



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0121636
(43) 공개일자 2019년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) G01N 27/327 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54373 (2013.01)
G01N 27/3277 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0045207
(22) 출원일자 2018년04월18일
심사청구일자 2018년04월18일

(71) 출원인
부산대학교 산학협력단
부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2 (장전동, 부산대학교)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
양해식
부산광역시 동래구 아시아드대로146번길 1, 106동 2604호 (사직동, 사직 롯데캐슬 더 클래식)
우한영
서울특별시 성북구 지봉로21길 19, 103동 1403호 (보문동3가, 보문아이파크아파트)
(74) 대리인
특허법인 무한

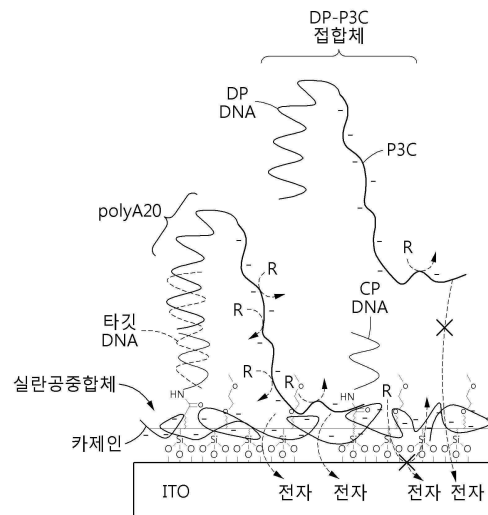
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 공액 고분자 전해질을 이용하는 바이오 센서 및 이를 이용한 분석물질 검출방법

(57) 요약

본 발명은 공액 고분자 전해질을 이용하는 바이오 센서 및 이를 이용한 분석 물질의 검출방법에 관한 것으로, 보다 자세히는 기관, 전극, 산화-환원 표지자, 프로브(probe) 및 기질을 포함하는 바이오 센서이며, 상기 산화-환원 표지자는 공액 고분자 전해질이고, 상기 공액 고분자 전해질은 상기 프로브와 접합하여, 전자를 상기 전극으로 직접 이동시켜 분석 물질을 검출하는 바이오 센서이다. 이를 이용하여 별도의 매개체 없이 전극과의 거리가 먼 전자를 직접 전달 하는 방법으로 분석물질을 검출하는 것을 목적으로 하고 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

박선화

부산광역시 금정구 서동로5번길 47-12 (부곡동)

정지은

서울특별시 동대문구 무학로 202, 606호 (제기동, 라이온스파스텔)

이반상

베트남 호치민시티 디스트릭 02 안 푸 워드 이 스트리트 블럭 제이 아파트먼트 이 16층 17호

서정욱

부산광역시 금정구 금샘로 262, 210동 302호 (구서동, 쌍용예가2단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SRFC-TA1503-01

부처명 삼성미래기술육성센터

연구관리전문기관 삼성전자주식회사

연구사업명 일반연구용역

연구과제명 (1세부)무세척 현장 진단 센서를 위한 수용성 전도성 고분자-애타이드 연결체

기 여 율 1/1

주관기관 부산대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

기관, 전극, 산화-환원 표지자, 프로브(probe) 및 기질을 포함하는 바이오 센서로,
상기 산화-환원 표지자는 공액 고분자 전해질이고,
상기 공액 고분자 전해질은 상기 프로브와 접합하여, 전자를 상기 전극으로 직접 이동시켜 분석 물질을 검출하는, 바이오 센서.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 공액 고분자 전해질은, P형 공액 고분자인, 바이오 센서.

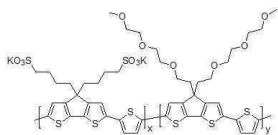
청구항 3

제2항에 있어서,
상기 P형 공액 고분자의 주사슬은, 싸이클로펜타디티오펜(Cyclopentadithiophene) 및 티오펜(Thiophene)이고, 곁사슬은 술폰산 음이온을 갖는 알킬 체인과 올리고 에틸렌 글리콜(Oligoethylene Glycol)을 포함하는 바이오 센서.

청구항 4

제2항에 있어서,
상기 공액 고분자 전해질은, 하기의 화학식 1인, 바이오 센서.

[화학식 1]



(x 및 y는 공액 고분자 합성 비율로, x 는 0.3 내지 1, y는 0 내지 0.7임)

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 기질은 $AB(H_3N-BH_3)$, H_2NNH_2 , $NADH$ 및 트리스(2-카르복시에틸포스핀)(tris(2-carboxyethylphosphine)) 중 적어도 하나를 포함하는, 바이오 센서.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 전극은 ITO(indium-tin oxide), FTO(fluorinated tin oxide), 붕소가 도핑된 다이아몬드 전극 및 유사다이아몬드 탄소 전극으로 구성된 군에서 선택되는, 바이오 센서.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 분석물질은, 대사 산물(metabolite), DNA, RNA, 단백질, 동식물 세포 및 미생물 중 어느 하나 이상인, 바이오 센서.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 바이오 센서는 전자를 전달하는 별도의 매개체를 포함하지 않는, 바이오 센서.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 공액 고분자 전해질에 카르복실기를 포함하는 티오펜(Thiophene)으로 말단 캡핑(end capping)하는 단계;

상기 공액 고분자 전해질과 상기 프로브를 결합시켜 공액 고분자 전해질 표지를 생성하는 단계;

상기 공액 고분자 전해질 표지가 생성된 바이오 센서에 상기 분석물질이 포함된 시료를 공급하는 단계;

상기 분석물질이 상기 프로브와 결합하는 단계; 및

상기 공액 고분자 전해질 표지로부터 전자를 상기 전극으로 직접 이동시켜 전기화학적 신호를 측정하는 단계;

를 포함하는, 분석물질 검출 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 바이오 센서는, 대사 산물(metabolite), DNA, RNA, 단백질, 동식물 세포 및 미생물 중 어느 하나 이상의 측정, 분석, 검출 또는 진단용으로 이용되는, 바이오 센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 공액 고분자 전해질을 이용하는 바이오 센서 및 이를 이용한 분석물질 검출 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 기관, 전극, 산화-환원 표지자, 프로브(probe) 및 기질을 포함하는 바이오 센서로, 상기 산화-환원 표지자는 공액 고분자 전해질이고, 상기 공액 고분자 전해질은 상기 프로브와 접합하여, 전자를 상기 전극으로 직접 이동시켜 분석 물질을 검출하는 바이오 센서 및 이를 이용한 분석물질 검출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

전기화학적 신호의 세기로 분석물질을 검출하는 바이오센서는 통상적으로 환경, 생물, 의학 등의 분야에 걸쳐 다양하게 사용되고 있다. 일반적으로는, 산화-환원 효소를 이용한 바이오센서로, 효소를 전극에 고정시켜, 산화-환원으로 발생하는 전자를 전극에 전달하는 방식으로 분석물질을 검출하는 방법이 사용되고 있다. 이처럼, 산화-환원 표지(redox label)와 전극(electrode) 사이의 직접 전자 이동(direct electron transfer)을 이용한 바이오센서(affinity biosensor)는 일반적으로 이용되고 있다(Lubin, A. A.; Plaxco, K. W. Acc. Chem. Res. 2010, 43, 496; Li, D.; Song, S.; Fan, C. Acc. Chem. Res. 2010, 43, 631; Vallee-Belisle, A.; Ricci, F.; Uzawa, T.; Xia, F.; Plaxco, K. W. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 15197). 또, 분석 물질(analyte, target)이 전극 표면에 고정된 프로브(probe)에 결합하면, 산화-환원 표지가 연결되어 있는 고정된 프로브에 구조적인 변화가 생기거나 혹은 경직도(rigidity)의 변화가 생겨 전극과 산화-환원 표지 사이의 거리 등에 영향을 준다. 결과적으로 직접 전자 이동의 가능 거리가 달라져 전기화학 신호에 큰 변화를 가져온다. 이를 통해서 세척 과정이 없이 저분자(small molecule)와 생체분자(biomolecule)를 고감도로 측정할 수 있게 되는데, 이러한 특징은 빠르고 저가격의 현장현시검사(point-of-care testing)에 이용이 용이하게 한다. 그러나, 전극과 산화-환원 표지 사이의 거리가 증가할수록 직접 전자 이동 속도(direct electron transfer rate)가 급격하게 감소하므로 1~2 nm 정도의 짧은 작업 거리 이내에서만 측정이 가능하다는 문제점이 있다(Chazalviel, J.-N.; Allongue, P. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 762; Lee, H.; Chang, B.-Y.; Kwack, W.-S.; Jo, K.; Jeong, J.; Kwon, S.-H.; Yang, H. J. Electroanal. Chem. 2013, 700, 8). 효과적으로 직접 전자 이동을 얻기 위해서 일반적으로 얇은 자기조립단분자막(self-assembled monolayer)을 매우 평평한 금 전극 위에 형성하여 사용하고 있

는데, 이러한 금 전극을 형성하기 위해서는 오랜 시간 동안의 전기화학적 전처리 과정이 필요하다(Xiao, Y.; Lai, R. Y.; Plaxco, K. W. Nat. Protoc. 2007, 2, 2875). 또, 샌드위치 형태의 바이오센서(sandwich-type biosensor)에서는 반응 후에 산화-환원 표지를 직접 전자 이동이 일어날 수 있을 만큼 전극 가까이 두기가 어렵다는 단점이 있다. 따라서, 직접 전자 이동을 이용하는 바이오센서는 전극 제조 과정이 복잡하고 샌드위치 형태 바이오센서에 적용하기가 어려워 실질적인 응용은 한계가 있어 왔다.

[0003] 최근에 금속 나노입자(metal nanoparticle)의 전자 매개(electron mediation)에 의해 전극과 산화환원 물질 사이의 전자 이동이 더 먼 거리까지 가능하다고 보고된 바가 있다(Chazalviel, J.-N.; Allongue, P. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 762; Barfidokht, A.; Ciampi, S.; Luais, E.; Darwish, N.; Gooding, J. J. Anal. Chem. 2013, 85, 1073). 이러한 장거리 전자 이동(long-range electron transfer)이 가능한 이유는 금속 나노입자가 큰 전자 상태밀도(electron density of state)를 가져서 많은 산화환원 활성 장소(redox-active site)를 가지기 있기 때문이다. 그럼에도 불구하고, 전극과 금속 나노입자 사이의 거리가 ~3 nm 이상일 때는 매개된 전자 전달 속도(mediated electron transfer rate)가 크게 감소한다. 생체분자 등의 절연층으로 덮혀져 있는 금속 나노입자를 표지로 사용하는 샌드위치 형태 바이오센서에서 금속 나노입자를 전극으로부터 3 nm 이내에 두는 것은 쉽지 않기 때문에 금속 나노입자를 이용한 직접 전자 전달을 얻기는 쉽지 않다.

[0004] 공액 결합(conjugation)을 이루는 주사슬(main chain)과 이온성 곁사슬(side chain)을 가지는 수용성 공액 고분자 전해질(water-soluble conjugated polyelectrolyte)은 빛을 강하게 흡수하거나 큰 형광 신호를 낸다(Duarte, A.; Pu, K.-Y.; Liu, B.; Bazan, G. C. Chem. Mater. 2011, 23, 501; Zhan, R.; Liu, B. Chem. Rec. 2016, 16, 1715). 수용성 공액 고분자 전해질을 이용한 화학 · 바이오센서는 고분자의 형광 세기 변화, 고분자의 색 또는 형광변화, 고분자에서 다른 형광체로의 fluorescence resonance energy transfer (FRET)에 의한 에너지 전달 현상 등이 주요 메커니즘으로 이용되고 있다. 특히 단 분자와 비교했을 때, 공액 고분자 전해질에서는 여러 광학적 활성 단위로부터 형성된 다수의 엑시톤(exciton)이 π -공액 구조의 주사슬을 통해 이동, 집적되어 형광 신호가 증대되는 분자선 효과(molecular wire effect)를 기대할 수 있어 센서의 감도 측면에서 이점이 있다. 즉, 분석 물질이 공액 고분자 전해질에 결합하면 흡광도(absorbance)나 형광에 큰 변화가 생기고, 이를 이용해 고감도의 선택적인 생체분자 검출 및 이미징(imaging)을 얻을 수 있다. 하나의 공액 고분자 전해질은 많은 산화환원 활성 장소를 가지기 때문에 장거리 직접 전자 이동을 일으킬 수 있지만, 이 공액 고분자 전해질을 산화-환원 표지로 이용하여 직접 전자 이동을 적용한 바이오센서는 아직 보고된 바가 없다.

[0005] 샌드위치 형태 바이오센서 및 경쟁 반응 바이오센서(competitive biosensor)에서도 긴 길이를 가지는 공액 고분자 전해질 표지는 쉽게 전극 근처에 접근할 수 있고, 공액 고분자 전해질이 많은 산화환원 활성 장소를 가지고 있어서 전극으로부터 더 먼 거리까지 전자 이동이 가능하고, 많은 산화환원 활성 장소의 산화환원 반응에 의해 큰 전기화학 신호를 줄 수 있다. 또한, 공액 고분자 전해질 표지를 전자 이동 매개체(electron mediator)로 이용하면 전도성이 좋은 공액 고분자 전해질의 주사슬 전체에서 전자 매개에 의해 촉매 반응이 일어나 더 큰 전기화학 신호를 얻을 수 있다. 직접 전자 이동을 이용하여 측정할 경우 두 개 이상의 전극을 사용하여 두 개 이상의 분석 물질을 동시에 측정하더라도 전기화학적 활성 물질의 확산에 의한 방해 작용(interference effect)이 존재하지 않는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 기관, 전극, 산화-환원 표지자, 프로브(probe) 및 기질을 포함하는 바이오 센서로, 상기 산화-환원 표지자는 공액 고분자 전해질이고, 상기 공액 고분자 전해질은 상기 프로브와 접합하여, 상기 전극으로 전자를 직접 이동시켜 분석 물질을 검출하는 바이오 센서 및 이를 이용한 검출방법을 제공하는 것이다.

[0007] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

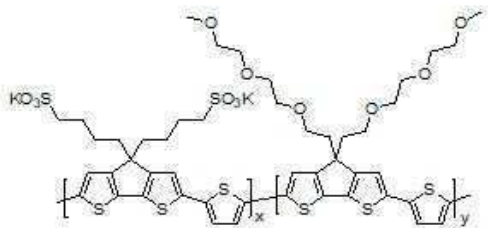
[0008] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 기관, 전극, 산화-환원 표지자, 프로브(probe) 및 기질을 포함하는 바이오 센서로, 상기 산화-환원 표지자는 공액 고분자 전해질이고, 상기 공액 고분자 전해질은 상기 프로브와 접합하여, 전자를 상기 전극으로 직접 이동시켜 분석 물질을 검출하는, 바이오 센서가 제공된다.

[0009] 일 측에 따르면, 상기 바이오 센서의 공액 고분자 전해질은 p형 공액 분자일 수 있다.

[0010] 일 측에 따르면, 상기 바이오 센서의 p형 공액 고분자의 주사슬(main chain)은 싸이클로펜타디티오펜(Cyclopentadithiophene) 및 티오펜(Thiophene)인이고, 곁사슬(side chain)은 술폰산 음이온을 갖는 알킬 체인과 올리고 에틸렌 글리콜(Oligo ethylene Glycol)일 수 있다.

[0011] 일 측에 따르면, 상기 바이오 센서의 공액 고분자 전해질은, 아래 화학식 1의 구조를 포함하는 것일 수 있다.

[0013] *[화학식 1]



[0014]

[0015] (상기 x 및 y는 공액 고분자 합성 비율로, x 는 0.3 내지 1, y는 0 내지 0.7임.)

[0016] 일 측에 따르면, 상기 기질은 AB(H_3N-BH_3), H_2NNH_2 , NADH 및 트리스(2-카르복시에틸포스핀)(tris(2-carboxyethylphosphine)) 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0017] 일 측에 따르면, 상기 전극은 ITO(indium-tin oxide), FTO(fluorinated tin oxide), 붕소가 도핑된 다이아몬드 전극 및 유사다이아몬드 탄소 전극으로 구성된 군에서 선택되는 것 일 수 있다.

[0018] 일 측에 따르면, 상기 분석물질은 대사 산물(metabolite), DNA, RNA, 단백질, 동식물 세포 및 미생물 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0019] 일 측에 따르면, 상기 바이오 센서는 전자를 전달하는 별도의 매개체를 포함하지 않는 것일 수 있다.

[0020] 일 측에 따르면, 상기 바이오 센서를 이용한 분석물질 검출 방법은, 상기 공액 고분자 전해질에 카르복실기를 포함하는 티오펜(Thiophene)으로 말단 캡핑(end capping) 하는 단계; 상기 공액 고분자 전해질과 상기 프로브를 결합시켜 공액 고분자 전해질 표지를 생성하는 단계; 상기 공액 고분자 전해질 표지가 생성된 바이오 센서에 상기 분석물질이 포함된 시료를 공급하는 단계; 상기 분석물질이 상기 프로브와 결합하는 단계; 및 상기 공액 고분자 전해질 표지로부터 전자를 상기 전극으로 직접 이동시켜 전기화학적 신호를 측정하는 단계; 를 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 일 측에 따르면, 상기 바이오 센서는 대사 산물(metabolite), DNA, RNA, 단백질, 동식물 세포 및 미생물 중 어느 하나 이상의 측정, 분석, 검출 또는 진단용으로 이용되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 공액 고분자 전해질을 산화-환원 표지자로 사용하는 바이오 센서로, 별도의 매개체 없이 전극과의 거리가 먼 전자를 직접 전달 하는 방법으로 분석물질을 검출하는 것을 목적으로 하고 있다. 한편, 별도의 매개체가 필요하지 않기 때문에 세척을 필요로 하지 않아 분석물질의 검출시간을 단축할 수 있는 효과가 있다. 또한, 하나의 기관에 복수 개의 전극을 사용하는 경우, 신호의 간섭이 일어나지 않아 서로 상이한 분석물질을 동시에 검출하는 효과도 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 일 실시예에 따른, 공액 고분자 전해질을 이용한 바이오 센서의 개념도이다.

도 2는 다른 일 실시예에 따른, 공액 고분자 전해질을 이용한 바이오 센서의 개념도이다.

도 3은 다른 일 실시예에 따른, 공액 고분자 전해질을 이용한 동시 검출용 바이오 센서의 개념도이다.

도 4는 일 실시예에 따른, 공액 고분자 합성과정과 합성된 공액 고분자의 산화-환원 반응도 및 전기 촉매 활성

도를 측정한 실험 데이터이다.

도 5는 일 실시예에 따른 P3C를 이용한 바이오 센서를 개략적으로 나타낸 것이다.

도 6은 기질이 포함된 바이오센서에서, 공액 고분자가 기질을 산화시켜 신호의 세기가 증가함을 증명한 실험 데이터이다.

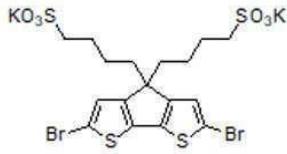
도 7은 BSA(Bovine serum albumin) 내에서의 전기촉매 활성 및 전극에 대한 비특이적 흡착물을 비교한 실험 데이터이다.

도 8은 DNA 농도에 따른 신호변화와 보정곡선을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

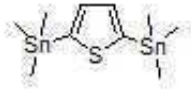
- [0024] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0025] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0026] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0027] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예는 기관, 전극, 산화-환원 표지자, 프로브(probe) 및 기질을 포함하는 포함하는 바이오 센서로, 상기 산화-환원 표지자는 공액 고분자 전해질이고, 상기 공액 고분자 전해질은 상기 프로브와 접합하여, 전자를 상기 전극으로 직접 이동시켜 분석 물질을 검출하는 바이오 센서이다.
- [0029] 여기서, 공액 고분자 전해질 (Conjugated Polyelectrolytes, CPEs)이란, 공액 구조에서 기인한 반도체 특성, 형광 특성 및 전기 화학적 특성을 가지는 물질이다. 상기 공액 고분자 전해질에 이온성 곁사슬(side-chain)을 도입함으로써 물에 녹는 수용성 공액 고분자 전해질(water-soluble conjugated polyelectrolytes)을 합성할 수도 있다. 상기 수용성 공액 고분자 전해질은 많은 산화-환원 활성장소를 가지므로 전극으로부터 먼 거리까지 전자의 직접이동이 가능하여, 전자 매개체를 필요로 하지 않는다. 한편, 공액 고분자 전해질이 매개체의 역할도 가능한데, 이 경우에는 더 큰 전기화학적 신호를 얻을 수 있어 본 발명의 산화-환원 표지자 역할로 적합하다.
- [0030] 일 측에 따르면, 상기 공액 고분자 전해질은 p형 공액 고분자일 수 있다. 상기 p형 공액 고분자는 주사슬이 싸이클로펜타디티오펜(Cyclopentadithiophene) 및 티오펜(Thiophene)이고, 곁사슬이 술폰산 음이온을 갖는 알킬 체인과 올리고 에틸렌 글리콜(Oligo ethylene Glycol)인 것일 수 있다.
- [0031] P형 공액 고분자는, 복수 개의 정공을 가져 전자 수용체 역할을 수행하는 공액 고분자이다. 일례로, 싸이클로펜타디티오펜(Cyclopentadithiophene) 및 티오펜(Thiophene) 을 주사슬로 하는 P형 공액 고분자는, 하기의 구조식 1 내지 3을 포함하는 구조일 수 있다. 또한, 구조식 1을 포함하는 공액 고분자 전해질은 음이온성 곁사슬에 의해 물에 잘 녹는 친수성 특성을 보인다. 구조식 3의 올리고 에틸렌 글리콜 (Oligoethylene Glycol)은 복수 개의 에틸렌 글리콜(Ethylene Glycol)을 일컫는다. 공액 고분자의 주사슬 내 구조식 1과 구조식 3의 비율을 달리하여 친수성 및 바이오 물질과의 비특이적 결합 특성을 조절하였다.

[0032] [구조식 1]



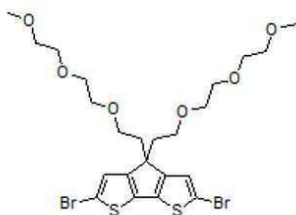
[0033]

[0034] [구조식 2]



[0035]

[0036] [구조식 3]

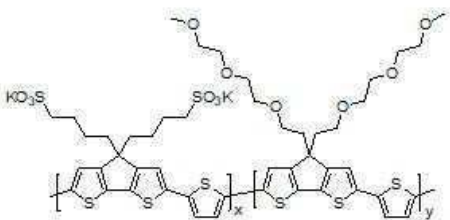


[0037]

[0038] 위 구조식 1 내지 3을 합성한 공액 고분자 전해질은 하기의 화학식1임이 바람직하다.

[0039] 하기의 화학식 1은 상기 구조식 1 내지 3을 합성하여 만든 공액 고분자이다. 화학식 1의 구조를 보면, 구조식 1 및 2로 구성된 화합물의 비율을 x로 하고, 구조식 2 및 3로 구성된 화합물의 비율을 y로 하여 합성의 비율을 달리하는 복수 개의 공액 고분자를 생성할 수 있음을 알 수 있다. 일 실시예에 따라, 합성된 공액 고분자 전해질은, 상기 [x : y]의 비율이 각각 [1.0 : 0.0] 인 것을 P0, [0.9 : 0.1] 인 것을 P1, [0.8 : 0.2]인 것을 P2, [0.7 : 0.3]인 것을 P3, [0.5 : 0.5]인 것을 P5 및 [0.3 : 0.7]인 것을 P7라고 명명하였다.

화학식 1



[0040]

[0041] 그리고, 상기 P0 내지 P3, P5 및 P7을 Chronocoulometry를 통해 0.1 V의 전압에서 전하량을 측정하였을 때, P3가 가장 많은 전하량을 나타냈다. 따라서 P3인 경우, 바이오 센서의 전해질로 이용하기에 바람직하다. 상기 공액 고분자의 전하량 측정 실험은 도면과 함께 자세히 후술하도록 한다.

[0042] 본 발명에 사용된 공액 고분자 전해질은 전자 이동 매개체(electron mediator)로 이용될 수 있다. 그 이유는, 공액 고분자 전해질의 주사슬 전체에서 전자 매개에 의한 촉매 반응이 일어나기 때문에, 이러한 공액 고분자 전해질을 바이오 센서에 이용하는 경우, 큰 전기화학 신호를 얻을 수 있다. 즉, 공액 고분자 전해질은 별도의 매개체가 없이 산화-환원 표지자 및 전자 이동 매개체 역할을 동시에 수행할 수 있다. 만일, 공액 고분자 전해질이 매개체의 역할도 수행하는 경우에는, 공액 고분자 전해질이 기질을 산화시켜 더 큰 전기화학 신호를 얻을 수 있도록 한다.

[0043] 한편, 프로브는 분석물질과 특이적으로 결합하는 물질로, 분석물질의 종류와 특성에 따라 다양한 종류의 프로브

가 사용될 수 있다. 또, 검출방법에 따라 n개의 프로브가 사용될 수 있다. 일례로, 본 발명의 일 실시예에 따른 샌드위치 타입의 바이오 센서에서는, 검출 프로브(Detection probe, DP)와 포획 프로브(Capture probe, CP)가 사용될 수 있다. 이 경우, 포획 프로브는 전극에 고정되고 검출 프로브는 공액 고분자 전해질과 접합한다. 또한, 포획 프로브와 검출 프로브는 분석물질을 사이에 두고 샌드위치 형태로 특이적 결합을 한다. 즉, 본 발명에 포함되는 프로브의 종류는 한정되어 있는 것이 아니라 검출하고자 하는 분석물질의 종류에 따라 적절히 선택할 수 있다. 따라서, 분석물질의 검출 방식에 따라, 2종 이상의 프로브가 함께 사용될 수도 있음을 의미한다.

[0044] 일 측에 따르면, 바이오 센서는 $AB(H_3N-BH_3)$, H_2NNH_2 , NADH 및 트리스(2-카르복시에틸포스핀)(tris(2-carboxyethylphosphine)) 중 적어도 하나를 기질로 포함하는 것일 수 있다. 상기 기질은 공액 고분자 전해질에 의해 산화-환원 되면서 더 큰 전기화학 신호를 얻을 수 있다. 기질의 유무에 따라 신호의 세기를 실험한 내용은 실시예에서 후술하도록 한다.

[0045] 일 측에 따르면, 전극은 ITO(indium-tin oxide), FTO(fluorinated tin oxide), 붕소가 도핑된 다이아몬드 전극 및 유사 다이아몬드 탄소 전극으로 구성된 군에서 선택되는 것을 포함할 수 있다. 일 측에 따르면, 바이오 센서는 상기 전극 중 적어도 하나를 2개 이상 포함하는 것 일 수 있다. 직접 전자 이동을 이용하여 2 종 이상의 분석물질을 검출하는 경우, 2개 이상의 전극이 하나의 기판에 있더라도 2종 이상의 검출 프로브와 접합한 공액 고분자 전해질 접합체 중 분석물질과 결합하지 않은 접합체는 전극으로부터 멀리 떨어져 그 신호에 영향을 주지 않는다. 또, 2 종 이상의 분석물질을 검출하기 위해 공급된 2종 이상의 검출 프로브 및 포획 프로브는 각각의 분석물질과 특이적 결합을 하는 방식으로 공액 고분자 전해질을 전극 가까이로 가져오는 역할을 수행한다. 각각의 전극은 일정거리가 이격되어 위치하므로, 상기 공액 고분자 전해질은 각각 접합한 프로브에 의해 물리적으로 가깝게 위치한 전극으로 직접 전자 전달을 하게 된다. 즉, 두 개 이상의 전극을 사용하여 동시에 신호를 측정하더라도 직접 전자 이동을 이용하기 때문에 하나의 전극에서 생성된 전기화학적 활성 물질이 이웃하는 전극으로 확산이 일어남으로써 생기는 전기화학적 방해 작용(interference effect)이 존재하지 않는다.

[0046] 일 측에 따르면, 바이오 센서는 대사 산물(metabolite), DNA, RNA, 단백질, 동식물세포 및 미생물 중 어느 하나 이상인 분석물질을 검출한다. 여기서 분석물질은, 상기 DNA 및 RNA 등 유전체뿐 아니라 항원, 항체, 효소 등의 단백질일 수 있다. 또는, 동식물의 조직이나 세포 중 특이적 결합이 가능한 물질일 수도 있으며, 바이러스, 세균 등의 미생물 중 어느 하나일 수도 있다. 따라서, 특이적 결합을 통해 검출할 수 있는 생체분자이면 될 뿐, 분석물질을 특별한 종류로 한정하지는 않는다.

[0047] 일 측에 따르면, 바이오 센서를 이용하여 분석물질을 검출하는 방법은 공액 고분자 전해질에 카르복실기를 포함하는 티오펜(Thiophene)으로 말단 캡핑(end capping) 하는 단계; 상기 공액 고분자 전해질과 상기 프로브를 결합시켜 공액 고분자 전해질 표지를 생성하는 단계; 상기 공액 고분자 전해질 표지가 생성된 바이오 센서에 상기 분석물질이 포함된 시료를 공급하는 단계; 상기 분석물질이 상기 프로브와 결합하는 단계; 및 상기 공액 고분자 전해질 표지로부터 전자를 상기 전극으로 직접 이동시켜 전기화학적 신호를 측정하는 단계를 포함한다. 여기서 공액 고분자 전해질은 전술한 공액 고분자 전해질 합성방법에 따라 합성된 어느 하나일 수 있다.

[0048] 공액 고분자 전해질이 산화-환원 표지자의 역할을 수행하기 위해서는 (i) 높은 산화-환원 반응성 및 전기 촉매 활성, (ii) 높은 수용성, (iii) 10 nm를 초과하는 긴 사슬 길이 및 iv) 낮은 비특이적 흡착물 등의 조건을 갖추는 것이 바람직하다. 상기 공액 고분자 전해질을 음(-)으로 하전하면 수용성이 높아지고 비특이적 흡착물은 낮아지게 되어 높은 신호를 얻을 수 있다.

[0049] 일 측에 따르면, 대사 산물(metabolite), DNA, RNA, 단백질, 동식물 세포 및 미생물 중 어느 하나 이상의 측정, 분석, 검출 또는 진단용으로 이용되는 것일 수 있다. 하지만, 특정 분석물질에 한정됨이 없이 추후 예상되는 다양한 분석물질에 대한 검출 수단으로 적용될 수 있으며, 이러한 용도가 본 발명의 범주를 벗어나는 것은 아니다.

[0050] 도 1은 일 실시예에 따른, 공액 고분자 전해질을 이용한 바이오 센서의 개념도이다.

[0051] 도1a은 공액 고분자 전해질을 산화-환원 표지자로 이용하여 분석물질을 검출하는 샌드위치 형태의 바이오 센서로, 포획 프로브가 전극에 고정되어 있다. 검출 프로브에는 산화-환원 표지자인 공액 고분자 전해질이 결합되어 있다. 일단 분석물질을 포함하는 시료가 공급되면, 상기 공액 고분자 전해질 및 검출 프로브가 시료에 녹아 섞이게 되고, 분석물질은 검출 프로브 및 포획 프로브와 특이적 결합을 하게 된다. 이러한 특이적 결합에 의해 검출 프로브가 전극 가까이에 존재하게 되면, 검출 프로브에 접합된 공액 고분자 전해질과 전극 사이의 거리가

가까워져 직접 전자 이동이 가능하게 된다. 이 때, 많은 산화-환원 활성 부위를 가지는 공액 고분자 전해질의 특성상, 더 먼 거리까지 전극으로 전자의 직접 이동이 가능하게 된다. 이 때, 분석물질과 특이적 결합을 하지 않은 검출 프로브 및 이에 결합한 공액 고분자 전해질 표지는 전극으로부터 멀리 떨어지게 되어 검출 신호에는 거의 영향을 주지 않는다. 따라서, 전극에 결합하지 않은 검출 프로브를 제거하는 세척 과정이 없이도 큰 신호-대-배경 비를 얻을 수 있다.

[0052] 도1b는 도1a에 기질을 추가한 바이오 센서로, 산화-환원 표지자인 공액 고분자 전해질이 전자 이동 매개체의 역할도 동시에 수행할 수 있다. 전술한 바와 같이, 공액 고분자 전해질이 첨가되는 기질을 산화-환원 시킴으로써, 도1a에서 검출되는 신호보다 더 큰 신호를 얻을 수 있다.

[0053] 도2는 다른 실시예에 따른, 공액 고분자 전해질을 이용한 바이오 센서의 개념도이다.

[0054] 도2a는 공액 고분자 전해질을 산화-환원 표지자로 이용하여 분석물질을 검출하는 경쟁반응 형태의 바이오센서로, 프로브가 전극에 고정되어 있다. 프로브는 '분석물질' 혹은 '공액 고분자 전해질이 접합된 분석물질'과 경쟁적으로 특이적 결합을 한다. 시료 중에 분석물질의 농도가 높으면 분석물질이 프로브에 많이 결합하고, 시료 중에 분석물질의 농도가 낮으면 공액 고분자 전해질이 접합된 분석물질이 프로브에 많이 결합한다. 이후, 전극 근처에 위치한 공액 고분자 전해질에 의해 직접 전자 전달이 일어나게 된다.

[0055] 도2b는 도2a에 기질을 추가한 바이오 센서로, 산화-환원 표지자인 공액 고분자 전해질이 전자 이동 매개체의 역할도 동시에 수행할 수 있다. 전술한 바와 같이, 공액 고분자 전해질이 첨가되는 기질을 산화-환원 시킴으로써, 도2a에서 검출되는 신호보다 더 큰 신호를 얻을 수 있다.

[0056] 도 3는 다른 실시예에 따른, 공액 고분자 전해질을 이용한 동시 검출용 바이오 센서의 개념도이다.

[0057] 도 3a는 공액 고분자 전해질을 산화-환원 표지자로 이용하여 복수 개의 전극에서 분석물질을 검출하는 동시 검출용 바이오센서로, 도 1a와 동일한 원리로 동시에 2종 이상의 분석물질을 검출 할 수 있다. 포획 프로브 1은 전극 1에 고정되어 있고, 포획 프로브 2는 전극 2에 고정되어 있다. 검출 프로브 1 내지 검출 프로브 2에는 각각 산화-환원 표지자인 공액 고분자 전해질이 결합되어 있다. 일단 분석물질 1과 분석물질 2를 포함하는 시료가 공급되면, 상기 공액 고분자 전해질이 연결된 검출 프로브가 시료에 녹아 섞이게 되고, 분석물질 1은 검출 프로브 1 및 포획 프로브 1과 특이적 결합을 하고, 분석물질 2는 검출 프로브 2 및 포획 프로브 2와 특이적 결합을 하게 된다. 이러한 특이적 결합에 의해 검출 프로브 1이 전극 가까이에 존재하게 되면, 검출 프로브 1에 접합된 공액 고분자 전해질과 전극 사이의 거리가 가까워져 직접 전자 이동이 가능하게 된다. 또한 특이적 결합에 의해 검출 프로브 2가 전극 가까이에 존재하게 되면, 검출 프로브 2에 접합된 공액 고분자 전해질과 전극 사이의 거리가 가까워져 직접 전자 이동이 가능하게 된다. 전극에 결합하지 않고 용액 중에 녹아 있는 공액 고분자 전해질은 전극으로부터 멀리 떨어져 있기 때문에 직접 전자 이동이 일어나지 않아 전기화학 신호에는 거의 영향을 주지 않는다.

[0058] 도 3b는 도 3a에 기질을 추가한 바이오 센서로, 산화-환원 표지자인 공액 고분자 전해질이 전자 이동 매개체의 역할도 동시에 수행할 수 있다. 전술한 바와 같이, 공액 고분자 전해질이 첨가되는 기질을 산화-환원 시킴으로써, 도 3a에서 검출되는 신호보다 더 큰 신호를 얻을 수 있다.

[0059] 도 4은 일 실시예에 따른, 공액 고분자의 합성과정과 합성된 공액 고분자의 산화-환원 반응도 및 전기 촉매 활성도를 측정한 실험 데이터이다.

[0060] 도 4a은 공액 고분자의 합성 과정 및 합성된 공액 고분자의 구조식이다.

[0061] 전술한 구조식 1 내지 3으로 구성되는 공액 고분자(P0 내지 P3, P5 및 P7)를 합성을 함에 있어서, 먼저 표1과 같이 3종류의 단량체(Monomer)를 합성하였다.

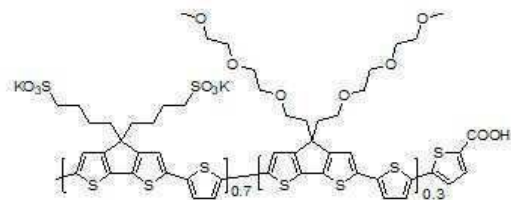
표 1

[0062] 단량체 1	2,6-dibromo-4,4-bis(4-sulfonatobutyl)-4H-cyclopenta-[2,1-b:3,4-b']dithiophene
단량체 2	2,5-bis(trimethylstannyl)thiophene
단량체 3	2,6-dibromo-4,4-bis(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)-4H-cyclopenta-[2,1-b:3,4-b']dithiophene

[0063] 상기 단량체 1 내지 3을 이용하여 복수 개의 공액 고분자 전해질을 합성하였다. 합성촉매로는 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (1.5

mol%) 및 트리(*o*-톨릴)포스핀(tri(*o*-tolyl)phosphine)를 사용하였고, 탈 건조된 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에서 단량체1내지3의 공급 비율을 변화시킴으로써 스틸레커플링(Stille coupling)을 통해 합성하였다. 상기 반응물들은 110 ℃에서 48시간 동안 가열한 후, 수용액을 실온으로 냉각시키고, 200 mL의 아세톤에 침전시켜 하기의 표2과 같은 7종의 공액 고분자 전해질을 합성하였다. 그 중, P3C는 합성된 P3에 2-티오펜카복실산(2-Thiophenecarboxylic acid)으로 말단을 캡핑(capping)하여 합성한 것으로 하기의 화학식 2와 같다.

화학식 2



[0064]

[0065]

합성되지 않은 단량체를 제거하기 위해, 분자량 컷 오프(cut-off) 값이 10K Da인 원심 분리 필터를 이용하여 12000 rpm에서 20분동안 4회 여과하였다. P0내지 P3 및 P3C는 1 mg을 증류수 1 mL에 녹인 후 원심 분리기로 여과한 결과 아래와 같이 합성이 확인 가능했으나, P5 및 p7은 낮은 수용성으로 인해 제대로 여과되지 않았다.

표 2

[0066]

공액 고분자 전해질 (CPEs)	조성/수득율(Yield)/합성확인
P0	조성 : 단량체 1 (221 mg, 0.323 mmol), 단량체2 (132 mg, 0.323 mmol). 수득율(Yield): 150 mg (76%). 합성 확인: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.55-7.06 (m, 4H), 2.32-2.16 (br, 4H), 1.95-1.77 (br, 4H), 1.55-1.35 (br, 4H), 1.05-0.87 (br, 4H)
P1	조성 : 단량체 1 (185 mg, 0.27 mmol), 단량체2 (123 mg, 0.3 mmol) and 단량체3 (18.9 mg, 0.03 mmol) 수득율(Yield): 110 mg (61%) 합성 확인 : ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.83-7.04 (m, 4H), 3.46-3.22 (br, 1.6H), 3.17 (s, 0.6H), 3.12-3.02 (br, 0.4H), 2.39-2.15 (br, 4H), 1.98-1.75 (br, 3.6H), 1.57-1.30 (br, 3.6H), 1.07-0.72 (br, 3.6H).
P2	조성 : 단량체 1 (164 mg, 0.24 mmol), 단량체 2 (123 mg, 0.3 mmol) and 단량체 3 (37.7 mg, 0.06 mmol) 수득율(Yield): 90 mg (50%) 합성 확인 : ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.80-7.05 (br, 4H), 3.59-3.28 (br, 3.2H), 3.25-3.12 (br, 1.2H), 3.11-3.00 (br, 0.8H), 2.40-2.12 (br, 4H), 2.00-1.73 (br, 3.2H), 1.57-1.36 (br, 3.2H), 1.08-0.78 (br, 3.2H).
P3	조성 : 단량체 1 (168 mg, 0.245 mmol), 단량체 2 (143 mg, 0.350 mmol) and 단량체 3 (66 mg, 0.105 mmol) 수득율(Yield): 125 mg (60%) 합성 확인 : ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.89-7.07 (br, 4H), 3.60-3.26 (br, 4.8H), 3.22-2.99 (br, 3H), 2.33-2.14 (br, 4H), 2.01-1.71 (br, 2.8H), 1.58-1.32 (br, 2.8H), 1.08-0.72 (br, 2.8H).
P3C	조성 : 5-bromo-2-thiophenecarboxylic acid 로 말단이 캡핑된 P3. 수득율(Yield): 125 mg (60%). 합성 확인 : ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7.87-7.04 (br, 4H), 3.60-3.26 (br, 4.8H), 3.22-3.00 (br, 3H), 2.34-2.12 (br, 4H), 1.98-1.73 (br, 2.8H), 1.54-1.33 (br, 2.8H), 1.04-0.72 (br, 2.8H).
P5	조성 : 단량체 1 (69 mg, 0.1 mmol), 단량체 2 (82 mg, 0.2 mmol) and 단량체 3 (63 mg, 0.1 mmol) 수득율(Yield): 70 mg (60%). 수용성이 낮아 정제가 잘 안됨.

P7	조성 : 단량체 1 (72 mg, 0.105 mmol), 단량체 2 (143 mg, 0.35 mmol) and 단량체 3 (154 mg, 0.245 mmol) 수득율(Yield): 100 mg (50%). 수용성이 낮아 정제가 잘 안됨.
----	---

[0067] 도 4b는 합성된 공액 고분자의 산화-환원 반응도 및 전기촉매 활성도를 측정한 실험 데이터이다. 앞서, 합성하는 과정에서 단량체의 조성이 상이한 비율로 구성됨에 따라, 각각의 공액 고분자의 산화-환원 반응도 및 전기 촉매 활성이 달라짐을 확인 할 수 있었다. 합성된 상기 P0 내지 P3, P5 및 P7 의 전하량을 측정한 결과, 도 4b에 도시된 바와 같이 P3에서 가장 높게 측정 되었으며, P5, P7, P2, P1, P0 순으로 점차 낮아짐을 확인할 수 있다. 이를 통해, P3가 가장 산화-환원 반응도 및 전기 촉매 활성도가 높은 공액 고분자임을 확인하고, 이후 분석물질들을 검출하는 실험에서 공액 고분자 전해질로 사용하여 실험을 진행하였다.

[0068] 도 5는 일 실시예에 따른 도 4의 P3C를 이용한 바이오 센서를 개략적으로 나타낸 것이다.

[0069] 도 5에 도시된 바이오 센서는, 실란공중합체(silane-copolymer) 및 카제인(casein)이 도포된 ITO 전극(감지전극), 공액 고분자 전해질P3C, DP-DNA, CP-DNA, AB(H_3N-BH_3) 및 타깃 DNA를 포함하고 있다. 이후, 바이오센서를 제작하고, 이를 이용하여 분석물질을 검출하는 내용은 실시예를 통해 자세히 설명하도록 한다.

실시예 1

[0070] 실란-공중합체(Silane-copolymer) 및 카제인(Casein)이 도포된 ITO 전극의 제조

[0071] 먼저, 감지 전극을 준비하기 위해 ITO 전극을 H_2O , H_2O_2 (30%) 및 NH_4OH (30%) 를 각각 5:1:1로 혼합한 용액에 침전시킨 뒤 ($70^\circ C$, 1시간), 증류수로 세척하는 전처리 과정을 수행하였다. 변성 ITO전극을 얻기 위해, 전처리된 ITO전극을 0.4% 실란-공중합체(Silane Copolymer)가 함유된 메탄올에 침전시킨 후($25^\circ C$, 1시간), 메탄올로 세척하였다.

[0072] 포획 프로브의 전극 고정

[0073] 위와 같은 방법으로 획득된, 변형 ITO 전극을 $100^\circ C$ 에서 10분간 경화시켰다. 포획 프로브인 아민-종결 DNA(Amine-terminated CP-DNA)를 상기 변형 ITO 전극 상에 고정시키기 위해, 10nM의 아민-종결 포획 DNA(Amine-terminated CP-DNA)를 포함하는 PBS 70 μL 를 전극 위에 떨어트린 다음 $25^\circ C$ 에서 3시간 유지시켰다. 이후, 전극에 $0.2^\circ C$ 카제인 용액을 함유하는 PBS(phosphate-buffered saline) 70 μL 를 떨어트린 뒤, 밀봉하여 $25^\circ C$ 에서 30분간 배양하였다.

[0074] 한편, DP-DNA는 검출 프로브로, 말단의 아민(Amine) 기가 P3C의 카르복실산-종결 (Carboxyl acid-terminated) 부위와 접합하여 DP-P3C 접합체를 형성하고, 형성 유무는 겔 전기영동(Gel Electrophoresis)으로 확인하였다.

[0075] DP-P3C 접합체 제조

[0076] P3C($\geq 10k$ Da)와 DP-DNA(35 mer, 11082.6 Da)는 1:1몰(mol) 비로 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디마이드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) 및 하이드로벤조트리아졸(hydroxybenzotriazole)을 함유하는 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 용매 내에서 접합이 가능했다. 1 mg/ml 의 P3C를 함유하는 무수 DMSO(anhydrous DMSO) 10 μL 를 분자량 cut-off가 10 KDa인 필터로 12000 rpm으로 20분씩 2회에 걸쳐 원심 분리한 후, 20 mM 1-에틸-3(3-디메틸아미노프로필)카르보디마이드 하이드로클로라이드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, EDC)가 함유 된 무수DMSO(anhydrous DMSO) 1.0 μL , 하이드록시벤조트리아졸(Hydroxybenzotriazole, HOBt)이 함유 된 무수 DMSO(anhydrous DMSO) 1.0 μL 및 DP-DNA가 100 μM 인 무수DMSO(anhydrous DMSO) 10 μL 를 혼합하여 $25^\circ C$ 에서 12 시간 동안 배양 하였다. 상기 혼합물을 상기 원심 분리 필터로 12000 rpm에서 20 분씩 2회 원심 분리하여 과량의 1-에틸-3(3-디메틸아미노프로필)카르보디마이드 하이드로클로라이드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, EDC) 및 하이드록시벤조트리아졸(Hydroxybenzotriazole, HOBt)을 제거 하였다. 남은 용액을 100 μL 의 증류수에 용해시켜 시료를 획득했다.

[0077] 겔 전기영동(Gel Electrophoresis) 를 통한 DP-P3C 접합체 생성 확인

[0078] 상기 시료를 6%(v/v) 글리세롤(glycerol), 0.05%(w/v) 브로모페놀 블루(bromophenol blue) 및 0.05%(w/v) 자일렌 캐놀FF(xylene cyanol FF)를 함유하는 겔-로딩 버퍼(gel-loading buffer)와 혼합한 후, 12%(w/v) 의 아크릴

아민드-비스아크릴아마이드(acrylamide-bisacrylamide(29:1)), 트리스-보레이트-EDTA(tris-borate-EDTA, TBE), 과황산 암모늄(ammonium persulfate) 및 테트라메틸에틸렌디아민(Tetramethylethylenediamine, TEMED)을 함유하는 비-변성 폴리아크릴아마이드 겔(non-denaturing polyacrylamide gel)에서 전기영동하여 시료를 분리했다. 120 V에서 1.5시간의 전기영동 후, 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)을 0.02% 메틸렌 블루 용액에 2시간동안 침전시킨 뒤, 증류수로 탈색하였다. 염색된 겔은 Bio-rad사의 Geldoc XR+ Imaging 시스템을 이용하여 시각적으로 확인하였다.

[0079] 타깃 DNA를 포함하는 시료 주입

[0080] 시료 내에 포함된 타깃 DNA의 혼성화(hybridization)를 위해, 0.05% 트윈-20(tween-20)를 함유하는 70 μ L의 트리스 버퍼(tris buffer)(pH 7.5), 상기 버퍼와 상이한 농도의 단일가닥DNA(ssDNA)를 카제인이 처리된 ITO 전극 상에 떨어트려 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하였다.

[0081] DP-P3C 접합체(10nM DP-DNA 및 100ng/ml P3C) 및 0.05% 트윈-20(tween-20)을 함유하는 70 μ L의 트리스 버퍼(tris buffer)(pH 7.5)를 타깃의 혼성화 전극에 떨어트려, DP-P3C 접합체를 혼성화 하고, 전극을 25 $^{\circ}$ C에서 1시간 유지시켰다.

[0082] 그 후, 0.05% 트윈-20(tween-20)을 포함하는 트리스 버퍼(tris buffer)로 세척한 전극을 4 $^{\circ}$ C의 냉장고에 보관했다. 전기화학적 신호를 얻기 위해 5.0 mM의 AB(H_3N-BH_3)를 함유한 PBS (pH 7.4)를 감지전극이 있는 셀(cell)에 공급했다. 타깃 ssDNA, 0.05% 트윈-20(tween-20), 50 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ 및 5 mM $(NH_4)_2SO_4$ 를 함유하는 800 μ L의 트리스 버퍼(tris buffer) (40 mM, pH 7.5), DP-P3C 접합체(100 nM DP DNA and 1 μ g/mL P3C), 0.05% 트윈-20(tween-20), 50 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ 및 5 mM $(NH_4)_2SO_4$ 를 함유하는 100 μ L의 트리스 버퍼(tris buffer) 및 50 mM AB, 0.05% 트윈-20(tween-20), 50 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ 및 5 mM $(NH_4)_2SO_4$ 를 함유하는 100 μ L의 트리스 버퍼(tris buffer)를 혼합하여 상기 셀에 주입하였고, DP-P3C 접합체 및 AB의 최종 농도는 10배 희석시켰다.

[0083] BRCA1 유전자의 DNA 검출

[0084] P3C를 산화-환원 표지자로 하여 BRCA1 Gene를 타깃 DNA로 하는 DNA검출을 실험해 보았다.

[0085] 타깃 DNA는 전극에 고정된 CP-DNA 및 용액 내의 DP-P3C 접합체와 두 번의 혼성화가 진행되었다. 31의 염기쌍 영역의 길이가 약 10 nm에 해당한다고 가정하면, DP-P3C 접합체는 도 5에 도시된 20개의 아데닌 중합체인 polyA20와 같은 유연한 스페이서(spacer)를 포함하고 있으며, 완전히 신장된 10 kDa의 P3C 길이는 18 nm 이내로 측정되었다. 샌드위치 형태의 바이오 센서에서는 타깃 DNA가 프로브에 결합한 후 DP-DNA와 결합한 P3C가 전극에 가깝게 접근하게 된다. 이와 같은 경우, 혼성화되지 않은 DP-P3C 접합체에 의한 전기 촉매 반응은 오레벨을 증가시켜 신호 측정에 간섭을 준다고 예상할 수 있다. 그러나 P3C와 전극 사이의 직접적인 전자 전달은 3 ~ 5 nm 내에서 일어나고, 혼성화되지 않은 DP-P3C 접합체의 농도는 매우 낮기 때문에 실험을 통한 신호 검출에서는 그 영향은 무시할 수 있는 정도였다. 또한, P3C 주사슬 전체에서 산화-환원 반응이 쉽게 일어날 수 있어서 첨가한 기질인 AB를 산화하면서 더 큰 세기의 신호를 얻을 수 있었다.

[0086] 도 6는 기질이 포함된 바이오센서에서, 공액 고분자가 기질을 산화시켜 신호의 세기가 증가함을 증명한 실험 데이터이다.

[0087] 도 6a는 (i) 5.0mM AB(H_3N-BH_3), (ii) 10 μ g/ml 공액 고분자 P3 및 (iii) 5.0mM AB+10 μ g/ml P3의 전기 촉매 활성을 비교한 실험 데이터이다. 물질을 달리하여 신호의 세기를 비교하는 실험으로, PBS(pH 7.4)내의 ITO 전극에 20 mV의 전압을 인가했을 때의 시간당 전류량을 비교하였다. 비교 결과, (i) 또는 (ii)만 있는 경우에 비해 P3와 기질인 AB를 함께 주입하면 신호의 세기가 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0088] 도 6b는 도 6a와 동일한 물질로 흡광도를 비교한 실험 데이터이다. 도시된 바에 따르면, 기질인 AB만 존재할 때, 흡광도는 매우 낮게 나타났다. 그러나 P3와 기질이 함께 존재하는 경우에는 P3만 넣었을 때보다도 흡광도가 높아지고 있음을 알 수 있다. 이는 P3가 AB를 빠르게 산화시켜 신호의 세기가 증가했음을 말한다.

[0089] 도 6a 및 도 6b의 실험 결과, AB는 직접 산화는 매우 느리면서도, 산화-환원에 의한 산화는 빠른 기질임을 확인할 수 있었다.

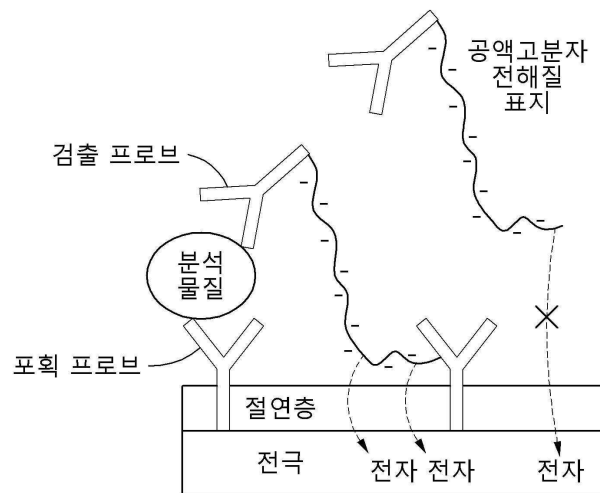
[0090] 도 7은 BSA(Bovine serum albumin) 내에서의 전기촉매 활성 및 전극에 대한 비특이적 흡착물을 비교한 실험 데

이터이다.

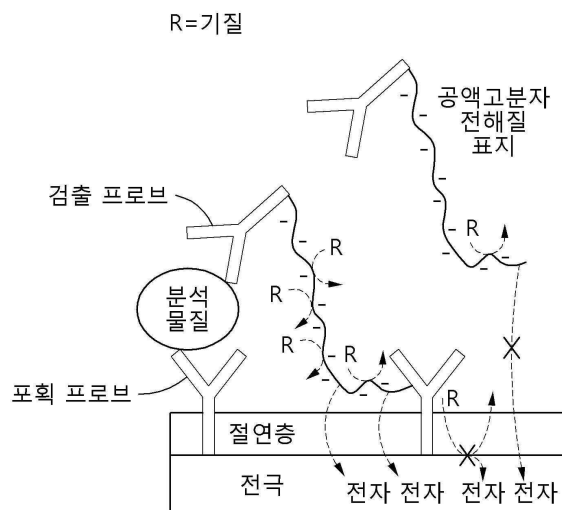
- [0091] 도 7a에 도시된 바에 따르면, (i)에서는 BSA가 전극에 흡착하여 P3의 존재 하에서도 낮은 신호세기를 보여주고 있다. (ii)에서는, (i)에 기질인 AB를 넣은 경우로, 신호의 세기가 미약하게 증가하고 있음이 확인된다. 반면, (ii)에 트윈-20(tween-20)을 넣으면 신호의 세기가 월등히 증가하고 있음을 알 수 있다.
- [0092] P3의 소수성 주사슬인 싸이클로펜타디티오펜(Cyclopentadithiophene) 및 티오펜(Thiophene) 로 인해 비특이적으로 단백질과의 흡착이 일어나기 때문에 전기 촉매 활성이 크게 감소되었다. 반면, 비이온성 계면활성제인 트윈-20(tween-20)의 소수성 결사슬은 P3의 주사슬에 흡착되고, 트윈-20(tween-20)의 올리고 에틸렌 글리콜(Oligo ethylene Glycol)이 BSA와의 흡착을 최소화 하기 때문에 P3의 전기촉매 활성을 크게 회복했음을 확인 할 수 있었다.
- [0093] 도 7b에 도시된 바에 따르면, (i)에서는 P3C를 포함하는 PBS의 경우에 ITO 전극에 대한 P3C의 비특이적 흡착물이 가장 높은 것으로 나타났다. (i)에 트윈-20(tween-20)을 넣은 (ii)의 경우 비특이적 흡착물이 약하게 감소한 것으로 나타났다.
- [0094] 반면, P3C를 함유하는 트리스 버퍼(tris buffer)인 (iii) 에 트윈-20(tween-20)을 첨가한 iv)의 경우, 매우 낮은 비특이적 흡착물을 보였다. 이는 비특이적 흡착을 유도하는 물질이 거의 없는 대조군 (iii)의 실험결과와 거의 대등한 수준이었다.
- [0095] 도 8은 DNA 농도에 따른 신호변화와 보정곡선을 나타낸 것이다.
- [0096] 도 8a는 BRCA1 유전자의 DNA 농도에 따른 전하 신호 변화를 나타낸 것이다. BRCA1 유전자의 DNA를 검출하기 위해, 일반적으로 롤링 서클 증폭에 사용되는 트리스 완충액(Tween-20 및 $MgCl_2$ 함유, pH7.5)을 이용하여 세척과정 없이 검출을 수행했다. 도시된 그래프를 보면, DNA의 농도가 증가함에 따라 전하의 변화량(기울기)이 증가하고 있어, 검출된 DNA의 농도에 비례하여 검출 신호의 세기가 증가함을 알 수 있다.
- [0097] 도 8b는 도 8a에서 100초 때의 전하를 이용하여 얻은 보정곡선을 나타낸 것이다. 계산된 DNA 검출한계는 약 10 pM였으며, 이를 통해 별도의 세척과정 없이도 낮은 검출 한계가 가능함을 알 수 있다.
- [0098] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.
- [0099] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

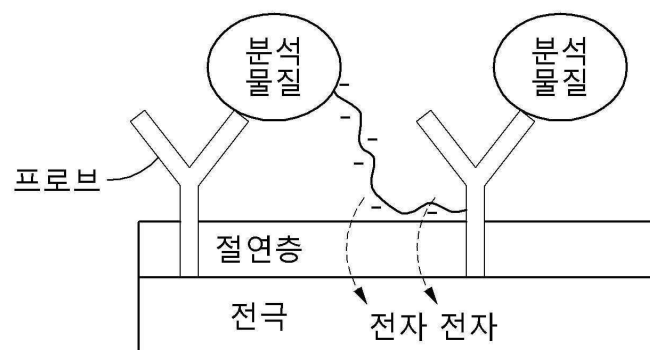
도면1a



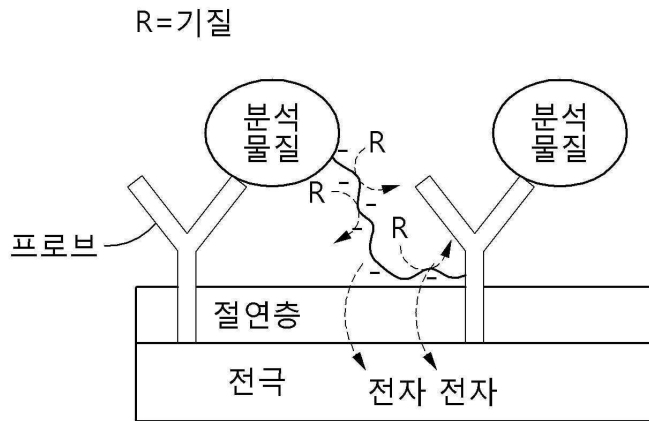
도면1b



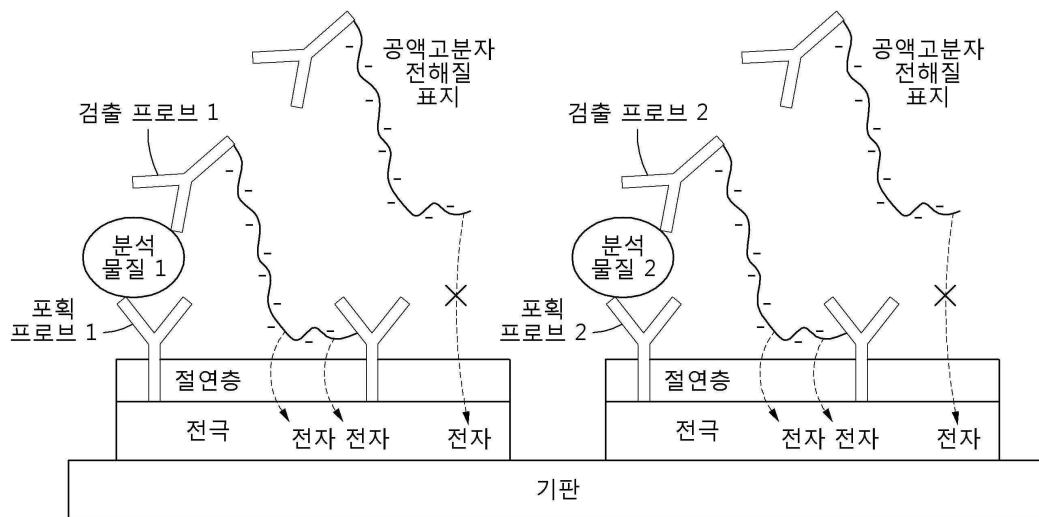
도면2a



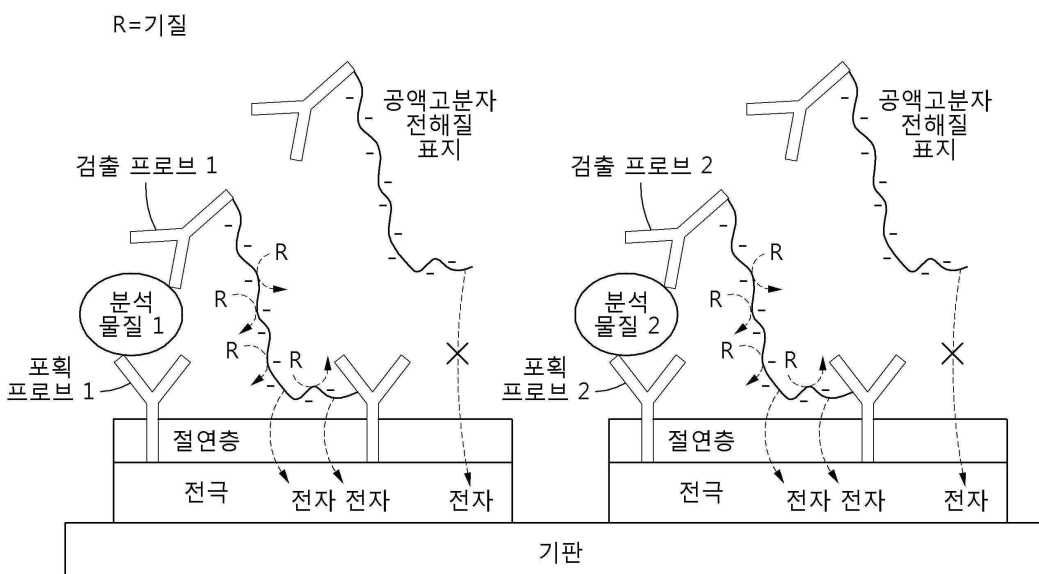
도면2b



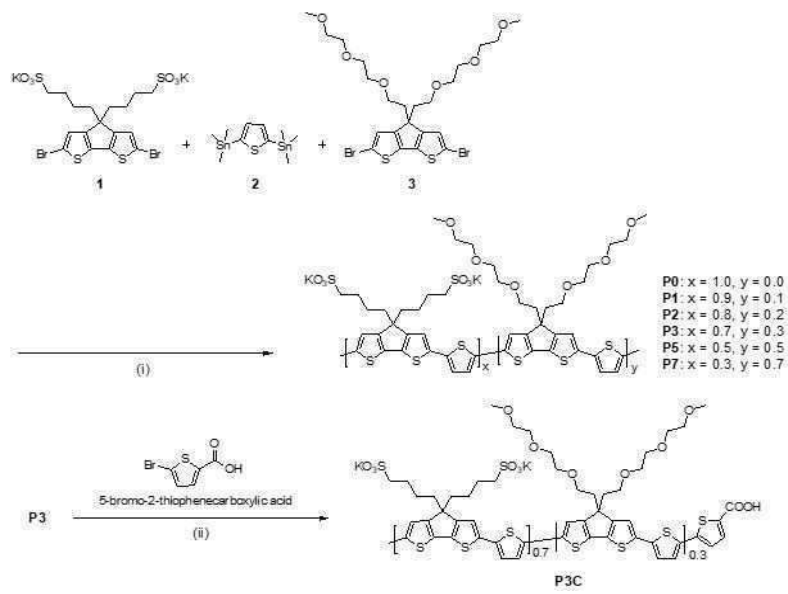
도면3a



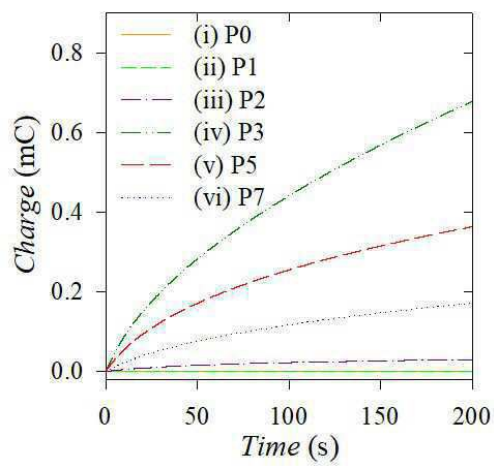
도면3b



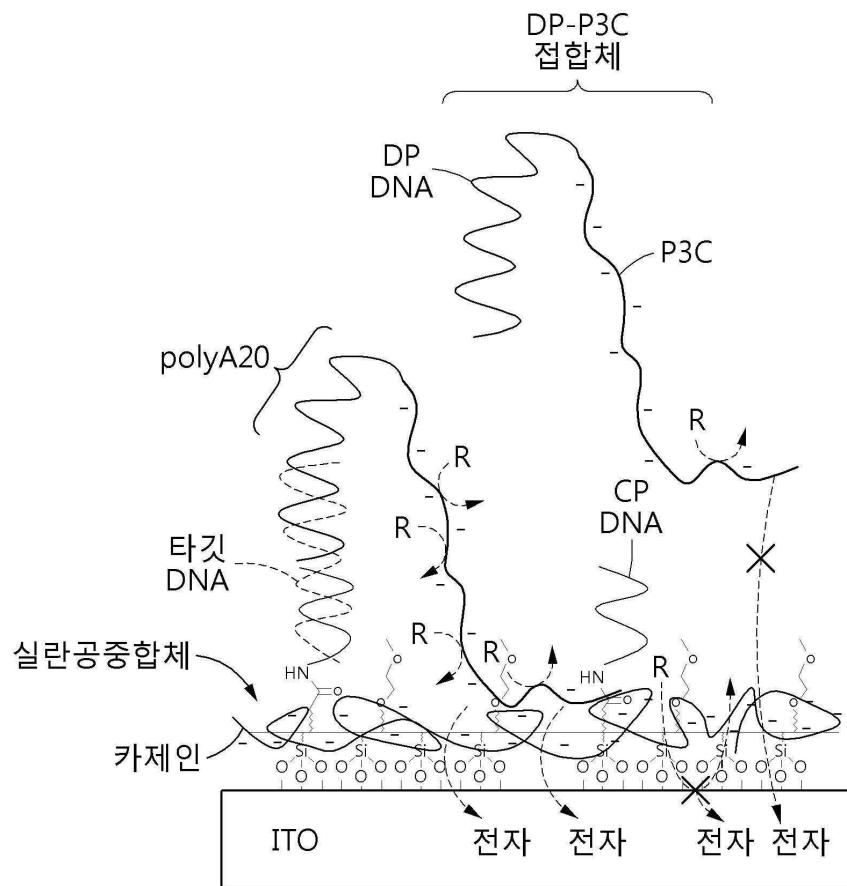
도면4a



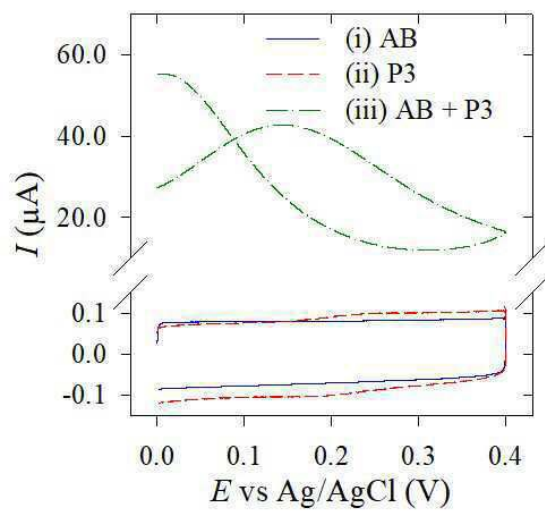
도면4b



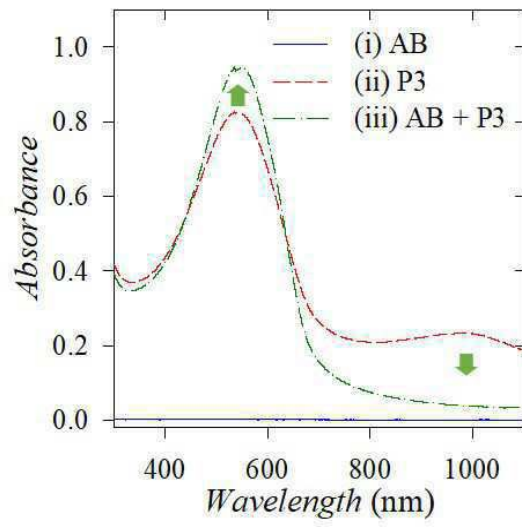
도면5



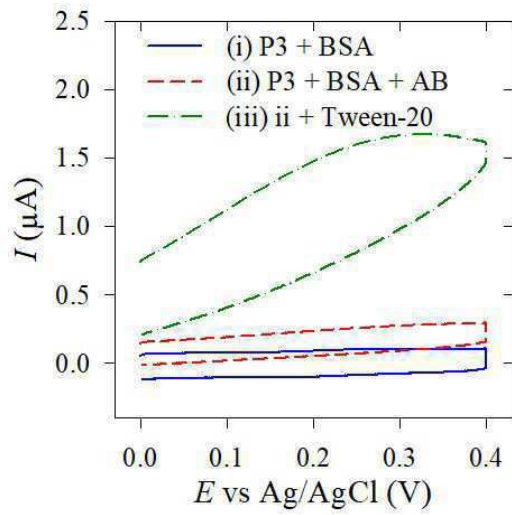
도면6a



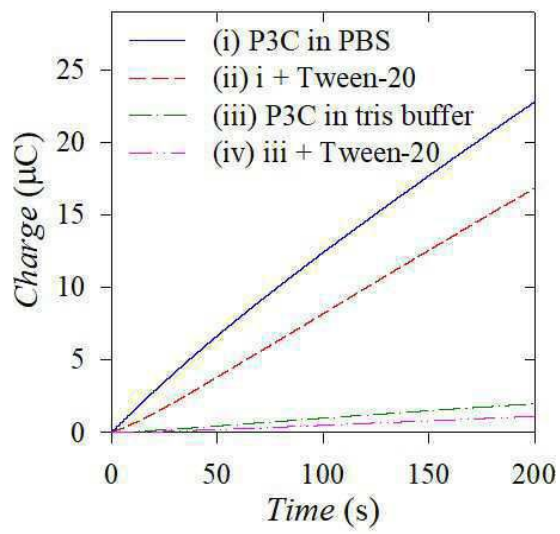
도면6b



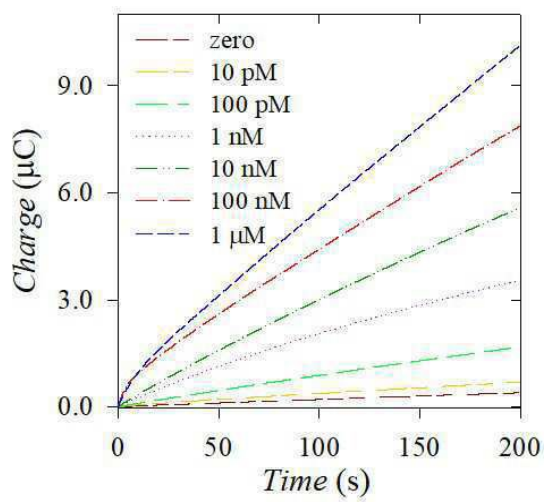
도면7a



도면7b



도면8a



도면8b

