

폐암 조기 진단을 위한 단백질 바이오마커 측정용 전압-전류법 기반의 나노바이오 분석법 개발

리징징 · 스원페이 · 누드듀돈타뉴 · 이혜진[†]

경북대학교 자연과학대학 화학과
(2021년 7월 2일 접수, 2021년 7월 13일 수정, 2021년 7월 16일 채택)

Development of Voltammetric Nanobio-incorporated Analytical Method for Protein Biomarker Specific to Early Diagnosis of Lung Cancer

Jingjing Li, Yunpei Si, Dieudonne Tanue Nde and Hye Jin Lee[†]

Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu-city 41566, Republic of Korea
(Received July 2, 2021; Revised July 13, 2021; Accepted July 16, 2021)

초 록

본 논문에서는 이동성이 좋고 경제적이며, 간편하게 일회용 진단칩으로 제작 가능한 스크린 프린팅 한 탄소칩 전극 [screen printed carbon electrode (SPCE)] 기반의 전압전류법 나노물질 융합형 바이오센서를 제작하여 폐암 조기진단에 활용 가능한 단백질 표지 인자 중에 하나인 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) 단백질의 농도를 정량 분석하고자 하였다. 먼저 SPCE 표면에 금 나노입자를 전기적으로 증착한 후 크로스링커를 이용하여 hnRNP A1에 특이적으로 결합할 수 있는 바이오리셉터인 DNA aptamer를 고정하였다. Ethanolamine을 블로킹 시약으로 사용하여 aptamer와 함께 센서 표면에 고정하여 그 표면을 처리함으로써 비특이적인 생물질의 흡착에 의한 방해 신호를 최소화하고자 하였다. DNA칩과 hnRNP A1 용액을 접촉하여 DNA와 hnRNP A1을 결합시킨 후 alkaline phosphatase (ALP) 효소로 결합한 hnRNP A1 항체(anti-hnRNP A1)을 센서칩 표면으로 주입하여 샌드위치 복합체를 형성하고, 이를 기질인 4-aminophenyl phosphate (APP)와 효소-기질 특이적 산화 반응에 의한 전류 변화를 순환 전압전류법과 시차 펄스 전압전류법으로 측정하여 단백질의 농도를 정량적으로 분석하였다. 상기 산화 반응에 의한 피크 전류 변화는 순환 전압전류법과 시차 펄스 전압전류법을 사용할 때 -0.05와 -0.17 V (vs. Ag/AgCl) 전위 값에서 각각 일어났다. 개발한 나노바이오센서를 실제 정상인 혈청 시료 분석에 적용 가능함을 보여줌으로써 혈청 한 방울로 폐암의 조기진단 가능성을 제시하고자 하였다.

Abstract

In this article, a portable and cost-effective voltammetric biosensor with nanoparticles was developed for the measurements of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 protein (hnRNP A1) biomarker which can potentially be used for lung cancer diagnosis. Gold nanoparticles were first electrodeposited onto screen printed carbon electrode (SPCE) followed by immobilizing a single stranded DNA aptamer specific to hnRNP A1 onto the electrode surface. Ethanolamine was also used when immobilizing DNA aptamer on the surface to prevent signals from non-specific adsorption events. Sequential injection of hnRNP A1 biomarker and anti-hnRNP A1 conjugated with alkaline phosphatase (ALP) onto the aptamer chip surface allows to form the sandwich complex of DNA aptamer/hnRNP A1/ALP-anti-hnRNP A1 on the electrode surface which further reacted with 4-aminophenyl phosphate (APP). The electrocatalytic reaction of the enzyme, ALP, and the substrate, APP, resulting in the oxidative current response changes at -0.05 and -0.17 V (vs. Ag/AgCl) against the hnRNP A1 concentration was measured using cyclic and differential pulse voltammetry, respectively. The Au nanoparticles-integrated voltammetric biosensor was applied to analyze human normal serum solutions possibly suggesting potential applicability for lung cancer diagnosis.

Keywords: Lung cancer, Early diagnosis, Protein biomarker, Voltammetric biosensor, Screen printed carbon electrode

1. 서 론

암질환은 전 세계적으로 사망률 증가에 주요 원인 중의 하나이며, 기대 수명을 증가하는 데 결정적인 장애 요인 중에 하나이다[1]. 그 중 폐암은 암 환자 사망률에 가장 큰 요인 중에 하나이며, 2020년에는 약 180만 명이 사망한 것으로 추정되고 있다[2]. 무엇보다도 폐암은

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

질환 말기에 진단되어 그 생존율 역시 연간 43.3%로 매우 낮은 편이다[3]. 따라서 이를 예방하기 위해 간편하면서 쉽게 폐암 질환을 조기에 진단하는 방법을 개발하는 것은 매우 중요하다. 폐암을 조기에 빠르고 간편하게 진단하기 위해 많은 바이오센서 개발 연구가 진행되어 왔으며, 이들의 대부분은 폐암 질환과 연관된 생체표지자(biomarker)를 측정하는 기술을 개발하고 이를 센서에 도입하는 방법이 선호되어 사용되고 있다. 다양한 생체표지자(예: 단백질, 대사체 등)들이 발굴되어 왔으며, 대표적인 예로 carcinoembryonic antigen (CEA), pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), human serum amyloid A1 (hSAA1) 등을 들 수 있다[4-7].

지난 10여 년간, 많은 연구자들이 측면 면역 크로마토그래피 분석법, 표면 플라즈몬 공명 분석법, 전기화학 및 형광, 발광 측정 분석법 등을 이용하여 폐암과 관련된 생체표지자의 농도를 분석함으로써 폐암 질환의 신속하고 편리한 진단이 가능한 다양한 바이오센서를 개발하여 왔다[8-14]. 그중 전기화학센서는 낮은 안정성, 짧은 장기간 보존성 및 비특이적 결합에 의한 방해 효과 등의 해결해야 할 어려운 문제들이 여전히 남아있지만, 간편하고, 비침습적이며, 경제적이어서 혈청, 혈장, 타액 등의 생물학적 용액 내에 폐암 관련 생체표지자의 농도를 검출하여 진단에 응용하는 연구들이 많이 이루어졌다[14-16]. 이에 맞추어 전기화학 신호 측정용의 다양한 소재의 센서 칩 또는 전극 개발 역시 박차를 가하여 왔는데, 이들 중 스크린 프린팅 한 탄소칩 전극 [screen printed carbon electrode (SPCE)]은 앞서 밝힌 장점들 외에도, 제작의 간편성, 작은 시료 부피 사용 및 일회용 진단칩으로 전환이 용이함 등의 추가적인 장점을 갖추고 있어서, 폐암을 포함한 다양한 질환의 현장진료 (point of care, POC)용 진단 키트로 전환하려는 연구가 최근 활발하게 수행되고 있다[17-18]. 최근 본 연구팀은 폐암 질환과 관련된 생체표지자 중에 하나인 protein tyrosine kinase 7 단백질의 농도를 정량할 수 있는 SPCE 기반의 전기화학적 바이오센서 개발에 대해 보고하였다[19]. 또한 Chen *et al.* 연구팀은 SPCE 전극 표면을 금 나노케이지와 다중벽 탄소나노튜브 복합체로 변형하여 폐암 질환과 연관된 non-coding RNA를 고감도로 분석할 수 있는 바이오센서를 개발하였다[20].

폐암 질환과 연관된 생체표지자 단백질 중에 하나인 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1)은 대장암[21], 유방암[22], 간암[23]과 관련된 것으로 문헌에 보고되었다. 예를 들어 본 연구팀은 최근 대장암 혈장 시료 안의 hnRNP A1 단백질의 양을 표면 플라즈몬 공명 분석법으로 측정함으로써 대장암 진단이 가능함을 밝혔다[24]. 특히 혈청 시료 안의 상기 hnRNP A1 단백질은 또한 폐암 질환과도 관련되는 중요한 단백질 생체표지자로 보고되었다[5,25,26]. 본 연구는 스크린 프린팅 한 탄소칩 전극(SPCE) 기반의 전압전류법 바이오센서를 제작하여 폐암 조기진단에 활용 가능한 단백질 표지 인자 중의 하나인 hnRNP A1 단백질의 농도를 측정 가능한 진단 센서를 개발한 내용에 대한 것이다. 기존 문헌에 보고된 hnRNP A1 단백질에 특이적인 DNA 압타머와 항체를[24] 이용하여 센서의 특이성을 높이고자 하였으며, 전기화학적 신호를 정량 분석함과 동시에 신호 증대를 위하여, alkaline phosphatase (ALP) 효소와 기질인 4-aminophenyl phosphate (APP)의 효소기질 특이적 반응을 이용하였다. 즉, SPCE 표면에 금 나노입자를 전기적으로 증착하고, 이에 카르복실기 말단기를 갖는 알켄티올 화합물로 자가조립을 한 후 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHSS) 크로스링커를 이용하여 5' 말단이 아민으로 변형된 DNA 압타머를 공유결합으로 고정하였다[27]. 이때 비특이적인 신호를 최소화하기 위해 블로킹 시

약으로 ethanolamine을 압타머와 함께 고정하였다. 이렇게 완성된 SPCE 센서칩에 hnRNP A1 단백질과 ALP 효소가 접합된 anti-hnRNP A1 항체(ALP-anti-hnRNP A1)를 접촉하면, DNA 압타머/hnRNP A1 단백질/ALP-anti-hnRNP A1 표면 샌드위치 복합체가 형성되고, 이를 기질인 APP와 반응시켰을 때 APP가 산화되면서 내놓은 전자를 전류의 흐름으로 측정함으로써 단백질의 농도를 정량적으로 분석 가능하였다. 실제 혈청 시료에 존재하는 hnRNP A1 양을 측정하는 데 적용함으로써 혈청 한 방울로 폐암의 조기진단 가능성을 보여주고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 재료

4-aminophenyl phosphate (APP, LKT Laboratories, Inc.), 3-mercaptopropionic acid (MPA, Sigma-Aldrich), (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC, Thermo), alkaline phosphatase (ALP, Abcam), ethanolamine (Sigma-Aldrich), gold (III) chloride trihydrate (HAuCl₄, Sigma-Aldrich), hnRNP A1 (Abcam), hnRNP A1 antibody (anti-hnRNP A1, Abcam), human normal serum (Sigma-Aldrich), protein tyrosine kinase 7 antibody (anti-PTK7, R&D systems), magnesium chloride (MgCl₂, Junsei), N-hydroxysulfosuccinimide (NHSS, Thermo), phosphate buffered saline (PBS, 10X, pH 7.4, ThermoFisher), potassium chloride (KCl, Daejung), sulfuric acid (H₂SO₄, OCI)와 tris(hydroxymethyl) aminomethane (tris, Sigma-Aldrich)은 정제하지 않고 그대로 사용하였다. hnRNP A1에 특이적으로 결합하는 DNA 압타머는 5' 말단을 아민으로 변형한 서열을 Integrated DNA Technologies사로부터 공급받아서 사용하였으며, 그 서열은 다음과 같다[24]. 5'-H₂N-GCA ATG GTA CGG TAC TTC CTG TGG CGA GGT AGG TGG GGT GTG TGT GTA TCC AAA AGT GCA CGC TAC TTT GCT AA-3'. ALP-anti-hnRNP A1은 Dojindo Molecular Technologies사에서 제공한 프로토콜 (<https://dojindo.com/product/alkaline-phosphatase-labeling-kit-nh2-1k12/>)에 따라서 alkaline phosphatase labeling kit-NH₂ (Dojindo Molecular Technologies, Inc.)을 이용하여 ALP와 anti-hnRNP A1를 접합한 후 사용하였다. 수용액 제조 시 Millipore사 필터를 이용하여 정제한 물을 사용하였다.

2.2. 금 나노입자 융합형 SPCE 기반의 전압전류법 바이오센서 제작

전압전류법으로 hnRNP A1 단백질을 분석하기 위해 SPCE 기반의 바이오센서에 DNA 압타머와 항체를 이용하여 표면 샌드위치 복합체를 형성하는 방법을 Figure 1에 간단히 나타내었다. 먼저 1 mM Au(III) 용액(0.5 M H₂SO₄)에 탄소 작업 전극을 장착한 후, 순환 전압전류법을 이용하여 -0.6 V에서 1.4 V (vs. Ag/AgCl) 전위 값 범위에서 50 mV s⁻¹ 속도로 10번 반복적으로 전위를 주사하여 금 나노입자를 전기화학적으로 탄소칩 표면에 증착하고[28], 표면을 물과 에탄올로 씻어 주고 말린다. 금 나노입자가 도포된 SPCE 전극을 40 mM MPA 수용액에 넣어, 약 13시간 이상 반응을 시켜 자가조립한 후 20 μ L의 EDC (2.8 mg/mL)와 NHSS (0.6 mg/mL) 혼합용액과 약 30분간 반응시켰다. 이를 통해 SPCE의 활성화된 카르복실기 기능기와 3 μ L의 아민 기능을 갖는 hnRNP A1 특이적인 서열을 갖는 aptamer (10 nM) 및 1 μ L의 ethanolamine (100 μ M)을 함께 약 3시간 동안 반응시킨다. 제작된 DNA 나노바이오센서를 3 μ L의 서로 다른 농도의 hnRNP A1 단백질과 약 1시간 동안 반응시킨 후 10 mM PBS 완충용액(pH 7.4)으로 씻어주고 질소가스를 이용하여 칩 표면의 물기를 제거한다. 최종적으로

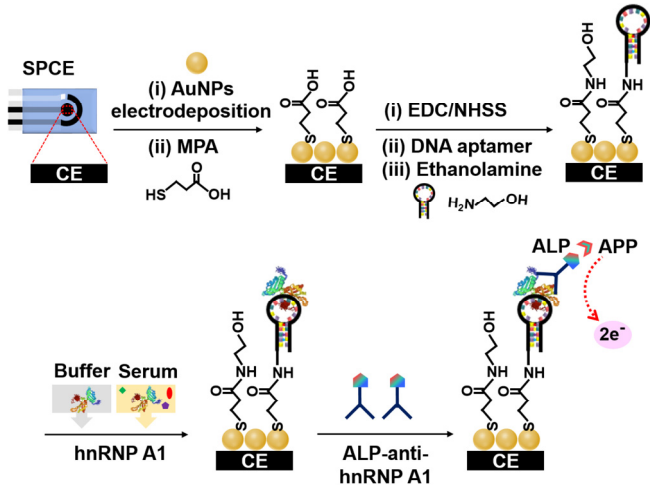


Figure 1. A schematic sensing approach for hnRNP A1 via forming sandwich complex of ALP-anti-hnRNP A1/hnRNP A1 on DNA aptamer modified gold nanoparticles (AuNPs) deposited SPCE followed by the catalytic reaction of ALP on the surface with APP in 50 mM tris buffer (pH 9.0).

제작된 센서 표면에 50 nM ALP-anti-hnRNP A1를 2 μ L 떨어뜨리고 약 1시간 반응시킨다. 전압전류법 측정 전에 표면 샌드위치 복합체가 형성된 SPCE 전극은 습도 챔버 안에 빛이 차단된 상태로 4 $^{\circ}$ C에서 10 mM KCl과 1 g/L MgCl₂를 포함하는 50 mM tris 완충용액 (pH 9.0)에 보관하였다.

2.3. 전기화학적 측정방법

순환 전압전류법(cyclic voltammetry, CV)과 시차 펄스 전압전류법(differential pulse voltammetry, DPV)은 Nova (version 2.1)과 연계된 Autolab사의 전위차계(potentiostat, PGSTAT128N)를 사용하였으며, 실온에서 수행하였다. 이때 3 전극 시스템으로 측정하였으며, 작업 및 보조 전극으로 탄소 잉크를, 기준전극으로 Ag/AgCl 잉크를 스크린프린팅 기술로 제작한 SPCE전극집(Daeyoungsilk Co. Ltd)을 사용하였다. CV의 경우 스캔 속도는 50 mV s⁻¹이었으며, DPV의 경우 스텝 전위 값은 15 mV, 진폭 변조는 50 mV, 변조 시간은 50 ms, 시간 간격은 0.5 s이었다. ALP 효소와 APP (60 μ M) 기질과의 반응은 tris 완충용액(pH 9.0)에서 진행하였다[29].

3. 결과 및 고찰

3.1. 완충용액 속에 hnRNP A1 생체표지자의 정량 분석

hnRNP A1 단백질 농도를 정량분석하기 위해 먼저 DNA 압타머로 고정된 전극 센서 표면에 서로 다른 농도의 단백질과 고정된 농도의 ALP-anti-hnRNP A1를 순차적으로 주입하여 “DNA 압타머/hnRNP A1 단백질/ALP-anti-hnRNP A1” 표면 샌드위치 복합체를 Figure 1과 같이 형성하였다. DNA가 고정된 센서집을 제작할 때 센서 작동 시 실제 시료에 존재하는 방해 생물질들과의 비특이적인 반응, 또는 흡착에 의해 거짓으로 나타나는 측정 신호를 최소화하기 위해 ethanolamine을 이용하여 표면을 처리하였다. 표면 샌드위치 복합체가 형성된 전극 표면을 일정한 농도(60 μ M)의 APP 기질과 반응시키면서 순환 전압전류법으로 전위를 주사하게 되면 복합체에 접합된 ALP와 APP가

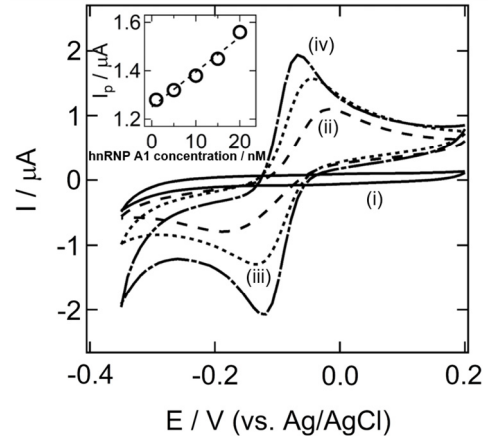


Figure 2. A series of CV data for various concentrations of hnRNP A1 including (ii) 1 nM, (iii) 10 nM, and (iv) 20 nM using DNA aptamer immobilized AuNPs modified SPCE. After the reaction with hnRNP A1, the electrode was exposed to the constant concentration of ALP-anti-hnRNP A1 (50 nM). This was then reacted with a fixed concentration of APP (60 μ M) in 50 mM tris buffer (pH 9.0). Scan rate = 50 mV s⁻¹. Curve (i) is in the absence of the substrate, APP. Inset is the linear plot of oxidative peak current versus hnRNP A1 concentration plot from CV.

효소-기질 반응을 하여 -0.05 V (vs. Ag/AgCl)에서 산화 과정을 통해 전자 2개를 내놓으면서 전류값의 변화가 나타나며, 4-aminophenol (AP) 생성물을 만들게 된다.

Figure 2에서 보듯이 DNA 압타머/hnRNP A1 단백질/ALP-anti-hnRNP A1 표면 샌드위치 복합체를 APP 기질과 반응시켰을 때 효소-기질의 산화 반응에 의한 피크 전류 변화가 -0.05 V (vs. Ag/AgCl)에서 나타나는 전압 전류 곡선을 얻을 수 있었다. APP 기질이 없을 때 표면 샌드위치 복합체가 형성된 전극에서 전위 변화에 따라 전류 변화가 거의 일어나지 않는 것을 볼 수 있다. hnRNP A1 단백질의 농도 (C)를 1에서 20 nM까지 증가시켰을 때 표면 샌드위치 복합체의 ALP 효소와 기질인 APP와의 산화 반응에 의한 피크 전류값(I_p)이 비례하여 증가하는 것을 볼 수 있으며 선형방정식으로 피팅을 하였을 때 I_p (μ A) = 0.015 C (nM) + 1.251 (R² = 0.98)가 얻어졌으며, 이를 통해 CV 방법을 이용하였을 때 민감도는 0.015 μ A nM⁻¹임을 확인하였다.

CV 방법을 통해 얻은 센서의 민감도를 증대하기 위해 DPV 기술을 이용하여 APP와 ALP 반응을 측정하였다. DPV 방법은 용량성 전류(capacitive current)를 최소화하여 낮은 바탕 신호와 좀 더 감도를 높이는 전기화학기술로 전압전류법 센서 개발에 많이 활용되어왔다[30]. Figure 3a는 hnRNP A1 단백질의 농도를 1에서 20 nM까지 변화시키면서 고정된 농도 (50 nM)의 ALP-anti-hnRNP A1를 이용하여 샌드위치 복합체를 SPCE 표면에 형성하고, 일정한 농도의 APP와 반응시키면서 얻은 DPV 곡선을 나타내었다. CV와 마찬가지로, APP 기질이 없는 완충용액에 샌드위치 복합체가 형성된 전극을 접촉하였을 때 전위를 인가해도 전류의 변화가 거의 없음을 볼 수 있으며, APP 용액과 접촉하였을 때 -0.17 V (vs. Ag/AgCl)에서 샌드위치 복합체의 ALP 효소와 기질인 APP가 반응하여 AP 생성물을 만들면서 산화됨에 따라 피크 전류가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. hnRNP A1 농도가 1에서 20 nM까지 증가함에 따라 산화 피크 전류값이 비례하여 증가하는 것을 볼 수 있으며, hnRNP A1 단백질 농도 대비 피크 전류값 변화량을 선형 피팅한 데이터를 Figure 3b에 나타냈으며, 그 결과 I_p (μ A) =

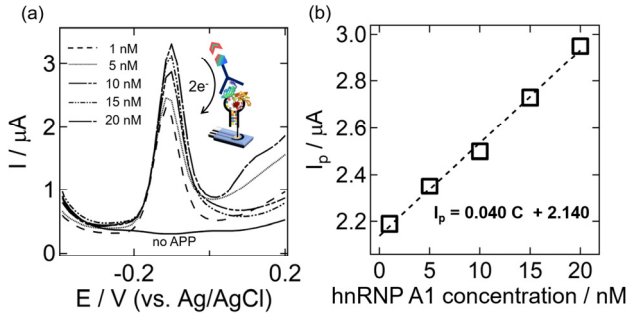


Figure 3. (a) DPV responses of different concentrations of hnRNP A1 from 1 to 20 nM detection using DNA aptamer immobilized AuNPs modified SPCE followed by the exposure of 50 nM ALP-anti-hnRNP A1. The DNA aptamer/hnRNP A1/ALP-anti-hnRNP A1 complex formed on the SPCE surface was then reacted with 60 μM APP in 50 mM tris buffer (pH 9.0). DPV parameters are as follows: step potential = 15 mV, modulation amplitude = 50 mV, modulation time = 0.05 s, and interval time = 0.5 s. The solid line is in the absence of APP. (b) A plot of DPV peak currents versus hnRNP A1 concentrations.

0.040 C (nM) + 2.140 ($R^2 = 0.999$) 관계식을 얻을 수 있다. 이를 바탕으로 개발한 센서를 이용하여 DPV방법으로 hnRNP A1 분석하였을 때 0.040 μA nM⁻¹ 민감도 값을 얻었다. 이는 CV 방법으로 분석하였을 때 대비 약 2.5배 향상된 것으로, 실제 시료 분석과 비특이적 반응에 대한 센서 신호 측정에도 DPV방법을 사용하였다.

개발한 바이오칩 센서를 실제 시료에 적용하기 전에 실제 시료에 존재하는 방해 생물질들과의 비특이적인 반응, 또는 흡착에 의해 거짓으로 나타날 수 있는 측정 신호를 최소화하는 것이 중요하며, 이를 위해 본 연구에서는 ethanalamine으로 DNA로 고정된 칩 표면을 처리하였으며, 두 가지 경우의 음성대조군을 고안하고 이들의 비특이적인 반응에 의한 거짓 신호 정도를 DPV 방법으로 측정하였다. Figure 4에서 보듯이, 첫 번째 세트의 샌드위치 복합체를 형성할 때 hnRNP A1을 넣지 않은 상태에서 ALP-anti-hnRNP A1를 직접 DNA aptamer에 주입하였을 때 신호를 측정하였으며(iii), 이때 APP와 ALP-anti-hnRNP A1의 반응에 의한 산화 전류가 미미하게 나타남을 확인할 수 있다. 하지만, ALP-anti-hnRNP A1 대신에 hnRNP A1과 결합이 특이적이지 않은 anti-PTK 7 항체에 ALP를 접합하여 hnRNP A1와 함께 DNA aptamer에 접촉하였을 때, APP와 ALP 반응에 의한 산화 전류 변화가 첫 번째 비특이적인 경우보다 좀 더 크게 나타나는 것을 볼 수 있다 (ii). 두 경우 모두 올바른 항체-항원-aptamer 페어로 샌드위치 복합체가 형성된 경우 (i) 보다 피크 전류 변화 값이 낮음을 볼 수 있다. 이를 통해 DNA aptamer에 ethanalamine의 사용으로 비특이적인 항원-항체의 반응을 어느 정도 해소하였으나 좀 더 많은 종류의 블로킹 화합물의 활용을 통해 최적의 조건을 잡는 것이 필요하다고 사료되며, 추후 블로킹 화합물의 종류에 따른 방해 효과에 관한 추가적인 실험을 통해 그 결과를 보고하고자 한다.

3.2. 혈청 시료 용액에서 hnRNP A1 생체표지자 농도 분석

폐암 질환과 관련된 혈액 생체표지자 단백질인 hnRNP A1의 농도 분석을 통해 개발한 나노바이오 융합형 전류법 센서의 폐암 진단에 적용 가능성을 살펴보기 위해 실제 인간 혈청 용액을 분석하는 기초 실험을 수행하였다. 본 연구에서 사용한 실제 시료인 혈청 용액은 사전 처리 과정을 전혀 하지 않고 직접 사용하였다. 먼저 DNA aptamer로

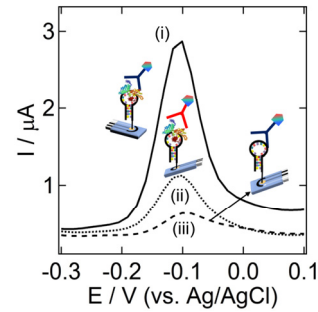


Figure 4. DPV data for different sets of sandwich complex formed on AuNPs modified SPCE surface. The solid line (i) (-) is the sandwich complex of DNA aptamer/hnRNP A1/ALP-anti-hnRNP A1 while the dash line (ii) (---) is the use of ALP-anti-PTK 7 instead of ALP-hnRNP A1 after the injection of hnRNP A1 on the aptamer surface. The dash line (iii) (-·-) is the exposure of aptamer surface to ALP-anti-hnRNP A1 in the absence of hnRNP A1 protein. The hnRNP A1 concentration for all three experiments were 10 nM and both the concentrations of ALP labelled antibodies including ALP-anti-hnRNP A1 and ALP-anti-PTK 7 were 50 nM. The DPV condition was the same as Figure 3.

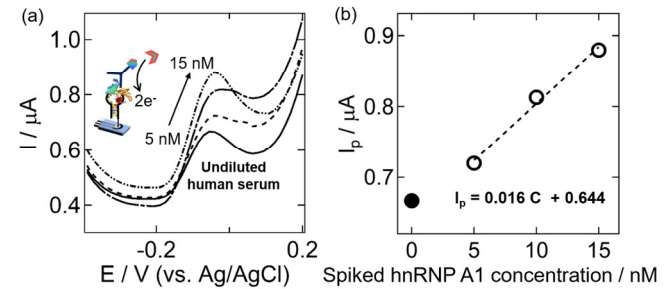


Figure 5. (a) A series of DPV analyses of undiluted human normal serum solutions using DNA aptamer attached AuNPs modified SPCE. The known concentrations of hnRNP A1 from 5, 10, to 15 nM were separately added to each undiluted human normal serum. The sandwich complex of DNA aptamer with hnRNP A1 in serum or spiked into the serum followed by the interaction with ALP-anti-hnRNP A1 was formed and further reacted with 60 μM APP in 50 mM tris buffer (pH 9.0). (b) is a linear plot of DPV peak current versus the spiked known hnRNP A1 concentrations in the human serum sample. The solid marker (●) is the serum only without spiking of hnRNP A1. DPV experimental parameters were the same as Figure 3.

고정된 SPCE전극을 혈청 시료 원액과 반응시키고 ALP-anti-hnRNP A1을 주입한 후, 상기 전극을 APP 용액에 접촉하고 DPV로 모니터링 하였다. 이와 함께 혈청용액에 알려진 hnRNP A1 농도를 5, 10, 15 nM로 각각 첨가한 후 DNA aptamer로 고정된 SPCE전극과 반응시키고, 이를 ALP-anti-hnRNP A1과 접촉한 후 최종적으로 -0.056 V (vs. Ag/AgCl)에서 APP와 산화 반응에 의한 DPV 피크 전류값을 측정하였다. 그 결과 얻어진 전압 전류 곡선을 Figure 5(a)에 나타냈으며, hnRNP A1 농도의 증가하였을 때 피크 전류값이 비례적으로 증가하는 것을 볼 수 있다. 혈청 용액 그 자체에 각각 첨가한 hnRNP A1 농도 대비 피크 전류값 변화를 Figure 5(b)에 나타내었으며, 선형 피팅을 함으로써 $I_p (\mu A) = 0.016 C (nM) + 0.644$ ($R^2 = 0.996$)의 관계식을

얻을 수 있다. 본 식에서 기울기 값인 $0.016 \mu\text{A nM}^{-1}$ 은 완충용액에서 측정된 hnRNP A1 농도 대비 전류 변화 신호 측정에서 얻은 기울기 값($0.040 \mu\text{A nM}^{-1}$)보다 약 2배 정도 낮았다. 그 이유 중 하나는 사전 처리 과정 없이 혈청 용액 자체를 사용함으로써 혈청 안에 존재하는 다양한 주요 단백질(예: albumin, globulin)의 비특이적인 흡착 등에 의한 시료 매트릭스 효과에 기인한 것으로 사료된다[31]. 상기 선형 식에 혈청 그 자체 용액에서 얻은 피크 전류값(Ip)인 0.667을 대입함으로써 혈청에 존재하는 hnRNP A1의 농도는 약 1.44 nM로 계산할 수 있었다. 측정된 hnRNP A1 농도는 문헌에 보고된 정상인 혈청 용액에 존재하는 hnRNP A1 농도 범위 (0.35-1.58 nM)에 속하는 것으로[32] 본 센서가 혈청 등의 생체 시료 용액 측정에 활용 가능함과 혈청 용액 내에 hnRNPA1의 농도를 측정함으로써 폐암 질환의 조기진단에 잠재적으로 활용 가능성을 시사한다.

4. 결 론

본 논문에서는 폐암 진단에 활용 가능한 혈청 생체 표지자 중에 하나인 hnRNP A1 단백질을 분석하기 위해 금 나노입자가 융합된 SPCE 기반의 전압 전류법 센서를 개발하였다. 이를 위해 DNA 압타머가 고정된 SPCE 전극을 제작하고, 상기 전극 표면에 DNA aptamer/hnRNP A1/ALP-anti-hnRNP A1 샌드위치 복합체를 형성하여 기질인 APP와의 효소-기질 선택적 반응에 의한 산화 전류값을 측정하였으며, 측정된 전류값이 hnRNP A1 단백질의 농도에 비례하여 증가하는 것을 CV와 DPV 방법으로 확인하였다. DPV 방법을 사용할 경우 센서의 감도가 약 2배 이상 증가하는 것을 보여주었으며, ethanolamine을 블로킹 시약으로 표면에 처리하여 단백질이 없을 때 ALP-anti-hnRNP A1이 비특이적으로 표면에 흡착하여 나타내는 신호를 최소화할 수 있었다. 전처리를 하지 않은 실제 혈청 용액에서 hnRNP A1 분석하는 데 개발한 센서를 적용하였으며, 이를 통해 폐암 질환의 진단에 활용가능성을 시사하였다. 하지만 실제 혈청 시료에 존재하는 다른 방해물에 의한 비특이적 흡착 또는 반응의 최소화를 위한 추가적인 실험을 좀 더 진행함으로써 센서의 정확도 및 정밀도를 향상할 필요가 있다고 사료된다.

Acknowledgments

This research was supported by Kyungpook National University Development Project Research Fund, 2018.

References

1. J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, D. M. Parkin, M. Pineros, A. Znaor, and F. Bray, Cancer statistics for the year 2020: an overview, *Int. J. Cancer*, **149**, 778-789 (2021).
2. H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.*, **71**, 209-249 (2021).
3. B. Youn, N. A. Trikalinos, V. Mor, I. B. Wilson, and I. J. Dahabreh, Real-world use and survival outcomes of immune checkpoint inhibitors in older adults with non-small cell lung cancer, *Cancer*, **126**, 978-985 (2020).
4. S. M. Hanash, E. J. Ostrin, and J. F. Fahrman, Blood based bio-

5. markers beyond genomics for lung cancer screening, *Transl. Lung Cancer Res.*, **7**, 327-335 (2018).
6. H. G. Ryu, Y. Jung, N. Lee, J. Y. Seo, S. W. Kim, K. H. Lee, D.Y. Kim, and K.T. Kim, HNRNP A1 promotes lung cancer cell proliferation by modulating VRK1 translation, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5506 (2021).
7. S. Lee, E. Goh, and H. J. Lee, Research trend of biochip sensors for biomarkers specific to diagnostics of lung cancer diseases, *Appl. Chem. Eng.*, **29**, 645-651 (2018).
8. A. Fajri, E. Goh, S. Lee, and H. J. Lee, Analysis of human serum amyloid A-1 concentrations using a lateral flow immunoassay with CdSe/ZnS quantum dots, *Appl. Chem. Eng.*, **30**, 429-434 (2019).
9. M. Hasanzadeh, and N. Shadjou, Advanced nanomaterials for use in electrochemical and optical immunoassays of carcinoembryonic antigen. A review, *Microchim. Acta*, **184**, 389-414 (2017).
10. L. J. Zhi, and A. L. Sun, Platinum nanozyme-encapsulated poly(amidoamine) dendrimer for voltammetric immunoassay of pro-gastrin-releasing peptide, *Anal. Chim. Acta*, **1134**, 106-114 (2020).
11. H. Filik, and A. A. Avan, Electrochemical immunosensors for the detection of cytokine tumor necrosis factor alpha: a review, *Talanta*, **211**, 120758 (2020).
12. N.-F. Chiu, and H.-T. Yang, High-sensitivity detection of the lung cancer biomarker CYFRA21-1 in serum samples using a carboxyl-MoS₂ functional film for SPR-based immunosensors, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **8**, 234 (2020).
13. V. Ranganathan, S. Srinivasan, A. Singh, and M. C. DeRosa, An aptamer-based colorimetric lateral flow assay for the detection of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), *Anal. Biochem.*, **588**, 113471 (2020).
14. S. Lee, and H. J. Lee, Recent research trend in lateral flow immunoassay strip (LFIA) with colorimetric method for detection of cancer biomarkers, *Appl. Chem. Eng.*, **31**, 585-590 (2020).
15. A. Khanmohammadi, A. Aghaie, E. Vahedi, A. Qazvini, M. Ghanei, A. Afkhami, A. Hajian, and H. Bagheri, Electrochemical biosensors for the detection of lung cancer biomarkers: a review, *Talanta*, **206**, 120251 (2020).
16. Y. Si, and H.J. Lee, Carbon nanomaterials and metallic nanoparticles-incorporated electrochemical sensors for small metabolites: Detection methodologies and applications, *Curr. Opin. Electrochem.*, **22**, 234-243 (2020).
17. G. Yang, Z. Xiao, C. Tang, Y. Deng, H. Huang, and Z. He, Recent advances in biosensor for detection of lung cancer biomarkers, *Biosens. Bioelectron.*, **141**, 111416 (2019).
18. A. A. Kava, and C. S. Henry, Exploring carbon particle type and plasma treatment to improve electrochemical properties of stencil-printed carbon electrodes, *Talanta*, **221**, 121553 (2021).
19. A. Roointan, T. Ahmad Mir, S. Ibrahim Wani, R. Mati Ur, K.K. Hussain, B. Ahmed, S. Abraham, A. Savardashtaki, G. Gandomani, M. Gandomani, R. Chinnappan, and M.H. Akhtar, Early detection of lung cancer biomarkers through biosensor technology: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **164**, 93-103 (2019).
20. S. Lee, S. Hayati, S. Kim, and H. J. Lee, Determination of protein tyrosine kinase-7 concentration using electrocatalytic reaction and an aptamer-antibody sandwich assay platform, *Catal. Today*, **359**, 76-82 (2021).
21. M. Chen, D. Wu, S. Tu, C. Yang, D. Chen, and Y. Xu, A novel biosensor for the ultrasensitive detection of the lncRNA biomarker

- MALAT1 in non-small cell lung cancer, *Sci. Rep.*, **11**, 3666 (2021).
21. W. C. Park, H. R. Kim, D. B. Kang, J. S. Ryu, K. H. Choi, G. O. Lee, K. J. Yun, K. Y. Kim, R. Park, K. H. Yoon, J. H. Cho, Y. J. Lee, S. C. Chae, M. C. Park, and D. S. Park, Comparative expression patterns and diagnostic efficacies of SR splicing factors and HNRNPA1 in gastric and colorectal cancer, *BMC Cancer*, **16**, 358 (2016).
 22. K. Otsuka, Y. Yamamoto, and T. Ochiya, Regulatory role of resveratrol, a microRNA-controlling compound, in HNRNPA1 expression, which is associated with poor prognosis in breast cancer, *Oncotarget*, **9**, 24718-24730 (2018).
 23. Z. J. Zhou, Z. Dai, S.L. Zhou, X.T. Fu, Y.M. Zhao, Y.H. Shi, J. Zhou, and J. Fan, Overexpression of HnRNP A1 promotes tumor invasion through regulating CD44v6 and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma, *Int. J. Cancer*, **132**, 1080-1089 (2013).
 24. S.H. Lee, Y.E. Park, J.E. Lee, and H.J. Lee, A surface plasmon resonance biosensor in conjunction with a DNA aptamer-antibody bioreceptor pair for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 concentrations in colorectal cancer plasma solutions, *Biosens. Bioelectron.*, **154**, 112065 (2020).
 25. R. Guo, Y. Li, J. Ning, D. Sun, L. Lin, and X. Liu, HnRNP A1/A2 and SF2/ASF regulate alternative splicing of interferon regulatory factor-3 and affect immunomodulatory functions in human non-small cell lung cancer cells, *PLoS one*, **8**, e62729 (2013).
 26. X. Liu, Y. Zhou, Y. Lou, and H. Zhong, Knockdown of HNRNPA1 inhibits lung adenocarcinoma cell proliferation through cell cycle arrest at G0/G1 phase, *Gene*, **576**, 791-797 (2016).
 27. G. Zhu, and H. J. Lee, Electrochemical sandwich-type biosensors for alpha-1 antitrypsin with carbon nanotubes and alkaline phosphatase labeled antibody-silver nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.*, **89**, 959-963 (2017).
 28. H. C. Chiang, Y. Wang, Q. Zhang, and K. Levon, Optimization of the electrodeposition of gold nanoparticles for the application of highly sensitive, label-free biosensor, *Biosensors*, **9**, 50 (2019).
 29. F. S. Diba, S. Kim, and H. J. Lee, Amperometric bioaffinity sensing platform for avian influenza virus proteins with aptamer modified gold nanoparticles on carbon chips, *Biosens. Bioelectron.*, **72**, 355-361 (2015).
 30. O. de Oliveira Jr, L. Ferreira, G. Marystela, F. de Lima Leite, and A.L. Da Róz, *Nanoscience and its Applications*, William Andrew, (2016).
 31. M. Leeman, J. Choi, S. Hansson, M. U. Storm, and L. Nilsson, Proteins and antibodies in serum, plasma, and whole blood-size characterization using asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4), *Anal. Bioanal. Chem.*, **410**, 4867-4873 (2018).
 32. Y.-L. Ma, J.-Y. Peng, P. Zhang, L. Huang, W.-J. Liu, T.-Y. Shen, H.-Q. Chen, Y.-K. Zhou, M. Zhang, and Z.-X. Chu, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is identified as a potential biomarker for colorectal cancer based on differential proteomics technology, *J. Proteome Res.*, **8**, 4525-4535 (2009).

Authors

Jingjing Li; M.Sc., Graduate Student, Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea; jingjing.2018@outlook.com

Yunpei Si; M.Sc., Graduate Student, Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea; yunpeith@hotmail.com

Dieudonne Tanue Nde; M.Sc., Graduate Student, Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea; ndehdieudonne@gmail.com

Hye Jin Lee; Ph.D., Professor, Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea; hyejinlee@knu.ac.kr