

**AAO(Anodic aluminum oxide) 바이오 칩을 이용한  $\beta$ -galactosidase의 광학적 분석**

안희철, 김병우\*  
 성균관대학교 화학공학과  
 (bwkim@skku.ac.kr\*)

**Optical analysis of  $\beta$ -galactosidase using a AAO(Anodic aluminum oxide) biochip**

Hee-Chul An, Byung-Woo Kim\*  
 Department of Chemical Engineering, SungKyunKwan University  
 (bwkim@skku.ac.kr\*)

**서론**

AAO는 사용하는 전해질이나 가해주는 전압에 따라 형성되는 기공의 구경 크기가 다양하게 변화되며, 기공의 배열이 규칙적으로 정렬될 수 있다. 또한, AAO는 비교적 간단한 제작과정에 비해 그 응용 분야가 넓으며, biochip 분야에서 Si를 대체할 수 있는 재료로 주목받고 있다.

실험에 사용한  $\beta$ -galactosidase는 외부오염물질에 대한 DNA damage 발생시, 대응 효소로 발생하는 것으로 알려져 있다.  $\beta$ -galactosidase의 activity를 분석함으로써 저농도의 환경 오염물질들을 정량적으로 검출할 수 있다.

본 연구에서는 나노크기의 다공성 AAO를 이용한 interferometric biochip의 적용 연구로, 표면을 기능화 시킨 다공성 AAO 표면상  $\beta$ -galactosidase의 농도 변화에 따른 광간섭 변화를 측정함으로써 미량의  $\beta$ -galactosidase를 짧은 시간에 검출하는 환경용 biosensor로의 적용을 목적으로 하였다. 나아가 기존의 방법으로는 비교, 분석할 수 없었던 저농도의  $\beta$ -galactosidase를 검출할 수 있는 biochip을 제작하고, nonspecific binding을 감소시키기 위한 실험을 수행하였다.

**재료 및 방법**

## 1) 양극 산화

양극 산화는 정전압 방법을 이용했으며, 전해액으로는 0.3M 옥살산 수용액을 사용하였다. 상대 전극으로 Pb plate를 사용하였으며, 40V전압에서 실험을 수행하였다.<sup>(1)</sup>

양극산화 시 반응기 내의 온도를 균일하게 유지시키기 위하여 chiller를 이용하여 이중관 반응기 내부로 냉각수를 순환시켰으며 동시에 양극산화 반응 시 동반되는 열을 효과적으로 제거하면서, 반응중의 두 전극 사이의 전해질의 균질성을 유지하기 위하여 magnetic bar를 이용하여 계속적으로 stirring하였다. 1차 양극 산화는 형성된 구멍 정렬의 균일성을 향상시키고, 전체 시편표면에 걸쳐 결점이 없도록 하는 데에 중요한 역할을 하고, 2차 양극 산화는 양극 산화 시간에 따라 알루미늄 층의 두께가 결정된다<sup>(2)</sup>.

## 2) 다공성 AAO의 표면 기능화

상온에서 3-aminopropyltrimethoxysilane를 50mM로 distill water에 녹여 acetic acid를 가하여 pH를 4.5로 한 후 24시간 정치한다. 그 후 시편을 꺼내어 세척하여 상온에서 1hr 건조시킨다. 마지막으로 115°C에서 30min간 N<sub>2</sub> purging하에서 건조시킨다<sup>(3)</sup>. 이렇게 기능화된 것을  $\beta$ -galactosidase와의 결합이 효율적인 prolinker<sup>TM</sup>A(Proteogen co, Korea)를 CHCl<sub>3</sub>에 10mM로 용해시킨 후 용액 내 5시간 동안 정치하여 기능화시킨다<sup>(4)</sup>.

### 3) $\beta$ -galactosidase의 광학적 검출

다공성 AAO의 간접적인 반사 스펙트럼을 기록하기 위해 광섬유 스펙트로미터(USB2000 spectrometer, Ocean Optics, Dunedin, USA, reflectance probe(200 $\mu$ m optical fiber))를 사용하였으며, 광원으로는 텅스텐 할로겐램프를 사용했다.

다공성의 AAO표면의 기능화를 통한 porous layer에서  $\beta$ -galactosidase의 농도에 따른 광학적 간섭에 의한 fringe pattern의 변화를 해석하기 위하여 다공층 내에 PBS buffer(phosphate-buffered silane)를 채워 넣은 후의 fringe를 기준으로 하여 여러 가지 농도의  $\beta$ -galactosidase 용액이 다공층 내에 채워졌을 때의 fringe의 변화를 관찰한다.

그리고 anti- $\beta$ -galactosidase를 채워 넣은 후의 fringe를 기준으로 하여 여러 가지 농도의  $\beta$ -galactosidase 용액이 다공층 내에 채워졌을 때의 fringe의 변화를 관찰한다.

## 결과 및 고찰

1) 결합하는  $\beta$ -galactosidase 농도 변화에 따른  $\Delta$ effective optical thickness (nm)의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 그림에서 보는바와 같이 낮은 농도에서  $\beta$ -galactosidase를 검출하는 것이 가능함을 나타내고 있다.

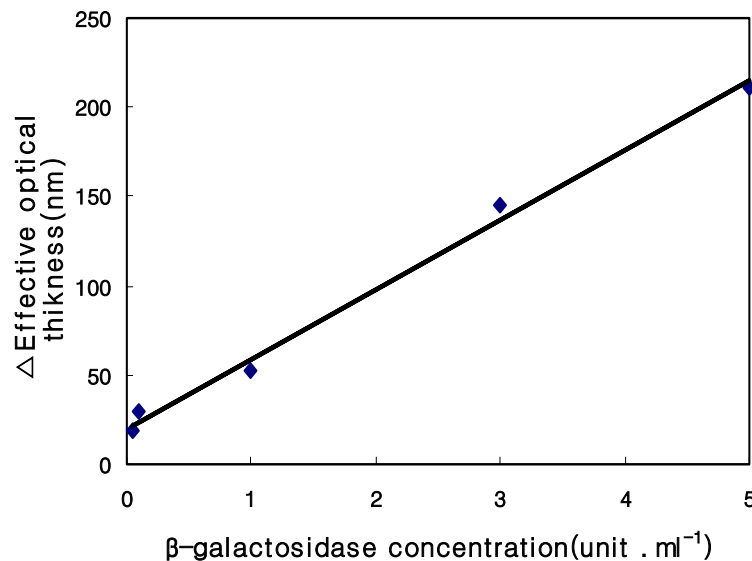
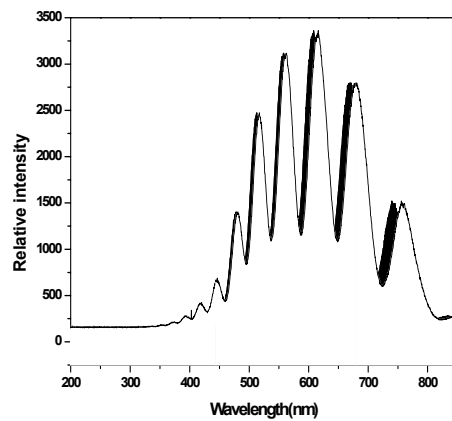
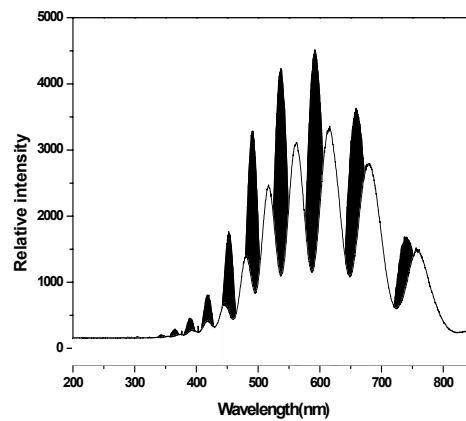


Fig. 1. Effective optical thickness as a function of  $\beta$ -galactosidase concentration when prolinker<sup>TM</sup>A was used as the biological binder.

2) Prolinker<sup>TM</sup>A가 고정된 다공성 AAO의 표면상 여러 가지 농도의  $\beta$ -galactosidase의 결합에 의해 생성되는 fringe pattern의 변화를 관찰하고, 0.05~5 unit 까지  $\beta$ -galactosidase의 농도의 증가에 따른 다공성 AAO와의 효소 결합에 따른 pattern의 변화를 확인하였다.(Fig. 2)



(a) 0.5unit enzyme/mL



(b) 5unit enzyme/mL

Fig. 2. Interference pattern and difference spectra with 0.5 and 5 unit  $\beta$ -galactosidase/mL (  $\square$  : Buffer solution,  $\blacksquare$  : 0.5 and 5 unit enzyme/mL).

### **Reference**

1. Brumlik, C. J., Menon, V. P., Martin, C. R., Template synthesis of metal microtubule ensembles utilizing chemical, electrochemical and vacuum deposition techniques., *J. Mater. Res.*, **9**, 1174, 1994.
2. Masuda, H., Fukuda, K., Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina., *Science*, **268**, 1466-, 1995.
3. Lee, I., Wool, R. P., Controlling amine receptor group density on aluminum oxide surfaces by mixed silane self assemble, *Thin Solid Films.*, **379**, 94-100, 2000.
4. Lee, Y. S., Lee, E. K., Cho, Y. W., Matsui, T., Jang, I. C., Kim, T. S., Han, M. H., ProteoChip : A highly sensitive protein microarray prepared by a novel method of protein immobilization for application of protein-protein interaction studies, *Proteomics*, **3**, 1-16, 2003.