

자기면역글로불린 G 측정을 위한 표면탄성과 바이오센서에 대한 연구

김기범 · 정우석* · 박영란** · 김상진 · 김성종*** · 강형섭 · 김진상 · 홍철운*[†]

전북대학교 수의과대학 약리학교실·인수공통전염병연구소

561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동1가 664-14

*전북대학교 공과대학 바이오메디칼공학부

561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동1가 664-14

**전북대학교 대학원 화학공학과

561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동1가 664-14

***전북대학교 공과대학 화학공학부

561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동1가 664-14

(2010년 8월 11일 접수, 2011년 10월 28일 채택)

Study of the Surface Acoustic Wave Biosensors for Detection of the Immunoglobulin G

Gi-Beum Kim, Woo-Suk Cheong*, Young-Ran Park**, Shang-Jin Kim, Seong-Jong Kim***, Hyung-Sub Kang, Jin-Shang Kim and Chul-Un Hong*[†]

Department of Pharmacology, Korea Zoonosis Research Institute, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University
664-14, 1ga, Duckjin-dong, Duckjin-gu, Jeonju-si, Jeonbuk 561-756, Korea

*Division of Biomedical Engineering, College of Engineering, Chonbuk National University
664-14, 1ga, Duckjin-dong, Duckjin-gu, Jeonju-si, Jeonbuk 561-756, Korea

**Department of Chemical Engineering, Graduate Schools, Chonbuk National University
64-14, 1ga, Duckjin-dong, Duckjin-gu, Jeonju-si, Jeonbuk 561-756, Korea

***Division of Chemical Engineering, College of Engineering, Chonbuk National University
64-14, 1ga, Duckjin-dong, Duckjin-gu, Jeonju-si, Jeonbuk 561-756, Korea

(Received 11 August 2010; accepted 28 October 2010)

요 약

본 연구에서 탄성표면파(SH-SAW) 디바이스의 지연선에 코팅된 골드 위에서 면역 글로불린 G(IgG) 검출을 위한 SH-SAW 센서를 개발하고자 하였다. 실험결과, 금표면 위에 anti-MIgG 혼합물을 일관되게 고정시킬 수 있었다. G-anti MIgG 혼합물과 blocking buffer를 이용한 골드 표면 위에 고정화 하였을 때 주파수 변위를 측정된 결과, G-anti MIgG 는 초기 주파수에서 75.1 kHz 주파수 변위를 보였으며 blocking buffer는 215.7 kHz의 주파수 변위를 보였다. 100 MHz 센서에서 MIgG의 농도가 25, 50, 75, 100 µg/ml 때 46.3, 127.45, 161.21, 262.39 kHz 주파수 변위를 보였다.

Abstract – In this study, we have developed shear horizontal(SH) surface acoustic wave(SAW) sensors for the detection of immunoglobulin G(IgG) on the gold coated delay line of SH-SAW devices. As the result of the experiment, we could uniformly immobilize anti-MIgG(mouse IgG) conjugate on the surface of gold. When displaying results of immobilization on the surface of gold using G-anti MIgG conjugate and blocking buffer in frequency shift, G-anti MIgG conjugate showed frequency shift of 75.1 kHz in the initial frequency, and blocking buffer showed frequency shift of 215.7 kHz. When various concentrations of MIgG was added in 100MHz type sensor, the sensor showed 46.3, 127.45, 161.21 and 262.39 kHz frequency shift at 25, 50, 75 and 100 µg/ml MIgG concentration, respectively.

Key words: Surface Acoustic Wave, Immunoglobulin G, Gold Nanocatalyst, Frequency Shift

1. 서 론

가스 환경 안에서 위험한 화합물을 검출하거나 조사하는데 있어서 음향 파를 기초로 한 센서들이 많이 사용되어 왔다[1]. 최근 들어

액체 상태 안에서 사용할 수 있는 음향파 장치들이 개발되었다[1-4]. 음향파 장치들은 thickness shear mode(TSM), shear horizontal acoustic plate mode(SH-APM), shear horizontal surface acoustic wave(SH-SAW), 그리고 flexural plate wave(FPW) 등이다. 이들 중에서 SH-SAW 장치는 액체 환경에서 생화학적 검출을 하는데 있어서 가장 우수하다고 할 수 있다. 표면 탄성파는 압전 결정체의 표면 위의 변환기(interdigital transducer)에 의해 송신과 수신 이루어진

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: cuhong@jbnu.ac.kr

[‡]이 논문은 전북대학교 김기범 교수의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

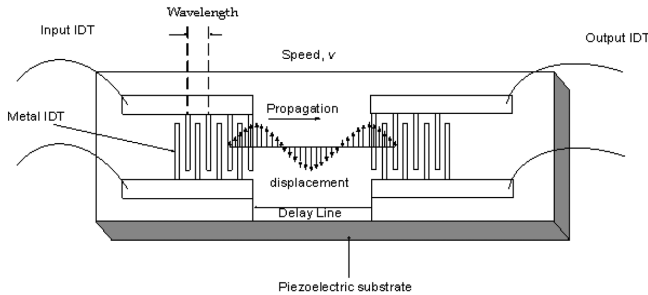


Fig. 1. Interdigital transducer on a piezoelectric substrate.

다(Fig. 1). 또한 표면 탄성과의 주파수는 변환기의 주기 간격에 의해서 결정이 된다. 따라서 이러한 특성을 이용하여 센서로서 사용될 수 있다. 그러나 보통 액체를 전달 표면 위에 올려놓았을 때 종파는 액체로 침투하여 들어가므로 액체 안에서 종파의 속도는 종파의 위상 속도보다 느려지게 된다. 그러므로 종파를 이용한 액체 센서는 구현하기가 사실상 어려워진다. 그러나 1977년 Nakamura 등은 36° 회전시켜 Y방향 절단하여 X 방향으로 전파하는 LiTaO₃(36YX.LT)에서의 표면 탄성과의 전파는 큰 기계적 결합 계수를 가지고 전단 모드(SH-SAW)로 전파된다는 것을 보고하였다. 또한 1987년 Moriizumi 등은 36YX.LT를 사용하여 전단모드 표면파를 액체 센서로 구현할 수 있다는 것을 보고하였다. 또한 SAW 센서의 에너지는 압전 기관 위의 환과장 이내에 에너지의 90%가 집중되어 전파하게 된다. 이러한 특성은 SAW가 진행되는 표면의 물리적 화학적 변화에 의해서 파가 변화하게 된다. 이를 검출할 수 있다면 SAW 센서는 액체 상태에서 구현할 수 있는 것이다. 그리고 SAW 센서는 생화학적 상호관계 반응에서 높은 신뢰성, 빠른 반응성, 쉬운 재현성, 그리고 저비용으로 생산할 수 있다. 이는 반도체 공정을 사용하여 적은 사이즈로 생산할 수가 있다[5,6].

최근 들어 바이오센서를 이용하여 생체 내에 극미량 물질의 존재를 찾아내어 생체 물질 정보를 인지하기 위한 연구가 진행 중이다. 그러나 현재 개발되어 있는 바이오센서의 대부분은 단 기능 센서로 한정되어 있어 복잡한 생체 물질 정보를 인식하는 것이 곤란하다. 그러므로 생체 물질을 분자수준으로 인식하는 것과 종합적인 생체 물질정보로부터 정확한 판단과 미래의 예측까지 가능한 지능화 바이오센서의 개발이 필요하다[7-10]. 탄성표면파를 이용한 신개념의 바이오센서는 SAW를 발진하기 위한 미세 전극(Inter-digital transducer, IDT)의 주기로 주파수가 결정되어 진다[11]. 발진된 주파수는 센서의 표면상 물질 흡착이 발진 주파수의 변화로 검출되어지며 주파수 변화는 발진 주파수의 제곱에 비례하기 때문에 고주파수화가 용이하다. 이와 같은 SAW를 이용한 방법은 기존의 바이오센서보다 큰 주파수 변화를 얻을 수 있으며 액상과 기상에서 동시에 응용이 가능하고 여진 주파수가 기존의 바이오센서보다 최대 10배 이상 크다. 그러므로 집적성이 용이하여 바이오센서를 소형화로 제작이 가능하고, 실시간 측정이 가능하며 측정 시료량을 소량화할 수 있는 장점이 있다[12,13].

항체 작용이란 항원에 선택적으로 반응하는 기능인데, 항체 작용을 하는 단백질 중 하나인 IgG는 분자량 약 2만 5,000의 가벼운 펩티드 사슬 1쌍과 분자량 약 5만의 무거운 펩티드 사슬 1쌍으로 되어 있고, 전체 분자량은 약 15만이다. 양서류 이상의 고등동물에서 중요한 면역글로불린으로, 사람에서는 면역글로불린의 약 70%를 차

지하고 있으며 태반을 통과하며 여러 형태의 항체활성을 지닌다. 그러나 어류에서는 보이지 않는다. IgG는 H_γ사슬 2개와 L사슬 2개의 폴리펩티드 사슬로 구성되며 분자량은 90만이고, 1~3%의 당사슬을 포함하는 단백질이다. 혈청 내 농도가 가장 높고(8~15 mg/mL) 침강상수 6~7S, 등전점 6~7인, 구조가 약간 다른 분자집단이다. H_γ사슬에는 4종류의 서브클래스인 γ1, γ2, γ3, γ4가 있으며 각각은 작동인자 기능에 차이가 있다. 보체결합능은 IgG1, IgG3은 강력하지만 IgG2는 약하고 IgG4는 없다. 세포막 상의 수용체 Fc_γ 수용체와 결합하여 세포기능을 조절한다[14,15]. 이와 같이 혈청성분 중 면역에 중요한 역할을 하고 또한 항체 작용을 하는 단백질 중 하나인 IgG를 정량적으로 검출할 수 있는 방법을 모색하고자 하였다[8]. 그래서 본 연구에서는 탄성표면파를 이용하여 IgG를 검출하기 위하여 anti-mouse IgG를 탄성표면파 센서의 지연선에 고정화하여 mouse IgG를 검출할 수 있는 SH-SAW 센서를 개발하고자 하였다.

2. 실험 방법

2-1. 센서의 제작

본 연구에서는 Mouse IgG 농도의 변화에 따른 표면 탄성과의 변화 특성을 측정하기 위하여 표면 탄성과 센서를 제작하였다. 표면 탄성과 센서는 LT 기관 위에 반도체 기판을 제작하는 공정과 동일한 Photo Lithograph 방법을 사용하여 제작하였다. 전극은 티타늄(Ti)을 기관 위에 200Å으로 증착하였으며 그 위에 금을 2800Å 증착시켜 제작하였다. 실험에 사용되어진 센서의 특성은 Table 1에 나타내었다. 또한 센서는 지연 라인에 골드가 증착되지 않은 비교 채널과 지연 라인에 골드를 증착한 센싱 채널 이렇게 두 개의 채널을 가지게 구성하였다. 이는 환경에 따른 변수를 상쇄하기 위해 구성한 것이다. 또한 anti-mouse IgG는 골드가 증착된 부분에만 증착되므로

Table 1. Dimensions of SAW sensor

Input Frequency (MHz)	30	40	50	100
Wavelength (μm)	140	80	80	40
IDT center distance (mm)	21.0	18.45	16.0	8
Cross distance (mm)	3.1	2.7	2	1.6
Number of pairs	30	29	28	20

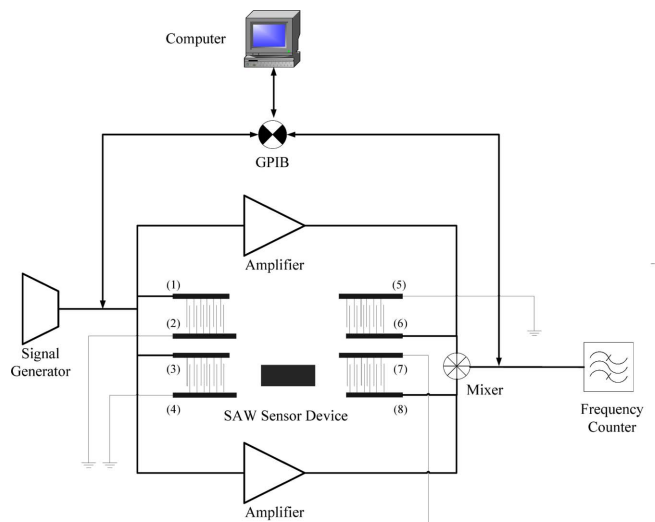


Fig. 2. Measurement system for detecting frequency counting.

표적 mouse IgG만을 센싱 채널에서 검출할 수 있는 것이다.

Fig. 2는 주파수 차이를 측정하기 위한 시스템을 나타낸 것이다. 주파수 차이 측정 방법은 입력에서 주파수가 주어지면 표적 물질에 의해 변화된 주파수를 출력포트에서 주파수 카운터(HP53132A)를 사용하여 측정하였다. 또한 주파수 측정법에서는 발진을 얻기 위한 RF 증폭기를 제작하여 사용하였다. 증폭기의 제작에는 범용의 금속 캔형 트랜지스터를 이용하여 고주파용 회로를 제작하였다. 증폭기는 같은 구조를 2단으로 연결하였으며, 그 사이에서 신호를 취하여서 측정하였다. 증폭기에서 앞단의 트랜지스터는 CE 구조로서 전압 증폭을 하였고, 뒷단의 트랜지스터는 CC 구조로서 전압 안정과 전류 증폭을 하는 기능을 갖게 설계하였다. 또한 표면 탄성과 소자와 증폭기의 연결은 고주파용 BNC 커넥터 동축 케이블을 사용하였다. 신호의 획득을 위하여 Labview 8.0을 사용하여 프로그래밍하였고 GPIB 통신 케이블을 이용하였다.

2-2. 시료의 준비

실험에 사용된 골드 anti-mouse IgG 합성물은 출판된 규약에 의해서 제조되었다. 먼저 PBS 용액에 있는 anti-mouse IgG를 작은 유리병에 50 µl를 준비하였다. 그리고 0.5 ml의 골드 콜로이드 용액을 재빠르게 첨가하였다. 1분이 경과 후 증류수에 녹아 있는 10%의 NaCl을 첨가한다. 그리고 5분 동안 잘 섞어 주었다. 이 골드 콜로이드 0.5 mL의 안정화된 양이 혼합물(40.3 µg) 안에 있는 현재 IgG의 양이다. 1분 후에 1% PEG 500 µL를 첨가하였다. 반응 혼합물은 5분 이상 흔들어서 주었다. 그 후 여분의 IgG를 제거하기 위해 정제하지 않은 IgG 나노촉매 결합물을 원심분리기에서 20,000 G로 2시간

이상을 4 °C에서 실시하였다. 무색의 표면에 뜨는 것은 조심스럽게 피펫으로 제거하였다. 마지막으로 침전된 IgG 나노촉매 결합물은 1% PEG가 833 µL 들어가 있는 PBS을 이용하여 마지막 용량이 20 mL가 되도록 하였다. 그 후 4 °C에서 냉장 보관하였다.

2-3. 고정화

Fig. 3은 단층화된 항체층의 흡착 과정을 보여주고 있다. 고정화의 순서는 첫 번째로 아세톤, 에탄올 그리고 증류수로 각각 10분 동안 골드 표면을 세척하였다. 그리고 두 번째로 PBS 안에 녹아 있는 Au-anti-M IgG 합성물을 골드 표면에 주입하고 30분간 정치시켰다. 세 번째로 blocking buffer 용액을 주입하여 남아 있는 공간을 매워 주었다. 그 후 마지막으로 표적 mouse-IgG 용액을 골드 표면 위에 주입하면서 주파수의 변화를 관찰하였다. 각각의 과정은 세척 버퍼 용액으로 세척하였다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 4는 골드 anti-mouse IgG 합성물과 mouse-IgG의 흡광도를 측정한 그림이다. 측정 결과로서 530 nm의 파장 영역에서 흡광도를 관찰 할 수 있었다. 이 결과는 Das[16]의 결과와 흡사하다.

Fig. 5는 골드 표면 위에 고정화된 G-Anti MIgG 합성물과 블러킹 버퍼 그리고 Mouse IgG를 AFM(multymide+, Digital instrument)를 이용하여 촬영한 사진이다. 사진으로부터 골드 표면 위에 G-anti-MIgG 합성물이 잘 고정화 되어 있는 것을 알 수 있으며, 또한 빈 공간을 blocking buffer 용액으로 채워진 것을 알 수 있었다, 마지막으로 Anti-mouse IgG 합성물과 mouse IgG가 안정 되게 고정화 되어 있다는 사실을 알 수 있었다.

Fig. 6은 골드 표면 위에서 G-Anti-MIgG 합성물과 blocking buffer가 고정화 될 때 시간 변화에 따른 출력 주파수 변화를 측정한 결과이다. 골드 표면 위에 G-Anti MIgG 합성물을 주입 후 주파수의 변화는 약 200초가 지나서 일어났고 1260초가 지났을 때 주파수의 변화는 끝났다. 이와 같은 결과로서 골드 표면과 주입한 G-Anti MIgG의 반응이 끝났음을 알 수 있다. 반응이 끝나면 반응에 사용되지 않은 G-Anti MIgG는 제거하고 골드 표면에 남아 있는 용액을 세척 용액을 사용하여 세척하고 그 곳에 다시 BB 용액을 주입하여 반응하지 않은 공간을 채워준다. 이때 다시 주파수 변화가 일어나게 된다. 이 주파수의 변화는 2,510초 까지 일어났다. Fig. 6(b)는 주파수의

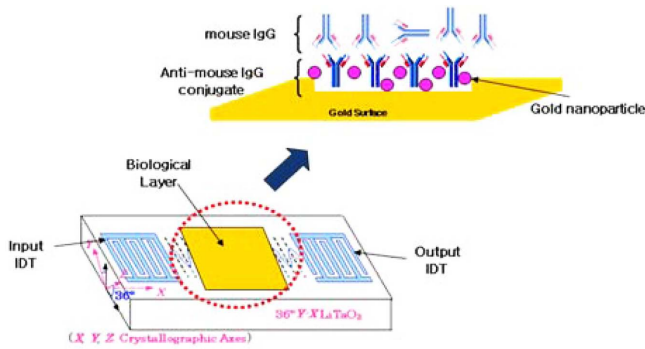


Fig. 3. Deposition process of the self-assembled antigen monolayer.

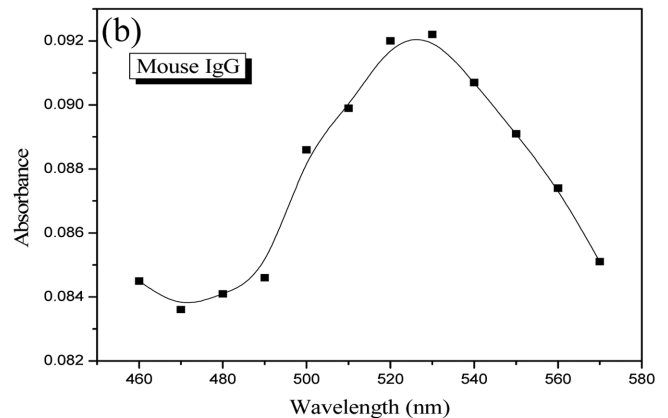
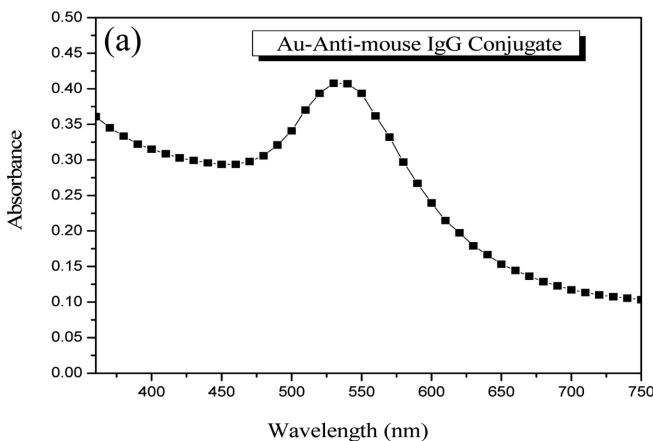


Fig. 4. Results of measuring absorbance of gold nanocatalyst-anti-MIgG conjugate (a), and MIgG (b).

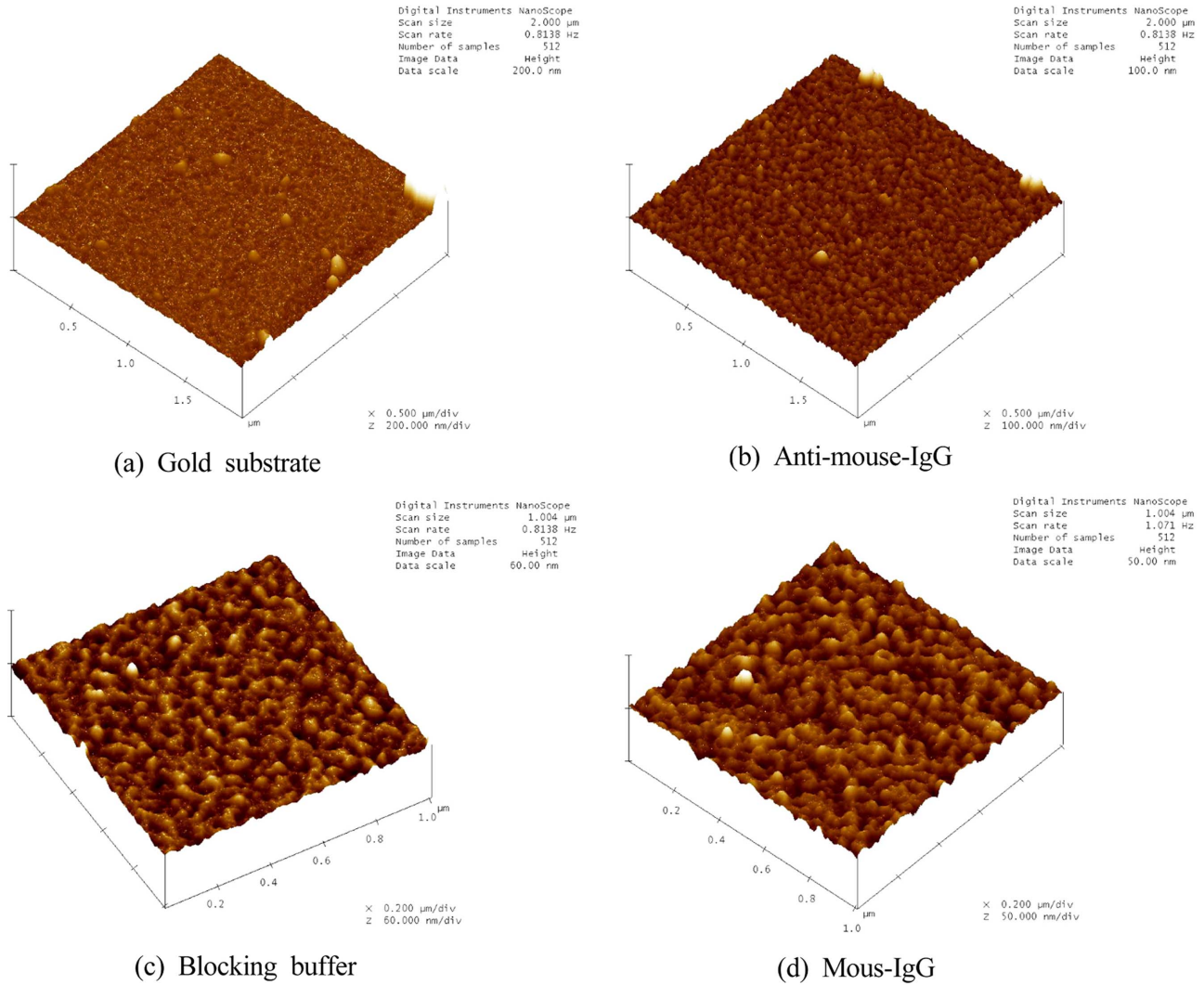


Fig. 5. Result photographs of immobilized G-Anti MIgG conjugate, and blocking buffer on the surface of gold in delay line using atomic force microscopy.

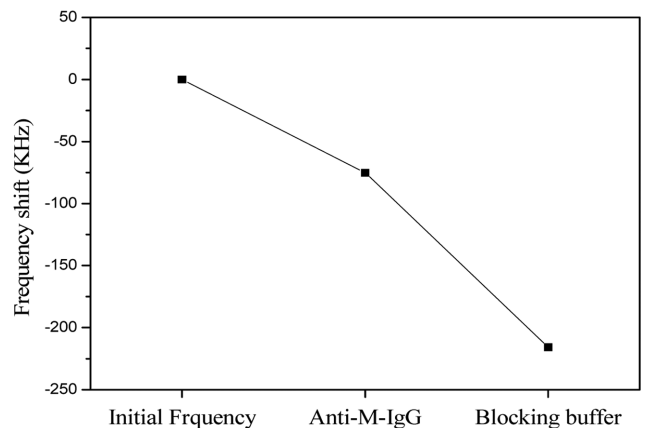
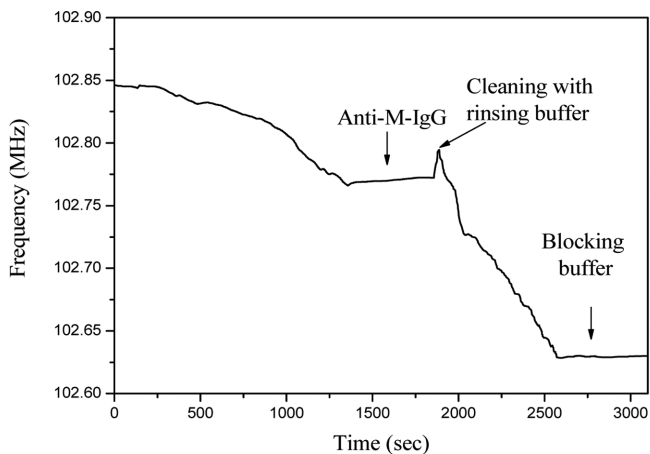


Fig. 6. Results of measuring frequency shift of outcomes which immobilized G-Anti MIgG conjugate and blocking buffer (BB) on gold by changes in time.

변화만을 나타낸 그림이다. 그림에서 알 수 있듯이 G-Anti MIgG와 의 반응으로 인한 주파수 변화는 약 75.1 kHz가 변화하였고, BB 용액에 의한 주파수 변화는 215.7 kHz가 변화하였다.

Fig. 7은 MIgG를 주입했을 때 비교 채널에서의 주파수 변화를 측정된 그림이다. 그림에서 알 수 있듯이 비교 채널에서의 주파수 변화는 거의 없음을 알 수 있다. 이때 센싱 채널에는 MIgG의 농

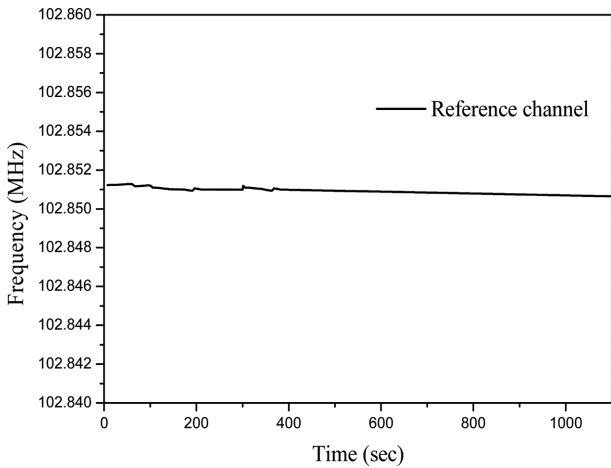


Fig. 7. Frequency change of the reference channel over time when exposed to the MIgG.

Table 2. The MIgG concentration at each line of the experiment

Line	MIgG concentration (μg)
A	0
B	25
C	50
D	75
E	100

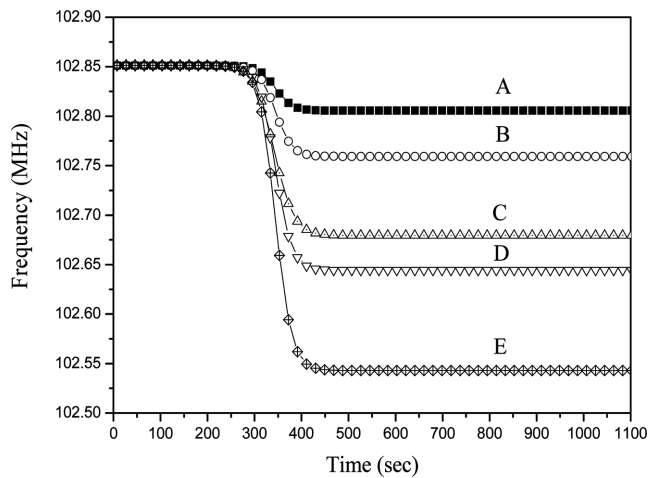


Fig. 8. Frequency change of the sensing channel over time when exposed to the MIgG.

도를 각각 다르게 하여 실험을 진행하여 농도에 따른 주파수 변화를 검출하고자 하였다. 사용된 MIgG의 질량은 Table 2에 나타내었다.

Fig. 8은 센싱 채널에 MIgG를 주입했을 때 각기 다른 농도에 따른 주파수의 변화를 나타낸 것이다. PBS 용액에 녹아 있는 25, 50, 75, 그리고 100 μg 의 MIgG를 주입했을 때 주파수의 변화는 각각 46.3, 127.45, 161.21 그리고 262.39 kHz의 주파수 변화를 나타내었다. MIgG가 25 μg 의 질량을 보였을 때 416.3 kHz의 주파수 변위를 보였다(Line B). MIgG의 질량이 증가하면 주파수의 변화가 증가함을 보여주고 있다(Line C-D). 질량에 대한 주파수 변화를 Fig. 9에 나타내었다.

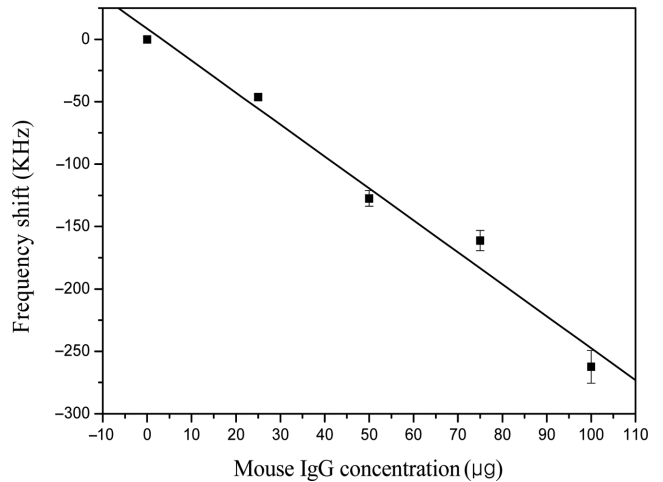


Fig. 9. Frequency shift of the sensor vs. concentration of the MIgG.

4. 결 론

본 연구에서는 단백질의 상호 보상적인 메커니즘을 이용하여 MIgG를 검출할 수 있는 SH-SAW 센서를 개발하였다. 본 연구를 통하여 우리는 IgG를 10 nm의 골드입자에 직접 접촉할 수 있었다. 이와 같은 접합 방법은 IgG 반응을 유지하는데 매우 효과적이며 Mouse IgG나 특정항체는 표적 단백질을 선택적으로 선택할 수 있다, 개발된 센서는 표적 MIgG의 농도 변화에 대해서 발진 주파수의 변화를 보여 주었다. 이는 탐침 단백질과 표적 단백질이 잘 고정화 되는 것을 의미하며, 이를 이용하여 센서로서 사용 가능함을 보였다. 본 연구에서 개발된 센서는 탐침 단백질을 바꾸어 주어 여러 가지의 단백질을 찾아내는 연구에도 기여할 것이라 사료된다.

감 사

이 논문은 전북대학교 김기주 교수님의 정년을 기념하여 투고되었으며 2010년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구입니다 (지역거점연구단육성사업/헬스케어기술개발사업단).

참고문헌

- Ballantine, D. S., White, R. M., Martin, S. J., Ricco, A. J., Zellers, E. T., Frye, G. C. and Wohltjen, H., "Acoustic Wave Sensors: Theory, Design, and Physico-chemical Application," Academic Press Inc., San Diego(1997).
- Gizelli, E., Goddard, N. J., Stevenson, A. C. and Lowe, C. R., "A Love Plate Biosensor Utilising a Polymer Layer," *Sens. Actuators B, Chem.*, **6**, 131-137(1992).
- Bender, F., Meimeth, F., Dahint, R., Grunze, M. and Josse, F., "Mechanisms of Interaction in Acoustic Plate Mode Immunosensors," *Sens. Actuators B, Chem.*, **40**, 105-110(1997).
- Welsch, W., Klein, C., Von Schickfus, M. and Hunklinger, S., "Development of a Surface Acoustic Wave Immunosensor," *Anal. Chem.*, **68**, 2000-2004(1996).
- Lee, Y., Kim, H., Roh, Y., Cho, H. and Baik, S., "Development of a SAW Gas Sensor for Monitoring SO₂ Gas," *Sens. Actuators, A*, **64**, 173-178(1998).

6. Hur, Y., Han, J., Seon, J., Pak, Y. E. and Roh, Y., "Development of a SAW Sensor for the Detection of DNA Hybridization," *Sens. Actuators*, **A120**, 462-467(2005).
7. Galipeau, D. W., Story, P. R., Vetelino, K. A. and Mileham, R. D., "Surface Acoustic Wave Microsensors and Applications," *Smart Mater. Struct.*, **6**, 658-667(1997).
8. Josse, F., Bender, F. and Cernosek, R. W., "Guided Shear Horizontal Surface Acoustic Wave Sensors for Chemical and Biochemical Detection in Liquids," *Anal. Chem.*, **73**, 5937-5944(2001).
9. Park, Y., "Biosensor and Lab-on-a-chip," *J. Korean Inst. Electron. Eng.*, **31**(1), 58-72 (2004).
10. Kim, G. B., Chong, W. S., Kwon, T. K., Hohkawa, K., Hong, C. U. and Kim, N. G., "Basic Study to Develop Biosensors Using Surface Acoustic Wave," *JJAP*, **44**(4B), 2868-2873(2005).
11. Japan Society for the Promotion of Science, Acoustic wave device Technology, Ohmsha(2004).
12. Thompson, M. and Stone, D. C., *Surface-Launched Acoustic Wave Sensors*, John Wiley & Sons, New York(1997).
13. Chong, W. S., Hong, C. U. and Kim, G. B., "Surface Acoustic Wave Characteristics of Piezoelectric Materials and Protein Immobilization," *Korean Chem. Eng. Res. (HWAHAK KONGHAK)*, **44**(2), 166-171(2006).
14. Tizard, I. R. *Veterinary Immunology: An Introduction*, 7th ed., Elsevier, Philadelphia(2004).
15. Robbins, S. L., *Robbins' Pathologic basis of disease*, Saunders, Philadelphia(1989).
16. Das, J., Jo, K., Lee, J. W. and Yang, H., "Electrochemical immunosensor using p-aminophenol redox cycling by hydrazine combined with low background current," *Anal. Chem.*, **79**, 2790-2796 (2007).