

Protein-A의 LB막을 이용한 HDL과 LDL의 형광 면역분석법의 개발

임인희, 민준홍, 박준효*, 최정우, 이원홍
서강대학교 화학공학과, (주)코오롱 유화*

Fluorescence Immunoassay for the Detection of HDL and LDL Using Protein-A LB Film

In Hee Lim, Junhong Min, Jun Hyu Park*, Jeong-Woo Choi and Won Hong Lee
Dept. of Chem. Eng., Sogang Univ., Kolon Chemical Co., Ltd.*

서론

혈액 내에는 콜레스테롤의 운반을 위한 두 종류의 주요 운반체가 존재한다. 두가지 운반체중 한 운반체가 혈관벽에 증착되어 혈액의 흐름을 방해하는 응집체의 발생을 유발시킨다. 이러한 두 종류의 운반체로는 high density lipoprotein (HDL) 그리고 low density lipoprotein(LDL)이 있으며, 정상인의 경우 각각의 운반체는 혈액내에 존재하는 콜레스테롤의 25% 그리고 75%를 인체의 각 기관으로 운반한다[1]. 운반체인 HDL의 혈중농도와 동맥경화증의 발병위험도는 반비례하며, LDL의 혈중농도는 비례한다[1-3]. 따라서, 일정량 이상의 LDL과 일정량 이하의 HDL이 혈액내에 존재하게 되면 동맥경화증과 같은 병이 발생할 수 있다. 이러한 HDL과 LDL의 농도측정을 위하여 빠르고 간단하며, 재사용이 가능한 광을 이용한 분석방법의 개발이 필요하다.

본 연구의 목적은 protein-A Langmuir-blodgett(LB)막을 이용하여 혈액내에 존재하는 HDL 및 LDL의 측정을 위한 형광성을 이용한 면역반응의 측정시스템을 개발하는 것이다. 항체의 단분자막을 형성시키기 위한 protein-A LB막의 누적조건과 anti-HDL과 anti-LDL의 결합을 조사하고, 형광이 약한 HDL과 LDL의 형광을 증대시키는 방법과 검출범위, 응답시간 및 안정성등을 연구한다.

실 험

Protein-A의 LB막 형성

Protein-A(5mg/vial, SIGMA, St. Louis, MO)를 LB기법으로 유리기관위에 막을 형성하기 위하여 유리기관을 *o*-octadecyltrichlorosilane(SIGMA)용액을 사용하여 소수성처리를 한다. 1mM HEPES(SIGMA)완충용액위에 stearytrimethylammonium chloride와 archidic acid methyl easte(1:4)를 혼합한 지질이 circular trough(NIMA TECH., London)위의 수면상에 단분자막을 형성시킨 후 protein-A를 뿌려 지질에 흡착시켜 소수성처리된 기관위에 protein-A가 흡착된 지질 단분자막으로 LB막을 형성한다.

항체의 고정화

Anti-HDL과 anti-LDL 항체(SIGMA)는 각각 시료내에 존재하는 항원인 HDL(cholesterol: >25 μ g/mg of protein, SIGMA)와 LDL(cholesterol: >500 μ g/mg of protein, SIGMA)를 인식하여 면역반응을 한다. 이 항체를 고정화하기 위하여 protein-A막이 형성된 기관을 항체용액내에 12시간동안 방치하여 protein-A LB막과 결합시켜 항체를 기관위에 고정화한다.

형광 측정

형광측정장치는 그림 1과 같이 광원부분(150W Xenon lamp, ORIEL, Stratford, CT.), 광전달부분(Optical fiber, ORIEL)과 광검측부분(Spectrograph and Photodiode array, ORIEL)로 구성되어 있다. 반응기는 항체가 고정화된 기판을 고정할 수 있는 육면체 반응기이며 외부의 빛에 의한 간섭을 줄이기 위해 비발광물질로 코팅되어 있다.

고정화된 항체와 HDL 또는 LDL과 면역반응하기 위하여 항원용액내에 각각 10분, 15분동안 방치하여 항원-항체반응시킨다. 항원-항체반응에 의하여 기판위에 고정화된 항체와 반응한 항원을 pH2.4인 glycine(1M, 15ml: SIGMA)완충용액내에 5분동안 방치하여 항체를 고정화 항원과 분리한 후 *o*-phthalaldehyde(0.5ml, SIGMA)와 2-mercaptoethanol(0.5ml, SIGMA)를 완충용액내에 첨가하여 HDL과 LDL의 형광의 세기를 증폭시켜 형광을 측정한다[4].

결과 및 토론

Protein-A의 LB막 형성 : π -A Curve

Protein-A는 pH7.0 완충용액내에서 (-)전하를 띠므로 (+)전하를 띠는 지질과 흡착을 하게된다[4]. 순수 지질단분자막과 protein-A가 흡착된 지질단분자막의 π -A isotherm을 비교한 결과는 그림 2와 같다. 순수 지질단분자막과 protein-A가 고정화된 단분자막의 π -A isotherm을 비교하면, 임계면적이 30~80cm²의 범위정도 이동하였다. 이것은 지질 단분자막의 한 분자가 차지하는 임계면적은 protein-A가 흡착된 지질의 단분자막의 경우 한 분자가 차지하는 임계면적보다 작음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 protein-A가 순수지질 단분자막에 흡착되어 지질과 지질분자사이로 protein-A분자가 들어감으로써 분자당 차지하는 면적이 늘어난 것으로 생각된다.

HDL과 LDL의 형광 측정

HDL과 LDL의 형광은 앞의 광섬유 형광센서를 이용하여 측정한 형광의 세기는 그림3과 같다. LDL은 단백질과 지질부위에 따라 여러가지 여기/형광파장을 가지고 있는데[5], 본 실험장치를 사용하여 355 nm에서 여기되어, 430nm의 형광을 방출하는 것을 알 수 있었다. 또한 HDL도 LDL과 유사한 분자구조를 가지고 있으므로 260과 300nm의 여기파장을 가지고 있으며, 각각의 형광파장은 290과 440nm이다. 그러나 본 실험장치를 사용하여 측정된 형광의 세기가 약하여 HDL 또는 LDL과 반응하여 새로운 형광물질을 생성하는 *o*-phthalaldehyde를 첨가하여 약 5분정도 반응시키면 340nm에서 여기되어 455nm에서 형광을 측정하여 신호대 잡음의 비를 증가시켜 HDL과 LDL의 양을 측정하였다.

형광 측정

LB기법으로 고정화된 항체와 항원인 HDL 또는 LDL사이의 항원-항체반응을 시간에 따라 측정한 형광은 그림 4와 같다. HDL과 LDL은 고정화된 항체와 반응하여 각각 10분과 15분의 반응시간을 가진다.

항원-항체반응을 15분동안 시킨 후, 측정된 HDL과 LDL의 농도에 따른 검측 범위는 그림 5와 같다. HDL의 검측범위는 40~230mg/dl이고, LDL의 검측범위는 20~200mg/dl에 선형성을 나타내었으며, 이 검측범위는 동맥경화증 발병 위험수치인 98mg/dl(HDL)과 114mg/dl(LDL)을 검측하는데 충분한 검측범위를 나타내었다. 형광의 세기에 대한 완충용액의 pH에 따라 형광의 세기는 pH5.0이하에서 급격하게 감소하는 것을 볼 수 있었다.

결론

본 연구에서는 항원을 LB기법을 사용하여 기관위에 고정화시켜 항체인 HDL과 LDL을 항원-항체반응을 통하여 형광의 세기로써 항원의 양을 측정하는 원리를 개발하였다. 유리나 실리콘 기관위에 적당한 지질을 사용하여 protein-A를 고정화시켜 항체를 protein-A LB막위에 고정화시키므로써, 시료내에 있는 항원을 선택적으로 분리해내어 시료내에 존재하는 다른 물질에 의한 간섭을 줄이고, 순수한 HDL 또는 LDL의 형광의 세기를 증폭시켜 형광의 세기로써 항원의 양을 검출하였다. 본 연구에서 제안된 형광 면역분석법은 HDL과 LDL에 대하여 각각 40~230mg/dl, 20~200mg/dl의 검출범위를 가지며, 측정시간은 각각 10분과 15분이다. 또한 pH5.0이상에서 위의 검출범위에서의 농도와 형광사이의 선형성을 볼 수 있었으며, 형광의 세기를 증폭시킴으로써 형광 면역센서의 감도와 선택도를 높일 수 있었다. 본 연구에서 개발한 형광 면역측정의 원리는 HDL과 LDL을 측정하기 위한 광센서의 구성에 이용될 수 있다.

참고문헌

1. ELDAN TECH : "Immunoturbidimetric assay kit for the determination of serum apolipoprotein B and A-I concentration", Israel(1993).
2. Lawn, R.M.: "Lipoprotein(a) in heart disease", *Scientific American*, **June** (1992).
3. Frohlich, J.J. and Pritchard, P.H.: *Clin. Biochem.*, **22**, 417(1989).
4. Sriyudthsak, M., Yamagishi, H. and Moriizumi, T.: *Thin Solid Films*, **160**, 463 (1988).
5. Koller, E., Quehenberger, O., Jurgens, G., Whlfbeis, O.S. and Esterbauer, H.: *FEPS*, **198**, 229(1986).

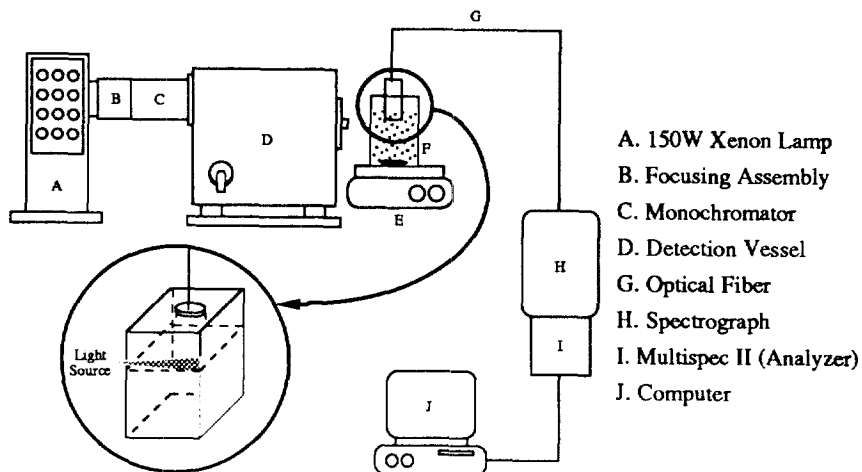


Figure 1. Schematic diagram of fluorescence immunoassay detection system

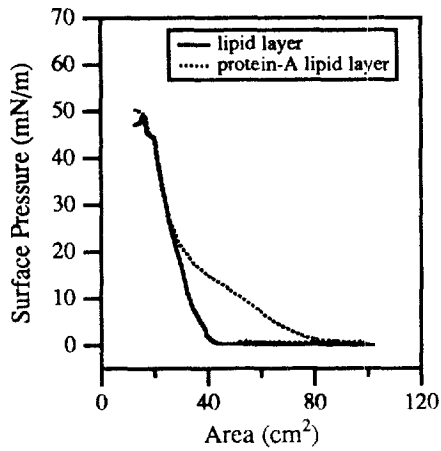


Figure 2. π -A curve of lipid layer and protein-A lipid layer

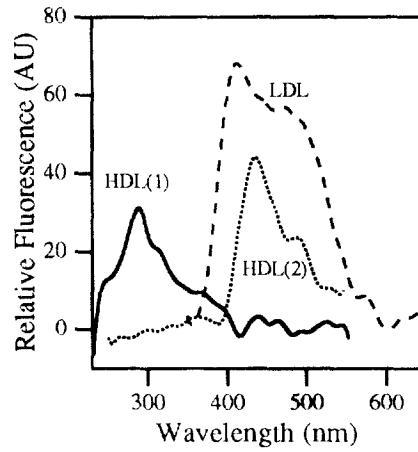


Figure 3. Fluorescence of HDL and LDL at excitation wavelength (HDL(1): 260nm, HDL(2):300nm, LDL:355nm)

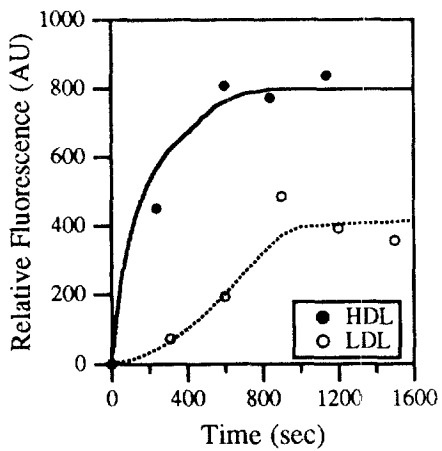


Figure 4. Transient response of immuno-reaction of HDL or LDL and immobilized antibody

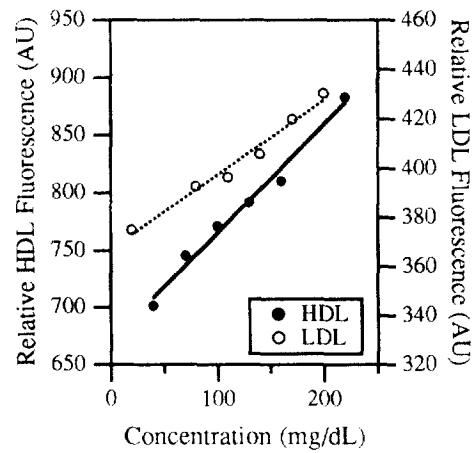


Figure 5. Fluorescence signal of HDL and LDL