

I. 서 론

최근에 광학 원리를 사용해서 단백질에 관련된 질병들을 진단하는 연구들이 많은 관심을 끌고 있다 [1,2]. 특히, 표면 플라즈몬 공명 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 원리를 이용한 생체 분자들이 흡착되는 생체표면 특성 연구 [3]을 비롯해서 유린(urine) 속 단백질 흡착 연구 [4], 혈청 속의 헤파린(heparin) 흡착 연구 [5], 등 단백질 분자의 흡착 연구는 생체 분자(biomolecules)들 사이의 다양한 상호작용에 대한 좋은 예들을 보여 주고 있다. 이러한 특정 물질 흡착 연구는 의학 등 기초분야 [6, 7]뿐만 아니라, 식품, 환경 등 응용분야[8-10]에도 많이 수행되었다.

의학 기초분야 중에서 혈청 단백질 속의 주성분인 알부민과 관련된 질병을 진단하는데 관심이 있다. 알부민과 관련된 질병은 알부민의 체내 농도에 따라 크게 고 알부민혈증(hyperalbuminemia)과 저 알부민혈증(hypoalbuminemia)으로 구분되어 진다. 고 알부민 혈증인 경우에는 탈수증세(dehydration)가 나타나는데 반해, 저 알부민 혈증인 경우에는 신증후군(Nephrotic Syndrome), 간경변(cirrhosis), 심한 영양부족(severe malnutrition) 등과 같은 증세가 나타난다 [11-13]. 이러한 알부민 관련 질병 진단을 위해서는 무엇보다도 혈중 알부민 농도를 정밀하게 측정하는 게 요구되므로, 알부민 흡착 연구가 활발하게 진행되고 있다. 예를 들면, 알부민 흡착 및 탈착 동역학에 대한 연구 [14], 항원-항체(antigen-antibody) 상호작용 [15]에 대한 연구 등이 발표되었다.

본 논문에서는 알부민의 농도와 유속이 알부민 초기 흡착 율에 미치는 영향에 대한 자세한 연구를 통해서 알부민 흡착에 대한 물질수송 효과(effect of mass transport)를 체계적으로 연구하고자 한다. 이러한 물질수송 효과 실험을 통해서 생체내의 알부민 농도를 예측하는데 사용될 기초자료를 얻을 수 있어서, 알부민 관련 질병 진단에 도움을 줄 수 있다.

이미 오래 전부터 생체 실험을 위해서 여러 가지 바이오 센서들이 사

용되었다 [16,17]. 그러나 이러한 기존의 장비는 크기도 거대하고, 질병 진단에 필요한 샘플의 양도 많이 요구되고, 질병을 진단하는데 까지 시간도 많이 소요되어서 경제적으로나 시간적으로 부담이 매우 크다. 그래서 SPR 원리와 디지털 신호처리 칩 기술을 결합시켜 최근 개발된 실용적이고 소형화 된 스프리타(SPREETTA™) 센서 [18]를 사용해서 단백질 흡착연구를 하였다. 그 결과, 생체 분자들 사이의 상호작용을 연구할 때 생체분자에 전처리 과정 없이(without label) 수행할 수 있게 되어서 기존의 장비보다 신속하고, 정확한 실험결과를 기대할 수 있다. 또한 실험에 필요한 샘플의 양도 적게 들어 경제적인 실험을 할 수 있다 [19, 20].

본 논문에서는 소형화 된 실용적인 스프리타 센서를 이용해서 알부민 흡착에 미치는 물질수송 효과를 연구했다. 이러한 물질 수송효과는 알부민 분자들이 금 표면에서 확산되는 경우보다 결합되는 경우가 더 지배적일 때 나타난다. 알부민 용액의 농도와 유속을 바꿔가면서 스프리타 센서를 통해서 초기에 흡착된 알부민의 굴절지수를 실시간으로 정밀하게 측정하였다. 이렇게 측정된 굴절지수를 통해서 흡착된 알부민 양을 알 수 있다. 그 결과, 초기 흡착된 알부민 양이 농도에 대해서는 선형적으로 증가하고, 유속에 따라서는 $v^{1/3}$ 형태로 증가함을 발견하였다. 이러한 실험한 결과는 기존의 이론적인 결과 와도 잘 일치하며, 향후 스프리타가 알부민 관련 질병 진단 센서로 개발되는데 유용한 자료로 사용되어질 수 있다.

II. 표면 플라즈몬 공명 원리

표면 플라즈몬 공명(Surface plasmon resonance, SPR) 현상 [3]은 그림 1에서와 같이 설명된다. 굴절률이 서로 다른 두 투명한 매질 즉, 고 굴절 기질인 프리즘과 금 박막의 경계면에서 프리즘을 통해 800nm 파장을 가진 입사한 광의 일부분은 반사가 되고 부분적으로는 굴절이 된다. 서로 다른 두 매질의 굴절률 비로 결정되는 어떤 특정한 입사각 이상에서 모든 광은 다른 매질로 굴절되지 않고 전부 반사된다. 이때 소산파(Evanescent wave)라고 불리는 전자기파 성분이 금 박막 표면 위 물질의 굴절률에 따른 특정한 입사 각도에서 광의 굴절률이 낮은 매질로 매우 짧은 거리 만큼 흡수된다. 이러한 현상을 표면 플라즈몬 공명 현상이라고 말한다. 여기서 입사 광에 의해 생기는 소산파의 벡터 성분(K_{ev})은 프리즘의 유전율 ϵ_p 과 입사각 θ 에 의해 다음과 주어진다.

$$K_{ev} = \frac{\omega}{c} \epsilon_p \sin \theta \quad (1)$$

여기서 ω 는 입사광의 진동수 이고, c 는 광속이다.

그리고 표면 플라즈몬 파의 벡터 성분(K_{sp})은 표면 물질의 유전율 ϵ_s 와 금 박막의 유전율 ϵ_m 에 의해 다음과 같이 주어진다.

$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_m + \epsilon_s}} \quad (2)$$

플라즈몬 공명은 위의 두 식 (1)과 (2)가 일치 할 때 즉, 소산파와 표면 플라즈몬 파의 위상이 일치 할 때 발생한다. 이러한 공명이 발생하면 입사광의 반사도는 급격하게 감소하게 되며 이때 입사각 θ^* 을 공명각이라고 부른다. 이러한 공명각의 변화는 그림 2에 잘 나타나 있다. 그림 2는 단백질의 흡착 과정을 실시간으로 나타냈으며, 동시의 공명각의 변화

도 나타냈다. 단백질이 표면으로 흡착 할 때 공명각은 단백질이 흡착되지 않은 상태의 θ_1 에서 표면에 포화 흡착 될 때의 θ_2 로 변한다. 이렇게 얻어진 공명각을 통해 표면 물질의 굴절률 n_s 을 식(3)과 (4)에 의해 구할 수 있다.

$$\epsilon_s = \frac{\epsilon_{mr} \epsilon_p \sin^2 \theta^*}{\epsilon_{mr} - \epsilon_p \sin^2 \theta^*} \quad (3)$$

$$n_s = \sqrt{\epsilon_s} \quad (4)$$

따라서 표면 플라즈몬 공명 현상은 근접 표면에서 굴절률의 매우 민감한 변화 및 생체 분자의 상호 작용에 의한 변화를 관찰 할 수 있고, 공명각은 전자기파가 흡수되는 용액의 굴절률에 따라 달라진다.

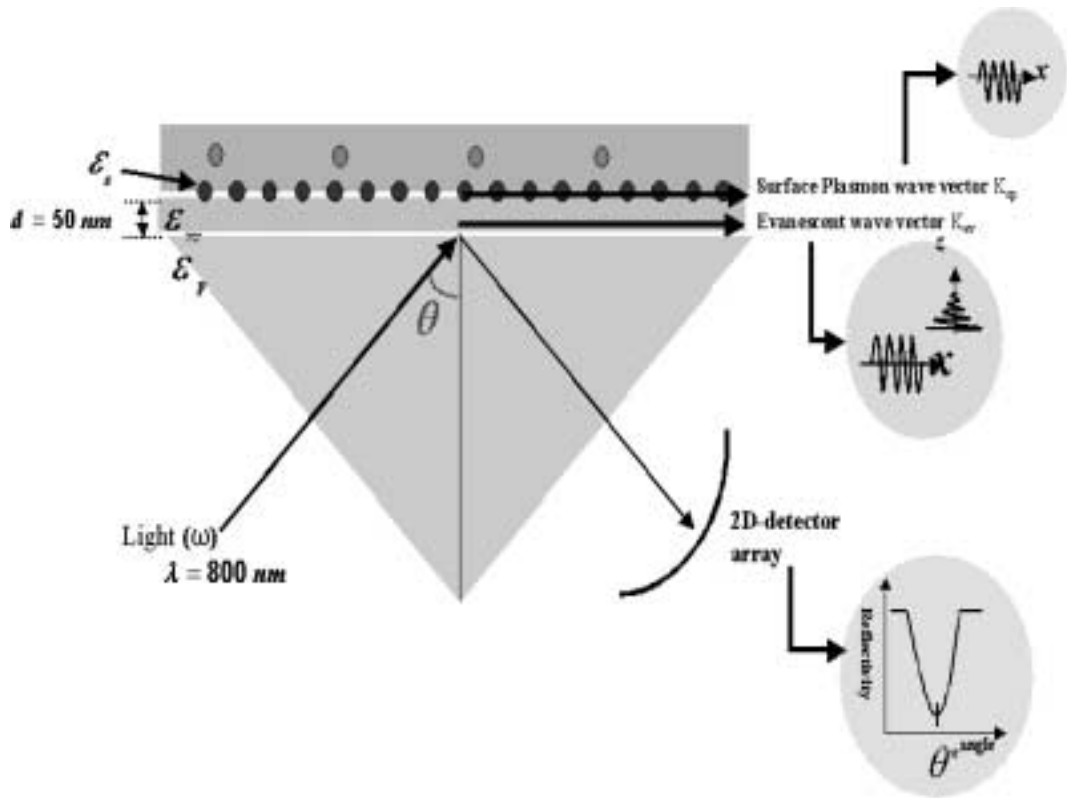


Fig. 1. A configuration for SPR. Resonance of a surface plasmon is excited at the metal/prism interface when the angle of incidence of light is such that the evanescent component of its wave vector (K_{ev}) is equal to the wave vector of the propagating surface plasmon (K_{sp}).

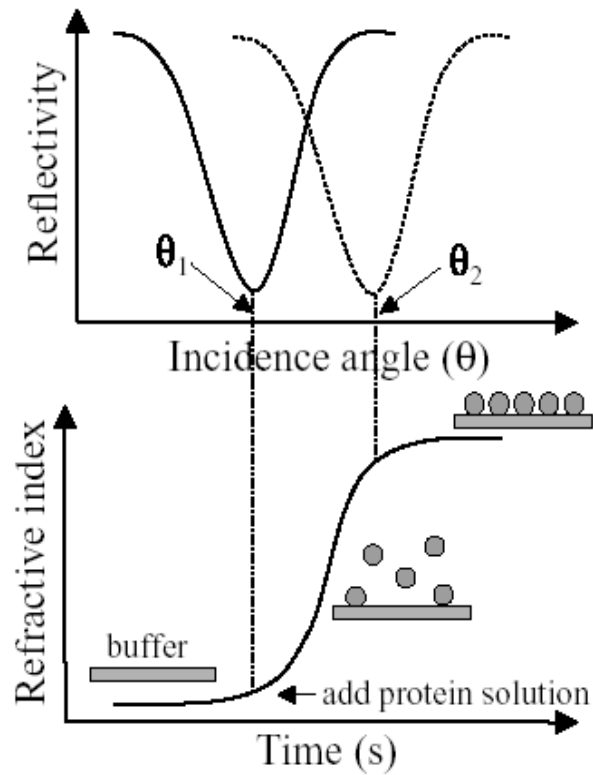


Fig. 2. A schematic example of an SPR adsorption profile for the adsorption protein to metal film. The change in the value of the resonance angle ($\theta_1 \rightarrow \theta_2$) is used to monitor the kinetics of adsorption.

Ⅲ. 물질 수송 원리

물질 수송 효과(Mass Transport Effect) [21-25]는 용액 속의 특정 분자가 매질의 표면으로 흡착될 때 확산에 의한 것보다 매질의 리간드(ligand) 결합에 의한 흡착이 강할 때 혹은 더 지배적일 때 나타난다. 이러한 물질 수송 원리는 그림 3의 두 칸막이 모델에 의해 설명된다. 즉 외부와 내부로 나뉜 두 칸막이 모델에서 외부 칸막이 속 용액의 농도를 c , 내부 칸막이 속 농도를 c' 이라고 보았을 때 다음과 같은 식이 성립된다.

$$Vdc'/dt = S(-k_a c' R + k_d B) + k_+(c - c') \quad (4)$$

$$dB/dt = k_a c' R - k_d B \quad (5)$$

여기서 V 는 내부 칸막이의 부피, S 는 분자의 표면적, R 은 매질 리간드의 농도, B 는 분자와 리간드가 결합된 상태의 농도 k_a 와 k_d 는 흡·탈착 계수를 말한다.

이때 초기 흡착 율에 대해 다시 정리 하면 즉, $t=0$ 일 때 $dc'/dt=0$ 가 된다. 이것을 (4)와 (5)식에 넣고 정리하여 초기 흡착 율을 다음과 같이 구할 수 있다.

$$dB/dt = k_f^e R c - k_r^e B \quad (6)$$

여기서 유효 상수 k_f^e 와 k_r^e 을 정리하면 (7)식과 같다.

$$k_f^e = \frac{k_a}{1 + k_a R S / k_+}, k_r^e = \frac{k_d}{1 + k_a R S / k_+} \quad (7)$$

만약 매질 리간드의 농도가 무한대라고 가정하면, (6)식은 아래와 같이 다시 쓸 수 있다.

$$\lim_{R \rightarrow \infty} dB/dt = k_+ c / S \quad (8)$$

여기서 k_+/S 는

$$k_+ / S = k_m = \frac{1}{\Gamma(4/3)} \left(\frac{3vD^2}{2hl} \right)^{1/3} \approx 1.282 \left(\frac{vD^2}{hl} \right)^{1/3} \quad (9)$$

이다. 여기서 h 와 l 은 칸막이의 높이를 D 는 확산 계수, k_m 은 물질 수송 상수, v 는 유속을 말한다.

(6)의 식을 간단히 하면 다음과 같다.

$$dB/dt \propto ck_m \quad (k_m \propto v^{1/3}) \quad (10)$$

따라서 시간에 따른 흡착율은 용액의 농도에 선형적으로 비례하고, 주입 유속의 3분의 1승에 비례함을 알 수 있다. 즉, 물질 수송 이론 [21-25]에선 용액의 농도와 주입유속이 초기 흡착율을 결정 짓는다.

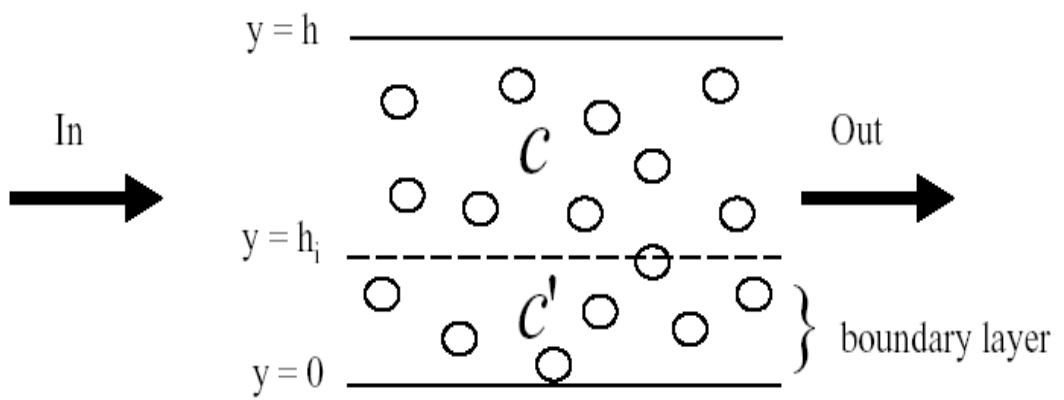


Fig. 3. A two-compartment model.

IV. 실험 방법

1. 용액의 준비 및 조성

알부민 흡착에 대한 물질 수송 효과를 연구하기 위해 다음과 같은 용액을 준비 하였다. 외부로부터 어느 정도의 산 또는 염기를 가해도 그것들의 영향을 받지 않고, 수소 이온 농도를 일정하게 유지하는 완충 용액으로 0.05M의 인산 나트륨(sodium phosphates)과 0.45%의 염화 나트륨(NaCl) 과 0.01%의 나트륨 산(sodium acid)의 조성을 가지고 산성도(pH)가 7.2인 Phosphate Buffered Saline(PBS 10X)을 사용했다.

세척 용액으로는 본격적인 실험에 들어가기 전에 금 박막과 기타 실험 장비를 세척하는 100% 에틸알코올(Ethyl Alcohol)과 피라나 용액(piranha solution)을 준비 했고, 본격적인 실험에는 0.1M의 수산화 나트륨(NaOH)과 1%의 TritonX-100의 조성을 가진 용액을 사용하였다.

알부민 용액은 사람 혈장의 fraction5로부터 필수 지방산이 제거되어 동결 건조되어 미국 시그마(Sigma, St. Louis, USA)사에서 제공된 알부민을 사용하여 알부민 대 완충 용액을 1대 1의 비율로 혼합했다. 이렇게 혼합한 최고농도 1mg/ml을 만들었으며, 이 농도의 용액을 분주(aliquot)하여 다양한 농도의 용액이 필요할 때마다 완충 용액에 희석 시켜 실험 재료로 사용했다.

이 밖에 금 박막을 센서에 고정할 때 필요한 보정 용액(index matching liquid)을 준비 했고, 모든 용액을 희석하고 센서 교정 시에 필요한 3차 증류수를 준비했다.

알부민 용액에서 알부민의 변질을 막기 위해 장기 보관 시 -24°C 에 냉동 보관 하고, 단기 보관 시에는 다른 용액과 마찬가지로 4°C 에 냉장 보관 하였다.

2. 실험 장치

물질 수송 효과를 보기 위해 갖추어야 할 실험 장비는 크게 센서와 유로 장비(flow system)로 나누어 진다.

SPR원리에 기반을 둔 소형화 된 실용적인 스프리타 센서[Texas Instrument, USA]의 내부 구조는 그림 4와 같다.

이 센서 칩은 유리판 위의 50nm 두께의 금 박막이 입혀졌고, 800nm 파장의 광원이 사용되었으며, 공명각을 읽어 내는 검파기(2D-photodiode-detector-array)로 구성되었다.

이러한 스프리타 센서의 굴절률 측정 가능한 범위는 1.29에서 1.43으로 액체 상태의 물질만 측정 가능하고, 센서의 크기는 길이 4.1cm, 높이 1.85cm 이다.

Flow system은 주사 펌프(syringe pump), 주입 밸브(injection valve), 주사기로 구성되어 있다.

Syringe pump는 (주)건아 정보 기술에서 종래의 수동 조절 방식의 부정확한 주입 방식을 탈피하여 미세 자동 조절 장치의 채용으로 주사 크기(Syringe size)를 조절 선택할 수 있고, 주입활동과 주입속도를 자유자재로 입력 사용할 수 있으며, 특히 문자표시기를 사용하여 프로그램 오류, 경과시간, 주입된 양 등을 문자와 숫자로 표시하며 항시 동작상태를 확인할 수 있도록 만든 펌프로 주입 유속이 최소 0.003 μ l/h 에서 30 ml/min 까지 조절 가능한 KASP005/150MT 모델의 장비를 사용 하였다.

3. 실험 과정

우선 금 박막을 세척하기 위해 피라나 용액에 금 박막을 24시간 담가 두었고, 그 후에 3차 증류수와 에틸 알코올을 사용하여 세척하고 질소를 불어 금 박막을 말렸다. 이렇게 준비된 금 박막을 에틸 알코올로 닦아 준비한 센서의 표면에 굴절률 보정 용액 2 μ l을 떨어뜨려 금 박막을 고정시킬 때 금 박막을 센서의 판독(sensing) 범위를 벗어나지 않고, 보정 용액이 주위로 새지 않도록 주의하여 고정시켰다.

그 다음 그림 5와 같이 플로우 셀(flow cell)을 덮고 테프론 튜브를 고정시키고, 주입 밸브와 주사 펌프, 주사기를 연결하여 플로우 시스템을 갖춘 후 공기 주입 상태에서 센서 초기화를 시키고 3차 증류수를 그림 5의 화살표 방향으로 흘려 센서 교정(calibration)을 하였다 그 후, 0.1M 수산화 나트륨과 1%의 TritonX-100조성을 가진 용액과 3차 증류수를 각각 3회 반복하여 흘려 보내면서 센서를 준비하면서 동시에 세척 하였다.

이후에 완충 용액을 흘려 기준을 설정하고 알부민 용액의 농도와 유속을 바꿔가면서 스프리타 센서를 통해서 초기에 흡착된 알부민의 굴절지수를 실시간으로 정밀하게 측정하였다.

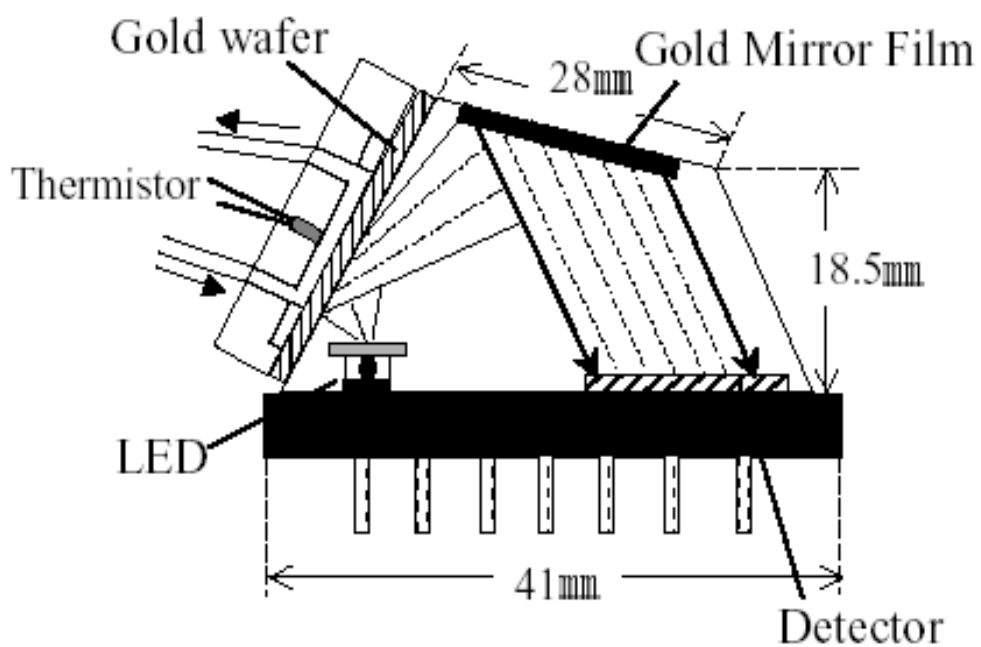


Fig. 4. The inner structure of miniature SPR sensor *Spreeta*TM.

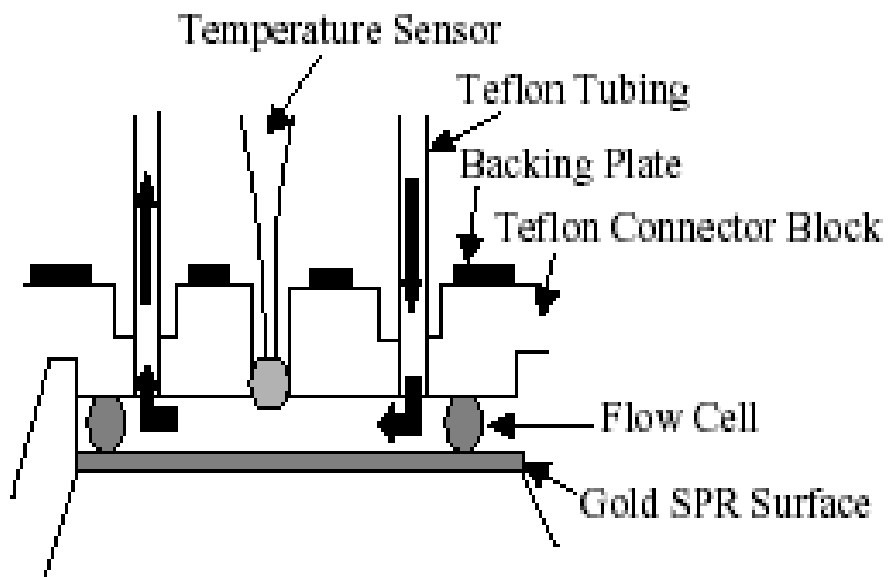


Fig. 5. The experiment process – Injection of solutions.

V. 실험 결과

1. 농도 변화에 따른 물질 수송 효과

그림 6은 용액의 주입 유속을 각각 5, 15, 125 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 고정 시키고 알부민 용액의 농도를 고정된 주입 유속에 따라 5, 20, 35, 50, 70, 85, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 변화 시켜가면서 물질 수송 효과를 본 결과이다. 실선은 실험 데이터를 피팅(fitting)한 값이고 (●)은 각 농도 변화에 따른 초기 흡착율을 본 실험 값이다. 표 1에는 실험 데이터를 fitting한 결과가 나타나 있다.

물질 수송 이론에 따르면 주입 유속이 고정 되어 있기 때문에 알부민의 초기 흡착율은 알부민의 농도에 선형적으로 비례해야 한다. 실험 결과를 볼 때도 이와 같음을 알 수 있다.

2. 유속 변화에 따른 물질 수송 효과

그림 7은 알부민 용액의 농도를 각각 5, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 고정 시키고 주입 유속을 고정된 알부민 용액의 농도에 따라 15, 25, 36, 52, 72, 96, 125 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 변화 시켜가면서 물질 수송 효과를 본 결과이다. 그림 7도 그림 6과 마찬가지로 실선은 실험 데이터를 fitting한 값이고 (●)은 각 주입 유속 변화에 따른 초기 흡착율을 본 실험 값이다. 그림 7의 x축은 유속의 3분의 1승 값으로 표시 하였다. 그리고 표 2에는 실험 데이터를 fitting 한 결과가 나타나 있다.

이 경우도 물질 수송 이론 결과와 같이 농도가 고정되어 있으면 초기 흡착율은 주입 유속 변화에 대해 $v^{1/3}$ 에 비례해야 한다. 실험 결과도 이론과 잘 일치 함을 볼 수 있다.

물질 수송 이론에서 초기 흡착율을 결정 짓는 주요 변수인 농도와 유

속에 대한 초기 흡착 율을 본 실험값이 이론과 잘 일치하고 있는 것을 알 수 있다.

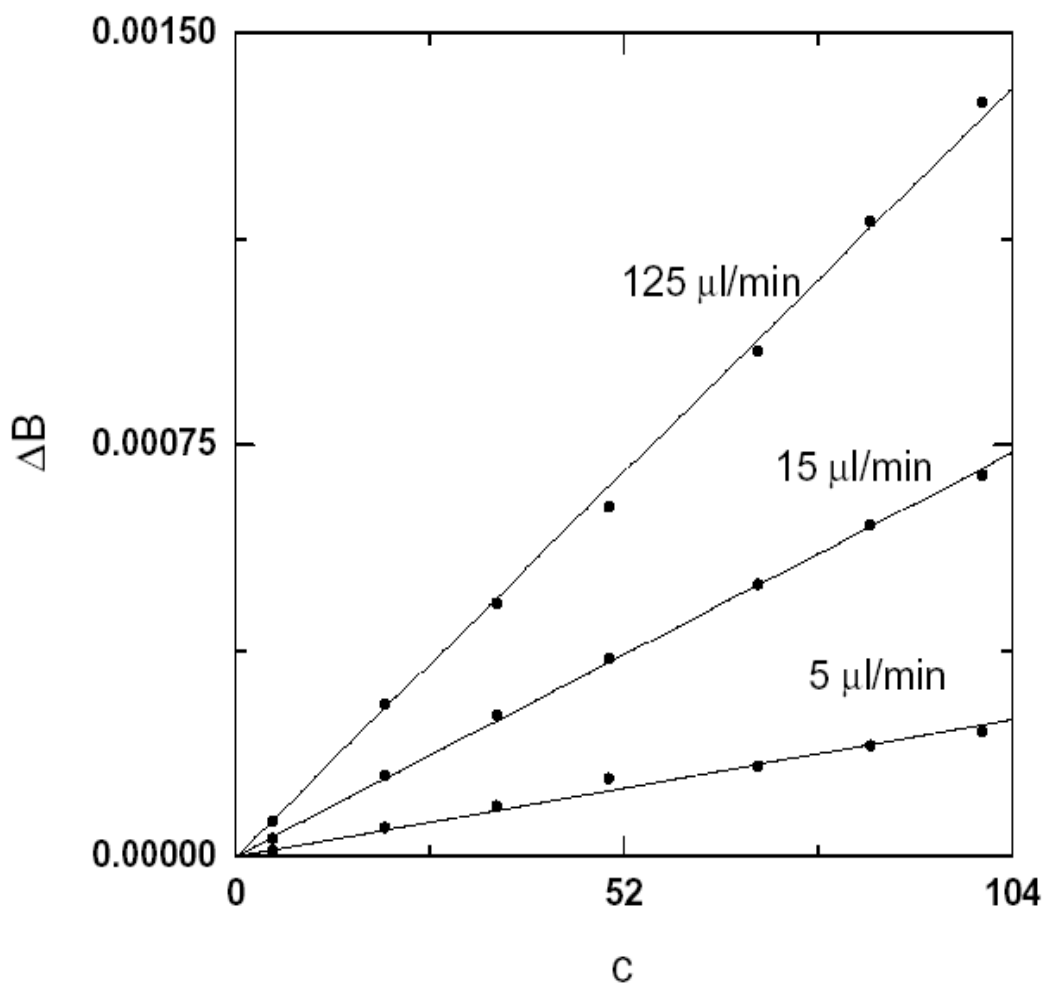


Fig. 6. Mass transport effect by albumin concentration – 5, 20, 35, 50, 70, 85, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$: (●) data, (—) fitting line.

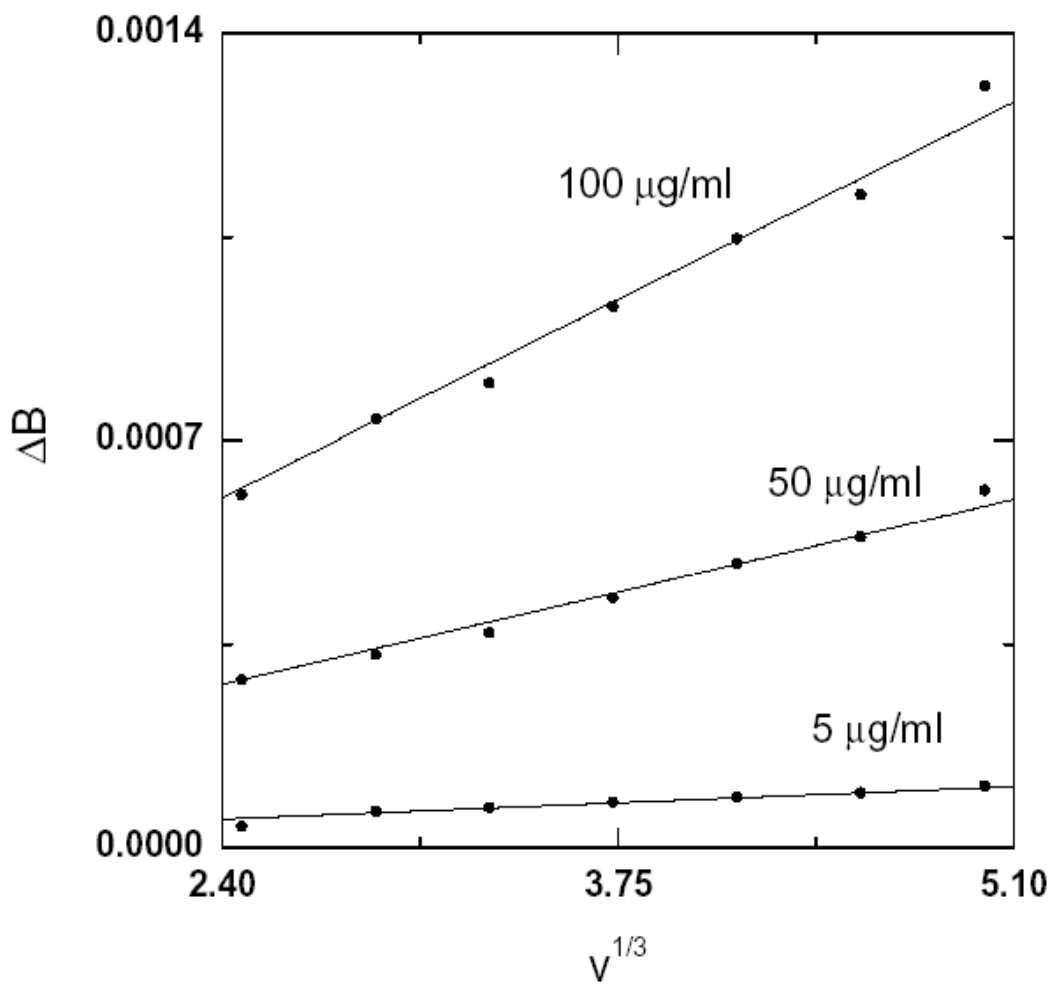


Fig. 7. Mass transport effect by flow rate -15, 25, 36, 52, 72, 96, 125 $\mu\text{l/min}$: (●) data, (—) fitting line.

Table 1. Mass transport effect by concentration

Fixed value ($\mu\ell/\text{min.}$)	Slope
5	$2.40 \times 10^{-6} \pm 6.95 \times 10^{-8}$
15	$7.07 \times 10^{-6} \pm 4.60 \times 10^{-8}$
125	$1.35 \times 10^{-5} \pm 1.35 \times 10^{-7}$

Table 2. Mass transport effect by flow rate

Fixed value ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Slope
5	$2.07 \times 10^{-5} \pm 6.03 \times 10^{-7}$
50	$1.17 \times 10^{-4} \pm 1.48 \times 10^{-6}$
100	$2.51 \times 10^{-4} \pm 2.82 \times 10^{-6}$

VI. 결 론

소형화 된 실용적인 스프리타 센서가 질병진단 센서로 개발 가능한지 알아보는 기초 자료를 얻기 위해 이 센서를 사용하여 알부민 흡착 시 물질 수송 효과를 연구 했다. 물질 수송 효과를 보기 위해 금 박막에 다양한 농도의 알부민 용액을 흘려주어 흡착된 알부민 굴절지수에 대한 실시간 측정을 통해 각 농도별 실험 값을 얻었다. 또한 다양한 유속 조건에 대한 실험 값도 얻었다.

각각 흡착된 알부민의 굴절 지수를 구하여 초기의 흡착된 양의 변화를 얻을 수 있었다. 따라서 금 박막에 흡착된 초기 흡착 율 대 농도의 변화 사이의 상관 관계와 초기 흡착 율 대 유속 변화 사이의 상관 관계를 구한 실험 값을 fitting 하여 얻은 결과 에러범위가 E-6 ~ E-8 정도로 상당히 작게 나왔다. 즉 물질 수송 이론에 잘 맞는 결과를 얻었다.

본 실험에서 잡은 모든 농도 조건과 유속 조건에서 이론 결과와 같은 관계가 유지 됐다. 이러한 실험적 결과는 기존의 물질수송 이론 결과와도 잘 일치하며, 향후 스프리타 센서가 알부민 관련 질병 진단 센서로 개발되는데 필요한 기초 자료가 된다고 생각한다.

참 고 문 헌

1. K. N. Baker, M. H. Rendall, A. Patel, P. Boyd, M. Hoare, R. B. Freedman and D. C. James, Trends in Biotechnol. **20**, 149–156 (2002).
2. S. Tsoka, A. Gill, J. L. Brookman and M. Hoare, J. Biotechnol. **63**, 147–153 (1998).
3. R. J. Green, R. A. Frazier, K. M. Shakesheff, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J.B. Tendler, Biomaterials **21**, 1823–1835 (2000).
4. G. Reid, H. J. Busscher, S. Sharma, M. W. Mittelman and S. McIntyre, Surf Sci .Rep. **21**,251–273 (1995).
5. K. Gaus, E. A.H. Hall, Biosens. Bioelectron. **13**, 1307–1315 (1998).
6. V. Hlady and J. Buijs, Curr. Opin. Biotechnol. **7**, 72–77(1996).
7. D. G. Myszka, Curr. Opin. Biotechnol. **8**, 50–57 (1997).
8. J. Melendez, R. Carr, D. U. Bartholomew, H. Taneja, S. Yee, C. Jung, C. Furlong, Sens. Actuators B **38–39**, 375–379 (1997).
9. R. Ballerstadt and J. S. Schultz, Sens.Actuators B **46**, 50–55 (1998).
10. W. Cha and R. L. Beissinger, J. Colloid Interface Sci. **177**, 666–

- 674 (1996).
11. J. P. Urizar, Francisco J. F. Murrieta and G. C. Hernández, *Life Sciences*, **71**, 1015–1022 (2002).
 12. J. Joven, E. Espinel, J. M. Simó, E. Vilella, J. Camps and A. Oliver, *Atherosclerosis*, **126**, 243–252 (1996).
 13. S. Horie, H. Nagai, T. Yuuki, S. Hanada and N. Nakamura, *General Pharmacology*, **31**, 811–815 (1998).
 14. J.R. Conder and B.O. Hayek, *Biochem. Eng. J.* **6**, 225–232 (2000).
 15. D. G. Myszka, T. A. Morton, M. L. Doyle, I. M. Chaiken, *Biophys. Chem.* **64**, 127–137 (1997).
 16. G. Davis, *Biosensors*, **1**, 161–178 (1985).
 17. G. Jönsson and L. Gorton, *Biosensors*, **1**, 355–368 (1985).
 18. <http://www.ti.com/spreeta>.
 19. R. L. Rich and D. G. Myszka, *J. Mol. Recog.* **13**, 388–407 (2000).
 20. C. L. Baird and D. G. Myszka, *J. Mol. Recog.* **14**, 261–268 (2001).
 21. P. Schuck and A. P. Minton, *Anal. Biochem.* **240**, 262–272 (1996).

22. R. W. Glaser, *Anal. Biochem.* **213**, 152–161 (1993).
23. D. G. Myszka, X. He, M. Dembo, Thomas A. Morton, and Byron Goldstein, *Biophys. J.* **75**, 583–594 (1998).
24. T. Mason, A. R. Pineda, C. Wofsy, B. Goldstein, *Math. Biosci.* **159**, 123–144 (1999).
25. J. Melendez, R. Carr, D. U. Bartholomew, K. Kukanskis, J. Elkind, S. Yee, C. Furlong, R. Woodbury, *Sens. Actuators B* **35–36**, 212–216 (1996).