

## FRET에 기반한 Open Sandwich Fluoroimmunoassay

<sup>1</sup>Quande Wei · <sup>2</sup>이 문 권 · <sup>2,4</sup>성 기 훈 · <sup>2,4</sup>주 재 범 · <sup>2,3,†</sup>이 은 규

<sup>1</sup>중국중산대학교 미생물학과, <sup>2</sup>한양대학교 마이크로바이오칩센터, <sup>3</sup>한양대학교 화학공학과, <sup>4</sup>한양대학교 응용화학과  
(접수 : 2007. 1. 4., 게재승인 : 2007. 8. 24.)

## Development of an Open Sandwich Fluoroimmunoassay Based on FRET

Quande Wei<sup>1</sup>, Moonkwon Lee<sup>2</sup>, Gi Hun Seong<sup>2,4</sup>, Jaebum Choo<sup>2,4</sup>, and Eun Kyu Lee<sup>2,3,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathogenic Biology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 530080, China

<sup>2</sup>Micro Biochip Center, <sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, <sup>4</sup>Department of Applied Chemistry, Hanyang University, Ansan 426-791, Korea

(Received : 2007. 1. 4., Accepted : 2007. 8. 24.)

We have developed a sensitive, one-step, homogeneous open sandwich fluoroimmunoassay (OsFIA) based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) and luminescent semiconductor quantum dots (QDs). In this FRET assay, estrogen receptor- $\beta$  (ER- $\beta$ ) antigen was incubated with QD-labeled anti-ER- $\beta$  monoclonal antibody and AF (Alexa Fluoro)-labeled anti-ER polyclonal antibody for 30 minutes, followed by FRET measurement. The dye separation distance was estimated to be between 80~90 Å. The present method is rapid, simple and highly sensitive, and did not require the bound/free reagent separation steps and solid-phase carriers. A concentration as low as 0.05 nM (2.65 ng/ml) receptor was detected with linearity ( $R^2 > 0.990$ ). In addition, the assay was performed with commercial antibodies. This assay provides a convenient alternative to conventional, laborious sandwich immunoassays.

**Key Words** : FRET, sandwich assay, quantum dots, fluorescence labels, sandwich immunoassay

### 서 론

단백질의 정량분석은 임상병리학, 생화학 등의 실험에 있어서 매우 중요한 요소이다. 면역분석법 (Immunoassay)은 이러한 분야에서 널리 사용되어 왔다. 그러나 대부분의 면역분석법은 1~10 ns의 짧은 형광수명을 가지는 유기형광체를 이용하며, 시료에서 발생하는 기저형광에 의한 영향으로 낮은 감도를 갖는다.

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)는 donor-acceptor 쌍 사이의 쌍극자간 결합을 통해서 donor chromophore의 전자여기 (勵起) 에너지가 근처의 acceptor 분자로 전이될 때 발생된다(1). Donor의 방출 스펙트럼과 acceptor의 흡수 스펙트럼이 분명히 겹쳐질 때, 보다 효율적인 FRET 현상이 발생된다(2). 일반적인 화학적 분석법과 비교해 볼 때, FRET에 기반한 분석법은 donor의 형광 소

멸현상과 acceptor의 형광 증가현상을 관측함으로써, 리간드-수용체 결합을 간단히 높은 감도로 측정할 수 있다. Donor와 acceptor의 거리는 일반적으로 100 Å 이하의 값을 가진다(3-6). 지난 수년 동안 많은 종류의 FRET 분석법이 개발되어졌다(7-10).

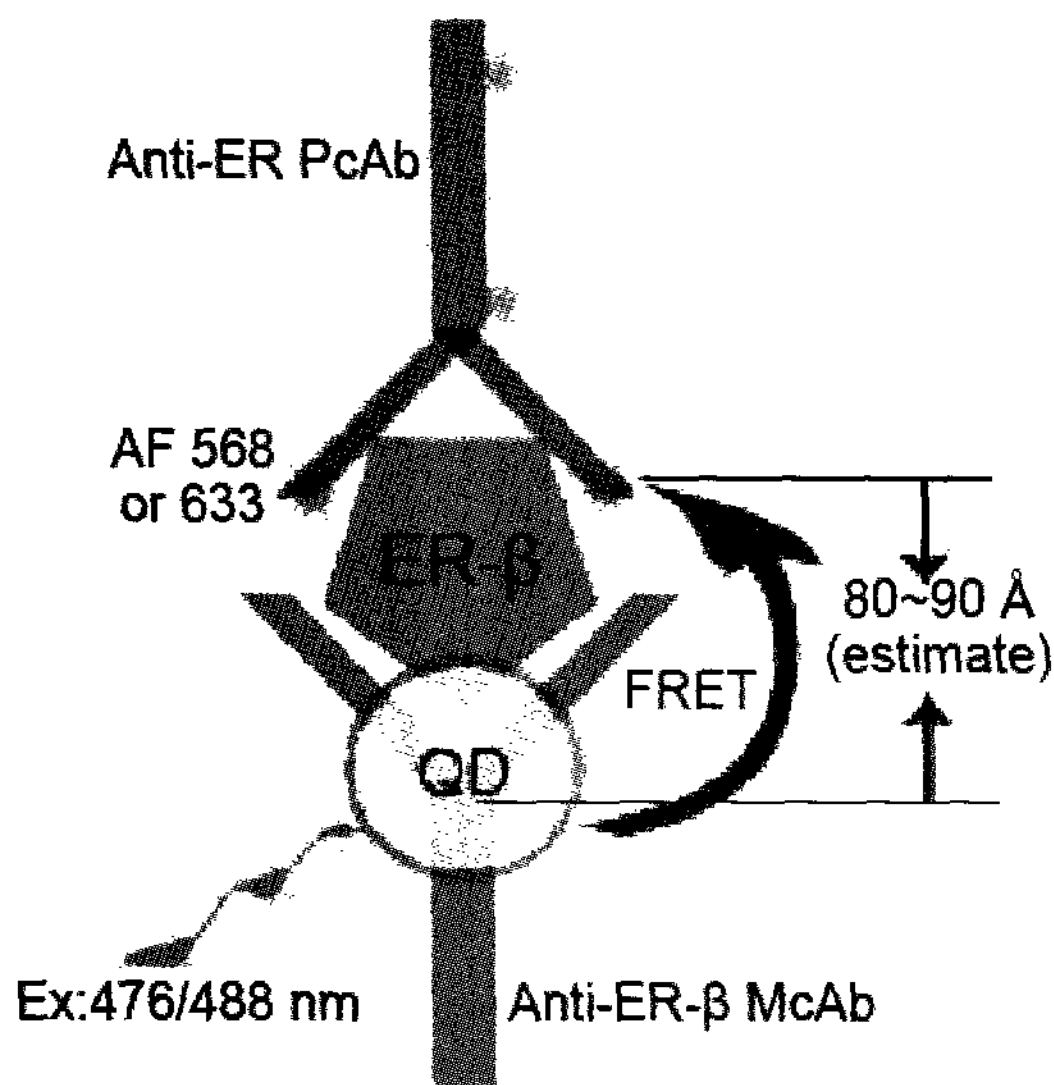
전통적인 면역분석법은 항체나 항원을 고정하기 위한 고체상의 지지체를 필요로 하며, 잔류 시약을 제거하기 위해 연속적인 결합과 세척과정 등 여러 단계를 필요로 한다. 이러한 문제점을 피하기 위하여 Ueda 등(11)은 open sandwich FIA (Fluorescence immunoassay)을 소개하였다. 이 방법은 항체의  $V_H$  (variable region of the heavy chain)과  $V_L$  (variable region of the light chain) 사이에서의 FRET을 이용한다.  $V_H$ -EGFP chimera와  $V_L$ -EGFP chimera가 시료에 섞여질 때, 두 GFP (green fluorescent protein) 사이에서 나타나는 FRET 현상을 관측함으로써, 항체의 농도를 결정할 수 있다. 이 측정과정은 매우 빠르고 간단하며, 대략 1  $\mu$ g/mL 농도의 항체까지 측정이 가능하다. 이와 유사한 또 다른 방법은  $V_H$ -Rluc (Renilla luciferase)와  $V_L$ -EYFP 사이의 FRET 현상을 이용한 것이며, 0.1  $\mu$ g/mL (또는 7 nM)의 농도가 측정한계이다(12). 단일 단계, 비경쟁적 FRET 면역분

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan 426-901, Korea

Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779

E-mail : eklee@hanyang.ac.kr

석법은 Eu-표지 항모르핀과 Cy5-표지 anti-IC (모르핀과 항모르핀 결합체) Fab 단편 사이의 FRET현상을 관측하며, 5 ng/mL의 morphine까지 측정되었다(13). 이러한 모든 방법은 두 형광 염색체 사이의 거리의 제약 때문에 특정한 항체 단편을 생성해야 한다. 또한 기저형광과 acceptor 형광체의 여기과정에서 donor의 방출광에 의한 여기가 아닌 광원에 의한 직접적인 여기 때문에 활용에 제약이 따른다.



**Figure 1.** Schematic illustrations of FRET based open sandwich fluoroimmunoassay (OsFIA). QD565 is excited by an Ar-visible laser and the energy transfer occurs from QD to AF that emits red fluorescence. The fluorescence is detected in the FRET channel with the detection window at 590-720 nm (for Alexa 568) or at 610-740 nm (for Alexa 633). The spectra are scanned from 515 nm to 720 nm (for Alexa 568 acceptor) or from 525 nm to 730 nm (for Alexa 633 acceptor).

콜로이드성 반도체 나노결정, 혹은 quantum dots (QDs)은 레이저와 같은 광원에 의해서 여기(勵起) 되었을 때, 형광이 발생·증가되는 반도체 물질의 나노결정이다. QD는 기존의 형광표지 물질에 비하여 폭넓은 흡수 파장과 좁은 방출 파장, 높은 방출 양자수율, 긴 수명시간, 파장의 조율 가능성, 큰 Stoke shift, 그리고 화학적, 광학적 안정성 등 많은 장점을 제공한다(14, 15). 또한, QD 기술의 장점은 레이저를 필요로 하지 않는 여기과정과 단순한 기기로도 높은 감도를 얻을 수 있는 것이다. 이러한 QDs은 일반적인 형광분광기를 이용하여도 기존의 가장 우수한 유기 염색체와 같은 농도 수준에서 측정할 수 있으며, 공초점현미경을 이용하면 생체물질과 결합된 각각의 QDs까지도 관측할 수 있다(16). 콜로이드 QDs은 다양한 작용기(표면 리간드)로 치환되어진 표면을 가지는 구형의 나노결정이며, 물을 포함하는 매우 다양한 용매에서 분산되어진다(16-19). In-vitro 생체분석도구로서 QDs을 사용함으로써 면역분석법 분야에서는 현저한 발전이 있었다(15). QDs이 결합되어진 항원과 항체 사이에서의 FRET은 면역분석법에 사용될 수 있다(20). 면역분석법에서 QD 결합체를 사용함으로써 유리한 점은 다양한 크기의 나노결정 형광체를 하나의 광원을

사용하여 여기시킬 수 있으며, 여러 개의 형광체도 동시에 측정할 수 있다는 것이다(21). 또한, donor로 사용되는 QD 결합단백질은 QDs의 높은 양자수율로 인해서 다른 형광염색체보다 먼 거리까지 에너지를 전이할 수 있다. QD과 acceptor 사이의 거리는 91 Å까지 가능하다(22).

QD-리간드 항체에 기반한 면역분석법의 많은 장점 때문에, 본 연구에서는 QD과 AF (Alexa Fluoro 염료)가 결합된 항체를 이용한 분석법을 연구하였다. 이 open sandwich fluoroimmunoassay (OsFIA)은 Fig. 1에 나타내었다. 항에스트로겐 수용체 β 단클론 항체 (anti-estrogen receptor β monoclonal antibody: ER-β McAb)는 QD 565을 결합하여 염색하였고, 항에스트로겐 수용체 다클론 항체 (anti-estrogen receptor Polyclonal antibody: ER PcAb)는 AF568과 AF633으로 염색하였다. 두 염색되어진 항체를 ER-β 항원과 함께 반응시키고, 공초점현미경으로 FRET현상을 측정하였다. 본 논문의 목적은 유리칩에서의 면역분석법에 QD결합항체를 적용시키고, 나아가 빠르고, 간단하며, 높은 감도의 항원 측정기술을 개발하는 것이다.

### 재료 및 방법

#### Anti-estrogen receptor β (ER-β) monoclonal antibody (McAb)에의 QD 565 표지

Anti-ER-β McAb (mouse ascites, IgM isotype; Sigma, St. Louis, MO, USA)는 QD 565 antibody conjugation kit (Quantum Dot Corporation, Haywood, CA; qdots.com)을 이용하여 표지하였으며, 제품설명서에 따라 진행하였다. 간략히 설명하면, 아민 그룹을 갖는 core(CdSe)-shell(ZnS) QD 나노결정 고분자 표면은 hetero bifunctional crosslinker인 4-(maleimidomethyl)-1-cyclohexanecarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester (SMCC)에 의해서 maleimide-나노결정 표면으로 활성화된다. 단클론항체는 dithiothreitol (DTT)로 처리하여 초기 항체의 disulfide 결합을 파괴한다. Maleimide-QD은 thiol-containing McAb와 순차적으로 섞는다. 1시간의 반응 후에 여분의 maleimide 그룹은 β-mercaptoethanol로 제거한다. QD과 결합되지 않은 항체는 SEC (size-exclusion chromatography) (Superdex 200, Amersham Biosciences, USA)을 이용하여 제거한다. QD이 표지된 항체의 농도는 excitation coefficient (QD 565~300,000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)와 흡광도(@556 nm, [QD 565] = A<sub>556</sub>/300,000)를 측정하여 계산하였다. 항체 1 μM에 결합된 QD 565의 농도는 60 nM 정도로 계산된다. 표지된 McAb는 사용 전까지 4°C에 보관했다.

#### Anti-ER polyclonal antibody (PcAb)에의 Alexa Fluor dyes의 표지

Rabbit anti-ER PcAb (antiserum, IgG isotype, Sigma, St. Louis, MO, USA)는 AF568 & 633 protein labeling kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)을 이용하여 표지하였으며, 제품설명서에 따라 진행하였다. 간략히 설명하면, 2 mg/mL의 항체용액 0.5 mL에 1 M의 bicarbonate를 50 μL 넣은 후, 반응시킬 염색체 1 vial과 혼합하여 실온에서 1시간동안 섞어준다. 이 염색체가 표지된 항체는 SEC (BioGel

P-30 Fine, Bio-Rad, USA)을 이용하여 정제한다. 항체에 표지된 AF 염료 (AF568 또는 AF633)의 비율은 염료 (577 nm [AF568], 632 nm [AF633])와 항체 (280 nm)에 해당하는 파장에서의 흡광도를 측정하여 계산하였다(labeling ratio = [AF568 or AF633]/[antibody]). AF568의 경우, [AF568] =  $A_{577}/91,300$ , [antibody] =  $(A_{280}-0.46A_{577})/203,000$ . AF633의 경우, [AF633] =  $A_{632}/100,000$ , [antibody] =  $(A_{280}-0.55A_{577})/203,000$ . 각각의 AF568 @577 nm와 AF633 @632 nm의 molar extinction coefficient는 대략  $91,300 M^{-1}cm^{-1}$ 와  $100,000 M^{-1}cm^{-1}$ 이다. 일반적인 IgG의 molar extinction coefficient는  $203,000 M^{-1}cm^{-1}$ 이다. 280 nm에서 염료가 영향을 미치는 흡광도를 보정하기 위하여 0.46과 0.55의 보정계수를 사용하였다. 0.85  $\mu M$  농도의 항체에 대하여 AF568은 7  $\mu M$ , AF633은 6  $\mu M$  정도의 결합 비율을 갖는다. 또한, 0.6  $\mu M$  농도의 항체에 대하여 AF568은 7.5  $\mu M$ , AF633은 4.5  $\mu M$  정도로 결합 비율이 나타났다. 이 표지된 PcAb는 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

**Open sandwich FRET (fluorescence resonance energy transfer) 기반 면역분석법 (OsFIA)**

FRET 면역분석법의 원리는 Fig. 1에 나타내었다. Donor 로써의 단클론항체의 hinge 부분에 QD를 부착하였으며, acceptor로써의 다클론항체의 N-terminal에는 AF568과 AF633을 결합시켰다. ER- $\beta$ 를 측정하기 위한 본 open sandwich immunoassay는 AF568 또는 AF633이 표지된 anti-ER PcAb와 QD565가 표지된 anti-ER- $\beta$  McAb을 이용하여 다음과 같이 진행하였다. QD565와 AF568 쌍의 경우는, QD565가 표지된 anti-ER- $\beta$  McAb 2  $\mu L$ 와 AF568가 표지된 anti-ER PcAb 1  $\mu L$ 를 여러 농도 (50 nM~0 nM)의 human ER- $\beta$  (Sigma) 1  $\mu L$ 와 함께 혼합하였다. QD565와 AF633 쌍의 경우는 QD565가 표지된 anti-ER- $\beta$  McAb 1  $\mu L$ 와 AF633이 표지된 anti-ER PcAb 3  $\mu L$ 를 여러 농도 (50 nM~0 nM)의 human ER- $\beta$  1  $\mu L$ 와 함께 혼합하였다. 실온에서 30분간의 반응 후 반응된 용액 중 2  $\mu L$ 를 커버글라스에 올려놓았다. 이 형광 이미지는 공초점형광현미경을 이용하여 측정하였다. 각각의 실험은 3회 반복하였으며, 음성대조군으로는 ER- $\beta$  대신에 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4)를 사용하였다. 모든 용액의 희석은 phosphate buffer를 이용하였다.

**형광현미경을 이용한 FRET 관찰**

측정에 사용된 형광현미경은 DM IRE 2 inverted microscope (Leica, Germany)이 포함되어있는 TCS-SL confocal system (Leica, Heidelberg, Germany)을 사용하였다. 그리고 0.3 nm의 numerical aperture (N/A) 값을 갖는 렌즈를 사용하여, xyz와 xy $\lambda$  모드로 형광이미지를 측정하였다. QD565와 AF568 쌍의 경우에는 476 nm의 파장을 갖는 Ar-visible 레이저를 이용하여 여기하였다. QD565의 형광 이미지는 PMT-1 (yellow channel)에서 515~590 nm로 설정하고, AF568의 이미지는 PMT-2 (red channel)에서 590~720 nm로 설정하여, xyz 모드로 동시에 측정하였고, 형광 스펙트럼의 측정은 xy $\lambda$  모드를 이용하여 515~720 nm 사이에서 5 nm 간격으로 40개의 이미지를 획득하여 측정하였다.

QD565와 AF633 쌍의 경우에는 488 nm의 파장을 갖는 Ar<sup>+</sup>-visible 레이저를 이용하여 여기하였다. QD565의 이미지는 PMT-1 (yellow channel)에서 515~605 nm로 설정하고, AF633의 이미지는 PMT-2 (red channel)에서 610~740 nm로 설정하여, xyz 모드로 동시에 측정하였으며, 이에 대한 형광 스펙트럼은 xy $\lambda$  모드를 이용하여 525~730 nm 사이에서 5 nm 간격으로 40개의 이미지를 획득하여 측정하였다. 모든 이미지는 Leica confocal software (Leica)를 이용하여 분석하였다.

시간에 따른 실험을 통해서 얻은 red/yellow 형광비율은 ER- $\beta$  항원의 유·무의 따른 FRET의 지표로 사용되었다. 각 검출기 (yellow & red channels)에서의 이미지는 5분 간격으로 70분 동안 기록되었으며, 매 시간마다 yellow와 red 형광의 평균 세기를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**QD565와 Alexa Fluor 568/633의 분광학적 특성**

QD565/AF568 쌍과 QD565/AF633 쌍은 ER- $\beta$  항원을 측정하기 위해 사용되었다. QD565와 AF568/633 표지된 항체의 방출 스펙트럼은 Fig. 2에 보여준다. AF633이 표지된 항체는 대략 632 nm에서 최대 흡수파장을 가지며, 580 nm에서 두 번째 흡수파장을 갖는다. AF568과 AF633의 흡수 파장은 QD565의 방출파장과 분광학적으로 매우 잘 겹쳐져서 나타난다.

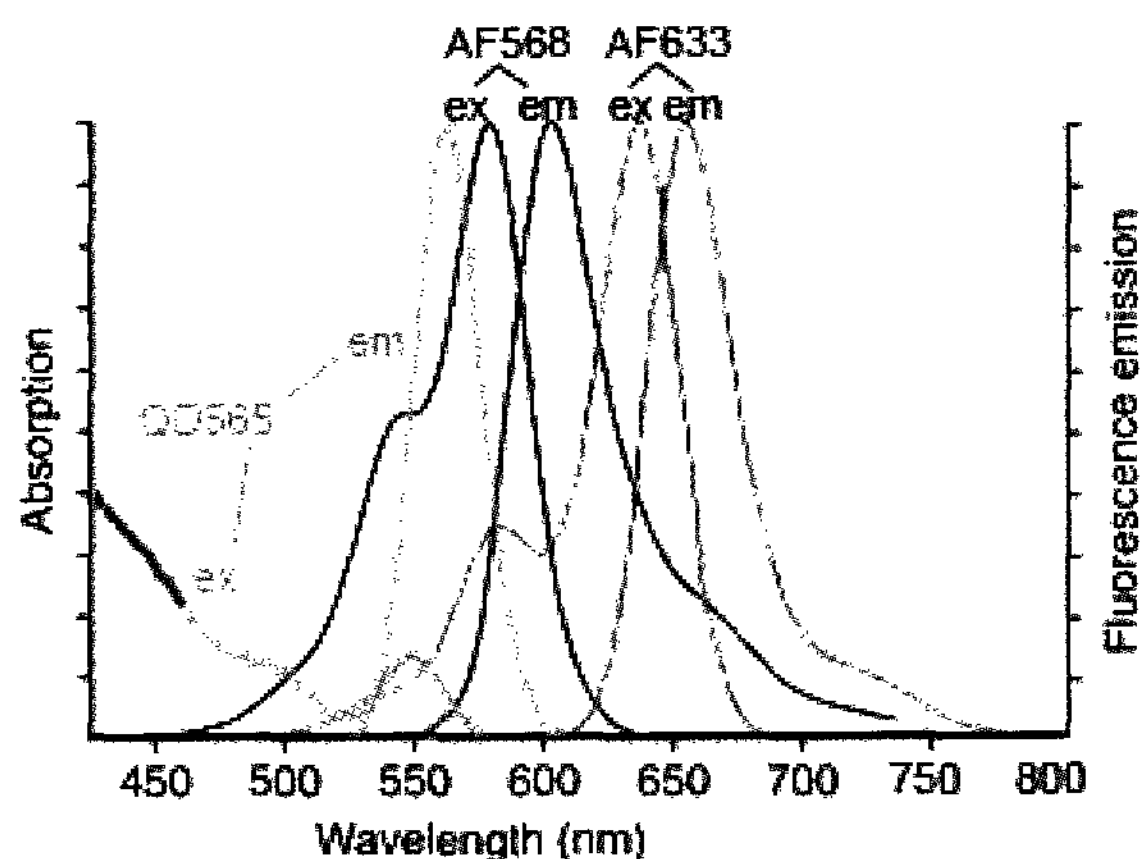
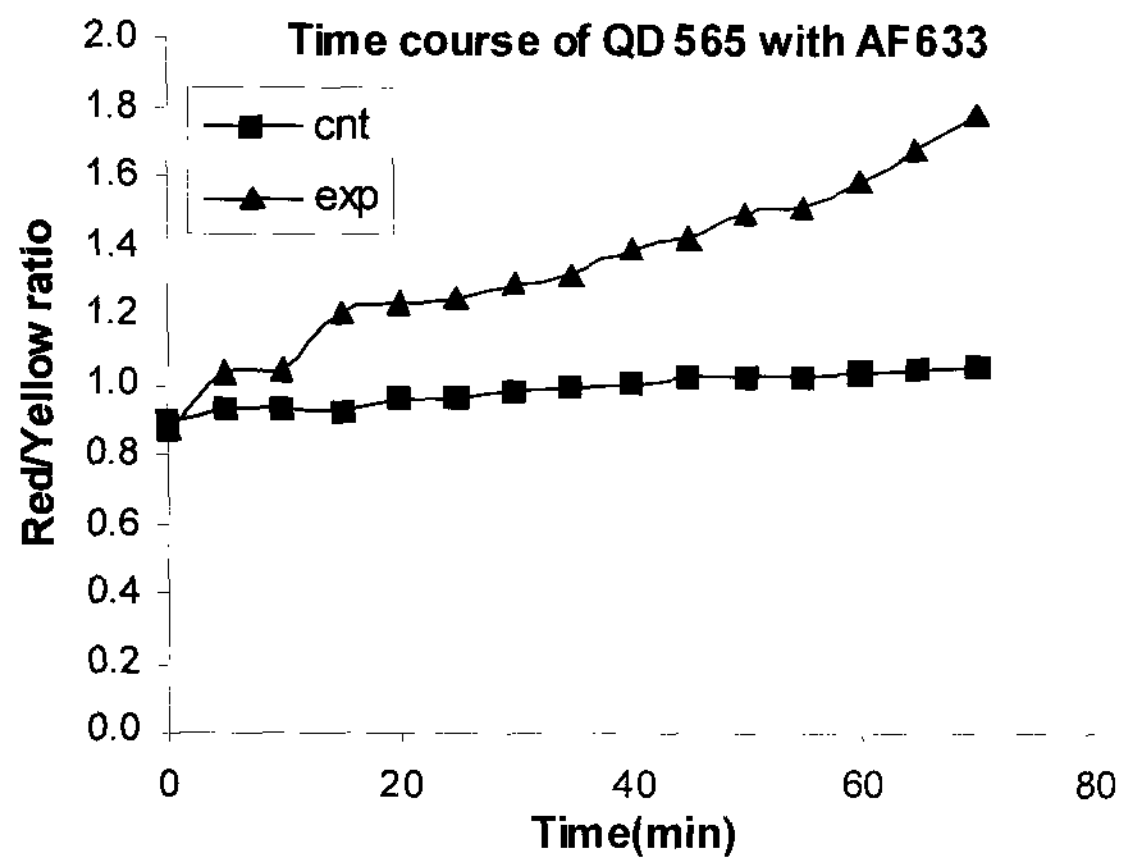


Figure 2. Spectra of QD565 labeled antibody, and Alexa 568 and Alexa 633 bound to antibody (Ex = excitation spectrum, Em = emission spectrum).

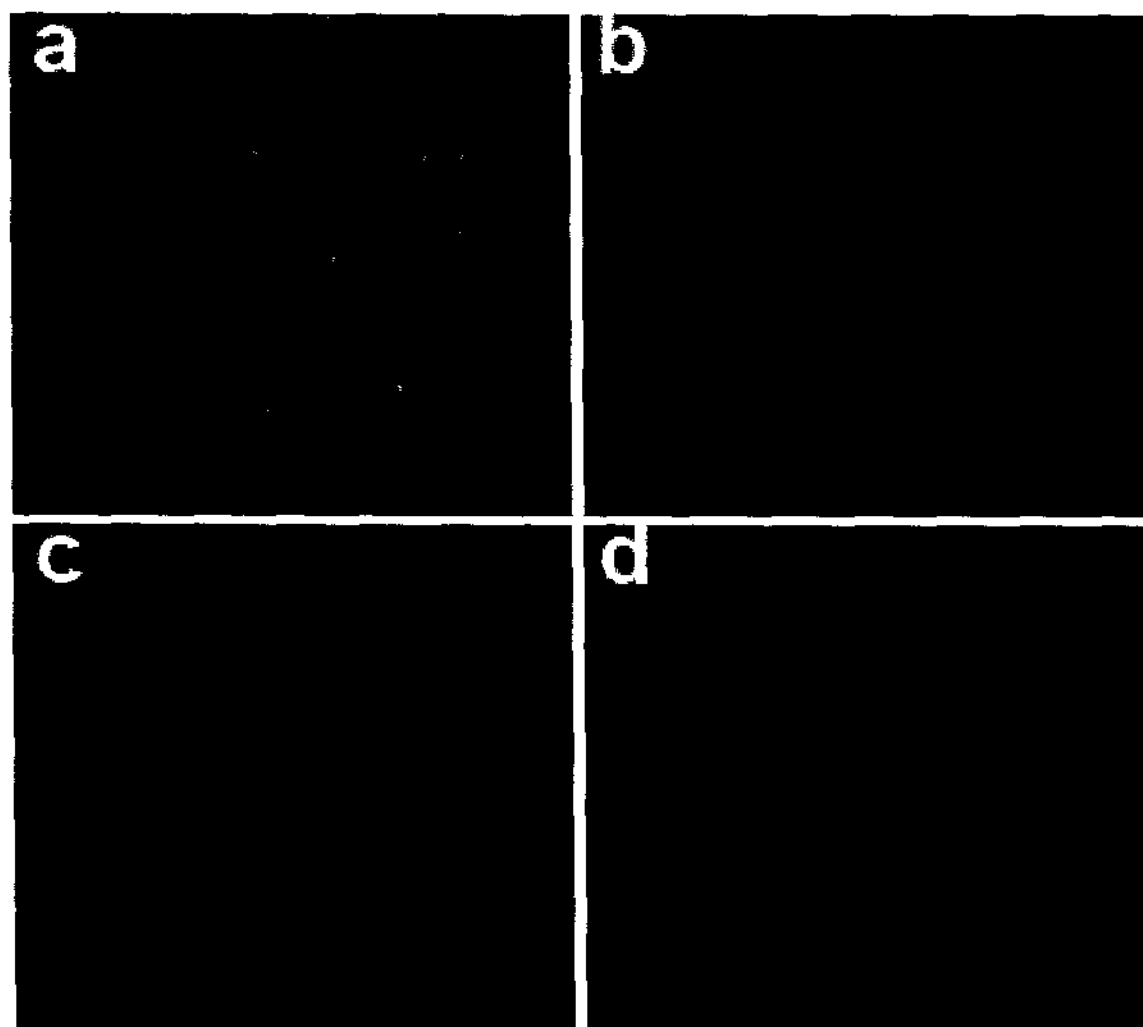
**반응 시간 및 농도**

형광물질이 표지된 항체들과 항원의 반응은 FRET 현상을 관측하여 최적의 시간을 정하였다. Fig. 3에 보는 바와 같이 실온에서 15분의 반응 후에 대조군의 acceptor/donor 형광세기 비율보다 실험군의 acceptor/donor 형광세기 비율이 눈에 띄게 증가되며, 30분 후부터는 소폭으로 증가하는 것을 볼 수 있다. 이러한 결과에 준하여, 모든 분석실험은 실온에서 30분간의 반응 후에 진행하였다. QD565와 AF568

이 표지된 각 항체를 이용한 실험에서는 각각의 최종농도가 0.5  $\mu\text{M}$  (30 nM QD565)과 1.75  $\mu\text{M}$  (200 nM AF568)이였으며, QD565와 AF633이 표지된 각 항체를 이용한 실험에서는 각각의 최종농도가 0.2  $\mu\text{M}$  (12 nM QD565)와 0.6  $\mu\text{M}$  (210 nM AF633)이었다.



**Figure 3.** The time course of FRET based OsFIA between QD565 and Alexa 633. Images from the yellow channel (515~605 nm) and the red channel (610~740 nm) were recorded at intervals of 5 min for up to 70 min with the final concentration of estrogen receptor at 10 nM (control with PBS).

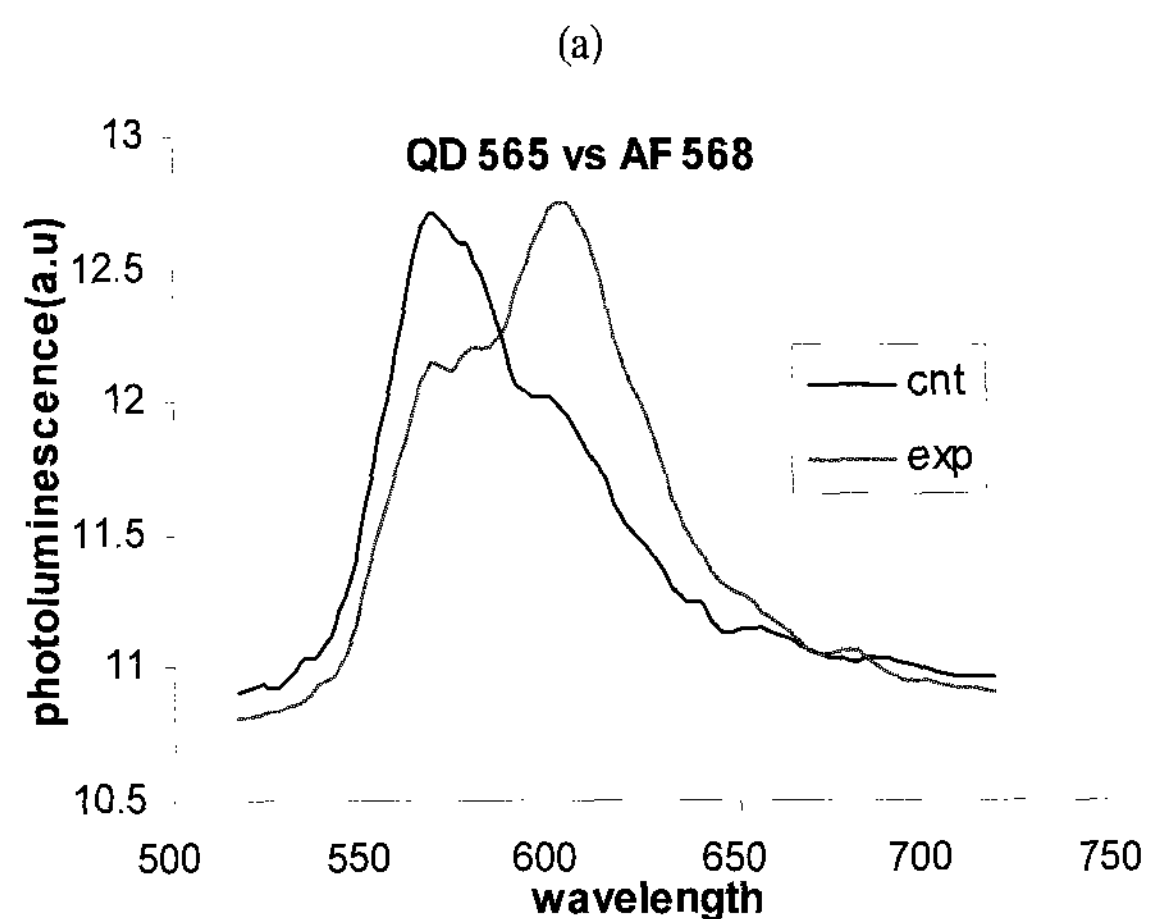
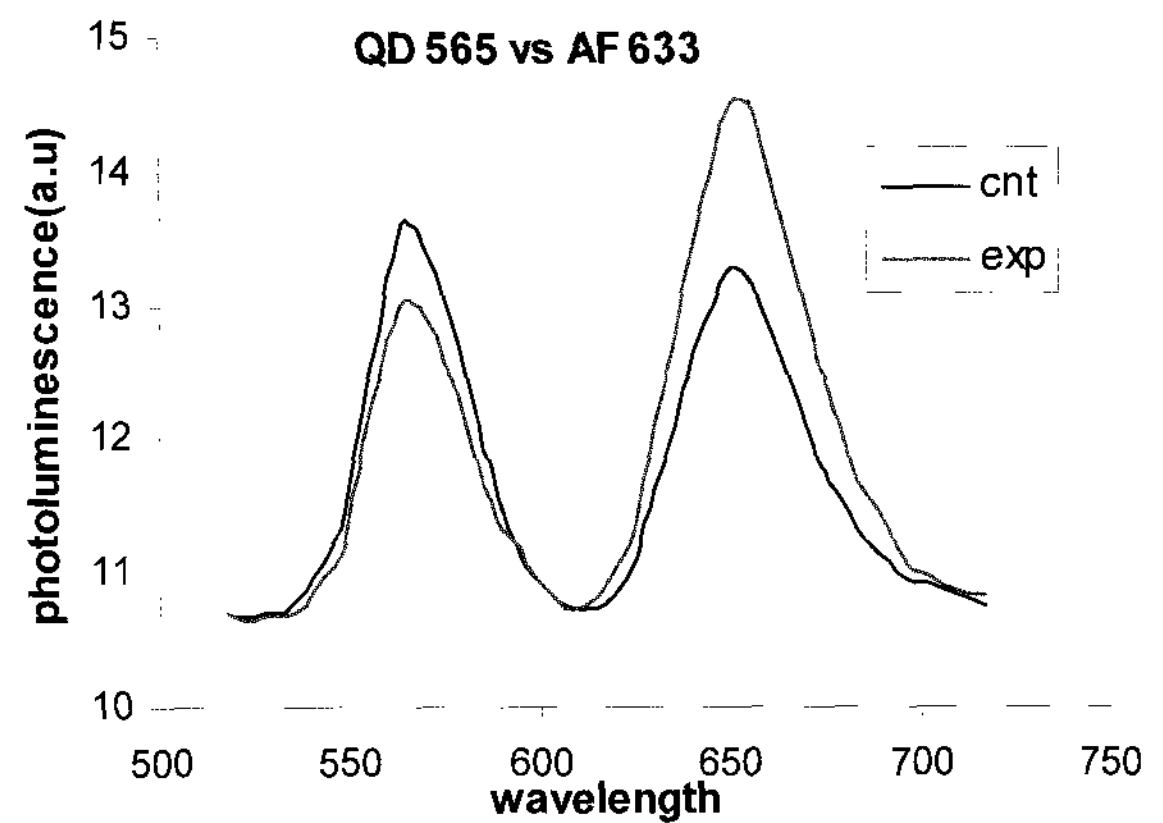


**Figure 4.** OsFIA with QD565 and Alexa 633 dye ((a) Donor fluorescent density of negative control (two fluorophore-labeled antibodies but no antigen). (b) Acceptor fluorescent density of negative control. (c) Donor fluorescent density of experimental sample (two fluorophore-labeled antibodies with antigen). (d) Acceptor fluorescent density of experimental sample. Sample was visualized by illumination using an Ar-visiblelaser with laser line set at 488 nm. QD565 Fluorescence was detected in the donor channel with the detection window at 515~605 nm. Fluorescence was colored in yellow (a, c). Alexa 633 Fluorescence was detected in the acceptor channel with the emission window at 610~740 nm. Fluorescence was colored in red (b, d)).

**QD과 Alexa Fluor 사이에서의 FRET**

Fig. 4와 Fig. 5에서는 QD이 표지된 anti-ER- $\beta$  (McAb)와

AF568 또는 AF633이 표지된 anti-ER (PcAb)를 ER- $\beta$  항원과 반응시켜서 얻은 FRET 현상을 나타내고 있다. FRET 현상에 의해서 형광이 발생하는 실험군의 acceptor channel (Fig. 4d)에서는 대조군(Fig. 4b)의 형광세기보다 눈에 띄이게 높은 형광세기가 보이는 반면에, 실험군의 donor channel(Fig. 4c)에서는 대조군(Fig. 4a)의 경우보다 낮은 형광세기가 보여진다. 분광적 측정에서도 대조군에 비해 실험군의 donor (565 nm) 파장의 크기는 감소하며, acceptor (Fig. 5a에서는 655 nm, Fig. 5b에서는 605 nm) 파장의 증가를 볼 수 있다(Fig. 5).



**Figure 5.** Spectra scanning of experiment and negative control ((A) QD565/Alexa 568 pair scanned from 515 nm to 720 nm with 40 images. (B) QD565/Alexa 633 pair scanned from 525 to 730 nm with 40 images).

위의 McAb (1차 항체)와 PcAb (2차 항체)의 ER- $\beta$ 에 의한 sandwich complex의 형성을 확인하기 위하여 ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) 실험을 시행하였으며, 대조군에 비해 실험군의 흡광도 (@405 nm)는 10배 이상 높게 나타나는 것을 확인하였다. 또한 SDS-PAGE 실험도 시행하였으나 결합을 확인할 수 있는 결과를 얻을 수 없었다. 이는 항원과 항체간의 결합을 SDS 성분이 방해하기 때문이라고 사료된다. 그리고 carboxymethyl dextran surface를 이용



한 SPR (Surface Resonance Plasmon) 실험을 시행하였다. Dextran 표면에 처음의 단클론 항체의 고정화와 ER-β의 결합은 매우 안정하게 잘 이루어 졌으나, ER-β와 다클론 항체 (free) 간의 결합은 안정적이지 않았다. 이는 channel에서 지속적으로 이동하는 용액의 흐름 때문이라고 판단되며, 이 전단력이 ER-β와 다클론 항체 사이의 약한 결합력에 방해 요소로 작용했다고 생각된다.

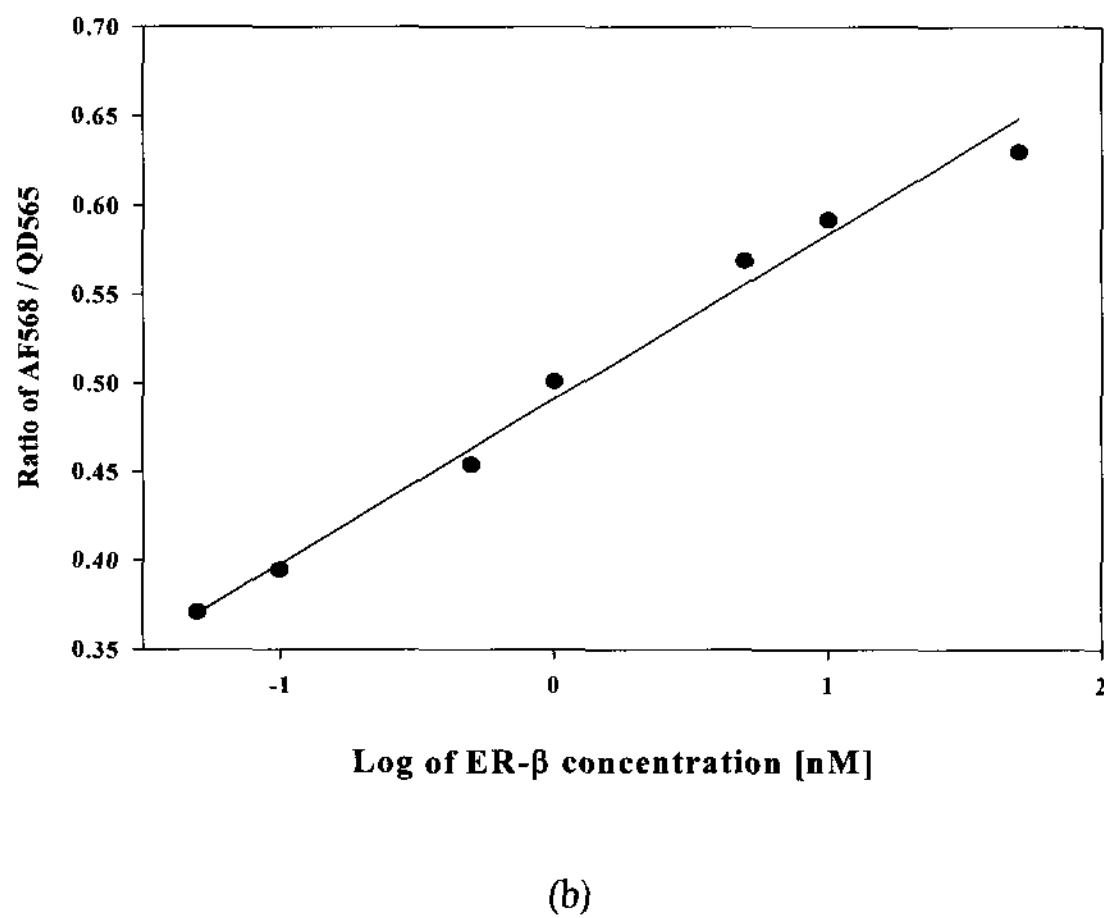
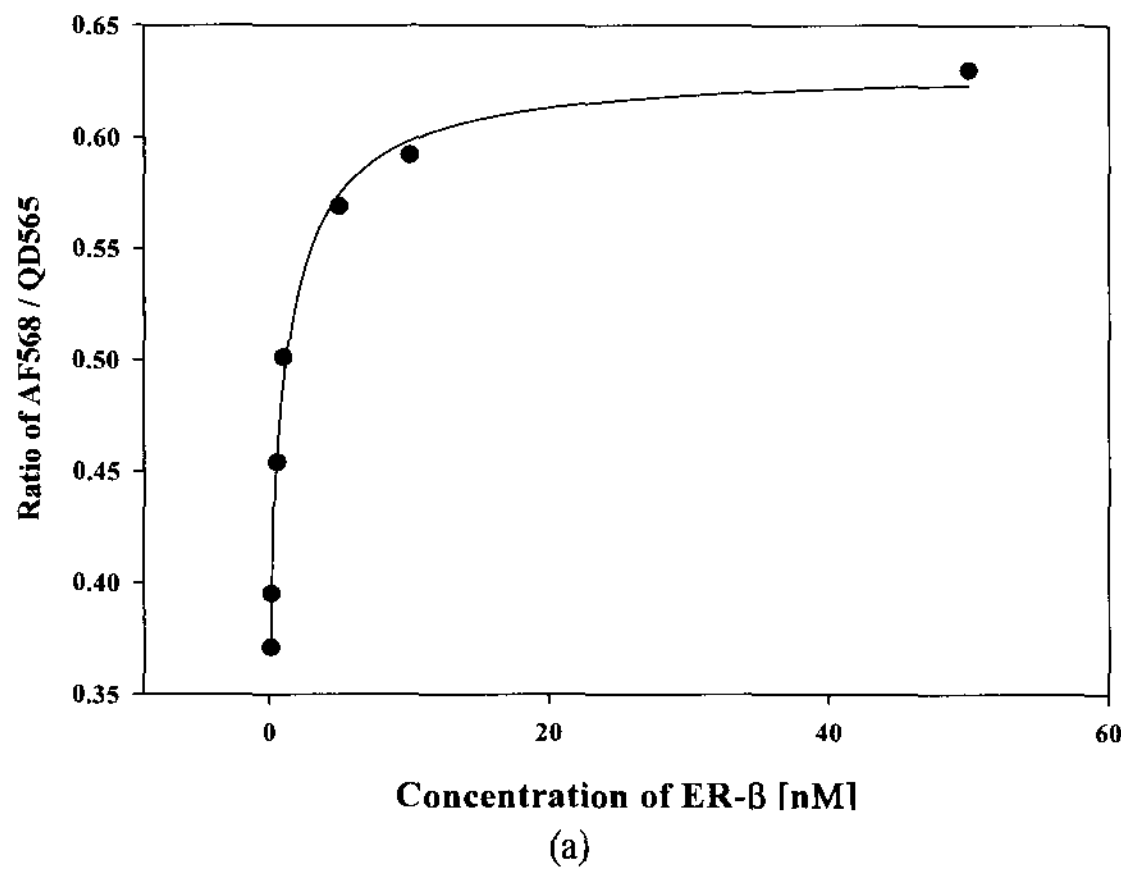


Figure 6. Calibration graphs between estrogen receptor concentration and donor/acceptor density ratio ((a): using 'two-site binding model' (b) using semi-log linear model).

Receptor의 농도 대 FRET

Energy transfer efficiency, 즉 FRET 효율 (E)는 다음의 식에 따른다.

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

F<sub>DA</sub>는 acceptor를 첨가했을 때 나타나는 donor의 형광세기이며, F<sub>D</sub>는 donor만 존재할 때의 형광세기이다. QD565와 AF568 사이의 FRET 효율은 약 30%로, QD565와 AF633의 효율 (약 20%)보다 높게 나타난다. 이 이유는 QD565의 방출파장과 AF568의 여기파장이 QD565의 방출파장과 AF633의 여기파장보다 근접하기 때문이다. Fig. 6은 ER-β

의 농도와 donor/acceptor 세기비율 간의 상관관계를 보여주고 있다. Fig. 6a에 나타난 donor/acceptor 세기비율은 'two-site binding' 모델에 매우 잘 맞는다(R<sup>2</sup> = 0.996). 이 모델에서 첫 번째 결합의 K<sub>d1</sub> 값 (0.007 nM)은 두 번째 결합의 K<sub>d2</sub> 값 (1.73 nM)보다 매우 낮게 계산되는데, 이는 첫 번째 결합이 매우 빠르게 진행됨을 보여준다. Fig. 6b의 그래프는 donor/acceptor 세기비율에 대한 ER-β 농도의 로그 선형 (log-linear plot)을 나타내는데, receptor의 최고농도 50 nM과 최저농도 0.05 nM까지는 매우 정확한 신뢰도 (R<sub>2</sub> = 0.990)를 보여준다. 위의 결과에 따라 본 분석법을 이용하여 30분의 반응시간 후에 0.05 nM까지 측정하였다.

고찰

본 연구를 통해 QDs이 표지된 단클론항체와 AF가 표지된 다클론항체를 사용하여, 항원을 측정할 수 있는 빠르고 단순한, FRET에 기반한 sandwich immunoassay (OsFIA)를 개발하였다. OsFIA는 비경쟁형태이며 자동화가 가능하다. 또한 항원과 항체의 결합에 수 분 밖에 소요되지 않는다. 30분의 반응시간 후에 혼합된 용액을 커버글라스 위에 놓고 형광을 측정한다. ELISA 반응같이 결합, 세척, 차단 등의 여러 단계가 필요치 않다. 이 분석법은 기존의 다른 면역분석법과 생체물질 검출법 대응으로 넓게 활용될 수 있을 것이다.

FRET 실험의 설계에서 형광염료 사이의 분리거리는 가장 중요한 인자이다. Donor-acceptor의 분리거리가 50~100 Å일 때 효과적인 FRET 현상이 발생한다. 본 연구의 OsFIA에서는 단클론항체의 hinge area에 thioester 결합에 의해서 QD이 표지되었으며, 다클론항체의 N-terminal α-amino groups에 N-hydroxysuccinimide (NHS)가 포함된 AF를 부분적으로 표지하였다. QD565의 반경은 약 30 Å이다. 항체의 최소크기는 45 Å이기 때문에 hinge 부분에서 Fab 사이의 최소거리는 22.5 Å라 할 수 있다(23). MBP (maltose binding protein)의 크기는 30 × 40 × 65 Å이고, avidin의 크기는 100 × 62 × 25 Å이다. 43 kDa의 MBP 68 kDa의 avidin의 크기는 각각 30 Å(23)과 25 Å(24)이며, ER-β (53 kDa)에서 추정되는 최소 크기는 25~35 Å이다. 본 연구에서 두 형광체 사이의 가장 근소한 거리는 80~90 Å이다(Fig. 1). 이 분석법은 다른 문헌에서 보고된 염료가 표지된 항원과 항체 사이의 거리 (20, 23, 26)보다 더욱 가깝다. FRET 효율로부터 실제 분리 거리를 계산하는 것은 몇 개의 acceptor가 반응에 참여하는 지가 불명확하기 때문에 매우 어렵다. 본 분석법은 acceptor 염료 (AF)에 더 멀리 영향을 미칠 수 있는 높은 양자 수율의 QDs을 이용하기 때문에 FRET 분석법에 이상적이다. AF의 작은 분자는 N-terminal의 아민기에 결합되어 지며, 항체의 활성화에는 영향을 주지 않는다. AF 염색체를 선택하여 사용한 이유는 다른 유기염료보다는 밝고 광학적 안정성이 높기 때문이다. 본 OsFIA 분석법은 두 항체간의 결합 epitopes 사이의 거리가 45 Å 이하일 때 다른 큰 분자량의 항원에도 사용될 수 있다.

서로 다른 항원 epitopes를 가지는 QD-항체와 AF568/633-항체가 결합될 때, 항원-항체 면역복합체가 형성되어진다. FRET 현상에 따른 AF568-항체 또는 AF633-항체의 red

**Table 1.** The lowest concentrations detected in other reports and OsFIA

Method	Description	Detection limit
FRET immunoassay <sup>27</sup>	Sq 635 labeled anti-HSA vs. Sq 660 labeled HSA	100 nM (7 ng/ml)
Open sandwich FIA <sup>11</sup>	Antibody variable region: V <sub>H</sub> -EBFP vs. V <sub>L</sub> -EGFP	1 ug/ml
ELISA <sup>28</sup>	Enzyme tagged antibody	10 ng/ml
Open sandwich FIA <sup>12</sup>	V <sub>H</sub> -Rluc(Renilla luciferase) vs. V <sub>L</sub> -EYFP	7 nM (0.1 ug/ml)
FRET immunoassay <sup>20</sup>	QD555-Anti-BSA vs. QD610-BSA	10 nM
Sandwich FIA <sup>13</sup>	Eu-labeled anti-morphine vs. Cy5-labeled anti-IC(immuno-complex) Fab fragment	5 ng/ml
<b>OsFIA</b>	QD565-Anti-ER-β vs. AF568-Anti-ER	0.05 nM (2.65 ng/ml)

emission의 현격한 증가와 그에 따른 donor로써의 QD565-항체의 yellow emission의 감소현상은 예상대로 관측되었다 (Fig. 4, Fig. 5). FRET 효율은 QD565/AF568쌍에서 더욱 높게 나타났는데, 이는 각 방출파장과 흡수파장이 강하게 겹치기 때문이다. 이러한 FRET 현상은 donor channel과 FRET channel의 형광세기 비율로 명확히 나타내진다. 이 비율에 따라서, QD565/AF568쌍에서는  $5 \times 10^{-11}$  M의 ER-β 까지 측정할 수 있었다. 이 OsFIA 분석법은 다른 연구보다 더욱 높은 감도를 보여준다(Table 1). 더욱이, OsFIA는 여타의 FRET 기반 면역분석법에서 필요로 하는 특정한 항체 절편(11-13)이 아닌 상용화된 일반적인 항체를 이용한다. OsFIA의 신호세기와 감도를 더욱 증진시키기 위해서 FRET 쌍의 최적화를 연구 중에 있다.

실리콘 칩과 well-plate보다 낮은 background noise를 갖는 커버글라스를 사용하는 것은 매우 효과적이다. QDs은 넓은 여기파장을 가지며, 이때 acceptor를 여기시키지 않는 범위의 여기파장을 선택하여 QD을 여기시켜야 한다. 이러한 낮은 background noise는 작은 범위에서도 파장을 조절할 수 있으며, 측정감도를 향상시킬 수 있다.

**요 약**

QDs을 기반으로 하는 OsFIA는 매우 빠르고 간단히 수행될 수 있다. 또한 이 분석법은 고체상의 담체나 결합/잔류 시약의 분리 등과 같은 여러 과정을 필요로 하지 않으며, 적은 양의 시약으로도 분석이 가능하다. 본 분석법은 높은 감도로 항원을 측정할 수 있으며, 일상적인 분석에도 쉽게 도입될 수 있을 것이다. 선형 범위 내에서 측정 가능한 receptor의 최소농도는 0.05 nM (2.65 ng/mL) 정도이다. 또한, 일반적으로 상용화된 항체를 가지고 수행이 가능하다. 이 OsFIA 분석법은 기존의 실험적 sandwich immunoassay의 효과적인 대안으로 제시된다.

**REFERENCES**

1. Selvin, P. R. (2000), The renaissance of fluorescence resonance energy transfer, *Nat. struct. Biol.* **7**, 730-734.
2. Clapp, A. R., I. L. Medintz, J. M. Mauro, B. Fisher, M. G. Bawendi, and H. Mattoussi (2004), Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein

- acceptors, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 301-310.
3. Clegg, R. M. (1995), Fluorescence resonance energy transfer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 103-110.
4. Clegg, R. M. (2002), FRET tells us about proximities, distances, orientations and dynamic properties, *J. Biotechnol.* **82**, 177-179.
5. Hillisch, A., M. Lorenz, and S. Diekmann (2001), Recent advances in FRET: distance determination in protein - DNA complexes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 201-207.
6. Selvin, P. R. (1995), Fluorescence resonance energy transfer, *Methods Enzymol.* **246**, 300-334.
7. Lundin, K., K. Blomberg, T. Nordstrom, and C. Lindqvist (2001), Development of a time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay (Cell TR-FRET) for protein detection on intact cells, *Anal. Biochem.* **299**, 92-97.
8. Periasamy, A. and R. N. Day (1999), Visualizing Protein Interactions in living cells using digitized GFP imaging and FRET microscopy, *Methods Cell Biol.* **58**, 293-311.
9. Ruiz-Velasco, V. and S. R. Ikeda (2001), Functional expression and FRET analysis of green fluorescent proteins fused to G-protein subunits in rat sympathetic neurons, *J. Physiol.* **537**, 679-692.
10. Van Thor, J. J. and K. J. Hellingwerf (2002), Fluorescence resonance energy transfer (FRET) applications using green fluorescent protein. Energy transfer to the endogenous chromophores of phycobilisome light-harvesting complexes, *Methods Mol. Biol.* **183**, 101-119.
11. Ueda, H., K. Kubota, Y. Wang, K. Tsumoto, W. Mahoney, I. Kumagai, and T. Nagamune (1999), Homogeneous noncompetitive immunoassay based on the energy transfer between fluorolabeled antibody variable domains (Open Sandwich Fluoroimmunoassay), *Biotechniques* **27**, 738-742.
12. Arai, R., H. Nakagawa, K. Tsumoto, W. Mahoney, I. Kumagai, H. Ueda, and T. Nagamune (2001), Demonstration of a homogeneous noncompetitive immunoassay based on bioluminescence resonance energy transfer, *Anal. Biochem.* **289**, 77-81.
13. Pulli, T., M. Hoyhtya, H. Soderlund, and K. Takkinen (2005), One-step homogeneous immunoassay for small analytes, *Anal. Chem.* **77**, 2637-2642.
14. Alivisatos, A. P. (1996), Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots, *Science* **271**, 933-937.
15. Mattoussi, H., I. L. Medintz, A. R. Clapp, E. R. Goldman, J. K. Jaiswal, S. M. Simon, and J. M. Mauro (2004), Luminescent quantum dot-bioconjugates in immunoassays, FRET, biosensing and imaging applications, *JALA* **9**, 28-32.
16. Mattoussi, H., J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, and M. G. Bawendi (2000), Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 12142-12150.
17. Bruchez, J. M., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A. P. Alivisatos (1998), Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels, *Science* **281**, 2013-2016.

18. Chan, W. and S. Nie (1998), Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection, *Science* **281**, 2016-2018.
19. Tran, P. T., E. R. Goldman, G. P. Anderson, J. M. Mauro, and H. Mattoussi (2002), Use of luminescent CdSe-ZnS nanocrystal bioconjugates in quantum dot-based nanosensors, *Phys. Stat. Sol. B* **229**, 427-432.
20. Wang, S., N. Mamedova, N. A. Kotov, W. Chen, and J. Studer (2002), Antigen/antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates, *Nano Letters* **2**, 817-822.
21. Goldman, E. R., A. R. Clapp, G. P. Anderson, H. T. Uyeda, J. M. Mauro, I. L. Medintz, and H. Mattoussi (2004), Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents, *Anal. Chem.* **76**, 684-688.
22. Medintz, I. L., J. H. Konnert, A. R. Clapp, I. Stanish, M. E. Twigg, H. Mattoussi, and J. M. Mauro (2004), A fluorescence resonance energy transfer-derived structure of a quantum dot-protein bioconjugate nanoassembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 9612-9617.
23. Sapsford, K. E., I. L. Medintz, J. P. Golden, J. R. Deschamps, H. T. Uyeda, and H. Mattoussi (2004), Surface-immobilized self-assembled protein-based quantum dot nanoassemblies, *Langmuir* **20**, 7720-7728.
24. Fehr, M., W. B. Frommer, and S. Lalonde (2002), From the Cover: Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9846-9851.
25. Wang, G., J. Yuan, K. Matsumoto, and Z. Hu (2001), Homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay of bensulfuron-methyl by using terbium fluorescence energy transfer, *Talanta* **55**, 1119-1125.
26. Youn, H. J., E. Terpetschnig, H. Szmecinski, and J. R. Lakowicz (1995), Fluorescence energy transfer immunoassay based on a long-lifetime luminescent metal - ligand complex, *Anal. Biochem.* **232**, 24-30.
27. Oswald, B., F. Lehmann, L. Simon, E. Terpetschnig, and O. S. Wolfbeis (2000), Red laser-induced fluorescence energy transfer in an immunosystem, *Anal. Biochem.* **280**, 272-277.
28. Suzuki, C., H. Ueda, K. Tsumoto, W. Mahoney, I. Kumagai, and T. Nagamune (1999), Open sandwich ELISA with V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>-alkaline phosphatase fusion proteins, *J. Immunol. Methods* **224**, 171-184.