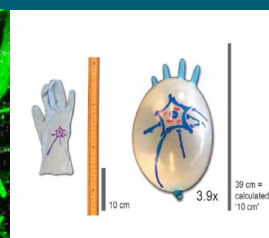
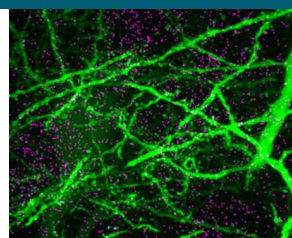
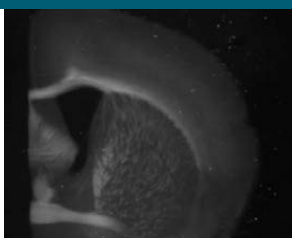
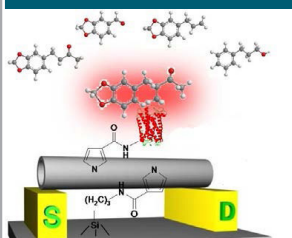


융합연구리뷰

Convergence Research Review

스마트한 센싱 시스템을 위한
바이오전자코 기술

초미세구조 관찰을 위한
조직 팽창 기술



C o n v e r g e n c e R e s e a r c h R e v i e w

Contents

융합연구리뷰 | Convergence Research Review
2017 July vol.3 no.7

- 01 편집자 주
- 04 스마트한 센싱 시스템을 위한
바이오전자코 기술
- 32 초미세구조 관찰을 위한
조직 팽창 기술



발행일 2017년 07월 10일

발행인 하성도

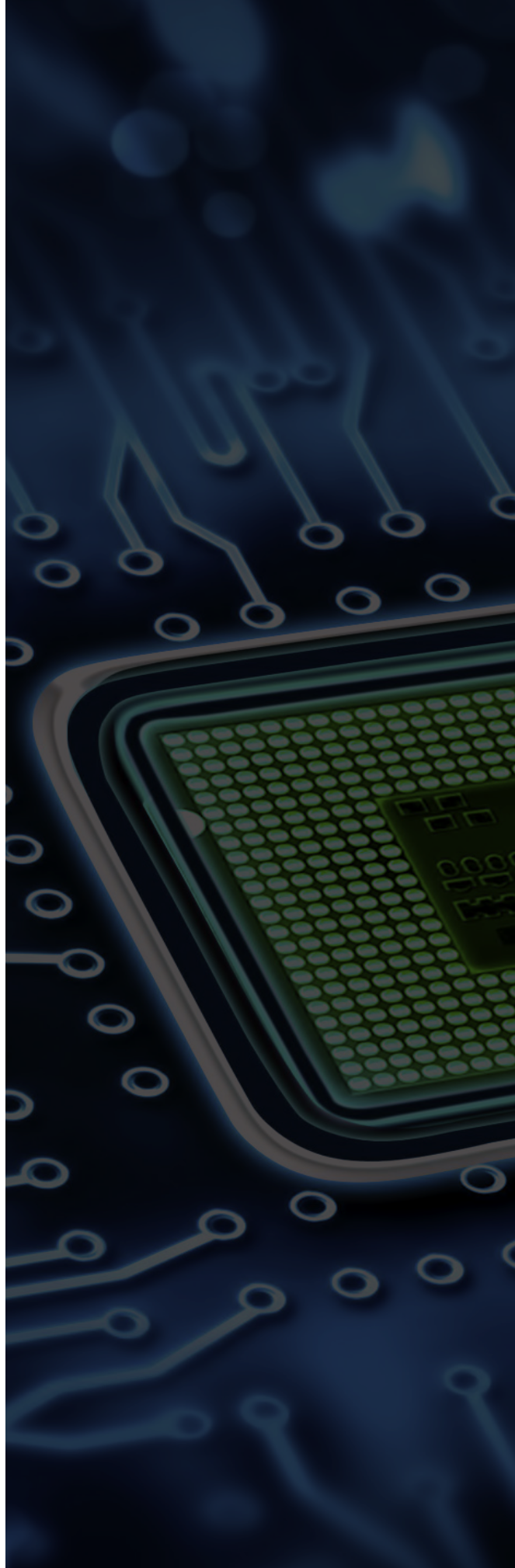
편집인 안주명 김보림

발행처 한국과학기술연구원 융합연구정책센터

02792 서울특별시 성북구 화랑로 14길 5

Tel. 02-958-4984 | <http://crpc.kist.re.kr>

펴낸곳 승일미디어그룹주식회사 Tel. 070-7416-4124



[편집자주]

| 냄새를 보다, 차세대 바이오 전자코 기술

과학기술로 인간의 오감(五感)을 모방하고자 하는 노력은 시각을 모사한 사진기를 비롯하여, 청각의 녹음기, 촉각의 스마트폰 터치에 이르기까지 꾸준히 발전해 왔다. 특히 미각과 후각은 인간의 미세한 감각수용체를 모사해야 하는 영역으로, 세계적으로 국내 연구진이 가장 앞서 연구를 진행하고 있다. 최근 서울대 박태현 교수 연구팀은 한국생명공학연구원과 공동으로 사람처럼 냄새 분자를 직접 탐지할 수 있는 차세대 전자코 기술을 개발하는데 성공하였다.

기존의 전자코 기술은 가스 경보기처럼 공기 중의 '가스'를 탐지하는 기술로, 한 번에 한 가지 냄새 밖에 탐지할 수 없었고 가스가 아닌 경우에는 무용지물이었다. 이러한 한계점을 극복하고자 사람이 냄새를 맡는 원리를 이용하여 바이오 전자코를 개발한 것이다. 즉, 인간의 콧속의 후각 수용체를 유전공학기술을 이용해 똑같이 만들어내고, 이를 센서 부품으로 활용해 바이오 전자코를 제작한 것이다.

이에 본 호 1부에서는 '바이오 전자코, 전자혀'분야의 권위자인 서울대 박태현 교수 연구팀을 통해 차세대 바이오 전자코 기술에 대해 살펴보고자 한다. 바이오 전자코는 유해한 냄새물질을 감지할 뿐만 아니라 식품과 향수 감별, 마약과 생화학무기 조기 검출 등 다양한 분야에 활용이 가능할 것으로 기대되며, 나아가 인간의 오감을 활용한 차세대 나노센서기술에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

| 20배 팽창시켜 뇌를 관찰하다, 초미세구조 관찰 기술

뇌 연구는 21세기 꿈의 기술로 꼽히며, 세계 여러 나라에서 경쟁적으로 연구를 진행하고 있다. 2013년 미국에서 'BRAIN Initiative'를 발표한 이후 유럽연합, 일본, 중국 등이 뇌과학을 국가 대형 프로젝트로 추진 중이며, 이러한 노력으로 뇌 과학 분야의 다양한 연구 기법들이 개발되었다. 그 일환으로 2014년에는 초고해상도 현미경을 개발한 세 명의 과학자들에게 노벨 화학상이 주어지며 뇌 관찰 기술에 대한 관심이 상기되었다.

기존에 개발된 초고해상도 현미경은 값비싼 특수 현미경이 필요하고, 두꺼운 조직을 관찰하기 위해서는 복잡한 시료 준비 과정이 필요하다는 한계가 있었다. 이를 극복하고자 성균관대 장재범 교수 연구팀은 MIT 에드 보이든 교수 연구팀과 공동으로 뇌를 20배 혹은 그 이상 팽창시켜 일반 현미경으로 초고해상도를 얻을 수 있는 기법을 개발했다. 이를 위해 지난 2015년에 개발된 4.5배 뇌 팽창 기술(융합연구리뷰 vol.2,no.1)을 획기적으로 개선하여 뇌 및 다양한 장기를 20배 혹은 50배 이상 팽창시킬 수 있게 만들었다.

이에 본 호 2부에서는 성균관대 장재범 교수를 통해 뇌의 초미세구조를 관찰하기 위한 최신 기술에 대해 살펴보고자 한다. 이 기술은 알츠하이머와 같은 뇌질환의 원인을 이해하고 치료법을 개발하는데 유용하게 활용될 것이며, 뇌 뿐만 아니라 암 연구, 줄기 세포 연구, 혹은 신약 개발 등 다양한 분야에 쓰일 수 있을 것으로 기대된다.

융합연구리뷰

Convergence Research Review 2017 July vol.3 no.7

<http://crpc.kist.re.kr>

01

스마트한 센싱 시스템을 위한 바이오전자코 기술

서울대학교 화학생명공학부
고휘진 연구부교수, 박태현 교수
(hwijinko@snu.ac.kr, thpark@snu.ac.kr)



01 서론

오래전부터 후각은 인간 생활에 있어서 매우 중요한 역할을 해왔다. 냄새를 통해서 음식의 신선함과 부패함 뿐만 아니라 향과 악취를 구분하고 때로는 화재와 같은 위험한 상황을 인지한다. 2004년에 후각의 기작을 연구한 공로를 인정받아 미국의 Linda Buck(워싱턴대)과 Richard Axel(컬럼비아대)에게 노벨생리의학상이 수여되었고, 이를 계기로 많은 연구자들이 후각의 근본적인 연구 뿐만 아니라 후각의 기능을 모사하는 후각센서 연구에 뛰어 들었다. 최근에는 넓은 영역에 걸친 잠재적 응용 가능성으로 인해서 더 많은 연구그룹들이 후각을 모사하는 인공 센서에 대한 연구를 시작하였다.¹⁻⁷⁾ 기존의 전자코와 같은 경우는 화학적 소재를 사용하여 민감도는 뛰어나지만 사용될 수 있는 화학적 소재 종류의 한계로 인해서 다양한 물질에 대한 선택성이 떨어졌다. 이러한 전자코는 나노테크놀로지 기술에 기반을 두고 있는데 최근 들어서 이처럼 민감도는 뛰어나지만 분석물질에 대한 선택도가 떨어지는 단일벽 탄소나노튜브 전계효과 트랜지스터 기반의 센서 소자의 단점을 생물학적 소재를 통해 극복하기 위한 연구가 진행되고 있다. 특히, 후각에서 냄새를 구별하는 중요한 역할을 하는 다양한 형태로 제작된 후각 수용체를 사용하는 바이오전자코(bioelectronic nose)에 대한 연구는 후각의 기능을 모사하는 최초의 바이오센서의 개발이라는 점과 인간의 후각이 *in vitro*ⁱ⁾에서 실현된다는 점에서 큰 의미를 갖는다. 또한 생물학 분야와 나노기술 분야의 융합을 통해 기존에 전자코와 같은 센서들이 가지는 민감도라는 장점과 후각 수용체가 가지는 높은 선택도라는 장점을 접목한 새로운 개념의 바이오센서라는 점에서 중요한 의미를 가지게 된다. 구별능력이 뛰어난 후각 수용체의 사용과 더불어 최근 나노기술의 발전은 바이오전자코의 성능을 급속도로 향상시켰다.

바이오전자코는 크게 두 부분으로 이루어지는데 하나는 1차 신호전달자(primary transducer)이고 다른 하나는 2차 신호전달자(secondary transducer)이다. 1차 신호전달자는 바이오전자코의 선택도를 담당하는 부분으로 냄새분자를 인지하는 생물학적 부분(biological part)이고, 2차 신호전달자는 바이오전자코

i) 라틴어로 'in glass'란 의미로 조직배양에서와 같이 시험관 내에서 조직의 일부 및 유기체를 인공의 조건으로 실험하는 것

의 감도를 결정하는 비 생물학적 부분(non-biological part)이다. 1차 신호전달자로는 세포(cell), 단백질(protein), 나노베시클(nanovesicle), 펩타이드(peptide)와 같은 생물학적 재료들이 사용되고, 2차 신호전달자로는 미세전극(microelectrode), 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR), 수정 진동자 저울(quartz crystal microbalance; QCM), 단일벽 탄소나노튜브 전계효과 트랜지스터(single-walled carbon nanotube-field effect transistor; swCNT-FET), 카르복실화된 폴리피롤 나노튜브 전계효과 트랜지스터(carboxylated polypyrrol nanotube-field effect transistor; CPNT-FET), 그래핀 기반의 전계효과 트랜지스터(graphene-based field effect transistor)와 같은 다양한 나노소자들이 사용된다.³⁻¹¹⁾ 이처럼, 바이오전자코의 성능은 바이오소자와 나노소자를 접목함으로써 상당히 향상되었고, 이러한 바이오전자코의 발달을 통해서 질병의 진단, 식품산업, 향과 관련된 산업, 환경오염의 모니터링, 폭발물 및 위험물 감지를 통한 대테러 및 공공안전과 같은 분야에서 매우 유용하게 사용될 뿐 아니라, 바이오전자코를 이용한 냄새의 시각화 및 표준화를 통해서 멀지 않은 미래에 후각에 대한 전 세계 표준을 확립할 수 있는 계기를 마련할 것으로 기대된다. <그림 1>

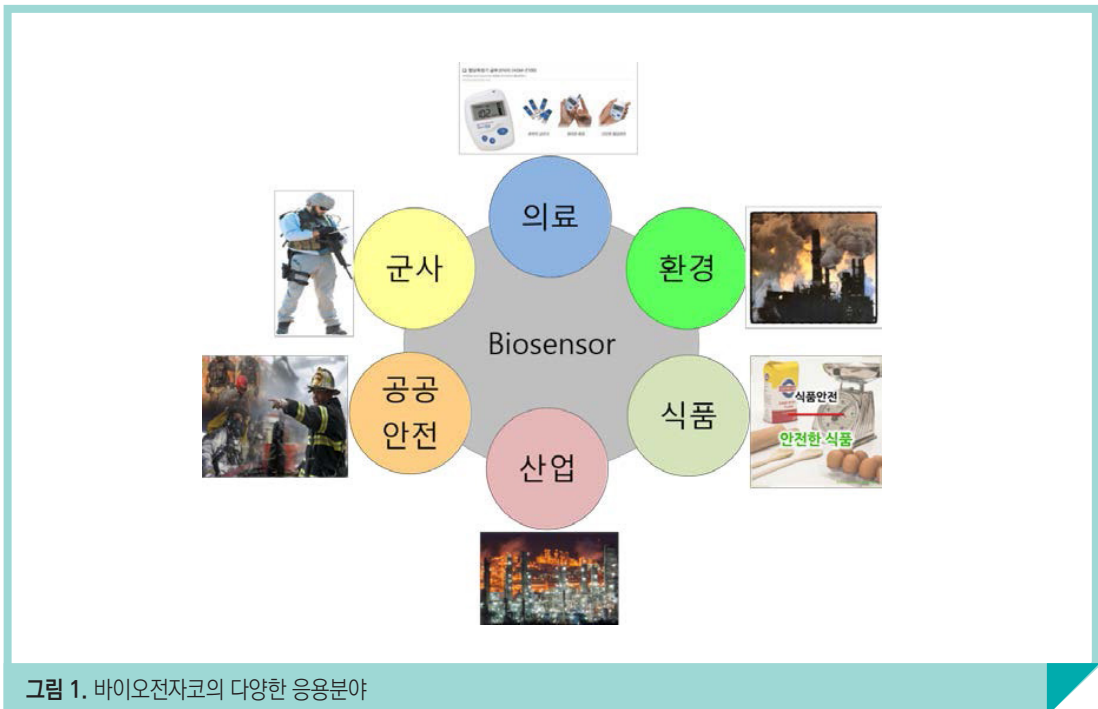


그림 1. 바이오전자코의 다양한 응용분야

02 바이오전자코

2.1 후각신호전달과정(Olfactory Signal Transduction)

냄새를 맡고 이것이 어떠한 냄새인지 뇌에서 인지하는 과정은 다음과 같다. 일반적으로 냄새를 인지한다는 것은 공기 중에 떠다니는 화학적인 분자들이 코를 통해 비강으로 유입되고, 점액질로 덮여 있는 후각 상피세포에 도달하여 후각 상피세포에 존재하는 후각 수용체에 결합을 함으로써 이루어진다.¹²⁻¹⁴⁾ 냄새분자가 후각 수용체에 결합하면 세포 내부에 신호전달 과정을 거쳐 후각 신경세포를 활성화하고, 여기서 발생하는 전기 신호들이 뇌의 사구체(glomerulus)에 전달되어 정리된다. 그 후 뇌의 심층부로 전달되어 우리가 비로소 냄새를 인지하게 되는 것이다. 인간은 냄새를 구별하는 후각 수용체를 약 390여종을 가지고 있는데 다양한 냄새분자들이 다른 결합체기로 후각 수용체에 결합을 하는 조합에 의해서, 약 1만여종 이상의 냄새들을 구별할 수 있다.^{15),16)} 후각에 대한 연구는 오랫동안 이루어져 왔지만 이렇다 할 성과를 내지 못하다가 2004년에 후각 연구 분야에서 노벨 생리의학상이 수여되면서 관심이 더 높아지게 되었고, 후각을 모사하는 바이오센서 개발에 박차를 가하기 시작하였다.¹³⁾

2.2 바이오전자코의 개념

2.2.1 1차 신호전달자(Primary Transducer)

앞에서 기술한 바와 같이 바이오전자코는 뛰어난 구별능력을 가지는 것으로 알려진 생물학적 소자(1차 신호전달자)와 감지능을 증폭시키는 다양한 나노소자(2차 신호전달자)의 접목을 통해서 감도와 구별능력이 뛰어나게 발전되었다. <그림 2>

다양한 생물학적 소자들이 바이오센서의 1차 신호전달자로 사용될 수 있으며, 여기에는 DNA, 효소, 항체, 엡타머, 감각 수용체 등이 있다. DNA는 특정 염기서열에 대한 특이적 상보서열의 결합 특성을 이용하는 것으로 특정 질병과 관련된 특이적 DNA 염기서열을 감지할 수 있으며, 기존에는 PCR (Polymerase Chain

Reaction) 기술이 질병의 진단에 사용되어져 왔으나 현재는 나노소자 기반의 DNA 센서를 사용하여 더 효율적으로 특정 DNA를 감지할 수 있게 되었다.^{17),18)} 효소는 기질에 대한 특유의 결합능력과 생촉매 성질을 이용하는 것이고,^{19),20)} 항체는 항원을 가지는 타겟 기질에 특이적으로 결합하는 특성으로 인해 바이오센서의 효과적인 감지 소자로 사용된다.¹⁹⁾ 최근 들어 많이 사용되고 있는 엠타머는 핵산 혹은 펩타이드로 만들어지는데, 특정 타겟 분자에 결합함으로써 1차 신호전달자로 사용될 수 있다.²¹⁾ 감각 수용체도 특정 물질과의 특이적 결합을 통해 세포 내로 신호를 전달하는 특징을 가지고 있어 많이 사용되는 1차 신호전달자이다. 이처럼 1차 신호전달자로서 생물학적 인지부분의 주요 역할은 서로 다른 다양한 냄새 분자들이 섞여 있는 곳에서 원하는 냄새물질만을 선택적으로 구별하는 것이다. 다양한 1차 신호전달자들 중에서 후각 기능을 모사하는 센서 개발을 위한 시도로 후각 수용체를 이용하려는 노력들이 많이 이루어지기 시작하면서 인공 후각세포, 후각 수용체 단백질, 후각 나노베시클 및 후각 펩타이드 등 다양한 형태로 제작된 후각 수용체들을 이용한 바이오전자코 연구가 많이 이루어지고 있다.

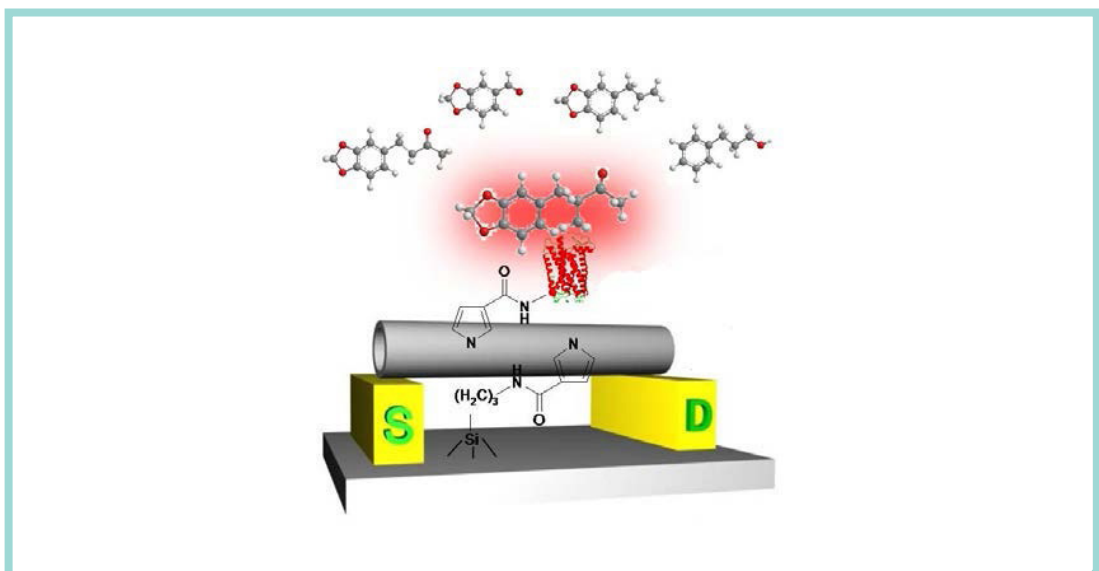


그림 2. 바이오전자코의 구성도(Lee et al., 2012, Biomaterials에서 발췌)



2.2.1.1 인공 후각세포(Artificial Olfactory Cells)

1990년대 이후 많은 연구 그룹들이 동물의 후각상피 조직이나 개구리²²⁾, *C. elegans*²³⁾, 제브라피쉬(zebra fish)²⁴⁾, 쥐²⁵⁾ 자체를 이용하여 후각 신호를 분석하고 후각 수용체에 특이적인 냄새물질을 찾으려는 노력을 해왔다. 하지만 동물로부터 적출한 후각 조직이 정상적인 기능을 하도록 신선하게 유지하는 것이 불가능했고, 같은 종의 동물이라도 동일한 조건을 가지는 조직을 지속적으로 공급하는 것이 사실상 불가능하였다. 이에 더하여, 동물로부터 나오는 후각 신호를 감지하고 분석하는 것과, 기능이 밝혀져 있지 않은 후각 수용체들의 특이적 리간드에 대한 반응을 분석하는 일 등이 쉽지 않았다. 후각 연구에 대한 이러한 제약들은 연구자들로 하여금 실제 후각세포와 유사한 기능을 하는 인공 후각세포를 유전공학적 기법을 사용하여 제작하게 하였다. 효모²⁶⁾, 제노프스 난모세포(*Xenopus oocyte*)²⁷⁾, 곤충 세포²⁸⁾ 및 포유동물세포^{29),30)}에 후각수용체 유전자 삽입을 통한 이종 발현으로, 유전공학적으로 만들어진 후각세포(engineered olfactory cells)가 개발되었다. 이후 다른 이종의 발현 시스템들보다 인간의 후각 세포의 기능을 더 잘 모방하기 위해서 포유 동물세포에 인간의 후각 수용체 유전자를 발현시킨 인공 후각세포가 제작되었고, 이를 이용하여 후각 신호과정에 대한 연구뿐 아니라 리간드가 밝혀지지 않은 후각 수용체의 특이적 리간드를 밝히는 데 사용되었다.²⁹⁻³²⁾ 인공 후각세포의 제작은 먼저 후각 수용체가 자신의 기능을 가지도록 하기 위해서는 세포의 막에 삽입되어 발현되어야 하므로 후각 수용체 유전자의 N-말단 쪽에 rho-tag이라고 하는 시각과 관련된 단백질인 로돕신에서 유래된 막 유도 신호서열을 연결하게 된다. 이렇게 연결된 후각 수용체 단백질은 이종의 포유 동물세포에서 발현되면서 막에 타깃팅이 되어 막에 위치하게 되고, 냄새물질이 막에 발현된 후각 수용체 단백질과 결합하면 세포 내에서 신호전달이 일어나며, 세포가 가지는 고유의 이온채널을 통해서 세포 내로 칼슘이온의 유입이 일어난다. 따라서 이러한 칼슘의 유입을 칼슘 이미징 어세이(calcium imaging assay) 방법을 이용하여 측정하거나 cAMP response element (CRE) 리porter 어세이, bioluminescence resonance energy transfer(BRET) 어세이 혹은 막 전위 어세이(membrane potential assay)를 통해서 측정함으로써, 인공 후각세포의 냄새분자에 대한 반응뿐 아니라 냄새의 농도에 따른 반응의 정도를 확인할 수 있다. 이러한 시스템은 해당 유전자가 클로닝되어 발현된 후각 수용체가 특이적 냄새물질을 구별하고 감지할 수 있다는 가능성을 보여 주었고, 바이오전자코의 개발에 중요한 기초가 될 수 있었다.

2.2.1.2 후각수용체 단백질(Olfactory Receptor Protein)

후각 수용체 단백질은 G-단백질 연결 수용체(G-protein-coupled receptor)에 속하는 막 단백질로 후각기관에서 냄새물질들을 구분하고 인지하는데 1차적으로 중요한 역할을 한다.¹⁵⁾ 인간의 후각 수용체 유전자는 염색체 상에 약 900개 정도가 존재하지만 실제로 후각 수용체로 발현되어 기능을 하는 후각 수용체 유전자 수는 390여개 정도이다.³³⁻³⁵⁾ 후각 수용체 단백질은 막을 일곱 번 통과하는 막 단백질(seven-transmembrane protein)이고 이러한 구조는 후각 수용체가 냄새분자와 특이적으로 결합하는데 중요하다. <그림 3> 인간은 390여개의 적은 숫자의 후각 수용체 단백질의 조합으로 약 1만 종 이상의 냄새물질들을 구별하고 감지할 수 있다. 이러한 특징은 많은 연구자들로 하여금 후각 수용체 단백질을 이용한 바이오센서의 개발에 대한 흥미를 유발하였고, 후각 수용체를 이종의 발현 시스템에서 기능을 가지도록 발현시키는 기술을 발달시켰다. 근래에는 후각 수용체와 나노소자를 접목한 고감도의 바이오전자코들이 개발되었는데,¹⁾ 이러한 바이오전자코의 뛰어난 구별능력은 다양한 1차 신호전달자들 중에서 후각 수용체를 사용하면서 매우 향상되었다.

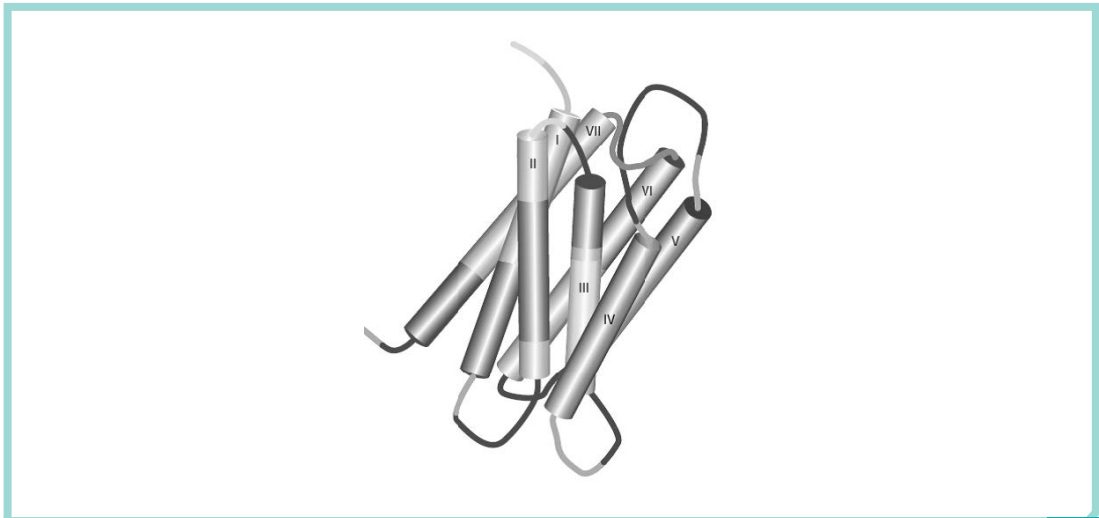


그림 3. 후각 수용체 단백질의 구조(Stuart Firestein, 2001, Nature에서 발췌)



2.2.1.3 후각 나노베시클(Olfactory Nanovesicle)

후각 기능을 가지는 살아있는 세포야말로 후각 기능을 가장 잘 모사하는 훌륭한 센싱 시스템이다. 이러한 세포들은 후각 수용체가 냄새 물질과 결합하는 반응을 하는데 가장 최적의 환경을 제공해 줄 수 있을 것이다. 앞에서 언급한 것처럼 오래 전부터 동물의 후각 조직을 이용한 센싱 시스템을 개발하려는 시도 뿐만 아니라, 후각 수용체를 이중의 세포에서 발현시켜 후각 기능을 가지도록 만든 인공 후각세포를 1차 신호전달자로 하는 바이오전자코를 개발하려는 시도들이 있었다. 하지만 이러한 인공 후각세포는 냄새분자들을 구별하는 능력에서는 센서의 조건을 충족시킬 수 있겠지만, 바이오전자코의 또 다른 필수 조건인 안정성, 재사용성 및 민감도 등을 만족시키지 못한다. 또한 세포의 크기가 2차 신호전달자로 사용되는 나노소자의 크기에 비해서 너무 클뿐 아니라, 살아있는 세포에서 일어나는 다양한 대사과정으로부터 발생하는 노이즈를 민감한 나노소자가 감지함으로 인해서 감도나 구별능력이 떨어진다. 이러한 인공 후각세포의 단점들을 보완하고 인공 후각세포와 동일한 기능을 하지만 살아있지 않아서, 안정성에서 더 뛰어난 1차 신호전달자인 후각 나노베시클이 제작되고 사용되었다. 후각 나노베시클은 인공 후각세포로부터 물리화학적 방법을 통하여 만들어지고, 크기가 200nm 정도로 작아서 세포에 비해서 다루기가 용이하고 나노소자에 안정적으로 고정화가 가능하며, 세포를 사용하는 바이오전자코에 비해서 감도와 구별능력이 뛰어나다는 장점을 가진다.

2.2.1.4 후각 펩타이드(Olfactory Peptide)

후각 수용체 기반의 바이오전자코 기술은 생체 모방 코의 한계를 극복하기 위해서 꾸준히 발달되어 왔고, 그 결과 매우 높은 구별능력과 민감도를 갖춘 바이오전자코가 개발되었다.^{3-6, 36)} 앞에서 설명한 것처럼 후각 수용체는 막을 일곱 번 통과하는 단백질로, 지질 이중층에 삽입되어 있을 때 정상적인 구조와 최적의 기능을 할 수 있다. 하지만 바이오전자코에서 올바른 구조를 가지도록 유지하면서 후각 수용체 자체나 후각수용체를 가지는 다른 구조물들을 나노소자 플랫폼에 안정적으로 고정하는 작업은 여러 단계의 작업을 거치는 까다로운 작업이다. 이러한 이유로 후각 수용체의 냄새분자 결합부위를 펩타이드로 합성하여 사용한다면, 나노소자 기반 센서 플랫폼에 고정화가 더 용이해질 수 있고 더 안정적일 수 있을 것이다. 최근에 후각 수용체 단백질의 냄새분자 결합부위를 모델링하고 C-말단 부위에 방향족 고리를 붙여서 합성된 후각 펩타이드가 탄소나노튜브에 자신의 방향족 고리들과 $\pi-\pi$ 결합이라는 간단한 단계만을 거쳐서 고정화된 바이오전자코가 개발되었다.³⁷⁾ 이러한 펩타이드 기반의 바이오전자코는 기존 다른 형태의 후각 수용체들로 이루어진 1차 신호전달자가 가지는 다양한 한계를 극복하여, 좀 더 안정되고 성능이 뛰어난 바이오전자코 개발을 가능하게 할 것이다.

2.2.2 2차 신호전달자(Secondary Transducer)

바이오전자코에서 미세한 신호를 증폭하는 부분을 2차 신호전달자라고 한다. 2차 신호전달자는 비 생물학적 부분으로 1차 신호전달자에 의해 구별된 특정 냄새분자의 전기적 신호를 증폭하여 감도를 증가시키는 역할을 한다. 2차 신호전달자는 미세전극(microelectrode), 수정 진동자 저울[quartz crystal microbalance (QCM)], 표면 플라즈몬 공명[surface plasmon resonance (SPR)], 전계효과 트랜지스터 [field effect transistor (FET)] 등을 들 수 있는데 이들은 바이오전자코의 1차 신호전달자에서 나오는 신호를 증폭시키는 역할을 해준다. 이 중에서 구별 능력이 뛰어난 바이오소자와 나노소자 기반의 센서 플랫폼의 접목을 통하여 바이오전자코는 더 높은 구별능력과 감도를 가지도록 개발될 수 있었다. 여기서 간단하게 언급한 2차 신호전달자들은 다음에 나오는 “2.3 바이오전자코의 발달” 부분에서 자세하게 설명 할 것이다.

2.3 바이오전자코의 발달

바이오전자코는 다양한 1차 신호전달자들과 2차 신호전달자들의 조합을 통해서 점진적으로 성능이 향상되었다. 여기서는 그 동안 발달되어 온 다양한 성능과 형태의 바이오전자코에 대해서 기술하려 한다.

2.3.1 미세전극 기반의 바이오전자코(Microelectrode-based Bioelectronic Nose)

2000년대 초반까지 칩 기반의 바이오전자코에 대한 다양한 연구들이 진행되어 왔다. 광지시형 전위차 감지기[Light-addressable potentiometric sensor (LAPS)], 미세가공 평판 전극(microfabricated planer electrode), 그리고 깎지형 미세전극(interdigitated microelectrode)가 세포 기반의 후각 센서를 위해 사용되었다. LAPS는 실리콘 기반의 감지장치로 표면에 전기적인 전위의 분포를 측정하는데 LAP위에 고정화된 세포의 외부 전위가 변하면 광전류가 이에 상응하는 파동을 유발하게 되고, 이러한 세포 외부 전위의 변화에 의한 광전류의 파동을 측정함으로써 세포 외부에서 일어나는 작은 변화들을 모니터링 할 수 있다.³⁸⁻⁴⁰⁾ 이러한 응용의 예로, LAPS를 사용한 후각 뉴런 기반의 신경 칩이 개발되었다.^{38),41)} 또한 전기화학적 임피던스 분광측정(Electrochemical impedance spectroscopy measurement) 방법에 의해서도 냄새가 감지될 수 있었다.⁴²⁾ 효모에서 발견된 후각 수용체가 self-assembled monolayer (SAM) 기법을 이용하여 금 전극에 고정화되었고, 전극은 다시 후각 수용체에 특이적인 바이오틴이 결합된 형태로 기능화되었으며 막부위에 있는 후각 수용체에 노출되었다. 이러한 방법을 통하여 지질층 환경 속에 후각 수용체 단백질이 잘 조절된 상태로 고정화될 수 있었고, 후각 수용체와 냄새분자들 간의 반응을 잘 측정할 수 있었다.

2.3.2 SPR 기반의 바이오전자코(SPR-based Bioelectronic Nose)

표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance) 기술은 센서의 표면에서 일어나는 작은 변화를 모니터링하기 위해 표면 플라즈몬 파(surface plasmon wave)를 사용하는 광학적 방법이다. 표면 플라즈몬은 딱딱한 표면 혹은 용액 안의 전자 밀도가 입사광에 의해 변동되는 것을 말한다. SPR은 은과 금처럼 자유전자 유사금속(free electron-like metals)들에서 일어난다. 금속에서 전자들은 전하를 띤 구름처럼 끊임없이 자유롭게 움직인다. 빛이 금 표면에 집중되면 공명 조건이 만들어지고 빛으로부터 표면의 전자로 에너지가 전달된다. 반사율이 0으로 떨어지는 특정 각을 공명 각(resonance angle)이라고 하는데 반사율은 표면의 어떠한 변화들 혹은 표면 근처에서의 결합반응 등에 의해서 변화될 수 있다. 이와 같이 SPR 시스템은 실시간으로 다양한 생체분자들의 상호작용들을 감지하는 바이오센서로 사용될 수 있다.^{43,44)}

1983년 처음으로 SPR이 바이오센서로 사용되었고, 이후로 리간드 스크리닝, 세포 생물학, 신호전달, DNA-DNA, DNA-단백질, 단백질-단백질, 단백질-지질 등의 다양한 생물학적 응용들에 사용되고 있다.⁴⁵⁻⁴⁷⁾ 최근에는 이러한 SPR 시스템을 이용하여 GPCR(G-protein coupled receptor)의 리간드 스크리닝과 신호전달 연구가 진행되었다.^{48),49)} 이러한 기술은 또한 냄새분자와 후각 수용체간의 결합을 감지하기 위해 사용되었는데, 여기서는 쥐의 ORI7과 G_{olf} 가 효모에서 동시에 발현되고 ORI7과 G_{olf} 을 가지는 나노솜(nanosomes)들이 물리적 자극을 통해 효모로부터 얻어졌다. 이러한 나노솜들은 다시 SPR의 표면에 고정화되고 냄새분자에 의한 후각 수용체의 활성화가 지질 이중층으로부터 G_{olf} 를 떨어뜨리는 것을 확인하였다. SPR 시스템을 이용한 세포 기반의 냄새물질 감지가 또한 수행되었는데 여기서는 SPR의 센서 표면에 후각 수용체 ORI7을 발현하는 인공 후각세포가 배양되었고, 특정 냄새의 자극에 의한 후각 세포의 반응이 반사율의 변화를 통해서 관찰되었다.^{50,51)} 이러한 연구에서 SPR 시스템은 냄새에 의해서 유발된 세포의 반응을 측정할 뿐만 아니라, 냄새결합 단백질(odorant binding protein)의 기능적 역할을 연구하는 데도 사용되었다.

2.3.3 QCM 기반의 바이오전자코(QCM-based Bioelectronic Nose)

압전효과(piezoelectric effect)를 이용하는 수정진동자저울(quartz crystal microbalance; QCM)은 작은 분자들 간의 상호작용을 감지할 수 있다. 많은 연구자들이 냄새물질을 감지하기 위해서 중합체, 지질, 효소, 펩타이드, 단백질과 같은 다양한 센싱 소자들을 표면에 코팅한 QCM 센서를 제작하였다. QCM은 간단하고 높은 민감도와 편리성을 가진다. 특정 가스 분자들이 QCM에 코팅되어 있는 물질과 결합하면 표면의

전체 질량이 증가하고, 이러한 질량의 변화가 수정의 공명 주파수(resonance frequency)를 감소시킨다. 가스 분자들을 정량적으로 감지할 수 있는 QCM의 능력 덕분에 화학적으로 변화된 QCM의 표면을 사용하는 냄새 감지 시스템을 개발하기 위한 많은 연구들이 이루어졌다. 예로써, 알코올(alcohol), 에스테르(ester), 산(acid), 알데히드(aldehyde) 같은 다양한 냄새분자들을 감지하기 위해서 pegylated lipid와 calixarene film이 QCM의 코팅 물질로 사용되었다.⁵²⁻⁵⁴⁾ 그러나 화학적 변형으로 만들어진 QCM은 구조적으로 유사한 분자들을 구분하는 데는 한계를 가지고 있다. 이러한 단점들을 보완하기 위해서 후각 수용체 단백질이 코팅된 QCM 센서가 개발되었다. 예로써, *C. elegans*의 후각 수용체인 ODR10이 대장균에서 발현 및 정제되었고 QCM의 금 표면에 코팅되었다. 제작된 QCM 센서는 특이적인 리간드인 디아세틸(diacetyl)을 구분할 수 있을 뿐 아니라 10^{-12} - 10^{-5} mM까지의 농도를 감지하는 능력을 보여주었다.¹⁰⁾ 이와 유사하게 동물세포 막에 쥐의 후각 수용체인 I7을 발현하여 인공 후각세포를 만들고, 이 인공 후각세포를 QCM의 금 표면에 배양하고 건조시켜서 제작된 QCM 센서는 I7에 특이적인 냄새분자인 다양한 농도의 옥타날(octanal)에 반응하였으며, 이와 더불어 다른 냄새분자들로부터 옥타날을 특이적으로 구별하여 감지하는 결과를 보여주었다.⁹⁾ 또 다른 연구로 후각 수용체 기반의 폴리펩타이드가 QCM에 고정화되어 10ppm의 낮은 농도의 아세트산을 감지할 수 있었다.⁵⁵⁾ 이러한 결과들은 QCM 센서가 높은 감도와 구별능력을 가지고 냄새분자들을 감지하는데 유용하게 사용되어질 수 있다는 것을 보여주고 있다.

2.3.4 전계효과 트랜지스터 기반의 바이오전자코(Field Effect Transistor-based Bioelectronic Nose)

전계효과 트랜지스터에 기초한 나노미터 크기의 센서가 개발되어 왔다. 최근 들어서 단일벽 탄소나노튜브 전계효과 트랜지스터(single-walled carbon nanotube field-effect transistor)와 카르복실화된 폴리피롤 나노튜브 전계효과 트랜지스터(carboxylated polypyrrol nanotube field-effect transistor)가 후각 수용체와 접목되어, 매우 높은 민감도와 구별능력을 보여주며 특이적인 냄새 분자를 감지할 수 있다. 예로써, 인간 후각 수용체인 hOR2AG1이 대장균에서 발현되고 부분적으로 정제된 후, 단일벽 탄소나노튜브 전계효과 트랜지스터에 고정화되어 만들어진 바이오전자코가 특이적 냄새분자인 아밀부티레이트(amylobutyrate)를 감지하였다. 후각 수용체와 냄새분자의 결합은 탄소나노튜브에 전압을 걸어 전류를 흘려주고 다양한 농도의 아밀부티레이트가 첨가되었을 때 아밀부티레이트와 후각 수용체와의 결합이 전류의 흐름을 방해하여 전류가 급격하게 감소하였다. 이 바이오전자코의 감지한계는 100 fM¹¹⁾이었고, 비슷한 구조를 가지는 다른 냄새분자들로부터 특이적 냄새분자만을 선택적으로 감지하는 고 선택도를 보여주었다.³⁾ 일반적으로 전자코는



기상에 있는 냄새를 감지하는 것으로 수십 ppb정도를 감지하며 fM의 경우는 수용액상에 있는 냄새분자를 감지하는 단위라서 직접적인 비교가 불가능하지만, 바이오전자코의 경우 기상에 있는 냄새를 0.02ppt 수준으로 감지를 할 수 있으므로 기상 냄새의 경우 약 10만배 정도 차이가 있다고 볼 수 있다.

다른 연구에서는 swCNT-FET 센서 시스템에 후각 수용체로부터 유래되어 후각 수용체와 후각 신호전달 물질들을 포함하는 후각 나노베시클이 사용되었는데 hOR2AG1을 가지는 후각 나노베시클이 swCNT-FET에 고정화된 후, 특정 냄새분자에 대한 반응이 측정되었다. 후각 나노베시클의 경우 세포와 유사하게 후각 반응에 필요한 신호전달 물질들과 막에 이온채널들이 존재하므로 냄새에 의해 후각 수용체가 자극되면 신호전달이 이루어지고, 나노베시클의 외부로부터 칼슘이온들이 막에 위치해 있는 이온채널들을 통해서 유입되는데 이러한 변화가 탄소나노튜브의 전류 흐름을 감소시키고 이것이 측정되게 된다. 이 연구에서 개발된 바이오전자코는 폐암의 특이적인 마커를 높은 민감도와 구별능력을 가지고 감지하여 폐암의 진단 센서로서의 가능성을 보여주었다.⁵⁶⁾

최근에는 펩타이드 기반의 swCNT-FET 바이오전자코가 개발되었을 뿐만 아니라, CPNT-FET 센서에 hOR2AG1이 결합된 바이오전자코가 개발되었고 10 fM까지의 매우 낮은 농도의 냄새분자를 감지할 수 있었다.^{4),37)} 2012년에는 대장균에서 발현된 인간 후각 수용체 hOR3A1 단백질이 CPNT-FET에 고정화되어 특이적 냄새분자인 가스 상태의 헬리오날(helional)을 감지하여 바이오전자코가 인간의 후각 시스템을 더욱 근접하게 모방하게 되었으며, 민감도는 인간과 유사한 0.02 ppt까지 감지할 수 있었다. 이러한 감지능은 기존의 다른 가스 센서보다 훨씬 더 감도가 뛰어난 것이었다.

이러한 탄소 및 폴리피롤 나노튜브들 이외에 그래핀 기반의 전계효과 트랜지스터를 이용한 바이오전자코가 개발되었다. 이 바이오전자코의 특징은 신호가 안정적이며 구부러질 수 있는 특성을 가지므로, 다양한 형태의 바이오전자코 개발이 가능하다는 장점을 가진다. 연구팀은 이 바이오전자코를 이용하여 0.04 fM의 극히 낮은 농도로 냄새분자의 단일 탄소 원자의 차이까지 구별해내는 초민감도와 구별능력을 가지는 바이오

ii) fM은 수용액상에 있는 냄새분자를 감지했을 때 단위를 나타내는 것으로, 10^{-15} M 만큼 낮은 농도의 냄새분자를 감지한다는 것을 의미함. 예를 들어 여기서 측정된 아밀부티레이트의 분자량이 158이므로 1리터의 용액안에 1.58×10^{-13} g 즉 0.158피코그램(pg) 만큼 들어있는 아밀부티레이트를 감지할 수 있는 것을 의미함

전자코의 개발이 가능하다는 것을 보여주었다.¹¹⁾ 최근에는 다중 바이오전자코(multiplexed bioelectronic nose)가 개발되었는데, 다양한 타깃물질들을 현장에서 빠르고 간편하게 그리고 동시에 감지가 가능하게 되었다. 이 바이오전자코는 대장균에서 발현된 후각 수용체와 미각 수용체 단백질들을 재구성하여 다채널 타입의 탄소나노튜브 전계효과 트랜지스터에 고정화한 후, 음식 오염의 표지자로 알려진 다양한 냄새 및 맛 물질들에 대해서 높은 민감도와 구별능력을 가지고 동시에 측정을 할 수 있었다.⁵⁷⁾ 이 바이오전자코 시스템은 사람의 후각 시스템에서처럼 냄새물질 혹은 맛물질들의 다양한 패턴 인식이 가능하고 휴대가 가능하도록 제작되어 현장에서 다양한 적용분야가 가능한 센싱 플랫폼으로 사용될 수 있을 것이다. <그림 4>

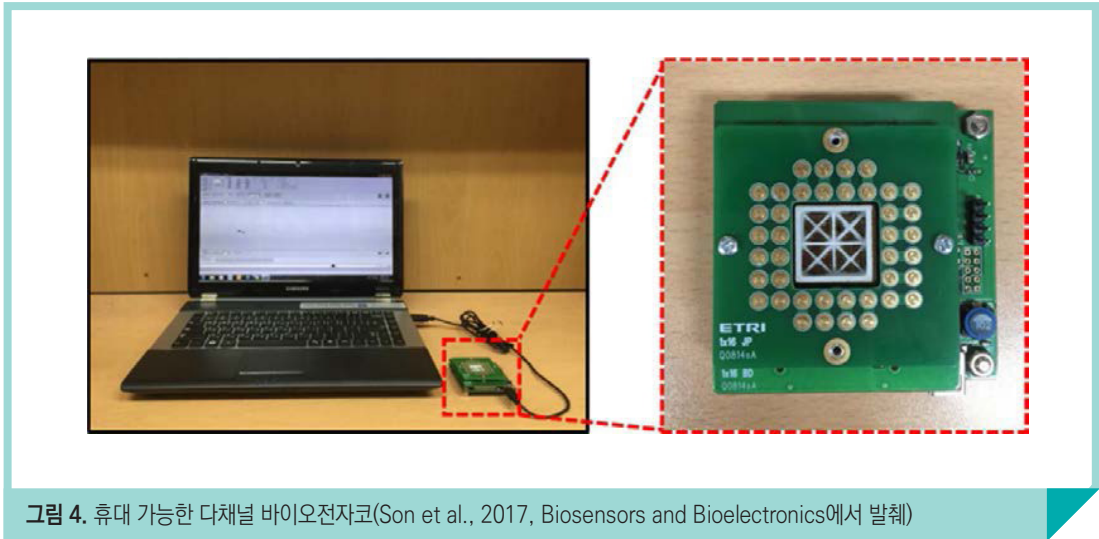


그림 4. 휴대 가능한 다채널 바이오전자코(Son et al., 2017, Biosensors and Bioelectronics에서 발췌)

2.4 바이오전자코 개발에서의 도전

2.4.1 냄새의 시각화(Smell Visualization)

냄새를 맡는 감각은 동물들 뿐만 아니라 인간 생활에서도 중요한 역할을 하고 있다. 냄새를 맡음으로써 음식의 신선도, 다양한 맛 및 상한 정도 등을 알 수 있고 위험한 상황이나 물질을 알아내어 자신을 보호하는 수단으로 사용될 수도 있다. 또한 다양한 향기와 향수 등의 좋은 냄새를 맡으면 기분이 좋아지거나 스트레스가 줄어들고, 심지어 특정 냄새와 기억이 연결될 경우 오랜 세월이 흐른 뒤에도 예전에 맡았던 냄새에서 옛날의 기억을 쉽게 떠올릴 수도 있다. 그럼에도 불구하고 냄새에 대한 정확한 정보는 설명이 불가능할 때가 많고,



냄새에 대한 표현은 매우 주관적이라서 같은 냄새가 개인에 따라서 다르게 인지될 수도 있다. 이러한 개인차는 개개인의 경험 혹은 냄새를 맡는 능력에 따라 발생하는 것이다.

지난 100여년 동안 많은 과학자들이 객관적으로 냄새를 분류하고 설명하려는 시도들을 해왔지만 실패하였다. 이와 더불어 냄새의 객관적 표현을 위해서 다양한 기술들을 사용하여 냄새를 시각화하려는 많은 노력이 있었다. 지금까지는 조향사와 같은 전문가, GC-MS와 같은 복잡하고 큰 장비, 혹은 전자코가 냄새를 객관적으로 감지하고 인지하는데 주요한 역할을 해왔고 최근에 와서는 광전자코(optoelectronic nose)가 이러한 목적을 위해서 개발되었지만 민감도나 구별능력 그리고 시각화될 수 있는 냄새의 수 등에 대한 몇 가지 한계들이 여전히 존재한다.

최근 개발되고 있는 바이오전자코는 나노바이오테크놀로지 기술의 향상과 더불어 크게 진보되었다. 특히, 유전공학적으로 만들어진 후각세포는 인간의 후각 시스템을 모방할 뿐 아니라 어떠한 종류의 후각 수용체라도 발현할 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서, 다양한 나노물질들과 인간의 후각 수용체 혹은 인공 후각세포로부터 만들어진 후각 나노베시클이 결합된 나노소자로 만들어진 바이오전자코는 인간에 의해 인지되는 거의 모든 냄새들을 감지할 수 있는 가능성을 가진다. 이러한 바이오전자코는 다음의 두 가지 기술을 통해서 기존에 다른 어떤 센싱시스템도 성공하지 못했던 냄새의 시각화 및 객관화를 이룰 수 있는 유용한 수단이 될 것으로 기대된다.

첫째는 다채널 어레이 시스템 기술의 확립이다. 인간의 코가 약 390종류의 후각 수용체를 어레이 타입으로 가지고 있는 것처럼 하나의 센서 칩 안에 모든 종류의 후각 수용체들을 집적할 수 있도록 하는 다채널 어레이 시스템 기술은 필수적일 것이다. 둘째는 이처럼 다채널 어레이 시스템을 통하여 약 390여개의 후각 수용체에서 나오는 신호를 분석하고 특정의 색이나 이미지로 전환하여 시각화하는 기술이 확립되어야 할 것이다. 이러한 기술들을 통해서 코에서만 인지되었던 냄새가 눈을 통해서 인지될 수 있는 시대가 곧 도래할 것으로 기대된다.

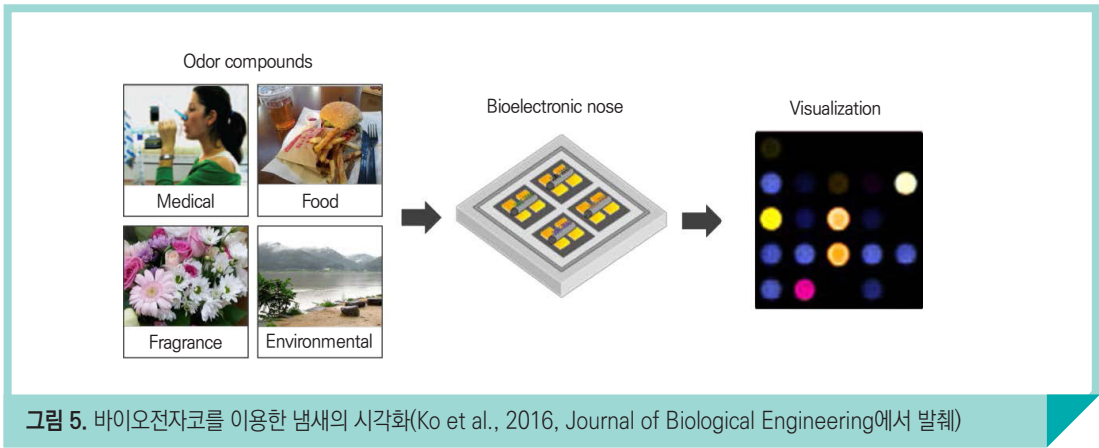


그림 5. 바이오전자코를 이용한 냄새의 시각화(Ko et al., 2016, Journal of Biological Engineering에서 발췌)

2.4.2 냄새의 표준화(Smell Standardization)

앞장에서 설명한 것처럼, 같은 냄새라도 개인의 경험 등에 의해서 다르게 인지될 수 있다. 따라서 개인 간에 냄새에 대해서 정보를 정확히 표현하고 공유하는 것이 쉽지 않다. 특히 멀리 떨어져 있는 개인간의 경우, 언어로 냄새를 표현하는 것은 더더욱 그렇다. 따라서 멀지 않은 미래에는 냄새에 대한 객관적인 정보를 공유하기 위해서 냄새를 분류하고 표준화하는 기술의 개발은 필수적일 것이다.

바이오전자코는 인간의 후각 시스템을 가장 잘 묘사하여 개발된 센싱 시스템이다. 인간이 갖는 다섯가지 감각들 중에서 시각, 청각 및 촉각 등은 이미 잘 연구되어 있어서 이들 감각 기관을 묘사하여 신호들을 기록하고 재생하는 장치가 잘 개발되어 있다(Table1). 예로써, 카메라는 우리가 보는 것을 그대로 포착하여 담아낼 수 있고 음성 기록장치도 우리가 듣는 것을 기록하여 동일한 소리로 재생할 수 있다. 압력센서의 경우 이미 개발되어 사용하고 있지만 인간의 촉각을 이용한 장치의 예로써 현재 통용되는 스마트폰이나 태블릿 PC는 인간의 손에 의한 접촉과 압력에 따라 작동된다. 이러한 장치들은 우리가 보고, 듣고, 만지는 것과 같은 주관적인 정보를 객관적인 정보로 전환하여 사람들에게 알려주게 된다. 인간의 시각 시스템에서 사물의 인지는 빛의 세기와 파장에 의해서 코드화되고 카메라, TV 모니터 같은 다양한 장치들을 통해서 RGB(red-green-blue) 표준색으로 재생될 수 있다.

표 1. 인간의 오감과 이들의 표준화(Son et al., 2017, Trends in Biotechnology에서 발췌)

Sense	Organ	Receptor	Standardization parameter	Device			
				Capturing	Display	Prosthesis	
Physical	Vision	Eye	Photoreceptor	Light wavelength, light amplitude	Camera	Monitor	Artificial retina
	Hearing	Ear	Cochlea receptor	Sound frequency, sound amplitude	Microphone	Speaker	Cochlear implant
	Touch	Skin	Cutaneous mechanoreceptor	Pressure	Tactile sensor	-	Electronic skin
Chemical	Smell	Nose	Olfactory receptor	Receptor-odorant binding pattern, binding intensity	Bioelectronic nose	Olfactory display system	-
	Taste	Tongue	Taste receptor	Receptor-tastant binding, binding intensity	Bioelectronic tongue	-	-

인간의 후각 시스템의 경우, 냄새분자의 숫자는 수없이 많지만 실제로 기능을 하는 인간의 후각 수용체 단백질은 겨우 390여개에 불과하므로 기존의 센싱 시스템을 사용하여 이들의 조합에 대한 정보를 분석하는 것은 매우 어려운 일이다. 더욱이 냄새는 개인의 감정과 경험에 기초하여 인지되고 냄새에 대한 어떠한 분류나 표준도 정해져 있지 않으므로⁵⁸⁾ 냄새의 표준화는 이 세상에 존재하는 다양하고 무수한 냄새들을 객관적으로 구분하고 개개인의 주관적인 개입 없이 냄새에 대한 객관적인 정보를 서로 교환하고 소통할 수 있게 해줄 것이다. 기존의 고전적인 실험 방법은 인간의 후각을 연구하기 위해 개발되었지만 적응⁵⁹⁾, 유전적인 다양성⁶⁰⁾과 같은 후각에 내재하는 몇몇 현상으로 인해 냄새의 표준화에 적합하지 않다. 또한 현재의 세포 기반의 어세이드 민감성이나 반응속도 면에서 매우 낮다는 단점을 가진다.⁶¹⁾ 따라서 냄새의 표준화를 위해서는 인간의 후각 시스템을 가장 잘 모사하고 민감하며 반응이 빠르고 복잡한 형태의 냄새분자들의 복합물도 표현할 수 있는 새로운 센싱 플랫폼이 필요하다.

본 리뷰에서 설명한 바이오전자코는 인간의 후각 수용체와 나노소자들을 접목하여 냄새들 간을 쉽게 구별하고 실시간으로 빠르고 민감하게 감지할 수 있고, 심지어 인간이 인지하는 정도 이상의 낮은 농도의 냄새분자들을 감지할 수 있는 뛰어난 성능을 보여주었다.^{4),(62)} 냄새의 표준화를 위해서는 앞서 설명한 바이오전자코

의 장점들 이외에 바이오전자코 시스템의 다채널, 신호분석 및 표현 기술이 요구될 것이다. 하나의 센서 칩 안에 모든 종류의 후각 수용체들을 집적하여 어레이 형태로 제작함으로써, 한가지 냄새 뿐 아니라 복잡한 복합물로 존재하는 냄새들을 패턴형식으로 인식하여 인간의 코와 뇌가 냄새를 맡았을 때 작동하는 원리와 유사하게 후각 패턴을 정의할 수 있을 것이고, 여기에 앞에서 설명한 냄새의 시각화 기술이 접목된다면 이러한 과정들을 통해서 냄새의 표준화뿐 아니라 개인간에 냄새에 대한 객관적인 정보의 전달이 가능한 시대가 머지않아 도래할 것이다.

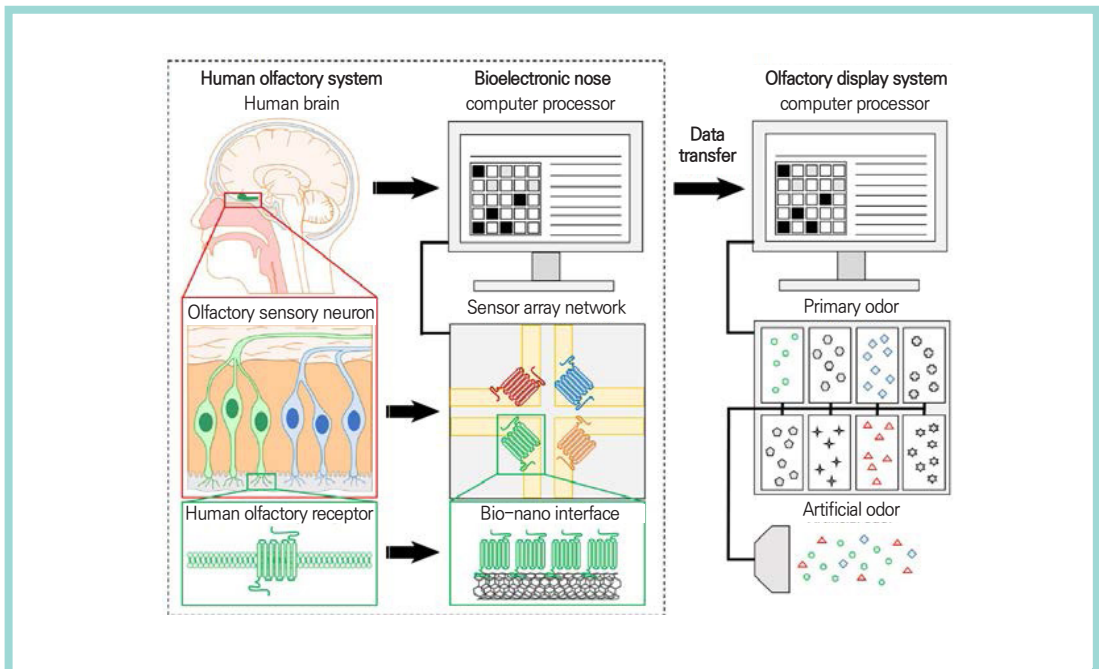


그림 6. 바이오전자코를 사용한 냄새의 표준화와 냄새 정보의 전달과정의 개념도
(Son et al., 2017, Trends in Biotechnology에서 발췌)



2.5 바이오전자코의 잠재적 응용분야

2.5.1 의학분야(Medical Field)

사람의 몸에서 나오는 휘발성 유기물질은 많은 질병들의 중요한 표지자가 될 수 있다. 이러한 휘발성 유기물질들은 구강, 겨드랑이, 발, 두피, 피부 그리고 날숨 등 다양한 부위에서 나오며 신체의 감염, 정신적인 스트레스, 몸의 면역상태, 질병의 유무 등과 같은 인간의 건강 상태에 대한 정보를 제공해 준다. 이처럼 환자의 몸에서 특히 날숨으로 발산되어 나오는 휘발성 유기물질들은 바이오전자코에 의해 감지되어 손쉽게 질병을 진단할 수 있다. 최근에 폐암을 진단하는 바이오전자코가 개발되었는데 이는 헵타날(heptanal)을 감지함에 의해 폐암을 진단할 수가 있었다. 휘발성 유기물질인 헵타날은 폐암에 특이적인 바이오마커로 일반인의 혈액보다 환자의 혈액에 더 많이 존재한다. 바이오전자코 제작을 위해서 헵타날에 특이적으로 결합하는 인간 후각 수용체가 390여종으로부터 스크리닝 되었고, 이종의 동물세포에 발현시켜 후각세포를 만든 후 이 세포로부터 후각 나노베시클이 만들어져 1차 신호전달자로 사용되었다. 이렇게 만들어진 후각 나노베시클은 2차 신호전달자인 단일벽 탄소나노튜브 전계효과 트랜지스터(Single-walled carbon nanotube field-effect transistors)에 고정화를 통해서 사람의 혈장으로부터 100 fM의 낮은 농도의 헵타날을 구별하고 감지할 수 있었다. 이와 같이 바이오전자코는 인간의 다양한 질병을 간단히 조기에 진단하여 빠른 치료를 가능하게 하고, 건강한 사회를 만들 수 있을 뿐 아니라 인류의 기대수명을 늘리는데 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

2.5.2 환경분야(Environmental Field)

현대 사회는 산업의 급속적인 성장으로 윤택한 생활을 영위하게 되었지만 그에 대한 댓가로 환경 오염물질이 증가하였다. 이러한 오염물질들은 전 세계의 환경뿐 아니라 우리의 건강과 생태계에 위협이 되어왔다. 환경오염은 산업 공정 과정에서 CO₂의 방출과 다양한 독성 물질들이 대기에 방출되는 대기오염과 토양, 강 및 바다로 유입됨으로써 발생하는 토양 및 수질오염들이 있다. 이러한 독성 물질들의 오염여부는 환경 뿐만 아니라 개개인의 건강을 위해서도 모니터링되고 통제되어야 하며, 이를 위해서 효과적인 감지 시스템이 필요하다. 바이오전자코는 이러한 환경오염을 모니터링하는데 적합한 방법일 수 있다. 다만 수질오염의 경우는 현재 개발되어 있는 타입의 바이오전자코의 사용이 가능할 수 있지만 대기오염의 경우는 1차 신호전달자인 후각 수용체 단백질이 액체 상태가 아닌 건조한 상태에서 대기 오염물질을 측정해야 한다. 따라서 단백질

인 후각 수용체가 건조한 조건에서도 여전히 기능을 발휘할 수 있는지의 여부가 중요하다. 한 연구 그룹이 이러한 후각 수용체의 문제를 후각 펩타이드를 사용하여 해결하였는데 건조한 조건에서도 후각 펩타이드는 잘 알려진 공기 오염물질인 트리메틸아민과 암모니아를 효과적으로 감지하였다. 또한 대장균에서 발현되고 정제된 후각 수용체 단백질이 카복실화된 폴리피롤 나노튜브(carboxylated polypyrrole nanotube)와 결합되어 건조한 조건하에서 냄새물질을 감지한 예도 있다.³⁶⁾ 이 바이오전자코는 가스상태의 냄새를 0.02 ppt 까지 식별할 만큼 고민감도를 가지고 선별적으로 감지하였다. 이 경우는 후각 수용체가 정상적인 작용을 하기 위해서 지질 이중층에 삽입된 상태가 되어야 하는 조건은 만족시키지 못했지만 특이적 결합은 이루어진 경우이다. 최근에는 후각 나노베시클과 단일벽 탄소나노튜브 전계효과 트랜지스터를 사용하여 물의 오염을 실시간으로 감지하는 바이오전자코가 개발되었다.⁶³⁾ 이러한 예들에서 볼 수 있듯이 바이오전자코는 환경 오염 물질들을 감지하여 환경을 모니터링하고 조정하는데 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

2.5.3 식품분야(Food Field)

식품의 품질은 소비자의 선택 및 상품의 판매량과 밀접하게 관련이 있으므로 식품의 품질을 관리하는 것은 식품 산업에서 중요한 이슈이다. 일반적으로 부패한 음식으로부터 나오는 냄새는 박테리아나 곰팡이에 의한 음식의 오염이나 음식의 산패에 의해서 유발된다.⁶⁴⁻⁶⁶⁾ 이처럼 부패한 음식의 섭취는 심각한 건강상의 문제를 유발하므로 상한 식품을 구별하고, 정상적이고 신선한 음식을 구분하여 섭취하는 것은 매우 중요한 일이 될 것이다. 이러한 역할은 사람의 코가 담당해 왔지만 개개인에 따라 인지능력이 다르고 감도가 낮은 단점을 가진다.

식품의 상한 척도로 직선형 알데히드의 양이 불포화 지방산의 산화에 의해서 비례적으로 증가한다는 것은 잘 알려진 사실이다.⁶⁷⁾ 바이오전자코에 대한 최근의 연구는 음식의 상한 정도를 나타내는 척도인 헥사날(hexanal)을 뛰어난 구별능력과 고민감도로 감지할 수 있음을 보여주었다.⁶⁾ 이 연구에서는 1차 신호전달자로 개의 후각 수용체를 사용하였고 2차 신호전달자로 단일벽 탄소나노튜브 전계효과 트랜지스터를 사용하여 1 fM의 낮은 농도로 헥사날을 감지할 수 있었을 뿐 아니라 상한 우유에 존재하는 헥사날도 구별하여 감지하였다. 또 다른 바이오전자코에 대한 연구는 해산물의 품질을 상한 해산물에서 나오는 트리메틸아민(trimethylamine)을 측정하여 결정하였는데 이 경우는 후각 펩타이드 수용체와 단일벽 탄소나노튜브 전계효과 트랜지스터를 사용하였다.³⁷⁾ 이 센서는 굴, 새우, 랍스터 같은 상한 해산물을 우유, 토마토, 소고기 등의



상한 음식으로부터 구분하였을 뿐만 아니라 해산물의 상한 정도를 단계별로 측정할 수 있었다. 이와 유사한 시기에 곰팡이에 오염된 곡물을 감지하는 바이오전자코도 개발되었는데 이러한 바이오전자코는 집에서 뿐만 아니라 산업현장에서 음식 및 식품의 품질을 평가하고 제어하기 위해 널리 사용될 것으로 기대된다.

2.5.4 다른 응용분야(Other Application)

실제적으로 바이오전자코의 가능한 응용분야들은 다양한 분야에 넓게 분포할 수 있다. 우리 삶의 질이 향수 등 향 관련 산업을 통해서 향상될 수 있고, 바이오전자코가 이러한 브랜드의 품질을 조절하는데 사용될 수 있을 것이다. 공정 모니터링 또한 고품질의 생산품을 생산하기 위해서 바이오전자코의 도움을 받아야 할지 모른다. 전 세계적으로 폭발물, 독성물질 등의 테러에 대한 위협이 심각한 상황인데 이러한 공공 안전의 경우 사람들이 많이 모이는 공공장소인 광장, 빌딩, 지하철, 극장 및 공항 등에서 바이오전자코는 위험물질을 사전에 구별하고 감지하여 위협으로부터 일반인들을 보호하는 중요한 역할을 할 것이다. 그리고 마약 밀수 또한 공공의 건강을 위협하는 심각한 사회 이슈이다. 현재에는 고도로 훈련을 받은 마약 탐지견이 마약탐지의 역할을 하고 있지만 탐지견을 훈련시키는데 들어가는 고비용과 오랫동안 지속적인 사용으로 인한 코의 피로도 축적 및 탐지견의 탐지 수명 등의 제약이 따르고 있다. 열거한 응용분야들 이외에 바이오전자코는 다양한 분야에 적용될 큰 잠재력을 가지는 센싱 시스템이 분명하다.

03 맺음말

현대 사회는 매우 복잡하여 인간의 감각으로 인지하거나 처리하지 못하는 많은 과정들이 존재한다. 불과 수십 년 전 만하더라도 대중교통을 이용하는 결제 수단으로 현금을 사용하였지만 현재는 센서를 내장하고 있는 단말기가 교통카드를 인식하거나 심지어 스마트폰을 이용하여 결제를 진행할 수 있다. 이 뿐만 아니라 화재로 인해 발생하는 가스나 열기를 감지하는 화재 경보 센서, 자동차 블랙박스의 기능에 포함되는 움직임을 감지하는 모션센서, 압력을 감지하는 압력센서, 수압을 파악하는 수량센서 등 수 많은 센서가 우리 주위에서 우리의 삶에 영향을 주는 첨단 사회에 어느새 진입해 있다. 센서의 개발이 이루어지지 않았던 시대에

는 광부들이 탄광에 들어갈 때 선두에 선 광부가 카나리아를 탐색조로 이용하였는데 이는 광부들이 코로 느끼지 못하는 유독가스의 위험을 호흡기가 약한 카나리아가 노래를 멈추거나 비틀거리는 현상으로 알아차릴 수 있게 해주었다고 하는데 이것이 아마도 인간이 이용한 센서의 시초이지 않았을까. 이처럼 수백 년 전부터 사람들은 인간의 감각을 대신하여 보다 더 민감하고 정확하게 사물을 감지하는 센서의 개발에 대한 욕구를 가지고 있었으며 생활환경이 매우 복잡한 현대 사회에 있어서 위험의 감지 뿐만 아니라 인간생활을 보다 윤택하게 하기 위해서 다양한 분야에 다양한 종류의 센서들이 개발되어 사용될 것이다. 이러한 목적을 위해서 좀 더 정확하고 민감한 센서를 개발하려는 욕구는 근래에 들어서 인간의 후각을 가장 잘 모사할 수 있는 바이오전자코에 대한 관심을 증가시켰고 많은 연구자들로 하여금 다양한 분야에 사용되는 바이오전자코의 개발을 가능하게 하였다. 최근의 다양한 형태의 후각 수용체의 사용과 나노기술의 향상은 감도와 구별능력이 다른 센서에 비해서 월등한 바이오전자코의 개발을 이끌었고 나아가 휴대가 가능하여 현장에서 실시간으로 감지할 수 있고 다채널 기술을 접목하여 복잡한 성분의 냄새들을 구별할 수 있게 되었다. 이러한 기술들은 훨씬 더 다양한 분야에 바이오전자코가 응용되어질 수 있는 가능성을 열었으며 이에 더하여 머지않은 미래에 냄새의 시각화와 표준화가 가능하게 되어 누구나 냄새를 객관적으로 정확히 표현하고 전달하는 시대의 도래를 이끌 것으로 기대한다.

저자 **고 휘 진**

Hwi Jin Ko

학력 서울대학교 생물화학공학 박사
성균관대학교 생물공학 석사
성균관대학교 유전공학 학사

경력 現) 서울대학교 연구부교수
前) University of Massachusetts Instructor
前) Pennsylvania State University Post-doctoral Research Fellow

저자 **박 태 현**

Tai Hyun Park

학력 美퍼듀대학교 화학공학 박사
한국과학기술원 화학공학 석사
서울대학교 화학공학과 학사

경력 現) 서울대학교 화학생물공학부 교수
現) 한국과학창의재단 이사장
現) 아시아생명공학연합체 부회장
前) 차세대융합기술연구원 원장



참고문헌

1. Lee, S.H. and Park, T.H. Recent advances in the development of bioelectronic nose. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15 (1), 22–29. (2010)
2. Ko, H.J. Recent Update of Nanobiosensors Using Olfactory Sensing Elements and Nanomaterials. *Biosensors Journal*, 4:129. doi:10.4172/2090-4967.1000129. (2015)
3. Kim, T.H., Lee, S.H., Lee, J., Song, H.S., Oh, E.H., Park, T.H., and Hong, S. Single-carbon-atomic-resolution detection of odorant molecules using a human olfactory receptor-based bioelectronic nose. *Advanced Materials*, 21 (1), 91–94. (2009)
4. Yoon, H., Lee, S.H., Kwon, O.S., Song, H.S., Oh, E.H., Park, T.H., and Jang, J. Polypyrrole nanotubes conjugated with human olfactory receptors: high-performance transducers for FET-type bioelectronic noses. *Angewandte Chemie International Edition*, 48 (15), 2755–2758. (2009)
5. Goldsmith, B.R., Mitala, J.J., Josue, J., Castro, A., Lerner, M.B., Bayburt, T.H., Khamis, S.M., Jones, R.A., Brand, J.G., Sligar, S.G., Leutje, C.W., Gelperin, A., Rhodes, P.A., Discher, B.M., and Johnson A.T.C. Biomimetic chemical sensors using nanoelectronic readout of olfactory receptor proteins. *American Chemical Society Nano*, 5 (7), 5408–5416. (2011)
6. Park, J., Lim, J.H., Jin, H.J., Namgung, S., Lee, S.H., Park, T.H., and Hong, S. A bioelectronic sensor based on canine olfactory nanovesicle-carbon nanotube hybrid structures for the fast assessment of food quality. *Analyst*, 137 (14), 3249–3254. (2012)
7. Kwon, O.S., Song, H.S., Park, S.J., Lee, S.H., An, J.H., Park, J.W., Yang, H., Yoon, H., Bae, J., Park, T.H., and Jang, J. An ultrasensitive, selective, multiplexed superbioelectronic nose that mimics the human sense of smell. *Nano Letters*, 15, 6559–6567. (2015)

8. Lim, J.H., Oh, E.H., Park, J., Hong, S., and Park, T.H. Ion-channel-coupled receptor-based platform for a real time measurement of G-protein-coupled receptor activities. *American Chemical Society Nano*, 9, 1699–1706. (2015)
9. Ko, H.J. and Park, T.H. Piezoelectric olfactory biosensor: ligand specificity and dose-dependence of an olfactory receptor expressed in a heterologous cell system. *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (7), 1327–1332. (2005)
10. Sung, J.H., Ko, H.J., and Park, T.H. Piezoelectric biosensor using olfactory receptor protein expressed in *Escherichia coli*. *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (10), 1981–1986. (2006)
11. Park, S.J., Kwon, O.S., Lee, S.H., Song, H.S., Park, T.H., and Jang, J. Ultrasensitive flexible graphene based (FET)-type bioelectronic nose. *Nano Letters*, 12 (10), 5082–5090. (2012)
12. Katz, D.B., Matsunami, H., Rinberg, D., Scott, K., Wachowiak, M., and Wilson, R.I. Receptors, circuits, and behaviors: new directions in chemical senses. *Journal of Neuroscience*, 28, 11802–11805. (2008)
13. Buck, L. and Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65, 175–187. (1991)
14. Jiang, Y. and Matsunami, H. Mammalian odorant receptors: functional evolution and variation. *Current Opinion in Neurobiology*, 34, 54–60. (2015)
15. Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., and Buck L.B. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96, 713–723. (1999)
16. Hallem, E.A. and Carlson, J.R. Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell*, 125, 143–160. (2006)
17. Star, A., Tu, E., Niemann, J., Gabriel, J., Joiner, S., and Valcke, C. Label-free detection of DNA hybridization using carbon nanotube network field-effect transistors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 921. (2006)



18. Li, Z., Chen, Y., Li, X., Kamins, T., Nauka, K., and Williams, R.S. Sequence-specific label-free DNA sensors based on silicon nanowires. *Nano Letters*, 4, 245–247. (2004)
19. Wang, J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst*, 130 (4), 421–426. (2005)
20. Nambiar, S. and Yeow, J.T.W. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (5), 1825–1832. (2010)
21. Tombelli, S., Minnuni, M., and Mascini, M. Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (12), 2424–2434. (2005)
22. Reval, M.F., Duchamp, A., and Holley, A. Odour discrimination by frog olfactory receptors: a second study. *Chemical Senses*, 3(1), 7–21. (1978)
23. Sengupta, P., Chou, J.H., and Bargmann, C.I. odr-10 encodes a seven-transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the 23-odorant diacetyl. *Cell*, 84, 899–909. (1996)
24. Friedrich, R.W. and Korsching, S.I. Combinatorial and chemotopic odorant coding in the Zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging. *Neuron*, 18(5), 737–52. (1997)
25. Duchamp-Viret, P., Chaput, M.A., and Duchamp, A. Odor response properties of rat olfactory receptor neurons. *Science*, 284(5423), 2171–4. (1999)
26. Minic, J., Persuy, M.-A., Godel, E., Aioun, J., Connerton, I., Salesse, R., and Pajot-Augy, E. Functional expression of olfactory receptors in yeast and development of a bioassay for odorant screening. *FEBS Journal*, 272(2), 524–37. (2005)
27. Yasuoka, A., Emori, Y., and Abe, K. Addition of signal sequences to the N-termini of olfactory receptor proteins enhances their expression in *Xenopus* oocyte. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1688–95. (2000)
28. Raming, K., Krieger, J., Strotmann, J., Boekhoff, I., Kubick, S., Baumstark, C., and Breer, H. Cloning and expression of odorant receptors. *Nature*, 361, 353–6. (1999)

29. Ko, H.J. and Park, T.H. Dual signal transduction mediated by a single type of olfactory receptor expressed in a heterologous system. *Biological Chemistry*, 387, 59–68. (2006)
30. Krautwurst, D., Yau, K.W., and Reed, R.R. Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell*, 95, 917–26. (1998)
31. Kajiya, K., Inaki, K., Tanaka, M., Haga, T., Kataoka, H., and Touhara, K. Molecular bases of odor discrimination: reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *Journal of Neuroscience*, 21, 6018–25. (2001)
32. Touhara, K., Katada, S., Nakagawa, T., and Oka, Y. Ligand screening of olfactory receptors. In: Haga, T., Takeda, S, editors. *G Protein-coupled Receptors: Structure, Function, and ligand Screening*. Boca Raton: CRC Press, p. 85–109. (2006)
33. Niimuts, Y. and Nei, M. Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (21), 12235–12240. (2003)
34. Glusman, G., Yanai, I., Rubin, I., and Lancet, D. The complete human olfactory subgenome. *Genome Research*, 11 (5), 685–702. (2001)
35. Zozulya, S., Echeverri, F., and Nguyen, T. The human olfactory receptor repertoire. *Genome Biology*, 2 (6), research0018.1–research0018.12. (2001)
36. Lee, S.H., Kwon, O.S., Song, H.S., Park, S.J., Sung, J.H., Jang, J., and Park, T.H. Mimicking the human smell sensing mechanism with an artificial nose platform. *Biomaterials*, 33 (6), 1722–1729. (2012)
37. Lim, J.H., Park, J., Ahn, J.H., Jin, H.J., Hong, S., and Park, T.H. A peptide receptor-based bioelectronic nose for the real-time determination of seafood quality. *Biosensors and Bioelectronics*, 39 (1), 244–249. (2013)
38. Wu, C., P. Chen, H. Yu, Q. Liu, X. Zong, H. Cai, and Wang, P. A novel biomimetic olfactory-based biosensor for single olfactory sensory neuron monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 1498–1502. (2009)



39. Stein, B., George, M., Gaub, H.E., and Parak, W.J. Extracellular measurements of averaged ionic currents with the light-addressable potentiometric sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 98, 299–304. (2004)
40. Xu, G.X., Ye, X.S., Qin, L., Xu, Y., Li, Y., Li, R., and Wang, P. Cell-based biosensors based on light-addressable potentiometric sensors for single cell monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 1757–1763. (2005)
41. Liu, Q., Cai, H., Xu, Y., Li, Y., Li, R., and Wang, P. Olfactory cell-based biosensor: a first step towards a neurochip of bioelectronic nose. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 318–322. (2006)
42. Hou, Y., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Zhang, A., Minic-Vidic, J., Gorojankina, T., Persuy, M.-A., Pajot-Augy, E., Salesse, R., Akimov, V., Reggiani, A., Pennetta, C., Alfinito, E., Ruiz, O., Gomila, G., Samitier, J., and Errachid, A. A novel detection strategy for odorant molecules based on controlled bioengineering of rat olfactory receptor I7. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1550–1555. (2007)
43. Harding, P.J., Hadingham, T.C., McDonnell, J.M., and Watts, A. Direct analysis of a GPCR-agonist interaction by surface plasmon resonance. *European Biophysics Journal*, 35 (8), 709–712. (2006)
44. Szabo, A., Stolz, L., and Granzow, R. Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Current Opinion in Structural Biology*, 5 (5), 699–705. (1995)
45. Alves, I., Park, C., and Hruby, V. Plasmon resonance methods in GPCR signaling and other membrane events. *Current Protein and Peptide Science*, 6 (4), 293–312. (2005)
46. Fägerstam, L.G., Frostell-Karlsson, Å., Karlsson, R., Persson, B., and Ronnberg, I. Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *Journal of Chromatography A*, 597 (1), 397–410. (1992)

47. Homola, J., Yee, S.S., and Gauglitz, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 54 (1), 3–15. (1999)
48. Navratilova, I., Besnard, J., and Hopkins, A.L. Screening for GPCR ligands using surface plasmon resonance. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2 (7), 549–554. (2011)
49. Chen, K., Obinata, H., and Izumi, T. Detection of G protein-coupled receptor-mediated cellular response involved in cytoskeletal rearrangement using surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (7), 1675–1680. (2011)
50. Lee, S.H., Ko, H.J., and Park, T.H. Real-time monitoring of odorant-induced cellular reactions using surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (1), 55–60. (2009)
51. Lee, J.Y., Ko, H.J., Lee, S.H., and Park, T.H. Cell-based measurement of odorant molecules using surface plasmon resonance. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (3), 375–380. (2006)
52. Wyszynski, B., Somboon, P., and Nakamoto, T. Pegylated lipids as coatings for QCM odor-sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 121 (2), 538–544. (2007)
53. Koshets, I.A., Kazantseva, Z.I., Shirshov, Y.M., Cherenok, S.A., and Kalchenko, V.I. Calixarene films as sensitive coatings for QCM-based gas sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 106 (1), 177–181. (2005)
54. Oh, E.H., Song, H.S., and Park, T.H. Recent advances in electronic and bioelectronic noses and their biomedical applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 48 (6), 427–437. (2011)
55. Panigrahi, S., Sankaran, S., Mallik, S., Gaddam, B., and Hanson, A.A. Olfactory receptor-based polypeptide sensor for acetic acid VOC detection. *Materials Science and Engineering: C*, 32 (6), 1307–1313. (2012)
56. Lim, J.H., Park, J., Oh, E.H., Ko, H.J., Hong, S., and Park, T.H. Nanovesicle-Based Bioelectronic Nose for the Diagnosis of Lung Cancer from Human Blood. *Advanced Healthcare Materials*, 3, 360–366. (2014)



57. Son, M., Kim, D., Ko, H.J., Hong, S., and Park, T.H. A portable and multiplexed bioelectronic sensor using human olfactory and taste receptors. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 901–907. (2017)
58. Gottfried, J.A. and Dolan, R.J. The nose smells what the eye sees: crossmodal visual facilitation of human olfactory perception. *Neuron*, 39, 375 – 386. (2003)
59. Dalton, P. Psychophysical and behavioral characteristics of olfactory adaptation. *Chemical Senses*, 25, 487 – 492. (2000)
60. Keller, A., Zhuang, H., Chi, Q., Vosshall, L.B., and Matsunami, H. Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. *Nature*, 449, 468 – 472. (2007)
61. Zhuang, H. and Matsunami, H. Evaluating cell–surface expression and measuring activation of mammalian odorant receptors in heterologous cells. *Nature Protocol*, 3, 1402 – 1413. (2008)
62. Zhang, A. and Lieber, C.M. Nano–bioelectronics. *Chemical Review*, 116, 215 – 257. (2016)
63. Son, M., Cho, D., Lim, J. H., Park, J., Hong, S., Ko, H.J., and Park, T.H. Real-time monitoring of geosmin and 2–methylisoborneol, representative odor compounds in water pollution using bioelectronic nose with human–like performance. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 199–206. (2015)
64. Kim, Y.D. and Morr, C.V. Dynamic headspace analysis of light activated flavor in milk. *International Dairy Journal*, 6 (2), 185–193. (1996)
65. Hu, M., McClements, D.J., and Decker, E.A. Lipid oxidation in corn oil–in–water emulsions stabilized by casein, whey protein isolate, and soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (6), 1696–1700. (2003)
66. Gardner, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7 (1), 65–86. (1989)
67. Shahidi, F. and Pegg, R.B. Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food Lipids*, 1 (3), 177–186. (1994)

02

초미세구조 관찰을 위한 조직 팽창 기술

성균관대학교 글로벌바이오메디컬공학과
장재범 교수
(jbchang03@skku.edu)



01 서론

지난 17세기 현미경이 처음으로 개발된 이래로 현미경은 눈으로는 볼 수 없었던 다양한 생명현상을 볼 수 있게 해줌으로써 생명과학 및 의학의 발전에 큰 기여를 했다. 지난 300년간 현미경의 성능을 개량하기 위한 다양한 시도가 있었는데, 특히 그 중에서도 해상도를 좀 더 높이기 위한 많은 연구들이 진행되었다. 해상도는 구별이 가능한 두 물체 사이의 최소 거리를 의미한다. 19세기 빛의 파동적 성질이 알려지고 회절에 대한 이론적인 연구가 이루어진 이후, 현미경의 해상도에는 물리적인 한계가 있다는 것이 알려졌다. 일반적으로 광학 현미경의 해상도는 그 파장에 비례하여 사용하는 빛의 파장이 짧을수록 해상도는 올라가게 된다. 현재 광학 현미경의 해상도는 200 - 250 nm 으로, 이는 두 점이 200 nm 보다 가까이 붙어 있는 경우 두 점인지 하나의 큰 점인지 구별하기 어렵다는 것을 의미한다.¹⁾**〈그림 1〉**

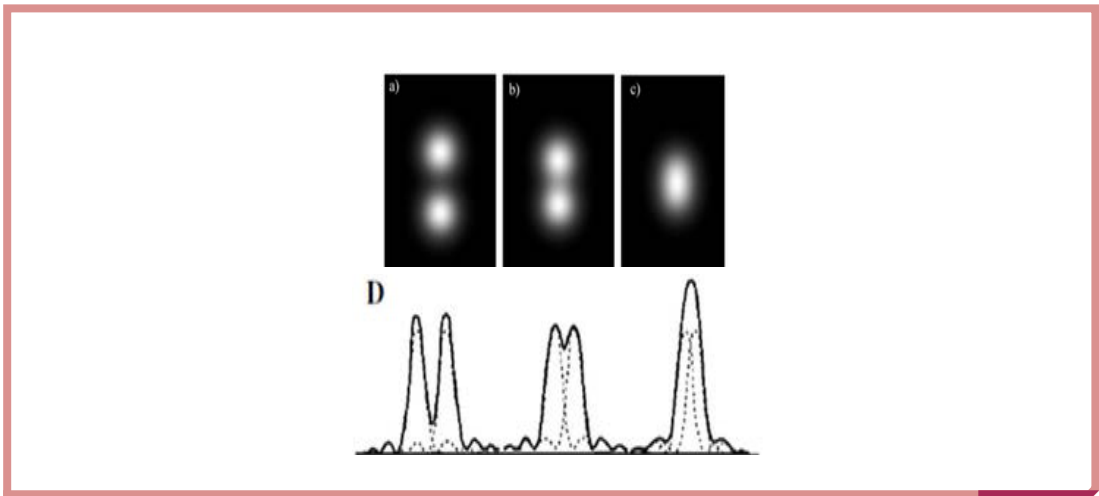


그림 1. 해상도의 정의. (a-c) 관찰하고자 하는 두 점. (d) (a-c)의 두 점을 현미경으로 관찰한 결과, 두 점 사이의 거리가 해상도보다 먼 경우 (a,b)에는 두 점을 구별할 수 있지만, 해상도보다 가까이 있는 경우 (c)에는 두 점인지 하나의 점인지 구별하기가 어려워진다.

지난 2014년 노벨 화학상은 현미경의 물리적 해상도 한계를 뛰어넘는 방법의 개발에 기여한 세 명의 과학자(Eric Betzig, Stefan Hell, William Moerner)에게 주어졌다. 이 세 명의 과학자가 개발한 방법은 크게 두 가지로, 하나는 Stimulated emission depletion (STED) microscopy이고,²⁾ 다른 하나는 Photoactivated localization microscopy (PALM)이다.^{3,4)} 이 두 기법은 서로 전혀 다른 접근법을 사용하였지만 그 기본 원리는 같다. 위의 <그림 1>로 다시 돌아가보자. 그림 1(A-C)에서는 두 점이 모두 동시에 빛을 내고 있어서 두 점의 거리가 가까운 경우 이 두 점을 구별하기가 어려웠다. 그런데 만약 두 점이 시간차를 두고 빛을 내도록 만들 수 있다면 어떨까. 왼쪽 점이 먼저 빛을 내고 오른쪽 점이 그 다음에 빛을 낸다고 가정해보자. 이 두 점을 현미경으로 관찰한다면 처음에는 왼쪽 점에서 나온 빛이 관찰될 것이고, 그 다음에 오른쪽 점에서 나온 빛이 관찰될 것이다. 만약 우리가 이 두 번 관찰된 빛의 중심점을 아주 정확하게 측정할 수 있다면, 두 빛이 서로 다른 위치에 있는 두 점에서부터 나왔다는 것을 알 수 있을 것이다. STED에서는 매우 정교한 광학 장치를 사용하여 한번에 아주 작은 영역(20-50 nm)에서 나오는 빛만을 포집한다.²⁾ 따라서 관찰하고자 하는 시료를 아주 작은 영역들로 나눈 후 한번에 하나의 영역씩 관찰하여 초고해상도를 얻는다. PALM에서는 시료를 화학적으로 처리하여 시료 내부의 빛을 내는 형광 단백질들이 연속적으로 빛을 내지 않고 깜박거리도록 만든다.⁴⁾ 그 후 현미경으로 시료를 관찰하면서 동영상을 얻은 후 각 프레임을 분석하여 형광 단백질들의 위치를 계산해서 기존의 방법으로는 두 개인지 하나인지 구별할 수 없었던 두 형광 단백질을 구별해낼 수 있게 된다³⁾. STED, PALM과 거의 동시에 개발된 또 다른 대표적인 초고해상도 이미징 기법인 Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)은 PALM과 같은 원리를 사용하는데, 이 때 형광단백질이 아닌 형광분자들을 사용한다.⁵⁾ <그림 2>

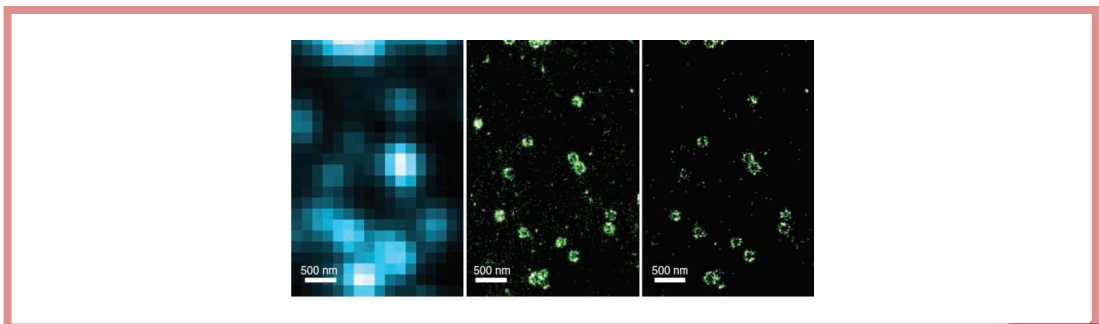


그림 2. 일반 현미경과 STORM 현미경으로 세포 내부의 clathrin-coated pit (CCP)를 관찰한 결과 (A) 일반 현미경 사진 (B) 2D STORM 사진 (C) 3D STORM 사진⁶⁾

최근 시료 자체를 물리적으로 팽창시켜 일반 현미경으로 고해상도를 얻을 수 있는 방법들이 발표되고 있다.⁷⁻¹²⁾ 시료를 물리적으로 팽창시키기 위해서는 물 속에서 스스로 팽창하는 하이드로젤(hydrogel)이 사용된다. 하이드로젤 네트워크를 시료 내부에 만들고, 하이드로젤-시료 복합체를 물속에 넣어 팽창시킬 수 있다. 이 때 하이드로젤이 팽창하면서 시료 내부에 있는 분자들을 밀어내서 분자들 간의 거리가 멀어지게 된다. 따라서 팽창 전에는 해상도 보다 가까이 붙어 있어 일반 현미경으로 구별할 수 없었던 미세구조들도 팽창 후에는 구별할 수 있게 된다.⁷⁾ <그림 3>은 실험용 장갑과 장갑 곁에 그려진 그림으로 이러한 시료 팽창이 어떤 장점이 있는지 보여준 그림이다. 실험용 장갑 표면에 미세한 그림을 그리고 장갑에 바람을 불어넣어 장갑을 팽창시켜주면, 팽창 전에는 잘 보이지 않았던 미세한 그림들이 팽창 후 선명하게 잘 보이는 것을 알 수 있다. 이 글에서는 다양한 시료 팽창 방법들에 대해서 소개하고 이런 방법들이 어떻게 쓰일 수 있는지에 대해서 소개한다.

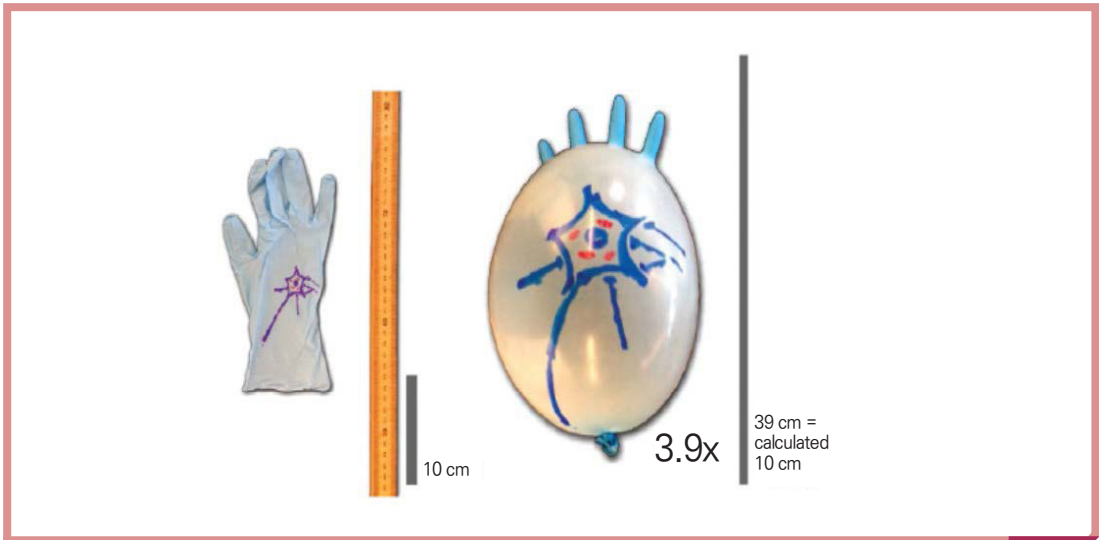


그림 3. 실험용 장갑으로 팽창 기반 이미지를 설명한 그림.¹³⁾
장갑을 3.9배 팽창시키면 장갑 표면에 그려진 그림을 좀 더 자세히 볼 수 있다.

02 본론

2.1 이러한 방법이 필요한 이유

서론에서 최근 발표되고 있는 팽창 기반 이미징 방법들에 대해서 간략하게 소개했다. 하지만 이미 광학적 혹은 화학적 방법으로 초고해상도를 얻을 수 있는 방법들이 존재한다. 그렇다면 왜 이런 팽창 기반 이미징 방법들이 개발되었으며 어떤 분야에서 필요한지에 알아볼 필요가 있다.

사람의 뇌는 사람의 여러 장기 중에서 가장 복잡하다. 성인의 뇌는 대략 860억 개의 신경 세포로 이루어져 있고, 각 신경 세포는 시냅스를 통해서 최대 만 개의 다른 신경 세포와 연결되어 있다.¹⁴⁾ 따라서 성인 인간 뇌에는 대략 150조(1.5×10^{14})개의 시냅스가 존재한다. 인간의 인지 능력은 이러한 복잡한 신경 네트워크로부터 생겨난다. 따라서 뇌세포들이 서로 어떻게 연결되어 있는지 관찰할 수 있다면 인간의 뇌가 어떻게 작동하고, 어떤 경우에 뇌 질환이 발생하며, 이를 어떻게 치료할 수 있는지에 대해서 이해할 수 있게 될 것이다. 이런 뇌 이미징을 위해서는 세 가지 요구 조건이 있다. 먼저 첫 번째로는 해상도가 매우 높아야 한다. 작은 공간 안에 무수히 많은 신경 세포 및 시냅스가 들어있기 때문에 이런 작은 구조들을 구별하기 위해서는 이미징 해상도가 매우 높아야 한다. 두 번째로 속도가 매우 빨라야 한다. <그림 4>에서 볼 수 있듯이 뇌는 매우 다양한 영역으로 나뉘어져 있고 각 영역별로 각기 다른 기능을 담당하고 있다. 따라서 뇌의 작은 부분만을 이미징 해서는 뇌 전체가 어떻게 작동하는지 이해할 수 없다. 따라서 큰 부피를 빠르게 이미징 할 수 있는 방법이 필요하다. 마지막으로 불투명한 시료를 관찰할 수 있어야 한다. 뇌는 가시광선 영역에서 불투명하여 일반 현미경으로는 그 내부를 들여다 보기가 어렵다. 기존의 초고해상도 현미경은 그 해상도는 높지만, 속도가 충분히 빠르지 않거나 불투명한 뇌 조직을 관찰하기 위해서는 뇌 조직을 아주 얇은 절편으로 만들어야 하는 어려움이 있었다.¹⁵⁾

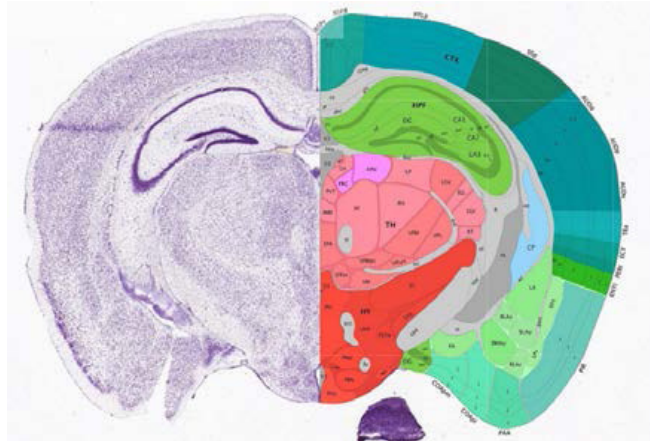
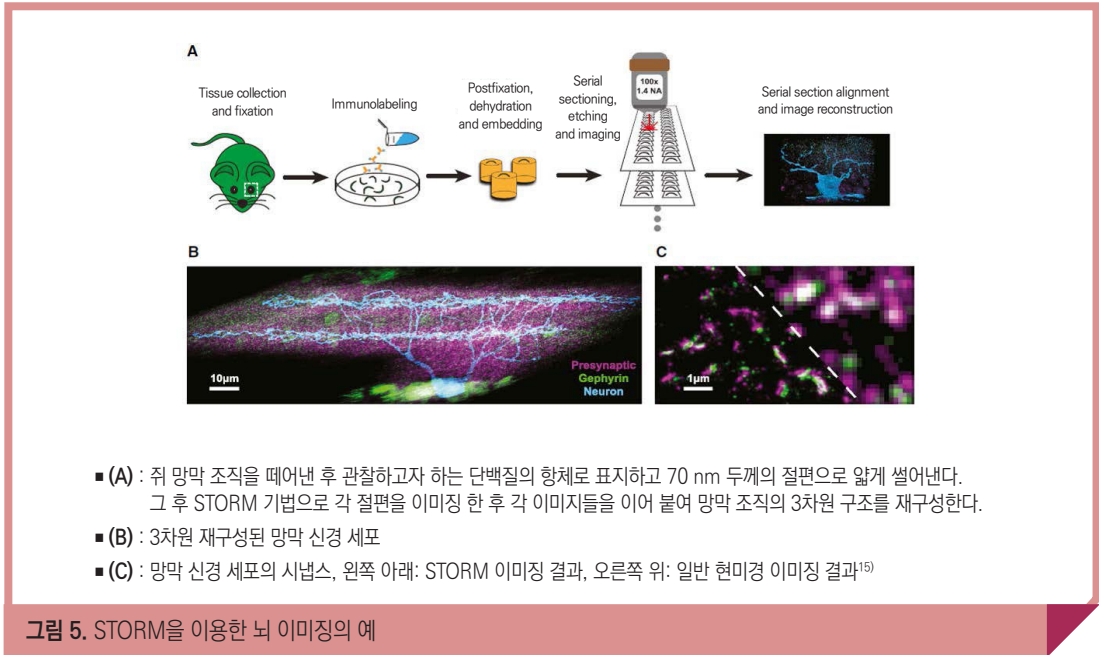


그림 4. 쥐 뇌 단면, 다른 색은 뇌의 서로 다른 영역을 나타낸다. (<http://brain-map.org/>)

그 동안 앞에서 말한 초고해상도 광학 현미경 기법(STORM, PALM, STED) 혹은 더 높은 해상도(~ 5 nm)를 얻을 수 있는 전자현미경(Scanning electron microscopy, SEM)을 이용하여 뇌를 관찰하고자 하는 다양한 시도가 있었다. 하지만 시료 내부의 빛의 산란 때문에 STORM, PALM, STED와 같은 초고해상도 광학 현미경으로는 아주 얇은 시료만 관찰할 수 있었으며, 전자현미경의 경우, 전자가 시료 내부로 거의 투과되지 않아 시료의 표면만 관찰할 수 있었다. 이에 관찰하고자 하는 시료(뇌)를 35 - 70 nm 두께의 절편으로 얇게 썰어서 STORM 혹은 전자현미경으로 관찰하고자 하는 시도가 있어왔다.^{15),16)} 하지만 이 경우 시료를 얇은 절편으로 자르기 위해서 특수한 장비가 필요하고, 각 절편의 이미지를 다시 이어 붙여야 하는 복잡한 작업이 필요했다. <그림 5>



이에 반해 시료를 팽창시켜 고해상도를 얻는 이미징 방법은 앞에서 말한 뇌 이미징의 세 가지 요구조건(해상도, 속도, 투명화)을 동시에 만족시킬 수 있는 가능성이 있다. 먼저 첫 번째로, 시료를 3-4배 팽창시킴으로써 일반 현미경의 해상도를 3-4배 높일 수 있다. 일반 현미경의 해상도가 대략 200-250 nm 이므로, 시료를 팽창시킴으로써 60-80 nm 해상도를 얻을 수 있다. 두 번째로, 팽창시킨 시료를 이미징 속도가 빠른 현미경으로 관찰함으로써 매우 빠르게 뇌 이미지를 얻을 수 있다. 일반적인 초고해상도 현미경의 경우 아주 빠른 속도로 초고해상도 이미지를 얻는 것이 쉽지 않았다. 하지만 시료를 팽창시켜 관찰하는 경우 해상도는 시료를 팽창시키는 정도에 의해서 결정되고, 이미징 속도는 현미경의 속도에 의해서 결정되기 때문에 해상도를 떨어뜨리지 않고 아주 빠른 속도로 큰 부피를 이미징 할 수 있다. 세 번째로, 하이드로젤로 뇌를 팽창시키면 뇌를 구성하는 물질들(단백질 혹은 지질)의 농도가 희석되기 때문에 뇌가 투명해지게 된다. 따라서 뇌를 아주 얇은 절편으로 만들지 않고도 그 내부를 관찰할 수 있게 된다.⁷⁾

2.2 시료 팽창 기작

2015년 1월 팽창 기반 이미징 기법(Expansion microscopy; ExM)이 처음으로 발표되었다.⁷⁾ ExM은 sodium acrylate 하이드로젤(sodium acrylate hydrogel)을 사용하여 시료를 팽창시키는 기법이다. sodium acrylate 하이드로젤은 그동안 아기 기저귀에 많이 사용된 물질로 건조 질량의 대략 천 배의 물을 흡수할 수 있다. Sodium acrylate 하이드로젤은 sodium acrylate 단분자를 연결하여 고분자로 만들고, 이런 고분자들을 서로 연결하여 만들 수 있다. 아래 <그림 6(a-ii)>은 sodium acrylate 하이드로젤의 구조를 보여준다. 이 하이드로젤을 물속에 넣게 되면 sodium acrylate에 붙어 있던 소듐 이온(Na^+)이 떨어져 나오게 되어 하이드로젤 내부의 고분자 백본(polymer backbone)이 음전하를 띠게 된다. 이러한 음전하 사이의 척력에 의해서 구불구불하게 뭉쳐 있던 고분자 백본 <그림 6(a-i)>이 곧게 펴지게 되어 하이드로젤이 팽창하게 된다. 이 sodium acrylate 하이드로젤을 뇌 절편 속에 만들고 물 속에 넣어주면, <그림 6(b),(c)>에서 보는 것과 같이 뇌 절편을 팽창시킬 수 있다.

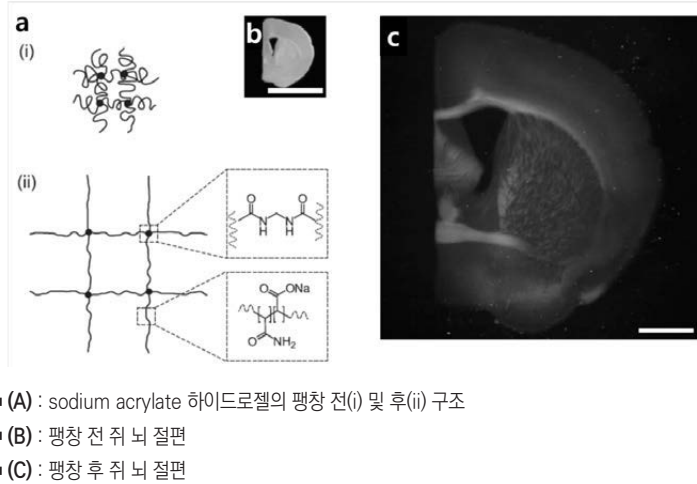


그림 6. Sodium acrylate 하이드로젤의 구조와 이 하이드로젤로 100 μm 두께의 쥐 뇌 절편을 팽창시킨 사진⁷⁾

뇌 내부에는 뇌의 구조를 지탱해주고 있는 다양한 단백질 구조물이 존재한다. 뇌 내부에 sodium acrylate 하이드로젤을 만들어주고 팽창시키게 되면 이런 단단한 단백질 구조물들 때문에 뇌가 균일하게 팽창하지 않는다. 따라서 뇌를 균일하게 팽창시키기 위해서는 뇌 내부의 단백질 구조물을 제거해주어야 한다. 이를 위해 ExM에서는 단백질을 분해시킬 수 있는 단백질 가수분해효소(proteinase)를 사용하였다. 뇌 내부에 sodium acrylate 하이드로젤을 만들어준 후, 단백질 가수분해효소로 뇌 내부에 존재하는 모든 단백질을 분해한 후 하이드로젤-뇌 복합체를 물속에 넣어 팽창시키게 된다. 하지만 이렇게 모든 단백질을 분해하게 되면 우리가 관찰하고자 하는 신경 세포 혹은 시냅스를 관찰할 수 없게 된다. 따라서 단백질이 분해되어도 관찰하고자 하는 단백질을 관찰할 수 있는 방법이 필요하다. 이를 위해 ExM에서는 <그림 7>에서 보이는 것과 같은 DNA 기반 링커를 도입하였다. 먼저 뇌 내부의 관찰하고자 하는 단백질을 일차 항체로 표지한 후, DNA가 붙어 있는 이차 항체로 표지한다. 그 후, 이 DNA와 상보적인 DNA를 이차 항체 DNA에 결합(hybridization) 시켜준다. 이 때 상보 DNA 한 쪽 끝에는 형광 분자가 달려있고 다른 쪽 끝에는 sodium acrylate와 화학적으로 비슷한 아크리다이트(acrydite)가 달려있다. 따라서 이 후 sodium acrylate 하이드로젤이 만들어지는 과정에서 아크리다이트가 하이드로젤 백본에 화학적으로 연결되게 된다. 그 후 단백질 가수분해효소로 항체를 비롯한 모든 단백질을 분해해주면 최종적으로 하이드로젤에는 형광 분자가 붙어 있는 DNA만 남게 된다.

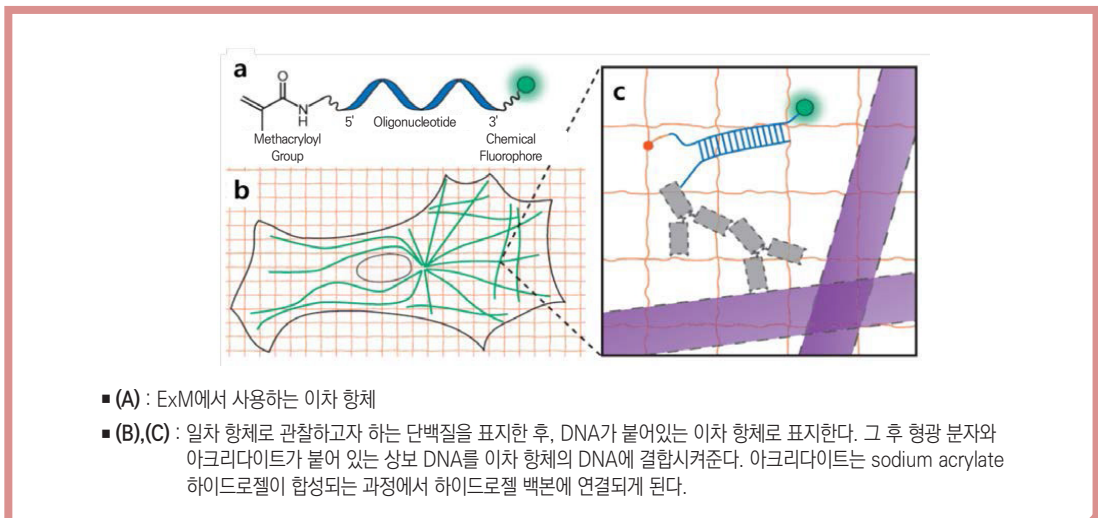
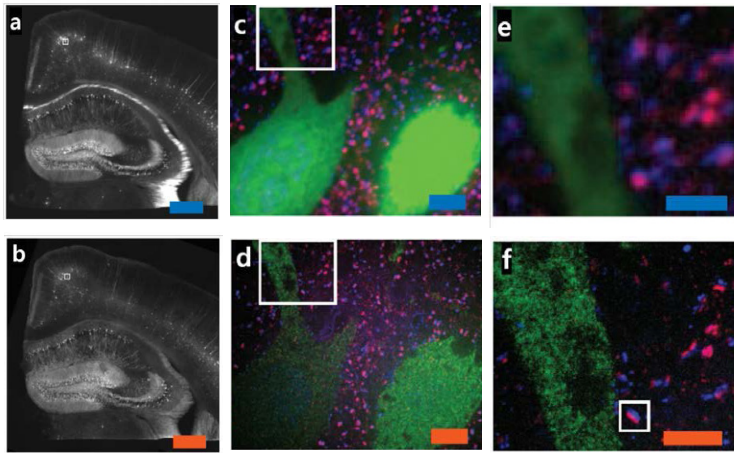


그림 7. ExM의 기작⁷⁾

위의 과정을 통해서 쥐 뇌 내부의 단백질을 면역표지(immunostaining) 한 후 팽창시키면 팽창 전에는 볼 수 없었던 뇌 세포 및 시냅스의 미세 구조를 관찰할 수 있게 된다. 아래 <그림 8(a)>는 팽창 전 쥐 뇌 절편 이미지이고, <그림 8(b)>는 4배 팽창 후의 같은 뇌 절편의 이미지이다. 4배 팽창되는 동안 뇌의 전체적인 모양이 크게 변화하지 않은 것을 알 수 있다. <그림 8(c)>는 <그림 8(a)>의 작은 흰 네모 부분을 확대한 그림으로 녹색은 신경 세포를, 파란색은 프리시냅스 단백질인 Bassoon을, 붉은색은 포스트시냅스 단백질인 Homer1을 나타낸다. <그림 8(d)>는 <그림 8(c)>와 같은 영역의 팽창 후 이미지이다. 팽창 전에는 보이지 않았던 신경 세포 및 시냅스의 미세 구조가 보이는 것을 알 수 있다. <그림 8(e)>는 <그림 8(d)>의 흰 네모 내부를 확대한 모습으로, 팽창 후인 <그림 8(f)>와 비교하면 해상도의 차이를 명확하게 알 수 있다. <그림 8(e)>에서는 시냅스의 모양과 방향을 명확하게 알 수 없었지만 <그림 8(f)>에서는 명확하게 알 수 있다.

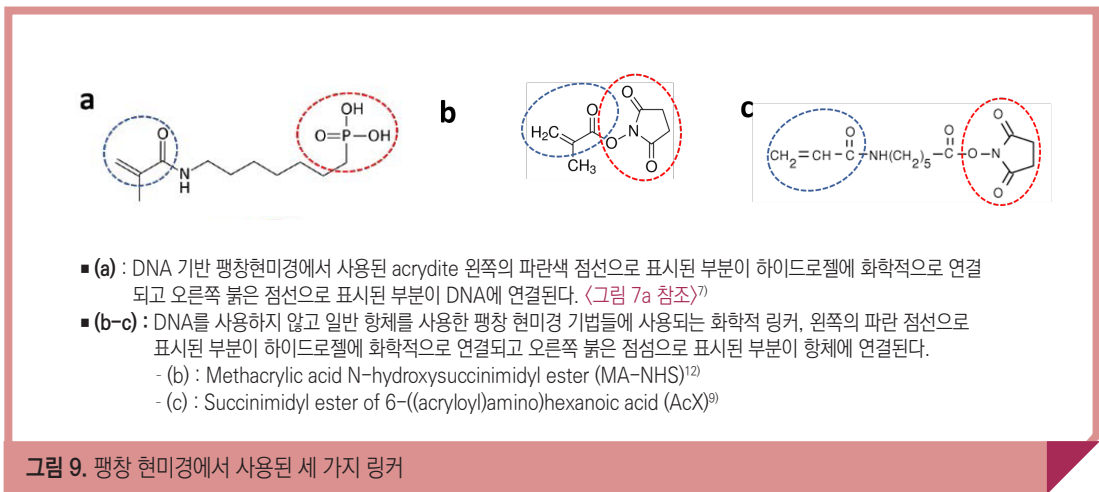


- (a),(c),(e): 쥐 뇌 절편의 팽창 전 이미지
- (b),(d),(f) 팽창 후 녹색: 신경세포, 붉은색: Homer1, 파란색: Bassoon
- 스케일바: (a) 500um, (b) 2.01 mm, (c) 5 um, (d) 20.1 um, (e) 2.5 um, (f) 10 um

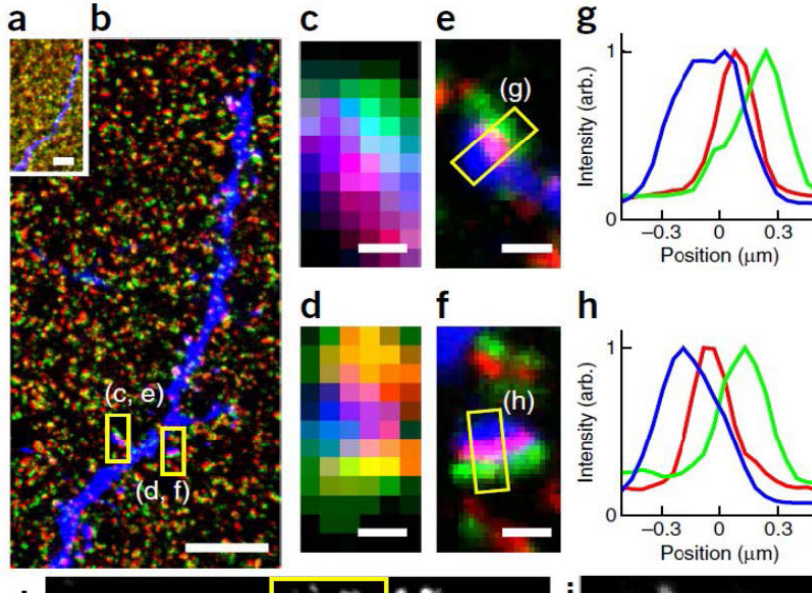
그림 8. ExM으로 쥐 뇌 절편을 이미징 한 예⁷⁾

2.3 일반 항체를 기반으로 한 ExM

앞에서 소개한 ExM은 DNA가 붙어있는 이차 항체를 사용한다. 하지만 DNA를 이차 항체에 붙이는 과정이 복잡하고 그 비용이 높아 ExM을 대중화 하는 데에 있어서 큰 걸림돌이 되었다. 이에 2016년 DNA가 붙어 있는 이차 항체 대신 일반 항체로 ExM을 구현한 두 개의 논문이 발표되었다.^{9),12)} 두 논문 모두 DNA를 대신해서 이차 항체와 하이드로젤을 연결해줄 수 있는 화학적 링커를 사용했다. <그림 9>



기본 방법은 관찰하고자 하는 단백질을 일차 항체, 그리고 형광 분자로 표지 되어 있는 이차 항체로 표지 한 후, 화학적 링커 처리를 해준 후 sodium acrylate 하이드로젤을 만들어준다. 화학적 링커는 이차 항체와 하이드로젤 사이를 화학적으로 연결해준다. 그 후 단백질 분해효소 처리를 하면, 잘게 잘린 이차 항체 조각들이 하이드로젤에 연결되게 된다. 이 때 이차 항체 조각들 중 일부에 형광 분자가 남아 있어서 하이드로젤이 팽창된 후 최초 표지된 단백질을 관찰할 수 있게 된다. 먼저 첫 번째 논문에서는 Methacrylic acid N-hydroxysuccinimidyl ester (MA-NHS)와 Glutaraldehyde를 사용하였다.¹²⁾ 아래 <그림 10>은 앞의 <그림 8>과 같이 쥐 뇌의 신경세포와 프리시냅스 단백질 Bassoon, 포스트시냅스 단백질 Homer1을 면역표지 한 후, MA-NHS로 하이드로젤에 연결하고 팽창시킨 결과이다. <그림 10>에서 알 수 있듯이 팽창 전에는 보이지 않았던 시냅스 및 신경세포의 미세구조가 팽창 후 명확하게 보이는 것을 알 수 있다.



- (a) : 팽창 전 쥐 뇌 절편
- (b) : 팽창 후
- (c),(d) : (b)의 노란색 상자 안의 부분을 확대한 그림 팽창 전
- (e),(f) : 팽창 후
- (g),(h) : (e),(f)의 파란색, 녹색, 붉은색 신호의 프로파일

그림 10. MA-NHS를 이용하여 쥐 뇌 절편의 뇌 세포(파란색), Homer1(붉은색), Bassoon(녹색)을 이미징 한 결과¹²⁾

두 번째 논문에서는 succinimidyl ester of 6-((acryloyl)amino)hexanoic acid (AcX)를 사용하였다. <그림 9c>⁹⁾ 이 논문에서는 AcX를 이용하여 두 가지 다른 방법을 선보였는데, 먼저 첫 번째는 <그림 9>에서 본 것과 같이 관찰하고자 하는 단백질을 일차 항체, 이차 항체로 면역 표지 한 후, AcX로 이차 항체를 하이드로젤에 연결해주고 모든 단백질을 분해해준 후 팽창시켜 준다. 두 번째 방법에서는 항체를 사용하지 않고 세포 혹은 조직 내부에서 발현된 형광 단백질을 사용한다. 먼저 이 논문에서는 형광 단백질은 단백질 가수분해 효소에 의해서 쉽게 분해되지 않는다는 것을 밝혔다. 따라서 형광 단백질을 가지고 있는 세포 혹은 조직의 경우, 면역 표지를 하지 않고 AcX로 세포 혹은 조직 내부의 형광 단백질을 바로 하이드로젤에 연결하는 것이 가능하다. 이 방법은 면역 표지를 필요로 하지 않는다는 장점이 있다. 두께가 100 um가 넘는 절편의 경우 면역표

지 하기 위해서는 절편을 항체 수용액 속에 넣고 짧게는 수일에서 길게는 일주일 정도 기다려줘야 하는 번거로움이 있다. 절편의 두께가 두꺼워짐에 따라 항체를 넣고 기다려야 하는 시간이 기하급수적으로 늘어난다. 하지만 이 방법을 사용하면 이러한 긴 면역 표지 과정이 필요하지 않아 두꺼운 절편도 쉽게 관찰할 수 있다.

2.4 다단계 면역표지

지금까지 설명한 ExM 방법들은 하이드로젤을 만든 후 단백질 분해효소로 모든 단백질을 분해해주었다. 따라서 시료 내부에 하이드로젤을 만들기 전에 관찰하고자 하는 단백질을 미리 정하고, 그 단백질들을 항체로 면역 표지해주어야 한다. 이 때 동시에 표지할 수 있는 단백질의 개수에는 두 가지 제한이 따르는데, 먼저 첫 번째로는 항체 생산 동물의 종류의 수이다. 현재 항체 생산에 쓰이는 동물은 10여종에 불과하여 한 번에 10종류 이상의 단백질을 동시에 표지하는 것이 어렵다. 두 번째로는 현미경 상에서 선명하게 구분되는 형광 분자의 색이 5종류에 불과하여 형광을 이용해서 구분할 수 있는 단백질의 종류가 5종류를 넘기가 어렵다. 이와 같은 제한 조건 때문에 위의 ExM 방법들을 사용하여 동시에 관찰한 단백질의 종류는 3종류를 넘기가 어려웠다.

최근 새롭게 발표된 방법 Magnified analysis of the proteome (MAP)은 먼저 모든 단백질을 하이드로젤에 연결시킨 후 세포 및 조직을 고온에서 처리해주어 단백질 간의 혹은 단백질 내부의 화학 연결을 끊어준다.⁸⁾ 그리고 하이드로젤을 팽창시켜준다. 이 방법을 사용하면 하이드로젤 팽창 후 면역 표지를 하는 것이 가능하다. 이 방법은 다양한 단백질을 순차적으로 면역 표지함으로써 여러 단백질을 관찰하는 것이 가능하다. 따라서 이 방법은 위에서 설명한 항체 생산 동물의 종류에 따른 제한과 형광 분자 색에 따른 제한을 받지 않기 때문에 이론적으로 수십 수백 종류의 단백질을 관찰하는 것이 가능하다. 또한 생체 조직 내부의 단백질을 항체로 표지하기 위해서는 항체를 조직 내부로 확산시켜야 하는데, 이 때 이 확산 속도가 매우 느려 두꺼운 조직을 관찰하기에는 큰 어려움이 있었다. 예를 들어 두께가 200 μm 인 조직 내부로 항체를 확산시키려면 1-2주 정도의 시간이 걸린다. 하지만 하이드로젤 팽창 후에는 항체의 확산 속도가 월등히 빨라 큰 시료도 면역 표지할 수 있다는 장점이 있다. <그림 11>

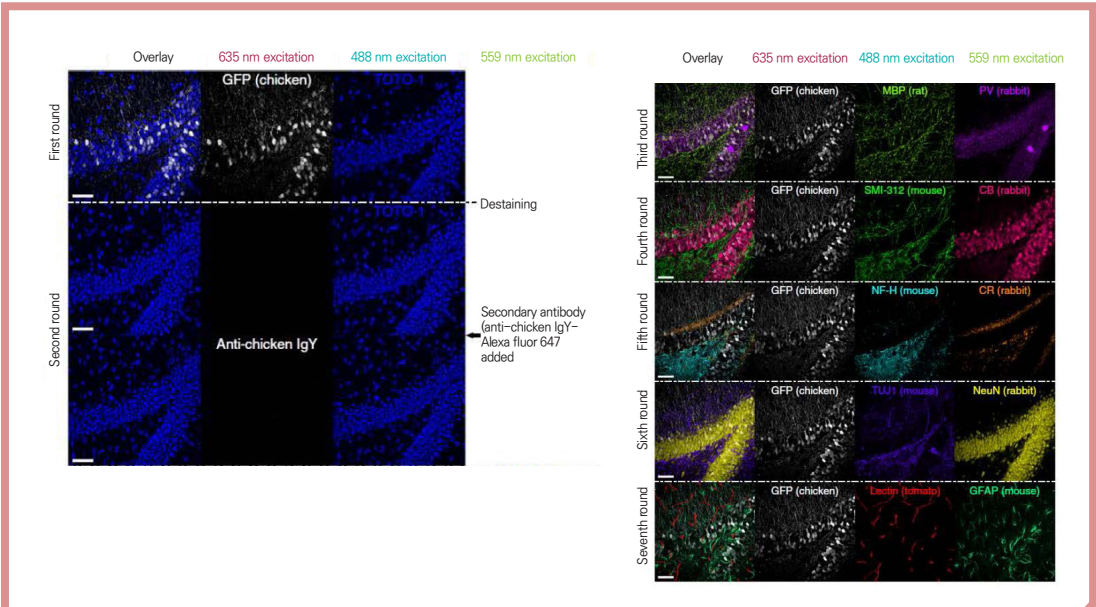


그림 11. MAP을 이용하여 여러 번에 걸쳐 순차적으로 다양한 단백질을 면역표지 한 결과⁸⁾

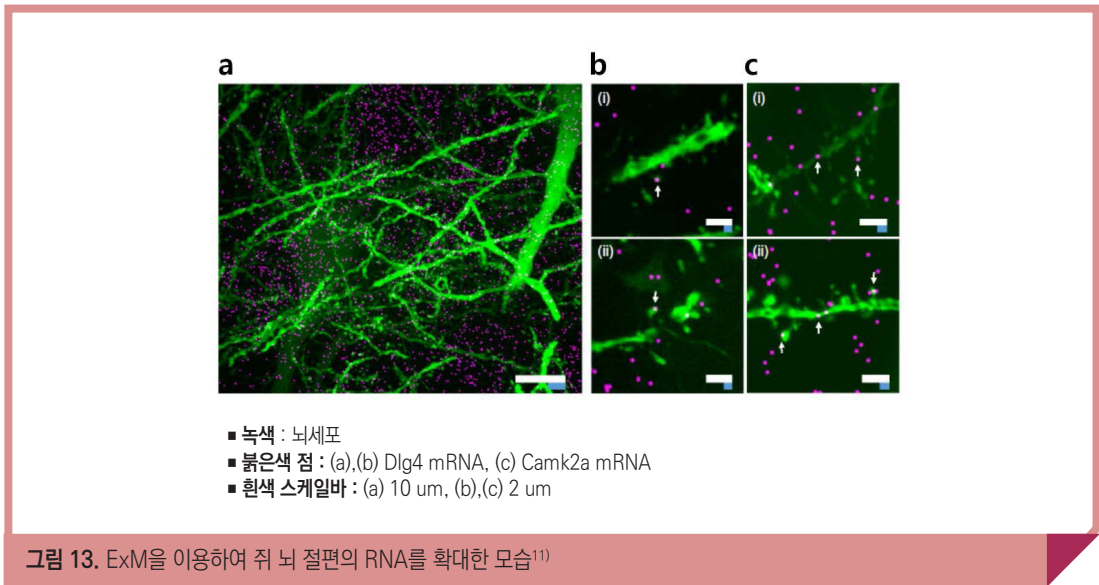
이 기법(MAP)은 큰 조직의 내부에 있는 단백질로 항체를 표지 할 수 있어서 아래 <그림 12>에서 보는 것처럼 큰 조직들도 팽창시켜 관찰하는 것이 가능하다.



그림 12. MAP을 이용하여 여러 번에 걸쳐 순차적으로 다양한 단백질을 면역표지 한 결과⁸⁾
 각 그림에서 오른쪽 아래의 작은 그림은 팽창 전 사진이고 왼쪽 위 큰 그림은 팽창 후의 사진이다.

2.5 시료 팽창을 이용한 RNA 이미징

시료를 팽창하여 단백질 뿐만 아니라 세포 혹은 조직 내부의 RNA도 관찰할 수 있다.¹¹⁾ 단백질 이미징과 같이 RNA를 이미징하기 위해서는 RNA를 하이드로젤에 연결할 수 있는 링커가 필요하다. 2016년 8월에 출판된 논문(Expansion Fluorescent In-Situ Hybridization; ExFISH)에서는 LabelX라는 화학물질을 이용했다. 이 화학물질은 모든 핵산과 화학결합을 하는 성질을 가지고 있는데, LabelX를 세포 혹은 조직 내의 모든 핵산에 연결하고, 앞에서 소개한 AcX로 LabelX와 하이드로젤을 연결하면 세포 혹은 조직 내의 RNA를 하이드로젤에 연결할 수 있다. 이 방법을 이용하여 아래 <그림 13>에서 보이는 것과 같이 쥐 뇌 절편에서 mRNA의 분포를 고해상도로 이미징 할 수 있다.



위의 <그림 13>에서 붉은색 점은 각각 mRNA 단분자이다. 이렇게 단분자를 이미징하기 위해서 위 논문에서는 Hybridization chain reaction (HCR)이라는 기법이 사용되었다. 최근 mRNA 단분자를 이미징 하기 위해 다양한 형광 신호 증폭 기술이 개발되고 있는데, HCR은 이러한 증폭 기술 중 하나이다.¹⁷⁾ 기본 원리는 mRNA에 상보적인 염기서열의 DNA(FISH probe)를 붙이고, 이 DNA 끝에 형광분자를 가지고 있는 DNA를 연속적으로 붙이게 된다. 이 과정을 통해 mRNA 단분자 하나에 수백 개의 형광분자를 붙일 수 있어서 일반 현미경으로도 mRNA 단분자를 관찰하는 것이 가능해진다. <그림 14>

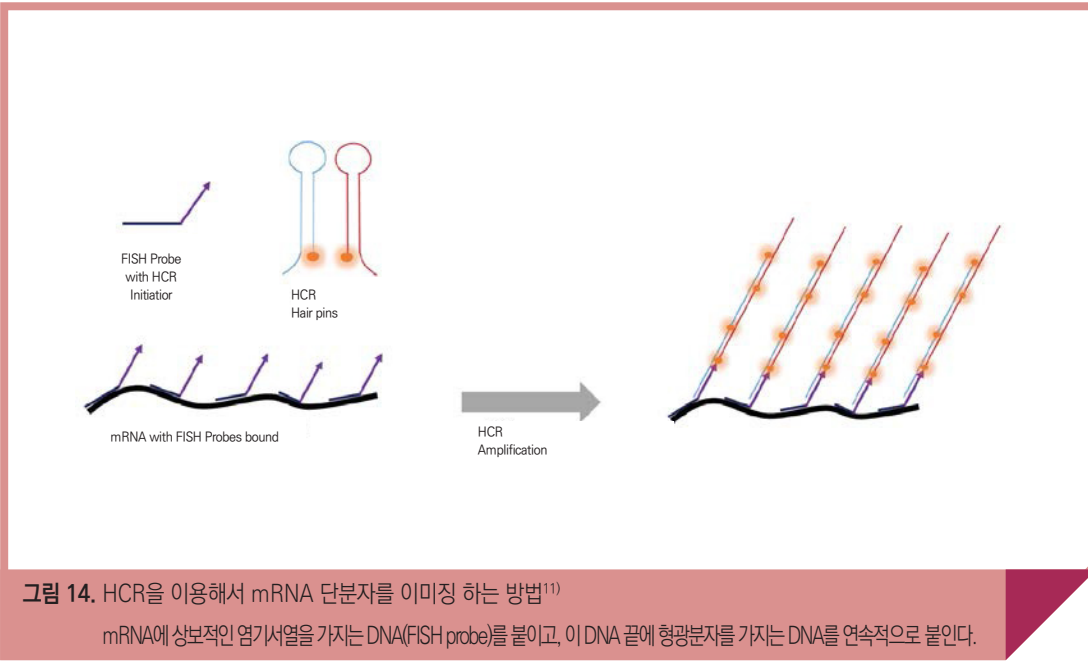
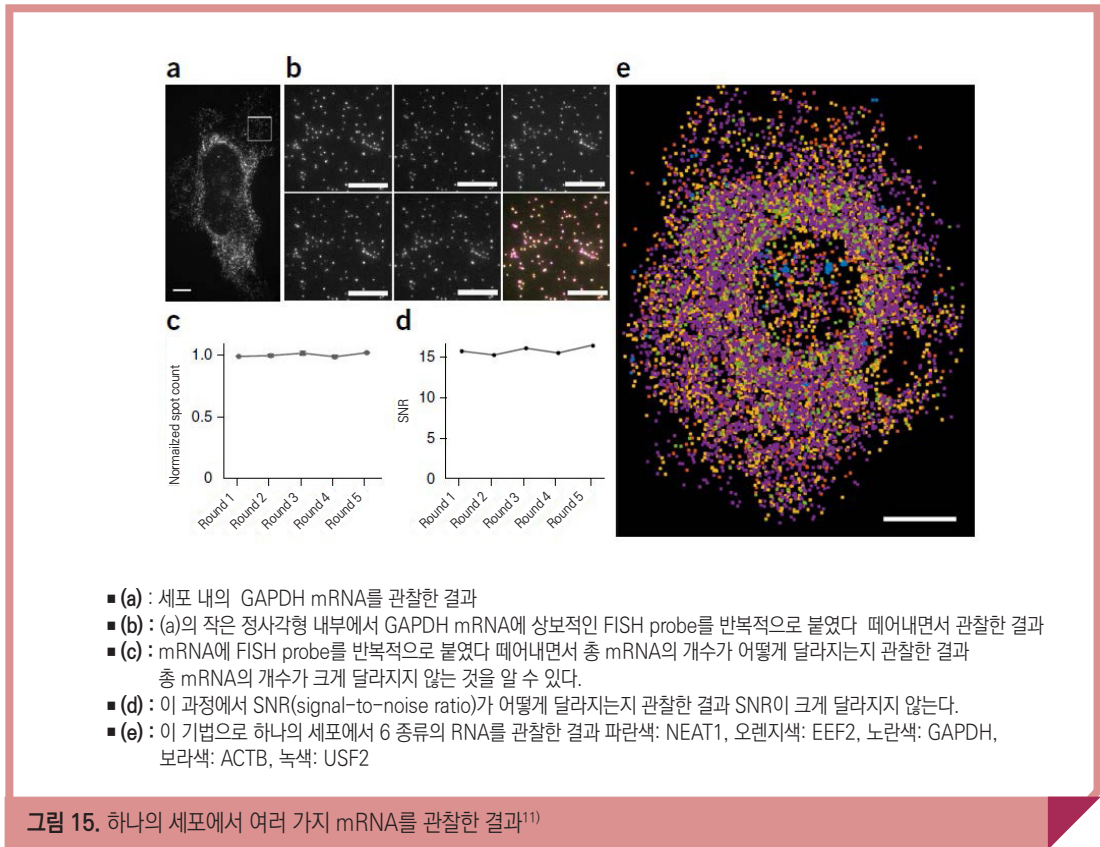


그림 14. HCR을 이용해서 mRNA 단분자를 이미징 하는 방법¹¹⁾

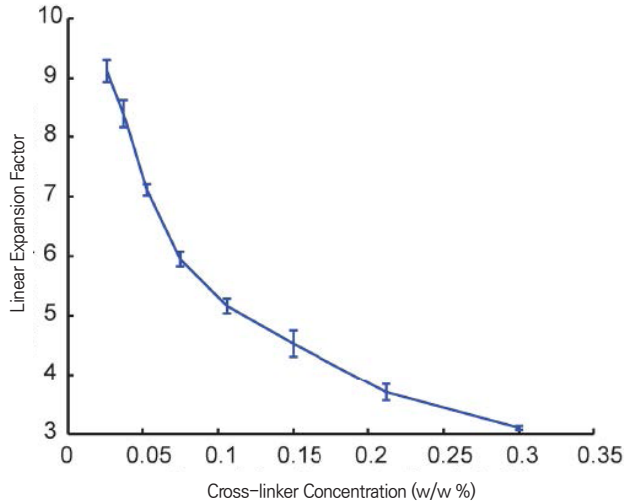
mRNA에 상보적인 염기서열을 가지는 DNA(FISH probe)를 붙이고, 이 DNA 끝에 형광분자를 가지는 DNA를 연속적으로 붙인다.

또한 mRNA와 DNA 사이의 결합은 가역적이기 때문에 mRNA에 붙어 있는 상보적인 DNA (FISH probe)를 떼어내고 다른 mRNA에 상보적인 DNA (FISH probe)를 붙이면 하나의 세포 내부의 여러 가지 mRNA의 분포를 이미징 할 수 있게 된다. <그림 15> 최근 세포 내의 수십 혹은 수백개의 mRNA를 이미징 하는 다양한 기법들(Sequential FISH¹⁸, Multiplexed error-robust FISH; MERFISH¹⁹)이 개발되고 있는데 이러한 기법들과 결합된다면 세포 혹은 조직 내의 수백 종류의 mRNA의 위치 및 개수를 정량적으로 측정 하는 것이 가능해질 것으로 예상된다.



2.6 반복적인 팽창을 통한 20 nm 해상도 달성

앞에서 소개한 기법들에서는 모두 시료를 3-4.5배 팽창시켜 60-70 nm 해상도를 얻을 수 있었다.^{7-9),11),12)} 이는 다시 말해 시료를 4.5배 이상 팽창시킬 수 있다면 더 높은 해상도를 얻을 수 있다는 것을 의미한다. 하이드로젤이 물 속에서 얼마나 팽창하는지는 하이드로젤을 만들 때 사용한 가교제(crosslinker)의 농도에 따라 결정된다. 높은 농도의 가교제를 사용한 경우 하이드로젤은 적게 팽창하게 되고, 낮은 농도의 가교제를 사용한 경우에는 하이드로젤이 좀 더 많이 팽창하게 된다. <그림 16>



■ x축은 하이드로젤을 처음 만들 때 넣어준 가교제의 농도이고 y축은 팽창계수이다. 팽창계수는 하이드로젤의 크기가 팽창 전/후 얼마나 달라졌는지를 나타낸다. 예를 들어 팽창 전 원형의 하이드로젤의 지름이 1cm였는데 팽창 후 5cm가 되었다면 팽창계수는 5이다. 위의 논문들에서는 0.15% 농도의 가교제가 사용되었고 이에 따른 하이드로젤 팽창 계수는 4.5였다.

그림 16. 가교제(crosslinker)의 농도에 따라 하이드로젤이 얼마나 팽창하는지 나타낸 그림⁷⁾

그렇다면 좀 더 낮은 농도의 가교제(0.1% 혹은 0.05%)를 사용하면 하이드로젤을 5배, 8배 팽창시킬 수 있을까. 이렇게 낮은 농도의 가교제를 사용하는 경우 하이드로젤을 좀 더 팽창시킬 수는 있지만 두 가지 문제가 존재한다. 먼저 첫 번째는 하이드로젤이 너무 약해져서 쉽게 그 모양이 틀어진다. 하이드로젤이 4.5배 팽창하는 경우 하이드로젤의 부피는 팽창 전에 비해서 4.5^3 (~91배) 늘어나게 된다. 만약 낮은 농도의 가교제를 사용해서 하이드로젤을 10배 이상 팽창시키는 경우, 부피는 팽창 전과 비교하여 1000배 이상 늘어나게 되어 하이드로젤이 매우 약해지게 된다. 두 번째 문제는 좀 더 근본적인 문제로, 낮은 농도의 가교제를 사용하게 되면 하이드로젤 내부의 균질성이 떨어져 팽창 자체가 점점 비균질하게 된다.²⁰⁾ 팽창이 균일하지 않게 되면 하이드로젤에 화학적으로 결합되어 있는 분자들 간의 거리가 균일하게 늘어나지 않게 되기 때문에 팽창 과정에서 이미지 변형이 생기게 된다.

이러한 문제를 해결하기 위해 지난 2017년 반복적 팽창현미경 (iterative expansion microscopy; iExM)이라는 기술이 개발되었다.¹⁰⁾ 이 기술을 사용하면 하이드로젤을 10배, 20배, 혹은 50배 이상으로 팽창시키는 것이 가능하다. 이 기술은 시료 내부에 하이드로젤을 만들고 한 번에 10-50배까지 팽창시키는 대신 시료 내부에 하이드로젤을 만들어 4.5배 팽창시키고 팽창된 하이드로젤 내부에 새로운 하이드로젤을 합성한 후 팽창시켜 팽창된 시료를 다시 한 번 팽창시키는 방법을 사용하였다. 이 방법을 사용하여 시료를 4.5 배씩 두 번 팽창시켜 주게 되면 시료를 20배($4.5 \times 4.5 \sim 20$) 팽창시킬 수 있게 된다. 4.5배씩 세 번 팽창시켜 주면 100배 팽창시키는 것도 가능하다. <그림 17>

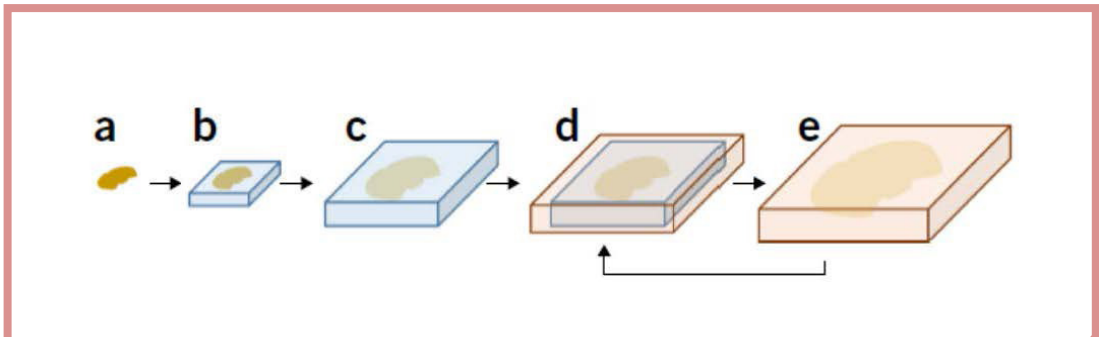
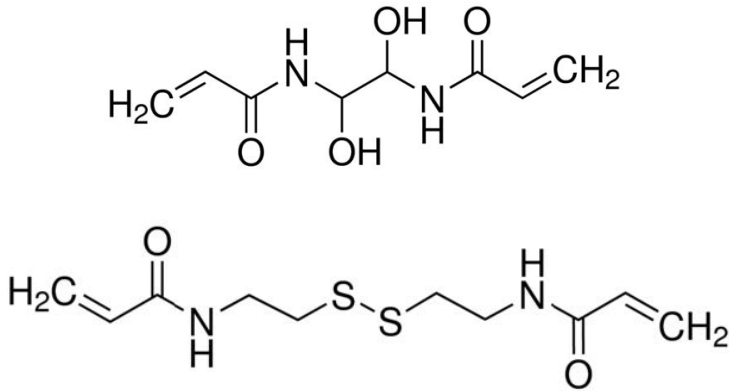


그림 17. 반복성 팽창현미경(iterative expansion microscopy)의 원리
 관찰하고자 하는 시료(뇌 절편) 내부에 하이드로젤을 만들어 팽창시킨 후, 다시 새로운 하이드로젤을 합성하여 시료를 두 번째로 팽창시켜준다. 이 과정을 여러 번 반복할 수 있다.¹⁰⁾

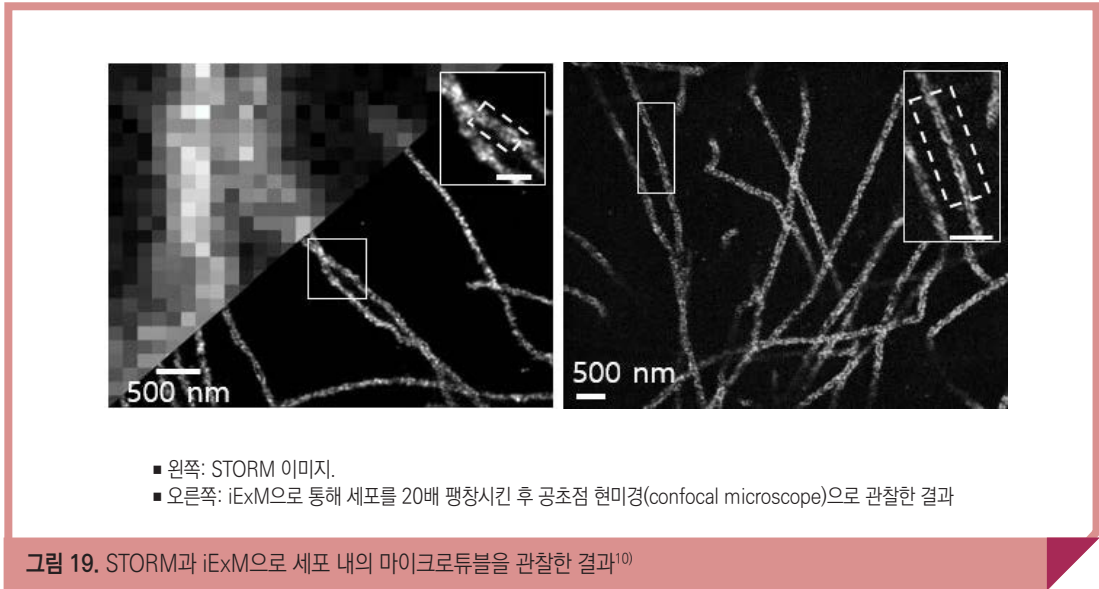
이미 팽창된 첫 번째 하이드로젤을 두 번째 하이드로젤로 다시 팽창시키기 위해서는 팽창된 첫 번째 하이드로젤을 제거해주어야 한다. 이를 위해 이 방법(반복적 팽창현미경; Iterative expansion microscopy)에서는 첫 번째 하이드로젤을 화학적으로 분해 가능한 가교제(crosslinker)로 만들어주었다.²¹⁾ 팽창된 첫 번째 하이드로젤 내부에 두 번째 하이드로젤을 합성한 후 첫 번째 하이드로젤을 화학적 처리를 통해 분해시키면 시료를 다시 한 번 팽창시킬 수 있다. 세 번 팽창시키기 위해서는 총 세 종류의 가교제가 필요한데, 첫 번째 두 번째 하이드로젤은 화학적으로 분해 가능한 가교제를 사용하고 마지막 세 번째는 분해가 되지 않는 가교제를 사용한다. 이 때 첫 번째 하이드로젤의 가교제와 두 번째 하이드로젤의 가교제는 둘 다 화학적으로 분해 가능하지만 그 화학적 성질이 달라 서로 다른 조건에서 분해가 되는 가교제를 사용한다. <그림 18>



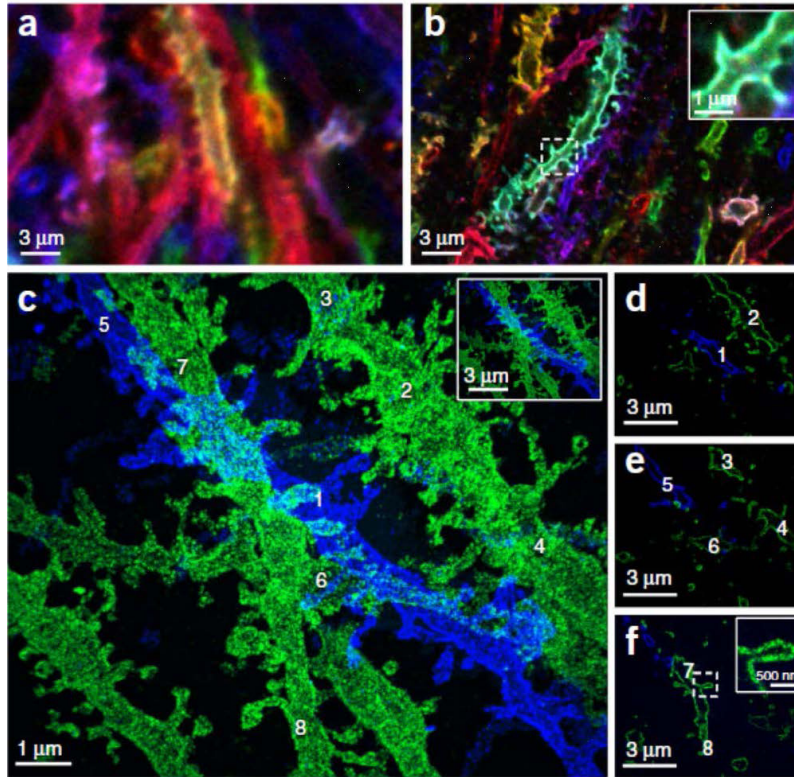
■ 위: N,N'-(1,2-Dihydroxyethylene)bisacrylamide, 아래: N,N'-Bis(acryloyl)cystamine

그림 18. 화학적으로 분해 가능한 두 가지 가교제(crosslinker)

이와 같은 방법으로 먼저 세포 내부의 초미세구조를 관찰하여 보았다. 세포 내부의 다양한 초미세구조 중에서 마이크로튜블을 관찰하였는데, 마이크로튜블은 속이 빈 튜브 형태의 구조로 지름이 25 nm에 불과하다. 따라서 그동안 초고해상도 현미경의 해상도를 측정하는 용도로 많이 사용되어 왔다.²²⁾ 지금까지 다양한 초고해상도 현미경이 개발되었지만 세포 내의 마이크로튜블의 튜브 형태를 관찰할 수 있는 기법은 STORM을 비롯한 몇 개에 불과하다.^{22),23)} 예를 들어 STORM과 같은 초고해상도 이미징 기법으로 세포의 마이크로튜블을 관찰하게 되면 아래 <그림 19>의 왼쪽 그림에서와 같이 마이크로튜블의 내부가 비어있는 것을 관찰할 수 있다. 이 마이크로튜블을 20배 팽창시켜 일반 현미경으로 관찰한 결과, <그림 19>의 오른쪽에서 보이는 것과 같이 마이크로튜블의 내부 구조를 관찰할 수 있었다. 이러한 마이크로튜블 이미징을 통해서 정량적으로 측정한 20배 팽창현미경의 해상도는 대략 22 nm 였다. 일반 현미경의 해상도가 250 nm 인 것을 고려하면 20배 팽창을 통해서 현미경의 해상도를 대략 12-13배 향상시킨 것을 알 수 있다.



그 다음으로 이 기법을 Brainbow^{24),25)}라는 기법으로 처리된 쥐의 뇌 절편에 적용해보았다. Brainbow는 지난 2007년에 개발된 기술로, 이 기술로 처리된 쥐 뇌의 신경세포는 서로 각기 다른 색을 띠게 된다. 그 원리는 쥐 뇌의 신경세포에 색이 다른 여러 종류의 형광 단백질(예: 붉은색, 파란색, 녹색)을 유전적 방법으로 도입하는데 이 때 신경세포마다 형광 단백질 간 발현량이 서로 달라지게 된다. 따라서 각 신경세포는 여러 색이 다른 형광 단백질을 각기 다른 비율로 발현하게 되고 그 결과 신경세포들의 색이 서로 달라지게 된다. 이 기법을 사용하면 가까이 붙어 있는 두 신경세포를 쉽게 구별할 수 있어 뇌 속의 신경세포들의 상대적 위치 혹은 배열을 자세히 관찰할 수 있게 된다. 하지만 이 경우에도 현미경의 해상도가 충분하지 않은 경우 복잡한 신경세포의 분포를 관찰하기 쉽지 않다. <그림 20a>에서 보는 것과 같이 팽창 전에는 신경세포들의 3차원 구조 및 배열을 자세히 관찰하기 어렵다. 이에 반해 4.5배 팽창 후에는 이러한 구조를 좀 더 자세히 관찰할 수 있으며 <그림 20b>, 20배 팽창 후에는 각 신경세포들의 크기, 모양, 배치 등을 매우 자세히 관찰할 수 있다. <그림 20c-f>



- (a) : 쥐 뇌 절편의 팽창 전
- (b) : 쥐 뇌 절편의 4.5배 팽창 후
- (c) : 쥐 뇌 절편의 20배 팽창 후
- (d-f) : (c)에 나온 영역을 다양한 focal height에서 관찰한 결과

그림 20. Rainbow 처리된 쥐 뇌 절편(100 μm 두께)을 20배 팽창시켜 관찰한 결과¹⁰⁾

03 결론

본 고에서는 지난 2015년 1월에서부터 2017년 4월까지 2년여의 시간 동안 개발된 다양한 시료 팽창 기반 이미징 기법들(ExM, ProExM, ExFISH, MAP, iExM)을 살펴보았다. 이러한 기법들이 뇌 연구에 활용될 수 있는 가장 대표적인 예는 신경세포 연결망 매핑이 될 것이다. 최근 뇌 내부 신경세포의 연결망을 매핑하려는 소위 커넥토믹스(connectomics)에 대한 논의와 연구가 매우 활발하게 이루어지고 있다. 그동안 전자현미경을 활용하여 다양한 동물의 신경 연결망을 관찰하려는 시도가 있어 왔다.¹⁶⁾ 앞으로는 이런 전자현미경 기반 기법과 더불어 팽창 기반 이미징 기법들이 같이 사용될 것으로 예상된다. 전자현미경 기반 기법들은 그 해상도가 매우 높지만 시료 내부의 다양한 단백질을 관찰하기 쉽지 않다. 이에 비해 팽창 기반 이미징 기법들은 그 해상도는 전자현미경 기반 기법에 비해서 떨어지지만 다양한 단백질을 관찰하기에 적합하다. 따라서 이 두 방법을 서로 같이 사용할 수 있다면 큰 시너지가 날 것으로 예상된다. 또한 팽창 기반 이미징 기법들을 사용하면 시냅스를 매우 자세히 관찰할 수 있게 되어 커넥토믹스에서 한 걸음 더 나아가 신경세포들이 어떤 시냅스로 연결되어 있는지 연구하는 시냅토믹스(synaptomics)를 구현하는 것도 가능해질 것으로 예상된다.

또한 이 기법들은 뇌 질환에 따른 신경세포의 미세한 변화를 관찰하여 뇌 질환의 원인을 이해하고 그 치료법을 개발하는 데에 사용될 수 있을 것이다. 예를 들어 현재 특정 유전자의 돌연변이에 따른 신경세포의 변화를 관찰하기 위해서는 해당 돌연변이를 가진 모델 동물을 만들고 이 동물의 뇌의 특정 부분을 잘라내고 그 내부의 단백질을 추출하여 발현량을 측정하는 방법이 사용되어 왔다.²⁶⁾ 하지만 이 방법의 경우 해당 단백질의 위치 정보가 사라져 신경세포 종류별 해당 단백질의 발현량이 어떻게 달라지는지, 서로 가까이 붙어 있는 신경세포들 간의 해당 단백질 발현량 사이에 상관관계가 있는지 등의 자세한 정보를 알 수 없었다. 그러나 팽창 기반 이미징 기법들을 사용하면 이러한 질병에 따른 단백질 발현량의 변화를 좀 더 자세히 관찰할 수 있게 된다.

팽창 기반 이미징 기법들은 뇌 연구를 위해 개발되었지만 기본적으로는 복잡한 생체 조직 내부의 단백질 혹은 mRNA, 더 나아가 다양한 분자들의 위치 정보를 추출하는 방법이다. 따라서 이미징이 필요한 모든 분야에 적용될 수 있을 것으로 생각된다. 가장 대표적인 분야로는 암 진단 및 연구가 될 것이다. 지금까지는 환자에게서 떼어낸 시료를 눈 혹은 일반 현미경으로 관찰하였다면 앞으로는 다양한 팽창 기반 이미징 기법들을 도입하여 시료 내부의 특정 단백질 혹은 mRNA의 위치 및 발현량을 정량화 하는 것이 가능해질 것으로 예상된다. 또한 최근 동물 실험을 대체하기 위해서 다양한 오가노이드(organoid)들이 개발되고 있으며,²⁷⁾ 이 오가노이드가 실제 장기와 얼마나 같은지 혹은 다른지에 대한 논란이 계속되고 있다. 팽창 기반 이미징 기법을 이용하여 오가노이드의 세포 타입, 단백질별 발현량, mRNA 발현량 및 분포 등을 자세히 관찰할 수 있다면 실제 장기와 오가노이드 사이의 유사성을 정량적으로 측정할 수 있게 될 것이다. 이를 통해 좀 더 실제 장기와 유사한 오가노이드를 만드는 방법의 개발에도 큰 기여를 할 것으로 예상된다.²⁸⁾

최근 인공지능의 빠른 발전에 힘입어 대량의 데이터를 분석하여 패턴 혹은 의미를 밝혀내는 것이 가능해지고 있다. 이에 따라 전에는 분석할 수 없었던 대량의 데이터도 빠른 속도로 분석하는 것이 가능해지고 있다. 이에 비해 정밀한 대량의 데이터를 얻는 방법은 그 발전 속도가 상대적으로 느리다. 팽창 기반 이미징 기법은 관찰하고자 하는 시료를 팽창시킴으로써 기존의 현미경으로는 얻을 수 없었던 시료 내부의 정밀 데이터를 얻을 수 있다. 따라서 앞으로 팽창 기반 이미징 기법으로 대량의 뇌 조직, 암 조직, 오가노이드 및 다양한 줄기세포 조직 내부의 단백질 및 mRNA에 대한 정보를 얻은 후 인공지능으로 분석하는 연구가 활발히 진행될 것으로 예상된다. 또한 이렇게 얻은 정보를 최근 매우 빠른 속도로 발전되고 있는 지노믹스 혹은 프로테오믹스(proteomics) 기법들 및 정보와 결합한다면 더 큰 시너지를 발휘할 수 있을 것으로 기대된다.

저자 장재범

Jae-Byum Chang

학력 美 MIT 재료공학 박사
 한국과학기술원 물리학/생명공학 학사

경력 現) 성균관대학교 글로벌바이오메디컬공학과 조교수
 前) MIT Media Lab 연구원

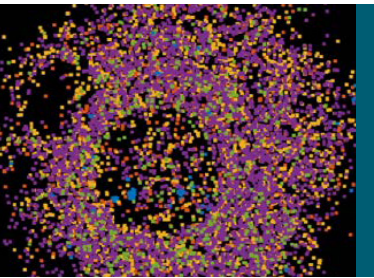
참고문헌

1. Huang, B., Bates, M. & Zhuang, X. Super-Resolution Fluorescence Microscopy. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 993-1016 (2009).
2. Hell, S. W. & Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* 19, 780-782 (1994).
3. Betzig, E. et al. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* (80-.). 313, 1642 LP-1645 (2006).
4. Dickson, R. M., Cubitt, A. B., Tsien, R. Y. & Moerner, W. E. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* 388, 355-358 (1997).
5. Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Meth* 3, 793-796 (2006).
6. Huang, B., Wang, W., Bates, M. & Zhuang, X. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* 319, 810-3 (2008).
7. Chen, F., Tillberg, P. & Boyden, E. S. Expansion Microscopy. *Science* (80-.). 347, 543 (2015).
8. Ku, T. et al. Multiplexed and scalable super-resolution imaging of three-dimensional protein localization in size-adjustable tissues. *Nat Biotech* 34, 973-981 (2016).
9. Tillberg, P. W. et al. Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies. *Nat. Biotechnol.* 34, 987-992 (2016).
10. Chang, J.-B. et al. Iterative expansion microscopy. *Nat. Methods* 14, 593-599 (2017).



11. Chen, F. et al. Nanoscale Imaging of RNA with Expansion Microscopy. *Nat. Methods* 13, 679 – 684 (2016).
12. Chozinski, T. J. et al. Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins. *Nat. Methods* 13, 485 – 488 (2016).
13. Engerer, P., Fecher, C. & Misgeld, T. Super-resolution microscopy writ large. *Nat Biotech* 34, 928 – 930 (2016).
14. Herculano-Houzel, S. The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain. *Front. Hum. Neurosci.* 3, 31 (2009).
15. Sigal, Y. M., Speer, C. M., Babcock, H. P. & Zhuang, X. Mapping Synaptic Input Fields of Neurons with Super-Resolution Imaging. *Cell* 163, 493 – 505 (2015).
16. Kasthuri, N. et al. Saturated Reconstruction of a Volume of Neocortex. *Cell* 162, 648 – 661 (2017).
17. Choi, H. M. T., Beck, V. A. & Pierce, N. A. Next-Generation in Situ Hybridization Chain Reaction: Higher Gain, Lower Cost, Greater Durability. *ACS Nano* 8, 4284 – 4294 (2014).
18. Lubeck, E., Coskun, A. F., Zhiyentayev, T., Ahmad, M. & Cai, L. Single-cell in situ RNA profiling by sequential hybridization. *Nat. Methods* 11, 360 – 361 (2014).
19. Chen, K. H., Boettiger, A. N., Moffitt, J. R., Wang, S. & Zhuang, X. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science* (80-.). 348, (2015).
20. Hecht, A. M., Duplessix, R. & Geissler, E. Structural inhomogeneities in the range 2.5–2500 Å in polyacrylamide gels. *Macromolecules* 18, 2167 – 2173 (1985).
21. O’Connell, P. B. H. & Brady, C. J. Polyacrylamide gels with modified cross-linkages. *Anal. Biochem.* 76, 63 – 73 (1976).
22. Dempsey, G. T., Vaughan, J. C., Chen, K. H., Bates, M. & Zhuang, X. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat. Methods* 8, 1027 – 1036 (2011).

23. Huang, F. et al. Ultra-High Resolution 3D Imaging of Whole Cells. *Cell* 166, 1028 – 1040 (2017).
24. Livet, J. et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450, 56 – 62 (2007).
25. Cai, D., Cohen, K. B., Luo, T., Lichtman, J. W. & Sanes, J. R. Improved tools for the Brainbow toolbox. *Nat. Methods* 10, 540 – 547 (2013).
26. Peca, J. et al. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472, 437 – 442 (2011).
27. Lancaster, M. A. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373 – 379 (2013).
28. Quadrato, G. et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature* 545, 48 – 53 (2017).



 **융합연구정책센터**
Convergence Research Policy Center

(02792) 서울특별시 성북구 화랑로 14길 5 (TEL) 02-958-4984