

티올화 항체 고정형 SPR 바이오센서를 이용한 미생물 인식

Recognition of Microorganisms Using SPR Biosensor Immobilized with Thiolated Antibody

조용진 김남수
정회원 N. S. Kim
Y. J. Cho

ABSTRACT

This study was performed to fabricate a batch-type SPR biosensing system using a thiolated *E. coli* antibody coupling, and to explore the feasibility of real-time detection of *E. coli* in a stagnant sample solution. In advance, "O" and "K" antigenic serotype *E. coli* antibodies were thiolated with sulfo-LC-SPDP and dithiothreitol, and immobilized by chemisorption in the gold surface of compact SPR sensors. When the SPR biosensor immobilized with *E. coli* antibody monitored a *E. coli* solution, it took 3 to 5 min to stabilize. The SPR biosensing system developed in this study was able to detect *E. coli* in the range above 10^4 CFU/mL at the 0.05 significant level. Also, the SPR biosensor had possibility to significantly detect *E. coli* in the range of 10^2 to 10^4 CFU/mL in *E. coli* solutions. Meanwhile, when the SPR biosensor immobilized with *E. coli* antibody was cleaned with NaOH solutions, its ability to detect *E. coli* largely decreased due to wash-out of the immobilized antibody. In order to reuse the SPR sensor, it should be antibody-immobilized newly.

Keywords : SPR, Biosensor, *E. coli*, Thiolation, Antibody.

1. 서 론

최근 건강에 대한 관심은 그 어느 때보다 높아져 건강 증진을 위한 식품 또는 의약품에 대한 수요가 폭발적으로 증가하고 있으며, 한편으로는 건강을 위해 요인을 탐지하여 제거하려는 노력이 기술 개발의 큰 줄기를 형성하고 있다. 전자의 경우는 개인적 관심의 측면이 강한 반면에, 후자는 사회적 및 국가적 관심이 더욱 큰 분야이다. 식품에서 살모넬라, 리스테리아, 대장균 O157:H7 등과 같은 병원성 미생물은 가장 대표적인 위해 요인으로 알려져 있으며, 미생물로 인한 위험성을 총체적으로 나타내는 지표로서 지표균수인 대장균 수가 다루어지

고 있다(Garbutt, 1997).

미생물 수를 측정하는 가장 정확하고 보편적인 방법은 배양법이다. 그러나 배양법은 많은 시간과 노력이 소요되기 때문에 현장에서 실시간에 준하는 측정법으로 사용하기에는 원천적으로 한계를 가지고 있다. 이러한 한계를 극복하기 위해서는 실시간(real-time) 또는 준실시간(near real-time)으로 미생물을 검출할 수 있는 기술이 요구된다.

표면플라즈몬공명(surface plasmon resonance: SPR)은 생물분자 또는 미생물을 실시간 또는 준실시간으로 검출할 수 있는 센서로서 특이성(specificity)과 정확도(accuracy) 측면에서 일찍이 큰 관심을 받아왔다. 1902년, Wood(1902)는 반사 회절격자를 사용

하여 연속광원의 스펙트럼을 관찰한 결과, 회절광 스펙트럼에서 어두운 좁은 밴드를 발견하였으며, Fano(1941)는 이 현상이 표면 플라즈마 파(surface plasma waves: SPW)와 관련이 있음을 이론적으로 밝혔다.

Nylander 등(1982)과 Leidberg 등(1983)은 감쇠 전 반사(attenuated total reflection)에 관한 Kretschmann 기하학(Kretschmann geometry)에서 SPW의 특성을 분석하였다. 1984년에는 SPR 센싱을 위해 각 변조(angular modulation)와 스펙트럼 변조(spectral modulation)가 도입되었고(Matsubara 등, 1988), 회절격자(Cullen 등, 1987) 및 면상 광학 도파관(planar optical waveguide)(Kreuwel 등, 1987)에 기초한 SPR 센서가 선보이기도 하여 공간 분해능 측정에 대한 SPR 방식의 가능성이 크게 평가되었다(Yeatman와 Ash, 1987)(재인용: Liedberg 등, 1995; Homola 등, 1999).

1990년대 초반, 최초의 광섬유 SPR 센서(fiber optic SPR sensor)가 보고되었고(Jorgenson과 Yee, 1993), 1990년 후반에 헤테로다인 위상 측정법(heterodyne phase measurement)과 간섭계(interferometry)(Nelson 등, 1996)에 기초한 위상 변조 SPR 센서(phase modulated SPR sensor)가 소개되었다(재인용: Liedberg 등, 1995; Homola 등, 1999).

SPR 센서 기기분석학의 발전은 SPR 센서를 이용하여 물리적, 화학적, 그리고 생물학적 현상을 정량적으로 측정할 수 있는 가능성을 크게 향상시켰다. 특히, 1990년 Biacore International AB에 의해 출시되었던 최초의 상용 SPR 바이오센서는 생물학적 응용 분야에서 각광을 받게 되었으며, 다음해 Biacore에서는 감쇠 전반사 방식과 angular modulation 방식의 Kretschmann 기하학에 기초한 연구용 SPR 장치를 개발하여 생물분자 반응공학 분석(biomolecular interaction kinetic analysis), 친화력 측정법(affinity measurements), 선별 및 농도 검정(screening and concentration assays) 등의 연구에 SPR 바이오센서 기술이 이용될 수 있었다(Ligler와 Rowe Taitt, 2002).

IBIS system(British Windsor Scientific Ltd., UK), SPR-670 및 SPR-CELLIA system(Nippon Laser and Electronics Laboratory, Japan), SPR system(Johnson & Johnson Clinical Diagnostics, UK), Spreeta SPR sensor(Texas Instruments Inc., USA) 등에서 SPR 센서를 개발하였으며, 최근 SPR 센서의 개발 동향은 검출한계의 개선, 대량생산, 센서의 소형화, 시료소모의 소량화 등에 초점을 맞추고 있다(Ligler와 Rowe Taitt, 2002).

그러나, 최근까지 상용화된 SPR 시스템은 실험실에서 분석용으로 활용되는 장비이거나 시료가 유동하는 시료 유동형 센서 시스템으로 구성되어 있어 현장에서 휴대용으로 활용하기에는 적절하지 못한 단점을 가지고 있다. 초소형 SPR 센서인 Spreeta를 활용한 SPR 바이오센서의 개발도 시료 유동형 센서 시스템으로 진행되었기 때문에 펌핑 시스템(pumping system)이 구비되어야 하므로 장치가 복잡할 뿐만 아니라 센서 전처리에 0.5~1시간이 소요되는 등 현장에서 실시간 측정을 구현하기가 어려운 단점을 가지고 있다(Meeusen 등, 2001).

따라서, 본 연구의 목적은 티올화 항체고정화 기법을 이용하여 대량의 SPR 센서에 대장균 항체를 미리 고정하여 시료 정체형 SPR 바이오센싱 시스템을 제작하고, 대장균의 검출 능력을 분석하여 휴대용 실시간 대장균 센서로서의 가능성을 평가하는데 있다.

2. 재료 및 방법

가. SPR 바이오센서의 제작

SPR 바이오센서는 Texas Instrument(USA)에서 제작된 SPR 센서(제품명: Spreeta)를 활용하여 센싱부에 대장균 항체를 고정화하는 방법으로 제작되었다(그림 1). SPR 센서의 광원은 840 nm의 편광 근적

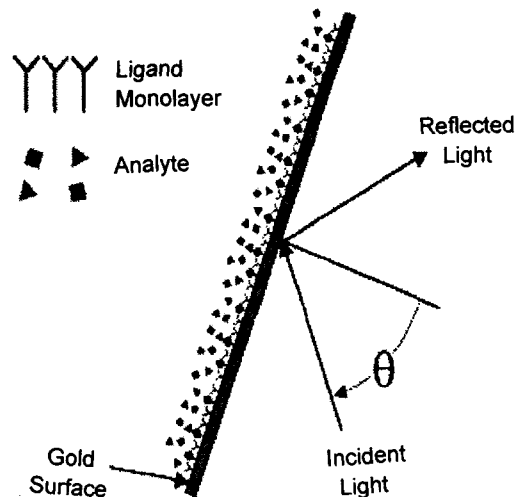


Fig. 1 Schematic diagram of a SPR biosensor immobilized with *E. coli* antibody.

외선 LED이고, 128 픽셀의 포토다이오드 어레이 (photodiode array)가 반사광 측정용으로 장착되어 있다.

대장균 항체는 "O" & "K" 항원 혈청형(antigenic serotype)(YVS1001, Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, USA)를 사용하였으며, 티올화 항체 공역기법(thiolated antibody coupling)에 의해 SPR 센서 표면에 고정화되었다. 항체의 고정화는 금막이 티올기(-SH)와 화학흡착(chemisorption)하는 성질을 이용하여 이루어졌다. 즉, 먼저 티올화 가교화제(thiolation cross-linker)에 의하여 -SH 기를 도입한 후 SPR 센서의 금막에 화학흡착시켜 항체를 고정화하였다. 대장균 항체를 고정화시키는 구체적인 방법은 그림 2에 나타내었다.

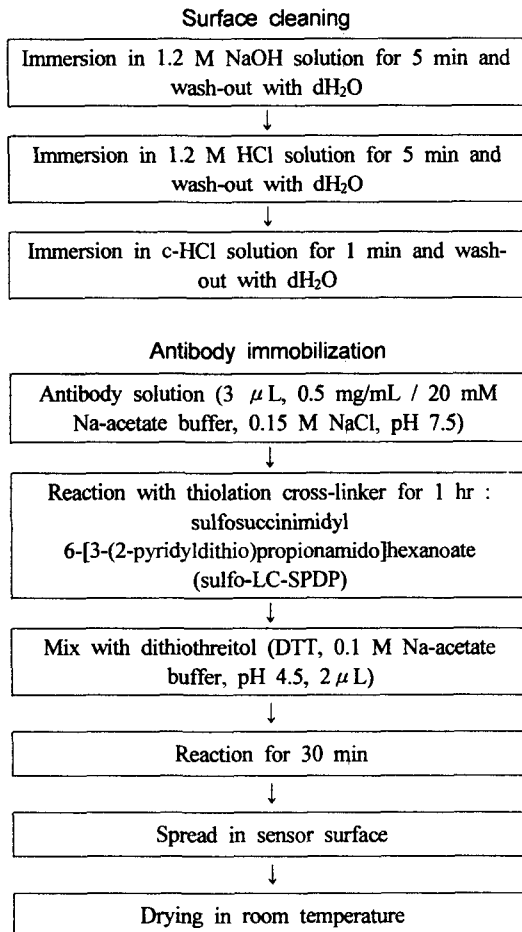


Fig. 2 Procedure of *E. coli* antibody immobilization.

나. SPR 바이오센싱 시스템의 구성

SPR 바이오센싱 시스템은 SPR 바이오센서, 센서 헤드부, 12-bit A/D 컨버터, 직렬형 통신(RS-232C), 노트북 컴퓨터, 암실 등으로 구성되었다(그림 3). 특히, 본 연구에서는 휴대식 바이오센싱 시스템을 개발할 목표를 고려하여 시료 정체형 시스템을 제작하였다. 즉, 미리 SPR 센서 표면에 대한 항체고정화 작업이 이루어진 후, 정체 상태의 시료에 대해서 SPR 바이오센서를 적용하는 방법이 가능하도록 시스템을 구성하였다.

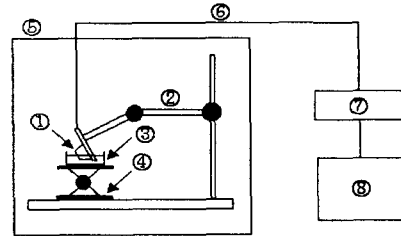


Fig. 3 Schematic diagram of a SPR bio-sensing system.

- ① SPR biosensor;
- ② height-and-angle-adjustable arm;
- ③ sample liquid; ④ height-adjustable platform;
- ⑤ dark room; ⑥ RS-232C; ⑦ A/D converter;
- ⑧ laptop computer.

다. 대장균 검출력 시험

SPR 바이오센싱 시스템의 대장균 검출력 평가를 위한 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 대장균 (strain: KFRI 272, ATCC 25922)은 한국식품개발연구원의 균주은행에서 분양 받아 MacConky 배양액 (Sigma Chemical, USA)에 접종하여 배양하였다. 배양 후 배양액을 원심분리하여 제거하였다. 대장균 용액의 초기 농도는 1.2×10^9 CFU/mL이었으며, 10^1 CFU/mL까지 희석하여 실험에 사용하였다.

센서별 편차를 제거하기 위하여 센서의 초기화 과정을 거쳤으며, 각 대장균 농도별로 3 반복 측정하여 농도간 측정신호의 유의성을 분석하였다.

라. SPR 바이오센서의 재사용 시험

대장균 항체가 티올화 항체 공역 화학흡착(thiolated antibody coupling chemisorption)에 의해 고

정된 SPR 바이오센서의 재사용시 나타나는 반응을 평가하기 위해 측정에 사용된 SPR 바이오센서를 고농도(1.2 M) 및 저농도(10 mM)의 NaOH로 세정한 후 다시 측정하고 그 신호를 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

가. SPR 곡선

그림 4는 SPR 바이오센서를 이용하여 대장균을 측정하였을 때 얻어진 SPR 곡선의 한 예를 나타낸 것이다. SPR 곡선은 식 (1)에 의해 산출된 것이다. 그림 4에서 보는 바와 같이 본 연구에서 개발한 SPR 바이오센서에 의해 대장균 농도를 측정하였을 때 전형적인 SPR 곡선이 잘 형성되고 있음을 알 수 있다.

$$SPR\ curve = \frac{Signal(liquid)}{Signal(air)} \dots\dots\dots (1)$$

본 연구에서는 SPR 곡선에서 기준선 수준(baseline level)을 0.85로 설정하여 기준선 이하로 나타나는 신호들을 대상으로 1차 모멘트를 구하여 각 시료의 굴절률을 산출하였다. 산출된 굴절률은 10⁻⁶까지 유효한 값을 가진다.

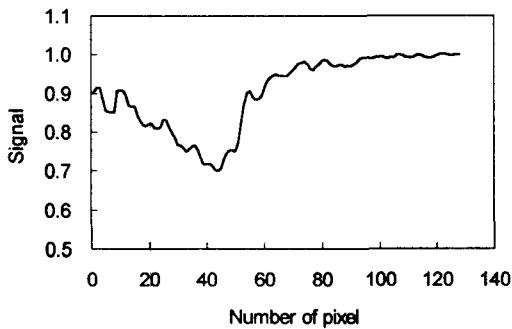


Fig. 4 A SPR curve obtained by detection of *E. coli*.

한편, 본 연구에서 개발한 시료 정체형 SPR 바이오센싱 시스템을 이용하여 대장균 용액에서 반응을 개시하였을 때, 반응의 안정기에 도달하는 시간은 센서의 초기화 과정을 포함하여 3~5분 소요되는 것으로 나타났다(그림 5).

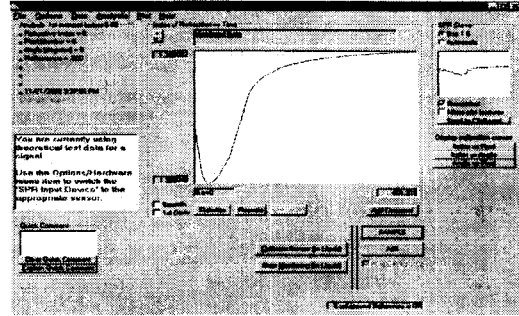


Fig. 5 Measuring unit of a SPR biosensor with respect to time during ligand-analyte binding.

나. 대장균 검출력 분석

그림 6은 10¹~10⁹CFU/mL 구간의 대장균 농도에 대해서 SPR 바이오센서의 대장균 검출력을 평가한 결과를 나타낸 것이다. 그림에서 대장균 농도별로 측정치에 표시된 영문자는 동일한 경우 유의수준 0.05에서 유의차가 인정되지 않음을 나타내는 것이다. 실험에 사용된 대장균 농도 구간에서 나타난 측정곡선은 Sigmoid 형으로 추정할 수 있는 것으로 나타났다. 즉, 본 연구에서 개발된 SPR 바이오센서의 신호는 10² CFU/mL 이하의 대장균 농도에서는 특정한 값으로 수렴하는 형태를 보였으며, 10⁶ CFU/mL 이상의 농도에서도 또다른 특정한 값으로 수렴할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

각 농도별로 3 반복 측정하여 농도별 측정능력에 대해서 Duncan의 다중검증에 의한 통계적 유의성을 분석한 결과, 0.05 유의수준에서 10² FU/mL까지는 대장균 검출능력이 유의한 것으로 나타났다. 다만, 10³~10⁴ CFU/mL 구간에서 유의차가 나타나지 않은

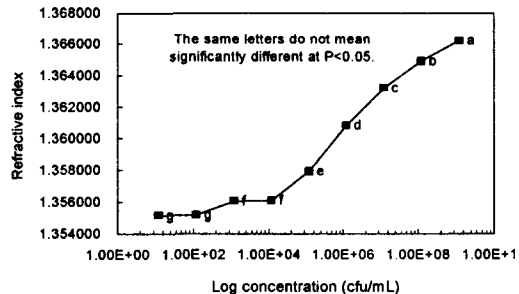


Fig. 6 SPR biosensor response to *E. coli* detection.

Table 1 Reuse of the SPR biosensors immobilized with an *E. coli* antibody.
(concentration of *E. coli*: 10⁵ CFU/mL)

Reuse after spray cleaning with 1.2 M NaOH				
Assay number	Refractive index	Δ RI ¹⁾	Relative scale 1 ²⁾	Relative scale 2 ³⁾
1	1.358263	0.025263	100	100
2	1.333681	0.000681	98.19	2.70
3	1.333418	0.000418	98.17	1.65
Reuse after stagnant cleaning with 10 mM NaOH for 2 min.				
Assay number	Refractive index	Δ RI	Relative scale 1	Relative scale 2
1	1.357801	0.024801	100	100
2	1.343619	0.010619	98.96	42.82
3	1.333352	0.000352	98.20	1.42

Notes: ¹⁾ Δ RI = (Refractive index of a sample from the SPR biosensor)
 - (Refractive index of pure water from a SPR sensor with clean surface: 1.333000)
²⁾ Relative scale 1 = Refractive index at an arbitrary use / Refractive index at the first use
³⁾ Relative scale 2 = Δ RI at an arbitrary use / Δ RI at the first use

것은 실험오차의 영향이 다소 크게 나타났기 때문인 것으로 판단된다.

이러한 결과를 볼 때, 10⁵ CFU/mL 이상의 대장균 농도에 대해서 본 연구에서 개발된 SPR 바이오센서는 대장균 검출에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

다. SPR 바이오센서의 재사용 평가

표 1은 SPR 바이오센서의 재사용 가능 여부를 평가한 결과를 나타낸 것이다. 본 연구에서는 동일한 SPR 바이오센서를 이용하여 3회까지 반복 사용하였을 때 나타나는 측정치를 식 (2)~(4)으로 표시되는 2종의 상대척도를 산출하여 센서의 재사용 능력을 평가하였다.

$$\Delta RI = (\text{Refractive index of a sample from the SPR biosensor}) - (\text{Refractive index of pure water from a SPR sensor with clean surface: 1.333000}) \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{Relative scale 1} = \text{Refractive index at an arbitrary use} / \text{Refractive index at the first use} \dots\dots\dots (3)$$

$$\text{Relative scale 2} = \Delta RI \text{ at an arbitrary use} / \Delta RI \text{ at the first use} \dots\dots\dots (4)$$

표에서 보는 바와 같이, relative scale 1에 의해 센서의 재사용 능력을 평가하였을 때 NaOH 농도에 무관하게 3회 측정시까지 98% 이상의 재현성을 보였다. 이 방법은 기존의 센서 연구에서 흔히 사용하는 평가법이다.

그러나, relative scale 2에 의해 평가한 결과, 세정액의 농도에 따라 다소의 차이는 있으나 SPR 센서에 항체를 고정화하여 대장균 검출을 하는 경우 센서의 검출능력은 급격히 감소하는 것으로 나타났다.

이러한 결과를 볼 때, 항체를 고정화한 바이오센서의 재사용 가능성은 매우 희박한 것으로 평가할 수 있다. 다만, 사용한 SPR 바이오센서를 충분히 세정한 후, 항체를 다시 고정화하여 SPR 센서를 재활용할 수 있음을 확인하였다.

4. 요약 및 결론

다양한 바이오센서 중에서 SPR 바이오센서는 특이성과 검출한계 측면에서 포텐셜이 매우 높은 것으로 평가되고 있다. 본 연구는 미생물 검출을 위

한 휴대식 SPR 바이오센싱 시스템 개발을 위한 기초연구로서 수행되었다. 즉, 티올화 항체고정화 기법을 사용하여 센서표면처리를 미리 대량으로 실시하여 측정현장에서의 전처리 시간을 배제하는 방식을 통해 실시간 측정시스템을 구현하고자 하였다. 주요 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 대장균 항체가 고정화된 SPR 바이오센서를 이용하여 대장균 용액을 측정하는데 3~5분이 소요되는 것으로 나타났다.

2) 본 연구에서 개발된 대장균 측정용 SPR 바이오센서는 0.05 유의수준에서 10^4 CFU/mL까지 대장균 검출 능력이 있는 것으로 분석되었다.

3) $10^2 \sim 10^4$ CFU/mL 구간의 경우, 0.05 유의수준에서 부분적으로 유의한 계측능력이 확인되었다.

4) 한번의 항체고정화를 통해 SPR 바이오센서를 세정 후 재사용하기는 곤란한 것으로 분석되었다. 그러나, 사용된 SPR 센서는 표면에 다시 항체를 고정하여 재사용할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Fano, U. 1941. Theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves). J. of Optical Society of America 31(3):213-222.
2. Garbutt, J. 1997. Essentials of Food Microbiology. Arnold, London.
3. Homola, J., S. S. Yee and G. Gauglitz. 1999. Surface plasmon resonance sensors: Review. Sensors and Actuators B, 54:3-15.
4. Liedberg, B., C. Nylander and I. Lundstrom. 1995. Biosensing with surface plasmon resonance-how it all started. Biosens. Bioelectron. 10:i-ix.
5. Ligler, F. S. and C. A. Rowe Taitt (eds.). 2002. Optical Biosensors: Present and Future. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
6. Meeusen, C. A., E. C. Alocilja and W. Osburn. 2001. Detection of *E. coli* O157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor. ASAE Paper No. 01-7030. St. Joseph, MI: ASAE.
7. Wood, R. W. 1902. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. Phil. Magm. 4:396-402.