

# 알츠하이머 질병 진단을 위한 혈액 바이오마커 검출용 바이오칩 센서 개발

김수희 · 이상혁 · 이혜진<sup>†</sup>

경북대학교 자연과학대학 화학과 및 청정나노소재 연구소  
(2017년 7월 15일 접수, 2017년 7월 19일 심사, 2017년 7월 20일 채택)

## Development of Biochip Sensors for Blood Biomarkers Specific to Alzheimer's Disease Diagnostics

Suhee Kim, Sang Hyuk Lee, and Hye Jin Lee<sup>†</sup>

Department of Chemistry and Green-Nano materials Research Center, Kyungpook National University, 80 Daehakro, Buk-gu, Daegu-city 41566, Republic of Korea  
(Received July 15, 2017; Revised July 19, 2017; Accepted July 20, 2017)

### 초 록

해마다 증가하는 알츠하이머 질병에 걸린 환자 수는 전체 노인 인구의 15%에 다다르고 있다. 인지장애를 유발하는 심각한 알츠하이머 질병을 조기에 진단하는 것은 중요한 일이지만 MRI, PET, 척수액 진단법과 같은 기존 진단법은 고비용뿐만 아니라 장시간의 진단으로 환자에게 부담을 줄 수 있다. 이러한 기존 알츠하이머 질병 진단법의 단점을 극복하기 위하여 소량의 환자 시료(예 : 혈액)만으로 신속하게 알츠하이머 질병을 조기에 진단할 수 있는 다양한 바이오센싱 기술을 개발하는 연구가 지속되고 있다. 본 미니총설에서는 알츠하이머 질병 진단에 유용하게 활용될 수 있는 혈액 바이오마커를 정성 및 정량적으로 검출할 수 있는 바이오칩 기반의 센서 기술과 이를 통한 조기진단 기술에 대해 간략하게 서술하고, 이와 관련한 최신 연구현황과 발전방향에 대해 논의하고자 한다.

### Abstract

The number of patients suffering from Alzheimer's disease is increasing year after year and almost approaching 15% of the total elderly population. Although it is critical to detect the early stage of Alzheimer's disease, which is a serious illness causing cognitive deficits, various existing diagnosis methods such as MRI, PET and CSF analysis could be the burdens for patients due to their high costs and long time to diagnosis. In order to tackle some of challenging issues for such existing diagnosis methods, extensive efforts have been made on developing fast and convenient biochip sensing methodologies for the diagnosis of Alzheimer's disease with a droplet of patient biofluids (e.g., blood). In this mini-review, we highlight some of the latest biochip sensing technologies that could qualitatively and quantitatively analyze blood biomarkers used for Alzheimer's disease diagnostics and discuss briefly related research trends and future aspects.

**Keywords:** Alzheimer's disease, blood biomarker, biochip sensors, surface plasmon resonance, surface sandwich assay

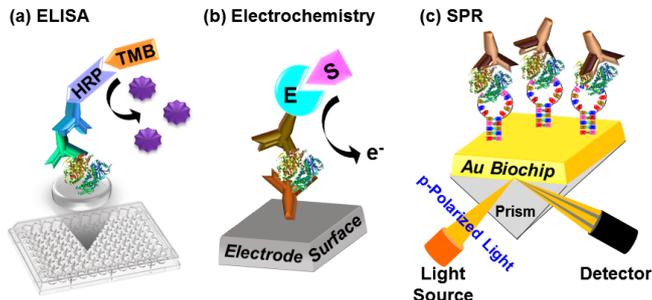
## 1. 서 론

현대인들에게 알츠하이머 질병은 암과 함께 가장 무서운 질병 중 하나로 인식되고 있다. 알츠하이머 질병은 치매 중 약 70%를 차지하고 있는 치매 유형의 뇌 질환이다. 이것은 뇌세포 손상에 의해서 발생하게 되고 이런 손상은 뇌세포 간의 소통 능력을 방해하게 된다[1]. 알츠하이머 질병은 만성적 신경퇴행성 질환이며 뇌세포 내부와 외부에 있는 특정 단백질의 수치가 높아져 뇌세포가 건강을 유지하고 서

로 소통하는 것을 어렵게 하고, 그중 학습 및 기억의 중심인 해마의 뇌세포를 가장 먼저 손상시키기 때문에 기억력 상실은 알츠하이머 질병의 대표적 초기 증상 중 하나라고 할 수 있다[2]. 알츠하이머 질병은 나이와 유전 및 심혈관성 요인으로 나뉘 수 있는데 그중 심혈관성 요인은 뇌세포에 필수적인 영양분의 공급을 어렵게 만들어 뇌기능 저하 속도를 높이거나 뇌손상을 더 심화시킨다[1,3]. 2013년 보건복지부에서 발표한 통계자료에 따르면, 해마다 치매환자가 증가하여 2050년이 지나면 약 300만 명으로 그 수가 증가할 것으로 보고되었으며, 전체 노인 인구 중 치매환자의 비율 또한 15%에 다다르고 있는 실정이다.

알츠하이머 질병 진단에 사용되어왔던 기존의 기술로는 뇌파분석법, 간이 정신상태 검사(mini mental state examination, MMSE), 뇌 자기 공명촬영(magnetic resonance imaging, MRI) 등이 주로 활용되어 왔다[1,4]. 예를 들어 계피와 페인트의 신나 냄새를 구별하지 못하면 알츠하이머 가능성이 높은 것으로 판단하는 방식의 간단한 후각검사

<sup>†</sup> Corresponding Author: Kyungpook National University, Department of Chemistry and Green-Nano materials Research Center, 80 Daehakro, Buk-gu, Daegu-city 41566, Republic of Korea  
Tel: +82-53-950-5336 hyejinlee@knu.ac.kr



**Figure 1.** Schematics showing representative biochip based sensing platforms for blood biomarkers used for Alzheimer's disease diagnostics. (a) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), (b) electrochemical and (c) SPR methods.

법, 환자에게 새로운 소리와 저주파 및 고주파 음을 들려주고 그로부터 300 s 후에 뇌에서 발생하는 유발뇌파를 분석하는 뇌파분석법, 알츠하이머 신경손상으로 발생하는 화학적 변화가 피부에서도 나타남을 이용한 피부검사법, 혈액 속에서 세포가 소통하는데 사용되는 120 개의 단백질 중 일부 단백질의 양이 환자에게서 현저히 다르게 나타남을 이용한 혈액검사법 등이 연구되었다. 그리고 뇌조직의 변화를 영상을 통해 직접 조사하는 방식으로 자기공명영상 촬영을 통해 뇌의 해마 용적 크기를 측정하는 방식과 단광자방출 컴퓨터단층촬영(single photon emission computed tomography, SPECT)을 통해 후대상회전물질의 혈류갑소를 측정하는 방식 등이 개발되었다. 또한 대부분은 MMSE 설문조사 형태로 이루지기도 하며, MRI, 양전자방출 단층촬영(positron emission tomography, PET) 등의 영상법이 활용되고 있다 [1,3]. 그러나 이러한 방법들은 진단까지 시간과 비용이 많이 들거나 환자의 고통을 유발할 수 있다는 단점이 있다. 따라서, 환자의 불안감과 치료비용을 감소시킬 수 있도록 피 한 방울로 알츠하이머 질병을 진단하는 혈액진단법이 매우 중요해지고 있다[5]. 현재 개발되어 있는 대표적인 알츠하이머 질병 진단용 키트로는 알츠하이머 질병 바이오마커 중에 하나인 베타-아밀로이드의 양을 분석하는 기술을 들 수 있는데 이는 체내 대사 수준에 따라 진단 결과가 달라질 수 있어 정확도가 낮다는 한계를 갖고 있다[6].

최근 대다수의 연구는 환자 시료(예 : 혈액, 소변 등) 분석을 통해 특정 질병을 신속 정확하게 진단하기 위해 특정 질병과 관련된 또는 진단에 중요한 인자로 활용 가능한 생분자 바이오마커를 검출하고 정량하는 방법을 개발하고 있는 추세이다[7]. 알츠하이머 질병 진단 센서 또는 키트의 경우에도 알츠하이머 질병의 유무를 암시할 수 있는 다양한 단백질 바이오마커 발굴과 이를 적용한 연구가 왕성하게 이루어지고 있다. 이들 바이오마커는 생리적 지표로서 중요한 부분을 차지하고 있으며, 바이오마커의 검출은 생체 분자 상호 작용과 바이오마커의 정성 및 정량 분석을 가능하게 하고, 적은 양의 환자 시료로 다양한 바이오마커를 검출할 수 있는 바이오센서에 응용할 수 있는 기반 연구가 되기도 한다[5].

칩 기반의 바이오센서는 주로 타겟이 되는 생물질과 선택 특이적으로 결합하는 바이오리셉터(또는 리간드)를 칩 표면에 고정한 다음, 타겟 생물질과 반응시켜 서로간의 특이적 결합으로 발생될 때 나타나는 신호 변화를 측정하는데 기반을 두고 있다. 표면에 고정하는 리간드로는 핵산, 항체, 펩타이드, 단백질 및 세포용해물과 같은 다양한 생물질이 활용되고 있으며[8], 보편적인 센싱 기술로는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), 전기화학 센서, 표면 플라즈몬 공명법(surface plasmon resonance, SPR)을 포함한 다양한 광학 센서 등을 들

수 있다[9-11]. Figure 1에 각 센싱 기반의 간략한 모식도를 나타내었다. ELISA는 샌드위치, competitive 방법 등이 있는데[12-13] 그중, 대표적으로 이용되는 샌드위치 어세이 방법은 타겟 물질에 특이적인 리간드를 표면에 부착한 다음, 타겟 물질을 농도별로 넣고, 2차 리간드와 horseradish peroxidase (HRP)가 붙은 항체를 넣어주어 기질과 효소 반응을 통해 신호를 확인하는 방법이다. 다음으로, 전기화학적 방법으로는 표면에 리간드를 결합시킨 후, 타겟 물질을 농도별로 넣고 전기화학적으로 활성을 가진 효소로 컨주게이션된 2차 리간드를 결합하여 이들이 기질과 반응하였을 때 나타내는 전기적 신호를 분석함으로써 타겟 물질의 농도를 측정하는 방법이다[14]. 표면 플라즈몬 공명법 센서에는 금 박막 표면에 흡·탈착되는 정도에 따라 변화되는 굴절률 차이를 측정하는 방법으로 입사각 변화에 따라 변하는 굴절률 측정 방법인 SPR[15], 파장 변화에 따른 굴절률의 차이를 측정하는 fourier transform-surface plasmon resonance (FT-SPR)[16], 마이크로 어레이 형태로 칩을 개발하여 charge coupled device (CCD) 카메라로 영상화하는 SPR imaging 방법[17] 등을 들 수 있다. 그 외에도, 나노미터 크기의 금속 구조를 표면에 패턴화하여 고정된 국소적인 표면 플라즈몬 현상에 기반을 둔 localized surface plasmon resonance (LSPR) 방법도 활용되고 있다[18]. 이 외에도 알츠하이머 질병 진단을 위해 다양한 기반의 바이오칩 센서 개발이 왕성하게 이루어지고 있으며, 본 총설에서는 특히 혈액 한 방울로 알츠하이머 진단을 가능하게 하기 위해 필요한 혈액 바이오마커들과 이를 검출하기 위한 바이오칩 기술 개발의 연구 동향에 대해 간략하게 논의하고자 한다.

## 2. 본 론

### 2.1. 알츠하이머 질병 진단을 위한 혈액 바이오마커

질병 바이오마커란 질병에 걸렸거나 신체에 이상징후가 발견되었을 때, 그 척도를 진단할 수 있는 지표로 시료에서 그 수치가 정상일 때와 다르게 급격히 변화하게 되면 몸에 이상이 있다고 판단할 수 있게 한다. 따라서 질병 바이오마커를 정량 및 정성분석하는 것은 질병 조기진단과 치료 및 연구에 중요하다고 할 수 있다[19]. 알츠하이머 질병 진단의 경우 환자의 척수액을 추출하여 정상인 집단 바이오마커 수치와 비교분석한 다음 이상이 발견되면 알츠하이머 질병을 확인하는 방법이 활용되고 있다[20-21]. 척수액 안에 신경퇴화를 결정할 수 있는 바이오마커로는 total tau (T-tau), neurofilament light protein (NFL), neuron-specific enolase (NSE), visinin-like protein 1 (VLP-1) 등과 amyloid precursor protein (APP) metabolism에 영향을 미치는 amyloid  $\beta$  42, amyloid  $\beta$  40, amyloid  $\beta$  38 등이 알려져 있다[20]. 또한, 신경병리학적 변화를 볼 수 있는 탱클 병리학과 관련된 phosphorylated tau (P-tau)와 신경 교세포 활성화와 연관된 YKL-40, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), glial fibrillary acidic protein (GFAP) 바이오마커 등도 알려져 있다. 하지만 척수액 진단 같은 경우, 척수액을 추출하기 위하여 환자의 허리뼈 사이에 긴 바늘을 찌러넣어서 추출하게 되며 이는 두통 및 감염 등의 부작용을 발생시킬 수 있다 [22]. 따라서 환자의 고통과 부작용을 최소화할 수 있는 혈액 내 바이오마커 분석을 통해 알츠하이머 질병 유무를 진단하는 연구 및 기술 개발이 최근 많이 진행되고 있다[23-24].

알츠하이머 질병 진단에 활용 가능한 혈액 및 척수액 바이오마커를 Table 1에 요약하였다. 대표적으로 amyloid  $\beta$  (1-42)와 amyloid  $\beta$  (1-40)를 포함한 amyloid  $\beta$  관련 단백질[25-26]과 tau pathology와 연관있는 효소인 glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), cyclin-dependent kinase 5 (CDK5), protein kinase c (PKC)를 들 수 있다[23-24]. 또한

**Table 1. Some of Representative Biomarker Molecules Found in Cerebrospinal Fluid (CSF), Serum or Plasma for Alzheimer's Disease**

	Alzheimer's biomarker	Ref.
CSF	Total tau, Phosphorylated tau	[20]
	Amyloid $\beta$ (38, 40, 42)	
	Neuron-specific enolase	
	Visinin-like protein 1	
	Heart fatty acid binding protein	
	Neurofilament light protein	
	Monocyte chemotactic protein-1	
	Glial fibrillary acidic protein	
Serum or Plasma	YKL-40	[23]
	Total tau (T-tau)	
	Amyloid $\beta$ (40, 42)	
	YKL-40	
	Cyclin-dependent kinase 5	
	Protein kinase C	
	Glycogen synthase kinase-3	

**Table 2. Various Biochip Sensing Technologies Developed for the Detection of a Wide Range of Alzheimer's Disease Blood Biomarkers**

Technique	Probe	Limit of detection	Analyte	Ref.
ELISA	antibody	106 $\mu\text{g/mL}$	Clusterin	[31]
	antibody	135 $\mu\text{g/mL}$	TTR	[30]
	antibody	2.9 $\mu\text{g/mL}$	Tau-A	[36]
	antibody	4.70 $\text{pg/mL}$	Amyloid $\beta$	[37]
Electrochemistry sensor	antibody	45 $\mu\text{g/mL}$	p53 protein	[32]
	antibody	100 fM	Amyloid $\beta$ (1-42)	[26]
	aptamer	58 pM	TNF- $\alpha$	[38]
	-	0.7 $\text{mg/mL}$	Amyloid $\beta$ peptide	[39]
SPR	antibody	22 nM	Amyloid $\beta$ peptide	[25]
	antibody	20 pM	Amyloid $\beta$ peptide	[5]
	antibody	50 $\mu\text{g/mL}$	17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10	[29]
	aptamer	10 fM	$\alpha$ -1 antitrypsin (AAT)	[27]
LSPR	aptamer	10 fM	Tau protein	[28]
	antibody	10 nM	Amyloid $\beta$ -derived diffusible ligands (ADDL)	[52]
	antibody	1 pM	Amyloid $\beta$ -derived diffusible ligands (ADDL)	[53]

$\alpha$ -1 antitrypsin (AAT)[27], tau protein[28], 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 10 (17 $\beta$ -HSD10)[29], transthyretin (TTR)[30], clusterin[31], p53 protein[32]도 알려져 있다. 혈액 내 바이오마커를 검출할 때 가장 중요한 것은 환자와 정상인 간의 농도가 확연한 차이를 보일 때, 진단을 정확하게 할 수 있다는 것이다. 환자와 정상인 간에 확연한 차이를 보이는 혈액 바이오마커로는 t-tau, YKL-40가 알려져 있으며, 반면에 heart fatty acid binding protein (HFABP), amyloid  $\beta$  40, amyloid  $\beta$  42와 같은 바이오마커는 큰 차이를 나타내지 않는다고 알려져 있다[20]. 또한 그 무엇보다도 반드시 고려해야 할 사항 중에 하나는 혈액 내에는 한 종류 이상의 바이오마커가 존재하고 있기 때문에 이를 동시에 검출할 뿐 아니라 고감도 및 고선택적으로 검출 가능한 바이오센서를 개발하는 것이라 할 수 있겠다.

**2.2. 혈액 바이오마커 검출을 위한 알츠하이머 진단용 바이오칩 센서**

혈액 한 방울 내에는 다양한 혈액 바이오마커와 질병진단과 관련한 정보가 존재하고 있기 때문에 그중에서 특정 질병 진단에 필요한 바이오마커만을 검출함으로써 필요한 정보를 수집 및 최종 진단에 이르도록 하는 것은 상당히 까다로운 연구라 할 수 있다. 다양한 플랫폼의 바이오칩 센서들이 개발되어 왔으나, 대다수의 칩 플랫폼 바이오센서의 경우 적용하고자 하는 바이오센서 칩 표면에 혈액 내에 존재하는 다른 혈액 바이오마커의 비 특이적 반응으로 생긴 false 신호에 의한 방해로 줄이고 혈액 내에 극소량으로 존재하는 특정 질병 바이오마커를 선택적 및 고감도로 검출하여야 하는 두 가지 조건을 동시에 만족 시킴으로써 질병진단의 정확도를 높이기 위한 노력이 진행되고 있다. 이 조건들을 해결하기 위한 방안 중 하나로 칩 표면에 특정 바이오마

커와 특이적으로 강하게 결합하는 적어도 두 개 이상의 리간드를 활용하는 샌드위치 분석법이 개발되어 왔다[27-28,30-31,33-37]. 그 대표주자인 효소면역측정법인 ELISA[30-31]를 포함하여 전기화학 기반 [26,32] 및 SPR[27-28] 기반의 바이오칩 센싱 플랫폼을 알츠하이머 질병 진단에 유용한 혈액 질병 바이오마커 검출에 적용한 연구를 Table 2에서 정리하였으며, 센싱 모식도를 Figure 1에 나타내었다. ELISA 연구 결과 중에, Lovestone 연구팀[30]은 TTR이 알츠하이머 혈액 바이오마커로 적합하다는 것을 증명하기 위하여 western blotting과 ELISA를 이용하여 알츠하이머 환자와 정상인의 실험결과 값을 통계화하였으며, 그 결과 질병에 걸렸을 때, TTR 농도가 감소함을 확인함으로써 바이오마커의 역할을 한다는 것을 보고하였다. Resnick 연구팀[31]은 기존의 검사방법인 MRI 스캔과 조직검사, 혈액검사를 동시에 진행한 결과, 알츠하이머 질병에 걸렸을 때, 환자의 clusterin의 농도가 정상인 보다 높다고 보고하였다. 또한, Karsdal 연구팀[36]에서는 ELISA 방법을 통하여 tau-A라고 지칭하는 a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM 10) 바이오마커를 약 2.9 ng/mL까지 검출할 수 있음을 보고하고, 상기 방법으로 정상인의 세럼 내에서 바이오마커 농도를 측정하여 알츠하이머 질병에 걸린 환자와 정상인 사이의 수치를 비교하였다. 이 뿐 아니라 Sarasa 연구팀[37]은 알츠하이머 질병 진단 바이오마커로 알려진 amyloid  $\beta$ 를 4.7 pg/mL에서 5.71 pg/mL까지의 검출 가능한 샌드위치 분석법을 개발하여 플라즈마와 혈액 세포 샘플을 비율에 맞추어 희석한 환자 및 정상인 샘플 분석에 적용하였다.

전기화학 칩 기반의 알츠하이머 질병 진단용 센서의 경우 예를 들어 Sardini 연구팀[32]에서는 휴대 가능하며 재현성과 민감도가 높은 탄소칩 전극 기반의 샌드위치 플랫폼을 개발하고 이를 약 45 ng/mL 농도의 p53 단백질 검출에 적용하였으며, 그 결과를 ELISA 분석법 결과와 비교하였다. 이를 통해 저비용으로 감도가 우수한 알츠하이머 질병 진단 키트 제작이 가능함을 보여주었다. 본 연구팀[26]은 알츠하이머 질병 진단 바이오마커인 amyloid  $\beta$ 를 선택적으로 분석하기 위해 두 종류의 서로 다른 항체를 이용한 샌드위치 플랫폼을 제작하였다. 스크린프린팅 기술을 이용하여 탄소칩을 제작하고 이에 금 나노입자를 전기화학적으로 증착한 후, amyloid  $\beta$ 에 특이적인 항체를 고정시키고 세럼 또는 플라즈마에 존재하는 amyloid  $\beta$ 와 alkaline phosphatase (ALP) 효소를 컨쥬게이션한 2차 항체를 결합시켜 샌드위치 플랫폼을 형성한 후 4-aminophenyl phosphate 기질과 반응시켜 얻어지는 전기화학적 신호를 측정함으로써 세럼과 플라즈마 내에서 약 100 fM 농도의 amyloid  $\beta$  peptide를 검출할 수 있음을 보고하였다. 또한, Revzin 연구팀[38]은 사각파 전압전류법(square wave voltammetry)을 이용하여 RNA 압타머로 고정된 전기화학 센서 칩에 혈액샘플을 떨어뜨려 동맥경화증, 알츠하이머 질병 진단 등에 이용할 수 있는 바이오마커인 tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )를 약 58 pM까지 검출한 결과를 보여주었다. Tamiya 연구팀[39]은 다른 연구와는 다르게 탐침용 리간드를 이용하지 않고 탄소전극 표면에서 aggregation 현상을 이용하여 amyloid  $\beta$  peptide를 0.7  $\mu$ g/mL까지 사각파 전압전류법으로 검출한 결과를 발표하였다.

### 2.3. 알츠하이머 질병 진단에 유용한 혈액 바이오마커 검출을 위한 SPR 바이오칩 센서

앞서 설명한 ELISA와 전기화학센서의 경우 센서 감응 신호 측정을 위한 시료, 측정하고자 하는 바이오마커, 리간드에 형광물질 또는 전기화학적 활성 효소의 레이블링이 필요하다. 이는 시료의 사전처리

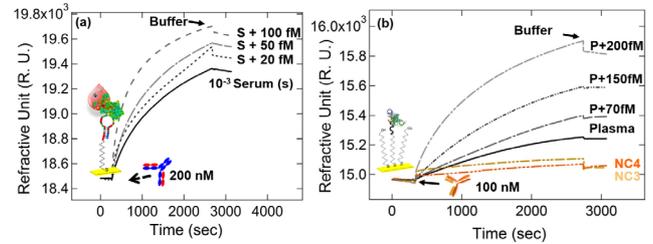


Figure 2. SPR sensorgrams for different (a) AAT[27] in serum or (b) tau protein[28] in plasma using with DNA aptamer on a thin gold film. Reprinted with permission from refs.[27-28].

등의 복잡한 실험 단계를 거쳐야 하며, 또한 센서의 성능(예 : 재현성 및 감도 등)에 영향을 줄 수 있다. 시료의 전처리 또는 신호 형질로 레이블링이 필요치 않는 분석법으로는 표면에서 반응물의 흡·탈착에 의한 굴절률 변화에 민감한 측정법인 표면 플라즈몬 공명(SPR) 센서를 들 수 있다. SPR 기반의 바이오칩 센서의 경우 약물전달, 환경오염물질 모니터링, 표면화학 연구 등[40]에 이용되고 있을 뿐 아니라 질병 바이오마커 검출에도 널리 활용되고 있으며[41-50], 암과 관련된 질병 바이오마커 검출[51] 및 알츠하이머 질병 진단에 유용한 바이오마커(예 : amyloid  $\beta$ , tau 및 17 $\beta$ -HSD10) 분석에도 활용되었다 [5,25,27-29,52-53].

알츠하이머 바이오마커 검출에 SPR 바이오칩 센서를 적용한 연구 중 Poduslo 연구팀[25]의 경우 알츠하이머 질병 진단용 혈액 바이오마커 중에 하나인 amyloid  $\beta$  peptide와 IgG 타입의 항체와의 강한 결합력 측정 결과를 기반으로 IgG 항체 칩을 제작하여 약 20 nM의 amyloid  $\beta$  peptide를 검출한 결과를 보고하였다. Wang 연구팀[5]은 SPR 칩 표면에 탐침용 항체를 고정하고 amyloid  $\beta$  peptide와 이차 항체를 이용하여 샌드위치 플랫폼을 구현하고 약 20 pM의 amyloid  $\beta$  peptide를 검출한 결과를 보고하였다. 또한 Dey 연구팀[54]에서도 알츠하이머 질병 혈액 바이오마커인 tau 단백질의 농도를 SPR 바이오센서로 분석하였으며, 특히 알츠하이머 환자들의 혈액샘플을 모아서 각각 질병의 단계에 따라서 그룹을 나눈 다음 각 샘플 내에 존재하는 tau 단백질을 검출하여 건강한 사람과의 데이터를 비교 분석한 연구 결과를 보고하였다. 그 결과 알츠하이머 질병을 가진 환자 샘플에서 tau 단백질의 수치가 정상인보다 높다는 것을 확인할 수 있었다.

Figure 2는 본 연구실에서 최근 발표한 알츠하이머 질병 진단용 혈액 바이오마커인 (a) AAT[27]와 (b) tau 단백질[28]을 각각 세럼과 플라즈마에서 SPR로 검출한 연구 결과를 나타내었다. 각각의 바이오마커에 특이적으로 결합 가능한 압타머와 항체 페어를 선정 한 후 SPR 센서칩 표면에 압타머를 고정하고, 이에 AAT 또는 tau 단백질을 흘려준 뒤 다시 항체를 흘려주어 압타머/질병바이오마커/항체 샌드위치 복합체를 형성시켜 검출함으로써 검출한계 및 선택성을 높이고자 하였다. 특히 tau 단백질을 검출할 경우 센서 칩 표면을 11-mercaptoundecanol (MUD)로 블로킹하여 플라즈마 내에 있는 tau 단백질 이외의 단백질과 비특이적 반응을 줄이고자 하였으며, 그 실험결과, 플라즈마 내에 존재하는 tau 단백질을 약 10 fM까지 정량 분석할 수 있음을 보여주었다.

또 다른 예로, 국소적인 표면 플라즈몬 공명 바이오센서를 들 수 있는데 Van Duyne 연구팀[52]에서는 은 나노입자 표면에 알츠하이머 질병 바이오마커로 알려진 amyloid beta-derived diffusible ligands (ADDL)에 특이적인 항체로 코팅하고 이를 이용하여 약 10 nM의 ADDL을 검출함을 시사하였다. 또한 Tamiya 연구팀[41]에서는 pep-

tide nucleic acid (PNA)를 탐침용 리간드로 센서칩에 고정하고 압과 관련된 인자로 알려진 DNA를 약 0.7 pM까지 검출할 수 있음을 보고하였다.

실시간 측정이 용이하고 시료의 레이블링이 필요치 않는 SPR 센서의 경우 칩 표면에 시료 내의 원하지 않는 생물질이 비특이적으로 흡착·탈착함에 따라 false positive 신호에 의한 정확도 저하와 함께 골절률 기반 센서가 가지는 낮은 민감도 문제를 해결해야 한다. 이를 위해 칩 표면에 다양한 블로킹 에이전트(예: 화학구조 말단에 -OH가 붙어 있는 물질 등)를 활용하는 연구[15]와 우수한 플라즈몬 성질을 갖는 다양한 금속 나노 입자를 접목하여 그 감도를 증대하고 이를 질병 진단을 위한 바이오마커 분석에 적용하는 연구가 많이 이루어지고 있다[35]. 즉, 기존의 MRI, PET진단법, 환자 척추액을 통한 질병 진단법 등의 고비용, 장시간, 환자의 고통과 진단 후의 부작용등과 같은 한계점을 극복하고 혈액 샘플에서의 알츠하이머 바이오마커의 유허 및 그 양을 측정함으로써 질병 진단에 활용하고자 하는 노력이 지속 되고 있는 추세이다.

### 3. 결론 및 발전 전망

본 총설에서는 신속하게 저비용으로 혈액 내에 존재하는 바이오마커 분석을 통해 알츠하이머 질병 진단이 가능한 바이오칩 센싱 플랫폼에 대한 최신 연구 동향을 소개하였다. 바이오 칩 센서의 큰 장점은 센서 표면에 분석하고자 하는 질병 바이오마커에 특이적으로 결합 가능한 다양한 종류의 탐침용 리간드를 도입함으로써 특정 질병 맞춤형의 센싱 플랫폼 제작이 가능하다는 것이다. 따라서 혈액 바이오마커 검출을 위한 칩 기반의 바이오칩 센서 개발에서 가장 중요한 요소 중 하나인 바이오마커에 선택적으로 결합 가능한 리간드 선정과 이를 칩 표면에 고정하는 화학이라 할 수 있겠다. 이들 리간드로 주로 항체가 많이 사용되어 왔으나, 최근 DNA 압타머, 펩타이드 등을 리간드로 이용하여 바이오마커에 대한 선택성을 높임으로써 질병 진단의 정확도를 향상시키는 연구도 많이 이루어지고 있다[27-28,55]. 특히 DNA 압타머의 경우, 항체에 비하여 온도에 영향을 크게 받지 않으며, in vivo 합성이 아니라 화학적으로 합성 가능하여 상대적으로 경제적이 며, 실온 실험 환경에서 안정하며 장기적인 안정성 및 내구성이 우수하다는 장점을 가지고 있어 각광을 받고 있다[20-22]. 본 연구실에서도 압타머/바이오마커/항체 샌드위치 복합체 형성을 통해 방법을 바이오마커 검출에 있어서 선택성과 민감도를 향상시키는 노력을 꾸준히 수행하고 있다. 이와 함께, 센서칩 제작 시 반드시 고려해야 할 다른 중요한 요소로 칩 표면에 비 특이적인 반응에 의한 false 신호를 감소시키는 노력을 들 수 있으며, 특히 생 시료 내에 존재하는 타겟 외의 다른 단백질 및 생물질로부터의 비특이적 반응을 최소화하기 위한 표면화학을 개발하여 선택성을 향상시키는 연구가 현재 활발하게 진행되고 있다[25-26,56]. 혈액 바이오마커의 대다수는 현재 한 가지 또는 그 이상의 질병에 관련이 있다고 보고되고 있다. 따라서 향후 적어도 한 질병에 대한 여러 개의 바이오마커를 동시에 분석 가능한 다중감지 플랫폼의 바이오 칩 센서로 개선 및 개발된다면 좀 더 정확하고 정밀하게 질병 진단에 활용될 것으로 사료된다.

최근 보건복지부의 자료(질병관리본부 치매노인 유병률조사, 2008년)에 의하면 알츠하이머를 포함한 퇴행성 뇌 질환의 조기 진단으로 발병 시기를 2년만 늦춰도 40년 후에는 유병률을 80% 수준으로 낮출 수 있다고 보고되었다. 또한 보건복지부 통계자료에 따르면 국내 알츠하이머 치매 진단시장의 규모는 2020년에 1.37조원에서 2050년에

는 3.5조원으로 증가할 것으로 예상된다. 간단한 혈액 채취를 통한 알츠하이머성 질병의 조기 진단 기술은 그 미래가 밝은데 예를 들어 한국과학기술연구원(KIST)은 최근 미량의 혈중 베타아밀로이드 양을 검출 가능한 미세 교차전극 센서 기술을 개발하여 일반적인 혈액검사로 치매 질병을 조기에 진단 가능성을 시사하였다. 또한 Nymox (세계 최초로 소변검사를 통해 알츠하이머 질병을 진단하는 키트 개발사의 경우 제품화한 알츠하이머 조기진단 키트(Nymox-alzheimer-urine test kit)가 임상실험에서 성공하자 그 주가가 두 배 가량 증가하였음을 보고하였다. 이렇게 알츠하이머 질병 진단 키트의 시장규모가 크고 수요가 절실한 상황에서 소변보다 위생적이고 편리한 혈액 채취를 통한 알츠하이머 진단 키트의 국내 기술 개발은 첨단 미래 의료 진단 기기 사업에 활용되어 고부가가치를 창출하고 상당한 경제적 파급효과를 가져올 것이다.

## 감 사

This research was supported by Kyungpook National University Bokhyeon Research Fund, 2015.

## References

1. R. J. Bateman, C. Xiong, T. L. S. Benzinger, A. M. Fagan, A. Goate, N. C. Fox, D. S. Marcus, N. J. Cairns, X. Xie, T. M. Blazey, D. M. Holtzman, A. Santacruz, V. Buckles, A. Oliver, K. Moulder, P. S. Aisen, B. Ghetti, W. E. Klunk, E. McDade, R. N. Martins, C. L. Masters, R. Mayeux, J. M. Ringman, M. N. Rossor, P. R. Schofield, R. A. Sperling, S. Salloway, and J. C. Morris, Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease, *N. Engl. J. Med.*, **367**, 795-804 (2012).
2. J. Holger, Memory loss in Alzheimer's disease, *Dialogues Clin. Neurosci.*, **15**, 445-454 (2013).
3. B. Dubois, H. Hampel, H. H. Feldman, P. Scheltens, P. Aisen, S. Andrieu, H. Bakardjian, H. Benali, L. Bertram, K. Blennow, K. Broich, E. Cavedo, S. Crutch, J.-F. Dartigues, C. Duyckaerts, S. Epelbaum, G. B. Frisoni, S. Gauthier, R. Genthon, A. A. Gouw, M.-O. Habert, D. M. Holtzman, M. Kivipelto, S. Lista, J.-L. Molinuevo, S. E. O'Bryant, G. D. Rabinovici, C. Rowe, S. Salloway, L. S. Schneider, R. Sperling, M. Teichmann, M. C. Carrillo, J. Cummings, and J. C. R. Jack, Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria, *Alzheimers Dement.*, **12**, 292-323 (2016).
4. A. Accorroni, F. S. Giorgi, R. Donzelli, L. Lorenzini, C. Prontera, A. Saba, A. Vergallo, G. Tognoni, G. Siciliano, F. Baldacci, U. Bonuccelli, A. Clerico, and R. Zucchi, Thyroid hormone levels in the cerebrospinal fluid correlate with disease severity in euthyroid patients with Alzheimer's disease, *Endocrine*, **55**, 981-984 (2017).
5. L. Liu, N. Xia, and J. Wang, Potential applications of SPR in early diagnosis and progression of Alzheimer's disease, *RSC Adv.*, **2**, 2200-2204 (2012).
6. S. A. Park, J. H. Kim, H. J. Kim, T. E. Kim, Y.-J. Kim, D. H. Lee, J. H. Park, W. S. Chae, S. J. Yim, S. W. Seo, D. L. Na, and S. H. Choi, Preliminary study for a multicenter study of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers, *Dement. Neurocogn. Disord.*, **12**, 1-8 (2013).
7. W. Zhou, P.-J. J. Huang, J. Ding, and J. Liu, Aptamer-based bio-

- sensors for biomedical diagnostics, *Analyst*, **139**, 2627-2640 (2014).
8. L. Y. Yeo, H.-C. Chang, P. P. Y. Chan, and J. R. Friend, Microfluidic devices for bioapplications, *Small*, **7**, 12-48 (2011).
  9. G.-J. Ye, R. A. Oshins, F. N. Rouhani, M. L. Brantly, and J. D. Chulay, Development, validation and use of ELISA for antibodies to human alpha-1 antitrypsin, *J. Immunol. Methods.*, **388**, 18-24 (2013).
  10. H. Li, C. Ya, X. Wu, Z. Ye, and G. Li, Peptide-based electrochemical biosensor for amyloid  $\beta$ 1-42 soluble oligomer assay, *Talanta*, **93**, 358-363 (2012).
  11. A. Olaru, C. Bala, N. J.-Renault, and H. Y. A.-Enein, Surface plasmon resonance (SPR) biosensors in pharmaceutical analysis, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **45**, 97-105 (2015).
  12. H. Englund, D. Sehlin, A.-S. Johansson, L. N. G. Nilsson, P. Gellerfors, S. Paulie, L. Lannfelt, and F. E. Pettersson, Sensitive ELISA detection of amyloid- $\beta$  protofibrils in biological samples, *J. Neurochem.*, **103**, 334-345 (2007).
  13. S. Levy, M. McConville, G. A. Lazaro, and P. Averbach, Competitive ELISA studies of neural thread protein in urine in Alzheimer's disease, *J. Clin. Lab. Anal.*, **21**, 24-33 (2007).
  14. F. S. Diba, S. Kim, and H. J. Lee, Amperometric bioaffinity sensing platform for avian influenza virus proteins with aptamer modified gold nanoparticles on carbon chips, *Biosens. Bioelectron.*, **72**, 355-361 (2015).
  15. J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, Surface plasmon resonance sensors: review, *Sens. Actuators B*, **54**, 3-15 (1999).
  16. R. M. Corn and S. C. Weibel, Fourier transform surface plasmon resonance in *Handbook of vibrational spectroscopy*, vol. **2**, J. M. Chalmers and P. R. Griffiths (eds), John Wiley & Sons, Ltd, 1057-1064 (2006).
  17. J. M. Brockman, B. P. Nelson, and R. M. Corn, Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic films, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **51**, 41-63 (2000).
  18. K. M. Mayer and J. H. Hafner, Localized surface plasmon resonance sensors, *Chem. Rev.*, **111**, 3828-3857 (2011).
  19. C. M. Cho, S. H. Kim, S. M. Yoon, Y. H. Ko, J. P. Jun, and J. H. Soung, Biomarker development for the diagnosis of Alzheimer's disease, *Public Health Wkly. Rep.*, **8**, 618-621 (2015).
  20. B. Olsson, R. Lautner, U. Andreasson, A. Ohrfelt, E. Portelius, M. Bjerke, M. Holta, C. Rosen, C. Olsson, G. Strobel, E. Wu, K. Dakin, M. Petzold, K. Blennow, and H. Zetterberg, CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Neurol.*, **15**, 673-684 (2016).
  21. M. Thambisetty and S. Lovestone, Blood-based biomarkers of Alzheimer's disease: challenging but feasible, *Biomark. Med.*, **4**, 65-79 (2010).
  22. K. Blennow and H. Hampel, CSF markers for incipient Alzheimer's disease, *Lancet Neurol.*, **2**, 605-613 (2003).
  23. C. Humpel, Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease, *Trends Biotechnol.*, **29**, 26-32 (2011).
  24. A. L. Baird, S. Westwood, and S. Lovestone, Blood-based proteomic biomarkers of Alzheimer's disease pathology, *Front Neurol.*, **6**, 1-16 (2015).
  25. M. Ramakrishnan, K. K. Kandimalla, T. M. Wengenack, K. G. Howell, and J. F. Poduslo, Surface plasmon resonance binding kinetics of Alzheimer's disease amyloid  $\beta$  peptide-capturing and plaque-binding monoclonal antibodies, *Biochemistry*, **48**, 10405-10415 (2009).
  26. F. S. Diba, S. Kim, and H. J. Lee, Electrochemical immunoassay for amyloid-beta 1-42 peptide in biological fluids interfacing with a gold nanoparticle modified carbon surface, *Catal. Today*, <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.02.039>.
  27. S. Kim and H. J. Lee, Direct detection of  $\alpha$ -1 antitrypsin in serum samples using surface plasmon resonance with a new aptamer-antibody sandwich assay, *Anal. Chem.*, **87**, 7235-7240 (2015).
  28. S. Kim, A. W. Wark, and H. J. Lee, Femtomolar detection of tau proteins in undiluted plasma using surface plasmon resonance, *Anal. Chem.*, **88**, 7793-7799 (2016).
  29. K. Hegnerová, M. Bocková, H. Vaisocherová, Z. Křištofiková, J. Řičný, D. Řípková, and J. Homola, Surface plasmon resonance biosensors for detection of Alzheimer disease biomarker, *Sens. Actuators B*, **139**, 69-73 (2009).
  30. L. Velayudhan, R. Killick, A. Hye, A. Kinsey, A. Guntert, S. Lynham, M. Ward, R. Leung, A. Lourdasamy, A. W. M. To, J. Powell, and S. Lovestone, Plasma transthyretin as a candidate marker for Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **28**, 369-375 (2012).
  31. M. Thambisetty, Y. An, A. Kinsey, D. Koka, M. Saleem, A. Guntert, M. Kraut, L. Ferrucci, C. Davatzikos, S. Lovestone, and S. M. Resnick, Plasma clusterin concentration is associated with longitudinal brain atrophy in mild cognitive impairment, *NeuroImage*, **59**, 212-217 (2012).
  32. S. Tonello, M. Serpelloni, N. F. Lopomo, G. Abate, D. L. Uberti, and E. Sardini, Screen-printed biosensors for the early detection of biomarkers related to Alzheimer disease: preliminary results, *Procedia Eng.*, **168**, 147-150 (2016).
  33. H. R. Jang, A. W. Wark, S. H. Baek, B. H. Chung, and H. J. Lee, Ultrasensitive and ultrawide range detection of a cardiac biomarker on a surface plasmon resonance platform, *Anal. Chem.*, **86**, 814-819 (2014).
  34. M. J. Kwon, J. Lee, A. W. Wark, and H. J. Lee, Nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance detection of proteins at attomolar concentrations: comparing different nanoparticle shapes and sizes, *Anal. Chem.*, **84**, 1702-1707 (2012).
  35. S. Zeng, D. Baillargeat, H.-P. Ho, and K.-T. Yong, Nanomaterials enhanced surface plasmon resonance for biological and chemical sensing applications, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 3426-3452 (2014).
  36. K. Henriksen, Y. Wang, M. G. Sorensen, N. Barascuk, J. Suhy, J. T. Pedersen, K. L. Duffin, R. A. Dean, M. Pajak, C. Christiansen, Q. Zheng, and M. A. Karsdal, An enzyme-generated fragment of tau measured in serum shows an inverse correlation to cognitive function, *PLoS ONE*, **8**, 1-7 (2013).
  37. V. P.-Grijalba, P. Pesini, I. Monleon, M. Boada, L. Tarraga, A. R.-Laza, P. M.-Lage, I. S.-Jose, and M. Sarasa, Several direct and calculated biomarkers from the amyloid- $\beta$  pool in blood are associated with an increased likelihood of suffering from mild cognitive impairment, *J. Alzheimers Dis.*, **36**, 211-219 (2013).
  38. Y. Liu, Q. Zhou, and A. Revzin, An aptasensor for electrochemical detection of tumor necrosis factor in human blood, *Analyst*, **138**, 4321-4326 (2013).
  39. M. Vestergaard, K. Kerman, M. Saito, N. Nagatani, Y. Takamura, and E. Tamiya, A rapid label-free electrochemical detection and kinetic study of Alzheimer's amyloid beta aggregation, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11892-11893 (2005).

40. I. Abdulhalim, M. Zourob, and A. Lakhtakia, Surface plasmon resonance for biosensing: A mini-review, *Electromagnetics*, **28**, 214-242 (2008).
41. T. Endo, K. Kerman, N. Nagatani, Y. Takamura, and E. Tamiya, Label-free detection of peptide nucleic acid-DNA hybridization using localized surface plasmon resonance based optical biosensor, *Anal. Chem.*, **77**, 6976-6984 (2005).
42. X. D. Hoa, A. G. Kirk, and M. Tabrizian, Towards intergrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress, *Biosens. Bioelectron.*, **23**, 151-160 (2007).
43. S.-H. Jung, J.-W. Jung, I.-B. Suh, J. S. Yuk, W.-J. Kim, E. Y. Choi, Y.-M. Kim, and K.-S. Ha, Analysis of C-reactive protein on amide-linked *n*-hydroxysuccinimide-dextran arrays with a spectral surface plasmon resonance biosensor for serodiagnosis, *Anal. Chem.*, **9**, 5703-5710 (2007).
44. Y. Li, H. J. Lee, and R. M. Corn, Detection of protein biomarkers using RNA aptamer microarrays and enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging, *Anal. Chem.*, **79**, 1082-1088 (2007).
45. A. Bini, S. Centi, S. Tombelli, M. Minunni, and M. Mascini, Development of an optical RNA-based aptasensor for C-reactive protein, *Anal. Bioanal. Chem.*, **90**, 1077-1086 (2008).
46. J. Ladd, A. D. Taylor, M. Piliarik, J. Homola, and S. Jiang, Label-free detection of cancer biomarker candidates using surface plasmon resonance imaging, *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 1157-1163 (2009).
47. H. Vaisocherova, V. M. Faca, A. D. Taylor, S. Hanash, and S. Jiang, Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels in cancer and control human sera, *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 2143-2148 (2009).
48. Z. Altintas, Y. Uludag, Y. Gurbuz, and I. E. Tothill, Surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of the cancer biomarker carcinoembryonic antigen, *Talanta*, **86**, 377-383 (2011).
49. Q. Zhao, R. Duan, J. Yuan, Y. Quan, H. Yang, and M. Xi, A reusable localized surface plasmon resonance biosensor for quantitative detection of serum squamous cell carcinoma antigen in cervical cancer patients based on silver nanoparticles array, *Int. J. Nanomed.*, **9**, 1097-1104 (2014).
50. J.-F. Masson, Surface plasmon resonance clinical biosensors for medical diagnostics, *ACS Sens.*, **2**, 16-30 (2017).
51. J. Homola, Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species, *Chem. Rev.*, **108**, 462-493 (2008).
52. A. J. Haes, W. P. Hall, L. Chang, W. L. Klein, and R. P. V. Duyne, A localized surface plasmon resonance biosensor: first steps toward an assay for Alzheimer's disease, *Nano Lett.*, **4**, 1029-1034 (2004).
53. A. J. Haes, L. Chang, W. L. Klein, and R. P. V. Duyne, Detection of a biomarker for Alzheimer's disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 2264-2271 (2005).
54. S. Shekhar, R. Kumar, N. Rai, V. Kumar, K. Singh, A. D. Upadhyay, M. Tripathi, S. Dwivedi, A. B. Dey, and S. Dey, Estimation of tau and phosphorylated tau181 in serum of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment patients, *PLoS ONE*, **11**, 1-10 (2016).
55. H. J. Lee, A. W. Wark, and R. M. Corn, Microarray methods for protein biomarker detection, *Analyst*, **133**, 975-983 (2008).
56. M. D. Sonawane and S. B. Nimse, Surface modification chemistries of materials used in diagnostic platforms with biomolecules, *J. Chem.*, **2016**, 1-19 (2016).