

옥수수중 Deoxynivalenol의 검출을 위한 효소면역측정법의 개발

이항범 · 손동화* · 小阪邦男¹ · 上野芳夫¹

한국식품개발연구원 이화학연구부, ¹일본이과대학 약학부

Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay System for the Detection of Deoxynivalenol in Corn. Hyang-Burm Lee, Dong-Hwa Shon*, Kunio Kosaka¹ and Yoshio Ueno¹.
Food Chemistry and Physics Division, Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea, ¹Dept. of Toxicology and Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo, Tokyo 162, Japan—In order to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for deoxynivalenol (DON) in corn, we produced a specific monoclonal antibody and established ELISA conditions. After the spleen cells from mice immunized with DON-bovine serum albumin conjugate were fused with Sp2/O myeloma cells, a hybridoma cell 3G7 producing anti-DON antibody was screened by ELISA. From the standard curve of competitive direct ELISA (cdELISA) using 3G7 monoclonal antibody and DON-HRP conjugate, the detection range of DON showed 3-3,000 ng/ml (ppb). The monoclonal antibody showed some cross-reactivities against DON analogues such as 15 acetyl-DON (110%), nivalenol (5.0%), 3 acetyl-DON (1.7%), fusarenon-x (0.72%), and T-2 (0.59%). When the cdELISA was applied to the spiked corns after extracting with 60% methanol and diluting 5-fold with washing buffer, the assay recoveries of DON were 313, 163, 106, and 88.9% (av., 168%) in the levels of 200, 600, 2,000, and 6,000 ng/g, respectively. For the quantitation of DON in corns, 30 samples kept under two different storage conditions of cold and room temperature were assayed by cdELISA. The mean detection concentrations were 595 (detection range, 0-2,750) and 2,448 (detection range, 0-4,500) ppb, respectively.

*Fusarium*속 곰팡이는 식물병원균으로서 다양한 식물 병을 일으킬 뿐만 아니라 부생균으로 서식하기도 한다. 이 균은 특히 비교적 저온에서도 생육이 양호하여 저장 또는 가공중의 곡류 및 채소류의 부패에 관여하여 많은 독성물질을 생성한다. 이들이 생성한 주요 독소들 중의 하나인 deoxynivalenol (DON)은 trichothecene 골격구조를 가지며 C-8위치에 ketone group을 갖고 있는 진균 독소(mycotoxin)이다. 이 독소는 1970년대 초 *Fusarium*에 감염된 곡류에서 처음 분리되었으며 돼지와 같은 가축에 주로 식욕부진과 구토를 일으키는 것이 관찰되어 vomitoxin으로 잘 알려져 있다(12, 13). DON은 또한 저장, 가공과정 및 고온에서도 분해되지 않는 매우 안정한 화합물로 nivalenol, T-2 toxin, HT-2 또는 fusarenon-x와 같은 trichothecene류 보다 독성이 강하지는 않지만 다양한 농산물에서 높은 농도로 검출되기 때문에 중요시 되고 있다(7, 11). 따라서 많은 나라에서 DON에 대한 법적 허용수준 등에 관한 규제법 등을 정해놓고 있는데 캐나다의 경우 연질밀 2 ppm, 유아식품 1 ppm 수준을, 그

리고 미국 FDA의 경우 밀 완제품 1 ppm, 사료 5 ppm 수준을 규제치로 정해놓고 있으며, 소련의 경우 보건성의 규제치는 경질밀 1 ppm, 기타밀 0.5 ppm으로 상당히 엄격하다(10). 그러나 우리나라의 경우 DON 등의 허용기준치 등이 아직 설정되어 있지 않은 실정이어서 이에 대한 관심과 연구가 더욱 필요한 실정에 있다.

일반적으로 DON을 포함한 trichothecene계 진균독소의 효과적인 검출을 위해 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)가 개발되어 활용되고 있는데 이는 검출감도가 뛰어나고 신속, 간편하면서 또한 경제적인 장점이 있기 때문이다(11).

한편, Zhang 등(14)은 DON에 대한 ELISA법과 여기에 다른 대안을 비교하는 분석방법을 제시한 바 있으며 Casale 등(3)은 단일클론항체를 이용하여 DON과 그 analogue에 대해 ELISA법을 이용하여 분석을 시도한 바 있다. 최근 Mills 등(8)은 3-acetyldeoxynivalenol-hemiglutarate를 BSA와 결합시킨 면역원으로부터 얻은 DON에 특이적인 다중클론항체(polyclonal antibody)를 사용하여 ELISA를 실시한 결과 이들 항체는 DON에 대해 90 pg/well의 검출한계를 나타내었으며 이를 이용하여 옥수수시료내 DON을 분석하였다.

국내에서는 항체를 이용한 곡류중 DON의 검출법에 대하여는 아직 보고된 바 없으므로 본 연구에서는 ELISA

*Corresponding author

Tel. 82-342-780-9133, Fax. 82-342-780-9877

E-mail: dhs95@chollian.dacom.co.kr

Key words: Deoxynivalenol, Monoclonal antibody, ELISA, Corn

에 의한 특이성과 검출감도가 우수한 DON의 검출법을 개발하고 옥수수 시료중 DON의 오염조사에 이를 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

Deoxynivalenol(DON), nivalenol(NIV), 3-acetyldeoxynivalenol(3Ac-DON), T-2, fusarenon-x 및 15-acetyldeoxynivalenol(15Ac-DON) 등 표준독소와 carrier protein으로 사용한 bovine serum albumin(BSA), horseradish peroxidase(HRP)와 succinic anhydride, glutaric anhydride 그리고 washing 및 coating buffer에 사용된 tris(hydroxymethyl)aminomethane, 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide(EDPC), Tween 20, acetylsterase는, Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 또한 thin layer chromatography(TLC)용 plate는 Merck사 SG60을 사용하였다. *N*-hydroxysulfosuccinimide(Sulfo-NHS), goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate, Freund's complete adjuvant와 incomplete adjuvant, dialysis tubing(benzoylated cellulose tubing), 단백질 정량용 micro BCA kit(#23235), 항체정제용 protein A column(ImmunoPure Plus IgG Purification Kit, #44679), 기질인 TMB (5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride)는 Pierce사의 제품을 사용하였다. 그리고 기타의 시약과 유기용매는 GR급 이상을 사용하였다.

실험동물로 사용한 New Zealand White 토끼는 한국 실험동물연구소(경기도 수원시)에서, BALB/c 생쥐는 수의과학연구소로부터 분양받았다. Microtiter plate는 Nunc사의 Maxisorp™(#446612)를, microplate reader는 Molecular Devices사의 THERMOmax™을 사용하였다.

Deoxynivalenol conjugate의 제조

면역원인 DON-BSA conjugate 그리고 경합적 ELISA에 필요한 DON-HRP는 각각 Chu 등(4), 및 Mills 등(8)의 방법에 준하여 준비하였다.

이 반응은 3Ac-DON 10 mg을 무수 pyridine 3 ml에 녹인 후 glutaric anhydride 83 mg을 첨가하여 90℃에서 3시간 동안 교반시킨 후 6 ml의 물을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이 반응으로 생성된 3Ac-DON-hemiglutarate(3Ac-DON-HG)의 추출은 chloroform으로 2회 실시하였으며 이를 물로 9회 washing하였다. 한편, 3Ac-DON-HG에 존재하는 acetyl기를 제거하기 위하여 acetylsterase를 이용하여 deacylation시켰다. 즉, 반응은 0.02% NaN₃가 처리된 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 3 ml에 이미 섞여있는 3Ac-DON-HG와 ace-

tylsterase(36 unit)를 처리하여 1주일간 30℃에서 서서히 교반하였다. 반응이 끝난 후 미반응된 3Ac-DON을 먼저 chloroform으로 추출하여 회수하였으며 나머지 수용층을 1 N HCl로 pH 3으로 맞춘 후 ethylacetate로 3회 추출하여 deoxynivalenol-hemiglutarate(DON-HG)를 얻었다. 다음으로, DON-HG의 -COOH기를 BSA와 HRP의 -NH₂기에 부착시키는 amide bond를 형성시키기 위하여 EDPC를 이용하는 water soluble carbodiimide(WSC) 방법을 사용하였다. 즉, BSA(28 mg)를 2.8 ml의 PBS buffer에 녹여 EDPC(58 mg)와 반응시키고 여기에 *N,N*-dimethylformamide(DMFA) 0.1 ml에 녹인 DON-HG(2.6 mg)를 한방울씩 떨어뜨리며 상온에서 12시간동안 교반하였다. 반응이 끝난 후 PBS에 대한 투석과 Sephadex G-25 column을 이용한 정제과정을 거쳐 순화된 DON-BSA, DON-HRP conjugate를 얻었다. 한편 3Ac-DON에서 출발하는 일련의 DON유도체 생성은 각 반응단계별로 TLC 및 GC-mass 등의 분석방법에 의하여 확인하였다.

단일클론항체의 생산

DON에 대한 단일클론항체를 얻기 위한 과정은 Goding(6) 및 Zola(15)의 방법을 따랐다. 요약하면, 생후 6주된 BALB/c 생쥐에 DON-BSA를 Freund's adjuvant로 emulsion을 만들어 마리당 30 µg/0.1 ml을 복강에 2주 간격으로 3차례 면역하였다. B세포의 융합은 세포융합 3일 전에 생쥐에 최종면역후 희생하여 적출한 비장세포와 myeloma세포(Sp2/0-Ag14)의 융합과정을 거쳐 얻었으며 이 융합세포를 HAT(hypoxanthine aminopterin and thymidine) 배지에 배양하였다. 배양 14일경 부터는 배양 상정액중의 항체를 비경합적 ELISA에 의하여 측정하였다. 단일클론항체의 cloning은 ELISA에 의하여 특이항체의 생성이 확인된 well의 hybridoma세포를 Mckearn의 한계희석법에 의하여 실시하였다(15). 선발된 클론으로부터 단일클론항체를 생산하기 위하여, 1주일전에 복강에 pristine 0.1-0.2 ml을 주입한 BALB/c 생쥐에 마리당 1-2×10⁶ cells의 융합 B세포 클론을 복강 주사하고 약 2주일 후 복수액을 얻어 이로부터 단일클론항체를 정제하였다. 정제는 Protein A column을 이용하여 Pierce사의 설명서에 따라 행하였다.

경합적 직접 ELISA (competitive direct ELISA, cdELISA)

DON의 농도 측정을 위하여 단일클론항체를 coating buffer(0.02 M tris, 0.15 M NaCl, pH 9.0)에 1/1,000로 희석한 항체용액 100 µl을 microplate의 well에 채우고 4℃에서 하룻밤 방치한 후, washing buffer(0.02 M tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 150 µl로

3회 세척하였다. 다음으로 여러농도의 DON 용액과 washing buffer로 1/2,000로 희석한 DON-HRP conjugate를 1:1로 혼합후 각 well에 100 μ l씩 넣고 상온에서 한시간 처리하였다. 그리고 washing buffer로 3회 세척한 다음 기질용액(0.01% TMB, 0.05 M phosphate citrate buffer, pH 5.0, 사용직전에 H₂O₂를 최종 0.02%가 되도록 첨가)을 well당 100 μ l를 넣고 상온에서 30분간 방치하여 발색시킨 다음 반응정지액(2M H₂SO₄) 50 μ l를 첨가하였다. Microplate reader로 파장 450 nm에서 well의 흡광도를 측정하였으며 각 시료당 3개씩의 well을 사용하여 얻은 흡광도의 평균값으로 분석하였다.

항체의 교차반응 시험

항체의 특이성을 조사하기 위하여 유사독소에 대한 항 DON 단일클론항체의 교차반응을 cdELISA로 분석하였다. Washing buffer에 농도별로 희석한 DON을 비롯한 유사독소(3Ac-DON, 15Ac-DON, NIV, T-2 및 fusarenon-x)에 대하여 경합적 직접 ELISA를 행하였다. 이들 독소에 대한 항체의 결합을 나타내는 교차반응의 정도는 항DON 단일클론항체에 대한 DON-HRP의 결합을 50% 저해하는 DON의 농도를, DON-HRP의 결합을 50% 저해하는 유사독소의 농도로 나눈 %값으로 나타내었다.

cdELISA에 의한 DON의 회수율 분석

표준독소 DON을 60% methanol에 용해시켜 200 ppb, 600 ppb, 2,000 ppb 및 6,000 ppb의 최종농도로 5 g의 오염되지 않은 분말 옥수수 시료에 각각 200 μ l씩 3반복으로 인위적인 오염처리를 하고 하룻밤 건조기에서 건조시켰다. 이를 60% methanol 25 ml로 추출하고 10분간 원심분리(10,000 \times g)한 후 상정액을 취하였다. 이 추출물을 washing buffer로 1/5 희석하고 ELISA를 실시하였다. 이때 정량을 위한 표준곡선은 오염되지 않은 옥수수 추출물을 앞의 경우와 마찬가지로 washing buffer로 1/5 희석하고 여기에 각 농도의 DON을 첨가하여 행한 ELISA로부터 작성하였다.

옥수수중 DON의 분석

옥수수내 DON의 오염정도를 cdELISA로 분석하기 위하여 30개의 옥수수시료를 사용하였으며 시료의 처리는 앞의 회수율 분석시와 같은 방법으로 행하였다. 본 시험에 사용한 옥수수시료는 94-95년도의 미국산 수입 옥수수로서 수집후 1-2년간 냉장저장 또는 상온보관중인 시료이었다.

결과 및 고찰

항DON 단일클론항체의 특성

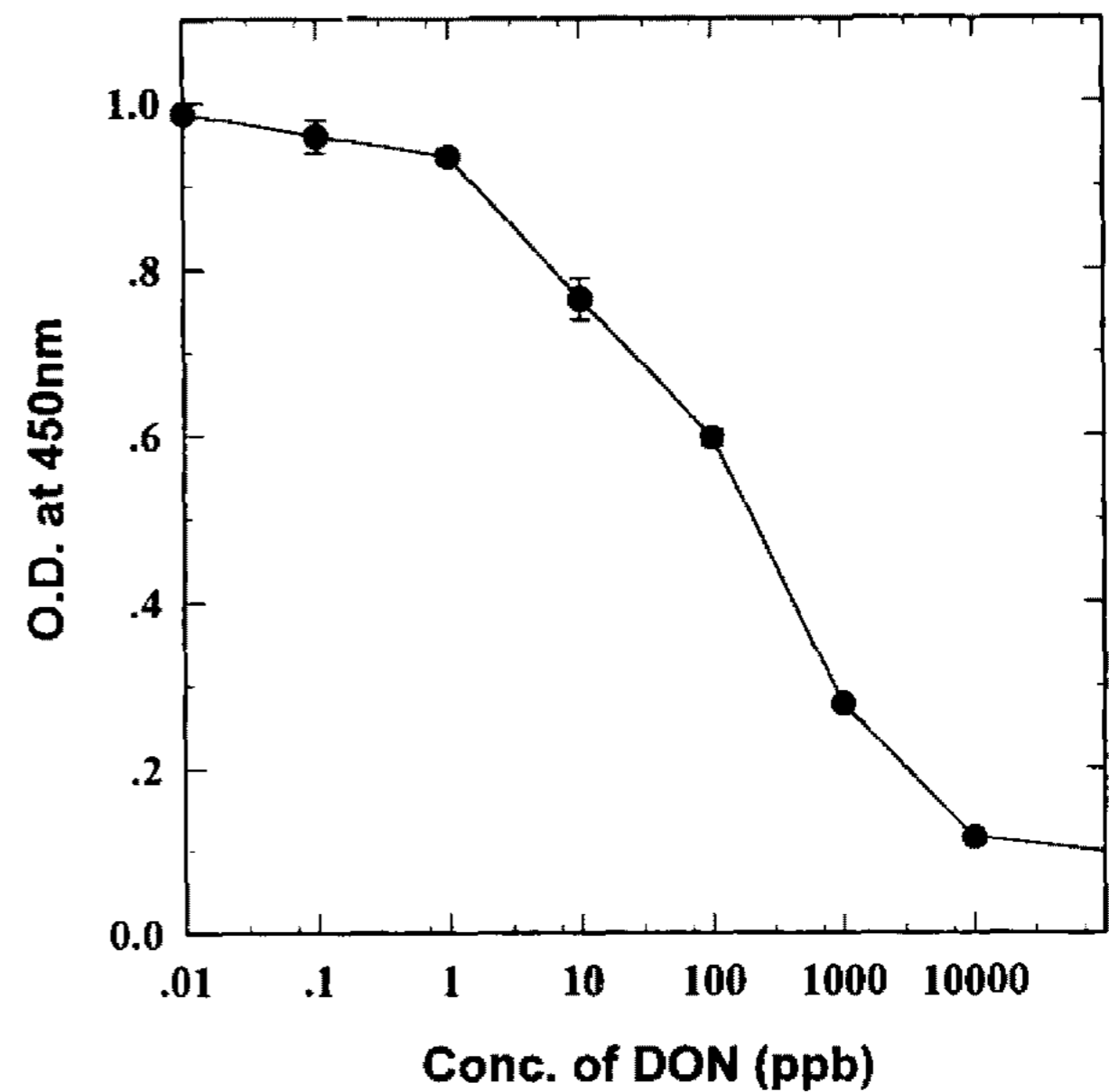


Fig. 1. Standard curve by competitive direct ELISA for DON using 3G7 monoclonal antibody and DON-HRP conjugate. Each point and bar represents an average of 3 determinations and its standard deviation.

실험방법에 따라 융합세포로부터 DON에 특이적으로 반응하는 항체를 생산하는 클론 2C10, 3G7, 4F9, 9A1 등을 분리하였으며 이중 3G7 단일클론항체만이 DON에 대하여 양호한 경합반응을 나타내었다(Fig. 1). 즉, 단일클론항체와 DON-HRP conjugate를 사용하여 DON에 대한 cdELISA를 실시한 결과 DON의 검출범위는 Fig. 1의 표준곡선을 통해 볼 때 3-3,000 ppb로 나타났다. 이는 DON-BSA conjugate를 coating한 경합적 간접 ELISA (competitive indirect ELISA)의 경우 (200-10,000 ppb) 보다 검출감도가 높았다(data 생략).

한편, DON 유도체들에 대한 교차반응을 cdELISA로 검토하였다. 항체에 대한 DON-HRP의 결합을 50% 저해하는 DON, 15Ac-DON, NIV, 3Ac-DON, fusarenon-x 및 T-2의 농도는 각각 0.33, 0.30, 6.6, 20, 46 및 56 ng/ml이었으며, 이로부터 구한 교차반응율은 각각 100, 110, 5.0, 1.7, 0.72, 및 0.59이었다(Fig. 2, Table 1). 일반적으로 분석에 사용되는 항체는 유사독소와의 교차반응이 낮은 것이 우수한데 이를 위하여는 다중클론항체보다 균일한 특이성을 갖는 단일클론항체를 선발하여 이용하는 편이 매우 효과적이다. 본 실험에서 DON에 대한 단일클론항체를 이용하여 cdELISA를 실시한 결과 15Ac-DON에 대한 경우를 제외하고는 매우 낮은 교차반응율을 보여 우수한 항체로 인정되었다. 단지 15Ac-DON은 DON보다 10% 더 높았으나 이 독소는 광범위하게 높은 농도로 분포하고 있는 DON과는 달리 흔히 존재하는 독소가 아니어서 이에 대한 주의만 한다면 DON의 검출분석법으로 이용하는 데는 별 문제가 없는 것으로 생각된다.

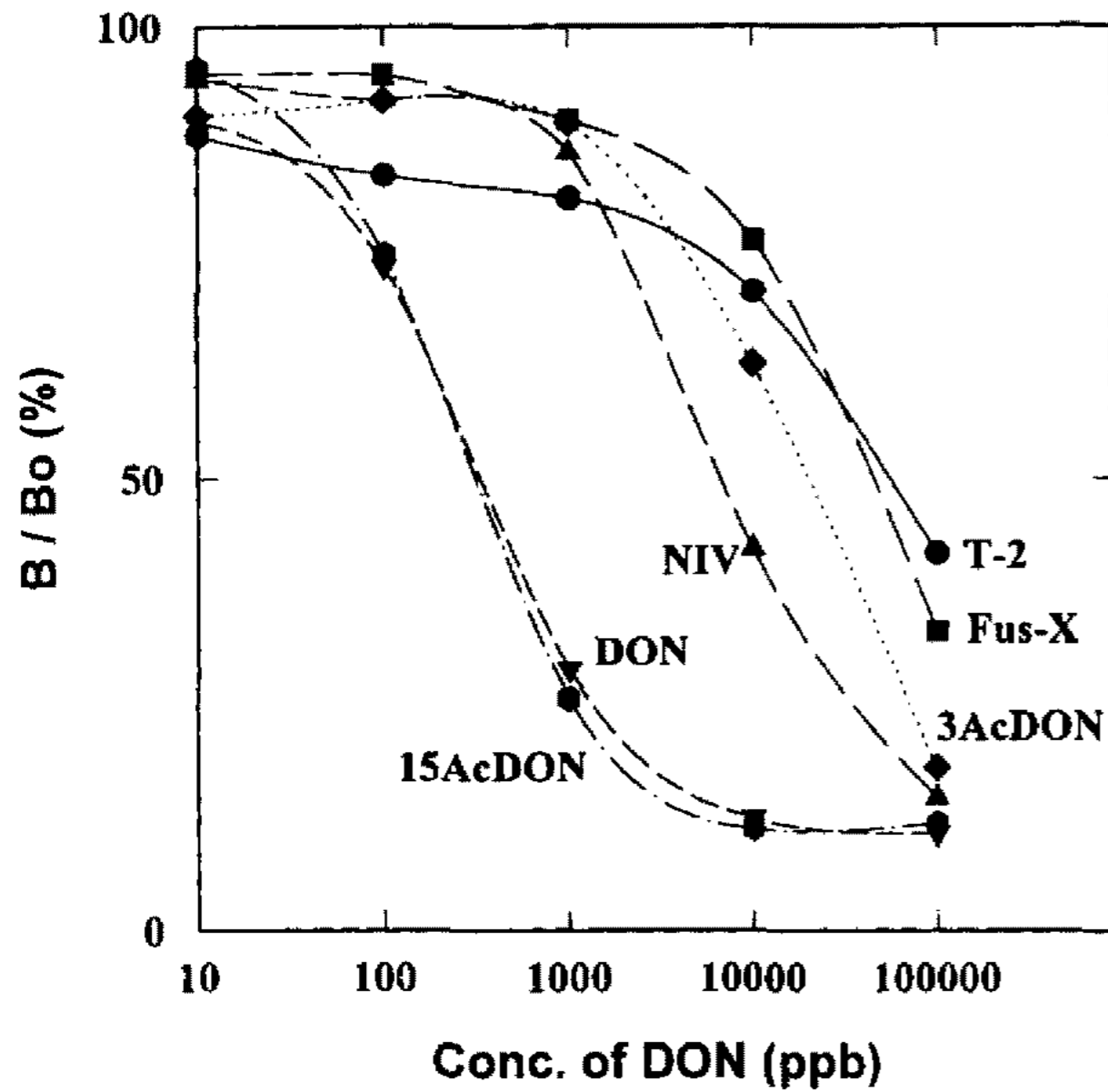


Fig. 2. Effect of different DON analogues on the binding of DON-HRP to anti-DON monoclonal antibody as determined by cdELISA.

cdELISA에 의한 DON의 회수율

시료에 DON 표준독소를 인위적으로 오염시킨 후 60% methanol로 추출하여 그 추출액을 희석하지 않고 직접 ELISA를 실시한 결과 회수율은 매우 불안정한 값을 나타내었다(data 생략). 이는 추출용매 및 옥수수 유래의 방해물질에 의한 영향 때문인 것으로 생각되었다. 따라서 옥수수 추출물을 washing buffer로 1/2, 1/3, 1/5 및 1/10 희석하고 여기에 독소를 첨가하여 ELISA를 행한 결과 1/5 및 1/10의 희석에서 안정된 표준곡선을 얻었다(Fig. 3).

다음으로 옥수수 시료의 추출물을 1/5로 희석하고 ELISA를 행하여 DON의 회수율을 구하였다. 그 결과, 200, 600, 2,000 및 6,000 ppb 농도의 처리구에서 각각 313, 163, 106 및 88.9%(평균, 168%)로 나타나 낮은 농도일수록 높은 회수율을 보였다. 그러나 600, 2,000 및 6,000 ppb의 세 처리구만의 평균회수율은 119%로 비교

Table 1. Cross-reactivity of DON and its derivatives with anti-DON monoclonal antibody as determined by cdELISA

Toxin	Toxin conc. displacing 50% of DON-HRP, µg/ml	Cross-reactivity ¹ %
DON	0.33	100
15Ac-DON	0.30	110
NIV	6.6	5.0
3Ac-DON	20	1.7
Fusarenon-X	46	0.72
T-2	56	0.59

¹ Conc. of DON displacing 50% of DON-HRP / Conc. of toxin displacing 50% of DON-HRP × 100

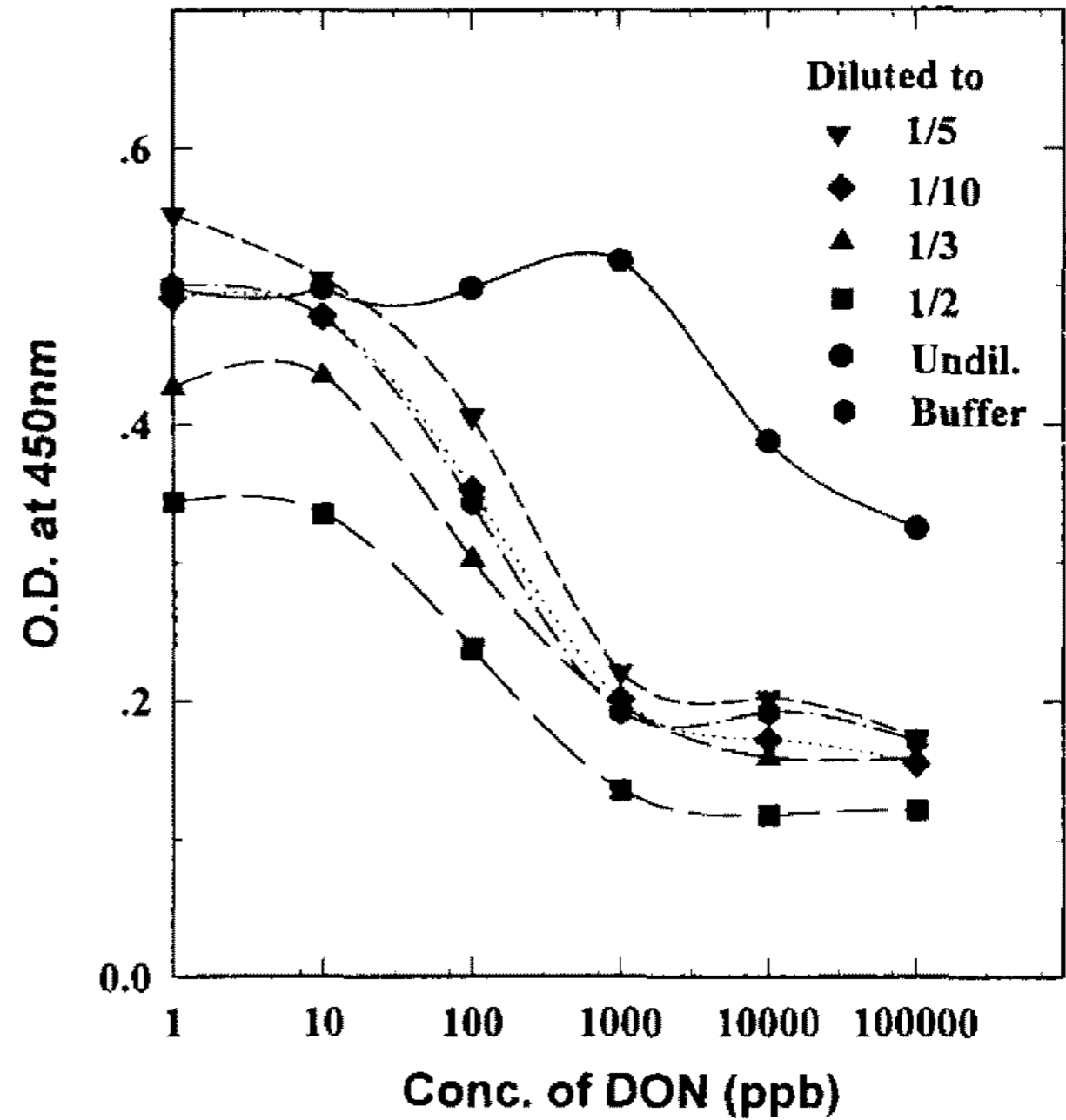


Fig. 3. Dilution effect of corn extract on the standard curve of cdELISA for DON. 60% methanol extracts of corn samples were diluted to 1/1-1/10 with washing buffer, and standard DON was solubilized into each diluents.

적 양호한 것으로 나타나, 약 500 ppb 이상의 DON을 검출하기 위한 assay에 매우 효과적으로 활용되어질 수 있을 것으로 생각되었다(Table 2). 한편, 1/10로 희석하여 assay한 결과 200, 600, 2,000 및 6,000 ppb에서의 회수율은 각각 850, 467, 215 및 122%(평균, 313%)로 나타나, 1/5로 희석한 경우보다 지나치게 높은 회수율을 보임으로써 분석에 부적합 하였다(data 생략). 따라서 다음 실험에서는 용매추출물을 washing buffer로 1/5 희석하여 assay하였다.

이러한 회수율 분석결과를 종합하면 Fig. 1의 표준곡선 상에서의 검출감도(검출한계, 3 ppb)보다 실제 시료 분석시의 검출감도(검출한계, 500 ppb)가 더욱 낮아지는 경

Table 2. Recovery of DON from spiked corns as determined by cdELISA

Added toxin, ng/g	Detected toxin ¹ , ng/g	Recovery, %
200	625 ± 127 (20.3)	313
600	975 ± 154 (15.8)	163
2,000	2,117 ± 418 (19.7)	106
6,000	5,333 ± 236 (4.4)	88.9
Mean of CV, %	15.1 [13.3] ²	
Overall recovery, %		168 [119] ²
SD		88.2 [31.7] ²
Mean CV		52.5 [26.6] ²

¹Mean of interassay (n=3) ± SD (CV, %). The concentration of extract diluted to 1/5 with washing buffer was determined with reference to the standard curve.

Table 3. Detection of DON in corn samples by cdELISA

Sample No.	Detected (ppb)	Sample No.	Detected (ppb)
Refrigerated in storage		Non-refrigerated in storage	
C- 1	1,750	C-15	3,125
C- 2	1,400	C-16	2,625
C- 3	1,500	C-17	2,000
C- 4	ND ¹	C-18	4,500
C- 5	ND	C-19	2,675
C- 6	ND	C-20	ND
C- 7	trace ²	C-21	2,500
C- 8	trace	C-22	2,250
C- 9	ND	C-23	2,500
C-10	trace	C-24	trace
C-11	1,425	C-25	2,700
C-12	ND	C-26	2,625
C-13	500	C-27	3,250
C-14	1,750	C-28	2,750
		C-29	2,800
		C-30	2,875
Number of samples	14		16
Average	595		2,448
S.D.	883		1,057
Range	0-2,750		0-4,500

¹ND: not detected, ²trace: below 250 ppb

향을 보였다. 또한, 본 실험방법은 경합적 직접 ELISA에 의한 것으로 Mills 등이 실시한 간접법과는 달리 2차항체를 처리하는 과정이 생략됨으로써 ELISA의 시행이 보다 간편하고 처리시간도 짧은 잇점이 있다.

옥수수시료중 DON의 오염현황

본 연구에서 확립한 cdELISA를 활용하여 실제 수입 옥수수시료중 DON의 오염현황을 분석하였다. 그 결과 분석에 사용한 전체시료의 평균오염치는 2,321 ppb이었으며, 냉장 및 상온보관상태 별로는 각각 595(검출범위, 0-2,750) 및 2,448(검출범위, 0-4,500) ppb를 나타냈다 (Table 3). 이러한 오염도의 차이는 독소의 오염이 곡물의 수확 및 수송중 뿐만 아니라 저장중에도 그 조건에 따라 곰팡이의 독소생산에 의해 오염도가 더 높아질 수 있음을 시사해주고 있다.

본 연구결과 대부분 국가의 허용기준치인 1 ppm 이상으로 DON에 오염된 옥수수 시료가 많은 것으로 나타나 농산물의 안전성 관리가 절실히 요구된다. 한편, DON은 북미와 유럽의 곡류재배지역에서 10 ppm까지 검출되었다는 보고가 있으며(11) 최근엔 낮은 농도의 DON에 오랫동안 노출됨으로써 야기되는 만성독성에 관한 관심이 커지고 있다. 따라서 본 연구에서 개발한 신속, 간이검출법인 cdELISA를 DON 오염시료에 대한 주기적이고 지속적인 분석에 적극 활용할 필요가 있다고 생각된다.

요 약

옥수수 시료내 deoxynivalenol(DON)의 검출을 위한 효소면역측정법(ELISA)의 개발을 위하여 특이적인 단일클론항체를 생산하고 ELISA조건을 확립하였다. 면역원으로는 DON-hemiglutarate-bovine serum albumin (DON-HG-BSA)을 면역원으로 사용하였다. 면역생쥐의 비장세포와 골수종세포 Sp2/0를 융합하여 항DON 항체를 생산하는 hybridoma세포 3G7를 ELISA로 선발하였다. 3G7이 생성하는 단일클론항체와 DON-HRP conjugate를 사용하여 DON에 대한 경합적 직접 ELISA(cdELISA)를 실시한 결과 DON의 검출범위는 3-3,000 ng/ml(ppb)을 나타내었다. 단일클론항체의 DON유사독소와의 교차반응을 경합적 직접 ELISA를 통해 조사한 바 DON, 15 acetyl-DON, nivalenol, 3 acetyl-DON, fusarenon-x 및 T-2에 대해 각각 100, 110, 5.0, 1.7, 0.72 및 0.59%를 나타내 15 acetyl-DON을 제외하고는 대부분의 교차반응율이 매우 낮았다. DON의 최종농도를 200, 600, 2,000 및 6,000 ppb가 되도록 옥수수 시료에 오염처리한 후, 60% 메탄올로 추출하고 그 추출물을 washing buffer로 5배 희석한 다음 cdELISA를 실시하였을 경우, 그 회수율은 각각 313, 163, 106 및 88.9%(평균, 168%)를 나타냈다. cdELISA로 냉장 및 상온보관된 30개의 옥수수 시료에서의 DON 오염정도를 조사한 결과 평균검출율은 각각 595(검출범위, 0-2,750) 및 2,448(검출범위, 0-4,500) ppb로 상온보관시료에서 더 높은 농도로 검출되었다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처의 '95 국책연구개발사업(UR대응농업기술사업)으로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다. 또한, 옥수수 시료 및 DON의 유사독소들을 제공해주신 서울대학교 농생물학과의 이인원 교수께 감사드립니다.

참고문헌

1. Abouzied, M. M., M. N. Beremand, S. P. McCormick and J. J. Pestka. 1991. Reactivity of Deoxynivalenol (vomitoxin) monoclonal antibody towards putative trichothecene precursors and shunt metabolites. *J. of Food Protection*, **54**: 288-290.
2. Arnold, D. L., P. F. McGuire, E. A. Nera, K. F. Karpinski, M. G. Bickis, Z. Z. Zawadzka, S. Fernie and Vesonders, R. F. 1986. The toxicity of orally administered deoxynivalenol (vomitoxin) in rats and mice. *Food and Chemical Toxicology*, **24**: 935-941.
3. Casale, W. L., J. J. Pestka and Hart, L. P. 1988. Enzyme

- linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for deoxynivalenol (vomitoxin) and several analogues. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, **36**: 663-668.
4. Chu, F. S., Zhang, G. S., Williams, D. and Jarvis, B. B. 1984. Production and characterisation of antibody against deoxyverucarol. *Applied Environmental Microbiology*, **48**: 781-784.
 5. Gendloff, E. H., W. L. Casale, B. P., Ram, J. H. Tai, J. J. Pestka and Hart, L. P. 1986. Hapten protein conjugates prepared by the mixed anhydride method-cross-reactive antibodies in heterologous antisera. *J. of Immunological Methods*, **92**: 15-20.
 6. Goding, J. W. 1983. Monoclonal antibodies: Principles and practice. Academic Press. New York.
 7. Jelink, C. F., Pahland, A. E. and Wood, G. E. 1989. Review of mycotoxin contamination. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem*, **72**: 223-230.
 8. Mills, E. N. S. M. Alcock, H. A. Lee and Morgan, M. A. 1990. An enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in wheat, utilizing novel hapten derivatization procedures. *Food & Agricultural Immunology*, **2**: 109-118.
 9. Pestka, J. J. and F. S. Chu. 1984. ELISA of mycotoxins. *J. Food Protect.* **47**: 305-308.
 10. Rotter, B. A., D. B. Prelusky and Pestka, J. J. 1996. Review: Toxicology of deoxynivalenol. *J. of Toxicology and Environmental Health*, **48**: 1-34.
 11. Scott, P. M. 1991. Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains. In cereal grains. *Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*, ed., J. Chelkowski, pp, 529-572. Amsterdam: Elsevier.
 12. Vesonder, R. F., Ciegler, A. and Jensen, A. H. 1973. Isolation of the emetic principle from Fusarium-infected corn, *Applied Microbiology*, **26**: 1008-1010.
 13. Yoshizawa, T. and Morooka, N. 1973. Deoxynivalenol and its monoacetate: new mycotoxins from Fusarium roseum and mouldy barley. *Agricultural Biological Chemistry*, **37**: 2933-2934.
 14. Zhang, G., S. W. Li and Chu, F. S. 1986. Production and characterisation of antibody against deoxynivalenol triacetate. *J. of Food Protection*, **49**: 336-339.
 15. Zola, H. 1987. Monoclonal antibodies: *A manual of techniques*, CRC press.

(Received 3 March 1997)