

ELISA에 의한 T-2 toxin의 분석법에 관한 연구

오유진·장성재*·윤여표

충북대학교 약학대학, *국립보건원 약품부

Studies on Analysis Method of T-2 Toxin by ELISA

You-Jin Oh, *Sung-Jae Jang and Yeo-Pyo Yun

College of pharmacy, Chungbuk National University, Cheong-Ju 360, Korea

* Department of pharmacy, National Institute of Health, Seoul 122, Korea

ABSTRACT-T-2 toxin is one of mycotoxins produced by fungi such as *Fusarium* spp. and possesses a potent cytotoxicity to eukaryotic cell. The contamination of mycotoxins in cereals and feedstuffs is one of the great concerns in health authorities. Therefore, the development of the specific, sensitive and simplified analysis method for T-2 toxin is required. During more than ten years, several chemical and biological analysis methods were proposed and applied for the detection and quantification of T-2 toxin. TLC, GLC-FID and GC-MS are widely employed, but these methods required numerous clean-up procedures before analysis, and the detection limit for T-2 toxin is more than 10 ppb. Biological analysis methods with dermal tissues and cultured cells are not specific to T-2 toxin, since T-2 toxin and other related derivatives possess a similar toxicological activity although their relative activity is different each other. Based on the specific reaction between antibody and antigen, the authors tried to introduce the immunochemical methods for determination of T-2 toxin. The enzyme-linked immunosorbent assay method using monoclonal antibody for T-2 toxin was applied to analyse T-2 toxin. The detection limit of T-2 toxin by ELISA method was 0.1 ppb. The correlation between ELISA and GC-MS method on these samples was very high.

ELISA method developed for the detection and quantification of T-2 toxin in this paper possesses simplicity, high sensitivity and specific for T-2 toxin. Furthermore, the ELISA method with T-2 toxin monoclonal antibody was an excellent tool for the screening of *Fusarium* spp. which was suspected to produce T-2 toxin.

Keywords □ *Fusarium Sporotrichioides* M-1-1, T-2 toxin, monoclonal antibody, ELISA, GC-MS, GLCFID detection limit

Mycotoxins(곰팡이독)은 *Aspergillus*, *Penicillium* 및 *Fusarium*속 등의 곰팡이가 생산하는 저분자 화합물로 인간 및 가축에게 유해한 작용을 나타내는 물질이다. 인간이 mycotoxins에 오염된 식품을 무의식적으로 섭취하므로써 여러가지 장애를 초래할 뿐만 아니라 오염된 사료의 섭취로 인해 가축에게도 장애를 주며 장애를 받은 가축의 장기

조직 및 milk 등을 통해 2차적으로 인간에게 장애를 초래하기도 한다.

이같은 mycotoxins은 식품을 오염시키는 생물독 중에서도 중요한 위치를 차지하고 있어 식품의 오염실태를 파악하는 것은 식품의 안전성 확보 및 인축의 건강유지를 위해 중요한 의의를 갖는다. 대표적인 mycotoxicosis 사건은 1945년 일본에서 발생한 황변미 사건으로서 그 원인 식품인 수입쌀로부터 *Penicillium islandicum* Sopp 및 *P. citrinum*같은 곰팡이가 분리동정되었고 대사산물

Received for publication 24, May, 1988
Reprint requests: Dr. S.J. Jang at the above address

로서 강한 간장독성을 나타내는 luteoskyrin과 간장독성을 나타내는 citrinin 등의 mycotoxins이 단리되었다¹⁾. 한편, 맥류를 오염시키는 mycotoxins로서 *Fusarium*속 균 유래의 *trichothecene*계 mycotoxins (*T-2 toxin*, *nivalenol*, *deoxynivalenol*, *fusarenone-X*, *3-acetyldeoxynivalenol* 등)과 *zearalenone*이 있다.

한국 및 일본에서는 옛부터 맥류의 붉은 곰팡이병의 원인균으로서 *Fusarium*속이 주목되었고 설사와 구토증을 유발하는 붉은 곰팡이 중독증 (red-mold toxicosis)이 보고되어 있다²⁾.

저자 등은 본 논문에서 이들 mycotoxins중 강한 세포독성, 기염성(起炎性), 조혈장기 장애성에 의한 면역기능 저하등 질병발생의 원인이 될 수 있는 강한 생리활성 물질인 *trichothecenes*중 독성이 강한 *T-2 toxin*에 대해 분석학적 및 식품위생학적 관점에서 연구를 행하였다.

Trichothecenes 및 *zearalenone* (ZEN)과 같은 mycotoxins는 *Fusarium*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Cephalosporium*, *Stachybotrys*속 등의 곰팡이^{7,8)}에 의해 생산되는 유독대사산물로, 현재까지 80종 이상의 관련화합물이 밝혀져 있다. 그중 *trichothecenes*는 12, 13위에 epoxy환을 가진 sesquiterpene계 화합물로 화학구조의 면에서 8위에 carbonyl기가 없는 type A group과 carbonyl기가 있는 type B group, 12, 13 이외에 7, 8위에 epoxy기를 가진 type C group 그리고 4, 5위에 macrolide ring을 가진 type D group으로 분류된다.

이들 화합물중 미국에서는 moldy corn 중독과의 관련에서 *F. tricinctum*으로 부터 *T-2*가 단리되었고^{3,4)} 일본에서 맥류의 붉은 곰팡이병에 대한 연구에서 辰野⁹⁾ 角田 등¹⁰⁾ 上野 등¹¹⁾이 *F. nivale*로 부터 *nivalenol* (NIV), *fusarenone-X* (=4-acetyl-NIV)를, 諸岡 등¹²⁾은 *deoxynivalenol* (DON)을 단리하였다. *trichothecenes*의 자연오염에 대한 보고는 주로 *T-2*, NIV, DON, FX, 3-acetyl-DON 등 수종의 mycotoxins로 한정되며 *T-2* 및 FX, 3-acetyl-DON은 산발적으로 검출되고 있다. 최근 macrolide ring을 가진 *trichothecenes*인 *satratoxin G*, H에 의한

사료오염이 동유럽에서 검출되어 주목을 끌고 있다^{5,6)}. *Trichothecenes*의 독성에^{13,14)} 대하여는 mouse에 대한 LD₅₀는 5~810 mg/kg으로 사망률은 투여후 3~4일 사이에 많이 발생하고 어떤 경우나 장내출혈 및 말초혈관 확장을 볼 수 있으며 중독학적 특징으로서는 오심, 구토, 설사, 장관출혈, 피부점막자극성, 백혈구의 감소와 재생불량성 빈혈 등이다. 병리학적 소견에서는 골수 등의 조혈조직 장애와 뇌막하(腦膜下)의 출혈을 수반하며 또한 소장점막, 흉선, 생식장기 등의 증식성 세포에 대한 핵분열과 세포괴사가 현저하여 소위 방사선 장애와 유사한 장애를 초래한다¹³⁾. 전술한 바와 같이 자연오염의 주체는 NIV, DON이지만 독성학적인 면에서 보면 *T-2*는 NIV나 DON의 약 100배 이상의 높은 치사독성을 갖고 있는 점에서 *T-2*의 오염실태를 밝히는 것은 식품위생상 극히 중요하므로 저자 등은 *trichothecenes*중 특히 *T-2*에 중점을 두어 연구를 행하였다. *T-2*는 네 개의 group중 A group에 속하는 *trichothecene*계 mycotoxin로 주로 *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum*, *F. poae*와 같은 *Fusarium* 속균에 의해서 생산되며 1968년 미국에서 젖소의 mold corn 중독사¹⁵⁾의 원인물질로서 최초 단리되었고^{3,4)} 일본에서는 콩깍지에 의한 말의 대량 폐사사건과 관련하여 원인물질로서 *T-2* 및 *neosolaniol*이 단리되었다¹⁶⁾. 현재 *T-2*는 곡물 및 사료 등의 오염원으로서 검출되고 있으며¹⁷⁻¹⁹⁾ 강력한 세포독성 및 면역기능 억제작용을 가지고 있고^{8,13,20)} 또 최근 *T-2*의 맹독성을 이용하여 소련이 그의 동맹국에서 생물학전의 무기 (Yellow Rain)²³⁾로서 공급하여 동남아시아 지역에서 사용하였던 점에서 특히 잘 알려진 *Fusarium* mycotoxin이다²⁰⁻²²⁾. *T-2*에 의한 장애는 면역기능억제 및 중추신경 장애, 생식기관의 기능억제, 급성혈관손상 및 강력한 피부점막 자극성 등으로 대표되는 이른바 radiomimetic effect로 불리우기도 한다^{13,24,25)}. *T-2*에 의한 고양이의 아급성 중독에서는 폐와 뇌막하(腦膜下)의 출혈이 현저하고 백혈구 감소로 인한 면역기능의 저하와 함께 병변의 상태가 복잡화 되며 장기투여에 의해 구강내와 위점막에 각질화 및 유두종(papilloma)의 형성이 인정되지만

종양성의 변화는 증명되지 않는다^{1,20)}. T-2는 가축 및 실험동물에 있어 높은 치사독성을 갖고 있는 점에서 미량분석법의 개발이 시급한 문제로 대두되고 있다.

현재 식품, 생체시료 및 곰팡이 대사산물중 T-2 분석법으로서는 화학적 및 생물학적 방법들이 보고^{17,21,22,27,28)}되어 있으며 이들 방법중 TLC²⁸⁾, GLC^{22,27)} GC-MS^{17,21)}를 이용한 방법들이 널리 사용되고 있으나 이들 방법은 분석전의 전처리 조작들이 복잡하며 검출감도가 낮고 또한 경제성이 낮은 단점들을 가지고 있다. 그리고 피부조직 및 배양세포를 이용한 생물학적 분석방법은 T-2 및 기타 trichothecene mycotoxins의 독성이 서로 다르기는 하나 T-2만이 가지고 있는 특성이 아니므로 특이성이 없는 점에서 문제가 되고 있다^{29,30)}.

그러나 mycotoxins을 포함한 환경독물 및 의약품의 분석에 있어 효소화학적 분석방법이 도입된 이래 Chu³¹⁾와 Peter 등³²⁾은 polyclonal antibody를 이용한 T-2의 ELISA법을 제안하였다. 그러나 이들 방법은 반복하는 immunization에 있어 장기간이 걸린다는 점과 항체의 대량생산이 어렵다는 점에서 문제가 되고 있다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위해 Hunter 등³³⁾은 T-2의 monoclonal antibody(MAb)를 생산하여 이를 이용한 ELISA법을 개발했으나 이 방법은 polyclonal antibody를 이용한 방법보다 감도가 낮은점이 문제점으로 대두되었다. 그러므로 높은 감도를 가진 MAb의 생산과 이를 이용한 ELISA법의 개발이 요구되어져 본 논문에서는 T-2에 대해 특이성이 뛰어난 MAb를 생산하였으며 이 MAb를 이용하여 ELISA법에 의한 T-2의 새로운 정량법을 개발하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

T-2의 생산—Ueno 등³⁴⁾에 의해 보고된 방법을 이용하여 T-2를 생산하였다. 즉 *Fusarium*속 균의 일종인 *Fusarium sporotrichioides* M-1-1를 20l의 SPY 배지(5% sucrose, 0.1% peptone, 1% yeast extract 용액)를 넣은 50l용 Jar fermentor에 접종한 다음 24~27°C에서 5일간 진탕 배양후 여액을 ethylacetate로 추출했다. 추출액

을 600g의 Silica gel(Wakogel C-300)이 들어있는 130 cm×5 cm의 glass column에 흡착시킨 다음 탈지하기 위하여 n-hexane 1l로 세척한 후 fraction collector를 이용하여 n-hexane:acetone(12:7) 2l 및 n-hexane:acetone(1:2) 2l로 유출시키면서 T-2의 fraction을 전부모은 다음 이를 감압건조하여 얻은 잔사를 benzene 5 ml에 녹인후 n-hexane을 현탁이 생기지 않을 때까지 소량씩 적가한 다음 냉장고에서 방치하여 T-2의 결정을 얻었다.

T-2 HS-BSA의 제조—BSA 40 mg을 0.01 M Phosphate buffer-0.9% NaCl solution(PBS액, pH 7.0) 4 ml에 용해시킨후 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide(EDPC) 80 mg을 가한 다음 T-2 HS 5 mg을 Dimethyl formamide(DMF) 0.1 ml에 용해시킨 액을 점적하여 혼화한 후 실온에서 교반하면서 12시간 반응시켜 T-2 HS의 carboxyl radical과 BSA중의 lysine에 있는 amino radical 사이에 acidamide 결합이 형성되어 T-2 HS-BSA 결합체가 생성됐다.

이 반응액은 0.9% NaCl 용액에서 3일간 투석하였으며 이때 생성된 침전물은 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 제거하였다. 이때 T-2 HS-BSA의 단백질 함량은 Lowry *et al.* 법에 의해 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였고 단백질 분자 주위에 결합하고 있는 T-2 HS의 수는 T-2 HS-BSA 용액 150 μ l를 취하여 gas-liquid chromatography(GLCFID)에 의해 T-2 tetraol의 양을 정량한 후 다음식에 의해 결정하였다.

즉 단백질량을 알고 있는 T-2 HS-BSA용액 150 μ l(단백질량 20 μ g)에 동량의 25% NH₄OH 액을 가한 후 밀전한 다음 실온에서 24시간 가수분해 시킨후 60~80°C의 hot plate 상에서 질소가스를 가하면서 증발농축시켜 T-2 HS 단백질 결합체는 가수분해 되어 T-2 tetraol 및 변성 단백질의 잔류물이 되었다. 이 잔류물에 50~60°C의 뜨거운 methanol 500 μ l씩을 가하여 3번 추출하여 methanol 층에는 T-2 tetraol 및 methanol 가용성 단백질이 추출됐다. 이 추출물을 질소기류 하에서 증발 농축시킨 후 가용성 단백질을 제거하

기 위하여 500 μ l의 chloroform으로 잔류물을 3회 추출한 다음 screw cap vial에 chloroform층을 취하여 질소기류하에서 증발농축시켜서 T-2 tetraol의 잔류물을 얻었다. 여기에 내부 표준물질로 5 μ -cholestone (半井化學株式會社製, 日本) 0.2mg/ml, 아세톤 용액 20 μ l를 가하여 질소기류하에서 증발 건조한 다음 TMS 화제 (bistrimethylsilylacetamide : trimethylsilylimidazole : trimethylchlorosilane = 5 : 5 : 1) 20 μ l를 가하여 밀전하고 실온에서 20분간 반응시킨 후 반응액 1 μ l를 취해 GLC-FID (GC-7A : Shimadzu, Japan)에 의해 T-2 tetraol의 양을 정량하였다.

검액중의 T-2 tetraol은 표준품의 retention time과 비교하여 확인하였으며 단백질 1분자당 결합하고 있는 T-2 HS의 분자수는 내부 표준물질에 대한 T-2 tetraol의 peak 높이와 비교하여 산출하였다.

T-2 HS-BSA 에 의한 mouse 의 면역—T-2 HS-BSA 10mg을 PBS액 5ml에 녹인 후 membrane filter를 통하여 멸균한 후 이 액 1ml와 생산된 항체가 (抗體價)가 계속 유지되도록 하기 위하여 olive유에 결합사균을 넣은 Freund's complete adjuvant (FCA) 1ml를 각각 다른 주사기에 취하여 양쪽에 아답타가 있는 멸균한 주사침에 2개의 주사기를 연결하여 양쪽 주사기를 서로 누르면서 유화시킨다. 유화의 종말점은 양쪽의 주사기를 밀어넣는 것이 좀 힘든 상태가 될 때이며 유화가 끝나면 하나의 주사기에 두 액을 옮기고 보통의 멸균된 주사침을 끼워 ether로 마취시킨 6주된 ddy계 mouse 암컷 5마리의 피하에 마리당 50 μ l씩 2개소에 포함 100 μ l의 T-2 HS-BSA를 주사하여 최초 면역을 시킨다. 최초 면역 후 7일째에 다시 최초 면역시와 동일한 조작으로 피하주사 (2차 면역)한 후 1주일 사육시킨 다음 5마리에 대하여 안저 정맥에서 각각 피를 채취하여 ELISA법으로 항체가 (抗體價)를 측정 한 후 그중 항체가 (抗體價)가 제일 높은 2마리를 선별하여 3일간 사육시킨 다음 최초 면역시와 같이 조작하여 유화시킨 T-2 HS-BSA 100 μ l을 주사 (3차 면역)한 후 최초 주사로 부터 20일만에 mouse를 죽여 spleen cell을 무균적으로 채취한다.

ELISA법에 의한 항체가 (抗體價)의 측정을 하기 위하여 항원인 T-2 HS-BSA를 10 μ g/ml 농도가 되도록 coating buffer solution (pH 9.6)에 녹인 후 8 channel multiple pipette을 이용하여 멸균한 ELISA plate의 well당 50 μ l씩 분주한 후 37°C에서 2시간 배양한 다음 세척기 (Immuno washer, NK 300, Inter Med., Denmark)를 PBS-tween solution을 이용, plate를 3회 세척하여 T-2 HS-BSA를 coating한 후 ELISA plate를 blocking하기 위하여 0.5% BSA의 PBS-tween 용액을 multiple pipette으로 50 μ l씩 well에 분주하여 실온에서 1시간 방치한 다음 PBS-tween solution으로 3회 세척하여 blocking한 다음 mouse의 안저정맥으로부터 채혈한 100 μ l 이상의 혈액을 polyvinyl 원심관에 넣어 2,000 rpm에서 약 5분간 원심분리하여 혈청과 혈구를 분리한 후 상등액의 혈청을 취하여 PBS soln으로 step wise dilution 방법에 의해 10^2 - 10^8 배로 희석하여 이 혈청 원액을 2개씩의 well에 농도별로 50 μ l씩 분주한 후 1시간 방치한 다음 PBS-tween soln으로 4회 세척한 후 alkaline phosphatase로 labelled된 용액 50 μ l씩을 다시 분주하고 37°C에서 1시간 방치하여 2nd Antibody reaction을 시킨 후 다시 p-nitro phenyl phosphate (PNPP) soln 50 μ l씩을 분주하고 37°C에서 30분간 다시 배양한 다음 microplate photometer (MPP-22, Corona Electrics, Japan)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 항체가 (抗體價)가 높은 mouse 2마리를 선정하였다.

MAB의 정제—세포융합 및 HAT 선택과 cloning 과정을 거쳐 single clone을 형성하는 well만을 ELISA법에 의하여 선택하였다.

100 μ l당 10^7 개의 cell이 들어가도록 PBS soln에 hybridoma cell을 희석시킨 후 1ml의 pristane을 미리 복강내 주사한 ddy계 mouse에 100 μ l씩 복강내 주사하여 복강암을 형성시킨다.

복강암이 형성된 mouse의 복수를 채취하여 실온에서 2,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 50% 포화 황산암모늄을 가하여 불순물을 침전시킨 다음 원심분리하여 얻은 gamma globulin을 4°C에서 3일간 saline로 투석시켰다. 이때

gamma globulin의 농도는 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였으며 T-2에 대한 MAb의 특이성과 검출한계는 ELISA법에 의하여 분석하였다.

ELISA법에 의한 T-2의 정량—항원으로서는 T-2 HS-BSA(10 mg/ ml coating buffer soln) 50 μ l씩을 96 well ELISA plate에 각각 분주한 다음 37°C에서 2시간 배양한 후 세척기를 이용하여 PBS-tween soln으로 각 well을 3회 세척한 다음 결합되지 않은 solid phase site를 차단하고 비특이성 결합을 극소화하기 위하여 0.5% BSA-PBS soln 50 μ l씩을 각 well에 가한 후 실온에서 1시간 배양하여 blocking시키고 PBS-tween soln으로 3회 세척한 다음 상등액 및 T-2 검액을 10% ethanol-PBS tween soln으로 step wise dilution한 후 각각의 농도별로 50 μ l씩과 항 T-2 MAb(1 μ g/ ml) 50 μ l씩을 well에 가한 다음 실온에서 1시간 배양한 후 PBS-Tween soln으로 4회 세척하고 sheep anti mouse IgG-alkaline phosphatase conjugate soln을 50 μ l씩 가한 다음 37°C에서 1시간 반응시킨 후 다시 well을 PBS-Tween soln으로 4회 세척한 다음 substrate buffer에 ml당 1mg의 PNPP를 녹인액 50 μ l씩을 가하여 37°C에서 30분간 다시 반응시킨 후 PNPP와 enzyme의 반응에 의해 생성된 황색의 강도를 microphotometer로 405 nm에서 흡광도를 측정했다. 검량선을 작성하기 위하여 T-2 표준품을 이용하여 0.01 ng/ ml에서 100 ng/ ml의 농도까지 ELISA법에 의해 T-2를 정량하였다.

GLC-FID 및 GC-MS에 의한 T-2의 정량—T-2의 함량을 ELISA법에 의한 결과와 비교 검토키 위해 GLC-FID 및 GC-MS에 의해 동시 정량하였다.

F. sporotrichioides M-1-1의 T-2의 생산성—밀 150g씩을 취하여 500 ml의 삼각 flask 5개에 각각 넣은 다음 autoclave에서 20분간 멸균한 후 clean bench 내에서 각각의 flask에 멸균 증류수를 45 ml씩 가한 다음 1시간 방치하여 멸균 증류수가 밑에 흡수되도록 한 4개의 flask에는 *F. sporotrichioides* M-1-1을 1백금이씩 접종하고 나머지 한개의 flask에는 균을 접종하지 않고 24-27°C에서 1-4주간 배양하면서 주당 한개씩 꺼내어 55°C의 dry oven에서 24 hr 건조시킨 것을 분쇄기를 이용 분쇄한 다음 분석전까지 냉동실(-20°C)

에서 보존하였으며, 시료의 분석은 ELISA 및 GLC-FID, GCMS에 의해 행하였으며 *F. sporotrichioides* M-1-1의 밀 기질에 대한 배양기간에 따른 T-2 생산성 변화를 세 방법으로 비교 검토하였다.

결과 및 고찰

T-2의 생산—*Fusarium sporotrichioides* M-1-1을 20 l의 SPY 배지에 접종한 다음 5일간 배양하여 얻은 배양여액은 약 18 l 정도를 얻을 수 있었으며 이 배양여액으로부터 crude toxin 9.63g을 얻었다. 이 crude toxin을 Silica gel column에 의해 정제한 후 얻은 T-2 toxin의 fraction으로부터 780 mg의 정제 T-2가 얻어졌으며 이것을 benzene : n-hexane으로 재결정하여 460 mg의 결정 T-2를 얻을 수 있었다.

최초 이 균을 분리 동정했던 Ueno³⁴⁾의 보고에 의하면 동일한 SPY 배지를 이용 24~27°C에서 5일간 배양한 결과 10 l당 3g의 crude toxin을 얻을 수 있었다고 하나 본 실험에서는 그의 1.5배 정도되는 양의 crude toxin을 얻을 수 있었다. 그러나 Ueno 등은 이 crude toxin 4.4g을 Silica gel(Kiesel gel 60, E. Merck, West Germany)으로부터 얻은 T-2 fraction으로부터 17 g의 결정 T-2를 얻어 38.6%의 수율을 보였으나 본 실험에서는 9.63g의 crude toxin으로부터 0.46g의 결정 T-2를 얻어 4.8%의 수율을 나타내었다. 이것은 배양액으로부터 배양여액을 얻을 때 균사의 여과 불량에서 기인 되었거나 같은 균이라 할지라도 여러차례 계대배양하는중 균 자체의 mutation으로 인해 생리활성이 적어진 것이 아닌가 하는 의문점 그리고 column에 사용했던 Silica gel의 차이 등 여러가지 문제점들이 대두된다. 대량배양시의 경제성을 고려할 때 최대 수율을 얻기 위해서라도 이러한 문제점에 대하여는 앞으로 연구가 요망된다.

Monoclonal antibody의 생산—T-2 HS에 대한 BSA의 결합에 미치는 pH 및 EDPC의 량, 반응 시간의 영향은 Table 1에 나타낸 바와 같으며 액성은 산성의 경우가 결합력이 크고 반응시간과 단백질 결합 비율 등을 비교할 때 No. 1의 조건이

Table 1. Efficiency of T-2 toxin conjugation to protein

No.	BSA (mg)	Buffer	pH	T-2 (mg)	HS (mg)	Condition	T-2/protein
1	40	PBS	7.0	5	5	EDPC 80 mg R.T. 12hrs	8.5
2	25	PBS	5.5	10	10	EDPC 15 mg R.T. 10min EDPC 5 mg R.T. 18hrs	2.7
3	40	PBS	7.0	5	5	EDPC 30 mg R.T. 30min EDPC 30 mg R.T. 15hrs	3.3
4	40	PBS	6.0	5	5	EDPC 30 mg R.T. 30min EDPC 30 mg R.T. 15hrs	5.8

BSA: bovine serum albumin
 PBS: phosphate buffered saline
 EDPC: ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
 R.T.: room temperature

적합했으며 이 조건에서 T-2와 protein의 결합비는 8.5이었다. HAT 선택과 cloning을 통하여 활성이 강한 4개의 hybridoma cell clone을 얻었으며 Fig. 1에서 보는 바와 같이 T-2 HS에 대하여 특이성을 가진 clone은 6E9와 7D4가 우수하였다. 또 이 clone을 이용하여 ELISA법으로 T-2를 분석한 결과 Fig. 2에서와 같이 정량성을 나타냈으며 검출한계는 약 25 pg/ assay였다.

F. sporotrichioides M-1-1의 T-2 생산성—T-2가 오염되지 않는 것이 확인된 밑을 기질로 하여 T-2 생산균으로 알려진 *F. sporotrichioides* M-1-1을 접종 24~27°C에서 1주에서 4주간에 걸쳐 배양한 다음 T-2 생산에 미치는 배양시간의 영향을

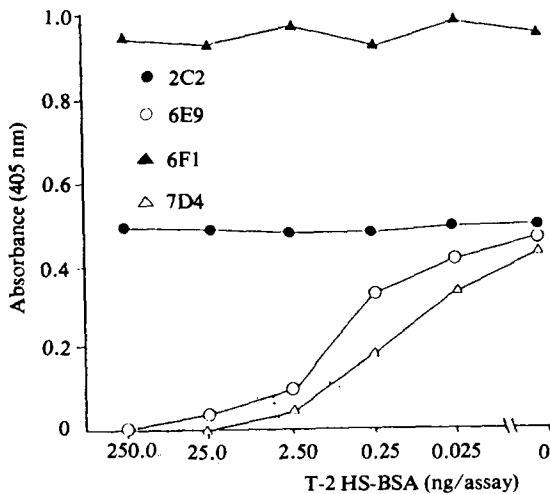


Fig. 1. Specification of some MAb to T-2 HS-BSA.

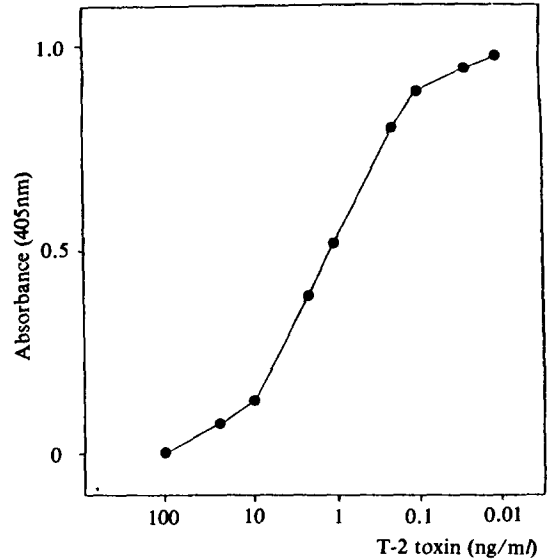


Fig. 2. Standard curve of T-2 toxin by ELISA method

ELISA 법으로 검토한 후 data의 신뢰성을 검토하기 위하여 Fig. 3, 4에서 나타낸 바와 같이

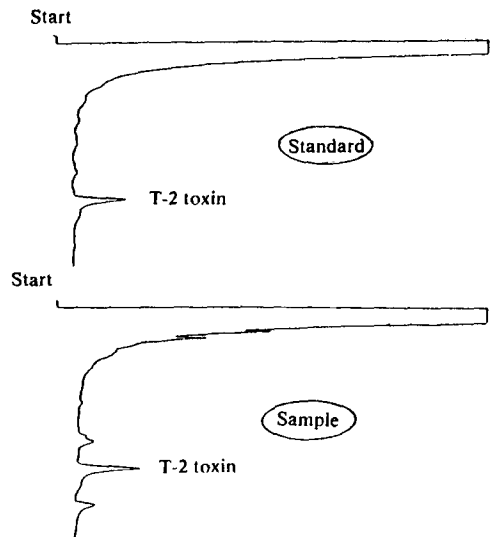


Fig. 3. GC chromatogram of T-2 toxin.

Column: glass column 3mmid. × 150cm,
 Detector: FID.
 Packing material: 1.5% ov 17 on 100 ~ 120 mesh chromosorb WHP.
 Initial temp.: 220 °C,
 Final Temp.: 280 °C,
 Final Time: 2min
 Inj. detet. temp.: 300 °C,
 N₂: 30ml/ min,
 Attenuation: 32(chart speed: 5mm/min)

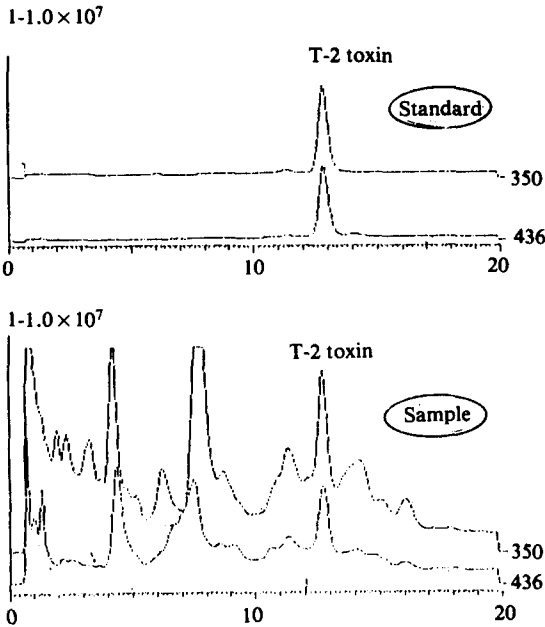


Fig. 4. GC-MS chromatogram of the trimethylsilyl ether of T-2 toxin.

Column: glass column (mm id. x 200cm) packed with 1.5% ov-17 on 80 ~ 100 mesh Gas-chrom Q.
 Carrier gas: helium 30ml/min
 Temp.: injector 270°C, Column 230 ~ 260°C (at 5°C/min) ion source 180°C
 Ionizing voltage: 20eV
 Injection volume: 2 µl
 total emission: 100 µA
 multiplier gain: 1.5 KA
 Vacuum: 3 × 10⁻⁷ torr
 Fragment ions: m/z 350 and 436.

Table 2. Production of T-2 toxin by *Fusarium sporotrichioides* M-1-1 on a wheat substrate

Culture (weeks)	Analytical Methods		
	ELISA	GLC-FID (ppm)	GC-MS
1	28.0	27.1*	29.1*
2	11.0	95.7	110.4
3	48.0	48.5	48.1
4	27.0	26.8	27.0
control	0	0	0

* Means of duplicate analyses.

GLC-FID 및 GC-MS를 이용 cross check한 바 Table 2과 같은 결과를 얻었다. *F. sporotrichioides* M-1-1을 접종하지 않고 24~27°C에서 4주간 배양한 시료에서는 ELISA, GLC, GC-MS 분석 결과 모두 음성의 결과를 나타내었으며 M-1-1균을 접종 후 1, 2, 3, 4주 배양한 시료의 경우도 세방법 모두 거의 유사한 data를 보였다. 이 결과에서 볼 때 T-2 분석의 기존 수단이었던 GLC 및 GC-MS방법과 ELISA법에 의한 data 사이에는 높은 상관성과 신뢰성이 있음을 알 수 있었으며 T-2 농도가 100 ppm을 넘는 고농도 오염시료의 경우 ELISA법이 좀 더 높은 감도를 보였다. 또 *F. sporotrichioides* M-1-1균을 밑에 배양할 때는 24~27°C의 온도조건에서는 2주간 배양하는 것이 최대의 toxin 생산량을 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

국문요약

종래의 화학적, 생물학적 분석방법의 단점인 검출한도가 낮은점, 시료전처리의 복잡성, 비경제성 및 비특이성 등을 극복하기 위해 monoclonal Ab를 사용한 ELISA법으로 T-2 toxin에 대해 특이성이 있는 새로운 분석법을 개발하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 종래의 GLC 및 GC-MS 분석법보다 간편하고 신뢰성이 높으며 검출한계가 0.1ppb인 고감도의 분석법을 개발하였다.
2. 본 분석법을 이용하여 *Fusarium spp.* 균의 T-2 생산유무를 단시간에 다량의 시료를 검색할 수 있었으며, data의 정확도가 GLC와 유사하며 GLC로는 검색할 수 없는 150ppb 이하의 미량함유 시료에서도 T-2 toxin을 검색할 수 있었다.
3. 본 실험에 사용한 *F. sporotrichioides* M-1-1 균주의 밑에 대한 최적배양조건은 24-27°C 2주간임을 알았다.

참고문헌

1. 上野 芳夫: Toxicology. (地人書館, 東京), 1109(1978).
2. Lee, U.-S., H.-S. Jang, T. Tanaka, A. Hasegawa Y.-J. Oh and Y. Ueno: The coexistence of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in Korean cereals harvested in 1983. *Food Additives Contam.*, **2**, 185 (1985).
3. Bamburg, J.R., N.V. Riggs and F.M. Strong: The structures of toxins from two strains of *F. tricinctum*, *Tetrahedron*, **24**, 3329 (1968).
4. Bamburg, J.R. W.F.O. Marasas, N.V. Riggs, E.B. Smalley and F.M. Strong: Toxic spiroepoxy compounds from *Fusaria* and other *Hyphomycetes*. *Biotech. Bioeng.*, **10**, 445 (1968)
5. Epply, R.M. and W.J. Bailey: 12, 13-Epoxy-delta-trichothecenes as the probable mycotoxins responsible for stachybotryotoxicosis. *Science*, **181**, 758 (1973).
6. Harrach, B., C.J. Mirocha, S.V. Pathre and M. Payusik: Macrocyclic trichothecene toxins produced by a strains of *Stachybotrys atra* from Hungary. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 1428 (1981).
7. Nelson, P.E., T.A. Toussoun and W.F.O. Marasas: *Fusarium* species-An Illustrated Manual for Identification. (The Pennsylvania State University Press, University Park and London), 1 (1983).
8. Ueno, Y.: Trichothecene Mycotoxins-Mycology, Chemistry and Toxicology. *Adv. Nutr. Res.* Vol. 3, ed. by H.H. Draper, (Plenum Press, New York), 301 (1980).
9. Tatsuno T., Y. Fujimoto and Y. Morita: Toxicological research on substances from *F. nivale* (III)-The structure of nivalenol and its monoacetate. *Tetrahedron Lett.*, **33**, 2833 (1969).
10. 角田廣, 戸失崎紀紘, 諸岡信一, 中野尚子, 吉山秀行, 大久保薫, 磯田政恵: 微生物による貯蔵穀類の被害に 関する研究(第34報), 食糧研究所報告, **23**, 89(1969).
11. Ueno, Y., I. Ueno, K. Amakai, Y. Ishikawa, H. Tsunoda, K. Okubo, M. Saito and M. Enomoto: Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria* (II) *J. Exp. Med.*, **41**, 507 (1971).
12. 諸岡信一, 裏に憲昭, 芳澤宅實, 山本弘幸: 赤カビ自然罹病麥中の 毒性物質に関する研究, 食衛誌, **13**, 368(1972).
13. Ueno, Y.: Trichothecenes-Chemical, Biological and Toxicological Aspects. ed. by Y. Ueno, (Elsevier Science Publishers, Amsterdam), 135 (1983).
14. Sato, N. and Y. Ueno: Mycotoxins in Human and Animal Health, ed. by J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine and M.A. Mehlman, (Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois) 295 (1977).
15. Ichinoe, M. and H. Kurata: Trichothecenes-Chemicals, Biological and Toxicological Aspects. ed. by Y. Ueno, (Elsevier Science Publishers, Amsterdam), 73 (1983).
16. Ueno, Y., K. Ishii, K. Sakai, S. Kanaeda, H. Tsunoda, T. Tanaka and M. Enomoto: Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria* (IV.). *Jpn. J. Exp. Med.*, **42**, 187 (1972).
17. Mirocha, C.J., B. Schauerhamer, C.M. Christen and T. Kommerdehl: Zearalenone, deoxynivalenol, and T-2 toxin associated with stalk rot in corn. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 557 (1979).
18. Ueno, Y.: Reviews in Environmental Toxicology. Vol. 2, ed. by Ed. Hodgson, (Elsevier Science Publishers, Amsterdam), 303 (1986).
19. Mirocha, C.J., S.V. Pathre, B. Schuerhamer and C.M. Christensen: Natural occurrence of *Fusarium* toxins in feedstuff. (1976).
20. Ueno, Y.: McGraw-Hill Yearbook of Science and Technology 1986. (McGraw-Hill Book Co., New York), 654 (1985).
21. Nowicke, J.W. and M. Meselson: Yellow rain-a palynological analysis *Nature*, **309**, 205 (1984).
22. Haig, A.M.: Chemical Warfare in Southeast and Afganistan. Report to the congress from

- the secretary of state, March 22, 1982, special Report No. 98, U.S. Department of State, Washington, D.C. (1982).
23. Brennecke, L.H. and H.A. Neufeld: Pathologic effects and LD₅₀ doses of T-2 toxin in rats by IM, SC and IP routes of administration. *Fed. Proc.*, **41**, 924 (1982).
 25. Schoental, R., A.Z. Joffe and B. Yagen: Cardiovascular lesions and various tumors found in rats given T-2 toxin, a trichothecene metabolites of *Fusarium*, *Cancer Res.*, **39**, 2179 (1979).
 26. Yarom, R., R. More, A. Eldor and B. Yagen: The effect of T-2 toxin on human platelets. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 210 (1984).
 27. Sato, N., Y. Ueno and M. Enomoto: Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*(VIII)-Acute and subacute toxicities of T-2 toxin in cats. Japan. *J. Pharmacol.*, **25**, 263 (1975).
 28. Ueno, Y., N. Sato, K. Ishii, K. Sakai, H. Tsunoda and M. Enomoto: Biological and Chemical detection of trichothecene mycotoxins of *Fusarium* species. *Appl. Microbiol.*, **35**, 699 (1973).
 29. Takitani, S., Y. Asabe, T. Kato, M. Suzuki and Y. Ueno: Spectrodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with 4-(*p*-nitrobenzyl) pyridine on silica gel thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr.*, **172**, (1979).
 30. Ueno, Y.: Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fund. Appl. Toxicol.*, **4**, S124 (1984).
 31. Ueno, Y.: Critical Reviews on Toxicology, Vol. 14, ed. by L. Grodberg, (CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida), 99 (1985).
 32. Chu, F.S., S. Grossman, R.-D. Wei and C.J. Mirocha: Production of antibody against T-2 toxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 104 (1979).
 33. Peters, H., M.P. Dietrich and K. Dose: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of T-2 toxin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **363**, 1437 (1982).
 34. Ueno, Y., M. Sawano and K. Ishii: Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species in shake culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **30**, 4 (1975).