

유러피움을 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)

kbnahm@hallym.ac.kr

시분할 형광 분석법은 시간에 따른 형광의 세기를 측정함으로써 시료내의 물질을 분석 할 수 있는 방법으로 생화학, 면역학 등 여러 분야에서 응용되고 있다.

본 연구는 형광체인 유러피움 화합물(Eu^{3+} chelate)과 결합된 PSA(prostate specific antigen)을 각 농도 별로 측방유동기(lateral flow assay)에 면역반응(immunoassay)을 시킨 후 형광체를 시분할 형광 분석하여 PSA를 정량 분석하며 측방유동기에서의 시분할 분석법을 제시한다.

1. 개요

1) Pulse fluorometry : 시분할 형광 분석법의 Pulse fluorometry는 수학적으로 델타함수에 준하는 $h\nu_{EX}$ 에너지를 분자에 인가 후 방출 되는 광자의 개수를 시간의 함수로 측정 하여 형광 소멸 곡선을 분석 하는 것으로서 Pulse response라고도 한다. 형광 소멸은 곡선은 비율 방정식(Rate equation)에 의해 여기된 분자와 방출될 분자의 일정비율이므로 지수함수이고, 이 지수함수는 시료의 형광 수명 (fluorescence lifetime)과 상대적인 형광 세기(amplitude)를 나타낸다.

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i}$$

($I(t)$: 시간에 따른 형광세기, α : 상대적 세기, τ : 형광소멸시간)

2) Eu^{3+} chelate : 란탄족 화합물인 Eu는 Fluorescence Process를 하지 못하므로 Eu^{3+} chelate 화 하였 고, Eu^{3+} chelate는 $h\nu_{EX}(333\text{nm})$ 와 $h\nu_{EM}(613\text{nm})$ 의 차이인 Stokes shift가 크기 때문에 여기필터와 방출필터의 선정이 매우 용이하다. 그리고 약 1000us의 lifetime은 일반적인 형광체의 lifetime(1~10ns)보다 길기 때문에 실험에 있어서 다른 형광체의 형광 방출을 효율적으로 제거 할 수 있다.

2. 실험

PSA를 희석하여 일정량의 Eu^{3+} chelate 와 mixed 된 시료를 만들어 sample-pad에 인가 하면 absorbent-pad 쪽으로 흐르게 된다. 이때 Nitrocellulose의 capture line에 고착되어 있는 anti-body와 mixed 된 시료가 면역 반응을 통해 결합된다. anti-body, PSA 그리고 Eu^{3+} chelate가

순서대로 샌드위치 결합을 한다. 결합에 참여 하지 못하는 시료는 absorbent-pad에 흡수된다. capture line 에서 면역반응에 의한 PSA와 Eu^{3+} chelate의 양은 비례하므로 Eu^{3+} chelate를 측정 함으로써 PSA를 정량

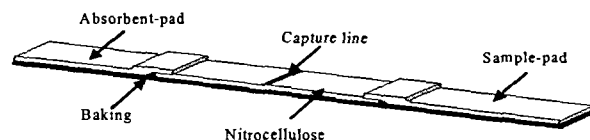


Fig.1. 측방 유동 분석 칩

분석할 수 있다. 10분이 경과되면 시료가 더 이상 흐르지 못하도록 sample-pad와 absorbent-pad를 제거 후 물 분자의 작용으로 인한 형광의 손실을 제거하기 위해 10여분간 건조한다. 이 후 시료를 광학계의 sample stage에 고정 시킨다.

기준 위치에서 pulse light를 75번 반복하며 형광 소멸곡선을 수집하고 0.1mm씩 움직인 후에 같은 방법으로 형광 소멸 곡선을 수집한다. Capture line의 길이가 약 1mm 이므로 Capture line을 포함하여 40번 즉 4mm를 움직이며 scanning을 한다.

Fig.2는 측방유동기를 scanning 한 결과 가장 높은 형광의 분포를 보이는 위치와 가장 낮은 형광의 분포를 보이는 위치의 low data이다. 0~100us 에서는 pulse light에 의한 형광이 검출되고 80~200us 에서는 Nitrocellulose 자체의 형광이 검출 된다. 이런 이유로 noise가 없는 Eu^{3+} chelate만의 방출 형광 데이터의 구간은 400~800us 이고, 이 구간의 photon을 모두 더함으로써 극소량의 Eu^{3+} chelate를 정량 분석이 가능하다.

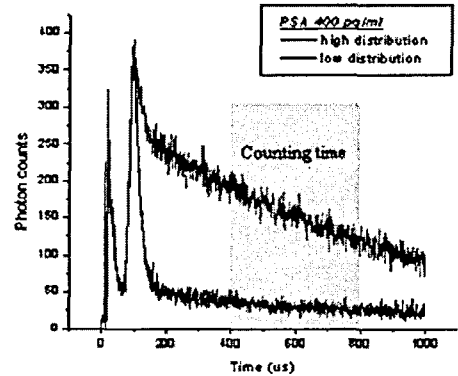


Fig.2. 형광 소멸 곡선

3.결과

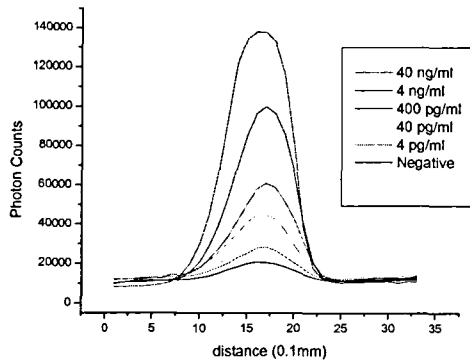


Fig.3. PSA농도별 형광 분포

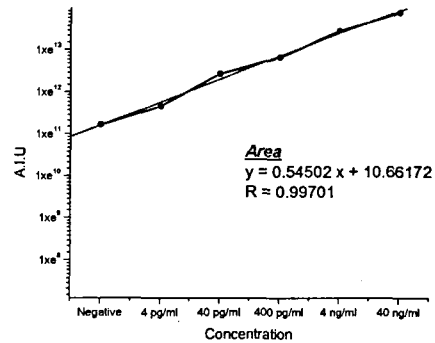


Fig.4. 형광 분포의 농도별 면적

Fig.3은 PSA를 각 농도별로 희석하여 얻은 scanning 데이터이다. 농도가 증가함에 따라 형광의 분포도 증가하고 있음을 알 수 있다. 그리고 Negative는 시료에 PSA가 mixed되어 있지 않은 것으로 nonspecific binding에 의해 Capture line의 anti-body와 결합한 것이 보이고, 모든 결과에서 Capture line이 아닌 곳에서도 Eu^{3+} chelate가 미량 존재 하는 것을 알 수 있다.

Fig.4는 형광분포를 정량화 하기위해 면적을 구한 것이고 로그스케일에서 형광 분포가 농도에 따라 선형임을 보여준다.

4.결론

시분할분석법의 측방유동기에 적용이 가능함을 확인 하였고, pg/ml 영역에서의 정확한 PSA측정이 가능하였다. 그리고 PSA 농도에 대해 선형이 높은 측정 결과로부터 시분할 분석법이 생체관련 분야에서 정확하고 감도 높은 실험이 할 수 있음을 알 수 있다.