

인플루엔자 바이러스 검출을 위한 종이 기반 neuraminidase 효소 활성 평가 센서 개발

황철환 · 정성근* · 박한규 · 이창수*[†] · 김윤곤[†]

송실대학교 화학공학과
06978 서울특별시 동작구 상도로 369

*충남대학교 화학공학과

34134 대전광역시 유성구 대학로 99

(2015년 12월 6일 접수, 2016년 1월 10일 수정본 접수, 2016년 1월 14일 채택)

Paper-Based Neuraminidase Assay Sensor for Detection of Influenza Viruses

Cheol-hwan Hwang, Seong-Geun Jeong*, Han-Kyu Park, Chang-Soo Lee*[†] and Yun-Gon Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Soongsil University, 369, Sangdo-ro, Dongjak-gu, Seoul, 06978, Korea

*Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, 99, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34134, Korea

(Received 6 December 2015; Received in revised form 10 January 2016; accepted 14 January 2016)

요 약

본 연구에서는 인플루엔자 바이러스 표면에 존재하는 neuraminidase 효소의 활성을 평가 할 수 있는 종이칩 기반의 분석 시스템을 구축하였다. 종이칩의 장점을 살려 분석 전문가와 장비 없이 현장 진단(Point-of-care)이 가능하도록 X-Neu5Ac 기질을 이용한 비색분석법을 통해 시료 내 neuraminidase 효소의 존재를 정량적으로 확인 할 수 있도록 설계 및 제작하였다. Neuraminidase 효소의 활성을 확인할 수 있는 종이칩 센서(Paper-based neuraminidase assay sensor; PNAS) 성능 실험 결과 neuraminidase를 0.004 U/mL 농도부터 검출 가능하였으며, 인간 혈청에 각기 다른 농도로 존재하는 neuraminidase 효소의 양을 활성 평가를 통해 정량적으로 검출할 수 있음을 입증하였다($R^2 > 0.99$). 또한, 보관 기간에 따른 종이칩의 안정성 평가 결과 빛이 차단 된 4 °C 환경에서 보관 시 70일까지 초기 성능이 안정하게 유지됨을 확인하였다. 마지막으로, PNAS 상에서 효소 반응의 신뢰성 평가를 위해 미카엘리스-멘텐 동역학 (Michaelis-Menten kinetics)을 적용하여 X-Neu5Ac 기질에 대한 neuraminidase의 동역학 분석 결과 K_m 값은 8.327×10^{-3} M으로 확인되었으며, 이 값은 용액상에서의 효소 반응 속도 계산으로부터 산출된 값과($K_m = 0.89 \times 10^{-3}$ M) 근사한 수치임을 확인하였다. 본 연구로부터 개발된 종이칩 기반의 neuraminidase 효소 활성 평가 시스템은 인플루엔자 바이러스의 신속하고 안전한 검출에 다양하게 응용 될 수 있을 것으로 생각된다.

Abstract – In this study, we described a paper-based neuraminidase assay sensor (PNAS) which can be applied to detect the infection by influenza viruses. The PNAS was designed and manufactured to quantitatively identify the levels of neuraminidase in the sample, which is based on colorimetric analysis using the X-Neu5Ac substrate. The limit of detection of the PNAS was determined as 0.004 U/mL of neuraminidase. According to the amount of neuraminidase in human serum, the PNAS could monitor the enzyme activity with a good linearity ($R^2 > 0.99$). In addition, the initial performance of the PNAS has been maintained up to 70 days in the 4 °C. Finally, we demonstrated whether the Michaelis-Menten kinetics is applied to the PNAS, which can show the reliability of the enzyme reactions. The kinetic studies indicated that the PNAS provides the good condition for enzyme reactions ($K_m = 8.327 \times 10^{-3}$ M), but they were performed on paper chip nonetheless. The paper-based neuraminidase assay sensor may be useful in a wide range of rapid and safe detection of influenza virus.

Key words: Influenza virus, Neuraminidase, Paper chip, Enzyme kinetics, X-Neu5Ac, Colorimetric assay

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: rhadum@cnu.ac.kr, ygkim@ssu.ac.kr

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.

1. 서 론

인플루엔자는 기존에 유행하던 계절 인플루엔자 바이러스에 의한 감염의 경우 대부분 수 일간 고열과 기침, 두통, 구토 등의 증상을 겪다가 회복을 하지만 폐렴 등의 치명적인 합병증을 유발 할 수 있다[1]. 따라서 비슷한 임상 증상을 갖게 되는 여러 질병들과 초기에 구별하여 진단한 후 적절한 치료를 하는 것이 신종 인플루엔자의 경우 유행병으로 퍼지는 것을 막을 수 있다. 인플루엔자 바이러스 종류는 크게 A, B, C 바이러스로 분류되며, 이중 A와 B 바이러스가 주로 유행병으로써 사람에게 질병을 유발하며 C 바이러스는 대략 6세 미만의 어린이에게만 미약한 감기증상을 유발한다[2,3]. B 바이러스는 아형(subtype)이 발견되지 않았고 그 증상이 비교적 약하며 성인에게 감염되는 일반적인 독감 바이러스는 A 바이러스이다[4]. 인플루엔자 바이러스가 숙주 세포를 감염시킨 후에 복제되어 증식된 바이러스가 숙주 세포 밖으로 나오는 과정에서 숙주세포 표면의 시알산(Sialic acid)과 인플루엔자 바이러스 표면의 hemmagglutinin 사이의 결합을 neuraminidase의 가수분해를 통해서 끊어야만 가능하다[5,6]. 특히, A 바이러스는 표면에 존재하는 HA와 NA의 조합을 통해 인플루엔자 A 바이러스의 항원 특이성 및 다양한 아형이 결정된다(예: H5N1, H7N2)[7]. 따라서, 인플루엔자 바이러스의 구조에 대한 이해는 바이러스 감염 진단 시스템 개발에 있어서 매우 중요한 요소이다[8-10].

고위험군 신종 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환은 개발도상국들에서 사망의 주요 원인이며 그 중 상당수는 필요한 시기에 적절한 진단의 부족 때문에 발생한다. 하지만 최근에는 해당 질환 발병 지역에서 체류했던 내국인들의 귀국에 따라 예기치 못하게 전국적인 유행병으로서 발병하여 여러 선진국에서조차 국가적 재앙사태로까지 이르는 사례가 빈번해 지고 있다. 신종 바이러스 치료제의 부재로 인한 어려움도 있지만 신속하고 정확한 진단에 따른 초기 감염 환자들에 대한 초동 대응 및 격리가 무엇보다 중요한 문제로 제기 되고 있다. 지금까지 바이러스 감염 진단은 크게 혈청학적 방법, 바이러스 배양, 바이러스 항원 검출, 바이러스 핵산 검출 등의 방법으로 진단이 이루어진다[11-15]. 최근 이러한 바이러스 진단 방법들에 있어서 기술적 진보가 더해지면서 바이러스 감염이 의심되는 환자에 대한 진단율이 크게 높아졌다[16]. 하지만 이러한 ‘gold standards’는 분석 결과를 얻기까지 비교적 오랜 시간이 소요되며 진단을 위한 고가의 분석 장비도 필수적이므로 현장에서 바이러스를 다양한 시료로부터 신속하게 검출하는데 있어서 많은 어려움이 있다. 이에 대한 대안 기술로서 microfluidic lab-on-a-chip 기술을 이용한 여러 point-of care testing (POCT) 진단 시스템이 개발되어 현장에서 보다 신속한 진단이 가능하도록 기술 개발이 진행되고 있다[17-23]. 이러한 기술들은 현장 진단에 있어서 1차 양성 반응 시 신속한 환자 격리 조치 및 적절한 초기 치료를 시작할 수 있게 할 뿐 아니라, 1차 음성 반응에 대해서 2차 정밀 진단을 통해 그 결과를 재확인 할 수 있는 시간을 확보해줄 수 있다. 하지만, 진단용 칩을 생산하는데 있어서 복잡한 제작 공정(i.e., photo-lithography or soft-lithography)으로 인해 초기 생산 비용이 높고 대량 생산에 제약이 있으며, 여전히 기기 내 미세유체의 흐름을 정밀하게 조절하고 신뢰할 수 있는 결과를 얻기에 사용자 편의성이 부족한 문제가 남아 있다. 최근 보고에 따르면, 종이기반 미세 유체 분석 장치(microfluidic paper-based analytical device, μ PAD)를 이용한 질병 진단 기술에 대한 개

발이 활발히 진행되고 있다[24,25]. 종이칩은 제작 비용이 매우 저렴하고, 유체 조작을 위한 별도의 펌프가 필요 없으며, 비색분석법 등을 적용하여 눈으로 진단 결과를 쉽게 확인 할 수 있어서 응용 가능성이 매우 높다. 또한 진단에 사용된 페이퍼 칩을 바로 소각할 수 있으므로 2차 감염을 막을 수 있는 장점이 있다. 따라서, 고위험군 신종 인플루엔자 바이러스 감염 질환을 초기에 현장에서 1차 스크리닝을 하는데 매우 유용한 진단 방법으로 활용 될 수 있을 것이며, 특히 제 3세계 국가와 같이 전기 설비와 전문 인력이 부족한 환경에서 초저가형 진단(zero-cost diagnosis)을 실현화하는데 매우 높은 가능성을 갖는다[26-29].

본 연구에서는 인플루엔자 바이러스 표면에 공통적으로 존재하는 neuraminidase 효소의 활성을 확인할 수 있는 종이칩 센서(Paper-based neuraminidase assay sensor; PNAS)를 개발하여 단순 검출뿐만 아니라 검량 데이터를 통해 정량적 수치를 확보하였다. 바이러스 표면의 neuraminidase 효소의 활성을 비색분석법(colorimetric assay)을 통해 확인하기 위해 X-Neu5Ac 기질을 사용하였고, neuraminidase 양의 증가에 따른 발색(청남색) 정도 사이의 관계가 높은 선형성을 보임을 확인하였다($R^2 > 0.98$). 또한, 제작된 종이칩은 70일까지 냉장 보관 상태에서 안정적으로 사용이 가능하였다. 제작된 종이칩 상에서 미카엘리스-멘텐 동역학(Michaelis-Menten kinetics)에 따른 neuraminidase의 K_m 값과 V_{max} 값을 계산 할 수 있었으며 이 값은 기존 연구에서 용액상에서의 효소 반응 속도 계산으로부터 산출된 값과($K_m = 0.89 \times 10^{-3} M$) 근사한 수치를 얻을 수 있었다[30]. 종이칩 상에서 효소-기질 반응을 응용한 비색분석 종이칩에 대한 연구는 혈액 필터 적용을 통한 간 기능 측정용 종이칩[31], 식중독균 검출을 위한 발색 기질 흡착 종이칩[27], 종이기반 ELISA (enzyme-linked immune sorbent assays)[32], 등 다수 보고되었다. 그러나 종이기반 효소의 반응속도 연구 및 용액상 효소 반응 속도 상수와 비교에 대한 보고는 최초이었으며, 매우 간단한 형태의 종이칩 상에서도 유의미한 정량 결과의 확보가 가능하였음을 입증하였다.

2. 실험

2-1. 실험 재료

Glyco[®] sequencing-grade Neuraminidase (Sialidase) A (N-acetylneuraminatase glycohydrolase)는 Prozyme사 제품으로 0.1 M potassium acetate

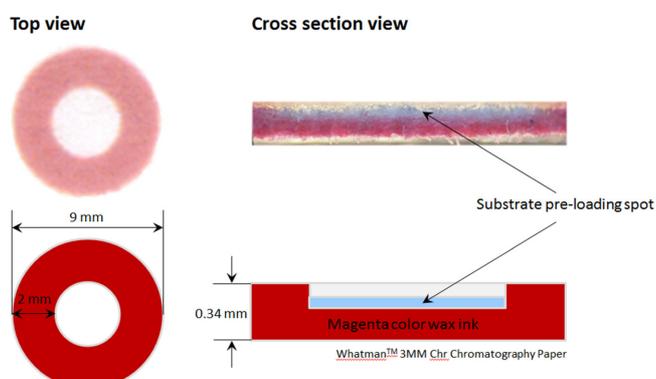


Fig. 1. Schematic of the paper-based neuraminidase assay sensor (PNAS). The PNAS sensor was simply designed as reservoir type. It was patterned with circular hydrophilic zone (d=2 mm) surrounded by a hydrophobic magenta color wax barrier.

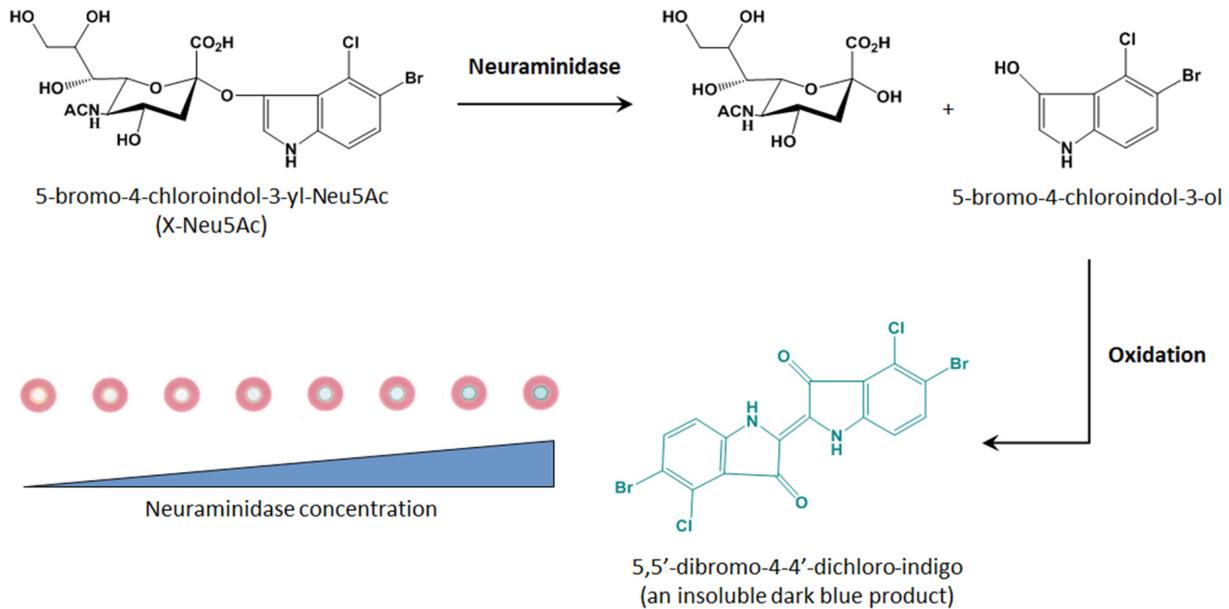


Fig. 2. Overall strategy for paper-based neuraminidase assay sensor. The halogenated 5-bromo-4-chloroindol-3-ol is produced by hydrolysis of the X-Neu5Ac with neuraminidase. Then a 5,5'-dibromo-4-4'-dichloro-indigo (an insoluble dark blue compound) is produced through the rapid aerobic oxidation reaction.

buffer (pH 5.5)에 5 U/mL로 녹여 냉장(4°C)에 보관하며 실험에 따라 희석하여 사용하였다. X-Neu5Ac (5-Bromo-4-Chloroindol-3-yl 5-Acetamido-3,5-Dideoxy- α -D-Glycero-D-Galacto-2-Nonulopyranosidonic Acid)는 Peptide사 제품으로 0.1 M potassium acetate buffer (pH 5.5)에 40 mM로 제조하고 냉동(-20°C) 보관하며 이를 실험에서는 희석하여 사용하였다. 종이는 Whatman 3MM Chr Chromatography Paper를 사용한다. 또한 종이칩 프린팅은 Xerox사의 Colorcube 8570 wax printer, GMP사의 Fastsync-320R6, Samsung사의 SCX-4623FK scanner를 사용하였다. Healthy human serum은 동국대학교 병원에서 IRB (Institutional Review Board) 승인을 통해 제공받았다.

2-2. PNAS 제작

본 종이기반 분석 기기는 매우 간단한 저장소 형태이며 종이칩 디자인은 Adobe Illustrator CS6를 사용하여 양면으로 Fig. 2에서 보이는 것과 같이 디자인 하였다. 전체 지름은 9 mm의 원형으로, 중앙에 저장소(지름 5 mm) 형태를 갖도록 하여 효소-기질 반응이 일어나는 동안 물을 머금고 있도록 하여 neuraminidase에 의해 기질이 가수분해 될 수 있도록 하였다. 디자인된 패턴은 wax기반 프린터로 whatman사의 크로마토그래피 종이에 양면 인쇄했다. 인쇄된 종이는 상온에서 식힌 뒤, 140°C에서 laminator를 사용하여 s1 속도로 가열하였다. 형성된 유체 저장소에 기질 농도 최적화 실험을 통해 설정된 40 mM X-Neu5Ac를 3 μ L씩 떨어트린 후 상온에서 말려 흡착시킨다. 그 후 빛이 차단된 상태로 냉장(4°C) 보관하고 이후 실험에 사용한다(Fig. 1).

2-3. Neuraminidase 검출 한계(LOD, limit of detection) 측정

Neuraminidase는 0.1 M potassium acetate buffer로 희석시켜(0.004, 0.006, 0.010, 0.014, 0.016 U/mL) 준비 한다. 희석된 샘플들은 동시에 PNAS에 3 μ L씩 떨어뜨리고, PNAS에서 반응이 일어나는 동안 샘플이 건조되지 않도록 페트리 디쉬 안에 물을 채워 그 안에서 반

응을 진행한다. 상온(25°C)의 빛이 차단된 곳에서 90 분간의 반응 시간이 끝나면 120°C 오븐에 넣어 급속 건조시킨다.

2-4. 혈액 내 neuraminidase 효소 활성 평가

PNAS에서 사람 혈액 내 neuraminidase 검출 가능성을 검증하고자 사람 혈청에 Glyko® sequencing-grade Neuraminidase를 직접 넣어 샘플(5 U/mL)을 준비한다. 준비한 샘플을 희석(0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 U/mL)하여 PNAS에 3 μ L씩 떨어뜨려 고습도 환경, 상온(25°C)의 빛이 차단된 곳에서 90 분간의 반응 시간이 끝나면 120°C 오븐에 넣어 급속 건조시킨다.

2-5. PNAS 안정성 평가

PNAS의 안정성 평가를 위해 위에서 제작한 PNAS를 빛을 차단한 후 냉장(4°C) 보관하여 일정 기간마다 꺼내어 초기성능이 유지되는지 확인하였다. Neuraminidase는 0.1 U/mL 농도로 3 mL씩을 사용하였으며 발색 반응물 5,5'-dibromo-4-4'-dichloroindigo (Dark blue compound) 이 포화되어 성능저하에 상관없이 상향 평준화 되는 것을 방지하기 위해 반응시간을 30분으로 줄여서 실험을 진행하였다. 반응 정지를 위해 이전 방법과 같이 120°C 오븐에 넣어 급속 건조시킨다.

2-6. Neuraminidase 동역학 분석

PNAS에서 Neuraminidase의 동역학적 특성분석을 위해, 위에서 설명된 종이칩 제작법에 X-Neu5Ac의 농도만을 달리하였다. 먼저 효소-기질 반응 초기속도(V_0)에 해당하는 초기반응 시간(t_0)를 구하였다. 기질은 3가지 농도(1.25 mM, 10 mM, 40 mM)로 종이칩 상에 흡착 건조시킨 후 0.1 U/mL의 Neuraminidase sample을 3 μ L씩 떨어뜨려 반응시키는데, 각 반응 시간(5, 10, 30, 50, 70, 90 min) 후 120°C 오븐에 넣어 급속 건조시켜 반응을 멈추고 그 회색조 세기를 측정한다.

초기 반응 시간(t_0)가 결정되면 하네스-울프 그래프(Hanes-Woolf plot)를 위한 실험을 진행한다. X-Neu5Ac의 농도가 각기 다르게 (1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 mM) 흡착 되어있는 PNAS를 각각 준비한 후 0.1 U/mL의 Neuraminidase 3 μ L와 10분간(t_0) 반응시킨다. 반응 정지를 위해 120 °C 오븐에 넣어 급속 건조시키고 각 결과물의 회색조 세기를 측정한다.

2-7. 기질 생성물 측정

Neuraminidase 효소 반응에 의하여 생성된 불용성 생성물은 청남색으로 발색하며, 발색 상태는 건조된 상태에서 사무용 스캐너 (Samsung, SCX-4623FK scanner)에 의해 디지털 이미지(300 DPI, JPG format)로 전환된다. 전환된 이미지는 'Image J' 소프트웨어를 사용하여 32bit gray scale로 변환한다. 변환된 이미지에서 저장소 전체면적을 선택하여 평균 회색조 세기(average gray intensity)를 측정한다.

3. 결과 및 고찰

3-1. Neuraminidase assay를 위한 종이칩 제작

Neuraminidase 효소 활성을 평가할 수 있는 종이칩(PNAS) 제작은 인플루엔자 바이러스의 표면에 공통적으로 존재하는 neuraminidase 효소를 직접 검출 할 수 있는 용도로 응용이 가능하다. 또한, 단순한 정성 평가가 아닌 종이칩 상에서 효소의 활성이 정량적으로 평가될 수 있다는 것을 효소 반응속도론(enzyme kinetics)을 통해 증명이 된다면 종이칩 결과를 더 신뢰할 수 있게 될 것이다. 따라서 본 연구에서는 매우 간단한 종이칩 상의 저장소(reservoir) 형태의 디자인으로부터 충분한 효소반응이 일어 날 수 있도록 하였으며 바이러스 표면의 neuraminidase 효소의 활성을 확인하기 위해 Saito 등[33]의 연구에서 비색분석법 기질로 사용한 X-Neu5Ac 기질을 사용하였다. 종이칩에 X-Neu5Ac를 먼저 흡착시켜 건조시킨 후 각기 다른 농도의 neuraminidase를 다르게 처리하여 가수분해 된 5-bromo-4-chloroindol-3-

ol은 산화반응에 의해 서로 이합체화(dimerization)를 이루며 청남색의 불용성 생성물을 만들게 된다(Fig. 2). 발색된 색의 질기는 스캐너를 통해 디지털 이미지로 변환하여 측정하였고, Image J 프로그램을 사용하여 이미지의 색상을 32bit gray scale로 변환하여 저장소 표면 전체 면적의 평균 회색조 세기를 측정하였다. Neuraminidase 효소 활성 측정을 위한 종이칩은 눈으로도 결과를 쉽게 확인 할 수 있도록 설계되었으며 별도의 유체 조작 없이도 종이칩 상에서 효소와 기질 반응을 일정하게 유도할 수 있었다.

3-2. PNAS 상에서 Neuraminidase 검출 한계 측정

Neuraminidase 효소 활성 평가를 위한 종이칩 제작을 위해 먼저 종이칩 상에 흡착 건조 시킬 X-Neu5Ac 기질 농도의 최적화 및 neuraminidase 효소의 검출 한계(limit of detection) 값을 측정하였다. X-Neu5Ac 기질을 각기 다른 농도(1, 5, 10, 20, 30, 40 mM)로 흡착 건조 시킨 후, 고농도의 neuraminidase (0.1 U/mL)를 처리하여 기질 농도에 따른 포화 시작점(onset of saturation)을 찾았다. 기질의 초기 농도부터 30 mM 까지 neuraminidase의 가수분해 반응을 통해 만들어지는 생성물의 색깔 변화가 선형성($R^2 > 0.9812$)을 보이다가 그 이상의 농도 (40 mM)에서는 포화가 시작됨($R^2 > 0.9669$)을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3a). 따라서, 효소의 반응 속도론에 있어서 초기 속도인 V_0 가 V_{max} 와 같아져 기질의 농도에 대해 V_0 가 독립성을 갖게 되는 기질 농도인 40 mM에서 다음 neuraminidase의 검출 한계(limit of detection)를 측정하였다. 40 mM의 X-Neu5Ac 기질이 흡착 건조된 PNAS에 다양한 농도(0.004, 0.006, 0.010, 0.014, 0.016 U/mL)의 순수 neuraminidase를 처리하여 종이칩 상에서 색 변화를 관찰하였다. 실험 결과 control (0 U/mL)에 비하여 0.004 U/mL부터 회색조의 변화를 확인 할 수 있었다(p value < 0.05). 이후 연구에서 사용한 neuraminidase의 농도는 Minami 등[34]의 PVDF 막 기반 neuraminidase 연구 결과를 참고하여 보다 다양한 기질 농도에 대해 종이기반 칩에서 안정적으로 색 변화를 관찰할 수 있도록 0.01 U/mL 이상을 사용하였다(Fig. 3b).

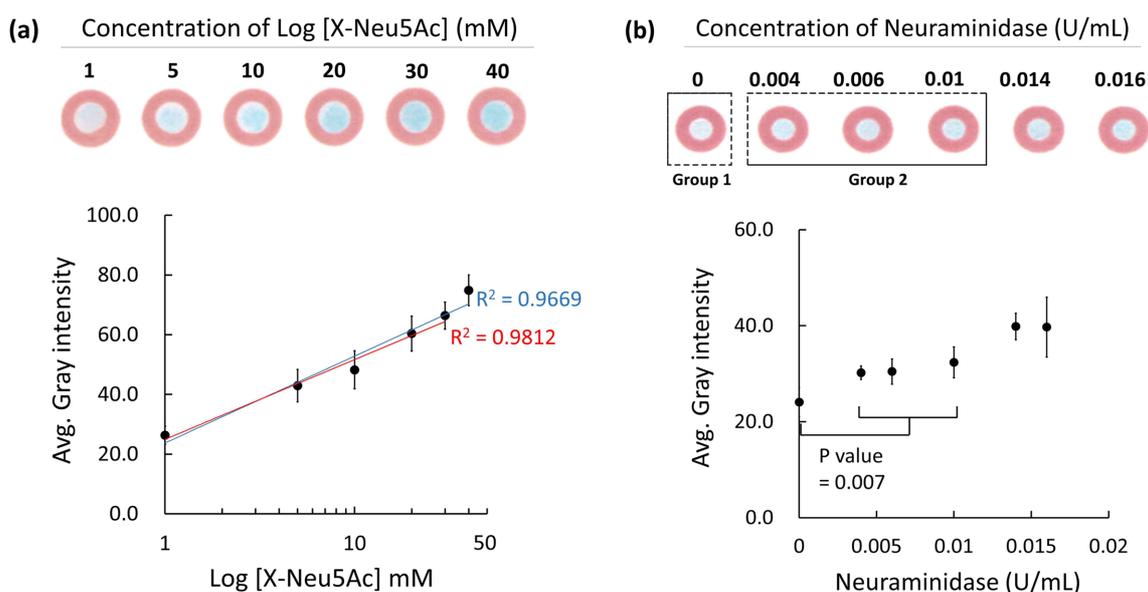


Fig. 3. Optimization of X-Neu5Ac concentration for neuraminidase assay on paper. (a) The neuraminidase substrate (X-Neu5Ac, 1, 5, 10, 20, 30, 40 mM) was pre-dried on the circular hydrophilic zone in advance, and then high-concentrated neuraminidase (0.1 U/mL) was treated to determine the onset of saturation. (b) Characterization of the detection limit of PNAS for neuraminidase enzyme assay.

3-3. PNAS를 이용한 혈액 내 neuraminidase 검출 및 PNAS 안정성 평가

실제 인플루엔자 바이러스에 의해 감염이 되었을 때 혈액 시료를 채취하여 혈액 내 바이러스를 neuraminidase 효소 활성을 통해 검출해야 하므로 이에 대한 모델 실험으로서 순수한 neuraminidase 효소를 직접 정상인의 혈액에 미리 첨가하여 PNAS 상에서 이를 정량적으로 검출 가능한지 여부를 확인하였다. 위의 neuraminidase 효소 검출 한계 실험으로부터 안정적으로 색 변화를 확인 할 수 있었던 0.01 U/mL 이상 농도(0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 U/mL)를 각각 정상인의 혈청(healthy human serum)에 첨가하고 40 mM X-Neu5Ac 이 흡착 건조된 PNAS를 이용하여 효소 활성을 테스트 하였다(n=3). Fig. 4에서 볼 수 있듯이 혈청 내에 다른 단백질 및 대사체들이 매우 복잡하게 혼재되어 있음에도 첨가한 neuraminidase 농도에 따라 PNAS 상에서도 매우 높은 정량적 선형성을 보임을 확인할 수 있었다($R^2 > 0.9903$).

또한, 제작된 PNAS를 일정 기간 보관 후에 초기 성능의 유지 기간이 얼마나 되는지에 대한 안정성 평가 테스트를 진행하였다. X-Neu5Ac 기질이 상온과 빛에 지속적으로 노출될 시 neuraminidase 없이도 스스로 분해되어 neuraminidase에 대해 활성을 잃기 때문에 PNAS는 제조 후 바로 빛이 차단되는 팩에 넣어주고 냉장(4 °C) 보관 하였다. 보관 기간에 따른 초기성능 유지 결과는 Fig. 5에 보여지는 것과 같이 70일까지는 그 초기성능이 유지되다가 90일에 이르러서 회색조 세기가 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 매우 간단한 종이칩이지만 2달이 넘도록 안정적으로 neuraminidase 효소 활성을 평가 할 수 있었다. 현재, 습도 및 빛을 더 완벽하게 차단시켜 칩의

Concentration of Log [Neuraminidase] U/ml

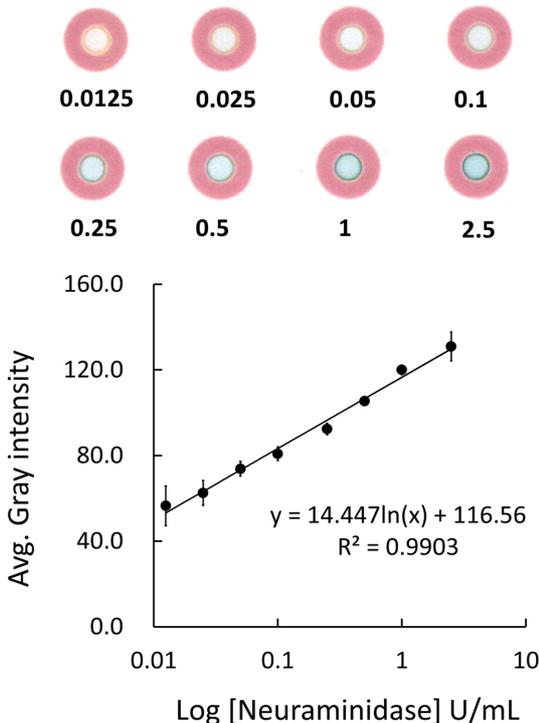


Fig. 4. Validation of quantitative assay for neuraminidase in human serum. Healthy human serum spiked by each concentration of neuraminidase (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 U/mL) was tested on the PNAS (n=3).

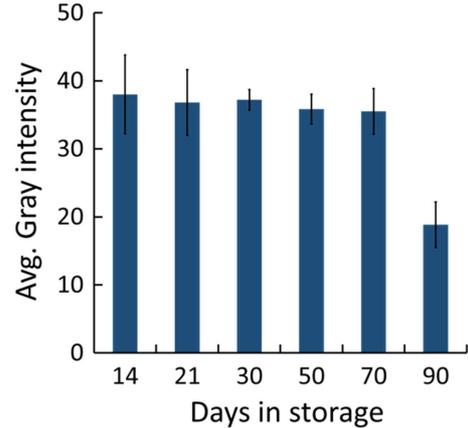


Fig. 5. Characterization of storage stability for PNAS. The PNAS was stored in the dark at 4 °C to prevent the degradation of X-Neu5Ac substrate.

안정성을 높이기 위해 동결 건조(freeze-dried) 및 진공 포장(vacuum-packaged)을 접목한 PNAS 제작에 대한 실험을 진행 중에 있다.

3-4. Neuraminidase activity assay

종이칩 상에서 neuraminidase의 효소 활성 평가를 위해 Michaelis와 Menten의 연구로 발표된 미카엘리스-멘텐 동역학(Michaelis-Menten kinetics)이 적용 가능한지를 확인하였다[35]. X-Neu5Ac 농도에 따른 생성물 회색조 진하기([P] intensity)는 매우 쉽게 그래프로 얻을 수 있었다. 이렇게 얻어진 그래프로부터, 종이칩 상 효소 반응이 있음에도 불구하고 neuraminidase 효소는 미카엘리스-멘텐 동역학(Michaelis-Menten kinetics)에 매우 잘 부합되며 이를 다시 직선 함수 형태로 표현한 하네스-울프 방정식(Hanes-Woolf equation) (2)을 통해 V_{max} 와 K_m 값을 계산할 수 있었다.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{max}} \tag{1}$$

Fanjul-Bolado 등[36]이 라인위버-버크 식(Lineweaver-Burk equation) (1)의 변형 식인 하네스-울프 식(Hanes-Woolf equation)을 활용한 것과 같이, 본 연구에서는 (1) 번 식에서 V대신 [P] intensity (단위 시간 동안 기질 생성물의 회색조 진하기)를 적용하였다(2).

$$\frac{[S]}{[P]} = \left(\frac{1}{V_{max}} \right) [S] + \frac{K_m}{V_{max}} \tag{2}$$

먼저 초기 반응속도를 측정할 초기 반응 시간을 확인하기 위해 neuraminidase 효소 농도는 0.1 U/mL, 기질은 1.25 mM, 10 mM, 40 mM 농도별로 2-6의 방법으로 시간에 따른 생성물 변화량을 PNAS에서 측정하였다. X-Neu5Ac 농도에 따른 생성물 회색조 진하기([P] intensity) 결과를 그래프로 표현하였고, 10분에 해당하는 그래프 위치에서 선형 증가를 보여 이를 통해 초기반응 시간(t_0)을 10분으로 설정 할 수 있었다(Fig. 6a). 초기반응 시간(t_0)을 10분으로 설정하고 기질 농도[S]를 증가시키며 PNAS에서 회색조 진하기[P] intensity를 측정, (2) 식을 그래프로 나타낸 결과 그 추세선이 높은 선형성을 보이며($r^2=0.9991$, n=3).

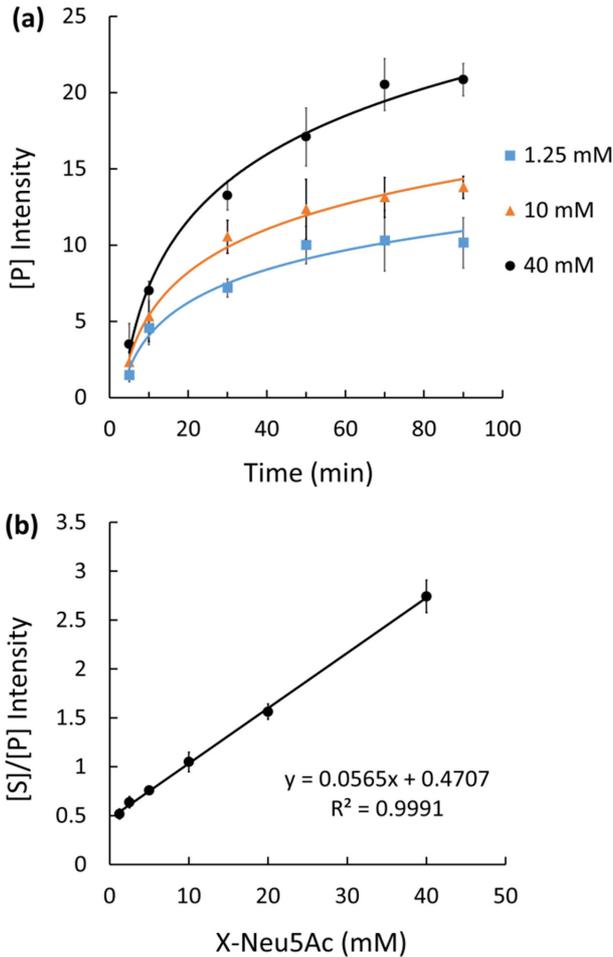


Fig. 6. Neuraminidase kinetic assay. (a) plot for determination t₀ (initial reaction time), (b) Hanes-Woolf plot. Gray color intensity of enzyme product for a unit time; [P], concentration of substrate; [S].

$$y = 0.0565x + 0.4707$$

으로 확인 되었다(Fig. 6b). 여기서 기울기는 1/V_{max}, Y절편은 K_m/V_{max}가 된다.

$$\frac{1}{V_{max}} = 0.05650$$

$$V_{max} = 17.69$$

$$\frac{K_m}{V_{max}} = 0.4707$$

$$K_m = 8.327 \times 10^{-3} \text{ M}$$

이는 Neuraminidase 효소 활성이 종이칩 상에서도 미카엘리스-멘텐 동역학에 따라 평가 가능함을 처음으로 확인한 결과이며, 이전 선행 연구에서 제시한 다른 미생물 중에서 추출한 neuraminidase 효소의 결과와 비교 가능한 수치를 보였다[30]. 최근, 직접 인플루엔자 바이러스 입자를 가지고 바이러스 표면에 발현되어 있는 neuraminidase 효소와 2'-(4-methylumbelliferyl)-α-D-N-acetylneuraminic acid 기질 사이의 K_m 값을 규명한 보고에 따르면 25 mM에서 34 mM의 K_m

값을 갖는 것으로 재조합 neuraminidase와 X-Neu5Ac 간의 K_m 값보다 낮은 값을 보이는 것으로 보아 실제 인플루엔자 바이러스 검출 시에는 X-Neu5Ac 기질에 대해 보다 민감한 검출이 가능 할 것으로 기대한다.

4. 결 론

본 연구에서는 인플루엔자 바이러스 표면에 존재하는 neuraminidase 효소의 활성을 종이칩 상에서 미카엘리스-멘텐 동역학(Michaelis-Menten kinetics)에 기반하여 평가하고, 실제 인체 혈액 내에 함께 존재하는 상황에서도 효소의 활성을 정량적으로 검출 할 수 있는 시스템을 개발하였다. Neuraminidase 효소의 활성을 종이칩 상에서 비색 분석법을 통해 눈으로도 결과를 확인하기 위해 neuraminidase에 의한 X-Neu5Ac 기질의 가수분해 산물(5-bromo-4-chloroindol-3-o)의 이합체화(dimerization)를 통해 청남색으로 발색되는 반응을 선택하였다. PNAS 성능 실험 결과 neuraminidase를 0.004 U/mL부터 검출 할 수 있었으며 혈청에 미리 다른 농도로 투여를 한 neuraminidase 효소 활성 평가에 있어서도 종이칩 상에서 높은 정량적 선형성을 보임을 확인할 수 있었다(R² > 0.99). 또한, 오랜 기간 보관에 따른 종이칩의 안정성 확인 결과 빛이 차단 된 4 °C 환경에서 보관 시 70일 까지 초기 성능이 안정하게 유지됨을 확인하였다. PNAS 상에서 미카엘리스-멘텐 동역학(Michaelis-Menten kinetics)을 적용하여 X-Neu5Ac 기질에 대한 neuraminidase의 동역학 분석 결과 K_m 값은 8.327×10⁻³M으로 확인되었다. 이는 처음으로 종이기반 분석기기를 통해 효소의 활성도를 확인한 것으로, 종이칩 상의 효소 반응에서도 신뢰성 높은 정량적 결과를 도출해 낼 수 있었으며 향후 다양한 효소 반응을 이용한 여러 질병 검출 및 환경 영향 평가 등에 매우 효율적으로 응용 될 수 있을 것으로 기대한다.

감 사

이 논문은 2015년도 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단 기초연구사업(NRF-2013R1A1A1004998, NRF-2015M1A5A1037196, NRF-2015R1A2A2A04006014)의 지원을 받아 수행된 연구로 이에 감사드립니다.

References

- Harper, S. A., Fukuda, K., Uyeki, T. M., Cox, N. J. and Bridges, C. B., "Prevention and Control of Influenza," *MMWR Prev Control*, **53**, 1-40(2004).
- Katagiri, S., Ohizumi, A. and Homma, M., "An Outbreak of Type C Influenza in a Children's Home," *J. Infect. Dis.*, **148**(1), 51-56 (1983).
- Matsuzaki, Y., Katsushima, N., Nagai, Y., Shoji, M., Itagaki, T., Sakamoto, M., Kitaoka, S., Mizuta, K. and Nishimura, H., "Clinical Features of Influenza C Virus Infection in Children," *J. Infect. Dis.*, **193**(9), 1229-1235(2006).
- De Jong, J., Rimmelzwaan, G.; Fouchier, R. and Osterhaus, A., "Influenza Virus: a Master of Metamorphosis," *J. Infect.*, **40**(3), 218-228(2000).
- Das, K., Aramini, J. M., Ma, L.-C., Krug, R. M. and Arnold, E., "Structures of Influenza A Proteins and Insights Into Antiviral

- Drug Targets; *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**(5), 530-538(2010).
6. Moscona, A., "Neuraminidase Inhibitors for Influenza," *N. Engl. J. Med.*, **353**(13), 1363-1373(2005).
 7. Wiley, D. C. and Skehel, J. J., "The Structure and Function of the Hemagglutinin Membrane Glycoprotein of Influenza Virus," *Annu. Rev. Biochem.*, **56**(1), 365-394(1987).
 8. Horimoto, T. and Kawaoka, Y., "Influenza: Lessons from Past Pandemics, Warnings from Current Incidents," *Nat Rev Micro*, **3**(8), 591-600(2005).
 9. Benton, D. J., Martin, S. R., Wharton, S. A. and McCauley, J. W., "Biophysical Measurement of the Balance of Influenza A Hemagglutinin and Neuraminidase Activities," *J. Biol. Chem.*, **290**(10), 6516-6521(2015).
 10. Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. and Klenk, H.-D., "Neuraminidase is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium," *J. Virol.*, **78**(22), 12665-12667(2004).
 11. Amano, Y. and Cheng, Q., "Detection of Influenza Virus: Traditional Approaches and Development of Biosensors," *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**(1), 156-164(2005).
 12. Spackman, E., Senne, D. A., Myers, T., Bulaga, L. L., Garber, L. P., Perdue, M. L., Lohman, K., Daum, L. T. and Suarez, D. L., "Development of a Real-time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes," *J. Clin. Microbiol.*, **40**(9), 3256-3260(2002).
 13. Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D., Clark, M. and Adams, A., "The Detection of Viruses by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)," *J. Gen. Virol.*, **33**(1), 165-167(1976).
 14. Schäfer, W., Pister, L., Hunsmann, G. and Moennig, V., "Comparative Serological Studies on Type C Viruses of Various Mammals," *Nature*, **245**(142), 75-77(1973).
 15. Bassin, R. H., Tuttle, N. and Fischinger, P. J., "Rapid Cell Culture Assay Technique for Murine Leukaemia Viruses," *Nature*, **229**, 564-566(1971).
 16. Yager, P., Edwards, T., Fu, E., Helton, K., Nelson, K., Tam, M. R. and Weigl, B. H., "Microfluidic Diagnostic Technologies for Global Public Health," *Nature*, **442**(7101), 412-418(2006).
 17. Yager, P., Domingo, G. J. and Gerdes, J., "Point-of-Care Diagnostics for Global Health," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **10**(1), 107-144(2008).
 18. Gervais, L., de Rooij, N. and Delamarche, E., "Microfluidic Chips for Point-of-Care Immunodiagnosics," *Adv. Mater.*, **23**(24), H151-H176(2011).
 19. Boehm, D. A., Gottlieb, P. A. and Hua, S. Z., "On-chip Microfluidic Biosensor for Bacterial Detection and Identification," *Sens. Actuators, B*, **126**(2), 508-514(2007).
 20. Fujii, T., "PDMS-based Microfluidic Devices for Biomedical Applications," *Microelectron. Eng.*, **61**, 907-914(2002).
 21. Plecis, A. and Chen, Y., "Fabrication of Microfluidic Devices Based on Glass-PDMS-glass Technology," *Microelectron. Eng.*, **84**(5), 1265-1269(2007).
 22. Huh, Y. S., Choi, B. G. and Hong, W. H., "Fabrication of Nano-filter Device for High Efficient Separation and Concentration of Biomolecules," *Korean Chem. Eng. Res.*, **50**(4), 738-742(2012).
 23. Huh, Y. S., Jeon, S. J., Lee, E. Z., Park, H. S. and Hong, W. H., "Microfluidic Extraction Using Two Phase Laminar Flow for Chemical and Biological Applications," *Korean J. Chem. Eng.*, **28**(3), 633-642(2011).
 24. Parolo, C. and Merkoçi, A., "Paper-based Nanobiosensors for Diagnostics," *Chem. Soc. Rev.*, **42**(2), 450-457(2013).
 25. Gomez, F. A., "Paper Microfluidics in Bioanalysis," *Bioanalysis*, **6**(21), 2911-2914(2014).
 26. Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M. and Carrilho, E., "Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices," *Anal. Chem.*, **82**(1), 3-10(2010).
 27. Jakerst, J. C., Adkins, J. A., Bisha, B., Mentele, M. M., Goodridge, L. D. and Henry, C. S., "Development of a Paper-based Analytical Device for Colorimetric Detection of Select Foodborne Pathogens," *Anal. Chem.*, **84**(6), 2900-2907(2012).
 28. Carrilho, E., Martinez, A. W. and Whitesides, G. M., "Understanding Wax Printing: a Simple Micropatterning Process for Paper-based Microfluidics," *Anal. Chem.*, **81**(16), 7091-7095(2009).
 29. Martinez, A. W., Phillips, S. T., Wiley, B. J., Gupta, M. and Whitesides, G. M., "FLASH: a Rapid Method for Prototyping Paper-based Microfluidic Devices," *Lab Chip*, **8**(12), 2146-2150(2008).
 30. Fujii, I., Iwabuchi, Y., Teshima, T., Shiba, T. and Kikuchi, M., "X-Neu5Ac: A Novel Substrate for Chromogenic Assay of Neuraminidase Activity in Bacterial Expression Systems," *Biorg. Med. Chem.*, **1**(2), 147-149(1993).
 31. Vella, S. J., Beattie, P., Cademartiri, R., Laromaine, A., Martinez, A. W., Phillips, S. T., Mirica, K. A. and Whitesides, G. M., "Measuring Markers of Liver Function Using a Micropatterned Paper Device Designed for Blood from a Fingertick," *Anal. Chem.*, **84**(6), 2883-2891(2012).
 32. Cheng, C. M., Martinez, A. W., Gong, J., Mace, C. R., Phillips, S. T., Carrilho, E., Mirica, K. A. and Whitesides, G. M., "Paper-Based ELISA," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**(28), 4771-4774(2010).
 33. Saito, M., Hagita, H., Iwabuchi, Y., Fujii, I., Ikeda, K. and Ito, M., "Fluorescent Cytochemical Detection of Sialidase Activity Using 5-bromo-4-chloroindol-3-yl- α -D-N-acetylneuraminic Acid as the Substrate," *Histochem. Cell Biol.*, **117**(5), 453-458(2002).
 34. Minami, A., Otsubo, T., Ieno, D., Ikeda, K., Kanazawa, H., Shimizu, K., Ohata, K., Yokochi, T., Horii, Y. and Fukumoto, H., "Visualization of Sialidase Activity in Mammalian Tissues and Cancer Detection with a Novel Fluorescent Sialidase Substrate," *PLoS One*, **9**(1), e81941(2014).
 35. Michaelis, L. and Menten, M. L., "Die Kinetik Der Invertinwirkung," *Biochem. z.*, **49**(333-369), 352(1913).
 36. Fanjul-Bolado, P., González-García, M. B. and Costa-García, A., "Quantitative Analysis of Enzymatic Assays Using Indoxyl-based Substrates," *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**(6), 1849-1854(2006).