

압전류적 면역센서에 의한 잉어 Vitellogenin 검출

김남수* · 박인선 · 김우연¹

한국식품연구원, ¹중앙대학교 생명공학과

Detection of Carp Vitellogenin with Piezoelectric Immunosensor

Namsoo Kim*, In-Seon Park and Woo-Yeon Kim¹

Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea

¹Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea

Received June 27, 2006; Accepted September 7, 2006

Vitellogenin has been known as a potent biomarker protein for the estrogenic activity in fish exposed to endocrine disruptors. In this study, a piezoelectric immunosensor making use of an anti-carp vitellogenin antibody and an AT-cut quartz crystal microbalance as the biological component and transducer was prepared, followed by its application to the analysis of carp vitellogenin as follows. Antibody immobilization was conducted by chemisorption of a thiolated antibody with a heterobifunctional thiolation cross-linker, sulfosuccinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)propionamido]hexanoate. The reaction buffer for the immunosensor system was optimized as 0.1 M sodium phosphate (pH 7.4). Concentration-dependent sensor responses were obtained in the vitellogenin concentrations ranging from 0.4864 to 486.4000 nM, with a linear correlation between vitellogenin concentration and frequency shift in double-logarithmic scale. The limit of detection of the immunosensor for carp vitellogenin was presumed as 0.4864 nM.

Key words: Biomarker protein, carp vitellogenin, piezoelectric immunosensor, detection

서 론

내분비계장애물질(endocrine disruptor)은 그 화학구조가 생명의 호르몬과 비슷하여 생명체에 흡수될 경우 정상적인 호르몬의 기능을 혼란시킴으로써 생태계를 파괴하고 먹이사슬(food chain)을 통하여 궁극적으로는 인간의 생식기능 저하, 기형, 성장장애, 암 등을 유발하는 물질로서 확인되고 있다.

내분비계장애물질에 노출된 잉어(carp), 무지개송어(rainbow trout), 광어(flat fish), 도미(sea bream) 등의 대부분 식용어류에서는 유전자발현에 의하여 오염지표단백질로서 에스트로겐 의존성의 난황단백질 전구체인, phospholipoglycoprotein으로서 vitellogenin이 정상어류보다 고농도로 분비되어 혈액 중에 축적되며 이 때 그 발현정도는 최대 백만배(혈청 vitellogenin 농도가 ng/ml 수준에서 mg/ml 수준까지 증가)에 이르는 것으로 보고되고 있다.^{1,2)}

현재 세계적으로 연구되고 있는 vitellogenin 검사법을 크게 분류하면 유전자 발현산물인 단백질 자체를 검색하는 방법과 유전자 수준에서 간접적으로 검색하는 방법으로 구분할 수 있

다.^{3,4)} 전자의 방법으로는 전기영동 및 Western blotting 결과를 비교하여 정량하는 방법⁵⁾과 효소면역분석법을 위주로 하는 면역분석법 등^{6,7)}이 보고되고 있고 후자의 방법으로는 전사산물인 mRNA를 분석하는 reverse transcriptase-polymerase chain reaction 방법 등^{8,9)}이 보고되고 있다. 이들 중 vitellogenin 직접 측정법으로 보다 신뢰성 있는 면역분석법의 일반적인 검출한계는 1~2 ng/ml로 보고되고 있으며,^{10,11)} 다클론항체를 이용한 실험에서는 일반적으로 동종에서 제조한 항체만이 동종의 vitellogenin을 정확하게 정량할 수 있으나 몇몇 vitellogenin 항체의 경우에는 분류학적 상관성에 따라 다른 어류의 vitellogenin 과 교차반응함이 알려지고 있다.^{12,13)}

그러나 이들 방법은 측정과정이 상대적으로 복잡하고 색소물질 등에 의한 계측저해현상이나 시료에 의한 매트릭스 효과가 발생할 수 있으며, 근본적으로는 실험실적 방법으로서 양식장 등에서의 현장적용에는 한계가 있어 vitellogenin 검사의 센서화기술에 대한 개발 필요성이 매우 높게 제기되고 있다. 이러한 센서화기술의 개발을 통하여 식용어류의 내분비계장애물질 오염여부를 파악할 수 있고 양성시료를 대상으로 기기분석법 등에 의한 정밀분석을 행할 수 있는 근거를 제공할 수 있으리라 기대된다.

본 연구에서는 국내의 대표적 담수어 어종의 하나인 잉어를 에스트로겐 화합물의 하나인 17 β -estradiol로 처리하여 그 발현

*Corresponding author

Phone: +82-31-780-9131; Fax: +82-31-709-9876

E-mail: k9130sen@hanmail.net

을 유도한 후 정제과정을 통하여 vitellogenin 단백질을 제조하였다. 이 단백질을 사용하여 제작한 다클론항체(polyclonal antibody)를 생물요소(biological component)로 하여 수정진동자(quartz crystal microbalance, QCM)상에 고정화함으로써 센서 chip을 제작하였다. 이 chip을 이용하여 잉어 vitellogenin에 대한 직접결합방식의 비표지 면역센서(label-free immunosensor) 계측을 행하였기에 결과로서 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 실험재료. 변환기(transducer)로서의 수정진동자는 Seiko EG & G사(Japan)에서 구입한 9 MHz의 AT-cut 압전수정웨이퍼를 사용하였는데, 여기에는 5 mm 직경의 금 전극이 아래 위로 장착되어 있으며 진동반응의 재현성은 ± 0.1 Hz 수준이었다. 수정진동자상으로서의 항체 고정화에 필요한 이형이기능성 티올화 가교화제인 sulfosuccinimidyl 6-[3-(2-pyridyl)thio]propionamido]hexanoate(sulfo-LC-SPDP)는 Pierce사(IL, USA)에서 구입하였으며 완충용액 제조를 위한 염류, dithiothreitol 및 기타 시약류는 Sigma사(MO, USA)의 것이었고 증류수를 사용하여 실험에 필요한 각종 용액을 제조하였다.

잉어 vitellogenin의 정제 및 이를 이용한 항체제작. 잉어 vitellogenin의 정제와 정제단백질을 이용한 토끼로부터의 다클론항체 제작은 문 등의 방법¹⁴⁾에 의하여 행하였다. Analyte로서는 앞의 방법에 따라 최종정제 된 잉어 vitellogenin을 사용하였으며 단백질함량 측정은 Bradford의 microprotein assay¹⁵⁾에 따라 bovine serum albumin을 표준시약으로 하여 행하였다.

센서 chip으로서의 항체 고정화. 수정진동자의 금 전극으로서의 잉어 vitellogenin에 대한 항체의 고정화는 *Salmonella* spp.에 대한 압전류적 면역센서 계측과 관련된 기존의 연구결과 그 효율성이 확인된 바 있는, 티올화 항체를 이용한 단분자층(self-assembled monolayer) 형성법¹⁶⁾에 근거하여 아래와 같이 수행하였다. 즉 수정결정의 금전극 표면을 전극선이 닿지 않도록 주의하며 1.2 M NaOH와 1.2 M HCl 용액에 각각 5분간 순차적으로 담그고 그 사이에 각각 증류수로 세척하였다. 이 후 20분간 건조시킨 후 토끼혈청을 5배 희석한 항체용액 3 μ l와 증류수에 용해된 동량의 20 mM sulfo-LC-SPDP 용액을 1시간 반응시키고 2 μ l의 dithiothreitol로 30분간 처리하여 disulfide bond가 환원된 thiol화 항체를 제조하였다. 이를 수정결정상에 고르게 도포하여 항체를 고정화한 후 증류수와 반응완충용액인 0.1 M sodium phosphate(pH 7.4)로 씻어주었다.

직접결합방식의 면역센서 시스템 구성 및 센서반응 측정. 잉어 vitellogenin을 검출할 수 있는 batch형 면역센서 시스템을 다음과 같이 구성하였다.¹⁷⁾ 먼저 항체가 고정화된 수정진동자 센서 chip을 dip holder의 내부에 장착하고 이를 진동수측정기(QCA 917, Seiko EG & G사)에 연결된 발진모듈(QCA 917-11, Seiko EG & G사)의 접속부에 삽입하였다. 이 때 진동수측정기에 나타나는 아날로그 신호는 GPIB interface에 의하여 디지털 신호로 PC에 입력되었다. 시스템의 작동은 WinEchem software (version 1.12, Seiko EG & G사)에 의하여 다음과 같이 수행하였다. 즉 자체 제작한 반응 cell에 6 ml의 반응완충용액을 가한

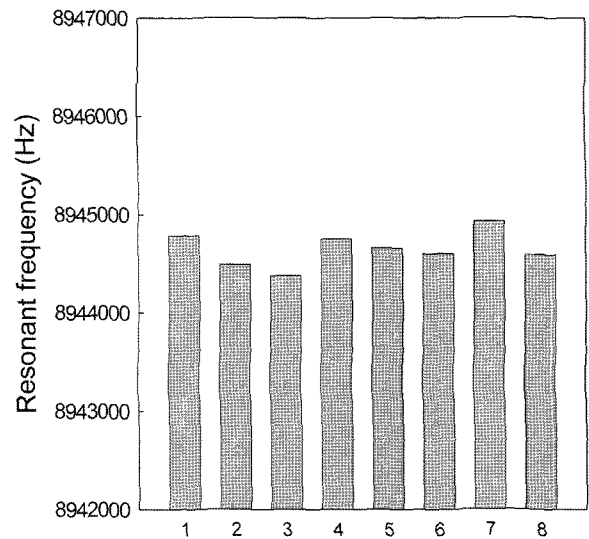


Fig. 1. Resonant frequencies according to air and bulk solutions for QCM analysis. Seven values of resonant frequency at adjacent measuring time were averaged after the steady-state sensor response was attained and the error bars were inserted. Arabic numerals 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 indicate distilled water, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 M sodium phosphate (pH 6.5), 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0), 0.1 M sodium phosphate (pH 7.2), 0.1 M sodium phosphate (pH 7.4), 0.1 M sodium phosphate (pH 7.5) and 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0), respectively.

후 잉어 vitellogenin에 대한 항체를 고정화하여 제조한 수정진동자 센서 chip이 장착된 dip holder를 침지하고 공명진동수 변화를 측정하여 정상상태(steady-state)의 공명진동수(F_1)를 확인하였다. 이 후 반응완충용액으로 희석한 잉어 vitellogenin 용액 2 ml를 반응 cell에 가하여 항원·항체반응을 유도하였다. 이 때 Sauerbrey식¹⁸⁾에 의하여 센서 chip 표면에서 질량축적에 따른 진동수감소가 나타나기 시작하여 일정시간 경과 후 정상상태의 공명진동수(F_2)가 성립되었으며 이로부터 센서반응에 해당하는 진동수변화(frequency shift, ΔF)를 계산하였다($\Delta F = F_1 - F_2$).

결과 및 고찰

반응완충용액의 설정. 본 연구의 면역센서 작동을 위한 반응완충용액을 결정하기 위하여 pH별로 제조한 0.1 M sodium phosphate에서의 수정진동자의 공명진동수를 증류수 및 0.1 M Tris-HCl(pH 7.4)에서의 그것과 비교하였다(Fig. 1). 대체로 완충용액에서의 수정진동자 센서 chip의 공명진동수는 증류수내에서 보다 낮았으며 0.1 M Tris-HCl(pH 7.4)에서도 안정된 진동특성을 보여주었으나 본 연구에서는 수정진동자에 의한 공명진동수 측정 시 인산완충용액이 진동신호의 안정성이 양호하여 보편적으로 사용됨¹⁹⁾을 고려하여 sodium phosphate를 선택하였고 이 때 센서 chip은 pH 6.5~8.0의 인산완충용액에서 모두 안정된 진동특성을 보여주어 어떠한 pH값을 선택하여도 좋을 것으로 생각되었으므로 항체용액의 제조에 사용된 것과 같은 pH 7.4의 인산완충용액을 사용하고자 하였다.

0.1 M을 포함하여 sodium phosphate(pH 7.4)의 이온강도에 따른 수정진동자의 공명진동수는 Fig. 2와 같으며 이온강도가

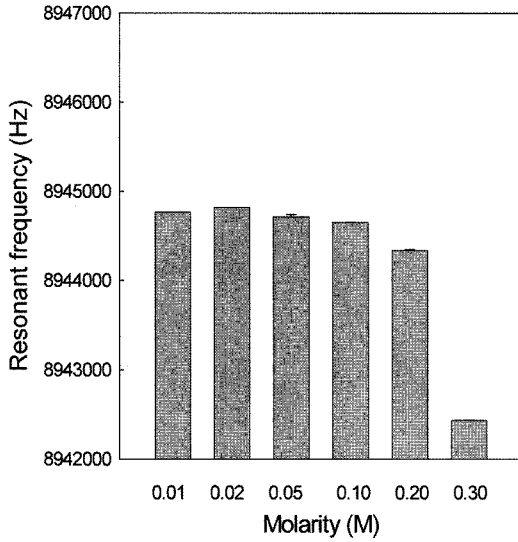


Fig. 2. Resonant frequencies according to the ionic strength of the selected sodium phosphate (pH 7.4). Seven values of resonant frequency at adjacent measuring time were averaged after the steady-state sensor response was attained and the error bars were inserted.

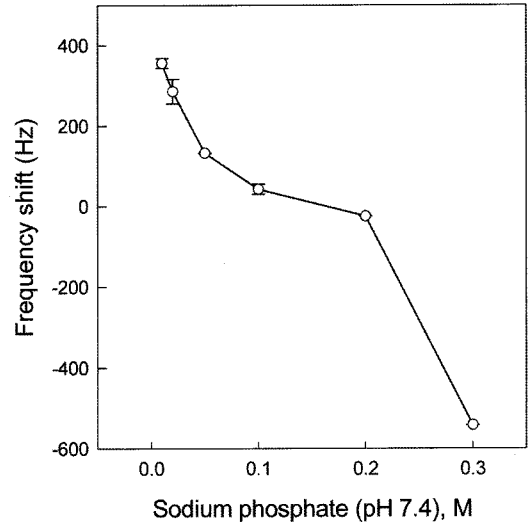


Fig. 3. Frequency shifts according to the injection of carp serum into the selected sodium phosphates (pH 7.4) differing in molarity. Seven values of frequency shift at adjacent measuring time were averaged after the steady-state sensor response was attained and the error bars were inserted.

높아질수록 대체로 공명진동수는 감소하는 것으로 나타났다. 본 연구의 실험대상인 잉어의 혈액을 채취한 후 저속으로 원심분리 하여 이온강도에 따른 매트릭스 효과를 평가할 혈청시료를 제조하였다. 이를 dip holder형 면역센서 시스템의 반응 cell에 주입하여 진동수변화를 측정하였다(Fig. 3). 완충용액의 몰 농도가 증가할수록 매트릭스 효과는 감소하여 0.1~0.2 M에 이르면 혈청자체에 의한 진동수변화는 거의 존재하지 않는 것으로 나타났다. 이 결과는 높은 이온강도의 완충용액을 사용하면 수정진동자 센서에 의한 *Pseudomonas aeruginosa* 검출 시 배지에 의한 매트릭스 효과를 최소화할 수 있다는 기존의 보고²⁰⁾와도 일치하는 경향이였다. 그러나 이온강도가 이보다 높아져

0.3 M에 이르면 시스템의 급격한 불안정화와 함께 공명진동수가 오히려 현저하게 증가하므로 0.1~0.2 M의 범위에 해당하는 이온강도의 완충용액을 사용하는 것이 타당할 것으로 생각되었고 본 연구에서는 면역센서 시스템의 안정성을 고려하여 0.1 M sodium phosphate(pH 7.4)를 잉어 vitellogenin 검출을 위한 반응완충용액으로 최종 선정하였다.

압전류적 면역센서에 의한 vitellogenin 검출. 잉어 vitellogenin에 대한 항체가 고정화된 수정진동자 센서 chip을 사용하여 본 연구의 면역센서에 의한 잉어 vitellogenin의 검출을 행하였다. 이 때 vitellogenin 농도가 각각 0.4864, 4.8640, 48.6400 및 486.4000 nM인 경우 센서반응으로서의 진동수변화는 각각 38.7

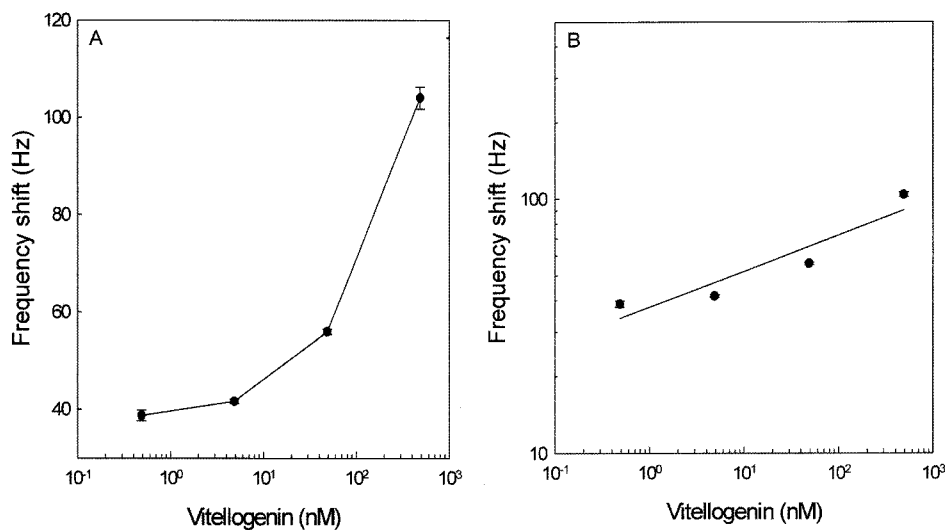


Fig. 4. Relationships between carp vitellogenin concentration and frequency shift obtained in a semi-logarithmic scale (A) and double-logarithmic one (B). Seven values of frequency shift at adjacent measuring time were averaged after the steady-state sensor response was attained and the error bars were inserted. The frequency shift obtained with the injection of the reaction buffer was 18.6 ± 2.6 Hz.

± 1.1 , 41.6 ± 0.4 , 55.9 ± 0.5 및 104.0 ± 2.3 Hz로서 농도 의존적이었다. 반응 cell로 반응완충용액 자체를 주입하였을 때의 진동수변화가 18.6 ± 2.6 Hz인 점을 고려해 볼 때 잉어 vitellogenin 이 항원·항체반응에 의하여 센서 chip에 결합하고 이에 따른 질량축적에 의하여 센서반응이 나타났음을 알 수 있었다.¹⁸⁾ 이때 vitellogenin은 에스트로겐 활성을 지닌 내분비계장애물질에 의하여 유도되므로 본 연구의 면역센서는 농약, 항생제 등 다른 환경오염물질의 공존 시에도 내분비계장애물질에 의한 오염 여부를 선택적으로 나타낼 것으로 기대된다.¹²⁾

Fig. 4와 같이 잉어 vitellogenin 농도와 진동수변화와의 관계를 반대수척도(semi-logarithmic scale)로 도시하면 진동수변화가 vitellogenin 농도에 의하여 결정되는 전형적인 1차반응 특성을 나타내었으며 이를 이중로그척도(double-logarithmic scale)로 표시하면 직선상의 관계를 보여주었고²¹⁾ 그 식은 $Y = 0.1416X + 1.5747$ ($r = 0.9356$)이었다(X 와 Y 는 각각 vitellogenin 농도와 진동수변화임). 또한 잉어 vitellogenin에 대한 검출한계는 0.4864 nM로 추정되었는데 이는 내분비계장애물질에 오염되어 vitellogenin 발현이 유도된 어류의 혈청에서의 vitellogenin 농도보다 낮은 농도이다.¹³⁾

이상의 결과로부터 본 연구의 직접결합방식의 압전류적 면역센서는 내분비계장애물질에 의하여 어류 체내에서 유도되는 에스트로겐 활성의 주요지표인 vitellogenin을 검출하는 분석수단이 될 수 있음을 확인하였으며 이를 이용하여 향후 양식어류의 혈청 중 vitellogenin 분석을 행할 예정이다. 본 연구의 시스템은 PC에 의하여 작동되어 실시간으로 센서반응의 변화를 모니터링 할 수 있고 비표지 계측특성으로 방사성 동위원소나 형광 혹은 효소 label을 사용하지 않으므로 식품안전성 및 기능성과 관련된 다른 바이오마커 단백질에 대한 계측수단으로서도 활용 할 수 있을 것으로 기대되며, 본 연구에서 자체 제작한 항체는 높은 항체활성을 지니고 있었고 기존의 상용항체 $100 \mu\text{l}$ 들이 한 vial의 가격이 수십만원 정도 하는 현실을 고려해볼 때 실용화가능성이 높은 것으로 여겨진다.

초 록

내분비계장애물질에 노출된 어류의 에스트로겐 활성에 대한 생물지표단백질인 vitellogenin을 검출하는 압전류적 면역센서를 잉어 vitellogenin에 대한 항체와 AT-cut 수정진동자를 생물요소와 변환기로 사용하여 구성하고 이를 이용한 잉어 vitellogenin 검출을 행하였다. 이형이가능성의 티올화 가교화제인 sulfosuccinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)propionamido]hexanoate 처리에 의하여 티올화된 항체를 수정진동자상의 금전극에 화학 흡착법에 의하여 고정화하여 센서 chip을 제조하였다. 센서반응을 위한 반응완충용액을 0.1 M sodium phosphate(pH 7.4)로 선정 후 0.4864 ~ 486.4000 nM의 vitellogenin 용액을 가하였을 때 농도의존적인 센서반응의 증가가 나타났으며 이 때 잉어 vitellogenin에 대한 검출한계는 0.4864 nM로 추정되었다.

Key words: 생물지표단백질, vitellogenin, 압전류적 면역센서, 검출

감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 연구과제 E063003에 의하여 수행 되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Chen, T. T. (1983) Identification and characterization of estrogen-responsive gene products in the liver of rainbow trout. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 802-810.
- Tyler, C. R., Van der Eerden, B., Sumpter, J. P., Jobling, S. and Painter, G. (1996) Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogen, in a wide variety of cyprinids. *J. Comp. Physiol.* **166**, 418-426.
- Tada, N., Saka, M., Ueda, Y., Hoshi, H., Uemura, T. and Kamata, Y. (2004) Comparative analyses of serum vitellogenin levels in male and female Reeves' pond turtles (*Chinemys reevesii*) by an immunological assay. *J. Comp. Physiol. B* **174**, 13-20.
- Inui, M., Adachi, T., Inui, H., Nakazawa, M., Ueda, M., Watanabe, H., Mori, C., Iguchi, T. and Miyatake, K. (2003) Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicol.* **194**, 43-50.
- Versonnen, B. J., Goemans, G., Belpaire, C. and Janssen, C. R. (2004) Vitellogenin content in European eel (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium. *Environ. Pollut.* **128**, 363-371.
- Mitsui, N., Tooi, O. and Kawahara, A. (2003) Sandwich ELISAs for quantification of *Xenopus laevis* vitellogenin and albumin and their application to measurement of estradiol-17 β effects on whole animals and primary-cultured hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **135**, 305-313.
- Prakash Vincent, S. G., Keller, R. and Subramoniam, T. (2001) Development of vitellogenin-ELISA, an *in vivo* bioassay, and identification of two vitellogenesis-inhibiting hormones of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mar. Biotechnol.* **3**, 561-571.
- Custodia-Lora, N., Novillo, A. and Callard, I. P. (2004) Effect of gonadal steroids on progesterone receptor, estrogen receptor, and vitellogenin expression in male turtles (*Chrysemys picta*). *J. Exp. Zoology* **301A**, 15-25.
- Celius, T., Matthews, J. B., Giesy, J. P. and Zacharewski, T. R. (2000) Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) zona radiata and vitellogenin mRNA levels using real-time PCR after *in vivo* treatment with estradiol-17 beta or alpha-zearalenol. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* **75**, 109-119.
- Okumura, H., Han, C. H., Suzuki, Y., Aida, K. and Hanyu, I. (1992) Changes in hemolymph vitellogenin and ecdysteroid levels during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*. *Zool. Sci.* **9**, 37-45.
- Parks, L. G., Cheek, A. O., Denslow, N. D., Heppell, S. A., McLachlan, J. A., LeBlanc, G. A. and Sullivan, C. V. (1999) Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comp. Biochem. Physiol. C* **123**, 113-125.

12. Heppell, S. A., Denslow, N. D., Folmar, L. C. and Sullivan, C. V. (1995) Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.* **103**, 9-15.
13. Tyler, C. R., Van Aerle, R., Nilsen, M. V., Blackwell, R., Maddix, S., Nilsen, B. M., Berg, K., Hutchinson, T. H. and Goksoyr, A. (2002) Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay to quantify vitellogenin for studies on environmental estrogens in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 47-54.
14. Moon, D.-K., Kim, N. and Kim, W.-Y. (2006) Reactivity of the antibodies against purified carp vitellogenin and a synthetic vitellogenin peptide. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* Submitted for publication.
15. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
16. Park, I.-S. and Kim, N. (1998) Thiolated *Salmonella* antibody immobilization onto the gold surface of piezoelectric quartz crystal. *Biosens. Bioelectron.* **13**, 1091-1097.
17. Kim, N., Park, I.-S. and Kim, D.-K. (2006) Optimization of quartz crystal microbalance-precipitation sensor measuring acetylcholinesterase activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* In Press.
18. Sauerbrey, G. (1959) Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Z. Phys.* **155**, 206-222.
19. Park, I.-S. and Kim, N. (1999) Rapid detection of *Salmonella* spp. by antibody immobilization with gold-protein A complex. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 1-6.
20. Kim, N., Park, I.-S. and Kim, D.-K. (2004) Characteristics of a label-free piezoelectric immunosensor detecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Sensors Actuat. B: Chem.* **100**, 432-438.
21. Park, I.-S., Kim, W.-Y. and Kim, N. (2000) Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting *Salmonella* spp. *Biosens. Bioelectron.* **15**, 167-172.