

나노크리스탈 Quantum-dot을 적용한 남조류 독소 Microcystin 탐지 연구

이진욱 · 유혜원 · 김인수[†]

광주과학기술원 환경공학과 BEEL연구실

Application of Quantum-dot Nanocrystals for Cyanobacterial Toxin-Microcystin Detection

Jinwook Lee · Hye-Weon Yu · In S. Kim[†]

Bio-Environmental Engineering Lab. (BEEL), Department of Environmental Science and Engineering,

Gwangju Institute of Science and Technology (GIST)

(Received 11 July 2007, Accepted 14 September 2007)

Abstract

Green quantum-dot nanocrystal (QD525) with anti-microcystin monoclonal antibody was applied for detection of microcystin, a monocyclic peptide hepatotoxin, extracted from the culture of *Microcystis aeruginosa*. The presence of microcystin in the cell lysate was verified by HPLC analysis with UV absorbance at 238 nm. *Microcystis* cell extract exhibited fluorescence emission spectra, which peak was around 460 nm because of their complex organic substances. When a spherical QD525 antibody conjugates (10~20 nm in diameter) were bound to the microcystins in the *Microcystis* cell lysate, the fluorescence intensity of the primary peak at 525 nm diminished while the secondary emission peak at 460 nm slightly increased intensities. It is due to energy transfer from the primary (major) to the secondary (minor) peak, resulting from physical deformation of QD525 and different environmental factors. On the other hand, other cell extracts did not show any fluorescence emission change. This study is very available for detecting and monitoring the microcystin because it is one step assay without washing step and portable spectrophotometer makes on-site measurement possible. For health risk assessment of the microcystin, the reliable and rapid system to detect and quantify microcystin is seriously required.

keywords : Antibody, Fluorescence, Microcystin, Quantum-dot

1. 서론

시아노박테리아는 여름철 및 초가을 고온기에 부영양 단계의 호소 및 댐 저수지에서 대량 증식하여 녹조현상을 일으키는 남조류(blue-green algae) 군집의 우점 미생물이다. 호소내 시아노박테리아의 출현은 물속의 산소를 고갈시켜 수질 오염을 가속화하고 해로운 독소를 만들어 인간과 동물에게 피해를 준다. 이 중, *Microcystis* 속은 마이크로시스틴(microcystin)이라는 펩타이드 고리(cyclic peptide)로 구성된 독소를 만들어 간장 장애를 일으키는데 이 마이크로시스틴의 높은 독성과 광범위한 출현이 인간의 건강과 관련된 문제들을 많이 야기시켜서 마이크로시스틴으로부터 유래하는 위해성을 저감화할 필요성이 지속적으로 대두되고 있다(Bu et al., 2006; Gilroy et al., 2000; Oberholster et al., 2004; Watanabe et al., 1985). 박 등(1995)과 정 등(2004)의 연구에 의하면 60여종의 변이체가 존재하는데 이 중 마이크로시스틴-LR이 독성이 강하고 일반적으로 많이 발견이 된다. 세계 여러 국가는 음용수의 수질관리를 위해

모니터링을 강조하고 있으며, World Health Organization (WHO, 1998)은 마이크로시스틴-LR의 감시항목 값을 1 µg/L로 그 기준을 정하였다. 그리고 Falconer 등(1994)은 급성 독성 농도인 microcystin-LR 1 µg/L에 해당하는 *Microcystis*의 세포수를 약 5,000 cells/mL로 계산하였다. 그러나 수중에 존재하는 마이크로시스틴의 농도가 검출 한계보다 낮은 경우 검출이 어려운 문제가 있고 모니터링의 중요성 때문에 현장에서 간단하고 민감하게 검출할 수 있는 방법의 개발이 필요하다(Lee et al., 2006; Pyo et al., 2005b; Zhang et al., 2007).

마이크로시스틴의 분석은 HPLC(high performance liquid chromatography), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), PCR(polymerase chain reaction), FISH(fluorescence *in situ* hybridization) 등의 방법을 사용해 진단 및 정량 분석할 수 있다(McElhiney et al., 2005; Pyo et al., 2005a; Sangolkar et al., 2006). HPLC는 실험실에서 마이크로시스틴을 가장 많이 분석하는 방법이지만, 분석을 할 때 독소 구조의 다양성 때문에 숙련된 기술을 필요로 하고 분석 시간이 길며 분석 전에 샘플을 정제 및 농축하는 전처리 단계를 필수적으로 거쳐야 하는 단점이 있다. ELISA, PCR, FISH등은 DNA 또는 단백질(antigen) 수준에서 마이크로시스틴-LR을

[†] To whom correspondence should be addressed.
iskim@gist.ac.kr

암호화하고 있는 유전자 영역이나 마이크로시스틴-LR을 항원으로 인지해 항원과 특이적으로 결합하는 성질을 가지는 항체를 이용하는 분자생물학적 방법들이다. 단일 항체(monoclonal antibody)를 사용한 ELISA 분석의 경우 민감도가 뛰어나다는 것이 장점인데, 마이크로시스틴을 95 pg/mL 수준까지 검출할 수 있다고 보고된 연구 결과도 있다(McDermott et al., 1995).

본 연구는 그린 형광성이 있는 나노 크리스탈 Quantum-dot(이하 QD)을 마이크로시스틴을 항원으로 인지해서 마이크로시스틴과 특이적으로 결합할 수 있는 단일 항체와 생접합(bioconjugation)시키고 생접합된 QD525 anti-microcystin antibody conjugates(이하 QD525 Ab conjugates)를 사용해서 마이크로시스틴을 간단하고 빠르게 탐지할 수 있는 방법의 개발에 목적이 있다. QD는 CdSe/ZnS로 만든 나노 크기(10~20 nm)의 구형의 크리스탈 결정체로 형광의 성질이 있다. 기존의 FITC, Cy3와 같은 형광 염료(fluorescent dye)에 비해 빛의 흡수 파장대가 넓어서 서로 다른 형광색의 여러 QD를 단색광(monochrome)으로 동시에 나타낼 수 있으며 다양한 광원에서 잘 여기(excitation)될 수 있고 형광 강도도 아주 높다. 또 photobleaching이 거의 일어나지 않으며 시료 안에서 수일동안 적은 양으로도 밝은 빛을 발해 생물 의료 진단 분야에서 이미지 형상 및 탐침용으로 많이 사용해 왔다(Chan et al., 1998, 2002; Gao et al., 2005; Jyoti et al., 2003; Tatavarty et al., 2006).

마이크로시스틴은 내독소(endotoxin)이므로 *Microcystis* cell이 살아 있는 동안은 세포막을 통해서 확산되지 않으나 세포가 사멸 또는 파괴에 의해 분해(lysis)되어 마이크로시스틴이 밖으로 나오게 되면 문제가 된다. 본 실험에서는 *Microcystis* 배양액에 열을 가해 세포벽을 파괴시킨 *Microcystis* cell lysate를 QD Ab conjugates와 반응하기 위한 시료로 준비하였다. 실험은 셀(quartz cuvette)에 QD Ab conjugates와 *Microcystis* cell lysate를 반응시키고, 샘플 중 마이크로시스틴이 있을 때와 없을 때 또 *Microcystis* cell lysate의 양에 따라 다르게 나타나는 fluorescence curve의 패턴의 변화를 보았다.

CdSe/ZnS로 구성된 QD Ab conjugates나 QD DNA aptamer conjugates가 타겟 박테리아 세포 표면에 결합하게 되면 본래의 QD가 갖고 있는 fluorescence emission이 60~140 nm 정도 'downshift' 내지 'blue shift'된다는 연구 결과가 있다(Dwarakanath et al., 2004). QD biomolecule conjugates가 타겟과 결합 반응을 하면 본래 QD가 갖고 있는 major emission peak에서의 형광 강도가 감소하면서 감소한 에너지가 전달되어 minor emission peak의 형광 강도가 증가하게 된다. 형광이 'blue shift'되는 현상의 정확한 메커니즘은 밝혀지지 않았지만 QD-biomolecule conjugate가 타겟에 결합했을 때 전체 크기도 늘어나고 소수성, 친수성, pH, 전기 전하 등 환경적 요인의 차이가 발생해서 QD의 원래 구조가 압축되어 변형(physical deformation)된 결과라고 여러 연구 논문에서 가정하고 있다(Dwarakanath et al., 2004; Wilfried et al., 2002). 본 연구는 QD525 Ab conjugates가 마이

크로시스틴과 결합 반응했을 때, QD525의 광학적 성질이 변하는 것을 통해서 쉽고 간단하게 마이크로시스틴을 검출할 수 있다는 실험적 방식을 증명해 보이는데 초점을 맞추었다.

2. 재료 및 방법

2.1. *Microcystis aeruginosa*의 배양 및 마이크로시스틴 확인

QD525 Ab conjugates와 반응하기 전에 본 연구에 사용된 *Microcystis* cell lysate에 마이크로시스틴의 존재 유무를 먼저 확인하기 위해 *Microcystis aeruginosa* 균주(NIER-10038)를 국립환경과학원에서 분양받았고 BG11배지에서 25°C, 24시간 빛(24 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$)을 주는 조건으로 2주간 진탕(shaking) 배양하였다. 50 mL 배양액 전부를 동결 건조한 다음 초음파 분쇄기를 사용해서 진한 녹색이 얼어질 때까지 분쇄하였다. 분쇄된 샘플은 원심분리(14,000 rpm, 3분)를 3회 반복하였는데 이 때, 펠렛을 버리고 마이크로시스틴이 포함되어 있는 여액만 분리하여 모았다. C18 카트리지를 100% 메탄올 5 mL와 증류수 5 mL를 차례로 통과시켜 활성화한 후, 마이크로시스틴이 포함된 상등액을 활성화된 C18 카트리지에 통과시켜 흡착시켰다. 흡착 후 20% 메탄올 2 mL를 카트리지내로 흘려 불순물을 제거한 다음 최종 100% 메탄올 1 mL를 카트리지(cartridge) 내로 통과시켜 마이크로시스틴이 있다고 가정되는 시료를 모았다(정등, 2004). 용출된 시료는 UV 스펙트럼(UV-vis spectrophotometer, Shimadzu)과 HPLC분석을 통해 *Microcystis* cell lysate안에 마이크로시스틴이 포함되어 있음을 확인하였다. HPLC분석은 photodiode array(PDA) detector(Varian, Walnut Creek, CA)와 reverse phase C8 column(5 μm particle size, 4.6 mm \times 250 mm, Milford, MA)를 사용했고 이동상(mobile phase)은 acetonitrile과 8 mM ammonium acetate를 사용했다. 0분 20% acetonitrile, 25분 35% acetonitrile, 30분 35% acetonitrile 그리고 40분 80% acetonitrile 이 1 mL/min의 속도로 흐르도록 하였고 238 nm에서 UV detector로 마이크로시스틴이 *Microcystis* cell lysate안에 있음을 확인하였다.

2.2. *Microcystis* cell lysate 준비

QD525 Ab conjugates와 반응시키기 위한 *Microcystis aeruginosa* cell lysate(이하 *Microcystis* cell lysate)는 boiling water bath extraction을 통해 준비하였다(Bu et al., 2006; Metcalf et al., 2000). 그 과정은 다음과 같다. (1) *M. aeruginosa* 배양액을 7,000 rpm, 15분 원심분리해서 상등액은 버리고 펠렛을 증류수에 다시 현탁시킨다. (2) 끓는 물에 15분 동안 놓아둔다. (3) 얼음에서 식힌 다음 4°C에서 12,000 rpm, 10분 원심분리하여 모은 상등액이 실험에 사용된 *Microcystis* cell lysate이다.

2.3. QD525와 마이크로시스틴 단일 항체의 bioconjugation

본 연구에 사용된 QD는 Invitrogen에서 구매한 Qdot525

Antibody Conjugation Kit(Cat# Q22041MP)를 사용했고 마이크로시스틴 단일 항체(anti-microcystin monoclonal antibody)는 Alexis Biochemicals(Cat# ALX-804-320, 200 µg)을 통해 구매했다. 동결 건조된 항체 200 mg을 1 mg/mL로 만들기 위해 0.02% sodium azide가 포함된 PBS (phosphate buffered saline: 10 mM phosphate, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.2) 200 mL에 녹였다. QD525와 마이크로시스틴 단일 항체를 conjugation해서 QD525 Ab를 얻는 것은 제조회사(Invitrogen, Qdot antibody Conjugation Kit cat# 2200-1)에서 제공하는 매뉴얼을 따랐으며 실험 과정을 요약하면 다음과 같다.

- (1) QD와 hetero-bifunctional crosslinker인 SMCC(4-maleimidomethyl-cyclohexanecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester)를 반응시켜 QD의 표면에 maleimide기가 생기도록 한다. 반응하고 남은 SMCC는 size exclusion chromatography를 통해 제거한다.
- (2) 1 mg/mL 항체 200 µL를 DTT (dithiothreitol)와 환원 반응시켜 항체 표면에 SH기가 불도록 한다. 반응하고 남은 DTT는 size exclusion chromatography를 통해 제거한다.
- (3) (1)에서 활성화된 QD와 (2)에서 환원된 항체를 혼합해 실온에서 1시간 반응시킨다. 1시간 뒤 2-mercaptoethanol을 넣고 30분 동안 반응을 정지 및 안정화(quenching) 시킨다.
- (4) (3)이 끝난 반응액을 ultrafiltration을 해서 농축한 다음, separation media column을 통해 QD525 Ab conjugates를 분리한다.

2.4. Fluorescence curve 분석

Fluorescence curve의 분석은 fluorescence spectrophotometer(F-2500, Hitachi)를 사용했고 분석 조건은 Table 1과 같다. QD525와 마이크로시스틴 단일 항체를 bioconjugation 시킨 QD525 Ab conjugates는 35°C에서 회전하면서 1시간 반응하는 조건으로 *Microcystis* cell lysate와 반응시켰다.

Table 1. Experimental conditions for fluorescence measurement

Measurement type	Wavelength scan
Scan mode	Emission
Data mode	Fluorescence
Excitation λ (nm)	400 nm
Emission λ (nm)	400~700 nm
Scan speed	300 nm/min
Excitation slit	5.0 nm
Emission slit	5.0 nm
PMT voltage	700 V

3. 결과 및 고찰

3.1. *Microcystis aeruginosa*의 배양 및 마이크로시스틴 확인

Fig. 1(a)는 배양된 *Microcystis aeruginosa*의 모습을 나타내고 있다. 수표면에 부유하거나 바닥 또는 일정한 깊이까지 침강하여 자라는 것도 관찰되었다. Fig. 1(b)는 CLSM (confocal laser scanning microscopy, Carl Zeiss LSM5)을 사용해 배양한 *Microcystis aeruginosa*를 DIC (differential interference contrast) image로 찍은 것이다. 세포의 직경은 평균 5 µm 정도이고 세포를 둘러싸고 있는 젤라틴 기질의 주변부가 현미경으로 관찰했을 때 뚜렷하였고 다수가 모여 군체를 이루고 있었다. 배양한 군체가 녹색을 나타내는 것은 phycocyanin, chlorophyll a와 같은 색소 때문이며 각 세포는 green autofluorescence를 가진다(Fig. 1(c)).

Fig. 2는 *Microcystis aeruginosa* 셀을 파괴했을 때 마이크로시스틴이 있는가를 확인하기 위해 HPLC와 UV spectrum을 사용해 분석한 결과이다. 마이크로시스틴은 HPLC분석을 하면 238 nm에서 피크가 나와야 하고 같은 시료를 UV spectrometer를 사용해 흡광도를 분석하면 peak가 나오는 파장대가 238 nm와 유사하게 나와야 *Microcystis* cell lysate 안에 마이크로시스틴이 있다고 할 수 있다(Domingos et al., 1999). *Microcystis* cell lysate의 UV spectrum 분석 결과(Fig. 2(b)), 230 nm 부근에서 흡광도가 높게 나타났다. 또 *Microcystis* cell lysate의 농도가 감소함에 따라 흡광도가 감소해서 absorbance peak가 작아지는 것도 확인하였다. 반면 *Microcystis* cell lysate와 비교하기 위해 *E. coli* lysate의 UV 흡광도를 측정하였을 때 200~

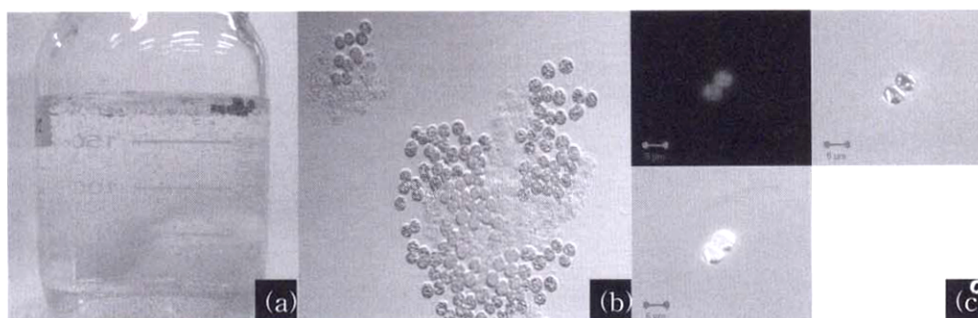


Fig. 1. (a) Visual image, (b) DIC image and (c) fluorescence image of *Microcystis aeruginosa*.

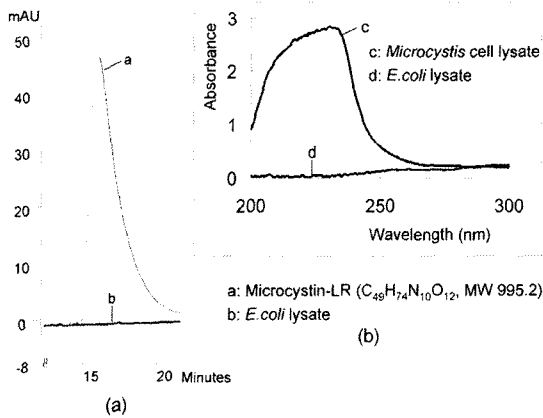


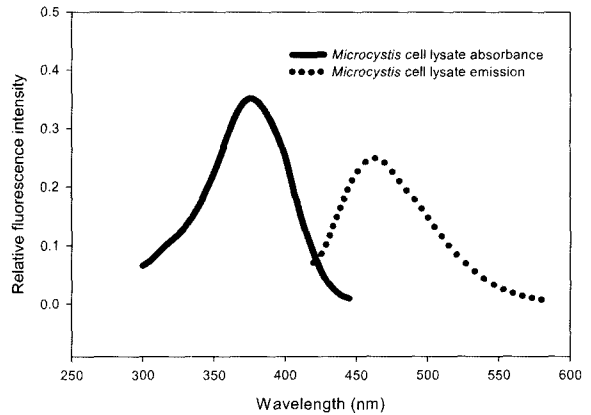
Fig. 2. (a) HPLC chromatograms of commercial microcystin-LR and *E. coli* lysate and (b) UV absorption spectra of *Microcystis* cell and *E. coli* lysate.

240 nm에서 빛이 흡수되는 것은 거의 없었다. 실제 Microcystin-LR 케미칼을 구매해서 HPLC로 분석해 보면 Fig. 2(a)의 a와 같이 238 nm에서 피크가 나타나며 *Microcystis* cell lysate도 238 nm에서 피크가 관찰되었다(Data not shown). 그러나 *E. coli* lysate의 경우 피크가 나타나지 않음을 볼 수 있다.

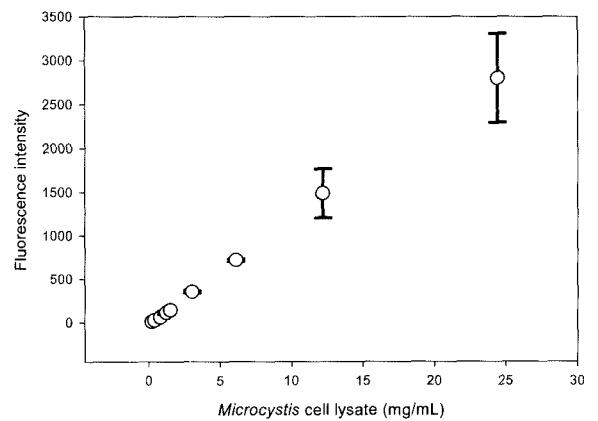
3.2. *Microcystis* cell lysate의 fluorescence 측정

Fig. 3(a)는 boiling water bath extraction를 통해 준비한 *Microcystis* cell lysate의 absorbance와 emission spectra를 나타낸 것이다. *Microcystis* cell lysate는 300~450 nm범위의 빛을 흡수하고 460 nm에서 emission 피크를 나타냈다. 400~460 nm에서 emission curve가 나타나는 근거를 찾아 보면, 우선 마이크로시스틴은 fluorophore가 없기 때문에 형광의 성질이 없다. Chlorophyll a는 440 nm와 680 nm에서, phycocyanin은 629 nm와 659 nm에서 각각 excitation과 emission 피크를 가지기 때문에 이들은 *Microcystis* cell lysate가 460 nm에서 형광 피크가 나타나는 현상을 설명하기에 부족하다. 하지만 Fig. 3(a)는 BFP(blue fluorescence protein)의 absorbance, emission spectra 패턴과 유사하고 또한 humic acid와 같은 복잡한 유기 화합물질들이 이 파장 부근에서 형광의 성질을 나타내므로 460 nm 부근에서 형광 피크가 나타나는 현상은 *Microcystis* cell lysate내 복잡한 세포 성분들의 종합적 성질의 결과물이라고 할 수 있겠다(Day et al., 2001; Sierra et al., 2005).

Fig. 3(b)는 *Microcystis* cell lysate의 농도에 따른 형광 강도를 460 nm에서 측정한 그래프이다. *Microcystis* cell lysate의 농도가 증가함에 따라 형광 강도도 비례하여 증가하였다. 마이크로시스틴의 농도는 *Microcystis* cell의 dry weight에 비례하고(Long et al., 2001) *Microcystis* cell의 dry weight는 *Microcystis* cell lysate 양에 상응한다. 따라서 460 nm에서 측정한 형광 강도가 높으면 마이크로시스틴의 양도 *Microcystis* cell lysate 양에 비례해서 많다는 것을 알 수 있다. *Microcystis* cell lysate가 QD525 Ab conjugates와 반응한 후 나타나는 형광 강도의 변화도 *Microcystis* cell lysate 안에 있는 마이크로시스틴의 양에 따라 차이가 날 것으로 가정된다.



(a) Absorbance/emission spectra of *Microcystis* cell lysate



(b) Fluorescence measurement at 460 nm according to the concentration of *Microcystis* cell lysate

Fig. 3. Fluorescence measurement of *Microcystis* cell lysate.

3.3. QD525 anti-microcystin monoclonal antibody conjugates와 *Microcystis* cell lysate의 반응

Fig. 4(a)는 QD525 Ab conjugates와 *Microcystis* cell lysate가 반응했을 때 fluorescence curve의 변화를 나타낸 것이고 Fig. 4(b)는 마이크로시스틴이 없는 *E. coli* lysate를 QD525 Ab conjugates와 반응했을 때의 fluorescence curve의 변화를 나타낸 것이다. Boiling water bath extraction를 통해 준비한 *Microcystis* cell lysate는 460 nm 부근에서 형광을 나타내는 피크가 나타나는데 이는 시아노박테리아가 갖고 있는 색소 성분 및 복잡한 유기 물질 성분 때문이며 *E. coli* lysate는 460 nm 부근에서 피크가 없다. QD525 Ab conjugates와 *Microcystis* cell lysate가 결합 반응한 셀(QD525 Ab conjugates + *Microcystis* cell lysate)과 QD525 Ab와 *E. coli* lysate가 결합 반응한 셀(QD525 Ab conjugates + *E. coli* lysate)의 fluorescence curve를 1시간 반응 뒤 각각 QD525 Ab conjugates의 fluorescence curve와 비교해 보면, QD525 Ab conjugates + *E. coli* lysate는 fluorescence intensity의 변화가 없었고 QD525 Ab conjugates의 fluorescence curve와 똑같이 겹쳐졌다. 반면 QD525 Ab conjugates + *Microcystis* cell lysate의 fluorescence curve의 경우 525 nm에서는 형광 피크가 낮아졌고 460 nm 부근에서는 형광 피크가 올라갔다. 이것은 QD525 Ab

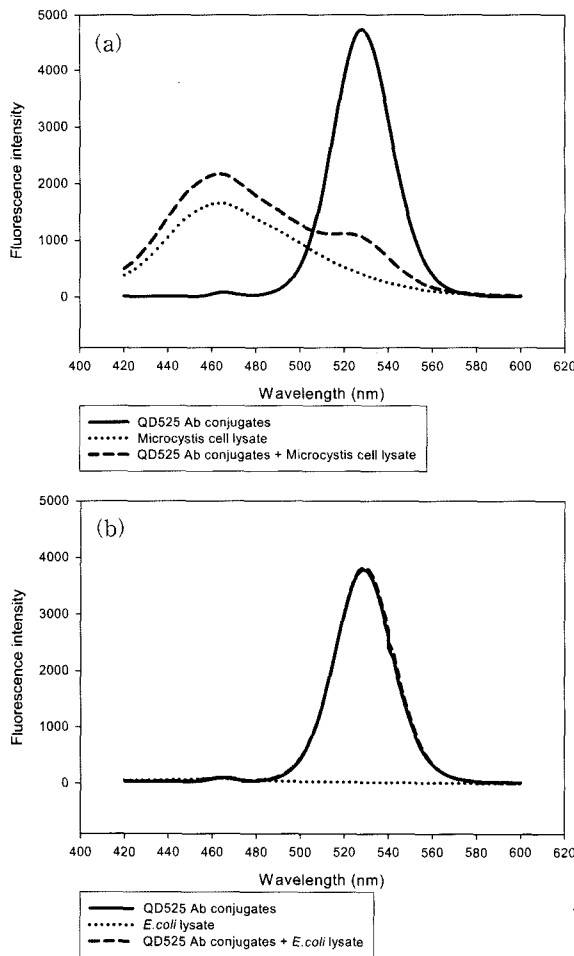


Fig. 4. Change of fluorescence emission spectra after reaction of QD525 Ab conjugate with (a) *Microcystis* cell and (b) *E. coli* lysate.

conjugates에 타겟 물질이 결합함으로써 물리적 변형이 일어났기 때문에 QD가 본래 갖고 있던 525 nm (major peak)의 에너지가 460 nm (minor peak) 부근으로 이동한 것이다. 마이크로시스틴이 없는 *E. coli* lysate는 QD525 Ab conjugates와 반응한 뒤 fluorescence spectra의 변화가 없지만 마이크로시스틴이 있는 *Microcystis* cell lysate는 QD525 Ab conjugates와 반응했을 때 마이크로시스틴과 특이적 항원, 항체 반응을 하여 fluorescence spectra가 변화함을 알 수 있었다.

Fig. 5는 QD525 Ab conjugates가 *Microcystis* cell lysate와 반응할 때 반응 시간에 따라 525 nm에서 형광 강도가 감소되는 정도를 상대적으로 나타냈다. QD525 Ab conjugates와 *Microcystis* cell lysate의 반응 양에 따라 다르지만 30분 반응 시간 이후에서 더 이상의 감소 없이 안정한 추세를 보인다는 것을 알 수 있었다.

Fig. 6은 QD525 Ab conjugates를 *Microcystis* cell lysate와 1시간 반응시켰을 때(b), 약 460 nm의 형광 강도가 초기보다 약 2배 정도 증가하였으나 proteinase를 처리한 후 1시간(c)과 2시간(d) 뒤 460 nm 부근에서 형광 강도가 점차적으로 감소함을 보여주고 있다. 이것은 proteinase가 QD525 Ab conjugates와 마이크로시스틴의 결합체를 분해

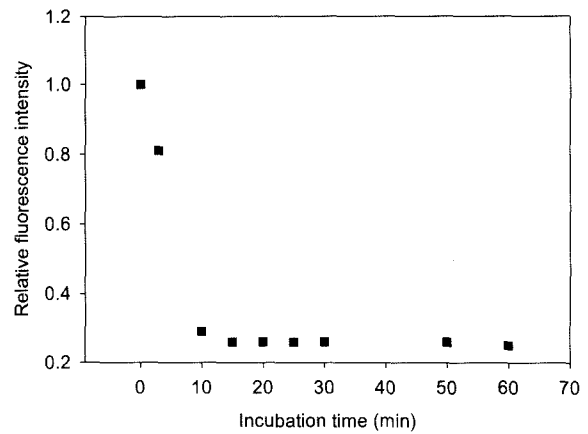


Fig. 5. Relative fluorescence intensity of mixture of QD525 Ab conjugates and *Microcystis* cell lysate according to the incubation time.

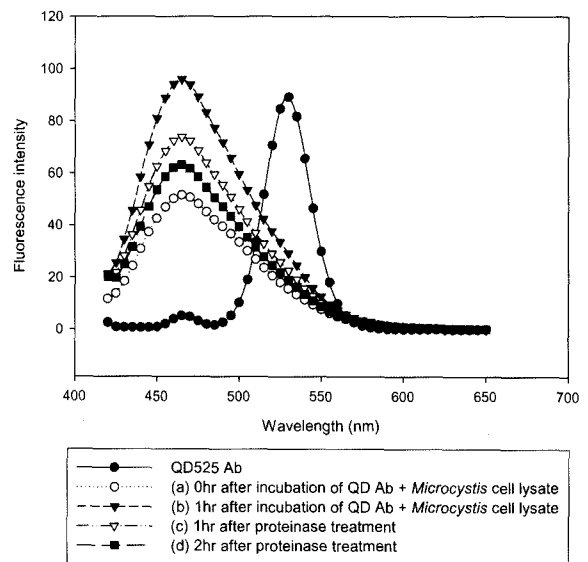
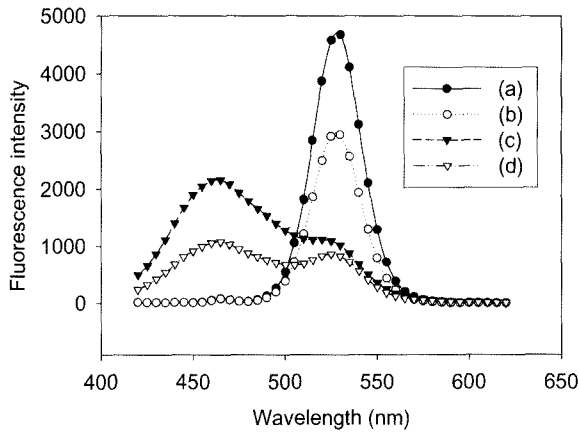


Fig. 6. Fluorescence spectra of the mixture of QD525 Ab conjugates and *Microcystis* cell lysate after proteinase treatment.

하는 역할을 해서 다시 형광 강도가 감소한 것이다. Fig. 4와 Fig. 6을 통해서 QD525 Ab conjugates가 *Microcystis* cell lysate에 있는 마이크로시스틴과 특이적 항원 항체 결합 반응을 한다는 것을 알 수 있다.

Fig. 7은 *Microcystis* cell lysate의 양은 동일하게 하고 QD525 Ab conjugates의 양을 차이가 나게 했을 때 fluorescence spectra의 변화를 나타낸 것이다. *Microcystis* cell lysate의 양이 같기 때문에 이 안에 반응할 수 있는 마이크로시스틴의 양도 거의 같은 상태에서 QD525 Ab conjugates의 양을 반으로 줄여 반응시키면 525 nm에서의 형광 강도의 차이는 거의 없는 반면 460 nm 부근에서의 형광 강도는 비례해서 거의 반으로 줄어들었다. 이것은 525 nm에서의 QD525 Ab conjugates가 갖고 있던 에너지가 downshift되어 460 nm로 전달된 결과인데 QD의 양이 반으로 줄어들면 downshift되어 minor 피크로 전달되는 에너지의 양도 반으로 감소하는 것을 알 수 있었다.



(a) QD525 Ab conjugates 6 μ L
 (b) QD525 Ab conjugates 3 μ L
 (c) QD525 Ab conjugates 6 μ L + *Microcystis* cell lysate 300 μ L
 (d) QD525 Ab conjugates 3 μ L + *Microcystis* cell lysate 300 μ L

Fig. 7. Fluorescence spectra of the mixture of QD525 Ab conjugates and *Microcystis* cell lysate according to the amount of QD525 Ab.

4. 결론

QD525 Ab conjugates와 *Microcystis* cell lysate를 반응시키면 원래 나노 크리스탈 QD가 가지고 있는 고유의 광학 특성이 변화하여 emission curve의 변화가 나타난다. 이 fluorescence emission 피크가 downshift되는 변화를 통해서 샘플 중 마이크로시스틴이 존재하는지 여부를 알 수 있었다. 그러나 fluorescence curve 측정 전에 *Microcystis* cell lysate에 있는 마이크로시스틴과 마이크로시스틴에 결합된 QD525 Ab conjugates를 정확하게 정량할 수 있는 실험이 요구되고 또 QD525 Ab conjugates와 *Microcystis* cell lysate의 반응 시간, 농도, 반응 온도, 반응 부피 등 인자들을 고려해 반응을 최적화시키는 연구를 앞으로 수행해야 한다.

사 사

본 연구는 광주과학기술원 분산센서네트워크 연구소와 일부 환경모니터링 신기술연구센터(ADEMRC)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

박혜경, 진익렬, 류홍일, 류재근, Microcystin(Hepatotoxin) Production form Korean Isolates of the *Microcystis* spp. (Cyanobacteria), *한국수질보전학회지*, **12**(1), pp. 29-34 (1995).
 정원화, 최정민, 김종민, 임연택, 정현미, 국내에서 분리된 남조류의 개체별 microcystins 농도, *대한상해수도학회 한국물환경학회 2004공동 추계 학술발표회 논문집*, pp. C113-C117 (2004).
 Bu, Y.-Z., Li, X.-Y., Zhang, B.-J., Chung, I.-K., and Lee, J.-A., Microcystins cause embryonic toxicity in mice, *Toxicology*,

48(8), pp. 966-972 (2006).
 Chan, W. C. W., Maxwell, D. J., Gao, X., Bailey, R. E., Han, M. and Nie, S., Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging, *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, pp. 40-46 (2002).
 Chan, W. C. W. and Nie, S., Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection, *Science*, **281**, pp. 2016-2018 (1998).
 Day, R. N., Periasamy, A. and Schaufele, F., Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy of Localized Protein Interactions in the Living Cell Nucleus, *Methods*, **25**, pp. 4-18 (2001).
 Domingos, P., Rubim, T. K., Molica, R. J. R., Azevedo, S. M. F. O. and Carmichael, W. W., First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria isolated from a northeast Brazilian drinking water supply, *Environmental Toxicology*, **14**(1), pp. 31-35 (1999).
 Dwarakanath, S., Bruno, J. G., Shastry, A., Phillips, T., John, A., Kumar, A. and Stephenson, L. D., Quantum dot-antibody and aptamer conjugates shift fluorescence upon binding bacteria, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **325**(3), pp. 739-743 (2004).
 Falconer, I. R., Burch, M. D., Steffensen, D. A., Choice, M. and Coverdale, O. R., Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water in growing pigs, as a animal model for human injury and risk assessment, *Environmental Toxicology & Water Quality*, **9**(2), pp. 131-139 (1994).
 Gao, X., Yang, L., Petros, J. A., Marshall, F. F., Simons, J. W. and Nie, S., In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots, *Current Opinion in Biotechnology*, **16**, pp. 63-72 (2005).
 Gilroy, D. J., Kauffman, K. W., Hall, R. A., Huang, X. and Chu, F. S., Assessing Potential Health Risks from Microcystin Toxins in Blue-Green Algae Dietary Supplements, *Environmental Health Perspectives*, **108**(5), pp. 435-439 (2000).
 Jyoti, K. J., Hedi, M., Mauro, J. M. and Simon, S. M., Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates, *Nature Biotechnology*, **21**, pp. 47-51 (2003).
 Lee, J. W., Chon, K., Jang, A., Yu, H. W., Cho, J. and Kim, I. S., The effect of Temperature on Microsensor Chip for the Monitoring of Nitrogenous Compounds (NH_4^+ , NO_3^-), *Journal of Korean Society on Water Quality*, **23**(1), pp. 33-37 (2006).
 Long, B. M., Jones, G. J. and Orr, P. T., Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate, *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(1), pp. 278-283 (2001).
 McDermott, C. M., Feola, R. and Plude, J., Detection of cyanobacterial toxins (microcystins) in waters of northeastern wisconsin by a new immunoassay technique, *Toxicol.*, **33**(11), pp. 1433-1442 (1995).
 McElhiney, J. and Lawton, L. A., Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **203**, pp. 219-230 (2005).
 Metcalf, J. S. and Codd, G. A., Microwave oven and boiling

- waterbath extraction of hepatotoxins from cyanobacterial cells, *FEMS Microbial. Lett.*, **184**, pp. 241-246 (2000).
- Oberholster, P. J., Botha, A.-M. and Grobbelaar, J. U., *Microcystis aeruginosa*: source of toxic microcystins in drinking water, *African Journal of Biotechnology*, **3**(3), pp. 159-168 (2004).
- Pyo, D. J., Lee, J. G. and Choi, E. Y., Trace analysis of microcystins in water using enzyme-linked immunosorbent assay, *Microchemical Journal*, **80**, pp. 165-169 (2005a).
- Pyo, D. J., Park, G. Y., Choi, J. C. and Oh, C. S., Microcystin Detection Characteristics of Fluorescence Immunochromatography and High Performance Liquid Chromatography, *Bull. Korean. Chem. Soc.*, **6**(2), pp. 268-272 (2005b).
- Sangolkar, L. N., Maske, S. S. and Chakrabarti, T., Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria, *Water Research*, **40**(19), pp. 3485-3496 (2006).
- Sierra, M. M. D., Giovanela, M., Parlanti, E., Soriano-Sierra and E. J., Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques, *Chemosphere*, **58**, pp. 715-733 (2005).
- Tatavarty, R., Samal, S., Lee, S., Kim, S., Cho, J. and Kim, I. S., Determination of The Size of Water-Soluble Nanoparticle and Quantum Dots by Field-Flow Fractionation, *J. of Nanoscience and Nanotechnology*, **6**, pp. 2461-2467 (2006).
- Watanabe, M. F. and Oishi, S., Effects of Environmental Factors on Toxicity of a Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under Culture Conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, **49**(5), pp. 1342-1344 (1985).
- Wilfried, G. J. H. M. van Sark, Patrick, L. T. M., Frederix, Ageeth, A., Bol, Hans, C., Gerritsen, Andries Meijerink, Blueing, Bleaching, and Blinking of Single CdSe/ZnS Quantum Dots, *ChemPhysChem*, **3**(10), pp. 871-879 (2002).
- World Health Organization WHO, Guidelines for Drinking-water quality Addendum to Volume 2. Health Criteria and Other Supporting Information, 2nd ed., World Health Organization, Geneva, pp. 95-110 (1998).
- Zhang, F., Yang, S. H., Kang, T. Y., Cha, G. S., Nam, H. and Meyerhoff, M. E., A rapid competitive binding nonseparation electrochemical enzyme immunoassay (NEEIA) test strip for microcystin-LR (MCLR) determination, *Biosensors and Bioelectronics*, **22**(7), pp. 1419-1425 (2007).