

Review on Nanoparticle Probes with Surface Enhanced Raman Spectroscopic Tags (SERS Dots) for Cellular Cancer Targeting

Dae Hong Jeong

(Department of Chemistry Education, Seoul National University; jeongdh@snu.ac.kr)

Abstract

This article is a review version of the article published on Oct. 2006 at *Analytical Chemistry*, 78, 6967-6973. We have developed biocompatible, photostable, and multiplexing-compatible surface-enhanced Raman spectroscopic tagging material (SERS dots) composed of silver nanoparticle-embedded silica spheres and organic Raman labels for cellular cancer targeting in living cells. SERS dots showed linear dependency of Raman signatures on their different amounts, allowing their possibility for the quantification of targets. In addition, the antibodyconjugated SERS dots were successfully applied to the targeting of HER2 and CD10 on cellular membranes and exhibited good specificity. SERS dots demonstrate the potential for high-throughput screening of biomolecules using vibrational information.

Key Words: SILVER NANOPARTICLES, SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING, ANTIBODY-ANTIGEN REACTION

Review on Nanoparticle Probes with Surface Enhanced Raman Spectroscopic Tags (SERS Dots) for Cellular Cancer Targeting

정대홍*

초 록

이 논문은 2006년 10월 학술지 Analytical Chemistry의 78권 6967-6973쪽에 발표된 논문의 요약 평론이다. 연구팀은 세포들 속의 암세포를 표적하기 위한 목적으로 생체호완성이 좋고 빛에 안정적이며 다중표적에 대한 분석이 가능한 물질로서 실리카 나노구 표면에 은 나노입자가 도입되고 그 위에 라만 산란 신호로 표지하기 위한 유기물이 흡착된 표면증강 라만산란 표지가 부착된 나노 물질 (SERS dots)을 개발하였다. 개발된 SERS dots은 양에 대한 라만 신호 크기가 선형성을 보였는데, 이는 이 물질이 표적에 대한 정량분석이 가능함을 나타낸다. 또, 항체가 연결된 SERS dots을 이용하여 세포 표면의 HER2와 CD10 표적을 찾는 실험에 성공적으로 적용할 수 있었으며 좋은 특이성을 보여주었다. 이 SERS dots은 분자의 진동 정보를 이용함으로써 분석처리량이 높은 검출(high-throughput screening)에 사용될 수 있는 가능성을 보여준다.

Key words: 은 나노입자, 표면증강 라만산란, 항원-항체 반응

* 서울대학교 화학교육과, jeongdh@snu.ac.kr

서론

비방사능 표지 기술은 안전성 및 안정성을 추구하며 생체분자의 공간적 시간적 탐색에서 많은 관심을 끌어왔다. 최근까지 여러 가지 표지 기술이 개발되어 왔는데, 그 중 대표적인 기술이 형광을 기반으로 한 물질이며 현재까지 가장 널리 사용되고 있다.¹⁻⁶ 그러나 이 기술은 형광의 본질적인 특성으로 광백색화와 넓은 밴드폭으로 인한 밴드간 겹침 현상이 한계로 지적된다. 반도체 양자점은 광백색화가 없고 형광보다는 좁은 밴드폭을 가지는 특성을 보여 새로운 대안으로 많이 연구 개발되고 있다.⁷⁻¹² 그러나 이 같은 장점에도 불구하고 표면 처리에서의 문제와 안전성에 있어서 문제가 있는 한계를 보이고 있다.¹³

최근, 표면증강 라만산란 현상(Surface-Enhanced Raman Scattering: SERS)은 민감한 광학적 특성으로 인해서 많은 가능성을 보이며 관심을 끌고 있다.¹⁴⁻²⁰ 형광 및 양자점이 갖는 문제를 해결하기 위해서 몇 연구팀에서 라만산란을 표지 기능으로 사용한 물질을 개발하였다.²¹⁻²⁶ 이 물질들은 많은 장점을 가지고 있는데 그 중에서 특징적인 것이 라만 산란신호의 선폭이 매우 좁아 밴드간의 겹침이 없이 수많은 서로 다른 표지 물질을 만들 수 있으며 여기 파장의 선택에서 자유롭고 광백색화 현상이 없다. 이 같은 장점에도 불구하고 기존의 라만 표지 물질들은 개별 금 및 은 나노입자에 기반하여 만들어짐으로 신호의 세기가 그리 크지 못하였다. 표면증강 라만산란 이론에 의하면 큰 신호증강 효과를 얻기 위해서는 은 및 금 나노입자들 사이의 간극이 존재해야 하며 그 간극 근처에 신호를 낼 분자가 위치해야 한다.²⁷⁻²⁹ 이 때문에 응집된 은 및 금 나노입자들이 효과적인 SERS 물질로 등장하였다.³⁰⁻³³ 최근에 분자로 금속 나노입자를 불안정하게 하여 응집하는 방법으로 라만 표지 물질을 개발한 연구가 보고되었다.³⁴ 그러나 불안정하게 하는 방법이 갖는 근원적인 한계는 개별 입자의 신호에 있어서 불균일성이 내재되어 있다.

이에 본 연구팀은 간단하면서도 재현성이 높은 방법으로 라만 표지 물질을 개발하는 방법을 개발하였다. 이 물질은 실리카를 기본 물질로 하여 그 위에 은 나노입자를 도입하고 은 위에 표지 분자를 흡착하며 SERS 신호를 내는 은 나노입자를 보호하기 위하여 실리카로 한 층 더 쌓은 구조를 하고 있다. 이렇게 해서 만들어진 SERS 표지된 나노입자 (SERS dots)을 이용하여 암 세포와 특이 결합을 하는 시스템에 적용하여 성공적인 결과를 얻었다.

결과 및 논의

연구 결과는 SERS dots의 합성에 대한 내용과 만들어진 SERS dots을 이용하여 암 세포 표적에 적용한 내용으로 구성된다. 합성과 분석의 전체 과정은 그림 1에 개략적으로 표현하였다.

SERS dots의 제조

SERS dots의 중심이 되는 실리카 나노입자는 3 mL 수산화암모늄을 40 mL 에탄올에 섞고 이 용액에 1.8 mL tetraethyl orthosilicate (TEOS)을 넣어 25 °C에서 24시간동안 격렬하게 저어주면만들어진다. 만들어진 실리카 나노입자에 은을 도입하기 용이하도록 표면에 3-mercaptopropyltrimethoxysilane (MPTS)을 결합시킨다. 그리고 AgNO₃ 수용액 속에서 은 이온을 환원시켜 실리카 나노입자 표면에 은 나노입자가 형성되게 한다. 이렇게 만들어진 나노입자는 고해상도 전자투과현미경(HR-TEM)을 이용하여 분석하였다 (그림 2).

특정 표적 물질에 특이적으로 결합된 SERS dots을 라만분광 신호로 구별하기 위하여 SERS 신호를 강하게 되는 분자를 은 표면에 흡착시키는데 이 때 사용된 분자는 4-mercaptotoluene (4-MT), 2-naphthalenethiol (2-NT), 그리고 thiophenol (TP) 이다. 생성된 은과 은에 흡착된 분자를 보호하여 SERS dots의 분광학적 신호가 환경에 영향을 받지 않도록 하고 특정 표적 물질에 특이적으로 반응하는 항체를 SERS dots 표면에 결합하기 위해서 실리카 껍질을 씌웠다. 실리카 껍질은 먼저 sodium silicate 수용액(1.83 mL, 2.16×10^{-2} wt % SiO₂, pH 9.5)으로 만들어진 나노입자 표면에 얇은 실리카 층을 형성하고 Stöber 법을 이용하여 실리카 층을 더 두껍게 확장하였다. 이렇게 만들어진 SERS dots의 나노 구조는 HR-TEM으로 확인하였다 (그림 3).

SERS dots과 항체의 결합

SERS dots이 특정 표적 물질에 특이적으로 결합하도록 하기 위해서 SERS dots 표면에 항체를 결합시켰다. SERS dot 과 항체를 연결하는 단위로 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS)를 SERS dot 표면에 결합하고 APTS의 amine 작용기에 N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-ε-aminocaproic acid (Fmoc-ACA-OH)와 N-(9-fluorenylmethoxy carbonyl)-β-alanine

(Fmoc-b-Ala-OH)를 각각 연결하였다. 이 후에 Fmoc 작용기를 제거하여 amine 작용기가 자유롭게 남아있게 하였다. 이렇게 처리된 SERS dot 은 N-hydroxysuccinimide ester를 처리하고 HER2 또는 CD10 항체와 결합하였다.

HER2 및 CD10 암 세포 표적

유방암 세포 (MCF-7), 백혈병 세포 (SP2/O), 그리고 비교군으로 정상 기관지 세포를 사용하였다. 이 세포들을 각각 Her2 또는 CD10 항체가 결합된 SERS dots과 함께 배양하였다.

라만분광법으로 SERS dots의 분석

라만산란 측정은 공초점 라만산란 분광시스템 (JY-Horiba, LabRam 300)을 사용하였다. 이 시스템에서는 180도 구조로 산란광을 수집하며 분광기를 거쳐 CCD 검출기로 신호를 읽는다. 여기광으로 514.5 nm의 파장을 갖는 연속파 레이저 빔을 사용하였고, 사용한 레이저 세기는 시료에서 100 mW이었다. 여기광은 100배율의 대물렌즈를 통해서 빛을 집중하고 동일한 렌즈를 통해서 산란광을 집광하였다. 모아진 광은 노치필터를 이용하여 강한 레일레이 산란광은 제거하고 라만산란광만을 투과하여 분광기로 전달하였다. 매 측정시 신호 수집 시간을 10 초로 동일하게 유지하였다.

라만분광법으로 SERS dots의 분석

4-MT, 2-NT, TP 및 MPTS를 은 나노입자가 도입된 실리카 나노물질에 흡착시킨 후 이들 표지 분자들의 SERS 신호를 측정하였다. 그림 4(a)에서 4-MT, 2-NT, TP 세 표지 분자들의 SERS 신호가 강하게 관찰되는 것을 볼 수 있으며, 그림 4(b)에서 TP 표지된 SERS dot 이 TP의 양에 따른 SERS 신호 세기의 변화를 보여준다. 100 pM 정도의 매우 묽은 농도의 분자까지 신호가 검출될 정도로 매우 신호증강 효과가 큰 것을 알 수 있다. 표지 분자의 라만산란 신호 증강을 일으키는 은 나노입자는 실리카 표면에 고착되어 있기 때문에 표지 분자의 양에 따라서 은 나노입자의 응집이 달라지는 등의 현상이 전혀 없기 때문에 SERS-표지 물질의 농도 조절이 가능하다는 것이 큰 특징 중 하나이다.

은 나노입자에 표지 분자를 흡착한 후 실리카 막을 형성하여 내부의 SERS 신호를 내는 부분을 보호하고 이후 항체와 결합할 화학결합을 용이하도록 하였다. 이 같은 처리를 한 후에도 SERS 신호가 잘 유지되었는지를 확인하기 위하여 라만 산란 측정 실험을 수행하였으며 그림 5(a)와 같이 SERS 신호가 크게 변화없이 유지됨을 확인하였다. 그림 5(b)는 이렇게 만들어진 SERS dot 을 이용한 정량분석의 가능성을 살펴보기 위한 결과로 입자의 양에 따른 신호의 세기가 선형적으로 나타남을 확인할 수 있었다.

SERS dot-Antibody 쌍을 이용한 HER2 와 CD10 암세포 표적

유방암 세포, 백혈병 세포, 대조군으로 기관지 세포를 모델 시스템으로 선택하였다. 일반적으로 MCF-7은 HER2 표면 수용체의 표적으로 사용되며, SP2/O는 세포막 표면에 있는 CD10 수용체와 특이적 결합을 한다. HER2 항체는 4-MT가 표지된 SERS dot 과 결합시켰고(SERS dot_{4MT-HER2}), CD10 항체는 TP가 표지된 SERS dot과 결합시켰다(SERS Dot_{TP-CD10}). MCF-7, SP2/O, 정상 세포를 SERS dot_{4MT-HER2} 및 SERS Dot_{TP-CD10} 와 함께 배양시켰다. 그림 6은 배양 후 이들 세포에 대해서 측정된 SERS 신호를 이용하여 그린 이미지이다. 이미지 처리를 위하여 4-MT의 1579 cm⁻¹ 밴드와 TP의 1573 cm⁻¹ 를 이용하였다. 이 결과는 각각의 암세포가 특이반응이 있는 수용체가 결합된 SERS dot 과 특이적으로 결합하는 것을 잘 보여주며 정상세포와 결합하는 SERS dot이 없음을 나타낸다.

결 론

요약하면, 본 연구팀은 실리카로 막이 쌓인 형태의 SERS 신호로 표지된 나노물질 (SERS dots)을 만들었다. 이 물질은 200 nm 크기의 실리카 구를 기반으로 하고 그 위에 은 나노입자가 도입된 형태를 취하며 은 표면에는 표면증강 라만산란을 일으키는 표지 분자들이 흡착되어 있다. 사용한 표지 분자는 4-MT, 2-NT, TP 세 분자로 이들 중에서 4-MT와 TP가 표지된 SERS dot 에 HER2, CD10 항체를 결합하였다. 항체가 결합된 SERS dot 을 유방암 세포, 백혈병 세포, 정상 세포와 함께 각각 배양을 하여 이들 SERS dot 이 특정 암

세포와 특이적 결합을 하는 것을 확인하였다. 이 실험의 결과는 광학적으로 안정되고 생체물질과 잘 호환이 되며, 다중 표적 검출이 가능한 라만산란을 이용한 나노프로브가 성공적으로 생체 물질 검출에 사용될 수 있음을 보여준 것으로 생명과학 및 생의학 연구에서 SERS dots이 높은 처리량을 갖는 검출에 사용될 가능성을 시사한다.

참고문헌

- (1) Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R. W.; Brown, P. O. *Science* 1995, 270, 467-470.
- (2) Castro, A.; Williams, J. G. K. *Anal. Chem.* 1997, 69, 3915-3920.
- (3) Pirrung, M. C.; Connors, R. V.; Odenbaugh, A. L.; Montague-Smith, M. P.; Walcott, N. G.; Tollett, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 1873-1882.
- (4) Duhachek, S. D.; Kenseth, J. R.; Casale, G. P.; Small, G. J.; Porter, M. D.; Jankowiak, R. *Anal. Chem.* 2000, 72, 3709-3716.
- (5) He, B.; Burke, B. J.; Zhang, X.; Zhang, R.; Regnier, F. E. *Anal. Chem.* 2001, 73, 1942-1947.
- (6) Peruski, A. H.; Johnson, L. H.; Peruski, L. F. *J. Immunol. Methods* 2002, 263, 35-41.
- (7) Bruchez, M., Jr.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. *Science* 1998, 281, 2013-2016.
- (8) Chan, W. C. W.; Nie, S. *Science* 1998, 281, 2016-2018.
- (9) Yang, C. S.; Kauzlarich, S. M.; Wang, Y. C. *Chem. Mater.* 1999, 11, 3666-3670.
- (10) Mattoussi, H. J.; Mauro, M.; Goldman, E. R.; Anderson, G. P.; Sundar, V.C.; Mikulec, F. V.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 12142-12150.
- (11) Goldman, E. R.; Balighian, E. D.; Mattoussi, H.; Kuno, M. K.; Mauro, J. M.; Tran, P. T.; Anderson, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 6378-6382.
- (12) Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W. K.; Nie, S. *Nat. Biotechnol.* 2004, 22, 969-976.
- (13) Jane, R. K.; Stroh, M. *Nat. Biotechnol.* 2004, 22, 959-960.
- (14) Jeanmaire, D. L.; Van Duyne, R. P. *J. Electroanal. Chem.* 1977, 84, 1-20.
- (15) Moskovvits, M. *Rev. Mod. Phys.* 1985, 3, 783-826.

- (16) Otto, A.; Mrozek, I.; Grabhorn, H.; Akemann, W. J. *Phys.: Condens. Matter* 1992, 4, 1143-1212.
- (17) Isola, N. R.; Vo-Dinh, D. L. T. *Anal. Chem.* 1998, 70, 1352-1356.
- (18) Kneipp, K.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. *Chem. Rev.* 1999, 99, 2957-2976.
- (19) Graham, D.; Mallinder, B. J.; Whitcombe, D.; Watson, N. D.; Smith, W. E. *Anal. Chem.* 2002, 74, 1069-1074.
- (20) Lyandres, O.; Shah, N. C.; Yonzon, C. R.; Walsh, J. T., Jr.; Glucksberg, M. R.; Van Duyne, R. P. *Anal. Chem.* 2005, 77, 6134-6139.
- (21) Ni, J.; Lipert, R. J.; Dawson, G. B.; Porter, M. D. *Anal. Chem.* 1999, 71, 4903-4908.
- (22) Cao, Y. W. C.; Jin, R.; Mirkin, C. A. *Science* 2002, 297, 1536-1540.
- (23) Doering, W. E.; Nie, S. *Anal. Chem.* 2003, 75, 6171-6176.
- (24) Mulvaney, S. P.; Musick, M. D.; Keating, C. D.; Natan, M. J. *Langmuir* 2003, 19, 4784-4790.
- (25) Grubisha, D.; Lipert, R. J.; Park, H. Y.; Driskell, J.; Porter, M. D. *Anal. Chem.* 2003, 75, 5936-5943.
- (26) Kneipp, J.; Kneipp, H.; Rice, W. L.; Kneipp, K. *Anal. Chem.* 2005, 77, 2381-2385.
- (27) Xu, H.; Aizupurua, J.; Ka'Il, M.; Apell, P. *Phys. Rev. E: Stat. Phys., Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* 2000, 62, 4318-4324.
- (28) Michaels, A. M.; Jiang, J.; Brus, L. *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 11965-11971.
- (29) Jiang, J.; Bosnick, K.; Maillard, M.; Brus, L. *J. Phys. Chem. B* 2003, 107, 9964-9972.
- (30) Bonsnick, K. A.; Jiang, J.; Brus, L. *J. Phys. Chem. B* 2002, 106, 8096-8099.
- (31) Grant, C. D.; Schwartzberg, A. M.; Norman, T. J.; Zhang, J. J. *Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 549-553.

- (32) Koo, T. W.; Chan, S.; Sun, L.; Su, X.; Zhang, J.; Berlin, A. *Appl. Spectrosc.* 2004, 58, 1401-1407.
- (33) Jeong, D. H.; Zhang, Y. X.; Moskovits, M. J. *Phys. Chem. B* 2004, 108, 12724-12728.
- (34) Su, X.; Zhang, J.; Sun, L.; Koo, T. W.; Chan, S.; Sundararajan, N.; Yamakawa, M.; Berlin, A. *Nano Lett.* 2005, 5, 49-54.

Figure Captions

그림 1. SERS dots 의 합성과 암세포 표적에 대한 개략도

그림 2. 실리카 나노입자의 TEM 사진: (a) 원 실리카 나노입자, (b) MPTS가 표면에 처리한 후, (c) 은을 도입한 후, (d) 은이 도입된 후의 확대된 사진.

그림 3. SERS dots의 TEM 사진: (a) 4-MT가 표지된 SERS dots, (b) 2-NT가 표지된 SERS dots, (c) TP가 표지된 SERS dots.

그림 4. 실리카 막을 짜기 전의 SERS dots의 SERS 스펙트럼:

(a) 4-MT, 2-NT, TP 각 표지된 SERS dots,
(b) TP의 농도에 따른 스펙트럼의 세기 차이.

그림 5. 실리카 막을 썬 후의 SERS dots의 SERS 스펙트럼:

(a) 4-MT, 2-NT, TP 각 표지된 SERS dots,
(b) TP가 표지된 SERS dot의 양에 따른 스펙트럼의 세기 차이

그림 6. 세포에서 항체와 연결된 SERS dot으로 HER2 및 CD10 암세포 마커를 검출한 결과:

(a) SERS dot4MT-HER2와 배양한 MCF-7,
(b) SERS dotTP-CD10과 배양한 SP2/O,
(c) SERS dotTP-CD10과 배양한 MCF-7,
(d) SERS dot4MT-HER2와 배양한 SP2/O,
(e) SERS dot4MT-HER2와 배양한 NHBE,
(f) SERS dotTP-CD10과 배양한 NHBE

그림 1.

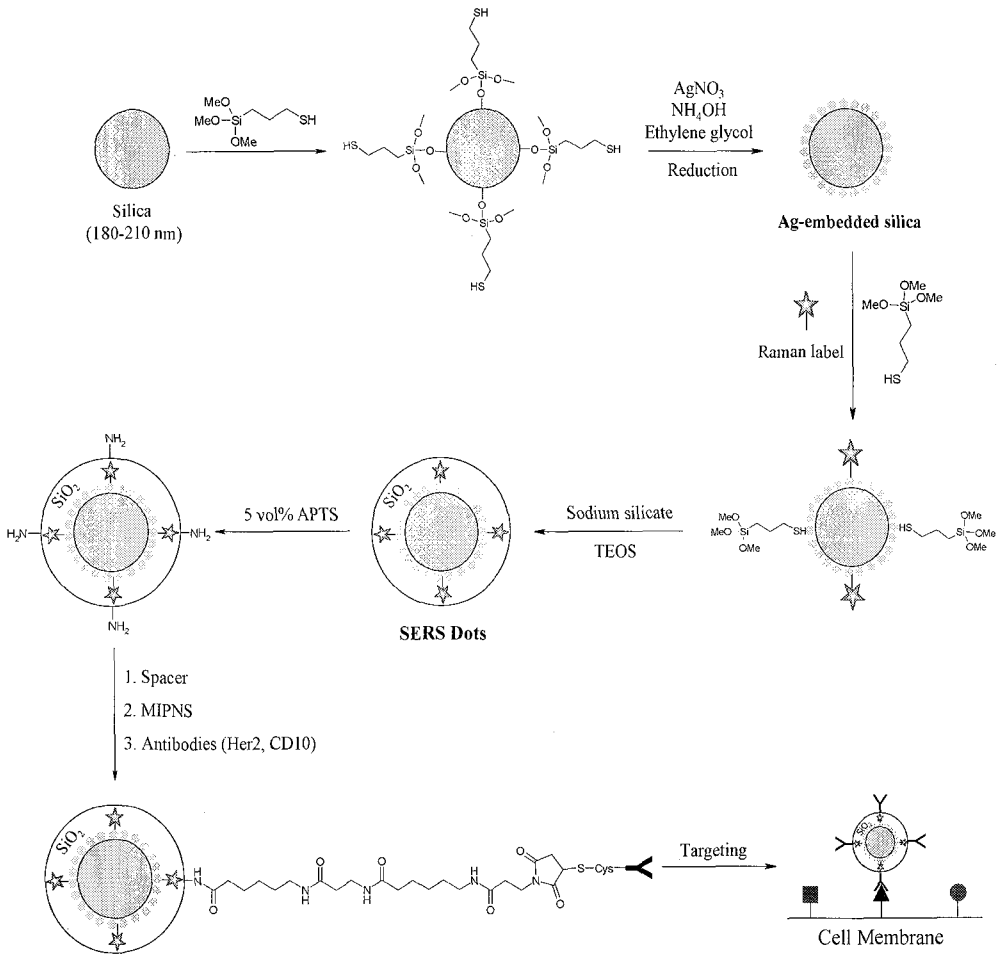


그림 2.

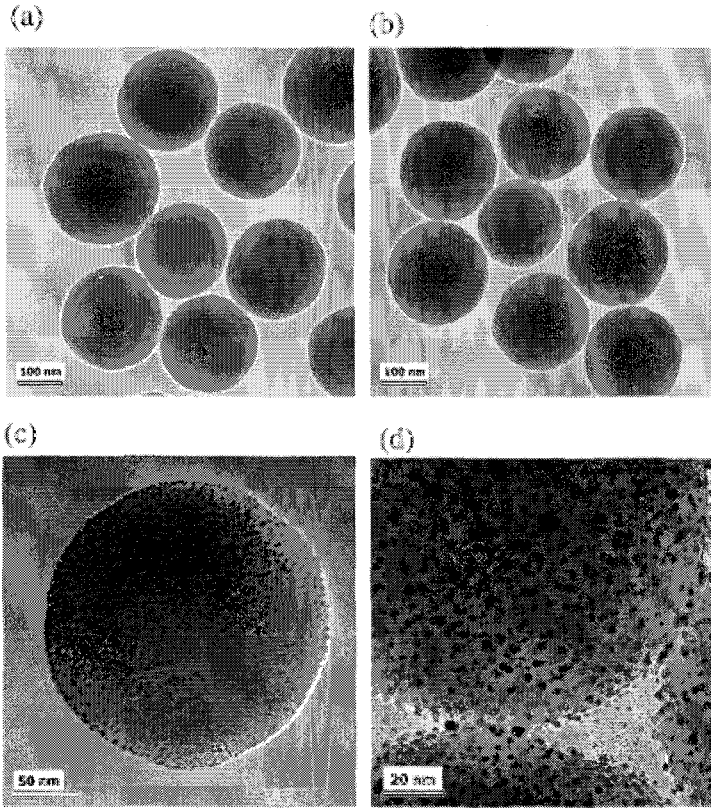


그림 3.

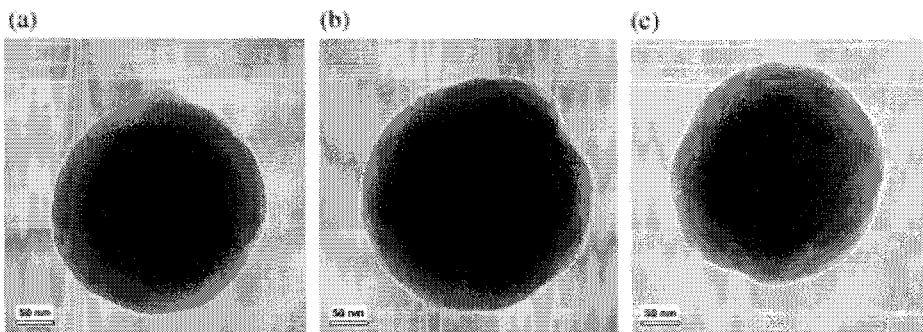
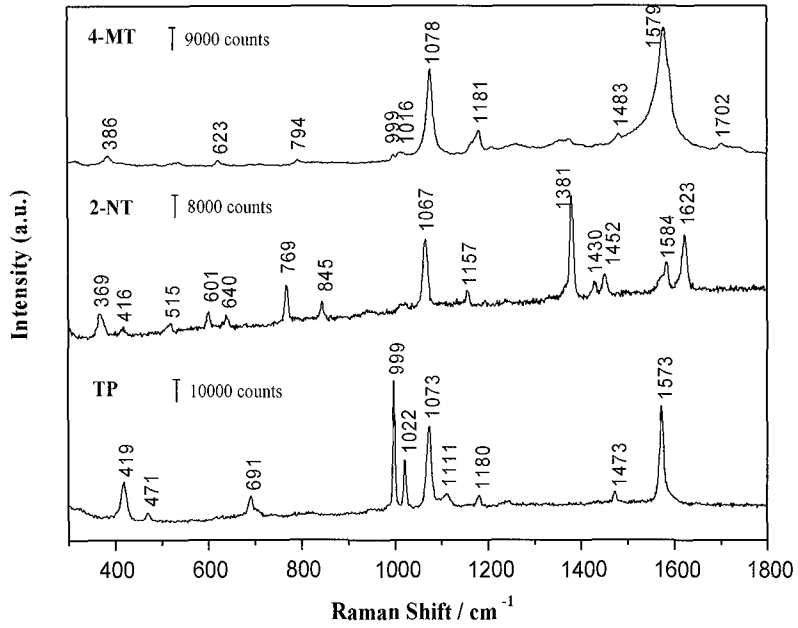


그림 4.

(a)



(b)

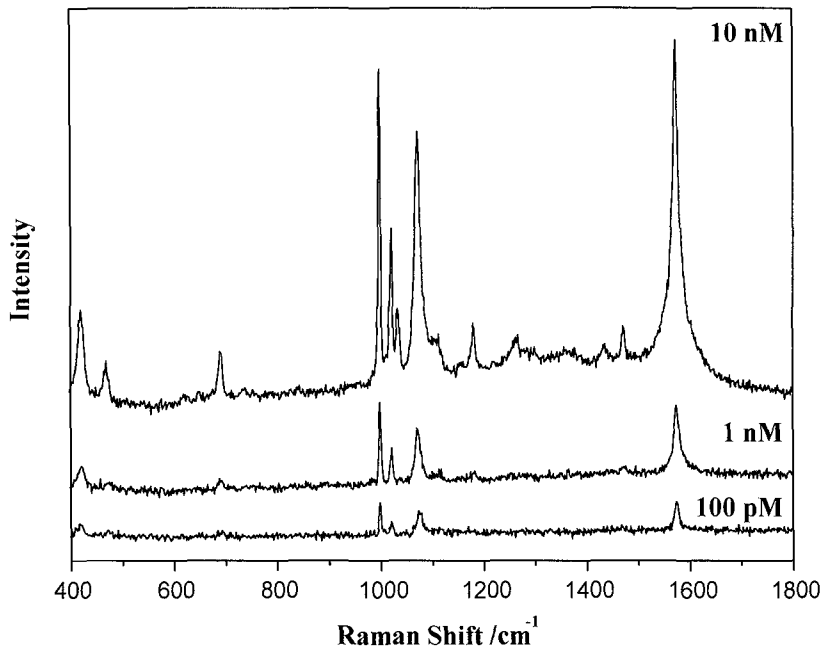
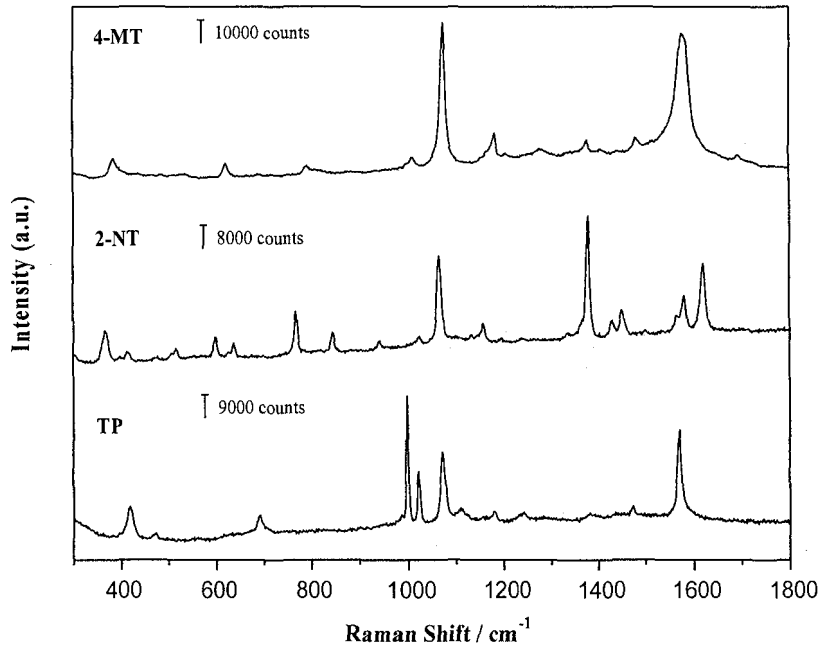


그림 5.

(a)



(b)

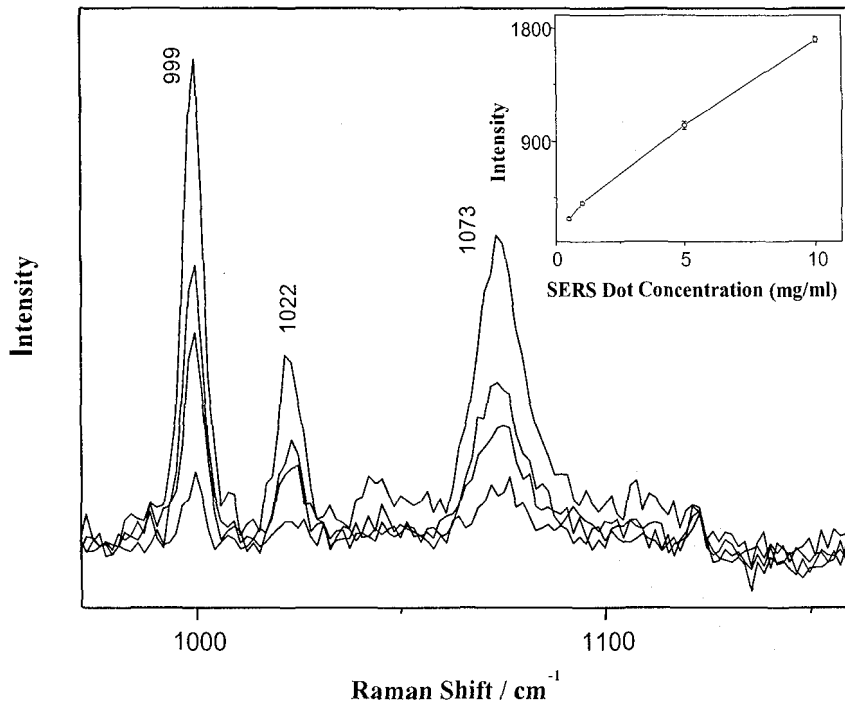
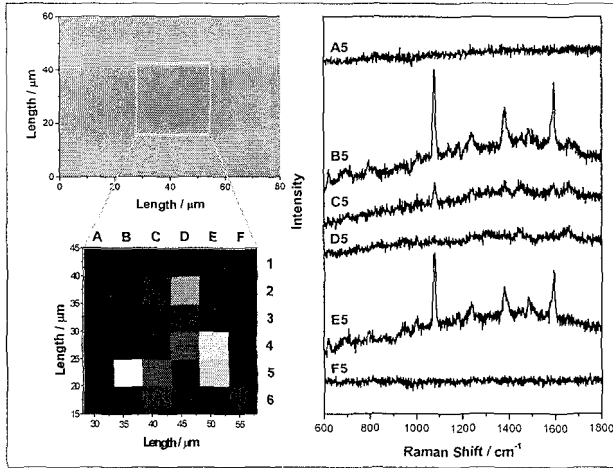
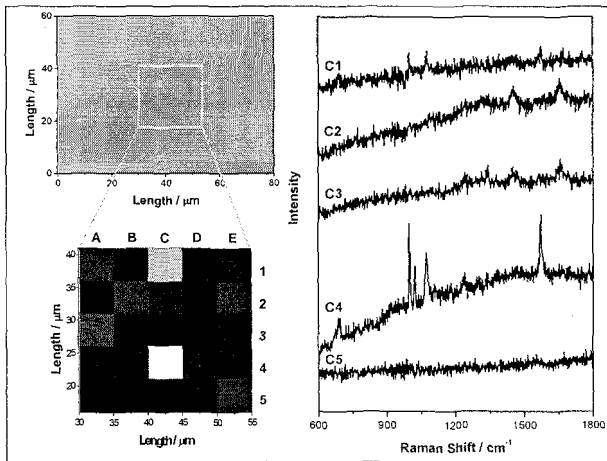


그림 6

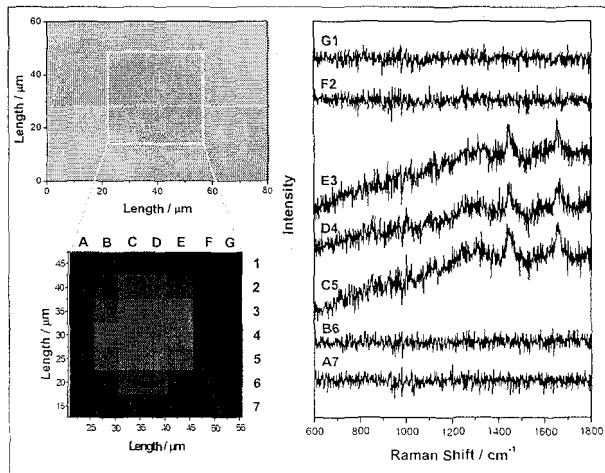
(a)



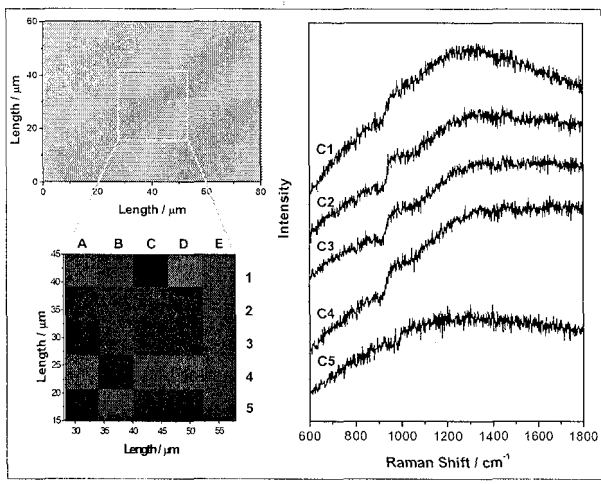
(b)



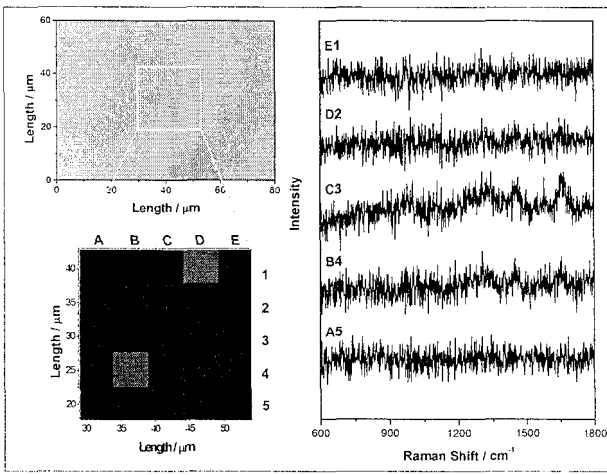
(c)



(d)



(e)



(f)

