(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0007803
(43) 공개일자 2013년01월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 339/08 (2006.01) *C07F 7/18* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0068360
(22) 출원일자 2011년07월11일
심사청구일자 2011년07월11일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119, 11호 12 (송도동)
(72) 발명자
김규원
인천광역시 서구 원당동 LG원당자이아파트 702-902
(74) 대리인
특허법인 충정

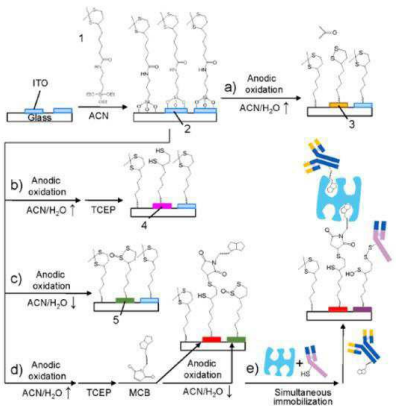
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **디티안 말단을 갖는 신규 화합물, 이를 포함하는 생물분자 고정용 링커 조성물 및 이를 이용한 바이오칩**

(57) 요 약

본 발명은 디티안 단부를 갖는 신규 화합물, 이를 포함하는 생물분자 링커 조성물 및 생물분자 고정화층이 표면에 형성된 생물분자 고정화 기재 및 상기 기재를 포함하는 바이오칩을 제공한다. 또한, 생물분자 고정화층을 형성하는 단계; 양극 산화한 후 활성화하여 관능기를 형성하는 단계; 및 생물분자 또는 리간드를 표면에 고정화하는 단계;를 포함하는 바이오칩의 제조방법을 제공한다. 본 발명은 양극 산화의 조건을 달리하는 간단한 방법으로 기재 표면을 다관능화 할 수 있어 멀티분석물의 분석이 용이하다는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

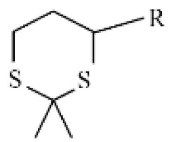
과제고유번호	KRF-2009-313-C00186
부처명	교육과학기술부
연구사업명	신진교수지원
연구과제명	전기화학 활성을 가지는 알리파틱 유기 실란 개발을 통한 고성능 바이오 랩온어칩 제작
주관기관	인천대학교 산학협력단
연구기간	2008.07.01 ~ 2010.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

1,3-디티안(dithiane)의 4번 탄소위치에 R기가 결합되어 있는 하기의 화학식 1의 화합물:

[화학식 1]



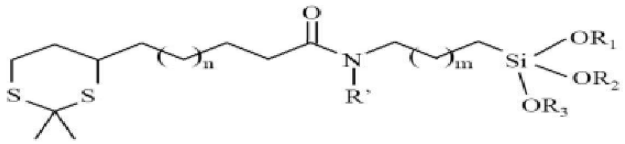
상기 식에서, R은 실란(silane), 티올(thiol), 디설파이드(disulfide), 아릴디아조니움 양이온(aryl diazonium cation), 아지드(azide), 에틸렌(ethylene), 에틴(ethyne), 시클릭 에테르(cyclic ether), 아민(amine), 카르복실산(carboxylic acid), 히드라지드(hydrazide), 말레이미드(maleimide) 및 N-히드록시석신이미드(hydroxysuccinimide, NHS) 중에서 선택된다.

청구항 2

제1항에 있어서,

하기 화학식 2인 것을 특징으로 하는 화합물:

[화학식 2]



상기 식에서, n 및 m은 각각 독립적으로 1 ~ 10의 정수이며, R'은 수소 또는 C1 내지 C4 알킬이고, R_1 내지 R_3는 각각 독립적으로 C1 내지 C4 알킬이다.

청구항 3

제2항에 있어서,

5-(2,2-디메틸-1,3-디티안-4-일)-N-(3-(트리에톡시실릴)프로필)펜탄아마이드(5-(2,2-dimethyl-1,3-dithian-4-yl)-N-(3-(triethoxysilyl)propyl)pentanamide, DTSI)인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 포함하는 생물분자 링커 조성물.

청구항 5

제4항에 따른 조성물을 포함하는 생물분자 고정화층이 표면에 형성된 생물분자 고정화 기재.

청구항 6

제5항에 따른 생물분자 고정화 기재; 및

상기 기재 상에 고정화된 생물분자 또는 리간드를 포함하는 바이오칩.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 생물분자 고정화 기재는 2 종 이상의 관능기로 다관능화 되어 2 종 이상의 표적물질을 검출할 수 있는 것을 특징으로 하며, 상기 관능기는 디설파이드기(disulfide), 디티올기(dithiol), 티오설피네이트기(thiosulfide) 및 티오설포네이트기(thiosulfonate)로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바이오칩.

청구항 8

(i) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 포함하는 용액 중에 기재를 침지시켜 생물분자 고정화층을 형성하는 단계;

(ii) 양극 산화한 후 활성화하여 관능기를 형성하는 단계; 및

(iii) 생물분자 또는 리간드를 접촉시켜 상기 고정화층 표면에 고정화하는 단계를 포함하는 바이오칩의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 양극 산화를 100부피%의 아세토니트릴(ACN)에서 수행한 후 H_2O를 엑시츄(ex-situ) 상태에서 처리하여 디설파이드 관능기를 형성하는 것을 특징으로 하는 바이오칩의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 디설파이드 관능기에 이의 환원제를 반응시켜 디티올 관능기를 형성하는 것을 특징으로 하는 바이오칩의 제조방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 양극 산화를 10~40부피%의 H_2O 및 60~90부피%의 아세토니트릴(ACN)에서 수행하여 티오설피네이트 또는 티오설포네이트 관능기를 형성하는 것을 특징으로 하는 바이오칩의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 디티안 말단을 갖는 신규한 유기 화합물, 이를 포함하는 생물분자 고정용 링커 조성물 및 바이오칩, 상기 바이오칩을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이오칩은 다양한 종류의 생체 물질을 단위면적의 고체상 지지체의 표면에 고집적 미세배열(High-Density Microarraying)한 것으로서, 바이오칩의 세부 기술로는 생체 물질을 고정화시키는 기술, 고체상 지지체를 생체 물질 친화적으로 만드는 기술, 생체 물질을 미세 배열하는 기술, 만들어진 칩 상에서 여러 가지 생체 반응을 실시하는 에세이 기술, 반응된 결과를 감지하는 기술, 고정화 대상인 생체 물질을 만드는 단백질 공학, 유전자 재조합 기술 등이 집적된 산물이다.

[0003] 초기의 단백질칩은 표면 처리된 유리판 위에 단백질을 그대로 부착시킨 후 간단한 결합 분석(binding assay)을 수행하는 것이었으나, 고정화된 단백질의 활성 여부에 따라 실제 작동 여부가 좌우되어, 본래의 목적을 달성하는데 어려움이 많았다. 이러한 문제점은 단백질이 갖는 고유의 물리화학적 특성 차이로 인하여 발생하는 단백질의 변성 혹은 불활성화, 분해 등으로부터 야기되는 것이다. 이러한 문제점을 극복하고자, DNA와는 구별되는 단백질의 특성에 부합하는 단백질 부착 표면 처리 기술 및 단백질 고정 물질 등에 대한 연구가 이루어지고 있다.

[0004] 이러한 연구는 단백질칩 표면상에 고정 반응을 일으키면서 동시에 단백질의 활성을 유지하려는 방법을 제공하는데 초점이 맞추어진 것이다.

[0005] 단백질을 고체 기재 표면에 고정하는 기존의 방법은 방향성 없이 멤브레인에 물리적인 흡착이나 멤브레인, 혹은 비선택적인 화학반응에 의한 공유결합 형성 방식을 이용하고 있다. 최근에는 켈릭스크라운 유도체(calixcrown derivative)를 이용하여 항체의 방향성을 조절하는 방식이 보고되었다 (Han, M. et al., Proteomics., 3:2289, 2003). 이 밖에 단백질에 바이오틴(biotin)을 결합시킨 후, 이 단백질을 스트렙타비딘(streptavidin)이나 아비딘(avidin)으로 처리된 고체표면에 적용시킴으로써 바이오틴-스트렙타비딘/아비딘 결합을 이용하여 단백질을 고정하는 방법이 발표되었으며, 고분자를 이용하여 비특이적인 결합을 줄여주는 방식도 등장하였다. 또한 금 박막을 사용할 경우 고가의 덱스트란(dextran) 고분자 표면이 사용되는데, 이는 현재 사용되는 표면 플라즈몬 공명 현상을 이용한 측정 방법에서 대표적으로 이용되고 있다.

[0006] 바이오센서나 바이오칩, 고정화용 담체에서 기재에 고정되는 단백질의 비특이적인 결합을 최소화하고자 올리고 또는 폴리에틸렌그룹을 이용하는 표면의 개발이 1990년대부터 꾸준히 진행되어왔다 (Witesides, G. et al. Chem. Rev., 105:1103, 2005). 이는 단백질의 비특이적 결합을 저해하는데 크게 기여하는 물질로, 이를 이용하여 단백질이나 세포를 고정하는 방법이 많이 사용되며, 이를 이용한 링커의 합성방법 및 응용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 디티안 말단을 갖는 신규한 화합물을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 디티안 말단을 갖는 화합물을 포함하는 생물분자 링커 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 링커 조성물로 이루어진 생물분자 고정화층이 표면에 형성된 생물분자 고정화 기재를 제공하는 것이다.

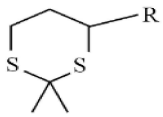
[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 생물분자 고정화 기재를 포함하는 바이오칩을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오칩을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 하기 화학식 1 로 표현되는 바와 같이, 1,3-디티안을 말단에 갖는 신규한 화합물을 제공한다.

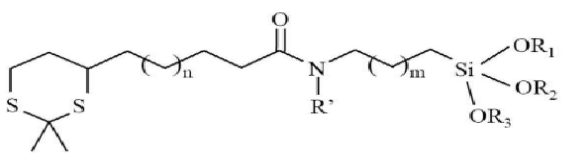
[0012] [화학식 1]

[0013] 

[0014] 상기 식에서, R은 앵커에 사용되는 다양한 유기기일 수 있다. 바람직한 예에서, 상기 R은 실란(silane), 티올(thiol), 디설파이드(disulfide), 아릴디아조니움 양이온(aryl diazonium cation), 아지드(azide), 에틸렌(ethylene), 에틴(ethyne), 시클릭 에테르(cyclic ether), 아민(amine), 카르복실산(carboxylic acid), 히드라지드(hydrazide), 말레이미드(maleimide), 및 N-히드록시석신이미드(hydroxysuccinimide, NHS) 중에서 선택된다.

[0015] 하나의 바람직한 예에서, 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표현되는 화합물일 수 있다.

[0016] [화학식 2]

[0017] 

[0018] 상기 식에서, n 및 m은 각각 독립적으로 1 ~ 10의 정수이며, R'은 수소 또는 C1 내지 C4 알킬이고, R_1 내지 R_3

는 각각 독립적으로 C1 내지 C4 알킬이다.

[0019] 본 발명의 일실시예에서 사용된 디티안 말단을 갖는 신규 화합물 중 하나는 5-(2,2-디메틸-1,3-디티안-4-일)-N-(3-(트리에톡시실릴) 프로필)펜탄아마이드 (5-(2,2-dimethyl-1,3-dithian-4-yl)-N-(3-(triethoxysilyl)propyl) pentanamide, DTSI)이다.

[0020] 또한, 본 발명은, 상기 디티안 말단을 갖는 신규 화합물을 포함하는 생물분자 링커 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 링커 조성물을 포함하는 생물분자 고정화층이 형성된 생물분자 고정화 기재를 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 생물분자 고정화 기재 및 상기 기재 상에 고정화된 생물분자 및/또는 리간드를 포함하는 바이오칩을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 트롬빈이 결합된 항체는 스트렙타비딘-항체 복합체(streptavidin-antibody complex), 상기 스트렙타비딘-항체 복합체의 스트렙타비딘에 결합된 트롬빈 앱타머 및 상기 트롬빈 앱타머에 결합된 트롬빈을 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바이오칩은 생물분자 기재는 2 종 이상의 관능기로 다관능화 되어 2종 이상의 표적물질을 검출할 수 있다.

[0025] 상기 관능기는 디설파이드기, 디티올기, 티오설피네이트기 및 티오설포네이트기 중에서 선택될 수 있다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 생물분자에 고정화되고, 표적물질과 특이적으로 결합하는 리셉터를 더욱 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 생물분자는 비오틴 또는 티올기를 갖는 항체이고, 상기 리간드는 상기 비오틴과 결합된 아비딘 또는 스트렙타비딘이며, 상기 리셉터는 항체 또는 비오틴화 된 항체일 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 (i) 상술한 디티안 말단을 갖는 화합물을 포함하는 용액 중에 기재를 침지시켜 생물분자 고정화층을 형성하는 단계; (ii) 양극 산화한 후 활성화하여 관능기를 형성하는 단계; 및 (iii) 생물분자 또는 리간드를 접촉시켜 상기 고정화층 표면에 고정화하는 단계를 포함하는 바이오칩의 제조방법을 제공한다.

[0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 양극 산화를 0~5부피%(v/v)의 H_2O와 95~100부피%(v/v)의 아세토니트릴(ACN) 중에서 수행하여 디설파이드 관능기를 형성할 수 있다. 또한, 상기 양극 산화는 100% 아세토니트릴 중에서 수행된 후 H_2O 를 엑시츄(ex-situ)상태에서 처리할 수 있다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 디설파이드 관능기에 이의 환원제를 반응시켜 디티올 관능기를 형성할 수 있다.

[0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 양극 산화를 10~40부피%(v/v)의 H_2O와 60~90부피%(v/v)의 아세토니트릴(ACN) 중에서 수행하여 티오설피네이트 및/또는 티오설포네이트 관능기를 형성할 수 있다.

[0032] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단계(ii)와 단계(iii)을 반복함에 따라 2 종 이상의 관능기로 다관능화 될 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따른 신규한 디티안-도입된 화합물은 사이클릭 다이설파이드 그룹(cyclic disulfide group)을 보호화할 수 있다. 따라서, 생물분자의 고정화를 위해 이를 기재 표면에 처리하는 경우 표면처리 공정, 정제, 취급이 매우 용이하다. 또한, 상기 디티올은 양극산화로 관능화될 수 있으며 이러한 관능기의 도입이 양극 산화시 반응조건의 간단한 변형을 통해 달성될 수 있어서 공정제어가 매우 용이하다. 특히, 단일 기재 상에 복수 개 생체물질의 동시 고정화 뿐만 아니라 복수 분석물의 연속적 검출이 가능하므로 분석이 신속하고 간편하게 이루어지고 정확한 측정 방법으로 유용하게 이용될 수 있다. 또한 이 방법은 면역 분석뿐 아니라, 표적 물질 검출 부분만 바꾸어 유전자 및 다른 단백질, 중금속 등의 검출에도 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따라 DTSI-개질된 ITO 어레이 표면에 다양한 양극 산화와 화학적 처치를 통해 다관능화된 바이오칩의 제조과정의 모식도이다; (a) 디설파이드, (b) 디티올, (c) TSFI (또는 TFSO), (d) 양극 산화의 조합을 통한 이관능기 표면의 제조, (e) 두 개의 단백질 동시 고정화된 바이오특이적 상호작용과 디설파이

드 결합 및 면역분석법에 기반한 멀티분석물 검출용 멀티프로브 표면제조이다.

도 2는 DTSI-개질된 표면의 양극 산화에 대한 CV그래프이다; 제1 사이클은 실선이고, 제2 사이클은 점선이고 모든 스캔 속도는 50 mV/sec이다; 양극산화시 0.1 M 테트라부틸암모늄 과염소산염 (TBAP)을 포함한 ACN/H2O (v/v) 용액의 비율이 (a) 100:0, (b) 70:30 이다. XPS는 DTSI-개질된 표면에 대해 0.1 M TBAP 갖는 ACN/H2O (v/v) 용액 (c) 95:5, (d) 70:30에서 양극 산화 후 S(2p)의 결과이다.

도 3은 실시예에서 제조된 기판의 형광 현미경 사진들이다; (a)는 동일 기판 상에서 선택된 전극 i과 iii을 100% ACN 조건에서 양극산화한 기판에 MCB 처리 후의 TR-SAv (좌) 와 FITC-SAv (우)의 마이크로패터닝 결과이다; (b) 전극 i 과 ii 를 70:30 ACN/H2O (v/v)로 양극 산화하고 전극 iii 을 100% ACN로 양극산화한 후 MPA-반응 기판 6 를 EDC/NHS로 처리한 후 TR-SAv 의 공유 고정화한 것이다. (c) 2 종의 항원인 Ab-R과 Ab-M 에 대한 동시검출을 위해 샌드위치 면역 분석법으로 얻은 레드와 그린 형광 이미지의 조합을 나타낸다.

도 4는 형광 현미경 이미지이다; 이미지 상의 점선은 ITO 전극의 경계이고, 각 전극의 좁은 폭은 150 m이다; (a) FITC-SAv 및 티올-함유 TRITC-c-Ab-R의 동시 고정화 후 형광 현미경 이미지이다, (b) 비오틴화된 Ab-M의 처리로 SAv 및 c-Ab-R의 동시 고정화 후 Ab-M 및 Ab-R의 동시검출에 대한 샌드위치 면역분석의 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 디티안이 도입된 신규 화합물

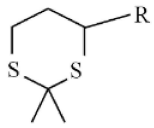
[0036] 바이오센서 등과 같이 생물분자가 기재 상에 결합되는 디바이스에 있어서 유기 앵커를 갖는 표면의 화학적 개질이 많이 연구되고 있다. 유기 앵커(anchor)로는 반응성기를 포함하는 오르가노 실란이 주로 사용되고 있다. 이러한 화합물을 생물분자와 결합되기 위해 별도로 활성화 과정을 거쳐야 한다. 편의성의 측면에서 생물분자 또는 리간드와 직접 결합될 수 있는 관능기가 도입된 실란을 이용하는 것이 고려된다. 그러나 관능기가 도입된 실란은 반응 중 안정성이 낮다.

[0037] 이를 극복하기 위해서 본 발명은 보호기가 도입된 화합물로서 기재와의 반응에 안정한 한편 간단한 방법으로 탈보호화되어 관능기를 형성할 수 있는 유기물을 제공하고자 한다.

[0038] 이에, 본 발명은 신규한 유기 화합물에 관한 것으로서, 구체적으로 사이클릭 다이설파이드 그룹(cyclic disulfide group)을 보호할 수 있는 전기반응성 1,3-디티안을 결합한 신규 화합물이다.

[0039] 본 발명의 화합물은 하기 화학식 1로 표현되는 바와 같이 1,3-디티안의 4번 탄소위치에 유기기가 결합되어 있는 화합물일 수 있다.

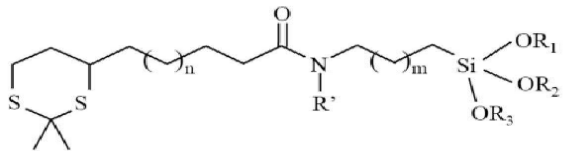
[0040] [화학식 1]

[0041] 

[0042] 상기 식에서, R은 기재와의 결합을 위한 유기 앵커라면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 실란(silane), 티올(thiol), 디설파이드(disulfide), 아릴디아조니움 양이온(aryl diazonium cation), 아지드(azide), 에틸렌(ethylene), 에틴(ethyne), 시클릭 에테르(cyclic ether), 아민(amine), 카르복실산(carboxylic acid), 히드라지드(hydrazide), 말레이미드(maleimide), 및 N-히드록시석신이미드(hydroxysuccinimide, NHS) 중에서 선택될 수 있다.

[0043] 일 구체예에서, 본 발명의 화합물은 하기 화학식 2로 나타나는 바와 같이, 1,3-디티안의 4번 탄소위치에 유기실란이 결합되어 있는 유기 실란 화합물 일 수 있다.

[0044] [화학식 2]



[0045]

[0046] 상기 식에서,

[0047] n 및 m은 각각 독립적으로 1 ~ 10의 정수이며,

[0048] R'는 수소 또는 C1 내지 C4 알킬이고,

[0049] R_1 내지 R_3는 각각 독립적으로 C1 내지 C4 알킬이다.

[0050] 이러한 화합물은 바람직하게는 5-(2,2-디메틸-1,3-디티안-4-일)-N-(3-(트리에톡시실릴)프로필)펜탄아마이드(5-(2,2-dimethyl-1,3-dithian-4-yl)-N-(3-(triethoxysilyl)propyl) pentanamide, DTSI)일 수 있다.

[0051] 상기 화합물에서 트리알콕시 실란은 기재 또는 전극 표면에 고정될 수 있는 관능기이고, 말단에 위치한 디티안은 탈보호화에 의해 관능화된다. 유기 합성에서 1,3-디티안이 주로 카보닐기를 보호하는 데 사용되어 왔지만, 양극 산화에 의해 시클릭 디설파이드를 생성시킨다. 이러한 시클릭 디설파이드로부터 다양한 디설파이드계 관능기가 도입될 수 있어서, 생물분자 또는 리간드를 고정화하기 위한 링커로 이용될 수 있다.

[0052] 따라서 본 발명은, 상기 본 발명에 따른 화합물을 유효성분으로 포함하는, 생물분자의 고정화를 위한 생물분자 링커 조성물을 제공할 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 화합물는 공지의 유기 화합물 제조법으로 합성할 수 있으며 특별히 제한되지 않는다.

[0054] 생물분자 고정화 기재

[0055] 또한, 본 발명은 상기 디티안 도입된 유기 화합물을 포함하는 생물분자 고정화층이 표면에 형성된 생물분자 고정화 기재를 제공한다.

[0056] 앞서 설명한 바와 같이 상기 디티안이 도입된 유기 화합물은 화학적으로 보호된 형태이다. 이와 같이 보호된 형태는 제조, 정제 및/또는 취급하는 것이 편리하다는 장점이 있다. 본 명세서에서 "화학적으로 보호된 형태" 또는 "보호화(protection)"는 하나 이상의 반응성 작용기가 바람직하지 않은 화학 반응으로부터 보호된, 즉, 보호되거나 보호기(마스킹된 또는 마스킹 기 또는 블로킹된 또는 블로킹 기라고도 함)의 형태인 화합물을 말한다. 반응성 작용기를 보호함으로써, 다른 비보호 반응성 작용기를 연루시키는 반응을 보호된 기에 영향을 주지 않고 수행할 수 있으며, 보호기는 통상적으로 후속 단계에서 분자의 다른 부분에 실질적으로 영향을 주지 않고서 제거될 수 있다.

[0057] 상기 보호화된 유기 화합물에서 전기활성(electroactive)을 갖는 디티안의 탈보호화에 의해 시클릭 디설파이드로 될 수 있다. 상기 탈보호화는 양극 산화로 수행될 수 있다. 도 1을 참조하면, 유기 화합물(1)은 1,3-디티안의 C(4) 탄소에 유기실란이 연결되도록 디자인되고, 카보닐부가 양극 산화 동안 표면으로부터 제거되며, 그 결과 디설파이드화된 표면(3)이 된다. 얻어진 시클릭 디설파이드기는 추가적인 산화나 반응조건에 따라 생물분자 또는 리간드와 결합될 수 있는 다양한 디설파이드계 관능기를 제공한다. 상기 관능기는 예를 들어, 디티올기, 티오설피네이트기, 또는 티오설포네이트기 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이와 같이 관능화되면 공유결합 등을 통해 생물분자가 고정화될 수 있을 것이다. 또한, 미세전극 어레이의 표면에 마이크로 패터닝을 통해 서로 다른 관능기를 도입함으로써 다관능화 표면을 형성할 수 있고, 그 결과 다양한 단백질을 동시에 고정화(immobilization) 시킬 수 있다.

[0058] 본 발명에 따른 신규 화합물의 표면 밀도는 약 3×10^{-10} ~ 6×10^{-10} mol/cm^2일 수 있다. 본 발명자들의 일실시예에 따르면 기재의 표면 거칠기를 고려하지 않은 최대 표면 밀도는 5.1×10^{-10} mol/cm^2로 확인되었다.

[0059] 본 발명에 따른 생물분자 고정화 기재를 이용하면 다관능기를 형성하여 표면에 복수의 생물분자가 동시에 고정화됨으로써 멀티분석물의 분석이 가능한 바이오 디바이스를 개발할 수 있다.

[0060] 바이오칩

[0061] 이에, 본 발명은 상기 생물분자 고정화 기재; 및 상기 기재 상에 고정화된 생물분자 및/또는 리간드를 포함하는 바이오칩을 제공한다. 일 예에서, 표적물질 인식할 수 있도록 상기 생물분자에 고정화되고, 표적물질과 특이적으로 결합하는 리셉터가 더욱 포함될 수 있다.

[0062] 바이오칩(biochip)은 생물에서 유래된 DNA, 단백질 또는 그 외의 리간드를 고체 기재의 표면에 고밀도로 집적화하고 조합하여 마이크로어레이(microarray)화시킨 칩을 말한다. 여기서, 마이크로어레이란 작은 고형체 기판 위에 수십 개 내지 수만 개의 생물분자를 고밀도로 배열해 놓은 것을 의미한다.

[0063] 상기 리간드는 표적물질의 리셉터와 특징적으로 결합될 수 있는 부위; 및 바이오분자와 결합될 수 있는 부위;를 포함한다. 또한, 리셉터는 리간드와 특징적으로 결합될 수 있는 부위를 포함한다.

[0064] 본 발명에 따라 바이오칩에 고정될 수 있는 생물분자 또는 리간드는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있어, 이들 간의 결합을 분석할 수 있게 하는 모든 물질이 사용될 수 있다. 바람직하게는, DNA, RNA 또는 PNA를 포함하는 핵산, 단백질 또는 올리고펩타이드, 항체, 항원, 지질, 카보하이드레이트 등이 있다. 또한, 저분자 물질 및 천연물 등 각종 화합물질을 고정화 할 수 있다. 구체적인 예에서, 항원, 항체, RNA, DNA, 합텐(hapten), 아비딘(avidin), 스트렙타비딘 (streptavidin), 뉴트라비딘 (neutravidin), 프로테인 A, 프로테인 G, 렉틴(lectin), 셀렉틴(selectin), 방사선동위원소로 표지된 성분으로 이루어진 물질을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 리셉터는 리간드와 결합할 수 있는 물질이라면 특별히 제한되지 않는다.

[0065] 상기 단백질은 예를 들어 HIV p24, Combo, RgpIII, HCV core, NS5, NS3, E1/E2, HBV surface antigen, antibody, IgG-Cy3을 포함하여, 감염성 질병 진단(infectious disease diagnosis)용 항원 혹은 항체, 또는 AFP, PSA, CA1-1, glypeACN을 포함한 암진단(ACNcer diagnosis) 용 항원 혹은 항체, 활성 측정에 이용되는 효소들이 포함된다. 상기 활성 측정용 효소에는 독성분석, 환경분석, 식품균 분석에 이용되는 효소들이 있다. 또한 단백질, 항원, 항체 뿐 아니라 신약 개발에 사용되어지는 저분자 물질 및 자생식물, 미생물, 곰팡이, 한약재 등의 천연물 역시 포함된다.

[0066] 상기 표적 물질은 본 발명에 따른 바이오칩을 이용하여 검출 가능한 물질을 모두 포함할 수 있으며, 상기 표적물질로는 이에 제한되지는 않으나, 항원, 핵산, 금속이온 및 글루코스(glucose)를 포함할 수 있다.

[0067] 하나의 구체적인 예에서, 상기 생물분자는 비오틴 또는 티올기를 갖는 항체이고, 상기 리간드는 상기 비오틴과 결합된 아비딘 또는 스트렙타비딘이며, 상기 리셉터는 항체 또는 비오틴화 된 항체일 수 있다.

[0068] 상기 바이오칩에서 생물분자 고정화 기재가 2 종 이상의 관능기로 다관능화 되면 2 종 이상의 표적물질을 검출할 수 있다. 즉, 2 종 이상의 표적 물질이 각각 서로 다른 관능기에 부착됨으로써 동시 검출이 가능하다는 장점이 있다.

[0069] 일 구체예에서, 바이오칩 상 일 전극은 티올기로 관능화되어 말레이미드-비오틴(maleimide-biotin) 또는 말레이미드-비오틴에 결합된 스트렙타비딘-항체 복합체(streptavidin-antibody complex)가 고정될 수 있다. 또 다른 일 전극은 티오설피네이트 및/또는 티오설포네이트로 관능화되어 티올기를 갖는 항체가 고정될 수 있다.

[0070] 본 발명에 따른 바이오칩은 면역진단 방법으로 샌드위치어세이 방법과 동일하게 항원을 형광 dye로 표지하여 진단에 사용할 수 있다. 이때, 결과를 측정하는 단계에서 현광 스캐너를 사용하고 프로그램을 통하여 진단 결과를 분석하고 정량화 할 수 있다. 본 발명에 따른 바이오칩은 예를 들어 HIV, HCV, HBV 등의 효소면역 진단 방법을 대체하여 사용할 수 있다.

[0071] 상기 리셉터는 항체 또는 프로브를 포함할 수 있는데, 상기 표적 물질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체는 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체 등 당업계에서 통상적으로 의미하는 “항체"를 포함할 수 있다.

[0072] 표적 물질에 대한 리셉터인 항체를 생성하는 방법은 당해 기술분야의 일반적 기술자가 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 예컨대, 다클론 항체의 경우에는 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있으며, 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조가능하다. 단일클론 항체의 경우에는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마(hybridoma) 방법(Kohler et al., European Jounral of Immunology, 6, 511-519, 1976)을 이용하여 제조할 수 있거나 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352,

624-628, 1991, Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 있다.

[0073] 또한, 표적 물질에 특이적으로 결합할 수 있는 상기 프로브의 경우, "프로브“란 용어는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타켓 뉴클레오타이드(핵산) 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오티드일 수 있다.

[0074] 또한, 본 발명의 프로브는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0075] 바람직한 기재는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 고정화는 화학적 결합 방법 또는 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0076] 본 발명에 따른 바이오칩을 이용하여 표적 물질을 검출하는 방법은 예를 들어, 바이오칩의 표면에 표적 물질을 반응시키는 단계; 상기 표적 물질을 반응시킨 바이오칩에 아비딘-항체 복합체 또는 스트렙타비딘-항체 복합체를 반응시키는 단계; 를 포함한다. 샌드위치 면역분석 방법은 예를 들어, 표지자가 부착된 아비딘-항체 복합체 또는 스트렙타비딘-항체 복합체를 떨어뜨려 항원의 결합여부를 판단한다.

[0077] 표지자로는 예를 들어, 컬러 비드(color bead), 형광을 띠는 입자, 양자점, 금(gold) 입자, 전기화학적으로 활성을 가지는 입자, 탄소 나노튜브, 그래핀, 풀러렌, 형광을 띠는 단백질, GOX (Glucose oxidase), ALP(Alkaline Phosphatase) 및 HRP(Horse-Radish Peroxidase)로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있으며, 상기 전기화학적으로 활성을 가지는 입자는 바람직하게 은, 구리, 납, 카드늄, 철 또는 아연일 수 있다.

[0078] 바이오칩의 제조방법

[0079] 또한, 본 발명은 표적 물질을 검출할 수 있는 바이오칩의 제조방법을 제공한다. 바람직하게 본 발명에 따른 바이오칩의 제조방법은, 하기 단계들을 포함한다.

[0080] (i) 제1 항 또는 제2 항에 따른 디티안-도입된 화합물을 포함하는 용액 중에 기재를 침지시켜 생물분자 고정화층을 형성하는 단계;

[0081] (ii) 양극 산화한 후 활성화하여 관능기를 형성하는 단계; 및

[0082] (iii) 생물분자 또는 리간드를 접촉시켜 상기 고정화층 표면에 고정화하는 단계.

[0083] 단계(i) 에서 기재 상에 생물분자 고정화층을 형성하는 방법은 특별히 제한되지 않으며 예를 들어 상기 유기 화합물 용액에 기재를 침지시켜 제조될 수 있다.

[0084] 본 발명의 실시에서는 5-(2,2-디메틸-1,3-디티안-4-일)-N-(3-(트리에톡시실릴) 프로필)펜탄아마이드 (DTSI) 용액에 ITO 기판을 침지하여 자기조립단분자막이 형성되었다. 이 과정에서 기재의 실란화(silanization)가 이루어졌는지를 모니터링하고 실란화하는 과정을 최적화하는 데 표면밀도를 측정하는 것이 바람직하다. 기존에 실란화의 모니터링에 주로 사용되는 엘립소메트리와 원자힘 현미경과 같은 방법은 전극 표면의 낮은 반사율과 낮은 거

칠기에 의한 한계를 갖고 있기 때문에 적절하지 않다. 반면 디티안 도입된 유기 실란은 전기활성이기 때문에, 전기화학 반응에 요구되는 전하로부터 표면밀도를 쉽게 측정할 수 있다.

[0085] 본 발명의 실시에 의하면 표면전하가 1시간 40분까지는 시간이 경과에 따라 증가하였으나 이후로는 더 이상 증가하지 않았다. 따라서, 기판과 DTSI 용액의 반응시간은 대략 1시간 40분 정도가 적절하며, 이를 초과하여 장시간 반응시켜도 기판 표면에 도입되는 DTSI의 양은 증가하지 않는다.

[0086] 단계(ii)에서 상기 양극산화는 아세토니트릴 (ACN)의 전해질 용액 하에서 순환전압전류법(CV)으로 수행될 수 있다.

[0087] 도 1의 a)를 참고하면, 양극 산화에 의해 디티안이 디설파이드화되어 디설파이드화 표면(3)을 형성한다. 이때 아세토니트릴(ACN)의 전해질 용액에는 H2O가 부가될 수 있다. H2O의 첨가량과 관련하여, 일 실시에 의해 H2O 가 5% 이하의 낮은 함량으로 부가되는 경우 100% ACN 하에서 수행된 것과 CV 결과가 유사하게 나타났다(도 2(a)와 (c) 참조). 이는 낮은 H2O 함량 하에서 양극 반응의 H2O 독립성을 나타내는 공지의 E.E.C.C. 반응 메카니즘과 일맥상통한다.

[0088] 이에, 상기 양극 산화를 0~5%의 H2O와 95~100% 의 아세토니트릴 (ACN) 중에서 수행하여 디설파이드 관능기를 형성할 수 있다. 그러나, H2O의 첨가량이 높아지면 디설파이드의 추가적 산화가 진행될 수 있으므로, 이를 회피하기 위해 H2O 없는 전해질 조건이 바람직하다. 메커니즘에 따르면, H2O 없는 100% 아세토니트릴 중에서 양극 산화 직후 H2O 의 엑시츄(ex-situ) 처리로 디설파이드가 생산될 수 있다.

[0089] 하나의 바람직한 예에서, 상기 디설파이드 관능기에 환원제를 반응시켜 디티올 관능기를 형성할 수 있다. 도 1의 b)를 참조하면, 본 발명의 실시에서는 양극산화 후 디설파이드의 환원제로 알려진 트리스(2-카르복시 에틸) 포스핀 (TCEP)로 처치하여 디티올-말단의 표면(4)을 얻었다.

[0090] 이와 같이 제조된 디설파이드화 표면(3)과 디티올화 표면(4) 를 X-선 광전자 분광법(XPS)으로 실험한 결과가 도 2에 나타나 있다. TCEP 또는 H2O의 부가를 무시하고, XPS 결과가 서로 비슷하게 나타났는 바, S(2p) 에 대한 ~164 eV 에서 큰 피크와 ~167 eV 에서 설폭시드로부터 무시해버릴 정도의 피크가 나타났다.

[0091] 또한, 본 발명자들은 디티올화 되었는지 여부를 확인하기 위해 디티올과 결합될 수 있는 Cu^{2+} 의 부착을 수행하는 실험을 수행하였다. Cu^{2+} 용액에 디설파이드화 표면(3)과 디티올화 표면(4) 를 담근 후 표면을 세척 및 건조하여 시차펄스전압전류법(differential pulse voltammetry)을 측정하였다. 그 결과 표면(4) 에서만 Cu^{2+} 의 환원에 의한 피크가 관찰되었다.

[0092] 상기 디티올화 된 표면(4)에는 생물분자가 결합될 수 있으므로, 본 발명자들은 디티올화된 표면(4)와 말레이미드-결합 비오틴 (MCB) 사이의 반응성을 마이크로패터닝을 통해 실험했다(실시예 2 참조). 즉, 전극 (i)의 양극산화 후 전체 어레이를 말레이미드-비오틴 용액과 텍사스 레드(Texas Red, TR) 로 라벨링된 스트렙타비딘 (SAv)용액에 순차적으로 노출시킨다. 동일하게 전극 (iii)에 대해서도 양극 산화 후 전체 어레이를 말레이미드-비오틴 용액과 FITC 로 라벨링된 스트렙타비딘에 노출하였다.

[0093] 그 결과가 도 3a에 나타나 있는 바, 도 3(a)에 따르면 선명하게 구별되는 레드와 그린이 각각 전극 (i)과 (iii)에서 관찰되었고, 이를 통해 말레이미드-비오틴(MCB)복합체가 성공적으로 결합되었다는 것을 확인할 수 있다. 또한, 양극 산화를 수행하지 않은 DTSI-개질된 전극 (ii) 및 (iv)는 환원제인 TCEP를 처리한 후에도 어떠한 형광 이미지도 나타나지 않은 것을 알 수 있다. 이를 통해 양극산화에 의한 표면 3의 디설파이드 뿐만 아니라 표면 4의 디티올의 존재를 확인할 수 있다. 이상의 모든 실험들은 양극 산화에 의한 기판 상의 디설파이드의 형성 뿐만 아니라 디티올의 존재를 증명한다.

[0094] 또 다른 바람직한 예에서, 전해질 용액 중 수분의 함량을 상대적으로 높게 한 상태에서 양극 산화를 진행함으로써 디설파이드를 능가하는 추가적인 산화가 유도되어 도1의 c)에서와 같이 티오설피네이트 및/또는 티오설포네이트 관능기가 도입된 표면(5)를 형성할 수 있다. 예를 들어, 양극 산화를 10~40%의 H2O와 60~90% 의 아세토니트릴 (ACN) 중에서 수행하여 티오설피네이트 및/또는 티오설포네이트 관능기를 형성할 수 있다.

[0095] 이와 관련하여, 본 발명자들의 실험에 따르면 낮은 H2O 조건이 아니라 70:30 ACN/H2O (v/v) 의 조건 하에서 CV를 수행한 결과가 도 2b에 나타나 있다.

[0096] 도 2a 에서 DTSI-개질된 표면 (2) 에 대해 적용된 것과 같이 제1스캔에 대해 비가역적 피크 및 제2 스캔에서 그것의 소멸은 도 2a에서와 유사했던 반면, 피크는 더 넓어지고 포지티브 포텐셜로 더욱 이동했다. 이는, 다중

양극 반응이 더 높은 포텐셜을 발생시키는 것을 암시한다. 피크 영역은 도 2a 의 영역에 비해 2.5 배나 많이 증가되었다.

[0097] 이러한 결과들을 종합하면, 더 높은 H2O 함량 하에서 양극 산화는 표면(5)에 티오설피네이트 (TSFI, R1SSOR2)와 티오설포네이트 (TSFO, R1SSO2R2) 를 동시에 생성하는 것으로 추측된다. 디설파이드 형태에는 2-전자 프로세스가 필요한 반면에, 디티안을 두 개의 산화된 형태로 변형하는 데 각각 4-와 6-전자 프로세스가 필요하기 때문이다. 도 2d에 나타난 바와 같이, XPS 결과, ~167 eV에서 설폭시드에 의한 현저히 증가된 피크를 나타내는 점이 이를 증명한다.

[0098] 본 발명자들은 또한 표면(5)의 반응성을 확인하기 위해, 알킬티올의 전극-선택적 부착을 마이크로전극 어레이 상에서 실험하였다. 전극 (iii)이 100% ACN 하에서 선택적으로 산화되는 동안 두 개의 전극 (i) 과 (ii)를 증가된 H2O 조건 하에서 양극 산화에 투입하였다. 제조된 어레이를 머캅토프로피온산(MPA)에 노출한 후 EDC/NHS 용액으로 처리하여 제조된 표면을 다음 단계인 TR-SAv 과의 공유결합에 활성화시켰다.

[0099] 도 3(b)는 SAv 고정화 후 형광 현미경 이미지를 나타낸다. 이에 따르면, 두 개의 전극 (i) 및 (ii)가 레드를 나타내는 바, 이는 MPA의 티올기가 전극 표면과 주로 반응했다는 것을 의미한다. 추가적 산화될 가능성을 제외할 수 없음에도 불구하고, 이를 통해 표면 5에서 TSFI 과 TSFO 가 생성된 것으로 추측할 수 있는 바 알킬티올에 대해 TSFI 과 TSFO 가 전극 (iii)상에 생성된 것으로 예측되는 시클릭 디설파이드 보다 훨씬 더 높은 반응성을 갖기 때문이다.

[0100] 이상 살펴본 바와 같이 본 발명에 따른 방법에서는 전해질 용액 중 H2O 함량을 단순히 변화시키거나 환원제를 반응시키는 것만으로 한 종류의 전기활성 전구체, 즉 디티안으로부터 차등화된 형태의 화학적 활성을 나타내는 2 종의 생성물을 만들어낸다. 더욱이, 두 개의 관능기인 티올과 TSFI (또는 TSFO) 는 상호 반응성이기 때문에 종래에는 동일한 기판 상에서 함께 형성하기가 쉽지 않았다.

[0101] 따라서, 본 발명에 따르면 간단한 방법으로 상호 반응성인 티올기와 TSFI (또는 TSFO)를 동일 기판 상에 형성할 수 있어서 멀티분석물을 효과적으로 분석할 수 있다는 장점이 있다.

[0102] 본 발명에 따르면 상기 단계(ii)와 단계(iii)을 반복함에 따라 2 종 이상의 관능기로 다관능화할 수 있다. 본 발명자들의 실험에 따르면 전극 (i) 및 (iii)를 개별적으로 차별성 있게 양극 산화함으로써 이관능화된 어레이를 제조하고, 서로 다른 앵커부를 갖는 두 개의 단백질의 동시 고정을 시도했다. 이에 반응식 1d에서와 같이 비오틴과 TSFI (또는 TSFO)가 각각 관능화되었다. 그런 다음 패턴 이미지를 나타내가 위해 FITC-SAv와 티올기를 갖는 TRITC-c-Ab-R의 혼합 용액으로 처리하였다.

[0103] 도 3a 에서 두 개의 색이 나타난 영역은 고정화가 바이오-특이적 상호작용과 공유결합을 통해 진행됨을 제안한다. 또한, 각각 두 개 링크인 아비딘-비오틴 복합체 및 디설파이드에 의해 비오틴화된 Ab 와 티올-함유 Ab의 배열(오리엔테이션)-특이적 고정화에 상기 과정이 이용될 수 있다는 것을 제안한다.

[0104] 이상 살펴본 바와 같이, 일종의 전기 활성 전구체인 디티안 말단이 차별화된 양극 산화 조건을 통해 표면의 다관능화가 이루어질 수 있다. 즉, 순수 디티안, 조건부 반응성 디설파이드, 상호 반응성 티올 및 TSFI (또는 TSFO)를 단일 기판 상에 드러내보일 수 있다. 따라서, 차별성 있는 양극 산화의 조합을 통해 복수 단백질의 동시 고정화 뿐만 아니라 복수 분석물의 연속적 검출이 가능한 다기능화된 표면을 제조할 수 있다.

[0105] 특히 1,3-디티안의 화학적 안정성으로 인해 티올, 아릴 디아조늄, 알켄, 알킨, 및 아지드 등과 같은 다양한 연결부(linkage)가 쉽게 1,3-디티안의 C(4)의 말단부에 도입될 수 있기 때문에, 유망한 바이오 고정화용 일반 툴로 제공될 수 있다.

[0106] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0107] **재료 및 장비의 준비**

[0108] 스트렙타비딘, 아비딘, anti-마우스 IgG, anti-rabbit IgG, Texas Red-표지된 아비딘, FITC-표지된 아비딘, 마

우스 IgG, rabbit IgG, 머캅토프로피온산, N-히드록시석신이미드 (NHS), 1-에틸-3-(디메틸아미노프로필) 카보디이미드 (EDC) 및 비오틴화 된 anti-마우스 IgG 를 Aldrich로부터 구입하였다.

[0109] 테트라부틸 암모늄 과염소산염 (TBAP), 말레이미드-PEO2-비오틴 (MCB) 및 트리스 (2-카르복시에틸) 포스핀 (TCEP) 를 Pierce로부터 구입하였다.

[0110] 포스페이트 버퍼 살린 (PBS) 용액은 0.01 M 포스페이트 및 0.15 M NaCl로 구성되어 있고, PBST는 PBS 및 0.05% (w/w) Tween 20로 구성되어 있다. 모든 버퍼와 수용액은 18.2 MΩ 순수로 제조하였다. 형광 이미지는 Olympus-IX71 형광 현미경을 이용해 촬영했다. 순환전압전류법 (Cyclic voltametry)은 Ivium Compactstat (B07014) Potentiostat로 수행하였다. XPS 를 SIGMA PROBE (ThermoVG, U.K)로 수행하였다.

[0111] **<제조예 1>**

[0112] **5-(2,2-디메틸-1,3-디티안-4-yl)펜탄산의 합성**

[0113] 100 ml의 2목 원형바닥 플라스크에 넣은 아세토니트릴(25 ml) 용액에, 프로판-2-온 (290 mg, 5 mmol) 과 6,8-디머캅토옥탄산 (1.500 g, 6 mmol)를 용해하였다. 그런 다음, 혼합액에 이트륨 트리플로로메탄술포네이트 (135 mg, 5 mol%)를 첨가하였다. 제조된 용액을 30분간 교반한다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 에틸 아세테이트와 물로 추출한 후 진공 여과하고 컬럼 크로마토그래피 (수율 93%)로 정제하여 누르스름한 혼합 용액을 얻었다. 컬럼 크로마토그래피는, 헥산 중의 15%의 에틸 아세테이트를 사용하였다.

[0114] 1H-NMR : δ ppm = 3.00-3.10 (m, 2H, CH and CH2), 2.76-2.79 (m, 1H, CH2), 2.35-2.38 (t, 2H, CH2), 2.15-2.18 (m, 1H, CH2), 1.81 (s, 3H, CH3), 1.61-1.67 (m, 6H, CH3 and 2 CH2), 1.45-1.59 (m, 4H, 2 CH2).

[0115] **<실시예 1>**

[0116] **5-(2,2-디메틸-1,3-디티안-4-일)-N-(3-(트리에톡시실릴)프로필)펜탄아마이드 (DTSI)의 합성**

[0117] 5-(2,2-디메틸-1,3-디티안-4-일)펜탄산 (500 mg, 2 mmol)을 THF (15 ml)에 용해하였다. 2-클로로-4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진 (420 mg, 2.4 mmol) 과 NMM (0.7 ml, 6 mmol)을 첨가하고 1 시간 동안 교반하였다. 3-(트리에톡시실릴)프로판-1-아민 (0.5 mL, 2 mmol) 을 적가한 후 8시간 동안 환류하였다. 반응이 완료된 후, 반응 용액을 셀라이트(Celite) 필터로 여과하였다. 그런 다음, 용액을 물 및 에테르로 추출한 후 NaHCO3로 세척하였다. 진공 증류 (750 mg) 후 누르스름한 용액을 얻었다. 최종 생성물은 컬럼 크로마토그래피 동안 불안정할 수 있기 때문에, NaHCO3로 수차례 세척하여 수득되어야 한다.

[0118] 1H-NMR : δ ppm = 5.72(s, 1H, NH), 3.80-3.85 (q, 6H, OCH2), 3.22-3.27 (q, 2H, CH2), 3.01-3.11(m, 2H, CH and CH2), 2.75-2.80 (m, 1H, CH2), 2.17-2.19 (m, 3H, 2 CH2), 1.80 (s, 3H, CH3), 1.60-1.66 (m, 6H, CH3 and 2 CH2), 1.43-1.56 (m, 6H, 3 CH2), 1.21-1.25 (t, 9H, CH3), 0.61-0.65 (t, 2H, CH2).

[0119] **<실시예 2>**

[0120] **디설파이드-기능화된 표면 상에 단백질의 고정화**

[0121] ITO 미세전극을 1 mM 의 DTSI를 함유한 아세토니트릴에 1 시간 40분 동안 침지한 후, 연속하여 에탄올, 아세톤 및 물로 세척하고, pirianha 용액에 5 초 동안 담근 후, 초순수로 세척하였다.

[0122] DTSI-개질된 ITO 표면에서 전극(i)에 대해, 양극 산화를0.1 M 테트라부틸 암모늄 과염소산염 (TBAP)을 포함하는 100% 아세토니트릴 (ACN) 중에서 수행하였다.

[0123] 그런 다음, 탈보호된 전극을 5 mM 말레이미드-PEO2-비오틴(MCB)과 PBS 중의 0.05 mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP)의 혼합 용액 10 L 로 처리하였고, 1 시간 20분간 인큐베이트하였다. 이어서PBS, 물로 세척한 후 N2 가스로 건조하였다. 그런 다음 어레이를 10L의 PBST 중의 1% Texas Red-표지된 아비딘(TR-SAv)에30분간 노출시켰다. 이어서PBS, 물로 세척한 후 N2 가스로 건조하였다.

[0124] 다른 DTSI-개질된 ITO 어레이를 앞서와 동일한 조건으로 양극 산화하였다. 그런 다음, 상기 ITO 어레이를 앞서와 동일한 조건으로 말레이미드-PEO2-비오틴(MCB)와 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP)의 혼합 용액으로 처리

하였다. 이어서 PBS, 물로 세척한 후 N2 가스로 건조하고, ITO 어레이를 10L의 PBST 중 10g/mL FITC-표지된 아비딘(FITC-SAv)에 노출시켰다. 이어서 PBST, 물로 세척한 후 N2 가스로 건조하였다. 제조된 ITO 표면을 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0125] 그 결과를 도 3(a)에 나타내었다. 도 3(a)에 따르면 선명하게 구별되는 레드와 그린이 각각 전극 (i)과 (iii)에서 관찰되었고, 이를 통해 말레이미드-비오틴(MCB)복합체가 성공적으로 결합되었다는 것을 확인할 수 있다. 또한, 양극 산화를 수행하지 않은 DTSI-개질된 전극 (ii) 및 (iv)는 환원제인 TCEP를 처리한 후에도 어떠한 형광 이미지도 나타나지 않은 것을 알 수 있다. 이를 통해 양극산화에 의한 표면 3의 디설파이드 뿐만 아니라 표면 4의 디티올의 존재를 확인할 수 있다.

[0126] **<실시예 3>**

[0127] **2개의 서로 다른 작용기를 나타내는 표면 상에 티올-함유 분자를 향한 티오설페이트기의 반응성을 나타내는 단백질의 고정화**

[0128] 세척된 ITO 미세전극을 1 mM의 DTSI 를 포함하는 아세토니트릴에 1 시간 40분 동안 침지하였다. 상기 DTSI-개질된 ITO 표면에 대해 각각 0.1 M TBAP-함유 70:30 ACN/H2O에서 전극 i과 ii의 양극 산화를 실시하고, 100% ACN에서 전극 iii 의 양극산화를 실시하였다. 따라서 ITO 어레이의 3개의 미세전극을 양극 산화에 사용하였다. ITO 어레이를 물 중의 5 mM 머캡토프로피온산(MPA)으로 40분 동안 처리하였다. 물로 세척한 후, N2 가스로 건조하고, 20 L의 PBS 내 0.1 M EDC/ 0.1 M NHS 를 ITO 어레이 상에 40분 동안 떨어뜨렸다. 이어서, PBS, 물로 세척한 후 N2 가스로 건조하였다. 그런 다음 10 L의 PBST 내 1% Texas Red-표지된 아비딘(TR-SAv)을 ITO 어레이 상에 떨어뜨렸다. PBS, 물로 세척한 후 N2 가스로 건조하고, 제조된 ITO 표면을 형광 현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 3(b)에 나타내었다.

[0129] **<실시예 4>**

[0130] **티오설피네이트-기능화된 표면(5) 상에 단백질의 고정화와 면역 어세이에의 응용**

[0131] 세척된 ITO 미세전극을 1 mM의 DTSI 를 포함하는 아세토니트릴에 1 시간 40분 동안 침지하였다. 상기 DTSI-개질된 ITO 표면에 대해 0.1 M TBAP-함유 70:30 ACN/H2O에서 단지 일 전극의 양극 산화를 실시하였다. 그런 다음 탈보호된 전극을 미리 준비된 PBST 내 anti-rabbit IgG (Ab-R)절편으로 2 시간 동안 처치하였다. 그 후 물로 세척한 후, N2 가스로 건조하였다. 다른 DTSI-개질된 ITO 어레이를 앞서와 동일한 조건으로 양극산화 하였다. 상기 ITO 어레이를 미리 준비된 PBST anti-마우스 IgG(Ab-M) 절편으로 30분 동안 처리하였다. 그 후 물로 세척한 후, N2 가스로 건조하였다. ITO 어레이를 PBST 내 5 g/mL rabbit IgG 와 5 g/mL 마우스 IgG를 포함하는 10 L의 혼합 용액에 1시간 동안 노출하였다. 이어서, PBST, 물로 세척한 후 N2 가스로 건조하였다. 5 g/mL TRITC-표지된 anti-rabbit IgG 과 5 g/mL FITC-표지된 anti-마우스 IgG in PBST 를 포함하는 10L의 혼합용액을 ITO 어레이 상에 1 시간 동안 떨어뜨렸다. 제조된 ITO 표면을 형광 현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 3(c)에 나타내었다.

[0132] 도 3(c)는 두 항원을 하나의 기판 상에서 동시 검출하여 얻은 현미경 사진을 나타낸다. 선명하게 구별되는 색의 전극 i과 iii의 이미지는 티올기를 갖는 항체의 전극 선택적이고 특이적 공유 결합 뿐만 아니라 멀티프로브 고정화에 대한 반응식 1c 의 유용성을 지지한다.

[0133] **<실시예 5>**

[0134] **양극 산화로 생성된 2종의 서로 다른 관능기를 갖는 ITO 표면 상의 단백질 고정화**

[0135] 세척된 ITO 미세전극을 1 mM의 DTSI 를 포함하는 아세토니트릴에 1 시간 40분 동안 침지하였다. 상기 DTSI-개질된 ITO 표면에 대해 0.1 M TBAP-함유 100% ACN에서 단지 일 전극의 양극 산화를 실시하였다. 탈보호된 전극을 5 mM 말레이미드-PEO2-비오틴과 0.05 mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 in PBS의 10 L 혼합 용액으로 처리하고, 1 시간 40분간 인큐베이트하였다. 이어서, PBS, 물로 세척한 후 N2 가스로 건조하였다. 다른 DTSI-개질된 ITO 전극을 0.1 M TBAP를 포함하는 70:30 ACN/H2O 중에서 양극 산화시켰다. 그런 다음, PBST 내 10 g/mL 스트렙타비딘과 anti-rabbit IgG 절편으로 이루어진 10 L의 혼합용액을 ITO 어레이에 1 시간 동안 떨어뜨렸다. 이어서,

PBS, 물로 세척한 후 N2 가스로 건조하였다. ITO 어레이를 10 L 의 10g/mL 비오틴화된 anti-마우스 IgG in PBST 에 1 시간 동안 노출하였다. 이어서, PBS, 물로 세척한 후 N2 가스로 건조하였다. 5 g/mL rabbit IgG 과 5 g/mL 마우스 IgG in PBST 를 포함하는 10 L의 혼합 용액을 ITO 어레이에 1 시간 동안 떨어뜨렸다. 이어서, PBST, 물로 세척한 후 N2 가스로 건조하였다. 10 L의 10 g/mL TRITC-표지된 anti-rabbit IgG 과 10 g/mL FITC-표지된 anti-마우스 IgG in PBST을 포함하는 혼합 용액을 ITO 어레이에 1시간 동안 떨어뜨렸다. 제조된 ITO 표면을 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0136] 도 4b는 샌드위치 면역 어세이로 두 개의 컬러로 구별되는 패턴이 나타났음을 보여주는 바, 본 발명에 따른 어레이 표면의 멀티기능화 개질의 유용성을 뒷받침한다.

[0137] **항체 절편의 준비: 티올기 함유 항체의 제조**

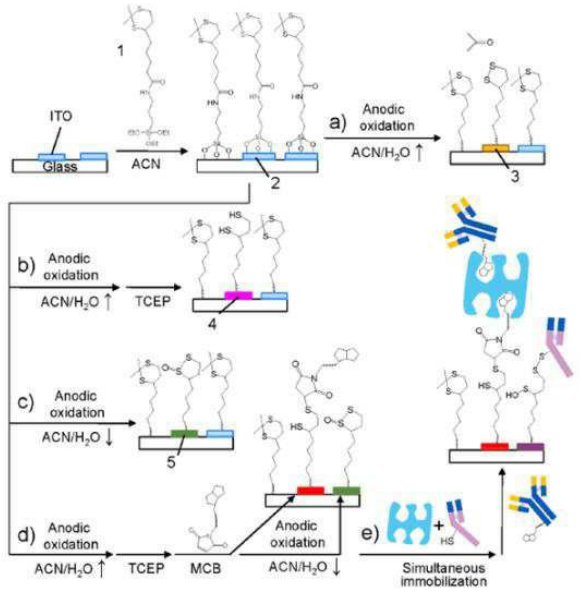
[0138] 30 g의 anti-rabbit IgG 과 100 g의 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP)을 500 L의 PB 용액에 가하고, 3 시간 동안 배양하였다. 혼합용액 내 TCEP 을 14,000 g, 4 ° C에서 17 분(cut-off MW: 50,000 Dalton) 동안 원심분리하여 제거하였다. 그런 다음 200L의 PB를 첨가하고 14,000 g 에서 13 분간 재차 원심분리하였다. TCEP의 제거가 완료된 후, 30 L PBST 를 첨가한 다음 즉시 사용하였다.

[0139]

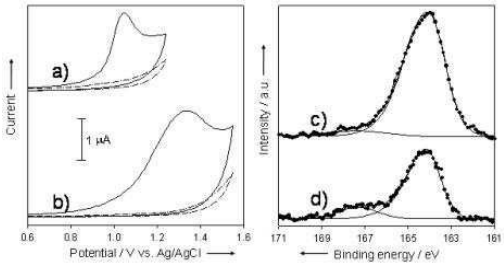
[0140] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

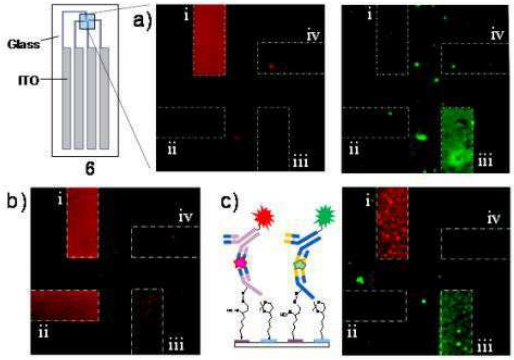
도면1



도면2


a)
b)
1 μA
Current
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
Potential / V vs. Ag/AgCl
c)
d)
Intensity / a.u
171
169
167
165
163
161
Binding energy / eV

도면3


Glass
ITO
6
a)
b)
c)
i
ii
iii
iv

도면4

