A401

Membrane Strip 크로마토그래피 방법에 기초한 전기화학발광 (Electro-Chemiluminescence) 면역센서의 개발

윤채하, 백세환
고려대학교 생명공학원, 바이오센서 시스템공학 연구실
전화 (02) 3290-3438, Fax (02) 923-9923

Abstract

A disposable, electro-chemiluminescent immunosensor utilizing a screen-printed carbon electrode and liposome coupled to antibody as tracer has been constructed. In proportion to the analyte (*Legionella* species as a model) concentration, the analyte-immunoliposome complexes were transferred by the capillary action through a membrane strip to the electrode, the liposomes were lysed in the presence of detergent, and ruthenium was released for signal generation. Such performance of the immunosensor was appropriate for a point-of-care testing.

서론

다양한 분석물질 (병원균, 환경호르몬 등)을 측정하기 위하여 높은 민감도와 특이성을 제공하는 면역분석법이 널리 이용되고 있다. 이러한 면역분석법에 전기화학발광 (electro-chemiluminescence, ECL) 신호발생방법을 접목시키면 비특이신호가 비교적 낮아 측정민감도가 향상될 것으로 예측된다. 본 연구에서는 전기화학발광체로써 ruthenium을 사용하였고 발광체를 운반하는 물질로써 리포좀을 도입하였다.[1] 리포좀은 내부에 많은 양의 표지물질을 포획할 수 있는 특성이 있으므로 ECL 신호발생 시 증폭효과를 얻을 수 있는 면역센서의 개발을 시도하였다. 특히 사용의 간편성을 도모하기 위해 membrane 상에 항체가 고정화된 면역스트립과 후막전극간의 물질전달을 모세관현상을 이용하여 자발적으로 수행하였고, 최적조건 하에서 분석물질 농도에 대한 신호응답을 구하였다.

재료 및 방법

ECL 신호발생원으로는 ruthenium을 사용하였고, 후막 전극은 탄소/은페이스트를 각기 다른 플라스틱 표면에 스크린프린팅하여 전극을 제조하였다. 각 전극은 glass fiber membrane이 위치한 capillary gap의 상부 및 하부에 위치하게 조립하였고 탄소 전극은 140℃에서 10분간 건조하였고 스크린 프린팅을 3회 실시하였다. 전압공급은 wave 형태로 2.5~3.5 V에서 50 mV/s로 공급하였다. 신호를 증폭하기 위해 신호발생원인 ruthenium을 리포좀에 포획하였고 제조된 리포좀은 size exclusion chromatography 방법을 이용하여 분리하였다. 정제된 단일클론 항체는 thiol 반응기를 부여하여 활성화된 리포좀과 반응시켜 면역리포좀을 합성하였고 Bio-gel A5m

column을 이용하여 면역리포좀을 분리하였다.[2] 분석물질 농도에 대한 ECL신호를 발생시키기 위해 네 종류의 membrane strip을 이용하여 면역 strip 시스템을 구성하였다. 하단으로부터 시료첨가패드, 항원 패드 (미반응 면역리포좀 제거), 계면활성제 패드 (리포좀 파괴), 그리고 전극이 내장된 capillary gap (ECL 신호발생)의 순서로 연결하여 구성하여 CCD detector가 장착된 spectrometer를 이용하여 620 nm에서 광학신호를 측정하였다.

결과 및 고찰

전기 화학발광에 이용될 전극재질은 탄소/은 전극계를 선택하였고 알칼리 조건 하에서 세척하였고 분석 시 친수성 표면을 제공하기 위해 계면활성제로 처리한 후 capillary gap 내의 3차원 공간에 배열하였다. 이와 같이 구성된 센서를 이용한 ruthenium으로부터의 ECL 신호는 그 농도에 정비례하여 증가하였고 탐지하한농도는 5 nmol/mL인 것으로 나타났다. 신호발생원 운반체로써 리포좀의 제조 시 freezing/thawing sonication 방법이 높은 포획률을 제공하였을 뿐만 아니라 높은 재현성을 나타내었다. 미 포획된 ruthenium을 리포좀으로부터 분리하기 위해 사용된 Sephadex G-50 크로마토그래피 분리성능이 뛰어났고 표지물질의 포획률은 약 60%로 나타났다. 합성된 리포좀은 항체와 화학결합되었고 이와 같이 제조된 면역리포좀의 활성을 보기 위해 microwell 상에서 ELISA를 실시한 결과 면역 리포좀을 만 배 희석 시에도 신호가 발생하는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로써 면역리포좀의 항체 활성이 유지되는 것을 알 수 있었다. 모델분석물질에 대한 ECL 신호발생을 위해 각 기능성 패드를 연결하여 조립한 후 membrane strip 면역센서의 면역리포좀의 양에 따른 농도응답을 구한 결과 10~30 μL에서 선형적인 관계를 얻을 수 있었다. 분석물질 농도에 따른 측정하한농도는 상대적으로 낮은 것으로 나타났고 이것은 리포좀 파괴 시 방출되는 지질분자에 의해 전극표면에서의 전자전달이 방해되고 또한 사용된 CCD 탐지기의 측정민감도가 낮기 때문으로 판단된다.

요약

스크린프린팅 된 탄소전극과 항체가 결합된 리포좀을 이용한 일회용 전기화학발광 면역센서를 구성하였다. 분석물질농도에 비례하여 분석물질-면역리포좀 복합체는 모세관현상에 의해 membrane strip에서 전극 상으로 전달되었고, 이 리포좀은 계면활성제에 의해 파괴되고 신호발생에 이용되는 ruthenium이 방출되었다. 이와 같은 면역센서의 성능은 의료현장검사 혹은 자가진단에 적합할 것으로 예측된다.

참고문헌

1) A. J. Bamner and R. D. Schmid, "Development of a new immunosensor for pesticide detection" (1998), *Biosens. Bioelectron.*, 13, 519-529

2) Edited by RRC New, "Liposomes: a practical approach" (1990), *Oxford University Press*, 163-170