

# 생명공학의 또 하나의 혁신: 광결정 (Photonic crystal) 바이오센서



한진희  
University of California, Davis /  
Postdoctoral researcher  
heehan@ucdavis.edu

## 1. 서언

바이오센서 (biosensor)란, 생물/화학 물질간의 특이 반응에서 발생하는 시그널을 변환기 (transducer)를 통해 가공하여 대상 물질을 정성적/정량적으로 검출, 분석 하는데 쓰이는 기기를 통칭한다. 바이오 센서는 크게 대상물질과 반응하는 인식물질 (bio-receptor), 시그널을 읽기 가능한 상태로 변환하는 변환기, 그리고 변환된 시그널을 읽는 장치 (reader)로 나누어진다. 센서의 종류는 일반적으로 인식물질과 변환기의 종류에 따라 분류 되어진다. 인식물질은 항원/항체, 효소, 핵산, 세포, 그리고 조직 반응등에 쓰이고 변환기로는 전기화학 (electrochemical), 광학 (optical), 이온채널 (ion channel), 압전 (piezoelectric)방식 등이 적용된다. 이러한 구성을 통해 바이오 센서는 단백질 또는 유전 관련 질병, 바이러스와 박테리아 감염에 의한 전염성 질병 (주로 식품/식수 관련), 환경 오염물질등을 빠르고 간단

하면서도 정밀하게 측정하기 위해 최첨단 공학/과학 기술을 접목하여 개발되어지고 있다.

질병의 진행 또는 환경 오염원의 확산을 막고 그에 대한 능동적인 후처리 (post-treatment)를 위해서는 대상 물질 검출의 신속성 (rapidity)과 정밀성 (sensitivity), 그리고 센서의 소형화/간편화로 인해 비 전문가도 사용가능한 현장진단(point-of-care)성이 중요한 요소임을 감안할때, 실험실 또는 병원에서 행해지는 기존의 분석 방식은 그 한계가 명확하다. 관련 학계와 산업체를 기반으로 수년간의 연구성과를 통해 센서의 정밀성은 세포 하나 또는 생물 분자 단위를 검출하는 단계에 까지 이르렀으며 최근에는 정밀성을 다소 절충하고 현장적용성을 강조하는 센서의 개발에 역점을 두고 있는 상황이다. 이러한 측면에서 나노 기술이 사용된 바이오센서는 그 스케일적 특성 (소량의 샘플 사용성, 신속성, 휴대성 등)을 통해 여타의 센서들과 비교하여 현장적용성을 가장 잘반영할 수 있는 가능성을 지니고

있다.

그러나 센서의 소형화 (miniaturization)는 감도를 결정하는 가장 중요한 요소인 시그널 대 노이즈 비율의 감소를 초래하게 되었다. 따라서 이러한 나노센서의 결점을 극복하기 위하여 센서의 외적인 요소, 즉 디텍터 (예: atomic force microscope, Kelvin probe force microscope, total internal reflection microscope)의 개발과 적용에 의존해왔다.[1] 그러나 이러한 고감도 디텍터들은 그 크기가 크고 고가의 것들이어서 현장성과 범용성을 증시하는 바이오센서분야에 제한 요소가 되어왔다.

본문에서 소개할 광 결정(photonic crystal) 나노 구조화 어레이(nanostructured array)는 나노입자(nanoparticle)와 결합한 면역복합체 (immunocomplex)를 광 결정구조속에 삽입함으로써 나노스케일화 되어있는 일반 나노 바이오센서의 모든 장점과 더불어 감도를 극대화시킬 수 있게 되었다. 이 새로운 형태의 면역플랫폼 (immunoplatfrom)은 간단하고, 저렴하며 나노스케일의 표면 기능화 (functionalized)된 어레이 생성의 대안을 제시한다.

## 2. 본문

반응 물질의 나노 구조 속에서 고정화 (Immobilization of bio-probe into a nanostructure) 마이크로어레이 (microarray)로 대표되는 어레이 구조에서의 면역반응 분석 또는 DNA 분석은 높은 처리율 (high-throughput)분석, 즉 다른 농도 배열을 가진 서로 다른 종류의 검출 대상 물질을 한 플랫폼에서 동시에 적은 샘플 양을 가지고 할 수 있다는 장점으로 인해 생명과학분야에서 혁신을 가져왔다. 또한 간단하면서도 휴대 가능

한 소형화 플랫폼의 형태는 실시간 (real-time), 현장 분석을 가능케 한다.[2] 이러한 마이크로 어레이의 성공 토대위에 어레이의 사이즈는 나노 스케일로 발전하고 있다. 나노 스케일화로 인해 사용 가능한 샘플양이 극히 한정되어 있어 마이크로 어레이 센서로도 검출하기 어려웠던 유전적 질병들, 암 관련 질병들 또한 나노 어레이 형태의 바이오센서로 검출할수 있는 가능성이 열리게 되었다. 우선 나노어레이 형태의 바이오센싱을 가능하게 하기 위해서는 특정 인식 물질을 나노사이즈의 특정 분석 장소로 고정하는것이 필요하다. 그러나 사이즈의 제한으로 인해 기존의 항원/항체 또는 생체 분자를 고체 표면에 고정화하는데 이용되었던 화학적 반응 기반의 고체화학 자가조립 단분자막 (self-assembled monolayer)방식은 불가능하다.[3] 이후에 개발된 딥펜 나노리소그래피 (dip-pen nanolithography)는 100 nm 수준까지 생체 분자를 표면에 고정화하는데 성공하였다.[4] 그러나 이 방법은 샘플용액의 표면으로의 확산

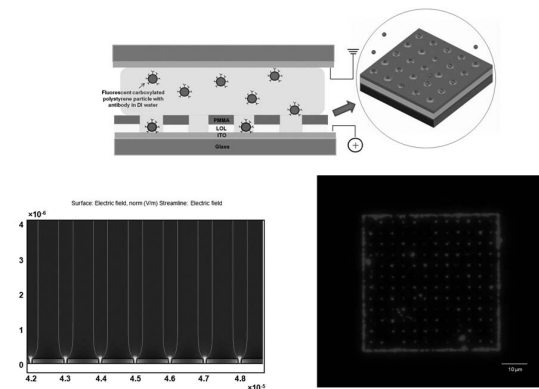


Figure 1. Electrophoretic particle entrapment system (EPES) and entrapment of the nanoparticles in the nanoarrays using the EPES. (Top) schematic of the EPES, (bottom-left) simulated electric field lines for the EPES, (bottom-right) fluorescent image of nanowells.

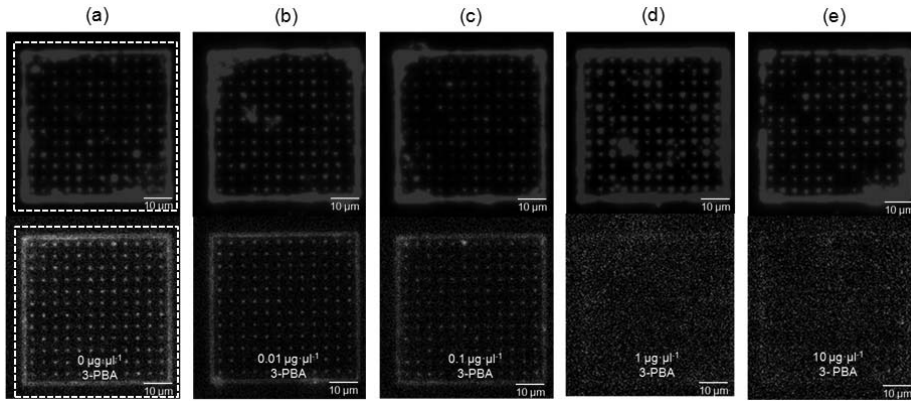


Figure 2. Immunofluorescent images of the nanoarrays in the 3-PBA competitive immunoassay. Top images (blue emission): the nanoarray with only 200 nm-fluorescent-carboxylated-polystyrene (PS) particles coated with 3-PBA; bottom images (green emission): the nanoarray after adding mixed solutions of 3-PBA and the fluorescein labeled antibody for the competitive immunoassay.

에 의존하기 때문에 장시간이 소요되고, 습기와 온도등의 여타 환경적요소가 중요한 변수로 작용하기 때문에 그 실효성에 한계가 발견되어져 왔다.[5]

이러한 기존방식의 고정화 문제점을 해결하기 위해 몇몇 연구들이 실행되었으며 그중에 입자를 이용한 생체 물질의 간접 고정화 방법이 그 편의성과 효율성을 입증하고 있다. 검출이 이루어질 표면에 직접적으로 생체 분자를 고정시키는 것이 아닌, 하전된 입자 (charged particle)표면에 생체 분자를 화학적/또는 물리적으로 고정시키고 이 하전된 입자를 표면으로 이동시켜 고정화시키는 방법이다. 이 입자 기반의 면역복합체를 이용할 경우 빠른 시간에 광범위한 면적에 반응 생체 분자를 고정시킬 수 있고 다른 환경적 요소의 제약 없이 쉽게 생체 분자를 원하는 표면에 고정화시킬 수 있는 장점이 있다. 여기서 우리는 이러한 장점을 응용하여 음성 하전된 입자 (negatively charged particle)의 표면에 생체 분자 (항체 또는 DNA probe oligo)부착하고 이후 형성된 입자-면역복합체를 양전하를 형성한 표면으로 이동

시키는 방법을 개발하였다.[6] 이 방법을 이용하여 우리는 하전된 나노입자-면역복합체를 그에 상응하는 크기의 나노 구조화된 어레이내부로 고정화하는데 성공하였다. Figure 1은 개발된 전기 영동 입자 구속 시스템 (electrophoretic particle entrapment system)의 개념도와 더불어 이 시스템상에서 형성된 전기장과 그에 따른 입자의 이동 경로, 그리고 시스템을 이용하여 200 nm 입자를 어레이 내부의 웰 (well)속으로 구속화한 것을 형광이미지를 사용하여 보여주고 있다. 사용된 어레이는 서로 다른 굴절률을 지닌 물질들 (PMMA: 1.48, ITO: 1.8, glass: 1.52)로 구성되어있어 어레이 내부에서 내부 전반사 (total internal reflection)가 발생하도록 제작되었다.

전기 영동 구속 시스템을 이용하여 실제 면역 반응 검출을 나노 어레이에서 실행하였다. 검출 대상 물질은 3-phenoxybenzoic acid로써 살충제 (insecticide)에 사용되는 환경 독성물질인 pyrethroid의 생체 지표 (biomarker)이다. 이 지표는 극소 분자로서 일반적인

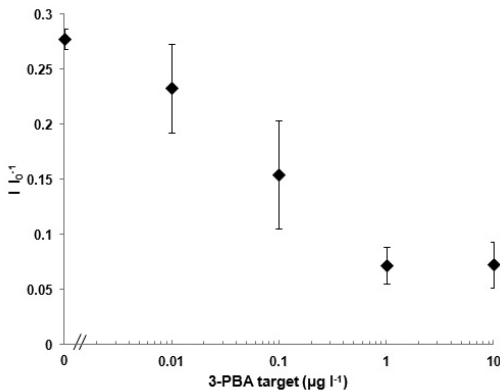


Figure 3. Immunofluorescent intensities of the fluorescein in labeled antibody bound to the 3-PBA coated on fluorescent-carboxylated-PS particles trapped into the nanowells after the competition with 3-PBA. I: fluorescent intensity of the fluorescein labeled antibody (excitation wavelength: 480 nm, emission wavelength: 520 nm), I<sub>0</sub>: fluorescent intensity of the particles (excitation: 360 nm, emission: 420 nm) trapped into the nanowells.

면역분석방식이 적용 불가능하여 합텐 (hapten)을 이용한 competitive 면역분석 방법을 이용하였다. Figure 2는 합텐이 부착된 200 nm-입자를 전기 영동 구속 시스템을 이용하여 어레이 내부로 고정화한 후 서로 다른 농도 (0 µg/L, 0.01 µg/L, 0.1 µg/L, 1 µg/L, 10 µg/mL)의 3-PBA를 반응시킨 후 형광 시그널의 변화를 나타내고 있다.

이렇게 생성된 형광 시그널의 차이를 이미지 분석 (image analysis) 하였고 그 결과 감도를 나타내는 검출 농도 한계 (the limit of detection)가 30 pM이었다. 이 감도는 일반적으로 실행되는 면역 분석 방법, 96-well plate-enzyme-linked immunosorbent assay의 감도보다 16배 향상된 것이었다 (Figure 3).

복잡한 고감도 시그널 변환기 또는 디텍터를 사용하

지 않고 단순 이미지 분석만으로 얻어진 결과로써 바이오센서의 현장 분석 향상을 보였다. 나노어레이의 스케일 장점으로 부터 오는 적은양의 샘플 (10 µL) 사용으로 확산에 의존하는 어레이 형태의 바이오센서의 측정속도를 향상시킬 수 있었고, 향상된 감도는 어레이 내부에 고정된 입자-면역복합체의 굴곡 (curvature)효과로 인해 항원/항체반응이 향상된 것과, 어레이 표면의 격자 (grating) 구조로부터 발생한 광 회절 (light diffraction)에서 기인한 형광 신호 증가로 설명될 수 있다.

전기 영동 구속 시스템은 생체 분자 고정화에 나노 스케일의 정밀성을 부여하였고 더불어 간편하면서도 효율적이어서 표면 고정화에 기반을 두고 있는 어레이 형태의 바이오 센서의 범용적 실현화에 혁신 적인 방법을 제시한다.

#### 광 결정 (photonic crystal) 바이오 센서 개발

광 결정은 감도를 높이기 위해 바이오센서에서 다양한 방법으로 응용되어왔다.[7, 8] 그러나 기존의 광 결정 바이오 센서는 광 결정 구조의 표면에 면역복합체를 랜덤하게 고정화 시키는 방법을 적용함으로써 시그널 증가의 효과를 얻을수는 있었으나 상대적으로 많은 양의 항원 또는 항체를 소비해야하고-일반적으로 항원, 항체는 고가이며 여타 질병의 검출을 행할시 혈액 또는 소변 으로부터 얻어지는 검출 물질의 양은 극히 제한적이다.-노이즈를 생성하는 비특이적(nonspecific) 시그널을 감소시키고 시그널 대 노이즈 비율을 증가시키기 위한 별도의 시간 소비적인 과정 (예: washing)이 요구된다. 이에 우리는 이러한 단점을 극복하고 바이오 센서에 광 결정 효과를 극대화하기 위한 방법을 개발하였다.[1]

개발된 광 결정 바이오 센서는 나노 입자를 면역복합

체 형성의 기반으로 이용한다. 나노 입자-면역복합체 이용은 입자 표면에 항원 부착을 적절히 제어하고 용액 으로부터 반응 물질의 분리를 용이하게 함으로써 전체 적인 분석 시간을 단축시킨다. 또한 나노 입자-면역 복합체를 원하는 센싱 장소로 제어/고정화시킬 수 있다면 불필요한 샘플 소비를 억제할수 있다. 이러한 장점때문에 우리는 광 결정 바이오 센서에 앞서 개발한 전기 영동 구속 시스템을 사용하였다.

우선 전기 영동 구속 시스템을 사용하여 입자-면역 복합체를 나노 웰 (nanowell)과 마이크로 웰 (microwell)에 고정하여 면역 반응 플랫폼의 구조 변화

에서 발생하는 시그널의 차이를 실험해보았다. 샘플속에 있는 항원에 반응할 항체가 고정화된 입자의 크기와 웰간의 간격 (periodicity)를 조절함으로써 항체가 고정화될 표면적을 동일화시켰다. 사용된 입자의 크기는 40 nm, 200 nm, 1  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ 였고 그에 따른 웰간의 간격은 650 nm, 2  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 0  $\mu\text{m}$ 로 어레이를 제작하였다. Figure 4는 전기 영동 구속 시스템을 이용하여 서로 다르게 구조화된 어레이 플랫폼의 각각의 웰에 입자-면역복합체를 고정시킨 것을 형광이미지를 통해 보여준다.

면역복합체의 고정 후  $10^{-3}\text{pg/mL}$ - $10^0\text{pg/mL}$ 의 9가지 Rabbit-IgG와 형광 물질이 부착되어있는 2차 anti-Rabbit IgG를 반응시켜 표준곡선 (standard curve)를 산출하였다. 형광 물질은 532 nm 파장의 레이저에 반응하여 555 nm의 빛을 방출하는 것을 사용하였다. 그 결과 40 nm (well size)-650 nm (periodicity)의 경우가 각각의 농도에 따라 가장 큰 시그널 값을 보였으며 검출 농도 한계 또한  $1\text{pg/mL}$ 으로 1  $\mu\text{m}$ -10  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ -0  $\mu\text{m}$ 의 것보다 감도에서 각각  $10^3$ ,  $10^6$ 배 각각 향상된 것이다 (Figure 5).

더불어 주어진 구조적 특징을 수치적 모델링에 적용하여 분석한 결과 형광시그널을 발생시키기 위해 사용된 주어진 레이저의 파장 (excitation: 532 nm, emission: 555 nm)에서 40nm-650 nm의 경우 어레이의 각각의 웰 내부 주위에 일정 형태의 강화된 전기장이 형성 되었고 (Figure 6), 이 전기장으로 인해 입자-면역복합체로부터의 형광 시그널이 증가되었다.

이 결과를 통해 마이크로 입자를 사용하는 것보다, 나노 입자를 그에 부합하는 사이즈의 어레이에 면역복합체의 기반으로 사용하는 것이 시그널의 향상에 크게 영향을 준다는 것을 알게 되었으며, 주어진 파장에 따라

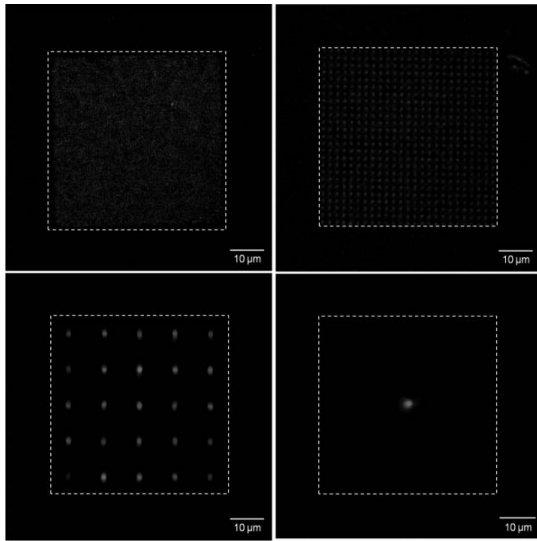


Figure 4. The nano- or microarrays/well with fluorescent carboxylated polystyrene particle (ex: 650 nm, em: 690 nm) conjugated with goat-anti-RlgG located to corresponding wells based on the size of particle after trapping using the EPES. (top-left) fluorescent images of 40 nm particles/wells with 650 nm periodicity, (top-right) 200 nm particles/wells with 2  $\mu\text{m}$  periodicity, (bottom-left) 1  $\mu\text{m}$  particles/wells with 10  $\mu\text{m}$  periodicity, (bottom-right) 5  $\mu\text{m}$  particle/well.

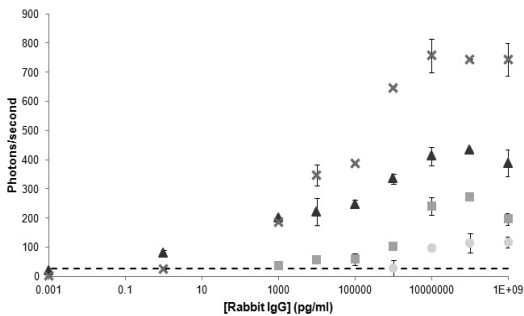


Figure 5. Detection of RlgG on the nano- or microarrays/well (40 nm, 200 nm, 1 μm, and 5 μm) with single photon counting detection system: ×, 40 nm nanoarray; ▲, 200 nm nanoarray; ■, 1 μm microarray; ●, 5 μm microwell. Nine different concentrations of RlgG dissolved in PBS buffer were used: 10<sup>-3</sup>, 1, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, and 10<sup>9</sup> pg/mL.

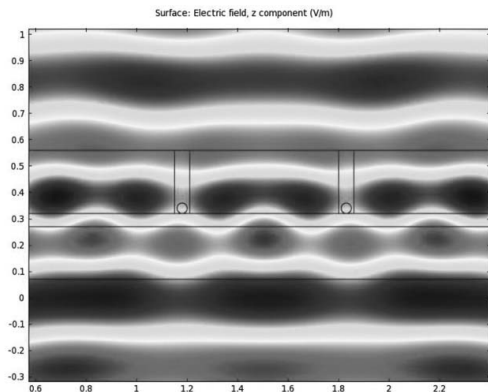


Figure 6. Numerical modeling of the nanoarray with PC structure. 40 nm PC-nanoarray with 650 nm periodicity for 532 nm.

광 결정 효과를 생성하고 면역복합체로부터 발생하는 시그널을 더 향상시키기 위해 어레이의 구조를 최적화할 필요가 발견되었다. 또한 어레이의 웰 내부에서 국부적으로 강화된 전기장이 입자-면역복합체와 결합할 때 시그널이 증폭된다는 사실에서 개발된 전기 영동 입자

구속 시스템과 나노어레이의 결합이 광 결정 바이오센서의 개발에 결정적인 요인임을 보였다.

광 결정구조의 최적화는 아래 위상 정합 (phase matching)식을 이용하여 전자기복사 (electromagnetic radiation)과 나노구조가 상호작용을 할 수 있도록 이루어졌다. 결과적으로 주어진 파장값과 웰 크기 (40 nm)에서, 웰간의 간격을 350 nm로 설계하고 어레이를 가공하였을때 (자세한 과정 생략) 입자-면역복합체가 고정되어있는 웰 내부 바닥과 주변에 최적으로 형성된 전자기를 얻을 수 있었다(Figure 7).

어레이에서 디텍터 방향으로의 1차 회절을 유도함으로써 여기 (excitation)와 발산 (emission)을 극대화할 수 있게 되었다. 이렇게 최적화된 광 결정 나노 어레이 플랫폼을 이용하여 실제 생체 분자물질을 검출하였다.

### 암 생체 지표 (cancer biomarker), HER2 진단

HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)는 다섯 형태의 유방암 (breast cancer)중에 가장 공격적이고 까다로운 HER2 양성 유방암을 진단하는데 쓰이는 생체 지표이다. 이 특정 단백질은 암세포의 증식을 증폭시키는 역할을 하며 인체내에 유방암 세포가 발현되었을때 급격하게 그 양이 증가한다. 비록 HER2 단백질의 암세포 생성시 초기 발현 농도 경계점이 15 ng/mL[9]로 검출 한계농도가 극히 낮을 필요는 없으나 개발된 입자 결합 광 결정 나노 구조화 어레이의 실제 인체 질병 진단의 그 실효성과 감도 수준을 파악하는데 있어서 좋은 실례가 될수 있어서 HER2가 검출 대상물질로 선택되었다.

본 실험에서는 서론 다른 다섯가지의 농도 (10<sup>-3</sup>, 1, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> pg/mL)의 HER2가 사용되었으며 실험의 실제성을 입증하기 위해 25%의 인체 혈청

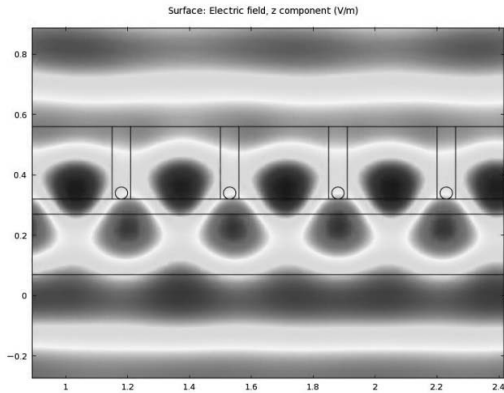


Figure 7. Numerical modeling of the nanoarray with PC structure. 40 nm PC-nanoarray with 350 nm periodicity for 532 nm.

(human serum)이 용액의 일부로 사용되었다. 또한 비교 검증을 위해 일반적으로 진단에 이용되는 면역분석법인 ELISA의 실험 데이터가 사용되었다. 검출 결과 기존의 면역분석 방법 또는 센서들과 비교하여 개발된 광결정 나노 구조화 어레이에서는 혈청 또는 기타 다른 요인들로 부터 생성되는 비특이성 또는 배경 시그널들이 극히 작았으며 검출 한계 농도 또한  $10^{-6}$  ng/mL (10 attomolar)로 기존의 ELISA를 사용하여 얻어낸 감도보다  $10^6$ 배 향상된 것이었다 (Figure 8).

또한 사용된 샘플의 양 또한  $10 \mu\text{L}$ 로 나노 스케일에서 기인한 장점들-극소량의 샘플 사용과 그에 기인한 비특이성 시그널의 감소-을 모두 이용하면서 광결정 구조의 시그널 향상을 이루어낸 검출의 혁신이라고 할 수 있다. 그러나 세부농도 검출을 위한 더 나은 감도를 얻기 위해서는 표준 곡선에서 발견된 두개의 서로 다른 경사도의 로그-선형 검출 구간 문제가 해결되어야 한다. 특히  $10^{-3}$ - $10^3$  pg/mL 검출 구간의 낮은 경사도가 나노 입자 표면에 항원 고정시 passive 고정화 방법으로부터 기인한 항원량의 불규칙성으로부터 기인함

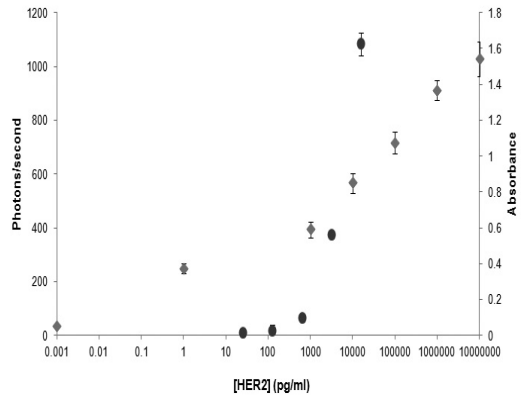


Figure 8. Detection of Her 2 using 40 nm nanoarray with 350 nm periodicity (◆). The standard curve obtained from conventional 96-well plate-based ELISA was compared (●). Seven different concentrations of HER2 spiked into 25% human serum were used:  $10^{-3}$ ,  $1, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6$ , and  $10^7$  pg/mL on the nanoarray. In the case of conventional ELISA, five different concentrations of HER2 dissolved in PBS were used: 25.6, 128, 640,  $32 \times 10^2$ , and  $16 \times 10^3$  pg/mL. Error bars, standard deviation over three replicates.

(temkin isotherm)을 고려하였을 때 [10] 입자 표면의 생체 분자물의 고정화 방법에 지속적인 연구가 필요함을 시사하였다.

식품 기인 독성 (foodborne toxin), Staphylococcal enterotoxin B (SEB) 검출

박테리아성 독성 물질에 의한 식품 중독은 인류 건강에 큰 위협이 되어왔다. 이러한 독성 물질 중에서 Staphylococcal enterotoxin B (SEB)는 식품 중독 관련 질병을 유발시키는 가장 보편적인 것이다. SEB에 의해 중독되면 위장염, 구토, 설사의 증상이 나타나고 이 물질을 흡입할 경우 호흡기관의 기능중지를 발생시킨다. [11-13] 증상이 나타나기 시작하는 초기 농도는 0.4

ng/mL이다. 이와 같이 식품을 통해, 그리고 호흡기를 통한 강한 전염성 때문에 생체전 (bio warfare)에도 적용될 수 있다. 따라서 SEB를 현장에서 조기에 검출할수 있도록 검출 속도가 빠르고 고감도를 지닌 바이오센서의 개발이 요구된다.

SEB의 검출을 위해 개발한 입자-기반 광 결정 나노 구조와 어레이가 사용되었고 형광 시그널 검출 기반의 샌드위치 면역분석법이 적용되었다.[14] 우선 phosphate buffered saline (PBS)에 용해된 SEB를 검출 대상 물질로 사용하여 실험을 한 결과 검출 한계 농도는  $10^{-9} \mu\text{g/mL}$  (35 attomolar) 이었으며 일반적으로 사용되는 96-well-ELISA의 감도와 비교하였을 때  $10^6$  배 향상된 것이었다(Figure 9).

광 결정 나노 구조화 어레이의 실제 적용성을 평가하기 위해 우유속에 포함된 SEB를 검출하였으며 PBS-SEB의 표준 곡선과 비교해 보았을때 각각의 농도에서 얻어진 데이터들이 통계적으로 상이하지 않음을 보여주었고 감도 또한 동일하였다 (Figure 10).

이를 통해 광 결정 나노 구조화 어레이에서 우유속의 다른 성분들에 의한 매트릭스 효과 (matrix effect)가 검출에 큰 영향을 미치지 못했음을 보여주었다. 적은 양의 샘플과 20분내의 면역 검출 시간, 그리고 단독 생체 분자 (single biomolecule)까지 검출할수 있는 감도로 개발된 분석 플랫폼의 범용성과 현장 적용성을 보여주었다.

**유전 돌연변이 질병, polycystic kidney disease (PKD) 검출을 위한 DNA 분석**

광 결정 나노 구조화 어레이가 항원/학체 반응에 의한 면역분석뿐 만이 아닌 single nucleotide polymorphism (SNP) DNA 검출에도 적용되었다. 광

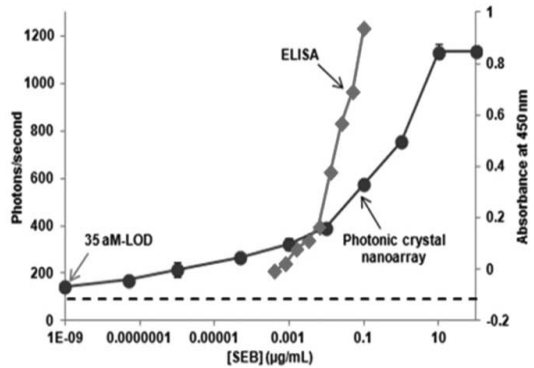


Figure 9. Detection of SEB in buffer (●). The standard curve obtained from ELISA was compared (◆). Ten different concentrations of SEB dissolved in PBS were detected using a sandwich immunoassay:  $10^{-9}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-3}$ , 0.01, 0.1, 1, 10, and  $100 \mu\text{g/mL}$ . In case of the ELISA, concentrations of 0,  $4 \times 10^{-4}$ ,  $8 \times 10^{-4}$ ,  $16 \times 10^{-3}$ ,  $31 \times 10^{-3}$ ,  $63 \times 10^{-3}$ ,  $125 \times 10^{-4}$ ,  $25 \times 10^{-3}$ , 0.05, 0.1  $\mu\text{g/mL}$  were used. LODs were determined from the mean plus three standard deviations of the background noise (dash lines). Error bars are based on the standard deviation of three replicates.

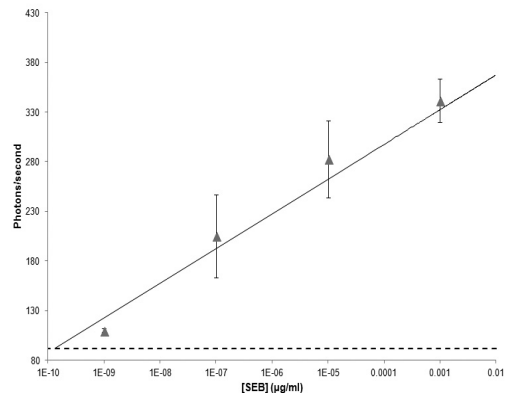


Figure 10. Measured results of SEB in milk (▲) compared to the standard curve (solid line) of SEB in PBS.



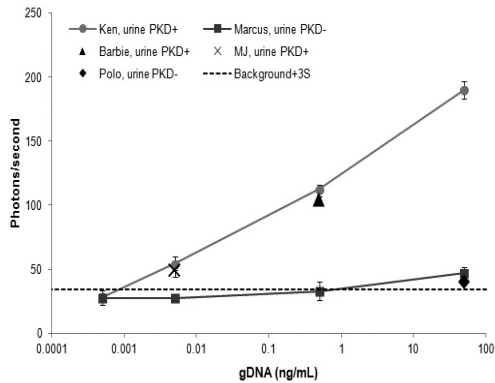


Figure 11. SNPs detection of the PKD+/PKD- gDNA extracted from feline urine. The samples were obtained from five Persian cats with known PKD positivity and negativity: Ken (+, ●), Marcus (-, ■), Barbie (+, ▲), MJ (+, ×) and Polo (-, ◆). Dash line indicated the mean plus three standard deviations of the background noise. The concentrations used for the standard curve:  $5 \times 10^{-5}$ – $4.5 \times 10^{-3}$ – $3.5 \times 10^{-1}$ , 1.50 ng/mL. The signal from target urine-gDNA of MJ, Barbie and polo were compared to the standard curve created from the signals of Ken and Marcus. Error bar: standard deviation determined from three replicates.

결정 어레이 내부에서 나노 입자와 결합한 DNA 복합체가 여기와 발산의 위상 적합을 통해 복합체로부터 발생하는 형광 시그널을 향상시킨다. 입자-DNA probe oligo가 전기 영동 입자 구속 시스템을 통해 광 결정 내부로 고정하고 샌드위치 hybridization 과정을 통해 feline polycystic kidney disease를 유발하는 돌연변이의 1 base pair 차이를 확인할 수 있었다. 검출에 이용된 DNA oligo는 PKD의 SNP를 포함할 수 있도록 합성된 것이었다. 한계 검출 농도는 0.9 fg/mL (50 aM)이었으며 이것은 한 어레이에서 30 oligo를 검출할 수 있는 감도와 부합한다 (Figure 11).

DNA-광 결정 나노 구조화 어레이 플랫폼의 실현성

이 실제 샘플인 PKD를 지닌 고양이의 혈액 과 소변 샘플을 사용하여 테스트 되었다. 그 결과 한계 검출 농도는 0.005 ng/mL이었으며 이는 단일 어레이가 혈액과 소변 샘플에서 추출된 6 femtogram의 genomic DNA 검출할 수 있음을 보여주었다. 광 결정 나노 구조화 어레이를 통해 얻어진 감도는 DNA 분석을 위해 일반적으로 이용되고 그 성능이 입증된 real time-polymerase chain reaction (PCR)방법의 그것과 유사하였고 반면, 분석시간, 경제성, 현장 적용성등에서 오히려 향상된 DNA 분석 방법임을 입증하였다.

### Bacteriophage 어레이 생성과 검출

전기 영동 사용을 통해 박테리오파지를 직접적으로 어레이에 배열시켰다.[15] 이 실험에 사용된 박테리오파지의 종류는 T7으로 불리는 것으로 머리의 크기가 60 nm, 꼬리의 길이가 23 nm로 이다. 이 파지는 이중 극성을 띄고 있는데 머리는 음전하, 꼬리는 양전하를 가지고 있다. 파지의 전체 극성을 z-potential 을 통해 측정 한결과  $-21 \pm 1.4$  mV로 머리의 음전하가 전체적 극성을 지배하고 있음을 알 수 있다. Figure 12은 나노 구조화 어레이 내부의 ITO 표면에 양전하를 적용하여 박테리오파지를 전기적 영동시키는 도해를 보여주고 있다.

T7 박테리오파지가 특정 박테리아와 결합하는 생물 감지물질 (bioreceptor)로 사용될 경우 파지의 머리가 바닥으로 향하는 고정화의 방법은 검출 대상 (예: 박테리아, RNA 결합 단백질 등)와 반응하는 주요 역할을 담당하는 꼬리부분을 외부로 노출시킴으로써 생체적 결합을 향상시킬 수 있는 장점이 있다. 이때 어레이 내부에 적용된 극성이 파지의 특정 방향으로의 지향-고정화를 조절할 수 있는 주요 요소가 된다. 적용되는 전압의 정도가 높은 밀도의 균일배열을 형성하는데 가장 중요한 요

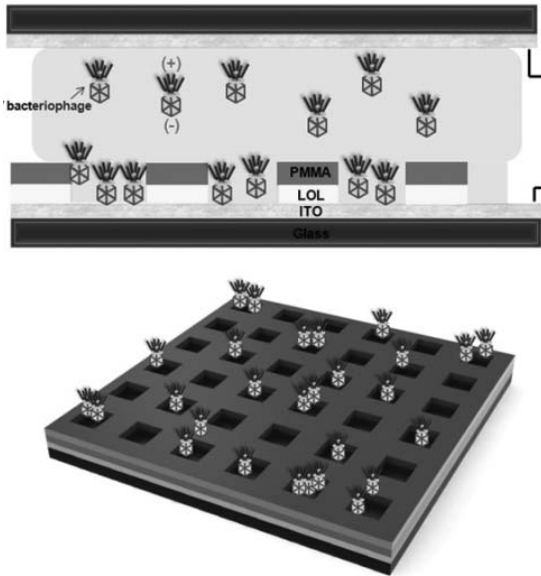


Figure 12. Schematic of T7 bacteriophage trapping into nanowells using an electrophoretic particle entrapment system. The inherent net negative charge on the phage capsid induces electrophoretic transport of the phages to the bottom of the nanowells of the array along the electric field created between top and bottom indium tin oxide layer.

소임을 보였다.

이 연구의 최종 목적은 식품등이 박테리아에 감염되었을 경우, 특정 박테리아 - T7 박테리오파지의 경우 E.Coli - 에만 결합하여 그 박테리아를 용해시키고 2차적으로 생성되어 외부로 노출된 박테리오파지를 정량분석함으로써 간접적으로 감염원인 박테리아를 검출하는 것이다. 따라서 개발한 전기 영동 고정화 시스템을 사용하여 용액으로부터 박테리오파지를 분리하고 광 결정 나노 구조화 어레이에 고정화시킴으로 파지의 고감도 검출이 가능하게 된다. 이때 검출 시그널은 박테리아파지 내부의 DNA에 삽입/결합된 형광 염료 (intercalating fluorescent dye)로 부터 생성된다. 형

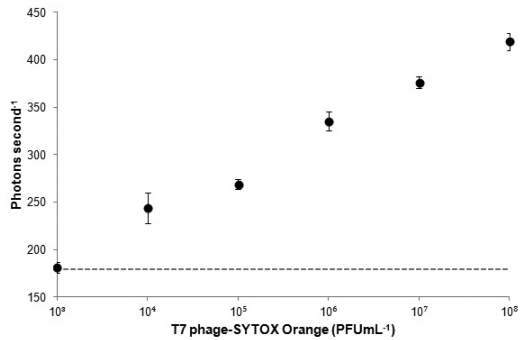


Figure 13. Quantification of T7 bacteriophages intercalated with SYTOX Orange (ex: 547 nm, em: 570 nm) using a photonic crystal nanostructured array.

광 시그널은 앞에서 언급한 바와 같이 고유한 광 결정 위상 정합에 의해 향상된다. 실험 결과, 전기 영동 고정화가 결합된 광 결정 나노 구조화 어레이에서 박테리오파지를 검출한 감도가 기존의 형광 시그널 리더를 사용하여 얻어진것도 10<sup>6</sup>배 향상되었음을 보여주었다 (Figure 13). 이러한 결과를 통해 전기 영동 시스템/광 결정 나노화 구조가 전하를 띤 파지를 직접적으로 고정시켜 정량 검출할 수 있게 함으로써 기존의 검출에 요구되었던 농축화 또는 배양등의 부가 과정등이 생략될 수 있고 신속하고 정확하며, 현장 사용이 가능한 병원체 검출이 가능하게 되었다.

### 3. 결론

과학과 기술의 발전으로 인해 인류의 생명연장과 삶의 질이 비약적으로 향상되었다. 그러나 여전히 시간과 공간의 제약에 의한 체계적인 예방, 신속한 처리의 미비로 인한 문제점들이 해결되어야 한다. 인류의 삶을 위협하는 질병의 요인들은 다양하고 이 원인들에 대한 검출,

분석, 치료, 후처리 등의 모든 일들이 기존의 실험실 기반이 되는 체계에 의존한다면 여태까지 이뤄낸 발전에서 제자리 걸음을 할 수 밖에 없다. 병원체가 발생하는 초기 단계, 즉 농도가 극히 작고 샘플의 양도 한정되어 있는 그 시기에 현장 운용이 가능하고 고감도를 지닌 바이오센서가 개발된다면 앞서 언급된 기존 기술에서 오는 제한적 요소들이 해결될 수 있다. 더 나아가 자원, 자본 그리고 기술의 한계로 인해 의료지원조차 제대로 받지 못하는 나라들에게 경제적이면서 효과적인 바이오센서의 개발은 전 세계의 모든 인류의 삶의 질을 균등히 발전시킬 수 있는 가능성을 제시한다. 지금까지 바이오센서들은 공학, 광학, 물리학, 생물학, 화학등의 다양한 학제간 상호 연구를 통해 단기간에 많은 성과를 이루어 냈다. 센서에 응용될 다양한 면역분석법들, 셀 하나의 반응에서 오는 작은 시그널이라도 검출하고 변형할 수 있는 변환기와 디텍터들, 시그널을 효과적으로 읽고 분석하는 리더들 등 센서를 이루는 주요 요소들은 나름의 획기적인 발전을 이루어가고 있으며 역시 이러한 향상된 검출 요소들의 기반위에 바이오센서가 추구해 나아가 할 방향은 현장 적용성과 경제성으로 압축되고 있다. 개발된 광 결정 나노 구조화 어레이는 면역분석법과 DNA분석으로 이원화된 분석 방법을 통합하고 범용적인 사용을 가능케 하며, 광 결정 구조에서 기인한 플랫폼 자체의 시그널 향상으로 인해 기존의 복잡하고 스케일이 큰 디텍터와 리더가 필요치 않음으로 인해 바이오센서가 나아가 할 최종목적에 가장 근접한 센서의 타입이다.

## 참고문헌

- [1] Han, J.-H.; Sudheendra, L.; Kim, H.-J.; Gee, S. J.; Hammock, B. D.; Kennedy, I. M. Ultrasensitive on-chip immunoassays with a nanoparticle-assembled photonic crystal. *ACS Nano* 2012.
- [2] Chan, S. M.; Ermann, J.; Su, L.; Fathman, C. G.; Utz, P. J. Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways. *Nat. Med.* 2004, 10, 1390-1396.
- [3] Schwartz, D. K. Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. *Annu. Rev. Chem.* 2001, 52, 107-137.
- [4] Lee, K. B.; Kim, E.-Y.; Mirkin, C. A.; Wolinsky, S. M. The use of nanoarrays for highly sensitive and selective detection of human immunodeficiency virus type 1 in plasma. *Nano Lett.* 2004, 4, 1869-1872.
- [5] Sanedrin, R. G.; Amro, N. A.; Rendlen, J.; Nelson, M. Temperature controlled dip-pen nanolithography. *nanotechnology* 2010, 21, 1-7.
- [6] Han, J.-H.; Kim, H.-J.; Sudheendra, L.; Hass, E. A.; Gee, S. J.; Hammock, B. D.; Kennedy, I. M. Electrophoretic build up of multi nanoparticle array for a highly sensitive immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* 2012.
- [7] Chaudhery, V.; Huang, C.-S.; Pokhriyal, A.; Polans, J.; Cunningham, B. T. Spatially Selective Photonic Crystal Enhanced Fluorescence and Application to Background Reduction for Biomolecule Detection Assays. *Opt. Express* 20011, 9, 1-17.
- [8] Huang, C. S.; George, S.; Lu, M.; Chaudhery, V.; Tan, R. M.; Zangar, R. C.; Cunningham, B. T. Application of Photonic Crystal Enhanced Fluorescence to Cancer Biomarker Microarrays. *Analytical Chemistry* 2011, 83, 1425-1430.

- [9] Gohring, J. T.; Dale, P. S.; Fan, X. Detection of HER2 Breast Cancer Biomarker Using the Opto-Fluidic Ring Resonator Biosensor. *Sensors and Actuator B: Chemical* 2010, 146, 226–230.
- [10] Johnson, R. D.; Arnold, F. H. The Temkin Isotherm Describes Heterogeneous Protein Adsorption. *Biochim. Biophys. Acta* 1995, 1247, 293–297.
- [11] Evenson, M. L.; Hinds, M. W.; Bernstein, R. S.; Bergdoll, M. S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* 1988, 7, 311–316.
- [12] Franz, D. R.; Jahrling, P. B.; Friedlander, A. M.; McClain, D. J.; Hoover, D. L.; Bryne, W. R.; Paviin, J. A.; Christopher, G. W.; Eitzen, E. M. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *JAMA* 1997, 278, 399–411.
- [13] Walt, D. R.; Franz, D. R. Biological warfare. *Anal. Chem.* 2000, 72, 738A–746A.
- [14] Han, J.-H.; Kim, H.-J.; Sudheendra, L.; Gee, S. J.; Hammock, B. D.; Kennedy, I. M. Photonic crystal Lab-On-a Chip for detecting Staphylococcal Enterotoxin B at low attomolar concentration. *Anal. Chem.* 2013, 85, 3104–3109.
- [15] Han, J.-H.; Wang, M. S.; Sudheendra, L.; Vonasel, E.; Nitin, N.; Kennedy, I. M. Capture and detection of T7 bacteriophage on a nanostructured interface. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014, 6, 4758–4765.