

노로바이러스 검출을 위한 측면유동면역분석법 기반의 바이오리셉터 선별기법 개발

장희수* · 조현지** · 전태준^{††} · 김선민[†]

Norovirus Targeted Bioreceptor Screening Method based on Lateral Flow Immunoassay (LFIA)

Huisoo Jang^{*}, Hyeonji Cho^{**}, Tae-Joon Jeon^{††} and Sun Min Kim[†]

Abstract Later flow immunoassay (LFIA) is a protein analytical method based on immunoreaction. On the LFIA based protein analytical method, bioreceptor molecule plays a key role, and so a system that evaluates and manages the binding affinity of bioreceptor is needed to secure detection reliability. In this study, Lateral Flow Immunoassay based rapid Bioreceptor Screening Method (rBSM) is presented that provide a simple and quick evaluating method for the binding affinity to the target protein of the antibody as model bioreceptor. To verify this evaluation method, Virus-like particles (VLP) and anti-VLP antibodies are selected as a model norovirus, which is target protein, and the candidate bioreceptors respectively. Among the 5 different candidate antibodies, appropriate antibody could be sorted out within 30 minutes through rBSM. In addition, selected antibodies were applied to two representative LFIA based techniques, sandwich assay and competitive assay. Among these methods, sandwich assay showed more effective VLP detection method. Through applying selected antibodies and techniques to the commercialized mass production lines, an VLP detecting LFIA kit was developed with a detection limit of 10^{12} copies/g of VLPs in real samples. Since this proposed method in this study could be easily transformable into other combinations with bioreceptors, it is expected that this technique would be applied to LFIA kit development system and bioreceptor quality management.

Key Words : Norovirus (노로바이러스), Bioreceptor(바이오리셉터), Lateral flow immunoassay (측면유동면역분석법), Virus-Like Particle (바이러스유사입자)

[†] Department of Mechanical Engineering,
Inha University, Professor
E-mail: sunmk@inha.ac.kr

^{††} Department of Biological Engineering,
Inha University, Professor
E-mail: tjeon@inha.ac.kr

^{*} Department of Biological Sciences and
Bioengineering, Inha University, Graduate student

^{**} Department of Biological Engineering,
Inha University, Undergraduate student

1 서론

생물학적 수용체(Biological receptor)라고도 하는 Bioreceptor는 단백질이나 유전물질로 이루어진 생화학적 구조체이며, 특정 단백질이나 생체 물질을 민감하게 감지하여 면역반응과 같은 일련의 생체 시스템이 제대로 작동하도록 하는 ‘생물학적 스위치’ 역할을 한다⁽¹⁾.

이러한 Bioreceptor는 구조와 기능에 따라 단

백질 기반의 항체, 효소, 펩타이드와 유전물질 기반인 DNA, aptamer 등으로 구분될 수 있다⁽²⁾. 단백질 기반의 bioreceptor 중에서도 경제적인 이점과 구조적 안정성이 오랜 기간 검증된 항체가 bioengineering application에서 주요한 tool로써 사용되고 있다⁽³⁾.

항체는 Bioengineering application 분야에서 바이오 의약품과 바이오센서로 활발히 적용되고 있다. 바이오 의약품 분야에서 항체는 특정 위치에 약물을 정확히 전달하는 표적인지 인자로서 역할을 하고⁽⁴⁾, 바이오센서에서는 특정 물질을 인지하여 이를 광학적 신호, 전기적 신호와 같은 사람이 인지 가능한 물리적 신호로 전달하는 중간자 역할을 한다⁽¹⁾. 특히, 바이오센서 분야에서는 ELISA⁽⁵⁾와 Western blot⁽⁶⁾과 같이 전문적인 장비와 기술을 갖춘 실험실에서 사용되는 방법이 있고, Lateral Flow Immunoassay(LFIA)와 같이 전문장비와 기술 없이도 일반인의 사용에 편리한 센서도 있다⁽⁷⁾.

LFIA 기술은 일반인들에게 가장 익숙한 바이오센서로써 코로나 펜데믹 상황을 경험하면서 그 관심이 더욱 증가하였다⁽⁸⁾. LFIA 핵심 원리는 항체를 활용한 Immunochromatography라고 볼 수 있다⁽⁹⁾. 구조적으로 LFIA는 크게 Sample pad, Conjugate pad, Membrane 그리고 Absorption pad로 구성된다. 특히, Membrane에는 Test line과 Control line에 각각 특이 항체가 코팅되어 있다. 또한 Conjugate pad에도 항체가 기능화 된 금나노입자(Gold nanoparticle, AuNP)가 약한 결합력으로 코팅되어 있다. LFIA는 Competitive 형태와 Sandwich 형태로 두가지로 나누어진다. 가장 많이 적용되는 방법은 Sandwich 방법으로, Sample pad에서 Target이 Solution과 함께 주입되면 Conjugate pad의 AuNP 표면의 항체와 1차적으로 결합이 일어나 Membrane 쪽으로 이동한다. 이후, Test line과 Control line에 있는 항체와 2차 결합되어 AuNP 고유의 색상을 통해 라인이 나타나고 육안으로 식별할 수 있게 된다. 한 가지 이상의 항체의 결합이 관여하는 만큼 항체의 결합력에 따라 센서의 민감도가 결정된다. 따라서, 민감한 센서 개발을 위해서 강력한 항체를

선별하는 기술이 개발되고 있다⁽¹⁰⁾.

한편, Norovirus는 구토와 발열을 일으키는 질병을 유발하는 동시에 전염성이 있는 바이러스다. 이 바이러스는 Capsid 단백질이 RNA를 둘러싸고 있는 형태로 존재하며 강한 생존력을 가지고 있다⁽¹¹⁾. Norovirus는 PCR과 분자진단 기술로 검출할 수 있음이 증명되었으며 시중에 판매되고 있다⁽¹²⁾. 하지만 일반인이 이용하기에 PCR 기술은 전문기술과 장비가 필요하다는 한계가 있으며 LFIA기반의 분자진단 기술은 사용이 간편한 반면 민감도가 PCR에 미치지 못한다는 한계가 있다. 특히나 LFIA기반의 분자진단 기술은 질병을 일으킬 만한 농도의 바이러스의 검출에 어려움이 있다⁽¹³⁾. 이러한 한계를 극복하기 위한 간단한 방법으로 민감도가 향상된 항체를 선별해서 적용하는 방법이 제시될 수 있다.

본 연구에서는 Model norovirus인 Virus-Like Particles (VLPs) 검출을 위한 LFIA기반의 항체 선별 플랫폼이 개발되었다. 본 연구에서 제시한 LFIA기반의 rapid Bioreceptor Screening method (rBSM)은 소량의 Bioreagent가 요구되며 선별시간이 30분 이내로 짧고, 간단한 장점이 있다. 또한, 평가 결과가 가시적으로 나타나므로 육안으로도 잠정적인 평가가 가능한 장점도 가지고 있다. rBSM을 통해 VLPs검출에 적합한 항체가 선별되었으며 이를 Sandwich assay와 Competitive assay에 적용하여 적절한 방법으로 Sandwich assay가 선정되었다. 이를 상업화 대량생산시스템에 적용하여 VLP검출용 LFIA kit을 개발했다. 이를 통해 실제환경과 유사한 환경에서도 VLP를 10^{12} copies/g 농도까지 검출 가능성이 증명되었다.

2. 실험장치 및 방법

2.1 Materials

Target으로 사용되는 Virus-Like Particles (VLPs)와 5가지 종류의 Anti-VLP antibody는 Abcam과 Mybiosource, Inc.에서 구매했다. 본 연구에서 제시한 데이터가 해당 제조사의 제품에 영향을 주

어 제조사와의 법적 분쟁 등을 야기할 우려가 있어 본 연구에서 비교한 VLPs와 Anti-VLP antibody에 대한 자세한 정보는 공개하지 않기로 결정했다. Gold(III) chloride trihydrate, Tween20, Poly(ethylene glycol) methyl ether thiol, Bovine Serum Albumin (BSA), NaCl는 Sigma-Aldrich에서 구매했다. Control line에 사용된 Anti-IgG antibody는 Abcam에서 구매했다. Potassium carbonate(K_2CO_3)와 Sucrose는 Junsei Chemical Co., Ltd (Tokyo, Japan)에서 구매했다. LFIA strip 제작에 사용되는 Nitrocellulose membrane, Sample pad, Absorption pad, Backing card는 모두 Bore Da Biotech Co. Ltd (Seongnam, Korea)에서 구매했다. 색상 강도의 정량적 분석은 이미지 처리 소프트웨어 프로그램인 Image J software (National Institute of Health, USA)를 사용했다. 또한, 모든 용액은 3차 탈이온수를 사용하여 준비했다.

2.2 Gold nanoparticles (AuNPs) solution preparation

AuNP 솔루션 합성을 위한 비커는 모두 Aqua regia와 3차 탈이온수로 순차적으로 세척한 뒤 사용했다. 40nm AuNPs 솔루션은 Seeded growth 방법으로 합성했다⁽¹⁴⁾. 먼저, 10 ml의 3차 탈이온수에 1.0g의 Gold(III) chloride trihydrate를 혼합하여 10%(w/v)의 Au Seed 솔루션을 만들었다. 그리고 100 ml의 3차 탈이온수에 1.0g의 Trisodium citrate를 혼합하여 1%(w/v)의 Trisodium citrate 솔루션을 준비했다. 다음으로 700ml의 3차 탈이온수를 1L 비커에 채우고 Heating mantle에서 Magnetic stir bar를 이용해 교반하면서 물이 끓을 때까지 가열했다. 물이 끓을 때 0.7 ml의 Au seed 솔루션을 혼합한 뒤 2.5분간 가열했다. 다음으로 0.7 ml, 1.5 ml, 2.4 ml의 Trisodium citrate 솔루션을 혼합한 뒤 1분, 1분, 5분간격으로 순차적으로 가열했다. 마지막 5분동안 혼합액의 색상이 노란색, 무색, 검정색, 와인색으로 변하는 것을 확인했다. 와인색이 된 이후 혼합액을 상온에 하루동안 식혔다. 완성된 AuNP solution을 4 °C 냉장보관으로 보관했다.

2.3 AuNP functionalization with VLPs and Anti-VLP antibody

먼저 AuNP 솔루션의 pH를 0.25M Potassium carbonate(K_2CO_3) buffer를 이용해 pH 7로 조정했다. 다음으로 5종류의 Anti-VLP antibody 혹은 VLPs를 각각 AuNP 솔루션에 첨가했다. 항체의 경우에는 AuNP와의 비율이 500:1이 되도록 첨가해주었으며, VLPs의 경우에는 50:1이 되도록 첨가해주었다. 이후 Electrostatic interaction을 통한 결합을 위해 1시간 동안 실온에서 반응한 뒤, 4°C 로 조정된 원심분리기를 이용해 150,000rpm에서 15분 동안 원심분리 했다. 원심분리가 완료된 후에는 상층액을 제거하고 AuNP 펠렛(Pellet)을 1mL borate buffer (100mM, pH 7.4)에 재현탁 하였다. 마지막으로 10% PEG를 16X로 희석한 뒤 10 μ L를 AuNP 현탁액에 첨가해주고 1시간 동안 실온에서 반응하여 AuNP functionalization을 완료했다.

2.4 AuNP stability test

Antibody가 고정된 AuNP의 안정도 테스트는 10% NaCl을 투여했을 때 Aggregation 발생과 광학적 특성의 변화를 통해 확인했다⁽¹⁵⁾. AuNP의 광학적 특성은 525 nm 위치의 흡광도 변화를 평가했는데 Spectrophotometer를 통해 측정했다. 먼저, Antibody-AuNP 샘플을 3 ml을 PMMA 큐벳에 채운 뒤 90 μ L의 10% NaCl 솔루션을 주입했다. 다음으로 525 nm 파장의 흡광도를 Spectrophotometer를 통해 5분간 측정했다. 흡광도가 급격히 감소하는 조건을 불안정한 상태로 판단했다.

2.5 Paper strip preparation for rBSM

본 실험에 사용한 Paper strip은 Sample pad, Nitrocellulose(NC) membrane, Absorption pad 그리고 Backing card로 구성된다. 구성 요소들을 부착하기에 앞서, Sample pad는 10 mM PBS (pH 7.02), 5%의 BSA 및 0.05% tween 20에 담근 뒤 60°C에서 2시간 동안 건조하여 준비하였다. 다음으로 NC membrane을 Backing card에 부착했

다. 그리고 Absorbent pad와 sample pad를 NC membrane 위쪽과 아래에 순차적으로 부착한 뒤 4 mm 크기로 잘라서 Paper strip을 완성했다. 절단된 Paper strip을 이후 rBSM에 사용했다.

2.6 Bioreceptor screening with rBSM

5가지 종류의 Anti-VLP antibody 0.5 μ L를 Paper strip NC membrane의 Test zone에 가해주었다. 다음으로 40 $^{\circ}$ C 오븐에서 5분간 건조하여 buffer solution을 제거했다. 이후 상온에서 10분간 식혀주었다. 다음으로 VLP surface modification을 마친 40 μ L의 AuNP 솔루션을 Paper strip의 sample pad에 주입한 뒤 15분 간 유지했다. 반응이 끝난 이후에는 이미지를 촬영하고 ImageJ software를 사용해 Red dot의 세기를 수치적으로 분석했다. 이때, 실험결과의 일관성을 유지하기 위해 촬영 환경의 밝기를 고정했다. 이를 위해, Paper strip의 촬영 시 장소와 카메라의 높이 및 각도를 고정했다. 이미지 촬영을 위해 휴대폰으로 삼성 갤럭시 노트 20 기종을 사용했다.

2.7 VLP detection with sandwich and competitive assay

Sandwich assay에서는 서로 다른 Epitope를 Target으로 하는 Anti-VLP antibody 두 종류 중 하나를 0.5 μ L 만큼 Test zone에 처리했다. 그리고 다른 종류의 Anti-VLP antibody를 AuNP 표면에 고정했다. 처리를 마친 이후에는 AuNP-Anti-VLP antibody 현탁액 40 μ L에 VLP를 1 μ L를 혼합한 뒤 곧바로 sample pad에 주입했다. 이후 15분간 반응했다. 반응이 끝난 이후에는 이미지를 촬영하고 ImageJ software를 사용해 Red dot의 세기를 수치적으로 분석했다.

Competitive assay에서는 VLP 0.5 μ L를 Test zone에 처리했다. 그 다음으로 Anti-VLP antibody를 AuNP 표면에 고정시켰다. 이후 AuNP-Anti-VLP antibody 현탁액 40 μ L에 VLP 1 μ L를 혼합한 뒤 곧바로 sample pad에 주입했다. 이후 15분간 반응했다. 반응이 끝난 이후에는 이미지를 촬영하고 ImageJ software를 사용해 Red dot의 세기를

수치적으로 분석했다.

두 가지 Assay모두 이미지를 촬영할 때는 Section 2.6에서 서술된 것처럼 촬영환경의 밝기를 고정하여 이미지를 촬영했다.

2.8 Line dispensing and real sample application

항체를 Line 형태로 NC membrane에 고정하는 작업은 보레다 바이오텍에 의뢰하여 수행했다. 최적의 조건으로 선정된 항체를 Test line에 고정했으며, 1 mg/ml의 Anti-IgG antibody를 Control line에 고정했다. 이후 Absorbent pad를 먼저 NC membrane의 control line 쪽에 부착했다. 다음으로 sample pad를 test line 부근에 부착한 뒤 4 mm 크기로 잘라서 Line dispensed strip을 완성했다.

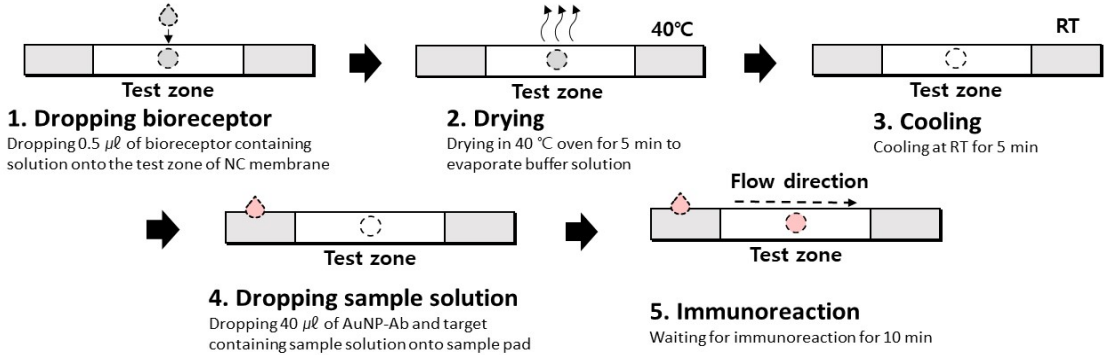
Practical application을 위해 지역마켓에서 닭고기 제품을 구매했다. 구매한 닭고기를 잘게 잘라 1.5 ml 에펜 튜브에 담고 각 농도 별 VLP를 가해주어 target이 혼합된 spiked 샘플을 만들었다. 이후 Antibody-AuNP가 담긴 검출액을 spiked 샘플에 주입한 뒤 곧바로 회수하여 line dispensed strip의 sample pad에 주입했다. 반응시간을 15분으로 고정하여 Line 신호 나타남을 확인했다.

3. 결과 및 고찰

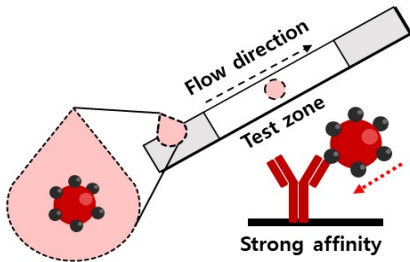
3.1 Construction of Lateral Flow Immunoassay based rapid Bioreceptor Screening Method (rBSM)

Lateral Flow Immunoassay based rapid Bioreceptor Screening Method (rBSM)을 개발하게 된 key motivation은 최적의 Bioreceptor를 신속하고 간단하게 선별하는 플랫폼을 구현하고자 함이다. Fig. 1A는 rBSM를 위한 Strip에 Bioreceptor를 고정하는 것부터 Binding affinity평가하는 것까지 일련의 단계를 보여주고 있다. 먼저, rBSM를 위한 strip의 NC membrane 표면에 0.5 μ L의 Bioreceptor sample을 물방울 형태로 떨어뜨려 Dot 모양의 Test zone을 형성했다. 이후, strip을 40 $^{\circ}$ C 오븐에서 약 5분간 건조하여 Buffer solution을 제거

A. Bioreceptor screening platform preparation procedure



B. Bioreceptor with strong affinity



C. Bioreceptor with weak affinity

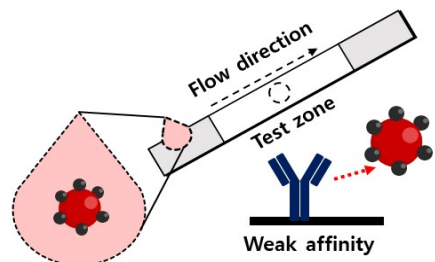


Fig. 1. Schematic illustration of Lateral Flow Immunoassay based rapid Bioreceptor Screening Method (rBSM) and Bioreceptor evaluation principle. A: Construction and evaluation procedure of rBSM. B: Bioreceptor with strong binding affinity. C: Bioreceptor with weak binding affinity

했다. 그리고 상온에서 약 5분간 식혀서 Strip을 완성시켰다. 다음으로, Bioreceptor의 affinity를 평가하기 위해 Target protein이 고정된 AuNP를 sample pad에 떨어뜨려 Flow movement를 형성했다. 이때, Sample solution은 Test zone에서 Immunoreaction을 일으킨 뒤 Absorbent pad까지 이동한다. AuNP 고유의 색상이 적색이므로 Test zone의 Bioreceptor에 의해 붙잡히면 Red dot이 나타나게 된다. 다양한 종류의 Bioreceptor의 동시비교를 위해 각 Strip내의 Test zone 위치를 일치시켰으며 Immunoreaction time은 10분으로 일정하게 고정했다.

Fig. 1B, C는 Target과 Bioreceptor의 Binding affinity의 차이에 따라 나타나는 현상과 Test zone의 모습을 보여준다. 강한 Binding affinity를 가지는 Bioreceptor의 경우 Immunoreaction에 의한 강한 결합이 일어나 더 많은 양의 AuNP가

고정되고 Test zone에 강한 Red Dot이 나타난다. 반면, Binding affinity가 약한 Bioreceptor의 경우 약한 결합력으로 비교적 적은 양의 AuNP가 고정되고 Test zone에 나타나는 Red Dot이 연하게 나타난다. 결과적으로 Test zone에 나타나는 Red Dot색의 진하기 비교를 통해 손쉽게 Binding affinity를 평가할 수 있다. 한편, Immunoreaction 시간을 10분으로 고정한다면, Bioreceptor 고정부터 결과 확인까지 약 30분이 소요된다. 결론적으로, rBSM를 통해 Bioreceptor와 target간의 Binding affinity를 단시간에 손쉽게 평가할 수 있다.

3.2 Binding affinity evaluation through rBSM

rBSM을 통해 Bioreceptor를 신속하게 평가할 수 있음을 보이기 위해 Model bioreceptor와 Target

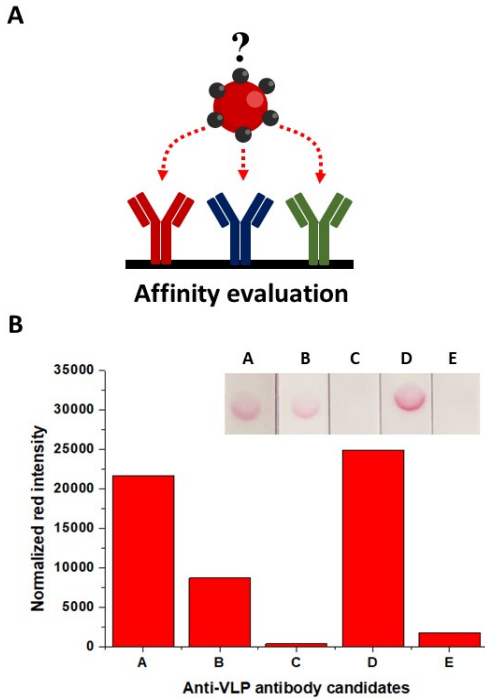


Fig. 2. Comparison of VLP binding affinity of Anti-VLP antibody candidates that are evaluated by rBSM. A: Schematic illustration of binding affinity evaluation. B: Quantitative results of binding affinity and photographic image of paper strip for Anti-VLP antibody candidates

으로 Anti-VLP antibody와 이에 상보적인 Model norovirus인 Virus-Like Particles(VLPs)를 준비했다. 연구자의 안전을 위해 실제 Norovirus를 사용하지 않고 구조적으로 유사하지만 증식능력은 상실한 Norovirus VP1 protein인 VLPs을 Model norovirus로 적용했다⁽¹⁶⁾. 또한, 시중에서 확보 가능한 5가지 종류의 Anti-VLP antibody를 확보하여 VLPs에 대한 각각의 Binding affinity를 평가했다. Fig. 2A는 rBSM를 통한 다양한 Anti-VLP antibody평가에 대한 모식도를 보여준다. 먼저 Model target인 VLPs를 AuNP에 표면에 Electrostatic interaction을 통해 50:1 비율로 고정시켰다. Non-specific binding을 방지하기 위해 AuNP의 VLPs가 고정되지 않은 부분은 Thiol-PEG로 blocking 했다. 5가지의 Anti-VLP antibody를 동일한 농도로 준비하여 rBSM을 통해 Binding

affinity를 평가했다. Fig. 2B는 각 항체후보에 따라 나타나는 Red dot을 비교한 이미지와 이를 수치화 하여 분석한 그래프를 보여주고 있다.

예상했던 것처럼, 각 항체후보의 Binding affinity에 따라 Test zone에 나타나는 Red dot의 세기가 다르게 나타났다. 이 Red dot 이미지를 스마트폰으로 촬영하여 Image J software를 통해 색상의 세기를 분석한 뒤 그래프로 나타냈다. 육안으로 보는것과 마찬가지로 항체후보 A와 B 그리고 D가 VLPs에 대한 Binding affinity를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 특히 항체후보 A와 D는 타겟에 대하여 유사한 Binding affinity를 가지고 있었으며 항체후보 B는 비교적 약한 Binding affinity를 가지고 있다고 평가할 수 있다.

한편, VLPs와 후보항체의 위치를 바꿔서 사용할 수도 있지만 고가의 후보항체 소모량을 최소화하며 평가과정 간소화에도 유리한 방법을 선택했다. 따라서, rBSM에서는 VLP를 AuNP에 고정하고 후보항체는 Strip에 고정했다.

3.3 Lateral Flow Immunoassay-based rapid Sandwich Assay (rSA) for VLP detection

다음으로, VLP 검출을 위해 rBSM을 변형한 LFIA 기반의 rapid Sandwich assay (rSA)가 제시되었다. Sandwich assay를 통한 Target 검출을 위해서는 두 종류의 항체가 요구된다. 이 중 Nitrocellulose(NC) membrane의 Test zone에 고정하는 항체는 AuNP에 고정하는 항체보다 Target과의 반응시간이 짧기 때문에 Binding affinity가 더 강한 것으로 사용하는 것이 유리하다⁽¹⁷⁾. 따라서 Section 3.2의 평가결과에 근거하여 VLPs에 대한 Binding affinity가 뛰어난 항체후보 A, D중 항체후보 A가 Test zone에 적합한 항체로 결정되었다. 다음으로 AuNP표면에 고정할 또다른 항체를 항체후보 B와 D 중에서 선별했다. 항체와 AuNP를 500 : 1 비율로 고정할 때 항체후보 D는 Target에 대한 Binding affinity는 뛰어나지만 AuNP의 안정도를 약화시키는 것으로 나타났다. Fig. 3A에서 항체후보 D를 고정했을 때 AuNP입자의 뭉침(Aggregation)으로 인해 육안으

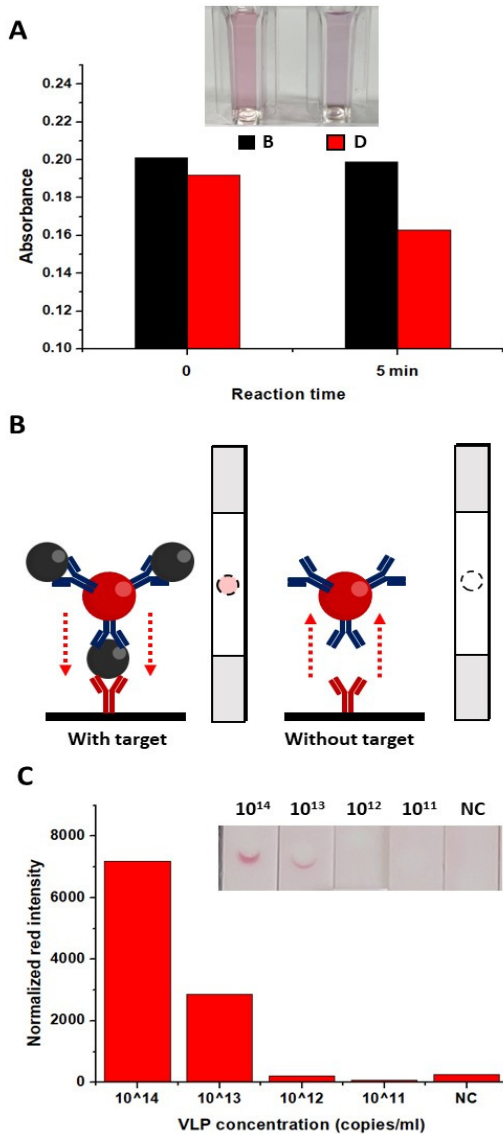


Fig. 3. Lateral flow immunoassay-based rapid sandwich assay (rSA) for VLP detection. A: Stability comparison result for antibody coated AuNP B: Schematic illustration of sandwich assay with rSA. C: Quantitative results of VLP detection by rSA and photographic image of paper strips after reaction with various concentration of VLP

로는 보라색으로 색변화가 나타났으며 이에따라 흡광도가 급격하게 감소되었다. 따라서 AuNP 표면에 고정하는 항체로는 항체후보 B가 적절하다고 볼 수 있다. 결과적으로, 항체후보 A를

Test zone에 고정하고 항체후보 B는 AuNP 표면에 고정시킨 뒤 rSA를 통해 VLP 검출 여부를 검증했다.

Fig. 3B는 앞서 선정된 항체를 활용한 rSA에 대한 모식도를 보여준다. VLP가 존재할 경우 Sandwich immunoreaction으로 인해 AuNP가 Test zone에 고정되고 Red dot이 나타난다. 반면 VLP가 존재하지 않을 경우 AuNP가 고정되지 않아 Red dot이 나타나지 않는다. 또한, VLP의 농도에 따라 나타나는 Red dot의 세기가 달라지게 되고 이를 분석하여 정량화가 가능하다. Fig. 3C는 VLP 농도에 따라 나타나는 Red dot의 세기와 이를 수치화한 그래프를 보여준다. VLP가 10^{13} copies/ml만큼 존재할 때부터 눈에 보이는 Red dot이 생성되었다. 따라서, rSA를 통해서 VLP가 10^{13} copies/ml만큼 존재할 때 육안으로 검출이 가능하다는 것이 증명되었다.

3.4 Lateral Flow Immunoassay-based rapid Competitive Assay (rCA) for VLP detection

다음으로는 rBSM을 변형한 LFIA 기반의 rapid Competitive assay (rCA)가 제시되었다. Competitive assay의 경우 Sandwich assay와 비교했을 때, 하나의 항체만을 필요로 하는 장점이 있다. 따라서, Section 3.2에서 선정된 항체중에서 AuNP표면에 고정했을 때 안정도가 가장 뛰어난 항체후보 B를 rCA에 적합한 항체로 선정했다. 이후, Target 간의 경쟁을 유도하기 위해 Test zone에 Target VLP가 고정되었다.

Fig. 4A는 rCA의 모식도를 보여주고 있다. AuNP표면에 고정된 항체는 Sample solution의 충분한 농도의 VLP에 노출되면 Immunoreaction으로 인해 Binding site가 모두 막힌다. 따라서, Test zone에 고정된 또다른 VLP를 만났을 때 더 이상 결합할 수 없으며 Red dot이 나타나지 않는다. 반면, Sample solution에 VLP가 없거나 충분하지 않다면 AuNP 표면의 항체에 Binding site가 여전히 남아있어 Test zone의 VLP와 결합이 일어나고 Red dot이 나타난다. 이 Red dot의 세기는 VLP의 농도에 따라 달라지므로 이를 분석

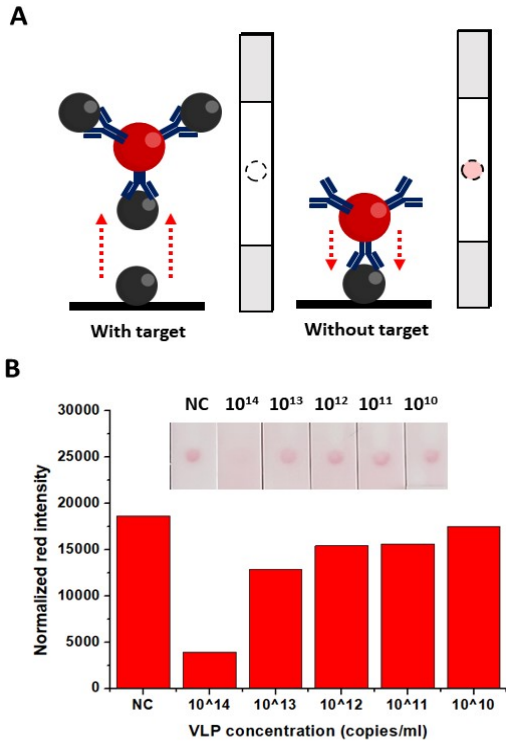


Fig. 4. Lateral flow immunoassay-based rapid competitive assay (rCA) for VLP detection. A: Schematic illustration of competitive assay with rCA. B: Quantitative results of VLP detection by rSA and photographic image of paper strips after reaction with various concentration of VLP.

하여 정량화가 가능하다. Fig. 4B는 VLP농도에 따른 Red dot의 세기 변화와 이를 수치화한 그래프를 보여준다. 10^{14} copies/ml부터 육안으로 눈에 띄는 변화가 나타났다. Section 3.3과 비교했을 때, 동일한 항체와 VLP를 사용했음에도 사용한 방법에 따라 검출 민감도가 달라지는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서는 Sandwich assay가 더욱 민감한 검출감도를 보였다.

3.5 Construction of line dispensed LFIA kit and real sample application

Section 3.2를 통해 VLP에 대한 Binding affinity가 뛰어난 항체가 선별되었고, Section 3.3과 3.4를 통해 VLP검출에 rSA가 가장 적합한 방법이

로 선정되었다. 또한, Sandwich assay를 위한 항체조합까지도 선정되었다. 다음으로 이를 LFIA kit의 상용화를 위한 대량생산라인에 적용했다. 보통의 LFIA kit의 경우 대량생산을 위해 항체가

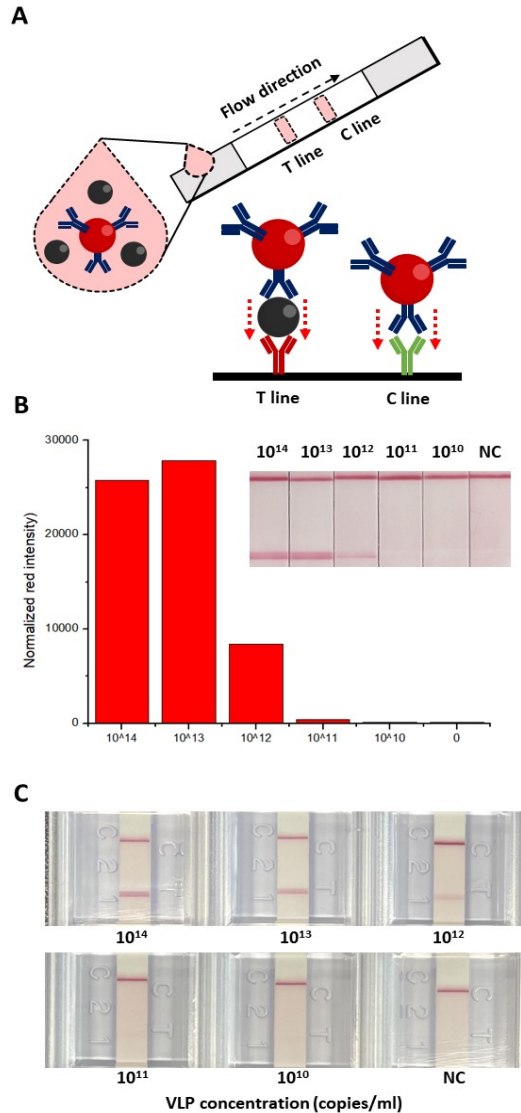


Fig. 5. VLP detection result with line dispensed LFIA kit and real sample application result. A: Schematic illustration of VLP detection with line dispensed LFIA kit. B: Quantitative result of VLP detection and paper strip after reaction with various concentration of VLP. C: Photographic image of VLP detection in real sample with various concentration.

NC membrane에 line dispenser를 통해 분주되며, Test line 뿐만 아니라 Control line도 함께 분주된다. Fig. 5A는 line dispensed rSA kit에 대한 모식도를 보여준다. Test line에는 VLP 검출을 위해 Anti-VLP antibody가 고정되었다. 또한, Control line에는 AuNP표면의 항체와 결합함으로써 Working의 완결을 확인하기 위해 Anti-IgG Antibody가 고정되었다. 따라서, VLP 존재유무와 상관없이 Control line이 나타남으로써 AuNP가 끝까지 통과하여 검사가 올바르게 완결되었음이 검증된다. Fig. 5B는 VLP농도에 따른 Red line의 세기를 보여준다. VLP가 10^{12} copies/ml의 농도로 존재할 때부터 육안으로 보이는 Red line이 나타났다. 특이하게도 Section 3.3의 결과와 비교하여 10배 증가한 검출한계를 보였다. 이는 NC membrane의 항체가 Dot형태보다 Line형태로 고정되었을 때가 더욱 효율적이라는 사실을 나타낸다. 시중에 판매되는 제품들이 모두 Line형태로 구성된 또 다른 이유라고도 볼 수 있다. 더 나아가 본 시스템이 실제환경에서도 동일하게 적용되는지를 확인했다. Local market에서 닭고기 제품을 구매하여 VLP를 주입한 뒤 Line dispensed rSA kit을 통해 검사했다(Fig. 5C). 실험실샘플로 실험한 것과 동일하게 VLP의 농도가 10^{12} copies/g일 때 부터 눈에 보이는 Line 신호가 나타나는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 본 연구에서 최적화한 시스템이 실제 샘플에서도 작동함이 검증되었다.

4. 결론

본 연구에서는 Bioreceptor의 Target affinity평가를 위한 Screening platform인 rBSM이 제시되었다. rBSM을 통해 Anti-VLPs antibody의 Model norovirus인 VLPs에 대한 Binding affinity가 평가되었고 가장 적합한 항체후보가 선별되었다. 선별된 항체후보를 LFIA 기술의 대표적인 두 기법인 Sandwich assay와 Competitive assay에 적용하여 Sandwich assay가 가장 적합한 방법임을 확인했다. 선별된 항체를 대량생산라인에 적용하여 실제샘플 1g당 10^{12} copies 만큼의 VLP가

존재하는 Spiked 샘플에서 작동하는 LFIA kit가 개발됨을 증명했다.

본 연구에서 제시한 방법은 LFIA kit를 대량 생산하기 이전에 Bioreceptor의 Target에 대한 binding affinity검증 및 평가하는 단계에 적용될 수 있다. LFIA kit를 대량으로 생산하는 경우 고가의 Bioreceptor가 많은 양으로 소모되기 때문에 문제발생시 손실이 막대할 우려가 있다. 따라서, 본 연구에서 제시하는 방법은 기업의 경제적 손실을 조기에 차단할 수 있는 기준으로 사용될 수 있다. 또한, 보통의 연구실에서 Line dispenser 장비를 보유하고 있지 않으므로 외부 협력업체에 의뢰하기 전 소량 샘플로 실험을 검증하는 용도로도 사용이 가능하다. 게다가, 평가 결과가 가시적으로 나타남으로 육안으로도 신속하게 평가가 가능한 장점도 가지고 있어서 다양한 분야의 응용을 기대할 수 있다. 또한, 본 연구에서 제시한 방법은 항체뿐 아니라 Peptide, Aptamer 등의 다른 Bioreceptor의 Binding affinity 평가에도 호환이 가능하므로 다른 분야로도 응용될 수 있을 것으로 전망한다.

후 기

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제명: 농축산물 생산현장의 안전관리 기술개발, 세부 과제번호: PJ014238042022)과 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원(사업명: 생활화학제품 안전관리기술개발사업, 과제번호: RE202201777)의 지원에 의해 이루어진 것임

REFERENCE

- 1) S. Sharma, H. Byrne, and R. J. O’Kennedy, 2016, “Antibodies and antibody-derived analytical biosensors,” *Essays Biochem*, vol. 60, pp. 9–18.
- 2) N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, and P. Estrela, 2016, “Introduction to biosensors,” *Essays Biochem*, vol. 60(1), pp. 1–8.
- 3) S. A. Lim and M. U. Ahmed, 2019, “CHAPTER 1: Introduction to Immunosensors,” in *RSC*

- Detection Science*, vol. 2019-January, no. 14, Royal Society of Chemistry, pp. 1–20.
- 4) F. B. Arslan, K. Ozturk Atar, and S. Calis, 2021, “Antibody-mediated drug delivery,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 596.
 - 5) S. Aydin, 2015, “A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA,” *Peptides (N.Y.)*, vol. 72, pp. 4–15.
 - 6) T. Mahmood and P. C. Yang, 2012, “Western blot: Technique, theory, and trouble shooting,” *N Am J Med Sci*, vol. 4(9), pp. 429–434.
 - 7) C. Parolo *et al.*, 2020, “Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays,” *Nature Protocols*, vol. 15(12), pp. 3788–3816.
 - 8) A. Somborac Bačura, M. Dorotić, L. Grošić, M. Džimbeg, and S. Dodig, 2021, “Current status of the lateral flow immunoassay for the detection of sars-cov-2 in nasopharyngeal swabs,” *Biochem Med (Zagreb)*, vol. 31(2)
 - 9) Merck Millipore, 2022, “Rapid Lateral Flow Test Strips Considerations for Product Development.” Accessed: Oct. 26, 2022. [Online]. Available: <https://www.merckmillipore.com/KR/en>
 - 10) J. A. Wippold, H. Wang, J. Tingling, J. L. Leibowitz, P. de Figueiredo, and A. Han, 2020, “PRESCIENT: platform for the rapid evaluation of antibody success using integrated microfluidics enabled technology,” *Lab Chip*, vol. 20(9), pp. 1628–1638.
 - 11) C. P. Campillay-Véliz *et al.*, 2020, “Human Norovirus Proteins: Implications in the Replicative Cycle, Pathogenesis, and the Host Immune Response,” *Frontiers in Immunology*, vol. 11.
 - 12) K. Rupprom, P. Chavalitshewinkoon-Petmitr, P. Diraphat, and L. Kittigul, “Evaluation of real-time RT-PCR assays for detection and quantification of norovirus genogroups I and II,” *Virolog Sin*, vol. 32(2), pp. 139–146
 - 13) H. S. Kim, J. Hyun, J. S. Kim, W. Song, H. J. Kang, and K. M. Lee, 2012, “Evaluation of the SD Bioline Norovirus rapid immunochromatography test using fecal specimens from Korean gastroenteritis patients,” *J Virol Methods*, vol. 186(1-2), pp. 94–98.
 - 14) T. You, W. Jeong, H. Lee, Y. S. Huh, S. M. Kim, and T. J. Jeon, 2021, “A simple strategy for signal enhancement in lateral flow assays using superabsorbent polymers,” *Microchimica Acta*, vol. 188(11).
 - 15) D. S. Kim *et al.*, 2016, “Development of lateral flow assay based on size-controlled gold nanoparticles for detection of hepatitis B surface antigen,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 16(12).
 - 16) X. I. Jiang, M. Wang, D. Y. Graham, M. K. Estes, B. Plaza, and G. Section, 1992, “Expression, Self-Assembly, and Antigenicity of the Norwalk Virus Capsid Protein,”
 - 17) D. Gasperino, T. Baughman, H. v Hsieh, D. Bell, and B. H. Weigl, 2018, “Improving Lateral Flow Assay Performance Using Computational Modeling,”