



단백질 칩 기판의 표면 스크래칭 효과

현준원*, 황정일

단국대학교 자연과학부 응용물리학과

Effects of Scratching on the Surface of Protein Chip Plates

June Won Hyun*, Jeong Il Hwang

Applied Physics, College of Natural Science, Dankook University, Seoul 140-714, Korea

(Received March 9 2007 ; accepted April 26 2007)

Abstract

NiCl_2 and poly-L-lysine coated protein chip plates have been fabricated using a spin coating system. Water has been used as solvent and scratching effects on glass slides and ITO have been investigated. We also observed the surface properties of NiCl_2 and poly-L-lysine coated slides by using PSA(Particle size analyzer) and AFM(Atomic force microscope). The AFM results imply that the surface patterns created in the spin coating system determine the protein adsorption. Adsorption of histidine-tagged KRS proteins immobilized on glass slides and ITO was analyzed using a BAS image system. The results suggest that the scratching effect was increased ability of protein adsorption.

Keywords : NiCl_2 and poly-L-lysine, Protein chip plate, Spin coating, Scratching effect, Protein adsorption

1. 서 론

생명체 내에서 발생하는 모든 활동을 근본적으로 지배하고 있는 것은 DNA(Deoxyribonucleic acid) 정보이지만 질병의 근원은 단백질과 미세한 분자 수준에서 발현된다. 그동안 DNA 칩은 유전정보의 대량 확보, 질병 진단 및 신약 개발 등에 있어서 독보적인 위치를 차지하였으나, 단백질-단백질간의 상호작용 정보를 제대로 공급하지 못할 뿐더러 단백질 칩에 비해 효율성과 경제성에 있어서도 취약점을 가지고 있다. 단백질은 유전자 발현을 통해 한 유전자로부터 많은 단백질을 생산할 수 있기 때문에 매우 다양한 종류를 보유한다. 그러나 단백질은 전이 후 변형(post-translational modification) 특성이나 대량 생산의 어려움 등으로 신약 개발, 질병 및 환경오염원 진단 등의 분야에서 그 활용가치를 확장하지 못하고 있는 실정이다¹⁻³⁾. 단백질 칩을 제조하기 위해서는 활성화된 단백질을 유지하면서 기판

에 수백~수천 개의 단백질을 균일하게 고정화시키는 작업이 필요한데, 이때 연결자(crosslinker)를 사용해서 기판 상의 작용기와 단백질 간의 특이적 결합으로 고정화를 꾀하게 된다^{4,5)}. 기판에 단백질을 균일하게 부착시키기 위하여 본 연구에서는 작용기로 NiCl_2 와 poly-L-lysine을 사용하였으며, 작용기의 농도, 코팅조건 및 건조 조건에 따라 단백질의 균일한 부착 정도가 결정되어진다^{6,7)}. 일반적으로 바이오 칩 플레이트로는 유리 기판이 많이 사용되나, 본 연구에서는 센서(sensor)의 기능을 겸비할 수 있는 ITO(Indium tin oxide)와 유리 기판을 선택하였다. 바이오센서는 DNA나 단백질과 같은 생체 관련물질을 기판 표면에 고정화하여 분석하고자 하는 시료를 생체촉매에 흡착하여 복합체를 형성한 다음 일어나는 상호화학, 전기적 반응 등을 검출기에 의해 정량할 수 있도록 만들어진 장치이다.

따라서 ITO를 바이오센서로 응용하고자 하는 목적은 현재 바이오칩 플레이트로 광범위하게 사용하고 있는 유리 기판으로 제작할 수 있는 장점을 갖고 있을 뿐만 아니라 전기전도도, 광투과성 및

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

화학적 안정성이 우수하기 때문이다. 현재까지 단백질 부착 특성을 향상시키기 위한 방법으로 첫째, 디핑(dipping) 시간을 증가시키는 방법이 제시되었으나 기판 표면의 균일화 특성이 떨어짐으로써 단백질 부착능력을 감소시켰고, 둘째, 다층 코팅화 공정은 건조 시 표면의 일그러짐 현상으로 부착 특성을 향상시키지 못하였으며, 셋째 용매의 변화 등의 방법이 시도되었다. ITO나 유리 기판의 표면은 몹시 매끄러운 특성 때문에 원하는 물질을 코팅하여 막 특성을 향상시키기가 어렵다. 따라서 기판 표면에 스크래칭을 넣으로써 작용기의 활성화를 증가시켜 단백질 부착 능력을 향상시키는 결과를 가져올 수 있었다. 다이아몬드 서스펜션 용액(diamond suspension)과 샌드 페이퍼(sand paper)를 사용하여 각각의 기판 표면에 스크래칭(scratching)을 넣으로써 스�핀 코팅(spin coating) 후 작용기의 표면코팅 상태와 이로 인한 단백질의 부착 능력 정도를 관찰하였다. 본 연구는 기판의 스크래칭 효과를 이용하여 단백질 칩 플레이트 제조를 시도한 첫 보고라는 면에서 중요한 의미를 지닌다고 할 수 있겠다.

2. 실험방법

2.1 NiCl₂와 Poly-L-lysine이 코팅된 기판의 제조

NiCl₂(ALDRICH, 0343MA 98%)와 poly-L-lysine(SIGMA, P 8920)을 유리기판과 ITO 위에 스�핀 코팅하기 위해 전자저울을 이용하여 작용기와 증류수를 무게비(1:3)로 제조하였다.

기판 표면에 스크래칭을 내기 위해 초음파기 내에서 기판을 다이아몬드 서스펜션액에 넣고 5분 동안 진동시켰으며, 또한 샌드페이퍼를 사용하여 한 쪽 방향으로 스크래칭을 행하였다.

제조된 시료를 각각의 기판에 코팅하기 전에 기판 위의 표면 불순물 제거를 위해 증류수를 사용하여 15분 동안 초음파세척 후 오븐에서 건조시켰다. 이렇게 세척된 유리 기판과 ITO를 스�핀코터(spin coater) 위에 장착한 후, NiCl₂나 poly-L-lysine을 그 위에 도포하고 2000 rpm의 코팅속도에서 스�핀코팅시켰다. 제조된 플레이트는 기판 표면의 안정화를 위해 hot plate에서 5분 동안 건조시켰다. 제조된 NiCl₂와 poly-L-lysine 막의 표면 특성을 관찰하기 위해 PSA와 AFM 분석을 수행하였다.

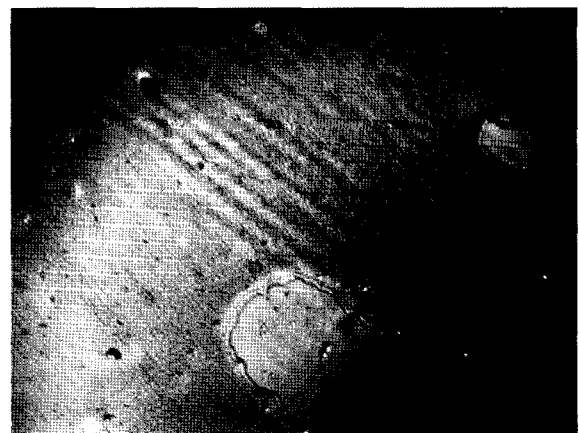
2.2 NiCl₂와 Poly-L-lysine 기판 위의 단백질 부착

NiCl₂의 경우와 다르게 poly-L-lysine의 경우에는 단백질 부착 특성 실험은 단백질을 기판에 보다 용이하게 결합시키기 위해 단백질 부착 전에 EDC

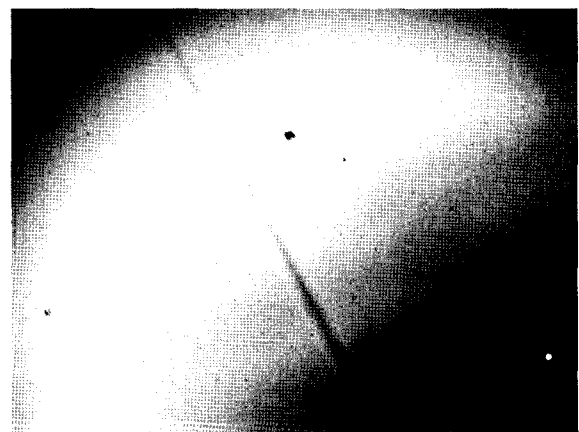
(1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodi-imide hydrochloride) 처리를 하였다. 본 연구에서 사용된 KRS 단백질은 Escherichia BL 21 대장균 내에서 크로마토그래피(chromatography) 분석법에 의해 정제되었다⁸⁾. NiCl₂나 poly-L-lysine이 코팅된 기판 위에 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated 단백질과 혹은 FITC-conjugated 되어 있으면서 동시에 histidine-tagged된 붙어 있는 단백질을 10 µg/ml 농도로 한 시간 동안 실온에서 반응시켰다. 단백질은 다시 증류수로 세 번 세척하여 건조한 후 형광 image analyzer로 분석하였다. 기판에 고정화한 단백질은 BAS(Bio-imaging analyzer system, Fuji Photo Film Co)에서 490 nm의 excitation 파장과 emission 파장 670 nm의 emission 파장에서 고정하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

오래 전부터 물질의 원활한 박막 제조를 위해 기판 표면에 스크래칭을 내는 방법이 사용되어져 왔



(a)



(b)

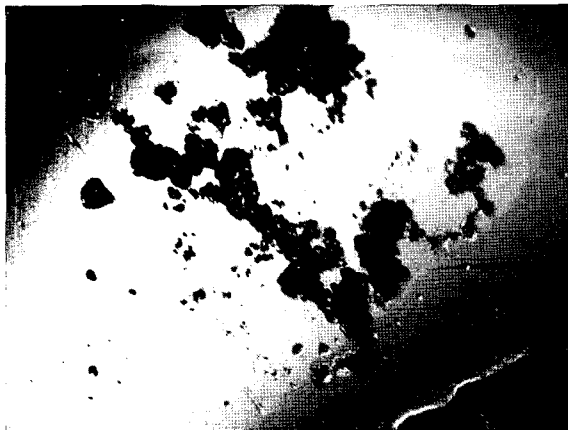
Fig. 1. Particle size analysis for the glass slides coated with (a) NiCl₂, (b) poly-L-lysine before scratching.

다. 기판 표면에 원하는 물질을 코팅하기 위해 스크래칭을냄으로써 스크래칭 방향을 따라 물질의 nucleation이나 막 두께의 증가를 가져올 수 있다. 우선 제조된 기판막의 표면 특성과 단백질 부착 특성을 조사하기 위한 측정들을 수행하였다. 그림 1은 스크래칭을 실시하지 않은 유리 기판의 NiCl_2 와 poly-L-lysine의 코팅 상태를 Particle size analyzer로 관찰한 결과이다. 유리 기판으로 단백질 기능 영역이 직접 부착되면 그 기능이 대부분 사라지게 되므로 단백질과 유리 기판 사이에 NiCl_2 와 poly-L-lysine 등과 같은 작용기를 코팅시켜 기판에 원하는 단백질을 잘 결합시켜야 한다. NiCl_2 가 코팅된 유리 기판의 경우 NiCl_2 의 친수성(親水性) 특성 때문에 기판 표면의 코팅 균일성이 poly-L-lysine이 코팅된 기판보다 다소 떨어지는 경향이 있으나 NiCl_2 가 코팅된 기판은 poly-L-lysine가 코팅된 기판에 비해 월등한 단백질 부착 특성을 보여준다.

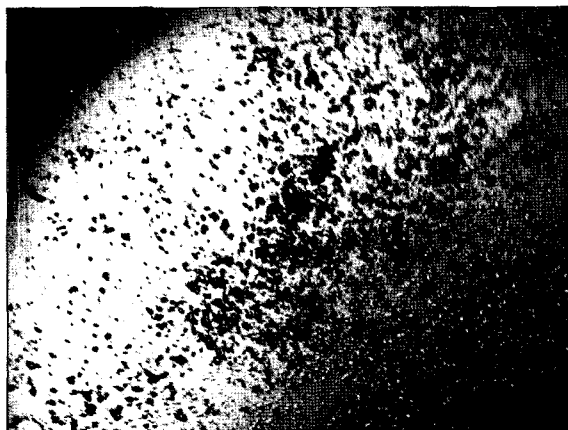
그림 2는 다이아몬드 서스펜션액으로 스크래칭한 유리 기판의 NiCl_2 와 poly-L-lysine의 코팅 상태를

보여준다. 다이아몬드 서스펜션액으로 스크래칭된 기판의 표면은 샌드페이퍼 스크래칭과는 다르게 랜덤(random)한 형태의 스크래칭 자국을 관찰할 수 있다. 본 실험에서 관찰한 바와 같이 스크래칭 효과는 단백질 부착 특성을 증가시키는데, 이는 스크래칭 부위에 니켈 이온의 양이 증가함으로써 단백질 부착 능력을 증가시키는 원인이 된다. 이러한 결과는 NiCl_2 분자 당 단백질 부착 활성 부위가 한 개씩 있는데 스크래칭 효과로 인해 활성 부위 개수가 증가했기 때문인 것으로 보여진다. 그림 3은 샌드페이퍼로 스크래칭한 ITO 기판의 NiCl_2 와 poly-L-lysine의 코팅 상태를 나타낸다. 다이아몬드 서스펜션액으로 스크래칭한 기판과는 다르게 일정한 방향으로 스크래칭된 자국을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 기판 표면의 균일성을 증가시켰다.

유리 기판과 더불어 ITO 기판은 전기전도도와 광투과성이 매우 우수한 재료로, 뚜렷한 단백질 부착 특성을 보여주며, 화학적 안정성이 우수하기 때문에 바이오센서로서의 광범위한 가능성을 내포한다.

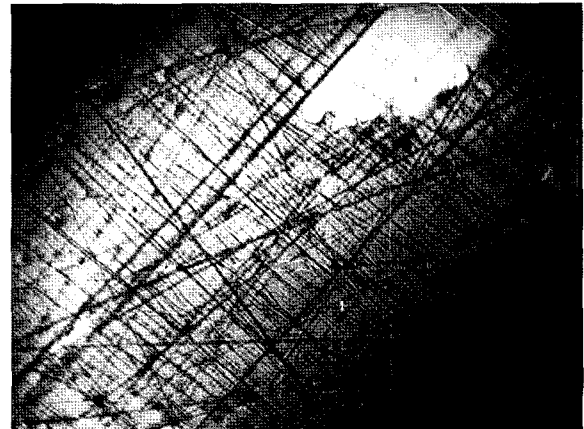


(a)

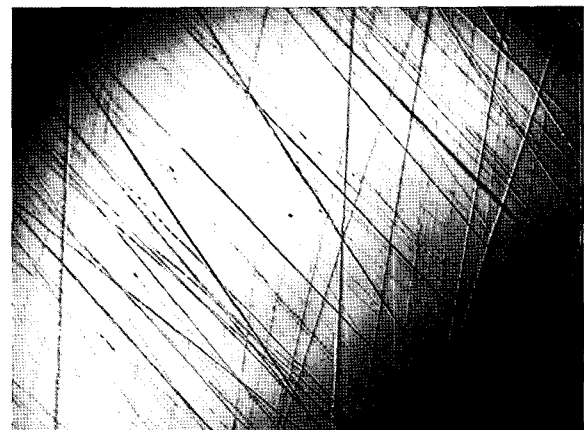


(b)

Fig. 2. Particle size analysis for the glass slides coated with (a) NiCl_2 , (b) poly-L-lysine after diamond suspension scratching.



(a)



(b)

Fig. 3. Particle size analysis for the ITO slides coated with (a) NiCl_2 , (b) poly-L-lysine after sand paper scratching.

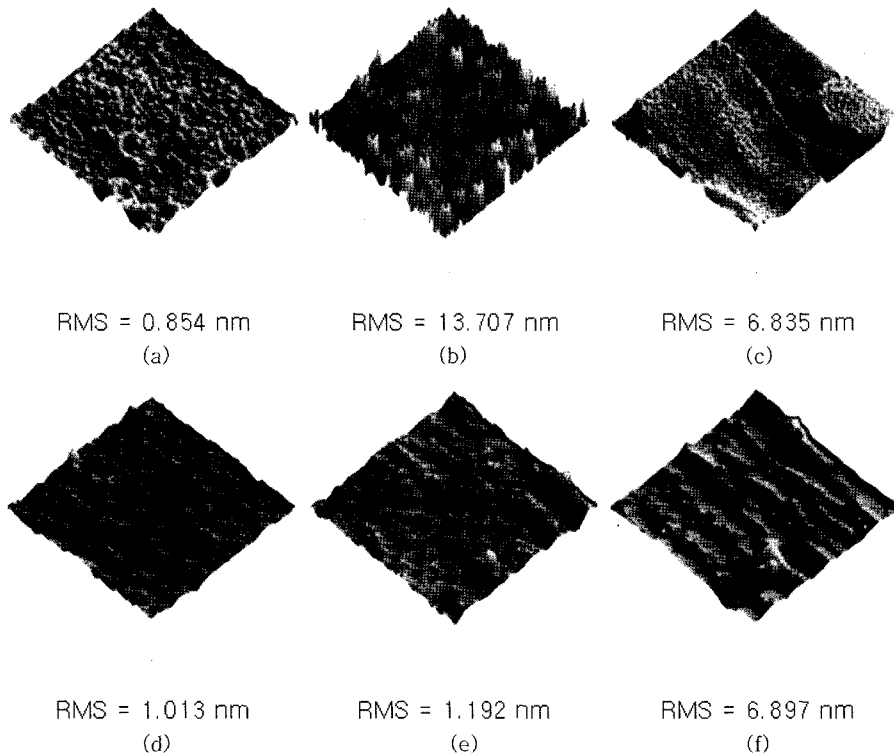


Fig. 4. AFM micrograph for the glass slides (a) before scratching, (b) after diamond suspension scratching, (c) after sand paper scratching and ITO slides (d) before scratching, (e) after diamond suspension scratching, (f) after sand paper scratching coated with $NiCl_2$.

그림 4(a)와 (d)는 스크래칭을 실행하지 않은 유리 기판과 ITO 기판에, (b)와 (e)는 다이아몬드 서스펜션액으로 스크래칭한 유리기판과 ITO 기판에, (c)와 (f)는 샌드페이퍼로 스크래칭한 유리기판과 ITO 기판에 $NiCl_2$ 가 코팅된 표면 형상에 대한 AFM 영상과 스크래칭에 따른 RMS 표면거칠기 값의 증가를 보여준다. 다이아몬드 서스펜션액으로 스크래칭한 기판의 경우 표면거칠기가 크게 증가하는 경향을 나타내었으며, 샌드페이퍼로 스크래칭한 기판에서도 표면거칠기가 스크래칭 방향을 따라 증가하는

모습을 관찰할 수 있다. 그림 5와 그림 6은 다이아몬드 서스펜션액과 샌드 페이퍼로 스크래칭 전후의 $NiCl_2$ 와 poly-L-lysine이 코팅된 유리 기판과 ITO 기판 상에 부착된 KRS 단백질 영상을 보여준다. 이와 같이 스크래칭에 따른 표면거칠기의 증가는 그림 5와 그림 6에서 보는 바와 같이 단백질 부착 능력을 크게 향상시키게 되는데, 이는 유리 기판이나 ITO 기판의 스크래칭된 부위를 따라 $NiCl_2$ 와 poly-L-lysine이 기판에 강하게 결합됨으로써 단백질 부착 효율을 증가시키기 때문인 것으로 보여진다.

이전의 보고에 따르면 스펀코팅 방법으로 제조된

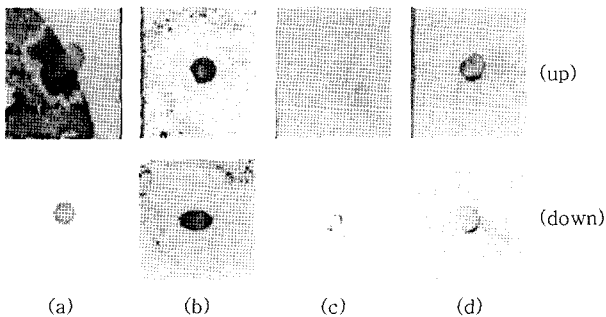


Fig. 5. The His-tagged KRS protein was specially adsorbed to the $NiCl_2$ (a)(b) and poly-L-lysine (c)(d) coated glass slides (up) and ITO slides (down). (a) no scratching, (b) after diamond suspension scratching, (c) no scratching, (d) after diamond suspension scratching.

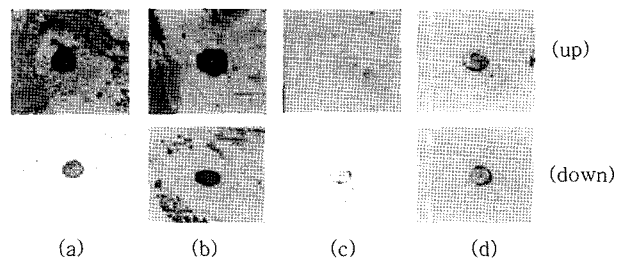


Fig. 6. The FITC-labeled protein was predominantly adsorbed to the $NiCl_2$ (a)(b) and poly-L-lysine (c)(d) coated glass slides (up) and ITO slides (down). (a) no scratching, (b) after sand paper scratching, (c) no scratching, (d) after sand paper scratching.

NiCl₂와 poly-L-lysine 기판은 뚜렷한 단백질 부착 능력을 보여준다^{6,7}). 그림 5와 그림 6에서 보는 바와 같이 다이아몬드 서스펜션액과 샌드 페이퍼로 스크래칭한 기판은 스크래칭을 하지 않은 기판에 비해 단백질 부착 능력이 향상되었다. 이와 같은 기판의 스크래칭 효과는 기판의 단위면적 당 NiCl₂와 poly-L-lysine의 밀도를 증가시킴으로써 이들의 단백질 부착 활성 부위를 늘려 많은 양의 단백질을 효과적으로 결합시키는 것으로 보여진다.

4. 결 론

본 연구에서는 PSA 분석과 AFM 분석을 통해 유리 기판과 ITO 기판의 스크래칭 표면 효과를 고찰하였으며, BAS 분석에 의해 스크래칭에 의한 단백질 부착 특성을 조사하였다. 이를 위해 유리 기판과 ITO 기판에 스크래칭을 낸 후 스펀코팅 방법으로 NiCl₂와 poly-L-lysine을 코팅하여 표면 형상 분석과 단백질 부착 테스트를 통해 다음과 같은 결론을 얻었다. 스크래칭을 실행하기 전과 스크래칭을 한 기판의 특성을 비교 고찰한 결과, 스크래칭을 실시한 기판의 단백질 부착 특성이 크게 증가한 것으로 나타났다. 이는 NiCl₂와 poly-L-lysine이 기판의 스크래칭된 방향을 따라 강하게 결합되어 단백질 부착 활성 부위가 증가하면서 단백질 부착 효율을 증가시켰기 때문인 것으로 보여진다. 반면에 스크래칭을 실행하지 않은 기판에 코팅된 NiCl₂와 poly-L-lysine은 기판과 견고하게 결합하지 못함으로써 기판에 빈 공간을 만들게 된다. 이 같은 사실은 단백질을 부착시킨 후 워싱(washing) 작업 시 NiCl₂와 poly-L-lysine이 쉽게 떨어짐으로써 단백질 부착

효율을 감소시키는 원인이 된다. 특히 본 연구에서 사용된 ITO 기판의 경우 유리 기판에 버금가는 단백질 부착 특성을 보여줌으로써 단백질의 검색이나 분석시스템 개발을 위한 바이오센서로의 무한한 응용가능성을 내포하고 있다.

후 기

이 연구는 2006학년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 연구되었음.

참고문헌

1. G. MacBeath, S. L. Schreiber, Printing Proteins as Microarrays for High-throughput Function Determination. *Science*, 289 (2000) 1760.
2. P. Arenkov, A. Gemmell, S. Voloshchuk, V. Chupeeva, A. Mirzabekov, *Anal. Biochem.*, 278 (2000) 123.
3. S. Ramaswamy, T. R. Golib, *J. Clin. Oncol.*, 20 (2002) 1932.
4. R. Bashir, R. Gomez, A. Sarikaya, M. R. Ladisch, J. Sturgis, J. P. Robinson, Adsorption of Avidin on Microfabricated Surface for Protein Biochip Applications, *Biotechnol. Bioengin.* 73 (2001) 324.
5. D. V. Nicolau, H. Taguchi, H. Taniguchi, S. Yoshikawa, *Langmuir* 14 (1998) 1927.
6. J. W. Hyun, S. Y. Kim, S. Lee, H. Park, J. Pyee, S. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 24 (2003) 412.
7. J. W. Hyun, S. Y. Kim, S. Lee, H. Park, J. Pyee, S. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23 (2002) 1725.
8. S. G. Park, K. H. Jung, J. S. Lee, Y. J. Jo, H. Motegi, S. Kim, K. Shiba, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 16673.