

Quartz Crystal Microbalance 시스템을 이용한 저밀도 지질단백질측정용 면역센서의 개발

김 상 현 · 윤 현 철 · †김 학 성

한국과학기술원 생물과학과

(접수 : 1997. 12. 1., 게재승인 : 1998. 4. 23.)

Development of Quartz Crystal Microbalance-Based Immunosensor for the Determination of Low-Density Lipoprotein

Sang-Hyun Kim, Hyun C. Yoon, and Hak-Sung Kim†

Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

(Received : 1997. 12. 1., Accepted : 1998. 4. 23.)

Immunosensor for the determination of LDL(Low-Density Lipoprotein), a good indicator for the diagnosis of atherosclerosis and hypercholesterolemia, was developed by using quartz crystal microbalance(QCM). The immunosensor consists of flow-through cell, oscillating circuit, oscilloscope, and frequency counter. FIA(Flow Injection Analysis) was applied to the QCM system for the measurement of LDL in liquid phase. Antibody showing binding affinity against LDL was immobilized on the gold electrode of a quartz crystal by covalent coupling via polyethylenimine / glutaraldehyde. LDL was injected and bound to the antibody immobilized on the QCM immunosensor. The response of the immunosensor ($F_0 - F_1$) was found to be proportional to the LDL concentration from 200 $\mu\text{g/ml}$ to 800 $\mu\text{g/ml}$. Operational conditions for the operation of immunosensor were also investigated in terms of sensitivity and non-specific binding.

Key Words : QCM, immunosensor, LDL(Low-density lipoprotein)

서 론

Quartz, rochelle salt($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), tourmaline과 같은 crystal 의 표면에 기계적인 압력을 주었을 때 가해 준 압력에 비례하여 crystal 의 양표면 사이에 전압이 걸리게 되는데, 이러한 현상을 압전효과(piezoelectric effect)라고 한다. 이와 반대로 crystal의 양표면 사이에 전압을 가해주게 되면, 기계적인 압력이 조성되어 crystal의 변형을 유발하는데, 이러한 변형은 탄성적이며 같은 크기의 전압을 반대방향으로 걸어주었을 때는 크기는 같고 방향이 반대인 변형을 유발한다. 따라서 crystal 에 상반되는 전압을 교차적으로 걸어주면 crystal은 표면에 평행한 방향으로 진동운동을 하며 이를 역압전효과라고 한다. 이런 진동운동은 transverse acoustic wave를 생성시키는데 이 wave의 주파수가 crystal이 갖는 고유한 공진주파수(resonant frequency)가 되며, 이는 현재 이용되고 있는 QCM(Quartz Crystal Microbalance) 시스템의 기본원리가 된다.

1950년대 들어서부터 quartz crystal을 측정소자로 이용하고자 시도되었다. Rayleigh(1)는 quartz crystal의 진동운동에 변

화를 주면 transverse wave의 주파수가 변화되는 것을 발견하였고, 이러한 현상은 Sauerbrey(2)에 의해 체계화되었다. 전극이 coating 된 quartz crystal 표면에 외부물질이 deposition 될 때, 기체상태에서의 공진 주파수 변화량(ΔF)은 다음과 같다.

$$\Delta F = -\frac{2.3 \times 10^6 F^2 \Delta M}{A}$$

ΔF : 주파수 변화량 (Hz)

F : 공진 주파수 (MHz)

ΔM : crystal 표면에 deposition 된 질량 (g)

A : quartz crystal 전극표면의 넓이 (cm^2)

Quartz crystal 의 전극표면에 외부물질이 붙으면 공진 주파수가 감소하며, 결국 Sauerbrey's equation으로부터 deposition 되는 외부물질량과 공진 주파수의 감소량 간에는 비례관계가 성립한다는 사실을 유추할 수 있다. 본 실험에서 사용한 전극 면적 0.312 cm^2 인 6 MHz AT-cut quartz crystal 의 경우, 1 Hz에 대한 질량 변화는 3.81 ng에 해당된다.

QCM 시스템을 이용한 면역센서에 관한 연구는 1970년대 초반부터 시작되었으며, QCM 시스템의 높은 민감도(sensitivity)와 항체가 지닌 높은 특이성(specificity)을 결합시킬 수 있다는

† Corresponding Author : Tel : (042) 869-2616

Fax : (042) 869-2610

e-mail : hskim@sorak.kaist.ac.kr

측면에서 각광을 받기 시작했다. QCM 시스템을 이용한 면역센서의 경우, coupling agent를 coating 한 quartz crystal에 항원 또는 항체를 고정화한 후 특이적인 측정대상물질과 반응시키고, 반응진과 반응 후의 주파수 변화량을 측정함으로써 측정대상물질의 농도를 측정한다.

바이오센서의 개발에 있어 그 주요 구성원인 생체물질(biological component)과 transducer의 선택은 측정대상물질과 밀접한 관련을 갖고 고려되어야 한다. 전기화학식 바이오센서의 경우 특정한 전기화학적 특성을 가지는 측정대상물질에 적용될 수 있으나, 전기화학적 특성이 없는 측정대상물질인 경우 전기화학적 방법으로는 측정이 불가능하기에 광학식이나 압전효과식 바이오센서를 고려할 가치가 있다. 또한 전기화학식 바이오센서의 경우, 간섭물질에 의한 noise가 심하며, 측정제한범위(detection limit)가 다소 높은 단점이 있다. 광학식 바이오센서는 측정제한범위가 낮은 장점이 있으나, 장비가 비싸고, 또 소형화(miniaturization)가 힘든 단점이 있다. 이에 비해 압전효과식 바이오센서의 경우 nanogram 단위까지 측정이 가능할 정도로 측정제한범위가 낮으며, 또 수정진동소자(quartz crystal resonator)를 포함한 작은 반응기(reacton cell)와 간단한 증폭회로만으로 구성되므로 장비가 값싸며, 소형화가 가능하다는 장점들이 있다. 또 항체가 가진 높은 선택성을 이용하기 때문에 측정하고자 하는 물질만을 정확하게 선택적으로 측정할 수 있고, 간섭물질에 의한 간섭현상을 최소화할 수 있다 또 항원항체반응을 측정하는데 있어, label이 필요없기 때문에 기존의 radioimmunoassay 에 비해 안전하고 경제적이다.

저밀도 지질단백질(LDL, Low-density lipoprotein)의 체내 수준(level)은 엄격하게 조절된다. LDL의 수준을 조절하는 중요한 기능을 하는 endocytosis 과정은 조직세포의 세포막에 위치한 LDL receptor에 의해 주도되기 때문에 LDL receptor에 문제가 발생할 경우 혈액내 LDL의 농도 증가에 따라 콜레스테롤의 농도도 증가하게 되어 피부, 건(tendon), 동맥(artery) 등에 콜레스테롤이 침착하게 된다. 특히 동맥에서의 콜레스테롤 침착은 동맥경화(atherosclerosis)를 유발하며, 이는 결국 심장마비(heart attack), 뇌일혈(stroke), 혈관질환(vascular disease) 등을 초래하게 된다. LDL receptor의 유전적 결함으로 생기는 Familial Hypercholesterolemia(FH)는 혈장내 콜레스테롤이 동형접합자(homozygote)의 경우 6.8 mg/ml, 이형접합자(heterozygote)의 경우 3.0 mg/ml로 매우 높는데, 이는 LDL 의 증가에 기인한다. 혈장내 LDL 농도는 National Cholesterol Education Program(NCEP) 가 발표한 바에 따르면 정상적인 경우 1.3 mg/ml이하이고 1.6 mg/ml 이상일 경우 비정상적인 것으로 규정하고 있다(4). 이러한 점들을 감안할 때 LDL의 농도를 신속하고, 정확하게 측정할 수 있는 방법의 개발은 임상진단학적으로 매우 중요하므로 LDL 측정용 바이오센서의 개발의 의미가 크다 할 수 있다.

본 연구에서는 임상진단학적으로 중요한 가치를 지니는 LDL의 농도를 빠르고 정확하게 측정할 수 있는 LDL 측정용 바이오센서를 개발하여 이의 분석성능(analytical performance)을 최적화하는데 그 목적이 있다. 이를 위해서, 첫째 전술한 바와 같이 높은 민감도(sensitivity)와 간단한 시스템 구성 및 간편하고 경제적인 설비 등의 장점을 가진 QCM(Quartz Crystal Microbalance) 시스템을 측정원리로 삼았다. 둘째, 응답시간

(response time)을 단축하기 위해 측정방법은 액체 상태로 하였으며, 이를 적용하기 위해 FIA 시스템을 도입했다. 셋째, LDL을 측정하기 위한 생체소자로서 LDL에 특이적인 항체를 선택해 적용하여 바이오센서의 기질특이성을 증가시킬 수 있었다. 넷째, quartz crystal에 항체의 효율적인 고정화 방법을 탐색 및 설정하였으며, 이를 구성된 시스템에 적용하여 보았다. 이러한 과정을 거쳐 연구된 LDL 측정 시스템의 개발 및 분석능의 비교를 통해 QCM을 채용한 immunosensor의 응용가능성을 알아보았다.

재료 및 실험

재 료

Gold coated 6 MHz, AT-cut quartz crystal 은 Leybold Inficon, Inc.(USA)에서 구입하였으며, 측정대상물질인 LDL 과; LDL에 특이적인 polyclonal anti-LDL IgG 가 포함된 혈청은 생명과학연구소의 박주원 박사님으로부터 기증받아 사용하였다. LDL은 CsCl₂-ultracentrifugation 을 이용해서 혈청에서 분리한 상태로 더 이상의 정제없이 실험에 사용하였고, 실험시 사용된 농도는 1.6 mg/ml 이었다. polyclonal anti-LDL IgG 가 포함된 혈청은 Pharmacia Biotech 社의 HiTrap Protein A column 을 사용하여 분리, 정제하였고, ELISA 를 통해 LDL 에 대한 결합 친화성을 확인한 후 결합 친화성이 확인된 fraction 들을 Amicon Industrial Controls, Inc.(USA)의 centricron^R 100 을 사용하여 농축하였다 농축된 항체시료는 Bradford assay 로 농도를 측정하고 ELISA로 결합 친화성을 최종적으로 확인한 후 실험에 사용하였다. 이외의 모든 시약은 분석용 등급(analytical grade)이었고, 항체 및 LDL 에 대한 완충용액으로는 PBS (Phosphate-buffered saline, pH7.4)를 사용하였다. 실험에 사용된 모든 용액은 이차증류수를 사용하여 제조하였다.

QCM 시스템

QCM 시스템에 필요한 회로는 직접 제작하여 사용하였다. Flow-through cell은 화학적으로 안정된 teflon으로 직접 제작하여 사용하였다 Oscilloscope는 LG 社(Korea)의 OS 9060D 60 MHz를 사용하였고, frequency counter로는 Hewlett Packard

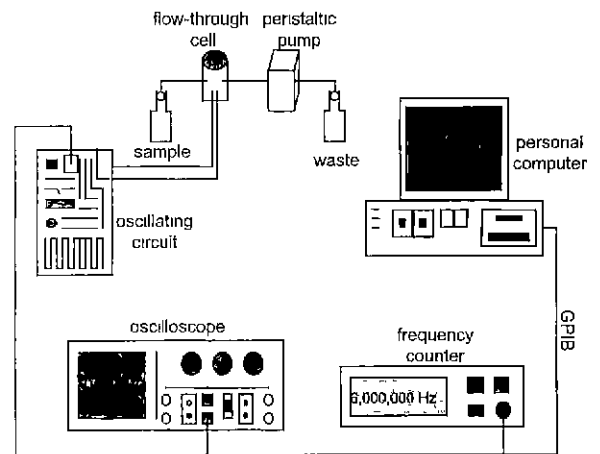


Figure 1. Schematic diagram of QCM system.

社(USA)의 HP 53131A universal counter를 이용하였다. Interfacing에 이용된 GPIB로는 National Instruments 社(USA)의 NI-488.2가 이용되었고, 이에 필요한 프로그램은 C 언어를 이용하여 직접 작성하였다(Figure 1).

Flow-through cell

Quartz crystal을 flow-through cell 내에 고정한 후(5) FIA 시스템에 의해 용액이 이를 통과할 때 용액이 quartz crystal의 한쪽전극에만 contact 되도록 하기 위해 cell을 특수하게 제작하였다. Quartz crystal의 양전극위에 전선을 연결하고 이에 O ring을 연결한 후 뚜껑을 screw를 통해 고정하였다. 용액과 접촉하는 면은 quartz crystal의 앞면 전극 중 가운데 금전극부분만 노출되게 하였고, 총 cell volume은 182 μ l였다(Figure 2).

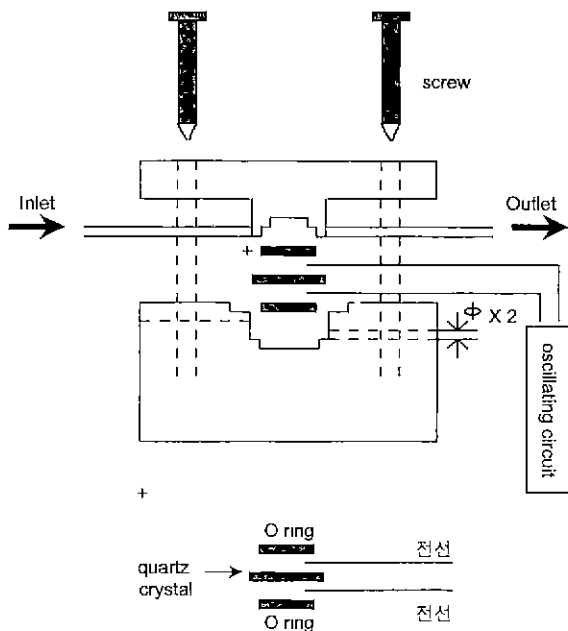


Figure 2. Assembly of flow-through cell.

항체의 고정화 방법

Quartz crystal에 항체 또는 항원의 효율적인 고정화를 위한 방법으로 PEI법(6), protein A법(7), 흡착법을 이용하였다.

A. Polyethylenimine(PEI) 방법

Quartz crystal을 2% polyethylenimine(in methanol)에 30초간 방치한 후 공기중에서 건조하고 methanol로 세척한 후 2.5% glutaraldehyde 용액(pH 7.0)에 2시간 동안 담근다. 이를 다시 이차증류수로 세척한 후 4 mg/ml의 polyclonal anti-LDL rabbit antibody 용액 10 μ l를 quartz crystal의 금전극위에 떨어뜨려 2시간동안 반응시킨다. 3% BSA(Bovine Serum Albumin, pH 7) 용액을 2시간 동안 blocking 시킨다. PBS 와 이차증류수의 순서로 세척한 후 공기중에서 말린다.

B. Protein A 방법

Quartz crystal을 1.2 M NaOH 용액에 20분간 담근 후 이차증류수로 세척한다. 1.2M HCl 용액에 5분간 담근 후 농축된

HCl 용액 20 μ l 를 quartz crystal의 금전극위에 떨어뜨린 후 2분간 반응시킨다. 이차증류수와 95% ethanol로 차례로 세척하고 100 $^{\circ}$ C oven에서 20분간 건조시킨 후 Protein A 용액(1 mg/ml in 50mM PBS, pH7, and in 0.1M acetate buffer, pH 5.5) 10 μ l를 quartz crystal의 금전극위에 떨어뜨려 공기중에서 반응시킨다. 이를 이차증류수로 세척한 후 4 mg/ml의 polyclonal anti-LDL rabbit antibody 용액 10 μ l를 quartz crystal의 금전극위에 떨어뜨린 후 2시간정도 반응시킨다. 3% BSA(Bovine Serum Albumin, pH 7.0) 용액으로 2시간 동안 blocking 한다. PBS와 이차증류수로 차례로 세척한 후 공기 중 에서 말린다.

C. 직접적 흡착 방법

Quartz crystal의 금전극을 acetone으로 세척한 후 4 mg/ml의 polyclonal anti-LDL rabbit antibody 용액 10 μ l를 quartz crystal의 금전극위에 loading 한 후 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 이상 반응시킨다. 이를 PBS buffer와 이차증류수로 차례로 세척한 후 공기중에서 말린다.

측정 방법

PBS 로 flow-through cell을 채운 후 연속적으로 흐르게 한 상태에서 quartz crystal의 공진주파수를 5분간 안정화시킨 후 공진주파수(F_0)를 측정한다. PBS buffer에 녹인 LDL 200 μ l를 injection 하고 주파수의 안정화를 기다린 후 공진주파수(F_1)를 측정한다(Figure 3).

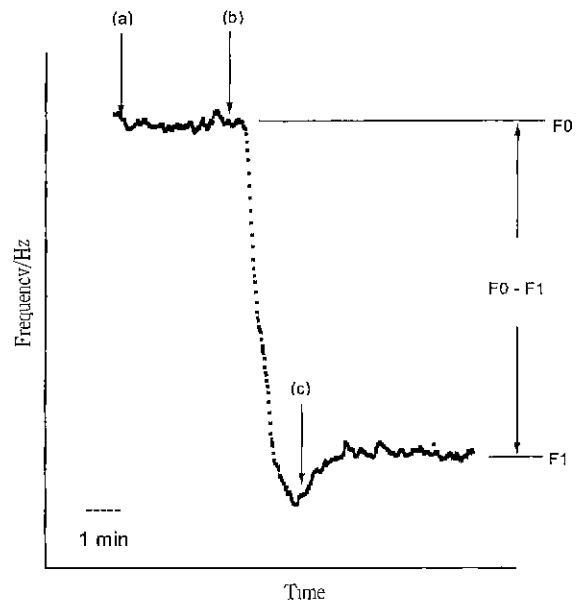


Figure 3. Representative response curve: (a) equilibration with PBS, (b) addition of antigen sample, (c) washing with PBS.

결과 및 고찰

응답 특성 곡선

시료가 flow-through cell을 거치면서 quartz crystal의 공진주파수가 변화되는데, 이 변화량이 구하고자 하는 신호량이

다. 반응전에는 PBS 완충용액을 이용하여 공진주파수를 안정화시켰다. 이에 도달하는 시간은, coating 된 quartz crystal의 경우 coating 되지 않았을 경우 보다 오래 걸렸으나, 최대 5분내에는 안정화되었다. 시료를 주입한 후 이 시료가 flow-through cell을 거치면서 항원-항체 반응을 일으키게 되며, Figure 3과 같은 응답 특성 곡선을 보여준다. 이 때, 안정화된 공진 주파수가 drifting 되는 것을 볼 수 있는데, 여기서의 문제점은 각 quartz crystal 마다 drifting 되는 정도가 달라진다는 점이다. 가장 큰 이유 중의 하나로서 quartz crystal의 quality를 들 수 있다. 실험에 사용된 quartz crystal의 경우 특정한 각으로 절단된 AT-cut 위에 chromium 층과 금전극 층으로 구성되는데 절단되는 각의 정확도와 coating 되는 chromium과 gold 층의 양상에 따라 drifting 되는 정도가 달라질 수 있다. 따라서 균질의 quartz crystal의 선별은 실험 결과에 매우 중요한 영향을 끼치는 것으로 나타났다. 이러한 문제점을 최소화하기 위해, 실험에 이용된 quartz crystal은 LDL 주입 전 PBS로 equilibration 시키는 과정에서 drifting이 적은 것을 선별하여 사용하였다.

고정화방법들 간의 민감도(sensitivity) 비교

Quartz crystal의 금전극위에 항체를 고정화시키는 여러 방법들이 개발되었고, 이 중에서 가장 효율적인 고정화 방법을 찾기 위해 physical adsorption을 이용하여 금전극위에 직접 항체를 고정화시키는 방법, polyethylenimine(PEI)을 이용하여 항체를 고정화시키는 방법, protein A가 항체에 가진 결합친화력을 이용하여 항체를 고정화시키는 방법 등을 선택하여 각각 LDL 농도에 대한 주파수변화량을 비교하였다(Figure 4). 이는 두 번의 반복 측정 후 평균을 구한 결과이며, PEI 방법과 protein A 방법이 직접적 흡착 방법보다 민감도(sensitivity)가 높은 것으로 나타났고, PEI 방법과 protein A 방법간에는 민감

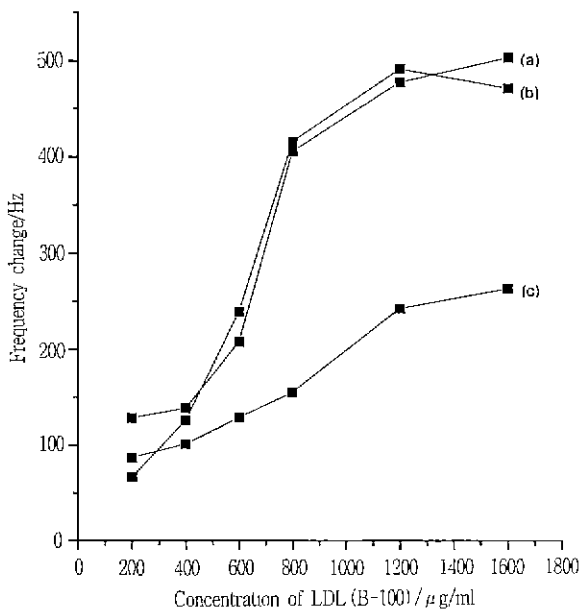


Figure 4. Comparison of immobilization methods in terms of sensitivity; (a) Protein A method, (b) polyethylenimine (PEI) method, (c) direct adsorption method.

도(sensitivity)가 거의 비슷한 것으로 나타났다. Polyethylenimine (PEI)를 이용한 방법은 quartz crystal의 금전극을 PEI로 coating 한 후 glutaraldehyde를 이용한 반응기(functional group)의 생성을 통해 항체를 공유결합시키는 고정화 방법으로 protein A 방법과 더불어 quartz crystal의 금전극위에 항체를 고정화할 때 가장 널리 쓰이는 방법 중의 하나이다. Protein A 방법은 protein A가 항체에 대해 지닌 친화력을 이용하여 항체를 고정화하는 방법이다. Protein A는 gold 표면위에도 잘 붙는 성질을 가지고 있기 때문에, 고정화시 다른 coupling layer가 필요없으며, 항체의 Fc부분에만 결합하기 때문에 항원에 대해 결합친화성을 가지는 항원 결합 부위가 노출되므로 항체에 orientation을 보장하는 장점이 있다. PEI 방법의 경우, protein A 방법에 비해 많은 양의 항체가 고정화될 수 있으나 항체의 방향성이 없이 고정화되기 때문에, 고정화되는 항체의 양은 적으나 방향성을 보장하는 protein A 방법과 비교될 수 있다. 결국 센서의 민감도 측면에서 어느것이 더 좋은가는 항원-항체의 종류에 좌우되기 때문에 각 경우에 따라 실험적인 확인이 필요하다.

비특이적 결합에 의한 효과 비교

민감도 측면에서 높은 결과를 보였던 PEI 방법과 protein A 방법에 대해서 LDL에 결합친화도가 없는 mouse IgG를 quartz crystal에 각각의 방법으로 고정화시키고 3% BSA(Bovine Serum Albumin) 용액으로 blocking 시켜준 후에, QCM을 통해 LDL 농도에 따른 주파수변화량을 측정함으로써 비특이적 결합 효과를 비교하였다(Figure 5). PEI 방법을 이용한 경우, 200 µg/ml의 LDL 농도에서 80 Hz 정도 변화되었고, 이는 LDL의 농도가 증가함에도 불구하고 거의 일정하게 유지되어 800 µg/ml 이상에서도 100 Hz 이상은 증가하지 않았다. Protein A 방법의 경우 PEI 방법에 비해 비특이적 결합 효과가 비교적 큰 것으로 나타났다. 200 µg/ml의 농도에서 130 Hz 정도 변했고, 농도에 따라 증가하여 1.6 mg/ml에서는 280 Hz 정도까지 변하는 것을 볼 수 있다. Polyethylenimine(PEI) 방법에 비해 protein A 방법에서 비특이적 결합 효과가 높은 것은, quartz crystal의 표면에 노출된 protein A와 시료내 LDL을 비롯한 여러 단백질과의 비특이적 결합이 증가함으로써 생기는 현상으로 사료된다.

항원-항체 결합에 의한 효과 비교

총 주파수변화량을 비특이적 결합에 의한 주파수 변화량으로 보정해줌으로써 항원-항체 결합에 의한 신호량을 얻을 수 있었다(Figure 6). 동일한 quartz crystal로써 총 결합 효과를 확인하는 실험과 비특이적 결합 효과를 확인하는 실험을 동시에 수행할 수 없기 때문에 각각의 측정오차에 의한 신호의 deviation 효과를 고려함으로써 경향성을 간접적으로나마 확인할 수 있었다. PEI 방법의 경우, 200 µg/ml의 LDL에서는 항원-항체 반응은 거의 일어나지 않았고, 이 이상의 LDL 농도에서 항원-항체 반응이 증가하여 1.2 mg/ml 이상의 LDL 농도에서 saturation 되는데, 이때의 주파수변화량은 약 400 Hz 정도였고, 이는 총 주파수 변화량의 약 80%를 차지함을 알 수 있다. Protein A 방법의 경우, 역시 200~400 µg/ml의 LDL 농도에서는 항원-항체 반응이 거의 일어나지 않다가, 이 이상의 농도

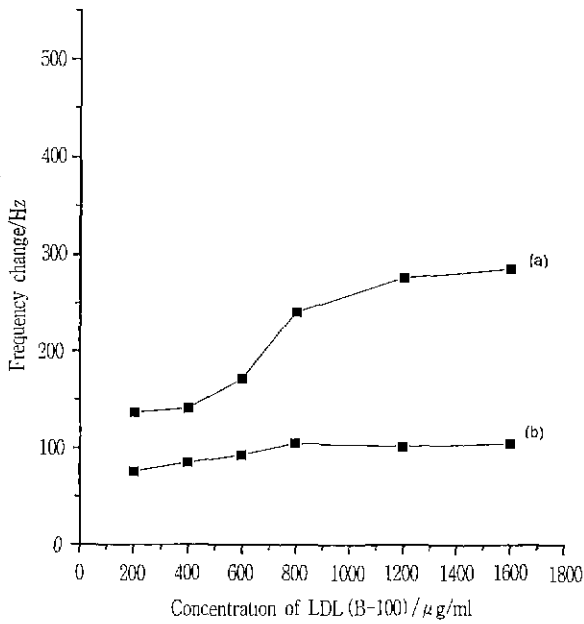


Figure 5. Comparison of effect of non-specific binding; (a) Protein A method, (b) polyethylenimine(PEI) method.

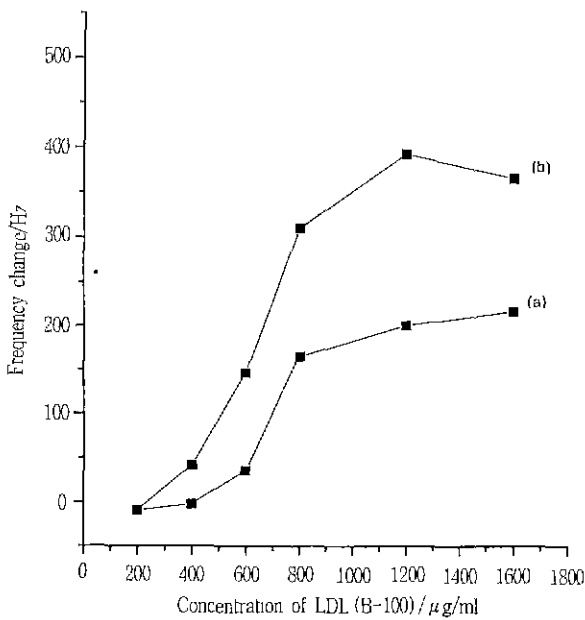


Figure 6 Comparison of effect of antigen-antibody binding; (a) Protein A method, (b) polyethylenimine(PEI) method.

에서 항원-항체 반응이 증가하여 1.2 mg/ml 이상에서 saturation 되었고, 이 때의 주파수 변화량은 약 200 Hz 정도 였다. 이는 protein A 방법에서의 총 주파수 변화량의 약 40 % 정도 였으며, PEI 방법에 비해 반 정도 밖에 안되는 신호량이다. 결국 총 주파수 변화량에서는 PEI 방법과 protein A 방법이 같다 할지라도, 항원-항체 결합에 대한 신호 선택성은 PEI 방법이 더 높은 것으로 나타났다. 고찰한 방법 모두 1.2 mg/ml의 농도에서 saturation되는 특성을 보여줌으로써, 정상혈액 내의 LDL의 농도는 결정하기에는 적당하나, 비정상혈액(환자의 경우) 내의

LDL의 농도를 결정하기 위해서는 시료의 희석이 필요할 것으로 생각된다. 이러한 방법은 시료 내 총 단백질의 감소로 인해 비특이적 결합을 감소시키는 효과도 있을 것으로 기대된다.

항체의 농도에 따른 고정화 효율의 최적화

Quartz crystal에 이용되는 항체는 ELISA 를 비롯한 다른 방법에 이용되는 것에 비해 농도가 상당히 높은 것을 사용하게 된다. 따라서 항체의 고정화시 이에 대한 최적의 농도를 선택하는 것이 중요하다. PEI 방법에서 각 quartz crystal에 서로다른 농도의 항체를 고정화시키고, 이에 같은 농도(800 $\mu\text{g/ml}$)의 LDL 을 반응시켜 고정화되는 항체의 농도에 따른 주파수변화량을 측정하였다(Figure 7). 고정화에 이용된 항체의 농도가 4 mg/ml의 농도 이상에서 saturation 되었는데, 이를 최적의 항체농도로 정하고 실험에 이용하였다.

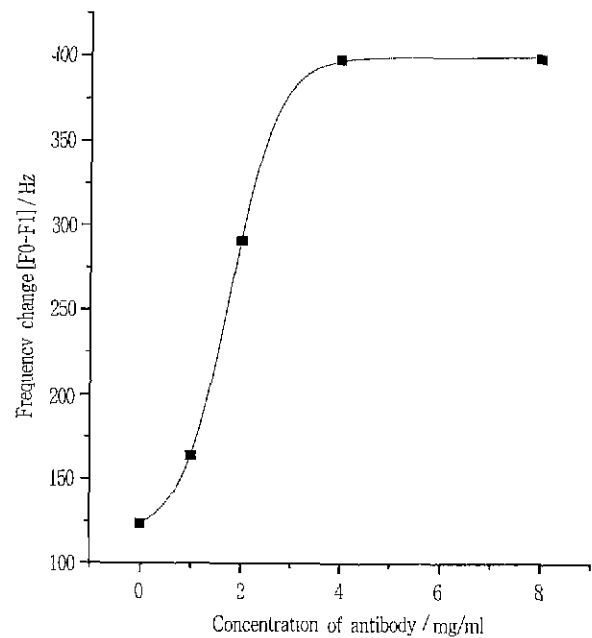


Figure 7. Calibration curve for optimum concentration of antibody (loaded LDL(B-100) 200 μl of 800 $\mu\text{g/ml}$, immobilization method : polyethylenimine(PEI) method.)

ELISA에 의한 QCM 시스템내의 항원-항체 결합 역가 확인

LDL에 대해 QCM 시스템으로 측정후, 이에 사용된 각 quartz crystal의 항체에 결합되어 있는 LDL의 양을 quartz crystal 상에서의 ELISA assay를 이용하여 확인하였다. 각 quartz crystal에는 서로다른 농도의 LDL을 반응시켰기 때문에 각 quartz crystal 당 고정화되어 있는 항체의 양이 모두 같다고 가정하면, quartz crystal 표면에 결합되어있는 LDL 양은 반응시킨 LDL 농도에 비례할 것이다. 따라서 LDL과 결합하지 않고 노출되어 있는 항체의 양은 반응시킨 LDL 양에 반비례하게 될 것이다. 이 상태의 quartz crystal의 금전극위에 동일한 농도의 LDL을 반응시켰다. 노출되어 있는 항체가 많은 것은 LDL과 반응이 많이 일어날 것이고, 노출되어 있는 항체의 양이 적은 것은 LDL과의 반응이 적게 일어날 것이다. 반응 후 반응액내의 LDL은 quartz crystal 금전극위의 항체에 반응한 LDL에 비례하여 줄어들 것이다. 이 반응액을 각각의 quartz crystal cell에서 일정량씩 얻어 이를 100배

희석한 후 ELISA 를 이용하여 LDL 농도를 측정하였다. 반응시킨 LDL의 농도는 160 μ g/ml 이었고, 반응시간은 30분이었다. ELISA에 의한 calibration curve와 QCM에 의한 calibration curve를 비교해본 결과 profile 이 동일하고 saturation region 이 일치하였다(Figure 8). 이는 QCM에 의한 calibration curve가 항원-항체 반응에 의한 것이라는 것을 직접적으로 증명하는 것이다.

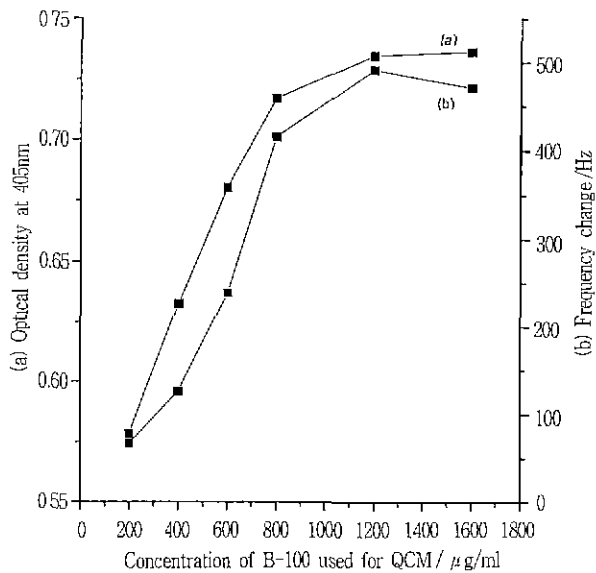


Figure 8. Confirmation of antigen-antibody binding in QCM by ELISA assay method: (a) ELISA, (b) QCM system.

요 약

QCM(Quartz Crystal Microbalance) 시스템을 이용한 저밀도 지질 단백질(LDL) 측정용 면역센서의 개발에 관한 연구를 수행하였다. 바이오센서의 민감도(sensitivity)를 고려하여 몇 가지 고정화 방법을 비교해 볼 때, PEI 방법과 protein A 방법이 직접적인 흡착 방법보다 우수한 것으로 나타났다. PEI 방법의 경우, saturation region은 LDL 농도 12 mg/ml 이상에서 나타났고, 직선 영역은 200 μ g/ml 에서 800 μ g/ml 까지로 조사되었다. 비특이적 결합에 의한 효과를 확인한 결과, Protein A 방법

의 경우 비특이적 결합에 의한 신호량이 polyethylenimine(PEI) 방법에 비해 크게 조사되었고, 또 LDL의 농도가 증가함에 따라 그 크기가 증가하여 200 μ g/ml에 비해 1200 μ g/ml 이상에서는 2 배가량 큰 것으로 측정되었다. 따라서 순수한 항원 - 항체 결합에 의한 신호검출은 PEI 방법이 protein A 방법보다 효과적인 것으로 나타났다. PEI 방법으로 고정화되는 항체의 최적 농도는 센서신호의 민감도를 최적화하는 관점에서 4 mg/ml로 결정되었다. QCM 시스템 내에서의 항원-항체 결합은 ELISA assay에 의해 확인되었다.

감 사

본 연구는 96년도 교육부 학술연구과제의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Strutt J.W. (Lord Rayleigh) (1945), *The Theory of Sound*, rev. ed., p. 117. Dover, NY.
2. Sauerbrey, G. (1959), Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, *Z. Phys.*, 155, 206-222.
3. Nakanishi, K., H. Muguruma, and I. Karube (1996), A Novel Method of Immobilizing Antibodies on a Quartz Crystal Microbalance using Plasma-Polymerized Films for Immunosensors, *Anal. Chem.*, 68, 1695-1700.
4. 이귀녕, 김진규 (1988), 임상화학, pp. 181-189, 의학문화사, 서울.
5. Caruso, F., E. Rodda, and D. N. Furlong. (1996), Orientational Aspects of Antibody Immobilization and Immunological Activity on Quartz Crystal Microbalance Electrodes, *J. Colloid and Interface Science*, 178, 104-115.
6. Guilbault, G. G., B. Hock, and R. Schmid. (1992), A Piezoelectric Immunobiosensor for Atrazine in Drinking Water, *Biosensors & Bioelectronics*, 7, 411-419.
7. Muramatsu, H., J. M. Dicks, E. Tamiya, and I. Karube. (1987), Piezoelectric Crystal Biosensor Modified with Protein A for Determination of Immunoglobulins, *Anal. Chem.*, 59, 2760-2763.