

폐암 진단에 적용 가능한 측면 유동 면역 형광 분석법 개발

물야수피안토 · 임정민 · 이혜진[†]

경북대학교 자연과학대학 화학과
(2022년 2월 18일 접수, 2022년 2월 24일 수정, 2022년 3월 7일 채택)

Development of Lateral Flow Immunofluorescence Assay Applicable to Lung Cancer

Mulya Supianto, Jungmin Lim and Hye Jin Lee[†]

Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea
(Received February 18, 2022; Revised February 24, 2022; Accepted March 7, 2022)

초 록

탄소나노점@실리카를 신호 형질 소재로 이용한 측면 유동 면역 형광 분석법을 개발하여 폐암 바이오마커 중에 하나인 레티놀 결합 단백질 4의 농도를 분석하는 데 적용하고자 하였다. 측면 유동 면역 형광 분석법에서 항원 검출을 위해 바이오리셉터로 주로 사용하였던 항체 대신 좀 더 경제적이고, 장기간 보관성이 용이하며, 특정 표적 단백질에 대해 친화력이 강한 압타머를 니트로셀룰로오스 멤브레인에 사용하였다. 레티놀 결합 단백질 4에 특이적이며 5' 말단을 비오틴으로 변형한 압타머를 뉴트라비딘과 반응시켜 비오틴과 뉴트라비딘의 강한 결합력에 의해 압타머가 니트로셀룰로오스 멤브레인에 고정되도록 하였다. 압타머가 고정된 스트립에 레티놀 결합 단백질 4 항체를 공유결합으로 고정된 탄소나노점@실리카 블루 형광 신호 형질 나노입자와 레티놀 결합 단백질 4 항원을 측면 유동 방식으로 흘려 주어 샌드위치 복합체를 형성하였다. 이렇게 형성된 샌드위치 복합체에서 탄소나노점@실리카 나노입자에 의한 형광 신호를 측정하여 항원 농도를 분석하기 위한 최적의 조건을 선정하기 위해 전개 완충용액에 첨가된 계면활성제의 농도, 이온 세기를 변화시키면서 블로킹 시약을 추가적으로 사용하였다. 그 결과 150 mM NaCl 및 0.05% Tween-20을 포함하는 10 mM Tris 완충용액(pH 7.4)에서 0.6 M 에탄올아민을 블로킹 시약으로 사용하였을 때 니트로셀룰로오스 멤브레인에 도포된 압타머와 레티놀 결합 단백질 4 항원 및 탄소나노점@실리카 나노입자로 레이블링한 항체가 결합하여 최적의 형광분석신호를 내는 것을 확인 가능하였다. 이러한 결과는 현장진단검사 키트로 현재 각광을 받고 있는 측면 유동 면역 형광 분석법에서 항체 대신 압타머를 니트로셀룰로오스 멤브레인에 고정함으로써 좀 더 경제적이고, 장기간 보관이 용이한 측면 유동 면역 형광 분석 칩을 제작하여 폐암 질환 진단용 바이오마커 검출이 가능함을 시사하였다.

Abstract

A lateral flow immunoassay (LFIA) method using carbon nanodot@silica as a signaling material was developed for analyzing the concentration of retinol-binding protein 4 (RBP4), one of the lung cancer biomarkers. Instead of antibodies mainly used as bioreceptors in nitrocellulose membranes in LFIA for protein detection, aptamers that are more economical, easy to store for a long time, and have strong affinities toward specific target proteins were used. A 5' terminal of biotin-modified aptamer specific to RBP4 was first reacted with neutravidin followed by spraying the mixture on the membrane in order to immobilize the aptamer in a porous membrane by the strong binding affinity between biotin and neutravidin. Carbon nanodot@silica nanoparticles with blue fluorescent signal covalently conjugated to the RBP4 antibody, and RBP4 were injected in a lateral flow manner on to the surface bound aptamer to form a sandwich complex. Surfactant concentrations, ionic strength, and additional blocking reagents were added to the running buffer solution to optimize the fluorescent signal off from the sandwich complex which was correlated to the concentration of RBP4. A 10 mM Tris (pH 7.4) running buffer containing 150 mM NaCl and 0.05% Tween-20 with 0.6 M ethanolamine as a blocking agent showed the optimum assay condition for carbon nanodot@silica-based LFIA. The results indicate that an aptamer, more economical and easier to store for a long time can be used as an alternative immobilizing probe for antibody in a LFIA device which can be used as a point-of-care diagnosis kit for lung cancer diseases.

Keywords: Carbon nanodots@silica, Lateral flow immunoassay, Lung cancer, Retinol-binding protein 4, Aptamer-antibody binding

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

1. 서 론

폐암은 암 발생 초기에 증상이 없어 진행 단계에서 발견되는 경우가 많기 때문에 진단 후 5년 이내 생존율이 20% 이하로 낮은 치명적인 질병이다[1]. 따라서 조기 폐암 진단은 치료 및 생존에 매우 중요한 영향을 끼친다[2]. 저선량 컴퓨터단층촬영, 기관지 내시경 검사, 흉부 방사선과 같은 보편적인 폐 검진 검사가 암일 가능성이 있는 폐의 이상 부위를 찾는데 도움이 될 수 있지만[3-5], 이러한 방법에는 거짓 양성 영상 결과와 높은 방사선에 의한 피폭 및 침습적 진단 절차 등에 대한 여러 잠재적 위험이 있다[3]. 이와 같은 영상 진단 기술의 한계를 극복하고 폐암을 초기에 발견하기 위해서는 시료 채취 방법이 비침습적이며, 낮은 거짓 양성 결과 및 저렴한 비용의 빠르고 간편한 진단 방법 개발이 시급하다. 폐암 환자에게서 정상인 대비 발현 정도가 높은 단백질 바이오마커를 진단에 이용하는 것은 영상 진단 기술의 한계를 극복할 수 있는 진단 방법이 될 것이다[6,7].

폐암 특이적 혈액 단백질 바이오마커로는 태아성암항원, 암 항원 125, 사이토케라틴-19 분절, 신경 특이 에놀라제[8,9], 레티놀 결합 단백질 4 (retinol-binding protein 4, RBP4) 등이 있는데 이중 RBP4는 폐암 환자의 혈청에서 높은 발현도를 보이기 때문에 유망한 폐암 혈청 바이오마커 중 하나이다[10]. 따라서 폐암의 조기 진단을 위해 특정 바이오마커를 이용한 현장진단검사(point-of-care testing, POCT)를 개발하는 것은 말기 폐암 예방의 주요 노력 중 하나로 사료된다[11,12]. 효소결합면역흡착검사, 미세유체 칩, 측면 유동 면역 분석법(lateral flow immunoassay, LFIA) 및 전기화학 센서와 같은 다양한 POCT 분석법 중에서 LFIA는 상대적으로 빠르고 간편하게 표적 단백질 바이오마커를 검출할 수 있어서 폐암 진단에 유용하게 활용될 수 있다[13,14].

LFIA는 보통 샌드위치 복합체를 형성하기 위한 요소로서 항체-항체 쌍을 이용하지만, 항체의 경우 생산 시 재현성이 떨어지며 상온에서 비가역적인 변성이 일어나 LFIA 제작 및 재현성 있는 정량 분석에 어려움이 있다[15]. 반면 압타머는 짧은 올리고뉴클레오타이드로서, 항체와 유사한 높은 친화력을 가지면서도 장기적인 안정성을 가지고 있기 때문에 항체 대신 LFIA에 이용될 수 있다. 제품 품질의 재현성이 높은 압타머를 LFIA에 사용할 경우 높은 정밀도 및 정확도를 갖는 결과를 얻을 수 있고, 상온에서 장기간 보관을 용이하게 할 수 있다[16]. 또한 기존 LFIA는 신호를 확인하기 위한 검출 라벨로 금 나노입자를 사용하는데, 금 나노입자는 상대적으로 고가의 재료임에도 검출 감도가 낮다는 단점이 있다[17-19]. LFIA에 형광 나노입자를 사용할 경우 검출 감도를 개선할 수 있는데[20], Lee 등은 최근 LFIA에서 인간 혈청 아밀로이드 A1의 검출 감도를 개선하기 위한 저비용 형광 라벨로 탄소 나노점@실리카(CND@SiO₂) 나노입자를 소개했다[21].

본 연구에서는 RBP4 검출의 감도를 개선하기 위해 CND@SiO₂를 형광 신호 레이블링 재료로 이용하고, 장기간 보관이 가능하며 우수한 친화력 및 경제성이 뛰어난 LFIA를 설계하기 위한 압타머-항체 샌드위치 면역분석 기술을 개발하고자 하였다. LFIA에서 가장 많이 사용되고 있는 항체 대신 압타머의 5' 말단을 비오틴으로 변형하여 비오틴-뉴트라비딘 상호작용을 통해 압타머를 맵트레인에 고정하였다. 압타머는 항체보다 상대적으로 크기가 작고 단백질 접힘으로 만들어진 3차원 구조가 풀리기 쉽다는 특징을 가지고 있다. 이로 인해 압타머는 LFIA 맵트레인의 기공 크기 및 전개 용액 속 여러 성분에 의한 영향을 받으며, 측방 흐름을 통해 이동한 항원 및 항체로 코팅된 신호 형질 소재와 샌드위치를 형성하는 데 어려움이 많았다. 이를 해결하기 위해 전개 완충용액의 조건, 특히 이온세기, 계면활성제 농도 및

블로킹 시약 첨가 등의 실험 조건 최적화를 통해 표적 단백질 및 CND@SiO₂-항체와 샌드위치 복합체 형성 유무를 확인하였다. 최적화된 분석 조건은 더 나아가 폐암 진단에 있어서 잠재적인 응용에 활용 가능할 것으로 사료된다.

2. 실험

2.1. 시약 및 재료

Citric acid (Sigma-Aldrich), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES, Sigma-Aldrich), ammonium hydroxide (Sigma-Aldrich), sodium citrate (Sigma-Aldrich), tetraethyl orthosilicate (TEOS, Sigma-Aldrich), dimethylformamide (DMF, Sigma-Aldrich), N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, Thermo Scientific), Tris-HCl (Sigma-Aldrich), sodium chloride (NaCl, Sigma-Aldrich), N-hydroxysulfosuccinimide (NHSS, Thermo), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES, Sigma-Aldrich), succinic anhydride (Sigma-Aldrich), phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4, Gibco), neutravidin (Thermo Scientific), Tween-20 (Sigma-Aldrich), non-fat dried milk (NFDM, Sigma-Aldrich), casein (Sigma-Aldrich), ethanolamine (ETA, Sigma-Aldrich), goat anti-mouse IgG polyclonal antibody (Arista Biologicals), bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich), retinol-binding protein 4 recombinant protein (RBP4, Mybiosource), mouse anti-human RBP4 monoclonal antibody (anti-RBP4, MyBiosource)는 특별한 처리 없이 구입한 시약 그대로 사용하였다. RBP4에 특이적으로 결합하며 5' 말단을 비오틴으로 변형한 DNA 압타머는 Integrated DNA Technologies사로부터 공급받아서 사용하였으며, 그 서열은 다음과 같다. 5'-5Biosg/ATA CCA GCT TAT TCA ATT ACA GTA GTG AGG GGT CCG TCG TGG GGT AGT TGG GTC-3'[22,23].

2.2. 카르복실화된 CND@SiO₂ 나노입자 합성 및 항체 기능성 도입

CND@SiO₂는 Lee 등[21]이 보고한 방법을 이용하여 합성하였다. 간단히 서술하자면, 질소 가스를 흘려주면서 APTES 15 mL와 시트르산 1 g의 혼합물을 3구 둥근 바닥 플라스크에 넣고 240 °C로 가열하여 CND-APTES 용액을 제조하였다. 상기 용액에서 응집된 입자를 제거하기 위해 15000 rpm으로 20 분 동안 원심 분리한 후 상층액을 수집하였다. 다음으로 CND-APTES (0.2 mL), TEOS (1 mL), 수산화 암모늄(0.3 mL), 에탄올(5 mL) 및 증류수(3 mL)를 혼합한 뒤 4 시간 동안 반응시켜 콜로이드 CND@SiO₂ 나노입자를 얻었고, 과량의 반응물을 제거해주기 위해 원심분리를 이용하여 에탄올로 세 번 세척하였다. 합성한 CND@SiO₂의 표면에 카르복실기를 도입하기 위해 에탄올에 100 mg의 CND@SiO₂, 0.2 mL의 NH₄OH 및 0.15 mL의 APTES를 넣고 4 시간 동안 반응시켰다. 상기 용액을 13000 rpm에서 원심 분리하여 상층액을 제거함으로써 나노입자를 세척하였고, 세척한 입자를 DMF (1 mg/mL)에 분산시켜 12 시간 이상 동안 석신산 무수물 0.6 g과 반응시켰다. 그 결과 표면에 카르복실화 처리된 CND@SiO₂ 나노입자를 합성되었으며, 이를 MES 완충용액(10 mM, pH 6.0)으로 씻어준 후 MES 완충용액에 분산시켰다. 합성한 CND@SiO₂의 광학적 특성은 UV-Vis (UV-1800 Shimadzu) 및 형광(Agilent Technologies) 분광광도계를 이용하여 측정하였으며, 입자 크기는 투과전자현미경(TEM, Hitachi HT 7700)과 나노입자 추적 분석(Malvern Nanosight NS 300) 장비를 이용하여 관찰하였다.

LFIA 스트립에서 샌드위치 복합체를 형성할 수 있도록 RBP4에 특이적인 항체에 존재하는 무작위의 아민기와 합성한 CND@SiO₂ 나노

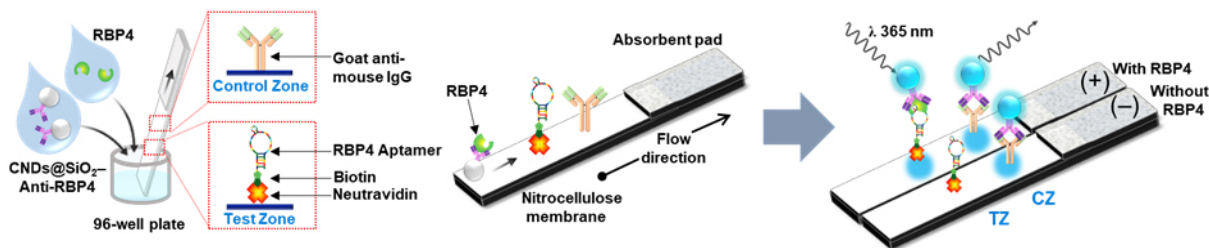


Figure 1. Schematic illustration of an aptamer-antibody-based lateral flow immunofluorescence assay (LFIA) for detection retinol-binding protein 4 (RBP4).

입자의 카르복실기를 EDC/NHSS 크로스링커를 이용하여 공유적으로 결합시켰다. 간단히 말하면, 2 mg의 카르복실화 한 CND@SiO₂와 0.4 mg의 EDC 및 0.6 mg의 NHSS를 1 mL의 MES 완충용액에 첨가한 후 상온에서 교반하면서 20 분 간 반응시키고, 그 후 기능기로 표면이 활성화된 CND@SiO₂ 나노입자를 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 이를 100 µg의 anti-RBP4 단일 클론 항체를 포함하는 PBS (pH 7.4) 완충용액 0.5 mL에 재분산하여 2 시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 혼합물을 5% w/v BSA가 함유된 PBS 완충용액 0.5 mL에 재분산시킨 후 30 분 간 반응시킴으로써 항체와 공유 결합된 나노입자 표면을 BSA로 블로킹하였다. 최종적으로 anti-RBP4가 도입된 CND@SiO₂ 나노입자를 9000 rpm에서 10 분 간 원심 분리하여 1%의 BSA를 함유하고 있는 PBS (pH 7.4) 완충용액에 저장하였다.

2.3. LFIA 형광 스트립 제작 및 RBP4 항원 검출 방법

본 논문에서는 LFIA 분석을 스팟 테스트 형태로 진행하였고, 스트립의 구조는 Figure 1에 설명되어 있으며 제작 방법은 다음과 같다. 먼저 니트로셀룰로오스(nitrocellulose, NC) 멤브레인(30 × 2.5 cm, whatman AE99)과 흡습패드(30 × 2 cm Worgina)를 백킹카드(30 × 6 cm Worgina)에 부착한 뒤 각 0.38 cm 너비로 자른다. 스트립에 압타머를 고정시키기 위해 5' 말단이 비오틴으로 변형된 RBP4 압타머(2 mg/mL) 0.1 mL와 뉴트라비딘(2 mg/mL) 0.1 mL를 혼합하여 2 시간 동안 교반하면서 반응시킨다. 단백질 정제 필터(amicon ultra-0.5 centrifugal filter, MWCO: 10000 Da, Merck)를 사용하여 반응한 용액을 13600 rpm에서 20 분 동안 원심 분리한 후 상층액을 제거함으로써 반응하지 않고 과량으로 존재하는 압타머를 제거하였다. 상기 뉴트라비딘-비오틴기로 변형된 RBP4 압타머 용액을 NC 멤브레인에 떨어뜨려 테스트 존(test zone, TZ)을 만들고, TZ과 겹치지 않게 IgG 항체를 떨어뜨려 컨트롤 존(control zone, CZ)을 만들어 LFIA 스트립을 제작하였으며, 이를 37 °C에서 3 시간 정도 건조시킨 뒤 4 °C에서 보관하였다. 제작한 LFIA 스트립을 이용하여 RBP4 항원 검출 가능 여부를 테스트하기 위해 96-웰 플레이트에 CND@SiO₂-anti RBP4 2.5 µL를 넣고, 서로 다른 농도의 RBP4 항원이 함유된 PBS 완충용액 10 µL를 넣은 후 20 µL의 전개 완충용액을 넣었다. 상기 웰에 스트립을 20 분 동안 담근 후 365 nm 파장의 자외선을 조사하여 스팟의 형광 발색 정도를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 압타머-항체 기반 샌드위치 분석법 및 CND@SiO₂의 특성 조사

본 논문에서 제작한 압타머-항체 샌드위치 형성을 통해 RBP4 단백질을 검출하기 위한 LFIA 분석법의 모식도를 Figure 1에 나타내었다.

먼저 뉴트라비딘-비오틴기로 변형된 RBP4 압타머 결합체를 TZ으로, goat anti-mouse IgG는 CZ으로 NC 멤브레인 표면에 고정하였다. RBP4 항원과 함께 CND@SiO₂-anti-RBP4를 웰에 넣어주면 측면 유동 방식에 따라 NC 멤브레인 스트립에서 전개되어 TZ에 고정 되어있는 RBP4 압타머와 결합하여 샌드위치 복합체를 형성하게 되고, 이에 자외선(365 nm)을 조사하면 복합체에 있는 CND@SiO₂로 인해 청색 형광 신호를 관찰할 수 있다. 그리고 RBP4 항원과 결합하지 않고 남은 CND@SiO₂-anti-RBP4는 TZ을 지나 CZ에 고정되어 있는 IgG에 의해 포획되어 CZ에서도 청색 형광 신호를 관찰할 수 있게 된다(Figure 1 오른쪽 그림 참조). 무엇보다도, TZ에서 압타머/RBP4/CND@SiO₂-anti-RBP4 샌드위치 복합체는 압타머가 RBP4와 결합하기 위한 정확한 3차원 구조를 형성하고 있는 경우에만 달성될 수 있어서[24], 멤브레인 내에서 압타머의 구조를 유지하는 것이 중요하다[16].

LFIA 스트립상에 압타머/RBP4/CND@SiO₂-anti-RBP4 샌드위치 복합체가 형성되었을 때 압타머 및 항체가 항원과 결합하는 것과 별개로, LFIA의 또 다른 핵심 요소는 검출 신호 형질인 CND@SiO₂ 나노입자이다. Figure 2(a)의 TEM 사진에서 확인할 수 있듯이 상기 나노입자는 직경 약 50 nm로 일정한 크기 및 모양의 구형 구조를 가지고 있으며, Figure 2(a)의 오른쪽에서 보이듯이 용액에 분산된 CND@SiO₂는 365 nm 파장의 UV 램프로 비추었을 때 파란색 형광색을 나타낸다. 나노입자 추적 분석 방법을 통해 확인한 CND@SiO₂ 구형 입자의 평균 크기 역시 약 50 nm이었으며(Figure 2(b)), 이는 NC 멤브레인의 기공(8 µm)을 관통하여 스트립을 따라 측면 유동 방식에 의해 흐르기에 적절한 크기임을 확인하였다. Figure 2(c)의 UV-vis와 형광 분석 결과에서 보듯이 CND@SiO₂는 342 nm에서 최대 흡수 피크를 보이며 439 nm에서 형광 방출 피크를 나타내는데, 이는 CND@SiO₂가 CND 자체의 청색 형광 특성을 유지함을 알 수 있다[25].

3.2. CND@SiO₂ 기반 LFIA 스트립을 이용한 RBP4 항원 검출

TZ에서 압타머/RBP4/CND@SiO₂-anti-RBP4 샌드위치 복합체가 형성되어 RBP4 농도변화에 따라 형광신호가 증가되는 방법을 이용하여 표적 단백질인 RBP4를 검출하기 위해서는 두 가지 실험 조건(전개 완충용액, 블로킹 시약)의 최적화가 중요하다. 특히 항체 대신에 사용한 작은 분자량의 압타머가 TZ에서 정확한 3차원 구조를 유지하여 RBP4와 결합하기 위해서는 전개 완충용액의 최적화가 무엇보다도 중요한 인자이다. 따라서 전개 완충용액에 첨가한 계면활성제의 농도 및 이온 세기를 변화시키면서 압타머/RBP4/CND@SiO₂-anti-RBP4 샌드위치 복합체 형성 유무를 관찰하였다. 이와 함께 LFIA 스트립에서 표적 단백질이 없음에도 멤브레인과 생물질의 비특이적인 흡착에 의하여 양성 신호를 보이는 거짓 양성 반응을 줄이기 위해 멤브레인에 블로킹 시약을 추가적으로 사용하였다. 이때 양성 반응을 확인

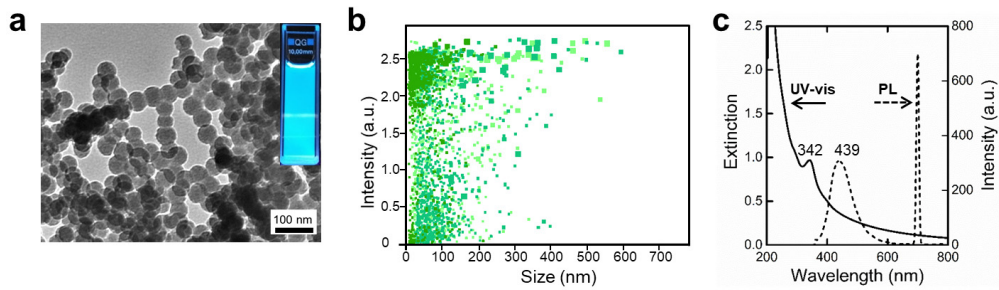


Figure 2. Characterization CND@SiO₂ as signal reporters for lateral flow immunofluorescence assay. (a) Transmission electron microscopy (inset: CND@SiO₂ in PBS), (b) nanoparticles tracking analysis, and (c) UV-vis and fluorescence spectrophotometer.

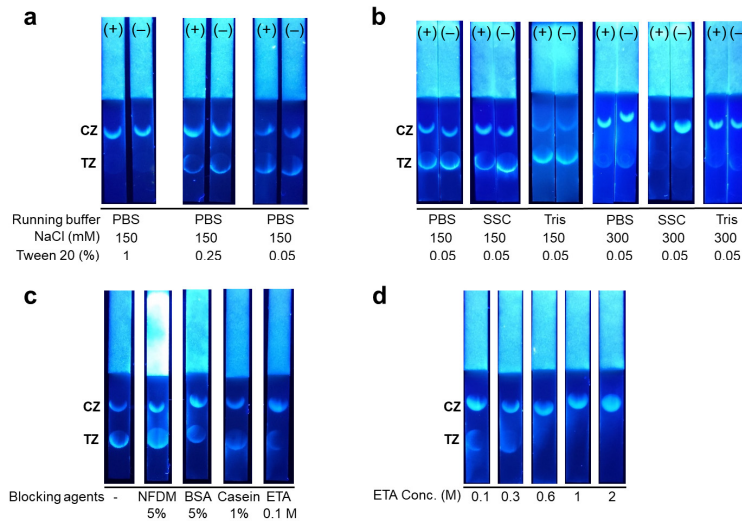


Figure 3. Optimization of an aptamer-antibody-based lateral flow immunofluorescence assay (LFIA) for detection retinol-binding protein 4 (RBP4). The effect of difference parameter on running buffer formulation: (a) variety of Tween-20 concentration, (b) the difference on buffer solutions and concentration of salts. The negative sign (-) represents to the absence of RBP4 protein, while the positive sign (+) represents to the presence of RBP4 with fixed concentration of 150 nM. (c) different used of blocking agents; non-fat dried milk (NFDM), casein, ethanolamine (ETA), and bovine serum albumin (BSA) (d) increasing concentration of ethanolamine as a selected blocking agent.

하기 위해 사용한 RBP4 항원의 농도는 150 nM이다. Figure 3(a)는 10 mM PBS (pH 7.4) 완충용액에 150 mM NaCl을 넣은 조건에서 계면활성제인 Tween-20를 첨가제로 사용하여 농도를 변화시키며 관찰한 결과를 나타내었다. 본 연구에서는 Tween-20을 계면활성제로 선택하였는데 그 주된 이유는 CND@SiO₂의 응집을 최소화하고 압타머와 표적 단백질의 결합력에 그 영향력이 작기 때문이었다[21,26]. 전개용액에 첨가한 계면활성제의 농도를 1에서부터 0.05%로 낮춰 가며 압타머/RBP4/CND@SiO₂-anti-RBP4 샌드위치 복합체 형성에 의한 CND@SiO₂ 형광검출 신호를 관찰한 결과, Tween-20 첨가제의 농도를 0.25 및 0.05%로 하였을 때 TZ에 형광 신호가 나타났으며, 스트립에 고정된 압타머가 표적 단백질과 결합함을 확인할 수 있었다. 하지만 Tween-20의 농도를 0.25% 이상으로 첨가하였을 경우 TZ에서 압타머의 3차원 구조를 변화시켜 표적 단백질과의 결합을 방해할 가능성이 더 높아져 상대적으로 형광세기가 감소함을 확인할 수 있었다[26]. 따라서 압타머의 3차원 구조를 변화시키지 않으면서 표적 단백질과의 결합 능력을 유지하여 검출 민감도를 높일 수 있도록 전개 완충용액에 첨가하는 최적의 Tween-20 농도를 0.05%로 선택하였다.

압타머-항원-항체 샌드위치 복합체의 형성에 대한 이온 세기의 영

향을 조사하기 위해 완충용액의 종류와 염의 농도를 변화시키면서 실험을 수행하였다. LFIA에서 항체 대신 압타머를 사용 시 주로 사용되는 완충용액인 PBS (10 mM, pH 7.4), saline-citrate (SSC, 10 mM, pH 7.4), Tris (10 mM, pH 7.4)를 선택하여 앞에서 확인한 최적 농도(0.05%)의 Tween-20을 각각 첨가한 뒤 다른 농도의 NaCl을 넣어 비교하였다. 그 결과 Figure 3(b)에서 보이는 것처럼 150 mM NaCl이 포함된 상기 3종의 완충용액을 전개 완충용액으로 사용하였을 때 300 mM NaCl이 포함된 3종의 완충용액 각각을 사용했을 때보다 TZ에서 상대적으로 더 강한 형광 검출 신호를 볼 수 있었다. 이러한 결과는 완충용액의 종류에 상관없이 염인 NaCl의 농도가 압타머-항원-항체 샌드위치 복합체 형성에 좀 더 큰 영향을 미치는 요소임을 보여준다. 본 논문에서는 150 mM NaCl과 0.05% Tween-20을 첨가한 10 mM Tris 완충용액이 다른 완충용액보다 TZ에서 압타머/RBP4/CND@SiO₂-anti-RBP4 샌드위치 복합체가 형성되어 나타내는 CND@SiO₂의 형광 검출 신호가 가장 강하였기 때문에 이를 최적의 전개 완충용액으로 선택하였다.

RBP4 항원이 없음에도 비특이적인 반응에 의해 TZ에서 형광 신호가 나타나는 거짓 양성 신호 문제를 해결하기 위해 NC 멤브레인 표면에 각기 다른 종류의 블로킹 시약, 즉 5% NFDM, 5% BSA, 1% Casein,

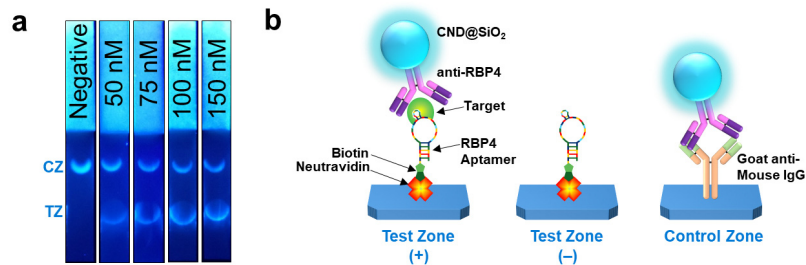


Figure 4. Detection of retinol binding protein 4 using the optimum of an aptamer-antibody-based lateral flow immunofluorescence assay (LFIA) with carbon nanodots@SiO₂. (a) The half strip tests show the detection RBP4 in Tris buffer solutions with concentration range of 0 – 150 nM. (b) The illustration of binding mechanism in TZ and CZ with the presence or absence of target RBP4.

0.1 M ETA를 사용한 뒤 양성 및 음성 형광 신호 결과를 비교하였다 (Figure 3(c)). 본 논문에서 사용한 각각의 블로킹 시약 초기 농도는 문헌에 보고된 멤브레인 표면의 비특이적 흡착을 줄일 수 있는 가장 효과적인 블로킹 농도를 사용하였다[27-29]. Figure 3(c)에서 볼 수 있듯이 5% NFDM을 사용했을 경우 RBP4 항원이 없음에도 TZ에 더 높은 형광 신호가 생성되는데, 이러한 광학적 노이즈는 자외선을 흡수하여 파란색 형광을 방출하는 NFDM의 생물학적 구성 요소가 복잡하기 때문으로 추측된다[29]. 그러므로 거짓 양성 결과를 보이는 이유인 비특이적 반응을 최소화하기 위해서는 5% BSA, 1% Casein 또는 0.1 M ETA를 사용해야 하는데, 그 중 ETA가 RBP4가 없을 때 TZ의 형광 신호를 가장 효과적으로 감소시키는 것을 볼 수 있었다(Figure 3c). 최종적으로 멤브레인에 사용한 ETA의 농도를 증가시키며 확인한 결과, 0.6 M의 ETA가 비특이적 반응을 충분히 최소화시킴을 알 수 있었다.

따라서 TZ에서 aptamer/RBP4/CND@SiO₂-anti-RBP4 샌드위치 복합체가 형성됨으로써 RBP4 항원을 검출하기 위한 최적의 전개 용액 조건으로 150 mM의 NaCl과 0.05% Tween-20를 함유하고 있는 10 mM Tris (pH 7.4) 완충용액을 사용하였고, 멤브레인 블로킹 시약은 0.6 M의 ETA를 적용하였다. 검체패드와 축합패드를 잘라낸 형태인 half-스트립을 이용하였으며, RBP4의 농도변화에 따라 TZ에서 형성된 aptamer-항원-항체 샌드위치 복합체의 CND@SiO₂-검출 형광신호의 세기가 변화되는지 조사하였다. Figure 4(a)에서 보듯이 0, 50, 75, 100 및 150 nM의 농도를 가지는 RBP4를 완충용액 조건에서 테스트한 결과, RBP4 항원이 없을 때(0 nM)는 UV 램프(365 nm) 아래에서 청색 형광 신호로 한 개의 스팟(CZ)이 나타나는 것을 확인하였고, RBP4 항원이 있을 때는 두 개의 즉, TZ와 CZ에서 모두 청색 형광 스팟 신호를 확인하였으며, 이와 함께 항원의 농도가 증가함에 따라 TZ의 형광 신호 강도가 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Figure 4(b)에서 보듯이 RBP4 항원이 있을 경우 TZ에 고정된 aptamer 위에서 CND@SiO₂-anti-RBP4와 RBP4 항원이 결합하며 샌드위치 복합체를 형성하여 CND에 의한 형광 신호를 내고, RBP4 항원이 없을 경우에는 TZ에 CND@SiO₂-anti-RBP4가 aptamer와 결합하지 않아 샌드위치 복합체가 형성되지 않아서 형광 신호를 나타내지 않기 때문이다. 그리고 두 경우 모두 항원과 결합하지 않은 CND@SiO₂-anti-RBP4가 CZ의 IgG 항체와 결합하면서 CZ 스팟에서 형광 신호를 나타내었으며, 이는 측면 유동 면역 분석이 잘 일어남을 보여준다. 이러한 half-스트립 테스트 결과를 통해 CND@SiO₂를 검출 라벨로 접목하여 설계한 aptamer-항체 기반 LFIA가 폐암 바이오마커인 RBP4 검출에 이용될 수 있음을 확인했다.

4. 결 론

본 논문에서는 폐암 단백질 바이오마커인 RBP4 항원 검출을 위해 CND@SiO₂를 검출 라벨로 접목한 aptamer-항체 기반 LFIA를 개발하였으며, TZ에 청색 형광 신호를 나타냄으로써 aptamer/RBP4/CND@SiO₂-anti-RBP4 샌드위치 복합체가 성공적으로 형성되었음을 확인했다. 기존 LFIA 칩에 주로 사용되었던 항체 대비 aptamer는 크기가 작고 3차원 구조를 유지하기 어렵기 때문에 LFIA 멤브레인에 고정 및 신호 검출이 어려웠다. 이를 해결하기 위하여 5' 말단이 비오틴으로 변형된 RBP4 aptamer와 뉴트라비딘의 상호작용을 이용하여 니트로셀룰로오스 멤브레인에 aptamer를 고정시켰으며, aptamer의 안정화된 구조가 유지되는 실험 조건, 즉 최적의 계면활성제의 종류 및 농도, 이온 세기를 선정하기 위한 실험을 체계적으로 수행하였다. 그 결과 150 mM NaCl 및 0.05% Tween-20를 첨가한 10 mM Tris (pH 7.4) 완충용액을 전개 완충용액으로 사용하였을 때 최적의 형광 분석 신호를 보이는 것을 확인하였다. 이와 함께 멤브레인에 0.6 M ETA를 블로킹 시약으로 사용하여 비특이적 반응에 의한 CND@SiO₂의 거짓 양성 형광 신호를 최소화하였다. RBP4 항원의 유무를 형광 신호로 간편하게 확인할 수 있는 본 연구의 결과는 항체 대신 aptamer를 사용하여 경제적이고 장기간 보관이 용이한 폐암 진단용 키트에 활용 가능성을 시사하였다.

Acknowledgment

This research was supported by Kyungpook National University Development Project Research Fund, 2019.

References

1. J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, C. Mathers, D. M. Parkin, M. Pineros, A. Znaor, and F. Bray, Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods, *Int. J. Cancer*, **144**, 1941-1953 (2019).
2. D. Mathios, J. S. Johansen, S. Cristiano, J. E. Medina, J. Phallen, K. R. Larsen, D. C. Bruhm, N. Niknafs, L. Ferreira, V. Adleff, J. Y. Chiao, A. Leal, M. Noe, J. R. White, A. S. Arun, C. Hruban, A. V. Annapragada, S. O. Jensen, M. W. Orntoft, A. H. Madsen, B. Carvalho, M. de Wit, J. Carey, N. C. Dracopoli, T. Maddala, K. C. Fang, A. R. Hartman, P. M. Forde, V. Anagnostou, J. R. Brahmer, R. J. A. Fijneman, H. J. Nielsen, G. A. Meijer, C. L.

- Andersen, A. Mellemegaard, S. E. Bojesen, R. B. Scharpf, and V. E. Velculescu, Detection and characterization of lung cancer using cell-free DNA fragmentomes, *Nat. Commun.*, **12**, 5060 (2021).
3. C. Rampinelli, D. Origgi, and M. Bellomi, Low-dose CT: technique, reading methods and image interpretation, *Cancer Imaging*, **12**, 548-556 (2013).
 4. P. Lee and H. G. Colt, Bronchoscopy in lung cancer: appraisal of current technology and for the future, *J. Thorac. Oncol.*, **5**, 1290-1300 (2010).
 5. J. K. Gohagan, P. M. Marcus, R. M. Fagerstrom, P. F. Pinsky, B. S. Kramer, P. C. Prorok, S. Ascher, W. Bailey, B. Brewer, T. Church, D. Engelhard, M. Ford, M. Fouad, M. Freedman, E. Gelmann, D. Gierada, W. Hocking, S. Inampudi, B. Irons, C. C. Johnson, A. Jones, G. Kucera, P. Kvale, K. Lappe, W. Manor, A. Moore, H. Nath, S. Neff, M. Oken, M. Plunkett, H. Price, D. Reding, T. Riley, M. Schwartz, D. Spizarny, R. Yoffie, and C. Zylak, Final results of the Lung Screening Study, a randomized feasibility study of spiral CT versus chest X-ray screening for lung cancer, *Lung Cancer*, **47**, 9-15 (2005).
 6. H. Mamdani, S. Ahmed, S. Armstrong, T. Mok, and S. I. Jalal, Blood-based tumor biomarkers in lung cancer for detection and treatment, *Transl. Lung Cancer Res.*, **6**, 648-660 (2017).
 7. C. Min, H. Ha, and J. Jeon, Development of fluorescent small molecules for imaging of alzheimer's disease biomarkers, *Appl. Chem. Eng.*, **32**, 1-9 (2021).
 8. A. Scott and R. Salgia, Biomarkers in lung cancer: from early detection to novel therapeutics and decision making, *Biomark. Med.*, **2**, 577-586 (2008).
 9. S. H. 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).
 10. E. F. Patz, Jr., M. J. Campa, E. B. Gottlin, I. Kusmartseva, X. R. Guan, and J. E. Herndon II, Panel of serum biomarkers for the diagnosis of lung cancer, *J. Clin. Oncol.*, **25**, 5578-5583 (2007).
 11. B. Hayes, C. Murphy, A. Crawley, and R. O'Kennedy, Developments in point-of-care diagnostic technology for cancer detection, *Diagnostics*, **8**, 39 (2018).
 12. H. Tian, C. Yuan, Y. Liu, Z. Li, K. Xia, M. Li, F. Xie, Q. Chen, M. Chen, W. Fu, and Y. Zhang, A novel quantification platform for point-of-care testing of circulating MicroRNAs based on allosteric spherical nanoprobe, *J. Nanobiotechnology*, **18**, 158 (2020).
 13. P. Zhou, F. Lu, J. Wang, K. Wang, B. Liu, N. Li, and B. Tang, A portable point-of-care testing system to diagnose lung cancer through the detection of exosomal miRNA in urine and saliva, *Chem. Commun.*, **56**, 8968-8971 (2020).
 14. A. Fajri, E. Goh, S. H. 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).
 15. V. Thivyanathan and D. G. Gorenstein, Aptamers and the next generation of diagnostic reagents, *Proteomics Clin. Appl.*, **6**, 563-573 (2012).
 16. K. Urmann, J. Modrejewski, T. Scheper, and J. Walter, Aptamer-modified nanomaterials: principles and applications, *BioNanoMaterials*, **18**, 1-2 (2017).
 17. X. Chen, X. Miao, T. Ma, Y. Leng, L. Hao, H. Duan, J. Yuan, Y. Li, X. Huang, and Y. Xiong, Gold nanobeads with enhanced absorbance for improved sensitivity in competitive lateral flow immunoassays, *Food*, **10**, 1488 (2021).
 18. 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).
 19. D. S. Kim and B. G. Choi, Preparation of surface functionalized gold nanoparticles and their lateral flow immunoassay applications, *Appl. Chem. Eng.*, **29**, 97-102 (2018).
 20. T. Mahmoudi, M. de la Guardia, and B. Baradaran, Lateral flow assays towards point-of-care cancer detection: A review of current progress and future trends, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **125**, 115842 (2020).
 21. M. Supianto, S. H. Lee, S. H. Jung, H. B. Mohammad, H. M. Vu, M.-S. Kim, W.-Y. Song, T.-Y. Kim, and H. J. Lee, Fluorescent paper strip immunoassay with carbon nanodots@silica for determination of human serum amyloid A1, *Microchim. Acta*, **188**, 386 (2021).
 22. S. J. Lee, B. S. Youn, J. W. Park, J. H. Niazi, Y. S. Kim, and M. B. Gu, ssDNA aptamer-based surface plasmon resonance biosensor for the detection of retinol binding protein 4 for the early diagnosis of type 2 diabetes, *Anal. Chem.*, **80**, 2867-2873 (2008).
 23. R. Torabi and H. Ghourchian, Ultrasensitive nano-aptasensor for monitoring retinol binding protein 4 as a biomarker for diabetes prognosis at early stages, *Sci. Rep.*, **10**, 594 (2020).
 24. N. Zhang, Z. Chen, D. Liu, H. Jiang, Z.-K. Zhang, A. Lu, B.-T. Zhang, Y. Yu, and G. Zhang, Structural biology for the molecular insight between aptamers and target proteins, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 4093 (2021).
 25. S. Mura, R. Ludmerczki, L. Stagi, S. Garroni, C. M. Carbonaro, P. C. Ricci, M. F. Casula, L. Malfatti, and P. Innocenzi, Integrating sol-gel and carbon dots chemistry for the fabrication of fluorescent hybrid organic-inorganic films, *Sci. Rep.*, **10**, 4770 (2020).
 26. A. M. Peterson, F. M. Jahnke, and J. M. Heemstra, Modulating the substrate selectivity of DNA aptamers using surfactants, *Langmuir*, **31**, 11769-11773 (2015).
 27. S. Dalirirad and A. J. Steckl, Aptamer-based lateral flow assay for point of care cortisol detection in sweat, *Sens. Actuators B: Chem.*, **283**, 79-86 (2019).
 28. Q. Yu, Q. Zhao, S. Wang, S. Zhao, S. Zhang, Y. Yin, and Y. Dong, Development of a lateral flow aptamer assay strip for facile identification of theranostic exosomes isolated from human lung carcinoma cells, *Anal. Biochem.*, **594**, 113591 (2020).
 29. T. Mahmood and P. C. Yang, Western blot: technique, theory, and trouble shooting, *N. Am. J. Med. Sci.*, **4**, 429-434 (2012).

Authors

- Mulya Supianto; M.Sc., Graduate Student, Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea; supianto.m@knu.ac.kr
- Jungmin Lim; B.Sc., Graduate Student, Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea; jungming4365@naver.com
- Hye Jin Lee; Ph.D., Professor, Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea; hyejinlee@knu.ac.kr