

나노포어 기반 나노바이어센서 기술

<http://dx.doi.org/10.5757/vacmac.2.1.4>

김주형, 윤여안, 이충만, 유경화

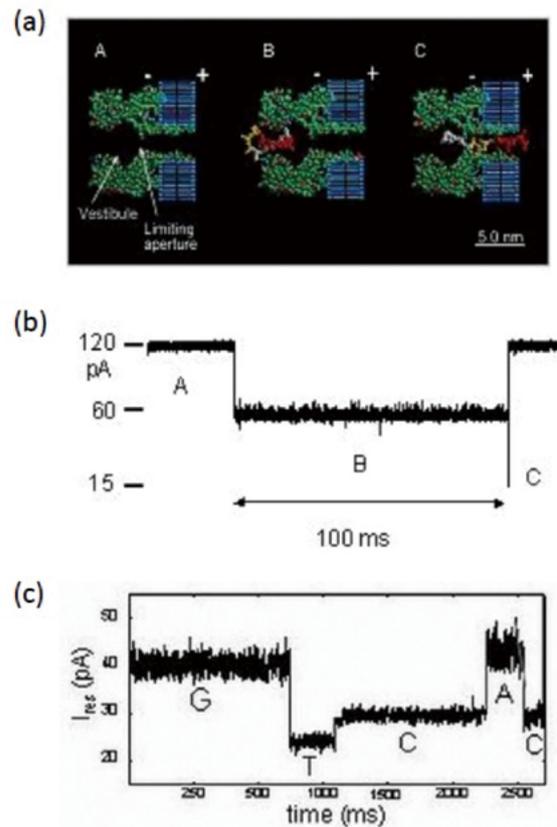
Introduction to research and current trend about nanopore-based nanobiosensor

Joo Hyung Kim, Yeon Youn,
Choongman Lee, Kyung-Hwa Yoo

A nanopore is a very small hole that can be used as single-molecule detector. The detection principle is based on monitoring the ionic current reduced by passage of a molecule through the nanopore as a voltage is applied across the nanopore. Here, we introduce biological nanopores and solid-state nanopores. Then, research and current trend about nanopore-based DNA biosensor and protein analysis are reviewed.

서론

나노포어 기반 나노바이어센서는 1996년 Kasianowicz 등 [1]이 포어 직경이 1.5 nm 인 α -hemolysin 나노포어를 이용하여 DNA 혹은 RNA가 나노포어를 통과하는 것을 측정할 수 있다는 결과를 발표한 이후 매우 활발한 연구가 수행되었다. 나노포어 양쪽에 전압을 걸어주면 용액 내의 이온들에 의해 이온전류가 흐르는데, (-) 전극 쪽 챔버에 음전하를 띠고 있는 DNA 용액을 넣으면, DNA가 나노포어를 통과하여 (+) 극 전극 쪽으로 이동하게 된다. 이때 DNA에 의해 이온들이 통과할 수 있는 공간이 줄어들기 때문에 이온전류가 감소하게 되며, 통과 후에는 초기 상태의 이온전류



[Fig. 1] (a) Schematic of DNA translocation measurements using α -hemolysin nanopore. (b) Real-time ionic current measured while a DNA molecule translocates through the nanopore. (c) Expected ionic current of different DNA bases for modified nanopore.

<저자 약력>

- 유경화 교수는 1985년 University of Illinois at Urbana-Champaign 물리학과에서 이학박사를 받았으며, 2001년부터 연세대학교 물리학과 교수로 재직 중이다 (khyoo@yonsei.ac.kr)
- 김주형 연구원은 2007년 연세대학교 물리학과에서 이학박사를 받았으며, 현재 연세대학교 물리학과 석박통합 과정 중이다. (yousaygoodbye@yonsei.ac.kr)
- 윤여안 연구원은 2015년 연세대학교 물리학과에서 이학박사를 받았으며, 현재 연세대학교 물리학과 석사 후 연구원으로 재직 중이다. (yanist@yonsei.ac.kr)
- 이충만 연구원은 2014년 연세대학교 물리학과에서 이학박사를 받았으며, 현재 연세대학교 물리학과 석사 과정 중이다. (sdfggh03@naver.com)

값으로 돌아온다 (그림 1(a),(b)). 따라서, 전류 펄스 혹은 blockade 전류 측정을 통해 DNA의 길이, 구조 등을 분석할 수 있다. 더 나아가 나노포어를 적절하게 변형시키면 DNA의 염기에 따라 그림 1의 (c)에서와 같이 감소하는 이온전류 값이 다르므로 DNA 염기서열 분석도 가능하다.

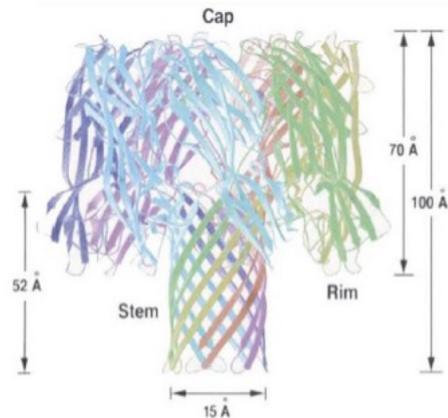
하지만 생체 나노포어는 안정성이 떨어질 뿐 아니라 나노포어의 크기를 조절할 수 없기 때문에 이를 보완하기 위해 고체 나노포어가 개발되었으며, 고체 나노포어를 이용하여 DNA뿐만 아니라 단백질 분석도 활발하게 연구되고 있다. 특히 고체 나노포어의 표면을 생체분자로 개질하면, 표면에 붙어있는 생체분자와 상호작용하는 생체분자와 상호작용하지 않은 생체분자를 구별할 수 있다.

다른 생화학 분석 방법과 비교하여 나노포어 기반의 나노바이어센서의 장점은 생체분자를 단 분자 수준에서 분석할 수 있다는 것이다. 나노포어 크기가 생체 분자 수준이므로 한 번에 1-2개의 생체 분자 만이 나노포어를 통과할 수 있기 때문에 단 분자 수준의 분석이 가능하다. 본 논문에서는 우선 나노포어의 종류와 제작 방법을 알아보고, 제작된 나노포어를 이용한 DNA와 단백질 분석에 대해서 살펴보고자 한다.

나노포어의 종류와 제작방법

나노포어는 크게 생체 나노포어와 고체 나노포어로 나눌 수 있다. 대표적인 생체 나노포어는 α -hemolysin이다 (그림 2). α -hemolysin은 황색포도상구균 (Staphylococcus aureus)에서 추출되는 33 kDa, 293 residue를 가지는 모노머(monomeric) 단백질로서, 7개의 모노머들이 지방질 이중층(lipid bilayer) 막에 직경이 1.5 nm인 헵타머(heptamer) α -hemolysin를 형성하게 된다. 헵타머 α -hemolysin의 구조는 1.9 Å 정도의 분해능을 가질 정도로 자세하게 분석되었는데, 그 전체적인 구조는 크게 세 개의 부분(모자, 줄기, 테)으로 나뉘며 모자에서 줄기까지 총 100 Å의 길이를 가지는 버섯모양의 구조이다 [2]. 줄기의 가장 작은 구멍의 크기가 1.5 nm이다.

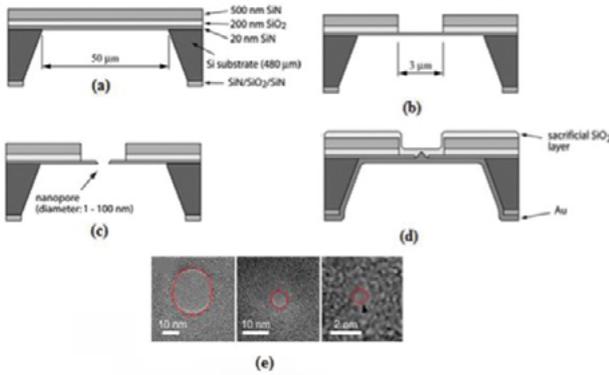
α -hemolysin 나노포어 외 다른 단백질로 이루어진 나노포어도 연구에 사용되었다. 미토콘드리아성 포린, 또는 voltage-dependent mitochondrial ion channel(VDAC)는 미토콘드리아 외부막에 위치하는 30



[Fig. 2] Structure of α -hemolysin heptamer nanopore.

kDa 모노머 단백질로 수용액 상에서 약 3 nm크기의 pore를 가진다 [3]. 이 크기는 이중가닥 DNA(double-stranded DNA)를 측정하기에 알맞은 크기이다. 또, E. Coli의 외부막에서 얻는, 크기 1.0-1.2 nm의 outer membrane protein F(OmpF) pore를 이용하여서 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)같은 수용성 polymer를 관찰하기도 하였다 [4].

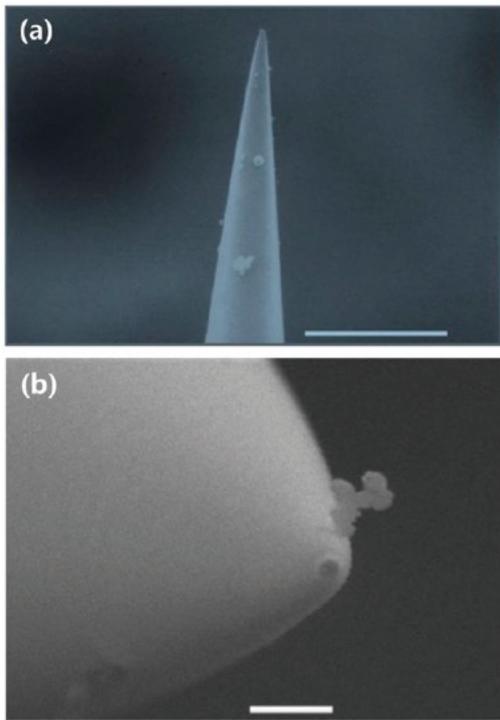
생체 나노포어는 구멍 크기가 1.5-3 nm로 매우 작고 일정한 크기의 포어를 얻을 수 있다는 장점이 있으나 단백질로 이루어져있기 때문에 온도, pH 등에 쉽게 변성이 되므로 안정성이 떨어진다는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 해결하기 위해 안정성이 높은 고체 나노포어가 여러 가지 방법으로 제작되었으나 가장 널리 사용되고 있는 방법은 그림 3과 같이 SiN 멤브레인에 focused ion beam (FIB) 혹은 TEM을 이용하여 나노포어를 제작하는 것이다 [5]. 제작과정을 간단하게 기술하면 다음과 같다. 우선 Si 기판의 윗면과 아래면에 CVD 방법 등을 이용하여 SiN, SiO₂, SiN 박막을 증착한 후, KOH를 이용하여 Si 기판을 그림 3의 (a)에서와 같이 식각한다. 윗면에 있는 SiN과 SiO₂를 그림 3의 (b)와 같이 식각하여 SiN 멤브레인을 제작한다. FIB 혹은 TEM을 이용하여 SiN 멤브레인에 원하는 크기의 나노포어를 형성한 다음, 마지막으로 SiO₂를 증착한 후 HF를 이용하여 에칭하면 피라미드 형태의 나노포어를 얻을 수 있다. 이 방법을 이용하여 1 nm 수준의 나노포어를 제작할 수 있지만 그에 따른 단점도 있다. 물리적인 힘을 통해 구멍크기를 줄이기 때문에 정확한 채널의 구조를 알 수 없고, 그에 따라서 원자의 흐름을 완전히 이해하기 어렵다. 그러나 재생



[Fig. 3] (a)-(d) Fabrication procedures of SiN membrane-based nanopores. (e) TEM images of fabricated SiN membrane-based nanopores.

산이 가능한 기술이기 때문에 고체 나노포어 제작에 널리 사용되고 있다.

SiN 멤브레인 기반 나노포어는 나노포어의 크기를 1 nm - 수십 nm 수준으로 조절할 수 있으며 실험환경에 매우 안정적이거나, 제작과정이 비교적 복잡하며 FIB, 혹은 TEM과 같은 고가의 장비가 필요하다. 따라서, 최근에는 석영을 이용한 나노캐피러리 (nanocapillary)를 이

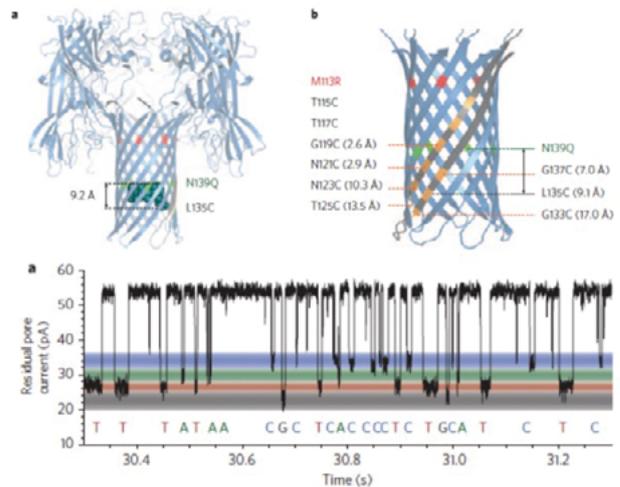


[Fig. 4] SEM images of fabricated nanocapillaries.

용한 연구가 보고되고 있다 (그림 4)[6]. 나노캐피러리는 석영으로 이루어진 얇은 피펫을 풀러(puller) 장비에 넣고, 피펫의 가운데 부분을 레이저로 녹이면서 동시에 양 끝을 당겨주면 형성되기 때문에 비교적 용이하게 제작할 수 있으며, 대량생산도 가능하다. 또한 나노캐피러리 자체가 석영이기 때문에, 형광물질을 이용하거나 광학 플랫폼에 맞추어 실험하기에 매우 용이하다는 장점을 가지고 있다. 하지만 나노캐피러리의 포어크기는 40-50 nm 수준으로 SiN 멤브레인 기반 나노포어 보다 크지만 최근에는 SEM을 이용하여 포어의 크기를 약 11 nm까지 줄였다는 보고가 있다 [7].

나노포어 기반의 DNA 센서

나노포어 기반의 DNA 센서는 차세대 염기서열 분석 방법(Next Generation Sequencing, NGS)의 하나로 주목을 받아 왔다. 때문에, 나노포어를 이용한 바이오 센서 연구 초창기부터 DNA는 연구의 주된 대상이었다. David W. Deamer와 Daniel Branton 교수 연구진은 이온 전류의 변화를 통해 lipid bilayer에 삽입된 생체 나노포어인 α -hemolysin을 통과하는 단일가닥 DNA와 RNA의 길이를 측정하였으며 [1], 나아가 다섯 가지의 조건이 충족될 경우 — 1) 각각의 염기가 특정한 이온 전류 변화를 만들고, 2) 포어의 구경이 단일 염기만 측정하기에 적합하며, 3) 이온 전류 측정의 시간 분해능이 핵산의 이동 속도보다 빨라야 하고, 4) 통과하는 핵산의 역방



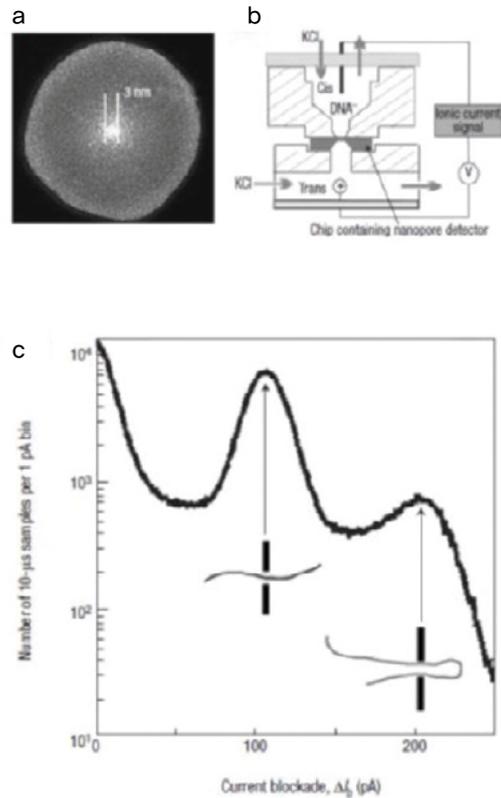
[Fig. 5] Translocation of mononucleotides through α -hemolysin mutants.



[Fig. 6] The photo of the MiniON device manufactured by Oxford Nanopore Technologies.

향 움직임이 적고, 5) 채널과 지지하는 박막이 측정 환경에서 안정적이어야 한다는 — 이 방법을 통한 염기서열 분석이 가능함을 제시했다. 이 가능성을 가지고 DNA를 이루고 있는 adenine (A), guanine (G), cytosine (C), thymine (T) 네 가지의 염기가 나노포어를 통과할 때 나타내는 이온전류의 변화량 차이를 측정하기 위한 연구가 진행되었고, 옥스포드 대학교의 Hagan Bayley 교수와 그 연구진 [8]이 adapter가 삽입된 α -hemolysin을 통해 각각의 염기를 구분해낼 수 있음을 보고했다 (그림 5). 이 기술을 이용하여 Oxford Nanopore Technologies는 저비용으로 빠르게 DNA 염기서열을 분석할 수 있는 그림 6과 같은 시제품을 출시하였다.

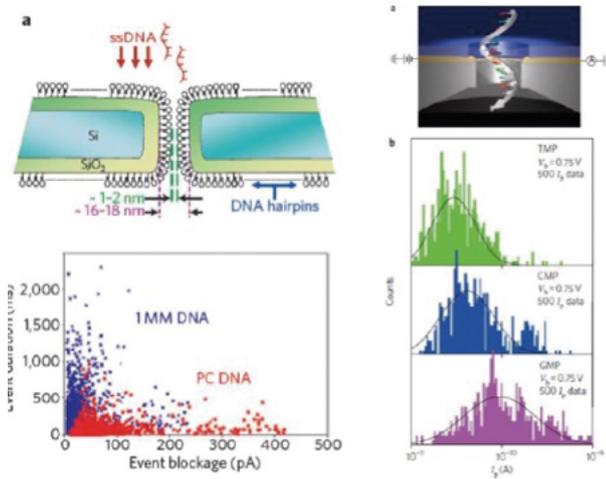
고체 나노포어를 이용하여 DNA를 측정하고자 연구는 꾸준히 수행되어왔다. 그림 7에서 보이듯 SiN 멤브레인 기반 나노포어와 나노캐피리리를 통해서 DNA의 folding state가 측정되었다 [9, 10]. 하지만, 생체 나노포어를 이용해 사용하였던 이온전도도의 변화를 통해 염기서열을 분석하는 방법은, 고체 나노포어의 경우 비교적 두꺼운 박막의 두께로 인해 단일 염기를 해석할 수 있는 공간 분해능을 갖기 어렵다는 점과 DNA의 통과 속도가 생체 나노포어에 비해 빠르다는 점 때문에 적용하기 어렵다는 단점이 있다. 최근에는 SiN 멤브레인의 두께를



[Fig. 7] Detection of folding state of DNA by using solid-state nanopore.

줄이기 위해 원자 단위의 두께를 갖는 2차원 물질인 그래핀, MoS₂ 등을 이용한 나노포어를 제작하여 DNA 측정의 공간 분해능을 향상시킬 수 있고, DNA가 통과할 때 2 차원 물질의 전기적 특성 변화를 이용해 DNA의 염기 서열을 분석할 수 있는 가능성을 제시한 연구들이 보고되고 있다 [11].

또한, 생체 나노포어에 비해 고체 나노포어는 포어 주변의 표면을 개질하기가 쉽기 때문에 이를 활용한 많은 연구가 DNA와 단백질 측정에 많이 활용되었다. 그 중에서도 그림 8의 좌측에서와 같이 고체 나노포어의 표면에 공유 결합을 이용해 머리핀 구조를 갖는 DNA를 결합시키고, 이렇게 제작된 나노포어를 사용할 때, 머리핀 구조의 DNA와 완전히 상보적인 염기서열을 갖는 DNA (PC)와 염기서열이 1개가 다른 DNA (1 MM) 간의 상호작용이 DNA 통과 양상에 영향을 주는 것으로 나타나므로 이를 통해 상보적인 염기서열을 갖는 DNA를 선택적으로 측정할 수 있다는 것이 보고되었다 [12]. 고체 나노포어를 이용한 다른 방법으로는 그림 8의 우측과 같이 터널링 전류(tunneling current)를 측정하는 방법이 있다.



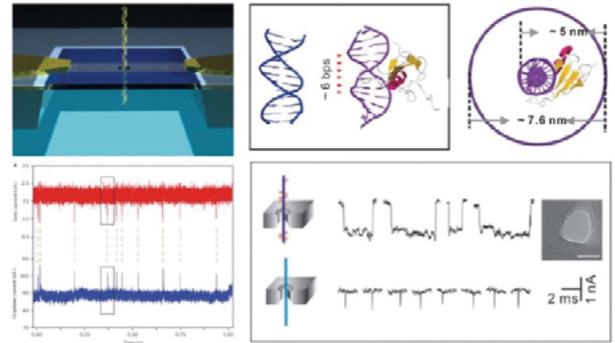
[Fig. 8] Selective detection of ssDNA through solid-state nanopore modified with DNA hairpin (left). Tunneling current measurement for mononucleotides (right).

각 염기의 전자 구조에 차이가 있으므로 각 염기는 서로 구별되는 터널링 전류를 갖는다. 이를 이용하여 수 나노미터의 간격을 갖고 있는 금속 전극 사이에 나노포어를 제작하여, 전극을 통해 측정되는 터널링 전류를 통해 나노포어를 통과하는 DNA의 염기서열을 분석하는 연구가 오사카 대학의 Tomoji Kawai 교수와 그 연구진에 의해 보고되었다 [13].

나노포어를 이용한 DNA 연구는 염기서열 분석에만 국한된 것은 아니다. 후생 유전학 분야 (Epigenetics) 에서 주목을 받고 있는 DNA 메틸화 (DNA methylation)를 측정하는 데에도 나노포어를 이용하였다. 그림 9의 우측과 같이 메틸화된 CpG dinucleotides에 특이적으로 결합하는 단백질을 결합하여 메틸화된 DNA가 나노포어를 통과할 때 특이적으로 결합된 단백질에 의해 발생하는 더 큰 이온 전류 변화량을 측정하여 DNA 메틸화 여부를 밝혀낼 수 있으며, 나아가서 암과 같은 질병 진단에도 응용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다 [14].

나노포어를 이용한 단백질 분석

나노포어를 이용하여 DNA뿐만 아니라 단백질 분석 연구도 활발하게 진행되어왔다. 하지만 단백질의 크기가 일반적으로 10 nm 수준이므로 직경이 1.5 - 3 nm인 생체 나노포어는 사용될 수 없기에 고체 나노포어를 사용해야 하며, 또한 DNA는 항상 음전하를 띠고 있으나 단

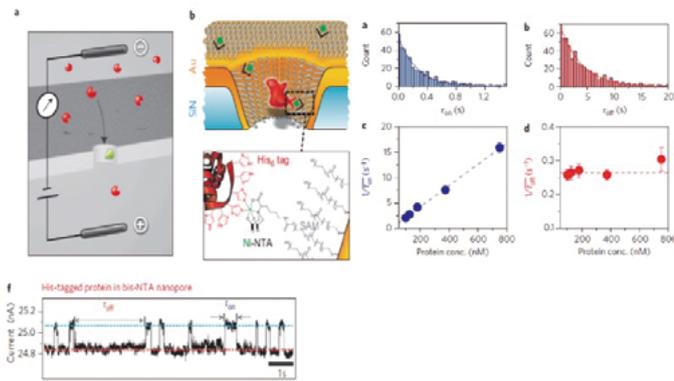


[Fig. 9] Simultaneous measurement of ionic and electric current during DNA translocation through nanopore with graphene nanoribbon (left). Detection of methylated DNA translocation through solid-state nanopore (right).

백질은 pH에 따라 음전하 혹은 양전하를 띌 수 있고, 전하량도 pH에 따라 다르기 때문에 blockade 이온전류의 크기 및 시간이 pH에 따라 달라질 수 있다. 이외에도 단백질의 크기가 DNA 길이 보다 훨씬 짧기 때문에 단백질이 나노포어를 통과할 때 나타나는 blockade 전류의 시간이 너무 짧아서 측정 장비가 미처 단백질의 통과를 검출하지 못할 수도 있으므로 단백질의 경우 측정 및 분석에 좀더 주의를 기울 필요가 있다 [15].

Rant 연구 그룹은 나노포어 표면에 NTA 단백질이 붙어있는 나노포어를 이용하여 NTA receptor와 표면에 붙어있는 NTA 단백질 간의 상호작용을 측정하였다 [16]. 그림 10에서 보는 바와 같이 NTA와 NTA receptor의 결합에 의해 나타나는 blockade 이온전류 펄스의 시간 (τ_{off})과 두 단백질이 결합하지 않고 있는 시간 (τ_{on})을 양단에 걸어주는 전압과 NTA 단백질의 농도를 변화시켜가며 측정하였다. τ_{off} 는 NTA 단백질의 농도에 거의 무관한 반면 τ_{on} 은 농도가 증가함에 따라 증가하였고, τ_{off} 는 인가 전압이 증가함에 따라 짧아진 반면, τ_{on} 은 인가 전압에 거의 영향을 받지 않았다. 이러한 결과로부터 NTA와 NTA receptor 간의 해리상수 (dissociation constant)를 예측하는 것이 가능하다는 것을 보여주었다.

Keyser 연구 그룹은 나노캐피리리를 이용하여 다양한 단백질이 나노포어를 통과하는 특성 측정을 통해 단백질을 분석하였다 [17]. 특히 그림 11에서 보는 바와 같이 광우병과 관련된 PrP 단백질을 측정하였다. pH 8에서 양전압 하에서는 단백질이 통과하는 것이 관측되었으나 음전압 하에서는 관측되지 않았는데 이것은 pH 8에서 PrP

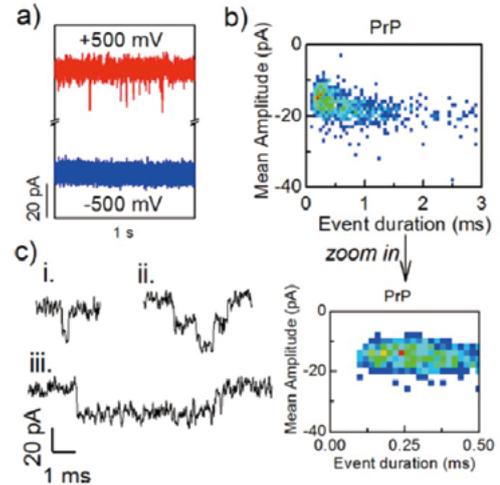


[Fig. 10] Experiments to measure the interaction between NTA protein and NTA receptor immobilized on the surface of SiN membrane-based nanopore. τ_{off} indicates the dwell time of blockade currents while NTA protein is bound to NTA receptor and τ_{on} is the dwell time while NTA protein is not bound to NTA receptor.

단백질이 음전하를 띠는 것을 의미한다 하겠다 (그림 11(a)), 그림 11(c)는 세 가지 전형적인 전류 trace를 보인다. (i)는 짧은 duration, (ii)는 duration 시간이 수 ms 수준이고 두 단계의 전류의 값을 보이는데, 이것은 두 개의 PrP 단백질이 나노포어 표면에 순간적으로 붙기 때문이라고 해석될 수 있다. (iii)는 단백질이 표면에 좀더 오래 붙어있는 경우의 긴 duration을 보인다. 이것은 단백질의 folding과 aggregation을 나노스케일 수준에서 연구할 수 있는 가능성을 보여주는 결과라 하겠다.

맺음말

지금까지 생체 나노포어와 고체 나노포어 제작 방법을 알아보고, 나노포어를 이용한 DNA 혹은 단백질의 분석 방법 및 결과들을 살펴보았다. 생체 나노포어를 이용하여서는 실시간 염기서열 분석의 가능성이 보고되었지만 아직까지 고체 나노포어를 이용하여서는 구현된 바 없으므로 앞으로 원자 크기의 두께를 갖는 그래핀 혹은 이차원적인 물질을 이용한 나노포어 기반 DNA 분석 연구가 활발하게 이루어질 것으로 예상된다. 또한 나노포어 기반 단백질 분석은 아직 다양한 단백질에 대한 해리상수가 측정된 것이 아니기 때문에 속단하기 이르지만 좀더 많은 연구결과가 축적 되면 중요한 단백질 분석 기술로 활용된 것으로 예상된다.



[Fig. 11] (a) Current trace showing PrP translocations in 1M KCl, 1xTE (pH8) upon applying positive voltage (red) and negative voltage (blue). (b) Scatter plot of mean amplitude versus event duration of PrP translocation. (c) Three typical PrP events showing (i) fast translocation and (ii and iii) transient adherence.

References

- [1] J. J. Kasianowicz, E. Brandin, D. Branton and D. W. Deamer Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 13770-13773 (1996).
- [2] L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, and J. E. Gouaux, Science **274**, 1859-1866 (1996).
- [3] C. A. Mannella, A. Ribeiro, and J. Frank, Biophys. J. **49**, 307-318 (1986).
- [4] T. K. Rostovtseva, E. M. Nestorovich, and S. M. Bezrukov, Biophys. J. **82**, 160-169 (2002).
- [5] A. J. Storm, J. H. Chen, X. S. Ling, H.W. Zandbergen, and C. Dekker, Nat. Mater. **2**, 537-540 (2003).
- [6] M. Karhanek, J. T. Kemp, N. Pourmand, R. W. Davis, and C. D. Webb, Nano Lett. **5**, 403-407 (2005).
- [7] L. J. Steinbock, J. F. Steinbock, and A. Radenovic, Nano Lett. **13**, 1717-1723 (2013).
- [8] J. Clarke, H-C. Wu, L. Jayasinghe, A. Patel, S. Raid and H. Bayley Nat. Nanotech. **4**, 265-270 (2009).
- [9] J. Li, M Gershow, D. Stein, E. Brandin and J. A. Golovchenko Nat. Mater. **2**, 611-615 (2003).
- [10] L. J. Steinbock, O. Otto, C. Chimere, J. Gornall and U. F. Keyser Nano Lett. **10**, 2493-2497 (2010).
- [11] F. Traversi, C. Railon, S. M. Benameur, K. Liu, S. Khlybov, M. Tosun, D. Krasnozhan, A. Kis and A. Radenovic Nat. Nanotech. **8**, 939-945 (2013).
- [12] S. M. Iqbal, D. Akin and R. Bashir Nat. Nanotech. **2**, 243-248 (2007).
- [13] M. Tsutsui, M. Taniguchi, K. Yokota and T. Kawai Nat. Nanotech. **5**, 286-290 (2010).
- [14] J. Shim, G. I. Humphreys, B. M. Venkatesan, J. M. Munz, X. Zou, C. Sathe, K. Schulten, F. Kosari, A. M. Nardulli, G. Vasmatzis and R. Bashir Sci. Rep. **3**, 1389 (2013).
- [15] C. Plesa, S. W. Kowalczyk, R. Zinsmeester, A. Y. Grosberg, Y. Rabin and C. Dekker Nano Lett. **13**, 658-663 (2013).
- [16] R. Wei, V. Gatterdam, R. Wieneke, R. Tampe and U. Rant Nat. Nanotech. **7**, 257-263 (2012).
- [17] W. Li, N. A. Bell, S. Hernandez-Ainsa, V. V. Thacker, A. M. Thackray, R. Bujdosó and U. F. Keyser ACS Nano, **7**, 4129-4134 (2013).