

Magnetic Immuno-separation 방법을 이용한 HDL Cholesterol 측정 시스템 개발

조정환, 채우칠, 백세환

고려대학교 생명공학원 바이오센서 시스템공학 연구실

전화: (02) 3290-3438, 팩스: (02) 927-2797

Abstract

A membrane immuno-chromatographic system that selectively separated plasma lipoproteins and generated a signal in proportion to the concentration of cholesterol within high-density lipoprotein (HDL) was investigated as a point-of-care device for the prognosis of coronary heart disease.

서론

인체 내 cholesterol은 수용액에 불용성 성분으로 혈장 지질단백질에 의해 조직과 간 사이에 운반되어 그 혈중 농도가 조절된다. 혈장 지질단백질은 구형의 입자형태로 존재하며 그 표면은 인화지방과 cholesterol 그리고 apolipoprotein으로 구성되어 있고, 그 밀도에 따라 크게 초저밀도 지질단백질 (VLDL), 저밀도 지질단백질 (LDL), 그리고 고밀도 지질단백질 (HDL)의 세 종류로 분류된다. 그 중 HDL Cholesterol은 1% 증가 할 때마다 심근경색 발병 위험도가 2~4% 정도 감소하는 것으로 보고되고 있어 동맥경화와 심근경색 발병을 진단하는데 매우 중요한 지표로 사용되고 있다. 또한 유럽에서는 그 측정키트의 판매가 약국에서 허용되고 있을 정도이다. 이에 본 연구팀은 면역분리를 이용 LDL과 VLDL을 선택적으로 분리 HDL-C 만을 측정할 수 있는 시스템을 선보이려 한다.¹ LDL과 VLDL에만 존재하는 Apo B100에 대한 항체와 streptavidin-biotin 반응을 이용 혈액시료 내 예상되는 LDL-C (100-200 mg/dL)와 VLDL-C (20-40 mg/dL)의 농도범위에서 시도해본 결과 포획률이 88% 정도로 나타났었다. 본 연구팀은 목표인 95% 이상의 분리효율로 좀 더 정확한 HDL-C 측정시스템을 만들기 위해 magnetic bead (MB)를 도입하여 항체와 MB를 이용 손쉽게 LDL과 VLDL을 분리할 수 있는 시스템을 개발하였다.

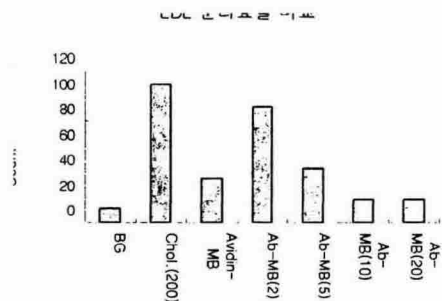
재료 및 방법

실험재료. Nitrocellulose (NC) membrane, cholesterol esterase (CE), dithiothreitol (DTT) cholesterol oxidase (CO), HRP, sodium cholate, magnetic bead (MB), anti-Apo B100 antibody, 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)를 구입하여 사용하였다.

실험방법. 항체-MB 중합체 제조는 Apo B100 특이항체를 생산하여 이것을 화학적 방법을 이용하여 magnetic bead에 중합을 시켰다. HDL cholesterol 농도측정을 위한 효소패드를 제조하기 위해 cellulose filter paper에 계면활성제 (e.g., sodium cholate), CE, CO, 그리고 발색제로써 DAB를 첨가하였다. 신호발생 패드 제조는 NC membrane에 HRP 용액을 spot하여 사용하였으며, 면역분리 및 시료첨가패드는 NC membrane과 glass fiber membrane을 각각 이용 BSA가 포함된 PBS에 적정량의 계면활성제를 첨가하여 제조하였다. 이렇게 제조된 각 패드들을 OHP film 위에 양면 테이프를 붙인 후 2 mm씩 겹치게 붙여 사용하였다.

결과 및 토의

항체-magnetic bead 중합체를 이용 LDL 포획효율을 알아보기 위해 콜레스테롤 농도가 200 mg/dL가 되는 LDL을 10 μ L씩 사용하였고 항체-magnetic bead 중합체의 농도에 따른 포획효율을 분석하였다. 또한 기존에 사용되었던 avidin-biotin 반응¹과 비교하기 위해 avidin-MB와 항체-biotin 중합체를 사용한 것과 포획효율을 비교하였다 (그림 참조). 그 결과 항체-MB 10 mg/mL 15 μ L 이상을 사용 시 95% 이상의 LDL 포획효율을 보였으며 HDL 콜레스테롤 농도와 관련된 신호는 영향을 받지 않고 그 농도에 비례한 신호발색을 보여주었다. 신호발색 측정은 스캐너를 사용 발색 부위를 이미지로 변환시킨 후 image analyzer를 이용 수치로 변환시켜 사용하였으며 이 외에도 발색 형태를 바꾸어 optical sensor를 이용 측정하는 것도 가능하며 궁극적으로 전극을 이용한 전류측정법과 같은 전기화학 신호를 측정하는 것도 가능하다.



요약

면역크로마토그래피 기술을 이용하여 동맥경화와 심근경색 발병을 진단하는데 매우 중요한 지표인 HDL-C 측정을 위한 현장의료용 진단시스템을 개발하였다.

참고문헌

1. Paek SH, Jang MR, Mok RS, Kim SC, Kim HB (1999), "Immunochromatographic membrane strip assay system for a single-class plasma lipoprotein cholesterol, exemplified by high-density lipoprotein cholesterol measurement", *Biotechnol. bioeng.*, **62**, 145-154.