

속보

광바이오센서용 효소를 함유한 PEG 수화젤 나노입자의 합성

김범상[†]

홍익대학교 화학공학과

(2005년 6월 29일 접수, 2005년 9월 29일 채택)

Synthesis of Enzyme-Containing PEG Hydrogel Nanospheres for Optical Biosensors

Bumsang Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Hongik University,

72-1, Sangsu-dong, Mapo-gu, Seoul 121-791, Korea

(Received June 29, 2005; accepted September 29, 2005)

초록: 본 연구에서는 한 개의 세포와 같은 미세한 생체시료 내부의 분석 대상물질을 감지하는데 사용할 수 있는 광바이오센서를 개발하기 위한 첫 단계로서 효소가 함유된 고분자 수화젤 구형입자를 나노크기로 중합하는 방법을 확립하고 센서로서의 사용 가능성을 확인하였다. 현탁 광중합을 통하여 305 nm의 평균크기를 가지는 horseradish peroxidase(HRP)가 함유된 poly(ethylene glycol)(PEG) 수화젤 구형입자를 합성하였으며, 중합반응 이후 입자내부의 효소의 존재 및 활성유지를 HRP와 H₂O₂의 효소반응에 의한 Amplex Red의 형광산화물 생성을 통하여 확인하였다. 합성된 HRP가 함유된 PEG 수화젤 입자는 Amplex Red의 존재하에 H₂O₂의 농도가 0에서 11 nM로 미량 변화함에 따라서 형광세기가 약 300% 증가함을 보여 주었다. 이러한 결과는 효소가 함유된 PEG 수화젤 나노입자를 합성하는 본 기술이 향후 미세한 생체시료 내부의 다양한 분석대상물질을 감지할 수 있는 나노크기의 광바이오센서를 개발하는데 이용 될 수 있는 가능성을 보여준다.

Abstract: In this work, as the first step to develop optical biosensors for a single cell level analysis, the preparation method of nano-scale polymer hydrogel spheres containing an enzyme was set up and the feasibility of the spheres as optical biosensors was investigated. The horseradish peroxidase (HRP) was encapsulated in the PEG hydrogel spheres by suspension photopolymerization, yielding spheres of the average size of 305 nm. After the polymerization, the incorporation and activity of HRP within the spheres were determined by the production of fluorescence resulted from the enzymatic reaction between HRP and H₂O₂. The fluorescence emission response of the HRP-loaded PEG hydrogel spheres increased by nearly 300% as hydrogen peroxide concentration was changed from 0 to 11 nM in the presence of Amplex Red. The results suggest that the method to prepare the PEG hydrogel nanospheres containing an enzyme could be used for developing optical biosensors to measure various analytes in the very small samples like a single cell.

Keywords: enzyme encapsulation, optical biosensor, PEG hydrogel, nanosphere, hydrogen peroxide.

1. 서론

바이오센서는 변환기(transducer)와 생화학적 물질로 구성되는 감응요

[†]To whom correspondence should be addressed. E-mail: bskim@hongik.ac.kr

소(sensing element)의 두 부분으로 이루어진다. 이 중 효소를 감응요소로 가지는 효소센서는 효소의 기질특이성, 작용특이성 및 저농도 반응특이성 등의 특징을 이용하여 고도의 정확성과 미량의 시료에 대해 최소한의 전처리만을 요구하는 분야에 많이 사용되어지고 있다.^{1,2} 효소센서에서 대부분의 효소는 전극, 실리콘웨이퍼, 광섬유 등 여러 종류의 고체표면에 고정화되어 분석대상물질(analyte)을 검출 가능한 물질이나 신호로 변환하는데, 대표적인 변환신호는 전자 또는 빛의 세기 변화 등이다. 현재까지는 효소에 의해 발생하는 전기화학적 변화를 검출하는 효소전극이 대표적인 효소센서로서 여러 분야에서 널리 적용되어지고 있다. 그러나 효소전극은 하나의 셀(cell)과 같이 미세한 생체시료 속에 있는 분석대상물질을 측정해야만 할 경우, 시료에 비해 상대적으로 커다란 센서의 크기 및 센서 자체가 셀에 미치는 생체부적합성 등의 문제점을 가지고 있다.^{3,4}

광나노센서는 빛의 세기 변화를 검출하여 분석대상물질을 측정하는 1000 nm 이하의 크기를 갖는 센서로서, Sasaki 등에 의해 보고되었는데,⁵ Sasaki가 개발한 광나노센서는 형광물질을 포함한 polyacrylamide 나노입자로 pH 변화를 감지하기 위한 것이었다. 1998년에 와서 Kopelman 등에 의해 PEBBLE(Probes Encapsulated By Biological Embedding) 센서의 개념이 소개되었다.⁶ PEBBLE 센서는 세포내 여러 가지 종류의 분석대상물질을 측정하기 위한 광나노센서로서, 생체적합성이 우수한 매트릭스(matrix) 내부에 감응소자 및 형광물질을 고정시킨 것이다. PEBBLE 센서의 장점은 작은 크기(나노미터) 덕분에 세포의 파괴없이 세포내부에 삽입시킬 수 있고, 센서를 구성하는 매트릭스는 센서내부에 존재하는 감응소자와 형광물질 등이 세포에 미칠 수 있는 나쁜 영향을 차단할 뿐만 아니라 감응소자와 형광물질을 공간적으로 고정시킬 수 있다.^{7,9}

인체의 여러 대사과정에서 발생하는 활성산소는 반응성이 대단히 높아 세포의 주요 구성물질인 지질, 단백질 및 핵산을 파괴하여 조직에 산화적 손상을 초래하게 되고 만성적인 산화적 손상은 세포의 기능저하뿐만 아니라 노화나 암과 같은 각종 만성질환을 유발하는 원인이 된다. 생체내에서 생성되는 대표적인 활성산소로는 O₂, H₂O₂, OH⁻가 있으며 이들은 세포 내 미토콘드리아나 마이크로솜 같은 과립이나 시토솔에서 주로 생성된다.^{10,11} 따라서 인체의 세포 내부의 활성산소의 존재 및 위치를 알아내는 것은 활성산소에 의해 발생하는 여러 가지 질병의 치료뿐만 아니라 예방을 위해서도 매우 중요한 일이다.

본 연구에서는 인체내 활성산소를 감지할 수 있는 광나노센서를 개발하기 위한 첫 단계로서 H₂O₂를 감지할 수 있는 효소인 horseradish peroxidase(HRP)를¹²⁻¹⁵ 함유한 poly(ethylene glycol)(PEG) 고분자 수화젤 구형입자를 나노미터 크기로 합성하고자 한다. 매트릭스로 사용되어지는 PEG 수화젤은 수친화적 고분자 네트워크로 우수한 생체적합성을 가지고 있기 때문에 인공장기, 약물전달과 같은 바이오메디칼과 약학 분야에서 오래전부터 사용되어지고 있는 물질이다.¹⁶⁻¹⁹ 합성된 수화젤 입자의 크기 및 크기분포, 수화젤 합성 과정에서 효소의 활성 유지 여부, 그리고 H₂O₂의 농도변화에 따른 HRP가 함유된 PEG 수화젤 입자의 감응특성의 변화를 조사하였다.

2. 실험

2.1 재료

실험에 사용된 silicone oil, sorbitan monolaurate, 그리고 HRP는 Sigma-

Aldrich사로부터, poly(ethylene glycol) (n)-monomethacrylate ($n=400$, PEGMA)와 tetra(ethylene glycol) dimethacrylate(TEGDMA)는 Polysciences사로부터, *N*-hydroxysuccinimide-PEG-acrylate(PEG-NHS, MW 3400)는 Nektar Therapeutics사로부터, 2-hydroxy-2-methyl-1-phenyl-1-propanone (Darocur[®] 1173)은 Ciba Specialty Chemicals사로부터, hydrogen peroxide는 VWR사로부터, Amplex Red(10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine)는 Molecular Probes사로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 phosphate buffered saline(PBS, 0.1 M, pH 7.4)은 1.1 mM potassium phosphate monobasic, 3 mM sodium phosphate dibasic heptahydrate, 그리고 0.15 M NaCl로 구성되었다. 모든 실험에 사용된 수용액은 Millipore사의 Milli-Q Ultrapure로부터 얻어진 deionized water(18 M Ω .cm)를 가지고 제조하였다.

2.2 HRP가 함유된 PEG 수화젤 입자의 합성

HRP가 함유 또는 함유되지 않은 PEG 수화젤 입자는 오일에 단량체를 포함한 반응물을 분산시킨 후 UV를 조사하는 현탁 광중합(suspension photopolymerization)을 이용하여 합성하였다. 중합반응 이전에 5 mg의 HRP를 1 mL의 PBS에 용해시킨 용액에 5 mg의 PEG-NHS를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 교반하여 주었다. 이 과정은 HRP에 아크릴레이트 반응기를 도입하기 위한 것으로, PEG-NHS의 에스터는 HRP 효소 표면에 있는 라이신(tyrosine)과 반응하여 HRP에 아크릴레이트 반응기를 도입하고,^{20,21} 아크릴레이트 반응기는 중합반응에서 HRP가 PEG 수화젤에 화학적으로 결합하도록 만들어 준다. 단량체 혼합물을 제조하기 위하여 PEGMA 1.0 g, 가교제인 TEGDMA 35 μ L, acrylated HRP 0.2 mg, deionized water 500 μ L, 그리고 UV 개시제인 Darocur[®] 1173 50 μ L를 혼합한 후, 10분 동안 질소 가스를 주입시켰다. 준비된 단량체 혼합물을 0.01 g의 sorbitan monolaurate을 첨가한 100 mL의 실리콘 오일에 첨가하고 호모지나이저를 이용하여 2분 동안 10000 rpm으로 교반하여 현탁액을 형성하였다. 현탁액 형성이 완료된 후, 30초 동안 UV를 조사하여 반응을 완료하고 합성된 수화젤 입자는 deionized water를 사용하여 여러 차례 원심분리와 sonication을 이용한 반복적인 세척을 통하여 오일로부터 분리하였다.

2.3 HRP가 함유된 PEG 수화젤 입자의 특성

합성된 수화젤 입자의 크기와 크기분포는 Zeta Sizer Nano ZS(Malvern Instruments)와 SEM을 사용하여 조사하였다. 수화젤 입자에 함유된 효소의 활성과 광바이오센서로서 사용가능성을 조사하기 위하여 HRP와 H₂O₂의 반응에 의한 Amplex Red의 형광산화물 생성을 QM-2000 SE spectrofluorometer(Photon Technologies)와 Zeiss Axiovert 200M inverted fluorescence microscope(Carl Zeiss)을 사용하여 관찰하였다.

3. 결과 및 토론

고분자를 마이크로 또는 나노크기의 구형입자로 합성하는 일반적인 방법인 현탁중합, 유화중합, 분산중합, 침강중합과 같은 불균일 중합에 대한 연구는 현재까지 활발히 이루어져 왔으나,^{22,25} 셀이나 효소와 같은 생체물질이 함유된 고분자 입자를 마이크로 크기 이하의 구형입자로 합성하는 중합방법에 대한 연구는 그다지 많이 이루어지고 있지 않다.^{7,26} 그 이유는 중합과정에서 생체물질의 활성이 손실되고, 반응에 참여하는 다른 반응물질에 비해 상대적으로 커다란 부피를 가지는 생체물질에 의한 전체적인 반응 전환율의 저하 등의 문제가 있기 때문이다. 본 연구에서는 현탁 광중합을 이용하여 중합 반응 과정에서 효소의 활성 손실없이 나노 수준의 고분자 구형입자

를 합성하였다. 광중합은 중합속도가 빠르고, 상온에서 용매의 존재없이 반응을 진행시킬 수 있기 때문에 생체물질의 활성에 영향을 많이 주지않으면서 중합반응을 완료할 수 있는 특징을 가지고 있다. 호모지나이저를 사용한 교반과정에서 형성된 단량체 혼합물의 구형입자는 UV조사에 의한 광개시제의 자유 라디칼의 생성으로 반응을 시작하여 고분자 수화젤 구형입자를 생성한다. 반응과정에서 HRP에 도입된 아크릴레이트 반응기는 HRP가 수화젤 네트워크에 화학적으로 결합하도록 한다.

Figure 1은 세척과정을 통해 오일로부터 분리된 PEG 수화젤의 SEM 사진이다. 현탁 광중합에 의해 생성된 PEG 수화젤 입자는 나노 크기의 매우 작고 안정한 구형입자를 형성하는 것을 관찰할 수 있었고, 입도분석 결과, Figure 2에서 보는 바와 같이 단분산성을 보이는 평균 입자크기 약 305 nm의 입자가 생성된 것을 알 수 있었다.

합성된 PEG 수화젤 나노입자 내부의 HRP 존재와 중합과정에서의 HRP의 활성손실 여부를 조사하기 위하여 HRP와 H₂O₂의 효소반응을 이용하였고 효소반응을 측정하는 시료로 Amplex Red를 사용하였다. Amplex Red는 H₂O₂와 peroxidase의 효소반응을 측정할 수 있는 시약으로서 오래전부터 사용되어져 왔다.^{27,28} HRP의 존재하에 Amplex Red는 H₂O₂와 1:1로 반응하여 resorufin이라는 붉은 색의 형광산화물을 생성한다. 여기서 resorufin은 563 nm와 585 nm에서 각각 흡수파장과 방출파장을 갖는다.²⁹ Figure 3은 H₂O₂와 Amplex Red를 HRP가 함유된 PEG 수화젤 입자에 첨가한 후 형광현미경으로

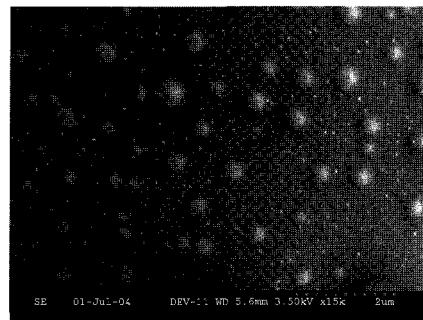


Figure 1. SEM image of the HRP-loaded PEG hydrogel spheres produced via suspension photopolymerization.

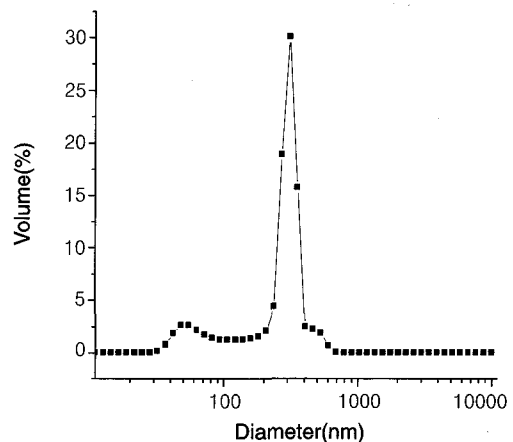


Figure 2. Particle size distribution of the HRP-loaded PEG hydrogel spheres produced via suspension photopolymerization.

관찰한 입자의 사진이다. Amplex Red의 존재하에 H₂O₂와 HRP의 효소반응에 의해 생성되는 붉은 색의 resorufin을 관찰할 수 있고, 구형 입자 전체가 균일하게 붉은 색을 띠는 것으로부터 HRP가 입자 내부에 균일하게 분포함을 알 수 있었다.

HRP가 함유된 PEG 수화젤 나노입자 내부에서 HRP와 H₂O₂에 의한 효소반응으로 생성되는 resorufin의 형광세기를 형광분광기를 사용하여 정량적으로 분석하였다. Resorufin의 형광분석은 들뜸파장(λ_{ex}) 565 nm 그리고 resorufin의 최대 방출파장(λ_{em})인 585 nm에서 이루어졌다. Figure 4는 Amplex Red를 첨가한 수화젤 입자의 분산용액에 H₂O₂를 첨가한 시료와 첨가하지 않은 시료의 형광스펙트럼을 보여준다. H₂O₂를 첨가하지 않은 분산용액에서는 HRP의 효소반응에 의한 resorufin의 생성이 없기 때문에 585 nm에서 관찰되는 피크를 볼 수 없었다. 반면에 H₂O₂를 첨가한 분산용액에서는 585 nm에서 나타나는 커다란 피크를 볼 수 있었다. 한편 수화젤 입자가 포함된 분산용액에서의 형광변화가 HRP에 의한 것임을 확인하기 위하여 HRP가 함유된 수화젤 입자와 HRP가 함유되지 않은 수화젤 입자를 합성한 후 Amplex Red와 H₂O₂를 첨가하고 형광분광기를 이

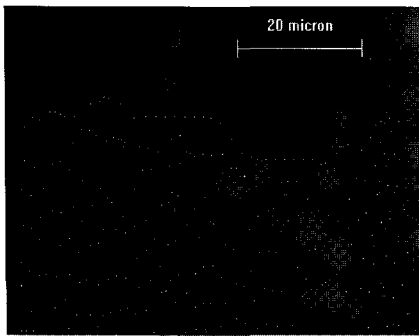


Figure 3. Fluorescence micrograph of the HRP-loaded PEG hydrogel sphere suspension after H₂O₂ and Amplex Red were introduced to the suspension.

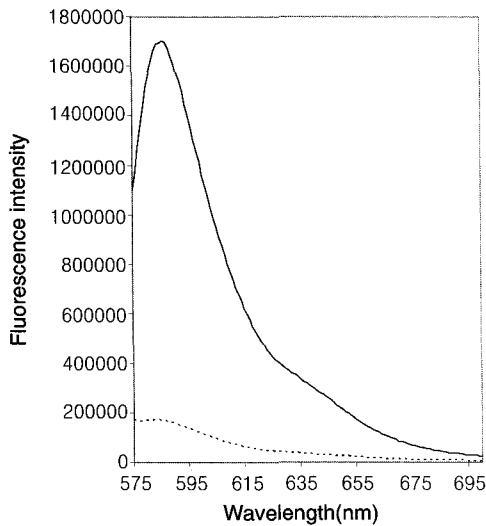


Figure 4. Fluorescence spectra of the HRP-loaded PEG hydrogel sphere suspension in various conditions; sphere suspension after adding only Amplex Red (···) and sphere suspension after adding H₂O₂ and Amplex Red (—).

용하여 형광변화를 관찰하였다. 그 결과 Figure 5에서 보는 바와 같이 HRP가 포함되지 않은 입자의 분산용액에서는 형광세기의 변화가 거의 없는 반면 HRP가 함유된 입자의 분산용액에서는 급격한 형광세기의 변화를 볼 수 있었다. 그러나 HRP가 포함되지 않은 입자의 분산용액에서도 H₂O₂ 첨가없이 Amplex Red 만을 첨가한 경우에도 아주 미약하나마 585 nm에서의 형광세기가 증가하는 것을 볼 수 있었는데, 이것은 분산용매로 사용된 PBS에 포함되어 있던 극소량의 O₂와 활성산소에 기인한 것으로 볼 수 있다.

마지막으로 본 연구에서 합성되어진 HRP가 함유된 PEG 수화젤 나노입자가 H₂O₂ 감지용 센서로 사용될 수 있는지의 가능성을 확인하기 위하여 다양한 H₂O₂의 농도 변화에 따른 형광세기의 변화를 관찰하였다. Figure 6은 10 mM 농도의 Amplex Red 1 μ L를

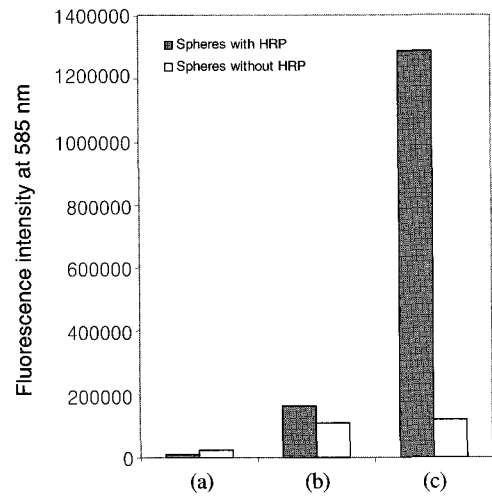


Figure 5. Fluorescence intensity at 585 nm of the spheres synthesized with HRP and without HRP; (a) sphere suspension, (b) sphere suspension after addition of 1 μ L of 10 mM Amplex Red, and (c) sphere suspension after addition of 1 μ L of 10 mM Amplex Red and 90 nM of H₂O₂.

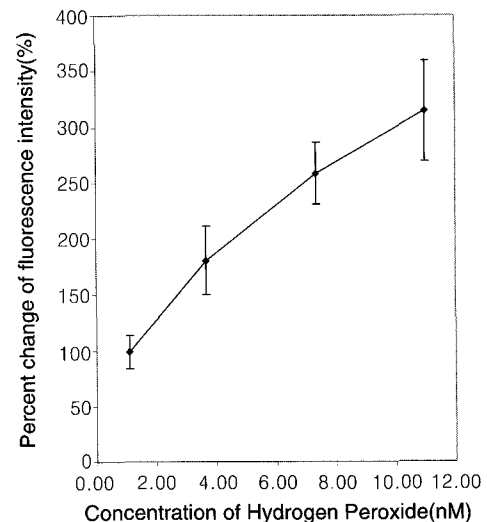


Figure 6. Change of fluorescence intensity of the HRP-loaded spheres as a function of hydrogen peroxide concentration in the presence of 1 μ L of 10 mM Amplex Red. Error bars represent standard deviation.

첨가한 수화젤 입자의 분산용액에 여러 가지 농도의 H_2O_2 를 첨가한 후 측정된 형광스펙트럼이다. 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 H_2O_2 의 농도가 0에서 11 nM로 미량 변화함에 따라서 형광세기의 변화가 약 300%에 이르는 것을 알 수 있다. 이와 같은 사실은 본 연구에서 합성된 HRP가 함유된 PEG 수화젤 나노입자가 미량의 H_2O_2 농도변화를 감지할 수 있는 광바이오센서로 사용될 수 있음을 보여준다.

4. 결론

본 연구에서는 한 개의 세포와 같은 미세한 생체시료 내의 여러 가지 분석대상물질을 측정하는데 사용할 수 있는 광바이오센서를 개발하기 위한 첫 단계로서 효소가 함유된 고분자 구형입자를 나노 크기로 중합하는 방법을 확립하고 센서로서의 이용 가능성을 확인하였다. 현탁 광중합을 통하여 305 nm의 크기를 가지는 HRP가 함유된 PEG 수화젤 구형입자를 합성하였으며, 중합반응 이후 입자내부의 효소의 존재 및 활성유지를 HRP와 H_2O_2 의 효소반응에 의한 Amplex Red의 형광산화물 생성을 통하여 확인하였다. 그리고 합성된 HRP가 함유된 PEG 수화젤 입자는 Amplex Red의 존재하에 H_2O_2 의 농도가 0에서 11 nM로 미량 변화함에 따라서 형광세기가 약 300% 증가함을 보여주었다. 이러한 결과는 효소가 함유된 PEG 수화젤 나노입자를 합성하는 본 기술이 향후 미세한 생체시료 내부의 다양한 분석대상물질을 감지할 수 있는 광나노센서를 개발하는데 사용되어질 수 있는 가능성을 보여주었다.

참고문헌

1. T. Vo-Dinh and B. Cullum, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366**, 540 (2000).
2. U. R. Kim, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 423 (2000).
3. J. W. Aylott, *Analyst*, **128**, 309 (2003).
4. J. Lu and Z. Rosenzweig, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366**, 569 (2000).
5. K. Sasaki, Z.-Y. Shi, R. Kopelman, and H. Masuhara, *Chem. Lett.*, **2**, 141 (1996).
6. H. A. Clark, S. L. R. Baker, M. Brausel, M. T. Miller, E. Monson, S. Parus, Z.-Y. Shi, A. Song, B. Thorsrud, R. Kopelman, A. Ade, W. Meixner, B. Athey, M. Hoyer, D. Hill, R. Lightle, and M. A. Philbert, *Sens. Actuators B*, **51**, 12 (1998).
7. H. Xu, J. W. Aylott, and R. Kopelman, *Analyst*, **127**, 1471 (2002).
8. H. A. Clark, M. Hoyer, M. A. Philbert, and R. Kopelman, *Anal. Chem.*, **71**, 4831 (1999).
9. H. A. Clark, R. Kopelman, R. Tjalkens, and M. A. Philbert, *Anal. Chem.*, **71**, 4837 (1999).
10. A. E. Favier, J. Neve, and P. Faure, *Trace Elements and Free Radicals in Oxidative Diseases*, American Oil Chemists, 1994.
11. M. K. Beissenhirtz, F. W. Scheller, and F. Lisdat, *Anal. Chem.*, **76**, 4665 (2004).
12. M. S. Lin, S. Y. Tham, and G. A. Rechnitz, *Eletroanalysis*, **2**, 511 (1990).
13. Y. Fang, R. Cai, and J. Deng, *Eletroanalysis*, **4**, 819 (1992).
14. W. Oungpipat, P. W. Alexander, and P. Sduthwell-Keely, *Anal. Chim. Acta.*, **309**, 35 (1995).
15. G. H. Seong, J. Heo, and R. M. Crooks, *Anal. Chem.*, **75**, 3161 (2003).
16. A. Lowman, M. Morishita, M. Kajita, T. Nagai, and N. A. Peppas, *J. Pharm. Sci.*, **88**, 933 (1999).
17. J. Harris, Ed., *Poly(ethylene glycol) Chemistry : Biotechnology and Biomedical Applications*, Plenum Press, New York, 1992.
18. B. Kim and N. A. Peppas, *Biomedical Microdevices*, **5**, 333 (2003).
19. B. Kim and N. A. Peppas, *Int. J. Pharm.*, **266**, 29 (2003).
20. M. Brinkley, *Bioconjug. Chem.*, **3**, 2 (1992).
21. R. P. Haugland, *Methods Mol. Biol.*, **45**, 205 (1995).
22. N. Behan, C. Birkinshaw, and N. Clarke, *Biomaterials*, **22**, 1335 (2001).
23. W. Leobandung, H. Ichikawa, Y. Fukumori, and N. A. Peppas, *J. Appl. Polym. Sci.*, **87**, 1678 (2003).
24. Y. Kamijo, K. Fujimoto, H. Kawaguchi, Y. Yuguchi, H. Urakawa, and K. Kajiwara, *Polym. J.*, **28**, 309 (1996).
25. D. Robinson and N. A. Peppas, *Macromolecules*, **35**, 3668 (2002).
26. K. Podual, F. J. Doyle III, and N. A. Peppas, *Biomaterials*, **21**, 1439 (2000).
27. J. Mohanty, J. Jaffe, E. Schulman, and D. Raible, *J. Immunol. Methods*, **202**, 133 (1997).
28. M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, and R. P. Haugland, *Anal. Biochem.*, **253**, 162 (1997).
29. R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 9th ed., Molecular Probes. Eugene, OR, 2002.