

Characteristics of New Estrogen Biosensor Employing Taste Principles

Soon-Bae Kwon¹, Cil-Han Lee¹, and Kyung-Nyun Kim^{1,2*}

¹Department of Physiology and Neuroscience, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

²Research Institute for Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

(received May 16, 2011 ; revised June 13, 2011 ; accepted June 17, 2011)

Measurement of estrogen concentration in bio-samples are very important for differential diagnosis of various disease or evaluation of health status. However, it is difficult to collect immediate data of estrogen concentration because they are measured by radioimmunoassay or chromatography which need time- and cost-consuming sample pre-treatment. This study was performed for development of new estrogen biosensor employing taste principles, and for evaluation of cross reactivity between various steroid hormones. Gene sequence of ligand binding domain of α -human estrogen receptor (amino acid 302-553; hER-LBD) was cloned from human breast cancer cell line. The proteins of hER-LBD were produced by T7-*E.coli* expression system, and isolated by chromatography. hER-LBD were coated on the gold plated quartz crystal (AT-cut 9MHz), and resonance frequencies were measured by universal frequency counter. Estradiol, progesterone, testosterone, and aldosterone were used for cross reactivity of the hER-LBD. We also monitored influences of pH change in resonance frequency. The resonance frequencies of hER-LBD coated quartz crystal were decreased during increase of estrogen concentration from 15 μ g/mL to 50 μ g/mL. However, similar steroid hormones, progesterone and aldosterone, did not elicit the change in resonance frequency. Testosterone evoke weak change in resonance frequency. The new estrogen biosensor was more sensitive in pH 7.2 than in pH 7.6. These results suggest that hER-LBD coated quartz crystal biosensor is a probable estrogen biosensor.

Key words: taste, biosensor, estrogen, receptor, endocrine disrupting chemicals

*Corresponding author: Kyung-Nyun Kim, Department of Physiology and Neuroscience, College of Dentistry, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea
Tel: +8233-640-2450, Fax: +82-33-642-6410
E-mail: knkim@gwnu.ac.kr

서 론

사람 에스트로젠 수용기(hER)는 세포의 핵 속에 존재하는 수용기로 세포막 수용기와는 다른 특성을 지니고 있다. 대개의 경우 핵 속에 존재하는 수용기는 스테로이드 호르몬, 갑상선 호르몬이나 비타민 D와 같은 분자량이 작고 소수성인 물질들과 결합하는 것으로 알려져 있다. hER은 세포핵과 세포질을 오가면서 작용하는 것으로 알려져 있지만 주로 핵 속에서 발견된다(신, 2005).

hER에는 전통적으로 알려져 온 alpha형과 비교적 최근에 알려진 beta형이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 스테로이드 호르몬에 반응하는 호르몬의 핵수용기로는 유일하게 2종류 이상의 아형을 갖고 있다(Mangelsdorf 등, 1995). hER은 성장 발육뿐만 아니라 세포 분화와 여성 생식기능의 조절 등 다양한 분야의 항상성 조절에 관여하고 있으며 에스트로젠이 결합하여 전사인자를 활성화시켜 표적 유전자의 활성을 조절하여 기능을 발휘한다(Paech 등, 1997). Alpha형 hER(hER α)와 beta형 hER(hER β)는 유전자의 구조뿐만 아니라 발현하는 장기의 종류 및 양상, 기질 특이성에서 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Paech 등, 1997).

사람에서 에스트로젠 혈중 농도는 여성의 월경주기에 따라 변하는 것이 잘 알려져 있으며 특히 여성의 배란직전에 관찰되는 에스트로젠의 폭발적인 분비증가는 배란에 필수적인 요소이며, 임신 중에도 특징적인 변화를 보인다(신, 2005). 또한 유방암과 같은 일부 악성 종양세포도 에스트로젠에 반응하는 것이 잘 알려져 있어(Travis와 Key, 2003) 에스트로젠 농도를 쉽게 측정하는 것이 필요하지만 현재는 방사선면역측정법(radioimmuno assay)이나 크로마토그래피를 이용한 측정방법이 널리 사용되고 있으며, 분석에 많은 시간과 비용이 필요하다.

내분비 교란 물질(endocrine disrupting chemicals, EDC)은 에스트로젠 수용기를 비롯한 스테로이드 호르몬의 수

용기와 반응하여 생체 교란 작용을 나타내는 물질로 그 화학적 구조는 매우 다양한 것으로 알려져 있다(Bolger 등 1998). 그러므로 쉽고, 정확하게 다양한 EDC 생체 내 활성을 동시에 측정하는 방법은 개발되어 있지 못하므로 에스트로겐 바이오 센서를 EDC 측정 센서로 확장 적용할 수 있는 가능성이 열려있다.

수정진동자는 매우 정밀하고 안정적인 진동자로 다양한 컴퓨터의 시계 등을 포함하여 다양한 전자기기에 표준 주파수 제공기로 널리 사용되고 있다. 수정진동자는 이를 이용한 미세 저울 시스템에서 가장 중요한 부품으로 생체면역센서, 필름 두께 센서 및 화학물질 센서로 사용될 수 있다(Kurosawa 등, 2006). 그러나 현재까지는 주로 항원-항체 반응을 이용한 생체면역센서로 널리 사용되어 왔으며, 따라서 항체를 만들기 어려운 물질의 검출에는 어려움이 있다(Kurosawa 등, 2006).

미각은 소수의 수용기를 통하여 해당 수용기와 상호작용을 하는 다양한 화학물질을 감지하는 특수감각으로, 수용기 반응 물질 사이의 화학적 공통점을 찾기 어려운 특징이 있다(Lee 등, 2008). 본 연구는 에스트로겐 수용기를 이용하여 다양한 내분비 교란물질을 탐색하고자 하는 시도의 첫 걸음으로 에스트로겐 수용기의 기질 결합 부위를 사용하고 있는 바, 미각의 기본 원리를 응용 활용한 것으로 내분비 교란물질을 검출하는 보다 진전된 바이오센서 개발에 적용될 수 있으리라 생각된다.

최근 hER 결합부위 재조합 단백질을 이용한 다양한 물질의 감지 방법에 대한 보고가 있기는 하였지만(Murata 등, 2003), 사람의 에스트로겐 감수기 중 어떤 종류의 감수기인지의 언급이 없을 뿐만 아니라 다양한 스테로이드 호르몬에 대한 특이성과 선택성이 보고되지 않아 실용화 여부는 추후 관찰이 필요한 실정이다.

본 연구는 hER α 를 이용하여 바이오센서를 제작하여 에스트로겐 측정 가능 여부를 확인하고 다양한 스테로이드 호르몬과의 반응성을 확인하기 위하여 시행하였다.

재료 및 방법

에스트로겐 수용기 발현 세포주의 배양

hER α 를 많이 발현하는 것으로 알려진 인간 유방암 세포주인 HCC1428을 선택하여 배양하였다(Liang 등, 2005). hER α 발현은 역전사 연쇄효소중합법(RT-PCR)을 이용하여 확인하였다.

통법(Liang 등, 2005)에 따라 RPMI 1640 배양액을 사용하여 10% fetal bovine serum을 첨가하여 5% 이산화탄소 배양기에서 37°C로 배양하였다.

에스트로겐 감수기 DNA 합성과 재조합 단백질의 발현

위의 세포주를 이용하여 사람 hER α 결합 부위(human

estrogen receptor- ligand binding domain, hER-LBD, 아미노산 302-553)를 포함하는 유전자를 합성하였다. 합성한 유전자의 아미노단에 histidine을 몇 개를 첨부하여 세균 접종용 vector를 제작하였다. 이 vector를 T7 발현 시스템(Novagen, 미국)을 이용하여 *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS 세포에 접종하여 발현되도록 하였다. 유전자가 정확하게 삽입되었는지 여부는 DNA서열로 확인하였다.

24시간 동안 배양한 후 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 가나마이신이 포함된 2YT 배양액으로 800 mL가 되도록 희석하고 37°C에서 O.D.가 0.7이 되도록 배양한 후 14°C로 식혔다. Isopropylthiogalactopyranoside를 1 mM 첨가하여 원하는 단백질이 발현되도록 하였다. Histidine이 표지된 단백질은 Hitrap(Amersham Pharmacia Biotech, 영국)을 사용하여 분리하였다. 원하는 단백질은 사용 목적에 적합한 정도로 불순물이 없이 정제할 수 있었으며, 파괴된 단백질도 거의 없었다.

분석 전극의 활성화

양극 면에 모두 금을 진공 증착한 수정진동자(Crystal Sunlife, 일본)의 표면에 히스티딘이 표지된 hER-LBD를 부착하여 실험에 사용하였다.

수정진동자 표면을 60°C의 97% H₂SO₄와 30% H₂O₂가 7:3으로 혼합된 piranha 용액으로 1분간 세척한 뒤 증류수와 ethyl alcohol로 다시 세척하였다. 세척한 수정진동자를 2 mM 11-mercaptoundecanoic acid와 2 mM 6-mercapto-1-hexanol(Fluka, 미국) 혼합용액에 담가 12시간 이상 교반하며 전 처리하였다. 전 처리된 수정진동자의 신호가 일정하게 나오는지 확인한 뒤, 0.12 M 2-[N-morpholino] ethane sulfonic acid, pH 6.0와 0.4 M N-thyl-N'-(3-dimethyl aminopropyl carbodiimide, 0.1 M N-hydroxysuccinimide(Fluka, 미국)의 2:1:1 혼합용액에 넣고 한 시간 동안 반응하였다. 증류수로 세척한 뒤 이미 만들어 놓은 hER-LBD 단백질 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 100 μl 가하여 30분 동안 표면에 침착되도록 하였다. 증류수로 세척 후 1 M ethanolamine 100 μl 를 넣고 40분 반응시켰다. 증류수로 3 회 세척한 다음 정상적인 신호를 확인하고 다음 실험을 진행하였다.

다양한 호르몬에 대한 QCM 측정

AT-cut이 9 MHz인 수정진동자(Crystal Sunlife, 일본)의 공명 주파수를 QCM 키트(Easy Q, 펠토텍, 한국)를 통하여 범용 주파수 계수기(Dagatron 7023, 대한민국)로 측정하여 개인용 컴퓨터에 저장하였다.

1% methanol을 포함한 pH 7.2 또는 7.6인 100 mM phosphate buffered saline (PBS)을 syringe pump (SP 100i, WPI, 미국)로 시간 당 3 mL의 속도로 관류하며 300 μL 의 호르몬을 주입하여 결합능력을 측정하였다. 한 호르몬의 측정을 마친 후 세척용 완충액(0.2 M glycine, 1% DMSO, pH 2.3)를 300 μL 주입하여 결합된 호르몬을 세척하고 다음 호르몬을 주입하였다. 호르몬의 농도와 공명 주파수 변

화와의 상관관계를 확인하기 위해서는 무작위적인 순서로 농도를 달리하며 호르몬을 주입하여 반응의 변화를 확인하였다.

합성한 재조합 단백질의 특성을 확인하기 위하여 생체 호르몬인 에스트라디올, 프로게스테론, 테스토스테론(Tokyo Kasei Kogyo Co., 일본), 알도스테론에 대한 결합능력을 측정하였다. 각각의 호르몬으로 유발되는 공명 주파수 변화를 확인하는 실험에서는 수정진동자 사이의 차이로 인한 변인을 방지하기 위하여 동일한 수정진동자를 사용하여 실험을 시행하였으며, 표준 호르몬인 에스트라디올의 반응에 대한 백분율로 실험 결과를 분석하였다.

시약

사용한 시약은 특별히 명시한 경우를 제외하고는 미국 Sigma사에서 분석용 등급 이상의 것을 사용하였다.

실험 결과

에스트라디올 농도에 따른 공명주파수의 변화

1% methanol을 포함한 100 mM PBS (pH 7.2)로 관류하며 hER-LBD를 이용한 바이오센서의 공명주파수 변화를 측정하였다. 50 µg/mL 농도의 에스트라디올 300 µL를 주입한 결과 27.14 ± 5.21 Hz의 공명주파수 저하가 관찰되었으며 15 µg/mL와 50 µg/mL 범위에서 에스트라디올 농도에 비례하여 공명주파수가 저하하였다(Fig. 1).

다른 스테로이드 호르몬 농도에 따른 공명주파수의 변화

비슷한 스테로이드 호르몬인 프로게스테론, 알도스테론,

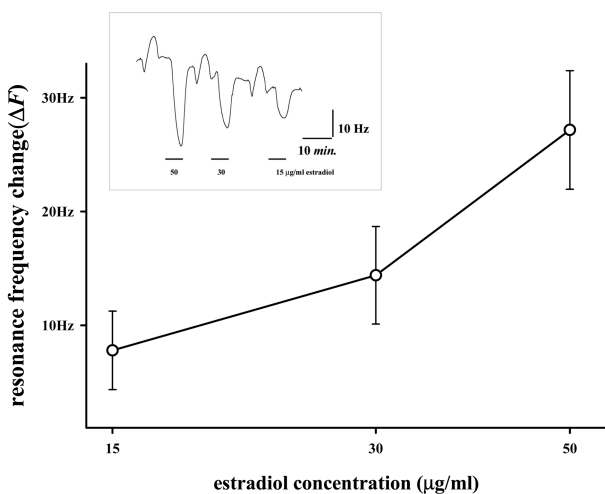


Fig. 1. Estradiol, the representative estrogen in human, decreased resonance frequency dose-dependently. The representative change in resonance frequency elicited by estradiol (inset). The black bars in inset graph mean periods of estradiol infusion. ΔF means change in resonance frequency was elicited by estradiol. Vertical bars mean S.E.M (n = 5).

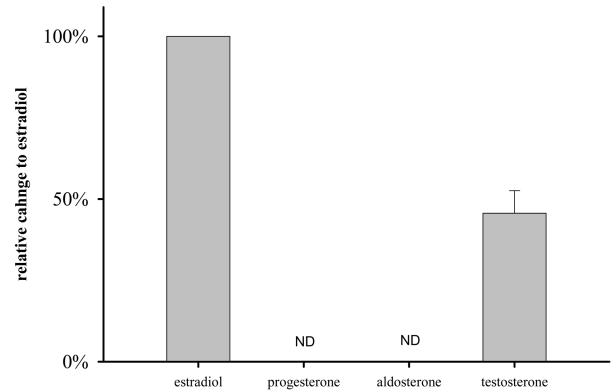


Fig. 2. The relative responses to estradiol of several human steroid hormones in pH 7.2. The responses of progesterone and aldosterone (n = 7 respectively) were not detected at all in our system. However, testosterone usually elicited weak responses (6 case of 7). ND means not detectable. Vertical bars mean S.E.M.

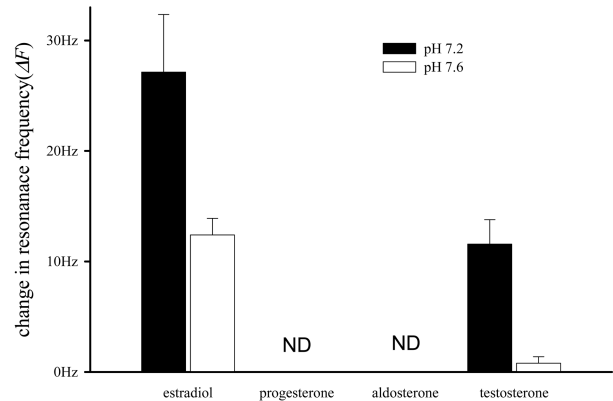


Fig. 3. Change in pH from 7.2 to 7.6 of perfusion buffer reduced sensitivity of biosensor system. ND means not detectable. Vertical bars mean S.E.M. (n = 6).

테스토스테론으로 유발되는 공명주파수의 변화를 pH 7.2에서 관찰하였다. 프로게스테론과 알도스테론은 1% methanol이 포함된 PBS에 최대 용해 농도인 20 µg/mL과 50 µg/mL까지에서 공명주파수의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig 2). 그러나 50 µg/mL의 테스토스테론을 주입한 경우에는 같은 농도의 에스트라디올에 의한 공명주파수 변화의 43%에 해당하는 11.57 ± 2.22 Hz의 변화를 보였다(Fig. 2).

pH 변화에 따른 공명주파수의 변화

pH 7.2와 7.6에서의 공명주파수의 변화를 관찰하여 보았다. 관류액의 pH가 7.2와 7.6인 경우 50 µg/mL 에스트라디올에 의하여 유발된 공명주파수 변화는 각각 27.17 ± 4.71 Hz와 12.40 ± 1.50 Hz로 pH가 7.6일 때 7.2일 때와 비교하여 45.6%로 줄어들었다(Fig. 3). 프로게스테론과 알도스테론은 최대 농도에서도 변화를 관찰할 수 없었으며, 50 µg/mL 테스토스테론에 의하여 유발된 변화도 pH 7.2와 7.6일 때 각각 11.57 ± 2.22 Hz와 0.80 ± 0.58 Hz로 pH가

7.6일 때 7.2일 때와 비교하여 6.9%로 현저히 줄어들었다 (Fig. 3).

고 찰

수정진동자 미세저울을 사용하여 생체 활성 물질을 측정하는 방법은 다른 방법과 비교하여 간단하고, 사용하기 쉽고, 비용이 적게 들며, 실시간으로 반응을 확인할 수 있는 장점으로 사용빈도가 많아지고 있다(Kurosawa 등, 2006). 수정진동자를 이용한 미세 저울을 바이오센서에 응용하려는 노력은 주로 항원-항체 반응을 이용한 면역센서의 개발에 집중되었으며(Hock 등, 2002), 실질적으로는 항체를 수정진동자 표면에 효율적으로 고정시키는 기술적인 방법에 초점이 맞추어져 왔다(Kurosawa 등, 2006).

항원-항체 반응은 인체의 면역반응으로 매우 높은 기질 특이성을 갖는 바이오센서에 매우 적합한 반응이다. 그러므로 이를 응용하여 방사선면역측정법, 효소면역측정법, 형광면역측정법 및 enzyme-linked immunosorbent assay 등 많은 분석 방법이 개발되어 있다. 그러나 작은 분자들이나 생체에서 항원성이 없는 물질들의 경우 항체 제작의 어려움 때문에 바이오센서의 개발이 어려우며, 항체의 높은 기질특이성으로 인하여 비록 생체 안에서 같은 기능을 수행하는 물질이라 하더라도 조금이라도 구조가 다르면 별도의 항체를 제작하여야 하는 특징이 있다. 만약 항체 대신에 세포막 또는 세포 내 수용기의 기질 결합부위를 이용할 수 있다면 같은 수용기에 결합하는 모든 기능 물질을 파악하는데 보다 유리한 바이오센서로 사용할 수 있으리라 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 세포 내 수용기 중 하나인 hER α 의 기질 결합 부위를 이용한 에스트로겐 바이오센서를 제작하고자 하였다.

hER에는 전통적으로 알려져 온 alpha형과 비교적 최근에 알려진 beta형이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 스테로이드 호르몬에 반응하는 호르몬의 핵수용기로는 유일하게 2종류 이상의 아형을 갖고 있다(Mangelsdorf 등, 1995). 더욱이 hER α 와 hER β 유전자의 구조뿐만 아니라 발현하는 장기의 종류 및 양상, 기질 특이성에서 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Paech 등, 1997). 최근 hER-LBD 제조 합 단백질을 이용한 다양한 물질의 감지 방법에 대한 보고가 있기는 하였지만(Murata 등, 2003), 사람의 에스트로겐 감수기 중 어떤 종류의 감수기인지의 언급이 없을 뿐만 아니라 비슷한 스테로이드 호르몬에 대한 검출능력과 특이성 검사가 보고되지 않아 실용화 여부는 추후 관찰이 필요한 실정이다.

에스트라디올은 스테로이드 호르몬 중 하나로 사람에서 대표적인 여성호르몬이다(신, 2005). 사람에서 기능을 발휘하는 여성호르몬인 에스트로겐에는 에스트라디올 외에 에스트론과 에스트리올이 있지만 순환 혈액 중에는 주로 에

스트라디올이 발견된다(Ganong, 2005). 스테로이드 호르몬은 콜레스테롤에서 합성되며 프로게스테론과 17수산화프로게스테론이 포함된 프로게스틴, 안드로스테디온, 테스토스테론 등이 포함되는 안드로겐, 알도스테론, 코티솔 등이 있다(신, 2005). 이들 스테로이드 호르몬은 비록 표적장기와 기능은 무척 다르지만 구조적 유사성뿐만 아니라 세포 내 수용기와 결합하여 전사인자를 활성화 시켜 기능을 발휘한다는 공통적인 특징이 있다(신, 2005; Ganong, 2005).

본 연구에 사용된 에스트라디올은 지용성인 스테로이드 호르몬이어서 1% methanol이 포함된 PBS에 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 녹일 수 있었다. 수정진동자 공명 주파수의 변화는 300 μL 의 시료를 주입하는 경우 15 $\mu\text{g/mL}$ 에서부터 관찰 할 수 있었으며 최대 용해 농도인 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 약 30 Hz의 공명 주파수 변화가 관찰되었다(Fig. 1). 이 때 수정진동자에 도포된 hER-LBD와 결합할 수 있는 에스트라디올의 최대량은 각각 4.5 μg 과 15 μg 으로 약 10 - 30 nmole에 해당하여 평상 시 에스트라디올의 혈장 내 농도인 약 500 pmole/L (Ganong, 2005)에 비교하여 볼 때 생체 내 에스트로겐 농도의 변화를 측정하기에는 다소 미흡하지만 1 μmole 의 에스트라디올로 200 Hz의 공명 주파수 변화를 확인한 앞선 보고(Murata 등, 2003) 보다는 약 5 배 민감도가 개선되었다. 그러나 생체에서 직접 에스트로겐 농도를 측정하기 위해서는 아직도 미흡하며, 바이오센서의 민감도 개선을 위한 경제적 결합 단백질의 이용이나 수정진동자의 민감도 개선 등의 방안이 요구된다.

제작된 수정진동자 바이오센서의 특이성을 확인하기 위하여 스테로이드 호르몬인 프로게스테론, 알도스테론, 테스토스테론에 의하여 공명 주파수의 변화가 유발되는지 확인하였다. 실험에 사용한 세 가지 스테로이드 호르몬 중 가장 에스트라디올과 구조가 유사한 테스토스테론에서만 공명 주파수의 변화가 관찰되었다. 에스트라디올 17위치의 수산화기가 케톤기로 치환된 구조의 테스토스테론에서 교차 반응이 관찰된 것은 화학적인 구조의 차이로 보면 타당해 보이지만 생체 내에서 hER α 에 대한 테스토스테론의 결합력이 에스트라디올에 비하여 1/10,000이하라는 보고(Kuiper 등, 1997)로 미루어 보아 수용기 고유의 특성으로 생각되지는 않는다. 더욱이 생체 내에서는 여성호르몬과 남성호르몬으로 전혀 다른 기능을 수행하므로 실제 세포 내 수용기에서 같은 현상이 관찰되지는 않을 것으로 생각된다. 그러나 hER에 결합하여 생체 내 내분비 교란 작용을 나타내는 일부 물질(endocrine disrupting chemicals, EDC)은 다른 스테로이드 호르몬의 수용기에 작용할 가능성도 있어(Bolger 등, 1998) 만약 이 바이오센서 시스템이 테스토스테론 또는 유사물질과 결합한다면 이 특성을 이용한 새로운 용도를 개발할 수 있는 가능성도 있다. 또한 세포를 이용하여 생산된 단백질의 경우 같은 아미노산 서열을 갖더라도 당화 등 전사 후 변화에 의하여 독특한 특성을 발휘하는 경우가 있고, 본 연구의 경우 hER을 대

장균에 발현시켜 실험을 시행하였으므로 이에 따른 사람과 대장균 종간의 차이가 단백질 당화의 차이로 다른 특성을 발휘하였을 가능성이 있다.

본 연구의 에스트로겐 수용기를 이용하여 화학적 특성의 공통점을 찾기 어려운 다양한 내분비 교란물질을 탐색하고자 하는 시도의 일환으로 에스트로겐 수용기의 기질 결합 부위를 사용하고 있는 바, 이는 소수의 수용기를 통하여 해당 수용기와 상호작용을 하는 다양한 화학물질을 감지하는 특수감각인 미각이 지닌 특징(Lee 등, 2008)을 응용 활용한 것이다. 미각 세포는 기능 발휘에 필요한 다양한 미각 수용기와 신경전달물질 수용기를 발현하고 있는 것이 잘 알려져 있으며, 각각의 수용기에 대한 반응의 총합을 단일 세포 또는 맛봉오리에서 통합하여 미각을 구별하는 것으로 알려져 있고 구강 외에 다양한 부위에서 발현하고 있다(Jun 등, 2008). 이런 미각의 인식 원리는 에스트로겐 수용기 외에 다른 지용성 호르몬의 수용기와도 상호작용을 하는(Bolger 등, 1998) 내분비 교란물질을 검출하는 보다 진전된 바이오센서 개발에 적용될 수 있리라 생각된다.

정상적인 세포 내의 pH는 7.2 이지만 다른 pH일 때 바이오센서의 반응을 확인하기 위하여 pH 7.6 일 때 공명 주파수의 변화를 확인하였다. 바이오센서 시스템은 세포 내에서 작용하는 pH 7.2일 때 더욱 예민하게 에스트로겐에 반응하는 양상을 보여 주었다. 이는 생리적인 호르몬의 수용기가 진화의 결과 만들어진 가장 적합한 구조를 지니고 있는 것을 시사하고 있다. 그러나 pH를 7.6으로 변화시키는 경우 에스트로겐에 대한 감수성보다 테스토스테론에 대한 감수성이 더욱 저하하는 것으로 보아 pH를 변화시킴으로써 에스트로겐의 특이성을 높일 수도 있을 가능성을 보이고 있다.

에스트로겐 특이 바이오센서를 개발하기 위하여 hER α 의 LBD와 수정진동자 미세저울을 이용하여 바이오센서를 제작하였다. 이 바이오센서 시스템은 에스트로겐에 감수성 높은 반응을 나타내어, 에스트로겐 특이 바이오센서로 사용할 수 있음을 시사하고 있다. 그러나 혈액이나 뇨와 같은 생체 시료에서 측정하기에는 아직 감수성이 부족한 실정이다. 그러므로 보다 높은 감수성을 보이고, 다른 물질과의 교차 반응을 해결하기 위하여 보다 진전된 방법을 적용하려는 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

에스트로겐의 생체 내 농도를 측정하는 것은 여러 가지 질환의 진단이나 부인과적 검사에 필수불가결한 요소이다. 그러나 에스트로겐 농도는 항체를 이용한 면역분석법이나 크로마토그래피를 이용하여 측정하여야 하므로 임상에서 즉시 결과를 확인하기에는 어려움이 있다. 이런 단

점을 극복하기 위하여 최근 에스트로겐 감수기 결합부위 제조합 단백질을 이용한 바이오센서의 제작에 관한 보고가 있기는 하였지만(Murata 등, 2003), 사람의 에스트로겐 감수기 중 어떤 종류의 감수기인지의 언급이 없을 뿐만 아니라 다양한 유사 호르몬에 대한 특이성과 선택성이 보고되지 않아 실용화 여부는 추후 관찰이 필요한 실정이다. 본 연구는 사람 α -에스트로겐 감수기를 이용하여 바이오센서를 제작하여 에스트로겐 측정 가능여부를 확인하고 다양한 스테로이드 호르몬과의 반응성을 확인하기 위하여 시행되었다.

사람 α -에스트로겐 감수기의 결합 부위(human estrogen receptor- ligand binding domain, hER-LBD, 아미노산 302-553)를 포함하고 유전자를 합성하였다. 세균에 접종시키고 배양하여 단백질 발현을 유도한 후 배양액에서 순수한 hER-LBD 단백질을 분리하였다. AT-cut이 9 MHz인 quartz crystal에 양측 면에 모두 금을 진공 증착하여 공명 주파수를 universal frequency counter (Dagatron 7023, 대한민국)로 측정하였다. pH 7.2 또는 7.6인 phosphate buffered saline으로 관류하며 300 μ L의 호르몬을 주입하여 결합능력을 측정하였다. 합성한 제조합 단백질의 특성을 확인하기 위하여 생체 스테로이드 호르몬인 에스트라디올, 프로그스테론, 테스토스테론, 및 알도스테론을 실험에 사용하였다.

hER-LBD를 이용한 바이오센서는 15 μ g/mL와 50 μ g/mL 범위에서 에스트로겐 농도에 비례하여 결합이 증가하였다. 그러나 비슷한 스테로이드 호르몬인 프로그스테론과 알도스테론은 뚜렷한 반응성을 확인할 수 없었다. 그러나 테스토스테론은 에스트로겐에 비하여 미약하기는 하지만 공명 주파수의 변화를 감지할 수 있었다. 또한 에스트로겐 바이오센서는 pH 7.2에서 보다 예민하게 반응하였다. 본 실험 결과는 hER-LBD를 이용한 바이오센서가 에스트로겐 특이 검출기로 사용할 수 있을 가능성을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2008년 강릉원주대학교 교수연구년 연구지원 및 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(2010-0007135)의 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- 신동민. 내분비, 전국치과대학(원)생리학교수협의회 저, 치의학 위한 생리학, pp 292-332, 대한나래출판사, 서울, 2005.
Bolger R, Wiese TE, Ervin K, Nestich S, Checovich W. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor

- binding capacity. *Environ Health Perspect.* 1998;106:551-77.
- Ganong WF. The gonads: Development and function of the reproductive system. in Ganong WF. *Review of Medical Physiology.* 22nd ed., pp 411-53, McGrawHill, Singapore, 2005.
- Hock B, Seifert M, Kramer K. Engineering receptors and antibodies for biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2002;17:239-49.
- Jun YK, Kim SN, Lee CH, Cho YK, Chung KM, Roper SD, Kim KN. Distribution of taste receptors in submandibular and von Ebner salivary glands. *Int J Oral Biol.* 2008;33:13-23.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138:863-70.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-A. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996;93: 5925-30.
- Kurosawa S, Park JW, Aizawa H, Wakida S, Tao H, Ishihara K. Quartz crystal microbalance immunosensors for environmental monitoring. *Biosens Bioelectron.* 2006;22:473-481.
- Lee SB, Lee CH, Cho YK, Chung KM, Kim KN. Expression of kainate glutamate receptors in type II cells in taste buds of rats. *Int J Oral Biol.* 2008;33:83-9.
- Liang Y, Wu J, Stancel GM, Hyder SM. p53-dependent inhibition of progestin-induced VEGF expression in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;93:173-82.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* 1995;83:835-9.
- Murata M, Gouda C, Yano K, Kuroki S, Suzutani T, Katayama Y. Piezo electric sensor for endocrine-disrupting chemicals using receptor-co-factor interaction. *Anal Sci.* 2003;19:1355-7.
- Paech K, Webb P, Kuiper GGJM, Nilsson S, Gustafsson J-A, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential Ligand Activation of Estrogen Receptors ER α and ER β at AP1 Sites. *Science* 1997;277:1508-10.
- Travis RC, and Key TJ. Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 2003;5:239-47.