

직접결합방식 수정진동자 면역센서에 의한 C-Reactive Protein 검출

† 김 남 수 · 김 동 경 · 조 용 진

한국식품연구원

(접수 : 2007. 11. 4., 게재승인 : 2007. 12. 21.)

Detection of C-Reactive Protein Using Direct-binding Quartz Crystal Microbalance Immunosensor

N. Kim[†], D.-K. Kim, and Y.-J. Cho

Food Nano-Biotechnology Research Center, Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea

(Received : 2007. 11. 4., Accepted : 2007. 12. 21.)

A prognostic indicator of coronary heart disease, C-reactive protein, was tried to be determined by a batch-type quartz crystal microbalance immunosensor. The sensor was operated by direct-binding mode and the optimum concentration for the corresponding antibody for immobilization was 50 µg/ml. The reaction buffer for the system was 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0) and system operation was performed in the order of baseline stabilization, analyte addition and measurement, and regeneration of the sensor chip with 10 mM NaOH. When plotted in double-logarithmic scale, the sensor showed a linear detection range of 0.27-106.00 nM for rat C-reactive protein with the limit of detection of 0.53 nM. It also showed a good reusability.

Key Words : C-Reactive protein, quartz crystal microbalance, immunosensor, linearity, reusability

서 론

최근 건강기능식품법이 발효되면서 국내에서도 천연물을 기반으로 하여 식품소재 및 가공식품을 제조하고 이를 식약청에서 건강기능식품으로 인정받을 수 있도록 문호가 개방되었다. 그러나 이를 위해서는 신청하고자 하는 식품의 기능성 (예, 심혈관계 질환예방, 대사증후군 예방 등)을 과학적으로 입증하는 자료를 제시하여야 하므로 이들 식품에 대한 기능성평가의 중요성이 점차 증가하고 있다. 특정식품의 심혈관계 기능성을 생체 내 (*in vivo*)에서 검색할 수 있는 방법의 하나는 동물모델에서 식품의 섭취가 C-reactive protein (CRP) 및 저밀도 지단백질 (low density lipoprotein) 등과 같은 바이오마커의 혈액 내 소장에 미치는 영향을 평가하는 것인데(1), 이를 위한 수단인 하나로 선진국에서 최근 각광받고 있는 것은 감응성과 선택적 반응성이 좋은 바이오센서를 개발하여 이들 지표물질을 나노수준의 고감도로 실시간대에서 신속하게 측정하는 것이다(2).

CRP는 포유동물의 간에서 IL-6 및 IL-1 β 에 의한 유도자극으로 합성되는 분자질량 118 kDa 정도의 펜타머 단백질로서(3), 관상동맥질환, 고혈압 및 염증에 대한 주요한 바이오마커의 하나로 알려지고 있다(4-6). 기존의 CRP 측정법은 효소면역분석법을 이용하는 것으로 그 방법이 잘 정립되어 있고 측정에 따른 재현성과 감응도도 충분히 좋은 것으로 알려지고 있다(7-9). 그러나 다른 모든 광도측정법에서와 같이 효소면역분석법에서 얻어지는 반응신호는 반응용액 및 혈액, 타액, 분변 등의 다양한 시료에 존재하는 착색물질에 의한 저해를 받을 수 있어 이를 개선한 새로운 CRP 측정기술의 개발이 필요하며 발색제나 형광 프루브 등의 색원체를 분석과정에 사용하지 않는 비표지 면역센서 (label-free immunosensor)는 이를 위한 주요한 수단의 하나로 기대되고 있다(10). 수정진동자 (quartz crystal microbalance)를 변환기로 사용하는 면역센서는 비표지 계측원리의 친화성 기반 바이오센싱에 널리 이용되고 있으며 계측시스템을 간편하고 경제적으로 구성할 수 있는 동시에 센서모듈의 어레이화도 손쉽게 행할 수 있어 식품산업에서의 품질관리에 효율적으로 활용될 수 있다(11-13).

따라서, 수정진동자 면역센서를 식품의 기능성평가에 적용하기 위한 노력의 일환으로서 본 연구에서는 CRP를 실시간대에서 간편하게 측정할 수 있는 직접결합방식 수정진동자 면역센서를 구성하고 센서반응의 농도의존성과 센

† Corresponding Author : Food Nano-Biotechnology Research Center, Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea
Tel : +82-31-780-9131, Fax : +82-31-709-9876
E-mail : k9130sen@hanmail.net

서 칩의 재사용성을 살펴보았다.

재료 및 방법

시약 및 재료

측정대상물질인 쥐 유래 CRP는 R&D Systems사 (Minneapolis, MN, USA)의 재조합 단백질 (1744-CR/CF)이었으며 생물요소로서 CRP와 반응하는 항체 (MAB1744)는 동사의 단클론 항체이었다. 변환기상으로의 항체 고정화에 필요한 이형이기능성 티올화 가교화제인 sulfosuccinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)propionamido]hexanoate (sulfo-LC-SPDP)와 dithiothreitol은 각각 Pierce사 (Rockford, IL, USA)와 시그마-알드리치사 (St. Louis, MO, USA)의 것이었다. 완충용액 제조를 위한 염류 및 기타 시약은 시그마-알드리치사 제품이나 여러 제조원의 특급시약을 사용하였으며 물은 HPLC급 증류수를 구입하여 사용하였다. 변환기인 수정진동자로는 Seiko EG & G사 (Matsudo, Japan)에서 구입한 9 MHz의 AT-cut 수정웨이퍼를 사용하였는데, 여기에는 5 mm 직경의 금 전극이 상하 중앙에 부착되어 있으며 이 전극의 진동제 현성은 ± 0.1 Hz 수준이었다. 반응 셀로서 동사의 well holder (QA-CL4)를 사용하였다.

센서 칩으로의 항체 고정화

수정진동자 전극에 CRP에 대한 항체를 고정화하여 면역 센서 칩을 제조하였는데 그 구체적인 방법은 선행연구에서 수정진동자상으로의 항체 혹은 효소 고정화 시 효율성이 확인된 바 있는 티올화 단백질을 이용한 단분자층 (self-assembled monolayer) 형성법(11, 14)을 부분적으로 변형하여 아래와 같이 수행하였다. 즉 수정결정의 금 전극 표면을 전극선이 닿지 않도록 주의하며 1.2 M NaOH와 1.2 M HCl에 각각 5분간 순차적으로 담가 처리하고 그 사이에 각각 증류수로 세척하였다. 이 후 진한 HCl을 1분간 처리한 후 증류수로 세척하고 대류 오븐에서 20분간 건조하였다. 상기의 동결건조 항체에 0.1 M PBS (0.1 M NaCl 포함)를 가하여 회수한 후 이를 적절한 농도로 희석한 용액 30 μ l에 증류수에 용해한 동량의 20 mM sulfo-LC-SPDP를 가하여 1시간 반응시켰다. 이 후 반응항체의 이황화 결합을 환원하여 티올기를 노출시키기 위하여 dithiothreitol 용액 20 μ l을 30분간 처리하였다. 이렇게 제조한 티올화 항체 10 μ l을 수정진동자의 금 전극 표면에 고르게 도포한 후 실온에서 1시간 건조시키고 증류수 및 반응완충용액인 0.1 M 인산완충용액 (pH 7.0)으로 연속하여 씻어주었다.

계측시스템 구성 및 센서반응 측정

CRP 검출 직접결합방식 면역센서의 계측시스템은 기존 보문(14)을 참고하여 다음과 같이 구성하였다. 먼저 항체가 고정화된 수정진동자 센서 칩을 well holder 내부에 장착하고 이를 진동수측정기 (QCA 917, Seiko EG & G사)에 연결된 발전모듈 (QCA 917-11, Seiko EG & G사)의 접속부에 삽입하였다. 이 때 진동수측정기에 나타나는 아날로그 신호는 GPIB interface에 의하여 디지털 신호로 컴퓨터에 입

력되었다. 시스템의 작동은 WinEchem software (version 1.12, Seiko EG & G사)에 의하여 다음과 같이 행하였다. 즉 CRP에 대한 항체를 고정화하여 제조한 면역센서 칩을 장착한 well holder 반응 셀에 250 μ l의 반응완충용액을 가한 후 공명진동수 변화를 측정하여 정상상태의 공명진동수(F_1)를 확인하였다. 이 후 다양한 농도로 희석하여 제조한 CRP 용액 250 μ l을 반응 cell에 가하여 항원·항체반응을 유도하였다. 이 때 Sauerbrey식(15)에 의하여 센서 칩 표면에서 질량축적에 따른 진동수감소가 나타나기 시작하여 일정시간 경과 후 정상상태의 공명진동수 (F_2)가 나타났으며 이로부터 센서반응에 해당하는 진동수변화 (frequency shift, ΔF)를 계산하였다($\Delta F = F_1 - F_2$).

결과 및 고찰

항체농도에 따른 센서반응

본 연구의 직접결합방식 면역센서는 CRP에 대한 항체를 수정진동자 센서 칩 표면에 고정화하고 여기에 측정대상물질인 CRP가 결합할 때 나타나는 질량축적에 따른 진동수변화를 측정하는 원리에 따르며, 이 때 계측시스템의 반응완충용액으로 센서 칩의 안정성이 양호하고 시료에 의한 매트릭스 효과를 어느 정도 배제할 수 있는 이온강도를 지닌 0.1 M 인산완충용액 (pH 7.0)을 사용하였다(15, 16).

Table 1. Sensor responses according to CRP concentrations at the anti-CRP antibody concentrations of 50 and 500 μ g/ml for immobilization

CRP (nM)	Frequency shift (Hz) ^a	
	Anti-CRP antibody (μ g/ml)	
	50	500
0.27	2.17 \pm 1.16	2.16 \pm 1.52
0.53	3.32 \pm 0.79	2.21 \pm 1.07
1.06	6.11 \pm 1.21	2.92 \pm 0.18
2.65	9.80 \pm 0.48	6.01 \pm 1.11
10.60	19.91 \pm 1.22	9.97 \pm 1.26
26.50	37.71 \pm 1.64	17.69 \pm 1.34
53.00	49.58 \pm 1.03	37.05 \pm 1.26
106.00	78.62 \pm 2.22	59.31 \pm 1.15

^aFive values of resonant frequency at adjacent measuring time were averaged after the steady-state sensor response was attained.

측정대상물질인 CRP의 농도를 0.27에서 106.00 nM 범위에서 변화시키면서 반응 셀에 가하였을 때 나타나는 진동수변화를 센서 칩의 고정화에 사용한 항체농도를 50 및 500 μ g/ml로 하여 측정하였다. Table 1에서 볼 수 있는 것처럼 CRP의 농도가 증가함에 따라 항체농도 50 및 500 μ g/ml에서의 센서반응은 각각 2.17 \pm 1.16에서 78.62 \pm 2.22와 2.16 \pm 1.52에서 59.31 \pm 1.15 Hz의 범위에서 농도 의존적으로 증가하였다. 반응 셀로 반응완충용액 자체를 주입하였을 때의 진동수변화가 1.57에서 2.47 Hz인 점을 고려해 볼 때 CRP가 항원·항체반응에 의하여 센서 칩에 결합하고 이에 따른 질량축적에 의하여 센서반응이 나타났음을 알 수 있

었다. Table 1의 결과로부터 고정화 시 센서감응을 높게 해 주는 항체농도에는 적정치가 있었는데, 이는 그 이상의 항체농도에서는 고정화 층이 두껍게 형성되어 항원의 결합은 추가로 증대시키지 못하는 반면 항원의 결합부위가 진동반응의 중심인 금 전극 표면에서 보다 멀어짐에 따라 발생하는 현상으로 생각되었다(17). 실제로 항체농도를 1000 및 5000 µg/ml로 증가시켰을 때 CRP 농도에 따른 센서반응은 항체농도가 500 µg/ml인 경우와 비슷하거나 낮게 나타났다.

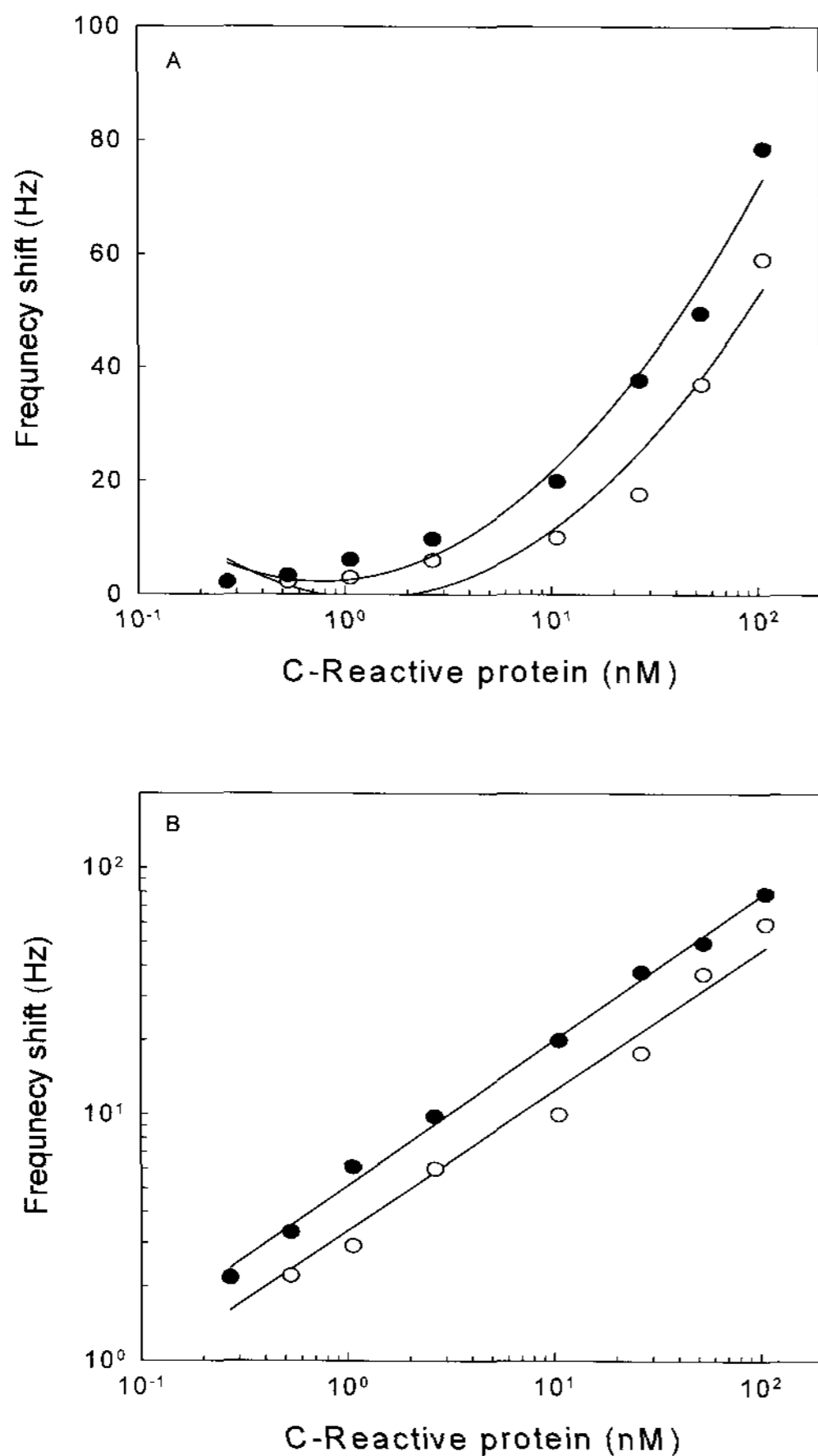


Figure 1. Relationships between analyte concentration and sensor response plotted in semi-logarithmic (panel A) and double-logarithmic scale (panel B). Antibody concentrations for immobilization (●, 50; ○, 500 µg/ml).

CRP 농도와 진동수변화와의 관계를 반대수척도로 나타내면 진동수변화가 CRP 농도에 의하여 결정되는 전형적인 1차 반응특성을 보여주었고(Fig. 1의 panel A) 이를 이중로그척도로 표시하면 Fig. 1의 panel B에서와 같이 직선상의 관계를 나타내었는데(17), 이 때 그 회귀 식은 고정화에 사용된 항체농도가 50 및 500 µg/ml일 때 각각 $Y = 0.59 X + 0.71 (r = 0.9980)$ 과 $Y = 0.57 X + 0.53 (r = 0.9869)$ 이었다(X와 Y는 각각 CRP 농도와 센서반응의 로그 값임). 아울러 상기에 서술한 바와 같이 반응완충용액 자체를 주입하였을 때의 진동수변화와 baseline drift에 대한 표준편차의 3배 값을 고려하였을 때 본 연구의 직접결합방식 수정진동자 면역센서의 CRP에 대한 검출한계를 0.53 nM로 추정하였는데 이 값은 63 ng/ml의 CRP 농도에 해당하고

SPR 및 자기 기반 면역센서에 의한 기존의 CRP 계측에서 보고되고 있는 검출한계 범위인 1-2000 ng/ml의 범위 내에 속하는 것으로 나타났다(10, 18, 19).

재사용성

앞서 서론에서 언급한 바와 같이 비표지 면역센서에 의한 CRP 계측은 기존의 효소면역분석법에 비하여 착색물질에 의한 측정저해를 거의 받지 않으며, 또한 생물요소인 항체가 변환기상에 고정화되어 있으므로 적절한 재생공정을 도입하면 반복하여 사용할 수 있고 이를 통하여 분석경비의 절감을 이룰 수 있는 장점이 있다. 그러나 반복사용에 따라 고정화된 항체 층이 부분적으로 손상되어 센서반응이 점차 감소할 수 있다는 기존의 보고(20)에 따라 본 연구에서는 10 mM NaOH를 재생용액으로 하고(21) 53.00 nM의 CRP를 반응 셀에 반복주입 함에 따른 센서감응의 변화를 살펴보았다. 그 결과 9회 반복측정에 따른 평균진동수변화는 35.18 ± 2.79 Hz로서 1회 차 측정 시의 센서반응인 33.71 Hz의 104.4%이었고 9회 차 측정 시의 센서반응도 34.69 Hz로 나타나 본 연구의 CRP 검출 면역센서 칩은 센서반응의 감소 없이 9회 정도 반복하여 사용할 수 있을 것으로 기대되었다.

이상의 결과로부터 본 연구의 직접결합방식 수정진동자 면역센서는 심혈관계 바이오마커의 하나로 보고되고 있는 CRP의 농도변화를 민감하게 측정할 수 있음을 확인하였고 이를 통하여 실험동물의 혈액 중 CRP 농도에 대한 실시간 대의 계측수단으로서 개발될 수 있을 것으로 기대되었다. 향후 batch 혹은 연속형의 간접결합방식 계측포맷 도입에 의하여 센서감응을 더욱 향상시키고자 하며 혈청 등 실제 시료를 사용한 분석도 추진할 예정이다.

요 약

관상심장질환 바이오마커의 하나인 CRP를 batch형 수정진동자 면역센서에 의하여 다음과 같이 분석하였다. 센서 시스템의 작동은 직접결합방식에 의하여 행하였으며 CRP에 대한 항체의 최적 고정화농도는 50 µg/ml이었다. 시스템의 반응완충용액으로 0.1 M 인산완충용액 (pH 7.0)을 사용하였고 시스템 작동은 baseline 안정화, 시료첨가 및 측정, 10 mM NaOH에 의한 센서 칩 재생의 순으로 행하였다. 이중로그척도로 표시하였을 때 0.27-106.00 nM 범위의 쥐 유래 CRP에 대하여 센서반응과 직선상의 관계를 이루었으며 센서의 검출한계는 0.53 nM이었고 재사용성도 양호하였다.

감 사

본 연구는 한국식품연구원 식품나노기술 개발사업의 하나 (E071004)로 수행된 것이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Nicolle, C., Cardinault, N., Gueux, E., Jaffrelo, L., Rock, E., Mazur, A., Amouroux, P., and C. Révész (2004), Health effect of vegetable-based diet: lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat, *Clin. Nutr.* **23**, 605-614.
- Sapsford, K. E., Charles, P. T., Patterson Jr., C. H., and F. S. Ligler (2002), Demonstration of four immunoassay formats using the array biosensor, *Anal. Chem.* **74**, 1061-1068.
- Weinhold, B. and U. Rütger (1997), Interleukin-6-dependent and independent regulation of the human C-reactive protein gene, *Biochem. J.* **327**, 425-429.
- Rifai, N. and P. M. Ridker (2001), High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease, *Clin. Chem.* **47**, 403-411.
- Wolf, M., Juncker, D., Michel, B., Hunziker, P., and D. Emmanuel (2004), Simultaneous detection of C-reactive protein and other cardiac markers in human plasma using micromosaic immunoassays and self-regulating microfluidic networks, *Biosens. Bioelectron.* **19**, 1193-1202.
- Gabay, C. and I. N. Kushner (1999), Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *New Engl. J. Med.* **340**, 448-454.
- Parra, M. D., Tuomola, M., Cabezas-Herrera, J., and J. J. Ceron (2005), Use of a time-resolved immunofluorometric assay for determination of canine c-reactive protein concentrations in whole blood, *Am. J. Vet. Res.* **1**, 62-66.
- Dominichi, R., Luraschi, P., and C. Franzini (2004), Measurement of c-reactive protein: Two high sensitivity methods compared, *J. Clin. Lab. Anal.* **18**, 280-284.
- Clarke, J. L., Anderson, J. L., Carlquist, J. F., Roberts, R. F., Horne, B. D., Bair, T. L., Kolek, M. J., Mower, C. P., Crane, A. M., Roberts, W. L., and J. B. Muhlestein (2005), Comparison of differing c-reactive protein assay methods and their impact on cardiovascular risk assessment, *Am. J. Cardiol.* **1**, 155-158.
- Meyer, M. H. F., Hartmann, M., Krause, H.-J., Blankenstein, G., Mueller-Chorus, B., Oster, J., Miethe, P., and M. Keusgen (2007), CRP determination based on a novel magnetic biosensor, *Biosens. Bioelectron.* **22**, 973-979.
- Park, I.-S. and N. Kim (1998), Thiolated *Salmonella* antibody immobilization onto the gold surface of piezoelectric quartz crystal, *Biosens. Bioelectron.* **13**, 1091-1097.
- Babacan, S., Pivarnik, P., Letcher, S., and A. G. Rand (2000), Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application, *Biosens. Bioelectron.* **15**, 615-621.
- Martin, S. P., Lynch, J. M., and S. M. Reddy (2002), Optimisation of the enzyme-based determination of hydrogen peroxide using the quartz crystal microbalance, *Biosens. Bioelectron.* **17**, 735-739.
- Kim, N., Park, I.-S., and D.-K. Kim (2007), High-sensitivity detection for model organophosphorus and carbamate pesticide with quartz crystal microbalance-precipitation sensor, *Biosens. Bioelectron.* **22**, 1593-1599.
- Park, I.-S. and N. Kim (1999), Rapid detection of *Salmonella* spp. by antibody immobilization with gold-protein A complex, *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 1-6.
- Kim, N., Park, I.-S., and D.-K. Kim (2004), Characteristics of a label-free piezoelectric immunosensor detecting *Pseudomonas aeruginosa*, *Sens. Actuators B: Chem.* **100**, 432-438.
- G. Sauerbrey (1959), Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, *Z. Phys.* **155**, 206-222.
- Meyer, M. H. F., Hartmann, M., and M. Keusgen (2006), SPR-based immunosensor for the CRP detection- A new method to detect a well known protein, *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1987-1990.
- Vikholm-Lundin, I. and W. M. Albers (2006), Site-directed immobilisation of antibody fragments for detection of C-reactive protein, *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1141-1148.
- Pyun, J. C., Beutel, H., Meyer, J.-U., and H. H. Ruf (1998), Development of a biosensor for *E. coli* based on a flexural plate wave (FPW) transducer, *Biosens. Bioelectron.* **13**, 839-845.
- Minunni, M. and M. Mascini (2000), A piezoelectric biosensor as a direct affinity sensor, In *Optical Sensors and Microsystems. New Concepts, Materials, Technologies*, S. Martellucci, A. N. Chester, and A. G. Mignani, Eds., p. 143, Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, New York.