

단백질 칩 기관의 표면에 미치는 용매 효과

현준원^{a*}, 윤미영^a, 안상민^a, 노승정^a, 허영덕^a, 박현용^a, 송예신^a,
 피재호^a, 김경례^b, 김성훈^c

^a단국대학교 자연과학부, ^b(주)휴시스, ^c서울대학교 약학대학 단백질합성효소 창의 연구단

Effect of Solvent on the Surface of Protein Chip Plate

June Won Hyun^{a*}, Mi Young Yun^a, S. M. An^a, S. J. Noh^a, Young-Duk Huh^a,
 Heonyong Park^a, Y. S. Song^a, Jaeho Pyee^a, K. R. Kim^b, S. Kim^c

^aCollege of Natural Science, Dankook University, Seoul 140-714

^bHUSIS Co.

^cNational Creative Research Initiatives Center for ARS Network, Seoul National University,
 Seoul 151-742

(Received 24 February 2004 ; accepted 2 April 2004)

Abstract

Nickel chloride coated protein chip plate was developed by using a spin coating method. The ability of histidine tagged protein adsorption was investigated at various solvents. The surface of plate has a large aggregated nickel complex with high density in water. However, the surface of plate has a very small size of aggregated nickel complex with low density in isopropanol. The ability of protein adsorption decreased as increasing the size of alkyl chain in various alcohol solvents. The mechanism on the ability of protein adsorption at the plate surface is discussed.

Keywords : Protein chip plate, Sol-gel methods, NiCl₂ Film, His-tagged

1. 서 론

단백질 칩은 유리기관 위에 수백~수천 개의 다른 종류의 단백질을 고정화시킨 단백질 배열구조물이다. 단백질 칩은 고정화된 단백질들의 동시다발적 분석이 가능하기 때문에 특정 생리활성을 갖는 단백질 검색, 신약 검색과 질병 진단 등에 그 이용 가능성이 있다^{1,2)}. 단백질 칩은 인간의 질병진단과 치료에 이용될 수 있는 가능성으로 인하여 그 가치가 높으며 사용목적에 따라 그 목적에 적합한 다양한 단백질 칩의 제조가 요구된다.

단백질 칩 제조의 가장 기초적 기술은 단백질을 유리 기관 위에 부착시키기 위한 기관의 전처리 기술로 이것은 단백질의 기관 부착 방법과 적합하게 이루어져야 한다^{2,4)}. 지금까지 보고된 유리 기관은

아민기와 알데히드기 등이 기관 표면에 노출되도록 제작하고, 노출된 작용기에 단백질의 직접적인 부착이나 크로스링커를 이용한 부착방법 등으로 단백질을 부착하였다. 그러나 이러한 부착방법은 단백질 노출표면 가운데 임의의 부위가 비 특이적으로 기관 위에 부착되기 때문에, 단백질 기능 영역이 유리 기관에 부착하게 되면 그 기능을 상실하게 된다. 단백질의 기능 영역이 유리 기관에 부착되는 것을 막기 위해서는 기관의 표면과 결합하는 단백질을 유전자 조작을 통하여 원하는 대상 단백질에 붙여서 단백질의 기능을 상실하지 않도록 하는 것이다.

본 연구에서는 단백질 표면 임의의 부위가 기관 위에 부착되는 것을 막기 위하여 Ni²⁺ 이온에 특이적으로 결합하는 Histine-tagged(His-tag)되어 있는 단백질을 기관 위에 결합시킬 목적으로 니켈이온이 부착된 기관을 제조하여, 기관의 표면 상태를 고찰하고 단백질 칩으로의 응용성에 대해 연구하였다.

*Corresponding author. E-mail : jwhyun@dankook.ac.kr

2. 실험방법

2.1 NiCl₂가 코팅된 기판의 제조

NiCl₂를 유리기판 위에 코팅하기 위해 NiCl₂와 유기용매(에탄올과 메탄올 등)를 전자저울을 이용하여 무게비로 제조하였다. 제조된 시료를 유리 기판에 코팅하기 전에 기판 위의 표면 불순물 제거를 위해 아세톤과 증류수를 사용하여 30분 동안 초음파세척 후 건조시켰다. 이렇게 세척된 유리 기판을 스핀코터(spin coater) 위에 장착한 후, 졸(Sol) 상태로 제조된 NiCl₂ 용액을 그 위에 도포하고 2500 rpm의 코팅속도에서 스핀코팅시켰다. 제조된 플레이트는 진공오븐에서 5분 동안 건조시켰다.

2.2 니켈 기판위의 단백질 부착

니켈이 코팅된 유리기판 위에 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated 단백질과 혹은 FITC-conjugated 되어 있으면서 동시에 His-tag이 붙어 있는 단백질을 10 µg/ml~1 mg/ml 농도로 10분에서 한 시간 동안 실온에서 반응시킨 뒤 PBS 완충액으로 5분간 세 번 세척하여 건조한 후 형광 image analyzer로 분석하였다. 유리 기판에 고정화한 FITC-

conjugated 단백질은 Bio-Imaging Analyzer System (BAS; Fuji Photo Film Co)에서 excitation 파장 490 nm와 emission 파장 670 nm로 고정하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

그림 1은 NiCl₂와 다양한 용매 ((a) 수용액, (b) 메탄올, (c) 에탄올, (d) 이소프로판올)를 사용하여 NiCl₂ 졸 용액을 제조한 후 스핀 코팅법에 의해 2500 rpm에서 7초 동안 코팅된 유리 기판의 표면을 particle size analyzer(IMT, i-30)를 통해 관찰한 특성을 보여준다. 그림 1(a)에서와 같이 수용액을 용매로 사용하였을 경우 알콜 용매를 사용했을 때 보다 상대적으로 NiCl₂의 입자 크기가 증가하면서 단백질 부착능력을 향상시킨다⁵⁾. (b), (c), (d)는 각각 메탄올, 에탄올 및 이소프로판올을 용매로 사용한 NiCl₂의 기판 표면을 보여준다. 알콜 용매로 사용된 알콜의 상대적인 분자의 크기는 메탄올에서 이소프로판올로 갈수록 증가한다. 알콜의 알킬 길이가 증가할수록 극성도가 감소됨과 동시에 수소 결합 능력이 감소한다. 즉, 사용된 용매인 수용액,

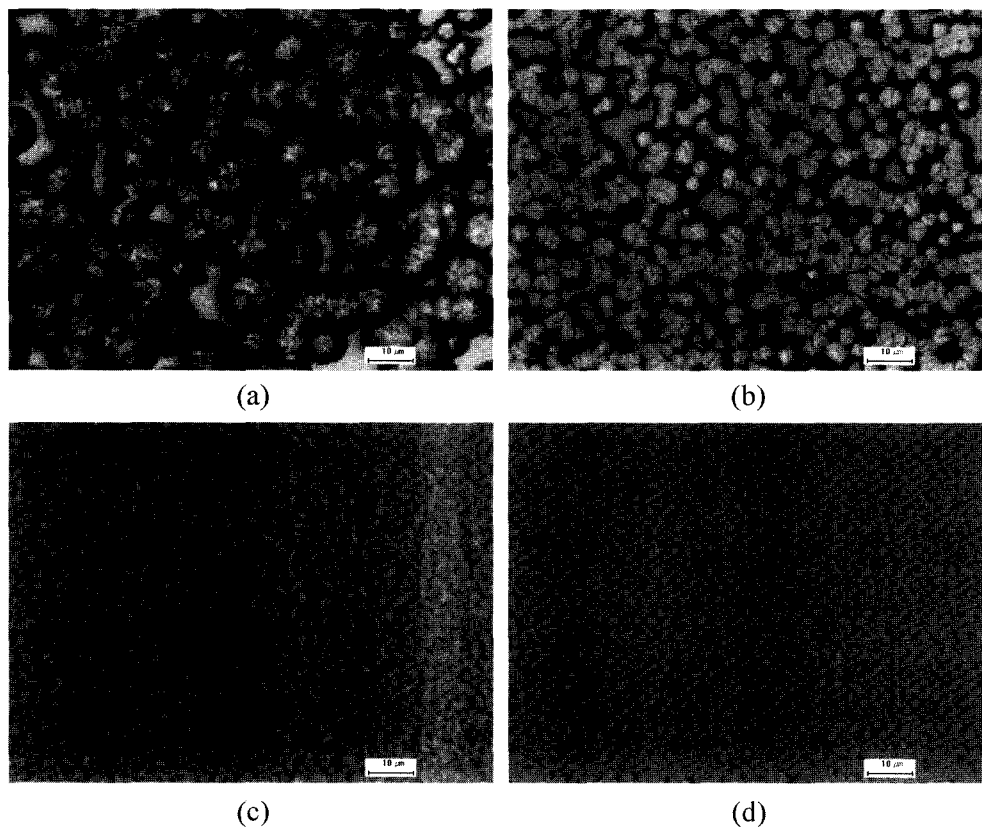


Fig. 1. Particle size analyzer analysis for the glass slides coated with different solvent (a) H₂O (b) methanol (c) ethanol (d) isopropanol.

메탄올, 에탄올, 이소프로판올 순서대로 수소 결합이 감소된다. Ni^{2+} 이온을 수화한 상태의 분자의 응집되는 정도는 수소 결합 능력에 비례하게 되므로, 수용액에서 Ni^{2+} 이온을 둘러싸고 있는 분자의 응집력이 가장 크고, 응집된 분자의 크기도 증가하게 될 것이다. 따라서 수용액에서 Ni^{2+} 이온을 둘러싸고 있는 수용액의 응집력이 강하게 작용하게 되어 응집된 분자들의 크기가 증가하게 된다. 이에 반하여 이소프로판올의 용매 한 개의 분자의 크기는 수용액, 메탄올, 에탄올에 비해서 크다. 그러나 이소프로판올의 긴 알킬 사슬이 수소결합을 방해하게 되므로 다른 용매에 비해서 수소 결합력이 매우 약하게 된다. 따라서 Ni^{2+} 이온을 둘러싸고 있을 능력도 감소하게 된다. 즉, 이소프로판올에서는 Ni^{2+} 이온을 둘러싸고 있는 용매들이 응집되는 능력이 감소하게 되므로 응집된 상태에서의 크기는 다른 용매에 비해서 작을 것이다. 그림 1에서 확인 할 수 있듯이 용매가 수용액, 메탄올, 에탄올 그리고 이소프로판올로 용매의 분자가 증가할수록 Ni^{2+} 이온을 둘러싸고 있는 분자들의 응집된 상태의 크기는 급격하게 작아진다. 또한 이소프로판올의 경우는 유리 기판의 많은 공간의 빈 공간으로 있게 된다. 따라서 유리 기판의 단위면적 위의 Ni^{2+} 이온의 밀도는 용매를 물로 사용했을 때가 가장 크게 된다. 이것은 용매를 수용액으로 사용했을 때 단백질 부착 능력이 가장 우수할 것으로 예측할 수 있다. 이러한 배경에서 단위면적 당 Ni^{2+} 이온이 상대적으로 수용액, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 순으로 크게 감소하기 때문에 단백질의 부착력이 수용액, 메탄

올, 에탄올, 이소프로판올 순으로 감소하게 된다.

그림 2는 $NiCl_2$ 용매 변화에 따른 기판상의 단백질 부착경향을 보여준다. Histidine-tagged 단백질은 유전자 조합을 이용하여 단백질에 6개의 히스티딘을 연속적으로 표지한 것으로 니켈이온에 특이적으로 부착하도록 만든 단백질이다. 그림 2의 경우 non-histidine-tagged 단백질의 경우 니켈이 코팅된 플레이트에 부착이 일어나지 않고 있음을 볼 수 있는데, 이는 니켈이온 코팅이 특이적으로 histidine-tagged 단백질이 잘 부착되도록 형성되었음을 알 수 있으며 본 연구에서 제조한 니켈이온이 코팅된 플레이트의 단백질 칩으로 응용 가능성을 증명하는 결과이다. 또한 수용액, 메탄올, 에탄올 및 이소프로판올을 용매로 한 $NiCl_2$ 의 단백질 부착특성은 그림 1의 표면 분석과 잘 일치한다. (a), (b), (c)의 경우 (d)에 비해 단백질 부착능력이 매우 월등한데, 이는 $NiCl_2$ 분자 당 한 개씩 있는 단백질 부착 활성 부위 개수가 늘어났기 때문인 것으로 보여진다. 그러나 $NiCl_2$ 분자 수가 단백질 분자 수 보다 많아지면 - 1:1 분자 비 이상 - $NiCl_2$ 단백질 부착력은 최고점에 달하게 될 것으로 사료된다.

4. 결 론

Sol-Gel 방법으로 유리기판 위에 다양한 용매를 사용하여 $NiCl_2$ 박막을 코팅시켜 표면 분석과 단백질 부착 테스트를 통해 다음과 같은 결론을 얻었다. 용매효과의 관점에서 용매로 사용된 수용액으로부터 알콜의 상대적인 분자의 크기는 수용액에서 이소프로판올로 갈수록 증가하면서, 수소결합 능력이 감소한다. 이러한 분자크기의 증가는 Ni^{2+} 이온을 둘러싸고 있는 용매의 응집력을 감소시켜서 응집된 상태의 분자의 크기를 급격하게 감소시킨다. 동시에 알킬 사슬의 길이가 증가함에 따라서 비극성 성질이 작용하여 극성 표면을 가지고 있는 유리 기판의 표면과 상호 작용을 감소시킨다. 따라서 유리 기판의 대부분을 빈 공간으로 만들게 된다. 알콜 용매의 알킬 사슬이 증가할수록 유리 기판의 단위 면적 당 Ni^{2+} 이온의 밀도가 급격하게 감소하게 된다. 따라서 수용액에서는 Ni^{2+} 이온의 밀도가 가장 높으므로 Ni^{2+} 이온 한 개당 한 개씩 있는 단백질 부착 활성 부위 개수가 늘어났기 때문에 단백질의 부착력이 증가하게 되므로 많은 양의 단백질을 효과적으로 결합시킬 수 있게 된다. 단백질 칩 제조를 위한 본 니켈 코팅 기판의 장점은 첫째, 기판의 제조방법이 간단하며 둘째, 제조비용이 다른 기판제조 방법에 비해 저렴하고 셋째, 기판 위에 부착되




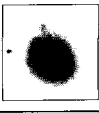
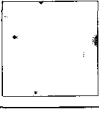
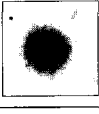

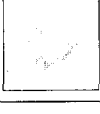
	Non-Histagged	Histagged
H ₂ O		
MeOH		
EtOH		
Iso-propanol		

Fig. 2. The adsorption of histidine-tagged or non-histidine-tagged protein to the $NiCl_2$ -coated glass slides prepared with H₂O, methanol, ethanol and iso-propanol.

는 His-tag된 타겟 단백질의 기능 손상이 다른 단백질 부착방법에 비해 매우 낮기 때문에 단백질 칩용 기판으로 매우 적합한 것으로 평가된다.

후 기

본 연구는 과학기술부 양성자 가속기 이용자 프로그램(No. M102KS010001-02K1901-01810) 및 (주) 휴시스의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. E. T. Fung, V. Thulasiraman, S. R. Weinberger, E. Dalmaso, Protein Biochips for Differential Profiling. *Current Opinion in Biotechnology*, 12 (2001) 65.
2. G. MacBeath, S. Schreiber, Printing Proteins as Microarrays for High-throughput Function Determination. *Science*, 289 (2000) 1760.
3. D. V. Nicolau, H. Taguchi, H. Taniguchi, S. Yoshikawa, Micron-sized Protein Patterning on Diazonaphthoquinone /novolak Thin Polymeric Films. *Langmuir*, 14 (1998) 1927.
4. R. Bashir, R. Gomez, A. Sarikaya, M. R. Ladisch, J. Sturgis, J. P. Robinson, Adsorption of Avidin on Microfabricated Surfaces for Protein Biochip Applications. *Biotechnol. Bioeng.*, 73 (2001) 324.
5. J. W. Hyun, S. Y. Kim, S. Lee, H. Park, J. Pyee, S. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23 (2002) 1725.

1. E. T. Fung, V. Thulasiraman, S. R. Weinberger, E. Dalmaso, Protein Biochips for Differential Profiling.