

면역 조직화학 반응이 통합된 바이오칩의 전기화학 및 광학적 분석

최형길 · ¹홍은경 · ¹이승원 · *윤현철
아주대학교 생명공학과, ¹전남대학교 의과대학 해부학교실
(접수 : 2005. 3. 10., 게재승인 : 2005. 4. 23.)

Integration of Immunohistochemical Reactions into Electrochemical and Optical Analyses of Biochips

Hyoung Gil Choi, Eun Kyoung Hong¹, Seung-won Lee¹, and Hyun C. Yoon*

Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

¹Department of Anatomy, Chonnam National University Medical School, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2005. 3. 10., Accepted : 2005. 4. 23.)

We have addressed two important issues of immunosensing biochips, including the construction of antibody functionalized surface for efficient affinity reactions and the development of a signal registration strategy that converts biospecific reactions into highly quantifiable electrochemical and/or optical signals. The developed immunoassay reaction is an integrated version of enzyme-mediated immunoprecipitation reaction, which is widely used in immunohistochemistry, and electrochemical signaling reaction. For the evaluation of analytical performance of fabricated immunosensing biochips, signaling for mouse IgG in antiserum was conducted. Applications of the developed strategy have been found for the evaluation of histology chemicals and for the signal amplification for array-type biochip analysis.

Key Words : Biochip, biosensor, immunohistochemistry, immunoassay, electrochemical

서론

바이오센서는 DNA, RNA, 항원-항체, 리간드-리셉터, 효소-기질 등과 같은 상호 인식기능을 가지고 있는 생체물질의 특성을 이용하여 특정 물질의 존재 및 농도를 신속하고 정확하게 측정하고 생체반응들에 대한 정보를 정량적으로 분석한다. 생명현상에 대한 신속하고 간편한 분석을 추구하는 바이오센서의 응용분야는 질병의 조기진단, 약품 분석, 독성물질의 검출, 식품 미생물 분석, 환경오염물질의 검출 등 생명공학 분야에 광범위하게 사용되고 있다. 바이오센서는 정량화된 신호로 전환하는 소자(transducer)의 측정원리에 따라 전압, 전류, 전도율 등을 측정하는 전기화학식 센서(1, 2), 형광이나 생체발광, 동위원소 또는 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 등의 변화를 감지하는 광학식 센서(3-5), 수정 진동자의 공진감쇄를 이용한 quartz crystal microbalance(QCM)이나 surface acoustic wave(SAW)와 같은 압전식 센서(6, 7) 등이 있다.

며, 이외에도 여러 가지 방법론이 개발되고 있다.

최근 생명공학 분야에서는 나노 및 마이크로 기계 기술, 전자공학 기술 등을 활용하는 융합기술의 개발이 활발해지고 있는데, 특히 바이오센서 분야에서는 융합기술을 접목시키기에 적합한 형태인 바이오칩에 대한 연구가 큰 관심을 끌고 있다. 이러한 융합기술을 바탕으로 바이오센서의 소형화, 대량검색 및 다중측정 등에 대한 기술 개발 및 응용 가능성이 상당할 것으로 기대하고 있다. 따라서 랩온어칩(lab-on-a-chip)이나(8, 9) μ -TAS(micro-total analysis system)형태의(10) 바이오센서 개발이 활발히 이루어지고 있으며 이에 부합되는 바이오칩의 개발에 많은 노력이 투입되고 있다.

바이오칩 분야에선 특히 단백질 칩에 대한 연구가 집중되고 있다. DNA칩의 경우 현재의 기술수준으로 대량의 분석 샘플의 동시검색이 가능하고 여러 조건에 적용할 수 있는 일반적인 방법론이 연구되어 있으나(11, 12), 단백질 칩의 연구는 아직 만족할 만한 수준에 이르지 못하고 있다. 이는 고유의 전하분포(pI), 특정 인식 부위의 존재, 비가역적 변성(denaturation) 등 단백질 자체가 다양한 특성들을 갖고 있고, 바이오칩 표면에 단백질을 존재하게 하여 기능을 발휘하게 할 수 있는 일반적인 방법론의 제시가 쉽지 않음에 기인한다. 따라서 칩 표면의 설계와 단백질의

* Corresponding Author : Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon 443-749, Korea

Tel : +82-31-219-2512, Fax : +82-31-219-2394

E-mail : hcyoon@ajou.ac.kr

기능을 유지할 수 있는 환경을 조성하고 생체인식반응을 최적화하기 위해 고정화 밀도, 분자의 배향성, 비특이적 결합의 최소화라는 여러 관점에서 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 면역 물질들에 대한 바이오칩을 제작함에 있어 두 가지 큰 관점, 즉 면역글로불린 (immunoglobulin)과 같은 단백질의 생체 인식반응이 효율적으로 이루어 질수 있는 센서막을 구성하는 것과 항원-항체 결합반응들을 매우 정량적인 신호로 전환하는 신호화 방법론의 개발에 초점을 맞추었다. 이를 위한 생체 물질과 고체 기관 (substrate) 간의 가교물질로 64개의 아민기가 분자 표면에 노출된 G4 (fourth generation) 폴리아미도아민 (polyamidoamine) 덴드리머를 센싱 표면에 도입하였다(13, 14). 덴드리머에 의해 개선된 센싱 표면에 생체 리간드의 수식화와 생체 특이성 인지반응에 대한 전기화학적 측정을 위한 효율적인 센서막을 구성하였다 (15, 16). 신호화 방법으론 면역조직화학 (immuno-histochemistry) 반응에서 전통적으로 사용되어온 효소에 의해 촉매되는 신호 증폭법을(17) 응용하였다. 기존의 면역조직화학 분석에선 horseradish peroxidase (HRP)나 alkaline phosphatase (ALP)에 의해 촉매되는 면역침전반응은 침전물에 의한 시각적 감지법이 일반적이었으나, 본 연구에서는 개발된 방법론에 기초한 전기화학(18) 및 광학적(19, 20) 센싱 방법을 통하여 항원-항체간 면역반응들을 매우 정량적인 신호로 전환하는 방법을 각각 제작된 바이오칩 상에서의 구현을 시도하였다. 또한 항혈청 및 면역조직화학 샘플에 대한 신호 증폭과 정량적 기능 분석을 제작된 면역센서에서 시도함으로써 다양한 면역 샘플의 분석에 대한 응용 가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

폴리아미도아민 덴드리머 (fourth generation), ferrocene methanol, hydrogen peroxide는 Aldrich사, 3,3-dithiopropionic acid bis-N-hydroxysuccinimide ester (DTSP), sodium meta

periodate, ethylene glycol, sodium cyanoborohydride, 4-chloro-1-naphtol (4-CN), dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma사, mouse IgG, anti-mouse IgG, anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP), anti-mouse IgG-Cy3는 Amersham Bioscience (Buckinghamshire, England)사, Envision™은 Dako (Carpinteria, USA)사, phosphate buffer saline (PBS) (0.1 M, pH 7.2)는 Pierce사로부터 구매하여 사용하였다. 또한 aldehyde-activated slide glass는 Telechem (Cupertino, CA)사에서 구입하여 사용하였다. 그 밖에 시약들은 최상급 순도의 시약을 구입하였고 모든 수용액은 비저항이 18 MΩ·cm 이상인 증류 탈이온수를 사용하였다.

순환전압전류법의 측정은 potentiostat/galvanostat (모델 630A, CH Instrument, USA)을 랩탑 (laptop) 컴퓨터에 연결하여 수행하였다. 전기화학측정의 전극계는 증착된 금 박막의 작업전극, platinum gauze 보조전극, Ag/AgCl 기준 전극 (BAS, USA)으로 구성된 표준 삼-전극계를 사용하였다. 형광 측정을 위한 스캔 장비는 GenePix 4000B (Axon Instruments, USA)모델을 사용하였다.

전기화학식 바이오칩의 반응표면조성

전기화학식 바이오칩 제작을 위한 기초 기관으로 40 nm 두께로 티타늄 (titanium)이 입혀진 실리콘 웨이퍼 (Si[100]) 위에 e-beam 증착에 의해 150 nm 두께의 금 박막 표면을 만들어 전극으로 사용하였다. 센싱 표면의 구성을 위한 기초 전극상에서의 상향식 (bottom-up) 막 형성과 생화학적 기능화 공정은 Fig. 1에 도식화하여 나타내었다. 막 형성 공정에 앞서, 기초 전극은 30% H₂O₂와 conc. H₂SO₄를 1 : 4의 부피비로 혼합된 piranha 용액으로 5분간 세척한다(주의: piranha 용액은 대부분의 유기물들과 격렬히 반응하므로 취급시 매우 주의를 기울여 다루어야 한다). 세척을 마친 후, 아민 (amine)에 대한 반응잔기를 제공하는 DTSP 자기조립 단분자막을 금 표면에 형성시키기 위해 DMSO에 녹인 5 mM DTSP 용액을 1시간 동안 전극에서 반응시켰다. DMSO와 에탄올로 전극을 세척한 다음, DTSP 자기조립 단분자막으로 활성화된 표면은 에탄올로 희석

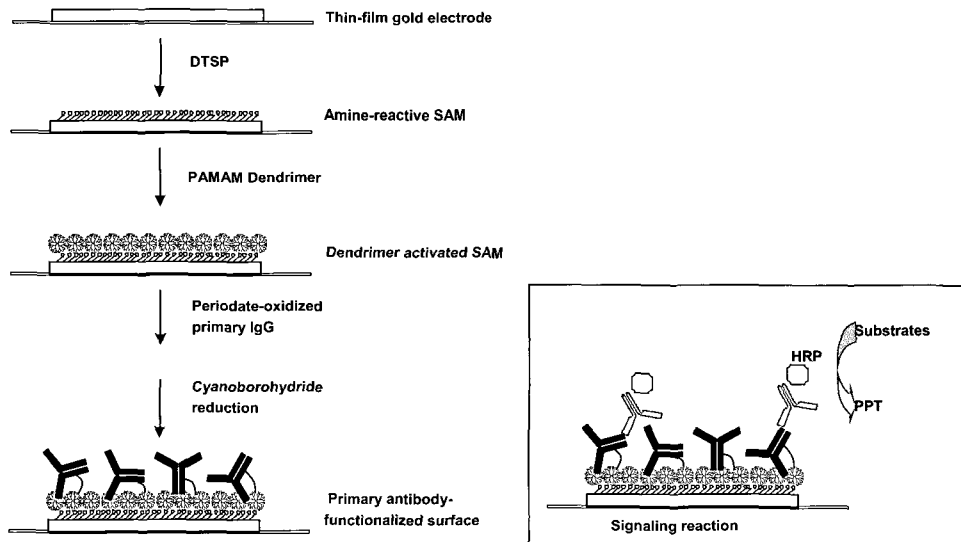


Figure 1. Schematic representation of the immunosensing surface construction and signaling.

된 덴드리머 용액 (1% w/w)으로 1시간 동안 수식되었다. 결과적으로 전극 표면은 아민기가 분자표면에 노출된 덴드리머 단분자막이 형성되었고 이 후 단백질 리간드의 수식화 반응단계를 위해 PBS (0.1 M, pH 7.2)에 보관하였다.

전극 표면의 아민 말단의 덴드리머 분자들과 항체간의 고정화 반응을 위해 일차 항체의 보존부위에 존재하는 탄수화물 사슬에 알데하이드 (aldehyde)기를 부여하기위해 sodium meta-periodate를 사용하여 항체를 산화시켰다. 산화 반응을 위하여 20 mM sodium meta-periodate를 PBS에 녹인 50 µg/mL의 mouse IgG 용액에 첨가하였다. 실온 및 빛을 차단한 조건하에서 1시간 동안 반응이 수행되었고, 이후 30분간 10 µL의 ethylene glycol을 추가하여 더 이상의 반응을 중단시켰다. 산화된 항체들은 Centriprep® (MWCO 30000, Millipore)을 사용하여 정제하고 필요 농도로 농축하였다. Periodate로 산화된 항체 샘플을 덴드리머가 수식된 전극에 1시간 동안 담가둠으로써 아민-알데하이드간의 결합반응을 통해 항체를 전극표면에 고정화하였다. 아민-알데하이드간의 표면 반응 이후, 형성된 Schiff bases의 환원을 통한 안정화를 위해 전극을 PBS에 녹인 5 mM의 sodium cyanoborohydride 용액 내에 20분간 침지시켰다.

전기화학식 면역센싱 과정

HRP가 표지된 anti-mouse IgG conjugate는 센서 표면에 고정화된 mouse IgG와의 면역반응을 위해 사용되었고, HRP에 의한 반응을 센서 신호의 검출에 이용하였다. 제작된 바이오센서 표면에서 일어나는 생체 특이성 반응과 제안된 신호화 반응은 Fig. 1의 오른쪽 패널에 도식적으로 요약하였다. 목적 항체의 농도에 따른 인지 반응을 위해, 5×10^5 에서 5×10^{12} g/mL까지의 단백질 농도 영역에서 항체-HRP 샘플의 등량 (100 µL)을 준비하였고, 이 샘플들은 실온 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$)에서 30분간 전극에서 각각 반응되었다. 반응 이후, 이차 IgG-HRP/일차 IgG가 결합된 바이오칩의 표면에서 신호화 반응을 진행하였다.

신호 발생을 위해, HRP의 기질로 4-CN을 사용하여 HRP에 의해 촉매되는 침전물 형성 반응이 수행되었다. 먼저, 에탄올에 녹인 4-CN 용액은 50 mM의 농도로 준비한 후, 30% hydrogen peroxide와 준비된 50 mM의 4-CN 용액을 각각 50 µL 씩 PBS에 혼합하여 총 1 mL이 되게 하였다. 이때 센서 표면을 1 mL의 4-CN 용액에 10분간 담가두어 충분한 신호 발생 반응을 수행하였다. 침전반응 이후, 전극 표면을 PBS로 완전히 세척하고 전기화학적 측정을 수행하였다.

순환전압전류법의 측정은 바탕 (background) 전해질로서 PBS와 신호 등록을 위한 전기 활성종으로 0.1 mM의 ferrocene methanol이 포함된 PBS 용액에서 공히 50 mV/s의 scan rate로 각각 수행되었다. 침전반응 전후의 등록된 전압전류곡선들은 기본 전해질에 의한 전류 값을 뺀 전압전류곡선들을 수집하였다. 침전 반응 전후의 전압전류곡선의 산화환원 전류의 피크 값들의 차이를 센서 신호로 등록하여 분석하였다.

광학적 친화 센싱

광학적 측정을 위한 기초 기판은 알데하이드기로 활성화된 표면을 갖고 있는 슬라이드 glass를 사용하였다. 항체 내의 mouse IgG를 검출하기 위한 샌드위치 (sandwich) 면역분석을

위해, mouse IgG와 인식반응을 하는 anti-mouse IgG를 센서 표면에 일차로 고정화하였다. 이를 위하여 100 µg/mL의 anti-mouse IgG를 준비하여 센싱 표면에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 항원-항체간 인지 반응을 수행하기위해 10^4 에서 10^{12} g/mL의 농도 영역에서 준비된 mouse IgG 용액을 1시간 동안 반응시켰다. 형성된 센싱 표면에서 생체 특이성 반응과 신호화 반응을 수행하였고, 두 가지 면역 샘플들을 비교하기 위해 anti-mouse IgG-Cy3 샘플과 Envision™ 샘플을 각각 준비하였다. 슬라이드 1은 1 µg/mL의 anti-mouse IgG-Cy3을 준비하여 빛을 차단한 조건하에서 1시간 동안 반응하였고, 슬라이드 2는 Envision™을 추가적인 회색이나 농축과정 없이 사용하여 1시간 동안 센서 표면에서 반응하였다. Envision™은 anti-mouse IgG와 HRP가 텍스트란 고분자에 다수 결합된 물질로서, 슬라이드 2에는 HRP에 의한 촉매반응을 통한 신호 증폭 방법인 TSA (tyramide signal amplification) 방법(18)을 적용하였다. 표지된 HRP에 의한 촉매반응과 형광 신호의 등록을 위한 기질로서 H_2O_2 와 tyramide-Cy3를 사용하였다. 친화 반응을 마친 후, 슬라이드를 PBS로 세척하고 10 µM의 H_2O_2 와 100 µM의 tyramide-Cy3를 PBS에 녹여 준비하였다. 신호화 반응을 위한 반응 용액은 15분 동안 실온 및 빛을 차단한 조건하에서 반응되었다. 각각 조성된 반응시편은 GenePix 4000B를 이용하여 Cy3에 대한 형광신호를 측정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

전기화학적 센서 측정을 위한 항체의 고정화

효율적인 전기화학식 면역센서의 개발을 위해서는 두 가지 중요한 관점들이 고려되어야 한다. 그 첫째는 항원-항체 결합 반응들을 정량적인 전기화학적 신호들로 전환하는 면역센서의 신호화 기법의 개발이고, 둘째는 효과적인 친화 반응을 위해 항체가 효율적으로 고정화된 표면을 형성하는 것이다. 이러한 관점에 착안하여 구성된 면역센싱 표면의 상향식 (bottom-up) 막 형성 방법과 바이오칩의 전기화학적 신호화 단계들을 Fig. 1에 나타냈다. 우선 금 박막 표면에 DTSP 자기조립 단분자막을 형성시키면 전극은 아민기와 반응하는 *N*-hydroxysuccinimide ester 기가 노출된 표면을 띄게 된다. 이를 이용하여 생체 분자들의 효율적인 고정화를 위한 생체 적합성 가교 물질로서 폴리아미도아민 덴드리머를 도입하여 전극 표면에 단일분자막을 형성시켰다. 총 64개의 아민기가 노출된 4세대 (G4) 덴드리머에 의한 단일분자막을 형성함으로써 다수의 아민기로 수식된 표면과 면역글로불린 단백질의 고정화 수준이 높은 전극 표면을 만들었다(15). 고정화 시킬 항체 샘플의 분자표면에 존재하는 탄수화물 가지들을 periodate로 산화시켜 알데하이드기를 부여함으로써 단백질의 덴드리머에 대한 접착성을 제공하였고 이를 통하여 아민-알데하이드간의 결합 반응을 유도하였다. 형성된 Schiff base는 sodium borohydride를 사용하여 단일결합으로 환원되었고 따라서 더욱 안정화되었다. 결과적으로 목적 물질과 인식반응을 하는 일차항체는 표면에 효율적으로 고정화되었고 이차 항체와의 결합반응과 신호화 반응이 수행될 친화 센싱 표면이 조성되었다.

ELISA 방법이 응용된 전기화학식 면역센싱

제작된 전극상에서 사용된 전기화학적 면역분석반응은 면역조직화학물질들의 분석에서 반응 결과의 시각화를 위해 전통적으로 사용되어온 효소에 의해 촉매되는 면역침전현상(17)의 발전된 기법이다. 우리는 앞서 biotin-antibiotin IgG와 biotin-(strept)avidin 간의 상호작용을 전기화학적 전류로 전환하는 신호화 방법을 연구해왔다(18). 일차 항체에 의해 수식된 면역센서의 표면에서 생체 특이적 상호작용은 이차 항체-HRP 복합체의 샘플을 이용하여 수행되었다. 목적 분석물의 생체 특이적 결합의 검출은, 이차 항체에 표지된 효소의 면역침전 반응에 의해 변화되는 전기화학적 특성의 분석을 순환전압전류법에 의하여 수행하였다.

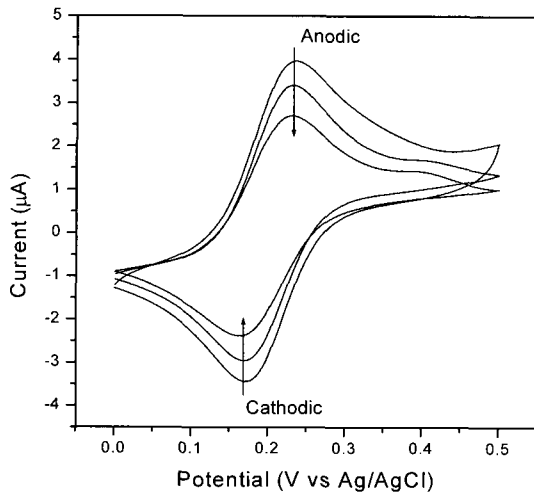


Figure 2. Typical cyclic voltammetric traces for the signal registration from electrochemical immunoassays. Arrows indicate the anodic/cathodic current changes from immunosensor signaling. Voltammetric traces were registered in a 0.1 M phosphate buffered saline (pH 7.2) containing 0.1 mM ferrocene methanol. Potential scan rate was 50 mV/sec.

제안된 면역침전반응에 의한 신호화 방법은, 효소의 기질로 사용된 가용성의 4-CN이 HRP에 의해 불용성물질로 변화되어 이때 유효전극면적의 감소로 인해 변화하는 전류량을 측정하는 것이다. 불용물질의 침전은 생체 특이적으로 결합된 이차 항체 분자에 표지된 효소인 HRP의 촉매 반응에 의해 유도되었다. 면역침전반응 이후 감소되는 유효 전극의 면적의 변화는 전기 활성종인 ferrocene methanol의 산화환원 전류의 추이를 나타내는 순환전압전류법을 통해 알 수 있었다(Fig. 2). 침전 반응 전의 전극은 ferrocene methanol에 대하여 약 65 mV의 피크 분리도를 가지며 Ag/AgCl 기준 전극에 대해 +235 mV (산화)와 +170 mV (환원)에서 잘 발달된 산화환원 피크 전위를 가지는 전형적인 전기화학적 특성을 보인다. 따라서 목적 단백질의 친화 반응과 침전 반응에 기초한 신호화 반응을 수행한 후, 조성된 집 표면에서 목적 단백질의 농도에 따른 신호 검출을 실험하였다. 목적 단백질 농도에 대응하여 ferrocene methanol에 대한 산화 환원 피크 전류가 순차적으로 감소하는 결과를 전압전류곡선을 통해 볼 수 있다(Fig. 2의 화살표). 따라서 센서 표면에서 일어나는 이차 항체-HRP의 생체 특이적 결합을 매우 정량적인 전기화학적 신호로 검출할 수 있었으며, 분석 샘플의 목적 단백질 농도를 다양하게 적용시켜 측정

함으로써 단백질 농도에 대응되는 신호값이 반비례하여 나타나는 검량곡선을 얻을 수 있었다. 또한 면역침전 반응에 기초한 전기화학적 분석 시스템을 통해서 전기화학적 신호화에 의한 검출뿐만 아니라 노출된 전극 표면에서 색의 변화에 의한 시각적 구분도 가능하였다(18).

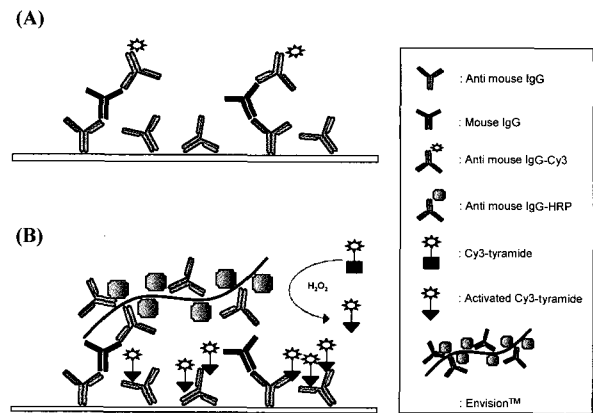


Figure 3. Schematic representation of fluorescence immunoassay via tyramide signal amplification (TSA) method. Two types of slides are described in the main text.

면역조직화학 반응에 기초한 광학적 형광센싱

광학적 측정을 위해 제작된 어레이 타입의 바이오칩은 생체 분자의 고정화를 위해 알데하이드기가 표면에 노출되어 있는 유리 슬라이드를 사용하였다. 고정화될 anti-mouse IgG의 분자 표면에 존재하는 아민기와 센서 표면에 노출된 알데하이드기를 통해 결합반응을 유도하였다. Anti-mouse IgG와 결합반응을 하는 mouse IgG를 농도에 따라 반응시키고 이들 간의 인식 반응에 대한 결과를 광학적으로 측정하는 샌드위치 면역분석과 신호화 방법은 Fig. 3에 도식적으로 요약하였다. 조성된 센서 표면에서의 형광 측정을 위해 슬라이드 1에는(Fig. 3의 A) anti-mouse IgG-Cy3 복합체를, 슬라이드 2에는(Fig. 3의 B) Envision™을 각각 적용하였다. 형광 측정을 위해 슬라이드 2에 사용된 Envision™은 mouse IgG와 인식반응을 하는 anti-mouse IgG와 HRP가 텍스트란 고분자에 결합된 형태의 물질로서, 정확한 HRP와 anti-mouse IgG의 중합숫자는 알려지지 않았다. 슬라이드 2에서는 mouse IgG의 인식 반응을 통해 부동화된 Envision™에 표지되어 있는 HRP에 의하여 촉매되는 기질인 tyramide-Cy3를 이용하여 형광 신호를 측정하였다. Tyramide는 HRP의 촉매작용에 의해 활성화된 형태의 tyramide로 전환되어 센서 표면에 존재하는 단백질들의 tyrosine 잔기에 결합된다. 따라서 HRP에 의해 촉매되는 tyramide-Cy3에 대한 형광 신호를 얻을 수 있었다. 이와 같은 TSA 방법은 면역조직화학분석에서 단백질의 검출 감도를 높이기 위해 사용되었다(19). Fig. 4는 mouse IgG의 농도에 대응하는 anti-mouse IgG-Cy3 (1 µg/mL)와 Envision™-TSA를 통해 얻어진 Cy3에 대한 형광 신호를 측정된 결과를 나타내었다. 슬라이드 1에 적용된 anti-mouse IgG-Cy3에 의해 Cy3에 대한 형광강도를 비교했을 때(Fig. 4의 A), 슬라이드 2의 Envision™에 의해 기록된 신호가 10 ng/mL의 mouse IgG 농도 이상의 수준에서 크게 증가되었음을 관찰할 수 있다(Fig. 4의 B). 또한 검량선이 100배 낮은 농도의 범위로 수평 이동하는 현상이 관찰되었다.

Envision™-TSA 방법은 다수의 HRP와 anti-mouse IgG가 존재하므로 비교적 낮은 밀도로 고정화된 단백질을 측정하는데 있어서 높은 신호로 측정이 되는 장점이 있지만 HRP에 의해 활성화된 tyramide는 단백질의 tyrosine 잔기에 반응하므로 본 연구에서와 같이 여러 종의 단백질이 고정화된 표면에선 특정 단백질의 tyrosine 잔기에 결합하는 것이 아니라 여러 종의 단백질에 비특이적으로 결합하므로 정량적이고 반복적인 신호를 얻기에는 적절하지 않은 단점이 있다.

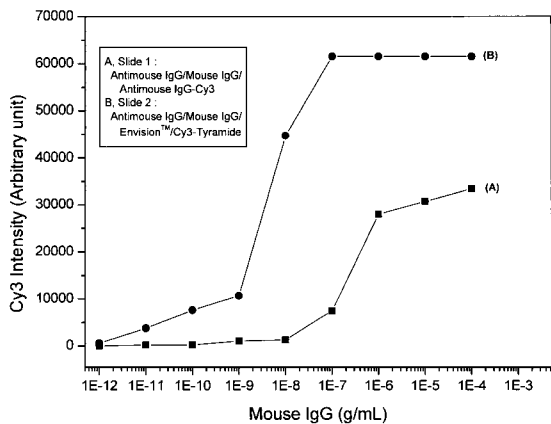


Figure 4. Calibration results of sandwich fluorescence immunoassay as a function of mouse IgG concentration. Anti mouse IgG-cy3 (A, slide 1) and Envision™ (B, slide 2) were applied on mouse IgG modified surfaces.

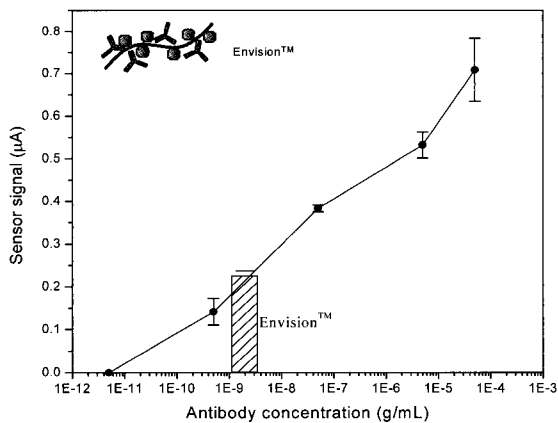


Figure 5. Calibration results for the electrochemical immunosensing as a function of applied protein (anti-mouse IgG-HRP conjugate) concentration. Inserted bar: Tests with the Envision™ sample. The mean of independent triplicate analyses is shown, and an error bar indicates a standard deviation. Conditions for the electrochemical tests were the same as Fig. 2.

전기화학식 센서를 통한 면역조직화학샘플의 정량적 평가

제작된 전기화학식 면역센서를 이용한 신호화 시험은 다양한 농도의 항체 샘플들을 이용하여 수행되었다. Fig. 2에서와 동일한 센서 구동 조건하에서, 제작된 면역센서들은 적용된 목적 단백질의 농도의 상관계수에 따라 피크 높이가 감쇄하는 순환전압전류곡선을 보여주었다. Fig. 5에서 보여주고 있는 센서 신호들은 목적 단백질의 다양한 농도들에서 등록되었고, 모든 전기화학식 신호값들은 각 실험에서 바탕 전해질에 의해 기록된 전류를 빼 ferrocene methanol의 산화환원 전류의 피크들을 모아 검량 곡선화 하였다. 면역반응 전후의 전류차이를

발생된 신호로 기록하였으며, 이렇게 얻어진 결과는 반응된 항체의 10⁻¹¹에서 10⁻⁵ g/mL까지의 농도 영역에서 대수 농도에 대해 선형 비례함을 보여주는 검량곡선을 나타내었다(Fig. 5). 제작된 면역센서에 대해 발생된 신호는 수 백 nA의 크기로 기록되었고, 검출 신호의 정밀도는 세 번의 동일한 시험으로부터 측정되어 수용할 만한 수준이었다.

또한 우리는 광학적 측정을 통해서 정밀한 신호를 얻기 어려웠던 Envision™의 분석 성능을 제안된 전기화학식 면역센서를 통한 신호들로부터 정량적 평가를 하였다. 면역조직화학 샘플로서 Envision™은 앞에서 설명했듯이 정확한 효소 및 항체의 중합 분자수를 알지 못하며, 단백질 칩 표면에서의 TSA 방법에선 tyramide가 비특이적으로 단백질과 결합하므로 정밀한 신호를 산출할 수 없었다. 그러나 면역침전반응에 의한 기초한 전기화학식 신호화 방법을 이용함으로써 Envision™을 정량적으로 평가할 수 있었다. Fig. 2의 실험과 동일한 방법으로 Envision™에 의해 측정된 신호를 기록한 결과, 이차 항체-HRP 샘플의 2 × 10⁻⁹ g/mL의 경우에 해당하는 분석능을 보임을 확인할 수 있었다(Fig. 5의 막대 그래프).

요 약

효율적인 바이오칩을 개발을 위해 칩 표면에 생체 물질들의 상호반응이 효과적으로 일어날 수 있는 센싱 표면의 조성과 항원-항체반응과 같은 생체 인식반응을 정량적 신호로 전환하는 방법에 대해 연구하였다. 전기화학식 센서의 표면을 개선하기 위해 폴리아미도아민 덴드리머를 가교 물질로 도입하였다. 생체 분자들의 인식작용을 정량적인 신호로 전환하기 위해 전형적인 면역조직화학분석에서 사용된 반응들을 바이오센서에 적용한 방법론을 사용하였다. 효소에 의해 촉매되는 신호화 방법은 면역반응들에 대하여 광학식 센서와 전기화학식 센서에서 공히 수행되었으며, 매우 정량적인 신호로 측정되었다. 측정된 신호들로부터 단백질 농도에 비례하는 검량곡선을 획득할 수 있었으며 다양한 면역 샘플에 대한 적용가능성을 제시하였다.

감 사

본 연구는 한국과학재단지정 초정밀생물분리기술연구센터(ERC)와 특정기초연구(R01-2002-000-00119-0)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Pemberton, R. M., J. P. Hart, and T. T. Mottram (2001), An electrochemical immunosensor for milk progesterone using a continuous flow system, *Biosens. Bioelectron.* **16**, 715-723.
2. Yoon, H. C., H. S. Yang, and S. Y. Byun (2004), Ferritin immunosensing on microfabricated electrodes based on the integration of immunoprecipitation and electrochemical signaling reactions, *Anal. Sci.* **20**, 1249-1253.
3. Lee, W., B. S. Chun, B. K. Oh, W. H. Lee, and J. W. Choi (2004), Fabrication of protein A-Viologen hetero Langmuir-Blodgett

- firm for fluorescence immunoassay, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9**, 241-244.
4. Kobori, A., S. Horie, H. Suda, I. Saito, and K. Nakatani (2004), The SPR Sensor Detecting Cytosine-Cytosine Mismatches, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 557-562.
 5. Pyo H. B., , Y. B. Shin, M. G. Kim, and H. C. Yoon (2004), Multichannel surface plasmon resonance imaging and analysis of micropatterned self-assembled monolayers and protein affinity interactions, *Langmuir.* **21**, 166-171.
 6. Kim, N. S., I. S. Park, and D. K. Kim (2004), Characteristics of a label-free piezoelectric immunosensor detecting *Pseudomonas aeruginosa*, *Biosens. Bioelectron.* **18**, 797-804.
 7. Kim, U. R. (2003), The theory and application of piezoelectric quartz crystal microbalance(PZ QCM), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 79-89.
 8. Yoon, H. C., J. S. Ko, H. S. Yang, H. B. Pyo, K. H. Chung, S. J. Kim, and Y. T. Kim (2003), A polymer-based microfluidic device for immunosensing biochips, *Lab on a Chip.* **3**, 106-113.
 9. McDonald, J. C., D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. Wu, O. J. A. Schueller, and G. M. Whitesides (2000), Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *Electrophoresis.* **21**, 27-40.
 10. Liu, Y., C. D. Gasrcia, and C. S. Henry (2003), Recent progress in the development of μ -TAS for clinical analysis, *Analyst.* **128**, 1002-1008.
 11. Wang, J. (1998), DNA biosensors based on peptide nucleic acid (PNA) recognition layer, *Biosens. Bioelectron.* **13**, 757-762.
 12. Miyachi, H., A. Hiratsuka, K. Ikebukuro, K. Yano, H. Muguruma, and I. Karube (2000), Application of polymer-embedded proteins to fabrication of DNA array, *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 323-329.
 13. Anzai, J. I., Y. Kobayashi, N. Nakamura, M. Nishimura, and T. Hoshi (1999), Layer-by-layer construction of multilayer thin films composed of avidin and biotin-labeled poly(amine)s, *Langmuir.* **15**, 221-226.
 14. Liu, Z., and M. D. Amiridis (2004), FT-IRRAS spectroscopic studies of the interaction of avidin with biotinylated dendrimer surfaces, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **35**, 197-203.
 15. Hong, M. Y., H. C. Yoon, and H. S. Kim (2003), Protein-ligand interactions at the PAMAM dendrimers monolayers on gold, *Langmuir.* **19**, 416-421.
 16. Yoon, H. C., M. Y. Hong, and H. S. Kim (2000), Affinity biosensor for avidin using a double functionalized dendrimer monolayer on a gold electrode, *Anal. Biochem.* **282**, 121-128.
 17. Wordinger, R., G. Miller, and D. Nicodemus (1987), Manual of immunoperoxidase techniques., p23-43, American Soc. Clin. Pathol. Press, Chicago.
 18. Yoon, H. C., H. S. Yang, and Y. T. Kim (2002), Biocatalytic precipitation induced by an affinity reaction on dendrimer-activated surfaces for the electrochemical signaling form immunosensors, *Analyst.* **127**, 1082-1087.
 19. Vlies, D., K. W. A. Wirtz, and E. H. W. Pap (2001), Detection of protein oxidation in Rat-1 fibroblasts by fluorescently labeled tyramide, *Biochemistry.* **40**, 7783-7788.
 20. Wang, G., C. L. Achim, R. L. Hamilton, C. A. Wilry, and V. Soontornniyomkij (1999), Tyramide signal amplification method in multiple-label immunofluorescence confocal microscopy, *Methods.* **18**, 459-464.