

돼지의 소장점막하 조직과 히알루론산을 이용한 조직공학적 담체의 제조 및 특성분석

임지에 · 김순희 · 강길선[†] · 이종문

전북대학교 고분자 소재 융합 연구센터

(2008년 3월 28일 접수, 2008년 5월 7일 수정, 2008년 5월 7일 채택)

Preparation and Characterization of Tissue Engineered Scaffold Using Porcine Small Intestinal Submucosa and Hyaluronic Acid

Ji Ye Lim, Soon Hee Kim, Gilson Khang[†], and John M. Rhee

Polymer Fusion Research Center, Chonbuk National University,

664-14, Dukjin, Jeonju 561-756, Korea

(Received March 28, 2008; Revised May 7, 2008; Accepted May 7, 2008)

초록: 면역 거부반응이 없는 돼지 소장점막하조직(small intestinal submucosa, SIS)과 천연보습제인 히알루론산(hyaluronic acid, HA)은 생체재료로 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 이를 이용하여 스폰지를 제조하고 이들의 특성을 분석하였다. SIS-HA 스폰지는 완성된 SIS 스폰지에 1 wt%의 HA 겔을 첨가하여 동결건조법으로 제조하고 100 mM의 가교제를 통해 가교하여 이를 전자주사현미경, 적외선분광기, 물흡수성 실험을 하였다. 초기 세포부착률을 확인하고자 NIH/3T3를 분주하여 MTT 분석법을 수행하였다. FT-IR 분석을 통해 C-O관능기가 관찰되어 SIS-HA 스폰지 내부의 HA가 빠져나가지 않고 고르게 분포되어 있음을 확인하였고, MTT분석을 통하여 제조된 스폰지에서의 높은 세포생존율을 확인하였다. 즉, 본 연구에서 제조한 SIS-HA 스폰지는 SIS와 HA 각각의 특성을 모두 내재하고 있어 조직공학적 담체로 적합할 것이다.

Abstract: The porcine small intestinal submucosa(SIS) without immunorejection responses and hyalurononic acid(HA) can be used as biomaterials. In this study, we tried to design and characterize novel sponge. SIS-HA sponge was prepared by freeze-drying after addition 1wt% HA solution into fabricated SIS sponge. Sponge was crosslinked with 1-ethyl-(3-3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) solution with 100 mM concentration for 24 hrs and lyophilized. SIS-HA sponge was characterized by scanning electron microscopy and fourier transform infrared spectrometer. And water absorption ability of sponge was evaluated. We seeded NIH/3T3 cells in SIS-HA sponge and cellular attachment was assayed by 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT) test. We demonstrated presence of HA in SIS-HA sponge from C-O functional group observed by the FT-IR analysis. Moreover, we confirmed low cytotoxicity and high cell viability of the SIS-HA sponges. Therefore, we could expect that SIS-HA scaffolds are applicable for the tissue regeneration.

Keywords: small intestinal submucosa, sponge, hyaluronic acid, crosslinking, scaffold.

서론

조직공학에 사용되는 고분자담체는 분리된 세포를 집적화하여 생체내에서 세포가 왕성하게 활성화하여 새로운 기질을 분비하게 함으로써 분화된 조직을 만들어준다. 이때 사용되는 고분자의 구조는 화학적 형성이나, 미세 구조화학적 형상이 세포와 친화력이 있어야 한다.¹⁻⁴

최근 콜라겐은 생체의료용 재료로 주목받고 있으며 많은 분야에서

다양한 형태로 응용되고 있다. 이는 피부나 이, 연골, 건 등을 구성하는 당단백질이며 당지질로서 세포 등의 부착을 우수하게 하며, 산소 전달 및 세포 이동에 관여하는 섬유성으로 신축성을 가지는 물성을 지니고 있어 인체 내에서 적절한 담체로서의 역할을 수행할 수 있다.⁵⁻⁷ 돼지의 소장 점막하조직(porcine small intestinal submucosa, SIS)은 세포가 존재하지 않는 조직으로 면역반응이 거의 일어나지 않는다. SIS는 약 60~90일 간의 생분해능을 가지며 수분흡수율이 높고 자체의 기계적 물성도 비교적 양호하다.⁸ 또한 글리코사미노글라이칸, 프로테오글라이칸, 파이프록틴과⁹⁻¹¹ 상처 치유와 복원에 중요한 역할을 하는 섬유아세포 성장인자,^{12,13} 전환 성장인자 등과 같은 여러

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

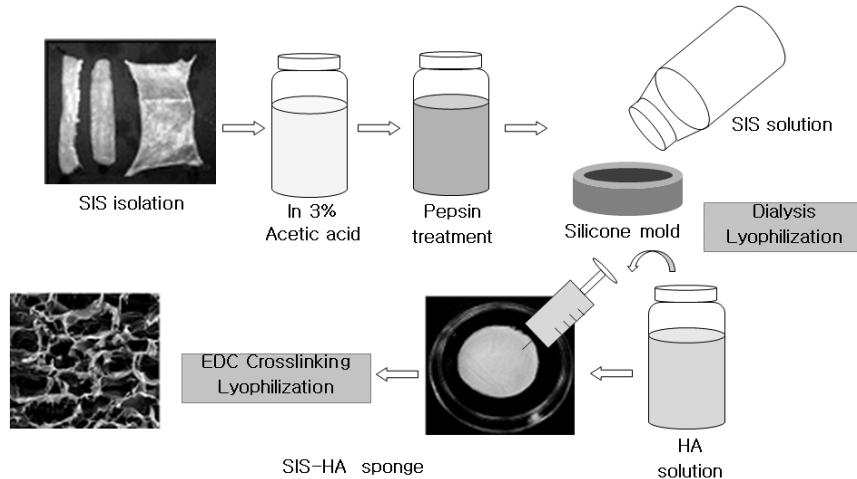


Figure 1. Process for fabricating SIS-HA sponge.

가지 성장인자들을¹⁴⁻¹⁶ 함유하고 있다.

히알루론산(hyaluronic acid, HA)은 관절액, 연골, 피부 등에 많이 존재하는 성분으로 많은 양의 물과 결합하여 겔 상태가 되어 관절의 윤활작용이나 피부의 유연성에 관여한다. 또한 점성이 커서, 박테리아와 같은 외부 물질의 침투를 막아 피부 감염 등의 질병을 예방한다. 특히 히알루론산은 주성분인 프로테오글라이칸이 코어 단백질을 중심으로 많은 수의 글리코사미노글라이칸들과 결합된 구조를 가지고 있는 특성에 의하여 친수성이 매우 뛰어나^{17,18} 천연 보습제라 부를 수 있는 물질이며, 자신의 무게보다 약 6000 배나 되는 물을 품을 수 있는 능력이 있다. 그러나 이런 탁월한 능력에도 불구하고 히알루론산은 수용성, 빠른 체내 분해성 및 조직 내에서의 짧은 체류기간 때문에¹⁹ 여러 과학자들에 의해 히알루론산과 합성고분자를 화학반응을 통한 일련의 연구가 진행되고 있다.^{20,21}

본 연구는 여러 가지 생체 대체물로서 다양하게 응용 가능하도록, 긴 생분해능과 자체의 기계적 물성이 양호한 SIS와 세포의 점착성이 우수하여 세포가 성장하기에 좋은 조건을 가지는 HA의 특성을 이용하여 SIS-HA 담체를 제조하고 다공의 생체활성물질 전달 디바이스로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

실 험

SIS 분리. SIS를 분리하기 위하여 돼지의 공장에 있는 지방조직을 제거 후 물로 깨끗이 공장 안과 밖을 여러 번 세척한 다음, 세척된 공장을 대략 10 cm 정도의 길이로 잘라 아세트산에 담귀 붙어있는 세포를 모두 과사시킨 후, 다시 식염수에 넣고 pH 7이 되도록 세척하였다. 잘라낸 공장을 물리적 힘을 가해서 바깥층에 있는 치밀층을 제거하고 다시 뒤집어서 점막 근육층을 제거하여 SIS 층만을 분리하였다. 이렇게 얻은 SIS를 마지막으로 다시 식염수로 세척하고, -80 °C 급저온 냉각기에 보관하였다. -80 °C에서 보관한 SIS를 동결건조한 뒤, 믹서기로 분쇄한 SIS를 동결 분쇄기(6700, SPEX Inc, USA)를 이용하여 대략 180 μ m이하의 고운 분말을 얻었다.

SIS 스폰지 제조. 3% 아세트산(Sigma Chem. Co., St.Louis, MO, USA)에 0.1% 펩신(Sigma Chem.)을 함유한 용액에 1 wt%의 SIS

분말을 첨가시켜 상온에서 24시간 교반 후, 4 °C에서 24시간 보관하였다. 이를 직경 3 mm의 자체 제작된 원형 몰드에 담고 급랭 후 동결 건조시켜 스폰지 형태의 SIS를 얻었다. 이들의 제조 모식도를 Figure 1에 나타내었다. 제조된 스폰지는 95, 90, 80, 70%의 에탄올에 EDC(1-ethyl-(3-3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride, Sigma Chem.)용액 100 mM의 농도로 순서대로 경화시켰다. 경화 후 40 °C의 증류수에 1시간 동안 세척하여 급랭 후 재동결 건조하여 최종적으로 경화된 SIS 스폰지를 얻었다.²²

HA 스폰지 제조. HA(Fluka Co., USA)에 DW를 넣어 녹여 상온에서 24시간 교반시킨 후, 4 °C에서 24시간 보관하여 1% HA 용액을 만들었다. 이를 웰(Nunc 48well)에 1 mL 분주하여 4, -20, -70 °C에서 각각 6시간 보관 후 동결 건조시켜 Figure 2와 같은 화학적 메카니즘을 이용하여 95% 에탄올에 100 mM의 EDC 용액으로 경화하였으며 조건을 Table 1에 나타내었다. 얻어진 HA 스폰지는 40 °C의 증류수에 1시간 동안 세척하여 급랭 후 재동결 건조하여 HA 스폰지를 얻었다.

SIS-HA 스폰지 제조. HA에 증류수를 넣어 녹여 상온에서 24시간 교반시킨 후, 4 °C에서 24시간 보관하여 1% HA 용액을 만들었다. 웰(Nunc 48 well)에 완성된 SIS 스폰지를 넣고 SIS 스폰지 내부로 HA 용액이 충분히 흡수될 수 있도록, 200 μ L씩 5번 주입하였다. 이를 4, -20, -70 °C에서 각각 96시간 보관 후 동결 건조시켜 Figure 2와 같은 화학적 메카니즘을 이용하여 95% 에탄올로 EDC 100 mM의 용액을 제조하여 24시간 동안 HA와 SIS를 가교하였다. 이를 Table 1에 나타내었으며 이들의 모식도는 Figure 1에 나타내었다. 그 후, 40 °C의 증류수에 1시간 동안 세척하여 급랭 후 재동결 건조하여 최종적으로 SIS-HA 스폰지를 얻었다.

세포의 초기 부착률. 세포의 부착률은 MTT(3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석법을 이용하여 관찰하였다. 섬유아세포(NIH/3T3 mouse embryo fibroblast, KCLB21658, Korean Cell Line Bank, Korea)는 Roswell Park Memorial Institute 1640 medium(RPMI 1640, Gibco BRL., USA)와 F-12 nutrient mixture(Ham's F-12, Gibco)에 10%(v/v) 우태혈청(FBS, Gibco) 및 1% 항생제(antibiotics-antimycotics)

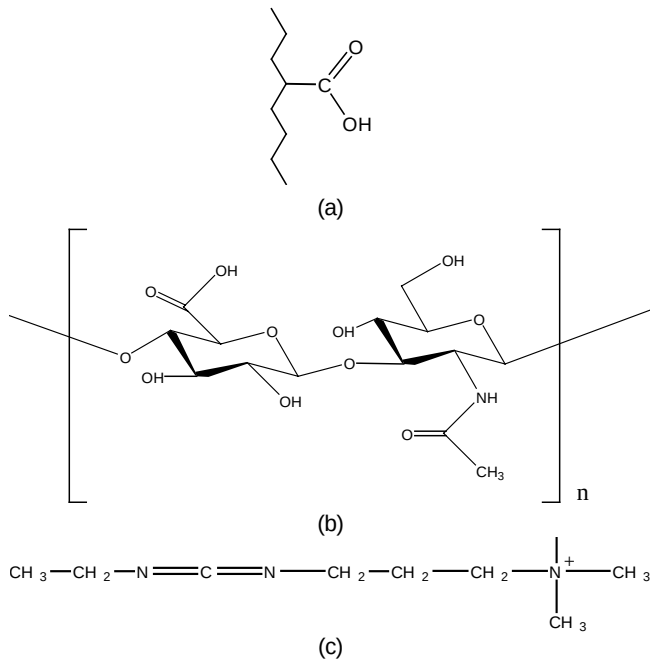


Figure 2. (a) Chemical scheme for modification of small intestinal submucosa, (b) Chemical scheme for modification of amphiphilic hyaluronic acid, and (c) EDC.

Table 1. A Sequence of Cross-Linking Protocol

EDC Density (mM)	SIS and HA sponge Ethanol: DW Solution	SIS/HA sponge Day	Ethanol: DW Solution	Day
100	95 : 5	1		
100	90 : 10	2		
100	80 : 20	2	95 : 5	1
100	70 : 30	2		

를 함유한 배양액으로 37 °C, 5% CO₂에서 배양하였다. 배양한 NIH 3T3 세포는 0.05% 트립신(Trypsin-EDTA, Gibco)을 이용하여 수거한 후, 제조된 스폰지에 1×10⁵ cell/담체의 농도로 계산하여 파종하였다. 배양 후, MTT (Sigma Co.) 용액(5 mg/mL)을 100 μL씩 넣고 4시간 동안 5% CO₂하의 37 °C 인큐베이터에서 배양하였다. 보라색 결정이 생성되면 PBS로 결정이 떨어지지 않게 3번 행구고 새로운 웰에 스폰지를 옮겨 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma Co.) 용액을 1 mL 넣어 2시간 동안 교반하였다. 96 웰 플레이트에 샘플을 100 μL씩 분주하고 플레이트 리더기(E-max, Molecular Device, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.²³

물 흡수성 실험. 제조된 HA와 SIS/HA 스폰지의 물 흡수 능력을 측정하기 위해 100 mM에 경화되어 완성된 스폰지를 10 mL의 물을 넣고 용기의 무게 및 용기를 뺀 물의 무게를 측정하고 0.05 g의 HA 및 SIS-HA 스폰지를 물에 넣어 1분간 방치 후 스폰지를 용기에서 꺼내어 물을 흡수한 담체의 표면의 물기를 제거한 후 무게(W_{wet})를 측정하여 식 (1)에 대입하여 물 흡수율을 측정하였다.⁸ 모든 실험은 동일 조건에서 세 번씩 수행하였으며 용기 내에서 완전히 젖

음 상태에 도달하기까지의 흡수성을 분과 시간단위로 실험을 하였다.

$$W(\%) = \frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} \times 100 \quad (1)$$

전자주사현미경 측정. SIS-HA 스폰지 경화 후의 형태학적 특성을 주사전자현미경(Hitachi, S-2250 N, Japan)으로 관찰하였다. SIS-HA 스폰지는 표면, 몰드바닥면을 가로축 및 세로축으로 잘라 그 단면을 관찰하였다. 샘플들은 금속판에 고정시키고 아르곤 하에서 2분 동안 플라즈마 스퍼터(Model SC 500 K, Emscope, UK)를 이용하여 백금을 코팅하였다. 관찰된 이미지는 분석 프로그램인 Bio-LV SEM(SN-3000 Hitachi, Japan)을 이용하여 분석하였다.

적외선 분광기 측정. 가공된 SIS-HA 스폰지에서 콜라겐 사슬과 HA사슬의 가교결합 여부를 확인하고자 FT-IR(Bio-Rad Digilab, FTS-165, Canada)로 측정하였다. 이 분석은 KBr 펠렛법²⁴을 이용하여 각 2.5 mg의 스폰지를 알루미늄 용기에 넣고 시편을 만들어 측정하였다.

결과 및 토론

SIS-HA 스폰지 제조. 천연재료로서 완성된 SIS 스폰지에 물리 화학적으로 HA 겔을 함유시켜 SIS-HA 스폰지를 제조하였다. 이의 물성 개량과 잔존 EDC로 인한 세포독성에 미치는 영향을 없애기 위해

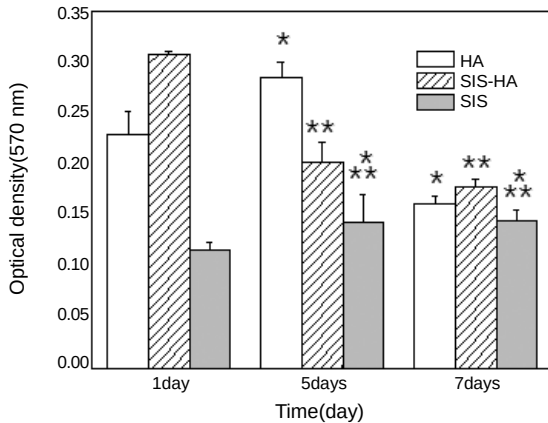


(a)



(b)

Figure 3. The gross pictures of SIS-HA sponge and HA sponge. (a) HA sponge and (b) SIS-HA sponge.



N=3; $p < 0.05$;

* Significantly different from 1day HA group.

** Significantly different from 1day SIS-HA group.

*** Significantly different from 1day SIS group.

Figure 4. NTH/3T3 cell viability in SIS-HA sponge.

100 mM의 EDC와 95, 90, 80, 70%의 에탄올에 순차적으로 경화하였으며 이를 Table 1에 나타내었다. 완성된 각각의 스폰지 육안 관찰 결과를 Figure 3에 나타내었다. 육안관찰 결과 두 스폰지 모두 가 교전과 같은 크기를 나타내었으며 HA 스폰지 보다 SIS-HA 스폰지가 형태 유지력이 좋고 매끄러워 보이는 것을 확인하였다.

세포의 초기 부착률. 섬유아세포(NIH/3T3)는 3세대 배양하여 제조된 SIS-HA 스폰지 형태의 담체에 파종하였다. 이를 배양 후 1, 5, 7일 동안 초기 부착률을 확인하였으며 이를 Figure 4에 나타내었다. HA 스폰지에서는 초기 부착률은 우수하였지만 시간이 경과함에 따라 스폰지가 빠르게 분해되어 측정이 불가능하였다. 반면에 제조된 SIS-HA 스폰지는 SIS 스폰지보다 높은 세포 생존률을 보였으며, 시간 경과 후에도 처음과 같은 형태를 유지하는 것을 확인하였다. 이는 HA 스폰지의 우수한 수분흡착성으로 인한 결과로 사료되며, 통계적으로 1일에 해당하는 실험군들을 기준으로 하였을 때 $p < 0.05$ 범위에서 유의성을 나타내었다. 또한, HA의 단기적인 분해성을 고려할 때, SIS-HA 스폰지는 SIS의 긴 생존해능과 우수한 세포 친화력의 특성에 의해 SIS-HA 스폰지 내부에서 SIS가 HA의 단점을 보완하여 지속적인 세포 부착을 도와줄 것이라 사료된다.

물 흡수율 측정. 완성된 HA, SIS-HA 스폰지의 친수성 효과를 Figure 5에 나타내었다. 초기 흡수율은 두 스폰지 모두 증가하였으나, 특히 HA 스폰지는 그 특성에 의해 빠른 속도로 증가함을 보였다(Figure 5(a)). 그러나 시간이 경과함에 따라 HA 스폰지는 감소를 보였고 SIS-HA 스폰지는 서서히 증가하는 수분 함유율을 확인할 수 있었다. 이는, 가교된 HA는 물에서 빠른 시간내에 분해되는 성질을 갖으나 SIS-HA의 경우, HA와 SIS가 혼합 및 가교되어 SIS-HA 스폰지 내에서 SIS가 스폰지 자체의 기계적 물성도를 높여주고 가교된 HA로 인하여 수분 함유율이 감소하지 않고 비교적 증가하는 것으로 사료된다.

전자주사현미경 측정. HA 스폰지와 SIS-HA 스폰지 다공체의 미세 형태는 표면과 내부에 균일한 다공을 가지며 다공도가 높게 나타났다. 특히 HA 내부에서는 뚜렷한 다공의 형성을 확인할 수 없었

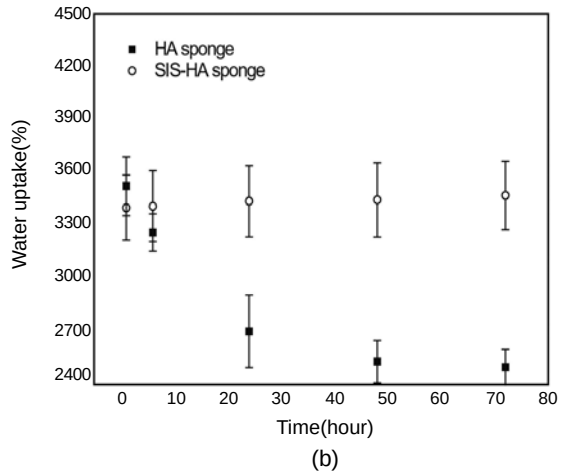
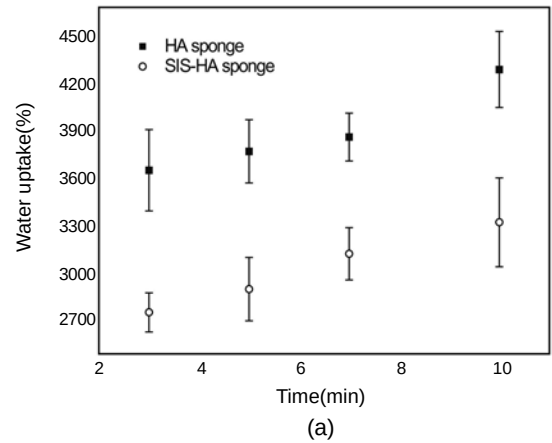


Figure 5. The water uptake ability of crosslinked HA and SIS-HA sponge at initial stage and during long-term.

지만, SIS-HA는 다공의 크기가 크고 열린 다공의 형태를 관찰할 수 있었다(Figure 6). 이는 HA의 높은 수분 흡수율과 약한 물성으로 인하여 100 mM에 경화 후 세척 중, 경화되지 않는 HA가 잠재적으로 제거되면서 다공을 지탱하는 상태가 상대적으로 감소되어 팽윤된 HA가 다공을 닫는 현상을 보여주었고, SIS-HA는 약한 HA의 물성을 SIS가 보완하고 잡아주어 SIS-HA 스폰지 내부에서 균일한 다공을 갖도록 하는 것으로 사료된다.

적외선 분광기 측정. FT-IR 분석을 통하여 스폰지 내의 화학적 성분을 정성적 분석을 하여 Figure 7에 나타내었다. 이전 연구에서 SIS 스폰지 측정결과 아미드 I(1653 cm^{-1}), 아미드 II(1543 cm^{-1}) 및 아미드 III(1453 cm^{-1})의 피크를 확인하였으며, 이로써, EDC 결합에 의하여 SIS의 주성분인 콜라겐에 풍부하게 존재하는 카르복실기의 활성화로 인한 아민의 치환반응으로 아미드를 형성하고, 카르복실기의 상대적인 감소가 일어남을 예상할 수 있었다.⁸ SIS-HA는 사전 연구에서 얻은 결과와 같이, SIS 스폰지에서 확인할 수 있었던 아미드 I, II 및 III가 모두 관찰되었으며 HA의 사슬에서만 관찰되어지는 C-O($1200-1300 \text{ cm}^{-1}$) 관능기가 SIS-HA 스폰지에서 관찰되어지는 것을 확인하였다. 이는 SIS와 HA가 가교결합되어 나타난 결과로 사료된다.

결론

본 연구에서는 세포의 부착과 조직형성에 있어 중요한 역할을 하는 3차원적 SIS-HA 다공성 스폰지를 제조 후, NIH/3T3 세포를 파종

하여 초기 부착물의 확인과 특성 분석을 하였다. 제조된 SIS-HA 스폰지는 손쉽게 제조할 수 있었으며 육안관찰 결과 HA스폰지에 비해 매끄럽고 물성이 좋은 SIS-HA 스폰지를 얻을 수 있었다. 이를 여러 분석방법을 통해 확인한 결과 단독의 HA 스폰지에 비해 HA가 함유

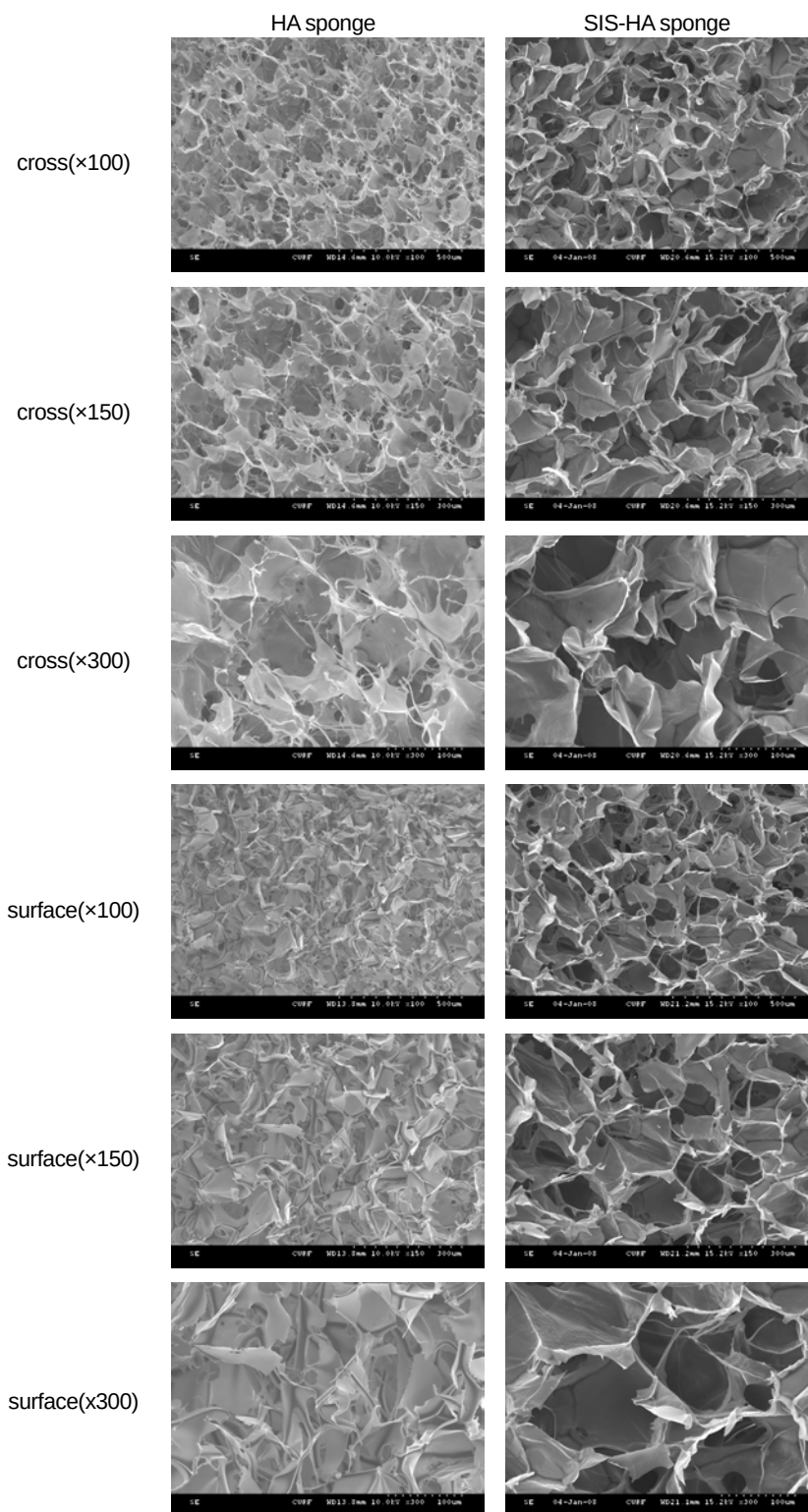


Figure 6. SEM measurements of HA and SIS-HA sponge (magnification $\times 100$, 150, and 300).

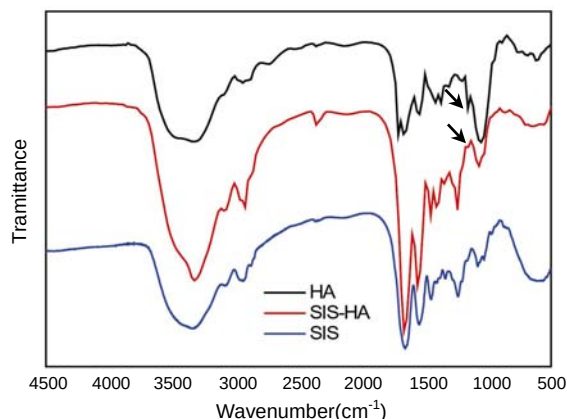


Figure 7. FT-IR spectra of HA and SIS-HA sponge (arrow is point out C-O functional group).

된 SIS-HA 스폰지 내부에서 열린 다공과 상호 연결된 고른 다공구조를 보임을 확인하였다. 또한 완성된 SIS 스폰지에 HA 겔을 첨가하여 EDC로 경화한 결과 C-O관능기가 관찰되어짐으로써, SIS-HA 스폰지 내부의 HA가 빠져나가지 않고 고르게 분포되어 있음을 확인할 수 있었다. 즉 본 연구에서 제조한 SIS-HA 스폰지는, 천연 재료로서 다루기 쉽고 세포의 점착성이 우수하며 SIS와 HA 각각의 특성을 모두 내재하고 있어 세포의 성장에 긍정적인 영향을 미치므로 조직공학적인 다공성 담체로 적합하다고 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지부(0405-BO01-0204-0006)와 세포응용사업단(SC4110)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- G. Khang, M. S. Kim, S. H. Cho, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 9 (2004).
- G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polym. Sci. Tech.*, **12**, 527 (2001).
- G. Khang, S. J. Lee, I. Lee, and H. B. Lee, *Polym. Sci. Tech.*, **13**, 4 (2002).
- G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polym. Sci. Tech.*, **13**, 226 (2002).
- S. B. Song, G. Khang, S. K. Hong, I. Lee, S. W. Kim, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **4**, 13 (2000).
- K. Lindberg and S. F. Badylak, *Burns*, **27**, 254 (2001).
- S. F. Badylak, *Semin. Cell Devel. Biol.*, **13**, 227 (2002).
- H. W. Shin, S. H. Kim, J. W. Jang, M. S. Kim, S. H. Cho, H. B. Lee, and G. Khang, *Polym. Sci. Tech.*, **2**, 194 (2004).
- J. P. Hodde, R. D. Record, R. S. Tullius, and S. F. Badylak, *Tissue Eng.*, **8**, 225 (2002).
- T. B. McPherson, H. Liang, R. D. Record, and S. F. Badylak, *Tissue Eng.*, **6**, 223 (2002).
- T. B. McPherson and S. F. Badylak, *Tissue Eng.*, **4**, 75 (1998).
- M. J. Shon, S. Y. Lee, T. H. Kim, C. K. You, S. Kim, P. H. Choung, Y. Son, E. K. Park, and S. Y. Kim, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 356 (2005).
- S. Y. Lee, M. J. Shon, T. H. Kim, S. Kim, Y. Son, S. Y. Kim, and E. K. Park, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2**, 362 (2005).
- M. A. Suckow, J. P. Hodde, W. R. Wolter, and M. C. Hiles, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **18**, 1105 (2007).
- J. P. Hodde, D. M. Ernst, and M. C. Hiles, *J. Wound Care*, **14**, 23 (2005).
- C. A. McDevitt, G. M. Wildey, and R. M. Cutrone, *J. Biomed. Mater. Res.*, **67A**, 637 (2003).
- G. Prestwich, D. Marecak, J. Marecek, K. Vercruysse, and M. Ziebell, *J. Control. Release*, **53**, 93 (1998).
- S. N. Park, H. J. Lee, K. H. Lee, and H. Seo, *Biomaterials*, **24**, 1631 (2003).
- H. S. Nam, J. H. Kim, J. H. An, and D. J. Chung, *Polymer (Korea)*, **25**, 476 (2001).
- S. Cai, Y. Liu, X. Z. Shu, and G. D. Prestwich, *Biomaterials*, **26**, 6054 (2005).
- H. S. Yoo, E. A. Lee, J. J. Yoon, and T. G. Park, *Biomaterials*, **26**, 1925 (2005).
- K. S. Park, C. M. Jin, S. J. Yun, K. D. Hong, S. H. Kim, M. S. Kim, J. M. Rhee, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer (Korea)*, **29**, 501 (2005).
- J. Y. Lim, S. H. Kim, S. W. Park, J. W. So, M. O. Back, M. S. Kim, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 96 (2008).
- L. A. Forato, R. B. Filho, and A. Colnago, *Anal. Biochem.*, **15**, 136 (1998).