

# 나노바이오 광센서

송준명 (충남대학교 화학과)

## 1. 서론

최근 나노기술의 발전은 단세포 내에서 일어나는 생명 활동의 측정에 적합한 나노바이오 광센서를 탄생시켰다. 나노바이오 광센서는 나노수준 크기를 갖는 광섬유를 프로브(Probe)로 이용하여 살아있는 단세포 내에서 일어나는 현상을 직접 관찰하는 것을 가능하게 하였다. 살아있는 단세포 세포질에서 일어나는 생물학적 과정을 직접 관찰할 수 있는 가능성은 곧 세포의 생명활동에 대한 전반적인 이해를 크게 증진시킬 수 있음을 의미한다. 나노바이오 광센서는 프로브로 이용하는 광섬유 끝에 바이오리셉터 (Bioreceptor)를 결합시킨뒤 단세포 세포질에 주입시켜서 표적 단백질 및 DNA등과 반응함으로써 작동이 된다. 반응은 곧 레이저 유발 형광에 의해서 광학적 신호로 변환이 되어 검출이 된다. 나노바이오 광센서는 프로브 광섬유가 갖는 나노수준 크기로 인해 단세포 세포질에 주입될 때 단세포에 최소한의 손상을 줄 수 있는 장점이 있다.<sup>[1]</sup>

서브마이크론 (Submicron) 광섬유 프로브

를 활용하는 다른 연구 예를 살펴보면, 서브마이크론 광섬유 프로브에 기초한 화학센서로, 그 개발 및 응용을 다룬 많은 논문들이 발표되었다.<sup>[2,3]</sup> 이 연구에서는 20-nm 에서부터 500-nm에 이르는 Distal Diameter를 갖는 광섬유 프로브에 기초한 근접장 주사 광학 현미경 (Near-field scanning optical microscopy)을 이용하여 서브마이크론 공간 분해능을 시도하였다. 또한 근접장 주사 광학 현미경과 표면 강화 라만 산란 (Surface-enhanced raman scattering)을 결합하여 고체 기질 (Solid substrate) 위에 놓인 바이오 물질들을 100-nm의 공간 분해능으로 검출하는 논문도 발표되었다.<sup>[4]</sup> 반면에 나노바이오 광센서는 일반적으로 생물학적 또는 화학적 인식을 할 수 있는 항체, 효소, DNA 및 기질 (Substrate) 등의 바이오리셉터를 활용한다. 바이오리셉터는 나노수준 크기의 광섬유 프로브에 공유결합에 의해 부착된 뒤 직접 단세포 속에 주입되어 표적 물질들을 선택적으로 검출하는데 이용된다. 나노바이오 광센서를 이용한 살아있는 단세포에 대한 분석은 기존 생물화학자들이 이용하는 다세포

분석법으로는 얻을 수 없는 정보를 제공할 수 있으며 다세포분석의 결과를 보다 강력히 뒷받침 할 수도 있다. 그리고 살아있는 세포 내에서 일어나는 다양한 상호작용들을 실시간으로 관찰할 수 있어서 세포의 신호 경로 (Signaling pathway) 및 체계 (Network)를 판독하고 자세히 배치할 수 있는 강력한 도구로 활용될 수 있다. 또한 단세포 분석은 세포의 수를 증가시킬 수 없는 조건에서도 세포를 분석할 수 있다. 일반적으로 세포내 분석이 행해질 경우 분석 전에 세포를 보존 (Fixing) 하게 되는데 종종 세포의 생존능력을 파괴할 수 있고 세포내 조직을 변형시킬 가능성이 있다. 이에 비해 나노바이오 광센서는 세포내 (In-vivo) 생화학적 과정에 최소한의 간섭을 주며 세포내 조사를 할 수 있는 수단을 제공한다. 나노바이오 광센서가 갖는 가장 큰 장점은 실시간 단세포 관찰시에도 나노 프로브가 세포에 최소한의 손상을 줄 수 있다는 점이다. 위에서 언급한 장점들은 나노바이오 광센서가 기존 시스템에서는 얻을 수 없는, 살아있는 단세포내 성분 및 생화학적 과정을 관찰할 수 있는 감도와 선택성을 갖춘 새로운 세대의 나노바이오 시스템임

을 입증하고 있다. 이 논문에서는 나노바이오 광센서의 제작 방법과 검출 시스템에 대한 고찰 및 단세포 분석에 응용을 검토한다.

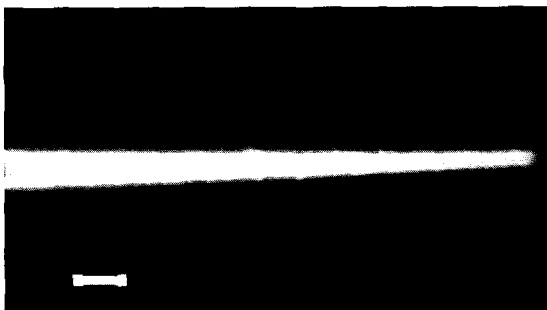
## II. 나노바이오 광센서 시스템의 구성 및 응용

### 1. 나노프로브 제작

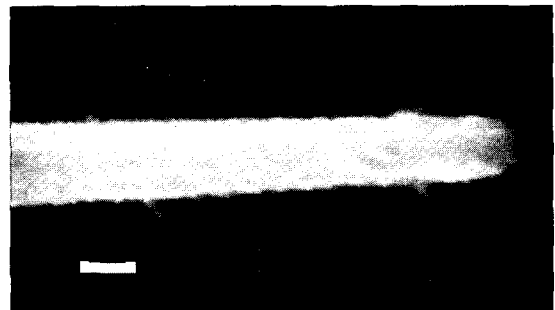
생물학적 시스템의 복잡성과 나노바이오 광센서의 센싱 (sensing) 과정에서 생기는 다양한 종류의 간섭 때문에 시스템에 특정한 표적 물질에 반응할 수 있는 선택성을 부여하는 것이 중요하다. 나노바이오 광센서에서는 단세포 내에 존재하는 복잡한 매트릭스 (Matrix)에서 센싱을 효과적으로 하기 위해 생물학적 프로브를 광섬유 프로브에 결합시켜 선택성을 높이고 간섭을 최소화하였다.

나노바이오 광센서의 핵심적 역할을 수행하는 광섬유 나노프로브 팁 (Tip)은 나노바이오 광센서의 성공적인 제작을 위해 매우 중요하며 "heat and pull"이라는 방법을 이용하여 제작한다. 이 방법은 직경 600  $\mu\text{m}$ 의 광섬유를 잡아당겨서 나노수준의 나노팁을 만

i)



ii)

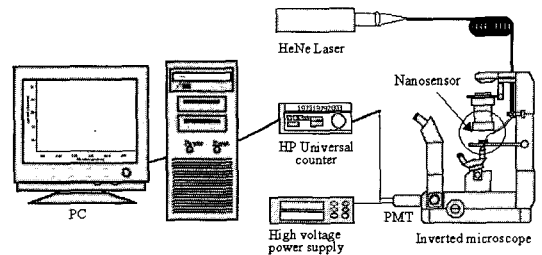


〈그림 1〉 광섬유 나노프로브 팁의 주사 전자현미경 그림. a 팁의 직경: 40-nm, b 팁의 직경: 250-nm, - 길이: 200-nm

드는 디바이스를 활용한다. 원리는 CO<sub>2</sub> 레이저 또는 열 필라멘트 (Heat filament)를 이용하여 광섬유를 부분적으로 가열시킨 뒤 나노팁을 갖는 광섬유가 되도록 잡아당기는 것으로 재현성 있는 직경의 나노팁을 만들 수 있다. 나노팁의 모양은 가열 온도와 잡아당기는 시간의 조절에 의해서 크게 영향을 받는다. 레이저는 광섬유의 중간지점을 쪼이고 서브마이크론 직경의 두께의 나노팁이 만들어지도록 광섬유가 잡아당겨진다. 그림 1-i)는 제작된 광섬유 나노팁을 보여준다. 그 다음 단계는 나노팁에 은을 코팅하는 과정으로 약 100-nm부터 200-nm 두께가 되도록 코팅을 시도한다. 이 코팅은 레이저 빔이 나노팁까지 도달되는 것을 돕는다. 코팅은 열 증발기 (Thermal evaporator)를 이용하여 행해지는데 두께가 일정한 코팅을 위해서 나노팁은 열 증발기 속에서 코팅이 끝날 때까지 회전되면서 코팅된다. 그림 1-ii)는 은이 두께 200-nm로 코팅된 나노팁을 보여준다. 은이 코팅된 나노팁에 마지막으로 행해지는 것은 나노팁 유도화 과정으로 바이오리셉터인 항체 또는 펩타이드를 공유결합으로 부착시키는 것이다. 이것은 Glycidoxypropyltrimethoxy Silane (GOPS)와 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI)를 이용한 실란화를 통해 이루어진다. 이렇게 제작된 나노팁은 단세포 세포질에 주입되고 세포질내 표적 단백질은 나노팁에 코팅된 바이오리셉터에 결합된 뒤 레이저 빔에 의해 여기되고 그 형광이 검출 된다. 나노팁 직경은 여기 레이저 빔의 파장의 반보다도 그 길이가 작으므로 레이저 빔은 나노팁을 통과할 수 없고 Evanescent Field에 의해서 표적 물질이 여기된다.

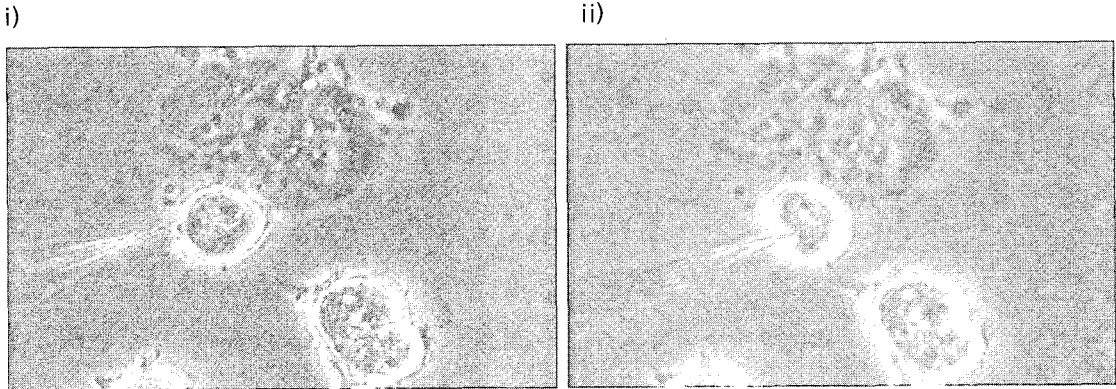
## 2. 광학적 측정 장치

나노바이오 광센서는 나노팁이 갖는 작은 크기로 인해 살아있는 단세포 속 특정 생물학적 물질들을 실시간 관찰할 수 있는 장점을 주지만 여기시키는 볼륨이 매우 작으므로 검출 시스템을 민감하게 제작하는 것이 필요하다. 검출시스템 중에서 광학적 검출이 매우 민감한 검출 방법으로 나노바이오 광센서는 분광학적 방법을 이용한 검출시스템으로 구성된다. 여기원으로는 레이저를 이용하며 검출기로는 형광 현미경, ICCD (Intensified charge-coupled device), 또는 광전자증배관 (PMT)에 기초한 Photon Counter가 이용된다. 그림 2는 나노바이오 광센서의 모형을 보여준다.



〈그림 2〉 나노바이오 광센서 모형도

모형도에서 보듯이 형광 현미경에는 나노팁을 컨트롤할 수 있는 Micromanipulation/microinjection 시스템이 설치되어 나노팁이 단세포 세포질 속으로 주입될 수 있게 한다. 또한 세포 배양을 위해 현미경의 스테이지는 온도가 일정하게 유지될 수 있도록 설치된다. 레이저 빔은 광섬유에 집광되어 광섬유를 거쳐서 나노팁에 도달되어 여기원으로 이용된다. 그림 3은 나노팁이 단세포 세포질에 주입되기 전(i)과 세포질에 주입된 후(ii)의 그림을 보여준다.



〈그림 3〉 세포질에 주입되는 나노팁

### 3. 나노바이오 광센서의 응용

#### 1) 세포사멸 (Apoptosis) 과정 관찰

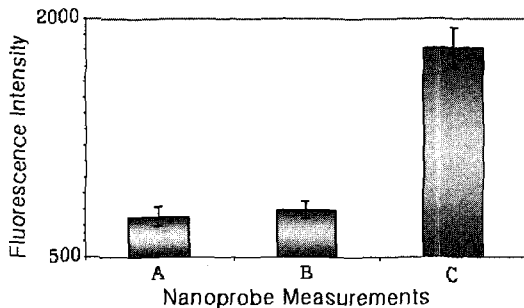
세포사멸은 인체내 티슈 (Tissue) 또는 조직 (Organ) 속의 세포가 일반적인 생명활동 과정 (normal development, aging, disease) 에서 행하는 일종의 프로그램된 죽음이다. 세포사멸 과정에 결함이 생길 때 암을 포함한 여러 가지 질병 (hydrocephalus, neurodegenerative disease 등)으로 발전할 수 있다. 따라서 세포사멸 과정은 인체내 조직과 티슈의 적절한 기능 및 평형을 유지하는데 있어서 매우 중요한 세포 활동이다. 또한 다세포개체 (Multicellular organism)가 증식 (Proliferation)하는 과정 등에서 생존과 관련된 매우 중요한 기능을 수행한다. 나노바이오 광센서는 나노팁을 이용하여 단세포 내에서 일어나는 세포사멸 과정을 직접 관찰할 수 있는 도구로써 유용하게 이용될 수 있다. 이는 세포 죽음과정 초기에 발생하는 여러 종류의 단백질을 측정함으로써 가능하다. 기존의 세포 사멸을 연구하는데 있어서 주로 이용되는 방법은 세포 사멸 마커 (Endpoint

biochemical and morphological marker)를 측정하는 것에 제한되어 있었다. 나노바이오 광센서가 갖는 장점은 단세포 내 세포사멸 단백질들, Caspase-9 또는 Cytochrome-c 등을 직접 검출하는데 있다. 나노바이오 광센서를 활용한 세포사멸 과정에 대한 고찰은 MCF-7 (Human mammary carcinoma cell) 표적세포에서 행해졌다. 세포사멸은 Photodynamic Therapy (PDT) Drug을 이용하여 유도되었으며 항체 및 펩타이드 기질을 이용하여 각각 Cytochrome-c와 Caspase-9 을 직접 검출하였다.

#### 2) Cytochrome-c 측정

Cytochrome-c는 세포사멸과 관련되어 잘 알려진 단백질이자 세포 에너지를 생산하는 과정에서 매우 중요한 역할을 하는 단백질이다. 세포사멸이 일어나면 미토콘드리아로부터 세포질로 Cytochrome-c가 방출된다. 그러나 Cytochrome-c의 방출량은 상대적으로 작은 양으로 알려져 있다. 적은 방출량을 나노팁으로 검출하는 것은 어려운 일로 이를 극복하기 위해 효소에 의한 증폭을 이용하였

는데 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 바이오에세이가 활용되었다. 우선 세포질의 Cytochrome-c는 Cytochrome-c 항체를 나토틱에 부착시켜서 항체에 결합되도록 했다. 결합된 Cytochrome-c는 효소가 라벨링된 항체에 기초한 ELISA를 수행하여 검출하였다. 최종 검출은 효소와 효소기질 반응으로부터는 생성되는 형광체를 검출함으로써 완성되었다. 또한 세포사멸을 위해 d-aminolevulinic acid (5-ALA)를 MCF-7에 주입시킨 뒤 빛을 쬐어주어 세포사멸을 활성화시켰다. 나노바이오 광센서와 ELISA의 결합은 나노바이오 광센서의 검출감도를 향상시켰다. 그림 4는 나노바이오 광센서를 이용하여 단세포 내에서 검출한 Cytochrome-c를 보여준다.<sup>[5]</sup>



〈그림 4〉 나노바이오 광센서를 이용한 Cytochrome-c의 검출. A 5-ALA가 주입되지 않은 단세포에서 얻어진 바탕신호. B 5-ALA는 주입되었으나 활성화되지 않았을 때 얻어진 형광신호. C 5-ALA로 활성화된 뒤 얻어진 형광신호.

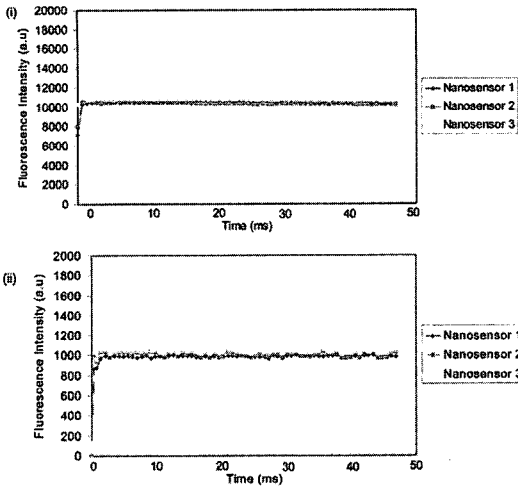
### 3) Caspase-9 측정

Caspase는 세포사멸 초기에 생성되는 매우 중요한 마커이다. Cytochrome-c가 미토콘드리아에서 세포질로 방출된 후 세포질에서는 Cytochrome-c로 인하여 연쇄반응이

진행되어 Caspase 단백질들이 생성된다. 따라서 생성된 Caspase 단백질들을 마커로 활용하여 세포사멸을 측정하는 것이 가능하다. Caspase 단백질 중에서 Caspase-9이 나노바이오 광센서에 의해 검출되었는데, Caspase-9의 기질, leucine-aspartic acid-histidine-glutamic acid 7-amino-4-methylcoumarin (LEHD-AMC)이 나토틱에 부착되어 측정이 행해졌다. 5-ALA 활성화 후 생성된 Caspase-9은 확산에 의해 나노팁에 도달하여 기질과 반응한다. 반응 결과 LEHD 펩타이드와 AMC 결합이 끊어지면서 형광체인 AMC가 생성된다. AMC는 Evanescent field에 의해서 여기되어 그 형광이 검출된다. 여기원으로는 HeCd 레이저가 이용되었다. PDT 활성화로 유발된 세포사멸 결과 생성된 Caspase-9의 검출은 PDT를 활성화 시킨 경우와 활성화 시키지 않은 컨트롤 실험을 비교함으로써 확인할 수 있었다. 그림 5는 그 결과를 보여준다. 그림 5는 바탕신호(ii)와 5-ALA에 의해 활성화된 세포사멸 과정시 발생한 Caspase-9를 검출한 형광신호(i)의 비교를 나타낸다.<sup>[6]</sup>

## III. 결론

이 논문은 나노바이오 광센서가 기존 방법으로는 힘든, 단세포내에서 일어나는 현상 및 생화학적 과정을 직접 관찰하는 것을 가능하게 하는 매우 강력한 도구임을 살펴보았다. 또한 세포의 생명활동에 대한 근본적 이해를 크게 증진시킬 수 있는 귀중한 자료를 제공할 수 있음을 세포사멸 과정을 통해 고찰해 보았다. 나노바이오 광센서가 갖는 특



〈그림 5〉 나노바이오 광센서를 활용한 Caspase-9의 검출. (i) PDT 활성화 후 Caspase-9 검출. (ii) PDT가 활성화 되지 않은 단세포에서 얻어진 바탕신호.

성은 세포의 신호 경로 및 체계를 자세히 이해를 하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다. 나노수준 크기의 나노프로브 팁을 바이오센서에 결합함으로써, 단세포 수준의 연구가 활발히 이루어지는데 있어서, 나노바이오 광센서의 획기적인 기여가 예상된다.

참고 문헌

[1] T. Vo-Dinh, J. P. Alarie, B. M. Cullum, G. D. Griffin, "Antibody-based nanoprobe for measurement of a fluorescent analyte in a single cell", Nat. Biotechnol. 제18권, 제7호, 764-767쪽, 2000년 7월

[2] Y. E. Koo, Y. Cao, R. Kopelman, S. M. Koo, M. Brasuel, M. A. Philbert, "Real-time measurements of dissolved oxygen inside live cells by organically modified silicate

fluorescent nanosensors", Anal. Chem. 제76권, 제9호, 2498-2505쪽, 2004년 5월

[3] J. Hwang, L. K. Tamm, Bohm, T. S. Ramalingam, E. Betzig, M. Edidin, "Nanoscale complexity of phospholipid monolayers investigated by near-field scanning optical microscopy", Science, 제270권, 제5236호, 610-614쪽, 1995년 10월

[4] V. Deckert, D. Zeisel, R. Zenobi, T. Vo-Dinh, "Near-field surface enhanced Raman imaging of dye-labeled DNA with 100-nm resolution", Anal. Chem. 제70권, 제13호, 2646-2650쪽, 1998년 5월

[5] J. M. Song, P. M. Kasili, G. D. Griffin, T. Vo-Dinh, "Detection of Cytochrome c in a single cell using an optical nanobiosensor", Anal. Chem. 제76권, 제9호, 2591-2594쪽, 2004년 5월

[6] P. M. Kasili, J. M. Song, T. Vo-Dinh, "An optical nanosensor for the detection of Caspase-9 in a single cell", J. Am. Chem. Soc. 제126권, 제9호, 2799-2806쪽, 2004년 3월

저자소개



송 준 명

1998년 5월 - 2000년 4월 Ames Laboratory 연구원  
 2000년 5월 - 2001년 4월 Brookhaven National Laboratory 연구원  
 2001년 8월 - 2004년 1월 Oak Ridge National Laboratory 연구원  
 주관심 분야 바이오센서, 광학적 체내 암진단