

액상 효소반응을 이용한 Membrane Strip 형 Cholesterol 측정시스템의 개발

¹신인수·목락선·장미라·†백세환
고려대학교 생명공학원, 식품의약품 안정청¹
(접수 : 1998. 6. 29., 게재승인 : 1998. 9. 30.)

Development of Membrane Strip Assay System for Lipoprotein Cholesterol Based on Liquid-Phase Enzyme Reactions

In-Soo Shin¹, Rak-Sun Mok, Mi-Ra Jang, and Se-Hwan Paek†
Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea
¹Pusan Regional Food and Drug Administration, Pusan 608-080, Korea
(Received : 1998. 6. 29., Accepted : 1998. 9. 30.)

A sensitive membrane strip assay for plasma lipoprotein cholesterol that can be performed without handling reagents has been investigated. We previously developed an assay system with immobilized enzymes (cholesterol esterase and cholesterol oxidase) on the surfaces of nitrocellulose membrane(1). In such a case, the amount of enzymes present on the membrane was limited by its surface area and, thus, the detection capability was relatively poor (> 50 mg/dL cholesterol). To overcome this problem, we devised a new system with non-immobilized enzymes by placing them within interstitial spaces of a cellulose membrane pad in a dry state. Upon contact with sample medium, the enzymes were immediately dissolved and participated in the reactions with cholesterol in a liquid phase. We constructed a user-friendly system consisting of four membrane pads for sample application, cholesterol decomposition, color development as signal, and medium absorption to invoke a continuous flow (sequential location from the bottom). A sample containing lipoproteins was added into the application pad by capillary action and transferred to the next pad for decomposition. The decomposition pad (namely, enzyme pad) contained a detergent (sodium cholate) for the destruction of lipoprotein particles, the two enzymes for cholesterol decomposition, and a chromogen (3,3'-diaminobenzidine). As a consequence of the enzyme reactions, hydrogen peroxide was produced, and then reacted in the presence of the chromogen with horseradish peroxidase immobilized on the signal generation pad. Finally, a colorimetric signal directly proportional to the cholesterol concentration was produced. The detection limit determined from this system under optimal conditions was at least 2 times lower than that of the enzyme-immobilized system.

Key Words : membrane strip assay, lipoprotein cholesterol, non-immobilized enzyme detection limit

서론

인체 내 cholesterol은 수용액에 불용성 성분으로 혈장 지질단백질에 의해 조직과 간 사이에 운반되어 그 혈중 농도가 조절된다(2-4). 혈장 지질단백질은 구형의 입자형태로 존재하며 그 표면은 인화지방과 cholesterol 그리고 apolipoprotein으로 구성되어 있고, 그 내부는 cholesterol에 지방산 한 분자가 결합된 cholesteryl ester와 triglyceride 분자들로 이루어져 있다. 지질단백질은 그 밀도와 전기영동상에서의 이동성 그리고 지방과 단

백질의 상대적인 함량에 따라 크게 초저밀도 지질단백질 (very low-density lipoproteins, VLDL), 저밀도 지질단백질 (low-density lipoproteins, LDL), 그리고 고밀도 지질단백질 (high-density lipoproteins, HDL)의 세 종류로 분류된다(5-8).

LDL은 cholesterol을 세포막의 구성 혹은 steroid hormone의 합성을 위해 조직으로 운반하는 기능을 지닌다 그러나 포화지방산과 cholesterol이 높은 식품을 다량 섭취할 경우, 간에서의 LDL 조절기구에 의한 화학대사작용이 감소될 수 있고 이에 따라 혈액 내 LDL cholesterol (LDL-C) 농도가 증가된다(4). 이것은 혈관 벽에 cholesterol 분자의 침착을 야기하고 궁극적으로 심근경색의 원인이 되는 동맥경화를 유발한다(6, 9). 반면에, HDL은 과량의 cholesterol을 조직에서 간으로 운반하는 역수송 기작을 담당하기 때문에 동맥경화의 발생확률은 HDL cholesterol (HDL-C)의 양에 반비례한다(10-13). HDL-C가 1%씩

† Corresponding Author ; Chochiwon, Chungman 339-800
Korea University Department of Biotechnology
Tel : 0415-860-1414, Fax : 0415-864-2665
e-mail shpaek@tger.korea.ac.kr

증가 할 때마다 심근경색 발병 위험도는 2-4% 정도 감소하는 것으로 보고되어 있다(14). 현재까지 연구된 바에 의하면, LDL-C의 증가와 마찬가지로 HDL-C의 감소는 심근경색을 일으킬 수 있는 독립적인 요인인 것으로 밝혀져 있다(4, 14).

본 저자들은 순환기의 이상유무에 대한 진단지표인 혈장 지질 단백질 cholesterol을 전문지식이 없는 일반인이 간편하게 측정할 수 있는 분석시스템의 개발에 역점을 두어왔다(1). 그 측정은 지질단백질의 파괴와 방출된 cholesterol 화학종들의 효소반응에 의한 분해(15,3,16) 그리고 이로부터 생성된 산물에 비례한 신호 발생의 순차적 반응공정에 의해 수행된다. 분석을 위해 반응물질들이 순서대로 측정 혹은 고정화된 membrane strip을 이용하면 모세관현상에 의해 야기되는 물질전달공정에 따라 시약을 첨가하거나 제거함이 없이 언급된 연속반응을 자발적으로 진행시키기에 적합하다. 개발된 기존 시스템에서는 효소들의 유체흐름에 의한 유실을 최소화시키기 위해 그 분자들을 membrane 표면에 고정화시킴으로써 고상 효소반응시스템을 구성하였다(1) 그러나 효소가 고체표면에 단분자층으로 고정화되므로 사용될 수 있는 효소량이 제한되었고 따라서 cholesterol 측정 하한농도는 비교적 높은 50 mg/dL 정도인 것으로 나타났다. 이 경우 동맥경화 지표물질 중 LDL-C (100-200 mg/dL; (3, 4))는 측정 가능하지만 HDL-C (20-70 mg/dL; (3,4))는 탐지할 수 없다.

측정민감도를 향상시키기 위해, 본 연구에서는 cholesterol 분해효소들을 membrane 세공 내에 건조상태로 축적시키는 방법을 이용하였고 시료가 포함된 수용액과 접촉되면 효소들은 용해되어 액상에서 효소반응이 수행되도록 측정시스템을 고안하였다. 이 경우 반응속도를 증가시키기 위해 효소량의 조절이 가능하게 되고, 더욱이 위에서 언급된 모든 반응물들을 한 공간 (예: membrane 세공) 내에 축적시킴으로써 반응기에서와 같이 연속반응이 액상에서 수행되도록 시스템을 설계하였다. 본 연구에서는 반응물들의 농도를 신호세기에 대해 최적화하였고 또한 시료의 첨가와 지질단백질 운반조건 및 시료 운반용액의 화학적 조건을 결정하였다.

재료 및 방법

재 료

Cholesterol esterase (CE; 미생물로부터 생산, 160 units/mg; EC 3.1.1.13), cholesterol oxidase (CO, Nocardia 종으로부터 생산, 14.0 units/mg, EC 1.1.3.6), horseradish peroxidase (HRP; 265 units/mg; EC 1.1.1.7), 그리고 3,3'-diaminobenzidine (DAB)을 Calbiochem 사 (미국)로부터 구입하였다. 지질단백질 cholesterol 표준용액 (cholesterol calibrators)과 sodium cholate는 Sigma 사 (미국)로부터 공급되었다. Nitrocellulose (NC) membrane (20 μ m 그리고 5 μ m 세공크기)을 Millipore 사 (미국)로부터 그리고 Whatman filter paper (qualitative #1)와 3MM chromatography paper를 Whatman 사 (미국)로부터 각각 구입하였다 그 외 다른 모든 시약들은 모두 분석용급으로 사용되었다

Cholesterol 분해 효소패드의 제조

지질단백질을 파괴시키는 계면활성제와 이로부터 방출된 cholesterol 화학종을 H_2O_2 로 전환시키는 반응에 관여하는 효소들

그리고 발색물질이 포함된 효소패드를 제조하였다 우선 패드모체로 선정된 Whatman qualitative #1 filter paper (5 x 10 mm)에 5% sodium cholate 용액 6 μ L를 첨가하여 공기 중에서 건조하였다. 건조된 패드에 140 mM NaCl이 포함된 10 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 7.4, PBS)을 이용하여 제조된 두 효소용액 CE (20 unit/mL)와 CO (50 unit/mL)를 1:2 (v/v) 비율로 혼합하여 패드 당 6 μ L씩 첨가한 후 다시 건조하였다. 마지막으로 17.5%의 sucrose가 포함된 7.5 mg/mL의 DAB를 1 μ L씩 첨가하였고, 발색 강화제인 4%의 $NiCl_2$ 와 $CoCl_2$ 를 각 패드 당 0.5 μ L씩 첨가하여 다시 상온에서 1시간 동안 건조함으로써 효소패드를 제조하였다.

HRP가 고정화된 신호발생패드의 제조

신호발생용 효소인 HRP를 물리흡착에 의해 NC membrane 상에 고정화하여 신호발생패드를 제조하였다. 제형성 있는 고정화를 성취하기 위해 우선 NC membrane strip (5 x 20 mm)을 10% methanol에 15분간 담근 후 탈이온수로 3번 세척하였다. 1시간 동안 상온에서 건조한 후, PBS 용액으로 제조한 2 mg/mL HRP 용액을 각 strip의 하단으로부터 8 mm 지역에 1.5 μ L 첨가하였고 100% 습도가 유지되는 상자 내에서 30분간 처리하였다. Membrane 진여표면은 0.5%의 casein이 포함된 100 mM tris 완충용액 (pH 7.6; Casein-Tris) 내에서 1시간 동안 처리되었다. 탈이온수로 3번 세척한 후, 상온에서 1시간 동안 건조함으로써 신호발생패드를 제조하였다.

측정시스템 구성과 분석과정

혈액 내 지질단백질 cholesterol을 정량할 수 있는 측정시스템을 구성하기 위해 준비된 4조각의 서로 다른 membrane 패드들을 양면 테이프 부착된 얇은 polyethylene film 상에 각 상단과 하단을 부분적으로 포개어 세로로 길게 부착하였다(Figure 1 참조) 먼저, 최하단에는 지질단백질 시료가 유입되는 장소로써 NC membrane strip (5 x 10 mm)으로 제작된 시료첨가패드가 위치되었다 시료첨가패드의 상단에 위에서 제조된 효소패드가 배치되었다. 또한 효소패드 상단은 발색신호를 발생하는 신호발생패드 하단과 연결되었고, 용액의 흐름을 지속적으로 유도하기 위한 수용액 흡수패드로써 3MM chromatography paper (5 x 30 mm)가 가장 상단에 배치되었다.

이와 같이 결합된 측정시스템을 이용한 3단계 분석과정은 다음과 같다. 첫째로, 표준 지질단백질 10 μ L가 첨가된 microwell 용기 내에 시스템의 하단을 담그어 시료를 흡수하였다. 둘째로, 지질단백질이 모두 흡수된 후 50 mM acetate 완충용액 (pH 5.1) 40 μ L를 운반용액으로 사용하여 시료를 상단으로 이송시켰고 총 수행시간을 10분 정도가 되도록 유속을 조절하였다. 마지막으로, 발색신호 세기를 측정하기 위해 video 사진기나 scanner에 의해 그 영상을 computer에 입력시켰고 strip 상의 발색부분이 모두 포함되도록 분석부위를 선택한 후 발색세기에 비례하는 적분치인 optical density로 전환하였다(1)

효소패드 내 반응물 농도 최적화

위에서 언급된 효소 패드의 제조 시 사용된 최적조건을 결정하기 위하여 효소패드 내 구성물인 효소, 발색물질, 그리고 계면활성제의 최적농도를 결정하였다. 세 가지 변수를 각각 시험 시

다른 두 변수는 효소패드의 제조에서 제시한 최적조건을 유지하였다. 우선 CE (20 unit/mL)와 CO (50 unit/mL)는 부피비 (총 6 μ L)로 1:1, 1:2, 그리고 1:4로 제조하여 시험하였고, DAB의 최적 농도를 구하고자 각 측정시스템 당 3.25 μ g, 7.5 μ g, 15 μ g, 그리고 30 μ g 수준의 농도를 시험하였다. 마지막으로 sodium cholate의 농도는 1%, 2%, 5%, 그리고 10% 용액 6 μ L씩을 각 strip에 첨가하여 실험하였다. 다른 구성성분의 제조, 측정시스템의 결합, 그리고 분석과정은 위에 언급된 바와 같이 동일하게 수행하였다.

시료첨가방법 및 운반조건 결정

시료운반과 관련된 변수로서 운반용액의 pH, 시료첨가방법 및 운반효율을 최적화하였다. 우선, 운반용액의 pH 효과를 시험하기 위하여 100 mM tris 완충용액 (pH 7.6)과 50 mM acetate 완충용액 (pH 5.1)을 서로 비교하였다. 시료첨가방법은 시료와 운반용액을 따로 분리시켜 순차적으로 이동시키는 방법과 30 μ L의 운반용액과 10 μ L의 시료를 서로 혼합하여 함께 이동시키는 방법을 시험하였다. 마지막으로, 최적 운반효율을 결정하기 위하여 세공크기가 다른 NC membrane (5 μ m, 20 μ m 세공크기)을 사용하여 그 측정민감도를 비교하였다. 각 패드의 제조 및 분석과정은 위에서 언급된 바와 동일하게 사용되었다.

농도응답곡선

위에서 결정된 최적조건 하에서 제조된 측정시스템의 분석민감도를 NC membrane 상에 두 효소 CE와 CO를 고정화한 고상 효소반응 (1)의 결과와 비교하였다. 우선 지질단백질 chole-

sterol 표준용액을 50 mM acetate 완충용액으로 희석하여 10-100 mg/dL 농도범위의 표준시료를 제조하였다. 제조된 각 지질 단백질 cholesterol 농도에서 발생된 신호를 측정하여 농도응답곡선을 작성하였고, 이로부터 두 측정시스템의 측정민감도를 상호 비교하였다. 언급되지 않은 실험과정은 위에서 설명된 바와 같다

결과 및 고찰

혈장 지질단백질 cholesterol의 정량을 간편하게 수행하도록 개발된 membrane strip 형 측정시스템(1)의 분석민감도를 향상시키고자 cholesterol 분해 효소반응을 액상에서 진행시키는 새로운 시스템을 고안하였다. 측정시스템은 다음과 같은 4조각의 membrane 패드를 상호 길이로 연결시켜 구성되었다(Figure 1) 하단의 NC membrane은 모세관현상에 의해 지질단백질이 함유된 시료를 흡수하는 시료첨가패드이다. 그 위에는 cellulose membrane 상에 지질단백질 파열용 계면활성제와 cholesterol 분해효소 (CE와 CO) 그리고 발색시호 형성에 사용될 발색물질이 포함된 효소패드가 위치되었다. 지질단백질을 파열시키는 계면활성제로써 통상적으로 사용되는 Triton X-100 대신에 CE의 활성제로 알려진 음이온성 sodium cholate가 선정되었다. 계면활성제에 의해 용액 속으로 방출된 cholesterol은 다음과 같은 연쇄 CE와 CO 효소반응에 의해 분해되어 cholesterol 농도에 비례하는 H₂O₂로 전환된다(15, 3, 16).

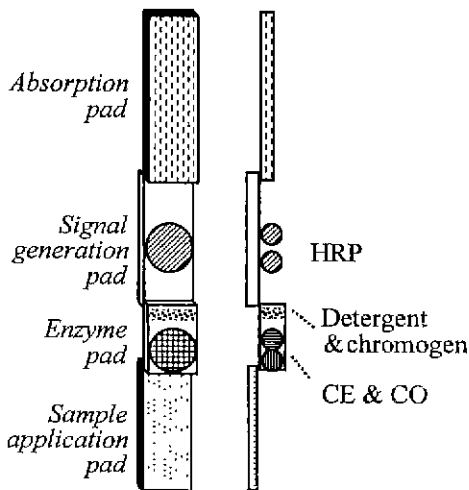
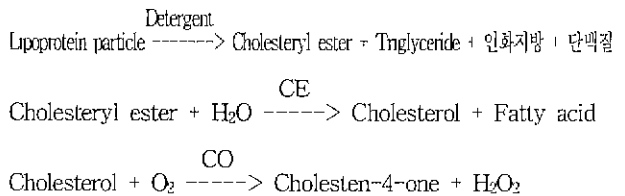
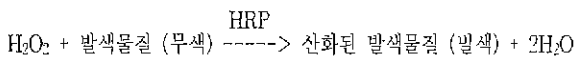


Figure 1. Model system of a membrane strip assay for plasma lipoprotein cholesterol by using enzyme reactions in liquid phase. Four major components are: 1) sample application pad made of nitrocellulose membrane, 2) enzyme pad consisting of detergent, CE, CO, and chromogen (DAB) that were dehydrated to deposit within cellulose membrane, 3) signal generation pad with immobilized HRP on NC membrane, and 4) absorption pad provoking a flow of medium. These pads were partially superimposed each other and mounted on a plastic film.



부가하여, 신호발생에 사용되는 발색물질인 DAB(17)를 유체 흐름에 따라 H₂O₂와 함께 상단의 HRP 효소층으로 이동시키기 위하여 효소패드 내에 포함시켰다. 그 상단에는 다음과 같은 반응을 이용하여 효소패드로부터 생성된 H₂O₂ 농도에 비례하는 발색시호를 발생시키기 위해 HRP가 고정화된 NC membrane이 배치되었다.



최상단에는 유체의 흐름을 지속시키기 위한 흡수패드가 위치되었다.

변수 최적화

위에서와 같이 구성된 액상 효소반응시스템의 성능을 극대화시키고자, 신호세기를 조절하는 효소패드 내 반응물의 농도와 반응용액의 화학적 조건 (pH 등) 뿐만 아니라 시료농도를 변화시킬 수 있는 시료첨가방법을 최적화하였고 또한 지질단백질 이동성에 대해 시료첨가패드의 세공크기를 결정하였다

효소패드에 포함된 반응물 농도

효소패드 내에 포함된 계면활성제인 sodium cholate의 농도, 효소농도를 결정하는 CE와 CO 혼합비율, 그리고 신호발생용 발색물질의 농도 최적화를 수행하였다. 먼저, 파랑의 계면활성제는 효소반응에 영향을 줄 수 있고(18) 본 시스템의 경우 신호발생패드 상에 고정화된 HRP의 탈착을 유발시킬 수 있으므로 그 최적농도를 신호발생기에 대해 결정하였다(Figure 2). 2% sodium cholate를 사용한 경우 100-200 mg/dL 지질단백질 cholesterol 농도영역에서 1% 보다 높은 신호를 생성시켰으나, 여전히 그 절대량이 부족하여 고농도 지질단백질 (200 mg/dL)을 완전히 분해시키지 못하는 것으로 나타났다. 5% sodium cholate를 사용한 경우에는 일부 HRP의 탈착이 예상되었으나 사용된 지질단백질 농도 전범위에서 신호세기의 현저한 감소없이 직선화된 농도응답곡선을 보였다. 계면활성제 농도를 그 보다 2배 증가시킬 경우에는 전체적으로 신호감소 현상이 나타났고 특히 지질단백질 고농도 영역에서 발색이 넓은 영역으로 분산되어 측정된 신호세기가 오히려 낮아졌다. 고농도의 sodium cholate는 효소 CE와 CO에 대해 활성억제 효과를 나타내거나 혹은 상층부에 고정화된 효소 HRP의 탈착을 유발시키는 것으로 판단된다(19). 이와 같이 결정된 농도응답곡선에 근거하여 5% sodium cholate를 최적농도로 결정하였다.

참고로, 계면활성제로써 선택된 sodium cholate는 지질단백질 입자를 파열시키는 기능 외에 효소 CE와 CO의 활성제 역할을 하는 것으로 알려져 있지만, 측정된 발색신호를 비교한 결과 sodium cholate의 기능성은 cholesterol 효소반응에서 일반적으로 사용되는 Triton X-100(16)와 비교하여 현저한 차이가 없었다 (제시되지 않은 자료).

계면활성제에 의해 방출된 cholesterol과 cholesteryl ester (cholesterol 분자에 한 개의 지방산이 첨가된 화학종)의 분해에 요구되는 효소농도를 결정하기 위하여 일정부피 내에 포함된 CE와 CO의 상대적 최적 효소요구량을 신호세기에 대해 결정하

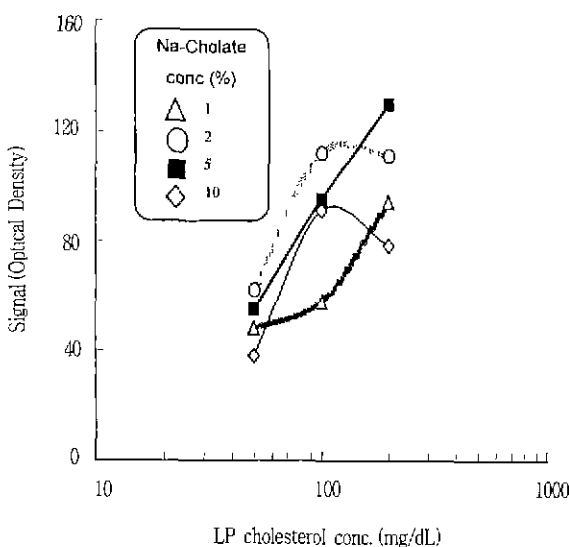


Figure 2. Effect of sodium cholate as detergent on the pattern of dose responses of the membrane strip system to lipoprotein cholesterol in samples

였다(Figure 3). CE와 CO의 unit 비율이 1:10인 조건에서는 CE가 부족하여 cholesteryl ester가 cholesterol로 전환되는 반응(15, 3, 16)이 제대로 이루어지지 않는 것으로 나타났고, 반면에 1:2.5인 조건에서는 CO의 절대량이 요구량보다 감소되어 cholesterol의 분해가 불완전한 것으로 예측된다. 그 중간 조건인 1:5의 효소 혼합비율에서 비교적 높은 신호가 발생되었고 이 조건을 그 두 효소의 최적비율로 결정하였다. 고상 효소반응시스템(1)에서와는 달리, 액상반응에서는 두 효소의 총량과 혼합비율의 조절이 용이하였고 또한 첨가한 효소가 모두 반응에 참여하므로 측정민감도 상승측면 뿐만 아니라 경제적 절약측면에서도 효소패드 설치방법은 매우 효율적인 것으로 판단된다.

효소패드로부터 cholesterol 분해반응에 의해 발생하는 H₂O₂의 존재 하에서 HRP에 의해 산화되어 신호를 발생하는 발색기질인 DAB 농도를 신호발생패드에 대해 최적화하였다(Figure 4). DAB를 총량 기준으로 3.75 µg을 사용한 경우 그 절대량이 부족하여 특히 cholesterol 고농도 범위 (> 50 mg/dL)에서 낮은 신호세기를 나타내었다. 이와 같은 문제점은 DAB 양을 2배 증가시킴으로써 해결될 수 있었고 또한 선택된 지질단백질 cholesterol 농도범위에서 선형관계를 나타내었다. 그러나 DAB 양을 4배 증가시키면 (15 µg DAB/strip) cholesterol 농도 50 mg/mL에서의 신호는 증가하나 200 mg/dL에서는 신호가 오히려 감소하였다. 이와 같이 cholesterol 고농도 범위에서 신호가 감소하는 현상은 DAB가 더욱 증가된 영역 (30 µg/strip)에서 심화되었다. 이것은 고상 효소반응에서도 나타난 바와 같이(1) 고농도의 DAB가 효소를 비활성시키기 때문인 것으로 예측된다. 이와 같은 결과에 근거하여 발색기질인 DAB는 총량기준으로 strip 당 75 µg이 사용되었고, 이 양은 고상 효소반응시스템에서 사용된 strip 당 50 µg과 비교하면 상대적으로 매우 적은 수준이다. 이것은 새로 고인된 시스템의 효소패드가 HRP 고정화지역에 근접하여 위치되었으므로(Figure 1 참조) DAB의 이동거리가 단축되었고 따라서 membrane 표면상에 비특정 부착에 의한 손실이 최소화되었기 때문으로 판단된다.

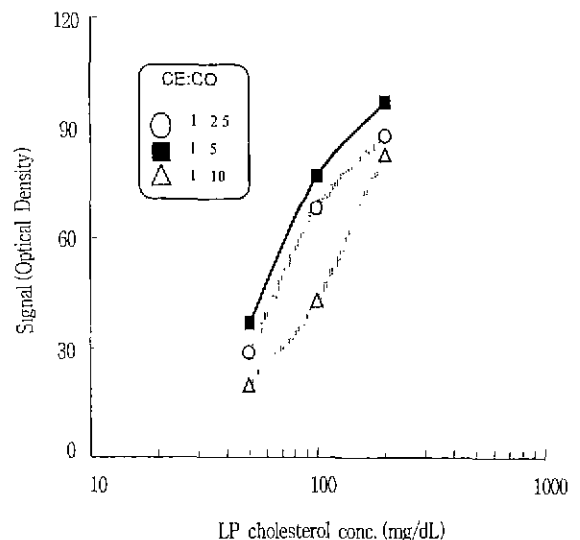


Figure 3. Determination of optimal ratio of CE over CO toward signal intensities resulting from the membrane strip enzyme assay. Three different excess unit ratios of CO over CE tested were 2.5, 5, and 10.

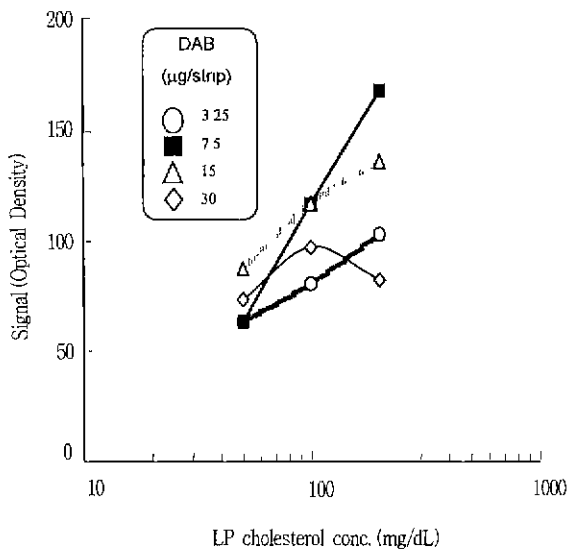


Figure 4 Effect of total DAB quantity on the signal intensity and dose-response pattern of the assay system.

운반용액의 pH.

일반적으로 효소반응의 화학적조건 중 특히 용액의 pH는 반응속도에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있으므로(20,21) 운반용액의 pH가 발색세기에 대해 최적화되었다. Cholesterol 분해와 신호발생을 위해 사용된 효소들 (CE, CO, 그리고 HRP)의 안정성에 대한 최적조건이 중성 pH 범위인 반면에(20,21) DAB에 의한 신호발생량에 대한 최적조건은 산성 pH이므로(1) 두 조건에서의 신호세기가 비교되었다(Figure 5). 중성 완충용액 (10 mM Tris-HCl, pH 7.6)을 사용한 경우, 지질단백질 cholesterol 농도응답곡선이 직선화되기는 하였으나 그 기울기가 완만하고 전체적으로 낮은 발색신호가 측정되었다. 반면에, 산성 완충용액 (50 mM acetate, pH 5.1)을 사용하면 상대적으로 높은 신호가 cholesterol 전농도범위에서 측정됨으로써 현저히 증가된 신호발

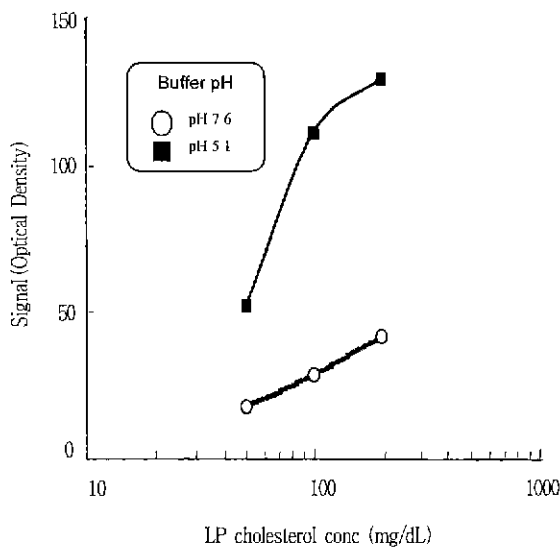


Figure 5. Effect of pH of aqueous medium carrying the analyte, i.e., lipoprotein cholesterol, on the signal intensity.

생 민감도를 나타내었다. 본 연구에서 개발하고자 하는 지질단백질 cholesterol 측정시스템의 분석소요시간은 15분 이내로 조절되므로 효소가 수용액에 노출되는 시간은 비교적 짧다. 이러한 분석시간 동안 효소의 구조적 안정성 보다 그 활성도가 신호발생에 더 크게 기여하는 것으로 예측된다.

시료 첨가방법 및 첨가패드 세공크기

신호발생세기는 시료 내 cholesterol 농도에 비례하고 또한 효소패드로의 이송 시 시료첨가패드에서 손실된 지질단백질 양에 반비례할 것으로 예측되었으므로 시료 첨가방법과 운반효율을 조절하는 시료첨가패드 세공크기의 효과를 시험하였다. 먼저, 운반용액과 지질단백질을 혼합하여 첨가하는 방법 (Mixed)과 지질단백질을 먼저 흡수시킨 후 운반용액을 순차적으로 첨가하는 방법 (Sequential)이 상호 비교되었다(Figure 6, 왼쪽). 혼합첨가방법과 비교하여 순차적 첨가방법을 사용한 경우, 지질단백질 cholesterol 농도 전범위에서 신호세기가 현저히 증가되었고 디

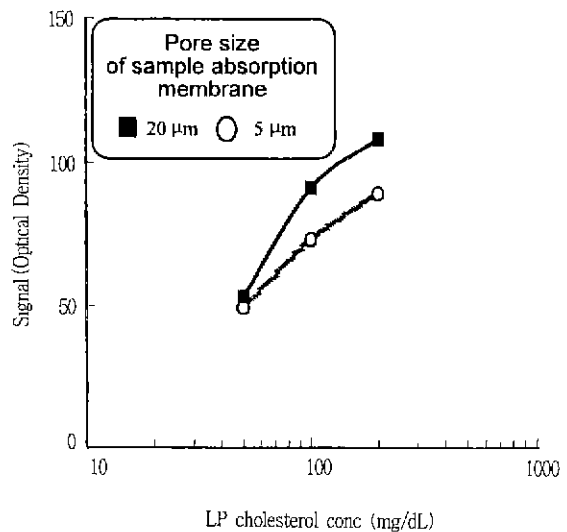
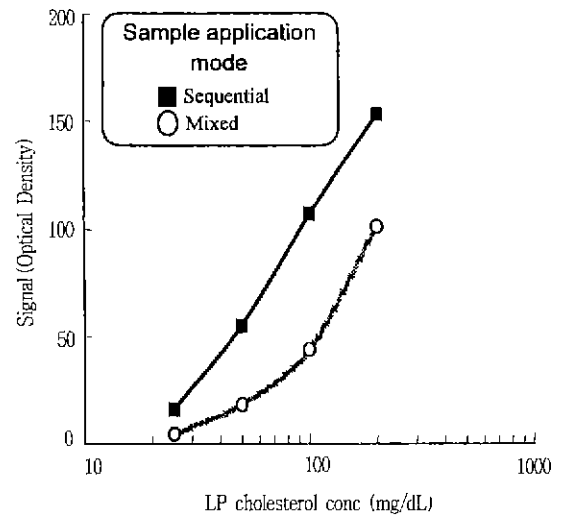


Figure 6. Determination of sample application mode (top) and membrane with a pore size (bottom) optimal for the intensity of signal generated from the assay system

육이 농도응답곡선을 직선화하는 효과를 나타내었다. 지질단백질의 운반효율을 시험하기 위해 다른 세공크기를 갖는 NC membrane (5 μm 그리고 20 μm)을 시료첨가패드로 이용하였다(Figure 6, 오른쪽). 세공크기에 비례하여 membrane을 통한 유속은 증가하였고 또한 전체 농도범위에서 신호세기가 상승하는 것으로 나타났다.

본 연구에서 개발하고자 하는 측정시스템은 cholesterol과 그 분해효소 (CE와 CO) 간의 화학반응 평형관계에 따라 신호가 발생되므로 그 세기는 시료로써 첨가된 cholesterol 농도에 비례하게 된다. 따라서, 시료를 운반용액과 혼합하여 첨가하는 방법보다 시료와 운반용액을 연속적 그리고 순차적으로 가하는 방법이 cholesterol 농도를 높게 유지시키고 따라서 측정가능한 농도를 감소시키는 것으로 판단된다(Figure 6, 왼쪽 참조). 부가하여, 시료 혼합첨가 시 분석물질들을 포함한 시료부피가 증가하게 되므로 효소패드 내 신호발생에 관여하는 물질들이 점진적으로 희석되어 신호발생효율이 감소되는 영향도 있을 것으로 예측된다. 또한, 지질단백질 입자의 크기 (직경 5-45 nm; (3))는 일반적인 용해성 단백질과 비교하여 평균직경이 10배 (부피는 1000배) 정도 크므로, 시료첨가패드를 통한 지질단백질 입자의 이송 시 그 운반효율은 패드로 선택된 membrane의 세공크기에 의해 조절되는 것으로 나타났다(Figure 6, 오른쪽 참조). 이러한 결과는 membrane의 세공크기가 증가될수록 입자의 배제효과가 감소되고 또한 membrane 표면적의 감소에 따라 그 표면과 입자간의 마찰력이 줄어들기 때문으로 해석된다.

측정성능 시험

위에서 결정된 최적조건 하에서 액상 효소반응을 수행함으로써 cholesterol 분석시스템의 농도응답을 구하였고 그 성능을 평가하고자 고정화된 효소를 이용하는 고상 효소반응시스템(1)과 그 분석민감도 (측정가능한 농도로써 정의)에 대해 비교하였다.

농도응답

액상 효소반응시스템의 성능을 시험하고자 지질단백질 cholesterol 표준용액을 이용하여 농도응답을 구하였다(Figure 7, 왼쪽). Cholesterol과 반응하여 발색된 membrane strip을 보면, cholesterol 농도 10 과 100 mg/dL 사이에서 육안으로 구분 가능한 발색이 발생되었을 뿐만 아니라 발색 세기는 cholesterol 농도에 비례하는 것으로 나타났다. 특히 20 mg/dL cholesterol 농도에서의 발색세기는 비특정신호 (즉, cholesterol 부재 하에서의 신호)와 비교하여 현저히 높았고 따라서 측정가능한 농도는 20 mg/dL 이하인 것으로 판단된다.

측정민감도 비교

이와 같이 구한 액상 효소반응시스템의 농도응답을 고상 시스템(1)으로부터 구한 결과와 비교하기 위해 농도응답곡선을 작성하였다(Figure 7, 오른쪽). 두 시스템으로부터 발생된 발색신호를 optical density로 전환하였고 이 값들을 지질단백질 cholesterol 농도에 대한 함수로써 표현하였다. 그 결과로부터, 고상 효소반응시스템은 40 mg/dL 이상의 cholesterol 농도범위에서 직선 상관관계를 나타낸 반면에 액상 반응시스템은 그 보다 2배 낮은 농도에서 유사한 응답패턴을 보였다. 특히, 액상 반응시스템은 순환기 제동의 이상유무를 나타내는 저밀도 지질단

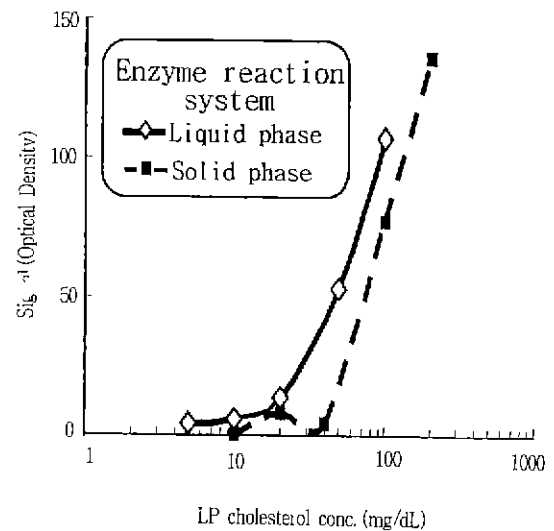
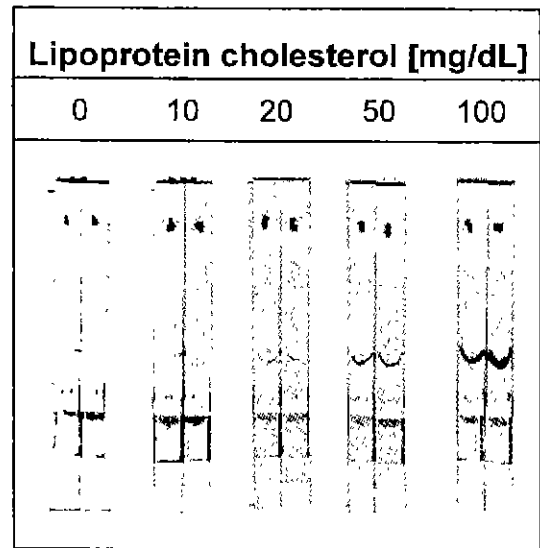


Figure 7. Dose responses of the membrane strip system utilizing liquid-phase enzyme reactions (top) and comparison of its performance with that of an assay with immobilized enzymes by plotting the respective dose-response curve (bottom).

백질 cholesterol 농도범위 (100-200 mg/dL; (3,4)) 뿐만 아니라 순환기 관리상태를 대표하는 고밀도 지질단백질 cholesterol 농도 (20-70 mg/dL, (3,4))를 측정하기 위해 사용될 수 있는 것으로 나타났다.

결론으로써, cholesterol 분해효소들의 반응을 액상에서 수행하고자 모든 반응물질들이 한 membrane 패드 내에 건조상태로 축적된 효소패드를 제조하였고 이를 이용하여 구성된 membrane strip 분석시스템의 지질단백질 cholesterol 측정 하한농도는 20 mg/dL 이하인 것으로 나타났다. 그 민감도는 고정화된 효소를 이용한 분석결과와 비교하여 2배 이상 향상되었고, 이와 같은 결과는 총 효소량의 조절이 가능할 뿐만 아니라 반응물의 이동이 최소화되도록 고안된 효소패드의 도입에 기인하는 것으로 판단된다. 개발된 cholesterol 분석시스템은 앞으로 동맥경화

진단 지표물질인 LDL-C와 HDL-C을 비전문인에 의해 간편하게 측정하는 분석시스템의 제작에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

시약을 가하거나 제거함이 없이 일반 사용자가 간편하게 사용할 수 있는 혈장 지질단백질 cholesterol 측정용 membrane strip 분석시스템이 개발되었다. 본 저자들에 의해 과거에 보고된 측정시스템은(1) cholesterol 분해효소들 (cholesterol esterase and cholesterol oxidase)을 nitrocellulose membrane 표면에 고정화시켜 제작되었으므로 효소 총량은 membrane 표면에 의해 제한되었고 따라서 측정정능이 비교적 낮은 것으로 나타났다 (> 50 mg/dL cholesterol). 이러한 문제점을 극복하기 위해, 효소들이 cellulose membrane 세공 내에 건조상태로 측정된 비고정화 상태의 새로운 분석시스템을 고안하였다 이 경우 효소들은 시료용반응액과 접촉되면 즉시 용해되어 액상에서 cholesterol 분자들과의 반응에 참여한다. 사용자의 편의를 고려하기 위해 시료첨가, cholesterol 분해, 신호로써 발색 형성, 그리고 유체의 흐름을 지속시키기 위한 용액흡수를 위한 4쪽의 membrane 패드들이 하부로부터 순서대로 연결되어 구성된 시스템을 제작하였다. 지질단백질이 포함된 시료는 모세관현상에 의해 첨가패드 내로 흡수된 후 상단에 위치한 분해패드로 이송되었다. 분해패드 (또한, 효소패드로 명명됨) 내에는 지질단백질 입자를 파괴하기 위한 계면활성제 (sodium cholate)와 cholesterol 분해효소들 그리고 발색물질 (3,3'-diaminobenzidine)이 포함되었다. 분해효소반응의 산물로서 생성된 과산화수소는 발색물질의 존재 하에서 신호발생패드 상에 고정화된 효소 horseradish peroxidase와 반응되었고, 최종적으로 cholesterol 농도에 비례하는 발색신호가 발생되었다. 최적조건 하에서, 개발된 시스템의 측정하한농도는 고정화된 효소를 이용하는 경우와 비교하여 적어도 2배 낮은 것으로 결정되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학기술연구원 (핵심연구 과제번호 951-1104-032-2)의 재정지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Shin, I-S and S.-H Paek (1996). Development of Membrane Strip Assay System for Lipoprotein Cholesterol, *Kor J. Biotechnol Bioeng.* 11, 140-150.
- Gotto, J. Antonio M., H. J. Pownall, and R. J Havel (1986), Introduction to the Plasma Lipoproteins, *Meth Enzymol.* 128, 3-41.
- Mackness, M. I. and P. N. Durrington (1992), Lipoprotein Separation and Analysis for Clinical Studies, Lipoprotein Analysis, A Practical Approach (C. A. Converse and E. R. Skinner, eds), p.1, IRL Press, Oxford.
- Schaefer, E. J. (1991), Overview of the Diagnosis and Treatment of Lipid Disorders, *Methods for Clinical Laboratory Measurement of Lipid and Lipoprotein Risk Factors* (N. Rifai and G. R. Warnick, eds.), p.1-16, AACC Press, Washington, DC.
- Bachorik, P. S. and J. J. Albers (1986), Precipitation Methods for Quantification of Lipoproteins, *Meth Enzymol.* 129, 78-100.
- Bachorik, P. S. and J. W. Ross (1995), National Cholesterol Education Program Recommendations for Measurement of Low-Density Lipoprotein Cholesterol: Executive Summary, *Clin Chem.* 41, 1414-1420
- Nauck, M., K. Winkler, W. Marz, and H. Wieland (1995), Quantitative Determination of High-, Low-, and Very-Low-Density Lipoproteins and Lipoprotein(a) by Agarose Gel Electrophoresis and Enzymatic Cholesterol Staining, *Clin. Chem.* 41, 1761-1767.
- Rudel, L. L., J. A. Lee, M. D. Morris, and J. M. Felts (1974), Characterization of Plasma Lipoproteins Separated and Purified by Agarose-Column Chromatography, *Biochem J.* 139, 89-95.
- Rifai, N., G. R. Warnick, J. R. McNamara, J. D. Belcher, G. F. Grunstead, and J. Frantz, Ivan D. (1992). Measurement of Low-Density-Lipoprotein Cholesterol in Serum. A Status Report. *Clin. Chem.* 38, 150-160
- Gordon, D. J. and B. M. Rifkind (1989), High-Density Lipoprotein - the Clinical Implications of Recent Studies, *New Eng. J. Med.* 321, 1311-1316
- Gordon, T., W. P. Castelli, M. C. Hjortland, W. B. Kannel, and T. R. Dawber (1977), High Density Lipoprotein as a Protective Factor against Coronary Heart Disease, *Amer. J. Med.* 62, 707-714.
- Johnson, W. J., F. H. Mahlberg, G. H. Rothblat, and M. C. Phillips (1991), Cholesterol Transport between Cells and High-Density Lipoproteins, *Biochim Biophys. Acta* 1085, 273-298.
- Tall, A. R. (1990), Plasma High Density Lipoproteins, *J. Clin Invest.* 86, 379-384.
- Warnick, G. R. and P. D. Wood (1995), National Cholesterol Education Program Recommendations for Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol. Executive Summary, *Clin. Chem.* 41, 1427-1433.
- Artiss, J. D., D. H. Feldbrugge, M. H. Kroll, M. J. McQueen, T. Pry, B. Zak, and J. Ziegenborn (1991), Measurement of Cholesterol Concentration, *Methods for Clinical Laboratory Measurement of Lipid and Lipoprotein Risk Factors* (N. Rifai and G. R. Warnick, eds.), p.33, AACC Press, Washington, DC.
- Warnick, G. R. (1986), Enzymatic Methods for Quantification of Lipoprotein Lipids, *Meth Enzymol.* 129, 101-123.
- Hsu, S.-M. and E. Soban (1982), Color Modification of Diaminobenzidine (DAB) Precipitation by Metallic Ions and its Application for Double Immunohistochemistry,

- J. Histochem. Cytochem.* **30**, 1079-1082.
18. Rothwell, T. C., V. S. Kamanna, J. Fu-You, E. Koren, T. Foley, and M. L. Kashyap (1995). Characterization of a Monoclonal Antibody (HB-22) and Development of an ELISA for Human Apolipoprotein A-I, *Clin. Chem.* **41**, 1150-1158
 19. Brown, W. R., S. E. Dierks, J. E. Butler, and J. M. Gershoni (1991). Immunoblotting: Membrane Filters as the Solid Phase for Immunoassays, *Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay* (J. E. Butler, ed.), p.151, CRC Press, London
 20. Clend. W. W. (1982). The Use of pH Studies to Determine Chemical Mechanisms of Enzyme-Catalyzed Reactions., *Meth. Enzymol.*, **87**, 390-405.
 21. Tipton, K. F. and H. B. F. Dixon (1979). Effects of pH on Enzymes., *Meth. Enzymol.*, **63**, 183-234.