

세라믹 나노구조체를 이용한 바이오 분석기술 개발

글 _ 정봉현, 이창수
한국생명공학연구원 바이오나노연구센터

1. 서론

현재 우리 사회의 가장 큰 화두 중 하나가 건강인 만큼 많은 사람들이 건강한 삶을 누리기 위해 다양한 노력을 하고 있다. 이런 흐름에 맞추어 평소에 간편하게 질병의 진단결과를 확인할 수 있는 진단기술에 대한 관심이 증폭하고 있다. 특히 최근 BT, IT, NT 융합기술을 기반으로 한 고감도 바이오 진단 및 분석 기술은 생명공학연구, 신약개발, 질병진단 등의 다양한 분야에 크게 기여할 것으로 예상되고 있으며 국내외적으로 진단 및 의료산업 시장의 확대에 진단 및 분석을 위한 새로운 차원의 플랫폼 기술개발에 대한 필요성이 매우 증폭되고 있는 시점이다. 따라서 독창적이며 새로운 개념의 바이오 진단 및 분석을 위한 시스템이 개발될 경우 수입 대체효과 및 해외시장 개척에 나설 수 있으며, 궁극적으로 질병진단 분야에 활용함으로써 관련 산업분야에 커다란 파급효과를 가져올 수 있다. 과거에는 바이오 진단 및 분석의 적용분야가 의료용 및 임상진단에 국한되어 왔으나, 최근 공해물질, 환경호르몬의 검출, 식품의 안정성 테스트, 그리고 군사적으로 생화학전에 대비한 독성물질 검출에 이르기까지 다양한 분야에 걸쳐 발전되어 왔으며, 향후 미래 먹거리, 국가경쟁력 제고에 주요 요소기술로 인식되고 있다. 따라서 효율적인 바이오센서의 개발이 미치는 사회·산업·경제적 파급효과는 대단히 클 것으로 예상된다. 한편 치료 및 진단용 또는 생체 대체용으로 인체 내에 이식되어 사용되는 생체 대체산업은 의료기술이 발달하고, 인

구의 고령화로 인한 사회의 의료복지 수요가 증가함에 따라 그 중요성이 크게 부각되고 있다. 2000년대 초반의 참살이 (well-being) 및 삶의 질 (quality of life) 향상과 관련하여 바이오산업은 미래산업의 근간으로 주목을 받고 있다. 특히, 2005년 말부터 LOHAS (Lifestyles of Health and Sustainability)에 편승하여 신기능 생체소재의 개발만이 미래 고부가가치 산업을 선점할 수 있는 기회로 자리매김 됨으로써 생체소재 개발은 큰 이슈가 되고 있다. 현재까지의 생체소재 개발은 고분자를 중심으로 발전을 해왔지만, 최근에는 생체적합성과 높은 반응 표면적을 갖는 신기능 생체세라믹 관련 소재를 중심으로 선진국에서 투자 및 개발이 되어 오고 있다. 본 고에서는 뛰어난 광학적 특성과 생체 안정성을 보이는 새로운 나노구조체와 금속산화물 구조체를 이용한 바이오분석에 대한 연구 결과를 소개하고자 한다.

2. 새로운 형광나노입자의 합성과 이를 이용한 바이오이미징

수 나노미터에서 수십 나노미터에 이르는 크기를 갖는 다양한 종류의 나노입자 중에서 형광 특성을 나타내는 나노입자는 고유의 크기와 광학적 특성으로 바이오 분야에 매우 유용하게 이용되고 있는데, 예를 들어 바이오 진단을 위한 바이오이미징, 바이오센싱, 그리고 약물과 같은 물질의 전달 등 다양한 분야에 활용이 되고 있다. 이러한 나노입자 중에서 바이오 분야에 대표적으로 사용되

고 있는 것이 양자점 (quantum dot, QD)으로 이는 넓은 범위의 파장영역에서 강한 형광 특성을 나타내며 광안정성이 매우 우수하기 때문에 많은 연구자들의 주목을 받고 있다. 그러나 양자점을 제조하기 위해서는 반도체 재료를 기반으로 해야 하기 때문에 이를 생체분야에 적용하기 위한 생체안정성 실험에서 유해하다는 결과를 나타내고 있다. 따라서 현재까지는 이를 직접 생체분야에 적용하는 것이 매우 어려운 것으로 알려지고 있기 때문에 생체환경에서 유해하지 않으면서 광학적으로도 높은 안정성을 나타내는 형광 나노입자의 개발이 절실히 필요하다. 최근 탄소재료를 이용한 형광 나노입자의 개발이 활발하게 이루어지고 있는데, hydrocarbon을 연소하여 수 나노미터 크기의 carbon nanoparticle 혹은 carbogenic quantum dots 등을 제조한 결과가 보고되었다. 이들 나노입자는 다양한 파장 영역에서 형광 특성을 나타내며 표면개질을 통하여 생체환경에서 안정한 나노입자를 제조할 수 있다. 그러나 높은 온도와 추가적인 표면개질을 요구하는 복잡한 제조과정은 개선될 필요가 있으며, 합성된 나노입자의 생체안정성에 대해 더욱 면밀히 검토해야 할 필요가 있다.

2.1. 하이브리드 나노구조체 제조

실리카 (세라믹) 재료는 생물학적 안정성이 매우 우수하면서도 표면개질이 용이한 대표적인 물질로 알려져 있다. 그러나 실리카 자체로는 형광 특성을 전혀 나타내지 않는 물질인데 본 연구에서는 실리카와 탄소의 동소체로 알려진 풀러렌 (fullerene, C₆₀)과의 하이브리드를 통한 새로운 형광 나노입자를 제조하였다. 풀러렌은 60개의 탄소가 약 1 nm 직경의 축구공 모양을 형성하며 이루어진 나노구조체로서 독특한 구조와 강한 자외선 흡수능력, 그리고 반도체 특성을 가지고 있다. 실리카-풀러렌 나노입자 (FSNP)는 일반적인 sol-gel 프로세스 중 역마이셀 방법(reverse microemulsion method)을 이용하여 실리카 나노입자가 제조되는 과정에서 첨가된 풀러렌이 실리카와의 네트워크에 의한 하이브리드 구조를 형성한다 (Fig 1(a)). 실리카-풀러렌 나노입자의 제조과정에서 사용된 계면활성제 (TX100)와 보조 계면활성제 (hexanol)는 소

수성이 강한 풀러렌을 실리카 전구체가 존재하는 마이크로 에멀전 (microemulsion)에 들어가도록 유도하였다. 또한 촉매제로 사용된 NH₄OH(ammonium hydroxide)는 실리카 전구체를 가수분해 시키는데 사용되었을 뿐만 아니라 풀러렌과 반응하여 라디칼 (radical)을 형성시켜 실리카 네트워크의 형성에 작용한다. 이 방법으로 제조된 나노입자는 지름이 약 60 nm 인 균일한 구형모양을 나타내고 있다 (Fig 1(b)).

2.2. 실리카-풀러렌 나노입자의 형광 특성

합성된 실리카-풀러렌 나노입자의 광학적 특성은 흡수 스펙트럼과 형광 스펙트럼을 통해 확인할 수 있다. 실리카-풀러렌 나노입자의 흡수 스펙트럼은 풀러렌을 첨가하지 않고 합성한 실리카 나노입자의 흡수 스펙트럼과 유사하지만 풀러렌의 흡수파장인 220, 260, 340 nm에서 broad band를 나타내고 있다. 이것은 실리카 내 풀러렌

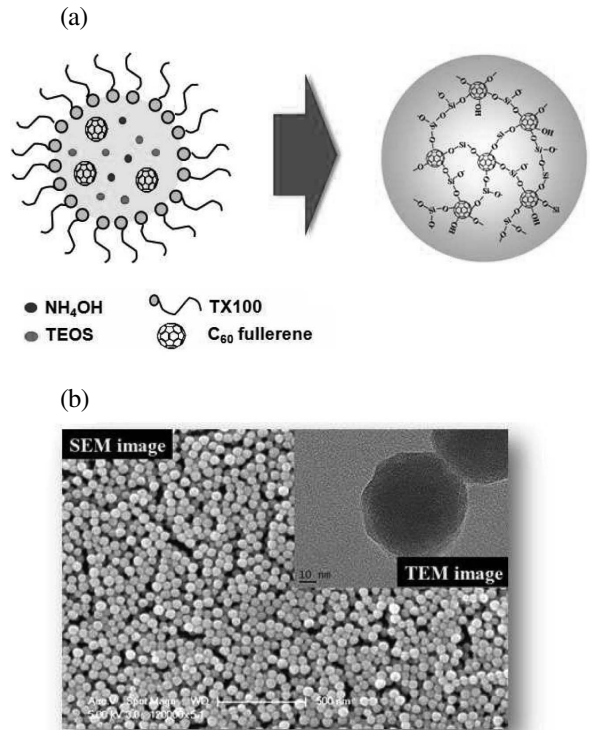


Fig. 1. (a) Preparation of fullerene-silica nanoparticles using reverse- microemulsion method, (b) SEM and TEM images of nanoparticles.

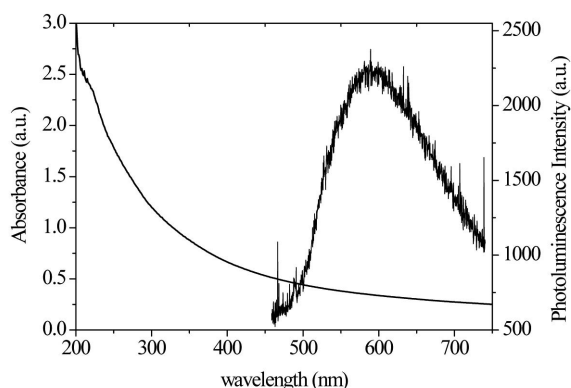


Fig. 2. Photoluminescence spectra of fullerene-silica nanoparticles.

의 전자전이 (electronic transition)의 변화를 나타낸 것으로 여겨진다. 실리카-풀러렌 나노입자의 형광은 720 nm에서 매우 약한 형광 (quantum yield ~0.0001%)을 나타내는 풀러렌과 달리 600 nm에서 강한 형광 (quantum yield ~0.0035%)을 나타내는 것으로 나타났다(Fig 2). 형광의 세기는 laser power와 비례하기 때문에 두 시료의 power의 차이로 실리카-풀러렌 나노입자의 형광이 얼마나 강한지 확인할 수 있다.

2.3. 실리카-풀러렌 나노입자의 세포투과성

새로운 실리카-풀러렌 나노입자를 바이오진단을 위한 이미징 재료 및 약물전달체로서의 특성을 검증하기 위하여 광안정성과 생물학적 안정성을 살펴보았다. 이를 위하여 실리카-풀러렌 나노입자를 세포 내에 투여하여 실험을 수행하였다.

대표적인 대식세포인 macrophage에 실리카-풀러렌 나노입자와 이와 비교하기 위하여 일반적으로 사용되는 형광안료인 Alexa 488을 투여한 뒤 약 10분 간 1초 간격으로 488 nm의 빛을 조사하여 세포이미지를 얻었다(Fig. 3). 그 결과, 실리카-풀러렌 나노입자를 투여한 세포에서는 형광이 50% 정도 남아있는데 반해 Alexa 488을 투여한 세포에서는 형광이 거의 소멸되어 사라졌음을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이것은 비교적 광안정성이 높다고 알려진 Alexa 488과 비교하여 실리카-풀러렌 나노입자의 광안정성이 현저하게 높다는 것을 보여주고 있는 것이다.

이는 single molecule fluorescence detection 실험을 통해서도 확인할 수 있었는데, 실리카-풀러렌 나노입자가 Alexa 488에 비해 약 10 배의 광자를 포함하는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라, 실리카-풀러렌 나노입자의 농도를 달리하여 세포에 처리하여 3일 뒤에 세포 안정성 (cell viability) 테스트를 수행한 결과, 100 µg/mL 실리카-풀러렌 나노입자는 세포에 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

일반적으로 대식세포를 제외한 다른 세포들은 외부인자가 세포 내부로 쉽게 들어갈 수 없다는 특징이 있다. 그러나 실리카-풀러렌 나노입자의 세포투과성은 대식세포 뿐만 아니라 다른 세포에서도 효과적인 것으로 나타났다. 예를 들어 포피 암세포인 HeLa 세포, 유방암 세포인 SKBr3 세포와 일반 세포인 HUVEC 세포에서 실리카-풀러렌 나노입자를 처리한 뒤 형광을 측정했을 때, 세포 내부에서 붉은색의 형광이 측정되는 것을 확인하였다. 이것은 실리카-풀러렌 나노입자가 대식세포와 더불어 다른 세포에서도 탁월한 세포투과성을 보이는 것으로 세포이미징에 활용될 가능성을 보여주고 있다 (Fig 5).

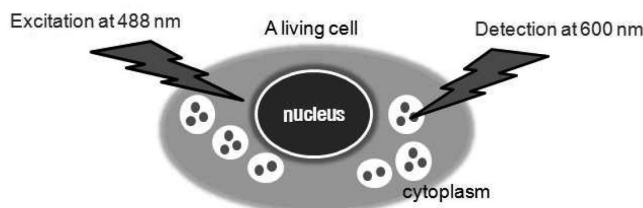


Fig. 3. Schematic illustration of intracellular uptake of fullerene-silica nanoparticles in a cell and bioimaging.

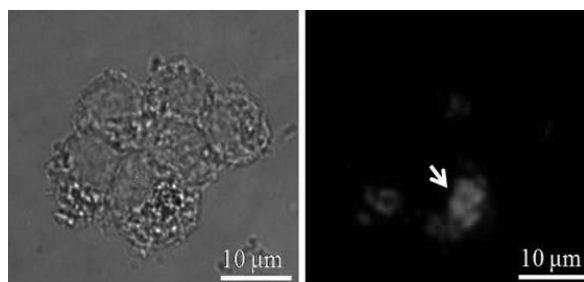


Fig. 4. Internalization into cell by endocytosis and imaging.

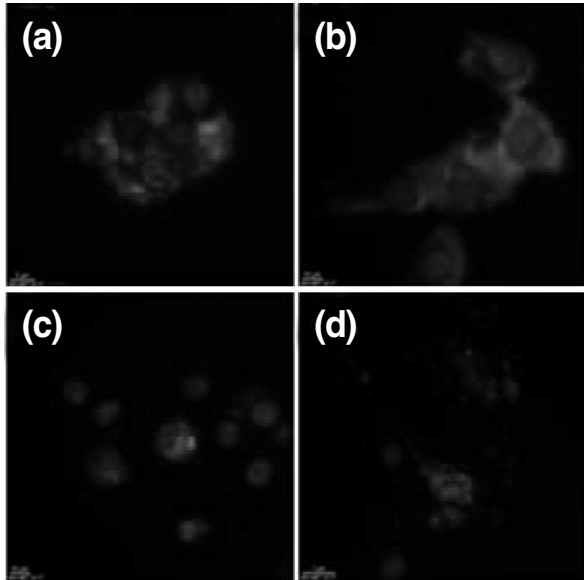


Fig. 5. (a) macrophage, (b) HeLa, (c) SKBr3, and (d) HUVEC cells.

3. 금속 산화물 나노구조체를 이용한 마이크로어레이 제조 및 고감도 바이오센싱

3.1. 금속산화물 나노구조체 제조

산화아연 나노구조체의 제조를 위한 전구체 (precursor)로서 아연수화물 ($Zn(NO_3)_2 \cdot xH_2O$ 등) 및 아민계 화합물 (hexamethylenetetramine 등)을 이용하였고, 형성된 산화아연 나노구조체에 생체분자의 고정에 적합하도록 하기 위해 표면을 실란계 화합물, 에스테르 화합물 그리고 마지막으로 EDC (t-ethyl-3-dimthyl aminopropyl carbodimide hydrochloride)/NHS (N-hydroxy succinimide) 반응을 이용하여 처리하였다. 산화아연 나노구조체를 수용액상에서 결정 성장시키는 방법을 이용하여 제조할 수 있으며, 이 때 고분자 화합물이 마이크로어레이 형태로 패터닝 된 부분에만 산화아연 나노구조체가 결정 성장하여 나노로드 형태의 구조체가 형성되며 미리 카르복실기로 표면처리 된 유리기판 부분에는 나노구조체가 성장하지 않는다(Fig. 6).

유리기판에 고분자 화합물 막이 잘 형성이 될 수 있도록 실란계 화합물을 이용하여 자기조립박막 (Self-Assembled Monolayer)을 형성한 후 마이크로어레이를 이용하여 고분자 화합물을 패터닝 한다. 물로 세척 후 zinc nitrate hexahydrate $\{Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O\}$ 및 hexamethylenetetramine의 혼합 용액을 약 $95^\circ C$ 에서 산화아연 나노구조체가 형성이 되도록 2시간 정도 놓아둔다. 주사전자현미경 (SEM)을 이용하여 고분자화합물 어레이 상에 직경 약 $1\mu m$ 크기의 산화아연 나노구조체가 고밀도

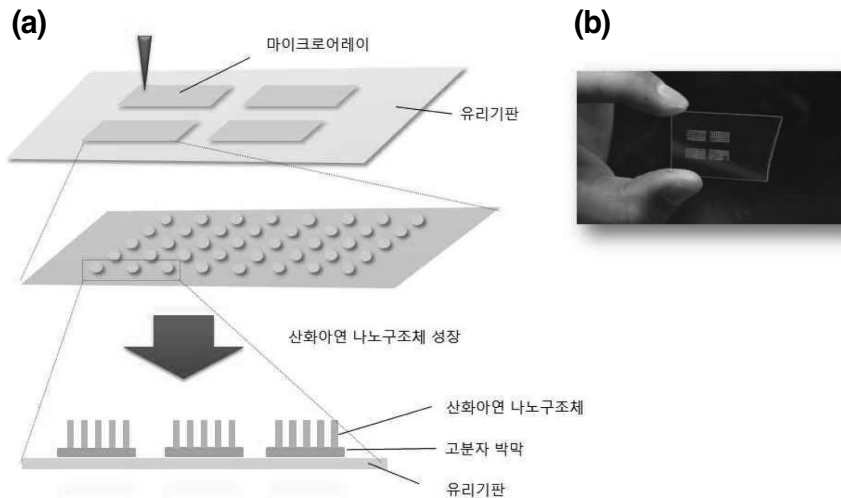


Fig. 6. (a) Preparation of zinc oxide nanostructures, (b) Microarray of zinc oxide nanostructures formed on glass substrate.

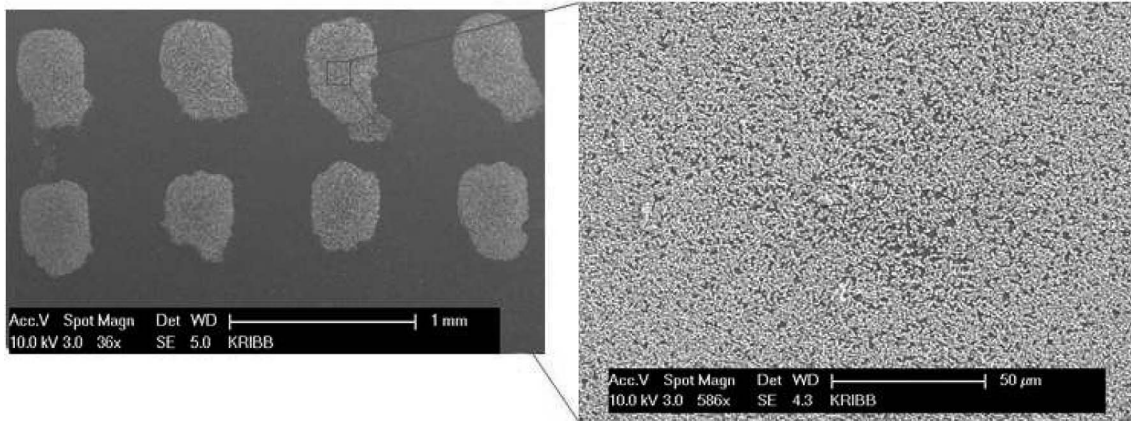


Fig. 7. SEM images of zinc oxide nanostructures.

로 성장한 것을 확인할 수 있었고 (Fig 7), EDAX를 이용하여 성분을 분석한 결과 Zn 및 O의 성분을 확인함으로써 산화아연 나노구조체가 제조되었음을 확인할 수 있었다.

3.2. 금속산화물 나노구조체 마이크로어레이를 이용한 바이오 분석

제조된 산화아연 나노구조체의 표면을 생체분자로 고정시키기 위해 유리기판을 아민기 (-NH₂)를 갖도록 표면 처리한 후, 여기에 1 mM succinyl anhydride와 EDC/NHS 반응을 이용하여 생체분자가 결합할 수 있도록 표면을 제조한다. 표면처리 된 산화아연 나노구조체에 생체물질

을 고정화하여 단백질간의 상호작용을 관찰하기 위해 우선 GFP (green fluorescence protein) 항체를 고정화시켰다(Fig. 8). 여기에 형광을 띄는 단백질인 GFP 항원이 항체가 고정된 표면에 선택적으로 상호작용을 하는지 확인하기 위해 형광 스캐너를 이용하여 GFP 항원이 결합했을 때 나타내는 형광 이미지를 확인할 수 있었다 (Fig 9(a)). 또한 GFP 항체에 결합하는 GFP 항원의 농도의 변화 (100 ng/mL, 10 ng/mL, 1 ng/mL, 100 pg/mL, 10 pg/mL)에 따른 형광이미지의 세기 (Fig 9(b)) 및 나노구조체가 없는 유리기판 상에서 형광이미지 (Fig 9(c))를 비교하였다. 산화아연 나노구조체 상에서의 생체분자 간

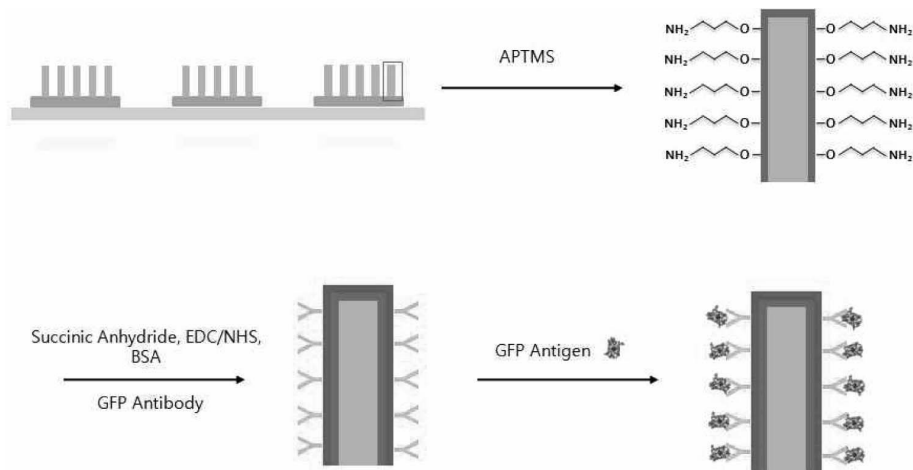


Fig. 8. Antigen-antibody conjugation on zinc oxide nanostructures.

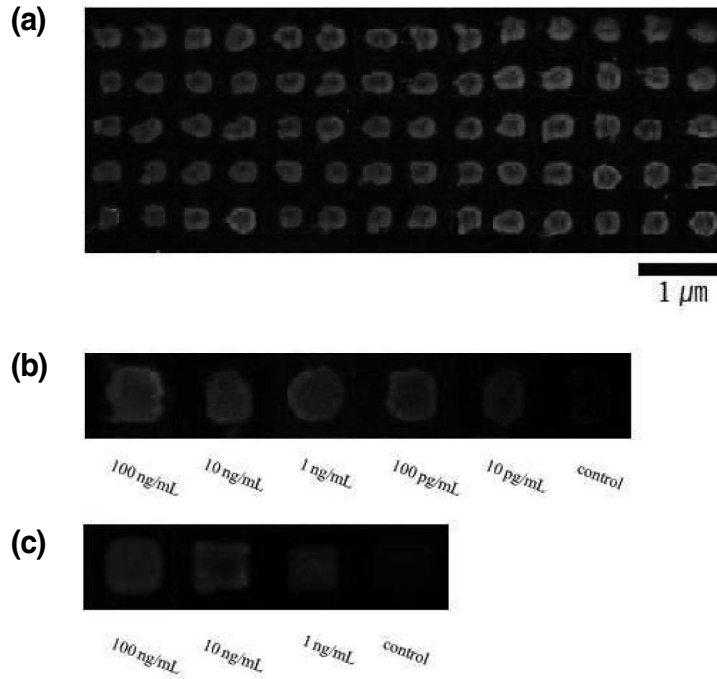


Fig. 9. (a) Fluorescent images by GFP antigen-GFP antibody conjugation, (b) Fluorescent intensity as a function of concentration, (c) Fluorescent images by GFP antigen-GFP antibody conjugation on bare glass.

상호작용의 높은 감도로 검출이 되고 있음을 확인하였고 검출되는 농도가 약 10 pg/mL에 이르는 것을 확인할 수 있었다.

4. 맺음말

역마이셀 방법을 이용하여 제조된 실리카-플러렌 하이브리드 나노입자는 강한 형광 스펙트럼을 나타내며, 이 나노입자를 다양한 종류의 세포에 적용하였을 때 우수한 세포 투과 특성을 나타내었다. 이를 이용하여 약물전달 기술의 개발뿐만 아니라 높은 생체안정성과 광안정성을 이용하여 향후 바이오 분석 및 진단을 위한 바이오이미징 분야에서 매우 유용한 소재로 활용될 것으로 기대된다. 또한 간단한 마이크로어레이 기술과 금속산화물 나노구조체 제조기술을 이용하여 패턴화 된 고밀도의 금속산화물 나노구조체를 제조하고 표면에 생체물질을 고정화하여 생체분자 간 상호작용을 고감도로 검출하였다. 이와 같은 3차원 나노구조체를 바이오센싱을 위한 표면

으로 이용함으로써 높은 표면적에 의한 고감도 바이오센싱 효과를 기대할 수 있으며 다양한 형태의 금속산화물 나노구조체를 이용하여 바이오칩, 바이오센서 등을 제작할 수 있을 것으로 기대된다. 이와 같이 다양한 세라믹 소재를 이용한 바이오 진단 및 분석을 위한 소재의 개발을 통해 기존에 사용되던 바이오칩/센서 및 디바이스용 재료를 이용했을 때 보다 비용의 절감, 생체분자의 열적, 환경적 안정성뿐만 아니라 민감도, 재현성 등에서도 뛰어난 효과를 가져 올 수 있을 것으로 기대된다. 결국 이러한 소재들을 바이오센서 및 소자에 적용했을 때 언제 어디서나 우리의 건강상태를 손쉽고 정확하게 진단할 수 있는 유비쿼터스 시대를 앞당기는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 소재원천기술개발사업의 연구비 지원으로 수행되었습니다.



참고 문헌

1. W. C. W. Chan and S. Nie, *Science*, **281** 2016-18 (1998).
2. H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, and U. Wiesner, *Nano Lett.*, **5** 113-17 (2005).
3. P. Innocenzi, and G. Brusatin, *Chem. Mater.*, **13** 3126-39 (2001).
4. H.-H. Kim, N. W. Song, T. S. Park, and M. Yoon, *Chem. Phys. Lett.*, **43**, 200-4 (2006).
5. J. Y. Jeong, M. Y. Cho, Y. T. Lim, N. W. Song, and B. H. Chung, *Angew. Chem. Int. Ed.* **121** 5400-03 (2009).
6. Y. Jin, S. Kannan, M. Wu, and J. X. Zhao, *Chem. Res. Toxicol.*, **20** 1126-33 (2007).
7. Y. Wang, Q. Guo¹, S. Lin, B. Chen¹, and D. Zheng, *Journal of Physics: Conference Series*, **152** 012018 (2009).
8. H. E. Unalan, P. Hiralal, D. Kuo, B. Parekh, G. Amaratungaand, and M. Chhowalla, *J. Mater. Chem.*, **18** 5909-12 (2008).
9. S. D. Lee, M. J. Jin, K. S. Shin, S. W. Jeong, and S. W. Kim, *J. of KIEEME*, **21** 599-602 (2008).

정봉현



- 1987년 KAIST 생물화학공학과 박사
- 1990년 California Institute of Technology 박사후연구원
- 1987년~현재 한국생명공학연구원 책임연구원
- 2003년~현재 과학기술연합대학원대학교 전공책임교수

이창수



- 2003년 Kyushu University 응용화학 박사
- 2003년 University of Wisconsin-Madison 박사후연구원
- 2004년 삼성정밀화학 책임연구원
- 2006년~현재 한국생명공학연구원 선임연구원

10. A. Rezania, R. Johnson, A. R. Lefkow, and K. E. Healy, *Langmuir*, **15** 6931-39 (1999).