

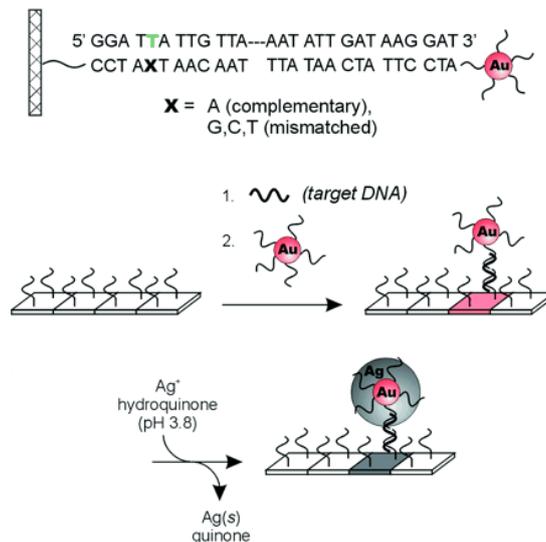
나노-바이오 진단의 연구동향 1

생물학에서 나노구조체를 이용하여 특정 반응을 검출하는 방법은 보통 광학적 방법, 전기적 방법, 자기적 방법으로 구분할 수 있다. 여기서는 먼저 광학적 방법을 이용하여 DNA를 분석한 예들에 대하여 알아보려고 한다.

1. Scanometric DNA Assay[1]

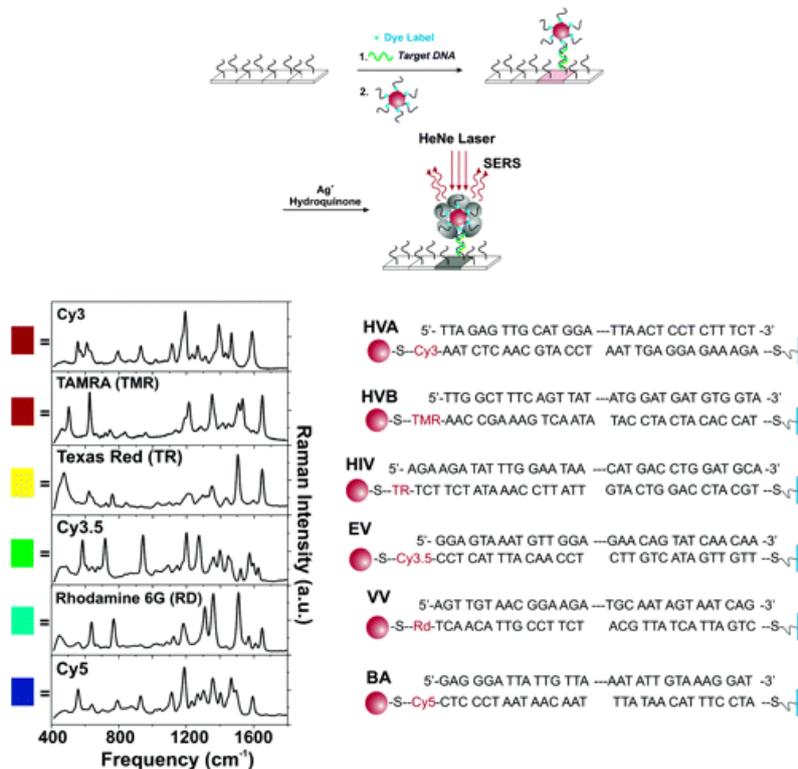
금 나노파티클(NP)을 이용하는 이 방법은 형광 물질을 달아 어레이를 형성하는 기술들에 비하여 몇 가지 장점들을 가지고 있다. 우선, single base-pair mismatch와 perfect target oligonucleotide를 구분할 수 있는 능력이 탁월하다. 또한 빠르고 쉬운 방법이며 분석을 위하여 비싸고 복잡한 장치가 필요하지 않다. 이러한 장점들은 NP들의 조성을 조절하여 multiple screening에 적용할 수 있지만 아직까지는 민감도의 제한(1-10 nM)이 있다. 정량적으로 보고된 최적 검출 한도는 50 pM 정도이나, 이는 형광 물질을 이용하여 보고된 최적 결과(~600 fM)에는 미치지 못한다. 한편, 금 NP에 금속을 증착시키면 DNA 검출에서 신호 증폭이 있음이 알려져 있다. 특히 은을 증착시킨 경우에 증착시키지 않았을 때보다 검출한도가 약 10000배 정도 증가함이 보고 되었다[2].

아래의 그림은 scanometric DNA assay를 형성하여 분석하는 과정을 간단하게 나타낸 것이다. 우선, 유리 기판에 특정 single DNA sequence를 심은 후에 또 다른 single DNA sequence로 개질된 금 NP들과 이들 두 개의 DNA sequence들과 결합할 수 있는 target DNA를 반응시키면 hybridization에 의하여 target DNA를 검출할 수 있다. 하지만 이때의 검출한도는 높지 않기 때문에 hydroquinone(pH=3.8)으로부터 은을 증착시키게 되면 신호증폭 효과에 의하여 검출한도를 증가시킬 수 있다.



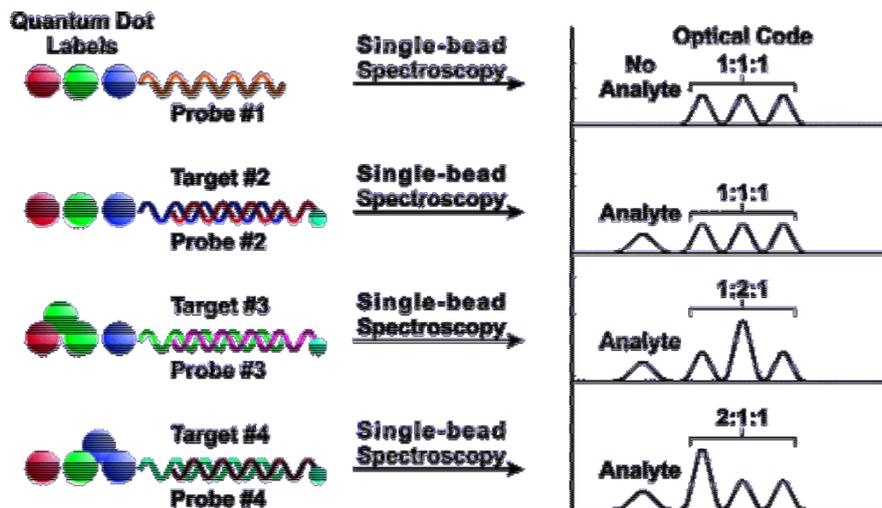
2. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) 이용[3]

금 NP에 DNA와 Raman-active dye들을 붙여서 DNA target들을 multiple 검출하는 방법에 대하여 알아보자. 이 과정에서도 은을 증착하는 과정이 필요하다. 이유는 은을 증착하지 않았을 경우에는 Raman scattering 신호를 얻을 수 없고 은이 증착한 경우에 매우 증가된 Raman scattering 신호를 얻을 수 있어 적은 양의 DNA도 검출할 수 있기 때문이다. 이 방법은 높은 선택성과 높은 민감도를 가지며 또한 다양한 Raman tag를 이용하여 다양한 NP probe들을 만들 수 있기 때문에 multiple 검출에 이용할 수 있다. 아래의 상단 그림은 은 증착을 통하여 SERS이 발생하는 과정의 개략도이고 하단 그림은 금 NP에 상용적으로 널리 사용되는 여섯 종류의 dye들과 특정 virus 또는 gene들(우측)과 hybridization을 할 수 있는 sequence들을 결합시킨 후에 분석한 Raman spectra(좌측)를 나타낸다. 사용된 dye들과 DNA들은 다음과 같다. Cy3, TAMRA, Texas-Red, Cy3.5, Rhodamine 6G, Cy5 와 complementary sequences for hepatitis A virus Vall7 polyprotein gene (HVA), hepatitis B virus surface antigen gene (HVB), human immunodeficiency virus (HIV), Ebola virus (EV), variola virus (smallpox, VV), Bacillus anthracis (BA) protective antigen gene. 각각의 dye 들에 나타내는 특정 frequency를 취하게 되면 (예, Cy3 = 1588 cm^{-1} , TAMRA for 1650 cm^{-1}) SERS 신호를 분석함으로써 multiple detection 뿐만 아니라 single nucleotide polymorphism(SNP), 즉 DNA sequence에서 하나의 base만 다른 경우까지 분석할 수 있다. 이 방법의 보고된 검출한계는 $\sim 1\text{ fM}$ 이다.



3. Quantum dots 이용[4]

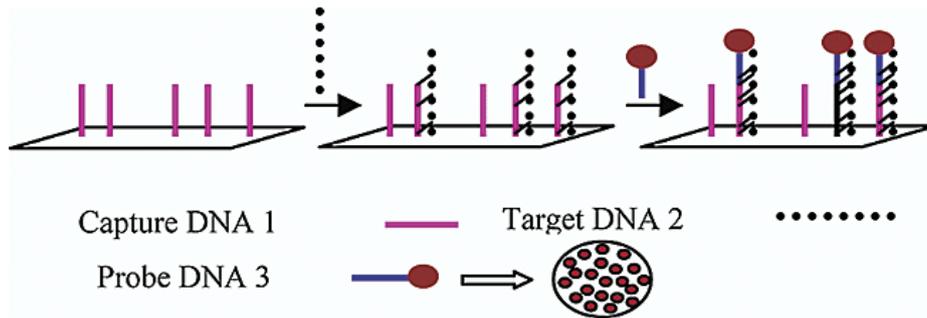
Quantum dots은 넓은 여기(excitation) 스펙트라, 좁은 발산(emission) 스펙트라와 쉽게 발산 성질을 조절할 수 있는 특징을 가진다. 이러한 특성은 바이오 검출 어레이에서 널리 사용되고 있는 형광 marker들을 대체할 수 있는 잠재성을 보여준다. 고분자 구조에 label로서 quantum dot들을 도입함으로써 multiple DNA 검출을 할 수 있음이 보고되었다[4, 아래그림]. 우선, target DNA에 형광 물질로 label를 하였고, target 형광에서 발산하는 파장과 다른 파장을 가지는 quantum dot들을 포함하고 있는 고분자 마이크로비드에 probe DNA를 도입하였다. 서로 다른 비율을 가지는 quantum dot들을 포함한 마이크로비드와 target DNA를 반응시키면 형광 신호로부터 target의 존재 여부를 알 수 있게 된다. 마이크로비드의 identification 정확도는 99.99%로 매우 우수하다. 이러한 coding 기술은 gene expression 연구들과 의학 진단 등에 새로운 기회를 제공할 것이라 생각된다.



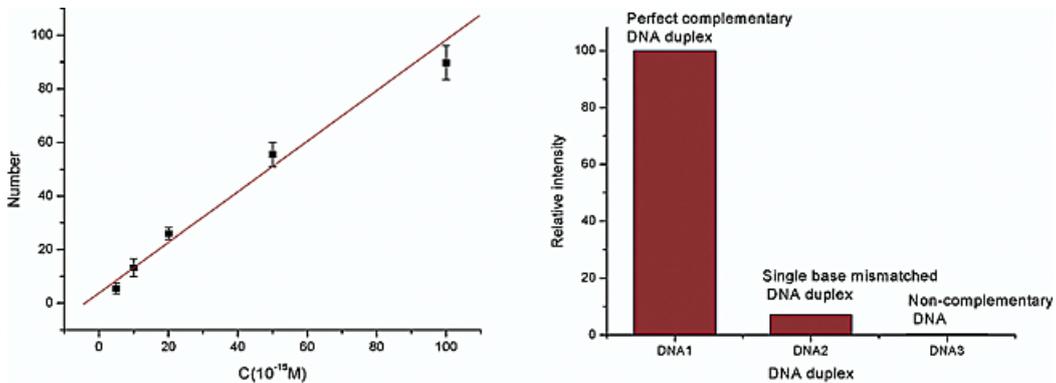
4. Silica nanoparticle 이용 [5,6]

칩에 바탕을 둔 sandwich DNA 어레이를 위한 label로서 silica NP을 이용하는 방법이 보고되었다. 이는 oligonucleotide로 표면 개질된 silica NP에 형광 dye들을 도입하여 DNA hybridization을 이용한 방법이다. 바이오분석을 위한 형광 probe로서 silica NP은 다음과 같은 세 가지 장점을 가진다. 첫째, 대단히 많은 수의 형광물질을 하나의 NP 안에 넣을 수 있다. 이는 하나의 NP가 결합하여도 대단히 큰 형광 증폭효과를 얻을 수 있어서 target에 대한 증폭이 필요 없고 매우 저농도의 DNA 검출이 가능하다. 둘째, NP는 매우 빛에 안정적이기 때문에 측정에 있어서 매우 일정하고 정확한 결과를 얻을 수 있다. 셋째는 silica 표면이 생체적합성 물질임과 동시에 바이오물질들을 고정화하기 위한 표면 개질이 용이하므로 매우 다양한 응용성

을 가진다. 아래 그림은 이러한 과정을 개략적으로 보여준다[5]. Capture DNA 1을 유리 기판에 고정화 한 후에 probe DNA 3와 형광 물질들이 결합된 silica NP와 target DNA 2를 함께 넣어 주면 DNA hybridization에 의하여 NP가 특정 영역에만 고정화된다. 여기서 반응하는 target DNA는 하나이지만 target DNA와 결합한 NP안에 매우 많은 형광물질이 존재하게 되어 일반적인 형광 dye를 사용하였을 때보다 검출 한계가 약 1000배 증가시킬 수 있었다.



한편, 농도에 따른 형광을 나타내는 NP의 개수를 나타낸 그래프가 하단의 왼쪽 그림이다. 이 방법의 검출 한계는 약 ~ 1 fM이었다. 하단의 오른쪽 그림은 silica NP를 이용하여 single base mismatched DNA를 분석할 수 있음을 나타낸 것이다. 상대적인 세기가 100 : 7 (perfect match : single mismatch)로 아주 우수함을 알 수 있다.



다양한 나노-바이오 시스템들이 DNA 검출을 위하여 이용되고 있음을 알 수 있었고 위에서 언급된 DNA 검출 방법들의 검출 한계를 다음의 표로 나타내었다.

Assay	DNA 검출한계
Scanometric (Au nanoparticles with Ag amplification) ^{1,2}	50 fM
Raman spectroscopy (Au nanoparticles with Ag amplification) ³	~ 1 fM
Fluorescence (fluorescent silica nanoparticles) ⁵	~ 1 fM

References

- [1] Taton, T. A., Mirkin, C. A., and Letsinger, R. L., "Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes", *Science*, **289**, 1757, 2000.
- [2] Storhoff, J. J., Marla, S. S., Garimella, V., and Mirkin, C. A., "Labels and Detection Methods," *Microarray Technology and its Applications*, 147-174, 2004.
- [3] Cao, Y. W., Jin, R., and Mirkin, C. A., "Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection," *Science*, **297**, 1536, 2002.
- [4] Han, M., Gao, X., Su, J. Z., and Nie, S., "Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules," *Nature Biotechnology*, **19**, 631, 2001.
- [5] Zhao, X., Tapecc-Dytioco, R., and Tan, W., "Ultrasensitive DNA Detection Using Highly Fluorescent Bioconjugated Nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 11474, 2003.
- [6] Zhao, X., Hilliard, L. S., Mechery, S. J., Wang, Y., Bagwe, R. P., Jin, S., and Tan, W., "A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles," *PNAS*, **101**, 15027, 2004.