

뉴트라비딘 검출용 간이 진단키트의 성능향상을 위한 기본 플랫폼 선정

최선미^{1,2} · 김기영^{1*} · 엄애선² · 문지혜¹ · 박선훈¹ · 이상대¹ · 김혁주¹

¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업공학부 바이오센서연구실, ²한양대학교 식품영양학과 식품 안전 및 독성연구실

The selection of basic platform for improving the sensitivity of neutravidin rapid detection kit

Sunmi Choi^{1,2}, Giyoung Kim^{1*}, Aeson Om², Jihea Moon¹, Saetbyeol Park¹, Sangdae Lee¹, Hyuk Joo Kim¹

¹Biosensor Lab., Dept. of Agricultural Engineering, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

²Food Safety & Toxicology Lab., Dept. of Food & Nutrition, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Received on 2 September 2012, revised on 14 November 2012, accepted on 14 November 2012

Abstract : This study was performed to optimize the basic platform of a lateral flow immunoassay. Improvement of the limit of detection (LOD) was evaluated according to the width of a nitrocellulose membrane with varying concentrations of analyte. The analyte, neutravidin was detected based on the avidin-biotin interaction. The antibody-Au nanoparticle conjugation was mostly stabled in a PBS buffer of pH 7.3. The optimal widths of a nitrocellulose membrane were 4 and 6 mm considering the sample flow rate and signal strength of the test line on the membrane. The LOD of neutravidin was 0.001 mg/ml in the optimum conditions.

Key words : Rapid detection kit, Nitrocellulose membrane, Avidin-biotin interaction

I. 서론

바이오센서란 생체인식소자인 효소, 미생물, 항체, 인공 수용체 등의 특이적 결합반응을 이용하여 특정 대상을 정량적으로 또는 정성적으로 측정하는 분석도구이다. 생체물질과 전극간의 조합으로 분석대상 물질을 보다 높은 감도로 측정할 수 있다고 Clark와 Lyson이 발표한 이후 이와 관련된 여러 연구가 이루어지고 있으며 1980년대에 들어서 바이오센서라는 용어가 생기게 되었다. 바이오센서는 측정 감도가 높을 뿐만 아니라 특정물질을 선택적으로 분석하는 것이 가능하므로 식품, 의료 등 여러 분야에 응용된다(Kim, 2007).

바이오센서는 사용된 생체물질에 따라 효소센서, 면역센서, 세포센서, DNA 센서로 분류된다. 그 중 항원-항체 반응을 이용하여 분석대상인 항원을 검출하는 면역분석법이 가장 대표적인 바이오센서의 분석방법이다. 면역분석법에서

가장 많이 사용되는 분석기법은 효소면역측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)이다. 이 기법은 반응의 민감도, 특이성, 신속성 및 재현성이 뛰어나고 항원이나 항체를 달리할 경우 단일 조작으로 다양한 종류의 항원, 항체 검출에 이용할 수 있는 장점이 있다(Kim et al., 2009). 그러나 이러한 기술은 조작이 복잡하고 수 시간 이상의 분석 시간이 요구되는 단점이 있다. 최근 이러한 단점을 보완하면서 기존의 면역분석방법을 대체할 목적으로 소형화된 면역바이오센서에 대한 연구·개발이 수행되고 있다. 이러한 기술 중 하나로 간이진단키트를 이용한 신속분석방법이 빠르게 상용화되고 있다. 신속진단법이란 효소면역측정법을 기본 원리로 하여 시료 속의 항원 또는 항체의 존재유무를 판정하는 방법으로 전문가가 아니더라도 10-30분 이내에 결과를 육안으로 판독하는 것이 가능하다(Mechlotra et al., 2000; Barzin et al., 2010). 간이진단키트는 간편성, 편리성, 다중 동시분석 가능성, 온라인·실시간 검출 능력, 경제성, 장치의 크기에서 기존의 면역분석 방법에 비해 장점을 가지고 있다. 이러한 장점으로 인하여 현재 간이진단키트는

*Corresponding author: Tel: +82-31-290-1899

E-mail address: giyoung@korea.kr

임상 분야(Choi et al., 2011), 식품 안전성(Sithigorngul et al., 2007; Hossain et al., 2009), 반려동물의 건강(Oh et al., 2006; Kang et al., 2007), 환경 오염(Tang et al., 2010)을 신속하게 검사하는 등의 많은 분야에서 이용되고 있다.

간이진단키트는 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막(NC 막), 흡수패드 등 네 개의 막으로 구성된다. 결합패드는 시료와 결합하여 색변화를 나타내는 표지자를 포함하고 있으며, NC 막은 항원-항체 반응을 이용하여 분석물질을 검출하기 위한 검사선과 표준선이 존재한다. 시료패드에 주입된 시료는 모세관현상에 의해 결합패드를 지나면서 분석물질과 표지자가 결합하게 되고 표지자와 결합된 분석물질은 NC 막 위를 통과하면서 검사선과 표준선에 존재하는 항체와 결합되고 나머지 시료는 흡수패드로 흡수된다(Park and Kim, 2011).

간이진단키트가 여러 분야에서 손쉽게 활용되기 위해서는 기본 플랫폼의 구축이 절실히 요구되고 있으나 이와 관련된 연구는 거의 없거나 미미한 실정이다(Choi et al., 2011). 따라서 본 연구는 NC 막의 폭과 시료의 농도에 따라 간이진단키트의 성능을 평가하고 그 결과를 이용하여 간이진단키트의 기본 플랫폼을 선정하기 위해 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

검사 결과를 색으로 나타내기 위해 Bioassay work사(MD, USA)의 40 nm 금나노입자를 구입하였으며 금나노입자와 결합되는 항체는 바이오틴이 부착된 것으로 ViroStat 사(ME, USA)에서 구입하였다. 또한 표준선의 항체는 토끼에서 생성된 다클론항체를 Fitzgerald사(MA, USA)에서, 검사선의 바이오틴-BSA(bovine serum albumin)와 뉴트라비딘은 Pierce사(IL, USA)에서 구입하였다. 간이진단키트의 중요구성품인 시료패드, 결합패드, NC 막, 흡수패드는 Millipore사(MA, USA)로부터 구입하였다. 인산완충생리 식염수(phosphate buffered saline, PBS)와 기타시약은 Sigma사(MO, USA)의 제품을 사용하였다.

2. 간이진단키트 제작

간이진단키트의 제작은 Kim 등(2010)의 방법을 참고하

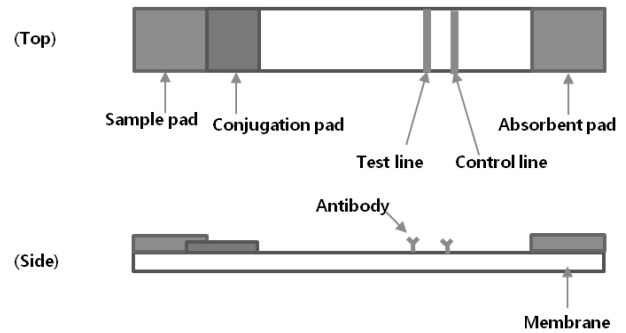


Fig. 1. Schematic diagram of a rapid detection kit.

여 본 실험의 목적에 맞도록 수정하였다. 간이진단키트는 항체 고정화 방법 중 가장 많이 사용되는 방법인 아비딘과 바이오틴의 특이적 결합 원리를 적용하여 제작하였다. 아비딘은 결합능이 뛰어난 뉴트라비딘을 사용하였고, 바이오틴은 바이오틴-BSA를 사용하였다.

간이진단키트는 Fig. 1과 같이 시료패드, 결합패드, NC 막, 흡수패드를 붙여 제작하였다. NC 막의 폭 변화에 따른 간이진단키트의 검출성능을 평가하기 위해 NC 막의 폭을 2, 4, 6, 8 mm로 재단하였다. 시료패드, 결합패드, 흡수패드의 폭은 동일하게 8 mm로 재단하였으며 최종 조립된 키트는 길이가 6 cm가 되도록 재단하였다. 시료패드, 결합패드, NC 막, 흡수패드는 시료가 연속해서 흐를 수 있도록 각각의 끝부분이 3 mm씩 겹치도록 조립하였다.

NC 막의 검사선과 표준선은 2 mg/mL 바이오틴-BSA와 1 mg/mL anti-rabbit IgG를 각각 도포한 후 37°C에서 1시간동안 건조하여 제작하였다.

3. 간이진단키트 구성부의 전처리

간이진단키트에 주입된 시료가 원활하게 이동할 수 있도록 각 구성부의 전처리를 수행하고 효과를 분석하였다. 결합패드의 전처리는 패드에 2% BSA와 10% sucrose가 첨가된 pH 7.4 PBS를 충분히 흡수시킨 다음 4시간동안 건조시키는 방법을 사용하였다. 전처리를 거친 결합패드에 항체-금나노입자 결합물이 녹아있는 용액을 분주한 후 37°C에서 1시간동안 건조하였다. NC 막의 전처리는 pH 7.4 PBS에 담근 후 37°C에서 1시간동안 건조하였다.

4. 금나노입자-항체 결합을 위한 최적 조건 구명

뉴트라비딘이 검출되었을 때 색 띠를 나타내기 위해 주

Table 1. pH charts and amount of required buffers for optimal coating of Au nanoparticle.

Tube number	pH	Amount of buffer A (μL)	Amount of buffer B (μL)	Tube number	pH	Amount of buffer C (μL)	Amount of buffer D (μL)
1	5.4	9	1	6	8.4	10	0
2	6.6	8	2	7	8.8	8	2
3	7.3	6	4	8	9.2	6	4
4	7.8	4	6	9	9.6	4	6
5	8.2	2	8	10	10.1	2	8

로 금나노입자가 사용되고 있다(Babacan et al, 2002). 따라서 본 연구에서는 40 nm 크기의 금나노입자를 사용하였다. 금나노입자와 항체의 결합은 금나노입자 제조사에서 제공하는 결합조건 및 방법을 참조하였다. 우선, 금나노입자 현탁액을 잘 흔들어준 다음 0.5 mL씩 10개의 시약에 옮겨 담는다. 그 다음 시험관에 1-10까지 표지를 붙이고 Table 1과 같이 제조사로부터 제공되는 pH 시약들을 조합하여 pH 값이 5.4에서 10.1까지 총 10단계가 되도록 적정한다. 서로 다른 pH 값의 용액이 들어있는 10개의 시험관에 1 mg/mL 농도의 항체 14 μL를 한 방울씩 천천히 첨가하고 저속의 교반기를 이용하여 교반한 다음 30분간 상온에서 반응시켰다. 금나노입자가 항체와 정상적으로 결합하면 혼합액이 붉은색을 유지하고 비정상적인 결합의 경우에는 진보라색이라 검은색으로 변화하므로 붉은색을 유지하는 pH 값을 측정하여 이용하였다. 최종적으로 50 μL의 안정화 시약을 첨가하여 결합반응을 종료하였다.

5. 간이진단키트 NC막의 폭과 뉴트라비딘 농도에 따른 검출 성능 향상 여부 확인

NC 막의 폭이 2, 4, 6, 8 mm로 제작된 간이진단키트에 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 mg/mL의 뉴트라비딘을 각각 150 μL씩 주입하여 제작된 간이진단키트의 성능을 평가하였다. 그리고 동일한 실험을 3회 반복하여 수행하였다.

NC 막 폭에 따른 간이진단키트의 성능평가는 검출선과 표준선에서 나타나는 색변화를 기준으로 평가하였다. Fig. 2(a)와 같이 검출선과 표준선에 짙은 색 띠가 형성되면 아비딘이 검출된 것으로 판단하고, Fig. 2(b)와 같이 표준선에만 짙은 색 띠가 형성되면 아비딘이 검출되지 않은 것으로 판단하였다. 그리고 Fig. 2(c)와 같이 검사선과 표준선 중에서 어느 곳에도 색 띠가 형성되지 않으면 실험이 잘못된 것으로 판단하였다.

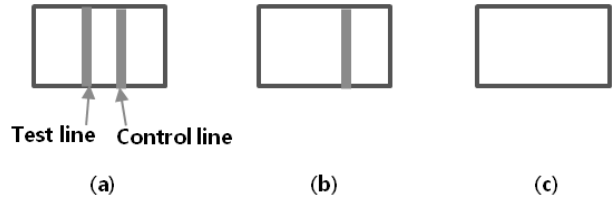


Fig. 2. Test interpretation of the test results for a rapid detection kit. (a) Positive, (b) Negative, (c) Fail.

III. 결과 및 고찰

예비실험에서 시료를 100 μL씩 간이진단키트에서 분주하였을 때 NC 막의 폭이 6 mm와 8 mm인 것에서 색 띠가 잘 생성되지 않았다. 이것은 NC 막의 폭이 증가하여 검사선과 표준선을 형성하는데 필요한 시료가 부족하여 나타난 현상으로 파악되었다. 따라서 NC 막의 폭과 농도를 제외한 모든 실험 조건을 동일시하게 하기 위해 시료의 양을 150 μL로 증가하였다. 시료패드에 시료가 주입되면 모세관현상에 의해 결합패드로 이동하여 결합패드에 건조된 상태로 포함되어 있는 항체-금나노입자 결합물을 수화시킨다. 이때 시료에 포함되어 있는 뉴트라비딘은 항체-금나노입자 결합물과 항원-항체 반응을 일으켜 새로운 결합물을 형성한다. 결합물은 모세관현상에 의해 계속 이동하여 결합패드를 빠져나와 NC 막으로 흐르게 된다. 이 결합물이 검사선에 이르면 검사선의 바이오틴-BSA에 포획되어 뉴트라비딘-항체-금나노입자 결합물이 고정되고 금나노입자로 인해 육안으로 식별 가능한 붉은색 띠가 형성된다. 시료는 계속 이동하여 바이오틴-BSA과 결합하지 않은 항체-금나노입자 결합물은 표준선의 anti-rabbit IgG와 결합하여 또 하나의 붉은색 띠를 형성된다. 잔여 시료는 NC 막을 따라 흡수패드에 저장된다. 표준선에 생성된 붉은색 띠를 통해 간이진단키트의 오작동 여부를 확인할 수 있었으며, 검사선에 생성된 붉은색 띠를 통해 농도별 뉴트라비딘과 바이오틴-BSA의 결합여부를 알 수 있었다.

1. 항체-금나노입자 결합을 위한 완충액의 최적 pH 값 선정

항체-금나노입자의 결합은 완충액의 pH 값에 크게 영향을 받는다(Kim et al., 2009). 따라서 최적 결합을 위해 완충액의 pH 값을 실험을 통해 구명하였다. 실험 과정 중 결합단계에서 금나노입자가 항체와 정상적으로 결합할 경우 혼합용액의 색변화가 없었다. 그러나 pH 조건이 적합하지 않으면 항체와 금나노입자가 불안정하게 결합되어 처음의 붉은색에서 짙은 보라색 또는 검은색으로 변하게 된다. 변색된 항체-금나노입자 혼합용액은 항체의 등전점에서 금나노입자끼리의 교차반응으로 인한 응집현상이 나타나게 되고 이로 인해 검출 물질과 반응할 수 없게 되어 면역분석에 사용할 수 없게 된다(Kim et al., 2011). Fig. 3(b)와 같이 육안으로 혼합용액의 색변화를 관찰한 결과 pH 6.6과 pH 7.3인 용액에서 가장 안정적인 붉은색이 관찰되었으며 침전물도 발생되지 않았다. 분광분석기(Spectra Max 190, Molecular Device, CA, USA)를 이용한 혼합용액의 흡광도 분석 결과로 Fig. 3(a)처럼 pH 6.6과 pH 7.3에서 흡광도가 높게 나타나 항체와 금입자의 결합이 잘 이루어진 것을 확인할 수 있었다. 그러나 pH 6.6에서는 시료를 담고 있는 PBS 버퍼의 pH 7.4 보다 pH가 낮아 항체와 금나노입자의 결합에는 적절하지 않았다. 따라서 pH 7.3인 완충액을 항체와 금나노입자를 결합을 위해 사용하였다.

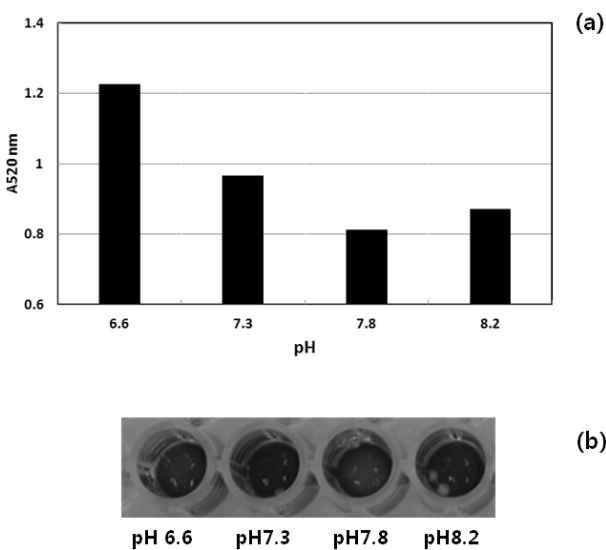


Fig. 3. (a) Absorbance of titrated Au nanoparticle and antibody buffer solutions; (b) Images of titrated Au nanoparticle and antibody buffer solutions.

2. 농도별 뉴트라비딘 검출

뉴트라비딘의 농도는 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 mg/mL로 준비하여 간이진단키트 샘플패드에 150 µL씩 분주하여 NC 막의 폭에 따른 간이진단키트의 검출성능을 평가하였다. 그 결과 0.001, 0.01, 0.1 mg/mL의 세 가지 농도에서 NC 막에 육안으로 확인할 수 있는 색 띠를 형성했다. Fig. 4를 보면 뉴트라비딘에 대한 검사선의 색변화가 일부 약하게 나타난 것을 볼 수 있다. 이는 시료가 항원-항체 반응을 하지 못하고 NC 막에 잔류하는 비특이적 반응을 일으켰거나 검사선 항체의 수작업으로 인한 항체가 불균일하게 도포되어 나타나는 현상으로 판단된다(Choi et al., 2011).

3. NC 막의 폭에 따른 검출 성능 향상

NC 막의 폭이 2, 4, 6, 8 mm로 준비된 간이진단키트에 뉴트라비딘을 검출시료로 사용하여 간이진단키트 검출 성능 향상 여부를 확인하였다.

뉴트라비딘의 검출은 센서 NC 막의 폭이 2, 4, 6, 8 mm 순으로 폭이 넓을수록 시간이 오래 걸렸다. 이를 통하여 NC 막의 폭이 좁아질수록 시료 이동 속도가 빨라짐을 알 수 있었다. NC 막의 폭이 2 mm인 경우 시료를 한 번에 분주하였을 때 시료 용액이 NC 막에 흡수되지 못하고 밖으로 흐를 수 있어 3-4회에 나누어 분주하였다. 따라서 2 mm인 경우와 8 mm인 경우 결과를 확인하기까지 전체 시

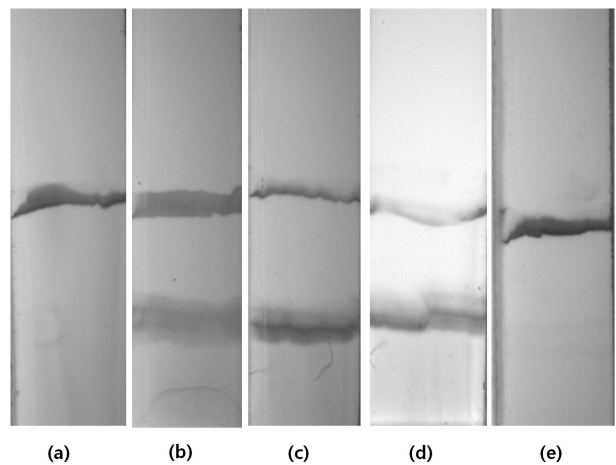


Fig. 4. Detection results of the neutravidin using the rapid detection kit that NC membrane is 4 mm in width. (a) 0 mg/mL, (b) 0.1 mg/mL, (c) 0.01 mg/mL, (d) 0.001 mg/mL, (e) 0.0001 mg/mL.

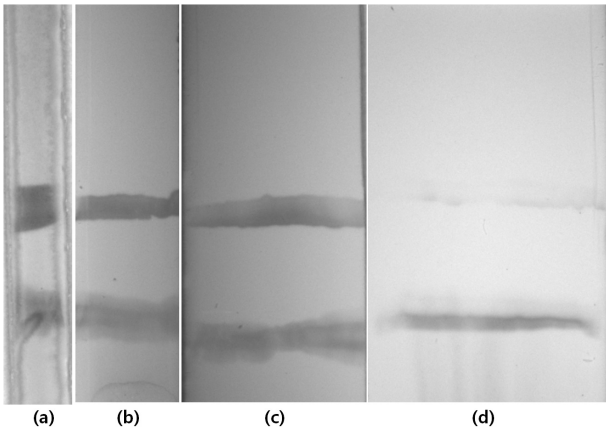


Fig. 5. Detection results of the rapid detection kit using 0.01 mg/mL neutravidin. (a) 2 mm, (b) 4 mm, (c) 6 mm, (d) 8 mm.

간에는 큰 차이를 보이지 않았다. 모든 간이진단키트는 개별적인 차이가 있으나 시료를 주입한 후 발색 및 건조까지 상온에서 10min 내에 검출 결과를 확인할 수 있었다.

Fig. 5와 같이 색 띠의 밝기는 NC 막의 폭 2, 4, 6, 8 mm 순으로 폭이 좁을수록 진하게 발색되었다. 이는 NC 막의 폭이 좁을수록 항원-항체 결합반응이 집약적으로 일어났기 때문에 색 띠의 밝기가 진해졌음을 알 수 있었다.

IV. 결론

본 연구는 간이진단키트의 중요 구성품인 NC 막의 폭과 뉴트라비딘의 농도에 따른 성능을 평가하여 간이진단키트의 기본 플랫폼을 선정하기 위해 수행되었다. 간이진단키트의 검출원리는 아비딘-바이오틴 특이적 결합원리를 이용하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 금나노입자와 항체의 최적 결합을 위한 완충액의 적절한 pH 값은 7.3인 것으로 조사되었다.
2. NC 막의 폭을 2, 4, 6, 8 mm로 제작된 간이진단키트와 농도가 다른 뉴트라비딘을 이용하여 제작된 간이진단키트 검출 성능을 평가하였다. 그 결과 NC 막의 폭이 넓을수록 시료의 이동시간이 느려지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 NC 막 폭이 좁을수록 검사선과 표준선에서 결합반응이 집약적으로 나타나 색 띠의 발색강도가 커지는 것으로 나타났다.
3. 시료의 농도와 이동속도를 고려하였을 때 NC막의 폭이 4 mm 또는 6 mm일 때 제작하는 것이 적합한 것으로 나타났다.

4. 최적화 조건으로 제작된 간이진단키트에서 뉴트라비딘의 최소검출 농도는 0.001 mg/mL 이었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(PJ006478)의 지원에 의해 수행되었습니다.

참고 문헌

- Babacan S, Pivarnik P, Letcher S, Rand A. 2002. Piezoelectric flow injection analysis biosensor for the detection of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Science* 67(1):314-320.
- Bazin I, Nabais E, Lopez-Ferber M. 2010. Rapid visual tests: Fast and reliable detection of ochratoxin A. *Toxins* 2(9): 2230-2241.
- Choi JH, Lee SJ, Jang SC, Kim KC. 2011. Development of disposable enzyme-linked immunosensor strip platform. 20(6): 400-405. [in Korean]
- Hossain ZSM, Luckham MRE, McFadden MJ, Brennan JD. 2009. Reagentless bidirectional lateral flow bioactive paper sensors for detection of pesticides in beverage and food samples. *Analytical Chemistry* 81(21):9055-9064.
- Kang BK, Oh JS, Lee CS, Park BK, Park YN, Hong KS, Lee KG, Cho BK, Song DS. 2010. Evaluation of a rapid immunodiagnostic test kit for rabies virus. *Journal of Virological Methods* 145(1): 30-36.
- Kim GY, Moon JH, Om AS, Yang GM, Mo CY, Kang SW, Cho HK. 2009. Evaluation of antibody immobilization methods for detection of *Salmonella* using impedimetric biosensor. *Journal of Biosystems Engineering* 34(4):254-259. [in Korean]
- Kim GY, Yang GM, Park SB, Kim YH, Lee KJ, Son JY, Kim HJ, Lee SR. 2011. Rapid detection kit for *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biosystems Engineering* 36(2):140-146. [in Korean]
- Kim YK. 2007. Signal transducing methods for immunosensing devices. *BioChip Journal*. 1:145-150. [in Korean]
- Mehlotra RK, Lorry K, Kastens W, Miller SM, Alpers MP, Bockarie M, Kazura JW, Zimmerman PA. 2000. Random distribution of mixed species malaria infections in Papua New Guinea. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62(2):225-231.
- Oh JS, Ha GW, Cho YS, Kim MJ, An DJ, Hwang KK, Lim YK, Park BK, Kang BK, Song DS. 2006. One-step immunochromatography assay kit for detecting antibodies to canine parvovirus. *Clinical and Vaccine Immunology* 13(4):520-524.
- Park SJ, Kim YK. 2011. Enzyme-linked immunosorbent assay strip sensor for rapid detection of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 22(5):522-525. [in Korea]
- Sithigomgul W, Rukpratanporn S, Sittidilokratna N, Pecharaburanin

N, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Sithigorngul P. 2007. A convenient immunochromatographic test strip for rapid diagnosis of yellow head virus infection in shrimp. *Journal of Virological Methods* 140(1-2):193-199.

Tang Y, Zhai YF, Xiang JJ, Wang H, Liu B, Guo CW. 2010. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of lead ions in water samples. *Environmental Pollution* 158(6):2074-2077.