

콜로이드 골드 나노입자의 단백질 수송성 평가법

김미영 · 노상명 · 김정목* · 최한곤** · 김정애** · 오유경†
포천중문 의과대학교, *한양대학교 의과대학, **영남대학교 약학대학
(2004년 10월 15일 접수 · 2004년 12월 9일 승인)

Protein-Coating Evaluation Method of Colloidal Gold Nanoparticles

Mi Young Kim, Sang Myoung Noh, Jung Mogg Kim*, Han-Gon Choi**, Jung-Ae Kim** and Yu-Kyoung Oh†

College of Medicine, Pochon CHA University, Seungnam, Kyonggi-do 463-712, Korea

*College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

**College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

(Received October 15, 2004 · Accepted December 9, 2004)

ABSTRACT—Colloidal gold nanoparticles might be of use as nano scale delivery systems of various therapeutic materials in the future. Recent studies have reported the feasibility of colloidal gold nanoparticles as gene delivery systems or protein delivery systems. In this study, we aimed to develop a short-step method useful for screening the optimal coating conditions of colloidal gold nanoparticles with proteins. We observed that colloidal gold nanoparticles have properties of changing its unique color when they were exposed to NaCl solution. Taking advantage of the color changing properties of colloidal gold nanoparticles, we applied the color testing method of colloidal gold nanoparticles solutions for evaluating the protein coating nature. Using bovine serum albumin as a model protein, we tested the protein coating of colloidal gold nanoparticles via the color change upon NaCl addition. The optimal coating concentration and coating conditions of colloidal gold nanoparticles with bovine serum albumin were fixed using the color testing methods. We suggest that the color testing method might be applied to optimize the coating condition of colloidal gold nanoparticles with other therapeutic proteins.

Key words—Colloidal gold nanoparticles, Protein delivery systems, Protein coating, Color testing method

콜로이드 골드(colloidal gold)란 순수한 물에 순도 높은 금이 콜로이드 상태로 녹아 있는 것으로 콜로이드 골드는 대부분 1~100 nm의 나노 입자 크기이며 이온형태를 띠며 존재하고 있다. 콜로이드 골드는 주로 특정 단백질이나 유전자를 결합하여 전자 현미경의 마커, 일반 광학 현미경의 마커로 사용하거나 골드를 probe로 사용하는 scanning probe microscopy(SPM)에 사용되고 있다.¹⁾ 콜로이드 골드는 또한 단백질이나 유전자를 정량할 때 사용하는 kit에도 다양하게 이용되고 있다.²⁾

최근 나노입자 분야에서는 이들 입자를 약물 수송체로서 또는 입자 자체를 치료 물질로 사용하는 연구들이 진행 중이다. 대표적인 예가 리포솜으로 리포솜을 100~400 nm 정도의 나노 입자(nanoparticle)로 제조하여 1990년대 초반부터 수송체로 사용하고 있다.³⁾ 리포솜은 낮은 독성을 나타내며 다양한 크기로 제조 가능하고 리포솜 표면이나 내부에 수용성 또는 지용성 약물이나 생리 활성 물질을 수송 가능

한 장점이 있다.^{4,6)} 그러나 리포솜은 보관 시의 약물 유출로 인하여 장기간의 안정성 개선이 문제로 남아 있으며 수송 대상 물질 면에서도 단백질 등의 고분자 수송체로서는 봉입 효율 면에서 한계가 있다.⁶⁾

반면 콜로이드 골드는 50 nm 이하의 미세 나노 입자 제조가 가능하고 입자의 크기 조절이 용이하며 표면에 약물이거나 치료 물질들을 붙일 수 있는 특성을 가지고 있어 수송체로서의 가능성이 있다. 즉 콜로이드 골드는 제조하는 과정에서 첨가하는 화학물질의 조성에 따라서 원하는 크기의 나노 입자로 제조 가능하며 세포 내로의 식작용이 용이하다. 또한 치료 목적으로 사용하는 유전자, 펩타이드, 단백질 등은 이온 형태로 존재하고 친수성인 물질들이기 때문에 물에 쉽게 녹아 존재하는 콜로이드 골드와 복합체를 쉽게 형성할 수 있다. 이런 특성을 이용하여 원하는 치료 물질(DNA, RNA, 단백질 등)을 이온형태를 띠는 콜로이드 골드와 복합체를 형성시켜 세포 안으로 운반시킨다면 치료를 할 수 있는 운반체로서 사용이 가능할 수 있다. 또한 의학 수송체로 사용되기 위해서는 수송체의 안전성 요건이 충족되어야 하는데 콜로이드 골드는 오래 전부터 미용이나 건강 보조 식품의 구

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 031)703-8613, E-mail : ohyk@cha.ac.kr

성 성분으로 사용되어 왔으며 관절염 치료에도 전신 투여용으로 사용되어 왔으므로 합성 고분자 소재의 나노 입자보다 안전성이 확보된 장점이 있다. 또한 콜로이드 골드는 사람들이 오래 전부터 사용하였으므로 의약품으로 사용하는 경우에도 거부감이 작은 장점이 있다.

본 논문에서는 위에서 기술한 장점을 가지는 콜로이드 골드 나노입자를 치료 단백질의 수송체로 개발하기 위한 기초 단계로서 콜로이드 골드에 치료용 단백질 복합체를 효율적으로 코팅하는 최적 조건을 간편하게 확립하는 새로운 평가 방법에 대하여 보고하고자 한다.

실험 방법

시약 및 기기

콜로이드 골드 나노입자의 제조에 사용된 gold(III) chloride trihydrate, 우혈청 알부민(bovine serum albumin)은 Sigma Aldrich Co.(MO, 미국)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 완충용액 및 시약은 모두 증류수를 사용하여 제조하였으며, 증류수는 Milli-Q(Millipore Co., MA, 미국)를 통과시켜 사용하였다. 콜로이드 골드 나노입자를 제조한 후 투석 과정에 사용하는 반투막으로는 Spectra/Por® CE Membrane(Spectrum Laboratories Inc., CA, 미국)을 사용하였다. 단백질의 정량은 BCA™ protein assay kit(Pierce, IL, 미국)를 사용하여 수행하였으며 단백질 정량시의 흡광도 측정시에는 Universal Microplate Reader ELx800(Bio-Tek Instruments, Inc., VT, 미국)를 사용하였다. 콜로이드 골드 나노입자 자체, 또는 알부민이 코팅된 콜로이드 골드 나노입자의 크기 및 구조는 주사전자현미경(scanning electron microscope, S-2380N, Hitachi, TY, 일본)을 사용하여 관찰

하였다. 제조된 콜로이드 골드 나노입자의 크기 분포와 제타 전위값은 electrophoretic light scattering spectrophotometer ELS-8000(Otsuka Electronics Co., Ltd., TY, 일본)을 사용하여 측정하였다.

콜로이드 골드 나노입자 제조

HAuCl₄ 수용액(0.01%, w/v)을 열판상에서 계속적으로 교반하며 가열하였다. 용액이 비등하기 시작할 때 sodium citrate 용액(0.025%, w/v)을 첨가하여 계속해서 교반하면서 용액 색깔이 적색으로 변하면 2~3분간 더 교반하여서 안정화 시킨 후 냉각하여 콜로이드 골드 나노입자를 수득하였다. 제조된 콜로이드 골드 나노입자는 4°C에서 차광 조건 하에서 보관하였다.⁷⁾

콜로이드 골드 나노입자의 단백질 코팅

제조한 콜로이드 골드 나노입자 용액과 알부민 완충용액을 10:1(v/v)로 섞은 후 30~60분간 실온에서 교반시키면서 방치하였다. 알부민 농도 조절에 사용한 완충용액은 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂의 조성으로 제조하였다. 최적의 단백질 코팅 조건을 확립하기 위하여 콜로이드 골드와 혼합하는 알부민 혼합 비율을 변화시키기 위하여 콜로이드 골드 나노입자 용액 500 μl에 다양한 농도의 알부민 완충용액 50 μl을 각 튜브에 넣어 전체 양이 550 μl되도록 하였고, 이때 알부민 완충용액의 농도는 Table I과 같이 사용하였다. 콜로이드 골드 나노입자 분산액과 다양한 농도의 알부민 완충용액을 혼합한 다음 1% NaCl을 100 μl 가하고 5분 방치하였다. 알부민의 각 농도 조건 하에서 콜로이드 골드 나노입자의 단백질 코팅성 여부를 NaCl 존재 하에서 콜로이드 골드 나노입자의 특징적인 적색이 변색되는 지의

Table I—The Optimal Coating Concentration of Colloidal Gold Nanoparticles with Bovine Serum Albumin Using the Color Test Method

Sample number	Bovine serum mg/ml	Albumin μl	Gold μl	10%NaCl μl	Color	Precipitation
1	0.10	50	500	100	Red	No
2	0.09	50	500	100	Red	No
3	0.08	50	500	100	Red	No
4	0.07	50	500	100	Red	No
5	0.06	50	500	100	Red	No
6	0.05	50	500	100	Purple	No
7	0.04	50	500	100	Purple	No
8	0.03	50	500	100	Blue-black	+
9	0.02	50	500	100	Blue-black	++
10	0.01	50	500	100	Colorless	++++
11	0.00	50	500	100	Colorless	+++++

여부를 관찰하여 평가하였다.

콜로이드 골드 나노 입자와 알부민의 코팅 비율을 확립한 다음 코팅 시간이 알부민의 코팅성에 미치는 영향을 평가하기 위하여는 Table I의 시료 중 5, 6, 7 및 8번 조건하에서 코팅 시간을 5분에서 10, 30 및 60분으로 증가시키면서 반응을 수행하였다. 이 경우에도 각 조건 하에서 나노 입자의 안정성은 콜로이드 골드의 특징적인 적색의 소실 여부로서 평가하였다.

콜로이드 골드 입자의 단백질 정량법

콜로이드 골드 나노입자 분산액에 알부민의 농도가 0.1, 1 및 2 mg/ml 되게 제조한 알부민 완충 용액을 1:1(v/v) 같은 용량으로 각 튜브에 섞은 후 실온에서 60분간 교반 하면서 방치하여 단백질이 코팅된 콜로이드 나노입자를 수득하였다. 알부민이 코팅된 골드 나노 입자로부터 코팅되지 못한 여분의 알부민을 제거하기 위하여 pore size가 100 KD인 반투막을 이용하여 투석을 수행하였다. 투석액이 콜로이드 골드 입자의 안정성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 콜로이드 골드 원액도 pore size가 100 KD인 반투막을 이용하여 같은 조건 하에서 투석을 수행하였다. 여기서 얻은 샘플

들을 BCA assay kit를 이용하여 콜로이드 골드 나노입자에 코팅된 상태로 존재하는 알부민의 양을 590 nm의 흡광도치를 측정하여 정량 하였다.

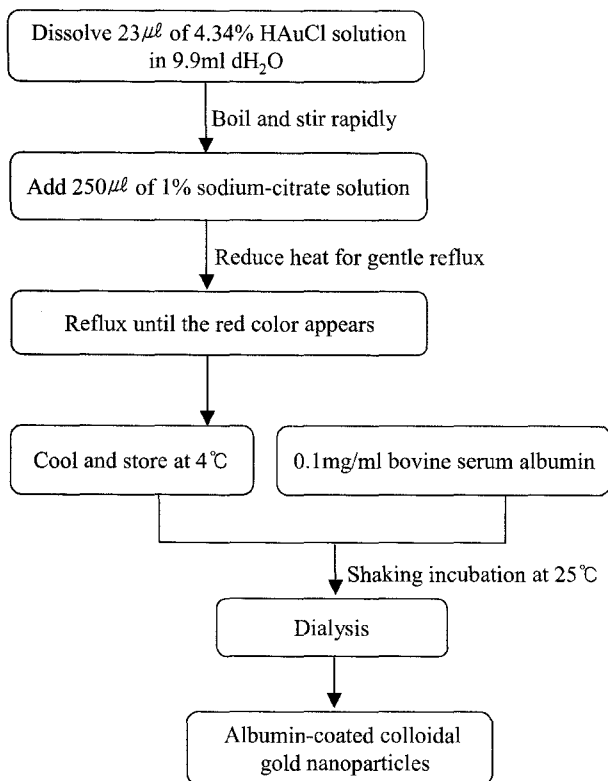
결과 및 고찰

콜로이드 골드 입자의 특성 및 구조

Scheme 1의 제법에 따라 제조된 골드 입자는 입자경 14.6 ± 3.6 nm(Figure 1), 제타전위 -15.06 mV의 콜로이드 성 입자이었다. 제조된 콜로이드 골드 나노 입자는 냉장 보관 시 최소 3개월 간 입자의 응집이나 색도 변화가 관찰되지 않았다. 또한 제조된 콜로이드 골드 나노입자의 구조는 주사전자현미경으로 관찰한 경우 균질한 분포의 구형을 나타내었으며(Figure 2a), 콜로이드 골드 나노입자에 알부민이 코팅된 경우에도 입자의 크기, 분포 정도 및 형태에는 영향이 없는 것이 관찰되었다(Figure 2b).

콜로이드 골드 나노입자의 단백질 코팅 평가법

단백질 수송체로서 콜로이드 골드 나노입자를 연구하기



Scheme 1—Scheme of colloidal gold nanoparticles manufacturing process.

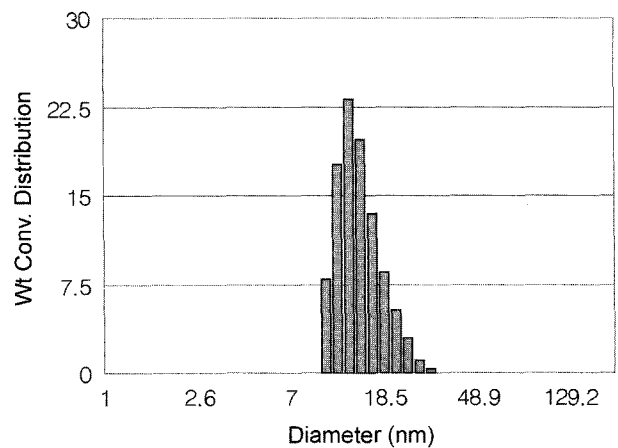


Figure 1—Size distribution of colloidal gold nanoparticles.

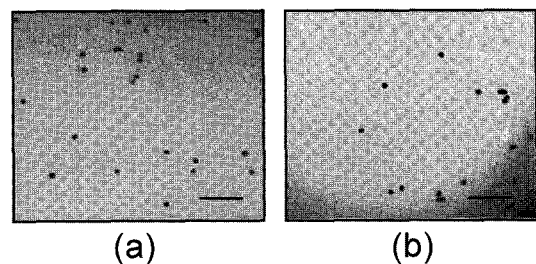


Figure 2—The morphology of colloidal gold nanoparticles. (a) colloidal gold nanoparticles, (b) colloidal gold nanoparticles coated with bovine albumin serum. Bar : 100 nm.

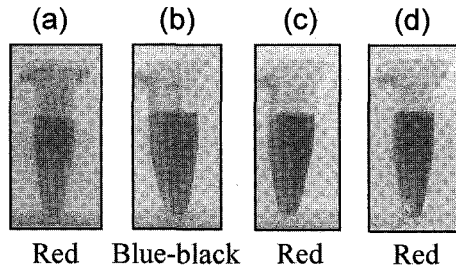


Figure 3—Color change of colloidal gold nanoparticles at various conditions. (a) colloidal gold nanoparticles, (b) NaCl + colloidal gold nanoparticles, (c) colloidal gold nanoparticles coated with bovine albumin serum, (d) NaCl + colloidal gold nanoparticles coated with bovine albumin serum.

위한 기초 단계로서 콜로이드 골드 입자와 알부민 단백질이 복합체를 형성하는데 필요한 최적의 조건을 연구하였다. 콜로이드 골드 나노입자의 특성 중 소량의 전해질을 콜로이드 용액에 가했을 때 입자가 침전되는 현상을 이용하여 콜로이드 골드 나노입자의 안정성을 유지하면서 수송이 가능한 적절한 알부민의 양을 결정하는 연구를 1차적으로 수행하였다 (Figure 3). 콜로이드 골드 나노입자 자체는 특징적인 적색을 나타내나(Figure 3a), NaCl이 첨가되면 전해질과 나노입자 표면의 반응성으로 용액의 상태가 회색으로 변색되었다(Figure 3b). 알부민으로 표면이 코팅된 콜로이드 골드 나노입자는 색상에 변화가 없었으며(Figure 3c), 알부민의 표면 차폐효과로 NaCl이 첨가된 경우에도 전해질과의 상호작용 저하로 나노입자의 색상이 그대로 유지되는 특징을 발견하였다(Figure 3d).

본 연구에서는 콜로이드 골드 나노입자의 안정성을 평가하기 위한 지표로서 NaCl 전해질 용액과 직접적으로 접촉시 나노 입자의 안정성이 현저히 저하되는 특징(Figure 3b)을 이용하였다. 즉, 콜로이드 골드 나노입자에 알부민이 결합된 경우 NaCl 전해질 용액에 나노입자가 노출되어도 알부민의 차폐기능으로 나노입자가 안정한 상태를 유지하는 반면, 알부민이 나노 입자에 코팅량이 적어서 나노입자를 차폐하는 효과가 적어질 경우 NaCl 용액에 접촉시 나노입자의 색변과 함께 분산성이 떨어지는 현상을 endpoint로 이용하였다.

콜로이드 골드 나노입자의 단백질 코팅 조건

Table I과 같은 조건으로 실험한 결과 나노 입자 분산액에 알부민 용액(0.1 mg/ml)을 50~30 μ l 가한 경우에는 알부민의 코팅으로 인하여 NaCl 용액을 첨가한 경우에도 나노 입자의 색상 및 안정성이 유지되었다. 그러나 알부민 용액(0.1 mg/ml)의 비율을 감소시켜 25 μ l 가한 경우부터 콜로이드 골드 나노입자에 알부민의 코팅이 불충분하여 NaCl 첨가시 나노입자의 색상이 적색에서 보라색으로 변색하였으며 나노입자에 가하여주는 알부민의 양이 15 μ l 보다 적어지면서 시료의 색깔이 검은색에 가까게 변했으며 침전물이 생기기 시작하였다. 또한 알부민을 첨가하지 않고 NaCl 전해질 용액만을 첨가한 경우 나노 입자의 색도 보라색에서 무색의 상등액과 검은색의 침전물 형태로 분리되었다.

그러나 나노 입자에 알부민(0.1 mg/ml) 30 μ l 이상은 시료의 색깔이 적색을 유지하였다. 이것은 대부분의 콜로이드 골드 나노입자가 알부민으로 코팅되어 전해질과 반응할 colloidal gold가 없어서 나타난 결과로 해석된다. 콜로이드 골드 나노입자의 분산액과 NaCl 용액의 반응성에 따른 분산액의 색도 변화에 기초한 단백질 코팅성 평가방법은 콜로이드 골드 나노입자에 알부민 외의 다른 치료 활성을 보유하는 단백질을 코팅하는 경우에도 간편하게 나노 입자의 코팅 조건을 확립하는 평가방법으로 활용 가능할 것으로 사료된다.

콜로이드 나노입자에 단백질을 코팅하는 경우 단백질의 수송량은 반응 시간과 반응 조건에 따라서 크게 영향을 받는 것으로 관찰되었다. Table I의 실험 조건 중 시료 번호 5, 6, 7 및 8번 조건을 중심으로 단백질 코팅된 나노입자 형성을 위한 반응 시간을 10, 30 및 60분으로 하고 반응 시간 중 교반을 하는 것과 교반을 하지 않는 조건을 실험한 결과 Table II와 같은 결과를 얻었다. 동일한 조건하에서 교반하면서 반응 하는 경우 나노 입자의 단백질 코팅성이 증가되어 NaCl 전해질을 추가로 넣어 주었을 때 나노 입자의 색상이 적색을 유지하며 침전물도 생기지 않는 것이 관찰되어 교반 조건이 나노 입자의 단백질 코팅성에 효율적인 것으로 평가되었다.

실질적으로 생명공학에서 합성되는 많은 단백질들의 경우

Table II—Color Changes of Bovine Serum Albumin-coated Colloidal Gold Nanoparticles

Sample number	No shaking during incubation			Shaking during incubation		
	10 min	30 min	60 min	10 min	30 min	60 min
	Color/Precipitation			Color/Precipitation		
5	Purple/NO	Red/No	Red/No	Red/No	Red/No	Red/No
6	Purple/No	Purple/No	Red/No	Red/No	Red/No	Red/No
7	Blue-black/++	Blue-black/+	Purple/No	Blue-black/+	Purple/No	Purple/No
8	Colorless/++++	Colorless/+++	Blue-black/++	Colorless/++	Blue-black/++	Blue-black/++

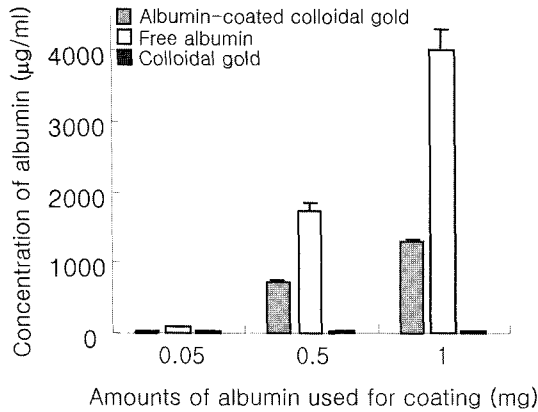


Figure 4—Assay of bovine serum albumin on colloidal gold particles.

연구 단계에서 대량 생산이 매우 어려우므로 가능한 소량의 단백질을 이용하여 나노 입자에 코팅하는 방법을 확립하는 것이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 소량의 단백질을 보다 효과적으로 콜로이드 골드 나노입자에 코팅하는 방법을 연구하기 위하여 알부민 양을 저 농도로 넣어 줄 경우의 코팅 조건에 대하여 실험하였다. 단백질의 농도가 최소화 된 경우에는 반응 시간을 증가시킨 경우, 나노입자에 전해질이 첨가 된 경우 입자의 색도 변화가 심하지 않고 침전물도 잘 생기지 않는 것으로 보아 코팅이 효율적으로 진행되는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해보면 콜로이드 골드 나노입자에 알부민을 코팅하는 경우 최적화 하여야 할 인자로는 알부민의 농도, 반응 시간이 고려되어야 하면 같은 조건 하에서는 교반 하면서 반응을 진행하는 것이 나노 입자에 단백질의 코팅 효율을 보다 증강시키는 것으로 사료된다.

콜로이드 골드 나노 입자의 단백질 수송성

콜로이드 골드 나노 입자의 단백질 수송성은 BCA assay 를 수행하여서 평가하였다(Figure 4). 나노 입자에 코팅되지 않은 미반응성 알부민 단백질은 알부민 보다 분자량이 큰 100 KD pore size를 가지는 투석막을 사용하여 제거하였다. 콜로이드 골드 나노입자의 단백질 수송성은 단백질 코팅에 사용되는 알부민의 양이 0.05 mg에서 0.5 및 1 mg으로 증가됨에 따라 비례적으로 증가되었다. 콜로이드 골드 나노 입자만을 BCA assay 수행한 결과 흡광도 치가 0.05 미 만이므로 코팅에 사용하는 단백질의 농도가 1 mg 이상인 경우 단백질 정량에 미치는 영향이 작은 것으로 측정되었다. 이상의 결과는 BCA assay가 콜로이드 골드 나노입자에 수송되는 단백질의 양을 정량 하는데 유용한 방법으로 사용될 수 있을 것임을 제시해준다.

결 론

생명공학의 발달에 따라 다양한 수송용 단백질을 유전적으로 제작하고 분리 정제하는 작업이 간편해졌다고 할 수 있으나 mg 단위의 단백질을 분리 정제하는 과정은 아직 실험실 적으로는 많은 시간과 노력이 필요하다. 본 연구에서는 소량의 단백질을 사용하여 콜로이드 골드 나노입자에 코팅이 되는 지의 조건을 간편하게 확인하는 방법으로서 전해질 첨가시 콜로이드 나노입자의 색도 변화를 응용하는 방법을 보고하였다. 이러한 전해질 첨가시의 콜로이드 나노 입자색도 변화 방법은 콜로이드 골드 나노입자와 코팅이 가능한 다양한 생리활성 단백질의 적정 농도 범위를 단기간에 연구하는데 응용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 나노 바이오 기술개발사업(과제번호 M10414010003-04N1401-00310) 및 산업자원부 지역혁신 인력양성사업(KITF 000-B-106-108)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) M. Haruta, T. Kobayashi, H. Sano and N. Yamada, *Chem. Lett.*, 405 (1987).
- 2) R. Hermann, P. Walther and M. Muller, Immunogold labeling in scanning electron microscopy, *Histochem. Cell Biol.*, **106**, 31-39 (1996).
- 3) Y.K. Oh, D. Suh, J.M. Kim, H.G. Choi, K. Shin and J.J. Ko, Polyethylenimine-mediated cellular uptake, nucleus trafficking and expression of cytokine plasmid DNA, *Gene Ther.*, **9**, 1627-1632 (2002).
- 4) S.F. Alino, J. Crespo, M. Bobadilla, M. Lejarreta, C. Blaya and A. Crespo, Expression of human alpha 1-antitrypsin in mouse after *in vivo* gene transfer to hepatocytes by small liposome, *Biochem. Biophys. Res. Commune.*, **204**, 1023-1030 (1994).
- 5) L. Mozzola, Commercializing nanotechnology, *Nature Biotechnology*, **21**, number 10 (2003).
- 6) R.K. Scheule, St J.A. George, R.G. Bagley, J. Marshall, J.M. Kaplan, G.Y. Akita, K.X. Wang, E.R. Lee, D.J. Harris, C. Jing, N.S. Yew, A.E. Smith and S.H. Cheng, Basis of pulmonary toxicity associated with cationic lipid-mediated gene transfer to the mammalian lung, *Hum. Gene Ther.*, **8**, 689-707 (1997).
- 7) M. Hayat, *Colloidal gold: Principles, method, and application*, Vol. 1(Ed.), Academic Press, San Diego (1993).