

중금속 생체지표인 메탈로티오닌의 나노리터 수준 전기화학 검출기술

Electrochemical Detection of Heavy Metal Biomarker, Metallothionein, in Nanoliter Level

김남수 | 바이오나노연구단

Nam-soo Kim | Food Bio-nano Technology Research Group

서 론

수계부하 중금속이온은 먹이사슬(food chain)상의 각종 조류와 플랑크톤을 거쳐 양식어류 등 식용 어류에 축적되는데, 이들을 사람이 섭취하면 인체 내로 중금속이 축적된다. 환경부가 2005년도 전국 성인남녀 2,000명을 대상으로 혈중 중금속 농도를 조사한 바에 의하면 혈액 10 당 수은과 카드뮴 농도는 각각 $4.34 \mu\text{g}$ 와 $1.52 \mu\text{g}$ 으로 미국인과 독일인의 혈중 농도에 비해 3~7.5배 높게 나타났다. 한편 어패류 섭취가 높은 일본인의 경우 수은과 카드뮴의 혈중 농도가 한국인보다 높은 것으로 나타나 어패류 섭취빈도가 인체 내의 중금속 축적과 밀접하게 관련될 개연성이 있다.

따라서 품질안정성이 높은 어패류 섭취를 위해서는 중금속오염 가능성이 상대적으로 높은 광어 등 연안양식업에 의하여 주로 공급되는 각종 식용 어류의 중금속 오염여부에 대한 모니터링이 필요하다. 이를 위하여 기기분석법에 의한 중금속이온

자체의 분석뿐만 아니라 중금속에 의하여 식용어류에서 발현되는 바이오마커(biomarker pro-tein)에 대한 현장성 있는 첨단검출기술 확립이 필요하며 아울러 순간적인 계측이 가능하도록 관련 장치의 센서화가 이루어져야 한다. 내분비계장애물질에 노출된 잉어, 도미 등 대부분 어류에서 바이오마커로써 비텔로제닌(vitellogenin)이 정상어류보다 고농도로 분비되듯이 하천과 연안해수의 중금속 노출 시 메탈로티오닌(metallothionein, MT)이 어류 체내에서 과량 발현된다. 이를 측정하면 식용어류 자체의 중금속 오염여부를 총체적으로 선행하여 파악할 수 있으며, 그 결과 메탈로티오닌 함량이 정상보다 높은 양성시료를 대상으로 중금속 정밀분석을 행할 수 있게 된다. 따라서 식용어류의 품질안정성 증진을 위한 총체적 품질지표로써의 메탈로티오닌에 대한 고감도 검출기술의 개발이 시급히 요구되고 있다.

메탈로티오닌은 분자량 6,000~8,000의 저분자 금속결합성 단백질로써 cysteine 함량이 30%에 이

르고 있어 산화환원반응이 손쉽게 일어나며 이와 같은 반응성에 따라 동물세포를 금속, 반응성 친전자체(reactive electrophile), 활성산소와 질소종(ROS/RNS)의 유독작용으로부터 보호해 주는 역할을 한다. 메탈로티오닌을 구성하는 20개의 cysteine 잔기는 동물의 종류에 따라 높은 보존도를 나타내며 금속결합능을 지니는 α 및 β 형의 thiolate cluster로 배열되어 있다. 보고된 바에 따르면 중금속 속에 노출된 동물 체내에서는 메탈로티오닌 유전자의 발현에 따라 메탈로티오닌이 수십에서 수백 $\mu\text{g/g}$ 수준까지 과량 생산되며, 어류의 경우에도 게, 새우, catfish(메기류), 뱀장어 등의 경우 중금속 이온의 체내축적에 의하여 메탈로티오닌이 생성되기도 된다고 보고되고 있다. 이 때 메탈로티오닌이 식용어류 등 모든 어류에 있어 고유하게 존재한다는 사실로부터 이를 어류의 중금속에 대한 품질안정성 지표로 사용하도록 유럽 등지에서 제안되고 있다. 따라서 어류 메탈로티오닌의 정성 및 정량적 측정이 양식어류의 품질 평가를 위한 필요과제로써 점차 대두되고 있어 일상적 측정에 적합한 메탈로티오닌에 대한 재현성 있는 신속·고감도 분석기법의 개발이 필요하다. 또한 유럽에서의 연구에 의하면 체내의 메탈로티오닌 함량과 유방암 발생과는 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있다.

메탈로티오닌 분석법으로는 Cd-hem 측정법, Hg 또는 Ag 포화법, thiol기 측정법, Sephadex G-75/atomic absorption spectrometry(AAS)법, 방사면역분석법(radioimmunoassay, RIA)과 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)과 같은 면역학적 방법, 모세관 전기영동(capillary electrophoresis, CE) 및 HPLC 등이 보고되고 있다. 이들 방법은 각각의 장단점이 있으나 바이오마커

분석에 있어 최근의 전반적 연구 추세인 생물분자 및 반응시약의 소모량 감소를 통한 경제성 제고와 친환경화, 측정과정의 간편화와 현장 사용성 증진에는 미흡한 측면이 있으므로 이에 부합하는 새로운 메탈로티오닌 검사방법의 확립이 필요한 상황이다. 따라서 본 고에서는 이와 같은 추세에 부응하고자 최근 보고되고 있는 Adam 등의 메탈로티오닌에 대한 나노리터 수준 전기화학 검출기술에 대하여 상세히 소개하고자 한다.

측정원리

본 연구의 전기화학 검출기술은 시료 중에 존재하는 티올 단백질인 메탈로티오닌을 작용전극(working electrode)의 표면에 흡착전이 스트리핑 기법(adsorptive transfer stripping technique, AdTS)에 의하여 고농도로 농축시킨 후(Fig. 1A) Brdicka 전해질[1 mM $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 와 1 M 암모니아 완충용액($\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$, pH = 9.6)]로 전극을 씻어주고 차동펄스 전압 전류법(differential pulse voltammetry, DPV)에 의하여 측정하는 방법이며, 그 작동조건은 초기전위(initial potential) - 0.35 V, 종기전위(end potential) - 1.8 V, 변조시간(modulation time) 0.057 s, 시간간격(time interval) 0.2 s, 스텝전위(step potential) 1.05 mV, 변조진폭(modulation amplitude) 250 mV, E_{acs} 0 V 및 전해질 온도 4°C이었다. Brdicka 전해질의 볼타모그램(점선)에 대한 메탈로티오닌의 볼타모그램(실선)은 Fig. 1B에 표시되어 있다. 이 때 전기화학측정은 VA-Stand 663(Metrohm, Switzerland)과 연결된 AUTOLAB 분석기(EcoChemie, Netherlands)에 의하여 수행하였다. 작용전극으로는 현수수은방울전극(hanging mercury

drop electrode, HMDE)을 사용하였고 여기에 Ag/AgCl/3M KCl 참조전극(reference electrode) 및 글래스카본(glassy carbon) 보조전극(auxiliary electrode)의 삼전극계를 사용하였다. 스무딩(smoothing)과 베이스라인 보정은 GPES 4.4 소프트웨어에 의하여 행하였다.

결과 및 고찰

흡착전기법의 메탈로티오닌 검출에의 적용

AdTS-DPV Brdicka 반응은 시료부피를 최소화하

는 동시에 흡착전이와 Fig. 1의 전극세척 과정을 거치므로 계측저해현상을 방지해주는 장점이 있으나 기존에는 극소량의 시료부피를 분석 시 재현성 높은 계측결과를 기대할 수 없는 상황이었다. Adam 등은 시료의 방울부피와 작용전극의 면적이 측정감과 재현성에 미치는 영향을 분석하였다. 100 μ M 메탈로티오닌 용액의 방울부피를 각각 2.5, 5.0, 10, 15 μ l로 하여 400 μ m²의 작용전극에서 AdTS-DPV 반응을 행한 경우에는 농도 의존적이고 재현성 있는 Cat 2 신호가 나타났다(Fig. 2Aa). 이 때 5회 반복측정에 따른 상대표준편차(relative standard deviation)는 5% 이내이었다. 100 nM 메탈로티오닌 용액의 방울부피를 각각 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 5.0 μ l로 하고 250 μ m²의 작용전극에서 실험한 경우, Brdicka 촉매반응

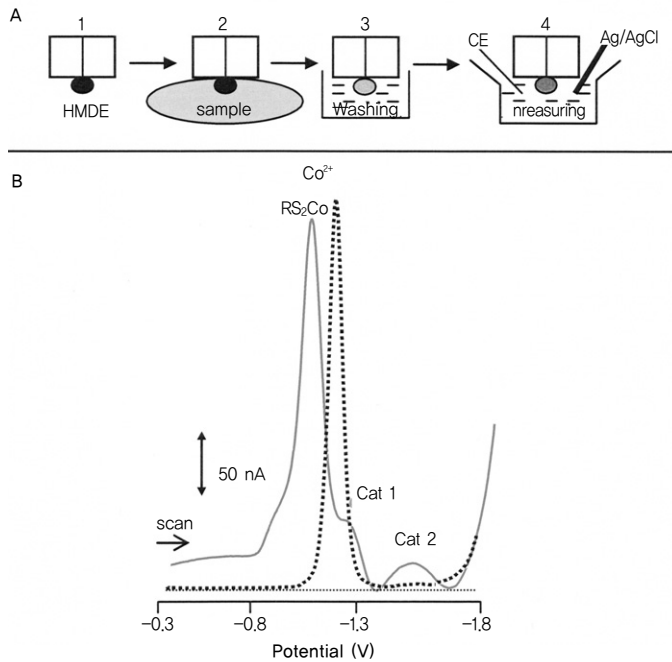


Fig. 1. Scheme of adsorptive transfer technique(A). Typical voltammograms of 100 nM MT(solid line) and supporting electrolyte(dotted line)(B).

의 피크가 아주 낮은 메탈로티오닌 농도에서도 잘 나타났다(Fig. 2Ba). 그러나 이 경우 상대표준편차가 4~40% 범위여서 재현성에 문제가 있었으며, 500 nL 부피의 메탈로티오닌 방울용액을 사용하여 AdTS-DPV 반응을 행한 경우 Cat 2 피크가 2500 nL 부피의 메탈로티오닌 방울용액을 사용한 경우보다 오히려 5배 정도 높았는데 이는 흡착전이 과정 중 물 분자의 증발에 따른 현상으로 보이므로 실온에서는 이 방법으로 극미량 부피의 시료 중 메탈로티오닌에 대한 정량분석을 행하기 어려운 것으로 생각된다.

흡착전이기법의 개선

상기의 문제점을 아래와 같이 개선하였다. 즉 파라필름(시그마사)을 사각형으로 절취하여 버너로 현미경 슬라이드에 접착하고(Fig. 3a) 이를 에탄올과 증류수로 씻어준 후 슬라이드를 비커에 담아 2°C의 항온수조에서 보관하였다. 사용 전 슬라이드를 수조에서 꺼내 셀룰로오스로 건조한 후 미량의 메탈로티오닌 방울용액을 슬라이드에 올리고(Fig. 3c) 작용전극의 표면에 흡착시켰다. 이 후 전극을 세척한 후 앞에서와 같이 반응시켜 Cat 2 피크를 측정하였다(Fig. 3e-g). 100 μ M 메탈로티오닌 용액의 방울부피를 각각 2.5, 5.0, 10, 15 μ L로

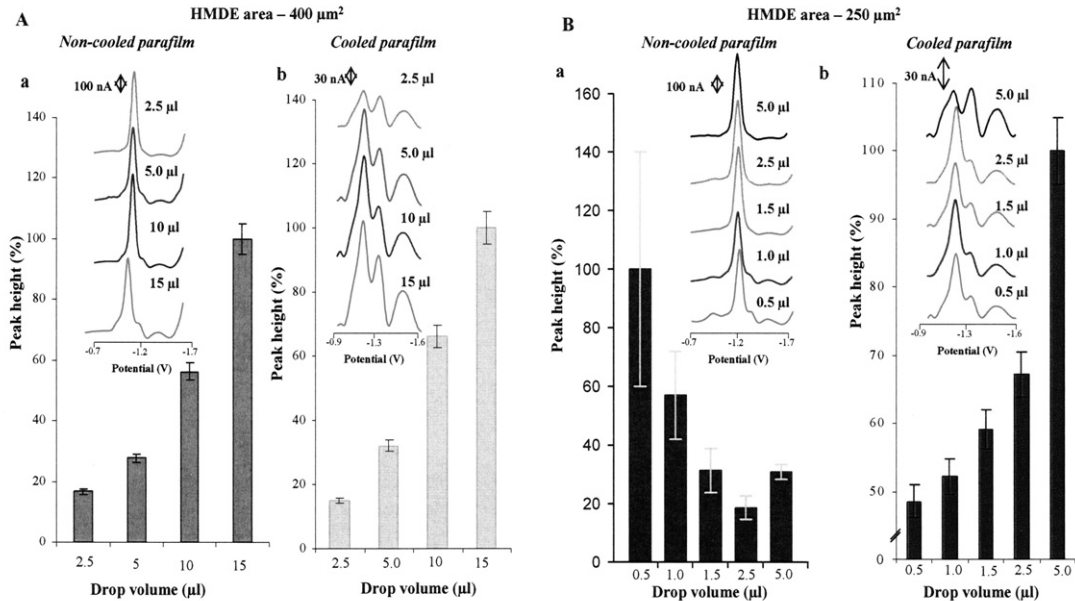


Fig. 2. Dependence of Cat 2 peak height of metallothionein of 2.5, 5.0, 10 and 15 μ L (A, non-cooled parafilm **a** and cooled parafilm **b**, measured at HMDE of area of 400 μ m²) and of 0.5, 1, 1.5, 2.5 and 5 μ L (B, non-cooled parafilm **a** and cooled parafilm **b**, measured at HMDE of area of 250 μ m²). In insets : typical DP voltammograms of metallothionein(100 nM). Peak height of 72.3 nA(Aa), 78.6 nA(Ab), 1.1 nA(Ba) and 22.3 nA(Bb) correspond to 100%.

하여 400 μm^2 의 작용전극에 대하여 개선된 AdTS-DPV Brdicka 반응을 행하였을 때(Fig. 2Ab)는 그렇지 않은 경우(Fig. 2Aa) 보다 큰 신호가 메탈로티오닌 농도에 의존적으로 발생하였다.

극미량 시료 중 메탈로티오닌에 대한 전기화학 분석

100 nM 메탈로티오닌 용액이 포함된 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 5.0 μl 의 극미량 시료를 250 μm^2 의 작용전극에 개선된 흡착전기법으로 반응시키고 전기화학 분석을 행한 결과 기존방법에 의한 경우보다 극미량 부피 중의 메탈로티오닌을 정량분석 할 수 있었다. 즉 Cat 2 피크의 높이는 메탈로티오닌 함량과 비례하였고 이 때의 상대표준편차는 6% 이내였다(Fig. 2Bb). 이처럼 분석결과가 현저히 좋아진 것은 극미량의 메탈로티오닌 방울용액에서 물이 증발하

는 현상이 억제된데 따른 것으로 여겨진다.

500 nL의 메탈로티오닌 용액을 작용전극에 흡착전이 하는 시간에 따라 Cat 2 피크를 측정하였을 때 120초가 경과하면 Fig. 4A에서와 같이 신호의 크기가 감소함을 알 수 있었다.

Fig. 4A의 결과에 따라 120초간 메탈로티오닌 용액을 작용전극에 흡착전이하고 바이오마커 농도에 따른 신호 크기의 변화를 측정된 결과 25~5,000 nM 농도범위에서 analyte 농도의 증가에 따라 Cat 2 피크가 증대되었으며(Fig. 4B), 특히 25~500 pM 범위에서는 선형관계가 관찰되었다(n=5, Fig. 4B의 inset). 측정결과는 1주일 이내에서는 재현성이 있었고 상대표준편차는 대개의 경우 5% 이하였다. 본 방법의 메탈로티오닌에 대한 검출한계(detection limit, 3 S/N)와 정량한계(quantification limit, 10 S/N)는 각각 1 및 3 pM으로 평가되었다.

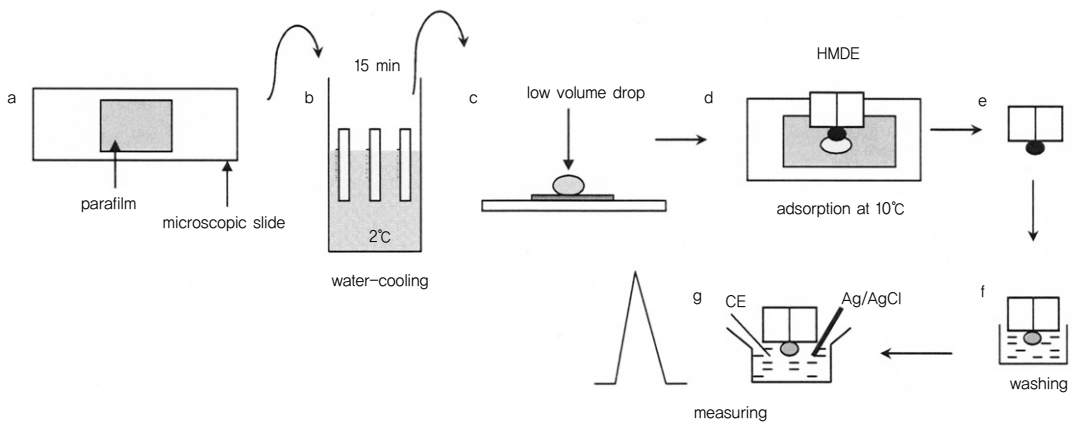


Fig. 3. Scheme of improvement of the transfer to detect metallothionein in very low volumes of a sample. Microscopic slide, degreasing and seaming of small square from parafilm(10 × 10 cm)(a), transferring it to a beaker filled with distilled water and placed in tempered water bath(2°C, at least 15 min)(b), drying it using cellulose and pipetting of a sample on it(c), adsorbing of metallothionein on the surface of HMDE(d), transferring the electrode(e) and washing it with supporting electrolyte(f), transferring the electrode and measuring(g).

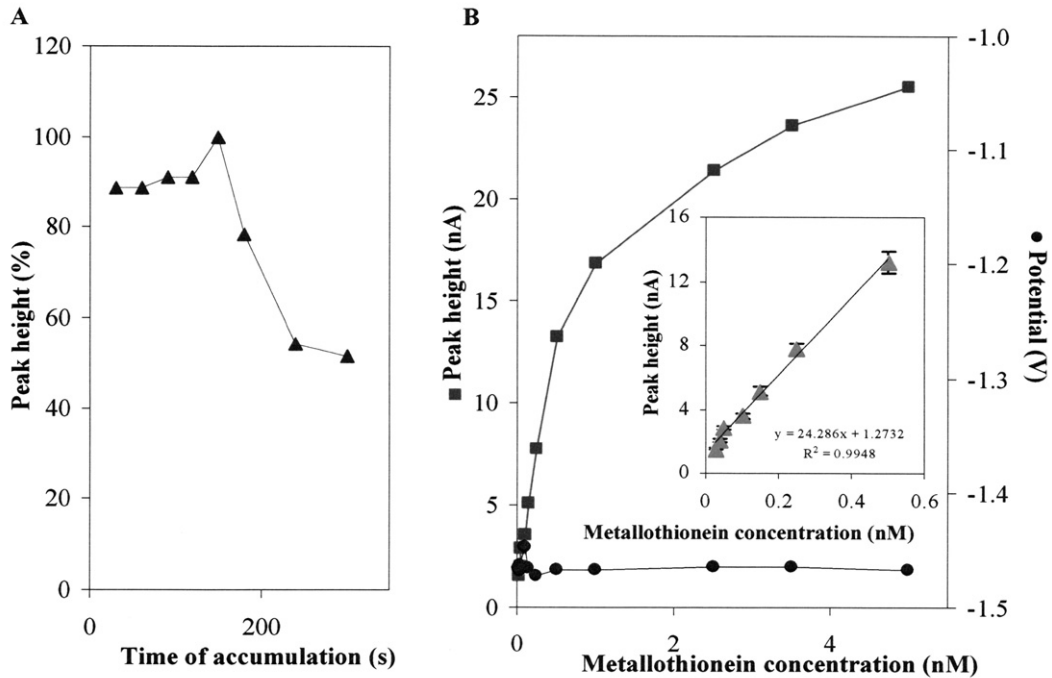


Fig. 4. Dependence of Cat 2 peak height on accumulation time(A) and on metallothionein concentration within the range from 25 to 5000 pM(square, B) and from 25 to 500 pM(triangle, in inset of B). Dependence of Cat 2 peak potential on metallothionein concentration(dot, B). Volume : 500 nL, HMDE area : 250 μm^2 .

결론

기준에는 새로운 바이오마커를 동정하고 분석하는데 2차원 전기영동(two-dimensional gel electrophoresis, 2D-PAGE) 및 질량분석기(mass spectrometer)가 주로 사용되었으나, 기기에 대한 의존성을 줄이고 분석에 따른 소모품 경비와 전문요원에 대한 수요를 최소화하는 바이오마커 검출법으로써 본 연구의 의의가 있다. 본 연구에서는 수백 나노리터의 극미량 시료방울에서 물이 증발하는 것을 최소화한 흡착전이기법을 도입하여 메탈로티오닌 분석 시 재현성 및 정량성을

크게 개선하였다.

식품분야 활용방안

중금속 바이오마커로서의 메탈로티오닌에 대한 본 연구의 전기화학 검출기술은 향후 식품원료의 안전성 평가 및 중금속 체내대사, 축적과 관련된 식품 영양학적 측면에서의 프롤테움 연구에 주요한 분석수단의 하나로 활용성이 높을 것으로 기대된다.

● 참고문헌 ●

1. Adam V, Baloun J, Fabrik I, Trnkova L, Kizek R, Sensors, **8**, 2293-2305, 2008
2. Chan HM, Pringle GA, Cherian MG, J Biochem Toxicol, **7**, 219-227, 1992
3. Chatterjee A, Maiti IB, Mol Cell Biochem, **94**, 175-181, 1990
4. Dabrio M, Rodriguez AR, Bordin G, Bebianno MJ, DeLey M, Sestakova I, Vasak M, Nordberg M, J Inorg Biochem, **88**, 123-134, 2002
5. Fabisiak JP, Borisenko GG, Liu SX, Tyurin VA, Pitt BR, Kagan VE, Methods Enzymol, **353**, 268-281, 2002
6. Goulding H, Jasani B, Pereira H, Reid A, Galea M, Bell JA, Elston CW, Robertson JF, Blamey RW, Nicholson RA, Schmid KW, Ellis IO, Br J Cancer, **72**, 968-972, 1995
7. Lacorn M, Lahrssen A, Rotzoll N, Simat TJ, Steinhart H, Environ Toxicol Chem, **20**, 140-145, 2001
8. Lanston WJ, Bebianno MJ, Burt G, Metabolic pathways in marine invertebrates, In Aquatic Environments, Chapman and Hall, London, 219-284, 1998
9. Marafant E, Binding of mercury and zinc to cadmium-binding protein in liver and kidney of goldfish (*Carassius auratus* L.), Experientia, **32**, 149-150, 1976
10. Minami T, Ichida S, Kubo K, Study of metallothionein using capillary zone electrophoresis, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, **781**, 303-311, 2002
11. Nordberg M, J Trace Elem Exp Med, **13**, 97-104, 2000

김남수 농학박사

소 속 : 한국식품연구원 바이오나노연구단

전문분야 : 식품바이오센서 및 효소화학

E-mail : nskim@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9131