

논문 97-6-5-02

광섬유 소산파를 이용한 면역 센서 제조 및 그 특성

최기봉*, 윤희주*, 차승희*, 최정도**

Fabrication of fiber-optic evanescent wave immunosensor and its measuring characteristics

Kibong Choi*, Heeju Youn*, Seunghee Cha*, Jungdo Choi**

요 약

광섬유 소산파 센서(fiber-optic evanescent wave sensor)를 제작하였다. 클래드층을 제거한 광섬유 코아 표면에 anti-mouse immunoglobulin G(IgG)를 결합시키고, 형광이 표지된 mouse IgG와의 반응을 직접적인 방법과 경쟁적인 방법을 통하여 측정하였다. 직접적인 방법과 경쟁적인 방법 모두 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 mouse IgG를 측정할 수 있는 감도를 얻을 수 있었다. Anti-mouse IgG는 단순 흡착 방법에 의하여 광섬유 코아 표면의 93.9%에 고정되었고 비특이적 결합반응을 제거하기 위하여 실시한 소혈청 알부민(bovine serum albumin : BSA)을 이용한 표면 코팅 효과는 없었다. Mouse IgG에 결합된 fluorescein의 비율이 높을수록 형광 발생량이 많았으나 관계는 직선적이지 않았다. 본 연구에서 제작된 광섬유 소산파 센서는 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 항원 항체 반응을 소산파 여기에 의한 형광량으로 측정할 수 있어 면역센서로의 응용이 가능할 것으로 판단된다.

Abstract

Fiber-optic evanescent wave sensor was designed and fabricated to detect mouse immunoglobulin G(IgG) with decladed optical fiber on which anti-mouse IgG was immobilized.

A sensitivity obtained by any direct or competitive method was lower than $1\mu\text{g}/\text{ml}$. Anti-mouse IgG was immobilized on 93.9% of core surface of optical fiber by simple adsoption method. The effect of postcoating using bovine serum albumin to remove non-specific binding was not observed. As the ratio of fluorescein to mouse IgG increased, the fluorescence signal increased, but that increase showed no linear relationship.

Our fiber-optic sensor system could be used as immunosensor by measuring evanescent fluorescence in antigen-antibody reaction with good sensitivity below $1\mu\text{g}/\text{ml}$ level.

1. 서 론

바이오센서는 효소, 항원, 항체, 수용체 등을 이용하여 생물 체내에 존재하는 특정 물질을 선택적이면서도,

고감도로 분석할 수 있는 것이 중요한 특징이다. 또한 특정 물질을 분리하지 않고 직접 측정 할 수 있다는 장점과 빠르고 자동화된 측정이 가능하다는 장점을 가지고 있다.

바이오센서는 크게 분자 인식 부위와 인식된 신호를 가시화하고 정량화 할 수 있는 전자적 또는 광학적 신

* 국방과학연구소(Agency for Defence Development)

** 충북대학교 생화학과(Department of Biochemistry,

Chungbuk National University)

<접수일자 : 1997년 3월 17일>

호변환 장치로 구성된다. 따라서 바이오센서는 감응물 질과 신호변환 방법에 따라 다양한 종류가 있다.^{1), 2)}

그동안 바이오센서에 대한 연구는 주로 포도당, 요소 등을 측정하는 효소 센서에 대한 연구가 진행되었으나 독성화합물, 독소, 병원균 등을 측정하기 위해서는 선택성과 민감도가 우수한 항원-항체 반응을 이용한 면역센서의 개발이 요구된다.

본 연구에서 제안한 광섬유를 이용한 센서의 가장 큰 장점은 긴 섬유를 이용하여 먼 곳에 위치한 시료를 분석할 수 있으므로 위험지역에서의 분석이 가능하고 미세한 좁은 지역에서 측정이 가능하다는 것이다. 광섬유를 이용한 면역센서로는 광섬유의 말단면에 항체를 고정하고 형광물질이 표지된 항원을 결합시켜 광섬유의 말단면에서 발생하는 형광광을 측정하여 시료 중의 항원의 양을 정량하는 시스템³⁾과 광섬유의 일부분 또는 전체에 클래드층을 제거한 코아부에 직접 항체를 고정하고 형광물질이 표지된 항원을 결합시킨 후 광섬유 코아 계면으로 방출되는 손실파 즉 소산파(evanescent wave)에 의한 여기형광법을 이용한 시스템⁴⁾이 있다. 전자의 방법은 광섬유 말단면의 면적이 작으므로 고정하는 항체의 양에 제한이 있어 감도가 낮고 분석시 결합하지 않은 표지된 시료를 매번 세척해야하는 불편이 있다. 반면 소산파 여기기를 이용한 시스템은 항체 고정 면적이 넓어 감도가 높으며 또한 분석시 결합하지 않은 표지된 시료를 매번 세척하지 않아도 되기 때문에 면역센서의 자동화가 더욱 용이하다.

소산파란 광도파로에 조사된 광이 내부 전반사를 하며 진행할 때 저굴절계 쪽으로 전자기장이 침투해 발생하는 일종의 손실파이다. 이 전자기장의 크기는 계면으로부터 거리가 증가함에 따라 지수함수적으로 감소한다. 전자기장이 침투하는 거리는 도파입사광의 각도, 굴절율비에 따라 틀리며 물이나 혈청이 저굴절율계이고 도파입사광의 파장이 500nm인 경우 통상 100nm 정도이다. 이러한 광학적 시스템을 이용하여 클래드 층을 제거한 광섬유 코아 표면에 항체를 고정시키고 여기에 형광물질이 표지된 항원을 결합시킨 후 여기광을 광섬유에 조사하면 소산파의 침투거리안에 고정된 항체에 결합된 형광물질이 형광을 방출시키므로 형광물질이 표지된 항원의 양을 측정할 수 있다.^{5), 6)}

본 연구에서는 광섬유 소산파 센서를 제작하고 광섬유의 코아 표면에 anti-mouse IgG를 결합하고 형광이 표지된 mouse IgG와의 반응을 직접적인 방법과 경쟁

적인 방법으로 본 시스템의 특성을 측정하고 면역센서의 응용 가능성을 검토하고자 한다.

2. 실험 방법

1) 시약 및 재료

Mouse IgG, anti-mouse IgG, fluorescein isothiocyanate와 그의 모든 시약은 Sigma사에서 구입하여 사용하였고 광섬유는 코아가 유리이고 직경이 1mm인 3M사의 FP-1.0-UHT를 사용하였다.

2) 광섬유 항체 고정부 제작

광섬유를 12cm씩 자르고 양끝면을 연마한 후 한쪽 끝의 클래드 층을 4cm 제거하여 코아를 노출시켰다. 노출된 코아를 크롬산이 포화된 진한황산에 담가 30분간 상온에서 방치한 후 에탄올로 완전히 세척하였다. 세척된 광섬유를 톨루엔으로 희석한 10% dichloro-dimethyl silane(DDS) 용액에 담가 1시간동안 상온에서 방치하고 톨루엔으로 세척 후 90°C 오븐에서 1시간 건조시켜 표면을 소수성으로 전환시켰다.⁷⁾

3) 항체 고정

DDS 처리된 광섬유를 3개씩 0.05M 탄산완충용액(pH 9.6)에 40 μ g/ml 농도로 녹인 anti-mouse IgG용액 600 μ l에 담그고 천천히 교반하면서 4°C에서 하루밤 방치하여 항체를 고정한 후 0.01M phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4) 용액으로 세척하여 보관하였다.⁷⁾ 또한 비특이적 결합 반응을 제거하기 위하여 anti-mouse IgG가 고정된 광섬유를 0.01M PBS에 1% 농도로 녹인 BSA 용액 600 μ l에 담그고 천천히 교반하면서 상온에서 2시간 방치하여 BSA 코팅을 실시하였다.

4) Mouse-IgG의 형광 표지

1mg mouse IgG를 0.2ml의 0.1M 탄산-중탄산완충용액(pH 9.0)에 녹이고 0.05M 탄산-중탄산 완충용액(pH 9.0)에 1, 0.5, 또는 0.25mg/ml 농도로 녹인 fluorescein isothiocyanate(FITC)을 50 μ l 첨가한 후 알루미늄 호일로 싸서 상온에서 2시간 동안 혼들면서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 desalting column을 이용하여 반응하지 않은 FITC를 제거하고 fluorescein이 표지된 항체를 PBS로 용출하여 분리하였다.⁸⁾

5) 광섬유 소산과 센서의 구성

광섬유의 소산과 여기를 이용한 형광면역센서의 개략도는 그림1과 같다. 광원과 detector로는 SLM-AMINCO사의 8100 spectrofluorometer의 광섬유 다발을 이용하였고 유동셀은 용량은 0.6ml가 되도록 유리로 제작하였다.

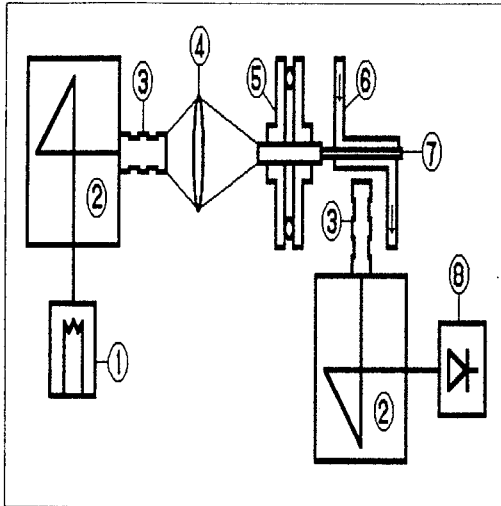


그림 1. 그림 1. 광섬유 소산과 센서의 구성도 :
 ①광원 ②단색화장치 ③광섬유다발 ④렌즈
 ⑤광섬유 고정대 ⑥유동셀 ⑦광섬유 ⑧광검출기.

Fig 1. Schematic diagram of fiber optic evanescent wave sensor :

- ①light source ②monochromator ③fiber bundle ④lens ⑤fiber positioner ⑥flow cell ⑦optical fiber ⑧detector.

6) 직접 면역분석법

유동셀에 anti-mouse IgG가 고정된 광섬유를 삽입한 후 fluorescein이 표지된 mouse IgG를 농도별로 넣어 3시간 반응시켰다. 여기용 광섬유 다발을 통하여 488nm의 광을 조사하고 항체가 고정화된 영역에서 발생한 525nm의 형광량을 측정하였다.

7) 경쟁적 면역분석법

유동셀에 anti-mouse IgG가 고정된 광섬유를 삽입한 후 fluorescein이 표지된 mouse IgG 4.725µg/300µl와 표지되지 않은 농도별 mouse IgG 용액 300µl를 혼합하여 주입한 후 3시간 반응시켰다. 여기용 광섬유 다발을

통하여 488nm의 광을 광섬유에 조사하고 항체가 고정화된 영역에서 발생한 525nm의 형광량을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 광섬유에 항체 고정

광섬유에 고정된 anti-mouse IgG의 양을 측정하기 위하여 고정 전후에 anti-mouse IgG용액의 단백질 총량을 Bradford 방법⁹⁾으로 측정한 결과 각 fiber 당 0.4974µg의 mouse IgG가 고정되었다. 광섬유의 클래드 층이 제거된 코어부분의 표면적이 127.17mm²이므로 항체가 방향성 없이 무작위로 단분자층으로 고정되었다고 가정할 때 항체 하나의 면적이 60nm²이므로 2.12 × 10¹²개의 항체가 광섬유 코어에 고정될 수 있다. 본 실험에서 항체가 광섬유 하나당 0.4974µg이 고정되었으므로 항체의 분자량을 150,000으로 계산할 때 항체 0.4974µg의 항체는 1.99 × 10¹²개이므로 fiber 표면의 93.9%가 항체로 고정되었다고 판단된다.¹⁰⁾

2) Mouse IgG의 fluorescein 표지

제조한 mouse IgG-fluorescein conjugate의 280nm와 495nm에서의 흡광도를 측정하여 아래 식에 의하여 mouse IgG-fluorescein conjugate의 농도 및 conjugate의 fluorescein과 IgG의 결합 비율을 계산하였다.⁸⁾ Fluorescein과 mouse IgG의 최초 반응 질량비를 각각 1:20, 1:40, 1:80으로하여 2시간 동안 반응시키고 desalting column을 이용하여 분리한 conjugate의 IgG 하나당 fluorescein의 결합수는 각각 6.4, 3.7, 1.7이었다.

$$Molar F/P = \frac{2.77 \times A_{495}}{A_{280} - (0.35 \times A_{495})}$$

$$IgG(mg/ml) = \frac{A_{280} - (0.35 \times A_{495})}{1.4}$$

표지된 mouse IgG 5µg/600µl를 anti-mouse IgG가 고정된 광섬유가 삽입된 유동셀에 넣고 3시간 반응 후 발생한 형광을 3반복으로 측정한 결과는 그림2와 같다. Mouse IgG에 결합된 fluorescein의 비율이 높을수록 형광 발생량이 많았으나 관계는 직선적이지 않았고 포화현상을 보였다. 이는 fluorescein 간의 quenching 또는 표지된 fluorescein에 의한 항체의 부분적 손상 때문일 것으로 사료된다. 따라서 fluorescein 결합 비율

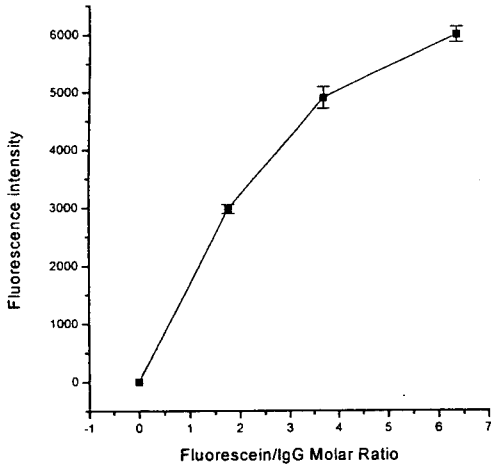


그림 2. 플로레사인과 항체 결합 비율에 따른 형광 발생량 (여기과장 ; Eexcitation=488nm, 방출형광파장 ; Eemission=525nm)

Fig 2. Effect of fluorescein/IgG molar ratio on the fluorescence intensity (λ excitation=488nm, λ emission=525nm)

이 높을수록 형광 발생량이 많으나 지나치게 높을 경우 비특이적 반응이 증가할 우려가 크므로 이후의 본 실험에서 fluorescein이 표지된 mouse IgG는 결합비율이 3.7인 mouse IgG-fluorescein conjugate를 사용하였다.

3) 직접 면역분석법

Fluorescein이 표지된 mouse IgG의 농도를 달리하여 anti-mouse IgG가 고정된 fiber를 삽입한 flow cell에 넣고 3시간 반응 후 발생한 형광을 3반복으로 측정 한 결과는 그림3과 같다. 18 μ g/600 μ l의 농도까지 포화 현상을 보이지 않았고 1 μ g/ml이하의 농도에서도 측정이 가능하였다.

4) 표면 코팅의 효과

비특이적 결합 반응을 제거하기 위하여 광섬유 코아에 anti-mouse IgG를 고정 한 후 PBS에 1% 농도로 녹인 BSA로 IgG가 고정되지 않은 부위를 코팅한 경우와 BSA 코팅을 하지 않은 경우의 형광 발생량을 3반복으로 측정 한 결과를 그림4에 나타내었다. BSA로 코팅한 경우와 하지 않은 경우의 형광이 비슷하게 나타나서 BSA 코팅의 효과가 없음을 알 수 있었다. 이는 anti-mouse IgG가 fiber 표면의 93.9%를 차지하여 광

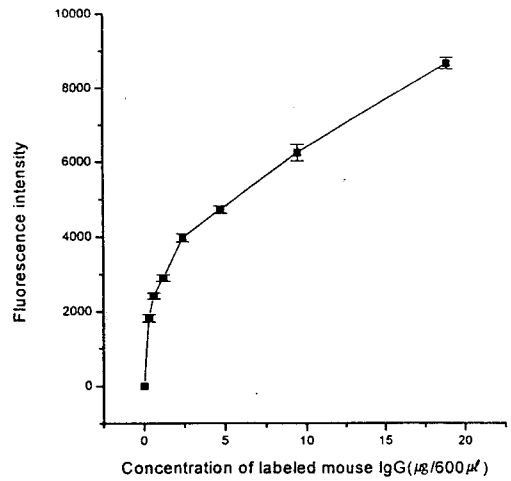


그림 3. 표지된 mouse IgG 농도에 따른 형광발생량 (여기과장 ; Eexcitation=488nm, 방출형광파장 ; Eemission=525nm)

Fig 3. Plot of fluorescence versus labeled mouse IgG (λ excitation=488nm, λ emission=525nm)

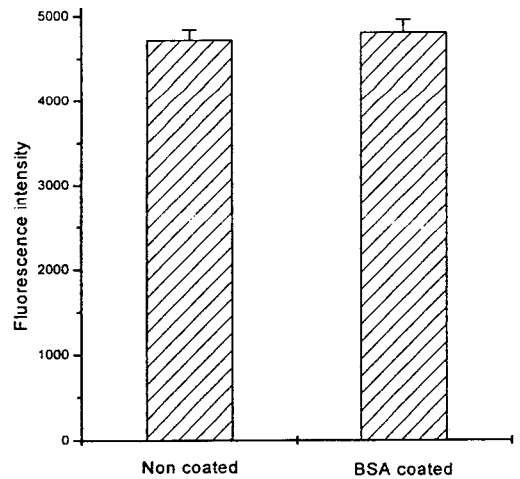


그림 4. 형광 발생량에 미치는 BSA 코팅의 효과 (여기과장 ; Eexcitation=488nm, 방출형광파장 ; Eemission=525nm)

Fig 4. Effect of BSA coating on the fluorescence intensity (λ excitation=488nm, λ emission=525nm)

섬유 코아의 6.1%가 비어 있기는 하지만 빈 부분이 입체 방해 효과 등으로 인하여 쉽게 다른 anti-mouse IgG가 결합하기 어려운 부위임을 알 수 있었다.

5) 경쟁적 면역분석법

Flow cell에 anti-mouse가 고정된 광섬유를 삽입한 후 fluorescein이 표지된 mouse IgG 4.725 μ g/300 μ l와 표지되지 않은 mouse IgG 300 μ l를 농도별로 혼합하여 반응시킨 후의 형광 소광량을 3반복으로 측정된 결과를 그림5에 나타내었다. 표지된 mouse IgG와 표지되지 않은 mouse IgG간의 경쟁에 의한 신호 감소는 두 물질에 비율에 따라 감소하였으며 1 μ g/ml이하의 농도에서도 측정이 가능한 감도를 얻을 수 있었다.

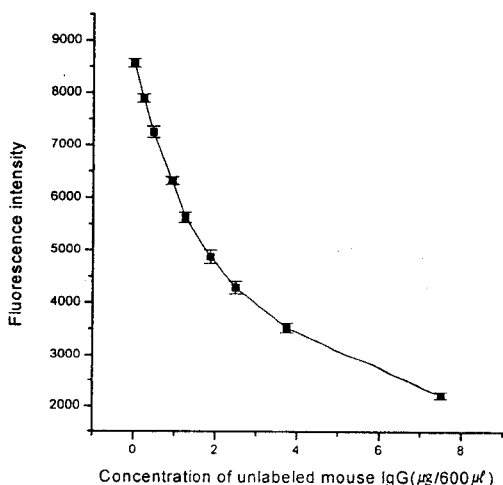


그림 5. 시료용 비표지 mouse IgG 농도에 따른 형광 소광 효과 (여기과장; Eexcitation=488nm, 방출형광과장; Eemission=525nm)

Fig 5. Quenching effect of the unlabeled mouse IgG of the sample (λ excitation=488nm, λ emission=525nm)

4. 결 론

광섬유 소산파 센서를 제작하고 광섬유 코어 표면에 anti-mouse IgG를 고정시킨 후 형광이 표지된 mouse-IgG를 직접적인 방법과 경쟁적인 방법을 통하여 반응시켜 mouse-IgG의 농도를 측정하였다. 항체는 단순 흡착 방법에 의하여 광섬유 표면의 93.9%에 고정되었고 BSA를 이용한 표면 코팅 효과는 없었다. 항체에 결합된 fluorescein의 비율이 높을수록 형광 발생량이 많았으나 관계는 직선적이지 않았고 포화현상을 보였는데 이는 fluorescein 간의 quenching 또는 표지된 fluorescein에 의한 항체의 부분적 손상 때문일 것으로 판단된다. 직접적인 방법과 경쟁적인 방법 모두 1 μ g/ml 이하의 항체를

측정할 수 있는 감도를 가지고 있었다.

광섬유 소산파 센서의 측정감도를 증가시키기 위하여 소산파가 발생하는 표면의 기하학적 형상을 변경시켜 소산파를 증대시키는 방법과 표면의 화학적 조절에 의하여 고정된 항체의 양을 증가시키고 고정된 항체의 배열을 최적화하는 연구가 기대된다.

참 고 문 헌

- [1] M. Thompson and U. S. Krull, "Biosensors and the transduction of molecular recognition", *Anal. chem.*, vol. 63, pp. 393-405, 1991.
- [2] J. S. Schultz, Biosensors, *Scientific American*, August, pp. 48-55, 1991.
- [3] F. V. Bright, T. A. Betts and K. S. Litwiler, "Regenerable fiber-optic-based immunosensor", *Anal. Chem.*, vol. 62, pp. 1065-1069, 1990.
- [4] J. R. Astles and W. G. Miller, "Reversible fiber-optic immunosensor measurements", *Sens. Actuators*, vol. 11, pp. 73-78, 1993.
- [5] E. F. Carome, G. A. Coghlan, C. N. Sukenik and J. E. Zull, "Fiberoptic evanescent wave sensing of antigen-antibody binding", *Sens. Actuators*, vol. 13-14, pp. 732-733, 1993.
- [6] B. I. Bluestein, I. M. Walczak and S. Chen, "Fiber-optic evanescent wave immunosensors for medical diagnostics", *TIBTECH*, vol. 8, pp. 161-168, 1990.
- [7] A. Ahluwalia, D. D. Rossi, C. Ristori, A. Schirone and G. Serra, "A comparative study of protein immobilization techniques for optical immunosensors", *Sens. Actuators*, vol. 7, pp. 207-214, 1991.
- [8] T. The and T. Feltkamp, *Immunol.*, vol. 18, pp. 865-868, 1970.
- [9] M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248-254, 1976.
- [10] J. R. Crowther, *Methods in molecular biology: ELISA, Theory and practice*, Hamana press, pp. 101-102, 1995.

 著 者 紹 介

**최 기 봉**

1964년생. 1989년 서울대학교 대학원 농화학과(석사), 1998년 - 현재 국방과학연구소 선임연구원, 1997년 현재 충북대학교 화학과 박사과정중. 주관심분야 : 바이오센서

**차 승 희**

1945년생. 1969년 서울대학교 대학원 식물학과(석사), 1987년 동대학원 식물학과(박사), 1976년 - 현재 국방과학연구소 책임연구원. 주관심분야 : 바이오센서

**윤 희 주**

1950년생. 1981년 충남대학교 대학원 생물학과(석사), 1986년 한양대학교 대학원 생물학과(박사), 1994년 메릴랜드 의과대학 형광분광센터(Post doc.), 1979년 - 현재 국방과학연구소 선임연구원. 주관심분야 : 바이오센서

**최 정 도**

1944년생. 1966년 서울대학교(학사), 1972년 서강대학교 화학과(석사), 1977년 Texas Tech 화학과(박사), 1977년 - 1978년 Cornell 대학교 선임연구원, 1978년 - 1984년 Emory 대학교 선임연구원, 1982년 - 1984년 국방과학연구소 선임연구원, 1984년 - 현재 충북대학교 교수. 주관심분야 : 생화학, 효소학, 광생물학