(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0111301
(43) 공개일자 2008년12월23일

(51) Int. Cl.
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0059513
(22) 출원일자 2007년06월18일
심사청구일자 2008년04월10일

(71) 출원인
단국대학교 산학협력단
경기도 용인시 수지구 죽전동 126 단국대학교 내
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
피재호
경기도 군포시 산본동 1091-1(31/2) 목련아파트 1241-805
김미경
서울 종로구 구기동 154-3번지 건덕빌라 5-102호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이덕록

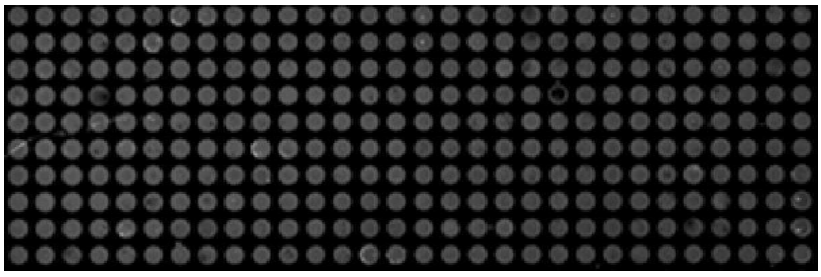
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 단백질 칩용 패턴화 기판과 이를 이용한 항비만 활성평가용바이오마커 단백질 칩 센서의 제작방법 및 그 용도

(57) 요 약

본 발명은 단백질 칩용 패턴화 기판과 이를 이용한 항비만 활성평가용 바이오마커 단백질 칩 센서의 제작방법 및 그 용도에 관한 것으로, 단백질 칩용 기판 제작에 있어서, 특정영역에 아민기를 증착시키고, 나머지 영역은 소수성을 띠도록 하여 기판의 특정 부위에서만 단백질이 고정화되도록 하여 번짐 효과가 현저히 줄어드는 패턴화된 기판을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명은 상기 패턴화된 기판에 비만 관련 바이오마커 항체와 크로스링커를 고정하여 약품 또는 식품 소재의 항비만 활성을 평가할 수 있는 단백질 칩 센서를 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 본 발명의 패턴화된 기판은 최대 수만 개의 단백질을 집적시킬 있어 단백질 활성의 대량분석을 가능케 하는 효과가 있을 뿐만 아니라, 이러한 패턴화된 기판을 이용한 단백질 칩은 종래기술과 비교하여 분석에 필요한 시료의 양을 크게 줄일 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김양하

서울 강남구 삼성1동 래미안삼성1차 아파트 301-405호

박헌용

경기 용인시 수지구 풍덕천동 태영데시앙아파트 101동 1401호

박종봉

경기 용인시 기흥구 마북동 115-2 306호

정동근

서울 강남구 도곡동 464 개포한신아파트 5동 501호

최창록

경기 군포시 군포2동 915-6 미소빌라 4층

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	없음
부처명	산업자원부
연구사업명	지역혁신특성화사업
연구과제명	서울바이오식품산업 혁신기술 네트워크 구축
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2004년 09월 01일 ~ 2007년 06월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

아민기가 코팅되어 있는 단백질 칩용 기판에 있어서,

소수성을 띠는 플라즈마 중합된 사이클로헥산(cyclohexane)을 전구체로 사용하여 플라즈마 화학 기상 증착법에 의하여 기판에 증착하고,

상기 기판의 패턴화를 위하여 섀도 마스크를 올려놓고 다시 한번 에틸렌디아민(ethylenediamine)을 전구체로 이용하여 플라즈마 화학 기상 증착을 하여 특정 영역에 아민기를 선택적으로 증착시키고, 나머지 영역은 소수성을 띠는 패턴화 기판이 되도록 제작함을 특징으로 하는 단백질 칩용 패턴화 기판의 제작방법.

청구항 2

제1항 기재의 방법에 따라 제작되는 단백질 칩용 패턴화 기판.

청구항 3

비만 관련 바이오마커 항체와 크로스링커를 반응시켜 제2항 기재의 패턴화된 기판 위에 고정화시킨 약품 또는 식품 소재의 항비만 활성 평가용 단백질 칩 센서.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 비만 관련 바이오마커는 ATP 결합 카세트 수송물질1(ATP binding cassette transporter 1, ABCA1), 아포지방단백질 E(apolipoprotein E, ApoE), CD36, 카르니틴 팔미토일트랜스퍼라아제 II(Carnitine Palmitoyltransferase II, CPT2), FAS, 섬유아세포 성장인자 10(Fibroblast growth factor 10, FGF10), F1AF, 글루코우즈 전달인자 4(glucose transporter-4, GLUT4), 인슐린 유사 성장인자 타입 1(insulin-like growth factor type 1, IGF-1), 인터루킨 6(Interleukin 6, IL6), 니도겐(Nidogen), 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 감마(peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, PPAR-gamma), 레티노이드 엑스 수용체-알파(retinoid X receptor alpha, RXR-alpha), 전사 신호전달 및 활성인자(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1) 및 혈관내피세포 성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)로 구성됨을 특징으로 하는 약품 또는 식품 소재의 항비만 활성 평가용 단백질 칩 센서.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 크로스링커는 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카보디이미드 하이드로클로라이드(1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride, EDC)임을 특징으로 하는 약품 또는 식품 소재의 항비만 활성 평가용 단백질 칩 센서.

청구항 6

약품 또는 식품 소재를 처리한 세포의 분해물을 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 기재된 단백질 칩 센서 상에 점적하고, 상기 세포분해물과 비만 관련 바이오마커 항체와의 결합 정도를 측정하여, 상기 약품 또는 식품 소재의 항비만 활성을 평가함을 특징으로 하는 약품 또는 식품 소재의 항비만 활성 평가방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<5> 본 발명은 단백질 칩용 패턴화 기판과 이를 이용한 항비만 활성평가용 바이오마커 단백질 칩 센서의 제작방법 및 그 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 단백질 칩의 기판을 제작함에 있어서, 특정영역에 아민기가 선택적으로 증착되고 나머지 영역은 소수성을 띠도록 패턴화 기판을 제작하고, 상기 기판에 비만 관련 바이오마커 항체와 크로스링커가 고정화된 단백질 칩 센서를 이용하여 약품 또는 식품 소재의 항비만 활성을 평가

하는 방법에 관한 것이다.

<6> 인간 게놈 프로젝트의 완료와 더불어 최근 인간의 질병의 원인과 치료 개발에 관한 기반연구가 특정 유전자나 단백질의 기능 분석에 국한하지 않고 수많은 유전자 혹은 단백질에 대해 High Throughput System (HTS) 을 이용한 동시 분석이 많은 연구자에 의해 수행되고 있다. 이렇게 수많은 유전자 혹은 단백질의 동시분석을 수행하는 학문분야의 대상을 유전체(genome), 단백질체(proteome), 생리체 (Physiome)라 부르고 이들을 연구하는 연구 분야를 유전체학, 단백질체학, 생리체학이라 한다. 이와 같이 다량의 단백질 혹은 유전자에 관한 연구가 HTS 분석법에 의하여 수행됨에 따라 새로운 초고속대량(high-throughput) 분석 방법의 개발이 필요하게 되었다.

<7> 유전체를 연구하는 데에 사용되는 DNA 칩은 이미 상용화가 많이 되어 있어, 새로운 DNA 칩의 개발에 대한 연구의 필요성이 비교적 적으나, 단백질 칩의 경우 상용화된 예가 매우 적고, 다양한 응용이 이루어질 여지가 매우 커서 이에 대한 연구가 더욱 요구되고 있다. 또한 원천적으로 단백질은 생리활성 기능을 나타내는 다양한 화학작용기가 있는데 이러한 작용기의 구조를 유지하는 것이 특정 조건에 한정되어있다. 이처럼 단백질은 구조적으로 안정성이 매우 약하기 때문에 단백질 칩의 개발 자체가 DNA 칩에 비해 매우 까다로우며 따라서 단백질 칩의 개발은 매우 느리게 진행되고 있는 실정이다. 이처럼 단백질은 구조적으로 안정성이 매우 약하기 때문에 단백질 칩의 개발은 DNA 칩에 비해 매우 까다로우며 따라서 매우 느리게 진행되고 있는 실정이다.

<8> 지금까지 진행되어온 단백질 칩에 관한 최신 기술은 다음과 같이 크게 네 가지로 분류할 수 있다:

<9> 첫째, 칩 상에서 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 이중가닥 올리고뉴클레오티드로 전환시킨 후, 다시 특정 DNA 서열에 특이적인 제한효소를 반응시켜 절단유무를 통해 DNA-단백질 상호작용을 검사함으로써 새로운 DNA 결합단백질을 발굴하고 그 특성을 밝혀내는 것이다.

<10> 둘째, 제한효소, 페록시다제 등의 효소 및 항원-항체반응을 칩 상에서 분석하는 기술이다(미국특허공개 제2002/0055186호, 대한민국 특허출원 제2003-0000464호, 대한민국 특허출원 제2002-65924호). 단백질-단백질 상호작용, 키나아제-펩타이드 기질 반응, 단백질-리간드 결합반응을 통해 대량검색, 생화학적 분석, 신약 후보물질 분석, 질병 진단 등에 응용될 수 있다. 그러나, 항원-항체 반응의 경우 항체의 60%만이 정량적인 결과를 나타냈고 단지 23%만이 정성적인 결과를 나타냈다고 보고되어 있다.

<11> 셋째, cDNA 라이브러리로부터 대량의 단백질을 칩 상에서 발현하여 분석하는 기술로 단백질의 생화학적 활성에 대한 대량검색에 유용하다.

<12> 넷째, 친화성 태그를 이용하여 생체분자의 배향성을 분자수준에서 조절하면서, 균일하고 안정된 생체분자의 단일층을 칩 표면에 형성시키는 기술을 이용하여 시료를 분석하는 기술이다(미국특허공개 제2002/0055125호).

<13> 그러나, 분자량이 작은 펩타이드를 이용한 단백질 칩 기술은 펩타이드와 상호작용하는 거대분자(효소 및 항체)에 대한 공간적이고도 구조적인 문제로 고정화된 펩타이드와 반응물질 간의 상호작용이 어렵고, 형광체로 표지된 항체를 이용하여 반응의 유무를 검출하는데 제한점이 많아 실용화가 어렵고, 펩타이드를 칩 위에 고정하기 위해서는 높은 농도가 요구되어 경제성이 떨어지는 단점이 있다.

<14> 한편, 표면 플라즈몬 공명 센서 기술은 단백질과 같은 생체물질이 센서 표면에 결합될 경우 신호 변화를 일으키는 현상을 이용하여 바이오센서 및 바이오칩 측정방법으로 많이 이용되고 있다. 그러나, 종래의 표면 플라즈몬 공명 바이오센서는 낮은 농도의 생체물질을 분석하기에는 그 감도가 떨어지는 문제점이 있어 이를 해결하고자 하는 연구들이 진행되고 있다(대한민국 특허출원 제2003-90410호).

<15> 이에, 본 발명자들은 이러한 단백질 칩 개발에 대한 시대적 필요성에 발맞추어, 단백질 칩 개발의 난점으로 지적되고 있는 단백질의 기판고정화를 효율적으로 수행할 수 있는 기술과 이를 천연 소재의 활성 평가에 적용하고자 본 발명을 안출하였다.

<16> 따라서, 본 발명의 목적은 단백질 칩에서 단백질 고정화의 집적도를 높이는 방법을 제공하고자 한다.

<17> 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질 고정화의 집적도를 높인 단백질 칩을 이용한 초고속대량(high-throughput) 진단 방법을 통해 약품 또는 식품 소재에 대한 항비만 활성을 평가하는 단백질 칩 센서를 제공하고자 한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<18> 본 발명의 상기 목적은 소수성을 띠는 플라즈마 중합된 사이클로헥산(cyclohexane)과 에틸렌디아민을 각각 전구체로 사용하여 플라즈마 화학 기상 증착법에 의하여 기판에 증착하여 특정 영역에 아민기를 선택적으로 증착시키고 나머지 영역은 소수성을 띠는 패턴화된 기판이 되도록 제작하고, 비만 억제 물질을 섬유아세포에 처리하여

배양 후 분쇄하여 얻은 세포분해물의 단백질과 크로스링커를 반응시켜 상기 기판의 아민기 영역에 고정화시키고, 비만을 진단할 수 있는 단백질의 1차 항체와 2차 항체를 상기 기판에 처리하여 반응시킨 다음 스캐닝하여 사진을 얻고, 종래의 상용화 기판에도 상기의 방법과 동일하게 단백질을 고정하여 본 발명의 패턴화된 기판의 실험결과와 비교하고, 단백질 칩과 ELISA 방법을 통해 얻은 분석결과를 비교하여 분석실험의 정확도를 확인하고, 상기 패턴화된 기판에 비만 관련 바이오마커 항체와 크로스링커가 고정화된 단백질 칩 센서를 제작함으로써 달성하였다.

발명의 구성 및 작용

<19> 본 발명은 소수성을 띠는 플라즈마 중합된 사이클로헥산(cyclohexane)과 에틸렌디아민을 이용하여 특정 영역에 아민기가 선택적으로 증착되고 나머지 영역은 소수성을 띠는 패턴화된 기판을 제작하는 단계; 상기 패턴화된 기판의 아민기 영역에 단백질을 고정화 및 검출하는 단계; 종래의 상용화 기판과의 비교실험 단계; 상기 기판으로 된 단백질 칩과 ELISA 방법을 통해 얻은 분석결과를 비교하는 단계; 및, 상기 패턴화된 기판에 비만 관련 바이오마커 항체와 크로스링커가 고정화된 단백질 칩 센서의 제작단계로 구성된다.

<20> 본 발명의 일차적인 특징은 단백질 칩 제작시 단백질의 기판고정화를 효율적으로 수행할 수 있도록 기판의 국소부위에 단백질이 부착될 수 있는 특이적인 작용기(functional groups)로 코팅하는 기판의 패턴화와 이를 통해 기판의 특정부위에만 단백질을 부착시킬 수 있도록 하는 기술을 제공한다. 또한 단백질이 고정화되는 부위 이외에는 소수성을 띄는 다른 작용기를 코팅함으로써 단백질을 용해하고 있는 수용액이 정치하지 못하게 하여 단백질의 고정화가 특이적 장소에서만 효율적으로 일어나도록 패턴화된 단백질 칩용 기판을 제공한다. 이렇게 패턴화된 기판은 단백질을 수용액 상태에서 고정화시킬 때, 특정부위에만 단백질 용해액이 정치하므로 단백질이 비특이적으로 아무 곳이나 부착되는 번짐 효과를 줄일 수 있다. 이는 미량(경우에 따라서는 수 ㎕(마이크로리터) 정도)의 단백질 용액으로 실험이 수행되는 HTS 실험에서 그 효율성이 매우 크다. 스팟(Spot)과 스팟 사이의 간격이 매우 좁은 경우 번짐 효과는 실험 자체의 성패를 좌우할 만큼 중요한 요인이기 때문이다.

<21> 따라서, 본 발명은 소수성을 띠는 플라즈마 중합된 사이클로헥산(cyclohexane)을 전구체로 사용하여 플라즈마 화학 기상 증착법에 의하여 기판에 증착하고,

<22> 상기 기판의 패턴화를 위하여 섀도 마스크를 올려놓고 다시 한번 에틸렌디아민(ethylenediamine)을 전구체로 이용하여 플라즈마 화학 기상 증착을 하여 특정 영역에 아민기를 선택적으로 증착시키고, 나머지 영역은 소수성을 띠는 패턴화 기판이 되도록 제작되는 단백질 칩용 패턴화 기판의 제작방법을 제공함을 특징으로 한다.

<23> 본 발명의 상기 기판은 항체 단백질 및 항원 단백질의 부착이 가능하다.

<24> 본 발명의 단백질 칩을 이용한 방법은 종전의 기술보다 분석에 필요한 시료의 양을 크게 줄일 수 있고, 최대 수만개의 시료를 기판 위에 고정화시킬 수 있기 때문에 대량 분석이 가능하다.

<25> 본 발명의 다른 특징은 비만 관련 바이오마커 항체와 크로스링커를 반응시켜 본 발명의 패턴화된 기판 위에 고정화시킨 약품 또는 식품 소재의 항비만 활성 평가용 단백질 칩 센서를 제공함을 특징으로 한다.

<26> 상기 크로스링커는 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카보디이미드 하이드로클로라이드(1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride, EDC)임을 특징으로 한다.

<27> 상기 기판에 고정화되는 비만 관련 바이오마커는 ATP 결합 카세트 수송물질1(ATP binding cassette transporter 1, ABCA1), 아포지방단백질 E(apolipoprotein E, ApoE), CD36, 카르니틴 팔미토일트랜스퍼라아제 II(Carnitine Palmitoyltransferase II, CPT2), FAS, 섬유아세포 성장인자 10(Fibroblast growth factor 10, FGF10), F1AF, 글루코우즈 전달인자 4(glucose transporter-4, GLUT4), 인슐린 유사 성장인자 타입 1(insulin-like growth factor type 1, IGF-1), 인터루킨 6(Interleukin 6, IL6), 니도겐(Nidogen), 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 감마(peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, PPAR-gamma), 레티노이드 엑스 수용체-알파(retinoid X receptor alpha, RXR-alpha), 전사 신호전달 및 활성인자(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1) 및 혈관내피세포 성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)로 구성됨을 특징으로 한다.

<28> 상기 바이오마커는 비만 예방 혹은 개선의 효능이 있는 것으로 알려진 몇 개의 약물 혹은 식품 소재를 섬유아세포에 처리한 후, 변화가 유의적으로 관찰된 몇 개의 단백질들을 ELISA 방법으로 검출하여 선발되며, 상기 비만 관련 단백질로 구성된 바이오마커에 대한 항체를 본 발명의 패턴화된 기판 위에 부착하여 항비만 활성 평가용 단백질 칩 센서를 제작한다.

<29> 본 발명의 다른 특징은 패턴화된 기판 위에 비만 관련 바이오마커 항체와 크로스링커를 고정화시킨 단백질 칩 센서 상에, 약품 또는 식품 소재를 처리한 세포의 추출물을 점적하고, 상기 세포추출물과 비만 관련 바이오마커 항체와의 결합 정도를 측정하여, 상기 약품 또는 식품 소재의 항비만 활성을 평가함을 특징으로 하는 약품 또는 식품 소재의 항비만 활성 평가방법을 제공함을 특징으로 한다.

<30> 이하 본 발명의 실시예를 기재한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<31> [실시예]

<32> **실시예 1: 단백질 고정용 기판의 제조**

<33> 플라즈마 중합된 패턴화된 기판을 제작하기 위해 사이클로헥산(cyclohexane)과 에틸렌디아민(ethylenediamine)을 유도 결합형 화학 기상 증착법을 이용하여 75㎜ × 25㎜ 크기의 유리기판(Corning Microslide Plain, Cat#: 2947, Corning, NY) 위에 증착하였다. 증착 챔버는 원통형의 모양을 가진 스테인리스 재질의 챔버로, 챔버의 직경과 높이는 각각 30cm와 28cm이다. 사이클로헥산 단량체(monomer)는 45℃로 가열된 거품기(bubbler)에, 에틸렌디아민 단량체는 50℃로 가열된 거품기에 각각 넣어 사용하였다. 각각의 거품기 안에는 불활성 알곤기체를 이동가스(carrier gas)로 사용하여 증기화시킨 다음 증착 챔버 내로 유입시켰다. 유도 결합형 플라즈마(ICP)는 원형의 코일이 결합된 라디오 주파수를 가지는 발생기(rf generator)를 통하여 샤워(shower) 링 주위에 발생시켰다. 슬라이드 전압 파워(SB power)는 라디오 주파수를 갖는 발생기를 슬라이드 기판 용기(holder)에 부착하여 슬라이드 주위에 플라즈마를 생성시켰다. 이때 증착 챔버 벽면은 접지시켰다. 유리기판은 증착 챔버에 넣기 전에 트리클로로에틸렌(trichloroethylene), 아세톤(acetone), 메탄올(methanol) 순으로 용매를 사용하여 초음파 세척하였고 이 후 초순수 물로 씻은 후에 사용하였다.

<34> 먼저, 소수성을 띠는 플라즈마 중합된 사이클로헥산(PPCHex)을 증착하기 위해 먼저 챔버의 압력은 로터리 펌프를 이용하여 ~10^{-3} torr 정도로 기본 압력을 맞추었다. 증착시, 알곤 기체의 흐름비는 MFC(mass flow controller)를 이용하여 20 sccm을 유지시켰고 이때의 증착 조건으로 기판온도는 상온에서 압력을 200 mtorr로 맞춘 뒤 30초간 증착하였다. 이 후 패턴화된 섀도 마스크를 상기 기판에 부착시킨 후, 진공 펌프를 이용하여 ~10^{-5} torr 정도를 챔버의 기본 압력으로 유지시켰다. 증착 시 기판온도는 상온으로 유지시켰고 알곤 기체 흐름비율은 15 sccm을 유지시킨 30 mtorr에서 2분간 증착하였다. 이 후 증착 챔버에서 기판을 꺼낸 뒤, 섀도 마스크를 제거하여, 특정 부분에만 작용기(아민기)를 가지고 나머지 영역은 소수성을 띄는 패턴화된 기판을 제작하였다.

<35> **실시예 2: 패턴화된 기판에서 단백질의 고정 및 검출**

<36> 상기 실시예 1에서 제작한 패턴화된 기판에 단백질을 고정화하고, 고정된 단백질을 검출하였다. 이를 위한 단백질 시료는 다음과 같이 준비하였다.

<37> 섬유아세포(fibroblast cell) 3T3 L-1을 포도당(glucose) 4.9g과 10% FBS(Fetal bovine calf serum)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배양액에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. 비만기능과 관련된 바이오마커를 선발하기 위하여 위의 배양조건에서 항비만 효과가 있는 식품소재군을 처리한 세포와 처리하지 않은 대조군의 세포분해물을 획득하여 두 실험군 사이에 발현량의 변화가 관찰되는 단백질들을 먼저 선발하였다. 비만억제 효과가 있는 것으로 알려진 약품 및 식품소재는 녹차추출물에서 분리한 EGCG, 에피네프린, 마늘 추출물을 사용하였다. 구체적으로 EGCG는 섬유아세포가 배양접시에서 80%이상 자랐을 때 최종농도 15㎛M로 처리한 후, 16시간 동안 추가로 배양기 안에서 배양하였다. 이렇게 배양한 세포들은 세포가 배양접시 상에서 90% 이상 자랐을 때 배양액을 제거하고 이를 따뜻한 PBS로 2번 이상 세척한 다음 소량(100㎖-배양접시 당 250㎕)의 PBS를 넣은 뒤 스크랩퍼(scraper)를 사용하여 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 초음파분쇄기를 이용하여 분쇄하여 세포분해물을 얻었다. 이후 세포분해물의 단백질을 정량한 후, 총 단백질을 사용하여 단백질 칩 실험을 수행하였다.

<38> 섬유아세포 분해물을 기판에 고정화하기 전에 크로스링커인 EDC를 최종 농도 1㎎/㎖로 섬유아세포 분해물 최종 농도 0.75㎎/㎖와 상온에서 10분간 반응시켰다. 이렇게 섬유아세포 분해물과 크로스링커의 결합물을 기판 위에 일정한 패턴으로 코팅되어 있는 아민기에 0.5㎕씩 고정화시켰다. 기판 위에 확실한 고정화를 위해서 4℃ 냉장실에서 16시간 동안 반응시키거나 상온에서 1~2시간 반응시켰다. 이렇게 기판 위에 고정화 후에 피펫맨을 사용하여 잔류하는 반응물을 제거한 뒤 3차 증류수로 남은 반응물을 깨끗이 씻어내었다. 다음으로 비만을 진단할 수

있는 여러 1차 항체들을 섬유아세포 분해물 고정화 지점에 각각 반응시켰다. 상온에서 1시간 1차항체를 반응시킨 후 섬유아세포 분해물을 제거한 방식과 동일하게 1차 항체도 깨끗이 제거하였다. 그 후 기판을 분석하기 위해서 형광물질이 표지된 2차 항체를 1차 항체와 반응시켰다. 이때 사용한 2차 항체는 FITC, TRITC와 같은 형광물질이 표지된 2차 항체를 사용하였다. 2차 항체의 반응은 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후, 피펫맨을 이용하여 잔류하는 2차 항체를 제거하였다.

<39> 1차 항체의 사용량은 항체와 완충용액 PBS 비율을 1:100으로 희석한 후 0.5㎕를 사용하였고, 2차 항체의 경우에는 항체와 PBS 비율을 1:200으로 희석한 후 0.5㎕를 사용하였다. 1차 항체들을 구입한 제조회사를 괄호 안에 기재하여 소개하면, STAT1(abcam), VEGF(abcam), Nidogen1(abcam), PPAR-gamma(abcam), GLUT4(abcam), IL6(abcam), RXR-β(abcam), IGF(Santa cruz Biotechnology), apoE(Santa cruz Biotechnology), FGF10(Santa cruz Biotechnology), ABCA1(NOVUS Bioligicals), FAS(NOVUS Bioligicals), CD36(BD Pharmingen), CPT2(Alpha Diagnotic Intl Inc.), FIAF(Biovision Inc.)와 같다. 2차 항체의 제조회사는 1차 항체를 생산한 동물에 따라 적합한 것을 사용하였고, 2차 항체의 제조회사를 괄호 안에 기재하여 보면, Mouse anti-Goat Ig FITC Conjugate(Upstate), Rabbit anti-Mouse Ig FITC Conjugate(Upstate), Goat anti-Rabbit Ig FITC Conjugate(Upstate)와 같다.

<40> 도 2b에 기판 위에 순차적으로 결합되어 있는 단백질의 결합형태를 보여주는 모식도를 나타내었다. 결과를 확인하기 위해 마이크로어레이 스캐너(Microarray Scanner: ScanArray Express, Perkin Elmer)로 기판을 스캐닝하여 기판의 사진을 얻었다.

<41> 비교실험예 1: 본 발명 패턴화된 기판관 상용화 기판 제품과의 비교 실험

<42> 상기 실시예 1에서 제작된 본 발명 패턴화된 기판의 실험적 우수성을 판단하기 위하여 시중에 판매되고 있는 아민기가 코팅되어 있는 단백질 칩 실험용 기판과 비교실험을 수행하였다. 실험 방식은 두 기판에서 모두 동일조건으로, 실험 방법은 상기 실시예 2와 같이 수행하였다.

<43> 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 패턴화된 기판을 사용하였을 때 신호의 S/N 비율(신호 대 잡음비, signal-to-noise ratio)이 기존의 다른 회사에서 제작한 아민 기판을 사용한 경우보다 높았는데 이는 본 발명의 패턴화 기판이 타 기판에 비해 부착된 단백질의 검출에 보다 적합함을 의미한다. 즉 본 발명의 패턴화된 기판은 단백질 칩기판으로 사용하기에 검출효과 면에서 그 질이 보다 우수하게 향상되었음을 보여주고 있다. 또한 본 발명의 패턴화된 기판은 단백질이 고정된 국소부위에 선택적으로 1차 항체와 2차 항체가 결합함으로써 번짐 효과가 확연히 줄어들었다.

<44> 비교실험예 2: 단백질 칩과 ELISA 분석 결과의 비교

<45> 본 발명의 패턴화된 기판을 사용한 실험의 정확성을 판단하기 위해서 기존의 ELISA 방법으로 실험한 결과와 비교하였다. 도표를 나타내기 위해서 패턴화된 기판의 스캐닝 데이터를 이미지화 분석 프로그램(Alphaimager2200)을 이용하여 마이크로어레이 패턴화 분석을 하였다. 도 4는 대조군에 대한 실험군의 차이를 Fold 형식으로 나타낸 것이다.

<46> 도 4에 나타난 바와 같이, ELISA 방법과 단백질 칩을 사용한 방법의 결과가 상당히 유사함을 알 수 있다.

<47> 이 결과를 통하여 본 발명에 사용된 단백질 칩과 실험 방법은 약품 또는 식품 소재의 항비만 활성 진단용으로 사용하기에 충분하다는 것을 알 수 있다.

<48> **실시예 3: 비만 관련 바이오마커 항체가 고정된 단백질 칩 센서의 제작**

<49> 상기 실시예 1과 2로부터 본 발명 패턴화된 기판은 시료 분석시 번짐 효과가 현저히 감소하는 등 진단용으로 사용하기에 적당함을 확인한바 본 실시예에서는 비만 관련 단백질의 항체를 실시예 1에서 제작된 기판에 고정시켜 약품 또는 식품 소재의 항비만 활성을 평가할 수 있는 단백질 칩 센서를 제작하였다.

<50> 비만 관련 단백질로는 ATP 결합 카세트 수송물질1(ATP binding cassette transporter 1, ABCA1), 아포지방단백질 E(apolipoprotein E, ApoE), CD36, 카르니틴 팔미토일트랜스퍼라아제 II(Carnitine Palmitoyltransferase II, CPT2), FAS, 섬유아세포 성장인자 10(Fibroblast growth factor 10, FGF10), F1AF, 글루코우즈 전달인자 4(glucose transporter-4, GLUT4), 인슐린 유사 성장인자 타입 1(insulin-like growth factor type 1, IGF-1), 인터루킨 6(Interleukin 6, IL6), 니도겐(Nidogen), 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 감마(peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, PPAR-gamma), 레티노이드 엑스 수용체-알파(retinoid X receptor alpha, RXR-alpha), 전사 신호전달 및 활성인자(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)

및 혈관내피세포 성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)을 선정하여 이들 각각에 특이적인 항체들을 실시예 2의 방법에 따라 기판의 아민기 영역에 고정시켰다. 기판에 고정시킨 항체는 항체와 완충 용액의 부피 비율을 1:100으로 제조하여 아민기에 0.5㎕씩 고정시켰다.

<51> 상기 단백질 항체들이 기판에 고정화하는 능력을 향상시키기 위해 크로스링커인 EDC를 상기 항체들과 반응시킨 다음 기판에 고정하였다.

발명의 효과

<52> 상기 실시예와 실험예를 통해 살펴본 바와 같이, 본 발명은 단백질 칩용 패턴화 기판과 이를 이용한 항비만 활성평가용 바이오마커 단백질 칩 센서의 제작방법 및 그 용도에 관한 것으로, 단백질 칩용 기판 제작에 있어서, 특정영역에 아민기를 증착시키고, 나머지 영역은 소수성을 띠도록 하여 기판의 특정 부위에서만 단백질이 고정화되도록 하여 번짐 효과가 현저히 줄어드는 패턴화된 기판을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한, 본 발명은 상기 패턴화된 기판에 비만 관련 바이오마커 항체를 크로스링커로 고정화하여 비만 개선 및 예방용 약품 또는 식품 소재의 검색 및 항비만 활성을 평가할 수 있는 단백질 칩 센서를 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 본 발명의 패턴화된 기판을 이용한 단백질 칩은 종래기술과 비교하여 분석에 필요한 시료의 양을 크게 줄일 수 있고, 최대 수 만개의 시료를 기판 위에 고정화시킬 수 있어 대량분석이 가능케 하므로 비만 개선 및 예방에 뛰어난 유용한 소재의 검색을 위한 도구로 응용될 수 있는 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 본 발명에 사용한 플라즈마 중합된 사이클로헥산(PPCHex, plasma polymerized cyclohexane)과 플라즈마 중합된 에틸렌디아민(PPEDA, plasma polymerized ethylenediamine)으로 패턴화된 기판으로 된 단백질 칩(PPCHex+PPEDA patterned protein chip)을 도시한 것이다.

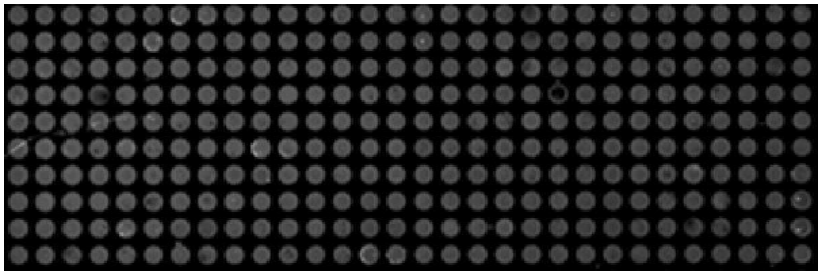
<2> 도 2는 단백질을 기판 위에 고정화시킨 뒤 형광 스캐너로 스캐닝한 사진도(a)와 이의 고정화 방식을 간단히 도식화한 것(b)을 나타낸 것이다.

<3> 도 3은 본 발명의 패턴화된 기판과 종래 기판과의 비교 실험 결과를 나타낸 것이다.

<4> 도 4는 ELISA 실험결과를 Fold 형식으로 나타낸 도표(a)와 단백질 칩 실험결과를 Fold 형식으로 나타낸 도표(b)를 나타낸 것이다.

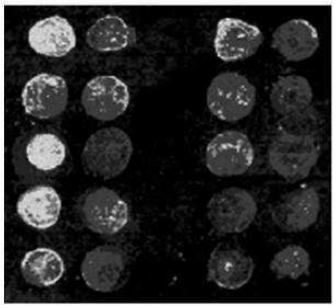
도면

도면1

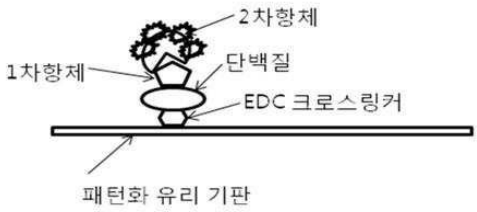


도면2

(a)

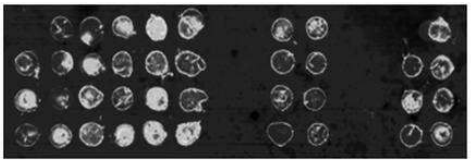


(b)

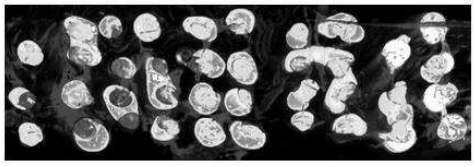


도면3

a) 본 발명에 사용한 패턴화된 단백질 칩

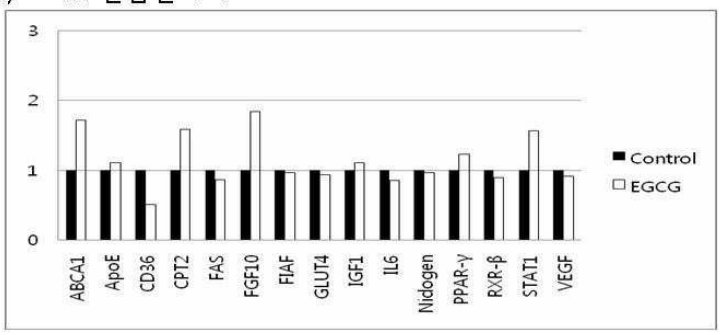


b) 상업화 되어있는 기판



도면4

a) ELISA 실험결과의 도표



b) 단백질 칩 실험 결과의 도표

