

## Construction and Patterning of the biospecific affinity surfaces on gold using dendrimer

홍미영, 윤현철, 김학성

한국과학기술원 생물과학과

전화 (042) 869-2656, FAX (042) 869-2610

### Abstract

We constructed a biospecific affinity surface using hyper-branched dendrimers on gold for biospecific recognition, and characterized the resulting surfaces by using confocal fluorescence microscopy. The dendrimer monolayer was firstly constructed on the mercaptoundecanoic acid SAM/Au with pentafluorophenyl ester activation and further functionalized with sulfo-NHS-biotin, an activated ester of biotin. To confirm the formation of biospecific affinity surface, FITC(fluorescein isothiocyanate)-labeled avidin was loaded onto the biotinylated dendrimer monolayer, and fluorescence images of the bound avidins were investigated with a confocal microscope. The constructed biospecific affinity surface showed a much more dense and uniform fluorescence compared to those from poly-L-lysine- and cystamine SAM-based affinity surfaces. For the dependency on the concentration of added FITC-labeled avidin on the affinity surface, derived fluorescence could be detectable from as low as  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ , and intensified up to  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ . Further reaction of FITC-labeled avidin layer with TMR(tetramethylrhodamine)-biocytins resulted in the efficient FRET(fluorescence resonance energy transfer) phenomenon. As an extension of the study, we attempted a patterning of the affinity surfaces on gold by microcontact printing. Fluorescence of the patterned surface demonstrated that FITC-labeled avidin molecules were specifically bound to the biotinylated patches.

### 1. 서론

모든 생명현상의 발생 및 분화는 단백질-단백질, 단백질-리간드, 리셉터-리간드, 항원-항체, 효소-기질, 단백질-DNA 등의 기능적인 상호작용에 의해 조절되어진다. 이러한 생체분자의 상호작용을 분자 수준에서 효과적으로 탐색(screening), 규명(identification)하기 위해 다수의 서로 다른 단백질이나 리간드 등을 고체(금속, 유리 등)에 마이크로어레이(microarray) 상태로 고정화시키는 기술과 상호작용을 보이는 생체분자를 찾아낼 수 있는 고감도의 신속한 분석 기술(형광 분석기, SPR(surface plasmon resonance), 질량 분석기 등)의 개발이 요구되어진다.

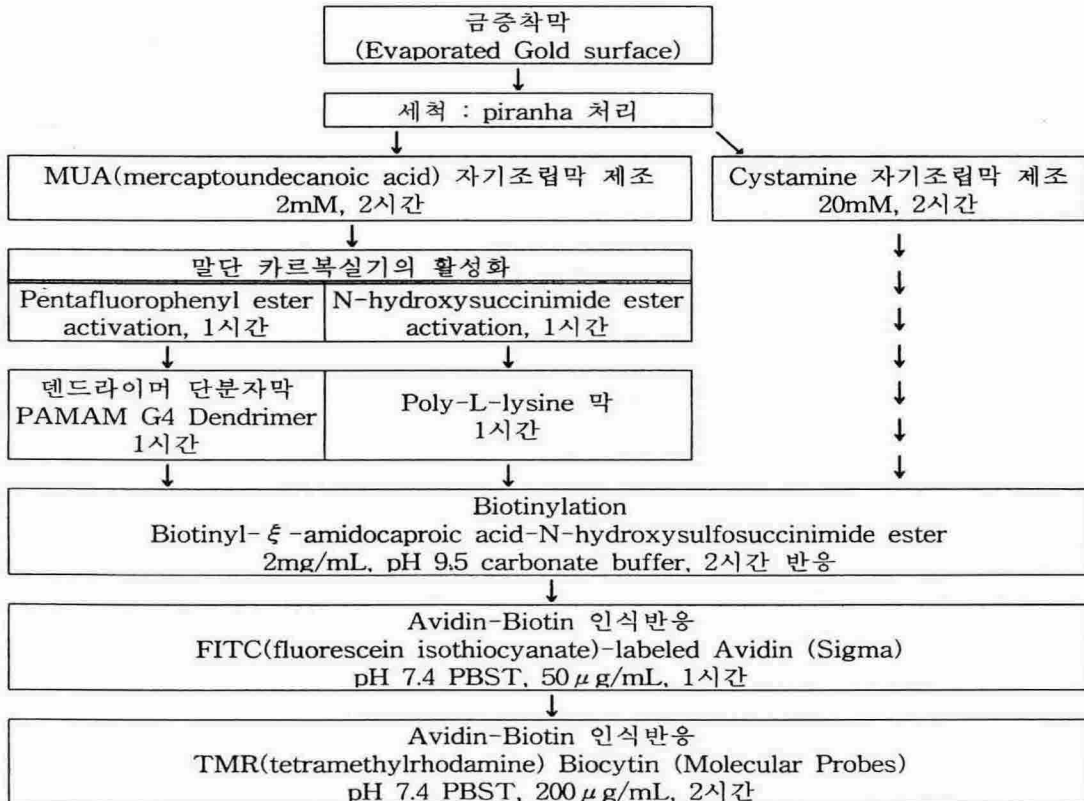
이상적인 생체분자의 고정화는 생체분자를 불활성시키거나 인식부위의 변형을 초래하지 않는 반응을 통해 고체 표면의 활성반응기가 생체분자 구조의 일부와 효과적으로 반응하여 고밀도로 집적된 분자층을 형성할 수 있어야 한다. 본 연구에서는 avidin-biotin 쌍을 표지물질로 채용하고 덴드라이머로 구성된 전극 표면에서 생체분자의 효율적인 고정화 및 인식반응(affinity reaction)이 이루어짐을 확인하고자 하며<sup>1,2)</sup>, 이 개념을 발전시켜 항체 마이크로어

레이의 제작 및 생체분자의 패턴을 구현하는데 활용하고자 한다. 인식표면은 자기조립박막(SAM) 기술에 기초한 덴드라이머 단일막 구성방법을 적용하여 구현하였으며, 표면 분석을 위하여 형광물질로 표식된 avidin을 반응시켜 칩 표면의 형광신호를 측정하거나<sup>3)</sup>, avidin과 biotin을 FRET(fluorescence resonance energy transfer)이 일어나는 형광물질 쌍으로 표식하여 분자인식반응에 의한 FRET의 측정을 이용하였다<sup>4)</sup>.

그리고 다수의 서로 다른 단백질이나 리간드를 수  $\text{cm}^2$  넓이의 칩 표면에 고정화시키기 위해서는 생체분자의 마이크로어레이를 제작하는 기술이 요구된다. 본 연구에서는 PDMS(polydimethylsiloxane) elastomer 스탬프에 덴드라이머를 입혀 칩 표면에 printing 하는 microcontact printing( $\mu\text{CP}$ ) 기법을 이용하여  $100 \times 100 \mu\text{m}$ ,  $50 \times 50 \mu\text{m}$  크기의  $4 \times 4$  구조인 어레이를 제작하였다<sup>5)</sup>. 여기에 형광물질로 표식한 생체분자를 반응시켜 생체분자의 마이크로어레이를 제작하고 형광현미경을 통해 확인하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 인식표면의 구성



### 2. 생체분자의 마이크로어레이 제작

패턴이 형성된 크롬마스크(chrome mask)를 제작하고 photoresist 작업을 통하여 마이크로어레이의 원형인 마스터를 제작하였다. 이 마스터의 입체면에 PDMS prepolymer를 부어  $70^\circ\text{C}$

진공건조기에서 경화시켜 microcontact printing용 스탬프를 제작하였다.

PDMS 스탬프의 돌출면에 텐드라이머 에탄올용액을 입히고 건조시킨 후 II-1의 과정에서 pentafluorophenyl ester로 활성화시킨 금전극 상부에 프린팅하여(정치, 20분) 반응시켰다. 이외의 과정은 동일하게 수행하여 최종적으로 생체분자의 마이크로어레이를 제작하였다.

### 3. 측정

형광분석기 : Confocal Laser Scanning microscope (LSM510, Carl Zeiss Co., Ltd.)  
Fluorescence Microscope (Olympus BX40)

## III. 결과 및 고찰

### 1. 인식표면의 구조 요소에 따른 생체분자의 고정화반응

현재 생체분자의 고정화는 주로 합성고분자, 자기조립단분자막(SAM), LB막(Langmuir-Blogett bilayer)으로 변형된 고체(금속, 유리 등)표면에 공유, 정전기, 소수성 결합 등을 통해 이루어지고 있다. 본 연구에서는 고밀도의 균일한 avidin 단분자막의 제조에 적합한 구조 요소를 정하기 위해 biotin화 반응에 유리한, 즉 biotin-NHS에 대한 반응성이 높은 아민기를 가지는 물질을 인식막 구성의 후보물질로 선정하였다. 이를 위하여 화학흡착(chemisorption)에 의해 자기조립단분자막을 이루며 말단이 아민기로 이루어진 cystamine, 고분자의 망쇄구조에서 노출되는 많은 아민기를 가진 poly-L-lysine과 방사상의 다공성 구조이며 한 분자당 균일한 숫자의 아민반응기를 가진 poly(amidoamine) 텐드라이머를 각각 채용한 인식막을 제작하여 avidin의 고정화 효율을 비교해 보았다.

텐드라이머 단일막으로 형성된 전극을 biotin과 FITC로 표식된 avidin(FITC-labeled avidin)으로 순차적으로 반응시켰을 때, FITC에 의한 녹색 형광이 고밀도의 균일한 점 상(spotted image)으로 관찰되었다. 반면, 활성화된 SAM에 공유 결합시킨 poly-L-lysine층의 아민기는 반응성이 텐드라이머에 비해 15% 수준이었으며, cystamine 자기조립막의 아민기는 biotin화가 저조하게 일어나 반응성이 거의 없는 것으로 나타났다. 이로써 텐드라이머는 생체분자의 단분자막 제조에서 높은 고정화 효율 및 균일성을 보여 인식표면의 구성요소로 바람직한 것으로 나타났다.

### 2. Avidin 처리농도에 따른 고정비율

분자간 인식부위의 결합으로 일어나는 avidin-biotin 반응은 높은 결합상수 ( $10^{-15}$ M)를 가져 낮은 농도에서도 처리시간에 따라 고정량은 증가하게 된다. 여기에서는 FITC-labeled avidin 반응시간을 1시간으로 고정하고 처리농도를 0.1, 1, 10, 50, 100 $\mu$ g/ml 로 증가시키며 avidin 고정량을 비교하여 avidin-biotin 결합에 의한 인식반응을 확인하였다. Avidin의 최적 처리농도는 비특이적 흡착은 최소가 되고 avidin 고정화는 최대가 되는 농도로 정하였다.

실험 결과 1 $\mu$ g/ml 농도 이하에서는 반응 여부를 확인할 수 없었고, 1 $\mu$ g/ml 농도에서부터 형광신호를, 10 $\mu$ g/ml 농도에서부터 그 광도가 증가하여 50 $\mu$ g/ml 에서 고밀도의 균일한 상을 얻을 수 있었다. 이러한 avidin 처리농도의 증가에 따른 형광신호의 밀도가 급격히 높아지는 특성은 생체분자의 인식반응에서 보여지는 전형적인 특성이다. 50 $\mu$ g/ml의 처리농도에서는 avidin의 비특이적 흡착에 의한 형광신호가 인식반응에 의한 경우에 비해 5% 이하로 낮게

나타났다.  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  이상에서는 avidin의 비특이적 흡착이 증가하였다. 이상의 조건에서  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 을 avidin-biotin 인식반응에 적합한 avidin 처리농도로 정하였다.

### 3. 광학측정에 의한 생체분자인식반응의 규명

Biotin으로 수식된 덴드라이머 단분자막에서 FITC-labeled avidin을  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 1시간동안 처리하여 avidin-biotin 인식반응에 의한 형광신호를 획득하였다. 단백질의 비특이적 흡착에 의한 결과와 달리 균일하고 고밀도의 형광신호를 보였으며 이는 분자인식에 의한 avidin-biotin 결합이 효율적으로 일어났음을 증명한다.

이와 같이 조성된 avidin 층에 TMR(tetramethylrhodamine) biocytin을 추가로 반응시키면 두 형광물질간의 에너지 전이(FRET, fluorescence resonance energy transfer)가 일어나 생체분자간의 상호작용을 관찰할 수 있다. 고정상에서 avidin-biotin 결합으로 형광물질로 표식된 두 분자가 인접한 위치에 놓이면 형광물질 간의 FRET, 즉 FITC에서 방사된 에너지를 인접한 TMR이 흡수, 방사시키는 과정이 연속적으로 일어나 최종적으로 적색 형광신호를 얻게 된다. 특히 FITC-labeled avidin를 처리한 금 전극에서 일부의 영역만을 TMR biocytin으로 반응시켜 동일한 전극에서 녹색과 적색 형광신호를 동시에 얻었다. 이로써 confocal microscopy를 이용하여 avidin-biotin 반응에 의한 항체의 고정화로 생기는 FITC-labeled avidin에 의한 형광 및 FRET을 효율적으로 검출하였다.

### 4. 생체분자의 마이크로어레이 제작

II-2의 방법에 따라 제작한 PDMS 스탬프는 선폭이  $100 \times 100 \mu\text{m}$  과  $50 \times 50 \mu\text{m}$  크기의 셀이  $4 \times 4$  구조로 배치되어 있는 정상과 역상의 패턴을 동시에 포함한다. 덴드라이머 에탄올 용액을 입힌 PDMS 스탬프를 금전극 상부에 압력을 가하지 않은 채 정치시키며 20분 동안 반응시켰다. 이후 biotin화, FITC-labeled avidin 반응을 거쳐 avidin 분자의 마이크로어레이를 완성하여 형광현미경으로 확인하였다. 덴드라이머로 활성화된 영역은 biotin화, avidin-biotin 반응이 선택적으로 이루어져 FITC의 형광이 뚜렷이 관찰되었고 비활성 영역은 검은 바탕으로 구분되었다. 또한 효율적인 분자인식반응이 이루어져 덴드라이머의 패턴과 동일한 생체분자의 마이크로어레이의 형광사진을 얻었다. 역상 구조의 마이크로어레이에서는 FITC-labeled avidin에 의한 인식반응이 뚜렷한 반응성의 차이를 보여 선명한 형광 패턴을 얻은 반면, 정상 구조에서는 printing 과정에서 스탬프의 접촉, 탈리 과정에서 생기는 부정확성으로 인해 역상 구조에 비해 선명도가 떨어지는 상을 얻었다.

## IV. References

1. HC Yoon, MY Hong, HS Kim, *Anal. Biochem.*, 282 (1), 121-128, 2000
2. HC Yoon, MY Hong, HS Kim, 2000, submitted
3. SA Brooks, WP Ambrose, and WG Kuhr, *Anal. Chem.*, 71, 2558-2563, 1999
4. T Ha, T Enderle, DF Ogletree, DS Chemla, PR Selvin, and W Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 6264-6268, 1996
5. J Lahiri, E Ostuni, and GM Whitesides, *Langmuir*, 15, 2055-2060, 1999