

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0098221 (43) 공개일자 2010년09월06일
(51) Int. Cl. <i>G01N 33/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/553</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0017278 (22) 출원일자 2009년02월27일 심사청구일자 2009년02월27일	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 가좌동 900 (72) 발명자 정종화 대전광역시 서구 둔산동 수정타운아파트 11동 501호 배두리 경상남도 진주시 신안동 주공아파트 205동 1403호 (74) 대리인 정홍식, 김종선, 김태현, 이현수

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 히스티딘 특이적 바이오센서 및 이의 제조방법

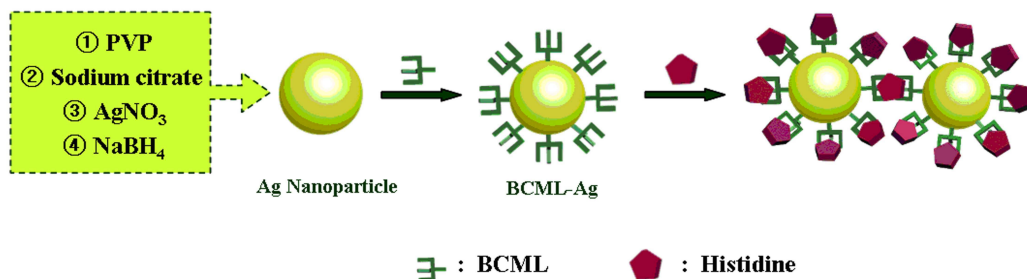
(57) 요약

본 발명은 히스티딘 및 히스티딘 다량 함유 단백질을 검출하는데 이용할 수 있는 히스티딘 특이적 바이오 센서, 이의 제조방법 및 이를 이용한 히스티딘의 검출 방법에 대한 것이다.

본 발명의 히스티딘 특이적 바이오 센서는 나노 크기의 은 입자와 상기 유기 리간드로서 카르복시기를 갖는 라이신, 대표적으로 N,N-비스(카르복실메틸)-L-라이신이 결합된 것을 특징으로 한다.

본 발명의 히스티딘 특이적 바이오 센서는 고가의 장비나 복잡한 실험 방법을 사용하지 않고 간단하고 편리한 방법으로 검출 대상 물질인 히스티딘을 검출해 내는데 효과적이다. 또한 본 발명의 히스티딘 특이적 바이오 센서는 히스티딘의 농도가 5 마이크로몰 이하로 매우 낮은 경우에도 이의 함유 여부를 판단할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 03-2008-121/03-2008-0128

부처명 과학기술부/환경부

연구관리전문기관

연구사업명 감마선 조사에 의한 중금속 흡착용 유기-무기../고 효율 중금속 분리/제거용 다공성 유기-무기..

연구과제명 감마선 조사에 의한 중금속 흡착용 유기-무기../고 효율 중금속 분리/제거용 다공성 유기-무기..

기여율

주관기관 경상대학교/경상대학교

연구기간 2008년 04월 01일 ~ 2009년 03월 31일/2008년 04월 01일 ~ 2009년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

히스티딘 특이적 바이오센서에 있어서,

금속 입자; 및

상기 금속 입자 표면에 결합된 유기 리간드;

를 포함하며, 상기 유기 리간드는 카르복시기를 가지는 것을 특징으로 하는 히스티딘 특이적 바이오센서.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유기 리간드의 카르복시기는 3개인 것을 특징으로 하는 히스티딘 특이적 바이오 센서

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 금속 입자에 결합하는 유기 리간드는 금속 입자 1몰에 대해 1몰 내지 100몰인 것을 특징으로 하는 히스티딘 특이적 바이오센서.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 금속 입자는 은, 금, 또는 백금에서 선택되는 것을 특징으로 하는 히스티딘 특이적 바이오센서.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 금속 입자의 입경은 1nm 내지 30nm, 더욱 바람직하게는 3nm 내지 10nm인 것을 특징으로 하는 히스티딘 특이적 바이오센서.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 유기 리간드는 카르복시기를 갖는 라이신인 것을 특징으로 하는 히스티딘 특이적 바이오 센서.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 카르복시기를 갖는 라이신은 N,N-비스(카르복실메틸)-L-라이신(N,N-bis (carboxymethyl)-L-lysine)인 것을 특징으로 하는 히스티딘 특이적 바이오 센서.

청구항 8

(a) 상기 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 바이오 센서를 검출 버퍼에 분산시키는 단계;

(b) 상기 바이오 센서가 분산된 검출 버퍼에 히스티딘이 함유된 수용액을 혼합하는 단계; 및

(c) 상기 히스티딘 함유 수용액이 혼합된 검출 버퍼의 색상 변화를 관찰하는 단계;

를 포함하는 히스티딘 특이적 바이오 센서를 이용한 히스티딘 검출 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 히스티딘 검출 방법은 상기 (c) 단계에서 또는 (c) 단계 이후에 색상이 변화된 검출 버퍼의 자외선-가시광

선 분광 광도계를 이용해 흡광도를 측정하여 히스티딘의 함유량을 정량분석하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 히스티딘 특이적 바이오 센서를 이용한 히스티딘 검출 방법.

청구항 10

(a) 금속 산화물을 환원제의 존재 하에 환원시켜 나노 수준의 금속 콜로이드 입자를 제조하는 단계;
 (b) (a) 단계에서 제조된 금속 콜로이드 입자에 카르복실기를 갖는 과량의 라이신을 함유한 수용액을 혼합하여 상기 금속 입자와 상기 라이신을 결합시키는 단계; 및
 (c) 상기 (b) 단계의 완료 후 (b) 단계에서 형성된 라이신이 결합된 금속 콜로이드 입자를 수용액과 분리하는 단계;
 를 포함하는 히스티딘 특이적 바이오 센서 제조 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,
 (c) 단계에서 생성된, 라이신과 결합된 금속 콜로이드 입자를 세척 분리하는 단계를 더 포함하는 히스티딘 특이적 바이오 센서 제조 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,
 상기 금속 산화물은 질산은(AgNO_3)인 것을 특징으로 하는 바이오 센서 제조 방법.

청구항 13

제10항 또는 제11항에 있어서,
 상기 카르복시기를 갖는 라이신은 N,N-비스(카르복실메틸)-L-라이신(N,N-bis (carboxymethyl)-L-lysine)인 것을 특징으로 하는 바이오 센서 제조 방법.

청구항 14

제10항 또는 제11항에 있어서,
 상기 (b) 단계에서 금속 입자에 결합하는 라이신은 금속 콜로이드 입자 1몰에 대해 1몰 내지 100몰인 것을 특징으로 하는 바이오센서 제조 방법.

청구항 15

제10항 또는 제11항에 있어서,
 상기 (a) 단계에서 형성된 금속 콜로이드 입자의 입경은 1nm 내지 30nm, 더욱 바람직하게는 3nm 내지 10nm인 것을 특징으로 하는 바이오 센서 제조 방법.

청구항 16

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 히스티딘 특이적 바이오 센서를 이용하여 간경변, 에이즈, 신장질환, 천식, 폐질환, 혈전성 장애 또는 말라리아를 진단하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오 센서를 이용한 생물학적 정량(bioassay) 기술에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 히스티딘 및 히스티딘 다량 함유 단백질을 검출하는데 이용할 수 있는 히스티딘 특이적 바이오 센서, 이의 제조방법 및

이를 이용한 히스티딘의 검출 방법에 대한 것이다.

배경 기술

- [0002] 최근 다양한 유기 및 무기 물질로 개질된 금속 나노 입자를 생물학 분야의 분석 도구, 즉 바이오 센서로 이용하기 위한 개발에 관심이 높아지고 있다. 특히, 나노입자 표면에 유기 리간드를 결합시키면 나노 입자에 소정의 기능을 부여할 수 있을 뿐만 아니라 다양한 용매(solvent) 내에서 검출 대상 물질의 리셉터로 작용하는 유기 리간드를 물리적 화학적으로 안정화하는데 도움이 되는 것으로 알려져 있다. 미르킨(Mirkin) 등에 따르면, DNA-금 나노입자를 이용하여 시스테인을 검출하는 비색 분석법(colorimetric assay)을 개발하였다고 보고한 바 있다.
- [0003] 의학 분야에서도 상기와 같은 바이오 센서를 이용하면 질병의 유무를 판단하는데 도움이 될 것으로 기대된다. 일례로, 히스티딘 및 히스티딘을 다량 함유한 단백질은 인체내에서 매우 중요한 지표의 역할을 한다. 혈액이나 체액에 히스티딘을 다량 함유한 단백질의 수치가 비정상적으로 높다면 간경변증(advanced liver cirrhosis), 에이즈, 신장질환(renal disease), 천식, 폐질환 (pulmonary disorders), 혈전성 장애(thrombotic disorders) 및 말라리아와 같은 질병이 의심될 수 있다. 이러한 히스티딘 및 히스티딘 다량 함유 단백질의 검출용 분석 방법은 면역학적 검정(immunoassays), 형광 검출법(fluorimetric detection) 및 비색 검출법(colorimetric detection)과 관련되어 개발되고 있다. 그러나, 종래에 개발된 히스티딘의 검출 방법은 고가의 장비와 복잡한 실험 절차를 요할 뿐만 아니라 재료 처리량이 낮아 효과적으로 사용할 수 있는 범위가 매우 제한적인 문제가 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0004] 본 발명은 상기의 문제점들을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 나노 크기의 금속 입자를 포함하는 히스티딘 특이적 바이오 센서 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 다른 목적은 상기 히스티딘 특이적 바이오 센서를 이용하여, 고가의 장비나 복잡한 실험절차를 거치지 않고, 히스티딘 및 히스티딘 다량 함유 단백질을 검출하는 할 수 있는 방법을 제공하는 것이다. 또한 본 발명은 적은 재료량으로도 효과적으로 상기 히스티딘 및 히스티딘 다량 함유 단백질을 검출할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

- [0005] 본 발명의 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 안출된 것으로서, 금속 입자 및 상기 금속 입자 표면에 결합된 유기 리간드를 포함하며, 상기 유기 리간드는 카르복시기를 가지는 것을 특징으로 하는 히스티딘 특이적 바이오 센서를 제공한다.
- [0006] 상기 바이오 센서는 상기 유기 리간드의 카르복시기는 3개인 것을 특징한다. 또한 상기 금속 입자에 결합하는 유기 리간드는 금속 입자 1몰에 대해 1몰 내지 100몰인 것을 특징으로 하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 바이오 센서에 있어서, 상기 금속 입자는 은, 금, 또는 백금에서 선택되는 것을 특징으로 한다. 상기 금속 입자의 입경은 1nm 내지 30nm, 더욱 바람직하게는 3nm 내지 10nm인 것이다.
- [0008] 상기 유기 리간드는 카르복시기를 갖는 라이신인 것을 특징으로 한다. 상기 카르복시기를 갖는 라이신의 구체적인 예로는 N,N-비스(카르복실메틸)-L-라이신(N,N-bis(carboxymethyl)-L-lysine)인 것이다.
- [0009] 또한 본 발명은 상기의 히스티딘 특이적 바이오 센서를 이용한 히스티딘의 검출 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 히스티딘 검출 방법은 상기 본 발명에 따른 바이오 센서를 검출 버퍼에 분산시키는 단계, 상기 바이오 센서가 분산된 검출 버퍼에 히스티딘이 함유된 수용액을 혼합하는 단계 및 상기 히스티딘 함유 수용액이 혼합된 검출 버퍼의 색상 변화를 관찰하는 단계를 포함한다.
- [0010] 또한 상기 히스티딘 검출 방법에 있어서, 검출 버퍼의 색상 변화는 자외선-가시광선 분광 광도계를 이용해 흡광도를 측정하여 히스티딘의 함유량을 정량분석하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0011] 또한 본 발명은 금속 산화물을 환원제의 존재 하에 환원시켜 나노 수준의 금속 콜로이드 입자를 제조하는 단계, 상기에서 제조된 금속 나노 콜로이드에 카르복시기를 갖는 과량의 라이신을 함유한 수용액을 혼합하여 상기 금속 입자와 상기 라이신을 결합시키는 단계; 및 상기에서 형성된 라이신이 라이신이 결합된 금속 입자를 수용액

과 분리하는 단계를 포함하는 히스티딘 특이적 바이오 센서 제조 방법을 제공한다. 또한 상기 제조 방법은 상기에서 생성된 라이신과 결합된 금속 입자를 세척 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명에 따른 히스티딘 특이적 바이오 센서의 제조에 있어서, 상기 금속 산화물은 질산은(AgNO_3)일 수 있다. 또한 상기 카르복시기를 갖는 라이신은 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신(N,N-bis(carboxy methyl)-L-lysine)일 수 있다.

[0013] 상기에서 금속 입자에 결합하는 라이신은 금속 입자 1몰에 대해 1몰 내지 100몰인 것이 바람직하다. 상기에서 형성된 금속 입자의 입경은 1nm 내지 30nm, 더욱 바람직하게는 3nm 내지 10nm인 것이 바람직하다.

[0014] 마지막으로 본 발명은 본 발명에 따른 히스티딘 특이적 바이오 센서를 이용하여 간경변, 에이즈, 신장질환, 천식, 폐질환, 혈전성 장애 또는 말라리아를 진단하는 방법을 제공한다.

효 과

[0015] 본 발명의 히스티딘 특이적 바이오센서는 히스티딘과 결합하여 색상의 변화를 일으키므로 검출결과를 간편하게 시각적으로 확인할 수 있다. 따라서, 기존에 사용되고 있는 고비용의 복잡한 실험절차에 비해 히스티딘 및 히스티딘 다량 함유 단백질을 선택적으로 검출할 수 있는 효과가 있다. 이와 같이 본 발명의 히스티딘 특이적 바이오 센서는 고가의 장비나 복잡한 실험 방법을 사용하지 않고 간단하고 편리한 방법으로 검출 대상 물질인 히스티딘을 검출해 내는데 효과적이다. 또한 본 발명의 히스티딘 특이적 바이오 센서는 히스티딘의 농도가 5 마이크로몰 이하로 매우 낮은 경우에도 이의 함유 여부를 판단할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 히스티딘과 선택적으로 반응하는 나노 크기의 금속 입자와 유기 리간드가 결합된 히스티딘 특이적 바이오센서 및 이의 제조방법을 제공한다. 또한 상기 바이오 센서를 이용하여 히스티딘 및 히스티딘이 다량으로 함유된 단백질을 검출하는 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 제1측면인 상기 히스티딘 특이적 바이오 센서에 있어서, 상기 입자는 유기 리간드에서 제공되는 비공유 전자쌍과 배위 결합할 수 있는 금속으로, 특히, 금, 은 또는 백금과 같은 귀금속제인 것이 바람직하다.

[0018] 상기 입자는 입경이 1 내지 30nm, 바람직하게는 3 내지 10nm인 것이다. 입자의 크기가 1nm 미만인 경우에는 입자 자체의 표면적이 적고 입자간 응집이 쉽게 발생하여 유기 리간드와 배위결합이 어렵다. 만일 입자의 크기가 30nm를 초과하는 경우에는 비표면적이 감소되기 때문에 충분한 양의 유기 리간드가 결합되기 어려운 측면이 있다.

[0019] 상기 유기 리간드는 본 발명의 바이오 센서에서 히스티딘의 리셉터 역할을 하는 것으로서, 히스티딘의 암모늄의 양이온과 결합할 수 있도록 음전하로 하전된 부분을 갖는다.

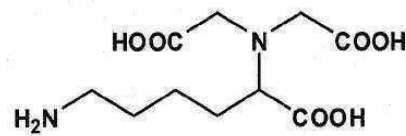
[0020] 상기 히스티딘 특이적 바이오 센서에 있어서, 상기 금속 입자 1몰에 대해 상기 유기 리간드는 1몰 내지 100몰, 더욱 바람직하게는 5몰에서 100몰 인것이다. 만일 1몰 미만인 경우에는 생물학적 유체, 즉 체액이나 혈액 중 히스티딘의 농도가 낮을 경우 효과적으로 히스티딘을 검출할 수 없는 문제가 있다.

[0021] 본 발명의 제1 측면인 상기 히스티딘 특이적 바이오 센서의 구체적인 일 실시 태양은, 상기 금속 입자로서 나노 크기의 은 입자와 상기 유기 리간드로서 카르복시기를 갖는 라이신이 결합된 것이다. 상기 카르복시기를 갖는 라이신으로는 구체적으로 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신을 예로 들 수 있다. 일반적으로 아미노산과 같이 생물학적인 활성을 갖는 분자는 외부의 온도나 주변의 산도 등 환경적인 요건에 매우 민감해서 환경적인 요건에 따라 그 활성에 있어 큰 차이를 보인다. 따라서, 상기와 같은 생물학적 분자를 상기 은 입자와 같은 고체 지지체에 고정화시켜 사용하면 열적 안정성이 증가되어 활성이 높은 상태로 장기간 유지될 수 있다.

[0022] 상기 은 입자와 상기 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신이 결합된 형태의 히스티딘 특이적 바이오 센서가 히스티딘을 선택적으로 검출하는 방법은 아래와 같다.

[0023] 상기 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신은 하기 화학식 1로 표현된다.

화학식 1



[0024]

[0025]

상기 화학식 1에서 확인할 수 있듯이 상기 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신은 카르복실기를 가지고 있어서 수용액 내에서 쉽게 수소이온을 잃고 양전하를 띠게 된다. 또한 히스티딘은 3개의 N(질소)를 포함하는데, 이 N은 비공유 전자쌍으로 인해 음전하를 띤다. 따라서, 상기 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신의 양전하 부분과 히스티딘의 음전하 부분이 이온적으로 결합함으로써 히스티딘을 선택적으로 검출하는 것이 가능하다. 도 1 및 도 9는 본 발명의 구체적인 일 실시 태양인 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신과 은 입자가 결합한 히스티딘 특이적 바이오 센서가 히스티딘과 선택적으로 결합하는 과정을 간략하게 나타낸 모식도이다.

[0026]

N, N-비스(카르복시메틸)-L-라이신(pH 9)의 음전하는 반발력에 의해 입자가 뭉치는 것을 방지한다. 은 나노입자의 표면은 카르복실산을 함유해서 이것이 양이온 타입의 아미노산과 결합할 수 있도록 한다.

[0027]

상기 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신은 카르복실기 3개를 가지면서도 분자의 크기가 작아 나노 수준의 입자 표면에 다량 결합할 수 있다. 따라서 히스티딘을 선택적으로 결합할 수 있는 수용체의 수를 충분히 확보하는데 효과적이다.

[0028]

본 발명의 제2 측면인 상기 히스티딘 특이적 바이오 센서를 이용한 히스티딘 검출 방법은 본 발명의 제1 측면에 따른 히스티딘 특이적 바이오 센서를 검출 버퍼에 분산시키는 단계; 상기 바이오 센서가 분산된 검출 버퍼에 히스티딘이 함유된 수용액을 혼합하는 단계; 및 상기 히스티딘 함유 수용액이 혼합된 검출 버퍼의 색상 변화를 관찰하는 단계를 포함한다. 상기 색상 변화를 관찰하는 단계는 자외선-가시광선 분광 광도계를 이용하여 히스티딘 함유량의 정량적인 분석을 수행할 수 있다.

[0029]

본 발명의 제3 측면인 상기 히스티딘 특이적 바이오 센서를 제조하는 방법은 금속 산화물을 환원제의 존재 하에 환원시켜 나노 수준의 금속 입자 콜로이드를 제조하는 단계; 상기에서 제조된 금속 입자 콜로이드에 카르복시기를 갖는 라이신을 함유한 수용액을 혼합하여 상기 금속 입자와 상기 카르복시기를 갖는 라이신을 결합시키는 단계; 상기 단계에서 형성된 카르복시기를 갖는 라이신이 결합된 금속 입자를 분리하는 단계를 포함한다.

[0030]

본 발명의 제3 측면인 상기 히스티딘 특이적 바이오 센서의 구체적인 일 실시 태양은 질산은(AgNO_3)를 환원시켜 은 콜로이드 용액을 제조한 후 여기에 과량의 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신을 첨가하여 상기 은 콜로이드 용액의 은 나노 입자와 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신을 결합시키는 방법으로 이루어질 수 있다. 상기에서 금속 입자에 결합하는 라이신은 금속 입자 1몰에 대해 1몰 내지 100몰인 것이 바람직하다. 상기에서 형성된 금속 입자의 입경은 1nm 내지 30nm, 더욱 바람직하게는 3nm 내지 10nm인 것이 바람직하다.

[0031]

이하 구체적인 실시예를 바탕으로 하여 본 발명의 히스티딘 특이적 바이오 센서를 구체적으로 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 더욱 명확하게 설명하기 위한 용도로서만 사용될 뿐 본 발명의 범위를 제한하거나 한정하는 것은 아니다. 또한 본 발명의 목적 범위 내에서 부수적인 부분을 치환 또는 변경하는 것은 당업자에게 자명한 것이다.

[0032]

실시예: 히스티딘 특이적 바이오 센서의 제조

[0033]

질산은(AgNO_3) 수용액(5.0mM, 1.0mL)을 상온에서 교반한 후 구연산 나트륨 액(sodium citrate solution, 30mM, 1.0mL), 보로수소화 나트륨(sodium borohydride)(50mM, 1.0mL), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone)(5mg)을 재빨리 넣었다. 상기 용액의 색상이 옅은 황색으로 변화된 후 상기 용액을 30분간 환류(reflux)하면서 가열하고 상온에서 냉각시켜 은 콜로이드 용액을 준비하였다. 상기 콜로이드 용액을 상온에서 24시간 동안 교반시키면서, 과량의 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신을 함유한 수용액을 혼합하여 리간드 교환 반응을 시켰다. 반응이 종료된 후 상기 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신이 결합된 은 나노 입자의 용액을 30분 동안 원심분리시키고, 상청액을 제거한 후 수용액에 재분산시켰다. 상기 입자를 3회 이상 세척한 후 최종적으로 검출 버퍼에 다시 분산시켰다. 이후 상기 용액의 산도를 NaOH를 이용해서 pH 9로 하였다. 이하 실시예 1에서 제조된 본 발명에

따른 바이오 센서를 BCML-Ag이라고 약칭하였다.

[0034] BCML-Ag에 대한 테스트

[0035] 나노 입자 표면과 유기 리간드의 결합여부 확인

[0036] 상기 실시예 1에 따른 BCML-Ag에 있어서, 히스티딘의 선택적인 리셉터로 작용하는 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신이 은 나노 입자에 결합되어 고정되어 있는지 확인하기 위해 TEM(transmission electron microscopy, 투과 전자현미경), 푸리에 변환 라만 분광 광도법(FT-Raman spectroscopy), TOF-SIMS(Time of flight secondary ion mass spectroscopy, 비행 시간형 2차 이온 질량 분석법), 자외선-가시광선 분광 광도법(UV-VIS spectroscopy)을 이용하여 확인하였다.

[0037] 상기 BCML-Ag의 FT-Raman 스펙트럼은 3263cm^{-1} , 1684cm^{-1} 및 1284cm^{-1} 에서 피크를 보였다. 이를 통해 히스티딘 특이적 리셉터인 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신이 은 나노 입자의 표면에 결합되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 도 2는 상기 FT-Raman 스펙트럼의 그래프를 나타낸 것이다. 상기 피크는 은 나노 입자 표면에 결합된 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신에서 기인된 것으로 판단된다. 도 3은 상기 본 발명의 바이오 센서의 TOF-SIMS 스펙트럼 결과를 그래프로 나타낸 것으로 상기 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신의 분자질량(molecular mass)이 ($m/z=262.26$)인 것을 나타내며, 은 입자 표면에 완전히 결합되어 고정되어 있는 상태를 의미하는 것으로 해석된다.

[0038] 도 4는 상기 실시예 1에 따른 BCML-Ag에 대한 자외선-가시광선 흡광도 측정 결과를 도시한 그래프이다. 자외선 흡수 피크는 400nm인 것으로 관찰되었으며, 이것은 아미노산이 없는 상태에서의 본 발명의 히스티딘 특이적 바이오 센서 표면의 플라스몬(plasmon) 흡수로부터 기인된 것으로 판단된다. 본 흡광도 측정에 있어서, 실험 시작 5분 후에 기록된 스펙트럼은 가장 협소한 반치폭(full-width-at-half-maximum(fwmn))을 보였는데 이것은 합성된 은 나노 입자가 단순 분산되었고(monodispersed), 균일하다는 것을 의미한다.

[0039] 히스티딘 검출 확인 실험

[0040] 본 발명의 히스티딘 특이적 바이오 센서의 히스티딘 검출 능력을 확인하기 위해 상기 실시예 1에서 제조된 BCML-Ag가 분산된 검출 버퍼에 히스티딘 수용액을 혼합하여 최종 부피가 1mL가 되도록 하였다. 상기 BCML-Ag의 최종 농도는 10.0 마이크로 몰이 되도록 하였다. 또한 상기 버퍼에 혼합되는 히스티딘 수용액은 히스티딘의 농도는 5.0 에서 30.0 μM 의 범위에서 5 μM 의 간격으로 수개 준비하였다. 또한 본 발명의 히스티딘 특이적 바이오 센서가 히스티딘을 선택적으로 검출하는지 확인하기 위해 상기 바이오 센서가 분산된 검출 버퍼에 각각 다른 아미노산 수용액을 혼합하여 색상이 변화되는지 관찰하였다.

[0041] 도 15는 상기 검출 버퍼에 히스티딘이 첨가되었을 때 색상변화를 나타낸 사진이다. 히스티딘이 첨가되지 않았을 때에는 검출버퍼의 색상이 옅은 황색을 나타내나 히스티딘이 첨가되면 상기 검출버퍼의 색상은 붉은 색으로 변화되었다.

[0042] 도 10c는 다양한 아미노산 용액(1.0×10^{-4})을 첨가한 후 상기 검출 버퍼의 색 변화 상태를 나타낸 것이며, 도 10b는 이의 R value(A_{520}/A_{400})이다. 검출 버퍼와 아미노산 수용액을 혼합하고 10분 후, 히스티딘을 함유한 용액은 황색에서 붉은 색으로 색이 변화하였으며, 흡광율은 A_{520}/A_{400} 에서 가장 큰 값을 보였다. 반면에 다른 아미노산을 첨가했을 때는 검출 버퍼의 색상 변화나 흡광도 변화가 관찰되지 않았다. 따라서, 본 발명의 바이오 센서는 히스티딘에 선택적으로 반응한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0043] 본 발명의 바이오 센서가 히스티딘과 결합하여 색상변화를 일으키는 것은 히스티딘에 의해서 상기 바이오 센서의 입자가 서로 응집하기 때문인 것으로 해석된다. 도 11a는 히스티딘의 첨가 전 및 첨가 후인 검출 버퍼의 TEM 이미지이며 도 11 b는 히스티딘 첨가 전 및 첨가 후의 BCML-Ag의 입경 변화를 그래프로 나타낸 것이다. 이다. 상기 TEM 이미지에 의하면 히스티딘 첨가 전에는 상기 BCML-Ag의 입자가 수용액에 넓고 균일하게 분산되어 있었으며, 입경은 약 3 내지 5nm인 것으로 관찰되었다. 반면에 히스티딘을 첨가한 후에는 BCML-Ag의 입자간 응집이 발생하여 입경이 16 내지 20nm로 증가하였다. 이러한 응집은 색상이 황색에서 적색으로 변화하는 요인이 되며, 응집된 상태에서 쌍을 이룬 플라스몬 엑시톤의 상호작용이 반영된 것으로 해석된다.

- [0044] 히스티딘의 검출에 있어서, 본 발명의 바이오센서의 히스티딘 특이적 특성(specificity)이 다른 아미노산의 복합적인 혼합물에 의해 저해되는지 알아보기 위해 검출 버퍼에 히스티딘과 다른 아미노산이 혼합된 수용액을 첨가하여 검출 버퍼의 색상변화를 관찰하였다. 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이 다른 아미노산이 혼합된 경우에도 본 발명의 바이오 센서를 첨가하였을 때 적색으로 색상이 변화되는 것을 관찰할 수 있었다.
- [0045] 상기 도 6에서 실시예 1에 따른 BCML-Ag가 포함된 검출버퍼에 (1)히스티딘 (2)알라닌+히스티딘, (3)시스테인+히스티딘, (4)류신+히스티딘, (5)프롤린+히스티딘, (6)발린+히스티딘, (7)세린+히스티딘, (8)티로신+히스티딘, (9)메티오닌+히스티딘, (10)페닐알라닌+히스티딘, (11)트레오닌+히스티딘, (12)아스파르산+히스티딘을 혼합한 것이다. 실험조 (2) 내지 (12)도 히스티딘만 포함된 실험조 (1)과 마찬가지로 색상이 붉게 변화된 것을 확인할 수 있다.
- [0046] 또한 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이 히스티딘이 다른 아미노산과 혼합되어 있는 경우에도 히스티딘이 단독으로 포함된 수용액의 흡광도와 차이가 없었다. 도 5는 히스티딘이 단독으로 포함된 수용액 및 히스티딘과 다른 아미노산이 혼합된 수용액의 $R(A_{520}/A_{400})$ 수치를 나타낸 것이다. 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이 히스티딘이 다른 아미노산과 혼합되어 있는 경우에도 $R(A_{520}/A_{400})$ 수치는 일률적이며, 히스티딘이 단독으로 혼합된 수용액과 유사한 값을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0047] 이를 통해 본 발명의 바이오 센서는 히스티딘을 선택적으로 검출할 수 있으며 다른 아미노산이 혼합되어 있어도 히스티딘의 검출능은 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다.
- [0048] 히스티딘 함유 단백질의 선택적 검출능의 확인
- [0049] N-말단의 히스티딘 태그(tag)가 결여된 유비퀴틴 단백질 및 N 말단에 6개의 히스티딘 잔기가 있는 Cdc20 단백질을 이용하여 상기 BCML-Ag의 선택적인 색상 변화를 조사하였다. 상기 BCML-Ag 입자(5.0 mM)를 상온에서 10분 동안 상기 단백질(1.5 마이크로그램)과 함께 배양한 후 BCML-Ag의 색상변화에 대한 흡광도를 관찰하였다. 도 12는 이의 결과를 도시한 그래프이다. 상기 그래프에서 (a)는 아무것도 넣지 않은 검출 버퍼의 흡광도, (b)는 상기 히스티딘 태그가 결여된 유비퀴틴 단백질이 포함된 검출버퍼의 흡광도 및 (c)는 상기 Cdc20 단백질이 포함된 검출버퍼의 흡광도 결과이다. 이에 따르면 (a)와 (c)는 흡광도의 차이가 거의 없으나 (c)는 흡광도에 변화가 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [0050] 검출버퍼의 색상 변화에 대해서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 히스티딘으로 표지된 단백질인 상기 Cdc20을 상기 BCML-Ag가 포함된 검출 버퍼와 혼합하면 A_{520}/A_{400} 에서의 흡수율이 증가하면서 황색에서 적색으로 색상이 변화되는 것이 관찰되었다(도 12b의 c). 이것은 상기 히스티딘 표지 단백질이 상기 BCML-Ag와 상호작용을 했기 때문이다. 반면에 비 히스티딘 표지 단백질(non-histidine-tagged protein)을 거의 동일한 조건에서 BCML-Ag로 처리하였을 때, 색상변화는 관찰되지 않았다(도 12b의 b). 상기 BCML-Ag를 히스티딘 표지 단백질과 비히스티딘 표지 단백질의 혼합물과 함께 배양하였을 때, 상기 BCML-Ag가 포함된 검출 버퍼의 색상이 황색에서 붉은색으로 변화되었는데, 이것은 히스티딘 표지 단백질이 선택적으로 BCML-Ag의 표면에 결합한 것을 의미하는 것이다.
- [0051] 또한 히스티딘 선택적 결합능력을 확인하기 위해, 히스티딘 잔기가 있는 단백질 및 히스티딘 잔기가 없는 단백질을 이용하여 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용한 분석을 실시하였다.
- [0052] 상기 SDS-PAGE 분석은 바이오 라드사(Bio-Rad)의 실험 메뉴얼에 따라 4%의 스택킹 젤(stack gel) 및 16%의 리졸빙 젤(resolving gel)을 이용하여 수행되었다. 각 각의 단백질을 본 발명에 따른 바이오 센서(10.0 μ M, 1.0mL)와 혼합하여 2시간 동안 상온에서 로터리 믹싱의 방법으로 배양시킨 후 상기 혼합액을 40,000xg로 원심분리(20분)하여 상청액을 제거하였다. 상청액과 조기 혼합된(premixed) 단백질을 SDS-PAGE 젤에 용해시키고, CBB(coomassie brilliant Blue)로 염색하여 시각화하였다.
- [0053] 다른 아미노산 시퀀스 pI(isoelectric point), 단백질 구조, 특정한 사이드 체인의 존재의 영향을 최소화하기 위해서, N-말단에 히스티딘 표지가 없는 유비퀴틴(ubiquitin) 단백질과 N-말단에 6개의 히스티딘 잔기로 표지된 Cdc20 단백질도 함께 사용하였다. 도 13은 BCML-Ag를 첨가하기 전 두개의 단백질 마커를 함유하는 젤의 이미지이다. BCML-Ag(도 13)를 첨가하고 분리한 후 비 히스티딘 표지 유비퀴틴 단백질이 젤 속에 여전히 관찰되었다. 반면에 히스티딘 표지 Cdc20 단백질은 사라졌는데, BCML-Ag와 Cdc20 간의 복합이 형성되어서 젤 매트릭스에 들어가기에는 크기가 너무 큰 구조가 되었기 때문이다. 6 개의 히스티딘 표지의 존재는 항 히스티딘 항체를 이용

한 면역탁본법(immunoblots)으로 확인하였다. 상기 결과는 히스티딘 표지 단백질이 효과적으로 BCML-Ag의 표면에 결합될 수 있다는 것을 보여주는 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 히스티딘 특이적 바이오 센서는 단백질 혼합물에서 히스티딘 단백질을 분리하는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0054] 히스티딘 검출을 위한 최소 농도

[0055] 색상변화를 감지할 수 있는 히스티딘 이온 수용액의 최소 농도를 알아보기 위한 실험을 준비하였다. 실시예 1에 따른 BCML-Ag가 포함된 혼합물이 담긴 플라스크에 히스티딘을 5.0 부터 30.0 마이크로몰을 5 마이크로몰의 범위로 첨가하였다. 각 플라스크의 수용액은 모두 색상이 황색에서 적색으로 변화하였으며, 육안으로 확인하였을 때, 히스티딘의 농도가 높을수록 적색으로의 색상변화가 뚜렷하였다. 또한 히스티딘 농도가 5.0 마이크로몰인 경우에도 색상변화를 육안으로 확인하는 것이 가능했다. 도 7은 BCML-Ag가 포함된 수용액에서의 히스티딘 농도에 대한 520nm에서의 흡광도를 측정하여 그래프로 도시한 것이다. 상기 결과에 따르면 흡광도 결과는 히스티딘 농도에 따른 선형적인 상관관계가 있으며, 히스티딘의 농도가 증가할수록 흡광도가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 검출 대상 용액의 흡광도를 측정하여 상기 용액 내 히스티딘의 농도를 역으로 산출할 수 있다. 농도에 따른 선형적인 상관관계를 얻을 수 있었다.

[0056] 히스티딘 검출을 위한 용매의 산도 조건

[0057] 히스티딘 검출 버퍼의 산도가 본 발명에 따른 바이오 센서의 히스티딘 검출 능력에 영향을 미치는지 확인하였다. 실시예 1에 따른 BCML-Ag가 분산된 검출버퍼에 히스티딘을 혼합하고(농도 1.0×10^{-4} M) 상기 혼합 용액의 산도를 pH 4.0 에서 12.0로 조정하며 흡광도를 측정하였다.

[0058] 이 결과 산성 조건이나 중성 조건보다 염기성 조건에서 히스티딘의 검출능이 향상되는 것을 확인하였다. 도 8은 버퍼의 산도에 따른 흡광도를 측정한 결과를 도시한 그래프이다. 이에 따르면 산성 조건에서보다 염기성 조건에서 흡광도가 높은 것을 확인할 수 있다. 도 14는 검출 버퍼의 산도에 따른 UV-VIS 스펙트럼 결과를 도시한 것이다. 상기 그래프에서 (a)는 검출버퍼에 히스티딘이 없는 경우, (b)는 염기성 조건에서 히스티딘을 첨가한 경우 및 (c)는 산성 조건에서 히스티딘을 첨가한 경우를 의미한다. 상기 실험결과를 통해 산성조건에서는 히스티딘이 없는 경우와 유사한 결과를 얻었음을 확인할 수 있었다. 이것은 염기성 조건하에서는 히스티딘의 암모니아의 양 이온과 BCML-Ag의 카르복실산의 음이온 사이의 정전기적인 상호작용에 의해 히스티딘이 BCML-Ag과 강하게 응집하는 경향이 있기 때문이다.

[0059] 또한 상기 BCML-Ag에 결합된 히스티딘 표지 단백질을 일정 농도의 염산(HCl)용액에서 배양하면, 단백질이 BCML-Ag에서 방출되어 UV-VIS 스펙트럼 강도의 95%가 회복되고, BCML-Ag 검출 버퍼는 적색에서 황색으로 역으로 색상이 변화하는 것을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 N,N-비스(카르복시메틸)-L-라이신이 은 나노 입자에 결합한 바이오 센서와 상기 바이오 센서에 히스티딘이 특이적으로 결합한 상태를 도식화하여 표현한 것이다.

[0061] 도 2는 본 발명의 히스티딘 특이적 바이오 센서의 FT-Raman 스펙트럼의 피크를 도시한 그래프이다.

[0062] 도 3은 본 발명의 히스티딘 특이적 바이오 센서의 TOF-SIMS 스펙트럼 결과를 도시한 그래프이다.

[0063] 도 4는 실시예 1의 바이오 센서 및 상기 바이오 센서와 히스티딘 및 기타 다른 아미노산이 결합한 상태의 UV-VIS 스펙트럼 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

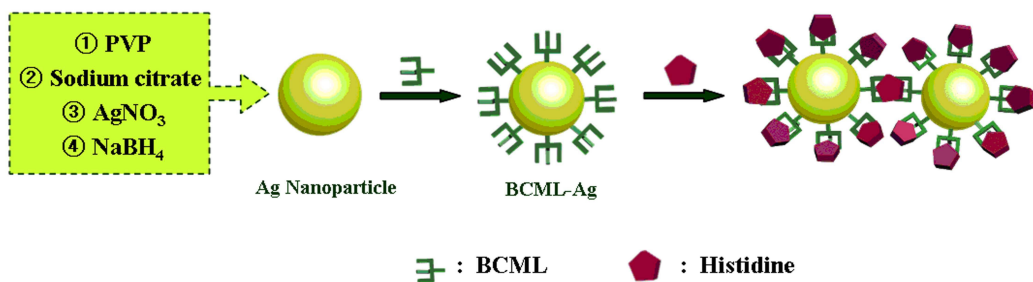
[0064] 도 5는 히스티딘과 선택적으로 결합한 본 발명의 바이오 센서의 $R(A_{520}/A_{400})$ 을 나타낸 것이다.

[0065] 도 6은 실시예 1의 바이오 센서가 포함된 검출 버퍼에 히스티딘을 단독으로, 및 히스티딘과 다른 아미노산을 혼합한 수용액을 첨가한 후 색상변화를 관찰한 것이다. 상기 도 6에서 (1)히스티딘 (2)알라닌+히스티딘, (3)시스틴+히스티딘, (4)류신+히스티딘, (5)프롤린+히스티딘, (6)발린+히스티딘, (7)세린+히스티딘, (8)티로신+히스티딘, (9)메티오닌+히스티딘, (10)페닐알라닌+히스티딘, (11)트레오닌+히스티딘, (12)아스파르산+히스티딘을 검출버퍼와 혼합한 것이다.

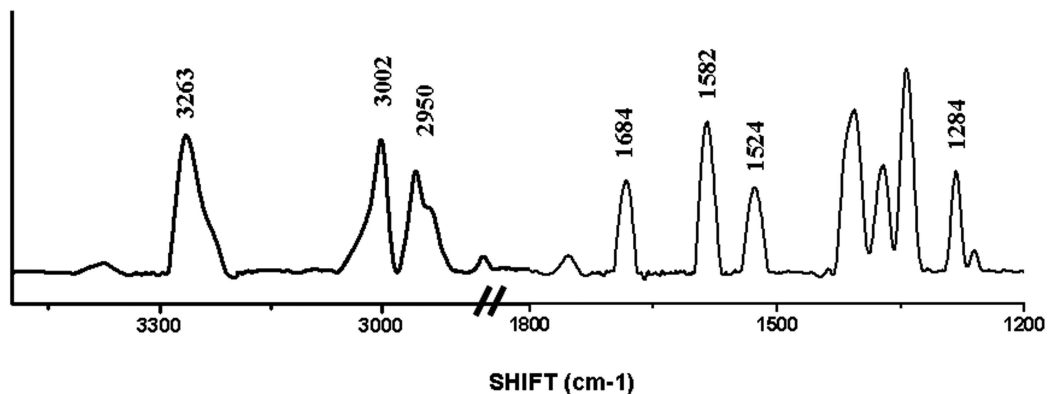
- [0066] 도 7은 수용액내의 히스티딘의 농도에 따른 자외선 흡수강도의 보정곡선(520nm)을 나타낸 그래프이다.
- [0067] 도 8은 산도에 따른 흡광도의 변화를 도시한 그래프이다. 이에 따르면 염기성 조건인 경우에 흡광도가 높은 것을 확인할 수 있다.
- [0068] 도 9는 본 발명의 히스티딘 특이적 바이오 센서에 포함된 카르복실기와 히스티딘의 암모니아 부분이 이온적으로 결합한 상태를 도시한 것이다.
- [0069] 도 10a, 도 10b 및 도 10c는 본 발명에 따른 바이오 센서가 히스티딘을 선택적으로 결합할 수 있음을 나타낸 것이다.
- [0070] 도 11은 본 발명에 따른 히스티딘 특이적 바이오 센서의 TEM 이미지(A)와 상기 바이오 센서가 히스티딘과 결합한 후의 TEM 이미지를 도시한 것이다.
- [0071] 도 12a 및 도 12b는 본 발명의 바이오 센서가 유비퀴틴 단백질 및 Cdc 20 단백질의 검출한 결과를 도시한 것이다.
- [0072] 도 13은 유비퀴틴 단백질의 첨가 전 및 후와 Cdc 20 단백질이 첨가한 후의 젤 이미지를 나타낸 사진이다.
- [0073] 도 14는 검출 버퍼의 산도에 따른 UV-VIS 스펙트럼 결과를 도시한 것이다.
- [0074] 도 15는 실시예 1에 따른 히스티딘 특이적 바이오센서가 포함된 검출버퍼에 히스티딘 혼합 후 색상이 옅은 황색에서 붉은 색으로 변화된 모습을 나타낸 사진이다.

도면

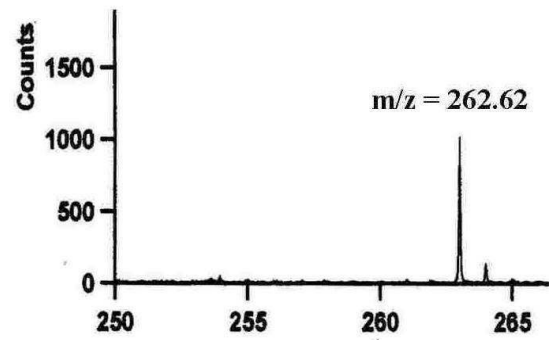
도면1



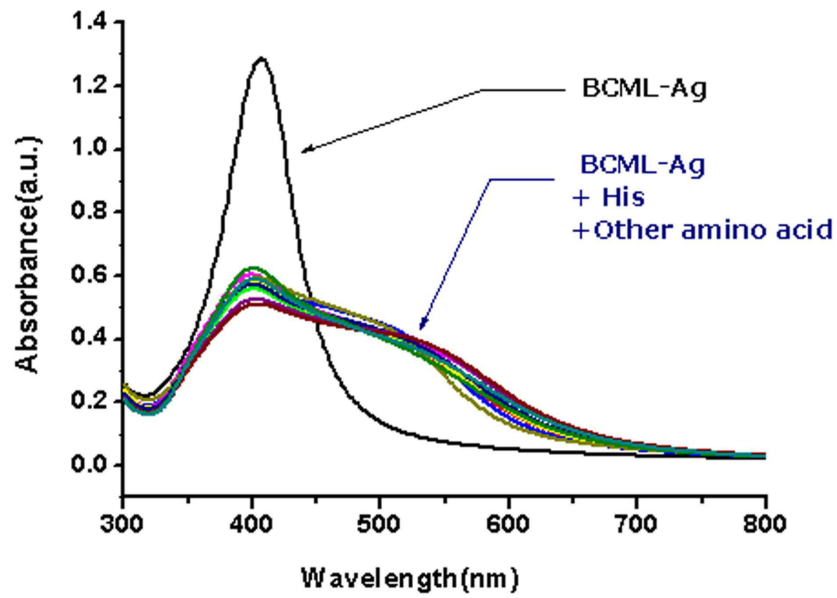
도면2



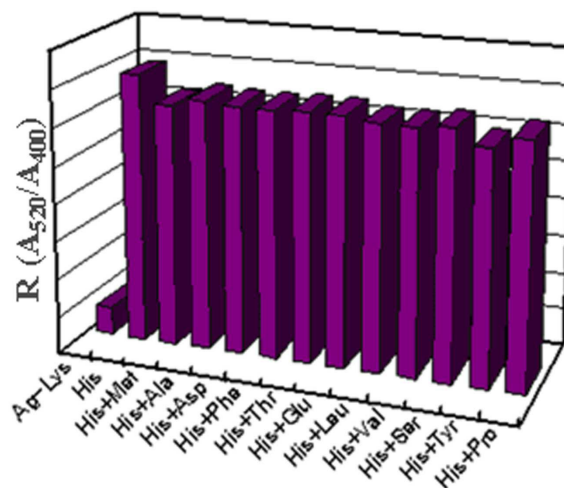
도면3



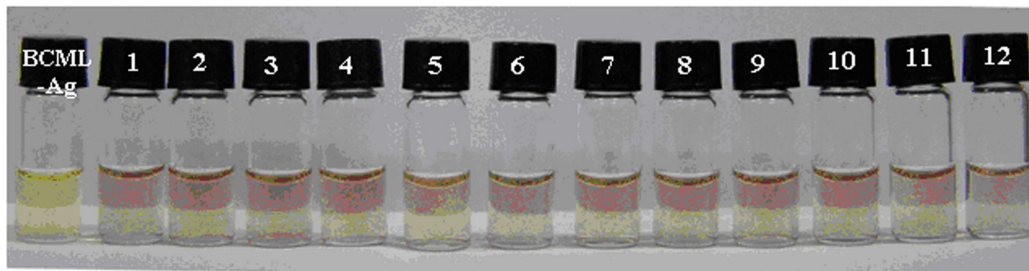
도면4



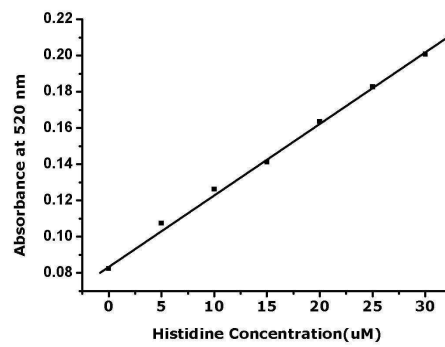
도면5



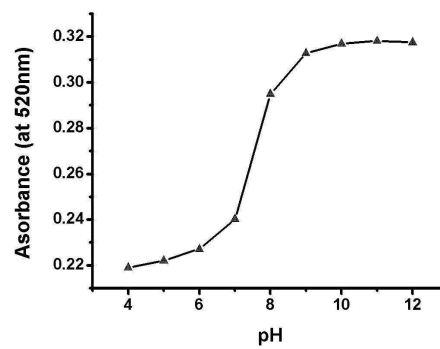
도면6



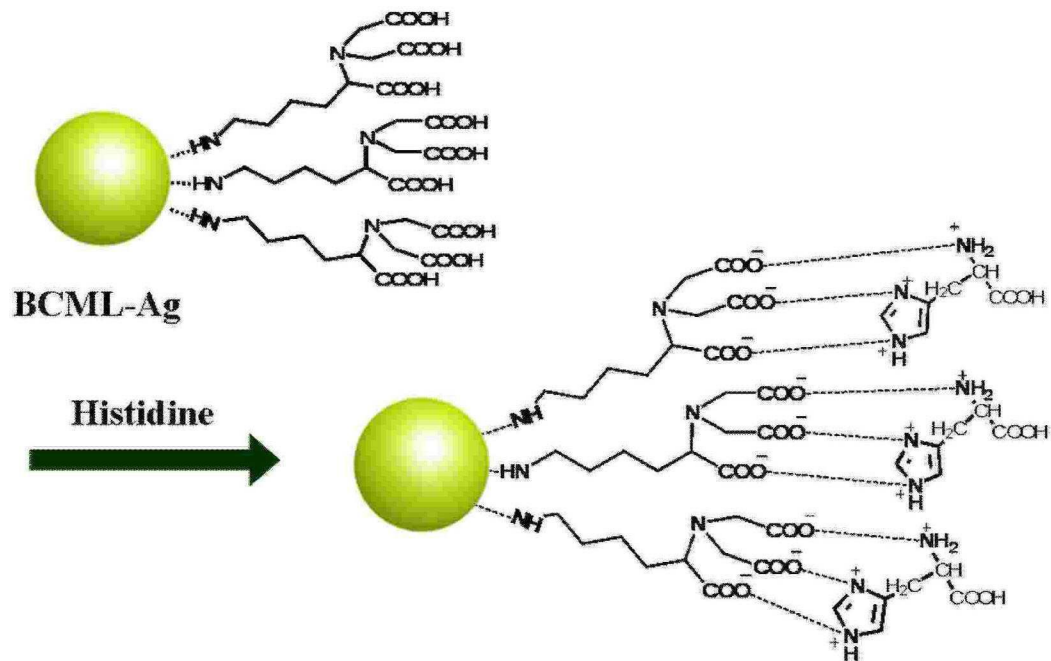
도면7



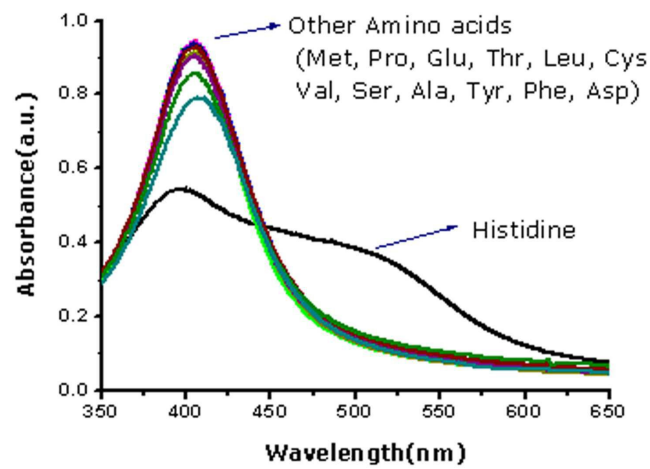
도면8



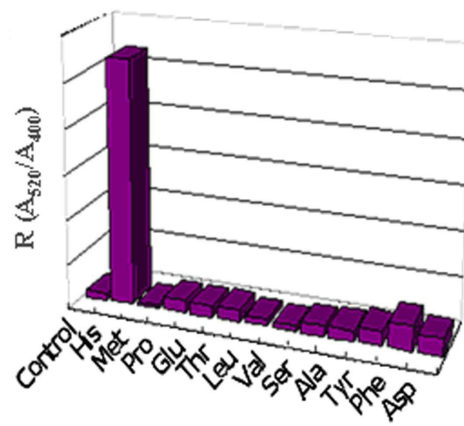
도면9



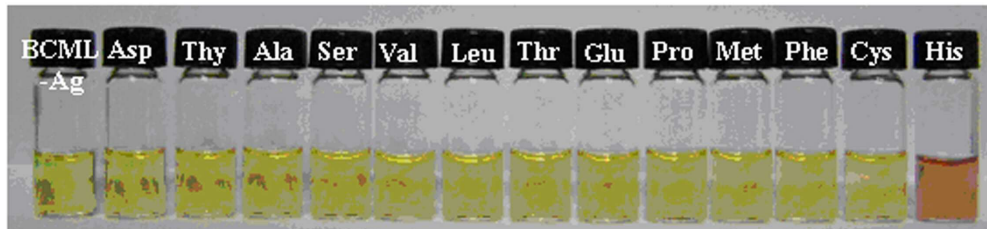
도면10a



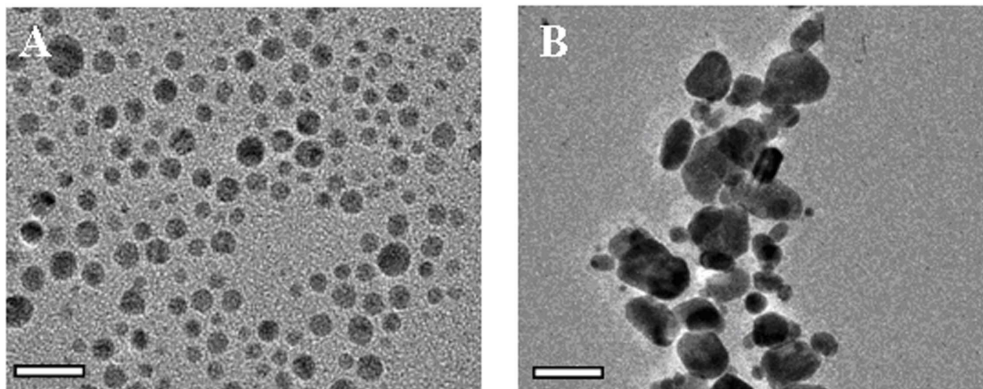
도면10b



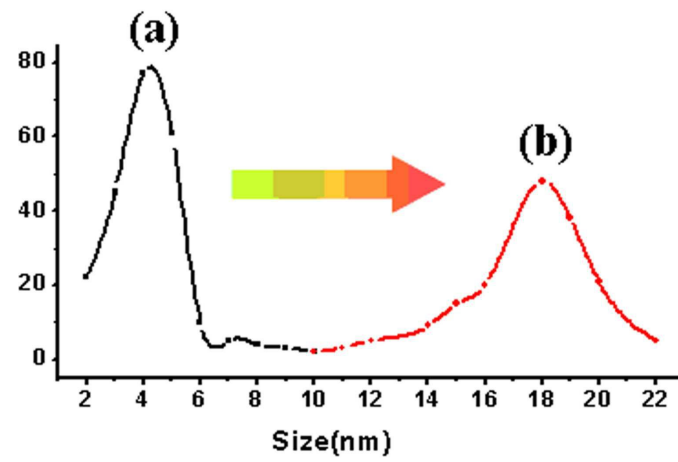
도면10c



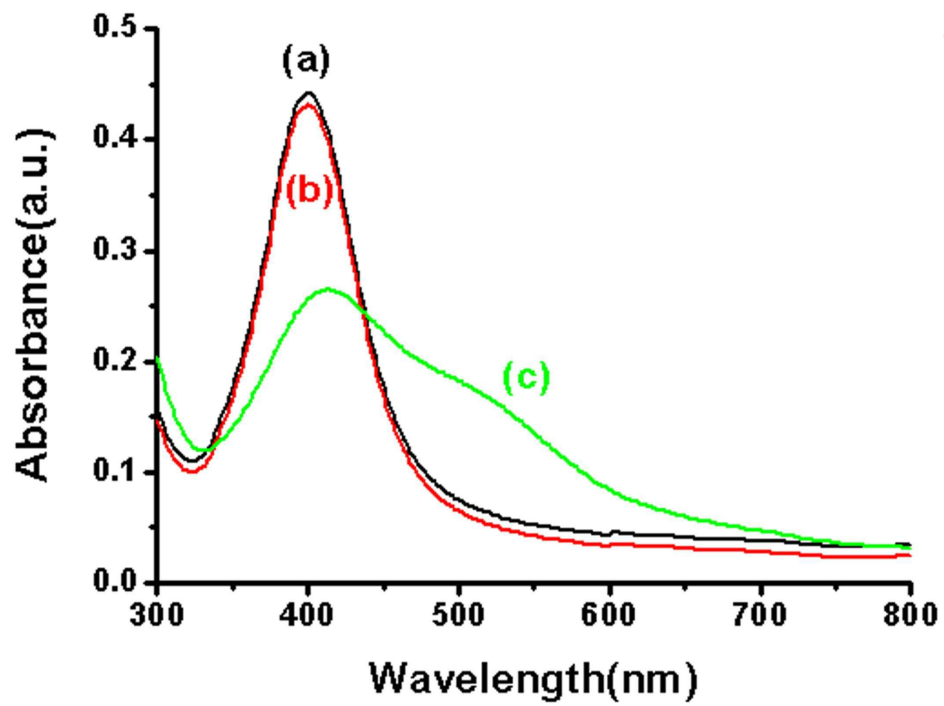
도면11a



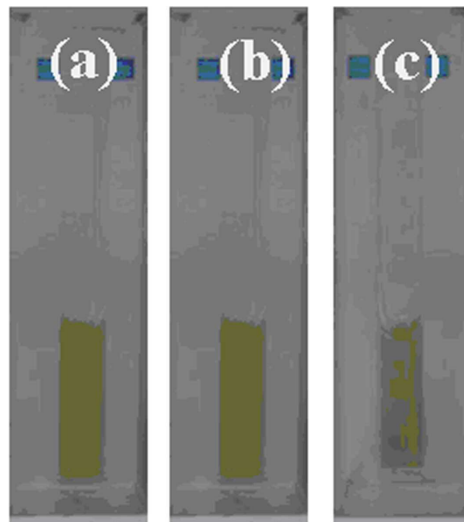
도면11b



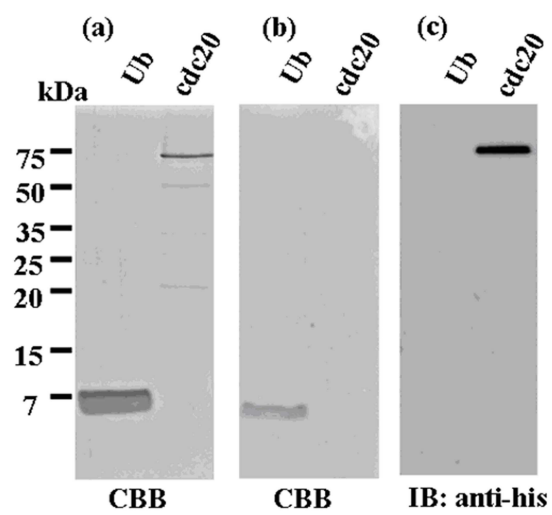
도면12a



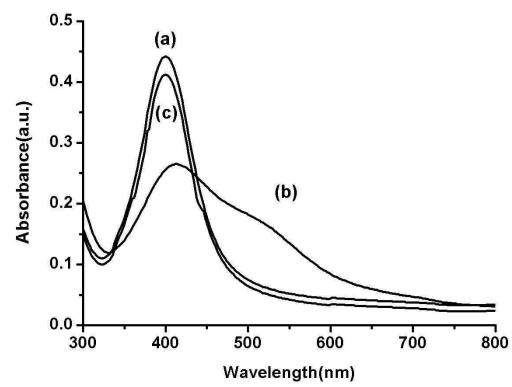
도면12b



도면13



도면14



도면15

