

# 국소표면 플라즈몬공명 바이오 센서

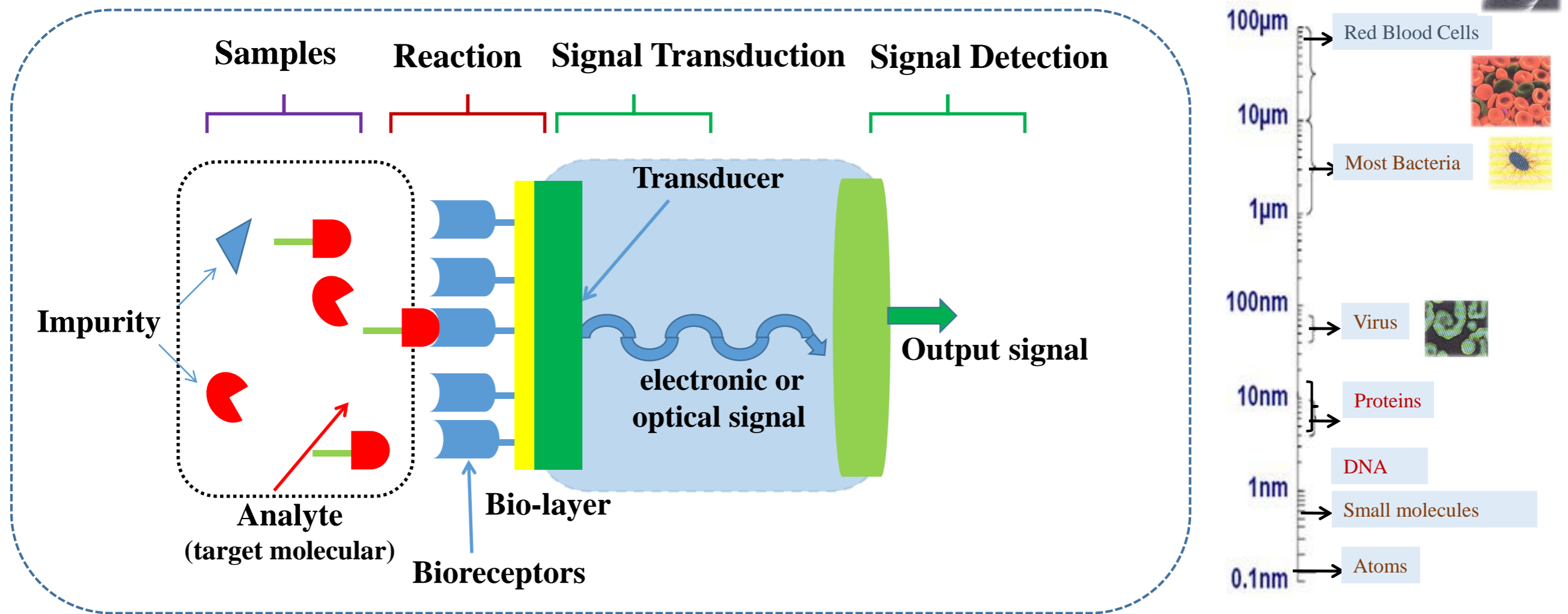
정미 (중앙대학교 신기능 이미징 연구소)

- 국소표면 플라즈몬 공명(LSPR, Localized Surface Plasmon Resonance)은 금속 나노구조 표면에서 빛과 상호작용에 의해 발생한다. 빛이 파장보다 작은 크기의 금속 나노구조 표면에 조사될 때, 금속 표면과 유전체의 경계에서 특정한 파장에서 빛과 전자와 상호작용에 의해 발생하는 전자들의 집단 진동 현상인 표면 플라즈몬(surface plasmon)에 의한 공명현상이 발생한다[1].
- 바이오 센싱분야에서 해결해야 할 가장 큰 문제는 표지자(label-free)없이 고감도의 센싱기법을 개발하는 것이다. 바이오물질의 크기는 100 nm 이하 크기의 바이러스(virus), ~10 nm의 단백질(protein), DNA (Deoxyribonucleic acid), 항원(antigen), 항체(antibody)와 같이 그 크기가 매우 작아 이들의 특성과 항원-항체반응(reaction)에 대한 연구를 하기 위하여는 이들을 검출(detection)하는 고감도 센싱기법이 필요하다.
- 국소표면 플라즈몬 바이오센서는 금속의 주위의 환경(environment)변화에 따른 미세한 굴절률 변화를 LSPR파장의 변화를 측정하여 바이오물질의 미세한 반응을 검출하려는 바이오 센싱기법이며 민감도와 선택성을 높이려는 연구로서 금속나노구조 배열의 국소표면 플라즈몬의 특성을 활용한 바이오센서에 대한 연구가 진행되고 있다[2].
- 국소표면 플라즈몬 공명 나노센서는 streptavidin[3], 알츠하이머 질병진단[4,5], 가벼운 분자[6], 이온과 단백질 변형[7], 다른 바이오 물질의 인식사건(biorecognition events)[8-10]의 검출을 위한 플랫폼으로 이용되었고, 이들 나노입자표면에 표적분석물질의 결합에 의해 유도된 LSPR파장변화를 모니터링하여 바이오센서로 응용하는 연구가 진행되고 있다.
- 금속 나노구조표면에서 표면에 고정된 항체 위에 결합하는 항원에 의해 굴절률이 변화하고 이에 따른 공명 파장의 변화(shift)가 발생한다. 금속표면에 고정된 항체 위에 결합된 항원의 농도에 따른 공명파장의 변화가 비례함을 이용하여 결합한 항원의 농도를 측정할 수 있다.
- 본고에서는 국소표면플라즈몬 공명에 대하여 알아보고, 국소표면플라즈몬 공명특성을 활용한 바이오센서의 응용에 대한 연구에 대하여 간략히 살펴보고자 한다.

# 1. What is biosensors?

➤ 바이오 센서는 분석물질 (analyte)의 검출을 위해 생물학적 요소 (biological component)가 물리화학적인 검출기와 결합된 분석장치(analytical device)이다.

## ➤ Principle of Biosensor



A device that uses biological **detection** elements( Antibody, DNA, Aptamer, Enzyme) to detect the presence and abundance of various biological analytes (DNA, Antigen, Bacteria)

## 2. Detection of Biomolecular Binding

금속박막을 얇게 증착하여 열처리로 어닐링 하여 제조된 나노아일이랜드 구조위에 Biotin을 고정하고 그위에 수용기(receptor)로 Streptavidin(STA)을 고정한 후, 검출물질(analyte)로 바이오틴이 부착된 소혈청 알부민 [biotinylated bovine serum albumin (Bio-BSA)] 의 결합을 모니터링하기 위한 연구를 진행하였다. 그림 1은 나노아일이랜드 구조위에 Bio-BSA 바이오품질 증착과정 모식도와 그림2는 Bio-BSA 바이오품질 증착한 후, STA-gold 나노 입자를 Bio-BSA 바이오품질위에 농도별로 도포한 흡수스펙트라이다. Bio-BSA농도에 따른 LSPR 스펙트라 변화그래프의 피크의 이동 정도를 정량화하여 바이오센서에 응용할수 있다.

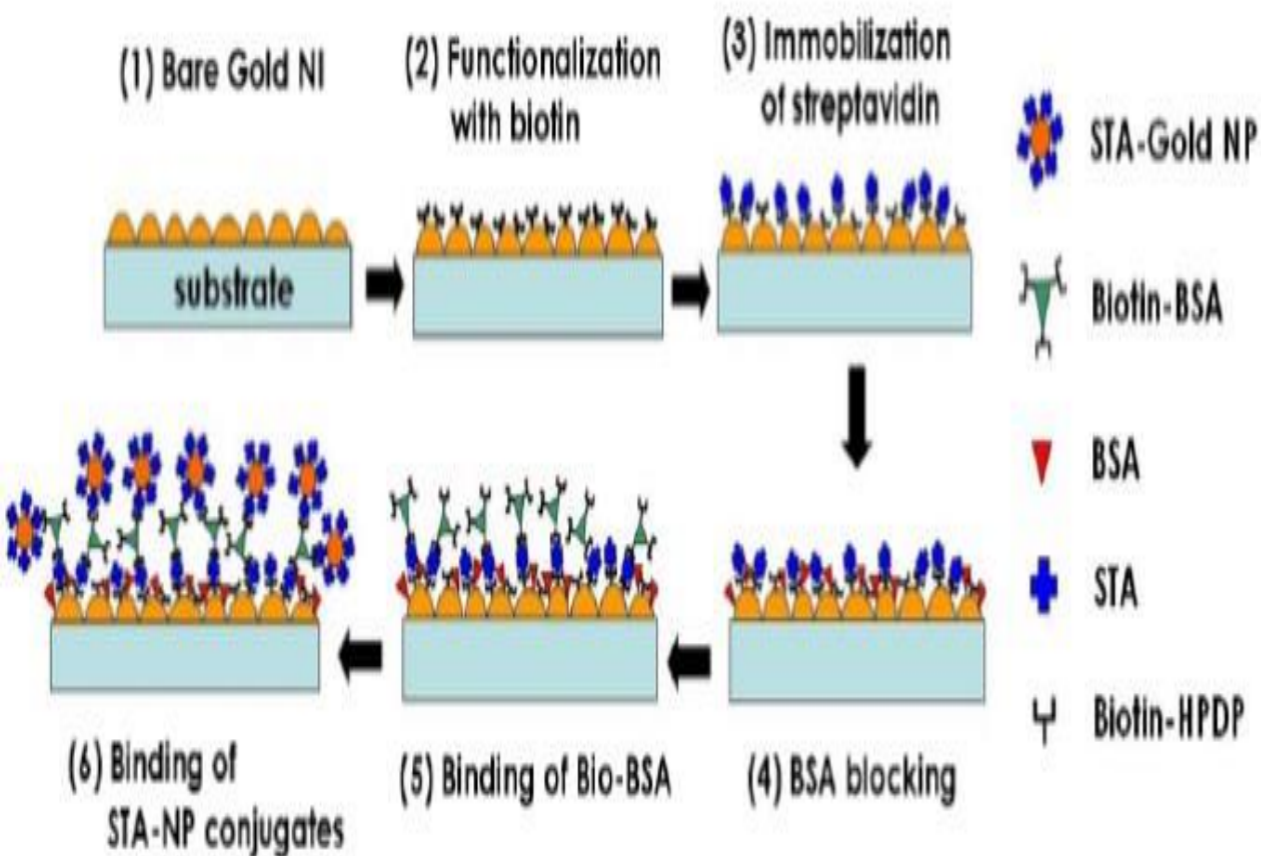


Fig. 1. Schematic illustration representing the modification procedure of gold nano-islands (NI) surfaces and the bindings of biomolecules.

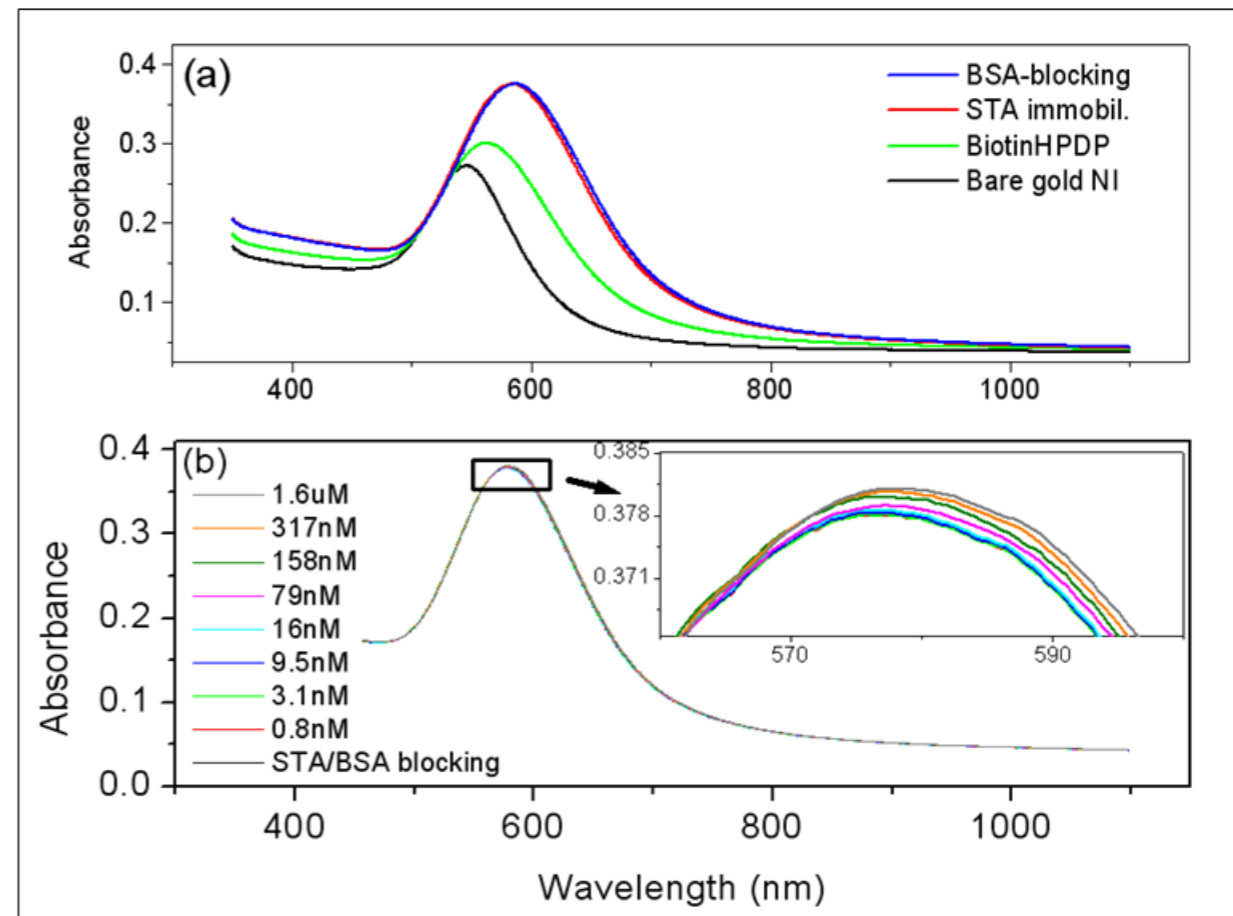
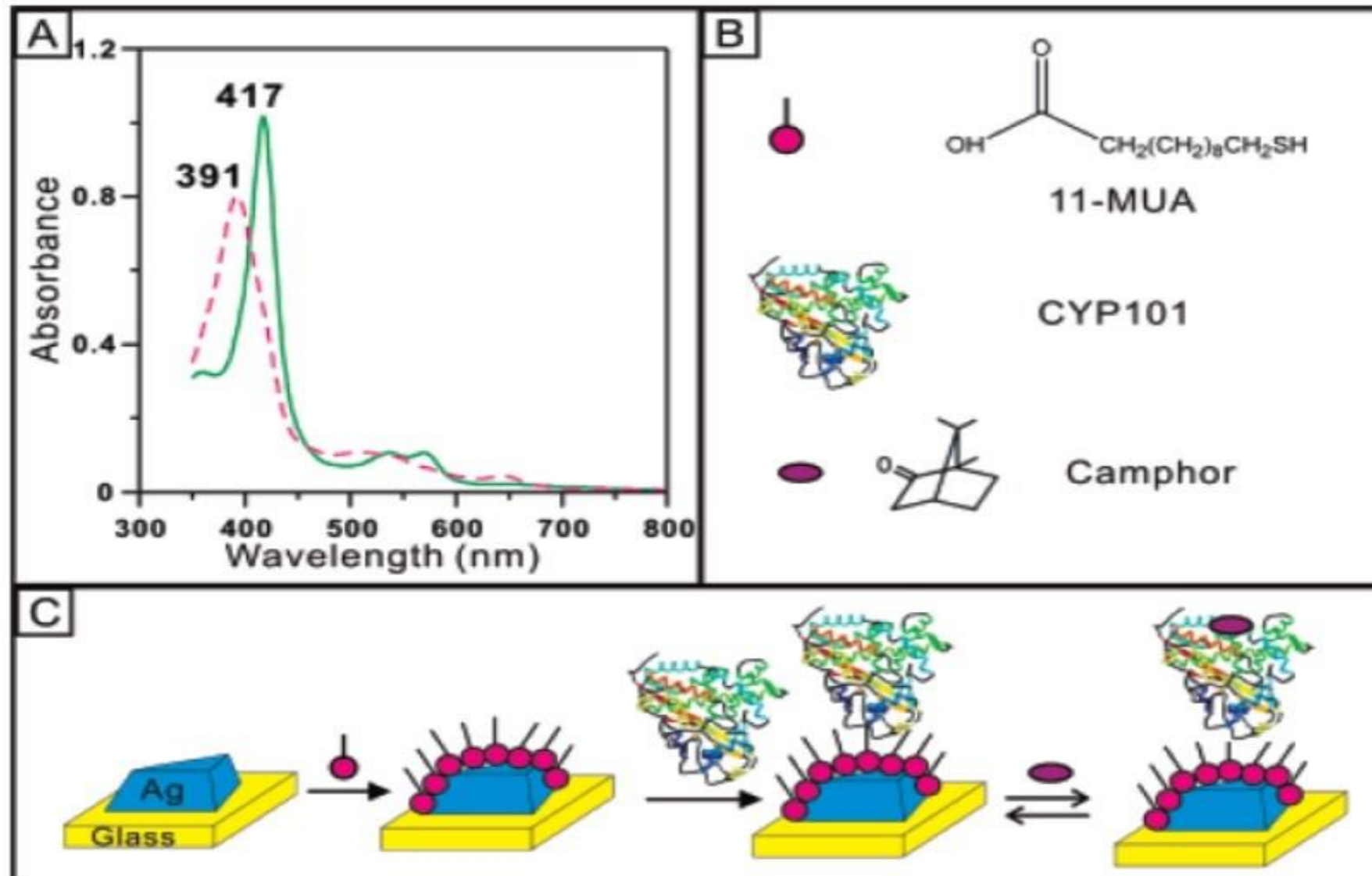


Fig.2. Changes in the absorption spectra of (a) the gold NI film due to the modifications steps which proceed from bare to BSA-blocking and (b) the gold NI films after the incubation of various concentrations of Bio-BSA following BSA-blocking. The peak region of LSPR band was enlarged in the inset plot.

### 3. Detection of Low Molecular Weight

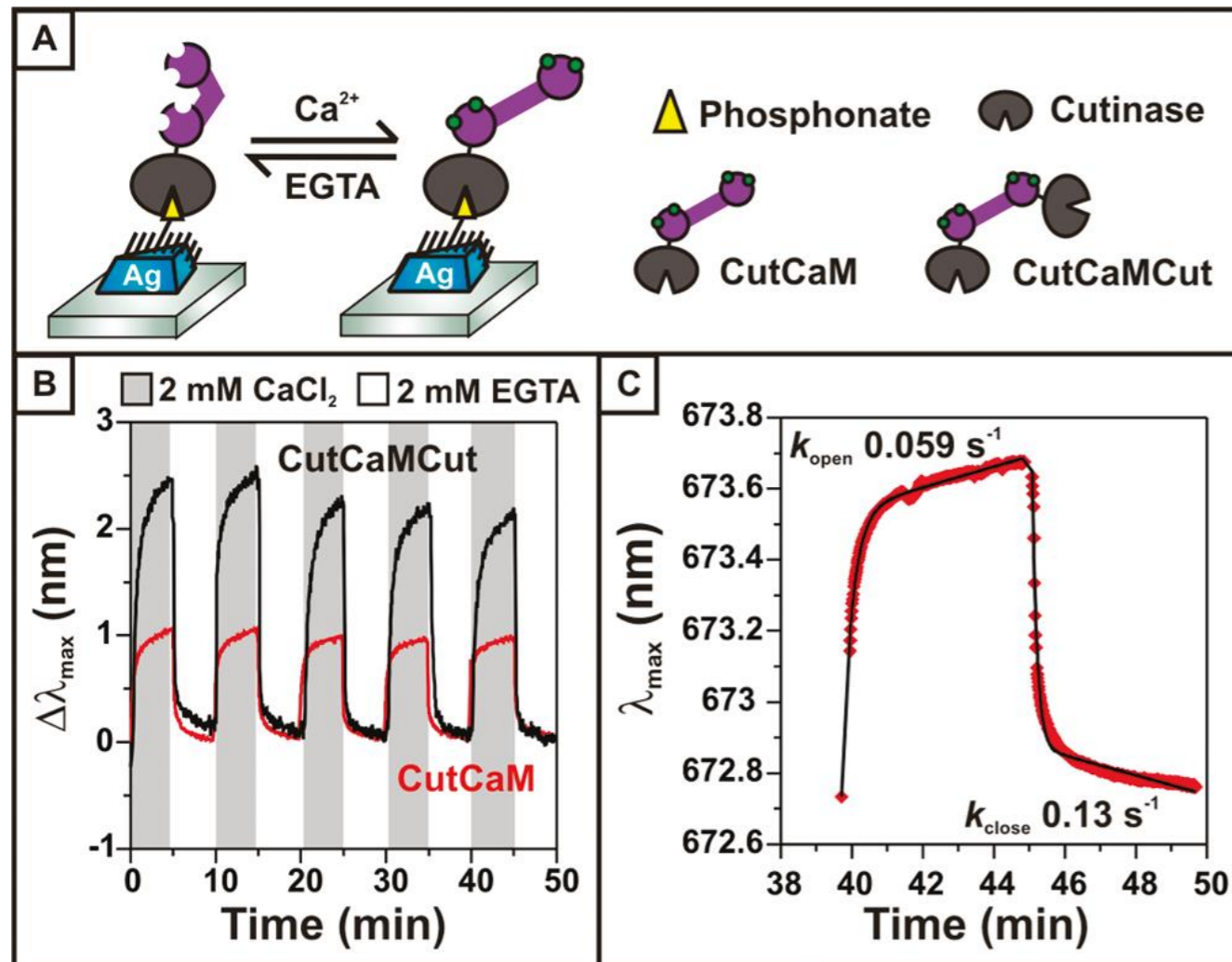
국소표면플라즈몬 공명은 나노입자에 흡착된 단백질 수용기에 낮은 분자량 (molecular Weight) 의 분석물질의 결합을 검출할 수 있는 가능성을 열었다. Cytochrome P450s 은 스테로이드 호르몬의 바이오 합성(biosynthesis )에 필요한 물질이고 생체이물질(xenobiotics )의 대사에 포함되어 있다. 산화와 환원에 관여하는 색소단백질인 CYP101(cytochrome P450cam protein)에 장뇌(camphor)[(C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O, molecular weight (Mr) ) 152.24 g·mol<sup>-1</sup>)]의 결합에 관한 실험이 진행되었다. LSPR의 공명반응으로 금속나노표면에 흡착된 (CYP101(Fe<sup>3+</sup>)) 단백질 수용기 (receptor)에 작은분자[a small molecule (camphor)]의 분석물질(analyte)의 결합은 LSPR 스펙트라의 변화를 생기게 하였고, 실버나노 센서의 을 검출을 검증하였다.



(A) UV-vis absorption spectra of CYP101(Fe<sup>3+</sup>) (green solid line) with a Soret band at 417 nm (low spin) and camphor-bound CYP101-(Fe<sup>3+</sup>) (pink dashed line) with a Soret band at 391 nm (high spin); (B) schematic notations of 11-MUA, CYP101, and camphor; (C) schematic representation of CYP101 protein immobilized Ag nanobiosensor, followed by binding of camphor. The Ag nanoparticles are fabricated using NL (nanosphere lithography) on a glass substrate.

## 4. Conformation- and Ion-Sensitive LSPR Biosensor

LSPR센서가 단백질의 배좌(conformational)의 변화에 대한 반응을 검출하였다. 이온 민감한 바이오센서에 대한 연구로 단백질 형성변화에 대한 반응을 칼슘결합성 단백질인 칼모듈린(calmodulin)의 표면 결합구조에서 칼슘에 의한 형태변화를 LSPR센서로 관측하였다. 칼슘의 농도에 따라 LSPR의 최대파장의 0.96 nm 적색편이를 보였고, 단백질 원래 구조로 돌아옴에 따라 파장이 원래의 위치로 역이동(reversal)함을 관측하였다. 이 LSPR센서는 칼모듈린 과 특이적 단백질 리간드의 검출과 마찬가지로, 23 $\mu$ M의 칼슘이온을 검출할 수 있었다.

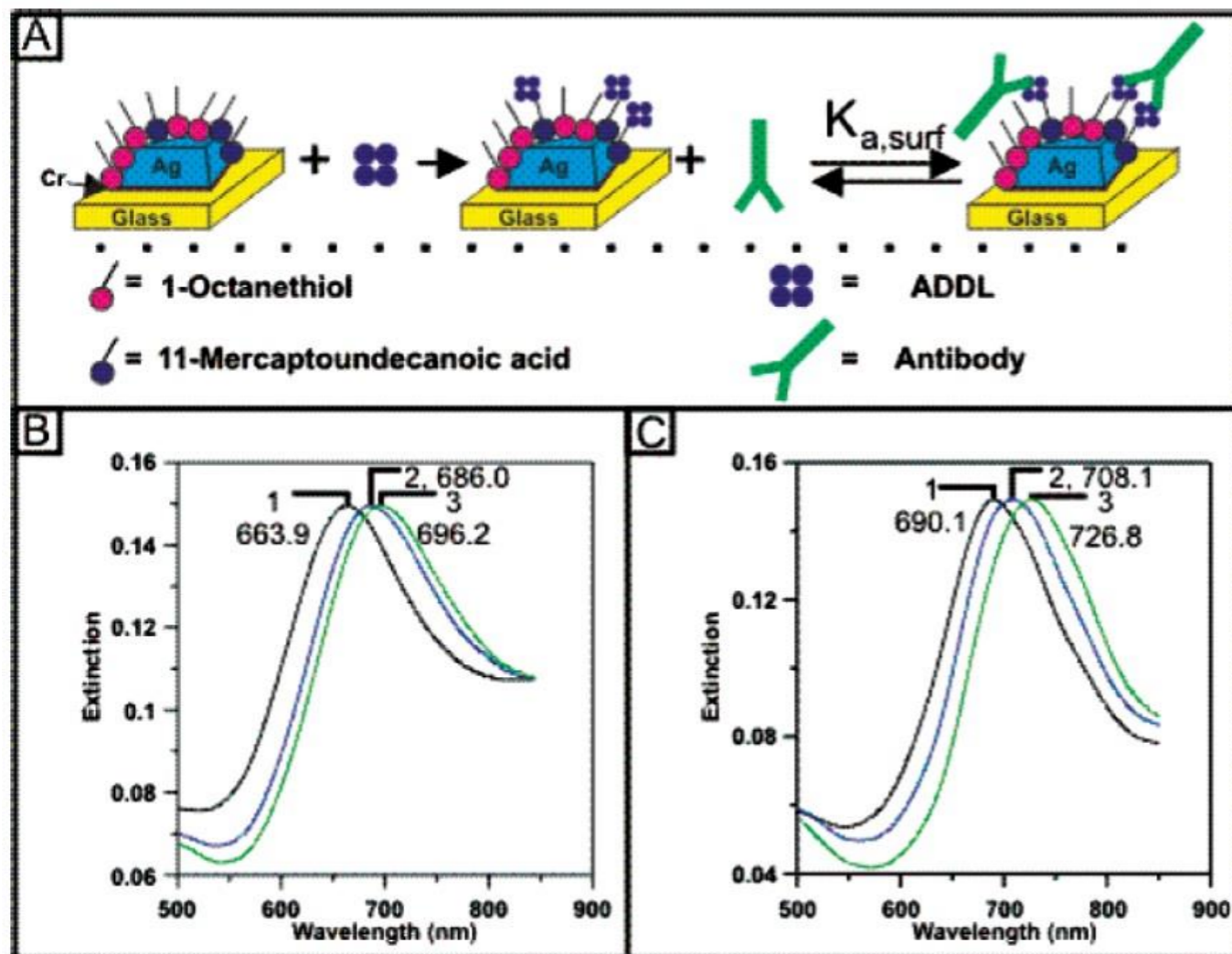


CutCaM conformational changes. (A) Schematic representation of the reversible conformational changes calmodulin undergoes in response to changing calcium concentration. In the presence of calcium (green circles) calmodulin adopts a rigid, extended structure. (B) LSPR  $\lambda_{\text{max}}$  changes plotted over time as calmodulin undergoes conformational changes. LSPR response to CutCaM is plotted in red; LSPR response to the larger CutCaMCut construct described in ref 21 is plotted in black as a comparison. (C) First-order kinetic fit to the CutCaM-induced  $\lambda_{\text{max}}$  changes occurring between 40 and 50 min from the plot in (B). Rate constants for the opening and closing transitions were found to be 0.059 and 0.13  $\text{s}^{-1}$ , respectively.

- Irreversible binding of the calmodulin construct (hereafter CutCaM)
- cutinase-labeled calmodulin (CutCaMCut)

## 5. LSPR biosensor of a Biomarker for Alzheimer's Disease

Ag나노 삼각기둥의 광학특성에 바탕을 둔 LSPR 나노센서는 알츠하이머질병의 진행에 관계 있는 아밀로이드ADDL ( $\beta$ -derived diffusible ligands)와 anti-ADDL항체와의 상호작용을 모니터링 할 수 있다. Anti-ADDL항체의 농도변화에 따라 ADDLs 과 anti-ADDLs 의 상호작용에 대한 결합상수가 LSPR 변이에 의하여 측정되었고, 이에 대한 연구는 앞으로 알츠하이머질병을 정확히 진단하고 치료하는데 도움이 될 것이다.



Design of the LSPR biosensor for anti-ADDL detection. (A) Surface chemistry of the Ag nanoparticle sensor. Surface-confined Ag nanoparticles are synthesized using NSL. The nanoparticles are incubated in a 3:1 1-OT/11-MUA solution to form a SAM. Next, the samples are incubated in 100 mM EDC/100 nM ADDL solution. Finally, incubating the ADDL-coated nanoparticles to varying concentrations of antibody completes an anti-ADDL immunoassay. (B) LSPR spectra for each step of the preparation of the Ag nanobiosensor at a low concentration of anti-ADDL antibody. Ag nanoparticles after modification with (B-1) 1 mM 3:1 1-OT/11-MUA,  $\lambda_{max}$  ) 663.9 nm, (B-2) 100 nM ADDL,  $\lambda_{max}$  ) 686.0 nm, and (B-3) 50 nM anti-ADDL,  $\lambda_{max}$  ) 696.2 nm. All spectra were collected in a N<sub>2</sub> environment. (C) LSPR spectra for each step of the preparation of the Ag nanobiosensor at a high concentration of anti-ADDL. Ag nanoparticles after modification with (C-1) 1 mM 3:1 1-OT/11-MUA,  $\lambda_{max}$  ) 690.1 nm, (C-2) 100 nM ADDL,  $\lambda_{max}$  ) 708.1 nm, and (C-3) 400 nM anti-ADDL,  $\lambda_{max}$  ) 726.8 nm. All spectra were collected in a N<sub>2</sub> environment.

# 국소표면 플라즈몬공명 바이오센서의 전망

- 국소표면 플라즈몬공명 바이오센서에 대한 연구는 단백질, 이온, 면역반응, 질병진단과 같이 다양하게 연구되고 있다. 세계적으로 국소표면 플라즈몬공명 바이오센서에 대한 기술 수준은 아직까지 학문적인 연구 수준으로 대부분 기존에 진행되어 나노구 리소그래피로 제작된 삼각기둥 모양의 금속나노구조 배열을 바이오 플랫폼으로 활용하여 연구하고 있다.
- 국소표면플라즈몬 공명센서는 나노입자에 흡착된 단백질 수용기에 낮은 분자량 (molecular Weight) 의 분석물질의 결합을 검출할 수 있는 가능성을 열었고, LSPR의 공명반응으로 금속나노표면에 흡착된 (CYP101(Fe<sup>3+</sup>)) 단백질 수용기(receptor)에 작은분자[a small molecule (camphor)]의 분석물질(analyte)의 결합은 LSPR 스펙트라의 변화를 생기게 하였고, 실버나노 센서의 을 검출을 검증하였다.
- 금속나노구조위에 고정된 단백질의 배좌(conformational)의 변화에 대한 반응을 LSPR 변화로 검출하였다. 이온 민감한 바이오센서에 대한 연구로 단백질 형성변화에 대한 반응을 칼슘 결합성 단백질인 칼모듈린 (calmodulin)의 표면 결합구조에서 칼슘이온의 농도에 따른 형태변화를 LSPR센서로 관측하였다.
- 국소표면플라즈몬 공명센서는 알츠하이머질병의 진행에 관계 있는 아밀로이드ADDL ( $\beta$ -derived diffusible ligands)와 anti-ADDL항체와의 상호작용을 모니터링 할 수 있다. Anti-ADDL항체의 농도변화에 따라 ADDLs 과 anti-ADDLs 의 상호작용에 대한 결합상수가 측정되었고, 이에 대한 연구는 알츠하이머질병을 조기 진단하여 질병을 치료하는데 도움이 될 것이다.
- 바이오센서에 대한 연구와 생물학 분야의 연구를 밑바탕으로 유해물질 측정 기법을 새로이 접목시켜 보는 수준으로 마이크로 수준의 바이오칩이 개발되었다. 현재 미국, 유럽을 중심으로 약물독성탐지 및 DNA 발현준위 검색, 환경오염 물질 검출 등에 응용되기 시작하고 있으며, 아직 국소표면플라즈몬 공명센서의 나노 바이오칩 실현은 요원하다.
- 바이오센싱 연구는 향후 바이오물질을 고정화하고 LSPR변이를 반응신호 처리할 수 있는 신호 검출 및 처리 기술 등은 약물독성탐지 및 DNA 발현준위 검색, 환경오염 물질 검출 등에 다양하게 응용될 수 있을 것으로 기대되고 있다, 향후 생물분자의 나노구조물질위에 패턴기술을 이용한 집적화를 통해 향후 나노 바이오칩 상용화의 요소기술로 다양한 연구 분야에 활용되어 신산업의 창출 및 융합기술의 발전에 기여할 것으로 기대된다.

## 참고문헌(Reference)

1. K.A. Willets and R.P. Van Duyne, "Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy," *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 267-297 (2007).
2. J. N. Anker, W. P. Hall, O. Lyandres, N. C. Shah, J. Zhao, and R. P., Van Duyne, "Biosensing with plasmonic nanosensors," *Nat. Mater.* **7**, 442-453(2008).
3. H. M. Kim, S. M. Jin, S. K. Lee, M.-G. Kim, and Y.-B. Shin, "Detection of biomolecular binding through enhancement of localized surface plasmon resonance (LSPR) by gold nanoparticles," *Sensors* **9**, 2334-2344(2009).
4. B. Sharma, R R. Frontiera, A.-I. Henry, E. Ringe, and R. P. Van Duyne, "A Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor: First Steps toward an Assay for Alzheimer's Disease," *Nano. Lett.* **4**, 1029-1034 (2004).
5. A. J. Haes, L. Chang, W. L. Klein, and R. P. Van Duyne "Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor" *J. Am. Chem. Soc.* **127**, (7) 2264(2005).
6. J. Zhao, A. Das, X. Zhang, G. C. Schatz, S. G. Sligar, and R. P. Van Duyne, "Resonance Surface Plasmon Spectroscopy: Low Molecular Weight Substrate Binding to Cytochrome P450," *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 11004-11005(2006)
7. W. P. Hall, J. Modica, J. Anker, Y. Lin, M. Mrksich, and R. P. Van Duyne, "A Conformation- and Ion-Sensitive Plasmonic Biosensor," *Nano Lett.* **11**,1098-1105(2011)
8. T-H Lee, S-W Lee, J-A Jung, J Ahn, M-G Kim and Y-B Shin., "Signal Amplification by Enzymatic Reaction in an Immunosensor Based on Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR)," *Sensors* **10**, 2045-2053(2010).
9. Y. Lin, Y. Zou, Y. Mo, J. Guo and R. G. Lindquist , "E-Beam Patterned Gold Nanodot Arrays on Optical Fiber Tips for Localized Surface Plasmon Resonance Biochemical Sensing, " *Sensors* **2010**, 9397 (2010)
10. E. M. Larsson, J. Alegret, M. Käll and D. S. Sutherland, "Sensing characteristics of NIR localized surface plasmon resonances in gold nanorings for application as ultrasensitive biosensors," *Nano Lett.* **7**, 1256-1263 (2007).