



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0097339
(43) 공개일자 2013년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 27/26* (2006.01)

C12N 15/115 (2010.01) *B82Y 15/00* (2011.01)

(21) 출원번호 10-2012-0018925

(22) 출원일자 2012년02월24일

심사청구일자 2012년02월24일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

송민정

서울특별시 영등포구 대림2동 1076-4호 19층 1반

임대순

서울특별시 강남구 개포동 140 주공아파트

201-104

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

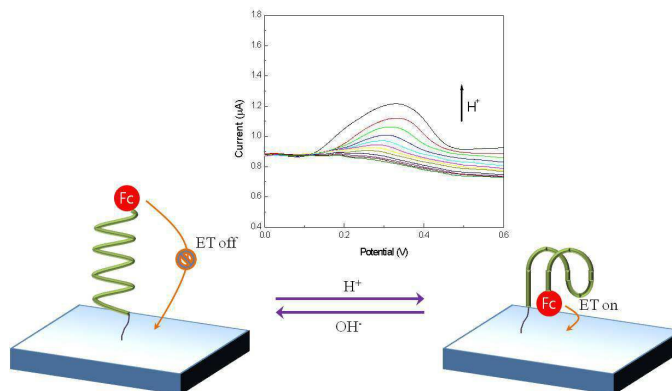
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 페로센-표지된 압타머를 이용한 전기화학적 센서 및 그 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 금(Au) 나노입자들이 증착된 다이아몬드 박막 전극을 기반으로 하여 페로센-표지된 압타머를 이용하여 pH를 측정하는 전기화학적 센서에 관한 것으로서, 종래 평면형 금(Au) 전극 보다 더 넓은 범위에서 더 높은 감도로 pH를 측정할 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

김종훈

서울특별시 동대문구 전농3동 67-3

이승구

서울특별시 노원구 중계4동 주공2단지아파트 206동
211호

특허청구의 범위

청구항 1

금(Au) 나노입자들이 증착된 다이아몬드 박막 전극을 기반으로 하는 전기화학적 pH 센서로서, 상기 금(Au) 나노입자는 페로센으로 표지된 압타머(aptamer)와 공유결합된 것을 특징으로 하는 전기화학적 pH 센서.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 압타머는 ss-DNA(single-stranded DNA)인 것을 특징으로 하는 전기화학적 pH 센서.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 페로센으로 표지된 ss-DNA는 말단기가 싸이올로 치환되어 금(Au) 나노입자와 공유결합된 것을 특징으로 하는 전기화학적 pH 센서.

청구항 4

- 1) 보론 도핑된 다이아몬드 전극 상에 금 나노입자들을 증착하는 단계; 및
- 2) 상기 금 나노입자와 페로센으로 표지된 ss-DNA를 결합시키는 단계:를 포함하는 전기화학적 pH 센서의 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 금 나노입자와 페로센으로 표지된 ss-DNA의 결합은 상기 ss-DNA의 말단기를 싸이올기로 치환하여 Au-S 공유결합을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 전기화학적 pH 센서의 제조 방법.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 전기화학적 pH 센서 및 그 제조 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 페로센(ferrocene)-표지된 압타머(aptamer)를 이용하여 전기화학적 방법으로 양성자를 검출함으로써 pH를 측정하는 센서 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 다이아몬드는 생체 적합성뿐만 아니라, 화학 안정성, 열전도성, 견고성, 광학적 특성이 우수하다. 그러나 다이아몬드 자체는 전기적 전류 전도성이 없는 절연체이며, 보론으로 도핑을 하면 반도체의 특성을 나타낸다. 다이아몬드 전극 기판은 높은 시그널-노이즈 비와 장기 안정성, 높은 감도, 우수한 재현성 등으로 인해, 기존의 금이나 백금 등의 전극을 사용하였을 때보다 더 낮은 농도까지 검출이 가능하다. 그러나, 다이아몬드 박막에 바이오 물질을 고정하기 위해서는 아미노기(-NH₂)나 카르복실기(-COOH)를 형성하는 과정이 필요한데, 이와 같이 표면에 작용기를 형성하는 공정은 매우 복잡하고 제한적이다.
- [0003] 페로센(Fc)는 산화환원 반응성 분자로서, 중심 고리 원자를 중심으로 반대쪽에 두 개의 싸이클로펜타디에닐 고리가 결합된 샌드위치 화합물이다. (도 1(c)) 이 화합물은 화학적으로 안정하고, 쉽게 작용기화될 수 있으며, 전기화학적으로 가역적이다. Fc-dT는 산화환원 반응성 페로센(Fc)기로 변형된 염기성 뉴클레오타이드로서, 도 1(d)에 보여지는 바와 같이 올리고뉴클레오타이드 내부로 혼입되어 핵산 분석을 위한 전기화학적 프로브로 사용되고 있다.

[0004] 또한 압타머는 표적 분자에 특이적으로 결합하는 올리고핵산 또는 펩티드 분자로서, 통상 RNA, 한 가닥 DNA(ss-DNA), 또는 합성 뉴클레오티드와 이들의 결합체 등을 들 수 있다. [James W (2000) aptamers. In: Meyers RA (ed) Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp 4848] 이 중에서 DNA 압타머는 한 가닥 사슬로 된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. DNA에서 발견되는 4개의 염기는 아데닌 (A), 사이토신 (C), 구아닌 (G) 및 티민 (T)이다. 도 1(a)에 보여지는 것처럼, 사이토신은 산성 조건에서 프로토네이티드 된 사이토신(C^+)과 3중 수소결합을 통하여 $C-C^+$ 염기쌍(base pair)을 형성하고, 이에 따라 ss-DNA는 2개의 평행한 듀플렉스를 형성하면서 *i-motif*라는 4중 구조를 갖게 된다.

[0005] 많은 연구자들이 Fc-표지된 올리고뉴클레오티드를 이용하여 전기화학적 DNA 센서를 개발해왔다. 타겟 물질은 이들 센서에 있는 표면 제한적이고 산화환원종으로 표지된 압타머와 특이적으로 결합하여 압타머 프로브의 배향에 변화를 일으킨다. 이러한 배향의 변화는 표지된 산화환원종과 전극 사이의 거리를 변화시키고, 이에 따라 효과적인 전자 전달을 용이하게 하고, 전기화학적 시그널을 증대시킨다. [Lu Y, Li X, Zhang L, Yu P, Su L, Mao L (2008) aptamer-based electrochemical sensors with aptamer-complementary DNA oligonucleotides as probe. Anal Chem 80:1883]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 다이아몬드 박막 전극을 기반으로 페로센-표지된 압타머를 이용하여 pH를 측정하는 전기화학적 센서 및 그 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 금(Au) 나노입자들이 증착된 다이아몬드 박막 전극을 기반으로 하는 전기화학적 pH 센서로서, 상기 금(Au) 나노입자는 페로센으로 표지된 압타머(aptamer)와 공유결합된 것을 특징으로 하는 전기화학적 pH 센서를 제공한다.

[0008] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 압타머는 페로센으로 표지된 ss-DNA(single-stranded DNA)인 것이 바람직하다. 이때, 페로센으로 표지된 ss-DNA는 말단기가 싸이올로 치환되어 금(Au) 나노입자와 공유결합된 것이 특징이다.

[0009] 본 발명의 일실시예에 따른 전기화학적 pH 센서의 pH 감지 범위는 pH 4.8 내지 8.3이며, 감도는 약 $0.196 \mu A/pH$ 이다.

[0010] 또한 본 발명은 1) 보론 도핑된 다이아몬드 전극 상에 금 나노입자들을 증착하는 단계; 및 2) 상기 금 나노입자와 페로센으로 표지된 ss-DNA를 결합시키는 단계:를 포함하는 전기화학적 pH 센서의 제조 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 의하면, 금 나노입자와 페로센으로 표지된 ss-DNA의 결합은 상기 ss-DNA의 말단기를 싸이올기로 치환하여 Au-S 공유결합을 형성함으로써 이루어질 수 있다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에서 사용된 금 나노입자는 다이아몬드 박막 표면 처리의 어려움을 해소하고, 전극면적을 개선하는 효과뿐만 아니라, 화학반응에 의해 생성된 전자 전달의 매개체 역할을 통해 전기화학 센서의 성능을 개선시켰다. 본 발명에 따른 센서는 pH 4.8 ~ 8.3의 선형 범위와 약 $0.196 mA/pH$ 의 감도를 나타내었으며, 이러한 결과는 종래 평면 금(Au) 박막 전극을 이용하여 개발한 pH 센서(약 $0.07 mA /pH$ 의 감도, pH 5.6 ~ 7.1의 선형 범위)에 비하여 약 2.8배 감도가 향상된 것이고, 선형 범위도 더 넓어진 것으로서 본 발명에 따른 pH 센서가 매우 우수한 성능을 나타냄을 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 (a) 사이토신과 헤미프로토네이티드(hemiprotonated) C-C⁺ 염기쌍의 구조, (b) *i-motif* 구조, (c) 페로센 및 (d) Fc-dT의 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 Fc-표지된 압타머를 가진 전기화학적 센서의 개요도와 다른 pH에서 측정된 SWV(strategy and square-wave voltammograms) 그래프이다.
- 도 3은 BDD 전극상에서 다음과 같은 여러 가지 전압하에 측정된 금(Au)-나노입자전극 SEM 이미지이다: (a) -0.1 V, (b) -0.2 V, (c) -0.3 V, (d) -0.4 V, (e) -0.5 V and (f) -0.6 V. (스케일 바: 2 μ m)
- 도 4는 Au-NP/BDD 전극과 평면 Au 전극에서의 양성자 검출을 위한 SWV 피크 전류의 교정 곡선이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.
- [0015] 본 발명은 다이아몬드 박막 전극을 기반으로 페로센-표지된 압타머를 이용하여 pH를 측정하는 전기화학적 센서에 관한 것이다. 본 발명에서는 압타머로 사이토신(cytosine)이 풍부한 한 가닥 사슬 DNA(single-stranded DNA; ss-DNA)를 사용하여 샘플의 pH값에 따라 시그널 변화를 측정하였다. 일반적으로 사이토신(C)은 산성 조건에서 프로토네이티드 사이토신(C⁺)과 3중 수소결합을 통하여 C-C⁺ 염기쌍(base pair)을 형성하면서 ss-DNA는 *i-motif*라는 4중 구조를 갖게 된다.(도 1) 페로센은 좋은 산화화학종으로서, 이런 구조에서 압타머에 표지된 페로센과 전극 간의 거리가 가까워지면 효과적인 전자전달이 이루어지게 된다.
- [0016] 도 2는 전기화학적 pH 센서의 원리를 보여준다. Fc-표지된 ss-DNA의 구조는 pH 값에 따라 변한다. 일반적으로 사이토신은 3중 수소 결합을 통해 양성자화된 사이토신과 결합한다. 염기성 pH에서, DNA는 DNA의 사이토신 잔기가 양성자화되지 않기 때문에 스트레치된(stretched) 랜덤 구조를 갖는다. 이 구조에서는 Fc 부분과 전극 표면 사이의 거리가 멀기 때문에 효과적인 전자 이동이 어렵다.
- [0017] 그러나 낮은 pH에서는 Fc 부분과 전극 표면쪽으로 더 가까이 오기 때문에, 사이토신이기는 부분적으로 양성자화되고, DNA는 촘촘하게 접힌 형태가 된다. 따라서 낮은 pH에서 전자 이동이 효과적으로 이루어지고, 피크 곡선의 증가한다. 이러한 원리에 기초하여, SWV에서 피크 전류를 측정함으로써 pH값을 결정할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 따른 금(Au) 나노입자들이 증착된 다이아몬드 박막 전극을 기반으로 하는 전기화학적 pH 센서에서 금(Au) 나노입자는 페로센으로 표지된 압타머(aptamer)와 공유결합된 것이 특징이다. 예를 들어, 압타머는 페로센으로 표지된 ss-DNA(single-stranded DNA)인 것일 수 있으며, 이때, 페로센으로 표지된 ss-DNA는 말단기가 싸이올로 치환되어 금(Au) 나노입자와 공유결합을 이루도록 구성한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 따른 전기화학적 pH 센서의 pH 감지 범위는 pH 4.8 내지 8.3이며, 감도는 약 0.196 μ A/pH로서 매우 우수하다.
- [0020] 또한 본 발명은 1) 보론 도핑된 다이아몬드 전극 상에 금 나노입자들을 증착하는 단계; 및 2) 상기 금 나노입자와 페로센으로 표지된 ss-DNA를 결합시키는 단계:를 포함하는 전기화학적 pH 센서의 제조 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 의하면, 금 나노입자와 페로센으로 표지된 ss-DNA의 결합은 상기 ss-DNA의 말단기를 싸이올기로 치환하여 Au-S 공유결합을 형성함으로써 이루어질 수 있다.
- [0022] 이하 실시예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 상세히 설명한다. 그러나 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 예시적인 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 실시예: 전기화학적 pH 센서의 제조

- [0024] BDD 박막 전극을 제조하기 위하여, 핫필라멘트 화학기상증착(HFCVD) 시스템을 사용했다. 열적으로 산화된 실리콘(Si) 와이퍼는 정전기적 자기정렬법에 의해 다이아몬드 나노결정 씨드로 밀도 있게 코팅하였다. 그 다음 이 다이아몬드 씨드로 코팅된 기판 상에 도핑된 다이아몬드 필름을 성장시켰다.
- [0025] Au-NPs/BDD 을 제조하기 위해, 2.0 mM HAuCl₄ 와 0.5 M H₂SO₄를 포함하는 혼합액 중에서 600초 동안 -0.5 V의 일정한 전압하에 금 나노입자를 BDD 전극상에 전기화학적으로 증착시켰다. Fc-ss-DNA는 Au-NPs/BDD 전극 상에

Au-S 상호작용에 의해 고정되었다. 이 전극을 실온에서 12시간 동안 10 $\mu\text{g/mL}$ ss-DNA 를 포함하는 0.01M PBS (pH 7.4) 중에 담갔다, PBS로 행구었다. 본 발명에 사용된 페로센-표지된 ss-DNA는 Bioneer Co.에서 합성하였으며, 이 DNA의 서열은 다음과 같았다:

[0026] (5') (Fc-dT)TTAATCCCAATCCCAATCCCAATCCC(Thiol) (3').

[0027] 한편 본 발명에 따른 페로센-표지된 압타머를 이용한 전기화학적 pH 센서와 성능을 비교하기 위해, RF 스퍼터링에 의해 금 전극을 제조했다. 이때, 금 박막층과 실리콘 기판 사이의 접착력을 향상시키기 위해, 금(Au) 박막 (박막 두께: 2000 Å)을 증착하기 전에, 200 Å 티타늄(Ti)층을 실리콘 기판 상에 하부층으로 증착했다.

[0028] 실험예: pH 측정 결과

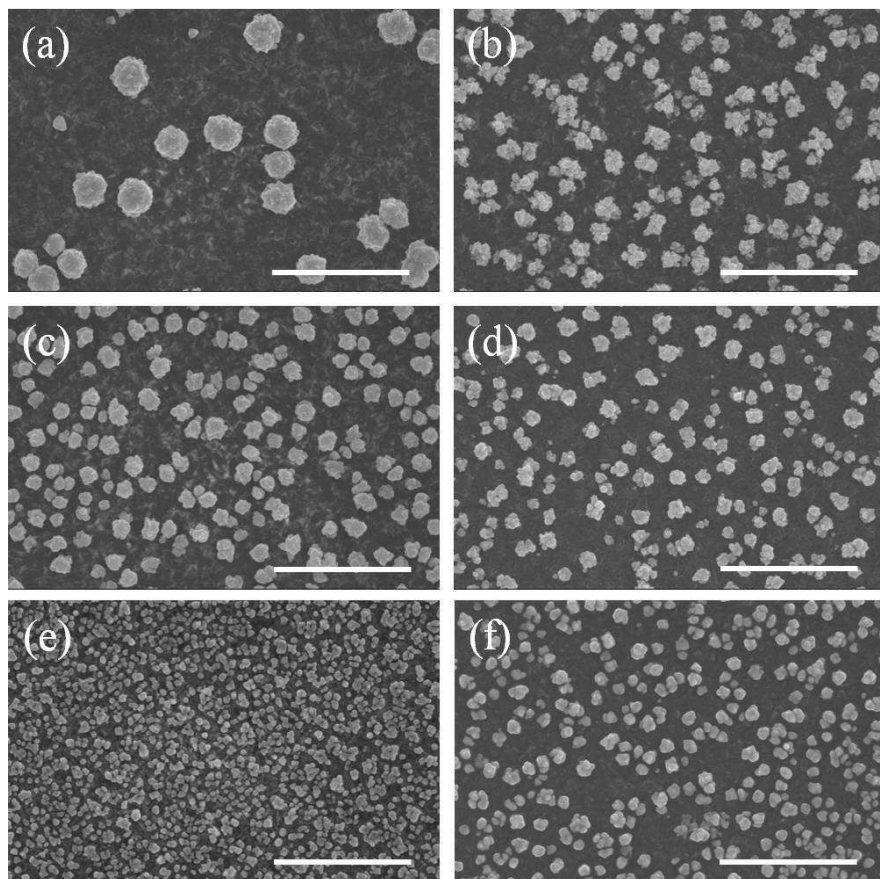
[0029] 도 3는 여러 가지 다른 전압에서 BDD 전극상에 위치한 금(Au)-나노입자전극의 SEM 이미지를 보여준다. 금(Au) 나노클러스터는 600초 동안 2 mM HAuCl₄과 0.5 M H₂SO₄용액을 이용하여 전기화학적으로 증착되었다. -0.5 V까지 네거티브 전압이 가해졌을 때, 금(Au)-나노입자는 더 밀도가 높아졌다. (도 3(a-e)) 그러나 -0.6 V 보다 더 큰 전압이 가해졌을 때는 금(Au)-나노입자의 밀도가 감소했다. (도 3(f)). 이러한 결과로부터, -0.5 V 가 적절한 전압으로 선택되었다. (도 3(e)) 이 전압에서 금 나노클러스터는 전극 표면에 평균 직경 80 nm로 균일하게 분포되었다.

[0030] 도 4는 Au-NPs/BDD 전극과 평면형 Au 전극에 대한 피크 전류(i_p) 대 pH의 교정 곡선을 나타낸다. Au-NPs/BDD 전극은 pH 4.8 ~ 8.3 범위에서 선형적 관계를 나타내며, 관계식은 $i_p(\mu\text{A}) = 1.7199 - 0.196 \times [\text{pH}]$ ($r = 0.9993$) 이다. 8.3 이상의 pH에서, 피크 전류는 더 작은 값으로 거의 유지되었다. 이것은 Fc-표지된 DNA가 스트레치된 구조를 갖기 때문에 효과적인 전자 전달이 어렵다는 것을 의미한다. 반면 낮은 pH에서 접힌 DNA 구조가 형성되기 때문에, 페로센 부분이 전극 표면에 더 가까워지고, 이에 따라 낮은 pH에서 피크 전류가 더 증가한다.

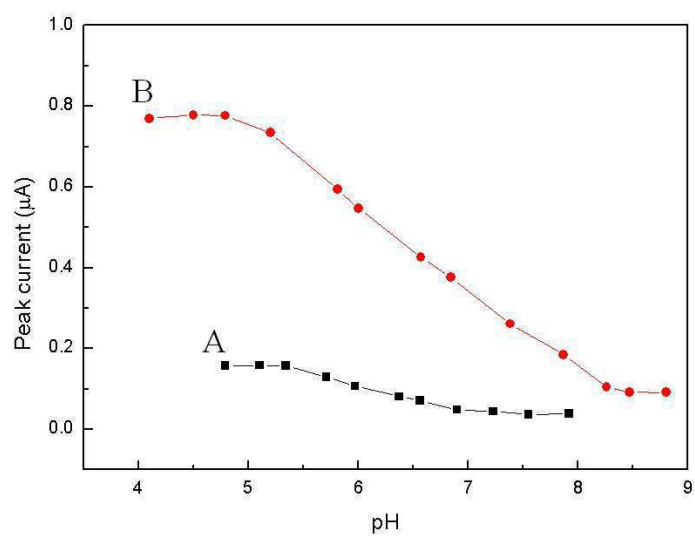
[0031] 최대 전류는 pH 4.8에서 관찰되었다. 피크 전류의 접힌 DNA의 형성은 pH가 이 값 이하로 감소되어도 거의 변화가 없었다. 평면형 Au 전극에 대해, i_p 와 pH의 관계는 pH 5.3 ~ 7.0 범위에서 선형적이다. ($i_p(\mu\text{A}) = 0.5246 - 0.06926 \times [\text{pH}], r = 0.99806$). 이 결과는 종래 보고된 감도가 0.07 $\mu\text{A/pH}$ 이고, pH 5.6 ~ 7.1 범위에서 전기화학적 반응을 보여주었던 i-DNA 기반의 전기화학적 양성자 센서의 경우[Xu X, Li B, Xie X, Li X, Shen L, Shao Y (2010) An i-DNA based electrochemical sensor for proton detection. Talanta 82:1122]와 선형 범위가 유사하면서도 감도는 현저하게 높다.

[0032] 상기 검출 결과로부터, 낮은 전자 전달 저항, 넓은 전위 윈도우, 넓은 표면적 및 효과적인 전자 전달 등의 BDD 전극과 Au-NPs의 시너지 효과로 인해 본 발명에 따른 전기화학센서가 평면형 Au 보다 더 넓은 범위에서 더 높은 감도를 나타낸다는 것을 확인할 수 있다.

도면3



도면4



서열목록

<110> KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Electrochemical pH sensor using ferrocene-tagged aptamer and

fabrication method thereof

<130> HPC-3080

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> single strand DNA

<400> 1

ttaatcccaa tccaatccc aatccc

26