한국환경분석학회지 제7권 (제2호) 00~00, 2004
J. of the Korean Society for Environmental Analysis

# DDT의 형광편광면역분석에서 Tracer에 따른 항체 친화력에 대한 연구

**홍지연 · 김종현**
서울여자대학교 화학과

# Affinity Study of Anti-DDT Antibodies with Tracer on Fluorescence Polarization Immunoassay

**Ji Youn Hong, Jong-Hyun Kim**
*Department of Chemistry, Seoul Women's University*

A simple and rapid detection method of DDT and its related chemicals were investigated using FPIA which needs no separation step. Three DDT derivatives (DDA, DDHP, DDCP) that contained carboxyl group were conjugated to KLH for the use of immunogen and three antisera (DDA-1, DDHP-2, DDCP-3) were prepared from each immunogen. Nine DDT fluorescence tracers were synthesized using a combination of three DDT derivatives (DDA, DDHP, DDT7) and three fluorescein derivatives (AF1, AF2, EDF) for the use of analyte competitiors of the antibody screening. Two pairs of antibody DDA-1 and tracer DDA-AF1, and antibody DDA-1 and tracer DDT7-AF1 were selected by FPIA. Ten samples of DDT analytes (DDT, DDA, DDE, DDD) can be detected up to 1 μg/mL using 50 μL sample volume within 10 minutes.

**Key words**: FPIA, DDT, Fluorescence tracer

## 1. 서 론

DDT는 유기합성 살충제의 시초로 과거에 농업용 또는 위생해충 방제용으로 널리 사용되어져 왔으나 지용성이 높아 농작물로부터 직접 경구적으로 섭취되어 인체의 지방층에, 또는 간접적으로 가축을 경유하여 우유나 고기 및 그 가공식품에 함유되어 인체에 이행되거나 축적되어 만성중독을 일으키는 것으로 알려져 사용이 중지된 살충제이다. 그러나 DDT는 빛이나 산화에 강해 화학적, 생물학적으로 매우 안정하여 살포된 DDT는 자연계에서 잘 분해되지 않고, 땅이나 물, 공기 중에 오랜 기간 잔류한다. 지질에 잘 녹는 특성 때문에 체내에 축적되어 신경계 및 생식기에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며,[1-4] persistant organic pollutants (POP)로서 검출법 연구가 다양하게 진행되고 있다. DDT는 기기분석법으로는 GC/MS를 사용하고 있으나[5,6] 시료추출에 따르는 시료조작이 번거로우며, 고가의 기기와 숙련된 인력을 필요로 하고 있다. 따라서 오염된 장소에서 다수의 시료를 간단히 빨리 분석하여 DDT 여부를 스크리닝하는데는 면역분석법이 가장 유용한 방법으로 대두되고 있다.

면역분석법은 화학물질에 대한 항체의 특이반응성을 이용하여, 분자량이 적은 미량의 환경오염물질을 대량으로 스크리닝하는데 유용한 방법으로 떠오르고 있다. 특히 시료의 숫자가 증가하고 검사비용이 높아지면서 실험실이나 현장에서 간이스크리닝 할 수 있는 면역분석법은 항체의 유사구조에 따른 교차반응성을 이용하여, 여러 종류의 화학물질을 동시에 검출할 수 있는 장점이 있다. 최근 이러한 면역분석법이 기기자동화에 따라 대량의 시료를 단시간내에 처리할 수 있는 실험실적 방법과, 간이스크리닝용으로 대별하여 개발되고 있다. 이러한 면역검출법은 면역원으로 사용하는 ligand의 구조에 따라 면역항체와 반응하는 epitope가 다르므로 다양한 ligand derivative를 합성하여 matching pair의 tracer와 antibody를 스크리닝 해야하며, 이를 기반으로 신속한 면역검출법을 개발해야 한다.

환경 오염 문제가 대두되면서 다수의 시료를 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 기법개발이 필연적으로

대두되고 있으며, 1994년 Samsonova의 polarization fluorimmunoassay(PFIA)가 개발되었다. 이는 그 물질에 특이적으로 반응할 수 있는 항체를 이용하는 면역분석법 중에서도 Fluorescence polarization immunoassay를 이용한 single reagent 자동화법이 가장 편리하고 유용한 방법으로 꼽히고 있다.

Fluorescence polarization immunoassay(FPIA)는 tracer로 fluorophor를 이용하는 homogeneous immunoassay로 매우 신속하게 분석결과를 얻을 수 있어 여러 가지 약물과 의학적 임상 marker 물질 분석에 이용이 되고 있으며, 그 기본 원리는 다음과 같다. 텅스텐 램프에서 나오는 빛이 filter와 polarizer를 거치면서 485 nm의 청색 편광만이 선택된 상태로 바뀌고 이 빛은 excitation wavelength가 485 nm인 fluorophor를 excitation 시킨다. Excitation 되고 난 후 fluorophor는 steady state로 되돌아오면서 525~550 nm의 초록색 빛을 방출하게 된다. 만일 fluorophor가 항체와 같이 커다란 분자와 결합이 되어있으면 그 fluorophor는 자유롭게 회전할 수가 없어 방출되는 초록색 빛은 편광을 비교적 잘 유지시킨다. 따라서 polarization level은 높게 나타나게 된다. 반대로 fluorophor가 항체와 결합되어 있지 않으면 fluorophor는 자유롭게 회전하고 방출되는 초록색 빛은 편광을 잃어버리게 되며 따라서 polarization level은 낮아지게 된다. 시료 용액 속의 분자가 회전하는 성질은 분자의 크기와 비례하므로 polarization level은 용액 속의 fluorophor가 항체와 결합하는 양에 비례하게 된다. 따라서 일정한 양의 항체와 일정량의 fluorescence tracer가 있는 용액에 시료 속의 free 항원이 더 들어가게 되면, 항체와 free 항원과의 결합반응에 의해 항체와 tracer의 결합이 적어지게 되고 그 결과 polarization level은 낮아지게 된다. Abbott사의 TDx analyzer를 이용하는 FPIA의 기본적인 방법은, 항원에 fluorescein isothiocyanate(FITC)가 결합된 tracer를 사용하고 photo-check mode를 이용하는 방법으로도 적용이 가능한데, 이 변형된 방법 역시 기본 방법과 마찬가지로 빠르고 자동화된 분석을 가능하게 하고 있다.

## 2. 실 험

### 2.1. 시약 및 기기

N-hydroxysuccinimide(NHS), succinic anhydride, 1-[3-dimethyl-aminopropyl]-3-ethyl carbodiimide hydrochloride(EDC), fluorescein isothiocyanate(FITC) Isomer I, dimethylformamide(DMF), aminofluorescein 등 모든 chemical은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO., U.S.A.) 및 Chem Service Inc.(West Chester, PA, U.S.A)의 제품을 사용하였다. Silica gel TLC plates(Art. 13895, PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F254) Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였고, 유기용매는 HPLC급을 사용하였다. DDT antiserum의 제조는 이전에 발표한 논문[8]에 기술하였으며, 모든 완충용액은 Milli-Q water system(Millipore Inc., MA, U.S.A)으로 정제된 탈이온수를 사용하였다. 항체 및 tracer의 희석은 10 mM PBS buffer, pH 7.4를 사용하였다. 시료의 혼합은 Vortex(Thermolyne, USA)를 사용하였으며, TDx Analyzer(Abbott, USA)를 사용하여 Photo check mode에서 fluorescence intensity와 polarization을 측정하였다. 형광의 polarization(mP) 값과 intensity(arbitrary units) 값을 7 min에 측정할 수 있다.

### 2.2. 햅튼 제조 및 면역원 합성

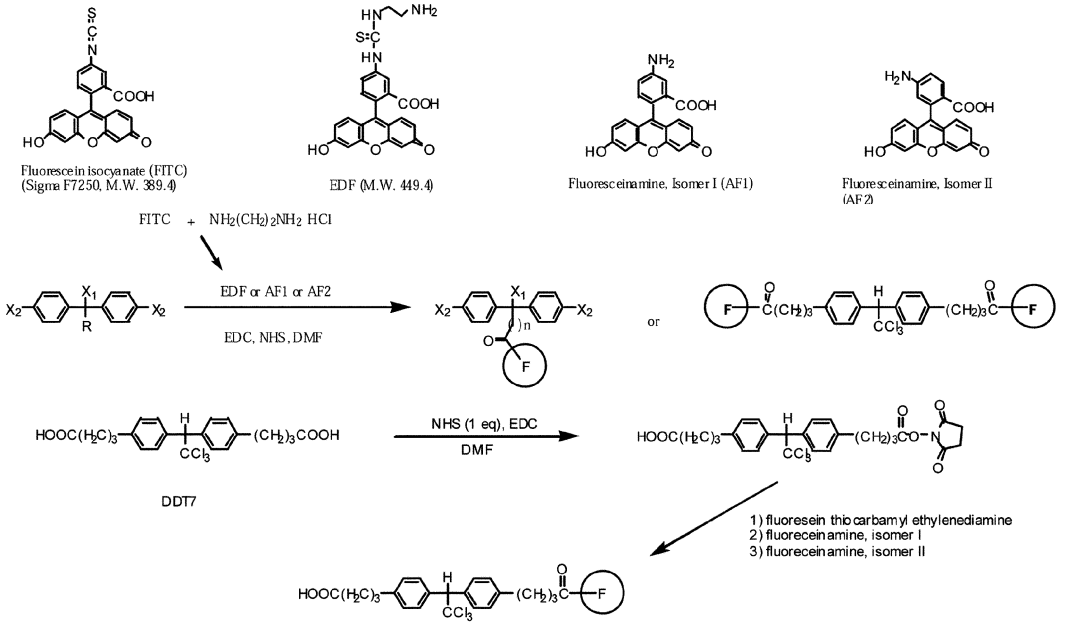
DDT 항체를 얻기 위하여 DDT와 유사구조를 갖는 세 종류의 햅튼을 합성한 후 KLH에 결합하여 토끼에 면역주사하여 세 종류의 DDT 항혈청을 얻었다. 합성방법은 이전 논문8)에 발표했으며, 세 종류의 햅튼은 2,2-Bis(4-chlorophenyl)acetic acid(DDA), 5,5-Bis(4-chlorophenyl)-5-hydroxypentanoic acid(DDHP), 5,5-Bis(4-chlorophenyl)-5-chloropentanoic acid(DDCP)이다.

### 2.3. 검출 표준용액의 제조

각각의 DDT analyte 1 mg/mL을 녹인 DMF와 PBS(10 mM, pH 7.2) 혼합용액의 stock 용액으로부터 PBS로 단계적으로 희석하여 100, 50, 10, 5, 1, 0.1 μg/mL까지 희석하였다.

### 2.4. Ethylenediamine fluorescein thiocarbamyl (EDF)의 합성

DDT유도체의 carboxyl group에 fluorescein을 label하기 위해 FITC(117 mg, 0.30 mmol)을 MeOH(10 mL)에 녹이고 $Et_3N$(0.1 mL)을 첨가한 혼합용액에 ethlenediamine · 2HCl(200 mg, 1.50 mmol)을 MeOH (50 mL)와 $Et_3N$(0.5 mL)에 녹인 용액을 30분 동안 천천히 첨가하여 실온에서 1시간동안 교반하였다. 붉은색 고체 생성물을 Watman No. 1 filter paper를 사용하여 거른 후 MeOH(10 mL)로 세척하고 건조하여 붉




| Hapten & Tracer | $X_1$ | $X_2$ | R |
|---|---|---|---|
| DDA | -H | -Cl | -COOH |
| DDHP | -OH | -Cl | $-(CH_2)_3COOH$ |
| DDCP | -Cl | -Cl | $-(CH_2)_3COOH$ |
| DDT7 | -H | $-(CH_2)_3COOH$ | $-CCl_3$ |
| Tracer DDA-AF1 | -H | -Cl | -CO-AF1 |
| Tracer DDA-EDF | -H | -Cl | -CO-EDF |
| Tracer DDHP-AF1 | -OH | -Cl | $-(CH_2)_3CO$-AF1 |
| Tracer DDT7-AF1 | -H | $-(CH_2)_3CO$-AF1 | $-CCl_3$ |
| Tracer DDT7-EDF | -H | $-(CH_2)_3CO$-EDF | $-CCl_3$ |

**Fig. 1.** Preparation of DDT-fluorescent tracer

은색 고체 생성물(90 mg, 77%)을 얻었다.

### 2.5. DDT-fluorescein tracer 합성

2.5.1. 1,1-Bis(4-3-carboxypropyl)-2,2,2-trichloroethane-fluorescinthiocarbamyl ethylenediamide(DDT7-EDF)의 합성

NHS(4.6 mg, 40 μmol)와 EDC(15.4 mg, 80 μmol)을 DMF(5.0 mL)에 녹인 용액에 DDT7(2-3 mg, 10 μmol)을 첨가하여 12시간동안 실온에서 방치하였다. 이 혼합물에 EDF(4.5 mg, 10 μmol)을 첨가(DDT7:EDF, 1:1)하여 10-15분 동안 완전히 녹이면 반응용액의 색이 노란색으로 변하였다. 이 반응 혼합물을 2시간동안 실온에서 교반 한 후 4°C에 보관하였다. 이 반응 혼합물 중 일부(50 μL)를 TLC plate(chloroform : methanol, 4:1)로 분리하였다. plate에서 UV에서 강한 노란색 띠를 나타내는 주 생성물(Rf=0.3, 0.5)을 scrap하여 silica gel로부터 fluorescein-labeled tracer를 MeOH로 swelling하여 추출하고 -4°C에 보관하였다. 위에서 얻은 tracer의 DDT antiserum과의 binding을 TDx의 photo-check mode에서 확인한 결과 좋은 binding을 보이는 생성물(Rf=0.3)을 TLC plate(chloroform : methanol, 4:1)에서 반복추출하여 정제된 tracer를 얻었다.

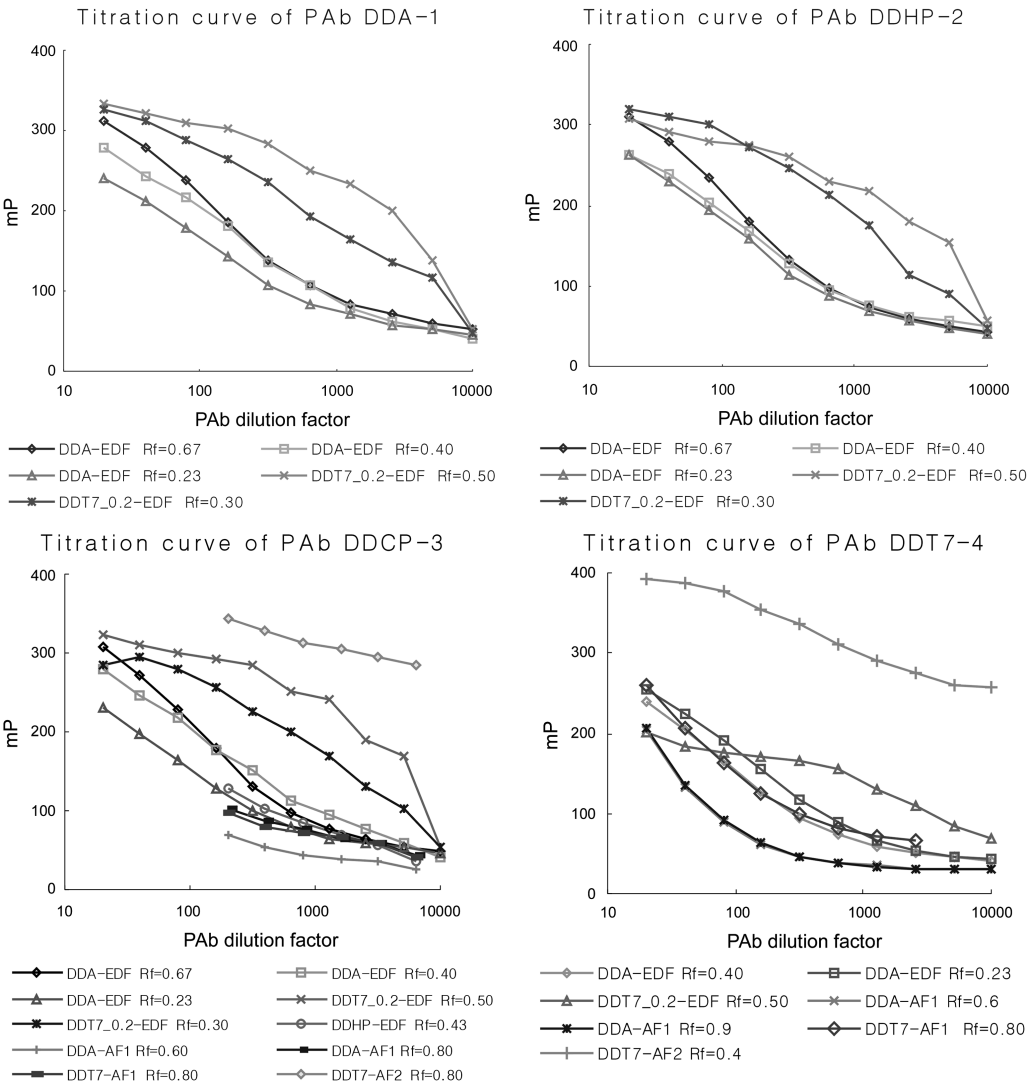



**Fig. 2.** Titration curve for polyclonal antibody by FPIA with various tracers.

2.5.2. 1,1-Bis(4-3-carboxypropyl)-2,2,2-trichloroethane-fluoresceinthiocarbamylethylenediamide-fluoresceinamine, isomer(DDT7-AF1)의 합성

NHS(4.6 mg, 40 μmol)와 EDC(15.4 mg, 80 μmol)을 DMF(1 mL)에 녹인 용액을 30분간 교반 한 후 DDT7(2-3 mg, 10 μmol)을 첨가하여 12시간동안 실온에서 방치하였다. 이 혼합물에 Fluoresceinamine, isomer I(3 mg, 10 μmol)을 첨가(DDT7:AF1, 1:1)하여 3과 같은 방법에 의하여 tracer DDT7- AF1을 얻었다.

2.5.3. 1,1-Bis(4-3-carboxypropyl)-2,2,2-trichloroethane-fluoresceinthiocarbamylethylenediamide-fluoresceinamine, isomer II(DDT7-AF2)의 합성

NHS(4.6 mg, 40 μmol)와 EDC(15.4 mg, 80 μmol), DDT7(2-3 mg, 10 μmol), Fluoresceinamine, isomer II(3 mg, 10 μmol)을 사용하여 3과 같은 방법에 의하여 tracer DDT7-AF2를 얻었다.

DDA-EDF, DDA-AF1, DDA-AF2 및 DDHP-EDF, DDHP-AF1, DDHP-AF2도 같은 방법으로 합성하였다.

### 2.6. Antibody 역가 측정

TDx cuvette에 tracer를 1 mL 가하고 intensity가 약 2000이 되도록 농도를 조정하였다. 10개의 TDx cuvette에 부피가 500 μL가 되도록 DDT antiserum

을 PBS buffer, pH 7.4를 사용하여 serial dilution 방법으로 희석한 후 각각의 cuvette에 DDT tracer를 500 μL씩 가하여 전체 1 mL이 되도록 하였다. TDx analyzer의 photo check mode에서 mP를 측정하였다.

### 2.7. DDT analytes에 대한 antibody와 tracer의 affinity 측정

항체는 mP value가 약 150정도(70% of max mP) 되는 각 항혈청의 희석배수를 구하여 해당 antiserum의 titer로 평가하였다. 각각의 antibody와 tracer에 대하여 DDT analytes(DDT, DDA, DDE, DDD)의 농도 0 μg/mL과 50 μg/mL을 적용하여 response의 차이를 비교하였다.

### 2.8. FPIA에 의한 DDT 검정곡선

Fig. 2에서 좋은 역가곡선과 Fig. 3에서 DDT analytes에 대한 좋은 반응성을 나타낸 항체와 tracer pair에 대하여, 항체 역가곡선의 70% mP값을 항체의 분석 농도로 하여 2.7과 동일한 방법으로 DDT 검출 표준용액에 대한 검정곡선을 작성하였다.

## 3. 결과 및 고찰

DDT와 그 분해물(DDA, DDE, DDD)들을 FPIA 방법을 이용하여 검출하기위하여 세 종류의 DDT유도체(DDA, DDHP, DDT7)에 EDF, AF1, AF2를 label하여 다양한 tracer를 제조하였다. 세 종류의 DDT 면

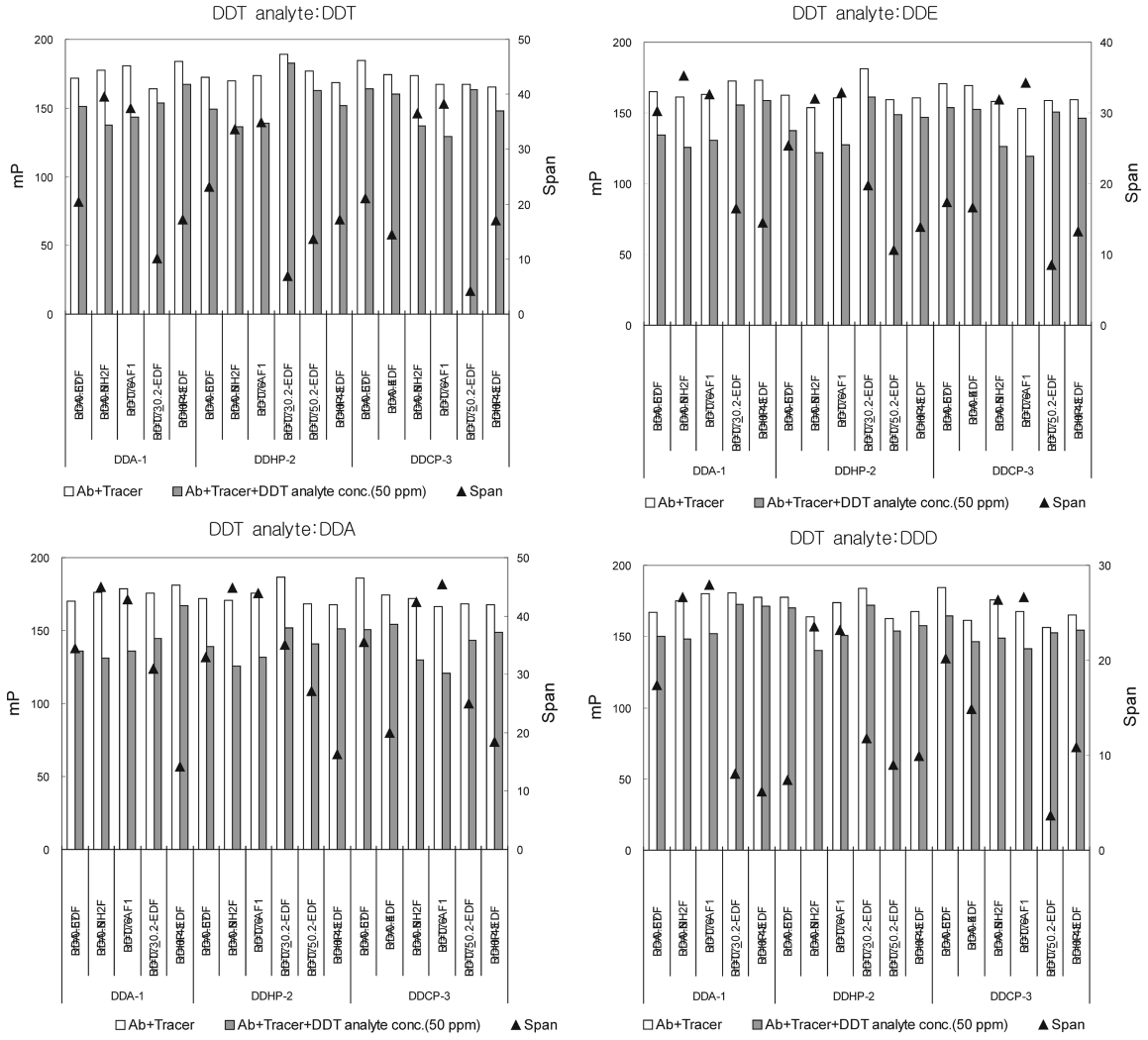



**Fig. 3.** Span in analytical signals of FPIA with different tracers and antibodies for DDT analytes

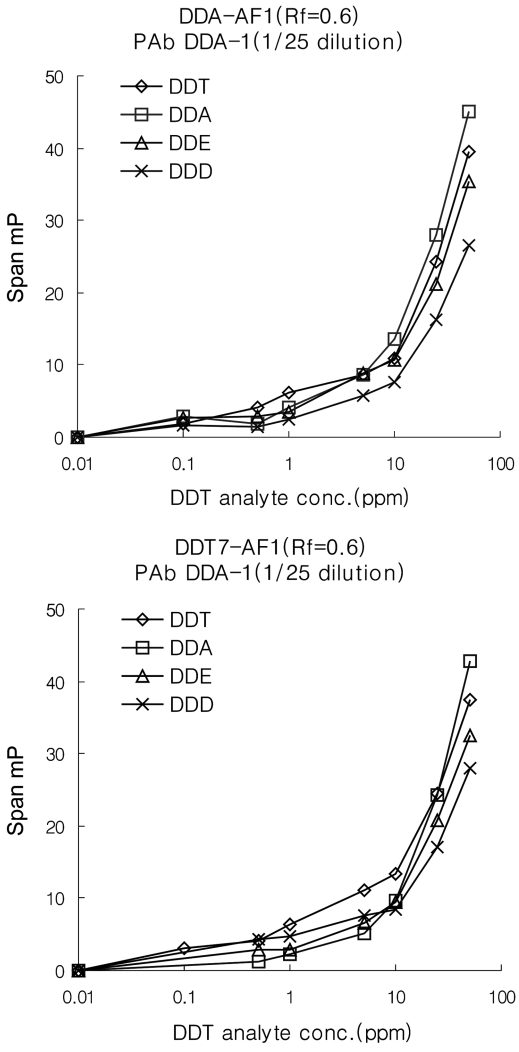



**Fig. 4.** Dose-response curves for DDT analytes by FPIA

역원(DDA-KLH, DDHP-KLH, DDCP-KLH)으로부터 얻은 항체 DDA-1, DDHP-2와 DDCP-3를 다양한 종류의 tracer에 대하여 반응성을 조사하였으며, DDT 항혈청에 대한 역가곡선은 Fig. 2와 같다. Tracer 종류에 따른 항체역가측정 결과는 DDA-AF1과 DDT7-AF1이 가장 반응성이 좋았다.

Dose-response curve를 작성하기에 앞서 각각의 tracer를 사용하여 항체의 반응성을 조사했으며, tracer와 DDT analytes 농도 0 μg/mL과 50 μg/mL을 적용하여 response의 차이(span)를 비교하여 span이 큰 tracer와 항체를 선별하여 dose-response curve를 수행하였다(Fig. 3).

각각의 serum에 대하여 좋은 antibody titer를 보인 tracer를 선정하여 DDT analyte(DDT, DDA, DDE, DDD)을 농도범위(0.1 μg/mL~50 μg/mL)에서 반응성을 측정하였다. 항혈청과 Tracer 종류에 따라서 반응성이 매우 다르게 나타났다. 가장 좋은 response를 나타낸 tracer는 DDT7-AF1(Rf=0.6)와 DDA-AF1(Rf=0.6)였다(Fig. 4-2-8, Fig. 4-2-9). 따라서 항체 DDA-1과 tracer DDT7-AF1(Rf=0.6)을 pair로, 또한 항체 DDA-1과 tracer DDA-AF1(Rf=0.6)을 pair로 사용했을 때 DDT, DDA, DDE, DDD 모두를 1 μg/mL까지 검출할 수 있었다.

## 4. 결 론

이상의 연구 결과를 종합해보면, FPIA에 의한 DDT 검출을 위한 항체를 스크리닝 시 tracer의 종류에 따라 항체의 분석감도가 달라짐을 알 수 있었다. 또한 같은 종류의 햅튼에 결합시킨 fluorescent의 종류에 따라서도 DDT 검정 곡선에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 즉 이전에 발표한 논문9-10)인 ELISA 방법에 의한 DDT검출에서 코팅 리간드의 영향과 마찬가지로 같은 항체라 하더라도 tracer의 종류에 따라 매우 다른 검정 곡선을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서, DDT에 대한 좋은 친화력을 갖는 항체를 스크리닝하고, 선정된 항체에 대한 적합한 tracer를 선정하는 것은 FPIA의 검출 감도를 증진 시킬 수 있는 좋은 방법임을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 2003년 서울여자대학교 자연과학연구소 학술연구비의 지원을 받아 수행되었으며, 연구자는 이에 감사드립니다. 홍지연 연구원은 서울여자대학교 자연과학연구소 전임연구원으로 재직하였음을 밝힙니다.

## 참고문헌

1. T. Colborn, M. J. Smolen, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **1996**, 146, 91-172.
2. A. Hussein, U. Maqbool, M. Asi, *J. Environ. Sci. and Health*, **1994**, 29, 1-15.
3. T. Samuel, M. K. K. Pillai, *Environ. Pollut.*, **1989**, 57, 63-77.
4. M. Ramachandran, SSA. Zaidi, B. D. Banerjee, Q. Z. Hussain, *Indian J. Med. Res.*, **1984b**, 80, 483-486.

5. H. R. Buser, M. D. Muller, *Anal. Chem*., **1995**, 67, 2691-2698.
6. J. C. Chuang, K. Hart, J. S. Chang, L. E. Boman, J. M. Van Emon, A. W. Reed, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 444, 87-95.
7. D. Burgisser, S. Frey, B. Gutte, S. Klauser, *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **1990**, 166(3), 1228-1236.
8. J. Y. Hong, J. -H. Kim and M. J. Choi, *Bull. Korean Chem. Soc*., **2002**, 23, 1413.
9. 홍지연, 김종현, 박송자, 최명자, *한국환경분석학회지*, **2002**, 5(2), 103-111.
10. J. Y. Hong, J. -H. Kim, S. -J. Park, D. -S. Lho and M. J. Choi, *Bull. Korean Chem. Soc*., **2003**, 24, 1605.