

Structural Manipulation of Microwell for Enhancing Analytical Performance of Enzyme Immunoassay

Sungsoo Kim^{1,*}, Eunjine Kim^{2,*}, Chungwan Lee^{2,*}, Jaewoong Sull^{1,**} and Il-Hoon Cho^{1,†,**}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

²Department of Kit Development, MicroDigital Inc., Seongnam 13487, Korea

In this investigation, a novel design for a well-plate structure was created to optimize antigen-antibody reactions. The main objective during the development process was to enhance the internal structure of the well plate and increase the surface area. To improve efficiency, the newly designed well-plate was conical in shape and featured internal protrusions, or fins, which increased the surface area per unit volume by 1.45 times compared to standard plates. The performance of the newly developed well plate was assessed using a sandwich CLEIA system, which demonstrated a detection limit approximately 2.5 times better than that of commercial products. Additionally, the coefficient of variation (CV%) was superior to that of commercial products, with inter-assay CV(%) ≤ 11 and intra-assay CV(%) ≤ 9 , compared with inter-assay CV(%) ≤ 15 and intra-assay CV(%) ≤ 10 for commercial products. Furthermore, the newly designed well plate demonstrated higher reaction efficiency, even with smaller sample volumes (25~50 μL) compared to the 50~100 μL typically required by commercial well plates. The incorporation of fine patterns increases the number of active sites available for interaction with the samples, thereby significantly enhancing the reaction sensitivity and overall performance.

Key Words: Microwell plate, Sandwich CLEIA, Surface area, Immunoassay, Signal enhancement

서 론

면역분석의 대표적인 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)는 바이오마커 탐지, 감염성 질환 진단, 약물 검사 및 식품 안전성 평가 등 현재까지 다양한 생물학 관련 분야에서 활용이 되고 있다. 특히 HIV, 간염, 면역질환 등의 조기 진단과 치료에 기여하고 있으며, 식품 산업에서는 알레르기 유발 물질 및 병원균 검출을 통한 안전성을 평가하는데 필수적으로 사용된다(Luis et al., 2008). 이러한 ELISA의 주요 장점은 높은 민감도와 특이성이다. 매우 낮은 농도의 단백질이나 항체를 정확하게 검출할 수 있으며, 목표 분자를 특정하여 식별하는 능력이 뛰어나다

(Zhao et al., 2022).

그러나 ELISA 방식은 여러 번의 공정 단계를 거쳐야 한다는 대표적인 단점 외에도 고감도 탐지를 요구하는 특정 마커 분석에서 충분한 분석적 민감도를 확보하지 못하는 경우도 발생하고 있다(Tabatabaei et al., 2021). 이러한 한계를 극복하기 위해 다양한 연구가 진행되고 있으며, 특히 고정화 기술을 통해 민감도를 높이고 분석 시간을 단축시키는 방법들이 개발되고 있다(Zhao et al., 2022). 고정화 향상을 위한 연구 방법으로 첫 번째, polystyrene 재질의 microwell 표면과 항체의 소수성 및 정전기적 상호작용을 통해 물리적 흡착을 기반으로 하는 고정화 방식이 있다(Deng et al., 2024). 하지만 항체가 무작위 방향으로 고정화되거나 변성되는 단점이 있다. 두 번째, 항체의

Received: August 22, 2024 / Revised: September 24, 2024 / Accepted: September 24, 2024

*Researcher, **Professor.

†Corresponding author: Il-Hoon Cho. Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Eulji University, Seongnam 13135, Korea. Tel: +82-31-740-7397, Fax: +82-31-740-7284, e-mail: ihcho@eulji.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

방향성 및 고정화 효율을 높이는 방법으로 플라즈마 표면 처리를 통해 형성된 화학적 기능기를 이용한 공유결합 기반의 고정화 방식이 있다(Mao et al., 2022). 세 번째는 biotin-streptavidin (SA), protein A/G, aptamer 등을 이용하여 항체의 배향성을 통해 민감도를 향상시키는 방법이 있다(Gao et al., 2022). 하지만 이러한 친화성 기반의 고정화 방식은 많은 비용과 분석 시간이 소요되는 단점이 있다(Welch, 2017). 비록 이러한 고정화 효율을 높임으로써 면역분석의 성능을 향상시킬 수도 있지만, 탐지항체를 기반으로 한 bioconjugation을 통해 신호를 증폭시키는 방법도 있다. 특히 SA-HRP과 biotin-HRP 혼합을 통한 다발체를 형성하여(Tao et al., 2020), 기존 SA-HRP 단일 사용 조건보다 약 2배 이상의 감도를 달성할 수 있다. 하지만 여전히 오랜 분석 시간과 많은 비용이 발생하는 문제점은 내포하고 있다.

본 연구에서는 상기한 문제점을 해결하기 위해 micro-well 표면의 미세 패턴 형성과 표면 처리를 통해 분석적 성능 향상을 추구하고자 하였다. 이와 같은 3차원 구조체는 항체를 고정화 할 수 있는 표면적의 증가가 이루어지고 반응적인 측면에서도 기존 2차원 형태에 비해 효율적일 것으로 예상된다. 이로 인해 보다 적은 volume의 샘플로도 분석이 가능할 수 있다. 이러한 새로운 버전의 microwell에 대한 물리화학적 특성화 및 기존 상용화된 제품과의 비교를 통해 본 기술의 유용성을 확인하고자 하며, 향후 상용화를 위해 추가적으로 보완해야 할 사항에 대해 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

재료

Microwell 전처리 용액의 경우 Sigma 사(St. Louis, MO)의 potassium hydroxide (#757551), (3-aminopropyl)triethoxysilane (#440140), glutaraldehyde solution (#49629)를 구입하여 사용하였다. 성능 분석을 위한 재료로는 ThermoFisher Scientific 사(Rockford, IL)의 goat anti-mouse IgG secondary antibody (#31160), goat anti-mouse IgG Fc, HRP (#A16084), Supersignal ELISA Femto maximum sensitivity substrate (#37074) 및 Arista 사(Allentown, PA)의 mouse IgG (#AGMIG-0100)을 구입하였다. 제조된 plate 표면적 계산은 SolidWorks를 활용하였고, 플레이트 디자인의 경우 Solidworks-2020 디자인툴을 사용하였다.

효소화학발광 well-type 플레이트 구축

새로운 well-plate 개발 과정에서는 민감도 향상과 항체 고정화 효율을 높이기 위하여 반응 well 표면에 화학적 처리를 수행하였다. 먼저 well-plate 표면을 1% (w/v) potassium hydroxide로 10분 동안 처리 후, 1% (v/v)의 3-(Aminopropyl)-triethoxysilane을 overnight으로 처리하였다. 이어서 1% glutaraldehyde 용액을 표면에 처리하여 항체 고정화 효율을 증가시켰다(Wang et al., 2019). 또한 표면 well-plate 내부 구조는 날개살을 추가하여 표면적을 기존 상용제품 대비 약 5배 증가시켰으며 내부 표면적 계산은 SolidWorks를 활용하여 수행하였다.

Sandwich CLEIA system

Sandwich CLEIA는 생물학적 샘플 내 특정 단백질을 고감도로 분석 가능한 시스템으로 본 연구에 적용되었다. 첫 번째로 micro well plate에 capture antibody를 첨가 후 37°C에서 1시간 반응 시켰다. 이 후 각 well에 blocking buffer를 첨가한 후 1시간 동안 반응 시켰다. 그 후 각 well에 sample dilution buffer를 1% bovine serum albumin (BSA), 0.1% tween20 / 10 mM phosphate buffered saline (PBS)를 사용하여 표준용액을 희석하여 반응 시켰으며, detection antibody와 secondary antibody를 1 µg/mL로 희석하여 반응 후 horseradish peroxidase (HRP)와 streptavidin (SA) 또는 secondary antibody를 1/1,000로 희석하여 반응 시킨 후 기질을 첨가하여 plate reader를 통하여 발광 신호를 확인하였다.

결 과

최종 개발된 well plate 설계 및 성능표

본 연구에서는 Solidworks2020 디자인 툴을 활용하여 well-plate의 도면을 설계하였고 구조체의 세부적인 정보를 통해 well-plate의 표면적을 정확하게 계산할 수 있었다. 이를 통해 제안된 새로운 well-plate는 기존 상용화된 제품보다 1.5~2.5배 넓은 표면적을 구축하였으며, 정밀하게 설계된 내부 디자인은 항원-항체 간의 효율적인 분석이 가능하도록 하였다(Fig. 1).

Taper well plate에 대한 고정화 효율 분석

첫 번째로 개발된 taper well-plate의 경우 원뿔모양으로 내부에 날개살이 추가되지 않는 구조이다. 이에 대한 성

능 분석은 direct CLEIA 시스템을 적용하여 행하였으며, capture antibody (mouse IgG) 농도에 따른 신호 측정을 통해 진행하였다. 상용화 제품과 개발된 taper well-plate에 capture antibody를 고정화하여 goat anti Mouse IgG-HRP를 통해 분석을 진행하였다. 그 결과 taper well-plate의 경우 표면적이 상용화 제품(64 mm²)에 비해 상대적으로 낮게 (60 mm²) 나타났으나, 이로 인한 고정화 효율의 저하 현상은 관찰되지 않았다. 또한 개발된 taper well-plate의 고정화에 사용된 capture antibody 총 용량은 50 µL이었으며, 상용화 제품의 경우 100 µL 용량을 사용하였다. 이를 통해 첫 번째로 개발된 taper well-plate의 경우 capture antibody 사용 용량이 적은 상태에서도 타사 제품과 비교하여 성능이 크게 저하되지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

5 wing well-plate에 대한 고정화 효율 분석

두 번째로 개발된 5 wing well-plate는 날개살 구조물을 추가한 형태이다. 이를 통해 taper well-plate에 비해 약간의 표면적 증가가 이루어짐을 확인하였다(Fig. 3). 표면적 증

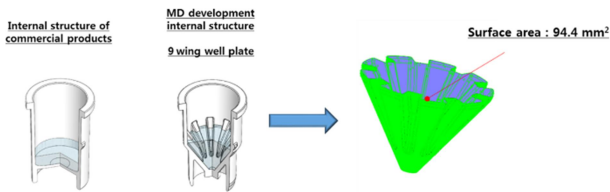


Fig. 1. Design tools were utilized to create fins for the well plate drawing. Subsequently, the surface area was calculated using SolidWorks software. The outcome was a well plate drawing with a greater surface area than that of commercial products.

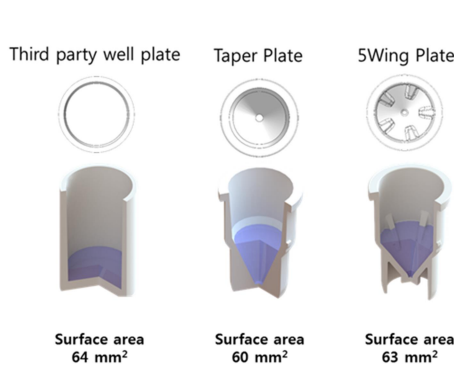


Fig. 3. The analysis of the signal in relation to the concentration of the capture antibody through direct CLEIA revealed that the newly developed 5-wing well plate had a significantly increased surface area of 3 mm², attributed to the addition of fins. Additionally, despite having a smaller volume, the immobilization efficiency was found to be 1.25 times higher than that of commercial products.

대에 따른 고정화 효율 성능 분석은 direct CLEIA 방식으로 동일하게 진행하였다. 그 결과 소량의 볼륨(50 µL)을 적용하였을 시 상용화된 제품 뿐만 아니라 taper plate에 비해 높은 고정화 효율을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이는 날개살 구조물의 적용이 well-plate의 표면적과 기능을 향상시키는 데 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다. 따라서, well-plate의 성능을 향상시키고자 할 때에는 소량 볼륨을 사용하는 실험에서의 고정화 효율을 고려하여 적절한 구조물을 도입하는 것이 해당 연구의 중요한 관점으로 작용한다.

5 wing well-plate에 대한 특성 확인

통상적인 고감도의 면역분석 수행 시 5 wing well-plate

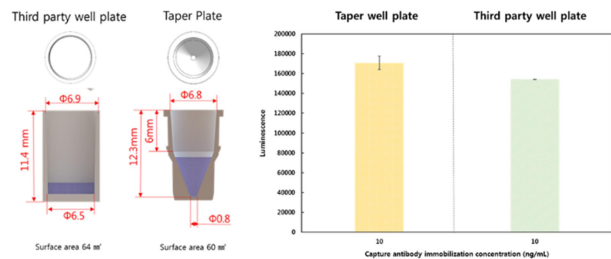
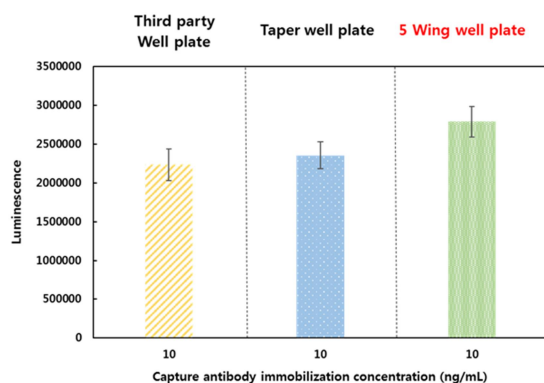


Fig. 2. The evaluation of the surface area of the well plate using SolidWorks demonstrated that the developed plate possessed a surface area of 60 mm², which is similar to the commercial product's 64 mm². There was no notable disparity between these values. The commercial product utilized a sample volume of 100 µL, while the developed plate required only 50 µL. Despite having a smaller surface area, the performance of the developed plate was comparable to that of the commercial product, even with a lower sample volume.



의 특성을 파악하기 위해 sandwich CLEIA 시스템을 적용하여 테스트를 진행하였다. Capture antibody (goat anti-mouse IgG)를 고정화 한 후 mouse IgG에 대한 감도를 확인한 결과, 5 wing well-plate를 사용한 경우 타사 제품 보다 배경 신호가 낮아져 특이 신호를 명확하게 구별할 수 있었다(Fig. 4). 이로서 5 wing well-plate는 날개살 구조물 구축을 통해 표면적이 넓어지는 이점과 동시에 배경 신호가 낮아지는 이점이 확인되었다. 이러한 결과는 well plate의 구조물이 표면적을 넓히는 데만 있지 않고, 배경 신호를 줄여 더욱 뚜렷한 결과를 얻을 수 있음을 시사한다. 따라서, 더 많은 구조물을 well plate에 형성시켜 그 효과를 검증할 필요가 있다.

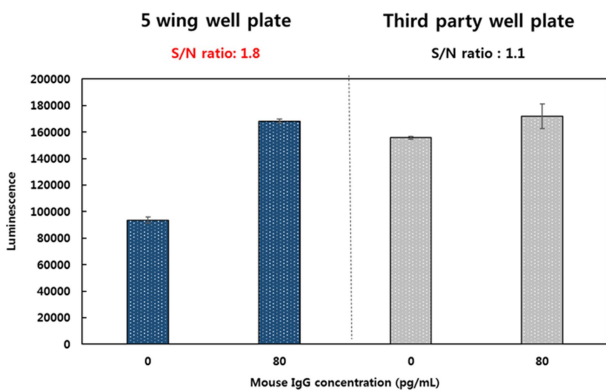


Fig. 4. The performance of the developed 5-wing well plate was evaluated through Sandwich CLEIA analysis. The results showed that the signal-to-noise (S/N) ratio of the developed 5-wing well plate was 1.8, indicating a significantly higher specific signal than the background noise. This advantage is attributed to the increased surface area owing to the addition of fins inside the plate, as well as the reduction in background noise.

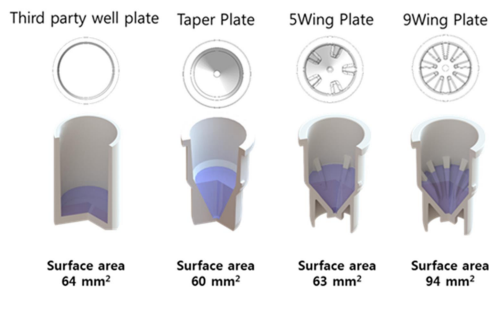


Fig. 5. For the 9-wing well plate, which includes a total of nine fins, the surface area increased by approximately 0.68 times compared to that of commercial products. Direct CLEIA analysis confirmed that the immobilization efficiency improved, with the sensitivity increasing by approximately 0.54 times.

9 wing well-plate의 고정화 효율 및 성능 평가

구조물 증가에 따른 추가적인 성능 향상을 목적으로 최종 버전의 9 wing well-plate를 구축하여 그 고정화 효율 분석을 direct CLEIA 방식으로 진행하였다. Capture antibody 로 mouse IgG를 사용하여 상용화 제품과 개발된 3가지 형태의 well-plate에 각각 10 ng/mL 농도로 mouse IgG를 고정화 하여 goat anti mouse IgG-HRP를 통해 분석을 진행 하였다. 우선 최종 개발된 9 wing well-plate는 초기에 개발 된 taper well-plate와 5 wing well-plate에 비해 현저한 표면 적의 증가(94 mm²) 및 높은 고정화 효율이 있음을 확인하 였다(Fig. 5). 또한 sandwich CLEIA 방식을 통한 각 well-

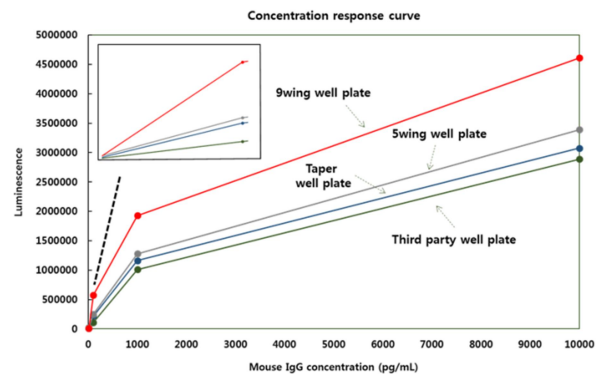


Fig. 6. The performance analysis of three well plate types developed using Sandwich CLEIA revealed that the tapered well plate and the 5-wing well plate exhibited equivalent or superior performance compared to commercial products. Additionally, the 9-wing well plate showed a sensitivity more than twice that of commercial products. The added wings not only increased the surface area, but also enhanced the interaction with the samples, allowing for the loading of more samples onto the plate.

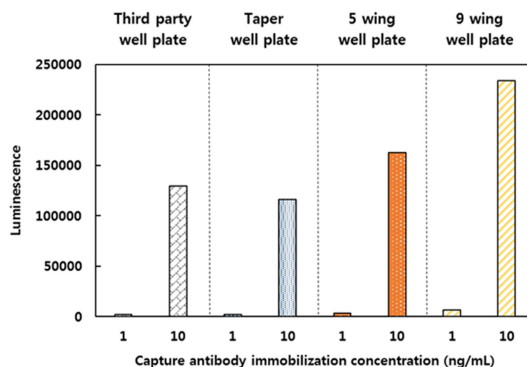


plate 형태별 비교 분석에서도 9 wing well-plate의 분석적 민감도가 높음을 알 수 있었으며(Fig. 6), signal-to-noise 분석 결과 또한 상용화 제품에 비해 배경 신호 대비 특이 신호가 높은 것으로 확인하였다(Fig. 7). 즉, 여기서도 구조물에 추가된 날개살은 표면적 증가 뿐만 아니라 샘플과의 상호작용을 촉진시켜 면역분석의 성능 향상을 극대화시킬 수 있었다.

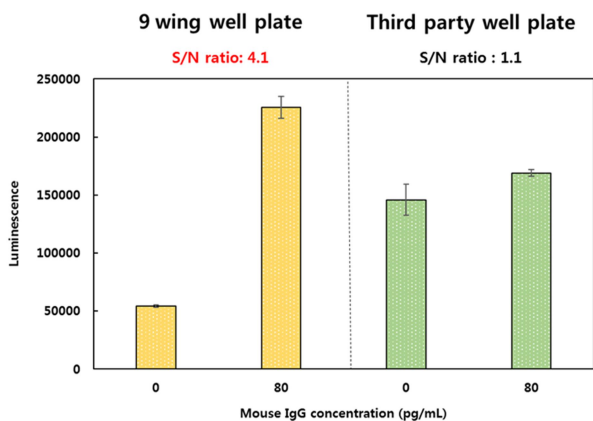
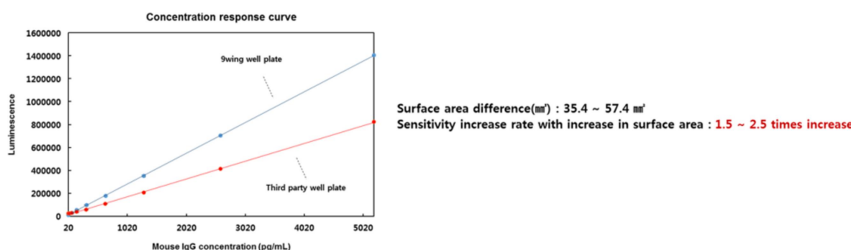


Fig. 7. The signal-to-noise (S/N) ratio of the 9-wing well plate was evaluated using a sandwich CLEIA assay. The results indicated that the S/N ratio was 4.1, demonstrating a significantly higher performance compared to a commercial version of well plate.



고찰

본 연구는 항원-항체 반응을 획기적으로 향상시키는 새로운 형태의 well-plate 구조를 개발하여 생물학 분야에서 범용적으로 사용되는 microwell 기반의 면역분석의 성능을 증가시키는 것에 대해 기술하였다. 기존 well-plate는 표면적과 반응 효율의 한계로 인해 민감도와 특이성이 필요한 실험에서 제한적인 성능을 보였으나, 본 연구에서

Fig. 8. Comparison of analytical performance between the developed 9-wing well plate and the commercial one. The increased surface area resulted in signal enhancement ranging from 1.5 to 2.5 times.

Table 1. Comparison of analytical performances between commercial and MD well plate

Performance data	Third party well plate		MD well plate	
LOD-LOB+1.645 (blank SD)	No. 1, 2, 3 average LOD = 91 pg/mL		No. 1, 2, 3 average LOD = 37.6 pg/mL	
Analytical sensitivity	91 pg/mL		38 pg/mL	
Measuring range	100~12,000 pg/mL		40~12,000 pg/mL	
Reaction volume	100 μ L		50 μ L	
Reaction time (based on 4 levels)	30 min		30 min	
Reproducibility	Inter-assay CV	Intra-assay CV	Inter-assay CV	Intra-assay CV
	< 15%	< 10%	< 11%	< 9%

제안된 3가지 형태의 well-plate와 내부 날개살 구조는 이러한 문제점을 성공적으로 극복하였다. Taper well-plate는 상대적으로 작은 표면적에도 불구하고 높은 고정화 효율을 유지하였고, 5-wing well-plate는 내부 날개살을 추가하여 표면적을 증가시키고 배경 신호를 줄일 수 있었다. 특히 새롭게 설계된 9 wing well-plate는 단위 부피당 표면적을 기존 상용 제품 대비 1.45배 증가시켜 항체 고정화 효율을 극대화하였으며, 이를 통해 sandwich CLEIA 시스템에서 LOD를 약 2.5배 향상시켰다. 또한, 표면적 증가와 고정화 효율의 개선은 CV (%)와 검출 범위에서도 우수한 성능을 보여주었다. 이러한 성과는 고감도 진단과 정밀한 정량 분석을 요구하는 다양한 분야에서 매우 중요한 의미를 지닐 수 있다. 특히, ELISA 및 CLEIA와 같은 면역 분석법에서 샘플 부피와 반응 시간을 줄이는 것은 매우 중요하다. 새로운 well plate는 표면적 증가로 인해 반응 효율이 향상되어 더 작은 샘플 부피로도 높은 민감도와 특이성을 확보할 수 있게 되었다. 이는 실험 처리량과 비용 효율성을 크게 향상시키며, 연구실 및 산업 현장에서의 응용 가능성을 확대할 수 있다. 향후 연구에서는 본 연구에서 개발된 well-plate의 산업적 대량 생산 가능성을 검토하고, 다양한 항원-항체 시스템에 대한 적용성을 평가하고자 한다. 또한, 새로운 소재와 표면 처리 기술을 적용하여 well-plate의 성능을 더욱 향상시키는 연구도 병행하고자 한다.

List of abbreviations

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

CLEIA: Chemiluminescence enzyme immunoassay

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Technology Innovation Program (or Industrial Strategic Technology Development Program-ATC+) (20008891, Development of fully automatic fast-CLEIA system and 96-well plate technologies based on enzyme chemiluminescence) funded By the Ministry of Trade, Industry & Energy (MOTIE, Korea).

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

- Deng Y, Liu J, Lu Y, et al. Novel Polystyrene-Binding Nanobody for Enhancing Immunoassays: Insights into Affinity, Immobilization, and Application Potential. *Analytical Chemistry*. 2024. 1597.
- Gao S, Guisan JM, Rocha-Martin J. Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms - A critical review. *Analytica Chimica Acta*. 2022. 1189.
- Luis A, Gonzalez I, Garcia T, et al. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*. 2008. 1-8.
- Mao X, Yu B, Li Z, et al. Comparison of lateral flow immunoassays based on oriented and nonoriented immobilization of antibodies for the detection of aflatoxin B1. *Analytica Chimica Acta*. 2022. 1221.
- Tabatabaei MS, Islam R, Ahmed M. Applications of gold nanoparticles in ELISA, PCR, and immuno-PCR assays: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2021. 1143.
- Tao Z, Zhou Y, Li X, et al. Competitive HRP-Linked Colorimetric Aptasensor for the Detection of Fumonisin B1 in Food based on Dual Biotin-Streptavidin Interaction. *Biosensors*. 2020. 10.
- Wang C, Lakshmi Priya T, Gopinath CB. Amine-Aldehyde Chemical Conjugation on a Potassium Hydroxide-Treated Polystyrene ELISA Surface for Nanosensing an HIV-p24 Antigen. *Nano-scale Res Lett*. 2019. 14.
- Welch NG, Scoble JA, Muir BW, et al. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). *Biointerphases*. 2017. 16.
- Zhao C, Pan B, Wang M, et al. Improving the Sensitivity of Nanofibrous Membrane-Based ELISA for On-Site Antibiotics Detection. *ACS Sensors*. 2022. 7.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2024.30.3.131>

Cite this article as: Kim S, Kim E, Lee C, Sull J, Cho IH. Structural Manipulation of Microwell for Enhancing Analytical Performance of Enzyme Immunoassay. *Biomedical Science Letters*. 2024. 30: 131-136.