

광 바이오센서를 이용한 비표지 생체물질들의 특이 상호작용력의 측정

†김 의 락 · 1최 정 우
계명대학교 자연과학부 화학과, 1서강대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2002. 1. 9., 게재승인 : 2002. 2. 21.)

Label-free Detection of Biomolecular Specific Interaction by Optical Biosensors

Ui Rak Kim† and Jeong-Woo Choi

Department of Chemistry, Keimyung University, 1000-Shyndang-Dong, Dalshyu-Ku, Daegu 704-701, Korea

¹Department of Chemical Engineering, Sogang University, 1-Shinsu-Dong, Mapo-Ku, Seoul 121-742, Korea

(Received : 2002. 1. 9., Accepted : 2002. 2. 21.)

Label-free optical methods for the monitoring of interactions between biological molecules have become increasingly popular within the last decade. A rising number of publications have demonstrated the benefits of direct biomolecular interaction analysis(BIA) for biology and biochemistry, such as antigen-antibody interactions, receptor-ligand interactions, protein-DNA, DNA- intercalator, and DNA-DNA interactions. This article gives an overview of the historical development, principle and application of label-free optical biosensor to examine the functional characteristics of biospecific interaction, such as kinetics, affinity, and binding position of biomolecular between an immobilized species at the transducer surface and its dissolved binding partner.

Key Words : label-free detection, biomolecular interaction analysis(BIA), surface plasmon resonance(SPR), bioaffinity sensor, optical sensor

서 론

변환기 표면에서 생체 물질들의 상호 작용력을 측정하기 위하여 처음으로 사용된 광학 기술은 영점조절 타원편광법(nulling ellipsometry)이다(1). 이 방법은 그동안 박막(thin films) 연구에 사용되어 왔으나, 1952년 Trurnit는 chymotrypsin 효소에 의하여 소혈청 알부민(bovine serum albumin)의 소화과정을 타원편광법을 이용하여 실시간(in real time)으로 처음 측정하였으며, 또 용액을 교반 하였을 때와 하지 않았을 때 측정값의 차이에 대해서도 설명하였다(2). 그 후 30년 동안 타원편광법(ellipsometry)은 소혈청 알부민(bovine serum albumin)과 그 항체(3,4) 또 fibrinogen과 항 fibrinogen 항체간의 상호 작용(4)과 같은 액체-고체간 계면반응의 변화량을 측정할 수 있는 유일한 비표지 광학적 측정법이였다. 1983년 Liedberg와 그의 동료들은 생체물질들의 상호작용력을 측정하기 위하여 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR)을 사용할 수 있다는 연구결과를 발표하였다(5). 비록 표면 프

라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR)방법이 1971년부터 알려졌지만(6), 주로 금속표면 위의 유기 단분자층과 다분자층 연구에 사용되었다(7,8). 1990년 스웨덴의 "Pharmacia Biosensor"회사는 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 비표지 생체물질들의 특이적 상호작용을 분석할 수 있는 "BIAcore"라는 상품을 개발하였다. 1988년 Nellen과 그의 동료들은 회절 발 coupler(grating coupler)을 이용한 생화학물질 측정용 센서에 대한 연구를 발표하였고(9), 이를 이용하여 1991년 스위스의 "ASI AG"회사는 "BIOS-1"이라 불리는 상품을 개발하였다. Strange와 그의 공동연구자는 다중각 Brewster각 굴절법(multiple-angle Brewster angle reflectometry, MABAR)을 이용하여 silicon 표면에 혈청 알부민을 도포하여 항 사 람혈청 알부민 항체의 결합에 관한 연구를 하였다(10). 그러나 이 방법은 생체물질들의 상호작용의 측정한계가 좋지 않았기 때문에 이용도가 적었다. Young 간섭기(Young interferometer)(11), Mach-Zehnder 간섭기, 그리고 시차 간섭기와(12) 같은 몇몇 적분광 간섭기 기술(integrated optical(IO) interferometer techniques)이 생체물질의 상호작용을 측정하기 위하여 사용되었다. 다른 도파관(waveguide) 변환기(transducer) 즉, 공명거울(resonant mirror)이 1993년 Cush와 그의 동료들에 의하여 처음으로 바이오센서에 응용한 연구결과가 발표

†Corresponding Author : Department of Chemistry, Keimyung University, 1000-Shyndang-Dong, Dalshyu-Ku, Daegu 704-701, Korea
Tel : +82-53-580-5181, Fax: +82-53-580-5164
E-mail : kur@kmu.ac.kr

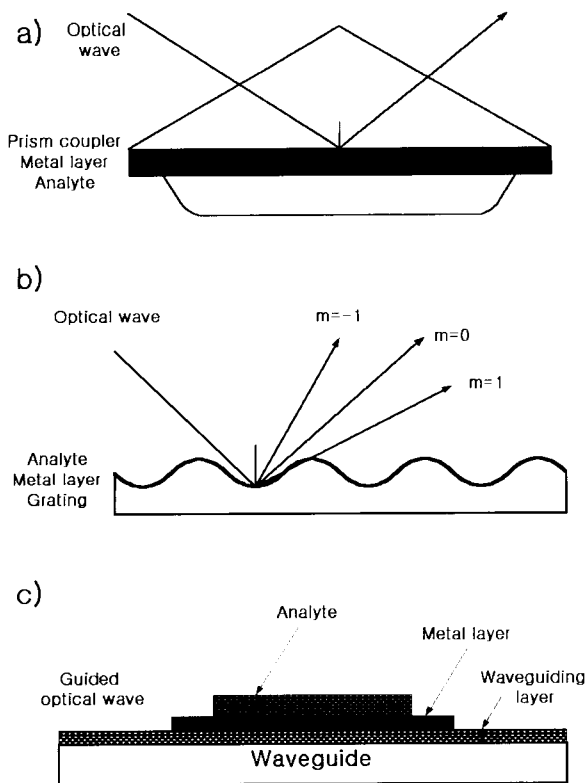


Figure 1. 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance, SPR)센서의 가장 널리 사용되어지는 구성계의 모형 a) prism coupler-based SPR system(ATR method) b) grating coupler-based SPR system c) optical waveguide-based SPR system

되었고(13), 같은 해에 영국의 “Attinity Sensor”가 이를 상품화하였다.

표면 플라즈몬 공명(SPR)에서는 단색광(monochromatic light)에 의하여 각분별 측정(angle resolved measurement)뿐만 아니라 백색광(white light)을 이용하여 고정각 측정(fixed angle measurement)이 이루어졌다. 이 방법은 Striebel과 그 공동 연구자들이 항원-항체 상호작용 측정과 인지질 소포체(phospholipid vesicles)들의 퍼짐(spreading)측정에 사용되었다(14).

1999년 Stemmler와 그의 공동연구자들은 바이오센서에 응용할 수 있는 소형화 SPR 변환기에 대하여 연구한 것을 발표하였다(15). 1937년 Langmuir(16)는 흡착된 단백질막 연구에 박막 간섭법(thin film interference)을 사용하였지만, 60년이 지난 1993년에 Gauglitz와 그의 공동연구자들에 의하여 박막 간섭법을 이용하여 시간 분별측정용 기구를 개발하였으며(17), 이를 굴절 간섭분광기(reflectometric interference spectroscopy, RIFS)라 부른다. 최근 SPR을 응용한 다른 바이오 센서가 시장에 나오고 있다. 즉 미국의 “Texas Instruments Incorporated”에서 moulded plastics으로 만든 광학기구를 이용한 “Spreeta” 제품을(18), 독일의 “Xantech”회사는 Dutch Group에서 개발된 진동거울 기술(vibrating mirror technology)을 응용한 “IBIS”제품을(19), 또 독일, 뮌헨에 있는 “BIOTUL”회사는 “Plasmoon”라는 제품을 개발하였다. 이들의 판매조직에 대한 정보는 manufactures websites을 열면 알 수 있다(20-24).

비표지 광 바이오센서가 1990년에 처음으로 상품화된 후,

이 방법들이 생리학과 생화학 반응에서 직접 생체물질들의 상호작용의 분석(biomolecular interaction analysis, BIA)에서 우수성을 설명하기 위하여 많은 연구결과가 발표되었다. 그 결과 광 바이오센서를 사용하면 고정화된 생화학종(immobilized biochemical species, ligand)과 용액속에 있는 측정하려고 하는 생체물질(ligand)과의 상호작용량을 변환기 표면위에서 일어나는 광화학적 성질의 변화를 실시간(in real time) 측정함으로써 얻을 수 있다. 이와 같은 비표지 방법의 가장 중요한 이점은 방사선 동위원소를 사용하지 않는다는데, 측정하려고 하는 물질 외에 다른 생체물질의 결합으로 일어날 수 있는 오차를 없애는 데 있다.

그러므로 비표지 방법은 특히 항원-항체 상호작용(25-28), 항체공학(29-31), receptor-ligand의 상호작용(32-34), protein-DNA, DNA-intercalator 그리고 DNA-DNA 상호작용(35-39) 연구에 널리 이용되고 있다. 비표지 바이오 센서는 보통 세 부분으로 구성되어 있다. 다시 말하면, 결합물질의 검출을 위한 변환기(transducer), 표면화학을 이용한 생체물질의 고정화(immobilization), 그리고 검사체계(assay formats)와 얻어진 실험결과 평가방법이다. 많은 검출기술이 비표지 바이오센서에 응용되어지지만 모두가 액체-고체 계면에서 일어나므로, 가장 좋은 결과를 얻기 위해서는 위의 세 부분의 기능이 모두 가장 좋은 상태일 때이다.

그러나 모든 검출 방법에는 각각 특이한 문제점과 한계성이 있으므로 본 총론에서는 불균일상 검출(heterogeneous phase detection), 고정화에 따른 기본 반응속도식, 얻어진 자료로부터 검사체계 구성, 그리고 여러 가지 변환기의 변환 원리를 비교 하고자 한다(40-45).

원리와 방법

바이오센서는 생물체내에 존재하는 생체물질 중 특정한 화학물질에 대한 우수한 인식기능을 가진 물질을 이용하여, 생체내와 같은 반응을 통하여, 생성되는 물질을 상온, 상압 하에서 직접 측정할 수 있는 장치로써 세 부분으로 구성되어 있다. 즉 어떤 특정화학물질을 기질선택성과 반응특이성에 의하여 선택적으로 분자를 인식하고 검지하는 포착(receptor) 기능부분과 포착된 물질의 양이나 농도를 감지하여 신호로 변환시키는 신호변환(transducer) 기능부분과 받은 신호를 전기량으로 나타내는 전기, 신호부분으로 구성되어 있다(46-48). 지금까지 표지 바이오센서는 주로 fluorescence, phosphorescence, bio/chemiluminescence나 동위원소(isotope)로 표지 되어졌는데, 이와 같은 luminescence 물질로의 표지는 조작이 힘들고, 측정용 특정 장치가 필요하며, 동위원소를 사용할 경우, 방사선 물질의 위험성, 분석 후 폐기물 문제, 짧은 수명, 방사선물질 취급요원의 필요성, 측정기기의 고가 등 여러 가지 문제점이 제기 되므로, 쉽게 측정이 가능하고, 제작비용이 적게 들며, 실시간 측정이 가능한 비표지 바이오센서 개발이 과거 20년 전부터 많은 연구가 진행되고 있다. 바이오센서의 선택성과 수명은 생체물질의 특이성과 안정성에 의존하므로 생 활성면(bioactive surface)의 제조와 활성분자의 인식기능의 보존은 바이오센서 개발에서 가장 중요한 문제이므로 비표지 생체물질(ligand)을 표면화학적

로 불균일표면(heterogenous surface)위에 고정화하는 방법과 비표지 생체물질(ligand)이 감지한 초미량의 감지물질(ligate)을 인식할 수 있는 분해능을 가진 변환기의 특성 그리고 얻어진 실험결과를 분석하고, 규격화하는 방법에 대하여 설명하고자 한다.

고정화(Immobilization)

변환기 표면에 비표지 생체물질을 고정화하여 측정하려고 하는 물질과 선택적으로 결합시켜 측정한다. 그러나 측정하려고 하는 특이적으로 결합된 생체물질과 비특이적으로 흡착된 생체물질과의 구별이 어려우므로, 대부분 경우 비특이적 결합을 최대한 줄일 수 있는 고분자 물질로 변환기 표면을 변형(modification)시킨다. 변환기 표면에 비표지 생체물질(ligand)를 공유결합(covalent)이나 친화도(affinity)를 이용하여 결합시켰으므로 바이오센서를 재사용(regeneration)할 수 있고, 또 연속적으로 측정이 가능하다. 그러므로 최근 많은 연구에 사용되어지고 있는 변환기 표면의 기능화(functionalization), 고분자 물질로 표면의 변형 그리고 비표지 생체물질(ligand)를 고정화하는 방법에 대하여 기술하고자 한다.

기초적인 변환기 표면변형(modification)과 기능화(functionalization)

변환기 표면의 기능화는 표면의 종류와 성질에 따라 달라진다. 즉 금이나 은 표면을 가지는 변환기 표면은 자기조립성 단분자층(self assembled monolayer, SAM)(49-51)을 형성할 수 있는 thiol로써 변형시킨다. 일반적으로 수산기(hydroxy group)를 가진 긴 사슬의 alkyl thiol을 사용하는 경우가 많은데, 이 수산기는 친전자 결합자리(electrophilic coupling sites)인 epoxy기를 부여하기 위하여 epichlorohydrin과 결합시키는데 사용된다.

다른 방법은 ω -carboxyalkyl thiol을 사용하는 경우인데 이때 carboxyl기는 다른 유도체를 만드는데 사용된다. 수정(quartz)이나 금속산화물과 같은 산화성 표면(oxidic surface)은 silane들로 쉽게 변형시킬 수 있다. aminoalk-yl-silane들과 epoxyalkyl-silane들은 가장 보편적으로 사용되어지는 silane들이다. 금이나 은 층에 형성되는 자기 조립성 단분자층(SAM)과는 달리 silane화된 표면은 규칙성이 떨어진다(52-54).

비특이성 결합을 최소화하기 위한 변환기 표면변형

정제하지 않은 세포 추출물이나 배양 상등액과 같이 복합기질(complex matrices)이 측정대상 생체물질일 경우 변환기 표면에 비특이성 결합물을 최소화 하는 것은 대단히 중요하다. 바이오센서의 표면 변형용 고분자로서 가장 많이 사용되어지는 것은 carboxymethylated dextran(CMD)(55)을 bromoacetic acid로 더욱 변형한 polysaccharide dextran이다. Piehler와 그의 공동 연구자들은 chitosan, polyoxyethylene과 dextran을 포함하는 아미노 기능화 고분자를 사용하였다(56). Dextran 표면은 평면이 아니고 많은 양의 검출물과 작용할 수 있도록 대량의 결합자리를 가지는 유연하고, 교차되지 않은 hydrogel 층이다. 또 hydrogel의 유연한 사슬은 생체 물질을 거의 균일(quasi-homogenous)하게 고정화할 수 있다. 완충 조건하에

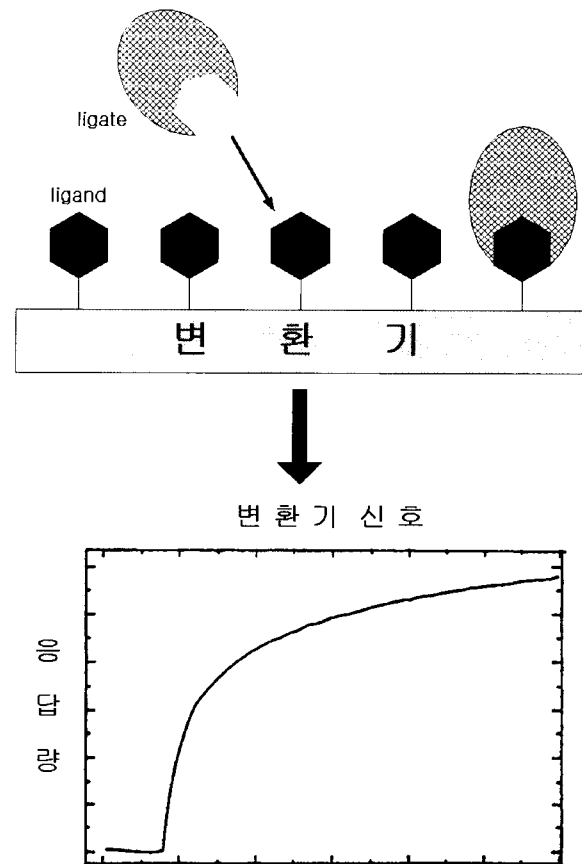


Figure 2. 비표지 바이오센서의 기본원리 고정화된 생체물질(ligand)에 용해한 생체물질(ligate)의 결합량에 비례한 변환기의 신호 변화량

서 dextran의 분자량과 결합방법(coupling method)에 따라 dextran층 두께를 19-36 nm(57)에서부터 200 nm(58)까지 만들 수 있다. 최근에 amino-polyoxyet-hylene면 위에 생체물질이 비특이성 결합을 대단히 적게 한다는 보고가 있다(59). 2차 표면(2-dimensional surface)은 다른 결합자리에서 틀리는 반응속도를 가지는 문제를 방지하여 주고, 또 재결합을 줄이도록 모든 결합자리가 같이 작용하는 이점이 있다. 두겹층 막(bilayer membrane)은 apolar anchor에 의하여 단백질을 고정화하는데 유용하게 사용되어지는 지지대이다(60-61). 이 막은 Langmuir-Blodgett 막 기술이나 친수성 표면에 막소포(vesicle)를 퍼뜨려 만든다. 이 방법의 이점은 고정화 물질의 방향성을 일정하게 할 수 있다. 또 다른 방법은 alkylthiol이나 alkylsilane을 지질 단분자층과 형성한 혼성 두겹층 막의 소수성 표면에 고정화 막을 형성하여 사용한다(62). 가장 흥미로운 것은 지질 두겹층 막을 사용하여 막 단백질을 고정화하면, 생체막의 성질을 연구할 수 있게 된다(63-64).

비표지 생체물질의 고정화(Immobilization)

변환기 표면에 생체물질을 고정화하는 가장 쉬운 방법은 표면에 흡착시키는 것이지만, 이 방법은 안정성과 비특이성 물질의 결합으로 재현성이 어렵고, 편차가 심한 문제점이 있다. 그러므로 가려막기 고분자(shielding polymer)에 생체물질을 공유결합(covalent coupling)시키는 방법이 종종 사용된다. 변환기 표면 위의 carboxyl기에 생체물질을 결합시켜 고정화하

는 방법은 친화 크로마토그래피(affinity chromatography)(65)개 발을 위하여 자주 쓰이는 방법인 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide(EDC)와 N-hydroxysuccinimide(NHS)을 사용하여 carboxyl기를 활성화 하여 amino기나 thiol기를 포함하는 생체물질을 결합시켜 고정화할 수 있다. 또 다른 방법은 활성화 carboxyl기를 cystamine dihydrochloride로 유도체를 만들고, 다시 dithioerythritol(DTE)로 환원하여 thiol기를 가지는 생체결합 물질과 결합할 수 있는 sulfhydryl기를 형성시킨다(58). 활성화 carboxyl기는 hydrazone을 형성하는 aldehyde기와 결합하기 위하여 hydrazine hydroxide와 결합할 수 있다. 이들은 sodium cyanoborohydride로써 환원되어 안정화된다(58). Sulfhydryl기를 포함하는 생체물질을 결합시키는 또 한 방법은 carboxy-표면을 maleimido유도체면으로 바꾸는 것이다(66). 만약 생체물질이 단지 carboxyl기를 포함하고 있다면 변환기 표면에 있는 amino기와 결합시키기 위하여 carbodiimide로, 그리고 amino기를 포함하면 생체물질은 glutaraldehyde로 결합시킬 수 있다.

생체물질을 고정화하는 다른 방법으로는 biotin-접합 생체물질을 avidin과 streptavidin 또는 neutravidin로 변형시킨 변환기 표면에 친화결합(affinity binding)으로 결합시키거나 또는 일반적인 화학적 방법으로 상호작용 포착 항체들(coupling capture antibodies)에 의하여 고정화한다. 이들 방법의 이점은 방향성 결합을 할 수 있는 동일한 결합자리(binding site)를 가지고 있다는 것이다.

포착 항체(capture antibodies)는 전형적 EDC/NHS방법으로 고정화하는 반면, streptavidin면은 단백질을 금이나 은 표면에 직접 흡착시켜 만든다(67). 이때 금 표면을 biotin화한 thiol로(68), biotin nitrophenylester로(69), methacryloxypropyl trimethoxysilane이나(70) aminosilane으로(71) 산화성 표면(oxidic surfaces)에 biotin화 하든지, amino polyoxyethylene으로 biotin화하여(72) 고정화한다.

특히 생체물질을 직접 고정화하는 자리로 분자생물학에서 잘 알려진 부위(Tag)를 사용하는 방법이 유용하다. Nickel 킬레이트면은 His-Tag(73-74)로써 접합된 분자들을 포착하는데 사용한다.

Glutathione-S-transferase(GST) 용융단백질을 사용하여 glutathione이나 항 GST항체로써 표면변형을 하면, 더욱더 방향성을 가진 표면을 얻는다(75). 고정화된 staphylococcal 단백질 A는 변환기 표면위에서 IgG를 포착하는데 사용되어진다(76-77).

변환기(Transducers)

바이오센서에 사용되어지는 변환기(transducer)는 변환방법에 따라 크게 세 가지로 나눌 수 있다.

즉 1)광학적 변환방법 2)전기 화학적 변환방법 3)질량 변환방법이다. 이들 세 가지 방법 중 광학적 변환방법은 가장 많은 수의 세부부류(subcategories)로 나누어지므로 이에 따라 광 바이오센서의 종류도 다양하다. 타원편광 반사기(ellipsometry)를 위시하여, 분광기(luminescence, phosphorescence, fluorescence, Raman)와 간섭기(백색광 간섭기, 광도파관 구조에 따라 modal 간섭기), 그리고 광도파관 구조에서 유도 방식에 따른 분광기(grating coupler, resonant mirror)와 표면

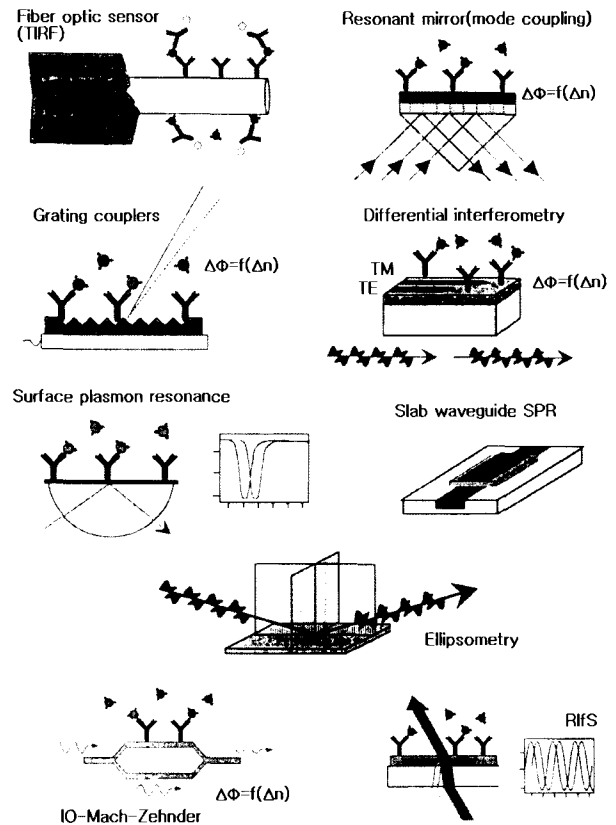


Figure 3. 광 바이오센서 변환기 원리의 개략적 설명도

프라즈몬 공명으로 나누어진다. 이들 센서들은 측정하고자 하는 생체물질들의 굴절률(refractive index), 흡광도(absorbance), 형광성질 또는 화학-광학 변환매질을 측정함으로써 얻고자 하는 양을 측정한다.(78-81)

기초과학 및 의료기기 산업 분야에서 고감도, 고속도 측정에 대한 필요성에 따라 빠른 응답특성과 높은 정밀도 등의 장점을 가지는 광센서 기술개발은 광 산업중에서도 중요한 분야 중의 하나가 되고 있다. 이러한 목적의 광센서 기술 중에서도 특히 SPR(surface plasmon resonance)관련 연구가 1983년 Liedberg와 그의 공동 연구자(5)들이 발표한 이래 20년 동안 활발히 연구되었다. SPR형 바이오센서는 입사된 레이저 광에 의하여 여기(excited)된 프라즈몬파(plasmon wave)와 소산파(evanescent wave)가 임의의 각에서 공명되어 반사도가 급격히 감소되는 현상(공명각)을 이용하므로 검출기 표면에서 일어나는 비표지 생체물질간의 생특이성 상호작용(biospecific interaction)으로 결합 및 분리과정을 실시간에 직접 관측할 수 있는 특징이 있다. 또한 이 공명각은 변환기 표면의 질량변화 등에 따른 유전률 변화에만 기인되므로 pM(picomol)수준의 저농도 시료까지도 감지할 수 있는 높은 감도를 가진다. 이러한 특징을 가지는 표면 프라즈몬 공명(SPR)현상을 이용한 센서 시스템으로는 회절 격자를 이용한 방법(82)과 광도파로를 이용한 방법(83) 그리고 프리즘을 이용한 방법(84)이 있으며 프리즘을 이용한 방법은 회절격자 방법이나 도파로 방법에 비하여 구조가 간단하여 센서 시스템화가 쉽고 효율이 좋은 장점을 가진다.

모든 광검출기의 검출원리는 표면 바로 근처상태에 따라

굴절률효과가 민감한 evanescent field을 응용한 것이다. 표면 직각에서 감도의 감소는 evanescent field의 감쇠(decay) 때문에 일어난다. 이는 벌크 굴절률(bulk refractive index)과는 별개의 감도이다. 감도의 감쇠는 전장(electric field)의 감쇠길이(decay length)에 의존한다. dextran hydrogel로 두꺼워진 표면두께와 짧은 감쇠길이 측정값과의 관계를 계산하였다(85). 벌크 굴절률 효과의 변화에 대한 감도는 만일 buffer가 변화되었을 때 신호의 뚜렷한 변화뿐만 아니라 온도에 크게 영향을 받는다. 그러나 타원편광법(ellipsometry), RIFs 그리고 MABAR을 사용하면 굴절률 효과뿐만 아니라 흡착층의 물리적 두께를 측정할 수 있고 또 온도 의존성이 적다. 감도, 잡음에 대한 신호의 비율(signal/noise, S/N), 그리고 편차(drift)와 같은 변환기 성능의 한계요인은 모든 분석장치에 공통적으로 적용된다. 측정한계(limits of detection, LOD)는, 순수한 굴절률효과를 측정하는 모든 장치가 하는 것처럼 굴절률 단위나, ng/mm^2 와 같은 표면도함률을 단위로 한다. 낮은 측정한계(LOD)는 높은 잡음에 대한 신호의 비율(S/N)과 높은 감도로부터 얻을 수 있다(86). 그러나 종종 장치들은 잡음한계보다 더 편차를 일으킨다. 특히 evanescent field 법은 온도 변화에 대하여 대단히 예민하지만, 완충조성에 대한 영향은 적다. 그리고, 편차의 다른 요인은 전원의 노화나 요동(fluctuation)에 의하여 생기는 측정기와 광원의 불안정성 때문에 일어난다. 측정기에 기준 channel을 도입하여, 측정 channel과 같이 검체를 균일하게 흐르게 하면, 모든 측정 단위들이 가지는 불안정성을 제거할 수 있을 뿐 아니라, 완충조성의 다른 영향도 최소화 할 수 있다(87-88). 또, 온도변화에 따른 편차는 성능이 좋은 항온조 속에서 측정하면 최소화 할 수 있다. 기준 channel의 사용은 모든 검출장치가 가지는 문제점인 변환기 표면에 결합된 비특이성 결합 생체물질의 영향을 제거할 수 있다. 그러나 생체물질의 고정화로 변환기의 표면이 변형되므로 기준 site에 고정화한 생체물질과 측정 site의 결합하려고 하는 물질의 성질이 결합상태의 특이성을 제외하고는 같은 성질이어야 한다. 변환기가 더욱 흥미를 일으키는 면은 많은 양의 시료 중에서 짧은 시간 내에 활성물질을 검출할 때 다중 channel(multi channel)로 평행검출(parallel detection)이 가능하다.

지금까지 많은 평행검출은 굴절계 간섭 분광기(reflectometric interference spectroscopy)를 이용하여 microtiterplate로 검출되었다(89).

분석절차/자료처리(평가)

바이오센서로 측정한 자료들의 평가를 작용시킨 분석절차법에 따라 설명하고자 한다. 주로 비표지 바이오센서로써 두 작용 생체물질의 상호작용력은 직접측정법과 간접측정법의 두 가지 틀리는 분석절차에 따라 측정한다.

직접측정

고정화한 생체물질(ligand)과 용해된 생체물질(ligate)사이의 상호작용을 직접 측정함으로써 반응속도 연구에 이용될 수 있다. 이 직접 측정법은 단백질과 같은 거대 분자측정에도 종종 사용되어진다. 간접 분석절차는 작은 분자량의 생체물질과 거대분자와의 사이의 상호작용을 측정하는데 보통

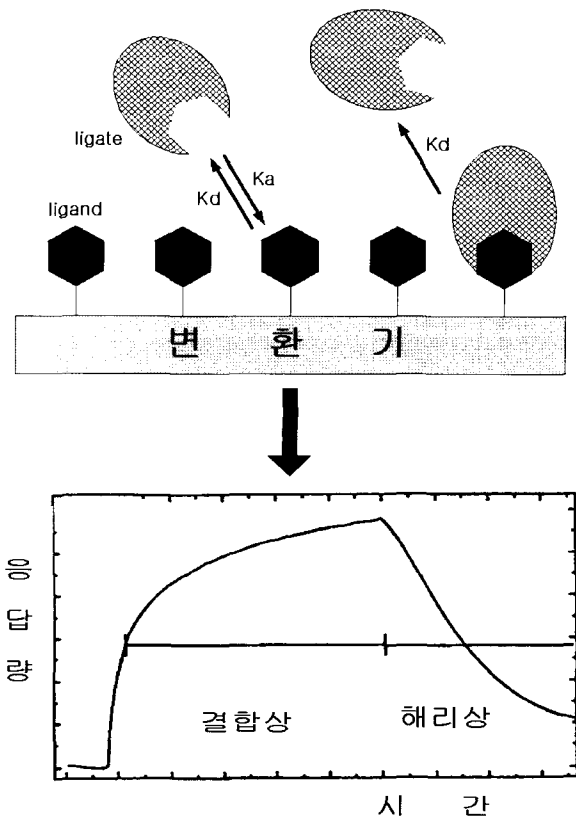


Figure 4. 단순 결합의 원리 결합상에 대한 결합속도 상수(Ka)와 해리속도 상수(Kd)의 영향.

쓰여진다. 이때 결합물질들은 용액상태이고, 평행상태의 농도는 바이오센서에 의하여 측정되고, 열역학적 해리상수 KD을 계산할 수 있게 한다.

첫째 방법은 두 생체물질의 상호작용력을 측정할 자료를 평가하는 가장 쉬운 방법을 다음과 같이 설명할 수 있다.(90)



여기서 A는 변환기 표면위에 고정화된 생체물질(ligand)이고, B는 용액속에 있는 측정하려고 하는 생체물질(ligate)이며, Ka와 Kd는 결합상수와 해리상수이다. 반응물을 포함하는 용액을 끊임없이 흘러 보내던가 휘저어 줌으로써 벌크용액과 무한히 빠른 속도로 측정하려고 하는 물질을 교환시켜 반응물의 농도를 일정하게 하면 결합반응은 Langmuir 이론에 의하여 유사 일차반응(pseudo-first order)이 된다.

$$d\Gamma/dt = K_a C_o (\Gamma_{max} - \Gamma) - K_d \Gamma \tag{2}$$

여기서 Γ 는 포착된 생체물질의 표면 도함률(surface coverage), C_o 는 용해된 생체물질의 농도, Γ_{max} 는 표면의 총 결합능(binding capacity)이다.

바이오센서의 신호는 표면에 고정화된 생체물질(ligand)에 결합된 용해된 생체물질(ligate)의 표면 농도에 직접 비례한

다. 그러므로 식(2)는 다음과 같이 된다.

$$dR/dt = K_a C_o (R_m - R) - K_d R \tag{3}$$

여기서 R 은 검출기에서 응답된 양이다. 유사 일차반응상태를 유지하기 위하여 결합반응은 고유반응속도 상수 (intrinsic kinetic rate constant) K_a 와 K_d 에 의하여만 조절된다고 가정하면(결합될 생체물질들이 표면으로 또는 표면으로부터의 확산은 반응속도를 제한하지 않는다) 측정할 생체물질의 농도 C_o 는 일정하고, 생체물질들은 1 : 1 화학량론적 비율(stoichiometric ratio)로 상호작용한다. 그리고 첫 자료분석법(90)은 식(3)을 이용하여 만든 다음식과 같은 선형 변형법이다.

$$dR/dt = K_a C_o R_m - (K_a C_o + K_d)R \tag{4}$$

여기서 R 에 대하여 dR/dt 를 도시하면 마이너스 기울기 $K_{obs} = K_a C_o + K_d$ 를 가지는 직선을 얻는다. 여러 가지 특정한 생체물질 농도 C_o 에 대하여 농도의존 속도 상수 K_{obs} 을 도시하면 기울기가 K_d 이고 그리고 축과 만나는 점이 $K_d R_m$ 인 직선을 얻는다.

이들 생체물질계(ligand/ligate)에서 해리상수 K_D 는 $K_D = K_d / K_a$ 로부터 구할 수 있다. 해리반응속도 상수 K_d 는 측정생체물질 대신에 buffer 용액으로 씻었을 때 결합된 생체물질이 표면에서부터 해리되어 buffer 용액속에 들어온 양으로부터 계산한다. 해리는 일차반응식으로 나타낼 수 있다.

$$dR/dt = -K_d R \tag{5}$$

그러므로 자료분석도 선형변형에 의하여 할 수 있다.

$$\ln(R_o / R_n) = K_d (t_n - t_o) \tag{6}$$

여기서 R_o 는 시간 $t=0$ 에서 센서의 응답량이고 R_n 는 시간 $t=n$ 일 때의 응답량이다. $(T_n - T_o)$ 에 대하여 $\ln(R_o/R)$ 를 도시하면 기울기가 K_d 인 선형직선이 얻어진다. 비록 이와 같은 선형변형법이 사용하기 쉽고 실용적이지만 자료가 종종 비선형이라는 사실을 은폐하던가 변형시켜 잘못을 전가시킬 가능성이 있다.

그러므로 이러한 종류의 분석은 비판의 대상이 되었다(91). 둘째 방법은 O. Shannessy와 그의 공동연구자는 지수곡선적합성 자료분석법을 제창하였다(92).

식(3)을 적분형으로 나타내면 다음과 같다.

$$R_t = \frac{CK_a R_m (1 - e^{-(K_a C_o + K_d)t})}{CK_a + K_d} + R_o \tag{7}$$

여기서 R_t 는 시간 t 에서의 센서의 응답량이고 R_o 는 초기 응답량이다. 결합곡선은 반복 지수곡선 맞춤법으로 식 (7)에 의하여 구한다. K_a 와 K_d 는 여러 가지 농도에서 측정되고, 얻어진 측정값의 정확성을 입증하기 위하여 통계처리를 한다.

다른 연구자들은 선형근접을 위하여 식 (7)에 K_{abs} 을 측정하여 C_o 에 대하여 K_{abs} 을 도시하여 K_a 와 K_d 를 얻는다(93-94). 식 (5)에 대하여도 미분식을 적분화 할 수 있다.

$$R_t = (R_o - R_\infty)e^{-k_d t} + R_\infty \tag{8}$$

여기서 R_t 는 시간 t 에서 센서응답값이고, R_o 는 초기 해리 응답값이며, R_∞ 는 외삽된 최종 응답값이다. 지수자료분석법(exponential data analysis)의 이점은 반응속도 상수를 잘못 측정하면 직접적으로 최초측정값에 영향을 준다. 만일 결합곡선이 측정 시간내 평형에 도달할 수 없을 때도 R_o 와 R_∞ 의 측정이 가능하다. 만일 해리 속도상수 K_d 가 결합상과 해리상을 구한다면 낮은 K_d 값은 결합상에서는 큰 의미가 없기 때문에, K_d 값은 해리상으로부터 구할 수 있다는 것을 암시한다(90-92). 더욱이 K_d 값은 결합상을 구하는데 사용된다. 반응속도상수 측정을 위한 세 번째 방법은 유속(flow rate)과 ligand의 표면 밀도와 같은 여러 가지 조건하에서 얻어진 결합곡선들에 동시적용이 가능한 종합분석(global analysis)법이다(95). 이때 측정값은 평행기준 채널로 측정된 참조표면으로부터 구한 자료를 이용하여 편차, 비특이적 결합 그리고 굴절률의 영향 등을 교정할 수 있다. 그러나, 이 방법을 이용하려면 대단히 높은 양질의 측정값이 필요하다. Morton, TA와 그의 공동연구자는 지금까지 논한 선형화법(linearization), 적분속도식법(integrated rate) 그리고 수치적분(numerical integration)법을 비교 검토한 결과를 발표하였다(93). 이들 분석 방법들의 가장 중요한 오류는 실제 실험결과가 단지 일차반응의 반응속도에 의하여 결정된다는 가정이다. 만일 실험이 이상조건(ideal conditions)들로부터 심각한 편차가 생긴다면 이상조건으로부터 만든 센서그램(sensorgrams)은 나쁜 결과를 나타낼 것이다. 예를 들면, Nieba와 그의 동료들은 표면에서 반응속도 측정으로부터 얻어진 해리상수와 용액에서 측정된 해리상수와와의 사이에는 큰 차이가 나타남을 보았다(96). 실험값과 모델로부터 구한 값의 차이가 나타나는 가장 큰 원인은 질량 운반(mass transport)이 결합에 크게 영향을 미치고, 변환기 표면에 재결합 효과 때문에 해리속도 측정결과가 너무 낮게 나타나며, 협동결합(co-operative binding)이 일어나던가, 둘 또는 그 이상의 결합부위(binding site)로 결합기구가 복잡하게 되는데 있다. Glaser는 컴퓨터 시뮬레이션(computer simulation)으로 측정된 실험값에 대한 질량운반 효과를 연구하였다(97). 이때 중요한 변수는 질량속도상수 K_d 와 $\gamma_{max} - \gamma$ 인 자유결합부위(free binding site)의 표면농도 g 와의 곱인 $K_d \cdot g$ 와 질량운반의 Onsager계수 L_m (Karlsson과 그의 공동연구자에 의하여 질량운반계수라 명명)이다(98). L_m 은 Sjölander와 Urbaniczky에 의하여 유체(flow system)에 대하여 계산하였다(99).

$$L_m = K_m = 0.98 \cdot \sqrt[3]{\frac{D^2 f}{h^2 b l}} \tag{9}$$

여기서 D 는 확산계수, f 는 부피흐름속도(volumetric flow rate), h 는 높이, b 는 채널의 폭, l 은 흐름용기(flow cell)입구

로 부터의 거리이다. Glaser는 질량운반 효과를 세 가지 틀리는 경우로 구분하였다(97).

a) $K_d \cdot g \ll L_m$ 일 때 반응속도가 질량운반에 영향을 받지 않는다.

b) $K_d \cdot g = L_m$ 일 때 속도상수 k_a 와 k_d 의 크기가 몇 배로 잘라 평가된다.

c) $K_d \cdot g > L_m$ 인 경우에 질량운반 효과가 완전히 조절되고, 반응속도 상태에 대하여 전혀 예측할 수 없게 된다. 그리고 결합곡선은 결합 생체물질의 농도를 결정하는데 사용되어진다.

Glaser는 측정생체물질의 농도가 낮을 때는 질량운반 한계와 속도론적으로 유도된 시간과의 차이가 대단히 적지만 높은 농도에서는 그 차이가 크고, 결합곡선은 선형신호(linear signal)로 시작하여 표면에 고정화한 생체물질의 농도의 감소로 결합곡선에 영향을 미치는 쪽으로 진행된다. Schuck와 그의 공동연구자들은 질량운반한계결합속도의 실험결과 평가를 위한 연구를 하였다(85,100-101). 결합상(association phase)의 실험결과분석을 위하여 종종 쓰여지는 방법이 질량운반 한계상과 속도론적 한계상으로 나누어진다. 이 방법은 R_t 에 대한 dR_t/dt 를 도시하여 선형부분의 측정으로 K_d 값을 얻는다. 그러나 Glaser는 큰 결합속도상수 일 경우 이 방법은 K_d 값이 예상보다 낮게 나타난다는 보고를 하였다. Schuck와 Minton는 질량운반을 설명하기 위하여 두 칸막이방 모형(two compartment model)을 제시하고, 질량운반은 단지 벌크 칸막이방(bulk compartment)에서 표면으로 이동한 것이라고 생각하였다(101).

질량운반을 위하여 식(7)과 (8)대신에 현상학적 반응속도 상수를 이용하여 결합곡선에 맞는 식을 유도하였다. 그러나 이 문제 해결에 가장 좋은 방법은 실험조건을 변형하여 질량운반 효과를 줄이는 것이다. 식(9)는 질량운반의 영향이 흐름 셀(flow cell)의 기하학적 구조, 흐름속도(flow rate) 그리고 확산계수 D 에 의존한다는 것을 보여 준다. 그러므로 높은 흐름속도(high flow rate)나 미량유체(microfluidics)는 반응속도 측정을 위하여 가장 좋은 조건이다. 확산계수는 분자의 크기에 의존한다. 그러므로 질량운반 한계성은 측정하려는 물질(ligand)이 고분자일 때 특히 문제가 된다. 실제로 선형 흐름속도(linear flow rate)의 증가에 의하여 질량운반 영향을 줄이는 방법은 한계성이 있다. 그러므로 결합부위의 표면농도와 측정된 결합 속도상수의 곱이 최소가 되어야 한다. 결합 속도상수가 생화학적 시스템(biochemical system)에 대하여 주어지므로, 이 곱이 최소화되는 유일한 방법은 고정화된 생체물질의 표면 농도를 감소시키는 것이다. 다른 한편으로 결합용량의 감소는 낮은 신호값(lower signal)을 나타낸다. 그러므로 바이오센서 장치는 낮은 S/N 비(ratio)와 고감도가 요구된다. 이들 파라미터(parameter)는 광 바이오센서에 의하여 연구되어야 할 결합 속도상수의 상한범위를 결정한다(102).

확산한계 조건하에서 결합속도가 흐름속도의 평방근(식9)에 비례하므로 질량운반 효과의 유무를 확인하는 방법은 흐름속도의 변화량으로 알 수 있다. 다른 방법으로는 설탕이나 glycerol의 첨가에 의하여 확산계수를 변형시켜 매질의 점도를 변화시킬 수 있다. 측정값이 편차를 일으키는 두 번째 이유는 재결합(rebinding)이다. 표면에 재결합 할 수 있는

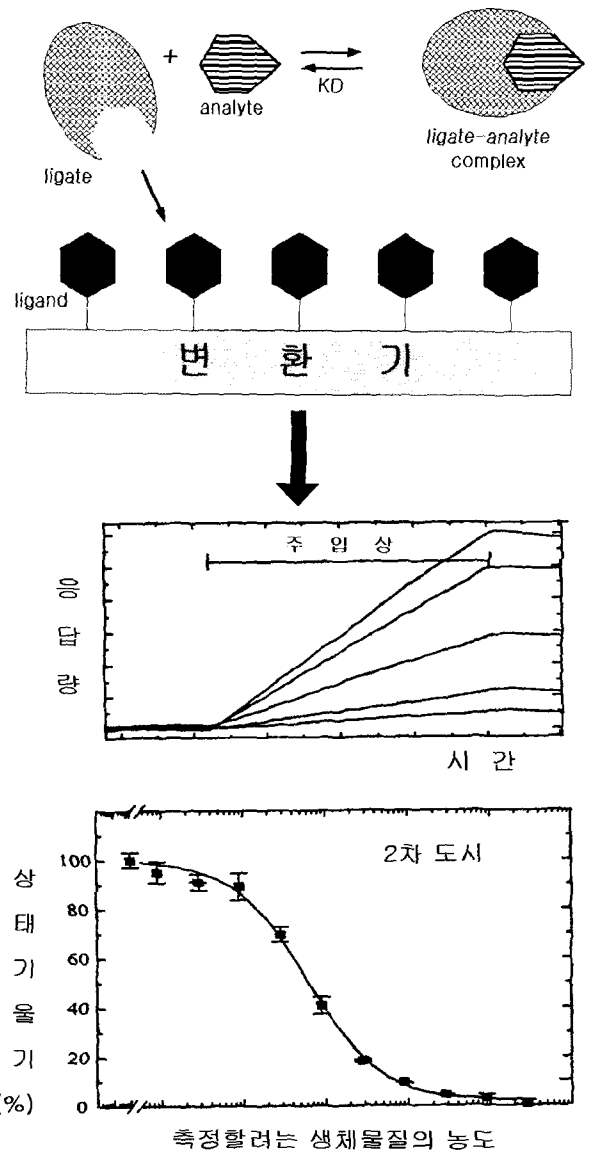


Figure 5. 결합속도의 측정에 의하여 바이오센서와 결합하지 않은 측정하려고 하는 생체물질과의 평형농도 측정. 결합곡선과 이차도시(적정곡선)

가능성은 자유 결합자리(free binding site)의 수가 증가할수록 커진다(103). 이 현상은 낮은 해리속도 상수를 나타내고, 결합상과 해리상에서 관측된 K_d 값은 실제값보다 낮게 나타난다. 또, 이 영향은 고정화 생체물질의 농도를 낮게 함으로써 줄일 수 있다. 재결합 효과를 방지할 수 있는 다른 유용한 방법은 순수한 완충용액 대신에 고농도의 가용성 경쟁물질을 첨가하는 것이다(97). 그러나 이것은 단지 해리상에만 적용 가능하다. 또한 측정물질로 표면의 최대 덮힘을 형성한 결합실험으로부터 해리상수의 측정이 가능하다. 만일 표면의 결합자리 대부분이 결합된다면 재결합 효과는 최소가 된다. 그러므로 해리상의 초기에는 일차반응속도에 따른다. 그 외 매트릭스 영향(matrix effect)은 인접 결합자리의 입체 장애효과와 고정화 효과이다. 한편으로는, 고정화 생체물질의 밀도를 낮춤으로 인접 결합자리의 입체 장애효과를 줄일 수가 있고, 결합자리를 직접 고정함으로 고정화 효과를 제

거할 수 있다. 그렇지만 얇은 매트릭스 또는 streptavidin층이나 고분자 막(polyoxyethylene)과 같은 이차 방향성을 가진 표면은 바이오센서에서 매트릭스 효과를 줄일 수 있다.

Edward와 그의 동료연구자들은 aminosilane 표면에 고정된 anti-HSA(human serum albumin)와 carboxymethyl dextran (CMD)표면에 고정화한 anti-HSA(human serum albumin)과의 상호작용력에 차이가 있음을 발표하였다(104). 트롬빈-방해제계의 해리속도 상수는 방해제를 dextran 매트릭스에 고정화하였을 때가 polyoxyethylene으로 변형시킨 표면에 고정하였을 때보다 4배나 낮다는 보고가 있다(59). 어떤 연구자들은 항원-항체의 1:1 모델로 만든 sensorgrams에 이중 지수식으로 맞춤함수를 적용시키지만 잘 맞지 않았다. 이는 두 개의 다른 부분집단(subpopulation)의 결합자리가 존재한다는 것을 제시한다(92). 또는 매트릭스의 영향으로 설명하는 방법을 제시하였다(104). 그러나 그러한 방법에는 문제가 있다. 왜냐하면 이중 지수식은 여러 가지 모델에 맞추지만 맞춤이 모델을 확실하게 하지 않을뿐더러 도리어 논란의 문제를 제공하기 때문이다. 왜 단지 두 개의 다른 부분집단(subpopulations)만 생각하느냐는 문제이다(92). 참고문헌(104)에 나타난 상호관계는 실 속도상수(real kinetic constants)를 나타내는 K_{obs} 에 대한 값이 높으면 높을수록, 또 질량의 영향을 나타내는 K_{obs} 값이 낮으면 낮을수록, 논란의 여지가 있게 된다. 해리상수 K_D 는 속도상수 K_a 와 K_d 로부터 계산된다. K_D 를 측정할 수 있는 또 다른 방법은 농도의존평형(R_{eq})를 측정하여 얻을 수 있다. 1:1반응에 대한 Langmuir 등온흡착식은 다음과 같다.

$$R_{eq} = R_{max} \frac{C_o}{K_D + C_o} \quad (10)$$

R_{eq} 에 대하여 R_{eq}/C_o 를 Scatchard 도서를 하면 기울기 $1/K_D$ 을 가진 직선이 된다. 이 식은 Cuvette을 가진 시스템을 사용하여 쉽게 측정할 수 있는 R_{eq} 값이 필요하다. 이때는 반응시간에 한계성이 없다.

단지 빠른 반응은 흐름계(flow system)(37)로나 또 특별한 장치가 요구된다. Schuck와 그의 동료들은 SPR 바이오센서에서 순환식 시료를 사용하였고, 그리하여 평형을 이룰 수 있는 충분한 항원시간을 얻었다(105). 이 방법은 해리상수를 질량 이동이 없는 조건하에서 해리상수를 측정할 수 있다는 이점이 있다. Schuck에 의하여 자체 확인 시험법은 다음과 같이 제시되었다.

1. K_a 와 K_d 로부터 계산된 속도론적 K_D 가 R_{eq} 로부터 유도된 열역학적인 K_D 와 같아야 한다.
2. 결합상과 해리상으로부터 계산된 해리속도 상수가 같아야 한다.
3. 모든 생체 결합물질 농도에 대하여, 결합상으로부터 계산된 농도의존상수 K_{obs} 가 해리속도 상수보다 커야 한다.

간접 검출법

앞 절에서는 열역학적 해리상수 K_D 와 속도상수 K_a 와 K_d 의 결정법에 대하여 기술하였고, 고정화법으로부터 생기는 문제점에 대하여 논하였다. 표면에서 측정된 상수가 용액속

에서 측정된 상수와 종종 다른 경우가 있다. 그러므로 균일 해리상수 K_D 를 측정하기 위하여, 센서를 이용하여 비결합 생체결합 물질(unbound ligates)의 농도를 측정하는 방법들이 개발되어 조사하였다.

Figure 3을 이용하여 측정원리를 설명하면 측정하려고 하는 생체물질(ligate)과 고정화 생체물질(ligand)의 혼합물을(센서표면에 고정화한 생체물질(immobilized ligand)과 용액에 녹인 고정화 생체물질과 구별하기 위하여 용해한 고정화 생체물질(dissolved ligand)을 어너레이트(analyte)라 한다)적당한 표면적을 가진 Cuvette안에서 진탕(stirred)되고 있는 센서의 변환기 표면 위로 흘러 보낸다. 측정하려고 하는 생체물질(ligate)과 용액에 녹인 고정화 생체물질(analyte)의 초기(총) 농도를 각각 l_0 와 a_0 로 할 때, 해리상수 K_D 는 다음과 같은 식으로 나타낼 수 있다.

$$K_D = \frac{a \cdot l}{x} = \frac{(a_0 - x) \cdot (l_0 - x)}{x} \quad (11)$$

여기의 a 와 l 은 측정하려고 하는 생체물질(ligate)과 용액에 녹인 고정화 생체물질(analyte)의 평형농도이며, a_0 와 l_0 은 이들의 초기농도이며, x 는 ligate-analyte 복합체의 평형농도를 나타낸다.

$l=l_0-x$ 라 할 때, 일가의 측정하려고 하는 생체물질(monovalent ligates)일 경우 식(11)은 다음과 같이 변형시킬 수 있다.

$$l = \frac{l_0 - a_0 - K_D}{2} + \sqrt{\frac{(l_0 + a_0 + K_D)^2}{4} - l_0 a_0} \quad (12)$$

용액속에 결합하지 않은 측정하려고 하는 생체물질의 농도를 (초기)결합속도(binding rate)로부터 측정할 수가 있다(98,106). 낮은 표면 덮힘률과 느린 반응속도는 경향이 유사하므로 식(13)으로부터 결합곡선의 시작점($R \approx 0 \text{ pg/mm}^2$)을 구할 수 있다.

$$dR/dt = K_a \cdot l \cdot R_m \quad (13)$$

그렇지만 C_o 는 결합하지 않은 고정화 생체물질의 농도(l)로 바꾸어 놓았다. 결합속도는 비결합의 측정하려는 생체물질(unbound ligate)의 농도에 직접 비례한다(98).

$$dR/dt = K_M \cdot l \quad (14)$$

여기서 K_M 은 질량운반계수이다.

지금까지 논의한 것처럼 두 경우 모두 결합속도는 비결합 측정하려고 하는 생체물질(unbound ligate)의 농도에 직접 비례한다. 그리고, 결합속도의 규격화(normalizing)(28)로 균일 해리상수 K_D 또는 방해 어너레이트(analyte)가 없는, 측정하려고 하는 생체물질만의 K_{obs} 측정(96)에 사용할 수 있다. 어너레이트 a_0 의 각 농도에 대한 이차도시(secondary plot, 적정곡선) 결과를 Figure 3에 나타내었다. 적정곡선에 식 (12)

을 맞춰서 해리상수 K_D 를 측정할 수 있다. 이런 종류의 분석은 종종 경쟁적이라 한다. 그 이유는 측정하려고 하는 생체물질(ligand)이, (고정화된)생체물질(ligand)과, 어너레이트(analyte, 용액에 녹인 고정화 생체물질)사이 경쟁적으로 결합이 일어나기 때문이다.

센서 표면과 흐름계(flow system) 속에 있는 측정하려고 하는 생체물질(ligand)과 용액에 녹인 고정화 생체물질(analyte) 사이에 짧은 상호작용 시간 때문에 이들 3 종류들간에는 평형에 도달할 수가 없다(만일 ligand-analyte 착합체의 해리가 그렇게 높지 않다면 용액속의 평형은 표면에 의하여 영향을 받지 않는다). 그리고 그 결과 결합속도는 단지 결합하지 않는 측정하려고 하는 생체물질(free ligand)의 농도에 의존한다. 이런 이유로 방해물질의 존재를 검사하는 시험을 하는 것은 중요하다.

또한 교반계(stirred system)를 가진 cuvette에 있어서 초기 반응속도는 측정하려고 하는 생체물질에 대하여 용액에 녹인 고정화 생체물질(analyte)과 고정화한 생체물질들 사이에 경쟁에 의한 것이 아니라 결합하지 않은 측정하려고 하는 생체물질의 농도에 의하여 결정되어진다. 이가의 측정하려고 하는 생체물질(bivalent ligates)에 대해서는 일가의 측정하려고 하는 생체물질만이 표면에 결합할 수 있는 식(12)을 변형하여 사용한다(28,96).

다클론성 항체(polyclonal antibody)와 같은 측정하려고 하는 생체물질의 혼합물에 대해서는 틀리는 해리상수 KD 때문에 지금까지 사용한 모델함수(model function)로는 설명할 수 없다. 그러한 계에 대한 측정곡선은 틀리는 항체를 비교할 수 있는 시험중간점(logistic function, IC_{50} 값과 비교할 수 있는)을 사용하여 측정할 수 있다. 만약 결합된 측정하려고 하는 생체물질의 양이 최대결합용량의 10%를 넘지 않는다면 항상 결합하지 않는 생체물질의 농도에 비례하는 결합반응 속도를 나타낸다. 그 결과 표면은 높은 결합능이 요구된다. 비극성 고정화 생체물질로 표면 변형을 시켰을 경우 수용성 매질을 사용하면 결합능에 어느 정도 영향을 받는다.

그러므로 변환기 표면에 높은 결합능을 얻기 위하여 유기 용매를 사용하여야 한다(28, 107). 이러한 측정방법의 좋은 점은 동일한 표면을 사용하여, 많은 다른 종류의 측정하려고 하는 생체물질에 적용할 수 있다는 것이다. 간접 측정법만으로 용액에 녹인 작은 크기의 고정화 생체물질(small analyte)을 측정할 수 있다. 그리고 고정화에 의한 영향(재결합 또는 질량운반)들이 결과에 영향을 미치지 않는다. 또, 이 방법은 용액속에서 열역학적 해리상수 K_D 에는 접근할 수 있지만 속도상수 K_a 와 K_d 의 측정은 할 수 없다는 것을 언급하지 않을 수 없다.

결 론

비표지 광 바이오센서는 여러 가지 생물학적 계의 열역학적 상수와 속도상수에 관한 정보를 제공한다. 그러나 표면에 고정화하는 한쪽 결합 상대물질(binding partner)은 측정과 실험장치에 크게 영향을 미친다. 표면에서 어떤 결합을 측정하므로 비특이성 결합이 최소가 되든가, 가능하면 잠고 사항을 표시하여야 한다.

그러므로 표면변형은 대단히 신중하게 이루어져야하고 그 결과들의 신빙성을 면밀히 조사하여야 한다. 만일 이들의 조건이 확인되면 생물학적 계에 대한 유효한 정보를 얻을 수 있다.

낮은 분자량을 가지는 물질과 거대분자로 이루어져 있는 계에 대해서는 만약 거대분자를 고정시키고, 용해시킨 적은 분자와의 작용이 이루어지면 질량운반으로 생기는 문제를 현격히 줄일 수가 있다(108,109). 이러한 방법은 receptor와 같은 단백질에도 마찬가지로 적용할 수 있다. 여기에는 자연적인 결합이 알려져 있지 않으므로 간접측정은 불가능하다.

그러나 이것은 높은 S/N 비, 낮은 편차들(low drifts), 그리고 비특이성 결합의 효과를 고려하여야 한다. 표면을 기초로 하는 측정법의 또 하나 특이한 장점은 결합의 측정시간 의존성이다. 이것은 속도상수 측정뿐만 아니라 비활성 물질이나 표면 변형의 문제점을 직접분석을 가능하게 한다. 그렇지만, 표면에 한쪽 결합물질의 고정화는 결합상수가 변형될 수가 있다.

그러므로 만약 균일상에 대한 해리상수가 결정되어진다면 결합방해 시험(binding inhibition test)을 하여야 한다.

광 바이오센서에 의하여, 측정이 가능한 속도상수의 범위는 질량운반 정도에 따라 영향을 받는다. K_a 의 높은 값은 $10^6 M^{-1} S^{-1}$ 범위이고(102), 낮은 값은 ligate의 항온시간에 주로 영향을 받는다.

간접측정의 경우, 측정 가능한 가장 낮은 K_D 의 값은 해리 속도 상수한계에 의하여 10^6 까지 측정이 가능하다(28). 측정 가능한 가장 큰 해리상수는 ligate의 농도가 K_D 의 범위내에 있기 때문에 측정한계에 의존한다. Piehler와 그의 동료들은 $10^{11} M$ 까지 계산하였다.

지금까지 논한 방법은 단지 결합결과 측정만 가능하고, 효소활성이나 형태변화(conformation change)와 같은 기능성에 관한 정보는 얻을 수 없다. 그러나 이들 방법은 구조와 기능과의 관계를 연구하기 위한 면역분석법 개발, 약품발견 그리고 돌연변이 연구와 같은 분야에서 특별히 유용하게 사용되어진다.

앞에서 언급한 다중반점(multiple spots)검출법 외에 최근에는 바이오센서와 다른 분석방법을 결합시켜 측정하는 방법이 연구되고 있다. 거대분자(macromolecular)에 대한 생특이성 검출(biospecific detection)을 위하여 액체 크로마토그래피와 비표지 바이오센서를 결합시켜 측정하는 방법이 보고되었고(110), 또 최근에는 저분자에 대한 연구도 발표되었다(111).

Krone와 그의 동료들은 변환기 칩(chip)에 항 마이옥신 항체(anti-myotoxin antibodies)를 고정하여 생성된 종(species)을 분석하기 위하여 MALDI-TOF를 사용한 방법을 보고하였다(112). Roos와 그의 동료들은 다양한 온도에서 바이오센서 측정으로 속도상수나 친화도 상수뿐만 아니라, 자유에너지, 엔탈피, 그리고 엔트로피와 같은 열역학적 파라메타(parameters)를 측정하였다.

감 사

본 연구를 수행하는데 워드작업을 도와준 박성수 대학원

생에게 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Trurnit, H. J. (1953), Studies of enzyme systems at a solid-liquid interface. I. The system chymotrypsin serum albumin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **47**, 251-271.
- Trurnit, H. J. (1954), Studies on enzyme systems at a solid-liquid interface. II. The kinetics of adsorption and reaction, *Arch. Biochem. Biophys.*, **51**, 176-199.
- Azzam, R. M., Rigby, P. G., and Krueger, J. A. (1977), Kinetics of protein adsorption and immunological reactions at a liquid/solid interface by ellipsometry, *Phys. Med. Biol.*, **22**(3), 422-430.
- Cuyper, P. A., Hermes, W. T., and Hemker, H. C. (1978), Ellipsometry as a tool to study protein films at liquid-solid interfaces, *Anal. Biochem.*, **84**, 56-67.
- Liedberg, B., Nylander, C., and Lundström, I. (1983), Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sens. Actuators*, **4**, 299-304.
- Kretschmann, E. (1971), Die bestimmung optischer konstanten von metallen durch anregung von oberflächen plasma schwingungen, *Z. Phys.*, **241**, 313-324
- Pockrand, I., Swalen, J. D., Gordon, J. G., and Philpott, M. R. (1978), Surface plasmon spectroscopy of organic monolayer assemblies, *Surface Sci.*, **74**, 237-244.
- Swalen, J. D., Gordon, J. G., and Philpott, M. R. (1980), Plasmon surface polariton dispersion by direct optical observation, *Am. J. Phys.*, **48**(8), 669-672.
- Nellen, P. M., Tiefenthaler, K., and Lukosz, W. (1988), Integrated optical input grating couplers as biochemical sensors, *Sens. Actuators*, **15**, 285-295.
- Stange, U., Hutchins, M. G., Groome, N., and Tarassenko, L. (1988), Quantitative analysis of immunological reactions on silicon surfaces by multiple-angle Brewster angle reflectometry, *Biomaterials*, **9**, 58-61.
- Brandenburg, A., and Henniger, R. (1994), Integrated optical Young interferometer, *Appl. Opt.*, **33**(25), 5941-5947.
- Stamm, C., and Lukosz, W. (1994), Integrated optical difference interferometer as biochemical sensor, *Sens. Actuators B.*, **18-19**, 183-187.
- Cush, R., Cronin, J. M., Stewart, W. J., Maule, C. H., Molloy, J., and Goddard, N. J. (1993), The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions Part I: Principle of operation and associated instrumentation, *Biosens. Bioelectron.*, **8**, 347-354.
- Striebel, C., Brecht, A., and Gauglitz, G. (1994), Characterization of biomembranes by spectral ellipsometry, surface plasmon resonance and interferometry with regard to biosensor application, *Biosens. Bioelectron.*, **9**, 139-146
- Stemmler, I., Brecht, A., and Gauglitz, G. (1999), Compact surface plasmon resonance-transducers with spectral readout for biosensing applications, *Sens. Actuators B.*, **54**, 98-105.
- Langmuir, I., and Schæfer, V. J. (1937), Built-up films of proteins and their properties, *Science*, **85**, 76-80.
- Gauglitz, G., Brecht, A., Kraus, G. and Nahm, W. (1993), Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers, *Sens. Actuators B.*, **11**, 21-27.
- Melendez, J., Carr, R., Bartholomew, D. U., Kukanskis, K., Elkind, J., Yee, S., Furlong, C., and Woodbury, R. (1996), A commercial solution for surface plasmon sensing, *Sens. Actuators B.*, **35-36**, 212-216.
- Kooyman, R. P. H., Lenferink, A. T. M., Eenink, R. G., and Greve, J. (1991), Vibrating mirror surface plasmon resonance immunosensor, *Anal. Chem.*, **63**, 83-85.
- <http://www.biacore.com/>
- <http://www.affinity-sensors.com/>
- <http://www.xantec.com/>
- <http://www.ti.com/spreeta/>
- <http://www.biotul.de/>
- Malmberg, A. C., Michaëlsson, A., Ohlin, M., Jansson, B., and Borrebaeck, C. A. K. (1992), Real time analysis of antibody-antigen reaction kinetics, *Scand. J. Immunol.*, **35**(6), 643-650.
- Kelley, R. F., and O'Connell, M. P. (1993), Thermodynamic analysis of an antibody functional epitope, *Biochemistry*, **32**, 6828-6835.
- George, A. J. T., French, R. R., and Glennie, M. J. (1995), Measurement of kinetic binding constants of a panel of anti-saporin antibodies using a resonant mirror biosensor, *J. Immunol. Methods*, **183**, 51-63.
- Piehler, J., Brecht, A., Giersch, T., Hock, B., and Gauglitz, G. (1997), Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system, *J. Immunol. Methods*, **201**, 189-206.
- Abraham, R., Buxbaum, S., Link, J., Smith, R., Venti, C., and Darsley, M. (1995), Screening and kinetic analysis of recombinant anti-CEA antibody fragments, *J. Immunol. Methods*, **183**, 119-125.
- Alfthan, K., Takkinen, K., Sizmann, D., Söderlund, H., and Teeri, T. (1995), Properties of a single chain antibody containing different linker peptides, *Protein Eng.*, **8**, 725-731.
- Huber, A., Demartis, S., and Neri, D. (1999), The use of biosensor technology for the engineering of antibodies and enzymes, *J. Mol. Recogn.*, **12**(3), 198-216.
- Balasubramanian, S., Chernov-Rogan, T., Davis, A. M., Whitehorn, E., Tate, E., Bell, M. P., Zurawski, G., and Barrett, R. W. (1995), Ligand binding kinetics of IL-2 and IL-15 to heteromers formed by extracellular domains of the three IL-2 receptor subunits, *Int. Immunol.*, **7**(11), 1839-1849.
- Johanson, K., Appelbaum, E., Doyle, M., Hensley, P., Zhao, B., Abdel-Meguid, S. S., Young, P., Cook, R., Carr, S., Matico, R., Cusimano, D., Dul, E., Angelichio, M., Brooks, I., Winborne, E., McDonnell, P., Morton, T., Bennett, D., Sokoloski, T., McNulty, D., Rosenberg, M., and Chaiken, I. (1995), Binding interactions of human interleukin 5 with its receptor alpha subunit. Large scale production, structural, and functional studies of Drosophila-expressed recombinant proteins, *J. Biol. Chem.*, **270**(16), 9459-9471.
- Bartley, T. D., Hunt, R. W., Welcher, A. A., Boyle, W. J., Parker, V. P., Lindberg, R. A., Lu, H. S., Colombero, A. M., Elliott, R. L., Guthrie, B. A., Holst, P. L., Skrine, J. D., Toso, R. J., Zhang, M., Fernandez, E., Trail, G., Varnum, B., Yarden, Y., Hunter, T., and Fox, G. M. (1994), B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase, *Nature*, **368**, 558-560.
- Bondeson, K., Frostell-Karlsson, Å., Fågerstam, L., and Magnusson, G. (1993), Lactose repressor operator DNA interactions: kinetic analysis by a surface plasmon

- resonance biosensor, *Anal. Biochem.*, **214**, 245-251.
36. Gotoh, M., Hasegawa, Y., Shinohara, Y., Shimizu, M., and Tosu, M. (1995), A new approach to determine the effect of mismatches on kinetic parameters in DNA hybridization using an optical biosensor, *DNA Res.*, **2(6)**, 285-293.
 37. Piehler, J., Brecht, A., Gauglitz, G., Maul, C., Zerlin, M., Thiericke, R., and Grabley, S. (1997), Label-free monitoring of DNA-ligand interactions, *Anal. Biochem.*, **249**, 94-102.
 38. Sauer, M., Brecht, A., Charisse, K., Maier, M., Gerster, M., Stemmler, I., Gauglitz, G., and Bayer, E. (1999), Interaction of chemically modified antisense oligonucleotides with sense DNA: a label-free interaction study with reflectometric interference spectroscopy, *Anal. Chem.*, **71**, 2850-2857.
 39. Bates, P. J., Dosanjh, H. S., Kumar, S., Jenkins, T. C., Laughton, C. A., and Neidle, S. (1995), Detection and kinetic studies of triplex formation by oligodeoxynucleotides using real-time biomolecular interaction analysis(BIA), *Nucleic Acids Res.*, **23(18)**, 3627-3632.
 40. Lukosz, W. (1991), Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing, *Biosens. Bioelectron.*, **6**, 215-225.
 41. Brecht, A., and Gauglitz, G. (1995), Optical probes and transducers, *Biosens. Bioelectron.*, **10**, 923-936.
 42. Gauglitz, G., In: Blates, H., G'opel, W., and Hesse, J. (eds)(1996), *Opto-Chemical and Opto-Immuno Sensors, Sensors Update Vol. 1, Verlag Chemie, Weinheim.*, 1-35
 43. Ramsden, J. R. (1997), Optical biosensors, *J. Mol. Recogn.*, **10(3)**, 109-120.
 44. Brecht, A., and Gauglitz, G. (1997), Recent developments in optical transducers for chemical or biochemical applications, *Sens. Actuators B.*, **38-39**, 1-7.
 45. Potyrailo, R. A., Hobbs, S. E., and Hieftje, G. M. (1998), Optical waveguide sensors in analytical chemistry: today's instrumentation, applications and trends for future development, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **362**, 349-373.
 46. Eggins, B. R., (1996), *Biosensors: an Introduction, John Wiley & Sons and Teubner, B. G. England and Germany.*
 47. Spichiger-Keller, U. E. (1998), *Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications, WILEY-VCH, F. R. Germany.*
 48. Ramsay, G. (1998), *Commercial biosensors: Application to clinical, bioprocess, and environmental samples, John Wiley & Sons, Inc., New York.*
 49. Nuzzo, R. G., and Allara, D. L.(1983), Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4481-4483.
 50. Bain, C. D., Throughton, E. B., Tao, Y-T., Evall, J., Whitesides, G. M., and Nuzzo, R. G. (1989), Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 321-335.
 51. Smith, A. M., Ducey Jr, M. W., Meyerhott, M. E. (2000), Nature of immobilized antibody layers linked to thioctic acid treated gold surfaces, **15**, 183-192.
 52. Weetall, H. H. (1969), Trypsin and papain covalently coupled to porous glass: preparation and characterization, *Science*, **166(905)**, 615-617.
 53. Robinson, P. J., Dunnill, P., and Lilly, M. D. (1971), Porous glass as a solid support for immobilisation or affinity chromatography of enzymes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **242**, 659-661.
 54. Waddell, T. G., Leyden, D. E., and DeBello, M. T. (1981), The nature of organosilane to silica-surface binding, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5303-5307.
 55. L'ofas, S., and Johnsson, B. O. (1990), A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensor for fast and efficient covalent immobilization of ligands, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1526-1528.
 56. Piehler, J., Brecht, A., Geckeler, K. E., and Gauglitz, G. (1996), Surface modification for direct immunoprobes, *Biosens. Bioelectron.*, **11**, 579-590.
 57. Piehler, J., Brecht, A., Hehl, K., and Gauglitz, G. (1999), Protein interactions in covalently attached dextran layers, *Colloids Surf. B.*, **13**, 325-336.
 58. Johnsson, B., L'ofas, S., Lindguis, G., Edstr'om, A., M'uller-Hillgreen, and Hansson, A. (1995), Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies, *J. Mol. Recogn.*, **8**, 125-131.
 59. Piehler, J., Brecht, A., Valiokag, R., Liedberg, B., and Gauglitz, G. (2000), A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces, *Biosens Bioelectron.*, **15**, 473-481.
 60. Ramsden, J. J., and Schneider, P. (1993), Membrane insertion and antibody recognition of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein: an optical study, *Biochemistry*, **32**, 523-529.
 61. Ramsden, J. J., Bachmanova, G. I., and Archakov, A. I. (1996), Immobilization of proteins to lipid bilayers, *Biosens. Bioelectron.*, **11(5)**, 523-528.
 62. Plant, A. L., Brigham-Burke, M., Petrella, E. C., and O'Shannessy, D. J. (1995), Phospholipid/Alkanethiol bilayers for cell-surface receptor studies by surface plasmon resonance, *Anal. Biochem.*, **226(2)**, 342-348.
 63. Heyse, S., Vogel, H., S'anger, M., and Sigrist, H. (1995), Covalent attachment of functionalized lipid bilayers to planar waveguides for measuring protein binding to biomimetic membranes, *Protein Sci.*, **4**, 2532-2544.
 64. Heyse, S., Ernst, P. E., Dienses, Z., Hofman, P. H., and Vogel, H. (1998), Incorporation of rhodopsin in laterally structured supported membranes: observation of transducin activation with spatially and time-resolved surface plasmon resonance, *Biochemistry*, **37**, 507-522.
 65. Cuatrecasas, P., and Parikh. (1972), Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose, *Biochem.*, **11**, 2291-2299.
 66. O'shannessy, D. J., Brigham-Burke, M., and Peck, K. (1992), Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector, *Anal. Biochem.*, **205**, 132-136.
 67. Ebersole, R., Miller, J., Moran, J., and Ward, M. (1990), *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3239-3241.
 68. H'aussling, L., Ringslorf, H., Schmitt, F. J., and Knoll. W. (1991), Biotin-functionalized self-assembled monolayers on gold: surface plasmon optical studies of specific recognition reactions, *Langmuir*, **7**, 1837.
 69. Daniels, P. B., Deacon, J. K., Eddowes, M. J., and Pedley, D. G. (1988), Surface plasmon resonance applied to immunosensing, *Sens. Actuators*, **15**, 11-18.
 70. Luo, S., and Walt, D. R. (1989), Avidin-biotin coupling as a general method for preparing enzyme-based fiber-optic sensors, *Anal. Chem.*, **61**, 1069-1072.
 71. Amankwa, L. N., and Kuhr, W. G. (1992),

- Trypsinmodified fused-silica capillary microreactor for peptide mapping by capillary zone electrophoresis, *Anal. Chem.*, **64**, 1610-1613.
72. Birkert, O., Haake, H.-M., Schütz, A., Brecht, A., Mack, J., Jung, G., and Gauglitz, G. (2000), *Anal. Biochem.*
 73. Nieba, L., Nieba-Axmann, S. E., Persson, A., Hamalainen, M., Edbratt, F., Hannsson, A., Lidholm, J., Magnusson, K., Karlsson, A. F., and Pluckthun, A. (1997), BIAcore analysis of histidinetagged proteins using a chelating NTA sensor chip, *Anal. Biochem.*, **252**, 217-228.
 74. Gershon, P. D., and Khilko, S. (1995), Stable chelating linkage for reversible immobilization of oligohistidine tagged proteins in the BIAcore surface plasmon resonance detector, *J. Immunol. Methods*, **183**, 65-76.
 75. Doupnik, C. A., Dassauer, C. W., Slepak, V. Z., Gilman, A. G., Davidson, N., and Lester, H. A. (1996), Time resolved kinetics of direct G beta 1 gamma 2 interactions with the carboxyl terminus of Kir3.4 inward rectifier K⁺ channel subunits, *Neuropharmacology*, **35**(7), 923-931.
 76. Fratamico, P. M., Strobaugh, T. P., Medina, M. B., and Gehring, A. G. (1998), Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor, *Biotechnology Tech.*, **12**, 571-576.
 77. Monfardini, C., Ramamoorthy, M., Rosenbaum, H., Fang, Q., Godillot, P. A., Canziani, G., Chaiken, I. M., and Williams, W. V. (1998), Construction and binding kinetics of a soluble granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor α -chain-Fc fusion protein, *J. Biol. Chem.*, **273**, 7657-7667.
 78. Vo-Dinh, T., Houck, K., and Stokes, D. L. (1994), Surface-enhanced raman gene probes, *Anal. Chem.*, **66**, 3379-3383.
 79. Isola, N., Stokes, D. L., and Vo-Dinh, T. (1998), Surface enhanced raman gene probe for HIV detection, *Anal. Chem.*, **70**, 1352-1356.
 80. Blum, L. J., and Coulet, R. R. (1994), Making light work, *Chem. Br.*, **30**, 300-302.
 81. Narayanaswamy, R. (1993), Optical chemical sensors: transduction and signal processing, *Analyst*, **118**, 317-322.
 82. Jory, M. J., Vukusic, P. S., and Sambles, J. R. (1994), Development of prototype gas sensor using surface plasmon resonance on gratings, *Sensors and Actuators B*, **17**, 203-209.
 83. Harris, R. D., and Wilkinson, J. S. (1995), Waveguide surface plasmon resonance sensors, *Sensor and Actuators B*, **29**, 261-267.
 84. Liedberg, B., Nylander, C., and Lundstrom, I. (1995), Biosensing with surface plasmon resonance - now it all started, *Biosensors and Bioelectronics*, **10**, pp i-iv.
 85. Schuck, P., (1996), Kinetics of ligand binding to receptor immobilized in a polymer matrix, as detected with an evanescent wave biosensor. I. A computer simulation of the influence of mass transport, *Biophysical J.*, **70**, 1230-1249.
 86. Stenberg, E., Persson, B., Roos, H., and Urbaniczky, C. (1991), Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins, *J. Colloid Interface Sci.*, **143**, 513-526.
 87. Karlsson, R., and Stahlberg, R., (1995), Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities, *Anal. Biochem.*, **228**, 274-280.
 88. O'Brien, M. J., Brueck, S. R. J., Perez-Luna, V. H., Tender, L. M., and Lopez, G. P. (1999), SPR biosensors: simultaneously removing thermal and bulk-composition effects, *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 145-154.
 89. Rothmund, M., Brecht, A., Berthel, G., Gräfe, D., Schütz, A., and Gauglitz, G. (1997), Label free binding assay with spectroscopic detection for pharmaceutical screening, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **359**, 15-22.
 90. Karlsson, R., Michaelsson, A., and Mattsson, L. (1991), Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system, *J. Immunol. Methods*, **145**, 229-240.
 91. O'Shannessy, D. J. (1994), Determination of kinetic rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions: a critique of the surface plasmon resonance literature, *Curr Opin Biotechnol.*, **5**, 65-71.
 92. O'Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M., Sonesson, K. K., Hensley, P., and Brooks, I. (1993), Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods, *Anal. Biochem.*, **212**, 457-468.
 93. Morton, T. A., Myszka, D. G., and Chaiken, I. M. (1995), Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: a comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration, *Anal. Biochem.*, **227**, 176-185.
 94. Gill, A., Leatherbarrow, R. J., Hoare, M., Pollard-Knight, D. V., Lowe, R. A., and Fortune, D. H. (1996), Analysis of kinetic data of antibody-antigen interaction from an optical biosensor by exponential curve fitting, *J. Biotechnol.*, **48**, 117-127.
 95. Roden, L. D., and Myszka, D. G. (1996), Global analysis of a macromolecular interaction measured on BIAcore, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **225**, 1073-1077.
 96. Nieba, L., Krebber, A., and Pluckthun, A. (1996), Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics, *Anal. Biochem.*, **234**, 155-165.
 97. Glaser, R. (1993), Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: a two-dimensional computer modes of binding and dissociation kinetics, *Anal. Biochem.*, **213**, 152-161.
 98. Karlsson, R., Roos, H., Fågerstam, L., and Persson, B. (1994), Kinetic and concentration analysis using BIA technology, *Companion Methods Enzymol.*, **6**, 99-110.
 99. Sjölander, S., and Urbaniczky, C. (1991), Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis, *Anal. Chem.*, **63**, 2338-2345.
 100. Myszka, D. G., Morton, T. A., Doyle, M. L., and Chaiken, I. M. (1996), Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor, *Biophys. Chem.*, **64**, 127-137.
 101. Schuck, P., and Minton, A. P. (1996), Analysis of mass transport-limited binding kinetics in evanescent wave biosensors, *Anal. Biochem.*, **240**, 262-272.
 102. Hall, D. R., Cann, J. R., and Winzor, D. J. (1996), Demonstration of an upper limit to the range of association rate constants amenable to study by biosensor technology based on surface plasmon resonance, *Anal. Biochem.*, **235**, 175-184.
 103. Shoup, D., and Szabo, A. (1982), Role of diffusion in ligand binding to macromolecules and cell-bound

- receptors, *Biophys. J.*, **40**, 33-39.
104. Edwards, P. R., Gill, A., Pollard-Knight, D. V., Hoare, M., Buckle, P. E., Lowe, P. A., and Leatherbarrow, R. J. (1995), Kinetics of protein-protein interactions at the surface of an optical biosensor, *Anal. Biochem.*, **231**, 210-217.
105. Schuck, P., Millar, D. B., and Kortt, A. A. (1998), Determination of binding constants by equilibrium titration with circulating sample in a surface plasmon resonance biosensor, *Anal. Biochem.*, **265**, 79-91.
106. Edwards, P. R., and Leatherbarrow, R. J. (1997), Determination of association rate constants by an optical biosensor using initial rate analysis, *Anal. Biochem.*, **246**, 1-6.
107. Brecht, A., Piehler, J., Lang, G., and Gauglitz, G. (1995), A direct optical immunosensor for atrazine detection, *Anal. Chim. Acta.*, **311**, 289-299.
108. Piehler, J., Brecht, A., and Gauglitz, G. (1996), Affinity detection of low molecular weight analytes, *Anal. Chem.*, **68**, 139-143.
109. Piehler, J., Brecht, A., Gauglitz, G., Maul, C., Grabley, S., and Zerlin, M. (1997), Specific binding of low molecular weight ligands with direct optical detection, *Biosens Bioelectron.*, **12**, 531-538.
110. Bracewell, D. G., Gill, A., Hoare, M., Lowe, P. A., and Maule, C. H. (1998), An optical biosensor for real-time chromatography monitoring: breakthrough determination, *Biosens Bioelectron.*, **13**, 847-853.
111. Haake, H-M., de Best, L., Irth, H., Abuknesha, R., and Brecht, A. (2000), Label-free biochemical detection coupled on-line to liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **72(6)**, 3635-3642.
112. Krone, J. R., Nelson, R. W., Dogruel, D., Williams, P., and Granzow, R. (1997), BIA/MS: interfacing biomolecular interaction analysis with mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **244**, 124-132.