

광간섭 바이오센서를 이용한 전립선암 지표의 검출

최정민, 김병우*
 성균관대학교 화학공학과 환경 공학 연구실
 (bwkim@skku.ac.kr*)

Detection of PSA(prostate specific antigen) by using Biosensor

Jung-Min Choi, Byung-Woo Kim*
 Sungkyunkwan University Department of Chemical Engineering
 (bwkim@skku.ac.kr*)

서 론

인간을 위협하는 질병들이 수 없이 많지만 그중 현대 의학이나, 생명공학에서 악성 종양의 조기 발견이 중요한 사안이 되고 있다. 이러한 암들 중에서도 과거의 위암이나, 간암, 폐암 이 외에 선진국형의 전립선암이 국내에서도 그 환자 발생수가 점점 늘어나고 있음을 알 수 있다. 암의 진단을 조기에 실현하기 위해서 국내에서도 biomarker의 발견 및 측정에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 암의 진단 지표중 임상적으로 유의성을 가지고 있는 전립선 암 지표인 prostate specific antigen (PSA)는 인간의 전립선암 발생 시 나타나는 특정 단백질로서 α -1-antichmotryp-sin(ACT)라는 PSA의 항체를 결합시킴으로서 결합에 따른 표면 기능화된 다공성 실리콘상 광간섭 변화를 면밀히 측정해 전립선암의 조기 진단에 적용코자 하였다.

본 론

재료 및 방법

1. 기관 제작에 필요한 시약 및 재료

재료

기관 제작

H_2SO_4 (황산)과 과산화 수소를 2:1 비율로 섞은 후 3분 30초에서 4 분정도 실리콘 웨이퍼를 처리한 후 약 6분간 증류수에 세척을 한다. 그리고 HF와 EtOH를 1:10 비율로 섞은 용액에 약 10초 동안 처리한 후 다시 증류수에 6분간 세척한다. 그리고 난후 furnace에서 $400^\circ C$ 에서 1시간 동안 열처리를 한 후 질소 blowing을 한다. EtOH 200ml과 3-aminopropyltrimethoxysilan 10ml를 녹인 용액에 24시간동안 Si 기관을 담근 후에 EtOH로 3번 세척 한다. 다음 단계는 $CHCl_3$ 6.93ml에 prolinker™-A를 녹인 후 5시간동안 실리콘 웨

이퍼를 담가둔다.

Si의 식각 및 표면 기능화

실험에 사용된 p-type(boron-doped, 100) Si wafer는 식각에 앞서 ohmic contact 형성을 위해 wafer 뒷면에 silver paste을 피복시켰다. 만들어진 wafer는 teflon 재질의 식각기 내부에서 HF/ethanol 혼합용액으로 일정 시간동안 양극 식각하였다. 식각이 진행되는 동안 pore의 깊이를 고르게 하기 위해 UV light (254 nm)를 조사하였다. Silicon 표면을 hydrogen peroxide와 sulfonic acid의 혼합 용액으로 상온에서 세척 후 400℃에서 thermal oxidation 시킨다. 그리고 난후 에3-aminopropyltrimethoxysilan로 기능화를 시킨 후 prolinker™-A,를 기관에 제작하는 다공성 실리콘의 기능화방법인 SAM(self-assembled monolayer)을 이용하였다.

2. PSA antibody 의 기능화된 다공성 Si 표면상 결합

시약

PBS buffer에 PSA를 녹여 준비한 후에 ACT를 PBS(PH7.47)에 녹인 후 Si 기관위에 0.1ml 결합시킨다. 30℃ 에서 1시간 30분 동안 incubator 안에서 결합시킨 후 PBS-Tween20-buffer로 세척을 4ml 한다. 세척 이유는 결합이 불안정하게 붙은 antibody를 기관에서 떨어트려 내기 위해서 이다. PSA 0.1 ml를 14시간 동안30℃ incubator에서 결합시킨 후 PBS-Tween20 buffer (PH7.84) 로 세척 후 CCD detector를 사용하여 광간섭 효과를 관찰한다.

제작 및 실험 방법

PBS buffer 에 일정량의 PSA의 항체인 α -1-antichmotrypsin(ACT)를 녹인후 기관에 결합시킨다. 그리고 난후 일정 시간이 지난 후에 그 기관을 PBS-Tween20 용액으로 세척한다. PSA를 기관위에 떨어트린 후 일정 시간 배양을 하고 나서 CCD detector (S2000, Ocean Optics, Inc., Dunedin, Florida, U.S.A.)를 사용하여 광간섭 효과를 관찰하였다. 광간섭 효과에 의해 나타나는 fringe pattern의 변화를 측정하면 알고자 하는 용액 내 PSA의 농도를 알 수 있다.

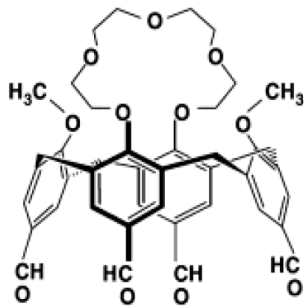
3. 이 론

1)다공성 실리콘의 기능화방법인 SAM(self-assembled monolayer)을 이용하였다. SAM은 규칙적이며, 핀 홀이 없고, 안정한 단분자층을 쉽게 형성하여 생체물질을 고정화하는데 생체물질이 미량으로 필요하게 되며, 여러 가지 측정을 위하여 사용 시간을 연장하더라도 오랜 시간 안정성을 유지할 수 있다.

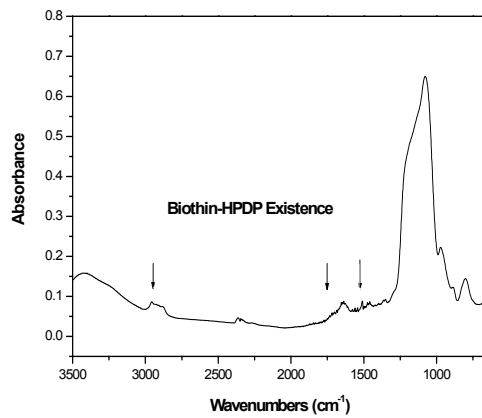
2)다공성 실리콘에서 나타나는 Fabry-Perot fringe 패턴에서 일어나는 변화는 다공성 실리콘에 검출대상물질을 고정시킬 수 있는 recognition group과 검출물질간의 binding에 의한 굴절을 변화에 의해서 일어나며, biomolecule을 높은 감도로서 검출할 수 있는 수단으로 사용될 수 있다. 다공성 실리콘에서의 백색광에 의한 반사는 다공성 실리콘 막의 유효광학두께 ΔEOT (effective optical thickness) 에 관계된 간섭 패턴을 나타낸다. effective optical thickness는 thickness L과 굴절을 n의 곱으로서, 다음과 같이 나타낸다(식1).

$$m\lambda = 2nL \quad (1)$$

여기서 m 은 fring order이고 λ 는 빛의 파장이다(5).



Fig(1) prolinker™-A



Fig(2) FT-IRspectra of function
-alized porous silicon surface

결 론

결과 및 고찰

다공성 Si 표면의 최적 기능화 반응을 진행 시켜, 해당되는 기능기의 유무를 XPS, IR로 확인하였다. 또한 표면상 항체 결합, 항체 항원 결합에 빠른 형상을 AFM으로 확인하고, 광간섭 fringe pattern의 전이론 해석해 PSA의 농도를 결정할 수 있었다. 임상적으로 PSA의 측정 검출 농도인(4ng/ml)의 정확성을 위해서는 더욱더 자동화된 실험을 통한 정밀 실험을 해야 할 것이다.

참고문헌

1. Lin, V.S., Motesharei, K., Dancil, K.S., Sailor, M.J. and Ghadiri, M.R., A Porous Silicon-Based Optical Interferometric Biosensor, *Science*, 278, 840-843(1997).
2. Wink, Th., Zuilen, S.J., Bult, A. and Bennekom, W.P., Self-assembled Monolayers for Biosensors, *Analyst*, 122, 43-50(1997).
3. W. Horninger A. Reissigl, H. Rogatsch, K. Fink, H. Strasser, and G. Bartsch, Improvement of Specific in PSA-BAsed Screening by Using PSA-transition Zone DENSITY and Percent Free PSA in Addition to Total PSA Level, 37,133-177(1998)
4. Msasru Ohi, Kazuto Ito, Kazuhiro Suzuki, Takumi Yamamoto, Hidetoshi Yamamoto. Diagnostic Significance of PSA Density Adjusted by Transition Zone V in males with PSA Levels between 2 and 4 ng/ml, 45, 92-97(2004)