

## 단백질 칩을 이용한 클라미디아 폐렴의 진단

강원대학교 의과대학 <sup>1</sup>내과학 교실, <sup>2</sup>생화학교실, 및 한림대학교 의과대학 <sup>3</sup>내과학교실

김우진<sup>1</sup>, 이희영<sup>1</sup>, 이승준<sup>1</sup>, 정세희<sup>2</sup>, 육종철<sup>2</sup>, 하권수<sup>2</sup>, 정기석<sup>3</sup>

### Development of Protein Chip for Diagnosis of *Chlamydia Pneumoniae*

Woo Jin Kim, M.D.<sup>1</sup>, Hui Young Lee, M.D.<sup>1</sup>, Seung-Joon Lee, M.D.<sup>1</sup>, Se-Hui Jung<sup>2</sup>, Jong Seol Yuk, PhD.<sup>2</sup>, Kwon-Soo Ha, PhD.<sup>2</sup>, Ki-Suck Jung, M.D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, and <sup>2</sup>Department of Molecular and Cellular Biochemistry, College of Medicine, Kangwon National University and <sup>3</sup>Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hallym University

**Background;** The diagnosis of chlamydial infection is based on serology. The current gold standard of diagnosis is MIF(microimmunofluorescence), but this modality is subjective and time-consuming. Protein microarray with using a SPR(surface plasmon resonance) sensor has recently been suggested as a method for detecting infection. For developing a protein chip to diagnose chlamydial infection, EBs(elementary bodies) were immobilized on a gold chip and the interaction between an antibody for *Chlamydia pneumoniae* and the EBs(elementary bodies) immobilized on the surface of the gold chip was measured by using an SPR sensor.

**Methods;** For the surface antigen, the EBs of *Chlamydia pneumoniae* LKK1 were purified. Charged arrays were prepared by using PDDA(polydiallyldimethylammonium chloride) which has a positive charge. After immobilization of the chlamydial EBs on the PDDA surface, the investigation of the surface was done with using atomic force microscopy. After the antibody for *C. pneumoniae* was applied on chip, we monitored the SPR wavelength-shift to detect any antigen-antibody interaction with using a self-assembled SPR sensor.

**Results;** The chlamydial EBs on the positively charged PDDA were visible on the surface with using atomic force microscopy. The SPR wavelength increased after interaction of antibody for *C. pneumoniae* with the EBs immobilized on charged gold surface. The wavelength-shift was correlated with the concentration of antigens.

**Conclusion;** The surface immobilization of EBs on the gold surface with the charged arrays was identified and the antigen-antibody interaction on the gold chip was detected via the SPR sensor. Further investigations are needed to apply this technique to the clinical field. (*Tuberc Respir Dis* 2006; 60: 412-418)

**Keywords;** *Chlamydia pneumoniae*, Protein array analysis

## 서 론

클라미디아 폐렴균은 상기도 및 하기도 감염을 일으키며, 10 - 20% 정도의 폐렴에서 원인균으로 알려져 있으며<sup>1</sup> 국내의 연구에서도 지역사회획득 폐렴으로 입원한 환자의 12.3%가 클라미디아 균에 혈청

양성이었음이 보고된 바 있다<sup>2</sup>. 최근 이 균에 의한 만성 감염이 심혈관계질환이나 만성 기도 질환 발병과 관련된다는 보고가 있다<sup>3,4</sup>.

클라미디아 폐렴균의 진단은 원인균의 배양, 혈청학적 검사와 polymerase chain reaction(PCR)을 이용한 DNA 검사 방법으로 이루어진다. 클라미디아 폐렴균은 배양이 어렵기 때문에 이 균의 진단으로 혈청검사가 주로 이용되며, 혈청검사는 EIA, microimmunofluorescence(MIF) 법, 그리고 ELISA 등이 있는데 현재 MIF 법이 표준 방법으로 인정되고 있으나, 해석이 주관적이고 시간이 많이 걸리는 단점이 있다<sup>5</sup>. 클라미디아 폐렴을 포함한 비정형 폐렴은 임상 소견만으로는 구별이 쉽지 않고, 현재까지 사용된 진단법이 단점이 많기 때문에 새로운 진단법이 요구되고 있다<sup>6</sup>.

단백질 칩은 특정 단백질과 반응할 수 있는 수십에서 수천 종류의 단백질이나 리간드 등을 고체의 표면

이 논문은 2004년도 정부재원(교육인적자원부 학술조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2004-003-E00087).

Address for correspondence: Ki-Suck Jung, M.D.  
Division of pulmonary and critical care medicine,  
Department of Internal Medicine, Hallym University  
Sacred Heart Hospital, 896 Pyungchon-dong, Dongan-gu,  
Anyang 431-070, Korea  
TEL : +82-31-380-3717 FAX : +82-31-380-3973  
E-mail : pulmoks@hallym.or.kr

Received : Mar. 10. 2006

Accepted : Apr. 17. 2006

에 부착시킨 후 이들과 특이적으로 상호 반응하는 생체고분자의 존재 또는 기능을 형광분석, surface plasmon resonance (SPR) 분석, 질량분석 등의 방법을 이용하여 분석하는 시스템이다.

최근 단백질 칩이 감염병의 진단에 유용하다는 연구결과들이 발표되고 있다<sup>7,8</sup>. 여러 가지 단백질 칩 분석 방법 중에 금속표면에서의 빛의 전반사의 변화를 감지하는 방법을 이용한 surface plasmon resonance (SPR) 센서를 단백질 칩 분석에 이용하여 세균 감염의 혈청학적 진단에 좋은 결과가 보고된 바 있으나<sup>9,10</sup>, 클라미디아 폐렴을 포함한 비정형폐렴의 진단을 위한 단백질 칩에 대한 연구는 아직 보고되고 있지 않다.

단백질 칩의 개발은 최근의 많은 기술적인 발전에도 불구하고 표면의 화학적 특성, 표면에 고정을 하기 위한 물질들, 측정방법 등의 해결해야 할 분야들이 있다<sup>11,12</sup>.

본 연구에서는 지금까지의 진단법으로는 한계가 있는 클라미디아 폐렴 진단의 새로운 시도를 위하여 단백질 칩의 개발을 위한 과정 중, gold 칩 표면 위에 클라미디아 폐렴균을 고정하고자 하였는데, 공유결합을 이용하여 단백질을 고정하기 위한 mixed thiol을 이용한 고전적 방법과 화학물질로 음전하 또는 양전하를 이용한 방법 등을 시도하였다. 대표적인 나노 이미징 영상 방법인 atomic force microscopy (AFM)로 고정 후의 표면의 상태를 확인하고자 하였고, 항원을 고정한 칩 위에 클라미디아 폐렴균에 대한 항체를 반응시킨 후, 표면 위의 나노 수준의 높이 변화를 감지할 수 있도록 고안한 surface plasmon resonance (SPR) 센서를 이용해 항원항체 반응을 관찰하고자 하였다.

## 방 법

### 1) 항원의 준비

항원을 준비하기 위하여, MEM 배양액으로 배양한 Hep-2 세포주에 국내 환자에서 분리한 클라미디아 폐렴균(LKK-1)<sup>13</sup>을 감염시켰다. 효과적인 감염을 위하여 균주를 세포주에 투여하고, 900 g에서 1시간 동안 실온에서 원심한 후, 35°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

감염여부의 확인은 3일간 배양한 well에서 시행하였다. 배지를 흡인한 후, PBS로 세척하고 메탄올 1 mL 씩 15분간 고정한 후, *C. pneumoniae*에 대한 FITC-conjugated monoclonal antibody (Denka Seiken, Japan) 20 µL 씩 올려놓고 커버글라스를 덮고 나서 37°C에서 45분간 반응시키고, PBS로 세척한 후, 형광 현미경으로 관찰하였다.

세포주와 reticulate body (RB)를 제거하고 순수한 elementary body (EB)를 항원으로 이용하기 위하여 EB의 분리 과정을 시행하였다. 먼저, 감염 세포액에 sonification을 30초간 2회 시행하였고, 2500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 그리고, 35% urografin을 이용하여 19000 rpm에서 1시간 동안 ultracentrifuge 시켰고 침전물을 PBS로 부유시킨 후 15000 rpm에서 다시 40분간 2회 ultracentrifuge 시켰다. 이를 PBS로 부유시킨 후 4°C에서 보관하였다.

### 2) Chip의 준비

글라스 슬라이드 위에 50 Å Ti과 450 Å Au film (2x4)으로 금 칩을 준비하였고, NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1:5, v/v)로 70°C에서 10분간 세정한 후, 여러 가지 조건으로 표면을 만들었다.

고전적인 방법으로는 금 표면을 1 mM 11-mercaptopundecanoic acid (MUA, Sigma, USA)와 2 mM mercaptohexanol을 16시간 동안 에탄올 용매에서 처리하고 50 mM N-Hydroxysuccinimide (NHS, Pierce, USA)와 200 mM N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC, Pierce, USA)를 처리하여 카르복실기를 활성화 시키고, EB를 고정하였다.

전하를 가진 표면을 만들기 위하여, 5 mM의 MUA에 16시간 동안 보존하고, 에탄올로 세정한 후, 0.05 N NaOH로 5분간 처리하고 양전하와 음전하를 띤 표면을 위해 각각 1 mg/mL polydiallyldimethylammonium chloride (PDDA)과 poly (sodium 4-styrenesulfonate) (PSS)로 처리하였고, 여기에 추출한 EB를 고정하였다.

### 3) 표면의 관찰

고정된 EB 표면은 AFM과 스캐닝 전자현미경

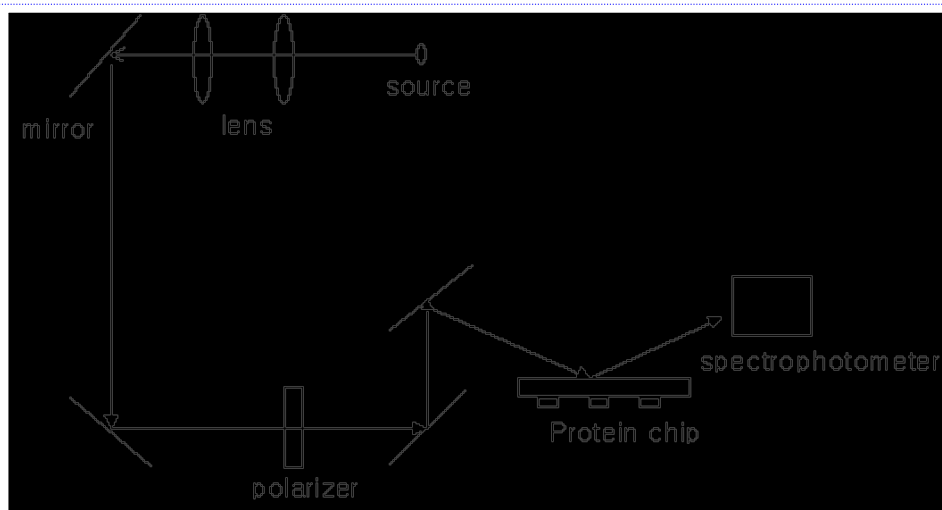


Figure 1. Scheme of self-assembled SPR sensor.

(SEM, JEOL JSM-5410)으로 관찰하였다. AFM imaging영상은 Nanoscope IIIa(Digital Instruments, USA)의 접촉방식의 nanoprobe cantilever(spring constant 0.32 N/M)로 시행하였다.

#### 4) SPR 센서

클라미디아 폐렴에 대한 항체(100 mg/L, DAKO, UK)를 농도별로 반응시킨 후 파장 변화를 자체 개발

한 파장 분석형 SPR 센서로 측정하였다(Fig. 1). 20 W의 텅스텐 할로겐 램프(Oriel, USA)를 광원으로 이용하였고, transverse magnetic polarized light를 얻기 위해 polarizer를 설치하였다. 실리카 프리즘과 단백질 칩을 올려놓고 LabVIEW 소프트웨어를 이용하여 시스템을 움직이도록 하였다. 입사각은 48°로 유지하여 resonance wavelength를 얻을 수 있도록 조절하였고, 반사된 SPR spectrum은 광학 spectrometer (AVS-S2000, Avantes, Netherlands)로 감지하였다. 금속표면위에서의 단백질 상호작용은 파장변화로 정량적 판정을 하였다<sup>14</sup>.

## 결 과

### 1) 배양 결과의 확인

HEp 2 세포주에서 클라미디아 균주(LKK-1)가 배양이 되었음을 형광 현미경으로 확인하였다.

### 2) EB 고정의 확인

고전적인 방법으로 단백질 결합을 유도한 표면위에서 AFM과 SEM으로 관찰한 결과 EB가 확인되지 않아 EB가 고정되지 않음을 알 수 있었다. FITC- conjugated 이차 항원을 반응시키고, 형광현미경으로 관찰한 경우에도 뚜렷한 증가를 확인할 수 없었다. 다음 실험으로 클라미디아 폐렴균의 EB를 PDDA로 처리

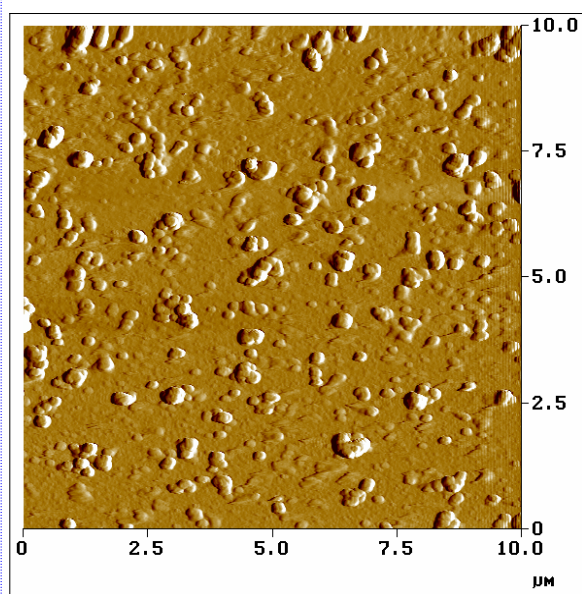
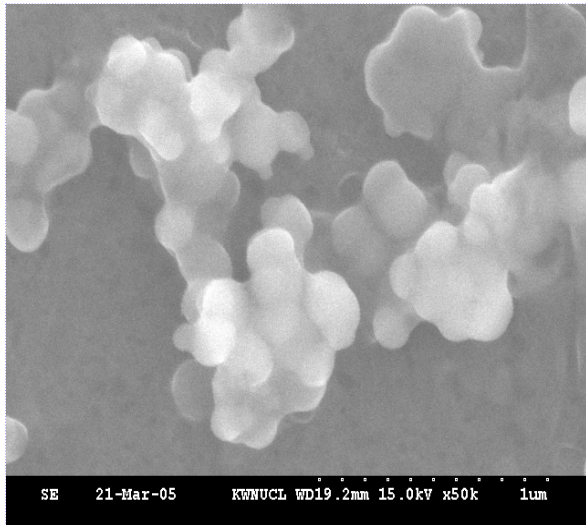
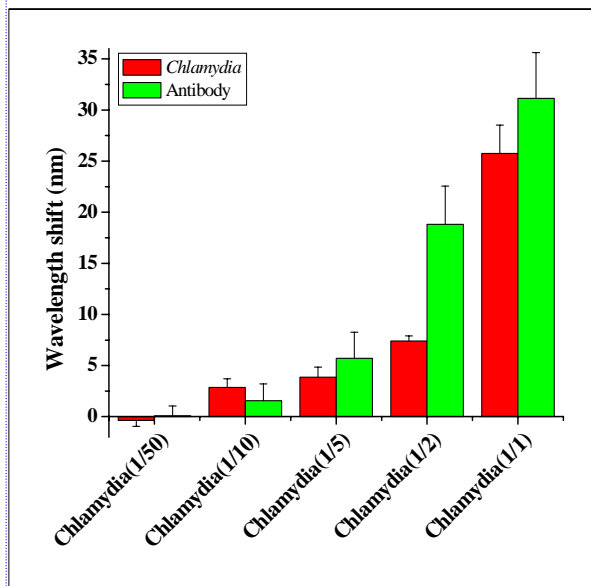


Figure 2. Atomic force microscopy image of *C. pneumoniae*(EB) on PDDA (polydiallyldimethylammonium chloride) gold surface



**Figure 3.** Scanning electron microscopy image of *C. pneumoniae*(EB) on PDDA (polydiallyldimethylammonium chloride) gold surface



**Figure 4.** SPR(surface plasmon resonance) wavelength change after antibody-antigen interaction

한 금 칩 표면위에서 AFM(Fig. 2)과 SEM(Fig. 3)으로 관찰하여 EB가 양전하를 이용하여 표면위에 고정됨을 확인하였다. 음전하를 이용하여 반응시킨 표면에서는 EB가 관찰되지 않아 음전하로는 고정되지 않음을 알 수 있었다.

### 3) 항원-항체를 반응의 확인

EB를 고정시킨 금 칩에 클라미디아 폐렴균에 대한

항체를 반응시킨 결과 항원-항체의 농도비에 비례하여 파장 변화가 30 nm까지 증가함을 확인하였다(Fig. 4)

## 고 찰

본 연구에서 전하를 이용하여 클라미디아 폐렴균의 EB를 gold chip 표면에 고정하여 AFM 영상으로 확인하였고, 제작된 칩을 항체와 반응시킨 후 SPR 센서로 항원-항체 반응이 농도에 비례하여 증가함을 SPR 센서로 확인하였다.

현재까지 클라미디아 폐렴의 진단에 있어서 현재 표준 진단법인 MIF법의 한계점 때문에 새로운 진단법들이 연구되고 있다. ELISA는 특이 항원을 이용하여 객관적으로 수치화 할 수 있다는 장점이 있다. 최근 외국의 보고에서 90%의 일치율이 있다고 보고한 바 있고<sup>15</sup>, 국내환자들을 대상으로 한 ELISA 결과에서도 비교적 좋은 결과를 보였으나<sup>16</sup>, IgG와 IgA의 특이도가 떨어진다는 단점이 있다. PCR을 이용한 DNA 검사법은 민감도가 높으나, 이전 감염에서도 양성으로 나올 수 있다는 문제점이 있고<sup>17</sup>, 방법이 통일되지 않았다는 문제가 있다. 이러한 한계점들 때문에 클라미디아 감염의 새로운 진단법이 요구되고 있다.

단백질 칩은 단백질 상호작용을 파악하기 위한 포스트지놈 시대의 프로테오믹 분야의 중요한 기술로<sup>18</sup> 이론적으로 적은 양의 혈액으로 여러 가지 항원에 대한 검사를 할 수 있다는 장점이 있다<sup>11</sup>. 호흡기 분야에서는 단백질 칩을 이용하여 호흡기 바이러스를 진단하는 연구가 보고된 바 있고<sup>19</sup> SARS의 진단에 대해서 연구가 된 바 있으나<sup>20</sup>, 비정형 폐렴에서는 단백질 칩의 이용이 아직 보고되지 않고 있다. DNA 칩을 이용한 클라미디아 폐렴의 진단에 관한 연구는 있으나<sup>21</sup>, DNA 칩은 DNA 추출 과정과 증폭 과정이 필요하여 시간이 소요된다는 한계점이 있다.

단백질 칩의 경우 그 표면의 처리에 따라서 분석 결과가 달라질 수 있다<sup>22</sup>. 본 연구에서는 PDDA를 이용하여 양전하를 표면에 만들어 항원을 고정하였다. 고전적인 방법으로는 mixed thiol에 NHS, EDC를 이용하여 carboxyl 기를 활성화시키고, 단백질의 아민기와 결합을 유도하나, EB 표면에서는 아민 결합을



이용한 고정기가 거의 되지 않음을 확인하였다. EB 표면이 음전하를 띠고 있는 것을 이용하여<sup>23</sup> 양전하로 만든 금 칩에 고정을 시켜 charged array를 만들었고, PSS로 음전하를 만든 금 칩 표면에는 고정되지 않았다. 이전의 연구에서 단백질의 pI 값에 따라 tissue transglutaminase와 lysozyme 등의 단백질이 음전하 혹은 양전하를 띠는 charged array에 고정되고 반응 결과를 SPR로 측정했던 원리를 적용하였다<sup>24</sup>.

SPR 현상은 금속과 유전체 접촉면(dielectric interface)에서 표면의 성질에 따라 소멸파가 발생되는 전기자기 현상이다. 이는 물리학적으로는 1983년에 발표되어<sup>25</sup> 알려진 현상으로 금속 표면에서의 reflective index의 변화를 민감하게 반영하기 때문에 금속표면 위의 분자생물화학적 상호작용을 감지하기 위한 데 이용이 시도되었고 있다<sup>25,26</sup>. SPR 센서의 장점은 이차적인 라벨링이 필요없다는 점이다<sup>12</sup>. 라벨링의 경우 단백질 활성도에 영향을 줄 수 있으나, SELDI mass spectrometry, AFM, SPR 센서 등은 라벨링 없이 단백질 상호작용이나 표면의 높이 증가를 감지한다. 이외에도 역동적 상호작용을 실시간으로 확인할 수 있고, 광학 시스템이 비교적 단순하다는 점 등이 있으며, 단점은 민감도에 한계가 있다는 점 등이다<sup>25</sup>. 본 연구에서 SPR 센서에 이용한 방법은 파장 신호를 감지하는 방식을 이용했다. 이전까지의 SPR 센서는 고정된 파장으로 들어온 빛을 센서에서 각도 신호로 감지하여 단백질 상호작용을 분석하였다. 최근 파장을 감지하는 SPR 센서의 개발로 단백질 농도를 파악할 수 있었고, 동시에 많은 샘플을 처리할 수 있는 장비와 시스템도 개발되고 있어, 센서의 기술적인 면은 앞으로 많은 부분 발전할 것으로 보인다.

클라미디아 균의 고정을 atomic force microscopy(AFM) 이미징영상으로 관찰하였는데, AFM은 이전의 광학현미경, 형광현미경, 레이저를 이용한 공초점현미경 등보다 해상도가 뛰어나 나노미터 수준의 이미징영상이 가능하고, 세균의 표면이나 분포도 분석할 수 있다는 장점이 있다.

본 연구는 클라미디아 폐렴의 진단을 위해 단백질 칩 표면에 클라미디아 항원을 고정하고, 항체를 반응시켜 확인한 처음 시도라는 데에 의의가 있다. 앞으로

여러 가지 비정형 폐렴에 대한 항체를 고정하여 단백질 칩을 만들면 적은 양의 혈액으로 빠른 시간 내에 비정형폐렴에 대한 혈청학적 진단을 동시에 할 수 있을 것이다.

단백질 칩을 임상에 적용하기에는 해결해야 할 점들이 있는데, 특히, 혈청에는 SPR 센서로 측정하는 경우, 여러 가지 비특이적인 반응들을 일으키는 물질들이 있어 측정에 오차가 생기는 것으로 알려지고 있다. 향후의 연구에서 실제 임상 검체를 이용한 항원-항체 반응의 감지를 이용하기 위해서는 혈청을 반응 전에 가열시키거나, 미리 blocking을 차단시키거나, 완충제로 희석 시키는 등 여러 가지 방법들이 이용되고 있고<sup>27</sup>, 단백질 칩을 이용한 비정형폐렴의 진단에 있어서도 앞으로 민감도와 특이도를 개선시키기 위하여 여러 가지 비특이적인 반응을 줄이는 방법들의 조합하여 시도하거나, 새로운 시도들이 있어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

**연구배경 :** 클라미디아 감염의 진단은 혈청검사로 이루어진다. 현재 표준 방법은 MIF(microimmunofluorescence)이나 이 방법은 주관적이고 시간이 많이 걸리는 단점이 있다. 최근 SPR(surface plasmon resonance) 센서를 이용한 단백질 칩이 감염의 새로운 진단 방법으로 제시되고 있다. 클라미디아 감염의 진단을 위한 단백질 칩 개발을 위하여 금 칩 표면에 세균을 고정하고 클라미디아 균에 대한 항체와 표면 위 세균과의 반응을 SPR 센서를 이용하여 측정하고자 하였다.

**방 법 :** 표면 항원으로 배양한 *Chlamydia pneumoniae* LKK1의 EB를 정제하였다. 양전하를 띤 PDDA (polydiallyldimethylammonium chloride)를 이용하여 전하를 이용한 단백질 칩을 제작하였다. 클라미디아 균을 고정시킨 후에 atomic force microscopy를 이용하여 표면을 관찰하였다. 클라미디아 균에 대한 항체를 투여하고 나서 자체 제작한 SPR 센서를 이용하여 항원 항체 반응을 SPR 파장 변화로 측정하였다.

**결 과 :** 양전하를 띤 PDDA 표면위에서 클라미디아 균이 고정되었음을 확인 하였다. 그리고, 항체를 투여한 후에 SPR 파장의 증가를 확인하였다. 파장 변화는 항원의 농도와 관련이 있었다.

**결 론 :** 전하를 이용하여 클라미디아 폐렴균의 EB를 단백질 칩에 고정하였고, 단백질 칩 위에서의 항원 항체 반응을 확인하였다. 비정형 폐렴의 진단에 SPR 센서가 기여할 수 있을 것으로 사료되나, 실제 임상 시료에의 적용을 위해서는 좀더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

- File TM Jr, Tan JS, Plouffe JF. The role of atypical pathogens: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in respiratory infection. *Infect Dis Clin North Am* 1998;12:569-92.
- Lee SJ, Lee MG, Jeon MJ, Jung KS, Lee H, Kishimoto T. Atypical pathogens in adult patients admitted with community-acquired pneumonia in Korea. *Jpn J Infect Dis* 2002;55:157-9.
- Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM, Pal S, Hessel A, Penninger JM. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* 1999;283:1335-9.
- Falck G, Gnärpe J, Hansson LO, Svardsudd K, Gnärpe H. Comparison of individuals with and without specific IgA antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. *Chest* 2002;122:1587-93.
- Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, et al. Standardizing Chlamydia pneumoniae assays: recommendations from the centers for disease control and prevention and the laboratory centre for disease control. *Clin Infect Dis* 2001;33:492-503.
- File TM. Community-acquired pneumonia. *Lancet* 2003;362:1991-2001.
- Campbell CJ, Ghazal P. Molecular signature for diagnosis of infection: application of microarray technology. *J Appl Microbiol* 2004;96:18-23.
- Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, di Cristana M, Rossi R, Bistoni F, Crisanti A. Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin Chem* 2002;48:121-30.
- Jongerijs-Gortemarker BG, Goverde RL, van Knapen F, Bergwerff AA. Surface plasmon resonance detection of serum antibodies against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *J Immunol Methods* 2002;266:33-44.
- Bokken GC, Corbee RJ, van Knapen F, Bergwerff AA. Immunochemical detection of *Salmonella* group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor. *FEMS Microbiol Lett* 2003;222:75-82.
- MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 2000;289:1760-3.
- Zhu H, Snyder M. Protein chip technology. *Curr Opin Chem Biol* 2003;7:55-63.
- Lee SJ, Nam EC, Won J, Park WS, Kim WJ, Han SS, et al. Characterization of the first Korean isolate of a *Chlamydia pneumoniae* strain. *Jpn J Infect Dis* 2003;56:62-4.
- Yuk JS, Yi SJ, Lee HG, Kim YM, Ha KS. Characterization of surface plasmon resonance wavelength by changes of protein concentration on protein chips. *Sens Actuators B Chem* 2003;94:161-4.
- Hermann C, Gueinzus K, Oehme A, von Aulock S, Straube E, Hartung T. Comparison of quantitative and semiquantitative ELISA for IgG against *C. pneumoniae* to a MIF test for use with patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2004;42:2476-9.
- Lee HY, Kim WJ. ELISA for antibodies against *Chlamydia pneumoniae* compared with MIF test with patients with chronic cough. *Tuberc Respir Dis* 2005;59:47-52.
- Menendez R, Cordoba J, de la Cuadra P, Cremades MJ, Lopez-Hontagas JL, Salavert M, et al. Value of the polymerase chain reaction assay in noninvasive respiratory samples for diagnosis of community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1868-73.
- Yuk JS, Ha KS. Proteomic applications of surface plasmon resonance biosensor: analysis of protein arrays. *Exp Mol Med* 2005;37:1-10.
- Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D, et al. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15687-92.
- Lu DD, Chen SH, Zhang SM, Zhang ML, Zhang W, Bo XC, et al. Screening of specific antigens for SARS clinical diagnosis using a protein microarray. *Analyst* 2005;130:474-82.
- Sachse K, Hotzel H, Slickers P, Ellinger T, Ehrlich R. DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp. *Mol Cell Probes* 2005;19:41-50.
- Angenendt P, Glöckler J, Murphy D, Lehrach H, Cahill DJ. Toward optimized antibody microarrays: a com-

- parison of current microarray support materials. Anal Biochem 2002;309:253-60.
  23. Vance DW Jr, Hatch TP. Surface properties of Chlamydia psittaci. Infect Immun 1980;29:175-80.
  24. Yi SJ, Yuk JS, Jung SH, Zhavnerko GK, Kim YM, Ha KS. Investigation of selection protein immobilization on charged protein array by wavelength interrogation-based SPR sensor. Mol Cells 2003;15:333-40.
  25. Yuk JS, Jung SH, Jung JW, Hong DG, Han JA, Kim YM, et al. Analysis of protein interactions on protein arrays by a wavelength interrogation-based surface plasmon resonance biosensor. Proteomics 2004;4:3468-76.
  26. McDonnell JM. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. Curr Opin Chem Biol 2001;5:572-7.
  27. Hifumi E, Kubota N, Niimi Y, Shimizu K, Egashira N, Uda T. Elimination of ingredients effect to improve the detection of anti HIV-1 p24 antibody in human serum using SPR apparatus. Anal Sci 2002;18:863-7.
-