



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0097704
(43) 공개일자 2009년09월16일

(51) Int. Cl.

G01N 33/533 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0023018

(22) 출원일자 2008년03월12일

심사청구일자 2009년03월26일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

이건형

서울 중구 신당4동 동아 하이츠 아파트 101동 1804호

조시 비수

인천광역시 남구 용현4동 대룡 빌라 26호

박준원

경기 부천시 오정구 고강본동 577-1 한솔빌라 2동 402호

(74) 대리인

백남훈, 이학수

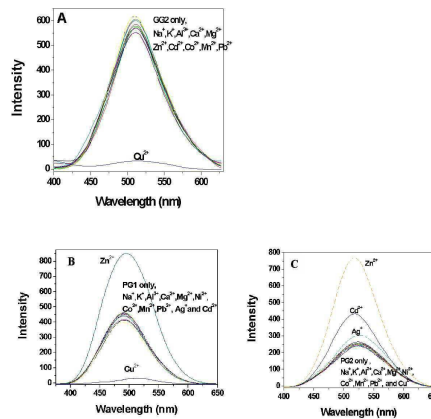
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 구리 또는 아연 이온의 선택적 검출용 형광 펩타이드 센서 및 그 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 구리 및/또는 아연 이온을 선택적으로 검출하기 위한 형광 펩타이드 센서, 그 제조방법, 및 그를 이용한 검출장치에 관한 것이다. 본 발명의 형광 펩타이드 센서는 종래의 센서가 주로 유기용매에서 중금속 이온을 검출할 수 있었던 반면, 본 발명에 따른 화합물은 지하수, 하천과 같은 수계 환경에서 구리 이온과 아연 이온을 검출할 수 있기 때문에 새로운 형광 펩타이드 센서로 활용 가능하고, 특히 약산성 내지 염기성 수용액, 특히 생체 시료의 pH 범위에서 선택성이 뛰어나므로, 생체 시료로부터 구리 또는 아연 이온을 선택적으로 검출하기 위한 형광 펩타이드 센서로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

형광표시물질과 펩타이드가 공유결합된 구리 또는 아연 이온을 검출 가능한 펩타이드 센서로서,
 상기 형광표시물질은 5-디메틸아미노-1-나프탈렌설폰일기이고,
 상기 펩타이드는 X1-Y1-Y2-X2-X3 또는 X3-X1-Y1-Y2-X2 아미노산 서열로 이루어진 것이고,
 상기 형광표시물질의 설폰일기와 상기 펩타이드의 아미노 말단이 공유결합되고,
 상기 X1, X2 및 X3는 각각 독립적으로 Cys, His 또는 Glu이고,
 상기 Y1 및 Y2는 각각 독립적으로 Gly 또는 Pro 인 것을 특징으로 하는 형광 펩타이드 센서.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
 상기 X1-Y1-Y2-X2-X3로 이루어진 펩타이드의 X2와 X3 아미노산 사이에 Y1-Y2 서열이 삽입된 것을 특징으로 하는 형광 펩타이드 센서.

청구항 3

제 2 항에 있어서,
 상기 펩타이드에서 X3가 결실된 것을 특징으로 하는 형광 펩타이드 센서.

청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서,
 상기 펩타이드의 서열에 포함된 2개의 Y1-Y2 서열 중 하나는 Gly-Gly이고, 나머지 하나는 Pro-Gly 또는 Gly-Pro 인 것을 특징으로 하는 형광 펩타이드 센서.

청구항 5

제 4 항에 있어서,
 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 8 중에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드인 것을 특징으로 하는 형광 펩타이드 센서.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,
 상기 펩타이드의 카복시 말단이 아미노기로 치환된 것을 특징으로 하는 형광 펩타이드 센서.

청구항 7

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,
 상기 펩타이드의 카복시 말단의 수산기가 -NH₂, -NHR₁ (R₁은 탄소수 1 ~ 18 알킬기), -OR₁ (R₁은 탄소수 1 ~ 18 알킬기), -(OCH₂CH₂)_n-COOH (n=2 ~ 5000), -(OCH₂CH₂)_n-polystyrene (n=2~5000) 또는 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 하는 형광 펩타이드 센서.

청구항 8

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,
 상기 펩타이드의 카복시 말단이 고체 지지체에 결합된 것을 특징으로 하는 형광 펩타이드 센서.

청구항 9

아미노 말단과 반응성 있는 결사슬이 보호기에 의해 보호된 아미노산 및 수지를 순차적으로 반응시켜, 제 1 항 내지 제 3 항 중에서 선택된 어느 하나의 형광 펩타이드 센서의 펩타이드 부분과 수지의 결합물을 고체상 합성법으로 합성하는 단계;

상기 수지와 펩타이드의 결합물을 5-디메틸아미노-1-나프타렌설포닐 클로라이드와 반응시키는 단계; 및

상기 반응 결과물을 결사슬 보호기 및 수지 제거 용액인 트리플루오로아세트산과 반응시키는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 형광 펩타이드 센서의 제조방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 3 항 중에서 선택된 어느 하나의 형광 펩타이드 센서, 및 형광 검출기를 포함하는 것을 특징으로 하는 구리 또는 아연 이온의 검출장치.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 형광 펩타이드 센서는 고체 지지체에 고정화된 것을 특징으로 하는 구리 또는 아연 이온의 검출장치.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 구리 및/또는 아연 이온을 선택적으로 검출하기 위한 형광 펩타이드 센서, 그 제조방법, 및 그를 이용한 검출장치에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 생체 내 주요물질과 이온들에 대한 새로운 센서의 설계와 연구는 그 동안 활발히 진행되어져 왔다. 최근 초분자(supramolecule) 화학에 대한 이해와 연구는 선택적으로 이온 혹은 여러 가지 다른 종류의 게스트 화합물들과 결합할 수 있는 호스트 화합물의 설계에 큰 가능성을 보여 왔으며, 최근 이러한 초분자 화합물을 형광물질에 연결시킴으로써, 게스트 화합물과의 선택적 결합을 형광변화를 이용하여 보다 손쉽게 관찰할 수 있는 형광 화학 센서(fluorescent chemosensor)의 개발에 대한 연구에 큰 도움을 주고 있다.

<3> 형광이란 특정한 광파(여기 파장)를 갖는 광자가 표지 분자(indicator molecule)와 충돌하고, 그 충돌의 결과로 전자가 고에너지 준위로 여기(excitation)되면서 일어나는 광화학적 현상이다. 여러 분석 방법 중에서 형광을 이용하는 방법은 아주 뛰어난 감도로 인해 10^{-9} M 농도에서도 신호를 관찰할 수 있는 큰 장점을 가지고 있다.

최근에는 이러한 성질을 이용하여 양이온, 음이온 그리고 중성 유기분자들에 대한 형광 화학 센서에 대한 연구들이 발표된 바 있다.

<4> 최근 들어, 다양한 형광 펩타이드 센서를 합성하여 여러 종류의 전위 금속을 검출하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 형광 펩타이드 센서는 아래에 나와 있는 몇 가지 측면에서 많은 관심을 받고 있다. 천연 아미노산을 포함하는 형광 펩타이드 센서는 고체상 합성법을 이용하여 빠른 시간 내에 비교적 손쉽게 합성을 할 수 있으며, 여러 가지 아미노산의 조합을 이용하여, 원하는 금속 이온에 대한 선택성과 감도를 조절할 수 있다. 또한, 생리적 조건과 유사한 수용액에 잘 녹는점은 형광화학 센서와 차별화 된 점으로 꼽을 수 있다. 더 나아가, 합성된 형광 펩타이드 센서를 불수용성 고체상 장치에 손쉽게 결합시킬 수 있고, 이를 통해 미래에 더 많은 응용이 가능하다. 다만, 여기서 합성된 형광 펩타이드 센서는 화학적으로 매우 수용성이기 때문에 세포 내로 투과시키는 것이 다소 어렵지만, 펩타이드에 존재하는 아마이드 본드를 통해서 추가적으로 기능을 부여하면, 세포 안으로 형광 펩타이드 센서를 투과시켜 더 많은 연구를 진행 시킬 수가 있다.

<5> 금속 이온의 생리적 조건에서의 높은 선택적 검출은 환경 및 생물학적 응용을 위한 형광 화학 센서 개발이라는 점에서 매우 중요하다[Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecular Recognition, Czarnik, A. W. Ed., American Chemical Society: Washington, DC, 1993]. 구리 이온과 아연 이온은 사람의 생체 내에서 가장 풍부한 전이 금속 이온들 중 하나이며, 유전자 발현, 효소 활동 조절, 및 신경 전달 과정 등에 매우 필수적인

역할을 담당하고 있다[Falchuk, K. H. *Mol. Cell. Biochem.* **1998**, *188*, 41].

- <6> 그 예로써, 아연 이온은 알츠하이머병의 초기 단계에 발생 되는 아밀로이드 플라크 형성에 영향을 미친다고 알려져 있다[Bush, A. I.; Pattingel, W. H.; Multhaup, G.; Paradis, M.D.; Vonsattel, J. P.; Gusella, J. F.; Beyreuther, K.; Masters, C. L.; Tanzi, R. E. *Science* **1994**, *265*, 1464]. 세포 내에 존재하는 아연 이온의 농도는 나노 몰(10^{-6} M)부터 밀리 몰(10^{-3} M) 범위까지 다양하다[Lippard, S. J.; Berg, J. M. *Principles of Bioinorganic Chemistry* University Science Books: Mill Valley, CA, **1994**, pp 10, 14, 78??183]. 그러므로 다양한 범위에서 최적화된 펩타이드 센서가 필요하다. 아연 이온을 검출하기 위한 대부분의 펩타이드 센서는 아연 손가락 영역들(Zinc finger domains)을 기반으로 해서 합성 되었다[Walkup, G. K.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3053]. 이들 펩타이드 센서의 대부분은 24개의 아미노산으로 구성되어 있고, 그 중 몇몇 펩타이드 센서는 비 천연 아미노산을 포함하고 있는데 [Shults, M. D.; Pearce, D. A.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10591] 이러한 형광 펩타이드 센서 대부분은 낮은 농도에서 취약한 검색 능력(검출 한계가 보통 밀리 몰 범위), 다른 금속(Mg^{2+} , Cd^{2+})의 방해, pH에 따른 활성 변화, 합성 과정의 어려움, 합성된 펩타이드의 변성(한 펩타이드 안에 두 개 이상의 시스테인 잔기(Cysteine)가 포함 되어 있을 경우 공기 중에서 손쉬운 산화 반응) 그리고, 생리적인 수용액 내에서 취약한 용해도로 인해서 많은 어려움을 겪고 있다[Ajayaghosh, A.; Carol, P.; Sreejith, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *127*, 14962, and reference therein].
- <7> 또 다른 금속 이온인 구리 이온은 생체 내에서 발생하는 환원 반응을 촉진 시키는데 관여할 뿐만 아니라, 세포 내의 잠재적인 위험 물질인 활성 라디칼을 억제하는 부분에서도 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다[Miranda S., Opazo C., Larrondo L.F., Muñoz F.J., Ruiz F., Leighton F. and Inestrosa N.C. *Prog. Neurobiol.* **62**, 633-648]. 따라서, 많은 생물체들은 세포 안의 구리 이온 농도를 적절히 조절하는데 여러 기작을 가지고 있다.
- <8> 이러한 이유로, 몸 안에 존재하는 구리 이온과 아연 이온의 함량을 잘 관찰 하는 것은 생체 내에서 발생하는 생리 현상을 파악하는데 중요한 도움을 줄 수 있다.
- <9> 따라서 상기 금속 이온에 대해 충분한 선택성을 갖는 새로운 형광 펩타이드 센서의 개발에 큰 관심이 모아지고 있다. 구리 이온과 아연 이온을 선택적으로 인식하는 많은 형광 화학 센서들이 보고 되었으나, 수용액 내에서 구리 이온과 아연 이온에 선택적으로 형광이 증가하는 형광화학센서의 예는 드물다. 이에, 본 발명자들은 구리 이온 및/또는 아연 이온에 대해 선택적으로 인식하는 화합물에 대하여 연구하던 중, 펩타이드에 형광체인 Dansyl을 도입하여 수용액에서 구리 이온과 아연 이온을 검출할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <10> 본 발명의 목적은 구리 또는 아연 이온을 선택적으로 검출하기 위한 형광 펩타이드 센서를 제공하는데 있다.
- <11> 본 발명의 다른 목적은 지하수, 하천과 같은 수계 환경이나 생체 시료로부터 구리 또는 아연 이온을 선택적으로 검출하기 위한 형광 펩타이드 센서를 제공하는데 있다.
- <12> 본 발명의 또 다른 목적은 약산성 수용액부터 염기성 수용액까지 다양한 범위에서 구리 또는 아연 이온을 선택적으로 검출하기 위한 형광 펩타이드 센서를 제공하는데 있다.
- <13> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형광 펩타이드 센서의 제조방법을 제공하는데 있다.
- <14> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형광 펩타이드 센서를 이용한 구리 또는 아연 이온의 선택적 검출장치를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <15> 본 발명은 형광표시물질과 공유결합 된 구리 또는 아연 이온을 검출 가능한 펩타이드 센서로서, 상기 형광표시물질은 5-디메틸아미노-1-나프타렌설포닐기이고, 상기 펩타이드는 X1-Y1-Y2-X2-X3 또는 X3-X1-Y1-Y2-X2 아미노산 서열로 이루어진 것이고, 상기 형광표시물질의 설포닐기와 상기 펩타이드의 아미노 말단이 공유결합되고, 상기 X1, X2 및 X3는 각각 독립적으로 Cys, His 또는 Glu이고, 상기 Y1 및 Y2는 각각 독립적으로 Gly 또는 Pro

인 것을 특징으로 한다.

- <16> 또한 본 발명은 형광 펩타이드 센서로서, 상기 X1-Y1-Y2-X2-X3로 이루어진 펩타이드의 X2와 X3 아미노산 사이에 Y1-Y2 서열이 삽입된 것으로, X1-Y1-Y2-X2-Y1-Y2-X3로 이루어진 서열인 것을 특징으로 한다.
- <17> 또한 본 발명은 형광 펩타이드 센서로서, 상기 펩타이드에서 X3가 결실된 것으로, X1-Y1-Y2-X2-Y1-Y2로 이루어진 서열인 것을 특징으로 한다.
- <18> 또한 본 발명은, 형광 펩타이드 센서로서, 상기 형광표시물질에 공유결합 된 펩타이드는 서열번호 1 내지 8 중 에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드인 것을 특징으로 한다.
- <19> 또한 본 발명은, 형광 펩타이드 센서로서, 상기 형광표시물질에 공유결합 된 펩타이드의 카복시 말단이 아미노 기로 치환된 것을 특징으로 한다.
- <20> 또한 본 발명은, 형광 펩타이드 센서로서, 상기 형광표시물질에 공유결합 된 펩타이드의 카복시 말단(COOH)의 수산기(-OH)가 $-NH_2$, $-NHR_1$ (R_1 은 탄소수 1 ~ 18 알킬기), $-OR_1$ (R_1 은 탄소수 1 ~ 18 알킬기), $-(OCH_2CH_2)_n-COOH$ ($n=2 \sim 5000$), $-(OCH_2CH_2)_n-polystyrene$ ($n=2 \sim 5000$) 또는 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 한다.
- <21> 또한 본 발명은, 형광 펩타이드 센서로서, 상기 형광표시물질에 공유결합 된 펩타이드의 카복시 말단 또는 상기 알킬기, 알킬렌옥사이드기 또는 알킬에스테르기와 펩타이드가 결합된 말단의 반대편 말단이 고체 지지체에 결합 된 것을 특징으로 한다.
- <22> 또한 본 발명은, 형광 펩타이드 센서의 제조방법으로서, 아미노 말단과 반응성 있는 결사슬이 보호기에 의해 보호된 아미노산 및 수지를 순차적으로 반응시켜, 수지와 제 1항 또는 제2 항의 형광 펩타이드 센서의 펩타이드 부분과 결합물을 고체상 합성법으로 합성하는 단계; 상기 수지와 펩타이드의 결합물을 5-디메틸아미노-1-나프타렌설포닐 클로라이드와 반응시키는 단계; 및 상기 반응 결과물을 결사슬 보호기 및 수지 제거 용액과 반응시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <23> 또한 본 발명은 구리 또는 아연 이온의 검출방법으로서, 상기 형광 펩타이드 센서 또는 상기 방법으로 제조된 형광 펩타이드 센서를 이용하는 것을 특징으로 한다.
- <24> 또한 본 발명은 구리 또는 아연 이온의 검출장치로서, 상기 형광 펩타이드 센서 또는 상기 방법으로 제조된 형광 펩타이드 센서, 및 형광 검출기를 포함하는 것을 특징으로 한다.

효 과

- <25> 본 발명의 형광 펩타이드 센서는 종래의 센서가 주로 유기용매에서 중금속 이온을 검출할 수 있었던 반면, 본 발명에 따른 화합물은 지하수, 하천과 같은 수계 환경에서 구리 이온과 아연 이온을 검출할 수 있기 때문에 새로운 형광 펩타이드 센서로 활용 가능하다.
- <26> 또한 본 발명의 약산성 내지 염기성 수용액, 특히 생체 시료의 pH 범위에서 선택성이 뛰어나므로, 생체 시료로부터 구리 또는 아연 이온을 선택적으로 검출하기 위한 형광 펩타이드 센서로 이용될 수 있다.
- <27> 또한 본 발명의 형광 펩타이드 센서는 구리 이온이 킬레이트 됨으로써 구리 이온에서만 선택적으로 형광이 감소되거나, 또는 아연 이온이 킬레이트 됨으로써 아연 이온에서만 선택적으로 형광이 증폭됨으로써 구리 또는 아연 이온을 선택적으로 검출할 수도 있고, 구리 이온을 통해 선택적으로 형광을 감소시키면서 동시에 아연 이온을 이용해 선택적으로 형광을 증폭시킴으로써, 구리 및 아연 이온을 동시에 선택적으로 검출할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <28> 본 발명의 형광 펩타이드 센서에서, 형광표시물질은 5-디메틸아미노-1-나프타렌설포닐기(또는 "Dansyl"이라 함)가 이용되고, 미세한 환경에서도 매우 민감한 형광 변화를 나타낸다.
- <29> 본 발명의 형광 펩타이드 센서는 상기 형광표시물질과 5 ~ 7개의 아미노산 잔기로 이루어진 펩타이드의 아미노 말단이 공유결합된 것이다.
- <30> 본 발명에서 형광표시물질에 공유결합 된 펩타이드는 아연 손가락 영역(Zinc finger domains)에서 많이 발견되는 시스테인(Cys), 히스티딘(His) 및 글루탐산(Glu) 중에서 선택된 어느 하나의 아미노산이 일정한 간격, 즉 2 개의 아미노산 잔기를 사이에 두고 배열되고, 상기 시스테인, 히스티딘 및 글루탐산 중에서 선택된 어느 하나의

아미노산 사이에 포함되는 2개의 아미노산은 글리신(Gly)-글리신(Gly) 또는 프롤린(Pro)-글리신(Gly) 또는 글리신(Gly)-프롤린(Pro) 또는 프롤린(Pro)-프롤린(Pro)인 것이 시스테인, 히스티딘 및 글루탐산 이 2차 구조의 공간적 영역에서 일정하게 배열되도록 하는데 적합하다. 따라서, 본 발명의 형광표시물질에 공유결합 된 펩타이드는 X1-Y1-Y2-X2-X3 또는 X3-X1-Y1-Y2-X2 아미노산 서열을 포함하는 것으로, 상기 X1, X2 및 X3는 각각 독립적으로 Cys, His 또는 Glu이고, 상기 Y1 및 Y2는 각각 독립적으로 Gly 또는 Pro인 것을 특징으로 한다. 상기 펩타이드 부분이 X1-Y1-Y2-X2를 포함하더라도 5개 미만의 아미노산 잔기를 가지면 다른 중금속과 비교하여, 구리 또는 아연 이온에 대한 선택성이 우수하지 않기 때문에 구리 또는 아연 이온을 선택적으로 검출하기 위해 센서로서 는 바람직하지 않으며, 형광표시물질로부터 8번째 이상의 아미노산 잔기는 2차 구조의 형성에 미치는 영향이 일반적으로 적은 경우, 구리 아연 이온 센싱에 큰 영향이 없다.

<31> 본 발명에서 형광표시물질에 공유결합 된 펩타이드가 5개의 아미노산 잔기로 이루어진 경우에는 X1-Y1-Y2-X2-X3 또는 X3-X1-Y1-Y2-X2 의 카복시 말단 쪽에 아미노산 잔기가 결합되어도 활성에는 영향이 없다. 바람직하기로 는 X1은 Cys 또는 His인 것이다. 또한 X1-Y1-Y2-X2-X3 또는 X3-X1-Y1-Y2-X2 의 카복시 말단에 결합되는 아미노산은 20 개의 변형되지 않은 아미노산 어느 것이나 가능하고, 다만 아연 손가락 영역에서 많이 발견되는 금속 결합 리간드를 가진 Cys, His, Glu, Asp 및 구조에 영향을 주는 Pro 등의 아미노산을 제외한 일반 아미노산이 오는 것이 더욱 바람직하다.

<32> 본 발명에서 형광표시물질에 공유결합 된 펩타이드가 6 또는 7개의 아미노산 잔기로 이루어진 경우에는 X1-Y1-Y2-X2-X3 로 이루어진 아미노산 서열의 펩타이드의 X2와 X3 아미노산 사이에 Y1-Y2 서열이 반복되는 것이 구리 또는 아연 이온의 선택적 검출에 바람직하고, 상기 반복되는 Y1-Y2 서열에서 하나는 Gly-Gly이고 나머지 하나는 Pro-Gly인 경우가 구리와 아연을 동시에 검출할 수 있어 더욱 바람직하다.

<33> 또한, 본 발명에서 형광표시물질에 공유결합 된 펩타이드의 X1, X2 및 X3 중에서 어느 하나가 Cys인 경우에는 다른 아미노산은 Cys가 아닌 것이 형광 펩타이드 센서의 안정성 면에서 유리하다.

<34> 본 발명의 형광 펩타이드 센서로 바람직한 화합물을 다음의 표 1 및 2에 예시하였다.

표 1

구분	화학식	비고
1	Dansyl-Cys-Gly-Gly-His-Gly-Gly-Glu-CONH ₂	GG2
2	Dansyl-Cys-Pro-Gly-His-Gly-Gly-Glu-CONH ₂	-
3	Dansyl-Cys-Gly-Gly-His-Pro-Gly-Glu-CONH ₂	PG1
4	Dansyl-Cys-Pro-Gly-His-Pro-Gly-Glu-CONH ₂	PG2
5	Dansyl-Cys-Gly-Pro-His-Gly-Pro-Glu-CONH ₂	-
6	Dansyl-Cys-Gly-Pro-His-Gly-Gly-Glu-CONH ₂	-
7	Dansyl-Cys-Gly-Gly-His-Gly-Pro-Glu-CONH ₂	-
8	Dansyl-Cys-Gly-Pro-His-Gly-Pro-Glu-CONH ₂	-

표 2

서열번호	화학식	비고
9	Dansyl-Cys-Pro-Gly-His-Glu-CONH ₂	Cp1
10	Dansyl-His-Pro-Gly-Cys-Glu-CONH ₂	Cp1-His
11	Dansyl-Cys-His-Pro-Gly-Glu-CONH ₂	Cp1-Cys-Glu
12	Dansyl-Glu-Pro-Gly-Cys-His-CONH ₂	Cp1-Glu
13	Dansyl-His-His-Pro-Gly-Glu-CONH ₂	Cp1-His-His

<37> 또한, 본 발명에서 형광표시물질이 공유결합된 펩타이드의 카복시 말단(COOH)의 수산기(-OH)가 -NH₂, -NHR₁ (R₁은 탄소수 1 ~ 18 알킬기), -OR₁ (R₁은 탄소수 1 ~ 18 알킬기), -(OCH₂CH₂)_n-COOH (n=2 ~ 5000),

$-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{-polystyrene}$ ($n=2 \sim 5000$) 또는 아미노산으로 치환될 수 있다. 상기 카복시 말단이 치환된 펩타이드는 고체상 합성법 및 액체상 합성법 등의 공지의 방법으로 제조될 수 있고, 특별히 한정하지 않는다.

- <38> 또한 본 발명의 형광 펩타이드 센서의 펩타이드의 카복시 말단; 또는 그 카복시 말단이 아미노기로 치환된 말단, 알킬렌옥사이드기, 또는 알킬에스테르기의 말단이 고체 지지체에 고정화되어 고정화 센서로서 사용될 수 있다. 고체 지지체의 형태는 비이드, 필름, 나노 튜브, 다공성 입자 등 어떠한 형태도 가능하고, 고체 지지체의 구성성분은 silica 표면, TiO_2 표면 등이며, 고분자 수지로는 폴리 에틸렌 옥사이드로 연결된 폴리스타일렌 수지 등이 가능하다. 또한 고체 지지체에 고정화시키는 방법은 본 발명의 목적에 적합하다면 공지의 어떠한 방법도 이용될 수 있다.
- <39> 본 발명의 형광 펩타이드는 여기 파장 $300 \sim 360 \text{ nm}$ 의 범위일 때, $450 \sim 550 \text{ nm}$, 바람직하게는 $490 \sim 520 \text{ nm}$ 의 파장의 형광을 증폭시키거나, 형광을 감소시킴으로써, 구리 또는 아연 이온을 선택적으로 검출할 수 있다.
- <40> 또한 본 발명의 형광 펩타이드 센서의 제조방법은 아미노 말단과 반응성 있는 결사슬이 보호기에 의해 보호된 아미노산 및 수지를 순차적으로 반응시켜, 수지와 제 1 항 또는 제 2 항의 형광 펩타이드 센서의 펩타이드 부분과 결합물을 고체상 합성법으로 합성하는 단계; 상기 수지와 펩타이드의 결합물을 5-디메틸아미노-1-나프타렌설폰일 클로라이드와 반응시키는 단계; 및 상기 반응 결과물을 결사슬 보호기 및 수지 제거 용액과 반응시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <41> 고체상 합성법에 사용되는 보호기는 아미노 말단을 보호하는 보호기로 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐기(이하 "Fmoc"라 함)와 반응성이 있는 결사슬을 보호하기 위한 보호기로는 트리페닐메틸(이하 "Trt"라 함), 부틸옥시카르보닐(이하 "Boc"라 함), t-부틸에스테르(이하 "tBu"라 함)등이 사용된다. 이러한 아미노산을 예시하면 Fmoc-L-Asp(Trt)-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH Fmoc-L-Pro-OH 등이 사용될 수 있다.
- <42> 펩타이드 합성에 사용하는 수지는 펩타이드를 수지에서 제거(cleavage) 할 때 카복시 말단이 아마이드 형태로 만들어지는 링크드 아마이드 메틸벤즈아드릴아민(Rinked amide MBHA (methylbenzhydrylamine) 수지가 바람직하다.
- <43> 일반적으로 아미노산과 수지를 사용하여 펩타이드를 고체상 합성할 경우 수지와 아미노산은 1:2 ~ 1:10의 몰 비로 사용하는 것이 좋고, 1:3 ~ 1:7의 몰 비로 사용하는 것이 경제적이다. 예를 들어, 수지 0.1 mmole 과 아미노산 0.3 mmole 을 사용할 수 있다. 펩타이드는 카복시 말단에서부터 아미노 말단 방향으로 합성되는데, 이때 수지에 미리 붙어 있는 한 아미노산과 다른 아미노산의 합성 시 붙이고자 하는 아미노산의 카복시기를 활성화제로 활성화시키고, 합성 후 아미노 말단의 보호기는 피페리딘 (Piperidine)으로 제거하고, 다음 합성을 수행할 수 있다. 상기 카르복실기 활성화제로는 N,N'-Diisopropyl carbodiimide(이하 "DIPC" 라고 함.)를 사용하고, 첨가 보조제로는 N-Hydrobenzotriazole(이하 "HOBt" 라고 함.)을 일반적으로 사용한다. 합성 시간은 약 1시간 정도이다.
- <44> 펩타이드 합성이 완료된 후 아미노 말단에 붙어 있는 Fmoc 보호기를 을 피페리딘을 이용해 제거한 후, 상기 결과물에 Dansyl 클로라이드(5-Dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl chloride)와 DIPEA (diisopropylethylamine)가 혼합된 용액을 첨가한 후, 약 2시간 정도 반응시켜 형광 물질을 펩타이드 결합시킨다. 결사슬 보호기 및 수지 제거 용액은 트리플루오로아세트산, 바람직하게는 트리클로로 아세트산 90 부피%, 트리메틸실란 5 부피%, 물 5 부피%로된 용액과 상온에서 약 3시간 반응시켜 아미노산의 결사슬 보호기 제거 및 수지로부터 펩타이드를 떼어낸 후, 여과를 통해 수지와 용액에 녹아있는 형광 펩타이드 센서를 분리한다.
- <45> 여과된 형광 펩타이드 센서 분리 용액 내의 트리플루오로아세트산은 질소 기체를 통과시켜 제거할 수 있고, 남아있는 물질은 -20°C 로 냉각된 디에틸에테르를 첨가한 후 디에틸에테르 용액과 침전된 형광 펩타이드 센서를 분리할 수 있다.
- <46> 이와 같이 분리된 형광 펩타이드 센서는 컬럼 크로마토그래피를 이용해 정제할 수 있고, 정제된 펩타이드의 분자량은 Maldi-TOF 질량분석기를 이용하여 확인할 수 있다.
- <47> 또한 본 발명은 상기 형광 펩타이드 센서를 이용한 수용액 환경 또는 생체 내에 존재하는 구리 또는 아연 이온의 선택적 검출방법을 제공한다.
- <48> 상기 구리 또는 아연 이온의 검출은 상기 형광 펩타이드 센서의 유효성은 형광 펩타이드 센서와 구리 또는 아연 이온의 복합체를 여기시켜 킬레이트 증폭 형광(CHEF) 효과를 확인함으로써 수행될 수 있으며, 이 형광 펩타이드

드 센서는 수지나 필름 등에 고정화된 후에도 이온 인식 능력이 유지되며, 이 경우 보다 저 농도의 구리 및 아연 이온을 검출 할 수 있으며 재활용이 가능하다. 이 경우 상기 킬레이트 증폭을 위한 여기 파장은 330 nm 인 것이 바람직하다.

<49> 이하, 본 발명을 실시예 및 도면을 참조하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

<50> <실시예 1> 형광 펩타이드 센서의 제조

<51> Rinked amide MBHA resin (147mg, 0.1mmol)을 3ml 무수 DMF에 넣고 약 30분간 미리 팽윤시킨다. 상기의 수지에 50% 피페리딘/DMF 용액 3ml을 첨가하여 15분간 반응 시켜 아미노 말단의 Fmoc 그룹을 제거한 후, 1.5ml 무수 DMF 용매 안에 0.3mmol Fmoc-L-Glutamic acid (158mg), DIC(48 μ l), 그리고 HOBt(40mg)를 첨가한 후, 미리 20분간 활성화 시킨 용액과 약 1시간 정도 반응시킨다. 반응 후 용액을 걸러내고, 수지를 DMF와 메탄올로 수차례 세척한 후, kaiser 테스트를 실행한다. kaiser 테스트가 양성으로 나오면 상기의 활성화 용액을 다시 만들어 첨가하고, 음성이 나올 경우 다음 순서의 아미노산을 합성한다. 펩타이드 합성이 완료되면, 50% 피페리딘/DMF을 이용해 아미노 말단의 Fmoc 그룹을 제거하고, 무수 DMF 용매 안에 Dansyl Chloride(0.3mmol), DIPEA(0.6mmol)가 든 용액을 상기의 수지와 혼합한 후, 상온에서 1시간동안 적절한 속도로 교반시킨다. 수지에 붙어있는 보호기를 포함하는 형광 펩타이드는 제거 용액 (trifluoroacetic acid 90 부피%, trimethylsilane 5 부피%, Water 5 부피%)과 상온에서 4 시간 반응시켜 아미노산의 결사슬 보호기의 제거 및 수지로부터 펩타이드를 떼어낸 후 여과를 통해 수지와 용액에 녹아있는 형광 펩타이드를 분리하였다. 여과된 형광 펩타이드 분리 용액 내의 트리플루오로아세트산은 질소 기체를 통과시켜 제거하였으며, 남아있는 물질에는 -20℃로 냉각된 디에틸에테르를 첨가한 후 디에틸에테르 용액과 침전된 형광 펩타이드를 원심분리기(3,000 rpm, 20min)로 분리하였다. 이렇게 얻어진 형광 펩타이드는 역상 HPLC (C-18 칼럼 delta pak C18-300A, 1.9×30 cm)을 이용하여 정제하였다(Eluent : water/acetonitrile in 0.1% TFA (gradient) : Flow Rate 2.5mL/min). 정제된 형광 펩타이드의 분자량은 Maldi-TOF 질량분석기를 이용하여 확인하였다(도 10).

<52> <실시예 2> 고체상에 지지된 형광 펩타이드 센서의 제조

<53> Tentagel resin (g, 0.1mmol)을 3ml 무수 DMF에 넣고 약 30분간 미리 팽윤시킨다. 1.5ml 무수 DMF 용매 안에 0.3mmol Fmoc-L-Glutamic acid (158mg), DIC(48 μ l), 그리고 HOBt(40mg)를 첨가한 후, 미리 20분간 활성화 시킨 용액과 약 1시간 정도 반응시킨다. 반응 후 용액을 걸러내고, 수지를 DMF와 메탄올로 수차례 세척한 후, kaiser 테스트를 실행한다. kaiser 테스트가 양성으로 나오면 상기의 활성화 용액을 다시 만들어 첨가하고, 음성이 나올 경우 다음 순서의 아미노산을 합성한다. 펩타이드 합성이 완료되면, 50% 피페리딘/DMF을 이용해 아미노 말단의 Fmoc 그룹을 제거하고, 무수 DMF 용매 안에 Dansyl Chloride(0.3mmol), DIPEA(0.6mmol)가 든 용액을 상기의 수지와 혼합한 후, 상온에서 1시간동안 적절한 속도로 교반시킨다. 형광 펩타이드 센서 결사슬에 붙어있는 보호기는 제거 용액 (trifluoroacetic acid 90 부피%, trimethylsilane 5 부피%, Water 5 부피%)과 상온에서 4 시간 반응시켜 떼어낸 후 여과를 통해 수지와 용액을 분리한 후, DMF와 메탄올로 각 수차례 반복해서 제거 용액을 씻어 낸다.

<54> <실험예 1> 형광 펩타이드 센서와 중금속 이온들의 결합에 따른 형광 변화 관찰

<55> 1-1. 형광 펩타이드 센서와 중금속 이온들의 결합에 따른 형광 적정 실험

<56> 형광 펩타이드 센서는 물에 완벽하게 잘 녹기 때문에 어떠한 유기 용매도 첨가되지 않은 10 mM HEPES 완충 용액 (pH 7.4)에 녹여서 실험하였다. 형광 방출 스펙트럼은 330nm에서 여기(excitation) 시켜서 350nm부터 650nm의 영역을 관찰하였다. 실험에는 Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , and Zn^{2+} perchlorate salts (과염소산염형태)와 Na^{+} , Al^{3+} , K^{+} chloride salts(염소산염 형태)를 중금속 이온으로 사용하였다. 도 1은 10mM HEPES 완충 용액 (pH 7.4) 안에 여러 펩타이드 표 1의 GG2, PG1, 그리고 PG2 (각 10 μ M)와 중금속이온 (1 eq.)들을 첨가한 다음, 형광 방출 스펙트럼을 관찰한 것이다.

<57> GG2 (Dansyl-Cys-Gly-Gly-His-Gly-Gly-Glu-NH₂)는 구리 이온을 제외하고 다른 어떤 금속에서도 형광 변화가 관찰 되지 않았고, 구리 이온을 넣은 후, 510 nm에서 형광이 급격히 감소되었다.

<58> PG1 (Dansyl-Cys-Gly-Gly-His-Pro-Gly-Glu-NH₂)은 구리와 아연 이온을 제외하고 어떠한 중금속 이온에서도 형광이 변화되지 않았다. 아연 이온을 첨가했을 때 형광이 증가하는 반면, 구리 이온을 첨가했을 경우에는 형

광이 감소하였다.

<59> 도 1에서 **PG2**(Dansyl-Cys-Pro-Gly-His-Pro-Gly-Glu-NH₂)는 아연과 카드뮴 이온을 제외하고는 구리를 포함한 다른 어떠한 금속에서도 형광 변화를 나타내지 않았다. 아연 이온을 첨가하자 510 nm에서 형광이 증가되었는데 이것은 비록 구리 이온과 아연 이온이 비슷한 크기와 전자 배치(electronic configuration)를 갖지만, PG2는 구리 이온보다 아연 이온을 더 선택적으로 검출하는 것을 의미한다.

<60> 일반적으로 Dansyl 그룹과 히스테인의 이미다졸 그룹 (imidazole)을 포함하는 형광 화학 또는 펩타이드 센서는 이미다졸 그룹으로 인해서 구리와 높은 결합력을 가진다는 것이 알려져 있다. [Shults MD, Pearce DA, Imperiali B: *J Am Chem Soc* **2003**, 125:10591-10597.] 그러나 PG2는 Dansyl 그룹과 이미다졸 그룹을 포함하고 있지만, 구리 이온에 대하여 형광 변화를 갖지 않았다. 또한, 다른 금속들이 있을 경우 GG2는 PG1보다 더 높은 형광을 나타냈고, 같은 농도에서 PG1은 가장 낮은 형광을 나타냈다. 따라서 이것은 Dansyl 그룹이 주변에 펩타이드의 이차 구조로 인해는 각기 다른 환경에 놓여 있다는 것을 증명하는 예라고 할 수 있다.

<61> 한편, PG1, PG2, GG2에서 각각 카복시 말단의 아미노산 Glu가 결실된 형광 펩타이드 센서는, 각각 PG1, PG2, GG2와 구리 및 아연 이온에 대한 형광의 패턴에는 차이가 없었고, 다만 형광의 세기만 약 5 ~ 15% 감소되었다.

<62> 또한, 펩타이드 부분의 합성을 용이하게 하기 위하여 PG1, PG2, GG2의 카복시 말단을 아미노기로 치환하였으나, PG1, PG2, GG2에서 카복시 말단을 아미노기로 치환하지 않은 형광 펩타이드 센서의 경우에도 형광의 패턴이나 세기는 차이가 없었다.

<63> 1-2. 아연 과 구리 이온에 대한 형광 펩타이드 센서의 화학양론 비 및 결합 상수 측정 실험

<64> 구리 이온과 아연 이온 모두 유전자 발현, 세포 사멸, 효소 조절 및 아밀로이드 피브릴 형성과 같은 여러 생화학적 기능에 중요한 역할을 하기 때문에 상기 형광 펩타이드 센서와 구리 및 아연 이온 간의 결합 상수를 측정하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<65> 도 2의 구리에 대한 형광 펩타이드 센서의 검정 곡선에 나타난 바와 같이, GG2의 형광 세기는 10 μM 구리에 의해 최대값에 도달한 것을 볼 수 있다. Job plot 분석법을 통해 GG2의 화학양론을 분석할 수 있다. [Chang, C. T.; Wu, C.-S. C.; Yang, J. T. *Anal. Biochem.* **1978**, 91] 형광이 완벽하게 감소한 지점은 0.5 mole 부분을 가리키는데 이것은 GG2와 구리 이온이 1:1 복합체를 이루고 있다는 것을 의미한다. 결합상수는 형광 검정 곡선을 통해 ENZFITTER 프로그램을 이용하여 계산한 결과 $4.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 을 얻었다.

<66> 도 3는 10 mM HEPES 완충 용액 (pH 7.4)안에서 아연 이온의 농도에 따른 PG2의 형광 변화가 측정된 결과이다. 형광 방출 스펙트럼의 형광 세기는 아연 이온의 농도가 증가함에 따라 현저하게 증가하는 것을 볼 수가 있다. 대략 9 μM의 아연 이온이 첨가 되었을 때, 형광의 세기가 최대 점에 도달하였고, Job plot 분석법을 통하여 아연 이온과 PG2는 마이크로 몰라(micro molar) 범위 안에서 1:1 복합체를 형성하는 것을 알 수 있다. 결합상수는 구리에 대한 형광 펩타이드 센서의 검정 곡선을 통해 ENZFITTER 프로그램을 이용하여 계산한 결과 $6.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 을 얻었다.

<67> 도 4는 10 mM HEPES 완충 용액 (pH 7.4)안에서 아연 이온의 농도에 따른 PG1의 형광 변화가 측정된 결과이다. PG2와 달리 형광 방출 스펙트럼의 형광 세기는 아연 이온의 농도가 증가함에 따라 증가하지만, 구리 이온이 증가할 경우 형광이 감소되는 효과를 발견하였다. Job plot 분석법을 통하여 아연 이온 및 구리 이온은 PG1과 1:1 복합체를 형성하는 것을 알 수 있다. 결합상수는 구리에 대한 형광 펩타이드 센서의 검정 곡선을 통해 ENZFITTER 프로그램을 이용하여 계산되었고, 도 9에 요약되어 있다.

<68> 또한, 표 2의 화합물에 대해서 아연과 구리 이온의 선택성과 Ka값을 확인한 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

서열번호	화학식	금속이온 선택성	Ka(M ⁻¹)
9	Dansyl-Cys-Pro-Gly-His-Glu-CONH ₂	Zn(II)	690000
		Cu(II)	4000000
10	Dansyl-His-Pro-Gly-Cys-Glu-CONH ₂	Zn(II)	460000
		Cu(II)	500000

11	Dansyl-Cys-His-Pro-Gly-Glu-CONH ₂	Zn(II)	620000
		Cu(II)	1000000
12	Dansyl-Glu-Pro-Gly-Cys-His-CONH ₂	Zn(II)	220000
		Cu(II)	430000
13	Dansyl-His-His-Pro-Gly-Glu-CONH ₂	Zn(II)	710000
		Cu(II)	920000

<70> 상기 펩타이드들은 모두 구리 아연이온에 대해 강한 선택성과 형광 변화를 보여주면 결합모드는 1:1이었다. 상기 화합물 각각의 검정곡선은 나타내지 않았다.

<71> 1-3. pH에 따른 형광 펩타이드센서와 금속이온의 형광 적정 실험

<72> 구리 이온과 아연이 존재할 경우 pH 변화에 따른 형광 펩타이드 센서의 형광 변화를 측정하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<73> 도 5는 pH 5.5 이하에서 금속에 대한 형광 펩타이드 센서의 형광 방출 스펙트럼을 나타낸 그림이다. 여기서 형광의 세기는 매우 약한 것을 알 수 있는데 이것은 아마도 Dansyl 그룹의 다이메틸아미노 그룹(dimethylamino group) ($pK_a \sim 4$)이 양자화(protonation)되어있기 때문일 것이다. 6.5 이상의 pH에서 GG2의 형광세기는 pH가 증가함에 따라 증가하지만, GG2-구리 이온 복합체는 pH 3.5에서 10.5 사이의 영역에서 매우 약한 형광을 나타낸다. 6.5 이상의 pH에서 PG1과 PG1-아연 이온 복합체의 차이는 pH가 증가함에 따라 각각의 형광 세기가 증가하기 때문에 형광의 차이는 별로 없다. 그러나 PG1-구리 이온 복합체의 경우 전 영역의 pH 즉, pH 3.5에서 11.5 약한 형광 세기를 나타내기 때문에 PG1과 PG1-구리 이온 복합체는 많은 차이를 나타낸다. PG2와 PG2-아연 이온 복합체의 형광 차이는 pH 9.5에서 최대로 나타났다. pH 9.5에서 PG2-아연 이온 복합체의 형광 세기가 PG2의 형광 세기보다 약 4배 이상 강하게 나타났다.

<74> 전체적으로 이 결과를 놓고 볼 때 상기의 형광 펩타이드 센서들은 약산성 pH 내지 염기성 pH, 바람직하게는 pH 6.5 ~ 12, 더욱 바람직하게는 pH 7 ~ 11에서 구리 이온과 아연 이온을 검출하는데 아주 유용한 도구로 판명되었다.

<75> 1-4. 다른 금속 존재 시 형광 펩타이드센서와 구리 이온 및 아연 이온의 형광 적정 실험

<76> 일반적으로 생체 내에서 1족 과 2족 금속 원소들은 밀리 몰(mM) 농도 범위로 존재하는데 비해 전위 금속들은 상대적으로 낮은 농도로 존재한다고 알려져 있다. 따라서 상기의 형광 펩타이드 센서가 그러한 조건에서도 잘 작동하는지 여부를 판명하기 위해서 하기와 같은 실험을 실행하였다.

<77> 생체 내와 비슷한 조건을 만들기 위해서 다음과 같은 조건을 가지고 실험을 하였다. 1 eq GG2-구리 이온 복합체, PG1-아연 이온 복합체, 그리고 PG2-아연 이온 복합체가 들어 있는 10 mM HEPS 완충 용액 (pH 7.4)에 1 eq 전위 금속 혹은 100 eq 1족 및 2족 금속 이온을 첨가한 후, 형광 변화를 측정하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, CG2-구리 이온 복합체는 다른 어떤 금속들에게 영향을 받지 않았다. PG1-아연 이온 복합체의 경우 역시 구리 이온을 첨가했을 때를 제외하고는 형광의 변화가 미미하였다. 도 9에 나타난 바와 같이 PG1은 아연 이온 보다는 구리 이온과 더 잘 결합하는 것으로 밝혀졌다. PG2-아연 이온 복합체의 경우는 구리 이온을 첨가했을 때 역시 형광이 증가하였는데 이것은 그동안 알려져 왔던 구리 이온으로 인한 Dansyl 그룹과 이미다졸 그룹이 포함되어 있는 형광 화학/펩타이드 센서들의 형광 소광 현상을 극복한 것이고, 결론적으로 다른 금속 이온이 존재할 경우에도 GG2, PG2, 그리고 PG1은 구리 이온과 아연 이온을 효과적으로 검출할 수 있는 형광 펩타이드 센서로 판명되었다.

<78> <실험예 2> 실시예 2에서 합성된 PEG-폴리 스타일렌 수지에 고정화된 형광 펩타이드와 중금속 이온들의 결합에 따른 형광 변화 관찰

<79> 2-1. 수지에 고정화된 형광 펩타이드 센서와 중금속 이온들의 결합에 따른 형광 변화 실험

<80> PEG-폴리 스타일렌 수지에 고정화된 형광 펩타이드 물에 잘 팽윤되지만 교반을 하지 않는 경우 쉽게 침전에 되므로 형광 변화 측정시 마그네틱 교반기로 잘 교반 하는 것이 중요하다. 모든 형광변화는 마그네틱교반기가 장착된 형광분광광도계 (ParkinElmer LS 55 Luminescence Spectrometer)를 사용하고, 형광 방출 스펙트럼은 330nm에서 여기(excitation) 시켜서 350nm부터 650nm의 영역을 관찰하였다. 실험에는 Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} ,

Pb^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , and Zn^{2+} perchlorate salts (과염소산염형태)와 Na^{+} , Al^{3+} , K^{+} chloride salts (염소산염 형태)를 이온으로 사용하였다. 우선 10mM HEPES 완충 용액 (pH 7.4) 2 ml에 PEG-폴리 스타일렌 수지에 고정화된 형광 펩타이드 **PG1**, 그리고 **PG2** (각 100 nmol)을 넣고 각 금속이온 (1 eq.)들을 첨가한 다음, 30분 후 형광 방출 스펙트럼을 관찰한 것이다.

<81> 도 12에서 보면, PEG-폴리 스타일렌 수지에 고정화된 형광 펩타이드 **PG1** (Dansyl-Cys-Gly- Gly-His-Pro-Gly-Glu-NH₂)은 수지에 고정화 되지 않은 펩타이드와 동일하게 구리와 아연 이온을 제외하고 어떠한 중금속 이온에서도 형광이 변화되지 않았다. 아연 이온을 첨가했을 때 형광이 증가하는 반면, 구리 이온을 첨가했을 경우에는 형광이 감소하였다.

<82> 도 13에서 보면, PEG-폴리 스타일렌 수지에 고정화된 형광 펩타이드 **PG2** (Dansyl-Cys-Gly- Gly-His-Pro-Gly-Glu-NH₂)은 수지에 고정화 되지 않은 펩타이드와 동일하게 아연과 카드뮴 이온을 제외하고 어떠한 금속 이온에서도 형광이 변화되지 않았다. 아연과 카드뮴 이온을 첨가했을 때 형광이 증가하였다.

<83> <실험예 3> Circular dichroism 을 이용한 펩타이드의 이차원 구조 분석

<84> 형광 펩타이드를 최종 농도가 150 mg/mL이 되도록 10 mM HEPES buffer (pH 7.4)에 녹인 후 1 mm pathlength cell에 넣은 후 Jasco J-715 spectropolarimeter (Tokyo, Japan)를 이용하여 190 nm부터 300 nm사이의 circular dichroism 스펙트럼을 상온에서 측정하였다. 또한 동일한 형광 펩타이드 용액에 1당량에 해당하는 아연이또는 구리 금속이온을 첨가한 후 30 분 후에 1 mm pathlength cell에 넣은 후 Jasco J-715 spectropolarimeter (Tokyo, Japan)를 이용하여 190 nm부터 300 nm사이의 circular dichroism 스펙트럼을 상온에서 측정하였다. CD 스펙트럼은 mean residue ellipticity로 표현하였다.

<85> 도면 14을 보면 GG2의 경우 205 nm에서와 215 nm에서 가장 낮은 mean residue ellipticity을 보이며 GG2 펩타이드는 무작위 구조 또는 약간의 병풍 구조를 가짐을 나타낸다. 이에 반하여 PG1의 경우, 230 nm에서 강한 negative band를 보이며 이는 PG1이 꺾임 구조를 가지고 있음을 나타내며 PG2 또한 225 nm에서 꺾임 구조의 특징적인 positive band를 225 nm에서 보여준다. PG1과 PG2의 이러한 구조는 그 일차원 구조에 꺾임 구조를 가지는 Pro의 역할이 중요함을 나타내며 이러한 꺾임 구조를 가지는 펩타이드는 공통적으로 아연이온과 결합하여 형광 증폭을 가질 수 있음을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

<86> 도 1은 10mM HEPS 완충 용액 (pH 7.4)에서 형광 펩타이드 센서 -GG2, PG2, 및 PG1- (10 μM)에 1 당량의 구리 이온, 아연 이온 및 여러 금속 이온 (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ag^{+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Na^{+} , Al^{3+} , 및 K^{+})을 가하였을 때 형광 변화를 나타낸 그래프이고,

<87> 도 2는 10mM HEPS 완충 용액 (pH 7.4)에서 구리 이온에 대한 GG2(10 μM)의 형광 검정 곡선 및 Job plot analysis를 나타낸 그래프이고,

<88> 도 3은 10mM HEPS 완충 용액 (pH 7.4)에서 아연 이온(위) 및 구리 이온(아래)에 대한 PG1(10 μM)의 형광 검정 곡선 및 Job plot analysis를 나타낸 그래프이고,

<89> 도 4는 10mM HEPS 완충 용액 (pH 7.4)에서 아연 이온에 대한 PG1(10 μM)의 형광 검정 곡선 및 Job plot analysis를 나타낸 그래프이고,

<90> 도 5는 1당량의 구리 이온 혹은 아연 이온 존재 시 여러 pH상에서 형광 펩타이드 센서(10 μM)의 형광 방출 스펙트럼을 나타낸 그래프이고,

<91> 도 6은 1 당량의 GG2-구리 이온 복합체가 들어 있는 10 mM HEPS 완충 용액 (pH 7.4)에 1 당량의 전위 금속 혹은 100 당량의 1족 및 2족 금속 이온을 첨가한 후, 발생하는 형광 방출 스펙트럼을 나타낸 그래프이고,

<92> 도 7은 1 당량의 PG1-아연 이온 복합체가 들어 있는 10 mM HEPS 완충 용액 (pH 7.4)에 1 당량의 전위 금속 혹은 100 당량의 1족 및 2족 금속 이온을 첨가한 후, 발생하는 형광 방출 스펙트럼을 나타낸 그래프이고,

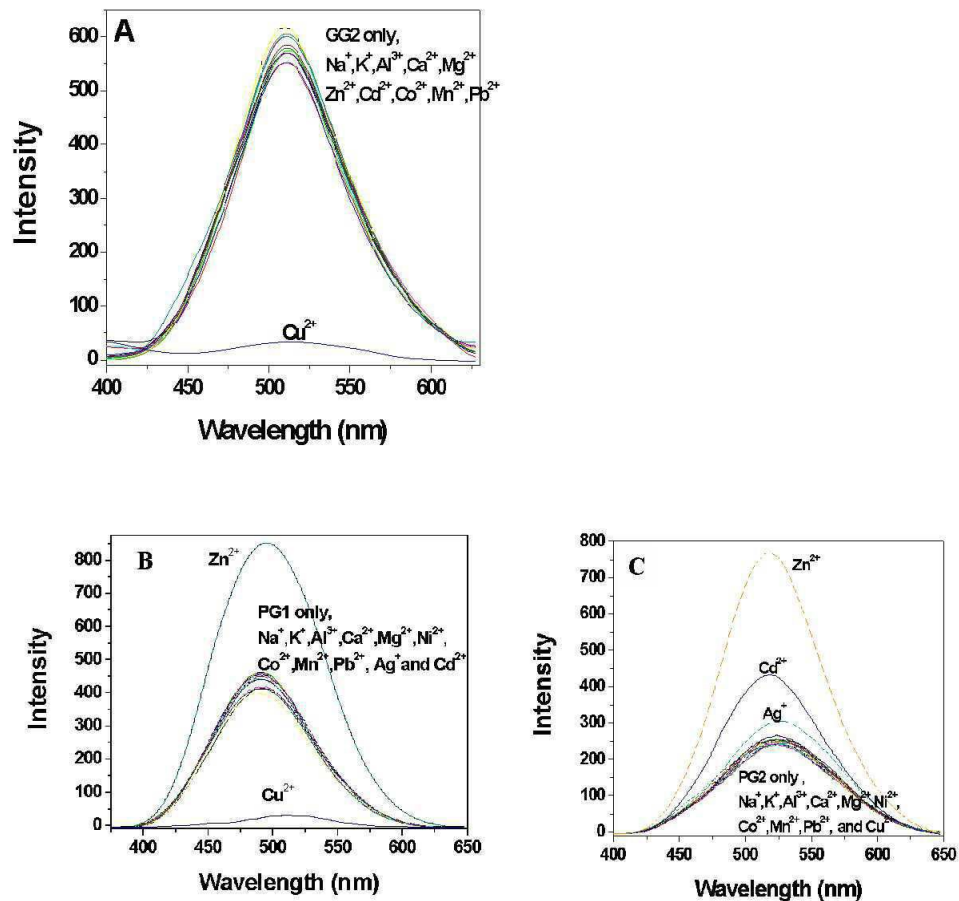
<93> 도 8은 1당량의 PG2-아연 이온 복합체가 들어 있는 10 mM HEPS 완충 용액 (pH 7.4)에 1 당량의 전위 금속 혹은 100 당량의 1족 및 2족 금속 이온을 첨가한 후, 발생하는 형광 방출 스펙트럼을 나타낸 그래프이고,

<94> 도 9는 각각의 형광 펩타이드 센서의 서열, 구리 혹은 아연 이온과의 결합상수 및 오차를 나타내는 표이고,

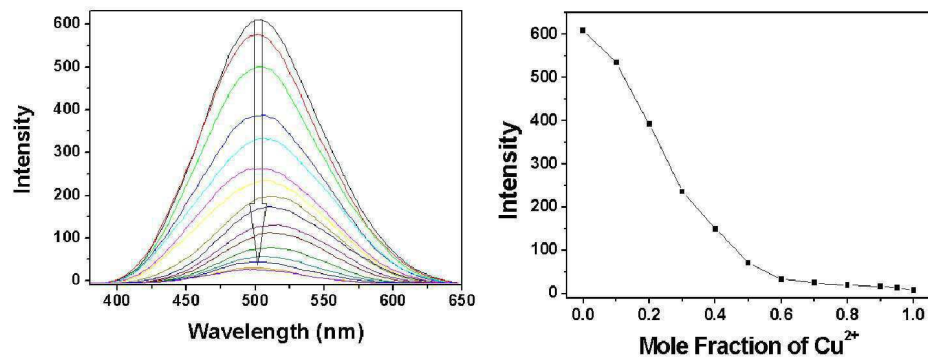
- <95> 도 10은 합성된 각각의 형광 펩타이드 센서의 종류, 서열, HPLC 및 질량 분석결과를 나타내는 표이고,
- <96> 도 11은 합성된 각각의 고체상 형광 펩타이드 센서의 종류, 서열, HPLC 및 질량 분석결과를 나타내는 표이고,
- <97> 도 12는 PEG-폴리 스타일렌 수지에 고정화된 형광 펩타이드 **PG1 (100 nmol)**을 10mM HEPS 완충 용액 (pH 7.4)에 넣은 후 교반 하며 1 당량의 구리 이온, 아연 이온 및 여러 금속 이온 (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ , Al^{3+} , 및 K^+)을 가한 후 30분 후에 형광 변화를 나타낸 그래프이고,
- <98> 도 13은 PEG-폴리 스타일렌 수지에 고정화된 형광 펩타이드 **PG2 (100 nmol)**을 10mM HEPS 완충 용액 (pH 7.4)에 넣은 후 교반 하며 1 당량의 구리 이온, 아연 이온 및 여러 금속 이온 (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Na^+ , Al^{3+} , 및 K^+)을 가한 후 30분 후에 형광 변화를 나타낸 그래프이고,
- <99> 도 14는 형광 펩타이드 (GG2, PG1, PG2)를 각각 최종 농도가 150 mg/mL이 되도록 10 mM HEPES buffer (pH 7.4)에 녹인 후 1 mm pathlength cell에 넣은 후 Jasco J-715 spectropolarimeter (Tokyo, Japan)를 이용하여 190 nm부터 300 nm사이의 circular dichroism 스펙트럼이다.

도면

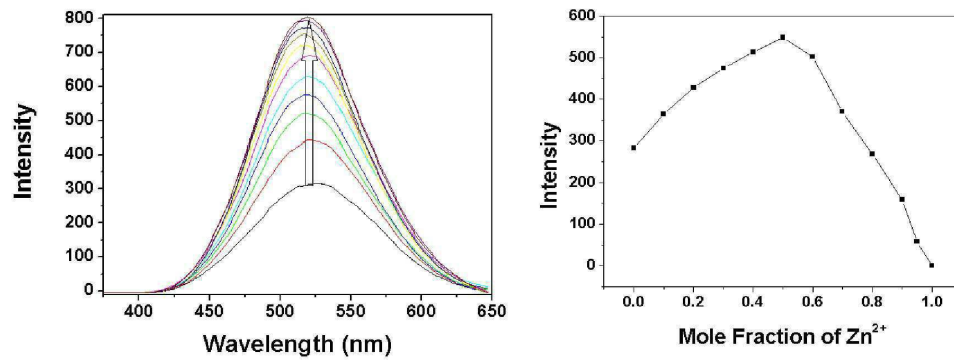
도면1



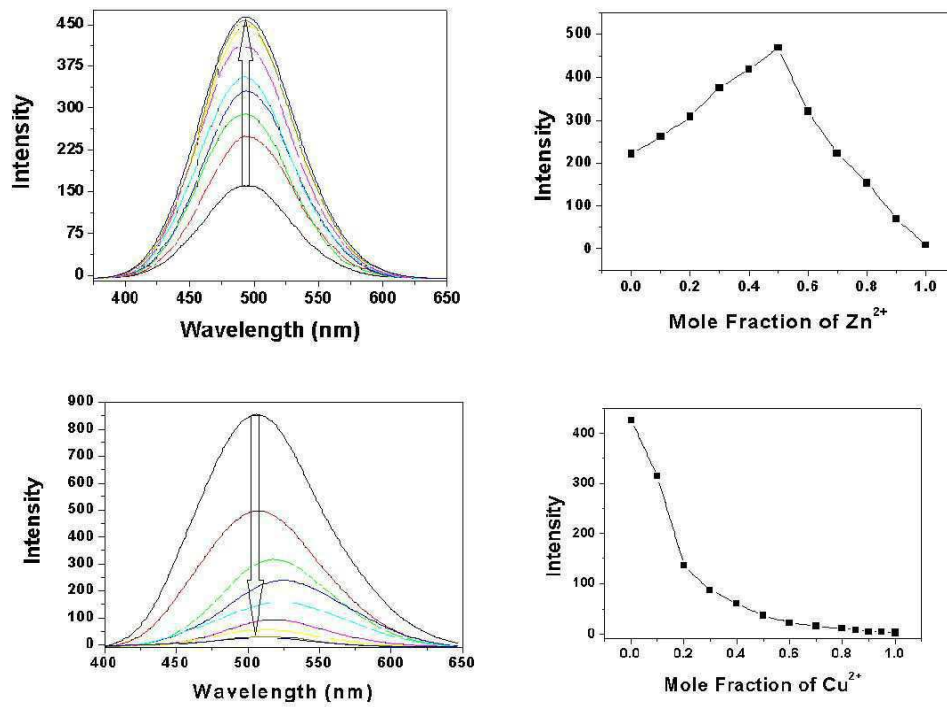
도면2



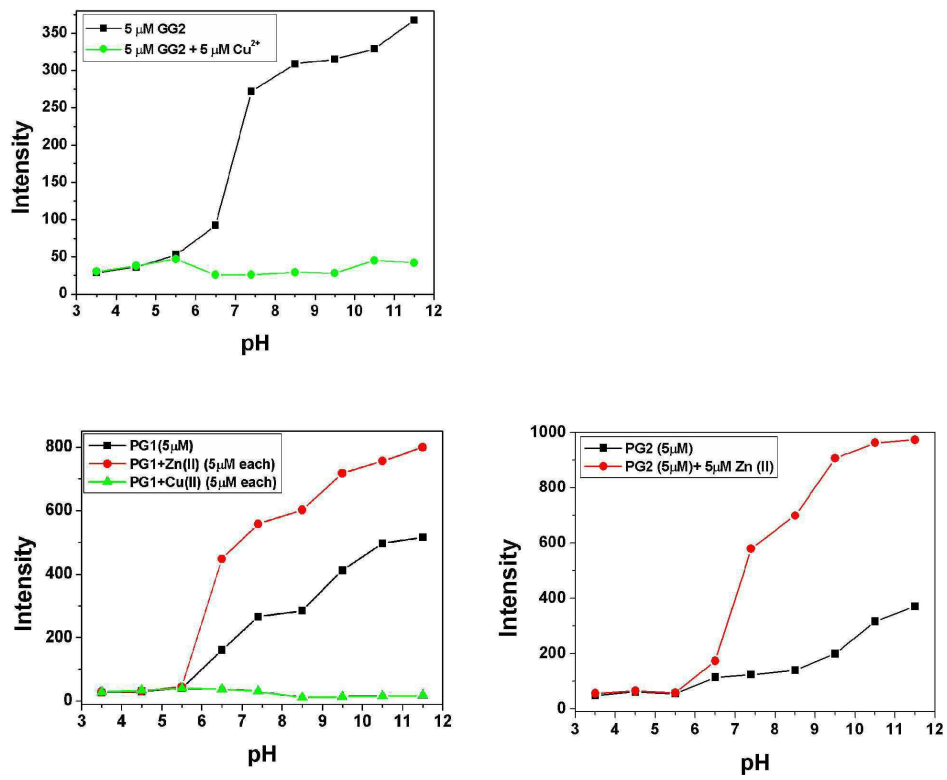
도면3



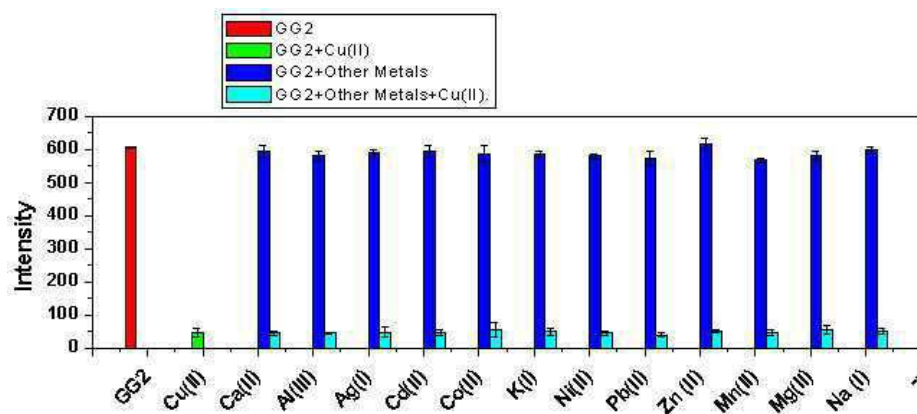
도면4



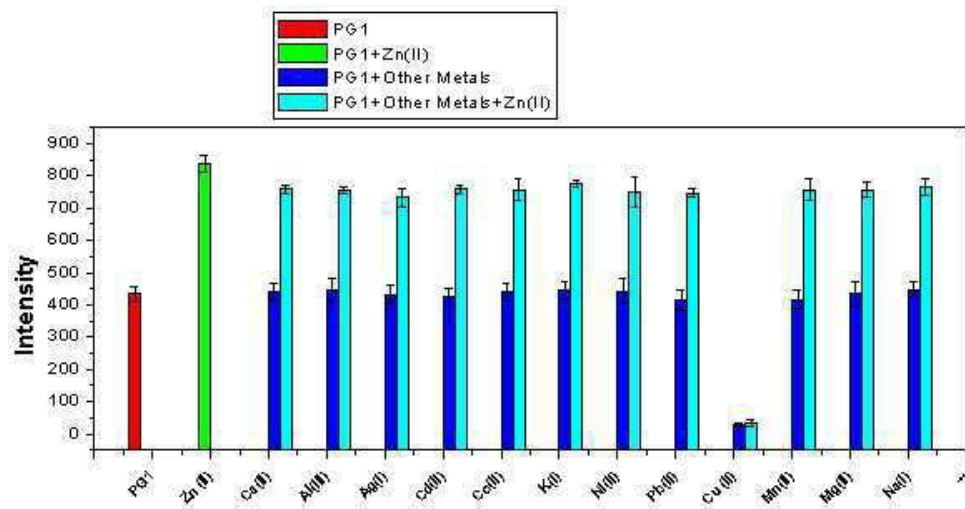
도면5



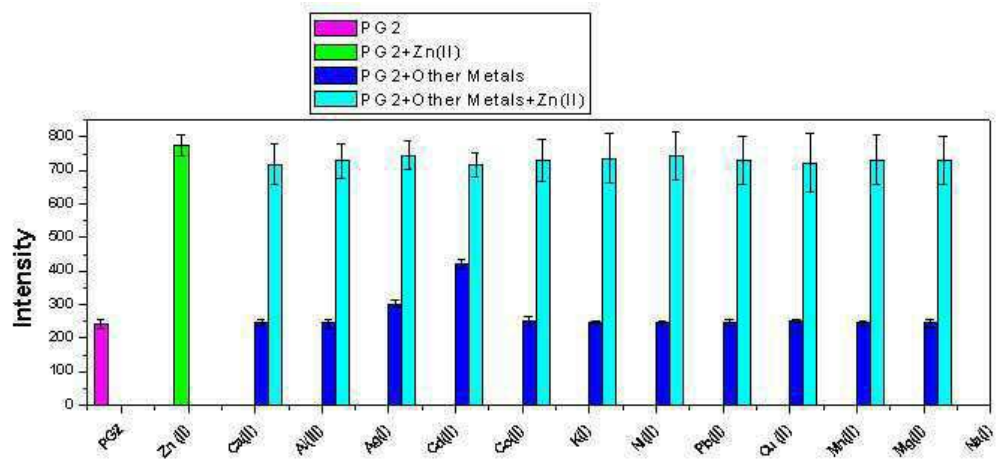
도면6



도면7



도면8



도면9

Name	sequence	metal ion	K _a Value 1:1(M ⁻¹)	Error %
GG2	Dan-CGGHGGE-NH ₂	Cu (II)	4.2×10 ⁻⁶	12.5
PG2	Dan-CPGHPGE-NH ₂	Zn (II)	6.0×10 ⁻⁶	14.3
PG1	Dan-CGGHPGE-NH ₂	Cu (II)	8.3×10 ⁻⁷	14.5
PG1	Dan-CGGHPGE-NH ₂	Zn (II)	1.13×10 ⁻⁶	14.4

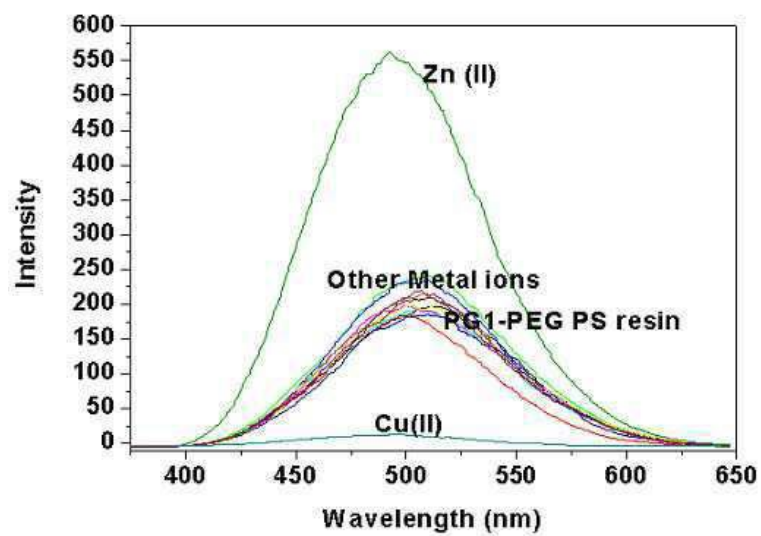
도면10

S.No.	Sequence	HPLC Retention time (Min.)	Calculated Mass	Observed Mass
GG2	Dan-CGGHGGE-NH ₂ .	27.5	848.48	848.60
PG2	Dan-CPGHPGE-NH ₂ .	25.77	928.26	928.79
PG1	Dan-CGGHPGE-NH ₂ .	22.37	888.24	888.47

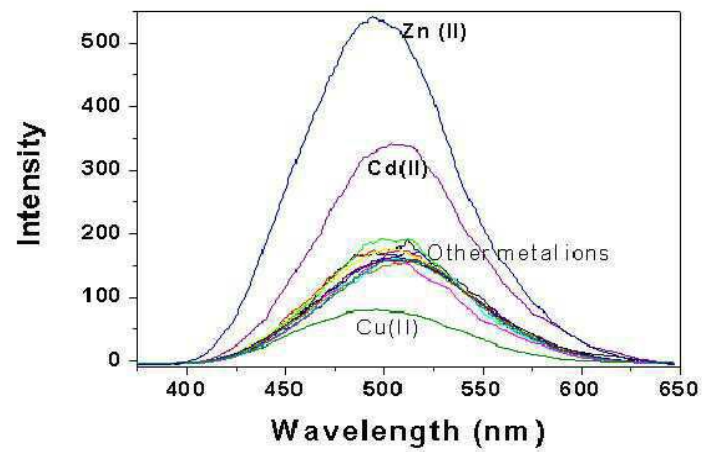
도면11

S.No	Sequence	HPLC retention time(min)	Calculated mass (M+H ⁺)	Observed mass(M+H ⁺)
PG1	Dan-CGGHPGE-CONH-PEG-Resin	24.22	888.24	887.92
PG2	Dan-CPGHPGE-CONH-PEG-Resin	28.07	928.26	927.90
GG2	Dan-CGGHGGE-CONH-PEG-Resin	20.97	848.48	848.60

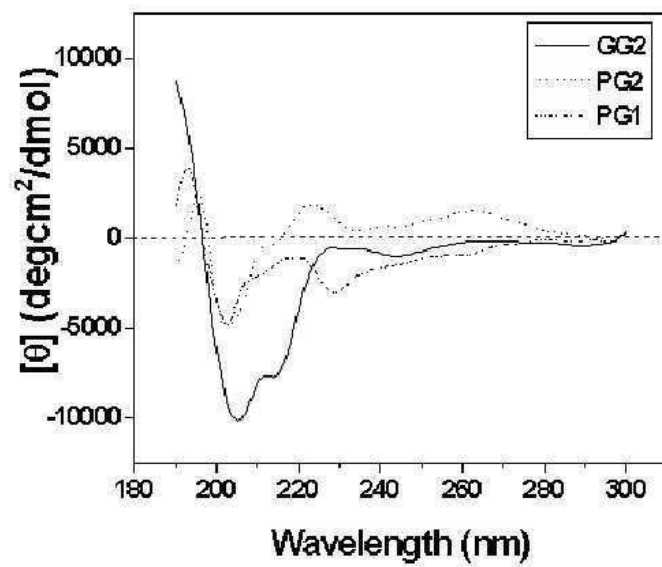
도면12



도면13



도면14



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Fluorescent peptide probe for selective detection copper or zinc ion, and preparation method thereof
- <160> 13
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 7
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper or zinc ion

<400> 1

Cys Gly Gly His Gly Gly Glu
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper or zinc ion

<400> 2

Cys Pro Gly His Gly Gly Glu
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper or zinc ion

<400> 3

Cys Gly Gly His Pro Gly Glu
1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper
 or zinc ion

<400> 4
 Cys Pro Gly His Pro Gly Glu
 1 5

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper
 or zinc ion

<400> 5
 Cys Gly Pro His Gly Pro Glu
 1 5

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper
 or zinc ion

<400> 6
 Cys Gly Pro His Gly Gly Glu
 1 5

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper
 or zinc ion

<400> 7
 Cys Gly Gly His Gly Pro Glu
 1 5

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper
 or zinc ion

<400> 8
 Cys Gly Pro His Gly Pro Glu
 1 5

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper
 or zinc ion

<400> 9
 Cys Pro Gly His Glu
 1 5

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper

or zinc ion

<400> 10
His Pro Gly Cys Glu
1 5

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper
or zinc ion

<400> 11
Cys His Pro Gly Glu
1 5

<210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper
or zinc ion

<400> 12
Glu Pro Gly Cys His
1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptidyl template of peptidyl fluorescent chemosensor for copper
or zinc ion

<400> 13
His His Pro Gly Glu
1 5