



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2023년 2월

석사학위 논문

다기능 나노복합체 기반의
신속하고 간편한 엑소좀
분리 및 검출

조선대학교 대학원

과 학 교 육 학 과

백 성 진

다기능 나노복합체 기반의
신속하고 간편한 엑소좀
분리 및 검출

Fast and simple isolation and detection of exosome
based on multifunctional nanocomposites

2023년 2월 24일

조선대학교 대학원

과 학 교 육 학 과

백 성 진

다기능 나노복합체 기반의
신속하고 간편한 엑소좀
분리 및 검출

지도교수 정 경 복

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2022년 10월

조선대학교 대학원

과 학 교 육 학 과

백 성 진

백성진의 석사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	명노준 
위원	조선대학교 교수	정경복 
위원	조선대학교 교수	황승림 

2022 년 12 월

조선대학교 대학원

목 차

I. 서론	1
II. 이론	5
2.1 라만 분광법.....	5
2.2 표면증강라만산란 (Surface-enhanced Raman scattering; SERS)	8
2.3 인지질 이중층과 금속산화물의 상호작용	9
III. 실험재료 및 실험방법	11
3.1 실험재료	11
3.2 금속산화물 나노입자의 합성	11
3.2.1 은 나노입자가 결합된 산화철 나노입자 (Fe ₃ O ₄ @Ag NPs) 합성	11
3.2.2 유로퓸을 첨가한 칼슘티타늄산화물 (CaTiO ₃ :Eu ³⁺) 합성	12
3.2.3 CaTiO ₃ :Eu ³⁺ @Fe ₃ O ₄ 나노복합체 합성	13
3.3 합성한 나노입자의 특성 분석	13
3.4 금속산화물 나노입자와 엑소좀과의 상호작용	14

3.4.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ NPs 에 의한 인지질 이중층의 흡착	14
3.4.2 세포 배양.....	16
3.4.3 초고속원심분리를 이용한 엑소좀 분리	16
3.4.4 나노물질을 이용한 엑소좀 분리	17
3.4.5 분리한 엑소좀의 특성 분석	18
3.5 SERS 기반의 엑소좀 검출	19
3.5.1 금 나노막대 (Gold nanorods; Au NRs) 기반 SERS 프로브 제작	19
3.5.2 SERS 프로브의 특성 분석	20
3.5.3 SERS 기반 엑소좀 검출	20
IV. 결과 및 고찰	22
4.1 금속산화물 나노입자의 물리·화학적 특성	22
4.1.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ 나노입자	22
4.1.2 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 분말	24
4.1.3 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@Fe_3O_4$ 나노복합체	27
4.2 금속산화물 나노입자와 인산염의 상호작용	30
4.2.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ 나노입자에 대한 DOPC 의 흡착	30

4.3 금속산화물 나노입자와 엑소좀의 상호작용	31
4.3.1 엑소좀의 특성	31
4.3.2 금속산화물 나노입자에 대한 엑소좀의 흡착	33
4.3.3 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체를 이용한 세포배양액 에서의 엑소좀 분리	34
4.4 SERS 기반의 엑소좀 검출	35
4.4.1 SERS 프로브 특성	35
4.4.2 SERS 기반 엑소좀 검출	37
 V. 결론	 39
 VI. 참고문헌	 42

List of Tables

Table 1. Advantages and disadvantages of different isolation methods for exosomes	3
---	----------

List of Figures

Figure 1. The structure and content of exosome and phospholipid bilayer	1
Figure 2. Schematic diagram of the energy transitions for Rayleigh and Raman scattering	7
Figure 3. Schematic illustration of the mechanism of Surface Enhanced Raman Scattering (SERS)	8
Figure 4. The interaction mechanism of metal oxide nanoparticles and phospholipid bilayer	10
Figure 5. Photographs of the (a) planetary ball mill, (b) bowl and balls, and (c) schematic illustration of the ball motion during mixing	12
Figure 6. Chemical structure of phospholipids used in the present study. (a) 1,2-Dioleoy-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and (b) 1-palmitoyl-2-(dipyrrometheneborondifluoride)undecanoyl-sn-glycero-3 phosphocholine (TOPC)	15
Figure 7. Steps of exosome isolation by Ultracentrifugation	16
Figure 8. Schematic illustration of the exosome isolation using metal oxide nanoparticles	17
Figure 9. Schematic illustration of SERS-based immunoassay for CD81 (a) the conjugation of Au NRs to the detection antigen and (b) the operating principle of SERS immunoassay for CD81 detection	21
Figure 10. XRD patterns of the Fe ₃ O ₄ and Fe ₃ O ₄ @Ag nanoparticles	22
Figure 11. SEM image (a) and EDX spectrum (b) of the Fe ₃ O ₄ @Ag nanoparticles	23
Figure 12. Magnetic hysteresis loops of the Fe ₃ O ₄ and Fe ₃ O ₄ @Ag nanoparticles ..	23
Figure 13. XRD pattern of the CaTiO ₃ :Eu ³⁺ powders	24

Figure 14. Schematic diagram of Bragg's law (a) and CaTiO₃ perovskite structure (b) 26

Figure 15. SEM image (a) and EDX spectrum (b) of the CaTiO₃:Eu³⁺ powders ... 26

Figure 16. XRD pattern of the CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites 27

Figure 17. SEM image (a) and EDX spectrum (b) of the CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites 28

Figure 18. FTIR spectra of the Fe₃O₄, CaTiO₃:Eu³⁺, and CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites 28

Figure 19. Magnetic hysteresis loops of the (a) Fe₃O₄ and CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites and (b) photograph of the CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites dispersed in water without and with a magnetic field. The inset of (a) presents an enlarged magnetic hysteresis loops of the CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites. 29

Figure 20. FTIR spectra of the Fe₃O₄@Ag and Fe₃O₄@Ag_DOPC 30

Figure 21. Adsorption efficiency of TOPC on Fe₃O₄ and Fe₃O₄@Ag nanoparticles 31

Figure 22. Characterization of exosomes derived from HEK293 cells. Western blotting analysis of the exosomal marker CD81 (a), TEM image (b), NTA analysis(c), and zeta potential (d). 32

Figure 23. Adsorption efficiency of exosomes on metal oxide nanoparticles 33

Figure 24. Optimization of the conditions for exosome isolation. Isolation efficiency of HEK293 cells' exosomes as a function of the quantity of CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites (a) and incubation time (b). 34

Figure 25. UV-vis absorption spectra of Au NRs, Au NRs@DTTC, and Au NRs@DTTC@Ab 35

Figure 26. Comparison of Raman spectrum for Al foil and Au NRs SERS substrates 36

Figure 27. TEM image of CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ NCs–exosome/SERS probe 37

Figure 28. SERS spectra of CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ NCs-exosome and CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ NCs-exosome/SERS probe 38

ABSTRACT

Fast and simple isolation and detection of exosomes based on multifunctional nanocomposites

Back Seong Jin

Advisor : Prof. Jung Gyeong Bok Ph.D.

Department of science education.

Graduate School of Chosun University

Exosomes are extracellular vesicle secreted from cells that are enclosed by a phospholipid bilayer. The size of exosome is about 30 - 200 nm. They are found in most biological fluids including serum, urine, saliva, cerebrospinal fluid, and breast milk. Exosomes are containing a variety of functional components, including nucleic acid, proteins, lipid, and metabolites. Recently, exosomes have been great interest as promising biomarker for early detection of cancer. However, despite their potential importance, enrichment of exosome remains significant issues due to the lack of exosome isolation technology. Therefore, simple and rapid exosome isolation and detection methods are required.

In this dissertation, we developed the metal oxide-based multifunctional nanocomposites, $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$, to quickly and easily isolate and detect exosome. The $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanocomposites were synthesized by high-energy ball-milling (HEBM), and their crystal structure and surface morphology were investigated by X-ray diffraction (XRD) and field emission scanning electron microscopy (FE-SEM). XRD peaks of the $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanocomposites were good matches with the standard XRD peaks of the orthorhombic CaTiO_3 phase without impurities. The morphology of the

CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites present spherical shape and agglomerates of tiny particles. We also investigated the magnetic property of the CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites using vibrating sample magnetometer (VSM). The saturation magnetization of the CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites was less than that of the Fe₃O₄ nanoparticles. However, it was strong enough for effective magnetic separation in cell culture media.

The synthesized CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites used in the isolation and the concentration of the exosomes through the binding of CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites and hydrophilic phosphate head of the exosome phospholipids. Compared with the commercially available TiO₂, the proposed CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites achieved comparable.

We demonstrate a Surface-enhanced Raman Scattering (SERS)-based immunoassay for the detection of exosomal biomarker CD81. The CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites were utilized as the separation and enrichment of exosome. Gold nanorods (Au NRs) were modified with detection antibodies and antibody-conjugated Au NRs were labeled with 3, 3', diethylthiatricarbocyanine iodide (DTTC), as the SERS probes. A method combining magnetic separation and SERS was developed to detection of exosomal biomarker CD 81. As a result, the proposed SERS-based immunoassay was able to detect with high sensitivity the exosome. The results demonstrate the feasibility of the new strategy as a useful tool for exosome isolation and detection. Therefore, this technique might be a useful tool for the early diagnosis of disease.

I. 서론

엑소좀 (Exosome)은 세포에서 분비하는 인지질 이중층 (Phospholipid bilayer) 구조의 세포 외 소포체 중 하나로, 그 크기는 30 - 200 nm 정도이다 [1, 2]. 엑소좀은 혈청을 포함한 타액, 소변, 담즙, 척수와 같은 다양한 체액에 존재한다 [3, 4]. 엑소좀은 모세포가 가지고 있는 mRNA, miRNA, 단백질, DNA 등을 함유하고 있으며 세포간 정보 전달자로서 모든 세포의 분자적·유전적 특징을 조절할 수 있다는 사실이 규명되면서 다양한 질병 진단에 대한 바이오 마커 및 치료의 표적으로 주목받고 있다 [5-8]. 질병 단계와 치료 과정에 따라 분자적 프로파일이 달라지기 때문에 질병의 진단과 치료의 근거로 활용될 수 있으며, 이러한 엑소좀 특성에 관한 모니터링은 임상가들이 개인의 건강 상태 또는 질병의 발달을 추적할 수 있게 해 준다. 엑소좀은 바이오마커, 약물전달매체, 치료제로써 과학자들 사이에서 매우 큰 관심을 받고 있으나, 약 100 nm 크기의 입자를 시료로부터 분리하고 분석하는데 분리시간, 분석시스템의 민감도 및

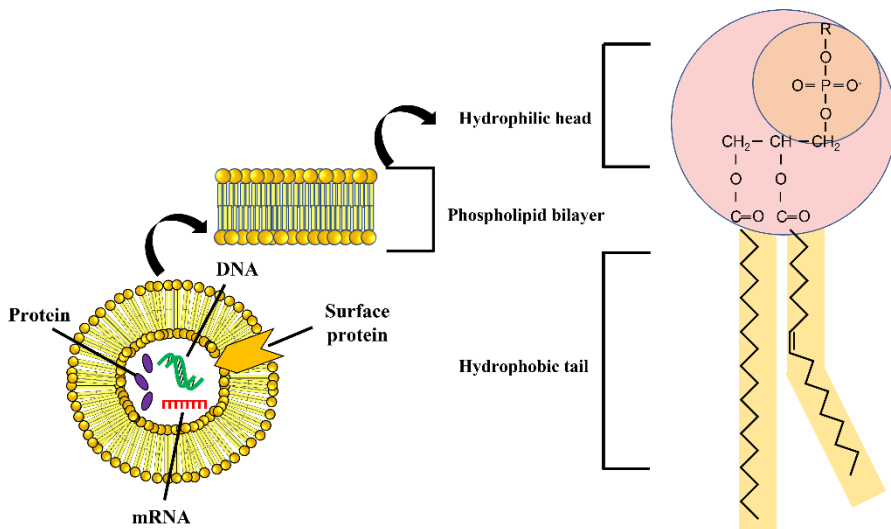


Figure 1. The structure and content of exosome and phospholipid bilayer

특이도 문제 등 여러 제약을 가지고 있다. 임상진단을 위해서는 적은 양의 샘플에서 엑소좀을 높은 수율과 고순도로 추출해야 하며, 초고속, 고민감도, 고선택적으로 분석할 수 있어야 한다 [9-12].

엑소좀 분리 방법에는 초고속 원심분리법 (Ultracentrifugation), 초미세여과법 (Ultrafiltration), 면역효소법 (Immunoaffinity), 폴리머 기반 침전법 (Polymer-based precipitation) 등이 대표적으로 사용되고 있다. 초고속 원심분리법은 원심력을 이용해 용액 속에 있는 다양한 밀도와 크기의 입자를 서로 분리하는 방법이다. 초고속 원심분리법은 시료를 대용량으로 준비할 수 있는 장점이 있지만 샘플에 강한 원심력이 가해져 샘플에 손상을 가하거나 형상을 변형시키게 되는 단점이 있다. 초미세여과법은 필터를 이용하여 여러 크기의 입자를 서로 분리하는 방법으로 높은 수율과 빠른 분리 시간이 장점이지만 엑소좀과 비슷한 크기의 다른 입자와 엑소좀을 서로 분리하지 못하는 단점이 있다. 면역효소법은 항원-항체의 특이적인 결합 반응을 이용해 엑소좀을 분리하는 방법이다. 엑소좀에 존재하는 대표적인 바이오 마커인 CD63, CD81, CD9 을 이용해 엑소좀을 분리한다 [8, 9]. 면역효소법은 선택적으로 엑소좀을 분리할 수 있지만 분리 과정이 복잡하다는 단점이 있다. 폴리머 기반 침전법은 무거운 고분자를 이용해 엑소좀을 침전시켜 분리하는 방법으로써 과정이 간단하다는 장점이 있지만 순수한 엑소좀을 얻을 수 없고 폴리머와 결합된 형태의 엑소좀을 얻어야 하는 단점이 있다. 기존의 엑소좀 분리 방법에 대한 장단점을 Table 1 에 나타내었다. 최근 이러한 단점들을 해결하기 위해서 금속산화물을 이용하여 간편하고 빠른 엑소좀 분리 방법에 대한 연구가 보고되었다 [13, 14]. 이 방법은 엑소좀을 분리할 때 소량의 샘플과 짧은 처리시간, 간단한

과정으로 매우 큰 장점을 가지고 있지만 엑소좀을 분석하는 과정에서는 기존의 2 차원 겔 전기영동 분석 및 다운스트림 LC-MS/MS 와 같은 단백질 분석법으로 과정이 복잡하며 소요시간이 길다는 문제점이 여전히 남아 있다.

종류	원리	장점	단점	시간
초원심분리법	입자의 크기와 밀도 차를 이용하여 분리	대용량의 시료를 분리함	수율이 낮고 분리 과정이 김	> 4 h
초미세여과법	입자를 입자량 또는 분자량으로 분리	분리 과정이 간단함	정확도 및 특이도가 낮음	< 4 h
폴리머기반침전법	고분자를 이용한 침전으로 분리	분리 과정이 간단함	순수한 엑소좀을 얻을 수 없음	< 1 h
면역효소법	항원과 항체의 특이적인 결합으로 분리	정확도 및 특이도가 높음	비용이 높고 분리 과정이 김	4-20 h

Table 1. Advantages and disadvantages of different isolation methods for exosomes

기존의 엑소좀 검출 및 분석 방법에는 분자생물학적 분석법인 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 (Real-time Polymerase Chain Reaction; RT-PCR), 형광 활성화 세포 선택장치 (Fluorescence-activated cell sorting; FACS), 효소면역측정법 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA), 웨스턴 블롯 (Western blot) 등이 대표적으로 사용되고 있는데 이러한 방법들은 과정이 복잡하고, 시간이 오래 걸리며 소량의 샘플에서는 측정이 어렵고 민감도가 떨어진다 [14].

광신호를 이용한 바이오마커의 분석 방법 중 라만 산란에 기반을 둔 분광 측정은 비침습적으로 기존의 형광분석기술과는 달리 생화학 분자 수준에서 바이오물질에 대한 정보를 좁은 선폭의 스펙트럼으로 제공하며, 분자들마다 고유의 라만 신호를 가지고 있기 때문에 동시에 다중 검출이 가능한 중요한 장점을 가지고 있다. 또한 금속 나노입자의 표면플라즈몬을

기반으로 한 표면증강라만산란 (Surface Enhanced Raman Scattering; SERS) 신호를 이용하면 미량의 시료만으로도 ELISA 보다 1000 배 이상의 높은 민감도를 얻을 수 있다.

이에 본 연구에서는 소량의 샘플을 이용하여 엑소좀 분리와 농축을 위해서 다기능 금속산화물 나노복합체를 개발하고, SERS 기반으로 초고속, 고민감도, 고선택적으로 엑소좀을 검출하고 분석하는 기술을 개발하고자 한다.

II. 이론

2.1 라만 분광법

빛이 어떤 물체와 충돌해서 여러 방향으로 흩어지는 현상을 산란이라 한다. 분자에 빛이 입사하게 되면 분자는 바닥 상태 (Ground state)에서 여기 상태 (excited state)로 들뜨게 된다. 여기 상태가 된 분자는 바닥 상태로 돌아가면서 빛을 방출한다. 대부분의 산란광은 입사될 때와 같은 파장으로 방출되게 된다. 이를 레일리 산란 (Rayleigh scattering)이라고 한다. 1928 년, 인도의 물리학자 C. V. Raman 은 일부 산란된 빛이 입사된 빛과 다른 파장과 에너지를 가지는 것을 발견하였다 [15]. 이는 입사광이 분자와의 상호작용 중에 에너지를 얻거나 잃었기 때문이다. 입사광에 비해 반사광이 에너지를 일부 얻어 파장이 더 길어지는 산란을 스토크스 산란 (Stokes scattering)이라 하며 에너지를 잃어 파장이 짧아지는 산란을 반-스토크스 산란 (Anti-Stokes scattering) 이라 한다. 스토크스 산란이나 반-스토크스 산란처럼 입사광에 비해 산란광의 에너지가 변하는 산란을 라만 산란 (Raman scattering) 이라고 한다 [16, 17]. Figure 2 에 레일리 산란과 라만 산란에 대해 나타내었다. 라만 산란은 편극으로 설명할 수 있다. 원자나 분자에 전기장을 가하면 핵은 - 극으로, 전자는 + 극으로 끌리게 된다. 이러한 현상을 편극이라고 하며, 이 때 전자의 중심과 핵의 중심이 서로 분리되므로 분자 안에 유도된 전기 쌍극자 모멘트가 생긴다. 쌍극자 모멘트의 크기는 전기장의 세기 E 와 분자가 얼마나 쉽게 편극 되는지를 나타내는 분극률에 의해 결정된다.

유도된 쌍극자 모멘트 \vec{P} 는 분자의 분극률 α 와 가해진 전기장 E 의 곱으로 나타난다.

$$\vec{P} = \alpha \cdot \vec{E} \quad (1)$$

분자에 진동수가 ν_0 인 빛이 입사하면 분자에는 다음과 같이 시간에 따라 변하는 전기장이 가해진다.

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (2)$$

이 때, 유도 쌍극자 모멘트 \vec{P} 는

$$\vec{P} = \alpha \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3)$$

가 된다. 이와 같이 가해진 전기장과 쌍극자 모멘트의 진동수가 같은 경우 레일리 산란이 일어나게 된다. 만약 분자가 ν 의 진동수로 단순 조화 운동을 한다면 분자의 위치는

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu t) \quad (4)$$

로 나타나게 된다. 만약 분극률이 분자의 진동에 따라 변하게 된다면

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q \quad (5)$$

로 표현할 수 있고, 식 (4)에 식 (5)를 대입하고 일차 미분항까지만을 고려하면

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 \cos(2\pi\nu t) \quad (6)$$

가 된다. 이 경우 \vec{P} 는

$$\vec{P} = \alpha \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 q_0 E_0 [\cos(2\pi(\nu_0 - \nu)t) + \cos(2\pi(\nu_0 + \nu)t)] \quad (7)$$

로 나타난다. 식 (7) 우변의 첫 번째 항은 레일리 산란을 나타낸다. 나머지 부분은 반-스토크스 산란과 스토크스 산란을 나타낸다. 식 (7)로부터 라만 산란은 입사광에 대해 진동수가 $\nu_0 \pm \nu$ 로 변하는 것을 알 수 있다. 또한 라만 산란이 일어나기 위해서는

$$\left(\frac{\partial\alpha}{\partial q}\right)_0 \neq 0 \quad (8)$$

를 만족해야 한다. 이는 분자가 진동하는 동안 분극률의 변화가 일어나야 라만 산란이 일어남을 의미한다.

산란광의 에너지 변화는 분자의 진동 운동에 따라 달라지게 된다. 라만 분광학은 분자의 진동 운동에 따른 산란광의 에너지의 변화를 분석한다. 이러한 에너지의 변화를 Raman Shift (cm^{-1})로 나타낸다.

라만 분광법은 분석 시간이 짧고 샘플의 상태 (고체, 액체, 기체)에 관계없이 측정이 가능하며, 형광 라벨이 필요 없고 비 파괴적인 분석법으로 샘플에 손상을 주지 않는 장점이 있다. 하지만 라만 산란은 형광에 비해 신호의 세기가 매우 낮다. 이러한 단점을 극복하기 위해 SERS 에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

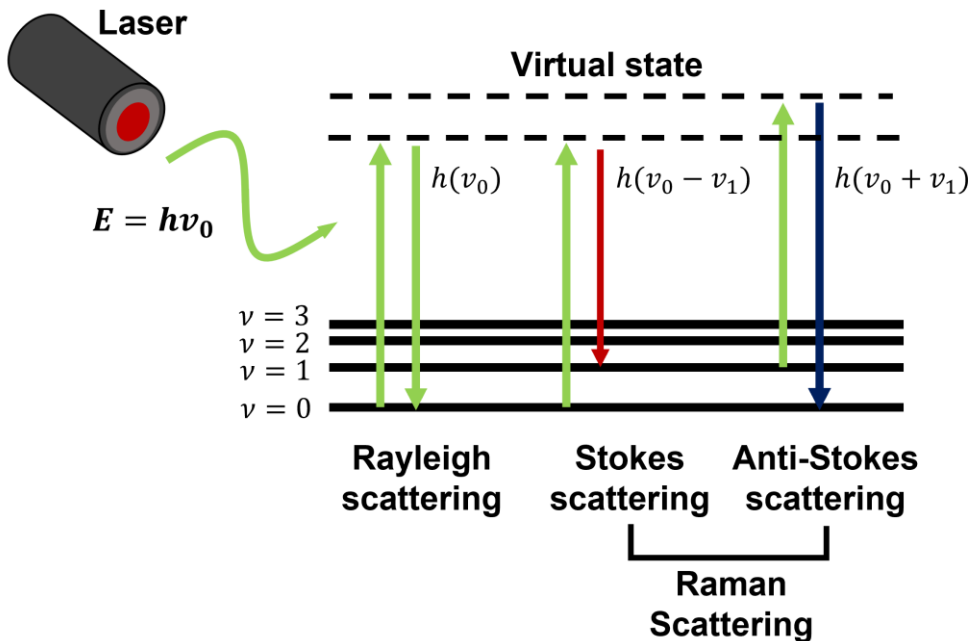


Figure 2. Schematic diagram of the energy transitions for Rayleigh and Raman scattering

2.2 표면증강라만산란 (Surface-enhanced Raman scattering; SERS)

1973 년 M. Fleischmann 은 (Ag)에 흡착된 pyridine 의 라만 신호가 크게 증폭되는 것을 발견하였다 [18]. 이 현상은 SERS 로, 라만 산란과 비교해서 $10^6 - 10^{14}$ 배 증가한 라만 신호를 얻을 수 있다. 표면 증강 라만 산란은 기존의 라만 산란으로 검출하기 어려웠던 화학 물질이나 생체 물질을 검출할 수 있어 새로운 고감도 검출 방법으로 발전되었다 [19, 20]. SERS 의 기본 원리는 금속 나노입자 (metal nanoparticle)의 표면플라즈몬 (surface plasmon)에 의한 전자기 증강 (electromagnetic enhancement; EM) 이론으로 설명할 수 있다. 금속 표면에 전자기파가 입사할 때, 전자기파에 의해 금속 표면의 자유 전자들이 집단적으로 진동하는 현상을 표면 플라즈몬이라 한다. Figure 3 은 금속 나노입자의 표면 플라즈몬 현상의 원리를 나타낸다.

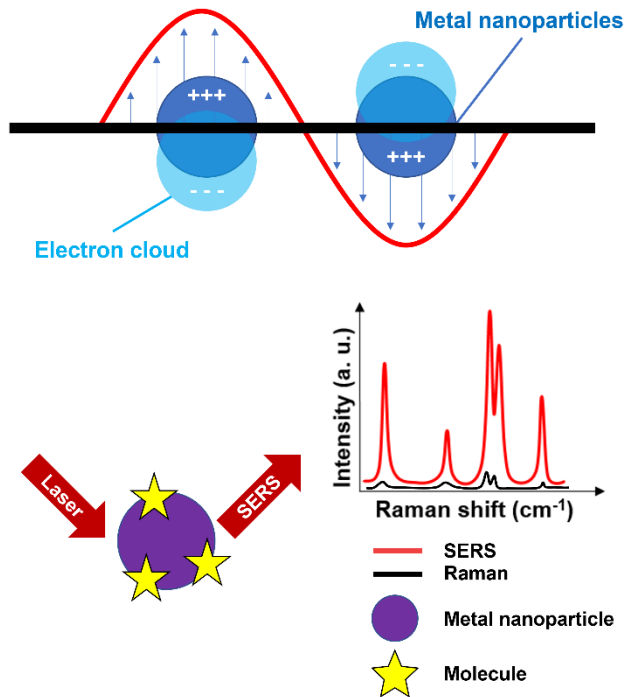


Figure 3. Schematic illustration of the mechanism of Surface Enhanced Raman Scattering (SERS)

입사된 전자기파의 주파수와 표면 플라즈몬의 주파수가 일치하면 둘 사이에서 공명이 발생하고 강한 전자기장이 발생하게 된다. 이러한 공명이 금속 표면에 강하게 형성되는 것을 국소 표면 플라즈몬 공명 (localized surface plasmon resonance; LSPR)이라 한다. LSPR 로 형성된 전자기장이 물질과 상호작용하게 되면 라만 신호가 증가하게 된다 [21-23].

2.3 인지질 이중층과 금속산화물의 상호작용

세포나 세포 외 소포체는 인지질 이중층의 생물학적 막으로 구성되어 있다. 인지질 (phospholipid)은 친수성인 머리 부분과 소수성인 꼬리 부분으로 이루어져 있으며 머리 부분은 인산염 (phosphate) 으로 구성되어 있다. 인산염은 금속산화물과 화학적 흡착으로 결합할 수 있는 것으로 알려져 있다 [24]. 인산염은 인산으로부터 3 개의 양성자가 제거되어 형성되고 $OP(O)_3$ 작용기를 가진다. TiO_2 나 Fe_3O_4 같은 금속산화물은 수용액 속에서 OH 기를 가지는 수산화물이 되고 인산염의 작용기에서 O는 수용액 속의 금속산화물의 OH 부분에 대신 결합할 수 있다. 이러한 결합을 인산염과 금속산화물의 화학적 흡착이라고 한다 [25-26]. Figure 4 에 인산염과 금속산화물의 화학적 흡착과정을 나타내었다.

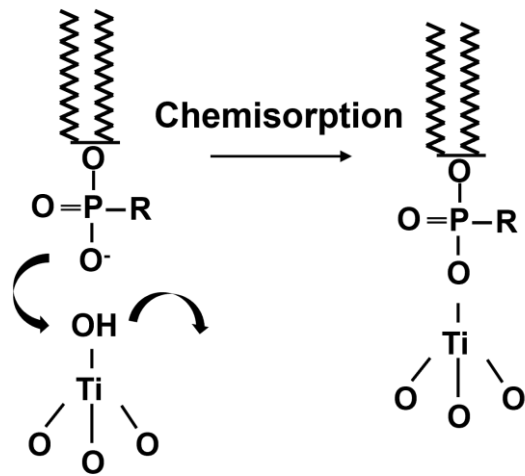


Figure 4. The interaction mechanism of metal oxide nanoparticles and phospholipid bilayer

III. 실험재료 및 실험방법

3.1 실험재료

실험에 필요한 시약은 Iron (II,III) oxide (50 - 100 nm particle size), Silver nitrate (AgNO_3), diethylthiatricarbocyanine iodide (DTTC), 1-palmitoyl-2-(dipyrrometheneboron difluoride) undecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (TOPC), Calcium carbonate (CaCO_3), titanium(IV) dioxide (TiO_2), Europium(III) oxide (Eu_2O_3), HS-PEG-COOH (MW 3.5 kDa), N-hydroxy sulfosuccinimide sodium salt (NHS), 1-ethyl-3-(3-dimethyl amino propyl)carbodiimide · HCl (EDC), Tween 20, Potassium carbonate (K_2CO_3), bovine serum albumin (BSA), Gold nanorod (10nm diameter), Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (30kDa) 이며, 시그마 알드리치에서 구입하였다. Anti-CD-81 antibody 는 santa cruz biotechnology 에서 구입하였다.

3.2 금속산화물 나노입자의 합성

3.2.1 은 나노입자가 결합된 산화철 나노입자 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ NPs) 합성

$\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ NPs 는 Fe_3O_4 과 AgNO_3 를 원료물질로 하여 고에너지 볼 밀링 (high-energy ball-milling; HEBM, Pulverisette 6, Fritsch, Germany) 방법으로 합성하였다. 볼 밀링 방법은 실린더 형 용기에 지르코늄 볼과 시료를 넣어 회전시킴으로써 텀블링에 의한 충격, 전단력, 마찰력 등으로 시료를 분쇄하는 것이다. 고에너지 볼 밀링으로 인한 합성은 이렇게 분쇄된 입자들이 얻은 높은 표면에너지로 인해 서로 화학적 또는 물리적으로 결합하여 이루어진다 [27, 28]. Figure 5 에 볼 밀러, 용기 및 볼, 혼합 중 볼 운동의 개략도를 나타내었다. 80 mL 용량의 지르코늄 용기에 Fe_3O_4 과 AgNO_3 를 볼 비율 1:1 로 넣고 직경 3 mm 의 지르코늄 볼을 넣은 후 30분간

400 rpm 의 회전속도로 볼 밀링 하였다. 볼과 시료의 무게비는 12:1 로 하였다. 밀링한 시료는 알루미나 도가니에 넣고 전기로에서 4 °C/min 속도로 승온시켜 400 °C에서 1 시간 동안 열처리한 후 상온에서 자연 냉각시켜 Fe₃O₄@Ag NPs 를 합성했다.

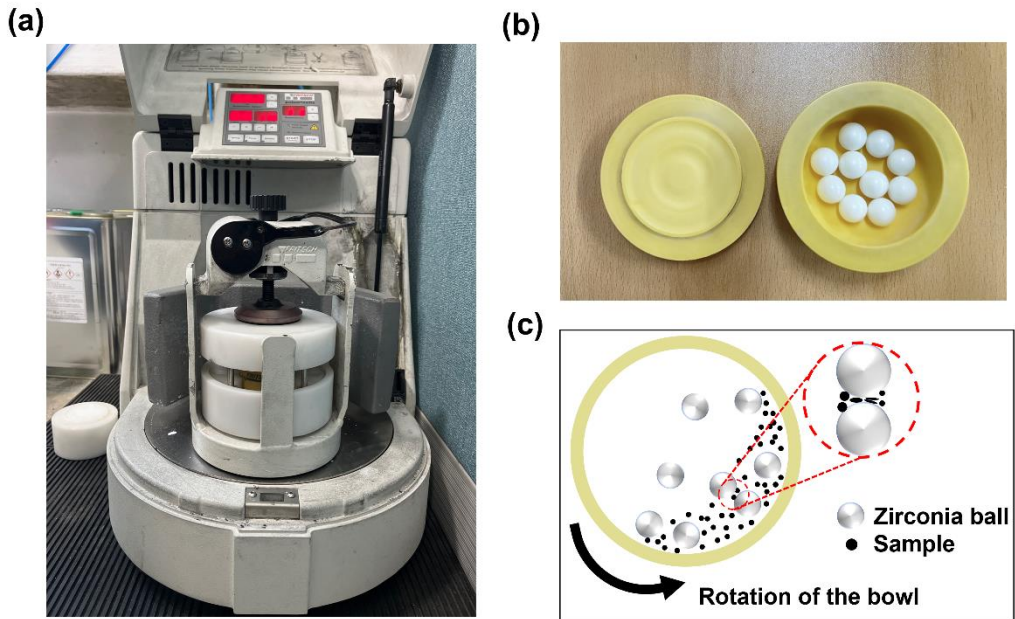


Figure 5. Photographs of the (a) planetary ball mill, (b) bowl and balls, and (c) schematic illustration of the ball motion during mixing

3.2.2 유로퓸을 첨가한 칼슘티타늄산화물 (CaTiO₃:Eu³⁺) 합성

금속산화물을 이용한 엑소좀의 분리를 연구하기 위하여 CaTiO₃:Eu³⁺ 분말을 합성하였다. CaTiO₃ 에 Pr 이나 Eu 같은 희토류를 첨가했을 때, 엑소좀에 대한 분리효율이 증가함이 알려져 있다 [23]. CaTiO₃:Eu³⁺ 분말은 CaCO₃, TiO₂, Eu₂O₃ 을 원료물질로 하여 화학양론적으로 준비하여 고에너지 볼 밀링 방법으로 합성하였다. Eu³⁺의 몰비는 6 mol%로 하였다. 80 mL 용량의

지르코늄 용기에 위의 시료를 직경 10 mm 의 지르코늄 볼과 함께 넣은 후 240 분간 400 rpm 의 회전속도로 볼 밀링 하였다. 볼과 시료의 무게비는 50:1 로 하였다. 이 때 온도 상승을 막기 위해 15 분 밀링 후 15 분 정지하였다. 밀링한 시료는 전기로에서 7 °C/min 속도로 1200 °C까지 온도를 올린 후 1200 °C에서 1 시간 동안 열처리하였고 이후 상온에서 자연 냉각시켜 CaTiO₃:Eu³⁺ 분말을 합성했다.

3.2.3 CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ 나노복합체 합성

자석을 이용한 간편한 엑소솜의 분리를 위해 CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ 나노복합체를 합성하였다. CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ 나노복합체는 합성한 CaTiO₃:Eu³⁺ 분말과 시그마 알드리치에서 구입한 Fe₃O₄ 나노입자를 5:1 의 질량비율로 혼합하여 50 mL 용량의 지르코늄 용기에 직경 3 mm 의 지르코늄 볼과 함께 넣어서 30 분간 400 rpm 의 회전속도로 볼 밀링하였다. 볼과 시료의 무게비는 50:1 로 하였다.

3.3 합성한 나노입자의 특성 분석

a) X-선 회절 (X-ray diffraction; XRD)

합성한 샘플의 결정구조는 XRD 를 이용하여 분석하였다. X-선 회절분석기 (X'pert PRO MPD, Malvern PANalytical, Worcestershire, UK)의 광원은 Cu-Kα 선 ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$)을 사용하였고, 전류와 가속전압은 각각 30 mA 와 40 kV 이었다. X-선의 산란각 (2θ)의 측정범위는 10° - 90° 로 하였으며, 스캔속도는 0.02°/sec 으로 측정하였다.

b) 전계방출형주사전자현미경 (Field Emission Scanning Electron Microscope, FE-SEM)

나노입자 및 나노복합체의 표면형상과 입자크기는 FE-SEM (S-4800 Hitachi, Tokyo, Japan)으로 가속전압 15kV 에서 측정하였고, 에너지분산형 분광분석법 (Energy-dispersive X-ray spectroscopy; EDX)을 통해 구성 물질을 확인하였다.

c) 진동형 시료 자력계 (Vibrating sample magnetometer; VSM)

샘플의 자기적 특성은 진동형 시료 자력계 (Lake Shore 7400, Ohio, USA)를 이용하여 실온에서 - 5000 Oe 부터 + 5000 Oe 까지 자기장을 변화시키면서 측정된 자기이력곡선 (hysteresis loop)을 통해 포화자화량 (saturation magnetization)을 분석하였다.

d) 푸리에 변환 적외선 (Fourier transform infrared; FT-IR) 분광

나노복합체의 분자간 결합구조를 분석하기 위해 FT-IR 측정을 하였다. FT-IR 측정을 위해 합성한 분말을 KBr 과 1:100 비율로 혼합하여 펠릿 (pellet)을 제작하여 FT-IR 분광기 (Nicolet 6700 spectrophotometer, Sinco)로 400 - 4000 cm^{-1} 영역을 측정하였다.

3.4 금속산화물 나노입자와 엑소좀과의 상호작용

3.4.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ NPs 에 의한 인지질 이중층의 흡착

금속산화물 나노입자에 의한 엑소좀 분리를 연구하기 위해서 먼저 엑소좀의 막구조와 유사한 인지질 이중층의 구조를 가진 DOPC 를 선택하였다. DOPC 의 화학적 구조는 Figure 6(a)와 같다. Fe_3O_4 및 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ NPs 에 의한 DOPC 의 흡착을 분석하기 위해 Fe_3O_4 NPs 10 mg 을 200 μL 의 PBS 에 분산시킨 다음, PBS 에 1 mg/mL 의 농도로 분산된 DOPC 10 μL 를

넣은 후 10 분간 교반기에서 교반하였다. 이후 10 분간 12,000 rpm 의 회전속도로 원심분리한 다음 상층액을 버리고 자석을 이용해 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag_DOPC}$ 를 얻었다.

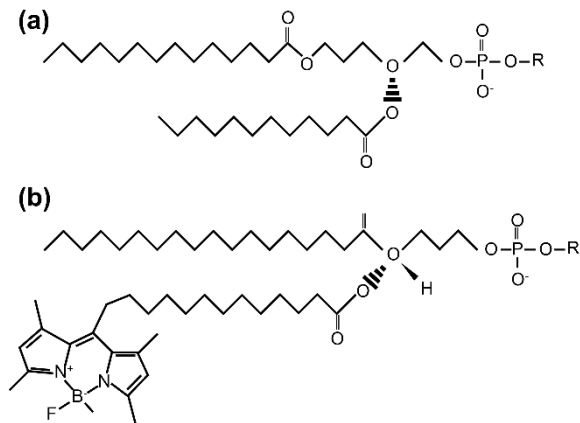


Figure 6. Chemical structure of phospholipids used in the present study. (a) 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) and (b) 1-palmitoyl-2-(dipyrrometheneboron difluoride)undecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (TOPC)

FT-IR 분광을 이용하여 나노입자와 DOPC 의 결합을 분석하였다. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ NPs 에 의한 흡착 효율을 분석하기 위해 DOPC 에 형광라벨이 붙은 TOPC 를 이용하였다. TOPC 의 구조는 Figure 6(b)에 나타내었다. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ NPs 10 mg 을 200 μL 의 PBS 에 분산시켰다. PBS 에 1 mg/mL 의 농도로 용해된 TOPC 10 μL 를 분산된 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ NPs 에 넣은 다음 10 분간 교반기에서 교반하였다. 흡착되지 않은 TOPC 의 제거를 위해 10 분간 12,000 rpm 으로 원심분리한 다음 상층액을 수집하여 형광 광도계 (FluoroMax-4 spectrofluorometer, Horiba Jobin Yvon Inc., Japan)로 형광의 세기를 측정하였다. 여기 파장은 460 nm 를 사용했으며 방출 파장은 501 nm

기준으로 발광 세기를 측정하였다. 각 샘플의 흡착효율은 1 mg/mL 의 농도로 용해된 TOPC 10 µL 를 positive control 로 하여 계산하였다.

3.4.2 세포 배양

HEK293 세포는 한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. HEK293 세포는 10% fetal bovine serum (Corning, NY, USA) 및 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Waltham, USA) 첨가된 DMEM 배지를 사용하였으며, 37 °C, 5% CO₂ 의 환경에서 배양하였다.

3.4.3 초고속원심분리를 이용한 엑소좀 분리

세포를 제거하기 위해 세포배양액 240 mL 를 300 x g 로 10 분 동안 원심분리 해 상층액을 제거하였다. 세포가 제거된 세포배양액을 2,000 x g 로 10 분간 원심분리 해 죽은 세포를 제거하였다. 죽은 세포가 제거된 세포배양액을 10,000 x g 로 30 분간, 16,500 x g 로 20 분간 원심분리하여 세포 파편을 제거하였다. 엑소좀의 농축을 위해 100,000 x g 로 120 분간 2 회

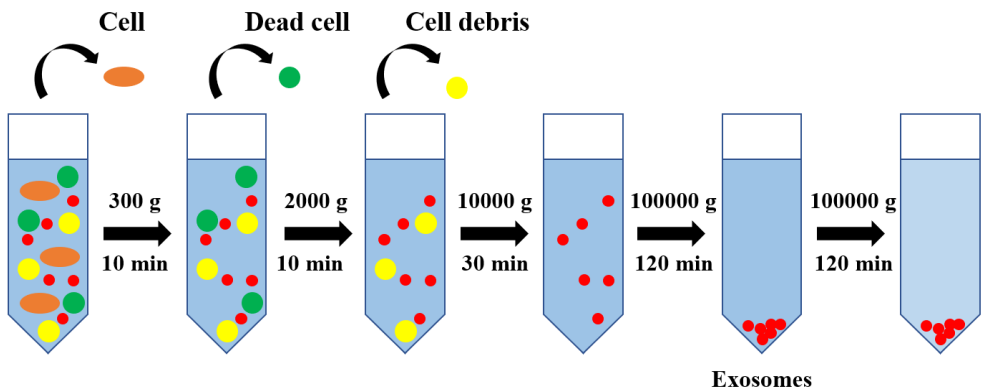


Figure 7. Steps of exosome isolation by Ultracentrifugation

초고속원심분리 한 다음 PBS 로 엑소좀 pellet 을 씻어내어 200 μ L 의 PBS 에 분산된 엑소좀을 얻었다. 엑소좀의 분리과정을 Figure 7 에 나타내었다.

3.4.4 나노물질을 이용한 엑소좀 분리

초고속원심분리를 통해 얻은 엑소좀과 나노물질들 간의 상호작용을 조사하기 위해 PBS 에 희석된 엑소좀 20 μ L 에 TiO_2 , $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 분말, Fe_3O_4 나노입자, $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체를 2mg 씩 넣은 후 교반기에서 10 분간 교반하였다. 나노물질과 결합하지 않은 엑소좀과 불순물은 원심분리를 통해 제거하였다. 원심분리를 통해 모은 나노물질은 PBS 를 활용해 3 차례 세척하였고, 나노물질에 결합된 엑소좀은 Western blot 으로 확인하였다.

세포배양액에서 엑소좀 분리의 최적화 조건을 찾기 위하여 인큐베이션 시간 (incubation time) (1, 5, 10, 30, 60 분) 과 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체의 양 (10, 20, 30, 40, 50 mg) 따른 엑소좀 분리 효율을 측정하였다. Figure 8 에 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체를 이용하여 세포배양액으로부터 엑소좀을 분리하는 과정을 개략적으로 나타내었다. 세포배양액을 농축하기 위해

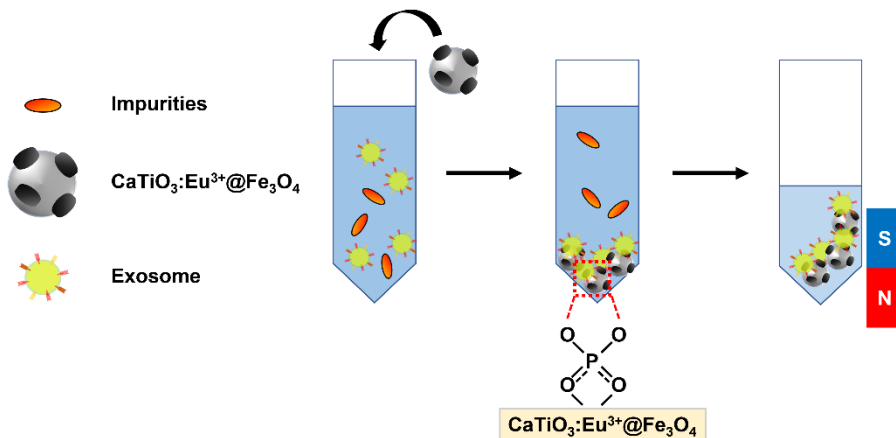


Figure 8. Schematic illustration of the exosome isolation using metal oxide nanoparticles

세포배양액 15 mL 를 ultrafiltration filter (30 kDa)를 이용해 5000 x g 에서 30 분간 원심분리를 하였다. 농축된 세포배양액에 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체를 넣은 후 교반기로 교반 하였다. $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체에 붙은 엑소좀을 (NCs@exo) 자석을 이용하여 모으고 상층액은 버렸다. 그 후 PBS 를 이용해 3 회 반복해서 세척하였다. $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체의 엑소좀 분리 효율은 Western blot 을 통해 조사하였다.

3.4.5 분리한 엑소좀의 특성 분석

a) 웨스턴 블롯

엑소좀은 Cell culture lysis buffer 를 활용하여 단백질을 확보하였다. 확보된 단백질은 5x loading dye 와 혼합 후 98 °C 에서 10 분간 가열한 뒤 12% SDS PAGE gel 을 활용하여 단백질을 크기별로 분리하였다. 분리된 단백질은 Immobilon transfer membrane(Merck Millipore, Billerica, MA, USA)으로 옮긴 뒤 5% Skim milk 를 활용하여 Blocking 시켰다. 이후 1:200 으로 희석된 CD81 항체(sc-166029, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)를 활용하여 4 °C 에서 16 시간 동안 부착하였다. 1 차 항체 부착 후 2 차 항체 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)를 부착하였다. 2 차 항체가 부착된 membrane 은 ECL solution (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 도포 후 Supernova-Q1800 ChemiDoc (Lugen™, Bucheon, Korea)을 활용하여 확인 하였다.

b) 투과전자현미경 (Transmission electron microscope; TEM)

엑소좀의 형상과 크기는 TEM (JEM-2100F, JEOL, Tokyo, Japan)을 이용해 조사하였다. PBS 로 희석한 carbon support film on 150 mesh nickel grid 위에 10 μ L 떨어뜨린 후 5 분간 실온에서 건조하였다. PBS 의 결정을 제거하기 위해 그리드에 증류수를 10 μ L 떨어뜨린 후 5 분간 실온에서 건조하였다. 완전히

건조되지 않은 증류수는 필터종이를 이용해 제거한 뒤 측정하였다. 건조된 시료는 200 kV 가속전압으로 관찰하였다.

c) 나노입자추적분석 (Nanoparticle tracking analysis; NTA)

엑소좀의 크기 분포와 표면 전위는 NTA (Zetasizer Nano ZSP, Malvern Worcestershire, UK)를 이용해 조사하였다. 초원심분리를 통해 분리한 엑소좀을 PBS 를 이용해 1/100 의 농도로 희석한 후 시료의 온도를 25 °C 로 2 분간 유지한 다음 측정하였다.

3.5 SERS 기반의 엑소좀 검출

3.5.1 금 나노막대 (Gold nanorod; Au NRs) 기반 SERS 프로브 제작

금 나노막대 (Au NRs)는 시그마 알드리치에서 구입하였고 크기는 10 nm 이다. 적외선 레이저를 조사하여 강한 라만 신호를 얻기 위해서 760 nm 의 흡수파장을 가진 DTTC 를 라만 프로브로 선택하였다. Au NRs 0.5 mL 를 12,000 rpm 으로 20 분간 원심분리한 다음 상층액을 제거하였다. Au NRs 의 표면을 카르복실기로 치환하기 위해 HS-PEG-COOH (1 μ M, 25 μ L)와 Tween 20 (0.01%, 0.5 mL)을 넣은 후 5 분간 sonication 하였다. DTTC (25 μ M, 50 μ L)를 넣은 후 30 분간 sonication 하였다. 안정성을 증가시키기 위해 mPEG (1 mM, 5 μ L)를 넣은 후 30 분간 sonication 하였다. 반응하지 않은 불순물을 제거하기 위해 12,000 rpm 으로 20 분간 원심분리 한 다음 상층액을 제거하고 K₂CO₃ (pH 8.5, 3 mM, 0.5 mL)으로 resuspension 하였다. 카르복실기로 표면이 치환된 Au NRs 에 항체를 결합시키기 위해 EDC (25 μ M, 25 μ L) 와 NHS (25 μ M, 25 μ L) 를 넣은 후 15 분간 sonication 하였다. 그 후 12,000 rpm 으로 20 분간 원심분리 한 다음 상층액을 제거하고 K₂CO₃ (3 mM, pH 8.5, 0.5 mL)으로 resuspension 하였다. 250:1 로 희석한 CD81 항체 (2 μ L)를 넣은 후

4 °C 에서 8 시간 동안 유지하였다. 반응하지 않는 Au NRs 의 표면을 블로킹 (blocking) 하기 위해 BSA 수용액 (1%, 170 μL)으로 4 °C 에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응하지 않는 불순물을 제거하기 위해 12,000 rpm 으로 20 분간 원심분리 한 다음 상층액을 제거하고 PBS 로 희석한 BSA (1%, 85 μL)로 resuspension 하여 SERS probe 를 제작하였다. Figure 9(a)에 SERS probe 제작과정을 나타내었다.

3.5.2 SERS 프로브의 특성 분석

자외선-가시광선(UV-vis) 분광 광도계 (Optizen POP, KLAB, Daejeon, Korea)를 이용하여 금 나노막대 (Gold nanorod; Au NRs) 기반 SERS 프로브의 합성 과정을 각 단계별로 흡수피크를 분석하였다. 측정 범위는 300 - 900 nm 로 하였다. 라만분광 (XperRam F1.4, Nanobase Inc., Seoul, Korea)을 통해 SERS 프로브로 사용한 DTTC 의 라만피크를 분석하였다. 사용된 레이저의 파장은 785 nm 이고 샘플에 조사되는 레이저의 출력은 0.3 mW 로 노출시간은 5 초로 하였다

3.5.3 SERS 기반 엑소솜 검출

세포배양액 30 mL 에 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체 30 mg 을 넣은 후 교반기에서 30 분간 교반하였다. 불순물을 제거하기 위해 자석으로 나노복합체를 모은 후 상층액을 제거하고 PBS 로 세척하는 과정을 3 차례 반복하였다. 엑소솜이 붙은 나노복합체 (NCs@exo)에 SERS 프로브 (AuNRs/Ab/DTTC)를 50μL 넣은 후 30 분간 sonication 하였다. 불순물을 제거하기 위해 자석을 이용해 NCs@exo-SERS probe 를 모은 후 상층액을

제거하고 PBS 를 이용해 3 번 세척하였다. 시료는 SERS 측정 전 증류수로 resuspension 하였다.

SERS 스펙트럼은 XperRam F1.4 (Nanobase Inc., Seoul, Korea)로 측정하였다. 샘플은 알루미늄 호일에 5 μL 씩 떨어뜨린 다음 측정하였다. 사용된 레이저의 파장대역은 785 nm 이고 샘플에 조사되는 레이저의 출력은 0.3 mW 로 하였다. 축적 횟수 (Accumulation number) 10 회, 노출시간 (time) 5 초로 조건을 설정하여 측정하였다. 기관 내 서로 다른 위치를 총 5 번 측정한 뒤 평균값을 이용하였다. Figure 9(b)에 SERS 기반 엑소좀 검출과정의 개략도를 나타내었다.

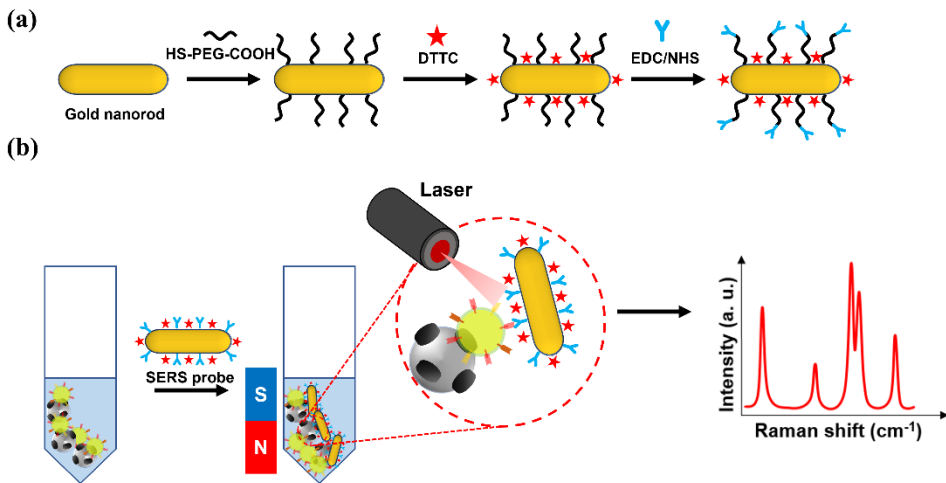


Figure 9. Schematic illustration of SERS-based immunoassay for CD81 (a) the conjugation of Au NRs to the detection antigen and (b) the operating principle of SERS immunoassay for CD81 detection

IV. 결과 및 고찰

4.1 금속산화물 나노입자의 물리·화학적 특성

4.1.1 Fe₃O₄@Ag 나노입자

Fe₃O₄@Ag NPs 은 고에너지 볼 밀링 (HEBM) 방법으로 합성하였고 XRD 측정을 통해 결정구조를 분석하였다. 합성한 Fe₃O₄@Ag NPs 는 35.7°와 39.0° 근처에서 강한 회절 피크가 나타났으며, 이는 Fe₃O₄ 의 (311) 면에서 발생한 주 회절 피크와 Ag 의 (111) 면에서 발생한 주 회절 피크와 일치하였다 (Figure 10) [31]. 이는 볼 밀링 방법을 통해 성공적으로 Fe₃O₄@Ag NPs 이 합성되었음을 나타낸다.

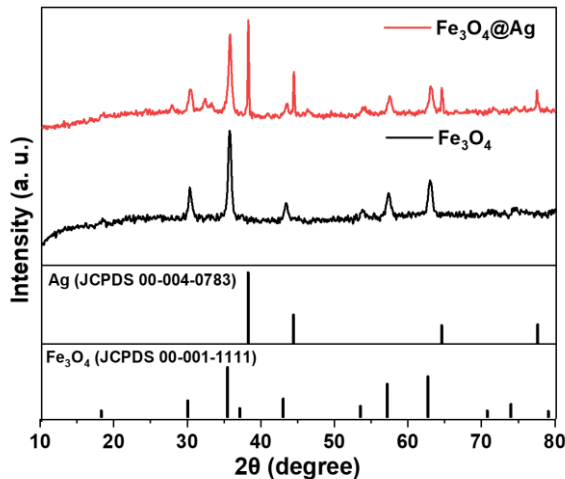


Figure 10. XRD patterns of the Fe₃O₄ and Fe₃O₄@Ag nanoparticles

합성한 Fe₃O₄@Ag NPs의 표면 형상과 미세구조는 FE-SEM과 EDX를 이용하여 분석하였다. Fe₃O₄@Ag NPs는 약 50 nm의 작은 입자들이 응집되어 있음을 확인했다 (Figure 11(a)). EDX 분석결과 Fe, O, Ag로

구성되어 있으며 다른 불순물은 존재하지 않았다 (Figure 11(b)) 이 결과는 XRD 결과와 잘 일치하였다.

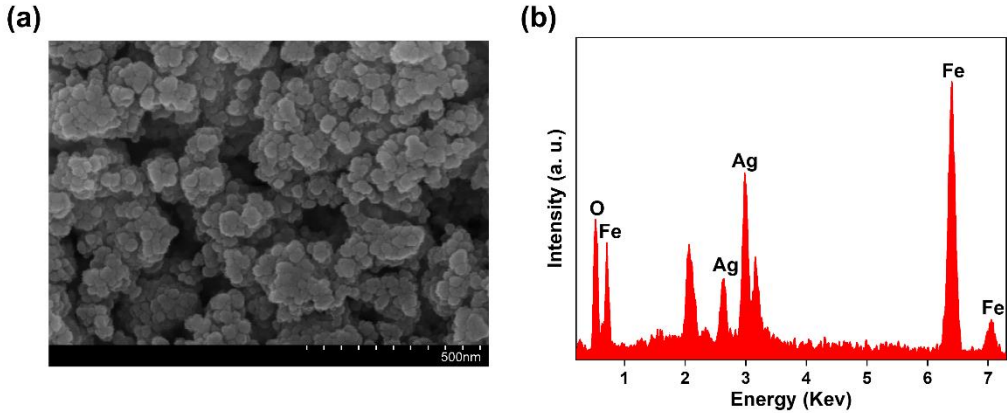


Figure 11. SEM image (a) and EDX spectrum (b) of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanoparticles

샘플의 자기적 특성은 VSM을 이용하여 자기이력곡선을 측정하였다. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ 와 Fe_3O_4 의 포화 자화 값은 각각 23.8 emu/g, 70.0 emu/g이다. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ NPs의 포화 자화 값은 Fe_3O_4 에 비해 감소하였다. 이는 Fe_3O_4 나노입자에 비자성 물질인 Ag가 포함되면서 단위 g 당 자성 물질의 양이 줄어들었기 때문이다.

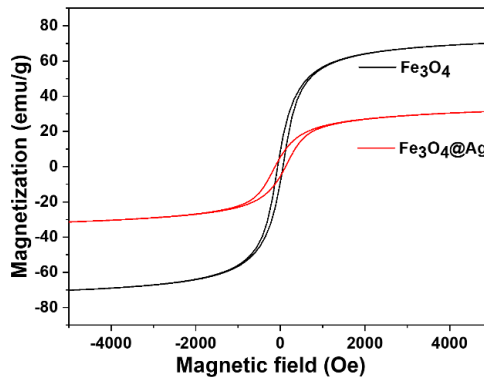


Figure 12. Magnetic hysteresis loops of the Fe_3O_4 and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$

4.1.2 CaTiO₃:Eu³⁺ 분말

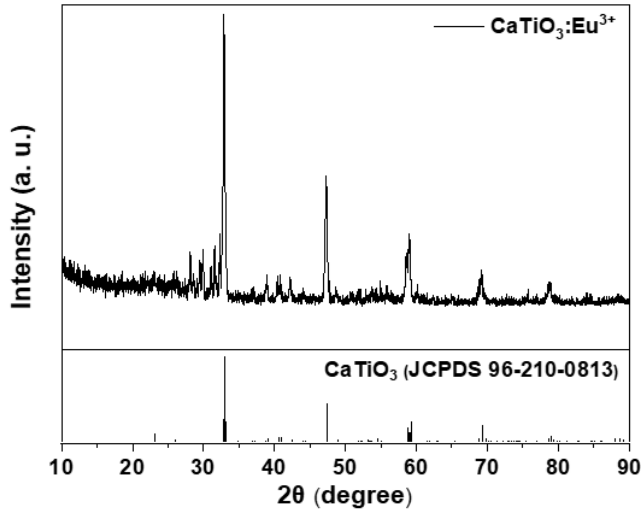


Figure 13. XRD pattern of the CaTiO₃:Eu³⁺ powders

Figure 13은 고에너지 볼 밀링 방법으로 합성한 CaTiO₃:Eu³⁺를 XRD 측정된 결과를 나타낸 것이다. CaTiO₃:Eu³⁺ 분말은 32.9° 근처에서 최대 회절 피크를 갖는 (121) 면에서 발생한 주 회절 피크와 상대적으로 약한 세기를 갖는 47.4°, 59.1°, 69.2°에 중심을 둔 (202), (123), (242) 면에서 발생한 피크로 구성되어 있으며, JCPDS 96-210-0813와 일치하는 CaTiO₃ 사방정계 (orthorhombic) 결정구조를 나타냈다. CaTiO₃는 사방정계 페로브스카이트로서 4개의 primitive cell로 이루어진 구조를 나타낸다. 격자면의 거리가 d 인 결정에 입사광 1과 2가 격자면과 θ 의 각도를 가지며 입사한 다음 결정 내에서 회절 하였을 때, 입사광 1과 2는 서로 $2d\sin(\theta)$ 만큼의 경로차가 생기게 된다. 이 때 회절된 두 빛의 경로차가 입사광의 파장의 정수 배 일 때 보강간섭이 일어나게 되고 이 조건을 브래그 법칙 (Bragg's law)라고

한다. 식 (9)은 브래그 법칙을 나타내고, 식 (10)은 사방정계 결정구조에 적용되는 방정식이다. Figure 14에 브래그 법칙과 사방정계 페로브스카이트 구조를 나타내었다.

$$\lambda = 2d\sin(\theta) \quad (9)$$

$$d = \frac{1}{\sqrt{\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}}} \quad (10)$$

여기서, λ 는 X-선 $K\alpha$ 의 파장을 나타내고, (h, k, l) 은 면 지수를 나타내고 a, b, c 는 각 축의 격자상수를 나타낸다. $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 의 주회절 피크 32.9° (121), 47.2° (202), 59.0° (123)를 이용하여 격자상수를 구하였다.

식 (9)와 식(10)을 이용하면

$$\frac{\lambda}{2} \sin^{-1}(\theta) = \frac{1}{\sqrt{\frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}}} \quad (11)$$

를 얻는다.

이 식을 이용하여 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 의 격자상수를 계산하면, $a = 5.453$, $b = 7.722$, $c = 5.393$ 의 값을 가진다. 이 값은 알려진 CaTiO_3 사방정계의 값과 유사하다 [34-36].

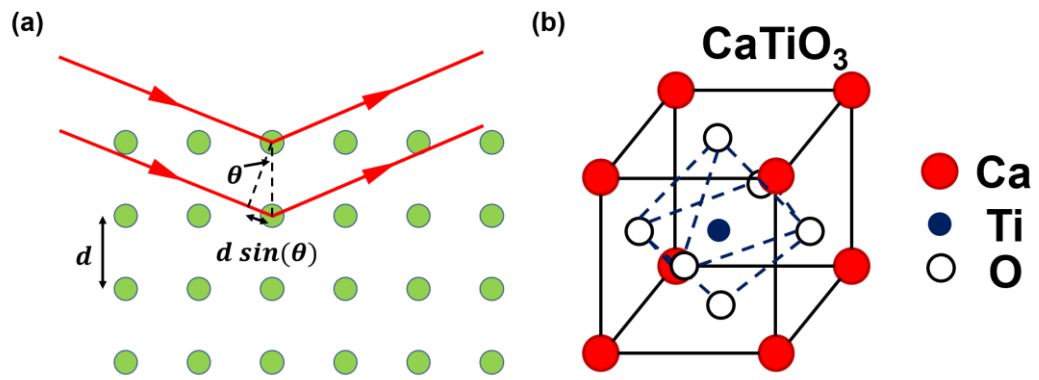


Figure 14. Schematic diagram of Bragg's law (a) and CaTiO_3 perovskite structure (b)

합성한 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 의 표면 형상과 미세구조는 FE-SEM과 EDX를 이용하여 분석하였다. $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 분말은 수 백 nm의 작은 입자들이 응집되어 있음을 확인했다 (Figure 15(a)). EDX 분석결과 Ca, Ti, O, Eu로 구성되어 있으며 다른 불순물은 존재하지 않았다 (Figure 15(b)). 이 결과는 XRD 결과와 잘 일치하였다.

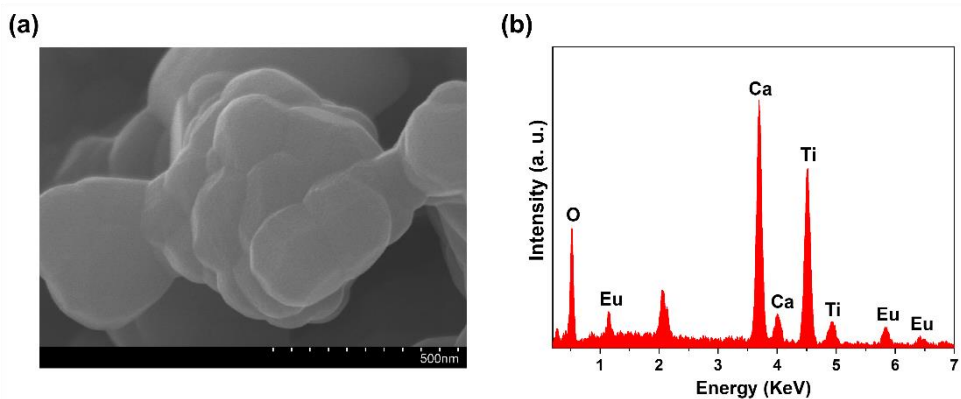


Figure 15. SEM image (a) and EDX spectrum (b) of the $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ powders

4.1.3 CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ 나노복합체

CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ 나노복합체는 CaTiO₃:Eu³⁺ 분말과 Fe₃O₄ 나노입자를 무게 비 5:1 의 비율로 고에너지 볼 밀링방법으로 합성하였고, XRD 측정을 통하여 결정구조를 분석하였다. CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ 는 32.9° (121) 면에서 발생한 주 회절 피크와 47.4°, 59.1°, 69.2°에 중심을 둔 (202), (123), (242) 면에서 발생한 피크로 구성 되어있으며, CaTiO₃:Eu³⁺ 분말과 동일한 사방정계 구조를 나타내었다.

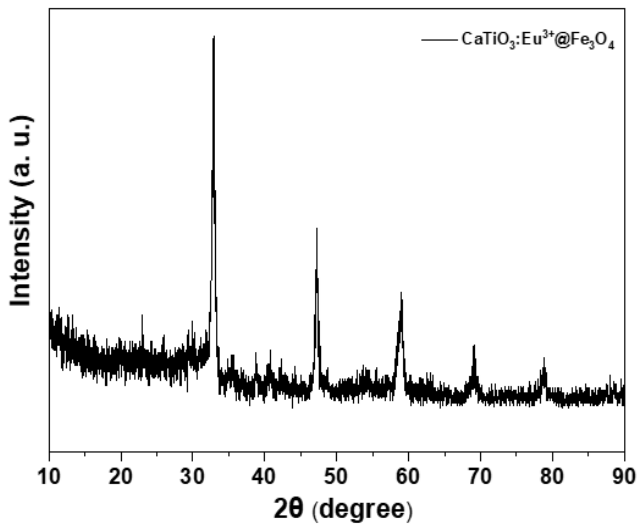


Figure 16. XRD pattern of the CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ nanocomposites

FE-SEM을 이용하여 CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ 나노복합체의 표면 형상과 미세구조를 분석하였다. SEM 이미지를 통해 볼 수 있는 것처럼 CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄는 작은 입자들이 응집 되어있고 그 크기는 수 μm 정도임을 확인하였다. Figure 17(b)는 CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ 나노복합체의 EDX 스펙트럼이다. CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ 나노복합체를 확인한 결과 원재료의 원소들 Ca, Ti, O, Eu, Fe로 구성되어 있으며 다른 불순물은 존재하지 않았다.

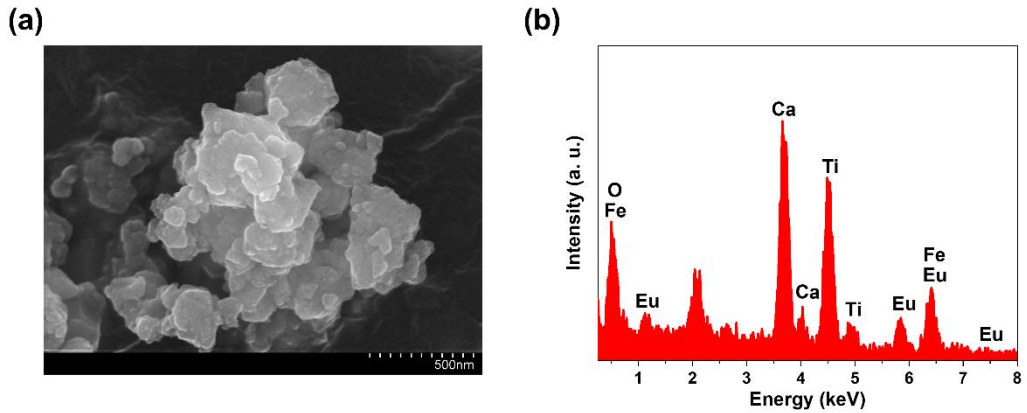


Figure 17. SEM image (a) and EDX spectrum (b) of the $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanocomposites

FT-IR 분광을 통해 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 의 분자 간 결합 구조를 분석하였다. Figure 18 은 Fe_3O_4 나노입자, $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 분말, $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체의 FT-IR 스펙트럼이다. 흡수 밴드 1650 cm^{-1} 은 O-H 굽힘 진동 (bending vibration)과 3423 cm^{-1} 은 O-H (stretching vibration)을 나타낸다. $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 분말과 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체에 공통적으로 나타나는

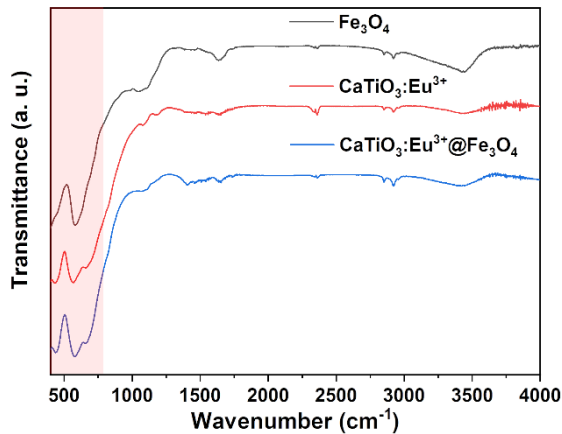


Figure 18. FTIR spectra of the Fe_3O_4 , $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$, and $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanocomposites

흡수 밴드 443 cm^{-1} 은 Ti-O 신축 진동 (stretching vibration)을 나타낸다. $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 분말에서, 565 cm^{-1} 는 Ti-O 신축 진동을 나타낸다 [26]. Fe_3O_4 나노입자에서는 539 cm^{-1} 로 Fe-O 의 진동모드를 나타내었다 [23]. $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체에서는 Ti-O 의 흡수 밴드 피크가 565 cm^{-1} 에서 577 cm^{-1} 로 이동하였다.

$\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체의 자기적 특성을 조사하기 위해 VSM 을 이용하여 자기이력곡선을 측정하였다. $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체의 포화 자화 값은 4.8 emu/g 로 포화 자화 값이 70.0 emu/g 인 Fe_3O_4 에 비해 급격히 감소하였다 (Figure 19(a)). 이는 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체에 비자성 물질인 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 가 포함되면서 단위 g 당 자성 물질의 양이 줄어들었기 때문이다. 그럼에도 불구하고 DI water 에 분산되어 있는 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체에 자석을 가까이하면 10 초 이내에 샘플이 자석에 끌리는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 19(b)).

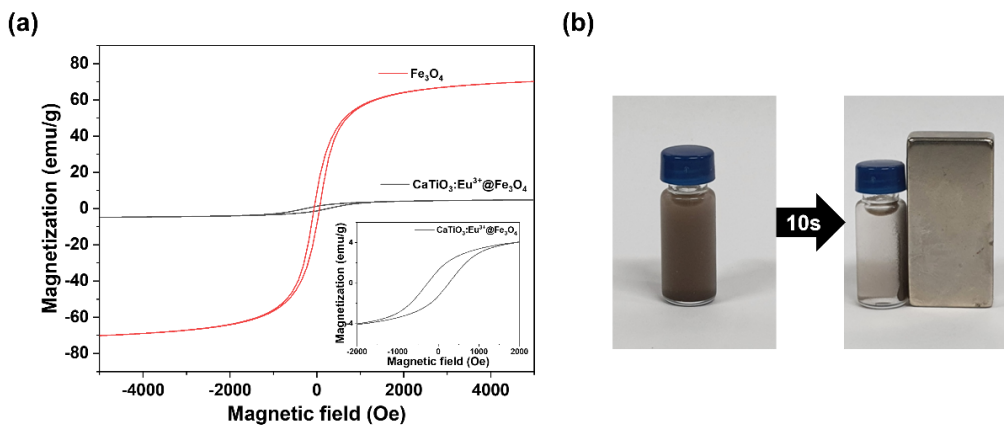


Figure 19. Magnetic hysteresis loops of the (a) Fe_3O_4 and $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanocomposites and (b) photograph of the $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanocomposites dispersed in water without and with a magnetic field.

4.2 금속산화물 나노입자와 인산염의 상호작용

4.2.1 Fe₃O₄@Ag 나노입자에 대한 DOPC의 흡착

엑소솜은 인지질 이중층 구조로 되어 있으며, 인지질의 머리 그룹 (head group)에는 인산기 (phosphate group)로 구성되어 있어서 금속산화물과 특이적으로 결합하는 특성을 가지고 있다 [24-26]. 본 연구에서는 엑소솜의 막구조와 유사한 DOPC 분자를 이용하여 Fe₃O₄@Ag NPs 과의 상호작용을 연구하였다. Figure 20 은 Fe₃O₄@Ag NPs 와 Fe₃O₄@Ag NPs 에 결합한 DOPC (Fe₃O₄@Ag_DOPC)의 FTIR 투과 스펙트럼을 나타낸다. Fe₃O₄@Ag_DOPC 는 1053 cm⁻¹ 에서 흡수 밴드가 나타났으며 이것은 P-O-C 결합의 진동모드를 의미한다 [35]. Fe₃O₄@Ag 에 DOPC 가 잘 흡착되었음을 나타낸다.

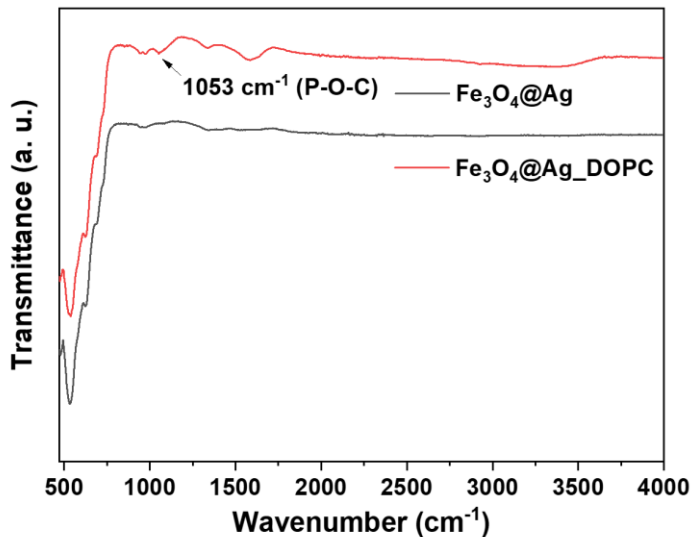


Figure 20. FTIR spectra of the Fe₃O₄@Ag and Fe₃O₄@Ag_DOPC

Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ NPs 와 인산염의 상호작용을 정량적으로 측정하기 위해 DOPC 에 형광 라벨이 붙은 TOPC 를 이용하였다. Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ NPs 은 각각 92%, 84%의 흡착 효율을 나타내었다 (Figure 21).

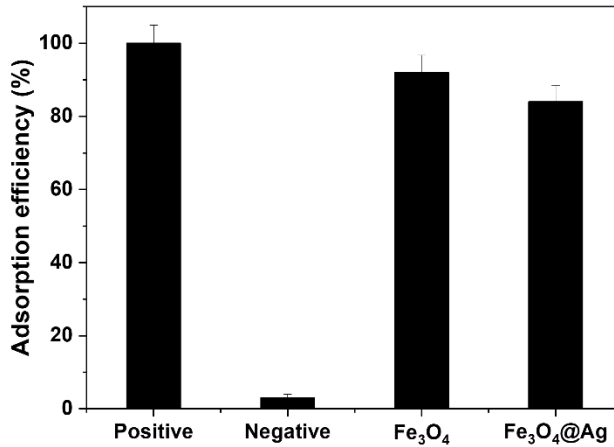


Figure 21. Adsorption efficiency of TOPC on Fe_3O_4 and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Ag}$ nanoparticles

4.3 금속산화물 나노입자와 엑소좀의 상호작용

4.3.1 엑소좀의 특성

본 연구에서는 인간배아의 신장에서 유래한 HEK293세포로부터 분리된 엑소좀을 사용하였다. 초고속원심분리를 통하여 얻은 엑소좀을 Western blot, TEM, 동적광산란 (Dynamic light scattering; DLS) 측정을 통해 엑소좀의 특성을 분석하였다. Figure 22 (a)는 엑소좀과 세포에서 Western blot을 하여 CD81과 β -actin의 단백질 발현을 분석한 결과이다. β -actin은 엑소좀과 세포 모두 발현이 되었지만 엑소좀의 바이오마커로 알려진 CD81은 세포에서는 발현되지 않고 엑소좀에서만 발현됨을 확인할 수 있었다. Figure 22 (b)는 엑소좀의 TEM 사진이다.

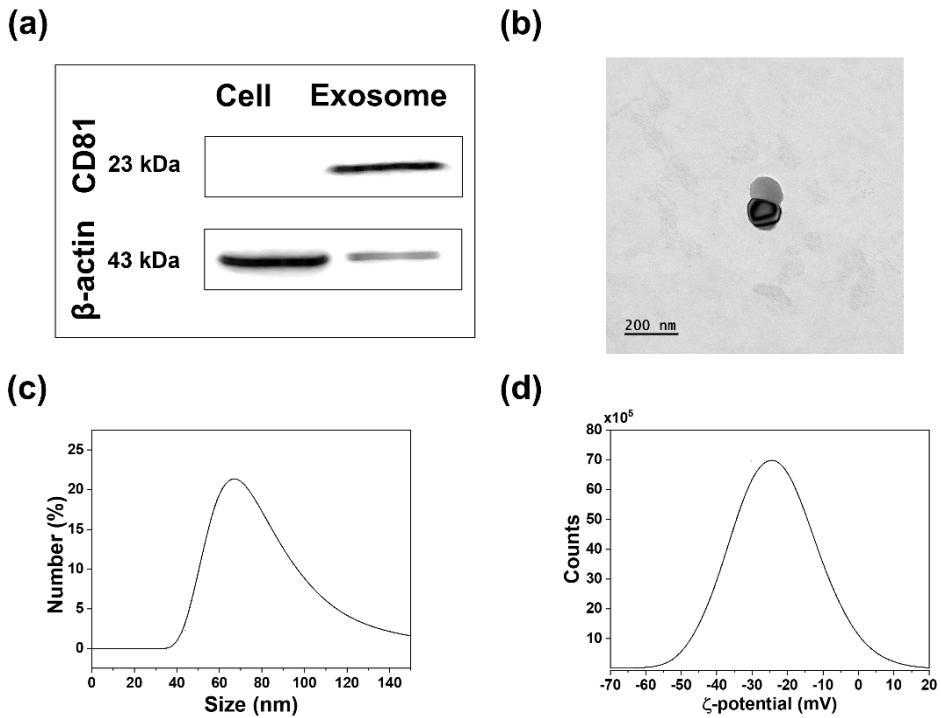


Figure 22. Characterization of exosomes derived from HEK293 cells. Western blotting analysis of the exosomal marker CD81 (a), TEM image (b), NTA analysis(c), and zeta potential (d).

TEM 사진을 통해 엑소좀은 약 100 nm 크기의 구 형태임을 확인할 수 있었다. 또한 NTA 분석을 통해 엑소좀의 크기 분포를 분석하였다. 엑소좀의 크기는 40 - 140 nm로 분포하였으며 68 nm에서 최대의 분포를 나타내었다 (Figure 22 (c)). Figure 22 (d)는 DLS 측정을 통한 엑소좀의 제타전위 분포 그래프이다. 엑소좀의 제타전위 분포는 -24 mV에서 최대가 되었으며 이는 선행연구에서 보고된 결과와 잘 일치한다 [32].

4.3.2 금속산화물 나노입자에 대한 엑소좀의 흡착

엑소좀의 막 구조는 인지질 이중층 구조로 되어 있어서 인지질의 인산기와 금속산화물이 특이적으로 결합하는 특성이 있다. 이러한 특성을 이용하여 간단하고 빠른시간에 엑소좀을 분리하는 방법을 연구하였다. 기존에 알려진 TiO_2 와 새롭게 합성한 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 분말과 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체를 이용해서 엑소좀의 흡착 효율을 측정하였다. Figure 23 (a)는 각 나노물질들에 흡착된 엑소좀을 Western blot하여 CD81의 발현 결과를 밴드로 나타낸 사진이다. Figure 23 (b)는 Western blot에서 얻어진 밴드의 세기를 ImageJ를 이용해 각 나노물질들의 흡착효율을 상대적으로 나타낸 그래프이다. $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 분말과 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체는 기존에 엑소좀을 잘 분리하는 것으로 알려진 TiO_2 와 비슷한 정도의 분리효율을 보였다 [20, 22]. 반면에, Fe_3O_4 는

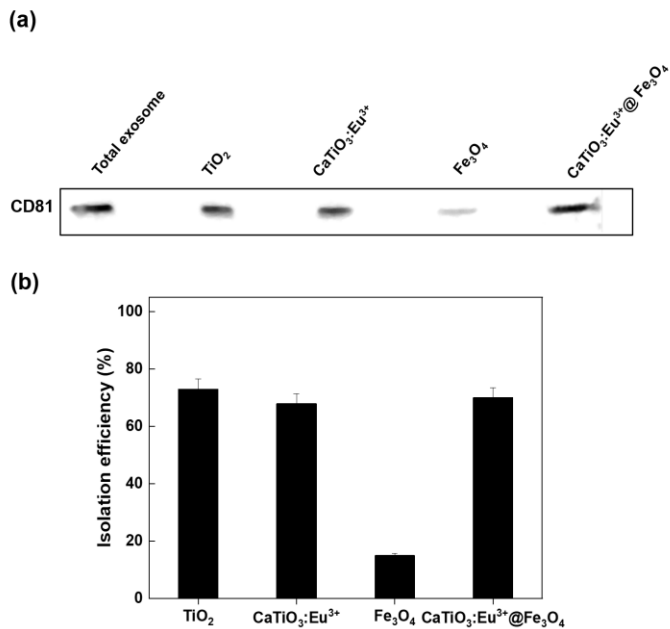


Figure 23. Adsorption efficiency of exosomes on metal oxide

가장 낮은 분리효율을 나타내었다. 특히, $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체는 높은 분리효율을 나타낼 뿐만 아니라 자성의 특성을 가지고 있기 때문에 여러 바이오품질들이 들어 있는 샘플에서 자석으로 엑소좀을 쉽게 분리할 수 있는 매우 뛰어난 장점을 가지고 있다.

4.3.3 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체를 이용한 세포배양액에서의 엑소좀 분리

여러 바이오품질들이 들어 있는 세포배양액에서 엑소좀 분리의 최적화 조건을 찾기 위해서 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체의 양과 incubation 시간에 따른 분리효율을 측정하였다. 분리 효율은 Western blot의 밴드 세기를 ImageJ로 처리하여 상대적인 세기를 분석하여 나타내었다. Figure 24(a)는 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체의 양 (10, 20, 30, 40, 50 mg)에 따른 분리 효율을 측정한 결과이다. $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체의 양이 40 mg 일 때 최대의 분리 효율을 나타내었다. Figure 24(b)는 Incubation 시간 (1, 5, 10, 30, 60분)을

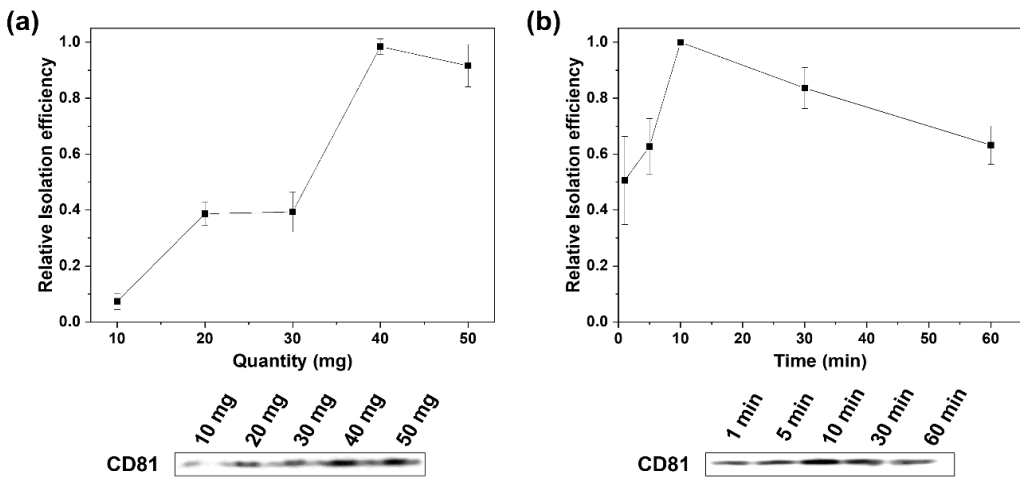


Figure 24. Optimization of the conditions for exosome isolation. Isolation efficiency of HEK293 cells' exosomes as a function of the quantity of $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanocomposites (a) and incubation time (b).

변화시키면서 분리 효율을 측정한 결과이다. Incubation 시간은 10분일 때 분리 효율이 최대가 되었음을 확인하였다.

4.4 SERS 기반의 엑소좀 검출

4.4.1 SERS 프로브 특성

본 연구에서는 SERS 기반의 엑소좀 검출을 위해서 금 나노막대 (Gold nanorod; Au NRs)를 이용하여 SERS 프로브 (probe)를 제작하였다. Au NRs에 엑소좀 바이오마커인 CD81의 항체를 붙이고 라만신호를 보기위해 DTTC를 결합하였다. Au NRs에 각 분자들의 결합을 확인하기 위해 UV-vis 흡수 스펙트럼 측정을 통해 분석하였다. Au NRs의 플라즈몬 밴드는 778 nm로 나타났으며, Au NRs에 항체(Antibody, Ab)가 결합되었을 때는 플라즈몬 밴드가 장파장 쪽으로 이동하였다 (Figure 25). 위 결과는 Au 나노입자에 항체가 결합되면 플라즈몬 밴드가 장파장으로 이동한다는 선행연구 결과 보고와 잘 일치하였다 [35, 36].

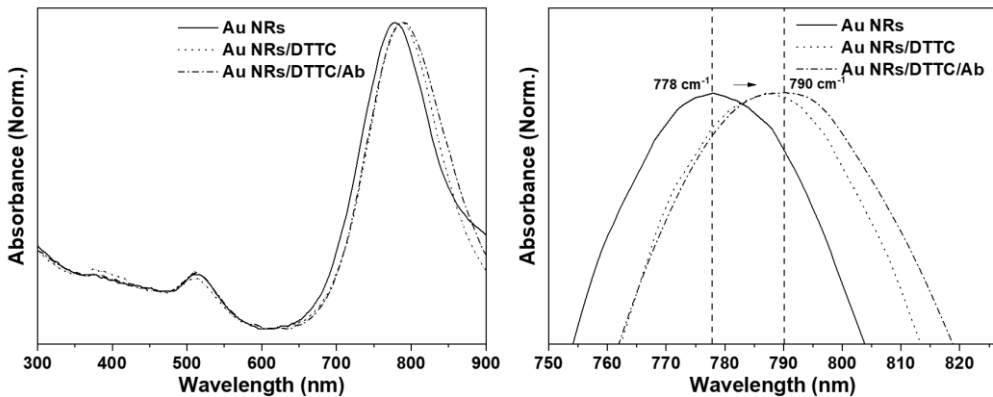


Figure 25. UV-vis absorption spectra of Au NRs, Au NRs@DTTC, and Au NRs@DTTC@Ab

Au NRs를 기반으로 제작한 SERS 프로브의 라만신호의 증폭을 알아보기 위해서 알루미늄 호일 (Al foil)과 Au NRs를 기반으로하여 DTTC의 라만신호를 비교하였다. Figure 26에서 볼 수 있는 것처럼 알루미늄 호일과 Au NRs에서의 DTTC는 동일한 주 라만 피크 (1132 cm^{-1} , C-C symmetric vibration), (1236 cm^{-1} , NC_3 symmetric vibration), (1288 cm^{-1} , C-C-C antisymmetric vibration), (1333 cm^{-1} C-C=C antisymmetric vibration), (1408 cm^{-1} , C-C=C antisymmetric vibration) 가 나타났다 [37]. DTTC의 라만 신호는 Au NRs의 SERS 효과에 의해 알루미늄 호일보다 Au NRs에서 크게 증폭되었다.

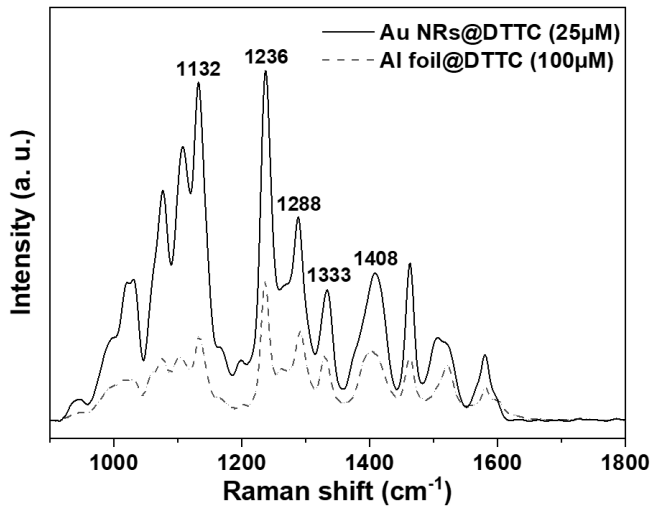


Figure 26. Comparison of Raman spectrum for Al foil and Au NRs SERS

4.4.2 SERS 기반 엑소좀 검출

SERS 기반 엑소좀 검출을 위해서 SERS 프로브 (Au NRs@DTTC@Ab)와 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-exosome}$ 이 결합되어 있는지 확인하기 위해 TEM 측정을 하였다. Figure 27의 TEM 이미지에서 볼 수 있는 것처럼 Au NRs가 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-exosome}$ 에 붙어 있는 것을 명확하게 볼 수 있다. 이는 엑소좀의 바이오마커인 CD81이 Au NRs에 결합시킨 Anti-CD81 항체와 잘 결합되었음을 의미한다. 본 연구에서는 이러한 결합을 통해 SERS 기반의 엑소좀을 검출하였다.

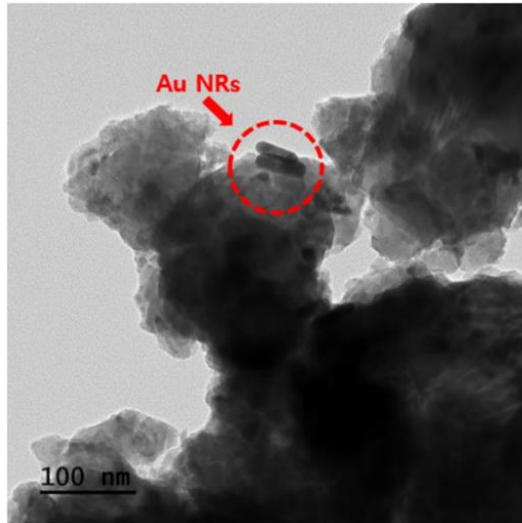


Figure 27. TEM image of $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ NCS-exosome/SERS probe

Figure 28은 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체에 엑소좀이 결합한 샘플 (NCs@exosome)과 NCs@exosome에 SERS 프로브가 결합된 샘플 (NCs@exosome-SERS probe)의 라만 스펙트럼이다. NCs@exosome은 라만 신호가 매우 약하게 나타나 100배 확대하였다. NCs@exosome에서는 엑소좀의 구성요소인 지질 (1311 cm^{-1})과 단백질 (1634 cm^{-1})에 해당하는

라만 신호가 나타났다. [38, 39]. NCs@exosome/SERS probe 샘플에서는 Figure 26에서의 DTTC와 동일한 라만신호가 강하게 나타남을 확인할 수 있었다. 이것은 나노복합체로 분리된 엑소솜에 SERS 프로브가 결합한 TEM 결과와 일치하였고 분리된 엑소솜을 SERS를 통해 검출할 수 있음을 보여준다.

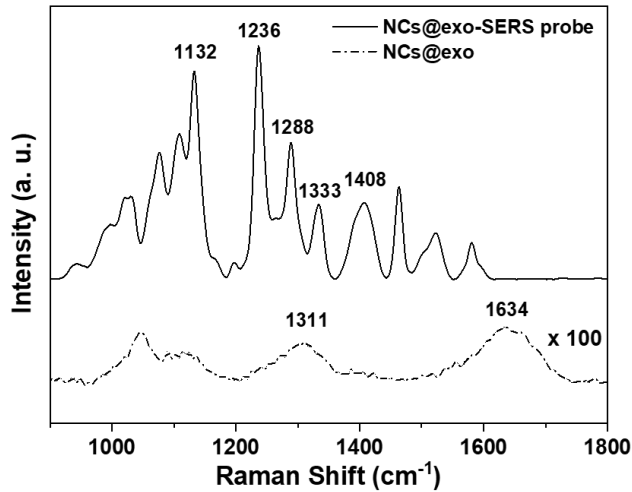


Figure 28. SERS spectra of CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ NCs-exosome and CaTiO₃:Eu³⁺@Fe₃O₄ NCs@exosome/SERS probe

V. 결론

엑소좀은 인지질 이중층 구조로 되어있으며, 인지질의 머리 그룹에는 인산기로 구성되어 있어서 금속산화물과 특이적으로 결합하는 특성을 가지고 있다. 본 연구에서는 이러한 엑소좀의 특성을 이용하여 신속하고 간편한 엑소좀 분리 및 검출을 위해 고에너지 볼 밀링 (High Energy Ball Milling, HEBM) 방법으로 금속산화물 기반의 다기능 나노복합체를 개발하였다.

자성의 성질과 플라즈몬 특성을 가진 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ NPs 을 합성하여 XRD, SEM, EDX 의 측정을 통해 결정구조와 표면형상 및 미세구조를 분석하였다. XRD 패턴의 결과 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ NPs 은 Fe_3O_4 와 Ag 의 주요 회절 피크 35.7° 와 39.0° 근처에서 강한 회절 피크를 보였다. EDX 결과 Fe, O, Ag 로 구성되어 있으며 XRD 결과와 일치하였다. 나노입자의 형상은 약 50nm 정도의 구형의 작은 입자들이 응집되어 있다. $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ NPs 에 대한 인산염과의 상호작용을 연구하기 위해서 DOPC 분자를 선택했다. FTIR 분광을 통해 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ NPs 에 DOPC 분자가 결합되어 있음을 확인할 수 있었고, 정량분석을 위해 DOPC 에 형광라벨이 붙은 TOPC 분자를 결합하여 형광의 세기를 분석하였다. $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ NPs 에 대한 TOPC 의 흡착효율은 약 84%를 나타내었다. 하지만, 엑소좀의 경우 $\text{Fe}_3\text{O}_4@Ag$ NPs 에 거의 흡착되지 않았으며, Fe_3O_4 나노입자에 대해서도 기존 연구에서 알려진 TiO_2 에 비해서 흡착 효율이 매우 낮았다.

본 연구에서는 엑소좀을 간단하게 고속으로 분리하며 분리효율을 증가시키기위해서 TiO_2 기반의 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 분말을 합성하였고, 여기에

자성의 특성을 가진 Fe_3O_4 를 결합하여 고에너지 볼 밀링 방법으로 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 다기능 나노복합체를 합성하였다. XRD 분석 결과 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}$ 와 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 모두 사방정계(orthorhombic)의 구조를 나타냈으며, EDX 분석 결과 원재료의 원소들로 구성되어 있고 다른 불순물은 존재하지 않았다. VSM을 이용해 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 의 자기이력곡선을 측정한 결과 포화 자화 값이 4.8 emu/g로 Fe_3O_4 의 포화 자화 값 (70.0 emu/g)에 비해 매우 작았지만 외부 자기장을 가해주면 10초 이내에 샘플이 자석에 끌리는 것을 확인할 수 있었다. 나노입자에 결합된 엑소좀을 세포배양액으로부터 분리하는 데 충분한 포화 자화 값이었다. 세포배양액에서 엑소좀 분리의 최적화 조건을 찾기 위해서 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체의 양과 incubation 시간에 따른 분리효율을 측정하였다. 샘플의 양이 40 mg, Incubation 시간 10분일 때 분리 효율이 최대가 되었음을 확인하였다. $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 나노복합체에 대한 엑소좀의 흡착 효율은 기존의 TiO_2 에 대한 흡착 효율과 비슷한 결과를 얻었다.

분리한 엑소좀을 빠른 시간에 고민감도로 검출 및 분석하기 위해 SERS 기반의 면역효소 (immunoassay) 방법으로 수행했다. Au NRs에 엑소좀 바이오마커인 CD81의 항체를 붙이고 라만신호를 보기위해 DTTC를 결합하여 SERS 프로브 ($\text{Au NRs}@\text{DTTC}@\text{Ab}$)를 합성하였다. SERS 프로브가 결합되지 않은 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ NCs-exosome의 샘플에서는 라만 피크를 거의 볼 수 없었으나 SERS 프로브가 결합된 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ NCs-exosome/SERS probe 샘플에서는 라만신호가 강하게 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 성공적으로 엑소좀에 나노복합체와 SERS 프로브가 잘

결합하였음을 보여주며, TEM 이미지를 통해서 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ NCs-exosome과 SERS 프로브 ($\text{Au NRs}@\text{DTTC}@\text{Ab}$)가 잘 결합되어 있음을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통해 새롭게 개발한 $\text{CaTiO}_3:\text{Eu}^{3+}@\text{Fe}_3\text{O}_4$ 다기능 나노복합체와 Au NRs 기반의 SERS 프로브는 신속하고 간편한 엑소좀의 분리 및 검출의 가능성을 보여주었다. 따라서, 본 연구의 결과는 앞으로 엑소좀을 이용한 암 진단에 유용한 도구로 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

VI. 참고문헌

- [1] S. Dommelen., et al. Microvesicles and exosomes: Opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. **161**, 635 (2012)
- [2] C. Théry., et al. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*. **9**, 581 (2009)
- [3] Y. Sun., et al. Systematic comparison of exosomal proteomes from human saliva and serum for the detection of lung cancer. *Analytica Chimica Acta*. **982**, 84 (2017)
- [4] T. Pisitkun., et al. Knepper, Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**, 13368 (2004)
- [5] X. Li and X. Wang. The emerging roles and therapeutic potential of exosomes in epithelial ovarian cancer. *Molecular Cancer*. **16**, 92 (2017)
- [6] A. Vlassov., et al. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta*. **7**, 940 (2012)
- [7] B. Tauro., et. al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods*. **56**, 293 (2012)
- [8] S. Mathivanan., et al. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature *Mol. Molecular & Cellular Proteomics*. **9**, 197 (2010)
- [9] D. Yang., et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*. **8**, 3684 (2020)

- [10] W. Li., et al. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Molecular Cancer*. **16**, 145 (2017)
- [11] M. Lee., et al. Exosomes as the source of biomarkers of metabolic diseases *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*. **3**, 119 (2016)
- [12] L. Li., et al. Clinical significance of exosomal miRNAs and proteins in three human cancers with high mortality in China. *Oncology Letters*. **17**, 11 (2018)
- [13] Y. Zhang., et al. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *International Journal of Nanomedicine*. **15**, 6917 (2020)
- [14] S. Jiawei., et al. Magnetic bead-based adsorption strategy for exosome isolation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. **10** (2022)
- [15] G. Jung. Biomedical Application of Raman Spectroscopy. *New physics: Sae Mulli*. **67**, 665 (2017)
- [16] J. Cheng and X. Xie. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Instrumentation, Theory, and Applications. *The Journal of Physical Chemistry B* **108**, 827 (2004)
- [17] H. Tsuda and J Arends. Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. *Advances in Dental Research* **11**, 539 (1997)
- [18] M. Fleischmann., et al. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*. **26**, 163 (1974)
- [19] C. Zong., et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis: Reliability and Challenges. *Chemical Reviews*. **118**, 4946 (2018)
- [20] C. Haynes., et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Chem*. **77**, 338 (2005)
- [21] A. Otto, et al. Surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Physics: Condensed Matter*. **4**, 1143 (1992)

- [22] R. Freeman., et al. Self-assembled metal colloid monolayers: An approach to SERS substrates. *Science*. **267**, 1629 (1995)
- [23] T. Furtak. Current understanding of the mechanism of surface enhanced Raman scattering. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. **150**, 375 (1983)
- [24] Y. Pang., et al. Personalized detection of circling exosomal PD-L1 based on Fe₃O₄@TiO₂ isolation and SERS immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*. **148**, 111800 (2020)
- [25] G. Wu., et al. Preparation of a CaTiO₃/Al³⁺/Pr³⁺/Sm³⁺ nanocomposite for enrichment of exosomes in human serum. *Talanta*. **226**, 122186 (2021)
- [26] F. Gao., et al. A novel strategy for facile serum exosome isolation based on specific interactions between phospholipid bilayers and TiO₂. *Chemical Science* **10**, 1579 (2019)
- [27] J. Benjamin. Dispersion strengthened superalloys by mechanical alloying, *Metall. Trans.* **1**, 2943 (1970).
- [28] F. Miani., et al. Designing a high energy ball-mill for synthesis of nanophase materials in large quantities, *Materials Science and Engineering: A* **168**, 149 (1993)
- [29] M. Kedzierska., et al. The Synthesis Methodology of PEGylated Fe₃O₄@Ag Nanoparticles Supported by Their Physicochemical Evaluation. *Molecules*. **26**, 1744 (2021)
- [30] M. Moreira., et al. Structural and optical properties of CaTiO₃ perovskite-based materials obtained by microwave-assisted hydrothermal synthesis: An experimental and theoretical insight. *Acta Materialia*. **57**, 5174 (2009)
- [31] N. Ganguli and P. Kelly. Tuning ferromagnetism at interfaces between insulating perovskite oxides. *Physical Review Letters*. **113**, 127201 (2014)
- [32] Y. Wang., et al. Synthesis of fern-like Ag/AgCl/CaTiO₃ plasmonic

- photocatalysts and their enhanced visible-light photocatalytic properties. *RSC Advances*, **6**, 47873 (2016)
- [33] J. Whittinghill. Determination of phospholipids in vegetable oil by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 1281 (1998)
- [34] I. Helwa., et al. A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents. *PLoS ONE*, **12**, 1 (2017)
- [35] X. Zhu., et al. Biosensing of DNA oxidative damage: A model of using glucose meter for non-glucose biomarker detection. *International Journal of Nanomedicine*, **12**, 979 (2017)
- [36] J. Webb., et al. Theranostic Gold Nanoantennas for Simultaneous Multiplexed Raman Imaging of Immunomarkers and Photothermal Therapy, *ACS Omega*, **2**, 3583 (2017)
- [37] H. Cai., et al. Surface-enhanced Raman scattering and DFT calculations studies of 3,3'-diethylthiatricarbocyanine iodide, *Journal of Raman spectroscopy*, **42**, 1722 (2011)
- [38] W. Lee., et al. Label-Free Prostate Cancer Detection by Characterization of Extracellular Vesicles Using Raman Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, **90**, 11290 (2018)
- [39] S. Kruglik., et al. Raman tweezers microspectroscopy of circa 100 nm extracellular vesicles, *Nanoscale*, **11**, 1661 (2018)

감사의 글

학사과정은 모든 것을 안다고 착각하는 시간, 석사과정은 내가 정말 아무 것도 모른다는 것을 깨닫는 시간이라는 말이 있습니다. 2 년간의 석사과정동안 자신의 부족함을 느끼며 많은 감사한 분들의 도움으로 부족한 부분을 채워갈 수 있었습니다. ‘감사하다’ 라는 말로 다 표현하지 못할 마음이지만 이 지면을 통해 전해보고자 합니다.

학부연구생 시절부터 4년이 넘는 시간동안 셀 수 없이 많은 가르침을 주신 정경복 지도교수님께 감사드립니다. 저에게 가르침을 주셨지만 오히려 저의 그릇이 작아 다 받아들이지 못하고 항상 기대에 못 미쳐 감사한 마음과 죄송한 마음을 전해드립니다.

학부시절부터 물리를 배울 때 항상 최선을 다해 가르쳐 주셔서 물리적인 기초를 쌓을 수 있게 해 주신 물리교육과 조광희 교수님, 하미순 교수님과 명노준 교수님께 감사드립니다.

힘든 기간에 중요한 조언을 해 주셨던 황승립 교수님, 언제나 친절히 도움을 주었던 Dr. Vinoth 와 박사과정 학생 Arkhil 에게 감사드립니다.

생물학적 지식이 많이 부족한 저에게 생물학적 실험에서 큰 도움을 주신 김석준 교수님과 김 옹 박사님께 감사드립니다.

2 년 동안 같이 연구실 생활을 해 오며 도움을 준 김다영 석사과정 학생에게 고마운 마음 전합니다.

마지막으로 제가 여기까지 올 수 있도록 저에게 모든 것을 희생하신 우리 부모님께 이 작은 논문을 바칩니다.