

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0052876 (43) 공개일자 2016년05월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인화로 100, 인하대학교 (용현동)
(21) 출원번호 10-2014-0148079		(72) 발명자 전태준 경기도 용인시 기흥구 한보라2로 93 화성파크드림 아파트 305동 1801호 김선민 인천광역시 남동구 장승남로 82 현대아파트 101동 1402호 (뒷면에 계속)
(22) 출원일자 2014년10월29일 심사청구일자 2014년10월29일		(74) 대리인 김순웅

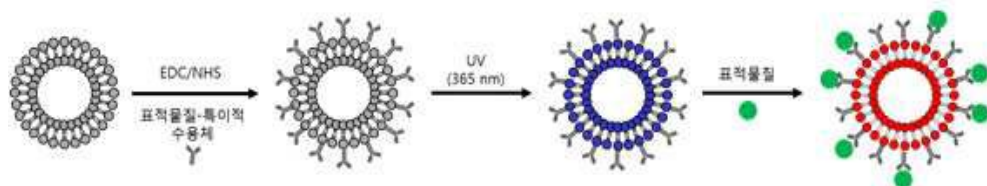
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 장기간 보관이 가능한 폴리디아세틸렌 기반의 바이오센서

(57) 요약

본 발명은 동결-건조를 이용한 폴리디아세틸렌(PDA) 기반의 표적물질 검출용 바이오센서 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 표적물질 검출용 바이오센서는 표적물질-특이적 수용체가 결합된 PDA 소포가 포집된 하이드로젤을 동결-건조함으로써, 외부의 자극에도 보존성이 우수하고, 장기 보관이 가능하며, 휴대성이 편리하고, 상기 바이오센서를 이용하여 표적물질을 검출하는 경우, 별도의 분석장비 없이도 색 변화를 통한 단순하고 경제적인 방법으로 우수한 표적물질 검출 효과를 나타낸다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

장희수

인천광역시 연수구 솔샘로 98, 2동 401호 (청학동, 안보빌라)

김영록

경기 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학관 508호 (서천동, 경희대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ007995

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 국립농업과학원

연구사업명 바이오그린21연구사업

연구과제명 최신 나노/애플타머 기술을 이용한 GMO 검정방법 개발

기 여 율 1/2

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012-0009575

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망융합기술파이오니어사업

연구과제명 생체채널기반 분자/이온 이송 시스템 기술

기 여 율 1/2

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

표적물질-특이적 수용체; 상기 수용체가 결합된 폴리디아세틸렌(PDA) 소포; 및 상기 PDA 소포가 내부에 포집된, 동결-건조된 하이드로젤;을 포함하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 표적물질-특이적 수용체는 항체, 압타머, 합성 리셉터, 이온너포어, 에피토프, DNA 프로브, RNA 프로브, 바이오틴, 단백질 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서.

청구항 3

제 1항에 있어서,

표적물질은 물리적 또는 화학적 상호작용에 의해 상기 표적물질-특이적 수용체와 결합하는 것을 특징으로 하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 표적물질은 금속 이온, DNA, RNA, ATP, 단백질, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 단백질은 트롬빈(thrombin), 피브리노젠(fibrinogen), 면역글로불린 G(immunoglobulin G, IgG), 면역글로불린 M(IgM), 면역글로불린 A(IgA), 면역글로불린 D(IgD), 헤모글로빈(hemoglobin), 미오글로빈(myoglobin), 알부민(albumin), 카제인(casein), 프롤라민(prolamin), 액틴(actin), 미오신(myosin), 콜라겐(collagen), 및 케라틴(keratin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 동결-건조는 -70 내지 -90℃에서 예비동결을 수행한 후, 진공 건조하는 것을 특징으로 하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 하이드로젤은 폴리에틸렌글리콜, 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 조성물로 포함하는 것을 특징으로 하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서.

청구항 8

(1) 폴리디아세틸렌(PDA) 소포를 준비하는 단계;

- (2) 상기 PDA 소포에 표적물질-특이적 수용체를 결합하는 단계; 및
- (3) 상기 수용체가 결합된 PDA 소포를 하이드로젤 내부에 포집한 후, 동결-건조하는 단계를 포함하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서의 제조방법.

청구항 9

제 1항의 바이오센서의 동결-건조된 PDA 소포를 재수화한 후, 표적물질을 가하여 색 변화를 탐지하는 단계를 포함하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서를 이용한 표적물질 검출방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 표적물질-특이적 수용체가 폴리디아세틸렌(PDA) 소포에 결합되어 있고, 상기 PDA 소포가 포집된 하이드로젤을 동결-건조한, 장기간 보관이 가능하며 휴대성이 편리한 표적물질 검출용 바이오센서에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 폴리디아세틸렌(polydiacetylene, PDA) 소포(vesicle)는 외부 교란, 예컨대 열, pH, 물리적 또는 화학적 자극, 또는 용매 등에 의해 청색에서 적색으로 변색하는 양색 발현능을 보이는 물질이다. 나아가, 적색의 폴리디아세틸렌 소포는 형광을 발현하는 성질까지 가지고 있어, 이러한 성질을 이용하여 각종 센서로서 개발되어 왔다. 예를 들어, 폴리디아세틸렌 센서는 인플루엔자 바이러스, 콜레라 독성물질, 대장균, 올리고뉴클레오타이드, 리포폴리사카라이드, 항체 및 항원 등 많은 다른 생물학적으로 관련된 흥미있는 분자들의 검출에 이용되어 왔다. 그러나, 지금까지 센서로서의 폴리디아세틸렌의 응용은 시간이 경과함에 따라 외부의 물리적 또는 화학적 자극에 노출될 위험이 있어 변색의 가능성이 존재하고, 결국에는 센서로서의 기능이 소실되는 문제점이 존재하였다.
- [0003] 동결-건조는 시료를 -40°C 이하의 온도로 동결시킨 후, $0.1\sim 1.0$ torr의 진공도로 -40°C 에서 25°C 전후의 온도 사이에서 수분을 승화시켜 건조하는 방법이다. 상온이나 다름없는 저온에서 건조가 되기 때문에 조직 등의 파괴가 극히 적고 장기 보관이 가능하다. 따라서 동결건조의 장점은 건조에 의한 수축현상이나, 형태의 변화가 없으며, 본연의 조직 구조가 파괴되지 아니하고, 가수시 2~3분 이면 원형상태로 복원이 되는 것이다.
- [0004] 따라서, 이러한 동결-건조를 이용한 외부의 자극에도 보존성이 우수하고, 장기 보관이 가능하며, 휴대성이 편리한 폴리디아세틸렌 기반의 바이오센서에 대한 연구의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) KR 10-2008-0047683

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명자들은 표적물질 검출용 바이오센서에 대해 탐색하던 중, 표적물질-특이적 수용체가 결합된 PDA 소포가 포집된 하이드로젤을 동결-건조하는 경우, 외부의 자극에도 보존성이 우수하고, 장기 보관이 가능하며, 휴대성이 편리한 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0007] 따라서, 본 발명은 동결-건조를 이용한 폴리디아세틸렌(PDA) 기반의 표적물질 검출용 바이오센서 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서,
- [0009] 본 발명은

- [0010] 표적물질-특이적 수용체; 상기 수용체가 결합된 폴리디아세틸렌(PDA) 소포; 및 상기 PDA 소포가 내부에 포집된, 동결-건조된 하이드로젤;을 포함하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은
- [0012] (1) 폴리디아세틸렌(PDA) 소포를 준비하는 단계;
- [0013] (2) 상기 PDA 소포에 표적물질-특이적 수용체를 결합하는 단계; 및
- [0014] (3) 상기 수용체가 결합된 PDA 소포를 하이드로젤 내부에 포집한 후, 동결-건조하는 단계를 포함하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서의 제조방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은
- [0016] 상기 바이오센서의 동결-건조된 PDA 소포를 재수화한 후, 표적물질을 가하여 색 변화를 탐지하는 단계를 포함하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서를 이용한 표적물질 검출방법을 제공한다.
- [0017] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0018] 본 발명은, 표적물질-특이적 수용체; 상기 수용체가 결합된 폴리디아세틸렌(PDA) 소포; 및 상기 PDA 소포가 내부에 포집된, 동결-건조된 하이드로젤;을 포함하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서를 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은, (1) 폴리디아세틸렌(PDA) 소포를 준비하는 단계; (2) 상기 PDA 소포에 표적물질-특이적 수용체를 결합하는 단계; 및 (3) 상기 수용체가 결합된 PDA 소포를 하이드로젤 내부에 포집한 후, 동결-건조하는 단계를 포함하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서의 제조방법을 제공한다.
- [0020] 일반적으로 "수용체"란 검출하고자 하는 표적물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하는데, 본 발명에서는 표적물질과 특이적으로 결합하는 수용체를 사용하였다.
- [0021] 상기 표적물질-특이적 수용체는 항체, aptamer(아프타머), 합성 리셉터(receptor), 이오노포어(ionophore), 에피토프(epitope), DNA 프로브, RNA 프로브, 바이오틴, 단백질 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있고, 표적물질과 선택적으로 결합하는 DNA, RNA 서열이라면 무엇이든지 가능할 수 있다.
- [0022] 표적물질은 상기 표적물질-특이적 수용체와 선택적으로 결합하는 물질로서, 물리적 또는 화학적 상호작용에 의해 상기 표적물질-특이적 수용체와 결합할 수 있는 물질이라면 제한 없이 검출될 수 있다. 즉 표적물질은 금속 이온, DNA, RNA, ATP 및 단백질 등과 같은 화학 또는 바이오 물질을 일컫는다.
- [0023] 상기 단백질로는 트롬빈(thrombin), 피브리노겐(fibrinogen), 면역글로불린 G(immunoglobulin G, IgG), 면역글로불린 M(IgM), 면역글로불린 A(IgA), 면역글로불린 D(IgD), 헤모글로빈(hemoglobin), 미오글로빈(myoglobin), 알부민(albumin), 카제인(casein), 프롤라민(prolamin), 액틴(actin), 미오신(myosin), 콜라겐(collagen), 및 케라틴(keratin) 등 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0024] 상기 폴리디아세틸렌(PDA) 소포는 디아세틸렌 계열의 지질로 구성된 소포 형태의 구조체로, 지질의 꼬리 부분에 두 개의 3중 결합을 가지고 있어, 가교를 통해 색 변화하는 특성을 가진다. 청색의 폴리디아세틸렌 소포는 온도, pH, 용매, 물리적 자극, 화학적 자극 등과 같은 외부 환경의 변화에 의해 약 540nm에서 최대 흡수 파장을 지니는 붉은색으로 전이가 일어나면서 적색의 폴리디아세틸렌 형광체가 된다.
- [0025] 상기 동결-건조라 함은 수용액이나 물 등을 포함하는 시료를 동결하고, 진공장치 내에서 수증기압 이하로 감압하여 얼음을 승화시켜 건조하는 방법이다. 본 발명에서 동결-건조하는 이유는 저온에서 일어나기 때문에 시료의 파손이 적고, 하이드로젤이 동결 건조에 의해 얼음이 되었다가 그대로 기화되면서 본래의 성질을 그대로 유지하기 때문에 시료의 장기간 보관성이 좋기 때문이다.
- [0026] 상기 동결-건조는 저온 냉동고나 액체 질소를 이용하여 -70 내지 -90℃에서, 더욱 바람직하게는 -80℃에서 예비 동결을 수행한 후, 진공 건조하는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 하이드로젤은 용액 속에 입자들이 들어가 고체나 반고체로 굳어진 물질로서, 이 중 용액이 물인 것을 하이드로젤이라고 한다. 상기 하이드로젤은 폴리에틸렌글리콜, 폴리알크릴산, 폴리메타크릴산, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 조성물로 포함하는 것이 바람직하고, 본 발명에 따른 폴리에틸렌글리콜 디알크릴레이트(PEG-DA)를 조성물로 포함하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0028] 또한, 본 발명은

[0029] 상기 바이오센서의 동결-건조된 PDA 소포를 재수화한 후, 표적물질을 가하여 색 변화를 탐지하는 단계를 포함하는, 장기간 보관이 가능한 바이오센서를 이용한 표적물질 검출방법을 제공한다.

[0030] 상기 재수화는 상기 동결-건조된 PDA 소포에 수분을 공급하여 본래의 상태로 돌아가게 하는 것으로써, 상기 재수화는 동결-건조된 PDA 소포를 재수화 용액에 담그어 수행되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따른 표적물질 검출용 바이오센서는 표적물질-특이적 수용체가 결합된 PDA 소포가 포집된 하이드로젤을 동결-건조함으로써, 외부의 자극에도 보존성이 우수하고, 장기 보관이 가능하며, 휴대성이 편리하고, 상기 바이오센서를 이용하여 표적물질을 검출하는 경우, 별도의 분석장비 없이도 색 변화를 통한 단순하고 경제적인 방법으로 우수한 표적물질 검출 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 표적물질-특이적 수용체가 결합된 PDA 소포의 표적물질 검출에 따른 색 변화를 나타내는 도이다.

도 2는 본 발명에 따른 PDA 소포의 외부 자극에 따른 색 변화를 나타내는 도이다.

도 3은 본 발명에 따른 PDA 소포의 (a) 하이드로젤화, (b) 동결-건조, (c) 재수화 및 (d) 외부 자극에 따른 색 변화를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0034] 실시예 1. 동결-건조를 이용한 표적물질 검출용 바이오센서의 제조

[0035] 1-1. 폴리디아세틸렌(PDA) 소포(vesicle)의 준비

[0036] 폴리디아세틸렌 소포의 제조를 위해, TCDA(10,12-Tricosadiynoic acid)를 GFS 케미컬(Columbus, OH, USA)에서 구매하고, DMPC(1,2-dimyristoyl phosphatidylcholine)를 아반티 폴라 리퀴드(Alabaster, AL, USA)에서 구매하고, 클로로포름을 플루카(Buchs, 스위스)에서 구매하였다. 또한, HEPES는 시그마-알드리치 (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 3차중류수에 5mM만큼 녹인 후 pH 7.5로 맞추어 사용하였다.

[0037] 폴리디아세틸렌(PDA) 소포는 공지된 방법에 따라 제조하였다(Su Y-l et al. (2004) Biointerfaces 38(1-2):29-33). 먼저, 두 종류의 지질 단량체, TCDA와 DMPC를 바이알에서 최종 농도 2mM에 맞추어 8:2 몰 비율로 클로로포름에 용해하였다. 그 후, 아르곤 기체 스트림으로 클로로포름을 날려서 제거하고, 남아있는 용매를 완전히 제거하기 위해 진공 상태에서 하룻밤 동안 정치하였다. 최종 2mM 지질 농도에 맞춰 HEPES 용액(5mM, pH 7.5)을 가한 후, 이 용액을 80℃의 수조에서 1시간 동안 가열한 뒤 15분 동안 초음파처리(probesonicator, Sonics & Materials, INC, VCX 500)하였다. 초음파처리 후, 지질 응집물을 제거하기 위해 0.8μm 시린지 필터를 이용하여 용액을 여과하고, 지질 멤브레인의 결정화를 위해 4℃에서 냉장 보관하여 하룻밤 동안 정치하였다. 365nm 파장의 UV (Vilber Lourmat, VL-4.LC)를 조사함으로써 배열된 디아세틸렌 단량체는 1,4-첨가(1,4-addition)에 의한 중합을 이루게 되고 청색의 PDA 소포 용액을 얻었다.

[0038] 1-2. PDA 소포에 표적물질-특이적 수용체의 결합

[0039] PDA 소포와 표적물질-특이적 수용체를 결합하기 위해, EDC(N-ethyl-N-(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide), NHS(N-hydroxysuccinimide), HEPES, 및 에탄올아민(ethanolamine)을 시그마-알드리치(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고, 표적물질-특이적 수용체로써 항-PAT 항체를 제작하여 사용하였다.

[0040] 폴리디아세틸렌(PDA) 소포 표면에 표적물질-특이적 수용체의 결합은 공지된 방법에 따라 EDC/NHS 짝지음반응(coupled reaction)을 이용하여 진행하였다(Lim M-C et al. (2011) Anal Bioanal Chem 400:777-785). 먼저, 표면의 활성화를 위해 실시예 1-1에서 제조한 PDA 소포를 20mM EDC 및 40mM NHS가 용해된 5mM의 HEPES 버퍼 (pH 7.5)와 혼합하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후, 잔여 EDC 및 NHS를 원심분리기(Eppendorf 5415R,

Eppendorf Gerätebau, Hamburg, Germany)를 이용하여 제거하였다.

[0041] PAT 단백질을 준비하기 위해 PAT 단백질을 코딩하는 pat 유전자를 GM 옥수수 Bt11에서 추출하여 pET15b 벡터에 클로닝한 후, 이 콜라이(E.coli) BL21에서 과발현하였다. 항-PAT 항체는 앞서 얻은 PAT 단백질을 토끼에 주입하여 세 번의 면역반응을 통해 얻었다.

[0042] 활성화된 PDA 소포를 4℃의 반응기에서 300 μ g/ml 농도의 항-PAT 항체와 하룻밤 동안 반응시켜 결합체를 제조하였다. 또한, 원심분리용 필터(Centrifu-gal filter (MWCO, 30,000 Da, Microcon, Millipore, Bedford, MA, USA)를 이용하여 결합이 일어나지 않은 잔여 항체를 제거하였다. 그 후, PDA 소포 표면이 활성화된 부분 중 항체가 결합되지 않은 부분을 2mM의 에탄올아민(ethanolamine)과 반응시켜 비활성화시켰다. 그 후, 365nm 파장의 UV를 조사함으로써 PDA 소포는 중합체를 형성하고 청색으로 바뀌었다. 표적물질-특이적 수용체가 결합된 PDA 소포의 표적물질 검출에 따른 색 변화를 도 1에 나타내었다.

[0043] 1-3. 하이드로젤 내부에 포집된 PDA 소포의 동결-건조

[0044] 하이드로젤의 제작 및 동결-건조를 위해, PEG-DA(Poly(ethylene glycol) diacrylate), Tris-EDTA 버퍼, 및 Darocur 1173 (2-hydroxy-2-methylpropiophenon)을 시그마-알드리치(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

[0045] 먼저, PEG-DA를 1 $\times$ tris-EDTA 버퍼 용액과 1:1 부피비로 혼합하고, 광 개시제인 Darocur 1173을 5%의 부피비로 가하여 PEG-DA 용액을 제조하였다. 그 후, 실시예 1-2에서 제조한 항체가 결합된 PDA 소포 및 PEG-DA 용액을 4:1의 부피비로 혼합하였다. 상기 혼합용액을 365nm 파장의 자외선 빛에 노출시켜 PDA 소포가 포집된 하이드로젤을 제작하였다. 하이드로젤의 장기간 보관을 위해 동결-건조를 이용하였다. 먼저, PDA 소포가 포집된 하이드로젤을 -80℃의 급속냉동냉장고에 보관하여 동결시켰고, 이를 동결-건조기에서 -40℃의 온도 및 0 mmHg의 압력으로 고정된 후, 온도가 25 ℃가 될 때까지 24시간 동안 서서히 건조시켰다.

[0046] 실험예 1. 동결-건조된 하이드로젤의 재수화 및 색 변화 측정

[0047] 1-1. PDA 소포의 색 변화 측정

[0048] 실시예 1-1에 따라 제조한 PDA 소포의 외부 자극에 의한 색 변화를 측정하였고, 이의 결과를 도 2에 나타내었다.

[0049] 도 2에 나타난 바와 같이, PDA 소포는 365nm 파장의 UV를 조사함으로써 청색을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 그러나, 청색의 PDA 소포에 외부 자극(기계적, pH 또는 온도 자극)을 가한 경우, 청색의 PDA 소포에서 적색의 PDA 소포로 변화한 것을 확인할 수 있다.

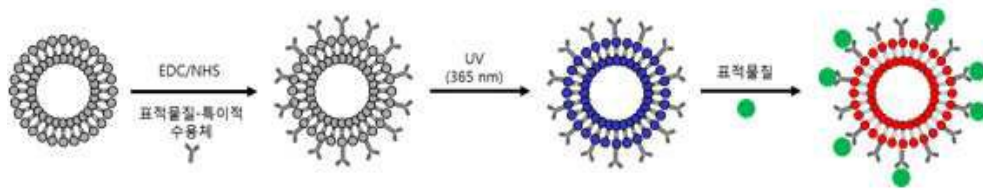
[0050] 1-2. 동결-건조된 하이드로젤의 재수화 및 색 변화 측정

[0051] 실시예 1-1 내지 1-3에 따라 제조한 PDA 소포가 내부에 포집된, 동결-건조된 하이드로젤을 보관용액이 채워진 바이알에 넣어 재수화시킨 후, 표적물질로서 PAT 단백질을 가하여 색 변화를 측정하였다. 이의 결과를 도 3에 나타내었다.

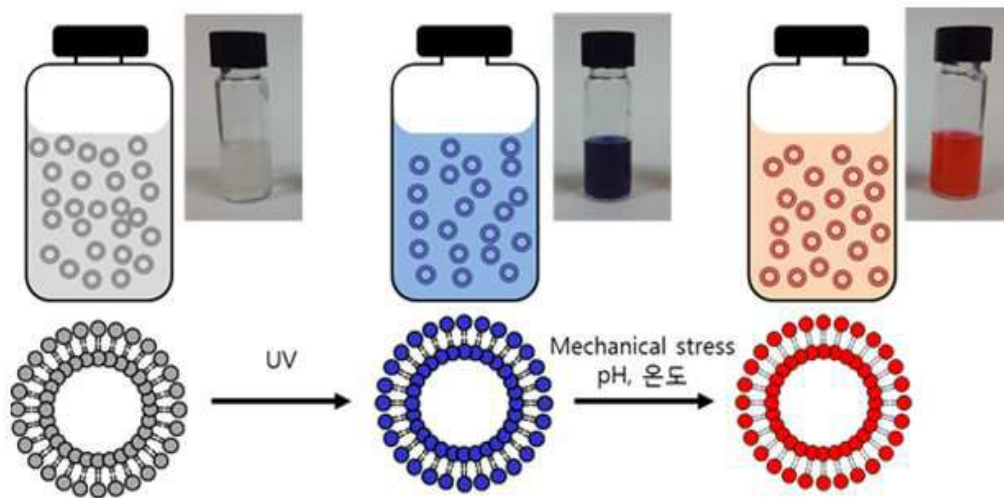
[0052] 도 3에 나타난 바와 같이, 재수화된 하이드로젤은 청색을 나타냈으나, 표적물질인 PAT 단백질을 가한 경우, 청색에서 적색으로 변화한 것을 확인할 수 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

