

생분해성 고분자, 폴리하이드록시알카노에이트를 이용한 바이오센서 칩 연구와 그 응용

박 태 정 · † 이 상 업

한국과학기술원 생명화학공학과 (BK21 프로그램), 생물공정연구센터,
시스템 및 합성생명공학연구센터, 초미세화학공정연구센터
(접수 : 2007. 10. 17., 게재승인 : 2007. 11. 29.)

A Research and Application of Polyhydroxyalkanoates in Biosensor Chip

T. J. Park and S. Y. Lee†

Department of Chemical & Biomolecular Engineering (BK21 program),
BioProcess Engineering Research Center, Center for Systems & Synthetic Biotechnology,
Institute for the BioCentury, and Center for Ultramicrochemical Process Systems,
† Department of Bio & Brain Engineering and Bioinformatics Research Center,
Korea Advanced Institute of Science and Technology, 335 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea
(Received : 2007. 10. 17., Accepted : 2007. 11. 29.)

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are a family of microbial polyesters that can be produced by fermentation from renewable resources. PHAs can be used as completely biodegradable plastics or elastomers. In this paper, novel applications of PHAs in biosensor are described. A general platform technology was developed by using the substrate binding domain (SBD) of PHA depolymerase as a fusion partner to immobilize proteins of interest on PHA surface. It could be shown that the proteins fused to the SBD of PHA depolymerase could be specifically immobilized onto PHA film, PHA microbead, and microcontact printed PHA surface. We review the results obtained for monitoring the specific interaction between the SBD and PHA by using enhanced green fluorescent protein, red fluorescent protein, single chain antibody against hepatitis B virus preS2 surface protein and severe acute respiratory syndrome coronavirus surface antigen as model proteins. Thus, this system can be efficiently used for studying protein-protein and possibly protein-biomolecule interactions for various biotechnological applications.

Key Words : Poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB) depolymerase, substrate binding domain, protein microarray

서 론

최근의 나노기술 (nanotechnology)과 같은 초미세 극한기술이 수 나노미터 스케일에서 분자 구조를 적절하게 결합시켜 미세한 구조를 제어하거나 분석할 수 있게 하여 새롭고 혁신적인 기술발전의 가능성을 열고 있다. 이러한 나노기술의 대상물질로서 바이오물질을 사용하여 분석 시스

템의 축소화를 가능하게 한 것이 바로 나노바이오기술 (nanobiotechnology)이라고 할 수 있다(1-3). 이러한 나노바이오기술은 나노스케일과 마이크로스케일 구조의 fabrication을 가능하게 했고 유기물 혹은 무기물이 있는 조건에서 유전물질과 단백질을 포함한 여러 바이오물질의 형상을 만들 수 있게 되었다(4-7). 특히, 나노바이오기술은 신약 개발, 병원균 분석, 진단, 유전체학, 단백질체학 연구를 위한 화학 및 제약 산업의 가치를 인정받을 수 있는 계기를 만들어 주었다.

고체 표면 위에 유전자, 단백질, 펩티드 (peptide), 세포 등을 포함한 바이오물질의 고정화는 바이오센서 연구와 바이오칩 개발에 많은 관심을 불러일으키고 있다(8-10). 그 중 단백질의 고정화는 단백질-유전자, 단백질-펩티드, 단백질-단

† Corresponding Author : Department of Chemical & Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea
Tel : +82-42-869-3930, Fax : +82-42-869-8800
E-mail : leesy@kaist.ac.kr

백질 (특히, 항원-항체), 단백질-소립자, 단백질-세포 등의 상호작용을 연구하기 위해 매우 중요한 요소이다. 단백질은 물리흡착, 화학결합의 하나인 공유결합, streptavidin-biotin과 같은 친화력이 높은 상호작용 등을 이용해서 고정화된다(8, 11-13). 반응 작용기의 공유결합은 재현성이 높은 강한 단백질의 고정화를 유도할 수 있지만, 낮은 민감도와 선택성에 따라 방향성 보장이 어렵고 비특이적 흡착에 대한 우려가 있을 수 있다. 또한, 변성에 의한 단백질의 불안전성은 또 다른 문제를 야기하기 때문에 고체 기판의 표면에 기능적이고 안정적으로 단백질을 고정화할 수 있는 범용적이면서 효과적인 방법이 요구되고 있다. 따라서, 바이오물질의 고정화를 위한 고체기판은 바이오칩의 fabrication을 위해 꼭 필요한 몇 가지 요소가 있는데 다음과 같다(8, 14-15). 첫째, 단백질의 원치 않는 비특이적 흡착이 없어야 한다. 둘째, 특이적이고 선별적인 단백질의 고정화가 이루어져야 한다. 마지막으로, 단백질의 고정화를 조절할 수 있어야 한다.

이러한 관점에서 폴리하이드록시알카노에이트 (polyhydroxyalkanoate, PHA)는 단백질 고정화를 위해 매력적인 기질이라고 할 수 있다. PHA는 단일체의 구성성분에 따라 물성이 다르게 나타나는 미생물 유래의 생분해성 고분자 polyester이다(16-21). 비록 PHA가 소수성이고 물에 녹지 않는 특성이 있지만, 많은 미생물들에 의해 분해되는 PHA depolymerase라고 하는 고유한 분해효소에 의해 분해된다(22).

본 논문에서 우리는 부착 모티프로서 PHA depolymerase의 기질결합 도메인 (substrate binding domain, SBD)과 기질로서 PHA를 사용하여 단백질을 고정화하기 위한 플랫폼 기술을 서술하고자 한다.

생분해성 고분자, 폴리하이드록시알카노에이트 (Polyhydroxyalkanoate)

PHA는 많은 미생물들이 세포내 축적하는 에너지 저장 물질로서, 기존의 난분해성 플라스틱을 환경적으로 대체할 수 있는 것으로 알려져 왔다(23). 당이나 유기산, 식물유 등을 탄소원으로 이용해서 미생물을 생육시켜 건조균체중량당 약 80 중량% 이상의 PHA를 축적시킬 수 있다. PHA는 고분자를 이용한 공정산업분야에서 사용되는 물질과 동일한 고성능 재료 및 필름을 가공하기 위해 이용될 수 있다. PHA의 물성은 단일체의 구성요소나 분자량에 의해 결정된다. 일반적으로 단일체 기본 유닛의 탄소 개수에 따라 세 가지의 그룹으로 나뉜다. Short-chain-length (SCL) PHA는 3-5개, medium-chain-length (MCL) PHA는 6-14개의 탄소원자로 구성되며 또 SCL-MCL 공중합체가 있을 수 있다. 지금까지 250여 가지의 서로 다른 세균이 PHA를 생산하는 것으로 보고되었다(24). 대표적으로 *Alcaligenes latus*(25, 26), *Ralstonia eutropha*(27, 28), *Azotobacter vinelandii*(29), methylotrophs(30, 31), 그리고 *Pseudomonas* 종(32-34)이 그것이다. 대사공학적인 기법에 의한 재조합 세균이 새로운 PHA의 생산과 그 생산성을 높이기 위해 개발되어 왔는데 그 중에서도 재조합 대장균 (*Escherichia coli*)이 PHA를 효율적으로 생산할 수 있는 것으로 알려졌

다(35-37). 많은 논문들에서 세균 유래 PHA의 특성에 대해 보고하였는데, PHA를 생산하기 위한 생리학, 유전학, 분자생물학적 특성과 새로운 단일체 및 발효 공정 개발, PHA 고분자의 생분해성 및 기타 일반적인 특성 등등에 대해 보고하였다(17-19, 24, 38).

PHA의 물성은 그 단일체의 구성요소에 따라 결정된다. PHA에 대해 가장 많이 연구된 것이 PHA의 일종인 poly(3-hydroxybutyrate)로서 약자로 'P(3HB)'로 표기된다. 고체 상태인 P(3HB)는 약 177°C에서 끓는점을 나타내며 더 단단하고 깨지기 쉬운 것을 제외하면 폴리프로필렌과 같은 기존의 범용 수지와 유사한 물성을 갖고 있으나 매우 고가이기 때문에 일반 플라스틱 포장재나 소모성 플라스틱 제품으로의 실용화는 현재로서는 어려운 면이 있으며, 고부가가치의 의료 용도로서 일부 사용되고 있고 높은 생산단가를 낮추고 경쟁력 있는 가격을 확보하기 위한 연구가 국내외에서 지속적으로 진행되고 있다(39). P(3HB)는 chiral 구조의 탄소원자에 기인한 입체적 규칙성 때문에 결정질의 구조를 가지고 있는데 다른 PHA와 마찬가지로 P(3HB) 단일체는 모두 (R)-configuration 상태이다. 미생물 발효에 의해 생산되는 P(3HB)의 분자량은 1만~300만 Da 정도로서 다양하며, 약 2 정도의 분산력을 나타낸다. SCL-단일체 및 MCL-단일체를 포함하고 있는 PHA 공중합체는 최근 몇 가지 세균에서 발견되었는데(16, 34, 40-42), 이 SCL-MCL PHA 공중합체는 각 단일체 PHA에서 나타나는 물성보다 뛰어난 특성을 갖는 것으로 나타났다(43). 이러한 SCL-MCL PHA 공중합체들 중에서 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)가 가장 잘 알려져 있는데 약자로 'P(3HB-co-3HHx)'로 표현되는 이 공중합체는 몇몇 *Aeromonas* 종에서 축적되는 것으로 밝혀졌다(16, 41). P(3HB-co-3HHx)는 상업적으로 대표적인 고분자 중에서도 저밀도 polyethylene (LDPE)과 동일한 기계적 특성을 가지고 있는 것으로 보고되었다(43). 특히, 10-17 mol% 조성분율의 3HHx를 포함하는 P(3HB-co-3HHx)는 850%까지 길게 늘어나는 성질을 가지고 있는데, 이는 20 mol% 조성분율의 3HV를 포함하는 [P(3HB-co-3HV)] 공중합체보다 더 우수한 물리적 특성을 가지고 있는 것이다(42, 43).

PHA depolymerase에 의한 PHA의 분해

과립형태로 균체 내에 축적되는 PHA는 많은 미생물들의 탄소원 및 에너지원으로 사용되며, 세포내 PHA depolymerase에 의해 분해될 수 있다. 또한, PHA는 다양한 종류의 세균과 곰팡이류에 의해 분해되는 depolymerase에 의해 단일체로 빠르게 분해될 수 있다(22). 세포 내외에서 서로 다른 여러 종류의 PHA depolymerase가 분리되었고 효소학적 특성과 유전자 수준에서의 특성이 밝혀져 왔다. PHA depolymerase는 catalytic 도메인 (lipase box), 기질결합 도메인 (SBD), 그리고 이 두 도메인사이를 연결하는 링커 (linker)로 이루어져 있다. Kinetic 분석으로부터, PHA의 가수분해는 PHA depolymerase가 고분자 표면에 먼저 결합된 다음, 가수분해가 진행되는 것으로 제안되었다. P(3HB) depolymerase의 결합에 대한 특성이 몇몇 세균 (*Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Comamonastestosteroni*,

Comamonas acidovorans)의 P(3HB) depolymerase의 SBD와 glutathione-S-transferase가 융합되어 연구되었다(44-47). P(3HB) depolymerase의 SBD에 의한 PHA로의 인식은 polyester 표면과 SBD에 있는 몇몇 아미노산 사이의 화학 결합뿐만 아니라 소수성 반응 (hydrophobic interaction)에 의해서 이루어짐을 알 수 있었다.

단백질 고정화를 위한 PHA 기질

많은 생물학적 실험과 진단 및 신약 개발 연구에서 고체 표면에 단백질을 고정화하려는 노력이 있어 왔다(10, 11, 48, 49). 칩 위에 고정화된 단백질은 적은 양의 단백질과 시약을 동시에 사용할 수 있어야만 한다. 예로서, MacBeath와 Schreiber는 aldehyde로 기능화된 유리 기판 위에 단백질을 고정화하였고 용액 상에서 다른 분자와의 반응이 가능하다는 것을 보였다(50). 또 다른 연구에서, Whitesides 등은 금 표면위에서 단백질이 자기조립단층으로 흡착된다는 것을 증명했다(51). 이러한 예들은 단백질 array가 산업적으로 이용 가능한 잠재력이 있음을 증명함과 동시에, 원하는 분자간의 특이적 반응만을 명확한 방법을 통해 확인할 수 있는 단백질의 고정화 기술 개발이 필요하다는 것을 제안하고 있다.

가장 널리 사용된 고정화 방법은 고체 기판에 단백질을 비특이적으로 흡착시키는 것이다. 이 방법은 고효율로 정제된 단백질을 필요로 하지만 방향성이 없을 수 있으며 단백질이 변성되는 경우도 있다. 단백질은 공유결합에 의해서 고정화될 수도 있지만, 고정화된 단백질이나 표면에 화학적인 처리를 해야 하는 단점이 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 PHA 표면 위에 단백질과 펩티드를 고정화할 수 있는 새로운 플랫폼 기술이 개발되었다. 이 방법은 PHA 표면과 PHA depolymerase의 SBD 간에 일어나는 특이적 결합을 이용한 것인데, 그 전략으로서는 단백질이나 펩티드를 고정화하기 위해서 유전자 재조합 기술을 이용하여 유전자 수준에서 PHA depolymerase의 SBD와 단백질 혹은 펩티드를 융합시켜서 이를 발현시키는 것이다. PHA depolymerase의 SBD는 원하는 단백질이나 펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 융합되고 이렇게 만들어진 융합단백질은 금속 결합성의 크로마토그래피 방법으로 쉽게 정제될 수 있는데 Ni에 결합되는 6개의 histidine tag이 도입될 수 있다. 이러한 융합단백질은 재조합 세균 (일반적으로 대장균)을 배양하여 생산되어질 수 있다. 이후 간단한 정제과정을 거쳐 다양한 PHA 표면에 고정화시킬 수 있는데 이때 사용되는 PHA 표면은 PHA 기판, PHA가 코팅된 고체 표면, PHA 마이크로 비드 혹은 패터닝된 PHA 등을 이용할 수 있다. Park 등(52, 53)과 Lee 등(54)은 녹색형광 단백질 (enhanced green fluorescent protein, EGFP), 적색형광 단백질 (red fluorescent protein, RFP), B형 간염 바이러스의 단일사슬항체 (single chain antibody against hepatitis B virus preS2 surface protein, ScFv), 사스 코로나바이러스의 표면항원 (severe acute respiratory syndrome coronavirus surface antigen, SCVe)을 모델단백질로서 사용하고 PHA 표면 위에서 단백질-단백질 간의 상호작용을 연구하고 진단에 응용하는 새로운 플랫폼 기술의 실행 가능성을 증명하였다.

융합단백질의 발현 및 생산

사용된 균주와 plasmid 목록은 Park 등(52)과 Lee 등(54)에 의해 보고되었다. *A. faecalis*의 PHA depolymerase의 SBD와 6개의 histidine 아미노산이 융합된 EGFP, RFP, ScFv, SCVe 유전자는 각각 유전자 증폭기술 (polymerase chain reaction, PCR)에 의해 증폭될 수 있었다. 모든 융합 유전자들은 각각의 발현벡터에 클로닝되고 *E. coli*에 형질 전환되었다. 6HEGFP-SBD, 6HRFP-SBD, 그리고 6HScFv-SBD 융합 유전자는 *E. coli* BL21(DE3) 균주에서 T7 프로모터에 의해 발현될 수 있었고, 6HSCVe-SBD 융합 유전자는 *E. coli* XL1-Blue 균주에서 *trc* 프로모터에 의해 발현되었다(Fig. 1). 융합단백질의 생산을 위한 재조합 *E. coli* 균주는 복합배지 (Luria-Bertani, 10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract and 5 g/L NaCl)에서 배양하여 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)에 의해 발현유도되었다. 배양된 세포를 모아 파쇄하고 발현된 융합단백질을 정제하기 위해 Ni-컬럼을 사용하였다.

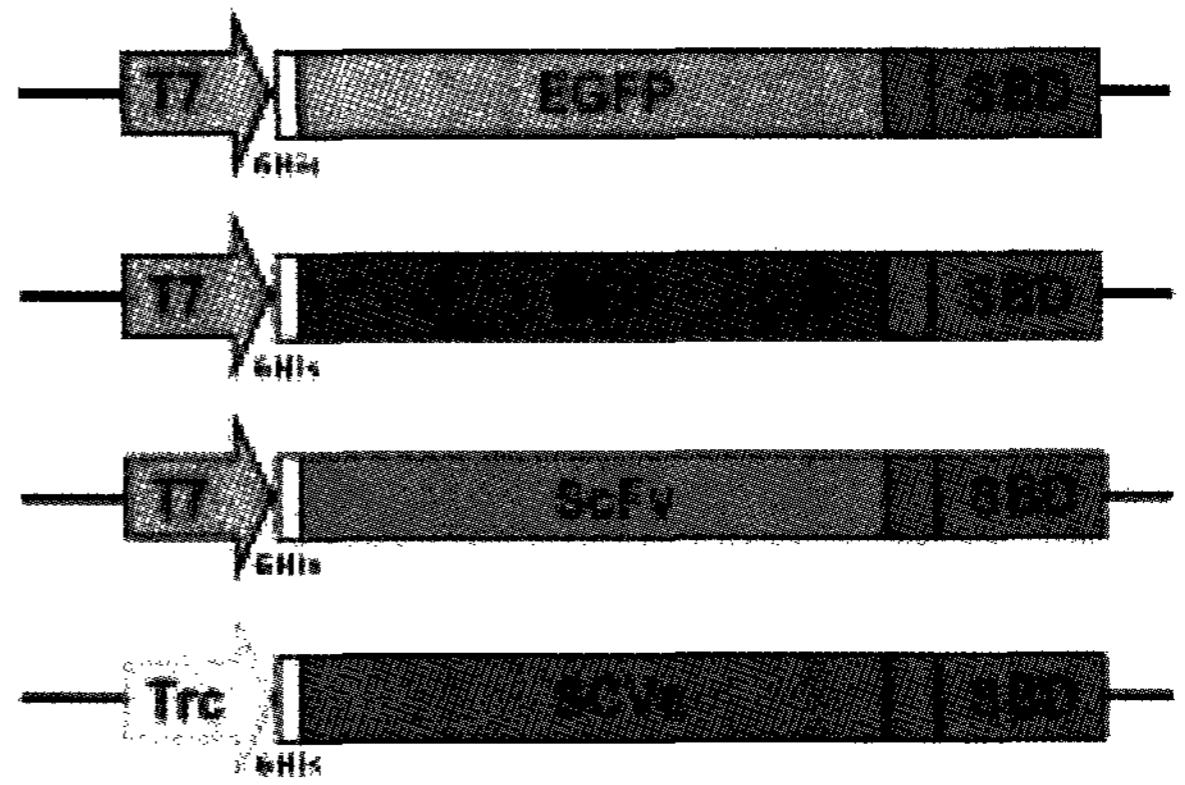


Figure 1. Schematic illustration for the expression of 6HEGFP-SBD, 6HRFP-SBD, 6HScFv-SBD and 6HSCVe-SBD fusion proteins. Redrawn from Park et al.(52) and Lee et al.(54).

PHA 기질 위의 단백질 microarray

두 개의 형광단백질을 PHA depolymerase의 SBD와 융합 발현하여 P(3HB) 기질에서 단백질 microarray의 모델 단백질로 사용하였다. P(3HB)는 유리 슬라이드에 스핀-코팅되었고 6HEGFP-SBD와 6HRFP-SBD 융합단백질들은 각각 P(3HB) 코팅된 슬라이드에 microarray를 이용하여 spotting 되었다. 슬라이드 칩은 세척 단계를 거친 후 confocal laser scanner로 관찰되었다. 특이적이면서 구분이 가능한 형광 신호가 융합단백질이 spotting된 위치에서 검출되었고 음성 대조군인 *E. coli* 세포 파쇄액을 사용한 위치에서는 형광이 나타나지 않았다. 더욱 중요한 것은 형광의 세기가 융합단백질의 양에 따라 비례하게 나타난다는 것이다. 형광 signal은 융합단백질의 농도가 각각 10.75 ng/mL (6HEGFP-SBD)과 6.25 ng/mL (6HRFP-SBD)로 낮게 나타났다. 이렇게 융합단백질을 이용하여 형광세기를 비교해보면 나타나는 직선의 비례관계는 농도에 비례하여 단백질의 정량분석에 사용될 수 있는 가능성을 제시하는 것이다.

PHA 칩을 이용한 B형 간염 바이러스와 사스 바이러스의 특이적 검출

PHA-SBD 상호작용이 단백질-단백질간의 상호작용을 특이적으로 검출하기 위해 사용될 수 있는지를 확인하기 위하여, B형 간염바이러스의 표면항원에 대한 단일사슬항체 (ScFv)와 사스 코로나바이러스의 표면항원 (SCVe)을 PHA depolymerase의 SBD와 융합발현하였다(Fig. 2). 두 융합단백질은 P(3HB) 칩에 농도를 다양하게 조절하여 spotting되었고 FITC가 접합된 B형 간염바이러스의 표면항원 (2.2 mg/mL)과 Cy5가 표지된 SCVe (1.7 mg/mL)의 polyclonal 항체를 각각 반응시켰다. 각각의 슬라이드 칩은 PBS 버퍼와 증류수를 이용하여 세척한 후 건조시켜서 spot의 형광세기를 측정하였다. ScFv-SBD와 SCVe-SBD 융합단백질은 P(3HB) 칩 위에 spotting되어 각각의 특이적인 항원-항체 반응에 의해 형광을 나타내었다. 하지만, 음성 대조군에서는 어떠한 형광도 나타나지 않은 것으로 나타났다. ScFv-SBD와 SCVe-SBD 융합단백질을 각각 2.7 ng/mL과 0.6 ng/mL의 낮은 농도로 사용한 것 또한 이 시스템의 높은 민감도를 나타내는 주목할만한 사실이다. 이러한 결과들로부터 PHA 칩과 PHA depolymerase의 SBD를 이용한 시스템은 B형 간염과 사스 바이러스를 검출할 수 있는 칩 시스템으로서 PHA depolymerase의 SBD를 이용하는 동일한 방법을 적용하면 다른 질병 진단 시스템에도 응용될 수 있음을 확인하였다(52).

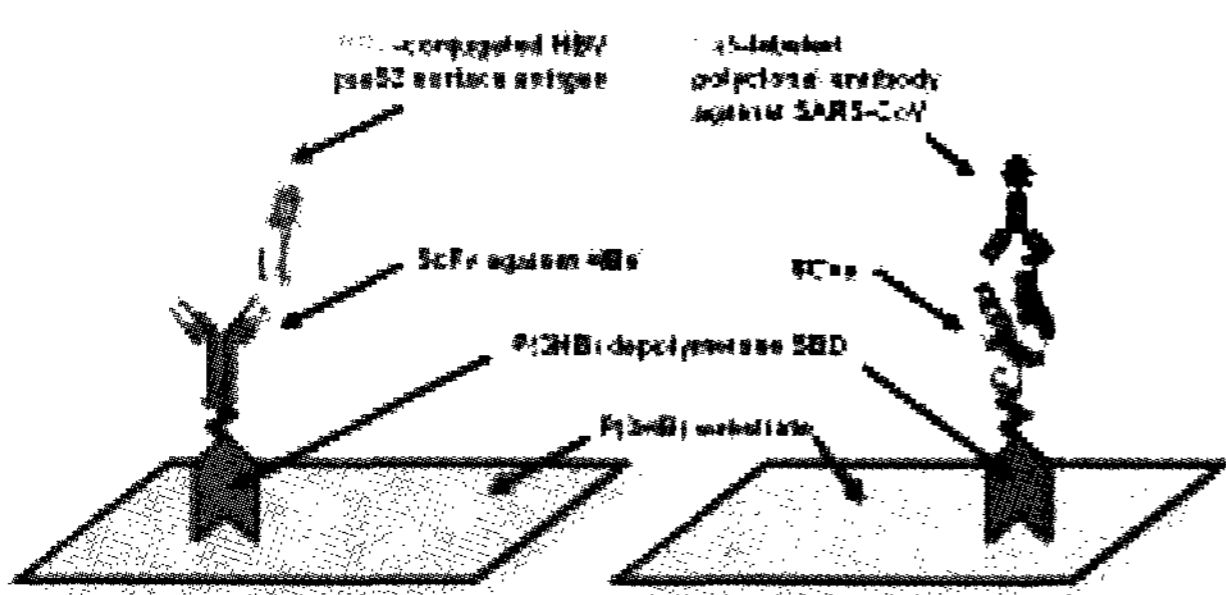


Figure 2. Schematic illustration of manufacturing P(3HB) chips for immunoassay. Immunoassays of HBV and SARS were carried out using the ScFv against HBV and SCVe protein, respectively, fused to the SBD of P(3HB) depolymerase based on antigen-antibody interactions on P(3HB) chips. Redrawn from Park et al.(52).

PHA 칩 위에 융합단백질의 고정화를 통한 단백질 미세패턴의 제조

미세접촉인쇄 (microcontact printing, μ CP)와 광평판술 (photolithography)을 포함한 몇 가지의 방법들이 유리, 고분자, 그리고 금속 재료위의 패턴에 단백질이나 펩티드를 고정화하기 위해서 개발되어왔다(51, 55-58). 특히, 미세접촉인쇄 (μ CP)는 바이오물질의 미세패턴을 만들기 위해서 간단하게 진행할 수 있고 다양한 목적으로 사용할 수 있는 방법이다. 여러 종류의 단백질들이 polydimethylsiloxane (PDMS)로 만들어진 고분자 도장 (stamp)을 사용하여 목적 용액으로부터 도장 찍듯 잉크를 묻혀낼 수 있는데, 최근에 PHA 표면에 단백질을 미세패터닝할 수 있다는 것이 보고되었다(Fig. 3)(53). *P. stutzeri*의 PHA depolymerase 도메인

구조를 분석하여, SBD와 융합된 두 개의 형광단백질을 발현시키기 위한 두 개의 plasmid 벡터가 제조되었다(22). 그리고 이 plasmid들은 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환되어 각 융합단백질을 생산하도록 이용되었다. PHA가 유리과 소수성 반응에 의해 부착되는 것을 방지하고, 유리 기질 위에 PHA를 스핀-코팅하기 위해 octadecyltrichlorosilane (OTS)를 처리하였다. 자기조립단층이 형성되고 나서 OTS로 기능화된 유리 기질은 스핀-코팅을 통해 PHA를 코팅하였다. 두 종류의 PHA가 모델 polyester로 사용되었는데 P(3HB)와 P(3HB-co-3HHx)가 그것이다. 요약하면, P(3HB-co-3HHx)는 P(3HB)보다 더 나은 미세패턴을 만들 수 있다는 것이다. 50 μ m의 줄무늬와 원형 구조의 단백질 패턴이 유리에 코팅된 P(3HB-co-3HHx)를 fabrication할 수 있다(Fig. 3). 또한, PHA 표면 위에서 단백질-단백질간의 상호작용은 표면자기공명분석 (surface plasmon resonance spectroscopy, SPR spectroscopy)에 의해서도 연구될 수 있다. 지금까지의 결과들로부터 어떠한 단백질이나 펩티드가 SBD와 융합될 수 있다면 본 플랫폼 전략은 성공적으로 PHA 기질 위에 목적 단백질이나 펩티드를 미세패터닝할 수 있음을 알 수 있으며 이는 단백질 (혹은 펩티드) 칩 연구에도 적용하여 단백질-단백질 간의 상호작용을 연구하는 적절한 수단이 될 수 있다(53).

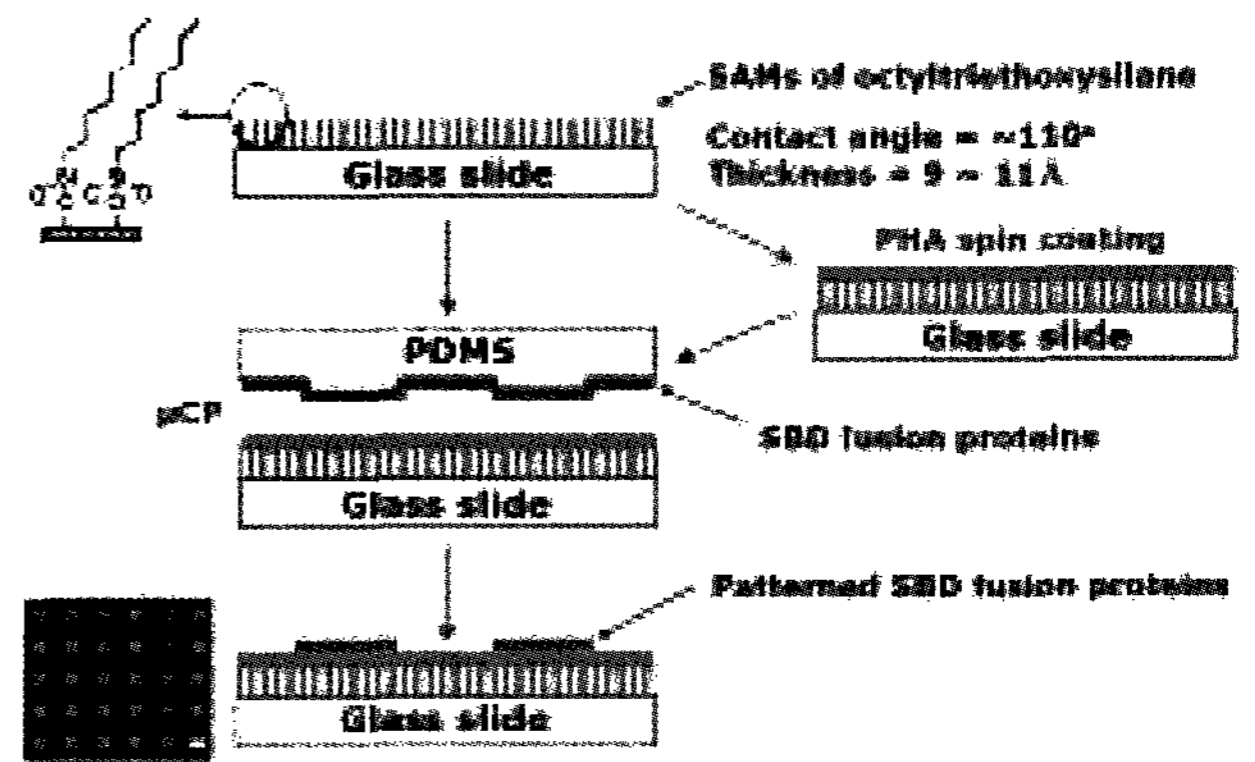


Figure 3. Schematic illustration of microcontact printing (μ CP) of the SBD-fusion proteins on PHA substrate. Glass substrate is treated with OTS, and PHA was spin-coated onto it. Then, the SBD-fusion protein was microcontact printed by using PDMS stamp. Confocal fluorescence images of 6HEGFP-SBD fusion protein (0.4 mg/mL) micropatterned in circles type on P(3HB-co-3HHx)-coated surface. White bar represents 50 μ m. Reproduced from Park et al.(53).

PHA 마이크로비드 위에 융합단백질의 고정화를 통한 바이오센서

바이오센서 연구를 위한 P(3HB) 마이크로비드가 O/W (oil in water) emulsion 방법에 의해 제조되었다(59). 간단하게 요약하면, 5 중량%의 P(3HB)를 5 mL chloroform에 녹이고, of water phase containing 5 중량% P(3HB)를 포함하고 있는 15 mL의 물상 (water phase)을 오일상 (oil phase)에 첨가했다. 이렇게 만들어진 O/W 상은 homogenizer (22,000 rpm, 20분)를 사용하여 emulsion을 준비한 후, 백색 용액은 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 P(3HB) 마이크로비드를 분리했다. 마지막으로 세척과정을 통해 정제

된 P(3HB) 마이크로비드는 동결건조하고 진공상태에서 하루 동안 건조시켰다. P(3HB) 마이크로비드의 형태학적 분석은 전자현미경 (scanning electron microscope, SEM)과 입자크기분석기 (particle size analyzer)로 관찰한 결과 평균 지름이 2 μm 였다. 융합단백질의 특이적 고정화를 확인하기 위해 P(3HB) 마이크로비드를 PBS 버퍼에 풀어서 EGFP-SBD 융합단백질을 포함하고 있는 세포파쇄액과 혼합한 후 37°C에서 반응시켰다. 최종적으로 원심분리와 세척과정을 거쳐 1차 항체인 GFP polyclonal 항체 (1 : 1,000, v/v)와 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 세척 후에 P(3HB) 마이크로비드는 다시 FITC가 부착된 2차 항체와 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 세척과정 후에 유세포 분석기 (FACSCalibur™, flow cytometer)를 사용하여 분석하였다. 모든 샘플의 형광세기는 녹색 형광 검출기에 의해 분석되었다(Fig. 4). 음성대조군인 P(3HB) 마이크로비드와 SBD없는 EGFP와 반응시킨 P(3HB) 마이크로비드를 각각 검정색과 빨강색 선으로 나타내었는데, EGFP-SBD 융합단백질을 P(3HB) 마이크로비드와 반응시킨 경우 (녹색)가 형광세기가 더 크게 나타났고 여기에 1차 항체를 비롯하여 FITC가 부착된 2차 항체를 반응시켰을 때 (오렌지색) 좀 더 강한 형광이 나타남을 확인할 수 있었다(54). 이를 통해 EGFP-SBD 융합단백질이 P(3HB) 마이크로비드에 선택적으로 결합하였음을 알 수 있었으며 활성을 나타내고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

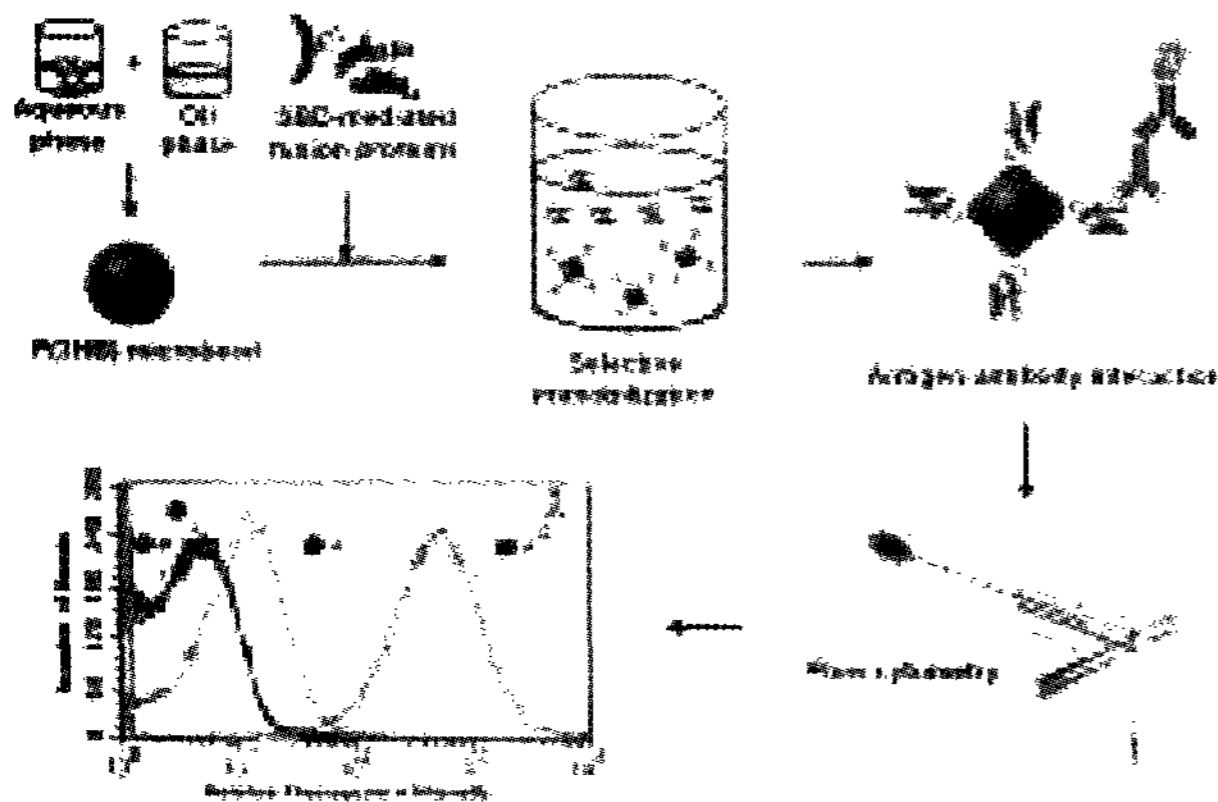


Figure 4. Overall scheme for the immunoassay using the SBD fusion proteins bound to the P(3HB) microbeads by flow cytometry analysis (M, the mean value of fluorescence intensity). The lines represent: black, P(3HB) microbeads only (M = 5); red, P(3HB) microbeads immobilized with EGFP (M = 5); green, P(3HB) microbeads immobilized with EGFP-SBD fusion proteins (M = 13); orange, P(3HB) microbeads immobilized with the EGFP-SBD fusion proteins followed by incubation with rabbit anti-GFP antibody and FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody (M = 688). Redrawn from Lee et al.(54).

또한, 항원-항체 반응을 통해 바이러스성 질환을 검출할 수 있는지를 확인하기 위해 P(3HB) 마이크로비드를 고체 기질로 사용하여 사스 코로나바이러스를 진단할 수 있다는 것을 확인하였다. SCVe-SBD 융합단백질과 그 항체와의 특이적 결합을 통해 유세포 분석기에서 형광을 확인할 수 있었다(54). 이를 통해 PHA와 PHA depolymerase의 SBD간

의 특이적 결합을 융합단백질과 함께 이용한 본 시스템이 항원-항체 반응에 의한 면역학적 검출방법에 응용될 수 있다는 것을 알 수 있다.

요약

나노기술과 바이오기술의 융합연구에 의해 나노바이오 기술이 발전되고 있다. 나노바이오기술의 중요한 응용연구 중의 하나로서, 진단이나 바이오센서 분야에서 단백질-단백질 및 단백질-바이오물질간의 상호작용을 연구하기 위한 단백질 센서 칩이 개발되어 왔다.

본 논문에서는 단백질의 선택적 고정화를 위한 새로운 생체고분자 기질로 PHA를 이용하는 첫 번째 예로서, 단백질-단백질 및 항원-항체 반응의 구현을 나타내고자 하였다. 본 시스템은 PHA 표면 위에서 PHA depolymerase의 SBD와의 선택적 결합에 기반한 것으로, PHA depolymerase의 SBD와 융합된 단백질이 PHA가 코팅된 표면 위에 spotting 될 수 있고 미세접촉인쇄방법에 의해 PHA 위에 미세패턴이 제조되어지는 것을 알 수 있었다(52, 53). 이러한 새로운 전략이 PHA depolymerase의 SBD와 다른 단백질을 융합함으로써 미세 spotting과 미세패터닝이 가능하게 되었고 항원-항체의 생물학적 반응을 통해 많은 바이오센서 칩 연구에 응용될 수 있음을 확인하였다. 또한, PHA 마이크로비드에도 PHA depolymerase의 SBD와 융합된 단백질을 고정시킴으로서 항원-항체 반응을 유도할 수 있음을 확인하였다(54). PHA의 구조를 변경하여 PHA 기판, PHA 필름, PHA 미세패턴, PHA 마이크로 비드 등을 이용할 수 있으며 multiplex assay를 동시에 진행할 수 있는 다양한 융합 단백질을 사용할 수 있을 것이다. 생분해성 플라스틱으로서 성공적으로 개발된 PHA를 이용한 새로운 플랫폼 기술이 PHA depolymerase의 SBD를 이용함으로써 특이적이고 선택적인 단백질의 고정화에 이용될 수 있음을 확인하였다. 본 전략이 다양한 단백질-단백질 및 단백질-바이오물질 반응을 이용한 바이오칩 및 바이오센서의 응용연구에 유용하게 사용될 것이다.

감사

본 논문은 정보통신부의 IT신성장동력 핵심기술 개발사업 IT융합분야 연구과제와 초미세 화학공정 시스템 연구사업에 의해 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Niemeyer, C. M. and C. A. Mirkin (2004), *Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
2. Fortina, P., L. J. Kricka, S. Surrey, and P. Grodzinski (2005), *Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition*, *Trends Biotechnol.* **23**, 168-173.

3. Whitesides, G. M. (2003), The "right" size in nanobiotechnology, *Nat. Biotechnol.* **18**, 760-763.
4. Gourley, P. L. (2005), Brief overview of biomicro nano technologies, *Biotechnol. Prog.* **21**, 2-10.
5. Laval, J. M., P. E. Mazeran, and D. Thomas (2000), Nanobiotechnology and its role in the development of new analytical devices, *Analyst* **125**, 29-33.
6. Lee, S. J. and S. Y. Lee (2004), Micro total analysis system (μ -TAS) in biotechnology, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 289-299.
7. Lowe, C. R. (2000), Nanobiotechnology: the fabrication and applications of chemical and biological nanostructures, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 428-434.
8. Hodneland, C. D., Y.-S. Lee, D.-H. Min, and M. Mrksich (2002), Selective immobilization of protein to self-assembled monolayers presenting active site directed capture ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 5048-5052.
9. Niemeyer, C. M. (2000), Self-assembled nanostructures based on DNA: towards the development of nanobiotechnology, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 609-618.
10. Wilson, D. S. and S. Nock (2003), Recent developments in protein microarray technology, *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 494-500.
11. Cha, T.-W., A. Guo, Y. Jun, D. Pei, and X.-Y. Zhu (2004), Immobilization of oriented protein molecules on poly(ethylene glycol)-coated Si(111), *Proteomics* **4**, 1965-1976.
12. Shirahata, N., T. Yonezawa, Y. Miura, K. Kobayashi, and K. Koumoto (2003), Patterned adsorption of protein onto a carbohydrate monolayer immobilized on Si, *Langmuir* **19**, 9107-9109.
13. Shadnam, M. R., S. E. Kirkwood, R. Fedosejevs, and A. Amirfazli (2004), Direct patterning of self-assembled monolayers on gold using a laser beam, *Langmuir* **30**, 2667-2676.
14. Frey, W., D. E. Meyer, and A. Chilkoti (2003), Dynamic addressing of a surface pattern by a stimuli-responsive fusion protein, *Adv. Mater.* **15**, 248-251.
15. Zhu, H. and M. Snyder (2003), Protein chip technology, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 55-63.
16. Kobayashi, G., T. Shiotani, Y. Shima, and Y. Doi (1994), Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from oils and fats by *Aeromonas* sp. OL-338 and *Aeromonas* sp. FA440, in: *Biodegradable Plastics and Polymers*, Doi and Fukuda, Eds., p410, Elsevier, Amsterdam.
17. Lee, S. Y. (1996), Bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 1-14.
18. Lee, S. Y. (1996), Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, *Trends Biotechnol.* **14**, 431-438.
19. Lee, S. Y. and E. T. Papoutsakis (1999), *Metabolic engineering*, Marcel Dekker, Inc., New York.
20. Steinbüchel, A. (1991), Polyhydroxyalkanoic acids, in: *Biomaterials: novel materials from biological sources*, D. Byrom, Eds., p124, Stockton, New York.
21. Madison, L. L. and G. W. Huisman (1999), Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 21-53.
22. Jendrossek, D. and R. Handrick (2002), Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates, *Ann. Rev. Microbiol.* **56**, 403-432.
23. Brandl, H., R. A. Gross, R. W. Lenz, and R. C. Fuller (1990), Plastics from bacteria and for bacteria: polyhydroxyalkanoates as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **41**, 77-93.
24. Lenz, R. W. and R. H. Marchessault (2005), Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology, *Biomacromolecules* **6**, 1-8.
25. Choi, J., S. Y. Lee, and K. Han (1998), Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4897-4903.
26. Wang, F. and S. Y. Lee (1997), Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3703-3706.
27. Dennis, D., M. McCoy, A. Stangl, H. E. Valentin, and Z. Wu (1998), Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*, *J. Biotechnol.* **64**, 177-186.
28. Wang, J. and J. Yu (2001), Kinetic analysis on formation of poly(3-hydroxybutyrate) from acetic acid by *Ralstonia eutropha* under chemically defined conditions, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 121-126.
29. Cho, K.-S., H. W. Ryu, C.-H. Park, and P. R. Goodrich (1997), Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from swine waste liquor by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Biotechnol. Lett.* **19**, 7-10.
30. Bourque, D., B. Ouellette, G. Andre, and D. Groleau (1992), Production of polybeta-hydroxybutyrate from methanol: characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 7-12.
31. Kang, C. K., H. S. Lee, and J. H. Kim (1993), Accumulation of PHA and its copolyester by *Methylobacterium* sp. KCTC 0048, *Biotechnol. Lett.* **15**, 1017-1020.
32. Ashby, R. D., D. K. Y. Solaiman, and T. A. Foglia (2002), The synthesis of short and medium-chain-length poly(hydroxyalkanoates) mixtures from glucose- or alkanolic acid-grown *Pseudomonas oleovorans*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 147-153.
33. Guo-Qiang, C., X. Jun, W. Qiong, Z. Zengming, and H. Kwok-Ping (2001), Synthesis of copolyesters consisting of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317, *React. Funct. Polym.* **48**, 107-112.
34. Kato, M., H. J. Bao, C. K. Kang, T. Fukui, and Y. Doi (1996), Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acids and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 363-370.
35. Ahn, W. S., S. J. Park, and S. Y. Lee (2000), Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3624-3627.
36. Choi, J. and S. Y. Lee (1999), High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4363-4368.
37. Park, S. J., W. S. Ahn, P. R. Green, and S. Y. Lee (2001), Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains, *Biotechnol. Bioeng.* **74**, 81-86.
38. Steinbüchel, A. (2001), Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example, *Macromol. Biosci.* **1**, 1-24.
39. Potter, M. and A. Steinbüchel (2005), Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation, *Biomacromolecules* **6**, 552-560.
40. Brandl, H., E. J. Knee, R. C. Fuller, R. A. Gross, and R. W. Renz (1989), Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly(β -hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyester, *Int. J. Biol. Macromol.* **11**, 49-55.
41. Haywood, G. W., A. J. Anderson, G. A. Williams, E. A. Dawes, and D. F. Ewing (1991), Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126, *Int. J. Biol. Macromol.* **13**, 83-87.

42. Lee, S. H., D. H. Oh, W. S. Ahn, Y. Lee, J. Choi, and S. Y. Lee (2000), Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*, *Biotechnol. Bioeng.* **67**, 240-244.
43. Doi, Y., S. Kitamura, and H. Abe (1995), Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), *Macromolecules* **28**, 4822-4828.
44. Kasuya, K., Y. Inoue, and Y. Doi (1996), Adsorption kinetics of bacterial PHB depolymerase on the surface of polyhydroxyalkanoate films, *Int. J. Biol. Macromol.* **19**, 35-40.
45. Kasuya, K. T. Ohura, K. Masuda, and Y. Doi (1999), Substrate and binding specificities of bacterial polyhydroxybutyrate depolymerases, *Int. J. Biol. Macromol.* **24**, 329-336.
46. Kikkawa, Y., M. Fujitani, T. Hiraishi, M. Yoshimoto, and Y. Doi (2004), Direct observation of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase adsorbed on polyester thin film by atomic force microscopy, *Biomacromolecules* **5**, 1642-1646.
47. Shinomiya, M., T. Iwata, and Y. Doi (1998), The adsorption of substrate-binding domain of PHB depolymerases to the surface of poly(3-hydroxybutyric acid), *Int. J. Biol. Macromol.* **22**, 129-135.
48. Jain, K. K. (2000), Applications of biochip and microarray systems in pharmacogenomics, *Pharmacogenomics* **1**, 289-307.
49. Rajagopal, K. and J. P. Schneider (2004), Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 480-486.
50. MacBeath, G. and Schreiber, S. L. (2000), Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination, *Science* **289**, 1760-1763.
51. Whitesides, G. M., E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, and D. E. Ingber (2001), Soft lithography in biology and biochemistry, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **3**, 335-373.
52. Park, T. J., J. P. Park, S. J. Lee, H. J. Hong, and S. Y. Lee (2006), Polyhydroxyalkanoate chip for the specific immobilization of recombinant proteins and its applications in immunodiagnosics, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **11**, 173-177.
53. Park, J. P., K.-B. Lee, S. J. Lee, T. J. Park, M. G. Kim, B. H. Chung, Z.-W. Lee, I. S. Choi, and S. Y. Lee (2005), Micropatterning proteins on polyhydroxyalkanoate substrates by using the substrate binding domain as a fusion partner, *Biotechnol. Bioeng.* **92**, 160-165.
54. Lee, S. J., J. P. Park, T. J. Park, S. Y. Lee, S. Lee, and J. K. Park (2005), Selective immobilization of fusion proteins on poly(hydroxyalkanoate) microbeads, *Anal. Chem.* **77**, 5755-5759.
55. Bouaidat, S., C. Berendsen, P. Thomsen, S. G. Petersen, A. Wolff, and J. Jonsmann (2004), Micro patterning of cell and protein non-adhesive plasma polymerized coatings for biochip applications, *Lab Chip* **4**, 632-637.
56. Ito, Y. (2000), Micropattern immobilization of polysaccharide, *J. Inorg. Biochem.* **79**, 77-81.
57. Lee, K., F. Pan, G. T. Carroll, N. J. Turro, and J. T. Koberstein (2004), Photolithographic technique for direct photochemical modification and chemical micropatterning of surfaces, *Langmuir* **20**, 1812-1818.
58. Tanaka, M., A. P. Wong, F. Rehfeldt, M. Tutus, and S. Kaufmann (2004), Selective deposition of native cell membranes on biocompatible micropatterns, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3257-3260.
59. Gangrade, N. and J. C. Price (1991), Poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres containing progesterone: preparation, morphology and release properties, *J. Microencapsul.* **8**, 185-202.