

1,3-bisdicyanovinylindane을 이용한 단백질 패터닝의 광학적 감지

박영민 · 이지혜¹ · 이창수¹ · 손영아*

¹화학공학전공, 바이오응용화학부, 충남대학교
BK21 FTIT 유기소재·섬유시스템전공, 충남대학교

Optical detection of protein patterns using 1,3-bisdicyanovinylindane

Young-Min Park, Ji-Hye Lee¹, Chang-Soo Lee¹ and Young-A Son*

¹Dept. of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon, S. Korea
BK21 FTIT, Dept. of Organic Materials and Textile System Engineering, Chungnam National University, Daejeon, S. Korea

(Received: June 29, 2007/Revised: August 16, 2007/Accepted: August 21, 2007)

Abstract— In this study, we have obtained the protein patterns using the membrane patterning of soft-lithography technique. The rapid detection of protein including bovine serum albumin (BSA) was resulted from the interaction with 1,3-bisdicyanovinylindane. For the proof of the interaction between BSA and dye, the UV-vis absorption spectra of BSA and dye were observed at 278 nm and 580 nm, respectively. As expected, the absorption spectrum of the interaction between BSA and dye was observed at 584nm. The absorption spectrum of the interaction was red-shifted. In addition, the optical images of the selectively reacted protein patterns showed the distinctive change of patterned color at different pH conditions. Because the dye has negative charges, the charge of BSA at different pH conditions could influence the interaction behavior between dye and BSA. Therefore, in the case of pH 7, the selectively patterned protein substrates obtained deep blue color pattern caused by electrostatic interaction between negative charges of the dye and positive charges of the BSA. However, in the case of pH 10, selectively patterned protein substrates obtained light blue color pattern because the electrostatic interaction was relatively lower than pH 7 due to the change of overall charge distribution of BSA.

Keywords: 1,3-bisdicyanovinylindane, Soft-lithography, Bovine serum albumin(BSA), Patterning

1. 서 론

단백질은 세포의 종류 및 세포가 처해있는 상황 혹은 환경에 따라 그 발현이 역동적으로 변화한다. 즉, 세포 내에서 일어나는 실제적인 반응들은 단백질 수준의 단위에서 진행되기 때문에 단백질의 검출 및 분석 연구는 매우 중요하다고 볼 수 있다. 최근의 연구동향에서 보면 단백질에 대한 연구는 대부분 단백질의 발현, 기능, 구조, 변형 및 다른 단백질과의 결합특성에 관한 부분에 주요한 초점을 두고, 세포 내 발현과정과 네트워크 형성을 특정 질병의 진행 과정과 관련하여 총괄적으로 분석

하는데 집중되어 있다. 과거와 달리 생물체의 조직, 또는 액체 샘플내의 단백질을 한 번의 과정으로 대형 스케일로 고속 분석하기 때문에 실험 데이터의 저장과 분석에서 벗어나, 정보의 효율적 통합과 검색, 새로운 분석 알고리즘의 개발, 유전자망의 구성 및 이해 등을 통한 새로운 지식을 창출하는 방향으로 발전하고 있다¹⁾.

이러한 배경의 관점에서 주요한 연구접근이 최근에 반도체공정의 포토-리소그래피^{2,3)} (photo-lithography) 기술을 생물학에 적용하고자 하는 시도가 계속되고 있다. 이러한 연구개발 및 노력의 결과로 유전자 칩 및 단백질 칩으로 대표되는 microarray^{4,5)}와

*Corresponding author. Tel.: +82-42-821-6620; Fax.: +82-42-823-3736; e-mail: yason@cnu.ac.kr

미세유체칩^{6,8)} (microfluidic chip)를 근간으로 한 Lab-on-a-Chip 기술들이 상업화 되어 생물분석에 있어 많은 기여를 하고 있다. 따라서 바이오칩은 DNA 또는 단백질의 분리, 정제, 검출에 사용되는 중요한 툴(tool)로 인식되고 있다. 그러나 단순한 분리, 정제, 검출의 도구를 제작하는 것 이외에도 단백질 검출 기술은 기존의 도구들을 사용해 설명할 수 없는 생명현상을 이해하는데 필요한 새로운 도구가 될 수 있다.

또한, 단백질 칩⁹⁾은 특정 단백질과 반응할 수 있는 수십~수천 종류의 단백질이나 리간드 등을 고체 표면에 부착시킨 후 이들과 특이적으로 상호 반응하는 생체고분자의 존재 또는 기능 및 역할을 신속하게 분석할 수 있는 시스템으로 사용이 가능하다. 이러한 단백질 칩은 DNA 칩¹⁰⁻¹²⁾과는 분석원리 및 응용범위가 다른 미래형 바이오센서로 단백질의 발현 및 기능연구, 단백질 상호작용 연구뿐만 아니라 질병 진단 및 바이오마커 발견, 신약개발 등에 응용이 가능하다. 그리고 단백질 칩은 생명과학, 분석화학, 광물리학, 전산학, 기계공학, 전자공학 등의 다양한 분야의 기술이 조합된 기술복합체로, 단백질 칩을 구성하는 핵심기술은 단백질 칩 제작 기술, 단백질 칩 분석기술 및 단백질 칩 응용 기술 등으로 설명할 수 있다.

통상적으로 이러한 바이오칩, 단백질 칩 분석에 있어서 레이저 유도 형광법¹³⁻¹⁴⁾ (laser induced fluorescence)을 이용한 검출방법을 많이 사용하고 있다. 그 이유는 DNA 및 단백질과의 결합반응만으로는 신호를 감지하기에는 전기적 분석 장비의 구축이 복잡하기 때문에 보다 쉽게 감지하기 위해서 형광이미지를 이용하는 경우가 대다수이다. 이것은 감지하고자 하는 시료에 미리 형광을 내는 물질과 결합시킨 후, 어레이(array)화 된 생체물질과 반응시키게 되면 결합된 부위의 형광유무를 측정함으로써 생화학반응 정도를 판가름 할 수 있게 된다. 그러나 이러한 형광 측정법은 고가의 레이저 혹은 형광 현미경등과 같은 고가의 분석기기를 이용해야 하며, 빛에 노출될 경우 형광의 세기가 감소된다는 단점이 있다. 이러한 이유로 색소물질을 단백질과 결합시켜 용이하고 편리하게 단백질 분석에 적용시키고자 하는 목적이다.

따라서 본 연구에서는, 일반적으로 단백질 바이오칩 분석에 있어서 사용되어지는 형광물질을 대체할 목적으로 가시광선 영역에서 색상강도가 높은 새로운 색소 화합물을 합성하여 이를 단백질

분석 방법으로 응용하고자 한다. 단백질 패터닝은 소프트-리소그래피¹⁵⁻¹⁶⁾ (soft-lithography) 방식 중의 하나인 멤브레인 패터닝 (membrane patterning) 방식을 이용하였다. 형광염료가 아닌 일반색소와 단백질의 결합을 이용한 패터닝을 통하여 기존 방법에 비해 시료 자체의 비용 절감과 분석의 용이함을 제공할 수 있을 것이라 예상되어진다.

2. 실험

2.1 1,3-bisdicyanovinylindane¹⁷⁾ 색소 합성

1,3-indandion (14.9mmol, 2.18g)과 malononitrile (44.7mmol, 2.95g)을 ethanol 50ml에 15분간 상온에서 용해시킨 후 sodium trihydrate acetate (3.05g)를 첨가하고 5시간 동안 환류 시킨다. 이 과정을 통해 얻어진 용액을 필터과정을 통하여 색소 합성 반응 중에 생성된 3-dicyanovinylindane-1-one과 같은 monocondensation을 제거한다. 필터과정을 통해 걸러진 미 반응 물질을 제외한 반응용액을 증류수 (100ml)를 이용하여 희석시키고, hydrochloric acid를 이용하여 산성화를 시켜 고체 생성물을 얻는다. 이렇게 생성된 고체 생성물은 다시 필터과정을 통한 후, 수세 및 건조를 통하여 회색의 고체인 1,3-bisdicyanovinylindane이 얻어졌다.

1,3-bisdicyanovinylindane의 전반적인 합성과정을 Fig. 1에 나타내었다. (수율 : 48.98%; m.p. 263-266°C; Calculated for C₁₅H₆N₄: C, 74.37; H, 2.50; N, 23.13, Found: C, 74.78; H, 2.49; N, 23.48)

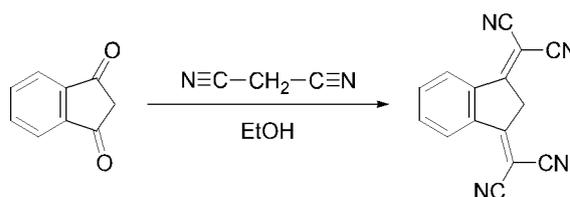


Fig. 1. Synthesis of 1,3-bisdicyanovinylindane.

2.2 패터닝 시료 및 시약

본 실험에는 패턴 멤브레인 몰드(membrane mold) 형성을 위해 dow corning 로부터 구입한 PDMS (polydimethylsiloxane) sygard 184를 사용하였으며, 단백질로서는 Sigma Aldrich 로부터 구입한 BSA(Bovine serum albumin)를 사용하였다. 그리고 PDMS 멤브레인 형성시에 이 형성을 향상하기 위해 불소고분자 (FC-40, EGC-1700)를 몰드에 코팅하여 사용하였다.

2.3 PDMS 멤브레인 제작

PDMS 멤브레인의 마스터를 제작하기 위해 384 well plate (Fisher Scientific Corp)에 PDMS와 경화제를 10:1 비율로 혼합한 용액을 붓는다. PDMS 및 경화제가 처리된 plate를 65°C의 오븐에서 12시간 경화시킨 후 well plate로부터 PDMS를 떼어낸다. 그리고 형성된 PDMS의 음각 패턴 형성을 위해 전처리 공정으로 FC 코팅처리를 한다. FC 코팅 처리를 하는 이유는 동일 PDMS간의 결합이 이루어져 패턴형성에 방해가 될 수가 있기 때문에 불소계열의 물질을 이용하여 표면 장력을 낮추어 PDMS간의 결합이 이루어지지 않도록 하여 음각 패턴 형성을 용이하게 하기 위함이다. FC 코팅 처리는 EGC-1700과 FC-40을 4:1의 비율로 혼합한 용액을 스프인코팅 (2000rpm, 60s)을 통한 후 110°C에서 10분간 hard baking, 65°C에서 5분 동안 soft baking을 하였다. FC 코팅처리된 PDMS에 음각 패턴 형성을 위해 다시 PDMS를 붓고 65°C의 오븐에서 12시간 경화시킨다. 이러한 과정을 통하여 음각의 패턴을 가지는 PDMS 멤브레인을 형성할 수가 있다. 전체적인 PDMS 멤브레인 제작과정을 Fig. 2에 나타내었다.

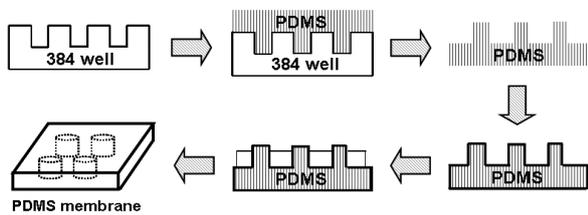


Fig. 2. Fabrication scheme of PDMS membrane.

2.4 BSA 단백질 패턴 제조

단백질 패턴 제조를 위한 기질 재료로서 glass slide를 준비하고, H₂SO₄와 H₂O₂가 7:3의 비율로 혼합된 피라나 용액에 70°C에서 30분간 처리하였다. 피라나 용액처리가 된 glass slide 표면위에 준비된 PDMS 멤브레인을 고정시킨 후 BSA 용액을 (1mg/ml) 표면에 흡착이 될 수 있도록 PDMS 멤브레인 위에 부은 후 30분간 처리하였다. 30분간 처리 후, PDMS 멤브레인을 glass slide 표면에서 떼어내면 음각의 PDMS 패턴을 통과한 BSA만이 glass slide 표면에 부착되어 패턴을 형성하게 된다.

형성된 단백질 패턴위에 합성된 1,3-bisdicyanovinylindane 용액을 (0.5mg/ml) 부은 후 30분간 처리

하였다. 마지막으로, 단백질 패턴 표면과 결합하지 못한 색소를 제거하기 위하여 증류수를 이용하여 세척을 통하여 최종 단백질 감지를 위한 패턴을 형성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 1,3-bisdicyanovinylindane의 특성

1,3-bisdicyanovinylindane은 1,3-indandion, malononitrile, sodium trihydrate acetate를 ethanol에서 5시간 환류 시킨 후 필터과정 및 산성화과정을 거쳐 합성하였다.

본 실험에서 합성한 1,3-bisdicyanovinylindane의 서로 다른 pH 조건에서의 흡수스펙트럼의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 보여 지듯이, 합성된 1,3-bisdicyanovinylindane의 흡수스펙트럼은 pH가 증가할수록 흡수피크가 변화하는 것을 확인할 수가 있다. pH 3에서는 흡수피크를 거의 확인할 수가 없었으며, pH 7의 범위로 증가할 수록 580nm에서 흡수피크가 강하게 형성되는 것을 확인할 수가 있었다. pH 10의 경우에는 합성물의 최대흡수 파장이 pH 7의 범위와 동일하나 흡수 피크의 증가가 다소 완만하게 이루어지는 것을 확인할 수가 있었다. 즉, 이 색소 화합물은 pH 3으로부터 7의 범위에 있어서 색소화합물내의 전자의 이동에 의하여 급격한 흡수로 인한 강한 색을 나타내는 것으로 설명할 수 있다 (Fig. 4). pH의 조건에 따른 1,3-bisdicyanovinylindane의 색상 변화로, 산성조건에서는 색상을 나타내지 않으며 pH가 증가함에 따라 진한 파란색을 나타내는 것을 확인할 수가 있었다. 이러한 pH에 따른 색상변화는 지시약의 원리로 설명이 가능한데, 르 샬틀리에 법칙에 의해서 분자내의 H⁺의 지시약과의 결합과 분리에 따라서 색상의 변화가 이루어지는 것이다. 이러한 원리에 따라 합성된 1,3-bisdicyanovinylindane의 pH 변화에 따른 화학구조의 변화를 Fig. 4에 나타내었다.

Fig. 4에서 보여 지듯이, 1,3-bisdicyanovinylindane의 경우 산성조건에서는 H⁺와 In⁻ (indicator)의 결합에 의해서 색상을 나타내지 않는 형태를 보이지만, 알칼리 조건에서는 합성된 색소의 화학구조가 H⁺와 In⁻의 분리/해리를 통해 색소내 구조적으로 전자의 흐름으로 인한 공명구조를 형성하여 강한 색상이 발현되고 있다.

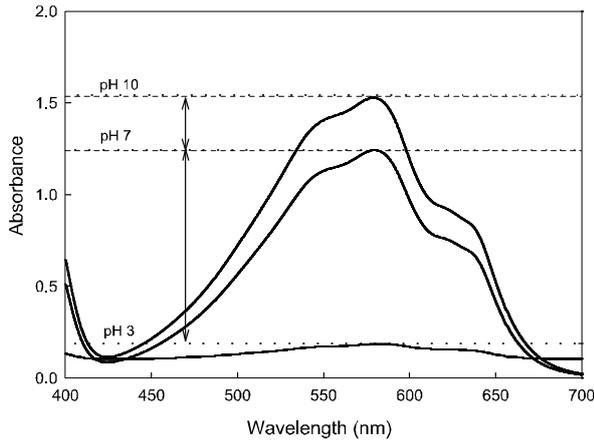


Fig. 3. Absorption spectral changes of 1,3-bisdicyanovinylindane at different pH conditions.

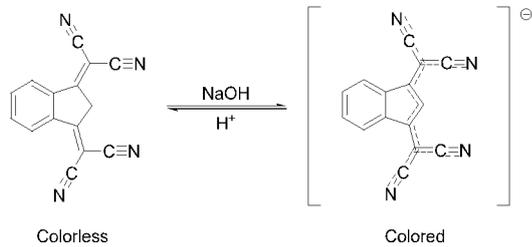


Fig. 4. Scheme of dye structural changes at different pH conditions.

3.2 BSA와 1,3-bisdicyanovinylindane의 결합

패턴형성을 통한 BSA와 색소의 결합에 따른 상호작용을 확인하기 위하여 본 실험에 사용된 BSA와 합성된 색소간의 흡광도변화를 통하여 결합에 의한 특성변화를 관찰하였다. Fig. 5는 BSA와 색소간의 고유 흡수피크 및 결합을 통한 흡수피크의 변화를 나타내고 있다. 결합전과 후의 흡수피크의 강도 차이는 동일량의 부피로 각각 준비된 BSA와 색소를 섞게 되어 상대적으로 색소량에 대한 물의 부피가 2배 증가 하여 이에 해당하는 색소농도가 감소하여 결과적으로 흡수과장이 반 정도 감소함을 보이고 있다. BSA는 자외선 영역의 278nm에서 흡수를 나타내고 있어 색상의 변화를 확인할 수가 없지만, Fig. 5에서와 같이 1,3-bisdicyanovinylindane 색소의 경우에 580nm 영역에서 진한 파란색을 나타내는 가시광선 흡수를 나타내고 있다.

이에, BSA와 색소간의 상호결합을 통하여 약간의 흡광도 변화가 나타나는 것이 얻어졌으며, 흡수피크가 전반적으로 장파장 영역으로 이동 (580nm → 584nm)하는 것으로 확인되었다. 이에 대한 전체적인 파장의 변화를 Table 1에 정리하여 나타내었다.

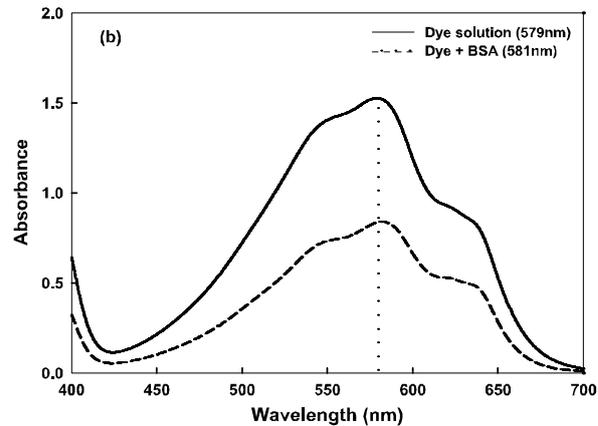
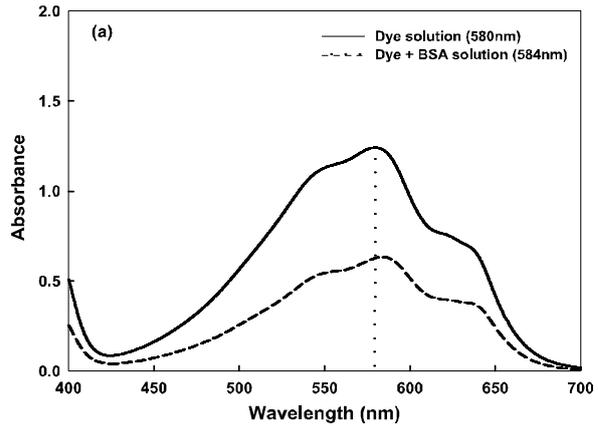


Fig. 5. UV-vis absorption spectra of dye/BSA mixture solution at different pH conditions: (a) pH 7, (b) pH 10.

Table 1. Comparison of absorption peaks

	Absorption (pH condition)	
	pH 7	pH 10
Dye	580nm	579nm
Dye/BSA mixture	584nm	581nm

3.3 1,3-bisdicyanovinylindane을 이용한 단백질 패터닝 검출

본 실험에서 단백질 패턴은 소프트-리소그래피 (Soft-lithography) 방법 중에 멤브레인 패터닝 (membrane patterning) 방법을 이용하여 제조되었다.

단백질 패턴 형성 후, 합성된 색소와의 결합은 phosphate buffer system을 이용하여 각각 pH 7과 pH 10의 조건에서 이루어졌다.

1,3-bisdicyanovinylindane 색소를 이용한 단백질 패턴의 형성을 현미경(Nikon SMZ800)을 통하여 측정된 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6에서 보여 지듯이, BSA와 색소간의 결합에 따른 패턴이 형성된 것을 확인할 수가 있었으며, pH에 따른 형

성된 패턴의 색상이 다름을 확인할 수가 있었다. pH 7의 경우가 pH 10 보다 색상이 진하고 뚜렷하게 패턴이 형성되어 있는 것을 확인할 수가 있는데, 이는 1,3-bisdicyanovinylindane 색소의 경우 Fig. 4에 나타내었듯이 pH가 알칼리 조건으로 갈수록 H⁺와 In⁻의 분리/해리를 통해 공명구조를 형성하여 음전하를 나타내고, BSA의 경우는 Fig. 7에서 보여 지듯이 단백질의 등전점이 4.7로써 pH가 알칼리 조건으로 갈수록 구조적으로 평형을 이루기 위하여 음전하를 나타낸다. 따라서 pH 7의 경우에는 색소가 음전하를 나타내고 있는 상태에서 양쪽 평형을 이루고 있는 BSA의 양전하 (NH₃⁺)와 상호작용을 통하여 용액상의 결과에서 보여진 것과 같이 색상의 변화가 이루어지면서 단백질과 색소간의 결합이 이루어져서 패턴이 형성되었다고 판단할 수가 있다. 하지만, pH 10의 경우에는 색소는 더욱 강하게 음전하를 나타내고 있으며, pH 7과 비교하여 알칼리 조건에서 상대적으로 BSA의 NH₃⁺의 양이 적어지고 COO⁻의 양이 많아지면서 음전하의 성향을 많이 나타내어 색소 음이온과 반발할 수 있는 개연성이 커진다. 이러한 현상을 통하여 pH 10에서는 BSA와 색소간의 상호작용이 pH 7 보다는 결합특성이 적어지게 되어 BSA에 남아있는 양전하와 결합은 이루어질지라도 상대적으로 적은양이기 때문에 pH 7에 비해서 단백질 패턴의 색상이 열게 보이는 것으로 설명할 수 있다. 이러한 결과를 토대로 pH 7의 경우가 pH 10일 경우보다 강한 색상강도의 패턴링 특성으로 형광물질을 사용하지 않더라도 명확한 단백질 감지 특성을 나타낼 수 있는 것을 확인할 수 있었다.

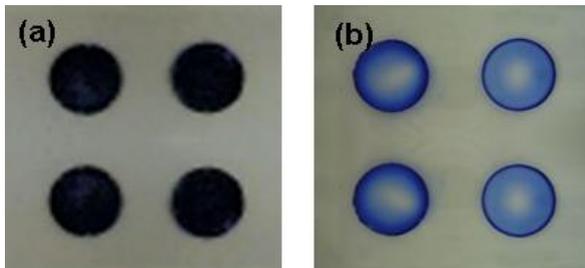


Fig. 6. Optical microscope images of the protein pattern with 1,3-bisdicyanovinylindane: (a) pH 7, (b) pH 10.

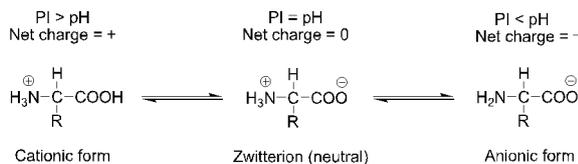


Fig. 7. Scheme of protein structural changes at different pH conditions.

4. 결 론

본 실험에서는 단백질 패턴링에서 소프트-리소그래피 방식 중의 하나인 멤브레인 패턴링 방식을 이용하여, 형광염료가 아닌 일반색소를 이용하여 단백질 감지를 위한 패턴을 형성하여 보았다.

합성된 1,3-bisdicyanovinylindane 색소의 경우, pH에 따른 색상의 변화를 통하여 색상의 감지가 가능하였고, PDMS를 이용한 패턴 형성을 통하여 BSA와의 결합을 통하여 단백질 패턴을 형성하였다. 단백질 패턴의 형성을 통한 단백질 감지는 pH가 7일 경우에는 합성된 색소의 음전하와 BSA의 상대적으로 많은 양의 양전하간의 상호작용을 통하여 강한 색상강도의 패턴링특성에 의해 단백질의 감지가 용이하였고, pH 10의 경우에는 상대적으로 BSA의 말단 양전하가 적어서 색소와 BSA간의 결합특성이 감소하여 다소 약한 패턴링의 색상 변화를 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Jeong-Woo Choi and Bum-Hwan Lee, Biodevice Technology, *Korean Chem. Eng. Res.* **44**(1), 1-9 (2006).
2. Kazuyosi Itoga, Jun Kobayashi, Masayuki Yamato, Akihiko Kikuchi and Teruo Okano, Maskless liquid-crystal-display projection photolithography for improved design flexibility of cellular micropatterns, *Biomaterials*, **27**, 3005-3009(2006).
3. Chang-Soo Lee, Sang-Ho Lee, Sung-Soo Park, Yong-Kweon Kim and Byung-Gee Kim, Protein patterning on silicon based surface using background hydrophobic thin film, *Biosensors & Bioelectronics*, **18**, 437-444(2003).
4. Bruce Posner, Yulong Hong, Eric Benvenuti, Michael Potchoiba and Dave Nettleton, Multiplexing G protein-coupled receptors in microarrays: A radioligand-binding assay, *Analytical Biochemistry*, **365**, 266-273(2007).

5. David A. Hall, Jason Ptacek and Michael Snyder, Protein microarray technology, *Mechanisms of Ageing and Development*, **128**, 161-167(2007).
6. Giles H. W. Sanders and Andreas Manz, Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis, *trends in analytical chemistry*, **19**(6), 364-378(2000).
7. Peng-Cheng Wang, Jun Gao and Cheng S. Lee, High-resolution chiral separation using microfluidics-based membrane chromatography, *J. Chromatography A*, **942**, 115-122(2002).
8. Chang-Soo Lee, Sang-Ho Lee, Yun-Gon Kim, Ji-Hye Lee, Yong-Kweon Kim and Byung-Gee Kim, A method of binding kinetics of a ligand to micropatterned proteins on microfluidic chip, *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 891-898 (2007).
9. Jeong-Woo Choi, Woochang Lee, Byung-Geon Oh, Hun-Joo Lee and Doo-Bong Lee, Application of complement 1q for the site-selective recognition of immune complex in protein chip, *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 764-767(2006).
10. K. M. Mysers., J. Gaba, S. F. Al-Khaldi, Molecular identification of *Yersinia enterocolitica* isolated from pasteurized whole milk using DNA microarray chip, hybridization, *Molecular and Cellular Probes*, **20**, 71-80(2006).
11. C. Kim, J. Kaysen, K. Richmond, M. Rodesch, B. Binkowski, L. Chu, M. Li, K. Heinrich, S. Blair, P. Belshaw, M. Suussman. F. Gerrina, Progress in gene assembly from a MAS-driven DNA microarray, *Microelectronic Eng.*, **83**, 1613- 1616(2006).
12. Taizo Hanai, Hiroyuki Hamada and Masahiro Okamoto, Application of bioinformatics for DNA microarray data to bioscience, bioengineering and medical fields, *J. Bioscience and Bioengineering*, **101**(5), 377-384(2006).
13. Karen E. Asermely, Clarence A. Broomfield, Janet Nowakowski, Bernard C. Courtney and Michael Adler, Identification of a recombinant synaptobrevin thioredoxin fusion protein by capillary zone electrophoresis using laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatography B*, **695**, 67-75(1997).
14. Gina M. Korf, James P. Landers and Dennis J. O'kane, Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for the analysis of free and lummne-complexed green fluorescent protein, *Analytical Biochemistry*, **250**, 210-218(1997).
15. Ratna Tantra and Jonathan Cooper, Imaging of protein arrays and gradients using softlithography and biochip technology, *Sensors and Actuators B*, **82**, 233-240(2002).
16. Se Young Oh, Jong Hwan Oh and Jeong Woo Choi, Studies on the fabrication of bioelectronic device using a softlithography technique, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(1), 35-40(2003).
17. Young-A Son and Sung-Hoon Kim, New pH indicator based on 1,3-bisdicyanovinylindane, *Dyes and Pigments*, **64**(2), 153-155(2005).