제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를" 신기능 효소발굴 및 재설계 원천기반기술개발 과제(세부과제" 미생물 유전체 활용 초고속 효소탐색을 위한 나노 Raman 분광 시스템 개발") 의 보고서로 제출합니다

2005. 05. 24

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 김 민 곤

연 구 원 : 신 용 범

〃 : 정 효 암

〃 : 황 혜 숙

〃 : 곽 동 환

〃 : 신 임 호

보고서 초록

과제관리번호	MG02 - 0301 - 0 05 - 2 - 1 - 0	해당단계 연구기간	30개월	단계 구분	1단계 / 1단계
연구사업명	중 사 업 명	21세기 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	미생물유전체활용기술개발사업			
연구과제명	중 과 제 명	신기능 효소발굴 및 재설계 원천기반기술개발			
	세부과제명	미생물 유전체 활용 초고속 효소탐색을 위한 나노 Raman 분광 시스템 개발			
연구책임자	김 민 곤	해당단계 참여연구원수	총 : 23 명 내부 : 6 명 외부 : 17 명	해당단계 연구비	정부: 178,750 천원 기업: 68,750 천원 계: 247,500 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 바이오나노연구센터	참여기업명	케이맥(주)		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위 탁 연 구	연구기관명 :	연구책임자 :			

요약	보고서 면수	60

유용 효소의 마이크로어레이 기반 초고속 스크리닝 기술을 개발하기 위하여 나노 Raman 기술(또는 SERS)을 활용한 결과 범용적으로 활용하기 어려운 것으로 나타났으며, 대안적인 방법으로 SPR 이미징 시스템을 이용한 방법을 개발하였다. 본 연구에서 마이크로어레이 상에서 효소활성 분석에 대한 몇 가지 방법을 고안하였는데, 가장 간편하고 범용성이 좋은 방법은 다음과 같다. Esterase 효소 분석을 SPR 마이크로어레이 분석을 위해, ester 기질에 alcohol oxidase, peroxidase, 4 - chloro - 1 - naphthol 을 미량 첨가하여, esterase 효소가 가수분해 반응을 할 경우 SPR 표면에 침전이 유도되도록 하여 SPR 이미징 시스템으로 분석하는 것이다. 이 방법에 의해 수십 ~수백 개 이상의 esterase 와 다양한 실제 기질들에 대한 마이크로어레이 기반 초고속 분석이 가능하였으며, oxidase, dehydrogenase, monooxigenase 등 다른 종류에 대한 분석 방법에 적용이 가능함을 확립하였다.

색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	나노기술, 표면증강라만산란, 표면플라즈몬공명, 효소, 마이크로어레이, 스크리닝
	영 어	nanotechnology, SERS, SPR, enzyme, microarray, screening

요 약 문

Ⅰ. 제 목

미생물 유전체 활용 초고속 효소탐색을 위한 나노 Raman 분광 시스템 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

- ▶ 최근 미생물 유전체 확보에 따라 효소를 유전자로부터 변형하는 단계에서 유전체로부터 진화시키는 high-throughput screening 시스템으로의 패러다임 전환이 요구되고 있는 시점에 효소의 high-throughput screening 에 있어서 bottleneck 이 되고 있는 기술은 초고속 효소활성 분석기술이다
- ▶ 대부분의 연구에서 실제적인 효소 분석은 GC 및 HPLC 방법을 사용하게 되는데 이 방법은 지금까지 보고된 바에 의하면 가장 최적화된 방법을 사용하더라도 하루에 500 회 정도 분석할 수 있는 것으로 알려져 있다.
- ▶ 따라서 보다 빠른 효소반응 분석속도가 필요하며, 특정 반응에 대해 분석 방법을 최적화해야 하는 번거로움을 탈피하여 일반화된 분석 툴이 요구되며, 효과적인 광학선택도 분석 기술이 요망되고 있다.
- ▶ 국내에서는 비교적 초고속 효소 개량 기술은 많이 발전한 반면 초고속 효소 특성 분석 기술은 취약한 상태이므로 이 기술의 개발이 가능하여야 초고속 개량 효소의 개발이 가능하여 소비자의 필요에 맞는 맞춤형 효소의 개발 및 산업화를 실현하는 데 있어 시간 및 비용을 단축할 수 할 수 있다.
- ▶ 초고속 효소반응 분석 툴의 개발은 미생물 유전체를 활용하여 유용 효소의 산업화 시기를 단축시키는 것을 가능하게 하여 다양한 청정생물공정, bioremediation 등의 실현에 의해 국민 보건복지 증진 및 삶의 수준 향상에 크게 기여할 것이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

구분	연구내용 및 범위
1년차	- 카르복실산에 선택성을 보이는 SERS 나노입자체 형성 기술 - 카르복실산 분석용 고감도 콜로이드형 SERS 시스템 개발 - 효소반응 직접 분석
2년차	- SERS 용 표면 개발 - 마이크로어레이 기반 분석기술 개발 - 아민, 알콜 카르복실산에 선택성을 보이는 SERS 칩 분석기술 개발 - 기분석된 물질의 효소반응 직접 분석
3년차	- 에스터라제 마이크로어레이 제작 - SPR 을 이용한 에스터라제 마이크로어레이의 활성 분석 - 다양한 효소에 대한 마이크로어레이 기반 효소활성 측정기술 확립
1단계 (종합)	- 마이크로어레이 기반 초고속 효소반응분석 시스템 개발

IV. 연구개발결과

1. 1 차년도

카르복실산에 선택성을 보이는 SERS 나노입자체 형성을 위하여 $AgNO_3$를 $NaBH_4$로 서서히 환원시키는 방법에 의해 Ag 나노입자를 제조하였으며, Au 나노입자는 상품화 되어 있어 5, 10, 20 nm 나노입자를 구매하여 실험하였다 SERS 실험을 위해 KAIST 물리학과에 설치된 Raman 분광기를 이용하였다 카르복실산의 범용적인 분석을 위해 수용성이 높은 것으로부터 낮은 물질을 선정하였다 즉 Ketoprofen, ibuprofen, flurbiprofen, 2-chlropropionic acid 와 이들 ester 와의 혼합물에 대해 SERS 실험하였다 실험 결과 각 카르복실산의 ester 와의 혼합물로부터 카르복실산 농도 분석이 가능함을 확인하였다 효소반응 직접 분석을 위하여 효소반응물을 chloroform

으로 추출 후 Ag colloid 와 혼합하는 방식을 취하여 비수용성의 효소반응 기질에 대해 마이크로웰 형태의 분석방법을 확립하였다.

2. 2 차년도

1 차년 연구결과를 토대로 2 차년도에는 마이크로어레이 형태의 효소반응 분석을 위해 SERS (surface-enhanced Raman scattering) 연구를 수행하였다. 유용효소의 high-throughput screening 을 위한 마이크로어레이 기반 효소반응 분석기술을 개발하기 위하여 아래와 같은 전략으로 연구를 추진하였다.

1. His_6-tagged 재조합 효소의 발현
2. IDA 가 고정화된 SPR 표면에 상기 효소의 마이크로어레이 제작
3. SPR 이미징 시스템으로 효소 발현 정도를 분석
   (1~3 과정은 2003 년 생명(연) 기관고유사업으로 개발완료)
4. 3 의 효소 마이크로어레이에 대상으로 하는 효소반응기질을 spotting 한 후 일정시간 정치시켜 효소반응이 일어나도록 함.
5. 4 의 효소반응물 마이크로어레이에 효소반응생성물이 결합될 수 있는 기능기를 가진 표면으로 접촉시켜 표면에 결합시킴.
6. 5 의 표면은 SERS 활성 표면일 경우 2D-Raman 분광기로 분석.
7. 5 의 표면이 매끄러운 표면일 경우 Ag 나노입자를 이 표면 위에 코팅 후 2D-Raman 분광기로 분석.
8. 5 의 표면에 효소반응생성물이 선택성이 높게 결합될 경우, 표면을 SPR 칩으로 하여 SPR 이미징 시스템으로 보다 더 간단하게 마이크로어레이 기반 효소반응 분석을 수행함.

위의 연구전략으로 2 차년도 연구에서는 SERS 활성 금속나노표면 개발, 다양한 효소반응생성물 분석, SPR 이미지를 이용한 효소반응의 마이크로어레이 분석 등을 수행하였다. SERS chip 기반 효소반응분석시스템을 구현하기 위해 두 가지 종류의 SERS 활성 표면을 개발하였다. 첫 번째 방법은 12 nm 또는 20 nm Au 나노입자를 아민기로 개질된 유리면 위에 결합시키고 LI-Ag 로 30 분간 enhancing 하는 방법에 의하여 제조하였다. 이 방법에 의해 제조된 표면의 AFM 이미지 측정 결과 약 20 nm 크기의 Ag 나노입자가 분포되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 두 번째 방법은 소위 'mirror reaction' 방법에 의해 제조하였다. 이 방법에 의해 제조된 것은 50 nm 크기의 Ag 나노입자가 분포된 표면임을 AFM 분석을 통해 알 수 있었다. 세 번째 방법은 E-beam evaporator 를 사용한 방법이다.

위 세 가지 표면의 SERS 활성을 측정하기 위해 SERS 연구시 일반적으로 사용되는 물질인 Rhodamine 6G의 Raman 분석을 실시하였다. E-beam evaporator 방법에 의해 제조된 표면 가장 높은 Raman 신호가 나타났으며, Tollen 방법에 의한 표면도 높은 신호를 보인 반면, silver enhancing 방법은 가장 약한 Raman 신호를 보여주었다. E-beam 증착법을 이용한 표면은 견고성이 매우 약하여 효소 스크리닝 칩으로 활용하기에 어려움이 있으므로 본 연구에서는 Tollen 방법의 표면을 사용하였다.

다양한 물질(효소반응생성물)에 대한 SERS 분석을 실시하였다. 사용된 물질은 Ketoprofen, methylbenzylamine, 6-APA, aminobenzoic acid, flurbiprofen 등이다. 먼저 케토프로펜의 normal Raman을 측정한 결과 1 M 농도에 뚜렷한 라만 스펙트럼을 얻을 수 있었으나 100 mM 이하의 농도에서는 라만 스펙트럼을 얻을 수 없었다. 케토프로펜의 SERS 측정을 한 결과 50 mM 이하까지 측정이 가능한 것으로 나타나 20배 정도의 민감도가 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 일반적으로 효소반응 분석이 가능하기 위해서는 1 mM 이하의 분석감도가 필요하므로 100 배 이하의 sensitivity 증가가 필요하여 현 기술로는 어려움이 있는 것으로 판단된다. 본 연구에서는 대안적인 방법으로 SPR 이미징 기술을 이용한 효소반응 마이크로어레이 분석기술을 개발하고자 하였다.

3. 3차년도

3차년도에는 2차년도 연구결과로부터 SPR 이미징 기술을 이용한 마이크로어레이 기반 범용적 효소반응 분석 시스템을 개발하는 데 주력하였다. 가장 활용성이 높은 방법은 Multi-well slide와 HRP-immobilized SPR 칩을 이용하는 것으로 그 방법을 정리해 보면 다음과 같다.

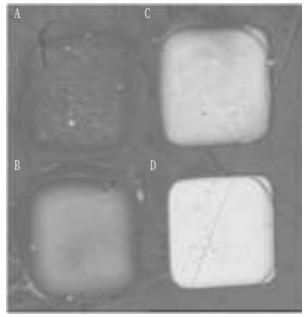
a. Erie Scientific Co.의 Multi-well slide (well 하나의 사이즈는 2 X 2 mm)의 먼저 위 well에 효소를 마이크로어레이어로 spotting 한다.
b. 각 well에 다른 효소들이 채워지면, slide를 반응 용액에 담지 하였다가 꺼내준다. 반응용액은 1.0 mM OctOEt, 0.5 mM 4-CN, 50 μg/mL alcohol oxidase, 5% DMSO를 포함한 0.1 M, pH 6.5 MES 완충용액을 사용하였다. 여기서 핵심 포인트는 2의 단계에서 spotting 된 효소 용액이 wash-out 되지 않는다는 점이다. Spotting 용액이 점성이 있는 PEG와 같은 물질을 포함하므로 spotting 된 well slide를 반응용액에 담궜다가 빼내는 시간이 1초 정도의 시간 동안 well에 머물러 있음을 확인

하였다.

c. 위 well slide 를 일정시간 humidified chamber 에 정치시킨 후 HRP 가 결합되어 있는 SPR 칩으로 덮으면 well 내에서 효소반응에 의해 H_2O_2가 생성되면 4-CN 과 반응하여 SPR 칩에 고정화 되어 있는 HRP 활성에 의해 칩 표면에 침전물을 형성한다.

d. 위 SPR 칩을 세척, 건조하여 SPR 이미지를 구하면 각 well 에 있는 효소의 esterase 활성을 알 수 있다.

실험 결과를 아래 그림에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 효소가 첨가되지 않은 control spot과 비교하여 0.1, 0.5 mg/mL esterase 를 첨가한 경우 spot intensity 가 증가하는 것을 볼 수 있으며, 1 mM H_2O_2을 spotting 한 경우 예상되는 바와 같이 가장 높은 intensity 를 보여주고 있다. 위 well slide 를 사용할 경우 SPR 이미징 시스템에 사용하는 칩이 20 X 20 mm이므로 한 번 실험에 측정할 수 있는 효소활성 측정 수는 20 개 정도이다. 만약 지름 1 mm 원형의 높이 30 μm well 을 제조한다면 부피는 24 nL 정도이며, 간격을 0.5 mm 정도로 고려한다면 15 X 15 mm 면적 내에 100 개의 well 을 형성할 수 있다. 이와 같은 well-slide 를 사용하면 well 하나당 한번의 spotting 만 해도 되며, 한 번에 측정할 수 있는 효소 수도 100 개가 된다. 이 경우 100 개의 효소에 대해 10 개 다른 기질에 대해 활성을 측정하고자 할 때 대략 3.5 ~ 4 시간이 소요된다.



<그림> Well slide 와 SPR 칩을 이용한 esterase 활성 측정을 한 SPR 이미지. Spotting 용액 A: control (10% PEG in pH 6.5, 0.1 M MES buffer), B: 0.1 mg/mL esterase, C: 0.5 mg/mL esterase, D: 1 mM H_2O_2

4. 결론

1, 2차년도의 연구를 통하여 초기 제안한 나노라만 기술은 범용적인 효소활성 분석에 어려움이 있는 것으로 판단되어 2, 3차년도에는 SPR 이미징 시스템을 이용한 효소활성 분석에 대한 연구를 집중하였다. 기본적인 아이디어는 효소반응에 의한 생성물로부터 과산화수소수가 만들어지도록 하여, SPR 칩 표면에 침전을 유도하여 측정하는 것이다. 다양한 분석방법들을 시도한 결과 범용성과 재현성이 좋은 방법은 well slide와 SPR 칩을 겹치는 방식을 활용하는 것이었다. 그러나 이 방법이 한 칩에서 100 개 이상의 효소반응 동시분석이 가능하기 위해서는 well size가 축소된 well slide를 제조하여야 하는데 이에 연구는 1단계 종료 이내에서 완료하지 못하였다. 본 연구에서 효소 스크리닝 외에 부수적인 연구결과는 알려진 oxidase 효소를 마이크로어레이로 제작한 효소칩 개발이라 할 수 있다. 원리는 효소 스크리닝 방법과 유사하다. Oxidase 마이크로어레이 칩은 인체나 미생물의 대사체 분석을 통한 질병진단 및 system biology 연구에 매우 중요한 툴이 될 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 마이크로어레이 기반 효소반응분석 기술을 개발하기 위해 많은 시행착오를 거치게 되어 esterase와 oxidase 효소에 대한 실험을 수행하는데 그쳤다. 그러나 본 연구의 결과는 위 효소에만 적용할 수 있는 것은 아니며 H_2O_2가 직간접적으로 효소반응에 간여하는 모든 반응에 대해 적용할 수 있다. 탈수소화효소(dehydrogenase)를 대상으로 할 경우 효소반응에 의해 생성된 NADH를 산화하는 NADH oxidase를 첨가하면 H_2O_2가 생성된다. Lyase의 한 종류인 aspartase 효소는 fumarate로부터 L-aspartate가 만들어 진다. 이 경우 L-amino acid oxidase를 사용하여 스크리닝에 활용할 수 있다. Monooxigenase를 스크리닝 하고자 할 때는 반응에 의해 생성된 H_2O_2를 측정하거나 반응에 사용된 산소를 측정할 수 있다. 이와 같이 적절한 설계에 의해 다양한 효소반응을 SPR 이미징 시스템으로 측정이 가능할 것으로 결론지을 수 있다.

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

1. 기술의 응용잠재력

- 본 기술은 다양한 효소의 초고속 저비용 극미량 스크리닝에 활용되어 산업적

유용 효소의 제품화에 활용될 수 있음

- 본 기술은 마이크로어레이 위에서 효소반응을 유도하여 측정하는 신기술이므로 초고속 신약스크리닝에 활용될 가능성이 있음

2. 활용계획

- 효소 초고속 스크리닝 칩으로 특허화 하여 제품화
- 진단용 및 대사체 분석용 효소 바이오칩 제작 및 제품화

S U M M A R Y

As enzyme libraries grow through sequencing of microbial genomes, generation of very large mutant libraries and metagenome discovery, new types of high-throughput microarray-based enzyme screening systems are required. We introduced the surface-enhanced Raman scattering (SERS) method to detect biochemical reactions between enzyme and substrate. The hydrolysis reaction of an esterase with various substrates, such as ketoprofen ethyl ester, ibuprofen methyl ester, flurbiprofen ethyl ester, was detected with SERS by mixing the reaction mixture with colloidal silver solution. The detection limit of SERS for the enzymatic hydrolysis reaction was less than 0.5 mM. To develop a chip-based analysis system of enzyme activity, three different SERS-active surfaces were produced and compared for SERS intensity of Rhodamine 6G. From the various experiments, however, we concluded that the SERS method was not appropriate for a microarray-based assay of enzyme activities.

As an alternative method, we introduced a surface plasmon resonance imaging (SPRI) method to detect biochemical reactions between enzyme and substrate. A reaction solution was designed to produce H_2O_2 which made precipitate on a HRP-immobilized SPR chip with 4-chloro-1-naphthol. To measure esterase activity, alcohol oxidase was used to produce H_2O_2 from alcohol, a product of an esterase-catalyzed hydrolysis of esters. Using a multi-well slide and a HRP-immobilized SPR chip, we could assay a microarray-based assay of enzyme activity.

C O N T E N T S

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

- 마이크로어레이 기반 초고속 효소반응분석 시스템 개발
- 초고속 효소 활성 분석용 SERS 및 SPR 마이크로어레이 시스템 개발

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

▶ 미생물 유전체를 활용한 연구 분야 중 유용 효소 및 효소 라이브러리의 개발은 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 오늘날 효소의 응용은 식품 및 의약품 생산에 응용되는 범위를 넘어 효소반응의 광학선택성과 반응매질의 다양성 등에 기인하여 청정화학공정, 환경 bioremediation, 키랄의약품 생산 등 응용성이 크게 확대되어 화학, 의약, 식품 환경 산업 등에 핵심 소재가 될 것임에는 의심의 여지가 없다.

▶ 이러한 효소의 응용성에 힘입어 종래의 자연계로부터 효소를 얻거나(대부분 미생물에서 효소를 분리 정제함), 난배양 미생물로부터 효소자원을 확보하는 기술에 더하여 chemical mutagenesis, error-prone PCR, mutagenic PCR with random oligonucleotides, saturation mutagenesis, cassette mutagenesis, incremental truncation, bacterial mutator strain, straggered extention process, DNA shuffling 등과 같은 다양한 in vitro 분자 진화에 의한 효소 확보기술이 개발되고 있다.

▶ 특히 최근 미생물 유전체 확보에 따라 효소를 유전자로부터 변형하는 단계에서 유전체로부터 진화시키는 high-throughput screening 시스템으로의 패러다임 전환이 이루어지고 있다.

▶ 그런데 효소의 high-throughput screening 에 있어서 bottleneck 이 되고 있는 기술이 초고속 효소활성 분석기술이라 할 수 있다 특히 효소의 초고속 광학활성 분석법의 개발은 매우 미미한 상황이다 대부분의 연구에서 실제적인 분석은 GC 및 HPLC 방법을 사용하게 되는데 이 방법은 지금까지 보고된 바에 의하면 가장 최적화된 방법에 의해 하루에 500 개정도 분석할 수 있는 것으로 알려져 있다

▶ 따라서 보다 빠른 효소반응 분석속도가 필요하며, 특정 반응에 대해 분석 방법을 최적화해야 하는 번거로움을 탈피하여 일반화된 분석 툴이 요구되며, 효과적인 광학선택도 분석 기술이 요망되고 있다

2. 경제·산업적 측면

▶ 국내에서는 비교적 초고속 효소 개량 기술은 많이 발전한 반면 초고속 효소 특성 분석 기술은 취약한 상태이므로 이 기술의 개발이 가능하여야 초고속 개량 효소의 개발이 가능하여 소비자의 필요에 맞는 맞춤형 효소의 개발 및 산업화를 실현하는 데 있어 시간 및 비용을 단축할 수 있다.

▶ 또한 국내에서는 전반적인 생명공학 연구가 발전하였으나 연구에 필수적인 분석 기기는 대부분 외국의 기술에 종속되어 있어 이를 개선할 필요성이 있으며, 원천기술에 기초한 기기 개발에 의해 국내뿐만 아니라 외국에 수출함에 따라 새로운 생명공학 산업을 창출할 수 있게 된다.

▶ 이러한 초고속 효소분석기술과 같은 생명공학 관련 하드웨어 기술은 전세계적으로도 미개발 된 상태이므로 원천기술 확보와 조기 개발에 의해 신산업을 창출할 수 있을 것으로 예상된다.

▶ 생명공학 관련 하드웨어 원천기술의 개발은 생명공학, 전자공학, 기계공학, 재료공학, 물리학 등 학제간의 협력이 필요할 뿐만 아니라 획기적 신기술을 창출하기 위하여 최근에 국내외적으로 큰 발전을 이루고 있는 나노기술을 응용한 연구개발이 필요한 시점이다.

3. 사회·문화적 측면

▶ 나노기술을 응용한 생명공학 하드웨어 기술을 개발하기 위하여 기술간의 접목과 더불어 각 분야 전문가의 밀접한 협력에 의한 아이디어 창출과 문제해결이 가능하다.

▶ 따라서 미래지향적인 생명공학 신산업을 창출하기 위한 나노바이오텍 연구에 대한 지속적인 지원 및 다학제 또는 산학연 협력이 이루어 질 수 있는 연구 프로그램의 개발이 필요하다.

▶ 초고속 효소반응 분석 툴의 개발은 미생물 유전체를 활용하여 유용 효소의 산업화 시기를 단축시키는 것을 가능하게 하여 다양한 청정생물공정, bioremediation 등의 실현에 의해 국민 보건복지 증진 및 삶의 수준 향상에 크게 기여할 것이다.

제 3 절 1단계 연차별 연구내용 및 범위

구분	연구내용 및 범위
1 년차	- 카르복실산에 선택성을 보이는 SERS 나노입자체 형성 기술 - 카르복실산 분석용 고감도 콜로이드형 SERS 시스템 개발 - 효소반응 직접 분석
2 년차	- SERS 용 표면 개발 - 마이크로어레이 기반 분석기술 개발 - 아민, 알콜, 카르복실산에 선택성을 보이는 SERS 칩 분석기술 개발 - 기분석된 물질의 효소반응 직접 분석
3 년차	- 에스터라제 마이크로어레이 제작 - SPR 을 이용한 에스터라제 마이크로어레이의 활성 분석 - 다양한 효소에 대한 마이크로어레이 기반 효소활성 측정기술 확립
1 단계 (종합)	- 마이크로어레이 기반 초고속 효소반응분석 시스템 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 외국의 경우

1. 초고속 효소 탐색 기술

미생물 다양성의 대량 스크리닝 방법이 신기능 효소를 찾는 데 가장 효과적인 것으로 평가되고 있다 미생물 다양성은 존재하는 효소 유전자의 임의적 추출에 의하여 인공적으로 생성하거나 미생물계로부터 직접 수집할 수도 있다 실질적으로 다양성은 박테리아에 의해 발현되는 플라스미드 또는 파아지 라이브러리나 배양되는 미생물 라이브러리가 주를 이루고 있다. 이러한 라이브러리는 원하는 성질을 지닌 표적 효소를 확인하여 선별되어야 한다 따라서 초고속(high - throughput) 효소 스크리닝 방법은 새로운 효소 또는 생촉매를 찾는데 핵심적인 역 할을 한다고 할 수 있다 이 기술은 미생물계나 error - prone PCR, 효소 유전자 및 유전체의 shuffling 과 같은 다양성 확보 방법으로부터 효소 라이브러리를 탐색하는 데 필수적이다 다음에 최근 외국의 초고속 효소 탐색 기술 동향에 대하여 정리하였다

▶ 유전적 선별법

미생물 세포 내에 특정 효소의 활성이 있으면 성장을 유리하게 하는 방식의 유전적 선별법이 일반적으로 쓰이고 있다. 이러한 최근의 연구결과들에 대해 아래표에 요약되어 있다(Current Opinion in Chemical Biology 2001, 5:152 - 158).

Screening biocatalysis by genetic selection.

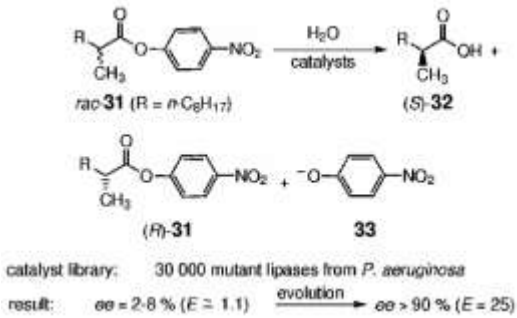
Method	Selection pressure	Reaction types	Application field
Substrate as carbon source	Ability to degrade substrate	For example, hydroxylation of hydrocarbons	Screening of microorganisms
Complementation	For example, ability to grow in the absence of tryptophan	For example, phosphoribosyl anthranilate isomerization	Engineered enzymes
Immunization against TSA	Tight binding to TSA	All	Catalytic antibodies
Reactivity-linked infection	Phage infectivity	One turnover acylation with hydrolytic catalysis	Catalytic antibodies
Reactivity-linked surface binding	Panning of phages	Glycosidic cleavage	Catalytic antibodies
Suicide inhibitors	Panning of phages	Esterase/amide hydrolysis	Catalytic antibodies, engineered enzymes

TSA, transition state analog.

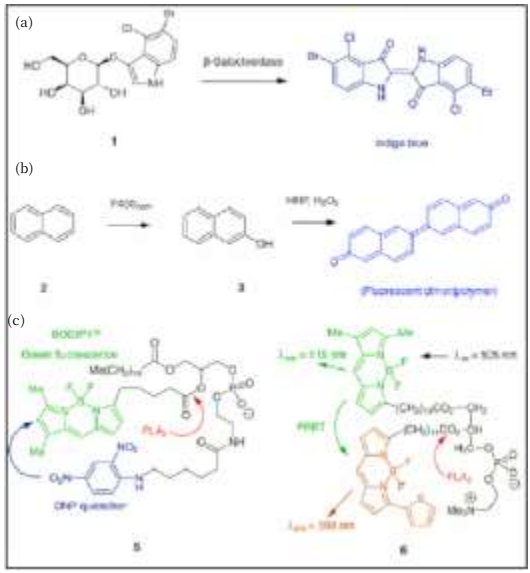
▶ UV/Vis 방법 및 형광법

UV/Vis 방법은 효소반응에 의해 발색반응이 일어나는 방법을 이용하는 것으로 가장 많이 사용되는 기술 중의 하나이다. 한 예로 아래 그림에서 나타낸 바와 같이 리파제

효소에 의한 라세믹 2-methyl decanoate (rac-31) 의 속도론적 분할 가수분해 반응을 들 수 있다(Angew. Chem. Int. Ed. 2001, 40:284-310). 이 경우 methyl ester 대신 p-nitrophenol 을 사용하여 반응이 일어나면 노란색을 나타내도록 설계하였다 표준 96-well 마이크로플레이트를 사용하여 몇 분내에 48 개의 변이주를 선별하였음을 보고하고 있다.

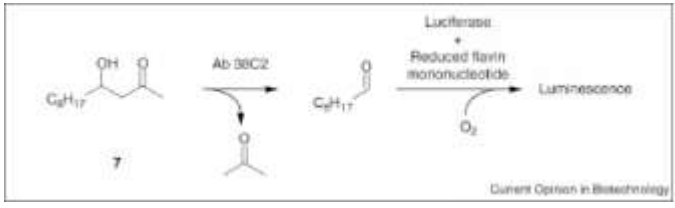


형광방법은 위의 UV/Vis 방법과 유사하게 효소반응에 의해 형광을 나타내도록 반응기질을 설계하는 방법이다. 특히 발색 및 형광 방법은 미생물 세포내 발현 효소의 in vivo 분석에 유용하게 이용되고 있다. 즉 발색성(chromogenic) 및 형광성(fluorogenic) 기질이 미생물에 흡수되어 세포내 발현 효소의 반응에 의해 나타난 색깔을 모니터링하게 한다. 전형적인 예로 아래 그림 a에서 보여진 바와 같은 α-galactosidase 반응에 의한 α-galactoside 로부터 불용성 indigo를 만드는 것을 들 수 있다 또다른 예로 변이 cytochrome P450 을 발현하는 세포의 감지를 위해 naphthalene 유도체의 cytochrome P450 의 hydroxylation 반응과 horse radish peroxidase (HRP) 에 의한 형광성 dimer 또는 polymer 를 만드는 과정을 들 수 있다 (아래그림 b). 또한 형광성 phospholipid 기질을 사용하여 phospholipase A2 분석을 위한 fluorescence resonance energy transfer (FRET) 기술에 기초한 방법을 아래 그림 c에서 볼 수 있다. 이러한 형광 방법은 같은 방식으로 활성 효소를 선별하는 fluorescence-activated cell sorting (FACS) 에서도 도입하고 있다



(참고: Current Opinion in Biotechnology 2001, 12:535 - 544)

Keinan 등은 aldolase catalytic antibody 의 활성을 측정하는 발광 박테리아에 대한 연구 결과를 발표한 바 있다. Aldolase catalytic antibody 가 retro - aldol 반응에 의해 생성된 nonanal 이 박테리아가 대사기작에 사용하여 발광하는 원리를 이용하고 있다 (아래 그림). 이와 같은 원리로 미생물 세포내 transglycosidase 활성을 측정한 연구결과도 보고되고 있다.



▶ 크로마토그래피법 및 Capillary Electrophoresis 방법

키랄 고정상을 이용한 GC 또는 HPLC 방법에 의해 일반적으로 하루에 수십개의

효소 광학선택성 분석을 할 수 있다 최근에는 이 방법을 개선하여 하루에 700 개 정도가 분석되는 결과가 발표되고 있다. 이 경우 크로마토그래피 칼럼을 병렬 연결하여 컴퓨터에서 데이터 분석을 하도록 설계한다.

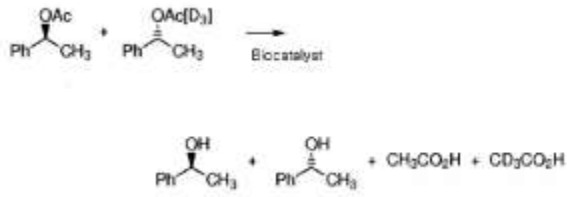
CE 분석도 유사하게 전통적인 방법으로는 하루에 수십개 정도의 분석이 가능하지만 소형화 기술의 발전에 의해 capillary array electrophoresis (CAE) 및 CE on microchip 기술이 개발되고 있다 이러한 기술의 발전에 의해 하루에 수천개 이상의 분석도 가능한 것으로 보고되고 있다.

▶ IR - thermographic 분석법

이 방법은 IR (infrared) radiation 로부터 온도를 감지하는 방법으로서 어레이 분석이 가능하게 한다 즉 효소반응에 의해 생성되는 적외선을 IR 카메라로 찍는 방식이다 한편 유사한 방식의 특별한 관심을 끄는 기술은 효소반응이 진행되는 마이크로플레이트상의 well 에서 온도 변화를 감지하는 작은 온도계 병렬 시스템인 thermistor 어레이 기술이 보고되고 있다. 그러나 이 방법은 기질이 상대적으로 높아야 하며, 효소의 양이 어느 정도 되어야 사용할 수 있는 기술이다

▶ Mass - spectrometric 방법

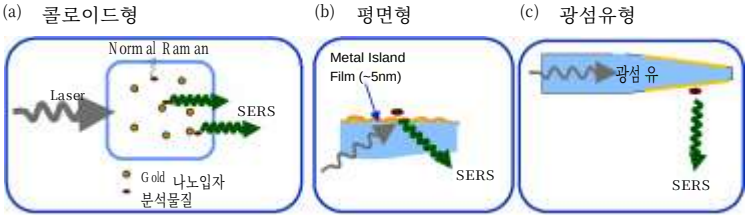
두 에난티오머에 대해 동위원소 표지한 후 Mass 분석으로 효소의 광학선택적 반응을 측정할 수 있다 한 예로 아래그림과 같이 S- 에난티오머와 다르게 R- 에난티오는 아세테이트 그룹에 수소대신 중수소를 표지한 다음 효소 반응에 의해 생성된 용액을 GC로 분리후 CH_3CO_2H와 CD_3CO_2H를 Mass 로 분석하여 효소의 광학선택성을 확인할 수 있다.



2. SERS 연구동향

Raman 분광법은 물질의 고유한 vibrational spectra 를 측정하는 것으로 혼합물 중에서 물질 각각의 고유한 peak 를 찾아내어 각 물질의 정성, 정량 분석이 가능하게 한다 특히 SERS (surface - enhanced Raman scattering) 는 금속 나노입자의 표면에

monolayer 로 결합 또는 흡착된 화학물질의 Ramam 스펙트럼만 증폭하여 나타나는 것이므로 금속 나노표면의 성질을 변형하여 특정 물질의 선택성을 높일 수 있으며 검출한도를 크게 높일 수 있다. SERS 분석의 형태는 크게 금속나노입자를 이용한 콜로이드형, 나노입자가 유리표면 위에 도포된 후 금속나노표면을 형성한 평면형, 광섬유 팀에 금속나노표면을 형성한 광섬유형으로 분류할 수 있다.



<그림> SERS (surface-enhanced Raman scattering) 의 세가지 유형

다양한 물질에 대한 SERS 연구는 많은 연구자들의 관심의 대상이 되어 95 년 이후에 수천편 이상의 논문이 발표되고 있다. 아래 표에 최근 외국 연구그룹의 SERS 연구결과들 중 효소반응기질과 상관성이 있는 결과들을 요약 정리 하였다.

Type	표면	물질	Detection Limit	특 징	Ref.
콜로이드형	Boronic acid functional gro up on Ag or Au	Mannan	~ 1 mg/mL	-	Langmuir, 1 6 (2000) 577 - 583.
	Ag	D - glucose, D - galactose, D - mannose, 위 물질들의 methyl 형 태	~ 10 mM	고유 피크 나타남	Analytical Chemistry, in press (2002)
	Ag or Au	αω - Amino acids	~ 10^{-4} M	탄소 길이에 따라 차이 보임	Biospectroscopy, 5 (1999) 9 - 17
	Ag	chiral β-blocker (propranolol, alpreno lol, acetobutolol, atenolol)	~ 50 μg/mL	alprenolol, atenolol 은 약 간의 광학선 택성을 보임	Analytical Chimica Acta, 335 (19 96) 87 - 94
	Ag	Benzoic acid, p - aminobenzoic acid	~ 2 mM	NaCl 농도에 따라 다른 강도 달라짐	Vibrational Spectroscopy, 27 (2001) 65 - 7 4
	Ag	Catechol, Salicylic acid, p - hydroxy bezoic acid 등	~ 5 mM	-	J. Colloid and Interface Science, 231 (2000) 98~1 06
	Ag	Doxorubicin	10^{-7} M	혈액 샘플 측정	Spectrochimica Acta Part A 57 (2001) 1 907 - 191 5
평면형	Ag	아미노산 (20 가지)	~ 10^{-10} M	각 side chain 에 대한 선 택성을 보임	Spectrochimica Acta Part A 55 (1 999) 1 641 - 1660
	Au	NAD	~ 10^{-5} M	효소 결합 상태와 비교	Langmuir, 1 4 (1998) 7420 - 742 6
	Ag	Peptides	-	카르복실산이 금속 표면에 붙는 것으로 확인 됨	Spectrochimica Acta Part A 55 (1 999) 1 61 5~1 640
	Pt, Pd, Ir, 꼬, Cu, Ag, Au	Benzonitrile	-	다양한 금속 표면에 대한 비교	J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 12817 - 1282 5
광섬유형	Ag	β-carotene	-	yeast 세포내 분석	Biopolymers, 67 (2002) 327 - 330

제 2 절 국내의 경우

1. 초고속 효소 탐색 기술

국내의 다수의 연구그룹에서 미생물 유전체로부터 효소 유전자 라이브러리를 보유하고 유용효소의 탐색연구를 수행하고 있다. 특히 표면발현기술에 대한 관심이 높은 것으로 조사되었다 그런데 초고속 효소분석 기술은 외국의 경우와 크게 다르지 않으며 유전적 선별, 크로마토그래피, 발색 등 비교적 간단한 방법을 사용하고 있는 것으로 나타났다. 한 예로 국내 벤처기업인 제노포커스에서는 표면에 디스플레이된 변이체의 효소활성과 숙주세포의 성장속도를 연계하거나 투명환이 보이게 하는 대장균 디스플레이 기술을 이용하여 효소를 탐색하는 방법을 사용하고 있다.

2. SERS 연구동향

SERS 분석에 대한 연구결과들은 포항공대 화학과, 아주대학교 분자과학기술학과 및 응용화학과, 서울대 화학공학과, 화학과, 화학교육과, 경북대학교 센서기술연구센터,

KAIST 물리학과, 한국화학연구원 등에서 최근 연구결과들이 발표되고 있다. 그러나 효소반응물질과 유사성이 있는 물질에 대한 분석 결과들은 없는 것으로 조사되었다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 1 차년도

1. 연구개요

본 연구는 효소반응을 마이크로어레이 형태로 분석 가능한 방법을 개발하고자 하였다. 마이크로어레이 기술은 최근 바이오칩 기술의 발전에 힘입어 널리 사용되고 있으며, 극소량의 시료양을 요구하는 반면 한 번에 분석할 수 있는 수가 수백~수만 개가 가능한 장점을 가지고 있다. 그러나 마이크로어레이 기술은 DNA 칩 기술에서 알 수 있는 바와 같이 주로 생체분자간 결합을 형광, 발색 등으로 측정한다 본 연구는 효소반응을 마이크로어레이로 분석할 수 있는 방법을 개발하고자 하였으며, 지금까지 개발된 바 없는 새로운 시도라 할 수 있다. 효소는 식품 및 의약품 생산에 폭넓게 응용되고 있을 뿐만 아니라, 효소의 광학선택성, 위치선택성 등과 같은 특성에 의하여 청정화학공정, 환경복원, 키랄의약품 생산 등 그 응용이 크게 확대되어 가고 있다. 이러한 효소의 응용성에 힘입어 종래에 자연계 미생물로부터 분리, 정제하여 확보하는 수준을 넘어, 미생물의 화학적 변이, error-prone PCR, 변이 PCR, saturation mutagenesis, cassette mutagenesis, incremental truncation, homolous recombination, bacterial mutator strain, straggered extention process, DNA shuffling 등과 같은 다양한 in vitro 분자 진화에 의한 효소 확보기술이 개발되고 있다. 특히 최근에는 미생물 유전체의 확보에 의하여 효소를 유전자로부터 변형하는 단계에서 유전체로부터 진화시키는 초고속 선별(high-throughput screening) 시스템 기술의 개발이 활발히 진행되고 있다. 이러한 효소의 초고속선별기술에 있어서 bottleneck 이 되고 있는 기술이 초고속 효소활성 분석기술이라 할 수 있다. 종래에 많이 사용되는 방법은 GC 및 HPLC 방법을 사용하게 되는데 이 방법은 지금까지 보고된 바에 의하면 가장 최적화된 방법에 의해 하루에 500 개정도 분석할 수 있는 것으로 알려져 있다. 마이크로웰 방식에 의해 고속 효소 분석방법으로는 효소반응에 의해 발색 및 형광이 나타나도록 하는 방법이 있으나, 이 방법은 효소 기질을 특수하게 설계해야 하며 이렇게 선별된 효소가 실제로 사용되는 효소반응기질에 반응성이 없는 경우가 생기는 문제점이 있다 따라서 보다 빠른 효소반응 분석속도가 필요하며, 특정 반응에 대해 분석 방법을 최적화해야 하는 번거로움을 탈피하여 일반화된 분석기술이 요구되고 있다

이러한 목적을 달성하기 위하여 새롭게 시도한 아이디어는 표면증강라만분광(surface-enhanced Raman spectroscopy) 기술을 이용한 효소반응분석에 관한 것이다. 효소반응기질과 효소반응생성물이 혼합된 액체와 나노입자 용액을 혼합하여, 효소반

응생성물이 선택적으로 나노입자에 의한 신호증폭 즉 표면증강라만산란 효과를 이용하여 초고속 효소반응 분석이 가능한 방법을 개발하고자 하였다(그림 1).

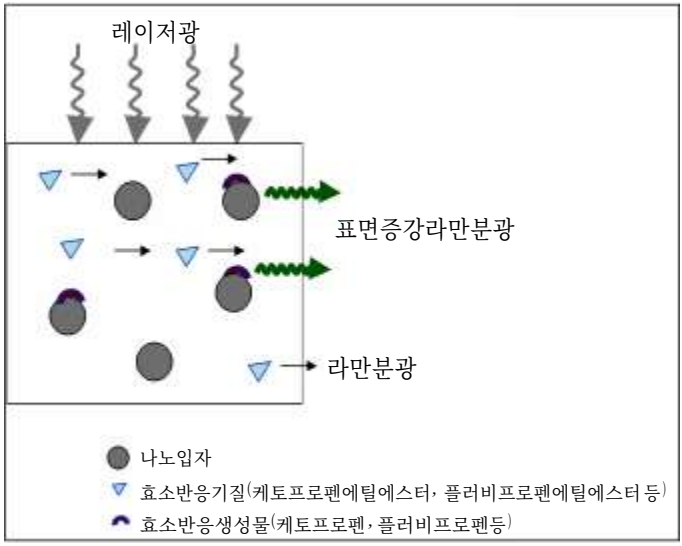


그림 1. 효소반응기질과 효소반응생성물이 혼합된 용액으로부터 효소반응생성물만 선택적으로 농도를 측정할 수 있는 표면증강라만분광 분석법을 개략적으로 나타낸 모식도.

라만(Raman) 분광법은 물질의 고유한 진동 스펙트럼을 측정하는 것으로 물질의 고유한 스펙트럼을 찾아내어 각 물질의 정성, 정량 분석이 가능하게 한다. 특히 표면증강라만분광(surface-enhanced Raman spectroscopy, 이하 SERS)는 금속 나노입자의 표면에 결합 또는 흡착된 화학물질의 Ramam 스펙트럼만 증폭하는 효과를 가져 기존의 라만 분광 분석법에 비하여 감도가 매우 높으며 표면선택성이 있는 장점이 있다. SERS를 활용하여 다양한 생화학 물질들을 분석한 연구결과들이 많이 발표되고 있다.

2. 케토프로펜과 케토프로펜에틸에스터 혼합물로부터 케토프로펜의 농도분석

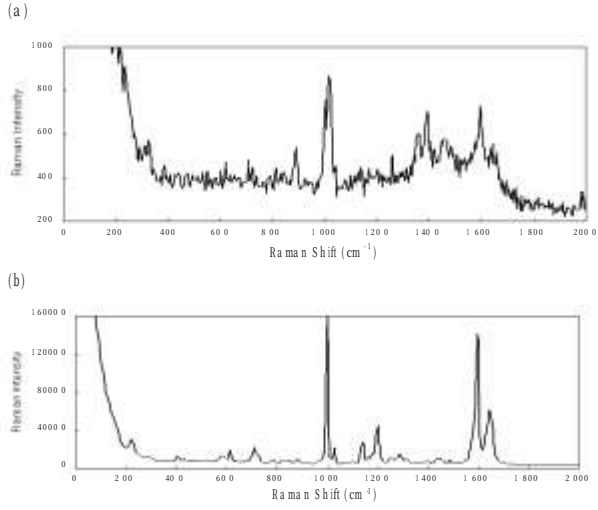
가. 은 나노입자 제조

1 mM의 농도로 $AgNO_3$를 녹인 수용액 10 mL을 2 mM의 농도로 $NaBH_4$를 녹인 수용액 30 mL에 4 ^{0}C에서 서서히 첨가하여 환원시키는 방법에 의해 은 나노입자를 제조

하였다. 이 방법에 의해 제조된 나노입자는 맑은 노란색의 콜로이드 액상을 나타낸다.

나. 케토프로펜의 SERS 분석

케토프로펜의 SERS 분석을 위하여 메탄올에 10 mM의 농도로 녹인 후 상기 은 나노입자 용액과 1:9의 부피비로 혼합하였다(최종적으로 케토프로펜의 농도는 1mM이 됨). 이 혼합액 2 mL을 1cm 지름의 유리병에 넣은 후 라만분석을 실행하였다. 라만분석은 488nm 파장의 아르곤 레이저를 조사하여 Jobin-Yvon double monochromater spectrometer로 측정하는 방식에 의해 측정하였다. 대조군으로 1M 수산화나트륨 수용액에 1M의 농도로 녹인 케토프로펜 용액, 상기 은 나노입자 수용액, 메탄올과 상기 은 나노입자 수용액을 1:9의 부피비로 혼합한 용액, 10mM의 농도로 케토프로펜에틸에스터를 녹인 메탄올 용액과 상기 은 나노입자 수용액을 1:9의 부피비로 혼합한 용액, 10mM의 농도로 케토프로펜을 녹인 메탄올 용액과 증류수를 1:9의 부피비로 혼합한 용액에 대한 라만 측정을 하였다. 그림 2에 상기 용액에 대해 측정한 라만 스펙트럼을 도시하였다.



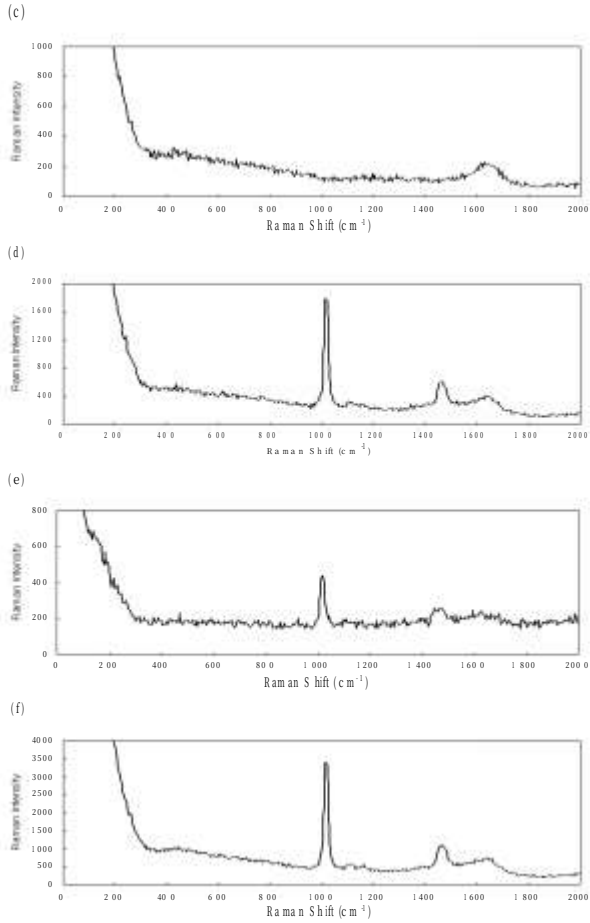


그림 2. 케토프로펜의 표면증강라만 스펙트럼. a : 케토프로펜을 메탄올에 10 mM의 농도로 녹인 용액과 은 나노입자 용액과 1:9의 부피비로 혼합한 용액의 라만 스펙트럼, b : 1M 수산화나트륨 수용액에 1M의 농도로 녹인 케토프로펜 용액의 라만 스펙트럼, c : 은 나노입자 수용액의 라만 스펙트럼, d : 메탄올과 은 나노입자 수용액을 1:9의 부피비로 혼합한 용액의 라만 스펙트럼, e : 케토프로펜에틸에스터를 메탄올에 10 mM의 농도로 녹인 용액과 은 나노입자 용액과 1:9의 부피비로 혼합한 용액의 라만 스펙트럼, f : 케토프로펜을 메탄올에 10 mM의 농도로 녹인 용액과 증류수를 1:9의 부피비로 혼합한 용액의 라만 스펙트럼.

그림 2(a) 는 1 mM 농도의 케토프로펜의 SERS 스펙트럼을 보여주고 있다 그림 2(b) 는 1 M 농도의 케토프로펜의 라만 스펙트럼을 보여주고 있다 그 이하 그래프는 비교하기 위해 측정한 것이다 결과들을 요약해 보면 그래프 a의 그림에서 나타나는 바와 같이 은 나노입자의 SERS 효과에 의해 1mM 의 케토프로펜이 그래프 b의 1M 케토프로펜에서 나타나는 라만 피크 중에서 230, 615, 715, 1000, 1598 cm^{-1} 등의 피크가 나타나는 것으로 확인되고 있다 그래프 c는 은 나노입자 수용액만 측정한 것으로 특정한 피크를 보이지 않고, 그래프 d는 그래프 a와 비교할 때 케토프로펜을 제외하였으므로 메탄올만의 라만 피크가 나타나며, 그래프 e는 그래프 a와 비교하여 케토프로펜 대신 케토프로펜에틸에스터를 첨가한 것으로 그래프 a와 같이 다양한 피크가 나타나지 않으므로 케토프로펜에 대해 선택적인 SERS 효과를 보여주는 결과이며, 그래프 f는 그래프 a와 비교할 때 은 나노입자 수용액 대신 증류수를 사용한 것으로 라만 피크를 확인할 수 없는 것으로 나타나 SERS 효과에 의해 1mM 의 케토프로펜의 분석이 가능함을 증명하여 주고 있다

다. SERS 를 이용한 케토프로펜과 케토프로펜에틸에스터 혼합물로부터 케토프로펜 농도 분석

클로로포름 유기용매에 케토프로펜과 케토프로펜에틸에스터를 0.0/5.0, 0.5/4.5, 1.0/4.0, 2.0/3.0 mM 의 비율로 혼합하여 녹인 용액과 상기 은 나노입자 수용액을 1:1 의 비율로 혼합한 후 상 수용액과 유기용매의 층 분리가 일어나면 수용액층만 분리하여 라만 측정을 실시하였다 그림 3에 측정한 결과를 도시하였다 케토프로펜의 농도가 증가함에 따라 1000 cm^{-1} 의 라만 피크가 증가하는 결과를 보여주며 케토프로펜이 함유되어 있지 않은 그래프 a의 경우 1000 cm^{-1} 에서 라만 피크가 나타나지 않는 것으로 나타나고 있다

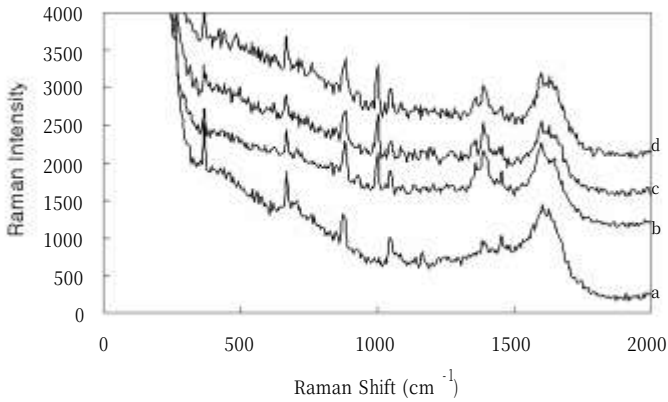


그림 3. 케토프로펜과 케토프로펜에틸에스터가 혼합된 클로로포름이 일정한 농도의 비로 혼합된 용액으로부터 케토프로펜만 선택적으로 표면증강라만 스펙트럼이 나타난 그래프. 케토프로펜/케토프로펜메틸에스터 농도가 각각 a : 0.0/5.0, b : 0.5/4.5, c : 1.0/4.0, d : 2.0/3.0 mM.

3. SERS 를 이용한 다양한 물질의 농도 분석

그림 3의 그래프에서 1000 cm^{-1}에서의 피크 세기를 케토프로펜의 농도에 대해 도시한 결과를 그림 4에 나타내었다. 이러한 결과의 의미는 5mM 케토프로펜에틸에스터를 수용액에서 에스터라제 가수분해 효소로 반응을 한 후, 효소반응기질인 케토프로펜에틸에스터와 효소반응생성물인 케토프로펜을 클로로포름으로 추출한 후, 은 나노입자 수용액으로 분석할 수 있는 방법을 모사한 점이다. 그림 4에 나타난 바와 같이 케토프로펜의 농도가 증가함에 따라 1000 cm^{-1}에서 라만 피크가 증가하는 것으로, 이러한 방법을 활용하여 마이크로웰 형태의 초고속 효소반응 분석이 가능한 방법을 제공한다는 점에 있다. 케토프로펜을 분석한 것과 동일하게 플러비프로펜과 플러비프로펜에틸에스터의 농도합은 5mM 로 하여 플러비프로펜의 농도를 변화시키며 라만분석 실험을 하였다. 플러비프로펜의 농도가 증가함에 따라 1620 cm^{-1}의 라만 피크가 증가하는 결과를 보여주었으며, 1620 cm^{-1}에서의 피크 세기를 케토프로펜의 농도에 대해 도시한 결과를 그림 4에 나타내었다. 이러한 결과의 의미는 5mM 플러비프로펜에틸에스터를 수용액에서 에스터라제 가수분해 효소로 반응을 한 후, 효소반응기질인 플러비프로펜에틸에스터와 효소반응생성

물인 플러비프로펜을 클로로포름으로 추출한 후 은 나노입자 수용액으로 분석할 수 있는 방법을 모사한 점이다 그림 4에 나타난 바와 같이 플러비프로펜의 농도가 증가함에 따라 1620 cm^{-1}에서 라만 피크가 증가하는 것으로 나타나므로 이러한 방법을 활용하여 마이크로웰 형태의 초고속 효소반응 분석이 가능한 방법을 제공한다

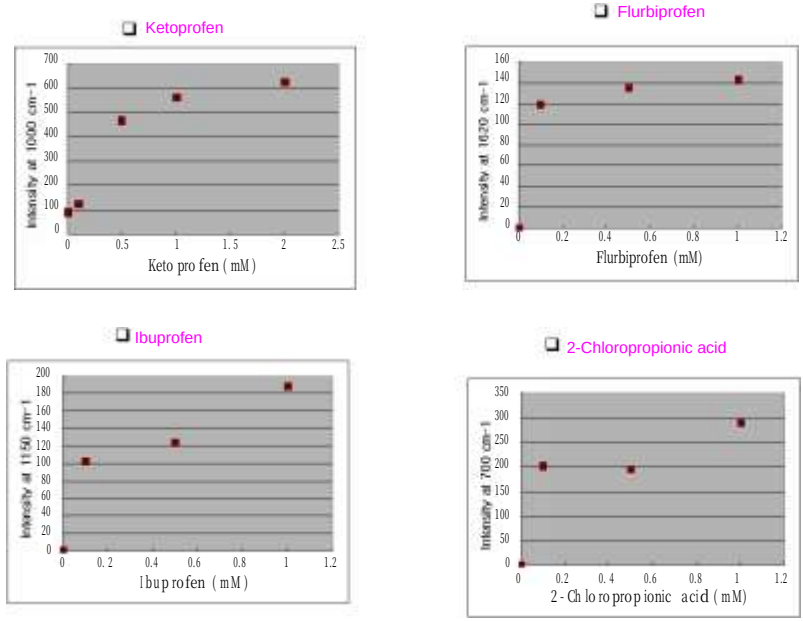


그림 4. 카르복실산과 에스터가 혼합된 용액으로부터 카르복실산의 농도에 따른 표면증강라만 스펙트럼 강도를 도시한 그래프.

4. 요약

효소반응 측정방법은 효소반응기질과 효소반응생성물이 혼합된 용액과 은 나노입자 수용액을 혼합하여 효소반응생성물만 은 나노입자에 결합되도록 하는 단계를 포함하는 것이 1차년도 연구의 핵심이라 할 수 있다. 그림 2는 효소반응기질의 일종인 케토프로펜 에틸에스터와 대응하는 효소반응생성물의 케토프로펜의 SERS 측정을 한 것이다 케토프로펜을 메탄올에 10 mM의 농도로 녹인 후 은 나노입자 수용액과 1:9의 부피비로 혼합한 용액(최종적으로 케토프로펜의 농도는 1mM이 됨)의 라만 분석을 한 결과 그림 2 그래프 a에 나타난 바와 같이 230, 615, 715, 1000, 1598 cm^{-1} 등에 라만 피크를 확인

할 수 있다. 케토프로펜 대신 케토프로펜에스터를 대치한 용액에 대한 라만 분석결과를 보면 라만 피크가 나타나지 않는다는 것을 알 수 있었다(그림 2(c)). 또한 은 나노입자 수용액 대신 증류수로 대체한 경우의 실험에서도 그림 2(a) 에서 나타나는 피크를 얻을 수 없었다(그림 2(f)). 이러한 결과는 케토프로펜이 은 나노입자에 선택적으로 결합되어 SERS 효과를 나타내었음을 증명하고 있다.

SERS 효과를 이용한 효소반응분석의 활용성을 높이기 위해 효소반응기질과 효소반응생성물을 수용액과 층 분리가 일어나는 유기용매에 녹인 용액을 도입하는 것이 보다 바람직하다. 일반적으로 효소반응은 수용액상에서 진행된다. 수용액에서 효소반응이 진행되면 효소반응기질과 효소반응생성물이 혼합된 상태로 존재하게 되며, 이러한 효소반응 용액을 유기용매로 추출한 후, 유기용매층만 취하여 다시 은 나노입자 수용액과 혼합하면 수용성이 높은 효소반응생성물이 은 나노입자로 결합하는 것이 용이하게 된다. 그림 4에 클로로포름에 케토프로펜과 케토프로펜에틸에스터의 농도합이 5mM 인 일정 비율로 녹인 용액을 은 나노입자 수용액과 혼합한 후 수용액층만 라만 분석한 스펙트럼을 보여주고 있다. 케토프로펜의 농도가 증가함에 따라 1000 cm^{-1}에서의 피크가 증가하는 결과를 보여주고 있다. 본 연구의 측정방법은 기존 HPLC 난 GC와 같은 방법을 사용하지 않고 두 단계의 추출과정과 라만 분광분석에 의해 간단하게 효소반응생성물의 분석이 가능하므로, 자동화된 액체수송 시스템과 결합하여 마이크로웰 형태의 초고속 분석이 가능한 방법이 될 것이다.

제 2 절 2차년도

1. 개요

1차년 연구결과를 토대로 2차년도에는 마이크로어레이 형태의 효소반응 분석을 위해 표면 SERS 연구를 수행하였다 유용효소의 high-throughput screening 을 위한 마이크로어레이 기반 효소반응 분석기술을 개발하기 위하여 아래와 같은 전략으로 연구를 추진하였다(그림 5).

A. His_6-tagged 재조합 효소의 발현

B. IDA 가 고정화된 SPR 표면에 상기 효소의 마이크로어레이 제작

C. SPR 이미징 시스템으로 효소 발현 정도를 분석

(1~3 과정은 2003 년 생명연 기관고유사업으로 개발완료)

D. 3 의 효소 마이크로어레이에 대상으로 하는 효소반응기질을 spotting 한 후 일정시간 정치시켜 효소반응이 일어나도록 함.

E. 4 의 효소반응물 마이크로어레이에 효소반응생성물이 결합될 수 있는 기능기를 가진 표면으로 접촉시켜 표면에 결합시킴.

F. 5 의 표면은 SERS 활성 표면일 경우 2D-Raman 분광기로 분석.

G. 5 의 표면이 매끄러운 표면일 경우 Ag 나노입자를 이 표면 위에 코팅 후 2D-Raman 분광기로 분석.

H. 5 의 표면에 효소반응생성물이 선택성이 높게 결합될 경우, 표면을 SPR 칩으로 하여 SPR 이미징 시스템으로 보다 더 간단하게 마이크로어레이 기반 효소반응 분석을 수행함.

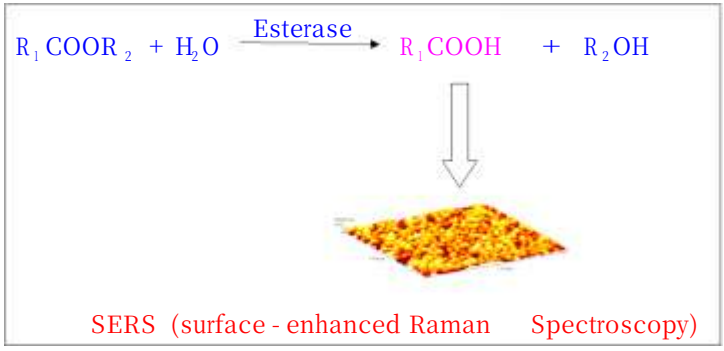


그림 5. SERS 를 이용한 효소활성 분석방법의 개념도.

2. 금속나노표면 제조 및 Raman 측정

위의 연구전략으로 2차년도 연구에서는 SERS 활성 금속나노표면 개발, 다양한 효소반응생성물 분석, SPR 이미지를 이용한 효소반응의 마이크로어레이 분석 등을 수행하였다. 세 가지 종류의 SERS 활성 표면을 개발하였다.

첫 번째 방법은 12~20 nm Au 나노입자를 아민기로 개질된 유리면 위에 결합시키고 silver enhancer 용액(Molecular Probe)으로 30 분간 enhancing 하는 방법에 의하여 제조하였다(Silver enhancing 방법). 그림 6에 이 방법에 의해 제조된 표면의 AFM 이미지를 나타내었다. 약 20~25 nm 크기의 Ag 나노입자가 분포되어 있는 것을 확인할 수 있다.

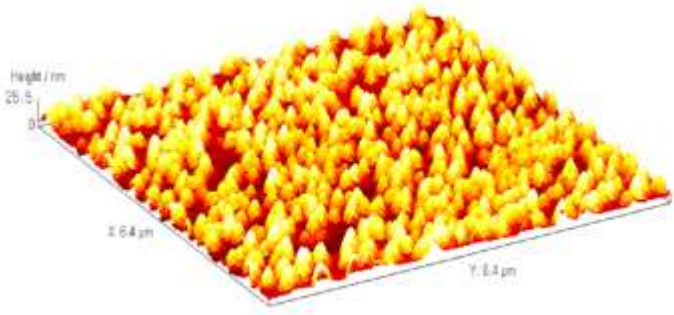


그림 6. Silver enhancing 방법에 의한 SERS 표면의 AFM 이미지

두 번째 방법은 소위 'mirror reaction' 방법에 의해 제조하였다(Tollen 방법). 0.22g/mL 의 농도로 DW에 녹인 $AgNO_3$ 용액에 0.5 M NaOH을 서서히 첨가하여 갈색의 침전이 생기도록 한다. 이 용액에 질산 수용액을 침전이 사라져 무색이 될 때까지 첨가한다. 이 용액을 냉장고에 저장하여 4~5 ^{0}C가 되도록 한다. 이 용액에 글루코스 수용액을 첨가하여 Piranha 용액(황산/과산화수소수 3/1 용액)으로 처리한 유리 기판에 담지되도록 한다. 30 ^{0}C에서 5~10 분 정도 두면 유리 기판 위에 나노입자들이 부착된 표면이 형성된다. 이 방법에 의해 제조된 것은 50~150 nm 크기의 Ag 나노입자가 분포된 표면임을 AFM 분석을 통해 알 수 있었다(그림 7).

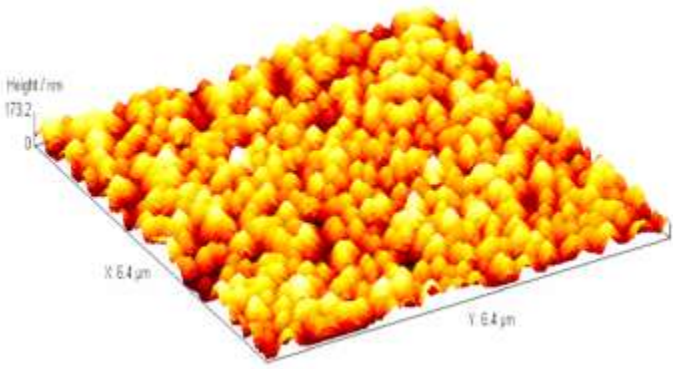


그림 7. Tollen 방법에 의한 SERS 표면의 AFM 이미지

세 번째 방법은 E-beam evaporator 를 사용한 방법이다. Piranha 용액으로 처리한 유리 기판을 E-beam evaporator 로 은을 증착하면 은이 유리 표면과 접착력이 약하여 스스로 응집하는 현상을 일으킨다 그림 8은 이 방법에 의해 제조된 은 나노표면을 보여주는 AFM 이미지 이다 2~7 nm의 나노 표면을 보여주고 있다.

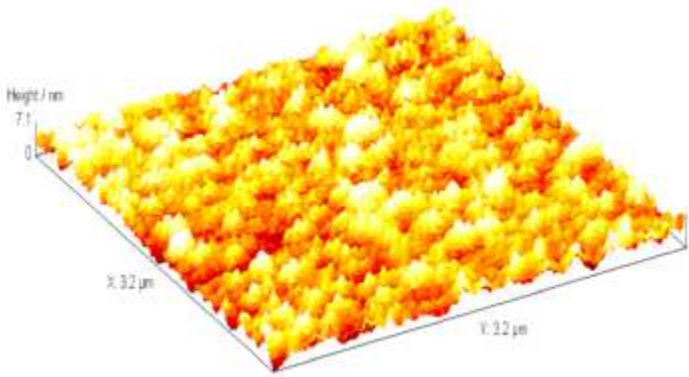


그림 8. E-beam evaporator 방법에 의한 SERS 표면의 AFM 이미지

위 세 가지 표면의 SERS 활성을 측정하기 위해 SERS 연구시 일반적으로 사용되

는 물질인 Rhodamine 6G의 Raman 분석을 실시하였다. Rhodamine 6G를 에탄올에 0.01 mM 농도로 녹인 용액을 위 세 표면에 30분간 정치시킨 후, 에탄올로 세척, 질소 가스로 건조시킨 후 Raman 분석을 수행하였다. 그림 9에 나타난 바와 같이 E-beam evaporator 방법에 의해 제조된 표면 가장 높은 Raman 신호가 나타났으며, Tollen 방법에 의한 표면도 높은 신호를 보인 반면, silver enhancing 방법은 가장 약한 Raman 신호를 보여주었다. E-beam 증착법을 이용한 표면은 견고성이 매우 약하여 효소 스크리닝 칩으로 활용하기에 어려움이 있으므로 본 연구에서는 Tollen 방법의 표면을 사용하였다.

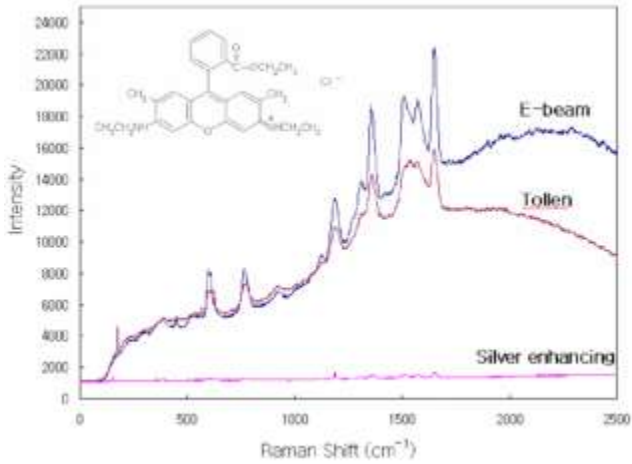


그림 9. 제작된 Ag 나노 표면의 SERS 활성 분석. 왼쪽: thiophenol의 자기조립단분자막, 오른쪽: 0.1 mM rhodamine 6G.

3. 다양한 효소 기질에 대한 SERS 측정

Tollen 방법에 의해 제조된 SERS 활성 표면을 이용하여 효소반응 기질 또는 생성물이 될 수 있는 다양한 물질에 대한 SERS 분석을 수행하였다. 먼저 케토프로펜의 normal Raman을 측정한 결과 1 M 농도에 뚜렷한 라만 스펙트럼을 얻을 수 있었으나 100 mM 이하의 농도에서는 라만 스펙트럼을 얻을 수 없었다. 그림 10. 왼쪽은 1 M 케토프로펜의 normal Raman 스펙트럼이다. 케토프로펜의 SERS 측정을 한 결과 50 mM 이하까지 측정이 가능한 것으로 나타나 20배 정도의 민감도가 증가하는 것으로 나타난다. 그러나 실제 효소반응 측정이 가능하기 위해서는 1 mM 이하의 농도분석이 가능하여야 하므로 현재 민감도로는 효소반응 분석에 어려움이 있음을 시사한다.

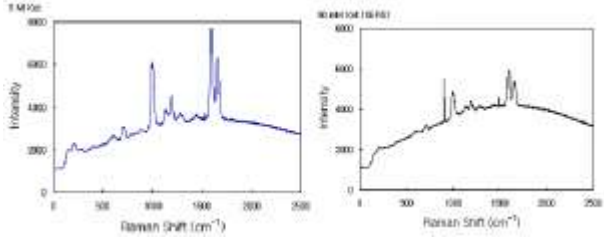


그림 10. 1 M 케토프로펜의 normal Raman (왼쪽)과 50 mM 케토프로펜의 SERS 스펙트럼(오른쪽)

28 여 가지 다양한 물질에 대해 SERS 실험을 수행하였다. 10 mM의 농도로 인산완충용액(0.1 M, pH 7.0)에 물질을 녹인 용액을 SERS 칩에 1 시간 동안 담지한 후 DW로 세척, 건조 후 Raman 측정을 하였다. 표 1에 SERS 측정 결과를 요약하였다.

표 1. 다양한 물질에 대한 SERS 측정

Sample #	물질명	Raman signal	Sample #	물질명	Raman signal
1	1-Amino-2-naphthol-4-sulfonic acid	m	15	Methylbenzylamine	n
2	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	n	17	Nicotinic acid	w
3	3-aminophenylboronic acid	w	18	Oxalacetic acid	m
4	6-Aminopenicillanic acid	n	19	p-Aminobenzoic acid	s
5	Captopril	m	20	Phenol	w
6	D-a-Aminophenylacetic acid	w	21	phenoxyacetic acid	w
7	DL-Benzylsuccinic acid	s	22	phenylglycine methylester	w
8	Iminodiacetic acid	w	23	Progesterone	m
9	L-glutamic acid(monosodium)	s	24	Propranolol.HCl	m
10	L-Lysine	w	25	S-Benzyl-L-Cysteine	m
11	L-phenylalanine	n	26	trans-cinnamic acid	m
12	L-prolineamide.HCl	w	27	z-Phe-Ala-OH	n
13	L-tryptophane	m	28	p-Dimethylaminobezaldehyde	m
14	L-Tyrosine	m			

s: strong, m: medium, w: weak. N: no signal

조사된 물질 중 강한 SERS 스펙트럼을 보여준 것은 benzylsuccinic acid, glutamic acid, p-aminobenzoic acid로 나타났으며(그림 11), 중간 정도의 SERS 스펙트럼을 보여준 물질은 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid, 3-aminophenylboronic acid, captopril, tryptophane, tyrosine, oxalacetic acid (중

간으로 분류된 것 중 가장 강함), progesterone, propranolol, S - benzyl - L - cysteine, cinnamic acid, dimethylaminobenzaldehyde 로 나타났다(그림 12, 13). 전반적으로 벤젠링 카르복실기나 아민기가 여러 개 있는 물질이 강한 SERS 스펙트럼을 보여주는 것으로 나타났다.

지금까지의 실험결과들로부터 결론내릴 수 있는 점은 본 연구에서 초기 계획하였던 방법 즉, 효소반응 기질과 효소반응 생성물이 보이는 다른 Raman 스펙트럼을 활용하고 나노 Raman 즉 SERS 현상을 이용한 Raman 증폭효과를 이용하여 효소반응분석을 마이크로어레이 방식으로 분석하는 것은 쉽지 않다는 것이다. 따라서 본 연구에서는 대안적인 방법을 고안하는 것이 필요하였다.

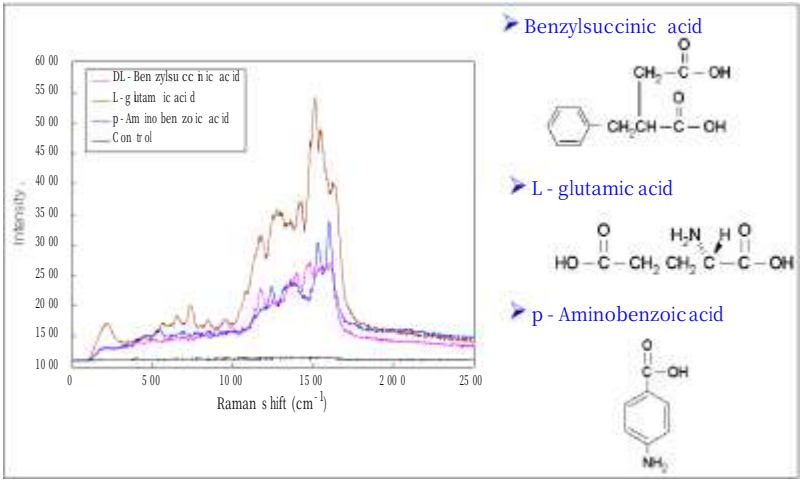


그림 11. 강한 SERS 신호를 보여주는 물질들.

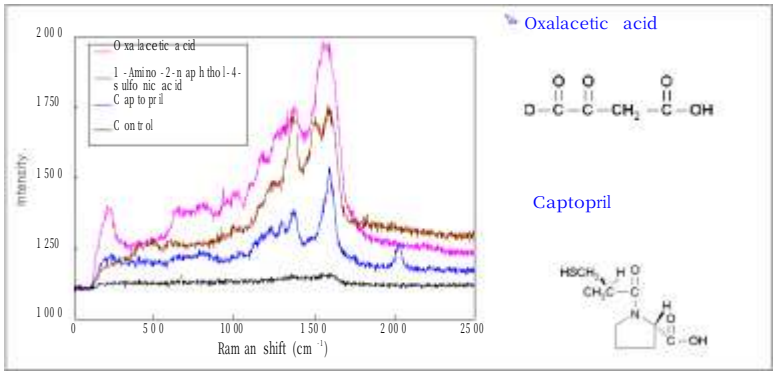


그림 12. 중간 SERS 신호를 보여주는 물질들 Ⅰ.

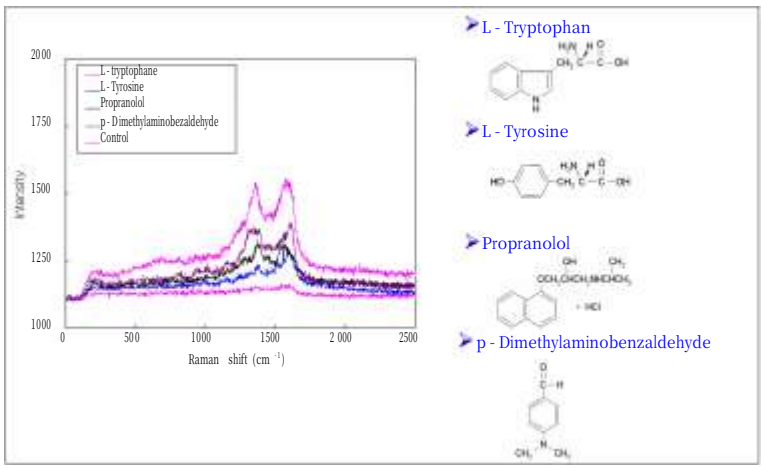


그림 13. 중간 SERS 신호를 보여주는 물질들 Ⅱ.

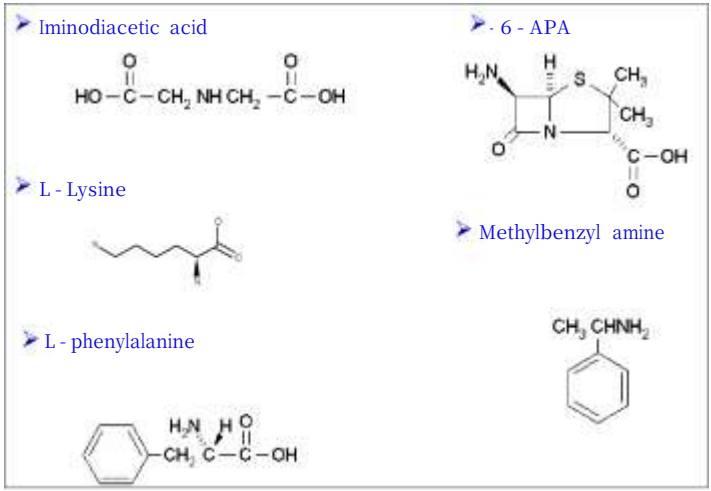


그림 14. SERS 신호가 약하거나 보이지 않는 물질 구조

4. 대안적인 방법 연구

가. 경쟁결합에 의한 SERS 비활성 물질의 분석

다양한 물질에 대한 SERS 실험을 한 결과 물질의 종류에 따라 Raman 강도가 매우 다르게 나타남을 알 수 있었다. SERS 현상을 보이지 않는 물질을 분석하고자 할 때 강한 SERS 신호를 보이는 물질과 경쟁결합을 유도하여 분석할 수 있을 것으로 예상할 수 있다. 이러한 시도로 강한 SERS 신호를 보이는 p-aminobenzoic acid (5 mM) 와 SERS 신호가 약하거나 없는 ketoprofen, 6-aminopenicillanic acid (6-APA), methylbenzylamine 을 각각 10 mM 농도로 혼합한 용액을 SERS 칩에 1 시간 동안 담지한 후 DW 로 세척, 건조 후 Raman 측정실험을 하였다. 흥미롭게도 6-APA 와 혼합한 경우 SERS 스펙트럼은 사라졌으며, methylbenzyl amine 과 혼합한 경우 aminobenzoic acid 의 SERS 강도가 매우 약해 졌으며, ketoprofen 과 혼합한 경우 혼합하지 않은 경우와 유사한 스펙트럼을 보여주었다(그림 15). Aminobenzoic acid 와 6-APA 는 카르복실기와 아민기를 동일하게 가지고 있어 6-APA 가 aminobenzoic acid 가 표면에 결합하는 것을 경쟁적으로 차단하는 것으로 설명할 수 있다. Methylbenzyl amine 의 경우 aminobenzoic acid 의 결합을 경쟁적으로 차단하는 것으로 나타나 카르복실기 보다 아민기가 표면에 결합하는 데 더 큰 역할을 하는 것으로 판단할 수 있다

경쟁결합을 이용하는 방법을 사용할 경우 효소반응분석에 유용하게 활용될 수 있다. 예를 들어 penicillin acylase 활성을 측정하고자 할 때 penicillin G로부터 효소반응에 의해 가수분해된 6-APA 를 위와 같은 방법으로 측정할 수 있다.

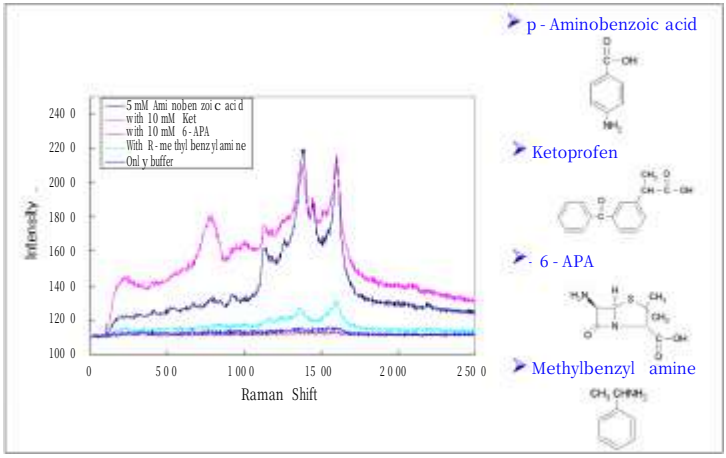


그림 15. 경쟁결합에 의한 SERS 비활성 물질의 분석

나. SPR 을 이용한 효소반응 측정

SPR (surface plasmon resonance) 센서는 물질이 센서 표면에 결합될 경우 표면 굴절률 변화에 따라 입사광 각도 또는 파장의 변화가 일어나는 현상을 이용하여 바이오센서 및 바이오칩 측정방법으로 많이 이용되고 있다 (Nice, E.C. and Catimel, B., BioEssays, 1999, 21, 339-352). 표면 플라즈몬이란 금속 표면과 같은 도체 표면을 따라서 전파하는 자유전자의 양자화된 진동이다 이와 같은 표면 플라즈몬은 프리즘과 같은 유전매체를 지나 유전 매체의 임계각 이상의 각도로 금속박막에 입사하는 입사광에 의해 여기 되며 일정한 각도에서 공명을 일으킨다 이러한 SPR이 일어나는 입사각, 즉 공명각은 금속박막에 근접한 물질의 굴절률 변화에 민감하다 SPR 센서는 이러한 성질을 이용하여 금속박막에 근접한 물질, 즉 시료의 굴절률 변화로부터 시료의 정량 분석, 정성 분석 및 박막인 시료의 두께를 측정하는데 이용된다 한편 SPR 이미징은 SPR의 장점과 함께 패턴화 된 평면의 SPR 신호를 이미지로 볼 수 있어, 마이크로어레이 형태의 SPR 분석이 가능한 시스템이다(Jung et al, 2004).

Esterase 효소가 에스터로부터 카르복실산을 만들 경우, 카르복실산만 SPR 표면

에 선택적으로 결합시키면 효소활성을 SPR 센서로 측정할 수 있다. 예를 들어 케토프로펜과 케토프로펜에틸 에스터 혼합물로부터 아민 표면에 EDC 촉매하에 케토프로펜만 선택적으로 화학결합 시킬 수 있다. 케토프로펜에틸 에스터가 에스터라제 및 리파제 가수분해반응에 케토프로펜이 생성되면서 만들어진 카르복실기는 아민 표면에 EDC를 매개체로 하여 아미드 결합을 하게 된다. 이 과정은 모든 에스터 가수분해 반응에 적용시킬 수 있다. 케토프로펜과 케토프로펜에틸 에스터 혼합물(총 농도는 5 mM 이며, 케토프로펜의 농도가 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0 mM) 을 EDC가 코팅되고 아민 단분자막이 형성된 SPR 칩에 마이크로어레이를 형성한 후 3 시간 정치시켰다 상기 칩을 세척 후 SPR 이미징 시스템으로 분석한 결과 0.5 mM 이하의 케토프로펜 분석이 가능함을 확인하였다 아래 그림 16 에 SPR 이미지와 농도 대비 spot intensity 를 도시하였다.

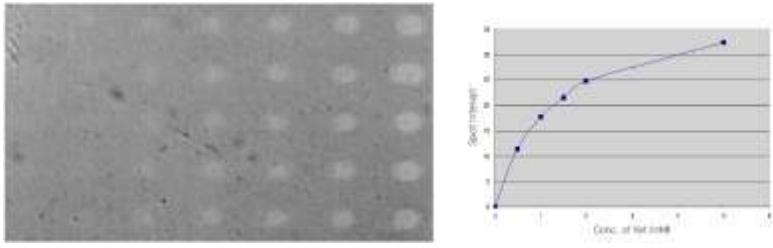


그림 16. 케토프로펜과 케토프로펜에틸 에스터 혼합물의 SPR 이미징 분석. 왼쪽: SPR 이미지(오른쪽부터 케토프로펜 농도가 5, 2, 1.5, 1, 0.5, 0.25, 0.1 mM), 오른쪽: 케토프로펜 농도 대비 spot intensity.

이 방법을 이용한 에스터라제 활성분석은 그림 17 에 도시하였다. His-tag esterase 를 Ni-IDA 로 기능화된 SPR 칩에 마이크로어레이어를 사용하여 spotting 한다. 이 칩을 세척하여 건조한 후 SPR 이미징을 측정하면 에스터라제의 발현양을 편리하게 측정할 수 있다(Jung et al. 2004). 위 칩에 케토프로펜에틸 에스터와 EDC를 혼합한 물질을 효소 spot 위에 spotting 한 후, 일정 시간을 두어 반응이 일어나도록 한다. 이 칩에 아민기로 수식된 다른 SPR 칩을 겹치면, 효소반응에 의해 생성된 케토프로펜이 EDC에 의해 아민 표면에 결합되게 된다. 이것을 SPR 이미징 센서로 측정하면 마이크로어레이 형태의 효소활성 분석이 가능하게 된다 그림 17 은 효소발현양을 측정한 SPR 이미지(그림 오른쪽)와 함께 효소활성을 측정한 SPR 이미지(그림 아래)를 동시에 테스트한 결과이다. 효소반응에 의해 생성된 마이크로어레이의 장점은 10 μL의 효소 샘플로 수십장의 마이크로어레이칩을 만들 수 있다는 점이다. 수십장의 효소 마이크로어레이가 만들어지면 발현양 측정, 다양한 기질에 대한 활성을 동시에 측정할 수 있게 된다.

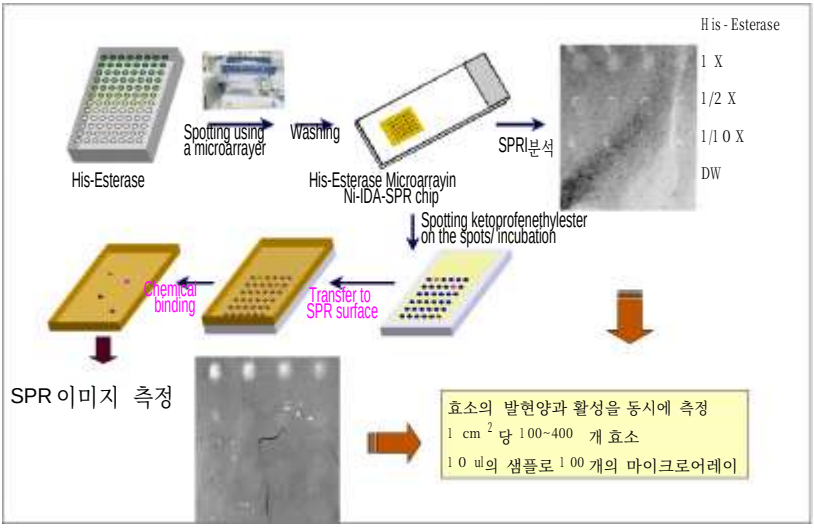


그림 17. SPR 이미징 센서를 이용한 esterase 활성 분석 방법

5. 요약

2 차년도 연구를 통하여 마이크로어레이 기반 초고속 효소반응 기술로 SERS 활성 금속나노표면의 개발, 검증, 적용 연구를 수행하였다. 향후 sensitity 가 10~100 배 더 증가시켜야 마이크로어레이 분석이 가능할 것으로 판단되며, SERS 의 대안적인 방법으로 SPR 이미징 시스템을 활용할 경우 esterase, amidase, lipase 등의 HTS 에 보다 간단한 방법으로 적용이 가능함을 확인하였다 따라서 3 차년도에는 이러한 연구결과를 기반으로 SPR 과 SERS 기술을 병행하여 마이크로어레이 기반 범용적 효소반응 시스템을 완성할 계획이다.

제 3 절 3차년도

1. 연구개요

3차년도에는 2차년도 연구결과로부터 SPR 이미징 기술을 이용한 마이크로어레이 기반 범용적 효소반응 분석 시스템을 개발하는 데 주력하였다. 2차년도 연구에서 효소반응에 의해 만들어진 생성물을 선택적으로 SPR 칩에 고정화 하는 방법을 제안하였으나 다양한 효소의 활성을 측정하는 측면에서 범용성이 떨어진다는 판단 하에 보다 범용적인 마이크로어레이 기반 효소활성 측정방법을 고안해 보았다.

2. SPR 이미징 시스템을 이용한 esterase 활성 분석

Esterase 의 high-throughput screening 을 위한 마이크로어레이 기반 효소반응 분석기술 전략은 다음과 같다. 1) SPR (surface plasmon resonance) 표면에 esterase 마이크로어레이 제작, 2) 효소 마이크로어레이에 효소반응기질을 spotting 한 후 일정시간 정치시켜 효소반응이 일어나도록 함, 3) SPR 마이크로어레이 분석을 위해, ester 기질에 alcohol oxidase, peroxidase, 4-chloro-1-naphthol (4-CN) 을 미량 첨가하여, esterase 효소가 가수분해 반응을 할 경우 SPR 표면에 침전이 유도되도록 하여 SPR 이미징 시스템으로 분석하였다(그림 18).

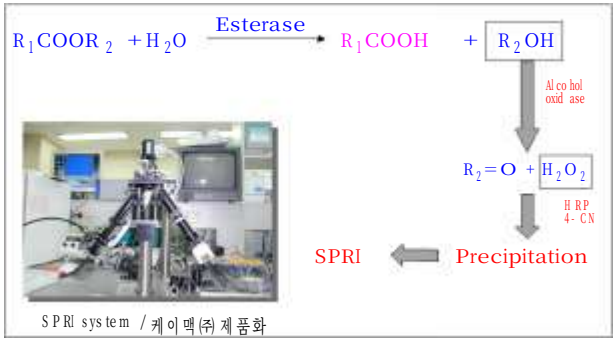


그림 18. SPR 이미징(SPRI) 를 이용한 마이크로어레이 효소분석 방법

먼저 그림 18 의 scheme 이 작동하는지 E-tube 에서 테스트하여 보았다. 효소반응의 기본 조성은 0.5 mM 4-CN, 10% PEG, 20 μg/mL alcohol oxidase, 10 μg/mL HRP, esterase 50 μg/mL, 0.1 인산완충용액(pH 7.0) 이며 이 용액에 1 mM 의 농도로 다양한 에스터를 첨가하여 침전반응에 의한 발색 현상을 관찰하였다. 그림 19 에 5분, 15

분에 관찰된 발색반응을 확인할 수 있다. 먼저 Control (에스터가 첨가되지 않은 용액)의 경우 발색되지 않는 것을 확인할 수 있다. OctOEt (ethyl octanoate)를 첨가한 경우 15 분에 뚜렷한 발색을 확인할 수 있다. KetOET (ketoprofen ethyl ester), FluOEt (flurbiprofen ethyl ester)를 첨가한 경우 15 분에 약간의 발색현상을 관찰할 수 있었다. MCP를 기질로 사용한 경우 5 분대에서도 진한 발색을 확인할 수 있으며, S-form 이 더 반응성이 좋음 나타내고 있다 이는 사용한 효소가 MCP 에 대해 S-form 에 대한 광학선택성이 있음을 의미한다

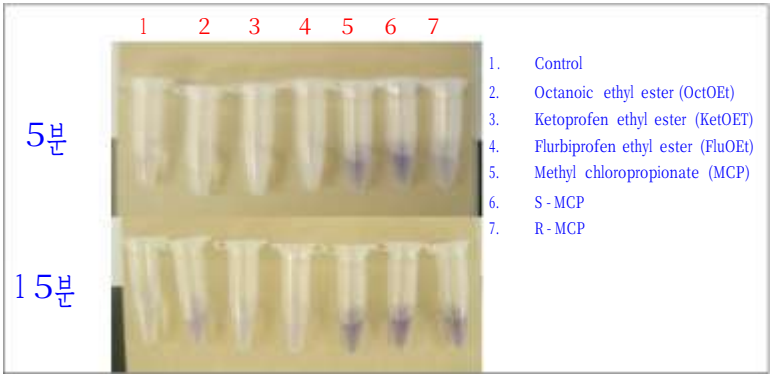


그림 19. 다양한 기질에 대한 esterase 활성 테스트

이와 같은 esterase 활성 측정방법은 문헌조사 결과 1985 년 이미 발표된 것으로 나타났다(Herzberg & Rogerson, 1985). 그러나 본 연구에서는 그림 19 에 테스트한 발색반응으로 esterase 효소활성을 측정하고자 하는 것이 아니라, 이러한 scheme 을 SPR 이미징 시스템에 적용하여 마이크로어레이 형태의 활성분석 방법을 개발하고자 하는 것이다

첫 번째 시도한 방법을 그림 20 에 도시하였다. 실험과정은 다음과 같다.

1. Preparation of HRP-immobilized SPR chip: SPR 칩 (2/45 nm Cr/Gold 박막)을 Piranha 용액으로 클리닝 한 후, Biotin-HPDP (Pierce)을 50 μM 농도로 녹인 에탄올 용액에 약 12 시간동안 정치시킨다. 에탄올 세척 후 poly STA-HRP conjugate (Sigma)에 칩을 30 분 동안 담지한 후, DW 세척과 질소가스 건조과정을 거친다.
2. First spotting: 에스터라제 후보 단백질을 duplicate 로 SPR 칩에 spotting 한다. Spotting 용액에는 10 % PEG 를 첨가하여 마름을 방지한다. Esterase

library 는 미생물유전체개발사업단으로 부터 공급받았다.

3. Second spotting: 5 mM OctOEt, 2 mM 4-CN, 20 μg/mL alcohol oxidase, 10 % PEG 를 함유한 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0) 을 1st spotting 의 duplicate spot 중에서 한 spot에만 150 μm spot interval 로 겹쳐서 일괄적으로 spotting 한다. Spot 크기는 300 μm 정도이므로 겹친 150 μm 정도가 1st spot과 2nd spot이 겹치게 된다. 이것은 humidified chamber 에 30 분 정도 incubation 하여 효소 반응이 진행되도록 한다.
4. 위 칩을 세척, 건조한다
5. SPR 이미지를 측정한다

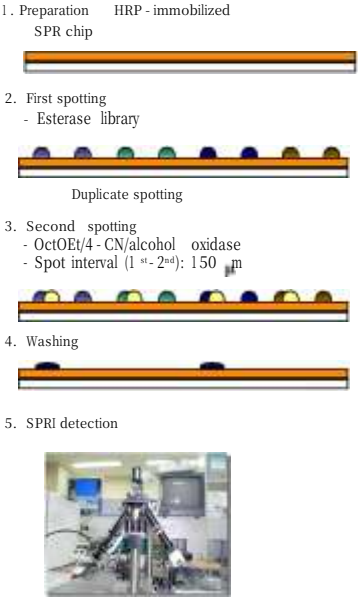


그림 20. SPR 이미징 시스템과 침전반응을 이용한 esterase 활성 분석 방법

위와 같은 과정에 의해 측정한 SPR 이미지를 그림 21 에 나타내었다. 그림 21 에서 duplicate spot 중 왼쪽은 효소용액 내 물질이 비특이적 반응에 의해 SPR 칩 표면에 결합한 이미지이며, 오른쪽 spot은 비특이적 결합과 함께 esterase 효소활성에 의해 나타

난 이미지라 할 수 있다. 따라서 왼쪽 spot에 비해 오른쪽 spot의 intensity 가 높은 경우 사용기질에 대해 활성을 보이는 것이라 할 수 있다. 마이크로어레이 결과 실제 발색 반응과 같은 결과를 보여주는지 확인하기 위해 그림 19 에 나타난 방법에 의해 측정한 발색 결과로부터 측정하였다. 실험결과를 표 2 에 정리하였다 Expression 결과는 SPR 이미지를 이용하여 His-tag 재조합 단백질의 양을 측정한 결과이다 (Ro et al., 2005). SPR 이미징 결과와 발색반응 결과가 거의 유사함을 알 수 있다. 그러나 일부 일치하지 않는 상반된 결과도 나타나고 있으며, 반복하여 실험한 결과 재현성이 떨어지는 실험결과들이 나왔다. 주요한 이유는 마이크로어레이어 pin이 한번에 spotting 하는 양이 약 3 nL 정도인데 spotting 할 때마다 그 오차가 클 수 있으며, 마름을 방지하기 위해 PEG 와 같은 물질을 사용하여야 하는데 이 물질이 spot-spot 간 물질이동을 방해할 수 있어서 반응 정도가 습도, 온도에 따라 매우 큰 영향을 받을 수 있다.

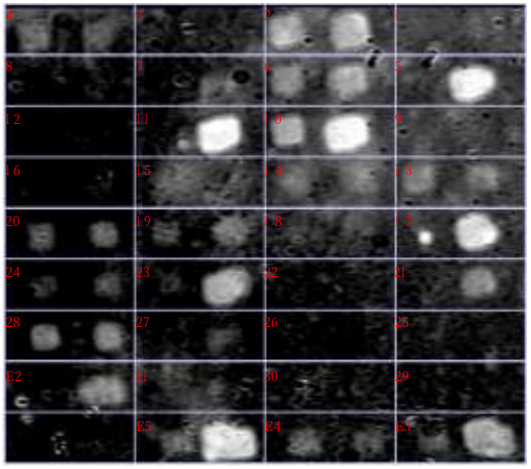


그림 21. SPRI 를 이용한 esterase 효소 활성 분석 결과

표 2 발색반응을 이용한 esterase 활성 분석

Esterase	E xpression	OctOEt	S-CPOMe	R-CPOMe	Esterase	Expression	OctOEt	S-CPOMe	R-CPOMe
1	+	-	-	-	16	-	-	-	-
2	+	-	-	-	17	++	+	++	+
3	++	-	-	-	18	++	-	-	-
4	++	-	-	-	19	++	-	-	-
5	+	+	-	-	20	++	-	-	-
6	++	-	++	++	21	++	-	-	-
7	++	-	-	-	22	+++	-	-	-
8	+++	-	-	-	23	++	+	++	+
9	+	-	-	-	24	+++	-	-	-
10	++	++	-	-	25	++	-	-	-
11	+	+	+	++	26	+++	-	-	-
12	+	+	-	-	27	+	-	-	-
13	++	-	-	-	28	+	++	++	++
14	++	-	-	-	29	+++	-	-	-
15	++	-	-	-	30	-	-	-	-

따라서 위와 같이 spot - spot matching 에 의해 초고속 효소활성을 측정함에 있어서 오차가 많을 것으로 판단되어 좀 더 재현성이 높은 방법을 모색하였다. Multi - well slide 와 HRP - immobilized SPR 칩을 이용하는 것으로 그 방법을 정리해 보면 다음과 같다.

1. 아래 그림은 Erie Scientific Co. 의 Multi - well slide 그림이다. Well 하나의 사이즈는 2 x 2 mm 이며 높이는 정확한 Spec. 은 없으나 대략 30~50 μm 정도 되는 것으로 측정되었다.

위 슬라이드의 특징은 well 표면은 glass 로서 비교적 친수성이 있는 반면 코팅된 것은 소수성이 높아 슬라이드를 수용액에 담근 후 빼면 well 부분만 수용액이 채워지게 된다. 이러한 원리는 결합 반응이 아닌 효소 반응에 매우 유용하게 활용될 수 있다.

2. 먼저 위 well 에 효소를 spotting 한다(10 % PEG 를 사용한다). Well 에 채워지는 부피가 500 nL 정도 되므로 한 well 에 같은 효소를 9 개 정도 찍히도록 하여 30 nL 정도 효소 용액이 채워지도록 하였다(본 실험은 위 well slide 를 활용하기 위한 것이며, 만약 well size 와 깊이를 줄이면 한 번의 spotting 으로 가능할 것임).

3. 각 well 에 다른 효소들이 채워지면, slide 를 반응 용액에 담지 하였다가 꺼내준다. 반응용액은 1.0 mM OctOEt, 0.5 mM 4-CN, 50 μg/mL alcohol oxidase, 5% DMSO 를 포함한 0.1 M, pH 6.5 MES 완충용액을 사용하였다. 여기서 중요한 포인트는 2 의 단계에서 spotting 된 효소 용액이 wash-out 되지 않는다는 점이다. Spotting 용액이 점성이 있는 PEG 와 같은 물질을 포함하므로 spotting 된 well slide 를 반응용액에 담궜다가 빼내는 1 초 정도의 시간 동안 well 에 머물러 있음을 확인하였다.
4. 위 well slide 를 일정시간 humidified chamber 에 정치시킨 후 HRP 가 결합되어 있는 SPR 칩으로 덮으면 well 내에서 esterase 와 alcohol oxidase 효소반응에 의해 생성된 H_2O_2 가 4-CN 과 반응하여 SPR 칩에 고정화 되어 있는 HRP 활성에 의해 칩 표면에 침전물을 형성한다.
5. 위 SPR 칩을 세척, 건조하여 SPR 이미지를 구하면 각 well 에 있는 효소의 esterase 활성을 알 수 있다.

위와 같은 방법에 의해 측정한 실험결과를 그림 21 에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 효소가 첨가되지 않은 control spot 과 비교하여 0.1, 0.5 mg/mL esterase 를 첨가한 경우 spot intensity 가 증가하는 것을 볼 수 있으며, 1 mM H_2O_2 을 spotting 한 경우 예상되는 바와 같이 가장 높은 intensity 를 보여주고 있다. 위 well slide 를 사용할 경우 SPR 이미징 시스템에 사용하는 칩이 20 x 20 mm 이므로 한 번 실험에 측정할 수 있는 효소활성 측정 수는 20 개 정도이다. 만약 지름 1 mm 원형의 높이 30 μm well 을 제조한다면 부피는 24 nL 정도이며, 간격을 0.5 mm 정도로 고려한다면 15 x 15 mm 면적 내에 100 개의 well 을 형성할 수 있다. 이와 같은 well-slide 를 사용하면 well 하나당 한번의 spotting 만 해도 되며, 한 번에 측정할 수 있는 효소 수도 100 개가 된다. 이 경우 100 개 효소의 10 개 다른 기질에 대한 대해 활성을 측정하고자 할 때 대략 3.5 ~ 4 시간이 소요되는 것으로 추정할 수 있다.

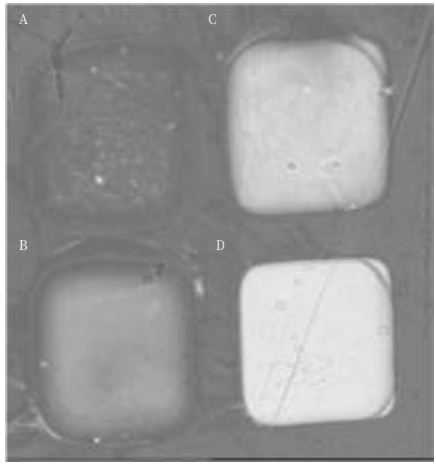


그림 21. Well slide 와 SPR 칩을 이용한 esterase 활성 측정을 한 SPR 이미지. Spotting 용액 A: control (10% PEG in pH 6.5, 0.1 M MES buffer), B: 0.1 mg/mL esterase, C: 0.5 mg/mL esterase, D: 1 mM H_2O_2

3. 효소 마이크로어레이 시스템

산화효소에 의해 기질이 반응하여 생성된 H_2O_2를 이용하여 SPR 칩에 침전을 유도하여 마이크로어레이 형태로 효소활성을 측정하는 방식은 간단하게 oxidase 효소 마이크로어레이의 활용성을 부수적으로 제공하여 준다. 먼저 SPR 칩 표면에 다른 종류의 oxidase 를 각각 HRP 와 혼합하여 고정화 하는 것에 의해 oxidase array 를 형성한다. 이 칩에 고농도의 BSA 로 blocking 한다. 그림 22 의 Control 은 고농도의 BSA 로 blocking 한 칩의 SPR 이미지를 보여준다. 첫 번째 줄은 glucose oxidase (GOx), 두 번째 줄은 alcohol oxidase (AOx), 세 번째 줄은 BSA 로 3 번 spotting 한 것이다. 이 칩에 기본용액 조성은 0.5 M CN을 혼합한 0.1 M, pH 7.0 인산완충용액으로 사용하였다. 0.5 mM glucose 를 포함할 경우 그림 22 의 두 번째에 보이는 바와 같이 GOx spot에 매우 강한 spot intensity 가 나타나며, 0.5 mM ethanol을 포함할 경우 그림 22 의 세 번째에 보이는 바와 같이 AOx spot에 매우 강한 spot intensity 가 나타난다. 이러한 결과는 마이크로어레이 기술에 대한 새로운 가능성을 제공하여 준다. 통상 마이크로어레이는 DNA - DNA, protein - protein 과 같은 결합을 측정하는 것이며, 효소반응을 마이크로어레이 칩 상에서 직접 분석하는 것은 kinase 반응에 의해 칩 표면의 기질이 인산화 되거나, protease 반응에 의해 칩 표면의 기질이 가수분해 되어 형광을 나타내는 것과 같이

극히 일부분에 응용에 국한되어 있는데 그림 22 와 같은 결과는 효소 자체를 마이크로어레이화 하여, 다양한 대사체 분석이 가능한 방법을 제공하여 준다. 구매할 수 있거나 미생물로부터 얻을 수 있는 다양한 oxidase 를 마이크로어레이화 한 다음 인체나 미생물의 대사체 분석을 한다면 질병진단이나 system biology 연구에 매우 중요한 툴이 될 수 있을 것이다.

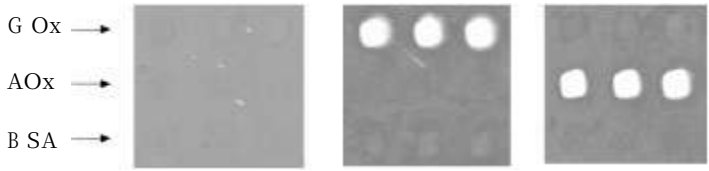


그림 22. 효소마이크로어레이

4. 결론

1, 2 차년도의 연구를 통하여 초기 제안한 나노라만 기술은 범용적인 효소활성 분석에 어려움이 있는 것으로 판단되어 2, 3 차년도에는 SPR 이미징 시스템을 이용한 효소활성 분석에 대한 연구를 집중하였다. 기본적인 아이디어는 효소반응에 의한 생성물로부터 과산화수소수가 만들어지도록 하여, SPR 칩 표면에 침전을 유도하여 측정하는 것이다. 다양한 분석방법들을 시도한 결과 범용성과 재현성이 좋은 방법은 well slide 와 SPR 칩을 겹치는 방식을 활용하는 것이었다(그림 21). 그러나 이 방법이 한 칩에서 100 개 이상의 효소반응 동시분석이 가능하기 위해서는 well size 가 축소된 well slide 를 제조하여야 하는데 이러한 연구는 1 단계에서 완료하지 못하여, 추후 추가적인 개발이 필요하다. 본 연구에서 효소 스크리닝 외에 부수적인 연구결과는 알려진 oxidase 효소를 마이크로어레이로 제작한 효소칩 개발이라 할 수 있다. 원리는 효소 스크리닝 방법과 유사하다. Oxidase 마이크로어레이 칩은 인체나 미생물의 대사체 분석을 통한 질병진단 및 system biology 연구에 매우 중요한 툴이 될 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 마이크로어레이 기반 효소반응분석 기술을 개발하기 위해 많은 시행착오를 거치게 되어 esterase 와 oxidase 효소에 대한 실험을 수행하는데 그쳤다. 그러나 본 연구의 결과는 위 효소에만 적용할 수 있는 것은 아니며 H_2O_2가 직간접적으로 효소반응에 간여하는 모든 반응에 대해 적용할 수 있을 것으로 예상할 수 있다. 탈수소화효소(dehydrogenase) 를 대상으로 할 경우 효소반응에 의해 생성된 NADH 를 산화하는 NADH oxidase 를 첨가하면 H_2O_2가 생성된다. Lyase 의 한 종류인 aspartase 효소는 fumarate 로부터 L-aspartate 가 만들어 진다. 이 경우 L-amino acid oxidase 를 사용하

여 스크리닝에 활용할 수 있다. Monooxigenase 를 스크리닝 하고자 할 때는 반응에 의해 생성된 H_2O_2를 측정하거나 반응에 사용된 산소를 측정할 수 있다. 이와 같이 적절한 설계에 의해 다양한 효소반응을 SPR 이미징 시스템을 사용하여 마이크로어레이 형태로 측정이 가능할 것으로 결론지을 수 있다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

년도	세부연구목표	평가의 착안점 및 척도	연구개발내용	달성도 (%)
1차년도 (2002)	카르복실산/카르복실릭 에스터 혼합물질에 선택성을 보이는 SERS 나노입자체 형성 기술	- Ibuprofen/ester - Ketoprofen/ester - 2 - Chloropropionic acid/ ester - 타그룹이 분석 필요로 하는 물질 (2 쌍 이상)	- 안정한 SERS 용 나노입자 합성 - 4물질에 대한 분석 재현	95
	고감도 SERS 시스템 개발	- 카르복실산에 대해 분석감도 1 mM 이하	- 카르복실산에 대해 분석감도 0.1~1 mM	100
	기분석된 물질 중 효소반응 직접 분석	- 위 물질 중 2물질 이상	- 2물질에 대해 효소반응 모니터링	100
2차년도 (2003)	SERS 표면 개발	- SERS 현상을 보이는 Metal nano - patterned surface 개발	- SERS 현상을 보이는 Metal nano - patterned surface 개발	100
	마이크로어레이 기반 분석기술 개발	- 효소반응물질의 마이크로어레이 분석	- 효소반응물질의 마이크로어레이 분석을 위한 방법 개발	100
	아민, 알콜, 카프복실산에 선택성을 보이는 SERS 칩 분석기술 개발	- Propranolol/ester - Phenylethyl amine/ester - 2 - octanol/2 - octanone - 타그룹이 분석 필요로 하는 물질 (2 쌍 이상)	- Ketoprofen, methylbenzylamine, 6 - APA, aminobenzoic acid, flurbiprofen 등 30 여 물질의 SERS 분석	100
	기분석된 물질의 효소반응 직접 분석	- 위 물질 중 2물질 이상	- Ketoprofenethyl ester 효소 가수분해 반응의 마이크로어레이 분석	90

3 차년도 (2004)	에스터라제 마이크로어레이 제작	- 사업단 인프라과제에서 확보한 200 여종 에스터라제 마이크로어레이 제작	- 30 여종 에스터라제 마이크로어레이 제작	95
	에스터라제 마이크로어레이의 활성 분석	- 상기 효소 마이크로어레이의 5종 이상 기질에 대한 활성 분석	- 5종 기질에 대한 활성 분석	100
	다양한 효소에 대한 마이크로어레이 기반 효소활성 측정기술 확립	- 에스터라제, 아미다제, oxidase 등 3 종 이상의 효소에 대한 마이크로어레이 기반 효소활성 측정기술 확립	- 에스터라제, oxidase, dehydrogenase, monooxigenase 등에 대한 마이크로어레이 기반 효소활성 측정기술 확립	100
최종	초고속 효소 활성 분석용 SERS 및 SPR 마이크로어레이 시스템 개발	- 마이크로어레이 기반 초고속 효소 스크리닝 기술 확릭	- Esterase 효소의 초고속 선별이 가능한 마이크로어레이 분석기법의 개발 - Oxidase, dehydrogenase, lipase 등 다양한 효소 및 실제 기질의 초고속/극미량 분석이 가능한 방법론 확립	98

제 2 절 관련분야 기술발전 기여도

○ 본 연구를 통하여 개발된 신기술

1. 마이크로어레이 기반 효소 스크리닝 기술
2. 대사체 분석이 가능한 효소 마이크로어레이 시스템

○ 기술발전 기여도

1. 마이크로어레이 기반 효소 스크리닝 기반기술 개발을 통하여 esterase, lipase, dehydrogenase, lyase, oxigenase 등 산업적 유용효소의 스크리닝 시간과 비용을 획기적으로 줄일 수 있다. 예를 들어 10 μL 정도 유용효소 후보 단백질을 가지고 20 개 정도의 다른 기질(substrate) 에 대해 테스트 할 수 있으며, 100 개 효소의 10 개 다른 기질에 대한 활성을 측정하고자 할때 4 시간 정도 시간이 소모되는 것으로 추산된다 이러한 속도와 효율성은 지금까지 보고된 기술 중에 가장 앞선 것으로 예상되며, 유용효소 개발에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다
2. 본 연구에서 개발한 oxidase 마이크로어레이 칩 기반기술은 인체나 미생물의 대사체 분석을 통한 질병진단 및 system biology 연구에 매우 중요한 툴이 될 수 있다 마이크로어레이는 DNA - DNA, protein - protein 과 같은 결합을 측정하는 효소반응을 마이크로어레이 칩 상에서 직접 분석하는 것은 kinase 반응에 의해 칩 표면의 기질이 인산화 되거나 protease 반응에 의해 칩 표면의 기질이 가수분해 되어 형광을 나타내는 것과 같이 극히 일부분에 응용에 국한되어 있는데 본 연구를 통하여 개발된 oxidase 마이크로어레이는 다양한 oxidase 기질을 한 칩에서 분석이 가능하도록 고안되었다

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

- 초고속 효소 스크리닝과 관련된 1단계 연구 결과가 연구 현장에서 직접 활용되기 위해서 1 mm이하 크기의 multi-nanowell slide 제작이 필수적임. 고난이도 기술의 요구 없이 일반적인 MEMS 기술로 제작이 가능함.
- Oxidase 마이크로어레이는 진단용 칩으로 제품화가 가능하며, 이를 위하여 효소 수를 10개 이상으로 한 칩 제작이 필요하며, 정량화, 민감도 증진과 같은 추가 연구가 필요함.

제 2 절 타 연구에의 응용

- 효소반응을 작용점으로 하는 신약 타겟에 대해 마이크로어레이 기반 초고속 신약스크리닝에 활용할 수 있음.
- Metabolomics 연구용 효소 마이크로어레이 칩 개발에 활용할 수 있음.

제 3 절 기업화 추진 방안

- 본 연구의 참여기업인 케이맥(주)는 생명(연) 바이오나노연구센터의 기술이전을 통하여 SPR 이미징 시스템을 2005년도 하반기에 출시 예정임. 본 연구에서 개발한 효소 스크리닝 칩, 효소 마이크로어레이 칩 등이 모두 SPR 이미징 시스템을 하드웨어로 사용되는 것임,
- 따라서 본 연구를 통하여 개발한 SPR 칩들은 케이맥(주)에서 제품화를 추진할 수 있음.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

Nanobiotechnology: Commercial Opportunities from Innovative Concepts, D&MD Executive Briefing, April 2002.

Nanobiotechnology, Edited by C. M. Niemeyer and C. A. Mirkin, Wiley-VCH, 2004

제 7 장 참고문헌

Bao, L. L., Mahurin, S. M., Liang, C. D., and Dai, S., Study of silver films over silica beads as a surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrate for detection of benzoic acid, J. Raman Spectrosc., 34, 394-398 (2003).

Batchelder, D. N., Saito, Y., Wang, J. J., and Smith, D. A., A simple chemical method for the preparation of silver surfaces for efficient SERS, Langmuir, 18, 2959-2961 (2002).

Bright, R. M., Walter, D. G., Musick, M. D., Jackson, M. A., Allison, K. J., and Natan, M. J., Chemical and electrochemical Ag deposition onto preformed Au colloid monolayers: Approaches to uniformly-sized surface features with Ag-like optical properties, Langmuir, 12, 810-817 (1996)

Buckland, B. C., Robinson, D. K., and Chartrain, M., Biocatalysis for pharmaceuticals-status and prospects for a key technology, Metab. Eng., 2, 42-48 (2000).

Bull, A. T., Bunch, A. W., and Bobinson G. K., Biocatalysts for clean industrial products and processes, Curr. Opin. Microbiol., 2, 246-251 (1999).

Castro, J. L., Lopez Ramirez, M. R., Lopez Tocon, I., and Otero, J. C., Vibrational study of the metal-adsorbate interaction of phenylacetic acid and α-phenylglycine on silver surfaces, J. Colloid Interf. Sci., 263, 357-363 (2003).

Christesen, S. D., Lochner, M. J., Elly, M. W., Spencer, K. M., Sylvia, J. M., and Clauson, S. L., Surface enhanced Raman detection and identification of chemical agents in water.

Chun Li, Sanxie Wu, Jianguo Huang, and Yingqiu Liang, Fourier transform surface-enhanced

Raman scattering of single-layer nucleolipid Langmuir-Blodgett films on silver island film substrates, J. Colloid. Interf. Sci. 270, 309-314 (2004).

De, G., Licciulli, A., Massaro, C., Tapfer, L., Catalano, M., Battaglin, G., Meneghini, C., and Mazzoldi, P., Silver nanocrystals in silica by sol-gel processing, J. Non-Cryst. Solids, 194, 225-234 (1996).

Fernandes, P. B., Technological advances in high-throughput screening, Curr. Opin. Chem. Biol., 2, 597-603 (1998).

Fessner, W. D., and Jones, J. B., Biocatalysis and biotransformation from discovery to application, Curr. Opin. Chem. Biol., 5, 103-105 (2001).

Hawkins, S. J., Ratcliffe, N. M., and Sagastizabal, A., The use of thin silver films for the detection of low concentrations of hydrogen sulphide, Anal. Chim. Acta, 359, 125-132 (1998).

Herzberg, G. R. and Rogerson, M., Use of alcohol oxidase to measure the methanol produced during the hydrolysis of D- and L-methyl-3-hydroxybutyric acid, Anal. Chem. 149, 354-357 (1985).

Horvath, E., Gajari, J., Kristof, J., Redey, A., and Kocsis, L., Monitoring of enzyme catalysed reactions by Fourier transform Raman spectrometry, Anal. Chim. ACTA, 370, 191-197 (1998).

Hou, X., Wu, L., Xu, W., Qin, L., Wang, C., Zhang, X., and Shen, J., Self-assembly and Langmuir-Blodgett (LB) film of a novel hydrogen-bonded complex: a surface enhanced Raman scattering (SERS) study, Colloid. Surface. A: Physicochemical and Engineering Aspects, 198-200, 135-140 (2002).

Hu, j., Zhao, B., Xu, W., Fan, Y., Li, B., and Ozaki, Y., Simple method for preparing controllably aggregated silver particle films used as surface-enhanced Raman scattering active substrates, Langmuir, 18, 6839-6844 (2002).

Istvan, K., Keresztury, G., and Szep, A., Normal Raman and surface enhanced Raman spectroscopic experiments with thin layer chromatography spots of essential amino acids using different laser excitation sources, Spectrochim, Acta A, 59, 1709-1723 (2003).

Jal, P. K., Patel, S., and Mishra, B. K., Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions, Talanta, 62, 1005-1028 (2004).

Liese, A., and Filho, M. V., Production of fine chemicals using biocatalysis, Curr. Opin. Biotech., 10, 595-603 (1999).

Lin He, Natan, M. J., and Keating, C. D., Surface-enhanced Raman scattering: A structure-specific detection method for capillary electrophoresis, Anal. Chem. 72, 5348-5355 (2000).

Lucht, S., Murphy, T., Schmidt, H., and Kronfeldt. H. D., Optimized recipe for sol-gel-based SERS substrates, J. Raman Spectrosc., 31, 1017-1022 (2000).

Maurizio Muniz-Miranda, Surface enhanced Raman scattering of 4,4'-bipyridine adsorbed on smooth copper, silver and aluminium surfaced activated by deposited silver particles, J. Raman Spectrosc., 27, 435-437 (1996).

Maxwell, D. J., Emory, S. R., and Nie, S., Nanostructured thin-film materials with surface-enhanced optical properties, Chem. mater., 13, 1082-1088 (2001)

Murphy, T., Schmidt, H., and Kronfeldt, H. D., Use of sol-gel techniques in the development of surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrates suitable for in situ detection of chemicals in sea-water, Appl. Phys. B, 69, 147-150 (1999).

Olsen, M., Iverson, B., and Georgiou, G., High-throughput screening of enzyme libraries, Curr. Opin. Biotech., 11, 331-337 (2000).

Pal, A., and Pal, T., Silver nanoparticle aggregate formation by a photochemical method and its application to SERS analysis, J. Raman Spectrosc., 30, 199-204 (1999).

Reetz, M. T., Combinatorial and evolution-based methods in the creation of enantioselective catalysts, Angew. Chem. Int. Ed., 40, 284-310 (2001).

Rivas, L., Sanchez-Cortes, S., Garcia-Ramos, J. V., and Morcillo, G., Growth of silver colloidal particles obtained by citrate reduction to increase the Raman enhancement factor, Langmuir, 17, 574-577 (2001).

Ro, H.-S., Jung, S. O., Kho, B. H., Hong, H. P., Lee, J. S., Shin, Y.-B., Kim, M. G. and Chung, B. H., Surface plasmon resonance imaging-based protein array chip system for monitroring a hexahistidine-tagged protein during expression and purification, Appl. Environ. Microbiol. 71, 1089~1092 (2005).

Rozzell, J. D., Commercial scale biocatalysis: myths and realities, Bioorgan. Med. Chem., 7, 2253-2261 (1999).

Tanaka, T., Nakajima, A., Wntanabe, A., Ohno, T., and Ozaki, Y., Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy and density functional theory calculation studies on adsorption of o-, m-, and p-nitroaniline on silver and gold colloid, J. Mol. Struct., 661-662, 437-449 (2003).

Wahler, D., and Reymond, J. L., High-throughput screening for biocatalysts, Curr. Opin. Biotech., 12, 535-544 (2001).

Wahler, D., and Reymond, J. L., Novel methods for biocatalyst screening, Curr. Opin. Chem. Biol., 5, 152-158 (2001)

Yoshika Imai, Yoichi Kurokawa, Masaru Hara, and Michiko Fukusima, Observation of SERS of picolinic acid and nicotinic acid using cellulose acetate films doped with Ag fine particles, Spectrochim. Acta A, 53, 1697-1 700 (1997).

Yu, K. H., Rhee, J. M., Ko, S. B., and Yu, S. C., Surface-enhanced Raman scattering study of 4-biphenylcarboxylic acid and a liquid crystalline oligomer on different metal surfaces, Langmuir, 17, 8184-8187 (2001).