

## 단백질 바이오센서를 이용한 중금속 이온의 선택적 측정

김 균 영 ·<sup>1</sup>김 지 현 ·\*유 영 제  
서울대학교 공과대학 응용화학부, <sup>1</sup>산업자원부 생물화학산업과  
(접수 : 2001. 11. 30., 게재승인 : 2001. 12. 21.)

## Selective Analysis of Heavy Metal Ions Using Protein-based Biosensor

Kyun Young Kim, Ji Hyeon Kim<sup>1</sup>, and Young Je Yoo\*  
School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742  
<sup>1</sup>Biotechnology and Chemicals Industries Division, Ministry of Commerce,  
Industry and Energy, Kyonggi-Do 427-723, Korea  
(Received : 2001. 11. 30., Accepted : 2001. 12. 21.)

New protein-based biosensors using fluorescence for the detecting heavy metal ions were developed. The detection range of heavy metal ions was between  $10^{-3}$  mM - 1 mM using casein and albumin as a transducer of biosensor, respectively. Casein showed better results for detecting heavy metal ions than albumin. Simple assay method was developed for the selective analysis of the two heavy metal ions by the fluorescence at wavelength of excitation and emission. This method was successfully applied to determining the concentrations of  $Co^{2+}$  and  $Fe^{3+}$ .

**Key Words** : biosensor, casein, albumin, fluorescence, heavy metal

### 서 론

폐수 속의 중금속에 의한 피해는 오래 전부터 잘 알려져 왔다. 폐수 속의 중금속은 일차적으로 수중 플랑크톤이나 조류 등에 의하여 흡수되어 축적되고, 이차적으로 이들을 먹고 사는 물고기에 축적되며 마지막으로 우리 인체에 축적되는 먹이 사슬에 의하여 인체에 영향을 미친다. 따라서 수용액 상에서 중금속의 농도를 분석하는 것은 매우 중요한 일이다.

금속이온의 농도를 측정하는 방법에는 현재까지 atomic absorption spectroscopy, inductively coupled plasma optical emission spectroscopy와 inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICPMS) 등 분광학적 방법이 널리 사용되고 있다(1). 그러나, 기기의 검출한계와 비정확성, 불편함 등으로 다른 측정 방법에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있는데 그 중에서도 바이오센서가 대표적인 대안으로 대두되고 있다.

바이오센서의 주요 원리는 바이오센서의 transducer와 중금속 이온과의 상호작용에 따른 변화를 측정하는 것인데 측정 시그널에 따라 다양한 종류의 바이오센서가 보고되고 있다. Transducer에 사용되는 단백질은 금속이온과 결합하면 구조적

변화가 발생하여 저항이 바뀌게 되는데 이를 전류나 전위차와 같은 전기 신호로 측정하거나(2) 금속 전극에 urease 효소를 고정화 시킨 후 중금속 이온에 의한 효소의 활성 저하를 측정하고 있다(3). 또한 luminescence 바이오센서의 경우 중금속 이온이 자극원으로 작용하여 일정 농도 범위에서 중금속 농도와 비례하여 발광하는 현상을 이용하고 있다(4). 형광을 이용한 경우에는 중금속 이온이 형광염료가 결합된 transducer로 사용되는 물질과 결합하여 발생하는 에너지 전이를 형광으로 측정하는데, 형광의 phase angle(5), intensity(6), life time(7) 등 다양한 시그널을 변수로 사용할 수 있고 측정이 편리하다는 장점이 있다. 또한 형광도를 이용하는 특성상 감도와 정확도도 우수하다.

한편 실제 폐수 속에는 여러 중금속이 혼합되어 있는 경우가 많은데 지금까지 연구는 주로 단일 중금속을 대상으로 수행되어 왔다. 일부 고분자를 이용한 형광센서의 경우 N-dansyl-N'-ethylthiourea(DET)(8), N-methyl-N-9-(methylantracene)-N'-benzoylthiourea(MABT)(9) 등을 첨가하여 pH에 따라 중금속 이온을 선택적으로 측정하고 있으나, 바이오센서의 경우 중금속 혼합물에서 선택적으로 중금속 이온을 분석하는 연구는 아직까지 미진한 실정이다.

본 연구에서는 형광염료와 transducer로 사용되는 단백질의 영향을 고찰하여 중금속 이온 측정을 위한 신규 형광 단백질 바이오센서를 제작하였으며 두 가지 중금속 혼합물에서 각각의 중금속 농도를 측정할 수 있는 방법을 제시하였다.

\*Corresponding Author : School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea.  
Tel : +82-2-880-7411, Fax : +82-2-888-7295  
E-mail : yjyoo@snu.ac.kr

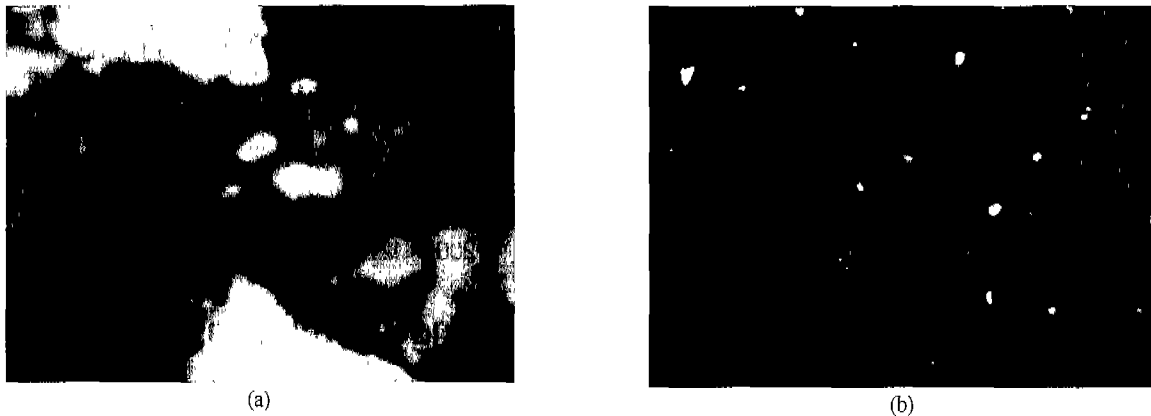


Figure 1. Fluorescence electron microscopy of labeled protein. Pictures were taken by Nikon Eclipse Te 300. Enlarging magnitude was 200 in UV-VIS region. (a) Casein-FITC powder (b) casein-FITC solution.

## 재료 및 방법

### 형광염료 표지 및 확인

Transducer 단백질인 알부민과 카제인에 형광염료인 eosin-5-isothiocyanate(EITC), fluorescein-isothiocyanate(FITC)를 298.15 K, potassium phosphate buffer(pH 7.0) 용액하에서 각각 부착 표지시켰다. 갈색 플라스크에서 6시간 동안 반응을 진행하였으며 반응 후 단백질에 부착되지 않은 형광염료는 Sephadex C-50 (Pharmacia Biotech.) 컬럼을 이용하여 gel-filtration으로 분리하였다. 반응에 사용된 단백질과 형광염료는 Sigma Chemical사에서 구입하였다.

Fluorescence 전자 현미경(Nikon Eclipse Te 300)을 이용하여 형광염료의 표지 여부를 확인하였다. 노출 시간을 2, -1, 0, 1, 2로 조절하였고 파장은 UV-VIS 영역에서 관찰하였다.

### 중금속 이온의 농도 측정

중금속 이온 농도는 단백질 바이오센서를 중금속 함유 시료에 첨가한 후 spectrofluorophotometer(Shimadzu, RF-5301PC)를 사용하여 측정하였다. 이때 bandwidth는 1.5 nm와 3.0 nm로 변화시켰다.

## 결과 및 고찰

### 형광 단백질 바이오센서 제작

형광 단백질 바이오센서를 제작하기 위하여 transducer 단백질로 우유 단백질에 함유되어 있는 카제인과 알부민을, 형광염료로는 fluorescein과 eosin을 사용하였다. 우유 단백질은 수은과 같은 중금속 이온을 산모에서 태아로부터 옮기는 역할을 수행하는데(10) 그 중에서 카제인과 알부민은 중금속 이온이 결합되는 대표적인 단백질로 알려져 있다. 카제인과 알부민은 아연, 크롬, 칼슘, 수은 등 다양한 중금속과 결합하는 특성이 있어(11-14) 중금속 이온의 흡착제로 사용 가능하다. 카제인과 알부민에는 여러 개의 중금속 결합위치가 있는 것으로 보고되고 있는데(12-14) 특히 카제인의 경우  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ 이 결합하는 위치가 서로 달라 두 단백질을 사용할 경우 중금속 이온을 선택적으로 분석할 수 있을 것으로 판단되었

다. 형광을 흡수하고 방출하는 염료인 fluorescein(FITC)과 eosin(EITC)은 단백질과 isothiocyanate 결합을 함으로써 표지되는데 표지방법이 간단하고 gel-filtration(15) 등으로 쉽게 분리된다는 장점이 있다.

먼저 단백질에 형광염료가 표지되었는지를 확인하기 위하여, 전자 현미경으로 단백질을 촬영하였다. Figure 1에서와 같이 카제인에 FITC가 잘 결합되어 있었으며, 증류수에 용해시킨 경우 단백질 바이오센서가 수용액 상에서도 고르게 분산됨을 알 수 있었다.

바이오센서를 제작하기 위하여 pH, 온도, 단백질 농도가 측정 감도에 미치는 영향은 고찰하였다. 먼저 pH의 경우 표지에 영향을 미치지 않고, 단백질의 용해도에 영향을 주지 않는 pH 7.0 완충 용액을 사용하였다. 온도의 경우 단백질의 구조 변성을 막고, 최고의 감도를 나타내는 적정 온도를 찾기 위하여 298.15 K에서 308.15 K범위에서 실험한 결과 303.15 K에서 상대적으로 감도가 좋음을 알았다(데이터 생략). 한편 단백질농도는 중금속이온의 측정범위와 관계가 있어 측정범위를 증가시키기 위해서는 적절한 단백질 농도를 결정하는 것이 중요하다. 본 실험에서는 카제인에 EITC가 표지된 단백질을 사용하여 비교적 고농도인 1 mM  $Cr^{6+}$ 를 대상으로 단백질 농도에 따른 형광도를 측정하였다. Figure 2에서와 같이 단백질 농도가 증가함에 따라 형광도가 증가하였으며  $3.45 \times 10^{-2}$  mM 이상의 농도에서는 형광도가 최대값을 보이고 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 위 결과를 바탕으로 바이오센서의 단백질 농도를  $3.45 \times 10^{-2}$  mM으로 결정하고 pH 7.0, 303.15 K에서 실험을 수행하였다.

### 형광 염료와 단백질 종류의 영향

단백질과 형광염료 종류를 변화시킨 카제인-FITC, 카제인-EITC, 알부민-FITC 3종류의 바이오센서를 가지고 중금속 이온 농도를 정량하였다. 바이오센서를 적절한 파장에서 excitation, emission 시키면 형광이 발생하는데 이 때 발생하는 형광도를 측정하면 적절한 범위에서 농도 정량이 가능하다. 먼저  $Cr^{6+}$ 과  $Fe^{3+}$  중금속 이온을 각각 첨가한 후 excitation, emission 시킨 결과 Figure 3에서와 같이 특정 파장에서 피크를 보였다.

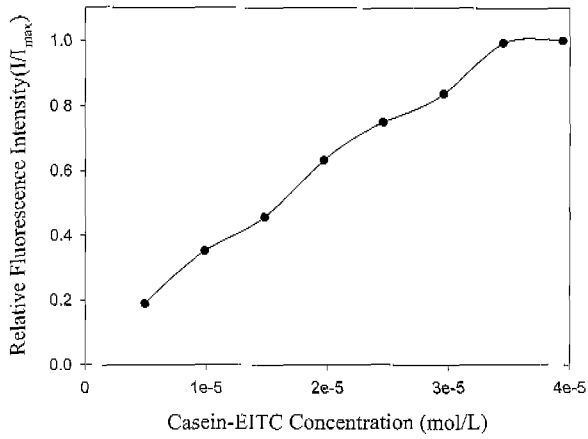


Figure 2. Effect of protein concentration on fluorescence of heavy metal ion. All samples were excited at 520 nm and emitted at 540 nm. Slit bandwidth was 1.5 nm. Casein-EITC and 1 mM Cr<sup>6+</sup> were used for the experiment.

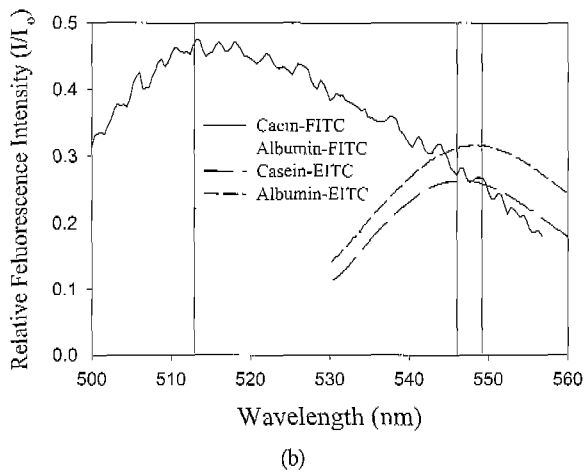
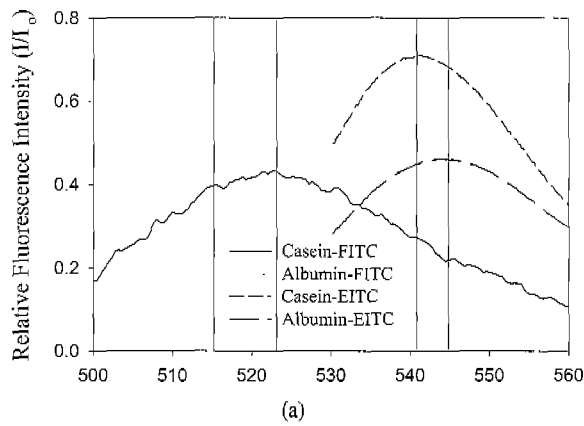


Figure 3. Emission scanning of (a) Cr<sup>6+</sup> and (b) Fe<sup>3+</sup>.

알부민-FITC를 사용하여 Cr<sup>6+</sup>과 Fe<sup>3+</sup> 농도 변화에 따른 형광도를 측정하여 Figure 4에 그 결과를 나타내었다. Cr<sup>6+</sup>의 경우 농도가 1 mM까지 증가함에 따라 선형적으로 형광도가 감소하고 있어 선형성이 유지되는 범위에서 정량곡선을 작성하면 농도 정량에 직접적으로 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 반면 Fe<sup>3+</sup>의 경우는 Cr<sup>6+</sup>에 비해 선형도가 우수하지 않는 것으로 관찰되었는데 이는 단백질과 중금속간의 결합력차이

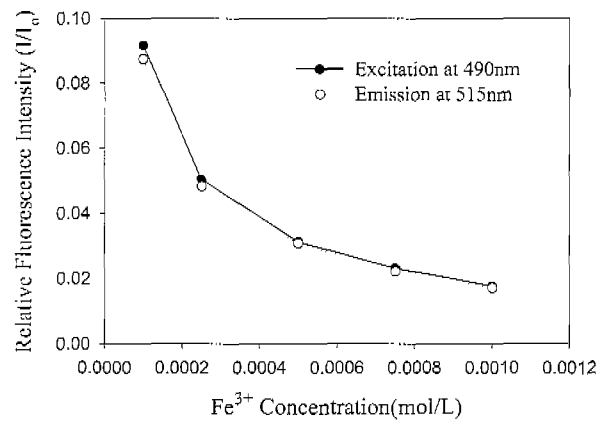
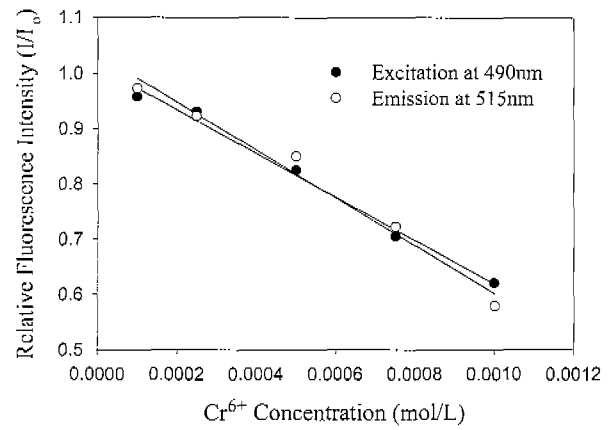


Figure 4. Calibration curves of Cr<sup>6+</sup> Fe<sup>3+</sup> by albumin-FITC. All samples were excited at 490nm and emitted at 515 nm.

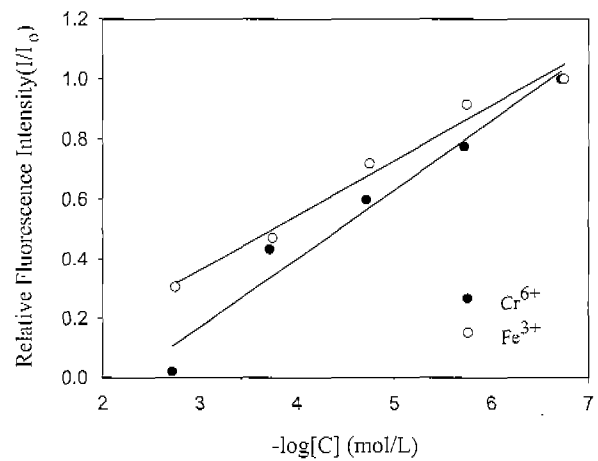


Figure 5. Calibration curves of Cr<sup>6+</sup> and Fe<sup>3+</sup> by casein-FITC. All samples were excited at 490 nm and emitted at 515 nm.

에 기인하여 나타나는 현상으로 판단된다.

Figure 5에 카제인-FITC를 사용하여 중금속 농도변화에 따른 형광도를 나타내었다. 분광학 데이터 처리에 주로 사용되는 방법대로 X축을 log 스케일로 처리하였다. 형광도는 10<sup>-3</sup> mM-1 mM의 농도 범위에서 선형성을 보였고 알부민-FITC 경우와 달리 Cr<sup>6+</sup>, Fe<sup>3+</sup> 두 이온에 대한 선형도가 모두 우수하였다.

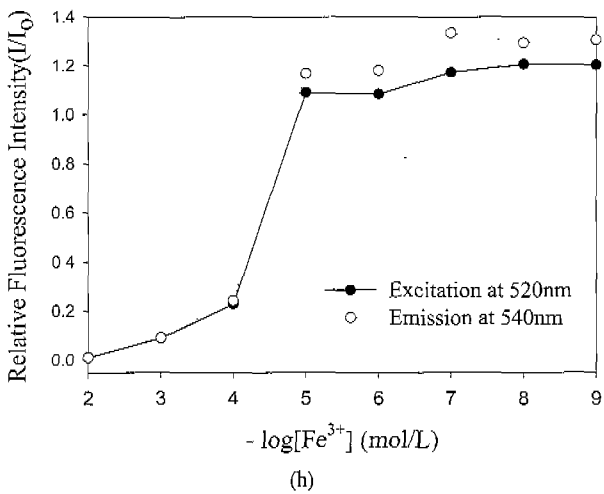
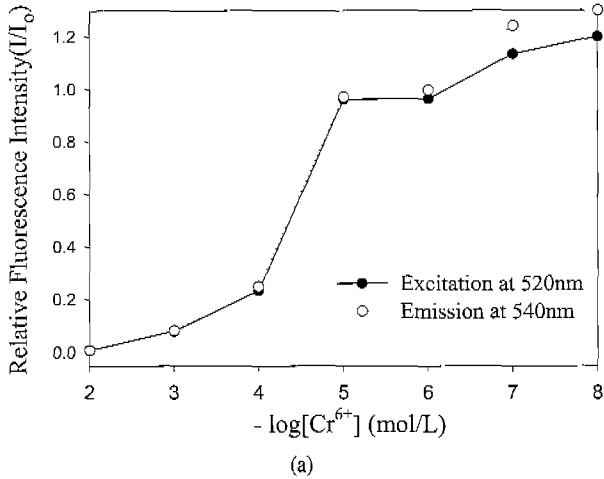


Figure 6. Calibration curves of Cr<sup>6+</sup> and Fe<sup>3+</sup> by casein-EITC. All samples were excited at 490 nm and emitted at 515 nm.

Casein-EITC의 경우 Figure 6에서와 같이 형광도가 10 mM에서 10<sup>2</sup> mM까지 급격히 증가한 후 10<sup>3</sup> mM에서 10<sup>5</sup> mM까지 다시 약간 증가하였다. Cr<sup>6+</sup>의 경우 Fe<sup>3+</sup>과는 달리, 10<sup>3</sup> mM에서 10<sup>5</sup> mM까지 완만하지만, 뚜렷한 변화를 보여 10<sup>5</sup> mM의 낮은 농도범위까지 정량이 가능한 것으로 판단되었다.

중금속 혼합물에서의 농도 계산

형광도는 형광을 나타내는 중금속의 특정 농도 범위에서 선형성을 가지며 그 관계는 Stern-Volmer 상수로 식 (1)과 같이 나타낼 수 있다(16).

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[C] \tag{1}$$

여기서 I<sub>0</sub> 와 I 는 각각 중금속 이온이 없을 때와 있을 때의 형광도이고, K<sub>SV</sub> 는 Stern-Volmer 상수, C는 중금속 이온 농도이다.

혼합물에서 Stern-Volmer 상수는 각 중금속의 결합정도에 따라 결정된다

$$K_{sv,mix} = \sum r_1 K_{SV,1}, \quad \sum r_1 = 1 \tag{2}$$

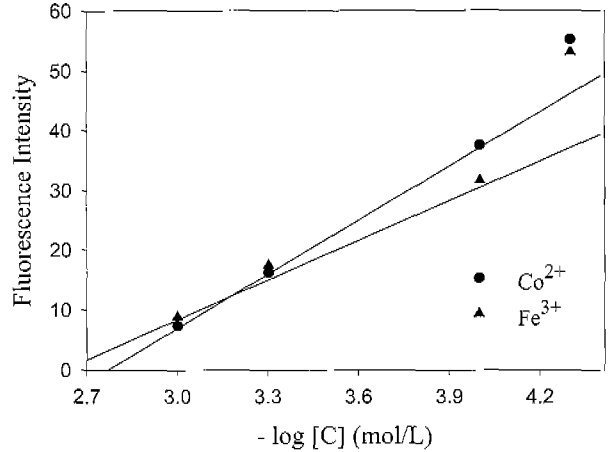


Figure 7. Calibration curves of Co<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> at emission. All samples were excited at 520 nm and emitted at 540 nm. Casein-EITC was used for the experiments.

여기서 r은 결합 비율을 나타내는 상수이다.

한편 두 중금속이 혼합된 혼합물에서 형광도는 각 중금속 농도에 비례하여 식 (3)-(4)와 같이 결정된다.

$$\text{At excitation: } I_{ex,mix} = r_{ex,A} I_{ex,A} + r_{ex,B} I_{ex,B} \tag{3}$$

$$\text{At emission: } I_{em,mix} = r_{em,A} I_{em,A} + r_{em,B} I_{em,B} \tag{4}$$

따라서 각 이온의 Stern-Volmer 상수와 농도 정량식을 알고 있는 두 중금속 이온의 혼합물의 경우, 먼저 식 (1)에 의해 혼합물의 Stern-Volmer 상수를 결정하여 각 중금속 이온의 결합비율 r을 계산한 후 혼합물의 형광도를 측정하면 식 (3), (4)에 의해 각 중금속 이온의 농도를 계산할 수 있다.

따라서 Co<sup>2+</sup>와 Fe<sup>3+</sup>를 대상으로 본 측정 방법의 유효성을 검증하여 보았다. 먼저 emission에서 Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, 혼합물의 Stern-Volmer 상수는 각각 28164, 25369, 26960으로 측정되었으며 이로부터 Co<sup>2+</sup>의 결합상수가 0.45, Fe<sup>3+</sup>의 결합상수가 0.55임을 알았다. Figure 7에 카제인-EITC 바이오센서를 사용하여 두 중금속 이온의 형광도를 측정한 결과를 나타내었다. Co<sup>2+</sup>와 Fe<sup>3+</sup> 이온은 5x10<sup>2</sup> mM-1.0 mM 범위에서 농도를 log 스케일로 처리한 결과 형광도가 선형성을 나타내었고 그 결과를 농도 정량 곡선인 식 (5)-(6)으로 표현하였다. 혼합물에서의 형광도는 각 중금속 이온의 결합상수를 사용하여 식 (7)으로 나타낼 수 있다.

$$I_{em,Co^{2+}} = 30.27 \log [Co^{2+}]^{-1} - 83.53 \tag{5}$$

$$I_{em,Fe^{3+}} = 22.31 \log [Fe^{3+}]^{-1} - 57.24 \tag{6}$$

$$I_{em,mix} = 0.551 I_{em,Co^{2+}} + 0.451 I_{em,Fe^{3+}} \tag{7}$$

한편 excitation에서도 emission에서와 같은 방법으로 농도 정량식 (8)-(10)을 결정하였다

$$I_{ex,Co^{2+}} = 30.15 \log [Co^{2+}]^{-1} - 83.50 \tag{8}$$

Table 1. Comparison of measured and calculated fluorescences

Conc.(mM)	Measured	Calculated	Error(%)
1	7.9	8.4	6.3
0.5	16.3	16.4	0.6
0.25	25.2	24.4	3.2
0.1	38.0	35.1	7.6

$$I_{\text{ex, Fe}^{3+}} = 22.31 \log[\text{Fe}^{3+}]^{-1} - 57.24 \quad (9)$$

$$I_{\text{ex, max}} = 0.511 I_{\text{ex, Co}^{2+}} + 0.491 I_{\text{ex, Fe}^{3+}} \quad (10)$$

따라서 두 가지 중금속 혼합물에서의 각 중금속 이온의 농도는 excitation, emission에서 혼합물의 형광도를 측정 한 후 식 (7), (10)의 연립방정식을 활용하여 계산할 수 있다. 각각의 농도를 알고 있는  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  혼합물에서 동 방법을 적용한 결과 Table 1에서와 같이 형광도의 측정값과 계산값이 잘 일치함을 알 수 있었다.

### 요 약

형광을 이용하여 중금속 이온의 농도를 측정할 수 있는 신규 단백질 바이오센서를 제작하였다. 바이오센서의 transducer로 카제인과 알부민을 사용하였을 때  $10^{-3}$  mM-1 mM 범위에서 중금속 이온의 농도 정량이 가능하였고 카제인이 알부민에 비해 중금속 농도 정량에 우수성을 보였다. 또한 두 가지 중금속 혼합물에서 excitation과 emission과장에서 형광도를 측정하여 각 중금속 이온 농도를 선택적으로 정량하는 방법을 제시하였고,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  이온 혼합물을 대상으로 본 논문에서 제시한 방법의 유효성을 입증하였다.

### REFERENCES

- Jackson, K. W. and Chen, G (1996), Atomic absorption, atomic emission, and flame emission spectroscopy, *Anal. Chemistry* **68**, 231-256.
- Bontidean, I. Berggren, C. Johansson, G. Csoregi, E. Mattiasson, B. Lloyd, J. R. Jakeman, K. J. and Brown, N. L (1998), Detection of heavy metal ions at femtomolar levels using protein-based biosensors, *Anal. Chemistry* **70**, 4162-4169.
- Zhylyak, G.A. Dzyadovich, S.V. Korpan, Y.I. Soldatkin, A.P. and El'skaya, A.V. (1995), Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion determination, *Sensors and Actuators B* **24-25**, 145-148.
- Tauriainen, S. Karp, M. Chang, W. and Vitra, M (1998), Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead, *Biosensors and Bioelectronics* **13**, 931-938.
- Thompson, R. B. Ge, Z. Patchan, M. Huang, C. and Fierke, C. A (1996), Fiber optic biosensor for  $\text{Co}(\text{II})$  and  $\text{Cu}(\text{II})$  based on fluorescence energy transfer with an enzyme transducer, *Biosensors and Bioelectronics* **11**, 557-564.
- Thompson, R. B. Maliwal, B. P. and Fierke, C. A (1999), Selectivity and sensitivity of fluorescence lifetime-based metal ion biosensing using a carbonic anhydrase transducer, *Anal. Biochemistry* **267**, 185-195.
- Thompson, R. B. and Patchan, M. W (1995), Lifetime-based fluorescence energy transfer biosensing of Zn, *Anal. Biochemistry* **227**, 123-128.
- Thompson, R. B. and Mallwal, B. P (1998), Expanded dynamic range of free Zinc ion determination by fluorescence anisotropy, *Anal. Chemistry* **70**, 1749-1754.
- Unterreitmaier, E. and Schuster, M (1995), Fluorometric detection of heavy metals with N-methyl-N-9-(methylanthracene)-N'-benzylthiourea, *Anal. Chimica Acta* **309**, 339-344.
- Bakir, F. Damluji, S. F. and Amin-Zaki, L (1973), Methylmercury poisoning in Iraq, *Science* **181**, 230-241.
- Curley, D. M. and Kumosinski, T. F (1998), Changes in the secondary structure of bovine casein by transform infrared spectroscopy: Effects of calcium and temperature, *J. of Dairy Science* **81**, 3154-3162.
- Kordowska, J. Stanford, W. F. and Wang, C.-L. A (1998),  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  bind to different sites and induce different conformational changes in human calyculin, *Eur. J. of Biochemistry* **66**, 253-257.
- Sadler, P. J. and Viles, J. H (1996),  $^1\text{H}$  and  $^{113}\text{Cd}$  NMR Investigations of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  binding sites on serum albumin competition with  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$ , *Inorganic Chemistry* **35**, 4490-4496.
- Bal, W. Christodoulou, J. Sadler, P. J. and Tucker, A (1998), Multi-metal binding site of serum albumin, *J. of Inorganic Biochemistry* **70**, 33-39.
- Schreiber, A. B. and Haimovich, J (1983), Fluorometric assay for detection and characterization of Fc receptors, *Methods in Enzymology* **93**, 147-155.
- Piana, J. and Zahir, K. O (2000), Investigation of metal ions binding of humic substances using fluorescence emission and synchronous-scan spectroscopy, *J. of Environ. Sci. Health* **B35(1)**, 87-102.