

## 바이오칩용 생체 물질의 고정화 기술

Watson과 Crick이 50여년전 이중 나선 구조의 DNA를 발견해 내고, 2000년 중반에 인간의 유전 정보를 담고 있는 수십억개의 염기쌍을 읽는 작업인 지놈 프로젝트(genome project)가 완성된 후, 유전자의 변화 등을 이용하는 생명공학기술의 발전은 매우 빨라지기 시작하였다. 이러한 생명공학의 발전을 통해 나온 지놈 정보는 의약 개발, 질병진단 등 여러 영역에 새로운 가능성을 제시하고 있다. 이에 따라, 관련 연구개발을 빠르고 효율적으로 처리할 수 있는 작업이 필요하게 되었으며, 분석기술의 하나로 바이오칩이 대두되고 있다. 이 바이오칩에서는 여러 종류의 DNA, 단백질 또는 세포과 같은 생체 물질을 집적화 시키기 위하여 유리나 실리콘과 같은 고체기판 위에 고정화시킨다.

이러한 바이오칩은 유일하고 특이적인 바이오 물질을 추적하는 것이 아니고, 많은 수의 표지물질의 양적인 변화를 통계학적인 방법을 이용하고 세포 각각의 실질적인 변화를 관찰함과 동시에 패턴기술을 이용하여 이를 진단에 적용하는데 그 의미가 있다. 즉, 질병의 진행 정도에 따라 하나의 특정한 항원의 질적인 변화보다는 많은 수의 표지인자의 양적인 변화가 생긴다는 가정하에 이 변화를 측정하여 질병의 유무나 진행정도를 판단해 내고자 하는 것이다. 이러한 시스템을 칩의 형태로 고안하려하는 것은 여러 가지의 표지물질을 동시에 빠르게 진단할 수 있는 시스템이기 때문이다.

이러한 시스템에서 화학공학자가 기여할 수 있는 부분은 매우 많다. 그 중 한부분이 바로 생체 물질을 고정화하는 것이므로 본고에서는 고정화 기술에 대해 논의하고자 한다.

생체 물질을 고체 기재 표면상에 고정화하기 위한 고체 기재 표면 제조방법은 다양하게 발표되고 있다. 간단하게 선택할 수 있는 방법으로 비공유결합을 이용한 분자와 분자간의 상호 작용을 통한 흡착에 의한 고체 기재 표면으로의 결합이 일어나는 흡착성 고정화방법을 들 수 있다[1]. 이 방법은 여러 가지 단점을 가지고 있다. 가장 큰 단점으로는 기재 표면 물성이 흡착성 결합을 할 수 있는 충분한 안정성이 보장되는 기재에만 사용할 수 있다는 것이다. 생체 분자층은 탈착 공정에 의해 또는 불완전한 코팅에 의해서 틈이 형성될 수 있다. 또한 만족할만한 분자의 양을 제어하기 어렵다.

생체분자를 고체 기재 표면상에 고정화하는 다른 기술로 랑뮈에르-블로젯트(Langmuir-Blodgett:LB) 기술이 있다. LB막을 제조하기 위한 적합한 물질을 물의

표면상에 적당히 살포하게 되면 이 물질들은 물의 표면상에 넓게 확산되어 단일 분자 막을 형성하게 된다. 이를 이용함으로써 원하는 작용기가 고체 기재의 표면 위쪽으로 분포하게 만들 수 있다[2].

가장 손쉽게 일정한 균일한 막을 제작할 수 있는 방법이며, 특히 단분자막을 Å order 정도의 두께로 조절할 수 있는 장점이 있다. 그러나 단점으로는 그림에서 알 수 있듯이 재료 사용의 제한이 있으며, 기계적 강도가 약하고 열에 약하다는 것이다. 또한 친수성기와 친유성기를 가지고 있는 물질이거나 이를 제조해야만 한다. LB막을 사용시 특히 질서정연하고 안정한 막은 소위 비양친매성 스타브-하르 (Stab-Haar) 중합체를 사용하여 얻어진다. 고체 기재로 전달되는 동안, 중합체 자신은 잠기는 방향과 평행하게 배열이 이루어진다.

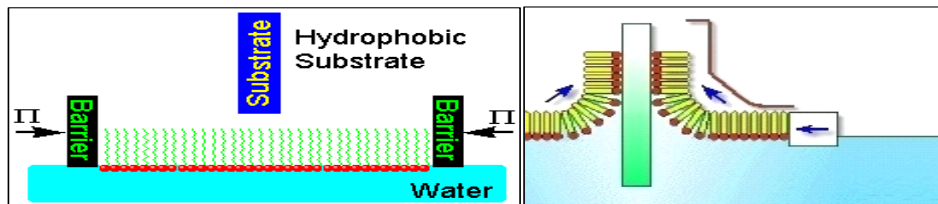


그림1. 랑뮈에르-블로젯트(LB)막을 이용한 고체 기재 표면 제조방법

생체분자를 고체 기재 표면상에 커플링시키는 다른 방법으로 자기조립 (Self-Assembly, SA) 기술이 있다. 여기서, 유기 표면의 안정한 필름은 고체 기재 상에 흡착되는 동안 분자들의 자발적인 자기조립에 의해 형성된다. 형성되는 SA계면활성제를 살펴보면, 첫 번째 분자부분은 최대의 발열반응을 하는 head group이다. 고체 기재위에 화학흡착을 계면활성제의 head group과 기재와의 강한 인력은 화학적 결합을 통하여 확실히 고착할 수 있게 해준다. 두 번째 분자부분은 alkyl chain이다. 사슬간의 인력은 van der waals interactions 이다. 이 interactions은 단순히 알킬 사슬인 경우에는 주요한 힘이다. 세 번째 분자부분은 terminal functionality이다. 알킬 사슬인 경우에는 methyl group이다. 이러한 surface group은 상온에서는 열적으로 불안정하다.

이 방법을 이용, 유리 표면에 금박막을 입힌 후 thiol잔기를 가진 자기조립분자 (alkanethiol)를 처리하면 thiol 잔기는 유리 표면의 금박막과 작용하여 단분자층을 형성하게 된다. 이 단분자층은 생체물질들을 공유결합으로 연결하면 또 한 층의 단백질층이 만들어진다. 지금까지 발표된 연구결과에 의하면 amine coupling법을 이용하여 생체물질이 고정되었다[3].



그림 2. amine coupling법

최근에는 미국의 telechem사에서 개발에 성공한 칩 제작용 슬라이드 글라스가 있다. 이 칩은 단백질 처리를 통해 칩 표면의 알데히드기와 공유결합을 통해 고정하는 방식을 사용하고 있다.

이 외에 고정화 기술로 기존의 공유결합을 사용하지 않고 이온 결합을 사용하기도 한다. 이온결합 방식으로 단백질 단분자층을 제조하는 방식은 Calixarene 이라는 고정화 분자를 합성함으로써 가능하게 되었다. 이 분자는 암모니아 이온만 선택적으로 결합하는 특성을 가지고 있는데, 단백질의 경우 Lysine이 가지고 있는  $\epsilon$ -아미노기가 크라운 분자에 삽입될 수 있다[1].

다음으로 Membrane을 이용한 고정 기술을 볼 수 있다. 과거 막을 사용하여 고정화하는 방식은 주로 항원 또는 항체를 스크리닝하는데 사용되어 왔다. 주로 사용된 막으로는 nylon이나 nitrocellulose를 이용하는 경우가 많았다. 이는 기존의 슬라이드 글라스와 달리 단백질 용액을 기관위에 뿌려 줌으로서 고정화하는 것이다. 이는 다른 방법에 비해 고정화 작업이 아주 간단하다는 장점을 가지고 있다.

Biomembrane은 살아있는 세포안에 작용기처럼 매우 중요하다. Biomembrane은 포스포리피트 분자같은 친수성 끝부분과 친유성 지질 꼬리를 다 가지고 있는 분자의 자기조립되는 구조를 가지고 있다. 수용액상에서 이 분자들은 친수성의 꼬리부분 때문에 SA를 통해 물과의 상호 작용을 최소화하는 구조로 움직인다. 그리고 물을 향해 친유성 부분이 표출되어 극대화된다. 이 결과로 unilamellar 또는 bilayer membrane이라 불리는 많은 다른 자기조립된 구조를 갖는다.

이 특별한 구조는 이중층이 닫힌 구형을 형성하고 밖과 안이 친수성을 형성한다. 이 구조는 vesicle 또는 liposome이라 불려진다. 그러나 이 구조는 실제 세포의 구조에서 볼 수 있는 이온 채널이나 단백질을 가진 membrane과는 조금 다른 구조를 가지고 있다. 우리가 실제 고정화에 사용하는 membrane은 평평한 이중막으로 supported membrane이라 불리운다. 이 막은 실제 세포와 같이 모방된 단백질등을 포함하고 있다.

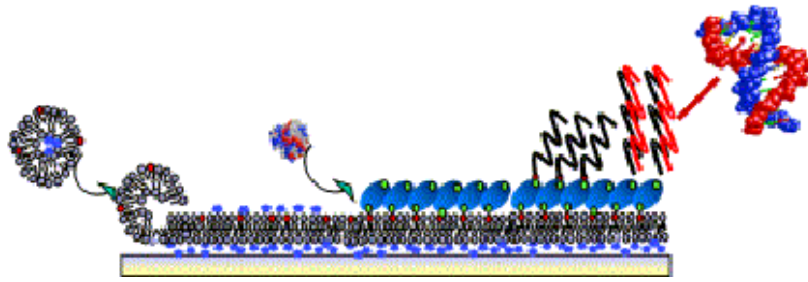


그림 3 supported membrane을 이용한 고정화

그림 3에서 보는 바와 같이 기판에 biotin이 들어있는 vesicle로 구성된 supported membrane을 기판에 고정한다. 다음으로 단백질이 supported membrane 위로 흡착된다. 흡착된 supported membrane에 있는 단백질은 다른 단백질이나(항원-항체반응)이나 세포를 고정화 할 수 있는 결합부위로 사용될 수 있다. 또는 한가닥의 DNA를 흡착시킴으로써 다른 DNA가닥을 발견할 수 있는 구조로 사용 할 수도 있다[4].

다른 고정화 방법으로 아미노산 또는 펩타이드를 이용할 수 있다. 이 방법은 UHV증발법을 이용한다. 예를 들어 glycine이나 몇몇 다른 아미노산은 간단한 Knudsen source로부터 낮은 온도에서 증발이 가능하다. 더욱 복잡한 아미노산들은 액상으로부터 침전을 이용한다. 그리고 이러한 기술은 UHV의 연구로부터 발전되었다. 고려해야 할 문제는 1)어떻게 아미노산들이 표면에 결합되는가, 2)흡착물과 흡착물간의 상호작용의 특성과 길이는 어떠한가, 3)분자의 형태, 4)2D 결정구조, 5)물분자들의 영향등이 있다.

Arg-Gly-Asp순서의 펩타이드에 히알루론산(hyaluronic acid)을 가교결합하여 만든 물질은 3차원 구조의 다공성 모형을 형성한다. 이는 세포의 고정화가 더욱 잘 일어날 수 있도록 하며, 고정된 세포는 고정화된 상태로 증식이 가능하다[5].

그 이외에 마지막으로 미래의 단백질 칩 소재로는 가장 좋은 반도체 칩을 들 수 있다. 다시 말하면 이전에 반도체 제조 과정에서 사용되어 왔던 MEMS(Micro Electro Mechanical System)기술을 이용하는 것이다. 이 기술을 이용 단백질 칩을 만들 경우 저가의 칩을 제작할 수도 있으며 소형화 또한 가능하다. 또한 마이크로 플루이딕스(microfluidics)와 같이 발전되며 미래의 진단기기로 상용화될 가능성이 매우 높다. 또한 전기화학적 검출방식을 이용함으로써 디지털 형태의 정보를 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 저렴하게 판독기를 제작할 수 있다[1].

앞에서 본바와 같이 생체물질을 고정화하는 방법과 사용되는 물질은 매우 다양

함을 알 수 있었다. 흡착성 고정화, LB막, SA를 이용한 막 그리고, membrane을 이용한 기관의 제조는 각각 사용되는 물질과 방법이 서로 다를 수 있었다. 그리고, 이 고정화 방법들은 비공유결합과 공유결합의 방법들을 사용하였으며, 물질의 특별한 처리를 통해 기관위에 단분자층을 형성하도록 하였다. 이러한 작업은 기관의 효율을 더욱 높이기 위한 방법이다. 고정화 방법에서 효율을 높이기 위해서는 생체물질을 어떠한 방법을 사용하는가도 중요하지만 그 이외에 또 고려해야 할 것도 있다. 예를 들면, 생체물질중 단백질의 경우 3D구조를 가지고 있다. 그리고 다른 물질과의 반응(항원-항체반응)이 일어나는 활성부위를 가지고 있다. 그러므로 고정화에 있어서 이 활성부위의 방향성 제어와 관련된 많은 연구가 되어야 할 것이며, 온도와 압력등 주위 환경에 변성이 잘 일어나는 생체 물질의 변성을 막을 수 있는 기술에 관해서도 많은 연구가 되어야 할 것이다.

#### 참고문헌

- [1] <http://www.boditech.co.kr>
- [2] <http://www.public.iastate.edu>
- [3] <http://www.dibiotech.com>
- [4] B. Kasemo, Biological surface science, *Surface Science*, **500**(10):656-677 (2002).
- [5] J.R. Glass, K.T. Dickerson, K. Stecker, and J. W. Polarek, Characterization of a hyaluronic acid-Arg-Gly-Asp peptide cell attachment matrix, *Biomaterials*, **17**:1101-1108, (1996).