

표면플라즈몬공명 바이오센서를 이용한 살균제 Iprovalicarb 잔류물의 검출

김운호 조한근 경기성 김기영

Detection of the Fungicide Iprovalicarb Residues Using a Surface Plasmon Resonance Biosensor

E. H. Kim H. K. Cho K. S. Kyung G. Kim

Abstract

Surface plasmon resonance (SPR) biosensor has been used to detect many biochemical reactions, because this label-free sensor has high sensitivity and rapid response. The reactions are monitored by refractive index changes of the SPR biosensor.

Iprovalicarb is protective, curative, and eradivative systemic fungicide introduced by Bayer AG in 1999. It has potential for control of downy mildew infesting onion, cucumber, grape and melon, late blight infesting tomato and potato, and anthracnose infesting watermelon and pepper. It is strictly limited to the maximum residue limit.

In this study, the applicability of a portable SPR biosensor (Spreeta, Texas instrument, TX, USA) to detect the iprovalicarb residue was examined. The sensor chip was adopted to detect the reaction of iprovalicarb to immobilized iprovalicarb-antibody. The binding of the iprovalicarb onto the biosensor surface was measured by change of the refractive index (RI).

Characteristics of the sensor chip including specificity, sensitivity, stability, and reusability were analyzed. In calibration test for seven levels of iprovalicarb concentration (0.32 to 5,000 mg/L) with three replications, a Sigmoidal model with Hill function was obtained between relative RI value and the iprovalicarb concentration with R-square of 0.998. It took 30 minutes to complete a set of detecting assay with the SPR biosensor.

Keywords : Surface Plasmon Resonance, SPR biosensor, Iprovalicarb, Fungicide residues

1. 서론

2008년은 광우병과 멜라민 파동으로 인해 안전한 식품에 국민의 관심이 그 어느 해 보다 집중된 한 해였다. 우리 식단에는 외국산 수입 농산물의 비중이 점점 증가하고 있어 안전한 농산물 공급에 대한 국민적 관심이 더욱 높아지고 있으며, 잔류 농약의 관리 및 규제 강화에 대한 국민적 요구도 증가하

고 있다. 농식품에 잔류하는 유해 농약의 신속하고 정확한 검출기술의 개발 필요성 증가로 다양한 방법과 기술이 개발되고 있으나 아직까지 초보적인 수준에 머무는 실정이다.

식물 보호 및 치료용으로 사용되는 침투성 살균제인 iprovalicarb는 양파, 오이, 포도, 부추와 참외의 노균병, 토마토, 고추와 무화과의 역병 방제에 많이 사용된다(Tomlin, 2003; KCPA, 2008). 이 농약의 잔류허용기준은 감자, 양파, 수박에

This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2007. The article was submitted for publication on 2009-01-14, reviewed on 2009-01-28, and approved for publication by editorial board of KSAM on 2009-02-04. The authors are Woon Ho Kim, Graduate Assistant, Han Keun Cho, KSAM member, Professor, Dept. of Biosystems Engineering, Kee Sung Kyung, Associate Professor, Dept of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, and Giyoung Kim, National Academy of Agricultural Science of RDA. Corresponding author: H. K. Cho, Professor, Major in Biosystems Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea; E-mail: <hkcho@cbu.ac.kr>.

서 각각 0.5 mg/kg, 오이, 고추, 무화과에서 각각 1.0 mg/kg, 토마토와 포도에서 2.0 mg/kg이다(KFDA, 2008). 최근에 식품원료, 가공식품 및 공정에 잔류하는 농약, 항생제, 및 중금속 등의 고감도 검출에 이용되는 효소면역분석법이 활용되고 있다. 이 분석법은 관행적인 분석법에 비해 사용이 간편하고 비용이 저렴하고 신속한 장점이 있지만, 실험실까지 시료를 이동해야 하며, 최소 2시간 이상의 분석시간이 요구될 뿐 아니라 숙련된 측정기술이 요구되어, 바이오센서와 같이 현장에서의 신속한 검출을 위한 간편한 장치 개발의 필요성이 증가하고 있다.

Yang and Cho(2005)는 살충제 carbofran 잔류물을 검출하기 위해 표면플라즈몬과 효소면역분석법을 이용하였다. Meeusen et al.(2005)은 소형화된 SPR(Surface Plasmon Resonance) 바이오센서를 활용하여 대장균 *E. coli* 0157를 검출하는 연구를 수행하였으며, 이 연구에서 상용화된 SPR 바이오센서인 Spreeta 센서의 사용 가능성을 조사하였다. Cho et al.(2007)은 잔류 살균제 iprovalicarb를 신속히 검출하기 위해 실험실용으로 개발된 효소면역분석법(Lee et al., 2004; Cho et al., 2006)을 기초로 한 바이오센서를 개발하였다. Shankaran et al.(2007)은 생의학, 식품 및 환경 분야의 소분자 검출을 위한 SPR 면역센서의 최근 발달이라는 문헌연구를 통해 SPR 면역센서를 차세대에 많이 사용될 바이오센서로 전망하였다.

본 연구에서는 표면플라즈몬공명(SPR) 원리로 제작하여 시판중인 SPR 바이오센서 칩과 측정시스템(Spreeta, Texas instrument, TX, USA)을 이용한 SPR 바이오센서 측정시스템을 구성하고, 살균제인 iprovalicarb의 검출 가능성을 구명하였다. 이를 위하여 SPR 바이오센서의 금막 표면에 iprovalicarb 항체를 고정하고 시료를 반응시킨 후, 바이오센서의 굴절률 변화를 분석하여 iprovalicarb를 검출하였다. 또한, 바이오센서의 검출 특성을 평가하기 위하여, 센서의 측정감도, 특이성 및 안정성을 분석하여 iprovalicarb를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는지를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 표면플라즈몬공명 바이오센서

표면플라즈몬공명(SPR) 바이오센서는 금속 박막의 표면에 플라즈마 공명현상으로 인해 광 에너지가 흡수될 때 일어나는 굴절률 변화를 이용하는 센서로서 금속 박막에 생물학적 요소로 이루어진 생물검출부를 구성하여 사용한다. SPR 바이오센서의 원리와 응용은 Cho(2003)에 자세히 설명되어 있다.

본 연구에 사용된 SPR 센서의 광원은 840 nm의 편광 근적외선 발광다이오드(LED)이며, 구조는 그림 1과 같다. 설정된

조명강도에 의해 LED에서 투사된 빛은 센서의 금막 표면에 부착된 분석물에 의해 광특성이 바뀐 상태로 전반사 굴절이 되며, 굴절된 빛은 센서 천장 면에 장착된 금반사경에 의해 광다이오드 어레이로 전달된다. 반사된 빛은 128픽셀의 광다이오드 어레이로 측정되어 A/D 변환을 거쳐 컴퓨터에 저장된다. 이때 금막표면에 반사된 광의 굴절각은 광다이오드 어레이의 특정위치(픽셀번호)에 감지된다. 금막표면에 반응하는 액체의 굴절률에 따라 표면플라즈몬공명이 발생하는 공명각에서 반사광의 강도가 최소가 된다.

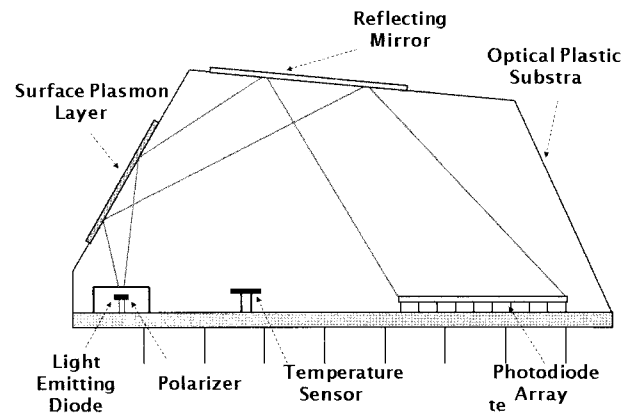


Fig. 1 Side view of the Spreeta SPR sensor.

SPR 바이오센서를 이용한 측정시스템을 그림 2와 같이 구성하였다. 항체가 고정화된 센서의 금막 표면에 플로우셀(flow cell)을 부착하고 연동펌프로 유속을 조절하여 농약시료를 공급하도록 하였다. 주입된 농약시료는 센서의 금막 표면에서 항체와 결합반응을 하고 나머지는 배출되도록 하였다. 항원-항체의 면역에 의한 결합반응으로 센서에서 발생하는 신호는 직렬통신(RS-232C)용 시리얼 케이블을 통하여 A/D 변환기에 전달되어 디지털 신호로 변환되며, 변환된 신호는 실험용 PC에 수집된 후, 분석을 위해 저장되도록 하였다. 저장된 데이터는 전용 소프트웨어(SPR EVM, ver. 6.45, TX,

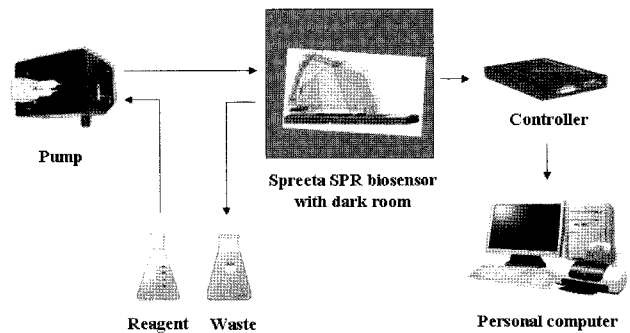


Fig. 2 Schematic diagram of a SPR sensing system for measurement of iprovalicarb residues.

USA)를 이용한 신호치리를 통해 확인할 수 있다. SPR 곡선의 1차 모멘트는 식 (1)에 의해 기준 값 0.85로 산출되었으며 초순도 3차 증류수를 기준으로 계산한 상대 굴절률로 SPR 측정신호를 표현하였다(Cho and Kim, 2003).

$$SPR \text{ curve} = \frac{S_l - B_l}{S_a - B_a} \quad (1)$$

where S_l : Signal in liquid
 S_a : Air reference
 B_l : Background reference in liquid
 B_a : Background reference in air

나. 시약 및 실험재료

표면플라즈몬공명과 면역분석법을 이용한 바이오센서의 성능평가에 필요한 iprovalicarb와 *p*-methylphenylethylamine는 Bayer AG(Leverkusen, Germany)에서 분석 등급으로 공급받았다. 농약시료는 공급받은 iprovalicarb 표준시약 100 µg/L를 PBS(phosphate buffered saline, Sigma, USA) 완충용액에 1:8,000과 1:16,000으로 희석하여 농도를 맞추어 4°C 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

항체는 Lee et al.(2004)에 의해 제조된 hapten-I-BSA와 hapten-II-KLH conjugate를 각각 코팅항원과 면역원으로 하여 실험용 토끼에서 생산된 항체를 공급 받아 사용하였으며, -15°C 이하로 냉장고에 냉동 보관하였다. 매 실험마다 15-20분간 완전 해동하여 필요한 양만큼 PBS 완충용액에 1 mg/mL의 비율로 용해하여 사용하였다.

센서 칩의 금막 표면에 고정할 항체와 결합할 티올기(-SH)를 코팅하기 위해 티올화 교차제(thiolation cross-linker)로 DSP(3,3'-dithiodipropionic acid, Sigma, USA)를 사용하였으며, DSP는 용매 DMSO(dimethyl sulfoxide, Cica, USA)로 4 mg/mL의 비율로 용해하여 사용하였다.

실험에 필요한 완충용액의 용매 또는 센서의 금막 표면을 세척하기 위해 PBS 완충용액을 사용하였으며, 센서 표면에 고정화된 항체를 포함한 완전 세척을 위하여 계면활성제인 Triton X-100(Fluka, Japan)을 사용하였다. 세척액은 1%의 비율로 거품이 생기지 않도록 주의하면서 초순도 3차 증류수에 용해하여 실온에서 보관하면서 사용하였다. 고정된 항체의 비선택성결합을 방지하기 위해 합성상태로 시판되는 Blocker™ BSA(10% in PBS, Bovine serum albumin, Pierce, USA)를 구입하여 4°C 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

농약시료의 주입을 위해 정격유속 0.03~1.00 mL/min을 갖는 저용량 변속 연동펌프(KH-73160-00, Cole-Parmer, Vermon, IL, USA)와 Viton 튜빙 재료를 사용하였다.

다. 실험 방법

1) SPR 바이오센서의 초기화

센서 초기화를 위해 분석용 프로그램을 실행한 후, 센서 헤드부, 신호변환기, RS-232C, 컴퓨터와의 연결 상태를 확인하였다. 연결 상태를 확인 후 옵션 메뉴의 하드웨어 서브메뉴에서 SPR 입력장치를 128화소 센서로 설정 후, 센서의 정상상태 확인을 위해 데이터 메뉴의 원시 신호보기 서브 메뉴를 통해 센서 입력과 조명강도(7-medium을 .5 ms의 적분시간)를 확인하였다. 유량 시스템을 준비하여, 공기 주입상태에서 이상적인 설정 값으로 센서를 초기화하고, 일정시간동안 기준선 완충용액(base line buffer)으로 3차 증류수를 센서에 공급하여 기준선을 잡아 주었다.

2) 항체의 고정화

본 연구에서는 항체고정화를 위해 티올화된 리간드를 금속 표면에 화학적으로 흡착시키는 방법을 사용하였다(Pierce, 2004). 센서의 금막 표면에 항체를 고정화하기 위하여, 우선 금막의 표면을 PBS-Triton 또는 PBS 완충용액으로 세척하여 금막 표면의 이물질을 제거한 후, 실온에서 완전 건조하였다. 마이크로 피펫으로 DSP 용액(4 mg/mL의 DMSO) 100 µL를 센서의 금막 표면에 1회 떨어뜨린 후 24°C 상온에서 30분간 반응시켰다. 이 때 DSP 용액에 포함된 티올기가 센서의 금막 표면에 흡착된다. 반응 후, DMSO 용액과 3차 증류수를 이용하여 각각 2~3분간 금막 표면을 세척하였다. DMSO 용액을 이용한 세척은 블로킹(blocking) 역할을 동시에 수행하여, 금막에 더 이상의 티올기가 흡착하지 못하게 하였다. 이후 금막에 고정화된 티올기에 항체가 흡착되는 활성도를 높이기 위해 3차 증류수로 세척하였다. PBS 완충용액으로 용해시킨 항체용액(1 mg/mL)을 마이크로 피펫을 이용하여 1회 150 µL씩 센서의 금막 표면에 떨어뜨려, 120분 동안 40분을 주기로 총 3회 공급하여 24°C 상온에서 반응시켰다. 이때 항체의 농도가 1~2 mg/mL 범위에 미치지 못하면 티올기와 흡착반응이 형성되지 않으므로, 예비실험을 통해 적정농도가 1 mg/mL임을 확인 후 실험을 계속하였다. 마지막으로 센서의 금막표면을 PBS 완충용액으로 1~2분간 세척 후 10% Blocker™ BSA로 10분 간 블로킹 처리하였다.

3) 항원-항체 결합반응

농약 잔류량을 측정하기 위한 최종단계로서 고정화된 항체에 항원을 결합 반응시키기 위해서는 연동 펌프의 적정 유속을 구하는 것이 필요한데, 유속이 적정값 보다 느리면 반응시간이 길어지고, 빠르면 고정화된 항체에 손상을 주어 적절한 반응을 저해하는 문제가 발생한다. 실험에 사용된 연동 펌프

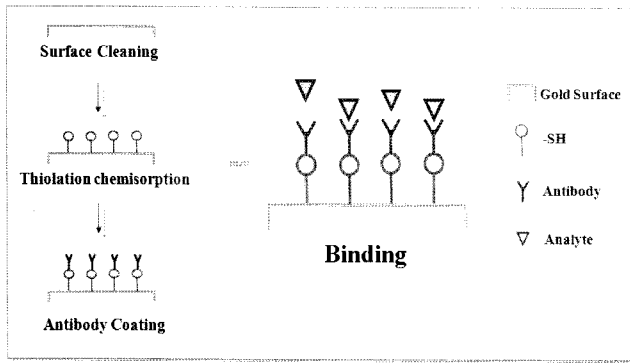


Fig. 3 Binding schematic of analytes to ligands.

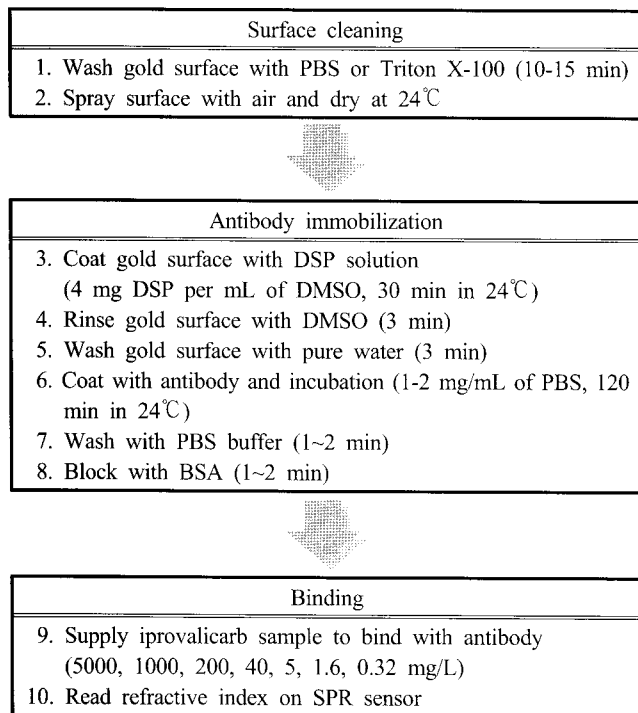


Fig. 4 Procedures of sensor surface cleaning, antibody immobilization, and antigen-antibody binding.

의 조절 손잡이 위치에 따른 유속을 예비실험을 통해 관계식을 구하고, 이상적인 항원-항체의 결합 반응에 필요한 최적 유속을 시행착오법에 의해 0.54 mL/min으로 결정하였다.

그림 3에 금막 표면처리와 항체고정화 작업을 포함한 항원-항체의 결합과정을 도식적으로 나타내었고, 그림 4에 금막표면 세척, 항체 고정화, 및 결합반응의 세부공정을 자세히 설명하였다.

4) 센서의 특이성 평가

SPR 바이오센서의 특이성은 분석대상의 물질에 따라 고유성을 보이게 되며, 바이오센서는 특이 반응을 유용하게 사용한다. 센서의 특이성 평가를 위해, 항체 고정화된 센서의 금막 표면에 iprovalicarb 시료, BSA 및 살균제 imidacloprid를

각각 반응시켜 굴절률의 변화를 측정하였다. 특이성 평가를 위해 사용된 화합물의 농도는 모두 200 mg/L로 하였다.

5) 센서의 검출 성능 평가

SPR 바이오센서의 검출성능을 평가하기 위해, 항체를 고정화한 센서에 iprovalicarb 시료를 농도별(5000, 1000, 200, 40, 8, 1.6, 0.32 mg/L)로 희석하여 사용하였고, 시료 농도 0 mg/L 대조구로서 농약시료를 첨가하지 않은 PBS 완충용액을 사용하였다. 항체의 농도는 Lee et al.(2004)이 발표한 효소면역법에 사용된 최적 희석비인 1,8000과 1:16,000을 사용하였다. 센서 간의 편차를 제거하기 위하여 매 실험마다 센서의 초기화 과정을 전처리로 수행하였으며, 반응 후 시간경과에 따른 굴절률 차와 공명각 변화를 측정하였다. Iprovalicarb의 농도별(대조구 포함)로 3회 반복하여 수집된 SPR 바이오센서의 출력신호를 통계처리하여 iprovalicarb 농도에 따른 상대 굴절률간의 관계식을 구하였다.

6) 센서의 재사용성 평가

SPR 바이오센서 칩에서 분자간의 상호작용이 발생하는 센서의 금속 표면이 중요하며, 센서의 금속 표면이 충분한 내구성과 재현성을 발휘할 때 상업적 부가가치를 지닌 바이오센서로서의 역할을 가능하게 한다. 티올화 항체를 화학흡착에 의해 고정시킨 센서 칩의 재사용성을 평가하기 위해, 새 센서 칩에 항체를 고정화하여 1회 사용 후, 고농도(1 M)와 저농도(10 mM)의 NaOH로 세정작업을 통해 항체에 반응된 농약시료만 제거한 후, 상대신호의 크기가 30% 이하로 측정될 때까지 이 과정을 반복하였다. 세정 작업은 항체의 손상을 최소화하기 위해, 센서의 핀을 위로 향하도록 하고, 금막 표면의 길이 방향을 수직과 45° 경사지게 한 후, 피펫으로 세정액을 100 ml 씩 금막 바로 위의 테두리에 떨어뜨려, 세정액이 중력에 의해 금막 표면의 길이 방향으로 흐르도록 하고, 이 작업을 4회 반복하였다.

3. 결과 및 고찰

가. SPR 센서의 초기화

그림 5는 공기에 의한 초기화 상태의 굴절률 변화(a)와 증류수를 주입한 후의 굴절률 변화(b)를 보여준다. 초기화 이전의 굴절률은 1.277이고, 50초에 초기화가 시작되어 120초 후인 170초에 종료되어 굴절률은 1.290으로 증가하였다. 이어 320초에 센서에 증류수를 주입하고 60초 후인 380초에 굴절률은 1.284로 감소하여, Sprecta™ 센서가 정상적으로 작동함을 확인하였다.

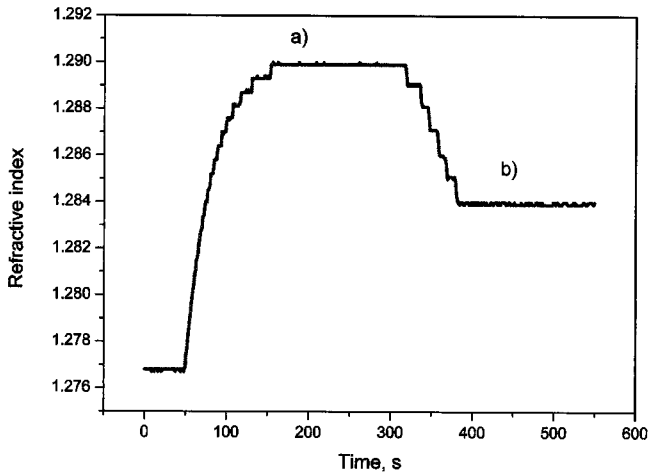


Fig. 5 Refractive index change through air initialization (a) and water calibration (b) of SPR biosensor.

나. 항체고정화

그림 6은 센서의 고정화 전후에 따른 SPR 곡선으로, 가로축은 공명각 변화를 픽셀위치의 변화로 세로축은 반사광의 강도를 보여준다. 고정화 후에 반사광 강도의 최소점에서의 공명각이 픽셀 번호로 81에서 90으로 증가된 것을 나타내고 있다. 공명각 변화는 센서의 금막 표면에 항체가 고정되어 단백질이 부착되었음을 의미한다.

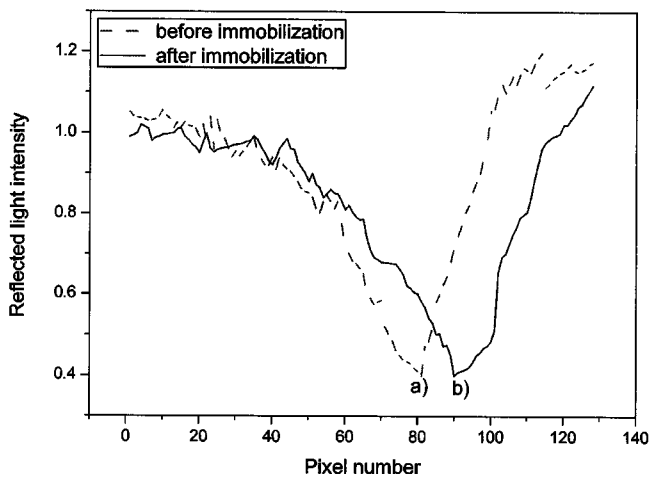


Fig. 6 Resonance angle shift on gold surface before (a) and after (b) antibody immobilization (a:81, b:90).

다. SPR 바이오센서의 특성

1) 센서의 특이성

항체를 센서의 금막 표면에 고정화하고, 농약시료를 추가한 후 SPR 곡선의 공명각이 변화되는 정도와 시간의 경과에

따른 굴절률 변화를 측정하였으며, SPR 바이오센서의 특이성을 알아보기 위해 항체가 고정화되지 않은 센서에도 동일한 조건으로 농약시료를 추가하고 굴절률 변화를 측정하였다.

그림 7은 항체가 고정화된 센서의 금막 표면에 iprovalicarb 시료(200 mg/L), BSA 그리고 살균제 imidacloprid를 각각 주입한 후 굴절률의 변화를 측정할 결과를 나타낸다. 모든 시료는 7분 후에 주입되어 32분까지 총 25분간 관찰되었다. Iprovalicarb의 경우 굴절률이 20분(7~27분)간 1.306에서 1.316으로 시간에 비례하여 증가되었다. 이는 고정화된 항체와 항원간의 면역반응에 의해 센서 금막 표면에서 광학성 특성의 변화로 굴절률이 증가된 것으로 확인된다. 비특이적 성질을 갖는 단백질 BSA와 살균제 imidacloprid를 같은 농도로 주입한 경우, 굴절률은 1.306에서 1.311로 급격한 수직 상승하여 서로 비슷한 반응을 보였으나, 시간에 비례하여 상승하는 iprovalicarb-항체간의 면역반응과는 전혀 다른 경향을 보여주었다.

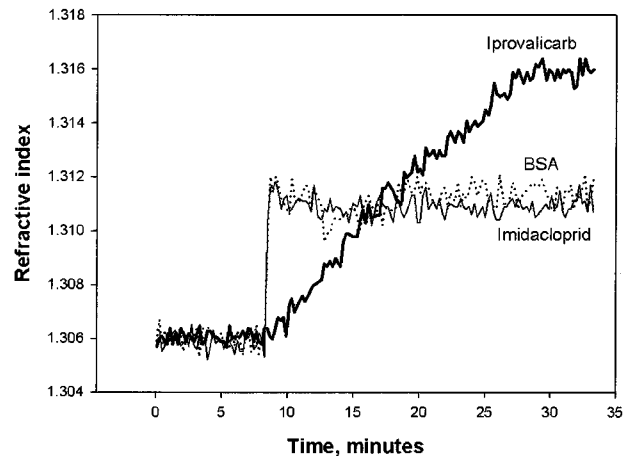


Fig. 7 Refractive index change after adding of iprovalicarb, BSA and imidacloprid to antibody immobilized sensor chip.

2) 센서의 검출성능 평가

센서의 검출성능과 측정 감도를 평가하기 위해, 센서의 금막 표면에 항체를 고정화한 후 iprovalicarb의 농도를 0.32, 1.6, 8, 40, 200, 1000, 5000 $\mu\text{g/L}$ 로 준비하여 SPR 센서에 반응시켜 결과를 측정하였다. 그림 8은 항체의 농도를 원액 대비 각각 1:16,000과 1:8,000의 비율로 용해하여 고정화 시킨 후 농약시료를 연동펌프로 금막 표면에 주입한 후 측정된 굴절률 변화의 매 1분간 평균값을 나타낸다.

항체의 농도와 관계없이 모든 농도범위에서 양호한 측정결과를 보여주고 있어 최소 0.32 mg/L까지 검출이 가능하며, 잔류 허용한계인 0.5 mg/kg의 검출이 충분한 것으로 확인되었다. 반응시간은 항체의 희석비가 높은 1:16,000의 경우가 30분 정도로 희석비가 낮은 1:8,000의 경우 40분 정도로 나타났고, 굴절률 변화는 1:8,000의 경우가 큰 것으로 확인되었다.

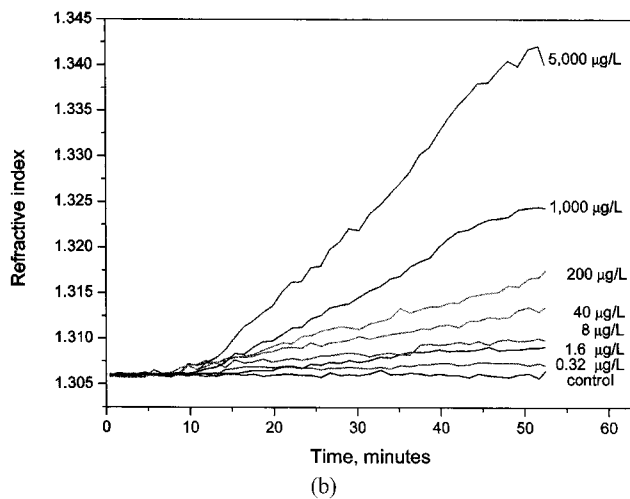
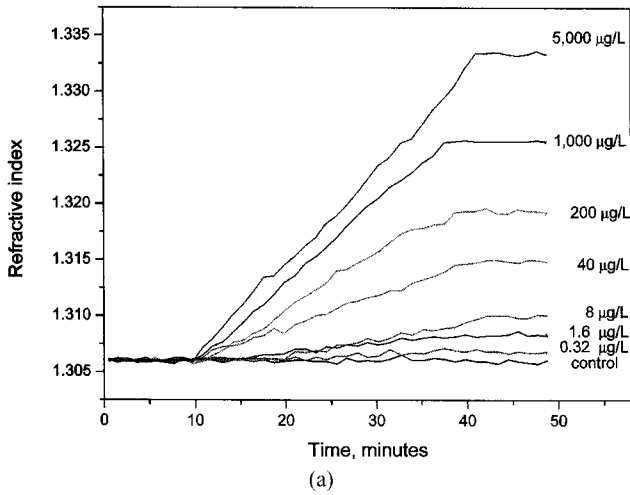


Fig. 8 SPR biosensor response curves by different antibody concentration with antibody dilution ratio of 1:16,000 (a), and 1:8,000 (b).

항체의 희석비가 1:16,000 인 경우에서, 교정곡선을 시그모이드(sigmoid) 모형의 비선형 곡선적합(curve fitting)으로 식 (2)와 같은 Hill 함수를 선택하였고 결정계수는 0.998로 산출되었다. 식(3)의 계수 값들은 99%의 신뢰구간을 갖는 것으로 나타났다(Prob > F : 3.75624e-5). 그림 9에서 가로축은 iprovalicarb 농도를 상용대수 눈금으로 나타내고, 세로축은 상대 굴절률을 나타내며, 실험에 의한 측정값과 모형에 의한 추정값을 함께 보여준다.

$$y = a + (b - a) \frac{x^n}{k^n + x^n} \quad (2)$$

- where y : ΔRI
- x : concentration of iprovalicarb ($\mu\text{g/L}$)
- a : -1.36083×10^{-4}
- b : 3.64161
- k : 4.24257×10^9
- n : 0.33631

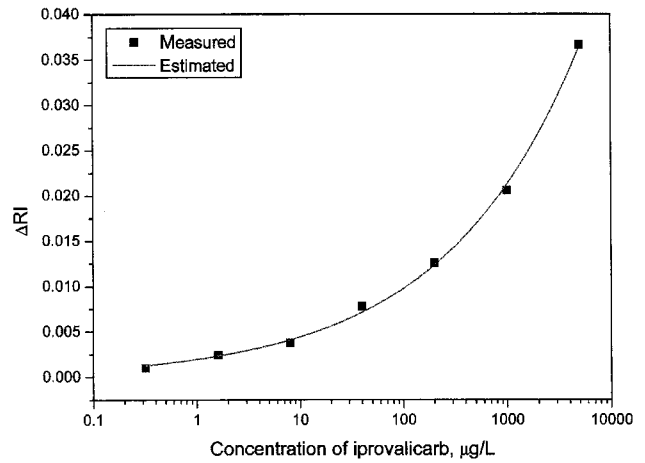


Fig. 9 Calibration curve of iprovalicarb SPR biosensor.

3) 센서의 안정성

SPR 바이오센서를 1회 사용 후 금막 표면을 세척하여 항체를 제외한 흡착물질을 제거하고 8 mg/L 농도의 iprovalicarb 로 반복하여 측정된 결과를 비교했다. 측정값으로 상대굴절률(ΔRI)을 구하고 식 (3)으로 상대척도(relative scale)를 계산하였다(Cho and Kim, 2003).

$$\text{Relative scale} = \frac{\Delta RI \text{ at an arbitrary use}}{\Delta RI \text{ at the first use}} \quad (3)$$

where ΔRI = (Refractive index of a sample from the SPR biosensor) - (Refractive index of baseline buffer from the SPR biosensor)

그림 10은 센서 칩의 재사용성을 평가한 결과로서 가로축은 재사용 횟수를 표시하고 세로축은 최초 측정값과의 비교 값을 보여준다. 세척액을 저농도로 한 경우 고농도에 비해 재사용성이 다소 높은 것으로 나타났다. 저농도 세척의 경우, 2회에는 98%, 3회와 4회에는 80%, 5회에는 75%, 6회에는

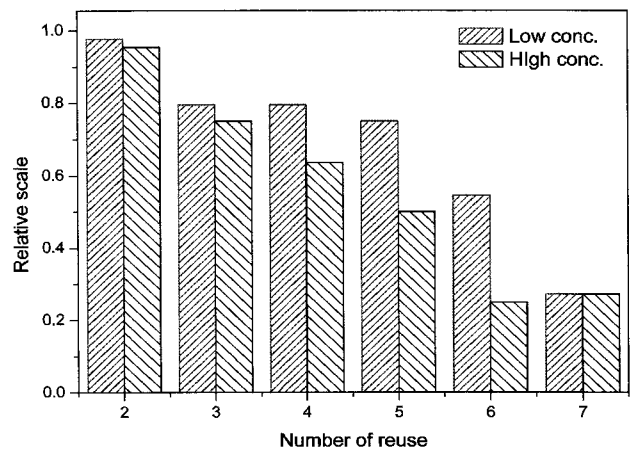


Fig. 10 Reusability result of sensor chip.

55% 그리고 7회에는 27%의 재사용 능력이 있는 것으로 관찰되었다. 고농도 세척의 경우 2회에는 95%, 3회에는 75%, 4회에는 64%, 5회에는 50%, 6회에는 25% 그리고 7회에는 27%의 검출 능력이 있는 것으로 관찰되었다. Cho and Kim (2003)의 연구결과(2회의 43%)와 비교할 때, 세정방법의 차이로 인해 센서의 재사용 능력이 다소 좋은 것으로 확인되었다.

4. 결론

본 연구에서는 Spreeta™ SPR 센서와 면역반응을 이용하여 살균제 Iprovalicarb를 검출할 SPR 바이오센서 시스템을 구성하였고, 바이오센서의 특이성, 잔류농약의 검출능력 및 재사용성을 분석하였다. 본 연구를 통해 얻어진 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

- (1) 센서 칩의 특이성 분석에서 본 실험에 사용된 항체의 고정화 유무에 따른 SPR 곡선의 최소점에서의 공명각이 픽셀번호로 81에서 90으로 변화됨을 확인하였다.
- (2) 비특이적 단백질인 BSA에는 반응하지 않고, Iprovalicarb에만 반응하는 특이성을 확인하였다.
- (3) 항체의 희석 비율이 1:8,000과 1:16,000일 때 Iprovalicarb 시료에 대한 SPR 바이오센서의 검출 성능을 확인한 결과 0.32 µg/L까지 검출이 가능하고, 검출에 필요한 반응시간은 각각 42분과 30분으로 나타났다.
- (4) 비선형 곡선적합에 의한 시그모이드 모형(Hill 함수)을 이용하여, 항체희석비가 1:16,000일 때의 상대굴절률과 Iprovalicarb 농도 사이의 측정모델(결정계수: 0.998)을 구하였다.
- (5) 센서 칩의 재사용성을 평가한 결과, 동일한 센서를 2회 이상 반복하여 사용하였을 때 검출능력은 최초 사용에 비해 75% 이하로 감소하였다. 따라서 재사용성은 양호하지 않은 것으로 확인되었다.

참고 문헌

1. Cho, Y. J. 2003. Surface plasmon resonance biosensors: Principle and application. Food Engineering Progress 7(1):54-59. (In Korean)
2. Cho, Y. J and N. S. Kim. 2003. Recognition of microorganism using SPR biosensor immobilized with thiolated antibody. Journal of Biosystems Engineering 28(2):167-172. (In Korean)
3. Cho, H. K., K. S. Kyung and E. Y. Lee. 2006. Enzyme immunoassay for rapid detection of the fungicide Iprovalicarb residues. Journal of Biosystems Engineering 31(6):535-540. (In Korean)
4. Cho, H. K., E. H. Kim, K. S. Kyung and E. Y. Lee. 2007. A biosensor for the rapid detection of the fungicide Iprovalicarb residues. Journal of Biosystems Engineering 32(6):440-447. (In Korean)
5. KCPA. 2008. Agrochemicals Use Guide Book. p.185. Korea Crop Protection Association, Seoul, Korea. (in Korean)
6. KFDA. 2008. MRLs for Pesticides in Foods. p.116. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea. (In Korean)
7. Lee, J. K. S. H. Park, E. Y. Lee, Y. J. Kim and K. S. Kyung. 2004. Development of an ELISA for the detection of the residues of the fungicide Iprovalicarb. Journal of Agricultural Food Chemistry 52:6680-6686.
8. Meeusen, C. A., E. C. Alocilja and W. N. Osburn. 2005. Detection of *E. coli* O157:H7 Using a Miniatured Surface Plasmon Resonance Biosensor. Transactions of the ASAE 48(6):2406-2416.
9. Pierce. 2004. Attach a protein onto a gold surface. Tech tip #2, TR0002.1, Pierce Biotechnology, Inc. P. O. Box 117, Rockford, IL 61105, USA.
10. Shankaran, D. R., K. V. Gobi and N. Miura. 2007. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. Sensors and Actuators B 121:158-177.
11. Tomlin, C. 2003. The Pesticide Manual (13th ed.). p.580. British Crop Protection Council, UK.
12. Yang, G. M. and N. H. Cho. 2005. Sensing of the insecticide carbofuran residues by surface plasmon resonance and immunoassay. Journal of Biosystems Engineering 30(6):333-339. (In Korean)