

신 결합체 및 항원을 이용한 Nonspecific binding 감소에 의한 광간섭 biosensor 개선

박재숙, 김병우*

성균관대학교 화학공학과 환경공학연구소

(bwkim@skku.ac.kr*)

Reduction of nonspecific binding by using a new linker and anti- β -galactosidase in the interferometric biosensor

Jae Sook Park, Byung Woo Kim*

Department of Chemical Engineering, SungKyunKwan University

(bwkim@skku.ac.kr*)

서론

1996년 이후부터 큰 이슈로 대두된 내분비 장애물질(Endocrine disruptors)은 생명체의 정상적인 호르몬 기능에 영향을 주는 합성 혹은 자연상태의 화학물질을 말하며, 환경 호르몬이라 칭하기도 한다. 이러한 물질들은 화학구조가 생명체 호르몬과 비슷하여 생명체에 흡수될 경우, 정상적인 호르몬 기능을 혼란시킴으로써 성기의 기형, 생식기능 저하, 행동의 변화, 암 발생 등을 유발할 수 있다. 대부분의 내분비 장애물질이 이와 같이 잠재적 위험성을 지니고 있는 것으로 알려져 있어, 환경 잔류실태에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(1).

그 중 bisphenol A는 환경 잔류성이 높고 유해성이 있다고 보고되어, EPA에서는 1일 허용 섭취량을 0.05 mg/kg(체중)으로 정하고 있다. 또한 환경부에서는 bisphenol A를 관찰 물질로 지정하여 제조, 수입 및 용도를 신고하도록 하고 있다(2).

실험에 사용된 유전자 재조합 균주는 외부오염물질에 대한 DNA damage 발생시, 대응 효소로 β -galactosidase를 분비하는 것으로, 생성된 β -galactosidase activity를 분석함으로써 극저 농도의 환경독성물질을 정량적으로 검출할 수 있다(3).

본 실험을 통해 재조합 *E-coli*의 SOS regulon을 통한 β -galactosidase 생성량을 분석하고, 다공성 실리콘을 이용한 biochip에서의 β -galactosidase 농도 변화에 따른 광간섭 변화를 측정함으로써 미량의 β -galactosidase를 짧은 시간에 검출하고자 하였다. 나아가 기존의 생물학적 방법으로는 비교, 분석 할 수 없었던 극저준위의 β -galactosidase를 검출 할 수 있는 biochip을 제작하고자 하였다.

이론

대부분의 bacteria는 외부로부터의 열충격, DNA damage, 중금속 등의 충격이 가해져도 특정 유전자적 시스템에 의해 새로운 환경에 적응하며 살아갈 수 있다. 특히 DNA damage가 있을 경우 SOS 레귤론 시스템에 의해 복구 가능하게 된다(4).

DNA damage 복구 과정에서 생성된 β -galactosidase는 Miller's assay 방식으로 정량되며, 광간섭 biosensor를 통해 확인할 수 있다. 이 biosensor는 ethanolic HF solution의 농도, etching 시간, 또는 전류량에 따라 size 조절이 가능한 pore를 지니고 있으며, 그러한 다공성(pore 크기: 20~50 nm) 실리콘은 SAM(self-assembled monolayer)을 이용하여 기능화하였다. SAM은 규칙적이며, 편홀이 없고, 안정한 단분자층을 쉽게 형성하여, 고정화되는 생체물질이 미량으로 요구되는 장점이 있으며, 사용 시간을 연장 하더라도 오랜 시간 안정성을 유지한다.

다공성 실리콘에서 나타나는 Fabry-Perot fringe 패턴 변화는 다공성 실리콘에 검출대상물질을 고정시키는 recognition group과 검출물질간의 binding에 의한 굴절을 변화에 기인하며, 높은 감도로 검출 가능하다. 다공성 실리콘에서의 백색광에 의한 반사는 다공성 실리콘 막의 유효광학두께(effective optical thickness)에 관계된 간섭 패턴을 나타내는데, effective optical thickness는 thickness L과 굴절을 n의 곱으로 다음과 같이 나타낸다(식 1).

$$m\lambda = 2nL \quad (\text{식 1})$$

여기서 m은 fringe order이고 λ 는 빛의 파장이다(5).

실험

1) 세균배양 및 bisphenol A 노출

균주의 배양은 30°C, LB 배지에서 시행하며, bisphenol A의 농도별 비교 실험시 over night 배양한 후 다시 LB배지에 균을 접종한다. OD가 0.8 정도에 이르렀을 때 bisphenol A를 첨가하여 30분마다 sampling 한 것의 흡광도를 측정하여 세균 농도를 결정한다.

2) Miller 's enzyme assay

Sample의 일부를 Z-buffer, SDS, chloroform이 첨가된 test tube에 넣고 10초간 격렬히 교반한 뒤 ONPG를 투입한다. Sample에 존재하는 β -galactosidase가 ONPG(無色)를 분해하여 o-nitrophenol(노란색)과 D-glucose를 생성하게 된다. 충분히 노란색으로 변하면 Na_2CO_3 용액을 첨가해 반응을 종결시키고 반응시간을 기록한다. 혼합물을 원심분리 한 후 상등액을 취하여 Miller's assay 식으로 activity를 계산한다(식 2).

$$\beta\text{-galactosidase} = \frac{1000(OD_{420} - 1.75 * OD_{550})}{t * V * OD_{600}} \quad (\text{식 2})$$

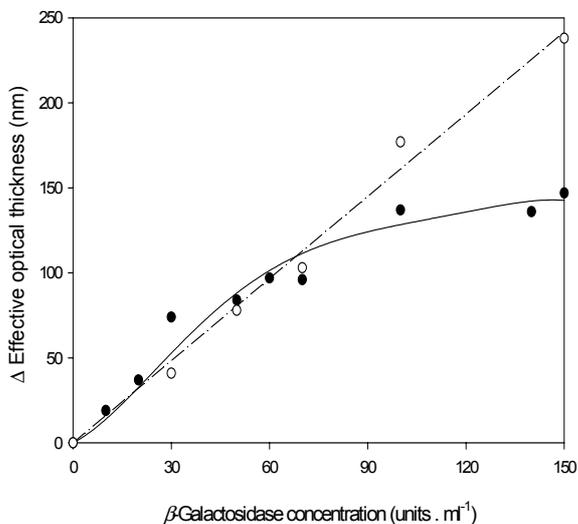
t: reaction time (min) V: reaction volme (ml)

3) 광간섭 biosensor용 porous silicon wafer 제조와 기능화

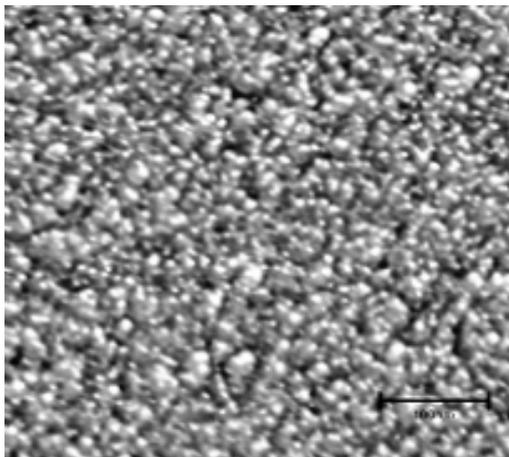
실험에 사용된 p-type(boron-doped, 100) Si wafer를 teflon 재질의 etching cell 에 넣어 HF/ethanol 혼합용액으로 일정 시간동안 anodic etching 한다(6). Silicon 표면을 hydrogen peroxide와 sulfuric acid의 혼합 용액으로 세척한 후 400°C에서 thermal oxidation 시킨다. (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane을 toluene (60°C)에 녹인 뒤, 다공성 실리콘 표면에 흘려 기능화시키고, anti- β -galactosidase을 binding 한다. prolinkerTM-A 는 (3-aminopropyl)trimethoxysilane과 ethanol 혼합용액으로 기능화된 다공성 실리콘 표면에 binding 시킨다. 기존의 biotinylation 한 것과 비교하여, nonspecific binding 이 얼마나 감소했는지 확인한다(7).

결과 및 고찰

- 1) 광간섭 바이오센서에 이용할 Si wafer 의 etching 결과, 적절한 pore size 로 조절 가능함을 알 수 있었다.
- 2) SAM 방식으로 기능화된 3-mercaptopropyl trimethoxysilane-biotin과 3-aminopropyl trimethoxysilane-prolinkerTM-A의 layer를 XPS, FT-IR, AFM을 이용하여 확인하였다.
- 3) prolinkerTM-A와 anti- β -galactosidase로 binding 했을 경우, 기존의 biotinylation 한 것보다 nonspecific binding 이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.



(A) Effective optical thickness as a function of β -galactosidase concentration when biotin and prolinkerTM-A were used as the biological binders (— ○ — : immobilization of β -galactosidase using biotin and — ● — : immobilization of β -galactosidase using prolinkerTM-A)



(B) AFM image of the functionalized silicon surface : 1 x 1 μm^2 image of prolinkerTM-A and silane coupled silicon surface.

참고 문헌

1. Stephen, S., Kevin, C., Kavita, R., Kevin, G., Susan, M., "Human exposure to endocrine active chemicals", *Regul. Toxicol. Pharm.*, 26, 52-58(1997).
2. Huff J., "Does exposure to bisphenol A represent a human health risk", *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 37, 407-408(2003).
3. Heitman, J., Model, P., "SOS induction as an in vivo assay of enzyme-DNA interactions", *Gene*, 103, 1-9(1991).
4. Walker, GC, "Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in E. coli", *Microbiol. Rev.*, 48, 60-93(1984).
5. Lin, V.S., Motesharei, K., Dancil, K.S., Sailor, M.J. and Ghadiri, M.R., "A Porous Silicon-Based Optical Interferometric Biosensor", *Science*, 278, 840-843(1997).
6. Janshoff, A., Dancil, K. S., Steinem, C., Greiner, D., Lin, V. S. Y., Gurtner, C., Motesharei, K., Sailor, M. J., Ghadiri, M. R., "Macroporous p-type silicon Fabry-Perot Layers. Fabrication, characterization, and applications in biosensing", *J. Ame. Chem. Soc.*, 120, 12108-12116(1998).
7. Lee, Y.S., Lee, E.K., Cho, Y.W., Matsui, T., Kang, 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).