

자성체를 이용한 단백질칩 마이크로어레이의 개발

최 용성, 이 경섭*, 박 대희
원광대학교, *동신대학교

Development of Protein Chip Microarray Using a Magnetic

Yong-Sung Choi, Kyung-Sup Lee* and Dae-Hee Park
Wonkwang University, *DongShin University

Abstract - In this paper, we have been described a new constructing method of multichannel biosensor using self-assembly by magnetic force interaction. A metal particle and an array was fabricated by photolithographic. Biomaterials were immobilized on the metal particle. The array and the particles were mixed in a buffer solution, and were arranged by magnetic force interaction and self-assembly. A quarter of total Ni dots were covered by the particles. The binding direction of the particles was controllable, and condition of particles was almost with Au surface on top. The particles were successfully arranged on the array. The biomaterial activities were detected by chemiluminescence.

용한 집적형바이오센서의 구축예이다. David 등은 polymethyl-styrene-divinylbenzene 비드 (bead)를 배치·고정화하는 곳에 광파이버를 이용하여 센서를 구축하였다. 비드를 배치·고정화하기 위한 홀은 광파이버 끝의 코어를 에칭하여 제작하였다. 비드를 배치·고정화하기 위한 친화력은 비드에 수식된 아미노기와 파이버 사이의 정전기력을 이용하였다. 이 센서의 측정은 배치·고정화한 비드에서의 형광에 의한 검출이다. 이 센서의 특징으로서는 구축시간이 80초로 짧고, 하나의 채널의 직경이 약 300nm로 매우 작다. 이 때문에 집적화가 매우 앞선 센서가 구축되었다. 그러나, 검출방법이 형광검출만으로 한정되어 있다.

따라서, 본 연구는 다종류의 생체재료를 동시에 고정화할 수 있는 방법의 개발과 광과 전기의 복합적인 검출을 할 수 있는 센서를 개발하는 것을 목적으로 하였다. 이 목적을 실현하기 위하여, 재료의 배치조작에 자기조직화의 방법을 채용하였다. 이와 같은 방법을 이용하여 시스템을 구축한 보고로서는 중력, 표면장력, 친수성, 소수성상호작용, 정전기력 및 생체재료의 특이적 친화력 등이 있다 [4-11]. 식별소자를 고정화하는 담체는 전기화학반응이 가능한 금체담체를 제작하였다. 이 담체를 기판에 배치하는 데는 자기력에 의한 자기조직화의 방법을 이용하였다. 집적형바이오센서를 구축하기 위하여, 포토 리소그래픽 기술, 자기조직화기술을 이용하였다.

1. 서 론

바이오센서는 생체재료가 갖는 매우 우수한 분자인식 능력을 이용하여 화학물질의 농도를 측정하는 센서이다. 원리적으로는 바이오센서의 채널수를 늘리고 집적형으로 함으로써, 측정대상물질의 종류를 증가시킬 수 있다. 바이오센서를 이용하여 각종 효소기질, 항원, DNA 등을 동시에 측정할 수 있을 뿐만 아니라, 냄새나 맛을 감지할 수 있는 디바이스도 구축할 수 있다. 이러한 센서를 제작하는 데는 생체재료인 효소나 항원 등 식별물질의 고정화가 필요하다. 지금까지는 각각의 생체물질들을 순차적으로 기판에 배치하여 고정화하였다. 이 방법은 센서의 미소화와 고정화 생체재료 종류의 증가에 대응하기 곤란하여, 측정대상이 한정되는 문제가 있었다. 또한, 단일검출방법으로서 검출방법에 적합한 식별소자를 선택해야 하므로, 채널로서 이용하는 식별소자의 선택폭이 한정되었다.

한편, 서로 다른 생체재료를 각각 담체에 병렬로 고정화하고, 이 담체를 기판에 무작위로 배치하는 방법으로 집적형센서를 구축한 예는 1998년 David 등에 의한 연구보고가 있다 [1-3]. 이들이 미립자의 자기조직화를 이

2. 실험 방법

2.1 센서용 미소담체의 제작

센서용 미세담체의 제작은 기상성장인 증착장치를 사용하였고, 1 μ m 이하 두께의 담체를 제작할 수 있었다. 유리기판을 초음파세척기로 순수, 이소프로필-알콜(IPA), 아세톤, IPA, 초순수의 순서로 각각 5분씩 하였다. 이 기판에 Cr 200Å, Al 4000Å이 증착되었다. 네거티브형 레지스트인 SU-8 50를 사용하여 레지스트 패턴을 제작하였다. 제작된 레지스트패턴에 Ni 4000Å, Ti 200Å, Au 2000Å을 증착하였다. 마지막으로 80~85°C

에서 기판을 SU-8 REMOVER에 10분간 담구어 레지스트를 제거하였다.

2.2 유리 bead 담체에 효소의 고정화

효소의 유리 비드에의 고정화방법은 그림 1에 나타내었다. 직경 100 μ m의 유리 비드를 아세톤에 담구어 20분간 각반하여 세척하였다. 이 담체의 금표면에 티올결합에 의하여 카르복실기를 수식하기 위하여 100 μ M의 3-카르복시프로필디설파이드 에탄올 (3-CPD) 용액중에 30분간 담구어 각반하였다. 그후 에탄올에 의한 세척을 2회하였다. 카르복실기를 활성화시키기 위하여 25mg의 수용액카르보디이미드 (EDC)와 15mg의 N-하이드록시석신이미드 (NHS)를 10ml의 90%, 1,4Dioxane에 용해한 것에 담구어 각반하였다. 종료후 농량의 증류수로 5분간 각반하고, 그후 증류수로 2회 세척하였다. POD 1mg을 pH8.0, 1mM의 인산완충액 1ml중에 녹여서 담체를 12시간 담구어 효소를 고정화하였다.

2.3 Ni 도트 어레이의 제작

기판의 세척, 전극제조를 위한 Cr과 Au의 증착, 도금형틀 제작을 위한 포토리소그래픽은 기상성장법에 의한 센서용 미소담체의 제작과 동일 조건이다. 유리기판상에 Cr과 Au를 증착하고, 포지티브 레지스트인 OFPR을 코팅하여 포토리소그래픽에 의하여 Cr과 Au를 에칭하였다. 또한, 네거티브 레지스트인 SU-8을 코팅하여 포토리소그래픽에 의하여 에칭하였다. Ni을 도금한 후, 기판상을 2400의 사포를 사용하여 연마하고, 알루미늄을 사용하여 마무리하여 기판표면을 매끄럽게 하였다.

2.4 센서 어레이의 제작

기판의 수평방향과 수직방향에 영구자석을 놓음으로써, 기판측의 Ni패턴을 자화시킨다. 다음으로, 담체는 기판과 물이 있는 샘플튜브에 넣고, 수분간 각반한다. 그후 기판을 샘플튜브에서 내어 건조시킨다. 이 기판을 디지털현미경 및 주사형전자현미경으로 관찰한다. 우선 용액중에서 담체가 자기력에 의하여 배치되는가, 담체의 결합방향의 제어가 가능한가를 조사하였다. 먼저, 자화되지 않은 Ni담체와 자화시킨 기판을 사용하여 담체가 Ni패턴상에 배치되는가를 검토하였다. 직경 200 μ m, 두께 1.2 μ m의 담체가 사용되었다. 참고로 담체와 기판 모두 자화하지 않고 동일 실험을 하였다. 또한, Ni과 Au 2층 구조를 갖는 자화시키지 않은 담체와 Ni패턴을 갖는 기판을 사용하여 담체가 금속을 외측으로 향하여 기판의 Ni패턴에 배치되는가도 검토하였다.

2.5 담체에 고정화한 효소활성의 측정방법

GOD, POD 및 양쪽을 고정화한 3종류의 비드를 준비하였다. p-요드페놀 0.13mM, 루미놀 1mM의 혼합용액 중에 기판을 담그고 이 기판의 챔버내에 각각의 bead를

넣는다. 발광은 2차원고감도화확발광계 측정시스템으로 측정하였다.

3. 결과 및 검토

3.1 효소고정화의 검토

사용된 생체재료는 효소이며, 고정화에 있어서 고정화량의 표면밀도와 효소의 배향성 등이 중요하다. 즉, 생체재료는 충분한 양이 고정화되지 않으면 실용화에 이용할 수 없다. 또한, 고정화에 의해서 입체구조가 변화하고, 효소로서의 기능이 작용하지 않거나, 배향이 적당하지 않으면 활성부위가 노출되지 않는 상태가 될 수 있다. 이 때문에 본 연구에서는 사용한 효소고정화 담체가 반응축대로서 이용 가능함을 루미놀발광에 의하여 검토하였다. 페록시다제의 활성의 최적 pH는 6.0~6.5이며, 루미놀의 발광의 최적 pH는 10~11이다. 이 때문에 우선, 사용하는 반응계에서의 최적의 pH를 구하였다.

그림 1은 1mM 루미놀 5ml, 0.13mM 파라요드페놀 1ml, 1mM 과산화수소 0.2ml의 혼합용액중에 페르옥시다제를 고정화한 효소를 넣고, 루미놀발광을 2차원고감도화확발광계측시스템으로 측정한 결과이다. pH7.5, 8.0, 8.5의 3종류를 조사하였다. pH7.5에서 발광은 얻어지지 않았고, pH8.0, 8.5에서 발광이 측정되었으나 pH8.0에서 보다 높은 발광이 얻어졌다. 이 때문에 이후의 루미놀발광을 이용한 실험은 pH8.0에서 실시하였다.

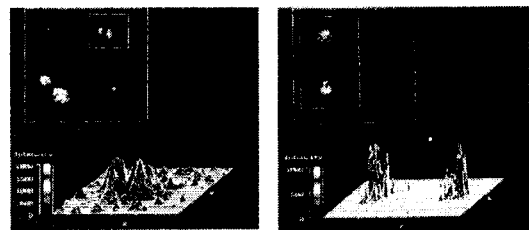


그림 1. HRP가 고정화된 비드의 루미네센스의 강도. 반응 용액은 1mM 루미놀과, 1mM 황산, 20mM 인산염 버퍼.

3.2 센서전극에 의한 환원전위 측정

그림 2는 50mM, 100ml인 산완충용액중에 담구고, 100mM의 과산화수소를 40초간격으로 0.5ml씩 가하면 산화환원전류값을 클로노암페로메트리로 측정된 결과이다. 이 결과로부터 본 연구에서 제작된 센서칩을 이용하여 과산화수소의 농도측정이 가능함을 알았다. 이 센서칩의 챔버내에서 과산화수소가 생성되는 반응이 일어나면 전기신호로서 검출될 수 있음을 알았다. 글로코스인 GOD에 의한 촉매반응에서 과산화수소가 생성됨을 알 수 있다.

따라서, GOD를 고정화한 비드를 센서인 챔버내에 배

치하면, 글루코스의 전기화학적 검출이 가능하다.

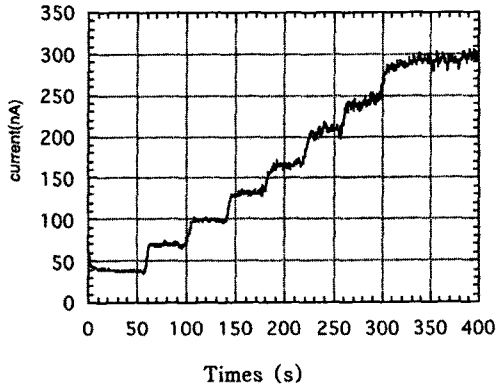


그림 2. 과산화물을 연속적으로 첨가함에 따라 칩 전극의 전기화학 반응 곡선.

3. 결 론

본 논문에서는 집적형바이오센서 구축에 있어서 미소담체의 제작, 기관의 제작 및 기관에 미소담체의 배치를 검토하여, 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 포토리소그래픽에 의하여 미소담체를 제작하고, 이것을 기관에 배치하였다.
- 2) 전기화학적 반응을 일으킬 수 있는 담체를 금속으로 하여 센서어레이를 구축하기 위하여, 담체의 기관에의 배치는 담체와 기관을 강자성체 재료로 제작하고, 기관축을 자화시킴으로서 실현시켰다.
- 3) 유리 비드에 티올기와 EDC 및 NHS를 통해서 효소를 고정화할 수 있었다. 또한, 이 고정화된 효소가 촉매반응으로 해서 사용할 수 있음을 루미놀발광에 의하여 확인하였다.
- 4) 효소 비드를 고정화하고 각각의 센서챔버에 배치하여 반응의 상호작용이 일어나지 않았으므로, 각각 챔버에서 독립된 반응계를 만들 수 있었다. 이것을 집적형바이오센서에 응용할 수 있음을 알았다.
- 5) 센서칩의 챔버내에서 과산화수소가 생성되는 반응이 일어나면 전기신호로서 검출될 수 있음을 알았다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R08- 2003-000-10312-0) 지원으로 수행되었음.

[참 고 문 헌]

- [1] David R. Baselt, Gil U. Lee, Mohan Natesan, Steven W. Metzger, Paul E. Sheehan, Richard J. Colton, "A biosensor based on magnetoresistance technology", *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 13, p. 731, 1998.
- [2] Karri L. Michael, Laura C. Taylor, Sandra L. Schultz, and David R. Walt, "Randomly Ordered Addressable High-Density Optical Sensor Array", *Anal. Chem.*, Vol. 70, p. 1242, 1998.
- [3] A. Terfort, N. Bowden and G.M. Whitesides, "Three-dimensional self-assembly of millimeter-scale components", *Nature*, Vol. 386, p. 162, 1997.
- [4] A.S. Dimitrov and K. Nagayama, "Continuous Convective Assembling of Fine Particles into Two-Dimensional Arrays on Solid Surfaces", *Langmuir*, Vol. 12, p. 1303, 1996.
- [5] K.L. Michael, L.C. Taylor, S.L. Schultz, and D.R. Walt, "Randomly Ordered Addressable High-Density Optical Sensor Array", *Anal. Chem.*, Vol. 70, p. 1242, 1998.
- [6] D.H. Gracias, J. Tien, T.L. Breen, C. Hsu, G.M. Whitesides, "Forming Electrical Networks in Three Dimensions by Self-Assembly", *Science*, Vol. 289, p. 1170, 2000.
- [7] Y.S. Choi, D.K. Kim and Y.S. Kwon, "Development of a new DNA chip microarray by hydrophobic interaction", *Colloid and Surfaces A: Physiochem. and Eng. Aspects*, Vol. 201, p. 261, 2002.
- [8] W.T.S. Huck, J. Tien, and G.M. Whitesides, "Three-Dimensional Mesoscale Self-Assembly", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 120, p. 8267, 1998.
- [9] J.J. Lavigne, S. Savoy, M.B. Clevenger, J.E. Ritchie, B. McDaniel, S.J. Yoo, E.V. Anslyn, J.T. McDevitt, J.B. Shear, and D. Neikirk, "Solution-Based Analysis of Multiple Analytes by a Sensor Array: Toward the Development of an Electronic Tongue", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 120, p. 6429, 1998.
- [10] S.M. Chang, K.Y. Kim, J.M. Kim, Y.S. Choi and Y.S. Kwon, "Detection of Odorants and Study on the Odorant Sensor System by using SAW Device", *J. KIEEME*, Vol. 8, p. 48, 1995.
- [11] Y.S. Choi, H.K. Shin, Y.S. Kwon and B.J. Lee, "Fabrication and Organic Response Characteristics of the Copolymer LB Films", *J. KIEEME*, Vol. 9, p. 180, 1996.