

Wistar 쥐 조직을 이용한 L-Glutamine 바이오센서

裴眞賢[†] · 崔誠文 · 林東俊[†] · 金宜洛*

啓明大學校 自然科學大學 化學科

[†]嶺南大學校 工科學 工業化學科

(1993. 12. 9 접수)

The Biosensor for L-Glutamine Using Tissue Slices of Wistar Rat

Jin-Hyun Bae[†], Sung-Moon Choi, Dong-Joon Lim[†], and Ui-Rak Kim*

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

[†]Department of Industrial Chemistry, Yeungnam University, Gyongsan 713-900, Korea

(Received December 9, 1993)

요 약. Wistar계 쥐의 신장 조직을 암모니아 기체 감응전극에 고정화하여 조직센서를 제작하고, L-glutamine을 정량하기 위한 최적 조건을 조사하였다. 그 결과, 30°C, pH 7.8의 0.05 M 인산완충용액과 30 µm 두께의 신장을 사용하였을 경우, 정량 가능한 직선범위는 $8.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 이었으며, 감응도는 53.8 mV/decade로 나타났고, 감응시간은 3~5분 소요되었다. 또한 같은 최적 조건하에서 조직을 파쇄하여 얻은 세포 소기관을 전극에 고정화시킨 센서의 경우, 정량 가능한 직선범위는 $1.2 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-3} M$ 이었으며, 감응도는 54.0 mV/decade, 감응시간은 6~7분이 소요되었다. 이와 같이 본 연구에서는 쥐의 신장 조직 및 세포 소기관을 이용하여 L-glutamine을 정량 분석할 수 있는 조직센서 개발에 관하여 연구하였다.

ABSTRACT. A biosensor for the measurement of L-glutamine has been constructed by immobilizing the slice of Wistar rat kidney and its organelle on NH_3 gas-sensing electrode. The effects of pH, buffer solution, temperature and thickness of slice were investigated in order to optimize electrode response. The tissue sensor had the linearity in the range of L-glutamine concentration $8.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ with a slope of 53.8 mV/decade in 0.05 M phosphate buffer solution, pH 7.8 at 30°C, and optimum thickness of slice and response time were 30 µm and 3~5 min, respectively. The organelle sensor showed the linearity within L-glutamine concentration range of $1.2 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-3} M$ with a slope of 54.0 mV/decade in 0.05 M phosphate buffer solution, pH 7.8 at 30°C, and response time was 6~7 min, respectively. Thus, it is clear that the tissue and organelle sensor will be useful for L-glutamine measurements.

서 론

바이오센서(biosensor)¹는 수용기(receptor)와 변환기(transducer)로 구성되어 있다. 수용기는 측정하고자 하는 특정 생체관련물질인 기질을 인식하는 생체기능성 소자인 효소, 항원, 항체, 세포내 소기관, 미생물, 조직 등을 물에 녹지 않는 고분자막으로 고정화²시켜 이들을 변환기에 연결시켜 만든 것이며, 변환기는 생체기능성막이 인식한 신호를 전기적 신

호로 변환시키는 소자 또는 장치이다.

바이오센서는 생체기능성 소자를 중심으로 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 즉 하나는 생축매 바이오센서(biocatalytic biosensor)로서 효소센서^{3,4}, 미생물 센서⁵, 조직센서^{6,7}, 세포 소기관 센서⁸가 여기에 속하며, 다른 하나는 선택적 친화성을 가지는 분자인 식막을 이용하는 생체친화성 바이오센서(bioaffinity biosensor)로서 항원, 항체를 이용하는 면역센서⁹,

receptor 센서, DNA 센서가 여기에 속한다. 변환기에는 전기화학적 원리를 이용한 이온 및 가스 전극과 반도체 소자인 ISFET(ion-selective field-effect transistor)^{9,10}, 열검출용 소자인 thermistor^{11,12}, 광검출용 소자인 optical fiber¹³, 그리고 음파검출용으로 SAW(sound acoustic wave) 소자 등이 있다.

바이오센서의 측정원리는 생체기능성 소자가 기질과 반응한 후 소비 또는 생성되는 물질의 농도변화를 전극과 같은 변환기로 정량하는 것을 기초로 하며, 체액, 폐수, 발효액 등의 시료액에서 목적하는 성분을 분리시키지 않고 신속하게 그리고 반복하여 측정할 수 있는데 그 특징이 있다.

현재 산업화되었거나 개발 중인 바이오센서는 대부분 경제성이 좋은 의료용이 주류를 이루고 있으나, 센서 기술이 보다 널리 응용되면 발효공업, 환경평가 등 다양한 분야에서 폭넓게 활용될 수 있을 것으로 전망되고 있다.

1960년대에 효소센서가 처음으로 연구된 이래 바이오센서는 용도에 따라 소형화와 대량화를 하기 위하여 연구되고 있으며, 최근에는 효소의 안정화를 증진시키기 위하여 유전자 조작에 의하여 만든 효소를 센서에 응용하는 기술이 보급되고 있다. 분자 인식기능 단백질로 효소와 항원, 항체 등을 이용하는 경우에는 선택성이 좋은 반면, 추출, 정제하는데 어려움이 많고, 정제된 효소나 항원, 항체의 구입가격이 비싸다는 단점이 있다. 한편, 미생물, 조직 그리고 세포내 소기관을 이용하는 경우에는 필요한 분자 인식물질 이외에 다른 인식물질도 함께 존재하므로 선택성이 좋지 않은 단점이 있으나, 이들을 분리 정제할 필요가 없으며, 안정하고, 제작 가격이 싸며, 조작이 간단한 장점이 있다.

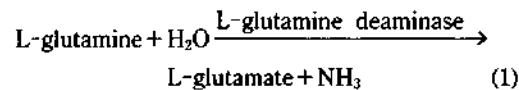
반도체 이온 센서의 경우에는 빠른 감응과 집적 회로를 사용하므로써, 소형화와 대량생산, 체내응용이 가능하나, 좁은 gate 표면에 효소를 고정화하는데 어려움이 있고, 압전기(piezo-electric) 전극^{14,15}의 경우는 용액상에서 측정의 어려움이 있으므로, 이러한 점을 해결하기 위하여 많은 연구들이 진행 중에 있다.

본 연구에서는 쥐의 조직을 암모니아 기체 감응 전극에 고정화시켜, 20가지 아미노산 용액의 감응도를 측정하고, L-glutamine이 가장 선택성이

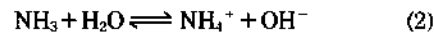
높았으므로, 쥐의 조직을 이용하여 L-glutamine을 정량하기 위한 센서 개발을 위하여, pH, 완충용액, 온도 및 두께의 영향, 전극의 안정성에 대하여 연구하였으며, organelle을 추출하여 만든 센서와 비교하였다.

이 론

L-glutamine은 조직내에 포함된 L-glutamine deaminase의 작용으로 식 (1)과 같이 가수분해되어 암모니아 기체가 발생한다.



여기서 발생된 암모니아 기체는 기체 투과성막을 통과하여 내부충전용액에서 다음과 같은 반응이 진행된다.



$$\frac{[\text{NH}_4^+][\text{OH}^-]}{[\text{NH}_3]} = \text{constant} \quad (3)$$

식 (3)에서 내부충전용액은 NH_4Cl 가 높은 농도로 포함되어 $[\text{NH}_4^+]$ 이 일정하게 유지되므로 $[\text{NH}_4^+]$ 은 상수로 간주할 수 있고, 식 (4)로 나타낼 수 있다.

$$[\text{OH}^-] = \text{constant} \cdot [\text{NH}_3] \quad (4)$$

즉, 바이오센서의 전위는 Nernst 식¹⁶에 대입하므로서 다음과 같은 식 (5)로 나타낼 수 있다.

$$E = E^\circ - S \log[\text{OH}^-] \quad (5)$$

여기서 S는 감응 기울기(response slope)이며, $[\text{OH}^-]$ 는 식 (4)에서처럼 $[\text{NH}_3]$ 에 비례하므로 식 (6)으로 나타낼 수 있다.

$$E = E^\circ - S \log[\text{NH}_3] \quad (6)$$

여기서 E° 는 표준전극전위이다. 따라서 전체전위 E는 $[\text{NH}_3]$ 에 따라 변하게 된다. 이와 같이 NH_3 의 발생은 L-glutamine의 양과 정량적으로 비례하므로 전위값은 L-glutamine양에 비례하게 된다.

실 험

기기 및 시약. 본 실험에 사용된 기기로서, pH 측정과 전위차 측정을 위한 pH Meter는 Orion Expandable Ionanalyser EA 920을 이용하였으며, 암모니아 기체 감응전극은 Orion Model 9512BN을 일정한 온도를 유지하기 위한 항온장치를 LKB 회사의 Bromma 2209의 Multi-Temp.를 조직의 두께를 조절하여 자르기 위한 냉동절단기는 Bright Crystal/microtome model FS/FAS/212을 사용하였다. 그리고 세포 소기관 추출¹⁷을 위한 냉동 원심분리기는 Centrikon T-124(Kontron Instruments)을 사용하였다.

본 실험에 사용된 조직은 Wistar계 쥐의 신장(kidney)과 간(liver)을 이용하였으며, 아미노산은 Sigma Chemical Co. 제품을, 완충용액을 제조하기 위한 시약은 Junsei Chemical Co. 제품을, 기타 시약은 Wako 및 Fisher계 특급 시약을 사용하였으며, 모든 실험은 탈염된 2차 증류수를 사용하였다.

조직 및 세포 소기관 센서의 구성. Fig. 1은 본 연구에서 이용한 센서의 구조를 나타낸 것이다. Pore size가 $0.3\ \mu\text{m}$ 인 투석막 위에 -60°C 이하의 deep freezer에 보관된 조직과 기체 투과성막을 차례로 놓은 후, 이것을 암모니아 기체 감응전극의 하단부에 부착시키고, 내부충전용액을 채워 조직 센서를 구성하였으며, 세포 소기관 센서는 조직 대신 조직을 파쇄하여 원심분리하여 분획한 세포 소기관을 이용하여 위와 같은 방법으로 센서를 구성하였다. 이렇게 조립된 조직 및 세포 소기관 센서를 L-glutamine이 포함된 시료용액에 담그고, 안정된 전위값을 읽었다.

세포 소기관 추출^{18,2}. 세포 소기관은 고도로 기능이 집약된 분자 집합체이고, 조직화된 복합 효소계로 구성되어 있다. 따라서 세포 소기관을 이용한 일련의 효소 특이반응을 이용하여 분자를 식별할 수 있다. 세포 소기관인 mitochondria, lysosome, cytosol 등에는 효소를 많이 포함하고 있으므로, 이들을 다공성 고분자막에 흡착 고정하거나 고분자 gel 막 위에 포괄 고정화하여 분자식별 소자로 이용할 수 있다. 이들 세포 소기관 고정화막과 변환기를 조합한 것이 세포 소기관 센서이다. 이들 세포 소기관 추출은 다음과 같은 방법으로 하였다.

Wistar계 흰쥐(200~250 g/마리, ♂)를 24시간 먹

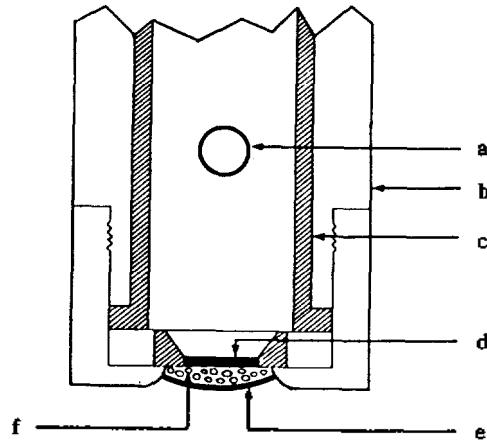


Fig. 1. Schematic diagram of the tissue sensor. a, reference electrode; b, outer body; c, internal electrolyte; d, gas-permeable membrane; e, dialysis membrane; f, tissue layer.

이를 주지 않은 후 회복하여 얻은 신장을 Teflon-pestle Wheaton Elvehjem 조직 파쇄기를 이용하여 파쇄하고, 10 mM tris-HCl 완충용액(pH 7.4)을 함유한 0.25 M sucrose 용액으로 10%(w/v) 파쇄액을 만든 후, $600\times g$ 에서 원심분리하여 분획(nuclei and cell debris)을 얻었고, 상층액을 $10,000\times g$ 에서 15분간 원심분리하여 얻은 침전물(mitochondrial fraction)을 일정량의 10 mM tris-HCl 완충용액(pH 7.4)을 함유한 sucrose 용액에 분산시켰다. 상층액을 다시 $12,000\times g$ 로 15분간 원심분리하여 얻은 침전물(lysosome fraction)을 위와 같은 sucrose 용액에 분산시킨 후, 상층액을 다시 $105,000\times g$ 로 60분간 원심분리하여 얻은 침전물(cytosol fraction)을 10 mM 인산완충용액(pH 7.40)에 분산시켰다.

결과 및 고찰

조직 센서(Tissue sensor)

신장과 간조직의 아미노산에 대한 선택성 측정. Wistar계 쥐의 신장과 간조직을 냉동절단기로 50 μm 의 두께로 절단하여 조직센서를 구성하여 10^{-3} M의 20가지 아미노산에 대하여 선택성을 조사하여 Table 1에 나타내었다.

그 결과 10^{-3} M의 20가지 아미노산 가운데 L-glutamine이 가장 높은 전위차값을 보였으므로 Wis-

Table 1. Response of the tissue electrode to amino acids

Amino acids ($10^{-3} M$)	Potential difference (ΔmV)	
	Kidney	Liver
Proline	0.1	0.4
Cysteine	4.2	1.7
Asparagine	0.5	7.9
Glutamic acid	0.3	1.7
Alanine	0.7	3.2
Aspartic acid	0.1	1.1
Glutamine	52.9	32.5
Leucine	0.5	3.0
Tryptophan	0.1	0.8
Valine	0	0
Histidine	0.1	0.8
Methionine	0.5	2.9
Serine	0.5	4.7
Isoleucine	0.2	0.3
Lysine	0.4	6.0
Phenylalanine	0.3	0.5
Glycine	0.1	5.2
Threonine	0.1	0.1
Tyrosine	0	0.1
Arginine	0.1	8.1

tar계 쥐의 간과 신장 조직에는 L-glutamine deaminase가 있음을 알았다. 그러나, 간조직은 신장조직에 비해 다른 아미노산에도 약간의 감응을 보이므로 L-glutamine에 대한 선택성이 떨어짐을 알 수 있었다. 본 연구에서는 L-glutamine을 정량하기 위한 실험으로 선택성 및 감응이 뛰어난 센서를 제작하기 위하여 Wistar계 쥐의 신장 조직을 이용하였다.

L-Glutamine 정량에서의 pH의 영향. L-glutamine에 대한 조직센서의 pH 변화에 따른 영향을 보기 위하여 0.05 M 인산완충용액에서 온도를 30°C로 고정시키고, pH를 각각 6.8, 7.0, 7.4, 8.0으로 변화시키면서 감응도를 조사하여 Fig. 2에 나타내었다.

그 결과 pH 6.8과 7.0에서 $8.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간(linear range)을 얻었으며, 감응도(response slope)는 45.4 mV/decade, 감응시간은 5~7분과 5~8분 소요되었다. pH 7.4에서는 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간을 가지며 감응도는 49.0 mV/decade, 감응시간은 3~5분 소요하였다. pH 7.8에서는 $8.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간을 얻었

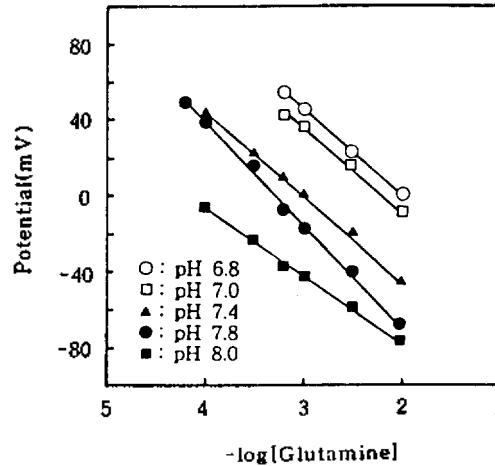


Fig. 2. The effect of pH on the L-glutamine response curves at 30°C in the 0.05 M phosphate buffer solution.

으며 감응도는 53.8 mV/decade, 감응시간은 3~5분 소요되었다. pH 8.0에서는 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간을 가지며, 감응도는 38.0 mV/decade, 감응시간은 5~6분 소요하였다. 이들 결과로부터, pH 7.8에서 Nernst식은 이론치인 59.1 mV/decade에 가장 가까운 감응도를 보이므로 L-glutamine의 정량에 대한 모든 실험은 pH 7.8에서 행하였다.

L-glutamine 정량에서 온도의 영향. L-glutamine에 대한 조직센서의 온도변화에 따른 영향을 보기 위하여 pH 7.8의 0.05 M 인산완충용액을 이용하여 온도를 20, 25, 30와 35°C로 변화시키면서 감응도를 조사하여 Fig. 3에 나타내었다.

그 결과 20°C 일 때 $8.0 \times 10^{-4} \sim 2.0 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간을 얻었으며 감응도는 40.0 mV/decade, 감응시간은 4~6분 소요되었다. 25°C에서는 $8.0 \times 10^{-4} \sim 3.0 \times 10^{-2}$ 의 직선구간에서 45.0 mV/decade의 감응도를 보였으며, 감응시간은 4~6분 소요되었다. 30°C 일 때는 $8.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간을 얻었으며, 감응도는 53.8 mV/decade, 감응시간은 3~5분 소요되었다. 35°C에서는 $4.0 \times 10^{-4} \sim 10^{-2} M$ 의 영역에서 직선구간을 얻었으며, 감응도는 43.0 mV/decade, 4~7분의 감응시간이 소요되었다. 위의 결과를 종합하여 볼 때 30°C에서 가장 좋은 감응도를 보이므로 L-glutamine의 정량에 대한 모든 실험은 30°C에서 행하였다.

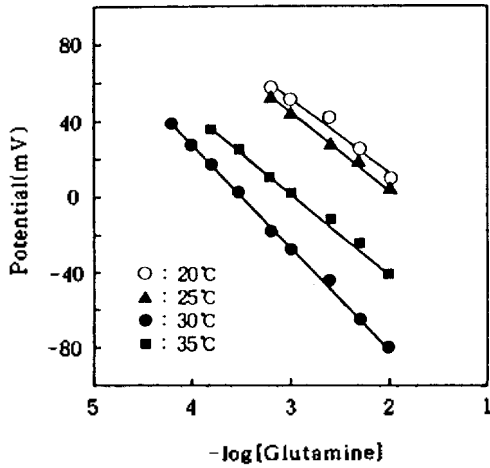


Fig. 3. The effect of temperature on the L-glutamine response curves at pH 7.8 in the 0.05 M phosphate buffer solution.

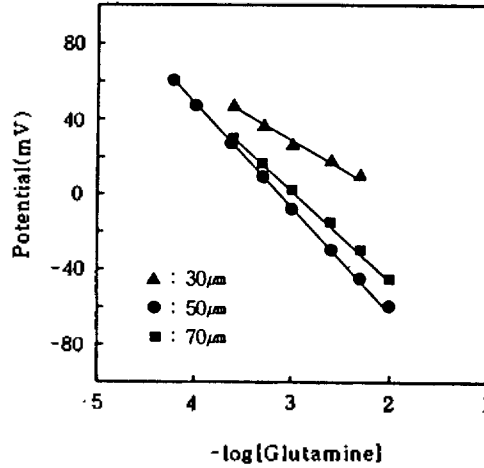


Fig. 5. The effect of tissue thickness on the response of L-glutamine sensor at pH 7.8 and 30°C in the 0.05 M phosphate buffer solution.

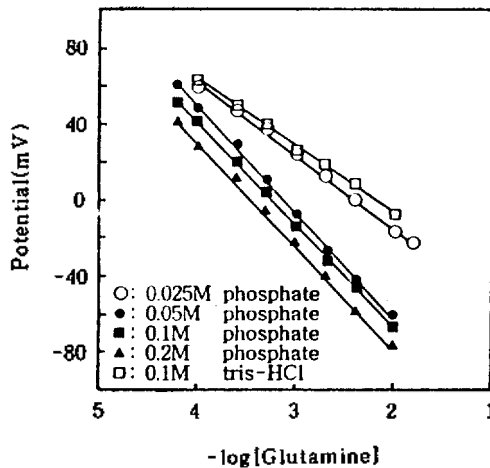


Fig. 4. The effect of various buffer solution on the L-glutamine response curves at pH 7.8 and 30°C.

L-glutamine 정량에서의 완충용액의 영향. L-glutamine에 대한 조직센서의 완충용액의 변화에 따른 영향을 보기 위하여 pH 7.8, 온도를 30°C로 고정시키고, 인산완충용액의 농도를 각각 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 M로 변화시켜 감응도를 조사하였으며, 또 0.1 M tris-HCl 완충용액을 사용하여서도 감응도를 조사하여 Fig. 4에 나타내었다.

그 결과, 가장 좋은 감응을 보인 것은 0.05 M 인산완충용액을 사용하였을 경우이며, 이때 $8.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간을 얻었으며, 감응도

는 53.8 mV/decade, 감응시간은 3~5분 소요되었다. 0.025 M 인산완충용액을 사용하였을 경우에는 $1.0 \times 10^{-4} \sim 2.3 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간을 얻었으며, 감응도는 46.2 mV/decade, 3~5분의 감응시간이 소요되었다. 0.1 M과 0.2 M 인산완충용액을 사용하였을 경우에는 $8.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2} M$ 의 직선구간을 얻었으며, 감응도는 51.5 mV/decade와 52.4 mV/decade, 3~5분의 감응시간이 소요되었다. 한편 0.1 M tris-HCl 완충용액에서는 직선구간에 따른 감응도 값이 33.0 mV/decade로서 매우 저조하였으며, 감응시간 또한 6~7분 소요되었다. 위의 결과로써 tris-HCl 완충용액은 인산완충용액보다 감응도가 떨어지고, 감응시간도 많이 소요됨을 알 수 있었다.

L-glutamine 정량에서 조직의 두께에 의한 영향. 조직의 두께는 감응시간에 큰 영향을 미치므로, 빠른 분석을 위해서는 얇은 막이 필수적이거나 장기 안정성도 고려되어야 하므로 가장 적합한 두께를 얻는 것이 중요하다. 그러므로 0.05 M 인산완충용액, pH 7.8, 온도를 30°C로 고정시키고, 두께를 30, 50, 70 μm로 변화시키면서 감응도를 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

그 결과, 30 μm 두께의 조직을 이용하였을 때 $4.0 \times 10^{-4} \sim 6.0 \times 10^{-3} M$ 에서 직선구간을 얻었으며, 감응도는 42.0 mV/decade, 감응시간은 3~5분 소요되었다. 50 μm 두께의 조직을 이용하였을 때 $8.0 \times$

Table 2. Effect of inorganic salts on tissue electrode to L-glutamine at pH 7.8 and 30°C in the 0.05 M phosphate buffer solution

Substances ^a	Response (mV)	Δ mV
KCl	-12.4	0
KNO ₃	-12.4	0
Na ₂ C ₂ O ₄	-12.4	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	+2.4	-14.8
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-12.4	0
Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	-12.4	0
K ₄ Fe(CN) ₆ ·6H ₂ O	-12.4	0
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	-12.4	0
Na ₂ NO ₃	-8.3	-4.1
None ^b	-12.4	0

^a1.0×10⁻³ M inorganic salts added to 1.0×10⁻³ M L-glutamine, ^bpure 1.0×10⁻³ M L-glutamine.

10⁻⁵~1.0×10⁻² M의 직선구간을 얻었으며, 감응도는 53.8 mV/decade, 감응시간은 3~5분 소요되었다. 70 μm 두께의 조직을 이용하였을 때 5.0×10⁻⁴~1.0×10⁻² M의 직선구간을 얻었으며, 감응도는 47.0 mV/decade, 감응시간은 6~7분 소요되었다. 여기서 조직의 두께가 얇은 경우에는 감응도가 떨어지며 두꺼운 경우에는 감응시간이 다소 길어졌다. 이들 결과로서 조직의 두께가 50 μm에서 가장 좋은 감응도를 나타내므로 L-glutamine의 정량에 대한 모든 실험은 50 μm 두께의 조직을 이용하였다.

방해 물질의 영향. 조직센서를 이용하여 L-glutamine을 정량할 때, 각종 무기염류가 감응에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1.0×10⁻³ M의 L-glutamine 용액을 기준물질로 하고 각종 무기염류를 1.0×10⁻³ M 농도로 첨가시켰을 때, 전위값을 측정하고 전위차(Δ mV)를 구한 값들을 Table 2에 나타내었다. 이때 측정 조건은 L-glutamine을 정량할 때의 조직센서의 최적조건인 0.05 M 인산완충용액, pH 7.8, 온도 30°C, 조직의 두께 50 μm이었다.

그 결과 (NH₄)₂SO₄와 Na₂CO₃를 제외한 무기염류는 감응에 아무런 영향을 주지 않았다. 그러나 (NH₄)₂SO₄와 Na₂CO₃의 경우 이 물질들은 단백질을 응고시키는 물질로서 알려져 있으며 이런 것들은 효소 단백질을 응고시키기 때문에 감응도가 떨어진 것으로 생각된다. 본 신장 조직에 의한 바이오센서는 이외의 다른 무기염류의 존재하에서도 L-gluta-

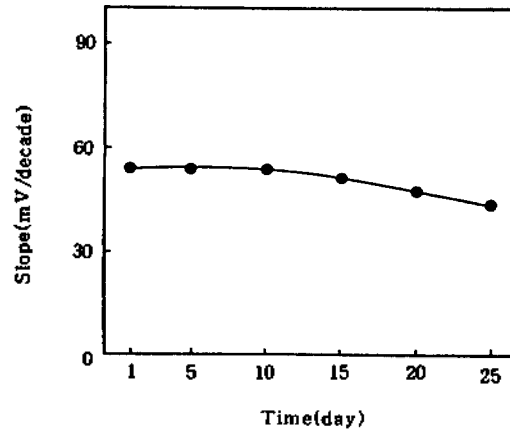


Fig. 6. Long-term stability of the tissue sensor for L-glutamine.

mine을 정확하게 정량할 수 있다.

센서의 안정성. 본 실험에서 제작한 L-glutamine 정량을 위한 조직센서로서 시간 경과에 따른 안정성을 조사하기 위하여 25일 동안 4°C, 0.05 M 인산완충용액에 센서를 보관하면서 최적 실험 조건으로 감응도를 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. 1일째의 경우, 8.0×10⁻⁵~1.0×10⁻² M의 직선구간을 보였고, 감응도는 53.8 mV/decade, 감응시간은 3~5분이 소요되었으며, 15일까지는 감응도가 거의 일정하게 유지되었으나, 그 이후부터는 직선영역은 같았지만, 감응도는 47.1 mV/decade, 43.5 mV/decade로 점차 떨어졌으며 감응시간도 6~8분이 소요되었다. 이것은 시간이 경과함에 따라 조직내 효소의 활성이 조금씩 저하되기 때문인 것으로 생각된다. 그러므로 본 실험에 이용된 조직센서는 15일 이내에서는 일정한 감응도를 유지할 수 있어서 유용하게 L-glutamine 정량에 이용할 수 있다.

세포 소기관 센서(Organelle sensor)

Fraction에 따른 선택성 측정. Wistar계 쥐의 신장 조직을 파쇄, 원심분리하여 세포 소기관(mitochondria, lysosome, cytosol)을 추출하여 세포 소기관 센서를 제작하고, fraction에 따른 감응도를 조사하여 Table 3에 나타내었다.

그 결과 mitochondrial fraction에 의한 L-glutamine 전극에서 전위차가 76.0 mV의 가장 좋은 감응을 보였다. 이것은 mitochondrial fraction이 lysosome fraction과 cytosol fraction보다 L-glutamine

Table 3. Response of L-glutamine sensor by various fractions of organelle

Fraction	Potential (mV)		Potential difference (Δ mV)
	Buffer solution	$10^{-3}M$ L-glutamine	
Mitochondria	30.8	-45.2	76.0
Lysosome	30.8	-26.1	56.9
Cytosol	30.8	25.6	5.2

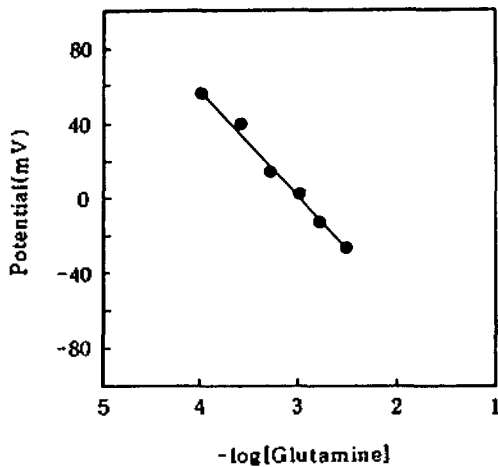


Fig. 7. Response of mitochondrial sensor to L-glutamine.

deaminase가 많이 존재하는데 기인한 것으로 생각된다. 그래서 L-glutamine 정량을 위한 세포 소기관 센서는 mitochondrial을 이용하여 제작한 센서로서 감응특성을 조사하였다.

L-glutamine에 대한 organelle(mitochondrial) 센서의 감응특성. 세포 소기관은 조직을 분쇄하여 내용물을 추출하므로 조직 자체보다 효소가 융합되어 있다. 그러므로 Wistar계 쥐의 신장 조직을 파쇄, 원심분리하여 mitochondria를 추출해서 세포 소기관 센서를 제작하고 30°C , pH 7.8의 0.05 M 인산완충 용액에서 L-glutamine에 대한 감응특성을 조사하여 Fig. 7에 나타내었다.

그 결과 $1.2 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-3} M$ 의 직선구간을 얻었으며, 감응도는 54.0 mV/decade, 감응시간은 6~7분 소요되었다. 또한 전극의 안정성을 조사한 결과, 8일 동안 감응도가 일정하게 유지되었으나, 조직센서의 안정성에 비하여 짧았으므로 세포 소기

Table 4. Comparison of tissue and organelle sensor in response characteristics for L-glutamine

	Tissue sensor	Organelle sensor
Response slope (mV/decade)	53.8	54.0
Linear range (M)	$8.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-3}$
Response time	3~5	6~7
Stability	15 days	8 days

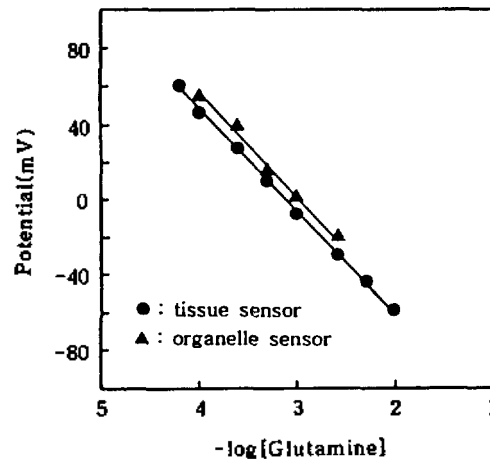


Fig. 8. Response of comparison of L-glutamine sensor.

관내 효소의 활성을 안정하게 유지시키는 방법이 고안된다면 조직센서와 더불어 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

조직 센서와 세포 소기관 센서의 비교. Wistar계 쥐의 신장내의 mitochondria를 추출해서 세포 소기관 센서를 제작하고, 이것을 조직센서와 비교한 결과를 Table 4와 Fig. 8에 나타내었다.

그 결과 세포 소기관 센서를 조직센서와 비교할 때, 감응도는 비슷하지만 직선범위가 좁고, 감응시간이 많이 소요되었다. 특히 센서의 안정성을 비교하였을 때 조직센서는 15일, 세포 소기관 센서는 8일간 안정성이 유지되었다. 이것은 효소가 조직내에 자연상태로 유지되어 있으므로 효소의 활성이 안정하게 유지되기 때문이라고 생각된다. 그리고 세포 소기관 센서 제작시에는 mitochondrial fraction을 추출하는 번거로운 점도 있으므로 L-glutamine을 쉽고 간단하게 정량하기 위한 바이오센서는 쥐의 신장을

이용한 조직센서가 유용함을 보여주었다.

본 연구에서는 Wistar계 쥐의 신장 조직을 암모니아 기체 감응전극에 고정화시켜서 조직센서를 제작하고, 이 센서로써 L-glutamine을 정량하기 위한 최적 실험 조건을 조사하였다. 아울러 조직을 파쇄, 원심분리하여 얻은 세포 소기관을 전극에 고정화시킨 세포 소기관 센서의 감응특성에 대하여도 연구하였다.

L-glutamine 정량을 위한 조직센서의 최적조건은 30°C, pH 7.8의 0.05 M 인산완충용액과 두께가 50 μm 인 신장 조직을 사용한 경우였다. 이 조건에서 $8.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ 의 직선구간을 얻었으며, 감응도는 53.8 mV/decade, 감응시간은 3~5분 소요되었다. L-glutamine에 대한 방해물질은 무기염 중에서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와 Na_2CO_3 만이 약간의 감응을 억제시켰으며, 제작된 센서로서 센서의 안정성을 조사한 결과, 15일 동안 안정성을 유지하였다.

세포 소기관 센서는 30°C에서 pH 7.8, 0.05 M 인산완충용액을 사용하였을 때, $1.2 \times 10^{-4} \sim 5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ 의 직선구간에서 54.0 mV/decade의 감응도와 6~7분의 감응시간을 보였으며, 8일 동안 안정성을 유지하였다.

이상의 결과로서 L-glutamine을 정량하기 위한 하나의 방법으로 Wistar계 쥐의 신장 조직을 이용한 조직센서로도 쉽고 간단하게 정량분석할 수 있음을 알았다.

본 연구는 한국과학재단의 ERC 연구 계획에 의하여 수행된 것으로 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

1. Guibault, G. G. *Analytical uses of immobilized enz-*

yme; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1984; p 77~204.

2. Woodward, J. *Immobilized cells and enzyme*; IRL Press: Oxford, Washington, D. C., 1985; p 67~74.
3. Hikuma, M.; Obana, H.; Yasuda, T.; Kurube, I.; Suzuki, S. *Anal. Chim. Acta* **1979**, *109*, 33.
4. Matsunaga, T.; Karube, I.; Suzuki, S. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1980**, *18*, 235.
5. Giaever, I. *J. Immunology* **1973**, *110*, 1424.
6. Rechnits, G. A.; Aronld, M. A.; Meyerhoff, M. E. *Nature* **1979**, *278*, 466.
7. Arnold, M. A.; Rechnita, M. E. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1170.
8. Aizawa, M.; Wada, S.; Kato, S.; Suzuki, S. *Biotechnol. Bioeng.* **1980**, *22*, 1769.
9. Caras, S.; Janata, J. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1935.
10. Matsuo, T.; Esashi, M. *Sensors and Actuators* **1981**, *1*, 77.
11. Daniesson, B.; Mattiasson, B.; Karlsson, R.; Wingvist, F. *Biotechnol. Bioeng.* **1979**, *21*, 1749.
12. Fuiton, S. P.; Cooney, C. L.; Weaver, J. C. *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 505.
13. Arnold, M. A. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 565.
14. Carey, N. P.; Kowalski, B. R. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 541.
15. Ngwainbi, J. N.; Foley, P. H.; Kuan, S. S.; Guibault, G. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5444.
16. Atkins, P. W. *Physical Chemistry*, 3rd Ed.; Freeman, W. H. and Company: New York, 1986; p 258~267.
17. Ihn, G. S.; Kim, B. W.; Sohn, M. J.; Kim, I. T. *J. Kor. Chem. Soc.* **1988**, *32*, 323.
18. Hak, C. H.; Chung, N. J. *Korean Biochem. J.* **1986**, *19*, 351.
19. Chung, N. J.; Eog, S. O. *Korean Biochem. J.* **1989**, *22*, 312.