BSL Biomedical Science Letters

BSL 2024;30(4):325-334
https://doi.org/10.15616/BSL.2024.30.4.325
eISSN 2288-7415

Original Article

Development of One-step Vertical Flow Immunoassay System for Onsite Diagnosis Assisted by Surface-enhanced Raman Scattering

Ha-Young Cho[1,*] and Il-Hoon Cho[1,2,†,**]

[1]Department of Senior Healthcare, Eulji University, Seongnam 13135, Korea
[2]Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

ABSTRACT

Objectives: A study was conducted to address two major limitations of the vertical flow assay (VFA) used in point-of-care diagnostics: low sensitivity due to visual analysis, and the inconvenience of requiring multiple steps, such as washing.
Methods: To overcome these issues, in this study, the VFA was integrated with surface-enhanced Raman scattering (SERS) for high sensitivity and applied a one-step analysis method using a premix. The developed one-step SERS-based VFA system is labeled by a Raman probe consisting of detection antibodies, Raman reporter (4-mercaptobenzoic acid [4-MBA]), and gold nanoparticles, and is based on a sandwich system composed of capture antibodies and analytes. To facilitate immediate SERS measurement, a customized cartridge was designed to eliminate the need for removal before analysis. Sensitivity was further improved by optimizing the sample dilution buffer, concentration of the capture antibody, and size of gold nanoparticles embedded in the Raman probe.
Results: Using only 60 μL of analyte, the system exhibited excellent linearity (R^2 = 0.9988) up to 10 ng/mL, with a detection limit of 0.66 ng/mL for the C-reactive protein (CRP) antigen, outperforming traditional lateral flow and VFAs.
Conclusion: This is superior to the lateral flow assay and VFA, which use CRP antigen as a biomarker. It is emphasized that the developed one-step SERS-based VFA system can be used as a potential point-of-care testing tool for diagnosing various biomarkers as well as CRP.

Keywords: Vertical flow assay, Raman scattering, Point-of-care testing, Signal enhancement, Immunoassay

서 론

현장진단 검사(point-of-care testing, POCT)는 개인이 직접 사용할 수 있어 사용자 친화적이며 신속한 결과 분석이 가능하다는 장점이 있어 검사시설이 갖춰지지 않은 환경에서도 사용이 가능하다. 또한 다양한 질병의 진단에 큰 잠재력을 가지고 있어 검사 기술과 방식도 점점 더 발전하고 있다 [(1)].

POCT 중 종이 기반 진단 장치는 대량 생산의 용이, 저렴한 비용, 생체 적합성과 같은 장점들을 가지고 있어 많이 사용된다. 기존에 종이 기반 진단 장치로 많이 사용되었던 측면 유동 분석법

Received November 28, 2024; Revised December 17, 2024; Accepted December 17, 2024

†Corresponding author: Il-Hoon Cho
Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Eulji University, 553 Sanseong-daero, Sujeong-gu, Seongnam 13135, Korea
Tel: +82-31-740-7397, Fax: +82-31-740-7284
E-mail: ihcho@eulji.ac.kr
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-4991-2268
*Graduate student, **Professor.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences.

(lateral flow assay, LFA)은 수평으로 나열된 종이층에 모세관 현상에 의한 유체와 샘플의 흐름으로 간단한 조작이 가능하여, 시중에서 코로나-19 자가검사키트나 임신진단키트 등으로 많이 사용된다. 하지만 검사 중 용액이 측면으로 확산되는 데 비교적 오랜 시간이 걸리므로 높은 배경 신호가 생성되고 감도가 제한될 수 있으며, 항원이 높은 농도로 존재할 때 테스트 라인의 신호가 감소하는 후크 효과(hook effect)에 의해서 위음성 결과가 나올 수 있다 [2]. 또한 다중분석 시 앞에 위치한 테스트 라인의 간섭으로 인해 정확도가 떨어질 수 있다. LFA와 달리 종이 층을 쌓아 중력과 모세관 현상에 의해 샘플의 수직 흐름을 이용하는 수직 유동 면역 분석법(vertical flow assay, VFA)은 더 짧은 시간 내에 신속한 검사가 가능하며 라인에 의한 간섭이 없다. 또한 한 번에 여러 검사가 가능하고, 높은 검출 처리량이 가능하다 [3]. 게다가 접합패드나 샘플패드가 필요하고 LFA에 비해 적은 재료로 분석이 가능하므로 비용이 절감된다 [4]. 그러나 VFA는 붉은 신호를 육안으로 분석하기 때문에 정확하고 민감한 분석이 어렵다. 또한 대부분 추가적인 washing 과정이 포함되어 있어 복잡한 프로토콜로 인해 사용자가 검사하기에 번거로움이 있다.

VFA의 정확도와 민감도를 증가시키기 위해 신호의 발색세기를 형광 [5]과 같은 검출물질을 활용하여 정량분석을 진행하지만, 형광은 시간에 따라 신호 강도가 감소할 수 있으며, 광표백이 발생할 수 있고, 다중분석 시 신호 간 간섭과 같은 단점이 있다. 따라서 새로운 기술과 결합하는 것이 필요하다.

표면 증강 Raman 산란(surface-enhanced Raman scattering, SERS)은 최근 많이 연구되고 있는 분야로, 금, 은, 구리 등 금속 나노입자에 흡착된 분자의 Raman 세기를 최대 10^{11}배 이상까지 증가시키는 기술이다 [6]. SERS는 분석 시간이 짧고, 비파괴적인 분석법이며 초고민감도의 정량분석이 가능하다는 장점이 있다. 따라서 SERS와 VFA의 장점을 결합한 SERS 기반 VFA는 다양한 질병 진단을 위한 도구로 활용될 수 있다 [7,8].

본 연구에서는 VFA의 한계점을 극복하기 위해 2가지를 개선하였다. 먼저, 상기한 VFA의 추가적인 washing 과정으로 인한 사용자의 번거로움을 해결하였다. Washing 과정 없이 premix 과정을 통해 one-step으로 검사가 가능한 VFA 시스템을 구축하여 편리한 검사가 가능하도록 하였다. 또한 육안분석으로 인한 민감도와 정확도의 한계를 개선하고자 SERS와 결합하여 고민감도의 정량분석이 가능하도록 하였다. SERS 측정 시 카트리지를 제거해야 하는 불편함을 해결하기 위해 three-dimensional (3D) printer를 이용하여 프린팅한 맞춤형 카트리지는 즉시 SERS 측정이 가능하도록 제작하였다. 고안된 SERS 기반 VFA 시스템은 SERS 측정 부위인 nitrocellulose (NC) membrane에 항체를 고정한 뒤 1.5 mL 튜브에 detection 항체, Raman reporter, 금 나노입자가 포함된 Raman reporter와 항원을 mix하여 반응시키고 분주하여 타 플랫폼에 비해 민감한 SERS 신호를 보였다.

재료 및 방법

1. 재료

Absorption pad (17CHR, chromatography grade)는 Whatman에서 구매하였다. NC membrane 1 (CLW-040-SH34)은 Advanced Microdevices Pvt. Ltd. (MDI)에서 얻었다. NC membrane 2 (PW-90)는 Polywick Co., Ltd.에서 구매하였다. Gold (Ⅲ) chloride trihydrate ($HAuCl_4$), sodium citrate tribasic dihydrate ($C_6H_5Na_3O_7$), boric acid, 4-mercaptobenzoic acid (4-MBA), EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride), NHS (N-hydroxysuccinimide), bovine serum albumin (BSA), casein sodium salt from bovine milk, tween 20은 Sigma-Aldrich에서 구매하였다. Anti-h C-reactive protein (CRP) clones 6404와 6405는 Medix Biochemica에서 구매하였다. CRP antigen은 Hytest에서 구매하였다.

2. VFA 시스템 제작

1) 3D printer를 이용한 맞춤형 카트리지 제작

Autodesk fusion 360 소프트웨어를 사용하여 시스템 맞춤형 카트리지의 상판과 하판을 모델링하였으며, UNIZ 3D printer IBEE로 프린팅하였다. 카트리지의 내부를 모든 시야에서 볼 수 있도록 high clear resin (Anycubic)을 사용하였으며, 카트리지의 견고한 결합을 위해 상판과 하판의 6곳에 각각 원형구멍과 원기둥을 제작하였다. 또한 카트리지를 제거하지 않고도 바로 SERS 측정이 가능하도록 상판과 하판 모두 얇은 판의 형태로 디자인하였다. 카트리지 상판에는 sample inlet과 VFA result checking, SERS detection을 위한 창을 제작하였으며, 하판에는 NC membrane 1, 2, 흡수 패드가 동일한 위치에 고정되도록 지지대를 제작하였다(Fig. 1).

2) VFA 시스템 구성

VFA 시스템은 카트리지의 크기에 맞춰 제작되었으며, NC membrane 1, 2, 흡수패드, backing card로 구성되었고 모두 커팅 장비로 잘라 제작하였다. NC membrane 1은 3.9 × 15 mm, NC membrane 2는 3.9 × 25 mm 크기로 잘라 사용하였으며, 양면테이프는 3.9 × 10 mm, 흡수패드와 양면테이프가 부착되어

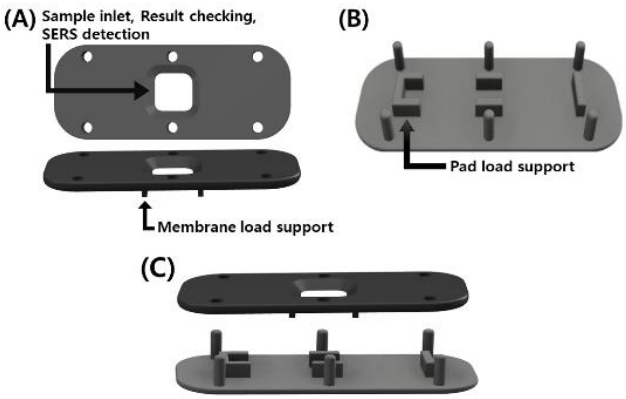

Fig. 1. The 3D-printed customized cartridges that allow for immediate SERS measurements without removing the cartridge. (A) The cartridge's top plate features six connection holes to the bottom plate, with a central opening designed for sample inlet, result checking, and SERS detection. A membrane load support section was also incorporated to securely position the membrane. (B) The bottom plate of the cartridge has six pillars for coupling with the top plate, and a pad load support part was manufactured to place the pad in the same position. (C) A schematic illustrates the assembled connection between the top and bottom plates of the cartridge. 3D, three-dimensional; SERS, surface-enhanced Raman scattering.

있는 backing card는 3.9 × 31 mm로 잘라 사용하였다. Backing card, 흡수패드, 양면테이프와 NC membrane 2를 차례로 부착한 뒤 카트리지 하판 틀에 끼워준다. 그 위에 NC membrane 1을 카트리지의 가운데로 위치시킨 뒤 카트리지 상판을 결합시켜 backing card, 흡수패드, NC membrane 1과 2를 고정시킨다. NC membrane 1 표면에 mouse anti-human CRP를 0.5% sucrose가 포함된 phosphate buffered saline (PBS)에 0.25, 0.5, 1 mg/mL 농도로 1 μL 분주 후 37℃에서 건조 후 사용하였다. 고정 농도는 최적화 과정을 거쳐 선정하였다.

3. Raman probe 제조

Raman probe 제조에 사용될 금 나노입자는 sodium citrate가 gold chloride trihydrate를 환원시키는 Turkevich 방법으로 합성하였다. 50 mL 삼각 플라스크에 deionized water 24.975 mL와 10% $HAuCl_4$ 25 μL를 분주하고 mix해준 뒤, magnetic bar를 넣고 hot plate 위에서 200℃로 가열하였다. 용액이 끓기 시작하면 200 rpm으로 교반 후 1% sodium citrate 용액을 각각 120, 150, 200 μL 분주하여 10분 동안 반응시킨다. 적절한 sodium citrate volume은 최적화를 통해 결정하였으며, 금 나노입자는 합성한 후 4℃에 보관하여 사용하였다. Glass tube에 제조한 금 나노입자 1 mL와 boric acid (pH 8.3)를 분주하고 혼합한 뒤 Raman reporter인 4-MBA를 금 나노입자와 실온에서 30분 동안 반응시킨다. 반응된 금 나노입자와 4-MBA를 1.5 mL 튜브에 옮겨 담고 금 나노입자에 흡착되지 않은 과량의 4-MBA를 제거하기 위해 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 boric acid 1 mL를 분주하였다. 새 glass tube에 옮겨 담은 후 EDC와 NHS를 분주하여 실온에 20분 동안 반응시킨 후, mouse anti-human CRP 항체를 borate buffer에 희석하여 실온에 60분 동안 반응시켰다. 1.5 mL 튜브에 옮긴 후, 비특이적 반응을 방지하고, 금 나노입자의 안정화를 위해 제조한 Raman probe 중합체를 1% BSA로 coating하여 30분간 실온에서 반응시켰다. 금 나노입자에 반응하지 않은 시료들을 제거하기 위해 14,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고, borate와 1% BSA 혼합액으로 상층액을 제거하여 세척하는 과정을 3회 반복하였다. 세척 완료 후 침전되어 있는 Raman probe 중합체를 20×로 농축하여 4℃에 보관하여 사용하였다(Fig. 2A).

4. Instruments

금 나노입자 용액의 ultraviolet visible (UV)-vis 스펙트럼은 Thermo Fisher Scientific의 Multiskan go 장비로 측정하였으며, dynamic light scattering (DLS)의 hydrodynamic diameter (nm)와 %polydispersity index (%PDI)는 Wyatt technology의 DynaPro Nanostar를 사용하여 측정하였다. 면역반응 후 SERS를 측정하기 위해 휴대용 Raman 분광계인 NS 200 (Nanoscope Systems Inc.)을 사용하였다. 레이저 파장, 레이저 세기(파워), 노출 시간과 레이저 스팟 직경은 각각 785.1 nm, 20 mW, 1 s, 20 μm로 사용하였다. 샘플을 x, y, z 샘플 스테이지에 놓고, 레이저는 SERS 강도를 최대화하기 위해 기판 표면에 초점을 맞추었다. 포커싱 후 NS-Raman ID ver. 5.0 소프트웨어를 사용하여 캡쳐 기판 내에서 5개의 Raman 스펙트럼을 수집하였으며, 스펙트럼은 기준선 보정과 Raman 스펙트럼의 형광 band가 제거된 상태로 데이터 분석에 사용되었다.

결 과

1. SERS 기반 VFA 시스템 원리

SERS 기반 VFA 시스템의 주요 구성요소는 하부 cartridge, backing card, double-sided tape, absorption pad, double-sided tape, NC membrane 2, NC membrane 1, 상부 cartridge이며 아래부터 순서대로 쌓여 있다. 시스템은 antigen과 antibody 사이의 면역반응을 이용하였다. NC membrane 1에

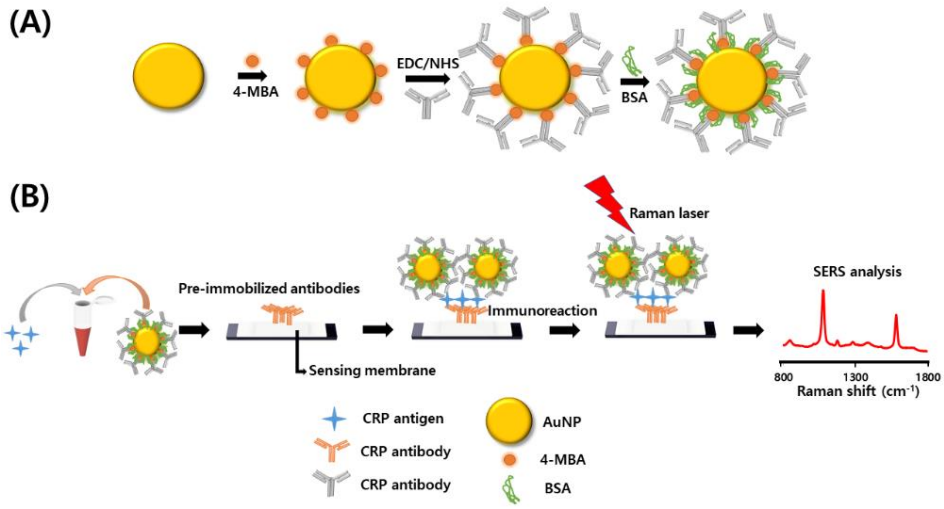

Fig. 2. The fabrication process of the Raman probe and the overall process of one-step SERS-based VFA. (A) A schematic illustrates the fabrication process of the Raman probe. Following the adsorption of 4-MBA onto the produced AuNPs, the unreacted 4-MBA is centrifuged, washed, and subsequently reacted sequentially with the EDC/NHS and CRP antibodies. BSA is then applied to the AuNPs' surface to stabilize them, and the unreacted material is extracted by centrifugation, three washings, and 20× concentration. (B) The schematic depicts the overall process of one-step SERS-based VFA. CRP antigen is mixed with the Raman probe in a 1.5 mL tube to allow a reaction. This mixture is then dispensed onto a sensing membrane with pre-immobilized antibodies, triggering an immunoreaction. After the immune reaction, the SERS spectrum is measured using a Raman laser for SERS analysis. SERS, surface-enhanced Raman scattering; VFA, vertical flow assay; 4-MBA, 4-mercaptobenzoic acid; AuNPs, gold nanoparticles; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride; NHS, N-hydroxysuccinimide; CRP, C-reactive protein; BSA, bovine serum albumin.

는 CRP antigen에 특이적인 mouse anti-h CRP IgG가 미리 load되어 있다. 첫 번째로 1.5 mL tube에 20×로 농축된 Raman probe 2 μL를 분주 후 분석물질 60 μL와 2분 동안 mix하여 분석물질에 포함된 CRP antigen을 Raman probe에 포함된 detection antibody와 반응시킨 Raman probe 복합체가 형성된다. 그 후 mix된 Raman probe 복합체를 카트리지 상판의 sample inlet 부분에 분주하였다. 카트리지 상판 membrane load support에 의해 Raman probe 복합체 용액이 가둬지는 동시에 capture antibody와 Raman probe 복합체가 반응하였다. 미반응된 Raman probe 복합체는 NC membrane 2를 통해 흡수패드로 이동되었다. 반응 완료 후 capture antibody가 미리 load된 substrate 위를 SERS 측정하였다(Fig. 2B). CRP antigen과 결합하지 않은 Raman probe는 NC membrane 2로 이동한 뒤 가로 흐름을 통해 흡수패드로 이동되었다(Fig. 3).

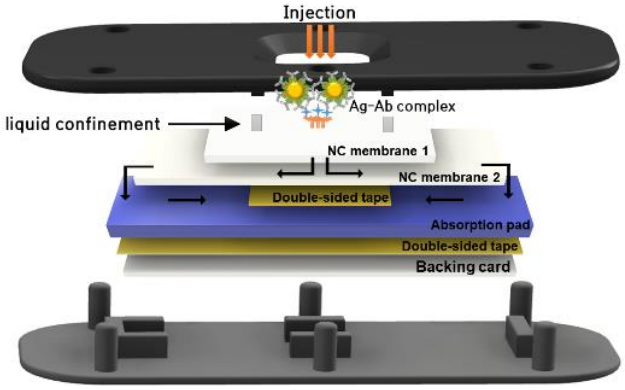

Fig. 3. The fabricated SERS-based vertical flow assay system. The cartridge lower plate, backing card, double-sided tape, absorption pad, double-sided tape, NC membrane 2, NC membrane 1, and cartridge upper plate are layered from the bottom. The cartridge top plate traps the liquid when the pre-reacted analyte and Raman probe are dispensed into the injection section, causing an antigen-antibody reaction on NC membrane 1. The unreacted Raman probe polymers pass through NC membrane 1 and move to NC membrane 2 along the horizontal flow and are then absorbed by the absorbent pad. SERS, surface-enhanced Raman scattering; NC, nitrocellulose.

2. SERS signal의 특징과 결과분석 방법

분석물질의 SERS signal은 Raman shift 1,076 cm^{-1}와 1,586 cm^{-1}에서 Raman reporter로 사용 중인 4-MBA의 구조에 의해 높게 나타났다. 그 중 더 높은 intensity가 나타나는 1,076 cm^{-1}

에서의 peak를 기준으로 결과를 분석하였다. 민감도를 비교하기 위해 상대적인 값인 Raman intensity 대신 signal to noise ratio (SNR)를 채택하였다. SNR은 Raman intensity noise 대비 분석물질의 Raman intensity이다. Raman intensity noise는 분석물질의 CRP antigen 농도가 0일 때 1,076 cm^{-1}에서의 Raman intensity를 나타내며, 분석물질의 Raman intensity는 1,076 cm^{-1}에서 분석물질의 Raman intensity를 나타낸다. VFA 시스템의 SNR value가 높을수록 민감도가 증가하며, 분석의 최적화를 위해 SNR value가 높은 조건을 선택하였다.

3. SERS 기반 VFA 시스템 조건 최적화

제작한 VFA system 성능을 최대화하기 위해서 CRP antigen dilution buffer, capture antibody 농도, 금 나노입자의 크기 실험 변수들을 최적화하였다. 최적화 실험의 재현성을 확인하기 위해 각각 다른 날에 3회에 걸쳐 독립적인 실험으로 수행되었다.

1) Sample dilution buffer 최적화

Sample dilution buffer는 항원과 항체의 비특이적 결합을 억제하고, 분석물질의 안정성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다. 특히 sample dilution buffer에 포함된 단백질의 유무와 종류에 따라 SERS intensity나 SNR이 달라질 수 있기 때문에 이를 확인하는 과정이 필요하다. Buffer에 단백질이 포함되지 않은 조건 (a)과 casein (b), BSA (c)가 포함된 조건을 비교하여 최적화하였다. (a) buffer는 0.1% tween 20 + PBS, (b) buffer는 0.5% casein + 0.1% tween 20 + PBS, (c) buffer는 0.5% BSA + 0.1% tween 20 + PBS로 구성되었다. 각 buffer를 비교하기 위해 CRP antigen의 농도는 0, 10 ng/mL로 통일하였으며, 결과는 4-MBA의 특징적인 peak인 1,076 cm^{-1}에서의 Raman intensity로 나타내었다. 단백질이 포함되지 않은 (a) 조건에서 background가 가장 낮았고, (b) 조건은 CRP antigen 0과 10 ng/mL에서 Raman intensity의 차이가 없었다(Fig. 4A). Antigen dilution buffer에 따른 SNR은 단백질이 포함되지 않은 (a) buffer에서 2.7로 가장 높게 나타났으며, (b)와 (c) buffer에서는 각각 1, 1.5로 낮은 SNR을 보였다(Fig. 4B). 이후 분석에서는 단백질이 포함되지 않은 sample buffer인 (a) buffer를 적용하였다.

2) Capture antibody 농도 최적화

Capture antibody 농도에 따라 미리 혼합된 분석물질 속 CRP antigen과 Raman probe의 반응이 달라질 수 있기 때문에 capture antibody 농도 0.25, 0.5, 1 mg/mL를 비교하여 최적화 실험을 진행하였다. Raman shift 1,076 cm^{-1}에서의 Raman intensity는 고정 농도 0.25 mg/mL와 0.5 mg/mL에서 유사하게 나타났다. 반면 1 mg/mL에서는 CRP antigen 0과 10 ng/mL에서의 Raman intensity 값의 차이가 크게 나타났다(Fig. 5A). SNR은 0.25 mg/mL에서 2.1, 0.5 mg/mL에서 1.9, 1 mg/mL에서 4.7로 1 mg/mL에서 가장 높은 값을 나타냈다(Fig. 5B). 이후 분석은 고정농도 1 mg/mL 조건으로 진행하였다.

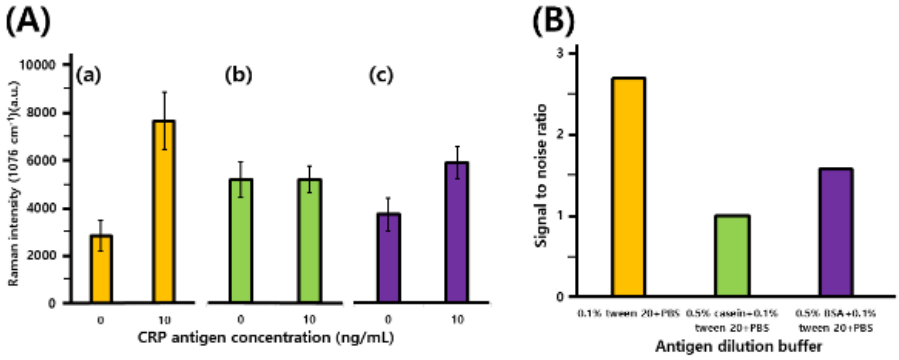

Fig. 4. Optimization of sample dilution buffer. (A) To optimize the sample dilution buffer, the SERS results were graphed through repeated measurements, considering the presence and type of protein. (a) consists of 0.1% Tween 20 + PBS, (b) consists of 0.5% casein + 0.1% tween 20 + PBS, and (c) consists of 0.5% BSA + 0.1% Tween 20 + PBS. An error bar is used to represent the standard deviation following repeated measurements. (B) The graph displays the SNR according to each antigen dilution buffer. The SNR values in the developed system were 2.7 for 0.1% Tween 20 + PBS, 1 for 0.5% casein + 0.1% Tween 20 + PBS, and 1.5 for 0.5% BSA + 0.1% Tween 20 + PBS. The highest value was observed in the protein-free 0.1% Tween 20 + PBS buffer. This suggests that proteins interfere with the antigen-antibody reaction. SERS, surface-enhanced Raman scattering; PBS, phosphate buffered saline; BSA, bovine serum albumin; SNR, signal to noise ratio; CRP, C-reactive protein.

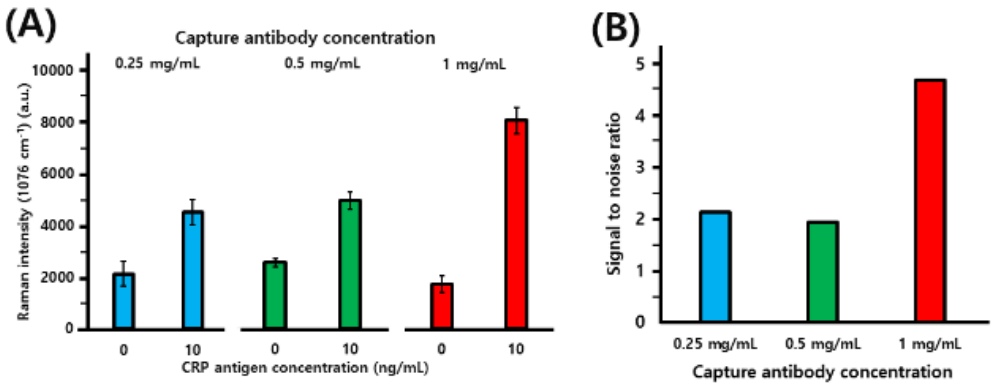

Fig. 5. Optimization of capture antibody concentration. (A) This is a graph showing the Raman intensity at 1,076 cm^{-1} repeatedly measured when all conditions are the same and the capture antibody concentration is 0.25, 0.5, and 1 mg/mL. (B) The ratio of CRP antigen 10 ng/mL (signal) to CRP antigen 0 (noise) was 2.1, 1.9, and 4.7 at 0.25, 0.5, and 1 mg/mL of capture antibody concentration, respectively. The best results were obtained when the SNR was at its maximum at 1 mg/mL of capture antibody concentration. CRP, C-reactive protein; SNR, signal to noise ratio.

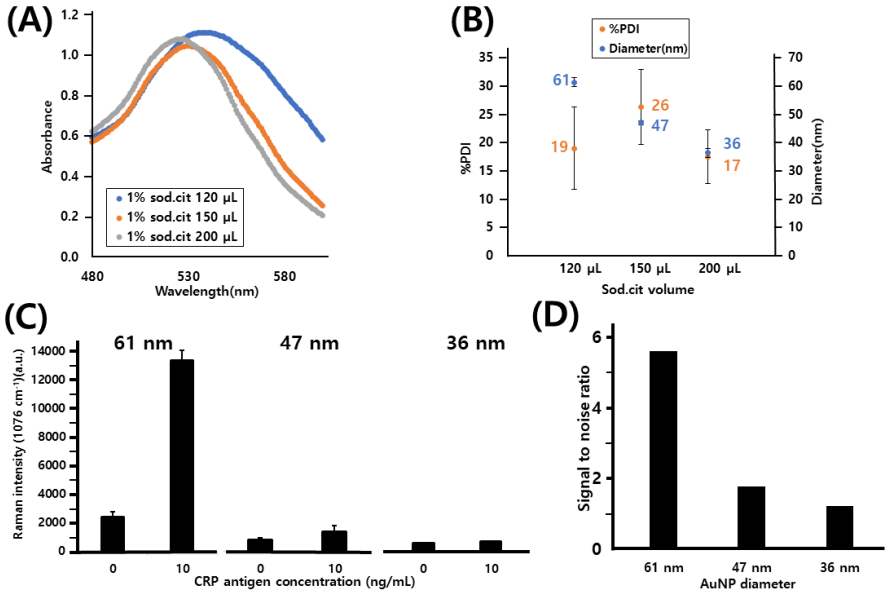

Fig. 6. Optimization of AuNP size. (A) This graph shows the UV-vis spectrum of AuNPs synthesized according to the sodium citrate volume. All three AuNPs showed a result of about 1 OD, and the maximum absorption wavelength decreased as the sodium citrate volume increased. (B) The difference in DLS of the synthesized AuNPs according to the sodium citrate volume is shown in a graph. The %PDI of AuNPs containing 120, 150, and 200 μL of sodium citrate volumes, were 19, 26, and 17, respectively, indicating that they were synthesized as generally homogeneous particles. The diameter (nm) was 61, 47, and 36, respectively, indicating that the diameter (nm) decreased as the sodium citrate volume increased. (C) This graph compares the Raman intensity at 1,076 cm^{-1} through SERS measurement after immunoreaction using a Raman probe made with the synthesized 61, 47, and 36 nm AuNPs. (D) This graph illustrates how the size of the AuNP affects the SNR. The SNR was 5.6 for 61 nm AuNP, 1.7 for 47 nm AuNP, and 1.2 for 36 nm AuNP. AuNPs, gold nanoparticles; UV, ultraviolet visible; OD, optical density; DLS, dynamic light scattering; SERS, surface-enhanced Raman scattering; SNR, signal to noise ratio; CRP, C-reactive protein.

3) 금 나노입자 크기 최적화

1% sodium citrate의 부피에 따라 제조한 금 나노입자의 광학적 특성과 크기 및 분포 평가를 위해 UV-vis 스펙트럼과 DLS를 측정하였다. UV-vis 스펙트럼 결과 1% sodium citrate 120, 150, 200 μL로 제조된 금 나노입자는 각각 538, 530, 526 nm에서 최대흡수파장을 나타냈고, 1 OD (optical density) 값을 나

타냈다(Fig. 6A). DLS는 3회 측정 후 평균값으로 분석하였으며, %PDI는 각각 18.9%, 26.3%, 17.4%, diameter (nm)는 각각 61.3, 47.1, 36.3 nm로 나타났다. %PDI 값이 20% 미만일 때 샘플은 단분산이며, 제조된 금 나노입자는 대체적으로 균질한 입자이다(Fig. 6B). 합성된 금 나노입자의 UV-vis 스펙트럼 결과 sodium citrate의 부피 증가에 따라 청색 편이를 보였고, diameter (nm) 결과 sodium citrate의 부피가 증가할수록 금 나노입자의 크기가 감소하는 일치한 결과를 보였다. 금 나노입자 크기에 따른 결과를 비교하기 위해 제조한 61, 47, 36 nm 금 나노입자를 적용하여 CRP antigen 0과 10 ng/mL에서 Raman intensity와 SNR을 측정하였다. 금 나노입자 크기가 증가함에 따라 CRP antigen 0에서의 Raman intensity background와 10 ng/mL에서의 signal 모두 증가하였다(Fig. 6C). 61, 47, 36 nm 금 나노입자에서의 SNR은 각각 5.6, 1.7, 1.2로 금 나노입자 크기가 증가함에 따라 SNR도 증가하였다(Fig. 6D). 이후 실험은 SNR이 가장 높은 61 nm 금 나노입자를 적용하였다.

4. 구축된 시스템의 분석 성능 평가

1) Standard curve 선정

SERS 기반 VFA 시스템 분석 최적화를 통해 최종적으로 고안된 시스템을 여러 농도의 CRP antigen으로 정량 분석하여 standard curve를 구축하였다. CRP antigen의 농도 5구간(0, 0.1, 1, 10, 100 ng/mL)을 각각 SERS로 측정하였으며, CRP antigen 농도가 증가함에 따라 Raman 스펙트럼의 Raman intensity가 증가하는 것이 확인되었다(Fig. 7A). 실험의 재현성 확인을 위해 각각 다른 날에 걸쳐 반복실험을 4회 진행하였으며, 각 농도의 평균과 표준편차가 그래프와 오차막대로 표현되었다(Fig. 7B). 최종 선정된 standard curve는 CRP antigen 농도가 100 ng/mL까지 R^2 = 0.9025, CRP antigen 농도가 10 ng/mL까지 R^2 = 0.9988로 나타났다(Fig. 7C). 이는 SERS 신호가 CRP antigen 농도의 변화를 100 ng/mL까지 약 90%, 10 ng/mL까지 약 99% 설명할 수 있음을 의미한다. 두 standard curve 중 직선성이 더 좋은 10 ng/mL까지 99% 설명할 수 있는 그래프로 선정하여 분석 성능을 평가하였다.

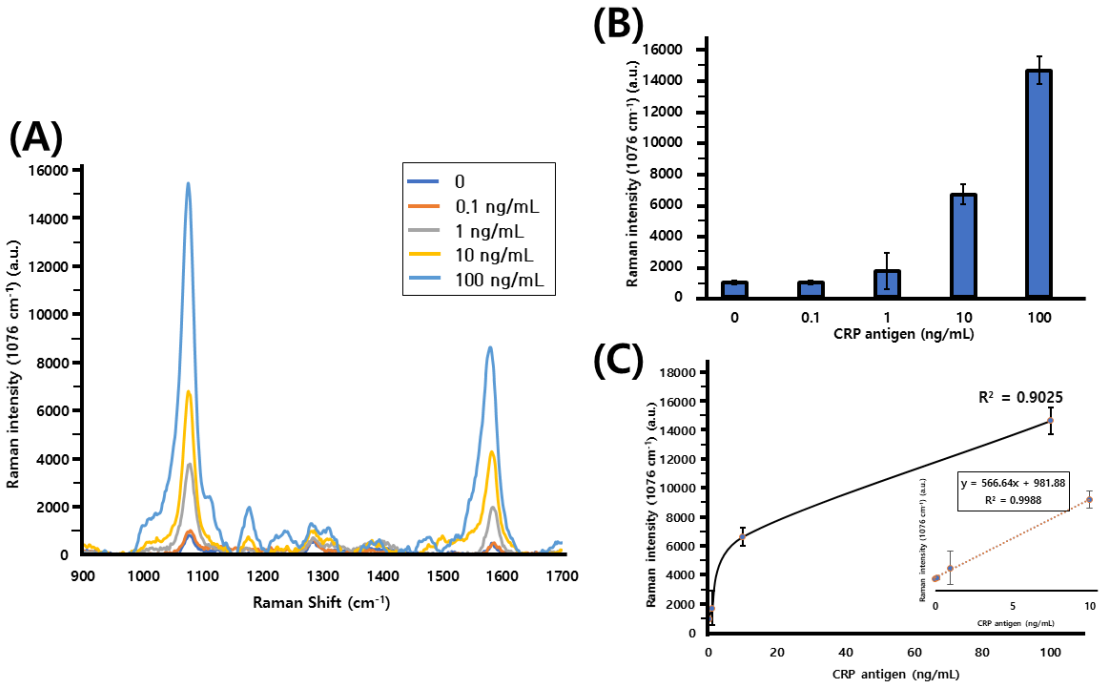

Fig. 7. Quantitative evaluation of the established SERS-based vertical flow assay using the sandwich system. (A) Due to an increase in the immunological response, the Raman intensity at 1,076 cm^{-1} and 1,586 cm^{-1} increased as the concentration of CRP antigen increased. (B) A graph shows the average value of Raman intensity at 1,076 cm^{-1}, which increases in proportion to the CRP antigen concentration through repeated measurements. (C) It is a graph linearly representing Raman intensity at 1,076 cm^{-1} from CRP 0 to 100 ng/mL to make a standard curve. The linearity was confirmed as R^2 = 0.9025 up to CRP 100 ng/mL and R^2 = 0.9988 up to 10 ng/mL. SERS, surface-enhanced Raman scattering; CRP, C-reactive protein.

2) 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ) 평가

개발된 SERS 기반 VFA 시스템에서의 CRP antigen의 분석 범위는 10 ng/mL까지 가능하며 분석 가능한 최소 농도인 LOD (limit of detection)는 3.3 × STD (standard deviation)/slope 식에 따라 약 0.66 ng/mL로 계산되었다. 또한 정량분석이 가능한 최소 농도인 LOQ (limit of quantification)는 10 × STD/slope 식에 따라 2 ng/mL로 계산되었다 [9]. 따라서 개발한 시스템을 통해 정량 가능한 범위는 2–10 ng/mL이며, 분석 가능한 최소 농도는 0.66 ng/mL로 산출되었다.

논 의

본 연구에서는 VFA의 두 가지 단점인 민감도 부족과 복잡한 과정을 보완하기 위한 새 시스템을 개발하였다. 기존에 육안분석에만 의존하였던 VFA를 SERS와 결합하여 민감하게 정량 분석하였고, washing을 포함한 여러 단계를 거치는 번거로운 과정 대신 one-step으로 사용에 용이한 바이오 마커 분석이 가능하도록 하여 one-step SERS 기반 VFA 시스템을 개발하였다. 재현성 있는 결과를 위해 3D printer로 프린팅된 맞춤형 카트리지는 얇은 판 모양으로 디자인되어 카트리지를 제거하지 않고도 즉시 SERS 측정이 가능하도록 제작되었다. 시스템의 민감도를 높이기 위해 첫 번째로 진행한 sample dilution buffer의 최적화를 통해 단백질이 분석물질 내 CRP antigen과 capture antibody의 반응을 저해하는 요인으로 작용했다고 판단되었다. 특히 casein은 micelles를 형성하는 경향 때문에 membrane을 통한 sample flow를 방해하여 capture antibody와 결합하지 않은 Raman probe들이 membrane에 붙어서 SERS background 자체가 높게 나오는 현상이 발생한 것으로 추측된다 [10]. 두 번째로 capture antibody 농도 최적화를 통해 1 mg/mL로 고정했을 때 Raman probe 중합체와의 비특이적 반응이 가장 적고 항원과의 결합의 강도가 가장 강했다. 마지막으로 금 나노입자 크기 최적화를 통해 61 nm 금 나노입자에서 가장 높은 SNR을 나타냈는데, 이는 금 나노입자 크기가 증가함에 따라 표면적이 증가하였고, 이에 따라 국소적인 전자기적 향상이 일어나 Raman intensity가 증가하였다고 생각된다. 본 연구에서 개발된 시스템이 얼마나 개선되었는지 확인하기 위해 다른 시스템과 비교하였다(Table 1) [4,11–15]. 먼저 No. 1–4 시스템은 CRP antigen을 기반으로 한 LFA 및 VFA 방식이다. LFA 방식은 대부분 금 나노입자를 label로 사용하며 1단계 분석 과정이 적용된다. VFA 방식 또한 대부분 금 나노입자를 label로 사용하지만 일반적으로 washing을 포함한 복잡한 과정이 필요하다. 타 LFA 및 VFA 시스템의 sample volume은 50–80 μL, LOD는 1.5–91

Table 1. Comparison of analytical performance with other systems using CRP antigen as an analyte

Assay type	No.	Type of nanoparticle	Assay label	Analyte	Assay step	Sample volume	Assay time	R^2	Range (μg/mL)	LOD (ng/mL)	System feature	Ref.
Lateral flow assay	1	Gold nanoparticle	Colorimetric	CRP	One step	60 μL	52 min	N/A	N/A	1.5 (after enhancement)	Pressed region	(11)
	2	Polystyrene nanoparticle	Fluorescence (Nile-red)	CRP	One step	N/A	3 min	0.9896	0.1–160	91	N/A	(12)
Vertical flow assay	3	Gold nanoparticle	Colorimetric	CRP	Multi step	50–60 μL	1–2 min	0.9973	0.01–10	10	N/A	(4)
	4	Gold nanoparticle	Colorimetric	CRP	Multi step	80 μL	15 min	N/A	0.005–5	5 (after enhancement)	Pressed region	(13)
	5	Silver nanoparticle	SERS	Flucytosine	Multi step	10 μL	15 min	0.971	N/A	10,000	N/A	(14)
	6	Gold nanoparticle	SERS	Mouse IgG	Multi step	100 μL	2 min	N/A	N/A	3	Membrane + gold nanoparticle	(15)
	7	Gold nanoparticle	SERS	CRP	One step	60 μL	50 min	0.9988	0.002–0.01	0.66	N/A	This platform

CRP, C-reactive protein; LOD, limit of detection; Ref., reference; N/A, not available; SERS, surface-enhanced Raman scattering.

ng/mL로 나타났다. 개발된 시스템은 sample volume 60 μL, LOD는 0.66 ng/mL, R^2 = 0.9988로 더 개선된 결과를 보였다. No. 5–6은 SERS 기반 타 VFA 시스템이다. 본 연구에서는 50분 이내에 분석이 가능하지만 다른 시스템들에 비해 민감도가 높다. 개발된 시스템에 적용된 바이오 마커인 CRP는 염증과 감염의 유의미한 지표이며, 정상 수치 내에서는 심혈관질환을 예방하는 데 사용된다 [16,17]. 임상 참조범위는 ≤1 μg/mL (저위험), 1–3 μg/mL (평균위험), ≥3 μg/mL (고위험)이다 [18]. 이는 개발된 시스템의 LOD (0.66 ng/mL)와 비교했을 때 위와 같은 수치를 충족할 만큼 충분히 민감하다. 따라서 다른 바이오 마커의 검출에도 활용하여 현장진단 분석을 위한 새 시스템으로 활용될 잠재적 가능성이 높음을 시사한다. 본 연구에서 다뤄지지 않은 두 가지 개선점이 존재한다. 먼저, 임상샘플을 사용한 임상연구가 진행되지 않았다. 이를 위해 후속 연구에서는 샘플 100개 이상을 적용하여 개발된 시스템이 임상에 적용되는 단계로 나아갈 수 있도록 개선시키고자 한다. 또한 다중 바이오마커 분석이 이루어지지 않았다. 후속 연구에서는 CRP를 포함한 염증과 관련된 바이오마커들을 분석물질로 하여, 시스템의 면역분석 범위를 넓혀 이를 보완하고자 한다.

NOTES

Acknowledgement

None.

Conflict of interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

Funding

This work was supported by the Technology Innovation Program (20022852, Development of 0.2 micron cellulose acetate membrane for biopharmaceutical industry) funded By the Ministry of Trade, Industry & Energy (MOTIE, Korea). This work was also supported by Eulji university 2021.

Authors' contribution

Conceptualization: HYC. Data curation: all authors. Formal analysis: all authors. Funding acquisition: IHC. Investigation: all authors. Methodology: all authors. Project administration: IHC. Resources: IHC. Software: HYC. Supervision: IHC. Validation: all authors. Visualization: HYC. Writing – original draft: HYC. Writing – review and editing: all authors.

ORCID

Ha-Young Cho, https://orcid.org/0009-0003-3913-0144
Il-Hoon Cho, https://orcid.org/0000-0002-4991-2268

REFERENCES

1. Wang C, Liu M, Wang Z, Li S, Deng Y, He N. Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. Nano Today. 2021;37:101092.
2. Jiang N, Ahmed R, Damayantharan M, Ünal B, Butt H, Yetisen AK. Lateral and vertical flow assays for point-of-care diagnostics. Adv Healthc Mater. 2019;8:e1900244.
3. Lei R, Wang D, Arain H, Mohan C. Design of gold nanoparticle vertical flow assays for point-of-care testing. Diagnostics (Basel). 2022;12:1107.
4. Prajapati A, Verma N, Pandya A. Highly sensitive vertical flow based point-of-care immunokit for rapid and early detection of human CRP as a cardiovascular risk factor. Biomed Microdevices. 2020;22:28.
5. Joung HA, Ballard ZS, Ma A, Tseng DK, Teshome H, Burakowski S, et al. Paper-based multiplexed vertical flow assay for point-of-care testing. Lab Chip. 2019;19:1027-34.
6. Schlücker S. Surface-enhanced Raman spectroscopy: concepts and chemical applications. Angew Chem Int Ed Engl. 2014;53:4756-95.
7. Su X, Liu X, Xie Y, Chen M, Zheng C, Zhong H, et al. Integrated SERS-vertical flow biosensor enabling multiplexed quantitative profiling of serological exosomal proteins in patients for accurate breast cancer subtyping. ACS Nano. 2023;17:4077-88.
8. Ebbah E, Amissah A, Kim JH, Driskell JD. Antibody-driven assembly of plasmonic core-satellites to increase the sensitivity of a SERS vertical flow immunoassay. ACS Sens. 2024;9:3496-501.
9. Little TA. Method validation essentials, limit of blank, limit of detection, and limit of quantitation. BioPharm Int. 2015;28:48-51.

10. Holt C, de Kruif CG, Tuinier R, Timmins PA. Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp. 2003;213:275-84.
11. Park SB, Shin JH. Pressed lateral flow assay strips for flow delay-induced signal enhancement in lateral flow assay strips. Biochip J. 2022;16:480-9.
12. Cai Y, Kang K, Liu Y, Wang Y, He X. Development of a lateral flow immunoassay of C-reactive protein detection based on red fluorescent nanoparticles. Anal Biochem. 2018;556:129-35.
13. Park J, Park JK. Pressed region integrated 3D paper-based microfluidic device that enables vertical flow multistep assays for the detection of C-reactive protein based on programmed reagent loading. Sens Actuators B Chem. 2017;246:1049-55.
14. Berger AG, Restaino SM, White IM. Vertical-flow paper SERS system for therapeutic drug monitoring of flucytosine in serum. Anal Chim Acta. 2017;949:59-66.
15. Frimpong R, Jang W, Kim JH, Driskell JD. Rapid vertical flow immunoassay on AuNP plasmonic paper for SERS-based point of need diagnostics. Talanta. 2021;223(Pt 2):121739.
16. Wu AH. Markers for early detection of cardiac diseases. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 2005;240:112-21.
17. Bassuk SS, Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: clinical importance. Curr Probl Cardiol. 2004;29:439-93.
18. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. Circulation. 2003;107:499-511.