소형 표면 플라즈몬 공명 센서와 이합체 구조를 가진 SAM을 이용한 CRP 검출

신은정 · 정은정 · 조진희 · 황동환 · 손영수*

A portable surface plasmon resonance sensor system for detection of C-reactive protein using SAM with dimer structure

Eun Jung Sin, Eun Jung Joung, Jin Hee Jo, Dong Hwan Hwang, and Young-Soo Sohn*

Abstract

The detection of C-reactive protein(CRP) using self-assembled monolayer(SAM) was investigated by a portable surface plasmon resonance(SPR) sensor system. The CRP is a biomarker for the possible cardiovascular disease. The SAM was formed on gold(Au) surface to anchor the monoclonal antibody of CRP(anti-CRP) for detection of CRP. Sequence injection of the anti-CRP and bovine serum albumin(BSA) into the sensor system has been carried out immobilize the antibody and to prevent non-specific binding. The portable SPR system has two flow channels: one for the sample measurements and the other for the reference. The output SPR signal was increased with the injection of the anti-CRP, BSA and CRP due to binding of the proteins on the sensor chip. The valid output SPR signals was linearly related to the critical range of the CRP concentration. The experimental results showed the feasibility of the portable SPR system with newly developed SAM to diagnose a risk of the future cardiovascular events.

Key Words : C-Reactive Protein, surface plasmon resonance, self assembled monolayer, immunosensor

1. 서 론

최근 나노 기술과 생명 공학 기술이 발전하면서 바이오센서에 대한 연구가 더욱더 활발히 이루어지고 있다. 바이오센서는 측정하고자 하는 단백질이나 효소 등의 생분자를 선택적으로 인식하여 검출해낼 수 있는 장치로, 생분자 간의 상호작용을 분석하기 위해 유용하게 사용 된다^[1]. 최근 건강과 질병 예방에 대한 관심이 증폭됨에 따라 실시간 측정이 가능한 고감도의 바이오센서를 이용한 질병의 조기 진단에 대한 연구가 주목받고 있다. 대부분의 조기 진단은 질병과 밀접한 관련이 있는 인자의 검출을 통해 이루어지며, 항원-항체 결합을 이용하는 면역 센서는 이러한 조기 진단을 위한 대표적인 바이오센서이다. 항원과 항체 사이의

강한 특이 인식력에 바탕을 둔 면역센서는 주로 금속이나 유리, 고분자(polymer), 실리콘 등의 고체 표면에서 관련 인자를 검출한다. 따라서 생체 내 또는 혼합 용액 안에서 측정하고자 하는 관련 인자를 선택적으로 검출 할 수 있다^[2,3]. 연구 및 임상 분야에서 면역 센서로 활용되는 센서로는 Quartz Crystal Microbalance (QCM)^[4], Neutron Reflection(NR)^[5], Fourier Transform Infrared Spectroscopy(FTIR)^[6], Field Effect Transistor(FET)^[7] 등 다양한 종류가 있는데, 그 중 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 센서는 금속 박막에 빛을 입사시켜 나타나는 공명각의 변화를 측정하여 박막 위에 흡착되는 물질들의 상호작용을 검출하는 센서이다. 이러한 SPR 센서는 금속 박막 표면에서 발생하는 생분자들의 상호 작용을 실시간으로 측정할 수 있으며 표지자를 필요로 하지 않는다^[8]. 또한 아주 작은 굴절률 차이를 감지할 수 있기 때문에 높은 분해능을 가진다는 장점이 있다^[1,9,10]. 이러한 SPR 센서에 사용되는 금속으로는 화학적으로 안정

대구가톨릭대학교 의공학과(Department of Biomedical Engineering, Catholic University of Daegu)

*Corresponding author : sohnys@cu.ac.kr

(Received : September 16, 2010, Revised : October 22, 2010

Accepted : November 3, 2010)

적이며 표면 플라즈몬 공명 현상을 일으키기 쉬운 금속인 금, 은 등이 있다^[9].

유리 위의 금속 박막, 즉 SPR sensor chip 위에 생분자를 고정시키기 위한 방안으로는 자기 조립 단분자층(self-assembled monolayer, SAM)을 이용하는 방법이 대표적이다^[11]. SAM은 물질 표면과 SAM의 유기 분자간의 상호작용에 의해 주어진 표면에 자발적으로 균일하게 형성되는 단분자막이며 사용 목적에 따라 분자막의 작용기를 조정할 수 있기 때문에 물질 표면의 기능화를 위해 널리 사용된다^[11,12]. C-reactive protein(CRP)은 급성 염증성 단백질로, 체내에 염증이 발생하면 간에서 생성되는 물질이다. CRP는 감염 및 염증성 질환의 진단 및 치료 후 경과 관찰에 이용할 수 있으며, 최근에는 CRP의 농도가 높을 때 뇌졸중과 심근경색증의 위험도가 높다는 사실이 알려져 심혈관계 질병의 조기 진단 인자로서 활발히 연구되고 있다^[13]. 혈중 1 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 1 $\mu\text{g/ml}$ ~3 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 CRP 농도는 각각 심혈관계 질병 발생률의 낮음, 보통, 높음을 나타낸다. 또한 10 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 혈중 CRP 농도는 급성 염증성 질환을 진단할 수 있다^[13,14].

본 연구에서는 소형화된 SPR 센서를 활용하여 sensor chip 위에 이합체 구조를 가진 SAM을 형성하고 이를 이용해 anti-CRP를 고정시켜 농도별 CRP를 측정하였다. 실험 결과를 통해 소형 SPR 센서와 사용된 SAM의 진단용 바이오센서로서의 이용 가능성을 조사하였다.

2. 실험 방법

2.1. SPR 센서

본 실험에서는 기존의 SPR 센서에 비해 작은 부피를 가지는 SPRmicro(K-MAC, Korea)를 사용하였다. SPRmicro의 부피는 45 mm×140 mm×130 mm로, Fig. 1에 나타나있다. 이 센서 시스템은 780 nm의 LED 광원과 2D CMOS 검출기를 사용한다. 광원은 Fig. 2와 같이 7.4°(61.3°~68.7°) 범위의 입사각으로 금속 박막에 입사되고 2D CMOS로 검출된 반사광 중 세기가 가장 약한 반사광의 입사각을 측정하여 공명각을 구한다. 또한 SPRmicro는 두 개의 채널을 보유하고 있어 하나의 채널을 기준 채널(reference)로 사용할 수 있다. 따라서 주위 환경에 의한 잡음 신호 등 거짓 양성(false-positive) 신호를 제거할 수 있어 정확한 생분자간의 신호를 얻을 수 있다. Fig. 1에 실제 실험에 사용된 SPRmicro, 시료 주입 밸브, 연동 펌프, 가스 제거기 등을 나타내었다.

Fig. 1. The SPR sensor system including SPRmicro, injection valve, degasser, and peristaltic pump for experiments.

Fig. 2. Schematic diagram of SPR sensor.

2.2. SAM의 형성

실험에 앞서 SPR gold chip을 piranha 용액(황산(H_2SO_4):과산화수소(H_2O_2)=3:1)을 이용하여 세척한 후 DI-water로 잔여물을 제거한 다음 질소(N_2) 가스로 건조시켰다. 그 후 SAM 용액(1 mM in chloroform, K-MAC)에 12시간 동안 반응시켜 SPR gold chip 표면에 SAM이 형성 되도록 하였다. 반응 후 chip을 ethanol로 세척한 다음 N_2 가스를 이용하여 건조시켰다.

본 실험에서 사용된 SAM은 K-MAC사에서 제조된 것으로 이합체(dimer) 구조를 가지며, 한 쪽 말단에는 금과 매우 강한 결합을 형성하는 thiol 기를 가지고 있고 또 다른 말단은 작용기인 N-hydroxysuccinimide

ide(NHS) group으로 구성되어 있다. NHS는 단백질의 1차 amine과 반응하는 특성을 가지기 때문에 단백질의 측정에 유용하게 사용될 수 있다^[15].

2.3. Anti-CRP의 고정

Anti-CRP는 CRP와 특이적으로 결합하는 항체로, CRP를 검출하기 위하여 SPR gold chip 표면에 고정되었다. SAM이 형성된 SPR gold chip을 SPRmicro에 장착한 후 두 개의 채널 중 하나에 시료를 순차적으로 주입하였다. 다른 하나는 시료의 용매로 사용된 PBS를 계속적으로 주입하여 기준 채널로 사용하였다. 가장 먼저 두 채널 모두 PBS를 주입하여 신호의 평형을 잡은 후 시료 채널에만 150 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 anti-CRP(R&D systems, inc. USA)를 주입 하였다. Anti-CRP에 의해 SPR 센서의 신호가 증가하는 것을 확인 한 다음 PBS 용액을 주입하여 완전히 결합하지 않은 anti-CRP를 제거 해주었다. 이와 같은 방법으로 chip 표면에 anti-CRP를 고정시킨 후 비특이적인 결합을 막기 위하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 Bovine Serum Albumin(BSA, sigma)을 주입하였다. 그 후 chip 위에 불안정하게 남아있는 단백질을 제거하기 위하여 PBS 용액을 충분히 주입해주었다. 본 실험에서는 주입 밸브를 이용하여 PBS 용액을 제외한 모든 시료의 양을 100 μl 로 통일하였다.

2.4. CRP의 검출

실험을 통하여 네 가지 농도의 CRP를 측정 하였다. 사용된 CRP(R&D systems, inc. USA)의 농도는 1, 3, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 이다. 각 농도별로 총 3번의 실험을 수행 하였으며, CRP 검출을 위한 전 처리 조건은 모두 동일 했다. Anti-CRP가 고정된 SPR gold chip 위에 농도별 CRP 용액을 주입 하였다. CRP에 의해 SPR 센서의 신호가 변화하는 것을 확인한 후 완전히 결합하지 않은 CRP를 제거하기 위하여 PBS 용액을 주입하였고, 신호가 안정화 되었을 때의 그 값을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. AFM 측정

Atomic Force Microscopy(AFM) 이미지를 이용하여 각 단백질의 흡착에 따른 sensor chip의 표면 변화를 Fig. 3에 나타내었다. SPR 센서를 이용하여 CRP를 측정하기 위해 표면을 처리하는 단계별로 샘플을 준비하였으며, 모든 이미지의 스캔 사이즈는 $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ 이다. Fig. 3(a)는 gold chip 위에 SAM이 형성된 후의 표면 상태를 관찰한 이미지이다. 이 경우 roughness의

Fig. 3. AFM images of (a) SAM, (b) SAM/anti-CRP, (c) SAM/anti-CRP/ BSA, (d) SAM/anti-CRP/BSA/CRP surfaces.

root means square(rms) 값은 0.994 nm였다. Fig. 3(b)는 SAM 위에 anti-CRP를 고정 시킨 후 측정한 것으로, 1.82 nm의 rms 값을 보였다. Fig. 3(c)는 anti-CRP 반응 후 BSA를 처리한 샘플이며 측정값은 1.94 nm였다. Fig. 3(d)는 anti-CRP, BSA 그리고 CRP까지 모두 처리한 것으로 rms 값은 3.10 nm로 나타났다. 각 단계별로 rms 값이 증가하였고, 이러한 rms 값을 통하여 SAM이 균일하게 형성된 것을 파악할 수 있었으며 CRP와 반응한 표면의 rms 값이 가장 큰 것을 알 수 있었다.

3.2. 농도별 CRP 측정

CRP를 농도별로 감지하기 위해서는 monoclonal anti-CRP를 센서 chip 표면에 고정시켜야 한다. 이를 위해 SAM을 형성시킨 SPR gold chip을 SPRmicro에 장착한 후 anti-CRP와 BSA를 순서대로 주입하였다. 실험을 통해 측정하고자 하는 CRP의 농도는 1, 3, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 이었으며, 각각의 단백질이 반응하면서 나타나는 공명각의 변화를 실시간으로 관찰 하였다. 본 실험에 사용된 SPRmicro는 2개의 주입 채널을 가지고 있어 2가지의 신호를 얻을 수 있다. Fig. 4는 시료의 용매인 PBS 만을 주입한 기준 채널과 anti-CRP와 BSA, 그리고 CRP 5 $\mu\text{g/ml}$ 을 순차적으로 주입한 시료 채널의 신호를 나타낸 그래프이다.

각 단백질의 상호작용으로 인한 SPR 신호의 변화를 정확히 측정하기 위하여 시료 채널에서 기준 채널의 신호를 빼주어 Fig. 5에 나타내었다. 이는 온도 등의

Fig. 4. Signals from two channels: injection of PBS into reference channel(down) and sequence injection of anti-CRP, BSA and 5 μ g/ml of CRP into sample channel(up).

Fig. 5. Output signal by subtracting signal of reference channel from signal by sequence injection of anti-CRP, BSA, and 5 μ g/ml of CRP.

외부 환경에 의해 SPR 센서 신호가 영향을 받기 때문이다. 비록 이러한 외부 영향은 일반적으로 시료 채널에 비해 신호의 변화가 작지만 거짓 양성 신호를 발생시킬 수 있어 제거해주어야 한다. 1000 RU 값은 0.1° 의 공명각 변화를 의미하며, SPRmicro의 오차 범위는 10 RU이다. 각 단백질에 의한 RU 값의 변화 정도는 단백질 주입 후 신호가 안정된 상태에서 100초 동안의 평균값으로 도출해내었다. 실험은 CRP 농도별로 3번씩 반복 수행하였다.

Chip이 장착된 센서에 anti-CRP를 주입한 후 chip 표면에 형성된 SAM에 anti-CRP가 고정되면서 SPR 신호가 크게 상승 하였다. 신호가 상승한 다음 PBS를 주입하자 신호가 소폭 하락하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 완전히 결합하지 않았거나 표면이 포화 된 후

Fig. 6. Actual signal due to sequence injection of anti-CRP, BSA, 500 ng/ml of PSA and 10 μ g/ml of CRP.

표면 근처에 남은 anti-CRP가 제거되었기 때문이다. Anti-CRP에 의해 증가한 출력신호의 평균값은 2425 RU이었다. 신호가 안정 된 후 비특이적인 결합을 막기 위하여 BSA를 주입 한 다음 다시 PBS를 주입하였다. BSA에 의한 출력 신호의 평균값은 36 RU로 anti-CRP에 비해 아주 미미하였는데, 이는 anti-CRP가 chip 표면에 거의 포화되었기 때문이라고 예측할 수 있다. 신호가 안정 된 것을 확인한 후 CRP와 이종 단백질을 주입하여 변화되는 SPR 신호 값을 실시간으로 측정 하였다.

SPR 면역센서의 선택성을 알아보기 위해 Prostate-Specific Antigen(PSA, R&D systems, inc. USA)을 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. SAM이 형성된 sensor chip을 SPRmicro에 장착시킨 후 anti-CRP와 BSA, 그리고 PSA 500 ng/ml를 차례대로 주입하였다. Anti-CRP 주입 후 SPR 출력 신호가 크게 증가하였으나, PSA를 주입하였을 때의 출력 신호의 변화는 7 RU로 나타났다. 이는 장비의 오차범위인 10 RU보다 작은 값으로, PSA가 sensor chip 표면에 거의 흡착되지 않았다고 판단할 수 있다. 신호가 안정된 후 CRP 10 μ g/ml를 주입하자 신호가 증가하였으며, PBS 주입 후 나타난 CRP의 출력 신호는 194 RU 였다. 이와 같은 결과를 통하여 상기의 SAM으로 고정된 anti-CRP를 사용한 SPR 면역센서가 CRP를 선택적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

각 CRP 농도에 대한 SPR 신호 변화의 평균값은 Fig. 7과 같다. CRP 1 μ g/ml의 평균값은 42 RU, CRP 3 μ g/ml는 86 RU, CRP 5 μ g/ml는 126 RU, CRP 10 μ g/ml는 219 RU만큼 증가 하였다. 이러한 CRP에 의한 SPR 신호의 변화는 anti-CRP에 의한 신호보다 비교적 적게

Fig. 7. Mean values of SPR signals caused by binding of CRP with various concentrations: The concentrations of CRP were 1, 3, 5, and 10 $\mu\text{g/ml}$.

나타났다. 이는 생분자의 결합에 의한 유전율의 변화만큼 SPR 출력 신호가 변화하는데, anti-CRP의 분자량(약 150 kDa)이 CRP의 분자량(약 23 kDa)에 비해 더 크고 실험에 사용된 anti-CRP의 농도(150 $\mu\text{g/ml}$)가 CRP의 농도(1, 3, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$)보다 더 높기 때문인 것으로 판단된다. 또한 결과를 통하여 Fig. 7에 나타난 것과 같이 CRP 농도 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 10 $\mu\text{g/ml}$ 사이에서 SPR 신호의 변화값이 선형적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 본 실험 결과를 통한 curve fitting의 정확도는 99.83%이며 감도는 $\mu\text{g/ml}$ 당 19.49 RU로 나타났다. 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 10 $\mu\text{g/ml}$ 사이의 혈중 CRP 농도는 임상적으로 심혈관계 질환의 위험도와 급성 염증성 질환을 진단할 수 있는 수치이다. 이와 같은 결과를 통하여 이합체 구조를 가지는 SAM과 소형 SPR 센서가 CRP 검출에 유용하게 사용될 수 있다는 것을 확인하였다.

4. 결 론

소형화 된 SPR 센서와 SAM을 이용하여 대표적인 염증인자인 CRP를 농도별로 검출 하였다. 실험에 사용된 CRP의 농도는 1, 3, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 이며, 실험은 각 농도별로 세 번씩 반복 수행되었다. SPRmicro의 두 개의 채널 중 하나는 기준 채널로 사용하여 주변 환경에 의한 영향을 배제함으로써 보다 정확한 신호를 얻을 수 있었다. 실험 결과는 시료를 주입하여 얻은 신호와 기준 채널 신호의 차이로 도출해내었고, 각 단백질간의 상호작용이 발생함에 따라 SPR 신호가 증가하는 것을 확인하였다. 농도에 따른 CRP에 의한 출력 신호는 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 10 $\mu\text{g/ml}$ 사이에서 선형적으로 증가 하였다. 이와 같은 결과를 통해 이합체 구조를 가지는

SAM을 이용하여 항체를 고정시킨 SPRmicro가 급성 염증 및 심혈관계 질환의 위험도를 진단하기 위한 CRP 검출 센서로서의 역할을 수행할 수 있음을 확인 하였다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 2010-0015527).

참고 문헌

- [1] H. Chen, J. Huang, J. Lee, S. Hwang, and K. Koh, "Surface plasmon resonance spectroscopic characterization of antibody orientation and activity on the calixarene monolayer", *Sens. Actuators B*, vol. 147, pp. 548-553, 2010.
- [2] P. J. Conroy, S. Hearty, P. Leonard, and R. J. O'Kennedy, "Antibody production, design and use for biosensor-based applications", *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, pp. 10-26, 2009.
- [3] R. M. Lequin, "Enzyme Immunoassay(EIA) / Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", *Clin. Chem.*, vol. 51, pp. 2415-2418, 2005.
- [4] R. Hao, D. Wang, X. Zhang, G. Zuo, H. Wei, R. Yang, Z. Zhang, Z. Cheng, Y. Guo, Z. Cui, and Y. Zhou, "Rapid detection of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibody functionalized QCM sensor", *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, pp. 1330-1335, 2009.
- [5] H. Xu, X. Zhao, C. Grant, J. R. Lu, D. E. Williams, and J. Penfold, "Orientation of a monoclonal antibody adsorbed at the solid/solution interface: a combined study using atomic force microscopy and neutron reflectivity", *Langmuir*, vol. 22, pp. 6313-6320, 2006.
- [6] M. Salmann, N. Fischer-Durand, and C.-M. Pradier, "Infrared optical immunosensor: Application to the measurement of the herbicide atrazine", *Anal. Biochem.*, vol. 373, pp. 61-70, 2008.
- [7] Y.-S. Sohn, C.-K. Kim, and S.-Y. Choi, "Characteristics of a label-less electrochemical immunosensor based on a field-effect transistor for the detection of a biomarker in urine", *Sens. Lett.*, vol. 7, pp. 640-643, 2009.
- [8] 윤성식, 이수형, 안종혁, 이종현, "Cyclic olefin copolymer(COC) 폴리머 프리즘을 사용한 광섬유 기반 표면 플라즈몬 공명(SPR) 바이오 센서", *센서*

- 학회지, 제 17권, 제5호, pp. 369-374, 2008.
- [9] R. B. M. Schasfoort and A. J. Tudos, *Handbook of surface plasmon resonance*, Royal Society of Chemistry, London, 2008.
- [10] 이훈, 이승기, “광섬유 국소화 표면 플라즈몬 공명 센서를 위한 광섬유 표면상의 금속 나노 입자 형성”, *센서학회지*, 제17권, 제2호, pp. 95-99, 2008.
- [11] S. K. Arya, P. R. Solanki, M. Datta, and B. D. Malhotra, “Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices”, *Biosens. Bioelectron*, vol. 24, pp. 2810-2817, 2009.
- [12] K.-Y. Park, Y.-S. Sohn, C.-K. Kim, H.-S. Kim, Y.-S. Bae, and S.-Y. Choi, “Development of FET-type albumin sensor for diagnosing nephritis”, *Biosens. Bioelectron*, vol. 23, pp. 1904-1907, 2008.
- [13] M. Hamer, Y. Chida, and E. Stamatakis, “Utility of C-reactive protein for cardiovascular risk stratification across three age groups in subjects without existing cardiovascular diseases”, *Am. J. Cardiol.*, vol. 104, pp. 538-542, 2009.
- [14] H. Y. Tsai, C. F. Hsu, I. W. Chiu, and C. B. Fuh, “Detection of C-reactive protein based on immunoassay using antibody-conjugated magnetic nanoparticles”, *Anal. Chem.*, vol. 79, pp. 8416-8419, 2007.
- [15] H.-M. Cho, D.-H. Jang, S.-K. Lee, S.-J. Ku, H.-C. Kim, K.-S. Yu, and J.-W. Lee, “Characterization of novel self assembled materials(SAM) for surface modification of sensor chip”, *Biochip J.*, vol. 2, pp. 206-211, 2008.

신 은 정

- 2006년~2010년 대구가톨릭대학교 의공학과 학사
- 2010년~현재 대구가톨릭대학교 의공학과 석사과정

정 은 정

- 2007년~현재 대구가톨릭대학교 의공학과 학사

조 진 희

- 2006년~현재 대구가톨릭대학교 의공학과 학사

황 동 환

- 2007년~현재 대구가톨릭대학교 의공학과 학사

손 영 수

- *센서학회지* 제19권, 제2호, p. 148, 참조