

Zearalenone ELISA kits의 응용에 관한 연구

윤화중 · 김태종 · 이승윤 · 제갈준 · 윤지병*

전국대학교 축산대학 수의학과
중앙가축전염병연구소*
(1998년 3월 19일 접수)

Studies on practical application of zearalenone ELISA kits

Hwa-joong Yoon, Tae-Jong Kim, Sung-Yun Lee, Jun JeGal, Ji-Byung Yoon*

Department of Veterinary Medicine, College of Animal Husbandry Kon-kuk University
Choong Ang Animal Disease Laboratory*

(Received Mar 19, 1998)

Abstract : For the extraction and measurement of zearalenone in the corn, bean, wheat and barley contaminated with *Fusarium graminearum*, the zearalenone-oxime, zearalenone-oxime BSA and zearalenone monoclonal antibodies were studied to develop and apply the direct competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The extraction range of zearalenone with the monoclonal antibodies produced in this experiment was 10ng to 500ng/g feed and the 50% inhibition value was 50ng/ml. The mean recoveries of zearalenone artificially spiked in the ground corn were 89%. The specificity of F-2 monoclonal antibody for the analogues was favorable for the direct competitive ELISA. The result of the experiment showed the zearalenone in the corn, bean, wheat and barely naturally contaminated with the mold would be suitable for extraction and measurement with the monoclonal antibodies.

Key words : Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), zearalenone, zearalanone, cross reaction, monoclonal antibody.

서 론

최근 우리나라 축산의 급진적인 발전으로 대량 이용

되고 있는 농후사료의 원료인 옥수수과 콩이 대부분 외국으로부터 수입되어 사용되고 있으므로 이들의 완전한 검사가 필요할 뿐만 아니라 수입곡물의 보관을 위한 완전한 위생적 보관소도 미비한 실정이므로 외국에서와

이 논문은 1995년과 1996년도 과학재단과 중앙가축전염병연구소의 지원에 의한 논문임.

Address reprint requests to Dr. Hwa-joong Yoon, College of Animal Husbandry, Kon-kuk University, 93, Mojin-dong, Kwangjin ku, Seoul, 143-701, Republic of Korea.

같이^{1,2} 곡물내 곰팡이 증식과 이들의 대사산물인 독소가 생산되어서 위발정에 의한 번식장해의 피해를 돼지를 비롯한 가축에서 자주 발생되고 있다. 우리나라의 기후는 일본과 대만을 비롯한 아시아의 다른 나라들과 비슷하여 *Fusarium graminearum*의 성장과 독소생산에 대단히 좋은 기후조건을 갖추고 있다^{2,6}. 이러한 곰팡이 독소 중 Zearalenone은 옥수수과 콩으로 된 곡류사료에 함유되어 돼지를 비롯한 각종 가축에 지대한 경제적 손실을 가져오고 있다⁶. Zearalenone은 돼지에서 위발정을 일으켜서 번식장해를 가져오므로 경제적 손실이 크다^{3,4}. 또한 zearalenone은 간에서 α 및 β -zearalenol로 전환되어 그 대사산물이 우유로 분비되어 나온다. 이러한 독소는 μ 나 ng의 미량이 사료내에 함유되어도 동물들의 건강에 심각한 문제를 야기할 수 있다. 그러므로 이러한 독소는 민감한 곰팡이 독소 추출방법으로 양질의 사료만이 사용되도록 독소 추출방법이 개선되어야 되겠다. 농후사료내에 함유된 곰팡이 독소를 정량하는 방법으로는 TLC^{8,9,10}, GC^{11,12}, HPLC¹³⁻¹⁵ 및 시도중인 GC-MSD 등의 화학분석법이 있으나 많은 시간과 다양한 화학제 및 고가의 기구 그리고 전문인력이 필요하므로 시간 및 경제적으로 많은 문제점을 내포하고 있을 뿐만 아니라 시료를 정제하는데 안전성의 확보도 큰 문제이다. 짧은 시간에 측정이 가능하도록 RIA법^{16,17} 개발·이용되고 있으나 방사성 물질의 위험성과 폐기물의 처리가 문제점으로 되어있다.

최근에 개발된 항원항체반응에 의한 면역분석법(ELISA)¹⁸⁻²⁴은 빠르고 특이성이 있으며 감지성이 뛰어나고 저렴하여 경제성이 있는 곰팡이 독소의 분석법으로 외국에서 최근 개발되어 많이 이용되고 있다. 우리나라에서도 이러한 연구가 수행되어 보고된 바 있으며²⁵ 계속하여 높은 감도의 항체생산, 효과적인 시료처리 및 반응조건 개선 등이 여러 연구기관에서 연구되어 오고 있다. 본 연구에서도 zearalenone을 검정하기 위한 연구결과로 특이성이 높은 단크론 항체와 간편한 시료의 처리방법 및 direct competitive ELISA법이 이루어져 사료내 zearalenone을 간편하게 검정할 수 있게 되어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

Z-oxime : Z-oxime의 제조는 Thouvenot¹⁶의 방법을 변형하여 만들었다. Sigma사(USA)로부터 구입한 zearalenone

50mg에 pyridine PNPP(p-nitrophenyl phosphate, disodium) 2ml를 넣어 vortex로 2분간 용해시키고, Sigma사로부터 구입한 carboxymethylamine 1-ethyl-3(3-dimethylamino-propyl) 100mg을 다시 넣어 5분간 vortex로 혼합한 후, 60℃의 진탕배양기에서 2일간 반응시켜서 진공을 가하여 evaporator에서 3일간 건조시켰다. 그 잔유물에 sodium hydroxide, pH 8.0의 증류수 25ml를 넣어 다시 vortex에서 5분간 용해시켰다. Sigma사(USA)에서 구입한 benzene 25ml를 가하여 물층에서 변화되지 않는 zearalenone을 제거했다. 형성된 hapten은 pH 1.0의 HCl을 가함으로써 결정화된 침전물의 형성이 확인되었으며, 다시 ethyl acetate 100ml를 4회에 걸쳐 추가로 넣어 hapten을 추출하였다. 추출된 hapten은 건조된 후 TLC(chloroform : methanol=1 : 1의 전개액을 이용한 후 aluminum chloride in methanol solution 40%(w/v)를 분사하고 hot chamber (60℃)에서 황산에 2일간 반응)로 다시 확인하고 진공상태로 evaporator에서 완전 건조한 후 Z-oxime-BSA 제조에 이용했다. 본 실험에서 건조는 장시간(2일 내지 3일간)이 소요되었으므로 독소의 분해를 방지하기 위하여 광선으로부터 보호하기 위한 암막장치내에서 시행되었다.

Z-oxime-BSA : 생산된 hapten 25mg을 dioxane 5ml에 용해하고, pH 6.0의 증류수 10ml에 Sigma사에서 구입한 50mg의 BSA가 함유된 용액을 혼합하였으며, 완전한 용해를 위해 Branson ultrasonics(USA)사의 sonicator에서 10분간 초음처리하였다. HCl로 pH 6.0을 유지하면서 Sigma사에서 구입한 carbodiimide 300mg을 1시간동안 서서히 혼합하였다. 그 용액은 실온에서 24시간동안 진탕배양기에서 반응되었다. 다시 300mg carbodiimide를 추가로 가하여 48시간동안 진탕하였다. Z-oxime-BSA는 30% dioxane 용액으로 5회 세척한 후 600g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 투석했다. Zearalenone-oxime-BSA 용액은 4℃의 2 l deionized water에서 3일간 투석되었는데 12시간마다 deionized water를 교체하였다. 항원의 농도는 PM10 membrane으로 고정된 Amicon cell에 ultrafiltration한 후 측정하였다. 결국 1mg protein이 1ml에 함유되도록 증류수로 희석하여 millipore사(USA)의 0.45 μ m membrane filter로 여과시켜 멸균하였다. 초자엠펙에 1ml씩 분병하여 동결건조한 후, -70℃의 냉동기에 보관하여 사용하였다. BSA에 결합된 hapten의 양은 310nm의 흡광도로서 측정되었고, 305nm에서 같은 농도의 BSA 용액 흡광도와 BSA-hapten의 흡광도를 비교하였다. 그리

고 protein 농도는 Biuret 방법으로 측정하였다. Z-oxime-HRP는 Z-oxime-BSA가 만들어질때의 방법과 같았으며, BSA대신 HRP를 이용했다.

Immunization and hybridoma production : Monoclonal antibody 생산을 위하여 Z-oxime-BSA conjugate의 1mg/ml (0.9% normal saline)을 Freund complete adjuvant 1ml에 유화(emulsified)하여 1차 면역을 실시하였고, 또한 4주후에 booster로서 1ml Freund complete adjuvant로 유화하여 재면역을 실시하였다. Freund complete adjuvant에 유화된 150 μ g 항원(Z-oxime-BSA) 0.3ml를 한국유전공학연구소에서 구입한 8주령의 Balb/C 암쥐 3마리에 피하로 0.2ml 그리고 복강내로 0.1ml씩 투여하여 1차 면역을 시켰다. 4주후 incomplete adjuvant에 유화된 150 μ g의 항원 0.3ml를 그 쥐들에 피하주사하여 재면역시켰다. 면역된 쥐의 혈청을 안저정맥에서 100 μ l씩 채취하여 indirect ELISA로 Ab의 역가(titer)를 측정하였다. 그 혈청은 1차 면역된 혈청과 비교하여 역가가 가장 높은 1마리의 쥐에 최종 booster로 150 μ g의 Ag이 함유된 0.3ml의 incomplete adjuvant가 도살 3일전에 복강내로 최종 투여되었다.

최종 항원투여후 3일에 쥐를 경추탈구로 도살하여 hood내에서 무균적으로 spleen을 추출하여 hemolysing buffer로 RBC를 제거한 후 200 ϕ filter로 여과하여 spleen cells를 회수하였다. 회수된 spleen cells를 Gibco사로부터 구입한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에 부유시켰다. ATCC사(USA)로부터 구입한 myeloma cells(SP2/O-Ag 14 mouse myeloma cell line)는 1개당 비장 세포 2의 비율로 DMEM 배지에 혼합하였다. 비장세포와 myeloma 세포를 혼합한 후 600g로 5분간 다시 원심분리하였다. 그 세포들의 융합은 37 $^{\circ}$ C의 항온실에서 DMEM 배지에 Boeringer사로부터 구입한 0.5ml의 50% PEG (polyethylene glycol)용액을 2분동안 가한 후 22 $^{\circ}$ C에서 10분간 조용히 진탕하여 융합시켰다. 융합된 세포의 농도는 HAT배지에 ml당 10⁶ 세포수로 희석하여 수의과학연구소로부터 구입한 ICR mice에서 채취한 복강내 대식세포인 feeder cells(4 \times 10⁵/ml)가 깔린 96-well feeder plates에 옮겨 배양했다.

ELISA screening for the selection of antibody producing clones : 세포융합 2주후에 항체생산을 확인하기 위하여 각 plates의 wells를 검정하였다. Z-oxime-BSA로 코팅된 96 well plates에서 각 cell line들은 indirect ELISA로 검정하였다. 그 plates는 4 $^{\circ}$ C에서 하루밤을 coating(50ng/well)한

후, 결합되지 않은 Z-oxime-BSA를 제거하기 위하여 phosphate-buffered saline tween 20으로 5회 세척하였다. 비결합부 solid phase sites의 특이성을 차단하기 위하여 1% BSA의 PBS 용액을 각 well에 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시켰다. 세척후 배양된 cell lines의 부유액 50 μ l를 그 plates의 각 well에 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시켰다. 그 plates는 다시 세척된 후 goat anti-mouse peroxidase-labelled Ig G의 50 μ l가 PBS 1000에 대하여 항체 1의 비율로 희석되어 각 well에 주입되었다. 그 plates는 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시킨 후 Sigma사에서 구입된 50 μ g의 OPD(O-phenylene-diamine)를 발색제로 가했다. 그 plates는 20분간 반응된 후 450nm의 흡광도에서 측정하였다. 양성반응을 나타내는 clone들은 같은 방법으로 재검사를 실시하였다. 항체생산을 위하여 Z-oxime-BSA에 양성을 나타내고 BSA에 음성을 나타낸 cell lines는 같은 방법으로 재검사를 실시하였다.

Production of ascitic fluids : Ab의 대량생산을 위하여 Balb/C mice의 복강내에 0.5ml Freund incomplete adjuvant를 주입한 1주일 후, PBS에 1 \times 10⁷/ml로 spleen cell과 myeloma cell이 융합되어 배양된 항체생산성이 좋은 hybridoma cells 5ml를 Balb/C mice의 복강내에 다시 주입하였다. 임신한 것과 같이 복강이 종창된 쥐들의 복수를 회수하여 ϕ 0.45 μ m membrane filter에 여과하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관해 이용토록 하였다.

Isotyping of monoclonal antibody : Gibco사로부터 구입된 immunoselect(Gibco, cat, No. 966OSA monoclonal antibody based isotyping system for mouse immunoglobulin)가 단클론항체의 isotyping에 이용되었다. Coating buffer내 monoclonal rat anti-mouse Ig antibody를 well당 0.1ml씩 주입하여 4 $^{\circ}$ C에서 하루밤 coating하였다. 각 well은 PBS/Tween 20으로 5회 세척한 후 배양중의 생산된 hybridoma cells의 상층액을 well당 0.1ml씩 주입하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시켰다. 각 well은 다시 PBS/Tween 20으로 5회 세척한 후 polyclonal rat anti-mouse Ig alkaline phosphates의 0.1ml를 well 마다 주입하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시켰다. 한시간 후에 각 well을 다시 PBS/Tween 20으로 5회 세척한 후 Sigma사로부터 구입한 substrate인 PNPP(p-nitrophenyl phosphate disodium)를 가하여 30분동안 실온에서 반응시켰다. 흡광도는 ELISA reader(Bio-Tec. instruments, EL311)로 405nm에서 측정하였다.

Direct competitive ELISA : 생산된 항체에 대한 typical direct competitive ELISA standard curve의 범위는 10ng에서 500ng/ml 사이였다. 방법은 Warne *et al*²⁷의 방법을 따랐다.

Determination of specificity : 생산된 anti-zearalenone의 crossreaction은 다음의 독소들에서 사용되었다. 즉, α -zearalenol, β -zearalenol, zearalanone, α -zearalanol 그리고 β -zearalanol 등이다.

Recovery of zearalenone spiked in the ground corn : 옥수수분말 5g에 순수한 zearalenone을 10에서 500ng까지 단계별로 추출하기 1일전에 혼합하였다. 1일후 그 시료는 추출용매액(Ethanol 80 : Water 20) 20ml와 1시간동안 진탕하였다. 상층액 100 μ l를 1로 하여 PBS-Tween과 1 : 25나 1 : 50으로 희석하여 direct competitive ELISA로 측정하여 정량하였다. 생산된 항체반응에서 시료중의 zearalenone을 측정하기 위하여 이미 얻어진 순수 zearalenone의 표준곡선에 시료중의 zearalenone을 비교하여 그 함량을 측정하였다.

결 과

Zearalenone-oxime-BSA와 Zearalenone-oxime-HRP를 만들기 위한 양질의 Zearalenone-oxime의 conjugates는 Thouvenot *et al*¹⁶이 보고한 방법을 변형하여 생산했다. 쥐들을 면역하기 위해 제조된 Zearalenone-oxime conjugates로 양질의 Zearalenone-oxime-BSA가 제조되었고, marker로 이용된 양질의 Zearalenone-oxime-HRP도 제조하였다.

특이성이 높은 hybridoma cells의 상층액이 단계별로 희석되어 goat-anti-mouse peroxidase-labeled IgG와 항원항체반응시험을 한 결과는 Fig 1에서와 같이 나타났다. F-2 toxin을 분비하는 가장 좋은 hybridoma cells을 쥐의 복강 내에 주입하여 myeloma 육종이 형성된 쥐의 복수도 indirect competitive ELISA로 검사한 결과 질이 좋게 나타

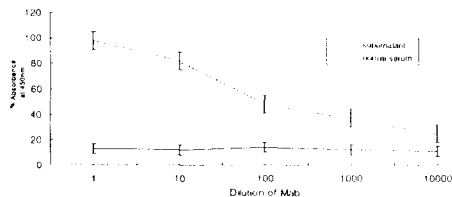


Fig 1. Reactivity of the monoclonal antibody (MAb) to the Zearalenone by ten fold serial dilution.

났다.

Fig 2는 zearalenone과 복수를 direct ELISA로 검사한 결과 표준곡선의 반응범위는 10ng으로부터 500ng/ml 사이였고, zearalenone의 50% inhibition value는 50ng으로 나타났다.

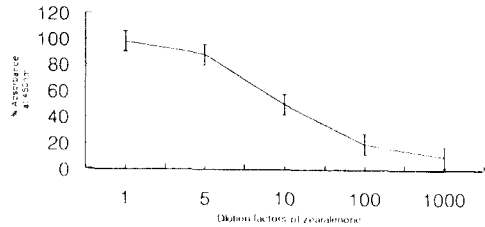


Fig 2. Sensitivity of the monoclonal Ab to Zearalenone.

Monoclonal antibody의 isotyping은 IgG2a와 λ type light chain의 subclass로 이루어졌다. Table 1에 나타내는 anti-zearalenone의 특이성(specificity)을 결정하는 crossreaction에서 zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, zearalanone, α -zearalanol 및 β -zearalanol에서 α -zearalenol과 zearalenone은

Table 1. Cross reactivity of zearalenone analogue

Mycotoxin	Cros reactivity(%)*
Zearalenone	100
α -zearalenol	91
β -zearalenol	21
Zearalanone	125
α -zearalanone	43
β zearalenone	8

* (50% inhibition of toxin concentration / 50% inhibition of detected mycotoxin) \times 100.

Table 2. Recovery of Zearalenone from artificially added ground corn

Zearalenone (ng/g)	Detected amount(ng/g) (60ng~2,000ng)	Recovered amount (%)
50	45	90%
100	92	92%
200	178	89%
400	360	90%
500	445	89%

* Each sample was infected in three parallel experiments and then extracted and assayed by three replications.

91%와 125%의 반응을 나타냈지만 α -zearalenol은 43% 그리고 β -zearalenol과 β -zearalanol은 21%와 8%를 나타냈다.

인위적으로 zearalenone을 추가혼합한 분쇄옥수수에서 zearalenone의 회수율은 Table 2에서와 같이 90%를 나타냈다.

고 찰

Zearalenone-oxime conjugates는 Thouvenot *et al*¹⁶의 방법을 일부 변형하여 생산하였다. Zearalenone, pyridine 및 carboxymethoxylamine은 Thouvenot *et al*¹⁶이 사용한 것보다 더 많은 양이 소요되었으며, 용해가 어려워 sonicator를 이용한 것은 새로운 시도였다. 이들의 결합반응시에는 60°C에서 2일간 진탕배양기가 이용되었다. 이러한 방법은 Thouvenot *et al*¹⁶의 방법과 차이가 있었다. 그리고 HCl(pH 1.0)은 crystal을 확인하는데 사용되었으며, 건조는 vacuum evaporator에서 이루어졌다. 이러한 방법으로 양질의 zearalenone-oxime conjugates를 생산하였다.

본 실험에서 생산된 zearalenone-oxime을 zearalenone-oxime-BSA를 제조하는데 사용되었다. Dioxane 5ml에 50mg의 BSA가 함유된 10ml의 증류수(pH 6.0)를 가하여 25mg의 zearalenone-oxime을 용해할 때 완전한 용해를 돕기 위하여 sonicator가 이용되었다. 또한 투석시에는 보통의 일반 증류수 대신 deionized water가 사용되었다. 생산된 zearalenone-oxime-BSA conjugate와 zearalenone-oxime-HRP conjugates는 zearalenone 검출을 위한 ELISA에 이용한 결과 특이성이 높은 protein conjugates였다. 제조방법과 소요시간 등은 보고된 연구자들^{20,24}과 약간의 차이는 있었으나 결과에서는 차이를 인정할 수 없었다.

항체의 isotyping에서 IgG, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM, IgA, κ and λ chains가 내포된 monoclonal antibody-based isotyping system을 이용했다. 본 실험에서 얻어진 anti-Zearalenone의 monoclonal antibody는 IgG_{2a}로서 λ -type의 light chain을 가지고 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 다른 연구자들의 보고와 유사하였다.²

Monoclonal antibody 생산을 위하여 만들어진 480여개의 Hybridoma cells 가운데 3주의 Hybridoma cell이 특이성이 높은 항체를 생산하였다. 좋은 항체를 실험에 이용하기 위하여 특이성이 가장 높은 cell-line을 Balb/C mice 복강내에 주입한 후 복수액을 취하였다. 그 항체의 시험 결과는 Fig 1에서 보여주고 있다. Fig 1에서의 항원항체

반응은 가장 좋은 hybridoma cell을 함유한 well의 상등액을 단계별로 희석한 것들의 결과를 나타내 주고 있다.

가장 강한 양성반응을 나타낸 hybridoma cells을 대량 배양하여 쥐의 복강내에 주입하여 얻어진 쥐의 복수는 indirect competitive ELISA test 방법으로 특이성 및 민감도를 조사하였으며, 그 결과는 우수하였다. 생산된 항체에 대한 zearalenone의 direct competitive ELISA의 표준곡선을 나타내는 Fig 2에서 나타난 유효반응범위는 10ng에서 500ng/ml였으며, zearalenone 농도의 50% inhibition value는 50ng으로 본 실험에서 얻어진 복수내 항체들은 우수하였다.

인위적으로 zearalenone을 혼합하여 추출할 때의 용매제는 methanol 대신 ethanol(ethanol 80 : water 20)²⁴을 사용하여 좋은 결과를 얻었으므로 추출용액과 추출방법이 더욱 간편하게 되었다. 특이성을 결정하기 위한 anti-zearalenone의 cross reactivity 시험에서 나타난 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서 α -zearalenol, β -zearalenol, zearalanone, α -zearalanol 및 β -zearalanol과 anti-zearalenone과의 교차반응에서 α -zearalenol과 zearalanone은 90%의 특이성을 나타냈으나 β -zearalenol과 β -zearalanol은 20% 정도로 매우 낮은 특이성을 나타냈으며, α -zearalanol은 69%의 특이성을 나타냈다. 이러한 결과는 약간의 차이는 있으나 다른 연구자들이 보고한 결과와 비슷하였고 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.^{4,26}

Zearalenone을 인위적으로 혼합한 분쇄옥수수에서의 생산된 항체를 이용하여 zearalenone을 회수한 결과는 Table 2에 보여주는 바와 같다. 그리고 zearalenone의 회수율은 89%였으며 상당히 좋은 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 다른 연구자들의 보고와 약간의 차이가 있었다.^{24,27}

본 실험에서 얻어진 항체와 enzyme tracer의 단기간 안전성을 연장하기 위하여 polystyrene plates의 표면에 항체를 미리 반응시켜 놓으면 6개월 이상 유효하게 이용될 수 있다. 또한 enzyme labelled toxins도 ammonium sulfate 용액에 미리 희석해둠으로서 6개월 이상 안전하게 이용할 수 있다. 이러한 연구의 결과는 zearalenone의 추출량을 측정하는데 앞으로 적용될 수 있다. 향후 연구과제는 toxin의 추출을 간편하게 하고 특이성을 높여 극소량의 함유시에도 특이적으로 검출이 가능하도록 효율을 높이는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

최근 우리나라를 비롯하여 세계적 현안으로 주시되고 있는 곰팡이 독소에 의한 가축들의 피해는 날로 증가되어 가고 있다. 이러한 문제들을 근본적으로 줄이고 해결하기 위해서는 곰팡이 독소가 생산되지 못하게 하여야 할 것이다. 그러나 기후조건을 비롯한 주위환경의 부득이한 사정으로 목적이 이루어지지 못하고 있다. 이러한 곰팡이 독소에 의한 가축의 피해를 줄이기 위해 곰팡이 독소들을 분석하는데 화학방법 및 RIA법 등이 개발 이용되고 있으나 모두 흡족한 방법이 되지 못하고 있다. 최근 이들의 분석법보다 여러면에서 간편하고, 안전하며 경제적인 방법이라 생각되는 ELISA법이 개발이 이용되고 있다.

본 시험에서는 zearalenone의 ELISA를 이용한 분석을 위하여 연구한 결과 다음과 같은 성과를 얻었다. 양질의 zearalenone-oxime의 protein conjugate가 제조되고, 면역력이 우수한 zearalenone-oxime-BSA가 제조되었으며, 반응력이 뛰어난 Z-oxime-HRP도 제조되었다. 이러한 protein conjugates로 감응도가 높은 양질의 anti-zearalenone의 monoclonal antibodies를 생산하여 zearalenone의 분석을 위한 좋은 kits를 제조할 수 있는 기틀이 되었다.

참 고 문 헌

1. Hart LP, Braselton WE, Stebbins TC. Production of zearalenone and deoxynivalenol in commercial sweet corn. *Plant Dis*, 66:1133-1135, 1982.
2. Shotwell OL, Goulden ML, Bennett GA, et al. Survey of 1975 wheat and soybeans for zearalenone, aflatoxin and ochratoxin. *J Assoc Offic Anal Chem*, 60: 778-783, 1977.
3. Hidy PH, Baldwin RS, Greasham RL, et al. Zearalenone and some derivatives : production and biological activities. *Adv Appl Microbiol*, 22:59-82, 1977.
4. Stob M, Baldwin RS, Tuite J, et al. Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature*, 196:1318, 1962.
5. Mirocha CJ, Pathre SV, Robison TS. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bo-

- vine milk. *Food Cosmet Toxicol*, 19:25-30, 1981.
6. Hagler WM, Danki GY, Horath L, et al. Transmission of zearalenone and its metabolites into ruminant milk. *Acta Vet Acad Sci Hung*, 28:209-216, 1980.
7. Mirocha CJ, Christensen CM, Nelson GH. F-2(zearalenone) estrogenic mycotoxin from *Fusarium*. *Microbial Toxins*, 7:107-138, 1971.
8. Swanson SP, Corley RA, White DG, et al. Rapid thin layer chromatographic method for determination of zearalenone and zearalenol in grains and animal feeds. *J Assoc Offic Anal Chem*, 65:580-582, 1984.
9. Gimeno A. Rapid thin layer chromatographic determination of zearalenone in corn, sorghum, and wheat. *J Assoc Offic Anal Chem*, 66:565-569, 1983.
10. Association of official analytical chemists. Book of Methods, 14th ed. AOAC, Washington, D.C. Sec, 26: 124-126. 132.
11. Thouvenot DR, Morfin RF. Quantitation of zearalenone by gas-liquid chromatography on capillary glass columns. *J Chromatogr*, 170:165-170, 1979.
12. Hold CL, Nony CR, Bowman MC. Trace analysis and/or zearalenol in animal chow by high pressure liquid chromatography and gas-liquid chromatography. *J Assoc Offic Anal Chem*, 60:272-278, 1977.
13. Devries JW, Chang HL. Comparison of rapid high pressure liquid chromatographic CB method for determination of aflatoxins in corn and pleanuts. *J AOAC*, 67:597-600, 1984.
14. Toshitsugu Tanaka, Akihiko Hasegawa, Susumu Yamamoto, et al. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* Mycotoxins. Nivalenol, Deoxynivalenol and zearalenone. Survey of 19 countries. *J Agric Food chem*, 36:979-983, 1988.
15. Scott PM, Panalaks T, Kanhere S, et al. Determination of zearalenone in cornfleakes and other corn based foods by thin layer chromatography, high pressure liquid chromatography and gas-liquid chromatography. *J Assoc Offic Anal Chem*, 61:593-600, 1978.
16. Thouvenot D, Morgin RF. A radioimmunoassay for zearalenone and zearalenol in human serum. : production, properties, and use of porcine antibodies. *Ap-*

- plied and Enviromental Microviology*, Jan. 16-23, 1983.
17. Pestka JJ, Yaguan Li, Chu FS, *et al.* Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxins in milks. *J AOAC*, 64:294-301, 1981.
 18. Usleber E, Renz V, Martlbauer E, *et al.* Studies on the application of enzyme immunoassays for the Fusarium-mycotoxins Deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone. *J Vet Med*, B39:617-627, 1992.
 19. Juan IA, Mohamed MA, Pestka JJ. Detection of zearalenone by tandem immunoaffinity-enzyme-linked immunosorbent assay and its application to milk. *J Food Protection*, 53:577-580, 1990.
 20. Macdougald OA, Thulin AJ, Pestka JJ. Determination of zearalenone and related metabolites in porcine urine by modified enzyme-linked immunosorbent assay. *J Assoc Off Anal Chem*, 73:65-68, 1990.
 21. Dixon DE, Warner RL, Ram BP, *et al.* Hybridoma cell line production of a specific monoclonal antibody to the mycotoxin zearalenone and α -zearalenol. *J Assoc Offic Anal Chem*, 35:122-126, 1987.
 22. Liu MT, Ram BP, Hart LP, *et al.* Indirect enzyme linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone. *Appl Environ Microbiol*, 50: 332-336, 1985.
 23. Reiko Teshima, Masako Kawase, Touichi Tanaka, *et al.* Production and characterization of a specific monoclonal antibody against mycotoxin zearalenone. *J Agr Food Chem*, 38:1616-1622, 1990.
 24. Ildiko Barna-vetro, Agnes Gyongyosi and Laszlo Sorti. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of Fusarium T-2 and zearalenone toxins in cereals. *Applied and Enviromental microbiology*, Feb:729-731, 1994.
 25. Jeung KH, Chung DH, Kim SY. Development of enzyme linked immunosorbent assay for determination of zearalenone in animal feeds. *Kor J Food Hygiene*, 6:111-117, 1991.
 26. Pestka JJ, Liu MT, Knudson BK, *et al.* Immunization of swine for production of antibody against zearalenone. *J Food protection*, 48:953-957, 1985.
 27. Warner R, Ram BP, Hart LP, *et al.* Screening for zearalenone in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay. *J Agr Food Chem*, 34:714-717, 1986.
-