

유리피움을 이용한 측방유동 시분할 형광 분석기법

A feasibility study on the Application of Europium in the Lateral Flow Assay System with Time Resolved Fluorometry

정진하, 남기봉, 고동섭*, 문정대**, 정동석**, 최의열**, 김재훈***

한림대학교 전자물리학과, *목원대학교 광 및 전자물리학과, **바디텍 메드(주), ***바이오메드포토닉스(주)
 kbnaam@hallym.ac.kr

시분할 형광 분석법은 발광하는 형광을 통해 시료내의 미량의 물질을 분석 할 수 있는 분석법으로 생화학, 면역학 등 여러 분야에서 응용되고 있으며 새로운 응용 분야에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 본 연구에서는 유리피움(Europium) 화합물을 면역학적 검출기로 사용한 측방유동 시료(lateral flow assay)를 시분할 형광 분석법으로 측정 한 결과를 소개한다.

1. 개요

시분할 형광 분석법 중 pulse fluorometry는 시료를 펄스형 광원을 여기 시킨 후 방출되는 형광의 상대적 세기를 시간에 대하여 측정하여 필요한 정보를 추출한다. 특히 세기가 약할 경우에는 photon counting 기법을 활용하여 그 정밀도를 높일 수 있다. 본 실험에서는 고감도 농도 측정을 목표로 하고 이를 구현하기 위하여 photon counting기법을 활용, 측방유동칩에 고정시킨 단백질에 부착된 유리피움 농도의 측정 한계를 조사하였다.

유리피움 화합물의 형광 수명은 720 μ s로 기타 대부분의 화합물의 수명(10ns 또는 그 이하)과 극명한 대조를 보인다. 본 연구에서는 측방유동용 칩에 알려진 농도의 유리피움 화합물을 배열시키고 이 부위를 Xenon flash lamp 광원으로 조사 하였다.

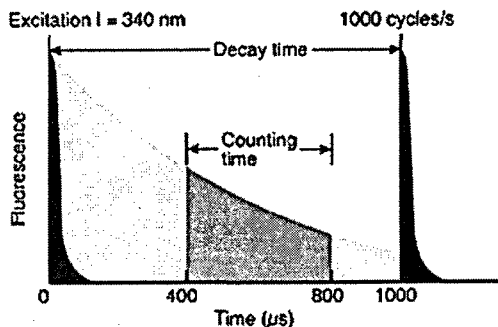


그림1. Eu chelate has a long decay time

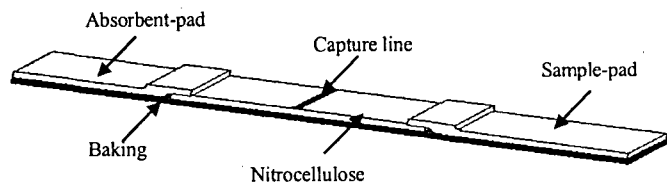


그림2. 측방 유동 분석 칩

측방 유동 분석칩은 그림2와 같은 구조로 되어 있으며, capture line에서 그림3에 보인 바와 같은 Nanoparticle-based immunoassay 방법이 사용된다. 시료를 sample-pad 인가하면 nitrocellulose를 지나면서 capture line에 준비된 항체와 면역 반응을 한 후 absorbent-pad로 이동하여 흡수된다.

광학계의 광원으로는 Xenon flash lamp를 사용하고 검출기는 photon counting용의 PMT를 사용하였다. PMT 출력은 MCS (muti-channe scaler)에서 시간에 따른 photon의 개수의 형태로 나누는 binning 과정을 거치게 된다.

2. 분석

유러피움 화합물과 PSA(Prostate-Specific Antigen)을 같은 양으로 하여 buffer(PBS)와 혼합, 각 농도별로 측정 유동 분석기에 유동시켰다. 그림5는 각 농도별 photon count를 보인 것으로, 400µs에서 800µs 구간 내에 든 photon count의 총 합을 측정 대상으로 이용하였고, 사용한 각 농도별 결과는 표1에 보인 바와 같다.

concentration	40ng/ml	400pg/ml	4pg/ml
total photon	110623	13800	8458

표3. 농도별 photon 개수

이 결과에 의하면 측정유동이 완료된 상태에서도 capture line을 제외한 다른 부분에 non-specific binding의해 잔존하는 유러피움 화합물이 존재함을 확인할 수 있었다. 이런 잔존 화합물을 제거하기 위하여 시료를 세척과정을 거치게 하면 이러한 noise제거가 가능해 진다. 그림6은 이러한 세척과정을 거친 4pg/ml의 시료에 대한 시간별 형광세기를, 표2는 세척과정의 영향을 소개한 것이다.

	배경1	반응띠 상	배경2
세척 전	6315	8487	8784
세척 후	6898	10936	6117

표4. 세척과정에 의한 방출 photon 수의 변화

3. 결론

유러피움 화합물을 사용한 측정 유동기에서의 시분할 형광 측정법이 가능함과 동시에 정량적인 분석이 가능함을 확인하였고, 표2로부터 세척과정을 거쳐 형광 S/N값을 향상시킬 수 있음을 확인하였다. 본 실험에서는 유러피움의 농도를 4pg/ml까지 확인 하였으나 0.5pg/ml까지의 측정도 가능할 것으로 예측되었다.

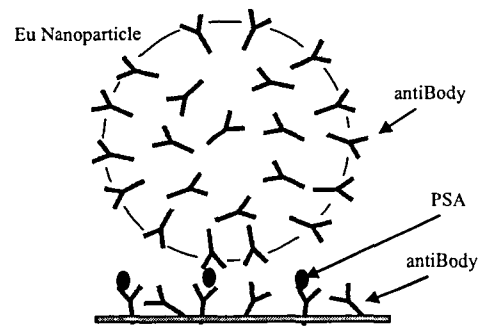


그림3. Nanoparticle-based immuno-assay의 원리

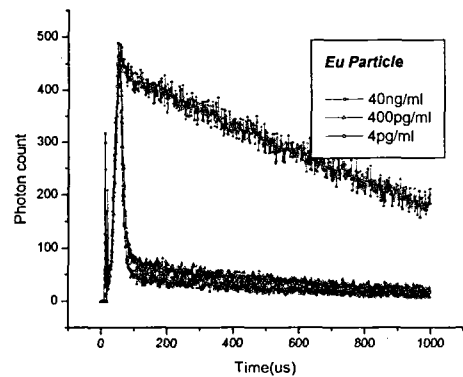


그림4. 농도별 photon count

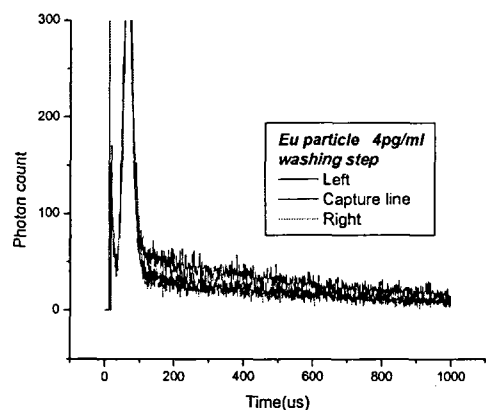


그림5. Eu, 4pg/ml의 형광. 세척과정 적용

