

BIACORE 바이오센서를 이용한 B형 간염 표면항원 정량분석의 기초연구

유창훈, 류강, ¹전준영, ¹이현익, ²최성철, 이은규*

한양대학교 화학공학과 생물공정연구실, ¹다이바이오텍(주), ²(주)녹십자백신 GE팀
전화 (031) 400-4072, FAX (031) 408-3779

Abstract

We performed a basic experiment for rapid, on-line, real-time measurement of HBsAg by using a BIACORE biosensor, a chip-based sensor utilizing surface plasmon resonance technology to quantify the recognition and interaction of biomolecules. We immobilized anti-HBsAg antibody on a CM5 chip surface which was activated by N-hydroxysuccinimide for amine coupling with HBsAg, and measured the mass increase from the coupling. This study showed the potential of this biosensor-based method as a rapid, multi-sample, on-line assay. Once properly validated, it can serve as a more powerful method for HBsAg quantification.

서론

BIACORE[®]는 SPR(surface plasmon resonance)을 이용하여 센서 칩 표면에서 일어나는 물질간의 결합 및 분리 과정을 실시간으로 읽어내는 분석장비이다¹⁻². 센서 칩은 유리로 이루어진 판에 50 nm의 두께의 gold film이 입혀져 있으며 이 위에 dextran 층이 도포되어 있다. 이 칩이 시스템에 장착되면 4개의 flow cell (BIACORE 2000, 3000 model 경우)이 형성되어 있는 통합미세유로장치 (integrated μ -fluidic cartridge)와 결합되어 microvalve에 의한 조절을 통해 각 flow cell을 독립적으로 혹은 연속적으로 사용할 수 있게된다. Flow cell로 sample이 흘러가면서 ligand가 고정화된 칩 위에서 두 물질간의 결합 및 분리과정을 sensorgram을 통해 실시간으로 확인할 수 있다¹. 단위는 resonance unit (RU)를 사용하고, 1000 RU의 변화는 1 ng/mm² (0.1 SPR angle 변화)의 질량변화를 의미한다.

BIACORE를 이용할 경우 대략 20 ng의 항체만을 가지고 100회 이상의 반복실험이 가능하며, 실시간, on-line 측정이 가능하고 labeling이 필요 없다는 장점을 기대할 수 있다^{1, 3, 4}. 또한 HBsAg 생산 공정 중 또는 보관 중의 바이러스 활성 변화 등을 즉시 분석할 수 있으며, 각 batch별 활성 비교도 가능하게 한다³. 따라서 본 실험에서는 BIACORE를 이용하여 재조합 HBsAg의 정량분석에 대한 기초실험을 수행하여 ELISA 대체 가능성과 타당성을 검토하였다.

재료 및 방법

HBsAg 및 anti-HBsAg antibody

분석대상물질인 재조합 *Hansenula polymorpha* 유래 HBsAg(분자량 22kD)와 ligand로 이용

된 anti-HBsAg antibody(polyclonal IgG from goat)는 (주)녹십자백신으로부터 제공받았다. Reference ligand는 anti-IFN- α -2 antibody(polyclonal IgG from rabbit, Sigma)를 이용하였다.

Ligand 고정화 과정

BIACORE AB사(Uppsala, Sweden)의 BIACORE 3000 시스템을 이용하였다. Ligand를 고정화시키기 위한 센서 칩은 CM5 chip으로 dextran 층의 carboxyl 기는 EDC/NHS에 의해 활성화되어 ligand (antibody)의 amine group과 공유 결합된다. Running buffer로 1X PBS (pH 7.4)를 30 μ l/min의 유속으로 계속하여 흘려주었다.

- Preconcentration test: ligand의 고정화 효율을 증가시키기 위해 pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5의 10 mM sodium acetate를 ligand와 혼합시켜 주입함으로써, 최적의 고정화 조건을 결정하였다.

- 칩 표면의 활성화: Dextran 층의 carboxyl 기를 HBsAg 표면의 amine 기와 공유결합시키기 위하여 0.2 M EDC(N-ethyl-N'-dimethylaminopropyl carbodiimide)와 0.05 M NHS (N-hydroxysuccinimide)를 10분 동안 흘려주어 반응성이 좋은 NHS ester로 활성화 시켰다³.

- Ligand 고정화: Preconcentration test를 통해 결정된 pH의 10 mM sodium acetate에 ligand(anti-HBsAg antibody) 및 reference ligand(anti-IFN- α -2 antibody)를 각각 최종농도 50 μ g/ml이 되도록 첨가한 후에 활성화된 4개의 flow cell위로 흘려주었다. 이 때, 센서 칩 표면 1, 3번 flow cell (Fc 1, Fc 3)에는 anti-IFN- α -2 antibody를, 2, 4번 flow cell (Fc 2, Fc 4)에는 anti-HBsAg antibody를 고정화하였다. 저밀도와 고밀도로 각각 공유결합시킴으로써, 고밀도 고정화에 의한 steric hindrance 영향이 있는지 또는 고정화된 ligand 당 결합되는 HBsAg의 비율에 차이가 있는지 확인하고자 하였다.

- 불활화(deactivation): Ligand와 결합하지 않고 남은 센서 칩 표면의 NHS activation site에 HBsAg의 amine기와 공유결합되지 않도록 하고, 비공유결합된 ligand를 제거하기 위하여 1 M ethanolamine을 8분 동안 흘려주어 deactivation 시켰다.

Biorecognition에 의한 HBsAg의 결합반응

HBsAg를 1,370, 685.5, 342.8, 171.4, 87.6, 42.9, 21.4, 10.7 μ g/ml로 각각 희석하여 저밀도 고정화된 칩 (Fc 1, Fc 2) 위로, 548.2, 274.1, 137.1, 68.6, 34.3, 17.1, 4.3, 2.1, 1.06, 0.53 μ g/ml로 각각 희석하여 고밀도 고정화 칩 (Fc 3, Fc 4) 위로 흘려주어 결합되는 HBsAg를 RU (resonance unit) 값으로 측정하였다. 이 때 각 flow cell로부터 측정된 RU 값은 anti-HBsAg antibody가 결합된 Fc 2와 Fc 4에서 anti-IFN- α -2 antibody가 결합된 Fc 1, Fc 3의 RU 값을 각각 제하여 줌으로써 bulk response 및 non-specific binding 값을 배제하였다. 또한 각 농도에서의 sensorgram으로부터 항원-항체 반응의 결합도를 질량 단위로 구하여 calibration curve를 작성한 뒤 correlation coefficient 값이 0.95 이상인 구간을 이 분석법의 선형 범위로 선정하였다. 또한 이 calibration curve로부터 항체와 항원 사이의 최대 결합도를 구한 뒤¹¹ 이 결합반응의 몰 비율을 결정하였다.

결과 및 고찰

Ligand 고정화

Ligand의 고정화를 위한 고정화 buffer(10 mM sodium acetate)의 최적 pH는 anti-HBsAg

antibody의 경우 pH 5.0, anti-IFN- α -2 antibody의 경우 pH 5.5에서 최적 조건이었다. 고정화 수준은 anti-HBsAg antibody를 저밀도로 고정화시킨 경우 2,304.2 RU (Fc 2), 고밀도 고정화 경우 17,635 RU (Fc 4) 이었다. Reference 단백질로 사용된 anti-IFN- α -2 antibody 경우저밀도는 2,657 RU (Fc 1)로 고밀도는 Fc 3에서 13,027 RU로 각각 측정되었다 (Fig. 1). Anti-HBsAg antibody 경우 고정화된 질량은 저밀도와 고밀도의 경우 각각 2.76, 21.12 ng/mm²이었다.

선형 범위의 결정

저밀도와 고밀도 고정화 칩 위로 각 농도의 HBsAg를 흘려주어 얻은 sensorgram을 Fig. 2에 나타내었다. 각 sensorgram으로부터 결합도를 결정한 후 x축에 HBsAg 농도, y축에 결합된 HBsAg를 RU 단위로 나타내었다 (Fig. 3). 이 calibration curve에서 correlation coefficient가 0.95 이상인 선형 범위 구간을 확인한 결과 두 경우 모두 30 - 40 μ g/ml까지 HBsAg의 농도에 비례해 RU가 선형적으로 변화함을 볼 수 있었다. 따라서 선형범위가 205 ng/ml로 알려져 있는 ELISA에 비해 Biacore를 이용한 분석법이 훨씬 더 광범위한 선형범위를 가짐을 확인하였다. 또한 선형범위 안에서의 기울기는 저밀도 경우 0.455, 고밀도 경우 6.50 RU/ μ g/ml로 단위 질량의 고정화된 polyclonal antibody 당 고밀도 칩이 저밀도 칩에 비해 약 14배의 항원 결합력을 보여 주었다.

최대결합도 및 항원-항체 결합반응의 물 비율

Fig. 3의 calibration curve는 전형적인 Langmuir 단일층 흡착 거동을 보여 주었다. 이로부터 최대결합도를 RU 단위로 얻기 위해 (RU_{max}) Langmuir 방정식을 적용시킨 후 이를 double-reciprocal plotting하여 1차 방정식으로 변환시켰다. 이로부터 Y절편 값을 통해 RU_{max} 값을 구한 결과 저밀도 칩에서 56.2 RU, 고밀도 칩에서 400 RU로 계산되었다 (Fig. 4). 계산된 RU_{max} 값과 각 flow cell에 고정화된 항체의 질량을 통해 항체-항원 결합반응의 질량 비율을 계산한 결과 저밀도 및 고밀도 칩에서 모두 일정한 값을 얻었다.

Low density: $RU_{max} / \text{low-density immobilized ligand mass (RU)} = 56.2 / 2,304.2 = 0.024$

High density: $RU_{max} / \text{high-density immobilized ligand mass (RU)} = 400 / 17,635.9 = 0.023$

요약

Biacore 바이오센서를 이용하여 재조합 HBsAg를 정량분석하기 위해 CM5 칩 위에 anti-HBsAg polyclonal antibody를 저밀도(2,304.2 RU)와 고밀도(17635.9 RU)로 고정화한 후 다양한 농도의 HBsAg를 흘려주어 각 농도별 sensorgram을 얻었다. 각 sensorgram으로부터 결합된 HBsAg의 질량을 구하여 액체 시료 내의 HBsAg의 농도 대 칩에 결합된 HBsAg의 질량 사이의 상관관계를 구한 결과 Langmuir 단일층 흡착 등온선과 매우 유사한 형태의 calibration curve를 얻었다. 약 40 μ g/ml까지 선형 관계가 유지되었다. 이 calibration curve를 double-reciprocal plotting 하여 RU_{max} 값을 각각 구한 뒤, 단위 질량의 고정화된 항체 당 결합된 HBsAg의 질량을 구한 결과 저밀도 칩에서 0.024, 고밀도 칩에서 0.023으로 매우 유사한 결과를 나타내었다.

감사

본 연구는 2001년 식품의약품안전청 용역연구개발사업인 “혈액제제의 바이러스 validation 지침 제정을 위한 연구”의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 초정밀 생물분리기술연구센터(ERC)의 부분적인 연구비 지원에도 감사드립니다.

References

1. D. G. Myszka and R. L. Rich, Implementing Surface Plasmon Resonance Biosensors in Drug Discovery, (2000), PSTT, 3(9), 310-316.
2. N. Bianchi, R. Gambari, et. al., Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction, (1997), Clinical and Diagnostic Virology, 8, 199-208.
3. J. S. Tung, G. Mark, et. al., Characterization of Recombinant Hepatitis B Surface Antigen Using Surface Plasmon Resonance, (1998), J. Pharmaceutical Sciences, 87(1), 76-80.
4. M. J. Gomara, I. Haro, et. al., Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology, (2000), J. Immunological Methods, 246, 13-24.

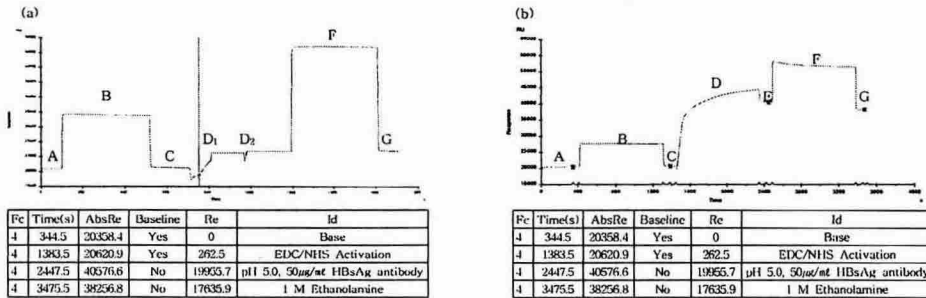


Fig. 1. The sensorgram of anti-HBsAg polyclonal antibody immobilization.

(a): low-density, (b): high-density immobilization. A: baseline, B: EDC/NHS activation, C: after activation, D: ligand binding, E: after ligand binding, F: deactivation, G: after deactivation.

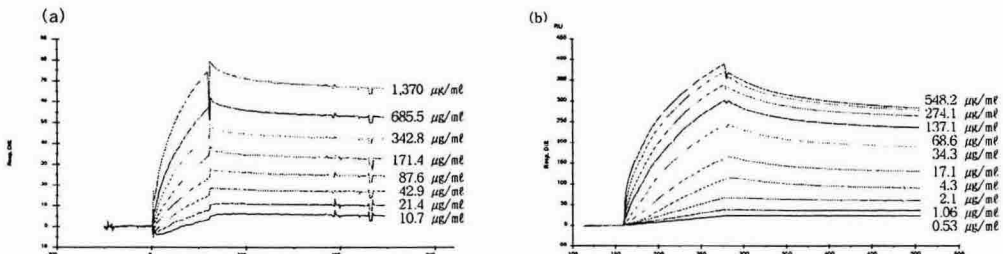


Fig. 2. Time-course profiles of HBsAg and anti-HBsAg antibody interactions at various HBsAg concentrations. (a): low-density sensor chip (Fc 2 - Fc 1), (b): high-density sensor chip (Fc 4 - Fc 3).