

수정진동자를 이용한 Au 표면에서 avidin-biotin 결합 리포솜 막의 구조 분석

박 종원, 한 성웅, 권 정훈, 박 진영, 조 홍식, 이 행자, 장 상목

동아대학교 화학공학과

전화 (051)200-6861, FAX (051)200-7728

ABSTRACT

Liposomes and proteoliposomes, artificial membranes, can interact with many solutes, such as drugs, peptides and proteins. Immobilization of (proteo)liposomes as supramolecular aggregates on gold surfaces have potential applications in nanotechnology and biosensors. We demonstrate a quartz crystal analyzer (QCA) method to monitor the construction of multi layers of unilamellar liposomes based on avidin-biotin binding on gold surface using quartz crystal microbalance (QCM). Thus, QCA provides an on line and efficient method to detect the protein membranes construction and have applications to biosensing system.

서론

금속 표면에 유기 분자막의 고정화와 그 고정화된 유기 분자막의 구조 제어는 바이오 센서, 세포 조절, 나노테크놀로지 분야에서 단백질 응용⁽¹⁾의 가장 중요한 부분이다. Avidin-biotin은 단백질 고정화에 널리 사용⁽²⁾되고 있는 것으로, biotin은 생체 내에서 아미노산과 당의 대사에 포함된 비타민 H로서 잘 알려져 있고, 달걀 흰자에 있는 단백질인 avidin과의 선택적인 강한 결합력을 가지고 있다⁽³⁾. 따라서 biotin에 결합된 생체 분자를 avidin과 biotin의 강한 결합력을 이용하여 금속 표면 위에 아주 간단하게 고정화할 수 있다. Avidin-biotin의 결합은 단백질과 리간드 사이의 강한 결합 중의 하나로서 이 강한 결합은 면역 조직 화학⁽⁴⁾를 포함하는 avidin-biotin 테크놀로지로서 다양한 분야에 응용할 수 있다.

미량 질량 분석기로서의 QCA를 이용하여 공진주파수와 최근 Muramatsu 등⁽⁵⁻⁹⁾이 제안한 공진저항 개념을 도입하여 이들 변화량을 연속적으로 측정하므로써 수정진동자 표면 위에서 일어나는 박막의 질량이나 점탄성 변화 즉, 특성 변화를 모니터링할 수 있고, 공진주파수와 공진저항의 관계를 조사함으로써 표면에 형성된 막의 점탄성 등을 조사할 수 있다. 따라서 이러한 QCA의 성질을 이용하여 avidin과 biotin의 강한 결합력에 의해 구성되는 다층의 고분자 층의 구조를 QCA를 이용하여 측정하고자 한다.

실험 방법 및 장치

Large unilamellar liposomes(LUVs, 16.4 mM phospholipid)의 적층 과정을 조사하기 위하여 다음의 각 네 단계로 나누어 각 단계에서의 변화량을 측정하였다. 첫 번째 단계로 900 ml HEPES 버퍼 용액(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4)에 미리 전처리한 QCM 셀을 넣고, 정상 상태에 도달할 때까지 방치한다. 두 번째 단계에서 이 버퍼 용액에 10 mg/ml avidin 100ml를 첨가한다. 세 번째 단계에서 다시 이 셀을 세척한 후 900 ml의 버퍼 용액을 다시 첨가한다. 정상 상태에 도달하면, 네 번째 단계로 biotin에 결합된 LUVs 100 ml를 첨가하여 정상 상태에 도달할 때까지 방치한다. 이 때 각 단계에서의 공진주파수 변화를 QCA(QCA917, SEIKO EG&G, Japan)로 측정했다. LUVs의 조성과 평균 사이즈 측정은 egg phosphatidylcholine(>99% pure, Avanti Polar Lipids, Alabaster)로 하였고, DLS(Dynamic Light Scattering)는 100 nm에서 측정하였다.

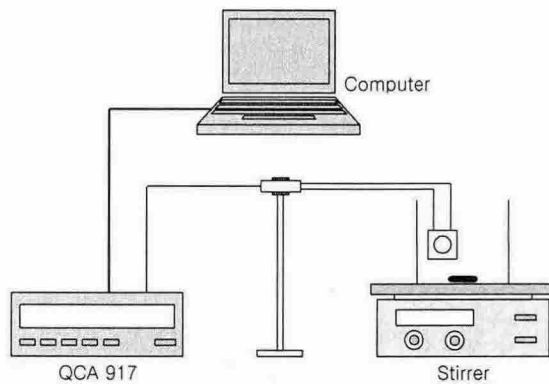


Fig. 1 Schematic diagram of QCA system.

결과 및 고찰

LUVs가 avidin-biotin 결합에 의해 Au 표면에 고정되었을 때 QCA로 모니터링한 공진주파수 변화를 Fig. 2(a)에 나타내었다. Au 표면에 고정화된 LUVs의 질량 부하로 인하여 공진주파수 변화는 첫 단계에서 130에서 1090 Hz로의 감소를 나타내었다. 위의 실험 방법을 5회 반복한 실험 전체에서는 약 4700 Hz 정도의 공진주파수 변화의 감소를 보였다. 시간에 따른 공진주파수 변화의 패턴을 조사해 보면, 일정한 패턴을 보이고 있으므로, 이를 공진주파수와 공진저항과의 관계(Fig. 2(b))와 시간에 따른 공진저항(Fig. 2(c))을 조사해 보면, 그 결과 Fig. 2(a)에서 나타내고 있는 결과와 유사한 패턴을 보이고 있다. 이러한 패턴으로부터 avidin-biotin과의 결합력을 이용하여 biotin이 결합되어 있는 리포솜 막이 금속 표면 위에 적층되는 모델을 Fig. 3에 표시하였다.

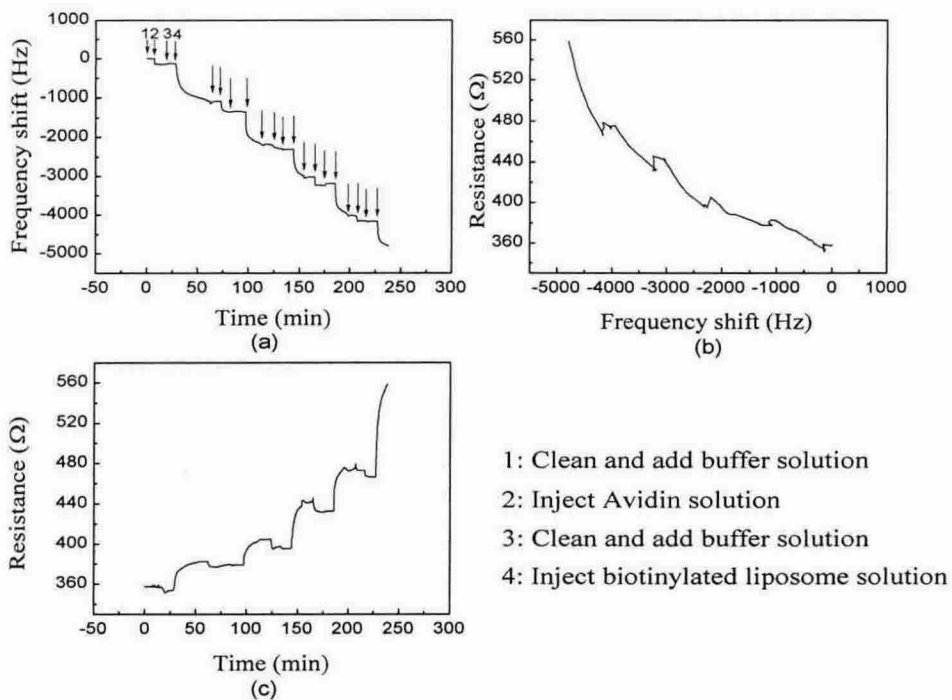


Fig. 2. Typical response for the construction of avidin- biotinylated liposome layers.

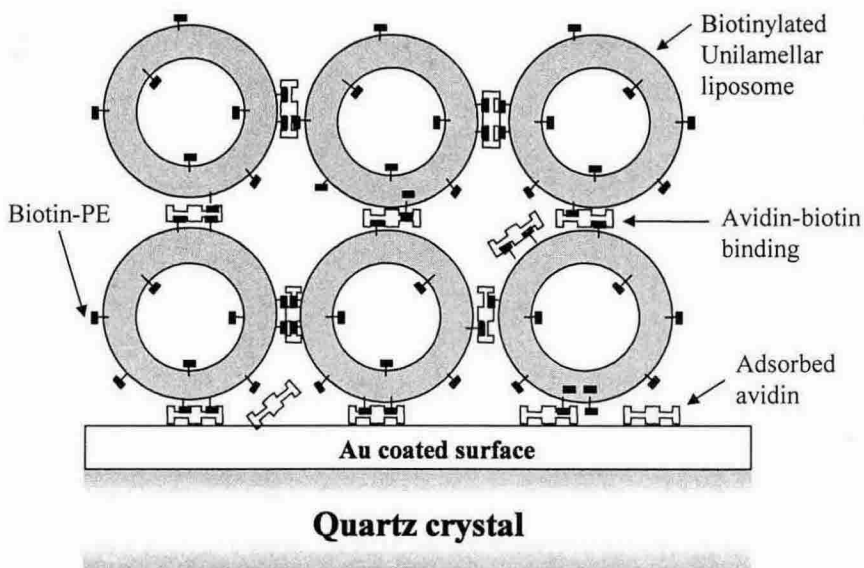


Fig. 3. Illustration of avidin-biotinylated liposome layers

요약

Avidin-biotin의 강한 결합력을 이용하여 금속 표면 위에 리포솜과 같은 유기 분자막의 다층 형성 과정을 QCA의 공진주파수와 공진저항의 변화를 측정함으로써 실시간 모니터링의 가능성을 검토하고, 유기 분자막이 금속 표면 위에 적층 됨에 따라 형성되는 적층 막에 대한 정보를 수집함으로써 바이오센서 시스템으로 QCA를 적용 가능함의 기초 데이터를 제공하고자 한다.

참고문헌

1. Morgan, H., Pritchard D.J., Cooper J.M., *Biosens. Bioelectron.* **10**, p.841~846(1995)
2. Wilchek M., Bayer E.A., *Anal. Biochem.*, **171**, p.1~32(1988)
3. Sugawara K., Tanaka S., and Nakamura H., *Anal. Chem.*, **67**, p.299~302(1995).
4. Bayer E.A., Safars M., Wilchek M., *Anal. Biochem.*, **61**, p.262~271(1987).
5. H. Muramatsu, M. Suda, T. Ataka, A. Seki, E. Tamiya and Karube, *Sensors and Actuators*, A21 - A23, 362(1990)
6. Y. Okahata, K. Kimura and K. Ariga, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **111**, 1363(1987)
7. X. Ye, H. Muramatsu, K. Kimura, T. Sakuhara and T. Ataka, *J. Electroanal. Chem.*, **258**, 457(1989)
8. H. Muramatsu, E. Tamiya and I. Karube, *Anal. Chim. Acta.*, **251**, 135(1991)
9. H. Muramatsu, X. Ye, M. Suda, T. Sakuhara and T. Ataka, *J. Electroanal. Chem.*, **322**, 311(1992)