



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0142723

(43) 공개일자 2015년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 27/30 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 27/327 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/86 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0070566

(22) 출원일자 2014년06월11일

심사청구일자 2014년06월11일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 11호 12 (송도동)

(72) 발명자

김규원

인천 연수구 청능대로 124, 117동 104호 (동춘동, 금호동아아파트)

고현준

인천 연수구 독배로40번길 48, 103동 1202호 (옥련동, 우성1차아파트)

(74) 대리인

차준용

전체 청구항 수 : 총 11 항

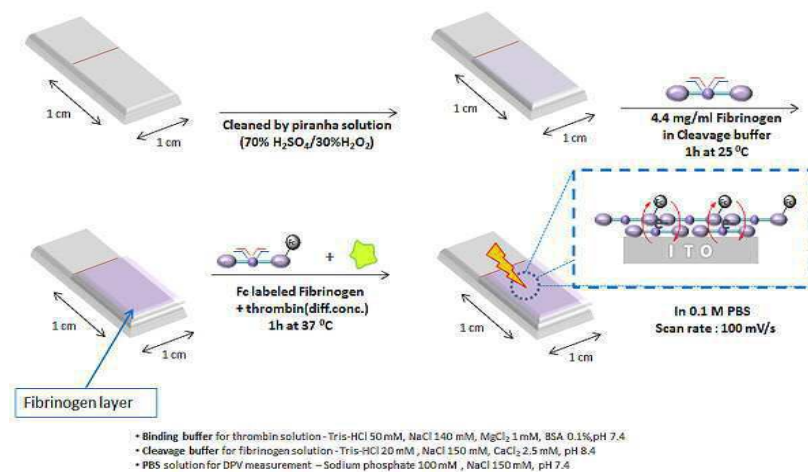
(54) 발명의 명칭 효소 반응을 이용한 트롬빈의 검출 방법 및 트롬빈 검출 키트

(57) 요약

본 발명은 효소 반응을 이용한 트롬빈의 정량적 검출 방법, 트롬빈 검출 키트 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 페로센으로 표지된 피브리노겐을 이용하여 트롬빈을 전기화학적으로 검출하는 방법, 이를 수행하기 위한 트롬빈 검출 키트 및 이러한 검출 키트의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 트롬빈 검출 키트 및 이를 이용한 트롬빈의 정량적 검출 방법은 단백질을 표면에 고정화하지 않고도 트롬빈을 검출하는 새로운 기술을 제시하는바, 단백질 활성 감소 문제 없이 신속하면서도 정확하게 표적 단백질을 검출할 수 있다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2011-0017219

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견핵심

연구과제명 트롬빈의 효소반응을 이용한 고감도 태겟검출법개발

기 여 율 1/1

주관기관 인천대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

전극; 및

전극 표면 상에 코팅되어 있으며, 페로센으로 표지된 피브리노겐을 응집시키기 위한 피브리노겐 층;
을 포함하는 트롬빈을 검출하는 검출용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 전극은 ITO 전극인 것을 특징으로 하는 트롬빈을 검출하는 검출용 키트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 전극은 다수의 하이드록시기가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 트롬빈을 검출하는 검출용 키트.

청구항 4

세척용액으로 처리한 ITO 전극 표면을 증류수를 처리하여 하이드록시기가 결합된 ITO 전극 표면을 제작하는 제 1단계; 및

상기 제 1단계에서 제작한 ITO 전극 표면 상에 피브리노겐 용액을 드롭하여 코팅시키는 제 2단계;

를 포함하는 트롬빈을 검출하는 검출용 키트의 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 제 1단계에서 세척용액은 Piranha solution인 것을 특징으로 하는 트롬빈을 검출하는 검출용 키트의 제조 방법.

청구항 6

피브리노겐이 첨가된 완충 용액에 페로센 용액을 첨가하여 용융시키고 교반시켜 페로센이 표지된 피브리노겐을 형성시키는 제 (a) 단계;

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 피브리노겐으로 코팅된 트롬빈을 검출하는 검출용 키트 상에 페로센이 표지된 피브리노겐 및 표적 물질이 혼합된 혼합 용액을 접촉시키는 제 (b) 단계; 및

상기 페로센이 표지된 피브리노겐 및 표적 물질이 혼합된 혼합 용액이 접촉된 키트의 산화-환원 전류를 측정하는 제 (c) 단계;

를 포함하는 표적 물질 내의 트롬빈의 정량을 측정하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 제 (a) 단계에서 피브리노겐이 첨가된 완충 용액은 0.01 내지 1 M 중탄산완충용액(bicarbonate buffer)으로 pH는 9 내지 10인 것을 특징으로 하는 표적 물질 내의 트롬빈의 정량을 측정하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 제 (a) 단계에서 페로센 용액은 무수 조건의 극성용매에 페로센이 용융되어 있는 것을 특징으로 하는 표적 물질 내의 트롬빈의 정량을 측정하는 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 제 (a) 단계 수행 후 페로센으로 표시된 피브리노겐을, 반응에 참여하지 않은 페로센, 표지되지 않은 피브리노겐으로 분리시키기 위해 세파텍스 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분리시키는 단계를 추가적으로 포함하는 표적 물질 내의 트롬빈의 정량을 측정하는 방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 표적 물질은 트롬빈을 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 표적 물질 내의 트롬빈의 정량을 측정하는 방법.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 제 (c) 단계의 산화-환원 전류를 측정하는 단계는 미분펄스 전압 전류법(Differential Pulse Voltammetry)를 이용하는 것을 특징으로 하는 표적 물질 내의 트롬빈의 정량을 측정하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 효소 반응을 이용한 트롬빈의 검출 방법, 트롬빈 검출 키트 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 페로센으로 표지된 피브리노겐을 이용하여 트롬빈을 전기화학적으로 검출하는 방법, 이를 수행하기 위한 트롬빈 검출 키트 및 이러한 검출 키트의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

일반적으로 혈액응고 과정은 혈액이 혈관 밖으로 나오면 혈액 내의 혈소판이 파괴되어 트롬보플라스틴이 생기고, 트롬보플라스틴은 혈액 속의 칼슘이온(Ca^{2+})과 함께 작용하여 혈장 단백질의 하나인 프로트롬빈을 트롬빈으로 변화시킨다. 이 트롬빈은 혈액 속의 가용성 피브리노겐을 가수분해하여 불용성인 피브린으로 변화시키는 반응을 촉매한다.

- [0003] 피브린은 실 모양의 물질로서, 그물처럼 얽히고 그 속에 혈구를 가둔 채, 시간이 지날수록 점점 작아지는데, 트롬빈은 피브리노겐에 대한 기질 특이성이 매우 높고, 피브리노겐의 아르기닌과 글리신 잔기 사이의 4개의 펩티드 결합을 자른다. 또한, 이러한 반응의 최적 pH는 중성 또는 약알칼리성 부근이며, 주성분은 단백질로서 최소 분자량은 8,000이며 중합하기 쉬운 성질을 가진다.
- [0004] 종래 트롬빈의 농도 측정을 위해서 트롬빈에 정량적으로 반응하는 히루딘 펩타이드를 이용하는 면역 측정법이 사용되기도 하였다. 형성된 트롬빈-히루딘 복합체에 대하여 ELISA 검사 또는 친화도 크로마토그래피를 통해 트롬빈의 농도를 확인할 수 있었다. 그러나 히루딘은 생체 외에서 타 단백질과의 기결합된 경우 트롬빈과 결합할 수 없어 정확한 양을 측정하기 어려운 문제가 있다.
- [0005] 또한 압타머를 이용하여 단백질을 검출하는 방법도 알려져 있으나, 단백질과 특이적 결합을 하는 압타머를 표면에 고정해야 하며 후에 단백질을 압타머와 결합시켜야 한다. 하지만 압타머가 표면에 고정화 되어 있어 단백질이 압타머와 결합할 때 표면으로부터 방해효과를 제공받기 때문에 검출 단백질을 효과적으로 결합시키는데 어려움이 있다. 또한 결합된 단백질의 효소반응을 이용한 검출방법에서는 압타머와의 결합으로 인하여 단백질의 활성이 줄어 들게 되어 효과적이고 정확한 단백질의 검출이 용이하지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0025226호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명이 이루고자 하는 기술적인 과제는 상술한 종래의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 종래의 압타머 방식을 대체하여 단백질을 표면에 고정화하지 않고 타겟 물질을 검출하는 새로운 방법을 제시하여 단백질 활성의 감소 없이 빠르고 정확하게 타겟 단백질을 검출하는 방법을 발견하였다. 구체적으로, 페로센(Ferrocene)으로 표지된 피브리노겐(Fib-Fc)을 이용하여 트롬빈 단백질을 전기화학적으로 검출하는 방법을 개발하였으며, 이를 통해 단백질의 활성을 감소시키지 않고도 신속하고 정확한 단백질의 정량 검출이 가능하게 되었다.
- [0008] 이에 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 페로센으로 표지된 피브리노겐을 이용한 트롬빈 단백질의 정량적 검출 방법을 제공하고자 하는 것이다.
- [0009] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 트롬빈 검출 키트를 제공하고자 하는 것이다.
- [0010] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 트롬빈 검출 키트의 제조 방법을 제공하고자 하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 과제를 달성하기 위한 트롬빈을 검출하는 검출용 키트는 전극; 및 전극 표면 상에 코팅되어 있으며, 페로센으로 표지된 피브리노겐을 응집시키기 위한 피브리노겐 층;을 포함한다.
- [0013] 또한 상기 과제를 달성하기 위한 트롬빈을 검출하는 검출용 키트의 제조 방법은 세척용액으로 처리한 ITO 전극 표면을 증류수를 처리하여 하이드록시기가 결합된 ITO 전극 표면을 제작하는 제 1단계; 및 상기 제 1단계에서 제작한 ITO 전극 표면 상에 피브리노겐 용액을 드롭하여 코팅시키는 제 2단계;를 포함한다.
- [0014] 또한 상기의 과제를 달성하기 위한 표적 물질 내의 트롬빈의 정량을 측정하는 방법은 피브리노겐이 첨가된 완충 용액에 페로센 용액을 첨가하여 용융시키고 교반시켜 페로센이 표지된 피브리노겐을 형성시키는 제 (a) 단계; 본 발명에 따른 피브리노겐으로 코팅된 트롬빈을 검출하는 검출용 키트 상에 상기 페로센이 표지된 피브리노겐

및 표적 물질이 혼합된 혼합 용액을 접촉, 노출시키는 제 (b) 단계; 및 상기 페로센이 표지된 피브리노겐 및 표적 물질이 혼합된 혼합 용액이 접촉된 키트의 산화-환원 전류를 측정하는 제 (c) 단계;를 포함한다.

[0015]

[0016]

기타 실시예들의 구체적인 사항은 발명의 상세한 설명에 포함되어 있다.

발명의 효과

[0017]

본 발명의 특징 및 효과에 대해서는 다음과 같다.

[0018]

본 발명의 트롬빈을 확인하는 키트 및 이의 제조 방법을 이용한 트롬빈의 정량적 검출 방법을 통해 단백질을 표면에 고정화하지 않고 트롬빈을 검출하는 새로운 방법을 제시하여 단백질 활성 감소 문제 없이 신속하면서도 정확한 검출이 가능하다.

[0019]

이의 방법은 종래의 압타머를 이용한 방법보다 보다 높은 효율을 보인다.

[0020]

본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0021]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 피브리노겐과 페로센이 결합된 Fc-NHS 에스터 사이의 반응으로 형성된 페로센이 표지된 피브리노겐의 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 의한 페로센이 표지된 피브리노겐을 제조하는 과정 순서를 보여주는 프로토콜이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 페로센이 표지된 피브리노겐을 ITO에 적용하는 과정의 간략한 모식도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 트롬빈 검출 키트를 제작하는 과정을 보여주는 모식도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 NHS-Fc, ITO 및 Fib-Fc/ITO의 순환 전압 전류법을 통한 산화 전류 값을 나타낸 데이터이다.

도 6 및 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 트롬빈 검출 키트에 가한 트롬빈의 농도에 따른 전기화학적 감응을 확인하기 위한 미분펄스 전압 전류법 데이터 및 전류의 크기를 막대그래프로 표시하고 이에 대한 추세선을 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022]

본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0023]

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 전극; 및 전극 표면 상에 코팅되어 있으며, 페로센으로 표지된 피브리노겐을 응집시키기 위한 피브리노겐 층;을 포함하는 트롬빈을 검출하는 검출용 키트를 제공한다.

[0024]

더욱 구체적으로는 전극 표면 상에 코팅되어 있는 피브리노겐 층에 페로센으로 표지된 피브리노겐 및 트롬빈이 혼합된 용액을 접촉시켜 페로센으로 표지된 피브린에 의해 증가하는 산화-환원 전류값을 측정하여 트롬빈의 농도를 측정하는 센서에 관한 것이다.

[0025]

본 발명의 트롬빈을 검출하는 검출용 키트는 바이오 칩이 포함될 수 있으며, 기질(Substrate) 상에 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 젤, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소 입자 및 모세관을 포함할 수 있으며, 피브리노겐과 ITO 전극 표면과의 고정화 과정은 화학적 결합 또는 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다.

- [0026] 본 발명에서의 표적 단백질인 트롬빈은 인체 내에서 피브리노겐을 피브린으로 전환시키는 효소 활동을 수행한다. 이를 통해 혈액 내 혈소판이나 혈액세포 및 혈관을 둘러싸 혈병을 형성시킨다. 이는 혈액의 응고 기작에 포함된다. 본 발명의 일 실시예를 통해, 생체 내에서 매우 조직적으로 미세한 반응에서도 반응 메커니즘이 수반되는 혈액 응고 반응을 이용하여 트롬빈을 검출할 경우 매우 빠르게 검출할 수 있다.
- [0027] 또한 트롬빈은 생성된 피브린 단일 가닥의 응집 작용에 역할을 한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 피브리노겐에 전기 활성 물질인 페로센을 고정화시킨다. 트롬빈의 농도에 따라 표면에 고정화된 페로센으로 표지된 피브린의 양을 전기화학적으로 정량하기 위한 방법에 대하여 보다 구체적인 실시예 등으로 설명할 것이다.
- [0028] 본 발명에서의 전극은 ITO 전극을 이용할 수 있다. ITO 전극은 세척된 ITO 전극을 이용하는 것이 바람직하며, 이를 위해 세척 용액을 이용하여 세척시키는데, 본 발명의 일 실시예에 따르면 Piranha solution을 이용하여 세척할 수 있다. Piranha solution은 약 70%의 황산과 30%의 과산화수소의 혼합 용액으로 이를 이용하여 ITO의 불순물을 완벽하게 제거하여 정확한 트롬빈의 정량을 측정하도록 준비할 수 있다.
- [0029] 또한 ITO 전극의 표면은 하이드록시기가 많도록 조절할 수 있다. 이를 위해 Piranha solution으로 세척한 ITO 전극을 물로 세척하는 과정 등으로 수행하여 음(-) 전하를 띠도록 하여 하이드록시기가 많은 표면을 제작할 수 있다. 이러한 과정은 추후 피브리노겐 용액을 ITO 전극 상에 코팅시키는 과정에서 강한 고정을 시킬 수 있다는 점에서 유리할 수 있다.
- [0030] 페로센은 전극 활성 물질로, 또한 전자 전달 매개체로 이용될 수 있다. 페로센은 산화-환원 전류를 생성시킬 수 있는 분자이며 단백질의 활성 감소를 일으키지 않는 분자로 이용될 수 있다. 페로센은 1 개의 유기 고리가 금속 원자와 대칭적으로 결합되어 있는 전이 금속의 유도체를 일컬으며, 샌드위치 화합물이라고도 불린다. 가장 널리 알려진 샌드위치 화합물로 분자식은 $(C_5H_5)_2Fe$ 이며, 다이사이클로펜타다이엔 철(dicyclopentadienyl iron)이라고 불린다. 이는 주황색 결정으로 벤젠과 같은 방향족 화합물과 같은 안정한 성질을 가지고 있어 치환 반응이 잘 일어날 수 있으며, 이를 이용하여 전극 활성 물질인 동시에 전자 전달 매개체로 이용되어 트롬빈 농도 리포터 또는 양전하 부여의 특징을 동시에 구현 가능한 센서로 이용할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 세척용액으로 처리한 ITO 전극 표면을 증류수를 처리하여 하이드록시기가 결합된 ITO 전극 표면을 제작하는 제 1단계; 및 상기 제 1단계에서 제작한 ITO 전극 표면 상에 피브리노겐 용액을 드롭하여 코팅시키는 제 2단계;를 포함하는 트롬빈을 검출하는 검출용 키트의 제조 방법을 포함한다.
- [0032] 먼저 페로센이 표지된 피브리노겐을 합성하는 과정을 설명하고자 한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 피브리노겐은 완충 용액에 녹이며, 이 때 피브리노겐이 첨가된 완충 용액은 0.01 내지 1 M 중탄산완충용액(bicarbonate buffer)으로 pH는 9 내지 10인 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 완충 용액의 농도는 0.05 내지 0.3 M이며, pH는 9.2 내지 9.5인 것이 좋다. 이 후, 페로센의 첨가를 완료시킨 후, 상온에서 4시간 이상 교반시키면서 페로센과 피브리노겐의 결합을 형성시키도록 한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 페로센을 도입하기 위하여 Fc-NHS 에스터의 산소 부위에 페로센이 결합된 구조를 이용할 수 있다. 피브리노겐에는 아민($-NH_2$) 작용기가 존재하고 있어 Fc-NHS ester에 결합되어 있는 페로센과 결합이 잘 일어날 수 있어 상온에서 교반하는 동안 페로센과 피브리노겐은 서로 결합되어 페로센이 표지된 피브리노겐을 제조하는 것이 가능하다.
- [0033] 페로센 용액은 무수 조건의 용매를 이용하는 것이 바람직하며, 또한 극성 용매를 이용하여 페로센을 용해시켜 놓을 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따른 무수 극성 용매는 DMSO, DMF, THF, HMPA, 아세톤 등 다양한 용매를 이용할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명은 상기 제 1단계 수행 후 페로센으로 표지된 피브리노겐을, 반응에 참여하지 않은 페로센, 표지되지 않은 피브리노겐으로 분리시키기 위해 세파텍스 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분리시키는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0035] 보다 구체적으로 설명하면, 반응을 종결시킨 후에는 페로센으로 표지된 피브리노겐 이외에도 반응에 참여하지 않은 페로센 및 피브리노겐 등이 혼합물로 존재하고 있어 순수한 페로센으로 표지된 피브리노겐을 분리시키기 위하여 분리 방법을 도입하여야 한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 세파텍스 컬럼 크로마토그래피(Sephadex column chromatography)를 이용할 수 있다. 세파텍스 컬럼은 다양한 크기의 글로불린 단백질을 분리시킬 수 있어, 본 발명의 일 실시예에 따른 적합한 겔을 이용하여야 하는데, 바람직하게는 G-25의 컬럼을 이용하는 것이 좋다. 하지만 레인지가 겹치고, 페로센이 표지된 피브리노겐을 적절하게 분리시키기 위한 다른 G-10, G-15, G-50, G-75, G-100 등의 다양한 겔을 이용할 수 있을 것이며, 그 밖의 다른 크로마토그래피의 방법을 이용하여 적

절하게 분리시킬 수 있다.

- [0036] 절단 완충용액(Cleavage Buffer)를 이용하여 세파텍스 컬럼을 활성화시킨 후, 혼합 용액을 가하여 표지되지 않은 피브리노겐을 먼저 제거한다. 또한 컬럼을 깨끗한 튜브에 옮긴 후 절단 완충용액을 가하여 컬럼 내에 있는 페로센이 표지된 피브리노겐을 튜브로 용출시켜 분리하는 것이 가능하다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 세척용액은 Piranha solution을 이용하는 것이 바람직하며, 이를 통해 ITO 전극의 불순물을 제거시킬 수 있다. 또한, 증류수 등의 물로 세척하여 ITO 전극을 음(-) 전하를 띠게 하여, 하이드록시기가 많은 표면을 만든 후에 피브리노겐 용액을 그 위에 드롭하여 코팅시킬 수 있다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 양태에 있어서, 본 발명은 피브리노겐이 첨가된 완충 용액에 페로센 용액을 첨가하여 용융시키고 교반시켜 페로센이 표지된 피브리노겐을 형성시키는 제 (a) 단계; 상기의 피브리노겐으로 코팅된 트롬빈을 검출하는 검출용 키트 상에 페로센이 표지된 피브리노겐 및 표적 물질이 혼합된 혼합 용액을 접촉시켜 페로센이 표지된 피브리노겐 및 표적 물질을 동시에 노출시키는 제 (b) 단계; 및 상기 페로센이 표지된 피브리노겐 및 표적 물질이 혼합된 혼합 용액이 접촉된 키트의 산화-환원 전류를 측정하는 제 (c) 단계;를 포함하는 표적 물질 내의 트롬빈의 정량을 측정하는 방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 제 (a) 단계에서 피브리노겐이 첨가된 완충 용액은 0.01 내지 1 M 중탄산완충용액(bicarbonate buffer)으로 pH는 9 내지 10으로 조절하는 것이 바람직하다. 키트에 접촉되는 혼합 용액 내에 포함되어 있는 표적 물질은 임의로 구성할 수 있으며, 표적 물질 내에 트롬빈이 포함되어 있는 것을 알고 있는 경우 이의 정량을 측정하기 위해서 키트 상에 접촉시킬 수 있을 것이다.
- [0040] 페로센 용액은 무수 조건의 용매를 이용하는 것이 바람직하며, 또한 극성 용매를 이용하여 페로센을 용해시켜 놓을 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따른 무수 극성 용매는 DMSO, DMF, THF, HMPA, 아세톤 등 다양한 용매를 이용할 수 있다. 또한, 상기 제 (a) 단계 수행 후 페로센으로 표시된 피브리노겐을, 반응에 참여하지 않은 페로센, 표지되지 않은 피브리노겐으로 분리시키기 위해 세파텍스 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분리시키는 단계를 추가적으로 포함하는 것이 바람직하다. 세파텍스 컬럼 크로마토그래피에 대한 구체적인 설명은 상기에서 설명하였으므로 생략한다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 산화-환원 전류를 측정하기 위해 전극 시스템을 이용할 수 있다. 상기 전극은 단일 전극 또는 2개 이상의 전극을 이용할 수 있으며, 예컨대 3 전극 시스템인 경우에는 작업 전극, 대조 전극, 기준 전극의 시스템을 이용할 수 있다.
- [0042] 작업 전극에 사용되는 금속은, 금, 은, 구리, 백금탄소, ITO 또는 알루미늄 전극을 사용할 수 있으며, 대조 전극으로는 금, 은, 구리, 백금, 알루미늄 또는 백금 와이어를 사용할 수 있으며, 기준 전극으로는 염화은 전극, 칼로멜 전극 또는 황산수은(I) 전극을 이용할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에 따른 트롬빈의 농도 측정은 전극 표면에 트롬빈과 선택적인 결합이 가능한 피브리노겐을 고정하고 이와 전기적 상호 작용이 가능한 페로센을 피브리노겐과 결합하여, 페로센에 의해 형성된 산화-환원 전류를 측정하여 트롬빈의 농도를 측정할 수 있다. 이와 같이 페로센은 산화-환원 전류를 측정하는 표지자가 되어 표적 물질 내부에 트롬빈이 존재하는 경우 늘어나는 전기적 산화를 통해 트롬빈의 농도를 확인할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 산화-환원 전류를 측정하는 단계는 미분펄스 전압 전류법(Differential Pulse Voltammetry)를 이용하는 것이 바람직하다. 또한 Cyclic voltammogram을 이용할 수도 있다. 다양한 시료 내에 각각 포함되어 있는 트롬빈의 농도가 다른 경우, 시료 각각을 피브리노겐이 고정되어 있는 전극에 페로센으로 표시된 피브리노겐과 같이 접촉시키면 트롬빈은 피브리노겐과 결합하여 피브리노겐을 피브린으로 변환시키면서 고정화하는 페로센으로 표시된 피브린의 농도가 달라지게 된다. 이 때 미분펄스 전압 전류법을 통해 산화 환원 전위의 값을 달리하여 변화하는 전류의 세기를 측정할 때 각 전류의 세기가 다르게 측정된다.
- [0045] 도 6 및 도 7을 참조하면, 트롬빈의 농도에 따라 트롬빈이 존재하지 않는 경우에서부터 트롬빈의 농도를 각각 달리 처리하여 그에 따른 전류 값을 측정해 놓았는데, 막대 그래프의 추세선을 확인해 보면 정량적으로 트롬빈의 양이 증가하는 경향에 따라 전류의 값도 증가하고 있으므로 이는 기준점이 될 수 있으며, 따라서, 미지의 시료에 포함되어 있는 트롬빈의 양을 이의 기준점에 해당하는 전류 값과 대응시켜 확인하면 용이하게 트롬빈의 농도를 확인하는 것이 가능할 것이다.
- [0046] 본 발명의 페로센이 표지된 피브리노겐을 이용한 미분펄스 전압 전류법을 이용하여 트롬빈의 농도를 측정하는

경우 기존의 압타머를 이용한 센서와 비교하였을 때 빠른 시간 안에 효율이 높은 검출 센서로서 이용하는 것이 가능할 것이다.

본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예를 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

실시예 1 : 페로센으로 표지된 피브리노겐 제조 과정

1) 10 mg 피브리노겐을 0.1 M 중탄산완충용액(bicarbonate buffer) 1 ml에 첨가하여 용융시켰다. 이 때 pH는 9.4로 조절하였다.

2) 상기 피브리노겐 용액에 페로센 용액 100 μ l(무수조건의 DMSO 상 10 mg/ml)를 서서히 첨가하였다.

3) 페로센 용액의 첨가가 완료된 후 상온에서 5시간 동안 저어주며 반응을 완료 하였다. 페로센으로 표지된 피브리노겐의 합성 개요는 도 1에서 나타내었다.

4) 반응이 종결 된 후 페로센으로 표지된 피브리노겐을 페로센, 표지되지 않은 피브리노겐과 분리하기 위하여 세파덱스 컬럼(sephadex column, G-25) 크로마토그래피를 수행하였다.

5) Cleavage buffer(Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2.5 mM, pH 8.4)를 이용하여 세파덱스 컬럼(sephadex column)을 활성화시킨 후 0.5 ml의 혼합 용액을 가하여 표지되지 않은 피브리노겐을 제거하였다. 이 후 컬럼을 깨끗한 튜브에 옮기고 1 ml의 cleavage buffer를 가하여 column 내에 잡혀 있는 페로센으로 표지된 피브리노겐(Fib-Fc)을 튜브로 용출시켰다(도 2).

실시예 2: 페로센으로 표지된 피브리노겐을 이용한 ITO 트롬빈 검출 키트 제조 과정

1) Piranha solution을 통해 세척된 Indium Tin Oxide(ITO) 키트 표면 상을 증류수로 처리하여 음전하를 띄는 하이드록시기(-OH)가 많은 표면을 제작하였다. 이 때 페로센으로 표지된 피브리노겐(Fib-Fc)과 접촉되는 면적은 1 cm X 1 cm이었다.

2) 준비된 ITO 키트 상에 4.4 mg/ml 피브리노겐(Fib)을 1시간 동안 드롭 코팅(drop coating) 하였고 이 후 물로 세척하였다.

3) 피브리노겐(Fib)이 결합된 ITO 키트에 여러 농도의(트롬빈 없음; 100pg/ml; 1 ng/ml; 10 ng/ml; 100 ng/ml; 1000 ng/ml) 트롬빈(thrombin) 용액과 페로센으로 표지된 피브리노겐(Fib-Fc) 용액으로 이루어진 혼합용액을 적하하여 1시간 동안 노출시킨 후 cleavage buffer와 물을 이용하여 세척하였다. 상기의 과정은 도 4에 나타내었다.

실험예 1. 페로센이 표지된 피브리노겐의 순환 전압 전류법(Cyclic Voltammetry, CV) 측정

도 5는 순환 전압 전류법을 이용하여 페로센이 표지된 피브리노겐을 분석한 데이터이다. Bare ITO 전극과 ITO위에 NHS(N-hydroxy succinimide)와 페로센이 결합된 NHS-Fc)을 노출한 경우, 그리고 페로센이 표지된 피브리노겐(Fib-Fc)을 노출한 경우의 순환 전압 전류법을 이용하여 데이터를 확인하였다.

그 결과 페로센이 표지된 피브리노겐(Fib-Fc)만 페로센의 산화, 환원 전류를 보였다.

이는 피브리노겐에 페로센이 잘 표지 되었으며 피브리노겐이 ITO 전극 표면과 잘 결합되어 있는 것을 확인한 것으로 전기화학적 센서의 플랫폼으로 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

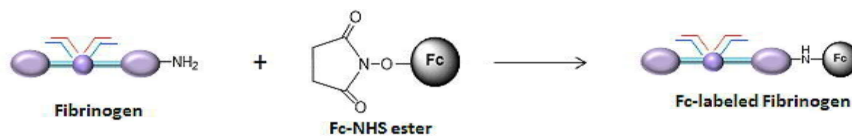
실험예 2. 페로센으로 표지된 피브리노겐을 이용한 ITO 트롬빈 검출 키트의 미분펄스 전압 전류법 곡선

(Differential Pulse Voltammetry)

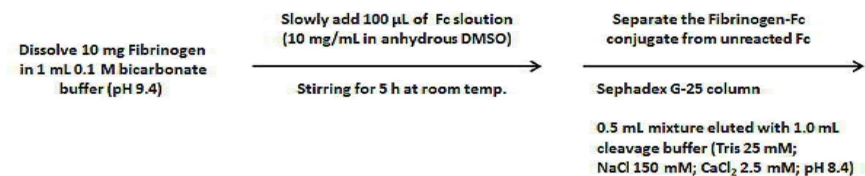
- [0063] 1) 실시예 2의 다양한 농도의(트롬빈 없음; 100pg/ml; 1 ng/ml; 10 ng/ml; 100 ng/ml; 1000 ng/ml) 트롬빈 (thrombin) 용액과 페로센으로 표지된 피브리노겐(Fib-Fc) 혼합용액을 적하한 ITO 키트에 대한 산화 전류 값을 확인하기 위해, 세척된 ITO 전극을 작업전극으로 하고, 백금(Pt) 전극을 상대전극으로 그리고 기준전극으로는 Ag/AgCl 전극을 이용하여 준비된 용액에 담근 뒤에 산화 전위를 0.2 V 에서 0.8 V로 하였다.
- [0064] 2) 각 트롬빈의 농도(트롬빈 없음; 100pg/ml; 1 ng/ml; 10 ng/ml; 100 ng/ml; 1000 ng/ml)에 따른 산화 전류의 차이를 확인하였다.
- [0065] 도 6 및 도 7을 참조하면, 실험 결과 트롬빈의 농도가 증가함에 따라 산화-전류 값이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 산화-전류 값을 막대 그래프로 나열하여 트롬빈의 농도에 따른 전류값의 변화 추세를 확인해 본 바, 트롬빈의 농도에 비례하여 산화 전류값도 정량적으로 증가하고 있음을 확인할 수 있었다.
- [0066] 이를 통해 트롬빈 농도에 따라 고정되는 페로센으로 표지된 피브린의 양이 달라지고 이를 미분펄스 전압 전류법 (Differential Pulse Voltammetry)을 이용하여 확인함으로써 트롬빈의 농도를 정확하게 검출할 수 있는 센서로 사용 가능함을 확인하였다.

도면

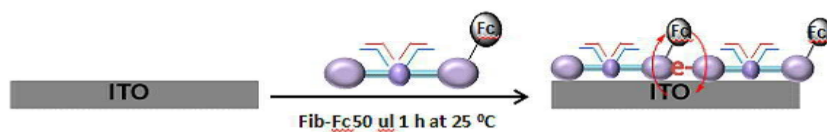
도면1



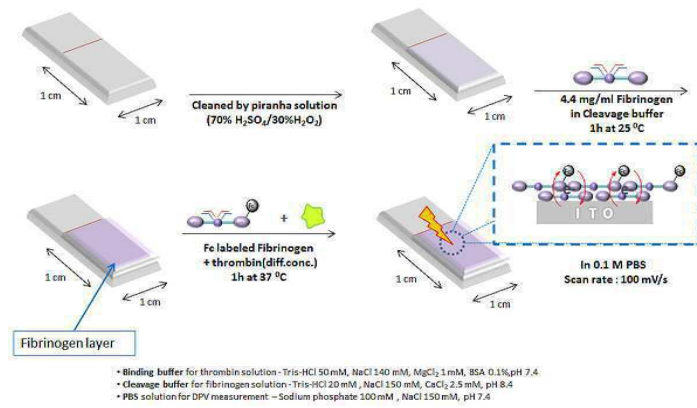
도면2



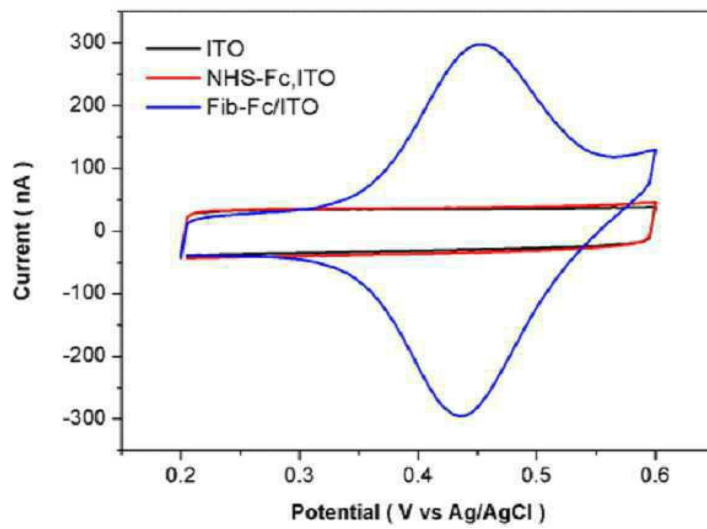
도면3



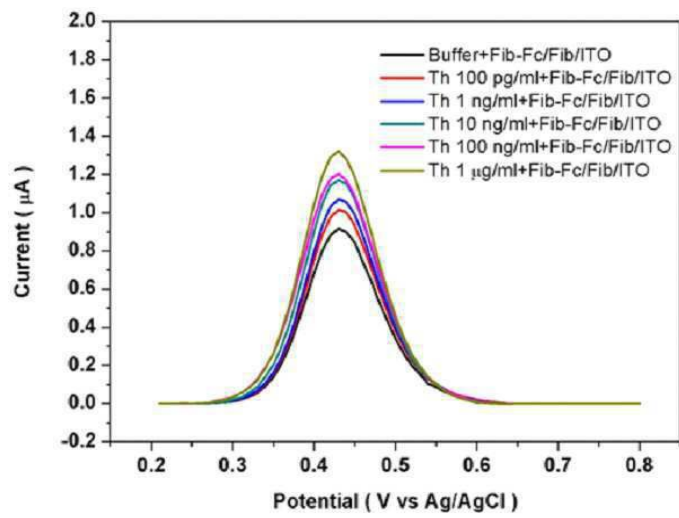
도면4



도면5



도면6



도면7

