

Measurement and Analysis of the Dynamics of Peptide-Antibody Interactions Using an Ellipsometric Biosensor Based on a Silicon Substrate

Geun-Jae Lee¹, Hyun Mo Cho², and Jae Heung Jo^{1†}

¹Department of Photonics and Sensor, Hannam University, 70 hannam-ro (Ojung-dong, Hannam Univ.)
Daeduk-gu, Daejeon 34430, Korea

²Center for Nanometrology, Korea Research Institute of Standards and Science, 267
Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34113, Korea

(Received September 13, 2016; Revised manuscript November 30, 2016; Accepted December 2, 2016)

We precisely measured and analyzed the dynamics of peptide-antibody interactions, using an ellipsometric biosensor based on a silicon substrate. To reduce the signal error due to the imperfect flatness of the substrate for extremely low concentrations of peptide, we fabricated the biosensor with a silicon substrate coated with Dextran SAM, instead of a glass prism coated with a thin metallic thin film. At an injection speed of 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ of buffer liquid, we detected the dynamics of antibody-Dextran SAM or peptide-antibody fixed on biosensor, respectively. We detected the dynamics of antibody-Dextran SAM interactions down to a low concentration of 5 ng per liter, and we precisely measured the dynamics of association and dissociation of peptide and antibody down to 100 nM of peptide. We obtained the rate constants for association and dissociation from fitting the data by using deduced dynamical equation. As a result, we obtained an equilibrium constant for dissociation of 97 nM of peptide-antibody complex, which belongs to Class I.

Keywords: Ellipsometry, Biosensor, Peptide-antibody, Surface Plasmons

OCIS codes: (120.2130) Ellipsometry and polarimetry; (170.1420) Biology; (170.1470) Blood or tissue constituent monitoring; (240.2130) Ellipsometry and polarimetry

실리콘 기판을 사용한 바이오센서와 회전 타원분광계를 이용한 펩타이드-항체 접합의 동특성 측정과 분석

이근재¹ · 조현모² · 조재흥^{1†}

¹한남대학교 공과대학교 광·센서공학과

Ⓣ 34430 대전광역시 대덕구 한남로 70 (오정동, 한남대학교)

²한국표준과학연구원 산업측정표준본부 나노측정센터

Ⓣ 34113 대전광역시 유성구 가정로 267

(2016년 9월 13일 받음, 2016년 11월 30일 수정본 받음, 2016년 12월 2일 게재 확정)

실리콘 기판으로 만든 바이오센서에서 펩타이드-항체의 접합 동특성을 회전 타원분광계로 정밀하게 측정하고 분석하였다. 극도로 낮은 몰농도의 펩타이드를 측정할 때, 시료가 놓이는 바이오센서의 표면의 불완전한 편평도와 완충용액 굴절률 변화로 인한 측정오차를 줄이기 위하여 금속박막의 유리 프리즘 대신에 실리콘 기판 위에 텍스트란 SAM을 직접 적층하여 바이오센서를 만들었다. 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 완충용액 주입속도에서 바이오센서에 올려진 항체 및 펩타이드의 접합특성을 각각 측정하였다. 리터당 5 ng의 낮은 항체농도에서도 항체-텍스트란 SAM 사이의 동특성을 쉽게 측정할 수 있었다. 또한 100 nM까지의 펩타이드에 대한 미세한 흡착 및 해리 특성을 정밀하게 측정할 수 있었으며, 접합 동특성 식에 이 실험결과를 피팅하여 흡착계수와 해리계수를 구할 수 있었다. 이 결과로부터 펩타이드의 평형상태의 해리상수인 K_D 는 97 nM이었고, 이 수치는 Class I에 속함을 알 수 있었다.

Keywords: 타원분광계, 바이오센서, 펩타이드-항체 결합, 표면 플라즈몬 공명 현상

OCIS codes: (120.2130) Ellipsometry and polarimetry; (170.1420) Biology; (170.1470) Blood or tissue constituent monitoring; (240.2130) Ellipsometry and polarimetry

†E-mail: jhjo@hnu.kr

Color versions of one or more of the figures in this paper are available online.

I. 서 론

표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR)에서 반사율이 현저히 줄어드는 입사각을 SPR 각이라 하며, SPR 각은 전자기파가 파고드는 영역의 굴절률에 따라 달라진다^[1,2]. 이러한 SPR을 이용하면, 금속박막 바깥쪽에 대한 센서칩 표면의 완충용액 굴절률 변화를 연속적으로 관찰할 수 있다. 이 굴절률은 센서칩 표면의 완충용액 내의 시료 종류와 질량 변화에 따라 달라진다. 즉 센서칩 표면에 고정화된 물질(ligand)과 분석물질(analyte)이 결합하면 질량의 변화가 생겨서 SPR 각이 처음과 달라진다. 생체물질에 대한 측정 분석에 있어서 SPR을 이용할 경우 분석물질에 형광물질을 부착하지 않고 분석물질인 DNA 또는 단백질 칩과 생체물질을 정밀하게 분석할 수 있다^[1-3].

SPR은 펩타이드-항체 반응, 단백질-항체 반응, 단백질-DNA 반응, 단백질-다당류 반응, 단백질-바이러스 반응, DNA-DNA 반응 연구에 사용되고 있다. 이와 같이 SPR을 이용한 측정이 바이오 연구에서 광범위하게 사용되면서 미량 생체물질의 측정을 위하여 SPR의 측정 감도를 향상시키려는 연구가 활발하게 진행되고 있다^[4-6].

그러나 기존 SPR 측정법은 금이나 은 등의 금속박막을 사용하고 있으며 금속박막은 제작 방법이나 표면 상태에 따라 측정감도가 바뀌고 균질성이 없어 신뢰성 있는 측정 장비로 사용하는데 문제점을 안고 있다. 또한 측정원리가 측정시료인 생체물질의 접합과 측정시료가 포함된 완충용액의 변화를 구분할 수 없어 항상 기준채널이 요구되고 측정오차를 일으키는 근본적인 문제점을 가지고 있다^[3].

본 논문에서는 이러한 SPR 금속박막의 문제점을 해결하기 위해 박막두께 측정 분해능에서 더욱 민감한 타원분광법(ellipsometry)을 이용한 실리콘 기판을 이용한 바이오센서를 사용한 타원분광계(ellipsometric biosensor based on a silicon substrate : EBSS)의 개념을 소개하고 이를 구성하고자한다. 이러한 EBSS는 유리면 위에 금속박막으로 코팅한 SPR의 불균일한 두께 및 굴절률 균질도와 완충용액 굴절률 변화로 인하여 오차신호가 발생하는 것을 억제하기 위하여 금속박막 없이 높은 균질도를 가진 실리콘 표면을 사용하는 방법이다. 실리콘 표면을 기판으로 사용하고 p-파 무반사 조건에서 증폭된 타원계측각을 측정함으로써 SPR 센서에서 발생하는 완충용액 굴절률 변화로 인한 오차신호를 획기적으로 개선하였다^[7]. 실리콘 칩 위에다 자기 조립 단분자막(self-assembled monolayer, SAM)으로 텍스트란(Dextran)을 올려 보관기간이 매우 긴 텍스트란 SAM을 만들고 그 위에 항체를 고정시킨 후 이 항체 위로 붙었다가 떨어지는 펩타이드의 접합 및 해리 동특성을 EBSS로 측정하고, 간단한 동특성 이론을 이용하여 이를 분석하고자 한다.

II. 기본원리와 접합동특성 분석식

2.1. 타원분광계의 기본원리

타원분광법(ellipsometry)에서는 p파와 s파의 프레넬 반사 계수인 r_p 와 r_s 의 비로 정의되는 타원계측함수인 $\rho = \frac{r_s}{r_p} = \tan\psi \exp(i\Delta)$ 를 측정한다. 여기에서 ψ 는 p-파와 s-파의 반사 계수 진폭비로 $\tan\psi = \frac{|r_s|}{|r_p|}$ 이고, Δ 는 p-파와 s-파의 위상 차이로 $\Delta = \Delta_s - \Delta_p$ 이다. r_p 와 r_s 의 각각 크기는 $|r_s|$ 와 $|r_p|$ 이고, 각각의 위상값은 Δ_s 와 Δ_p 이다. 아래첨자 p와 s는 각각 p파와 s파를 의미한다^[8-11].

그림 1은 기본적인 타원분광계(ellipsometer)의 개략적인 구조로 무편광된 광원(lamp)으로부터 나온 빛을 단색화장치(monochromator)를 거쳐서 단색으로 만든 후, 일정한 선편광 상태가 되도록 편광기(polarizer)를 통과시켜 선편광을 만들어서 시료(sample)면에 입사시킨다. 시료에서 반사된 빛은 타원편광이 되어서 25 Hz ~ 60 Hz로 회전하는 검광기(analyzer)를 통과하여 광검출기(detector)로 입사하며, 이 때문에 이 타원분광계를 회전 타원분광계라 한다. 이 타원분광계에서 측정되는 타원분광 상수(ellipsometric parameters)의 이론적 계산은 빛의 편광 상태를 기술하는 존스행렬 계산법을 이용한다^[11]. 편광자 방위각 P와 검광자 방위각 A는 입사면에 평행할 때 원점으로 정의하며, 빛의 양의 방향은 빛의 진행 방향 기준으로 시계 방향으로 정의한다. 그러나 모터의 엔코더에서 결정되는 편광자와 검광자의 원점 ($P = 0, A = 0$)이 그림의 x축과 정확히 일치하지 않기 때문에 타원분광계의 보정을 통하여 정확한 편광자와 검광자의 방위각 보정이 필요하다. 따라서 이때 엔코더의 원점에 대한 편광자와 검광자의 방위각을 보정하면, 광 감지기에 입사되는 전기장 E_A 는 존스행렬과 벡터를 이용하여 나타낼 수 있다.

E_A 를 이용하여 검출기로 측정되는 복사조도는 I로 표기하면 식 (1)과 같이 된다.

$$I \propto (1 - \cos 2P \cos 2\psi) [1 + \alpha \cos 2A + \beta \sin 2A] \quad (1)$$

여기에서 α 와 β 는 광 감지기에 입사되는 전기장 E_A 의 편광 상태를 나타낸 존스행렬의 풀이식을 $(1 - \cos 2P \cos 2\psi)$ 으로

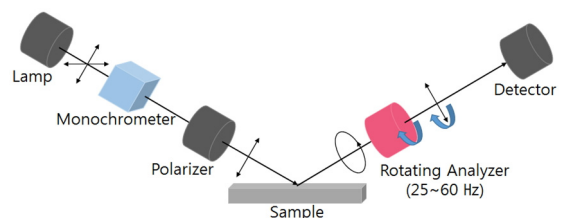


Fig. 1. Schematic diagram of general rotating ellipsometer.

정규화 시키고, 다시 코사인 배각공식을 이용해 정규화된 푸리에 계수이다. 이를 사인과 코사인의 2배각 공식을 이용하면 식 (2)와 같다.

$$\alpha = \frac{\tan^2\psi - \tan^2P}{\tan^2\psi + \tan^2P}, \quad \beta = \frac{2\tan\psi\cos\Delta\tan P}{\tan^2\psi + \tan^2P} \quad (2)$$

이렇게 구한 식 (2)를 $\tan\psi$ 와 $\cos\Delta$ 로 풀어내면 다음과 같은 식 (3)이 나온다.

$$\tan\psi = \sqrt{\frac{1+\alpha}{1-\alpha}} |\tan P|, \quad \cos\Delta = \frac{\beta}{\sqrt{1-\alpha}} \quad (3)$$

식 (2)의 α 와 β 는 실질적으로 프로그램에서 구할 때는 식 (1)에서 +1은 신호의 의미가 없으므로 DC 성분을 제거하고 $\cos 2A$ 에 대하여 푸리에 변환하여 그 크기인 α 를 구한다. β 역시 마찬가지로 $\sin 2A$ 에 대하여 푸리에 변환을 하게 되면 알 수 있다. 이렇게 나온 식을 식 (3)에 대입하여 ψ 와 Δ 를 알게 된다^[9-11].

2.2. 접합동특성 분석 이론

물질의 합성에서 두 물질이 서로 결합하는 정도를 나타내는 흡착상수(association rate constant)와 두 물질이 서로 분리되는 정도를 나타내는 해리상수(dissociation rate constant)를 각각 k_a 와 k_d 로 표현한다. k_a 와 k_d 는 시간의 역수의 차원을 갖는다. 두 물질 B와 C의 합성에서 합성된 물질인 BC의 시간에 따른 변화를 식 (4)와 같이 나타낼 수 있다.

$$\begin{aligned} \frac{d[BC]}{dt} &= k_a[B][C] - k_d[BC] \\ &= k_a[B]([C]_0 - [BC]) - k_d[BC] \end{aligned} \quad (4)$$

식 (4)에서 []는 각 물질의 양을 나타내는 표기이며, 식 (4)의 마지막 식에서는 물질 C의 초기양인 $[C]_0$ 을 사용하여 $[C]$ 를 $[C] = [C]_0 - [BC]$ 로 표기한 것이다. 이 식을 $[B]$ 을 D 로, $[BC]$ 을 R 로, $[C]_0$ 을 R_{max} 로 바꾸어 기술한 후, 이 미분방정식을 R 에 대해서 풀면 접합동특성을 나타내는 식 (5)를 쉽게 구할 수 있다.

$$R = \frac{Dk_a R_{max} [1 - \exp(-\{dk_a + k_d\}t)]}{dk_a + k_d} \quad (5)$$

식 (5)를 두 물질의 결합할 때 측정된 실험식의 시간별 R 의 변화를 데이터 피팅(data fitting)하여 k_a 와 k_d 를 구할 수 있다. 식 (5)를 통하여 구한 k_a 와 k_d 로 평행상태의 해리상수(equilibrium dissociation rate constant)인 $K_D = \frac{k_d}{k_a}$ 로 나타낼 수 있고, 평행해리상수로 물질의 흡착과 해리의 상태를 알 수 있다^[12,13].

III. 실험장치 및 시료제작

3.1. EBSS의 실험장치와 실험방법

SPR 측정시 완충용액의 굴절률이 변하거나 측정시료가 금속박막에 적층되어서 금속박막의 질량이 변하여도 SPR 각이 변한다^[3]. 그래서 이러한 오차요인을 보정하기 위하여 완충용액만을 채널에 넣어서 SPR 신호를 측정하여 이 값을 측정 시료로부터 측정된 신호에서 제외한다. 그러나 일반적인 SPR 측정장비에서는 이러한 과정이 한 채널에서 이루어지는 것이 아니고 제각기 서로 다른 채널에서 측정하기 때문에 측정 정밀도의 신뢰성이 낮다. 그리고 SPR의 특성상 금속박막(보통은 금박막)을 수십 nm로 얇게 올려야 하는데 이 금속박막은 금속을 코팅하는 과정에서 두께와 균질도가 항상 고르게 제조가 되지 않는 커다란 단점이 있다. 그래서 한 채널의 동일 지점을 측정하지 않는다는 것은 의미가 없다. 이를 보완하기 위하여 본 논문에서는 금속박막보다 두께의 신뢰성이 높은 실리콘 박막을 이용하였다.

그림 2는 EBSS와 바이오센서에 완충용액을 주입하는 실린지 펌프의 결합을 보여주는 실험장치도이다. 이 EBSS는 파장 655 nm의 안정화된 레이저 다이오드(LD)를 광원으로 사용하며, 편광기(polarizer), BK-7으로 만든 프리즘(prism), 실리콘(silicon) 기판, 30 Hz로 회전하는 검광기(rotating analyzer), 광검출기(detector), 그리고 실리콘 기판에 구성된 다채널 미세유로(multi-channel microfluidics)를 포함하는 시료 스테이지(sample stage), 완충용액을 주입하는 실린지 펌프(syringe pump), 측정하기를 원하는 시료를 주입하는 밸브 시스템(valve system)으로 구성된다. 바이오 시료가 올라가는 바이오센서의 칩은 실리콘 웨이퍼를 1 cm × 1 cm로 잘라서 실리콘 칩으로 만든 후 이 칩 위에 텍스트란 SAM 처리를 하여 사용하였다. 기본적으로 실린지 펌프에서 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 주입속도로 완충용액을 밀어주었다. 편광자와 시료 스테이지의 각도 조절은 고니오미터를 컴퓨터와 연결하여 모든 각도는 컴퓨터를 사용하여 0.01°의 정확도로 맞추었다. 시료 스테이지는 X축과 Y축을 조절할 수 있는 스테이지를 제작하여 시료

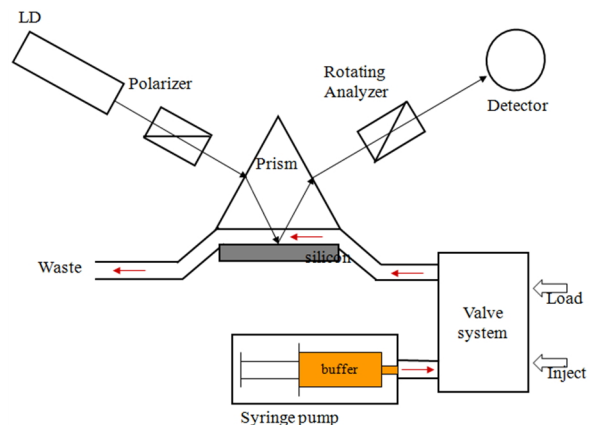


Fig. 2. Schematic diagram of ellipsometric biosensor based on a silicon substrate combined with syringe pump to inject buffer liquid.

를 맞고 나오는 광에 대한 광학부품들의 정렬이 용이하도록 하였다. 실리콘 기판에 만든 시료 스테이지와 결합시킬 프리즘을 고정하여 완충용액이 새지 않도록 만든 바이오센서는 그림 3과 같이 제작하였다. 그림 3은 2채널 미세유로 시스템의 바이오센서로 왼쪽 2개의 유관은 완충용액 또는 시료를 주입하는 주입구이고, 오른쪽 2개의 유관은 주입된 용액들이 나가는 출구이다. 여기에서는 1개 채널만을 사용하여 실험을 하였다.

그림 4(a)는 식 (1) ~ 식 (3)을 이용하여 EBSS의 SiO₂ 두께가 0 nm, 10 nm, 20 nm로 주어진 경우에 대한 Ψ 의 시뮬레이션 결과이다. 입사광의 입사각을 변화시키다 보면 Ψ 가 작아지는 지점, 즉 p-파가 급속히 줄어드는 약 71°에서는 다른 곳에 비하여 두께에 관한 민감도가 높아짐을 알 수 있기 때문에 이 지점을 이용하여 시료의 두께변화를 측정한다. 그림 4(b)는 측정감도를 평가하기 위하여 그림 4(a)의 적색 원부분을 확대하여 실리콘 위의 SiO₂ 박막의 두께가 그림 4(a) 보다 더 얇은 2 nm, 4 nm, 6 nm로 바뀔 때의 Ψ 의 변화를 나타낸 것이다. 이러한 시료 두께의 초미세 변화에서도 여전히 약 71°에서 두께변화에 대한 신호의 변화가 확연하게 커지는 것을 알 수 있다. 그림 3의 실리콘 기판에 형성된 바이오센서 위에 설치한 유로를 통하여 적층된 수 nm ~ 수십 nm 두께의 시료에 대해서 식 (1) ~ 식 (3) 및 변환 프로그램을 이용하여 시간적으로 Ψ 의 변화를 측정할 수 있다. 이 Ψ 의 변

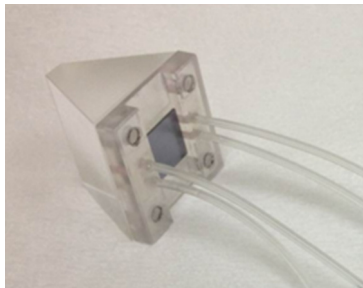


Fig. 3. Photograph of 2 channel biosensor with a silicon substrate for the buffer liquid not to leak.

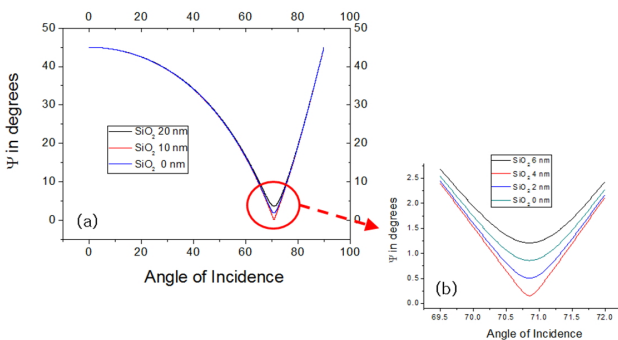


Fig. 4. Simulation results of Ψ (a) in case of SiO₂ thicknesses of 0 nm, 10 nm, and 20 nm or (b) in case of those of 0 nm, 2 nm, 4 nm, and 6 nm in ellipsometric biosensor based on a silicon substrate by using Eq. (1) ~ Eq. (3).

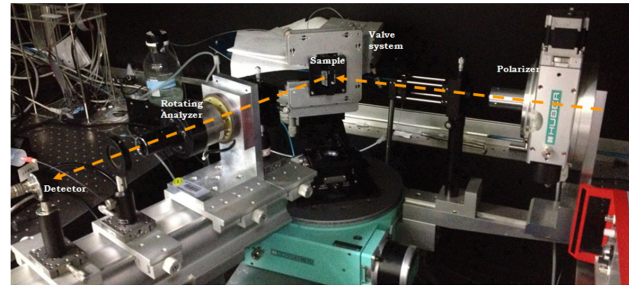


Fig. 5. Experimental setup for ellipsometric biosensor of Fig. 3.

화는 완충용액의 굴절률 변화를 나타내는 RIU(refractive index unit) 혹은 박막의 두께 단위로 표현할 수 있다. 본 논문에서는 기존 SPR 센서에서 완충용액의 굴절률 변화에 상응하는 각도 이동량을 나타내는 RU(response unit) 단위 대신 RIU의 변화(바이오 박막의 굴절률을 $n=1.45$ 로 가정)로 나타내었다.

그림 5는 그림 2에 따라 그림 3의 바이오센서를 사용하여 구성된 EBSS의 실험장치 사진이다. 사진에서의 광 경로는 오른쪽에서 화살표로 표시된 방향으로 편광기, 시료, 회전형 검광기, 광검출기 순서대로 진행된다. 편광기에서 나온 광은 바로 앞의 렌즈를 통해 프리즘 모듈 내의 시료에 초점이 맞도록 샘플에 입사하며, 입사광의 지름은 0.8 mm이다. 입사부의 채널 높이가 1 mm이기 때문에 채널 안에 광이 들어가게 된다. 시료에 맞고 반사되어 나오는 광은 회전형 검광자를 지나 광검출기에서 검출된 후, 이는 식 (2)와 식 (3)을 이용하여 Ψ 와 Δ 로 표현된다.

3.2. 시료제작

실험에 사용하는 펩타이드는 cyclic peptide인 (H₂NCH₂CH₂(OCH₂CH₂)₃CH₂CO-AspCys*AlaTrpHisLeuGlyGluLeuValTrpCys*Thr-NH₂로 Pepton 사의 것을 사용하였으며, 항체(Immunoglobulin G, IgG)는 SIGMA 사의 제품을 사용하였다. 실험에 사용하는 완충용액(running buffer)은 PBS(Phosphate Buffered Saline)를 사용하였으며, 바이오센서의 기판으로는 실리콘 센서칩(sensor chip)을 사용하였다.

센서칩 위에 바로 펩타이드나 다른 물질이 붙는 것이 아니기에 그림 6에서와 같은 적층 공정처리를 해주어야 한다. 일단은 실리콘 칩 위에 SAM을 깔고 그 위에 덱스트란(Dextran)을 올려 덱스트란 SAM을 만든다. SAM을 실리콘 칩 위에 깔아놓기 위해서는 실리콘 위에 만들어진 SiO₂ 박막을 산성 불화암모늄인 NH₄F에 넣어 제거한다. 그 후 질소의 환경에서 불순물 제거를 위하여 254 nm의 광을 2시간 이상 조명한 후, 25% 농도의 Trifluoroacetic Acid에 실리콘 칩을 넣었다가 10% 농도의 NH₄OH에 5분 동안 담갔다 꺼내어 SAM을 만든다. 이 SAM 위에 덱스트란을 올려 덱스트란 SAM을 만든다. 덱스트란 SAM까지는 시료 스테이지 밖에서 공정을 통하여 제작하게 된다. 그리고 덱스트란 SAM을 만드는 이유는 보관기간이 SAM 보다 매우 길어서 실험이 용이하기 때문이다.

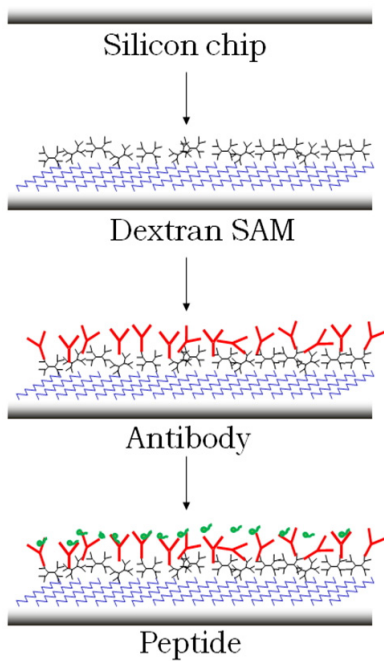


Fig. 6. Stacking process of Dextran SAM, antibody, and peptide on a silicon chip.

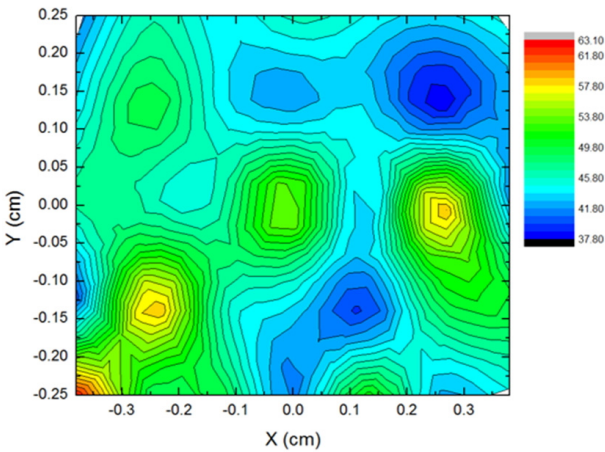


Fig. 7. Experimental result of thickness variation of a silicon chip coating Dextran SAM.

물론 이때 만들어진 시료들의 편평도는 바이오센서의 측정 정밀도에 중요하게 영향을 미친다. 그림 7은 텍스트란 SAM 까지 만들어진 시료를 두께측정 장비(J. A. Woollam Co., Inc., M-2000D)를 이용하여 측정한 결과로 텍스트란 SAM이 올려진 실리콘 칩의 편평도를 나타낸 그래프이다. 빨간색이 가장 높은 곳을 나타내고 있으며 최고 높이는 6.3 nm 이고, 최저 높이는 3.7 nm 이다. 최고와 최저의 높이 차가 2.6 nm 이고, 높이의 표준편차는 ± 1 nm 이다. 바이오센서의 편평도를 최고와 최저의 높이 차이 정도로 고려하여도 SPR에서 사용하는 유리 프리즘의 편평도인 $\lambda/10$ 인 65.5 nm의 약 25배 정도 편평도가 좋은 것을 알 수 있다.

IV. 펩타이드-항체 접합 동특성 측정결과

실리콘 칩에 적층한 텍스트란 SAM 위에는 항체를 고정시킨 후 펩타이드의 농도별 접합 동특성을 EBSS로 측정하여 텍스트란 SAM에 항체가 잘 붙는 지를 먼저 살펴본다. 그림 7에서 보인 시료의 텍스트란 SAM을 활성화하기 위해 본 논문에서는 0.4 M의 EDC/0.1M의 NHS를 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 주입 속도로 흘려주어 치환시켜 텍스트란 SAM을 활성화시켰다. 이렇게 활성화된 텍스트란 SAM에 항체를 50초부터 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 느린 주입속도로 고농도인 10 μg 을 흘려주어 항체를 고정하였다. 이후 ethanolamine을 흘려주어 이후에 실험할 펩타이드-항체의 결합 실험에서 펩타이드와 텍스트란 SAM 사이의 비특이적 접합을 하지 못하도록 하였다. 그림 8에서 보듯이 항체의 성장에 따라 RIU(refractive index unit)가 50초부터 급격히 커져서 약 2×10^{-3} 까지 상승한다. 즉 텍스트란 SAM에 항체가 잘 고정되고 있다는 것을 그림 8로부터 쉽게 알 수 있다. 그리고 약 600초부터는 항체가 없는 완충용액만을 바이오센서의 채널에 넣는데, 이 경우 불완전하게 결합한 항체의 일부가 활성화된 텍스트란 SAM에서 떨어지므로 RIU의 값이 약간 낮아짐을 알 수 있다.

그림 9는 본 논문에서 제작한 바이오센서의 감도 성능을 알아보기 위하여 RIU로 측정한 항체의 농도별 접합동특성의 결과이다. 항체의 주입속도는 펩타이드의 주입속도와 같은 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 로 흘려주었다. 여기에서 보면 리터당 항체량은 그림 8에서 사용한 양보다 훨씬 적은 5 ng(흑색선), 15 ng(적색선), 30 ng(청색선)으로 극미량의 항체를 3배, 6배로 늘리면서 RIU를 측정하였다. 그 결과 항체량에 따라 RIU가 4×10^{-6} , 12×10^{-6} , 24×10^{-6} 와 같이 정비례로 올라가는 것을 알 수 있다. 텍스트란 SAM과 항체만의 동특성에 대한 RIU의 최댓값에 대한 감도는 기존의 SPR의 최대 감도와 비슷하다^[4]. 또한 항체의 농도에 정비례하여 RIU의 최댓값이

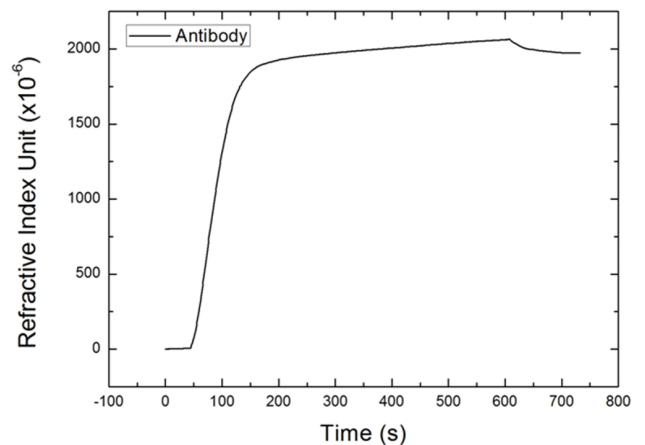


Fig. 8. Experimental graph shown by RIU(refractive index unit) of dynamics of antibody-Dextran SAM on biosensor in case of the antibody injection mass of 10 μg at the injection speed of 20 $\mu\text{l}/\text{min}$.

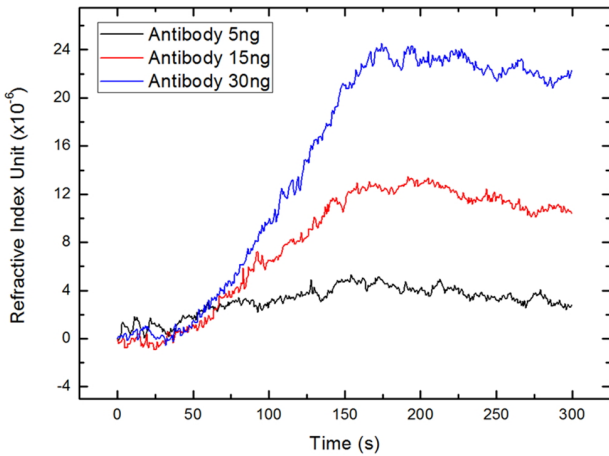


Fig. 9. Experimental graph shown by RIU(refractive index unit) of dynamics of antibody-Dextran SAM on biosensor in case of various antibody injection masses of 5 ng(black line), 15 ng(red line), and 30 ng(blue line) at the injection speed of 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

커지므로 항체는 텍스트란 SAM에 거의 전부 부착된다고 볼 수 있다. 그리고 이를 정량화하면 항체의 절대농도 측정도 가능하리라 본다.

그림 10은 그림 8의 항체에 펩타이드를 농도별로 흘려서 펩타이드와 항체간의 접합동특성을 측정(실선)한 결과와 펩타이드-항체 접합동특성 분석식인 식 (5)를 사용하여 피팅한 결과(점선)이다. 그림 10의 그래프에서 (a)는 펩타이드 몰농도가 100 nM(흑색선)인 경우이고, (b)는 펩타이드 몰농도가 200 nM(적색선)인 경우이며, 그리고 (c)는 펩타이드 몰농도가 400 nM(청색선)인 경우에 대한 접합동특성을 측정한 결과이다. 여기에서 펩타이드는 항체와 달리 극미량을 취급하므로 항체량을 나타내는 ng과는 다르게 몰농도를 표기하는 nM 단위를 사용한다. 펩타이드가 들어있는 완충용액의 속력은 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 이고, 주입(injection)시간은 10초이며, 펩타이드가 항체와 결합되는 로드(load)시간은 대략 120초 ~ 130초 사이이다. (a) ~ (c)의 경우 펩타이드에 의한 낮은 몰농도로 펩타이드를 흘려주기 시작했을 때부터 접합이 시작되어 RIU가 비선형적으로 올라가서 약 15×10^{-6} , 약 20×10^{-6} , 약 25×10^{-6} 의 최댓값을 보여준다. 이는 그림 9의 항체의 경우와는 다르게 펩타이드는 항체에 일부만 부착되기 때문에 펩타이드 몰농도와 RIU의 변화가 정비례하지 않는 것이다. 그리고 125초 이후에는 완충용액만 바이오센서의 채널에 주입되어 불완전하게 결합한 일부의 펩타이드가 해리가 되어 시간이 지남에 따라 RIU가 지속적으로 낮아지는 경향을 보인다. 그림 10에서는 SPR로 측정이 어렵다고 하는 100 nM의 펩타이드 몰농도임에도 불구하고 REBSS로 펩타이드 접합동특성의 정밀한 측정이 가능함을 알 수 있다.

그림 10의 점선들은 펩타이드 몰농도별 RIU의 변화한 측정값을 식 (5)를 이용하여 피팅한 그래프이다. 피팅한 결과와 실험 결과는 전반적인 경향이 일치하지만 완벽하게 일치하지는 않는다. 이는 식 (5)에서 펩타이드가 항체에 100% 흡

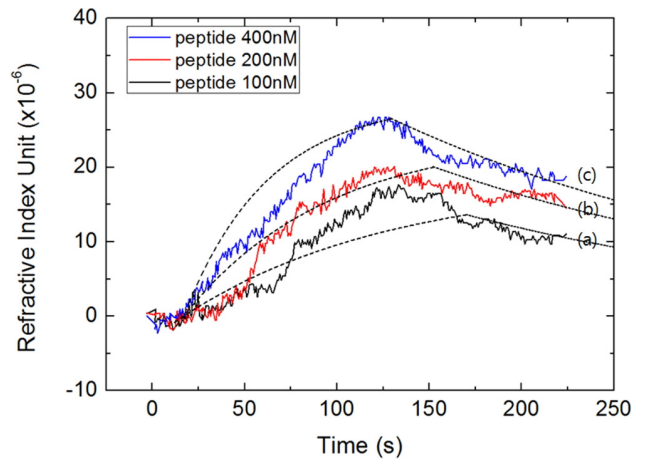


Fig. 10. Experimental graph(solid lines) and fitting curves(dotted lines) shown by RIU of dynamics of antibody-Dextran SAM on biosensor in case of various peptide mole density antibody injection mass of 100 nM(black line), 200 nM(red line), and 400 nM(blue line) at the injection speed of 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Table 1. Association rate constant k_a , dissociation rate constant k_d , and equilibrium dissociation rate constant K_D of peptide-antibody measured by rotating ellipsometric biosensor based on a silicon substrate

$k_a(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_d(\text{s}^{-1})$	$K_D(\text{nM})$
4.5×10^4	4.4×10^{-3}	97

착 및 해리를 한다고 가정하였으나, 앞서 설명하였듯이 펩타이드가 100% 항체와 흡착 및 해리를 하지 않고, 유로에 펩타이드가 흐르는 동안에 항체의 일부도 떨어져나가기 때문이다. 또한 본 논문에서 자체 제작하여 사용한 유로 시스템은 밸브가 프리즘 모듈에서 10 cm 정도로 멀리 떨어져 있어 이 거리를 이동하는 사이에 원래 몰농도보다 낮은 몰농도가 되어서 식 (5)의 k_a 와 k_d 가 부정확해지는 오차가 발생한다.

그림 10의 실험값을 식 (5)에 피팅한 결과, 표 1에서 보듯이 k_a 는 $4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 이고, k_d 는 $4.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 이다. 두 흡착 상수와 해리 상수로 부터 평형상태 해리상수 K_D 는 97 nM이 나왔다. 약물의 종류는 평형상태 해리상수 값에 따라 Class I, Class II, Class III 로 나뉜다^[14,15]. 평형상태 해리상수는 흡착상수와 해리상수에 의해 결정되기 때문에 하나의 K_D 값을 갖더라도 k_a 와 k_d 의 가능한 조합은 다양하다. 일반적으로 Class I은 1 nM ~ 100 nM를 갖고 있지만, 해당 범위 내에서도 k_a 와 k_d 의 값을 확인하여 약물로서 효용성이 높은 상태인 체내 빨리 흡수되고 약효가 오래 지속되는지 확인하여야 한다. 본 논문의 실험 결과 평형상태의 해리상수는 97 nM이기 때문에 Class I에 속하며, 빠른 흡착과 느린 해리를 확인하였다.

V. 결 론

본 논문에서는 EBSS를 이용하여 펩타이드와 센서 표면에 고정된 항체의 접합특성을 조사하였다. 실리콘 기반이기에 기존 SPR과는 다른 방식의 측정이 이루어 졌고 이를 바이오 센서에 접목하였다. 그리고 EBSS는 p-파 무반사 지점을 이용하여 측정 장비의 감도를 높게 끌어 올렸고, 반사된 광의 세기만을 측정하는 것이 아니고 편광 정도와 위상차를 분석함으로써 정확성을 높였다. 완충용액을 입사매질로 사용하고 실리콘을 센서 기판으로 사용하여 완충용액의 굴절률 변화에 거의 독립적으로 생체물질 접합동특성을 측정함으로써 또 다른 기준 채널이 필요 없이 1채널에서 모든 측정이 가능하도록 하였다.

본 실험에서는 극도로 낮은 몰농도의 펩타이드를 측정할 때 생기는 바이오센서의 기판의 편평도에 의한 오차를 줄이기 위하여 실리콘 기판 위에 텍스트란 SAM을 직접 적층하여 바이오센서를 만들었다. 항체를 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 주입속도로 10 μg 을 흘려주어 고정시킨 결과, 항체의 성장에 따라 RIU가 50초부터 급격히 커져서 약 2×10^{-3} 까지 상승하였다.

그리고 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 완충용액/펩타이드 주입속도에서 펩타이드를 몰농도별로 흘려주면 낮은 몰농도에서도 충분히 바이오센서가 측정이 가능한가를 알아보았다. EBSS로 기존 항체보다 2,000배 낮은 농도에서도 항체의 미세한 흡착 및 해리 특성을 정밀하게 측정할 수 있었다. 그리고 항체를 올린 실리콘 위에 펩타이드를 몰농도 별로 흘려주면서 몰농도에 대한 접합특성을 측정하였다. EBSS로 100 nM까지의 펩타이드에 대한 미세한 흡착 및 해리 특성을 정밀하게 측정할 수 있었으며 접합 동특성 식으로부터 계산된 이론값과 측정값이 어느 정도 일치함을 알 수 있었다. 그 결과, 접합특성 방정식인 식 (5)로부터 분석한 펩타이드의 k_a 는 $4.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 이고, k_d 는 $4.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 이며, 평형상태의 해리상수인 K_D 는 97 nM이므로 실험에 사용한 펩타이드-항체는 Class I에 속함을 알 수 있었다.

항후 펩타이드-항체의 접합 동특성을 분석하는 식 (5)에 불완전한 결합의 정도를 고려한 수정된 분석식을 구하여 보다 정확한 평형상태의 해리상수를 구할 예정이다. 그리고 EBSS를 활용한 고감도 바이오센서에서 유로 시스템을 보완할 경우, 저분자 물질을 포함한 고감도 측정이 요구되는 바이오물질의 접합특성 측정에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 이러한 펩타이드-항체 동특성 측정과 분석법은 어떤 펩타이드나 약물이 항체와 적절하게 안정적으로 결합 및 해리가 되는지를 구별할 수 있는 수단으로 사용될 수 있으리라 생각한다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 한남대학교 학술연구비조성 지원(2015A103)에 의하여 연구되었음.

References

1. Hyun Mo Cho, Yong Jai Cho, and Won Chegal, "Nano-bio convergence technologies using ellipsometry," The Korean Society of Mechanical Engineers Journal of the KSME, **44**, 57-61 (2004).
2. Su Jin Koo, "Surface Plasmon Resonance," The Korean Society For Biotechnology And Bioengineering BT NEWS, **11**, 24-34 (2004).
3. Nico J. Mol, Marcel, and J. E. Fischer, "Surface plasmon resonance," Humana Press (2010).
4. Gyeong Sik Ok and Gwang rak Go, "Analysis of interfacial phenomena in nano-level using surface plasmon resonance," Polymer Science and Technology, **13**, 825-832 (2002).
5. A. V. Nabok, A. Tsargorodskaya, A. K. Hassan, and N. F. Starodub, "Total internal reflection ellipsometry and SPR detection of low molecular weight environmental toxins," Applied Surface Science, **246**, 381-386 (2005).
6. H. J. Kang, Y. J. Kang, Y.-M. Lee, H.-H. Shin, S. J. Chung, and S. Y. Kang, "Developing an antibody-binding protein cage as a molecular recognition drug modular nanoplatfrom," Biomaterials, **33**, 5423-5430 (2012).
7. M. S. Diware, H. M. Cho, W. Chegal, Y. J. Cho, J. H. Jo, S. W. O, S. H. Paek, Y. H. Yoon, and D. Kim, "Solution immersed silicon (SIS)-based biosensors: a new approach in biosensing," Analyst, **140**, 706-709 (2015).
8. M. A. Azzam and N. M. Bashara, "Ellipsometry and polarized light," North-Holland (1997).
9. H. G. Tompkins, "A user's guide to ellipsometry," Academic, (1993).
10. H. Fujiwara, "Sepectroscopic ellipsometry principle and applications," John Wiley & Sons (2007).
11. I. S. An, "Ellipsometry," Hanyang University Press (2007)
12. Daniel J. O'Shannessy, Michael Brigham-Burke, K. Karl Soneson, Preston Hensley, Ian Brooks, "Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: Use of nonlinear least squares analysis methods," Analytical Biochemistry, **212**, 457-468 (1993).
13. K. Alftan, "Surface plasmon resonance biosensors as a tool in antibody engineering," biosensors & bioelectronics, **13**, 653-663 (1998).
14. C.-Y. Wu and L. Z. Benet, "Predicting Drug Disposition via Application of BCS Transport, Absorption, Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System," Pharmaceutical Research, **22**, 11-23 (2005).
15. H. K. Sah, K. S. Lee, and M. S. Baek, "Implementation of biopharmaceutics classification system concepts in developing dissolution tests," J. Kor. Pharm. Sci., **36**, 161-167 (2006).