해양 생물 독소 신속 검출 기법의 개발 동향

Trends in rapid detection methods for marine organism-derived toxins

박찬영, 권소연, 박태정*

Chan Yeong Park, So Yeon Kweon, Tae Jung Park*

중앙대학교 자연과학대학 화학과, 캠바이오진단기술연구소

Department of Chemistry, Research Institute of Chem-Bio Diagnostic Technology, Chung-Ang University, Seoul 06974, Korea

해양 생물 독소의 위험성

해산물은 우리 몸에서 자체적으로 생성할 수 없는 해양 오메가-3부터 다양한 종류의 비타민과 철분, 코발트 등의 조혈 성분이 풍부해 노화 예방에도 탁월한 건강식으로 알려져 인기 있는 먹거리 중 하나다(Hosomi et al., 2012). 하지만 복어와 같은 어류를 비롯한 굴이나 바지락, 홍합 등의 일부 패류들은 스스로 독성 물질을 생성하거나 유독 미세 조류를 섭취한 뒤 체내에 해당 독소를 축적하는 경우가 있어 섭취에 주의를 요한다. 우리나라에서는 1986년 마비성 패류 독소(paralytic shellfish poisoning)에 의한 사고 이후 해양 독소에 대한 경각심이 팽배해졌으며, 국제적으로도 해산물 섭취로 인해 발생한 다양한 해양 독소 관련 사고 사례를 통해 관리의 중요성이 부각되고 있다. 국내에서 관리 중인 해양 생물 유래 독소는 마비성 패류 독소 외에도 중독 증상 및 독소를 생성하는 조류의 종류 및 독소의 구조적 특성에 따라 기억 상실성 패류 독소(amnestic shellfish poisoning), 설사성 패류 독소(diarrhetic shellfish poisoning), 신경성 패류 독소(neurotoxic shellfish poisoning)가 있으며, 재외국 기준 관리 독소는 이에 추가로 다섯 종류의 독소가 더 있다(Figure 1)(Vilarino et al., 2010; Baek, 2012; Mok et al., 2013).

<재외국 기준 관리 독소>

<국내 기준 관리 독소>
- PSP (마비성 패독)
- DSP (설사성 패독)
- ASP (기억 상실성 패독)
- TTX (테트로도톡신)

- NSP (신경성 패독)
- AZP (아자스필산)
- PTX (펙테노톡신)
- YTX (예소톡신)
- CFP (시구아톡신)

Figure 1. 국내 · 외 해양 독소별 기준 관리 현황

해양 생물 유래 독소의 국가별 규제 방법 및 기존 검출법의 난점

해양 생물 유래 독소는 비단 이를 섭취하는 소비자의 건

* Corresponding author: Tae Jung Park
Department of Chemistry, Research Institute of Chem-Bio Diagnostic Technology, Chung-Ang University, Seoul 06974, Korea
Tel: +82-2-820-5220 Fax: +82-2-825-4736 E-mail: tjpark@cau.ac.kr

강뿐만 아니라 양식, 어업, 해양 생태계 전반에 걸쳐 유해한 영향을 미치기에, 각국에서는 이들을 강력하게 규제하며 상시적으로 감시하고 있다. 우리나라의 경우 식품 의약품 안전처 주관하에 여러 지자체와 협동하며 유통되는 패류, 피낭류 등의 수거 검사를 실시 중이며, 재외국의 경우 보편적으로 미국 식품 의약국의 어패류 관리 방침을 따르고 있다(Ha et al., 2009; Yoo et al., 2010).

현재 우리나라를 비롯한 다수의 국가들이 공식적으로 채택하고 있는 해양 독소 검출법은 국제 분석 화학회가 제정한 쥐를 이용하는 바이오어세이법이며, 해산물 추출물을 실험용 쥐에 투여하고 증상과 사망 시간을 기록하여 진행하는 방식이다. 그러나 이는 실험실 동물의 사용과 관련된 윤리적 우려와 위양성과 위음성 같은 결과의 낮은 신뢰도와 분석 시간이 많이 소요된다는 기술적 한계가 있다(Gao et al., 2017). 이 외에도 몇몇 국가에서는 액화 크로마토그래피-질량 분석기를 사용한 기기적 분석법과 효소 결합 면역 흡착 검사법도 일부 독소에 한해 도입하고 있으나 수입 및 수출되는 양을 감시하기에는 분석 시간이 오래 걸리고, 고가의 장비와 전문 인력이 필요하므로 대량 분석 및 모니터링을 하기에는 기실 어렵다(Bodero et al., 2018).

이에 본 고에서는 종래의 분석 기법에 나노 물질을 도입함으로써 생물을 사용하지 않고도 실제 검체 내의 해양 독소 함량을 신속하게 검출하는 최신의 연구 기술들에 대한 내용을 소개하려 한다.

나노 기술로 개선된 해양 독소 검출법

1. 효소 결합 면역 흡착 검사법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

ELISA 기법은 시료 내 표적 물질의 정성 및 정량 평가를 위해 다방면에서 사용되는 분석 기법으로 항원-항체 간 면역 반응을 검출의 근간으로 한다. 하지만 절차상 여러 단계의 실험 과정을 거치기 때문에 대량으로 스크리닝하는 데 어려움이 있으며, 반응 시간 및 표지 효소의 활성도에 따라 검출 시간 및 감도가 달라질 수 있다. 또한 실제 검체 사용에 있어 전처리 과정이 까다롭고, 실험 도중 여러 번 진행되는 세척 과정으로 인해 항원 및 항체가 손실되는 경우가 있어 키트화 및 현장 진단용으로 사용하기 어렵다는 문제가 있다(Waritani et al., 2017).

해양 독소는 일반적으로 ELISA 방법으로 검출하는 표적 물질인 세균이나 바이러스와는 달리 단일 유기 분자라는 특수성으로 인해 항원 결정 부위(epitope)가 제한적일 수밖에 없어 여러 ELISA 기법 중 경쟁적 ELISA 방식을 사용해 해양 독소 검출에 적용하고 있다. 경쟁적 ELISA는 항원-항체 반응에서 동일 결합 부위에 대한 두 가지 항원 또는 두 가지 항체 간의 경쟁에 의해 이루어진다. 즉, 위 그림과 같이 시료 내에 포함된 해양 독소량이 증가할수록 검출되는 신호가 점점 낮아지는 원리다(Figure 2).

상기 문제들을 해결하여 ELISA 기술을 신속 진단에 활용하기 위해, 기존 물질보다 반응성이 높고 안정적인 표지 물질로 자성 나노 입자를 도입한 시료의 전처리 및 신호 증폭 기법이 제안되었다. 보편적으로 사용되는 자성 나노 입자는 Fe_3O_4의 화학식을 갖는 물질로, 자석에 의해 끌리는 특성이 있어 자성 나노 입자 표면에 해당 표적 독소의

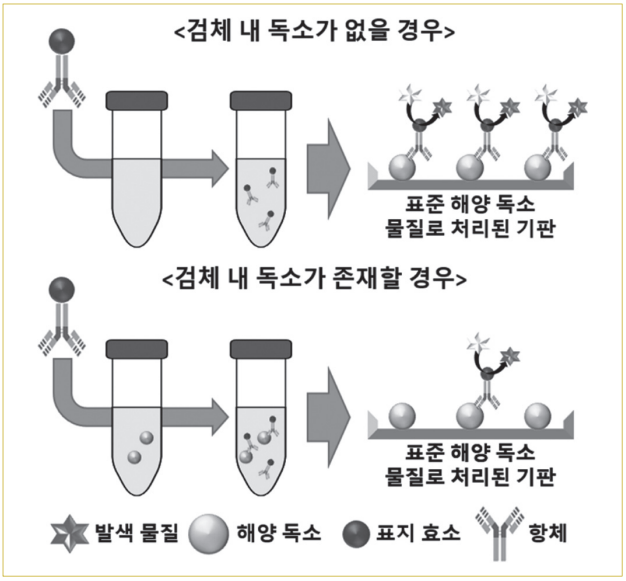

Figure 2. 경쟁적 ELSIA법의 기본 검출 원리

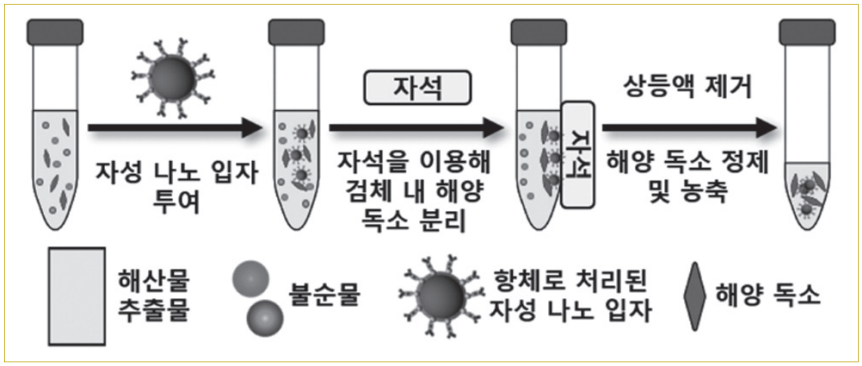

Figure 3. 자성 나노 입자 기반의 시료 전처리 기법

항체를 처리한 뒤 검체 용액에 투여 후 자석으로 분리함으로써 손쉽게 검체 내의 해양 독소의 정제 및 농축이 가능하다. 또한, 자성 나노 입자 내에 포함된 Fe^{2+}와 Fe^{3+}로 인해 과산화 효소와 유사한 촉매 활성을 갖고 있어 표지 물질로서의 역할도 수행할 수 있다는 장점이 있다.

일부 연구자들은 이러한 접근 방식을 통해 실제 검체 내의 테트로도톡신(tetrodotoxin) 및 브레브톡신 B(brevetoxin B)를 자성 나노 입자 기반의 비색 면역 측정법을 구현하였다(Lai et al., 2016; Campàs et al., 2020). 이렇듯 자성 나노 입자를 시료의 전처리에 사용할 경우, 원심 분리기와 같은 고가의 장비 없이도 생체 내 단백질을 비롯한 각종 저해 요소를 제거함으로써 배경 신호를 낮추고 검사의 정확도를 향상시킬 수 있다(Figure 3).

2. 측방 유동 면역 분석법(Lateral flow assay, LFA)

측방 유동 면역 분석법은 효소 면역 측정법과 측방 유동 분석법을 결합한 기술로, 일회용으로 사용이 편리하고 휴대가 용이하며 전문 인력 또는 고가의 장비 없이 취급할 수 있다는 장점이 있어 자가 진단이나 현장 진단을 목적으로 다방면에서 상용화되어 있다(Goux et al., 2019). 그러나 해당 방식의 경우 다소 민감도 및 특이도가 낮아 해양 독소의 규제 기준인 수 ppm에서 수 ppb의 검출을 진행하기에는 부족하다는 문제가 있다(Koczula et al., 2016). 또한, 스트립 구성상 한 종류의 표적 물질에 대한 2개의 서로 다른 부위를 인지하는 항체가 필요하기 때문에 하나의 항체만으로 검출해야 하는 해양 독소 특성상 이를 적용시키기 어려웠다. 이러한 문제를 개선하기 위해 1개의 항체만으로도 표적 독소 물질의 검출이 가능한 경쟁적 측방 유동 방식을 통해 테트로도톡신을 검출하는 내용이 발표되었다(Shen et al., 2017).

경쟁적 측방 유동 분석 스트립의 구성 및 검출 방식은 위와 같으며 대부분 일반 측방 유동 분석 스트립의 구성과 유사하나, 검출선에 표적 물질에 대한 2차 항체가 있는 대신 표적 물질이 고정화되어 있다는 것이 가장 큰 차이점이다(Figure 4). 여기서 시료 패드는 검체를 투여하는 장소이고, 접합 패드는 표적 물질과 선택적으로 인지할 수 있는 1차 생체 수용체로 처리된 표지 물질이 담지되어 있다. 검출선에는 표적 물질로 처리되어 표적 물질의 유무를 파

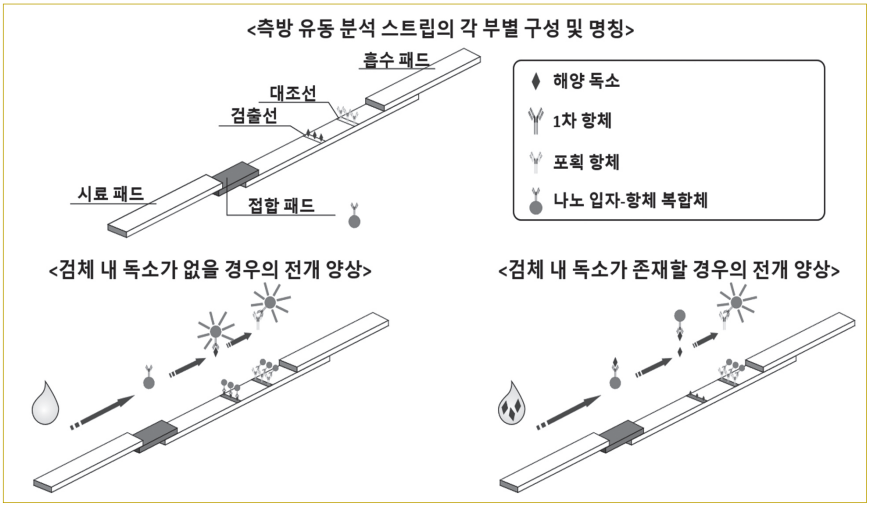

Figure 4. 경쟁적 측방 유동 분석법의 검출 원리

악할 수 있도록 되어 있으며, 검체 내에 표적 물질이 있을 경우 검출선의 항원과 반응하지 못하고 지나온 1차 생체 수용체를 인지하는 포획 항체로 처리된 대조선이 있다. 해당 테트로도톡신 검출 연구에서는 보편적으로 사용되는 금 나노 입자 대신에 형광 나노 입자를 사용함으로써 신호의 감도를 높였다. 자세하게는, 접합 패드에는 테트로도톡신 항체로 처리된 금 나노플라워를, 검출선에는 테트로도톡신을, 검출선과 대조선에는 소 혈청 알부민으로 블로킹한 양자점 나노비드를 처리했다. 양자점 나노비드와 금 나노플라워를 같이 사용하여 두 파장을 겹치면 형광 공명 전이 현상으로 인해 양자점 나노비드 주변에 금 나노플라워의 양이 증가할 경우 소광 현상이 일어나며 동일한 파장 하에서 양자점 나노비드의 발광량이 줄어든다. 즉, 시료 패드에 테트로도톡신이 있는 검체를 적재할 시 이것이 측면으로 이동하여 접합 패드에 있는 테트로도톡신 항체로 처리된 금 나노플라워와 결합하게 되고, 검체 내의 테트로도톡신의 양에 따라 검출선에 잔류하는 금 나노플라워의 양이 줄어들어 대조군과 유사한 정도의 형광값을 나타냄으로써 정량 검출이 가능하다. 이 방법은 8분 이내에 분석이 가능하며 검출 한계가 매우 낮았고, 신호 밝기가 우수하며 간섭 신호 또한 낮았다.

3. 전기 화학 기반 해양 독소 검출법

전기 화학은 전극 표면에 있는 물질이 표적 물질과 상호작용 함에 따라 자체적인 또는 주변의 산화/환원과 같이 전자가 이동하는 반응을 유도시킨 뒤, 관찰하고자 하는 대상의 전기 화학적 특성의 변화를 전류값으로 읽어 분석하는 방법이다(Ivase et al., 2020). 전기 화학 기반의 유해물질 검출 센서는 일반적으로 용액상에서 검출하는 데 사용되므로, 작업 전극, 기준 전극, 상대 전극으로 구성된 3전극계 시스템을 사용한다. 전기 화학 센서의 경우, 각종 고분자나 나노 재료, 바이오 물질 등을 접목함으로써 검출능 및 신뢰성을 향상시킬 수 있으며, 특히 검출 시스템의 저비용, 소형화가 가능하고 반응에 따른 신호 대응이 빠르다는 이점이 있어 현장 진단에 적합한 분석 방법이다. 전기 화학 기반의 검출법은 크게 두 가지로 나뉜다. 작업 전극의 임피던스를 측정함으로써 검출하는 전기 화학 임피던스 분광학(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)방식과 작업 전극의 전류를 측정함으로써 판별하는 전류 측정 방식(amperometric method)이 그것이다(Figure 5).

3-1. 전기 화학 임피던스 분광학

임피던스란 교류 회로 내의 저항값으로, EIS법은 산화 · 환원 활성종이 존재할 때 교류 전압의 진동 수를 변화시켜 얻은 정보를 통해 전극 표면의 상태를 대변한다. 괄목할 만한 점은 최근 발표된 임피던스 기반의 해양 독소 검출 관련 연구 중 다수가 생체 수용체로 항체 대신 압타머를 도입했다는 것이다. 압타머는 단일 가닥의 올리고 핵산으로, 안정된 삼 차 구조를 유지하여 항체와 유사하게 표적 물질을 선택적으로 인지하여 결합할 수 있다. 압타머 기반 임피던스 기법의 검출 기작은 작업 전극 표면에 고정한 압타머가 표적 물질과 결합함에 따라 구조가 변하고, 그 영향으로 전극 주변의 환경이 변화한 정도를 임피던스 측정을 통해 파악하여 검출에 활용하는 것이다. 이러한 원리에 입각하여 신호의 민감성을 향상시키기 위해 금 전극과 압타머를 활용해 오카다산을 검출하거나, 유리 탄소 전극과 압타머, 티오닌-그래핀 나노 복합체를 사용해 실린드로스퍼맙신을 검출하는 내용이 발표되었다(Eissa et al., 2013; Zhao et al., 2015).

3-2. 전류 측정법

전류 측정법의 경우, 표적 물질을 인지하는 수용체에 다양한 나노 입자 및 유기 물질 등을 전류 신호 증폭의 표지 물질로 도입해 검체 내의 독소량에 따라 나타나는 전류 신호를 측정함으로써 이를 판별한다. 하지만, 해양 독소 검출에는 상기한 바 하나의 생체 수용체만을 사용해야 하는 제약이 있어, 전류 측정법에서도 경쟁 ELISA 기반의 검출 방식으로 진행하는 경우가 많다. 또한, 해당 방식에서도 전처리의 중요성이 강조되어 자성 나노 입자를 도입해

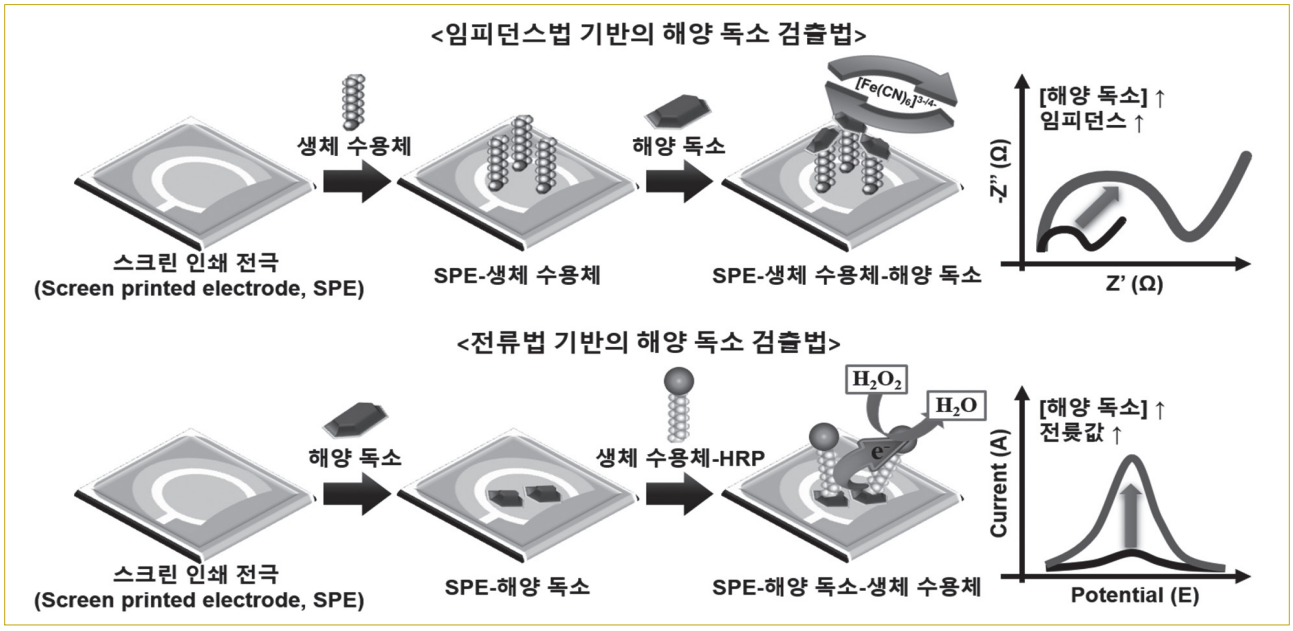

Figure 5. 전기 화학 분석법의 검출 원리

전기 화학적 면역 센서 방식으로 아자스필산을 검출하는 내용이 발표되었다(Leonardo et al., 2017). 자세하게는, 단백질 G로 코팅된 자성 나노 입자에 아자스필산 항체를 고정시킨 나노 복합체 및 HRP(horseradish peroxidase)로 표지된 아자스필산을 사용한 전기 화학적 면역 센서를 구현했다. 아자스필산 항체가 고정된 나노 복합체와 독소가 있는 검체를 먼저 반응하여 아자스필산 항체가 항체 부위를 차단한 뒤 HRP로 표지된 아자스필산과 반응하여 검체와 반응한 후 남은 결합 부위에 HRP가 잔여하게 된다. 즉, 검체 내 독소 농도가 높을수록 자성 나노 입자 표면에 잔존한 HRP 양이 감소하고, 그 결과 TMB를 산화시키며 발생하는 전류값이 낮아지게 되는 원리다.

결론

해양 독소의 지속적인 감시는 수산 식품의 안전성 확보, 국민 건강 보호, 양식 산업의 육성을 위해 필수적이다. 해양 생물 유래 독소를 신속하게 검출하기 위해 다양한 나노 재료를 접목함으로써 기존의 방법을 개선하고, 더 나아가 이들을 활용한 신규 검출 기술들이 개발되는 추세다. 그러나 해양 독소의 경우 바이러스나 세균 같은 항원 물질과는 달리 단일 유기 분자라는 특수성 때문에 항원 결정 부위가 제한적일 수밖에 없어 두 개 이상의 생체 수용체를 활용한 진단법을 사용하기 어렵다. 따라서 독소 종류에 관계없이 하나의 생체 수용체를 이용한 EIS법이나 경쟁적 ELISA 기반 광학 검출 기법이 주로 사용된다.

경쟁적 ELISA 방식의 경우 독소 물질의 저해제화가 필요한 반면, EIS법은 하나의 생체 수용체만으로 센서 개발을 할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 나노 입자를 도입하는 시도들은 기존의 방법들에 비해 실험용 동물을 희생시키지 않고도 고감도의 신속 검출이 가능하다는 이점이 있지만 최종적으로 이들을 현장 진단에 적용하기 위해서는 아직 제약이 있다. 실제 생물 시료를 전처리하는 데 여전히 복잡한 실험 단계가 요구된다는 것과 독소별 항체 또는 압타머를 발굴하기 위해 많은 시간과 금액이 필요하다는 것이다. 또, 해양 생물 유래 독소의 이성질체 및 아직 발견되지 않은 신종 독소에 대한 대책과 검출법 개발에는 지연이 발생할 수밖에 없다. 나노 재료와 생체 수용체의 대

량 생산화가 어렵고 키트화한다고 해도 품질 관리가 어렵다는 난점 또한 있다. 그러므로 아직은 실험실 단계인 신속 검출법을 현장 진단에 이용하기 위해서는 전처리의 간소화와 압타머 발굴 기술 및 파지 디스플레이와 같은 생체 수용체 발굴 기술의 고도화가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 2020년도 식품의약품안전처의 연구개발비(20163MFDS641)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Hosomi, R., Yoshida, M., & Fukunaga, K. (2012). Seafood consumption and components for health. *Global Journal of Health Science*, 4, 72–86.

2. Vilarino, N., Louzao, M.C., Vieytes, M.R., & Botana, L.M. (2010). Biological methods for marine toxin detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1673–1681.

3. Baek, S.H. (2012). First report for appearance and distribution patterns of the epiphytic dinoflagellates in the Korean peninsula, *Korean Journal of Environmental Biology*, 30, 355–361.

4. Mok, J.S., Song, K.C., Lee, K.J., & Kim, J.H. (2013) Variation and profile of paralytic shellfish poisoning toxins in Jinhae bay, Korea, *Fisheries and Aquatic Sciences*, 16, 137–142.

5. Ha, K.S., Shim, K.B., Yoo, H.D., Kim, J.H., & Lee, T.S. (2009). Evaluation of the bacteriological safety for the shellfish growing area in Hansan · Geojeman, Korea, *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 449–455.

6. Yoo, H.D., Ha, K.S., Shim, K.B., Kang, J.Y., Lee, T.S., & Kim, J.H. (2010). Microbiological quality of the shellfish-growing waters and mussels in Changseon, Namhae, Korea, *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43, 298–306.

7. Gao, S., Zheng, X., Hu, B., Sun, M., Wu, J., Jiao, B., & Wang, L. (2017). Enzyme-linked, aptamer-based, competitive biolayer interferometry biosensor for palytoxin, *Biosensors and Bioelectronics*, 89, 952–958.

8. Bodero, M., Gerssen, A., Portier, L., Klijnstra, M.D., Hoogenboom, R.L., Guzmán, L., ... & Bovee, T.F. (2018). A strategy to replace the mouse bioassay for detecting and identifying lipophilic marine biotoxins by combining the Neuro-2a bioassay and LC-MS/MS analysis, *Marine Drugs*, 16, 501–515.

9. Waritani, T., Chang, J., McKinney, B., & Terato, K. (2017). An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays, *MethodsX*, 4, 153–165.

10. Lai, W., Wei, Q., Zhuang, J., Lu, M., & Tang, D. (2016). Fenton reaction-based colorimetric immunoassay for sensitive detection of brevetoxin B, *Biosensors and Bioelectronics*, 80, 249–256.

11. Campàs, M., Reverté, J., Rambla Alegre, M., Campbell, K., Gerssen, A., & Diogène, J. (2020). A fast magnetic bead-based colorimetric immunoassay for the detection of tetrodotoxins in shellfish, *Food and Chemical Toxicology*, 140, 111315.

12. Goux, H.J., Raja, B., Kourentzi, K., Trabuco, J.R., Vu, B.V., Paterson, A.S., ... & Truong, V.T.T. (2019). Evaluation of a nanophosphor lateral-flow assay for self-testing for herpes simplex virus type 2 seropositivity, *PLoS One*, 14, e0225365.

13. Koczula, K.M., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays, *Essays in Biochemistry*, 60, 111–120.

14. Shen, H., Xu, F., Xiao, M., Fu, Q., Cheng, Z., Zhang, S., ··· & Tang, Y. (2017). A new lateral-flow immunochromatographic strip combined with quantum dot nanobeads and gold nanoflowers for rapid detection of tetrodotoxin, *Analyst*, 142, 4393–4398.

15. Ivase, T.J.P., Nyakuma, B.B., Oladokun, O., Abu, P.T., & Hassan, M.N. (2020). Review of the principal mechanisms, prospects, and challenges of bioelectrochemical systems, *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 39, 13298–13306.

16. Eissa, S., Ng, A., Siaj, M., Tavares, A.C., & Zourob, M. (2013). Selection and identification of DNA aptamers against okadaic acid for biosensing application,

Analytical Chemistry, 85, 11794–11801.

17. Zhao, Z., Chen, H., Ma, L., Liu, D., & Wang, Z. (2015). A label–free electrochemical impedance aptasensor for cylindrospermopsin detection based on thionine–graphene nanocomposites, *Analyst*, 140, 5570–5577.

18. Leonardo, S., Rambla Alegre, M., Samdal, I.A., Miles, C.O., Kilcoyne, J., Diogène, J., O'Sullivan, C.K., & Campàs, M. (2017). Immunorecognition magnetic supports for the development of an electrochemical immunoassay for azaspiracid detection in mussels, *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 200–206.