

Ratiometric optical PEBBLE nanosensors for real-time magnesium ion concentrations inside viable cells

김범상 (홍익대학교 화학공학과)

본 내용은 Edwin J. Park, Murphy Brasuel, Caleb Behrend, Martin A. Philbert, and Raoul Kopelman, 'Ratiometric optical PEBBLE nanosensor for real-time magnesium ion concentrations inside viable cells', *Analytical Chemistry*, 75(15), 3784-3791 (2003)에서 발췌한 내용입니다.

마그네슘은 세포 내에서 가장 풍부한 2가의 양이온이고 몸 안에서는 네 번째로 풍부한 양이온이며 세포 내 액체 중에서는 두 번째로 가장 일반적인 양이온이다. 마그네슘은 세포 기능에 필수적인 물질로, 마그네슘이나 마그네슘이 결합된 단백질은 많은 효소 반응의 공동인자(cofactor)로 작용하고 마그네슘은 단백질과 핵산의 합성, 신호변환, 에너지 대사, 세포골격과 미토콘드리아의 유지, 그리고 각종 이온의 수송펌프, 운반 등의 조절에 반드시 필요한 물질이다. 마그네슘은 많은 세포 활동에 관여하기 때문에, 마그네슘의 결핍은 인간의 건강, 다양한 미생물, 조직, 세포에 심각한 위협을 준다. 때때로 소장에서의 마그네슘 흡수 불량과 신장에서의 마그네슘의 배출증가에 의해 마그네슘의 결핍이 발생하는데 뇌졸중, 심장병, 고혈압, 당뇨, 동맥경화, 천식 등과 마그네슘 결핍과의 관련성이 잘 알려져 있다. 그리고 마그네슘이 편두통, 골다공증, 면역체계의 장애와 관계가 있다는 제안도 있다. 이와 같이 마그네슘은 세포 내에서 칼슘과 더불어 매우 중요한 요소이지만 세포 내에서의 마그네슘의 조절과 전달에 대한 연구는 매우 불충분한 실정이고, 마그네슘에 대한 연구가 부족한 이유는 살아있는 세포에서 마

그네슘을 정확하게 측정할 수 있는 방법이 부족하기 때문이다. 1980년대 초반 ETH1117, ETH2220, ETH4060과 같은 마그네슘 이온투과담체(ionophore)를 사용한 마그네슘 검출 전극이 개발되었다. 이 전극들은 칼슘 대비 마그네슘에 대한 우수한 선택도를 보여주었으나 최소 1 μm 에 달하는 커다란 전극의 크기 때문에 살아있는 세포에서 실시간으로 마그네슘을 측정하는데 문제가 있었다. 비록 이온 선택전극(ISE)들이 요구되는 선택도를 가지고 있지만, 형광 표시기에 의해 얻을 수 있는 수준의 공간적 해상도는 제공하지는 못한다. Mag-Fura-2, Mag-Indo-1, Magnesium Green 등의 형광 마그네슘 표시기가 상용화되어 세포 내부의 마그네슘을 모니터하고 시각화하는데 사용되고 있다. 그러나 상용화된 대부분의 마그네슘 형광 표시기는 칼슘에 감응하고 때로는 마그네슘보다 칼슘에 더 민감하게 반응하기 때문에 왜곡된 측정결과를 가져오기도 한다.

Bakker는 마그네슘 이온투과담체인 ETH 7025를 이용하여 액체 중합체를 기초로 한 마그네슘 optode를 개발하였다. 이 마그네슘 optode는 1~2 μm 의 막으로 구성되어 있고, 막의 열역학적 성질과 pH에 반응하는 chromoionophore와 광학적으로 조용한 이온투과담체를 이용하였다. 그러나 이온선택전극에서보다 칼슘 대비 마그네슘에 대해서 우수한 선택도를 보여주었던 ETH 7025가 세포 내부의 환경에서는 요구되는 선택도를 보여주지 못했다. K22B1B5와 같은 마그네슘 이온투과담체를 사용한 마그네슘 optode도 개발되었다. 최근 쿠마린(coumarin) 유도체를 변형한 KMG-20-AM이 개발되었는데 KMG-20의 마그네슘 검출 능력을 살펴보면, 현재까지 상용화된 마그네슘 표시기에 비하여 약 200배나 높은 Mg^{2+} 대 Ca^{2+} 선택도($K_{\text{Mg}}/K_{\text{Ca}}$)를 보여주었다. 마그네슘을 검출하는데 있어서 칼슘에 의한 측정의 왜곡이 대부분이기 때문에 마그네슘 표시기를 선정할 때, $K_{\text{Mg}}/K_{\text{Ca}}$ 값은 고려해야 할 가장 중요한 특성 중의 하나이다. KMG-20-AM의 합성과정에서 쿠마린 343(C343)에 acetoxymethyl 그룹을 도입하는데 이것은 막을 통한 염료의

전달을 도와준다. 최근까지 칼슘, 마그네슘과 같은 알칼리 금속과 C343 염료의 반응에 대한 연구가 이루어지지 않았고 C343을 이용한 optode도 만들어지지 않았다. 뿐만 아니라 C343은 마그네슘보다 칼슘에 대한 선택도를 증가시키기 위하여 monoaza-15-crown-5와 합성적으로 결합되었다. 그러나 본 연구에서는 유용한 마그네슘 센서를 제작하기 위하여 C343의 칼슘에 대한 마그네슘의 선택도를 조사하고 이를 이용한 PEBBLE 센서를 개발하고자 한다.

광섬유 마이크로 입자 센서 어레이(fiber-optic microsphere sensor array)와 molecular beacon과 같은 다양한 종류의 형광물질을 포함한 방법이 세포 내부의 이온을 감지하기 위하여 사용되고 있다. 본 연구에서는 polyacrylamide를 매트릭스로 사용하는 PEBBLE 센서를 개발하였다. 나노 PEBBLE은 세포 내부의 pH, 칼슘, 산소, 칼륨, 아연, 나트륨 등을 측정하는데 사용된다. PEBBLE 나노센서는 측정 요소와 감응하는 형광 염료와 기준 염료 그리고 염료들을 둘러싸는 구형의 고분자 매트릭스로 구성된다. PEBBLE은 20~200 nm의 다양한 크기를 가지며 polyacrylamide, sol gel, polydecylmethacrylate 등과 같은 다양한 매트릭스를 사용하여 합성할 수 있다. PEBBLE 센서의 측정 대상인 단일세포의 작은 크기를 고려해 볼 때, 마이크로미터 크기의 탐침에 비하여 PEBBLE의 작은 크기는 세포에 대한 물리적인 손상을 최소화할 수 있다. 그리고 비활성인 매트릭스는 형광 염료를 세포 환경에서 보호하고 반대로 세포에 대한 화학적 간섭을 최소화한다. 이러한 기능은 잠재적으로 유독한 형광 염료를 사용할 수 있게 하고 동시에 단백질, 세포기관, 또는 세포 내부의 여러 가지 물질과 염료가 불특정 결합을 하는 것을 방지할 수 있다. 이것은 생리적 형광 세기가 불특정 단백질 결합에 의하여 측정에 왜곡을 가져다 주는 현상을 PEBBLE 센서가 해결할 수 있다는 것을 의미한다. PEBBLE 센서에서 매트릭스를 이용하여 염료를 감싸는 방법을 이용하면 표시기 염료와 기준 염료 등 두 가지 이상의 염료를 동시에 나노입자안에 고정화시킨

ratiometric 센서를 제작할 수 있다. Ratiometric 센서란 표시기 염료와 기준 염료의 형광 세기의 비를 계산하여 측정 물질을 감지하고 정량화하는 센서를 말한다. 본 연구에서는 C343을 표시기 염료로, Texas Red dextran(TRD)을 기준 염료로 사용하여 C343에 추가적인 개질 없이 살아있는 세포 내부의 마그네슘을 실시간으로 측정할 수 있는 나노 수준의 ratiometric 센서를 개발하였다.