

서로 다른 두 작용기를 이용한 결합법에 의한 접합체: 도파민 면역분석법

류지은 · 이인숙*

서울여자대학교 화학과

(2010. 11. 11. 접수, 2010. 11. 26. 승인)

Bioconjugation by dual heterobifunctional coupling method: Use of the conjugates for the detection of dopamine

Jieun Ryu and Insook Rhee Paeng*

Dept. of Chemistry, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

(Received November 11, 2010; Accepted November 26, 2010)

요 약: 도파민은 카테콜아민류의 중요한 신경전달물질로서 부족하면 파킨스병과 정신분열증 등을 야기할 수 있다. 그러므로 조작성 비교적 간단하면서 감도가 우수한 분석법의 개발이 필요하다. 이에, 도파민에 대한 경쟁적인 효소면역분석법이 연구되었다. 경쟁적인 면역분석법의 분석감도는 일반적으로 두가지 요소에 의해 조절된다. 하나는 경쟁자의 특성과 농도이며, 다른 하나는 결합체, 즉 항체의 그것이다. 따라서, 경쟁자인 BSA-DA과 결합체인 항체-avidin 접합체의 최적화가 수행되었다. 두 접합체는 SATA와 SMCC를 이용한 dual heterobifunctional coupling법에 의해 합성되었으며, 최적화 과정을 통해 BSA-DA 접합체의 농도는 6.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 항체-avidin 접합체의 농도 4.17×10^{-10} M로 결정되었다. 도파민에 대한 dose-response curve와 calibration curve의 결과로써 도파민에 대한 검출 한계는 2.3×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고 검출 영역은 1.0×10^{-3} M ~ 1.0×10^{-7} M 이다. 직선성을 갖는 검출영역에서의 검정선을 얻은 결과 [Absorbance = $-0.1098 \log[\text{DA}] + 0.0353$ ($R^2 = 0.9956$)] 우수한 직선관계를 얻었다.

Abstract: Dopamine (DA) is an important neurotransmitter molecule of catecholamines. Its deficiency could lead to brain disorder such as Parkinson's disease and schizophrenia. Therefore, it is necessary to establish a suitable analytical technique with sensitivity and simplicity. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for DA has been optimized and characterized. Assay sensitivity is controlled by two factors in competitive immunoassay. One is a nature and concentration of competitor, and the other is those of binder, antibody. Thus, optimization was performed: BSA-DA conjugate and antibody-avidin conjugate were prepared by dual heterobifunctional coupling method using SATA and SMCC. Assay condition was optimized with 6.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of BSA-DA and 4.17×10^{-10} M of antibody-avidin conjugate. A dose-response curve was constructed, and a limit of detection and a dynamic range for DA were accomplished to 2.3×10^{-2} $\mu\text{g}/\text{mL}$ and four orders of magnitude (1.0×10^{-7} M to 1.0×10^{-3} M), respectively. Calibration curve was constructed on dynamic range and least-squares regression of this data gave the following relationship: absorbance = $-0.1098 \log[\text{DA}] + 0.0353$ ($R^2 = 0.9956$).

Key words: immunoassay, dopamine, heterobifunctional coupling, avidin/biotin

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-970-5657 Fax : +82-(0)2-970-5972

E-mail : irpaeng@swu.ac.kr

www.kci.go.kr

1. 서 론

Biogenic amine이란 생명체 내에 존재하는 저 분자량의 유기염기(organic base)를 총칭하는 것으로, 동·식물, 미생물 등 모든 생명체의 세포 내 대사과정에서 생성 또는 소멸되며, 생체 내의 대사를 조절하거나 신경전달물질로의 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁵ Biogenic amine류의 대표적인 예로는 카테콜아민(catecholamine)과 인돌아민(indoleamine) 등이 있으며, Dopamine (DA), Norepinephrine, Epinephrine 그리고 serotonin 등은 카테콜아민류에 속한다. 이러한 물질들이 체내에서 비정상적으로 작용할 경우 파킨슨병(Parkinson's disease), 기억력 감퇴, 치매, 우울증, 주의력 결핍 등과 같은 신경관련 질환들의 발병을 초래할 수 있으며,^{6,8} 파킨슨병의 경우 뇌 속 중뇌의 흑질(Substantia nigra)에서 선구체 경로를 구성하는 DA성 신경 변성에 의해 발생한다. 병의 증상으로는 떨림증, 몸의 경직, 운동 느림증, 자세 불안정성 등의 비정상적인 운동성 장애와 우울증, 불안장애, 수면장애 등의 정신장애, 그리고 체온 조절 장애나 기립성 저혈압증 등의 자율신경계 기능장애를 들 수 있다. 이러한 경우 DA 자체는 뇌혈관 장벽을 직접적으로 통과할 수 없기 때문에 일차적인 치료제로 DA 전구체인 L-DOPA를 사용한다. 적정 농도의 L-DOPA의 투여는 질환의 완화에 긍정적인 효과를 나타내지만, 그 이상이 체내에 유입되게 되면 구토, 심장항진, 두통 등의 부작용을 유발할 수 있다.⁷ 이러한 치료법은 일시적인 약물의 투여로 질병을 완치시키는 원인적인 치료가 아니라, 고혈압이나 당뇨병과 같이 약물을 복용하여 증상을 완화시키는 조절 치료이다. 따라서 환자 자신이 꾸준히 건강 상태를 체크하고 진단하는 것이 요구된다. 그러므로 미숙련자도 쉽고 간편하게 진단을 할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.^{9,10}

카테콜아민류에 대한 분석은 주로 시료 중의 분석 물질을 선택적으로 추출하고, 이를 HPLC-MS¹¹를 이용하여 분리한 후 다시 전기화학적 방법 등을 이용하여 검출하였다. 이 방법은 분석시간이 길고, 시료의 전처리가 필요하며 이로 인해 많은 양의 시료가 소모될 뿐 아니라, 고가의 장비와 숙련자가 요구된다. 또한 DA와 관련된 질병인 파킨슨병의 경우 약물투여로 증상의 호전여부를 임상진단을 하거나 양전자방출단층촬영(PET)에 의한 DA 운반체의 밀도 분석을 통해 병의 진행 정도를 진단한다고 알려져 있다. 양전자방출단층촬영의 경우 방사성 의약품인 ‘에프피씨아이티

주사([¹⁸F]FP-CIT)’가 사용됨에 따라 방사성 물질에 대한 부작용과 안정성이 우려된다. 따라서 조작성이 비교적 간단하고 효율적이며 신속 정확하게 분석할 수 있는 분석법에 대한 필요성이 대두되었다. 면역분석법(immunoassay)은 항원-항체간의 상호 인식 결합에 의한 특이성(specificity), 분석법에 사용되는 표지물질로부터의 높은 분석 감도(sensitivity), 그리고 전처리 과정이 필요하지 않은 분석상의 용이성(simplicity)을 갖추고 있다.

본 연구에서는 이러한 면역분석법을 기초로 하여 DA에 대한 정량 분석에 강한 결합력($K_a=10^{15} M^{-1}$)을 가지는 결합단백질과, 리간드인 avidin과 biotin system을 도입하였다.¹²⁻¹⁴ 특히, dual heterobifunctional coupling method¹⁵를 이용하여 항체-Avidin 그리고 BSA-DA 접합체를 합성하여 신호증폭과 구성 요소들 간의 상호작용의 향상을 꾀하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시약

Rabbit polyclonal to DA antibody (ab 8888)는 Abcam (Cambridge, MA, USA)에서 구매하였고 inject Bovine Serum Albumin (inject BSA), biotin-free BSA, *N*-Succinimidyl-S-acetylthioacetate (SATA), succinimidyl 4-[*N*-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)는 Pierce (Rockford, IL, USA)에서 구매하여 사용하였다. DA, avidin (from egg white), peroxidase-biotinamidocaproyl conjugate (biotin-HRP), DMSO, phosphate-citrate buffer with sodium perborate와 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride (TMB)는 sigma (ST. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. Sodium bicarbonate, sodium carbonate, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic과 sodium chloride는 Duksan Pure Chemical (Ansan, Kyonggido, Korea)에서 구매하였다. 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였으며, 모든 용액은 탈이온수(Milli-Q water purification system, Millipore, Billerica, MA USA)로 제조하였다.

2.2. 기구

효소의 활동도는 E_{max}[®] precision microplate reader (Molecular Device Co., Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다. 실험에 사용된 plate는 immulon 4 HBX Flat bottom microtiter plate (high binding) (Dynerx technologies Inc., USA)이고, well plate에 결합되지 않은 반응시료

는 Multiwasher III (Tricontinent, Grass vally, CA, USA) 를 사용하여 제거하였다.

2.3. 완충용액

접합체의 합성을 위한 Coupling buffer A는 50 mM phosphate buffered saline (PBS), pH7.2가 사용되었고 coupling buffer B와 dialysis buffer A는 모두 50 mM PBS, 1 mM EDTA, pH7.2를 사용하였다. Dialysis buffer B는 10 mM phosphate buffer, pH7.2가 사용되었고, deacetylation solution으로 0.5 M hydroxylamine hydrochloride, 25 mM EDTA in 50 mM PBS, pH7.2 을 사용하였다. Antibody-avidin 접합체의 coupling buffer C로는 50 mM sodium bicarbonate buffer, pH8.0 가 사용되었다.

DA 분석에서 coating buffer는 50 mM sodium bicarbonate buffer, pH9.6, Assay buffer로는 10 mM PBS, 0.01% Tween20, pH7.2를 사용하였다. Blocking solution 은 3% BSA in 10 mM PBS, pH7.2, wash buffer로는 10 mM PBS, 0.05% Tween20, pH7.2가 사용되었다. Substrate buffer는 50 mM phosphate-citrate buffer를 사용하였다.

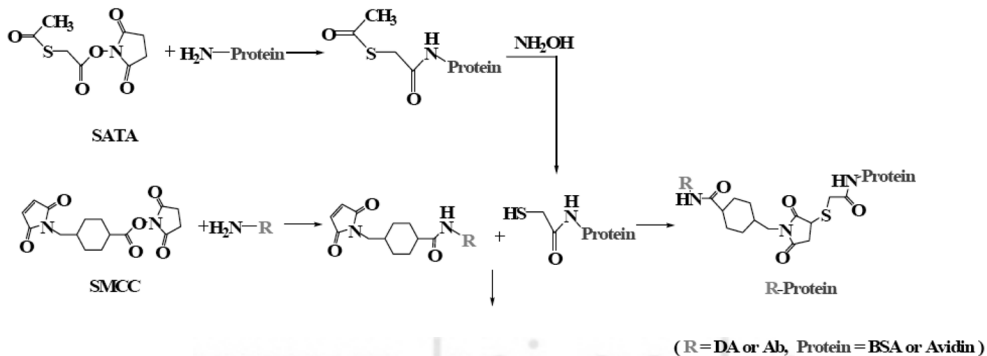
2.4. 접합체의 합성

BSA-DA 접합체와 antibody-avidin 접합체는 아래의 방법과 같이 서로 다른 linker를 사용한 dual heterobifunctional coupling method에 의하여 합성하였다 (Scheme 1).

BSA-DA 접합체: Coupling buffer A에 녹인 BSA를 v-vial에 넣고, DMSO에 녹인 SATA를 천천히 적가하면서 4 °C에서 24시간 교반하였다. 반응액을 centricon에 넣고 dialysis buffer A를 사용하여 dialysis시켜 free SATA를 제거하였다. Free SATA가 제거된 BSA-SATA

접합체는 다시 v-vial에 넣고 deacetylation solution을 이용하여 상온에서 2시간 동안 deacetylation 시켰다. 이때 사용된 deacetylation solution은 사용하기 직전에 제조한다. Deacetylation이 끝난 후 반응액을 위와 동일한 방법으로 dialysis시켜 남은 hydroxylamine hydrochloride를 제거한다. DA을 coupling buffer B에 녹여 v-vial에 넣고 DMSO에 녹인 SMCC를 천천히 적가하면서 상온에서 1시간 반응시킨다. 반응에 첨가되는 DMSO의 양은 전체 부피의 10% 이하로 조절한다. V-vial에 BSA-thiol solution과 SMCC-DA solution을 넣어 4 °C에서 24시간 교반하면서 반응시킨다. 마지막으로 dialysis를 통해 반응하지 않고 남은 SMCC-DA을 제거하면서 buffer를 dialysis buffer B로 교체한다. 합성된 BSA-DA 접합체는 dialysis buffer B로 BSA의 농도가 666.65 µg/mL (9.95×10^{-6} M)이 되도록 stock solution을 만들어서 4 °C에 보관하였다. 사용된 SATA는 BSA mol수의 약 50배를 사용하였고, SMCC와 DA과의 접합에서의 DA은 SMCC보다 50배 많은 mol수를 사용하였다. 마지막 step에서 사용된 SMCC-DA 접합체는 SMCC기준으로 BSA mol수보다 100배 과량 사용되었다.

Antibody-avidin 접합체: Coupling buffer C를 사용하여 antibody에 SMCC를 접합시키고, coupling buffer A를 사용하여 avidin에 SATA를 접합시켜서 반응시켰다. 반응은 4 °C에서 24시간 반응시켰다. 이때 SATA의 deacetylation에는 25배의 과량을 넣어주었다. 최종적으로 assay에 적용된 antibody-avidin접합체는 antibody-SMCC에서 SMCC가 antibody의 mol수보다 500배 사용되었고, SATA-avidin에서 SATA는 avidin의 양보다 250배 과량 사용되었다. 마지막 단계에서 사용된 SATA-Avidin의 양은 antibody-SMCC의 양보다 500배 과량 사용되었다(protein 기준의 mol수). Antibody-avidin



Scheme 1. BSA-DA and Antibody-Avidin conjugates by dual heterobifunctional coupling method.

접합체의 최종농도는 antibody 농도 기준 6.67×10^{-8} M이다.

2.5. 분석 조건의 최적화

분석 감도에 영향을 주는 다양한 요소에 대하여 최적화 실험을 하였다. Competitor인 BSA-DA, binder인 antibody-avidin 접합체(4.17×10^{-10} M과 2.78×10^{-10} M) 그리고 assay buffer에 detergent로 사용되는 Tween20 (0.00%, 0.01% 그리고 0.03% in 10 mM PBS)의 농도를 최적화 하였다. 또한 buffer의 pH, 이온 강도 그리고 incubation time 및 temperature 등을 고려하였다.

2.6. 표준 검정곡선의 작성

BSA-DA 접합체는 coating buffer를 사용하여 $6.66 \mu\text{g/mL}$ 로 희석한 후, well 당 $100 \mu\text{L}$ 씩 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시킨다. Well 표면에 흡착되지 않은 접합체는 washing buffer를 사용하여 3회 세척함으로써 제거한다. 비특이적 반응을 방지하기 위하여 3% BSA blocking solution을 well당 $300 \mu\text{L}$ 씩 넣고 실온에서 30분간 반응시킨다. Assay buffer를 사용하여 DA을 2×10^{-3} M~ 2×10^{-10} M의 표준 용액을 제조하고 antibody-avidin conjugate (4.17×10^{-10} M)를 준비한다. DA 표준용액 $50 \mu\text{L}$ 씩을 well에 넣은 직후, antibody-avidin conjugate solution 각각 $50 \mu\text{L}$ 를 well에 넣고 실온에서 1시간 동안 incubation시킨다. Assay buffer를 이용하여 $1 \mu\text{g/mL}$ 로 희석한 biotin-HRP conjugate를 well 당 $100 \mu\text{L}$ 씩 넣고 실온에서 30분 동안 반응시킨다. Washing step을 거친 후 TMB substrate solution을 $100 \mu\text{L}$ 씩 넣고 10분 동안 반응시킨다. 2 M H_2SO_4 ($50 \mu\text{L}$) 첨가로 color development를 멈춘다. 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

3. 결과 및 고찰

Competitive assay는 두 가지 요소에 의해서 분석 감도가 조절된다. 첫째는 고체상에 고착되어 있는 competitor (BSA-DA)이고, 둘째는 결합체인 antibody-avidin conjugate이다. 이들 conjugate를 합성하는 과정에서 heterobifunctional linker인 SATA와 SMCC를 사용하였다. Antibody와 avidin의 초기 반응 몰비와 반응 시간은 antibody-avidin conjugate를 assay에 적용하였을 때, binding affinity 및 입체효과에 따른 분석 감도에 영향을 미치게 된다. Scheme 1은 접합체 합성방법을 도식화 하였다. Avidin-SATA 접합체 합성에서의

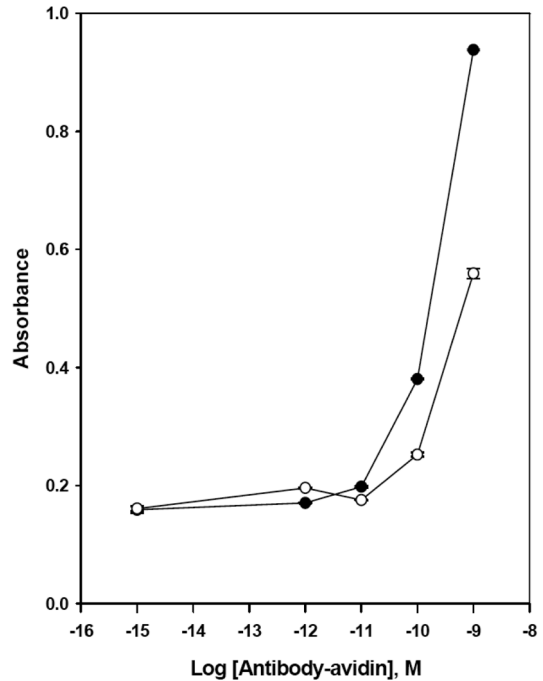


Fig. 1. The effect of coupling condition of antibody-avidin conjugates. The reaction condition was: (●) at 4 °C for 24 hr, and (○) at RT for 2 hr.

초기 몰비는 1:250으로 최적화하였고, antibody-SMCC 접합체의 경우는 초기 반응 몰비 1:500으로 최적화하였다. 이때 반응조건은 두 가지로 수행 될 수 있다. 첫번째는 실온에서 2시간 반응시키는 방법이고, 두번째는 4 °C에서 24시간 동안 반응시키는 것이다. 서로 다른 반응조건에서 진행시켜 얻어낸 접합체를 여러 농도로 희석시켜 dilution study를 하였을 때의 최대 signal을 비교해보면, 4 °C에서 24시간 동안 반응시킨 접합체에서 더 큰 흡광도 값의 변화를 볼 수 있다 (Fig. 1). 최적화된 조건으로는 SATA의 deacetylation (RT, 2시간)을 제외하고는 antibody-SMCC 반응과 SATA-avidin반응은 모두 4 °C 24시간 이었다. 따라서 저온(4 °C)에서의 반응을 통하여 균일한 접합체를 얻을 수 있었다.

Fig. 2(a)는 $6.66 \mu\text{g/mL}$ 의 BSA-DA를 competitor로 사용하고 서로 다른 농도의 antibody-avidin 접합체 (4.17×10^{-10} M, 3.34×10^{-10} M 그리고 2.78×10^{-10} M)를 사용하여 얻은 dose-response curve를 나타낸다. Antibody-avidin conjugate의 농도가 높을수록 더 낮은 검출한계와 최대/최소 신호값의 차이가 크음을 볼 수 있다. 이는 plate에 흡착되어 있는 BSA-DA 접합체와 결합할 수

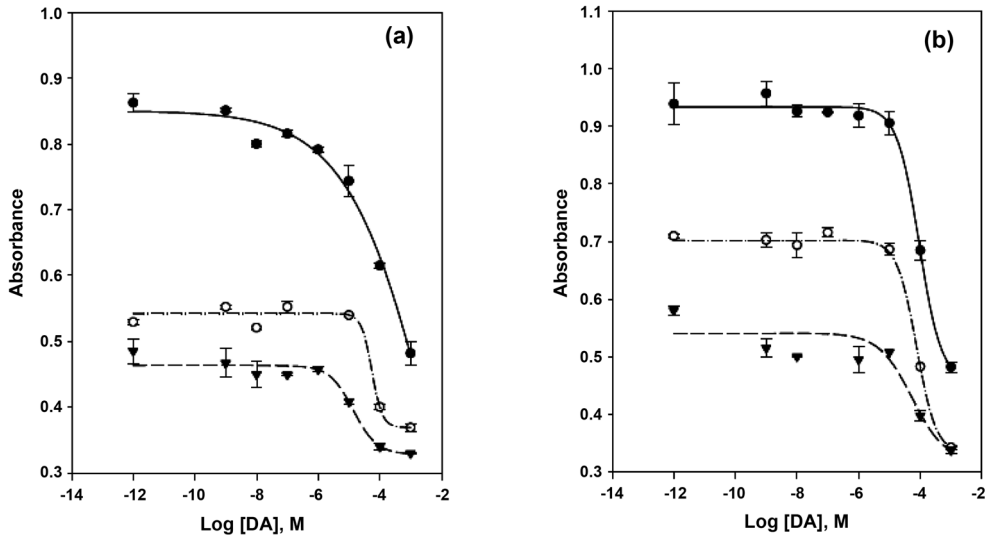


Fig. 2. The influence of antibody-avidin conjugate concentration in assay. The amount of antibody-avidin conjugate was: (a) 6.66 µg/mL, (b) 11.11 µg/mL. The concentration of antibody-avidin conjugate was: (●) 4.17×10^{-10} M, (○) 3.34×10^{-10} M, (▼) 2.78×10^{-10} M.

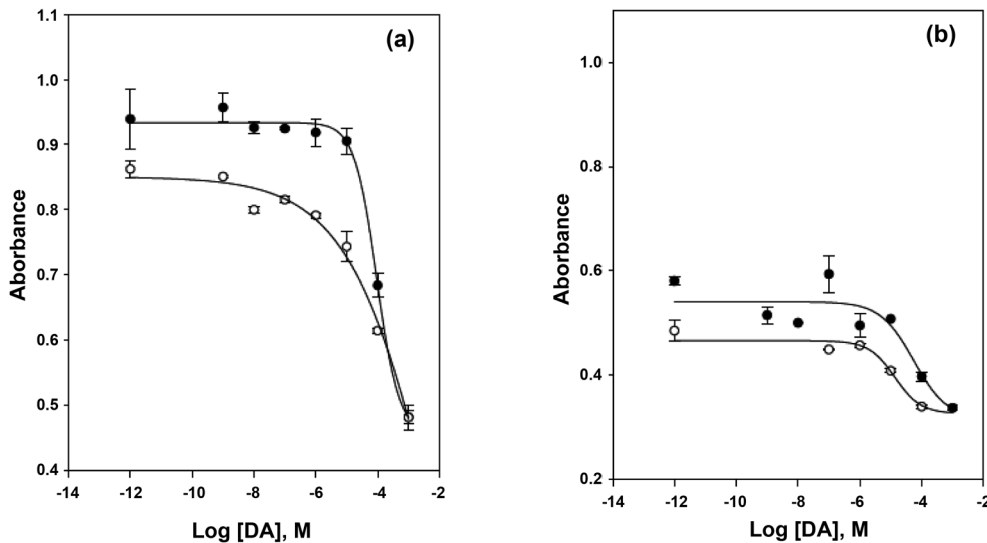


Fig. 3. The effect of BSA-DA conjugate concentration in assay. The amount of antibody-avidin conjugate was: (a) 4.17×10^{-10} M, (b) 2.78×10^{-10} M. The concentration of BSA-DA conjugates was: (●) 11.11 µg/mL, (○) 6.66 µg/mL.

있는 antibody-avidin 접합체가 증가함에 따른 결과임을 예측할 수 있다. 이는 11.11 µg/mL의 BSA-DA를 사용한 Fig. 2(b)에서도 동일한 결과를 보였다. 또한, Fig. 3는 antibody-avidin 농도가 고정된 상태에서 BSA-DA의 농도 변화에 따른 dose-response curve를 나타낸다. Fig. 3(a)는 4.17×10^{-10} M의 antibody-avidin conjugate를 그리고 Fig. 3(b)는 2.78×10^{-10} M 사용하

였다. BSA-DA 접합체는 분석하고자 하는 분석물질과 antibody와의 결합을 경쟁하는 competitor로서 BSA-DA 접합체의 농도가 클수록 신호값은 증가하나 검출 한계는 점차 커지는 것을 볼 수 있다. 이러한 양상은 Fig. 3(a)와 (b)에서 동일하게 관찰된다. DA 분석에서 검출한계는 BSA-DA 접합체와 antibody-avidin 접합체의 상호작용에 의해 각각 영향을 받게 됨을 확인 할

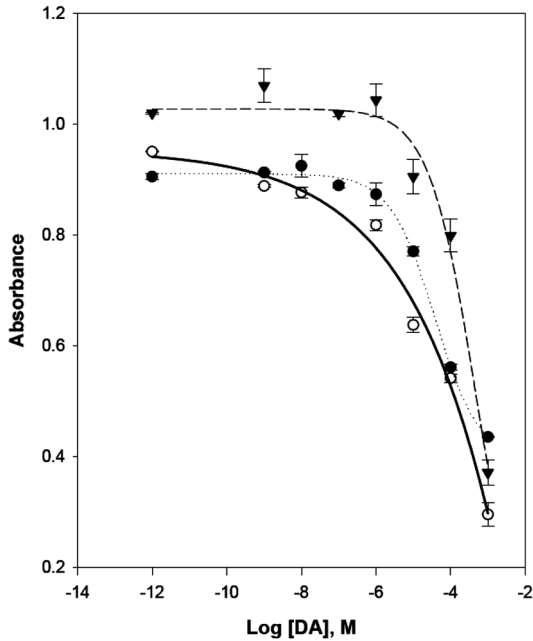


Fig. 4. The influence of Tween20 concentration in 10 mM PBS: (●) no Tween 20, (○) 0.01% Tween 20, (▼) 0.03% Tween 20.

수 있었다. 위의 두 결과를 종합하여 competitor, BSA-DA 접합체의 농도로 가장 감도가 뛰어나며 넓은 검출영역을 나타내는 6.66 $\mu\text{g/mL}$ 을 선택하였으며, antibody-avidin의 경우는 4.17×10^{-10} M일 때 가장 적합한 assay 조건으로 선택하였다.

계면활성제는 면역분석법에서 몇가지 목적으로 사용된다. Wash buffer에 첨가되는 계면활성제는 생-분자와 표면간에 형성되는 소수성 결합을 교란함으로써 생-분자의 비특이적 결합을 제거하는데 사용한다. 다른 목적으로는 blocking agents이다. 그러나, 계면활성제는 단백질 회합을 분산하는 성질을 가지고 있어 단백질 즉, antibody와 해텐 즉, 분석대상물질 사이의 높은 결합효율을 초래한다. 따라서 계면활성제는 종종 assay buffer에 첨가된다. 본 실험에서 Tween20 (0, 0.01 그리고 0.03%) 가 assay buffer에 첨가되었고 그 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 그 결과 0.01%의 Tween20 가 assay buffer에 첨가되었을 때 분석감도가 좋은 것으로 확인할 수 있다.

최적화 과정을 통해 BSA-DA 접합체의 농도는 6.66 $\mu\text{g/mL}$, antibody-avidin 접합체의 농도 4.17×10^{-10} M로 선택하였다. 최적화를 통해 결정된 조건하에서 DA의 dose-response curve와 calibration curve를 작성하였다

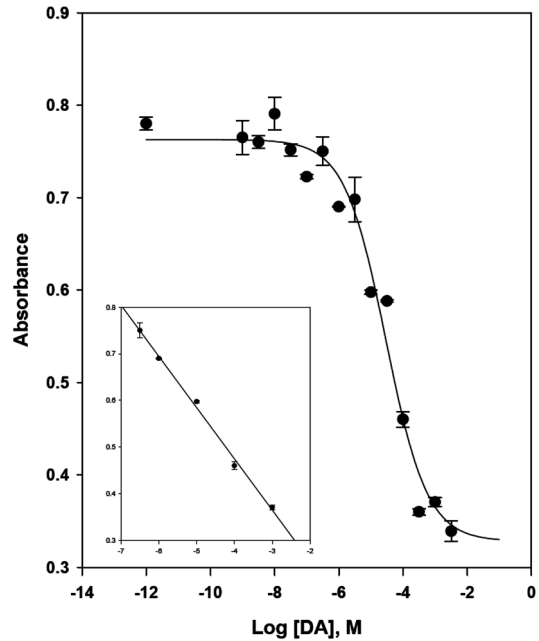


Fig. 5. Dose-response curve and calibration curve for DA. BSA-DA conjugate (6.66 $\mu\text{g/mL}$) and antibody-avidin conjugate (4.17×10^{-10} M) were used. Absorbance = $-0.1098 \log[\text{DA}] + 0.0353$ ($R^2 = 0.9956$)

(Fig. 5). 표준 검정 곡선은 1.0×10^{-3} M~ 1.0×10^{-7} M에서 직선성을 가지며, blank를 10회 측정하여 계산된 표준편차의 3배에 해당되는 시료의 농도인 검출 한계는 2.3×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$ 이다. 검출 영역인 1.0×10^{-3} M~ 1.0×10^{-7} M 사이의 범위 내에서 calibration curve를 얻은 결과 absorbance = $-0.1098 \log[\text{DA}] + 0.0353$ ($R^2 = 0.9956$)의 우수한 직선관계를 얻었다.

4. 결 론

본 연구에서는 BSA-DA, antibody-avidin 접합체의 합성방법을 제시하였고, avidin/biotin system을 도입함으로써 signal의 증폭효과에 따른 분석 감도를 높이고자 설계하였다. 그 결과 antibody-avidin 접합체와 같은 protein-protein 간의 접합체의 합성은 protein-small molecule 접합체의 합성에 비해 반응 비율과 반응시간에 민감하게 작용한다는 반응조건을 확인할 수 있었다. Protein-protein 접합체를 합성할 때 각각의 protein에 linker를 접합시킬 때와 protein-linker간의 접합을 할 때 모두 4 °C에서 24 시간 동안 mild한 condition하에서 반응시켜야 균일한 접합체의 합성이

가능하였다. 실험에서 얻은 검정곡선으로부터 검출 범위는 1.0×10^{-3} M ~ 1.0×10^{-7} M이며, antibody-avidin 집합체의 농도가 4.17×10^{-10} M 이고 BSA-DA 집합체의 농도가 6.66 $\mu\text{g/mL}$ 로 coating 되어 있을 때 2.3×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$ 범위의 낮은 검출한계를 보였다. 또한 검정곡선 내의 모든 측정값의 상대표준편차는 3%미만으로 정밀도가 매우 뛰어나며 평균 98% 회수율을 나타내었다. 그러므로 본 연구에서 제시된 분석방법은 시료 내의 DA¹⁶의 정량분석을 가능하게 하여, DA 관련 질환의 치료적인 접근¹⁷에 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2010학년도 서울여자대학교 교내 학술특별연구비의 지원을 받았음.

참고문헌

1. P. Damier, E. C. Hirsch, Y. Agid and A. M. Grzaybiel, *Brain*, **122**, 1437-1448(1999).
2. T. Selvaraju and R. Ramaraj, *Electrochem. Commun.*, **5**, 667-672(2003).
3. T. Hussain and M. F. Lokhandwala, *Exp. Biol. Med.* **228**, 134-142(2003).
4. P. A. Jose, G. M. Eisner and R. A. Felder, *Pharm. Therap.*, **80**, 149-182(1998).
5. G. Ivan, N. Szigeti-Csucs, M. Olah, G.M. Nagy and M. I. Goth, *Endocrine*, **28**, 101-110(2005).
6. T. Kienast and A. Heinz, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **5**, 109-131(2006).
7. Q. Li, J. Li and Z. Yang, *Anal. Chim. Acta*, **583**, 147-152(2007).
8. S. Thiagarajan and S. M. Chen, *Talanta*, **74**, 212-222(2007).
9. J. Kim, H. Park, J. Ryu, O. Jeon and I. R. Paeng, *J. Immunoass. Immunochem.*, **31**, 33-44(2010).
10. J. Kim, M. Jeon, K.-J. Paeng and I. R. Paeng, *Anal. Chim. Acta.*, **619**, 87-93(2008).
11. V. Carrera, E. Sabater, E. Vilanova and M. A. Sogorb, *J. Chromatogr. B*, **847**, 88-94(2007).
12. M. Jeon and I. R. Paeng, *Anal. Chim. Acta.*, **619**, 180-185(2008).
13. M. Jeon, J. Kim, K.-J. Paeng, S.-W. Park and I. R. Paeng, *Microchem. J.*, **88**, 26-31(2008).
14. S. Shrestha, I. R. Paeng, S. K. Deo, and S. Daunert, *Bioconjugate Chem.*, **13**, 269-275(2002).
15. D. Wild, *Immunoassay Handbook*, 2nd ed Nature Publishing Group, U.K. 2001.
16. A. E. Sanchez-Rivera, S. Corona-Avendano, G. Alarcon-Angeles, A. Rojas-Hernandez, M. T. Ramirez-Silva and M. A. Romero-Romo, *Spectrochim. Acta A.*, **59**, 3193-3203(2003).
17. J. Zheng and X. Zhou, *Bioelectrochemistry*, **70**, 408-415(2007).