

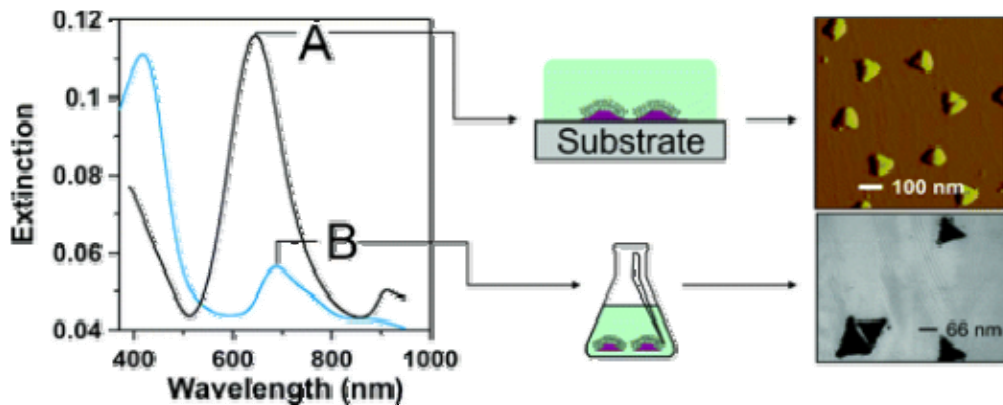
# Nanobiotechnology 최신 연구동향 5

## 1. Nanoscale Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) Biosensors [1-5]

빛과 금속 나노파티클들(NPs)의 상호작용은 다양한 적용 분야(nanoscale lithography, surface-enhanced spectroscopies, chemical and biological sensing)를 가지기 때문에 상당한 관심 속에 연구가 진행되어 왔다. 빛은 반도체 NPs에서 집합된 전자의 진동을 여기(exciting)함으로써 나노미터스케일로 국지화, 조작 및 증폭될 수 있다. 이를 localized surface plasmon resonance(LSPR)이라 한다. NPs의 크기, 형태, 물질과 국소 유전체 환경을 변화시키면 plasmon의 resonance를 가시광선 영역과 근접 적외선 영역에서 조절할 수 있다[1]. 금속(bulk or nanoscale) 표면에 적당한 진동수를 가진 빛을 쬐어주게 되면 금속의 전도전자들이 빛의 진행 방향에 수직으로 간섭성(coherent) 진동을 하게 된다. 이러한 진동을 plasmon이라 한다. Plasmon은 금속 표면전자밀도의 변동(경도 전자밀도 파동)으로 분석될 수 있다. 입사 빛의 진동수보다 작은 금속 NPs들의 경우에는 bulk 금속과 달리 이러한 plasmon이 NP의 표면에 국지화(localized)된다.

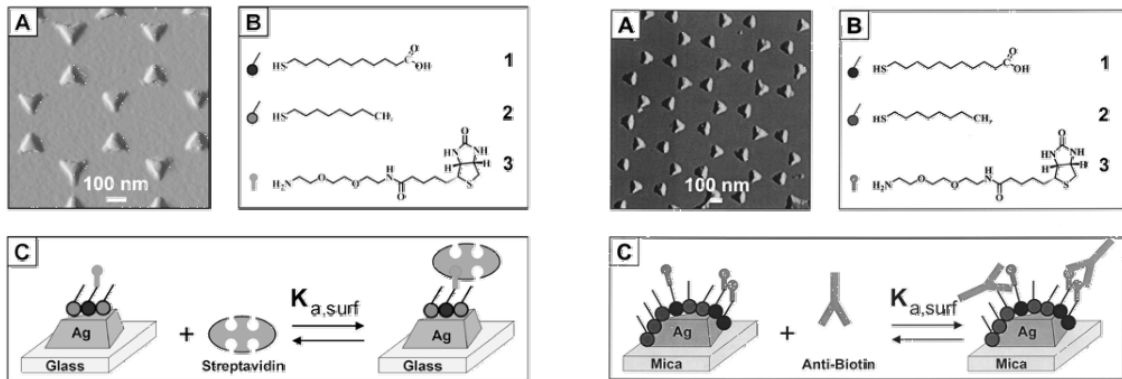
### 1.1 Solution-Phase NSL-Fabricated Nanotriangles [2]

Nanosphere lithography(NSL)를 이용하면 유리 기판에 삼각형의 Ag NPs를 형성할 수 있다. 이런 표면에 부착된 Ag NPs를 에탄올 용매에 녹이면 용액상의 균일한 크기의 hexadecanethiol 단일막이 코팅된 Ag NPs를 생산할 수 있다. 아래의 중간 그림이 간단하게 형성된 Ag NPs를 보여주고 있으며 A의 AFM 이미지로부터 폭은 100nm이고 높이는 52nm인 삼각형의 NPs임을 보여주고 B의 TEM 이미지는 폭이 약 95nm로 균일한 NPs이 형성된 것을 보여주고 있다. 그림 A와 B의 LSPR spectra를 비교하여 보자. 우선 표면에 존재하는 NPs는 645.6nm의 extinction maximum을 가진다. 에탄올 벌크 상에 존재하는 NPs는 417.9와 682.1nm로 매우 다른 경향을 보임을 알 수 있다.



## 1.2 Protein Detection Using Localized Surface Plasmon Resonance of NPs [3,4]

많은 용액상의 NP 에세이들은 analyte가 야기한 aggregation을 이용한다. 이러한 aggregation은 측정 가능한 변화를 일으키고 NP의 LSPR 밴드의 위치를 변화시킨다. 이 방법을 이용하여 타겟 단백질을 결합시킨 후에 LSPR에서의 변화를 측정하면 단백질 검출을 할 수 있다[3,4]. 아래의 왼쪽과 오른쪽 그림은 C에서 검출하고자 하는 단백질이 streptavidin[6]과 anti-biotin[7]이라는 점만 다를 뿐 사용된 방법과 물질들은 동일하다. 먼저 A는 삼각형 모양의 Ag NPs이 NSL를 이용하여 생성된 모습의 AFM 이미지이다. B는 사용된 물질들로 1은 11-mercaptanundecanoic acid이고 2는 1-octanethiol이다. 두 분자를 1:3으로 혼합하여 NPs 위에 단분자막을 형성한 것이 C의 첫 번째 그림이다. 이렇게 형성된 단분막에 분자 3(biotinyl-3,6-dioxaoctanediamine)을 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC)를 이용하여 1번 분자와 공유결합을 통하여 부착한다. 이러한 반응의 결과로 외부에는 biotin기가 노출되게 된다. 여기에 streptavidin이나 anti-biotin를 반응하게 되면 Ag NP의 SPR 밴드의 변화가 일어나게 된다. 이러한 방법을 이용하여 측정 가능한 streptavidin의 농도는 ~0.1-1 pM이고 anti-biotin의 경우에는 ~100 pM였다. 특히, streptavidin의 경우에는 streptavidin의 반응 사이트가 4개이기 때문에 바이오틴으로 치환된 금 NP를 반응시키면 LSPR 신호의 변화를 증가시킬 수 있는 장점이 있다. 여러 가지 대조실험을 통하여 특정 반응 단백질에서만 의미 있는 LSPR 밴드의 변화가 측정되었다. 이러한 방법은 단순하면서도 작고 가볍고 강하면서도 저비용의 초민감도의 바이오검출 센서로 이용 가능할 것이다.



## 1.3 Outlook

SPR은 매끄럽고 얇은 금속 막 표면에서 분석되면 근본적으로 벌크 기술이다. 이에 반하여 LSPR은 각각의 NPs을 측정할 수 있어서 빠른 검출 속도와 좋은 민감도를 가질 수 있다. 새로운 NP geometries의 형성을 포함한 증폭 전략들이 순조롭게 수행되면 적은 농도의 analyte 결합 시에도 파장의 변화를 크게 할 수 있어 검출한계를 증가시킬 수 있을 것이다. 그러한 전략에는 NPs, 효소, 공명분자 등의 2차 레이블링 도입, single-particle LSPR 등이 포함된다.

## 2. Cantilever Array Sensors for Bioanalytical Assays [1,5-7]

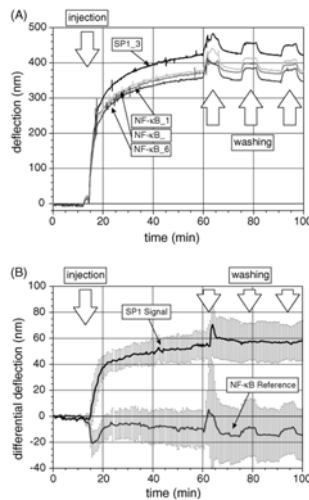
생화학과 의학에 적용하기 위한 센서의 다음과 같은 요구조건을 만족해야만 한다. 크기가 매우 작고 민감도는 매우 좋으면서도 반응시간이 짧아야만 한다. 또한 재현성 있는 정량적, 정성적 데이터를 얻을 수 있어야 한다[1]. 다양한 종류의 전기적 센서가 이용되고 있는데 여기서는 위에서 언급한 조건들을 만족시키는 mechanical sensor에 대하여 알아보려고 한다. 특히 많이 연구가 진행되고 있는 한쪽 끝이 고정된 직사각형 바 모양의 cantilever(캔티레버)를 이용한 센서에 대하여 알아보자. 바의 길이는 폭보다 매우 길고 두께는 길이와 폭보다 짧은 특성을 가지고 있다. 날카로운 팁이 부착된 캔티레버는 atomic force microscopy(AFM)에서 표면의 morphology를 분석하는데 사용되었다. 최근에는 팁이 없는 캔티레버를 이용하여 표면에 흡착 또는 탈착 시에 캔티레버가 휘는 정도를 측정하여 nanomechanical sensor로써 응용하고 있다. 이러한 센서의 장점은 일반적인 센서에서 필수적인 labeling이 필요하지 않은 무표지(label-free) 시스템이라는 것이다.

### 2.1 Detection of Protein Interaction with Double-Stranded DNA Oligonucleotides Using Cantilever Microarray Technology [5]

두 개의 DNA결합 단백질(the transcription factors SP1 and NF-kB)이 cantilever microarray sensor를 이용하여 동시에 분석되었다. 두 개의 단백질은 단백질 생산과 유전발현에서 매우 중요한 역할을 한다. SP1 and NF-kB과 결합할 DNA sequence(55-mer)는 각각 다음과 같다.

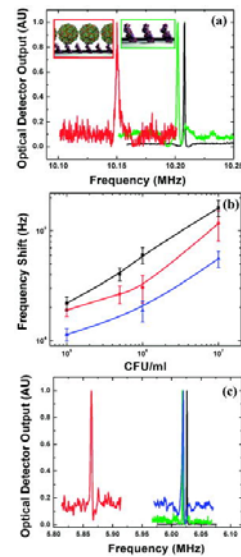
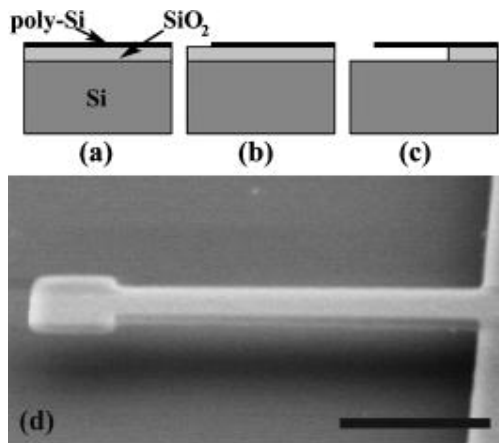


55-mer 헤어핀 구조로 되어 있고 가운데 10-mer 부분이 단백질과 실질적으로 결합을 하는 사이트이다. SP1과 결합하는 DNA를 캔티레버에 고정화한 후에 두 개의 단백질을 동시에 반응시킨 결과가 다음의 그림이다. 그림 A는 80nM의 SP1 단백질과 대조군으로써 NF-kB 3개의 시료를 분석한 결과로써 deflection 정도가 SP1에서만 차이가 나는 것을 확인할 수 있다. 이는 캔티레버를 이용하여 단백질을 검출할 수 있음을 보여준다. 그림 B는 differential deflection으로써 그림 A와 마찬가지로 SP1 단백질에서만 다른 특성을 보여주고 있다. 이러한 결과는 많은 수의 캔티레버에 특정 반응을 하는 DNA 또는 receptor를 고정화 한 후에 이와 결합하는 단백질 또는 ligand를 반응시키면 동시에 많은 경우의 특정 반응들을 분석할 수 있는 multiplexing sensors로써의 적용 가능성을 보여주는 것이다.



## 2.2 Biodetection Using Nanoelectromechanical Devices [6,7]

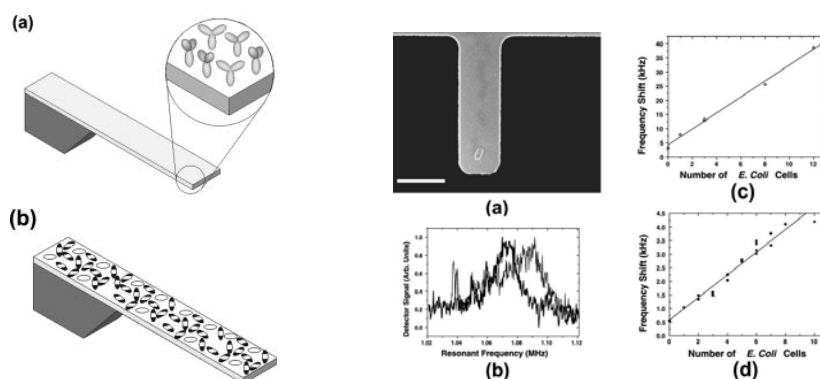
Photolithography와 e-beam lithography 기술의 발달로 나노스케일의 복잡한 장치를 제조할 수 있게 되었다. 나노스케일의 두께를 가진 캔티레버를 이용하면 바이러스[6]와 박테리아[7] 등을 검출할 수 있다. 타겟 물질의 결합에 따른 캔티레버의 진동수 변화를 측정함으로써 바이오물질을 검출하는 것이다.



위의 왼쪽 그림은 nanomechanical oscillator를 만드는 과정과 실제 만들어진 것의 FE-SEM 이미지(d)이다. 실리콘 기판에 산화 막을 입힌 후에 polycrystalline 실리콘을 chemical vapor deposition (CVD) 방법을 이용하여 증착하였다(그림 a). Lithography 기술을 이용하여 패턴을 만든 후에 (그림 b) 산 용액을 이용하여 산화층을 제거(그림 c)하면 길이 6  $\mu\text{m}$ , 폭 0.5  $\mu\text{m}$ , 두께 150 nm의 장치가 완성된다. (그림 d). 오른쪽 그림은 실제로 바이러스를 분석한 결과이다. 우선 그림 (a)는 6  $\mu\text{m}$  길이의 oscillator를 이용하여 *Autographa californica* virus 1(AcV1) 항체를 반응시킨 것(녹색)과 여기에 baculovirus를 반응시킨 것(빨간색)의 진동수 스펙트라이이다.

항체와 바이러스가 반응하게 되면 oscillator의 질량이 증가하게 되어 공명 진동수가 감소하게 된다. 이러한 반응들의 개략도가 위에 있는 그림들이다. 그림 B는 baculovirus의 농도에 따른 6, 8, 10 $\mu\text{m}$  길이의 oscillator들(각각 44개 이용)의 진동수 변화를 측정한 것이다. 길이가 증가함에 따라서 진동수의 변화가 감소하는 것을 알 수 있다. 그림 c는 대조 실험으로써 8 $\mu\text{m}$  길이의 oscillator를 이용하여 항체(녹색), baculovirus가 없는 버퍼용액(파랑), baculovirus가 포함된 버퍼용액(빨강)을 반응시킨 후에 진동수의 변화를 측정한 것이다. Baculovirus가 있는 상황에서만 의미 있는 변화가 측정됨을 알 수 있다.

다음은 캔티레버가 박테리아를 검출하는데 사용될 수 있음을 보여주는 결과들이다. 우선 왼쪽 그림은 검출과정을 간단하게 나타낸 개략도로 (a)는 캔티레버에 anti-*Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 항체를 고정화 한 후에 *E. coli* O157:H7를 반응시키면 질량이 증가하여 진동수 변화를 유발한다.



오른쪽 그림의 a는 항체가 고정화된 캔티레버에 single *E. coli* O157:H7이 결합한 것을 SEM 이미지이다. 세포의 크기는 1.43 $\mu\text{m}$  $\times$ 730nm였다. 그림 b는 항체 고정화와 세포 반응시의 진동수 변화의 결과로 항체 반응 시에 3.3 kHz, 세포 반응할 때는 4.6 kHz의 진동수 변화가 있었다. 그림 c, d는 oscillator의 크기(c; 길이 15 $\mu\text{m}$ , 폭 5 $\mu\text{m}$ , d; 길이 25 $\mu\text{m}$ , 폭 10 $\mu\text{m}$ )를 변화시켰을 때 세포의 수에 따른 진동수 변화를 분석한 것으로 선형적인 관계가 있음을 알 수 있다. 이러한 캔티레버의 방법은 다양한 바이오물질(DNA, 바이러스, 다른 analytes)의 검출에 적용될 수 있을 것이다.

## References

- [1] Mirkin, C. A. and Miemeyer, C. M., *Nanobiotechnology II: More Concepts and Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
- [2] Haes, A. J., Zhao, J., Zou, S., Own, C. S., Marks, L. D., Schatz, G. C., and Van Duyne, R. P., "Solution-Phase, Triangular Ag Nanotriangles Fabricated by Nanosphere Lithography," *J. Phys. Chem. B.* **109**, 11158, 2005.

- [3] Haes, A. J., and Van Duyne., R. P., "A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10596, 2002.
- [4] Riboh, J. C., Haes, A. J., McFarland, A. D., Yonzon, C. R., and Van Duyne., R. P., "A Nanoscale Optical Biosensor: Real-Time Immunoassay in Physiological Buffer Enabled by Improved Nanoparticle Adhesion," *J. Phys. Chem, B*, **107**, 1772, 2003.
- [5] Huber, F., Hegner, M., Gerber, G., Güntherodt, H.-J., Lang, H. P., "Label free analysis of transcription factors using microcantilever arrays," *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1599, 2006.
- [6] Ilic, B., Yang, Y., and Craighead, H. G., "Virus detection using nanoelectromechanical devices," *Appl. Phys. Lett.*, **85**, 2604, 2004.
- [7] Ilic, B., Czaplewski, D., Zalalutdinov, M., Craighead, H. G., Neuzil, P., Campagnolo, C., and Batt, C., "Single cell detection with micromechanical oscillators," *J. Vac. Sci. Technol.*, **19**, 2825, 2001.