



센서칩 보관을 위한 Storage kit 방식 차이 비교

Introduction

SPR 분석에서 센서칩은 단백질, 항체, 펩타이드 등 다양한 생체분자를 고정화하여 분자 간 상호작용을 정량적으로 분석하는 핵심 구성요소입니다. 이러한 센서칩은 단일 소모품으로 소비되기보다, 동일 리간드에 대한 반복 측정이나 장기간 프로젝트 수행 시 여러 차례 재사용되는 경우가 많습니다. 그러나 단백질이 고정된 센서칩은 시간 경과에 따라 변성, 탈리 또는 비특이적 결합 증가 등의 이유로 활성이 저하될 수 있기 때문에, 적절한 저장 방법의 선택이 데이터의 재현성과 신뢰도를 좌우합니다.

일반적으로 센서칩의 저장 방식은 습식(Wet storage)과 건식(Dry storage)으로 구분됩니다. 센서칩 습식 보관은 보관용 플루이드 모듈을 활용하여 리간드가 부착된 표면이 보존용 완충용액과 만나쳐 보관하는 방법으로, 수용성 환경에서 안정적인 리간드에 유리합니다. 반면 건식 보관은 센서칩 표면을 건조한 상태로 유지함으로써 오염이나 미생물 증식을 방지하고, 장기간

보관이나 운송 시 관리가 용이하다는 장점이 있습니다. 아이클루바이오는 이러한 연구자들의 다양한 실험 조건과 단백질 특성에 대응하기 위해, 센서칩 재사용을 위한 두 가지 형태의 저장 솔루션을 제공합니다.

Storage Kit – Wet type (CAT# IOSS1000)

Storage Kit – Dry type (CAT# IOSR1000)

본 연구에서는 동일한 조건에서 고정화된 단백질을 대상으로 두 가지 저장 방식(Wet vs. Dry)에 따른 시간 경과별 활성 변화와 표면 안정성을 비교·평가하였습니다. 이를 통해 연구자는 리간드의 특성과 실험 목적에 가장 적합한 저장 방법을 선택할 수 있습니다.

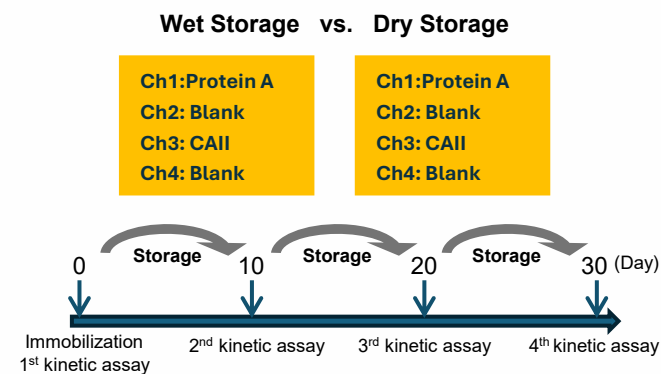
Materials and methods

Materials

- Instrument : iMSPR-Pro2X [CAT#INPX2000]
- Sensor chip : HC1000 [CAT#HCCH101KX]
- Amine coupling kit [CAT#IMAM1000]
- Running buffer: HBST [CAT#RBHTF1010-500]
- Ligand: Protein A, Carbonic anhydrase II (CAII)
- Analyte: IgG, Furosemide
- Regeneration solutions:
Glycine-HCl (pH 1.5) [CAT#RGGH1015]

Preparation

1. iMSPR-Pro2X에 HC1000을 장착한 프리즘 홀더를 로딩하고 1X HBST를 연결한 후에 Prime을 진행한다.
2. 50 mM NaOH를 20 µl/min로 1분씩 3회 주입하여 Precondition을 진행한다.



[Figure 1. 센서칩 저장방법 비교를 위한 실험 설계 개요]



Protein A – IgG

Immobilization: Protein A

1. Continuous mode로 ligand channel, reference channel에 200 mM EDC와 100 mM NHS 혼합 용액을 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 로 7분 동안 주입하여 activation 한다.
2. Individual mode로 ligand channel에 Protein A를 acetate buffer (pH 4.0)로 희석하여 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 준비하여 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 10분간 주입한다.
3. 다시 continuous mode로 바꾸고 1M Ethanolamine-HCl을 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 7분 동안 주입하여 남아 있는 COOH 작용기를 blocking한다.

Kinetic analysis

1. IgG를 running buffer로 2배씩 연속 희석하여 Table1의 농도와 같이 준비한다.
2. 준비된 IgG 용액을 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 2분간 주입하여 association을 관찰 후, running buffer가 흐르는 상태로 8분을 더 관찰하여 dissociation을 확인한다.
3. Dissociation 관찰이 끝난 후, Table 1와 같은 조건으로 regeneration한다.
4. Regeneration이 끝난 후, 다음 농도의 IgG 용액에 대해 2~3번 과정을 반복 수행한다.
5. 실험이 완료된 직후, 자동으로 평가된 kinetic 분석 결과를 확인한다.
6. 실험이 완료된 센서칩은 storage kit에서 보관하고, 10일마다 동일한 실험을 진행한다.

| Analyte | Range of analyte conc. |
|-----------------------|---------------------------|
| IgG | 1.56 - 100 nM |
| Regeneration solution | Injection time/ Wash time |
| Glycine-HCl (pH 1.5) | 1 min / 5 min |

[Table 1. IgG 분석 농도 구간 및 Regeneration 조건]

CAII– Furosemide

Immobilization: CAII

1. Continuous mode로 ligand channel, reference channel에 200 mM EDC와 100 mM NHS 혼합 용액을 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 로 7분 동안 주입하여 activation 한다.
2. Individual mode로 ligand channel에 CAII를 acetate buffer (pH 5.0)로 희석하여 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 준비하여 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 15분간 주입한다.
3. 다시 continuous mode로 바꾸고 1M Ethanolamine-HCl을 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 7분 동안 주입하여 남아 있는 COOH 작용기를 blocking한다.

Kinetic analysis

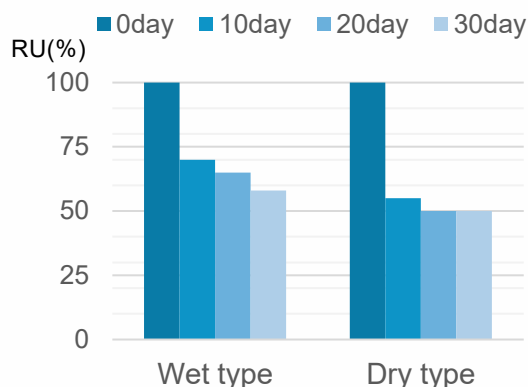
1. Furosemide를 running buffer로 2배씩 연속 희석하여 Table2의 농도와 같이 준비한다.
2. 준비된 Furosemide 용액을 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 2분간 주입하여 association을 관찰 후, running buffer가 흐르는 상태로 6분을 더 관찰하여 dissociation을 확인한다.
3. Dissociation 관찰이 끝난 후, 다음 농도의 Furosemide 용액에 대해 2번 과정을 반복 수행한다.
4. 실험이 완료된 직후, 자동으로 평가된 kinetic 분석 결과를 확인한다.
5. 실험이 완료된 센서칩은 storage kit에서 보관하고, 10일마다 동일한 실험을 진행한다.

| Analyte | Range of analyte conc. |
|------------|--------------------------|
| Furosemide | 0.156 - 10 μM |

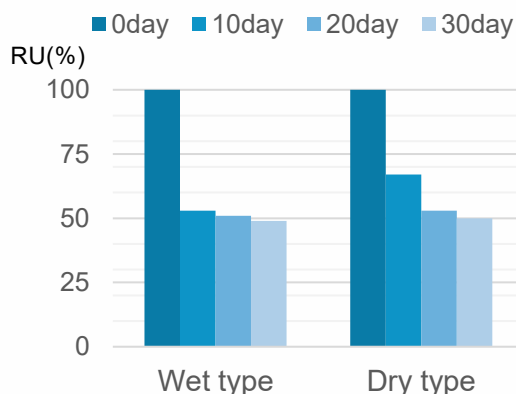
[Table 2. Furosemide 분석 농도 구간]



Results and Discussion



[Figure 5. 센서칩 저장방법에 따른 Protein A-IgG 결합 신호(IgG 농도: 100 nM)]



[Figure 6. 센서칩 저장방법에 따른 CAII-Furosemide 결합 신호(Furosemide 농도: 10 μM)]

| Storage kit type | 저장일 (day) | K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) | K_{off} (s^{-1}) | K_D (M) |
|------------------|-----------|-----------------------------|------------------------|-----------|
| Wet | 0 | 6.24E+04 | 9.67E-05 | 1.50E-09 |
| | 10 | 4.25E+04 | 1.07E-04 | 2.51E-09 |
| | 20 | 5.50E+04 | 1.01E-04 | 1.84E-09 |
| | 30 | 8.18E+04 | 1.63E-04 | 1.99E-09 |
| Dry | 0 | 8.24E+04 | 1.15E-04 | 1.40E-09 |
| | 10 | 2.76E+04 | 9.73E-05 | 3.53E-09 |
| | 20 | 6.48E+04 | 1.39E-04 | 2.14E-09 |
| | 30 | 6.54E+04 | 1.13E-04 | 1.73E-09 |

[Table 3. Protein A-IgG의 kinetic 분석결과]

| Storage kit type | 저장일 (day) | K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) | K_{off} (s^{-1}) | K_D (M) |
|------------------|-----------|-----------------------------|------------------------|-----------|
| Wet | 0 | 1.35E+04 | 1.42E-02 | 1.06E-06 |
| | 10 | 2.02E+04 | 3.45E-02 | 1.70E-06 |
| | 20 | 1.72E+04 | 2.48E-02 | 1.72E-06 |
| | 30 | 2.69E+04 | 4.71E-02 | 1.75E-06 |
| Dry | 0 | 1.59E+04 | 1.69E-02 | 1.06E-06 |
| | 10 | 1.38E+04 | 1.82E-02 | 1.32E-06 |
| | 20 | 1.26E+04 | 1.59E-02 | 1.26E-06 |
| | 30 | 1.22E+04 | 1.41E-02 | 1.16E-06 |

[Table 4. CAII-Furosemide의 kinetic 분석결과]

동 일 한 센서 칩 에 Protein A와 CAII를 각 각 공유결합 방식으로 고정화한 후, 30일 동안 습식(Wet) 및 건식(Dry) 조건으로 보관하며 10일간 격으로 결합 신호 및 kinetic 특성을 측정하였습니다(Figure 1). 고분자 결합 모델로는 Protein A-IgG, 저분자 결합 모델로는 CAII-Furosemide 조합을 사용하였으며, 각각의 analyte는 고정된 농도(100 nM IgG, 10 μM Furosemide)로 주입하여 센서칩 표면에 고정된 단백질의 활성 변화를 평가하였습니다(Figure 5, 6). 두 결합 모델 모두 보관 초기(0-10일)에는 결합 신호가 빠르게 감소하는 경향을 보이며, 이후에는 감소 속도가 완만해지면서 약 30일 시점까지 초기 대비 약 50% 수준의 활성이 유지되는 것으로 확인됩니다. Protein A의 경우, 습식 보관 조건에서 초기 활성 저하가 건식 보관 조건보다 상대적으로 적게 나타나며, 30일차에서도 습식 보관 시 결합활성이 소폭 더 높게 유지됩니다. 반면 CAII는 건식 보관에서 활성 감소가 더 완만하게 나타나며, 30일차 시점에는 두 보관 조건 모두 유사한 수준의 활성을 보입니다. 본 센서칩은 공유결합 방식으로 단백질을 고정하고 있기 때문에, 관찰된 신호 감소는 단백질의 탈리보다는 시간 경과에 따른 구조적 안정성 저하로 인한 결합 활성 감소로 해석됩니다.



본 연구 결과, 센서칩을 저장하는 동안 결합 신호는 감소하였지만 kinetic 파라미터는 크게 변화하지 않아 affinity 측정에는 제한적인 영향만을 미치는 것으로 확인되었습니다. 이러한 경향은 저장 과정에서 발생한 활성 저하가 반드시 k_{on} 또는 k_{off} 의 변화를 동반하지 않을 수 있음을 보여줍니다. 즉, 단백질 전체의 구조가 변성되기보다는, 저장 조건에 따라 일부 리간드가 기능을 상실하면서 실제로 결합에 참여할 수 있는 활성 리간드 집단이 감소한 데 따른 신호 변화로 해석하는 것이 더욱 타당합니다.

다만 단백질의 구조적 특성, 안정성, 저장 환경에 대한 민감도는 분자마다 매우 다양하므로, 특정 경우에는 저장 방식이 kinetic 특성에도 영향을 줄 가능성을 완전히 배제하기는 어렵습니다. 실제로 Protein A와 CAII는 습식 및 건식 보관 조건에서 서로 다른 활성 감소 양상을 보였으며, 이는 저장 방식의 영향이 분석 대상 분자의 특성에 따라 달라질 수 있음을 보여줍니다.

따라서 센서칩 보관 및 재사용의 적합성은 분석하려는 단백질의 성질, 실험 목적, 측정 기간 등을 종합적으로 고려하여 결정할 필요가 있습니다. 특히 장기간에 걸쳐 여러 analyte의 affinity를 측정해야 하는 경우에는, 보관 후 control analyte를 활용하여 표면 상태를 사전에 점검하는 절차가 실험의 신뢰도 확보에 도움이 될 수 있습니다. 이러한 접근은 다양한 유형의 분자를 다루는 실험 환경에서 데이터의 일관성을 유지하고, 장기 프로젝트 운영 시 실험 효율성을 높이는 데 유용한 전략이 될 것으로 판단됩니다.