(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0128286
(43) 공개일자 2009년12월15일

(51) Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0054372
(22) 출원일자 2008년06월10일
심사청구일자 2008년06월10일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
이창수
대전시 유성구 궁동 220 충남대학교 바이오응용화학부생명화학공학전공
이지혜
대전시 유성구 궁동 220 충남대학교 바이오응용화학부생명화학공학전공
(74) 대리인
이동희

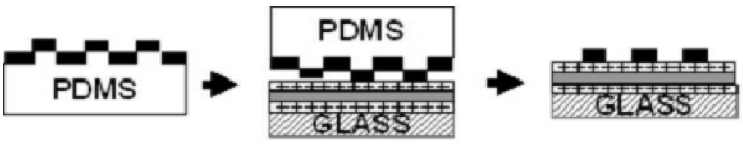
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 고분자 전해질 다층박막과 마이크로 컨택트 프린팅을이용한 단백질 고정화방법

(57) 요 약

본 발명은 선택적 단백질 고정화방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 고분자 전해질을 이용한 다층박막 증착(Layer-by-layer deposition, LBL)의 표면 처리를 통하여 얻어진 표면 위에 정전기적 인력에 의한 선택적 단백질 고정화방법 및 상기 방법으로 항원 단백질을 고정화함으로써 항원-항체 반응을 유도할 수 있는 단백질 패터닝을 수행하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 단백질 고정화 방법은 단백질 활성 유지에 적합한 단백질의 3차원 입체구조가 유지되기에 유리한 조건이 되어 단백질 칩 내에서 탐침으로서의 효율을 높이고, 확산에 의한 단백질의 고정화가 아니므로 고분자 박막의 두께가 증가하여도 단백질 패턴의 크기가 동일하게 유지되고, 그 결과 동일 조건에서 형광세기가 항상 일정하므로 신호 세기에 대한 오차범위가 좁아져 보다 정확한 진단을 가능하게 한다. 따라서, 본 발명은 진단을 위한 단백질 칩의 제작에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 미생물 칩, 세포 칩, 조직(tissue)칩을 제작하기 위한 미생물이나 세포의 고정화를 유도하는 단백질의 고정화시에 응용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

고분자 전해질을 이용한 다층박막 증착(Layer-by-layer deposition, LBL)의 표면 처리를 통하여 얻어진 표면 위에 정전기적 인력에 의하여 선택적으로 단백질을 고정화시키는 단백질 고정화방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 고분자 전해질은 PAH(폴리아릴아민 하이드로 크롤라이드)와 PSS(폴리소듐 4-스타이렌 술포네이트) 중에서 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 고정화방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 PAH는 20 mM(pH 9.0)이고, 상기 PSS는 60 mM(pH 7.0)인 것을 특징으로 하는 단백질 고정화방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 다층박막 증착의 표면 처리는 다층박막의 마지막 층으로 단백질의 등전점과 사용되는 완충용액의 pH의 상호관계에 따른 단백질의 알짜전하(net charge)를 고려하여, 단백질이 갖게 되는 전하와 반대되는 전하의 고분자 전해질을 처리하는 것을 특징으로 하는 단백질 고정화방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 정전기적 인력에 의하여 선택적으로 단백질을 고정화시키는 것은 마이크로 컨택트 프린팅 방법에 의하는 것을 특징으로 하는 선택적 단백질 고정화방법.

청구항 6

단백질을 고정화시키는 방법에 있어서,

ⅰ) 고분자 전해질을 이용하여 다층박막의 기판을 제작하는 단계;

ii) 미세패턴을 가지는 마이크로 스탬프를 제작하는 단계; 및

iii) 상기 ⅰ) 단계의 기판에 상기 ii) 단계의 마이크로 스탬프를 이용하여 마이크로 컨택트 프린팅 방법에 의하여 단백질을 고정화시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 고정화방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 단백질 고정화방법은, 산소 플라즈마 처리를 통하여 친수성기가 도입된 PDMS 마이크로 스탬프를 단백질 용액 내에 담지한 후 꺼내어서 질소를 이용하여 과잉의 단백질을 제거한 뒤 마이크로 컨택트 프린팅하는 것을 특징으로 하는 단백질 고정화방법.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 단백질 고정화방법은, 단백질의 전사가 잘 이루어질 수 있도록 하기 위해서 마이크로 컨택트 프린팅 하기 전에 저온의 냉동고에서 일정시간 유지시키는 것을 특징으로 하는 단백질 고정화방법.

청구항 9

제 6항에 있어서,

상기 기판은 고분자 전해질 용액을 처리하기 전에, 각각 H_2SO_4 및 H_2O_2를 포함하는 피라나 용액, 증류수, 에탄올(ethanol) 및 아세톤(acetone)으로 세척하는 것을 특징으로 하는 단백질 고정화방법.

청구항 10

제 6항에 있어서,

상기 마이크로 스탬프는 PDMS 전중합체(prepolymer)와 경화제를 섞은 후에, 이것을 실리콘 마스터 위에 올리고 나서, 열적 경화 후에 상기 실리콘 마스터로부터 경화된 PDMS를 분리해 제작되는 것을 특징으로 하는 단백질 고정화방법.

청구항 11

제 6항에 있어서,

상기 마이크로 컨택트 프린팅 방법은,

ⅰ) 마이크로 스탬프를 세척하는 단계;

ii) 상기 세척 후 플라즈마 처리를 이용하여 PDMS 마이크로 스탬프의 표면을 친수성 표면으로 유도하는 단계;

iii) 상기 친수성 표면으로 유도된 스탬프 위에 단백질을 잉킹시키는 단계;

iv) 상기 단백질 잉킹 후, 과잉의 단백질을 제거하고 단일층 수준의 단백질만을 남기는 단계;

ⅴ) 상기 단일층 단백질이 결합된 것을 고분자 전해질의 다층박막 위에 마이크로 스탬핑하는 단계; 및

vi) 상기 마이크로 스탬핑 후, 유리기판에 정전기적 인력 외에 물리적으로 흡착된 과잉의 단백질을 제거하기 위해 스탬핑이 이루어진 유리 기판을 세척하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 고정화방법.

청구항 12

제 1항 내지 제 12항의 방법으로 항원 단백질을 고정화함으로써 항원-항체 반응을 유도할 수 있는 단백질 패터닝을 수행하는 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 항원 단백질의 고정화는

ⅰ) 항원 단백질 토끼(rabbit) IgG를 마이크로 컨택트 프린팅 방법으로 고분자 전해질 다층박막에 고정화시키는 단계;

ii) 상기 고정화된 항원 단백질에 BSA로 표면을 처리하여 고정화되지 않은 단백질을 세척하는 단계; 및

iii) 상기 세척 후, 항체가 되는 산양 항-토끼(goat anti-rabbit) IgG-FITC을 표면 위로 흘려줌으로써 표면상에 비특이적인 결합이 발생하지 않으면서 항원-항체가 반응하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 패터닝을 수행하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 선택적 단백질 고정화방법으로, 고분자 전해질의 다층박막에 의해 처리된 기질 위에 마이크로 컨택트 프린팅 기법으로 단백질을 고정하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 단백질 센서는 생체물질이 갖는 매우 우수한 분자인식능력을 이용하여 화학물질 혹은 생체물질의 농도를 측정하는 센서로써 이를 이용하여 각종 효소기질, 항원 등의 유무 판단 및 농도를 정량 분석할 수 있게 하는 장치이다. 이러한 단백질 센서를 제작하기 위해서는 효소나 항체 등 식별물질의 고정화가 필수적이다. 이러한 이유로 단백질 칩을 제작하기 위한 단백질의 고정화 방법에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 종래에 이루어진 연구 중 슬라이드 글라스 위에 단백질을 어레이하는 기술로써 단백질의 아민기와 반응하여 결합을 할 수 있는 교차결합제를 가지고 슬라이드 글라스를 처리한 후, DNA 어레이를 제작할 때 사용된 마이크로어레이어(microarrayer)나 마이크로스캐너를 사용하여 DNA칩을 제작할 때와 같은 방식으로 제작을 한다. 이때 단백질의 안정성을 유지시키기 위하여 고정화시키고자 하는 단백질은 40% 글리세롤(glycerol) 용액에 처리하는 방법이다. 이는 단백질 어레이 기판을 슬라이드 글라스를 사용하여 경제적이고, 공유결합에 의한 단백질의 결합력이 강하다는 장점은 있으나, 각각의 단백질 패턴을 어레이어(arrayer) 팁(tip)으로 고정화해야 한다는 번거로움과 고정화된 단백질의 3차원 구조의 안정성을 고려하지 않아 단백질의 민감도가 떨어질 수 있다는 점, 그리고 단백질 용액이 표면에 고정화 될 때 확산 현상이 발생하기 때문에 정확한 사이즈와 모양을 구현할 수 없다는 단점이 있다.

<3> 한편, 다공성 3D 젤 패드 글라스 위에 단백질을 어레이 시키는 기술은 Mirzabekov에 의해서 개발된 기술로써 silane 처리된 슬라이드 글라스 위에 3% polyacrylamide 젤과 젤의 다공성을 향상시키기 위한 교차결합제인 N,N'-(1,2-dihydroxyethylene) bisacrylamide(DHEBA)와의 혼합물을 먼저 어레이 시킨 후에 그 안에 단백질을 고정화시킴으로써 단백질을 100 × 100 × 20 ㎛ 크기에 200 ㎛ 간격으로 고정화 시키는 방법이다. 이는 3D 젤 패드를 사용함으로써 단백질의 안정성을 향상시킬 수 있다는 장점이 있는 반면, 단백질의 고정화 과정이 복잡하고 번거롭기 때문에 경제성이 떨어진다는 단점이 있다.

<4> 다른 기술로는 미국 예일대 Heng Zhu의 연구팀에 의해 개발된 기술로서 소프트리소그래피(soft-lithography) 방법으로 PDMS 마이크로 웰(microwell)을 제작한 후 교차결합제인 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane(GPTS)을 이용하여 마이크로웰을 처리하여 단백질의 아민기와 공유결합을 가능하게 함으로써 단백질을 고정화시킨 기술이다. 기존의 기술에 비해서는 비교적 간단하고 획기적인 방법이지만 역시 공유결합에 의한 단백질의 고정화로 인해서 단백질의 활성이 낮아질 수 있다는 것과 형광 단백질로 신호를 감지할 때 형광램프의 광원에서 나오는 빛에 의한 PDMS의 자가형광(autofluorescence)에 의한 낮은 신호는 감지하기 어려워지므로 센서의 감도가 떨어지는 단점이 있다.

<5> 이에, 본 발명자들은 단백질의 고정화방법을 연구하던 중, 고분자 전해질을 이용한 다층박막의 기판에 미세패턴을 가지는 마이크로 스탬프를 사용하여 마이크로 컨택트 프린팅을 이용한 단백질을 고정화를 시킨 결과, 단백질 센서의 제작에 있어서 효율성과 경제성을 향상시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> 본 발명의 목적은 단백질의 고정화가 간단한 방법으로 빠르고 효율적으로 이루어지는 동시에 기질에 고정화된 단백질의 3차원 입체구조가 잘 유지되도록 함으로써 단백질의 활성이 우수한 단백질 칩을 제공하는 것이다.

<7> 본 발명의 또 다른 목적은 고정화된 단백질의 패턴의 크기와 모양을 정확하게 제어함으로써, 기질 위에 단백질이 확산되어 면적이 넓어짐으로 인해 발생될 수 있는 형광신호의 왜곡현상을 방지하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<8> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 고분자 전해질을 이용한 다층박막 증착(Layer-by-layer deposition, LBL)의 표면 처리를 통하여 얻어진 표면 위에 정전기적 인력에 의한 선택적 단백질 고정화방법을 제공한다.

<9> 또한, 본 발명은 상기 방법으로 항원 단백질을 고정화함으로써 항원-항체 반응을 유도할 수 있는 단백질 패터닝을 수행하는 방법을 제공한다.

<10> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<11> 본 발명은 단백질을 기반으로 하는 고속 스크리닝 시스템의 마이크로어레이를 제작하기 위해서 사용될 수 있는 방법으로, 고체 기판 위에 효율적으로 단백질을 고정화시키기 위한 표면처리 방법과 단백질 고정화 방법에 관한 것이다.

<12> 본 발명은 고분자 전해질을 이용한 다층박막 증착(Layer-by-layer deposition, LBL)의 표면 처리를 통하여 얻어진 표면 위에 정전기적 인력에 의한 선택적 단백질 고정화방법을 제공한다.

<13> 본 발명의 선택적 단백질 고정화방법에 있어서, 상기 고분자 전해질은 PAH(폴리아릴아민 하이드로 크롤라이드) 및/또는 PSS(폴리소듐 4-스타이렌 술포네이트)를 포함하는 것이 바람직하고, 이때 상기 PAH는 20 mM(pH 9.0)이고, 상기 PSS는 60 mM(pH 7.0)인 것이 보다 바람직하다.

<14> 또한, 본 발명의 선택적 단백질 고정화방법에 있어서, 상기 다층박막 증착의 표면 처리는 다층박막의 마지막 층으로 단백질의 등전점과 사용되는 완충용액의 pH의 상호관계에 따른 단백질의 알짜전하(net charge)를 고려하여, 단백질이 갖게 되는 전하와 반대되는 전하의 고분자 전해질을 처리하는 것이 바람직하고, 상기 정전기적 인력에 의한 선택적 단백질 고정화는 마이크로 컨택트 프린팅 방법인 것이 바람직하다.

<15> 또한, 본 발명의 선택적 단백질 고정화방법에 있어서, ⅰ) 고분자 전해질을 이용한 다층박막의 기판을 제작하는 단계; ii) 미세패턴을 가지는 마이크로 스탬프를 제작하는 단계; 및 iii) 상기 ⅰ) 단계의 기판에 상기 ii) 단계의 마이크로 스탬프를 이용하여 마이크로 컨택트 프린팅을 이용한 단백질을 고정화시키는 단계;를 포함하는 것이 바람직하고, 이때 상기 단백질 고정화는 산소 플라즈마 처리를 통하여 친수성기가 도입된 PDMS 마이크로 스탬프를 단백질 용액 내에 담지한 후 꺼내어서 질소를 이용하여 과잉의 단백질을 제거한 뒤 마이크로 컨택트 프린팅하거나 단백질의 전사가 잘 이루어질 수 있도록 하기 위해서 마이크로 컨택트 프린팅 하기 전에 저온의 냉동고에서 일정시간 유지시키는 것이 보다 바람직하다. 또한 이때 상기 기판은 고분자 전해질 용액을 처리하기 전에, 각각 H_2SO_4 및 H_2O_2를 포함하는 피라나 용액, 증류수, 에탄올(ethanol) 및 아세톤(acetone)으로 세척하는 것이 보다 바람직하고, 상기 마이크로 스탬프는 PDMS 전중합체(prepolymer)와 경화제를 섞은 후에, 이것을 실리콘 마스터 위에 올리고 나서, 열적 경화 후에 상기 실리콘 마스터로부터 경화된 PDMS를 분리해 내에 제작되는 것이 보다 바람직하고, 상기 마이크로 컨택트 프린팅은 ⅰ) 마이크로 스탬프를 세척하는 단계; ii) 상기 세척 후 플라즈마 처리를 이용하여 PDMS 마이크로 스탬트의 표면을 친수성 표면으로 유도하는 단계; iii) 상기 친수성 표면으로 유도된 스탬프 위에 단백질을 잉킹시키는 단계; iv) 상기 단백질 잉킹 후, 과잉의 단백질을 제거하고 단일층 수준의 단백질만을 남기는 단계; v) 상기 단일층 단백질이 결합된 것을 고분자 전해질의 다층박막 위에 마이크로 스탬핑하는 단계; 및 vi) 상기 마이크로 스탬핑 후, 유리기판에 정전기적 인력 외에 물리적으로 흡착된 과잉의 단백질을 제거하기 위해 스탬핑이 이루어진 유리 기판을 세척하는 단계를 포함하는 것이 보다 바람직하다.

<16> 또한, 본 발명은 상기 방법으로 항원 단백질을 고정화함으로써 항원-항체 반응을 유도할 수 있는 단백질 패터닝을 수행하는 방법을 제공한다.

<17> 본 발명의 단백질 패터닝을 수행하는 방법에 있어서, 상기 항원단백질의 고정화는 ⅰ) 항원 단백질 토끼(rabbit) IgG를 마이크로 컨택트 프린팅 방법으로 고분자 전해질 다층박막에 고정화시키는 단계; ii) 상기 고정화된 항원 단백질에 BSA로 표면을 처리하여 블록킹하는 단계; 및 iii) 블록킹 후 , 항체가 되는 산양 항-토끼(goat anti-rabbit) IgG-FITC를 표면 위로 흘려줌으로써 표면 위로 비특이적인 결합이 발생하지 않으면서 항원-항체가 반응하는 단계;를 포함하는 것이 바람직하다.

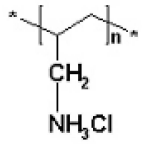
<18> 본 발명의 단백질 고정화방법은, 정전기적 인력을 이용한 간단한 공정을 사용하여 단백질을 고정화시킬 수 있다. 따라서 단백질 센서의 제작에 있어서 효율성과 경제성을 향상시킬 수 있다.

<19> 본 발명은 단백질 칩 및 바이오센서의 제작을 위해 기질 표면 위에 단백질을 고정화하는 기술에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 폴리아릴아민 하이드로 크롤라이드와 폴리소듐 4-스타이렌 술포네이트의 고분자 전해질을 이용한 다층박막 증착(Layer-by-layer deposition, LBL)의 표면 처리를 통하여 얻어진 표면 위에 정전기적 인력을 이용하여 선택적으로 단백질을 고정화시키는 방법에 관한 것으로, 기질과 단백질간 정전기적 인력에 의해 단백질이 효과적으로 고정화됨과 동시에 단백질의 3차원 입체구조를 유지시킴으로써 인지 대상 물질에 대한 감도를 높일 수 있는 방법에 관한 것이다.

<20> 본 발명의 단백질 고정화를 위한 기판의 표면처리 방법에 있어서, 상기 기판은 유리 기판이고, 피라나 용액(50%의 H_2SO_4: 30%의 H_2O_2 = 1 : 4)으로 처리함으로써 유리 기판의 표면이 하이드록실기($-OH^-$)를 갖도록 하는 것이 바람직하다. 또한 본 발명의 단백질 고정화를 위한 표면 처리 방법에 있어서는, 다수의 양이온을 갖는 고분자 전해질과 다수의 음이온을 갖는 고분자 전해질을 이용하여 반복, 교차적으로 담지하여 고분자 다층박막(Layer-by-layer deposition, LBL)을 형성하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 사용한 양이온 고분자 전해질은 하기 화학

식 1로 기재되는 폴리아릴아민 하이드로 클로라이드(Poly(allylamine hydrochloride), PAH) 또는 하기 화학식 2로 기재되는 폴리4-암모니움 스타이렌 술포닉 엑시드(Poly(4-ammonium styrene sulfonic acid), PSS)인 것이 바람직하다.

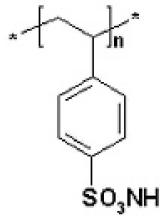
화학식 1



<21>

<22> Poly(allylamine hydrochloride)

화학식 2



<23>

<24> Poly(4-ammonium styrene sulfonic acid)

<25> 또한, 본 연구의 가장 핵심적인 기술 중 하나는 고정화시킬 단백질의 등전점과 단백질을 둘러싸고 있는 완충용액의 pH와의 상호 관계를 통하여 단백질의 알짜 전하(net charge)를 양의 값을 갖도록 혹은 음의 값을 갖도록 함으로써, 기판 위에 단백질을 정전기적 인력으로 고정화시킬 수 있도록 단백질의 알짜 전하와 반대되는 전하를 갖는 고분자 전해질을 다층박막의 제일 마지막 층에 처리하는 것이다. 도 1은 유기 기판 위에 고분자 전해질의 다층박막을 처리한 것에 대한 개념도이며 이것은 단백질을 고정화하기 위한 하나의 예시로써 본 개념도는 단백질 고유의 등전점과 단백질을 둘러싸고 있는 완충용액의 상호관계를 통하여 단백질의 알짜전하가 음전하를 갖게 되는 경우를 나타낸 것이다. 단백질이 갖게 되는 알짜 전하에 따라서 매우 간단하고 쉽게 표면의 전하를 다르게 함으로써 다양한 단백질의 고정화를 매우 자유롭게 구현할 수 있다.

<26> 본 발명은 단백질의 고정화 방법에 마이크로 컨택트 프린팅 기법을 이용하였고, 이를 구현하기 위해서는 마이크로 스탬프가 필요하다. 도 2에 도시된 바와 같이 마이크로 스탬프를 얻기 위해서는 i) 포토리소그래피 공정; ii) 포토리소그래피 공정을 이용하여 얻어진 실리콘 마스터 위에 경화시키지 않은 PDMS를 붓고 경화시키는 공정; iii) 실리콘 마스터와 경화된 PDMS를 분리시킴으로써 실리콘 마스터의 음각이 되는 패턴을 갖는 마이크로 스탬프를 얻는 공정이 포함된다. 단백질을 고정화하기에 요구되는 혹은 필요로 하는 크기나 모양이 있다면 포토리소그래피 공정을 위해 마스크를 제작할 때 그에 맞게 디자인을 하면 원하는 마이크로 스탬프를 얻을 수 있게 된다. 마이크로 스탬프의 제조는 전중합체(prepolymer)와 경화제를 섞은 것을 실리콘 마스터 위에 올리고 오븐 내에서 열적 경화 후에 실리콘 마스터로부터 경화된 PDMS를 분리해 냄으로써 미세패턴을 가지고 있는 마이크로 스탬프를 제조할 수 있다(도 2 참조).

<27> 본 발명에서 사용된 마이크로 컨택트 프린팅 기법은 종래의 마이크로어레이어를 사용했을 때 각 패턴을 개별적으로 고정화해야 한다는 단점을 극복할 수 있는 데, 이것 또한 상기에 서술한 포토 공정을 위한 마스크를 제작하는 과정에서 스탬프 하나에 포함되는 패턴의 수를 결정하여 디자인함으로써 한 번의 프린팅으로 수백, 수천개의 패턴을 구현할 수 있다는 장점이 있다. 더욱이 유리 기판을 기질로 사용함으로써 가격도 저렴하고 자가발광이 매우 낮아서 낮은 농도의 생체물질도 감지가 가능하기 때문에 단백질 칩의 제작에 있어서 매우 유용한 기술이다.

<28> 도 3은 상기에 서술한대로 표면처리를 한 고분자 다층박막(도 1) 위에, 상기에 서술한대로 얻어진 PDMS 마이크로 스탬프(도 2)를 이용하여 단백질을 마이크로 컨택트 프린팅 함으로써 단백질의 고정화를 나타낸 모식도이다. 마이크로 컨택트 프린팅은 i) 마이크로 스탬프를 세척하는 단계; ii) 플라즈마 처리를 이용하여 PDMS 마이크로 스탬트의 표면을 친수성 표면으로 유도하는 단계; iii)친수성 표면으로 유도된 스탬프 위에 단백질을 잉킹시키는

단계; iv) 과잉의 단백질을 제거하고 단일층 수준의 단백질만을 남기는 단계; v) 고분자 전해질의 다층박막 위에 마이크로 스탬핑하는 단계; vi) 유리기판에 정전기적 인력 외에 물리적으로 흡착된 과잉의 단백질을 제거하기 위해 스탬핑이 이루어진 유리 기판을 세척하는 단계로 이루어지는 것이 바람직하다. 본 발명자들은 이러한 실시예로 FITC-BSA 단백질을 사용하였다. 상기 실시예에서 고분자 전해질의 다층박막의 마지막 층을 PAH로 처리하면 양전하로 유도되고, 상기 FITC-BSA 단백질은 사용된 완충용액인 50mM, pH 7.2의 인산완충용액에서 음전하를 띄므로 단백질이 기판 위에서 정전기적 인력에 의해서 고정화된다. 아울러, PDMS 마이크로 스탬프를 산소 플라즈마 처리를 통하여 친수성 스탬프로 유도하고 FITC-BSA 용액 내에 스탬프를 담지시켜 단백질이 PDMS 마이크로 스탬프로 충분히 흡착되게 한다. 과잉의 BSA를 제거한 후 단백질이 표면으로의 전사 효율을 높이기 위하여 약간의 수분을 제공한다. 그 후 단백질이 흡착되어있는 마이크로 스탬프를 고분자 전해질의 다층박막 위에 접촉시켜 단백질이 정전기적 인력에 의해서 스탬프에서 유리 기질 위로 전사되게 한 뒤, 정전기적 인력 외의 물리적 흡착에 의해 고정화된 단백질을 제거하기 위해 세척한다.

<29> 그 결과 상기 마이크로 컨택트 프린팅 기법으로 인하여 단백질 고정화는 단백질 패턴의 크기를 다층박막의 두께와 관계없이 동일하게 생성시켰다(도 4 참조). 다층박막 위로 전사된 단백질의 마이크로 패턴의 크기는 오차범위가 매우 작아 기존의 방법에 비해 현저하게 개선된 결과를 나타낸다. 결국, 본 발명의 단백질 고정화방법은 정량분석을 위한 단백질 칩 혹은 센서의 제작에 매우 중요하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 단백질 고정화방법은 물리적 흡착, 단일층의 정전기적 인력, 공유결합으로 고정화된 단백질과 비교했을 때 단백질 활성을 유지하는 측면에서 매우 우수하다(도 5 참조). 구체적으로, 본 발명자들은 고분자 전해질의 다층박막과 비교를 하기 위해 처리를 전혀 하지 않은 유리 기판, 아민기가 유도된 기판, 알레하이드가 유도된 기판, 에폭사이드 유도된 기판, 폴리-L-라이신 기판에 대한 immunoassay(도 5a 참조)와 이에 대한 형광신호 세기(도 5b 참조)를 측정하였다. 그 결과, 정전기적 인력에 의한 고정화가 공유결합에 의한 고정화에 비해서 단백질의 고정화 밀도는 낮을 수 있지만 활성을 유지하고 있는 단백질의 양은 더 많았고, 정전기적 인력을 이용한 경우로만 비교하여 보면 단일층인 폴리-L-라이신 기판과 다층박막 기판의 신호세기는 단일층 기판 위에서의 신호보다 고분자 전해질 다층박막 위에서 신호가 큰 값을 나타내었다. 즉 전하를 가지고 있는 기판의 표면은 단층박막으로 존재할 때보다는 다층박막일 경우 표면 내에 존재하는 전하의 양이 많아 고정화 효율을 높일 수 있다.

효 과

<30> 지금까지 기술한 바와 같이, 본 발명은 고분자 전해질의 다층 박막 증착을 이용한 표면처리 과정 후 마이크로 컨택트 프린팅 방법으로 단백질을 고정화시키는 방법으로 종래방법과 비교하여 단백질 칩 및 센서의 제작시 고정화된 단백질의 3차 입체 구조의 측면에서 효과적으로 단백질의 활성을 유지시킨다. 또한, 단백질 고정화시에 마이크로어레이어를 사용하는 방법 대신 마이크로 컨택트 프린팅 방법을 사용함으로써 다층박막 위에 고정화되는 단백질 패턴의 크기가 다층박막의 두께와 관계없이 항상 일정한 크기를 유지하고 있기 때문에 정량분석을 할 경우 신호세기의 오차범위를 줄일 수 있어 보다 정확한 단백질 칩 및 센서를 제작을 가능하게 한다. 아울러, 본 발명은 과정자체가 쉽고 단순하며, 유기용매를 사용하지 않고 수용액 기반이기 때문에 친환경적 방법으로 단백질을 고정화한다는 의의도 가지고 있다.

<31> 이와 같이, 본 발명의 단백질 고정화 방법은 단백질 칩을 제작함에 있어서 필수조건 중 하나인 단백질의 고정화를 고분자 전해질의 다층박막 위에 마이크로 컨택트 프린팅 기법을 이용하여 정전기적 인력에 의해 이루어지도록 함으로써, 단백질 활성 유지에 적합한 단백질의 3차원 입체구조가 유지되기에 유리한 조건이 되어 단백질 칩 내에서 탐침으로서의 효율이 높아지고, 단백질 용액의 확산에 의한 고정화가 아니어서 고분자 박막의 두께가 증가하여도 단백질 패턴의 크기가 동일하게 유지되어 형광세기가 동일 조건에서 항상 일정하므로 신호 세기에 대한 오차범위가 좁아져 보다 정확한 진단을 가능하게 한다. 따라서, 본 발명은 진단을 위한 단백질 칩의 제작에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 미생물 칩, 세포 칩, 조직(tissue)칩을 제작하기 위한 미생물이나 세포의 고정화를 유도하는 단백질의 고정화시에 응용 될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<32> 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 보다 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되는 것이 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 치환 및 균등한 타 실시예로 변경할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 명백할 것이다.

<33> <실시예 1> 고분자 전해질 다층박막의 기판 제작

<34> 단백질을 고정화하기 위한 기질의 고분자 전해질의 다층박막 처리를 위하여, 먼저 기판으로 사용될 슬라이드 글라스를 가로 x 세로(2.5㎝ x 2.5㎝)로 절단한 후 80℃ 피라나 용액(50%의 H_2SO_4 : 30%의 H_2O_2 = 1 : 4)에 1시간 동안 담지시킴으로써 세척하였다. 그리고 나서, 증류수, 에탄올(ethanol) 그리고 아세톤(acetone)에 각각 5분씩 초음파 세척 후 질소로 건조한 후에 세척된 슬라이드 글래스를 20 mM, pH 9.0의 PAH(폴리아릴아민 하이드로크롤라이드) 용액에 20분간 담지시켰다. 그리고 나서, 증류수로 30초간 세척하는 것을 3번 반복하여 유리 기판에 과잉으로 흡착된 고분자 전해질을 제거함으로써 단일층의 고분자 전해질 층을 얻었다. 그리고 나서, 바로 음전하 용액인 60 mM, pH 7.0의 PSS(폴리소듐 4-스타이렌 술포네이트) 용액에 20분간 담지함으로써 두 번째 층을 코팅하였다. 그리고 첫 번째 층과 마찬가지로 증류수에 30초간 3번 반복하여 세척하여 과잉으로 흡착된 음전하 고분자를 제거함으로써 균일하게 음전하로 처리된 표면을 얻을 수 있었다. 이러한 방법을 원하는 층만큼 반복하고 마지막 층의 처리는 고정화해야 하는 단백질의 알짜전하와 반대되는 전하를 갖도록 처리를 하였다(도 1).

<35> <실시예 2> 마이크로 스탬프의 제작

<36> 원하는 패턴을 만들 수 있도록 캐드를 이용하여 포토리소그라피에 사용될 마스크를 디자인하였다. 제작된 마스크를 이용하여 포토리소그라피 공정을 통하여 실리콘 웨이퍼 위에 패턴이 생기도록 하였다. PDMS 전중합체(prepolymer)와 경화제를 10 : 1 비율로 섞은 후 제작된 실리콘 마스터 위에 올리고 진공 펌프 내에서 PDMS 전중합체와 경화제가 섞일 때 주입된 기포를 제거해 주었다. 그리고 나서, 65℃ 오븐 내에서 8시간 열적 경화 후에 실리콘 마스터로부터 경화된 PDMS를 분리해 냄으로써 미세패턴을 가지고 있는 마이크로 스탬프를 얻을 수 있었다(도 2).

<37> <실시예 3> 마이크로 컨택트 프린팅을 이용한 단백질의 고정화

<38> 상기 실시예 1을 통해 제조된 고분자 전해질의 다층박막 위에 상기 실시예 2를 통해 제조된 PDMS 마이크로 스탬프를 이용하여 단백질을 마이크로 컨택트 프린팅 하였다(도 3). 사용된 단백질은 FITC-BSA(bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate) 10 ㎍/㎖이었다. BSA의 등전점은 4.6으로써 BSA가 안정적으로 유지할 수 있는 pH 7.2의 인산완충 용액 내에서 음전하를 띄게 된다. 그러므로, 본 실시예에서는 고분자 전해질의 다층 박막의 마지막 층을 PAH로 하였고 이로 인하여 고분자 전해질 층의 마지막 층은 양전하로 유도되었고 단백질은 음전하를 띄고 있으므로 단백질이 기판 위에서 정전기적 인력에 의해서 고정화되었다.

<39> 또한, PDMS 마이크로 스탬프를 20초간 산소 플라즈마 처리를 통하여 친수성 스탬프로 유도하였고 10 ㎍/㎖의 FITC-BSA 용액 내에 스탬프를 30분간 담지시킴으로써 단백질이 PDMS 마이크로 스탬프로 충분히 흡착될 수 있게 하였다. 과잉의 단백질은 오히려 정확한 모양과 크기의 단백질 패턴을 얻는데 방해를 하기 때문에 질소를 이용하여 과잉의 BSA를 제거한 후 단백질이 표면으로 전사 효율을 높이기 위하여 -20℃ 냉장고에 10초간 유지시킴으로써 약간의 수분을 제공하였다. 그 후 단백질이 흡착되어있는 마이크로 스탬프를 고분자 전해질의 다층박막 위에 30분간 접촉시킴으로써 단백질이 정전기적 인력에 의해서 스탬프에서 유리 기질 위로 전사 될 수 있게 하였고, 0.1 wt% PBST(20 mM, pH 7.2) 용액을 이용하여 세척함으로써 정전기적 인력 외의 물리적 흡착에 의해 고정화된 단백질을 제거하였다.

<40> <실시예 4> 고분자 전해질 박막의 두께와 고정화된 단백질의 크기 변화

<41> 고분자 전해질의 박막 위에 단백질을 마이크로어레이어를 통해 단백질을 고정화시켰을 경우 단백질이 고분자 전해질 박막 내부로 확산(diffusion)되어 일정한 패턴 모양과 크기를 구현할 수 없다. 기판 위로 고정화되는 단백질의 크기가 일정하지 않은 경우 센서로서의 응용시에 치명적일 수 있다. 왜냐하면 동일한 조건에서 고정화시킨 단백질의 면적이 일정치 않음으로 인해서 형광신호가 증폭 혹은 감소되어 진단의 오차 범위를 넓히기 때문이다. 즉 정량분석이 요구되는 단백질의 칩 혹은 센서에 사용하기 위해서는 고분자 전해질 다층박막 위의 고정화되는 단백질 패턴의 크기는 다층박막의 두께와 관계없이 동일하게 생성되어야 한다.

<42> 이와 같은 문제를 본 발명은 상기 실시예 3의 마이크로 컨택트 프린팅 기법으로 고정화함으로써 극복할 수 있었다(도 4). 구체적으로, 본 발명에서의 표면처리는 상기의 도 2의 방법과 동일하게 PAH와 PSS를 이용하여 다층박막을 1층부터 19층까지 처리하였다. PDMS 마이크로 몰드는 40 ㎛, 90 ㎛의 원모양의 패턴으로 이용하였으며 10 ㎍/㎖의 FITC-BSA를 이용하여 도 3의 방법으로 각 표면 위를 마이크로 패터닝하였다. 다층박막 위로 전사된 단백질의 마이크로 패턴의 크기는 각각 39.9±1.0 ㎛와 90.5±0.9 ㎛로써 오차범위가 2% 이내로 기존의 방법에 비해 현저하게 개선된 결과를 나타냄으로써 단백질이 다층박막 위로 전사되는 것은 확산에 의존하지 않음을 알 수 있었다. 때문에 본 발명은 정량분석을 위한 단백질 칩 혹은 센서의 제작에 매우 중요하게 사용될 수 있는

기술이 될 수 있음을 나타낸다.

<43> <실시예 5> 다양한 표면 위에서의 immuno-assay를 이용한 효율성 비교

<44> 본 발명에서는 고분자 전해질 다층박막의 정전기적 인력을 이용하여 단백질을 고정화하였다. 종래의 기술은 단순 물리적 흡착, 다층이 아닌 단일층의 정전기적 인력, 화학 공유결합에 의한 결합을 이용하여 단백질을 표면에 고정화하는 것이다. 단순 물리적 흡착은 결합력이 매우 약하다는 단점이 있었으며, 결합력만 고려한다면 공유결합에 의한 고정화가 가장 좋은 방법이라고 할 수 있지만, 단백질 칩/센서를 위한 단백질의 고정화는 단순히 단백질을 가장 안정적인 방법으로 고정화하는 것이 목적이라고 할 수 없다. 왜냐하면 단백질을 고정화하는 목적은 고정화된 단백질을 하나의 탐침으로 사용하여 인지물질을 감지하는 것이기 때문이다. 즉 고정화된 단백질과 특이적으로 결합해야 하는 단백질이 나타났을 때, 그 단백질과 결합하여 검출신호를 나타내야 하기 때문이다. 때문에 단백질의 고정화만큼 중요한 것이 고정화된 단백질이 자신의 단백질 활성을 얼마나 유지할 수 있느냐 하는 것이다.

<45> 본 발명에 따라 고정화된 단백질이 활성을 유지하는 정도는 다른 방법 즉 물리적 흡착, 단일층의 정전기적 인력, 공유결합으로 고정화된 단백질과 비교했을 때 매우 우수하다(도 5). 이하, 그 결과를 보다 구체적으로 설명한다.

<46> <5-1> 표면 처리예

<47> 도 5a는 각 표면에 대한 immunoassay 결과의 사진이고, 도 5b는 형광신호의 세기를 분석했을 때 나타나는 형광신호의 세기를 표로 나타낸 것이다. 그리고 고분자 전해질의 다층박막과 비교를 하기 위해 사용된 표면은 처리를 전혀 하지 않은 유리 기판, 아민기가 유도된 기판, 알레하이드가 유도된 기판, 에폭사이드 유도된 기판, 폴리-L-라이신 기판이다.

<48> 아민기를 기질에 도입하는 방법은 다음과 같다. 먼저 슬라이드 글래스를 80℃ 피라나 용액(50%의 H_2SO_4 : 30%의 H_2O_2 = 1 : 4)에 1시간 동안 담지시켜 세척한다. 그리고 나서, 증류수, 에탄올(ethanol) 그리고 아세톤(acetone)에 각각 5분씩 초음파 세척 후 질소로 건조한 뒤에 플라즈마를 20초간 처리함으로써 슬라이드 글래스의 활성화 상태를 좋도록 한 다음 에탄올로 희석시킨 2%의 3-aminopropyl triethoxysilane 용액에 담지시킨 후 상온에서 1시간 반응시켰다. 그리고 나서, 에탄올로 세척한 뒤에 95℃ 오븐에서 30분간 건조시킴으로써 표면에 아민기를 도입시켰다.

<49> 알데하이드기를 기질에 도입하는 방법은 아민기를 도입시킨 표면을 인산완충용액으로 희석시킨 2%의 gutaraldehyde 용액에 상온에서 2시간 담지시킨 후 인산완충용액으로 세척한 뒤 질소로 건조하였다.

<50> 에폭사이드를 기질에 도입하는 것은 다음과 같다. 먼저 유리 기판을 80℃ 피라나 용액(50%의 H_2SO_4 : 30%의 H_2O_2 = 1 : 4)에 1시간 동안 담지시켜 세척하였다. 그리고 나서, 증류수, 에탄올(ethanol) 그리고 아세톤(acetone)에 각각 5분씩 초음파 세척 후 질소로 건조한 뒤에 플라즈마를 20초간 처리함으로써 유리 기판의의 활성화 상태를 좋도록 한 다음 에탄올로 희석시킨 1%의 3-glucidoxypropyltrimethoxysilane 용액에 1시간 동안 담지한 후 에탄올로 3번 세척 해 주었다. 그 후 처리된 표면은 135℃ 오븐에서 2시간 동안 건조되면서 표면처리가 더욱더 안정하게 되도록 하였다.

<51> <5-2> immunoassay

<52> 먼저 immunoassay의 탐침으로 사용된 단백질은 Rabbit IgG(sigma aldrich, I5006)이고 Rabbit IgG의 등전점은 6.1-6.5로써 이 단백질에 적절한 완충용액인 20 mM, pH 7.2 인산완충용액에서 단백질의 알짜 전하는 음전하를 띄게 되므로 마지막 층이 양이온으로 하전된 고분자 박막 위에서 10 ㎍/㎖의 rabbit IgG를 마이크로 컨택트 프린팅 방법으로 고정화시켰다. 또한 고분자 전해질 박막과 비교하기 위해 준비한 다양한 기판 즉 유리기판, 알데하이드가 도입된 기판, 아민기가 도입된 기판, 에폭시가 도입된 기판, 폴리-L-라이신 기판위에도 동일한 방법으로 rabbit-IgG를 고정화하였다. 그리고 나서, 인산완충 용액으로 충분히 세척하여 표면에 안정적으로 고정화된 단백질만 남기고 1%의 BSA 용액을 이용하여 30분간 블록킹 처리하였다. 인산완충용액으로 충분히 세척한 후에 rabbit IgG의 감지 물질인 10 ㎍/㎖의 Goat-anti rabbit IgG-FITC(sigma-aldrich, F9887)와 30분간 반응시킨 후 0.1 wt% PBST(20 mM, pH 7.2)용액으로 충분히 세척하였다. 형광현미경을 통하여 FITC의 형광세기를 관찰함으로써 표면에 고정화된 Rabbit IgG의 밀도와 고정화된 단백질의 활성 정도를 유추해 낼 수 있었다.

<53> 형광세기가 강한 이유는 첫째, 고체 표면 위에 고정화된 단백질의 밀도가 높기 때문이고, 둘째는 고체 표면 위

에 고정화된 단백질의 3차 입체구조가 잘 유지되어서 단백질의 활성이 잘 유지되기 때문에 인지감도가 높은 상태로 유지될 수 있기 때문에 2차 항체와의 결합력이 높기 때문이라고 생각할 수 있다. 형광세기가 가장 낮은 것은 어떠한 처리도하지 않은 유리기판 위에 단백질을 고정화했을 때로서 형광세기가 35.40±0.99로 매우 낮다. 단순 물리적 흡착에 의한 방법으로는 단백질을 고밀도로 고정화시키기 어렵다는 것을 보여주고 있다. 공유결합에 의한 방법으로 단백질을 고정화시키기 위해 사용된 표면은 알데하이드, 에폭사이드로 처리된 표면이다. 알데하이드 표면에서의 형광세기는 80.67±12.22이고 에폭사이드로 처리된 표면 위에서의 형광세기는 80.09±10.61로써 정전기적 인력에 의해 고정된 단백질보다 고밀도로 고정되었지만 고정된 단백질의 3차 입체구조가 유지되기 어려운 조건이기 때문에 Rabbit IgG가 활성을 많이 손실하여 Goat anti-rabbit IgG-FITC와 반응률이 낮아지게 됨으로써 결합량이 비교적 저조하게 된다. 다른 경우에 비해 표준편차가 상대적으로 높은 편인데 이것 역시 고정화된 단백질 중에서 활성을 유지하고 있는 것과 활성을 손상된 것이 무작위로 혼재되어있기 때문에 나타나는 현상이다. 반면에 단백질과 표면이 정전기적 인력에 의해 고정되도록 하기 위해서 제작된 표면인 폴리-L-라이신, 아민(amine) 그리고 고분자 전해질의 다층박막에서는 높은 형광 신호가 나타났다. 이것으로 보아 정전기적 인력에 의한 고정화가 공유결합에 의한 고정화에 비해서 단백질의 고정화 밀도는 낮아지겠지만 활성을 유지하고 있는 단백질의 양은 정전기적 인력에 의한 고정화일 때 더 많다는 것을 알 수 있었다. 그 중에서 고분자 전해질의 다층박막에서 신호세기가 110.20±4.40으로 표준편차도 비교적 작고 형광신호도 가장 좋았다. 이것은 전하를 가지고 있는 표면 단층박막으로 존재할 때 보다는 다층박막일 경우 표면 내에 존재하는 전하의 양이 많기 때문에 고정화 효율이 높기 때문이다.

도면의 간단한 설명

<54> 도 1은 단백질을 고정화하기 위해 기질에 고분자 전해질의 다층박막을 증착함으로 표면처리 하는 방법을 나타낸 것이다.

<55> 도 2는 소프트 리소그래피의 방법으로 PDMS 마이크로 스탬프를 얻는 과정이다.

<56> 도 3은 마이크로 스탬프에 단백질을 도입하여 상기 도 1에서 얻어진 표면 위에 마이크로 컨택트 프린팅 방법을 이용하여 단백질을 고정화하는 방법에 관한 것이다.

<57> 도 4는 본 발명의 고정화 방법을 통해 다층박막 위에 고정화 하였을 때 다층박막의 수에 따라 고정화된 단백질 패턴의 크기를 나타내는 그래프이다.

<58> 도 5a는 다양한 표면과 정전기적 고분자 다층박막 위에서 고정화된 단백질의 탐침으로서의 효율을 비교한 형광 사진이고,

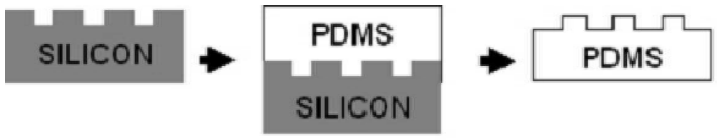
<59> 도 5b는 상기 도 5a의 형광 사진의 형광이미지를 정량 분석한 그래프이다.

도면

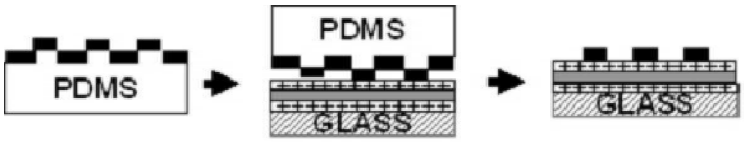
도면1



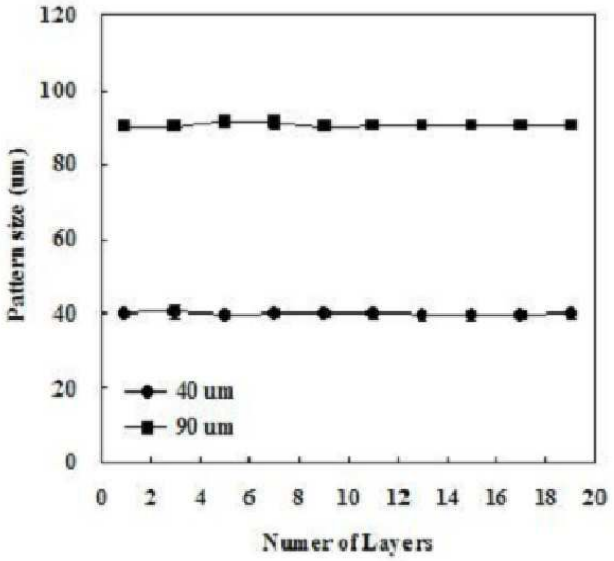
도면2



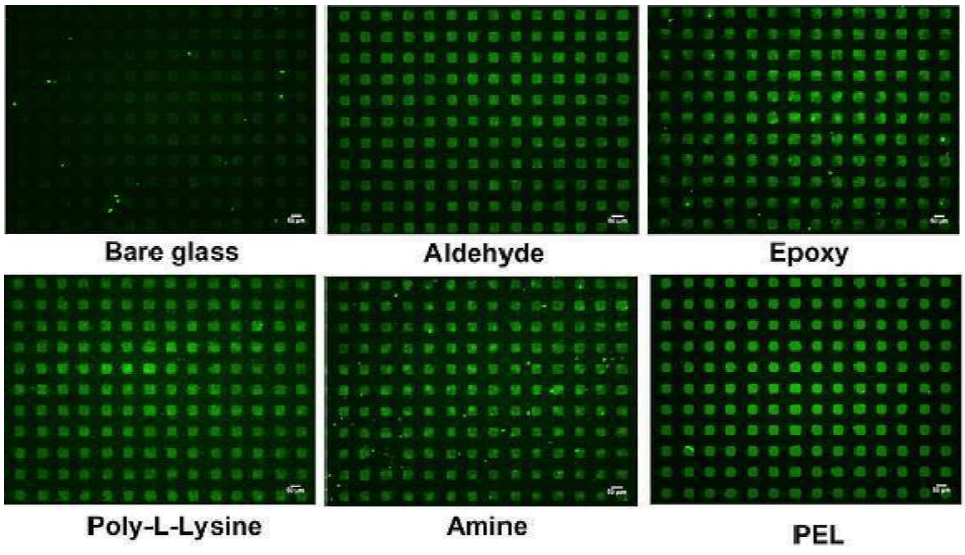
도면3


PDMS
PDMS
GLASS
GLASS

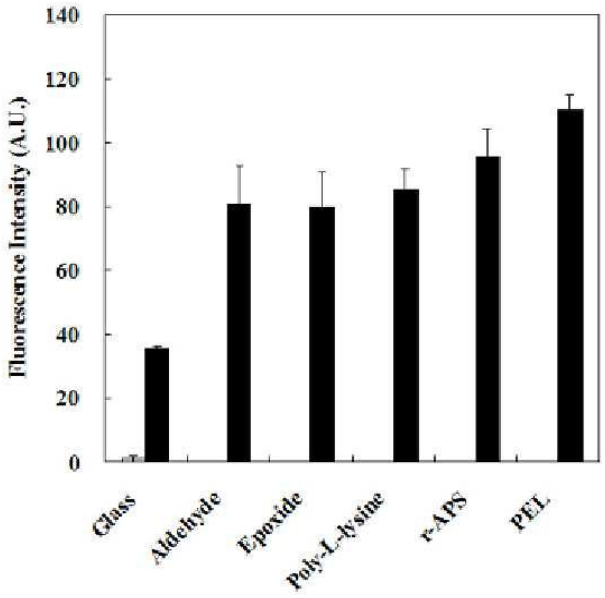
도면4


120
100
80
60
40
20
0
Pattern size (um)
40 um
90 um
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Numer of Layers

도면5a


Bare glass
Aldehyde
Epoxy
Poly-L-Lysine
Amine
PEL

도면5b


Fluorescence Intensity (A.U.)
140
120
100
80
60
40
20
0
Glass
Aldehyde
Epoxide
Poly-L-lysine
r-APS
PEL