

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. <i>C12N 11/02</i> (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년05월16일 10-0580642 2006년05월09일	
(21) 출원번호 (22) 출원일자	10-2004-0001963 2004년01월12일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	10-2005-0073856 2005년07월18일

(73) 특허권자
삼성전자주식회사
경기도 수원시 영통구 매탄동 416

(72) 발명자
황규연
인천광역시 부평구 부평4동 12-13118/6

(74) 대리인
리엔목특허법인
이해영

심사관 : 장제환

(54) 표면에 활성화된 카르복실기를 갖는 기판을 이용하여 생물분자를 고체 기판상에 고밀도로 고정화하는 방법 및 그에 의하여 제조되는 마이크로어레이

요약

본 발명은 고체 지지체를 실란 무수물로 코팅하여 고체 지지체 표면에 무수물 관능기를 도입하는 단계; 상기 무수물 관능기를 가수분해시켜, 카르복실기로 전환하는 단계; 상기 카르복실기를 카르보디이미드 및 숙신이미드와 반응시켜, 상기 카르복실기를 활성화하는 단계; 및 상기 카르복실기로 활성화된 고체 지지체와 생물분자를 접촉시켜 생물분자를 고체 지지체 상에 부착시키는 단계를 포함하는, 생물분자를 고체 지지체 상에 부착시키는 방법을 제공한다.

대표도

도 4

색인어

카르복실기, 실란, 아미노실란, 무수물

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 표면에 활성화된 카르복실기를 갖는 마이크로어레이용 기판의 제조방법의 일 예를 나타내는 도면이다.

도 2는 본 발명에 따른 표면에 활성화된 카르복실기를 갖는 마이크로어레이용 기판의 제조방법의 일 예를 나타내는 반응식이다.

도 3a와 3b는 본 발명의 방법의 구체예에 따라 제작된 기판에 핵산 프로브를 고정화하고, 표적 핵산과 혼성화 한 다음, 형광으로 검출한 결과를 나타내는 도면이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 생물분자를 마이크로어레이용 기판에 부착하는 방법 및 그에 의하여 제조되는 생물분자 마이크로어레이에 관한 것이다.

마이크로어레이는 특정 분자가 기판 상에 일정한 영역에 고밀도로 고정화되어 있는 것을 말한다. 이러한 마이크로어레이에는 예를 들면, 폴리뉴클레오티드 또는 단백질 마이크로어레이가 포함된다. 이러한 마이크로어레이에는 당업계에 잘 알려져 있다. 마이크로어레이에 관하여는 예를 들면, 미국특허 제5,445,934호 및 제5,744,305호에 개시되어 있다. 또한, 상기 마이크로어레이의 제조방법에는 일반적으로 포토리소그래피를 이용하는 방법이 알려져 있다. 포토리소그래피를 이용하는 경우, 제거가능한 기로 보호된 단량체가 도포된 기판 표면 상의 일정한 영역을 에너지 원에 노출시켜 보호기를 제거하고, 제거가능한 기로 보호된 단량체를 커플링시키는 단계를 반복함으로써, 폴리뉴클레오티드의 어레이를 제조할 수 있다. 또 다른 방법으로는, 이미 합성된 폴리뉴클레오티드를 일정한 위치에 고정화시키는 방법에 의하여 고정화될 수 있다. 이미 합성된 폴리뉴클레오티드를 일정한 위치에 고정화시키는 방법에는 예를 들면, 스팽팅법, 잉크젯 프린터와 같은 압전 인쇄 방식(piezoelectric printing), 및 마이크로 피랫팅법 등이 이용될 수 있다. 일반적으로 이미 합성된 생물분자를 기판 상에 고정화하는 방식이 생물분자를 자유로이 배열할 수 있다는 장점이 있기 때문에 널리 사용되고 있다.

유리나 플라스틱과 같은 기판 자체의 표면에 생물분자를 고정화하는 것은 일반적으로 어렵기 때문에, 종래 이미 합성된 생물분자를 고체 기판 상에 고정화하기 위하여 기판 표면은 특정한 관능기를 갖도록 처리되었다. 이러한 관능기의 예에는, 예를 들면, 아미노기, 알데히드기, 에폭사이드기, 및 에스테르기가 포함된다.

고체 기판을 관능기로 코팅하고, 여기에 활성화된 생물분자를 고정화하는 방법은 종래 알려져 있다. 예를 들면, 미국특허 제5,350,800호에는 헤파린 또는 라미닌과 같은 카르복실기를 함유하고 있는 단백질의 카르복실기를 카르보디이미드로 활성화시키고, 이를 아미노기로 코팅된 고체 기판과 반응시켜 고정화하는 방식이 개시되어 있다. 또한, 미국특허 제5,760,130호에는 아미노기로 코팅된 유리 기판에 포스포이미졸라이드(phosphorimidazolide)에 의하여 활성화된 폴리뉴클레오티드를 기판에 고정화하는 방법이 개시되어 있다. 그러나, 이들 방법은 모두 아미노기로 코팅된 기판을 사용하고 있기 때문에, 생물분자를 활성화하여야 한다는 단점이 있다.

또한, 미국특허 제5,656,462호에는 이미 카르복실기를 가지고 있는 플라스틱 플레이트를 이용하여 폴리뉴클레오티드를 고정화하는 방법이 개시되어 있다. 예를 들면, 카르복실기와 아미노기를 동시에 갖고 있는 "Sumilon" MS-3796F 및 MS-3696F (Sumitomo Bakeliet 사)가 이용될 수 있음이 개시되어 있다. 그러나, 상기 방법은 이미 카르복실기를 가지고 있는 플라스틱 플레이트를 사용하고, 그렇기 때문에, 카르복실기의 밀도가 적정하지 않거나 높지 않다는 문제점이 있다. 또한, 상기 발명은 폴리뉴클레오티드가 고정화된 지지체를 이용하여 cDNA를 합성하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 마이크로어레이와 같이 표적 생물분자에 관한 분석을 위하여 형광 강도를 측정할 필요성이 높지 않다. 따라서, 고밀도의 카르복실기를 도입할 필요성에 대하여도 언급되어 있지 않다.

이에 본 발명자들은 마이크로어리에용 기판 상에 생물분자를 고밀도로 고정화하여 표적 생물분자에 대한 분석 결과로 얻어지는 형광 신호의 강도를 높이고자, 집중적으로 연구하던 중 카르복실 무수물을 이용함으로써 기판 상에 고밀도로 생물분자를 고정화할 수 있다는 것을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 활성화된 카르복실기를 갖는 기판을 이용하여 생물분자를 기판 상에 고밀도로 고정화하는 방법을 제공한다.

본 발명의 목적은 또한, 활성화된 카르복실기를 갖는 기판을 이용하여 생물분자를 기판 상에 고밀도로 고정화하는 방법에 의하여 제조되는 마이크로어레이를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 고체 지지체를 실란 무수물로 코팅하여 고체 지지체 표면에 무수물 관능기를 도입하는 단계;

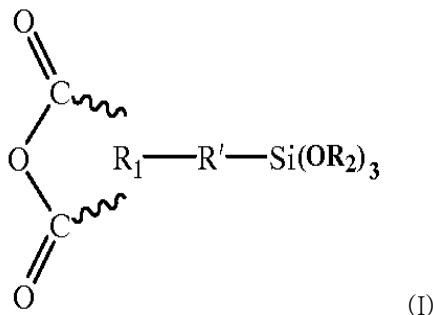
상기 무수물 관능기를 가수분해시켜, 카르복실기로 전환하는 단계;

상기 카르복실기를 카르보디이미드 및 숙신이미드와 반응시켜, 상기 카르복실기를 활성화하는 단계; 및

상기 카르복실기로 활성화된 고체 지지체와 생물분자를 접촉시켜 생물분자를 고체 지지체 상에 부착시키는 단계를 포함하는, 생물분자를 고체 지지체 상에 부착시키는 방법을 제공한다.

본 발명의 방법에 있어서, 상기 고체 지지체는 특별히 제한되는 것은 아니며, 투명 또는 불명한 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 고체 지지체는 환경적으로 안정하거나 내화학성을 지닌 물질이다. 바람직한 고체 지지체의 예에는 유리, 실리콘 웨이퍼, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리카르보네이트, 폴리에스테르, 폴리아크릴레이트 및 폴리우레탄이 포함된다.

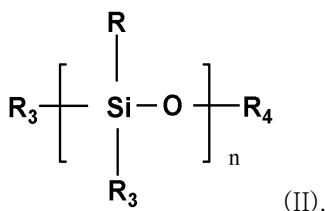
본 발명의 방법에 있어서, 상기 실란 무수물은 바람직하게는, 하기 식 I의 구조식을 갖고,



식 중 R_1 은 알킬렌, 아릴렌 또는 알킬아릴렌기, 바람직하게는 R_1 은 $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ 의 직쇄 또는 분지된 알킬렌기이고, 더욱 바람직하게는, R_1 은 메틸, 에틸, 프로필 또는 부틸기이고, R' 는 각각 $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ 의 치환 또는 비치환된 알킬렌기, 아릴렌기, 아릴렌 알킬기 또는 알킬렌아릴렌기이고, R_2 는 $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ 의 알킬기, 아릴기, 아릴렌알킬기, 알킬렌아릴기 또는 수소이고, 각각의 R_2 는 동일하거나 다를 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 실란 무수물은 3-(트리에톡시실릴)프로필숙시닉 무수물이며, 이는 예를 들면, Gelest, Inc.으로부터 상업적으로 구입가능하다.

본 발명의 방법에 있어서, 실란 무수물을 0.01 중량 % 내지 90 중량 %로 포함하는 용액으로 코팅될 수 있다.

더욱이, 본 발명의 방법에 있어서, 고체 지지체 표면을 실란 무수물로 코팅하는 단계는 하기 식 II 또는 식 III으로 표시되는 실란 화합물을 더 포함하는 실란 무수물 용액으로 코팅될 수 있다.



식 중, R_3 은 C_1-C_{20} 의 알콕시기, 히드록시기 또는 할로겐이고, R_4 는 C_1-C_{20} 의 칙쇄 또는 분지쇄 알킬기, 아릴기, 아릴렌알킬기 또는 CF_3 를 포함한 불소화된 탄화수소 화합물 관능기이고, n 은 1-15의 정수이고,

$Si(OR_5)_4$ (III),

식 중, R_5 는 C_1 내지 C_{20} 의 칙쇄 또는 분지쇄 알킬기, 아릴기, 아릴렌알킬기 또는 수소인 것이다. 상기 식 II 또는 식 III의 화합물은 각각 실란 무수물 100 중량부에 대하여 0 내지 0.01 중량부로 포함되는 것일 수 있다.

코팅에 사용되는 용액은 적당한 용매에 화학식 I의 화합물을 희석하거나, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물 중 어느 하나와 혼합하여 준비된다. 실란 무수물 I과 화학식 II 또는 III의 중량비는 0.01 : 99.99 내지 100:0이 바람직하며, 합성된 실란 올리고머의 총 조성은 중량비로 0.01 내지 90 %가 될 수 있다. 사용될 수 있는 용매에는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올과 같은 알콜 용매 또는 메틸에틸케톤, 디메틸포름아미드, 메틸피롤리돈(N-메틸피롤리돈) 또는 이들의 혼합물이 포함된다.

본 발명의 방법에 있어서, 상기 실란 무수물의 코팅은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들면, 딥 코팅법 (자기조립단분자 코팅법), 스판법, 스프레이법, 및 화학기상 증착법으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법에 의하여 수행되는 것일 수 있다. 딥 코팅법은 1분 이상의 시간이면 가능하고, 스판 코팅 법은 300 rpm 내지 2,500 rpm 범위에서 가능하다. 이렇게 형성된 무수물 코팅층은 100 °C 내지 300 °C 정도의 온도에서 경화시켜 3차원 망상구조층을 형성하게 할 수 있다.

본 발명의 방법에 있어서, 상기 무수물의 가수분해는 20 °C ~ 100 °C의 수용액에서 수행되는 것일 수 있다. 이러한 가수분해는 상기 온도에서 산성 또는 중성의 물에서 1 분 이상 처리하고, 질소 분위기에서 전조시킴으로써 수행될 수 있다. 가수분해 결과, 하나의 무수물로부터 두 개의 카르복실기가 생성되기 때문에 고밀도의 카르복실기를 갖는 기판을 형성시킬 수 있다. 그에 따라서, 고밀도의 활성화된 카르복실기를 형성할 수 있고, 상기 활성화된 카르복실기에 생물분자를 고밀도로 부착할 수 있게 된다. 예를 들면, 종래의 널리 사용되고 있는, 표면에 아민기를 갖는 기판에 숙신산 무수물을 반응시키면, 하나의 카르복실기가 형성된다. 따라서, 본 발명의 방법에 의하면, 종래의 표면에 아민기를 갖는 기판을 이용하는 경우에 비하여, 두 배나 많은 카르복실기를 형성하기 때문에, 이러한 기판을 이용하여 제작된 마이크로어레이를 이용한 분석에서, 형광강도가 강하게 검출될 수 있다.

본 발명의 방법에 있어서, 상기 카르보디이미드는 하기 식 IV로 표시되고,

$R_6N=C=NR_7$ (IV),

식 중, R_6 은 알킬 또는 시클로알킬이고, R_7 는 알킬아민 또는 시클로알킬아민 기인 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 카르보디이미드는 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필) 카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 또는 N,N'-디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC)인 것이다. 또한, 본 발명의 방법에 있어서, 상기 숙신이미드는 바람직하게는, N-히드록시숙신이미드 또는 N-히드록시술포숙신이미드인 것이다. 본 발명의 방법에 있어서, 상기 카르보디이미드 또는 숙신이미드는 적당한 용매 중에서 바람직하게는, 20 mM ~ 200 mM의 농도에서 반응되는 것일 수 있다. 반응 시간은 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 30 분 이상이다. 카르보디이미드 또는 N-히드록시숙신이미드와 같은 화합물은 Aldrich Chemical Co., Inc. 와 같은 회사로부터 상업적으로 구입가능하다.

카르복실기를 카르보디이미드 및 숙신이미드와 반응시키는 것은 다음과 같은 기작에 의하여 일어나는 것으로 추정되나, 특정한 기작에 한정되는 것은 아니다. 먼저, 카르보디이미드에 의하여 기판 표면의 카르복실기는 아민기와 반응할 수 있는 불안정한 중간체, 즉 O-아실이소우레아 (O-asylisourea) 에스테르 결합을 형성하고, N-히드록시숙신이미드(NHS) 또는 수용성인 N-히드록시술포숙신이미드에 의하여 보다 안정한 숙신이미딜 에스테르를 갖는, 활성화된 카르복실기를 갖는 기판으로 된다.

본 발명의 방법에 있어서, 고정화되는 생물분자는 활성화된 에스테르기에 결합할 수 있는 관능기를 갖는 것이면, 어느 것이나 포함된다. 예를 들면, 아민기를 갖는 생물분자가 포함된다. 바람직하게는, 상기 생물분자는 DNA, RNA, PNA, 또는 단백질이다.

본 발명에 따라 제작된 활성화된 카르복실기를 갖는 기판에 일차 아민기와 같은 반응성 관능기를 갖는 생물분자를 반응시키면, 활성화된 카르복실기의 에스테르 결합에 작용하여 아미드 결합을 형성하여 생물분자가 고정화된다. 이러한 고정화 방식은 혼성화 과정에서 일어날 수 있는 표적 물질과 기판과의 비특이적 결합을 상당히 줄일 수 있다는 장점이 있다.

도 1은 본 발명에 따른 표면에 활성화된 카르복실기를 갖는 마이크로어레이용 기판의 제조방법의 일 예를 나타내는 반응식이다. 먼저, 고체 지지체 상에 실란 무수물, 즉 3-(트리에톡시실릴)프로필숙시닉 무수물 (TSA)를 코팅하여, 3-(트리에톡시실릴)프로필숙시닉 무수물 (TSA)이 코팅된 기판을 제조한다 (a). 다음으로, 가수분해 반응을 수행하여, 카르복실기를 갖는 기판을 제조하고 (b), 이를 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필) 카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N,N'-디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC)와 같은 카르보디이미드 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS) 및 N-히드록시술포숙신이미드 (Sulfo-NHS)와 같은 숙신이미드 화합물의 존재하에서 반응시켜, 활성화된 카르복실기를 갖는 기판을 제조한다 (d).

본 발명은 또한, 상기한 고체 지지체 표면에 생물분자를 부착하는 방법에 따라 생물분자를 부착하여 제조되는 생물분자 마이크로어레이를 제공한다. 이러한 마이크로어레이는 통상적인 마이크로어레이와 같이, 생물분자가 고정화되어 있는 영역인 스팟 영역이 어레이 형태로 배열되어 있다.

생물분자를 기판 상에 고정화하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 접촉형 방식인 스팟팅(spotting), 잉크젯 프린터와 같은 압전 인쇄 방식(piezoelectric printing), 및 마이크로 피랫팅법 등이 이용될 수 있다.

본 발명은 또한, 고체 지지체를 아미노실란으로 코팅하여 고체 지지체 표면에 아미노 관능기를 도입하는 단계;

상기 아미노 관능기를 테트라카르복실 이무수물과 반응시켜, 무수물 관능기를 고체 지지체 표면에 도입하는 단계;

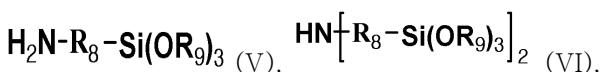
상기 무수물 관능기를 가수분해시켜, 카르복실기로 전환하는 단계;

상기 카르복실기를 카르보디이미드 및 숙신이미드와 반응시켜, 상기 카르복실기를 활성화하는 단계; 및

상기 카르복실기로 활성화된 고체 지지체와 생물분자를 접촉시켜 생물분자를 고체 지지체 상에 부착시키는 단계를 포함하는, 생물분자를 고체 지지체 상에 부착시키는 방법을 제공한다.

본 발명의 방법에 있어서, 고체 지지체 상에 아미노실란 화합물은 아미노실란 화합물을 1 중량 % 내지 90 중량 %로 포함하는 용액으로 코팅되는 것이 바람직하다.

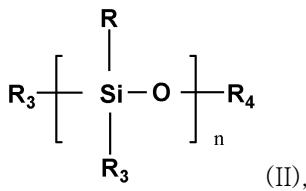
본 발명의 방법에 있어서, 상기 아미노실란 층은 하기 식 V 또는 VI로 표시되는 1차 또는 2차 아미노실란으로서,



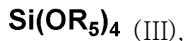
식 중, R₈은 알킬렌기, 아릴렌기, 아릴렌알킬렌기 또는 알킬렌아릴렌기, 에테르, 에스테르, 또는 이민을 함유한 기이고, R₉은 C₁~C₂₀의 알킬기, 아릴기, 아릴렌알킬기 또는 알킬렌아릴기 또는 수소이다. 바람직한 R₆ 또는 R₉은 알킬기이며, 더욱 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 또는 부틸기이다. 아미노실란 화합물의 예에는 3-아미노프로필트리메톡시실란, 3-아미노프로필트리에톡시실란, 2-아미노운데실트리메톡시실란, 아미노페닐트리메톡시실란, 비스(트리메톡시실릴프로필)아민, N-(2-아미노에틸아미노프로필)트리에톡시실란이 포함된다.

본 발명의 방법에 있어서, 고체 지지체 표면에 아미노실란을 코팅하는 단계는 화학식 V 또는 VI로 표시되는 1 이상의 화합물을 혼합하여 아미노 실란 화합물의 혼합물을 얻고, 여기에 물과 에탄올, 및 메탄올과 같은 알콜 용매를 첨가하여 용액을 제조하고, 이 용액을 교반하여 실란 화합물을 축합 반응시켜 용액 내에 존재하는 올리고머 수화물을 얻는 단계를 포함한다. 아미노 실란 화합물로 코팅된 기판은 200 °C 내지 300 °C 정도의 온도에서 소성 과정을 거쳐 3 차원 망상 구조 층을 형성하게 할 수 있다.

또한, 본 발명의 방법에 있어서, 고체 지지체 표면에 아미노실란을 코팅하는 단계는 하기 식 II 또는 식 III으로 표시되는 실란 화합물을 더 포함하는 아미노실란 용액으로 코팅이 가능하고,



식 중, R_3 은 C_1-C_{20} 의 알콕시기, 히드록시기 또는 할로겐이고, R_4 는 C_1-C_{20} 의 칙쇄 또는 분지쇄 알킬기, 아릴기, 아릴렌알킬기 또는 알킬렌아릴기, 또는 CF_3 를 포함한 불소화된 탄화수소 화합물 관능기이고, n 은 1-15의 정수이고,

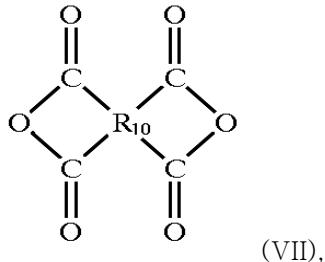


식 중, R_5 는 C_1 내지 C_{20} 의 칙쇄 또는 분지쇄 알킬기, 아릴기, 아릴렌알킬기 또는 알킬렌아릴기, 또는 수소인 것일 수 있다. 이러한 식 II 또는 III의 화합물은 아민 층의 소수성을 조절하기 위하여 소수성 실란 화합물이나 결착력 증대를 위해 실란 알콕사이드로만 구성된 실란 화합물을 혼합하여 사용할 수도 있다.

상기 식 II 또는 식 III의 화합물은 각각 실란 무수물 100 중량부에 대하여 0 내지 0.01 중량부로 포함되는 것이 바람직하다.

본 발명의 방법에 있어서, 상기 아미노실란을 코팅하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있는 코팅 기술을 이용할 수 있다. 예를 들면, 자기조립단분자코팅법, 스피ń법, 스프레이법, 및 화학기상 증착법으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법에 의하여 수행되는 것일 수 있다.

본 발명의 방법에 있어서, 상기 테트라카르복실 이무수물을 하기 식 VII으로 표시되고,



식 중, R_{10} 는 4가의 카르본시클로 방향족기 (carboncyclic aromatic group), 헤테로환기, 알리시클로기 또는 지방족기와 같은 4가 유기기인 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 상기 테트라카르복실 이무수물은 피로멜릭티(pyromellitic) 이무수물, 3,3',4,4'-비페닐테트라카르복실릭 이무수물, 2,2',3,3'-비페닐테트라카르복실릭 이무수물, 2,3,3',4'-비페닐테트라카르복실릭 이무수물, 1,2,4,5-벤젠텐테트라카르복실릭 이무수물, 3,3',4,4'-벤조페논테트라카르복실릭 이무수물, 2,2',3,3'-벤조페논테트라카르복실릭 이무수물, 2,3,3',4'-벤조페논테트라카르복실릭 이무수물, 비스(3,4-디카르복시페닐) 에테르 이무수물, 비스(3,4-디카르복시페닐)술폰 이무수물, 1,4,5,8-나프탈렌테트라카르복실릭 이무수물, 1,2,5,6-나프탈렌테트라카르복실릭 이무수물, 2,3,6,7-나프탈렌테트라카르복실릭 이무수물, 2,2-비스(3,4-디카르복시페닐)-헥사플루오로프로판 이무수물, 시클로부탄테트라카르복실릭 이무수물, 메틸시클로부탄테트라카르복실릭 이무수물, 및 1,2,3,4-테트라카르복시부탄 이무수물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이다.

본 발명의 방법에 있어서, 상기 테트라카르복실 이무수물은 0.02 중량% 내지 90 중량%로 반응되는 것이 바람직하다. 테트라카르복실 이무수물은 다양한 용매에 용해되어 반응될 수 있으며, 바람직하게는 아세톤, 메틸에틸케톤, 디메틸포름아미드 및 N-메틸피롤리돈로부터 선택되는 하나이상의 용매에 용해되어 있는 것이다.

상기 테트라카르복실 이무수물과 표면 상의 아미노기와의 반응은 예를 들면, 상기 테트라카르복실 이무수물을 아민 기판 상에 딥 코팅법 (자기조립박막코팅법)에 의하여 단분자막을 형성하게 하고, 10 분 이상 반응시킴으로써 수행될 수 있다.

이러한 이무수물의 첨가는 아민기에 의한 친핵성 치환 반응에 의하여 이루어지는 것으로 여겨진다. 반응 종료 후, 반응 용매를 사용하여 물리적으로 흡착되어 있는 상기 테트라카르복실 이무수물은 세척에 의하여 제거되고, 질소 분위기하에서 건조될 수 있다. 또한, 잔존하는 세척 용매를 질소 오븐에서 건조하여 제거할 수 있다.

본 발명의 방법에 있어서, 상기 무수물의 가수분해는 20 °C ~ 100 °C의 수용액에서 수행되는 것일 수 있다. 이러한 가수분해는 상기 온도에서 산성 또는 중성의 물에서 1분 이상 처리하고, 질소 분위기에서 건조시킴으로써 수행될 수 있다. 가수분해 결과, 하나의 무수물로부터 두 개의 카르복실기가 생성되기 때문에 고밀도의 카르복실기를 갖는 기판을 형성시킬 수 있다. 그에 따라서, 고밀도의 활성화된 카르복실기를 형성할 수 있고, 상기 활성화된 카르복실기에 생물분자를 고밀도로 부착할 수 있게 된다. 예를 들면, 종래의 널리 사용되고 있는, 표면에 아민기를 갖는 기판에 숙신산 무수물을 반응시키면, 하나의 카르복실기가 형성된다. 따라서, 본 발명의 방법에 의하면, 종래의 표면에 아민기를 갖는 기판을 이용하는 경우에 비하여, 두 배나 많은 카르복실기를 형성하기 때문에, 이러한 기판을 이용하여 제작된 마이크로어레이를 이용한 분석에서, 형광강도가 강하게 검출될 수 있다.

본 발명의 방법에 있어서, 상기 카르보디이미드는 하기 식 IV로 표시되고,



식 중, \mathbf{R}_6 은 알킬 또는 시클로알킬이고, \mathbf{R}_7 는 알킬아민 또는 시클로알킬아민 기인 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 상기 카르보디이미드는 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필) 카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 또는 N,N'-디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC)인 것이다.

본 발명의 방법에 있어서, 상기 숙신이미드는 N-히드록시숙신이미드 또는 N-히드록시술포숙신이미드인 것인 것이 바람직하다.

또한, 본 발명에 있어서, 상기 카르보디이미드 또는 숙신이미드는 20 mM ~ 200 mM의 농도에서 반응되는 것일 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 생물분자는 활성화된 카르복실기와 결합할 수 있는 관능기를 가진 생물분자이면 어느 것이나 포함된다. 예를 들면, 아민기를 갖는 것이 포함되며, 바람직하게는, 상기 생물분자는 DNA, RNA, PNA, 또는 단백질이다.

도 2는 본 발명에 따른 표면에 활성화된 카르복실기를 갖는 마이크로어레이용 기판의 제조방법의 일 예를 나타내는 반응식이다. 먼저, 기판 상에 갑마-아미노프로필트리에톡시실란 (γ -aminopropyltriethoxysilane)(GAPS)과 같은 아미노 실란 화합물을 코팅하여, 표면에 아민기를 갖는 기판을 제조한다 (a). 다음으로, 표면에 아민기를 갖는 기판에 1,2,4,5-벤젠 테트라카르복실산 이무수물과 같은 테트라카르복실산 이무수물을 반응시켜, 무수물을 기판 상에 도입한다 (b). 다음으로, 가수분해 반응을 수행하여, 카르복실기를 갖는 기판을 제조하고 (c), 이를 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필) 카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N,N'-디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC)와 같은 카르보디이미드 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS) 및 N-히드록시술포숙신이미드 (Sulfo-NHS)와 같은 숙신이미드 화합물의 존재하에서 반응시켜, 활성화된 카르복실기를 갖는 기판을 제조한다 (d).

본 발명은 또한, 본 발명의 고체 지지체 상에 생물분자를 부착하는 방법에 의하여 제조되는 생물분자 마이크로어레이를 제공한다.

생물분자를 기판 상에 고정화하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 접촉형 방식인 스팟팅(spotting), 잉크젯 프린터와 같은 압전 인쇄 방식(piezoelectric printing), 및 마이크로 피펫팅법 등이 이용될 수 있다.

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이를 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예

실시예 1 : 활성화된 카르복실기를 갖는 기판 또는 아미노 실란으로 코팅된 기판에 핵산을 코팅하는 방법.

(1) 아미노 실란으로 코팅된 기판의 제조

감마-아미노프로필트리에톡시실란 (γ -aminopropyltriethoxysilane)(GAPS)를 에탄올에 용해시켜, 0.002 M의 감마-아미노프로필트리에톡시실란 (GAPS)의 용액을 제조하였다. 얻어진 용액을 세정된 슬라이드 형태의 유리 기판 상에 딥 코팅 (dip coating)에 의하여 코팅하고, 120 °C에서 1 시간 동안 처리하여, 아미노 실란으로 코팅된 유리 기판을 제조하였다.

(2) 활성화된 카르복실기를 갖는 기판의 제조

3-(트리에톡시실릴)프로필숙시닉 무수물 (TSA)를 에탄올에 용해시켜, 0.002 M의 3-(트리에톡시실릴)프로필숙시닉 무수물 (TSA)의 용액을 제조하였다. 얻어진 용액을 세정된 슬라이드 형태의 유리 기판 상에 딥 코팅 (dip coating)에 의하여 코팅하고, 120 °C에서 1 시간 동안 처리하여, 각각 실란 무수물로 코팅된 유리 기판을 제조하였다.

상기 실란 무수물 (TSA)로 코팅된 유리 기판을 약 산성의 물에서 3 분 동안 세척하여, 무수물을 가수분해하여 카르복실기로 전환시켰다. 얻어진 카르복실기를 표면에 갖는 상기 유리 기판을 각각 100 mM의 N-히드록시숙신이미드(NHS)와 N,N'-디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC)의 DMF 용액에 1 시간 동안 반응시켜, 활성화된 카르복실기를 갖는 마이크로 어레용 기판을 제조하였다. 반응 후, 유리 기판을 에탄올로 세척한 후 질소 용기에서 보관하였다.

(3) 핵산의 부착과 혼성화 실험

서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 프로브를 DMSO와 혼합한 후, 스팟터 (spotter)를 사용하여 상기 활성화된 카르복실기를 갖는 기판 또는 아미노 실란으로 코팅된 기판 상에 고정화하여 스팟을 형성하였다. 37 °C, 100 % 상대 습도에서 1 시간 동안 고정화하고, 세정 후 처리를 수행하여 프로브가 고정화된 마이크로어레이를 제작하였다.

이렇게 제작된 마이크로어레이에 대하여, 상기 프로브와 상보적인 뉴크레오티드 서열을 가지고 있는 타겟 핵산을 혼성화 반응시켰다. 혼성화 조건은 0.1% SSPET (0.1% Triton X-100을 포함하는 염수 소듐 포스페이트 EDTA 버퍼)에 타겟 핵산을 녹이고, 37 °C에서 14 시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 마이크로어레이를 6x SSPET와 3x SSPET로 각각 5 분 동안 세척하고, 질소 상에서 건조시켰다. 건조된 마이크로어레이를 엑손사의 GenePix 4000B 모델을 이용하여 스캐닝하였다. 그 결과를 도 3a 및 3b에 나타내었다. 혼성화 과정에서, 아미노 실란으로 코팅된 기판, 즉 아민 기판에 대하여는 숙신산 무수물/NMP 차단 과정을 수행하였다.

도 3a 및 3b에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 방법에 따라 제작된 활성화된 카르복실기를 갖는 기판을 이용한 마이크로어레이가 혼성화 과정에서 차단 과정을 필요로 하지 않으면서, 우수한 스팟 형광강도와 스팟 모양 (morphology)이 얻어지도록 하였다. 도 3a 및 3b에서 각각 좌측은 프로브 농도 100 μ M에 대한 결과이고, 우측은 25 μ M에 대한 결과이다. 도 3a는 TSA 기판에 대한 결과이고, 도 3b는 GAPS 기판에 대한 결과이다. 도 3a와 3b에 나타낸 결과를 형광강도의 수치로 나타내면 하기 표 2가 같다.

표 1.

DNA 농도(μ M)	TSA	GAPS
100	17,000	12,000
25	14,000	11,000

실시예 2 : 활성화된 카르복실기를 갖는 기판, 아민 기판 및 아민층 상에서 활성화된 카르복실기를 갖는 기판을 이용한 핵산의 코팅

(1) 활성화된 카르복실기를 갖는 기판의 제조

3-(트리에톡시실릴)프로필숙시닉 무수물과 1,2-비스(트리에톡시실릴)에탄을 에탄올에 용해시켜, 0.002 M의 3-(트리에톡시실릴)프로필숙시닉 무수물(TSA)과 1,2-비스(트리에톡시실릴)에탄의 혼합물을 제조하였다. 얻어진 혼합물을 세정된 슬라이드 형태의 유리 기판 상에 딥 코팅 (dip coating)에 의하여 코팅하고, 120 °C에서 1 시간 동안 처리하여, 실란 무수물로 코팅된 유리 기판을 제조하였다.

상기 무수물로 코팅된 유리 기판을 약 산성의 물에서 3 분 동안 세척하여, 무수물을 가수분해하여 카르복실기로 전환시켰다. 얻어진 카르복실기를 표면에 갖는 상기 유리 기판을 각각 100 mM의 N-히드록시숙신이미드(NHS)와 N,N'-디시클로헥실 카르보디이미드(DCC)의 DMF 용액에 1 시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 유리 기판을 에탄올로 세척한 후 질소 용기에서 보관하였다. 이하 이렇게 제작된 기판을 TSA 기판이라 한다.

(2) 아미노 실란으로 코팅된 기판의 제조

3-아미노프로필트리메톡시실란(3-aminopropyltrimethoxysilane)과 1,2-비스(트리에톡시실릴)에탄을 에탄올에 교반하면서 용해시켜, 0.002 M의 3-아미노프로필트리메톡시실란과 1,2-비스(트리에톡시실릴)에탄의 에탄올 용액을 제조하였다. 이 혼합물을 세정된 슬라이드 형태의 유리 기판 상에 딥 코팅(dip coating)에 의하여 코팅하고, 120 °C에서 1 시간 동안 처리하였다. 이를 이하 "아민 기판"이라 한다.

(3) 아민층 상에서 활성화된 카르복실기를 갖는 기판의 제조

또한, 상기 아민 기판을 숙신산 무수물(succinic anhydride)과 1,2,4,5-벤젠테트라카르복실산 이무수물(benzenetetracarboxylic dianhydride)이 0.01 M 녹아있는 DMF 용액에 담구고 1 시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 에탄올로 세정하고 질소 용기에 건조시켰다. 다음으로, 숙신산 무수물과 1,2,4,5-벤젠테트라카르복실산 이무수물로 처리된 각 기판을 약 산성의 물에서 3 분 동안 세척하여, 무수물을 가수분해하여 무수물을 카르복실기로 전환시켰다. 얻어진 카르복실기를 표면에 갖는 상기 유리 기판을 각각 100 mM의 N-히드록시숙신이미드(NHS)와 N,N'-디시클로헥실 카르보디이미드(DCC)의 DMF 용액에 1 시간 동안 반응시켜, 카르복실기를 활성화시켰다. 반응 후, 유리 기판을 에탄올로 세척한 후 질소 용기에서 보관하였다. 이하 이렇게 제작된 기판을 각각 "SA(숙신산 무수물) 기판" 및 "BD(1,2,4,5-벤젠테트라카르복실산 이무수물) 기판"이라 한다.

(4) 핵산의 부착과 혼성화 실험

서열번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 프로브를 DMSO와 혼합한 후, 스팟터(spotter)를 사용하여 기판 상에 고정화하여 스팟을 형성하였다. 37 °C, 100% 상대 습도에서 1 시간 동안 고정화하고, 세정 후 처리를 수행하여 프로브가 고정화된 마이크로어레이를 제작하였다.

이렇게 제작된 마이크로어레이에 대하여, 상기 프로브와 상보적인 뉴크레오티드 서열을 가지고 있는 타겟 핵산을 혼성화 반응시켰다. 혼성화 조건은 0.1% SSPET(0.1% Triton X-100을 포함하는 염수 소듐 포스페이트 EDTA 버퍼)에 타겟 핵산을 녹이고, 37 °C에서 14 시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 마이크로어레이를 6x SSPET와 3x SSPET로 각각 5 분 동안 세척하고, 질소 상에서 건조시켰다. 건조된 칩을 엑손사의 GenePix 4000B 모델을 이용하여 스캐닝하였다. 그 결과를 표 1과 도 4에 나타내었다. 혼성화 과정에서, 아민 기판에 대하여는 숙신산 무수물/NMP 차단 과정을 수행하였다.

표 2.

기판 종류	TSA	BD	SA	아민 기판
형광 강도	9588	9612	4811	5294
숙신산 무수화물/NMP 차단 과정의 유무	x	x	x	o

표 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 방법에 의하여 제작된 마이크로어레이에는 차단 과정이 필요 없으며, 스팟 또한 우수한 특성을 나타내었다. 도 4는 각 마이크로어레이에 대하여 행하여진 혼성화 결과를 나타내는 도면이다. 도 4에서 (A) 내지 (D)는 각각 순서대로 TSA 기판, BD 기판, SA 기판 및 아민 기판을 나타낸다. 형광 강도는 적색으로 갈 수록 강하고, 청색 쪽으로 갈 수록 약한 것이다.

발명의 효과

본 발명의 생물분자를 고체 지지체 상에 부착시키는 방법에 의하면, 하나의 무수물 관능기에 대하여 두개의 카르복실기가 생성되기 때문에 생물분자를 고밀도로 고체 지지체 상에 고정화할 수 있다.

본 발명의 마이크로어레이에 의하면, 생물분자가 고밀도로 고정화되어 있기 때문에, 마이크로어레이를 이용한 분석 결과 얻어지는 형광 강도가 증진될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

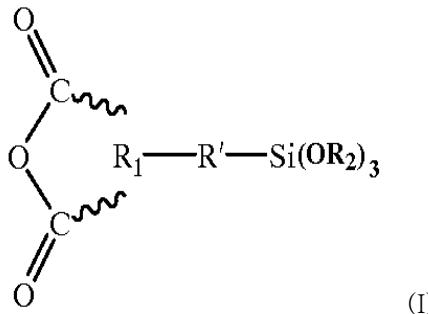
고체 지지체를 실란 무수물로 코팅하여 고체 지지체 표면에 무수물 관능기를 도입하는 단계;

상기 무수물 관능기를 가수분해시켜, 카르복실기로 전환하는 단계;

상기 카르복실기를 카르보디이미드 및 숙신이미드와 반응시켜, 상기 카르복실기를 활성화하는 단계; 및

상기 카르복실기로 활성화된 고체 지지체와 생물분자를 접촉시켜 생물분자를 고체 지지체 상에 부착시키는 단계를 포함하는, 생물분자를 고체 지지체 상에 부착시키는 방법으로서,

상기 실란 무수물은 하기 식 I의 구조식을 갖고,



식 중 R_1 은 알킬렌, 아릴렌 또는 알킬아릴렌기이고, R' 는 각각 $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ 의 치환 또는 비치환된 알킬렌기, 아릴렌기, 아릴렌알킬기 또는 알킬렌아릴렌기이고, R_2 는 $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ 의 알킬기, 아릴기, 아릴렌알킬기, 알킬렌아릴기 또는 수소이고, 각각의 R_2 는 동일하거나 다를 수 있는 것이고,

상기 카르보디이미드는 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필) 카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 또는 N,N' -디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 고체 지지체는 유리, 실리콘 웨이퍼, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리카르보네이트, 폴리에스테르, 폴리아크릴레이트 및 폴리우레탄으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

삭제

청구항 4.

제1항에 있어서, R_1 은 메틸, 에틸, 프로필 또는 부틸 기인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 실란 무수물은 3-(트리에톡시실릴)프로필숙신닉 무수물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제1항에 있어서, 실란 무수물을 0.01 중량 % 내지 90 중량 %로 포함하는 용액으로 코팅되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

제1항에 있어서, 상기 실란 무수물의 코팅은 자기조립단분자코팅법, 스픈법, 스프레이법, 및 화학기상 증착법으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

제1항에 있어서, 상기 무수물의 가수분해는 20 °C ~ 100 °C의 수용액에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

삭제

청구항 12.

삭제

청구항 13.

제1항에 있어서, 상기 숙신이미드는 N-히드록시숙신이미드 또는 N-히드록시솔포숙신이미드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.

제1항에 있어서, 상기 카르보디이미드 또는 숙신이미드는 20 mM ~ 200 mM의 농도에서 반응되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제1항에 있어서, 상기 생물분자는 아민기를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제15항에 있어서, 상기 생물분자는 DNA, RNA, PNA, 또는 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17.

제1항, 제2항, 제4항 내지 제6항, 제9항, 제10항 및 제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의하여 제조되는 생물분자 마이크로어레이.

청구항 18.

고체 지지체를 아미노실란으로 코팅하여 고체 지지체 표면에 아미노 관능기를 도입하는 단계;

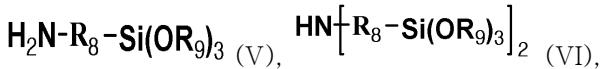
상기 아미노 관능기를 테트라카르복실 이무수물과 반응시켜, 무수물 관능기를 고체 지지체 표면에 도입하는 단계;

상기 무수물 관능기를 가수분해시켜, 카르복실기로 전환하는 단계;

상기 카르복실기를 카르보디이미드 및 숙신이미드와 반응시켜, 상기 카르복실기를 활성화하는 단계; 및

상기 카르복실기로 활성화된 고체 지지체와 생물분자를 접촉시켜 생물분자를 고체 지지체 상에 부착시키는 단계를 포함하는, 생물분자를 고체 지지체 상에 부착시키는 방법으로서,

상기 아미노실란은 하기 식 V 또는 VI로 표시되는 1차 또는 2차 아미노실란으로서,



식 중, R_8 은 알킬렌기, 아릴렌기, 아릴렌알킬렌기 또는 알킬렌아릴렌기, 에테르, 에스테르, 또는 이민을 함유한 기이고, R_9 은 $\text{C}_1\sim\text{C}_{20}$ 의 알킬기, 아릴기, 아릴렌알킬기 또는 알킬렌아릴기 또는 수소인 것이고,

상기 카르보디이미드는 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필) 카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 또는 N,N'-디시클로헥실 카르보디이미드 (DCC)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19.

제18항에 있어서, 아미노실란 화합물을 0.01 중량 % 내지 90 중량 %로 포함하는 용액으로 코팅되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20.

삭제

청구항 21.

삭제

청구항 22.

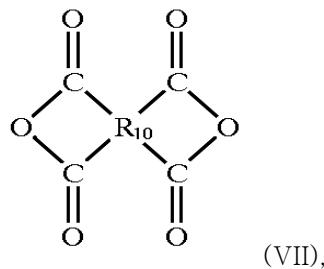
삭제

청구항 23.

제18항에 있어서, 상기 아미노실란의 코팅은 자기조립단분자코팅법, 스피드, 스프레이법, 및 화학기상 증착법으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24.

제18항에 있어서, 상기 테트라카르복실 이무수물은 하기 식 VII으로 표시되고,



식 중, R₁₀는 4가의 카르본시클로 방향족기(carboncyclic aromatic group), 해테로환기, 알리시클로기 또는 지방족기와 같은 4가 유기기인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25.

제24항에 있어서, 상기 테트라카르복실 이무수물은 피로멜릭틱(pyromellitic) 이무수물, 3,3',4,4'-비페닐테트라카르복실릭 이무수물, 2,2',3,3'-비페닐테트라카르복실릭 이무수물, 2,3,3',4'-비페닐테트라카르복실릭 이무수물, 1,2,4,5-벤젠테트라카르복실릭 이무수물, 3,3',4,4'-벤조페논테트라카르복실릭 이무수물, 2,2',3,3'-벤조페논테트라카르복실릭 이무수물, 2,3,3',4'-벤조페논테트라카르복실릭 이무수물, 비스(3,4-디카르복시페닐)에테르 이무수물, 비스(3,4-디카르복시페닐)술폰 이무수물, 1,4,5,8-나프탈렌테트라카르복실릭 이무수물, 1,2,5,6-나프탈렌테트라카르복실릭 이무수물, 2,3,6,7-나프탈렌테트라카르복실릭 이무수물, 2,2-비스(3,4-디카르복시페닐)-헥사플루오로프로판 이무수물, 시클로부탄테트라카르복실릭 이무수물, 메틸시클로부탄테트라카르복실릭 이무수물, 및 1,2,3,4-테트라카르복시부탄 이무수물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26.

제18항에 있어서, 상기 테트라카르복실 이무수물은 0.02 중량% 내지 90 중량%로 반응되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27.

제18항에 있어서, 상기 테트라카르복실 이무수물은 아세톤, 메틸에틸케톤, 디메틸포름아미드 및 N-메틸피롤리돈로부터 선택되는 하나이상의 용매에 용해되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28.

제18항에 있어서, 상기 무수물의 가수분해는 20 °C ~ 100 °C의 수용액에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29.

삭제

청구항 30.

삭제

청구항 31.

제18항에 있어서, 상기 숙신이미드는 N-히드록시숙신이미드 또는 N-히드록시술포숙신이미드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32.

제18항에 있어서, 상기 카르보디이미드 또는 숙신이미드는 20 mM ~ 200 mM의 농도에서 반응되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33.

제18항에 있어서, 상기 생물분자는 아민기를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34.

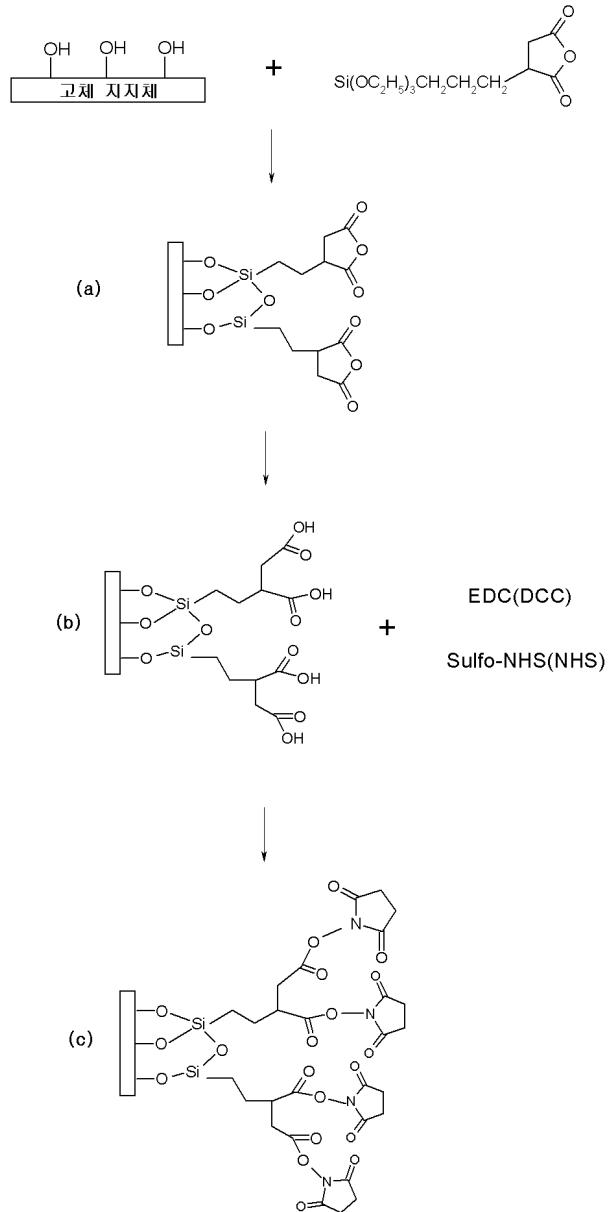
제33항에 있어서, 상기 생물분자는 DNA, RNA, PNA, 또는 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35.

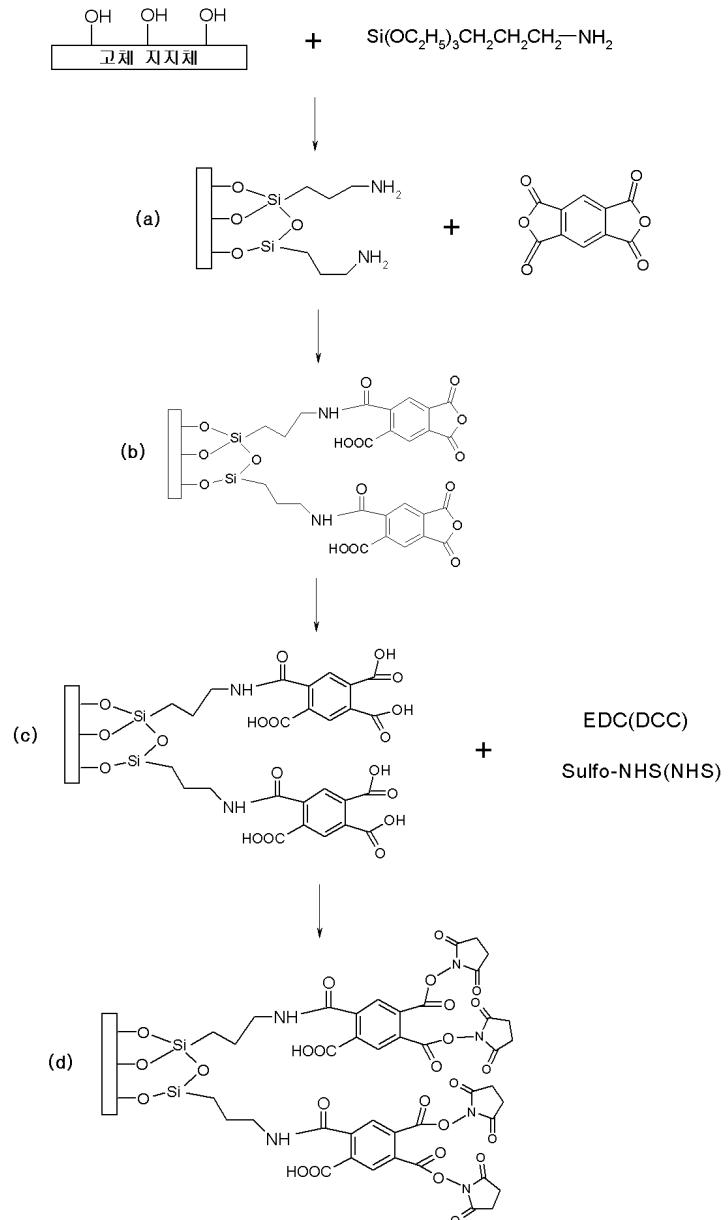
제18항, 제19항, 제23항 내지 제28항 및 제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의하여 제조되는 생물분자 마이크로어레이.

도면

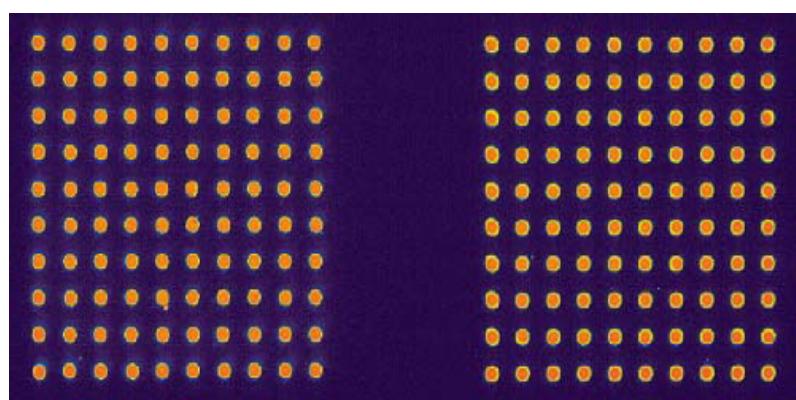
도면1



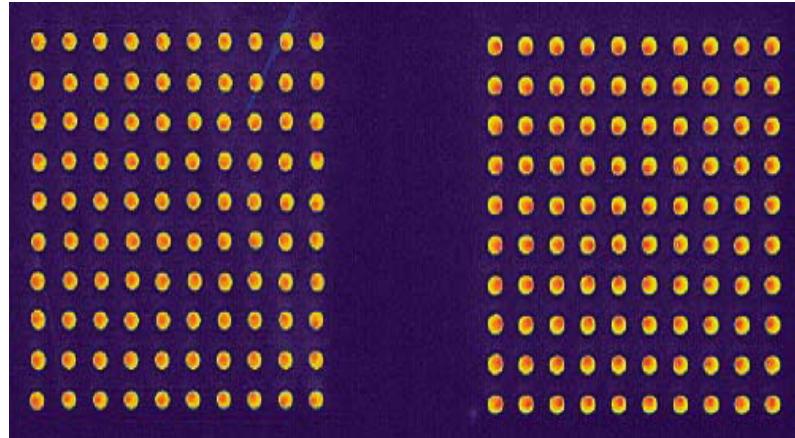
도면2



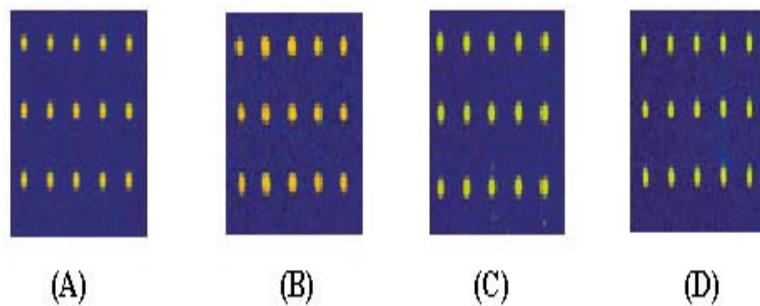
도면3a



도면3b



도면4



서열목록

<110> Samsung Electronic Co. Ltd.
 <120> A method for immobilizing a biomolecule to a solid substrate at a high density by using a substrate having an activated carboxyl group at the surface thereof and microarray produced using the same
 <130> PN052195
 <160> 1
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe oligonucleotide
 <400> 1
 caggtgggac tggtt

15