

A fluorescent PEBBLE nanosensor for intracellular free zinc

김범상 (홍익대학교 화학공학과)

본 내용은 James P. Sumner, Jonathan W. Aylott, Eric Monson, and Raoul Kopelman, 'A fluorescent PEBBLE nanosensor for intracellular free zinc', Analyst, 127, 11-16 (2002)에서 발췌한 내용입니다.

연구내용

철 다음으로 인체 내에서 풍부한 미량 원소인 아연은 대부분 인체에서 carbonic anhydrase 또는 zinc finger protein과 같은 단백질과 결합되어 있는 형태로 발견된다. 아연은 알츠하이머병이나 파킨슨병과 관련이 있으며, 신경조절물질의 역할을 하고, 특정 효소에서 구조적 기능을 수행하거나 루이스 산으로 작용하는 것으로 알려져있다. 인체 내 아연의 농도는 세포의 시토솔에서 nM부터 뉴런의 소포에서 mM까지 다양하게 분포되어 있다. 그러나 인체에서의 아연의 역할이 아직까지 명확히 밝혀져 있지 않기 때문에 생체 내에서의 아연의 기능을 설명하기 위하여 보다 발전된 분석 기술의 필요성이 대두되고 있다.

아연을 검출하기 위하여 사용 가능한 염료(dye)의 종류는 칼슘이나 마그네슘을 검출하기 위한 염료의 종류와 비교하여 볼 때 많이 부족한 실정이다. 일반적으로 많이 사용되는 아연 검출용 염료로는 N-(6-methoxy-8-quinolyl)-p-toluene sulfonamide (TSQ)와 (2-methyl-8-P-toluenesulfonamido-6-quinolyloxy) acetic acid (Zinquin)와 같은 퀴놀린 유도체가 있다. 이러한 염료들은 UV에 의해 들뜨기 때문에 세포 실험에서 자발적 형광이 증가되거나 아연과 1:1 그리고 1:2의 복합체를 형성하기 때문에 측정과정에서 보정을 어렵게 만드는 문제점이 있다. 효소와 단백질을 이용한 아연 검출용 형광탐침들도 개발되었는데, zinc finger protein을 이용

한 형광탐침과 신호변화의 수단으로 형광 억제물질과 결합된 돌연변이 carbonic anhydrase를 이용한 형광탐침이 있다. 이 중 zinc finger protein을 기반으로 하는 탐침의 경우, zinc finger protein이 쉽게 산화되므로 비활성 분위기에서 실험을 수행하여야만 하기 때문에 실제 세포 실험에서는 사용될 수 없다. 대표적인 마그네슘과 칼슘 염료인 Mag-Fura-2와 Mag-Fura-5도 아연의 정량평가에 사용되기도 하지만 이러한 염료들은 아연과 함께 칼슘과 마그네슘 이온에도 동시에 반응하기 때문에 실제적 세포실험시 측정오차가 발생할 가능성이 크다. 9-(1',4',7',10',13'-pentaazacyclopentadecyl) methylanthracene과 개질된 키토산을 이용한 아연 검출용 광섬유 센서가 보고되었지만, 가역성과 용매 문제로 사용이 제한적이다. 아연 검출용 염료 중에서 상용화된 Newport Green은 앞서 언급한 탐침들과 비교하였을 때 많은 장점을 가지고 있다. Newport Green은 가시영역인 506 nm에서 관찰이 가능하고, 아연에 대해 가역적인 반응을 나타내며, 세포 내 이온에 의한 간섭이 적고, 수용성이다. 비록 Newport Green은 제한된 감도를 갖고 있지만 세포 실험에서 매우 낮은 농도의 아연을 검출할 수 있기 때문에 본 연구에서 아연 검출용 염료로 사용하였다.

현재까지 대부분 아연의 정량 측정은 세포 시료에 대한 조직 화학적 착색에 의해 이루어졌다. 그러나 조직 화학적 착색과정에서 염료와 단백질 또는 염료와 세포기관의 불특정한 결합과 같은 의도하지 않은 결과가 나타나기도 하고, 때때로 염료가 주변 세포 환경에 대한 독성을 나타내는 경우가 있어서 실시간 생체 관찰에 적합하지 않다. 그리고 아연 검출용 이온선택전극(ISE)이 연구되고 있지만 상대적으로 큰 이온선택전극의 크기는 세포에 심각한 물리적 손상을 줄 수 있다. 따라서 현재까지 실시간으로 세포 내부의 아연의 측정을 위해 사용할 수 있는 실용적 아연 센서는 없는 실정이다. 나노입자를 이용한 센서는 살아있는 세포 내부의 분석에 가장 적합하다. 최근에 개발된 PEBBLE 센서는 매트릭스 내부에 염료를 캡슐화시킴으

로써 세포로부터 염료 그리고 염료로부터 세포를 동시에 보호하면서 비침투적으로 세포 내부로 이식되어 세포 내부를 측정할 수 있고, 불특정한 결합 또는 독성으로부터 발생할 수 있는 측정의 오차를 방지할 수 있다. 초기 PEBBLE 센서의 매트릭스로는 주로 polyacrylamide가 사용되었지만 decyl methacrylate와 sol-gel를 매트릭스로 사용하는 새로운 센서에 대한 연구도 수행되고 있다. 매트릭스의 종류가 다양해짐으로써 친수성과 소수성 염료를 모두 캡슐화 할 수 있는 PEBBLE 센서를 제작할 수 있다. PEBBLE은 지름 200 nm이하의 작은 크기이기 때문에 세포에 물리적 손상 없이 세포 내부의 특정 장소에 이식하여 분석이 가능하며 응답 시간이 빠르다.

본 연구는 아연을 검출할 수 있는 광학적 나노센서에 관한 것으로, ratiometric 기법으로 분석할 수 있는 센서로 만들기 위하여 고분자 매트릭스 내부에 두 종류의 형광염료를 고정시켰다. Ratiometric 분석기법은 특정 측정물질에 감응하는 염료와 기준 염료가 측정물질에 대하여 나타내는 각각의 고유 파장의 피크 세기의 비를 계산하여 측정물질의 농도를 분석하는 것으로, 사용 광원의 세기 또는 조사 시간 등의 변화에 따라서 염료가 보여주는 피크의 절대 세기가 변화하더라도 그 비는 항상 일정하다. 따라서 측정물질의 농도 이외의 다른 요인에 의한 측정상의 오차를 제거할 수 있다. 본 연구에서는 아연 검출용 염료로는 Newport Green을 사용하였고 기준 염료로는 dextran과 결합된 Texas Red를 사용하였다. 기준 염료로 사용된 Texas Red-dextran은 아연의 농도 변화에 영향을 받지 않는다. 두 종류의 염료 모두 친수성이기 때문에 polyacrylamide를 매트릭스로 사용하였고 마이크로에멀전 중합을 이용하여 나노 크기의 센서를 합성하였다.

마이크로에멀전 중합으로 합성된 PEBBLE 센서의 지름은 50~80 nm이었고 아연에 대한 반응 시간은 4초 이하였으며 아연에 대해 가역적인 응답을 나타내었다. 그리고 Na^+ , Ca^{2+} , K^+ 와 같은 세포내 다른 이온에 대한 선택특성을 보여주었

다. PEBBLE 센서의 광안정성을 실험한 결과, 외부의 빛에 의한 센서의 광학적 성질이 변하는 photobleaching 현상은 나타나지 않았다. 그리고 세포 내 단백질에 의한 간섭 현상을 알아보기 위하여 BSA(bovine serum albumin)을 사용한 실험 결과, 매트릭스가 없는 Newport Green의 경우 BSA의 농도가 증가함에 따라 피크의 세기가 증가하고 피크의 파장이 이동하였다. 그러나 매트릭스인 polyacrylamide로 캡슐화된 Newport Green은 BSA의 농도에 따른 피크의 변화가 없었다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때, 본 연구에서 제작된 아연 검출용 PEBBLE 센서는 아연의 농도가 클 것으로 예상되는 신경 시료에서의 아연 검출에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.