

공액 고분자 전해질 기반의 바이오센서 및 바이오이미징

Conjugated Polyelectrolytes-Based Biosensors and Bioimaging

정지은¹ · 우한영^{1,2} | Ji-Eun Jeong · Han Young Woo

¹Department of Cogno-Mechatronics Engineering (WCU),
Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

²Department of Nanofusion Engineering College of Nanoscience and Nanotechnology,
Pusan National University, Miryang 627-706, Korea
E-mail: hywoo@pusan.ac.kr

1. 서론

오늘날 생체 내 존재하는 단백질이나 효소, 이온 및 특정 염기서열을 갖는 DNA 등을 실시간으로 검출하는 기술은 학문적으로 중요한 과제이며 동시에 질병 감염 및 유전자 변형 진단 등 실제 임상 적용을 위해서 현재 활발한 연구가 진행되고 있다. 이에 따라 감지물질이 생화학 및 생물학적 종 등 표적 물질과의 결합 및 상호작용에 의해서 발생하는 신호를 인지 가능한 전기적 또는 광학적 신호로 변환하는 다양한 종류의 센서 시스템이 보고되고 있으며, 센서의 선택성과 민감도를 높이기 위한 연구가 절실히 요구되고 있다.

특히 형광 센서는 흡광분광법에 비해 백만 배 정도의 높은 감도와 빠른 응답성이라는 장점을 가지며, 복잡한 분석기기를 필요로 하지 않기 때문에 실시간 감지 및 진단 도구로 응용될 가능성이 매우 높다. 따라서 최근 형광 공액 고분자의 형광 특성, 전기화학적 특성 등을 활용하여 화학센서 혹은 DNA, 단백질 검출 등 바이오센서로 응용하고자 하는 연구 분야가 많은 주목을 받고 있다.

형광 공액 고분자(conjugated polymer, CP)는 탄소-탄소 간의 단일 결합과 이중 결합이 순차적으로 반복되는 구조(공액 구조)로 인해 중첩된 p오비탈을 가지므로 반도체적인 전기전도성을 보이며 비공액 고분자에 비해 낮은 밴드갭을 갖고 있어, 가시광선 영역대의 흡수 및 발광 특성을 갖는다. 특히 공액 고분자의 흡수 및 발광 특성은 표적 물질 등과의 상호작용으로 인해 변화될 수 있으므로 비색분석(colorimetric) 및 형광분석(fluorometric)을 기반으로 한 가시적 관찰이 가능하다. 이러한 공액 고분자를 DNA 검출, 단백질 검출, 효소 활성 조사, 생리 활성 물질 검출 등 수용성 검출 환경(aqueous media)에 적용 및 바이오 물질과의 친화력을 높이기 위해서는 형광 공액 고분자에 양이온 혹은 음이온 그룹을 갖는 알킬 결사슬을 도입하여 수용성을 부여할 필요가 있다. 이와 같이 공액 고분자에 이온 그룹을 갖는 결사슬을 도입한 이온성 공액 고분자를 공액 고분자 전해질(conjugated polyelectrolyte, CPE)이라 지칭한다(그림 1). 공액 고분자 전해질을 표적 물질 검출을 위한 광학 플랫폼으로 사용할 경우 여러 광학적 활성 단위로부터 형성된 다수의 여기자

Author

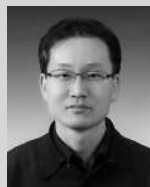


정지은

2012

2012-현재

부산대학교 나노소재공학과
(학사)
부산대학교 인지메카트로닉스공학과
(석사과정)



우한영

1994
1996
1999
1999-2003
2003-2006

2006-현재

서강대학교 화학과 (학사)
서강대학교 화학과 (석사)
한국과학기술원 화학과 (박사)
효성 R&D 센터 책임연구원
Center for Polymers and
Organic Solids (CPOS), UCSB,
USA (Post-doc.)
부산대학교 나노과학기술대학
나노융합공학과 부교수

가 주사슬을 통해 이동·집적되는 분자선 효과(molecular wire effect)를 기대할 수 있다. 1995년 MIT의 Swager 그룹에 의해 제안된 분자선 효과를 통해 공액 고분자 전해질 기반의 센서는 단분자와 비교하여 증대된 형광 신호를 기대할 수 있어 높은 민감도라는 장점을 기대할 수 있다.¹ 최근 고분자 내 작용기, 친수성/소수성 특성 및 전하 밀도 등을 조절하여 공액 고분자 전해질의 형광 특성을 개선하고자 하는 연구들이 진행되고 있으며 공액 고분자 전해질 기반 검출 시스템의 선택도 및 민감도 등 검출 특성을 더욱 향상시키고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있다.²⁻⁶

또한 공액 고분자 전해질을 이용한 바이오 분야의 응용 연구가 주목받으며 바이오센서뿐만 아니라 바이오이미징 분야에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다. 복잡한 생물체 내에서 일어나는 구성 성분 간의 상호작용 및 반응 기작에 대한 이해와 질병 발생의 원인이 되는 기작 및 질병의 성격, 진행, 역학에 대한 연구는 질병의 예방과 치료에 직접적으로 관련되어 있으므로 살아있는 세포를 가시적으로 관측하는 기술이 요구되고 있다. 이에 세포 내 질병 발생에 관한 분자 수준에서의 변화과정 및 특정 질병이 유발되는 위치 등을 이미지화하기 위해 가시적인 바이오이미징 기술들이 시도되고 있다.

이러한 관점에서 본 특집에서는 공액 고분자 전해질을 광학적 플랫폼으로 적용하여 표적 물질과의 상호작용에 의한 고분자의 구조변화, 이에 따른 흡수 및 형광 특성 변화, 형광 공명 에너지 전달(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 등과 같은 다양한 검출 메커니즘을 소개하고자 하며, 화학 및 바이오센서, 이미징 센서 응용 분야에 대해 살펴보하고자 한다.

2. 본론

2.1 DNA 감지 센서

특정 DNA 염기 서열은 질병과 관련된 유전자의 존재

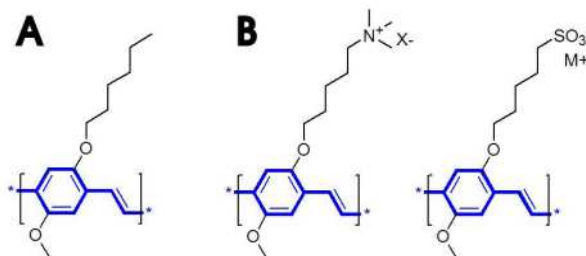


그림 1. 형광 공액 고분자 (A)와 양이온 및 음이온 공액 고분자 전해질 (B)의 분자 구조 예.

유무 및 발현 가능성과 밀접하게 관련되어 있으므로 효과적으로 DNA 염기 서열을 검출하기 위한 방법에 대한 연구가 진행되고 있으며 한 뉴클레오타이드(nucleotide)의 불일치도 검출해 낼 수 있는 높은 민감도를 가지는 검출 메커니즘이 보고되었다.⁷⁻¹⁷ 그림 2의 양이온성 polythiophene 유도체는 수용액에서 노란색(최대흡수파장, $\lambda_{\max}=397$ nm)을 띠는 random-coil 형태를 가진다. 여기에 음전하를 갖는 단일가닥 probe DNA(ssDNA₁)가 도입되면 정전기적 착체를 형성하고 ssDNA₁과 이중 나선 구조를 이루므로 고분자 사슬의 형태 변화가 유도된다. 이 경우, 고분자는 붉은색($\lambda_{\max}=527$ nm)을 띠고 기존에 비해 형광 세기가 감소하게 된다. 이후 probe DNA와 상보적인 염기서열을 갖는 표적 DNA(ssDNA₂)가 첨가되면 이중 나선의 DNA(dsDNA) 구조가 형성되고 고분자/dsDNA의 삼중 나선의 정전기적 착체가 이루어지면서 고분자의 형태가 변하고 유효 공액화도에 영향을 주게 된다. 결과적으로 억제되었던 고분자의 형광 세기가 회복됨과 동시에 다시 노란색($\lambda_{\max}=421$ nm)을 띠게 된다. 이와 같은 흡수 및 형광 특성 변화를 통해 ssDNA 염기서열에 대한 정보(ssDNA₁에 대한 상보성 여부)를 확인할 수 있다.⁹

미국 University of California, Santa Barbara의 Bazan 교수팀에 의해 고안된 실시간 DNA 검출법은 양이온성 공액 고분자 전해질(energy donor)에서 탐지 PNA(peptide nucleic acid)에 레이블된 형광체(energy acceptor)로의 형광 에너지전달(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상을 이용하는 것으로, 고분자의 분자선 효과에 기인한 높은 감도를 장점으로 한다. 본 검출 시스템은 두 가지 중

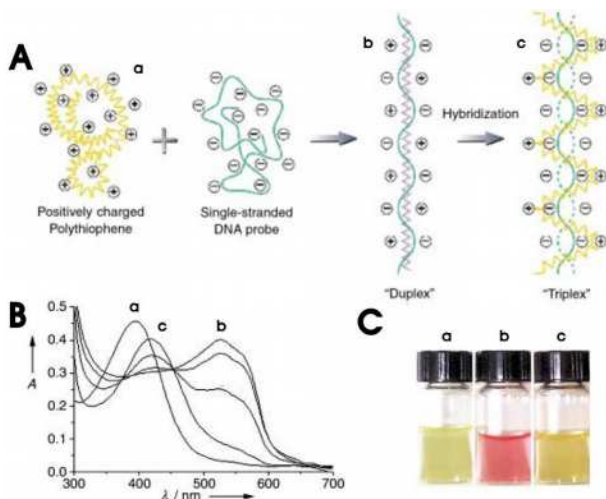


그림 2. (A) 고분자의 형태 변화에 따른 색 변화를 이용한 DNA 검출 메커니즘 (a) 고분자 (b), 고분자-probe DNA 복합체, 고분자-DNA 이중가닥 복합체의 스펙트럼과 (B), (C) 색변화.⁹

요한 분자 간 상호작용을 포함하고 있다. 첫 번째는 양이온 공액 고분자전해질과 음전하를 띠는 DNA 간의 정전기적 인력이다. 표적 DNA를 검출하되, 양이온 공액 고분자전해질과 불필요한 결합을 방지하기 위해 표적 DNA와 상보적인 염기서열을 갖고 정전기적으로 중성인 PNA에 형광체를 레이블하여 탐지 PNA로 사용한다.

이때 시료 내에 찾고자 하는 표적 DNA가 존재하는 경우, 표적 DNA와 탐지 PNA가 결합하며 이중 나선 구조를 이룬다. 여기에 양이온성 공액 고분자전해질이 첨가되면 정전기적 인력에 의해 전체적으로 음전하를 띠는 DNA/PNA 복합체와 정전기적 착체를 형성하게 된다. 하지만, 시료 내에 찾고자 하는 표적 DNA가 존재하지 않는 경우, 오직 음전하의 DNA와 공액 고분자전해질 간의 정전기적 착체가 형성된다. 여기서 두 번째 메커니즘인 FRET에 의해 두 가지 경우가 구별 가능하다. 시료 내에 표적 DNA가 존재하는 경우 FRET에 의해 유도된 형광체의 형광을 볼 수 있고, 시료 내에 표적 DNA가 없는 경우 고분자의 형광을 관찰하게 된다. 따라서 발색단 형광 유무를 통해 시료 내 찾고자 하는 DNA 존재 유무를 실시간으로 검출할 수 있다. 또한 고분자를 에너지 주개로 이용하였을 경우 공액 고분자전해질의 광학적 안테나 효과에 의한 신호증대현상으로 인해 기존의 형광 세기에 비해 ~25배 이상 증가된 감도 특성을 얻을 수 있다.¹⁰ Bazan 교수 연구팀에서는 고분자와 DNA 간 상호작용을 미세 제어하고 센서 감도를 높이기 위한 다양한 아이디어를 제시해오고 있다.¹¹⁻¹³

일반적으로 공액 고분자전해질을 광학적 플랫폼으로 사용하고 FRET 현상을 이용한 신호 증대효과를 위해서는 탐지 DNA 제작 시 DNA 말단에 FRET 에너지 받개인 형광체를 레이블하는 수고와 비용을 감수해야 하는 문제점이 있다. 이에 DNA 이중가닥 사이로 침투해 들어가 형광

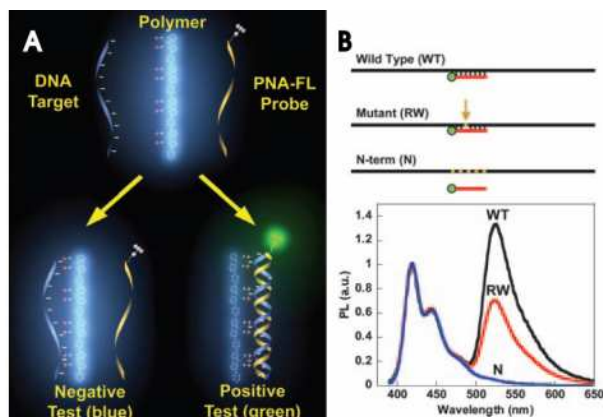


그림 3. CPDs에서 형광 수용체로의 FRET을 이용한 DNA 검출 센서.^{10,11}

을 내는 삽입형 형광체(intercalation dye)를 이용하여 탐지 DNA에 형광체의 레이블이 필요 없는(label-free) 검출 기작이 보고되고 있다.¹⁴⁻¹⁶ 삽입형 형광체는 DNA가 이중 가닥을 이룰 때 특이적으로 이중 나선 사이에 침투하여 형광을 내는 물질로 단일 가닥 DNA에서는 그 형광의 세기가 약하다. 탐지 DNA에 상보적인 염기서열을 갖는 표적 DNA를 첨가하면 이중 나선 구조의 탐지 DNA/표적 DNA의 복합체가 형성되며 삽입형 형광체가 DNA 이중 나선 사이로 침투해 들어가게 된다. 이때 양전하의 공액 고분자전해질을 첨가하면 공액 고분자전해질/DNA 복합체 사이의 정전기적 착체가 형성되고 공액 고분자전해질에서 삽입형 형광체로의 FRET 현상에 의해 형광체의 형광을 관찰할 수 있다. 반면에 표적 DNA가 존재하지 않을 경우 공액 고분자전해질과 탐지 DNA와 비상보적인 DNA 사이의 정전기적 인력으로 아래와 같은 복합체를 이루며, 삽입형 형광체는 이중나선 구조 속으로 침투하지 못하므로 공액 고분자전해질에 의한 형광만을 관찰하게 된다(그림 4).

미국 University of Michigan의 김진상 교수팀은 공액 고분자전해질과 탐지 DNA를 생접합(bioconjugation)하고 공액 고분자전해질의 광학적 안테나 효과를 이용하여 새로운 DNA 검출 방법을 제시하였다. 수용액에서 높은 형광 특성을 보이는 poly(*p*-phenylene ethynylene)(PPE) 기반의 공액 고분자 주쇄에 carbodiimide 화학을 이용하여 단일 가닥 탐지 DNA 또는 분자 비컨(molecular beacon, MB)을 생접합하였다. 샘플 내에 탐지 DNA와 상보적인 염기서열을 갖고 형광체가 레이블된 표적 DNA가 존재할 경우 DNA 간의 결합에 의해 고분자 주쇄와 형광체 간의

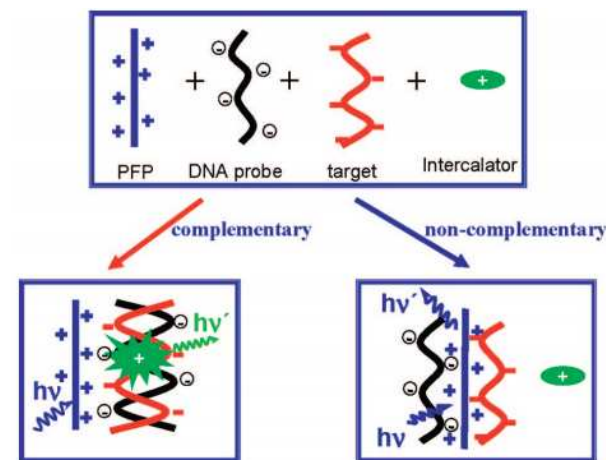


그림 4. 공액 고분자전해질-삽입형 형광체 간 FRET 현상을 이용한 label-free 검출 기작.¹⁴

거리가 가까워지므로 FRET에 의해 증대된 형광체의 신호를 관찰할 수 있다. 하지만 시료 내에 PPE-DNA와 상보적인 표적 DNA가 존재하지 않는 경우 DNA 이중나선을 형성할 수 없으며 형광체로의 FRET이 일어날 수 없으므로 FRET에 의한 형광체의 신호유무를 관찰하면 특정 DNA 염기 서열의 존재 유무를 확인할 수 있게 된다. 같은 방법으로 PPE의 주쇄에 단일 가닥 탐지 DNA 대신 형광 억제체가 레이블된 고리 모양의 분자 비컨을 생접합할 경우, 고분자의 형광 세기는 형광 억제체에 의해 강하게 억제된다. 하지만 표적 DNA가 존재할 경우, 고리 모양의 분자 비컨은 표적 DNA와 결합하며 선형 모양으로 변형되므로 결과적으로 공액 고분자 주쇄와 형광 억제체 간의 거리는 멀어져 고분자의 형광 세기가 회복된다.¹⁷

2.2 단백질 감지 센서

대부분의 생명 현상은 단백질로부터 기인하므로 항체, 항원 반응 검사 및 질병의 진단뿐만 아니라 질병의 원인과 치료에 대해 연구하기 위해서는 효과적인 단백질 센서가 요구되고 있다. 이에 중국 화학연구소의 Shu Wang 교수팀과 싱가포르 대학의 Liu Bin 교수팀 등 여러 연구팀에서 우수한 민감도와 선택도로 특정 단백질을 검출하는 시스템을 보고하고 있다.¹⁸⁻²³ 단백질 검출센서의 경우 DNA의 특정 염기 서열 혹은 금속 이온의 감지와 비교하여 이온 그룹을 갖는 공액 고분자전해질과 단백질 분자 간의 비특이적 상호작용뿐만 아니라 단백질 자체의 안정성 때문에 응용에 많은 제한이 있다. 이에 검출 시스템에 적용하기 위해 항체 또는 특이적으로 결합하는 단백질 복합체를 활용함으로써 단백질과 공액 고분자전해질 간 결합력을 높

이는 방법을 주로 이용하고 있다.

Shu Wang 교수 연구팀은 양이온성 치환기를 갖는 폴리플루오렌(polyfluorene)을 광학적 플랫폼으로 사용하고, fluorescein이 레이블된 biotin을 FRET 형광 수용체로 이용하여 단백질 검출 기작을 개발하였다. Biotin과 강한 결합력을 가지는 streptavidin이 존재하면 fluorescein이 streptavidin에 묻혀 공액 고분자전해질에서 fluorescein으로 FRET이 일어나지 않지만, 비오틴과 상호작용하지 않는 bovin serum albumin(BSA) 등의 다른 단백질이 첨가되면 강한 FRET이 일어나 fluorescein의 형광이 발현되는 것을 특징으로 한다.²⁰

당과 결합하는 단백질 렉틴의 대표적인 부류인 Concanavalin A(Con A)를 감지하기 위해 Liu 교수 연구팀은 청색 형광을 내는 양이온성 poly(fluorene-phenylene) 기반의 공중합물에 녹색 형광을 띄는 단량체를 소량(20%) 도입하고, 고분자의 측쇄에 α -mannose를 도입하였다. Con A는 4개의 결합 위치를 가지고 있으며, 칼슘 이온(Ca^{2+})과 망간 이온(Mn^{2+})이 존재할 경우 4개의 α -mannose 또는 α -glucose와 결합하게 된다. 따라서 본 검출 시스템에서 묶은 용액의 고분자는 청색 형광을 나타내지만, 이 용액에 Con A를 첨가하게 되면 Con A와 α -mannose 간의 강한 친화력에 의해 고분자-고분자 간 거리가 감소하게 되고 고분자의 청색 발광 unit에서 녹색 발광 부분으로 FRET에 의해 녹색 형광이 증대되게 된다.²¹

실리카 나노 입자는 넓은 표면적으로 검출 효율을 높일 수 있으며 정제가 쉽고 안정하다는 점에서 바이오센서의 플랫폼으로 널리 사용되고 있다. 이에 실리카 나노 입자 표면에 항체를 도입하여 항원-항체 결합 반응이 가능하도

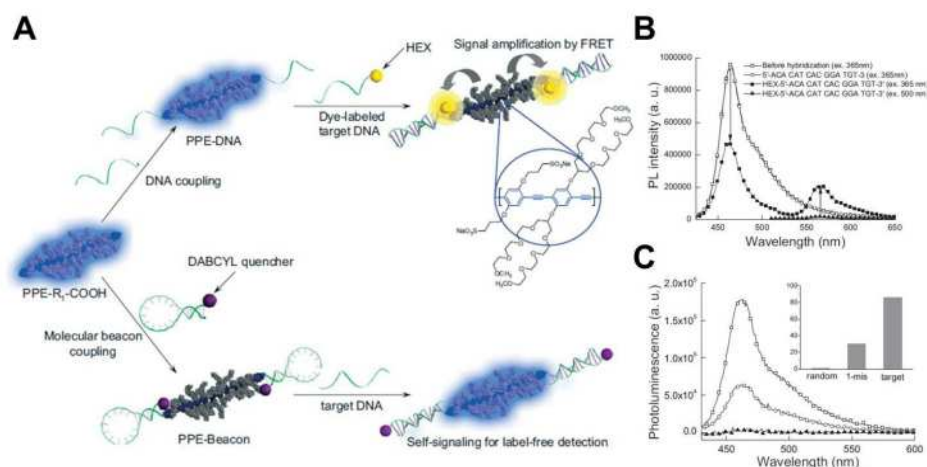


그림 5. (A) 고분자-탐지 DNA 생접합을 기반으로 한 FRET 및 형광억제 현상을 이용한 DNA 검출 기작, (B) PPE-DNA와 dye-labeled target DNA의 결합에 의한 형광 스펙트럼, (C) PPE-분자 비컨과 표적 DNA의 결합에 의한 형광 스펙트럼.¹⁷

록 함으로써 특정 항체를 검출하는 시스템이 보고되었다.²² 실리카 나노 입자에 도입된 1차(primary) 항체는 항원과 특이적으로 반응한 후 형광체가 레이블된 2차(secondary) 항체와 샌드위치 구조를 형성한다. 실리카 나노입자 표면은 제타 포텐셜(zeta potential) 측정 결과 음전하를 띄므로 양이온성 공액 고분자를 첨가하게 되면 정전기적 인력으로 인한 복합체를 형성하고 공액 고분자전해질에서 2차 항체에 레이블된 형광체로 FRET이 일어난다. 1, 2차 항체에 비특이적인 항원의 경우 세척과정을 통해 결합하지 못한 2차 항체가 제거되므로 공액 고분자전해질의 형광만 나타나게 된다.

최근 활발히 연구되고 있는 DNA 압타머(aptamer)는 상보적인 DNA 뿐만 아니라 특정 생체분자와 상호작용할 수 있는 염기서열을 가진 단일 가닥 DNA로 표적 물질의 분자 인식 기능을 담당할 수 있는 물질로 주목을 받고 있

다. 최근 세균의 세포벽에 있는 다당류 내 결합을 가수분해하는 효소인 라이소자임(lysozyme)을 검출하기 위해 표면에 압타머를 부착시킨 실리카 나노 입자를 플랫폼으로 한 검출 기작이 보고되었다.²³ 실리카 표면의 압타머는 라이소자임과 특이적으로 결합하며, 양전하를 띄는 라이소자임은 음전하를 띄는 압타머-실리카 나노입자와 정전기적 인력으로 결합하여 더욱 안정화된다. 이후 음이온성 공액 고분자전해질을 도입하게 되면 정전기적 인력으로 인해 라이소자임이 공액 고분자전해질에 의해 염색(staining)되므로 라이소자임의 가시적 검출이 가능하다. 실리카 나노 입자의 무게를 이용하여 실험 단계마다 세척과정을 거침으로써 원치 않는 복합체들을 제거할 수 있는 장점이 있다.

2.3 이온 감지 센서

생체 및 혈액 내 삼투압, pH 및 활동전위 등을 조절하기 위해 K^+ , Na^+ , Ca^{2+} 등의 금속 이온은 농도차에 의한 확산 등의 방법으로 적정 농도를 유지하고 있다. 질병에 노출되

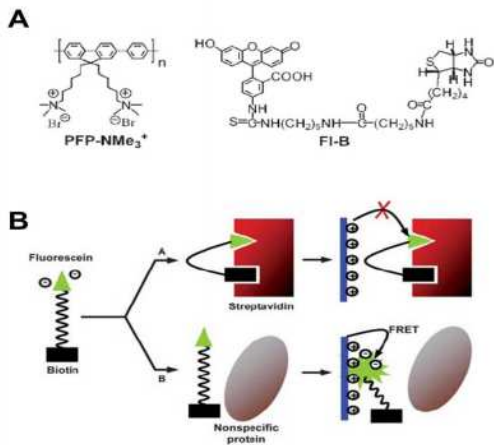


그림 6. (A) 양이온성 polyfluorene 및 fluorescein이 레이블 된 biotin의 구조, (B) 양이온성 polyfluorene을 에너지 주개로, biotin에 레이블된 fluorescein을 FRET 받개로 이용한 streptavidin 검출 기작.²⁰

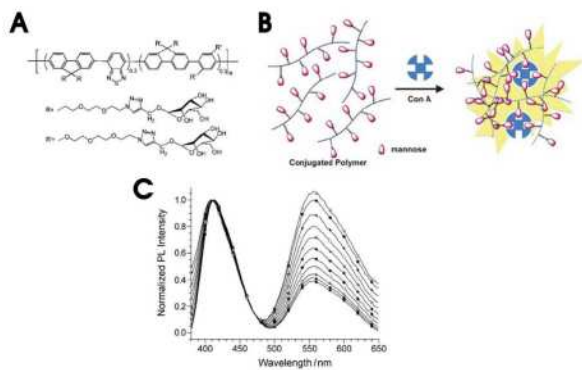


그림 7. (A) α -mannose가 치환된 고분자 구조 (B), 고분자 응집에 따른 고분자 형광 변화를 이용한 Con A 센서 기작, (C) Con A에 의한 형광 스펙트럼.²¹

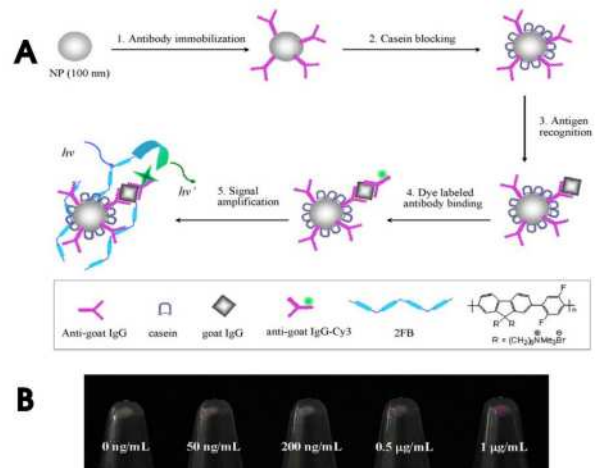


그림 8. (A) 실리카 나노입자 기반의 항원 검출 시스템 (B), 항원 농도에 따른 FRET 신호의 변화.²²

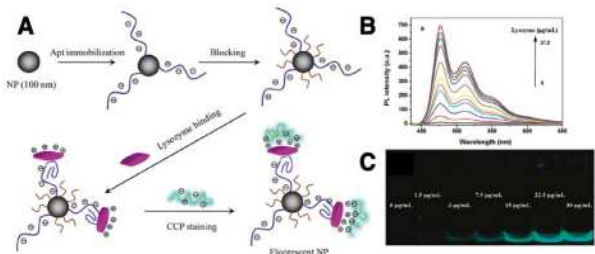


그림 9. (A) 압타머-실리카 나노입자 기반의 라이소자임 검출 방법, (B) 라이소자임 농도에 따른 형광 스펙트럼 및 (C) UV 램프를 이용한 형광 이미지.²³

거나 체내 특정 장기가 제 기능을 못할 시 체내 이온 농도가 정상 범위를 벗어나게 되므로 혈액 내 이온 농도를 모니터링함으로써 진단 및 질병의 경과를 확인할 수 있다. 하지만 체내에는 무수히 많은 종류의 이온들이 존재하므로 다른 이온의 존재 하에서도 높은 선택도로 검출이 가능한 기작들이 연구, 보고되고 있다.^{24,25,27}

예를 들면 crown ether를 분자 인식 그룹으로 활용하여 특정 금속 이온을 검출하고자 하는 연구가 최근 주목을 받고 있다. Crown ether를 구성하는 ethylene oxide의 수에 따라 ether 고리의 크기가 결정되는데, 고리의 크기에 따라 특정 금속과 선택적으로 결합하는 특징을 갖는다. 이러한 선택적 결합을 활용하는 K^+ 이온 검출 센서의 예로, PPE 기반의 고분자 겔사슬에 결합된 15-crown-5가 K^+ 이온과 2:1 착체를 형성하며 고분자간 응집이 증대되고, 이에 따라 고분자 사슬 간 π - π stacking을 야기하여 고분자의 흡수 및 형광 특성이 변화하고 이를 통해 K^+ 의 존재 여부를 확인할 수 있다.²⁴

특정 금속 이온과 G-quadruplex를 형성할 수 있는 DNA 압타머와 고분자의 상호작용을 이용한 K^+ 이온의 감지 기작이 최근 보고되었다. Poly(thiophene) 계열의 고분자는 DNA 압타머와 정전기적 착체를 형성함에 따라 random-coil 형태에서 planar 형태로의 구조변화가 일어나게 된다. 여기에 K^+ 가 첨가되면 압타머가 K^+ 와의 상호작용에 의해 quadruplex 형태를 갖게 되고, 이러한 변화에 대응하여 고분자 또한 꼬인 형태가 됨으로써 유효공액화도에 영향을 미쳐 광 특성에 변화가 유도되게 된다.²⁵

또한 본 연구실에서는 최근 양이온성 공액 고분자전해질과 표적 물질에 특이적으로 결합하는 분자 비컨 압타머 (molecular beacon aptamer, MBA)를 이용하여 형광 발

현의 억제 및 FRET에 의한 형광 증폭을 유도함으로써 고 분해능으로 K^+ 을 검출할 수 있는 기작을 개발하였다. MBA는 헤어핀 구조의 oligonucleotide 탐침을 말하며, MBA 구조의 양 말단에 형광체와 형광 억제제가 각각 레이블되어 있고 검출하고자 하는 표적 물질에 특이적인 염기서열을 갖는 압타머 구조를 MBA의 고리 부분에 도입하였다. 본 연구에서는 K^+ 와 강하게 결합하여 G-quadruplex 구조를 형성할 수 있는 GGTT GGTT TGGT TGG 염기서열을 MBA에 도입하였다. K^+ 이온이 존재하지 않을 경우 MBA는 양이온성 공액 고분자전해질과 소수성 상호작용에 의해 헤어핀 구조에서 열린 형태로 구조 변화가 유도되며 이에 따라 형광체와 형광억제제 간의 분자간 거리가 증가하므로 형광억제 효과가 감소된다.²⁶ 특히 이 경우, 고분자에서 형광체로 FRET이 가능하여 안테나 효과에 의해 형광체의 형광 신호가 증폭된다(on-state). 하지만 K^+ 이 존재할 경우 MBA의 고리 부분에 도입된 압타머가 K^+ 이온과 G-quadruplex를 형성하게 되는데 이 경우 공액 고분자전해질을 첨가하여도 MBA와 K^+ 의 높은 친화력에 의해 G-quadruplex를 구조를 유지하여 형광체와 형광억제제가 여전히 접촉 상태를 유지하므로 효율적인 형광 억제제가 가능하다(off-state). 이 검출 기작은 K^+ 을 제외한 다양한 금속 이온들에 대한 높은 선택성과 1.5 nM의 높은 검출 민감도를 갖는 장점이 있다. 이러한 높은 선택성 및 민감도는 특정 표적구조에 대해 높은 친화도를 갖는 압타머 구조와 조율 가능한 광학 특성을 갖는 합성 고분자 시스템을 접목하여 각각의 장점을 결합시킨 데서 기인한다. 또한 이 감지 기작을 통해 K^+ 뿐 아니라 G-quadruplex 형성이 가능한 다양한 금속 이온 및 바이오 물질 검출에 확대 적용이 가능함을 제시하였다.²⁷

2.4 효소 활성 감지 센서

효소는 생체 내 일어나는 화학반응을 선택적으로 진행시킬 수 있는 촉매이며, 따라서 체내 존재하는 특이적 화

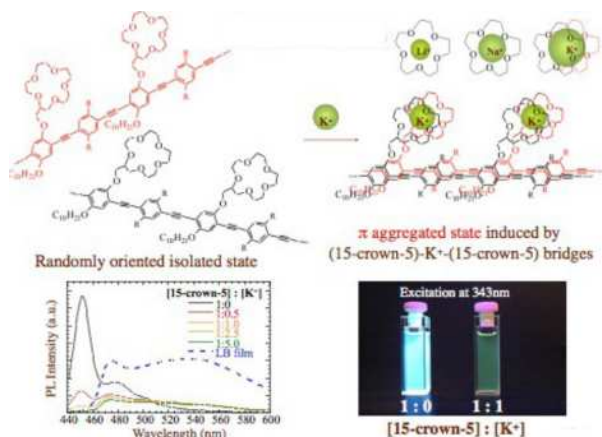


그림 10. Crown ether를 겔사슬에 포함한 고분자를 이용한 금속이온 검출.²⁴

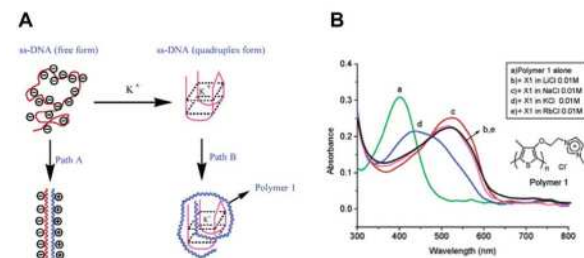


그림 11. (A) DNA 압타머를 이용한 칼륨이온 센서 기작, (B) 금속 이온에 따른 흡수 스펙트럼의 변화.²⁵

학물질을 인식하는 센서로 활용될 수 있는 가능성이 높다. 표적물질 인식을 위해 효소를 이용할 경우 높은 기질선택성으로 인해 우수한 선택도를 보이므로 효소 활성 조사 및 의료 분석, 식품 분석에 적용된 예가 보고되고 있다.²⁸⁻³³

최근에는 수용성 공액 고분자를 이용하여 다양한 종류의 효소 활성을 감지하는 기작 또한 보고되고 있다. 그림 12의 양이온성 고분자는 청색 형광을 내는 단량체에 5%의 녹색 형광을 내는 단량체를 도입한 것으로, 묽은 용액 내에서 청색 형광을 낸다. 이 용액에 ATP 등과 같은 음이온성 단백질을 첨가하면 고분자/단백질 간의 정전기적 착체가 형성되어 고분자-고분자간 거리가 감소하게 되고 고분자의 청색 형광 분절에서 녹색 형광 분절로의 형광 에너지 전달이 일어나게 된다. 하지만 ATP를 분해하는 효소, ALP(alkaline phosphate)를 넣어주게 되면 ATP의 인산화 그룹이 떨어져 나가 중성의 아데노신으로 변하게 된다. 이 경우 고분자/단백질 간의 정전기적 착체가 약화되어 고분자의 응집이 완화되고 이에 따라 고분자의 형광은 청

색으로 다시 회복된다. 따라서 이러한 고분자의 색 변화에 따른 효소의 활성도를 확인할 수 있다.³⁰

Phospholipase C(PLC)는 인지질의 가수분해 반응 중 인산기 부분을 잘라내는 효소로 보통 인지질의 인산에스테르(phosphate ester)의 가수분해를 촉진시키는 촉매로써 사용된다. 가수분해 반응이 종료된 후 생성되는 디아실글리세롤(diacylglycerol, DAG)은 표유류 시스템에 있어 세포 기능 및 신호 전달에 중요한 역할을 하므로 PLC의 촉매 활성 및 억제제를 정량적으로 모니터링하여 DAG의 활성 연구가 가능하다. 이에 University of Florida의 Schanze 교수팀은 인지질(1,2-didecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; 10CPC)과 음이온성 공액 고분자전해질(BpPPESO₃) 복합체를 이용하여 PLC의 가수분해 반응에 의한 형광 신호의 turn off 분석에 대해 보고하였다.³¹ 공액 고분자전해질의 형광 신호는 양친성(amphiphilic) 인지질의 첨가시 증가한다. 여기에 PLC를 첨가하게 되면 인지질을 가수분해하며 인지질-공액 고분자전해질 복합체를 효과적으로 파괴하므로 형광 신호가 감소(turn-off)하게 된다. 본 검출 시스템은 1 nM의 우수한 검출 한계를 가지며 Ca²⁺에 의한 활성화 및 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)에 의한 억제 작용에 대한 연구에 적용함으로써 보다 효과적으로 PLC의 가수분해 반응을 설명하였다.

신체에 필요한 에너지를 생산해내기 위해 호흡과정에서 발생하는 활성산소와 결합하여 체내 활성산소 농도를 낮추는 역할을 하는 glutathione(GSH)은 산화되면 두 개의 GSH가 결합하여 GSSG가 된다. GSSG는 glutathione reductase(GR)와 NADPH 의존적으로 GSH로 환원될 수 있다. GR의 활성을 감지하기 위해 Qinhan 교수팀은 다중 carboxylate 그룹을 가지는 공액 고분자전해질을 이용한 turn-on 검출 기작을 제안하였다.³² 사전에 Cu²⁺을 이용하여 공액 고분자전해질(PPE-(COOK)₄)의 형광 신호를 억

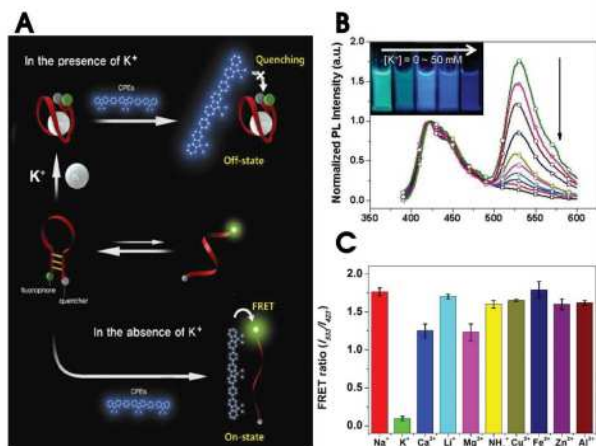


그림 12. (A) 분자 비컨 알타머 및 양이온성 고분자전해질을 이용한 칼륨 이온 감지 기작, (B) 칼륨 이온 존재, 부재 시 형광 스펙트럼, (C) 다양한 금속 이온에 대한 선택성.²⁷

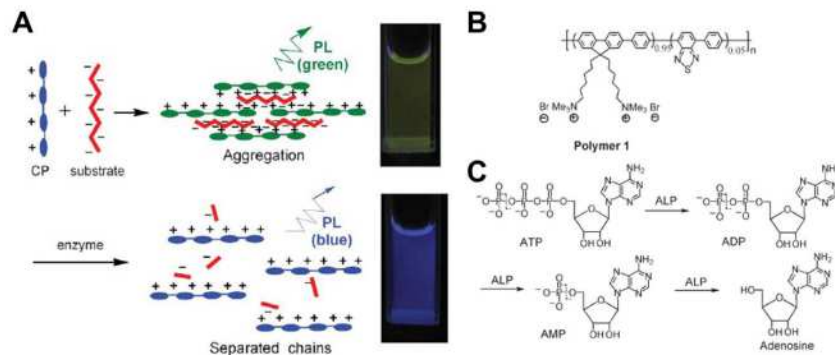


그림 13. (A) 양이온성 고분자를 이용한 효소 활성 감지 기작, (B) 고분자 구조, (C) ALP에 의한 ATP의 효소 반응식.³⁰

제하였으므로 GSSG가 존재하는 초기 단계에서는 형광 신호를 확인할 수 없다. GR과 조효소인 NADPH가 도입된 후 GSSG는 환원반응을 일으키며 GSH로 변화되고, Cu^{2+} 을 공액 고분자전해질에서 떼어내므로 고분자의 형광이 되살아난다. GR의 농도와 반응시간을 달리하여 실험을 반복함으로써 GR의 활성도를 확인할 수 있게 된다.

또한 국내 서울대학교의 민달희 교수 연구팀에서는 그래핀을 이용하여 효소의 활성을 검출할 수 있는 센서 기작을 개발하였다. 그래핀(graphene)은 sp^2 혼성화도를 가는

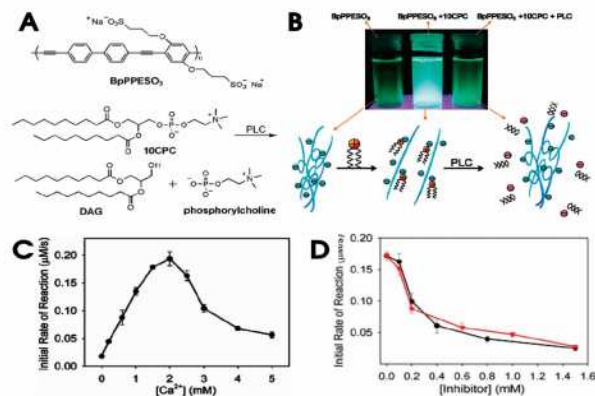


그림 14. (A) 공액 고분자전해질 및 인지질의 분자구조와 PLC의 가수분해 반응, (B) PLC turn-off 분석의 메커니즘, (C) Ca^{2+} 의 PLC 활성화, (D) EDTA의 PLC 억제 반응.³¹

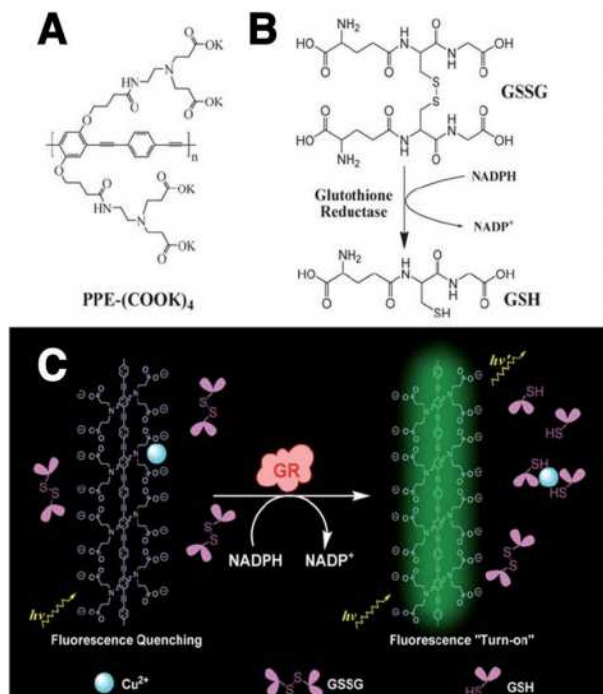


그림 15. (A) 공액 고분자전해질의 구조, (B) GR에 의한 GSSG-GSH 환원 반응, (C) GR 활성 분석 메커니즘.³²

탄소 원자들이 6각형의 벌집 모양으로 연결되어 형성된 2차원 구조로 상온에서 단위면적당 구리보다 약 100배 많은 전류를, 실리콘보다 100배 이상 빠르게 전달할 수 있을 뿐만 아니라 열전도성, 기계적 강도, 신축성 등이 우수해 현재 많은 주목을 받고 있다. 특히, 그래핀 옥사이드(graphene oxide, GO)의 경우 단일 가닥 DNA의 염기 부분과 π -stacking에 의해 강하게 결합할 수 있으나, 이중 가닥 DNA의 경우 DNA의 염기 부분이 외부에 노출되어 있지 않으므로 그래핀 옥사이드와 결합할 수 없다는 특징을 가지고 있다. 또한 GO는 일반적인 유기 형광체의 형광을 효과적으로 억제하는 것으로 알려져 있다. 이러한 성질을 이용하여 민 교수 연구팀에서는 dsDNA를 ssDNA로 바꾸는 헬리카아제(helicase) 효소를 검출하였다. 형광체가 레이블된 dsDNA는 GO와 비교적 약한 결합을 하므로 강한 형광을 나타내나, 헬리카아제를 첨가하면, dsDNA가 ssDNA로 풀리면서 GO와 강하게 결합하게 된다. 이때 레이블된 형광체의 형광은 GO에 의해 강하게 억제되므로 형광 억제 정도를 관찰하면 헬리카아제의 활성도를 측정할 수 있게 된다.³³

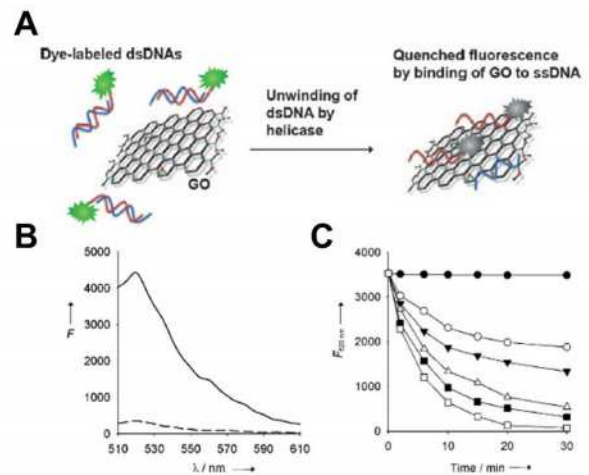


그림 16. (A) GO를 이용한 helicase 감지 기작, (B) GO가 ssDNA 및 dsDNA와 결합했을 때의 형광 스펙트럼, (C) helicase 효소 활성.³³

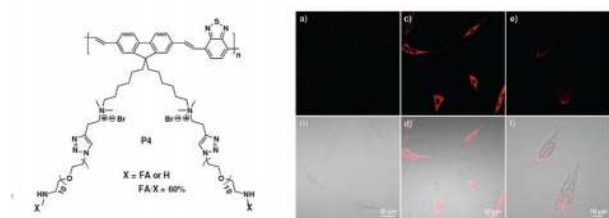


그림 17. 공액 고분자의 주쇄에 작용기의 도입을 통한 세포 이미징의 예.³⁹

2.5 공액 고분자전해질 기반의 세포 이미징

살아있는 세포를 가시적으로 관측하는 기술은 세포 내 질병 발생에 대해 분자 수준에서의 유발 및 발전 과정을 이해하기에 적합하므로 질병 발생의 원인이 되는 기작 및 진행을 이미지화하기 위한 연구들이 진행되고 있다. 공액 고분자전해질은 알킬 체인 말단에 달린 이온 그룹으로 친수성 특성을 보이거나 그 크기로 인해 세포로 침투하기 힘들며 독성을 띄어 세포의 생존을 어렵게 한다는 문제점을 가진다. 따라서 세포에 침투하기 쉬운 구조 및 작용기 등을 이용하여 세포 이미징을 구현하고 있다.³⁴⁻⁴²

싱가포르의 Liu 교수 연구팀은 공액 고분자전해질의 주쇄에 다양한 작용기를 도입함으로써 core-shell 나노 구조를 형성하거나 특정 암세포에 특이적으로 결합할 수 있는 작용기를 치환하여 성공적인 세포 이미징을 보고하였다.^{39,40}

스웨덴의 Nilsson 교수 연구팀에서는 amyloid deposit에 선택적으로 반응하여 구조 변화가 유도되는 다양한 공액 고분자 전해질을 합성하고 *ex vivo* 조직 샘플에 대한 세포 이미징을 성공적으로 수행하였다.⁴¹

또한 본 연구실에서는 이광자 형광 분광법 (two-photon fluorescence microscopy, TPM) 분자 레이블로 적용하기 위해 음이온성 블록 공중합체(E_m-A_n)와 양이온성 계면활성제(C_{16}) 및 공액 단분자전해질(C_1)을 이용하여 정전기

적 인력에 의한 수용성 나노 구조체($C_1/E_m-A_n/C_{16}$) 형성을 유도한 결과를 보고하였다.⁴² 형성된 나노 구조체는 낮은 pH에서 정전기적 인력이 감소하여 파괴되는 특성을 가진다. 이를 세포 내에 직접적으로 주입하여 TPM 이미징에 적용한 결과, 세포질 내에서 밝은 형광 신호를 보였으며, 낮은 pH에서 나노 구조체가 분해되는 현상을 관찰하였다. 따라서 본 연구의 나노 구조체는 TPM 바이오이미징 뿐만 아니라 기존의 세포보다 낮은 pH를 보이는 암세포 등으로 선택적인 약물 전달을 위한 나노 전달체로의 응용 가능성을 제시하였다.

3. 결론

지금까지 공액 고분자전해질의 흡수, 형광, 형광 억제, 형광 공명 에너지 전달 등 다양한 메커니즘을 활용한 공액 고분자전해질 기반 바이오센서 및 바이오이미징 연구 동향에 대하여 살펴보았다. 특히 형광 공액 고분자전해질을 기반으로 한 검출법은 분자선 효과에 기인한 신호증대 효과에 기인한 높은 감도를 가지며, 복잡한 분석기기를 필요로 하지 않기 때문에 실시간 감지 및 진단 도구로 응용될 가능성이 매우 높다. 바이오 분야의 연구가 주목받으며 바이오센서뿐만 아니라 수용성 형광고분자를 이용한 약물 전달 시스템, 유전자 전달 시스템, 바이오이미징에 대한 다양한 응용 연구도 활발하게 진행되고 있다. 이와 같이,

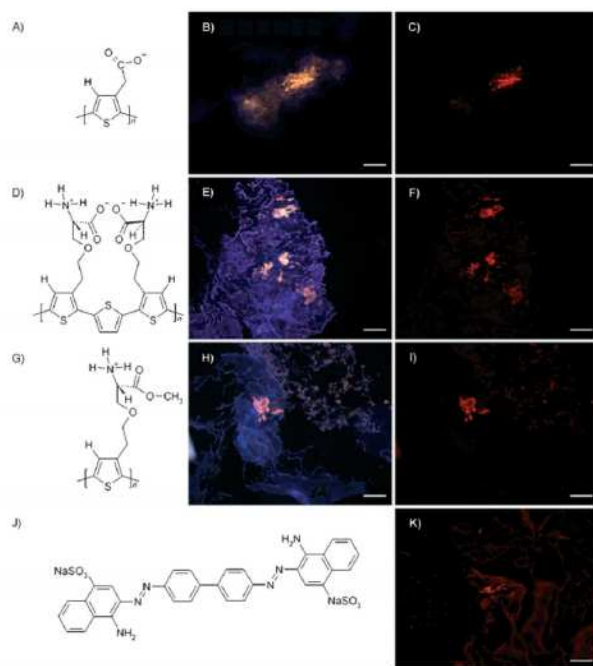


그림 18. Amyloid deposits에 선택적으로 반응하는 공액 고분자 및 세포 이미징의 예.⁴¹

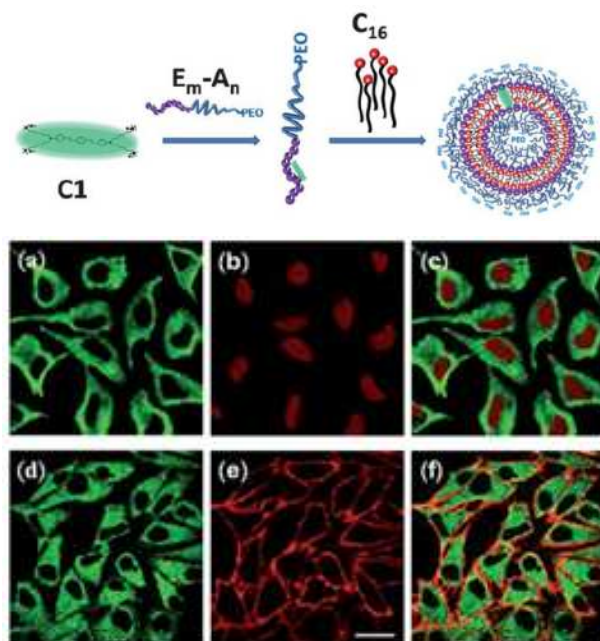


그림 19. C_1 을 포함하는 나노 구조체 형성 모식도와 HeLa cell TPM 이미징.⁴²

공액 고분자를 이용한 바이오 분야의 응용 연구는 인류의 건강 및 행복 증진에 밀접히 관련되어 있는 매우 중요한 분야이며, 형광 공액 고분자전해질의 광학적 집광 특성과 바이오 물질과의 정전기적 인력 등 다양한 상호작용을 기초로 한 다양한 검출 기작 개발, 바이오이미징 형광 프로브로서의 특이성 및 치료학적 가치를 향상시킴으로써 미래 성장을 주도할 수 있는 고부가가치의 핵심기술로 연결될 수 있으리라 예상된다.

참고문헌

1. Q. Zhou and T. M. Swager, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7017 (1995).
2. B. Liu and G. C. Bazan, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 1188 (2006).
3. R. R. Nayak, O. K. Nag, H. Y. Woo, S. Hwang, D. Vak, D. Korystov, Y. Jin, and H. Suh, *Curr. Appl. Phys.*, **9**, 636 (2009).
4. K. -Y. Pu, Z. Fang, and B. Liu, *Adv. Funct. Mater.*, **18**, 1321 (2008).
5. M. Kang, O. K. Nag, S. Hwang, I. Kim, H. Yang, K. Kyhm, and H. Y. Woo, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 15482 (2010).
6. M. Kang, O. K. Nag, R. R. Nayak, S. Hwang, H. Suh, and H. Y. Woo, *Macromolecules*, **42**, 2708 (2009).
7. S. Tyagi and F. R. Kramer, *Nat. biotechnol.*, **14**, 303 (1996).
8. Y. Wang, R. Zhan, T. Li, K. -Y. Pu, Y. Wang, Y. C. Tan, and B. Liu, *Langmuir*, **28**, 889 (2012).
9. H. -A. Ho, M. Boissino, M. G. Bergeron, G. Corbeil, K. Dore, D. Doureau, and M. Leclerc, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 1548 (2002).
10. B. S. Gaylord, A. J. Heeger, and G. C. Bazan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 10954 (2002).
11. B. S. Gaylord, M. R. Massie, S. C. Feinstein, and G. C. Bazan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 34 (2005).
12. C. Chi, A. Chworos, J. Zhang, A. Mikhailovsky, G. C. Bazan, *Adv. Funct. Mater.*, **18**, 3606 (2008).
13. H. Li, R. Yang, and G. C. Bazan, *Macromolecules*, **41**, 1531 (2008).
14. X. Ren and Q. -H. Xu, *Langmuir*, **25**, 43 (2009).
15. S. Wang, B. S. Gaylord, and G. C. Bazan, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5446 (2004).
16. Y. Wang and B. Liu, *Anal. Chem.*, **79**, 7214 (2007).
17. K. Lee, L. K. Povlich, and J. Kim, *Adv. Funct. Mater.*, **17**, 2580 (2007).
18. Wang and B. Liu, *Chem. Commun.*, 2284 (2009).
19. E. Ji, D. Wu, and K. S. Schanze, *Langmuir*, **26**, 14427 (2010).
20. L. An, Y. ang, S. Wang, Y. Li, and D. Zhu, *Macromol. Rapid. Commun.*, **27**, 993 (2006).
21. J. Shi, L. Cai, K. -Y. Pu, and B. Liu, *Chem. Asian. J.*, **5**, 301 (2010).
22. Y. Wang and B. Liu, *Biosens. Bioelectron.*, **24**, 3293 (2009).
23. Y. Wang, K. -Y. Pu, and B. Liu, *Langmuir*, **26**, 10025 (2010).
24. J. Kim, D. T. McQuade, S. K. McHugh, and T. M. Swager, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3868 (2000).
25. H. -A. Ho and M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 1384 (2004).
26. F. Xia, X. Zuo, R. Yang, Y. Xiao, D. Kang, A. Vallee-Belisle, X. Gong, A. J. Heeger, and K. W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 1252 (2010).
27. B. Kim, I. H. Jung, M. Kang, H. -K. Shim, and H. Y. Woo, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 3133 (2012).
28. F. Feng, L. Liu, and S. Wang, *Macromol. Chem. and Phys.*, **210**, 1188 (2009).
29. M. R. Pinto and K. S. Schanze, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 7505 (2004).
30. L. An, Y. Tang, F. Feng, F. He, and S. Wang, *J. Mater. Chem.*, **17**, 4147 (2007).
31. Y. Liu, K. Ogawa, and K. S. Schanze, *Anal. Chem.*, **80**, 150 (2008).
32. H. Fan, T. zhang, S. Lv and Q. Jin, *J. Mater. Chem.*, **20**, 10901 (2010).
33. H. Jang, Y. -K. Kim, H. -M. Kwon, W. -S. Yeo, D. -E. Kim, and D. -H. Min, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 5703 (2010).
34. I. B. Kim, H. Shin, A. J. Garcia, and U. H. F. Bunz, *Bioconjugated chem.*, **18**, 815 (2007).
35. R. L. McRae, R. L. Phillips, I. B. Kim, U. H. F. Bunz, and C. J. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 7851 (2008).
36. J. Liu, D. Ding, J. Geng, and B. Liu, *Polym. Chem.*, **3**, 1567 (2012).
37. C. A. Traina, R. C. Bakus II, and G. C. Bazan, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 12600 (2011).
38. K. -Y. Pu and B. Liu, *Adv. Funct. Mater.*, **21**, 3408 (2011).
39. K. -Y. Pu, K. Li, Bi Liu, *Adv. Funct. Mater.*, **20**, 2770 (2010).
40. K. Li, S. -S. Feng, A. W. Wu, K. -Y. Pu, Y. and B. Liu, *Adv. Funct. Mater.*, **19**, 3535 (2009).
41. K. P. R. Nilsson, P. Hammarstrom, F. Ahlgren, A. Herland, E. A. Schnell, M. Lindgren, G. T. Westermark, and O. Inganas, *Chembiochem.*, **7**, 1096 (2006).
42. O. K. Nab, C. S. Lim, B. L. Nguyen, B. Kim, J. Jang, J. H. Han, B. R. Cho, and H. Y. Woo, *J. Mater. Chem.*, **22**, 1977 (2012).
43. H. Jiang, P. Taranekekar, J. R. Reynolds, and K. S. Schanze, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 4300 (2009).
44. A. Duarte, K. -Y. Pu, B. Liu, and G. C. Bazan, *Chem. Mater.*, **23**, 501 (2011).
45. Y. Yang and L. Zhao, *Trends in Analytical Chemistry*, **29**, 980 (2010).
46. Y. Liu and K. S. Schanze, *Anal. Chem.*, **81**, 231 (2009).
47. I. -B. Kim, J. N. Wilson, and U. H. F. Bunz, *Chem. Commun.*, 1273 (2005).