



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0011159
(43) 공개일자 2010년02월03일

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0072253
(22) 출원일자 2008년07월24일
심사청구일자 2008년07월24일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

김동하

서울특별시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 화학나노과학과

(74) 대리인

이원희

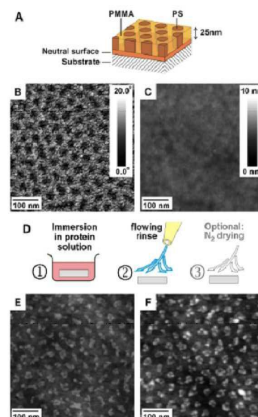
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 자기조립 블록 공중합체 박막을 이용한 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법 및 이에 따라 제조된 단백질나노어레이

(57) 요약

본 발명은 자기조립 블록 공중합체 박막을 이용한 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법 및 이에 따라 제조된 단백질 나노어레이에 관한 것으로, 블록 공중합체의 자기조립을 이용하여 나노 크기의 규칙적인 구조를 형성하고, 이에 표적 생체분자와 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 선택적으로 부착하여 패턴을 형성시키는 단계를 포함하는 단백질 나노어레이의 제조방법 및 이에 따라 제조된 단백질 나노어레이에 관한 것이다. 상기 방법에 따르면 종래 단백질 고정화 방법을 개선하여 물리적 방법에 의하여 자기조립 블록 공중합체 박막 상에 단백질을 선택적으로 흡착시킴으로써, 보다 간편한 단백질 나노어레이의 제조가 가능하며, 상기 제조된 단백질 나노어레이에는 다양한 관능화된 단백질이 흡착되어 생체분자를 검출하는 단백질 센서로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10816

부처명 서울특별시

연구사업명 서울시 산학연 협력사업(2006년 기술기반구축사업)

연구과제명 나노 기술을 이용한 바이오 융합산업 혁신 클러스터

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2006년 8월 1일~ 2008년 7월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

기관 상에 용매에 용해시킨 랜덤 공중합체를 스핀코팅하여 중성 표면층을 형성하는 단계(단계 1);
 상기 중성 표면층 위에 용매에 용해시킨 블록 공중합체를 스핀코팅하여 도포하는 단계(단계 2);
 상기 블록 공중합체를 열처리하여 자기조립을 유도하고 규칙적인 구조를 형성한 템플레이트로 제조하는 단계(단계 3);
 상기 템플레이트를 단백질 용액에 침지하여 단백질이 흡착된 단백질 나노어레이를 제조하는 단계(단계 4); 및
 상기 단백질 나노어레이를 세척하여 나노패턴을 형성시키는 단계(단계 5)를 포함하여 이루어지는 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 1의 랜덤 공중합체는 폴리스티렌-폴리벤조사이클로부텐-폴리메틸메타크릴레이트 [P(S-r-BCB-r-MMA)]인 것을 특징으로 하는 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단계 2의 블록 공중합체는 폴리스티렌-블록-폴리메틸메타크릴레이트인 것을 특징으로 하는 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 폴리스티렌-블록-폴리메틸메타크릴레이트는 폴리스티렌:폴리메틸메타크릴레이트 부피비가 2.5:7.5 내지 7.5:2.5의 범위인 것을 특징으로 하는 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단계 3은 사용한 블록 공중합체의 유리전이온도 이상으로 온도를 올린 후에 서냉하는 것을 특징으로 하는 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 단계 4의 단백질은 표적 특이적 결합을 수행할 수 있는 관능화(functionalization)된 단백질인 것을 특징으로 하는 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 단계 4의 단백질 흡착은 perfect template registration에 대하여 % deviation이 40% 이하가 되도록 흡착 시간과 용액 내 단백질의 농도를 조절하는 것을 특징으로 하는 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 단계 5는 흐르는 물 또는 인산완충용액(PBS)에 단백질 나노어레이를 세척하여 나노패턴을 형성시키는 것을 특징으로 하는 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법.

청구항 9

폴리스티렌-블록-폴리메틸메타크릴레이트(PS-b-PMMA)를 이용한 자기조립이 형성된 템플레이트 중 상기 템플레이트를 구성하는 폴리스티렌(PS) 영역에 배타적으로 단백질이 부착되어 패턴이 형성된 것을 특징으로 하는 제1항의 방법에 의해 제조되는 단백질 나노어레이.

청구항 10

제10항의 단백질 나노어레이를 이용하여, 관능화된 단백질과 상기 단백질에 특이적 결합을 수행할 수 있는 생체

분자를 반응시키는 것을 특징으로 하는 표적 생체분자의 검출방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자기조립 블록 공중합체 박막을 이용한 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법 및 이에 따라 제조된 단백질 나노어레이에 관한 것으로, 보다 상세하게는 블록 공중합체의 자기조립을 이용하여 나노 크기의 규칙적인 구조를 형성하고, 이에 표적 생체분자와 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 선택적으로 부착하여 패턴을 형성시키는 단계를 포함하는 단백질 나노어레이의 제조방법 및 이에 따라 제조된 단백질 나노어레이에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고효율의 핵산 분석용 고체 기반의 어레이(array)가 성공을 거둔 이후로 이와 유사한 프로테오(protome) 분석용 단백질 어레이가 주목을 받고 있다. 단백질 어레이를 바이오칩으로 이용하면, 생물의 생명현상에 대한 근본적 원리와 구조를 분석, 새로운 신약을 개발하거나 인간의 뇌의 정보처리 메카니즘을 분석할 수 있을 뿐만 아니라 질병을 진단하고 예측할 수 있다. 또한 단백질 구조를 분석해 인공 유전자를 개발하거나 지금까지는 처리할 수 없었던 다양한 목적과 기능을 가진 새로운 형태의 정보를 가공할 수 있는 바이오컴퓨터 개발은 물론 생물학적 전자부품에도 응용될 수 있다.

[0003] 상기 단백질 어레이의 효율성을 높이기 위하여 단위 부피당 수집되는 정보의 양을 늘릴 필요가 있으며, 단백질은 핵산과 달리 증폭될 수 없기 때문에 단백질 나노어레이의 고집적화와 소형화가 요구된다.

[0004] 단백질 마이크로어레이는 기관상에 폴리펩티드를 배열할 때 종래 광식각기술(photolithographics)을 대표로 하는 순차적인 기법(serial method) 위주로 이용해왔다. 그러나 단백질 어레이는 DNA 어레이보다 소형화하거나 보다 감도를 좋게 하는 실질적인 포맷으로 집적화하거나 배열하는 것이 쉽지 않다. 즉, DNA 올리고뉴클레오타이드의 격자 패턴은 광식각 기술로 기질의 표면에 생성할 수 있으나, 수백 개 이상의 아미노산으로 구성된 단백질의 경우는, 항체가 일반적으로 약 1400 개의 아미노산을 가져야 하는 등, 질병의 정확한 진단을 위해서는 더욱더 고집적화된 고밀도의 격자패턴이 요구되나, 이를 실현하기는 쉽지 않다. 또 다른 문제점은 단백질은 쉽게 변성되는 단점이 있어서, 단백질 조작 시 많은 제한점이 있다.

[0005] 이러한 문제들의 해결점은 단백질의 3차 구조를 잃지 않고 얼마나 높은 고해상도(high resolution)로 단백질을 배열하느냐에 달려 있는데, 현재까지는 잉크젯 프린팅(inkjet printing), 드롭-온-디맨드(drop-on-demand) 기술, 마이크로컨택트 프린팅(micro-contact printing, μ CP), 딥펜(dip-pen), 이온 또는 전자빔 식각기술, 연성 식각기술(soft lithography) 등 다양한 접근 방법이 시도되고 있다. 하지만, 상기 방법 역시 대부분 수십 μ m ~ 수 mm의 스페이싱(spacing) 크기를 갖고 있어, 마이크로 또는 서브마이크로 크기에서는 적용하기에 충분치 못한 단점이 있다. 또한, 상기 기술 중 일부 기술들은 나노크기의 패턴을 제조하는데 사용되기는 하였지만, 큰 면적의 패턴을 형성하는데 제한이 있었다.

[0006] 이에 비하여 블록 공중합체(block copolymer; BCP)의 자기-조립(self-assembly) 특성을 이용하면 큰 면적의 나노구조를 형성할 수 있으며, 종래 기술보다 훨씬 간편하게 나노패턴을 형성할 수 있는 장점이 있다.

[0007] 블록 공중합체(BCP)는 두 개 또는 그 이상의 고분자 사슬이 공유결합으로 연결된 형태로 두 블록 간의 공유결합 연결점의 제약으로 인해 각 블록을 각각의 도메인으로 상분리시키는 경향을 띠게 된다.

[0008] 상기과 같은 블록 공중합체는 자발적인 상분리에 의하여 10 nm 에서 100 nm 정도의 크기를 갖는 나노구조를 형성할 수 있고, 이러한 나노구조의 형태와 크기는 블록 공중합체의 분자량, 각 블록의 부피비, 각 블록간의 Flory-Huggins 상호작용계수 등에 의하여 결정되며, 나아가 한 블록에만 선택적인 용매에 용해시키면 자발적으로 나노미터의 크기를 갖는 구형, 원통형 등의 미셀을 형성할 수 있다.

[0009] 상기과 같은 블록 공중합체의 자기-조립 특성을 이용하면 블록 공중합체의 나노구조 내에서 입자의 크기는 별도의 처리가 없어도 나노미터 크기로 제한될 수 있으며, 그 입자의 어레이 또한 나노구조에 크기와 간격에 의하여 제한되어 입자의 크기와 어레이를 조절가능하다.

- [0010] 종래 블록 공중합체를 이용한 다양한 나노어레이 템플레이트가 보고된 바 있다(M. J. Fasolka, A. M. Mayes, Annu. Rev. Mater. Res. 2001, 31, 323-355; I.W. Hamley, Nanotechnology 2003, R39; M. Lazzari, M. A. Lopez-Quintela, Adv. Mater. 2003, 15, 1583-1594; R. A. Segalman, Mater. Sci. Eng. R 2005, 48, 191-226; T. Thurn-Albrecht, J. Schotter, G. A. Kastle, N. Emley, T. Shibauchi, L. Krusin-Elbaum, K. Guarini, C. T. Black, M. T. Tuominen, t. P. Russel, Science 2000, 290, 2126-2129; X. Li, K. H. A. Lau, D. H. Kim, W. Knoll, Langmuir 2005, 21, 5212-5217).
- [0011] 단백질 나노어레이의 패턴형성을 위해서는 표면 고정화 후 단백질 활성을 유지하는 것이다. 일반적으로 적절한 연결 분자(linker molecule)와 화학적 공유 결합을 통해 고정화하는 방법이 사용되어 왔다. 하지만, 화학적 공유 결합은 단계가 복잡하고, 효율이 떨어져서 표면 단백질 밀도와 단백질 활성을 제한하는 문제점이 있었다. 반면에 물리적 흡착에 의한 단백질 고정화 방법은 단백질의 변성을 일으킬 가능성이 있고, 표면에 단백질이 무작위 방향으로 부착되어 단백질 활성이 낮은 단점이 있다. 그럼에도 불구하고, 방법이 간단하여 상당히 많이 적용되고 있다.
- [0012] 이와 관련된 종래 등록 특허기술을 살펴보면, 대한민국 등록특허 10-0532812호에서는 기질-금속 박막-블록공중합체로 구성된 구조물을 에칭하여 노출된 금속에 바이오 리셉터를 부착하는 '블록 공중합체의 나노패턴을 이용한 나노-바이오칩의 제조방법'이 기재되어 있다. 이는 바이오 리셉터와 친화력이 있는 금속에 단백질 등을 부착시키는 것으로 금속과 단백질의 부착력이 약하며, 공정이 복잡한 단점이 있다.
- [0013] 이에 본 발명자들은 보다 간단한 단백질 나노어레이를 제조하기 위하여 각고의 노력을 거듭한 결과, 자기조립 공중합체 템플레이트에 선택적으로 단백질을 부착시킬 수 있는 방법을 알아내고, 이를 이용하여 패턴이 형성된 단백질 나노어레이를 제조함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 보다 간편하게 패턴이 형성된 단백질 나노어레이를 제조하는 방법 및 이에 따라 제조된 단백질 나노어레이를 제공하는데 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질 나노어레이를 이용하여 다양한 표적 생체분자를 검출하는 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 블록 공중합체의 자기조립 특성을 이용하여 나노어레이된 템플레이트를 제조하고, 상기 템플레이트 상에 선택적으로 단백질을 부착시켜 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법을 제공하며, 이에 따라 제조된 단백질 나노어레이를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한 상기 단백질 나노어레이를 이용하여 다양한 표적 생체분자를 검출하는 방법을 제공한다.

효 과

- [0018] 본 발명은 자기조립 블록 공중합체 박막을 이용한 패턴이 형성된 단백질 나노어레이의 제조방법 및 이에 따라 제조된 단백질 나노어레이에 관한 것으로, 종래 단백질 고정화 방법을 개선하여, 보다 간편하게 자기조립 블록 공중합체 박막 상에 단백질을 선택적으로 흡착시킬 수 있게 하며, 다양한 관능화된 단백질을 흡착시킴으로써 단백질 센서로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 상세히 설명한다.
- [0020] 본 발명은 기판 상에 용매에 용해시킨 랜덤 공중합체를 스핀코팅하여 중성 표면층을 형성하는 단계(단계 1); 상기 중성 표면층 위에 용매에 용해시킨 블록 공중합체를 스핀코팅하여 도포하는 단계(단계 2); 상기 블록 공중합체를 열처리하여 자기조립을 유도하고 규칙적인 구조를 형성한 템플레이트로 제조하는 단계(단계 3); 상기 템플레이트를 단백질 용액에 침지하여 단백질이 흡착된 단백질 나노어레이를 제조하는 단계(단계 4); 및 상기 단백질 나노어레이를 세척하여 나노패턴을 형성시키는 단계(단계 5)를 포함하여 이루어지는 패턴이 형성된 단백질

나노어레이의 제조방법을 제공한다.

- [0021] 이하, 본 발명을 단계별로 상세히 설명한다.
- [0022] 먼저, 본 발명에 따른 상기 단계 1은 기판 상에 중성 표면층을 도포하는 단계이다.
- [0023] 상기 기판은 단백질 나노어레이를 지지하기 위한 것으로, 폴리싱된 실리콘 기판 또는 유리기판을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 통상 DNA 센서, 나노칩 등에 사용되는 기판을 사용할 수 있다.
- [0024] 한편, 상기 단계 1의 중성 표면층은 열역학적으로 중성인 표면층을 의미하는 것으로, 중성 표면층 위에 도포되는 블록 공중합체 나노 영역의 배향을 임의의 기판에 수직인 방향으로 유도하기 위해 필요하다. 중성 표면층은 랜덤 공중합체를 기판 상에 도포하여 제조되는데, 바람직하게는 폴리스티렌-폴리벤조사이클로부텐-폴리메틸메타크릴레이트[P(S-r-BCB-r-MMA)]을 사용할 수 있으며, 당업자의 관점에서 자기조립 단분자막, 자외선-오존 조사법 등과 같은 다양한 기법도 사용할 수 있다. 한편, 상기 단계 1의 용매는 벤젠을 사용하는 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 다음으로, 본 발명에 따른 단계 2는 단계 1의 중성 표면층에 용매에 용해시킨 블록 공중합체를 스핀코팅하여 도포하는 단계이다.
- [0026] 본 발명의 효율적인 나노어레이 제조를 위해서는, 상기 블록 공중합체가 폴리스티렌-블록-폴리메틸메타크릴레이트(PS-b-PMMA)인 것이 바람직하다. 상기 자기-조립 공중합체는 이중블록 공중합체로서 양쪽 블록에 모두 친화성이 있는 용매에 용해시킨다. 이때, 용매는 벤젠 또는 톨루엔을 사용하여 제조하는 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다. 나아가, 상기 용매에 용해되는 공중합체의 비율은 0.5 내지 2 중량%인 것이 바람직하다. 상기 자기-조립 공중합체가 0.5 중량% 미만이거나 2 중량 %를 초과하면 나노 도메인의 배향이 정렬되지 않아 나노 패턴이 형성되지 않는 문제가 있다.
- [0027] 상기 폴리스티렌-블록-폴리메틸메타크릴레이트 이중블록공중합체(PS-b-PMMA)의 폴리스티렌 블록과 폴리메틸메타크릴레이트 블록간의 부피 비율은 2.5:7.5 내지 7.5:2.5의 범위인 것이 바람직하다. 너무 한쪽으로 치우치면 구형 도메인이 얻어지고 그 경우 표면에서 패턴이 관찰되지 않는 문제점이 있다.
- [0028] 다음으로, 본 발명에 따른 단계 3은 블록 공중합체 박막을 열처리하여 자기조립을 유도하고 규칙적인 구조를 형성한 템플레이트로 제조하는 단계이다.
- [0029] 상기 단계는 단계 2에서 스핀코팅된 블록 공중합체를 유리전이온도(glass transition temperature, T_g) 이상으로 온도를 올린 후에 서냉하여 자기조립을 유도하는 단계로서, 180 °C의 진공상태에서 2일 동안 방치하여 자기조립을 유도할 수 있다.
- [0030] 다음으로, 본 발명에 따른 단계 4는 단계 3에서 형성된 템플레이트에 단백질을 부착시키는 단계로서, 템플레이트를 일정한 농도의 단백질 용액에 침지시킴으로서 물리적으로 단백질이 흡착되도록 한다.
- [0031] 상기 흡착된 단백질은 표적 생체분자, 예를 들면 단백질, 핵산, 항체, 효소, 탄수화물, 지질 또는 기타 생체 유래의 생물분자와 반응하거나 결합할 수 있는 바이오 리셉터 역할을 하는 것으로서, 표적 생체분자와 특이적 결합을 수행할 수 있는 관능화(functionalization)된 단백질을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 면역글로불린G(IgG), 바이오티닐화된 면역글로불린G(Biotinylated IgG) 또는 소혈청알부민(BSA)일 수 있다.
- [0032] 최적의 패턴 형성을 위해서는, 침지시키는 단백질 농도와 침지시간이 중요한데, 본 발명에서는 바람직하게는 10~20 $\mu\text{g/mL}$ 의 단백질 용액에 8 내지 18분간 자기조립이 유도된 템플레이트를 침지시켜 최적의 패턴을 형성시킬 수 있다. 상기과 같이 단백질 흡착시간과 용액 내 단백질의 농도를 조절함으로써 perfect template registration에 대하여 % deviation이 40% 이하가 되도록 조절할 수 있다.
- [0033] 마지막으로, 본 발명에 따른 단계 5는 단백질이 부착된 템플레이트를 세척하는 단계로서, 흐르는 물 또는 인산 완충용액(PBS)를 이용하여 세척하거나, 단백질 용액을 희석해가면서 세척할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 자기조립이 형성된 블록 공중합체 템플레이트 중 상기 템플레이트를 구성하는 일부 영역에 배타적으로 단백질이 부착되어 패턴이 형성된 것을 특징으로 하는 단백질 나노어레이를 제공한다.
- [0035] 일례로, 본 발명에서 폴리스티렌-블록-폴리메틸메타크릴레이트 공중합체 템플레이트에 BSA 또는 IgG 단백질을 부착시키는 경우, 상기 BSA 또는 IgG는 선택적으로 소수성 PS 영역에만 흡착되게 된다.
- [0036] 나아가, 본 발명은 본 발명에 따라 제조된 단백질 나노어레이를 이용하여, 나노어레이 상의 관능화된 단백질과

상기 단백질에 특이적 결합을 수행할 수 있는 생체분자를 반응시키는 것을 특징으로 하는 표적 생체분자의 검출 방법을 제공한다.

[0037] 이하, 본 발명을 구체적인 실시예 및 실험예를 들어 상세히 설명하고자 하지만, 본 발명의 권리범위가 이들 실시예 등에 한정되는 것은 아니다.

[0038] **실시예 1: 블록 공중합체 템플레이트를 이용한 단백질 나노어레이의 제조(1)**

[0039] 기판(substrate)의 준비

[0040] 실리콘 기판은 폴리싱된(polished) 실리콘 기판(substrate)(522 mm 두께)을 시-맷(Si-Mat; Landsberg, Germany)사에서 구입하여 사용하였다.

[0041] 유리 기판은 열증착(thermal evaporation; Autolab 306, BOC Edwards, UK)에 의해 2 nm의 크롬 접착층(adhesion layer)을 갖는 45 nm의 금으로 코팅된 폴리싱된 LaSFN9 고굴절을 유리 기판을 Hellma Optik GmbH(Jena, Germany)사에서 구입하여 사용하였다.

[0042] 단계 1: 중성 표면층의 제조

[0043] 상기 준비한 유리 기판 위에 수 평균 분자량(Mn; number average molecular weight)이 25 kg mol^{-1} 이고, 다분산성(polydispersity)이 1.18인 스티렌, 반응성 벤조사이클로부텐(BCB) 및 메틸 메타크릴레이트로 이루어진 가교성 랜덤 공중합체(random copolymer)(P(S-r-BCB-r-MMA))를 스핀코팅하여 표면 에너지가 중성인 표면층을 도포하였다. 폴리스티렌/폴리벤조사이클로부텐/폴리메틸 메타크릴레이트의 비율은 55/3/42로 조정하였다. 제조방법은 하기와 같이 활성 프리-라디칼 중합(living free radical polymerization)에 의하여 제조하였다.

[0044] 먼저, P(S-r-BCB-r-MMA)을 벤젠에 0.3 중량%로 용해시킨 후, 유리 기판에 적하시키고, 3000rpm에서 60초 동안 스핀코팅하였다. 그 후, 상기 스핀코팅된 층의 열가교를 위해 220°C 의 진공 상태하에서 하룻밤 동안 방치하여 어닐(anneal)시키고, 톨루엔으로 세척하여 랜덤 공중합체 중성 표면층을 제조하였다. 상기 제조된 중성 표면층의 두께를 표면 프로파일러(모델 P-10, KLA Tencor, USA)를 이용하여 측정한 결과, 약 10 nm였다.

[0045] 단계 2: 자기-조립 블록 공중합체 템플레이트의 제조

[0046] 상기 단계 1에서 제조한 중성 표면층 위에 자기-조립 블록 공중합체 템플레이트를 제조하였다.

[0047] 수 평균분자량(Mn)이 94.4 kg mol^{-1} 이고, 폴리스티렌:폴리메틸메타크릴레이트 부피비가 3:7인 폴리스티렌-블록-폴리메틸메타크릴레이트(PS-b-PMMA)를 톨루엔에 1% 농도로 용해시킨 후 단계 1에서 제조한 중성 표면층 위에 3000 rpm으로 스핀코팅하였다.

[0048] 그리고 나서, 상기 스핀코팅된 층을 180°C 의 진공 상태하에서 2일간 보존하여 열처리시켰다. 상기 열처리된 자기-조립 블록 공중합체 템플레이트는 에탄올로 세척하여 보관하였고, 사용시 탈이온수로 재세척하여 사용하였다.

[0049] 상기 제조된 자기-조립 블록 공중합체 템플레이트를 도 1A에 나타내었다. PS 영역은 6각형으로 배열된 원형이며, PMMA에 의해 둘러싸여 있고, 평균 중심간 반복주기(repeat period)는 약 53 nm였다.

[0050]

[0051] 단계 3: 단백질 나노어레이의 제조

[0052] 상기 단계 2에서 제조된 블록 공중합체 템플레이트 위에 단백질을 흡착시켜 단백질 나노어레이(nanoarray)을 제조하였다.

[0053] 소혈청알부민(BSA)을 인산완충식염수(PBS; pH 7.4)에 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 의 농도로 용해시켜 단백질 용액을 제조한 후 상기 단계 2에서 제조된 블록 공중합체 템플레이트를 4분간 침지시켜 BSA 단백질을 흡착시켰다. 상기 단백질이 흡착된 나노어레이에 인산완충식염수(PBS) 또는 탈이온수를 10초 이내로 흘려주어 세척하였다.

[0054] 상기 단백질 부착 과정을 도 1D에 도식화하여 나타내었다.

[0055] **실시예 2: 블록 공중합체 템플레이트를 이용한 단백질 나노어레이의 제조(2)**

[0056] 상기 실시예 1의 단계 3에서 단백질로 BSA 대신에 IgG를 사용한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 단백질 나노

어레이를 제조하였다.

[0057] **실험예 1: 단백질 나노어레이의 패턴 특성 분석**

[0058] 자기-조립 공중합체 템플레이트의 특성 분석

[0059] 실시예 1의 단계 1과 2를 거쳐 제조된, 단백질이 부착되지 않은 자기-조립 블록 공중합체 템플레이트의 특성 분석을 위하여, 상기 템플레이트를 물로 세척하고, 질소가스로 건조시킨 후 원자힘현미경(AFM)으로 관찰하였다. $15 \times 15 \mu\text{m}$ 스캐너를 갖춘 Nanoscope IIIa Multimode(Digital Instruments/Veeco Metrology, USA)를 이용하여 태핑모드 AFM(Tapping mode AFM)을 수행하였으며, 2종류의 4면체 실리콘 마이크로 캔틸레버(cantilever)(Olympus, Japan)와 42 Nm^{-1} , 300 kHz 팁을 사용하였다.

[0060] 측정결과는 도 1B 및 1C에 나타내었다.

[0061] 도 1B는 AFM 위상차(phase contrast) 영상을 나타낸 것으로, 위상차는 다른 중합체 상에서의 태핑 AFM 팁의 에너지 손실차를 측정하는 것이다. 도 1B에서 알 수 있는 바와 같이, PS 영역은 어두운 영역으로, PMMA는 보다 밝은 색상의 영역으로 나타났으며, PS 영역은 PMMA 매트릭스에 의해 둘러싸여 있었다.

[0062] 도 1C는 AFM 높이 영상(height image)을 나타낸 것으로, 평평한 토포그래피(topography)를 나타내었고 ($R_{\text{rms}}=0.4 \text{ nm}$), 측정된 PS 표면 분율(surface fraction)은 PS:PMMA 부피 비와 일치하게 29 %였다.

[0063] 단백질 나노어레이의 패턴 특성 분석

[0064] 실시예 1의 단계 1, 2 및 3을 거쳐 제조된 BSA가 부착된 나노어레이와 실시예 2의 단계 1, 2 및 3을 거쳐 제조된 IgG가 부착된 나노어레이에 대하여, 원자힘현미경(AFM)을 이용하여 높이 영상을 촬영하였다. 1.8 Nm^{-1} , 70 kHz 팁을 사용하였다. 관찰 결과는 하기 도 1E 및 도 1F에 나타내었다. 상기 결과들은 건조된 상태의 나노어레이를 대상으로 AFM을 통하여 관찰한 것이며, 상기 나노어레이의 변형을 최소화하기 위하여 PBS 용액에 침지되어 있는 액상 상태에서도 관찰이 가능하다. 다만, 건조 상태에서의 해상도가 더 좋으므로, 본 명세서의 도면은 건조상태의 결과로 나타내었다.

[0065] 도 1E는 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 의 IgG이 용해된 PBS 용액에 4분간 침지하여 제조된 BSA 나노어레이의 높이 영상을 나타낸 것이고, 도 1F는 $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ 의 IgG이 용해된 PBS 용액에 10분간 침지하여 제조된 나노어레이의 높이 영상을 나타낸 것이다.

[0066] 도 1E와 F를 단백질이 부착되지 않은 템플레이트(도 1C)와 비교하여 볼 때, 단백질이 PS 영역에만 독점적으로 부착되었고, 단백질 나노어레이가 BCP 6각형 구조에 의하여 템플레이트 되었음을 확인할 수 있었다.

[0067] 도 1F에서 IgG 클러스터는 2~5 nm의 높이를 가지며, IgG의 장축이 표면에 평행한 것으로 나타났다. BSA(66kDa; $8 \times 7 \times 4 \text{ nm}$)는 IgG(150kDa; $14 \times 9 \times 4 \text{ nm}$)보다 크기가 작으며, 따라서 흡착된 BSA 클러스터는 높이가 더 짧았다. 상기 측정된 높이는 AFM 팁에 의한 기계적 압축을 고려하여 실제보다 낮게 측정된 것으로 간주해야 한다. 도 1F에서 각 단백질 클러스터 내의 개별적인 높이 돌출(protrusion)은 지름이 11~19 nm인데, 이는 대략 IgG의 장축에 해당하는 것이고, 개개의 IgG를 가리키는 것일 수 있다. 측정된 지름 및 높이가 다양한 것은 흡착된 방향이 다양함을 의미하는 것일 수 있으며, 나노클러스터 당 5 개 또는 그 이상의 IgG이 있다고 추측된다.

[0068] **실험예 2: 단백질의 흡착 동역학 측정**

[0069] BSA와 IgG는 많은 고분자 표면에 흡착하며, 일반적으로 PMMA보다 PS에 흡착되는 단백질의 양이 많다고 알려져 있다. 본 실험에서는 표면플라즈몬공명(surface plasmon resonance, SPR) 분광기(spectroscopy)를 이용하여 실시간(in situ) IgG 흡착 동역학(adsorption kinetics)을 측정하였다. 상기 SPR은 단백질 흡착의 결과 증가된 표면상의 광학적 밀도를 측정함으로써 단백질 층 두께를 측정하게 된다. 상기 실험을 위하여 45 nm의 금으로 코팅된 유리 기판 위에 순수한 PS 및 PMMA가 코팅된 막을 제조하였다. 본 실험 조건하에서 BSA 또는 IgG가 PS와 PMMA에 동시에 흡착할 수는 없으며, 흡착된 단백질 및 그 사이 공간이 광학 신호에 기여하기 때문에 측정된 단백질 층 두께는 단백질 도포(coverage)를 가리키는 유효수치이다. 최대 도포는 단백질 흡착 동역학이 층 두께 면에서 더 이상 증가하지 않을 때 도달한다.

[0070] 측정결과는 도 2에 나타내었으며, 도 2는 $8.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 용액으로부터의 IgG 흡착 동역학을 보여준다. 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, PMMA 대비 PS 흡착 비율은 모든 흡착단계에서 1.2 내지 2의 범위였으며, 이로부터 IgG가

PMMA보다 PS에 흡착되는 것을 더 선호한다는 것을 알 수 있었다. 상기 흡착 비율은 IgG의 농도에 약간 민감하였는데, $17 \mu\text{g mL}^{-1}$ 에서 3.8로 증가하였다. 본 발명의 단백질 나노어레이 표면의 30%만이 PS로 구성되어 있다는 사실을 고려할 때, 이론적으로 PMMA에 흡착되는 IgG의 양과 PS에 흡착되는 IgG의 양이 동일할 것이다. 나아가 도 2에서 10분 동안의 흡착 후 PS 상의 유효 IgG 층 두께는 40분에서의 최종 두께의 절반밖에 되지 않았으며, 이는 표면 도포가 낮음을 의미한다. PMMA의 경우에도 비슷한 경향이 관찰된다. 따라서, IgG 나노어레이를 제조함에 있어서, 10분 흡착 후에는 PS와 PMMA 상의 많은 부위는 여전히 다 채워지지 않은 상태로 존재함이 분명하다. 하지만, 도 1F에서 알 수 있는 바와 같이, IgG이 PMMA 매트릭스 상에 흡착되지 않으며 PS 영역에만 도포되므로, PS 영역에의 흡착 선호와 같은 단일 변수에 의해 관찰된 PS 영역 상의 독점적 단백질의 나노패터닝을 설명할 수 없을 것이다.

[0071] 실험예 3: 블록 공중합체 크기에 따른 단백질 나노어레이의 패턴 특성 분석

[0072] 블록 공중합체 크기에 따른 본 발명의 블록 공중합체 단백질 나노어레이의 특성을 알아보기 위하여 총 분자량 (Mn)이 각각 42, 204, 1725 kg mol⁻¹인 PS-b-PMMA를 대상으로 AFM을 측정하였다. PS와 PMMA 비율은 1:1의 부피 비로 하였고, 흡착시간은 각각 4분, 12분 및 10분으로 조절하였다.

[0073] 측정결과는 도 3A 내지 도 3F에 나타내었다. 도 3A 및 도 3B는 42 kg mol⁻¹, 도 3C 및 도 3D는 204 kg mol⁻¹인, 도 3E 및 도 3F는 1725 kg mol⁻¹인 PS-b-PMMA의 AFM 및 AFM 높이 영상을 나타낸다.

[0074] 도 3의 결과로부터 PS-b-PMMA의 크기를 달리한 경우, PS 영역 라인 폭(Wps)이 각각 13 nm, 55 nm 및 ~200 nm이었고, 반복 주기가 29 nm, 116 nm 및 ~300 nm임을 알 수 있었다. 가장 큰 분자량을 갖는 PS-b-PMMA는 유동성이 낮아 큰 범위의 자기 정렬을 하기에 충분치 않음에도 불구하고, 제조된 패턴은 전형적이고 재현 가능한 평균 영역 반복 주기를 나타내었다.

[0075] 한편, Wps가 13 nm인 경우 각각의 IgG 주위에 16 nm이하의 넓은 점들이 연속적으로 줄지어 나타났는데(도 3B), 이는 IgG를 가리키는 것으로써 IgG이 PS 영역에만 흡착되었음을 입증하는 것이다. Wps가 큰 경우(도 3D, 3F), IgG가 주로 PS에 흡착되었음에도 불구하고, 몇몇 IgG는 또한 주로 PMMA 영역에서 관찰되었다. 더욱이, 더 큰 플레이트 상에서는 IgG가 부착되지 않은 표면 역시 IgG가 풍부한 PS 영역 내에 존재하였다. 그러므로, PS 상으로만 단백질이 흡착되는 것은 PS-b-PMMA 템플레이트의 분자량 크기와 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

[0076] 실험예 4: 세척방법을 달리한 블록 공중합체 단백질 나노어레이의 패턴 특성분석

[0077] 단백질 나노어레이 제조 후 세척방법을 달리한 경우의 차이를 비교하기 위하여 1) 흐름 세척(flowing rinse); 2) 정적 세척(static wash)으로 나누어 세척을 하였다. 1) 흐름 세척의 경우 흐르는 탈이온수 하에서 10초간 세척하였고, 2) 정적 세척의 경우, 탈이온수로 단백질 용액을 천천히 희석하여 세척하였다. 그리고 나서 각각을 건조한 후 AFM 높이 영상을 촬영하였다. 도 4A 및 4B에 ~300 nm의 반복 주기를 갖는 템플레이트(도 3F에 해당)의 AFM 높이 영상을 나타내었다. 상기 도 4A와 4B의 PS 영역의 외곽선은 컴퓨터 영상 분석에 의하여 확인되었고, 이를 통하여 IgG 클러스터가 PMMA 영역 상에 상대적으로 드물게 존재함을 알 수 있었다.

[0078] 한편, 도 4C에 $\sim 10 \mu\text{m}^2$ 에 해당하는 면적에 해당하는 PMMA 영역의 도포 측정결과를 나타내었다. 도 4C에서 보는 바와 같이, 흐름 세척 후 PMMA 상에 부착된 IgG의 양은 10% 이하였는데, 정적 세척 후 PMMA 상에 부착된 IgG는 이보다 3배 정도 도포량이 더 높음을 알 수 있었다. 이러한 경향은 크기가 작은 공중합체를 사용한 템플레이트에서도 유사하였다. 따라서, 흐름 세척시의 수력학적 힘이 PMMA 상의 IgG 도포를 급격하게 감소시키는 주 요인으로 파악되었다.

[0079] 또한, 도 1에서 나타낸 바와 같이, 단백질 나노어레이를 몇 분동안 흐름 세척시에도 나노패턴은 원상태를 유지하였고, 특히 PS 영역에 흡착된 IgG는 제거되지 않았었다. 나아가 도 2의 SPR 측정 결과를 통해서도 IgG이 PMMA보다 PS에 흡착되는 것을 선호하고, 흡착 동역학이 빠르며, PMMA보다 PS 상에서는 탈착이 덜하다는 것을 알 수 있었으며, 이로써 IgG가 PMMA 보다는 PS와 더 강한 상호작용을 한다는 것을 확인할 수 있었다. 동시에, 도 2로부터 10초간의 흐름 세척과 같은 짧은 세척에 의하여는 PMMA로부터 탈착되는 IgG의 양이 적음을 알 수 있다(예를 들어, 1분 세척 후 2% 탈착됨). 결론적으로 짧은 흐름 세척 후에는 PS-b-PMMA 나노어레이 템플레이트 표면로부터 탈착이 없었다.

[0080] 본 발명자는 PMMA가 더 높은 분획 표면 면적을 가지며, IgG가 PS 영역을 더 선호하여 흡착하는 것으로부터 PS와 PMMA 영역에 흡착되는 양이 거의 동일할 것이라고 기술한 바 있다. 또한, 10분 흡착 후 흡착된 IgG의 양은 표면

을 완벽히 도포하지 못하였다고 기술한 바 있다. 1) 짧은 세척으로 인한 탈착이 그리 심하지 않다는 점, 2) PS에 흡착된 IgG는 견고하게 고정되어 있다는 점, 3) 흐름 세척으로 PMMA 상의 IgG 밀도가 급격하게 감소될 수 있다는 점들을 종합하여 볼 때, PMMA 상에 흡착되었던 IgG가 세척 중에 비어있는 PS 표면상으로 이동하였음이 분명해진다. 이는 연속적인 탈착 및 재부착을 통해 이뤄질 수 있다.

[0081] 50 nm 이상의 PS 영역을 갖는 템플레이트 상으로의 독점적 패턴 형성이 불가능하다는 점은 패턴형성 과정에 관하여 좀 더 세부적 사항들을 제공한다. 첫째는, 흐름 세척 동안에 IgG 이동이 공간적으로 제약받다는 것이다. 둘째는, 더 넓은 PS 영역을 갖는 템플레이트의 경우에 PS 영역 일부가 비워져 있는데(도 3D, 3F), IgG의 탈착이 무시할만한 수준이라는 점과 SPR 측정으로부터 10분 흡착 시간으로는 IgG가 PS 영역을 완전히 도포하지 못한다는 점(도 2)을 감안할 때, PMMA 상에 흡착되어 있던 IgG가 이동 중에 PS/PMMA 경계를 지나면서 비워져 있는 PS 영역을 만나 흡착하여 고정화됨으로써, 비어 있는 PS 영역으로 이동하는 다른 IgG의 이동을 막는다는 점이다. 이는 도 3D 및 F에서 PS와 PMMA 영역간의 경계부분에 흡착된 IgG이 존재하는지를 통해 즉시 확인할 수 있다.

[0082] 블록공중합체 나노패턴의 크기가 감소함에 따라, PS/PMMA 경계의 단위 면적 당 길이가 증가한다. 따라서, PS-b-PMMA 나노패턴의 영역 사이즈가 감소함에 따라 이동하는 IgG의 재부착이 가능한 비어있는 PS 영역의 비율이 증가하게 될 것이다. 사실상, 만약 PS 영역의 폭이 단백질 크기의 2배이면, 모든 PS 흡착 지점은 PS/PMMA 경계에 인접할 것이고, 잠재적으로 재부착이 가능할 것이다. IgG의 부피($14 \times 9 \times 4$ nm)와 IgG이 아마도 부착점의 수를 최대화하기 위해 표면에 평행한 장축으로 흡착될 것이라는 것을 고려할 때, PS 영역이 초기 흡착 동안에 이미 완전히 도포되지 않는 한 18~28 nm까지의 PS 영역 폭을 갖는 나노패턴에 대하여 흡착과 세척에 의해 독점적 패턴형성이 가능할 것이다. 실질적으로 개별적인 IgG 크기보다 작은 비어있는 PS 표면은 단백질 패턴 정의를 엄격히 분해하지 않을 것이며, 단백질 크기의 3배 정도의 폭이 사용될 수 있을 것이다.

[0083] 세척 및 PMMA 표면상의 IgG 이동 외에도, 표면 장력이 단백질의 이동과 부분적으로 관련이 있을 수 있다. 그럼에도 불구하고, 정적 세척 후에는 IgG가 PMMA 표면에 존재하였고, 따라서, PS 영역에만 배타적으로 IgG 패턴형성을 위해서는 외부 수력학적 힘이 요구될 것이다.

[0084] 실험예 5: 흡착 시간 및 단백질 용액의 농도에 따른 블록 공중합체 단백질 나노어레이의 특성 분석

[0085] PS 영역에만 배타적으로 흡착된 PS 단백질 나노어레이의 최적화를 위해서는, 템플레이트 크기, 단백질 크기 등과 같은 구조적 제약 이외에도 흡착되는 총 단백질 양이 매우 중요하다. 왜냐하면, 초기에 PS와 PMMA에 흡착된 IgG의 합이 PS 영역에 존재하는 모든 흡착 부위를 차지할 수 있을 만큼 충분해야 하기 때문이다. 너무 많은 IgG가 흡착되면, 단백질이 덜 선호하는 PMMA 표면도 채우게 되고, 그 결과 나노어레이를 정의(definition)하는 기준이 모호해질 것이며, 반면 너무 적은 IgG가 흡착되면 불완전한 패턴이 형성될 수 있다.

[0086] 또한, 흡착 시간은 별개로 하고, 흡착에 사용되는 단백질 용액의 농도도 템플레이트에 흡착되는 양에 영향을 미치는 또 다른 주된 요인이다. 낮은 농도에서는 동일한 양의 단백질을 흡착하기에 더 많은 시간이 필요할 것이고, 높은 농도의 경우에는 짧은 시간으로도 가능할 것이기 때문이다. 일반적으로 흡착된 단백질과 표면 간의 상호작용 힘은 초기 흡착 후 시간에 따라 증가한다. 따라서, 만약 단백질이 PMMA 상에서 충분한 유동성이 없다면 흡착 시간이 긴 것이 단백질 나노어레이 형성에 있어 바람직하지 않을 것이고, 너무 흡착시간이 짧으면, PS 및 PMMA 상에서 단백질의 유동성이 너무 높아 최적의 패턴을 정의하는데 바람직하지 않을 것이다.

[0087] 최적 IgG 나노어레이 형성을 위한 조건을 찾기 위하여, 단백질 용액의 농도와 흡착 시간 간의 관계를 실험적으로 탐색하였다. 영상 분석(image analysis)을 통하여, 각 흡착된 단백질 나노클러스터와 PS 영역 간의 면적과 형태상의 차이, 단백질 나노어레이와 PS 영역간의 표면 도포 차이를 측정하고, 이로부터 이상적인 PS-b-PMMA 나노패턴과 본 발명의 단백질 나노어레이의 일치 정도를 파악하였다. 상기 결과들은 도 5에 이상적인 PS-b-PMMA 템플레이트 패턴(perfect template registration)으로부터의 평균 및 절대 퍼센트 편차(% deviation)로 도식화하였다. 퍼센트 편차가 작을수록, 단백질 나노어레이는 이상적인, 각형의 정렬된 PS-b-PMMA 템플레이트와 잘 일치함을 의미한다.

[0088] 도 5의 결과로부터 흡착 시간 10분, 단백질 용액 농도 $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ 이 최적의 조건임을 알 수 있었다. 도 5에 삽입된 AFM 영상들은 이러한 분석결과로 불완전하거나 지나치게 채워진 템플레이트를 잘 형성된 IgG 나노어레이와 구분 할 수 있음을 보여준다. 예를 들면, 도면 상단 우측에 삽입된 영상은 PS 영역을 완전히 도포하기에 충분한 양보다 많은 IgG가 흡착되면, 상기 IgG는 PMMA 부위, 특히 PS 영역에 인접한 부위에 흡착된다는 것을 보여준다. 그 결과 거의 분리되지 않은 단백질 클러스터를 야기하였다. 도 5에서 상대적으로 낮은 농도의 편차(<40%)는 낮은 농도와 긴 흡착시간으로부터 높은 농도 및 짧은 흡착 시간으로 그래프의 사선방향을 따라 증가한다. 이는 좋

은 패턴 정의를 얻기 위해서는, 흡착되는 단백질의 총량이 더 중요함을 보여준다. 즉, 본 발명에서 좋은 단백질 패턴은 perfect template registration에 대하여 % deviation이 40% 이하가 되도록 흡착 시간과 용액 내 단백질의 농도를 조절하여 얻을 수 있는 것으로 나타났다.

[0089] **실험예 5: IgG 나노 어레이의 면역분석법 수행**

[0090] 상기 최적 조건하에서 제조된 IgG 나노어레이에 대하여 면역분석법을 수행하여 흡착된 단백질의 활성을 측정하였다.

[0091] RxM-IgG 항원 또는 MxG-IgG 항원 결합 실험

[0092] 도 6에 나타난 방법에 의하여, 블록 공중합체 템플레이트 상의 PS 영역에 goat anti-Rabbit IgG(GxR-IgG)를 흡착시켜 단백질 나노어레이 패턴을 형성한 후, 상기 패턴을 형성한 단백질 나노어레이를 BSA(100 $\mu\text{g/mL}$ -1) 용액에 60분간 침지시켜 BSA가 PMMA를 덮어 RxM-IgG 항원의 비특이적 흡착을 방지하였다. 이 후 항원인 Rabbit anti-mouse IgG(RxM-IgG)를 도입하여 GxR-IgG에 결합하도록 하였다. 상기 RxM-IgG는 17 $\mu\text{g/mL}$, 85 $\mu\text{g/mL}$ 및 170 $\mu\text{g/mL}$ 로 농도를 달리하여 결합시켰다.

[0093] 상기 항원을 흡착한 단백질 나노어레이에 대하여 실시간 SPR을 이용하여 유효 층 두께와 GxR-IgG 나노어레이의 양 대비 결합한 RxM-IgG의 양(결합비율, 즉 항원결합능력)을 계산하여 도 7에 나타내었다.

[0094] BSA 흡착 후 170 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ 의 고농도의 GxR-IgG를 재도입한 대조군 실험을 한 결과, 더 이상 흡착이 나타나지 않았으며, 이는 BSA의 패시베이션(passivation; 표면을 덮는 것)의 효과를 입증하는 것이다. GxR-IgG가 무작위 방향으로 GxR-IgG에 흡착되었고, BSA에 의하여 압축되었음에도 불구하고, 17 $\mu\text{g/mL}$ -1($\sim 1 \mu\text{M}$)의 RxM-IgG의 경우 30분 결합 후 0.04 비율의 항원결합이 관찰되었다. 5배 이상의 항원 농도에서는 결합비율이 0.13으로 3배 정도 증가하였고, 10배 이상의 농도에서는 결합비율이 0.2로 5배 증가하였다. 도 7의 좌측에 삽입된 AFM 높이 영상은 GxR-IgG/BSA 표면이 평평함을 보여주고, 우측에 삽입된 AFM 높이 영상은 GxR-IgG 나노어레이에 결합된 RxM-IgG가 6각형 어레이를 형성하고 있음을 보여준다.

[0095] 한편, Rabbit anti-mouse IgG(RxM-IgG) 대신에 mouse anti-goat IgG(MxG-IgG)를 항원으로 이용하여 결합시키고 면역분석을 수행한 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 17 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에도 불구하고 0.3의 결합비율이 측정되었다. 이는 MxG-IgG가 결합을 위한 최적의 방향을 찾는 데 보다 자유롭게 거동하기 때문으로 판단된다.

[0096] **실험예 6: IgG-b 나노 어레이 센서의 제조 및 특성 분석**

[0097] IgG-b 나노어레이 센서의 제조

[0098] 본 발명의 단백질 나노어레이의 잠재적 응용성을 평가하기 위하여, 나노어레이 형태의 DNA 센서용 스트랩타비딘-PNA(peptide nucleic acid) 구조물을 제조하였다. 상기 구조물의 제조방법은 도 6B에 나타내었다.

[0099] 구체적으로 바이오틴화된 IgG(IgG-b)를 본 발명의 블록 공중합체 템플레이트에 8.5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ 의 농도로 6분간 흡착시켜 패턴을 형성하게 한 후, BSA를 사용하여 부착되지 않은 고분자 표면을 도포하였다. 상기 IgG 나노어레이를 안정화하기 위하여 에틸렌 글리콜 비스(숙신이미딜 숙시네이트)에 의하여 BSA 층을 가교결합시켰다. 그리고 나서, 스트랩타비딘(6 $\mu\text{g/mL}$ -1)을 도입하여 IgG-b 클러스터에 결합시켰다. 그 후 15-mer의 단일 가닥의 바이오틴화된 PNA 프로브(1 μM)를 IgG-b/스트랩타비딘 클러스터 위에 고정화하였다. 상기 PNA는 활성을 갖는 DNA 센싱 요소로서, 상기 고정화된 PNA에 상응하는 단일가닥의 DNA 타겟 서열이 혼성화되는 반면, 일치하지 않은 서열은 혼성화되지 않거나 불일치하는 경우 효능이 감소된다. 또한, 상기 단일가닥의 타겟 DNA 서열에 형광표지물질을 부착하면 표면 플라스몬 장-증가(field-enhanced) 형광(fluorescence) 분광기(SPFS)에 의하여 혼성화 동역학을 측정할 수 있다.

[0100] SPFS를 이용한 혼성화 동역학 측정

[0101] 상기 제조된 IgG-b/BSA/스트랩타비딘/PNA 나노어레이에 대하여 DNA 결합의 SPFS 동역학을 측정한 결과는 도 8에 나타난 바와 같다.

[0102] 우선 백그라운드 대조구에 스트랩타비딘을 결합시킨 후 PNA 프로브 고정화 전에 상응하는 DNA 타겟(44 nM)을 도입한 결과, PNA 프로브가 존재하지 않아 혼성화가 일어나지 않았고, 그 결과 형광 강도는 백그라운드 수준 이상으로는 거의 올라가지 않았으며 세척 후에는 백그라운드 수준으로 되돌아왔음을 알 수 있었다.

[0103] 한편, PNA 프로브 고정화 후 하나의 뉴클레오티드가 불일치하는 44 nM(M1)의 DNA 타겟 서열을 도입한 결과, 이

로 인하여 결합 동역학이 약간 상승하였고, 세척으로 상기 불일치하는 PNA-DNA의 급격한 해리가 일어났다. 상기 나노어레이-센서 구조물은 10 μ M의 NaOH 첨가로 재생되었는데, 상기 NaOH는 결합된 모든 DNA를 완전히 해리하여 씻겨 나가게 한다.

[0104] 다음으로 44 nM의 상응하는 DNA(MO)를 도입한 경우, 40%의 형광이 증가하였고 동역학이 훨씬 빨라졌는데 이는 혼성화가 강하게 일어났음을 의미하는 것이다. 세척 후에도 PNA-DNA의 해리는 매우 낮은 수준이었다.

[0105] 상기 결과를 종합하여 볼 때, 센서 구조물에 기초한 본 발명의 나노어레이는 혼성화된 DNA 양과 결합 및 해리 동역학으로부터 하나의 뉴클레오타이드 불일치까지 구별할 수 있으므로, DNA 센서로 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

[0106] 나아가, 본 발명의 나노어레이에 흡착되는 단백질을 적절하게 관능화(functionalization)하면, 기타 다양한 분자들을 결합시킬 수 있는 효과가 있으므로, 이에 기초하여 보다 복잡한 생분자 조합의 나노어레이를 제조하는데 응용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0107] 도 1A는 PS-b-PMMA 블록 공중합체를 도포한 후 자기조립을 유도하고 규칙적인 나노 구조를 갖게 된 템플레이트의 구조를 나타낸 것이고, 도 1B는 상기 템플레이트의 AFM 위상차 영상을, 도 1C는 상기 템플레이트의 AFM 높이 영상을 나타낸 것이며, 도 1E는 BSA 나노어레이의 높이 영상을, 도 1F는 IgG 나노어레이의 높이 영상을 나타낸 것이다.

[0108] 도 2는 본 발명에 따른 단백질 나노어레이의 시간 경과에 따른 층 두께를 나타낸 것이다.

[0109] 도 3은 블록 공중합체 크기에 따른 단백질 나노어레이의 패턴 특성을 나타낸 것으로, 도 3A 및 도 3B는 42 kgmol⁻¹인 PS-b-PMMA의 AFM 위상차 영상 및 AFM 높이 영상을 나타낸 것이고, 도 3C 및 도 3D는 204 kgmol⁻¹인 PS-b-PMMA의 AFM 위상차 영상 및 AFM 높이 영상을 나타낸 것이며, 도 3A 및 도 3B는 1,725 kgmol⁻¹인 PS-b-PMMA의 AFM 위상차 영상 및 AFM 높이 영상을 나타낸 것이다.

[0110] 도 4는 세척방법에 따른 PMMA 상의 단백질 부착 정도를 나타낸 것으로, 도 4A는 흐름 세척, 도 4B는 정적 세척의 AFM 높이 영상을 나타낸 것이고, 도 4C는 이를 그래프화한 것이다.

[0111] 도 5는 단백질 농도와 흡착 시간에 따른 이상적인 PS-b-PMMA 나노패턴과의 비교에 의한 편차를 그래프로 나타낸 것이다.

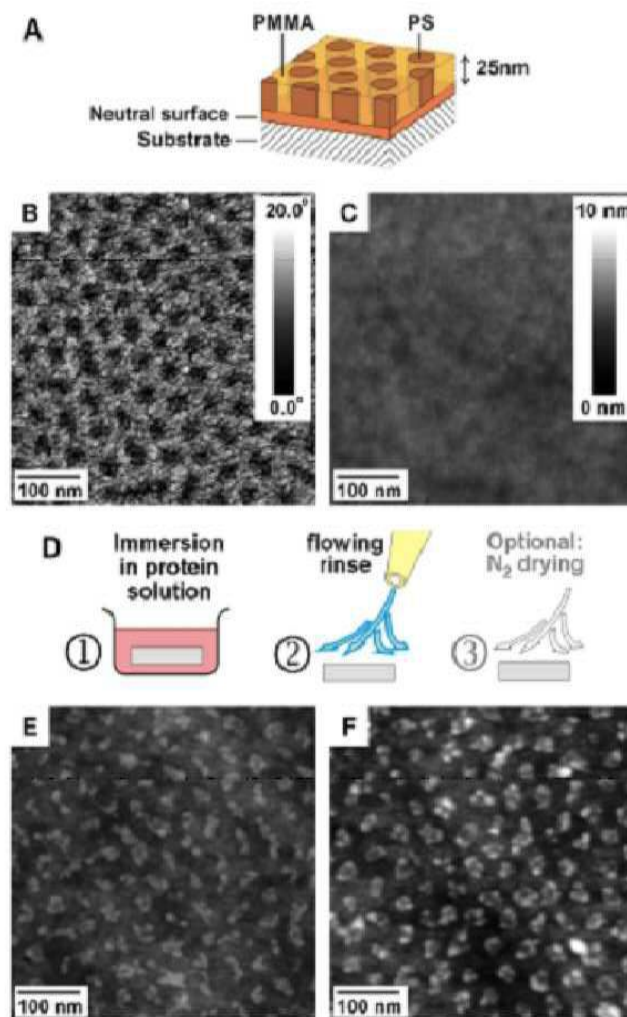
[0112] 도 6A는 블록 공중합체 템플레이트 상에 GxR-IgG를 흡착시키고, 이에 항원인 RxM-IgG 또는 MxG-IgG를 결합시킨 구조를 모식적으로 나타낸 것이고, 도 6B는 블록 공중합체 템플레이트 상에 바이오틴화된 IgG(IgG-b)를 흡착시키고, 이에 스트렙타비딘을 결합시킨 후 DNA 센싱 요소인 PNA 프로브를 고정화한 DNA 센서를 모식적으로 나타낸 것이다.

[0113] 도 7은 RxM-IgG 또는 MxG-IgG 항원이 결합된 IgG 나노어레이에 대하여 유효층 두께와 GxR-IgG 대비 결합한 RxM-IgG, MxG-IgG의 양을 나타낸 것이다.

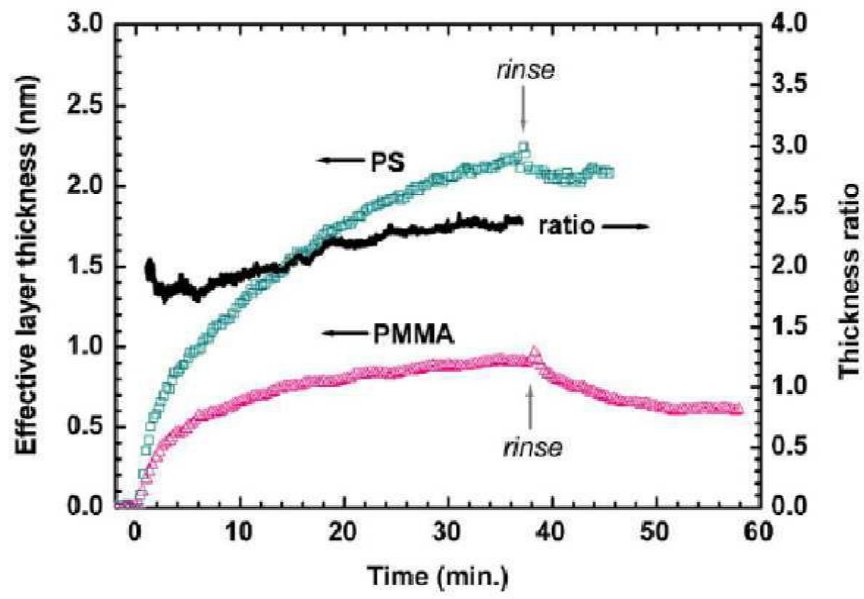
[0114] 도 8은 IgG-b/BSA/스트렙타비딘/PNA 나노어레이에 대하여 DNA 결합의 SPFS 동역학을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도면

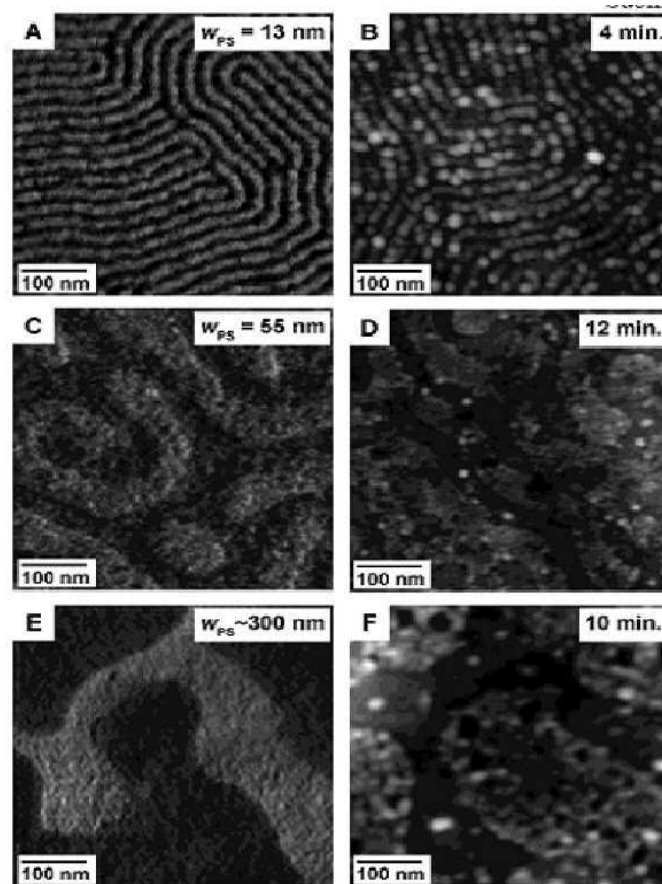
도면1



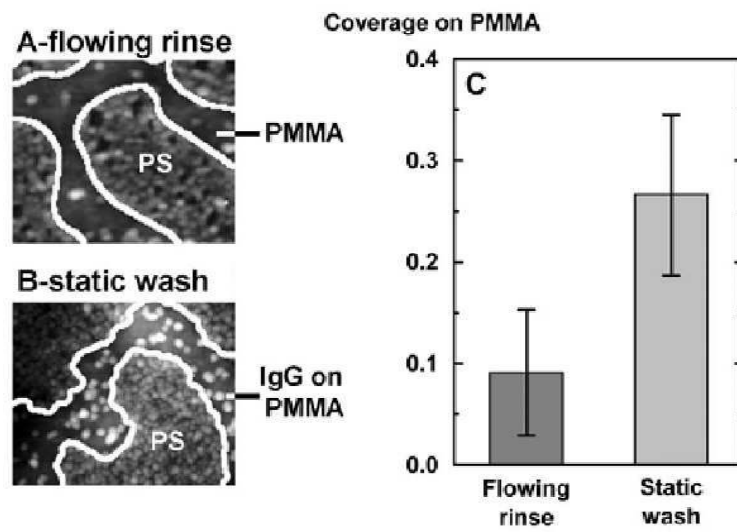
도면2



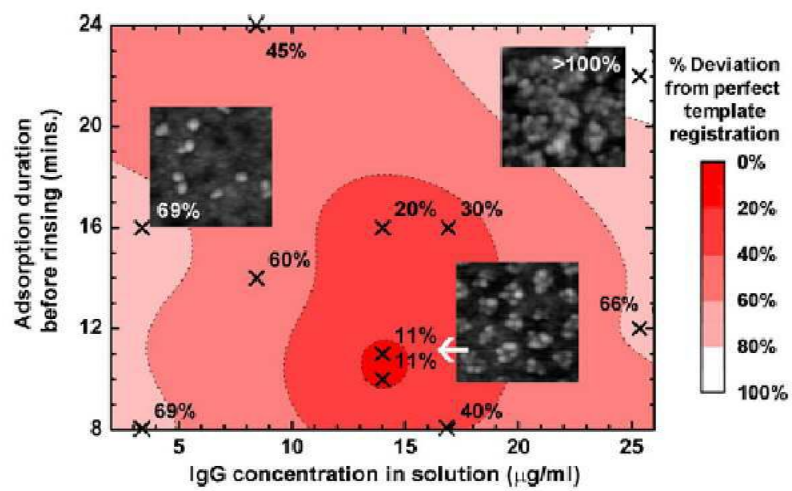
도면3



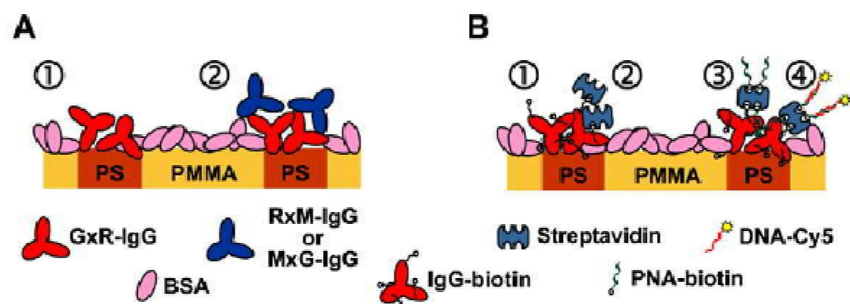
도면4



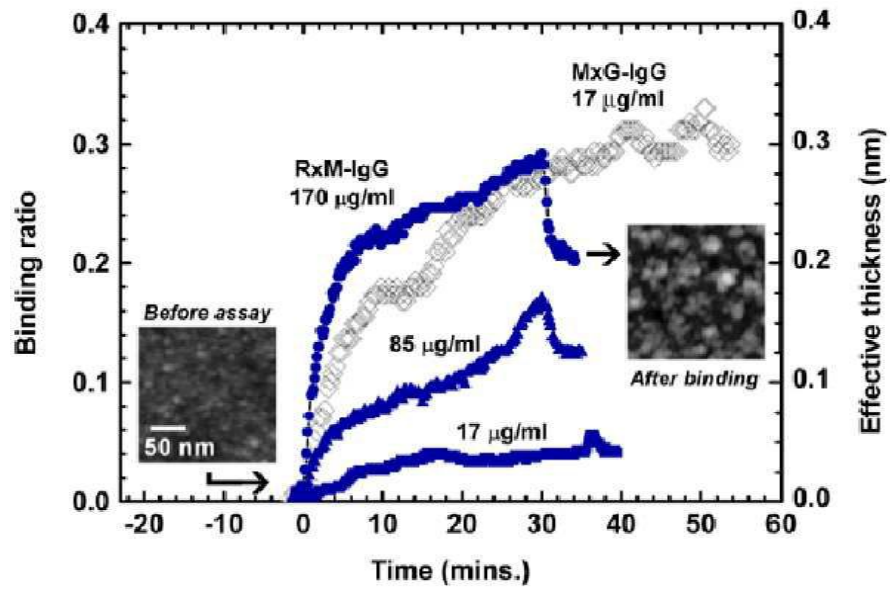
도면5



도면6



도면7



도면8

