



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0059667
(43) 공개일자 2016년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/58 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0161433

(22) 출원일자 2014년11월19일

심사청구일자 2014년11월19일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

에스에프씨 주식회사

충청북도 청원군 오창읍 과학산업5로 89

(72) 발명자

조봉래

서울특별시 성동구 성수일로4길 26 103동 504호(성수동2가, 서울숲힐스테이트아파트)

(74) 대리인

정은열

전체 청구항 수 : 총 7 항

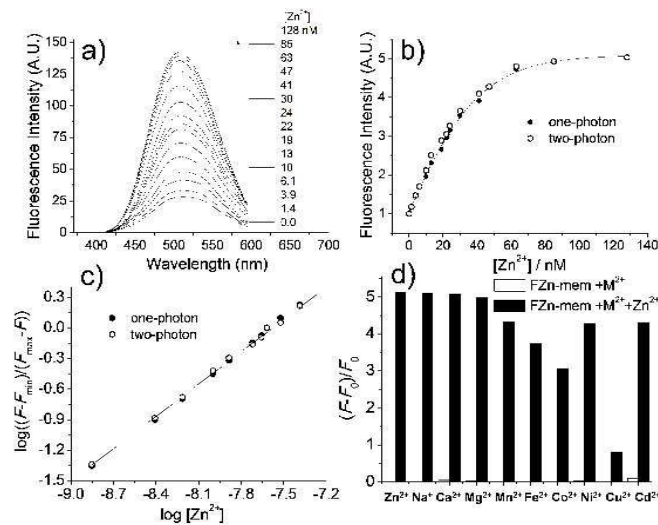
(54) 발명의 명칭 원형질막 부근의 아연 이온 검출을 위한 이광자 프로브 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 원형질막 부근의 아연 이온 검출을 위한 이광자 프로브, 이의 제조방법 및 상기 이광자 프로브를 이용하여 원형질막 부근의 아연 이온을 검출하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 이광자 프로브는 살아 있는 세포 및 조직 슬라이스 내에 쉽게 도입되어 이광자 현미경법에 의해 원형질막 부근의 아연 이온을 장시간 동안 다른 경쟁 금속이온에 의한 방해, pH, 세포독성 및 광안정성에 의한 영향이 최소화된 상태에서 검출할 수 있다.

대표도 - 도3



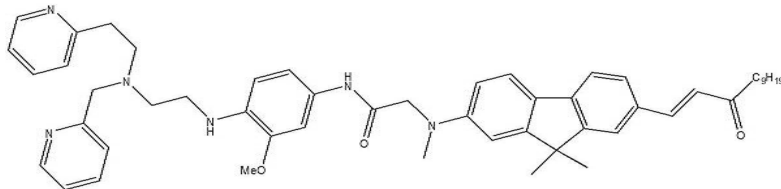
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 원형질막 부근의 아연 이온 검출용 이광자 프로브:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이광자 프로브는 800 내지 850 nm 파장대의 레이저 펄스에 의해 여기되는 것을 특징으로 하는 원형질막 부근의 아연 이온 검출용 이광자 프로브.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 이광자 프로브는 820 nm의 파장대에서 40 내지 45 GM의 이광자 동작 단면적($\Phi \delta$)을 갖는 것을 특징으로 하는 원형질막 부근의 아연 이온 검출용 이광자 프로브.

청구항 4

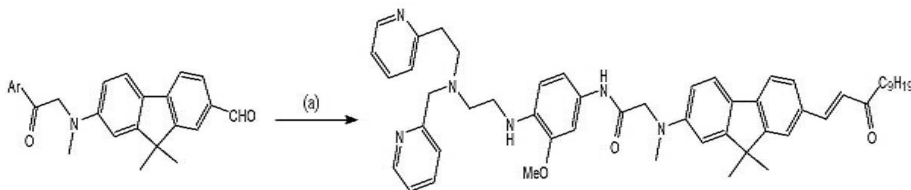
제1항에 있어서,

상기 이광자 프로브는 생체 세포 또는 생체 조직 내 100 내지 120 μm 의 투과 깊이에서 원형질막 부근의 아연 이온을 검출할 수 있는 것을 특징으로 하는 원형질막 부근의 아연 이온 검출용 이광자 프로브.

청구항 5

하기 [반응식 1]에 따라, 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물로부터 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 원형질막 부근의 아연 이온 검출용 이광자 프로브를 제조하는 방법:

[반응식 1]

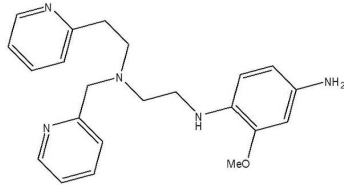


[화학식 2] [화학식 1]

상기 [반응식 1]에서,

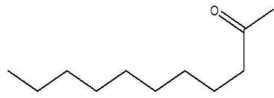
Ar은 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물이고,

[화학식 3]



(a)는 NaOH, EtOH 및 하기 [화학식 4]로 표시되는 화합물을 포함하는 반응조건이다

[화학식 4]



청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 이광자 프로브를 관찰 대상이 되는 생체질 내로 주입한 후, 방출되는 이광자 여기 형광 영상을 관찰하는 단계를 포함하는 원형질막 부근의 아연 이온의 검출 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 이광자 여기 형광 영상은 상기 관찰대상의 생체 세포 또는 생체 조직 내 100 내지 120 μm 깊이의 원형질막 부근에서 방출되는 것을 특징으로 하는 원형질막 부근의 아연 이온의 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 원형질막 부근의 아연 이온 검출을 위한 이광자 프로브, 이의 제조방법 및 상기 이광자 프로브를 이용하여 원형질막 부근의 아연 이온을 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아연 이온은 효소와 단백질의 활성성분으로서, 정상적인 세포기능을 비롯한 다양한 생물학적인 과정에서 필수적인 성분이다. 아연 이온은 대부분 단백질 및 펩티드와 단단하게 결합되어 있고, 이동성 있는 세포 내 아연 이온은 뇌, 장, 췌장 및 망막을 포함한 다양한 인간 조직 내에 존재하며, 그 중 소량만이 세포 내에서 자유 아연 이온(Zn^{2+})으로 존재한다. 뇌에서 사이토졸 내 자유 아연 이온의 농도는 피코몰 범위이며, 수 밀리몰의 자유 아연 이온이 저장된 시냅스 전 소낭에서 방출시, 마이크로몰 수준으로 증가할 수 있다.

[0003] 뇌가 정상적으로 기능하기 위해서는 아연 이온의 항상성 유지가 매우 중요한데, 이는 세포 외 공간과 소포체 및 미토콘드리아와 같은 특정 세포소기관 사이의 자유 아연 이온의 전달에 의해 조절된다. 따라서 아연 이온의 생물학적 기능을 이해하기 위해서는 사이토졸, 미토콘드리아, 소포체, 원형질막과 같은 여러 세포환경에서의 아연 이온 활성을 모니터링하는 것이 필수적이다.

[0004] 최근에는, 낮은 여기 에너지를 갖는 이광자를 사용하여 장시간 동안 조직 내부를 비파괴적으로 영상화할 수 있는 이광자 현미경(two-photon microscopy, TPM)을 이용하여 생물학적 활성을 시각화하는 기술이 개발되었으며, 특히 이광자 현미경을 이용하여 세포질 및 미토콘드리아 내의 아연 이온을 검출할 수 있는 이광자 프로브들이 개발되었다. 예를 들어, 대한민국 등록특허 제10-0954585호에서는 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자염료, 그 제조방법 및 이를 이용한 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링 방법에 대한 기술이 개시된 바 있다.

[0005] 그러나, 여전히 아연 이온을 검출할 수 있는 이광자 프로브는 매우 드문 실정이고, 특히 원형질막 부근의 아연 이온을 검출할 수 있는 이광자 프로브에 대한 연구 보고는 전무하다.

발명의 내용

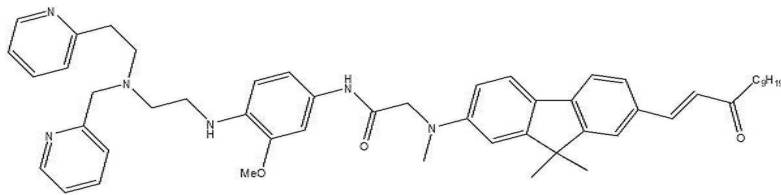
해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 원형질막 부근의 아연 이온을 효과적으로 검출할 수 있는 이광자 프로브, 이의 제조방법 및 상기 이광자 프로브를 이용하여 원형질막 부근의 아연 이온을 검출하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 원형질막 부근의 아연 이온 검출용 이광자 프로브를 제공한다:

[0008] [화학식 1]



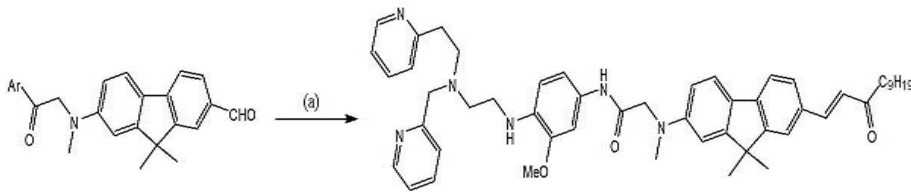
[0009] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 이광자 프로브는 800 내지 850 nm 파장대의 레이저 펄스에 의해 여기될 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 이광자 프로브는 820 nm의 파장대에서 40 내지 45 GM의 이광자 동작 단면적($\Phi \delta$)을 갖는 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 이광자 프로브는 생체 세포 또는 생체 조직 내 100 내지 120 μm 의 투과 깊이에서 원형질막 부근의 아연 이온을 검출할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 하기 [반응식 1]에 따라, 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물로부터 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 원형질막 부근의 아연 이온 검출용 이광자 프로브를 제조하는 방법을 제공한다:

[0014] [반응식 1]

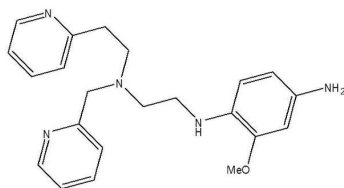


[0015] [화학식 2] [화학식 1]

[0017] 상기 [반응식 1]에서,

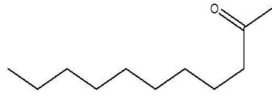
[0018] Ar은 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물이고,

[0019] [화학식 3]



[0020] (a)는 NaOH, EtOH 및 하기 [화학식 4]로 표시되는 화합물을 포함하는 반응조건이다

[0022] [화학식 4]



[0023]

[0024]

또한, 본 발명은 상기 이광자 프로브를 관찰 대상이 되는 생체질 내로 주입한 후, 방출되는 이광자 여기 형광 영상을 관찰하는 단계를 포함하는 원형질막 부근의 아연 이온의 검출 방법을 제공한다.

[0025]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 이광자 여기 형광 영상은 상기 관찰대상의 생체 세포 또는 생체 조직 내 100 내지 120 μm 깊이의 원형질막 부근에서 방출되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0026]

본 발명에 따른 이광자 프로브는 살아 있는 세포 및 조직 슬라이스 내에 쉽게 도입되어 이광자 현미경법에 의해 원형질막 부근의 아연 이온을 장시간 동안 다른 경쟁 금속이온에 의한 방해, pH, 세포독성 및 광안정성에 의한 영향이 최소화된 상태에서 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027]

도 1은 본 발명에 따른 이광자 프로브(이하, 'FZn-mem'이라 한다.)의 MOPS 완충액 내에서의 용해도를 측정한 결과를 나타내는 것으로서, a)는 이광자 프로브의 일광자 형광 스펙트럼이고, b)는 이광자 프로브의 농도에 따른 형광 강도를 나타내는 그래프이며, 여기 파장은 395 nm이다.

도 2는 1, 4-디옥산(1, 4-dioxane), DMF, EtOH, MOPS 완충액 및 MOPS/DPPC(1/1) 내에서의 FZn-mem의 정규화된 흡광(a) 및 발광(b) 스펙트럼이다.

도 3에서 a)는 자유 아연 이온(0-128 nM)의 존재 하에서 5 μM Fzn-mem의 이광자 형광 스펙트럼이고, b)는 Fzn-mem과 자유 아연 이온의 착물화 반응에 대한 일광자 및 이광자 형광 적정곡선이며, c)는 Fzn-mem과 자유 아연 이온의 착물화 반응에 대한 Hill곡선이고, d)는 5.0 mM의 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 및 300 μM Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} 존재 하 및 5.0 μM 의 아연 이온을 가한 후 5.0 μM Fzn-mem 상대 형광 강도를 나타내는 그래프이며, 모든 데이터는 MOPS/DPPC(1/1) 내에서 측정하였고, 일광자 및 이광자 파장의 여기 파장은 각각 395 nm와 800 nm이다.

도 4에서 a) 및 b)는 각각 자유 아연 이온(0-128 nM)의 존재 하에서 FZn-mem의 일광자 흡광 및 발광 스펙트럼 (30 mM MOPS, 100 mM KCl, 10 mM EGTA 및 DPPC(1:1), pH 7.2)이고, c)는 MOPS/DPPC(1/1) 내에서 Fzn-mem과 자유 아연 이온의 착물화에 대한 Job곡선이며, d)는 MOPS/DPPC(1/1) 내에서 자유 아연 이온의 부존재 및 존재시 pH가 5 μM Fzn-mem의 일광자 형광강도에 미치는 영향을 측정한 그래프이며, 모든 데이터에서 자유 아연 이온이 0 μM 일 때의 데이터는 10 mM EGTA를 첨가하여 구하였으며 여기 파장은 395 nm이다.

도 5는 DMF 내에서 128 nM 자유 아연 이온의 부존재 및 존재시 5 μM Fzn-mem의 이광자 동작 스펙트럼이다.

도 6에서 a), c) 및 d)는 5 μM Fzn-mem 존재 하에 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20 분 동안 인큐베이션한 HeLa세포의 TPM 이미지로, a)는 DTTP로 처리하기 전, c)는 150 μM 의 DTTP로 처리한 후, d)는 150 μM 의 DTTP 및 10 μM 의 CCCP로 처리한 후의 TPM 이미지이다. b)는 DPPC와 CCCP로 처리한 후 a)에서 원으로 표시된 개별 세포들의 시간에 따른 TPEF를 나타낸다. TPM 이미지는 820 nm의 여기 파장을 사용하여 450-600 nm에서 2.0초 간격으로 촬영한 것이다 (스케일바 30 μm).

도 7은 CCK-8 키트(Cell Counting Kit-8, Dojindo, Japan)를 사용하여 농도별 Fzn-mem 존재 하에 HeLa세포의 생존능을 측정한 그래프이다.

도 8에서 (a) 및 (c)는 5 μM Fzn-mem으로 표지된 HeLa세포의 TPM 이미지이며, (b)는 (a)에서 원으로 표시된 영역의 이광자 형광 스펙트럼이고, (d)는 (c)에서 표시된 A-C영역의 시간에 따른 상대적인 TPEF 강도를 나타낸 것으로서, xyt 모드에서 1시간 동안 1.63초 간격으로 디지털화된 강도를 기록하였고, 820 nm에서 fs펄스로 여기시킨 후 450-600 nm에서 TPEF를 기록하였다. 반복 실험(n=5) 후 얻은 세포의 대표적 이미지이다.

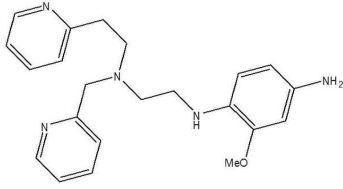
도 9는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 30 μM Fzn-mem으로 표지된 랫트 해마 슬라이스의 TPM 이미지로서, a)는 CA3영역의 10 배 배율의 명시야(Bright-field), b)는 TPM 이미지이다(스케일바 30 μm). c) 및 d)는 각각 20 μM CCCP를 가하기 전과 후, 깊이 110 μm 이하의 CA3 영역의 100 배 배율의 이미지이다. 모든 이미지는 820 nm에서 fs펄스로 여기시킨 후 450-600 nm에서 촬영하였다.

[0041] [화학식 2] [화학식 1]

[0042] 상기 [반응식 1]에서,

[0043] Ar은 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물이고,

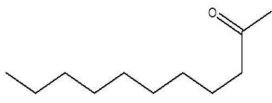
[0044] [화학식 3]



[0045]

[0046] (a)는 NaOH, EtOH 및 하기 [화학식 4]로 표시되는 화합물을 포함하는 반응조건이다

[0047] [화학식 4]



[0048]

[0049] 또한, 본 발명은 상기 이광자 프로브를 관찰 대상이 되는 생체질 내로 주입한 후, 방출되는 이광자 여기 형광 영상을 관찰하는 단계를 포함하는 원형질막 부근의 아연 이온의 검출 방법을 제공한다.

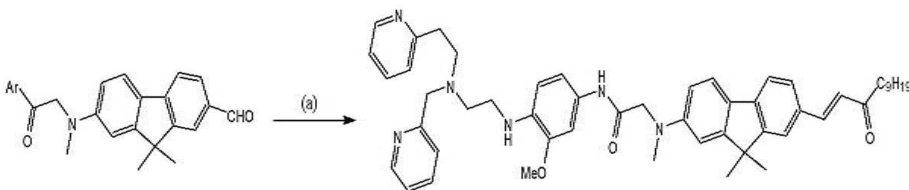
[0050] 상술한 바와 같은 이광자 프로브의 특성으로 인해 종래에 보고 된 바 없는 원형질막 부근의 아연 이온을 검출할 수 있으며, 이때 상기 이광자 여기 형광 영상은 상기 관찰대상의 생체 세포 또는 생체 조직 내 100 내지 120 μm 깊이의 원형질막 부근에서 방출되는 것일 수 있다.

[0051] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0052] **실시예. [화학식 1]로 표시되는 이광자 프로브의 합성**

[0053] 하기 [반응식 1]에 따라 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 원형질막 부근의 아연 이온 검출용 이광자 프로브(이하, 'FZn-mem'이라 한다.)를 합성하였다.

[0054] [반응식 1]



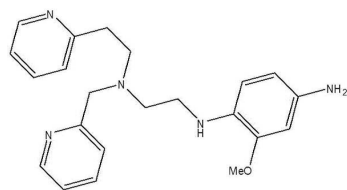
[0055]

[0056] [화학식 2] [화학식 1]

[0057] 상기 [반응식 1]에서,

[0058] Ar은 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물이고,

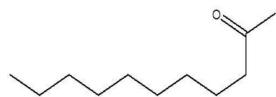
[0059] [화학적식 3]



[0060]

[0061] (a)는 NaOH, EtOH 및 하기 [화학적식 4]로 표시되는 화합물을 포함하는 반응조건이다

[0062] [화학적식 4]



[0063]

[0064] 구체적으로, 상기 화학식 4로 표시되는 2-운데카논(11 mg, 0.087 mmol)을 1 ml의 EtOH에 녹인 용액을 실온에서 1 ml의 EtOH 내 상기 화학식 2로 표시되는 화합물(39 mg, 0.058 mmol)과 NaOH 수용액(56 μ l, 1 M)의 혼합액에 적가 하였다. 반응 혼합액을 60 $^{\circ}$ C에서 28 시간 동안 교반한 후 진공에서 용매를 증발시켰다. 잔류물을 CHCl_3 내 2% MeOH를 용리액으로 실리카겔 컬럼크로마토그래피하여 노란색 점성 오일 상태의 FZn-mem (24 mg, 0.029 mmol)을 51%의 수율로 얻었다.

[0065] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.47 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 8.44 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.65-7.62 (m, 1H), 7.60 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 7.55-7.50 (m, 2H), 7.49 (dd, J = 7.8, 2.4 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.13-7.04 (m, 3H), 6.85 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.81 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.88 (brs, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.19-3.11 (m, 5H), 3.07-3.97 (m, 4H), 2.94-2.86 (m, 2H), 2.67 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 1.47 (s, 6H), 1.38-1.22 (m, 14H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H)(도 10a 참조).

[0066] ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 200.7, 167.9, 160.0, 156.2, 153.6, 149.9, 149.0, 148.7, 146.8, 142.9, 141.8, 136.3, 136.2, 135.7, 132.2, 129.6, 128.2, 126.8, 124.9, 123.4, 122.9, 122.0, 121.8, 121.5, 121.1, 119.3, 113.1, 112.8, 109.5, 107.5, 103.7, 60.0, 59.9, 55.5, 54.3, 52.8, 46.8, 41.1, 40.8, 40.3, 35.5, 31.8, 29.6, 29.4, 29.3, 29.2, 27.3, 24.5, 22.6, 14.1(도 10b 참조).

[0067] HRMS (FAB) Calcd. for $\text{C}_{52}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 821.5118. Found 821.5117(도 10c 참조).

[0068] 시험예.

[0069] 시험예 1. 용해도, 분광학 측정 및 겔보기 해리 상수의 결정

[0070] 소량의 FZn-mem을 DMSO에 용해하여 스톡 용액(1.0×10^{-2} M)을 제조하였다. 스톡 용액을 (6.0×10^{-3} ~ 6.0×10^{-5}) M으로 희석한 후 마이크로 시린지를 사용하여 3.0 ml의 H_2O 가 들어 있는 큐벳에 가하였다. 모든 경우에 범용 완충액 내 DMSO의 농도를 0.2 %로 유지하였다. FZn-mem 농도에 따른 형광 강도 그래프는 낮은 농도에서는 선형을 나타내었으며 농도가 증가함에 따라 아래쪽으로 굽어지는 곡선 형태를 보였다(도 1). 선형 영역의 최대 농도를 용해도로 결정하였다. MOPS 완충액 내에서 FZn-mem의 용해도는 2.0 μ M이었다.

[0071] 또한, 흡광 스펙트럼은 Hewlett-Packard 8453 다이오드 어레이 분광광도계를 사용하여, 형광 스펙트럼은 Amico-Bowman 시리즈 2 발광분광계와 1 cm 표준 석영셀을 사용하여 측정하였다. 형광 양자 수율은 Coumarin 307을 대조염료로 하여 문헌에 소개된 방법에 따라 측정하였다(J. N. Demas, G. A. Crosby, J. Phys. Chem. 1971, 75, 991). FZn-mem의 여기 및 발광 스펙트럼은 분광학 등급의 유기용매와 MOPS 완충액(30 mM MOPS, 100 mM KCl, pH 7.2)을 사용하여 측정하였다. MOPS/DPPC(1/1)는 MOPS 완충액(30 mM MOPS, 100 mM KCl, pH 7.2)과 DPPC의 1:1 (부피비) 혼합액을 가열, 교반하여 제조하였다.

[0072] 겔보기 해리상수는 다양한 양의 ZnSO_4 (0~9.5 mM)와 10 mM의 EGTA(에틸렌글리콜-비스(2-아미노에틸에테르)- N,N,N',N' -테트라아세트산)를 포함하는, MOPS(4-모폴리노프로판설폰산) 완충용액(30 mM, pH 7.2, 0.1 M KCl)과 DPPC의 1/1 혼합액을 제조하였다. 식 (1)을 이용하여 $K_{\text{Zn-EGTA}}^{\text{app}}$, $[\text{EGTA}]_{\text{total}}$, $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{total}}$ 로부터 $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}$ 를 계산하였다(C. J. Fahrni, T. V. O' Halloran, J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 11448 및 M. Taki, J. L. Wolford, T. V. O' Halloran, J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 712 참조).

[0073] 식 1)

$$[\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}} = [\text{Zn}^{2+}]_{\text{total}} / (\alpha_{\text{Zn}} \times K_{\text{Zn-EGTA}}^{\text{app}} \times [\text{EGTA}]_{\text{free}})$$

[0075] 위 식 1)에서,

$$K_{\text{Zn-EGTA}}^{\text{app}} = K_{\text{Zn-EGTA}} / \alpha_{\text{Zn}} \alpha_{\text{EGTA}}$$

$$\alpha_{\text{Zn}} = 1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_1)} + 10^{(2\text{pH} - \text{p}K_1 - \text{p}K_2)} + 10^{(3\text{pH} - \text{p}K_1 - \text{p}K_2 - \text{p}K_3)} \dots$$

$$\alpha_{\text{EGTA}} = 1 + 10^{(\text{p}K_1 - \text{pH} + 0.11)} + 10^{(\text{p}K_1 + \text{p}K_2 - 2\text{pH} + 0.22)} + 10^{(\text{p}K_1 + \text{p}K_2 + \text{p}K_3 - 3\text{pH} + 0.33)} \dots$$

[0079] 이고,

$$[\text{EGTA}]_{\text{free}} = [\text{EGTA}]_{\text{total}} - [\text{Zn}^{2+}]_{\text{total}}$$

[0081] 이므로

$$K_{\text{Zn-EGTA}}^{\text{app}} = \frac{K_{\text{Zn-EGTA}} (1 + 10^{(\text{p}K_{\text{Zn-EGTA}} - \text{pH})})}{(1 + 10^{(\text{pH} - \text{p}K_{\text{Zn}})}) (1 + 10^{(\text{p}K_1 - \text{pH})} + 10^{(\text{p}K_1 + \text{p}K_2 - 2\text{pH})})}$$

[0083] Zn^{2+} -EGTA착물의 안정화상수($K_{\text{Zn-EGTA}}$)는 참고문헌(A. E. Martell, R. M. Smith, NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes. NIST Standard Reference Database 46, Version 7.0, 2003.)을 참조하였다.

[0084] EGTA(pH 7.2, 0.1 M KCl, 25 C)의 경우, $\text{p}K_1=9.40, \text{p}K_2=8.79, \text{p}K_3=2.70, \log K_{\text{Zn-EGTA}}=12.6$. 이온 세기가 0.1 M인 경우 모든 해리상수를 0.11씩 높게 계산하여야 한다. $[\text{EGTA}]_{\text{total}}$ 는 20 mM로 계산되었으며 $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{total}}$ 은 3.5~9.8 mM 범위였다. 각 용액에서 계산된 $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}$ 농도는 다음과 같다. Zn^{2+} -프로브 착물의 겔보기 해리상수를 결정하기 위하여, 형광 적정곡선(도 3 a) 및 도 4 b))을 작성한 후 식 2를 이용하여 피팅하였다(도 3 b))(A. E. Martell, R. M. Smith, NIST Critical Stability Constants of Metal Complexes. NIST Standard Reference Database 46, Version 7.0, 2003 및 T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, T. Higuchi, T. Nagano, J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 12399 참조).

[0085] 식 2)

$$F = F_0 + (F_{\text{max}} - F_0) \frac{[\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}}{K_d + [\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}}$$

[0087] 위 식 2)에서, F 는 형광강도, F_{max} 는 최대 형광강도, F_0 는 Zn^{2+} 부존재시 형광강도, $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}$ 는 유리 Zn^{2+} 의 농도이다. 적정곡선과 식 2에 가장 잘 부합하는 K_d 값을 Excel 프로그램을 사용하여 계산하였다. 이광자 과정에 대한 K_d^{TP} 를 결정하기 위하여, DM IRE2 현미경(Leica)을 사용하여 xyλ 모드에서 800 Hz의 스캔속도로 TPEF 스펙트럼을 기록하였다. 여기는 파장 780 nm, 출력전력 1180 mW(초점면 상에서 약 10 mW의 평균전력에 해당)로 설정된, 모드 잠금된 티타늄-사파이어 레이저 광원(Coherent Chameleon, 90 MHz, 200 fs)을 사용하여 수행하였다. 얻어진 TPEF 적정곡선(도 3 a))을 식 2에 피팅하였다(도 3b)).

[0088] 완충용액(30 mM MOPS, 100 mM KCl, pH 7.2)내에서 형광법(H. M. Kim, H. J. Choo, S. Y. Jung, Y. G. Ko, W. H. Park, S. J. Jeon, C. H. Kim, T. Joo, B. R. Cho, ChemBioChem 2007, 8, 553-559. 참조)에 의한 FZn-

mem의 용해도 측정 결과는 2.0 mM이었다(도 1). 극성이 큰 용매로 용매를 교체하자 FZn-mem의 흡광 및 발광 스펙트럼은 점진적인 적색이동을 보였으며 이와 함께 형광 양자 수율이 감소하였다(1,4-디옥산 < DMF < EtOH ≍ MOPS 완충액(도 2 및 표 1)). 적색이동의 효과는 발광 스펙트럼이 흡광 스펙트럼보다 컸다. 따라서, FZn-mem은 극성 프로브로서 유용함을 알 수 있다.

표 1

Solvent (E_T^N) ^[a]	$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$, nm ^[b]	$\lambda_{\max}^{\text{fl}}$, nm ^[b]	Φ ^[c]	$\lambda_{\max}$, nm ^[d]	$\Phi \delta_{\max}$	$FEF^{\text{OP}} / FEF^{\text{TP}}$ ^[f]	$K_d^{\text{OP}} / K_d^{\text{TP}}$ ^[g]
1,4-dioxane(0.164)	383	489	0.25	—	—		
DMF (0.386)	398	508	0.11	820	43		
EtOH (0.654)	392	538	0.053	—	—		
MOPS	408 ^[h]	533	0.029	—	—		
MOPS/DPPC(1/1)	400	506	0.19	—	—	5.4/5.2	20/19

[a] 괄호 안의 수치는 용매의 극성을 나타내는 정규화된 경험적 파라미터, [b] 일광자 흡광 및 발광 스펙트럼의 $\lambda_{\max}$ (단위: nm), [c] 형광 양자 수율, $\pm 15\%$, [d] 이광자 여기 스펙트럼의 $\lambda_{\max}$ (단위: nm), [e] 이광자 동작단면적($10^{-50} \text{ cm}^4/\text{photon}$ (단위: GM, $\pm 15\%$), [f] 이광자 동작단면적, [g] 일광자(K_d^{OP}) 및 이광자(K_d^{TP}) 과정에서 측정된 Zn^{2+} 의 해리상수(단위: nM 단위, $\pm 10\%$), [h] FZn-mem의 몰흡광계수는 $16,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이다.

HeLa 세포 내에서 FZn-mem의 최대 발광파장(495 nm, 도 8 a))은 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC)을 1/1의 비율로 포함하는 MOPS 완충액 내에서 측정한 값과 비슷하였다. 형광 양자 수율은 MOPS에서보다 MOPS/DPPC(1/1)에서 더 컸다(표 1). 이는 MOPS/DPPC(1/1)가 더 소수성임을 의미하는데, 그 이유는 DPPC의 포화된 탄화수소 꼬리부분과 FZn-mem 사이의 소수성 상호작용에 유리하기 때문으로 보여진다. 이러한 결과로부터 MOPS/DPPC(1/1)의 극성이 원형질막의 극성과 비슷함을 알 수 있다.

MOPS/DPPC(1/1) 내에서 FZn-mem에 Zn^{2+} 를 가하자 Zn^{2+} 의 농도가 증가함에 따라 형광강도가 점차 증가하였는데(도 3 a) 및 도 4 b)), 이것은 Zn^{2+} 이온의 착물화에 의한 광유도 전자전달(PeT)의 억제와 소수성 환경에서의 큰 Φ 값 때문으로 보여진다. 128 nM Zn^{2+} 존재 하에서 일광자 및 이광자 적정곡선으로부터 결정된 FZn-mem의 형광증폭 계수[FEF = $(F - F_{\min})/F_{\min}$]는 5로, Zn^{2+} 농도의 변화에 대하여 높은 감도를 나타내었다(표 1). 또한, 적정곡선은 1:1 결합모델에 잘 부합하였으며(도 3 b)), Hill 곡선은 기울기 1.0인 직선을(도 3 c)) 나타내었고, Job 곡선은 물분율 0.5에서 최대값을 보였다(도 4 c)). 이로부터, 프로브와 Zn^{2+} 이 1:1로 착물을 형성함을 알 수 있다.

형광 적정곡선으로부터 해리상수(K_d^{OP})를 계산하였다(도 3 b)). MOPS/DPPC(1/1) 내에서 일광자(K_d^{OP}) 및 이광자(K_d^{TP}) 과정에 대한 FZn-mem의 Zn^{2+} 에 대한 K_d 값은 각각 $20 \pm 0.4 \text{ nM}$ 과 $19 \pm 0.2 \text{ nM}$ 이었다(표 1). FZn-mem은 5 mM 농도의 Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 및 300 μM 의 Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 존재 하에 무시할 수 있는 정도의 형광강도를 나타낸 반면, 5 μM 의 Zn^{2+} 를 가한 경우 큰 형광강도의 증가를 나타내어 Zn^{2+} 에 대하여 높은 선택성을 보였다(도 3 d)). 따라서, 본 발명에 따른 FZn-mem 프로브는 다른 경쟁 금속이온에 의한 방해가 최소화된 상태에서 막 부근의 Zn^{2+} 를 검출할 수 있다. 또한, FZn-mem은 pH > 6.5에서 상대적으로 pH에 덜 민감하였다(도 4 d))

시험예 2. 이광자 동작 단면적의 측정

먼저, 문헌에 소개된 펨토초(fs) 형광 측정기법을 이용하여 이광자 단면적(δ)을 측정하였다(S. K. Lee, W. J. Yang, J. J. Choi, C. H. Kim, S.-J. Jeon, B. R. Cho, Org. Lett. 2005, 7, 323). FZn-mem을 DMF에 용해시키고 이광자 특성이 잘 알려진 로다민 6G를 대조염료로 사용하여 이광자 과정에 의한 형광강도를 720~920 nm에서

측정하였다. 대조물질과 샘플에 대하여 이광자 과정에 의한 형광 스펙트럼의 강도를 동일한 여기 파장에서 측정하였다. TPA 단면적은 식 $\delta = \delta_r(S_s \Phi_r \theta_r c_r) / (S_r \Phi_s \theta_s c_s)$ 를 사용하여 계산하였다. 식에서, 아래 첨자 s와 r은 각각 샘플과 대조물질을 나타낸다. S는 CCD 검출기에 의해 측정된 신호의 강도이고, Φ 는 형광 양자 수율이며, θ 는 실험장치의 전체 형광 수집효율이고, c는 용액 내 분자의 수밀도이고, δ_r 은 대조물질의 이광자 단면적이다.

[0096] Zn^{2+} -FZn-mem 착물의 TP 동작단면적($\Phi \delta$)을 형광법에 의해 측정하였다. 소낭에 의한 산란으로 인해 상당량의 TPEF가 손실되었기 때문에 MOPS/DPPC(1/1) 내에서 $\Phi \delta$ 값을 정확하게 측정하는 것은 불가능하였다. 따라서, Zn^{2+} -FZn-mem 착물이 완전히 용해될 수 있는 DMF 내에서 $\Phi \delta$ 값을 측정하였으며, $\Phi \delta$ 값은 820 nm에서 43 GM으로 측정되었다. 따라서, FZn-mem을 사용하여 막 부근의 Zn^{2+} 를 TPM에 의해 검출하는 것이 가능함을 알 수 있다(도 5).

[0097] 실험예 3. 헬라 세포(HeLa cells)에서 아연 이온의 검출

[0098] 1) 세포배양

[0099] HeLa 인체 자궁 경부암세포(ATCC, Manassas, VA, USA)를, 10% FBS(WelGene Inc, 서울, 한국), 페니실린(100 units/ml) 및 스트렙토마이신(100 ug/ml)으로 보충된 DMEM(WelGene) 내에서 배양하였다. 모든 세포는 37 °C의 가습환경(CO₂와 공기의 v/v가 5/95)을 유지하였다. 촬영 2일 전에, 세포를 유리바닥 접시(MatTek)로 옮겼다. 표지를 위하여, 성장배지를 FBS를 포함하지 않는 DMEM으로 교체하였다. 세포를 1 mM FZn-mem을 포함하는 DMSO 스톱용액(5 μ M FZn-mem) 내에서, 5 % CO₂ 존재 하에 37 °C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어, 세포를 인산염 완충액(PBS; Gibco)으로 3회 세척하고 무혈청 배지 내에서 15분 동안 더 인큐베이션한 후 촬영하였다.

[0100] 2) 이광자 형광현미경 분석

[0101] 프로브로 표지한 HeLa 세포 및 조직의 이광자 형광현미경 이미지를 분광형 공초점현미경과 다광자현미경(Leica TCS SP2)을 사용하여 얻었다. $\times 100$ 오일 대물렌즈와 $\times 10$ 건식 대물렌즈를 각각 사용하였으며, 개구수(NA)는 각각 1.30과 0.30이었다. 이광자 형광현미경 이미지는 DM IRE₂ 현미경(Leica)을 사용하여 얻었으며, 여기는 파장 750~840 nm, 출력전력 1345 mW(초점면 상에서 약 5 mW의 평균전력에 해당)로 설정된, 모드 잠금된 티타늄-사파이어 레이저 광원(Coherent Chameleon, 90 MHz, 200 fs)을 사용하여 수행하였다. 450~600 nm 범위에서 이미지를 얻기 위하여, 내부 PMT를 사용하여 부호 없는 8비트 1024 $\times$ 1024 픽셀 상에서 400 Hz의 스캔 속도로 신호를 수집하였다.

[0102] 분석 결과, 밝은 이미지가 얻어졌으며 원형질막 내 Zn^{2+} 의 분포를 확인할 수 있었다. FZn-mem으로 표지한 HeLa 세포를 Zn^{2+} 가 결합된 단백질로부터 Zn^{2+} 의 유리를 촉진하는 시약인 2,2'-디티오디피리딘(DTDP; 150 mM)으로 처리하자, TPEF 강도가 증가하였으며(도 6 c)), 미토콘드리아 전위를 와해시키고 원형질막을 탈분극시켜 Zn^{2+} 를 세포 외 공간으로 유리시키는 카르보닐 시아나이드 *m*-클로로페닐히드라존(CCCP; 10 mM)을 가하자 TPEF 강도가 감소하였다(도 6 b), d)).

[0103] 3) 세포 생존능 확인

[0104] 인큐베이션 조건 하에서 FZn-mem 프로브가 HeLa 세포의 생존능력에 영향을 미치지 않음을 확인하기 위하여, CCK-8 키트(Cell Counting Kit-8, Dojindo, Japan)를 사용하여 세포 생존능을 측정하였다. HeLa 세포는 5~20 μ M FZn-mem 존재 하에 2시간, 4시간 및 6시간 동안 인큐베이션 하였다. 그 결과를 도 7에 도시하였으며, 그 결과 본 발명에 따른 FZn-mem 프로브가 헬라세포의 생존에 영향을 미치지 않으며, 세포 독성으로부터 최소한의 간섭으로 아연 이온을 검출할 수 있음을 알 수 있다.

[0105] 4) 광안정성

[0106] FZn-mem의 광안정성 측정을위하여, FZn-mem 프로브로 표지한 HeLa 세포에서 임의로 한 영역을 선택한 후 해당 영역에서 시간에 따른 TPEF(TP excitated flueorescence) 강도의 변화를 모니터링하였다. 펄스초 펄스를 30 분 동안 연속적으로 조사하였을 때 FZn-mem으로 표지한 HeLa 세포 상의 정해진 위치에서의 TPEF 강도가 거의 일정 하게 유지될 정도로 높은 광안정성이 확인되었다(도 8 c), d)).

[0107] 상기의 실험 결과를 종합해 볼때, FZn-mem은 살아 있는 세포 내에서 막 부근의 Zn^{2+} 를 장시간 동안 다른 경쟁 금속이온에 의한 방해, pH, 세포독성 및 광안정성에 의한 영향이 최소화된 상태에서 검출할 수 있음을 알 수 있다.

[0108] 시험예 4. 랫트 뇌조직 중의 아연 이온의 검출

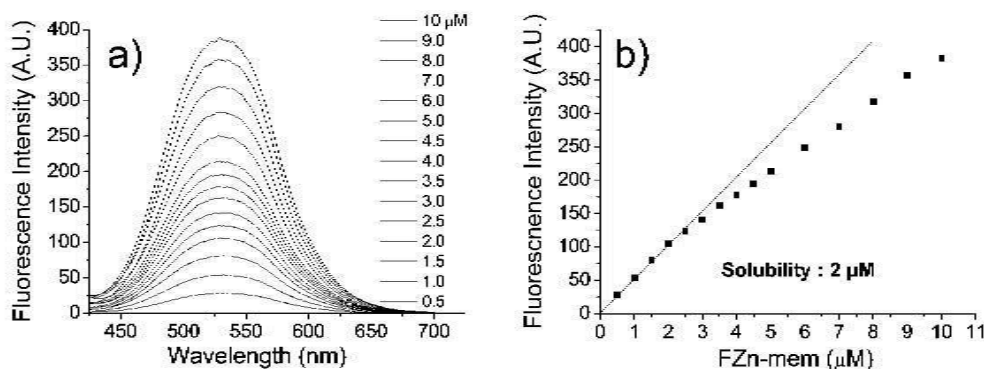
[0109] 2주령 쥐(SD)의 해마와 시상하부로부터 슬라이스를 제조하였다. 관형태의 슬라이스를, 진동 블레이드 마이크로 톰을 사용하여 인공뇌척수액(ACSF; 138.6 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 21 mM $NaHCO_3$, 0.6 mM NaH_2PO_4 , 9.9 mM D-글루코스, 1 mM $CaCl_2$, 3 mM $MgCl_2$) 내에서 400 μm 의 두께로 절단하였다. 슬라이스를 37 $^{\circ}C$ 에서, 95% O_2 와 5% CO_2 의 혼합기체 버블링 하에 ACSF 내에서 3 μl 의 DMSO 스톱용액 내 10 mM FZn-mem(30 μM FZn-mem)으로 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어, 슬라이스를 ACSF로 3회 세척한 후 유리바닥 접시(MatTek)로 옮기고 분광형 공초점 다광자현미경으로 관찰하였다. 도 9는 FZn-mem(30 mM)으로 표지된 조직 슬라이스의 명시야 이미지와 TPM 이미지가이다.

[0110] 분석 결과, 명시야 이미지로부터 CA3 영역이 확인되었으며, TPM 이미지로부터 동일 영역 내 막 부근의 Zn^{2+} 분포를 확인할 수 있다(도 9 a), b)). 고배율 TPM 이미지로부터 살아 있는 조직 내 110 μm 깊이의 세포막에서의 막 부근의 Zn^{2+} 분포를 얻었다(도 9 c)). 20 mM CCCP를 가하자 TPEF 강도가 상당히 감소하였다(도 9 d)). 따라서, FZn-mem을 사용하여 살아 있는 조직 내 110 μm 깊이에서 막 부근의 Zn^{2+} 를 TPM에 의해 검출할 수 있음을 확인하였다.

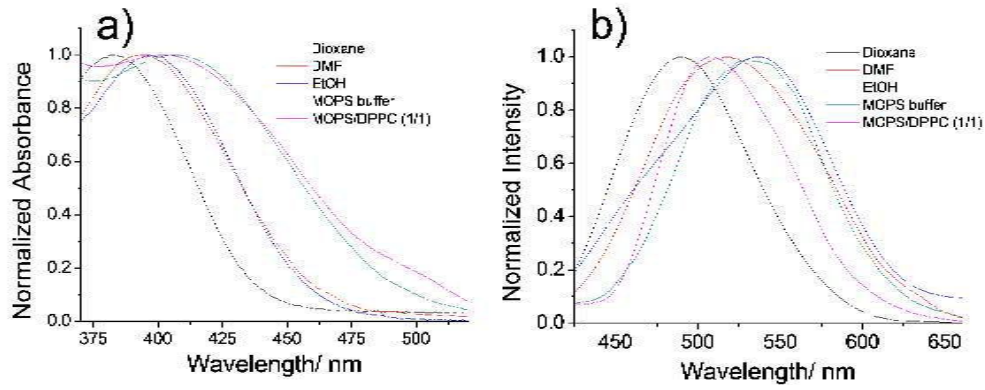
[0111] 상기 시험예들을 종합해 볼때, 본 발명에 따른 FZn-mem 프로브는 Zn^{2+} 에 대하여 7배의 TPEF 증가를 보이며 해리 상수(K_d^{TP})가 (19 ± 0.2) nM이고 생물학적 pH 범위에서 pH의 영향을 받지 않으며, 다른 금속이온의 영향을 받지 않고 살아 있는 세포와 살아 있는 조직 내 110 μm 깊이에서 막 부근의 Zn^{2+} 를 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

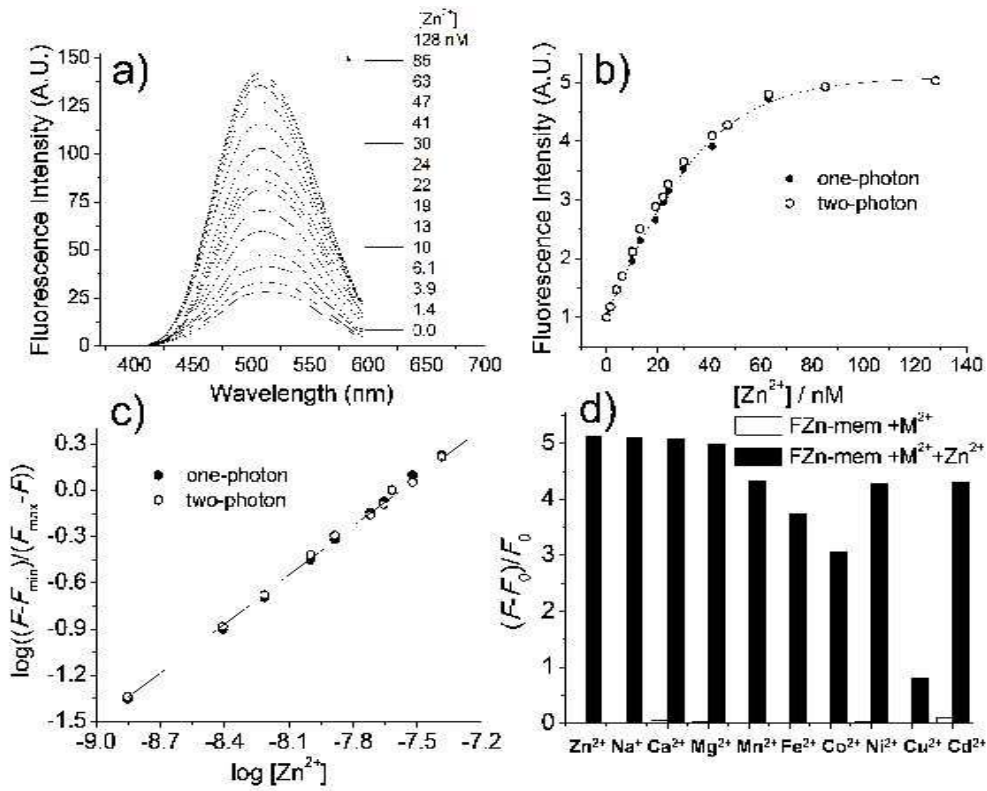
도면1



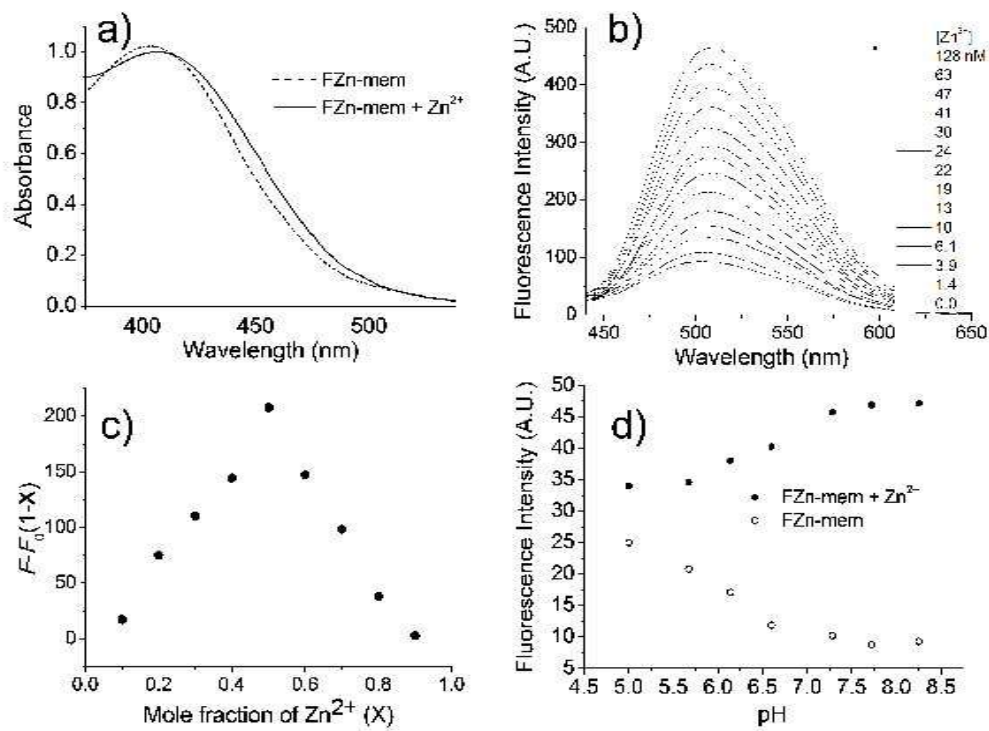
도면2



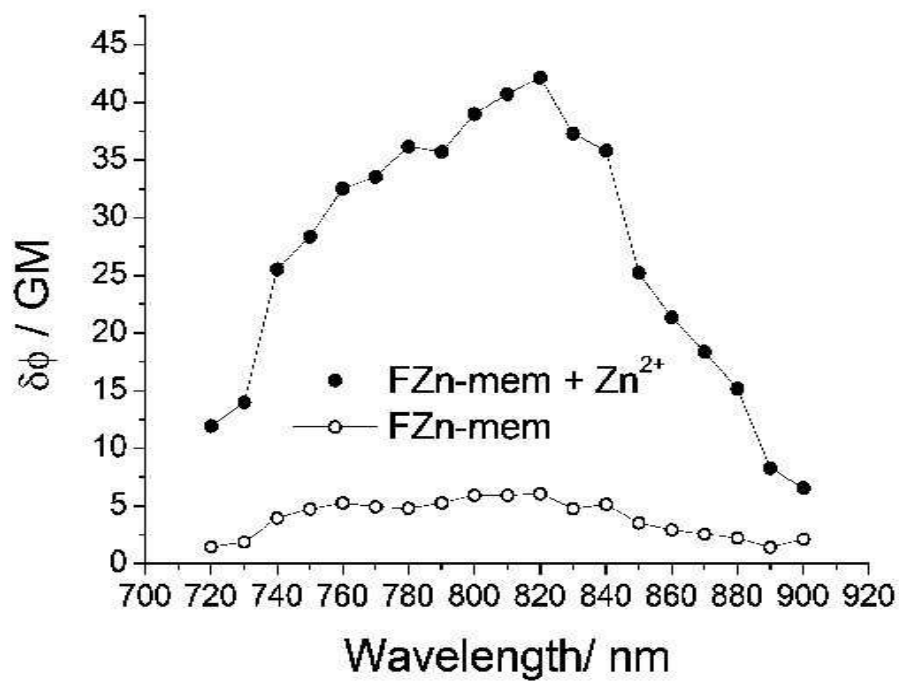
도면3



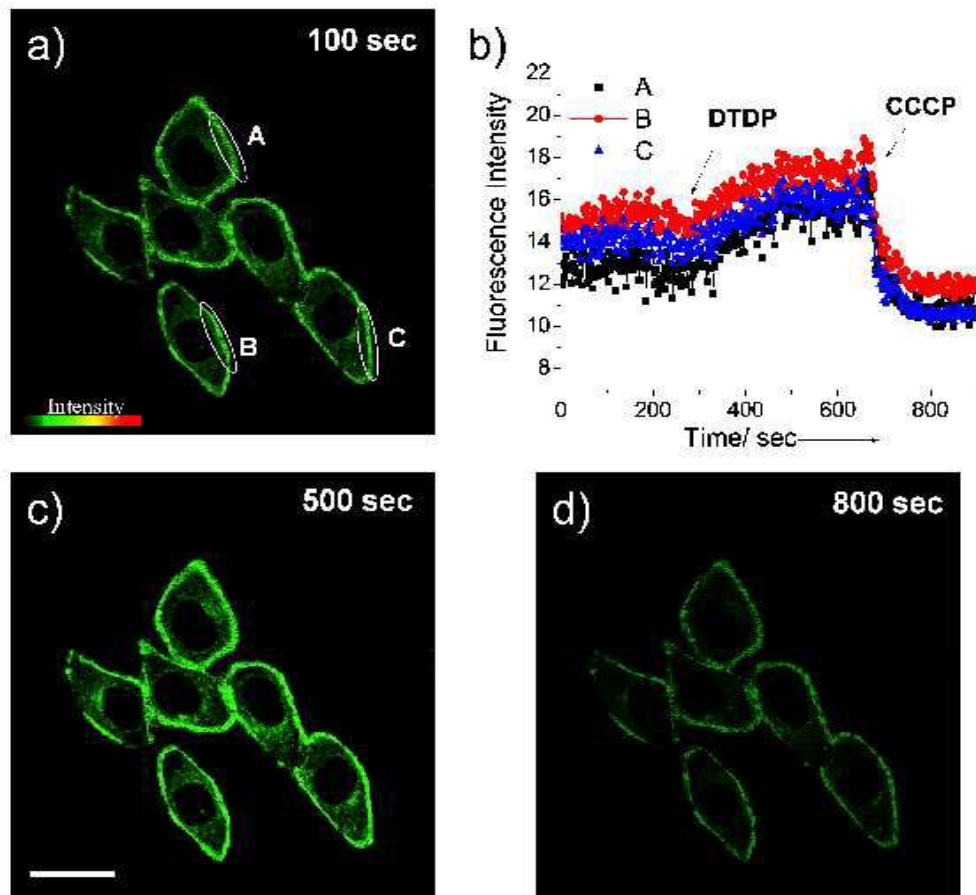
도면4



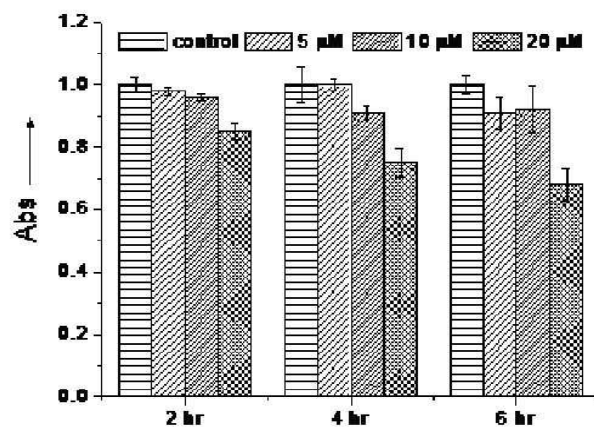
도면5



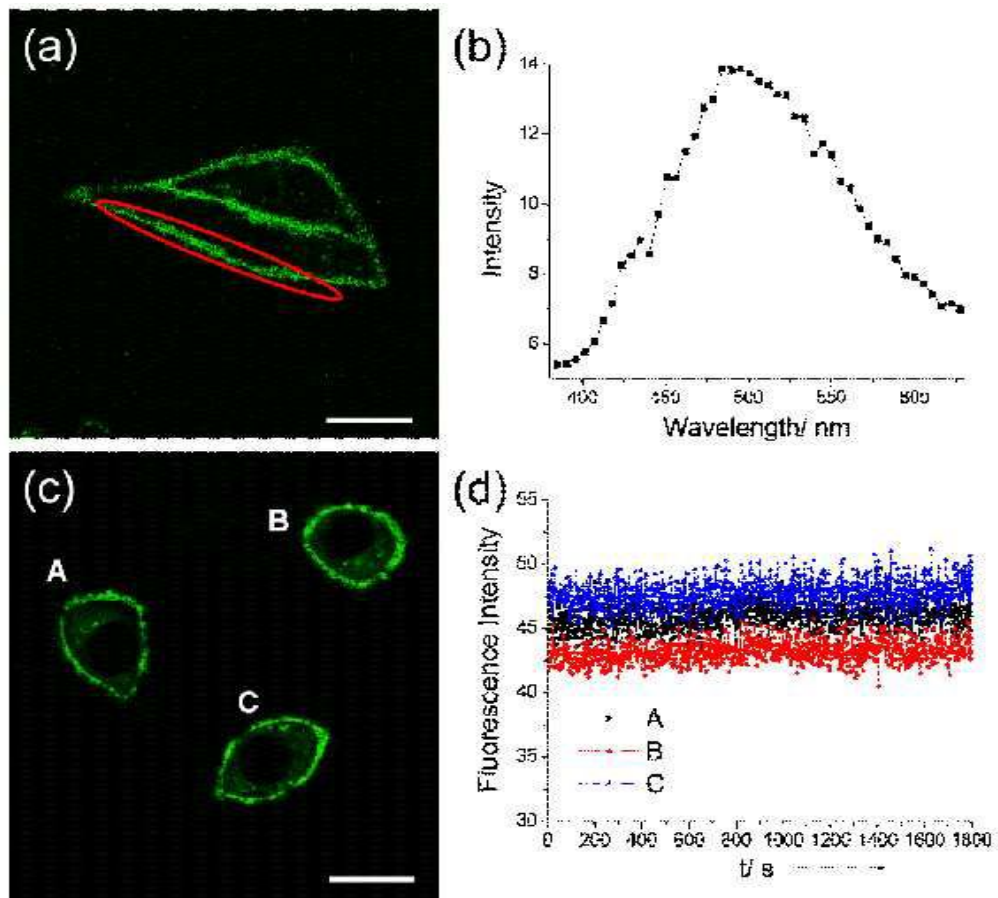
도면6



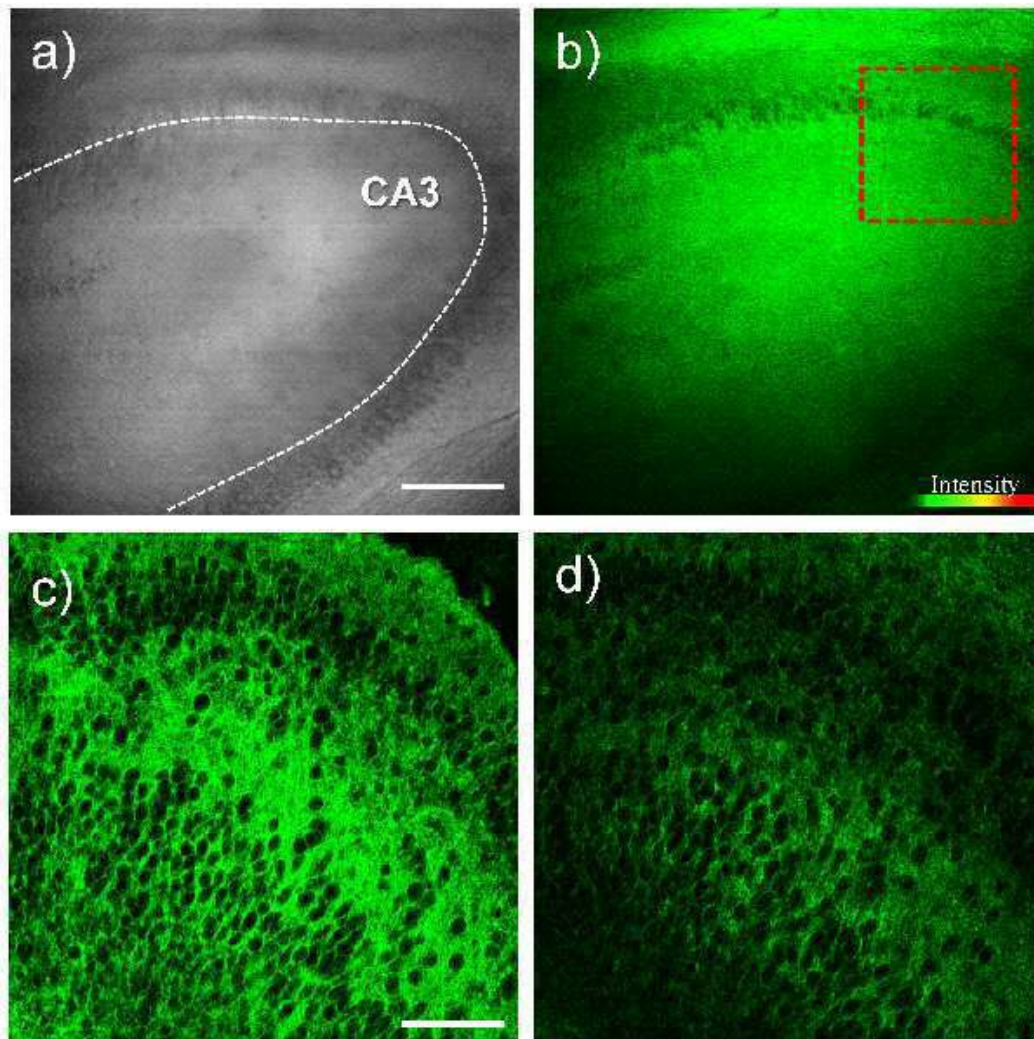
도면7



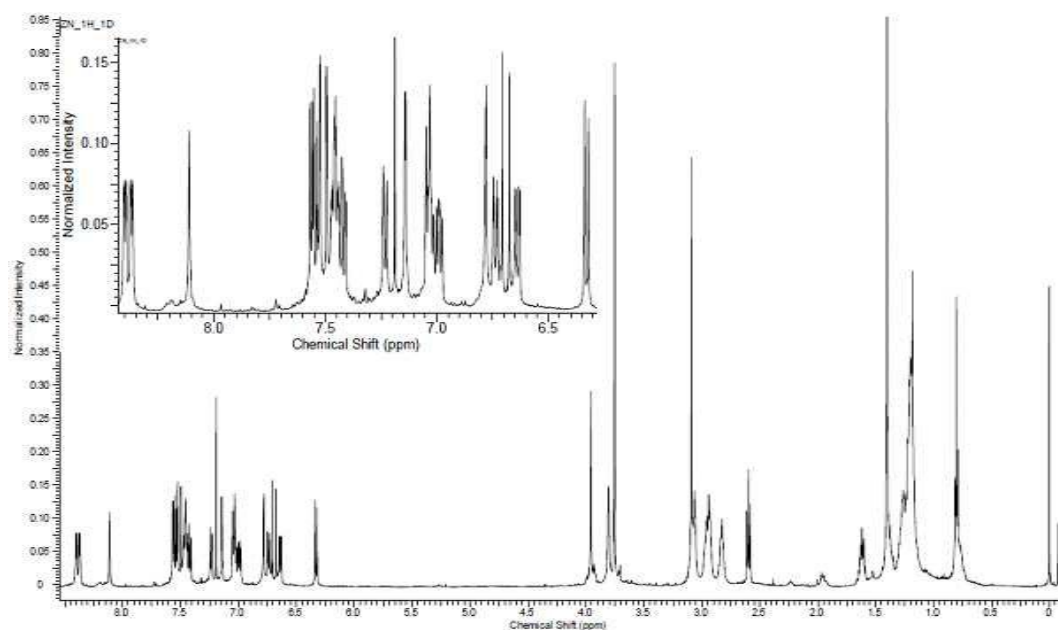
도면8



도면9

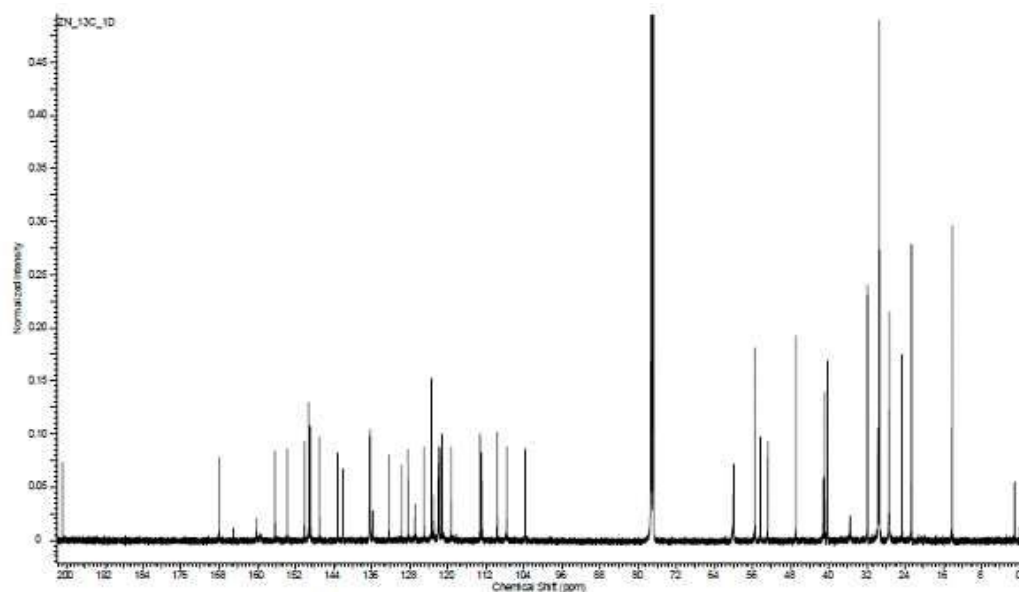


도면10a



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) of FZn-mem

도면10b



^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) of FZn-mem

[Elemental Composition]

Data : HFAB-POS-140422002

Date : 22-Apr-2014 11:36

Sample: KR-04-094

Note : with NBA

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

RT : 1.92 min

Scan#: 24

Elements : C 52/0, H 65/0, O 3/0, N 6/0

Mass Tolerance : 20ppm, 10mmu if $m/z < 500$, 20mmu if $m/z > 1000$

Unsaturation (U.S.) : -1.0 - 100.0

Observed m/z	Int%				
821.5117	100.0				
Estimated m/z	Error [ppm]	U.S.	C	H	O
821.5118	-0.2	23.5	52	65	3

도면10c

