

국소 표면 플라즈몬 공명 (LSPR) 기반 비표지 바이오칩 제작 및 바이오센서로의 응용

김도균 · 박태정 · 이상엽^{1*}

한국과학기술원 생물공정연구센터, 시스템 및 합성생명공학연구센터, 바이오융합연구소, 초미세화학공정연구센터
¹생명화학공학과 (BK21 프로그램), 바이오 및 뇌공학과, 생명과학과, 생물정보연구센터

Fabrication of Label-Free Biochips Based on Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) and Its Application to Biosensors

Do-Kyun Kim, Tae Jung Park, and Sang Yup Lee^{1*}

BioProcess Engineering Research Center, Center for Systems & Synthetic Biotechnology, Institute for the BioCentury, and Center for Ultramicrochemical Process Systems, ¹Department of Chemical & Biomolecular Engineering, Department of Bio & Brain Engineering, Department of Biological Sciences, Bioinformatics Research Center, KAIST, 335 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea

Abstract In the past decade, we have observed rapid advances in the development of biochips in many fields including medical and environmental monitoring. Biochip experiments involve immobilizing a ligand on a solid substrate surface, and monitoring its interaction with an analyte in a sample solution. Metal nanoparticles can display extinction bands on their surfaces. These charge density oscillations are simply known as the localized surface plasmon resonance (LSPR). The high sensitivity of LSPR has been utilized to design biochips for the label-free detection of biomolecular interactions with various ligands. LSPR-based optical biochips and biosensors are easy to fabricate, and the apparatus cost for the evaluation of optical characteristics is lower than that for the conventional surface plasmon resonance apparatus. Furthermore, the operation procedure has become more convenient as it does not require labeling procedure. In this paper, we review the recent advances in LSPR research and also describe the LSPR-based optical biosensor constructed with a core-shell dielectric nanoparticle biochip for its application to label-free biomolecular detections such as antigen-antibody interaction.

Keywords: localized surface plasmon resonance, nanoparticle, core-shell dielectric nanoparticle biochip, label-free optical biosensor, biomolecular interaction

서 론

생체분자를 신속히 측정하는 기술은 바이오센서 개발의 기초연구와 함께 의료현장에서도 빠질 수 없는 기술로 인식되어 왔다. 인간 게놈의 분석에 의해 게놈과 질환의 관계가 보다 선명하게 밝혀지고 있는 지금, 의료현장에서

는 간단하면서 보다 알기 쉬운 유전자 진단이 요구되어 지고 있으며, 그에 따른 기술 개발이 진행되고 있다. 생체 분자 자체의 상호작용을 분석하는 것이 중요하다는 것은 말할 것도 없으나 나노 스케일의 생체분자를 관찰하는 것은 어려운 일이다. 따라서, 최근에는 나노 크기의 공간에서 일어나는 현상을 관찰하기 위해 금속 나노입자와 같은 플라즈모닉스 (plasmonics) 나노재료와 생체분자를 결합 시켜서 관찰하는 광학 바이오센서에 대한 연구가 증가하고 있다. 이것은 나노테크놀로지의 발전에 의해 금속 나노입자와 같은 플라즈모닉스 나노재료의 제어 (합성, 평가, 이용)

*Corresponding author

Tel: +82-42-350-3930, Fax: +82-42-350-8800

e-mail: leesy@kaist.ac.kr

가 가능하게 되었기 때문이다. 플라즈모닉스 나노재료는 단순한 광학재료(1, 2)로서 사용되는 것뿐만 아니라 바이오센서 분석의 도구(3)로서도 활용이 기대되고 있다.

금속 나노입자와 같이 국소적인 표면이 존재하는 재료에 다양한 파장을 갖는 빛을 조사하면 벌크 금속과는 달리 금속 나노입자 표면에 분극이 발생하고 전기장의 강도를 증대하는 특이한 성질을 나타낸다. 분극에 의해 형성된 전자들은 집단 (플라즈몬, plasmon)을 이루게 되며, 금속 나노입자의 표면에서 국소적으로 진동하게 되는데 이러한 현상을 국소 표면 플라즈몬 공명 (localized surface plasmon resonance : LSPR)이라고 한다. 이러한 현상에 대해서는 오래 전부터 Mie 등에 의해 이론적으로 계산되고 예측되어 왔으나 최근 들어 나노 가공기술이 발전하게 되면서 다양한 센서와 결합시키는 유용한 연구결과들이 발표되고 있다(4-8).

표면 플라즈몬 공명 (surface plasmon resonance : SPR)과 마찬가지로 LSPR 광학특성은 나노입자 근처에서 발생하는 유전을 변화, 즉, 굴절을 변화에 민감하게 응답하기 때문에 수정진동자 미세저울법 (quartz crystal microbalance : QCM)(9, 10)이나 전기화학법(11, 12)을 이용한 비표지 바이오센서보다도 고감도로 간편하게 생체분자 상호작용의 분석이 가능하다. 또한 LSPR 광학특성은 가시영역에서 흡수 피크가 얻어지기 때문에 지금까지 개발된 SPR 광학특성을 이용한 비표지 바이오센서와 비교하여 보다 간단한 광학계로서 생체분자 상호작용의 분석이 가능하다. 따라서 LSPR 광학특성을 검출 원리로 하여 단일 바이오칩 위에 여러 가지 리간드를 고정화하는 것으로서, 종래의 바이오칩보다 다중검체의 동시 분석이 가능하기 때문에 비표지 바이오칩에서 요구되어지고 있는 온사이트 모니터링 (on-site monitoring)도 가능하게 된다.

본 총설에서는 나노입자의 LSPR 광학특성의 여기 원리에 대해서 설명하고, LSPR 광학특성을 검출 원리로 하는 바이오칩의 보고예에 대해서 기술하였다. 또한 지금까지 수행된 코어-셸 (core-shell) 구조 나노입자 바이오칩의 제작 방법 및 센서로서의 응용에 대한 결과를 서술하고자 한다.

국소 표면 플라즈몬 공명 (LSPR) 광학특성

일반적으로 각각의 물질이 특유의 색을 띠는 것은 어떤 진동수의 빛을 강하게 흡수 또는 반사하기 때문이다. 금속에는 자유전자가 많이 포함되어 있으며, 자유전자는 서로 상호작용을 하며 집단적으로 진동한다. 보통 이와 같은 진동을 플라즈마 진동 (양자로 생각하면, 플라즈몬)이라고 불려진다. 자유전자가 진동하면 전하가 진동하는 것이 되기 때문에 당연히 전기장의 진동이 따르게 된다. 고체 물리학에서는 입자의 진동과 전기장 진동이 결합한 것을 플라리톤 (polariton)이라고 부른다. 따라서 플라즈몬도 정확히 말하면 플라즈몬 플라리톤이라고 부르는 것이 정확

한 표현이다. 표면 근처에서 국소 전장이 발생할 수 있는 재료 (예를 들어, 금속 박막이나 금속 나노입자)에서는 벌크 금속과는 양상이 다른 플라즈마 진동, 즉 표면 플라즈몬 플라리톤이 존재한다. 표면 플라즈몬 (간단히 플라리톤은 생략)은 전기장을 나노공간에 국한시켜서 전기장 강도를 증대시키려는 특이한 성질을 가지고 있다. 최근 금속 나노구조의 제작기술의 향상으로 표면 플라즈몬이 가지고 있는 성질을 바이오센서 등의 여러 가지 응용에 적용하려고 하는 “플라즈모닉스” 분야의 연구가 활발히 진행되고 있으며 커다란 성과를 보여주고 있다. 이런 플라즈모닉스 연구 분야의 핵심요소는 나노구조를 형성할 수 있는 재료에 의한 플라즈몬 전기장의 국소 제어이다.

LSPR 광학특성은 SPR 광학특성과는 다르게 금이나 은 등의 금속 나노입자가 가지는 비선형 광학특성이다. 예를 들어 금 나노입자 현탁액이 적색을 띠는 것은 입사광의 전기장 진동에 의해 금 나노입자내의 자유전자가 파장 520 nm 근처에서 진동하기 때문에 발생한다. 이것은 금 나노입자의 유전율이 벌크상태일 때와는 다르기 때문에 얻어지는 특성이며, 나노입자의 직경이 전자의 평균 자유이동 거리보다 작아지게 되면 전자가 그 거리를 이동하기 전에 나노입자의 표면에 충돌하고 산란되기 때문에 발생한다.

금속 나노입자에 의한 LSPR 광학특성의 여기

LSPR 광학특성의 여기에는 금이나 은 등의 금속 나노입자가 중요하게 이용되고 있다. 금속 나노입자에 빛을 조사하면 광의 전자파로서의 극성에 의해 분극이 발생한다. 균일한 주위 매질에 고립된 구형 금속 나노입자에 대해서 LSPR 광학특성의 거동은 Maxell 방정식에 의해 기술하는 것이 가능하다. 금속 나노입자의 직경이 광의 파장과 비교해서 충분히 작다고 가정하면, 분극을 α 는 다음과 같은 식으로 나타내어진다.

$$\alpha = 4\pi r_m^3 \frac{\epsilon_m(\omega) - \epsilon_1}{\epsilon_m(\omega) - 2\epsilon_1} \quad (1)$$

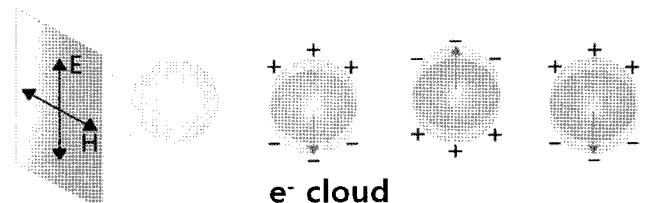


Fig. 1. Schematic illustrating of excitation of dipole surface plasmon oscillation of spherical gold nanoparticles.

여기서 r_m 은 금속 나노입자의 반경, $\epsilon_m(\omega)$ 은 금속 나노입자의 유전율, ϵ_1 은 금속 나노입자 주위 매질의 유전율이다. 식 (1)에서 발산조건은 분극율의 분모가 0이 되는 것이며, 이 때 공명현상이 발생하게 된다. 직경이 파장과 비교하여

충분히 작은 금속 나노입자에서 발생하는 LSPR의 공명 주파수는 $\epsilon_m(\omega)$ 과 ϵ_1 에 의해 결정된다. 즉, 나노입자의 유전율과 주위 매질의 유전율에 의존한다. 반면에 나노입자의 직경이 파장과 비교하여 무시할 수 없을 정도의 크기라면, 공명주파수는 Mie의 산란이론을 이용하여 유도할 수 있지만, 실제적으로는 나노입자의 직경이나 형태에도 의존한다는 것이 알려져 있다(Fig. 1)(13-22).

LSPR 광학특성의 비표지 바이오칩에의 응용

금속 또는 반도체로 구성된 나노입자, 나노튜브, 나노와이어 물질은 독특한 광학 및 전자기적 성질을 지니며 크기와 형태의 변형이 용이하여 최근 이들의 다양한 합성 방법을 개발하는 연구 외에도, 바이오, 환경, 식품, 의학 등의 다양한 분야에 접목/응용하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이 중에서도, 금속 나노입자와 같은 생체분자의 검출에 사용되는 플라즈모닉스 나노재료는 검출단계를 단순화할 수 있으며, 바이오센서의 검출 신호 증폭, 정확도 및 신뢰도를 향상시킬 수 있다. 이 중에서도 금 나노입자는 형태와 크기에 따라 빛의 전자기성과 커플링하여 LSPR 광학 특성을 가지게 되며, 이를 이용한 고감도 광학 바이오센서들이 많이 개발되고 있다. 예를 들어, Chilkoti 그룹(23, 24), Okamoto 그룹(25) 및 Frederix 그룹(26) 등은 유리기판 상에 금이나 은의 나노입자를 물리 흡착시킨 후, 항원-항체 반응 등 생체분자 상호작용의 비표지 모니터링을 실시하였다. Van Duyne 그룹은 나노리소그래피 방법에 의해 규칙적인 삼각형 형태의 은 나노패턴을 형성하여 고감도 DNA 센싱에 응용하였고(27-31), Sönnichsen과 Reinhard 그룹은 바이오물질로 코팅된 나노입자간의 거리에 의존하여 플라즈몬 커플링 효과를 증대하는 plasmon ruler 바이오센서를 개발하였다(32-35). 또한, El-Sayed 그룹(36, 37)은 리소그래피에 의해 제작된 금 나노디스크 패어에서 형성된 LSPR 광학특성을 이용한 센서를 개발하였다. 이뿐 아니라 칩 표면위에 나노크기보다 큰 규칙적인 마이크론 사이즈의 금 패턴에서 형성되는 SPR 현상과 특정한 파장에서 금 나노입자의 광학적 성질과 융합시킨 새로운 고감도 나노 바이오 분석방법을 개발하여 DNA검출에 응용하였다. 간섭 효과 (interferometry)를 이용한 바이오센서의 경우, Nikitin 그룹은 바이오 센싱과 화학적 측정방법으로의 응용을 위하여 SPR 현상에 의해 반사된 빛의 위상 (phase)을 측정할 수 있는 간섭효과 측정방법인 SPR-interferometry 방법을 개발하였다(38). 이 방법은 센서 표면의 입자에 고정된 리셉터층의 두께 변화에 따른 interference pattern의 위상 변화에 의해 분석가능하며, 기존의 상업적인 SPR 장치에 의해 얻어진 결과보다 고감도의 결과를 보여주고 있다. Wu 그룹은 SPR 특성과 헤테로다인 간섭효과 (heterodyne interferometry)를 결합시킨 고감도 시스템을 개발하였다(39). 이 시스템 또한 SPR 현상에서 일어나는 위상 변화를 측정할 수 있는 시스템으로서 기존의 SPR 장치와 total internal

reflection (TIR) 장치를 결합함으로써 측정이 가능하다. Mirkin 그룹은 자기장 나노입자, 금 또는 은 나노입자에 짧은 올리고머 또는 항체를 고정한 후, 위의 세 가지 물질들의 적절한 조합을 통해 바이오 바코드센서를 개발하였고 암 바이오 마커검출에도 성공적으로 응용하였다(40). Bailey 그룹(41, 42)은 2차 항원으로 코팅한 금 나노입자와 무전해 용 은 나노입자를 이용한 증폭방법을 DNA-encoded antibody libraries (DEAL)에 응용하여 단백질과 핵산을 동시에 고감도로 검출하였다. 또한 Keating 그룹은 분자 비콘 (molecular beacon) 리셉터를 디자인하고, 나노 와이어기술과 접목한 새로운 나노 광학 바이오센서를 개발하여 HIV와 SARS 바이러스의 동시 검출에 활용하였다(43). Lieber 그룹은 항체로 코팅된 나노와이어 어레이를 이용한 비표지 field effect transistor (FET) 디바이스를 제작하여 바이오물질을 검출할 수 있는 고감도 바이오센서를 제작하였다(44).

코어-셸 구조 나노입자 바이오칩의 제작 및 센서로의 응용

앞에서 언급한 것과 같은 형태의 LSPR 광학특성 기반 바이오센서들은 비표지로 간편하면서 단시간에 생체분자 상호작용의 분석이 가능하다는 장점이 있지만 금속 나노입자 제작공정의 복잡화, 제작기간의 장기화, 여러 가지 크기의 금속 나노입자 제작의 어려움, 그리고 금속 나노입자의 불규칙적인 고정에 의한 재현성 확립의 어려움 등의 문제점을 가지고 있다. 따라서, 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 새로운 구조의 금 나노입자 바이오칩을 이용한 광학 바이오센서의 설계 및 응용에 대한 연구가 수행되고 있다(45-47). 즉, 일정 크기의 실리카 나노입자를 유리기판 위에 고정시킨 후, 어레이된 나노입자들의 표면에 여러 가지 두께의 금을 증착시킴으로써 여러 가지 크기의 나노입자를 기판 표면에 어레이시키는 것과 같은 효과를 얻을 수 있는 코어-셸 구조 나노입자 바이오칩이 개발되고 있다. 코어-셸 구조 나노입자 바이오칩의 장점은 제작공정이 간단하고, 제작기간을 단축할 수 있으며, 일정 크기의 나노입자를 기판 위에 고정할 수만 있다면 나노입자의 표면에 증착하는 금의 두께를 제어하는 간단한 조작으로 다양한 파장영역에서 반응하는 LSPR 광학특성을 얻을 수 있다는 것이다. 또한 기판위에 고정되는 코어-셸 구조 나노입자의 형태를 제어함으로써 생체분자를 다중검지로 검출할 수 있는 다중검지 코어-셸 구조 나노입자 바이오칩에도 응용할 수 있다.

나노 코어-셸 구조 나노입자에 의한 LSPR 광학특성의 여기

최근에는 금속 나노입자 외에 유전체 나노입자 주위에 금속을 증착한 코어-셸 구조를 이용하여 LSPR의 공명주파수를 변화시키는 것이 가능하게 되었다. 금 나노입자에 의한 LSPR

광학특성에서는 나노입자의 유전율과 주위 매질의 유전율에 의해 공명주파수가 연어지지만, 코어-셸 구조의 경우에는 코어에 해당하는 구형 유전체 나노입자의 유전율도 관여한다.

구형 유전체 나노입자의 유전율을 ϵ_1 , 반경을 r_1 , 금속 박막의 유전율을 ϵ_2 , 반경을 r_2 라고 하면 나노입자의 분극율 α 는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\alpha = 4\pi r_m^3 \frac{(\epsilon_1 + 2\epsilon_2)(\epsilon_2 - \epsilon_3) + (r_1/r_2)^3(\epsilon_1 - \epsilon_2)(2\epsilon_1 + \epsilon_3)}{(\epsilon_1 + 2\epsilon_2)(\epsilon_2 + 2\epsilon_3) + 2(r_1/r_2)^3(\epsilon_1 - \epsilon_2)(\epsilon_1 - \epsilon_3)} \quad (2)$$

여기서 ϵ_3 은 매질의 유전율이다.

코어-셸 구조를 이용한 경우, 금속 나노입자에서 발생하는 LSPR 광학특성과 비교하여 금속층 박막을 변화시키는 것만으로도 피크파장의 제어가 가능하다. 금속 나노입자에 의해 발생하는 LSPR 광학특성에서는 입자 크기가 증가하는 것에 의해 피크 파장이 레드 (오른쪽) 방향으로 이동 (shift)한다. 그러나 코어-셸 구조 나노입자의 경우에는 코어에 해당하는 구형 유전체 나노입자의 입자 크기가 변하지 않고 셸에 해당하는 금속층의 박막만이 두껍게 변화하면 피크 파장은 블루 (왼쪽) 방향으로 이동한다. 반대로 금속층의 박막을 변화시키지 않고 구형 유전체 나노입자의 입자 크기만을 바꾼 경우에 피크 파장은 레드 (오른쪽) 방향으로 이동하는 것으로 알려져 있다(48).

코어-셸 구조 나노입자 바이오칩의 제작방법 및 항원-항체 상호작용 검출

코어-셸 나노입자 바이오칩은 셸에 해당하는 상하 금 박막층과 코어에 해당하는 구형 유전체 나노입자 (실리카 나노입자)층의 3층 구조로 구성되어 있다. 제작방법으로는 우선 유리기판상에 금 박막층을 증착시킨 후, 4,4'-dithiodibutyric acid (DDA)를 금 표면에 주입하여 자기조직화 단분자층 (self-assembled monolayer : SAM)을 형성시켰다. SAM이 형성된 기판 표면에 3-aminopropyltriethoxysilane (γ -APTES)로 표면 수식을 한 직경 100 nm의 실리카 나노입자를 전개하여, 금 박막이 증착된 기판 표면에 구형 유전체 나노입자층을 형성하였다. 구형 유전체 나노입자층 형성방법은 흡착에 의한 구형 유전체 나노입자층의 형성 방법보다도 용이하게 기판 표면에 대한 나노입자 밀도의 제어가 가능할 뿐만 아니라 보다 견고하게 구형 유전체 나노입자를 기판 표면에 배치시키는 것이 가능하다. 또한 공유 결합에 의해 구형 유전체 나노입자층을 형성함으로써 구형 유전체 나노입자의 비특이적인 흡착을 방지할 수 있을 뿐만 아니라 동시에 구형 유전체 나노입자층의 다층화도 방지할 수 있다. 구형 유전체 나노입자층 형성 후, 다시 한번 구형 유전체 나노입자층의 표면에 금 박막을 증착함으로써 코어-셸 나노입자 바이오칩이 완성된다. 이와 같은 방법으로 제작된 코어-셸 나노입자 바이오칩의 표면에 수직 방향으로부터 입사광을 조사하고 바이오칩 표면으로부터

반사된 반사광을 검출기로 검출하여 흡수 스펙트럼을 소형의 분광기로 해석함으로써 코어-셸 나노입자 바이오칩 기반 비표지 광학 바이오센서로 응용할 수 있다. 코어-셸 나노입자 바이오칩 기반 비표지 광학 바이오센서는 SPR 광학특성과는 달리 가시영역에서 LSPR 광학특성에 의한 특이적인 흡수피크를 관찰하는 것이 가능하다. 또한 전반사의 광학 장치가 필요하지 않기 때문에 SPR 광학특성 분석에는 꼭 필요한 프리즘이 필요 없게 된다. 그러므로 Fig. 2의 코어-셸 나노입자 바이오칩 기반 비표지 광학 바이오센서의 개략도에 나타낸 것처럼, 간편하면서 소형의 광학 장치만으로도 LSPR 광학특성 평가가 가능하다. 코어-셸 나노입자 바이오칩의 각 제작과정에 따른 LSPR 광학특성을 Fig. 3a에 나타내었다. 구형 유전체 나노입자층이 형성될 때까지는 LSPR 광학특성에 의한 특이적인 흡수피크가 관찰되지 않았으며, 벌크상태의 금 박막에 의해 발생하는 흡수피크만이 보여졌다. 그러나 구형 유전체 나노입자층의 표면에 다시 한번 금 박막층을 진공증착함으로써 피크파장 530 nm 근처에 LSPR 광학특성에 의한 특이적인 흡수피크가 관찰되어졌다. 이것은 구형 유전체 나노입자층 표면에 증착된 상층의 금 박막층의 표면에서 LSPR 광학특성의 여기가 일어났다는 것을 시사한다.

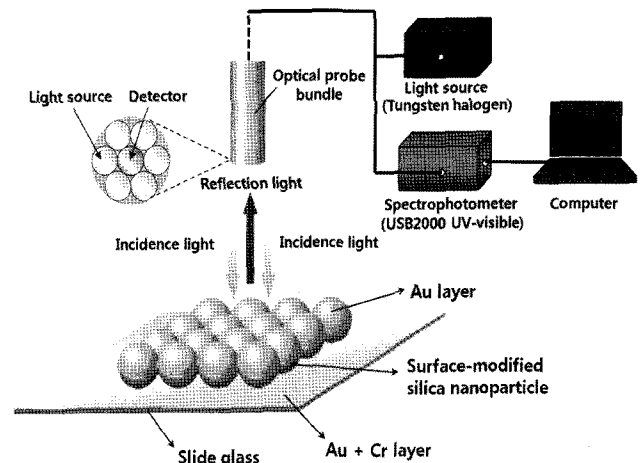


Fig. 2. Experimental setup and construction of LSPR-based label-free optical biosensor with core-shell structure nanoparticle biochip.

코어-셸 나노입자 바이오칩 기반 비표지 광학 바이오센서를 이용한 항원-항체 상호작용의 비표지 검출 및 정량 특성 평가를 위해서 몇 가지 표면처리과정을 거치게 되는데, 코어-셸 나노입자 바이오칩 표면에 반응 항체의 고정화를 위해서는 다음과 같은 과정이 수행된다. 우선, 구형 유전체 나노입자층 형성방법과 같으며, 제작된 코어-셸 나노입자 바이오칩 표면에 DDA 용액을 첨가하여 SAM을 형성시킨 후, DDA 처리로 형성된 SAM에 의해 코어-셸 나노입자 바이오칩 표면에 카르복실기가 도입되고, EDC 용액 및 N-hydroxysuccinimide (NHS) 용액을 동일량 혼합

시킨 용액을 첨가하여 코어-셸 나노입자 바이오칩 표면의 카르복실기의 활성화 및 NHS기의 도입이 가능하다. NHS기 도입 후, Protein A 용액을 첨가하고 1시간 반응시킴으로써 Protein A를 코어-셸 나노입자 바이오칩 표면에 고정시키는 것이 가능하게 된다. Protein A는 IgG 항체의 Fc부위에 특이적으로 결합하는 것으로 알려져 있으므로, Protein A를 이용하여 항체의 배향성을 유지하고 칩 표면에 항체를 고정화하는 것이 가능하게 된다. Protein A 결합 후, 항체 수용액을 코어-셸 나노입자 바이오칩 표면에 첨가하여 항체의 고정화를 수행한다. 이상의 과정을 통해 항체가 고정화된 코어-셸 나노입자 바이오칩을 제작할 수 있다(Fig. 3b). 항체가 고정화된 코어-셸 나노입자 바이오칩 표면에 목표로 하는 특정 항원 용액을 첨가한 후, 항체와 항원의 특이적으로 결합에 의해 발생하는 LSPR 흡수피크 강도 변화를 관찰할 수 있다(Fig. 3b).

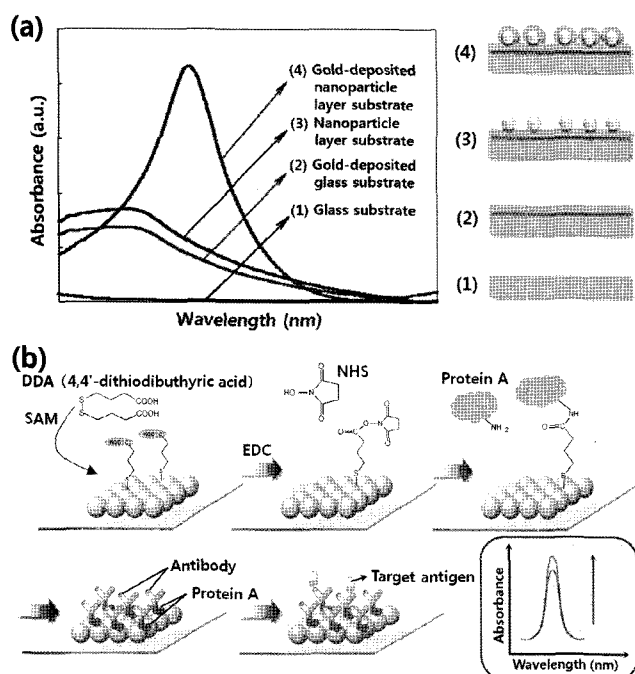


Fig. 3. Schematic diagrams for LSPR optical experiment. (a) LSPR optical characteristics of the core-shell structure nanoparticle biochip. The specific LSPR absorbance peak was observed only gold deposited nanoparticle layer substrate. (b) Immobilization of antibodies onto the gold-capped nanoparticle layer surface of the multiarray LSPR-based protein array biochip and its antigen-antibody interaction.

SAM이 형성된 코어-셸 나노입자 바이오칩 표면에 Protein A 및 항체를 순서대로 고정시킨 후, 특정 항원 용액을 첨가하여 LSPR 흡수피크 강도 변화를 관찰함으로써, 각각 LSPR 흡수피크 강도가 증가되었음을 확인하여 CRP와 fibrinogen을 검출한 예가 보고되었으며(45), 우유 속의 casein(46)과 Alzheimer's tau protein을 검출한 보고

도 있다(47). 항체가 고정화된 코어-셸 나노입자 바이오칩 표면에 서로 다른 농도 (1 fg/mL ~ 1 µg/mL)의 항체 용액을 각각 첨가한 후, LSPR 흡수피크 강도 변화를 관찰한 결과, 농도에 따른 LSPR 흡수피크 강도의 증가가 확인되었으며, 또한 각각의 항원인 CRP와 fibrinogen을 각각 반응시킨 결과, 검출한계가 100 pg/mL 및 1 pg/mL이라는 것을 각각 확인할 수 있었다(Fig. 4a와 4b). 이상의 결과로부터 코어-셸 나노입자 바이오칩 기반 비표지 광학 바이오센서로 CRP 및 fibrinogen 항원-항체 상호작용의 특이적 검출 및 정량특성을 관찰하는 것이 확인되었다. 또한, 동일한 방식의 코어-셸 나노입자 바이오칩 기반 비표지 광학 바이오센서를 이용하여 Hiep 등(46)에 의해 casein을 10 ng/mL의 검출 한계까지 구현한 보고가 있으며(Fig. 4c), Vestergaard 등(47)에 의해 Alzheimer's tau protein을 10 pg/mL까지 검출하여 보고된 바 있다(Fig. 4d).

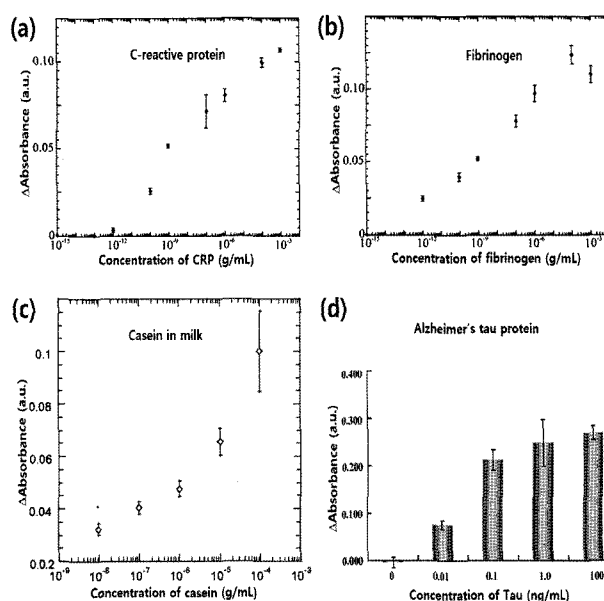


Fig. 4. LSPR absorbance strength change according to concentration of target antigen by using LSPR-based label-free optical sensor. e.g., The detection limit was found to be (a) 100 pg/mL CRP (45), (b) 1 pg/mL fibrinogen (45), (c) 10 ng/mL casein (46), and (d) 10 pg/mL Alzheimer's tau protein (47) by using its antibodies, respectively, immobilized on the surface of core-shell structure nanoparticle biochip. Redrawn from Endo et al.(45), Hiep et al.(46), and Vestergaard et al.(47).

요 약

현재까지 연구개발된 바이오칩 및 센서의 경우에는 생체분자 상호작용의 분석을 수행하기 위해서 효소나 형광 물질 등과 같은 표지물질을 생체분자에 주입할 필요성이 있었다. 이러한 표지작업은 단백질 등과 같이 고차구조를

형성하는 생체분자에 있어서 그 분자인식능을 저하시키는 문제가 발생하게 된다. 그리고 표지작업은 일련의 조작이 필요하기 때문에 조작의 복잡성을 띄게 되고, 간편성을 저해하는 문제가 발생하게 되며, 분석 결과를 얻기 위해서는 장시간을 필요로 하게 된다. 또한, 생체분자 상호작용의 분석에 적용되는 측정장치도 대형화하게 되어 온사이트 모니터링에 이용하기 어렵다.

이러한 문제점들을 해결하기 위해서 비표지로 생체분자의 상호작용 분석이 가능한 SPR 광학특성, QCM 및 전기화학법 등을 이용한 비표지 바이오칩 및 센서가 개발되었다. 하지만 표지 바이오칩 및 센서와 마찬가지로 장치의 대형화 및 복잡화, 간편성 및 감도 등에 문제가 있었다.

따라서 지금까지 개발되어진 표지 및 비표지 바이오칩의 문제들을 해결하기 위해서 나노구조에서만 발현되는 새로운 광학특성인 LSPR을 기반으로 하는 새로운 형태의 코어-셸 구조 나노입자 바이오칩이 제작되었다. 코어-셸 나노입자 바이오칩의 표면에 수직방향으로부터 입사광을 조사하고 바이오칩 표면으로부터 반사된 반사광을 검출기로 검출하여 흡수 스펙트럼을 소형의 분광기로 해석함으로써 코어-셸 나노입자 바이오칩 기반 비표지 광학 바이오센서를 완성하였다. 또한 단백질 항원-항체 반응에 대한 비표지 검출 및 정량특성을 평가한 결과, 감도, 간편성, 유연성, 폭넓은 응용성 등에 양호한 특성을 확인할 수 있었다.

이상에서 살펴본 바와 같이, 코어-셸 나노입자 바이오칩 기반 비표지 광학 바이오센서는 생체분자 상호작용의 분석에 많이 이용되고 있는 단백질, DNA, 세포 등의 생체분자에 유연하게 대처할 수 있을 것으로 생각되어지며, 그 밖에도 의료, 식품분석, 환경 및 공정 모니터링 등 분야에 폭넓게 이용될 것으로 기대되고 있다. 또한 본 코어-셸 나노입자 바이오칩 기반 비표지 광학 바이오센서는 소형으로 저렴한 분광기를 이용하여 측정을 실시하고 있기 때문에 온사이트 모니터링에의 적용도 가능할 것으로 생각된다.

감 사

본 논문은 지식경제부의 IT신성장동력 핵심기술 개발 사업 IT융합분야 연구과제에 의해 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2008년 10월 24일, 게재승인 : 2009년 1월 19일

REFERENCES

- Liz-Marzán, L. M. (2006), Tailoring surface plasmon through the morphology and assembly of metal nanoparticles, *Langmuir* **22**, 32-41.
- Maier, S. A. and H. A. Atwater (2005), Plasmonics : Localization and guiding of electromagnetic energy in metal/dielectric structures, *J. Appl. Phys.* **98**, 011101.
- Niemeyer, C. M. and U. Simon (2005), DNA-based assembly of metal nanoparticles, *Eur. J. Inorg. Chem.* **18**, 3641-3655.
- Hutter, E. and J. H. Fendler (2004), Exploitation of localized surface plasmon resonance, *Adv. Mater.* **16**, 1685-1706.
- Ebbesen, T. W., H. J. Lezec, H. F. Ghaemi, T. Thio, and P. A. Wolff (1998), Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays, *Nature* **391**, 667-669.
- Karlsson, R. and R. Ståhlberg (1995), Surface plasmon resonance detection multipot sensing for direct monitoring of interaction involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities, *Anal. Biochem.* **228**, 274-280.
- Ueno, K. (2005), Optical properties of nanoengineered gold blocks, *Opt. Lett.* **30**, 2158-2160.
- Ishida, A. and A. Fujii (2005), Effective photoexcitation in gold nanowells based on localized surface plasmon, *Chem. Commun.* **5**, 608-610.
- Marx, K. A., T. Zhou, A. Montrone, D. McIntosh, and S. J. Braunhut (2005), Quartz crystal microbalance biosensor study of endothelial cells and their extracellular matrix following cell removal: Evidence for transient cellular stress and viscoelastic changes during detachment and the elastic behavior of the pure matrix, *Anal. Biochem.* **343**, 23-34.
- Shen, Z., G. A. Stryker, R. A. Mernaugh, L. Yu, and X. Zeng (2005), Single-chain fragment variable antibody piezoimmunosensors, *Anal. Chem.* **77**, 797-805.
- Kerman, K., M. Saito, Y. Morita, Y. Takamura, M. Ozsoz, and E. Tamiya (2004), Electrochemical coding of single-nucleotide polymorphisms by monobase-modified gold nanoparticles, *Anal. Chem.* **76**, 1877-1884.
- Vestergaard, M., K. Kerman, M. Saito, N. Nagatani, Y. Takamura, and E. Tamiya (2005), A rapid label-free electrochemical detection and kinetic study of Alzheimer's amyloid beta aggregation, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11892-11893.
- Oldenburg, S. J., J. B. Jackson, S. L. Westcott, and N. J. Halas (1999), Infrared extinction properties of gold nanoshell, *Appl. Phys. Lett.* **75**, 2897-28994.
- Scaffardi, L. B., N. Pellegrini, O. de Sanctis, and J. O. Tocho (2005), Sizing gold nanoparticles by optical extinction spectroscopy, *Nanotechnology* **16**, 158-163.
- Kumbhar, A. S., M. K. Kinnan, and G. Chumanov (2005), Multipole plasmon resonances of submicron silver particles, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12444-12445.
- Evanoff, D. D., jr. and G. Chumanov (2004), Size-

- controlled synthesis of nanoparticles. 2. Measurement of extinction, scattering, and absorption cross sections, *J. Phys. Chem. B.* **108**, 13957-13962.
17. Link, S. and M. A. El-Sayed (1999), Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods, *J. Phys. Chem. B.* **103**, 8410-8426.
 18. Schider, G., J. R. Krenn, W. Gotschy, B. Lamprecht, H. Ditlbacher, A. Leitner, and F. R. Aussenegg (2001), Optical properties of Ag and Au nanowire gratings, *J. Appl. Phys.* **90**, 3825-3830.
 19. Millstone, J. E., S. Park, K. L. Shuford, L. Qin, G. C. Schatz, and C. A. Mirkin (2005), Observation of a Quadrupole plasmon mode for a colloidal solution of gold nanoprisms, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5312-5313.
 20. Malikova, N., I. Pastoriza-Santos, M. Schierhorn, N. A. Kotov, and L. M. Liz-Marzán (2002), Layer-by-layer assembled mixed spherical and planar gold nanoparticles : Control of interparticle interaction, *Langmuir* **18**, 3694-3697.
 21. Kim, F., S. Connor, H. Song, T. Kuykendall, and P. Yang (2004), Platonic gold nanocrystals, *Angew. Chem. Int. Edit.* **116**, 3759-3763.
 22. Nehl, C. L., H. Liao, and J. H. Hafner (2006), Optical properties of star-shaped gold nanoparticles, *Nano Lett.* **6**, 683-688.
 23. Nath, N. and A. Chilkoti (2002), A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface, *Anal. Chem.* **74**, 504-509.
 24. Nath, N. and A. Chilkoti (2004), Label-free biosensing by surface plasmon resonance of nanoparticles on glass: Optimization of nanoparticle size, *Anal. Chem.* **76**, 5370-5378.
 25. Okamoto, T. and I. Yamaguchi (2000), Local plasmon sensor with gold colloid monolayers deposited upon glass substrates, *Opt. Lett.* **25**, 372-374.
 26. Frederix, F., J.-M. Friedt, K.-H. Choi, W. Laureyn, A. Campitelli, D. Mondelaers, G. Maes, and G. Borghs (2003), Biosensing based on light absorption of nanoscaled gold and silver particles, *Anal. Chem.* **75**, 6894-6900.
 27. Haes, A. J. and R. P. Van Duyne (2004), A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.* **379**, 920-930.
 28. Haes, A. J. and R. P. Van Duyne (2002), A nanoscale optical biosensor : Sensitivity and selectivity of an approach based on localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10596-10604.
 29. Riboh, J. C., A. J. Haes, A. D. McFarland, C. R. Yonzon, and R. P. Van Duyne (2003), A nanoscale optical biosensor : Real-time immunoassay in physiological buffer enabled by improved nanoparticle adhesion, *J. Phys. Chem. B.* **107**, 1772-1780.
 30. Haes, A. J., S. Zou, G. C. Schatz, and R. P. Van Duyne (2004), A nanoscale optical biosensor : The long range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of noble metal nanoparticles, *J. Phys. Chem. B.* **108**, 109-116.
 31. Haes, A. J., S. Zou, G. C. Schatz, and R. P. Van Duyne (2004), Nanoscale optical biosensor : Short range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of noble metal nanoparticles, *J. Phys. Chem. B.* **108**, 6961-6968.
 32. Sönnichsen, C. and A. P. Alivisatos (2005), Gold nanorods as novel nonbleaching plasmon-based orientation sensors for polarized single-particle microscopy, *Nano Lett.* **5**, 301-304.
 33. Pierrat, S., I. Zins, A. Breivogel, and C. Sönnichsen (2007), Self-assembly of small gold colloids with functionalized gold nanorods, *Nano Lett.* **7**, 259-263.
 34. Reinhard, B. M., M. Siu, H. Agarwal, A. P. Alivisatos, and J. Liphardt (2005), Calibration of dynamic molecular rulers based on plasmon coupling between gold nanoparticles, *Nano Lett.* **5**, 2246-2252.
 35. Skewis, L. R. and B. M. Reinhard (2008), Spermidine modulated ribonuclease activity probed by RNA plasmon rulers, *Nano Lett.* **8**, 214-220.
 36. Maillard, M., M.-P. Pileni, S. Link, and M. A. El-Sayed (2004), Picosecond self-induced thermal lensing from colloidal silver nanodisks, *J. Phys. Chem. B.* **108**, 5230-5234.
 37. Jain, P. K., W. Qian, and M. A. El-Sayed (2006), Ultrafast cooling of photoexcited in gold nanoparticle-thiolated DNA conjugates involves the dissociation of the gold-thiol bond, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2426-2433.
 38. Nikitin, P. I., A. N. Grigorenko, A. A. beloglazov, M. V. Valeiko, A. I. Savchuk, O. A. Savchuk, G. Steiner, C. Kuhne, A. Huebner, and R. Salzer (2000), Surface plasmon resonance interferometry for micro-array biosensing, *Sensor. Actuat. B-Chem.* **85**, 189-193.
 39. Wu, C.-M., Z.-C. Jian, S.-F. Joe, and L.-B. Chang (2003), High-sensitivity sensor based on surface plasmon resonance and heterodyne interferometry, *Sensor. Actuat. B-Chem.* **92**, 133-136.
 40. Mirkin, C. A., R. L. Letsinger, R. C. Mucic, and J. J. Storhoff (1996), A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials, *Nature* **382**, 607-609.
 41. Bailey, R. C. and J. T. Hupp (2003), Micropatterned polymeric gratings as chemoresponsive volatile organic compound sensors : Implications for analyte detection

- and identification via diffraction-based sensor arrays, *Anal. Chem.* **75**, 2392-2398.
42. Bailey, R. C., G. A. Kwong, C. G. Radu, O. N. Witte, and J. R. Heath (2007), DNA-encoded antibody libraries : A unified platform for multiplexed cell sorting and detection of genes and proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 1959-1967.
43. Keating, C. D. (2005), Nanoscience enables ultrasensitive detection of Alzheimer's biomarker, *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 2263-2264.
44. Patolsky, F., G. Zheng, and C. M. Lieber (2006), Nanowire-based biosensors, *Anal. Chem.* **78**, 4261-4269.
45. Endo, T., K. Kerman, N. Nagatani, H. M. Hiepa, D.-K. Kim, Y. Yonezawa, K. Nakano, and E. Tamiya (2006), Multiple label-free detection of antigen-antibody reaction using localized surface plasmon resonance-based core-shell structured nanoparticle layer nanochip, *Anal. Chem.* **78**, 6465-6475.
46. Hiep, H. M., T. Endo, K. Kerman, M. Chikae, D.-K. Kim, S. Yamamura, Y. Takamura, and E. Tamiya (2007), A localized surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of casein in milk, *Sci. Technol. Adv. Mat.* **8**, 331-338.
47. Vestergaard, M., K. Kerman, D.-K. Kim, H. M. Hiep, and E. Tamiya (2008), Detection of Alzheimer's tau protein using localized surface plasmon resonance-based immunohip, *Talanta* **74**, 1038-1042.
48. Himmelhaus, M. and H. Takei (2000), Cap-shaped gold nanoparticles for an optical biosensor, *Sensor. Actuat. B-Chem.* **63**, 24-30.