

표면 플라즈몬 공명 타원계측장치를 이용한

Streptavidin-Biotin 접합특성연구

Analysis of Streptavidin-Biotin Interactions Using

Surface Plasmon Resonance Ellipsometer

조은경, 이흥원, 원종명*, 신기량*, 제갈원**, 조용재**, 조현모**, 조재홍

한남대학교 물리학과, 안동대학교 물리학과*, 한국표준과학연구원 나노바이오융합연구단**

eun-kyoung0308@hanmail.net

생체분자 물질에 대한 측정 분석에 있어서 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 이용할 경우 형광물질의 부착 없이 실시간 분석 및 다양한 생체물질의 검출이 가능하며 고정화 되는 생체물질의 두께와 흡착상수, 해리상수, 결합농도의 측정을 통하여 생체물질 접합 동특성 분석을 할 수 있어 응용연구에 널리 이용되고 있다. 대부분의 신약 후보 물질이 저분자 물질인데 분자량이 작은 저분자의 경우 취약한 SN(signal-noise ratio) 비로 인해 적절한 분석에 용이하지 않다는 단점이 있다. 그러나 표면 플라즈몬 공명 타원계측기술(SPR ellipsometry)을 이용할 경우 박막두께 측정 분해능에서 더욱 민감한 감응도를 통하여 저분자 물질 등이 타겟 단백질에 접합할 때 위상변화를 측정함으로써 측정 감도를 향상 시킬 수 있다. 본 연구에서는 자체 제작한 표면 플라즈몬 공명 타원계측장치를 이용하여 저분자 물질인 biotin 이 streptavidin에 결합하는 특성을 측정하였다.

본 연구에서 이용한 표면 플라즈몬 공명 타원계측장치는 각각 1개의 편광자(polarizer)와 회전 검광자(analyzer)를 가진 PSRA 구조의 타원계측 장비에 다채널 미세유로 시스템과 시료를 주입하기 위한 실린지 펌프(syringe pump)와 시료 제어를 위한 각종 밸브들로 구성되어 있다. 광원으로는 633 nm 의 He-Ne 레이저를 사용하였으며, 50 nm 정도의 gold 박막이 증착된 프리즘을 사용하였다. 측정오차 요인들 중에서 시료 정렬에서 발생하는 입사각 오차를 최소화하기 위해 간접계 장치를 이용하여 입사각을 정렬하였다.

표면 플라즈몬 공명 타원계측기를 이용한 생체물질 연구를 위하여 저분자 물질인 biotin과 센서표면에 고정된 streptavidin을 사용하여 실험하였다. 먼저 50 nm 정도의 gold 박막이 증착된 프리즘위에 MUAM SAM을 고정화 시키고 그 위에 Sulfo-NHS-LC-biotin을 올려주었으며 그 위에 streptavidin을 고정 시킨다. 그리고 나서 저분자 물질인 biotin을 저농도부터 흘려준다. 그리고 나서 각각의 물질에 대한 접합 특성을 분석해 보았다. Running buffer로는 PBS buffer를 사용하였다. 비특이적 결합을 억제하기 위하여 ethanolamine 1 M pH 8.5 용액을 사용하였다.

그림 1은 검광자 회전형 타원계측기를 이용한 SPR 측정 장치의 구조를 보여준다. SF10 프리즘 위에 금 박막을 증착하여 SPR 센서로 사용하였고 시료주입장치를 이용하여 시료와 buffer 용액을 센서표면에 주입하여 측정하였다. 그림 2는 streptavidin과 저분자 물질인 D-biotin의 접합 특성을 D-biotin 농도 500 μ M ~ 4 nM의 시료를 이용하여 실험하였으며 그 결과치를 나타내었다. 굴절률 용액을 측정하여 표면 플라즈몬 공명 타원계측장치의 측정감도와 선형응답 특성을 알 수 있는데 PBS buffer에 ethanol

1.5%(volume fraction)를 혼합한 용액을 사용하였다. 결합 시 수십 RU 이하의 응답특성을 나타내는 biotin과 같은 저분자 물질의 분석에도 표면 플라즈몬 공명 타원계측기의 적용이 용이함을 알 수 있었다. 그림 3은 streptavidin과 biotin의 광학상수를 모델링 한 것이다. streptavidin과 biotin의 결합동특성으로부터 K_D (equilibrium dissociation constant)값을 측정할 수 있다.

본 논문에서는 생체 분자물질의 측정을 위한 고감도 표면 플라즈몬 공명 타원 계측기를 이용하여 streptavidin과 저분자 물질인 biotin을 측정하였다. 본 연구에서 개발된 고감도 측정기술은 정량분석 기술 향상을 통하여 더 많은 생체 분자 접합 특성 측정에 유용한 기술이 될 것이라 생각한다.

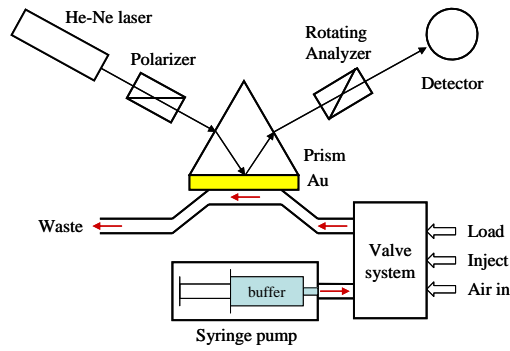


그림 1 SPR Ellipsometer 장비의 개략도

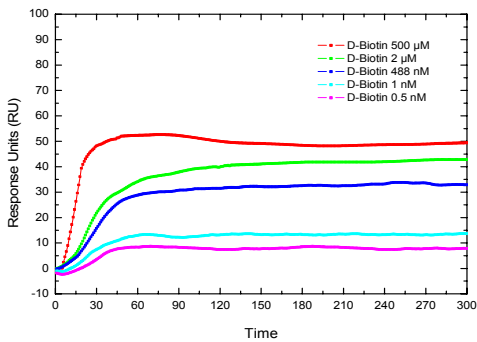


그림 2 Streptavidin-biotin 결합으로 인한 RU 변화

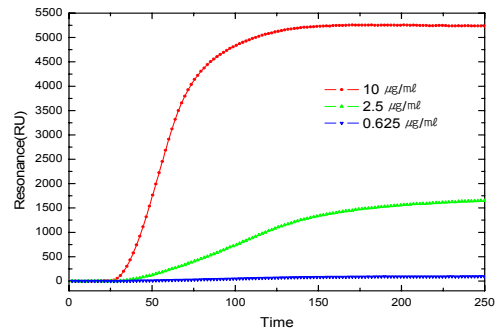


그림 3 Streptavidin-biotin 광학상수 모델링