

## 수정진동자를 이용한 Au 표면에서 avidin-biotin 결합 리포솜 막의 형성구조 분석

†송 성 훈·조 흥 식·박 종 원·김 광·\*中村 史·\*Qing Yang·\*三宅 淳·장 상 목  
동아대학교 화학공학과, \*日本 工業技術院 産業技術融合領域研究所  
(접수 : 2000. 8. 24., 게재승인 : 2000. 10. 10.)

### Analysis of Avidin-biotinylated Liposome Layers on Au Electrode by Quartz Crystal Analyzer

Seong-Hun Song†, Hong-Sig Cho, Jong-Won Park, Kwang Kim, \*Chikashi Nakamura, \*Qing Yang,  
\*Jun Miyake, and Sang-Mok Chang

Department of Chemical Engineering, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

\*Tissue Engineering Group, National Institute for Advanced Interdisciplinary Research, 1-1-4, Higashi, Tsukuba,  
Ibaraki 305-8562, Japan

(Received : 2000. 8. 24., Accepted : 2000. 10. 10.)

Liposomes and proteoliposomes, artificial membranes, can interact with many solutes, such as drugs, peptides and proteins. The immobilization of (proteo)liposomes as supramolecular aggregates on gold surfaces have potential applications in nano and biosensor technology. We demonstrated a quartz crystal analyzer (QCA) based method to monitor the construction of multi-layers of unilamellar liposomes based on avidin-biotin binding on gold surfaces using a quartz crystal microbalance (QCM). Thus, the QCA provides an on line and efficient method of detecting the construction of protein membranes, which has applications in biosensing systems.

**Key Words** : avidin, biotin, liposome, QCM, LUVs

#### 서 론

금속 표면에 유기 분자막의 고정화와 그 고정화된 유기 분자막의 구조 제어는 바이오 센서, 세포 조절, 나노테크놀로지 분야에서 단백질 응용(1)의 가장 중요한 부분이다. Avidin-biotin은 단백질 고정화에 널리 사용(2)되고 있는 것으로, biotin은 생체 내에서 아미노산과 당의 대사에 포함된 비타민 H로서 잘 알려져 있고, 달걀 흰자에 있는 단백질인 avidin과의 선택적인 강한 결합력을 가지고 있다(3). avidin은 금속표면에 강하게 흡착하며, 또 다른 한편에는 각종 단백질과 강하게 결합한다. avidin의 이런 특성을 이용하여 각종 단백질을 고정화시켜 바이오센서 개발에 응용하고 있다. 그리고 biotin 리포솜은 넓은 활성 표면적과 선택적 결합성 때문에 분석화학분야에서 널리 이용되고 있다. 따라서 biotin에 결합된 생체 분자를 avidin과 biotin의 강한 결합력을 이용하면 금

속 표면 위에 아주 간단하게 고정화할 수 있을 것이며 그 응용도 광범위 할 것이다. Avidin-biotin의 결합은 단백질과 리간드 사이의 강한 결합 중의 하나로서 이 강한 결합은 면역조직 화학(4)를 포함하는 avidin-biotin 테크놀로지로서 다양한 분야에 응용할 수 있다.

미량 질량 분석기로서의 QCA를 이용하여 공진주파수와 최근 Muramatsu 등(5~9)이 제안한 공진저항 개념을 도입하여 이들 변화량을 연속적으로 측정함으로써 수정진동자 표면 위에서 일어나는 박막의 질량이나 점탄성 변화 즉, 특성 변화를 모니터링 할 수 있다. 본 연구에서는 QCA를 이용하여 avidin과 biotin의 강한 결합력에 의해 구성되는 다층의 고분자 층의 결합 여부를 분석하고자 하였다.

#### 이 론

##### 수정진동자의 모식도와 진동모드

Figure 1은 수정진동자의 진동모드와 모식도를 나타낸 것이다. 수정진동자의 양면에 있는 전극에 RF(Radio-Frequency) 전압을 걸어주면 수정진동자 수직방향으로 전장이 형성되어 지고 수정진동자는 전장과는 수직인 수평방향으로 진동하게

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
Dong-A University, Pusan 604-714, Korea  
Tel : +82-51-200-6861, Fax : +82-51-200-7728  
E-mail : smjang@mail.donga.ac.kr

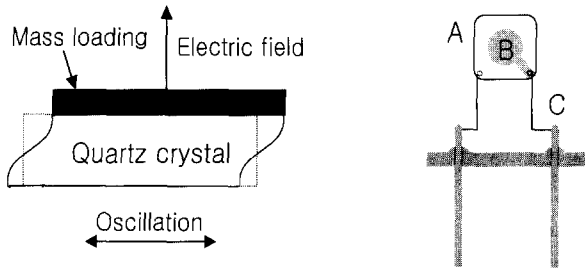


Figure 1. AT-cut quartz crystal's shear vibration model. (A: bare quartz, B: gold electrode, C: lead wire)

된다.

이때, 수평방향으로 진동하는 수정진동자의 전극 표면 위에 특정 물질이 흡착하게 되면 진동에너지가 감소하게 되고, 결과적으로 흡착된 물질의 양에 비례하여 수정진동자의 주파수가 감소하게 된다.

**액상에서의 중량변화에 따른 공진주파수의 변화**

일반적으로 수정진동자가 액체와 접촉한 상태에서는 기계적 저항이 커서 발진이 되지 않을 것으로 생각되어 왔으나, 실제에 있어서 액체와 접촉한 상태에서도 발진이 가능하며, 또한 액체의 종류에 따라서도 발진 주파수가 변화한다는 사실이 실험적으로 밝혀졌다. 수정진동자의 표면이 액체와 접하여 진동하는 경우 용액이 갖는 점성 때문에 용액과 수정진동자 표면 사이에는 전단응력에 의한 기계적인 저항이 생긴다. 이 전단응력에 의한 기계적인 저항 때문에 용액자체가 일종의 질량부하 작용을 하게 되고 이에 따라 공진주파수도 변화하게 된다. 따라서 용액중에서 혹은 수정진동자의 표면에 흡착된 물질의 물성에 따라서 진동에너지 감소는 달라지게 된다. 즉 수정진동자 표면에 탄성막이 형성되면 막의 물성에 따른 진동에너지 감소는 거의 없지만 점탄성막이 형성하게 되면 막의 점성이 수정진동자의 공진운동에 대한 저항으로 작용하여 질량부하효과를 일으키고 진동에너지도 감소하게 된다. 이 현상을 해석하기 위하여 공진저항 개념을 도입하였다. 액체중에서 횡 방향으로 탄성진동을 하는 경우 액체와 접한 수정진동자의 발진주파수 특성에 관한 식은 Kanazawa등에 의해 식 (1)과 같이 유도되었다.

$$\Delta F = -F_s^{3/2}(\eta \rho_L / \pi \mu \rho_Q)^{1/2} \quad (1)$$

여기서,  $\eta$ 는 액체의 점성,  $\mu$ 는 수정의 탄성,  $\rho_L$ 은 액체의 밀도,  $\rho_Q$ 는 수정의 밀도이다. 액체와 접한 경우 주파수 변화는  $(\rho_L \eta)^{1/2}$ 에 비례하여 변함을 알 수 있고 수정진동자를 사용함으로써 수정진동자에 접한 용액의 밀도와 점도의 측정도 가능함을 알 수 있다.

**수정진동자의 공진저항**

수정진동자 표면위의 정량적인 특성변화만을 나타내는 공진주파수와는 달리, 공진저항 개념을 도입하여 공진주파수와 공진저항 변화를 동시에 측정하여 상호 비교함으로써 수정진동자 표면위에서 일어나는 정성적인 특성변화도 분석할 수 있다. 공진저항에 관련한 식은 Muramatsu등에 의해 식 (2)와

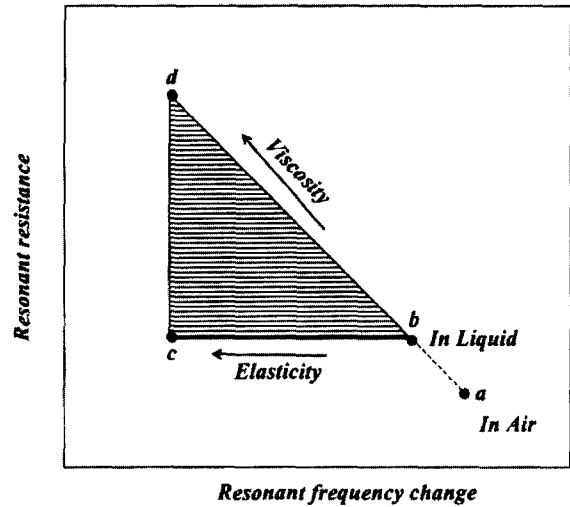


Figure 2. The quantitative relations of resonant frequency change and resonant resistance(F-R) diagram

같이 유도되었다.

$$R_1 = (2\pi F_s \rho_L \eta)^{1/2} A / k^2 \quad (2)$$

식 (2)에서 공진저항  $R_1$ 은 액체의 점도와 밀도에 의존하여 변화한다는 것을 알 수가 있다. 즉, 수정진동자의 공진저항  $R_1$ 을 측정함으로써 용액의 점도와 밀도의 변화를 계산할 수 있다는 것이다.

Figure 2에 F-R 도를 나타내었다. 여기서 수정진동자가 공기중에서 진동하는 경우 공진하는 수정진동자에는 수정진동자 자체의 기계적 저항만이 존재하므로 공진저항이 상당히 적어 F-R도의 낮은 영역(a)에 존재한다. 이 수정진동자가 액체와 접하여 진동하게 되면 수정진동자의 진동에 따라 유동하는 액의 질량 부하 효과에 의해 공진주파수가 감소하고 또한 액의 점성효과로 인한 진동에너지의 감소 때문에 공진저항이 증가한다(b). 이러한 일련의 분석을 통해 용액중 수정진동자 표면에 각종 형태의 막이 형성 되었을 경우의 형성된 막의 질량변화에 대한 공진주파수 변화와 공진저항 변화의 상관도인 F-R diagram을 작성하여 정성적으로 비교함으로써 수정진동자 표면위에 형성된 막막의 동특성을 보다 상세하게 고찰할 수 있다(10~11).

**실 험**

**LUVs(Large unilamellar liposomes)의 제조**

LUVs는 DMPC(dimyristoyl phosphatidyl choline)과 B-c-P(phosphatidylethanol amine-cap-biotinyl) 을 chloroform용액에서 50:2의 비율로 조제하여 이것을 회전증발을 행하고 고진공에서 하루 정치시킨다. 이렇게 제조된 lipid film을 Hepes buffer에서 수화시킨후 수조에서 sonication을 1분간 행한다. 여기서 제조된 multilamellar liposome(MLVs)를 100 nm의 polycarbonate 필터를 사용하여 고압 추출시켜 Large unilamellar liposome(LUVs)를 제조하였다.

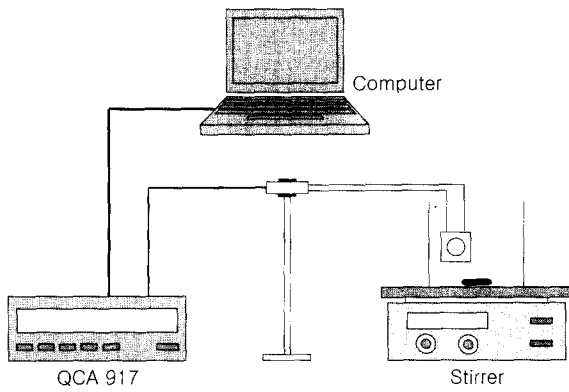


Figure 3. Schematic diagram of QCA system.

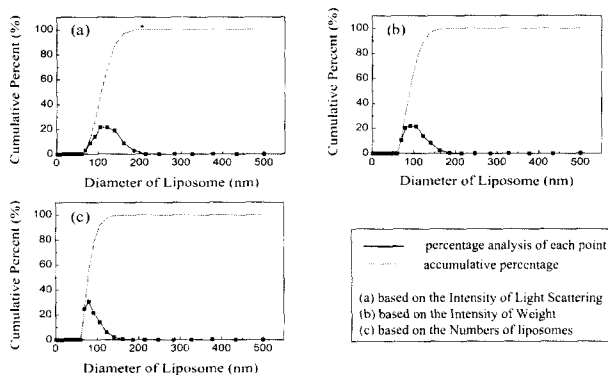


Figure 4. The analysis results of cumulative biotinylated liposome's size measured by Dynamic Light Scattering(DLS).

**Au표면상에서의 LUVs의 적층 분석**

AU 수정진동자 표면상에서의 LUVs의 적층과정을 분석하기 위한 장치도를 Figure 3에 나타내었다. Large unilamellar liposomes(LUVs, 16.4 mM phospholipid)의 적층 과정을 조사하기 위하여 다음의 네 단계로 나누어 그 변화량을 측정하였다. 900 ml HEPES 완충용액 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4)에 미리 전처리한 QCM 셀을 넣고, 정상 상태에 도달할 때까지 방치한다. 주파수 변화가 정상상태에 도달하면, 이 완충용액에 10 mg/ml avidin 100 ml를 첨가한다. 주파수 변화가 정상상태에 도달하면 다시 이 셀을 세척한 후 새로운 완충용액 900 ml을 첨가한다. 그리고 주파수가 정상 상태에 도달하면, biotin에 결합된 LUVs 100 ml를 첨가하여 정상 상태에 도달할 때까지 방치한다. 이 때 각 단계에서의 공진주파수 변화를 QCA(QCA917, SEIKO EG&G, Japan)로 측정했다(12-13). 이러한 과정을 반복하면서 avidin-biotin을 누적시켜 갔다. LUVs의 조성과 평균크기 측정은 egg phosphatidylcholine (>99% pure, Avanti Polar Lipids, Alabaster)로 하였고, DLS(Dynamic Light Scattering)는 100 nm에서 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**LUVs의 크기분석**

Au표면상에서 LUVs의 적층과정에서 LUVs의 농도를 계산

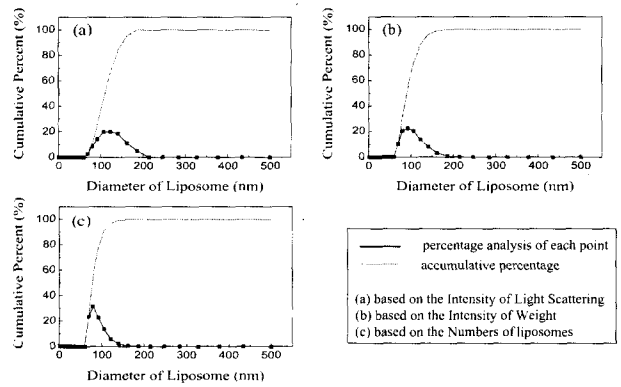


Figure 5. The analysis results of cumulative biotinylated liposome's size measured by Dynamic Light Scattering(DLS) after one week.

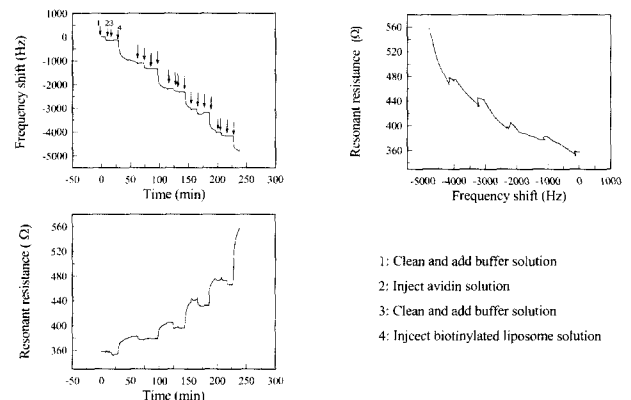


Figure 6. Typical response for the construction of avidin-biotinylated liposome layers.

하고 변형성 여부를 검토하기 위해 biotin과 결합된 liposome의 크기를 DLS(dynamic light scattering)법과 liposome의 수에 기초하여 그 적층정도를 분석하였다. Figure 4는 LUVs를 조제하여 바로 측정한 결과를 나타내고 있으며, 집합체 형성 여부를 검사하기 위하여 1주일 동안 정치시켜 측정한 결과를 Figure 5에 나타내었다. Figure 4와 Figure 5에서 알 수 있듯이 1주일 후에도 LUVs의 크기에는 거의 차이가 없음을 알 수 있다. 즉, 1주일의 시간내에서 LUVs막의 누적 실험에 신뢰성이 있음을 알 수 있다.

**Au표면에서의 LUVs의 고정화**

Au표면에 부착된 avidin에 biotin과 결합된 LUVs가 avidin-biotin간의 결합력에 의해 적층되는 일련의 과정에서 공진주파수의 변화와 공진저항 변화를 측정하여 Figure 6에 나타내었다. LUVs의 적층과정을 총 5회 반복하였으며 각각의 단계에서의 일련의 과정들을 화살표로 각각 표시하였다. Au 수정진동자의 표면을 세척하고 HEPES buffer 용액에 전처리한 수정진동자를 HEPES buffer 용액에 넣어(1) 공진주파수가 정상상태에 도달하면 avidin용액을 주입하였다(2). 이 때 공진주파수는 약 160 ~ 200Hz변화하였고, 공진저항은 약간 증가하였다. 이것을 다시 세척한후 새로운 완충용액을 첨가하였다(3). 이 때 약하게 흡착된 avidin이 떨어져 나오기 때문에 공진주파수는 약간 증가하고 공진저항은 감소하였다. 공진주파수가

정상상태에 도달하면, biotin과 결합한 LUVs를 주입하였다(4). 이 때 공진주파수는 약 800 ~ 900Hz 변화였고 공진저항은 증가하였다. 이러한 과정을 거치면서 avidin-biotin 결합이 누적되어 가는 것을 알 수 있다.

### 요 약

Avidin의 금속표면에 대한 강한 결합력과 avidin-biotin의 강한 결합력을 이용하여 금속 표면 위에 리포솜과 같은 유기 분자막의 다층 형성 과정을 수정진동자를 이용하여 분석하였다. 금속 표면위에 적층되는 유기 분자막에 대한 정보를 수집하고 그 가능성을 검토하여 바이오 센서에서 감도를 향상시킬 수 있는 새로운 방법을 제시하고자 하였다.

### 감 사

이 논문은 2000년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음. (KRF-2000- 041-E00377)

### REFERENCES

1. Morgan, H., Pritchard D. J., and Cooper J. M., *Biosens. Bioelectron.* **10**, p.841~846 (1995)
2. Wilchek M., Bayer E.A., *Anal. Biochem.*, **171**, p.1~32 (1988)
3. Sugawara K., Tanaka S., and Nakamura H., *Anal. Chem.*, **67**, p.299~302 (1995).
4. Bayer E. A., Safars M., and Wilchek M., *Anal. Biochem.*, **61**, p.262~271 (1987).
5. H. Muramatsu, M. Suda, T. Ataka, A. Seki, E. Tamiya, and Karube, *Sensors and Actuators*, A21 - A23, 362 (1990)
6. Y. Okahata, K. Kimura, and K. Ariga, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **111**, 1363 (1987)
7. X. Ye, H. Muramatsu, K. Kimura, T. Sakuhara, and T. Ataka, *J. Electroanal. Chem.*, **258**, 457 (1989)
8. H. Muramatsu, E. Tamiya, and I. Karube, *Anal. Chim. Acta.*, **251**, 135 (1991)
9. H. Muramatsu, X. Ye, M. Suda, T. Sakuhara, and T. Ataka, *J. Electroanal. Chem.*, **322**, 311 (1992)
10. J. M. Kim, S. M. Chang, and H. Muramatsu Scanning Localized Viscoelastic Image using a Quartz Crystal Resonator Combined with an Atomic Force Microscopy, *Applied Physics Letters*, 74(3), p.466~468 (1999)
11. J. M. Kim, S. M. Chang, and H. Muramatsu Monitoring changes in the viscoelastic properties of thin polymer films by the quartz crystal resonator, *Polymer*, 40(12), p.3291~3299 (1999)
12. J. M. Kim, S. M. Chang, and H. Muramatsu, In situ Optoelectrochemical Approach for the Dynamic Property Study of Polypyrrole Thin Film by Quartz Crystal Combined with UV-Vis Advanced Design, *J. Electrochem. Soc.*, 146(12), p. 4544~4550 (1999)
13. S. A. Choi, S. R. Kin, J. D. Kim, M. S. Park, Y. K. Chang, and S. M. Chang, The Characteristics of Quartz Crystal Microbalance Coated with Lipid Langmuir-Blgett Films as an Olfactory Sensing System, *Sensors and Materials*, 8(8), p.513~521 (1996)