

알츠하이머 진단을 위한 당성분에 민감한 초파리 세포기반 ISFET센서개발

임정옥^{1,+} · 유준부² · 권재영³ · 변형기⁴ · 허중수² · 조원주^{5,+}

Development of Sugar Sensitive Drosophila Cell based ISFET Sensor for Alzheimer's Disease Diagnosis

Jeong-Ok Lim^{1,+}, Joon-Boo Yu², Jae-Young Kwon³, Hyung-Gi Byun⁴, Jeung-Soo Huh², and Won-Ju Cho^{5,+}

Abstract

In this study a biosensor was developed by using Drosophila cells expressing a gustatory receptor Gr5a and an ion sensitive field effect transistors (ISFETs) sensor device, which demonstrated significant compatibility with the Drosophila cells expressing Gr5a and their response to sugar. These results suggested that the newly developed cell based biosensor has a potential as a simple and easy screening device for Alzheimer's disease in the future.

Keywords : Alzheimer's disease (AD), Non-invasive sampling, Sugars as AD biomarker candidate, Cell based biosensor, Drosophila, ISFET, Medical diagnostic device

1. 서론

알츠하이머 질병(Alzheimer's Disease: AD)은 60세 이상 인구의 11%에 발병하는 퇴행성 뇌 질환으로 노령화와 더불어 발병이 급속히 증가하고 있으며 삶의 질에 미치는 영향과 의료비의 부담 등 경제적인 피해는 지대하다[1-3]. AD 치료법과 약물들은 병의 근본적인 치료와 예방보다는 병의 진행을 늦추고 증상들을 경감시키는 방법이기 때문에 조기진단을 통하여 환자에게 적절한 치료를 제공할 수 있으므로 말미암아 환자 본인의 고통을 줄이고 사회비용의 소

모를 경감시킬 수 있으므로 그 필요성과 중요성은 매우 크다. 현재의 진단법으로 유전자 검사, 뇌척수 검사, PET혹은 MRI등을 이용하는데 이들 방법은 고비용일 뿐 아니라 침습적이어서 환자에게 매우 부담이 된다[4, 5].

또한 현재까지 알려진 대표적인 AD biomarker로서는 뇌에서 집적되어 AD발병의 직접적인 원인이 되는 beta amyloid가 있으나 최근 metabolomics 등을 통해 이외의 biomarker 검색 연구가 활발하다[6]. 본 연구진에서는 비침습적 AD biomarker 검색을 위해 환자의 침(saliva)을 수집한 후 이를 GC-MS로 분석한 결과 뇌 질환 환자에게서 특이적으로 많이 나타나는 당 성분을 찾아 내었고 이 물질을 새로운 AD의 biomarker로 선정하였다.

이에 실험적으로 특이하게 많이 발견되는 당 성분에 민감하게 반응하는 세포기반 바이오 센서시스템을 개발하여 값싸고 편리한 방법으로 AD를 진단할 수 있는 센서를 개발하였다. 이 연구의 새로운 시도는 센서물질로 살아있는 초파리 세포를 이용한다는 점에 있다. 즉 이는 초파리는 후각 및 미각 감각수용체의 유전 정보가 잘 알려져 있고, in vivo에서의 기능이 확인되었으며 세포표면에 존재하는 화학감각수용체가 특이한 냄새나 맛에 민감하게 반응하기 때문에 이러한 세포를 센서물질로 사용할 때 민감도와 선택성이 최대화될 수 있는 장점이 있고 이 장점을 최대한 살릴 수 있는 바이오 센서의 개발은 매우 중요한 기술이라고 볼 수 있다. 본 연구에서는 이 초파리 세포를 당에 민감하게 반응하는 수용체가 세포표면에 많이 발현될 수 있도록 유전자를 변형하여 사용하였다. 포유류세포에 비하

¹경북대학교 생명의학연구소 (Biomedical Research Institute, Kyungpook National University)

680 Gukchaebosang-ro, Jung-gi, Daegu 700-842, Korea

²경북대학교 금속신소재공학과 (Materials Science and Metallurgical Engineering, Kyungpook National University)

80 Daehak-ro, Bukgu, Daegu, 702-701, Korea

³성균관대학교 (Biological Science, Sungkyunkwan University)

2066, Seobu-ro, Jangan-gu, Suwon-Si, Gyeonggi-do, Korea

⁴강원대학교 (Department of Information and Communication Engineering, Kangwon National University)

Joongang-ro, Samcheok-si, Kangwon, Korea 245-711

⁵광운대학교 (Department of Electronic Material Engineering, Kwangwoon University)

447-1 Wolgye-dong Nowon-gu, Seoul Korea 139-701

⁺Corresponding author : jolim@knu.ac.kr, chowj@kw.ac.kr

(Received : May. 23, 2013, Revised : Jun. 9, 2013, Accepted : Jul. 18, 2013)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

여 곤충세포인 초파리 세포는 실온에서도 안정적인 세포로 실용성이 높아 센서에 응용 가능성이 높은 장점이 있다.

선행기초연구를 통해 당의 일종인 trehalose에 세포기반 ISFET 센서가 민감하게 반응하는 것을 확인하였으며 초파리 세포를 ISFET에 올려 세포센서를 만들어 100여명의 환자의 침을 분석하여 AD 질병진단의 가능성을 평가하였다.

2. 실험 방법

2.1 AD 환자의 침 수집

AD 환자는 침을 채집하기 전 4시간 이상 금식한 후 방부제인 2%의 sodium azide가 처리된 1.7 ml의 소독된 vial에 1ml의 침을 받아 담는다. 이 침은 1500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 분리한 후 새로운 vial에 넣어 4°C에 보관한다. 장기간 보관 시에는 -80°C에 보관한다.

2.2 AD 환자 침의 GC-MS 분석

환자의 침은 1.7 ml의 vial에 0.5 ml를 넣고 메탄올 0.5 ml를 넣어 전처리 하였다. Gas Chromatograph Mass Spectrometer(GS/MS: HP5890, HP 5972)사용 조건은 칼럼은 30 m(HP-5), inlet 온도는 250°C, column flow는 1.0 ml/min으로 splitless 상태로 진행하였다. Mass range는 50~600 m/z이며, 사용된 SPME(Solid-phase microextraction) Fiber 65 um PDMS/DVB (polydimethylsiloxane/divinylbenzene)를 사용하였다.

2.3 LUSH 단백질 제작

초파리 lush 유전자의 cDNA를 pRSET vector에 클로닝하여 대장균(BL21)에 형질전환 하였다. 형질전환된 균주를 3 ml 씩 배양 하면서, 37°C, 4 hrs, 200 rpm 조건과 20°C, over-night, 110 rpm 조건에서 단백질 발현을 유도하여 발현이 최적화되는 조건을 측정하였다. 단백질 발현을 유도한 대장균을 buffer A: 20 mM Tris, 10 mM NaCl(pH8.0) 와 buffer B : 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl(pH8.0) 를 이용하여 용해하고, SDS-PAGE gel을 통해 단백질 발현을 확인하였다. 발현된 cell pellet을 8M urea buffer를 이용하여 Ni-NTA affinity binding test를 진행하였고, binding 하는 것을 확인하였다. 1 L 대장균 배양을 통해 약 24 mg의 단백질을 얻어 storage buffer(8 M Urea, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 10% Glycerol)에 보관하였다. LUSH 단백질은 약 14 kDa 크기로, 단백질 추출 및 정제는 영인프

런티어의 도움을 받았다.

2.4 Gr5a 발현 세포주 제작

초파리 미각수용체의 하나인 Gr5a 발현 세포주 제작은 기본적으로 Drosophila Schneider 2(S2) cells 을 이용한 Drosophila Expression System(Invitrogen) 방법을 이용하였다[7]. (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/des_man.pdf). Gr5a cDNA를 pAC vector에 클로닝한 후, 클로닝된 plasmid 2 µg 과 hygromycin 저항성을 가진 선택용 vector 인 pCoHygro 200 ng 을 serum 이 없는 Schneider medium(Invitrogen)에서 poly(ethylenimine)(PEI) 를 사용하여 S2 세포주에 co-transfection 시켰다. Gr5a 발현 stable cell line은 4일 간격으로 6회 이상 hygromycin 이 포함된 배지에서 배양하여 구축하였다 [8-10].

초파리의 중요 미각수용체인 Gr5a를 발현하는 초파리 유래 세포주를 제작하여 그 자체로는 sugar 감지를 할 수 없는 S2 세포주에 Gr5a 발현 벡터를 도입하여 Gr5a 수용체를 발현하였고 이 세포주가 AD 환자의 침에 특이적으로 반응하는 것을 평가하였다.

2.5 ISFET 기반 세포센서제작과 AD 환자 샘플의 센싱

바이오센서에 있어서 가장 중요한 요소인 감지막의 특성을 향상 시킨 물질을 합성하였으며 세포와 반응물질간의 신호를 민감하게 detection 할 수 있도록 새로 개발한 감지막을 이용한 ISFET를 제작하여, 소자의 감도와 안정성에 대한 특성 및 전기적인 특성 분석을 통해 소자의 transfer 특성을 평가하였다. 세포와 반응물질과의 반응은 current-voltage(I-V) curve로 평가하였으며, 고정밀 반도체 파라미터 분석기(Hewlett-Packard 4156B) 와 Ag/AgCl 기준 전극을 이용하였다. 또한, 모든 실험은 빛과 전기적인 잡음을 피하기 위하여 암상자 안에서 실시되었다. 또한, 반응이 직접적으로 일어나는 챔버 부분은 PDMS (polydimethylsiloxane)로 제작하였으며 크기는 1 cm 가량의 지름과 0.7 cm 가량의 높이를 갖는다. 세포와 반응물질은 액체 상태의 용액이며 각각 감지막이 있는 챔버에 주입한 후, 충분히 반응이 일어나도록 시간을 두고 측정을 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 환자의 샘플

알츠하이머 환자 53명, 대조군으로 파킨슨질환 환자 23명, 경도인식장애 7명, 정상인 12명 총 95명의 환자를 대상으로 침을

분석하였다.

3.2 환자의 샘플 분석

AD 환자의 GC-MS분석 대상은 아래 표와 같으며, 유사 질병 대조군으로 IPD와 MCI 환자가 선정되었으며, 질병에 대한 대조군으로 건강한 사람을 선정하여 비교 분석하였다. AD 환자의 침에서 나온 성분은 다양한 화합물이 포함되어 있었으며, 특히 당에서 유도되거나 관련된 성분으로 D-Glucuronic acid, DL-Arabinose, Sorbitol, Glucose등이 검출되었다. 이 외에도 Arabitol, Pentose, D-Xylitol, Indole 성분 등은 미량으로 다수 발견되었다. 환자에게서 검출되는 AD DL-Arabinose가 나타나는 동일한 retention time에서 carbamic acid와 같이 다른 성분으로 나타나고 있음을 확인하였다.

Table 1. Sugar components in saliva from AD patients and normal persons

Disease	Subject number	Number of subject having sugar components			
		Lactose	DL-Arabinose	Sorbitol	Glucose
AD	53	13	21	9	8
IPD	23	4	5	3	1
MCI	7	1	2	0	1
Nomal	12	0	0	0	0

3.3 당에 민감한 초파리 세포주

초파리 세포주(S2)에 미각수용체 유전자(Gr5a) 발현 벡터를 transfection 하고, 단백질 발현을 Fig. 1과 같이 진행하였다.

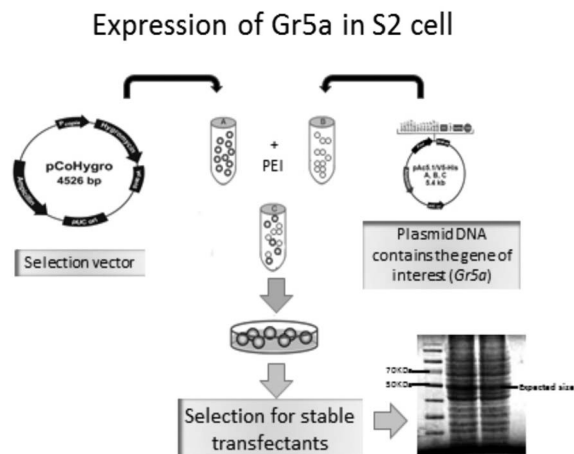


Fig. 1. Drosophila cell line establishment expressing chemical sensing receptor.

3.4 ISFET 기반 세포 센서 제작

바이오센서 개발에 있어서 가장 중요한 요소인 감지막의 특성이 pH buffer solution에서 매우 안정적임을 확인하였다.

ISFET 바이오센서는 게이트 절연막을 갖는 구조로 인해 소자 동작 시 생체물질의 손상을 막을 수 있다는 장점을 가지며 그로 인해 신호 검출을 오랜 시간 모니터 할 수 있기 때문에 이번 실험의 센서로 사용하였다. 또한, 세포와 반응물질간의 신호를 민감하게 detection 할 수 있도록 SiO₂ 물질을 감지막으로 사용하였으며, 소자의 감도와 안정성에 대한 특성 분석을 실시 하였다[11-14]. ISFET의 SiO₂ 감지막은 Fig. 2에서와 같이 34 mV/pH 나타났다. SiO₂ 감지막 표면의 site 들이 상대적으로 작기 때문이라고 해석하고 있다[14, 15]. 최근 많은 연구에서, 높은 감도와 안정성을 얻기 위하여 높은 유전 상수(Al₂O₃, Er₂O₃, HfO₂, ZrO₂ 등)를 갖는 물질들이 감지막으로 연구되고 있다. 그럼에도 불구하고, 위의 물질들에 비해 SiO₂는 성장이 쉽고 계면 특성이 우수할 뿐만 아니라 생체 분자와의 결합이 우수하기 때문에, 본 실험에 있어서 적합한 물질이라고 판단한다.

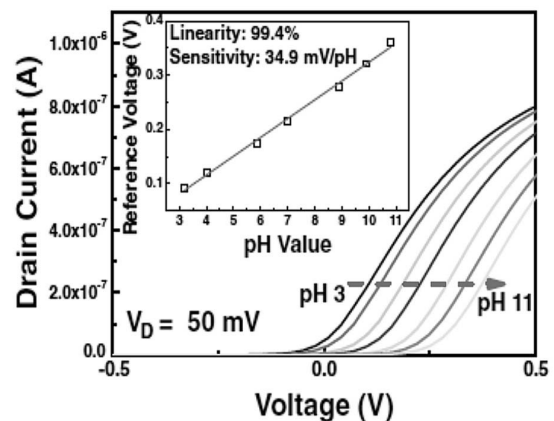


Fig. 2. pH sensing properties of ISFET with SiO₂ sensing membrane.

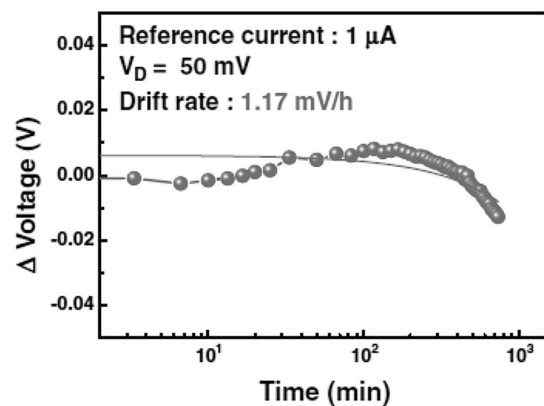


Fig. 3. Drift effect of ISFET with SiO₂ sensing membrane.

ISFET의 시간에 대한 드리프트 현상은 기준 전류를 1 μ A에서 1.7 mV/h로 Fig. 3과 같이 나타났다.

결과적으로, 우수한 감지특성과 안정성을 갖는 ISFET 바이오센서를 제작하였으며 이를 통해 세포 기반의 생체인지요소 신호를 검출하기 위한 실험에 적용하였다.

3.5 ISFET기반 세포센서에 의한 trehalose 및 AD 및 정상군의 침에 대한 반응

Fig. 4는 Drosophila의 S2 세포와 Gr5a을 발현한 S2 세포를 사용한 trehalose의 반응성을 분석한 결과이며, Gr5a를 발현한 S2 세포에서 상대적으로 큰 반응성을 보였다. 또한, trehalose의 농도가 높아 질수록 신호의 경향이 uniform 하게 증가하였다. S2 세포의 경우에도 반응이 나타나고 있는으나 아주 작게 나타나고 있으므로 Gr5a의 영향이 있음을 확인할 수 있다.

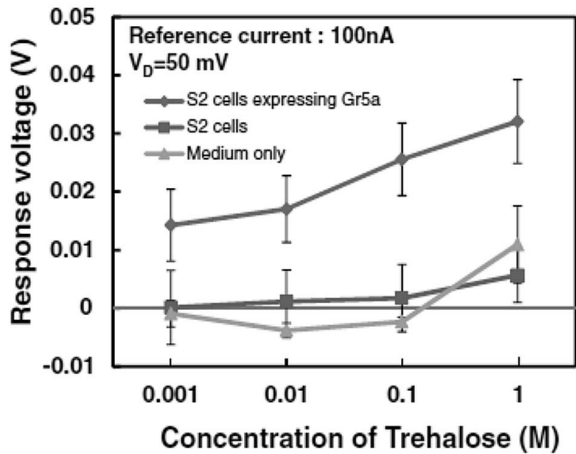


Fig. 4. Responsive voltage from Gr5a transfected Drosophila cells, S2 cells and media depending on different concentrations of trehalose.

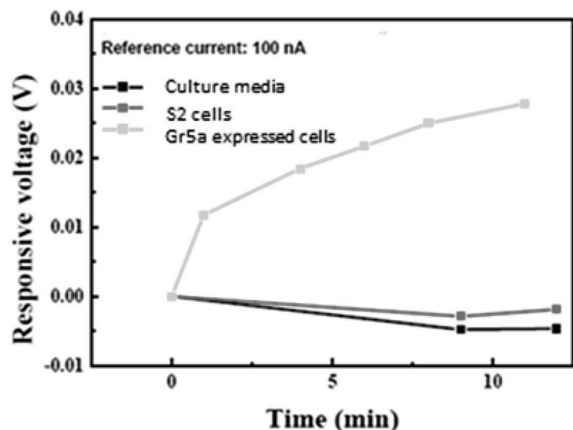


Fig. 5. Response from AD patients' saliva verses controls with cell based sugar sensor.

Fig. 5는 Gr5a를 발현한 세포와 S2 세포를 알츠하이머환자의 침에 대한 반응을 나타난 결과이다. Gr5a를 발현한 cell의 경우 반응성 또한 크게 나타나는것을 볼 수 있으며, S2 cell은 거의 반응 하지 않고 있다. 따라서 침에 포함된 성분에 반응 하고 있는 것을 알 수 있다. 이 결과를 바탕으로, 세포와 수용체 단백질에 대한 신호 검출에 있어서 ISFET 센서를 적용할 수 있으며 나아가 질병의 chemical marker를 측정하는데 활용할 수 있음을 기대할 수 있다.

4. 결론

알츠하이머 환자의 침을 GC-MS로 분석한 결과 다양한 종류의 당성분이 정상군에 비하여 환자군에서 많이 검출됨을 발견하였다. 이에 당에 민감한 미각 수용체를 초파리세포 표면에 많이 발현할 수 있도록 세포를 유전자 변형시켜 이 세포가 당에 대하여 민감하게 반응할 수 있는지를 표준 당 즉 trehalose로 검토하여 확인하였다. 나아가 알츠하이머 환자와 정상군 및 대조군의 침을 이용하여 세포의 센싱능력을 평가하였다. 실제로 세포를 이용한 센서를 구성하기 위해 ISFET센서에 세포를 고정화하는 시스템을 제작하였고 이렇게 개발된 세포기반 바이오센서로 침을 이용하여 실험한 결과 유전자 변형된 초파리 세포는 알츠하이머 질병을 가진 환자와 정상인을 구별할 수 있는 센싱 기능이 있는 것으로 나타났다. 본 연구를 통하여 알츠하이머 환자의 새로운 바이오 마커로서 당성분이 검색되었고 이에 당에 민감한 초파리 세포주를 만들어 반도체 센서와 집적시스템을 만들어 세포센서를 개발하였다. 환자의 침을 이용한 실험에서 이 세포센서는 알츠하이머 환자와 정상군을 구분할 수 있는 것으로 나타나 screening device로서의 활용가능성을 보여주었다. 이러한 당성분이 선택성과 민감도를 가진 바이오 마커로서 확립되기 위해서는 다양한 대조군을 이용한 추가적인 측정과 검증이 필요하다고 본다.

감사의 글

이 논문은 2013년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 휴먼 인지환경 사업본부-신기술 융합형 성장동력 사업의 지원을 받아 수행된 연구임(2012K001351).

REFERENCES

[1] N. C. Berchtold and C. W. Cotman, "Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-roman period to the 1960s",

- Neurobiology of Aging*, Vol. 19, No. 3, pp. 173-189, 1998.
- [2] G. Waldemar, "Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline", *Eur. J. Neurol.*, Vol. 14, No. 1, pp. 1-26, 2007.
- [3] R. Brookmeyer, E. Johnson, K. Ziegler-Graham, and M. H. Arrighi, "Forecasting the global burden of Alzheimer's disease", *Alzheimers. Dement.*, Vol. 3, No. 3, pp. 186-191, 2007.
- [4] M. Silveira and J. Marques, "Boosting Alzheimer disease diagnosis using PET images", *2010 International Conference on Pattern Recognition*
- [5] E. Salmon, B. Sadzot, P. Maquet, C. Degueldre, C. Lemaire, P. Rigo, D. Comer, and G. Franck, "Differential diagnosis of Alzheimer's disease with PET", *J. Nucl. Med.*, Vol. 35, No. 3, pp. 391-398, 1994 .
- [6] I. Allaman, M. Gavillet, M. Be langer, T. Laroche, D. Viertl, H. A. Lashuel, and P. J. Magistretti, "Amyloid-aggregates cause alterations of astrocytic", Metabolic Phenotype: Impact on Neuronal Viability, *J. Neurosci.*, Vol. 30, No. 9, pp. 3326-3338, 2010.
- [7] http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/des_man.pdf
- [8] A. Dahanukar, K. Foster, W. M. van der Goes van Naters, and J. R. Carlson, "A Gr receptor is required for response to the sugar trehalose in taste neurons of *Drosophila*", *Nat. Neurosci.*, Vol. 4, pp. 1182-1186, 2001.
- [9] A. Dahanukar, Y. T. Lei, J. Y. Kwon, and J. R. Carlson, "Two Gr genes underlie sugar reception in *Drosophila*", *Neuron*, Vol. 56, pp. 503-516, 2007.
- [10] L. A. Weiss, A. Dahanukar, J. Y. Kwon, D. Banerjee, and J. R. Carlson, "The molecular and cellular basis of bitter taste in *drosophila*", *Neuron*, Vol. 69, pp. 258-272, 2011.
- [11] T. Matsuo and M. Esashi, "Method of ISFET fabrication", *Sens. Actuator B-Chem.*, Vol. 1, pp. 77-96, 1981.
- [12] S. Yoshida, N. Hara, and K. Sugimoto, "Development of a wide range pH sensor based on electrolyte-insulator-semiconductor structure with corrosion-resistant $\text{Al}_2\text{O}_3\text{Ta}_2\text{O}_5$ and $\text{Al}_2\text{O}_3\text{ZrO}_2$ double-oxide thin films", *J. Electrochem. Soc.*, Vol. 151, pp. H53-H58, 2004.
- [13] S. Jamasb, S. Collins, and R. L. Smith, "A physical model for drift in pH ISFETs", *Sens. Actuator B-Chem.*, Vol. 49, pp. 146-155, 1998.
- [14] T. M. Pan, M. D. Huang, C. W. Lin, and M. H. Wu, "Development of high- κ HoTiO_3 sensing membrane for pH detection and glucose biosensing", *Sens. Actuator B-Chem.*, Vol. 144, pp. 139-145, 2010.
- [15] R. E. G. Hal, J. C. T. Eijkel, and P. Bergveld, "Novel description of ISFET sensitivity with the buffer capacity and double-layer capacitance as key parameters.", *Sens. Actuator B-Chem.*, Vol. 24, pp. 201-204, 1995.
- [16] T. E. Bae, H. J. Jang, and W. J. Cho, "Enhanced sensing properties by dual-gate ion-sensitive field-effect transistor using the solution-processed Al_2O_3 sensing membranes", *Jap. J. Appl. Phys.*, Vol. 52, p. 06GK03, 2013.