $B_0$ ) and presence(B) of SMZ. By the standard curve prepared by plotting  $\log(\text{SMZ})$  vs percent binding of each known reference solution, the detection limit was 1.0 ppb or less. Cross reaction with sulfadimethoxine, sulfaguanidine, sulfamerazine, sulfamethoxypyridazine, 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

\*이 연구는 1995년도 한국과학재단 연구비 지원에 의한 결과임

\*과제번호: 951-0612-206-1

## 서 론

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.<sup>1)</sup>

사료의 첨가제로 많이 사용되는 SMZ 같은 설파제는 알러지반응 유발과 백혈구감소증, 호산구증다증, 혈소판감소증, 무과립백혈구증, 골수이형성, 용혈성빈혈 등의 조혈기능의 이상과 발암성, 감상선 기능 실조, 면역체 형성저해와 관절염, 신장질환이 있는 경우 간질성 신염을 유발시켜 결정뇨를 일으키는 등 많은 부작용이 알려져 있다.<sup>2), 3), 4)</sup>

이와 같은 유해성 때문에 각 국가에서는 축산식품내의 최대잔류허용기준을 정하여 이의 섭취에 의한 국민보건위해의 방지도모하고 있다. 또한 무분별하게 도입될 가능성이 있는 수입축산물 및 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(GCMS), 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 합성 항균제 SMZ를 검출하기 위하여 가장 간단히 준비될수 있는 재료 즉, HRP와 protein A의 접합체, gelatin과 SMZ의 접합체 및 SMZ에 대한 기니픽 항혈청만을 이용하여 실시할 수 있는 competition ELISA법을 실험하여, 이 방법이 잔류 SMZ검출에의 이용이 가능한가 여부를 알아보기 위하여 시도하였다.

## 재료 및 방법

**SMZ와 BSA의 접합체(SMZ.BSA) 합성** : Dixon - Holland와 Katz<sup>5)</sup>의 방법에 따랐다. 즉, SMZ(Sigma, USA) 350mg과 BSA (Sigma, USA) 600mg을 75ml의 접합액(0.1M phosphate buffer, pH7.2, 2 volume : dioxane, 1 volume)에 용해하고 25%의 glutaraldehyde 0.35ml를 가하여 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 이 후 0.1M phosphate buffer(pH7.0)으로 매일 2회 외액을 교환하며 6일간 투석하였다. 얻어진 접합체액(SMZ.BSA)은 제균여과(pore size 0.22 $\mu$ m)하여 냉장보관하며 실험에 사용하였다.

**SMZ와 Gelatin의 접합체(SMZ. GEL) 합성** : SMZ 350mg과 Gelatin(Difco, USA) 600mg을 SMZ.BSA 제조시와 동일한 방법으로 준비하였다.

**Protein A와 HRP의 접합체 합성** : Wilson 과 Nakane<sup>6)</sup>의 방법에 준하여 제조하였다. 즉 HRP(RZ=3이상, Sigma USA) 6mg을 2차증류수 1ml에 녹인 후 0.1M NaIO<sub>4</sub> 0.3ml를 가하여 실온에서 20분간 흔들여 주었다. 이후 0.001M acetate buffer (pH 4.4)를 사용하여 4°C에서 20시간 투석

시킨 다음, 0.2M sodium carbonatebicarbonate buffer(pH 9.5)를 20 $\mu$ l를 첨가하고, 0.01M sodium acetate buffer(pH 9.5) 1ml에 녹인 protein A 5mg와 즉시 섞어 실온에서 2시간 반응시켰다. 이 후 0.4% sodium borohydride를 0.1ml 넣고 4°C에서 2시간 정치시킨 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 투석하였다.

**Anti - SMZ 생산** : SMZ,BSA 1.5ml를 Fre-und's complete adjuvant 3ml와 섞어 유탁액을 만들어 체중 약 350g의 Hartley 계통의 기니피 5수의 복강내로 접종하였다. 추가접종은 15일, 35일 및 52일에 초회와 동일한 방법을 사용하여 실시하였다. 매 추가접종 직전에 심장채혈로 약 1ml씩 취하여 항체를 검사하고, 최종접종 후 10일째에는 심장을 통하여 전채혈하여 항체를 ELISA로 측정하였다.

**ELISA용 plate** : ELISA plate의 각 well (Nunc - Immuno Module, Polysorb U16, Denmark)에 SMZ.GEL 접합체 용액을 50mM carbonate buffer(pH 9.6)로 계단희석하여 100 $\mu$ l씩 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 $\mu$ l씩 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 표준 농도의 SMZ를 가하고 잘 섞은 혼합액을 100 $\mu$ l씩 각 well에 가하여 60분간 반응시킨 후 DDW로 4회

세척하고, Prot A - HRP 용액을 100 $\mu$ l 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 이후 4회 세척하고, 0.1M citrate - phosphate buffer(pH4.0)에 0.1% ABTS (2-2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) 및 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 용해한 액을 100 $\mu$ l씩 각 well에 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응정지액은 0.005% NaN<sub>3</sub>를 사용하였으며 흡광도는 405nm에서 측정하였다. 표준 SMZ용액을 측정하여 얻어진 흡광도 값은 SMZ 농도 0 ppb의 흡광도 값으로 나눈 Percent binding치(B/B<sub>0</sub> %)를 환산하여 표준곡선을 구하고 시료의 Percent binding치를 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, sulfamethoxypyridazine, sulfanilamide, sulfapyridine, sulfisomidine, sulfisoxazole을 비교적 높은 농도인 10ppm이 되게 용해하고 각 well당 100 $\mu$ l씩 가하여 ELISA를 실시하였으며, 교차반응을 보이는 물질에 대해서는 blank well의 발색반응을 50% 저해하는 농도(EC - 50)<sup>7)</sup>를 구하여, 각 well에 흡착된 SMZ와 guinea pig anti - SMZ과의 결합반응에 경쟁을 보이는가의 여부를 관찰하였다.

## 결 과

**Anti - SMZ 역가** : 각 추가접종 직전에 채혈한 혈청을 PBS - T로 500배 희석

하여 SMZ.GEL이 흡착된 well에 반응시켜 분석한 결과는 Table 1과 같이 접촉횟수의 추가에 비례하는 항체가의 순조로운 상승이 관찰되었다.

**흡착항원 및 항혈청의 적정조건 :** 각 well의 흡착항원의 적정농도와 항혈청의 적정 희석배수를 결정하기 위한 예비시험에서 SMZ.GEL액의 흡착농도를  $\times 2,500$ ,  $\times 5,000$ ,  $\times 10,000$  및  $\times 20,000$ 배로 결정하고, 항혈청은  $\times 200$ ,  $\times 400$ ,  $\times 800$ ,  $\times 1,600$ ,  $\times 3,200$  및  $\times 6,400$ 배 희석하였다. 각 혈청 희석액에 SMZ를 0 및 2ppb되게 넣고 분석한 결과는 Table 2와 같다. B/BO% 값 중 흡광도가 2.0이상을 보이며 70%대의 낮은 값을 보이는 조건을 선택하였는데, SMZ.GEL 농도  $\times 10,000$ 으로 흡착하여 항혈청  $\times 400$  배로 반응시키는 조건이 가장 양호한 결과를 보였다.

**SMZ 검출한계 :** 상기 조건에 따라 PBS - T액에 SMZ를 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100 ppb로 농도를 변화시키면서 ELISA를 실시한 결과, 적어도 1.0 ppb 까지 검출이 가능하였다(Fig 1).

**기타 합성항균제와의 교차반응 :** guinea pig anti - SMZ.BSA는 Table 3의 결과와 같이 sulfamerazine 외에는 다른 합성항균제와 뚜렷한 교차반응을 보이지 않았다. Sulfamerazine의 EC - 50값은 2.0ppm이었다. 또한 SMZ 자체의 EC - 50값은 20ppb였다.

## 고 찰

본 연구는 식육등에 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 광범위하게 사용되는 효소접합체이므로 상품화된 것을 구매하여 사용할 수도 있다는 편리함이 있다. SMZ와 gelatin, 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, 상기 ELISA방법의 SMZ검출한계는 적어도 1.0 ppb이었는데, 이 값은 동물의 혈청을 대상으로 측정하는 경우, 검사혈청을 50배로 희석하여 측정하더라도 그에 해당하는 factor를 곱하면 50ppb 즉 0.05ppm에 해당한다. 정육의 SMZ농도는 특히 돈육의 경우 혈청내 농도의 1/4 값에 해당하므로<sup>8)</sup> 가장 까다로운 규제를 하고 있는 일본의 가이드라인(0.05ppm) 내외의 값을 갖는 시료를 측정 비교함에도 충족되는 성능이다.

각 sulfa제와의 교차반응은 sulfamerazine을 제외하면 뚜렷하지 않았으며, 특히 10 ppm이라는 비교적 높은 농도의 시료로 검사를 실시하였으므로 교차반응에 관련된 문제점은 심각하지 않을 것으로 생각된다. 교차반응을 보인 sulfamerazine은 SMZ의 pyrimidinyl기에서 6번의 methyl기가 없는 상태이며, 전혀 교차반응을 보이지 않은 sulfa제중 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 competition ELISA의 방법은 이 연구에서의 경우와 같이 항원(SMZ, GEL)을 고정상에 흡착시키고 항혈청(anti - SMZ)과 시료(SMZ)를 경쟁적으로 반응시키는 방법과, 항체(anti - SMZ)를 흡착시키고 시료(SMZ) 및 효소접합체(SMZ,HRP)를 경쟁적으로 반응시키는 방법<sup>5), 9)</sup>이 이용 가능하다. 전자의 경우를 보면, 면역글로불린은 항원과 결합부위(Fab)가 적어도 2개이므로 고정상의 SMZ와 결합한 항체가 시료속의 SMZ와 경쟁이 없이 동시에 결합될 가능성이 있으므로, 이론적으로는 후자의 방법론이 더욱 높은 민감도를 지닐수 있을 것으로 생각된다.

그러므로 제조한 기니픽 anti - SMZ를 순수정제하고, HRP를 SMZ와 접합시켜 후자의 방법을 실시하여 각 방법론을 상호비교하여 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.

## 결 론

축산식품 및 사료에 잔류하는 Sulfamethazine(SMZ)을 검출하기 위한 방법으로서 Horseradish peroxidase(HRP)를 접합한 protein A (Prot A - HRP)를 이용한 새로운

ELISA법의 유용성을 시험하였다.

Microplate 흡착항원은 glutaraldehyde를 사용하여 gelatin과 접합한 SMZ(GEL, SMZ)를 사용하였으며, SMZ에 대한 항혈청은 glutaraldehyde를 사용하여 Bovine serum albumin(BSA)과 접합시킨 SMZ(BSA,SMZ)를 기니픽에 복강내에 접종하여 얻었다. Prot A - HRP는 sodium periodate를 이용하여 접합시켰다.

SMZ를 검출하기 위한 경쟁적 ELISA는 GEL, SMZ를 흡착시킨 microplate의 well에 검사를 위한 SMZ의 각 단계별 희석액을 기니픽 anti - SMZ가 희석투입된 phosphate buffered saline(PBS)와 섞어서 100 l씩 가하여 반응시켰다. 이후 세척하고 Prot A-HRP를 가하여 반응시켰다. 반응은 2-2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)(ABTS)를 사용하여 발색시킨 후 파장 405 nm에서 측정하였다.

ELISA로 표준곡선을 작성한 결과 SMZ의 검출한계는 1ppb 이하이었다.

제조한 기니픽 anti - SMZ와 다른 합성 항균제와의 교차반응을 조사한 결과, sulfapyridine, sulfisoxazole, sulfadimethoxine, sulfamethoxypyridazine, sulfanilamide, sulfamerazine, sulfaguanidine, sulfisomidine 등과는 교차반응을 보이지 않았고 sulfamerazine와는 확실한 교차반응을 보였다.

이상의 결과는 추가의 공정관리와 Prot A - HRP의 정제도를 높인다면 SMZ 검출을 위한 ELISA kit로서 실용화도 가능할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Smither R, Lott AF, Dalziel RW, et al. Antibiotic residues in meat in the United Kingdom: an assessment of specific tests to detect and identify antibiotic residues. *J Hyg Camb* 1980; 85 : 359-369.
2. Bevill RF. Sulfonamides in *Vet. Phar. Theraph* 6ed Iowa State University Press 1988; pp785-795.
3. Mandell GL, Sandae MA. *Antimicrobial agents. Goodman and Gilman. The pharmacological Basis of Therapeuics. 6th ed, Macmillan Publishing Co, Inc, New York. p.1106.*
4. WHO Technical Report Series 788 : Thirty - fourth Report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain veterinary drug 1989 residues in food. WHO, Geneva. p. 32.
5. Dixon - 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* 1988; 71(6) : 1137-1140.
6. Wilson MB, Nakane PK. 'Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies' In Knapp, W., Holubar, K. and Wick, G. (eds), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 1978; pp. 215-224.*
7. Walker CC, Barker SA. Extration and enzyme immunoassay of sulfamethoxine residues in Channel catfish(*Ictalurus punctatus*) Muscle. *J AOAC International. 1994; 77(4) : 908-916.*
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* 1987; 50 : 115-122
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* 1991; 74(1) : 43-46.

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

Guinea pig no.	days after first inoculation		
	d15	d35	d52
1	0.212 <sup>1)</sup>	0.363	D <sup>2)</sup>
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 405nm
- 2) Animals died

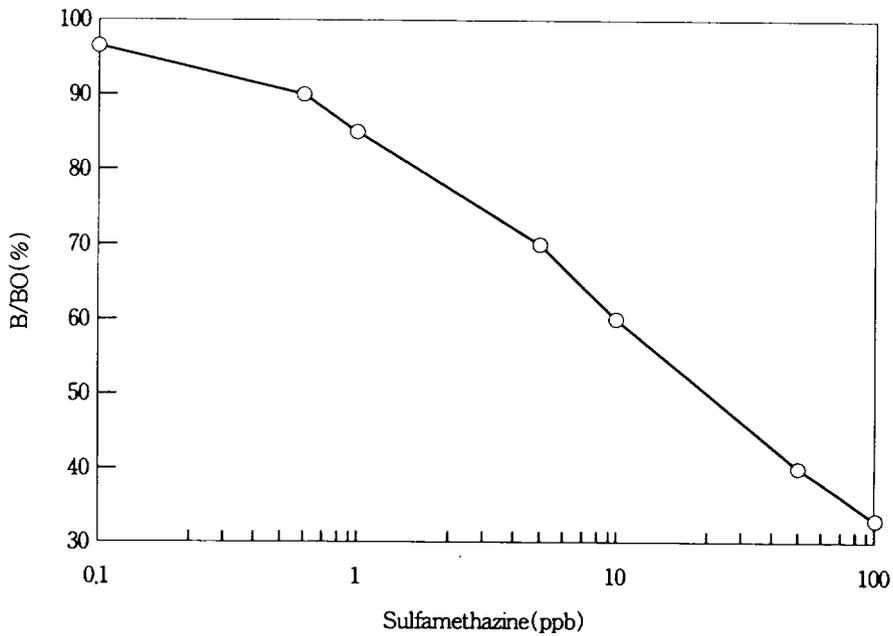


Figure 1. Percent binding of Prot A - ELISA on reference SMZ.

Table 2. Optimum dilution of SMZ,GEL and anti-SMZ,BSA

dil.	anti - GEL,BSA dil											
	×1,000			×2,000			×4,000			×8,000		
	SMZ concentration <sup>1)</sup>											
	0	2	PB <sup>2)</sup>	0	2	PB	0	2	PB	0	2	PB
×5,000	1.322	1.281	(96.9)	0.718	0.475	(66.2)	0.467	0.323	(69.1)	0.258	0.227	(88.2)
×10,000	0.825	0.620	(75.1)	0.475	0.352	(74.2)	0.371	0.323	(87.1)	0.225	0.261	(88.0)
×20,000	0.578	0.430	(74.5)	0.379	0.285	(75.1)	0.277	0.233	(84.1)	0.219	0.175	(79.9)
×40,000	0.367	0.278	(75.9)	0.258	0.251	(97.5)	0.236	0.211	(89.4)	0.189	0.172	(91.1)

1) ppb

2) percent binding :  $(B/BO)\% = \frac{OD \text{ of } 2 \text{ ppb}}{OD \text{ of } 0 \text{ ppb}} \times 100$

Table 3. Cross reactivity of sulfamethazine and other chemicals to antisera used in ELISA

Compounds	EC - 50 (ppm)
sulfamethazine	0.060
sulfamerazine	6.0
sulfadimethoxine	- <sup>1)</sup>
sulfaguanidine	-
sulfamethoxypyridazine	-
sulfanilamide	-
sulfapyridine	-
sulfisomidine	-
sulfisoxazole	-

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

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