

급성 심근경색 검지를 위한 비표지식 단백질 센서 제작 및 검증에 관한 연구

Fabrication and evaluation of label-free protein sensor for diagnosing acute myocardial infarction

조영걸*, 강기원*, 김효겸*, 조익현*, 강신일†

Younggeol Cho, Ki-won Kang, Hyo-Kyum Kim, Eikhyun Cho and
Shinill Kang

Abstract

We proposed a method to fabricate label-free protein sensor with sub-wavelength nanograting structures to be used for diagnosing acute myocardial infarction. A nickel stamp for the injection molding of nanograting integrated protein sensor was fabricated by electroforming process with high fidelity. By using metallic stamp, we replicated label-free protein sensor via injection molding, which is an outstanding method for low-cost and mass production of polymer products. Finally, we performed a feasibility test, examining cardiac troponin T (cTnT) and anti-cTnT interactions. From the results, we demonstrated that the fabricated protein sensor can provide information for the early and accurate detection of cardiac diseases such as acute myocardial infarction.

Key Words: Cardiac troponin T, label-free, protein sensor, injection molding, peak wavelength value

1. 서 론

Cardiac troponin T (cTnT) 물질은 심근 세포의 구성 단백질 중 하나로, 심근 손상에 의한 급성 심근경색, 급성 관상동맥 증후군 등의 질병에 대한 예후 및 진단에 활용되는 바이오 마커이며, cardiac troponin I (cTnI) 물질과 더불어 심근 손상을 반영하는 매우 민감한 지표 중 하나이다.[1,2] 본 연구에서는 나노 그레이팅 구조를 갖는 광학 기반의 비표지식 단백질 센서를 통해 cTnT 항원 및 항체 반응에 따른 급성 심근경색 진단 가능성을 검증하였다. 비표지 기반의 단백질 칩은 형광 물질 등과 같은 표지자에 대한 라벨링 과정이 요

구되지 않아 단백질 구조 변형에 의한 활성 저하를 막을 수 있으며, 라벨링 공정에 의한 시간 소모 및 라벨링 후 형광 광도 저하에 따른 낮은 신호 균일도 문제를 해결할 수 있다.[3] 제작하고자 하는 단백질 센서 역시 나노 그레이팅 내부에서 발생하는 공진 현상에 의한 좁은 반사 피크 스펙트럼의 이동을 통해 단백질 상호 작용을 검출하는 비표지식 센서이며, 솔루션 상태에서 측정이 가능해 다른 비표지식 센서와 비교해 단백질 센서로의 강점을 갖는다.

일반적인 단백질 센서와 마찬가지로 나노 그레이팅 기반의 단백질 센서 역시 측정의 용이성, 진단의 신뢰성 확보 및 감염에 대한 문제 등을 고려하여 재사용이 불가능 일회용 칩 형태로 제작되어야 한다.[4] 따라서 센서 상용화를 위해서는 단백질 칩의 저가 양산 기술 개발이 필수적이다. 본 연구에서는 현존하는 가장 우수한 플라스틱 부품 양산 공정으로 알려진 사출성형을 통해

† School of Mechanical Engineering, Yonsei Univ.
E-mail : snlkang@yonsei.ac.kr
TEL : (02)2123-2829

* School of Mechanical Engineering, Yonsei Univ.

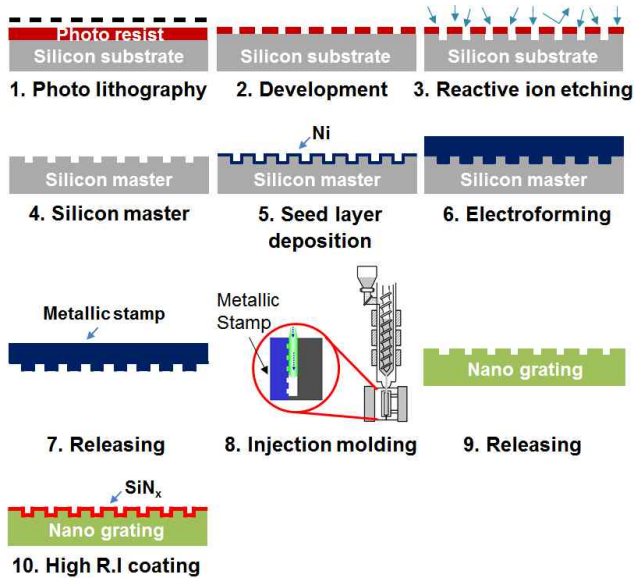


Fig.1 Fabrication processes of label-free protein sensor. Protein sensor was replicated by injection molding using a metallic stamp which was fabricated by electroforming. And metallic stamp was obtained from the silicon master.

단백질 칩을 복제하였다.[5] 사출성형은 제작하고자 하는 패턴 형상과 반대 형상을 지닌 스탬프를 필요로 하는데, 실리콘 스탬프는 brittle한 특성으로 인해 고온 및 고압 환경에서 진행되는 사출성형에서 내구성 확보가 어렵다. 따라서 본 연구에서는 제작된 실리콘 마스터 상에 니켈 전도층을 형성 후 전주도금 공정을 진행함으로써 내구성을 갖는 금속 스탬프를 제작하였다. 제작된 금속 스탬프를 사출성형에 적용함으로써 고품위 단백질 센서를 복제하였으며, 복제된 센서를 측정 시스템에 적용함으로써 피크 스펙트럼 형성 및 cTnT 반응에 의한 피크 이동을 확인하였다.

2. 비표지식 단백질 센서 제작

Fig.1은 나노 그레이팅 구조를 갖는 비표지식 단백질 센서의 제작 공정도를 나타낸다. 칩 제작을 위한 첫 번째 공정으로 포토 리소그래피 및 reactive ion etching (RIE) 공정을 통해 Fig. 2 (a)와 같이 445.2 nm 피치 사이즈 및 159.0 nm 패턴 높이를 갖는 나노 그레이팅 패턴을 실리콘 기판 상에 형성하였다. (설계 값은 피치 사이즈 450 nm 및 패턴 높이 160 nm) 사출성형에 적용하기 위한 금속 스탬프 제작을 위하여 전주도금 공정을

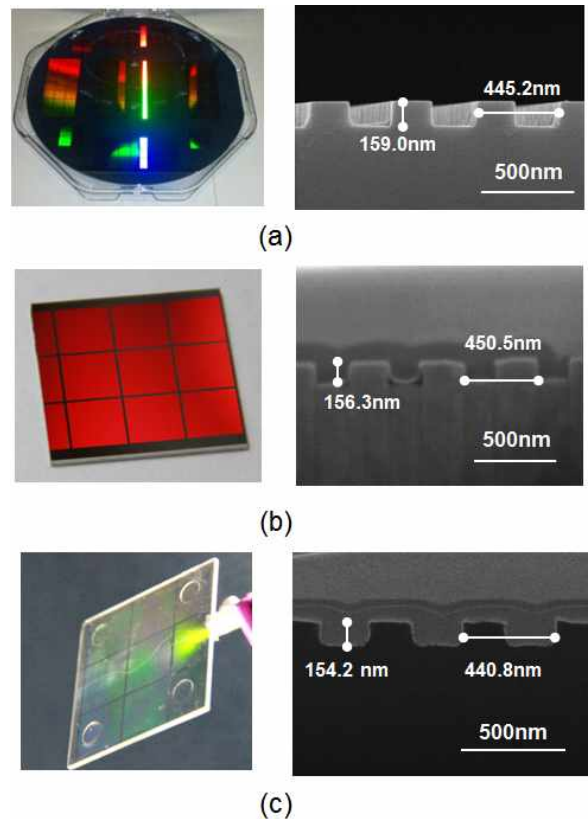


Fig. 2 A photograph and a cross sectional image of (a) silicon master with a pitch size of 445.2 nm and a height of 159.0 nm, (b) metallic stamp with a pitch size of 450.5 nm and a height of 156.3 nm, and (c) protein sensor with a pitch size of 440.8 nm and a height of 154.2 nm.

진행하였으며, 전주도금을 위한 첫 번째 단계로 비전도성인 실리콘 기판 상에 50nm에 해당하는 니켈을 evaporation 장비를 통해 증착하여 전도층을 형성하였다. 이후 기계적 강성 및 우수한 adhesion property를 갖는 니켈을 이용해 전주도금 공정을 진행하였다. 니켈층의 안정적인 성장을 위해 초기 30분간 전압과 전류를 조절하는 ramping time을 설정하였으며, 전류 250A 및 전압 4V, 용액 온도 52°C, pH 3.2에서 공정을 진행하였다. 금속 스탬프는 사출 성형을 진행하는데 필요한 강성을 유지하기 위해 1 mm 두께로 제작하였다. Fig. 2 (b)는 제작된 금속 스탬프 사진 및 단면 scanning electron microscopy (SEM) 이미지를 나타낸다. 나노 그레이팅의 피치 사이즈는 450.5 nm, 높이는 156.3 nm로 설계 값과 비교하여 오차 범위 내로 제작되었음을 확인하였다.

제작된 금속 스탬프를 사출 몰드에 적용하여 단백질 센서를 복제하였다. 센서 복제에 사용한

폴리머는 우수한 광학적 성질(90% 이상의 높은 투과도 및 낮은 복굴절율) 및 높은 내열성(열 변형 온도 170°C), 혈액과 높은 화학적 친화성을 갖는 cyclic olefin copolymer (COC, n=1.53)이며, 사출온도 240°C 및 사출속도 32 mm/s, 몰드 온도는 120°C, 사출 압력은 2040 kgf/cm²에서 사출성형을 진행하였다. Fig. 2 (c)는 복제된 단백질 센서 사진이며 34mm X 34mm 크기에, 피치 사이즈 440.8 nm, 패턴 높이 154.2 nm의 나노 그레이팅 구조물로 복제되었다. 최종적으로 나노 그레이팅 표면에 고굴절층에 해당하는 실리콘 나이트라이드 (n=2.05)를 70 nm 증착함으로써 비표지 기반의 단백질 센서를 제작하였다.

3. 단백질 칩의 유용성 검증

본 연구에서는 급성 심근경색 표지자에 해당하는 cardiac troponin T (cTnT) 물질을 통해 항원 항체 반응에 따른 나노 그레이팅 기반 단백질 센서의 피크 이동을 확인하였다.

Fig. 3은 비표지식 단백질 센서 측정 시스템 사진이며, 백색 광원 및 선형 편광기, 단백질 칩, 그리고 스펙트럼 분석기로 구성되어 있다. Transverse magnetic (TM) 편광된 빛이 단백질 칩의 나노 그레이팅 구조물에 수직으로 입사하게 되며, 단백질 칩으로부터 반사된 빛이 광 파이버를 통해 스펙트로미터로 입사된다.

cTnT 결합에 의한 피크 스펙트럼 이동 (peakwavelength value shift)를 검증하기 위해서는 항원 항체 반응을 확인하기에 앞서 나노 그레이팅 표면에 surface functional group을 형성하는

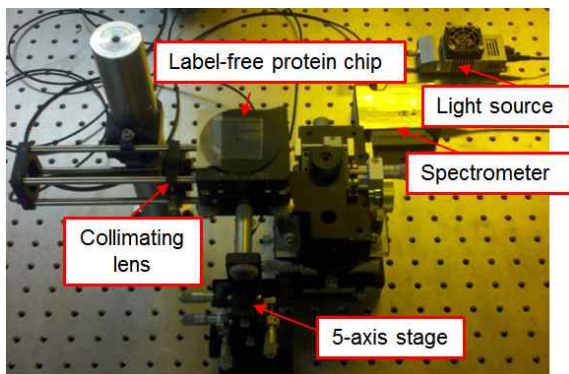


Fig. 3 Label-free protein sensor system set-up for detection of cTnT and anti-cTnT binding. It is composed of light source, polarizer, protein chip, and spectrometer.

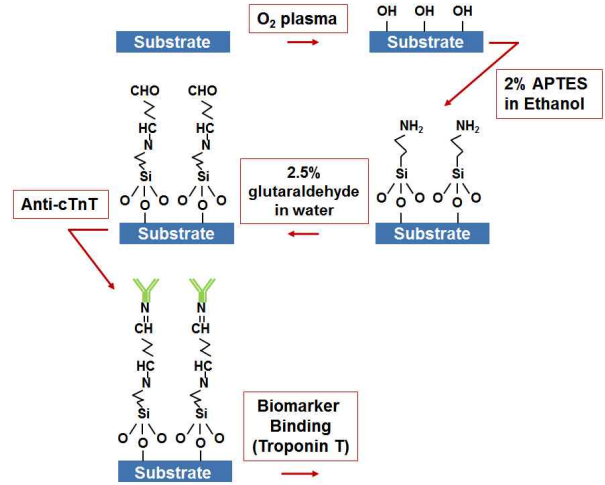


Fig.4 Schematic diagram of the chemical processes for surface functionalization in label-free protein sensor.

과정이 요구된다. 따라서 Fig.4와 같이 에탄올과 물을 혼합한 (95%/5%, v/v) 용액 속에 2%의 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) 용액을 섞은 후 2시간 동안 단백질 칩과 반응시켜 아민기를 형성하였다. 칩 표면에 아민기를 형성한 후 2.5% glutaraldehyde를 1시간 동안 처리하여 아민기에 anti-cTnT가 결합할 수 있는 알데히드기를 형성하였다. 이후 2시간 동안 항체를 처리하였으며, 최종적으로 항원을 떨어뜨린 후 1시간 동안 실시간으로 피크 스펙트럼의 이동을 관찰하였다. 본 실험에서 활용한 cTnT 항체 및 항원의 농도는 각각 100 ug/ml 및 100 ug/ml였으며, 항체 고정화 및 항원 항체반응과 관련한 구체적인 실험 공정도는

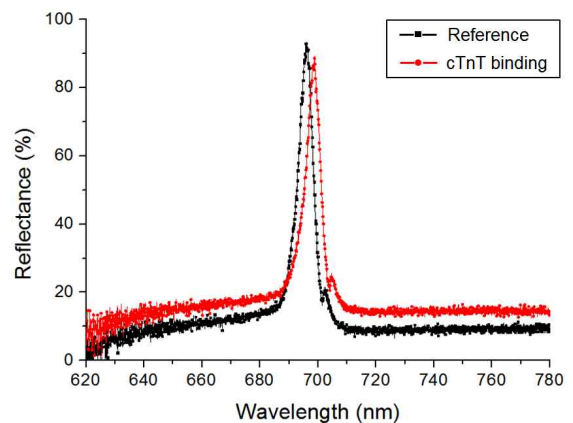


Fig. 5 Result of the peak wavelength value shift by cTnT and anti-cTnT interactions. The amount of PWV shift was 2.8 nm, from 696.2 nm to 699.0 nm with the spectral resolution of 0.08 nm.

Fig.4에 제시하였다. Fig.5는 cTnT에 대한 실시간 스펙트럼 측정 결과이다. 실험에 사용한 스펙트로미터 장비는 파장 분해능이 0.08 nm 에 해당하는 Ocean optics HR4000 모델이며, 그래프에서 보는 바와 같이 반사 피크 스펙트럼이 항원 결합 전 696.2 nm에서 항원 결합 후 699.0 nm로 2.8 nm 이동함을 확인하였다. 또한 동일한 cTnT 농도에 대하여 피크 이동량의 평균값은 2.7 nm이며, 표준 편차는 0.05로 제작한 칩에 대하여 균일한 측정 결과를 얻었다.

4. 결론

본 연구에서는 실제 질병 표지자에 해당하는 cTnT 마커를 복제 공정을 통해 제작한 단백질 센서에 적용함으로써, 급성 심근경색 진단을 위한 센서로서의 활용 가능성을 검증하였다. 본 연구에서 활용한 단백질 센서는 나노 그레이팅 구조를 갖는 비표지식 센서로서 광학적 방식을 통한 고감도 검지가 가능하며, 실시간 검지가 가능하다. 하지만 센서의 양산화를 위해서는 저가 대량 생산이 필수적으로 요구된다. 따라서 본 논문에서는 사출성형 공정을 제안하였고, 공정 프로세스를 최적화함으로써 고품위 나노 패턴을 갖는 단백질 센서를 저가로 제작 가능함을 확인하였다. 제작된 칩을 적용하여 cTnT 항원 항체 반응을 측정한 결과 2.7 nm의 평균적인 피크 스펙트럼 이동을 확인하였고, 표준편차 0.05로 제작된 단백질 칩에 대하여 균일한 이동량을 보임을 확인하였다. 현재 cTnT 마커를 활용하여 검지 가능한 최소 검출 농도 (limit of detection)를 확인하기 위한 연구가 진행 중에 있다

후 기

이 논문은 2012년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국과학창의재단 (학부생연구프로그램 사업)의 지원을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

[1] Young Mi Hong, Byung-Kwan Lim, Jae-Ok Shin, and Eun-Seok Jeon, 2002, "Change of Serum Cardiac Troponin T and Fetal Troponin T Isoform in Rats with Adriamycin-induced Cardiac Injury", Korean Circulation J, Vol.

32, No. 6, pp.485-491
 [2] Jay Huiyi Chua, Ru-Ern Chee, Ajay Agarwal, She Mein Wong, and Guo-Jun Zhang, 2009, "Label-free electrical detection of cardiac biomarker with complementary metal-oxide semiconductor-compatible silicon nanowire sensor arrays", Analytical Chemistry, Vol. 81, No. 15, pp.6266-6271
 [3] Brian Cunningham, Peter Li, Bo Lin, and Jane Pepper, 2002, "Colorimetric resonant reflection as a direct biochemical assay technique", Sensors and Actuators B: Chemical, Vol. 81, No. 5, pp.316-328
 [4] Bo Lin, Peter Li, and Brian T. Cunningham, 2005, "A label-free biosensor-based cell attachment assay for characterization of cell surface molecules", Sensors and Actuators B: Chemical, Vol. 114, pp.559-564
 [5] Shinill Kang et. al., 2011, "Design and fabrication of label-free biochip using a guided mode resonance filter with nano grating structures by injection molding process", Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Vol. 11, No. 1, pp.417-421