

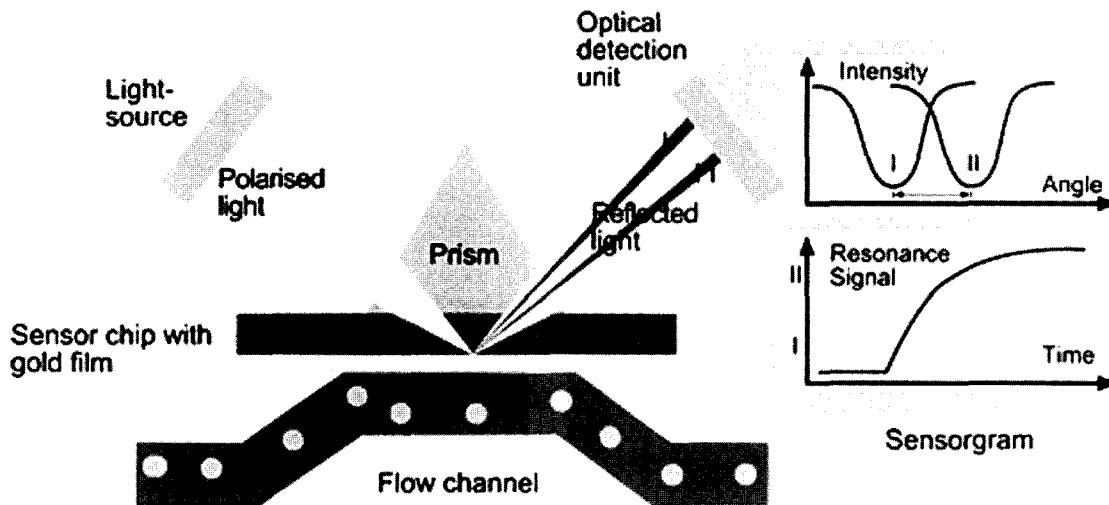
바이오센서로서 표면 플라즈몬 공명 (Surface Plasmon Resonance)

케이맥㈜ 물성분석연구소 구 수진 박사



1. 서론

센서란 측정 대상물로부터 정보를 감지 또는 측정하여 그 측정량을 인식 가능한 유용한 신호로 변화하는 장치(device)로 정의할 수 있으며, 바이오센서(biosensor)는 생물학적 요소와 분석 대상 물질과의 반응에서 나타나는 전기화학적 변화, 열에너지의 변화, 형광 또는 색의 변화 등을 인식 가능한 신호로 변환시켜주는 장치와 결합하여 제작한 기구를 지칭한다. 바이오센서의 효시는 1962년 포도당을 측정하기 위해 Clark이 dialysis membrane을 이용하여 최초의 Glucose센서를 개발한 이래로 생물공학,



화학공학, 전자공학, 생명공학 및 컴퓨터 공학 등 여러 분야가 접목되면서 급속도로 연구·개발되어 왔다. 바이오센서의 종류는 측정 대상 물질, 센서에 고정된 생물학적 요소, 또는 신호변환기의 종류에 따라 나눈다. 신호변환 방법으로는 전기화학(electrochemical), 열(thermal), 광학(optical), 역학적 (mechanical) 방법 등 다양한 물리화학적 방법이 사용되고 있다.

최근 Proteomics분야에서 각광 받고 있는 표면 플라즈몬 공명(SPR; surface plasmon resonance)법은 광 변화를 전기신호로 변환시켜 반응을 검출하는 광학 바이오센서(optical biosensor)의 하나이다. SPR 현상은 1900년대 초 Wood¹가 Fano의 금속 회절격자에서 표면 플라즈몬과 여기로 인한 비정상적 회절 현상을 관측함으로써 비롯되었다. 1968년 Kretschmann²과 Otto³에 의해 프리즘을 이용한 두 개의 서로 다른 구조를 가진 표면 플라즈몬 공명의 여기가 시도되어 처음으로 표면 플라즈몬 공명의 일반적인 응용 가능성을 보여주었다. 그리고 1970년대에 박막의 특성 분석⁴과 금속 계면에서 변화⁵를 관측하기 위한 표면 플라즈몬 공명의 가능성이 입증되었고, 1982년 Nylander과 Liedberg^{6,7}에 의해서 가스 검출과 바이오센서로서 SPR 이용이 구현되었다. 그 뒤 물리, 화학, 생물학적 측정을 위한 SPR 감지용 기기의 응용뿐만 아니라 SPR 현상을 측정할 수 있는 새로운 기기 구성의 개발이 계속되었으며, 생체 분자 상호작용을 감지하기 위한 SPR의 응용과 관련된 많은 연구 문헌도 보고되었다.

이러한 SPR 센서의 장점은 방사성 물질이나 형광물질을 이용한 별도의 표식 없이 광학적 원리만으로 분자들 간의 상호작용 계측이 가능하고, 실시간으로 결합 친화도를 측정할 수 있으며, 분자 인식 검출에 우수한 감도를 가진다는 것이다. 현재 SPR 생체분자 상호작용을 실시간으로 관측하기 위한 탁월한 Tool로 각광을 받고 있고 다양한 기술과 제품들이 개발되고 있다.

2. 표면 플라즈몬 공명 이론

2.1 표면 플라즈몬 (surface plasmon)

표면 플라즈몬 (surface plasmon)은 금속 박막 표면에서 일어나는 전자들의 집단적 진동 (collective charge density oscillation)이며, 이에 의해 발생한 표면 플라즈몬 파는 금속과 유전체의 경계면을 따라 진행하는 표면 전자파이다. 이러한 현상을 나타내는 금속은 gold, silver, copper, aluminum 등과 같은 외부 자극에 의해 전자의 방출이 쉽고 음의 유전상수를 갖는 금속들이 주로 사용되는데, 그 중에서 가장 예리한 SPR 공명 피크를 보이는 silver와 우수한 표면 안정성⁸을 나타내는 gold가 보편적으로 이용되고 있다.

표면 플라즈몬의 여기(excitation)는 외부에서 서로 다른 유전함수를 갖는 두 매질 경계면 즉, 금속과 유전체의 경계면에 전기장을 인가하면 두 매질 경계면에서 전기장 수직

성분의 불연속성 때문에 표면전하가 유도되고 이러한 표면 전하들의 진동이 표면 플라즈몬 파로 나타난다. 이 표면 플라즈몬 파는 자유공간에서의 전자기파와는 달리 입사면에 평행하게 진동하는 파로서 p-polarization의 편광성분을 가진다. 따라서 광학적인 방법으로 표면 플라즈몬을 여기시키려면 TM 편광된 전자기파에 의해서만 가능하다.

2.2 표면 플라즈몬 공명 (Surface Plasmon Resonance, SPR)

SPR은 전반사(Total Internal Reflection) 현상을 광학적 기본 원리로 한다. 전반사란 입사광이 굴절률이 높은 매질에서 굴절률이 낮은 매질로 진행할 때 어떤 특정 입사각(임계각) 이상이 되면 모든 광은 다른 매질로 굴절되지 않고 경계면에서 전부 반사되는 현상을 말한다.⁹ (Fig. 1(a)) 이때 소산장파(evanescent field wave)라고 불리는 전자기파 성분이 굴절률이 낮은 매질로 진행하게 되는데, 소산파의 침투 깊이는 입사광 파장 정도의 길이와 같고, 그 세기는 경계면으로부터 지수함수적으로 감소한다. 만약 전반사 현상이 일어나는 계면에 금속과 같은 얇은 두께의 전도성 막을 입히면 전반사가 일어나는 조건에서 SPR 현상이 나타나게 된다. (Fig. 1(b))

즉, 입사파는 금속박막의 경계면에서 전반사되고 소산파(evanescent wave)는 경계면에서 금속박막 속으로 지수함수적으로 감소되지만 특정한 입사각과 박막의 두께에서는 경계면에 평행한 방향의 입사파와 금속박막과 공기의 경계면을 따라 진행하는 표면 플라즈몬 파의 위상이 일치할 경우 공명이 일어나게 된다. 이 때 입사파의 에너지는 모두 금속박막에 흡수 되어 반사파는 없어지고, 경계면에 수직인 방향의 전기장의 분포는 지수함수적으로 경계면에서 가장 크고 금속박막 속으로 갈수록 급격히 감소하는 현상이 발생하게 되는데 이를 **표면 플라즈몬 공명 (surface plasmon resonance)** 이라고 한다. 그리고 입사한 광의 반사도가 급격하게 감소하는 각도를 **표면 플라즈몬 공명각 (surface plasmon resonance angle : θ_{SP})** 라고 한다.

Fig. 2에 표면 플라즈몬 공명이 일어나기 위한 구조를 도식화하여 나타내었다.¹¹

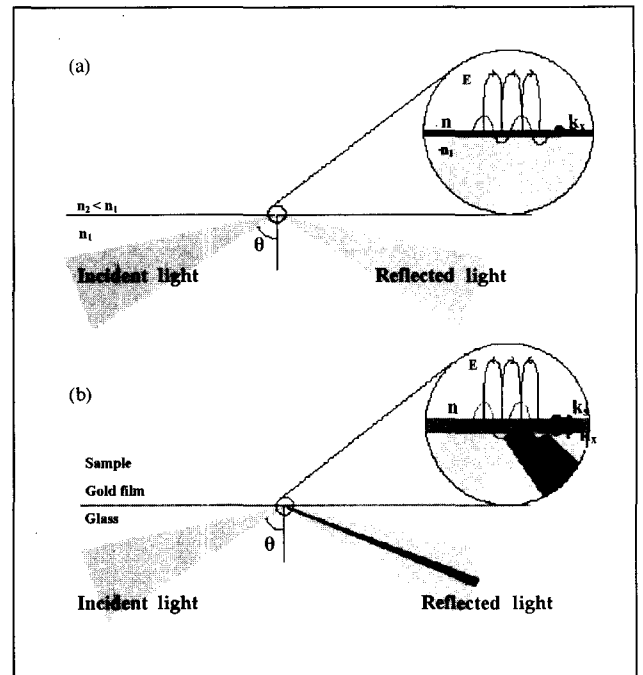


Fig. 1 (a) 전반사 (Total Internal Reflection) 현상 (b) 표면 플라즈몬 공명현상¹⁰

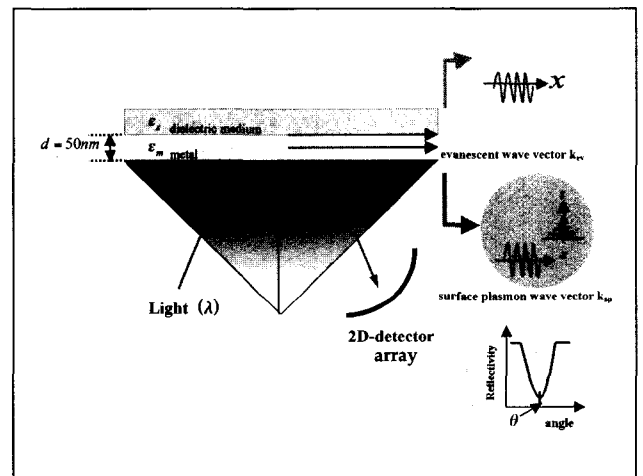


Fig. 2 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 위한 배열. 금속/프리즘 계면에서 소산파 파수벡터(k_{ev})와 표면 플라즈몬파 파수벡터(k_{sp})가 일치하는 입사광 특정각도에서 표면 플라즈몬 공명이 일어남.

앞서 언급했듯이, 표면 플라즈몬파는 입사면에 평행하게 진동하는 파로서 p-polarization의 성분을 가지므로 표면 플라즈몬의 여기는 TM 편광된 전자기파에 의해서만 가능하다.

이러한 TM편광된 전자기파의 조건을 이용하여 Maxwell 방정식을 전개하면 p-편광된 표면 플라즈몬 파의

분산관계식이 얻어지고, 입사광에 의해 금속표면과 시료 사이에서 여기된 표면 플라즈몬의 파수 벡터(k_{sp})로 표현을 하면

$$k_{sp} = \frac{\omega_0}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_m + \epsilon_s}} \quad (1)$$

식(1)과 같이 표현할 수 있으며, ϵ_m 은 금속의 실수부 유전율이고, ϵ_s 는 시료의 유전율, c 는 광속, ω 는 주파수를 나타낸다.¹² 그리고 ω 의 주파수를 가지고 시료의 내부를 전파하는 입사광의 k_s 는 다음과 같이 주어진다.

$$k_s = \frac{\omega_0}{c} n_p \sin \theta \quad (2)$$

여기에서 ω_0 는 입사광의 주파수이며, n_p 는 유전체 매질(glass)의 굴절률, θ 는 광의 입사 각도이다.

식(1)과 (2)에서 Fig. 3의 분산곡선을 얻을 수 있고, 이 곡선에서 보이는 바와 같이 시료에 서의 입사광 주파수 $\omega(k_s)$ 는 항상 표면 플라즈몬의 주파수 $\omega(k_{sp})$ 보다 크며, 어떤 점에서든 교차하지 않음을 볼 수 있다. 이것은 표면 플라즈몬 파와 입사광이 자연적으로는 공명을 이룰 수 없음을 나타낸다.

하지만 굴절률이 높은 유전물질 즉, 프리즘을 사용해 전 반사 조건으로 광을 입사시키면 프리즘에 입사된 광의 파수 벡터는

$$k_p = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_p} \quad (3)$$

이고, 프리즘의 빛변에 발생하는 소산파의 파수 벡터는

$$k_{ev} = k_p \sin \theta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_p} \sin \theta \quad (4)$$

이다. 여기서 ϵ_p 는 프리즘의 유전율이며 θ 는 입사각이다. 따라서 Fig. 3과 같이 소산파의 파수 벡터(k_{ev})곡선은 그 기울기가 매질 내에서 입사광의 파수 벡터(k_p)보다 $\sin\theta$ 만큼 작아져 표면 플라즈몬의 파수 벡터(k_{sp})의 분산곡선과 입사광의 임의의 주파수에서 두 파수 벡터가 교차함을 알 수 있다.

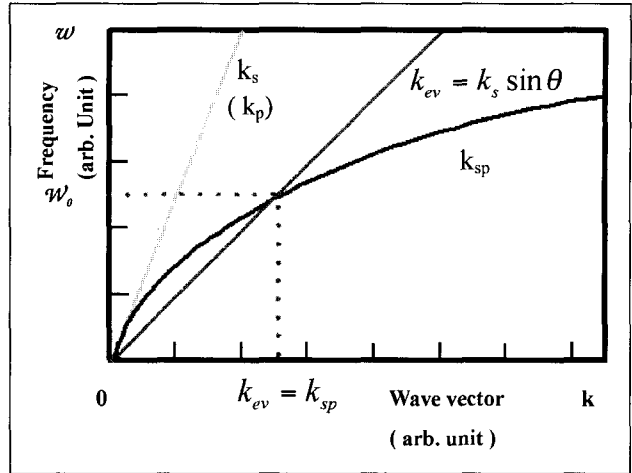


Fig. 3 표면 플라즈몬의 파수 벡터(k_{sp}), 입사광의 파수벡터(k_s), 소산파 파수 벡터(k_{ev})의 분산곡선

즉, 임의의 주파수 ω_0 에서

$$k_{ev} = k_{sp} \quad (5)$$

이며, 이것은 입사광이 공명각 θ_{sp} 로 프리즘에 입사될 때 금속 표면에 여기된 플라즈몬의 파수 벡터(k_{sp})와 소산파의 파수 벡터(k_{ev})가 같은 주파수를 가지므로 서로 공명을 일으킴을 의미한다. 이 때 입사광의 에너지 대부분은 표면 플라즈몬과 공명하여 금속표면을 따라 진행하며 소실되어, 반사되는 광의 강도는 급격히 감소하게 된다. 또한 반사도를 입사각의 변화에 따라 측정하면, 표면 플라즈몬 공명각에서 반사도의 급격한 감소를 볼 수 있다. 즉 입사광의 에너지가 표면에 존재하는 전자에 모두 흡수 되므로 반사되는 광이 전혀 없는 현상이 발생한다. 표면 플라즈몬 공명각은 식 (1), (4), (5)에서

$$\theta_{sp} = \sin^{-1} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_p (\epsilon_m + \epsilon_s)}} \quad (6)$$

으로 유도되며, 여기서 표면 플라즈몬 공명각(θ_{sp})은 시료의 유전율(ϵ_s)에 대한 함수임을 알 수 있다. 또한 이렇게 얻어진 공명각을 통해 표면 물질의 굴절률 n_s 를 구할 수 있다.

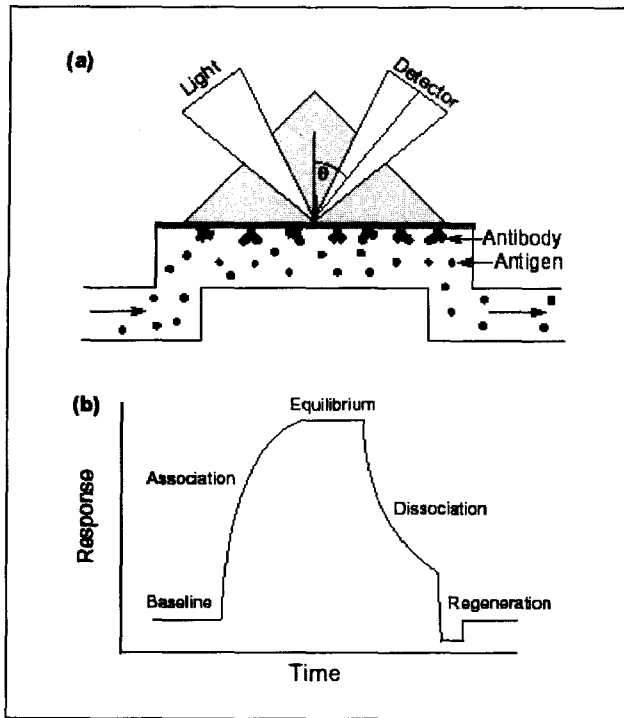


Fig. 4 표면 플라즈몬 공명을 나타내는 도식도.

(a) ligand(antibody)가 센서 표면에 고정화 되어있고, analyte(antigen)가 microfluidic flow cell을 통하여 흐르면 SPR은 센서표면 굴절률의 변화를 감지한다.

(b) 전형적인 SPR sensorgram의 형태

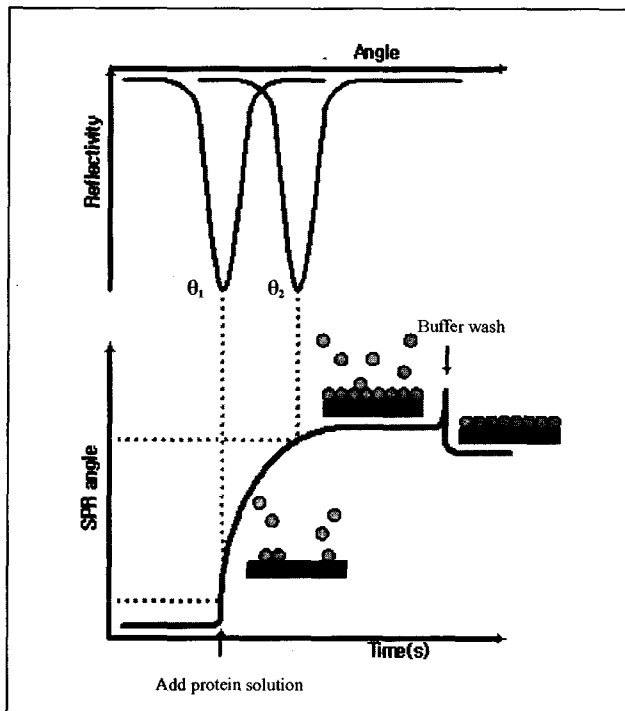


Fig. 5 고분자 필름에 대한 단백질 흡착에 대한 SPR curve.

SPR각의 변화 ($\theta_1 \Rightarrow \theta_2$)는 흡착 kinetics를 관찰하기 위해 사용된다."

$$\epsilon_s = \frac{\epsilon_m \epsilon_p \sin^2 \theta_{sp}}{\epsilon_m - \epsilon_p \sin^2 \theta_{sp}} \Rightarrow n_s = \sqrt{\epsilon_s} \quad (7)$$

표면 플라즈몬 공명이 일어나는 공명각, 즉 반사광이 최소가 되는 각도는 금속 박막 표면층 유전체 질량이 증가하거나 구조가 변형되면 결과적으로 유효 굴절률(effective refractive index)이 변화하여 공명각이 달라지게 된다. 따라서 이러한 물질의 변화를 광학적인 방법으로 측정할 수 있는 SPR 원리를 이용하면 금속 박막 표면 층의 적절한 화학적 변형을 통해 다양한 생화학물질들 사이의 선택적 결합이나 분리와 같은 생화학적 반응을 공명각의 변화로 감지할 수 있어 SPR 센서는 고감도 생화학 센서로 활용할 수 있게 된다. 보고된 논문에 의하면 상용화된 SPR센서의 경우, 유전층 굴절률이 0.001변할 때 공명각의 변화가 0.1° 변하게 되며 이는 단위 mm면적 당 1ng정도의 질량변화에 해당하는 것으로 알려져 있다. 그리고 Fresnel방정식을 이용한 수치적인 해석으로 다층 막 측정시료의 굴절률과 흡수계수, 두께에 대한 정보도 얻을 수 있다.

2.3 표면 플라즈몬 공명을 이용한 Data 해석

Fig. 4(a)는 SPR현상을 이용한 antibody-antigen 상호작용을 보여준다. Antibody는 센서 표면에 공유결합으로 고정되어 있고 이를 ligand로 간주한다. 여기에 분석 대상 물질인 antigen이 flow cell을 거쳐 흐르면 analyte-ligand 화합물의 결합, 해리과정에 따른 굴절률 변화를 SPR 검출기가 감지하게 된다. 이러한 실시간 반응 변화를 도식화한 data를 sensorgram 이라 부르며 (Fig. 4 (b)), sensorgram을 통하여 kinetic 분석이 가능하다.¹³

Fig.5에서는 금속 막에 단백질을 고정하는 과정에 따른 공명각의 이동 변화를 잘 보여주고 있다. 단백질의 흡착 과정을 실시간으로 나타내었으며 동시에 공명각의 변화도 나타내었다. 단백질이 표면에 흡착될 때 공명각은 흡착되지 않은 상태의 θ_1 에서 표면에 포화 흡착될 때의 θ_2 로 변한다. 따라서 표면 플라즈몬 공명 현상은 근접 표면에서 굴절률의 미세한 변화 및 생체 분자의 상호 작용에 의한 변화를 실시간 관찰할 수 있으므로 생체 시료 결합의 kinetic 분석에 유용하게 사용할 수 있다.

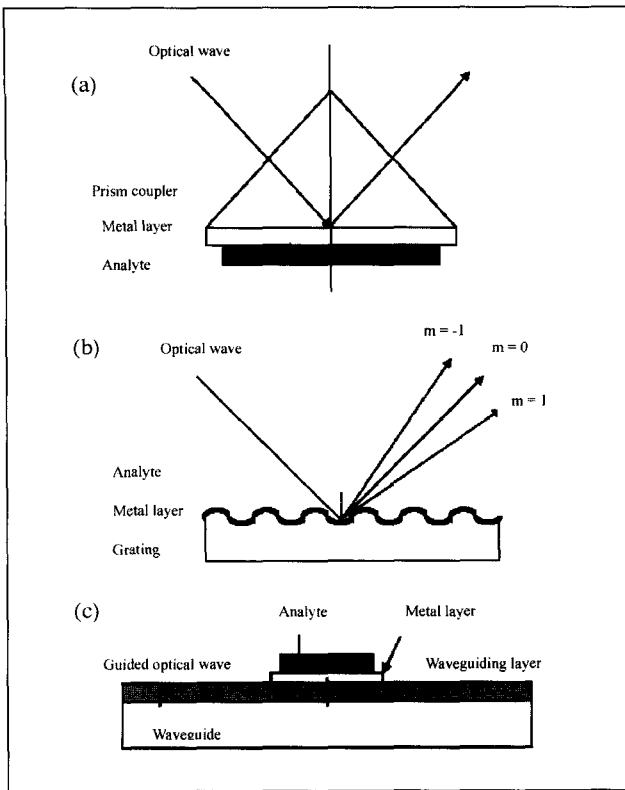


Fig. 6 SPR 센서로서 가장 일반적으로 이용되는 구성.

- (a) Prism을 이용한 SPR 센서 시스템
- (b) Grating을 이용한 SPR 센서 시스템
- (c) 평판 optical waveguide를 이용한 SPR 센서 시스템

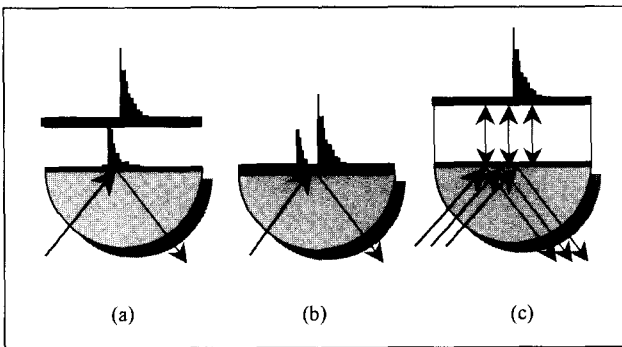


Fig. 7 SPR 여기를 위한 프리즘을 이용한 구조

- (a) Otto 구조 (b) Kretschmann 구조 (c) Frustrated TIR(FTIR) 구조

2.4 표면 플라즈몬 공명을 위한 구성

앞서 논의한 바와 같이, 표면 플라즈몬 파의 파수 벡터 (wave vector)의 크기는 유전체 내부에서 진행되는 광자의 파수 벡터보다 크다. 그래서 유전체 내부로 전파 할 수 없고 표면에만 존재하게 된다. 이러한 성질 때문에 표면 플라즈몬을 여기 시키기 위해서는 파수 벡터를 크게 만들어야 한

다. SPR센서에서 입사파를 여기 시키는 방법으로서 Fig. 6과 같이 프리즘, 광 도파로, 회절 격자 등을 주로 이용하고 있다.¹⁴

표면 플라즈몬을 여기시키는 구조 중 프리즘 전반사를 이용한 방식에는 Fig 7의 세가지 구성이 있다. Fig. 7(a)의 Otto구조³로 알려진 프리즘-공기-금속막 배열과 (b)의 Kretschmann 구조²로 알려진 프리즘-금속막-공기의 배열이 있다. (c)의 배열은 Otto 구조와 유사하나 전반사를 향상시키기 위한 특수한 층이 존재하는 Frustrated TIR 구조이다. 이는 Resonant Mirror(RM) 원리에 의해서 전반사 되는 입사광과 플라즈몬의 결합이 일어난다.¹⁵ 프리즘 위에 얇은 두께의 silica (~1mm)가 증착되어 있고 그 위에 고 굴절률의 titania 층이 광 도파로의 역할을 한다. 여기에서 가장 보편적으로 사용되는 SPR 센서는 Kretschmann 구조이다. 이 구조의 센서는 측정매질의 교환이 용이하고 측정 변수가 다양하고 감도가 좋다는 장점과 소형화 및 집적화가 불가능하다는 단점을 내포하고 있다.

SPR 현상을 측정하는 방식은 크게 입사각 분해형 표면 플라즈몬 공명 측정장치와 파장 분해형 표면 플라즈몬 공명 측정 장치로 구분할 수 있다. 입사각 분해형은 여러 입사각에 대해 반사도가 최소가 되는 공명각을 찾는 방식이다. 이는 입사광의 각도가 측정 시료의 굴절률의 함수로 주어지므로 이 방식은 측정시료의 변화를 공명각의 변화로 측정할 수 있는 것이다. 다음으로 파장 분해형은 각 매질이 갖는 굴절률의 파장 의존성을 이용하여 주어진 입사각에 대해 광의 파장을 변화시키는 가운데 공명이 일어나는 파장을 찾는 방식이다. 두 가지 방법 모두 이미 상용화 되어있으나 대부분 측정 방식은 입사각 분해형을 이용하고 있다. 입사각 분해형은 세부적으로 일정한 범위 내에서 입사광의 입사각을 바꾸어 가며 광 다이오드로 측정하는 방식과 입사광을 쪼개기 모양으로 분해하고 다채널 광센서 (CCD나 Photodiode Array)를 이용하여 동시에 쪼개기모양 범위 내의 입사각에 대한 광신호를 한번에 측정하여 공명점의 변화를 찾는 방식으로 나뉘어진다.

〈Table 1〉 SPR surfaces

<p>BIACORE surfaces</p> <p>CM5-carboxymethyl dextran SA-streptavidin NTA-nickel chelation HPA-hydrophobic monolayer B1-low charge C1-flat carboxymethylated F1-short dextran J1-gold surface L1-lipophilic dextran</p> <p>Affinity sensors surfaces</p> <p>CM- carboxymethyl dextran Hydrophobic planar Amino planar Carboxylate planar Biotinylated planar</p>	<p>Routine analysis Biotin conjugation His-tagged conjugation Create hybrid lipid bilayers Reduces nonspecific binding No dextran Large analytes User-defined surfaces Capture liposomes</p> <p>Routine analysis Create lipid monolayers Alternative coupling chemistry No dextran Streptavidin conjugation</p>
---	---

3. 표면 플라즈몬 공명의 응용분야

바이오센서는 효소, 미생물, 항원-항체 등과 같이 분자 인식기능을 가진 생체 분자를 적절한 전기, 물리, 화학 소자(transducer)에 결합시켜 이들과 특이적으로 반응하는 생리적 지표 물질의 농도를 측정하는 장치이다. 바이오센서는 생체분자가 특이적으로 반응하는 성질을 이용하여 특정 성분만을 정확하고 신속하게 분석할 수 있으며, 질병의 조기 진단, 독성 오염 물질의 측정 등 환경, 식품, 생명공학 분야에서 광범위하게 활용될 수 있다.

이러한 생체고분자 물질의 상호 관계를 이해하기 위해서는 관계의 정도, 강도, 반응속도의 측면에서 상호작용의 특성을 연구하는 것이 일반적이다. SPR을 이용한 일종의 바이오센서가 1990년에 유럽에서 개발되어, 현재는 제약회사들을 필두로 산업계와 연구계에서 이 분석 기기의 이용이 점차 활발하게 진행되고 있다.

바이오센서의 가장 중요한 부분은 분자들과 상호 작용하는 센서의 표면이다. 센서 표면이 내구성과 재생성을 가질 경우 상업적인 바이오센서를 제작하기가 용이하다.

Table 1는 일반적인 응용에 따른 BIACORE와 Affinity sensor의 센서 칩 종류들을 명시하였다.²⁰

SPR 센서가 가지는 여러 가지 특성들과 활용성은 생명공학, 환경, 신약개발, 식품 산업 등 여러 분야에서 다양하게 검증되어 왔고, 최근 바이오칩의 등장과 함께 더욱 많은 관심이 SPR 센서에 모여지고 있다. 그 이유는 기존의 형광법을 이용한 단백질, DNA, RNA의 기능 연구과정에서 필수적으로 사용되었던 표식자를 사용하지 않고 다양한 생화학적 현상들을 높은 감도로 계측할 수 있기 때문이다.

SPR이 표식자와 같은 다른 보조수단 없이도 원천적으로 고감도의 계측이 가능한 근본적인 이유는 표면으로부터 수백 nm 이하의 범위 내에서 형성된 소산파의 sampling depth가 기존의 다른 광학적인 방법에 비해 월등하게 작다는 것에 있다. 즉, 표면에 고정된 측정 물질과 소산파의 작용영역이 다른 광학적인 방법에 비해 매우 협소하여 소산파를 이용하면 극 미량의 시료만으로도 물질 간의 상호작용이 쉽게 계측된다는 것이다. 이러한 소산파의 특성은 SPR을 응용하는 분야 외에도 광 도파로를 이용하는 분야에서도 그 원천적인 특성이 다양하게 활용되고 있는 추세이다.

3.1 물리·화학적 응용분야

SPR 초기 연구는 SPR 현상이 일어나는 계면의 기판이 금속이므로 금속 박막 유전상수와 박막과 계면에서 상호작용에 대한 연구로 출발하였다. 금속 막 위에 Langmuir-Blodgett 막이나 유기 단분자 조립층 (Self-Assembled Monolayer)의 증착으로 기판의 제한성을 극복하여 응용할 수 있는 분야가 넓어졌고, 또한 금속 기판 위 고분자 물질의 코팅은 SPR 센서의 가능성을 확대시켰다. 예를 들어, 금 표면에 alkanethiols SAM을 화학 흡착시킨 뒤, biotin을 고정화하고 biotin-streptavidin 화합물을 형성하는 실험에서 각 단계의 흡착 특성을 확인할 수 있다는 것이다.

이제 SPR 센서는 다양한 물질들의 유전 성질, 흡착 과정, 수화에 의한 표면 degradation 등 표면 특성을 결정짓는 물리적 성질을 규명하는 유용한 방법으로 평가된다. 특히 계면이나 표면계측에 우수한 장점을 가진 SPR 방법은 최근 나노 기술분야에서 더욱 광범위하게 응용 될 것으로 기대되는데 대표적으로 유기 박막 응용 분야에서 박막의 형성과정이나 박막자체의 물성을 동시에 측정할 수 있는 방법으로서 그 활용가치가 한층 더 고조되고 있다.

3.2 생물학적 응용

3.2.1 Target characterization

SPR센서는 신약개발 및 개선과정에서 특히 target macromolecules과 생체 의약의 특성 조사에 사용된다. 분자들의 기능에 따른 결합 활성도를 직접 관측할 수 있으며 ligand-receptor 상호 작용의 반응속도론적, 열역학적인 변수측정은 효소면역법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), 면역침강(immunoprecipitation), High-Throughput Screening의 조건 정립에 유용한 정보를 제공한다. SPR 바이오센서는 저 분자량 (< 1000Da)의 screening에 사용되며 총 소요시간과 비용을 절약할 수 있고 화학물질과 혈액 내 HAS 결합친화도 및 세포 내 막의 흡착 연구에도 적용된다.

3.2.2 Small-molecule 검출

SPR 센서의 감도는 분석대상 물질의 굴절률에 따라 변

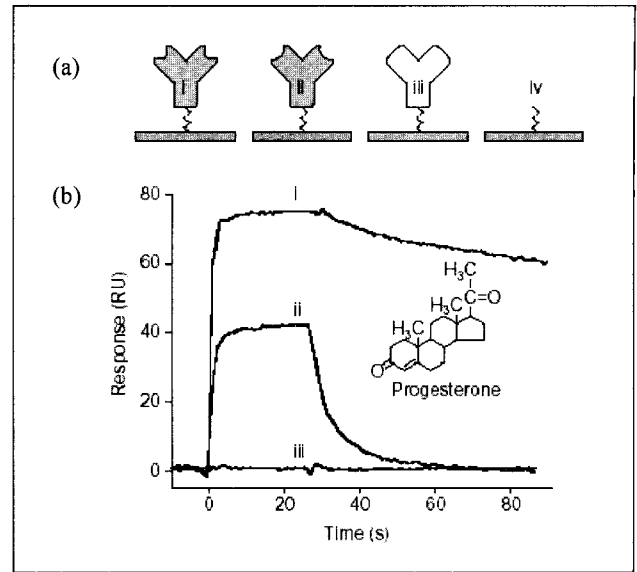


Fig. 8 표면 플라즈몬 공명 바이오센서를 이용한 small-molecule 분석에 예.

- (a) 항체-항원(antibody-antigen) assay
 - (i) anti-progesterone (ii) anti-testosterone
 - (iii) anti-mouseFc (iv) reference
- (b) progesterone(2 μ M)의 결합 반응 data

화하게 되는데 일반적으로 단백질의 질량에 비례한다. 과거에는 수천 Da의 큰 분자량을 가진 분자만 측정할 수 있었지만, 바이오센서 분야에서 기기 시스템과 실험적 설계의 개발로 작은 분자량(<500 Da)의 분석대상 물질의 검출도 가능해졌다. Fig. 8는 SPR 바이오센서를 이용하여 고정화된 항체에 steroid hormones와 같은 작은 분자량 분자 검출의 사례를 보여주고 있다.²¹ 이 실험에서는 세가지 단일 항체 (anti-progesterone, anti-testosterone, anti-mouse Fc)를 동일 수준(~15000 resonance unit, RU)으로 고정화시키고 각 다른 항체에 progesterone을 결합시킨 뒤 나타나는 특징적인 반응변화를 보여주고 있다. Anti-progesterone 항체에 progesterone을 결합시키는 (i)의 경우에 75RU정도의 큰 RU값을 나타내며, 이 반응은 빠르게 평형상태에 이르고 anti-progesterone 표면에서 progesterone이 천천히 해리된다. 이와 같이 SPR을 이용하면 결합, 해리속도상수를 측정하여 분자간 결합 친화력을 알 수 있다.

3.2.3 High-resolution screening

표식인자 없이 대용량의 정보획득이 가능한 SPR 센서

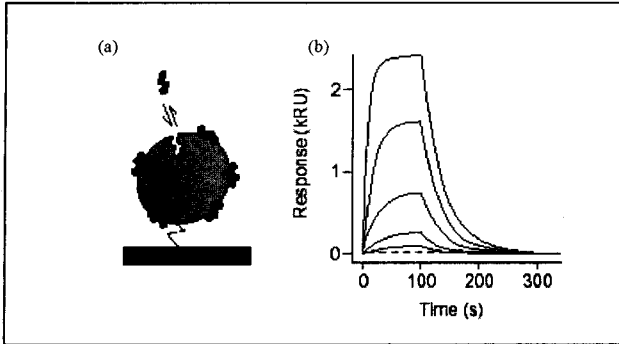


Fig. 9 Target 단백질에 대한 비 특이적인 결합

- (a) 비 특이적으로 다수의 site에 결합하는 효소 결합의 도식적 표현
- (b) 비 특이적 반응이 관찰되는 효소-반응 억제제 상호작용의 SPR 반응 data 유입농도를 0, 3.3, 1.1, 0.12 μ M로 다르게 했으며 특이적인 결합 즉, 단일 site 상호작용시 약 ~20RU로 추정되는 반응 세기(점선표시) 보다 훨씬 강한 세기를 나타내고 있다.

는 small molecule screening에 우수한 성능을 나타내며, 그 사례가 Markgren 등에 의해 보고되었다.²² 이들은 SPR 센서를 이용한 HIV proteinase에 대한 small molecule 반응 억제제의 결합을 관측할 수 있는 유용한 방법을 제안했다. Proteinase 결합 합성물을 확인하고 결합, 해리속도를 근거로 결합 정도를 파악할 수 있다는 것이다.

이처럼 SPR센서는 결합 반응속도론적 연구가 가능하므로 표적(target)분자에 어떤 화합물이 일차 screen으로 생성 가능할지 추론할 수 있다. 예를 들어 유사한 친화도를 갖고 전혀 다른 반응속도를 가진 두 화합물의 경우 생성에 관련된 구체적 정보를 얻을 수 있으며, 이러한 high resolution의 반응속도 정보는 신약개발 분야에서 매우 유용하다.

3.2.4 Non-specific interaction

SPR센서의 중요한 가능성은 특정 표적 분자와 결합하는 특이 반응에 있지만, 비 특이적인 작용이 유용하게 사용되는 경우도 있다. 예를 들어 일차적으로 효소 screen에 선별된 화합물의 결합의 분석할 때 SPR센서는 비 특이적으로 표적분자에 결합하는 양상을 나타낸다. Fig.9에서 보여주는 것처럼 일차 선별된 표적효소를 센서 표면에 고정시키고 가능성 있는 반응 억제제의 결합을 관찰한다.²¹ 주어진 표면에 결합된 효소의 양에 따라 이들 반응 신호는 화학양론적인 효소-반응 억제제 화합물 신호보다 훨씬 크게 나타

난다. 이것은 다수의 효소 반응 site에 결합이 이루어졌음을 의미하며, 이러한 예는 불규칙하게 결합하는 화합물 확인하고자 할 때 SPR 센서가 유용하다는 것을 보여주고 있다.

3.2.5 Proteomics

유전자 분석을 위한 DNA칩의 경우 극미량의 특정 유전자를 PCR 방법으로 증폭하여 분석에 필요한 양을 만들 수 있지만 단백질의 경우에는 실험에 필요한 절대량을 확보하는 것이 용이하지 않다. 따라서 극소량의 특정 단백질을 검출, 정량화하기 위해서는 정밀도 높은 분석기술이 요구되며 대표적인 분석기술은 2차원 전기영동법과 질량분석법 (MALDI-TOF MS, SELDI-TOF MS)이다.

SPR시스템은 1 ng/mm²의 질량변화까지 검출할 수 있어 pM (10⁻¹²M) 수준까지 측정이 가능하며 분자량으로는 180 Da 정도의 저 분자부터 세포수준까지 측정할 수 있다. 신약개발에 필수적인 저 분자의 검색과 새로운 단백질 발견, 면역센서에 사용되는 분석방법 개발, 세포 내 물질들 간의 조절 기작 연구 등 다양한 생화학적 연구를 수행할 수 있다. 특히 기존의 분석법이 형광물질이나 방사선 물질의 표식이 필요한 반면 이 방법은 이러한 과정을 생략할 수 있어 label-free 면역분석이 가능하다는 데 있다. 이런 장점 때문에 최근에는 다수의 단백질을 array 형태로 배열한 단백질 칩 상에서도 SPR image 신호를 검출 하려는 시도가 이루어지고 있다. 이 분야의 응용 예로서 SPR은 세포 배양액이나 cell extract 혹은 body fluid에서 얻어진 치료로부터 orphan receptor를 찾는 orphan ligand screening의 논리적인 방법이 될 수 있다는 것이다. SPR센서를 이용하여 Lackmann²³ 등이 kinase ligand를 확인하고 순도를 계측하는 방법을 개발했고, Sakano등은 HTK 융합 단백질을 위한 ligand를 확인하고자 cell line screening에 SPR을 이용한 바 있다.²⁴

3.3 기타 응용

물리적, 생물학적 응용 외에도 SPR센서는 환경관련 산업에서 그 가능성이 증대되고 있다. 이는 SPR의 선택적 인식 기능성 감지막 기술과 결합하여 환경에 유해한 중금속이

(Table 2) 광학적 바이오센서 (Optical biosensor) 기기와 제조업체 25

Affinity sensors	IAsys, IAsys Plus, IAsys Auto	www.affinity-sensors.com
Analytical μ - System	BIO-SUPLAR2	www.micro-systems.de
AVIV Instruments	PWR Model 400	www.avivinst.com
Biacore AB	BICORE 1000, 2000, 3000, X, J 등	www.biacore.com
Farfield Sensors Ltd	AnaLight Bio250	www.farfield-sensors.co.uk
Graffinity	Plasmon Imager	www.graffinity.com
HTS Biosystems	SPR array	www.htsbiosystems.com
IBIS Technologies	IBIS I, IBIS II	www.ibis-spr.nl
KMAC	SPRiLAB	www.kmac.to
Leica	Prototype	www.leica-ead.com
Luna Innovations	Fiber Optic prototype	www.lunainnovations.com
Prolinx	OCTAVE	www.prolinxinc.com
Quantech Ltd	FasTraQ SPR array	www.quantechltd.com
SRU biosystems	BIND	www.srubiosystems.com
Texas Instruments	Spreeta	www.ti.com/sc/docs/products/msp/control/spreeta
ThreeFold Sensors	Label-free prototype	http://ic.net/~tfs

온 등을 낮은 농도에서 그리고 높은 감도로 검출할 수 있으므로 환경분야의 응용에 우수한 특성을 나타내고 있다. 특히 fiber형 SPR센서 시스템의 발달로 인한 on-line 감시체계 개발과 실시간 다점(multipoint)측정의 가능성으로 많은 연구가 진행되고 있다. 이외에도 식품가공업, 수질 관리 등 그 응용분야는 계속 확대될 것으로 예측된다.

4. 표면 플라즈몬 공명(SPR) 제품 개발 동향

생체 분자 감지를 위한 바이오센서로서 SPR 현상의 이용은 연구자들의 비약적인 관심의 증대를 가져오고 있으며, 이미 상용화 된 제품들이 다양하게 출시되고 있는 실정이다.

최근 SPR 관련 기업들의 기술적 동향은 High Throughput Screening과 관련하여 시료의 측정 site를 Array형태와 Micro-Fluidics기술을 바탕으로 발전하고 있는 추세이다. 또한 SPR을 이용해 2차원 신호처리가 가능해짐에 따라 DNA칩, 단백질 칩과 같은 2차원 평면의 SPR image 신호검출 시도가 이루어지고 있으며, grating이나 평판 waveguide를 이용하여 프리즘과 같은 접촉광학계 도

움 없이도 SPR현상을 유도할 수 있다.

Table 2은 현재 바이오 시장에서 소개되고 있는 SPR을 포함한 광학적 바이오센서 제품군의 기기명과 제조업체 등을 간략하게 소개한 것이다. Fig.10은 상용화된 SPR 센서 시스템의 제품군들을 나타내고 있는데, 가장 선도적인 BIACORE series를 비롯하여 국내 최초로 제품화 된 케이맥의 SPRiLAB등이 있다.

5. 결론

모든 생명 현상은 단백질-단백질, 단백질-리간드(ligand), 리셉터(receptor)-리간드, 항원-항체, 효소-기질, 단백질-DNA사이의 분자인식(biomolecular recognition)과 기능적인 상호작용에 의해 유지된다. 따라서 이러한 생체분자 사이의 상호작용이나 인식반응을 밝히는 연구는 생명 과학, 보건 및 의료 분야 등에서 중요한 연구과제가 되고 있다. 구체적으로, 생체분자 사이의 상호작용 분석은 인체 질병의 조기진단이나 원인 규명, 생물체 내에서의 신호 전달 체계 해석, proteomics, 신약 개발을 위한 HTS(High throughput screening) 시스템의 개발 등

에 결정적인 요소가 되고 있다.

바이오센서 분야에서 우수한 활용성을 가진 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance) 현상은 금속박막 상에 발생하는 전자들의 진동을 광학적인 방법으로 유도하는 것을 말한다. SPR이 바이오센서로서 사용하기에 적합한 이유는 SPR 현상이 금속박막의 표면 근처에서 일어나는 물리 화학적인 변화에 매우 민감하게 영향을 받기 때문에 금속 박막의 화학적 표면 개질을 기반으로 한 다양한 감지계면 생성을 통해 여러 가지 생체 분자의 상호작용을 관측할

수 있다는 것이다. 더구나 SPR은 다른 방법에 비해 시료손상이나 변형이 없는 비 파괴적인 분석방법이며 형광법처럼 표식자를 추가하지 않아도 고감도로 생화학적 반응을 측정할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

현재 바이오센서의 응용범위는 의료·의약 분야 이외에도 환경, 식품 등 다양한 분야에서 활용되고 있으며 그 시장 규모가 비약적으로 성장하고 있다. 따라서 바이오센서로서 SPR 시스템은 활용가치적 측면에서 중요성이 점차 더 부각되고 있다. ●

Reference

1. R.W. Wood, *Phil. Magm.* 4, 396-402 (1902)
2. E.Kretschmann, H. Raether, *Z. Naturforsch.* 23A, 2135-2136 (1968)
3. A.Otto, *Z. Physik* 216, 398-410 (1968)
4. I. Pockrand, J.D. Swalen, J.G. Gordon, M.R. Philpott *Surface Sci.* 74, 237-244 (1978)
5. J.G. Gordon II, S. Ernst *Surface Sci.* 101, 499-506 (1980)
6. C. Nylander, B. Liedberg, T. Lind, *Sensors and Actuators* 3, 79-88 (1982)
7. B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom *Biosensors Bioelectron.* 10, i-ix (1995)
8. De Bruijn HE, Kooyman RPH, Greve J. *Appl. Opt* 31, 440-442 (1992)
9. Mirabella, E.M. and Harrick, N.J., "International reflection Spectroscopy : Review and Supplement" *Harrick Scientific Corporation* 3 (1995)
10. Biacore technology note "Surface Plasmon Resonance" www.biacore.com
11. R.J. Green, R.A. Frazier, K.M. Shakesheff, M.C. Davies et al. *Biomaterials* 21, 1823-1835 (2000)
12. Matsubara K, Kawata S, Minami S. *Appl. Spectrosc.* 42, 1375-1379 (1988)
13. Fagerstam, L.G. et al. *J. Chromatogr.* 597, 397-410 (1992)
14. J. Homola, Sinclair S. Yee, et al. *Sensors and Actuators B* 54, 3-15 (1999)
15. Hall. D. *Analytical Biochemistry* 288, 109-125 (2001)
16. Lackmann M., Bucci T. Mann RJ. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2523-2527 (1996)
17. Markgren P-O, Danielson U. *Anal. Biochem.* 265, 340-350 (1999)
18. Zeder-Lutz G., Neurath AR, Van R. *Biologicals* 27, 29-34 (1999)
19. Mysaka D.G., Jonsen M.D. Graves B.J. *Anal. Biochem* 26, 326-330 (1998)
20. Rebecca L.R., David G.M. *Biotechnology* 11, 54-61 (2000)
21. David G.M., Rebecca L.R. *PSTT* 3, 310-317 (2000)
22. Markgren, P.O et al. *Anal. Biochem.* 265, 340-350 (1998)
23. Lackmann M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2523-2527 (1996)
24. Sakano S. et al. *Oncogene* 13, 813-822 (1996)
25. Cheryl L. B., David G. M. *J. Mol. Recognit.* 14, 261-268 (2001)