

## CNT-FET 기반 항체절편을 이용한 단백질의 초고감도 검출

김준표, 홍승훈<sup>1</sup>, 심상준\*  
 성균관대학교, <sup>1</sup>서울대학교  
 (simsj@skku.edu\*)

## Ultrasensitive detection of proteins using antibody-binding fragments based on CNT-FET

Jun Pyo Kim, Seunghun hong<sup>1</sup>, Sang Jun Sim\*  
 Sungkyunkwan University, <sup>1</sup>Seoul National University  
 (simsj@skku.edu\*)

서론

일반적인 트랜지스터의 경우 소스와 드레인 전극사이의 채널의 전류는 제3의 게이트 전극에 의해 조절되는 반면, 탄소나노튜브 트랜지스터의 경우에는 감지하고자 하는 화학 물질이나 차지를 띤 분자들이 전류의 흐름을 조절하게 된다. 즉, 탄소나노튜브 표면에 기체분자나 바이오분자가 흡착되게 되면 전하의 고갈이나 축적이 일어나게 되고 이는 나노튜브 소자에서 전기전도도의 변화로 나타나게 된다. 탄소나노튜브는 일반적으로 p형 반도체로 작동하므로 양의 게이트 전압, 이 경우에는 양의 전하를 띤 단백질 흡착으로 인해 전기 전도도가 감소하게 된다. 그러나 탄소나노튜브 트랜지스터를 이용하여 바이오 분자를 검출하기 위해서는 그 반응이 디바이 길이(Debye Length) 내에서 일어나야 한다 [1]. 이와 같이 탄소나노튜브 트랜지스터 센서에서 표적물질을 검출하기 위해서는 탄소나노튜브에 고정화 하는 리셉터의 크기가 작아야 한다. 일반적으로 표적물질 검출에 쓰이는 항체들은 10-15 nm의 크기를 갖는다[2]. 이는 일반적으로 10 mM 이온 농도에서 약 3 nm의 디바이 길이를 갖는데 이를 훨씬 초과하게 된다[3]. 따라서 표적 물질과의 반응을 쉽게 감지하지 못해 민감도가 떨어지게 되고, 심지어는 전혀 검출할 수 없기 때문에 표적물질에 대한 리셉터의 크기는 아주 작아야만 한다. 따라서 우리는 항체를 절단하여 고정화함으로써 탄소나노튜브에 고정화 되는 리셉터의 크기를 줄여, 리셉터 크기에 따른 트랜지스터형 탄소나노튜브 바이오센서의 민감도의 변화를 연구하였다.

실험 방법

탄소나노튜브 트랜지스터의 채널영역을 이루고 있는 그물망형 탄소나노튜브의 표면에 리셉터를 고정화하기 위한 자기조립 단분자층의 형성은 1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester(PASE)을 이용하였다. 1mM PASE 용액에 2시간 동안 담근다. 그 후 메탄올로 탄소나노튜브 트랜지스터 센서의 채널부위를 씻어내고, 정상적인 anti-human IgG, F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG, Fab anti-human IgG (20 µg/ml)를 각각 밤새 고정화 시켰다 (그림 1). 그 후 세척을 위해 PBS buffer에 두 시간 동안 천천히 교반하며 씻어준 후 질소가스로 건조하였다. 그리고 후 1 fg/ml-1000 ng/ml 농도의 human IgG를 반응시켜 탄소나노튜브 트랜지스터 센서의 전류 특성을 측정하였다. 탄소나노튜브 트랜지스터 센

서의 전기적 특성은 우선 디바이스를 probe station을 이용하여 source 와 drain 전극에 연결하고 타겟 단백질의 주입 후에 source meter(Keithley 2400, USA)에 의해 측정되었다. 이때 source 와 drain bias는 10 mV를 인가하여 측정하였다[4].

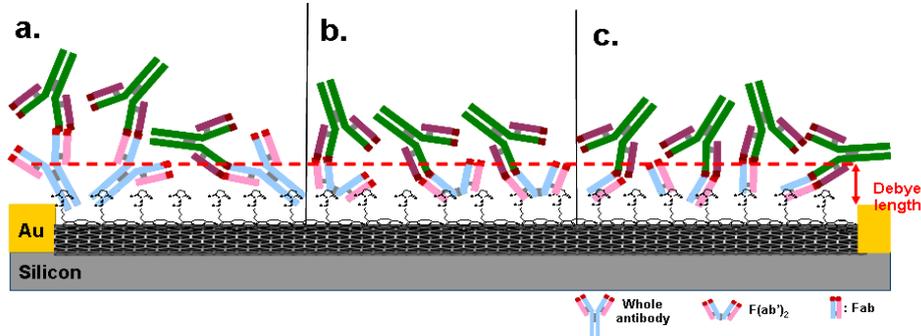


그림 1. CNT 표면에 리셉터의 고정화. (a) 표적물질과 결합하는 전체 항체를 탄소나노튜브에 고정화 하여 표적물질을 검출, (b) F(ab')<sub>2</sub> 만을 탄소나노튜브에 고정화 하여 표적물질을 검출, (c) Fab 만을 탄소나노튜브에 고정화 하여 표적물질을 검출한 경우.

## 결과 및 토론

### (1) 탄소나노튜브 트랜지스터 센서에서 전체 항체를 이용한 표적물질 검출

일반적으로 human IgG의 pI 값은 8.6 정도인데, 우리가 사용하는 버퍼의 pH (7.4)보다 높기 때문에 (+) 전하를 갖게 된다. 이러한 표적 단백질이 p-type 탄소나노튜브 트랜지스터에 게이트 역할을 하며 소스와 드레인의 전류를 감소시킨다. 그러나 그림 2에서처럼 10 ng/ml과 100 ng/ml 농도의 human IgG를 반응시켰을 때는 소스-드레인 전류가 타겟 단백질이 검출 되지 않음을 알 수 있었다. 이러한 이유는 항체의 크기(약 10 nm)가 너무 커서 Debye length 내에서의 면역 반응을 감지하지 못하여 나타나는 현상으로 간주된다 [3]. 그러나 1000 ng/ml human IgG를 반응시켰을 때는 컨트롤 보다 전류 특성이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 이같은 결과에 따라 정상적인 anti-human IgG를 고정화시켰을 때의 검출 한계는 1  $\mu$ g/ml 이었다. 하지만 이러한 검출 한계는 수 ng/ml 농도의 표적물질을 검출해야 하는 질병 진단 센서로서 사용 하는 것은 불가능 하다.

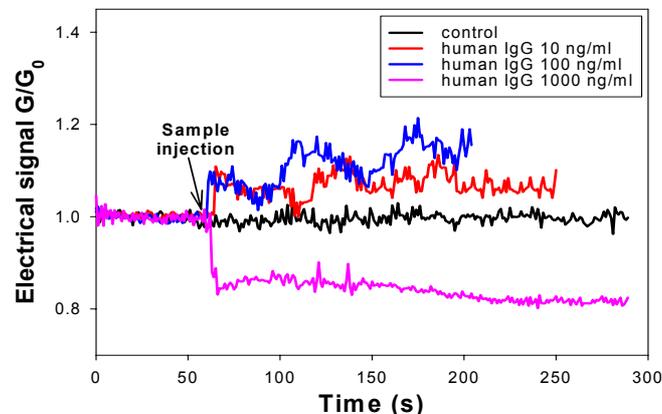


그림 2. 탄소나노튜브의 표면에 항체를 고정화 한 후 표적 단백질을 흘려주었을 때의 전기적 특성 변화

(2) 탄소나노튜브 트랜지스터 센서에서 F(ab')<sub>2</sub>를 이용한 표적물질 검출

위와 같이 항원-항체의 면역 반응 만으로는 탄소나노튜브 트랜지스터 센서를 이용한 질병진단에 있어 심각한 한계를 드러낸다. 일반적으로 병을 진단하기 위한 바이오마커의 기준이 10 ng/ml 전후이기 때문에 탄소나노튜브 트랜지스터 바이오센서를 이용하여 질병 진단을 하기 위해서는 검출 한계를 더 낮춰야만 한다. 따라서 이와 같은 문제점을 해결하기 위해, pepsin을 이용하여 anti-human IgG를 자른 후 생긴 항체 단편인 F(ab')<sub>2</sub>을 같은 방식으로 탄소나노튜브에 고정화 하여 표적물질인 human IgG를 1 ng/ml부터 1000 ng/ml 까지 반응시켰다(그림 3). 이 때 소스와 드레인 사이의 전류 변화를 측정하였는데 human IgG 1 ng/ml를 반응시켰을 때에는 버퍼만 흘려주었을 때처럼 전류가 컨트롤보다 약간 증가하였고, 10 ng/ml 이상의 농도를 흘려주었을 때 전류가 농도에 따라 점점 더 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 항체의 불필요한 부분인 Fc 부분(5 nm)을 잘라 내어 항체의 크기가 절반 정도로 줄어, Debye length 내의 범위 내에서의 면역반응 검출이 일반 항체를 사용한 것보다 더 쉽기 때문으로 사료된다. 이렇게 anti-human IgG의 F(ab')<sub>2</sub>를 탄소나노튜브에 고정화 시켜서 표적물질인 human IgG를 검출 하였을 때, 정상적인 anti-human IgG를 고정시킨 것보다 검출한계가 10 ng/ml로 100배나 높아졌음을 알 수 있었다. 그러나 항체의 높이는 절반정도 수준으로 감소했지만, 여전히 항체의 가로 폭은 10 nm 정도이기 때문에 그 크기를 더 줄여야만 한다.

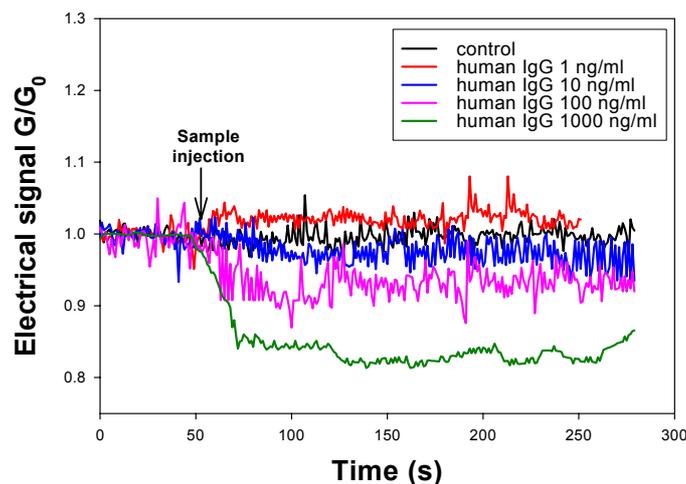


그림 3. 탄소나노튜브의 표면에 F(ab')<sub>2</sub>를 고정화 한 후 표적 단백질을 흘려주었을 때의 전기적 특성 변화

## (3) 탄소나노튜브 트랜지스터 센서에서 Fab을 이용한 표적물질 검출

우리는 F(ab')<sub>2</sub>의 한계를 극복하기 위해 papain으로 F(ab')<sub>2</sub>을 잘라 더 작은 사이즈인 Fab을 만들고, 이를 이용하여 탄소나노튜브에 동일한 방법으로 고정화하였다. 그리고 human IgG를 농도별로 100 fg/ml부터 1 ng/ml까지 탄소나노튜브 트랜지스터 채널에 떨어 뜨려 반응시켰다(그림 4). 이 때 소스와 드레인 사이의 전류 변화를 측정하였는데 human IgG 1 pg/ml 이상의 농도를 흘려주었을 때 전류가 농도에 따라 점점 더 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 1 ng/ml 이상의 농도를 흘려주었을 때는 소스-드레인 전류의 감소폭이 줄어드는 것을 볼 수 있었다. 이는 이전까지 고정되어 있는 Fab anti-human IgG에 human IgG가 모두 결합하여 전류의 감소폭이 줄어드는 것으로 사료된다. 이와 같이 Fab을 리셉터로 사용했을 때의 검출 한계는 1 pg/ml에서부터 100 pg/ml까지였다. 이렇게 anti-human IgG의 Fab을 탄소나노튜브에 고정화 시킨 후 표적물질인

human IgG를 검출 하였을 때, 온전한 anti-human IgG 항체를 고정화 한 것보다 검출한계가 1 pg/ml로  $10^6$ 배나 낮아졌다.

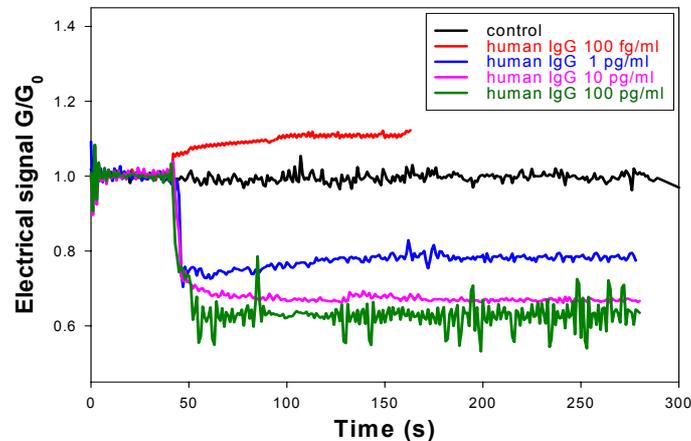


그림 4. 탄소나노튜브의 표면에 Fab을 고정화 한 후 표적 단백질을 흘려주었을 때의 전기적 특성 변화

## 결론

Debye Length는 CNT-FET 바이오센서의 액상에서의 단백질 검출 한계를 결정짓는 매우 중요한 인자이다. 여기서 우리는 탄소나노튜브의 표면으로부터 Debye Length 내에서 면역반응을 일으키기 위해 항체 단편들을 이용한 CNT-FET 바이오센서를 고안하였다. 우리는 이 방법을 이용한 결과 표적 단백질에 어떠한 증폭 과정을 거치지 않고서도 단백질의 검출 한계를 1 pg/ml (약 7 fM 수준)까지 낮출 수 있었다. 이렇게 항체 단편을 사용하는 것은 몇 가지 장점이 있다. 첫째로 질병 진단을 위해 지금까지 개발된 모든 항체를 CNT-FET 바이오센서에 적용 가능하다는 점이다. 또한 리셉터의 크기를 줄여 CNT-FET의 민감도를 대폭 상승시킬 수 있고, 리셉터의 크기가 작아짐에 따라 더 많은 리셉터를 탄소나노튜브의 표면에 고정화시킬 수 있다. 따라서 항체 단편을 이용한 전략은 프로테오믹스나 의료 진단 등에 적용 가능한 주요 돌파구로 이용될 수 있다.

## 참고문헌

1. Maehashi K., Katsura T., Kerman K., Takamura Y., Matsumoto K., and Tamiya E., "Label-free protein biosensor based on aptamer-modified carbon nanotube field-effect transistors," *Anal. Chem.*, **79**, 782-787(2007).
2. So H., Won K., Kim Y. H., Kim B., Ryu B. H., Na P. S., Kim H., Lee J. J., "Single-walled carbon nanotube biosensors using aptamers as molecular recognition elements," *AM. CHEM. SOC.*, **127**, 11906-11907(2005).
3. Schasfoort R. B. M., Kooyman R. P. H., Bergveld P., Greve J., "A new approach to immunoFET operation," *Biosens. Bioelectron.*, **5**, 103-124(1990).
4. Chen R. J., Bangsaruntip, S., Drouvalakis K. A., Kam, N. W. S., Shim, M., Li, Y., Kim, W., Utz, P. J., Dai H., "Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4984-4989(2003).