

헵토글로빈 측정을 위한 수정미소저울 바이오센서 개발

김성일 · 이현정* · 박순혁* · 방현수* · 이진아* · 최석정†

QCM biosensor for the determination of haptoglobin

Sung-Il Kim, Hyeon-Jeong Lee*, Soon-Hyuk Park*, Hyun-Soo Bhang*,
Jin-Ah Lee*, and Suk-Jung Choi†

Abstract

The purpose this research is to develop QCM (quartz crystal microbalance) biosensor for the determination of haptoglobin. Haptoglobin is an acute-phase protein with a hemoglobin-binding activity and has a potential to be used as a biomarker for infection or cancer. Haptoglobin level in milk has been used for the diagnosis of cow mastitis. In this study, anti-bovine haptoglobin antibody or bovine hemoglobin was chemically immobilized on the surface of the QCM, and the resulting sensor chips were tested for their response to samples containing haptoglobin at different concentrations. Concentration dependent frequency change was observed with both of the sensor chips. Especially, the sensor chip containing anti-bovine haptoglobin antibody showed sufficient sensitivity in the concentrations typically observed in the cows with mastitis.

Key Words : haptoglobin, biosensor, QCM (quartz crystal microbalance)

1. 서 론

최근에 식품안전성은 사회의 중요한 이슈로 등장하고 있다. 이런 사회적 추세를 반영하여 2006년 3월 농촌진흥청에서는 축산물의 안전성 확립을 통해 소비자 신뢰를 구축하기 위해 일부 젖소 사육농가에 HACCP (위해요소중점관리기준) 시스템 시범사업을 국내에서 처음 실시한다고 밝혔다. 우유에 대한 소비자의 불신을 일으킨 대표적인 사건을 꼽는다면 1995년 유방염(mastitis)에 걸린 젖소들로부터 채취된 우유가 판매되었던 이른바 고름 우유 파동을 들 수 있다.

젖소 유방염의 진단에는 일반적으로 체세포 수 측정법 (somatic cell count, SCC)이 사용되는데 유방염은 젖소의 건강과 생산성뿐만 아니라 우유의 품질에도 영향을 미치기 때문에 SCC 수치가 유가공 업체에서 우유의 품질을 평가하는 기준으로 사용되기도 한다. 그러나 최근에 SCC 대신 우유에 포함된 헵토글로빈 (hap-

toglobin) 단백질 수치로 유방염을 진단할 수 있다는 연구결과들이 보고되고 있다^[1,2]. 헵토글로빈에 결합하는 활성을 가지고 있는 헵토글로빈은 염증 반응에 의해 나타나는 급성기단백질(acute-phase protein)로서 동물의 감염 여부를 진단하는 척도가 될 뿐만 아니라^[3], 암을 진단하는 바이오마커로도 알려져 있다^[4-7].

지금까지 헵토글로빈 측정은 주로 효소면역측정법 (enzyme immunoassay, EIA)이 사용되어왔으나 이 방법으로는 현장에서 실시간에 시료를 검사하는 것이 불가능하다. 따라서 최근에는 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR)이라는 광학 현상을 이용하여 헵토글로빈을 측정하는 바이오센서 개발이 시도되었다^[8]. 이와 같은 바이오센서는 특별한 표지 물질을 붙이지 않고도 실시간에 분석 물질을 검출할 수 있기 때문에 매우 편리하고 비전문가도 쉽게 사용할 수 있도록 측정방법을 단순하게 만드는 것이 가능하다. 최근에는 나노 그램 수준까지의 질량 측정이 가능할 뿐만 아니라 소형화가 가능하고 경제성이 높다는 장점으로 인하여 QCM(quartz crystal microbalance)에 대한 관심이 점점 높아지고 있어 바이러스^[9], 박테리아^[10,11], 유기물질^[12], 단백질^[13]등을 검출하는 다양한 QCM 바이

강릉대학교 화학과 (Department of Chemistry, Kangnung National University)
*강원과학고등학교 (Gangwon Science High School)

†Corresponding author: sjchoi@kangnung.ac.kr
(Received : February 8, 2007, Accepted : March 14, 2007)

오센서가 개발되었으며 최근에는 노점센서의 제작에도 이용되었다^[14].

이전에 Akerstedt 등에 의해 헵토글로빈 측정을 위해 개발된 SPR 바이오센서는 소형화가 어려운 현장에서 사용하기 어려운 단점을 가지고 있다^[15]. 뿐만 아니라 그들은 센서 칩 표면에 헵토글로빈을 고정시키고 간접적인 방법으로 시료의 헵토글로빈 농도를 측정하는 접근법을 사용하였다. 헵토글로빈을 포함하는 시료에 일정한 양의 헤모글로빈을 넣어주고 헵토글로빈과 결합하지 않은 헤모글로빈의 양을 측정하는 이 방법은 넣어드는 헤모글로빈의 양에 의해 측정의 민감도나 범위가 좌우되는 단점을 가지고 있다. 따라서 이번 연구에서는 현장 적용이 가능하면서 측정범위가 넓은 헵토글로빈 측정용 바이오센서 개발을 목표로 하여 헵토글로빈에 결합하는 단백질인 헵토글로빈 항체(anti-haptoglobin antibody) 또는 헤모글로빈을 고정시킨 QCM 센서 칩을 개발하고 그 기능과 특성을 분석하였다.

2. 실험 방법

2.1. QCM과 바이오센서 시스템

이번 실험에 사용된 QCM 바이오센서 시스템은 QCM을 장착하는 cell, QCM에 전기를 공급하고 QCM의 진동정보를 주파수 측정기로 보내주는 oscillator 회로, 용매를 이송하는 syringe pump(KDS, Holliston, USA), 시료를 주입하는 injection valve(Upchurch, Oak Harbor, USA), 주파수 측정기(Dagatron, 한국), 그리고 컴퓨터 등으로 구성되어있다. 그림 1에 시스템을 간단한 모식도로 나타냈다. 본 연구실에서 제작한 oscillator 회로와 cell은 공기의 흐름을 차단한 별도의 chamber 내부에 고정시켜 환경의 영향을 최소화 시켰다. 본 연

구에서는 QCM 전극 위에 용액을 더할 수 있는 우물을 가지고 있는 batch cell과 용액이 tubing을 통해 흘러가며 QCM 전극과 접촉하도록 되어있는 flow cell을 함께 사용하였다. 먼저 batch cell에서 검출 물질과 특이적 결합을 하는 수용체 단백질을 고정시킨 다음 flow cell로 교체하여 완충용액을 펌프를 통해 주입하고 검출하고자 하는 시료는 injection valve를 통해 주입한다. 분석물질이 flow cell에 장착된 crystal의 표면을 통과하면서 항체에 결합하면 진동 주파수에 변화가 일어나게 되고 주파수 측정기에서 이 진동을 측정하여 컴퓨터로 보냄으로써 데이터를 분석할 수 있도록 하였다. QCM은 Crystal Sunlife(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 사각형인 QCM crystal 크기는 8×8 mm이고 원형인 gold 전극의 직경은 5 mm이며 QCM의 고유진동수는 약 10 MHz이다.

2.2. QCM electrode 표면 처리와 SAM의 형성

전극 표면을 세척하기 위해 QCM을 1분 동안 60 °C piranha solution(H₂SO₄:H₂O₂=7:3)에 담근 후 증류수와 에탄올로 헹구고 질소가스로 건조시켰다. 다음으로 11-mercapto-undecanoic acid(MUA)(Aldrich, USA)와 6-mercapto-1-hexanol(MHL)(Fluka, USA)을 에탄올에 각각 0.4 mM과 1.6 mM로 녹인 용액에 QCM을 넣고 12~15시간 동안 stirring하여 전극 표면에 자기조립 단분자층(self-assembled monolayer, SAM)이 형성되도록 하였다. SAM은 단백질과 같은 생분자를 금속 표면에 고정시키기 위한 작용기를 제공하는 역할을 한다. MUA와 MHL의 농도비를 1:4로 조정하였기 때문에 결과적으로 SAM의 표면에는 carboxyl group과 hydroxy group이 약 1:4의 비율로 분포하게 된다. SAM이 형성된 센서 칩을 꺼내서 에탄올로 헹구고 질소가스로 건조시킨 후 cell에 장착하였다.

2.3. 헤모글로빈의 고정

SAM 표면의 carboxyl group에 헤모글로빈을 고정하기 위해 다음의 방법을 사용하였다. 먼저 batch cell에 장착된 전극 위에 PBS(phosphate-buffered saline)를 100 μl 넣고 주파수가 안정화 될 때까지 기다렸다. PBS를 만들 때는 800 ml 정도의 증류수에 NaCl 8 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g을 녹이고 HCl을 이용하여 pH를 7.4로 조정한 후 초순수로 최종 부피를 1 리터로 맞춰주었다. 주파수가 안정화 되면 QCM을 초순수로 3회 씻은 후 cell에 pH를 6.0으로 맞춘 0.1 M 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid(MES) 완충용액 50 μl, 0.4 M N-ethyl-N'-(3-dimethyl-aminopropyl)car-

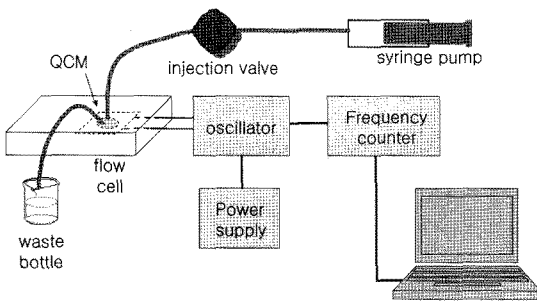


그림 1. 이 실험에서 사용된 QCM 바이오센서 시스템의 모식도

Fig. 1. Schematic diagram of the QCM biosensor system used in this experiment.

bodiimide(EDC)(Sigma, USA)용액 25 μ l, 0.1 M N-hydroxysuccinimide (NHS) (Fluka)용액 25 μ l를 더하고 1시간 동안 반응 시켰다. 다시 초순수로 3회 씻어준 후 PBS에 50 μ g/ml의 농도로 녹인 bovine hemoglobin을 100 μ l 넣어주고 100분 동안 반응시켰다. 이 반응에서 헤모글로빈의 amino group이 SAM 표면에 형성된 NHS group과 반응함으로써 헤모글로빈이 고정된다. 마지막으로 헤모글로빈이 고정된 센서 칩을 증류수로 씻고 1 M ethanolamine을 100 μ l 더한 후 30분 동안 반응시켜 반응하지 않고 남아있는 NHS group을 blocking 하였다.

2.4. 헵토글로빈 항체의 고정

헵토글로빈 항체는 헤모글로빈처럼 amino group을 이용하지 않고 불변 영역에 있는 탄수화물을 이용하여 고정시켰다. 이와 같이 탄수화물을 이용하여 고정하면 항원 결합 자리가 위로 향하도록 일정한 방향을 유지할 수 있다^[17]. 먼저 항체의 탄수화물에 hydrazide group과 반응할 수 있는 aldehyde group을 도입하기 위해 다음과 같은 방법으로 탄수화물을 산화시켰다. 농도가 0.5 mg/ml이 되도록 녹인 헵토글로빈 항체(anti-bovine haptoglobin antibody)(ICL, Newberg, USA) 용액 1 ml/당 50 mM sodium m-periodate (Sigma) 용액을 0.2 ml 넣은 후 알루미늄 포일로 싸 어둡게 한 상태에서 실온에 놓고 30분 반응시켰다. 1 L의 buffer A(100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5)를 이용하여 8시간 간격으로 3회 dialysis 함으로써 반응하지 않은 sodium m-periodate를 제거하였다. 산화된 헵토글로빈 항체는 100 μ l씩 micro-tube에 담아 냉동보관 하였다. 다음으로 헤모글로빈을 고정시킬 때와 동일한 방법으로 SAM 표면에 NHS group을 도입하였다. 초순수로 3회 씻은 후 5 mM carbonylhydrazide(Sigma)를 100 μ l 더하여 30분 동안 반응하도록 함으로써 hydrazide group을 도입하였다. 다시 초순수로 3회 씻은 후 반응하지 않고 남은 NHS group의 blocking을 위해 pH를 8.5로 맞춘 1 M ethanolamine 용액을 100 μ l 더하고 30분 동안 반응 시켰다. QCM을 완충용액 A(100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5)로 3회 씻은 후 앞에서 산화시킨 헵토글로빈 항체를 5 μ g 더하여 1시간 동안 반응 시켰다. 마지막으로 초순수로 3회 씻은 후 이중결합의 환원을 위해 0.1 M cyanoborohydride (Sigma)를 100 μ l 더하고 1시간 동안 반응시켰다.

2.5. 헵토글로빈 분석 실험

헵토글로빈 항체 또는 헤모글로빈을 고정시킨 QCM

을 이용하여 헵토글로빈을 검출하는 실험은 flow cell에서 하였다. Batch cell에서는 씻어주는 단계에서 주파수의 요동이 심하지만 flow cell에서는 PBS가 50 μ l/min의 일정한 속도로 흘러가는 가운데 시료가 주입되므로 주파수를 안정하게 유지할 수 있다. 시료는 injection valve를 통해 주입되었으며 sample loop의 부피는 200 μ l로 맞춰 놓았다. 시료의 injection 후 반응이 나타나기까지는 약 1분의 시간이 소요되기 때문에 injection valve로부터 cell까지의 dead volume은 약 50 μ l이다. 시료의 injection 이후 센서 칩을 regeneration 할 때는 0.2 M Glycine-HCl, pH 2.3, 1 % DMSO(dimethylsulfoxide) 용액 200 μ l injection 함으로써 이전에 결합한 모든 물질을 해리시켰다^[16]. 실험에 사용한 소 헵토글로빈 표준시료는 ICL에서 구입하였다.

2.6. AFM을 이용한 표면 분석

QCM 표면에 대한 AFM(atomic force microscope) 분석은 PSIA XE100(PSIA, 수원, 한국)을 이용하였으며 접촉 모드에서 40 \times 40 μ m 범위를 스캔 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. QCM 시스템의 안정성과 편리성

본 연구실에서 제작한 QCM 바이오센서 시스템의 안정성을 공기 중에서도 용액이 흐르는 상태에서 확인 해보았다. 공기 중에서의 안정성을 확인할 때는 전극 표면에 아무런 처리를 하지 않은 QCM을 oscillator 회로에 연결하여 공기 중에 놓아두었다. 그 결과 그림 2(a)에서 보는 것처럼 noise는 ± 0.3 Hz 이하이고 drift가 거의 없어 매우 안정하였다. 다음으로 QCM을 flow cell로 옮기고 PBS를 50 μ l/min의 속도로 흘러주면서 주파수 변화를 측정하였다. 그 결과 noise는 ± 0.5 Hz 이하이고 drift가 거의 없어 실험을 위한 충분한 안정성을 가지고 있는 것으로 확인되었다[그림 2(b)]. 우리가 사용한 것과 동일한 10 MHz 고유 진동수를 갖는 다른 QCM의 경우 1 Hz의 주파수 변화가 약 0.9 ng의 질량 변화에 해당한다고 알려져 있다^[17]. 따라서 본 연구실에서 제작된 바이오센서 시스템은 나노 그램 수준의 질량 변화를 감지할 수 있는 것으로 평가된다.

이 시스템의 또 한 가지 장점은 QCM이 연결되어 주파수를 측정하고 있는 상태에서 batch cell과 flow cell을 간단하게 교환할 수 있다는 점이다. flow cell은 용액이 일정한 속도로 흘러가는 가운데 시료가 들어가면서 실시간에 결합을 볼 수 있는 장점이 있지만 일정한 반응시간이 필요한 화학반응에는 불리하다. 반면에

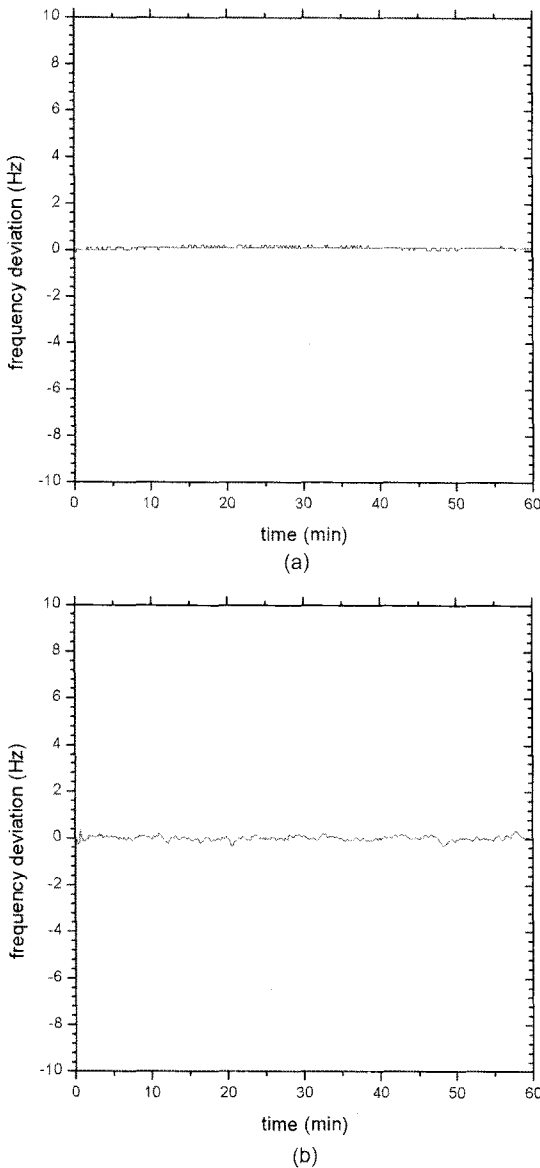


그림 2. QCM 바이오센서 시스템의 안정성: (a) QCM이 공기 중에 있을 때의 안정성, (b) flow cell에서 QCM이 50 µl/min의 속도로 흘러가는 완충용액과 접촉한 상태에서의 안정성

Fig. 2. Stability of the QCM biosensor system: (a) stability when QCM is in the air, (b) stability when QCM is in contact with flowing buffer at a flow rate of 50 µl/min.

batch cell은 우물에 들어있는 용액을 바꾸기 위해서 용액을 다 제거한 후 새로운 용액을 더해야 하기 때문에 그 과정에서 주파수가 불안정하게 움직이는 단점이 있

지만 반응용액을 넣고 일정한 시간을 기다릴 수 있기 때문에 화학반응에는 유리하다. 대부분의 바이오센서들은 flow cell만을 사용하도록 되어 있어서 수용체를 고정하는 화학반응을 위해서는 높은 농도의 반응물을 매우 느린 속도로 흘려보내주어야 한다. 그러나 본 연구실에서 제작된 바이오센서 시스템은 두 종류의 cell을 교체하며 사용할 수 있기 때문에 헵토글로빈 항체 또는 헤모글로빈을 고정시키기 위한 화학반응은 batch cell을 사용하고 그 후에 헵토글로빈 시료를 분석하는 실험은 flow cell을 사용하는 것이 가능하였다.

3.2. 헵토글로빈 항체 또는 헤모글로빈의 고정

SAM이 형성되어 있는 QCM 전극 표면에 헵토글로빈 항체를 고정시키기 위해서는 EDC/NHS 반응, carbohydrazide 반응, ethanolamine 반응, 산화시킨 헵토글로빈 항체의 고정 반응, 그리고 cyanoborohydride 반응의 다섯 단계 반응이 필요하기 때문에 약 다섯 시간에 가까운 시간이 소요되었다. 그리고 헵토글로빈 항체의 고정반응 과정에서는 약 140 Hz의 주파수 감소가 관찰된 반면 나머지 화학반응에서는 뚜렷한 주파수 감소가 관찰되지 않았다. 그 이유는 분자량이 큰 단백질이 고정될 때는 질량의 변화가 크지만 다른 화학 작용기들의 도입은 질량에 큰 영향을 주지 않기 때문인 것으로 생각된다. 일반적으로 SAM을 형성하는 분자의 밀도는 약 10^{-7} mole/cm²인 것으로 알려져 있다^[18]. 따라서 직경이 5 mm인 electrode에는 2×10^{-11} mole의 분자가 존재한다. 이 실험에서는 carboxyl group을 가진 화합물과 hydroxy group을 가진 화합물이 1:4의 비율로 섞인 mixed SAM을 만들었기 때문에 그 가운데 carboxyl group을 가진 분자의 양은 4×10^{-12} mole이 된다. NHS group이 도입되는 경우를 예로 들어보면 NHS group의 도입으로 늘어나는 분자량은 97이기 때문에 이것을 질량으로 계산하면 약 4×10^{-10} g 즉 0.4 ng이 된다. 이번 실험에 사용된 QCM은 1 Hz의 주파수 변화가 약 0.9 ng의 질량 변화에 해당되기 때문에 0.4 ng의 질량은 약 0.44 Hz의 주파수 변화에 해당된다. 즉 작용기 도입에 따른 주파수 변화는 거의 관찰되지 않는 것이 당연하다고 할 수 있다.

반면에 분자량이 150,000인 항체를 고정시킬 때는 주파수가 약 140 Hz 감소하였다. 이 주파수 변화만을 근거로 고정된 항체의 양을 계산하면 0.13 µg이 되지만 점탄성이 있거나 유연한 물질이 QCM 표면에 붙어 있을 경우 주파수 변화가 질량 변화를 정확하게 반영하지 못하는 것으로 알려져 있다^[19]. 항체와 같은 단백질의 구조는 어느 정도의 유연성을 지니고 있는 것

로 알려져 있기 때문에 주파수 변화로 질량 변화를 정확하게 측정하는 것은 어렵다. 그러나 동일한 QCM에 항체를 최대로 고정시키고 결합한 항체의 양을 EIA 방법으로 측정한 실험에서도 약 0.1 μg 의 항체가 결합한 것으로 평가된 것을 고려한다면 이 실험에서도 최소한 0.1 μg 정도의 항체가 결합한 것으로 생각된다. 0.1 μg 의 항체는 6.7×10^{-13} mole에 해당되기 때문에 SAM 표면에 있는 전체 carboxyl group(4×10^{-12} mole) 가운데 약 17%가 항체의 고정에 사용된 것으로 평가된다.

다음으로 항체의 고정이 화학결합에 의한 것인지 아니면 단순히 비특이적인 흡착에 의한 것인지 확인하기 위해 작용기를 도입하지 않은 SAM 표면에 5 μg 의 항체를 더하고 흡착된 항체의 양을 EIA 방법으로 측정하였다. 그 결과 약 0.02~0.03 μg 정도의 항체가 흡착되지만 dissociation solution으로 씻어준 후에는 거의 제거되는 것으로 나타났다. 그 이유는 작용기를 도입하지 않은 SAM 표면은 carboxyl group과 hydroxy group만을 포함하고 있어서 항체가 화학결합을 통해 고정되는 것이 아니라 비특이적인 물리적 흡착에 의해 고정되기 때문일 것이다. 반면에 화학적인 방법으로 항체를 고정시킨 센서 칩의 경우에는 dissociation solution으로 반복해서 씻어주어도 활성을 잃지 않는 것으로 미루어볼 때 항체가 비특이적인 흡착이 아니라 화학결합에 의해 고정된 것으로 판단된다.

헤모글로빈의 고정에는 EDC/NHS 반응, 헤모글로빈 고정 반응, 그리고 ethanolamine 반응의 세 단계만 필요하지만 헤모글로빈 고정 반응에 100분이 소요되어 전체 반응에는 3시간 40분 정도가 소요되었다. 항체 고정에서와 마찬가지로 헤모글로빈을 고정하는 반응에서는 약 110 Hz의 주파수 감소가 관찰되었지만 다른 화학반응 단계에서는 거의 주파수 변화를 관찰할 수 없었다. 헤모글로빈의 주파수 변화가 항체에 비해 작게

나타난 것은 아마도 헤모글로빈의 분자량이 더 작기 때문일 것이다. 그러나 헤모글로빈의 분자량은 64,500으로 항체의 43%에 불과하기 때문에 고정된 헤모글로빈 단백질의 수는 항체보다 더 많을 수도 있을 것으로 생각된다.

항체의 고정에 따른 표면의 변화를 확인하기 위해 아무것도 처리하지 않은 QCM의 전극 표면, 전극에 SAM을 형성한 표면, 그리고 항체를 고정한 이후의 표면을 AFM으로 분석하였다. 그 결과 금 전극 표면과 SAM을 형성한 표면 사이에서는 뚜렷한 변화를 관찰할 수 없었지만 항체가 고정된 표면은 굴곡이 더 심한 것을 알 수 있었다(그림 3). 이는 아마도 분자량이 큰 항체가 고정된 부분과 항체가 고정되지 않은 부분의 차이가 크기 때문일 것으로 생각된다.

3.3. 헵토글로빈 검출 실험

헵토글로빈 항체를 고정시킨 QCM 센서 칩에 서로 다른 농도의 헵토글로빈을 포함하는 시료를 injection 함으로써 농도변화에 대한 반응성을 검사하였다. 헵토글로빈이 2.0 mg/ml의 농도로 포함된 소의 혈청을 PBS로 묽혀 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 다섯 가지 시료를 만들고 가장 낮은 농도부터 차례로 injection 하며 주파수 변화를 관찰하였다. 그림 4의 그래프는 각 농도에서 injection이 시작되는 시점을 기준으로 하여 주파수 변화량을 그래프로 그린 것인데 헵토글로빈 농도에 비례하여 주파수 변화의 기울기와 최대값이 점점 더 커지는 것을 볼 수 있다. 그러나 혈청에 포함된 가장 풍부한 단백질들인 알부민과 면역글로불린 단백질을 각각 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 만들어 주입했을 때는 주파수 변화를 전혀 관찰할 수 없는 것으로 미루어볼 때 위의 주파수 변화는 단백질들의 비특이적인 흡착에 의한 것이 아니라 헵토글

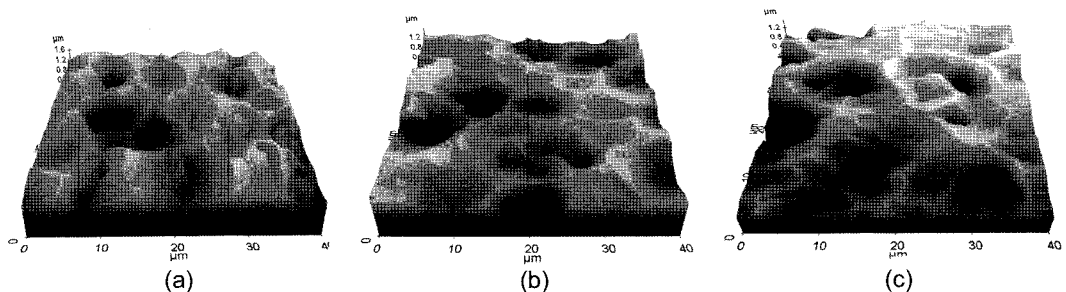


그림 3. QCM 표면에 대한 AFM 분석 결과: (a) 아무것도 흡착되지 않은 gold 전극 표면, (b) SAM이 형성된 표면, (c) 항체가 고정된 이후의 표면

Fig. 3. AFM analysis of QCM surface: (a) surface of a bare gold electrode, (b) electrode surface after SAM formation, and (c) electrode surface after antibody conjugation.

로빈 항체와 헵토글로빈 사이의 특이적인 결합에 의한 것임을 알 수 있다.

주파수 변화는 injection valve에 시료를 injection 한 후 약 1분 후부터 나타나기 시작하였는데 이는 우리가 사용한 QCM 시스템에서 injection port에서 cell까지의 dead volume이 50 μ l 정도인데 pump의 flow rate 역시 50 μ l/min으로 맞춰놓았기 때문이다. 그리고 injection 된 시료의 부피가 200 μ l이기 때문에 시료가 cell에 들어가기 시작한 후 4분 정도가 지나면 주파수 변화가 완료되는 것을 볼 수 있었다. 따라서 한 시료를 측정하는데 걸리는 시간은 약 5분 정도 걸린다는 것을 알 수 있다. 그러나 여러 개의 시료를 연속적으로 측정할 경우에는 새로운 시료를 주입해야 하기 전에 이전 측정에서 결합한 시료를 완전히 떼어내야 하기 때문에 dissociation solution을 injection 하고 주파수가 처음의 수준으로 돌아와 안정해질 때까지 기다려야 한다. dissociation solution의 injection에는 역시 약 5분이 소요되지만 그 이후 PBS가 흐르면서 주파수가 안정해질 때까지 거의 10분이 걸려 전체적으로는 20분 정도가 소요되었다.

Batch cell에 시료를 더해주고 결합을 측정할 때는 결합한 헵토글로빈과 결합하지 않은 헵토글로빈 사이에 평형이 이루어진 상태에서의 최종 주파수 변화만을 측정하게 된다. 그러나 이번 실험과 같이 flow cell로 시료를 흘려보내는 경우에는 평형이 이루어진 상태에서의 결합을 측정하는 것이 아니라 농도에 의존하는 두 가지 kinetic data를 얻게 된다. 첫 번째 kinetic data는 주파수 변화의 초기 기울기로서 결합반응의 속도상수를 반영하는 값이다. 두 번째 data는 주파수 변화량으로서 각 농도에서 최종적으로 결합한 헵토글로빈의 양을 반영한다. 이 두 가지 data 모두 헵토글로빈의 농도에 의존하기 때문에 시료에 포함된 헵토글로빈의 농도를 측정하는데 사용할 수 있지만 기울기의 측정에는 상대적으로 오차가 발생할 가능성이 높기 때문에 더 정확한 결과를 얻기 위해서는 주파수 변화량을 사용하는 것이 유리하다. 특히 처음 주파수가 상승하기 시작하면서 약 10초 정도의 lag period를 볼 수 있는데 이는 시료의 front line이 진행하면서 diffusion에 의해 묶여지기 때문에 나타나는 현상이다. 더 신뢰할 수 있는 kinetic data를 얻기 위해서는 이와 같은 lag period를 없앨 수 있는 유로(流路)의 구성이 필요할 것이다.

앞에서 언급한 것처럼 주파수 변화의 기울기보다는 주파수 변화량이 오차가 적기 때문에 그림 4의 그래프에서 얻은 주파수 변화량을 가지고 헵토글로빈 농도에 대한 표준곡선을 그렸다(그림 5). 그 결과 헵토글로빈

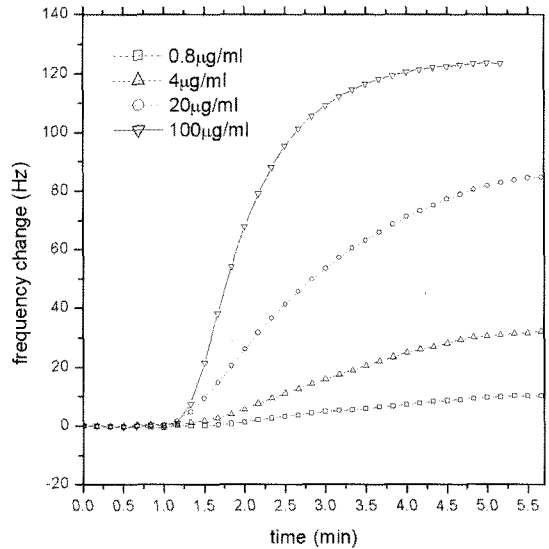


그림 4. 헵토글로빈 항체를 고정시킨 센서 칩에 헵토글로빈 시료를 injection 했을 때 시간에 따른 주파수 변화

Fig. 4. Frequency change when haptoglobin samples were injected on a sensor chip containing anti-haptoglobin antibody.

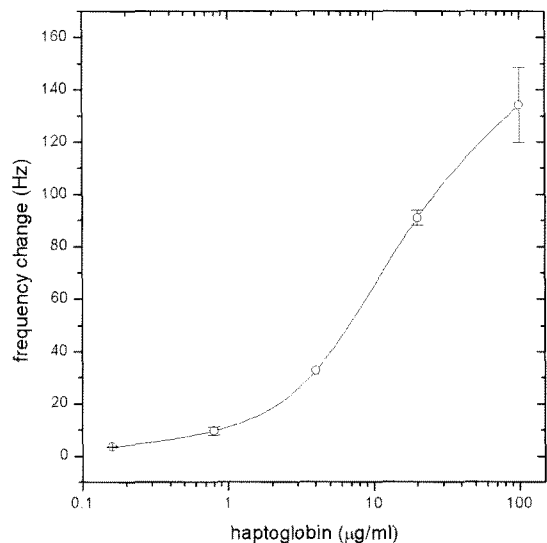


그림 5. 헵토글로빈 항체를 고정시킨 센서 칩에서 헵토글로빈 농도에 대한 주파수 변화량의 관계(2회 실험한 평균값을 표준편차와 함께 나타냈다.)

Fig. 5. Haptoglobin concentration-dependent frequency change on a sensor chip containing anti-haptoglobin antibody (The curve represents an average of two experiments with standard deviation.).

농도가 증가함에 따라 주파수 변화가 커지는 것을 확인할 수 있었으며 특히 1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 범위에서 주파수 변화가 뚜렷하게 나타났다. SCC 방법을 사용하는 CMT(california mastitis test)에서 유방염으로 진단을 받은 소들 가운데 우유의 헵토글로빈 농도가 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 소가 7%, 1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 범위에 있는 소가 82%, 그리고 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 소가 11%로 측정되었다^[8]. 헵토글로빈 항체를 고정시킨 센서 칩의 경우 1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 범위에서 좋은 반응성을 보여주기 때문에 대부분의 유방염에 대해 적절한 민감도를 가지고 있는 것으로 평가된다. 물론 헵토글로빈 농도가 가장 낮은 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 경우도 측정은 가능할 것으로 보이며 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 높은 농도는 시료를 묽혀 다시 측정함으로써 진단이 가능할 것이다. 이와 같이 헵토글로빈 항체를 고정시킨 QCM 센서 칩이 유방염 진단에 필요한 충분한 민감도와 범위를 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

헤모글로빈을 고정시킨 센서 칩에 서로 다른 농도의 헵토글로빈 시료를 흘려보내면서 주파수 변화를 측정 한 실험에서도 전체 농도 범위에서 헵토글로빈의 농도에 비례하는 주파수 변화를 관찰할 수 있었다(그림 6). 그리고 헵토글로빈 항체를 고정시킨 센서 칩에서와 마

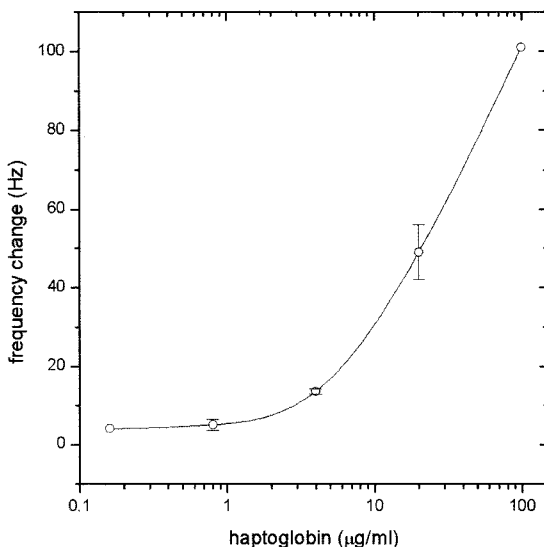


그림 6. 헤모글로빈을 고정시킨 센서 칩에서 헵토글로빈 농도에 대한 주파수 변화량의 관계(2회 실험한 평균값을 표준편차와 함께 나타냈다.)

Fig. 6. Haptoglobin concentration-dependent frequency change on the sensor chip containing hemoglobin (The curve represents an average of two experiments with standard deviation.).

찬가지로 알부민과 면역글로불린 단백질을 주입했을 때는 주파수 변화를 관찰할 수 없었다. 항체를 고정한 센서 칩의 경우 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서 주파수 변화가 크게 나타난 것과는 달리 헤모글로빈을 고정시킨 센서 칩에서는 거의 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이 되어야 주파수 변화가 크게 나타나기 시작했다. 또한 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서의 주파수 변화도 항체를 고정한 센서 칩에 비해 35 Hz 정도 더 낮았다. 이와 같은 결과는 헤모글로빈을 고정한 센서 칩이 헵토글로빈 항체를 고정한 센서 칩에 비해 민감도가 더 낮다는 것을 의미한다. 센서 칩의 민감도를 결정하는 요인으로는 분석물질과 수용체 사이의 친화도도 중요하지만 센서 칩 표면에 고정된 수용체의 방향성 및 활성 그리고 입체적인 장애 등도 영향을 미칠 수 있다. 헵토글로빈과 헤모글로빈은 매우 강하게 결합하는 것으로 알려져 있어 헵토글로빈과 항체의 결합에 비해 친화도는 낮지 않을 것으로 생각된다^[20]. 그러나 우리의 실험에서 항체를 고정시킬 때는 탄수화물을 이용함으로써 일정한 방향성을 갖게 했지만 헤모글로빈은 amino group을 이용하여 무작위로 고정시켰기 때문에 방향이 일정하지 않다. 그 결과 헤모글로빈에 있는 헵토글로빈 결합 자리 가운데 일부는 헵토글로빈이 결합하기 어려운 방향을 향할 수도 있을 것이다.

이 연구에서 헤모글로빈을 고정시킨 센서 칩으로 헵토글로빈을 검출할 수 있었던 것과는 대조적으로 Akerstedt 등은 헤모글로빈을 고정시킨 SPR 센서 칩을 만드는데 실패하였다고 보고하였다^[8]. 그들은 분자량이 큰 헵토글로빈이 센서 칩 표면에 고정된 헤모글로빈에 접근하는데 입체적인 장애가 있었을 것이라고 추측하였다. 사람의 헵토글로빈은 Hp 1-1과 Hp 2-1 그리고 Hp 2-2의 세 가지 표현형이 섞여 있는데, 소의 헵토글로빈은 사람의 Hp 2-2형과 유사하며 분자량이 1,000,000이 넘는 것으로 보고되었다^[21,22]. 그러나 우리가 헤모글로빈을 고정한 센서 칩에서 헵토글로빈이 제대로 측정된 것을 보면 거대한 분자량으로 인한 입체적인 장애의 문제라기보다는 그들이 사용했던 시스템의 어떤 특성 때문에 발생한 문제일 가능성이 더 높다. 그들은 BIACORE사에서 만든 CM5 센서 칩을 사용하였는데 이 센서 칩은 dextran matrix 위에 수용체를 고정시키도록 되어 있다. 헤모글로빈을 dextran matrix에 고정시켰을 때 헵토글로빈에 대한 친화도가 감소한다는 연구결과를 고려한다면 그들이 사용한 CM5 센서 칩이 실패의 원인인 가능성이 높다^[23].

우리가 개발한 센서 칩이 갖는 또 하나의 장점은 센서 칩 표면에 헵토글로빈이 결합할 수 있는 항체나 헤모글로빈을 고정시켰기 때문에 시료의 헵토글로빈을

직접 측정할 수 있다는 점이다. Akerstedt 등이 개발한 SPR 센서 칩은 헵토글로빈이 포함된 시료에 일정한 양의 헤모글로빈을 넣고 헵토글로빈과 결합하지 않은 헤모글로빈의 양을 측정하는 간접적인 방법을 사용하기 때문에 측정범위가 0.11~4 µg/m로 제한되었다^[8]. 시료에 일정한 양의 헤모글로빈을 넣고 측정하는 간접적인 방법은 측정범위를 제한할 뿐만 아니라 혈액이 포함된 시료는 측정할 수 없는 단점도 가지고 있다. 왜냐하면 혈액에 있는 헤모글로빈으로 인하여 정확한 결과를 얻는 것이 불가능하기 때문이다. 최근 연구결과에 의하면 헵토글로빈은 C형 간염 바이러스에 의한 hepatocellular carcinoma^[4], chronic myeloid leukemia^[5], ovarian cancer^[6] 등의 암에서 발현이 증가되었으며 사람의 암세포를 이식하여 종양이 형성된 nude mouse의 혈청에서도 농도가 증가된 것으로 보고되어^[7] 암을 진단할 수 있는 바이오마커(biomarker)로 사용될 수도 있을 것으로 보인다. 우리가 개발한 센서 칩은 혈액 시료의 측정이 가능하기 때문에 이번 연구결과를 바탕으로 사람의 헵토글로빈을 측정할 수 있는 센서 칩을 개발한다면 암의 진단에도 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

4. 결 론

우리는 이번 연구를 통해 헵토글로빈을 측정함으로써 소의 유방염을 진단할 수 있는 두 종류의 QCM 센서 칩을 개발하였다. 그 가운데 헵토글로빈 항체를 고정시킨 센서 칩은 유방염에 걸린 소의 우유에서 관찰되는 일반적인 헵토글로빈 농도인 1~100 µg/m의 범위에서 좋은 반응성을 보여주었다. 그리고 헤모글로빈을 고정시킨 센서 칩 역시 항체를 고정시킨 센서 칩보다는 민감도가 낮았지만 5~100 µg/m의 농도 범위에서 헵토글로빈을 측정할 수 있었다. 이 두 종류의 센서 칩은 모두 시료에 포함된 헵토글로빈을 직접 측정하는 방식을 사용하고 있기 때문에 사용이 간편하다는 장점을 가지고 있다. 따라서 앞으로 휴대용 QCM 바이오센서 시스템이 개발된다면 현장에서 젖소의 유방염을 진단하는데 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 이번에 개발한 센서 칩으로는 혈액 시료에 포함된 헵토글로빈도 측정할 수 있기 때문에 동일한 방법으로 사람의 헵토글로빈을 측정하는 센서 칩을 만든다면 암 진단에도 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(RTI05-01-

02)과 과학재단 R&E 프로그램의 지원으로 수행되었음.

참고 문헌

- [1] H. H. Petersen, J. P. Nielsen, and P. M. Heegaard, "Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry", *Vet. Res.*, vol. 35, pp. 163-187, 2004.
- [2] U. Gronlund, C. H. Sandgren, and K. P. Waller, "Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis", *Vet. Res.*, vol. 36, pp. 191-198, 2005.
- [3] H. Van Vlierberghe, M. Langlois, and J. Delanghe, "Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease", *Clin. Chim. Acta*, vol. 345, pp. 35-42, 2004.
- [4] M. Kotaka, G. G. Chen, P. B. Lai, W. Y. Lau, P. K. Chan, T. W. Leung, and A. K. Li, "Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus by suppression subtractive hybridization", *Oncol. Res.*, vol. 13, pp. 161-167, 2002.
- [5] Y. Kaneta, Y. Kagami, T. Tsunoda, R. Ohno, Y. Nakamura, and T. Katagiri, "Genome-wide analysis of gene-expression profiles in chronic myeloid leukemia cells using a cDNA microarray", *Int. J. Oncol.*, vol. 23, pp. 681-691, 2003.
- [6] B. Ye, D. W. Cramer, S. J. Skates, S. P. Gygi, V. Pratomo, L. Fu, N. K. Horick, L. J. Licklider, J. O. Schorge, R. S. Berkowitz, and S. C. Mok, "Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry", *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, pp. 2904-2911, 2003.
- [7] H. F. Juan, J. H. Chen, W. T. Hsu, S. C. Huang, S. T. Chen, J. Y.-C. Lin, Y. W. Chang, C. Y. Chiang, L. L. Wen, D. C. Chan, Y. C. Liu, and Y. J. Chen, "Identification of tumor-associated plasma biomarkers using proteomic techniques: From mouse to human", *Proteomics*, vol. 4, pp. 2766-2775, 2004.
- [8] M. Akerstedt, L. Bjorck, K. P. Waller, and A. Sternesjo, "Biosensor assay for determination of haptoglobin in bovine milk", *J. Dairy Res.*, vol. 73, pp. 299-305, 2006.
- [9] A. J. Eun, L. Huang, F. T. Chew, S. F. Li, and S. M. Wong, "Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors", *J. Virol. Methods*, vol. 99, pp. 71-79, 2002.
- [10] Y. S. Fung and Y. Y. Wong, "Self-assembled monolayers as the coating in a quartz piezoelectric crystal

- immunosensor to detect Salmonella in aqueous solution”, *Anal. Chem.*, vol. 73, pp. 5302-5309, 2001.
- [11] X. L. Su and Y. Li, “A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of Escherichia coli O157:H7”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, pp. 563-574, 2004.
- [12] L. Pastorino, F. Caneva Soumetz, M. Giacomini, and C. Ruggiero, “Development of a piezoelectric immunosensor for the measurement of paclitaxel”, *J. Immunol. Methods*, vol. 313, pp. 191-198, 2006.
- [13] S. F. Chou, W. L. Hsu, J. M. Hwang, and C. Y. Chen, “Determination of alpha-fetoprotein in human serum by a quartz crystal microbalance-based immunosensor”, *Clin. Chem.*, vol. 48, pp. 913-918, 2002.
- [14] S. Y. Kwon, J. C. Kim, and B. I. Choi, “Development of QCM dew point sensor and its sensing characteristics study”, *J. of the Korean Sensors Society*, vol. 15, pp. 269-276, 2006.
- [15] M. M. Vareiro, J. Liu, W. Knoll, K. Zak, D. Williams, and A. T. Jenkins, “Surface plasmon fluorescence measurements of human chorionic gonadotrophin: role of antibody orientation in obtaining enhanced sensitivity and limit of detection”, *Anal. Chem.*, vol. 77, pp. 2426-2431, 2005.
- [16] V. B. Kandimalla, N. S. Neeta, N. G. Karanth, M. S. Thakur, K. R. Roshini, B. E. Rani, A. Pasha, and N. G. Karanth, “Regeneration of ethyl parathion antibodies for repeated use in immunosensor: a study on dissociation of antigens from antibodies”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, pp. 903-906, 2004.
- [17] X. Su, F. T. Chew, and S. F. Li. “Self-assembled monolayer-based piezoelectric crystal immunosensor for the quantification of total human immunoglobulin E”, *Anal. Biochem.*, vol. 273, pp. 66-72, 1999.
- [18] N. K. Chaki and K. Vijayamohan, “Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 17, pp. 1-12, 2002.
- [19] C. Kumar, *Nanosystem Characterization Tools in the Life Sciences*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 109-144, 2006.
- [20] T. Okazaki, Y. Yanagisawa, and T. Nagai, “Analysis of the affinity of each haptoglobin polymer for hemoglobin by two-dimensional affinity electrophoresis”, *Clin. Chim. Acta.*, vol. 258, pp. 137-144, 1997.
- [21] P. D. Eckersall and J. G. Conner, “Plasma haptoglobin in cattle (*Bos taurus*) exists as polymers in association with albumin”, *Comp. Biochem. Physiol. B*, vol. 96, pp. 309-314, 1990.
- [22] M. Morimatsu, B. Syuto, N. Shimada, T. Fujinaga, S. Yamamoto, M. Saito, and M. Naiki, “Isolation and characterization of bovine haptoglobin from acute phase sera”, *J. Biol. Chem.*, vol. 266, pp. 11833-11837, 1991.
- [23] S. C. Tam and J. T. Wong, “Modification of hemoglobin upon covalent coupling to dextran: enhanced stability against acid denaturation and reduced affinity for haptoglobin”, *Can. J. Biochem.*, vol. 58, pp. 732-736, 1980.



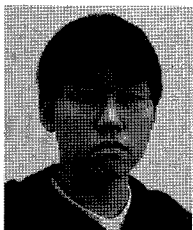
김 성 일

- 2001년 2월 강릉대학교 졸업(이학사)
- 2003년 2월 강릉대학교 졸업 (이학석사 생화학 전공)
- 2006년 8월~현재 강릉대학교 해양바이오·신소재 클러스터 사업단 전임연구원



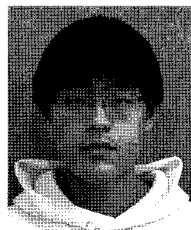
이 현 정

- 현재 강원과학고등학교 2학년 재학 중



박 순 혁

- 현재 강원과학고등학교 2학년 재학 중



방 현 수

- 현재 강원과학고등학교 2학년 재학 중



이진아

- 현재 강원과학고등학교 2학년 재학 중



최석정

- 1983년 2월 서울대학교 화학과 졸업 (이학사)
- 1985년 2월 서울대학교 화학과 졸업 (이학석사 생화학 전공)
- 1989년 8월 서울대학교 화학과 졸업 (이학박사 생화학 전공)
- 1989년 9월~현재 강릉대학교 화학과 교수
- 주관심분야: 생물공학, 분석생화학, 바이오센서