

표면 플라즈몬 공명 바이오센서의 원리와 응용

조용진

한국식품개발연구원

Surface Plasmon Resonance Biosensors: Principle and Applications

Yong-Jin Cho

Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea

Abstract

SPR biosensors which belong to a family of thin film refractometry-based sensors measure refractive index changes produced by biomolecular interactions occurring at the surface of the sensors. The main advantage of SPR biosensors is to detect molecular interactions directly without the use of labels. This feature makes them possible to observe biomolecular interactions in real-time or near real-time. The non-specific binding between ligand and target analyte may, however, produce a false refractive index change resulting in false sensor response. The applications of SPR biosensors have involved biomolecular interaction kinetics analysis, affinity measurement, screening and concentration assay, and so on.

Key words: surface plasmon resonance, biosensor, refractive index, ligand-analyte

서 론

표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 센서는 광 에너지가 금속 박막의 표면에 흡수되었을 때 일어나는 표면 플라즈마 파(surface plasma wave)의 공명 현상을 이용하는 센서이다. 그리고 금속 박막에 생물학적 요소를 도입하여 생물 변환기(biotransducer)를 구성하게 되면 SPR 바이오 센서가 된다.

지난 20여 년 동안 화학적 및 생물학적 성분을 측정하는 데 있어 광학 센서에 대한 연구와 기술 개발은 괄목할 만한 성장을 보였다. 최초의 광학 센서는 광 에너지의 흡수 스펙트럼의 변화를 측정하는 방법에 기초를 둔 것이다. 이후로 다양한 광학적 방법이 개발되어 물리화학적 센서 및 바이오센서로서 역할을 하고 있으며, ellipsometry, spectroscopy (luminescence, phosphorescence, fluorescence, Raman 등), interferometry, surface plasmon resonance 등이 예이다.

이러한 원리는 액체나 기체의 성분 분석에 활용되어 오늘날 현장에서 보편적으로 이용되고 있을 뿐만 아니라 고체 시료의 비파괴 측정에서도 주요 기술로 자리잡고 있다. 예를 들면, 식품이나 농산물의 품질 평가, 생체 진단 등의 분야에서 응용되고 있다.

특히, SPR 센서는 물리화학적 센서로서 뿐만 아니라 최근 바이오센서로서 큰 관심의 대상이 되고 있으며, biomolecular interaction kinetics analysis, affinity measurement, screening 및 concentration assay 등의 분야에서 큰 성과와 함께 잠재력을 보여주고 있다.

따라서, 여기서는 SPR 센서의 발전사와 함께 원리를 소개하고, 응용사례를 살펴보고자 한다.

SPR 발전사

1902년, Wood(1902)는 반사 회절격자를 사용하여 연속광원의 스펙트럼을 관찰한 결과, 회절광 스펙트럼에서 어두운 좁은 밴드를 발견하였으며, Fano(1941)는 이 현상이 surface plasma wave와 관련이 있음을 이론적으로 밝혔다.

Nylander 등(1982)과 Leidberg 등(1983)은 감쇠

Corresponding author: Yong-Jin Cho, Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea.
phone: +82-31-780-9136, E-mail: yjcho@kfri.re.kr

전반사(attenuated total reflection)에 관한 Kretschmann geometry에서 surface plasma wave의 특성을 분석하였다. 1984년에는 SPR sensing을 위해 angular modulation과 spectral modulation이 도입되었고(Matsubara 등, 1988), 회절격자(Cullen 등, 1987) 및 planar optical waveguide(Kreuwel 등, 1987)에 기초한 SPR sensor가 선보이기도 하여 공간 분해능 측정에 대한 SPR 방식의 가능성이 크게 평가되었다(Yeatman와 Ash, 1987)(재인용: Liedberg 등, 1995; Homola 등, 1999).

1990년대 초반, 최초의 fiber optic SPR sensor가 보고되었고(Jorgenson과 Yee, 1993), 1990년 후반에 heterodyne phase measurement와 interferometry(Nelson 등, 1996)에 기초한 phase modulated SPR sensor가 소개되었다(재인용: Liedberg 등, 1995; Homola 등).

SPR sensor instrumentation의 발전은 SPR sensor를 이용하여 물리적, 화학적, 그리고 생물학적 현상을 정량적으로 측정할 수 있는 가능성을 크게 향상시켰다. 특히, 1990년 Biacore International AB에 의해 출시되었던 최초의 상용 SPR 바이오센서는 생물학적 응용 분야에서 각광을 받게 되었으며, 다음해 Biacore에서는 감쇠 전반사 방식과 angular modulation 방식의 Kretschmann geometry에 기초한 연구용 SPR 장치를 개발하여 biomolecular interaction kinetic analysis, affinity measurements, screening and concentration assays 등의 연구에 SPR 바이오센서 기술이 이용될 수 있었다(Ligler와 Rowe Taitt, 2002).

IBIS system(British Windsor Scientific Ltd.,

UK), SPR-670 및 SPR-CELLIA system(Nippon Laser and Electronics Laboratory, Japan), SPR system(Johnson & Johnson Clinical Diagnostics, UK), Spreeta SPR sensor(Texas Instruments Inc., USA) 등에서 SPR 센서를 개발하였으며, 최근 SPR sensor의 개발 동향은 검출한계의 개선, 대량생산, 센서의 소형화, 시료소모의 소량화 등에 초점을 맞추고 있다(Ligler와 Rowe Taitt, 2002).

그러나, 최근까지 상용화된 SPR 시스템은 실험실에서 분석용으로 활용되는 장비이거나 시료가 유동하는 시료 유동형 센서 시스템으로 구성되어 있어 현장에서 휴대용으로 활용하기에는 적절하지 못한 단점을 가지고 있다. 초소형 SPR sensor인 Spreeta를 활용한 SPR 바이오센서의 개발도 시료 유동형 센서 시스템으로 진행되었기 때문에 펌핑 시스템이 구비되어야 하여 장치가 복잡할 뿐만 아니라 센서 전처리가 측정현장에서 이루어져야 하여 측정시간이 0.5~1 hr이 소요되므로 현장에서 실시간 측정을 구현하기가 어려운 단점을 가지고 있다(Meeusen 등, 2001).

표면 플라즈몬 공명

표면 플라즈몬 공명(SPR)은 빛이 금속 표면과의 상호작용에 의해 발생하는 양자역학적 광전 현상(quantum optical-electrical phenomenon)을 말한다. 광자(photon)에 의해 수송되는 에너지는 특정 조건 하에서 금속 표면상의 전자 즉, 플라즈몬(plasmon)으로 전달되는데, 에너지의 전달은 빛의 특정한 공명 파장(resonance wavelength)에서만 이루어진다. 즉, 이때의 광 파장은 광자가 가진 양자 에너지와

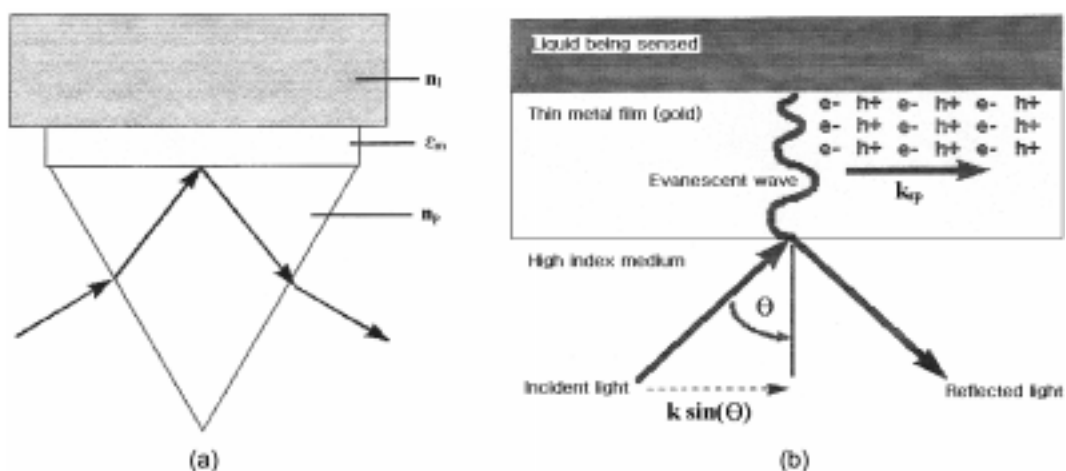


Fig. 1. Principle of SPR.

플라즈몬의 양자 에너지 준위가 정확히 일치하는 경우이다.

Fig. 1은 SPR의 원리를 나타낸 것이다. 금속 박막에서 자유전자가 특정한 속성을 가진 입사광에 의해 표면 플라즈마 파(surface plasma wave, SPW)를 형성하며, 이때 입사되는 전자파는 경계면에서 최대이며 점점 소멸되고, 반사광은 SPW의 공명조건에서 급격히 감소한다. 이때 식 (1)과 같이 자유공간에서의 파동수와 표면 플라즈몬의 파동수는 일치한다. SPW의 전파정수(propagation constant)는 식 (2)와 같다.

$$k = k_{sp} \quad (1)$$

$$\beta = k \sqrt{\frac{\epsilon_m n_1^2}{\epsilon_m + n_1^2}} \quad (2)$$

여기서, ϵ_m 은 금속의 유전상수이며, n_1 은 유전체 측, 측정될 액체의 굴절률이다. SPR 시스템에서 금속은 주로 금과 은이 사용된다. Table 1은 금속-물 경계 시스템에서 형성되는 표면 플라즈마 파의 주요 특성을 나타낸 것이다.

신호처리 방법별 SPR 센서의 종류

SPR 센서는 입사광이 SPW와의 상호작용에 의해 나타나는 반사광의 특성에 근거를 두고 있으며, 유형은 다음과 같이 구분된다.

각 변조

각 변조(angular modulation) SPR 센서는 입사광의 각도 조절에 의해 SPW의 공진 특성을 측정하는 방식이다. 이때 단파장의 입사광이 이용된다.

파장 변조

파장 변조(wavelength modulation)는 일정한 각도로 입사되는 전자파 즉, 특정각의 입사광에 대해서

Table 1. Characteristics of SPW at the metal-water interface

Metal layer supporting SPW	Gold		Silver	
Wavelength of input light (nm)	630	850	630	850
Propagation length (μm)	3	24	19	57
Penetration depth into metal (nm)	29	25	24	23
Penetration depth into dielectric (nm)	162	400	219	443
Concentration of field in dielectric (%)	85	94	90	95

SPW의 공진 현상이 일어날 때의 파장 변화를 분석하는 방식이다.

강도 변조

강도 변조(intensity modulation)는 특정한 파장을 가지는 전자파의 입사각을 일정하게 유지하였을 때 SPW의 공진 현상과 관련하여 광 에너지의 강도 변화를 측정하는 방식이다.

위상 변조

위상 변조(phase modulation)는 특정한 파장을 가지는 전자파의 입사각을 일정하게 유지하였을 때 SPW의 공진 현상과 관련하여 광 에너지의 위상 변화를 측정하는 방식이다.

분극 변조

입사광의 TM(transverse magnetic) 분극파는 SPW와 상호작용을 하는 동안 SPW의 전파정수가 변할 때 TM 분극파의 진폭과 위상이 변하게 되는 반면에, TE(transverse electric) 분극파에서는 진폭과 위상의 변화가 발생하지 않는다. 이와 같이 SPW의 공진에 따른 TM 및 TE 편광의 진폭과 위상 변화를 이용하는 측정 방식을 분극 변조(polarization modulation)라 한다.

SPR 바이오센서

SPR 바이오센서는 SPR 센서의 금속 박막에 생물학적 요소(biological element)를 도입하여 생물변환기(biotransducer)를 장착한 센서이다. SPR 센서가 측정 신호를 주로 굴절률(index of refraction)로 환산하여 측정에 이용되는 것과 같이 SPR 바이오센서에서도 측정 신호를 굴절률로 환산하여 나타낸다. SPR 바이오센서의 작동 원리는 Fig. 2와 같다.

SPR 바이오센서는 여러 가지 생체분자의 결합 작용을 이용하게 된다. 예를 들면, 항원-항체, 호르몬-수용체, 단백질-단백질, DNA-DNA, DNA-단백질 등의 결합에 의해 바이오센서로서 작동하게 된다. 그러므로 SPR 바이오센서의 요체는 리간드를 SPR 센서의 금속 표면에 고정화하는 것이다. 이러한 방법의 하나로 리간드에 티올기를 공유결합에 의해 붙여 티올화된 리간드를 금속 표면에 화학적 흡착을 시켜 고정화하는 방법이 있다. 또 다른 방법으로는 carboxyl-methylated dextran 사슬로 구성된 hydrogel matrix를 이용하여 리간드를 SPR 센서의

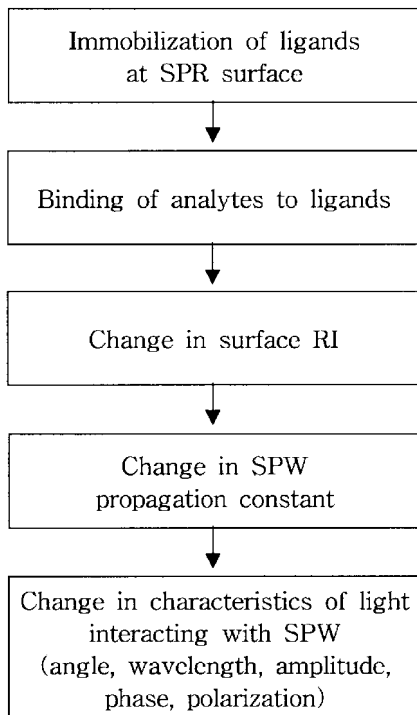


Fig. 2. Principle of SPR biosensors.

금속 표면에 고정화하는 방법이 있다. 리간드를 금속 표면에 고정화할 때, 고정화 강도를 높이면 리간드의 결합력이 상실될 우려가 있다.

최근, SPR 바이오센서의 연구 동향을 살펴보면, 리간드의 결합력과 방향성을 극대화하면서 SPR 센서 표면의 고정화 강도를 높이는 방법이 주요 관심사 중의 하나이다(Ligler와 Rowe Taitt, 2002).

응용사례

SPR 바이오센서의 주요 응용은 생체분자의 인식(detection of biological analyte)과 생체분자의 반응공학 분석(biophysical analysis of biomolecular interaction)의 두 분야에서 찾을 수 있다. 즉, SPR 바이오센서를 이용하여 생체분자의 존재 여부 및 농도를 측정할 수 있을 뿐만 아니라 생체분자의 ligand-analyte 결합과정에서 나타나는 반응속도론적 특성을 관찰할 수 있다.

Pfaff *et al.*(1994), Fratamico *et al.*(1998), Cranfield Biotechnology Center(2000) 등은 SPR 바이오센서를 이용하여 항원-항체 반응 측정, 계면에서의 생체분자 결합과정 분석, 식품에서의 잔류농

약, 항생제, 잔류약물 등의 검색 등의 연구결과를 소개하였다.

의약 분야에서의 응용 사례로는 human enzyme creatine kinase, anticonvulsant drug phenytoin, human chorionic gonadotrophin, 그리고 혈액, 혈청, 플라즈마, 오줌 등의 구성 성분에 관한 연구가 있다(Wortberg *et al.*, 1997).

또한, 비등방성 생체막의 특성 분석(Salamon *et al.*, 1999), 단백질 결합에 관련된 반응속도 인자 분석(Karlsson *et al.*, 1991; Faegerstam *et al.*, 1992; O'Shannessy *et al.*, 1993; Masson *et al.*, 1994; Natsume *et al.*, 1994; Shinohara *et al.*, 1994) 등의 연구에 SPR 바이오센서가 활용되었으며, 항체 측정(Medina, 1997), 농약 분석(Harris *et al.*, 1996), 우유에서의 잔류약물 측정(Sternesjoe *et al.*, 1996), 인삼의 성분 분석(Kajiwara, 1998), Clostridium botulinum 독소 측정(Ogert *et al.*, 1992), Bacillus thuringiensis 독소 측정(Masson *et al.*, 1995), lectin 결합 분석(Ozeki *et al.*, 1998), E. coli O157:H7 측정(Fratamico *et al.*, 1998) 등의 응용 사례도 있다.

조용진 등(2002)은 대장균 농도 측정을 위한 SPR 바이오센싱 시스템을 구성하였는데, “O” & “K” 항원 혈청형 대장균 항체를 티올화하여 센서 표면에 화학적으로 흡착하여 항체를 고정화하였으며, 10^3 CFU/mL의 대장균 농도까지 측정이 가능하다고 하였다.

장점 및 제한점

SPR 바이오센서는 grating coupler, resonant mirror, integrated optical interferometer 등과 같은 박막 굴절계 센서(thin film refractometry-based sensor)의 일종이다. 이러한 유형의 센서는 센서 표면의 경계면에서 리간드와 목표 물질(target analyte)의 결합에 의해 발생하는 굴절률의 변화를 측정하게 된다. 박막 굴절계 센서의 일종인 SPR 바이오센서의 가장 큰 장점은 방사성 물질이나 형광 물질과 같은 지표 물질을 사용하지 않고 직접 분자를 측정할 수 있다는 점이다. 이러한 장점으로 인해 SPR 바이오센서를 이용하여 생체 분자를 실시간 또는 준실시간으로 결합 과정을 관찰할 수 있다.

한편, SPR 바이오센서의 가장 큰 제한점은 ligand-analyte 결합의 특이성(specificity)이 확보되어야 목표 물질을 성공적으로 측정할 수 있는 점이다. 즉, 목표 물질과 비목표 물질이 혼합되어 있는 미지의

용액에 대해서 SPR 센서의 표면에 고정화되어 있는 리간드가 목표 물질에 대한 특이적 결합력을 가지고 있지 못한 경우 비목표 물질이 센서 표면에 흡착되어 왜곡된 굴절률 변화를 초래하게 될 우려가 있게 된다는 점이다.

결국 SPR 바이오센서가 성공적으로 작동하기 위해서는 ligand-analyte의 반응이 특이성을 가지도록 고안하여야 한다.

요 약

SPR 바이오센서는 박막 굴절계 센서의 일종으로서 ligand-analyte의 특이적 반응을 이용하는 센서이다. 센서 표면에 여러 가지 방법으로 고정화된 리간드가 미지의 용액 속에 있는 목표 물질과 특이적 결합을 하였을 때 굴절률의 유의한 변화가 나타나 그 물질의 농도, 결합과 해리 과정 등을 실시간 또는 준실시간으로 측정할 수 있다. SPR 바이오센서의 가장 큰 장점은 비지표 방식의 센서라는 점이다. 그러나 리간드와 목표 물질의 특이적 반응이 보장되지 않으면 측정 오류를 범할 가능성이 높은 센서이기도 하다. SPR 센서는 현재 몇 종의 상업적 제품이 출시되어 있으며, 이를 이용한 SPR 바이오센서의 성공 사례도 소개되고 있다. SPR 바이오센서는 biomolecular interaction kinetics analysis, affinity measurement, screening 및 concentration assay 등의 분야에서 이미 많은 성과를 보였으며, 또한 큰 잠재력을 보여주고 있다. 특히, 식품산업, 생명산업, 의료산업 등에서 SPR 바이오센서의 응용은 크게 확대될 것으로 전망되고 있다.

문 헌

조용진, 김철진, 김남수, 김종태, 전향숙, 김재은. 2002. Surface Plasmon Resonance와 Biophotonics를 이용한 식품의 품질 및 안전성 평가 시스템 개발(1 차년도). 한국식품개발연구원 연구보고서 E02601-0238

Cranfield Biotechnology Centre. 2000. <http://www.cranfield.ac.uk/biotech/spr.htm>

Faegerstam, L. G., A. Frostell-Karlsson, R. Karlsson, B. Persson and I. Roennberg. 1992. Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J. Chromatography* **597**: 1448-1454

Fano, U. 1941. Theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves). *J. of Optical Society of America*

31(3): 213-222

Fratamico, P. M., T. P. Strobaugh, M. B. Medina and A. G. Gehring. 1998. Detection of *E. coli* O157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor. *Biotechnology Techniques* **12**(7): 571-576

Garbutt, J. 1997. *Essentials of Food Microbiology*. Arnold, London

Harris, R. D., B. J. Luff, J. S. Wilkinson, R. Wilson, D. J. Schiffrin, J. Piehler, A. Brecht, R. A. Abuknesha and C. Mouvet. 1996. Integrated optical surface plasmon resonance biosensor for pesticide analysis. Research Report, Optical Fibers Group, University of Southampton

Homola, J., S. S. Yee and G. Gauglitz. 1999. Surface plasmon resonance sensors: Review. *Sensors and Actuators* **B54**: 3-15

Kajiwara, H. 1998. Motif 2 in adenine kinase homologous hinseng polypeptide showed affinity to D-ribose by capillary zone electrophoresis and surface plasmon resonance. *J. Chromatography* **817**: 173-179

Karlsson, R., A. Michaelsson and L. Mattsson. 1991. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensorbased analytical system. *J. Immunological Methods* **145**: 229-240

Liedberg, B., C. Nylander and I. Lundstrom. 1995. Biosensing with surface plasmon resonance-how it all started. *Biosens. Bioelectron.* **10**: i-ix

Ligler, F. S. and C. A. Rowe Taitt (eds.). 2002. *Optical Biosensors: Present and Future*. Elsevier Science B.V., Amsterdam

Masson, L., A. Mazza and R. Brousseau. 1994. Stable immobilization of lipid vesicles for kinetic studies using surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry* **218**: 405-412

Masson, L., A. Mazza, R. Brousseau and B. Tabashnik. 1995. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* toxin binding with brush border membrane vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*. *J. Biological Chemistry* **270**(20): 11887-11896

Medina, M. B. 1997. Hygromycin B antibody production and characterization by a surface plasmon resonance biosensor. *J. Agricultural Food Chemistry* **45**: 389-394

Meeusen, C. A., E. C. Alocilja and W. Osburn. 2001. Detection of *E. coli* O157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor. ASAE Paper No. 01-7030. St. Joseph, MI: ASAE

Natsume, T., T. Koide, S. Yokota, K. Hirayoshi and K. Nagata. 1994. Interactions between collagen-binding stress protein HSP47 and collagen. *J. Biological Chemistry* **269**(49): 31224-31228

Ogert, R. A., J. E. Brown, B. R. Singh, L. C. Shriver-Lake and F. S. Ligler. 1992. Detection of *Clostridium botulinum* toxin a using a fiber optic-based biosensor. *Analytical Chemistry* **205**: 306-312

O'Shannessy, D. J., M. Brigham-Burke, K. K. Soneson, P.

- Hensley and I. Brooks. 1993. Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions by surface plasmon resonance methods. *Enzymology* **240**: 323-349
- Ozeki, M., Y. Furuichi, H. Umekawa and T. Takahashi. 1998. A surface plasmon resonance assay for the binding of *Amaranthus Hypochondriacus* var. Mexico Lectin to glycoprotein. *Biochemistry and Molecular Biology International* **44**(1): 211-216
- Pfaff, M., W. Goehring, J. C. Brown and R. Timpl. 1994. *European J. Biochemistry* **225**: 975-984
- Salamon, Z., M. Brown and G. Tollin. 1999. Plasmon resonance spectroscopy: probing molecular interactions with membranes. *TIBS* **24**, p. 213-219
- Shinohara, Y., F. Kim, M. Shimizu, M. Goto, M. Tosu and Y. Hasegawa. 1994. Kinetic measurement of the interaction between an oligosaccharide and lectins by a biosensor based on surface plasmon resonance. *European J. Biochemistry* **223**: 189-194
- Sternesjoe, A., C. Mellgren and L. Bjoerck. 1996. Analysis of sulfamethazine in milk by an immunosensor assay based on surface plasmon resonance. *Immunoassay for Residue Analysis*, American Chemical Society, p. 463-470
- Wood, R. W. 1902. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Phil. Magm.* **4**: 396-402
- Wortberg, M., M. Orban, R. Renneberg and K. Cammann. 1997. Fluorimetric Immunosensors. In Kress-Rogers(ed.), *Handbook of Biosensors and Electronic Noses*, CRC, Boca Raton, p. 369-405