

Membrane strip을 이용한 지질단백질 Cholesterol 측정시스템의 개발

신 인 수 · †백 세 환

고려대학교 자연과학대학 생물공학과

Development of Membrane Strip Assay System for Lipoprotein Cholesterol

In-Soo Shin and Se-Hwan Paek †

Dept. of Biotechnology, College of Natural Sciences and Technology, Korea University,
Chochiwon, Chungnam 339-700, Korea

ABSTRACT

To develop a home-version assay system for plasma lipoprotein cholesterol, variables that can control the assay performance were optimized. The system was constructed by using two major components: nitrocellulose membrane strip with immobilized enzymes (cholesterol esterase, cholesterol oxidase, and horseradish peroxidase); and sample carrier solution containing non-ionic detergent (Triton X-100) and chromogen (3,3'-diaminobenzidine). Once a sample combined with the carrier was absorbed from the bottom of the strip, cholesterol was delivered by capillary action to the immobilized enzymes and a sequential reactions took place. In the final reaction, the chromogen was oxidized and then generated a color as signal that was proportional to the concentration of cholesterol. The signal intensity was enhanced by optimizing conditions for the immobilization of enzymes and the chemical composition of carrier. Under these conditions, a dose-response curve was obtained and revealed a high sensitivity enough to measure the cholesterol in blood.

서 론

인체 내 cholesterol은 각 조직을 형성하는 세포막의 주요 구성성분이며 steroid 호르몬의 선구체이다. 그러나 cholesterol이 과량으로 존재하여 그 혈중 농도가 높아지면 혈관벽에 혈전과 지방 등의 침착을 유발시킬 수 있다. 이러한 현상이 진전됨에 따라 혈관벽에 플라그가 형성되고 혈관이 좁아지거나 유연성을 잃는 동맥경화증세가 나타난다. 대표적인 증세로써 혈압상승과 관상동맥심장병(coronary heart

disease)인 심근경색이 유발될 수 있다(1, 2).

소수성성질을 지닌 cholesterol 분자는 수용액에 불용성이므로 혈장 지질단백질에 의해 혈관을 통해 운반된다 (3). 지질단백질은 입자형태로써 그 내부는 한개의 지방산이 첨가된 cholesterol 유도체인 cholesteryl ester와 triglyceride를 포함하며 그 표면은 phospholipid, cholesterol, 그리고 단백질로 구성된다. 종류에 따라 일부 지질단백질은 cholesterol을 조직으로 공급하는 역할을 하며 반면에 다른 일부는 과잉농도로 국부에 존재하는 cholesterol을 간으로 운반하여 제거하는 기능을 한다 (1,3). 그러나 여러 가지 요인에 의해 간에서의 화학대사가 감소될

† Corresponding Author

경우, 지질단백질에 의한 혈중 cholesterol 농도의 조절기능은 저하되어 그 농도가 증가될 수 있다. 그 농도는 또한 달걀과 육류 등 cholesterol 함유식품의 섭취량에 비례하여 증가될 수 있다.

혈중 cholesterol 농도는 화학적 방법, chromatography 방법, 그리고 효소분석법에 의해 측정될 수 있다(4-6). 첫 두 방법들은 비교적 긴 측정시간을 요구하거나 화학물질 등 인체에 해로운 성분을 사용하여야 하는 단점을 갖는 반면에, 효소분석법은 수행이 간편하고 신속할 뿐만 아니라 또한 효소센서와 같은 전기화학적 시스템을 도입할 경우 측정자동화가 가능하다는 장점을 부여한다. 더욱이 효소분석법은 다른 방법들에 비해 측정민감도가 높아 병원이나 연구실험실에서 널리 사용되고 있다(6).

현재 사용되고 있는 일반적인 효소분석법은 microwell과 같은 용기 내에서 수행되고 발색된 신호세기는 spectrophotometer를 이용하여 측정되는 실험실 위주의 운용체계이다. 그러나 cholesterol과 지방이 다량 함유된 식품의 섭취가 늘면서 혈중 cholesterol의 고농도에 기인하는 혈관질환의 증가에 따라 그 농도를 가장에서 간편하게 측정할 필요성이 요구되고 있다. 그러므로, 전문지식이 없는 일반인이 사용할 수 있도록 조작이 쉽고, 단시간 내에 결과를 얻을 수 있어야 할 뿐만 아니라, 또한 경쟁력있는 가격조건을 갖추기 위해 기기를 사용하지 않는 측정시스템의 개발이 요구된다(7, 8).

효소반응법을 기초로 하고 임신진단시약에서와 같이 membrane strip(8, 9)을 이용한 가정용 cholesterol 측정시스템의 개발을 시도하였다. 위에서 언급된 바와 같은 분석성능을 성취하기 위해 membrane 표면에 효소들을 부동화하였고 시료는 운반용액과 혼합한 후 membrane 내로 흡수시켜 모세관현상에 의해 야기되는 유체의 이동상태에서 효소반응을 수행하였다. 본 논문에서는 가정용 시스템의 개발을 위해 효소의 부동화조건과 화학성분들의 조성에 대한 최적조건이 결정되었고 또한 그 조건 하에서 측정성능이 시험되었다.

Membrane strip을 이용한 측정원리

혈중 cholesterol의 측정은 일반적으로 다음과 같은 세 다른 효소들의 순차적 반응에 의해 수행된다(6).

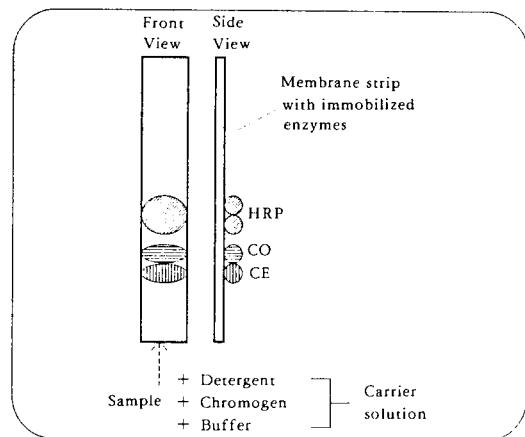
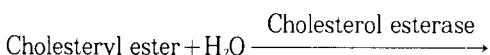
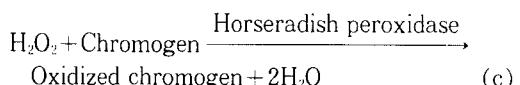
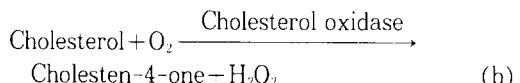
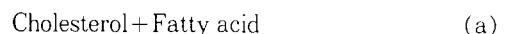


Fig. 1. Two major components of a membrane assay system for lipoprotein cholesterol. One is a membrane strip with immobilized enzymes: cholesterol esterase (CE), cholesterol oxidase (CO), and horseradish peroxidase (HRP). The other is sample carrier solution containing detergent, chromogen, and buffer.



혈중에 존재하는 지방산이 첨가된 cholesteryl ester는 지방산 분해효소인 cholesterol esterase(CE)에 의해 분해되어 cholesterol이 생성된다(a). 생성된 cholesterol은 산화효소인 cholesterol oxidase (CO)의 기질로 작용하여 cholesten-4-one과 H_2O_2 로 분해된다(b). 마지막으로, 적절한 발색물질의 존재 하에서 H_2O_2 는 효소 horseradish peroxidase (HRP)에 의해 분해되고 그 결과로써 발색물질은 산화된다(c). 선택된 발색물질은 일반적으로 환원상태에서 무색이지만 산화되면 특정색을 띠게 되고 이색의 세기는 흡광도로써 측정된다. 발색세기는 총 cholesterol의 농도에 비례하므로 측정된 흡광도에 의해 혈중 cholesterol 농도가 정량된다.

위에서 설명된 순차적 효소반응은 세공성 membrane을 이용하면 효율적일 뿐만 아니라 시약을 첨

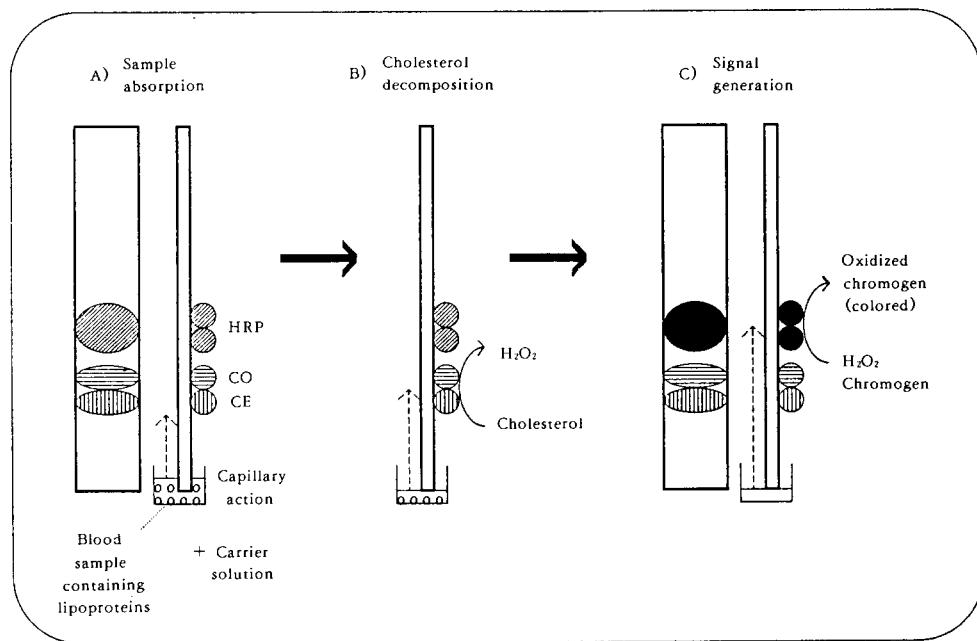


Fig. 2. A principle of lipoprotein cholesterol measurement by using the membrane system. A blood sample combined with the carrier is absorbed from the bottom of the membrane strip and the aqueous mixture is migrated upward by capillary action (A). Once the mixture reaches the sites of immobilized CE and CO, a sequential reactions take place and hydrogen peroxide is then produced (B). In the presence of this product, HRP oxidizes chromogen and a color is generated as signal that is proportional to the cholesterol concentration (C).

가하거나 제거함이 없이 편리하게 수행될 수 있다. 이와 같은 성능을 얻기 위한 측정시스템은 다음과 같은 2 주요성분으로 구성된다(Fig. 1 참조). 첫째로, 측정에 요구되는 3 효소들이 부동화된 membrane strip이다. 세로로 긴 membrane 표면에 하단으로부터 CE, CO, 그리고 HRP가 순서대로 공간적으로 분리되어 부동화된다. 둘째로, 혈액시료의 운반체로써 세척제와 발색물질이 함유된 완충용액이다. 세척제는 지질단백질 입자를 과괴하여 cholesteroyl ester를 방출시키는 역할을 한다. 이러한 두 성분으로 구성된 측정시스템의 작동원리는 다음과 같다(Fig. 2 참조). 지질단백질이 포함된 혈액시료와 시료운반체를 혼합한 후, 효소들이 부동화된 membrane의 하단을 시료-혼합액에 담그면 수용액은 membrane 내로 흡수되고 모세관현상에 의해 CE가 부동화된 지역으로 전달된다(Fig. 2A). 이 효소와의 반응에 의해 생성된 cholesterol은 유체의 흐름에 따라 CO 지역으로 이동되고 분해반응 결과로써 H_2

O_2 가 발생된다(Fig. 2B). 이 생성물이 다음 지역의 HRP 층에 도달되면 발색물질의 존재 하에서 마지막 효소반응이 야기된다. 결국 최종반응에 의해 산화된 발색물질은 membrane 표면에 침착되어 육안으로 식별이 가능한 발색을 띠게 된다(Fig. 2C). 이와 같이 효소가 부동화된 membrane을 이용하면 다수의 효소반응이 단시간 내(10분 정도)에 간편하게 수행될 수 있고 그 분석결과를 육안으로 확인할 수 있을 뿐만 아니라 장기간 보존이 가능하다.

재료 및 방법

재료

CE(bovine pancreas로부터, 28.2 units/mg; EC 3.1.1.13), CO (Pseudomonas fluorescens로부터, 4.8 units/mg; EC 1.1.3.6), HRP (275 units /mg; EC 1.11.1.7), 지질단백질 cholesterol 표준 용액, 그리고 Triton X-100가 Sigma사(미국)로

부터 구입되었다. Nitrocellulose(NC) membrane ($8\mu\text{m}$ pore size)과 3,3'-diaminobenzidine (DAB)은 Whatman사(미국)와 Calbiochem사(미국)로부터 각각 구입되었다. 그외 다른 모든 시약들은 분석용급으로 사용되었다.

효소가 부동화된 membrane strip의 제조

가정용 cholesterol 측정시스템의 주요 구성성분을 준비하고자 NC membrane strip($5 \times 45\text{mm}$) 상에 효소들을 물리흡착에 의해 부동화하였다. 재현성있는 부동화를 성취하기 위해 먼저 membrane을 10% methanol 용액에 5분간 적신 후 탈이온수로 3번 세척하여 전처리하였고 공기 중에서 1시간 동안 건조하였다. 140mM NaCl을 포함하는 10mM sodium phosphate 완충용액(PBS)과 glycerol이 동일한 부피비율로 혼합된 용액(PBS-glycerol)에 용해된 $5\text{mg}/\text{ml}$ CE와 같은 농도로 제조된 CO를 1:4의 비율로 섞은 후 전처리된 membrane strip의 하단으로부터 5mm와 10mm 지역에 각각 $2\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 흡수시켰다. PBS-glycerol 용액에 용해된 $2\text{mg}/\text{ml}$ HRP 효소용액 $2\mu\text{l}$ 를 membrane 하단으로부터 20mm 지역에 흡수시켰다. 효소가 흡수된 membrane은 100% 습도가 유지되는 상자 내에서 1시간 동안 배양되었다. 그 후 잔여표면 처리를 위해 0.5% casein이 함유된 PBS에 담가 1시간 동안 상온에서 배양하였고, 탈이온수로 3번 세척 후 1시간 동안 건조하였다. 이와 같이 처리된 membrane은 양면테이프를 이용하여 polyethylene film 위에 접착되었다.

시료운반용액의 제조

분석시료를 운반시키고 또한 cholesterol 분석에 요구되는 성분들을 포함시키기 위한 운반용액이 제조되었다. 50mM acetate 완충용액(pH 5.1)에 Triton X-100을 가하여 1%(v/v)로 조절하였고 DAB는 $1.25\text{mg}/\text{ml}$ 농도가 되도록 첨가하였다. 신호증폭을 위해 NiCl_2 와 CoCl_2 를 운반용액 내에 부가하여 각각 0.03%(w/v)로 조절하였다. 또한 membrane 세공을 통한 용액의 이동속도를 적절히 감소시키기 위해 polyethylene glycol(분자량 8,000)을 5%(w/v) 농도로 추가하였다.

지질단백질 cholesterol 분석과정

제조된 구성성분들을 이용한 cholesterol 분석과정은 다음과 같다. 지질단백질 cholesterol 표준용액시료 $10\mu\text{l}$ 와 시료운반용액 $30\mu\text{l}$ 를 microwell 용기 내

에 넣은 후 membrane strip의 하단을 그 용기 내의 용액에 담가 세웠다. Membrane 내로 흡수된 용액은 위로 이동하여 10분 이내에 상단 끝에 도달하였고, 그 membrane을 꺼내어 얹어진 발색신호를 video image analyzer를 이용하여 정량하였다. 발색된 membrane을 video 사진기(CCD camera) 아래 놓고 monitor(Hi-tron, 흑백, 하이트론시스템즈) 화면을 보면서 위치와 촛점을 조절한 다음 personal computer에 내장된 scanning board와 software(Biomed Instruments Inc., 미국)를 이용하여 membrane image를 포착하였다. 포착된 image는 분석프로그램(2D Archive programs, Advanced American Biotechnology, 미국)을 이용하여 타원형의 발색부분이 모두 포함되도록 분석부위를 선택한 후 발색세기에 비례하는 적분치인 optical density로 전환되었다.

최적 부동화조건의 결정

Membrane 상에 부동화된 효소로부터 최대신호를 발생시키고자 부동화조건이 변화되었다. 위에서 설명된 membrane strip 제조조건 중 시험변수로써 전처리방법, CE와 CO 혼합효소의 농도, 그리고 membrane 표면에 가한 효소의 배양조건과 시간이 선택되었다. 첫째로, 전처리를 위해 위에서와 같이 membrane을 10% methanol로 적신후 탈이온수로 세척하는 방법과 단지 탈이온수로만 세척하는 방법이 비교되었다. 둘째로, 효소용액농도의 변화에 따른 부동화된 양을 시험하고자 CE와 CO를 무게비율로 1:4로 혼합한 후 총 효소농도가 $1\sim 5\text{mg}/\text{ml}$ 이 되도록 PBS-glycerol 용액으로 희석하여 membrane 표면에 가하였다. 세째로, 표면에 가해진 효소의 배양 조건을 시험하기 위해 공기 중 배양과 100% 습도가 유지되는 상자 내 배양방법이 비교되었고 또한 배양시간은 15~120분 범위에서 변화되었다. 그 외 언급되지 않은 실험조건들과 분석과정은 위에서 설명된 바와 동일하게 사용되었다.

최적 시료운반용액 조성의 결정

시료운반용액 내 세척제와 발색물질의 농도 그리고 완충용액의 몰농도와 산성도가 발생된 신호세기에 대해 시험되었다. 위에서 제시된 시료운반용액의 제조방법 중에서 세척제인 Triton X-100의 농도는 0.1~10% (v/v) 범위에서 변화되었고 발색물질인 DAB는 $0.625\sim 6.25\text{mg}/\text{ml}$ 농도범위에서 시험되었다. 예비실험에 의해 DAB로부터 발생된 signal-to

-noise 비는 산성조건에서 우수한 것으로 규명되었으므로, pH 4.5와 5.1로 조절된 완충용액을 사용한 결과들이 비교되었고 그 몰농도는 50~150mM 범위에서 변화되었다. 별도로 설명하지 않은 조성조건 및 분석과정은 위에서 제시된 바와 같다.

성능시험

최적조건 하에서 제조한 membrane strip과 시료운반용액(위 제조조건 참조)으로 구성된 측정시스템의 성능이 평가되었다. 첫째로, 측정하한농도를 결정하기 위해 지질단백질 cholesterol 표준용액을 이용하여 농도응답곡선을 구하였다. 이를 위해 시료 내 cholesterol 농도를 10~400mg/dl 범위로 조절한 다음 위에서 언급된 분석과정에 따라 수행하였다. 둘째로, 제조된 membrane 상에 부동화된 효소들의 안정성을 시험하였다. 위 제조방법에 따라 구성된 membrane strip을 6시간 동안 공기 중에서 건조시킨 후 선조제가 포함된 상자 내에 넣고 -4°C에서 보관하였다. 건조 혹은 보관 중 안정성을 시험하기 위해 시간에 따라 시료분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

전문지식이 없는 일반인이 가정에서 간편하게 사용할 수 있는 혈중 cholesterol 측정시스템이 membrane strip을 이용하여 구성되었다. 위에서 설명된 바와 같이, 측정시스템의 주요 구성성분은 효소들이 부동화된 membrane과 시료운반용액이다. 첫번째 성분에서, 효소 부동화모체로써 nitrocellulose (NC) membrane이 선택되었다. NC membrane은 cellulose에 nitrate가 결합된 소수성 잔기를 포함하므로 물리흡착방법에 의해 쉽게 효소들을 부동화시킬 수 있다 (10). 또한 그 내부의 세공들이 비교적 균일하여 모세관현상이 일정하게 일어날 뿐만 아니라 필요에 따른 세공크기의 선택범위도 넓다. 두번째 성분에서, 시료운반용액은 분석에 요구되는 필수물질인 비이온세척제와 발색물질을 포함한다. 세척제는 cholesterol의 운반체인 지질단백질입자를 파괴시켜 그 내부의 분석물질인 cholesteryl ester와 cholesterol을 방출시키는 역할을 하며 본 실험에서는 Triton X-100이 효과적으로 사용되었다 (6). 효소 HRP의 기질인 발색물질로써 membrane 세공을 통한 이동성과 신호발생 민감도가 비교적 우수한 3,3'-diaminobenzidine (DAB)가 선정되었다 (11, 12). 이와 같은 성분들로 구성된 cholesterol 측정시스-

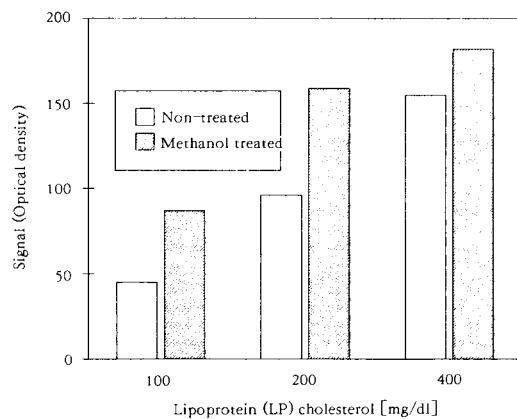


Fig. 3. Effect of methanol treatment of nitrocellulose (NC) membrane on the assay performance. Treatment of NC membrane with 10% methanol before enzyme immobilization resulted in an increased signal.

템의 성능을 조절할 수 있는 각 변수들의 물리적 그리고 화학적 조건들을 최적화하였고, 그 조건 하에서 검출한계 및 시스템의 안정성을 시험하였다.

변수 최적화

일정 cholesterol 농도에서 측정시스템으로부터 발생되는 발색신호세기는 부동화된 효소들의 밀도와 활성도에 비례한다. 효소활성도는 노출된 환경에 매우 민감하게 반응하여 부동화된 상태와 수행경로에 의해 영향을 받을 수 있을 뿐만 아니라 용액 내 화학성분들에 의해 변화될 수 있다. 그러므로 신호세기를 증가시키기 위해 membrane 상에 효소의 부동화조건과 시료운반용액의 화학적조성이 변화되었다.

종이막의 전처리

NC membrane은 빛과 습기에 노출정도 등 보관상태에 따라 소수성성질이 변할 수 있으므로 효소의 재현성있는 부동화를 성취하기 위해 전처리를 수행하였다(13, 14). 이를 위해 구입 후 6개월 간 보관된 membrane을 10% methanol 용액에 적신 후 탈이온수로 세척하여 사용하였고 그 결과가 단지 탈이온수로만 세척한 경우와 비교되었다(Fig. 3). 사용된 지질단백질 cholesterol 농도범위에서, 전처리된 membrane을 사용하면 처리되지 않은 경우보다 신호발생량이 17~93% 증가되는 것으로 나타났고

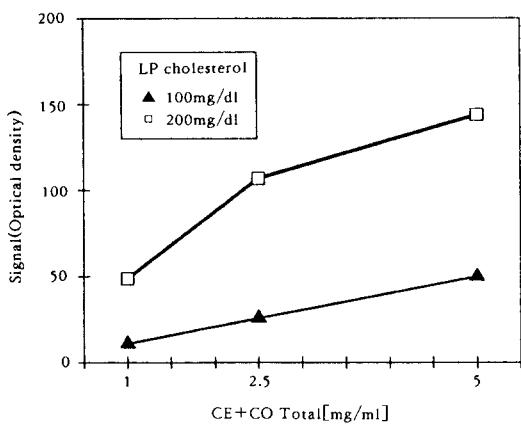


Fig. 4. Determination of optimal concentration of CE and CO immobilized on the membrane. The mixture of enzymes prepared in 1:4 (CE:CO weight ratio) was used to apply onto the membrane. The signal intensity from the membrane strip system was increased in proportion to the enzyme concentration in the selected range. Maximum concentration allowed was 5mg/ml of total enzymes and this condition was used in the following experiments.

신호량의 증가폭은 낮은 cholesterol 농도에서 더 높았다. 이러한 결과는 methanol 처리에 의해 membrane의 소수성성질이 강화되었고 따라서 단백질분자와의 결합력이 증가되어 부동화된 효소량이 많아졌기 때문으로 해석된다(10). 이와 같은 methanol 전처리방법을 사용하므로써 membrane의 보관기간에 따른 영향이 최소화되어 비교적 재현성있는 실험 결과를 얻을 수 있었다.

부동화된 CE와 CO 혼합효소의 농도

일정 기질농도 하에서, cholesterol의 반응속도는 사용된 CE와 CO의 농도에 비례되므로 그 최적농도를 결정하기 위해 membrane 상에 부동화된 효소량이 변화되었다. 본 실험실에서 수행된 예비실험에 따르면, 두 효소를 Fig. 1에서와 같이 공간적으로 분리시켜 부동화한 경우와 두 효소를 1:4의 무게비율 (신호세기에 대한 최적비)로 혼합하여 같은 공간에 사용한 결과를 비교하였을 때 발생된 신호세기들 간에 차이가 없었으므로 편의상 후자조건을 선택하였다.

이러한 효소혼합방법은 연쇄반응을 위한 반응물의 이동거리가 단축되므로 특히 많은 효소량을 요구하는 콜레스테롤 고농도범위에서 유리할 것으로 예측된다. 부동화된 CE와 CO의 효소밀도는 부동화에 사용될 혼합효소용액의 농도에 의해 조절되었고 세번째 효소 HRP는 과량으로 부동화되었다(Fig. 4). 측정시스템으로부터의 신호발생량은 혼합효소농도에 비례하여 증가되는 것으로 나타났다. 이 결과는 비교적 높은 효소용액의 농도범위(1~5mg/ml)에서 부동화된 효소의 밀도가 포화될 것이라는 예측과 상반되었다. 이것은 효소 회석용액으로 50% glycerol이 포함된 완충용액이 사용되어 부동화 효율이 낮아졌기 때문인 것으로 추가실험에 의해 규명되었다. 참고로, 50% glycerol이 포함된 완충용액은 효소를 -20°C에서 얼리지 않은 상태로 장기간 보관하기 위해 사용되었다.

Membrane strip을 이용한 cholesterol 측정시스템에서는 microwell 등을 사용하는 회분식 시스템에서와는 달리 기질을 포함한 유체의 이동상태에서 효소반응이 일어난다. 회분식 시스템에서는 기질과 효소 간에 충돌 반응할 기회가 일정시간 동안 주어지는 반면에 membrane 시스템에서는 유체의 이동에 따라 부동화된 효소층으로 전달된 기질은 효소와 충돌시 결합반응하지 않으면 기질은 유체에 의해 이송된다. 따라서 일정 신호세기를 얻기 위해 회분식 시스템에서는 비교적 적은 양의 효소가 사용될 수 있지만 membrane 시스템에서는 고밀도로 부동화된 효소의 사용이 필수적이다. 그러므로 아래 제시된 모든 실험조건에서 CE와 CO 혼합용액의 농도는 경

제적으로 사용가능한 최대농도인 5mg/ml이 사용되었다.

부동화를 위한 효소의 배양조건과 시간

효소는 일반적으로 노출된 환경조건에 매우 민감하여 용액 내의 화학적조성 예를 들어 산성도와 억제물질의 존재 여부에 따라 활성도가 크게 변할 뿐만 아니라 온도와 같은 물리적 변화에도 영향을 받는다 (15). 이러한 민감한 효소의 부동화 시 그 조건에 따라 활성도의 변화가 예측되었으므로 단백질용액을 membrane 표면에 가한 후 배양조건과 시간이 시험되었다(Fig. 5). 배양조건으로 편의상 선택할 수 있는 공기 중 배양과 100% 습도가 유지되는 상자 내 배양방법이 효소활성도에 대해 비교되었다. 이와 같은 두 조건 하에서 부동화된 효소를 비교적 낮은 농

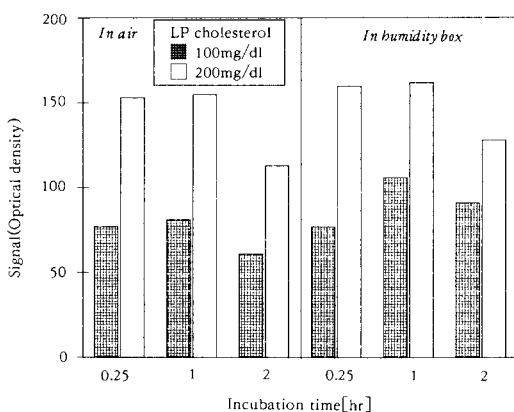


Fig. 5. Determination of optimal conditions for the enzyme immobilization. Two conditions were varied: incubation condition and time. After applying enzyme solution to the membrane, enzymes were incubated in air or in a 100% humidity box. The latter was more favorable for the maintenance of enzyme activities. Regardless of different incubation modes, the optimal incubation time was 1h.

도의 cholesterol(100mg/dl)과 반응시킨 결과를 보면, 15분간 배양시 차이가 없었으나 배양시간이 증가함에 따라 공기 중 배양조건에서 효소활성도가 상대적으로 현저히 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 membrane 표면에 가한 효소용액이 공기 중에서 점차 증발함에 따라 효소를 둘러싼 수분의 양이 감소되어 비활성화되기 때문으로 보고된 바 있다 (14). 농도가 2배 높은 cholesterol을 반응시킨 결과에서도 발생된 신호량의 감소폭에 있어서 다소 차이는 있었지만 비슷한 양상이 얻어졌다. 참고로, 효소의 비활성화는 효소가 부동화된 membrane을 casein과 같은 비반응성 단백질로 처리 후 보관할 경우 현저히 감소될 수 있다(Fig. 10 참조). 이것은 효소분자가 다른 단백질분자와의 공존시 접촉에 의한 구조적 안정 혹은 공기 중 산화작용으로부터의 보호에 의한 것으로 예측된다.

배양시간에 대한 신호세기의 변화를 보면, 두 다른 배양조건에서 최적 배양시간은 모두 1시간인 것으로 나타났다. 부동화모체로써 membrane의 사용 시, 매우 적은 부피의 효소용액($2\mu\text{l}$)이 membrane 표면에 가해지고 또한 그 표면적이 매우 넓기 때문

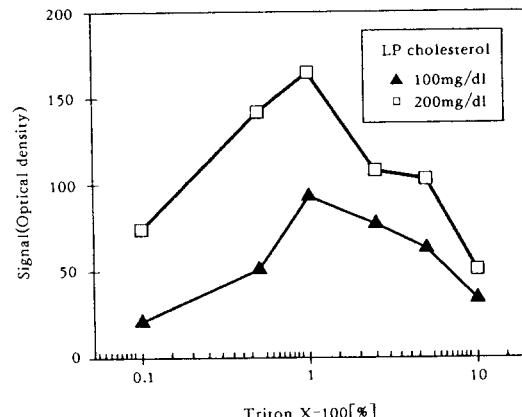


Fig. 6. Determination of optimal concentration of Triton X-100 in the carrier solution. The optimal concentration was 1% which was significantly higher than that in a conventional system. This result reflected that the detergent is not required only for the destruction of lipoproteins, but also for the facilitation of cholesterol migration through membrane pores (see text for details).

에 효소분자가 물리흡착되기 위한 표면까지의 확산거리는 짧아 흡착평형상태에 도달하는 시간은 일반적으로 15분 이내이다. 그러나, 본 실험에서 효소를 용해시키기 위해 50% glycerol이 포함된 점도가 매우 높은 용액이 사용되었고(위에서 언급된 내용 참조), 따라서 이러한 용액 내에서 효소분자의 확산속도는 현저히 감소되어 일반적인 경우보다 최대흡착밀도에 도달되기 위해 필요한 배양시간이 증가된 것으로 판단된다.

시료운반용액 내 세척제 농도

효소반응의 전단계로써 지질단백질 입자 내에 포함된 cholesterol을 용액으로 방출시키기 위해 세척제가 사용되었다. 비이온세척제인 Triton X-100가 선택되었고 신호발생세기에 대한 그 농도의 영향이 시험되었다(Fig. 6). 신호세기는 비교적 낮은 세척제의 농도범위에서 그 농도에 정비례하여 증가하였지만 세척제의 농도가 높을 때 반비례하여 감소하였고, 그 최적농도는 시료운반용액 내 부피비로 약 1%인 것으로 나타났다. 세척제의 농도가 최적치보다 낮을 경우 주어진 지질단백질 입자를 모두 파괴

시키지 못하므로 더 많은 양의 세척제가 요구되지만, 그 양이 과잉으로 사용될 경우 부동화된 효소가 탈착되거나 그 활성도가 저해될 수 있다(14, 16).

위에서 결정된 Triton X-100의 최적농도인 1%는 microwell 등을 사용하는 회분식 측정시스템에서 필요로 하는 농도(6)보다 현저히 높았다. 이것은 membrane strip 시스템에서 요구되는 세공을 통한 cholesterol의 원활한 이동성과 밀접한 관련이 있는 것으로 예측된다. 분석물질인 cholesterol 분자 자체는 소수성성질이 매우 높아 membrane 표면이나 혹은 표면처리에 사용된 단백질분자에 소수성 상호작용에 의해 부착하려는 경향이 크다. Triton X-100과 같은 세척제분자는 소수성과 친수성 부분으로 구성되어 있어(17) 소수성부분이 membrane 혹은 단백질분자 표면에 달라붙게 되면 표면이 친수화되어 cholesterol의 부착을 예방할 수 있을 뿐만 아니라 membrane의 세공을 통한 이동을 원활하게 해줄 수 있다. 그러므로, 결정된 세척제의 농도는 지질단백질 입자의 파괴와 또한 cholesterol의 이동성에 대해 최적상태인 것으로 판단된다.

발색물질 농도

세척제 외에 시료운반용액의 주요 구성성분은 신호를 발생시키는 발색물질이다. 발색물질은 cholesterol의 CE와 CO 분해반응으로부터 생성된 과산화수소의 존재하에서 HRP 효소반응에 의해 산화된다. 일반적으로 환원상태의 발색물질은 무색이지만 산화되면 색을 띠게 되고 이 산화물질은 수용액에 불용성이므로 membrane 표면에 침착된다. 이러한 목적으로 사용될 수 있는 발색물질의 후보로써 4-chloro-1-naphthol(4C1N), 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine(TMB), 그리고 DAB가 고려되었다(18). 예비 실험결과에 따라, TMB는 신호발생민감도가 낮아 배제되었고 4C1N은 용액을 제조하기 위해 요구되는 유기용매가 NC membrane을 용해시키는 문제때문에 사용될 수 없었다. 이러한 두 문제점은 DAB의 사용으로 해결될 수 있었을 뿐만 아니라 더욱기 용액 내에 Co과 Ni 금속의 첨가로 신호가 증폭될 수 있었다(12, 19).

분석시스템에 사용될 수 있는 발색물질의 최적농도를 결정하기 위해 시료운반용액 내 DAB의 농도를 변화시켜 그에 따라 발생된 신호세기를 측정하였다(Fig. 7). 신호세기는 낮은 농도범위에서 그 농도에 비례하여 증가하였지만 비교적 높은 농도범위에서는 반비례하여 감소하였다. 신호량의 감소는 예상

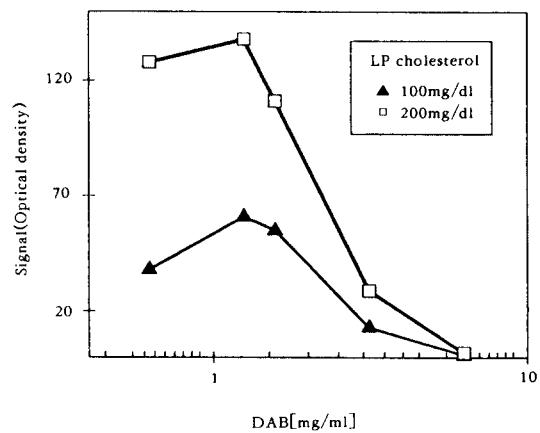


Fig. 7. Determination of optimal concentration of 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as chromogen in the carrier solution. The maximum signal was obtained with 1mg/ml of DAB which was 2 times higher than in a conventional system. This represented a loss of the chromogen by adsorption during wicking process before reaching the site of HRP immobilized.

치 못했던 현상으로 고농도의 DAB에 의해 효소활성이 억제되는 비활성효과 때문인 것으로 예측된다. 발색물질의 최적농도는 약 1mg/ml인 것으로 나타났는데 이것은 membrane blotting에 사용되는 최대량보다 2배 높았다(18). 위에서 cholesterol의 이동성에 관해 언급된 바와 같이, 발색물질 DAB도 소수성 상호작용에 의해 membrane 표면에 흡착될 수 있으므로 이러한 흡착에 의한 손실이 반영된 농도가 최적조건으로 결정된 것으로 판단된다.

운반 용액의 몰농도 및 산성도

효소반응속도는 또한 수용액의 이온 몰농도와 산성도에 의해 영향을 받을 수 있으므로 시료운반용액의 조제에 필요한 완충용액의 화학조성이 효소활성도에 대해 시험되었다. Cholesterol 측정을 위한 효소반응은 주로 중성범위에서 수행되지만(6, 20), 선택된 HRP의 기질인 DAB는 산성조건에서 최대 반응속도를 나타낼 뿐만 아니라 DAB의 비특정흡착에 의한 배경색의 발생도 최소화시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이러한 이유로 산성에서 주로 사용되는 acetate 완충용액이 선택되었다고 그 몰농도와 산성도가 변화되었다(Fig. 8). 선택된 용액이 완충효과를

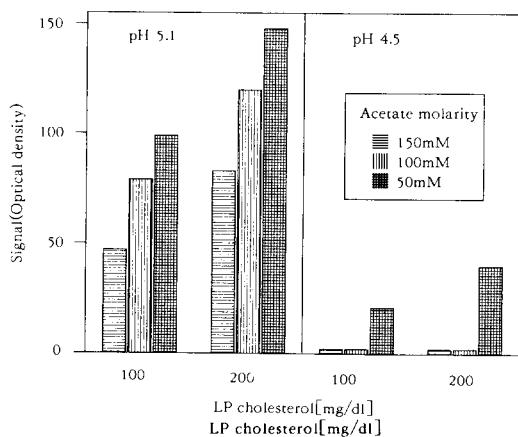


Fig. 8. Determination of optimal pH and molarity of the carrier solution. The buffering conditions of the carrier were varied by using acetate buffer that was selected for high signals. Optimal pH and molarity were 5.1 and 50 mM, respectively. The effect of pH on the system performance was more pronounced than that of molarity.

낼 수 있는 하한 산성도인 pH 5.1을 사용할 경우 신호발생세기에 의해 측정된 효소활성도는 몰농도 50mM에서 최대치에 도달되었고 그 보다 높은 몰농도에서 반비례하여 감소되었다. 산성도가 증가된 pH 4.5를 사용한 경우 몰농도에 의한 영향은 유사한 양상을 보였지만 효소활성도는 현저히 감소되었다. 이러한 결과로부터, 사용된 효소와 기질 간의 상호작용이 이온결합이 포함되는 것으로 예측되고 그 상호작용은 산성도와 몰농도의 증가에 따라 감소된다.

시스템의 성능시험

일반적으로, 분석시스템의 성능은 측정민감도와 재현성에 의해 평가될 수 있다(21). 측정민감도의 척도로써 시스템이 탐지할 수 있는 분석물질의 하한농도가 보편적으로 사용된다. 재현성은 분석시스템에 의해 측정된 결과들 간의 변이에 의해 주로 결정되지만 실험초기평가로써 구성된 시스템의 보관기간에 따른 안정성에 의해 표현될 수 있다. 이러한 두 성능지표들 즉 측정하한농도와 안정성이 위에서 결정된 변수들의 최적조건 하에서 시험되었다.

측정 하한농도

혈장 지질단백질 cholesterol의 농도가 200mg/dl

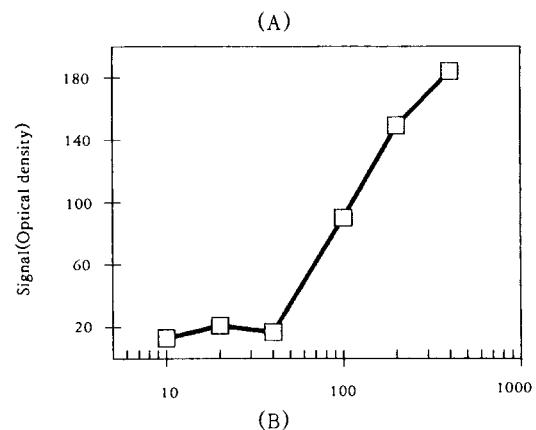
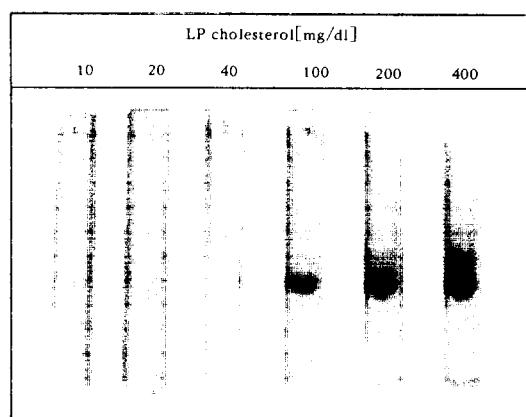


Fig. 9. Dose-responses of the membrane strip system constructed under optimal conditions. Typical results of signal generation on the membranes were obtained by using a video image analyzer (A). The signals were quantified by using an image software and a dose-response curve was obtained (B). This curve revealed a detection limit of approximately 50mg/dl of lipoprotein cholesterol.

이하일 경우 이상적이고 200~239mg/dl 범위이면 cholesterol과 지방이 포함된 식품의 섭취를 자제하여야 하며 239mg/dl를 초과하면 동맥경화에 의한 심근경색 발병위험이 매우 높으므로 약물치료를 필요로 한다(1). 이러한 수치에 근거하여 요구되는 cholesterol 측정범위는 150~300mg/dl 정도이고 하한농도는 약 100mg/dl이다. 이와 같은 요구조건을 본 논문에서 개발된 측정시스템이 충족시킬 수

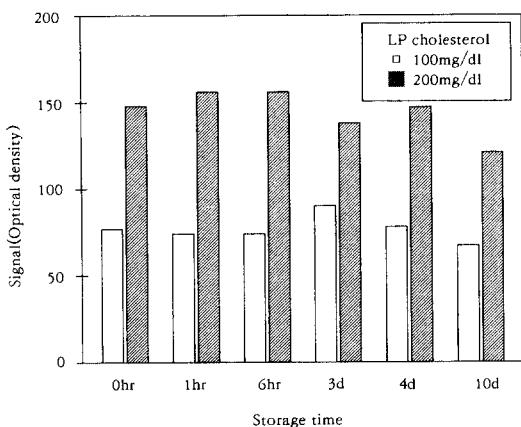


Fig. 10. Stability of the membrane strip system against storage time. The system constructed was stored for 6 hours at room temperature and thereafter at 4°C in the presence of silica gels. A decreased signal was measured after 10 days.

있는지 지질단백질 cholesterol 표준용액을 이용하여 시험되었다(Fig. 9). Cholesterol과 반응하여 발색된 membrane strip을 보면(Fig. 9A), cholesterol 농도 100과 400mg/dl 사이에서 유판으로 확인가능한 발색이 발생되었을 뿐만 아니라 발색세기는 cholesterol 농도에 비례하는 것으로 나타났다. 발색세기를 optical density로 환산한 후 cholesterol 농도의 함수로 표현한 농도응답곡선에서(Fig. 9B), 발색세기와 cholesterol 농도는 40~400mg/dl 범위에서 선형관계를 보였고 측정 하한농도는 약 50mg/dl인 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터, 개발된 시스템은 혈중 cholesterol 농도를 측정하기 위해 사용될 수 있는 것으로 확인되었다.

측정시스템의 안정성

효소들은 일반적으로 매우 민감하기 때문에 효소를 이용하여 구성된 분석시스템의 측정재현성은 매우 낮을 수 있다. 효소활성도는 특히 견조상태에서 더욱 변화될 수 있으므로 측정시스템 제조 후 보관기간에 따른 안정성이 시험되었다(Fig. 10). 그 결과를 보면, 시스템으로부터 발생된 신호량은 보관기간 4일 동안 현저히 감소되지 않았지만 보관기간 10일 후에는 초기신호세기에 비해 평균 15% 감소되었다. 이러한 신호감소현상은 주로 부동화된 효소의 비활성화에 기인되는 것으로 예측되며 그 활성도

를 유지시키기 위해 아미노산 혹은 다당류와 같은 안정제의 도입이 필요한 것으로 판단된다. 참고로, 본 논문에서 발표된 실험결과들은 여러 다른 변수들을 시험하고자 매번 새로 제조된 측정시스템이 사용되었으며, 장기간 보관시 효소안정화를 위한 실험은 본 프로젝트의 상업화단계에서 수행하고자 한다.

결론으로써, 전문지식이 없는 일반 사용자가 혈중 cholesterol 농도를 가정에서 간편하게 측정할 수 있는 membrane strip 진단시스템의 주요변수들 특히 cholesterol 분석에 필요한 효소들의 부동화조건과 시료운반용액의 화학조성이 최적화되었고, 이러한 조건 하에서 시험된 분석시스템은 혈중 지질단백질 cholesterol 농도를 측정하기 위해 사용될 수 있는 것으로 나타났다. 그러나 개발된 시스템을 가정용시약으로 보급하기 위해서는 사용자의 편리가 도모된 새로운 신호발생체계의 개발이 요구된다. 본 논문에서 사용한 신호발생체계는 원형으로 부동화된 효소 HRP 부위에 발색이 형성되므로(Fig. 9A 참조) 발색된 면적을 표준대조표와 비교하여 cholesterol의 농도를 결정하여야 하는 불편이 있다. 향후 해결방안으로써, HRP를 여러개의 가는 가로막대형태로 부동화시키고 이 경우 cholesterol 농도와 발색된 효소 막대의 수가 비례하도록 고안하고자한다. 또한, 정화하고 연속적인 측정을 위해 CE와 CO 효소반응으로부터 발생된 H_2O_2 를 전기화학적 시스템으로 개발하는 방안도 고려해 볼 수 있다.

요약

가정용 혈중 cholesterol 측정시스템을 개발하고자, 그 성능을 조절할 수 있는 변수들의 최적화가 수행되었다. 시스템의 주요 구성성분은 분석에 요구되는 효소들(cholesterol esterase, cholesterol oxidase, 그리고 horseradish peroxidase)이 부동화된 nitrocellulose membrane strip과 비이온세척제(Triton X-100) 및 발색물질 (3,3'-diaminobenzidine)이 포함된 시료운반용액이다. 시료와 운반용액이 혼합된 수용액을 membrane의 하단으로부터 흡수시키면 모세관현상에 의해 시료는 부동화된 효소층으로 전달되어 연속효소반응이 일어난다. 마지막 효소반응에서 발색물질은 산화되고 그에 따라 cholesterol 농도에 비례한 특정색이 신호로써 발생된다. 그 신호세기에 대해 효소들의 부동화조건과 운반용액의 화학조성이 최적화되었다. 최적조건 하에서 구성된 측정시스템의 농도응답곡선은 혈중 cholesterol 농도

를 측정하기에 충분히 높은 민감도를 나타내었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단(과제번호 : 951-1104-032-2)과 (주)삼덕인터내셔널로부터 재정지원을 받아 수행되었다.

참 고 문 헌

1. E. J. Schaefer(1993), Methods for Clinical Laboratory Measurement of Lipid and Lipoprotein Risk Factors, (N. Rifai and G. R. Warnick, eds), 1, AACC Press, Washington, D.C.
2. Pooling project research group(1978), *J. Chronic Diseases*, **31**, 201.
3. A. M. Gotto, H. J. Pownall, and R. J. Havel (1986), *Meth. Enzymol.*, **128**, 3.
4. W. W. Christie(1987), High Performance Lipid Chromatography and Lipids, Pergamon Press, Oxford.
5. B. Zak(1977), *Clin. Chem.*, **23**, 1201.
6. G. R. Warnick(1986), *Meth. Enzymol.*, **129**, 101.
7. S. C. Lou, C. Patel, S. F. Ching, and J. Gordon(1993), *Clin. Chem.*, **39**, 619.
8. K. May(1991), *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **165**, 2000.
9. R. F. Zuk, V. K. Ginsberg, T. Houts, J. Rabbie, H. Merrick, E. F. Ullman, et al. (1985), *Clin. Chem.*, **31**, 1144.
10. J. M. Gershoni and G. E. Palade(1983), *Anal. Biochem.*, **131**, 1.
11. S. Van Noorden(1993), Methods of Immunological Analysis, (R. F. Masseyeff, W. H. Albert, and N. A. Staines, eds), Vol. 3, 229, VCH, New York.
12. S. M. Hsu and E. Soban(1982), *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 1079.
13. Z. Schneider(1980), *Anal. Biochem.*, **108**, 96.
14. W. R. Brown, S. E. Dierks, J. E. Butler, and J. M. Gershoni(1991), Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay, (J. E. Butler, ed), 151, CRC Press, London.
15. J. M. Lee(1992), Biochemical Engineering, p. 8, Prentice-Hall, Inc., London.
16. W. H. Liu, M. H. Meng, and K. S. Chen (1988), *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 413.
17. A. Helenius and K. Simons(1975), *Biochem. Biophys. Acta*, **415**, 29.
18. M. A. Kerr, L. M. Loomes, and S. J. Thorpe (1994), Immunochemistry, (M. A. Kerr and R. Thorpe, eds), 127, Bios Scientific Publishers, Oxford.
19. J. C. Adams(1981), *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 775.
20. S. Dong, Q. Deng, and G. A. Cheng(1993), *Anal. Chim. Acta*, **279**, 235.
21. D. J. Holme and H. Peck(1993), Analytical Biochemistry, Second, p. 1, Longman Scientific & Technical, New York.