

## 탄소 나노튜브와 DNA와의 결합을 통한 나노-바이오 마커 응용

황응수(서울대학교 의과대학), 조승범(성균관대학교 기계공학과), 홍상현(성균관대학교 기계공학과), 정혜진(서울대학교 의과대학), 차창용(서울대학교 의과대학), 최재봉(성균관대학교 기계공학과), 김영진(성균관대학교 기계공학과), 백승현(성균관대학교 기계공학과)

### Carbon Nanotube DNA Bioconjugates as Nano-Bio Markers

Eung-Soo Hwang(Microbiol. & Immunol. Dept. SNUCM), Cao Chengfan(Mechanical Eng. Dept. SKKU), Sanghyun Hong(Mechanical Eng. Dept. SKKU), Hye-Jin Jung(Microbiol. & Immunol. Dept. SNUCM), Chang-Yong Cha(Microbiol. & Immunol. Dept. SNUCM), Jae-Boong Choi(Mechanical Eng. Dept. SKKU), Young-Jin Kim(Mechanical Eng. Dept. SKKU), Seunghyun Baik(Mechanical Eng. Dept. SKKU)

#### ABSTRACT

Carbon nanotubes exhibit strong fluorescence emissions in the region of near infrared regions where most biomolecules are transparent. Such signals are highly sensitive to environment variations as well as adsorption of specific biomolecules. In this research, single walled carbon nanotubes(SWNTs) are assembled with different types of DNAs and used to target specific types of DNAs. Dot blot investigations and corresponding raman spectroscopy observations demonstrated excellent selectivity of carbon nanotube-DNA bioconjugates. The results show possibility of using SWNT as generic nano-bio markers for precise detection of different kinds of genes.

**Key Words :** Carbon nanotube (탄소 나노튜브), Fluorescence (형광), Conjugate (복합체), Raman spectroscopy (라만 분광법), Single walled carbon nanotube (SWNT) (단일벽 탄소 나노튜브)

#### 1. 서론

탄소 나노튜브는 1991년 Iijima<sup>1</sup>에 의해 그 존재가 발견된 이래 우수한 기계적, 전기적 및 광학적 특성으로 인하여 나노복합체, 나노전자소재 등 극미세 응용영역에서 많은 각광을 받게 되었다<sup>2,3</sup>. 특히, 탄소 나노튜브는 근적외선 근처에서 강한 형광신호를 방출한다<sup>4,5</sup>. 대부분 생체세포들은 근적외선 형광신호에 투명한 성질을 가지고 있어 근적외선 형광신호를 이용하면 비침습적 방법으로 세포에 이식되어 사용되는 광학 나노-바이오 센서<sup>7</sup>를 개발할 수 있다. 탄소 나노튜브의 밴드갭 형광신호는 pH 값의 변화<sup>6</sup>에 매우 민감하고 나노튜브벽에 흡착된 분자들의 기능화<sup>7</sup> (functionalization)에도 높은 민감도를 나타내고 있다. 또한, 플루오레세인 (fluorescein) 및 로다민 (rhodamine) 등과 같은 상용 세포유기염색물에 비해 탄소 나노튜브의 밴드갭 형광신호는 블링킹 (blinking) 또는 광표백 (photobleaching) 현상이

잘 발생하지 않아서 장기간 및 반복적인 세포관측에도 활용될 수 있다<sup>8</sup>.

본 논문에서는 HiPco 방법으로 제작된 단일벽 탄소 나노튜브 (Single walled carbon nanotube : SWNT)와 DNA로 만들어진 바이오복합체를 이용하여 나노-바이오 마커로서 사용할 수 있는가를 알아보았다. 초음파처리 및 원심분리과정을 거쳐 제작된 SWNT-DNA 복합체를 이용하여 상호간 상보성염기서열에 대응되는 여러 가지 DNA들을 변성 (denaturing) 및 상동결합 (annealing) 과정을 통하여 선택적으로 추적 및 측정하였다. 흡광도 (absorbance) 및 라만 신호 (raman signal)를 측정한 결과 SWNT-바이오분자 복합체를 나노-바이오 마커로서 사용할 수 있음을 이론적 및 실험적으로 검증하였다.

#### 2. 탄소 나노튜브의 바이오 마커 응용

##### 2.1 나노튜브-바이오 센서 선행 연구

HiPco방법에 의해 제작된 SWNT는 지름 0.7~1.1nm, 길이 1 $\mu$ m 정도로 구성되며, **chirality** 특성에 따라 금속성 나노튜브와 반도체성 나노튜브로 분류된다<sup>2,3</sup>. 전기적 특성에 따른 금속성 나노튜브와 반도체성 나노튜브의 분리<sup>12,13,14</sup>는 여러 연구그룹에 의해 연구되고 있다. 액상에서 균일하게 분산된 반도체성 탄소 나노튜브는 van hove singularity (vHs)에 의해 근적외선 근처에서 강한 형광특성을 나타낸다<sup>4,10</sup>.

탄소 나노튜브의 형광신호를 이용하여 포도당의 농도 측정을 수행한 연구가 보고된 바 있다<sup>7</sup>. 나노바이오 센서를 개발하기 위해 SWNT 디칸트(decant)와 포도당산화효소(glucose oxidase : GOx)의 복합체가 제작되었다. 먼저, 분말 상태의 SWNT를 2% wt. cholate H<sub>2</sub>O 용액에 넣은 다음 믹서(mixer)로 균일하게 섞는다. 초음파처리 및 원심분리과정을 거쳐 소수성질(hydrophobic)을 지닌 SWNT는 cholate 미셀(micelle)에 둘러싸인 형태로 액상에 균일하게 분산되어 있는 SWNT 디칸트가 형성된다. 여기서 cholate 대신 DNA, sodium dodecyl sulfate (SDS)를 사용해도 비슷한 결과물을 얻을 수 있다.

Cholate를 제거하고 SWNT와 GOx의 복합체를 만들기 위해 다음과 같은 처리과정을 사용한다. 이미 만들어진 SWNT 디칸트와 GOx를 일정한 질량비로 혼합한 다음 투석(dialysis)과정을 거친다. 결과적으로 분자량이 적은 cholate는 서서히 투석 카트리지(cut off M.W. : 10000)밖으로 나오게 되고 분자량이 상대적으로 큰 GOx는 카트리지 안에 남게 되며 SWNT를 비공유결합 형식으로 친화적으로 둘러싸게 된다. SWNT-GOx 복합체도 액상에서 균일하게 분산된 상태로 존재할 수 있다<sup>7</sup>.

Fig.1은 SWNT-GOx 복합체의 라만 신호를 보여 준다. 측정은 Kaiser Optics사에서 제작된 Holographic Raman System을 이용하여 수행되었고, 레이저 파장은 785nm이다. Fig.1에서는 탄소 나노튜브의 대표적인 라만특성을 볼 수 있다. 첫 번째 구간 [150-350cm<sup>-1</sup>]의 radial breathing mode (RBM)는 사용된 SWNT가 일정한 지름분포를 갖고 있는 것을 알 수 있다. 지름은 아래와 같은 식으로 계산 된다.

$$\omega_{RBM} = a/d_{SWNT} + b$$

여기서  $\omega_{RBM}$  : RBM 신호의 주파수 (cm<sup>-1</sup>)

$d_{SWNT}$  : SWNT 지름 (nm)

$$a = 223.5 \text{ nm}, \quad b = 12.5 \text{ nm}$$

두 번째 구간 [약 1593cm<sup>-1</sup>]에서 나타나는 G-Peak는 나노튜브벽의 탄소원자들의 진동으로 생기는 SWNT의 고유의 특성이다. 세 번째 구간 [약 1330cm<sup>-1</sup>]의 D 모드는 탄소 나노튜브와 흡착된 분자

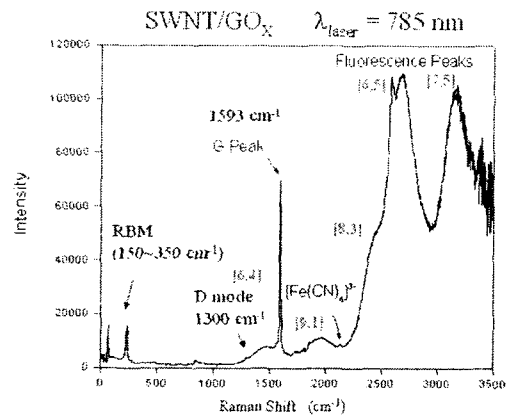


Fig.1 Raman spectroscopy of SWNT-GOx hybrid at laser excitation of 785nm.

가 공유결합을 하여 sp<sup>2</sup>결합이 sp<sup>3</sup>결합으로 바뀌에 따라 야기되는 특성이다. 본 실험에서 사용한 초음파처리과정은 강도의 크기에 따라 나노튜브벽에 손상을 줄 수 있다<sup>15</sup>. 라만 주파수의 후반부에서 나타나는 광대역 형광신호들은 반도체성 SWNT의 밴드갭에 의해 야기되는 것으로 반도체성 나노튜브가 GOx에 의해 잘 분산되어 있음을 알 수 있다<sup>10</sup>.

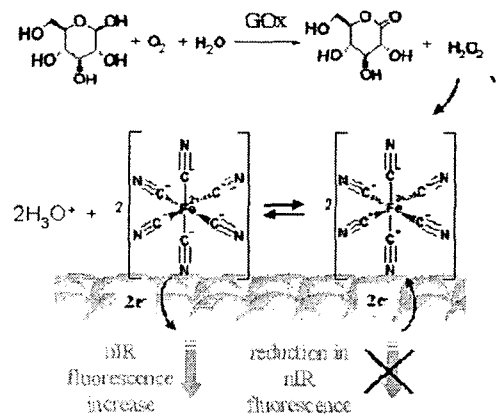


Fig.2 Detection of glucose using SWNT-GOx with Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> as a reaction mediator, reproduced from Ref. 7.

SWNT-GOx 복합체의 형광신호는 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>에 매우 민감한 변화를 보인다. 이러한 변화는 β-D-glucose의 산화반응 결과물 과산화수소 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>의 반응을 이용하여 β-D-glucose의 측정을 수행할 수 있다. Fig.2에서는 Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>를 반응매체로 하고 SWNT-GOx 복합체의 형광신호가 과산화수소에 민감한 반응도를 나타내는 과정을 도식화 하고 있다<sup>7</sup>.

## 2.2 SWNT-DNA 복합체의 제작

SWNT와 single stranded DNA (ssDNA) 의 복합체는 듀프그룹에 의해 특정 염기서열을 갖고 있는 ssDNA와 SWNT가  $\pi$ -stacking에 의해 안정된 결합이 가능하고, 음이온 교환 색층분석 (anion exchange chromatography)에 의해 전기적 특성 및 지름에 의존하는 분리도 가능함이 보고 된 바 있다<sup>11,12</sup>.

본 연구에서 사용된 SWNT-DNA복합체는 아래와 같은 절차로 제작되었다. 먼저 표적 DNA에 대응하는 상보성 염기서열을 갖고 SWNT에 친화적인 특정 DNA를 나노튜브와 혼합한다. 염기서열은 이후의 결합실험을 하기 위해 FLF (Fetal Lung Fibroblast) DNA의 상보결합으로 디자인 되었다. 다음 단계에서 NaCl을 추가한 다음 약 6시간동안 초음파 처리한다. 그리고 혼합용액을 다시 약 10000g 원심력 하에서 30분 동안 원심분리과정을 수행하였다. 이러한 과정을 거치게 되면 덩어리상태의 탄소 나노튜브와 기타 이물질들은 튜브 밑으로 침전하게 되며 완충액상에서 균일하게 분포되는 SWNT-ssDNA 복합체들만 용액 상에 떠있게 된다. 마지막으로 상층액의 80~90%의 디캔트 과정을 거치게 되면 SWNT-ssDNA 복합체가 완성이 되게 된다.

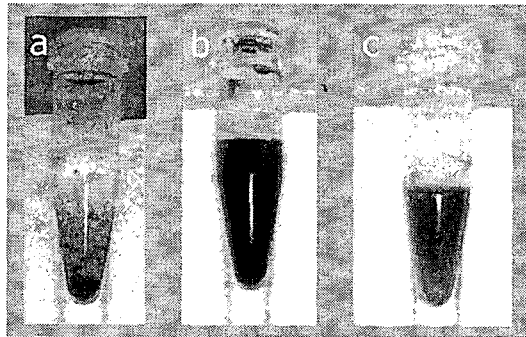


Fig.3 (a) SWNT+ssDNA before sonication (b) after sonication (c) and after centrifugation.

Fig.3은 분말상태의 HiPco SWNT를 DNA 용액에 혼합한 다음 초음파처리 및 원심분리과정을 거쳐 얻어진 상태를 단계적으로 보여준다.

## 2.3 SWNT-ssDNA 복합체의 선택적 결합

만들어진 SWNT-ssDNA를 이용하여 여러 가지 종류의 DNA와의 선택적인 결합(hybridization)을 검증하기 위해 Fig.4와 같이 서던 블롯 (southern blot) 실험을 수행하였다. 표적 DNA는 FLF DNA 염색체와 대장균 (*Escherichia coli* : *E.coli*) DNA 염색체를 사용하였다.

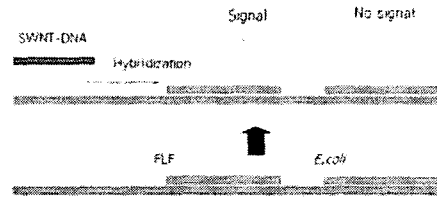


Fig.4 Schematic diagram of the selectivity of SWNT-ssDNA hybridization with target chromosome DNA (FLF) and nontarget DNA (*E.coli*) through southern blot process.

먼저 FLF와 *E.coli*를 nitrocellulose membrane 위에 농도를 10배씩 희석시키면서 2 $\mu$ l 씩 각각 로딩한다. 여기서 농도를 비례적으로 희석한 목적은 SWNT-ssDNA와 표적 DNA와의 결합 상관관계를 도출하기 위해서이다. 다음, membrane에 결합된 두 가지, 종류의 DNA를 이용하여 SWNT-ssDNA 복합체와 반응시킨다. 다음, 증류수에서 깨끗하게 씻어내면 결합이 된 탄소 나노튜브는 membrane 위에 부착이 되어 있고 결합이 되지 않은 나노튜브 및 여러 가지 분석물들은 제거된다. 마지막으로 라만분광기를 이용하여 membrane 위의 분석물들에 대한 라만신호측정을 수행하였다. 측정은 Reinshaw에서 제작된 Micro-Raman System을 이용하였고, 레이저 파장은 633nm이다.

Fig.5는 서던 블롯 결과물에 대한 G-Peak의 정규화된 결과를 보여준다. SWNT-ssDNA농도가 낮아짐에 따라 G-Peak신호가 감소함을 보여준다. Fig.5에 나타낸바와 같이 SWNT-ssDNA + FLF 염색체는 강한 라만신호를 나타내고 SWNT-ssDNA + *E.coli* 염색체는 상응되는 신호가 나타나지 않았다. 삽입도는 SWNT-ssDNA와 FLF와의 복합체에서 측정된 전형적인 라만신호를 보여준다.

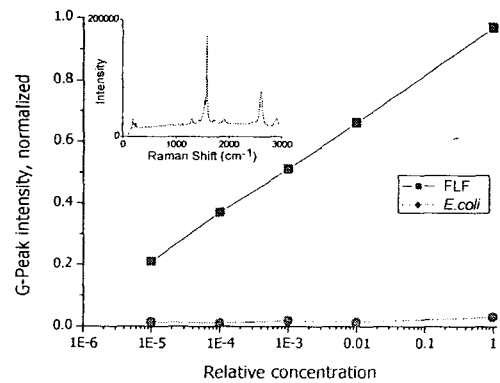


Fig.5 Raman spectroscopy of southern blot hybridization samples with respect to concentration variations

### 3. 결론

본 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SWNT-바이오분자 복합체는 미세 량이더라도 라만 신호 및 근적외선 근처에서 강한 형광신호를 보여 준다. 주변환경의 변화에 따라 반응하는 형광신호의 변화를 이용하여 바이오센서로 사용하는 것이 가능할 뿐 아니라, 형광 및 라만 신호를 이용하여 바이오마커로서 활용할 수 있다.
2. SWNT-ssDNA 복합체를 이용하여 여러 가지 특정 DNA와의 성공적인 선택적 결합을 수행하였다. 이러한 결합방식의 선택성은 바이오 연구에서 유용하게 사용될 수 있으며 나노튜브의 광학신호를 이용하여 특정한 염기서열의 DNA를 추적하여 측정하는 것이 가능하다.

본 논문에서 얻은 실험결과에 기초하여 현재 신호 대 노이즈를 향상시키기 위한 지속적인 연구가 진행 중이며 SWNT-DNA 복합체의 결합 선택성을 이용하여 질병진단에서 특정 DNA를 검진하는 관련 연구도 진행 중이다.

### 감사의 글

본 연구의 라만 측정은 성균관대학교 CNCN의 Micro-Raman System을 사용하였으며 이에 CNCN와 이영희 교수님께 감사의 뜻을 표합니다.

### 참고문헌

1. Iijima, S., "Helical microtubules of graphitic carbon", *Nature*, Vol. 354, pp.56-58, 1991.
2. Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G. & Eklund, P. C., "Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes", (Academic, San Diego, 1996).
3. Saito, R., Dresselhaus, G. & Dresselhaus, M. S., "Physical Properties of Carbon Nanotubes", (Imperial College Press, London, 1998).
4. O'Connell, M. J. et al., "Band gap fluorescence from individual single-walled carbon nanotubes", *Science*, Vol. 297, pp. 593-596, 2002.
5. Bachilo, S. M. et al., "Structure-assigned optical spectra of single-walled carbon nanotubes", *Science*, Vol. 298, pp. 2361-2366, 2002.
6. Strano, M. S. et al., "The selective chemistry of single walled carbon nanotubes", Book chapter is in preparation.
7. Paul W. Barone et al., "Near-infrared optical sensors based on single-walled carbon nanotubes", *Nature Mater.*, Vol. 4, pp. 86-92, 2005.
8. Heller, D. A. et al., "Long-term, directed cell labeling using single-walled carbon nanotubes as near infrared raman and fluorescent markers", *Adv. Mater.*, under review.
9. M. J. Bronikowski, P. A. Willis, D. T. Colbert, K. A. Smith, R. E. Smalley, "Gas-phase production of carbon single-walled nanotubes from carbon monoxide via the HiPco process: A parametric study", *J. Vacuum Sci. Technol. A*, Vol. 19, pp. 1800-1805, 1998.
10. Graff, R. A. et al., "Achieving individual nanotubes at high loading in single-walled carbon nanotube composites", *Adv. Mater.*, Vol. 17, pp. 980-984, 2005.
11. Zheng, M. et al., "DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes", *Nature Mater.*, Vol. 2, pp. 338-342, 2003.
12. Zheng, M. et al., "Structure-based carbon nanotube sorting by sequence-dependent DNA assembly", *Science*, Vol. 302, pp. 1545-1548, 2003.
13. Ralph Krupke, et al., "Separation of metallic from semiconducting single-walled carbon nanotubes", *Science*, Vol. 301, pp. 344-347, 2003.
14. Baik et al., "Using the selective functionalization of metallic single-walled carbon nanotubes to control dielectrophoretic mobility", *J. Phys. Chem. B*, Vol. 108, pp. 15560-15564, 2004.
15. Heller, D. A. et al., "Concomitant length and diameter separation of single-walled carbon nanotubes", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 126, pp. 14567-14573, 2004.