



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0106700
(43) 공개일자 2020년09월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) G01N 21/65 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54346 (2013.01)
G01N 21/658 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0025259
(22) 출원일자 2019년03월05일
심사청구일자 2019년03월05일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울특별시 용산구 서빙고로 35 용산시티파크1단지아파트 103-603
최진하
서울특별시 성북구 오패산로16가길 40, 꿈의숲푸르지오아파트 115동 801호
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

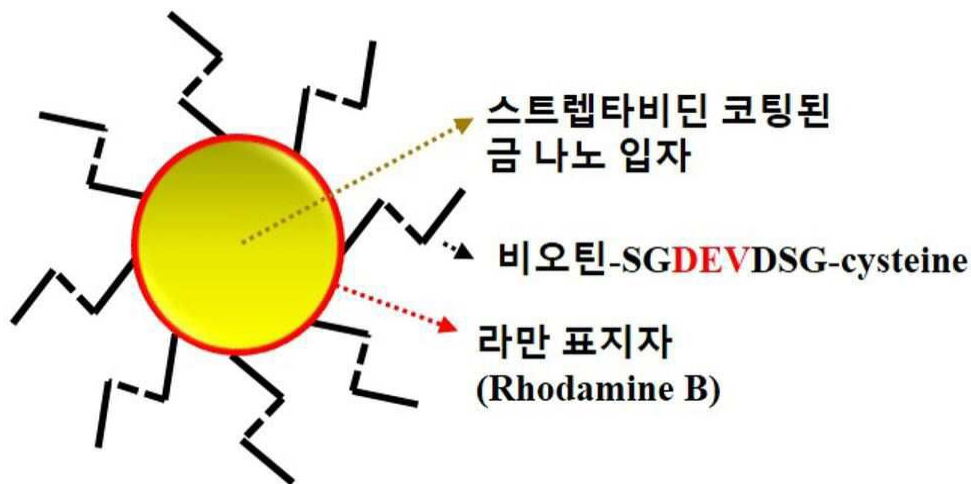
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 전도성 고분자 나노 구조체 및 금속 나노입자 복합체를 이용한 표면증강 라만분광 기반 단백질 분해 효소 검출용 센서

(57) 요약

본 발명에 따른 전도성 고분자 나노 구조체 및 라만 표지자 및 단백질 분해 효소에 의해 절단 가능한 서열로 이루어진 펩타이드가 고정화된 금속 나노입자 복합체를 포함하는 표면증강 라만분광법 기반의 바이오 센서는 단백질 분해 효소의 존재 유무, 농도, 활성 및 활성 억제 등을 신속하고 정확하게 측정할 수 있는 고민감도 플랫폼을 제공하며, 향후 세포 기반의 비파괴, 실시간 측정 및 체액 기반의 현장 질병 진단 키트 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/54366 (2013.01)

G01N 33/6812 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013K1A4A3055268
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	해외우수연구기관유치사업
연구과제명	서강-하버드 질병 바이오물리 연구 센터
기 여 율	33/100
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2018.07.01 ~ 2019.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1A6A1A03012845
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중점연구소지원사업
연구과제명	뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오 칩 개발
기 여 율	33/100
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2018R1A6A3A11051465
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	리서치펠로우
연구과제명	딤벨형 패턴/단백질 나노입자 기반의 CRISPR-Cas9 미세유체 칩 개발
기 여 율	34/100
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 금속 나노입자로 코팅된 전도성 고분자로 이루어진 나노 구조체; 및
(b) 금속 나노입자, 라만(Raman) 표지자 및 단백질 분해 효소에 의해 절단 가능한 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 금속 나노입자 복합체를 포함하는 단백질 분해 효소 검출용 센서.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 금속 나노입자는 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu) 및 백금(Pt)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 단백질 분해 효소 검출용 센서.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 (a)의 금속 나노입자는 은(Ag)인 것인, 단백질 분해 효소 검출용 센서.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 (b)의 금속 나노입자는 금(Au)인 것인, 단백질 분해 효소 검출용 센서.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단백질 분해 효소에 의해 절단 가능한 서열로 이루어진 펩타이드는 일 말단에 티올기(thiol group, -SH)가 도입되어 상기 나노 구조체에 연결되는 것인, 단백질 분해 효소 검출용 센서.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 (b)의 금속 나노입자는 스트렙타비딘(streptavidin)으로 코팅되어 있고, 상기 단백질 분해 효소에 의해 절단 가능한 서열로 이루어진 펩타이드는 일 말단에 비오틴(biotin)이 도입되어 상기 금속 나노입자와 상기 펩타이드가 연결되는 것인, 단백질 분해 효소 검출용 센서.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 전도성 고분자는 폴리피롤(polypyrrole, PPy), 폴리아닐린(polyaniline, PANI), 폴리티오펜(polythiophene, PT), 폴리아세틸렌(polyacetylene) 및 PEDOT(poly(3,4-ethylene dioxythiophene))로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 단백질 분해 효소 검출용 센서.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 라만(Raman) 표지자는 로다민 B(rhodamine B), 로다민 6G(rhodamine 6G), 시아닌-3(Cyanine-3), 시아닌-5(Cyanine-5), 시아닌-5.5(Cyanine-5.5), 시아닌 7(Cyanine 7), 4-아미노티오펜올(4-

aminothiophenol), 4-메틸벤젠티올(4-methylbenzenethiol), 2-나프탈렌티올(2-naphthalenethiol), 로다민-5-(and-6)-이소티오시아네이트(rhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate), 테트라메틸로다민-5-이소티오시아네이트(tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate), FAM 및 TAMRA으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 단백질 분해 효소 검출용 센서.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 단백질 분해 효소는 카스파제(caspase), 트립신(trypsin), 카텝신(cathepsin), 우로키나아제(urokinase), MMP(matrix metalloproteinases), 트롬빈(thrombin), HIV-1 단백질 분해 효소(HIV-1 protease), HSV-1 단백질 분해 효소(HSV-1 protease), TEV 단백질 분해 효소(TEV protease), PSA(Prostate Specific Antigen) 및 세크레타아제(secretase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 단백질 분해 효소 검출용 센서.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 단백질 분해 효소 검출용 센서에 목적 단백질 분해 효소를 가하는 단계; 및

상기 센서로부터 라만(Raman) 신호를 측정하는 단계

를 포함하는 단백질 분해 효소의 검출 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 단백질 분해 효소 검출용 센서를 포함하는 단백질 분해 효소의 활성을 억제하는 물질의 스크리닝용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 전도성 고분자 나노 구조체 및 금속 나노입자 복합체를 이용한 표면증강 라만분광 기반 단백질 분해 효소 검출용 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

단백질은 우리 몸을 구성하고 있는 생체 물질 중 하나로, 세포 안에서 DNA로부터 전사 및 번역되어 다양한 기능을 수행한다. 특히, 질병을 진단하고 측정하는데 있어서 과발현된 특정 단백질들은 바이오마커로 활용되고 있다. 따라서 단백질 바이오센서 개발은 질병 진단 및 의학분야에서 넓은 활용성으로 큰 주목을 받아왔다. 그 중에서 면역 반응을 기반으로 하는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 검출법이 주로 이용되었다. 이 검출법의 특징은 항원-항체 반응 기반으로 특이 단백질의 선택적 측정이 유리하고, 단백질 기반의 표적 물질에 제한이 없다는 장점이 있다. 그러나 항체 제작에 시간과 비용이 많이 발생하고, 항체의 안정성이 떨어져 바이오센서의 오작동을 유발할 수 있다는 한계점을 지니고 있다.

[0004]

이와 같은 면역 반응 기반의 단백질 바이오센서가 보유하고 있는 문제점들을 극복하기 위하여 수 많은 생체 물질들이 이용되었다. 질병과 관련된 단백질 중 효소의 성질을 가진 일부는 단백질을 분해하는 성질을 가지며 특히, 특정 펩타이드 서열을 인식하여 분해하는 특징을 가진다. 이와 같은 단백질의 성질을 이용하여, 특정 펩타이드 서열이 부착된 peptide-cleavage based biosensor에 대한 개발이 진행 중이다. 이는 항체 기반 바이오센서의 한계점인 고비용, 긴 시간 소요, 안정성 등의 단점을 극복할 수 있는 우수한 바이오센서의 검출법으로 주목을 받고 있다. 또한, 항체 기반 바이오센서에서 필요한 추가적인 신호 물질의 고정화 단계를 생략(label-free)할 수 있어 사용자 입장에서 좀 더 쉽고 신속한 단백질 측정이 가능할 것으로 전망된다.

[0005] 모든 물질에 빛을 조사하게 되면 빛의 산란 현상이 일어나게 되며, 이 중 파장이 다른 빛의 산란을 측정하는 것을 라만 분광법이라고 한다. 이를 이용하면 특정 물질을 선택적으로 측정할 수 있지만, 라만 세기가 작아 측정하기가 어렵다는 단점이 있다. 이를 보완하기 위해 표면증강 라만분광법이 바이오센서에 응용되고 있다. 이 기술은 라만 신호를 증폭시키는 기술로, 대략 10^{11} 배까지 신호 증폭이 가능하다. 이를 유도하기 위해서는 주로 금, 은 등의 나노 구조체나 그래핀, 탄소 나노 튜브 등과 같은 탄소 기반 물질이 사용된다. 특정한 라만 파장을 가지는 라만 표지자를 이용하게 되면, 질병과 관련된 생체물질의 민감한 측정이 가능하게 할 수 있다. 생체물질을 민감하게 측정하기 위해서는 라만 신호의 증폭을 극대화할 수 있는 나노 구조체의 제작이 필수적이라고 할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 단백질 분해 효소의 존재 여부, 활성 및 농도 등을 효과적으로 검출할 수 있는 바이오 센서를 개발하고자 연구 노력하였다. 그 결과, 전도성 고분자 나노 구조체 및 표면에 라만 표지자를 포함하는 금속 나노 입자-펩타이드 복합체를 제조하고, 나노 구조체와 금속 나노입자-펩타이드 복합체가 표면의 전자기적 효과로 인해 라만 표지자의 신호를 증폭시키며, 단백질 분해 효소에 의해 펩타이드가 분해될 경우, 나노 구조체와 라만 표지자의 거리가 멀어져 라만 표지자의 신호가 감소되는 것을 확인하였다. 이를 통해 표면증강 라만분광을 기반으로 라만 표지자 신호의 증폭 현상을 유도하는 전도성 고분자 나노 구조체와 금속 나노입자-펩타이드 복합체를 이용하여 신속하고, 안정적으로 단백질 분해 효소를 검출할 수 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 단백질 분해 효소 검출용 센서를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 단백질 분해 효소 검출용 센서를 이용하여 단백질 분해 효소를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 단백질 분해 효소 검출용 센서를 포함하는 단백질 분해 효소의 활성을 억제하는 물질의 스크리닝용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 금속 나노입자로 코팅된 전도성 고분자로 이루어진 나노 구조체; 및 (b) 금속 나노입자, 라만(Raman) 표지자 및 단백질 분해 효소에 의해 절단 가능한 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 금속 나노입자 복합체;를 포함하는 단백질 분해 효소 검출용 센서에 관한 것이다.

[0013] 본 발명자들은 단백질 분해 효소의 존재 여부, 활성 및 농도 등을 효과적으로 검출할 수 있는 바이오 센서를 개발하고자 연구 노력하였다. 그 결과, 전도성 고분자 나노 구조체 및 표면에 라만 표지자를 포함하는 금속 나노 입자-펩타이드 복합체를 제조하고, 나노 구조체와 금속 나노입자-펩타이드 복합체가 표면의 전자기적 효과로 인해 라만 표지자의 신호를 증폭시키며, 단백질 분해 효소에 의해 펩타이드가 분해될 경우, 나노 구조체와 라만 표지자의 거리가 멀어져 라만 표지자의 신호가 감소되는 것을 확인하였다. 이를 통해 표면증강 라만분광을 기반으로 라만 표지자 신호의 증폭 현상을 유도하는 전도성 고분자 나노 구조체와 금속 나노입자-펩타이드 복합체를 이용하여 신속하고, 안정적으로 단백질 분해 효소를 검출할 수 있음을 규명하였다.

[0014] 라만분광법(Raman Spectroscopy)은 입사되는 빛의 에너지가 분자체에 가해졌을 때 비탄성 산란이 발생하여 에너지의 변화가 발생하는 현상이다. 그러나, 라만분광법은 신호의 세기가 매우 약하고 재현성이 낮아 분석과 진단의 민감도 및 정확도를 떨어뜨린다는 단점이 있다.

[0015] 표면증강 라만분광법(Surface-Enhanced Raman Spectroscopy)이란 금속 나노구조의 주변에 표적 분자가 존재할 경우, 해당 분자의 라만 신호가 크게 증가하는 현상을 말한다. 나노입자의 표면처리를 통해 일반 라만산란에 비해 신호를 증강시킴으로써 기술적으로 단분자를 측정할 수 있는 수준까지 초고감도 소량 검출이 가능하다. 입사된 에너지가 다양한 나노갭을 갖는 금속 나노 구조체로부터 증폭되어 방출되는 국소 표면 플라즈몬 공명(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR) 효과를 활용하여 신호의 세기가 증폭되어 특정 바이오 물질 혹은 화학 분자의 분석과 정량화가 가능하다. 또한, 분자 고유의 라만 신호를 가지고 있어 다중 검출이 가능하고,

라만 신호는 시간에 따라 줄지 않고, 온도 및 습도 등 주위 환경 영향에 민감하지 않다.

- [0016] 본 발명에서는 전도성 고분자를 나노 구조체로 합성하고 금속 나노입자로 표면을 코팅하여 라만 신호가 증폭되도록 기판을 제작하고, 금속 나노입자 표면에 특정 단백질 분해 효소에 의해 절단 가능한 펩타이드와 스트렙타비딘, 라만 표지자를 고정화한 금속 나노입자 복합체를 제작하였다. 상기 펩타이드의 양 말단에 시스테인 및 비오틴을 각각 붙여 상기 나노 구조체 및 금속 나노입자 복합체가 상기 펩타이드에 의해 서로 연결되도록 설계하였다. 나노 구조체 및 금속 나노입자 복합체가 펩타이드에 의해 연결된 경우, 표면증강 라만분광의 특성에 의해 금속 나노입자 표면의 라만 신호가 증폭되고, 펩타이드가 단백질 분해 효소와 반응하여 분해되었을 때에는 나노 구조체 및 금속 나노입자 복합체 표면의 라만 표지자가 멀어지게 되어 라만 신호가 감소하므로 이러한 특성을 통해 단백질 분해 효소 검출용 센서로 이용할 수 있다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 상기 단백질 분해 효소 검출용 센서에 포함되는 금속 나노입자는 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu) 및 백금(Pt)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 금속 나노입자로 코팅된 전도성 고분자로 이루어진 나노 구조체에서 금속 나노입자는 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu) 및 백금(Pt)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 예를 들어, 은(Ag)일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 전도성 고분자로 이루어진 나노 구조체에서 전도성 고분자는 폴리피롤(polypyrrole, PPy), 폴리아닐린(polyaniline, PANI), 폴리티오펜(polythiophene, PT), 폴리아세틸렌(polyacetylene) 및 PEDOT(poly(3,4-ethylene dioxythiophene))로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 예를 들어, 폴리피롤(polypyrrole, PPy) 일 수 있다.
- [0020] 상기 전도성 고분자로 이루어진 나노 구조체는 나노 크기의 구멍이 있는 빨 모양의 형태로 제작될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 금속 나노입자 복합체에서 금속 나노입자는 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu) 및 백금(Pt)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 예를 들어, 금(Au)일 수 있다.
- [0022] 상기 금속 나노입자 복합체에서 금속 나노입자의 크기는 1 내지 100 nm, 5 내지 100 nm, 10 내지 100 nm, 15 내지 100 nm, 20 내지 100 nm, 25 내지 100 nm, 1 내지 90 nm, 5 내지 90 nm, 10 내지 90 nm, 15 내지 90 nm, 20 내지 90 nm, 25 내지 90 nm, 1 내지 80 nm, 5 내지 80 nm, 10 내지 80 nm, 15 내지 80 nm, 20 내지 80 nm, 25 내지 80 nm, 1 내지 70 nm, 5 내지 70 nm, 10 내지 70 nm, 15 내지 70 nm, 20 내지 70 nm, 25 내지 70 nm, 1 내지 60 nm, 5 내지 60 nm, 10 내지 60 nm, 15 내지 60 nm, 20 내지 60 nm, 25 내지 60 nm, 1 내지 50 nm, 5 내지 50 nm, 10 내지 50 nm, 15 내지 50 nm, 20 내지 50 nm, 25 내지 50 nm, 1 내지 40 nm, 5 내지 40 nm, 10 내지 40 nm, 15 내지 40 nm, 20 내지 40 nm, 25 내지 40 nm, 1 내지 30 nm, 5 내지 30 nm, 10 내지 30 nm, 15 내지 30 nm, 20 내지 30 nm 또는 25 내지 30 nm 일 수 있고, 예를 들어, 30 nm 일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 금속 나노입자 복합체는 표면이 스트렙타비딘(streptavidin)으로 코팅되어 있는 것일 수 있다.
- [0024] 상기 펩타이드는 일 말단에 비오틴(biotin)이 도입되어 상기 금속 나노입자에 연결될 수 있다.
- [0025] 상기 펩타이드는 일 말단에 티올기(thiol group, -SH)가 도입되어 상기 전도성 고분자로 이루어진 나노 구조체에 연결될 수 있고, 예를 들어, 티올기를 갖는 시스테인(cysteine)이 상기 펩타이드의 일 말단에 도입되어 상기 전도성 고분자로 이루어진 나노 구조체에 연결될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 라만(Raman) 표지자는 로다민 B(rhodamine B), 로다민 6G(rhodamine 6G), 시아닌-3(Cyanine-3), 시아닌-5(Cyanine-5), 시아닌-5.5(Cyanine-5.5), 시아닌 7(Cyanine 7), 4-아미노티오펜놀(4-aminothiophenol), 4-메틸벤젠틴올(4-methylbenzenethiol), 2-나프탈렌티올(2-naphthalenethiol), 로다민-5-(and-6)-이소티오시아네이트(rhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate), 테트라메틸로다민-5-이소티오시아네이트(tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate), FAM 및 TAMRA로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 예를 들어, 로다민 B(rhodamine B) 일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질 분해 효소 검출용 센서에서 펩타이드는 아미노산 잔기의 수에 따라 디펩타이드, 트리펩타이드, 올리고 펩타이드 또는 폴리펩타이드일 수 있고, 예를 들어, 2 내지 500개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드일 수 있다.

- [0028] 상기 펩타이드는 하나 이상의 아미노산이 펩타이드(peptide) 결합에 의하여 결합된 화합물로서, 목적 단백질 분해 효소에 의해 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질인 것이 바람직하다.
- [0029] 상기 단백질 분해 효소는 펩타이드 서열 안의 특정 두 아미노산 사이를 절단하는 단백질 분해 효소로서, 카스파제(caspase), 트립신(trypsin), 카텝신(cathepsin), 우로키나아제(urokinase), MMP(matrix metalloproteinases), 트롬빈(thrombin), HIV-1 단백질 분해 효소(HIV-1 protease), HSV-1 단백질 분해 효소(HSV-1 protease), TEV 단백질 분해 효소(TEV protease), PSA(Prostate Specific Antigen) 및 세크레타아제(secretase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 수 있고, 예를 들어, 카스파제(caspase)일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 카스파제(caspase)는 카스파제-3(caspase-3) 또는 카스파제-1(caspase-1)일 수 있고, 예를 들어, 카스파제-3(caspase-3)일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질 분해 효소 검출용 센서에서 펩타이드는 카스파제-3에 의해 절단 가능한 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있고, 예를 들어, 서열목록 제1서열로 표시되는 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단백질 분해 효소 검출용 센서에 목적 단백질 분해 효소를 가하는 단계; 및 상기 센서로부터 라만(Raman) 신호를 측정하는 단계;를 포함하는 단백질 분해 효소의 검출 방법에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질 분해 효소 검출용 센서에서 나타내는 고유한 라만 피크(Raman Peak)의 세기를 측정함으로써, 단백질 분해 효소의 존재 유무, 농도, 활성 및 활성 억제 등을 쉽게 분석할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단백질 분해 효소 검출용 센서를 포함하는 단백질 분해 효소의 활성을 억제하는 물질의 스크리닝용 조성물에 관한 것이다.
- [0037] 단백질 분해 효소는 넓은 범위에서 다양한 세포기능을 조절하는 역할을 하고, 이는 생리활성 물질의 분해를 통하여 이루어지기 때문에, 모든 생명체의 생명현상에 대한 단백질 분해효소의 기능 및 역할은 매우 중요하며 따라서, 특정 단백질 분해 효소의 결핍이나 부족 또는 과다발현은 암, 관절염, 퇴행성 신경질환, 심혈관계 및 자가 면역 염증질환 등의 원인이 될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 단백질 분해 효소 검출용 센서는 생체 내 특정 조직 또는 세포에 존재하는 단백질 분해 효소의 존재 유무, 활성, 및 활성 억제 등을 쉽게 판별해 낼 수 있기 때문에 세포 영상, 특정 조직 영상, 약물전달체 등의 다양한 목적으로 사용될 수 있다. 상기 조성물은 생체 내(*in vivo*) 및 생체 외(*in vitro*) 모두 적용이 가능하며, 신약 개발에 필요한 고성능 스크리닝(high-throughput screening) 방법 및 조기 질병 진단 등의 다양한 용도로 사용이 가능하다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명에 따른 전도성 고분자 나노 구조체 및 라만 표지자 및 단백질 분해 효소에 의해 절단 가능한 서열로 이루어진 펩타이드가 고정화된 금속 나노입자 복합체를 포함하는 표면증강 라만분광법 기반의 바이오 센서는 단백질 분해 효소의 존재 유무, 농도, 활성 및 활성 억제 등을 신속하고 정확하게 측정할 수 있는 고민감도 플랫폼을 제공하며, 향후 세포 기반의 비파괴, 실시간 측정 및 체액 기반의 현장 질병 진단 키트 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 제작된 금 나노 복합체를 나타내는 모식도이다.
- 도 2는 표면증강 라만 효과를 유도하는 은/폴리피롤/은 나노 구조체 및 금 나노 복합체의 제작 모식도이다.

도 3a는 폴리피롤과 은/폴리피롤/은 나노 구조체의 라만 신호를 비교하기 위한 라만 스펙트럼이다.

도 3b는 폴리피롤과 은/폴리피롤/은 나노 구조체의 라만 신호를 비교하기 위해 특정 피크를 나타낸 막대그래프이다.

도 4는 은/폴리피롤/은 나노 구조체와 금 나노 복합체를 사용한 은/폴리피롤/은 나노 구조체의 라만 신호를 비교한 스펙트럼 그래프이다.

도 5는 제작된 금 나노 복합체-은/폴리피롤/은 나노 구조체 위에 caspase-3를 농도별로 반응시킨 후 얻은 라만 스펙트럼이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0045] 실시예 1: 금 나노입자-라만 표지자-스트렙타비딘-펩타이드 복합체 제작

[0046] 라만 표지자의 라만 세기를 증폭시키기 위해 30 nm 크기의 금 나노 입자를 사용하였다. 금 나노입자(1 ml) 표면에 라만 표지자 중 하나인 Rhodamine B(10 mg/ml)를 상온에서 10시간 이상 반응하여 코팅하였다. 이는 Rhodamine B가 가지고 있는 고유의 라만 신호를 증폭시키는 역할을 한다.

[0047] 금 나노입자와 은/폴리피롤/은 나노구조체의 결합을 위해 특정 서열로 구성된 펩타이드를 사용하였다. 이 특정 서열은 표적 단백질에 선택적으로 반응하여 분해되는 DEVD가 포함된 펩타이드로써, caspase-3에 의해 선택적으로 분해되는 성질을 가진다. 금 나노입자와 은 나노 구조체의 결합을 위해 펩타이드 양쪽에 각각 비오틴과 cysteine이 붙도록 디자인하였다. 또한, 금 나노입자 표면에 비오틴과 결합 가능한 스트렙타비딘(1 mg/ml)을 상온에서 10시간 이상 반응시켜 붙였다. 비오틴이 붙은 펩타이드를 금 나노입자와 상온에서 1시간 반응하여 서로 결합시킨 이후에, 은/폴리피롤/은 나노 구조체와 상온에서 1시간 동안 반응시켜서 금 나노입자가 은 나노구조체 표면에 잘 붙을 수 있도록 하였다. 모든 바이오 물질은 금 나노입자와 반응 후에 원심분리기와 세척용액(0.1% BSA, 0.05% Tween 20 in PBS, pH 7.4)을 통해 3번 세척 과정을 거친다.

[0048] 도 1은 합성된 금 나노입자-펩타이드 복합체의 모식도이다. 금 나노 복합체는 금 나노 입자, 라만 표지자(Rhodamine B), 스트렙타비딘 및 비오틴-펩타이드로 구성되어 있으며 펩타이드의 구체적인 서열은 모식도에서 나타난 것과 같다.

[0049] 금 나노입자의 표면은 Rhodamine B와 스트렙타비딘으로 코팅되어있으며, 스트렙타비딘에는 비오틴이 붙어있는 펩타이드가 선택적으로 결합된다. 제작된 금 나노 복합체는 은/폴리피롤/은 나노 구조체 표면에 SH-Au 반응을 매개로 결합되며, Rhodamine B의 라만 신호가 금-은 나노 구조체의 이중 전자기적 영향으로 인해 증폭될 것으로 보인다.

[0051] 실시예 2: 제작된 은/전도성 고분자/은 나노 구조체 및 금 나노 복합체의 라만 증폭 효과 확인

[0052] 앞서 제작된 금 나노 복합체의 라만 신호 향상을 위해 은/폴리피롤/은 나노 구조체를 제작하였다. 세척된 금 기판을 작업전극으로 사용하여 폴리피롤을 전기화학적으로 증착하였다. 증착 완료된 폴리피롤 나노 구조체는 가운데 나노 크기의 구멍이 있는 빨 모양의 형태로 제작되었으며, 이를 통해 반응 표면적이 넓어지는 효과를 기대할 수 있으며 바이오센서의 신호를 향상시킬 수 있을 것으로 보인다. 제작된 폴리피롤 나노 구조체 표면에 은 이온을 환원시켜 표면증강 라만분광 효과를 유도하고자 한다. 금 나노 복합체와 은 나노 구조체 사이의 라만 표지자는 두 금속의 전자기적 효과로 인해 라만 신호가 향상될 것으로 보인다.

[0053] 도 2는 단백질 측정을 위한 은/폴리피롤/은 나노 구조체 및 금 나노 복합체의 모식도이다. 먼저 전기 증착법으로 만들어진 폴리피롤(전도성 고분자) 나노 구조체에 은이온을 환원시켜 은/폴리피롤/은 나노 구조체를 제작한다. 앞서 제작된 금 나노 복합체를 은 나노 구조체 위에 고정화하여 라만 신호가 증폭되도록 제작한다. 이후에 가수분해 성질을 가지는 단백질을 반응시켜 펩타이드가 분해되는 것을 라만 신호가 감소하는 것으로 확인한다.

[0054] 은 이온의 환원을 통해 만들어진 나노 구조체 위에 펩타이드가 고정화된 금 나노 복합체를 1시간 동안 상온에서

반응시킨다. 펩타이드 끝에 있는 cysteine은 은 나노 구조체 표면과 결합할 수 있는 thiol 그룹을 가지고 있어, 금 나노 복합체-은 나노 구조체간의 연결을 유도한다. 제작된 단백질 측정용 나노 플랫폼은 강한 세기의 라만 신호를 나타내게 되며, 이를 이용해 적은 농도의 단백질도 민감하게 측정할 수 있을 것으로 예상된다. 본 센서에서 설계된 특정 펩타이드 서열을 선택적으로 분해할 수 있는 caspase-3 단백질을 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후에, 기판을 세척해주고 Raman 신호를 측정하게 되면, caspase-3의 농도에 따라 라만 세기가 줄어드는 정도를 확인할 수 있다.

[0055] 도 3은 은 나노 구조체의 라만 신호 증폭을 확인하기 위한 라만 측정 그래프이다. 은을 환원시킨 나노 구조체와 은이 환원되지 않은 폴리피롤 나노 구조체 위에 펩타이드-Rhodamine B를 붙인 라만 신호를 비교했다. 그림에서 확인할 수 있듯이, 은을 환원시킨 나노 구조체의 라만 세기가 폴리피롤 나노 구조체에 비해 월등히 높은 것을 확인하였다. 또한, 각 기판 위에 caspase-3 1000 ng/ml를 반응시켰을 때, 폴리피롤 나노 구조체에서는 라만 신호의 변화가 감지되지 않은데 반해, 은/폴리피롤/은 나노 구조체에서는 확연히 떨어진 라만 신호를 확인할 수 있었다. 이를 통해 은/폴리피롤/은 나노 구조체가 라만 기반의 바이오센서 제작에 필수적인 것을 확인하였다.

[0056] 도 4는 금 나노 복합체의 표면증강라만 효과를 확인하기 위해 은/폴리피롤/은 나노 구조체 위에 금 나노 복합체의 고정화 전, 후의 라만 신호를 보여주는 그래프이다. 총 3회의 반복실험을 진행하였으며, 라만 스펙트럼에서 확인할 수 있듯이 금 나노 복합체를 사용한 라만 신호가 그렇지 않은 것에 비해 약 4배 이상의 증폭 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 이는 전에 언급했듯이, rhodamine B가 금 나노 입자와 은 나노 구조체 사이에서 전자기적 효과를 동시에 받아 라만 신호가 증폭되어 생기는 현상으로 볼 수 있다. 이 결과를 통해, 제작된 은/폴리피롤/은 나노 구조체와 금 나노 복합체를 동시에 사용하는 나노 플랫폼의 표면증강 라만 효과를 확인하였다.

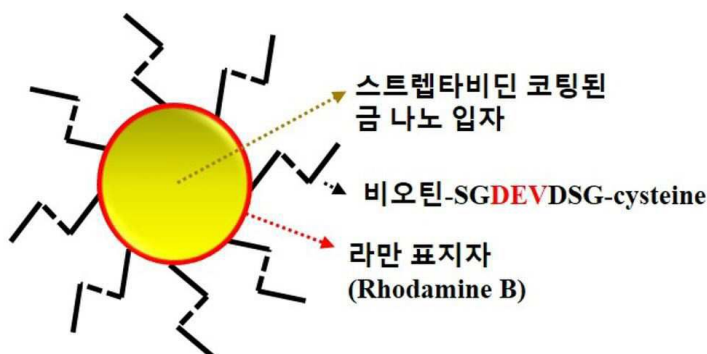
[0058] 실시예 3: 발명된 은/전도성고분자/은 나노 구조체 및 금 나노 복합체 기반 단백질 측정

[0059] 제작된 은/폴리피롤/은 나노 구조체 및 금 나노 복합체를 이용하여 라만 신호의 증폭 효과를 확인하였다. 이를 이용하여 단백질 가수분해 효소 중 하나인 caspase-3를 정량적으로 측정하고자 하였다. 은 나노 구조체와 금 나노 입자를 연결하는 펩타이드 서열에는 caspase-3에 선택적으로 분해되는 DEVD가 있다. Caspase-3가 펩타이드를 분해하게 되면, 라만 표지자가 붙어있는 금 나노 복합체는 은/폴리피롤/은 나노 구조체 표면에서 떨어지게 되고, 라만 신호는 급격하게 줄어드는 것을 예상할 수 있다. 이를 통해 caspase-3의 민감한 측정이 가능할 것으로 예상된다.

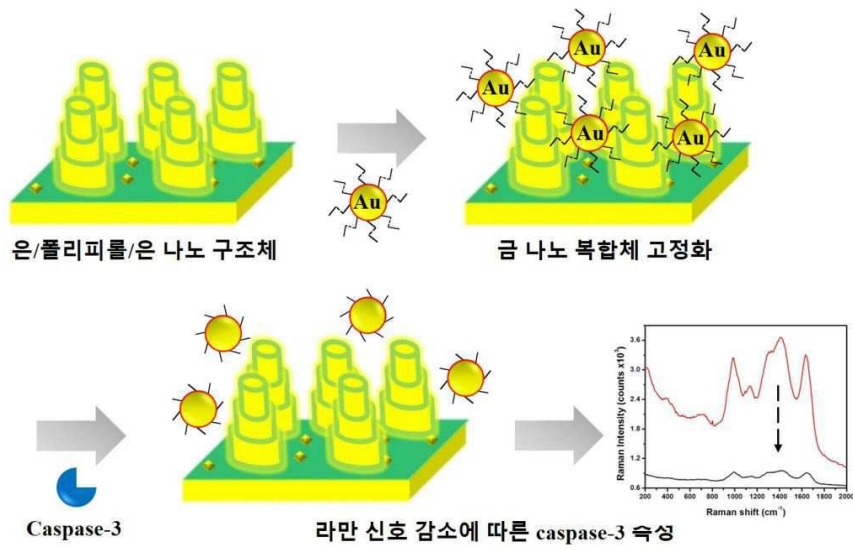
[0060] 도 5는 caspase-3의 농도별 라만 신호의 변화를 나타내는 라만 스펙트럼 그래프이다. cCaspase-3의 농도는 10 pg/ml에서 10 μ g/ml 까지 측정하였고, 반응조건은 상온에서 1시간이다. 스펙트럼에서 볼 수 있듯이, caspase-3의 농도가 높으면 라만 신호가 급격히 떨어지고, 농도가 낮을수록 떨어지는 크기가 줄어드는 것을 확인할 수 있다. 실험 결과를 통해 확인한 것은 농도가 작은 10 pg/ml에서도 caspase-를 성공적으로 측정이 가능하다는 것과, 측정 범위가 10^7 으로 비교적 넓다는 것이다. 이를 통해, 제작된 나노 기술 기반의 플랫폼이 민감도와 측정 범위가 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

도면

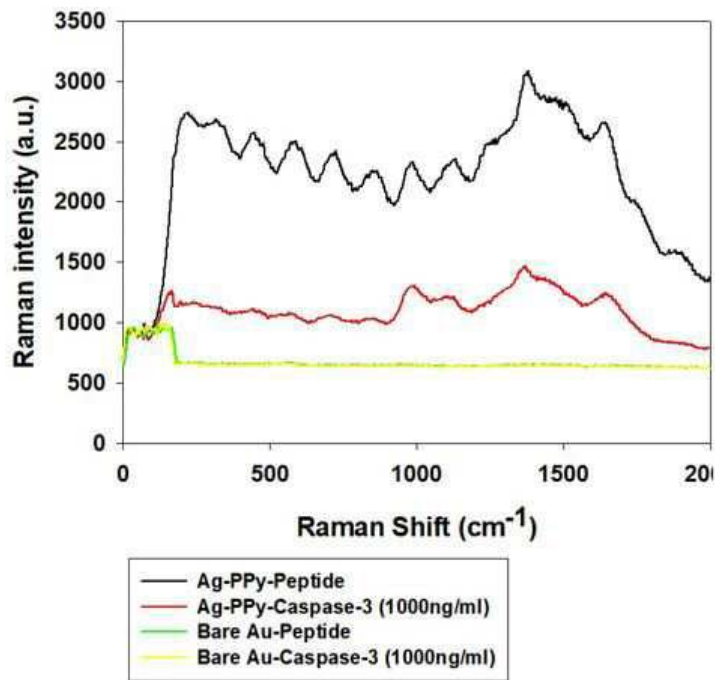
도면1



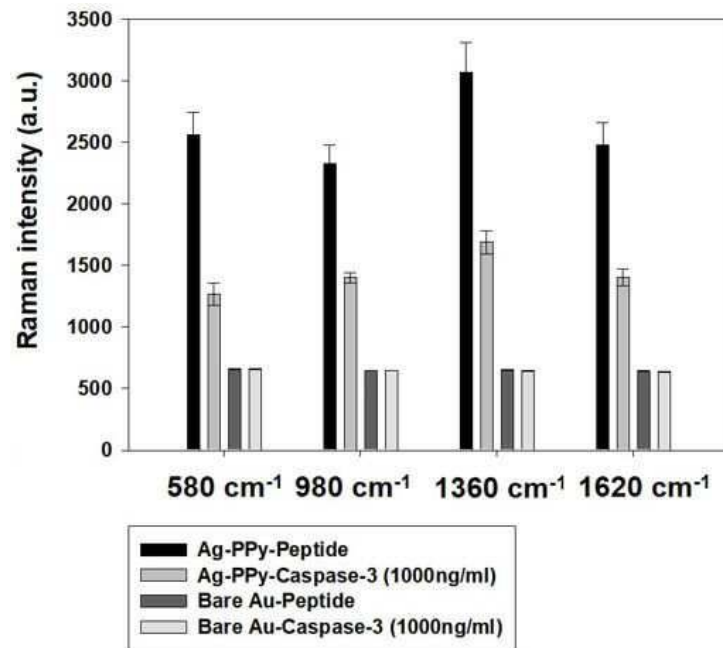
도면2



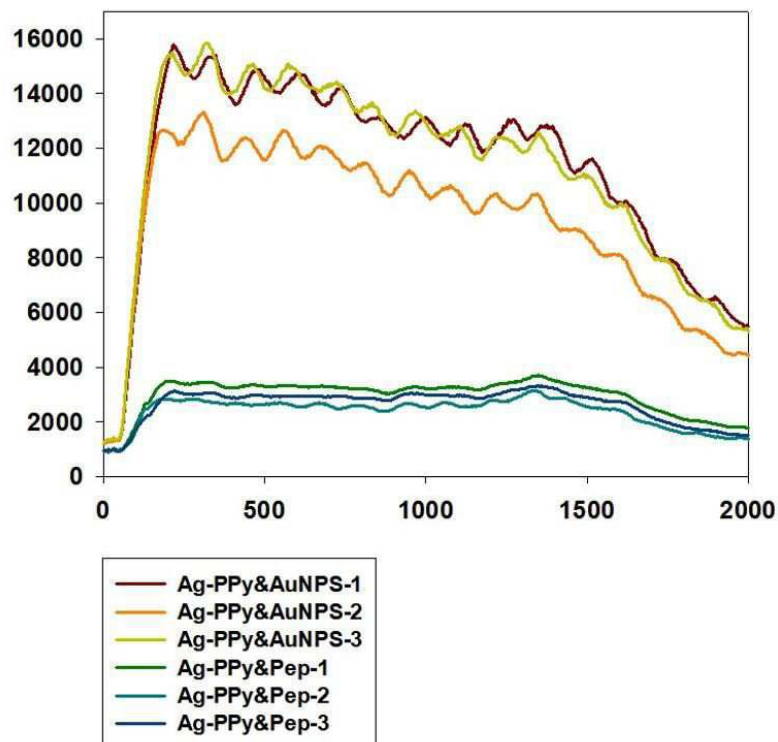
도면3a



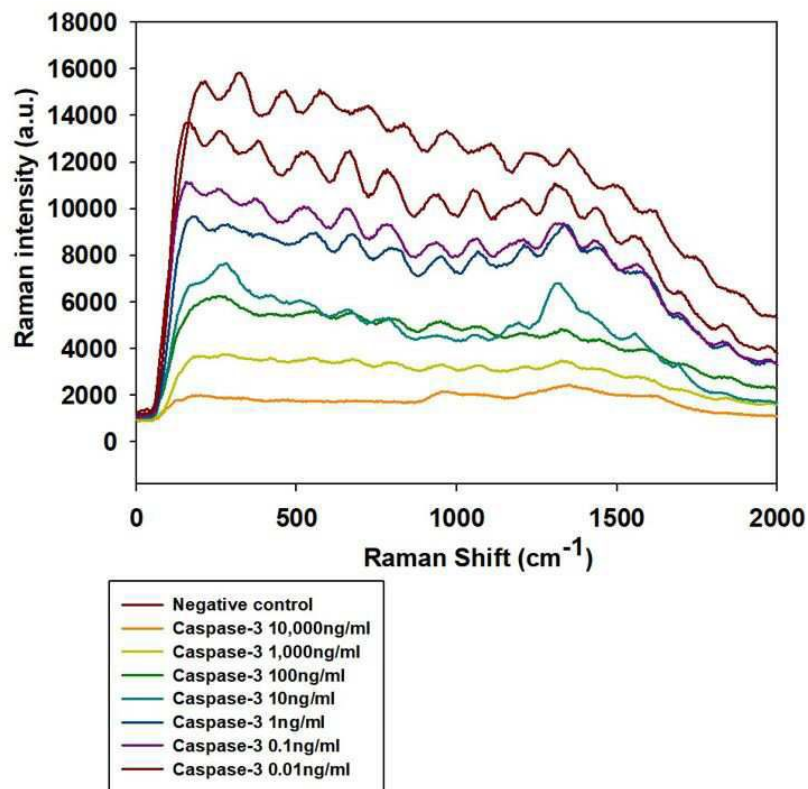
도면3b



도면4



도면5



서열목록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION

<120> Surface-Enhanced Raman Spectroscopy based Protease Detection Sensor using Conductive Polymer Nanostructures and Metal Nanoparticle Complex

<130> PN190005

<160> 1

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Digestion peptide by Caspase-3

<400> 1

Ser Gly Asp Glu Val Asp Ser Gly