Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 36(4): 231-237 (2021)
http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2021.36.4.231 ISSN 1225-7117 / eISSN 2288-8268

Review Paper

M13 박테리오파지 기반의 바이오센서 개발

양효정, 조채환, 김지홍, 신재환, 박종필*

Recent Advances of M13 Virus-based Biosensor for Detection of Various Targets

Hyo-Jeong Yang, Chae Hwan Cho, Ji Hong Kim, Jae Hwan Shin, and Jong Pil Park*

Received: 8 December 2021 / Revised: 25 December 2021 / Accepted: 26 December 2021
© 2021 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: A biosensor is an analytic microsystem in which a biological component is coupled with a transducer to convert biological signal into an electrical out. Utilization of biosensors has been considered the importance in the field of drug discovery, biomedicine, food safety, biodefense with security, and environmental monitoring. Recently, interest in biosensor is still increasing, and it needs to develop more advanced biosensor that capable of any of targets with high sensitivity and selectivity. Therefore, it is necessary to discover new bioreceptors with high sensitivity and selectivity. Bacteriophage, especially M13 bacteriophages, are emerging as new biological receptors. The peptide-displayed M13 bacteriophage not only could specifically and selectively bind to desired target molecules but also easily manipulate genetical and/or chemical modification in biosensor applications. Therefore, we summarize recent advances and the possibilities of biosensor development utilizing M13 bacteriophages.

Keywords: biosensor, M13 bacteriophage, Genetic engineering, Chemical modification

1. INTRODUCTION

전세계적으로 건강에 대한 관심이 증대됨에 따라 스마트 헬스케어를 위한 다양한 바이오센서 제품이 개발되고 있다. 특히 2019년 코로나 판데믹 (COVID-19) 이후, 빠르고 정확한 진단에 대한 중요성이 대두되면서 신속하고 정확한 진단과 예후판정의 목적으로 바이오센서 수요가 증가하고 있고 바이오센서의 대중화가 이뤄지고 있다. 바이오센서는 나노기술과 바이오기술을 접목한 첨단 융복합기술로서 빠른 속도로 끊임없이 발전하고 있고 종래의 기술로서는 넘어설 수 없는 불가능한 검출한계, 특이도, 민감도 등의 달성이 가능해지고 있다. 현재 바이오센서의 다수를 차지하고 있는 의료용 바이오센서뿐만 아니라 군사 (무기 감지) [1], 환경 (대기/토양/수질) 모니터링 [2], 동식물 품질 검사 [3,4] 등의 분야에 활용되고 있으며, 최근 개발되고 있는 센서는 기존의 기술보다 신속하며 정확하고 고감도 검출이 가능하고, 공간 제한적이지 않은 장점으로 인해 더 많은 분야에서 활용될 것으로 기대된다 [5].

바이오센서는 목적물질과 특이적으로 반응하는 수용체 (bioreceptor)와 목적물질 (target)의 생물학적 반응을 감지하고, 신호변환기 (transducer)가 이를 물리 화학적인 상호작용을 통해 측정 가능한 출력으로 변환하여 목적물질을 정량적인 정보를 제공하는 분석기술이다[6]. 센서가 갖추어야 할 요소는 감도 (sensitivity), 선택성 (selectivity), 특이성 (specificity), 안정성 (stability) 등이 있다. 목적물질을 검출하는 기술에 따라 광학, 전기화학 등으로 분류되는데 이 중 전기화학 검출 방법은 빠르고 정확하게 전기화학적 신호로 변환되고 측정 과정이 단순하다는 점에 있어서 가장 활발히 연구가 진행 중이며 이를 활용한 검출기술은 이미 상당한 수준까지 와있는 상태이다. 목적물질에 대한 바이오센서의 선택성, 특이성, 기능성은 생체물질의 안정성에 의존하므로 목적물질과 특이적으로 반응하는 생물학적 수용체가 바이오센서 개발에 있어서 굉장히 중요하며 새로운 수용체의 발굴이 중요한 이슈로 떠오르고 있다.

최근, M13 박테리오파지를 수용체로 이용한 바이러스 기반 센서가 주목을 받고 있다. M13 박테리오파지는 화학적

중앙대학교 식품공학부
Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea
Tel: +82-31-670-4703, Fax: +82-31-675-1381
E-mail: jppark@cau.ac.kr

및 생물학적 감지를 위해 연구되고 있는 다양한 바이러스 중에서 수용체로 사용되기에 가능성 높은 후보임이 입증되었다[7]. 가장 중요한 이유는 파지디스플레이라는 기술을 사용하여 무작위 배열된 펩타이드 또는 라이브러리에서 표적 인식 펩타이드 또는 단백질을 식별할 수 있다는 점이다 [8]. 또한 파지는 견고하고 열에 안정하며 파지가 갖은 표면 특성을 이용하여 화학적 링커를 통해 쉽고 빠르게 변환기 표면에 고정될 수 있어 생체분자와 결합하기 쉽다. 이는 시간단축, 생산비용 측면에서 센서개발에 큰 장점이 된다 [9]. 이에 본 연구에서는 높은 선택성과 뛰어난 감도를 가진 바이오센서의 개발을 위해 박테리오파지, 특히 M13 박테리오파지를 유전적, 화학적으로 변형하여 바이오센서에 응용하는 방법에 대해 소개하고, 이와 관련된 연구 결과에 대해 소개하고자 한다.

2. Functionalization of M13 bacteriophage

M13박테리오파지는 880 nm의 길이에 6.6 nm의 직경을 갖는 필라멘트 모형의 파지이며, 나노 수준의 일정한 작은 입자이다. 일반적인 나노 입자의 경우 합성 과정에서 다양한 변수들에 의해 각기 다른 크기와 형태를 띄지만, M13 박테리오파지를 포함한 모든 종류의 박테리오파지의 경우 일정한 유전자를 통해 발현되기 때문에 모든 입자들이 동일한 크기에 동일한 형태를 띄게 된다. 그러나, 간혹 박테리오파지 자체 유전적 변형, 숙주인 *E. coli*의 돌연변이로 인하여 유전자 발현에 영향을 줄 수 있을 것으로 본다. 또한 부피당 표면적의 비율 (surface to volume ratio)이 아주 높아 입자당 표면에 갖고 있는 단백질이 굉장히 많다 [10].

필라멘트 파지인 M13 박테리오파지는 원형 단일 가닥 DNA 게놈을 둘러싸고 있는 약 2800개의 고도로 정렬된 5개의 외피 단백질 (pⅢ, pⅥ, pⅦ, pⅧ, pⅨ) 사본으로 구성된 원통형 구조이며, 여기서 p는 단백질 (protein)을 의미한다. 파지 표면의 대부분을 둘러싸고 있고 단일 가닥 DNA 게놈을 캡슐화하는 주요 외피 단백질인 pⅧ은 약 2700여개의 주요 사본이 존재하고, 소수 외피 단백질인 pⅢ와 pⅥ, pⅦ그리고 pⅨ은 각각 5개의 사본이 존재한다 [11].

50개의 잔기로 구성된 pⅧ은 3개의 도메인으로 구별된다. 음전하를 띄는 친수성 N-말단 도메인 (1-20), 중간의 소수성 도메인 (21-39), 그리고 파지의 DNA와 정전기적으로 상호작용하는 양전하를 띄는 도메인 (40-50)으로 구성된다. N-말단 도메인은 미디어에 노출되는 부위로, 유전적 또는 화학적 기능화의 대상이 된다 [12]. 또한, 필라멘트 파지의 한쪽 말단 끝에 있는 소수 외피 단백질인 pⅢ는 유연성과 N-말단의 접근성으로 인해 파지 디스플레이에서 광범위하게 활용되어 큰 단백질을 포함하여 다양한 길이의 펩타이드를 삽입할 수 있다.

일반적인 센서 기술의 주요 특징은 저비용, 소형, 견고성, 선택성 및 감도이다. M13 박테리오파지는 화학반응에서 표적 특이성이 높아 감도가 뛰어난 물질로 많이 연구되었고 [13], 대장균과 같은 특정 균만 감염시키기 때문에 인체에 무해한 생체 친화적 물질이라는 점에 있어서 바이오센서의 수용체로 사용되기에 큰 장점을 갖고 있다. 또한 M13 박테리오파지는 증식속도가 굉장히 빠르고 수율이 높아 생산 효율적이며 이는 생산시간단축, 저비용 그리고 신속성 측면에서 센서로서의 중요 이점을 갖는다 [14]. 이러한 특성으로 인해 M13 박테리오파지는 생체공학을 비롯한 다양한 분야에서 떠오르는 바이오 원료로 많은 연구가 되고 있으며 [15], 유전적, 화학적 변형을 쉽게 유도하는 pⅢ, pⅧ의 기능화에 초점을 맞추어 M13파지의 유전적, 화학적 변형과 활용사례에 대해 소개하려고 한다.

2.1. Genetical Modification of M13 Bacteriophage

필라멘트 파지인 M13 박테리오파지는 바이오센서 개발에 있어 각광받고 있는 재료 중 하나이다 [16]. 파지는 생체 인식을 위한 표적 특이적인 펩타이드나 단백질을 보유하도록 유전적으로 조작이 가능하다 [17]. 높은 선택성과 감도를 가진 바이오센서 개발을 위해 파지의 이러한 유전공학 기술을 활용할 수 있는데, 대표적인 기술이 파지디스플레이 (phage display)기술이다. 파지디스플레이는 주로 필라멘트 파지, 특히 M13 박테리오파지를 기반으로 하며 원하는 물질에 특이적으로 결합하는 파지를 찾을 수 있는 유전적 변형 기술이다 [18]. 원하는 펩타이드의 DNA를 파지의 단일 가닥 DNA에 삽입함으로써 원하는 펩타이드 자체가 파지 외피단백질 끝에 발현된다. 이것이 파지에 펩타이드 또는 단백질을 표시하는 DNA공학이라 불리는 원리이며, 이 같은 원리로 펩타이드 또는 단백질이 주요, 또는 소수 외피 단백질과의 융합을 통해 파지의 측벽을 따라 부위에 특이적으로 표시될 수 있다 (Fig. 1) [19].

외래 펩타이드나 단백질은 이를 암호화하는 DNA를 파지에 직접 삽입함으로써 필라멘트의 외피 단백질에 발현된다. 따라서 수십억 개의 M13 박테리오파지 클론으로 구성된 라이브러리는 각각의 파지 클론이 특정한 펩타이드나 단백질 서열을 표시하고 있고, 이 라이브러리는 바이오패닝 (biopanning)이라는 생물학적 선택 과정을 통해 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 펩타이드나 단백질을 식별하는 데 사용될 수 있다. 1985년, G. P. Smith 등에 의해 파지디스플레이 기술이 처음으로 도입되었고 [20], 이후 현재까지 다양한 분야에 걸쳐 활용되고 있으며, 파지디스플레이는 임상 시험에서 수많은 FDA 승인을 받은 약물 및 약물 후보의 원천이 되고 있는 기술이다 [21].

다양한 연구들 중에서도, 유전공학 기술을 이용하여 M13 박테리오파지 표면에 외래 펩타이드/단백질을 가장 많이 발현하는 표적 부위는 두 종류의 외피 단백질이다. 하나는 주요 외피 단백질인 pⅧ부분이고 [22], 다른 하나는 소수 외피 단백질인 pⅢ부분이다 [23]. 주요 외피 단백질인 pⅧ의 경우, 사본이 약 2700여 개이기 때문에 발현하고자 하는 펩타이드의 수가 늘어난다는 장점을 갖지만, 8-12 개 이상의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 발현할 경우, M13 박테리오파지의

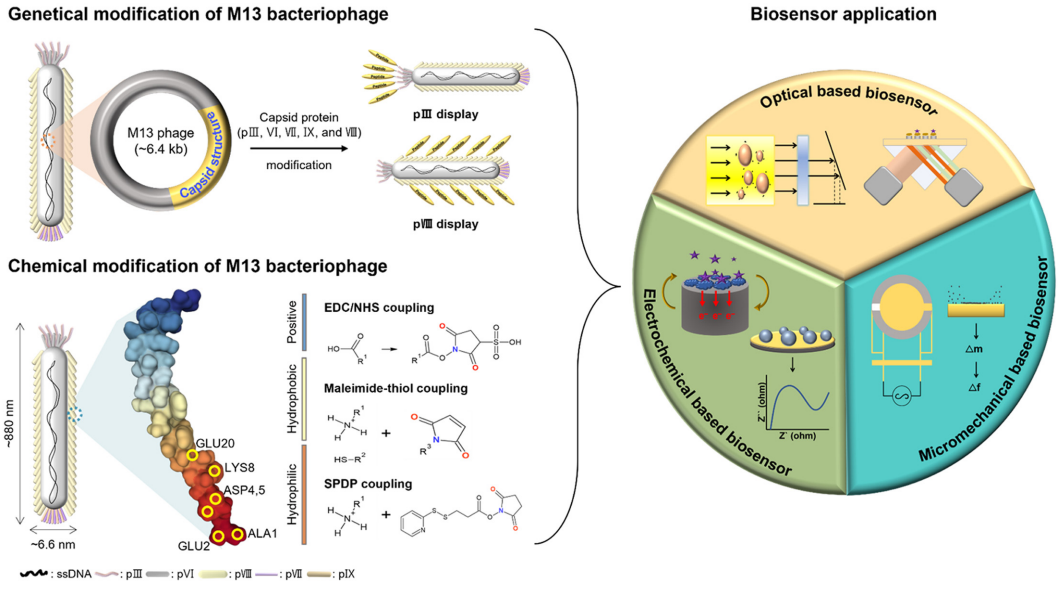

Fig. 1. General approach of M13 bacteriophage modification for biosensor applications.

구조적 안정성이 떨어져 성숙한 입자를 형성하기에 불완전하다는 단점이 있다 [24]. 소수 외피 단백질인 pⅢ부분에 외래 펩타이드/단백질을 발현할 경우, N-말단의 접근성과 유연성으로 인해 구조적인 제한 없이 다양한 크기의 펩타이드 및 단백질을 안정적으로 발현할 수 있다는 장점을 갖는다 [25]. 그러나 5개의 사본에만 외래 펩타이드를 발현할 수 있다는 한계점이 제기되고 있다. Table 1에 나타난 바와 같이, 외피 단백질인 pⅢ, pⅧ부위의 유전공학적 변형을 통한 사례들이 있다 [22,26-28].

Guo 등은 생물 공정에 중요한 Fe^{3+}, Fe^{2+} 이온의 검출을 위해 유전공학 기술이 적용된 M13 박테리오파지 기반의 바이오센서를 개발하였다 [27]. 해당 방법에서는 글라이신 (glycine)과 알라닌이 풍부한 AAEGYGE 부분을 갖도록 M13 박테리오파지의 주요 외피 단백질인 pⅧ부분에 티로신을 발현시켜 철과 상호작용하도록 설계하였다. pⅧ부분에 티로신 (tyrosine) 잔기가 표시된 M13 박테리오파지 기반 바이오센서는 유기체에 필수적인 전이 금속이며 세포 대사 및 효소 촉매 작용에 중요한 역할을 하는 철 이온을 특이적으로 검출이 가능하였고, TEM을 통해 M13 박테리오파지에 티로신 잔기가 부착되었음을 확인했다. 결과의 안전성과 신뢰성을 확인하기 위해 다양한 철 이온 농도에 대해 실험을 진행하여 58 nmol/L의 검출한계를 나타냈고, 철 이온에 대한 WHO의 위생 검출 한계보다 훨씬 낮은 검출한계를 나타내어 파지기반 바이오센서로서 민감도와 선택성을 보여주었다. 해당 연구결과는 식품산업 및 생물, 환경 분야에서 철 이온 검출을 위한 효율적인 방법으로 활용될 것으로 기대된다.

Koh 등은 과일에서 paraquat (PQ)을 검출하기 위해 유전공학 기술이 적용된 M13 박테리오파지 기반의 바이오센서를 개발하였다 [28]. PQ는 제초제의 일종으로 독성이 매우 강한 물질이다. 해당 연구에서는 생산효율성, 저가생산비용, 높은

Table 1. Genetic modification of M13 bacteriophage for biosensor development

Target	Analytical method	Insert sequence	Modification site	Detection limit	Reference
Paraquat	SERS	BPWHW	pⅧ	40.2 ng/cm^2	[28]
Ferric / Ferrous ion	TEM	AAEGTGE	pⅧ	58 nmol/L	[27]
Hg (II)	TEM/HAADF-STEM	VSGSSPDS/EEEE	pⅧ	10.8 nM	[47]
Nitrate ion	SEM	YEEE/EEEE	pⅧ	0.190 μA/μM	[48]
Trinitrotoluene	SPR	WHW	pⅧ	-	[49]
Tumor	NIR	SWNT	pⅢ	-	[22]
Paraquat	SERS	SPPWPPRP	pⅢ	8 ng/cm^2	[26]
Staphylococcus aureus	SERS	SSYGGSS	pⅢ	10 cfu/mL	[50]

Abbreviation: surface-enhanced raman spectroscopy (SERS), transmission electron microscope (TEM), high angle annular dark field scanning transmission electron microscopy (HAADF-STEM), scanning electron microscope (SEM), surface plasmon resonance (SPR), near infrared spectroscopy (NIR)

표면비 등의 장점으로 인해 M13 박테리오파지를 수용체로 사용했고, 트립토판-히스티딘-트립토판 (WHW) 펩타이드 서열 (BPWHW)을 M13 박테리오파지의 주요 외피 단백질인 pⅧ부위에 발현했다. 유전적 변형된 M13 박테리오파지를은 나노 와이어 (AgNW) 표면에 결합시켰고, 이는 PQ의 선택적 검출을 위한 생체 수용체로 사용하였다. M13 박테리오파지의 유전적 변형을 통해 개발된 이 센서는 검출한계 (LOD)는 40.2 ng/cm^{2}로 높은 감도로 PQ를 검출했고, 실제 살충제를 처리한 사과를 사용하여 현장 적용 테스트를 진행한 결과 PQ 신호는 0.1 μg/cm의 낮은 농도에서 검출되었고, 이를 통해 BPWHW/AgNW는 농약이 처리된 복잡한 매트릭스에서도 선택적으로 PQ를 검출할 수 있음을 확인했다. 이 연구를 기반으로 M13 박테리오파지의 기능화된 AgNW 센서는 M13 파지 표면 펩타이드 서열을 유전적으로 변형함으로써 다양한 화학 및 생물학적 센서에 생체수용체로 활용될 것으로 예상된다.

이렇듯, M13 박테리오파지는 유전적 변형에 의해 표면을 부분적으로 변화시킬 수 있는 강력한 특징으로 인해 새로운 생체 나노 물질을 설계하는데 널리 사용되고 있고 [29], M13 박테리오파지의 다양한 응용은 파지의 외피단백질에 크게 의존하며 [30], 이를 다양하게 재조합 함으로써 기존의 특성을 변경하고 추가적인 기능을 제공하여 바이오센서로서 다양하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

2.2. Chemical Modification of M13 Bacteriophage

지난 10년간 M13 박테리오파지의 뛰어난 구조적 특성을 활용하여 새로운 물질을 개발하기 위한 수단으로 파지 표면에 외인성 화합물을 접합하는 방법이 큰 관심을 받았다. 또한 파지는 다른 유기/무기 물질과 결합하여 바이오센서뿐만 아니라 이온 배터리, 광전지, 세포 배양 지지대 등과 같은 다양한 장치의 제조에 사용될 수 있는 우수한 빌딩 블록이라는 것이 입증되었다 [13].

최근 M13 박테리오파지 외피 단백질 내 아미노산의 부위별 화학적 변형 방법에 대한 다양한 연구 결과들이 보고되고 있다 (Table 2) [31]. M13 박테리오파지의 화학적 변형은 주로 아미노산 잔기에서 이루어지며 부위 특이적인 이러한 접근법은 다양한 화학 물질로 M13 박테리오파지 표면의 변형을 가능하게 한다 (Fig. 1) [32]. 가장 많이 연구가 진행되고 있는 화학적 변형의 표적 잔기로 사용되는 아미노산에는 시스테인 (cysteine), 라이신 (lysine), N-말단 세린/트레오닌 (N-terminal serine/threonine), N-말단 알라닌 (N-terminal alanine), 아스파르트산 (aspartic acid), 글루탐산 (glutamic acid), 티로신 (tyrosine) 등이 있다 [32].

야생형 (wild type) 파지에서 N-말단 알라닌과 라이신의 아미노 그룹, 주요 외피단백질 pⅧ의 글루탐산 및 아스파트산의 카르복실산 그룹은 아마이드 (amide)와 같은 선택적 화학적 기능화를 위한 대표적인 표적 중 하나이다. 파지의 더 다양한 활용을 위해 야생형 외피단백질의 용매 노출부위에는 나타나지 않는 시스테인, N-말단 세린/트레오닌 또는 티로신과 같은 기타 아미노산들이 활용되기도 한다.

일반적으로 라이신, 아스파르트산, 글루탐산, 시스테인 및 티로신과 같은 파지 외피 단백질의 아미노산은 EDC/NHS 커플링 [33,34], Maleimide-thiol 커플링 [35] 등과 같은 표면 화학을 이용한 반응 또는 공유결합을 통해 기능적 유도체와 접합되어 다양한 역할을 하게 된다 [13]. 특히 화학적 변형 방법에서는 2700개의 사본에 50개의 아미노산 잔기를 갖고 있고, 용매에 접근이 가능한 N-말단 아미노기를 갖고 있는 pⅧ부위가 pⅢ를 포함한 다른 부위보다 용매 접근성이 높고 pKa 값 (N-말단: 7.6-8.0) 이 낮기 때문에 p8의 N-말단 부위가 NHS-에스테르 (ester)의 우선적인 표적부위로 알려져 있다 [11].

Fang 등은 deoxynivalenol (DON)의 고감도 검출을 위해 비색 면역분석센서를 개발했다 [36]. DON은 곰팡이 독소로 밀, 보리, 귀리, 옥수수와 같은 곡물에서 주로 발생한다. 해당 연구에서는 DON과 결합하는 펩타이드 발굴을 위해 M13 박테리오파지의 pⅢ부위에 7-mer 펩타이드가 발현된 라이브러리로 바이오패닝을 진행했고 [37], DON과 특이적으로 결합하는 7-mer 펩타이드 ($M13_{DON}$)를 발굴했다. M13 박테리오파지의 pⅧ부분을 SPDP 화합물을 사용하여 화학적으로 변형시켜 pⅧ부분의 노출부분을 sulfhydryl (SH) 그룹으로 치환한 후 Au-S 결합을 통해 $M13_{DON}$ 표면에 나노물질 (AuNP)을 자가조립시켜 (self-assembly) M13DON@AuNPs을 얻었고, 측정에 쓰이는 퍼옥시다아제의 유사 활성을 향상시키기 위해 Ag입자를 AuNP의 표면에 접합시켜 최종적으로 $M13_{DON}$@AuNPs@Ag를 형성했다. 해당 연구에서는 DON 검출을 위해 천연효소가 없는 면역분석법 ($M13_{DON}$-NLISA)을 개발했으며, 이 방법으로 M13DON@AuNPs@Ag의 성능을 확인했다. M13 박테리오파지의 화학적 변형을 통해 개발된 이 센서는 경쟁억제농도 IC50는 2.03 ng/mL, 검출한계 LOD는 13.67 pg/mL로 DON 검출에 대한 높은 민감도를 보여주었고, M13 박테리오파지는 유전적/화학적으로 변형됨으로써 다양한 표적물질과 결합할 수 있는 수용체로서의 잠재력을 보여주었다 [36].

Suthiwangcharoen 등은 화학적 변형된 M13 박테리오파지에 약물을 봉합한 후 암세포의 표적에 사용하여 약물전달과 약물전달센서로의 접근가능성을 보여주었다 [15]. 해당 연구에서는 수용체 매개 세포내이입 (endocytosis)을 통해 특정 세포의 흡수를 향상시키는데 효과적이라고 알려진 엽산 (folic acid)을 EDC-NHS coupling 반응을 통해 M13 박테리오파지의 pⅧ 부위에 결합시켜 M13 박테리오파지를 수용체로 활용하였다. 이렇게 형성된 M13-엽산 (FA-M13)은 약물 캡슐화에 사용되는 나노 블록체인인 PCL-P2VP와 합성되어 약물전달체인 (FA-M13-PCL-P2VP)를 형성하여 표적물질을 치료할 수 있는 doxorubicin (DOX)을 로딩하여 약물을 봉입할 수 있는 나노 크기의 전달 시스템을 개발했다. 이렇게 개발된 항 종양 약물인 DOX가 봉입된 M13 박테리오파지 기반의 나노 약물 전달체의 세포독성 평가는 KB 세포와 HMSC를 사용하여 평가되었고, 세포독성이 상대적으로 낮다는 것

Table 2. Chemical modification of M13 bacteriophage for biosensor development

Target	Analytical method	Coupling chemistry	Modification site	Detection limit	Reference
Deoxynivalenol	NLISA	SPDP	pⅧ	2.03 ng/mL	[36]
Antigen	MALDI-TOF	SPDP	pⅧ	25 fM	[51]
KB cancer cell	TEM	EDC/NHS	pⅧ	-	[11]
Cancer antigen	MALDI-TOF	EDC/NHS	pⅧ	125 fM	[52]
Vibrio	Colorimetric immunoassay	EDC/NHS	pⅧ	15 cfu/mL	[33]
Staphylococcus aureus	SERS	EDC/NHS	pⅧ	10 cfu/mL	[50]
Coliform bacteria	SEM	EDC/NHS	pⅧ	45 cfu/mL	[53]
Salmonella	SPR	EDC/NHS	pⅧ	8.0×10^7 cfu/mL	[54]

Abbreviation: nanozyme linked immunosorbent assay (NLISA), matrix assisted laser desorption ionization (MALDI-TOF), transmission electron microscope (TEM), surface-enhanced raman spectroscopy (SERS), succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS)

을 확인함과 동시에FA-M13 파지 수용체가 표적세포에 대한 높은 선택성과 표적 특이성을 나타냄을 확인했다. 또한 최근 인간 대상 임상 시험에서 M13 박테리오파지가 혈뇌 장벽을 통과할 수 있고, 독성이나 면역 반응을 유발하지 않는다고 보고되어 M13 박테리오파지 기반의 약물전달 수용체가 약물전달과 바이오센서에 활용 가능성이 있음을 시사하고 있다 [38]. 이처럼 M13 박테리오파지는 다양한 목적에 따라 표면을 화학적으로 변형이 가능하여 기존의 센서 성능을 능가하여 더욱 다양한 기능을 갖게 될 것으로 예측된다.

3. Conclusion Remarks and Challenges

바이오센서의 감도와 특이성 및 선택성은 표적분자 결합에 사용되는 바이오 리셉터의 특성에 따라 달라진다 [39]. 본 논문에서 다룬 M13 박테리오파지는 안정성이 뛰어나고 분자량이 작은 물질부터 큰 분자량의 단백질, 그리고 세포 수준의 표적 물질까지 검출할 수 있는 감도 높은 생체 친화적인 물질이다 [40]. 또한 쉽고 빠르게 다량증식이 가능하고 유전적 또는 화학적 변형을 위한 최적의 생화학적 구조적 특징을 갖고 있기 때문에 이상적인 바이오 리셉터로 활용되고 있다 [41].

M13 박테리오파지의 다양한 유전공학적 접근과 화학적 변형 방식은 약물전달, 표적치료, 바이오 이미징, 조직공학 등 바이오 의약 분야, 식품, 환경 모니터링 산업에 활용될 수 있는 잠재력을 보여주었고, M13 박테리오파지 기반 바이오센서는 꾸준히 개발되고 있는 실정이다 [42]. 하지만 파지 기반의 바이오센서는 몇 가지 한계를 해결하기 위한 노력이 필요하다. 예를 들어, 파지 기반 바이오센서 시스템의 생체 내 직접 적용을 위한 안정성 문제를 해결해야 한다. 실제로, 의학적 진단 및 식품 매개를 통제하기 위한 바이러스의 사용으로 인해 발생할 수 있는 잠재적인 안전성을 확보하기 위한 추가적인 연구가 필요하다 [43].

또한, 다른 외피단백질인 pⅦ과 pⅨ도 파지디스플레이 및 후속적인 화학적 변형을 위한 대체 표적으로 사용되고 있지만, pⅢ와 pⅧ부위에 비하면 안정성이나 변형방법 등이 확립되어 있지 않고 디스플레이 효율이 낮다는 점에 있어 실제 센서개발로 이어지기 위해서는 선행되어야 하는 연구가 필요한 실정이다 [44]. 최근 사람들의 건강에 대한 인식 개선과 관심으로 인해 쉽고 빠른 진단이 가능한 바이오센서에 대한 수요가 증가하고 있고, 코로나라는 새로운 질병이 대두되면서 전세계적으로 진단키트와 바이오센서에 대한 대중화가 이루어졌다. 바이오센서에 활용되기에 무궁무진한 잠재력을 갖은 파지 응용에 대한 관심이 높아지고 있음에도 파지를 안정적으로 기질에 고정시키는 방법과 고정된 파지를 활용하여 다양한 타겟 물질을 검출할 수 있는 바이오센서는 널리 알려져 있지 않다. 이에 대한 추가적인 연구가 진행되어 기술개발에 대한 확립이 필요하며 많은 관심과 투자가 이루어져야 할 것으로 보인다 [45,46].

Acknowledgements

본 연구는 2019년, 2021년 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행한 연구임(2019 R1A2C2084065, 2021R1A4A1022206).

REFERENCES

1. Singh, V. V. (2016) Recent advances in electrochemical sensors for detecting weapons of mass destruction. A review. *Electroanalysis* 28: 920-935.
2. Ferro, Y., M. Perullini, M. Jobbagy, S. A. Bilmes, and C. Durrieu (2012) Development of a biosensor for environmental monitoring based on microalgae immobilized in silica hydrogels. *Sensors* 12: 16879-16891.
3. Ye, Y., H. Guo, and X. Sun (2019) Recent progress on cell-based biosensors for analysis of food safety and quality control. *Biosens. Bioelectron.* 126: 389-404.

4. Li, Y., S. S. Panwar, and S. Mao (2006) A wireless biosensor network using autonomously controlled animals. *IEEE Netw*. 20: 6-11.
5. Choe, C.-J. (2011) Recent research trends in nanobiosensor. *J. of the Kor. Ceram. Soc*. 14: 44-49.
6. Whitcombe, M. J., I. Chianella, L. Larcombe, S. A. Piletsky, J. Noble, R. Porter, and A. Horgan (2011) The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection. *Chem. Soc. Rev.* 40: 1547-1571.
7. Lee, J. H., P. F. Xu, D. W. Domaille, C. Choi, S. Jin, and J. N. Cha (2014) M13 bacteriophage as materials for amplified surface enhanced Raman scattering protein sensing. *Adv. Funct. Mater*. 24: 2079-2084.
8. Smith, G. P., and V. A. Petrenko (1997) Phage display. *Chem. Rev.* 97: 391-410.
9. Moghimian, P., V. Srot, B. P. Pichon, S. J. Facey, and P. A. van Aken (2016) Stability of m13 phage in organic solvents. *J. Biomater. Nanobiotechnol*. 7: 72.
10. Kim, C., W.-G. Kim, and J.-W. Oh (2014) Understanding and Applications of M13 Bacteriophage Based Self-Assembly Structures. *CRC Press, FL, USA*. 25: 307-314.
11. Li, K., Y. Chen, S. Li, H. G. Nguyen, Z. Niu, S. You, C. M. Mello, X. Lu, and Q. Wang (2010) Chemical modification of M13 bacteriophage and its application in cancer cell imaging. *Bioconjugate. Chem*. 21: 1369-1377.
12. Johnson, I. D., and B. S. Hudson (1989) Environmental modulation of M13 coat protein tryptophan fluorescence dynamics. *Biochemistry* 28: 6392-6400.
13. Yang, S. H., W. J. Chung, S. McFarland, and S. W. Lee (2013) Assembly of bacteriophage into functional materials. *Chem. Record*. 13: 43-59.
14. Moon, J.-S., E. J. Choi, N.-N. Jeong, J.-R. Sohn, D.-W. Han, and J.-W. Oh (2019) Research progress of M13 bacteriophage-based biosensors. *Nanomaterials*. 9: 1448.
15. Suthiwangcharoen, N., T. Li, K. Li, P. Thompson, S. You, and Q. Wang (2011) M13 bacteriophage-polymer nanoassemblies as drug delivery vehicles. *Nano Res*. 4: 483-493.
16. Mao, C., A. Liu, and B. Cao (2009) Virus?based chemical and biological sensing. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48: 6790-6810.
17. Skovgaard, N. (2008). Bacteriophage, Genetics and Molecular Biology, Stephen Mc Grath, Douwe van Sinderen (Eds.), Caister Academic Press (2007), www. caister. com.
18. Bratkovič, T. (2010) Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cell. Mol. Life Sci*. 67: 749-767.
19. idhu, S. S. (2001) Engineering M13 for phage display. *Biomol. Eng.*. 18: 57-63.
20. Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317.
21. Nelson, A. L., E. Dhimolea, and J. M. Reichert (2010) Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov*. 9: 767-774.
22. Yi, H., D. Ghosh, M.-H. Ham, J. Qi, P. W. Barone, M. S. Strano, and A. M. Belcher (2012) M13 phage-functionalized single-walled carbon nanotubes as nanoprobes for second near-infrared window fluorescence imaging of targeted tumors. *Nano Lett*. 12: 1176-1183.
23. Petrenko, V. A., and G. P. Smith (2000) Phages from landscape libraries as substitute antibodies. *Protein Eng*. 13: 589-592.
24. Rodi, D. J., S. Mandava, and L. Makowski (2005) Filamentous bacteriophage structure and biology. pp. 21-82. *Phage display in biotechnology and drug discovery*. CRC Press, FL, USA.
25. Lubkowski, J., F. Hennecke, A. Plückthun, and A. Wlodawer (1998) The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of g3p. *Nat. Struct. Biol*. 5: 140-147.
26. Lee, J.-M., E. J. Choi, J. Park, V. Devaraj, C. Kim, J. Han, W.-G. Kim, K. Kim, Y.-C. Kang, and K. H. Kim (2019) Improvement of high affinity and selectivity on biosensors using genetically engineered phage by binding isotherm screening. *Viruses* 11: 248.
27. Guo, X., C. Niu, Y. Wu, and X. Liang (2015) Application of an M13 bacteriophage displaying tyrosine on the surface for detection of Fe 3+ and Fe 2+ ions. *Virol. Sin*. 30: 410-416.
28. Koh, E. H., C. Mun, C. Kim, S.-G. Park, E. J. Choi, S. H. Kim, J. Dang, J. Choo, J.-W. Oh, and D.-H. Kim (2018) M13 bacteriophage/silver nanowire surface-enhanced raman scattering sensor for sensitive and selective pesticide detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10: 10388-10397.
29. Park, I. W., K. W. Kim, Y. Hong, H. J. Yoon, Y. Lee, D. Gwak, and K. Heo (2020) Recent developments and prospects of M13-bacteriophage based piezoelectric energy harvesting devices. *Nanomaterials* 10: 93.
30. Meijer, A. B., R. B. Spruijt, C. J. Wolfs, and M. A. Hemminga (2001) Configurations of the N-terminal amphipathic domain of the membrane-bound M13 major coat protein. *Biochemistry* 40: 5081-5086.
31. Tridgett, M., J. R. Lloyd, J. Kennefick, C. Moore-Kelly, and T. R. Dafforn (2018) Mutation of M13 bacteriophage major coat protein for increased conjugation to exogenous compounds. *Bioconjugate Chem*. 29: 1872-1875.
32. Chung, W.-J., D.-Y. Lee, and S. Y. Yoo (2014) Chemical modulation of M13 bacteriophage and its functional opportunities for nanomedicine. *Int. J. Nanomed*. 9: 5825.
33. Liu, P., L. Han, F. Wang, X. Li, V. A. Petrenko, and A. Liu (2018) Sensitive colorimetric immunoassay of Vibrio parahaemolyticus based on specific nonapeptide probe screening from a phage display library conjugated with MnO 2 nanosheets with peroxidase-like activity. *Nanoscale* 10: 2825-2833.
34. Blaik, R. A., E. Lan, Y. Huang, and B. Dunn (2016) Gold-coated M13 bacteriophage as a template for glucose oxidase biofuel cells with direct electron transfer. *ACS Nano.* 10: 324-332.
35. Santoso, B., S. Lam, B. W. Murray, and G. Chen (2013) A simple and efficient maleimide-based approach for peptide extension with a cysteine-containing peptide phage library. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 23: 5680-5683.
36. Fang, H., S. Zhan, L. Feng, X. Chen, Q. Guo, Y. Guo, Q. He, and Y. Xiong (2021) Chemical modification of m13 bacteriophage as nanozyme container for dramatically enhanced sensitivity of colorimetric immunosensor. *Sens. Actuator B-Chem*. 346: 130368.
37. Yan, J., Q. Shi, K. You, Y. Li, and Q. He (2019) Phage displayed

mimotope peptide-based immunosensor for green and ultrasensitive detection of mycotoxin deoxynivalenol. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 168: 94-101.
38. Krag, D. N., G. S. Shukla, G.-P. Shen, S. Pero, T. Ashikaga, S. Fuller, D. L. Weaver, S. Burdette-Radoux, and C. Thomas (2006) Selection of tumor-binding ligands in cancer patients with phage display libraries. *Cancer Res*. 66: 7724-7733.
39. Hock, B., M. Seifert, and K. Kramer (2002) Engineering receptors and antibodies for biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 17: 239-249.
40. Arugula, M. A., and A. Simonian (2014) Novel trends in affinity biosensors: current challenges and perspectives. *Meas. Sci. Technol*. 25: 032001.
41. Molas, M., R. Bartrons, and J. Perales (2002) Single-stranded DNA condensed with poly-L-lysine results in nanometric particles that are significantly smaller, more stable in physiological ionic strength fluids and afford higher efficiency of gene delivery than their double-stranded counterparts. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj*. 1572: 37-44.
42. Alhadrami, H. A. (2018) Biosensors: Classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 65: 497-508.
43. Peltomaa, R., I. Lopez-Perolio, E. Benito-Pena, R. Barderas, and M. C. Moreno-Bondi (2016) Application of bacteriophages in sensor development. *Anal. Bioanal. Chem*. 408: 1805-1828.
44. Ghosh, D., A. G. Kohli, F. Moser, D. Endy, and A. M. Belcher (2012) Refactored M13 bacteriophage as a platform for tumor cell imaging and drug delivery. *ACS Synth. Biol*. 1: 576-582.
45. Hosseinidoust, Z., T. G. Van de Ven, and N. Tufenkji (2011) Bacterial capture efficiency and antimicrobial activity of phage-functionalized model surfaces. *Langmuir* 27: 5472-5480.
46. Kim, D. K., and J. Dobson (2009) Nanomedicine for targeted drug delivery. *J. Mater. Chem*. 19: 6294-6307.
47. Manivannan, S., Y. Seo, D.-K. Kang, and K. Kim (2018) Colorimetric and optical Hg (ii) ion sensor developed with conjugates of M13-bacteriophage and silver nanoparticles. *New J. Chem*. 42: 20007-20014.
48. Seo, Y., S. Manivannan, I. Kang, S.-W. Lee, and K. Kim (2017) Gold dendrites Co-deposited with M13 virus as a biosensor platform for nitrite ions. *Biosens. Bioelectron*. 94: 87-93.
49. Kim, W.-G., C. Zueger, C. Kim, W. Wong, V. Devaraj, H.-W. Yoo, S. Hwang, J.-W. Oh, and S.-W. Lee (2019) Experimental and numerical evaluation of a genetically engineered M13 bacteriophage with high sensitivity and selectivity for 2, 4, 6-trinitrotoluene. *Org. Biomol. Chem*. 17: 5666-5670.
50. Wang, X.-Y., J.-Y. Yang, Y.-T. Wang, H.-C. Zhang, M.-L. Chen, T. Yang, and J.-H. Wang (2021) M13 phage-based nanoprobe for sers detection and inactivation of staphylococcus aureus. *Talanta* 221: 121668.
51. Lee, J. H., D. W. Domaille, and J. N. Cha (2012) Amplified protein detection and identification through DNA-conjugated M13 bacteriophage. *ACS Nano*. 6: 5621-5626.
52. Domaille, D. W., J. H. Lee, and J. N. Cha (2013) High density DNA loading on the M13 bacteriophage provides access to colorimetric and fluorescent protein microarray biosensors. *Chem. Commun*. 49: 1759-1761.
53. Nakama, K., M. Sedki, and A. Mulchandani (2021) Label-free chemiresistor biosensor based on reduced graphene oxide and M13 bacteriophage for detection of coliforms. *Anal. Chim. Acta*. 1150: 338232.
54. Karoonuthaisiri, N., R. Charlermroj, M. J. Morton, M. Oplatowska-Stachowiak, I. R. Grant, and C. T. Elliott (2014) Development of a M13 bacteriophage-based SPR detection using Salmonella as a case study. *Sens. Actuator B-Chem*. 190: 214-220.