(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0078268
(43) 공개일자 2010년07월08일

(51) Int. Cl.
C07B 63/00 (2006.01) *C07C 71/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0136478
(22) 출원일자 2008년12월30일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
주식회사농심
서울시 동작구 신대방동 370-1
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
박수현
경기도 성남시 분당구 금곡동 143 청솔마을 701-1201
김승욱
서울특별시 노원구 공릉2동 737번지 삼익아파트 104동 905호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
서원호

전체 청구항 수 : 총 4 항

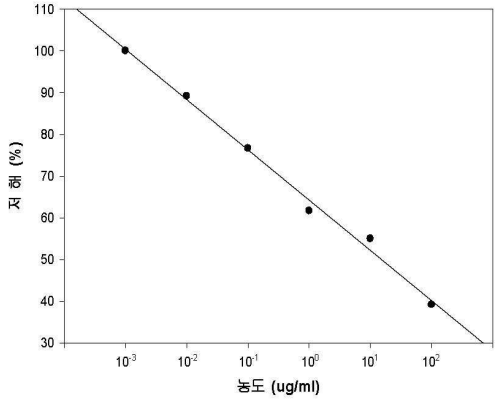
(54) 효소면역학적 방법을 이용한 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 검출방법

(57) 요 약

본 발명은 항원-항체 반응을 이용한 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 검출하는 방법으로, 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)과 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin; KLH)을 결합하여 토끼에서 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)에 대한 항체를 생성 후 정제하여 효소면역반응을 이용하여 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 검출하는 방법이다.

본 발명에 따르면, 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)과 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin; KLH)을 결합하여 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)에 대한 항체가 생성되는 것을 확인하였고, 효소-면역반응을 이용하여 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 검출하였다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

안동준

서울특별시 동작구 사당동 105 우성아파트 301-1002

노재필

경기도 시흥시 은행동 538-1 신명APT 101동 309호

신현용

경기도 군포시 재궁동 충무1차아파트 208동 106호

정동식

서울특별시 관악구 봉천7동 1598-8번지 태양원룸 305호

김은지

경기도 남양주시 진접읍 장현리 신동아아파트 102동 203호

특허청구의 범위

청구항 1

2,4,5-트리클로로페녹시아세트산을 포함한 시료와 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산의 합텐 화합물과 단백질이 아미드 결합에 의해 결합된 복합체로부터 생성된 항체 및 고체 지지체에 고정된 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산의 합텐 화합물과 단백질이 아미드 결합에 의해 결합된 복합체를 결합시키는 단계; 및

상기 항체에 특이적으로 결합하는 효소 표지된 이차 항체를 이용하여 상기 고체 지지체에 고정된 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산에 대한 상기 항체의 결합을 검출하는 단계;를 포함하는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산를 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산의 합텐 화합물이 카르복실기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단백질이 소 혈청 알부민 또는 키홀 림펫 헤모시아닌인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 시료 중의 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산를 정량적으로 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명의 기술분야는 항체를 이용하여 화학물질, 특히 농약을 검출하는 기술이며, 다량의 시료를 기기분석이 아닌 효소-면역학적 방법으로 화학물질을 검출하는 방법이다.

배 경 기 술

[0002] 인구의 증가와 농지의 감소로 인한 식량난을 해결하고 우수한 품질의 농산물을 생산하기 위해 각종 농약이 사용되기 시작하였다. 그 후, 전세계적으로 농약 사용량이 지속적으로 증가하였다. 농약은 농업생산성 향상과 농산물의 품질 향상뿐만 아니라 농작업의 간편화와 능률화를 가져왔으나 농약의 오남용으로 인한 식품과 자연환경의 오염은 인간 건강에 심각한 위협이 되고 있으며 새로운 해충의 출현, 해충의 내성 증가 등의 문제를 야기시키고 있다. 또한 농약은 현재까지 알려진 내분비계 교란물질(endocrine disrupting chemicals; EDC)의 다수를 차지한다.

[0003] 이런 이유로, 농산물에 존재하는 농약의 잔류량을 각국마다 규제함으로써 농약의 안정사용기준 준수를 유도하여 농약사용량을 억제함으로써 농산물의 안정성을 사전에 확보하고 있다.

[0004] 기존의 농약분석법으로는 기체크로마토그래피(gas chromatography; GC)와 고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC)가 있다. GC와 HPLC는 감도가 매우 높고 정확하며 다수성분을 동시에 분석할 수 있다는 장점은 있지만 분석하기에 앞서 전처리 과정을 필요로 하므로 장시간이 소요되며 전문적인 인력과 고가의 장비가 필요하다는 단점이 있다. 이러한 단점을 해결하기 위해 보다 효율적인 농약분석법의 개발이 활발하게 시도되고 있는데, 그러한 새로운 농약분석법들 중 가장 기대를 모으고 있는 것이 면역분석법(immunoassay)에 의한 농약검출법이다. 면역분석법 중에서도 항원 혹은 항체를 고체표면에 고정시키고 항원-항체 반응을 효소반응으로 측정하여 물질을 정량하는 ELISA(enzyme-;iked immunosorbent assay)가 농약분석에 많이 사용된다.

[0005] 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)은 베트남 전쟁에서 2,4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)과 함께 고엽제로 사용된 화학물질이며, 다이옥신과 같은 생물의 내분비계 교란물질(endocrine disrupting chemicals; EDC) 중 하나이다.

[0006] 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)은 현재 사용이 엄격히 제한된 화학물질로서 HPLC를 이용하여 검출하고 있다. 그러나 분석시간이 길고, 많은 량의 시료를 측정하는데 많은 시간과 비용을 소비하게 된다. 그러나, 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 등의 농약은 저분자 물질로서, 그 자체로 항원으로 작용할 수 없어서 항체 생산이 불가능하므로, 농약과 구조가 유사하며 단백질과 공유결합할 수 있는 원자단을 가진 물질, 즉 합텐(hapten)을 합성하여야 한다. 또한, 경쟁적 면역분석법에서 사용되는 경쟁자인 코팅항원 및 효소 트레이서(enzyme tracer)의 제조를 위해서도 합텐을 합성해야 한다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 기존의 많은 시간과 비용을 요하는 기기분석기술의 문제점을 극복하기 위하여 다량의 시료를 짧은 시간에 분석할 수 있는 검색용 효소면역검출방법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; ELISA)을 개발하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명의 주된 해결과제는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)과 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin; KLH)을 아미노 결합하여 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)에 대한 항체를 토끼로부터 생산하고, 생산된 항체를 이용하여 효소면역학적방법을 이용하여 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 검출하는데 있다.

과제 해결수단

[0009] 본 발명의 해결 수단은 하기 단계들을 포함하는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 검출방법을 제공한다.

[0010] a) 토끼로부터 항체를 생산하기 위한 키홀림펫헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin ; KLH)과 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 결합하는 단계;

[0011] b) 토끼에서 생성된 항체를 정제하는 단계;

[0012] c) 정제된 항체를 이용하여 경쟁적 효소-면역학적 방법으로 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 검출하는 단계

[0013] 본 발명에서 토끼로부터 항체를 생산하기 위해서 키홀림펫헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin ; KLH)과 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 결합하여 토끼에 주입하여 항체를 생산하였으며, 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)에 대한 특정 항체 생산의 유도가 가능했다.

[0014] 토끼로부터 생산된 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 항체는 IgG 컬럼 (Pirece #44667)을 이용하여 정제하고, 이후 결합된 소혈청알부민 (Bovine Serum Albumin; BSA)과 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 이용하여 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)에 특이적 항체만을 정제하였다.

[0015] 효소-면역반응 중 경쟁반응을 이용하여 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 검출하기 위해 결합된 소혈청알부민 (Bovine Serum Albumin; BSA)과 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 효소-면역반응 기판 (ELISA plate) 에 4℃에서 16시간 고정화하고, 3% skim milk 로 37℃에서 2시간 반응하여 효소-면역반응기판을 제작하였다.

[0016] 제작된 효소-면역반응기판에 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 100ppb, 10ppb, 1ppb, 0ppb 농도로 표준시료를 첨가하여 경쟁반응에 의한 저해율을 측정하였다.

[0017] 본 발명에서 항체의 생산은 키홀림펫헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin ; KLH)과 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 이용하여 토끼로부터 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산

(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)의 항체를 유도하고, 경쟁적 효소-면역방법으로 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 검출하는 것을 특징으로 한다.

효 과

[0018] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)와 키홀림펫헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin ; KLH) 복합체에 의한 항체와 경쟁적 효소-면역학방법을 이용한 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 검출방법을 이용하여 다량의 시료를 짧은 시간동안 검출 및 정량이 가능하므로, 가공식품과 농산물의 잔류농약을 검출하는데 크게 기여할 것으로 기대된다.

[0019] 본 연구의 활용분야는 가공식품 또는 농산물의 잔류농약 검출을 위해 고압액체크로마토그래피를 사용하여 분석하였으나, 다량의 시료 분석 시간 및 분석비용이 크게 증가하였다. 본 기술을 이용하여 식품의 잔류농약 검출에 적용한다면 분석 시간 및 분석비용을 감소시킬 수 있다.

[0020] 또한 최근 잔류농약 식품의 수입제한조치가 일본, 유럽 국가를 중심으로 크게 증가하고 있으며, 우리나라의 농산물 및 식품의 수입이 증가하고 있어, 이에 대한 검역용으로 사용하면 소규모의 인력과 장비로 다수의 식품을 규제하여 국민의 건강 지킴에 크게 기여할 것으로 예상된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0021] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명의 방법에서, 시료 중의 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)는 정량적으로 검출될 수 있다. 본 발명의 방법을 이용하면 시료 중의 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)를 정성적으로 검출하는 것도 가능하지만, 정량적으로 검출하는 것도 가능하다. 이는 표준 물질을 이용하여 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 농도에 따른 흡광도를 나타내는 표준 곡선을 얻은 후, 시료를 이용한 동일한 절차에 의해 흡광도를 측정한 후, 측정된 흡광도로부터 역으로 시료 중의 농도를 정량적으로 구할 수 있다.

[0023] [실시예 1] active ester의 합성 및 hapten-protein 복합체 제작

[0024] Dichloromethane (5ml)에 N-hydroxysuccinimide (38.05mg-0.33mmol)을 용해 시킨 후 소량의 dichlormethane에 녹인 2.4.5-T (100mg,0.3mmol), 그리고 N,N-dicyclohexyl carbodiimide (68.09mg-0.33mmol)을 차례로 첨가하였다. 반응용액을 실온에서 3시간 동안 반응시킨 다음 센트원심분리 (4,000rpm, 10min) 돌린 후 질소가스 사용하여 용매를 휘발 후 얻어진 시료가 active ester 이다.

[0025] 0.2M borate buffer 1ml 에 10mg의 소혈청알부민 (BSA)을 용해 시킨 후 0.1ml의 Dimethylformamide 를 떨어뜨리면서 세게 교반시켰다. 여기에 active ester (3.1mg)을 녹인 Dimethylformamide(0.15ml)용액을 20분에 걸쳐 천천히 떨어뜨린 후 실온에서 1시간, 4℃에서 16시간 교반한다. 그 다음 그 액체를 투석튜브에 넣고 2 L의 Phosphate buffer saline(ph 7.4) 을 이용하여 4℃에서 3일간 투석한다. 투석액은 24시간마다 새로운 phosphate buffer saline으로 전액 교환한다.

[0026] [실시예 2] 경쟁적 효소-면역반응

[0027] 도 1의 실험결과로부터 만들어진 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)와 키홀림펫헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin ; KLH) 복합체를 이용하여 토끼로부터 생산된 항체를 이용하여 경쟁적 효소-면역반응을 수행하였다. 수행한 결과 100ppm ~1ppb 까지의 검량선의 r^2 값이 0.9936으로 정확한 측정값을 가졌다(도 2).

[0028] 결론적으로, 제 1도에 의한 복합체를 이용하여 성공적으로 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 항체가 생성되었고, 생성된 항체를 이용하여 경쟁적 효소-면역반응을 수행하여 100ppm ~ 1ppb 농도에서 정확한 검량선이 제작되어, 미지의 시료로부터 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산

(2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid)의 농도 측정을 기기분석보다 빠른 시간에 다량의 시료분석이 가능하였다.

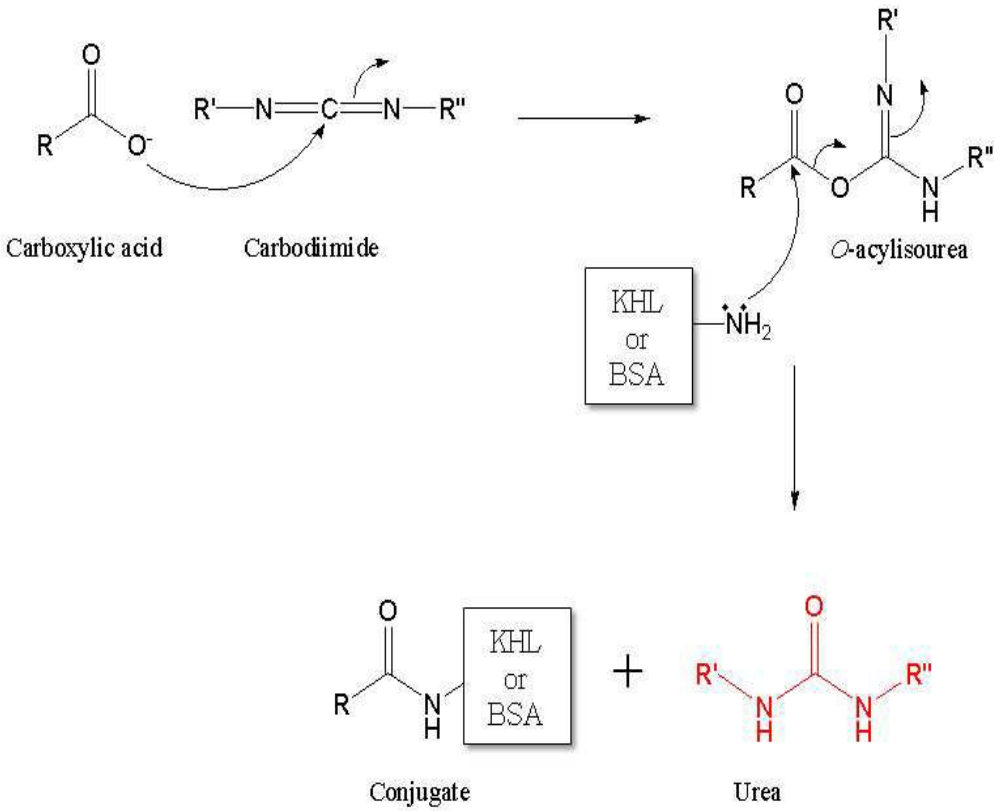
도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 합텐-단백질 복합체의 형성과정을 나타낸 것이다.

[0030] 도 2는 간접 경쟁 ELISA 결과를 나타낸 그래프이다.

도면

도면1



도면2

