

곰팡이 독소 동시 분석용 간이진단키트 최적화 연구

문지혜 · 김기영* · 이상대 · 박셋별 · 김혁주
국립농업과학원 농업공학부

Optimization of Lateral Flow Assay for the Dual-detection of Mycotoxins

Jihea Moon, Giyoung Kim*, Sangdae Lee, Saetbyeol Park, and Hyeokju Kim

Department of Agricultural Engineering, National Academy of Agricultural Sciences

Abstract

This study was performed to develop and optimize a rapid strip kit for the dual-detection of Aflatoxin B₁ (AF) and Ochratoxin A (OTA). The strip kit is composed of sample pad, conjugation pad, nitrocellulose membrane, and absorbent pad. Manually spotted mycotoxin-BSA conjugates and anti-mouse IgG on nitrocellulose membrane were used as the test line and the control line, respectively. Conditions for rapid and easy detection of mycotoxins, conjugation between toxin-MABs and nano Au particles, pretreatment method of pads, and composition of standards solutions were optimized. Feasibility of the strip kit to detect AF and OTA were evaluated with standard samples. Test results were acquired in 10 min and the detection limits were 100 ppm for AF and OTA, respectively.

Key words: aflatoxin B₁, ochratoxin A, lateral flow assay, mycotoxins, biosensor

서 론

곰팡이독소(mycotoxin)란 곰팡이를 뜻하는 ‘mykes’와 독을 의미하는 ‘toxium’의 합성어으로써, 크기가 작은 독소를 의미한다. 곰팡이독소는 농작물의 생산, 수확 및 저장 전후의 과정에서 발생하는 곰팡이의 2차 대사산물로, 지역, 온도 및 곰팡이 종류 등에 영향을 받게 된다(Turner et al., 2009). 농식품에서 주로 발생하는 곰팡이독소는 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*속 균류에서 생성되며, 아플라톡신 B₁(Aflatoxin, AF), 오크라톡신 A(Ochratoxin A, OTA), 데옥시니발레놀(Deoxynivalenol, DON), 제랄레논(Zearalenone, ZEN), 니발레놀(Nivalenole, NIV), T-2 toxin(T-2) 등이 대표적인 독소로 알려져 있다(Kim, 2010). 곰팡이 독소는 화학적으로나 구조적으로 그 형상이 매우 다양하다. 또한 2차 대사과정 후에 생성되는 합성물은 사람이나 가축 모두에게 급성 또는 만성적 독성 영향을 주게 된다. 이미 농식품 내에 발생된 곰팡이 독소를 제거하는 것은 거의 불가능하므로, 사전에 철저한 예방과 관리가 가장 중요시된다.

최근 각국에서는 농식품 및 가축의 곡류사료에 대해 안전관리를 위해 곰팡이독소의 허용기준을 설정하고 곰팡이독소에 의한 피해를 줄이기 위해 노력하고 있다(Oh et al., 2011). 동물사료에 존재하는 곰팡이독소는 축산식품(육류, 소시지, 계란 및 우유 등)에서 농축된 형태로 발생되며, 식품의 안전성을 위협하는 위험요인으로 분류된다. 2002년 FAO에서는 곰팡이독소에 오염된 축산식품 분석결과를 발표하였다. 발암물질로 판정된 아플라톡신(Aflatoxins, AF)의 경우 계란, 우유, 돼지 간, 근육 및 신장 등에서 발견되었으며, 신경계에 영향을 미치는 오크라톡신A(Ochratoxin A, OTA)의 경우 돼지 간, 신장 및 소시지에 주로 오염되어 있는 것으로 파악되었다(Akande et al., 2006).

곰팡이독소는 다양한 환경 조건에서 쉽게 발생되므로, 발생된 독소를 신속하게 검출하여 관리할 수 있는 신속·정밀 검출기술 개발의 필요성이 증가하고 있다. 현재 가장 많이 사용되고 있는 곰팡이독소 검출법은 시료 내 곰팡이독소 함량을 화학·생물학적으로 분석하는 thin layer chromatography(TLC)법, high performance liquid chromatography(HPLC)법 및 효소면역분석법(ELISA)등이 있다. 그러나 이러한 곰팡이독소 검출법들은 복잡한 시료 추출과정과 분석과정이 요구되어 곰팡이독소의 정량까지 수일 이상의 시간이 소요된다. 또한 시료의 모집 방법에 따라 곰팡이 독소 함량에 대한 오차 발생률이 90%까지 증가할 수 있다는 단점이 지적되면서, 곰팡이독소 검출방법

*Corresponding author: Giyoung Kim, Department of Agricultural Engineering, National Academy of Agricultural Sciences, Suin-ro, 126th, Gwonseon-gu, Suwon, 442-707, Korea
Tel: +82-31-290-1899; Fax: +82-31-299-1900

E-mail: giyoung@korea.kr

Received August 10, 2012; revised August 21, 2012; accepted August 21, 2012

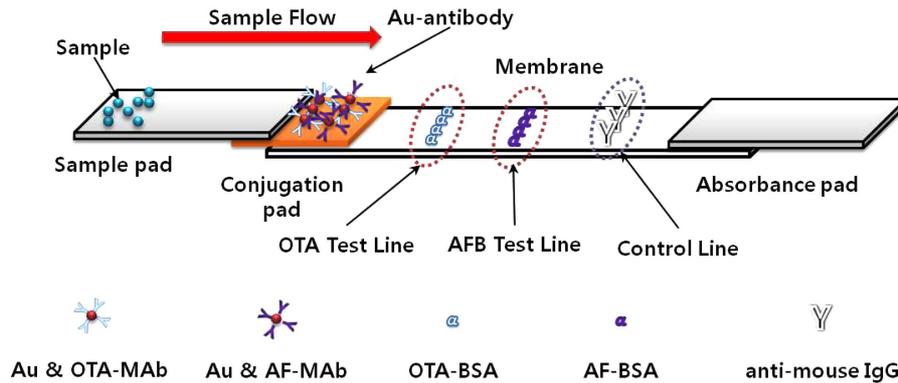


Fig. 1. Schematic diagram of a lateral flow assay kit for the detection of mycotoxins.

및 대상 시료 추출방법에 대한 개선이 요구되고 있다 (Krska et al., 2008). 이러한 단점을 보완하기 위하여 항체-항원간 면역학적 방법을 이용한 면역학적 기법(immuno-affinity colour)이 개발되어 목적인 곰팡이독소만을 특이적으로 추출할 수 있게 되었다. 그러나 고가의 추출 키트와 분석장비 및 전문 분석기술이 동시에 요구되므로, 이를 해결할 수 있는 신속하고 간편한 검출 기술의 필요성이 제시되었다(Moon et al., 2012).

가정용 임신진단키트에서 유래된 Lateral flow assay(간이진단키트)는 상용화된 대표적인 면역센서의 한 종류이다. 간이진단키트는 면역크로마토그래피 시험법(immuno-chromatographic test)과 항체-항원 결합력을 이용하여 검출 민감도를 개선한 면역센서이다. 또한 ELISA의 경쟁적 결합 반응을 이용하여 곰팡이독소와 같이 분자량이 작은 물질까지도 선택적으로 검출할 수 있는 장점이 있다. 간이진단키트는 일회용 검출 키트이나, 제작 및 검출법이 간편하고 검출시간이 10 분 이내로 짧기 때문에, 개발된 간이진단키트의 활용도는 매우 높다(Bazin et al., 2010; Kim et al., 2011). 현재까지 국내외에서 개발된 곰팡이독소용 간이진단키트는 단일 곰팡이 독소에 대한 검출을 목표로 하고 있으며, 그 검출 한계를 향상하기 위한 연구들이 다양하게 시행되고 있다(Zheng et al., 2006; Krska et al., 2008; Turner et al., 2009; Moon et al., 2012). 그러나 현재 식품에서 발생하는 곰팡이 독소는 식품 별 단일 곰팡이 독소가 아닌 복수의 곰팡이 독소가 관찰되고 있다. 따라서 현장에서 직접 사용할 수 있는 복수의 곰팡이독소 신속검출기법에 대한 연구의 필요성이 제시되고 있으나, 관련 연구는 거의 없다.

따라서 본 연구에서는 현재 국내 식품에서 규제하고 있는 곰팡이독소 중 강력한 발암물질로 알려져 있으며, 곰팡이독소 검사대상품목이 가장 높은 대표적인 곰팡이독소 2종(아플라톡신 B₁, 오크라톡신 A; Oh et al., 2011)을 동시에 검출할 수 있는 간이진단키트를 개발하기 위해 최적화

연구를 실시하였으며, 이를 토대로 향후 다중 곰팡이독소 검출용 간이진단키트 개발을 위한 이론적인 토대를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

간이진단키트 재료 및 구성

곰팡이독소 동시 검출용 간이진단키트는 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 흡수패드로 구성되며, 시료패드와 흡수패드는 동일한 재질을 사용하였다. 모든 패드는 Millipore 사(Bedford, MA, USA)의 제품을 사용하였다. 시료 및 흡수패드는 Cellulose Fiber sample pad를 사용하였으며, 니트로셀룰로오스 막과 결합패드는 Hi-Flow Plus 240 membrane cards와 Glass Fiber conjugation pads를 각각 사용하였다. 표지자는 Bioassay Works사(Ijamsville, MD, USA)에서 구입한 40 nm 나노금입자를 사용하였다. AF, AF-BSA(Bovine Serum Albumin) 중합체, OTA, 및 OTA-BSA 중합체는 Sigma에서 구입한 제품을 사용하였다.

간이진단키트는 선행연구에서 사용된 형태의 strip sensor를 사용하였으나, 검출선과 표준선으로 구성된 Fig. 1과 같으며, 니트로셀룰로오스 막 위에 시료패드, 결합패드 및 흡수패드를 서로 결합하였다(Moon et al., 2012). 시료 용액이 막을 따라서 원활하게 흐르도록 각 패드의 끝부분이 서로 겹치도록 구성하였으며, 제작된 간이진단키트의 총 길이는 60 mm, 폭은 4 mm로 결정하였다.

나노 금입자 표지 독소-항체 결합을 위한 최적 조건 구명
간이진단키트는 곰팡이독소의 검출유무를 판단하기 위해 표지자로 콜로이드 형태의 금입자를 사용하며, 본 연구에서는 AF 및 OTA의 존재 유무를 알려주는 표지자로서 40 nm 금나노입자를 사용하였다. 금입자와 독소-항체의 결합은 선행 연구와 동일한 방법으로(Kim et al., 2011) pH 조건과 농도에 따른 최적 조건을 구명하였다(Fig. 2).

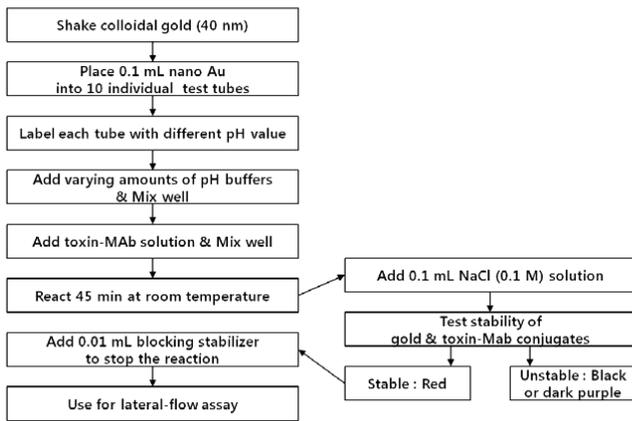


Fig. 2. Au nanoparticle and antibody conjugation procedure.

간이진단키트의 전처리

간이진단키트를 이용한 곰팡이독소 검출 시 시료 및 시약의 원활한 흐름을 위해 시료패드와 결합패드, 니트로셀룰로오스 막을 전처리하였다. 전처리 용액의 조성은 선행 연구를 참고하여 수행하였다(Moon et al., 2012). 시료패드의 전처리 용액은 50 mM borate buffer(pH 7.4)에 1% BSA 및 Tween-20 0.05%를 첨가하여 사용하였다. 결합패드의 전처리 용액은 시료패드와 동일한 완충액에 BSA 2%, Sucrose 10% 및 Tween-20 0.05%를 첨가하여 사용하였다. 니트로셀룰로오스 막은 10 mM Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)을 그대로 사용하였다. 전처리 방법은 다양한 조성의 전처리 용액에 패드 또는 막을 완전하게 적신 후, 37°C 오븐에서 패드의 경우 18 시간, 니트로셀룰로오스 막의 경우 2 시간 건조하는 방법을 사용하였다.

전처리된 결합패드의 경우, 진단키트에 사용되는 금나노입자 표지 독소-항체 중합체를 처리한 다음 37°C에서 2 시간 건조시켜 사용하였다. AF와 OTA의 동시 검출을 위하

여 결합패드를 그림과 같은 4 종류의 방법으로 처리하여, 처리 방법에 따른 최적 검출 결과를 구명하였다. 금나노입자 결합체는 2 개의 튜브에 나누어 담고 AF 항체와 OTA 항체를 각각 반응시키고 결합이 끝난 후, 결합 패드에 적용하였다. 적용 방법은 Fig. 3과 같이 각각의 결합액을 다양한 방법으로 적용하거나, 1:1로 혼합하여 적용하는 방법을 사용하였다.

곰팡이독소 표준 용액

곰팡이독소인 AF와 OTA는 10%의 메탄올이 첨가된 PBS에 농도별로 희석하여 표준용액을 제조한 후 간이진단 키트에 적용하였다. 간이진단키트에서 AF와 OTA의 최적 검출조건을 확립하기 위하여 메탄올을 각각 10, 20, 및 30%씩 PBS에 첨가한 후, 곰팡이독소 검출 결과를 비교, 분석하였다.

결과 및 고찰

간이진단키트 결과 해석

간이 진단키트를 이용한 검사 결과는 Fig. 4와 같은 원리에 의해 확인할 수 있다. 시료 패드에 주입된 곰팡이독소가 결합패드에 고정된 금나노입자 표지 독소-항체와 결합하면서 모세관 현상에 의해 니트로셀룰로오스 막을 따라 흐르게 된다. 이때 막에 고정된 곰팡이독소-BSA 중합체와 2 차 항체의 결합에 의해 금나노입자가 발색을 하게 된다. 곰팡이독소는 그 크기가 매우 작기 때문에, 기존의 진단키트처럼 Sandwich 결합 방식을 사용하기에는 무리가 있다. 따라서 본 연구에서는 시료에 곰팡이독소가 존재할 경우 곰팡이독소가 독소-BSA 중합체와 먼저 결합하여 니트로셀룰로오스 막에 고정된 독소-BAS 중합체와 결합할 수 없는 원리를 이용하였다(Zheng et al., 2006). 단, 2 차 항체와는 무조건 결합이 가능하기 때문에 Fig. 4(a)와 같은 양성 결

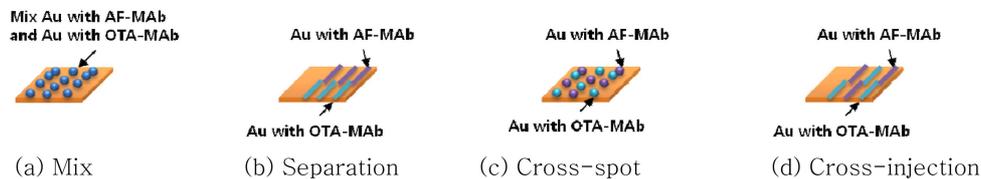


Fig. 3. Pre-treatment of conjugation pad by different methods of injecting nano Au and antibody conjugates.



Fig. 4. Test result interpretation of the lateral flow assay.

과를 가지게 된다. 그러나 시료에 독소가 존재하지 않을 경우, 금나노입자 표지 독소-항체 입자는 니트로셀룰로오스 막위의 독소-BSA 및 2 차 항체에 모두 결합되어 Fig. 4(b)의 음성 결과를 가지게 된다.

나노 금입자 표지 독소-항체 결합을 위한 최적 조건

금나노입자와 항체의 결합체는 용액의 pH 값에 따라 영향을 받으므로, 최적 결합을 위한 pH 조건 구명을 우선적으로 수행하였다. 적용된 금나노입자 용액의 pH 범위는 pH 5.4-pH 10.1 이었다. Kim et al.(2011)의 연구에 의하면, 항체와 금나노입자는 정상적으로 결합할 경우, 용액의 색이 붉은색을 유지하게 된다. 불완전한 결합 시에는 금나노입자가 붉은색에서 짙은 보라색 또는 검은색으로 변하게 되는데, 이때 금나노입자들 사이에 교차결합이 발생하게 된다. 따라서 본 연구에서도 금나노입자와 항체 사이의 결합 후, 발색을 참고하여 최적 pH 범위를 선택하고 기존 연구와 비교하여 AF와 OTA 항체의 최적 pH를 선정하였다.

아플라톡신 B₁ 단클론항체(AF-Monoclonal antibodies; AF-mAb)의 경우 pH 8.8에서 가장 안정적인 결합이 관찰되었다. Shim et al.(2007)의 연구에서도 AF-MAb는 pH 8.5에서 금나노입자와 가장 안정적으로 결합하였다고 보고한 바 있으며, 다른 연구에서도 금나노입자의 pH 7.0-pH 9.0 사이일 때 안정적인 결합이 관찰된다고 설명하였다(Ye et al., 2010). 따라서 본 연구에서는 기존의 연구 결과를 고려하여 AF-MAb와 40 nm 금나노입자의 최적 결합 pH를 8.8로 선정하였다.

오크라톡신A 단클론항체(OTA-MAb)의 경우 금나노입자와 pH 7.3에서 가장 안정적인 결합이 관찰되었으며, 이는 기존의 연구 결과에서 보고된 pH 7.0-pH 7.2와도 유사한 연구 결과이다(Shim et al., 2007; Manda et al., 2010). 따

라서 OTA-MAb와 40 nm 금나노입자의 최적 결합 pH를 7.3으로 선정하였다.

간이진단키트의 전처리에 따른 곰팡이독소 검출 최적화

AF와 OTA 동시 검출용 간이진단키트를 개발하기 위해 결합패드에 금나노입자 표지 AF-항체와 OTA-항체 결합체를 적용하였다. 결합패대에서 AF-항체 또는 OTA-항체 결합체와 곰팡이독소의 결합 및 이동과 니트로셀룰로오스 막에서 곰팡이독소의 최적 결합을 위해 Fig. 3과 같이 4 가지 방법으로 결합패드의 전처리를 수행하였다. 결합 패드 전처리 방법에 따른 검출 최적화를 구명하기 위하여 준비된 시료 100 μL (PBS only, AF 100 ppm, OTA 100 ppm, AF 및 OTA 100 ppm)을 4 종류의 간이진단키트에 각각 주입하였다(Fig. 5). 결합체를 Fig. 3(a)와 같이 혼합한 경우 AF 및 AF, OTA 적용 시료에서 완벽한 경쟁결합이 관찰되었으나, OTA 단독 시료의 경우 미약한 경쟁결합이 관찰되었다(Fig. 5a). 결합패드를 1/2로 분리하여 결합체를 각각 처리한 경우, 검출선이 1/2씩만 검출되는 결과가 관찰되었다(Fig. 5b). 결합물을 서로 고르게 spotting 한 경우, 각각의 시료에서 적절한 경쟁 결합이 관찰되었다(Fig. 5c). Fig. 5(d)의 경우에는 경쟁 결합은 관찰되었으나, Mix 방법 또는 Cross-spot 방법에 비하여 검출선의 발색이 미약하였다. 본 연구에서 수행한 결합 패드의 처리 방법에 따른 곰팡이독소 검출 결과는 나노골드-항체 결합체를 혼합하여 적용하거나(mix)나, cross-spot 한 경우 가장 좋은 검출 결과가 관찰되었다.

곰팡이독소 표준 용액 조성에 따른 검출 결과

AF와 OTA 동시 검출용 간이진단키트의 최적 검출조건을 구명하기 위해, 표준 시료의 메탄올 조성에 따른 검출 결과를 비교하였다. 검출 시 사용한 진단키트의 결합패드

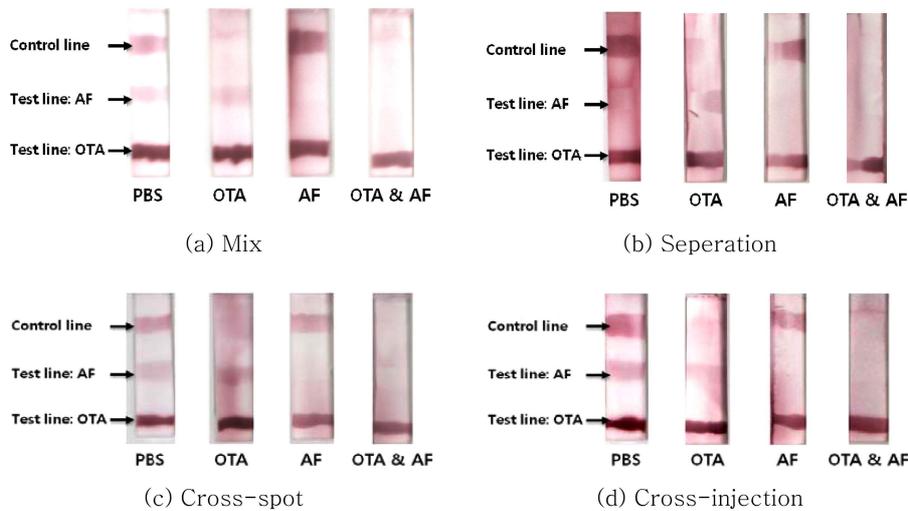


Fig. 5. Detection results of Aflatoxin B₁ and Ochratoxin A with rapid test kit by different methods of injecting nano Au and antibody conjugates.

는 AF 및 OTA-항체 및 나노 금 결합물을 서로 결합패드 전처리 조건의 4 가지 명칭 정리방법으로 전처리 후 사용하였다. 기존의 ELISA 방식으로 곰팡이독소를 검출할 때 곰팡이독소 표준 용액의 조성은 PBS에 메탄올을 혼합하는 형태로 사용하였으며, 연구자에 따라 메탄올 함량이 다르게 관찰되었다(Delmulle et al., 2005; Kolosova et al., 2006). 본 연구에서는 메탄올 함량을 각각 10, 20, 및 30%씩 혼합하여 표준 용액을 제조하여 진단키트에 적용하였다. 검출 결과 10% 메탄올 조건에서 AF와 OTA 혼합 용액의 경쟁결합이 가장 높게 관찰되었다. 이는 기존에 발표된 곰팡이독소 검출 관련 연구와도 일치하는 결과이다(Shim et al., 2007; Moon et al., 2012). 20% 메탄올 조건에서는 Cross-spotting 조건보다 혼합 조건에서 경쟁결합이 더 높게 관찰되었다. 30% 조건에서는 AF 100 ppm 시료에서 경쟁결합이 모두 낮게 관찰되었다. 메탄올 함량에 따른 곰팡이독소 표준용액의 검출결과, 10% 메탄올을 포함한 PBS에서 검출 감도가 가장 높은 것으로 관찰되었다.

결 론

본 연구는 축산식품에서 문제가 되고 있는 중요 곰팡이독소인 AF와 OTA 오염 여부를 신속하게 진단할 수 있는 간이진단키트를 개발하기 위하여 수행되었다. 제작된 AF와 OTA 동시 검출용 간이진단키트를 제작하기 위해 진단키트 전처리 조건과 검출 용액 조성에 따른 최적 조건을 확립하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

(1) 금나노입자와 곰팡이독소 항체의 최적 결합을 위한 반응 버퍼의 적정 pH는 AF-MAb의 경우 pH 8.8, OTA-MAb의 경우 pH 7.3인 것으로 조사되었다.

(2) 시료패드와 결합패드에 실시한 BSA, Sucrose, 그리고 Tween-20의 전처리는 곰팡이독소항체-나노금입자간의 비특이적 결합을 방지함으로써, 니트로셀룰로오스 막을 통과하는 시료의 이동성을 향상시켜준다.

(3) 곰팡이독소 시료용액의 조성은 methanol과 PBA를 1:9로 제작하였다.

본 연구에서는 AF와 OTA 동시 검출을 위한 신속진단키트 개발을 목표로 하였다. 그러나 본 연구에서 관찰된 곰팡이독소(AF, OTA)의 검출 한계는 ppm 단위에 한정되어 있어, 현재 식품 규격인 ppb 수준까지 검출하기에는 한계가 있었다. 본 연구의 목표는 복수의 곰팡이 독소를 동시에 검출하기 위한 최적 전처리 조건을 개발하기 위한 연구로써, 10 분 이내에 AF와 OTA를 검출할 수 있었다. 그러나 검출 한계가 현행 식품 법규인 ppb 수준에 적용하기에는 한계가 있으므로, 이후 연구에서는 본 연구를 선행연구로 하여 검출 성능을 ppm에서 ppb 단위로 향상시키기 위한 연구를 수행하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ006478)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

- Akande KE, Abubakar MM, Adegbola TA, Bogoro SE. 2006. Nutritional and health implications of mycotoxins in animal feeds: A review. *Pakistan J. Nut.* 5: 398-403.
- Bazin I, Nabais E, Lopez-Ferber M. 2010. Rapid visual tests: Fast and reliable detection of ochratoxin A. *Toxins.* 2: 2230-2241.
- Delmulle BS, De Saeger SMDG, Sibanda L, Barna-Vetro I, Van Peteghem CH. 2005. Development of an immunoassay-based lateral flow dipstick for the rapid detection of aflatoxin B₁ in pig feed. *J. Agric. Food Chem.* 53: 3364-3368.
- Kim DH. 2010. Mycotoxin contamination of feed domestic distribution survey. *Monthly poultry.* 5: 150-152.
- Kim GY, Yang GM, Park SB, Kim YH, Lee KJ, Son JY, Kim HJ, Lee SR. 2011. Rapid detection kit for *Salmonella typhimurium*. *J. of Biosystems Eng.* 36: 140-146.
- Kolosova AY, Shim WB, Yang ZY, Eremin SA, Chung DH. 2006. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B₁. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 384: 286-294.
- Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, Sulyok M, Macdonald S, Crews C. 2008. Food Addit. Contam. Part A. *Chem Anal. Control Expo. Risk Assess.* 25: 152-163.
- Manda G, Bardhan M, Ganguly T. 2010. Interaction of bovine serum albumin and albumin-gold nanoconjugates with L-aspartic acid. A spectroscopic approach. *Colloid. Surf. Biointerfaces.* B. 81: 178-184.
- Moon JH, Kim GY, Lee SD. 2012. A gold nanoparticle and aflatoxin B₁-BSA conjugates based lateral flow assay method for the analysis of aflatoxin B₁. *Materials.* 5: 634-643.
- Oh KS, Choi EJ, Yoo SY, Lee CN, Hong HW. 2011. Status of the inspection for mycotoxins in foods. *Food Sci. Indust.* 44: 44-49.
- Shim WB, Yang ZY, Kim JS, Kim JY, Kang SJ, Woo GJ, Chung YC, Eremin SA, Chung DH. 2007. Development of immunochromatography strip-test using nanocolloidal gold-antibody probe for the rapid detection of aflatoxin B₁ in grain and feed samples. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 1629-1637.
- Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta.* 632: 168-180.
- Ye Y, Zhou Y, Mo Z, Cheng W, Yang S, Wang X, Chen F. 2010. Rapid detection of aflatoxin B₁ on membrane by dot-immunogold filtration assay. *Talanta.* 81: 792-798.
- Zheng MZ, Richard JL, Binder J. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. *Mycopathologia.* 161: 261-273.