(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0022396
(43) 공개일자 2015년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/37* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0100184
(22) 출원일자 2013년08월23일
심사청구일자 2013년08월23일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이택승
대전광역시 유성구 배울2로 78, 611동 2001호 (관평동,대덕테크노밸리6단지아파트)
노재국
충청남도 논산시 대화로33번길 15-3
(74) 대리인
김홍균

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **형광 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 복합체를 이용한 트립신의 선택적 검출방법**

(57) 요 약

본 발명은 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 간의 에너지 전이에 의한 형광강도가 변하는 원리를 바탕으로 트립신이 고분자 나노입자 표면에 도입된 폴리펩타이드를 분해하는 것을 이용하여 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드의 상호작용을 제어함으로써 수용액 상에서 트립신을 선택적으로 형광을 검출하는 방법에 관한 것이다.

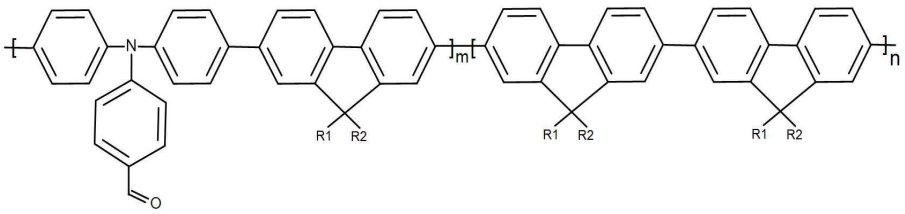
또한, 공액화 고분자 화합물을 이용하여 고분자 나노입자를 제조한 후 표면에 폴리펩타이드를 도입하여 그래핀 옥사이드와의 복합체 형성을 통하여, 수용액상에서 특정 바이오물질에 대한 인지물질로 사용할 수 있으며, 화학센서 및 바이오센서로 다양하게 사용할 수 있고, 진단, 의학연구, 임상실험, 화학분석 등에 널리 사용될 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 공액화 고분자 화합물을 이용하여 재침전법으로 제조된 고분자 나노입자에서 상기 고분자 나노입자의 표면에 특정 단백질 분해효소에 의하여 분해되며 전하를 갖는 폴리펩타이드를 도입시켜 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 간 상호작용에 의하여 서로 결합함으로써 고분자 나노입자의 형광이 감쇄되는 것을 특징으로 하는 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 복합체를 포함하여 이루어진 센서.

[화학식 1]



[상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 직쇄 또는 분지쇄의 C_1 내지 C_8의 알킬기이고, m, n은 몰분율로, m은 0.05 내지 0.7의 실수이고, n은 1-m이다.]

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 C_1 내지 C_8의 알킬기는 서로 독립적으로 메틸, 에틸, i-프로필, n-프로필, i-부틸, n-부틸, t-부틸, n-펜틸, i-펜틸 또는 n-헥실, 헵틸 또는 옥틸 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 복합체를 포함하여 이루어진 센서.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 공액화 고분자 화합물은 수평균 분자량이 3,000 내지 100,000인 것을 특징으로 하는 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 복합체를 포함하여 이루어진 센서.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 폴리펩타이드가 표면에 도입된 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 복합체는 형광광도계를 이용하여 단백질 분해효소를 선택적으로 검출하는 것을 특징으로 하는 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 복합체를 포함하여 이루어진 센서.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 단백질 분해효소는 트립신인 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 6

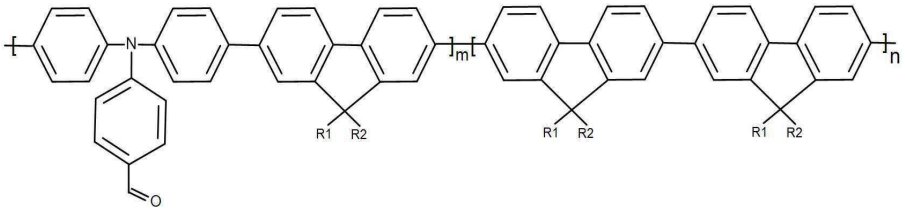
하기 화학식 1로 표시되는 공액화 고분자 화합물을 제조하는 단계;

공액화 고분자 화합물을 이용하여 재침전을 이용하여 고분자 나노입자를 제조하는 단계;

상기 고분자 나노입자의 표면에 폴리펩타이드를 도입시키는 단계; 및

표면에 폴리펩타이드가 도입된 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 간 상호작용에 의하여 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드가 서로 결합하여 고분자 나노입자의 형광이 감쇄되는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 복합체를 포함하여 이루어진 센서의 제조방법.

[화학식 1]



[상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 직쇄 또는 분지쇄의 C_1 내지 C_8의 알킬기이고, m, n은 몰분율로, m은 0.05 내지 0.7의 실수이고, n은 1-m이다.]

청구항 7

폴리펩타이드가 도입된 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드가 상호작용에 의해 결합된 복합체로 이루어진 센서를 이용하여 단백질 분해효소가 상기 폴리펩타이드를 분해함으로써 상기 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드가 분리되어 상기 고분자 나노입자의 형광이 회복되는 것을 특징으로 하는 단백질 분해효소의 형광 검출방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 단백질 분해효소는 트립신인 것을 특징으로 하는 단백질 분해효소의 형광 검출방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 형광 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 복합체를 이용한 트립신의 선택적 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 간의 에너지 전이에 의한 형광강도가 변하는 원리를 바탕으로 트립신이 고분자 나노입자 표면에 도입된 폴리펩타이드를 분해하는 것을 이용하여 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드의 상호작용을 제어함으로써 수용액 상에서 트립신을 선택적으로 형광을 검출하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현대 사회의 현대인들은 많은 질병에 직·간접적으로 노출되어 있다. 그로 인하여 다양한 질병을 신속 정확하게 분석할 필요가 있다. 이러한 분석에는 특정 질병을 선택적으로 감지할 수 있는 바이오 센서 물질들이 사용되며, 센서의 일반적인 감지 신호는 전기, 저항, 전위차 등의 전기적 성질이나 색채, 형광 등의 광학적 성질을 이용한다. 이중에서 색의 변화 및 형광의 변화는 육안으로 쉽게 판별이 가능하므로 특별한 장비가 없어도 측정이 용이한 방법 중의 하나이다. 특히, 색채 및 형광의 변화를 나타내는 센서로는 공액화 고분자가 일반적으로 사용되어지는 추세이다.

[0003] 분석 화학에 있어 공액화 고분자의 사용은 정성적, 정량적 측면에서 발전을 가져왔다. 그 이유는 환경의 변화에 따라 공액화 고분자의 기본적 특성이 변화를 가져오기 때문이다. 특히 분자나 이온 인식기능을 가진 공액화 고분자가 표적을 인식하여 산화-환원의 전위차, 흡수나 발광 스펙트럼의 변화를 가져오면 센서로서의 응용이 가능하다. 센서로의 다양한 응용 중에서도 색변이 유도체 화합물들을 센서에 사용하려는 연구가 진행되고 있다. 최근 화학 및 바이오 분야의 응용을 위한 색변이 및 전기화학적, 또는 광 응답을 통하여 이온을 인식할 수 있는 분자들에 대하여도 많은 연구가 이루어지고 있다. 그런데, 기존의 형광 응답 신호의 변화를 이용한 센서재료는 감지물질 응답특성에 있어서는 뛰어난 응답을 보이지만, 외부에서 형광응답 신호를 인식하기 위하여 추가로 인식기기가 필요하므로, 최근에는 사용 목적에 따라 인간의 눈으로 식별이 가능한 색변이 유도체 화합물들이 많이 연구되는 추세이다(A. P. De silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, Chem. Rev. 97, 1515-1566, 1997; D. Esteban-Gomez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, J. Org. Chem. 70, 5717-5720, 2005).

[0004] 공액화 고분자 화합물을 이용하여 제조한 고분자 나노입자는 감지시약, 바이오센서, 광전자장치 물질 등과 같은 분야에서 다기능적인 나노크기의 물질로서 사용된다. 이러한 고분자 나노입자는 공액화 고분자를 설계 합성하고, 고분자 나노입자의 표면처리를 통하여 요구분야에 맞게 사용할 수 있다. 고분자 나노입자는 제조하기 쉽고, 특성의 조작이 간단하고, 독성도 양자점에 비교하여 현저히 떨어지므로, 바이오센서로 사용하기 적합하다. 뿐만 아니라 고분자 나노입자는 높은 형광 양자수율을 가지며, 크기조절이 용이하여 많은 응용분야에 사용된다(J. Pecher, S. mecking, Chem. Rev. 110, 6260-6279, 2010; D. Tuncel, H. V. Demir, Nanoscale, 2, 484-494, 2010; S. N. Clafton, D. A. Beattie, A. Mierczynska-Vasilev, R. G. Acres, A. C. Morgan, T. W. Kee, Langmuir, 26, 17785-17789, 2010; C. Wu, Y. Jin, T. Schneider, D. R. Burnham, P. B. Smith, D. T. Chiu, Angew. Chem. Int. Ed. 49, 9436-9440, 2010).

[0005] 그래핀 옥사이드는 2차 구조를 갖는 탄소물질로 기계적/열적 우수성으로 인하여 많은 관심을 받고 있는 물질이다. 특히 생물학적인 응용에 많은 가능성을 가지고 있는 물질이다. 그래핀의 산화 형태인 그래핀 옥사이드는 물에 잘 분산되고 나노크기의 에너지 전이 특성을 나타내며, 특히 형광 물질과 결합하여 물질의 형광을 감소시키는 기능을 한다(X. Gu, G. Yang, G. Zhang, D. Zhang, D. Zhu, ACS Appl. Mater. Interfaces, 3, 1175-1179, 2011; C. Shan, H. Yang, D. Han, Q. Zhang, A. Ivaska, L. Niu, Langmuir, 25, 12030-12033, 2009).

[0006] 한편, 본 발명의 검출대상 물질인 트립신은 분자량이 약 24,000Da인 단백질 분해효소의 하나로서, 췌장액 중에 함유되며 염기성 아미노산을 많이 함유하는 폴리펩타이드의 분해에 적용한다. 췌장에서 분비될 때는 불활성의 트립신 전구체인 트립시노겐이지만, 장의 엔터로키나아제 및 트립신 자체의 작용으로 인해 활성 트립신으로 전환되며, 단백질의 소화에 있어서 펩신과 함께 가장 중요한 효소이다. 위에서 펩신에 의하여 가수분해된 펩타이드는 소장에서 키모트립신과 트립신에 의하여 더 가수분해되어 작은 펩타이드 파편이 된다. 또 트립신은 펩타이드 사슬을 끊는 엔도펩디다아제의 하나로 특이성이 높고, 아르기닌 또는 라이신의 펩타이드 에스테르의 카르복시기쪽을 가수분해한다고 알려져 있다 (Q. Zhu, R. Zhan, B. Liu, Macromol. Rapid. Commun. 31, 1060-1064, 2010; L. An, L. Liu, S. Wang, Biomacromolecules, 10, 454-457, 2009; J. H. Wosnick, C. M. Mello, T. M. Swager, J. Am. Chem. Soc. 127, 3400-3405. 2005; X. Gu, G. Yang, G. Zhang, D. Zhang, D. Zhu, ACS Appl. Mater. Interfaces, 3, 1175-1179, 2011).

[0007] 상기와 같은 폴리아르기닌 또는 폴리라이신과 같은 염기성 아미노산이 많은 폴리펩타이드의 분해에 의하여 트립신을 검출하려는 실험은 주로 저분자 또는 수용성 공액화 고분자 물질을 이용하여 많이 시도되었다. 특히 수용액 상에서 형광의 변화를 이용하여 감지하려는 방법은 많이 시도되었으나, 형광의 미세한 변화까지 측정하기에 많은 어려운 문제를 가지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

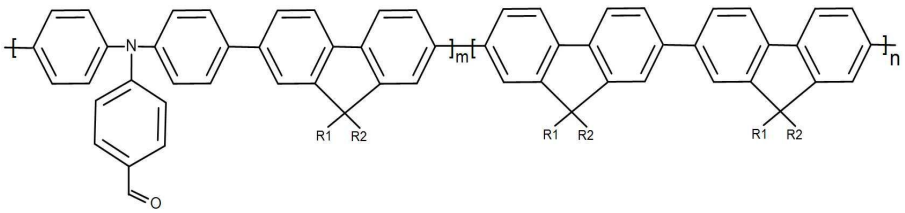
[0008] 본 발명은 상기한 바와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 첨가하는 트립신이 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 간 결합의 매개역할을 하는 폴리펩타이드를 분해하여 그래핀 옥사이드와 고분자 나노입자간의 상호작용이 없어지면서 형광이 다시 증가하는 턴-온(turn-on)방법으로 트립신을 검출하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 단백질 중에서 트립신만을 선택적으로 인지하여 형광강도가 변화함으로써 감지신호를 나타내는 화학센서 및 바이오센서로 응용이 가능한 공액화 고분자 나노입자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 적절한 실시 형태에 따르면, 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 복합체를 포함하여 이루어진 센서는 하기 화학식 1로 표시되는 공액화 고분자 화합물을 이용하여 재침전법으로 제조된 고분자 나노입자에서 상기 고분자 나노입자의 표면에 특정 단백질 분해효소에 의하여 분해되며 전하를 갖는 폴리펩타이드를 도입시켜 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 간 상호작용에 의하여 서로 결합함으로써 고분자 나노입자의 형광이 감쇄되는 것을 특징으로 한다.

[0011] [화학식 1]

[0012] 

[0013] [상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 직쇄 또는 분지쇄의 C_1 내지 C_8의 알킬기이고, m, n은 몰분율로, m은 0.05 내지 0.7의 실수이고, n은 1-m이다.]

[0014] 그리고, 상기 공액화 고분자 화합물의 C_1 내지 C_8의 알킬기는 서로 독립적으로 메틸, 에틸, i-프로필, n-프로필, i-부틸, n-부틸, t-부틸, n-펜틸, i-펜틸 또는 n-헥실, 헵틸 또는 옥틸 중 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한, 상기 공액화 고분자 화합물은 수평균 분자량이 3,000 내지 100,000이며, 상기 폴리펩타이드가 표면에 도입된 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 복합체는 형광광도계를 이용하여 단백질 분해효소를 선택적으로 검출하고, 상기 단백질 분해효소는 트립신인 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 복합체로 이루어진 센서 복합체의 제조방법은 상기 화학식 1로 표시되는 공액화 고분자 화합물을 제조하는 단계; 공액화 고분자 화합물을 이용하여 재침전법으로 제조된 고분자 나노입자를 제조하는 단계; 상기 고분자 나노입자의 표면에 폴리펩타이드를 도입시키는 단계; 및 표면에 폴리펩타이드가 처리된 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 간 상호작용에 의하여 서로 결합하여 고분자의 형광이 감쇄되는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 단백질 분해효소의 형광 검출방법은 폴리펩타이드가 도입된 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드가 상호작용에 의해 결합된 복합체로 이루어진 센서를 이용하여 단백질 분해효소가 상기 폴리펩타이드를 분해함으로써 상기 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드가 분리되어 상기 고분자 나노입자의 형광이 회복되는 것을 특징으로 하며, 상기 단백질 분해효소는 트립신인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0018] 이상에서 설명한 바와 같이 상기와 같은 구성을 갖는 본 발명의 센서는 공액화 고분자 화합물을 이용하여 고분자 나노입자를 제조한 후 표면에 폴리펩타이드를 도입하여 그래핀 옥사이드와의 복합체 형성을 통하여, 수용액 상에서 특정 바이오물질에 대한 인지물질로 사용할 수 있으며, 화학센서 및 바이오센서로 다양하게 사용할 수 있고, 진단, 의학연구, 임상실험, 화학분석 등에 널리 사용될 수 있다.

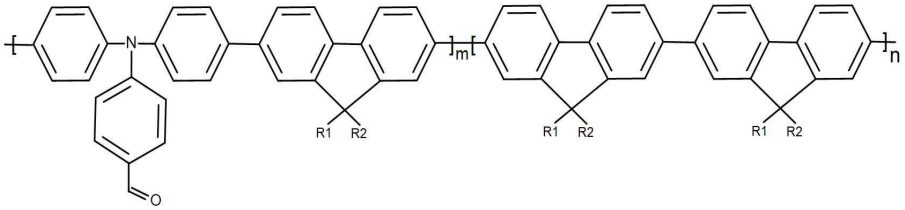
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 실시예를 참조하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 본 발명의 실시예 등에서 사용된 용어 등은 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시한 것에 불과할 뿐 본 발명의 청구범위가 이에 한정되어 해석되어서는 아니됨이 명

백하다.

[0020] 본 발명은 하기 화학식 1과 같은 알데하이드기가 도입되어 있는 공액화 고분자 화합물을 이용하여 공액화 고분자 나노입자를 제조한 후, 공액화 고분자 나노입자의 표면에 효소 단백질에 의해 분해되는 폴리펩타이드를 정전기적 인력에 의하여 도입하였다. 수용액 상에서 분산되어 있는 공액화 고분자 나노입자 표면의 폴리펩타이드가 그래핀 옥사이드와의 정전기적 상호작용에 의하여 결합을 하게 되어 복합체를 형성하며, 공액화 고분자 나노입자로부터 그래핀 옥사이드로의 에너지 전이에 의하여 형광이 감소된다. 그런데 트립신이 결합의 매개 역할을 하던 폴리펩타이드를 분해하여 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 간의 상호작용이 약화되면, 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드가 서로 떨어져 공액화 고분자 나노입자의 형광이 다시 증가하는 방법을 이용하는 것을 특징으로 한다.

[0021] [화학식 1]

[0022] 

[0023] [상기 화학식 1에서, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 직쇄 또는 분지쇄의 C_1 내지 C_8의 알킬기이고, m, n은 몰분율로, m은 0.05 내지 0.7의 실수이고, n은 1-m이다.]

[0024] 상기 C_1 내지 C_8의 알킬기는 서로 독립적으로 메틸, 에틸, i-프로필, n-프로필, i-부틸, n-부틸, t-부틸, n-펜틸, i-펜틸 또는 n-헥실, 헵틸 또는 옥틸 중 어느 하나이다.

[0025] 본 발명에 따른 공액화 고분자 화합물의 분자량은 원칙적으로 제한이 없으나, 수평균 분자량(Mn)으로 3,000 내지 100,000이 바람직하고, 그 용도에 요구되는 특성에 따라 그 범위를 적절히 조절하여 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 사용한 공액화 고분자 화합물과 공액화 고분자 화합물을 이용하여 만든 공액화 고분자 나노입자는 본 발명자에 의하여 출원된 대한민국 특허 출원번호 제2012-0106850호에 기재되어 있다.

[0027] 본 발명에서는 단백질을 보다 쉽고 빠르게 검출하기 위하여 화학식 1의 공액화 고분자 화합물로 고분자 나노입자를 제조하여 수용액상에서 더 쉽게 단백질의 감지가 가능한 장점을 가지고 있다. 트립신에 의해 분해되는 폴리펩타이드(폴리아르기닌, 폴리라이신)는 본 발명에 따른 화학식 1의 공액화 고분자로 제조한 고분자 나노입자 표면에 정전기적 인력에 의하여 도입된다. 이러한 나노입자 분산 수용액에 그래핀 옥사이드를 첨가하면, 두 물질간의 전하 차에 의해 결합을 하게 되어 복합체를 형성하게 된다. 이에 따라, 고분자 나노입자에서 그래핀 옥사이드로 에너지 전이가 일어나 복합체의 형광은 감소하게 된다. 이 복합체 수용액에 일정농도의 트립신을 가하면 트립신의 효소 작용에 의해 고분자 나노입자 표면의 폴리펩타이드가 분해되어, 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 간의 결합력이 저하되면서 고분자 나노입자의 형광을 억제하던 그래핀 옥사이드가 나노입자로부터 이탈됨으로써 고분자 나노입자 형광이 다시 증가하는 변화로 트립신을 감지할 수 있다.

[0028] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 예시적인 목적일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니며, 공액화 고분자와 이를 사용하여 재침전법으로 나노입자를 제조할 수 있는 모든 방법에 적용할 수 있다. 또한, 본 발명은 특정 효소에 의해 분해되는 폴리펩타이드를 공액화 나노입자의 표면에 도입한 후 상기 폴리펩타이드를 분해하는 모든 효소 단백질에 적용될 수 있다.

[0029] **[실시예 1] 알데하이드기를 포함한 공액화 고분자 화합물의 제조(화학식 1 R_1=R_2=$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)**

[0030] 4-(비스(4-브로모페닐)아미노)벤즈알데하이드 0.215g(0.5mmol)과 2,7-다이브로모-9,9-다이옥틸-9-플루오렌 0.274g(0.5mmol)과 9,9-다이옥틸플루오렌2,7-다이보로닉엑시드 비스(1,3-프로페인다이올)에스터 0.670g(1.2mmol)과 그리고 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 촉매 0.047g(0.04mmol)을 습기가 제거된 8mL의 톨루엔과 4mL의 2M K_2CO_3의 혼합용액에 용해시키고 90℃에서 40시간동안 환류하였다. 반응 후 상온으로 냉각하고 메탄올에 석출시킨 다음 석출물을 여과하였다. 여과하여 얻어진 석출물은 수평균 분자량이 10,000이상인 공액화 고분자 화합물이었다. 이를 원소분석한 결과 m은 50%의 몰분율을 차지하는 것을 알 수 있었다.

[0031] ^1H NMR(300 MHz, $CDCl_3$) δ=9.8(1H, 알데하이드기), 7.7~6.6(30H, 방향족), 4.2~3.7(12H, 알킬기), 3.7~3.3(36H, 알킬기), 3.0~2.6(24H, 알킬기), 2.1~1.7(12H, 알킬기), 1.6~1.0(18H, 알킬기)ppm

[0032] **[실시예 2] 알데하이드기를 포함한 공액화 고분자 화합물을 이용한 고분자 나노입자의 제조**

[0033] 상기 실시예 1에서 제조한 공액화 고분자 화합물을 1mg/mL의 농도로 1mL를 만든 후, 음파처리 하에서 12mL의 3차 증류수가 담긴 비커에 빠르게 주사기로 주입하면 재침전에 의해 구상의 고분자 나노입자가 제조된다. 상기의 방법을 통하여 만들어진 고분자 나노입자를 전자현미경으로 분석하여 본 결과, 농도에 따라 약 30-50nm의 직경을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0034] **[실시예3] 공액화 고분자 화합물로 만든 고분자 나노입자의 표면에 폴리아르기닌의 도입**

[0035] 상기 실시예 2에서 제조한 공액화 고분자 나노입자의 표면에 폴리아르기닌을 도입하기 위하여, 초음파 분해욕에 있는 고분자 나노입자 수분산액 12mL에 폴리아르기닌(1mg/mL) 1mL를 주입한 후 1시간 동안 초음파 분해욕에서 방치한다.

[0036] **[실시예 4] 공액화 고분자 화합물 형태로 제조된 고분자 나노입자의 표면에 폴리라이신의 도입**

[0037] 상기 실시예 2에서 제조된 공액화 고분자 나노입자의 표면에 폴리라이신을 도입하기 위하여, 초음파 분해욕에 있는 고분자 나노입자 수분산액 12mL에 폴리라이신(1mg/mL) 1mL를 주입한 후 1시간 동안 초음파 분해욕에 방치한다.

[0038] **[실시예 5] 폴리펩타이드가 도입된 공액화 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드와의 결합**

[0039] 실시예 3과 4에 의하여 제조한 폴리아르기닌 또는 폴리라이신이 표면에 도입된 공액화 고분자 나노입자 수분산액 2mL와 그래핀 옥사이드(0.5mg/mL) 500μL를 혼합한 후 5분 동안 교반한다. 폴리아르기닌 또는 폴리라이신이 도입된 공액화 고분자 나노입자는 표면의 전하가 양전하를 갖고 그래핀 옥사이드는 음전하를 갖기 때문에 두 물질간 서로 다른 전하에 따른 상호작용에 의하여 서로 결합하면서 발생된 에너지 전이에 의한 형광 변화를 관찰하였다.

[0040] 형광광도계에 의해 495nm의 형광을 측정한 결과, 그래핀 옥사이드의 농도가 0μg/mL에서 116.8μg/mL로 증가할수록 초기농도(그래핀 옥사이드 농도: 0μg/mL) 대비 형광강도는 78.2% 감소하였다.

[0041] **[실시예 6] 폴리펩타이드가 도입된 공액화 고분자 나노입자의 트립신 센서로의 성능 평가**

[0042] 실시예 5에 의하여 제조한 폴리펩타이드가 도입된 공액화 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드의 수분산액에 트립신을 0, 5, 10, 15, 20, 25μg/mL의 농도로 총 6가지 농도가 다른 용액을 만들어 40분 동안 노출시킨 후, 형광광도계를 이용하여 형광의 변화를 측정하였다.

[0043] 형광광도계에 의해 495nm의 형광을 측정한 결과, 트립신의 농도를 0μg/mL에서 25μg/mL으로 증가시킬수록 공액화 고분자 나노입자의 형광이 초기농도(트립신 농도: 0μg/mL) 대비 351.53% 증가하였다.

[0044] **[비교예] 다른 분해 효소에 대한 감지 성능 평가**

[0045] 실시예 5에 의하여 제조한 폴리펩타이드가 도입된 공액화 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드의 수분산액에 일반 단백질인 보빈 세럼 알부민과 다른 종류의 효소 단백질인 펩신, 글루코즈 옥시데이즈, 라이소자임을 25㎍/mL의 농도로 넣은 후 40분 동안 노출시켰을 때 495㎚에서 형광광도의 변화가 거의 없었다.

[0046] 이상의 결과로 보아 제조된 폴리아르기닌 또는 폴리라이신이 도입된 공액화 고분자 나노입자와 그래핀 옥사이드 복합체는 트립신의 존재와 농도에 따라 형광강도의 변화가 나타나고, 트립신에 대하여 선택적인 화학/바이오센서로 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0047] 그래핀 옥사이드의 농도에 따른 형광강도(실시예 5 참조) 및 트립신의 농도에 따른 형광강도(실시예 6 참조)를 각각 표 1 및 표 2에 나타내었다.

표 1

[0048]

그래핀 옥사이드의 농도(㎍/mL)	형광강도
0	150.14
33.3	109.90
501.	82.69
66.7	67.43
83.4	52.50
100.1	41.50
116.8	32.67

표 2

[0049]

트립신의 농도(㎍/mL)	형광강도
0	12.09
5	18.79
10	23.72
15	30.97
20	35.42
25	42.50