

Calmodulin 단백질의 형태변화를 이용한 광섬유 형광센서에 의한 Ca^{2+} 의 정량

이창섭[†] · 양승태^{*}

계명대학교 자연과학대학 화학과

^{*}경북대학교 자연과학대학 화학과

(1995. 4. 24. 접수)

Determination of Ca^{2+} by Fiber Optic Fluorosensor Based on the Conformational Change of the Protein Calmodulin

Chang-Seop Ri and Seung Tae Yang^{*}

Department of Chemistry, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

^{*}Department of Chemistry, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

(Received Apr. 24, 1995)

요약 : Ca^{2+} 에 대하여 특이한 선택성을 보이는 광섬유형광센서에 대하여 연구하였다. 이 센서는 Ca^{2+} 과 형광성 킬레이트를 형성하는 단백질 Calmodulin(CaM)을 사용하였으며, 두 갈래로 된 광섬유 다발의 끝면에 플루오르세인 이소티오시아네이트로써 형광 표지된 Calmodulin(FCaM)으로 만든 용액을 투석막 안에 넣어서 제작하였다. 이 센서의 감응 메카니즘은 FCaM이 Ca^{2+} 과 결합하여 킬레이트를 형성할 때에 나타나는 형광 스펙트럼의 이동 현상을 바탕으로 한다. CaM은 Ca^{2+} 과 결합할 때에 형태변화를 일으키며, 이로 인해 유발되는 FCaM의 형광세기 변화로써 농도를 결정하였다. 광전자증배관으로 형광의 세기를 측정하여 Ca^{2+} 에 대한 검정곡선을 작성하였으며, 센서의 Ca^{2+} 에 대한 검출한계와 Mg^{2+} , Eu^{3+} , La^{3+} 들에 의한 방해효과, 감응 시간 및 수명을 조사하였다.

Abstract : The fiber optic fluorosensor that shows a specific selectivity for calcium ion is studied. This sensor employs protein Calmodulin(CaM) which forms a fluorescent chelate with Ca^{2+} . A dialysis membrane is used to entrap a fluorescein isothiocyanate-labeled CaM solution at the common end of a bifurcated fiber optic bundle. The sensing mechanism of this sensor is based on the shifts in the fluorescence spectrum of metal-calmodulin complexes which FCaM forms a chelate with Ca^{2+} . Upon binding with Ca^{2+} , CaM undergoes a conformational change which induces a change in the fluorescence of FCaM. This change in fluorescence signal which is measured by photomultiplier tube is related to the concentration of Ca^{2+} for calibration curve. Detection limit for Ca^{2+} and the interference effects by Mg^{2+} , Eu^{3+} and La^{3+} for this sensor are studied. Response time and life time for this fluorosensor are also investigated.

Key words : Fiber Optic Sensor, Fluorescence, Calcium ion, Calmodulin

1. 서론

광섬유 센서는 각종 금속 및 비금속 이온을 정량하는 데 사용할 수 있는 간편하고도 매력적인 도구이며, 최근에는 생체 내에 존재하는 여러 가지 금속이온을 정량하는 데 필요한 센서의 개발이 많은 관심을 끌었다. 이 방법의 장점은 측정할 때에 기준신호가 필요하지 않으며, 센서를 작은 규모로 만들기가 용이하고, 광학적인 장치만을 사용함으로써 측정할 때에 전기적인 간섭을 피할 수 있다. 이 광섬유 센서는 작은 광섬유관을 도구로써 사용하며 또한 생체 시료 속에 존재하는 미량의 물질을 정량하는 Biosensor로서도 활용될 수 있다. 지금까지 여러 가지 형태의 광섬유 화학센서(fiber optic chemical sensor, FOCS)의 제작 방법이 알려져 왔으며, 이 센서의 감응원리는 주로 발색제나 형광 지시약을 써서 용액의 pH 변화나¹⁻³, 착물 생성과정^{4,5} 또는 효소 반응⁶⁻⁸으로 생성되는 광학적 신호를 측정하여 특정한 물질의 농도와 관련지우는 것이다. 대상 물질로서는 금속이온^{9,10}, 할로겐화이온^{11,12} 및 기체^{13,14}에 대한 연구가 있으며, Glucose^{15,16}, Lactate^{17,18} 및 Urea¹⁹ 등의 생체 관련 물질을 대상으로 하는 Biosensor로서의 연구도 많이 이루어지고 있다. 금속이온의 정량에 쓰이는 광섬유 화학센서 중에서도 특정한 금속이온과 킬레이트를 형성함에 따라서 형광특성이 변하는 리간드를 광섬유 다발 끝에 고정하여 제작한 광섬유 형광센서(fiber optic fluorosensor, FOFS)가 특히 흥미를 끌고 있다. Morin을 고정화시켜서 Al^{3+} 및 Be^{2+} 를 정량하거나²⁰, Quinolin-8-ol-5-sulfonate를 고정화한 센서로서 Al^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} 및 Cd^{2+} 를 정량한 연구가²¹ 보고되었다.

일반적으로 광섬유 형광센서는 빛을 통과시킬 수 있는 광섬유 다발을 쓰며, 이 광섬유 다발 끝에 분석물질과 선택적으로 반응하여 형광을 발생하는 시약상(reagent phase)을 고정화하여 센서를 제작하며, 형광물질이 금속이온과 착물을 형성할 때에 나타나는 형광의 세기변화를 측정함으로써 정량이 이루어진다.

본 연구에서는 Ca^{2+} 를 정량하기 위하여 Ca^{2+} 과 결합하는 감응물질로서 분석 물질에 높은 선택성을 가진 단백질 Calmodulin(CaM)을 선택하였다. CaM은 비교적 분자량이 작은(16,700) 단백질로서 열적으로 안정하며, 산성(pH=3.9~4.3)을 띠는 단백질이다. Cytosol에서 발견되며, 세포 내에서 Ca^{2+} 농도의 변화

를 전달하는 기능을 가지고²², 여러 가지 효소의 작용을 조절한다. 또한 이 CaM의 결정 구조를 보면^{22,23}, 직경이 30Å이고, 길이가 65Å이며, 나선형 축을 가진 아령과 같은 모양이고, 4개의 결합 자리를 가지고 있는데, 이 중 두 자리는 높은 친화력의 결합 자리이고, 나머지 두 자리는 낮은 친화력을 가지고 있으며, 결합상수는 각각 5×10^6 및 $5 \times 10^5 M^{-1}$ 이다. 이 CaM이 Ca^{2+} 과 결합하면 단백질 전체의 구조 변화를 일으킨다. 만약 형광 표지를 단 CaM을 사용하면, Ca^{2+} 과 결합하는 단백질의 양에 따라서 발생하는 형광의 세기도 변화하므로 이것을 이용하여 생체 용액이나 시료 용액 속에 존재하는 Ca^{2+} 의 양을 결정할 수 있다. 본 실험에서는 단순한 형광 측정을 하는 기존의 방식과는 달리, 분석물질인 금속이온이 지시물질과 결합함으로써 구조의 변화를 일으키고, 이로써 형광세기의 변화가 유발되는 단백질을 지시물질로 써서 센서를 제작하였다. 이 센서를 이용하여 생화학적으로 중요한 Ca^{2+} 을 정량하는 방법을 개발하였다. 플루오르세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC) 형광 표지된 Calmodulin(FCaM)을 두 갈래로 된 광섬유 다발 끝에 투석막으로 봉하여 고정화함으로써 광섬유 형광센서를 제작하였으며, 이를 이용하여 Ca^{2+} 을 정량하여 보았다. 시료용액 속의 Ca^{2+} 은 투석막을 통하여 센서 속으로 확산되어 들어와서 FCaM과 결합하며, 이 때에 유발되는 형광세기의 변화값을 시료용액 중의 Ca^{2+} 의 농도와 연결시켰다.

2. 실험

2.1. 시약

감응물질로 사용한 CaM은 Sigma(U.S.A.)제의 Bovine brain phosphodiesterase 3':5'-cyclic nucleotide activator-FITC labeled(FCaM)을 구입하여 사용하였으며, 이 시약은 단백질 분자 1mol당 0.8mol의 Fluorescein을 함유하고 있다. 센서 내의 지시용액을 만드는 데 쓴 Ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-N, N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA)와 완충용액의 제조에 쓴 Tris(hydroxymethyl) aminomethane(Tris)은 Aldrich(U.S.A.)제를 사용하였다. 시료용액 제조에 쓴 $CaCl_2$ 는 Yakuri(Japan)제, 방해효과의 시험에 쓴 $MgCl_2$, $LaCl_3$ 및 $EuCl_3$ 는 Sigma(U.S.A.)제를 사용하였으며, 시료용액 제조에 사용한 물은 탈이온화수(Mil-

li-Q Water purification system, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 2. 실험장치

CaM 및 Ca^{2+} 과 FCaM이 반응하여 형성된 Ca-FCaM 착물에 대한 형광 스펙트럼은 형광계 (SPEX Model Fluorolog-2 F 111, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다. 광섬유 형광센서 시스템의 광원은 100W, 12V DC 전력이 공급되는 정전압 전원(Suntronix, Korea)이 연결된 Tungsten halogen lamp (General Electric Co., U.S.A.)를 사용하였으며, Spectrophotometer(영우기기, Korea)로써 들뜸광원의 파장을 선택하였다. 광섬유다발로서는 Glass bifurcated fiber optic bundle(Oriel Model 77533, U.S.A.)을 사용하였으며, 광전자증배관(Photomultiplier tube, PMT, Hammamatsu, U.S.A.)이 부착된 Monochromator(McPherson, U.S.A.)로써 방출 스펙트럼의 파장을 선택하였다. PMT로써 측정된 형광신호는 Multimeter를 써서 전압단위(mV)로 측정하고, Strip chart recorder(Yokogawa, Japan)로써 기록하였다. 측정장치에 대한 개략적인 그림을 Fig. 1에 나타내었다.

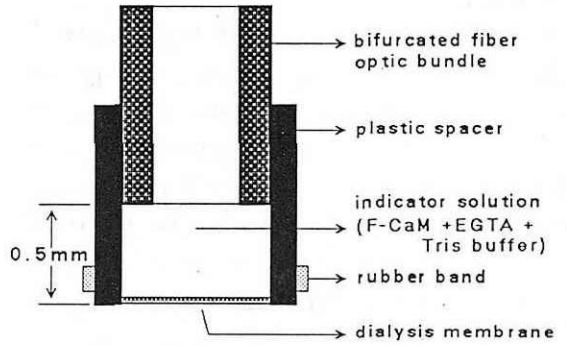


Fig. 2. Configuration of fluorosensor probe using bifurcated fiber optic bundle.

다.

Fig. 2에는 광섬유 다발 끝에 부착된 형광센서의 구조를 나타내었다. 센서는 5.0mM Tris-HCl 완충 용액에 FCaM이 $25\mu M$, EGTA가 0.50mM가 되도록 한 지시용액을 광섬유 다발 끝에 부착되어 있는 Polytetrafluoroethylene (PTFE) spacer에 고정시키고, 친수성 투석막(Union Carbide, U.S.A.)으로 봉한 다음, 고무밴드로써 spacer에 고정하여 센서를 제작하였다. 투석막은 증류수에 약 1시간 정도 세척한 후에 사용하였다.

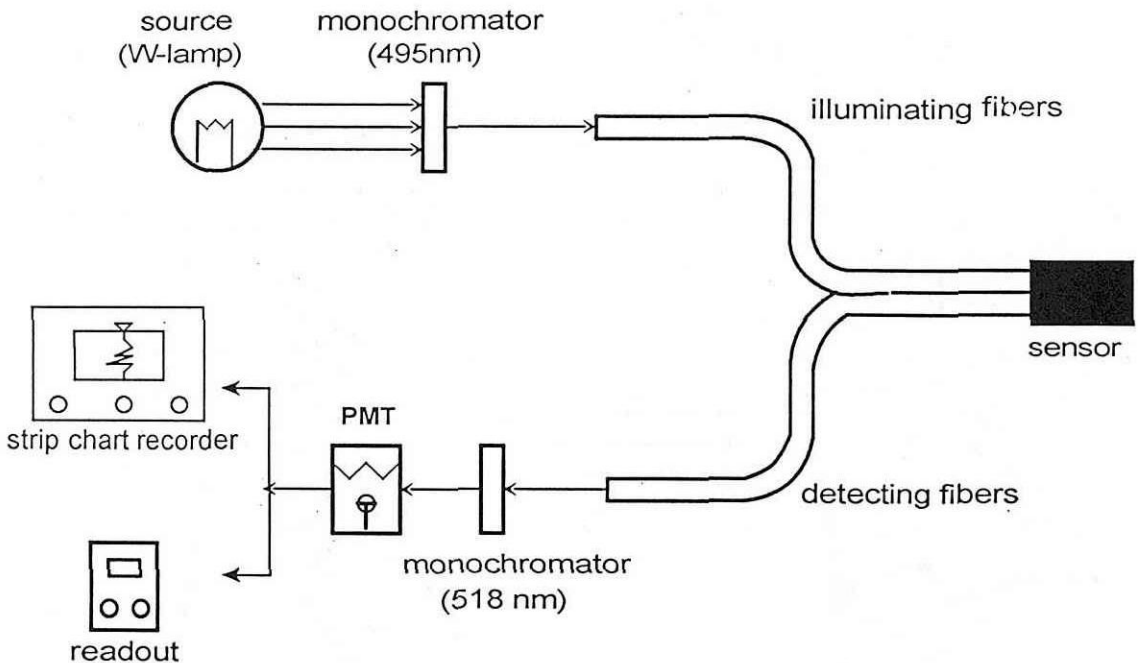


Fig. 1. Schematic diagram of a fiber optic fluorosensor system using a bifurcated fiber optic bundle to transient radiation.

2. 3. 측정

방출 스펙트럼의 파장(519nm)을 선택할 때에 Monochromator의 슬릿 나비를 800nm로 하였으며, 주위에서 발생하는 산란광의 영향을 피하기 위하여 모든 측정을 암상자 속에서 수행하였다. 측정할 때에는 암상자 속에 있는 시료 용액에 센서의 끝 부분만 접촉하도록 하였으며, 측정 도중에 자석교반기로써 일정한 속도로 용액을 교반하여 농도 편차가 없도록 하였다. 지시용액과 시료용액은 동일한 조성의 완충용액으로써 제조하였다. $1.00 \times 10^{-2} M$ 의 $CaCl_2$ 시료용액을 Microsyringe로써 일정량씩 첨가함으로써 Ca^{2+} 의 농도를 조절하여 PMT에 전압으로 나타나는 형광신호의 세기를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

형광센서를 제작할 때에 감응물질로써 사용한 FCaM과 이것이 Ca^{2+} 과 결합한 Ca-FCaM 착물의 형광특성을 조사하기 위하여 형광계로써 0.5mM EGTA가 녹아 있는 pH 7.0의 Tris-HCl 완충 용액으로 $1.0 \mu M$ 의 FCaM과 Ca-FCaM의 형광 스펙트럼을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 이 형광 스펙트럼의 518nm에 나타나는 방출띠는 495nm에서 흡수하는 띠보다 넓어졌다. Ca^{2+} 을 시료용액에 첨가함에 따라서 형광세기

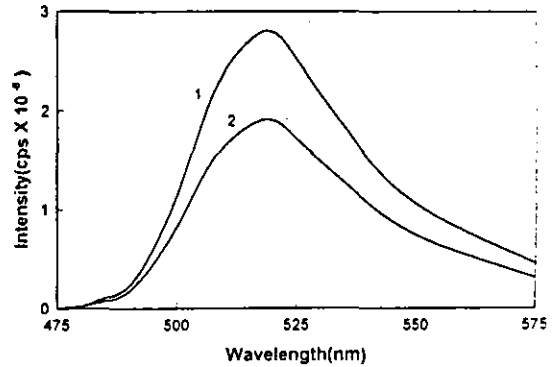


Fig. 3. Fluorescence spectra of $1.0 \mu M$ FCaM in the 0.50mM EGTA/5.0mM Tris-HCl buffer, pH 7.00 (1) with no Ca^{2+} added (2) with $20 \mu M$ of free Ca^{2+} concentration.

가 변화하는 것을 FCaM의 최대 방출파장에서 측정해 보았더니, FCaM에 Ca^{2+} 을 첨가할수록 착물이 형성되기 때문에 측정된 형광세기는 감소하였으며, 이 형광세기의 감소를 이용하여 Ca^{2+} 을 정량할 수 있었다.

특정한 이온에 감응하는 지시시약을 광섬유 다발의 끝에 고정화시키는 방법에는 음이온 교환막이나 고분자 수지 등과 같은 고체 지지체에 시약을 흡착시키거나^{10,24}, PVC막으로 감응시약을 감싸는 방법²⁵ 및 적당한 막에 감응시약을 공유결합시켜서 고정화시키는

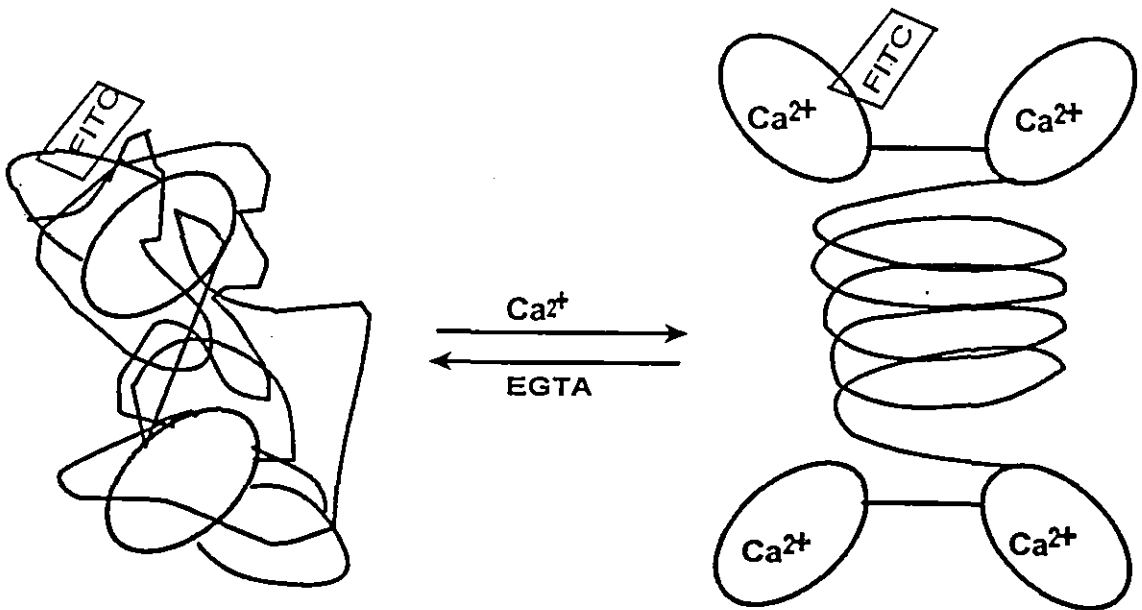


Fig. 4. Schematic diagram of the conformational change of CaM upon binding of Ca^{2+} and EGTA

방법²⁶ 등이 있다. 감응물질을 막에 공유결합시키면 센서의 수명이 어느 정도 연장되지만, 생체관련화합물인 CaM과 같은 단백질을 화학적으로 고정화시킬 때에 특정한 이온에 감응하는 단백질의 감응특성이 줄어들 수도 있으며, 분자량이 비교적 큰 물질을 고체 지지체에 고정화시킬 때에 오히려 결합 자리를 막을 수도 있다. 따라서 본 연구에서는 FCaM을 고분자막에 화학적으로 고정화시키는 대신에 광섬유 다발 끝에 위치한 plastic spacer에 형광 표지된 단백질을 넣고, 투석막으로 봉하여 Ca^{2+} 에 감응하는 센서를 제작하였다.

형광 세기의 감소는 Calmodulin 단백질이 Ca^{2+} 와 결합할 때에 구조변화를 일으키며^{22, 23}, 이에 따라서 CaM에 부착된 Fluorescein이 방출하는 형광의 세기가 줄어들기 때문이다. Fig. 4에 Ca^{2+} 과의 결합에 따른 FCaM의 구조 변화를 나타내었다.

형광센서로서 Ca^{2+} 을 정량할 때에 최적의 pH를 조사하기 위하여 0.50mM EGTA가 녹아 있는 5.0mM Tris-HCl 완충 용액에서 FCaM을 지시용액으로 사용하였으며, pH에 따른 검정곡선의 변화를 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 이 그림으로부터 알 수 있듯이, Ca^{2+} 의 농도를 증가시켰을 때에 mV 단위로 측정된 PMT의 신호는 Ca^{2+} 의 농도가 증가할수록 감소하였으며, pH 7.0의 완충용액의 조건에서 형광세기가 가장 감소하였다. 이로써 형광센서의 최적 pH는 7.0임을 알

수 있다.

25 μ M의 FCaM을 써서 형광센서를 제작하였을 때, Ca^{2+} 의 농도가 $1.0 \times 10^{-6} \sim 3 \times 10^{-8}$ M인 범위에서 신호의 크기는 0~12.8mV였으며, 검출한계는 3×10^{-8} M였다. 이는 Blair 등이²⁷ 전류 단위로 측정하여 얻은 0~4.6nA보다도 감도가 좋은 값이라고 할 수 있으며, Suzuki 등이²⁸ 보고한 1×10^{-7} M의 검출한계보다 더 좋은 값이라고 할 수 있다. 지시용액 속에 잔류하는 Ca^{2+} 을 masking시키기 위하여 지시용액을 제조할 때에 EGTA를 첨가하였으며, EGTA 첨가에 따른 신호의 변화를 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. 이 그림으로부터 알 수 있는 바와 같이, EGTA를 지시용액에 첨가하였을 때는 시료용액 중의 Ca^{2+} 농도가 증가함에 따라서 형광신호가 감소하지만, EGTA를 첨가하지 않았을 때는 형광신호가 거의 변하지 않았다. 따라서 형광센서의 감응특성을 높이기 위하여 EGTA를 넣는 쪽이 좋음을 알 수 있다.

형광센서의 다른 이온들에 대한 방해 정도를 조사하기 위하여 5.5×10^{-4} M의 몇 가지 금속염 용액들을 제조하고, Ca^{2+} 시료 용액에 첨가하였을 때의 검정곡선의 변화를 조사하여 Fig. 7에 나타내었다. 이 그림에 나타난 바와 같이 La^{3+} 및 Eu^{3+} 이 Ca^{2+} 에 공존하면 검정곡선을 얻을 수 없을 정도로 방해하였으며, Mg^{2+} 은 Ca^{2+} 의 정량에 전혀 방해하지 않았다. 이것은 Ca^{2+} 에

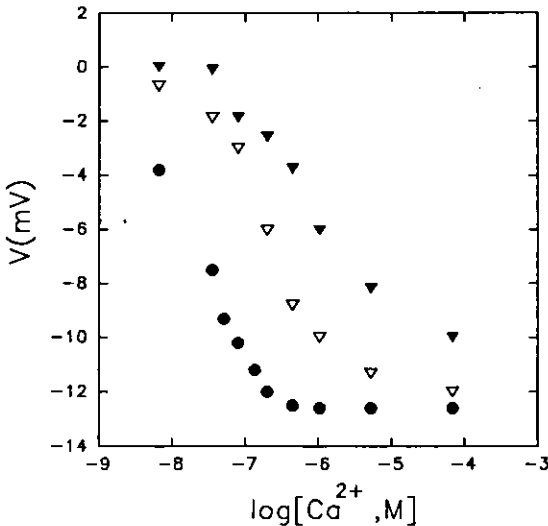


Fig. 5. Influences of buffer pH to the fluorescence signals of FCaM-FOFS. 25 μ M of FCaM was used. ΔV refers to the change of PMT voltage(mV). ● : pH=7.0, ∇ : pH=7.5, \blacktriangledown : pH=8.0

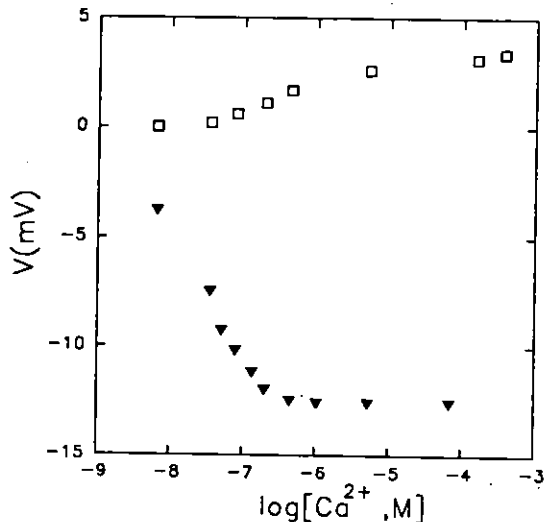


Fig. 6. Effect of EGTA to the fluorescence signals of FCaM-FOFS in the 5.0mM Tris-HCl buffer, pH=7.00, 25 μ M FCaM was used. □ : no EGTA added, \blacktriangledown : EGTA added.

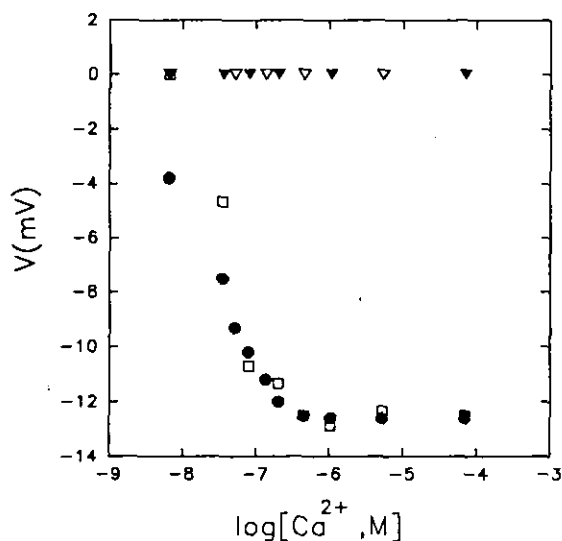


Fig. 7. Responses of the FCaM-FOFS to Ca^{2+} in the 5mM EGTA/0.5mM Tris-HCl buffer, pH 7.00 with 5.5×10^{-4} M other metal ions. ● : no metal ion added, □ : Mg^{2+} , ▼ : Eu^{3+} , ▽ : La^{3+}

대한 CaM의 결합상수가 각각 5×10^6 및 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ 인데 비하여 Mg^{2+} 에 대한 결합상수는 2×10^3 및 $3 \times 10^2 \text{M}^{-1}$ 으로써²⁹ Ca^{2+} -FCaM 착물의 안정도상수가 Mg^{2+} -FCaM 착물의 안정도상수보다도 훨씬 크기 때문이다. 그러나 La^{3+} 및 Eu^{3+} 이 공존하는 용액에서는 Ca^{2+} 의 농도가 변하더라도 센서는 감응하지 않았는데, 이는 La^{3+} 및 Eu^{3+} 이 Ca^{2+} 보다 과량 들어 있고, CaM의 결합 자리에 Ca^{2+} 과 경쟁적으로 반응하여 Ca^{2+} 의 정량을 방해함을 의미한다. 그 이유는 이 이온들이 전하는 Ca^{2+} 보다 크지만 수화된 이온 반경이³⁰ Ca^{2+} 과 비슷하기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 CaM은 적당한 조건하에서 Ca^{2+} 이외에도 La^{3+} 및 Eu^{3+} 에 대한 센서로서 활용될 수 있음을 암시하고 있다.

형광센서의 감응시간을 측정할 결과, 약 12분에서 20분 정도로 나타났으며, Ca^{2+} 의 농도가 묽어짐에 따라서 감응시간은 길어졌다. 이는 Ca^{2+} 이 투석막을 통과하여 확산하는 데 걸리는 시간이 감응시간을 결정하는 가장 중요한 인자임을 시사하고 있다. 제작한 센서의 수명은 대략 22시간 정도였으며, 그 이후에는 센서의 감응능력이 현저히 저하되었다. 이것은 지시 물질로서 사용되는 FCaM이 투석막을 통하여 센서 밖으로 유출되기 때문인 것으로 생각되며, 센서를 시료 용액

에 담가서 1일 경과한 후에 시료 용액의 형광량을 측정함으로써 확인할 수 있었다.

4. 요약

Ca^{2+} 에 좋은 선택성을 가지는 CaM 단백질을 사용하여 광섬유 형광센서를 제작하였다. 형광 표지한 CaM을 지시물질로 사용하였으며, 이는 Ca^{2+} 과 착물을 형성할 때에 구조변화를 일으켜서 형광 세기에 영향을 미쳤다. 생성된 착물의 방출 스펙트럼의 파장(519nm)에서 형광 세기의 감소를 PMT의 전압단위로 측정하여 Ca^{2+} 의 검정곡선을 구하였다. 센서는 pH 0의 완충용액에서 가장 좋은 측정 감도를 보였으며, 이 조건에서 검출한계는 $3 \times 10^{-8} \text{M}$ 였다. 이 형광센서는 Mg^{2+} 에 대하여는 우수한 선택성을 보였으나, La^{2+} 및 Eu^{3+} 에 대하여는 매우 심하게 방해하였다. 제작한 형광센서의 감응시간은 12~20분이었으며, 수명은 22시간 정도였다.

5. 참고문헌

1. D. W. Lubbers, N. Z. Opitz, *Biochem., Biophys., Boil. Virol.* **30C**, 532(1975).
2. J. I. Peterson et al, *Anal. Chem.*, **52**, 864(1980).
3. L. A. Saari, W. R. Seitz, *ibid.*, **54**, 823(1982).
4. L. A. Saari, W. R. Seitz, *ibid.*, **55**, 667(1983).
5. J. I. Peterson, R. V. Fitzgerald, D. K. Buckhold, *ibid.*, **56**, 62(1984).
6. M. A. Arnold, *ibid.*, **57B**, 565(1985).
7. T. M. Freeman, W. R. Seitz, *ibid.*, **50**, 1242(1977).
8. N. Uwira, N. Opitz, D. W. Lubbers, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **169**, 913(1984).
9. Z. Zhujun, W. R. Seitz, *Anal. Chim. Acta.*, **171**, 251(1985).
10. L.-K. Chau, M. D. Porter, *Anal. Chem.*, **62**, 1964(1990).
11. D. A. Russel, R. Narayamaswamy, *Anal. Chim. Acta.*, **220**, 75(1989).
12. W. A. Wyatt, F. V. Bright, G. M. Hieftje, *Anal. Chem.*, **59**, 2272(1987).
13. T. D. Rhynes, M. A. Arnold, *Anal. Chim. Acta.*, **227**, 387(1989).
14. O. S. Wolfweis, L. J. Weis, M. J. P. Porter, *Anal. Chem.*, **60**, 2208(1989).
15. N. Uwira, N. Opitz and D. W. Lubbers, *Adv. Exp.*

- Med. Biol.*, **169**, 913(1984).
16. N. Opitz, D.W. Lubbers, *Talanta*, **35**, 123(1988).
 17. D. W. Lubbers, et al, *Progress in Enzyme and Ion Selective Electrodes*, Spring, New York, 1981.
 18. K. P. Voelkl, N. Opitz, and D. W. Lubbers, *Adv. Physiol. Sci. Proc. Intl. Congr.*, **25**, 99(1981).
 19. M. J. Goldfinch, and C. R. Lowe, *Anal. Biochem.*, **138**, 430(1984).
 20. L. A. Saari and W. R. Seitz, *Anal. Chem.*, **55**, 667(1983).
 21. Z Zhujun and W. R. Seitz, *ibid.*, **171**, 251(1983).
 22. J. Bruno, W. D. Horrocks, Jr., and R. J. Zauhar, *Biochem.*, **31**, 7016(1992).
 23. R. H. Kretsinger, S. E. Rudwick and L. J. Weisman, *J. Inorg. Biochem.*, **28**, 289(1986).
 24. Y. Kawabata, R. Tahara, T. Imasaka, N. Ishibashi, *Anal. Chim. Acta.*, **212**, 267(1988).
 25. W. E. Morf, K. Seiler, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Chem.*, **62**, 738(1990).
 26. T. Rosatzin, P. Holy, K. Seiler, B. Rusterholz, W. Simon, *ibid.*, **62**, 738(1990).
 27. T. L. Blair, S.-T. Yang, T. Smith-Palmer, and L. G. Bachas, *ibid.*, **66**, 300(1994).
 28. K. Suzuki, et al, *ibid.*, **61**, 382(1989).
 29. G. You, J. M. Buccigross, D. J. Nelson, *J. Inorg. Biochem.*, **38**, 117(1990).