

체외 진단을 위한 나노구조 기반 바이오센서

홍유찬

한국기계연구원 의료기계연구실

Nanostructure based biosensor for in vitro diagnostics

Yoochan Hong*

Department of Medical Device, Korea Institute of Machinery and Materials (KIMM)

*ychong1983@kimm.re.kr

Abstract

In this presentation, I would like to present studies related to nanostructure based biosensors for use as in vitro diagnostic medical devices. In particular, I would like to present research related to nanostructures that have been conducted so far, as well as research related to the development of surface-enhanced Raman scattering substrates using nanostructures that have recently been conducted. Various surface modification techniques have been used to determine cancer aggressiveness, diagnose multiple qualities through liquid biopsy, and determine normal/aging exosomes. In addition to the field of developing in vitro diagnostic medical devices that include surface modification technology, I would like to present cases of developing fully automated in vitro diagnostic medical devices.

1. 연구 배경

aptamer은 특정 표적 분자에 대한 높은 친화성과 특이성을 가진 단일 가닥 DNA 또는 RNA 시약이다. 단클론 항체와 비교하여 DNA aptamer은 열 및 pH 안정성, 작은 크기, 간단한 화학 합성을 포함한 몇 가지 이점을 가지고 있다. 즉, 적은 비용으로 쉽고 재현 가능하게 생산 및 수정할 수 있다. aptamer 기반 측면 흐름 분석, 효소 연결 올리고뉴클레오파이드 분석(ELONA) 및 aptamer 기반 전계 효과 트랜지스터(FET) 바이오 센서와 같은 여러 DNA aptamer 기반 분석 접근법이 이미 개발되었다. 그러나, 다양한 감지 플랫폼에 aptamer을 통합함으로써 초민감 감지 방법이 달성되었지만, 이들은 일반적으로 aptamer 시퀀스의 5' 또는 3' 말단에서 신호 보고를 위한 라벨을 가진 aptamer 수정이 필요하며, 이는 화학 합성 측면에서 생산 비용을 증가시킨다.

그래서, 본 연구진은 레이블이 없는 표면 강화 라만 산란(SERS) 기반 aptamer 센서를 개발했다. 지난 10년 동안, SERS 기반의 aptamer 센서는 소분자 표적에서 단백질 표적에 이르는 다양한 크기의 분석물의 민감한 검출을 위해 집중적으로 연구되었다 [1]. 라만 산란은 본질적으로 신호가 약하기 때문에 생물학적 응용에 본질적으로 이상적이지는 않지만, SERS를 사용하면 최대 10^8 배의 신호 향상을 제공할 수 있다. 이러한 향상은 나노 구조의 금속 기질 표면에서 분석 물질 분자의 분자 진동과 국부적으로 증폭된 전자기장에서 비롯되었습니다 [2]. 이 연구에서, 우리는 강력한 고처리량 aptamer 선별 접근법인 입자 디스플레이를 사용한 네 번의 선별을 통해 SARS-CoV-2 스파이크(S) 단백질에 대항하는 두 개의 새로운 DNA aptamer를 분리했습니다 [3]. S 단백질은 SARS-CoV-2 표면에 위치하며 COVID-19 진단 테스트에 사용되는 주요 항원으로, aptamer가 바이러스 표면에 접근하고 바이러스 분석 없이 신속하게 탐지할 수 있다. 두 개의 aptamer가 결합되었다.

은 나노포레스트(SNF) 기판 위에 있다. SNF는 3차원 나노구조로 제작되어 aptamer의 고유한 특성을 사용하여 라만 신호의 효과적인 향상을 달성했다. 라벨이 없는 이 aptamer 접근법을 사용하여, 우리는 100 fg/mL(240 aM)의 검출 한계로 재조합 삼량체 S 단백질의 초민감 검출을 달성할 수 있었다. 우리는 야생형 우한 변종뿐만 아니라

새로운 델타 및 오미크론 변종 모두에 대해 임상 샘플에서 우수한 정확도로 이 검사의 진단 성능을 추가로 검증할 수 있었다.

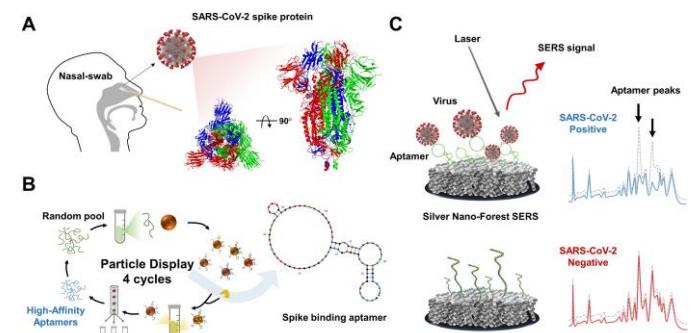


그림 1. 비표지 SERS 기반 aptamer 플랫폼 개발 개략도

2. 연구 방법

이전 연구에서, 우리 그룹은 나노 스퍼터링 방법을 사용하여 SNF 기판의 제작을 확립했다. 표면개질이 없는 SERSpace 기판은 광림정공에서 제공하였다. 간단히 말해서, 나노구조용 나노 스퍼터링 기반의 제조 시스템을 적용하여 나노 다공성은 구조물을 제조하고, SNF 기판을 6인치 실리콘 웨이퍼 상에서 제조하였다. 은 나노 다공성 구조 기판을 제작하기 위한 기본 조건은 다음과 같다. 나노 스퍼터링 시스템의 조리개 직경과 길이는 각각 5mm와 45mm였다. SNF 기판을 제작하기 위한 추가 조건이 고려되었다. 클러스터링 챔버 내 스퍼터링 압력 400mTorr, 클러스터 소스에 대한 DC 전원 300W, 클러스터 소스에 대한 온도 20°C. 아르곤과 헬륨은 각각 85 sccm와 15 sccm의 가스 유량이 사용되었다. 또한, 6인치 웨이퍼 위의 완성된 기판을 4×4mm² 크기로 절단했다.

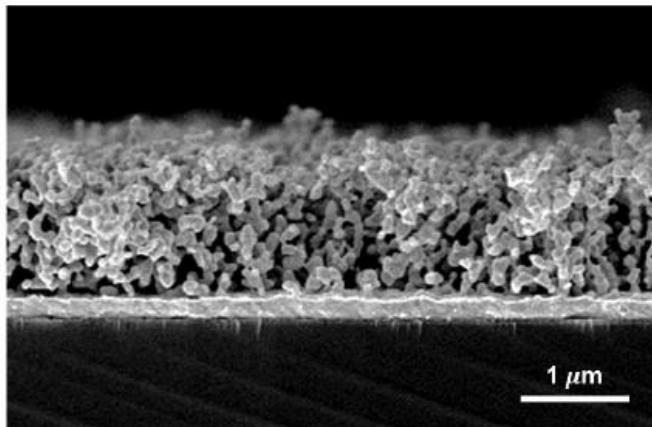


그림 2. 제작한 SERS 기판의 단면도

3. 연구 결과

우리는 $1,587 \text{ cm}^{-1}$ 라만 신호를 사용하여 각각 240 fM과 240 aM의 검출 한계를 확인했다. 라만 신호가 감소하는 이유는 다음과 같다. 압타머 가닥의 3' 부분은 SARS-CoV-2S 단백질이 결합하기 전 SNF 표면에 가깝다. 결합 후, 압타머-단백질 복합체로 구성된 3D 구조가 형성되며, 이는 압타머의 3' 부분이 SNF 표면으로부터 멀어짐에 따라 라만 신호를 감소시킬 것으로 예상된다. 이 결과는 SNF 기질이 효과적인 SERS 기질로 사용될 수 있다는 것과 이 압타센서가 우리가 최고의 압타머를 사용할 때 SARS-CoV-2S 단백질의 검출에 가장 민감하다는 것을 확인했다.

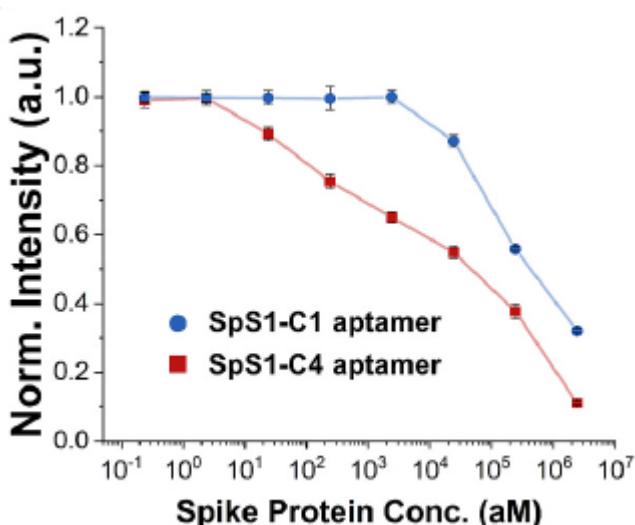


그림 3. 시험관 상 압타머 성능 비교

2019년 SARS-CoV-2의 최초 발견 이후, 조상 우한 야생형 변종은 알파(B.1.1.7), 베타(B.1.351), 감마(P1), 엡실론(B.1.429), 델타(B.1.617.2) 및 오미크론(B.1.5.1.29) 변형을 포함하여 전달성, 병원성 및 잠재적 면역 탈출 가능성이 변경된 다수의 변형을 가진 변종을 발생시켰다. 이를 위해 다양한 상업용 RAT이 개발되었지만, 이들 중 일부는 감염된 지 며칠 후에도 현재 널리 퍼져 있는 오미크론 변종을 탐지할 수

없음이 입증되었다. 이는 COVID-19의 확산을 관리하는 데 심각한 문제로 남아 있으며, 이 바이러스가 여전히 새로운 혈통의 출현에 대한 풍부한 기회를 가지고 있다는 점을 감안할 때 광범위한 변형을 감지할 수 있는 진단 도구가 분명히 필요다. 따라서 COVID-19 환자로부터 수집한 실제 임상 샘플을 테스트하기 위해 SpS1-C4를 사용하여 압타센서 플랫폼의 유용성을 검증했다. 향상된 정확도를 고려하여 SpS1-C4는 SpS1-C1 압타머보다 1000배 더 민감하기 때문에 임상 샘플을 검증하기 위해 선택되었다. 세종 보건환경연구원에서 얻은 임상 비인두 검체 80개를 사용했다. 알려진 음성 20개와 야생형, 델타 및 오미크론 변종을 가진 알려진 양성 검체 각각 20개를 사용했다.

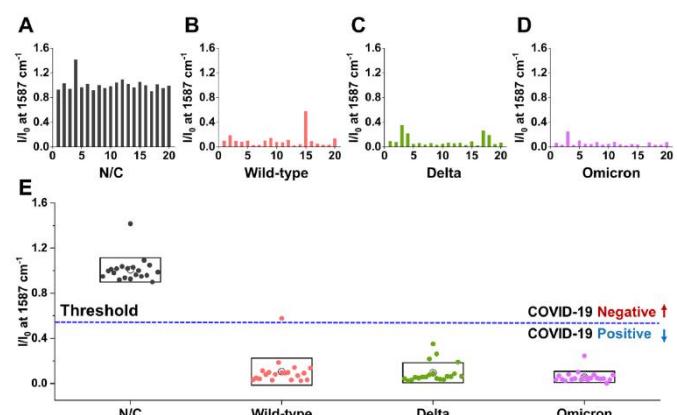


그림 4. 환자 시료를 이용한 압타센서 실증

4. Acknowledgements

이 연구는 한국기계연구원 기본사업 (NK244D)과제의 지원을 받아 수행하였음.

5. 참고 문헌

- [1] E. Scatena, S. Baigueara, and C. D. Gaudio. "Raman Spectroscopy and Aptamers for a Label-Free Approach: Diagnostics and Application Tools." *Journal of Healthcare Engineering*, Vol 2019, p.12815789, 2019
- [2] O. Ambartsumyan, D. Gribanyov, V. Kukushkin, A. Kopylov, and E. Zavyalova. " SERS-Based Biosensors for Virus Determination with Oligonucleotides as Recognition Elements." *International Journal of Molecular Sciences*, Vol 21, No. 9, p.3373, 2020
- [3] J. Wang, Q. Gong, N. Maheshwari, M. Einsenstein, M. L. Arcila, K. S. Kosik, and H. T. Soh. " Particle Display: A Quantitative Screening Method for Generating High-Affinity Aptamers." *Angewante Chemie*, Vol 126, No.19, p4896-4901, 2014