

섬광근접측정법

원자력병원 핵의학과, 싸이크로트론응용연구실

최 창 운

Scintillation Proximity Assay

Chang Woon Choi, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Cyclotron Application Laboratory,
Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

Abstract

Scintillation proximity assay (SPA) is a unique type of radioimmunoassay and makes it possible to use radioisotopes for monitoring binding reactions continuously without separation procedure. Microbeads containing a fluorophor are covalently linked to antibody or receptor. When a radiolabeled antigen or ligand is added it binds to the beads and the emitted short range electrons, excite the fluorophor in the beads. The light emitted can be measured in a scintillation counter. ³H or ¹²⁵I has been used for SPA. The sensitivities achieved with SPA are comparable to the sensitivities of other procedures. SPA is applicable to immunology, receptor binding, monitoring interactions of biomolecules and study for the kinetics of interaction between receptors and ligands. (Korean J Nucl Med 1999;33:461-5)

Key Words: Scintillation proximity assay, Radioimmunoassay

서 론

섬광근접측정법(scintillation proximity assay)은 1979년 Hart와 Greenwald에 의해 소개된 독특한 방사면역측정법(radioimmunoassay)의 변형된 검사법으로, 항체 또는 수용체들이 결합된 형광미세구슬(fluomicrosphere)을 사용하여 미량물질을 측정하는 검사법이다.¹⁾

미량물질 측정을 위하여 1960년 Berson과 Yalow

에 의해 소개된 방사면역측정법(radioimmunoassay)이 사용되었고,²⁾ 현재도 생물학 연구와 임상 검사에서 가장 널리 쓰이는 분석방법으로 사용되고 있다. 그러나 방사면역측정법은 많은 개선이 있었음에도 불구하고 결합분획과 유리분획의 분리과정이 필요하여 작업단계의 자동화가 어려우며, 비특이적 결합이 증가되는 단점이 있다. 섬광근접측정법은 예민도가 높고, 분리과정이 필요없는 특징을 가지고 있어 방사면역측정법이 가지는 문제점들을 해결할 수 있게 되었다.^{1,3)} 그러나 국내 핵의학분야에서 섬광근접측정법에 대한 관심과 연구가 부족한 면이 있었다. 이 종설에서는 섬광근접측정법의 원리를 중심으로 소개하고자 하였다.

1. 섬광근접측정법의 원리

Hart와 Greenwald는 에너지를 받으면 빛을 내는

Corresponding Author: Chang Woon Choi, M.D., Department of Nuclear Medicine, Cyclotron Application Laboratory, Korea Cancer Center Hospital, 215-4, Gongneung-Dong, Nowon-Ku, Seoul, Korea
Tel: (02) 970-1214, Fax: (02) 970-1341
E-mail: cwchoi@kcchsun.kcch.re.kr

형광체와 짧은 비거리를 가진 삼중수소를 이용하여 경합적 방법으로 미량물질 농도를 측정할 수 있는 방법을 고안하였고 이를 섬광근접측정법이라 하였다.¹⁾

섬광근접측정법은 경합적(competitive) 방사면역 측정법의 특수한 형태로 방사선에 조사되면 섬광을 방출하는 특수한 형광미세구슬(fluomicrobead)을 이용하여 물질의 농도를 측정한다. 원리는 형광체를 포함하는 형광미세구슬에 특정항원에 대한 항체나 수용체를 결합하여, 방사성 동위원소 표지항원이 형광미세구슬의 항체에 결합하여 비정거리내 형광미세구슬의 형광체를 여기시켜 광자를 방출하게 된다 (Fig. 1). 실제로는 시험관 내에서 완충용액에 수용체 또는 항체를 결합시킨 형광미세구슬과 방사성동위원소 표지 리간드 또는 항원을 첨가하여 이 수용체-리간드 또는 항원-항체의 결합한 정도를 베타계측기로 광자를 측정한다. 따라서 가능한 비특이적 측정치를 줄이기 위하여 비거리가 아주 짧은 사용되는 방사성동위원소를 사용하게 되며, 결합된 리간드만 형광미세구슬에 에너지가 전달되어 빛을 방출하고 결합되지 않은 리간드(충분히 멀리 떨어진 리간

드)는 빛을 방출하지 않는다. 사용되는 방사성 동위원소로는 전자를 방출하는 방사성 핵종들로 ^3H , ^{125}I 있다.^{5,7)} 또한 이 때 사용되는 완충용액은 일상적으로 베타계측기로 측정할 때 이용되는 용액이 아니라 보통 완충용액을 이용하여 β -ray 핵종의 측정에 사용되는 섬광액의 폐기 문제를 해결할 수 있게 되었다.

2. 섬광근접측정법의 구성

1) 방사성 동위원소

^3H 은 6 keV의 베타입자를 방출하고, 방출된 전자는 물 속에서 최대비거리가 8 μm 이며, 약 90%는 1 μm 이내에 흡수된다. ^{125}I 은 35 keV의 Auger전자를 방출하고 비정은 35 μm 이다. ^{125}I 은 Auger전자와 감마선을 발생하지만 감마선은 에너지가 커서 형광미세구슬에 영향을 주지 못하고 따라서 ^{125}I 은 섬광근접측정법에서 약한 베타방출원 역할을 한다. 이 두 방사성동위원소가 섬광근접측정법에 적당한 핵종으로 널리 사용되고 있다.⁴⁾ 최근 반감기가 긴(12년) ^3H 대신에 비방사능이 높고 비교적 값이 싸고 표지법이 잘 알려진 ^{125}I 이 많이 사용된다.

그 외에 ^{14}C , ^{35}S 등은 전자를 방출하는 핵종이나

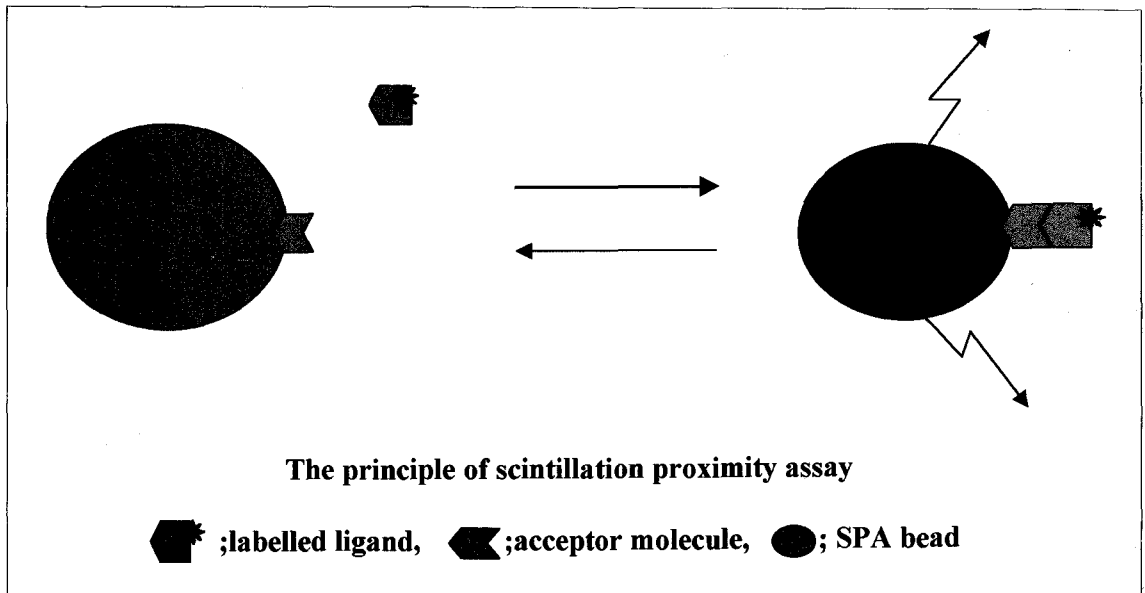


Fig. 1. The principle of scintillation proximity assay. Microbeads containing a fluorophor are covalently linked to acceptor molecule. Only radiolabelled ligand bound to the acceptor molecule generates a signal on the fluomicrosphere. The light emitted can be measured in a scintillation counter.

Table 1. Properties of Some Radioactive Nuclides of Interest to Biologist^a

Isotope	Half-Life	Approximate energies of emitted electrons (MeV)
³ H	12 y	0.018
¹²⁵ I	60 d	0.004-0.030
⁵⁸ Co	9 h	0.02
⁷² Se	9 d	0.03-0.04
⁷³ As	80 d	0.01-0.05
¹⁰⁰ Pd	4 d	0.01-0.08
¹⁰⁹ Cd	460 d	0.06-0.08
^{119m} Sn	250 d	0.02-0.06
¹¹⁹ Sb	119 h	0.02
¹⁹⁵ Au	190 d	0.02-0.08
¹⁹⁷ Hg	65 h	0.06-0.07
²¹⁰ Pb	20 y	0.04-0.06

^a, data from reference 3).

물속에서 비정미 80~90 μm로 SPA법에 사용하기에는 배후방사능 계수치가 지나치게 높아 부적당하다(Table 1).³⁾

2) 형광미세구슬

Hart와 Greenwald는 섬광물질을 함유한 고분자 구슬(polymer bead)을 개발하였고 이후 개선되어 최근 섬광근접측정법에 사용되는 형광미세구슬은 diphenyloxazole-latex나 polyvinyltoluene이 이용되고 있다.⁴⁾ Hart와 Greenwald가 구슬(bead)라는 표현을 사용하여 계속 이 용어를 사용하고 있으나 실제로는 구슬 형태가 아닌 형체를 가지지 않고 크기도 다양한(1~10 μm) 입자이다. 이 형광미세구슬에 원하는 항체 또는 수용체를 이중결합(cobalent bond)으로 부착시켜 이용한다.

3. 섬광근접측정법의 실제 이용

섬광근접측정법은 원리가 간단하여 형광미세구슬, 항원-항체, 또는 수용체-리간드와 방사성동위원소만 있으면 베타계측기로 측정이 가능하기 때문에 단백질, 펩타이드, 의약품 등 다양한 물질의 분석에 이용되고 있어 열거할 수도 없이 많은 연구에 이용되고 있다.⁶⁻⁹⁾ 초기 섬광근접측정법에 방사성동위원소로 ³H이 이용되었으나, ³H은 반감기가 길고 폐기

물 처리에 불편하여, 최근에는 ¹²⁵I이 주로 이용되고 있으며, ¹²⁵I은 ³H보다 방출전자의 에너지가 높아 예민도를 높일 수 있고 표지방법이 잘 알려져 있는 장점도 가지고 있다.

섬광근접측정법의 장점은 측정반응이 일어나는 동안 형광미세구슬에 결합된 방사성동위원소 표지 리간드에서 방출된 방사선이 계속 형광미세구슬로부터 빛을 발생시키므로 연속적인 결합 정도를 측정할 수 있다는 점이다. 따라서 동역학적 분석이 가능하여 다양한 수용체의 연구에 이용되고 있다. 핵의학 분야에 국한하여 생각하면 방사면역측정법은 결합분획과 유리분획의 분리과정이 필요하여 작업단계의 자동화가 어려운 반면에 섬광근접측정법은 분리과정이 필요없는 특징을 가지고 있어 자동화 검사장치 개발이 가능하다(Table 2).

국내 핵의학에서 저자 등이 섬광근접측정법으로 사람용모성 성선자극호르몬(human chorionic gonadotropin) 측정을 위한 기초연구를 보고한 바 있으며, anti-α hCG-biotin을 이용하여 작성한 표준곡선에서 0.5~200 mIU/ml 범위에서 우수한 직선성을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).¹⁰⁾

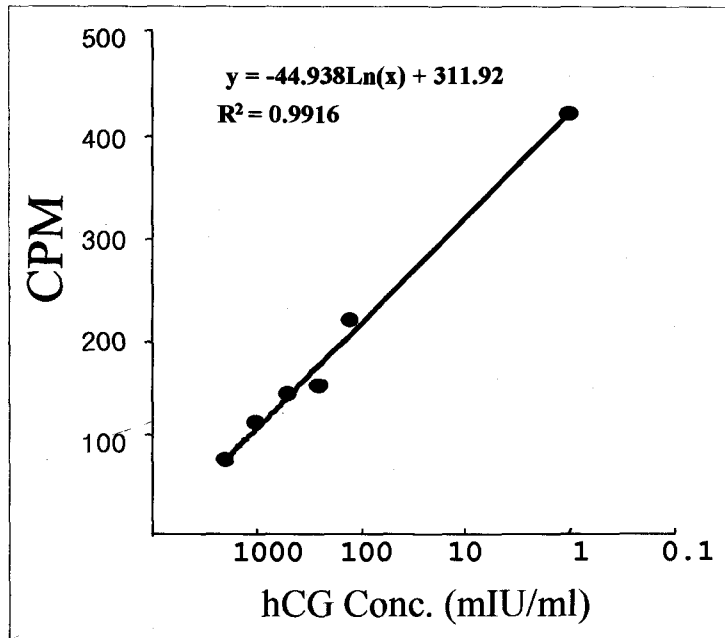


Fig. 2. Standard curve of the hCG measured by scintillation proximity assay. This result shows high sensitivity and linearity from 0.5 mIU/ml to 200 mIU/ml.

Table 2. Comparison of Scintillation Proximity Assay and Radioimmunoassay

	RIA	SPA
Sensitivity	Comparable	Comparable
Separation procedure of free from bound forms	Necessary	Not necessary
Automation	Difficult	Possible
Kinetic study	Impossible	Possible
Counter	γ -counter	β -counter
Availability of kit	Easy	Commercialized, but limited

결 론

섬광근접측정법은 경합적 방사면역측정법의 한 검사법으로, 항체 또는 수용체들이 결합된 형광미세구슬과 짧은 비거리의 전자를 방출하는 방사성동위원소를 사용하여 미량물질을 측정하는 검사법이다. 섬광근접측정법은 방사면역측정법과 달리 결합분획과 유리분획의 분리과정이 불필요하여 자동화가 가능한 검사법으로 예민도가 높고, 동력학적 분석

(kinetic analysis)이 가능하다.

외국의 경우는 섬광근접측정법을 다양한 기초연구에 응용하고 있음에 비하여 국내에서는 아직 섬광근접측정법에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 이는 국내에서 섬광근접측정법에 대한 이해가 부족하고, 검사키트를 이용하기 어려운 실정에 기인한다고 생각된다. 앞으로 형광미세구슬의 생산에 관한 연구가 필요하며, 항체의 결합, 동위원소 표지 등의 기존의 연구와 결합으로 섬광근접측정법은 중요한 핵의학적 검사법으로 발전할 수 있을 것으로 전망된다.

참 고 문 헌

- 1) Hart HE, Greenwald EB. Scintillation proximity assay (SPA): A new method of immunoassay. *Mol Immunol* 1979;16:265-7.
- 2) Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest*, 1960;39:1157-75.
- 3) Udenfriend S, Gerber L, Nelson N. Scintillation proximity assay: A sensitive and continuous isotopic method for monitoring ligand/receptor and antigen/antibody interactions. *Anal Biochem* 1987; 161:494-500.
- 4) Bosworth N, Towers P. Scintillation proximity assay. *Nature* 1989;341:167-8.
- 5) Udenfriend S, Gerber L, Brink L, Spector S. Scintillation proximity radioimmunoassay utilizing ¹²⁵I-labeled ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8672-6.
- 6) Nelson N. A novel method for the detection of receptors and membrane proteins by scintillation proximity radioassay. *Anal Biochem* 1978;165; 287-93.
- 7) de Serres M, McNulty MJ, Christensen L, Zon G, Findlay JW. Development of a novel scintillation proximity competitive hybridization assay for the determination of phosphorothioate antisense oligonucleotide plasma concentrations in a toxicokinetic study. *Anal Biochem* 1996;233;228-33.
- 8) Kyono K, Miyashiro M, Taguchi I. Detection of hepatitis C virus helicase activity using the scintillation proximity assay system. *Anal Biochem* 1998;257;120-6.
- 9) Frolik CA, Black EC, Chandrasekhar S, Adrian MD. Development of a scintillation proximity assay for high-throughput measurement of intact parathyroid hormone. *Anal Biochem* 1998;265; 216-24.
- 10) Choi TH, Choi CW, Lim SM, Woo KS, Chung WS, Lim SJ, Lee SJ. Basic research of measurement of serum HCG with scintillation proximity assay. *Korean J Nucl Med* 1998;32;20P.