

시티딘 정량을 위한 식물조직 센서

印權植 · 鄭鎮甲 · 金基元 · 全泳國*

계명대학교 자연과학대학 화학과

(1991. 7. 20 접수)

Plant Tissue Sensor for Determination of Cytidine

Gwon Shik Ihn, Chin Kap Chung, Bong Weon Kim, and Young Guk Jeon*

Department of Chemistry, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

(Received July 20, 1991)

요 약. 시티딘은 장미조직이 가지고 있는 시티딘 디아미나제에 의해 우리딘과 암모니아 기체를 생성한다. 이 장미조직 50 mg을 암모니아 기체감응센서에 고정시켜 장미조직센서를 제조하고, 수용액 중의 시티딘을 정량하는데 최적 실험조건을 조사하였다. pH 8.4, 온도 37°C, 0.2 M 인산 완충용액을 사용하였을 때 시티딘의 농도가 $7.0 \times 10^{-4} M$ 에서 $1.0 \times 10^{-2} M$ 까지 직선이었고, 53 mV/decade의 감응기울기를 나타내었다. 검출한계는 $3.0 \times 10^{-4} M$ 상대표준편차는 3.4%였다. 또한 이 조직센서는 선택성이 탁월하였다.

ABSTRACT. Rose tissue containing cytidine deaminase converts cytidine to uridine and ammonia gas. Rose tissue sensor was constructed by immobilizing 50 mg of a rose petal tissue on an NH_3 gas sensor and the optimum condition of the sensor for the determination of cytidine was investigated. The tissue sensor showed a linear range of $7.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ cytidine with a slope of 53 mV/decade in 0.2 M phosphate buffer, pH 8.4 at 37°C. The detection limits were $3.0 \times 10^{-4} M$ and relative standard deviation was 3.4%. This sensor showed an excellent selectivity among various nucleosides and amino acids.

서 론

최근 바이오센서는 측정대상에 대한 선택성이 탁월하고 감도가 크기 때문에 아미노산 및 핵산 등 생체 유기물의 직접 정량에 많이 이용되고 있다. 특히 핵산 정량에 바이오센서를 이용한 것도 효소 센서를 사용한 아데노신¹ 정량법, 미생물센서를 이용한 NAD^+ , 시토신⁴, 아데노신⁵ 정량법 및 동식물의 조직을 이용한 조직센서로 아데노신⁶, AMP^{7-9} , 구아닌¹⁰ 정량법이 보고되었다.

한편, 피리미딘 염기인 시토신이 리보오스와 결합한 리보뉴클레오타이드로서 디아미나제에 의해 우리딘과 암모니아 기체로 분해¹¹되는 시티딘 정량은 플라로그래피법^{12,13}, 박테리아 및 오르가넬라센서¹⁴를 이용한 방법만이 보고되었다.

따라서 본 연구에서는 시티딘을 정량하기 위해 아직까지 보고된 바 없는 장미조직을 이용한 식물

조직센서를 제조하여 시티딘 정량에 이용하고자 한다.

실 험

기기 및 시약

기 기. 암모니아 기체센서로는 Orion Research Model 95-12를 사용하였으며, 기전력 및 pH 측정에는 Orion Research Digital pH/millivolt meter 611과 Beckman Model 76 Century SS pH meter를 각각 사용하였다. 항온조는 Forma Scientific Model 2067을 사용하였다. 또한, pore size가 0.3 μm 인 Millipore 제품을 투석막으로 사용하였고, Orion-951204를 기체투과막으로 사용하였다.

시 약. Cytidine, 완충용액으로 사용한 Tris (hydroxymethyl)aminomethane 및 조직이 부패되는 것을 막기 위해 사용한 NaN_3 는 Sigma제 특급

시약을 사용하였다. 또한, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 는 Wako계 특급시약을 사용하였으며, 그 외 아미노산 및 핵산류 등은 Sigma계, Wako계, Fluka 및 Junsei계의 특급시약을 사용하였고, 모든 용액의 제조에는 탈염된 증류수를 사용하였다.

식물조직. 본 실험에서 사용된 장미 품종은 *Sonia(Rosa-hybrida Hort)*로서 화원에서 구입하여 1 mm 간격으로 잘라서 7 psi 압력을 약 450회 가해서 꽃잎의 소수성 부분을 파괴하여 사용하였다.

전극의 조립 및 전위의 측정. Pore size가 0.3 μm 인 투석막과 기체투과막 사이에 잘게 썰어 다진 장미의 꽃잎 부분 50 mg을 놓고, 기존의 암모니아 기체센서(ϕ 7 mm)의 하단부에 부착시켜서 조직센서를 조립한다. 이 센서를 조직이 가지고 있는 암모니아를 제거하기 위해서 4~6시간 동안 0.02% NaN_3 가 포함된 완충용액에 저장한 후, 이 센서를 시료용액 50 ml에 담그고, 용액을 자석젓개로 저어 가면서 기전력을 기록하였다. 이 센서로 시티딘을 전위차법으로 정량하기 위해 가장 좋은 감응특성을 나타내는 pH, 온도, 완충용액, 조직량을 찾고 선택성 및 전극의 수명을 조사하고자 한다.

결과 및 고찰

조직센서의 최적 조건 조사

pH의 영향. 시티딘을 정량하는데 식물조직의 활성이 가장 크게 나타나는 pH를 찾기 위하여 본 센서에 대한 pH의 영향을 조사하였다. 온도 37°C, 장미조직의 양을 50 mg으로 고정시키고, 0.2 M 인산 완충용액의 pH를 7.6에서 8.6까지 변화시켜서 측정 한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과, 모든 pH에서 시티딘의 농도가 $7.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 범위내에서 직선이었으며, 그 중 pH 8.4에서 감응기

울기가 53 mV/decade로서 다른 pH 보다 가장 좋은 감응기울기를 나타내어 최적 pH임을 알 수 있었다. 이 최적 pH는 *Proteus mirabilis* 박테리아센서로 시티딘을 정량할 때의 7.8보다는 약간 높게 나타났으며¹⁴, Walters 등¹⁵이 *Pseudomonas sp.*로부터 정제한 *histidine ammonia-lyase*를 암모니아 가스센서에 고정시켰을 때, 0.05 M Tris-HCl 완충용액의 최적 pH 9.2와 Ma 등¹⁶이 돼지 신장조직으로 glucosamine-6-phosphate를 정량할 때, 0.1 M Tris-HCl 완충용액의 최적 pH 9.25 보다는 낮게 나타났다.

온도의 영향. 본 센서가 시티딘을 분해하는데 온도가 영향을 끼치는지의 여부를 알아보기 위해 측정 용액의 온도를 변화시켜서 감응특성을 다음과 같이 조사하였다. 조직량 50 mg, pH 8.4, 0.2 M 인산 완충용액으로 각각 고정시키고, 측정 용액의 온도를 33°C에서 40°C까지 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 33°C에서 37°C까지는 $7.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 의 같은 직선농도범위를 나타내었고, 감응기울기는 점차 증가하였다. 37°C 이후의 온도에서는 직선농도범위와 감응기울기가 조금씩 감소하는 것으로 나타나 37°C가 최적 온도로 나타났다. 이 최적 온도는 *Proteus mirabilis* 박테리아센서로 시티딘을 정량할 때의 30°C보다는 높게 나타났으며¹⁴, 붉은 장미조직센서의 꽃잎 부분으로 글루타민을 정량할 때의 37°C와는 같은 온도였다¹⁷.

완충용액의 영향. 본 센서로 시티딘 정량에 최적 감응을 나타내는 완충용액을 알아보기 위해 완충용액의 영향을 조사하여 Table 1에 나타내었다. 이 때 각 완충용액에 조직층의 박테리아 오염을 막기 위하여 0.02% NaN_3 를 첨가하였다. Table 1로부터 알

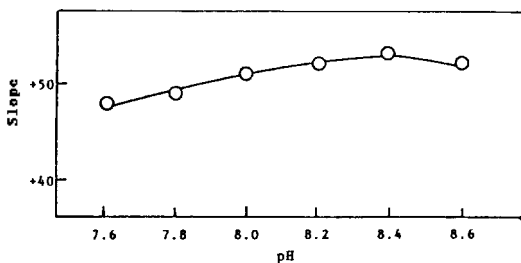


Fig. 1. Effect of pH to cytidine.

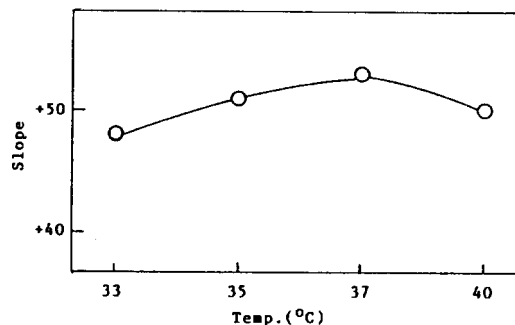


Fig. 2. Effect of temperature on the activity of rose tissue.

Table 1. Effect of buffer on the activity of rose tissue*

Buffer	Linear range (M)	Response slope (mV/decade)
0.05 M phosphate	$7.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$	42
0.1 M phosphate	$7.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$	47
0.2 M phosphate	$7.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$	53
0.2 M Tris-HCl	$8.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$	42

*tested at pH 8.4, 37°C with 50 mg of rose petal tissue.

수 있는 것처럼 최적 감응을 나타낸 0.2 M 인산 완충용액은 0.05 M, 0.1 M 인산 완충용액보다 감응 기울기면에서 우수하였고, 0.2 M Tris-HCl 완충용액은 0.05 M 인산 완충용액의 경우와 비슷하였다. 따라서 0.2 M 인산 완충용액이 최적 완충용액임을 알 수 있었다. 다른 연구자들의 결과를 살펴보면, Gorton 등¹⁸은 glucose를 정량하는데 0.1 M 인산 완충용액을 사용하였고, Mascini 등¹⁹은 nystatin을 정량하는데 *Saccharomyces cerevisiae*를 CO₂ 및 O₂ 가스전극에 고정시켰는데 0.05 M 인산 완충용액을 사용하였다.

조직양에 의한 영향. 본 센서로 시티딘을 정량할 때에 조직의 양이 감응특성에 영향을 끼치는지의 여부를 알아보기 위해 조직 양의 변화에 따른 영향을 조사하였다. Fig. 3에서 처럼 사용한 조직의 양이 30, 40, 50 mg일 때, $7.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ M의 같은 직선농도범위를 나타내었으나, 50 mg일 때 가장 좋은 감응기울기를 나타내었다. 따라서 본 실험에서는 조직의 물질분해능력과 발생된 NH₃ 가스의 내부용액으로 확산되는 속도 등의 상호작용에 의해 50 mg의 조직양을 사용하였을 때 최적 조직양으로 생각할 수 있었다.

시티딘의 검정선

용액 중에서 투석막을 통과하여 조직 층으로 들어간 시티딘은 장미조직이 가지고 있는 효소에 의해 다음과 같이 우리딘과 암모니아 기체로 분해된다¹⁴.

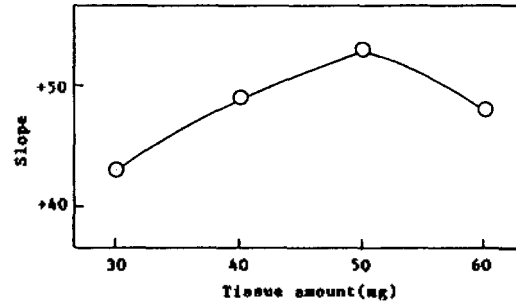
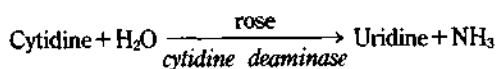


Fig. 3. Effect of tissue amounts on the activity of rose petal tissue.

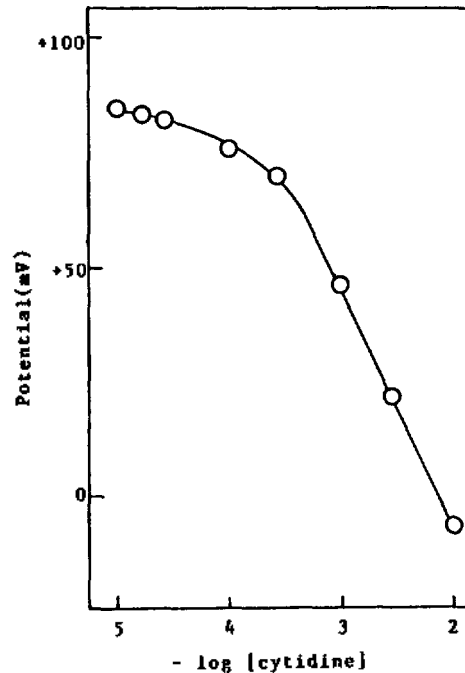


Fig. 4. Calibration curve for the optimum condition to determine the amount of cytidine.

이와 같이 생성된 암모니아 기체는 기체투과막을 통과하여 전극 내부로 들어가서 시티딘 농도에 따라 전위를 변화시킨다¹⁴. 이렇게 하여 구한 시티딘 정량의 최적 실험조건은 pH 8.4, 온도 37°C, 조직량 50 mg, 0.2 M 인산 완충용액이었다. Fig. 4에서 처럼 검정선이 $7.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$ M 시티딘 농도내에서 직선이었고, 감응기울기는 53 mV/decade로서 이 값은 박테리아센서를 이용하여 시티딘을 정량할 때의 56 m/decade보다는 약간 떨어진 값이었으나¹⁴, 오르가넬라센서로 시티딘을 정량할 때의 30 mV/de-

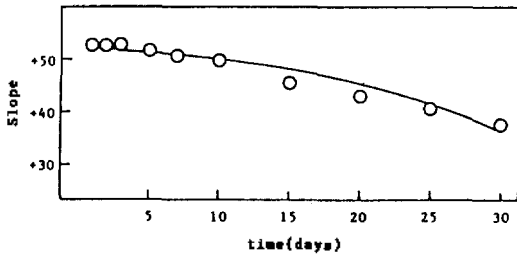


Fig. 5. Lifetime of tissue sensor for cytidine.

cade보다는 훨씬 좋은 감응기울기였다¹⁴.

아미노산과 핵산에 대한 선택성

장미조직센서로써 시티딘을 정량할 때 이 센서의 감응에 방해할 하는 물질을 알아보기 위해 아미노산 및 핵산이 기전력에 미치는 영향을 다음과 같이 조사하였다. $1.0 \times 10^{-3} M$ 의 시티딘 수용액에 각종의 아미노산 및 핵산을 같은 농도가 되도록 첨가시켰을 때 방해하는 기전력의 변화 정도를 ΔmV 로 나타내었다. 그 결과, 아미노산은 전혀 방해할 하지 않았으며, 핵산에서는 아데닌, 아데노신, 시토신, 구아노신, 2'-데옥시시티딘, 2'-데옥시아데노신, 2'-데옥시구아노신 및 요소 중에서 2'-데옥시시티딘만 10 mV 방해하였다. 박테리아센서로 시티딘을 정량하였을 때 대부분의 핵산과 아미노산이 방해할 하였으나¹⁴, 본 조직센서에서는 대부분이 방해할 하지 않았으므로 기존의 어느 센서보다 선택성이 탁월하였다. 최적 조건 선정에서 pH의 영향을 조사했을 때 각 pH에서 감응기울기와 직선농도범위가 별 차이가 없었으므로 pH의 변화에 대한 선택성을 조사해 보았다. 그 결과, pH 8.0 이하에서 글루타민, 구아노신, 2'-데옥시시티딘 및 요소가 방해하였다. 따라서 센서의 선택성이 pH에 크게 영향을 받는 것으로 나타났다.

식물 구성 요소에 따른 activity 측정

본 실험에 사용한 장미 구성 요소의 활성을 측정하여 앞에서 구한 실험의 최적 조건에서 비교하여 보았다. 그 결과, 꽃잎의 경우, 시티딘의 농도가 $7.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 범위내에서 직선이었고, 53 mV/decade의 감응기울기를 나타내었다. 엽신과 악편의 경우는 같은 $8.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 의 직선 농도범위를 나타내었으며, 각각 48, 45 mV/decade의 감응기울기를 나타내었다. 실험결과에서처럼 꽃잎의

경우가 가장 좋은 결과를 나타내어 이 조직을 이용하였다. Uchiyama 등²⁰은 국화꽃잎을 사용하여 urea를 정량하였고, 카네이션의 꽃잎과 꽃바침을 사용하여 urea를 정량한 바 있다²⁰.

전극의 수명

본 센서를 어느 기간까지 유용하게 사용할 수 있는지 알아보기 위해 앞에서 측정한 최적 실험조건에서 30일 동안 4°C로 전극을 보관하면서 감응특성을 조사하였다. Fig. 5로부터 알 수 있는 것처럼 10일까지는 직선농도범위가 변화가 없었으나, 그 후에는 다소 좁아졌고, 시간이 지남에 따라 감응기울기는 조금씩 감소하였다. 본 장미조직센서는 시티딘 정량에 사용한 오르가넬라센서의 3일¹⁴보다는 길게 나타났으나, 박테리아센서를 이용했을 때의 20일¹⁴보다는 짧게 나타났다.

결 론

본 연구에서는 장미조직 구성성분 중에서 꽃잎부분을 이용하여 식물조직 센서를 개발하고, 수용액 중의 시티딘을 정량할 수 있는 최적 실험조건을 조사하였다. 최적 실험조건은 pH 8.4, 온도 37°C, 조직의 양 50 mg 및 0.2 M 인산 완충용액이었다. 이 조건에서 정량할 수 있는 시티딘의 직선농도범위는 $7.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$, 감응기울기는 53 mV/decade였으며, 검출한계 및 상대표준편차는 각각 $3.0 \times 10^{-4} M$, 3.4%(6회)였다. 시티딘 정량에 방해하는 물질로는 2'-데옥시시티딘 뿐으로서 선택성이 탁월한 장점이 있었으며, 10일까지는 좋은 감응을 나타내었다.

인 용 문 헌

1. I. Deng and C. Enke, *Anal. Chem.*, **52**, 1937 (1980).
2. C. R. Bradley and G. A. Rechnitz, *ibid.*, **56**, 664 (1984).
3. T. L. Riechel and G. A. Rechnitz, *J. Membr. Sci.*, **4**, 243 (1978).
4. G. S. Ihn and B. W. Kim, *J. Kor. Chem. Soc.*, **32**(4), 333 (1988).
5. G. S. Ihn, B. W. Kim, and Y. G. Jeon, *J. Kor. Soc. Anal. Sci.*, **2**(1), 29 (1989).

6. M. A. Arnold and G. A. Rechnitz, *Anal. Chem.*, **53**, 515 (1981).
7. M. A. Arnold, *ibid.*, **53**, 1837 (1981).
8. M. A. Arnold and J. A. Flocchi, *Anal. Lett.*, **17**, 2091 (1984).
9. M. A. Arnold, *Anal. Chem.*, **54**, 777 (1982).
10. D. S. Papastathopoulos and G. A. Rechnitz, *ibid.*, **48**, 862 (1976).
11. M. Taribana, "Interrelationship of nucleotide metabolism in mammalian tissues, Protein, Nucleic acid and Enzyme", Vol. 14, p. 1310, 1969.
12. Y. M. Remerk and P. Valenta, *J. Electroanal. Chem. Interfacial. Electrochem.*, **214**, 391 (1986).
13. M. M. Kamal, Y. M. Temerk, and M. E. Ahmed, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **16**(3), 485 (1986).
14. G. S. Ihn, J. S. Kim, Y. G. Jeon, and B. W. Kim, *J. Kor. Chem. Soc.*, **35**(1), 38 (1991).
15. R. R. Walters, P. A. Johnson, and R. P. Buck, *Anal. Chem.*, **52**, 1684 (1980).
16. Y. L. Ma and G. A. Rechnitz, *Anal. Lett.*, **18**(B13), 1635 (1985).
17. G. S. Ihn, B. W. Kim, and Y. G. Jeon, *J. Kor. Chem. Soc.*, **34**(6), 622 (1990).
18. L. Gorton and K. M. Bhatti, *Anal. Chim. Acta*, **225**, 293 (1989).
19. M. Mascini, A. Memoli, and F. Olana, *ibid.*, **200**, 237 (1987).
20. S. Uchiyama and G. A. Rechnitz, *Anal. Lett.*, **20**(3), 451 (1987).