

## 실란 카르복실 표면을 사용한 단백질 칩 기판의 기능 분석

김지현, 송예신, 윤미영, 피재호\*

단국대학교 자연과학대학 자연과학부

### Functional Analysis of Protein Chip Plate Using Silane Carboxylate Surface

Ji Hyun Kim, Ye Sinn Song, Mi Young Yun, Jaeho Pyee\*

Faculty of Natural Sciences, College of Natural Sciences, Dankook University, Seoul 140-714, Korea

(Received 6 July 2004 ; accepted 23 August 2004)

#### Abstract

We fabricated protein chip plates coated with silane carboxylate. The silane compound was immobilized by hydrogen bond and/or other chemical bonds on the surface of the plate. The plates were then prepared by binding  $Ni^{2+}$  to surfaces terminated with silane carboxylate groups. The carboxylic acid surface was generated by chemical oxidation of the terminal double-bond functions of the silane-deposited layer. The  $Ni^{2+}$  ions on the surface reacted readily to His-tagged proteins. A significant increase in His-tagged protein adsorption was achieved on the surface terminated with silane carboxylate with longer alkyl chain, suggesting better availability of these protein chip plates for proteomic studies.

*Keywords* : Protein chip, Nicke, His-tagged protein, Silane

## 1. 서 론

단백질 칩은 유리기판 위에 수백 또는 수천 개 다른 종류의 단백질을 고정화시킨 단백질 배열 구조물이다. 최근 인간 유전체의 구조가 밝혀지면서 유전체의 기능 연구에 총대한 관심도가 높아졌고, 그러한 총체적 연구의 한 분야가 단백질체학(proteomics)이다. 이러한 단백질체학의 연구에 단백질 칩의 개발은 매우 중요하다. 단백질 칩은 고정화된 단백질들의 동시다발적 분석이 가능하기 때문에 특정 생리활성을 갖는 단백질의 검색, 신약 검색과 질병 진단 등에 이용된다<sup>1,2)</sup>. 또한 단백질 칩은 사용목적에 따라 적합한 칩 기판을 필요로 한다<sup>2,4)</sup>.

현재 시판 중인 Histidine (His)-tagged 단백질을 올릴 수 있는 기판은 유리 슬라이드위에 금을 매우 얇은 두께로 증착시킨 다음 하이드로젤(덱스트란, dextran)을 약 100 nm 두께로 도포시켜 놓았다

(Biacore Co.). 이때 dextran 안에는 NTA [nitriloacetic acid,  $N(CH_2COOH)_3$ ]가 들어있다. NTA는 3개의 카르복실산의 산소원자와 중심의 비공유 전자쌍을 가진 질소원자가 있어  $Ni^{2+}$  금속이온과 배위 결합을 하게 된다. 따라서 4개의 배위결합으로  $Ni^{2+}$ 이 안정화되면서 His-tagged 단백질과 결합을 하게 된다<sup>5)</sup>. 그러나, 기존의 단백질 칩은 SPR(surface plasmon resonance) 방법으로 분석해야하며, 동시에 흐름 경로 장치(flow channel device)에 사용하도록 디자인 되어있을 뿐 아니라 가격이 매우 비싸다.

본 연구팀은 유리 기판에  $Ni^{2+}$  이온을 표면 흡착 시켜서 His-tagged 단백질을 고정화시키는 실험을 수행해 왔다<sup>6,7)</sup>. 그러나 이 경우는  $Ni^{2+}$  이온이 유리 기판에 물리적으로 붙어 있는 상태이므로 화학적으로 고정화시키지 못했다. 따라서 본 연구에서는 매우 간단한 방법으로 단백질을 고정화시킬 수 있는 유리 기판을 제작하고자 하였다. 특히 유리 기판의 표면에 화학적인 결합으로 강하게 결합함과 동시에  $Ni^{2+}$  이온을 배위 결합시킬 수 있는 화합물을 유리

\*Corresponding author. E-mail : jpyee1@dankook.ac.kr

기판에 코팅시킨 칩 기판을 제조하는데 있어서 화학적 최적 조건과, 제작된 단백질 칩 기판의 표면 상태에 대해 연구하였다.

## 2. 실험 방법

단백질 칩 기판으로는 일반적으로 시중에서 사용되는 유리 슬라이드를 사용하였다. 실험을 하기 전 유리 슬라이드를  $H_2O_2$ 와  $H_2SO_4$  혼합 용액(부피 비 1:1)에 30분 동안 담근 후, 증류수로 3회 씻었다. 이때 슬라이드의 표면은 하이드록시(-OH) 그룹으로 노출된다. 하이드록시 그룹과 화학적인 결합을 유도하기 위해서 사용된 시약은 TMOS [trimethoxy(7-octen-1-yl) silane,  $H_2C=CH(CH_2)_6Si(OCH_3)_3$ ]와 ATMS [allyltrimethoxy silane,  $H_2C=CHCH_2Si(OCH_3)_3$ ](Aldrich Co.)이었다. 헥산(hexane)을 용매로 만든  $1 \times 10^{-3} M$  TMOS (또는 ATMS) 용액에 유리 슬라이드를 담갔다 꺼내 공기중에서 질소가스를 흘려주면서 약 2분간 건조시켰다. 이때 표면의 하이드록시 그룹이 시약의 메톡시(-SiOCH<sub>3</sub>) 그룹과 수소결합을 하면서 유리기판에 TMOS(또는 ATMS)가 고정화된다. 이것을 다시  $1 \times 10^{-3} M$   $KMnO_4$  수용액에 30분간 담구어 유리 슬라이드에 붙어있는 TMOS(또는 ATMS)의 탄소-탄소 이중결합을 산화시켜서 카르복실산으로 치환하였다. 카르복실기로 만든 유리 슬라이드에 에탄올에 녹인 0.5 M  $NiCl_2$  용액을 2500 rpm의 속도로 스핀 코팅시켰다. 헥산용액에서의 서로다른 TMOS의 농도( $1 \times 10^{-3} M$ ,  $2 \times 10^{-3} M$ ,  $5 \times 10^{-3} M$ )에 따른 단백질 부착 능력을 실험한 결과 TMOS의 농도가  $1 \times 10^{-3} M$ 인 경우가 단백질 부착능력이 가장 좋음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는  $1 \times 10^{-3} M$  TMOS(또는 ATMS) 용액을 사용하였다.

니켈이 코팅된 유리기판 위에 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated되어 있으면서 동시에 His-tag이 붙어 있는 단백질을 10 µg/ml 농도로 10분에서 한 시간 동안 실온에서 반응시킨 뒤 phosphate buffered saline(PBS) 완충액으로 5분간 세 번 세척하여 건조한 후 형광 image analyzer로 단백질 부착 정도를 분석하였다. 유리 기판에 고정화한 FITC-conjugated 단백질은 Bio-Imaging Analyzer System (BAS; Fuji Photo Film Co.)을 사용하여 excitation 파장 490 nm와 emission 파장 670 nm에서 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 silane 화합물을 유리 표면에 고정

시키고 다시  $Ni^{2+}$  이온을 배위결합시킨 칩 기판을 만들고, 여기에 His-tagged 단백질을 부착시키고자 하였다. 이를 위하여 유리 슬라이드를 제일 먼저 산 처리하여 슬라이드의 표면에 하이드록시(-OH) 그룹이 노출되도록 하였다. 이것을 TMOS (또는 ATMS) 용액에 넣으면 유리 슬라이드 표면의 하이드록시 그룹이 silane의 메톡시(-Si-OCH<sub>3</sub>) 그룹과 수소결합을 하면서 유리기판에 TMOS(또는 ATMS)가 화학적으로 안정한 상태를 유지하면서 고정화된다. 일반적으로 FT-IR를 이용하면 화학 결합의 고유 진동수를 확인할 수 있으므로 수소결합의 유무를 확인하는 것은 이론적으로는 가능하다. 그러나 본 연구에서는 슬라이드의 표면에 있는 얇은 막의 하이드록시 그룹을 분석해야만 했으며, FT-IR과 ATR-FT-IR 방법을 모두 사용했으나 분석이 불가능했다. 이러한 어려움은 표면 코팅을 분석하는데 있어서 가장 큰 문제점이다. 대부분의 연구자는 의도적으로 여러 층의 화합물을 적층시켜서 화합물의 농도(두께)를 증가시킨 후에 분석을 한다. 본 연구에서는 표면의 화학 분석이 아니라, 단백질을 선택적으로 잘 붙일 수 있는 유리 슬라이드를 만드는 것에 보다 중요한 목적이 있으므로 표면의 화학 분석은 추후에 수행할 계획이다.

유리 슬라이드에 붙은 TMOS(또는 ATMS)의 가장 끝 부분은 탄소-탄소 이중결합으로 되어있다. 이것을  $KMnO_4$  용액을 이용하여 산화시키면 카르복실산으로 치환될 것이다. Maoz 등은 이와 유사한 반응을 NTS [nonadacyltrichlorosilane,  $H_2C=CH(CH_2)_{17}SiCl_3$ ] 화합물에 적용시켰다<sup>8)</sup>. NTS는 chlorosilane(Si-Cl)계 화합물이고, TMOS(또는 ATMS)는 methoxysilane(Si-OCH<sub>3</sub>)계 화합물이다. 일반적으로 chlorosilane계 화합물의 반응성은 methoxysilane계 화합물보다 매우 크다. 또한 chlorosilane계 화합물은 공기중의 물분자와 반응하여 HCl 가스를 방출하면서 화합물은 silanol(Si-OH)로 변한다. 본 연구에서는 상업적으로 단백질 칩을 만드는 경우를 고려하여 NTS와 같은 chlorosilane계 화합물을 사용하지 않았다. 왜냐하면 단백질 칩을 만들 때 방출되는 독성 가스인 HCl를 처리해야 하는 문제점과 반응성이 너무 빠른 chlorosilane계 시약은 한번 사용하면 공기에 노출되기 쉽고, 공기에 노출된 채 사용하지 않고 남은 시약은 다시 사용할 수 없는 문제점이 있기 때문이다. 따라서 반응성이 상대적으로 낮고 공기에서 안정한 methoxysilane을 사용했다. 그러나 NTS와 같이 TMOS도  $KMnO_4$  용액을 이용하여 산화시키면 슬라이드의 가장 끝 표면의 탄소-탄소 이중결합이 카르복실산으로 치환될 것이다. 이와 같이 얻은 기

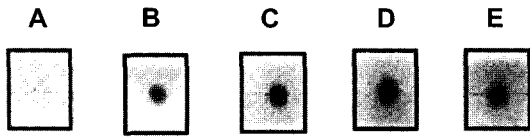


Fig. 1. Adsorption of Histidine-tagged protein to the glass slide attached with TMOS, subsequently oxidized by  $KMnO_4$  for various incubation time (A: untreated, B: 5 min, C: 15 min, D: 30 min, E: 60 min).

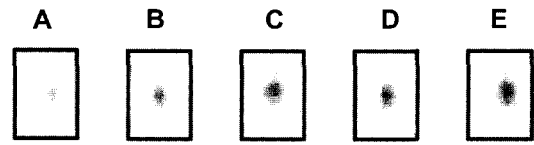


Fig. 2. Adsorption of Histidine-tagged protein to the glass slide attached with ATMS, subsequently oxidized by  $KMnO_4$  for various incubation time (A: untreated, B: 5 min, C: 15 min, D: 30 min, E: 60 min).

판에  $NiCl_2$  용액을 스핀 코팅하면 2개의 카르복실 이온이  $Ni^{2+}$  이온과 이온결합으로 안정화 될 것이다. 즉 유리 슬라이드의 가장 바깥 부분에  $Ni^{2+}$  이온이 붙어 있는 상태가 된다. 따라서 His-tagged 단백질은  $Ni^{2+}$  이온에 매우 선택적으로 강한 결합을 하므로 이렇게 만든 유리 슬라이드는 단백질 칩 기판으로의 역할을 잘 하게 될 것이다.

그림 1은 유리 슬라이드에 붙은 TMOS의 가장 끝 부분의 탄소-탄소 이중결합을  $KMnO_4$  용액으로 산화시키는 시간을 5분에서 60분까지 변화시키며 만든 유리 슬라이드의 단백질 부착 경향을 보여준다. 그림 1-A에서는  $KMnO_4$ 를 사용하지 않았으므로 슬라이드의 가장 끝 표면이 탄소-탄소 이중결합으로 되어 있는 상태에서  $Ni^{2+}$  이온을 스핀 코팅 한 후에 단백질을 부착시킨 것이다. 그림 1-B에서 1-E는  $KMnO_4$ 를 사용하여 슬라이드의 가장 끝 표면을 카르복실산으로 만든 후  $Ni^{2+}$  이온을 스핀 코팅 한 후에 단백질을 부착시킨 것이다. 그림 1에서 확인할 수 있듯이 슬라이드의 가장 끝 표면을 카르복실산으로 만든 경우가 탄소-탄소 이중결합으로 되어 있는 상태보다 단백질 부착력이 더 좋았다. 또한  $KMnO_4$ 를 사용하여 산화시키는 시간이 증가할수록 단백질 부착 능력이 약간씩 증가함을 확인하였다. 이것은  $Ni^{2+}$  이온이 이온결합을 할 수 있도록  $KMnO_4$ 로 산화시켜 유리 슬라이드의 표면에 카르복실 이온을 만들었기 때문으로 판단된다. 그리고 산화 반응 속도는 초기 5분 간에 매우 빠르고 그 이후에는 반응속도가 느려지는 대표적인 빠른 반응을 보였다. 따라서 산화된 정도에 따라 단백질 부착능력이 증가하므로 단백질이 부착되는 정도도 초기에 크게 증가하다가 산화과정 시간이 더 증가해도 단백질이 부착되는 정도는 약간씩만 증가하게 되었다.

그림 2는 유리 슬라이드에 붙은 ATMS의 가장 끝 부분의 탄소-탄소 이중결합을  $KMnO_4$  용액으로 산화시키는 시간을 5분에서 60분까지 변화시키며 만든 유리 슬라이드의 단백질 부착 경향을 보여준다. 이 경우도 TMOS와 같이 슬라이드의 가장 끝 표면

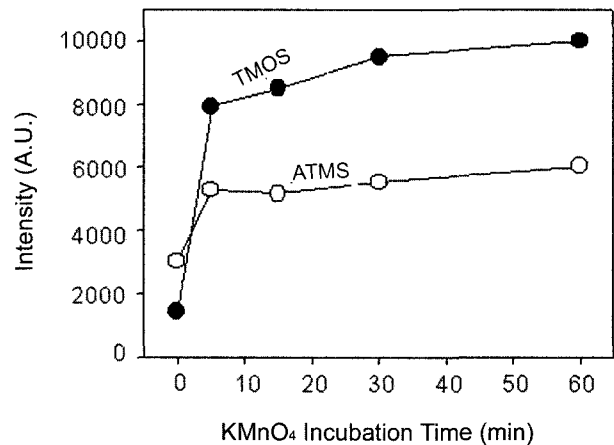


Fig. 3. Quantitative analysis of protein adsorption to the glass slide as a function of incubation time for oxidation by  $KMnO_4$ . The intensity of the spots of protein adsorption on the glass slides was measured by a Bio-Image analyzer system.

을 카르복실산으로 만든 경우가 탄소-탄소 이중결합으로 되어 있는 상태보다 단백질 부착 능력이 더 좋았다. 또한  $KMnO_4$ 를 사용하여 산화시키는 시간이 증가할수록 단백질 부착 능력이 약간씩 증가함을 확인하였다.

그림 3은 그림 1과 2에서 설명한 유리 슬라이드에 붙은 TMOS와 ATMS를  $KMnO_4$ 로 산화시키는 시간에 따른 단백질 부착능력을 정량적으로 측정된 결과이다. 산화된 경우 TMOS가 ATMS 보다 단백질을 더 잘 부착시킴을 확인하였다. TMOS와 ATMS는 단지 알킬 사슬의 길이만 차이가 있는데, 알킬 사슬이 긴 TMOS가 단백질을 더 잘 붙이는 것을 알 수 있다. 이것은 알킬 사슬이 증가할수록 유리 슬라이드위에 있는 화합물 사이의 반데르 발스 힘 (van der Waals force)이 증가하기 때문일 것이다. 따라서 분자간의 상호작용이 증가하면서 TMOS 분자들이 더 촘촘히 유리 슬라이드에 붙어 있을 것으로 예측된다. 따라서 유리 슬라이드에 더 많은 분자들이 부착된 TMOS의 경우가 ATMS에 비해서  $Ni^{2+}$ 이온을 더 많이 결합할 수 있으므로 단백질 부착능력도 증가할 것이다. 이러한 실험 결과는 유기

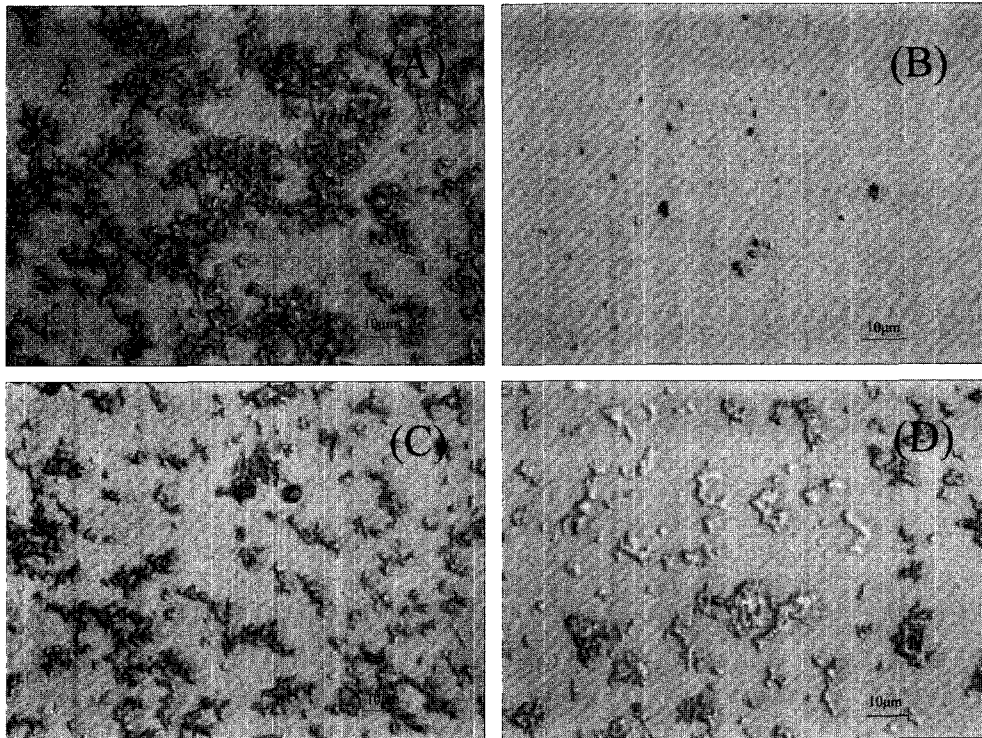


Fig. 4. Particle size analysis for proteins on the surface of the glass slide prepared with TMOS or ATMS, subsequently oxidized by  $\text{KMnO}_4$  (a) TMOS then oxidation by  $\text{KMnO}_4$  (b) TMOS without oxidation (c) ATMS then oxidation by  $\text{KMnO}_4$  (d) ATMS without oxidation.

화합물을 유리 슬라이드에 잘 고정화시키기 위해서는 반데르 발스 상호작용이 큰 알킬 사슬이 긴 silane 화합물을 사용하는 것이 좋다는 것을 보여주는 증거이다.

그림 4는 TMOS와 ATMS를  $\text{KMnO}_4$ 로 산화시킨 것과 산화시키지 않은 유리 슬라이드의 표면에 각각 부착시킨 His-tagged 단백질들의 표면을 particle size analyzer(IMT, i-30)로 관찰 한 결과이다. 산화되지 않은 탄소-탄소 이중결합을 유지하고 있는 TMOS 화합물보다 산화되어서 카르복실 그룹으로 치환된 TMOS의 경우가 유리 슬라이드에 부착된 단백질의 밀도도 증가함과 동시에 부착된 단백질의 particle의 크기도 크다는 것을 확인하였다. 또한 유기화합물의 알킬 사슬이 긴 TMOS가 알킬 사슬이 짧은 ATMS 보다 유리 슬라이드에 부착된 단백질의 밀도와 particle의 크기가 컸다. 이러한 실험 결과는 앞서 단백질을 부착하여 얻은 각 슬라이드의 단백질 부착 능력 실험 결과와 일치한다.

따라서 알킬 사슬이 긴 TMOS를 산화시켜서 카르복실 그룹으로 만든 후에  $\text{Ni}^{2+}$  이온을 이온 결합시킨 경우가 His-tagged된 단백질을 더 잘 부착시키는 것을 확인하였다. 이러한 단백질 부착성은 TMOS의 알킬 사슬의 반데르 발스 힘에 의해서 분자간의 상호작용이 증가하면서 TMOS 분자들이 더 촘촘히 유

리 슬라이드에 붙어 있게 되고, 산화에 의해 카르복실 그룹이 생기면  $\text{Ni}^{2+}$  이온이 이온 결합으로 더 잘 부착되어, 잘 고정화된  $\text{Ni}^{2+}$  이온은 His-tagged 단백질과 선택적으로 결합하기 때문으로 설명할 수 있다. 본 연구에서 얻은 결과는 향후 단백질 칩 기판을 제작하는데 중요한 자료를 제공할 것이다.

#### 4. 결 론

유리 슬라이드 표면에  $\text{Ni}^{2+}$  이온을 배위 결합시킬 수 있는 silane 화합물을 화학적인 방법으로 고정화시켜 단백질 칩 기판을 제작하였다. 하이드록시(-OH) 그룹으로 노출된 슬라이드의 표면을 TMOS (또는 ATMS)의 메톡시(-OCH<sub>3</sub>) 그룹으로 결합시켜서 유리 기판에 TMOS(또는 ATMS)가 고정화되도록 하였다. 슬라이드에 고정된 TMOS(또는 ATMS)의 가장 끝 부분에 있는 탄소-탄소 이중결합을  $\text{KMnO}_4$ 로 산화시켜서 카르복실산으로 치환시켰다. 이와 같이 얻은 기판에  $\text{Ni}^{2+}$  이온을 카르복실이온과의 이온 결합으로 붙였으며, 여기에 His-tagged 단백질이 부착되도록 만들었다. 실험 결과 알킬 사슬이 긴 TMOS를 고정화시킨 다음 이를 다시 산화시켜서 카르복실산으로 치환한 단백질 칩 기판이 가장 좋은 단백질 부착 능력을 보였다.

## 감사의 글

본 연구가 진행되는 동안 많은 토의와 실험적인 조언을 준 단국대학교 자연과학부 허영덕, 박현용, 현준원 박사께 깊은 감사를 드리며, 이 연구는 2001년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 수행되었음을 밝힙니다.

## 참고문헌

1. E. T. Fung, V. Thulasiraman, S. R. Weinberger, E. Dalmaso, *Current Opinion in Biotechnology*, 12 (2001) 65.
2. G. MacBeath, S. Schreiber, *Science*, 289 (2000) 1760.
3. D. V. Nicolau, H. Taguchi, H. Taniguchi, S. Yoshikawa, *Langmuir*, 14 (1998) 1927.
4. R. Bashir, R. Gomez, A. Sarikaya, M. R. Ladisch, J. Sturgis, J. P. Robinson, *Biotechnol. Bioeng.*, 73 (2001) 324.
5. L. Nieba, S. E. Nieba-Axmann, A. Persson, M. Hamalainen, F. Edebratt, A. Hanasson, J. Lidholm, K. Magnusson, A. F. Karlsson, A. Pluckthun, *Anal. Biochem.*, 252 (1997) 217.
6. J. W. Hyun, S. Y. Kim, S. Lee, H. Park, J. Pyee, S. Kim, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, 23 (2002) 1725.
7. J. W. Hyun, M. Y. Yun, S. M. An, S. J. Noh, Y. D. Huh, H. Park, Y. S. Song, J. Pyee, K. R. Kim, S. Kim, *J. Kor. Inst. Surf. Eng.*, 37 (2004) 76.
8. R. Maoz, J. Sagiv, D. Degenhardt, H. Mohwald, P. Quint, *Supramolecular Sci.*, 2 (1995) 9.