



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0036365

(43) 공개일자

2014년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2012-0100776

(22) 출원일자

2012년09월12일

심사청구일자

2012년09월12일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

이택승

대전광역시 유성구 관평동 테크노밸리6단지 운암아파트 611-2001

서성원

전북 정읍시 태인면 태용신길 29, 101동 502호 (샘들내아파트)

(74) 대리인

김중관, 권오식, 박창희

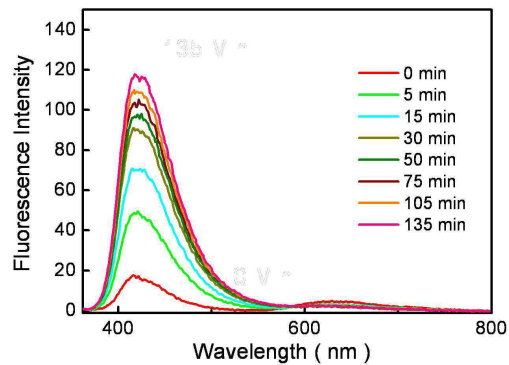
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 트립신의 선택적 검출방법

(57) 요약

본 발명은 트립신의 선택적 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 보빈세럼알부민 또는 폴리라이신과 이온성기를 가지는 수용성 형광 공액화 고분자 화합물과 회합체를 이용하여 간단한 방법으로 매우 적은 양의 검출도 가능한 매우 효과적인 방법이다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

- 수용성 형광 공액화 고분자 화합물 용액을 제조하는 단계;
- 상기 용액에 보빈세럼알부민(Bovine serum albumin) 또는 폴리라이신을 첨가하여 회합체 용액을 제조하는 단계;
- 상기 회합체 용액의 1차 형광을 측정하는 단계; 및
- 상기 회합체 용액에 시료를 첨가하여 2차 형광을 측정하는 단계;를 포함하는 트립신의 선택적 검출방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

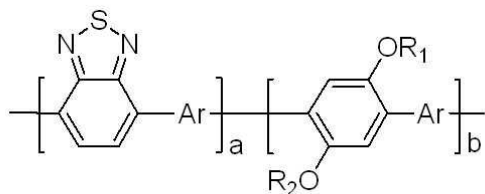
상기 트립신의 검출은 c)단계와 d)단계에서 측정된 형광스펙트럼 패턴을 비교하여 형광 피크, 형광 강도 또는 이들의 조합에 의해 수행되는 것인 트립신의 선택적 검출방법.

청구항 3

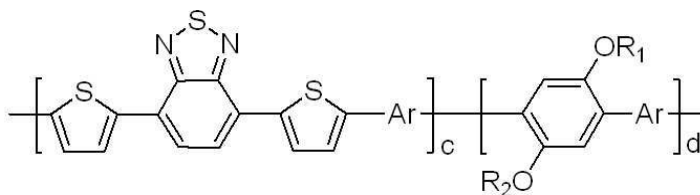
제 1항에 있어서,

수용성 형광 공액화 고분자는 하기 화학식 1 및 화학식 2에서 선택되는 중합단위를 갖는 것인 트립신의 선택적 검출방법.

[화학식 1]



[화학식 2]



[상기 화학식 1 내지 2에서, R_1 및 R_2 는 서로 동일하거나 상이 할 수 있으며 말단에 술포산염 또는 트리(C1-C7)알킬암모늄염으로 치환된 직쇄 또는 분지쇄의 C1 내지 C6의 알킬기이고; Ar은 (C6-C20)아릴렌이고; a, b, c 및 d는 몰분율로, a 및 c는 0.08 내지 0.1이고, b 및 d는 0.9 내지 0.92이다.]

청구항 4

제 3항에 있어서,

R_1 및 R_2 의 알킬기의 말단은 서로 독립적으로 술포산염, 트라이메틸암모늄, 에틸다이메틸암모늄, 다이에틸암모늄, 트리아에틸암모늄으로 치환된 것인 트립신의 선택적 검출방법.

청구항 5

제 3항에 있어서,

Ar은 페닐렌 또는 싸이에닐렌인 트립신의 선택적 검출방법.

청구항 6

제 3항에 있어서,

회합체는 상기 화학식 1 또는 2에서 R_1 및 R_2 가 각각 말단이 술폰산염으로 치환된 직쇄 또는 분지쇄의 C1 내지 C6의 알킬기인 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-폴리라이신인 트립신의 선택적 검출방법.

청구항 7

제 3항에 있어서,

수용성 형광 공액화 고분자는 수평균 분자량이 3,000 내지 100,000인 트립신의 선택적 검출방법.

청구항 8

제 3항에 있어서,

측정은 형광광도계를 이용하는 것인 트립신의 선택적 검출방법.

청구항 9

제 1항에 있어서,

시료는 트립신의 농도가 2.7×10^{-8} M 이상인 트립신의 선택적 검출방법.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 보빈세럼알부민의 농도는 1.5×10^{-7} 몰이상이며, 상기 폴리라이신 농도는 1.0×10^{-7} 몰 이상인 트립신의 선택적 검출방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 트립신의 선택적인 검출방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 보빈세럼알부민 또는 폴리라이신과 수용성 형광 공액화 고분자 화합물의 회합체를 이용한 트립신의 선택적 검출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 진단, 의학연구, 임상실험 또는 화학분석 등 많은 경우에 시험 용액에 함유되어 있는 다양한 단백질의 농도를 신속 정확하게 분석할 필요가 있다. 이러한 분석에는 특정 단백질에 선택성이 있는 물질을 이용한 다양한 종류의 바이오센서물질 등이 사용되며, 센서의 일반적인 감지 신호는 전기, 저항, 전위차 등의 전기적 성질이나 색채, 형광 등의 광학적 성질을 이용한다. 이 중에서 색의 변화 및 형광의 변화는 육안으로 쉽게 판별이 가능하므로 특별한 장비가 없어도 측정이 용이한 방법 중에 하나이다.

[0003] 특히 색채 및 형광의 변화를 나타내는 센서로는 일반적으로 저분자 물질이 많이 이용되고 있으며, 측정대상물질도 이온뿐만 아니라 분자와 같은 다양한 화학종을 감지할 수 있다.

[0004] 한편, 최근 공액화 고분자 화합물을 이용한 센서의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다. 공액화 고분자 화합물은 화학신호를 측정 가능한 전기 또는 광신호로 신호변환이 가능하고, 특히 피측정물과 상호작용에 대한 응답으로 신호를 발현할 때 감도가 증가한다는(증폭현상) 장점을 가지고 있어 금속이온 및 음이온 감지, 폭발물(방향족 나이트로 화합물) 감지 등의 센서재료로 널리 사용되고 있다(D. T. McQuade, A. E. Pullen, T. M. Swager, Chem. Rev. 100, 2537, 2000). 또한, 수용성 형광 공액화 고분자 화합물은 공액화 고분자의 신호 증폭 현상을 이용한 감도 향상의 장점과 물에 녹는다는 특징을 이용하여 바이오물질, 단백질, DNA 등에 대한 화학 또는 바이

오 센서재료로 널리 사용되고 있다(C. Li, M. Numata, M. Yu, S. Wang, S. Shinkai, Angew. Chem. Int. Ed. 42, 4803, 2003; I. -B. Kim, J. N. Wilson, U. H. F. Bunz, Chem. Commun. 1273, 2005; 한국공개특허공보 2010-0044528).

[0005] 그 중 단백질을 감지하는 센서물질의 개발은 현재 많은 관심을 끌고 있으며, 특히 센서물질의 색이나 형광색의 변화에 의한 단백질의 감지는 그 감지 신호의 민감도 때문에 널리 사용되고 있다. 단백질 중에서도 트립신의 감지는 환경적, 생리적으로 중요한 요소가 되고 있다. 일반적으로 트립신은 체액 중에 함유되며 염기성 아미노산을 함유하는 폴리펩티드에 작용한다. 장안에서 단백질 중간 산물에 작용하여 아미노산을 생성한다. 단백질의 소화에 있어서 펩신과 함께 가장 중요한 효소이다. 단백질의 소화에서 펩신과 함께 가장 중요한 효소이다. 그렇기 때문에 생물학적 환경의 유지와 인체 내 소화계의 조절을 위해 트립신의 감지가 반드시 필요하다.

[0006] 상기와 같은 단백질의 특성으로 색변화에 의한 컬러센서를 이용하여 단백질을 감지하려는 노력이 저분자와 고분자 물질을 사용하여 다양하게 시도되었다.

[0007] 지금까지 연구된 대부분의 트립신 감지 방법은 색이나 형광색의 변화가 아닌 형광의 증가 및 감소의 형태로 측정된 것이 많다. 이러한 경우 매우 적은 농도 차이를 쉽게 구별할 수 없기 때문에 민감도 및 선택성의 문제가 있으며, 트립신을 인지하는 리간드를 고분자 내에 도입하기 위한 합성 방법은 복잡하기 때문에 트립신 감지를 위한 단순화된 방법이 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 2010-0044528

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Chem. Rev. 100, 2537, 2000

(비특허문헌 0002) Angew. Chem. Int. Ed. 42, 4803, 2003

(비특허문헌 0003) Chem. Commun. 1273, 2005

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 보빈세럼알부민(BSA; bovine serum albumin) 또는 폴리라이신과 수용성 형광 공액화 고분자 화합물의 회합체를 이용한 트립신의 선택적인 검출방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 간단하고 효과적인 트립신의 선택적인 검출방법을 제공하는 것으로 본 발명의 트립신의 검출방법은,

[0012] a) 수용성 형광 공액화 고분자 화합물 용액을 제조하는 단계;

[0013] b) 상기 용액에 보빈세럼알부민(Bovine serum albumin) 또는 폴리라이신을 첨가하여 회합체 용액을 제조하는 단계;

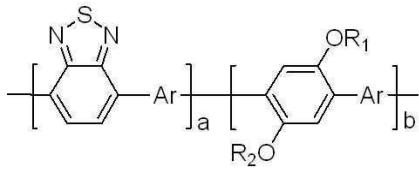
[0014] c)상기 회합체 용액의 1차 형광을 측정하는 단계;및

[0015] d) 상기 회합체 용액에 시료를 첨가하여 2차 형광을 측정하는 단계;를 포함한다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 따른 트립신의 검출은 c)단계와 d)단계에서 측정된 형광스펙트럼 패턴을 비교하여 형광 피크, 형광 강도 또는 이들의 조합에 의해 수행될 수 있다.

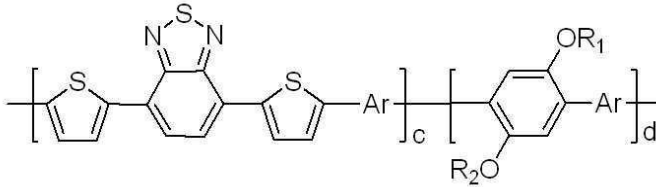
[0017] 본 발명의 일 실시예에 따른 수용성 형광 공액화 고분자 화합물은 하기 화학식 1 및 화학식 2에서 선택되는 중합단위를 갖는 것일 수 있다.

[0018] [화학식 1]



[0019]

[0020] [화학식 2]



[0021]

[0022] [상기 화학식 1 내지 2에서, R_1 및 R_2 는 서로 동일하거나 상이 할 수 있으며 말단에 술포산염 또는 트리(C1-C7)알킬암모늄염으로 치환된 직쇄 또는 분지쇄의 C1 내지 C6의 알킬기이고; Ar은 (C6-C20)아릴렌이고; a, b, c 및 d는 물분율로, a 및 c는 0.08 내지 0.1이고, b 및 d는 0.9 내지 0.92이다.]

[0023] 본 발명의 일 실시예에 따른 화학식 1 및 2에서 R_1 및 R_2 의 알킬기의 말단은 서로 독립적으로 술포산염, 트라이메틸암모늄, 에틸다이메틸암모늄, 다이에틸암모늄, 트리아에틸암모늄으로 치환된 것일 수 있으며, Ar은 페닐렌 또는 싸이에닐렌일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 따른 회합체는 상기 화학식 1 또는 2에서 R_1 및 R_2 가 각각 말단이 술포산염으로 치환된 직쇄 또는 분지쇄의 C1 내지 C6의 알킬기인 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-폴리라이신일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에 따른 수용성 형광 공액화 고분자 화합물은 수평균 분자량이 3,000 내지 100,000일 수 있으며, 측정은 형광광도계를 이용하는 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따른 시료는 트립신의 농도가 2.7×10^{-8} 몰이상일 수 있으며, 보빈세럼알부민과 폴리라이신 농도는 각각 1.5×10^{-7} 몰과 1.0×10^{-7} 몰 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 트립신의 선택적인 검출방법은 간단한 공정으로 트립신을 선택적으로 검출이 가능하며, 형광의 증가나 감소가 아닌 형광색의 변화로 검출이 가능하다.

[0028] 또한 간단한 방법으로 매우 적은 농도의 트립신도 검출이 가능하며, 형광의 증가나 감소가 아니라 형광색의 변화로 검출되어 육안으로도 쉽게 식별이 가능하며, 고가의 장비가 필요하지 않아 매우 경제적인 방법이다.

[0029] 특히 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-폴리라이신 회합체는 정전기적인 상화작용에 의한 회합체를 형성하여 간단한 방법으로 검출이 가능하며, 확연한 형광색의 변화로 미량의 트립신 검출에 매우 효과적이며, 육안으로도 식별이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 제조예 3에서 제조된 수용성 형광 공액화 고분자 화합물에 폴리라이신의 농도를 달리하여 측정한 1차 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 2는 도1의 1차 형광 스펙트럼에서 적색형광부분을 확대한 1차 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다.

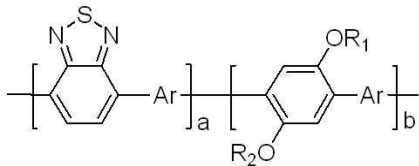
도 3는 실시예 2에서 트립신의 첨가하였을 시의 2차 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4는 도 3의 형광스펙트럼에서 적색형광 부분을 확대한 2차 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

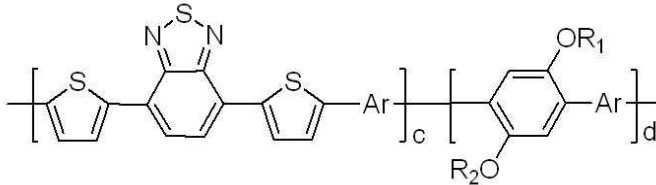
- [0031] 본 발명의 트립신의 검출방법은,
- [0032] a) 수용성 형광 공액화 고분자 화합물 용액을 제조하는 단계;
- [0033] b) 상기 용액에 보빈세럼알부민(Bovine serum albumin) 또는 폴리라이신을 첨가하여 회합체 용액을 제조하는 단계;
- [0034] c)상기 회합체 용액의 1차 형광을 측정하는 단계;및
- [0035] d) 상기 회합체 용액에 시료를 첨가하여 2차 형광을 측정하는 단계;를 포함한다.
- [0036] 본 발명의 트립신 검출방법은 보빈세럼알부민과 폴리라이신과 수용성 형광 공액화 고분자 화합물이 회합체를 이용하여 간단한 방법으로 검출이 가능한데, 보다 상세하게는 보빈세럼알부민 또는 폴리라이신과 수용성 형광 공액화 고분자 화합물은 상호작용을 하여 각각 회합체를 형성한다. 수용성 형광 공액화 고분자 화합물과 보빈세럼알부민 또는 수용성 형광 공액화 고분자 화합물과 폴리라이신의 회합을 통하여 형광색의 변화를 야기한다. 그리고 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-보빈세럼알부민 회합체 또는 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-폴리라이신의 회합체에 각각 트립신을 첨가하면 보빈세럼알부민과 폴리라이신을 각각 구성하는 아르지닌과 라이신에 선택적 분해거동이 유발된다. 따라서 트립신의 첨가는 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-보빈세럼알부민 또는 형광 공액화 고분자 화합물-폴리라이신 회합체의 분해를 야기하고, 이에 따라 수용액에서 고분자 화합물의 용해성이 증가되어 장파장 형광으로 변했던 형광색이 회합체가 형성되기 전 형광색인 단파장 형광으로 다시 회복되어 청색으로 변화를 일으켜 트립신을 감지할 수 있다.
- [0037] 특히 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-폴리라이신 회합체는 이러한 형광색의 변화가 커 트립신의 검출에 보다 효과적이다.
- [0038] 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-보빈세럼알부민 회합체 또는 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-폴리라이신의 회합체를 이용한 트립신의 검출은 간단한 공정으로 트립신의 유무, 트립신의 농도를 알 수 있으며, 형광의 증가와 감소가 아니라 형광색의 변화에 의해 검출되므로 매우 적은 량도 검출이 가능하다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 따른 시료는 트립신의 존재 유무 또는 트립신의 농도를 검출하고자 하는 대상물질을 의미한다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에 따른 트립신의 검출은 c)단계와 d)단계에서 측정된 형광스펙트럼 패턴을 비교하여 형광 피크, 형광 강도 또는 이들의 조합에 의해 수행될 수 있다.
- [0041] 상세하게는 트립신의 유무 또는 농도는 1차 형광 측정에서의 형광스펙트럼 패턴과 2차 형광 측정에서의 형광스펙트럼 패턴을 비교하여 형광 피크들의 변화, 형광 강도의 변화, 형광 피크들의 유무, 형광 피크들의 소멸과 생성 또는 이들의 조합에 의해 검출되는 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예에 따른 트립신의 유무는 상기 1차 형광의 스펙트럼 및 2차 형광의 스펙트럼 상에서, 가장 큰 강도를 갖는 주피크의 파장에 의해 결정될 수 있으며, 일례로 적색형광인 612nm에서의 피크 또는 417nm에서의 청색형광일 수 있으며, 트립신의 농도는 1차 형광 스펙트럼 및 2차 형광 스펙트럼 상 370 ~ 540 nm 파장에서 하기 식 1로 표시되는 형광 강도비에 의해 측정될 수 있다.
- $$\frac{I_2}{I_1} \times 100$$
- [0043] 식 1
- [0044] [상기 식 1에서
- [0045] I_1 은 1차 형광 스펙트럼의 370 ~ 460nm 파장에서 형광 강도이며,
- [0046] I_2 는 2차 형광 스펙트럼의 370 ~ 460nm 파장에서 형광 강도이다.]
- [0047] 보다 구체적으로 트립신의 농도는 상기 형광강도비가 400보다 크거나 같을 경우 시료에 함유된 트립신의 농도가 2.7×10^{-8} 몰이상일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 실시예에 따른 수용성 형광 공액화 고분자 화합물은 하기 화학식 1 및 화학식 2에서 선택되는 중합단위를 갖는 것일 수 있다.

[0049] [화학식 1]



[0050]

[0051] [화학식 2]



[0052]

[0053] [상기 화학식 1 내지 2에서, R_1 및 R_2 는 서로 동일하거나 상이 할 수 있으며 말단에 술폰산염 또는 트리(C1-C7)알킬암모늄염으로 치환된 직쇄 또는 분지쇄의 C1 내지 C6의 알킬기이고; Ar은 (C6-C20)아릴렌이고; a, b, c 및 d는 몰분율로, a 및 c는 0.08 내지 0.1이고, b 및 d는 0.9 내지 0.92이다.]

[0054] 본 발명의 일 실시예에 따른 화학식 1 및 2에서 R_1 및 R_2 의 알킬기의 말단은 서로 독립적으로 술폰산염, 트라이메틸암모늄, 에틸다이메틸암모늄, 다이에틸암모늄, 트리아에틸암모늄으로 치환된 것일 수 있으며, Ar은 페닐렌 또는 싸이에닐렌일 수 있다.

[0055] 보빈세럼알부민 또는 폴리라이신과의 바람직한 회합체의 형성을 위한 측면에서 상기 화학식 1 및 2에서 R_1 및 R_2 의 알킬기는 서로 독립적으로 메틸, 에틸, i-프로필, n-프로필, i-부틸, n-부틸, t-부틸, n-펜틸, i-펜틸 또는 n-헥실로부터 선택되어지며, 상기 Ar은 2가의 페닐렌일 수 있다.

[0056] 본 발명의 일 실시예에 따른 보빈세럼알부민의 경우는 4.9의 등전점을 가지고 있어 중성 상태에서 음전하를 갖지만, 수용성 형광 공액화 고분자 화합물 주쇄의 소수성기와 소수성 결합을 통해 회합체가 형성되며, 고분자 화합물과 회합체 형성 시 고분자 종류에 따라 청색형광에서 녹색형광 또는 청색형광에서 적색형광으로 형광색의 변화를 유발할 수 있다. 폴리라이신의 경우 9.87의 등전점을 가지고 있어 중성 상태에서 양전하를 가지며, 수용성 형광 공액화 고분자 화합물 측쇄의 음이온성기와 정전기적인 상호작용을 통해 회합체가 형성되며, 고분자 화합물과 회합체 형성 시 고분자 종류에 따라 청색형광에서 녹색형광 또는 적색형광으로 형광색의 변화를 유발할 수 있다.

[0057] 이런 측면, 즉, 폴리라이신은 수용성 형광 공액화 고분자 화합물과 정전기적 상호작용을 통해 회합체를 형성하므로 트립신의 첨가에 따라 형광색의 변화가 매우 커, 본 발명의 일 실시예에 따른 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-폴리라이신 회합체는 트립신의 검출에 보다 유용하며, 매우 미량의 트립신 검출에도 효과적이다.

[0058] 보다 바람직하게 상기 수용성 형광 공액화 고분자 화합물은 폴리라이신과 회합할 수 있는 음이온성 작용기를 가져야하며, 따라서 본 발명의 일 실시예에 따른 회합체는 상기 화학식 1 또는 2에서 R_1 및 R_2 가 각각 말단이 술폰산염으로 치환된 직쇄 또는 분지쇄의 C1 내지 C6의 알킬기인 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-폴리라이신일 수 있다.

[0059] 본 발명의 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-폴리라이신 회합체는 트립신을 첨가하면 트립신 첨가전의 형광스펙트럼, 즉 1차 형광 측정시의 형광 스펙트럼에 대비하여 2차 형광 측정시의 형광스펙트럼에서 청색형광이 400 ~ 750%의 증가를 보이고 적색형광 또는 녹색형광의 경우 55 ~ 65%의 감소를 보인다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에 따른 수용성 형광 공액화 고분자 화합물은 보다 많은 회합체를 얻기위해 즉 회합체의 농도를 높이기 위해 수평균 분자량이 3,000 내지 100,000일 수 있으며, 측정은 형광광도계를 이용하는 것일 수 있다

[0061] 본 발명의 일 실시예에 따른 시료는 트립신의 농도가 2.7×10^{-8} 몰이상일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에

다른 보빈세럼알부민과 폴리라이신 농도는 각각 1.5×10^{-7} 몰과 1.0×10^{-7} 몰 이상일 수 있으며, 트립신은 형광색의 변화를 육안으로 용이하게 확인가능한 측면에서 8.4×10^{-5} M 이상일 수 있다.

[0062] 이하, 아래의 비제한적 실시예에서 본 발명을 보다 자세하게 설명하나 본 발명의 청구범위가 이러한 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0063] [제조예] 수용성 형광 공액화 고분자 화합물의 제조

[0064] [제조예 1] 화학식 1의 벤조싸이아다리아졸계 고분자 화합물 ($R_1=R_2=4$ -술포네이트부틸, $Ar=1,4$ -페닐렌)의 제조

[0065] 4,7-다이브로모-2,1,3-벤조싸이아다리아졸 26.5 mg (0.090 mmol)과 1,4-다이브로모-2,5-비스(4-술포네이트부톡시)벤젠소듐염 474.4 mg (0.812 mmol)과 1,4-벤젠다이보론산비스(피나콜)에스터 297.7 mg (0.902 mmol), 그리고 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 촉매 3.5 mg (0.003 mmol)을 습기가 제거된 6 mL의 DMF와 9 mL의 2M Na_2CO_3 혼합용액에 용해시키고 90 °C에서 48시간동안 환류하였다. 반응 후 상온으로 냉각하고 500 mL의 부피비가 10:40:50인 메탄올/아세톤/에테르 혼합 용액에 부어 결정을 석출시킨 다음 석출물을 여과하였다. 여과하여 얻어진 고체를 3차 증류수에 녹인 후 삼투막을 이용한 여과로 분자량이 12,400이상인 화학식 1의 고분자 화합물을 얻었다. 이를 원소분석 한 결과 a는 10%의 물분율을 차지하는 것을 알 수 있었다.

[0066] 1H NMR(300 MHz, D_2O) δ =8.1~7.3(2H, 방향족), 7.2~6.7(2H, 방향족), 3.9(4H, 알킬기), 2.8(4H, 알킬기), 1.7~1.3(7.8H, 알킬기) ppm.

[0067] [제조예 2] 화학식 1의 벤조싸이아다리아졸계 고분자 화합물 ($R_1=R_2=3$ -N,N-트라이메틸암모늄프로필, $Ar=1,4$ -페닐렌)의 제조

[0068] 4,7-다이브로모-2,1,3-벤조싸이아다리아졸 26.5 mg (0.090 mmol)과 1,4-비스(3-브로모프로폭시)-2,5-다이브로모벤젠 414 mg (0.812 mmol)과 1,4-벤젠다이보론산비스(피나콜)에스터 356.2 mg (1.08 mmol), 그리고 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 촉매 3.5 mg (0.003 mmol)을 습기가 제거된 9 mL의 톨루엔과 4.5 mL의 2M Na_2CO_3 혼합용액에 용해시키고 90 °C에서 48시간동안 환류하였다. 반응 후 상온으로 냉각하고 200 mL의 메탄올에 부어 결정을 석출시킨 다음 석출물을 여과하고 얻어진 고체를 아세톤 200 mL에 수세한 후 여과하였다. 여과하여 얻어진 고체를 THF 10 mL에 녹인 후 -78 °C로 냉각시킨 후 트라이메틸아민 4 mL를 천천히 넣어주었다. 반응용액의 온도를 상온으로 승온시킨 후 6시간동안 교반한 후 아세톤 200 mL에 부어 석출하였다. 석출된 고체를 3차 증류수에 녹인 후 삼투막을 이용한 여과로 분자량이 12,400이상인 화학식 1의 고분자 화합물을 얻었다. 이를 원소분석 한 결과 a는 10%의 물분율을 차지하는 것을 알 수 있었다.

[0069] 1H NMR(300 MHz, D_2O) δ =8.1~7.3(2H, 방향족), 7.2~6.7(2H, 방향족), 4.1(4H, 알킬기), 3.8~3.2(6H, 알킬기), 2.9(4H, 알킬기), 1.7(4H, 알킬기) ppm.

[0070] [제조예 3] 화학식 2의 비스싸이에닐벤조싸이아다리아졸계 고분자 화합물 ($R_1=R_2=4$ -술포네이트부틸, $Ar=1,4$ -페닐렌)의 제조

[0071] 4,7-비스(5-브로모싸이오펜-2-일)벤조-2,1,3-싸이아다리아졸 21.6 mg (0.057 mmol)과 1,4-다이브로모-2,5-비스(4-술포네이트부톡시)벤젠소듐염 300.0 mg (0.514 mmol)과 1,4-벤젠다이보론산비스(피나콜)에스터 188.0 mg (0.571 mmol), 그리고 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 촉매 3.5 mg (0.003 mmol)을 습기가 제거된 8 mL의 DMF와 12 mL의 2M Na_2CO_3 혼합용액에 용해시키고 100 °C에서 48시간동안 환류하였다. 반응 후 상온으로 냉각하고 500 mL의 부피비가 10:40:50인 메탄올/아세톤/에테르 혼합 용액에 부어 결정을 석출시킨 다음 석출물을 여과하였다. 여과하여 얻어진 고체를 3차 증류수에 녹인 후 삼투막을 이용한 여과로 분자량이 12,400이상인 화학식 2의 고분자 화합물을 얻었다. 이를 원소분석 한 결과 c는 8%의 물분율을 차지하는 것을 알 수 있었다.

[0072] 1H NMR(300 MHz, D_2O) δ =8.1~7.3(3.1H, 방향족), 7.2~6.7(2H, 방향족), 4.0(2.8H, 알킬기), 3.0(3H, 알킬기), 2.0~1.5(5H, 알킬기) ppm.

- [0073] [제조예 4] 화학식 2의 비스싸이에닐벤조싸이아다리아졸계 고분자 화합물 ($R_1=R_2=3-N,N,N$ -트라이메틸암모니움프로필, $Ar=1,4$ -페닐렌)의 제조
- [0074] 4,7-비스[5-(4,4,5,5,-테트라메틸-1,3,2-다이옥사보로레인-2-일)싸이오펜-2-일]벤조-2,1,3-싸이아다리아졸 41.2 mg (0.090 mmol)과 1,4-비스(3-브로모프로폭시)-2,5-다이브로모벤젠 414 mg (0.812 mmol)과 1,4-벤젠다이보론 산비스(피나콜)에스터 356.2 mg (1.08 mmol), 그리고 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 촉매 3.5 mg (0.003 mmol)을 습기가 제거된 9 mL의 톨루엔과 4.5 mL의 2M Na_2CO_3 혼합용액에 용해시키고 100 °C에서 48시간동안 환류 하였다. 반응 후 상온으로 냉각하고 200 mL의 메탄올에 부어 결정을 석출시킨 다음 석출물을 여과하고 얻어진 고체를 아세톤 200 mL에 수세한 후 여과하였다. 여과하여 얻어진 고체를 THF 10 mL에 녹인 후 -78 °C로 냉각시킨 후 트라이메틸아민 4 mL를 천천히 넣어주었다. 반응용액의 온도를 상온으로 승온시킨 후 6시간동안 교반한 후 아세톤 200 mL에 부어 석출하였다. 석출된 고체를 3차 증류수에 녹인 후 삼투막을 이용한 여과로 분자량이 12,400이상인 화학식 2의 고분자 화합물을 얻었다. 이를 원소분석 한 결과 c는 10%의 물분율을 차지하는 것을 알 수 있었다.
- [0075] 1H NMR(300 MHz, D_2O) δ =8.1~7.3(3.1H, 방향족), 7.2~6.7(2H, 방향족), 4.0(2.8H, 알킬기), 3.7~3.2(4.7H, 알킬기), 3.0(3H, 알킬기), 2.0(3.1H, 알킬기) ppm.
- [0076] [실시예] 트립신 센서로 성능 평가
- [0077] [실시예 1] 벤조싸이아다리아졸 또는 비스싸이에닐벤조싸이아다리아졸을 포함하는 고분자 화합물을 이용한 트립신의 검출
- [0078] 제조예 1, 제조예 2, 제조예 3 및 제조예 4에서 제조된 벤조싸이아다리아졸계 또는 비스싸이에닐벤조싸이아다리아졸계 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-보빈세럼알부민 회합체의 트립신에 대한 화학적 검출 능력을 확인하기 위하여, 상기 고분자 화합물을 각각 증류수에 녹여 1.0×10^{-4} 몰농도로 맞추었다. 여기에 보빈세럼알부민의 농도에 따른 형광 변화를 확인하기 위하여 0에서 4.9×10^{-6} 몰농도까지 각기 다른 농도의 보빈세럼알부민을 증류수에 녹여 소량 첨가하여 용해시켰다. 고분자 화합물-보빈세럼알부민 회합체들을 형성한 후 용액의 형광 변화를 형광광도계를 이용하여 관찰하였다.
- [0079] 형광광도계를 이용하여 관찰한 결과, 제조예 1, 제조예 2, 제조예 3 또는 제조예 4의 화합물들을 이용하여 형성된 고분자 화합물-보빈세럼알부민 회합체들은 실험에 사용한 보빈세럼알부민의 농도에 따라 점차적인 형광의 변화를 나타냈다. 우선 수용성 형광 공액화 고분자 화합물에 각각 보빈세럼알부민을 첨가 시, 보빈세럼알부민의 첨가 전보다 고분자의 형광이 증가하는 것을 알 수 있었으며, 첨가되는 보빈세럼알부민의 농도가 많을수록 형광의 증가량도 비례하였다. 고분자 화합물들에 보빈세럼알부민을 첨가하여 발생하는 형광의 변화는 다음과 같다. 제조예 1과 제조예 2의 화합물을 이용한 고분자 화합물-보빈세럼알부민 회합체 제조시 발생하는 형광 변화는 417 nm의 청색형광이 232% 증가하고, 530 nm의 녹색형광이 355% 증가하였으며 제조예 3과 제조예 4의 화합물을 이용한 고분자 화합물-보빈세럼알부민 회합체는 417 nm의 청색형광이 251% 증가하고, 612 nm의 적색형광이 476% 증가하였다.
- [0080] 보빈세럼알부민의 첨가된 농도별 형광 변화를 확인한 후, 보빈세럼알부민의 농도가 2.4×10^{-5} 몰농도 일 때 트립신을 1.3×10^{-5} 몰농도 첨가 시, 트립신을 넣지 않았을 때와 비교하여 제조예 1과 제조예 2의 화합물을 이용한 고분자 화합물-보빈세럼알부민 회합체는 417 nm의 청색형광이 22.5% 감소하고, 530 nm의 녹색형광이 65.8% 감소하였으며, 제조예 3과 제조예 4의 화합물을 이용한 고분자 화합물-보빈세럼알부민 회합체는 417 nm의 청색형광이 25% 감소하고, 612 nm의 적색형광이 70.5% 감소하였다. 즉, 고분자에 회합되어 있던 보빈세럼알부민을 구성하고 있는 라이신과 아르지닌이 첨가하는 트립신에 의하여 분해되면서 고분자 화합물과 보빈세럼알부민간의 소수성 상호작용이 약화되어 회합체가 붕괴됨을 확인하였다. 트립신의 농도가 증가할수록 장파장 형광 (녹색 또는 적색) 단파장 형광 (청색)으로 형광색의 변화가 나타났으며, 이는 육안으로도 식별이 가능하였다.

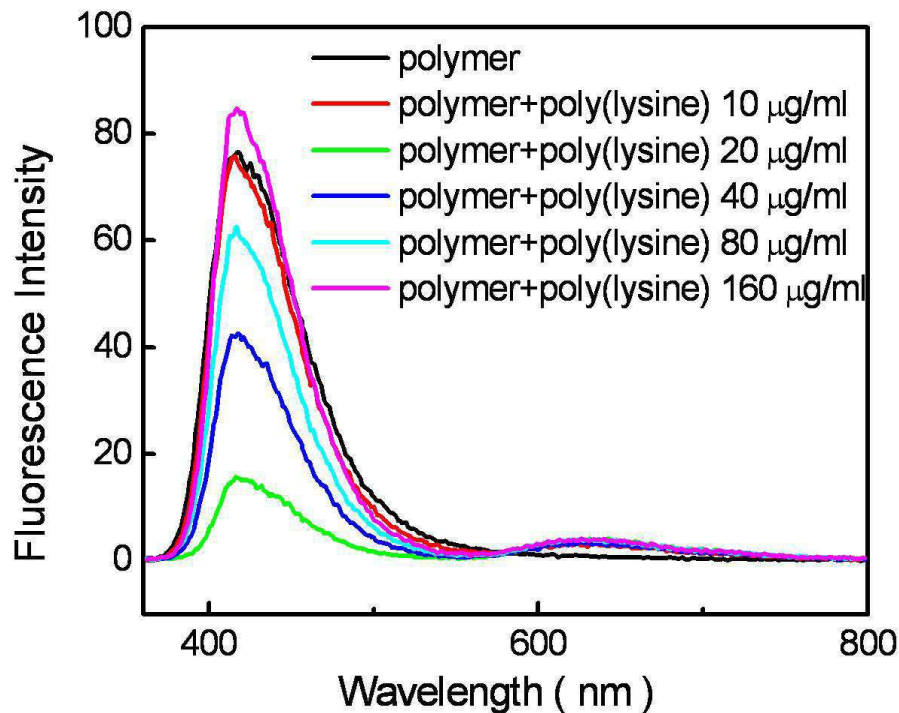
- [0081] 상기의 트립신의 검출을 위한 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-보빈세럼알부민 회합체들의 붕괴에 따른 형광색의 변화는 고분자 화합물의 농도를 1.0×10^{-4} 몰로 보빈세럼알부민의 농도를 2.4×10^{-5} 몰농도로 유지하고 트립신의 농도를 0에서 1.3×10^{-5} 몰농도로 조절하여 제조예 1, 제조예 2, 제조예 3과 제조예 4를 이용한 고분자 화합물-보빈세럼알부민 회합체의 형광색의 변화를 측정한 결과, 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-보빈세럼알부민 회합체와 반응할 수 있는 트립신의 농도가 많이 설정될수록 장파장 형광에서 단파장 형광으로의 변화가 나타났다.
- [0082] **[실시예 2] 벤조싸이아다리아졸 또는 비스싸이에닐벤조싸이아다리아졸을 포함하고 음이온성을 띄는 고분자 화합물을 이용한 트립신의 검출**
- [0083] 제조예 1 및 제조예 3에서 각각 제조된 벤조싸이아다리아졸과 비스싸이에닐벤조싸이아다리아졸을 포함하고 음이온성을 띄는 수용성 형광 공액화 고분자 화합물들의 트립신에 대한 화학적 검출 능력을 확인하기 위하여, 상기 고분자 화합물들을 각각 증류수에 녹여 1.0×10^{-4} 몰농도로 맞추었다. 여기에 폴리라이신의 농도에 따른 형광변화를 확인하기 위하여 0에서 3.4×10^{-5} 몰농도까지 각기 다른 농도의 폴리라이신을 소량 첨가하였다. 고분자 화합물-폴리라이신 회합체들을 형성한 후 용액의 형광 변화를 형광광도계를 이용하여 관찰하였다. 고분자 화합물들에 폴리라이신을 첨가하여 발생하는 형광의 변화는 다음과 같다. 제조예 1 화합물을 이용한 고분자 화합물-폴리라이신 회합체 제조시 발생하는 형광 변화는 417 nm의 청색형광이 73% 감소하고, 530 nm의 녹색형광이 582% 증가하였으며 제조예 3의 화합물을 이용한 고분자 화합물-폴리라이신 회합체는 417 nm의 청색형광이 80% 감소하고, 636 nm의 적색형광이 610% 증가하였다.
- [0084] 도 1에 폴리라이신의 농도에 따른 고분자 화합물-폴리라이신 회합체의 1차 형광 스펙트럼을 나타내었으며, 도 2는 도 1의 1차 형광 스펙트럼의 적색형광 부분을 확대하여 나타내었다.
- [0085] 앞서 상술한 바와 같이, 도 1과 도 2에서 고분자 화합물용액에 폴리라이신을 첨가하였을 경우 폴리라이신을 첨가하지 않을 때보다 청색형광은 감소하고 적색형광이 증가한 것을 알 수 있다.
- [0086] 폴리라이신의 첨가된 농도별 형광 변화를 확인한 후 폴리라이신의 농도가 2.1×10^{-6} 몰농도 일 때, 트립신의 1.3×10^{-5} 몰농도 첨가 시, 트립신을 넣지 않았을 때와 비교하여 제조예 1 화합물을 이용한 고분자 화합물-폴리라이신 회합체는 417 nm의 청색형광이 564% 증가하고, 530 nm의 녹색형광이 57.8% 감소하였으며 제조예 3의 화합물을 이용한 고분자 화합물-폴리라이신 회합체는 417 nm의 청색형광이 688% 증가하고, 623 nm의 적색형광이 61% 감소하였다. 즉, 고분자에 회합되어 있던 폴리라이신이 트립신이 첨가되면서 고분자간의 회합이 붕괴되고 트립신의 농도가 증가할수록 장파장 형광(녹색 또는 적색)에서 단파장 형광(청색)으로 형광색의 변화가 나타났으며, 이는 육안으로도 식별이 가능하였다.
- [0087] 상기의 트립신의 검출을 위한 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-폴리라이신 회합체들의 붕괴에 따른 형광색의 변화는 고분자의 농도를 1.0×10^{-4} 몰로 폴리라이신의 농도를 2.1×10^{-6} 몰농도로 유지하고 트립신의 농도를 0에서 1.3×10^{-5} 몰농도로 조절하여 제조예 1과 제조예 3을 이용한 고분자-폴리라이신 회합체의 형광색의 변화를 측정한 결과, 수용성 형광 공액화 고분자-폴리라이신 회합체와 반응할 수 있는 트립신의 농도가 많이 설정될수록 장파장 형광에서 단파장 형광으로의 변화가 나타났다.
- [0088] 도 3에 트립신을 추가하였을 경우 시간에 따른 2차 형광 스펙트럼을 나타내었으며, 도 4는 도 3의 형광 스펙트럼에서 적색형광 부분을 확대한 2차 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- [0089] 도 3과 도 4에서 보이는 바와 같이 트립신을 첨가한 경우 청색형광이 증가하고 적색형광이 대폭감소한 것을 알 수 있으며, 이러한 변화는 시간이 지남에 따라 확연히 나타남을 알 수 있어, 본 발명의 고분자 화합물-폴리라이신 회합체에 트립신 검출의 선택적 검출에 매우 유용함을 알 수 있다.
- [0090] **[비교예] 다른 분해 효소에 대한 감지 성능 평가**
- [0091] 본 발명의 트립신 검출의 선택성을 확인하기 위하여 트립신 사용 대신 같은 몰농도의 펩신, 글루코오스 산화 효소를 사용하였다. 제조예 4에서 제조된 비스싸이에닐벤조싸이아다리아졸계 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-

보빈세럼알부민, 또는 비스싸이에닐벤조싸이아다리아졸계 수용성 형광 공액화 고분자-폴리라이신 회합체를 제조하고, 펩신 또는 글루코오스 산화 효소를 첨가하여 형광을 관찰하였다. 상기 수용성 형광 공액화 고분자에 보빈세럼알부민과 폴리라이신을 용해시켜 각각 회합체를 제조한 후, 펩신 또는 글루코오스 산화 효소를 첨가하여 배양하였다. 그 결과 펩신 또는 글루코오스 산화 효소를 이용한 수용성 형광 공액화 고분자 화합물-보빈세럼알부민, 또는 수용성 형광 공액화 고분자-폴리라이신 회합체의 417 nm의 청색형광은 각각 22.1, 및 23.4% 증가하였으며, 633 nm의 적색형광은 각각 42.0, 37.2% 감소하여 펩신과 글루코오스 산화 효소의 농도의 증가에 따른 적색형광에서 청색형광으로의 색변화가 나타나지 않았다.

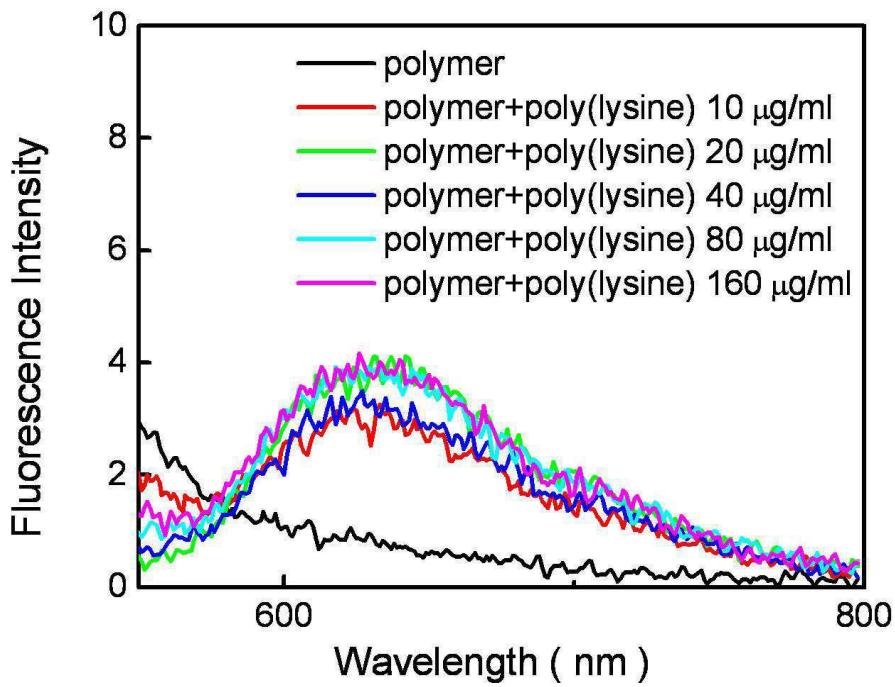
[0092] 이상의 결과로 보아 제조된 수용성 형광 공액화 고분자-보빈세럼알부민 회합체 또는 수용성 형광 공액화 고분자-폴리라이신 회합체는 트립신의 존재와 농도에 따라 형광색의 변화가 나타나, 트립신을 선택적으로 검출에 매우 유용함을 알 수 있다.

도면

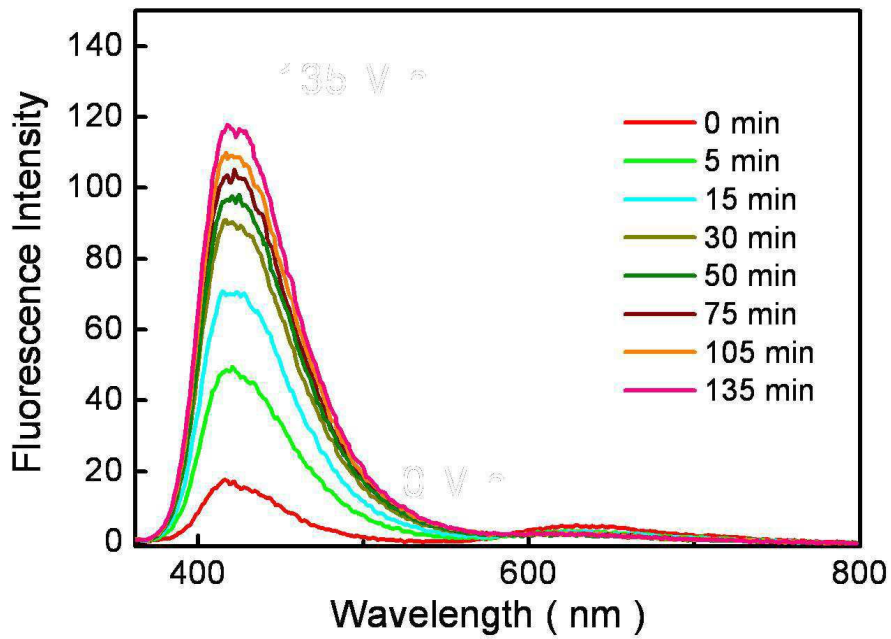
도면1



도면2



도면3



도면4

