

## 자성체 어레이를 이용한 단백질칩

최용성, 이경섭\*, 박대희  
원광대학교, 동신대학교\*

### Protein Chip by Magnetic Array

Yong-Sung Choi, Kyung-Sup Lee\* and Dae-Hee Park  
Wonkwang University, Dong-Shin University\*

**Abstract :** This research describes a new constructing method of multifunctional biosensor using many kinds of biomaterials. 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 and electrochemical methods.

**Key Words :** Multichannel biosensor, Self-assembly, Magnetic force interaction, Metal particle, Chip

### 1. 서 론

서로 다른 생체재료를 각각 담체에 병렬로 고정화하고, 이 담체를 기판에 무작위로 배치하는 방법으로 집적형센서를 구축한 예는 1998년 David 등에 의한 연구보고가 있다<sup>(1~3)</sup>. 이들이 미립자의 자기조립화를 이용한 집적형바이오센서의 구축예이다. David 등은 polymethyl-styrene-divinylbenzene bead를 배치고정화하는 곳에 광파이버를 이용하여 센서를 구축하였다. bead를 배치고정화하기 위한 홀은 광파이버 끝의 코어를 에칭하여 제작하였다. 비치를 배치고정화하기 위한 친화력은 bead에 수식된 아미노기와 파이버 사이의 정전기력을 이용하였다. 이 센서의 측정능 배치고정화한 bead에서의 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. 식별소자를 고정화하는 담체는 전기화학반응이 가능한 금체담체를 제작하였다. 이 담체를 기판에 배치하는 데는 자기력에 의한 자기조직화의 방법을 이용하였다. 집적형바이오센서를 구축하기 위하여, photolithography기술 및 자기조직화기술을 이용하였다.

### 2. 실험 방법

#### 2.1 센서용 미세담체의 제작

센서용 미세담체의 제작은 기상성장인 증착장치를 사용하였고, 1 $\mu$ m 이하 두께의 담체를 제작할 수 있었다. 유리기판을 초음파세척기로 순수, isopropyl-alcohol (IPA), 아세톤, IPA, 초순수의 순서로 각각 5분씩 하였다. 이 기판에 Cr 200Å, Al 4000Å이 증착되었다. 네거티브형 레지스트인 SU-8 50을 사용하여 레지스트 패턴을 제작하였다. 제작된 레지스트패턴에 Ni 4000Å, Ti 200Å, Au 2000Å을 증착하였다. 마지막으로 80~85°C에서 기판을 SU-8 REMOVER에 10분간 담구어 레지스트를 peel off하였다. 희생층인 Al층을 에칭함으로써 담체를 제작하였다.

#### 2.2 Ni dot 어레이의 제작

기판의 세척, 전극제작을 위한 Cr과 Au의 증착, 도금형을 제작을 위한 photolithography는 기상성장법에 의한 센서용 미세담체의 제작과 동일 조건이다. 유리기판상에 Cr과 Au를 증착하고, 포지티브 레지스트인 OFPR을 코팅하여 photolithography에 의하여 Cr과 Au를 에칭하였다. 또한, 네거티브 레지스트인 SU-8을 코팅하여 photolithography에 의하여 에칭하였다. Ni을 도금한 후, 기판상을 2400의 사포를 사용하여 연마하고, 알루미나를 사용하여 마무리하여 기판표면을 매끄럽게 하였다. Ni 도금의 조건은 온도 : 50 (50~60)°C, 전류밀도 : 3 (2~5) A/cm<sup>2</sup>, pH : 4.0 (3.5~4.5), 양극 : Ni anode로 하였다. 석출속도는 1.6  $\mu$ m/min이다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 효소고정화의 검토

금번에 사용한 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 반응속도로서 이용 가능함을 루미놀발광에 의하여 검토하였다. 페르옥시다제의 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 2차원고감도화학발광계측시스템으로 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.

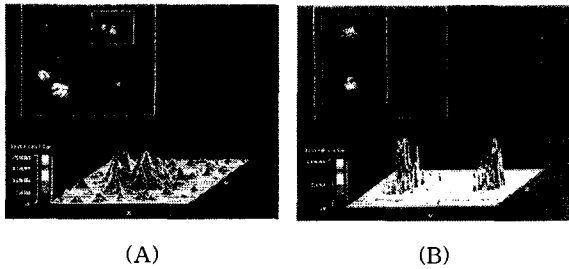


Figure 1. Luminescence intensities of HRP-immobilized beads. The reaction solution was a mixture of 1mM luminol, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20mM phosphate buffer pH8.0 (A) or pH8.5 (B).

#### 3.2 센서전극에 의한 환원전위측정

그림 2는 제작된 센서를 50mM, 100ml 인산완충용액중에 담구고, 100mM의 과산화수소를 40초간격으로 0.5ml씩 가하면서 산화환원전위값을 클로노양페로메트리로 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. 글루코신 GOD에 의한 촉매반응에서 과산화수소가 생성됨을 알 수 있다. 따라서, GOD를 고정화한 bead를 센서인 챔버내에 배치하면, 글루코스의 전기화학적 검출이 가능하다.

### 4. 결론

본 논문에서는 집적형바이오센서 구축에 있어서 미소담체의 제작, 기판의 제작 및 기판에 미소담체의 배치를 검토하였다. 포토리소그래픽에 의하여 미소담체를 제작하고,

이것을 기판에 배치하였다. 전기화학적 반응을 일으킬 수 있는 담체를 금속으로 하여 센서구축을 시도하였다. 담체의 기판에의 배치는 담체와 기판을 강자성체 재료로 제작하고, 기판측을 자화시킴으로서 실현시켰다. 유리 bead에 티올기와 EDC 및 NHS를 통해서 효소를 고정화할 수 있었다. 또한, 이 고정화된 효소가 촉매반응으로 해서 사용할 수 있음을 루미놀발광에 의하여 확인하였다. 효소 bead를 고정화하고 각각의 센서챔버에 배치하여 반응의 상호작용이 일어나지 않았으므로, 각각 챔버에서 독립된 반응계를 만들 수 있었다. 이것을 집적형바이오센서에 응용할 수 있음을 알았다.

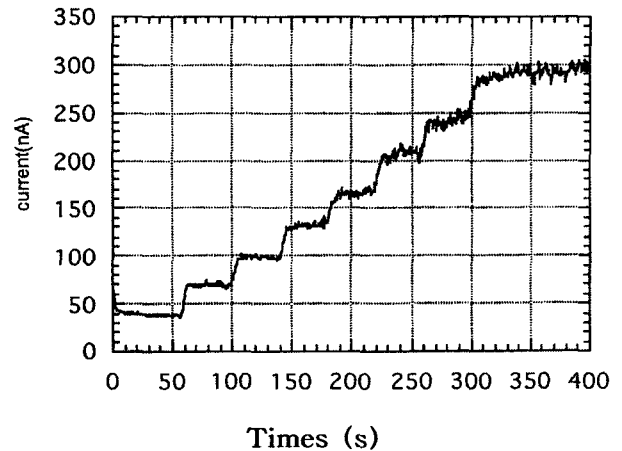


Figure 2. Response curve of the electrode on the chip against the sequential addition of hydrogen peroxide.

### 감사의 글

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

### 참고 문헌

- [1] David R. Baselt, Gi U. Lee, Mohan Natesan, Steven W. Metzger, Paul E. Sheehan, Richard J. Colton, "A biosensor based on magneto-resistance technology", *Biosen. & Bioelect.*, **13**, pp.731-739, 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.*, **70**, pp.1242-1248, 1998.
- [3] A. Terfort, N. Bowden and G.M. Whitesides, "Three-dimensional self-assembly of millimeter-scale components", *Nature*, **386**, pp.162-164, 1997.