

Thiolated protein G로 개질된 SPR 센서 칩을 이용한 IgG 검출

신은정 · 이연경 · 손영수*

Detection of IgG Using Thiolated Protein G Modified SPR Sensor Chip

Eun Jung Sin, Yeon Kyung Lee, and Young-Soo Sohn*

Abstract

A portable surface plasmon resonance (SPR) based immunosensor using thiolated protein G and protein G was developed for the detection of immunoglobulin G (IgG). The protein G has specific affinity with Fc fragment of IgG and was thiolated by 2-Iminothiolane for introduction of thiol groups. Anti-IgG, bovine serum albumin (BSA), and IgG have been sequentially injected after surface modification of gold sensor chip with protein G and thiolated protein G. The output signal was increased with the injection of each protein and the actual signal was measured by subtracting signal of reference channel from signal of sample injected channel. The experimental results showed the higher detection capability of IgG using thiolated protein G compared with protein G. From these results, we can conclude that the current surface modification technique and the portable SPR sensor system can be applied to various immunosensors for diagnosis.

Keywords : Surface Plasmon Resonance, Immunosensor, Protein G, Thiolation, Immunoglobulin G

1. 서론

최근 의료 기술의 발달과 함께 평균 수명이 연장되면서 건강에 대한 관심이 증가하고 있다[1]. 만성질환을 포함한 다양한 질병을 조기에 진단하면 환자의 생존율을 높일 뿐만 아니라 많은 의료비용을 절감할 수 있기 때문에 의료 기술의 패러다임이 치료에서 조기 진단으로 변화하고 있다[1, 2]. 조기 진단을 위해 연구되는 대표적인 기술이 바로 바이오센서의 일종인 면역센서이다. 면역센서는 항원과 항체의 특이적인 결합 능력을 이용하여 항원 혹은 항체를 선택적으로 측정하는 센서이다. 이러한 면역센서는 극미량으로도 정밀한 생체 물질의 측정이 가능하여 1960년대 초부터 지금까지 건강의 진단과 진료에 있어서 중요한 정보를 제공해 왔다[3]. 면역센서로 활용하기 위해 연구되고 있는 대표적인 센서로는 Quartz Crystal Microbalance (QCM)[4], Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (OWLS)[5, 6], Surface Plasmon Resonance (SPR)[7], Field Effect Transistor (FET)[8], Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)[9] 등이 있는데, 이 중 SPR 센서가 최근 주목을 받고 있다. SPR 센서는 금속 박막 표면에서 일어나는 물리 화학

적인 변화를 측정하는 센서로, 별도의 표식 없이 시료를 손상시키거나 변형을 주지 않고 생분자 간의 상호작용을 실시간으로 측정할 수 있다. 또한 높은 감도를 가지기 때문에 극미량의 시료를 측정할 수 있으며 소형화뿐 아니라 경량화와 상용화에 유리한 장점을 지니고 있다[7, 10, 11]. 이러한 SPR 면역센서의 민감도를 향상시키려면 센서 칩 표면에 항체를 효율적으로 고정하는 것이 중요하다[12]. 항체의 효율적인 고정화는 면역센서뿐만 아니라 다양한 생물분석 기술에서 측정 감도를 높이기 위해 연구되는 핵심 기술 중 하나이다. 센서 칩 위에 항체를 고정화하는 여러 방법들이 개발되고 있는데, 그 중 항체를 고정화할 수 있는 리간드(ligand)를 다양한 물리화학적 방법으로 처리해 주는 기술이 널리 사용되고 있다[13, 14]. 항체 고정을 위한 리간드로는 self-assembled monolayer (SAM)[14]와 같은 화학물질이나 protein A[15], protein G[16]와 같은 단백질 등이 있다. 특히 protein A와 protein G는 항체의 일종인 면역 글로불린 G(IgG)의 Fc 분절과 특이적으로 결합하는 특성을 가지고 있다. 즉 항체 중에서도 항원과 결합하는 부위인 Fab 분절이 아닌 Fc 분절과 결합함으로써 항원의 결합 확률을 높일 수 있다. 이러한 리간드에 금속과 강한 결합력을 가지는 작용기를 도입하여 센서 칩 표면과의 자가 조립을 유도하는 등 보다 효율적인 항원 검출을 위한 연구가 이루어지고 있다[14-16]. 본 연구에서는 소형화된 SPR 센서 칩 표면에 protein G와 thiol group이 도입된 protein G(thiolated protein G)를 각각 형성시킨 후 anti-IgG를 고정시켜

대구가톨릭대학교 의공학과 (Department of Biomedical Engineering, Catholic University of Daegu)

*Corresponding author : sohny@cu.ac.kr

(Received : Oct. 7, 2011, Accepted : Nov. 8, 2011)

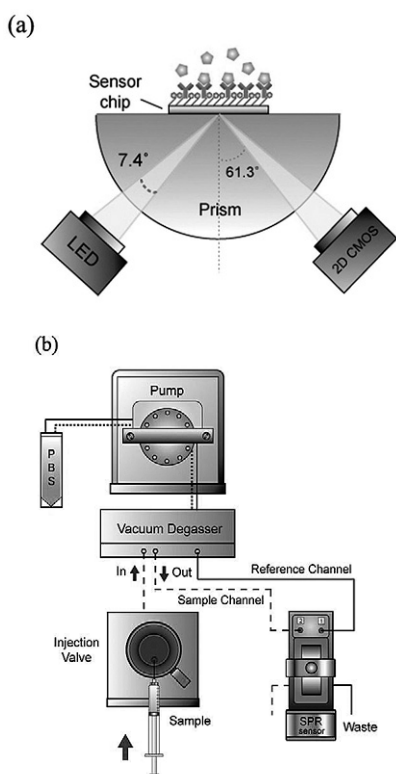


Fig. 1. The schematic diagram of the SPR sensor: (a) structure of the SPR sensor (b) experimental setup with the SPR system: The solid line represents the flow of the reference, and the dashed line the flow of the samples.

IgG를 검출하였다. 금과 강한 결합력을 가지는 thiol group을 protein G에 도입함으로써 센서 칩 표면에 보다 효율적으로 항체를 고정화 하고자 하였다. 실험 결과를 통하여 protein G와 thiolated protein G의 항체 고정화 성능을 비교 및 분석하고, 효율적인 항원 검출에 대하여 조사하였다.

2. 실험방법

2.1 SPR 센서

본 실험에서 활용한 센서는 소형 SPR 센서(K-MAC, Korea)로, 부피는 45 mm × 140 mm × 130 mm 이다. 이 SPR 센서는 Kretschmann 방식의 광학 모듈과 미량의 샘플을 제어할 수 있는 유체 모듈로 구성되어 있으며, 780 nm의 LED 광원과 2D-CMOS 광 검출기를 사용한다. 소형 SPR 센서의 구조를 Fig. 1 (a)에 나타내었다. 광원은 7.4° 범위의 빔(beam)을 내며, 이 빔은 프리즘을 통해 금속 박막에 입사된다. 2D-CMOS로 검출된 반사광의 세기가 최소가 될 때의 입사각을 인식하여 공명각으로 정의한다. 금속 박막 표면에 생분자가 흡착되면 굴절률이 변화하게 되며, 이로 인해 발생

하는 공명각의 변화를 실시간으로 측정하게 된다. 이를 기반으로 금속 박막 표면에서 일어나는 생분자들의 상호작용을 분석할 수 있다. 본 센서는 2개의 채널을 가지고 있으며, 하나의 채널에는 시료를 주입하고 다른 하나의 채널은 기준 채널(reference channel)로 사용하여 대조군으로 활용하면 온도 등과 같은 주위 환경에 의한 영향을 배제 시킬 수 있다. Fig. 1 (b)는 실제 실험에 사용된 소형 SPR과 유체 시스템의 구성을 나타낸 것이다.

2.2 Protein G Thiolation

항체를 고정하기 위해 사용되는 단백질인 protein G의 말단에 금과 강한 결합력을 가지는 thiol group을 도입하였다. 이를 위해 다음과 같은 thiolation 과정이 수행되었다. 먼저 200 μg/ml 농도의 protein G 용액(in phosphate buffered silane(PBS)) 150 μl에 2-iminothiolane 3.44 mg을 혼합한 후 4 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후에는 원심분리기(비전과학, Korea)와 spin desalting column(Thermo Scientific, USA)을 이용하여 반응하지 않고 남은 2-iminothiolane을 제거해주었다. 원심분리는 4 °C에서 1000 rpm의 속도로 이루어 졌으며, desalting column을 통하여 2-iminothiolane이 제거된 thiolated protein G용액 150 μl를 획득하였다.

2.3 Protein G와 thiolated protein G를 이용한 IgG의 검출

실험에 앞서 센서 칩을 piranha 용액(황산(H₂SO₄) : 과산화수소수(H₂O₂) = 3 : 1)으로 세척한 후 SPR 센서 시스템에 장착하였다. Protein G를 센서 칩 표면에 형성시키기 위하여 200 μg/ml 농도의 protein G를 시료주입장치를 통하여 100 μl 주입하였다. Protein G가 센서 칩과 반응한 다음 PBS 용액을 주입하여 결합하지 않은 protein G를 제거해 주었다. 신호가 안정되는 것을 확인한 후 anti-IgG 150 μg/ml를 주입하였고 그 다음 충분한 양의 PBS를 흘려보내주어 결합하지 않은 단백질을 제거하였다. 이와 같이 protein G가 형성된 센서 칩 표면에 anti-IgG를 고정화한 다음 비 특이적인 반응을 막기 위하여 bovine serum albumin(BSA) 100 μg/ml를 주입하였다. 마지막으로 100 μg/ml 농도의 IgG 용액을 주입하여 반응을 확인한 다음 결합하지 않은 IgG를 제거하기 위하여 PBS를 충분히 주입하였다. 평형을 찾은 후 IgG의 반응에 대한 신호를 획득하였다. Thiolated protein G로 고정된 anti-IgG의 IgG 검출 실험 역시 동일한 과정으로 진행되었다. 200 μg/ml 농도의 thiolated protein G를 SPR 센서에 주입하여 센서 칩 표면에 형성시킨 다음 protein G를 이용한 실험과 동일한 농도의 anti-IgG와 BSA를 주입하여 반응시켰다. 그리고 100 μg/ml 농도의 IgG 용액을 주입 하여 센서 칩 표면에 고정된 anti-IgG와 반응시켰다. 각 시료를 주입한 다음엔 반응하지 않은 단백질을 제거하기 위하여 PBS를 충분히 흘려보내주었다. 모든 실험에서 유속은 30 μl/min으

로 일정하게 유지하였으며, 시료는 시료주입장치를 통하여 100 μ l의 일정한 용량으로 주입하였다. 시료와 PBS를 포함한 모든 용액은 센서로 주입되기 전에 degasser를 이용하여 기체를 제거해주었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Protein G와 thiolated protein G를 이용한 IgG 검출

Protein G와 thiolated protein G의 항체 고정화 성능을 비교하기 위해 SPR 센서 칩 위에 각각을 형성시킨 후 anti-IgG, BSA, IgG를 차례대로 주입하여 공명각의 변화를 실시간으로 측정하였다. 본 실험에 사용된 소형 SPR 센서의 두 개의 주입 채널 중 하나의 채널을 기준 채널로 이용하여 시료의 용매로 사용된 PBS 만을 주입하였다. 다른 하나의 채널에는 단백질 시료를 100 μ l씩 주입하였다. 보다 정확한 신호를 얻기 위하여 시료 주입 채널과 기준 채널의 차이로 분석을 수행하였다. 각 단백질에 의한 SPR 센서의 신호 상승값은 단백질이 반응하여 신호가 증가한 후 안정화된 상태에서의 100 초 동안의 평균값으로 계산하였다. 실험은 protein G와 thiolated protein G를 사용하여 각각 3회씩 반복 수행되었다.

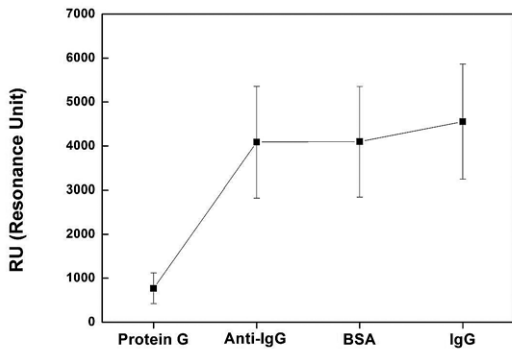


Fig. 2. Mean difference values of SPR response after sequence injection of protein G, anti-IgG, BSA, and IgG.

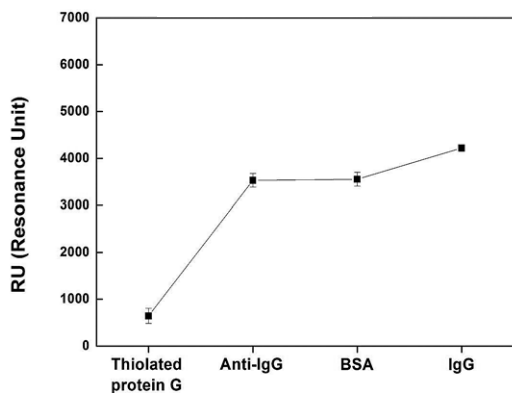


Fig. 3. Mean difference values of SPR response after sequence injection of thiolated protein G, anti-IgG, BSA, and IgG.

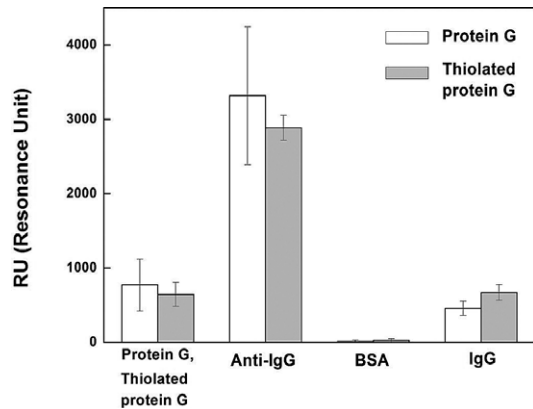


Fig. 4. Comparison of mean difference values of SPR response after sequence injection of BSA, anti-IgG, and IgG on the protein G and thiolated protein G modified sensor chip surface.

Fig. 2는 protein G로 고정된 anti-IgG를 이용한 IgG 검출 실험의 결과로, 각 단백질을 주입하여 얻은 신호값의 평균을 나타낸 것이다. 각 신호값의 표준편차는 세로 선으로 나타내어졌다. 그래프 상의 resonance unit(RU)은 1000 RU당 0.1°의 공명각이 변화한 것을 의미하며 실험에 사용된 SPR 센서 시스템의 오차 범위는 10 RU이다. 센서 칩 표면에 protein G를 주입하여 얻은 신호의 평균값은 769 RU였으며, protein G가 형성된 센서 칩 표면에 anti-IgG를 주입하자 3317 RU의 신호가 상승하였다. 이와 같은 SPR 신호의 변화를 통하여 센서 칩 표면에 형성된 protein G에 anti-IgG가 고정화된 것을 알 수 있었다. 비특이적인 반응을 막기 위하여 주입한 BSA는 10 RU의 증가한 신호값을 보였고, 마지막으로 IgG를 주입하자 평균 454 RU의 신호가 상승하였다. 이는 protein G로 센서 칩 표면에 고정된 anti-IgG에 IgG가 결합하였기 때문인 것으로 판단된다. Thiolated protein G로 고정된 anti-IgG를 이용한 IgG 검출 결과는 Fig. 3과 같다. SPR 신호값은 thiolated protein G를 주입하였을 때 약 644 RU 증가하였고, 이어서 anti-IgG를 센서 칩 표면에 반응시키자 평균 2887 RU의 신호가 상승하였다. 따라서 thiolated protein G 또한 센서 칩 표면에 anti-IgG를 고정화시킬 수 있음을 알 수 있었다. BSA에 의한 신호는 22 RU로 나타났으며, 이와 같이 처리된 센서 칩 표면에 IgG를 주입하자 약 667 RU의 신호가 상승하였다. 이는 protein G를 이용하여 고정된 anti-IgG의 IgG 검출 신호에 비해 200 RU 이상 큰 값이다. 이와 같은 결과를 통하여 thiolated protein G를 이용하여 고정된 anti-IgG가 protein G로 고정된 anti-IgG 보다 IgG를 더 민감하게 검출한다는 것을 알 수 있었다. Fig. 4는 protein G와 thiolated protein G를 이용한 IgG 검출 실험 결과를 비교한 것이다. 각각의 막대그래프는 protein G와 thiolated protein G를 형성한 후 그에 따른 anti-IgG, BSA, IgG 신호값의 평균과 그 표준 편차를 나타낸다. Anti-IgG에 의한 신호의 변화값은 protein G를 사용한 실험에서 더 높게 나타났으나, IgG 검출 신호는 thiolated protein G를 사용한 실험에서 더 크게 상승하였다.

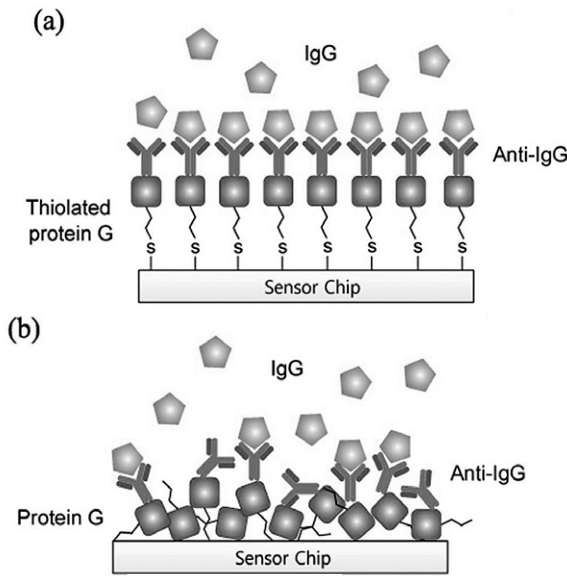


Fig. 5. The schematic configuration of anti-IgG immobilized on the protein G and thiolated protein G modified sensor chip: (a) thiolated protein G (b) protein G.

이는 thiolation 과정을 거쳐 protein G의 말단에 도입된 thiol기가 센서 칩의 금 표면과 강한 공유결합을 형성하면서 protein G가 일정한 방향성을 가지고 센서 칩 표면에 형성되었기 때문인 것으로 추측된다. Protein G는 anti-IgG의 Fc 분절과 결합하기 때문에, 이로 인해 anti-IgG 역시 방향성 있게 고정화된 것으로 판단된다 [Fig. 5 (a)]. 또한 thiolated protein G를 이용한 실험 결과에 비해 protein G를 이용한 실험 결과에서 protein G와 그에 고정화된 anti-IgG 신호값의 오차 범위가 매우 크게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이는 protein G와 protein G에 의해 고정된 anti-IgG가 센서 칩 표면에 불규칙하게 형성되었기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 불규칙하게 형성된 protein G를 이용하여 anti-IgG를 고정화한 경우, 위의 실험 결과와 같이 항체가 많이 처리되더라도 IgG의 검출 신호는 상대적으로 적게 나타날 것이라 추측할 수 있다 [Fig. 5 (b)].

4. 결론

본 연구에서는 protein G와 thiolated protein G로 센서 칩 표면에 anti-IgG를 고정화 후 IgG를 검출하였다. 실험은 동일하게 각각 3번씩 반복 수행되었으며, IgG 검출 성능을 비교함으로써 보다 효율적인 항체 고정화 방안을 찾고자 하였다. 실험 결과 protein G를 이용하여 고정화한 anti-IgG의 신호가 thiolated protein G를 이용한 검출 신호에 비해 더 크게 나타났다. 반면에 고정된 anti-IgG를 이용한 IgG 검출 신호는 thiolated protein G를 이용하는 것이 protein G를 이용하였을 때 보다 더 크게 증가하였다. 이러한

결과가 나타난 이유는 thiolation 과정을 거쳐 말단에 thiol기가 처리된 protein G가 센서 칩 표면에 방향성을 가지고 형성되어 anti-IgG 역시 일정한 방향성을 갖고 고정화되었기 때문인 것으로 판단된다. 이와 같은 결과를 통하여 thiolated protein G가 항체의 효율적인 고정화에 도움을 줄 수 있으며, 이를 적용한 소형 SPR 센서의 면역 센서로서의 가능성을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 휴먼인지 환경사업본부-신기술융합형 성장동력사업의 지원을 받아 수행된 연구임(2011K000679).

REFERENCES

- [1] 성건용, 박찬우, 김경현, 양종현, “유비쿼터스 건강관리를 위한 바이오센서 기술 동향”, 전자통신동향분석, 제24권, 제5호, pp. 38-51, 2009.
- [2] 조재형, 권혁상, 윤건호, ““Ubiquitous Health Care System”을 이용한 미래형 당뇨병 관리에 대한 전망”, 당뇨병, 제30권, 제2호, pp. 87-95, 2006.
- [3] 김의락, 백세환, “면역센서의 원리와 의학적 응용”, 한국생물공학회지, 제17권, 제2호, pp. 121-136, 2002.
- [4] K. A. Mark, “Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface Interface”, *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 5, pp. 1099-1120, 2003.
- [5] N. Trummer, N. Adanyi, M. Varadi, and I. Szendro, “Modification of the surface of integrated optical wave-guide sensors for immunosensor applications”, *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 371, no. 1, pp. 21-24, 2001.
- [6] R. Kurrat, B. Walivaara, A. Marti, M. Textor, P. Tengvall, J.J. Ramsden, and N.D. Spencer, “Plasma protein adsorption on titanium: comparative in situ studies using optical waveguide lightmode spectroscopy and ellipsometry”, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 11, no. 4, pp. 187-201, 1998.
- [7] K. Hegnerova, M. Bockova, H. Vaisocherova, Z. Kristofikova, J. Ricny, D. Ripova, and J. Homola, “Surface plasmon resonance biosensors for detection

- of Alzheimer disease biomarker”, *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 139, no. 1, pp. 69-73, 2009.
- [8] C. Bian, J. Tong, J. Sun, H. Zhang, Q. Xue, and S. Xia, “A field effect transistor(FET)-based immunosensor for detection of HbA1c and Hb”, *Biomed. Microdevices*, vol. 13, no. 2, pp. 345-352, 2011.
- [9] M. Salmain, N. Fischer-Durand, and C.M. Pradier, “Infrared optical immunosensor: application to the measurement of the herbicide atrazine”, *Anal. Biochem.*, vol. 373, no. 1, pp. 61-70, 2008.
- [10] Sung-Sik Yun, Soo hyun Lee, Chong H. Ahn, and Jong-Hyun Lee, “A fiber optic surface Plasmon resonance(SPR) sensor using cyclic olefin copolymer(COC) polymer prism”, *J. Kor. Sensors Soc.*, vol. 17, no. 5, pp. 369-374, 2008.
- [11] P. Englebienne, A. Van Hoonacker, and M. Verhas, “Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences”, *Spectroscopy*, vol. 17, pp. 255-273, 2003.
- [12] K. S. Lee, J. M. Son, D. Y. Jeong, T. S. Lee, and W. M. Kim, “Resolution enhancement in surface plasmon resonance sensor based on waveguide coupled mode by combining a bimetallic approach”, *Sensors*, vol. 10, no. 12, pp. 11390-11399, 2010.
- [13] A. M. Bond, “Past, present and future contributions of microelectrodes to analytical studies employing voltammetric detection. A review”, *Analyst*, vol. 119, issue. 11, p. 1R, 1994.
- [14] Y. M. Bae, B.-K. Oh, W. C. Lee, W. H. Lee, J.-W. Choi, and Young Min Bae, “Study on orientation of immunoglobulin G on protein G layer”, *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, no. 1, pp. 103-110, 2005.
- [15] M. Suzuki, F. Ozawa, W. Sugimoto, and S. Aso, “Miniature surface plasmon resonance immunosensors - rapid and repetitive procedure”, *Anal. Chim. Acta.*, vol. 404, no. 2, pp. 187-194, 2000.
- [16] 최효진, 황상연, 장대호, 조형민, 강정혜, 성기훈, 주재범, 이은규, “자성 미세입자에의 항체 고정화 방법이 면역결합반응에 미치는 영향”, *화학공학*, 제44권, 제1호, pp. 65-72, 2006.



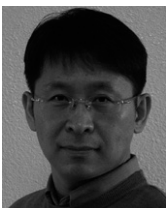
신 은 정(Eun Jung Sin)

- 2006년 ~ 2010년 대구가톨릭대학교 의공학과(공학사)
- 2010년 ~ 현재 대구가톨릭대학교 의공학과 석사과정



이 연 경(Yeon Kyung Lee)

- 2008년 ~ 현재 대구가톨릭대학교 의공학과 학사



손 영 수(Young-Soo Sohn)

- 1997년 경북대학교 물리학과(이학석사)
- 1998~2001년 The Univ. of Texas at Austin, 전기컴퓨터공학과(공학박사)
- 2001년~2005년 Univ. of Cincinnati/The Univ. of Texas at Austin, Research Associate
- 2005년~2008년 대구경북과학기술연구원/한국과학기술연구원 선임연구원
- 2008~현재 대구 가톨릭대학교 의공학과 교수