

양자점 표지 형광미세비드의 합성 및 응용

김 남 수

바이오나노연구단

Synthesis and Application of Quantum Dot-tagged Fluorescent Microbeads

Nam-Soo Kim

Food Bio-nano Technology Research Group

기술소개

형광양자점(fluorescent quantum dot, QD)은 생물학적 응용 분야에서 전통적 의미의 형광발색단(fluorophore)을 대체하는 형광표지(fluorescent label)로서 부각되고 있다. 이 때 양자점 미세입자내로 여러 가지 기능성을 부가하면 생물학적 검출목적에 적합하도록 광안정성, 광도 증진, 다중측정과 같은 여러 가지 특성을 증진시킬 수 있다. 여기에서 소개하고자 하는 양자점 표지 미세비드(QD-tagged microbead)는 새로운 형태의 형광표지로서 나노테크놀로지 및 생물학 분야에서의 면역측정, 생체 내 이미징(*in vivo* imaging) 및 센싱 분야 등에서 새로운 기회를 제공할 수 있을 것으로 여겨지고 있다.

내용요약

1. 양자점 개요

1.1. 광학특성

21세기 프루브로 불리는 양자점은 그 고유특성으로 인하여 유전학, 생화학, 분자생물학 분야의 생물표지에 적합하다. 현재 가장 보편적인 유기형광발색단과 비교하여 볼 때 양자점에는 연속흡광특성, 견고한 신호강도, 높은 광화학적 안정성과 같은 특유의 광전자학적 특성이 존재한다. 그림 1에 대표적 양자점인 CdSe@ZnS의 광학특성을 표시하였다.

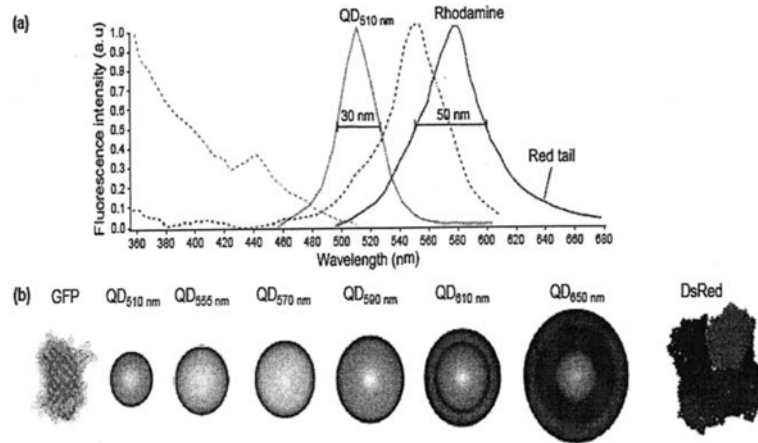


그림 1. 양자점의 광학특성
(a) 양자점과 로다민(rhodamine)의 여기 및 방출 스펙트럼. (b) 양자점의 크기와 방출사이의 관계

그림 1에 나타나 있는 것처럼 양자점 피크의 절반높이에서의 넓이(FWHM)는 25 nm에 불과하고 유기형광색소에 비하여 훨씬 좁아 방출 스펙트럼(emission spectrum)이 매우 좁은 영역에서 나타나며 또한 양자점 입자의 크기를 조절하면 방출파장을 연속적으로 조절할 수 있으며 그 표면특성에 기인하여 양자효율이 높아 CdSe 양자점 한 분자의 형광강도는 로다민 분자에 비해 약 20배 정도 높은 것으로 나타나고 있다. 양자점의 가장 탁월한 장점은 광안정성이 표준유기색소에 비하여 100~10,000배 정도 높다는 점이며 생물분자로 접합된 양자점 프루브는 단백질과 크기가 비슷하여 동력학적 저해와 구조적 저해를 야기하지 않는다는 점이다. 양자점의 주요한 두 가지 특성 -넓은 여기파장 대역과 좁은 방출 스펙트럼- 은 다중 생물분석에서 특히 유용하여 하나의 여기파장을 사용하여

여러 방출파장의 양자점을 동시에 여기 할 수 있으며 이와 함께 여러 종류의 양자점에서 발생하는 신호는 서로 중첩되지 않는 장점을 지닌다.

1.2. 응용 및 한계

생물적합성 양자점과 같은 기능화 양자점의 개발결과 새로운 진단수단 및 방법의 개발이 촉진되고 있다. 즉 양자점은 몇 주 혹은 몇 달 간 생체세포 및 생물체내에서 형광을 나타내며 잔류할 수 있다. 또한 직접적이며 빠르고 높은 감도의 계측을 위하여 양자점을 아비딘(avidin), Protein A, Protein G 및 2차 항체(secondary antibody)와 같은 링커(linker)에 공유결합 및 정전기적 작용에 따른 자기조립(self-assembly)에 의하여 접합할 수 있으며, 이와 같이 제조한 양

자점 접합체는 최근 생물학적 이미징(biological imaging), 면역분석, 바이러스 검출, 온라인 모니터링, 에너지 전달 등에 활용되고 있다. 한 예를 들면 비 침투성의 실시간대 생체 내 이미징을 위한 CdTeMnHg-BSA 양자점을 근적외 나노결정(nanocrystal)으로 제조하여 혈관조영 대조제로서 마우스에 피하 혹은 정맥주사하고 한 시간 정도 연속으로 여기하면 광분해 현상이 현저하지 않은 상태에서 박동하는 심장의 영상을 측정할 수 있다.

이처럼 양자점의 응용가능성은 무한하나 극복해야 할 과제도 있다. 즉 양자점에서 발생하는 형광은 간헐적으로 명멸하고 양자점-단백질 접합체의 제조과정에서 응집현상이 발생할 수 있는 점, 염색실험에서의 광도 감소, 극단적 생물분석 환경에서의 불안정성 및 독성 문제는 양자점의 실제응용 시 문제점을 야기할 수 있다. 또한 약알카리성의 교질상태 양자점은 산성 및 산화조건과 냉동조건에서 변성될 수 있고 양자점의 제조과정에서 발생하는 중금속과 유해한 유기화합물도 문제를 야기할 수 있으며 그 크기에 의하여 생물학적 기능에 영향을 미칠 수 있다.

초고감도 고속분석을 위한 양자점 표지 형광 미세비드는 앞서 언급한 양자점의 한계를 극복하고 그 응용범위를 높이는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 이 때 그 지향점은 표면에 생물분자의 접합기능이 있고 내면에 검출대상을 신속동정하는데 필요한 정보를 포함하는 지능형 미세비드(smart microbead)의 개발이며 그 산

물로서의 양자점 표지 형광미세비드의 탁월한 특성은 비드 매트릭스에 끼워진 양자점의 광안정성, 핵산 등 생물분자의 접합을 용이하게 하는 표면기의 증대, 표면적 증가에 따라 생물학적 연구의 플랫폼으로서 적합한 결합력의 증대와 균질용액에서의 빠른 반응속도에 기인한 것이다. 여러 색상의 양자점을 적절한 비율로 조정하여 혼합하면 양자점 부호화비드(QD-encoded bead)가 형성되며 이 때 각각의 비드는 분광학적 사인(spectroscopic signature) 혹은 바코드(bar code)로서 각인되어 진다.

2. 양자점 표지 형광미세비드의 제조

최근 양자점 표지 형광미세비드를 제조하는 여러 가지 방법이 개발되었다. 이 때 고려해야 할 점은 미세비드가 양자점과 같은 스펙트럼 특성을 가지는지 여부와 양자점이 비드에서 누출 없이 발광하며 생물학적 적용에 적합할 것인가 하는 점이다. 현재 균일한 크기의 양자점 표지 형광 미세비드를 제조하는 방법으로 비드 나노공극 안으로의 양자점 임베딩, 적층조립(layer by layer fabrication), 양자점 부가에 의한 미세비드 중합 및 실리카 화합물에 의한 양자점 코팅이 보고되고 있어(그림 2), 이하 이들에 대하여 간략하게 기술하고자 한다.

2.1. 비드 나노공극 안으로의 양자점 임베딩

임베딩 기법은 크게 두 가지로 나뉜다. 즉 중

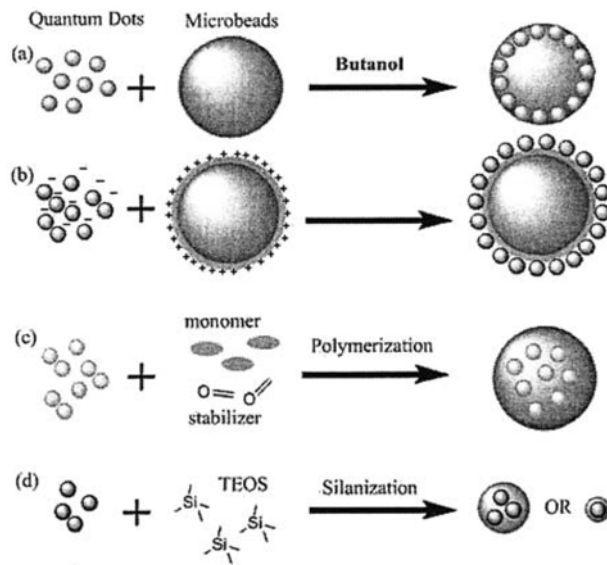


그림 2. 양자점 표지 형광미세비드의 제조과정
(a) 팽윤 후 미세비드 나노공극 안으로의 양자점 임베딩, (b) 적층조립에 의한 음전하 양자점의 정전기적 결합, (c) 양자점 부가에 의한 미세비드 중합, (d) 실란 화합물을 이용한 양자점-미세비드 제조

합체 입자를 적절한 용매에서 팽윤 후 양자점을 포함시키는 방법과 양자점을 2~50 nm 범위의 공극을 지닌 미세비드에 침투시키는 방법이다. 이들은 모두 양자점과 입자 내 탄화수소 잔기와의 강한 소수성결합(hydrophobic interaction)을 이용하므로 소수성 양자점(예, trioctylphosphine oxide, TOPO) 코팅 양자점이 주로 사용되며 이 입자는 중합체 비드에 고유한 소수특성에 잘 어울린다. 전자의 경우 입자를 용해제/불용해제 혼합물(예, 클로로포름, 부탄올)에 가하여 팽윤시키며 이 때 팽윤도는 가교화 단량체의 양에 따라 결정된다. 미세비드가 팽윤하고 양자점이 용액으로부터 침투한 후 용매를 제거하면 미세비드가 양자점을 입자표면의 아래지

역에 포함하게 된다. 후자의 경우는 양자점이 미세비드의 공극을 통하여 침투한 후 내부구조에 소수성결합에 의하여 포획된다. 이 때 분배 시간은 보통 수 분 내로 종료되며 침투과정에 사용되는 미세비드는 상기의 팽윤공정에 사용되는 것보다 나노공극이 광범위하게 형성되어 있어야 이 공극들을 통하여 양자점이 신속하게 흡수된 후 공극 벽과의 강한 소수성결합에 의하여 고정화되며 전자의 경우보다 미세비드의 내부로 보다 깊숙이 침투하게 된다.

2.2. 적층조립

정전기적 적층조립 기법은 미세비드를 코팅

하는데 사용되는 중요하고 다용도의 기술로서 미세비드, 필름 및 전극의 전하를 띤 표면에서 반대전하의 고분자전해질이 정전기적 결합에 의하여 흡착되는 현상을 이용하며 이를 반복하여 수행하면 다층조립물의 형성이 가능하다. 이 방법의 장점은 나노미터 두께로 형성할 층의 수와 흡착되는 화합물의 양을 조절할 수 있다는 점과 다층구조를 만드는 데 특별한 기구가 필요 없는 점을 들 수 있다. 적층조립 과정은 기질의 크기와 형태에는 무관하기 때문에 다양한 교질입자에 적용될 수 있어 유기라텍스입자, 무기입자, 색소와 약제 결정, 단백질 응집체 및 생물세포를 고분자전해질의 다층침전에 의하여 코팅할 수 있다.

2.3. 양자점 부가에 의한 미세비드 중합

양자점을 미세비드의 표면영역에 결합시키는 위의 방법들에 비하여 미세비드의 전 부분에 걸쳐 양자점을 분포시키기 위한 중합공정이 개발되고 있다. 이 때 고려해야 할 중요한 요소는 중합공정 중 단량체 에멀전에 양자점을 안정하게 잘 분산할 수 있는가 하는 점인데, 이를 위하여 중합화 리간드로 양자점을 미리 코팅하는 방법이 에멀전 및 현탁액 중합반응에 사용되고 있다. 수 시간 정도의 전 중합(*pre-polymerization*) 과정을 거치면 양자점은 에탄올에 잘 용해되며 이를 가열하면 양자점과 함께 있는 단량체의 중합반응이 시작되어 양자점은 단량체와 함께 공중합(*copolymerization*) 되며 몇

몇 소중합체에 의하여 기능화되어 미세입자에 골고루 분포하게 된다. 이 때, 보다 균일하고 재현성 있는 양자점 표지 미세비드를 제조하기 위하여 소수성 양자점을 에멀전 중합방법으로 폴리스티렌 입자에 포함시키는데, 한 예를 들면 양자점/톨루엔 용액을 *cetyltrimethylammonium bromide* 용액에 가하여 에멀전을 얻은 후 스티렌, *divinylbenzene*, *methacrylic acid*, *azobisisobutyronitrile*의 단량체 혼합물을 아르곤 하에서 가한다. 70°C에서 20시간 중합반응 후 폴리스티렌 입자가 침전하면 양자점을 둘러싸고 있는 폴리스티렌 입자를 실리카 코팅할 수 있고 생물분자의 접합에 유효한 새로운 표면을 확보할 수 있으며 입자의 크기는 300 nm에서 20 μm 범위에서 조절할 수 있다. 양자점 부가에 의한 미세비드 중합법은 양자점을 미세비드의 전 영역에 걸쳐서 부가할 수 있으므로 부가된 양자점의 부피를 크게 할 수 있으나 중합과정 중에 양자점이 응집하는 현상을 방지하기 어려운 문제점이 있다.

2.4. 실리카 화합물에 의한 양자점 코팅

실란화 방법 중 하나인 Stöber법에 의하여 양자점을 코어(*core*)로 하여 실리카 셸을 형성시킬 수 있으며 안정제, 계면활성제, 실란 결합제 (*silane coupling agent*)를 사용하여 미세비드를 직접 코팅한다. 또한 양자점 표지 미세비드로부터 양자점의 누출을 막기 위하여 투명 실리카 셸이 사용되기도 한다. 다른 실란화 방법으로는

역 미세에멀전법(reverse micro-emulsion method)이 있는데, 여기에서는 친수성의 머리 부분이 나노수준 크기의 물 코어를 둘러싸고 소수성의 꼬리 부분은 미세에멀전 시스템에 있는 유기상(organic phase)에 노출된다. 나노수준 크기의 미셀(micelle) 코어는 양자점을 포획하여 산화실리콘(SiO₂) 복합비드를 형성하게 된다.

Stöber법은 구연산나트륨에 의하여 안정화된 수용성 양자점을 코팅하여 코어-셸 형태의 미세비드를 제조하는데 효율적이다. 실리카 비드에 양자점을 포함시키는 동시에 관능기를 도입하는 대표적 공정을 소개하면, 알칼리성 용액에서 양자점 표면분자들이 mercaptopropyltris(methoxy)-silane(MPS)로 치환되면 methoxysilane 기(Si-OCH₃)가 실라놀기(Si-OH)로 가수분해하여 일차중합층을 형성하게 된다. 이후 열처리에 의하여 실록산 결합이 형성되고 새로운 실란 전구체가 셸로 부가되어 표면 기능성을 부여하게 된다. 이렇게 하여 제조한 실란화 비드는 원래의 양자점 코어와 동등한 광학적 특성을 보유하는 동시에 양자점의 광화학적 산화를 억제하며 약 25~50%의 양자 수율(quantum yield)과 수 개월간 안정한 특성을 지니고 있으며 최적화 조건에서 약 30~120 nm의 실리카 구체를 형성한다.

역 미세에멀전법에 의하여 제조되는 실리카 코팅 양자점은 시클로헥산, 트리톤 X-100, *n*-헥산올, CdTe 및 암모니아를 포함하며 오일 내에 존재하는, 양자점이 농축되어 있는 소량의 물을 안정화시키는 미세에멀전계에서 제조된다. 실리카 비드의 형성은 tetraethylorthosilicate(TEOS)

의 가수분해 후 이루어지며 이 때 양자점과 실리카 중간체 사이에 발생하는 정전기적 작용이 최종구조를 결정하는데 결정적인 역할을 하고 하나의 실리카 비드에 여러 개의 양자점이 들어간 경우 광도가 보다 높게 나타난다.

이용분야

양자점 표지 미세비드를 통하여 얻어질 수 있는 괄목할만한 기술적 발전은 다중코딩기술(multiplexed coding technology)을 가능하게 한다는 점이다. 즉 다른 색상의 양자점을 양을 조절하여 가함에 의하여 광학적 바코드로서 활용할 수 있는 형광미세비드를 제조할 수 있다(그림 3). 일반적으로 *n*개의 강도수준과 *m*개의 색상이 결합되면 [*n^m*-1]의 이론적 코드를 얻을 수 있다고 한다. 분자인지와 광학적 코딩을 통합하면 각각의 비드는 복합혼합물 내에 있는 화합물이나 그 서열을 검출하고 분석할 수 있는 하나의 “화학실험실”로서의 역할을 할 수 있고 유전자 발현연구, 고속 스크리닝, 의료진단 및 식품분야에서의 영양유전체학 연구 등에 활용가능성이 높을 것으로 기대된다.

1. DNA 교잡분석(DNA hybridization assay)

광도 및 광안정성이 높은 양자점 표지 미세비드는 형광 이미징, 분광학, 마이크로어레이, flow cytometry 기반 DNA 교잡실험에 사용될

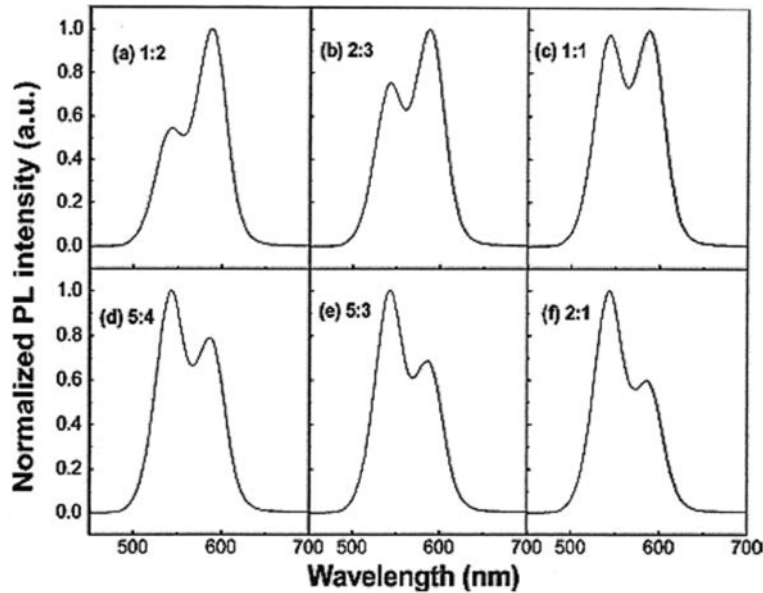


그림 3. 두 가지 색상의 양자점 표지 미세비드(540 및 585 nm의 분리 피크)와 코드 1:2, 2:3, 1:1, 5:4, 5:3과 2:1

수 있다. 이 때 형광비드는 DNA 프루브와 결합할 수 있는 활성화 표면을 지녀야 한다. 세 개의 코드를 지닌 미세비드를 이용한 DNA 교잡실험의 예를 들면 비오틴결합 올리고 프루브를 양자점 표지 미세비드에 스트렙타아비딘(streptavidin)을 경유하여 결합시킨다. 이후 아비딘-Cascade Blue로 표지된 비오틴결합 타깃 올리고를 비드 위에 있는 올리고 프루브와 40°C에서 30분간 교잡시키는데 양자점 표지 미세비드를 이용한 DNA 교잡분석의 특이성과 감도는 매우 높은 것으로 알려지고 있다.

2. 면역분석

양자점 표지 미세비드는 분자생물학 및 진단

분야에서의 면역분석에 널리 사용될 수 있다. 예를 들면 300 nm 크기의 양자점 표지 미세입자를 마우스 유래의 면역글로불린에 접합하여 *p*-glycoprotein의 면역형광 측정에 활용한 보고가 있으며 3차원 공초점 형광이미징에 의한 면역표지 분야 연구에 양자점 표지 미세입자를 활용하고 있다. 양자점 표지 미세입자를 활용한 면역분석의 검출한계(detection limit)는 단 항원 분자 수준으로 낮아질 수 있다고 하며 세포내에서의 항체의 3차원 분포를 분석하는데도 활용할 수 있다고 한다. 또한 양자점 표지 미세비드를 다중광학 부호화(multiplexed optical encoding) 및 미세유체공학(microfluidics) 기반 면역분석에 활용한 연구도 보고되고 있다.

3. 생체 내 이미징

기존의 미세입자를 대신하여 양자점 표지 미세입자를 조직 및 혈관의 영상분석에 활용하면 생체 내 다중 이미징(*in vivo multiplexed imaging*)을 고감도로 행할 수 있고 실험과정 중 양자점의 응집화현상과 생리완충용액 및 체내에서의 형광감소현상도 방지할 수 있다. 즉 양자점 부호화 미세비드를 이용한 다색상 이미징 연구에서 마우스에 각각 녹색, 노란색 및 적색의 양자점으로 도핑된 500 nm 크기의 중합체 미세비드를 서로 인접한 곳에 주사하였을 때 하나의 광원으로 세 가지 색상의 양자점을 동시에 관찰할 수 있었는데 이 사실은 암 진단 등에서 다중 바이오마커의 영상을 동시에 확보할 수 있는 가능성을 제시한다.

4. 세포기반 센싱

부탄올 내에서 산화철(Fe_3O_4) 나노결정과 양자점을 실리카 미세비드에 포함시켜 광학적 부호화 및 자기분리의 두 가지 기능을 지닌 실리카 미세비드를 제조할 수 있으며 이와 같은 미세비드는 산화철 나노결정의 상자성특성에 기인하여 신속하게 자기분리에 의한 타겟 포획 및 강화를 하는데 활용할 수 있다. 또한 다기능성의 양자점 표지 미세비드의 개발을 통하여 바이오센싱 및 분석을 위한 새로운 플랫폼의 확보가 가능할 것으로 기대된다. 예를 들면 실

리카 비드를 나노입자와 다색상 CdTe 양자점으로 코팅한 후 이를 보호하는 외부 실리카 셀을 입히고 가교화 poly-(*N*-isopropylacrylamide) (PNI-PAM)으로 표면변형하여 생체 내 효소분해로부터 보호한다. 이후 Chinese hamster 난소 세포와 PNI-PAM으로 감싼 미세비드(≥ 100 nm)를 배양하여 내포작용(endocytosis)을 거쳐 미세비드로 충전된 세포를 얻게 된다. 이 때 세포 내 양자점 표지 미세입자는 세포내에서도 스펙트럼 신호가 강하고 광안정성이 높으며 세포질의 액상성분인 시토졸(cytosol)에 주로 분포하게 된다. 이러한 다기능 미세입자는 형광추적분석이나 타겟세포로의 시토졸내 약물전달 등의 연구에 활용될 수 있다.

5. 전기화학적 동정

다금속 양자점 표지 부호화 비드는 전기화학적 특성을 지니고 있으므로, ZnS, PbS, CdS, InAs 및 GaAs 양자점을 싸서 캡슐화하고 있는 폴리스티렌 비드는 전기적 사인을 생성하며 이때 양자점의 수가 증가하면 전기화학적 동정을 위한 전기적 코드 수도 증가한다. 비드내에서의 양자점의 응집화가 광학적 특성에 영향을 미치는 반면 전기적 동정에는 영향을 미치지 못하므로 양자점 표지 미세비드의 전기화학적 신뢰성을 응용하여 손쉽게 사용할 수 있는 stripping analyzer의 개발이 가능할 것으로 여겨진다.

6. 광학이온센서

양자점 부호화 중합체 미세입자를 사용하면 형광이온센서의 구축이 가능하다. 이를 위하여 먼저 양자점 부호화 이온센싱 미세입자를 나트륨 이온투과담체 X(sodium ionophore X), chromoionophore II, 친유성의 tetraphenylborate 양이온 교환수지와 형광표지로서 TOPO-캐핑 코어-셸 CdSe/CdS 양자점(610 nm의 방출 피크) 및 CdTe/CdS 양자점(700 nm의 방출 피크)을 동시에 처리하여 제조한다. 이 때 양자점 전체 양전하에 의하여 센서 표면에서 음이온 교환효과가 발생하는 것이 관찰되었다. 한편 초산마그네슘 완충용액(pH 4.8)에서 양자점 부호화 나트륨 선택성 미세입자의 나트륨 반응성이 관찰되는데 이 센서에 대한 관찰결과로부터 나트륨 반응성의 양자점 표지 미세입자의 저해제(interferant)에 대한 선택성이 매우 높음이 확인되었다. 향후 각각의 분석대상물질에 대한 선택성이 높게 다중 센싱을 위한, 다양한 양자점 표지 미세입자를 이용한 미세비드 기반 분석시스템의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

7. 바이오칩기반 다중코딩분석

다중 양자점 부호화 미세비드 시스템의 실제 응용 예에 관한 연구가 아래와 같이 보고되고 있다. 즉 네 가지 색상의 양자점(방출 피크: 525, 545, 565, 585 nm)을 8 μm 직경의 미세비드로 부호화한 후 열두 개의 강도수준과 네 개

의 색상을 지닌 미세비드를 만들어 유전자발현 프로파일링에 사용하였다. 이 때 타깃 유전자에 대한 비오틴화 cRNA와 결합하는 스트렙트아비딘 결합 양자점을 정량 리포터로 사용하는데, 검출감도는 타깃 유전자의 증폭을 행하지 않을 때 10^6 타깃 분자이고 1회의 증폭을 하는 경우는 10^4 타깃 분자 이하로서 이 값은 고밀도 마이크로어레이 시스템의 10^5 수준과 정량적 중합효소연쇄반응의 감도수준보다 양호하다고 한다. 또한 다중 부호화 미세비드 시스템은 유전자발현변이를 고속으로 정확하게 분석할 수 있으며 기존의 바이오칩에 비하여 유연성, 속도 및 가격 측면에서 장점이 있는 것으로 보고되고 있다.

8. 향후의 미세비드기술 개량방향

앞으로 양자점 표지 미세비드가 보다 널리 사용되기 위해서는 몇몇 관점에서의 기술개량이 필요한 것으로 여겨진다. 그것은 비드로부터의 양자점의 누출방지, 균일한 입자크기와 형광강도의 확보 등이 있다. 또한 미세비드가 다중 부호화 응용을 위하여 여러 색상의 양자점을 포함할 경우에는 양자점 사이의 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer)와 스펙트럼의 부분적 중첩문제도 해결해야할 과제이다. 아울러 현재 다색상 양자점 표지 미세비드의 신호를 해독할 수 있는 실험기기가 거의 없는 실정이므로 관련 하드웨어의 개발도 긴요한 것으로 여겨진다.

자료출처
Qiang Ma, Chao Wang, Xingguang Su,
Synthesis and application of quantum dot-
tagged fluorescent microbeads, Journal of

Nanoscience and Nanotechnology, **8**, 1138-
1149, 2008

김남수 농학박사

- 소속 한국식품연구원 바이오나노연구단
- 전문분야 식품바이오센서 및 식품효소공학
- E-mail nskim@kfri.re.kr
- TEL 031-780-9131