

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

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

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

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

서론

AAO(Anodic Aluminum Oxide)는 carbon nanotube, metal nanodot, nanowire 등 여러 분야에서 사용되고 있다. AAO의 구조적인 특징과 산화막의 성장 속도는 전해질의 농도, 전해질의 종류, 전해질의 온도, 전압, 양극 산화 시간등에 따라 다양하게 형성된다.

본 연구에서는 AAO의 산화조건으로는 2차 양극 산화법을 이용하는데, 1차 양극 산화법에 비해서 균일한 다공층 산화막이 형성되므로 기공 직경이 균일하고, 배열성이 뛰어난 다공성의 AAO를 생성할 수 있다. 이러한 장점을 활용하여 AAO를 광간섭(Interferometer) 바이오칩으로 이용하였다. 또한, AAO의 표면기능화를 위해서  $\beta$ -galactosidase와 결합한다고 알려진 Prolinker<sup>TM</sup>A를 사용하였으며, 이를 고정화시키기 위하여 3-aminopropyltrimethoxysilane을 이용한 SAM(Self-Assembled Monolayer)방식을 사용하였다.

기능화시킨 AAO에  $\beta$ -galactosidase와 anti- $\beta$ -galactosidase를 결합시켜 Fabry-perot fringe pattern의 변화를 이용하여 분석하였다. 이 변화는 파장의 변화로인해 일어나는 광간섭 효과를 이용한 것이다. 또한, anti- $\beta$ -galactosidase가  $\beta$ -galactosidase이외의 단백질등과 결합하는지(non-specific binding)를 확인하기 위해서 BSA(Bovine Serum Albumine)를 이용해 대조실험을 진행하였다.

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 50mM 3-aminopropyltrimethoxysilane에 acetic acid를 가하여 pH를 4.5로 한 후 24 hr 정치한다. 그 후 시편을 꺼내어 세척하여 상온에서 1 hr 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 기능화 시킨다<sup>(4)</sup>.

## 3) $\beta$ -galactosidase의 광학적 검출

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

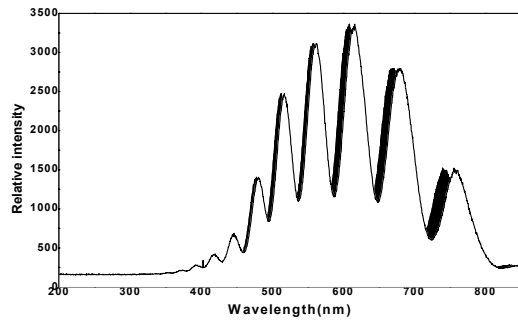
다공성의 AAO 표면의 기능화를 거친 porous layer에서  $\beta$ -galactosidase의 농도변화에 따른 광학적 간섭에 의한 fringe pattern의 변화를 해석하기 위하여 다공층 내에 anti- $\beta$ -galactosidase를 채워 넣은 후의 fringe를 기준으로 하여 여러 가지 농도의  $\beta$ -galactosidase 용액이 다공층 내에 채워졌을 때의 fringe의 변화를 해석 한다.

## 4) BSA(Bovine Serum Albumine)에 의한 nonspecific binding 검토.

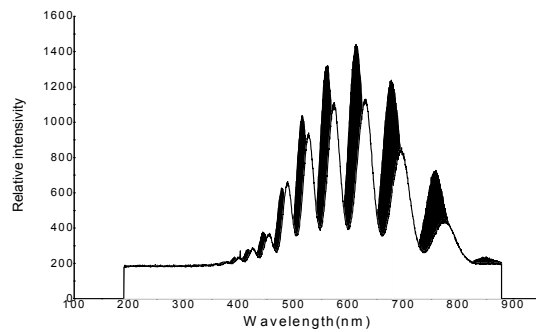
표면을 기능화시킨 다공성의 AAO에 anti- $\beta$ -galactosidase를 채워 넣은후  $\beta$ -galactosidase가 아닌 BSA를 채워 넣어  $\beta$ -galactosidase를 채워 넣었을 때의 fringe의 변화와 비교를 하여 anti- $\beta$ -galactosidase가 BSA와 결합을 하는지의 여부를 확인 한다.

## 결과 및 고찰

1) Prolinker<sup>TM</sup>A가 고정된 다공성 AAO의 표면에 여러 가지 농도의  $\beta$ -galactosidase와의 결합에 의해 생성되는 fringe pattern의 변화를 관찰하고, 0.05~5 unit  $\beta$ -galactosidase/ml범위내  $\beta$ -galactosidase의 농도의 증가에 따른 다공성 AAO와의 효소 결합에 따른 pattern의 변화를 확인하였다(Fig. 1).



(a) 0.5 unit  $\beta$ -galactosidase/ml



(b) 5 unit  $\beta$ -galactosidase/ml

Fig. 1. Interference pattern and difference spectra with 0.5 and 5 unit  $\beta$ -galactosidase/mL ( **■** : anti- $\beta$ -galactosidase, **□** : 0.5 and 5 unit  $\beta$ -galactosidase)

2) BSA를 결합하여 실험한 결과 BSA를 결합하기전과 후의 fringe pattern의 변화가 거의 없었다. 이는 BSA와 anti- $\beta$ -galactosidase가 nonspecific binding을 하지 않는다는 것을 보여 준다.

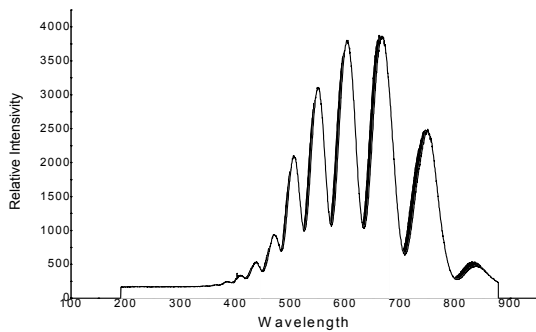


Fig. 2. Interference pattern and difference spectra with a 0.1 wt% BSA( **■** : anti- $\beta$ -galactosidase, **□** : 1wt% BSA).

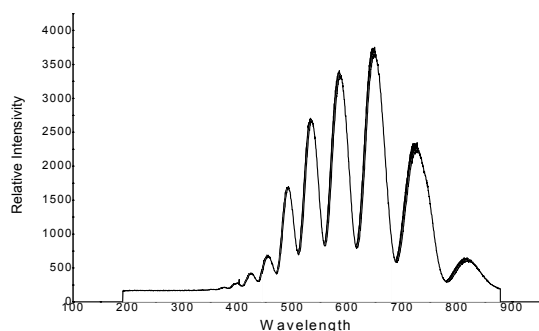


Fig. 3. Interference pattern and difference spectra with a 1 wt% BSA( ■ : anti- $\beta$ -galactosidase, □ : 0.1wt% BSA).

### 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.