

## 펩타이드 Microarray를 위한 유리 칩의 표면 개질

\*조형민 · 임창환 · <sup>1</sup>Silke Neff · <sup>1</sup>Alois Jungbauer · †이은규

한양대학교 바이오테크놀로지와 생물공정연구소

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria

(접수 : 2007. 2. 20., 게재승인 : 2007. 8. 20.)

## Surface Modification of Glass Chip for Peptide Microarray

Hyung Min Cho, Chang Hwan Lim, Silke Neff<sup>1</sup>, Alois Jungbauer<sup>1</sup>, and Eun Kyu Lee<sup>†</sup>

Bioprocessing Research Laboratory, Department of Bionanotechnology, Hanyang University, Ansan 426-791, Korea

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria

(Received : 2007. 2. 20., Accepted : 2007. 8. 20.)

Peptides are frequently studied as candidates for new drug development. Recently, synthesized peptide library is screened for a certain functionality on a microarray biochip format. In this study, in order to replace the conventional cellulose membrane with glass for a microarray chip substrate for peptide library screening, we modified the glass surface from amines to thiols and covalently immobilized the peptides. Using trypsin-FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugate that could specifically bind to a trypsin binding domain consisting of a 7-amino acid peptide, we checked the degree of surface modification. Because of the relatively lower hydrophilicity and reduced surface roughness, the conjugation reaction to the glass required a longer reaction time and a higher temperature. It took approximately 12 hr for the reaction to be completed. From the fluorescence signal intensity, we could differentiate between the target and the control peptides. This difference was confirmed by a separate experiment using QCM. Furthermore, a smaller volume and higher concentration of a spot showed a higher fluorescence intensity. These data would provide the basic conditions for the development of microarray peptide biochips.

**Key Words** : Peptide library, immobilization, surface modification, microarray, peptide screening

### 서 론

펩타이드는 생체분자 간 상호작용의 기본 motif를 제공하는 경우가 많아 신약 개발의 출발물질로 개발이 시도되고 있다. 최근에는 펩타이드 library를 통해 합성된 펩타이드들을 array 형태로 집적시킨 후 대상 물질과의 반응여부를 탐색하여 특정 기능의 펩타이드를 스크리닝하는 시도가 증가하고 있다. 마이크로어레이는 96 well plate를 이용한 면역분석법을 소형화하기 위한 요구에서 시작되었다. 단백질 결합능이 우수한 셀룰로즈 멤브레인이 단백질 및 펩타이드 array를 위한 지지체로 펩타이드 library의 스크리

닝을 위해 널리 사용되고 있다. 하지만 셀룰로즈 멤브레인 상에서의 펩타이드 합성은 많은 시간을 필요로 하여, 1회용으로 사용하기에는 비용이 많이 들고 멤브레인을 재사용하는 것은 비생산적이다. 멤브레인 array는 시료 1 ml 당 pg 정도의 단백질 상호작용만 분석할 수 있고, 비교적 높은 친수성과 다공성 (porosity) 때문에 단백질 array를 위해서는 많은 양의 샘플이 필요하다. 따라서 시료의 양이 제한되어 있는 경우 array를 적용하기에는 적합하지 않은 지지체 (substrate)이다.

이러한 이유로 셀룰로즈 멤브레인에서 유리로 지지체를 바꾸는 연구가 진행 중이다. 유리는 마이크로어레이에 널리 이용되는 칩 기판으로 멤브레인에 비해 상대적으로 낮은 친수성 및 표면 조도를 갖고 있어, 시료와 지지체 표면의 상호작용에 의해 일어나는 액체의 퍼짐 (smearing) 현상을 방지할 수 있다. 표면 구조상 10 ul 정도면 분석이 가능하며, 많은 종류의 시료를 간단하게 분석할 수 있으며, 시료 부피를 줄여 1회용으로 사용될 장점을 갖고 있다 (1-3).

\* Present address : SD, Inc., Yongin, Korea

† Corresponding Author : Bioprocessing Research Laboratory, Department of Bionanotechnology, Hanyang University, Ansan 426-791, Korea

Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-408-3779

E-mail : ekleee@hanyang.ac.kr

본 실험에서는 유리 표면을 개질시켜 목적 펩타이드와의 공유결합에 의한 고정화를 시도하였다. Trypsin 결합 부위 (trypsin binding domain)를 구성하는 peptide를 합성한 후 trypsin-FITC (trypsin에 부착된 FITC)를 결합시킨 후 형광 신호를 검출하여 표면개질 과정 및 펩타이드 고정화를 분석하였다.

**재료 및 방법**

**펩타이드 합성**

Fmoc chemistry에 의한 고체상에서의 펩타이드 합성은 4-hydroxymethyl-phenoxy-methyl-copolystyrene-1% divinylbenzene (HMP) resin을 사용하였다. Fmoc group에 의해 보호되는 모든 아미노산의 α-아미노산은 두 번째 아민에 의해 모든 단계의 시작에 제거되었다. Deprotection 후에 남은 물질을 제거하기 위해 N-methylpyrrolidone (NMP)로 resin을 세척하였다. 펩타이드를 coupling하기 위해 아미노산의 카르복실기를 2-(1H-benzotriazol-1-yl)1,2,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)-FastMoc 방법으로 활성화시켰다. 활성화된 Fmoc 아미노산은 펩타이드 결합 형성을 위해 펩타이드 chain의 N-terminus와 반응한다. Coupling 후 resin을 다시 NMP로 세척하였다. 실험 결과 펩타이드의 N-terminus 아미노산은 아세틸화되며 C-terminus 아미노산은 lysine기로 되었다. 이를 HPLC를 이용하여 정제한 후 mass spectrometry를 사용하여 target 펩타이드는 Ac-Leu-Pro-Leu-Arg-Gly-Lys (trypsin binding domain), control 펩타이드는 Ac-Phe-Ala-Asp-Asn-Ala-Lys의 sequence를 나타냄을 확인하였다. 이와 같이 합성된 펩타이드의 C-terminus lysine기와 iodoacetic anhydride를 반응시켰다. 이 반응기작을 Fig. 1(a)에 나타냈다. 이를 HPLC를 이용하여 정제한 후 동결건조시켜 사용하였다.

**유리 칩의 표면 개질**

표면에 아민기를 나타내는 유리 칩 (Nuricell, Seoul, Korea)을 펩타이드와의 원활한 고정화를 위해 thiol기로 표면 개질하였다. 유리 칩 위에 50 mg/ml의 iminothiolane (Sigma, St. Louis, USA) 용액을 증발을 막기 위해 30% glycerol과 섞은 후 spotting하여 35°C에서 2시간 동안 반응시켰다. Fig. 1(b)에 반응기작을 나타내었다(4, 5). 아민기와 반응하는 Cy5 (Amersham Bioscience, Sweden)를 30분 간격으로 반응시킨 후 형광스캐너 (Genepix, Axon instrument, USA)를 이용해 표면 개질 여부를 확인하였다.

**유리 칩 위의 펩타이드 고정화**

표면개질 방법을 통해 thiol기로 개질된 유리 칩 위에 1 mg/ml의 target 펩타이드 용액을 spotting하여 12시간 동안 상온에서 반응시켰다. 공유결합에 의한 고정화 반응 기전을 Fig. 1(c)에 나타내었다. 비교를 위하여 동일 농도와 부피의 control 펩타이드 용액을 같은 조건으로 반응시켰다. 고정화 여부를 확인하기 위해 target 펩타이드와 특이적으로 반응하는 trypsin-FITC를 두 가지 펩타이드와 1시간 반응시키고 세척한 후 형광 신호를 형광 스캐너로 검출하였

다(6-9).

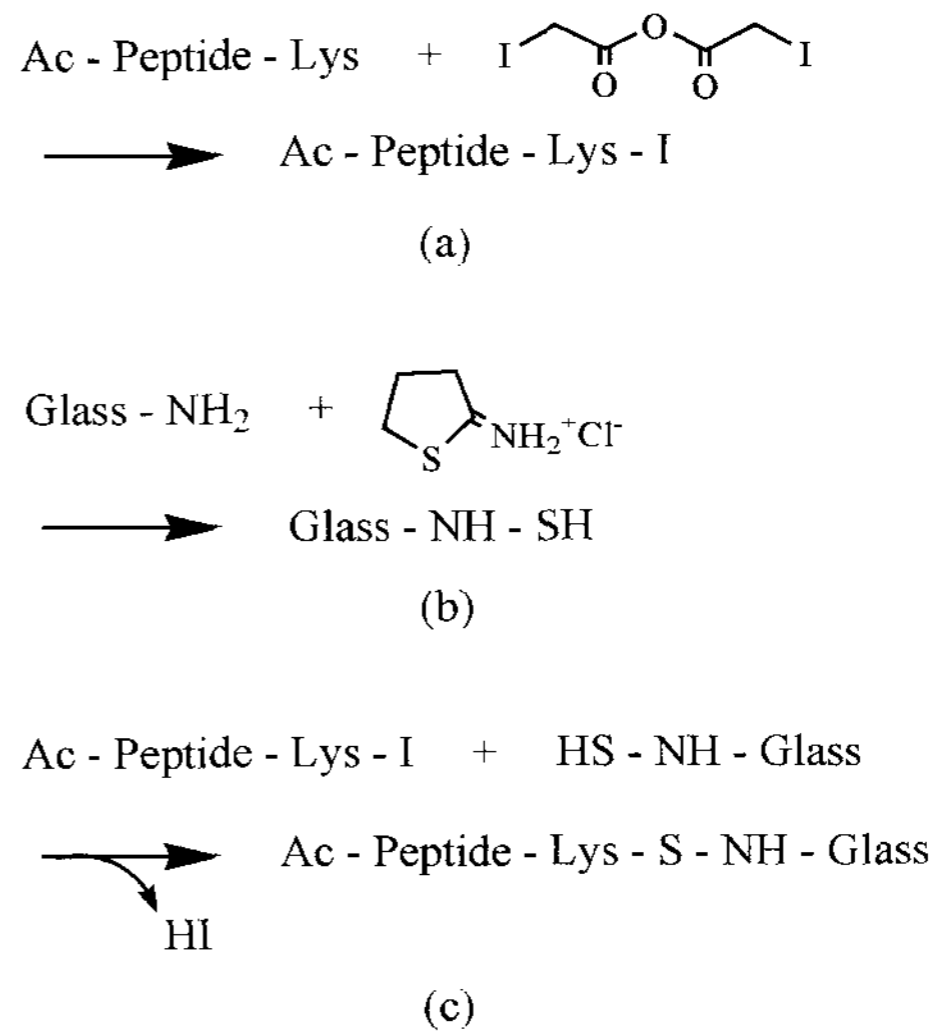


Figure 1. The reaction mechanisms of (a) peptide synthesis, (b) glass surface modification, (c) covalent immobilization of a peptide on modified glass chip (Ac: Acetyl, Lys: Lysine, I: Iodine).

**QCM (Quartz Crystal Microbalance)을 이용한 펩타이드 고정화 분석**

펩타이드의 고정화 과정을 quartz crystal microbalance (QCM; Q-sense, Sweden)를 이용하여 센서 칩 위에서 구현하여 고정화된 target 펩타이드와 control 펩타이드의 고정화 정도 및 trypsin-FITC와의 결합 친화도를 알아보았다. Gold 센서 칩의 표면을 자기조립물질인 11-amino-1-undecanethiol (Dojindo, Kumamoto, Japan)과 4시간 반응시켜 아민기로 개질시킨 후, 50 mg/ml의 iminothiolane 용액을 유리 칩과 같은 조건으로 반응시켜 thiol기로 개질하였다. 표면개질된 칩 위에 0.1 mg/ml의 target 펩타이드와 control 펩타이드를 흘려주어 결합 정도를 비교하였으며, trypsin-FITC와 반응시켜 결합 친화도를 알아보았다(10-12).

**펩타이드 고정화에 미치는 spot 부피 및 펩타이드 농도의 영향**

펩타이드의 고정화에 미치는 펩타이드 용액의 spot 부피 및 농도의 영향을 평가하였다. 여러 농도 (1.2, 0.6, 0.3, 0.15, 0.08, 0.04 mg/ml)의 펩타이드 용액을 표면개질된 동일한 유리칩 위에 같은 조건으로 고정화시켰다. 또한 1.2 mg/ml의 펩타이드 용액을 5, 10, 15, 20 μl로 spotting 부피를 달리하여 고정화시켰다. 고정화된 두 종류의 펩타이드 위에 trypsin-FITC를 1시간 반응시켜 형광 신호를 검출하였다(13, 14). 검출된 형광 intensity는 spot 내 모든 영역에서 균일하지 않기 때문에 spot된 단위 면적당 평균 형광 intensity (형광 밀도)를 산출하였다. Spot 내 형광 intensity를 스캐닝 하여 합한 후 spot 면적으로 나누어 단위면적당 평균 형광 intensity를 계산하였다. 또한 이 형광 밀도는 표면에 고정화되어 있는 펩타이드의 개수와 관련이 있으므로 spot 부피가 spot 면적에 미치는 영향에 대하여도 분석하였다.

결과 및 고찰

유리 칩의 표면 개질

실온에서는 유리 칩의 표면 개질이 되지 않음을 확인한 후 이 문제를 해결하기 위해 표면개질 반응온도를 35°C로 높여 주었다. 이는 온도 상승에 의해 반응 속도를 높여주고자 한 것이다. 표면개질 시킨 유리 칩을 개질 반응 후 30분 간격으로 아민기와 결합하는 Cy5와 반응시켜 형광 신호를 검출한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 반응시간이 지남에 따라 형광 신호가 약해지며, 2시간 후에는 형광 신호를 전혀 검출할 수 없음을 확인하였다. 이는 아민기에 특이적으로 반응하는 Cy5의 성질로 미루어 보아 2시간 반응 후에는 모든 아민기가 thiol기로 개질됨을 알 수 있었다.

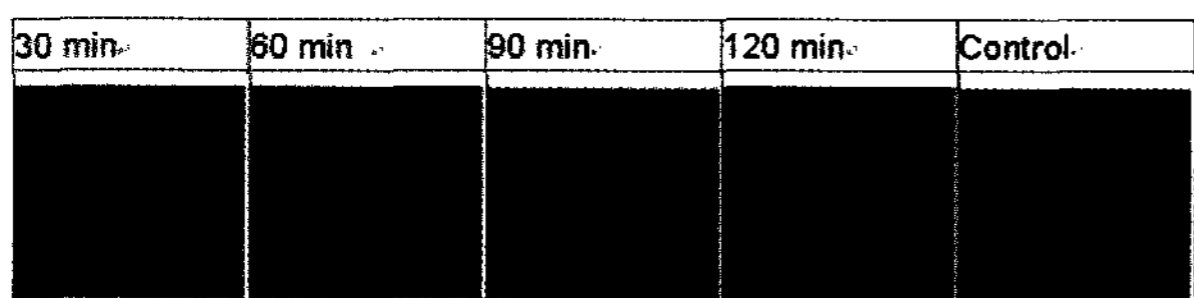


Figure 2. Surface modification of glass chip from amine to thiol at 35°C (Control is amine surface).

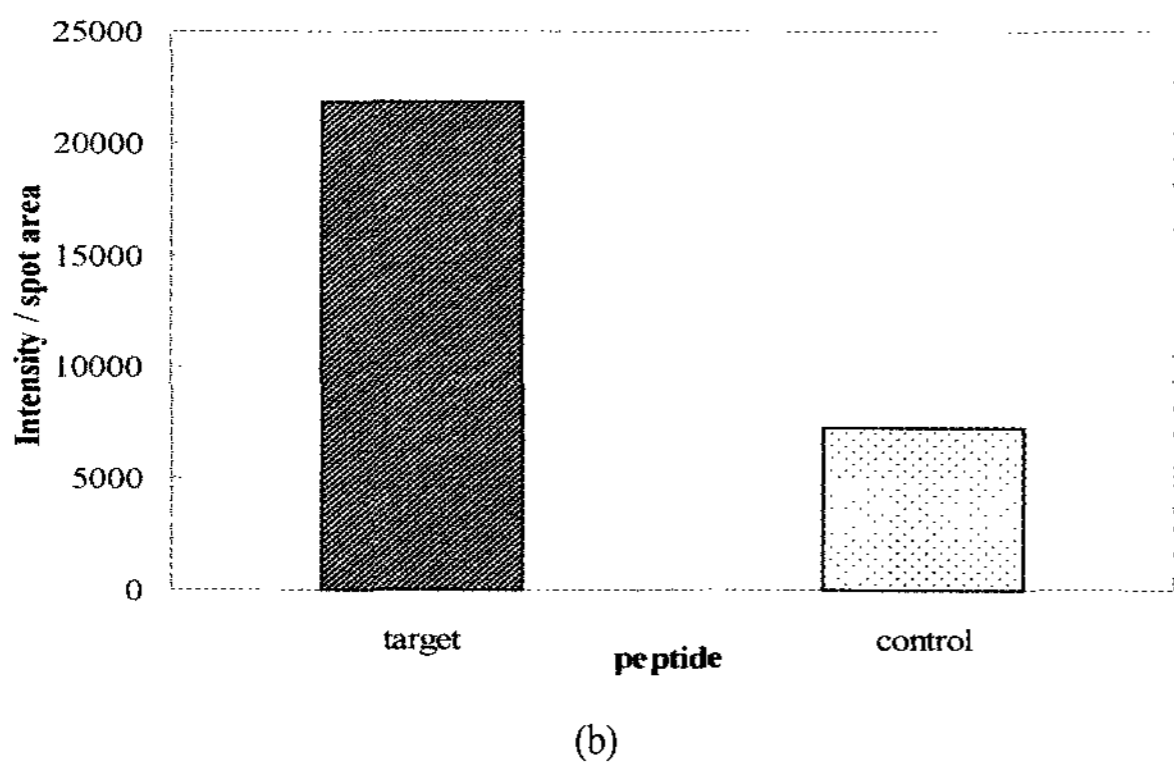
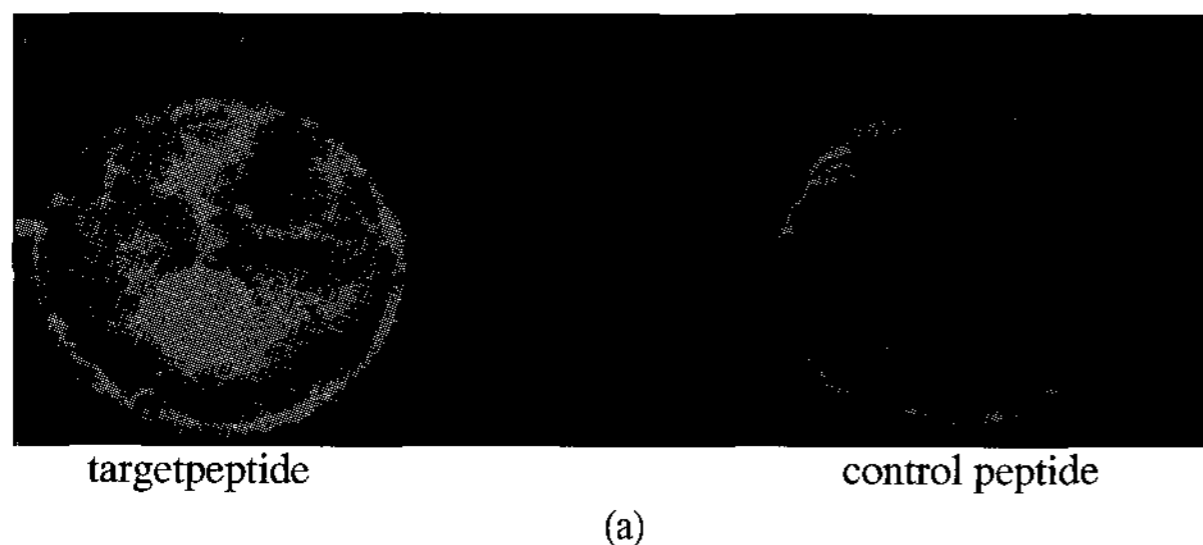


Figure 3. Comparison of fluorescence signals between target and control peptides ((a) fluorescence image, (b) fluorescence intensities).

유리 칩을 이용한 펩타이드 고정화

Target 펩타이드와 control 펩타이드 사이의 형광 신호의 차이를 확인하기 위해 thiol기로 표면개질 된 유리 칩에 12시간 동안 두 가지 펩타이드를 같은 조건으로 고정화시킨 후, target 펩타이드와 특이적으로 반응하는 trypsin-FITC를 이용해 확인한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. Target 펩타이드는 control 펩타이드에 비해 높은 형광 intensity를 보이는 것을 확인하였다. Target 펩타이드는 단위면적 당 22,000 정도의 intensity를 나타냈지만 control 펩타이드는 7,300 정도의 intensity를 보여 target 펩타이드가 control 펩타이드보

다 3배 정도 높은 형광 신호를 보였다. 이를 통해 Target 펩타이드가 control 펩타이드에 비해 trypsin-FITC와 높은 결합력을 보임을 array spot 상에서 확인하였고, 이에 따라 array format에서도 펩타이드를 식별할 수 있음을 확인하였다.

QCM을 이용한 펩타이드 고정화 연구

유리 칩 상에서 구현하였던 펩타이드 고정화 실험을 QCM을 이용해 분석하였다. Thiol기로 개질시킨 QCM 센서 칩 (QSX 301-standard gold, 14 mm x 14 mm)을 MES (2-N-morpholino ethanesulfonic acid) 버퍼 (pH 6.5)를 사용하여 평형을 잡은 후, 0.1 mg/ml의 target 펩타이드와 control 펩타이드를 흘려주어 고정화를 유도하고 세척한 후 trypsin-FITC와 결합시켰다. Table 1에 QCM 실험 결과를 나타냈다. Frequency의 변화를 통해 같은 질량의 target 펩타이드와 control 펩타이드가 칩 표면에 고정화됨을 확인하였다. 하지만 두 가지 펩타이드는 trypsin-FITC와의 결합량에서는 큰 차이를 보였다. Trypsin-FITC가 gold 센서 칩 표면에 비특이적으로 흡착되는 양을 제외하면 control 펩타이드와 거의 붙지 않은 반면에 target 펩타이드에는 약 9배 높은 양이 결합됨을 확인하였다. 즉, control 펩타이드는 단위질량당 0.09 질량의 trypsin-FITC가 결합하는 반면에 target 펩타이드는 0.82 질량의 trypsin-FITC가 결합함을 확인하였다. 다만 QCM은 센서 칩 위에서 일어나는 질량 변화를 ng 단위까지 감지하기 때문에 정량적인 면에서는 실제 형광 강도와 차이를 보일 수 있다.

Table 1. Analysis of frequency changes and the corresponding mass changes in immobilized peptides by using QCM.(10)

	Target peptide			Control peptide		
	peptide	FITC	F/p**	peptide	FITC	F/p
$\Delta f$ (Hz)	11	9	0.82	11	1	0.09
$\Delta m$ (ng)	194.7	159.3		194.7	17.7	

\* 1 Hz = 17.7 ng/cm<sup>2</sup>/Hz, \*\* F/p = mass ratio of FITC/peptide

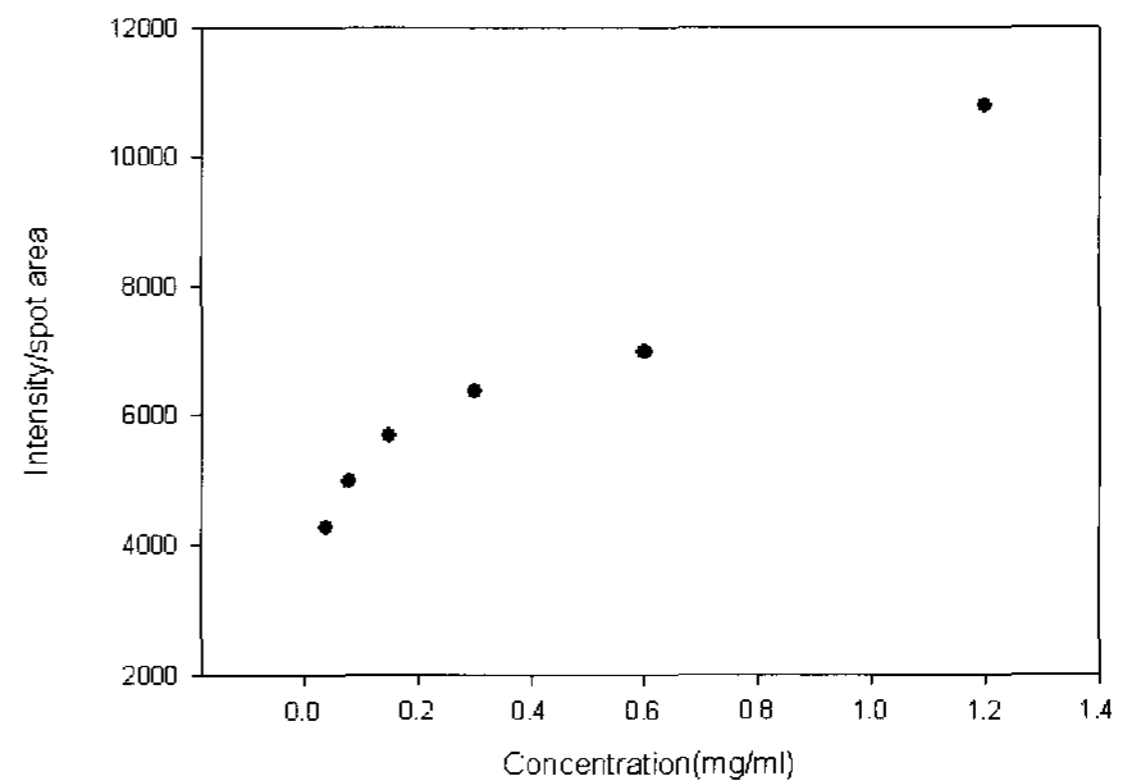


Figure 4. Effect of peptide concentration on fluorescence intensity.

펩타이드 고정화에 미치는 부피 및 농도의 영향

펩타이드의 고정화 및 형광신호 생성에 spot 부피와 시료 내 펩타이드 농도가 미치는 영향을 알아보기 위해 여러 농도 (1.2, 0.6, 0.3, 0.15, 0.08, 0.04 mg/ml)의 펩타이드

용액을 thiol로 표면개질된 유리 칩에 12시간 동안 고정화시킨 후 trypsin-FITC를 이용해 확인하였다. 그 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 먼저 같은 부피 (10  $\mu$ l)의 펩타이드 용액을 spotting한 경우, 1.2 mg/ml에서 단위면적 당 형광 intensity가 가장 높았고 농도가 낮아짐에 따라 형광 신호가 약해지는 것을 확인하였다. 이는 농도가 높을수록 단위 면적당 고정화된 peptide의 표면 밀도가 높아짐에 따라 더 많은 trypsin-FITC가 결합할 수 있기 때문이다.

부피의 영향을 알아보기 위해 1.2 mg/ml의 펩타이드 용액을 5, 10, 15, 20  $\mu$ l로 spotting하여 고정화시킨 후 trypsin-FITC를 이용해 확인한 결과를 Fig. 5에 나타냈다. 5  $\mu$ l에서 가장 강한 신호를 보였고, 부피가 커짐에 따라 형광 intensity는 낮아지는 현상을 보였다. 이는 아래의 식 (1)을 이용하여 설명할 수 있다(15).

$$\frac{d\theta}{dt} = \frac{4R_m k_{ass} D_o C_o}{\pi R_m^2 k_{ass} C_s + 4D_o R_m} \quad (1)$$

여기서  $\frac{d\theta}{dt}$ 는 점유율 (occupancy)을 말하는 것으로 특정 반경 ( $R_m$ ) 내에 있는 리간드 물질 (펩타이드)과 반응하는 물질 (trypsin-FITC)의 양을 말한다.  $k_{ass}$ 는 결합상수 (association constant),  $C_o$ 는 액체 시료 내 반응물 (analyte)의 농도,  $D_o$ 는 확산계수 (diffusion coefficient),  $C_s$ 는 spot내 리간드 물질의 표면 밀도를 말한다.

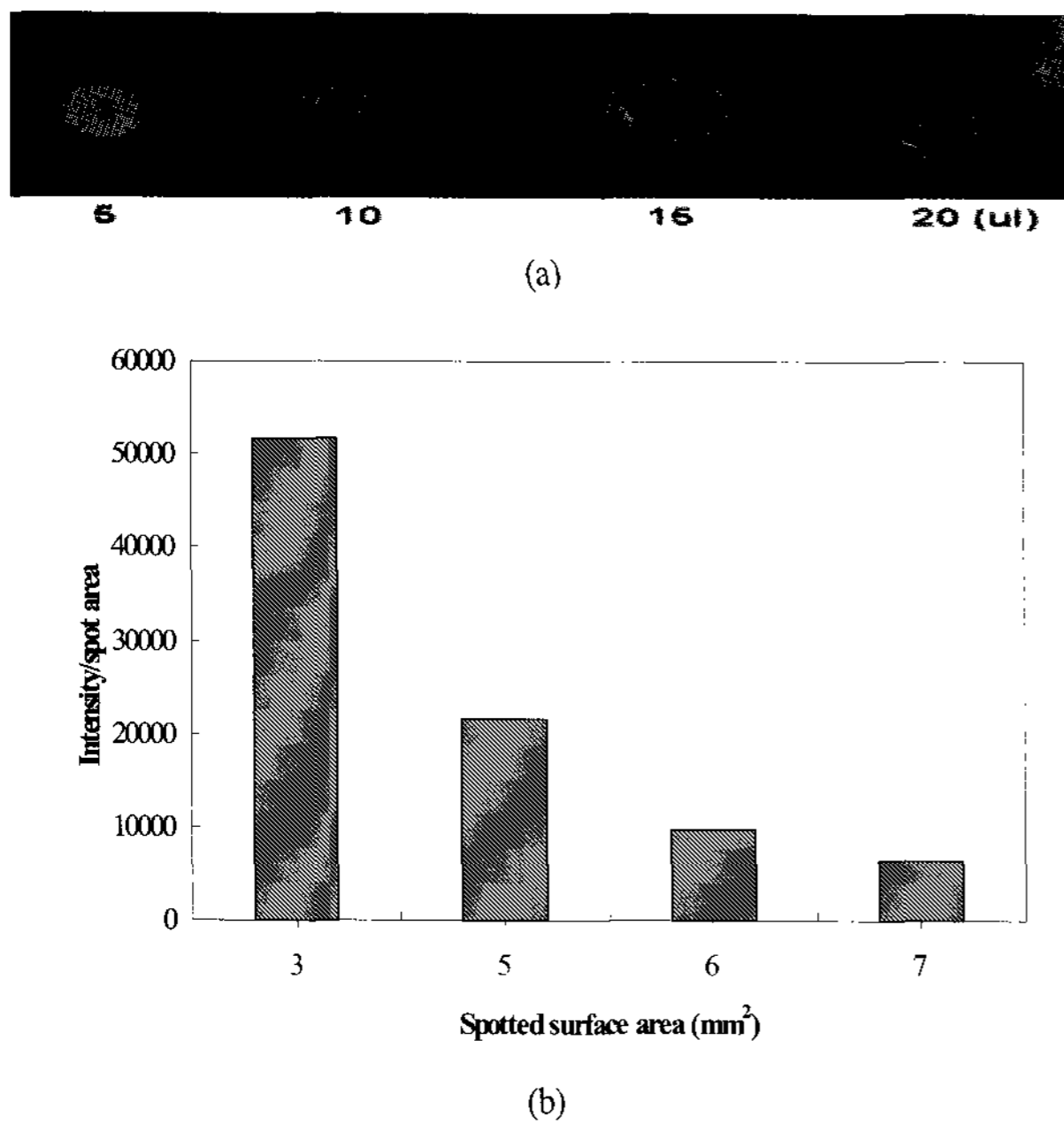


Figure 5. Effect of volume on fluorescence intensities ((a) fluorescence image, (b) fluorescence intensity profiles).

이 실험에서는 동일한 리간드와 동일한 반응물을 사용하였기 때문에  $k_{ass}$ 는 일정하며, 동일한 trypsin-FITC의 농도를 사용하였기 때문에  $C_o$ 와  $D_o$ 는 일정하다. 또한 일정 농도 (1.2 mg/ml)의 펩타이드를 사용하였기 때문에 spot 내 표면 밀도( $C_s$ )는 일정하다. 그러므로 trypsin-FITC가 펩타이드와 반응하는 점유율은  $R_m$ 에 반비례하게 된다. 결과적으로

로 부피가 작아질수록 즉 spot 반경이 작아질수록 더 높은 점유율을 나타내어 더 높은 형광 intensity를 검출할 수 있는 것이다. 이를 통해 마이크로어레이를 위한 펩타이드의 고정화를 위해서는 높은 농도와 낮은 부피의 spotting이 효율적임을 알 수 있었다.

### 요 약

본 실험에서는 마이크로어레이 형태로 펩타이드와의 공유결합에 의한 고정화를 시키기 위해 유리 칩의 표면을 아민기에서 thiol기로 개질하였다. 펩타이드의 lysine기와 thiol기와의 공유결합반응에는 12시간 정도의 반응시간이 필요하였고 실온보다는 35 $^{\circ}$ C가 유리함을 확인하였다. Trypsin-FITC와의 반응을 통해 trypsin 결합부위를 가진 target 펩타이드가 control 펩타이드보다 더 높은 형광 신호를 나타냄을 확인하였고, 이를 통해 target 펩타이드를 마이크로어레이 상에서 식별할 수 있었다. 이 trypsin-FITC와의 결합 친화도 차이를 별도의 QCM 실험을 통해서도 확인하였다. 또한 작은 부피의 spot과 높은 농도의 펩타이드 용액이 더욱 높은 표면형광신호를 생성함을 확인하였다. 본 실험을 통해 펩타이드 마이크로어레이 칩 개발을 위한 기초 조건을 확립하였다.

### 감 사

본 연구는 교육인적자원부, 산업자원부, 노동부의 출연금으로 수행한 최우수실험실지원사업의 연구비 지원으로 행하여졌으며, 이에 감사드립니다. 조형민 및 임창환은 2차 BK사업단인 "바이오나노융합기술산업화인력양성사업단"의 장학금 지원에도 감사드립니다.

### REFERENCES

- Sompuram, S. R., K. Vani, L. Wei, H. Ramanathan, S. Olken, and S. A. Bogen (2004), A water-stable protected isocyanate glass array substrate, *Anal. Biochem.* **326**, 55-68.
- Shim, H. Y., S. H. Lee, D. J. Ahn, K. D. Ahn, and J. M. Kim (2004), Micropatterning of diacetylenic liposomes on glass surfaces, *Mat. Sci. Eng. C* **24**, 157-161.
- Taylor, R. H., S. M. Fournier, B. L. Simons, H. Kaplan, and M. A. Hefford (2005), Covalent protein immobilization on glass surface: application to alkaline phosphatase, *J. Biotechnol.* **118**, 265-269.
- Olle, E. W., J. Messamore, M. P. Deogracias, S. D. Mcclintock, T. D. Anderson, and K. J. Johnson (2005), Comparison of antibody array substrates and the use of glycerol to normalize spot morphology, *Exp. Mol. Pathol.* **79**, 206-209.
- Deng, Y., X. Y. Zhu, T. Kienlen, and A. Guo (2006), Transport at the Air/Water interface is the reason for rings in protein microarrays, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2768-2769.
- Lee, S. J. and S. Y. Lee (2004), Microarrays at peptides elevated on the protein layer for efficient protein kinase assay, *Anal. Biochem.* **330**, 311-316.

7. Lee, C. S. and B. G. Kim (2002), Improvement of protein stability in protein microarray, *Biotechnol. Lett.* **24**, 839-844.
8. Sreekumar, A., M. K. Nyati, and S. Varambally (2001), Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation regulated proteins, *Cancer Res.* **61**, 7585-7593.
9. Cordek, J., X. Wang, and W. Tan (1999), Direct immobilization of glutamate dehydrogenase on optical fiber probes for ultrasensitive glutamate detection, *Anal. Chem.* **71**, 1529-1533.
10. Hook, F., M. Rodahl, P. Brzezinski, and B. Kasemo (1998), Energy dissipation kinetics for protein and antibody-antigen adsorption under shear oscillation on a quartz crystal microbalance, *Langmuir* **12**, 729-734.
11. Rodahl, M., F. Hook, and B. Kasemo (1996), QCM operation in liquids: An explanation of measured variations in frequency and Q factor with liquid conductivity, *Anal. Biochem.* **68**, 2219-2227.
12. Rodahl, M., F. Hook, A. Krozer, P. Brzezinski, and B. Kasemo (1995), Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q factor measurements in gaseous and liquid environments, *Rev. Sci. Instrum.* **66**, 3924-3930.
13. Barber, T. A., G. M. Harber, S. Park, M. Gilbert, and Healy K. E. (2005), Ligand density characterization of peptide modified biomaterial, *Biomaterials* **26**, 6897-6905.
14. Laurell, T., V. G. Marko (2002), Miniaturisation is mandatory unravelling the human proteome, *Proteomics* **2**, 345-351.
15. Morozov, V. N. (2005), Principles and limitations, In *Protein microarrays*, M. Schena, Eds., p. 73, Jones and Bartlett publishers, Massachusetts, USA.