

Human Serum Amyloid A-1 단백질 농도 분석을 위한 CdSe/ZnS 양자점 기반의 Lateral Flow Immunoassay 방법 개발

아이딜파지리 · 고은서 · 이상혁 · 이혜진[†]

경북대학교 자연과학대학 화학과
(2019년 6월 2일 접수, 2019년 6월 13일 심사, 2019년 6월 22일 채택)

Analysis of Human Serum Amyloid A-1 Concentrations Using a Lateral Flow Immunoassay with CdSe/ZnS Quantum Dots

Aidil Fajri, Eunseo Goh, Sanghyuk Lee, and Hye Jin Lee[†]

Department of Chemistry, Kyungpook National University, 80 Daehakro, Buk-gu, Daegu-city 41566, Republic of Korea
(Received June 2, 2019; Revised June 13, 2019; Accepted June 22, 2019)

초 록

본 논문에서는 수용성의 CdSe/ZnS 양자점을 합성하고 이에 항체기능성을 도입하여 lateral flow immunoassay (LFIA) 플랫폼에 융합하여 폐암 질병진단에 활용 가능한 단백질 바이오마커[예: 인간 혈청 아밀로이드 A-1 (hSAA1)]의 농도 분석에 적용하고자 한다. 면역분석법 센서 스트립은 니트로셀룰로오즈 막에 테스트라인과 대조라인으로 각각 항hSAA1 단일클론항체(10G1)(anti-hSAA1)와 항chicken IgY (anti-chicken IgY)를 스프레이하여 제작하였다. 이와 함께, 유기상에서 합성된 CdSe/ZnS 양자점은 카르복실기로 변형된 알케인티올기를 이용한 리간드 교환방법으로 수용성으로 전환하였으며, 이에 타겟 단백질인 hSAA1에 특이적으로 결합 가능한 항체인 항hSAA1 단일클론항체(14F8)로 컨쥬게이션하여 형광검출용 입자[QDs-anti hSAA1 (14F8)]로 사용하였다. 제작된 LFIA 스트립 위에 순차적으로 다른 농도의 hSAA1과 QDs-anti hSAA1 (14F8)의 복합체를 흘려주면, 테스트라인에 anti hSAA1 (10G1)/hSAA1/QDs-anti hSAA1 (14F8) 샌드위치 복합체가 형성되어 양자점에 의한 발광신호가 검출됨을 측정하였다. 최적화된 측방흐름이 가능한 완충용액 조건에서 100 nM 농도의 hSAA1 단백질의 유무를 5 min 안에 눈으로 확인 가능하였다.

Abstract

A lateral flow immunoassay platform utilizing antibody functionalized water soluble CdSe/ZnS semiconductor quantum dots (QDs) was developed for the analysis of human serum amyloid A-1 (hSAA1) in a buffer solution. hSAA1 was chosen as a target protein because it is regarded as a potential biomarker associated with early diagnosis and prognosis in patients of lung cancer. The immunoassay strip on a nitrocellulose membrane was fabricated by spraying two lines composed of a test line with a monoclonal antibody against hSAA1 (10G1) (anti hSAA1) and a control line of anti-chicken IgY. While the CdSe/ZnS QDs synthesized in an organic phase were transferred to a water phase by ligand exchange using carboxylic acid modified alkane thiol. The QDs was then conjugated to monoclonal antibody against hSAA1 (14F8) [anti hSAA1 (14F8)] and used as a fluorescent detection probe. The sequential lateral flow of hSAA1 in different concentration and QDs-anti hSAA1 (14F8) complex allowed to form the surface sandwich complex of anti hSAA1 (10G1)/hSAA1/QD-anti hSAA1 (14F8), which was then analyzed using fluorescence microscope. A 100 nM concentration of hSAA1 protein can be detected by naked eyes under an optimized lateral flow buffer condition with a sensing time of 5 mins.

Keywords: Lateral flow immunoassay, Human serum amyloid A-1, CdSe/ZnS semiconductor quantum dots, Lung cancer biomarker

1. 서 론

전 세계적으로 가장 생존율이 낮은 암 관련 질환으로 폐암을 들 수 있으며[1,2], 조기 진단을 통해 그 사망률을 상당히 낮출 수 있다. 최근 폐암 조기 진단을 위해 이들 질병과 관련이 있는 다양한 단백질 바이오마커 생분자를 연구하는 노력이 왕성하게 이루어지고 있다[3,4]. 그중 흡연중독자들의 플라즈마 시료로부터 단백질 분석을 통해 혈청

[†] Corresponding Author: Kyungpook National University, Department of Chemistry, 80 Daehakro, Buk-gu, Daegu-city 41566, Republic of Korea
Tel: +82-53-950-5336 e-mail: hyejinlee@knu.ac.kr

아밀로이드 A (serum amyloid A, SAA) 단백질이 폐암 바이오마커로 활용 가능하다는 논문이 보고되었다[5]. 또한 플라즈마 SAA 단백질 농도는 방사선 폐렴(radiation pneumonitis)과도 연관되어 있으며, 흉부 방사선 항암치료를 받은 비소세포성 폐암 환자의 생존율과 깊은 관련이 있는 것으로 보고되었다[6]. SAA 단백질 농도를 분석하기 위해 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 질량분석법(MALDI-TOF MS)[7], 표면 강화 레이저 탈착/이온화 질량분석법(SELDI-TOF-MS)[8,9], 효소면역 분석법(ELISA)[10,11] 등을 포함한 다양한 분석방법이 개발되었다.

ELISA 방법과 유사하게 lateral flow immunoassay (LFIA) 역시 특정 타겟 생분자에 특이적으로 결합 가능한 두 개의 항체를 이용하여 샌드위치 복합체를 센서 기관에 형성하여 시료 안에 생분자의 유무 또는 농도를 분석하는데 활용되어 왔으며, 폐암을 포함한 다양한 질환의 조기진단용 키트로 그 응용범위를 확장하고 있다. 특히 LFIA는 값싸게 제작 가능하고, 신속하게 실시간으로 질환관련 바이오마커의 존재 유무를 확인할 수 있다는 장점을 가지고 있어서[12,13], 다양한 질병과 관련 있는 생분자 바이오마커인 circular anodic 항원(CAA)[14], 푸에라린(puerarin, PUE)[15], 알파 태아단백질(alpha-fetoprotein, AFP)[16], HIV-DNA[17]과 아플라톡신 B1 (aflatoxin B1, AFB1) 및 푸모니신 B형(type-B fumonisins, FMs)[18] 등의 검출에 활용되어왔다. 하지만 아직까지 폐암 질환의 조기진단에 적용 가능한 hSAA1 (human serum amyloid A-1) 바이오마커 분석은 현재까지 보고되지 않았다.

LFIA의 단점 중에 하나로 논의되는 민감도는 ELISA[19]를 포함한 바이오센서 분석법[20]과 비교해 볼 때 다소 낮은 편이며, 따라서 이를 개선하기 위해 우수한 광학 및 전기적 성질을 갖는 검출용의 다양한 나노 소재의 융합이 다수 보고되어왔다. 그 예로 리포좀[21], 탄소[22], 자성[23] 및 금[24] 나노입자뿐 아니라 분자성형광물질[25], 반도체 양자점[26] 등을 들 수 있다. 이 중에서 양자점은, 안정한 형광세기, 효율, 입자크기와 소재에 따른 들뜸 및 방출과정의 조절 등의 장점을 가지고 있어 바이오센서에 활용도가 높은 편이다[27]. 그 예로는 대표적으로 높은 형광 양자수율과 화학적 안정성을 가지고 있는 CdSe/ZnS 코어셸 양자점을 들 수 있다[28].

본 논문에서는 폐암 질환의 조기 진단에 활용이 가능한 hSAA1 바이오마커의 농도를 측정하기 위해 CdSe/ZnS 코어셸을 융합한 새로운 LFIA 바이오센싱 플랫폼 개발에 대해 보고하고자 한다. 니트로셀룰로오즈 막에 테스트라인과 대조라인으로 각각 항hSAA1 단일클론항체(10G1)와 항chicken IgY 항체(anti-chicken IgY)를 스프레이하여 제작한 LFIA 스트립 센서에 hSAA1에 특이적인 항체인 항hSAA1 단일클론항체(14F8)로 컨쥬게이션한 형광검출용 CdSe/ZnS 양자점을 융합하였다. QDs-anti hSAA1 (14F8)와 서로 다른 농도의 hSAA1 단백질 용액(0.1~1 μM)을 스트립상에 순차적으로 흘려줄 때, 테스트 라인에 anti hSAA1 (10G1)/hSAA1/QDs-anti hSAA1 (14F8) 샌드위치 복합체가 형성되어 양자점에 의한 발광신호가 나타나는 것을 눈으로 식별할 수 있었다.

2. 실험

2.1. 재료 및 시약

아래 리스트한 시약은 특별한 처리 없이 구입한 시약 그 자체를 사용하였다. Sulfur powder (S, Sigma-Aldrich), zinc acetate (Zn(OAc)₂, Sigma-Aldrich), cadmium oxide (CdO, Sigma-Aldrich), selenium powder (Se, Sigma-Aldrich), oleic acid (OA, Sigma-Aldrich), oleylamine (OLA, Sigma-Aldrich), 1-octa-decene (ODE, Sigma-Aldrich), 3-mer-

captropionic acid (MPA, Sigma-Aldrich), ethanol anhydrous (Sigma-Aldrich), glycine (Sigma-Aldrich) and sodium hydroxide (NaOH, Sigma-Aldrich), 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (PIPES, Sigma-Aldrich) buffer, 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), bovine serum albumin (BSA, Calbiochem), toluene (Sigma-Aldrich), butanol (Sigma-Aldrich), acetone (Sigma-Aldrich), 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino) propyl) carbodiimide (EDC, Thermo Fisher Scientific) and N-Hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS, Thermo Fisher Scientific), 10 mM phosphate buffered saline (PBS pH 7.4, Gibco). anti hSAA1 monoclonal antibody (10G1) (PROTANBIO), anti hSAA1 monoclonal antibody (14F8) (PROTANBIO), human serum amyloid A1 (hSAA1), and anti-chicken IgY (PROTANBIO).

2.2. 수용성 CdSe/ZnS 코어셸 양자점 합성 및 항체 기능성 도입

수용성 CdSe/ZnS 양자점은 (i) CdSe 코어 합성, (ii) CdSe/ZnS 코어셸 합성, (iii) 리간드 교환방법에 의해 수용성 CdSe/ZnS 코어셸 제작을 포함한 3단계 과정으로 합성하였다. CdSe 코어는 Beloglazova 등[29]이 보고한 방법으로 합성하였으며, Se 파우더를 ODE 용매에 넣어 5 mL의 0.1 M Se 용액을 만든 뒤 이를 195 °C에서 용액이 투명해질 때까지 약 15 min간 격렬하게 저어주어 Se 전구체를 제조하였다. Cd 전구체는 다음과 같이 제조하였다. CdO와 OA를 1 : 8의 몰 비율로 ODE 용매에 섞어(0.1 M의 Cd 용액이 되도록) 삼각 플라스크에 넣은 후 220 °C에서 투명해질 때까지 약 10 min간 교반한다. 용액이 투명해지면 온도를 260 °C로 올린 후 여기에 앞서 만들어 놓은 Se 전구체 5 mL를 빠르게 넣어 반응시킨다. Se 전구체를 넣으면 용액의 온도는 내려가게 되며 이 때 온도가 230 °C에 다다르면 온도를 일정 시간 유지시켜 CdSe 양자점을 성장시킨다. 본 논문에서는 1 min 10 s 동안 유지시켜 최대 들뜸 파장이 약 530 nm에서 나타나는 CdSe 양자점을 합성하였다. 그 다음 순수한 CdSe만을 얻기 위하여 다음과 같이 분리정제한다. 부탄올과 에탄올의 1 : 1 혼합용액을 합성한 CdSe 양자점 용액에 첨가한 후 에탄올을 한 방울씩 점차 첨가하여 유탁한 용액을 얻는다. 상기 용액을 3,000 g에서 5 min간 원심 분리한 후 침전물을 톨루엔에 녹이고 다시 에탄올로 침전시키는 과정을 반복하여 CdSe 양자점을 분리하였다.

CdSe/ZnS QDs 콜로이드 용액은 Danek 등[30]과 Hines 등[31]이 보고한 방법을 이용하여 합성하였다. CdSe 양자점 합성과 유사하게 각 합성과정마다 필요시 격렬하게 저어주었다. S 전구체 용액은 160 °C에서 황을 ODE 용액에 녹여서 만들었으며, 쉘 성장을 시킬 때마다 새로 제작하여 사용하였다. 반면에 Zn 전구체 용액은 ODE 용매에 Zn(Ac)₂ 녹이고 약 10 min 동안 저어준 후 OLA 용매를 첨가하여 제작하였다. 상기 혼합물을 120 °C에서 10 min 동안 반응시키고, 50 °C로 온도를 낮춘 후 S 전구체를 추가로 넣었다. Zn과 S 전구체의 혼합 용액을 CdSe 양자점 용액에 섞은 후 온도를 점차적으로 올려서 170 °C로 유지한 상태에서 용액을 약 15 min 정도 보관한다. CdSe/ZnS 양자점은 아세톤을 이용하여 침전시킨 후 다시 톨루엔에 녹여서 진공상태에서 약 5 min간 보관하였으며, 상기 과정을 두 번 정도 반복하였다. 수용성의 CdSe/ZnS 양자점을 제조하기 위해 톨루엔에 용해되어있는 CdSe/ZnS 양자점에 수용액상의 MPA (pH = ~10)를 넣은 후 격렬하게 저어주었다[32]. MPA와 양자점 몰비는 500 : 1로 사용하였으며, 상분리가 된 상기 용액을 적어도 12 h 이상 저어주면 MPA로 코팅된 양자점은 수용액층에 분배되고, 톨루엔은 무색으로 변하게 된다. 수용액 상에 존재하는 과량의 MPA는 용액이 뿌옇게 변할 때까지 아세톤을 첨가하여 제거하였다. 제작된 양자점은 3,000 rpm에서 약 5 min간 원심

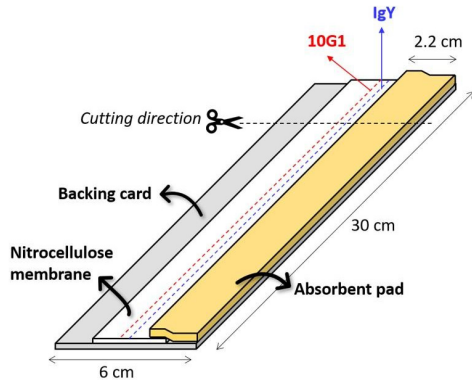


Figure 1. A diagram of a LFIA strip only for the half strip test, before being cut. It is composed of a test (10G1) and a control line (IgY) on a nitrocellulose (NC) membrane (2.5 cm × 30 cm) with a plastic backing card (6 cm × 30 cm) and an absorbent pad (2.2 cm × 30 cm).

분리하였고, 얻어진 침전물(양자점)은 다시 PBS 완충용액에 재 분산 시킨 후 4 °C 에서 보관하였다. 합성한 양자점의 광학적 특성은 UV-vis 분광광도계(Shimadzu 1800 spectrophotometer)와 형광분광광도계(Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer)를 이용하여 측정하였으며, 양자점의 크기 및 성분분석은 전계방사형 투과전자현미경(FEI Titan G2) 과 이에 부착된 에너지분산형 분광분석장비(Bruker Nano GmbH)로 관찰하였다.

LFIA 스트립에서 형광 검출을 위해 hSAA1 단백질에 특이적인 항체[anti hSAA1 (14F8)]의 아민기와 말단이 카르복실기로 처리된 양자점을 잘 알려진 EDC/sulfo-NHS 크로스링커 화합물을 사용하여 컨쥬게이션하였다. 간단히 서술하자면, 50 mM sulfo-NHS와 20 mM EDC 혼합용액을 PIPES 완충용액(pH 7)에 분산된 양자점에 첨가하여 약 10 min 동안 반응시킨 후 2-머캅토에탄올 용액을 넣어 과량으로 존재하는 EDC 반응을 중지시켰다. 상기 용액에 anti hSAA1 (14F8)를 넣고 60 min 정도 반응한 후 원심분리기를 이용해 상층의 용액을 제거함으로써 과량의 시약을 제거하였으며, anti hSAA1 (14F8)로 기능성이 도입된 양자점을 PIPES 버퍼에 재분산 시켰다.

2.3. LFIA 스트립 제작 및 SAA1 단백질 분석 방법

Figure 1과 같이 니트로셀룰로오즈 막 위에 플라스틱 백킹카드(30 cm × 6 cm)와 흡수패드(30 cm × 2.2 cm)를 붙인 후 6 μM of anti hSAA1 (10G1)과 6 μM of IgY 항체를 라인디스펜서(Zeta Corporation)를 사용하여 0.8 μL/cm의 흐름속도로 각각 뿌려주어 테스트와 대조군 라인을 제작한다. 막을 약 30 min간 건조한 후 자동 종이 커팅 장비(Zeta Corporation)를 이용하여 각 3.8 mm 너비의 스트립으로 자른다. Figure 2와 같이 96-웰 플레이트에 각 웰에 먼저 30 μL PBS (pH 7.4)를 넣고, 20 μL의 QD-anti hSAA1 (14F8) 용액을 넣은 후 5 μL of 계면활성제 G를 넣었다. 계면활성제는 스트립에서 생물질의 확산을 도와주기 위해 첨가하였다. 상기 웰에 분석물질인 hSAA1을 서로 다른 용액으로 만들어서 각 10 μL씩 첨가하고 약 5 min 정도 반응시킨 후 스트립을 꺼내서 PBS buffer (pH 7.4) 완충용액으로 씻어준 후 양자점의 형광발색 정도를 눈으로 식별하였다.

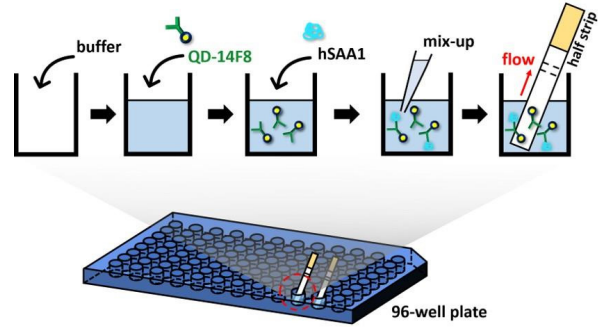


Figure 2. Schematic showing the procedure of half strip test using a 96-well plate for the performance evaluation of our newly fabricated LFIA strip.

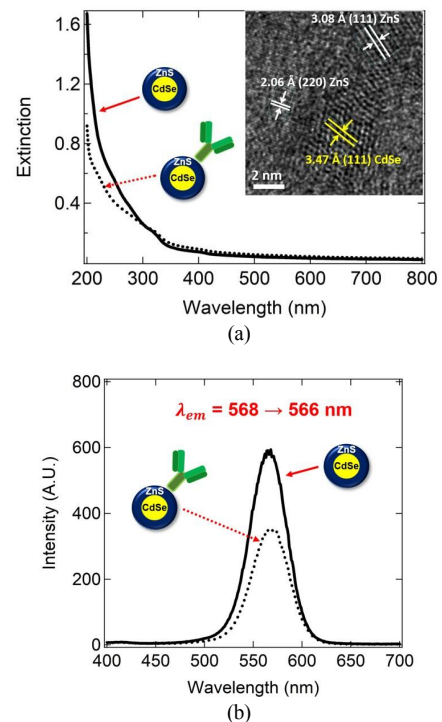


Figure 3. Absorbance (a) and fluorescence emission spectra at 365 nm excitation (b) of CdSe/ZnS cores-shell QDs. Inset in (a) shows HR-TEM image of CdSe/ZnS QDs showing lattice fringe with various interplanar distances which are compatible with the (111) plane of CdSe (JCPDS 77-2307), and (111) and (220) plane of ZnS (JCPDS 05-0566), respectively.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항체기능성 CdSe/ZnS 양자점의 특성 조사

LFIA 스트립을 이용하여 hSAA1 단백질을 분석하기에 앞서서 항체 기능성의 양자점의 광학적 특성을 조사하였다. 항체 기능성을 도입하기 전과 후의 수용성 CdSe/ZnS 코어셸 양자점의 흡광과 형광 특성을 UV-Vis와 PL 분광분석법으로 측정된 결과를 Figure 3에 나타내었다. 본 논문에서 합성한 양자점은 Shin 등[33]의 방법을 사용한 것으로 발광 파장이 450~650 nm가 될 것으로 예상되었다[32,34]. Figure 3(a)를 보면 CdSe/ZnS 코어셸 양자의 UV-Vis 흡광 최대파장이 명확히 보

Table 1. Mass and Atomic Ratio of Elements of Synthesized CdSe/ZnS Core-shell QDs, Obtained from the EDS System Attached to HRTEM

Element	Ratio [norm. wt.%]	Ratio [norm. at.%]	Error in wt.% (3 Sigma)
Zinc	42.0	34.6	4.1
Selenium	13.5	9.2	1.7
Sulfur	29.1	48.9	2.8
Cadmium	15.4	7.3	4.8

축한 피크를 보이기는 어깨 피크(shoulder peak) 모양의 형태를 띠고 있으며 이는 CdSe/ZnS 코어/셸 구조에서 셸이 상대적으로 두꺼울 때 나타나는 현상으로 보고된 바 있다[35]. 이는 본 실험에서 합성한 양자점 샘플을 HRTEM에 부착된 에너지분산형 분광분석법(energy dispersive spectrometry, EDS)을 사용하여 분석하였을 때 얻은 결과와 일치하는 것으로, 전체 성분 중에서 Zn과 S가 각각 34.6, 48.9%의 몰 비율을 차지하여 매우 두꺼운 셸 구조를 가지고 있는 것으로 보인다(Table 1). 그럼에도 불구하고 항체를 컨쥬레이션한 후에는 전반적인 그래프 모양이 장파장으로 이동하는 경향을 보여주고 있으며, 이러한 장파장으로서의 이동은 주로 항체와 같은 큰 생분자를 양자점 및 금속성 나노입자에 컨쥬레이션할 때 주로 볼 수 있는 현상으로, 항체에 존재하는 이중결합, 비 공유전자쌍 존재로 인해 주로 이동한 것으로 사료된다. 특히 본 연구에서 합성한 항체를 도입한 양자점은 들뜸 최대 파장이 UV 영역이어서 경제적이고 간단한 UV 램프를 사용하여 양자점을 들뜨게 할 수 있는 장점을 가지고 있다. Figure 3(b)는 형광 발광 스펙트럼을 측정된 결과로, 항체를 양자점에 컨쥬레이션하기 전과 후에 각각 형광발광 최대 파장이 568와 566 nm로 얻어졌다. 항체를 코팅한 후 단파장으로 약 2 nm 이동한 것을 볼 수 있는데 이는 양자점 표면에 항체가 컨쥬레이션 되면서 표면전하가 감소하고, 양자점 주위의 직접적인 극성이 감소하여 나타난 것으로 사료되며, 항체가 양자점 표면에 존재함을 나타내주는 증거라 할 수 있다[36]. 합성한 양자점의 크기분포도는 형광 발광 스펙트럼의 반치전폭(full width at half maximum, FWHM) 값이 약 42 nm로 비교적 균일한 양자점이 얻어진 것을 알 수 있으며, HR-TEM을 이용하여 크기를 분석한 결과 약 3.5 nm 크기의 양자점이 얻어진 것으로 확인되었다. 또한 상기 양자점의 형광 방출 최대 파장이 568 nm로 노란색을 띄며, 이를 통해 쉽게 눈으로 양자점의 존재 여부를 눈으로 식별할 수 있다.

3.2. LFIA 스트립을 이용한 SAA1 단백질 농도 분석

폐암 바이오마커 단백질인 SAA1의 농도를 분석하기 위해 제작한 LFIA 스트립은 기존의 LFIA 칩[37]과 유사한 형태로 니트로셀룰로오즈 막, 백킹카드, 흡수패드로 구성된 half 스트립을 제작하였다. 흡수패드는 막의 끝에 위치하게 제작하여 모세관 힘으로 인하여 니트로셀룰로오즈 막을 따라 흐르는 용액을 모두 흡수하게 하였고, 타겟 단백질과 특이적으로 결합하는 캡처 항체(테스트 라인, TL)와 대조군 항체(대조라인, CL)로 구성된 두 개의 라인을 각각 니트로셀룰로오즈 막 위에 도포하였다. 니트로셀룰로오즈 막을 사용한 이유는 막의 니트로기능기의 극성과 항체에 존재하는 극성에 의해 강한 정전기적 인력으로 각 항체가 막에 고정될 수 있도록 하기 위해서이다[38]. 먼저 시료 용액 안에는 계면활성제 G를 포함하여 타겟 단백질과 결합가능한 항체가 코팅된 형광발광 양자점과 타겟 단백질이 항원-항체반응으로 결합되어 존재하도록 준비하였다. 그 다음 시료용액을 half 스트립의 니

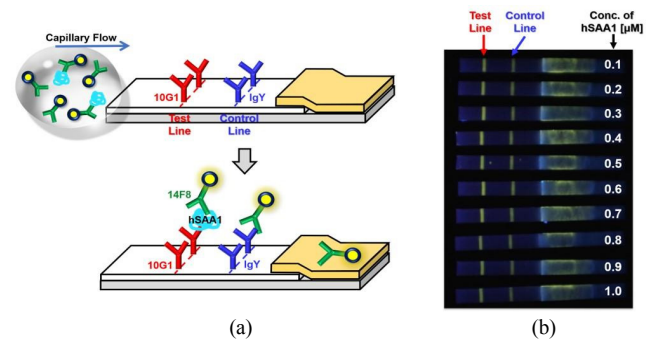


Figure 4. (a) Schematic showing the principal of half strip test. The solution, which contains both hSAA1-14F8-QDs and 14F8-QDs (without hSAA1), migrates toward the absorbent pad by capillary force. (b) The result of the detection of hSAA-1 in several antigen concentration.

트로셀룰로오즈 막에 테스트 라인 및 대조라인에 닿지는 않게 담그면 시료용액은 모세관 현상에 의해 테스트와 대조라인 쪽으로 이동하게 되고 최종적으로 흡수패드로 모이게 된다[39].

Figure 4(a)에서 보듯이 타겟인 hSAA1 단백질과 QD-anti hSAA1 (14F8) 항체 복합체가 스트립의 테스트라인에 있는 anti hSAA1 (10G1) 항체와 특이적으로 결합하게 되면 샌드위치 복합체가 형성되고, 이에 UV 광원을 조사해주면, 양자점들이 집적하여 노란색으로 발광하게 된다. 이와 함께, hSAA1 항원과 결합하지 못한 남은 QD-anti hSAA1 (14F8) 항체 복합체는 니트로셀룰로오즈막을 따라 이동하게 되어 대조라인에 고정되어 있는 anti-chicken IgY 항체에 의해 흡착되고, 최종적으로 남은 복합체는 여분의 흡착패드로 흡수된다. 따라서 타겟이 있는 경우 스트립에 2개의 노란색을 띄는 라인을 쉽게 눈으로 확인할 수 있으며, 타겟이 존재하지 않을 경우 원칙적으로는 대조라인에만 노란색이 관찰되어야 하나, 본 실험에서는 대조라인뿐 아니라 테스트라인에서도 형광라인이 종종 관찰되는 경우가 있었다. 이는 추후 버퍼 조건을 조절하는 등 비특이적인 흡착을 줄일 수 있는 추가적인 실험 조건 확립을 통해서 개선될 수 있을 것으로 보인다. Figure 4(b)는 다양한 농도 범위의 hSAA1 용액을 사용할 경우 각 스트립에서 양자점에 의해 형광이 발현되어 노란색 라인이 나타나는 결과를 나타내었다. hSAA1이 존재할 경우 두 개의 노란색 라인이 확실하게 나타나는 것을 볼 수 있으며, 적어도 타겟의 존재 유무를 신속하게 판단할 수 있는 방법이라 사료된다. 본 실험을 통하여 약 100 nM 농도의 hSAA1을 5 min 안에 눈으로 쉽게 검출할 수 있었으며, 정상인과 폐암환자의 혈액샘플을 분석한 연구결과[40]에 따르면 정상인과 폐암환자를 구분하는 판정기준치(cut-off value)는 약 110 nM이므로(폐암환자의 경우 hSAA1의 농도가 모두 110 nM 농도를 초과함), 이는 폐암 질환의 조기 진단에 충분한 활용 가능성을 보여준다고 할 수 있다. 하지만, 스트립의 농도변화에 따라 정량분석을 하는 것은 어려운 것으로 판단되며, 이는 컨쥬레이션 과정에서 QD-anti hSAA1 (14F8)가 비특이적인 흡착하는 반응에 의해 hSAA1 농도에 따라 형광 색 변화의 현격한 차이가 나는 것을 방해하는 것으로 사료되며 니트로셀룰로오즈 막의 추가적인 표면처리, 이동용 완충용액 조성, 계면활성제의 추가 적용 등의 추가적인 향후 연구를 통해 개선하면 좋을 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 논문에서는 수용성의 CdSe/ZnS 양자점을 합성하였으며, 이에 항체 기능성을 성공적으로 도입하였다. 항체로 컨쥬게이션한 형광 양자점(방출 최대 파장 = 566 nm)은 폐암 질환의 조기 진단에 활용 가능한 바이오마커인 hSAA1을 검출하기 위한 LFIA 스트립에 융합하여 최소 100 nM 그리고 최대 1 μ M 농도의 hSAA1의 존재 유무를 5 min 안에 확인할 수 있는 간단하고, 신속한 분석법으로 개발하였다. 정성적으로 hSAA1 단백질의 유무를 간단한 UV-램프를 사용하여 쉽게 눈으로도 확인할 수 있는 본 연구의 결과는 앞으로 폐암의 조기 진단용 키트로 활용 가능성을 제시하였으며, 추후 감도 증대를 위해 스트립 막의 표면처리, 이동용 완충용액의 조성변화 등의 추가적인 연구가 필요할 것이다.

감 사

This work was supported by the Material Component Technology Development Program (No. 10080588) through the Korea Evaluation Institute of Industrial Technology (KEIT) grant funded by Ministry of Trade, Industry and Energy (MOTIE).

References

1. D. Brown, A. Zingone, Y. Yu, B. Zhu, J. Candia, L. Cao, and B. M. Ryan, Relationship between circulating inflammation proteins and lung cancer diagnosis in the national lung screening trial, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **28**, 110-118 (2019).
2. L. A. Fashoyin-Aje, L. L. Fernandes, R. Sridhara, P. Keegan, and R. Pazdur, Demographic composition of lung cancer trials: FDA analysis, *J. Clin. Oncol.*, **36**, 9088 (2018).
3. S. H. Yang, Biomarkers for lung cancer, *J. Lung Cancer*, **8**, 67-77 (2009).
4. S. K. Arya and S. Bhansali, Lung cancer and its early detection using biomarker-based biosensors, *Chem. Rev.*, **111**, 6783-6809 (2011).
5. M. Cremona, E. Calabrò, G. Randi, M. De Bortoli, P. Mondellini, C. Verri, G. Sozzi, M. A. Pierotti, C. La Vecchia, U. Pastorino, and I. Bongarzone, Elevated levels of the acute-phase serum amyloid are associated with heightened lung cancer risk, *Cancer*, **116**, 1326-1335 (2010).
6. J. Zhao, X. Li, X. Zhao, J. Wang, Q. Xi, and G. Hu, Study on the correlation of serum amyloid A level with overall survival and radiation pneumonitis in non-small cell lung cancer patients receiving thoracic radiotherapy, *Precis. Rad. Oncol.*, **1**, 46-51 (2017).
7. Z. N. Farwig, C. J. McNeal, D. Little, C. E. Baisden, and R. D. Macfarlane, Novel truncated isoforms of constitutive serum amyloid A detected by MALDI mass spectrometry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **332**, 352-356 (2005).
8. W. C. S. Cho, T. T. Yip, W. W. Cheng, and J. S. K. Au, Serum amyloid A is elevated in the serum of lung cancer patients with poor prognosis, *Br. J. Cancer*, **102**, 1731 (2010).
9. J. Tolson, R. Bogumil, E. Brunst, H. Beck, R. Elsner, A. Humeny, H. Kratzin, M. Deeg, M. Kuczyk, G. A. Mueller, C. A. Mueller, and T. Flad, Serum protein profiling by SELDI mass spectrometry: Detection of multiple variants of serum amyloid alpha in renal

10. B. P. C. Hazenberg, P. C. Limburg, J. Bijzet, and M. H. Van Rijswijk, Monoclonal antibody based ELISA for human SAA. In: J. B. Natvig, Ø. Førre, G. Husby, A. Husebekk, B. Skogen, K. Sletten and P. Westermark (eds.), *Amyloid and Amyloidosis 1990: VIIth International Symposium on Amyloidosis August 5-8, 1990, Oslo, Norway*, 898-901, Springer Netherlands, Dordrecht, Netherlands (1991).
11. T.-L. Wu, I. C. Tsai, P.-Y. Chang, K.-C. Tsao, C.-F. Sun, L. L. Wu, and J. T. Wu, Establishment of an in-house ELISA and the reference range for serum amyloid A (SAA): Complementarity between SAA and C-reactive protein as markers of inflammation, *Clin. Chim. Acta*, **376**, 72-76 (2007).
12. E. Fu, T. Liang, J. Houghtaling, S. Ramachandran, S. A. Ramsey, B. Lutz, and P. Yager, Enhanced sensitivity of lateral flow tests using a two-dimensional paper network format, *Anal. Chem.*, **83**, 7941-7946 (2011).
13. F. Oberpenning, S. Hetzel, C. Weining, B. Brandt, G. De Angelis, A. Heinecke, M. Lein, P. Fornara, H.-P. Schmid, L. Hertle, and A. Semjonow, Semi-quantitative immunochromatographic test for prostate specific antigen in whole blood: Tossing the coin to predict prostate cancer?, *Eur. Urol.*, **43**, 478-484 (2003).
14. P. L. A. M. Corstjens, L. van Lieshout, M. Zuiderwijk, D. Komelis, H. J. Tanke, A. M. Deelder, and G. J. van Dam, Up-converting phosphor technology-based lateral flow assay for detection of schistosoma circulating anodic antigen in serum, *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 171-176 (2008).
15. H. Qu, Y. Zhang, B. Qu, H. Kong, G. Qin, S. Liu, J. Cheng, Q. Wang, and Y. Zhao, Rapid lateral-flow immunoassay for the quantum dot-based detection of puerarin, *Biosens. Bioelectron.*, **81**, 358-362 (2016).
16. Q. Yang, X. Gong, T. Song, J. Yang, S. Zhu, Y. Li, Y. Cui, Y. Li, B. Zhang, and J. Chang, Quantum dot-based immunochromatography test strip for rapid, quantitative and sensitive detection of alpha fetoprotein, *Biosens. Bioelectron.*, **30**, 145-150 (2011).
17. X. Deng, C. Wang, Y. Gao, J. Li, W. Wen, X. Zhang, and S. Wang, Applying strand displacement amplification to quantum dots-based fluorescent lateral flow assay strips for HIV-DNA detection, *Biosens. Bioelectron.*, **105**, 211-217 (2018).
18. F. Di Nardo, E. Alladio, C. Baggiani, S. Cavalera, C. Giovannoli, G. Spano, and L. Anfossi, Colour-encoded lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and type-B fumonisins in a single test line, *Talanta*, **192**, 288-294 (2019).
19. J.-J. Wang, B.-H. Liu, Y.-T. Hsu, and F.-Y. Yu, Sensitive competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip for detecting aflatoxin M1 in milk, *Food Control*, **22**, 964-969 (2011).
20. S. Joshi, A. Segarra-Fas, J. Peters, H. Zuilhof, T. A. van Beek, and M. W. F. Nielen, Multiplex surface plasmon resonance biosensing and its transferability towards imaging nanoplasmics for detection of mycotoxins in barley, *Analyst*, **141**, 1307-1318 (2016).
21. J. A. A. Ho and R. D. Wauchope, A strip liposome immunoassay for aflatoxin B1, *Anal. Chem.*, **74**, 1493-1496 (2002).
22. J. Bogdanovic, M. Koets, I. Sander, I. Wouters, T. Meijster, D. Heederik, A. van Amerongen, and G. Doekes, Rapid detection of fungal α -amylase in the work environment with a lateral flow immunoassay, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **118**, 1157-1163 (2006).
23. D. Serrate, J. M. De Teresa, C. Marquina, J. Marzo, D. Saurel, F.

- A. Cardoso, S. Cardoso, P. P. Freitas, and M. R. Ibarra, Quantitative biomolecular sensing station based on magnetoresistive patterned arrays, *Biosens. Bioelectron.*, **35**, 206-212 (2012).
24. B. Liu, L. Wang, B. Tong, Y. Zhang, W. Sheng, M. Pan, and S. Wang, Development and comparison of immunochromatographic strips with three nanomaterial labels: Colloidal gold, nano-gold-polyaniline-nanogold microspheres (GPGs) and colloidal carbon for visual detection of salbutamol, *Biosens. Bioelectron.*, **85**, 337-342 (2016).
 25. C. Chen and J. Wu, A fast and sensitive quantitative lateral flow immunoassay for crylab based on a novel signal amplification conjugate, *Sensors*, **12**, 11684 (2012).
 26. F. Wu, H. Yuan, C. Zhou, M. Mao, Q. Liu, H. Shen, Y. Cen, Z. Qin, L. Ma, and L. Song Li, Multiplexed detection of influenza A virus subtype H5 and H9 via quantum dot-based immunoassay, *Biosens. Bioelectron.*, **77**, 464-470 (2016).
 27. F. Ma, C. Li, and C. Zhang, Development of quantum dot-based biosensors: Principles and applications, *J. Mater. Chem. B*, **6**, 6173-6190 (2018).
 28. H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, and M. G. Bawendi, Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12142-12150 (2000).
 29. N. V. Beloglazova, E. S. Speranskaya, A. Wu, Z. Wang, M. Sanders, V. V. Gofman, D. Zhang, I. Y. Goryacheva, and S. De Saeger, Novel multiplex fluorescent immunoassays based on quantum dot nanolabels for mycotoxins determination, *Biosens. Bioelectron.*, **62**, 59-65 (2014).
 30. M. Danek, K. F. Jensen, C. B. Murray, and M. G. Bawendi, Synthesis of luminescent thin-film CdSe/ZnSe quantum dot composites using CdSe quantum dots passivated with an overlayer of ZnSe, *Chem. Mater.*, **8**, 173-180 (1996).
 31. M. A. Hines and P. Guyot-Sionnest, Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-Capped CdSe nanocrystals, *J. Phys. Chem.*, **100**, 468-471 (1996).
 32. E. S. Speranskaya, V. V. Gofman, and I. Y. Goryacheva, Preparation of water soluble zinc-blende CdSe/ZnS quantum dots, *Nanotech. Russ.*, **8**, 129-135 (2013).
 33. S. J. Lim, B. Chon, T. Joo, and S. K. Shin, Synthesis and characterization of Zinc-blende CdSe-based core/shell nanocrystals and their luminescence in water, *J. Phys. Chem. C*, **112**, 1744-1747 (2008).
 34. P. Reiss, M. Protiere, and L. Li, Core/shell semiconductor nanocrystals, *Small*, **5**, 154-168 (2009).
 35. S. Mathew, B. S. Bhardwaj, A. D. Saran, P. Radhakrishnan, V. P. N. Nampoori, C. P. G. Vallabhan, and J. R. Bellare, Effect of ZnS shell on optical properties of CdSe-ZnS core-shell quantum dots, *Opt. Mater.*, **39**, 46-51 (2015).
 36. N. Vo, H. Ngo, D. Vu, A. Duong, and Q. Lam, Conjugation of *E. coli* O157 : H7 antibody to CdSe/ZnS quantum dots, *J. Nanomater.*, **2015**, 8 (2015).
 37. T. C. Tisone and B. O'Farrell, Manufacturing the next generation of highly sensitive and reproducible lateral flow immunoassay. In: R. Wong and H. Tse (eds.). *Lateral Flow Immunoassay*, 1-26, Springer, New York, USA (2009).
 38. S. Low, R. Shaimi, Y. Thandaithabany, J. Lim, A. Ahmad, and A. Ismail, Electrophoretic interactions between nitrocellulose membranes and proteins: Biointerface analysis and protein adhesion properties, *Colloids Surf. B*, **110**, 248-253 (2013).
 39. S. Choi, J. Hwang, S. Lee, D. W. Lim, H. Joo, and J. Choo, Quantitative analysis of thyroid-stimulating hormone (TSH) using SERS-based lateral flow immunoassay, *Sens. Actuators B*, **240**, 358-364 (2017).
 40. H.-J. Sung, S.-S. Na, K.-J. Seul, H.-S. Jeon, J. Y. Park, and J.-Y. Cho, Clinically applicable diagnostics assay development for lung cancer biomarker, SAA, *J. Proteom. Bioinform.*, **07**, 303-309 (2014).