

광기능 초분자 기반 바이오센서·칩 Conjugated Supramolecules for Biosensors and Chips



안동준,¹ 김종만²

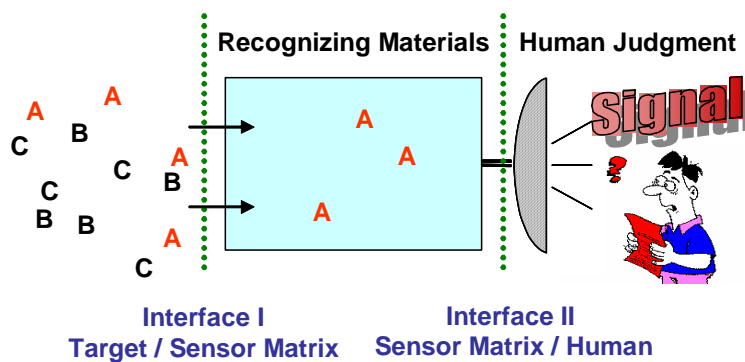
¹고려대학교 화공생명공학과 / ahn@korea.ac.kr

²한양대학교 응용화공생명공학부 / jmk@hanyang.ac.kr

I. 서론

화학 및 바이오 센서는 측정 대상물로부터 정보를 감지, 측정하여 그 측정량을 인식가능한 유용한 신호로 변화하는 물질/장치이다. 센서는 측정 대상물로부터 정보를 획득할 때 화학/생물학적 요소를 이용하거나 또는 생물학적 요소를 모방하는 물질을 활용하여 색, 형광, 전기적 신호 등과 같이 인식 가능한 신호로 변환시켜 인간의 판단을 돕는다. 센서의 시스템은 감지 물질로 이루어진 리간드 매트릭스와 감지시에 발생하는 신호를 전달하는 신호변환기 (signal transducer)로 구성된다. 그림 1에 보이는 바와 같이 혼합물 중에서 표적물질을 선택적으로 인식하기 위해서는 타겟과 센서 매트릭스 사이에 계면이 존재하며 이 계면을 통해서 분석물질과 센서 매트릭스 사이의 상호작용이 이루어진다. 센서 매트릭스가 표적물질을 인식하면 사람이 인식할 수 있도록 신호변환기를 통해서 시그널을 보내게 된다.

Sensor Systems

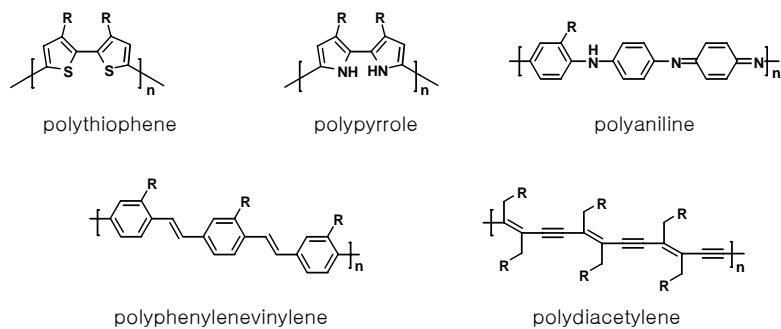


[그림 1] 센서의 구성 개념.

바이오센서에 이용되는 센서소재 또는 센서는 검출하고자하는 표적물질에 대한 높은 선택성(selectivity)과 감도(sensitivity)가 요구된다. 이러한 관점에서 효소(enzyme)와 항체(antibody)가 센서 매트릭스로 가장 널리 사용되어 왔다. 효소와 항체가 뛰어난 기질특이성과 높은 결합력을 가지고 있으나 센서장치에 고정화되었을 때 안정성이 떨어지고 가격이 비싼 단점을 지닌다. 따라서 효소 및 항체와 같은 생체물질의 기능을 모방하는 합성 센서 매트릭스에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 분자량이 적은 저분자(small molecule) 센서로부터 분자량이 큰 고분자(polymer) 센서에 이르기까지 다양한 종류들이 연구, 개발되고 있다. 저분자 및 고분자 센서소재는 각각 장단점을 지니고 있으며 본 고에서는 공액고분자(conjugated polymer)인 폴리다이아세틸렌 (polydiacetylene) 초분자 센서에 대하여 살펴보고자 한다. 공액고분자 센서기술은 기존 센서시스템의 기본 구성요소인 감지물질과 신호변환기를 하나로 통합한 것으로서 감지물질/신호변환기간 계면 접합의 문제가 없으므로 센서의 설계가 간단해지는 장점을 지닌다.

II. 공액고분자(Conjugated Polymer)의 센서 특성

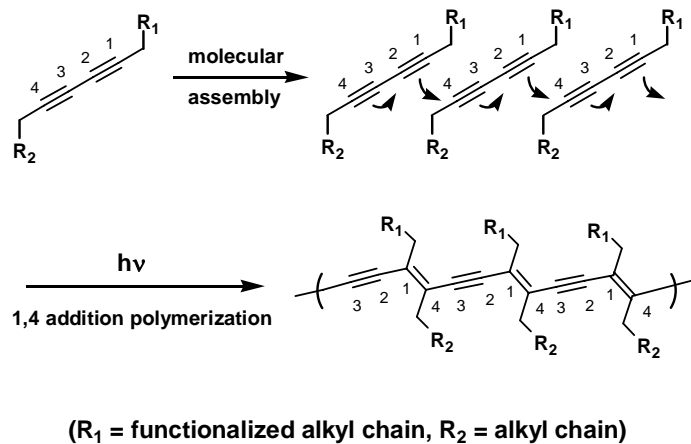
공액고분자의 기본적인 특성은 환경의 변화에 의해 전도성(conductivity), 산화-환원 전위차(redox potential), 흡수(absorption) 또는 방출(emission) 스펙트럼의 변화를 가져온다는 것이다. 분자인식 기능기를 지니는 공액고분자가 표적물질을 인식하여 위의 특성의 변화를 가져오면 센서로서의 응용이 가능하다. 공액고분자 센서가 분자량이 적은 저분자 센서에 비교해서 가지는 큰 장점은 신호의 증폭현상을 가져올 수 있다는 것이다. 따라서 공액고분자 시스템에서는 분자인식이 부분적으로 일어나도 생성된 신호는 공액고분자 주쇄에 전달되기 때문에 신호의 증폭현상이 일어나 저분자센서에 비해서 낮은 농도를 검출할 수 있는 장점을 지닌다. 실제로 폴리페닐렌비닐렌(poly(phenylenevinylene))계 고분자를 이용한 결과 약 1,000배의 감도 증진을 나타낸 연구 결과가 보고 되었다. 이러한 결과는 현재 전도성 및 디스플레이용으로 연구되고 있는 많은 공액고분자의 구조를 적절히 변형시키면 훌륭한 센서의 소재가 될 수 있음을 보여준다. 센서용으로 연구되고 있는 대표적인 공액고분자로는 폴리다이아세틸렌(polydiacetylene), 폴리페닐렌비닐렌(polyphenylenevinylene), 폴리티오펜(polythiophene), 폴리피롤(polypyrrole), 폴리아닐린(polyaniline)을 들 수 있다(그림 2).



[그림 2] 센서소재로 사용되고 있는 공액고분자의 구조.

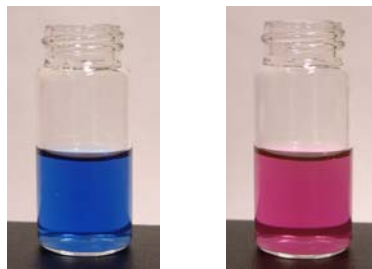
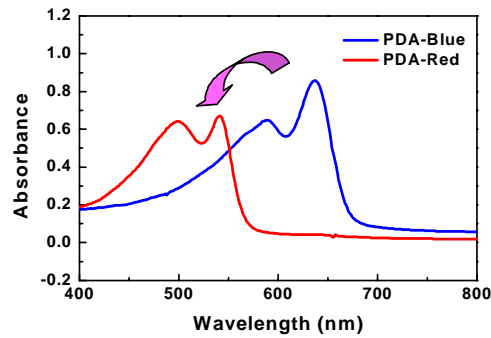
III. 폴리다이아세틸렌(Polydiacetylene) 초분자

다른 공액고분자와 비교하여 폴리다이아세틸렌이 지니는 장점은 고분자의 합성이 수용액 상에서 쉽게 이루어지는 것이다. 센서 실험이 주로 수용액 상에서 이루어지는 점을 감안하면 센서 고분자를 수용액상태에서 만들 수 있는 것은 큰 장점이 될 수 있다. 또한 고분자 합성시 촉매나 개시제와 같은 부가적인 물질이 필요치 않는 특성을 지닌다. 일반적인 공액고분자 합성시 사용된 금속촉매가 고분자를 만든 후 제거가 쉽지가 않고 합성된 고분자의 물성에 좋지않은 영향을 미치는 현상이 종종 보고되고 있다. 그림3에서 보이는 바와 같이 분자내에 diacetylene을 지니는 단량체는 수용액상에서 비극성결합에 의해 단량체들끼리 충분히 가까운 거리를 유지하게 된다. 이때 254 nm의 자외선을 노광하게 되면 diacetylene끼리 중합이 일어나서 고분자 주쇄에 이중결합과 삼중결합이 교대로 존재하는 폴리다이아세틸렌이 만들어 진다. 폴리다이아세틸렌이 제대로 만들어 지는지는 용액의 색변화로 쉽게 확인할 수 있다. 자외선을 노광하기 전에는 용액의 색이 무색에서 중합이 이루어지면 약 650nm에서 최대흡수파장을 지니는 청색으로 바뀌게 된다. 합성된 고분자는 주로 100-200 nm의 크기를 지니는 입자로 존재한다.



[그림 3] 자외선 노광에 의한 폴리다이아세틸렌 공액 초분자의 합성.

폴리다이아세틸렌 고분자가 센서 소재로 관심을 끄는 가장 큰 이유는 스트레스에 의한 센서의 색전이 현상 때문이다. 폴리다이아세틸렌의 색전이를 유발하는 스트레스는 온도, pH, 유기용매 및 분자인식을 들 수 있다. 그림4에서도 나타난 바와 같이 스트레스를 받기 전 폴리다이아세틸렌 고분자는 약 650 nm에서 최대흡수파장을 지니는 청색을 띄게 되며 스트레스에 의해 약 550nm에서 최대흡수파장을 지니는 적색으로 색전이를 일으킨다. 폴리다이아세틸렌 고분자의 색전이 현상에 대한 메카니즘은 아직 정확히 밝혀진 바가 없으나 스트레스에 의해 고분자 주쇄의 유효공액길이(effective conjugation length)가 짧아져서 단파장의 최대 흡수파장으로 이동하는 것으로 인식되고 있다.



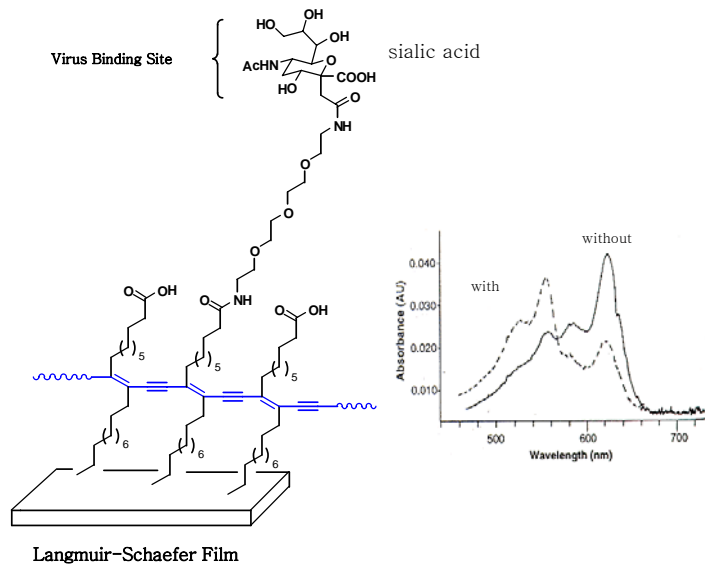
Blue phase Red phase

[그림 4] 폴리다이아세틸렌 공액고분자의 센서특성.

IV. 폴리다이아세틸렌 (Polydiacetylene)의 센서·칩 응용

(1) 바이러스 검출

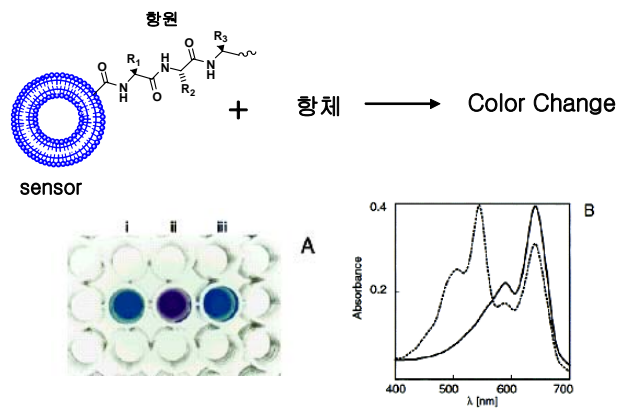
폴리다이아세틸렌 초분자체가 스트레스를 받으면 색이 변한다는 것은 이미 오래 전부터 알려져 왔으나 이러한 현상을 바이오센서에 적용하기 시작한 것은 1993년 Science지에 Charych 그룹이 폴리다이아세틸렌 LS 필름을 이용하여 influenza 바이러스를 검출하는데 적용한 후부터이다. 그림 5에서 보는 바와 같이 말단에 인플루엔자 바이러스를 선택적으로 인식 할 수 있는 기능을 지니는 폴리다이아세틸렌 LS 필름을 바이러스가 들어있는 용액에 담근 결과 필름의 색이 청색에서 적색으로 변하는 것을 관찰하였고 이는 그림 5의 오른쪽에 보이는 가시광선 흡수스펙트럼의 변화에서도 잘 나타나 있다. 약630 nm에서의 흡수가 줄어들고 550 nm에서의 흡수가 증가함을 보여준다. Charych 그룹이 바이러스를 인식하기 위하여 센서의 말단에 사용한 분자인식 기능기는 silalic acid라는 당(carbohydrate)으로서 바이러스의 표면에 있는 hemagglutinin을 특이적으로 인식한다. 폴리다이아세틸렌 센서 표면에 바이러스가 붙으면 바이러스-바이러스 사이의 입체장애 또는 바이러스-고분자 사이의 스트레스에 의해 폴리다이아세틸렌 고분자 주쇄의 conjugation 길이가 짧아지게 되어 단파장으로 최대흡수파장이 이동하게 된다.



[그림 5] 바이러스 검출용 폴리다이아세틸렌 센서의 구조 및 바이러스 인식에 의한 센서의 visible 스펙트럼의 변화.

(2) 향원-향체 센서

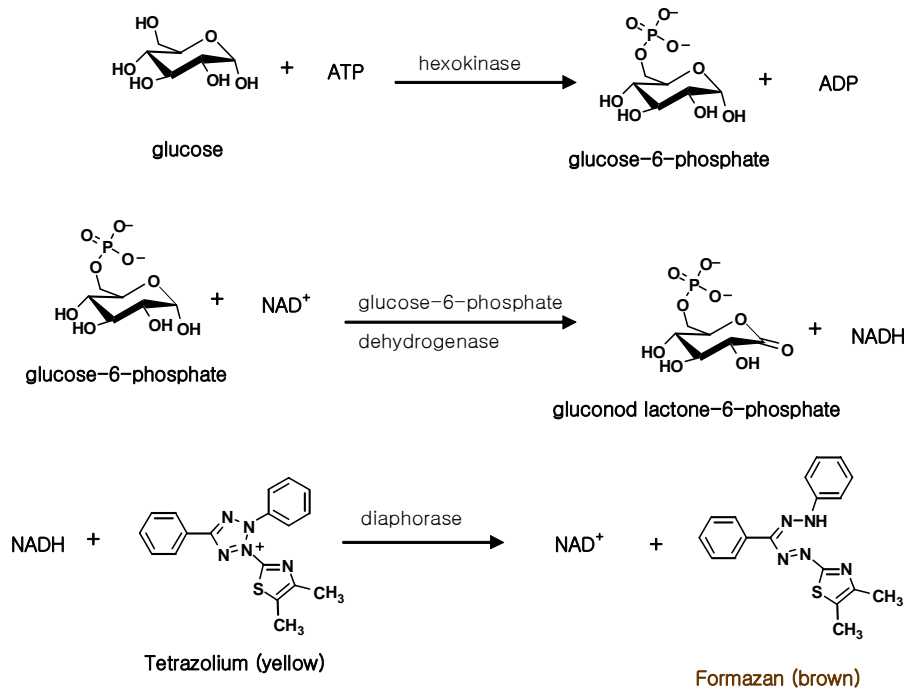
현재 바이오 센서에 이용되는 매트릭스로 중 효소와 더불어 가장 많이 이용되는 것이 향원-향체 반응이다. 향체는 향원을 매우 선택적으로 인식하며 결합 강도 또한 크다. 이러한 향체-향원 반응의 특이성 및 선택성을 폴리다이아세틸렌 센서에 적용한 예가 최근 보고되었다. Jelinek 그룹은 향체에 특이성을 지니는 펩타이드를 폴리다이아세틸렌 리포솜에 삽입시킨 후 이 펩타이드를 인식하는 향체와의 반응으로 폴리다이아세틸렌 센서의 색전이를 살펴본 결과 그림6에 나타난 것과 같이 청색에서 보라색으로 센서의 색이 변함을 보여주고 있으며 UV-visible 스펙트럼 상에서도 이러한 변화를 관찰 할 수 있었다.



[그림 6] 향체와의 반응에 의한 폴리다이아세틸렌 리포솜 센서의 색 및 흡광 변화.

(3) 글루코즈 센서

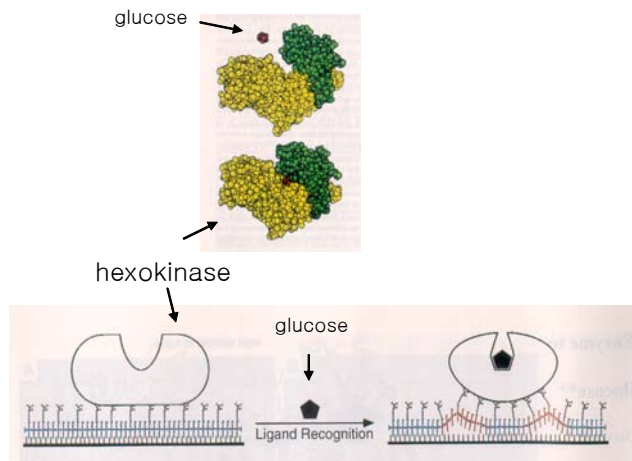
현재 바이오센서 시장의 약 80% 이상을 차지하는 것이 글루코즈 센서인 혈당측정기이다. 혈당측정기는 글루코즈를 산화시키는 glucose oxidase를 사용하여 산화과정에서 생성되는 중간체와 색소원과의 반응으로 생기는 발색물질의 양을 빛을 이용하여 측정하거나 글루코즈 산화과정에서 발생하는 전자를 전극을 이용하여 측정하여 글루코즈의 농도를 계산한다. 글루코즈 센서에 이용되는 효소는 glucose oxidase 외에도 hexokinase라는 phosphoryl group을 transfer하는 효소를 사용한다. 현재 독일 바이엘사에서 개발한 글루코미터라는 혈당측정기는 그림 7에서 보이는 것과 같은 원리를 사용한다. 먼저 hexokinase 효소가 ATP(adenosine triphosphate)를 기질로 사용하여 글루코즈의 6-hydroxy기를 phosphorylation 시켜 glucose-6-phosphate를 만든다. 다음 단계에서 glucose-6-phosphate는 glucose-6-phosphate dehydrogenase에 의해 산화되고 이 과정에서 조효소로 사용된 NAD+(nicotine amide adenosine dinucleotide)는 NADH로 환원된다. 환원된 NADH가 tetrazolium이라는 발색단을 변화시켜 갈색의 formazan으로 바꾼다. 따라서 혈액속의 글루코즈 농도는 그림 7에 나타난 반응 메커니즘에 의해 갈색의 formazan 생성 농도에 비례하게 되고 formazan의 농도를 측정해서 글루코즈의 양을 계산한다.



[그림 7] Hexokinase를 이용한 글루코즈 센서의 원리.

Hexokinase 효소가 글루코즈에 phosphate group을 transfer시킬 때 hexokinase의 conformation의 변화를 가져온다. 이러한 변화를 이용하여 글루코즈를 인식하는 폴리다이아세틸렌 센서가 최근 보고되었다. 그림 8에 나타난 바와 같이 hexokinase를 폴리다이아세틸렌에 고정화 시킨 후 글루코즈를 넣어 주면 hexokinase가 글루코즈를 인식할 때 폴리다이아세틸렌의 구조가 변형되어 색 변화를 일으킨다.

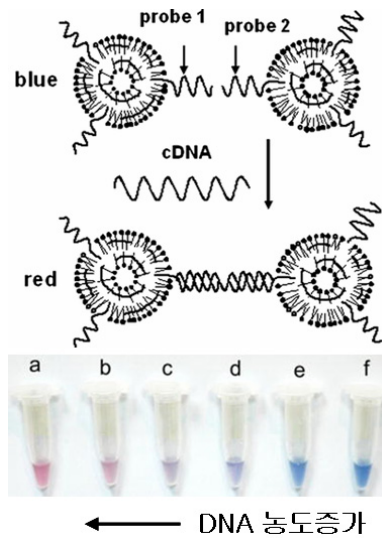
이아세틸렌을 끌어당기게 되면서 폴리다이아세틸렌의 주쇄에 많은 스트레스를 가하게 되고 따라서 센서의 색이 변하게 된다.



[그림 8] Hexokinase-polydiacetylene을 이용한 글루코즈 센서.

(4) DNA 센서

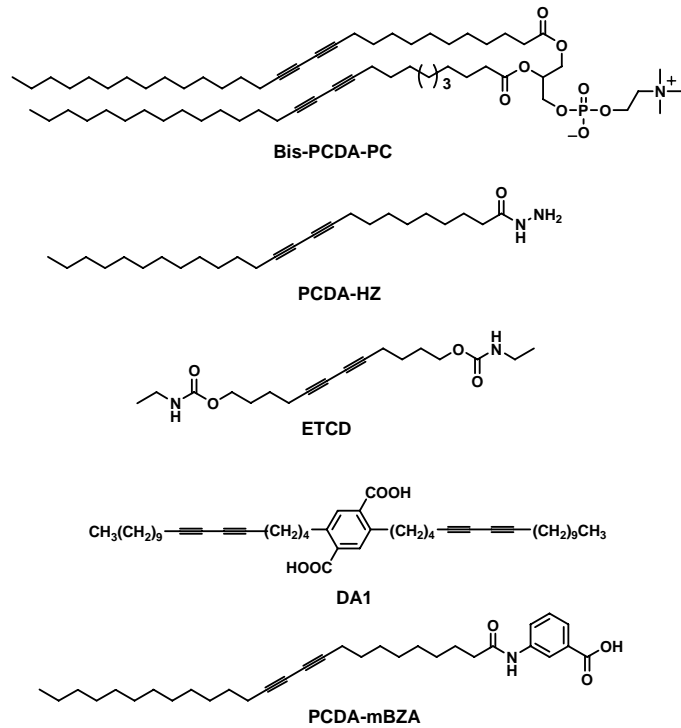
미국 노스웨스턴대의 Mirkin 연구팀은 금 나노입자의 표면에 probe DNA를 고정시키고 표적 DNA와 반응시켜 금입자의 aggregation을 유도하여 용액의 색전이를 가져오는 DNA 센서에 대하여 많은 논문을 발표하고 있다. 이와 비슷한 원리를 폴리다이아세틸렌에 이용한 예가 최근 중국의 Ma 연구팀에 의해 보고되었다. 그림 9은 폴리다이아세틸렌을 이용한 DNA 센서의 원리를 보여준다. 폴리다이아세틸렌 입자의 한쪽에는 probe 1 DNA를 연결시키고 다른 폴리다이아세틸렌 입자에는 probe 2 DNA를 고정시킨 후 complementary DNA(cDNA)와 반응하면 고분자 입자들이 서로 aggregation 되면서 색전이를 가져오게 된다. 이 결과는 기존의 항원-항체 반응, 글루코즈 센서, 바이러스 검출기능과 더불어 폴리다이아세틸렌을 이용한 센서의 응용가능성을 nucleic acid 영역으로 확대시킬 수 있기 때문에 큰 의미를 지닌다.



[그림 9] 폴리다이아세틸렌 입자를 이용한 DNA 센서.

(5) 가역적 색변환 센서

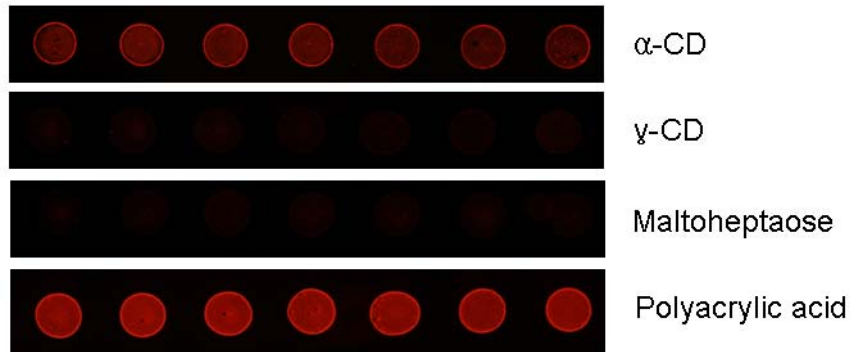
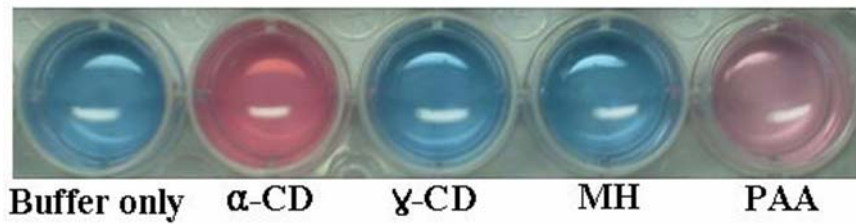
지금까지 보고된 폴리다이아세틸렌을 이용한 센서는 거의 대부분 비가역적인 색전이를 보여주었다. 즉, 센서의 색이 청색에서 적색으로 변하면 색전이를 유도한 인자를 제거하여도 청색으로 돌아가지 못하는 비가역적인 색전이를 나타내었다. 그러나 이러한 비가역 색전이를 보여주는 센서는 일회용으로 사용할 수 밖에 없으며 가역적 색전이 센서에 비해서 한계를 지닌다. 이러한 단점을 극복하기 위해서 가역적 색전이 현상을 보여주는 폴리다이아세틸렌 센서를 개발하려는 노력이 이루어지고 있으며 용액상에서 최초의 가역적 색전이는 1986년 Singh 그룹에 의해 보고되었다. Singh 그룹은 그림 10에 보이는 Bis-PCDA-PC를 단량체로 사용하여 폴리다이아세틸렌 리포솜을 제조하였다. 이 리포솜은 온도에 의해 가역적 색전이를 보여주었다. 그러나 가역적 색전이를 보여주는 온도 범위가 상대적으로 낮고 완벽한 가역성을 보여주지는 못하였다. 반면에 최근에 보고된 센서는 산-염기 반응에 의한 거의 완전한 가역성을 나타내었다. Jonas 그룹은 말단에 hydrazide기를 지니는 PCDA-Hz를 단량체로 사용하여 유기용매에서 중합을 하여 폴리다이아세틸렌을 합성하였다. 이렇게 제조된 폴리다이아세틸렌 입자는 산-염기 반응에 의해 가역적 특이성을 보여주었다. Sandman 연구팀은 ETDC를 사용하여 만든 폴리다이아세틸렌이 고체상에서 가역적 색전이를 보여주는 것을 ^{13}C NMR로 증명하였다. 최근 아주대의 이석현 교수 연구팀은 다이아세틸렌을 양쪽에 지니는 dicarboxylic acid DA1을 가지고 만든 고분자가 유기용매에서 가역적 색전이를 나타내는 것을 보고하였다. 본 연구팀은 말단에 수소결합을 할 수 있는 작용기를 두 개 지니는 단량체 PCDA-mBZA를 합성하여 리포솜 및 필름을 만든 결과 놀랍게도 온도와 pH에 거의 완벽한 가역성을 나타내었다. IR을 이용하여 분석한 결과 리포솜의 headgroup에 강한 수소결합이 존재함을 확인하였고 이로 인하여 스트레스가 제거되었을 때 본래의 구조로 되돌아 갈 수 있음을 증명하였다.



[그림 10] 가역적 색변환 센서에 사용된 단량체의 구조.

(6) 초분자 기반 어레이 칩

지금까지 알려진 대부분의 폴리다이아세틸렌을 이용한 센서의 응용은 상술한 바와 같이, 청색에서 적색으로의 색전이 현상에 국한되어 왔다. 한편, 청색의 폴리다이아세틸렌은 형광을 나타내지 않으나 적색의 폴리다이아세틸렌은 형광을 나타냄에 따라, 이를 이용한 형광센서의 개발이 진행되었다. 그러나, 폴리다이아세틸렌의 형광변화를 이용한 센서 적용은 용액상 리포솜의 활용 또는 고체기판상에 증착된 필름의 활용에 국한되었다. 최근 본 연구팀에서는, 통상적으로 사용되는 마이크로 어레이어를 활용하여 폴리다이아세틸렌 초분자를 고체기판에 패턴어레이 칩을 형성하는 기술을 확립하였으며, 이를 이용하여 검출 특이성이 있음을 보고하였다. 그림 11에서 보듯이, 용액상 리포솜이 보유한 색전이에 의한 검출 특이성이 어레이 칩에서도 자가 형광발현 기능에 의해 그대로 유지되고 있음을 알 수 있다. 이러한 초분자 어레이 칩기술은 무표지 탐지기술이므로, 향후 신규 DNA, 단백질, 세포 칩의 개발에 확장되어 적용될 것으로 기대된다.



[그림 11] 폴리다이아세틸렌 초분자 용액과 어레이 칩의 검출특이성 비교.

V. 결론

나노구조의 폴리다이아세틸렌 초분자체를 이용한 센서는 여러 가지 면에서 다른 공액고분자 센서에 비해 장점을 지닌다. 우선 적절한 조건에서 수용액 상태에서 이중층을 지니는 리포솜의 형태로 쉽게 만들 수 있다. 또한 LB 필름 제조 장치를 이용하면 나노 구조의 폴리다이아세틸렌 박막을 용이하게 제조 할 수 있다. 이렇게 만들어진 폴리다이아세틸렌 초분자는 최적화된 조건에서 약 640 nm에서 최대흡수파장을 지니며 청색을 나타낸다. 폴리다이아세틸렌 센서가 지니는 가장 큰 장점은 바로 외부자극 또는 스트레스에 의한 센서의 색전이 현상을 보여주는 것이다. 즉, 청색의 폴리다이아세틸렌 리포솜 또는 박막은 분자인식, 온도, pH, 용매, 등과 같은 환경의 변화에 대하여 청색에서 적색으로의 색전이를 나타낸다. 이러한 특성은 쉽게 바이오센서에 적용할 수 있으며 지금까지 많은 연구 결과가 보고되고 있다. 폴리다이아세틸렌 센서가 여러 가지 면에서 장점을 지님에도 불구하고 아직 개선해야 할 부분은 여전히 남아있다. 예를 들면, 부과되는 스트레스의 종류와 색전이 사이의 명확한 메커니즘이 알려지지 않고 있으며 이로 인해 표적물질에 대한 센서 설계의 어려움을 보여준다. 또한 대부분의 폴리다이아세틸렌 센서가 비가역적 색전이 특이성을 보여주는 것도 개선해야 할 부분이다. 이러한 부분들이 개선된다면 폴리다이아세틸렌을 기초로 한 보다 실용적인 바이오센서가 개발될 것으로 기대된다. 색전이 현상과 별도로, 폴리다이아세틸렌의 자가 형광 발현 기능을 활용하면 무표지 화학칩 및 바이오칩으로의 응용이 가능하다. 폴리다이아세틸렌 초분자를 통상적인 마이크로 어레이어를 활용하여 고체기판에 패턴을 형성하는 기술이 새롭게 도입되었으므로, 이 기술을 기반으로 기존의 칩 기술을 보완할 수 있는 방안이 다각적으로 시도되고 있다. 마지막으로, 폴리다이아세틸렌에 더하여 다른 공액고분자들도 적절한 분자 구조적 변형을 시도하면 훌륭한 센서·칩 소재가 될 것으로 사료된다.

VI. 참고문헌

1. Charych, D. et al., *Science* **1993**, *261*, 585.
2. Li, J. et al., *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6349.
3. Jelinek, R. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *113*, 417.
4. Basu, A. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5038.
5. Okawa, Y. et al., *Nature* **2001**, *409*, 683.
6. Ma, Z. et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1708.
7. Kim, J.-M and Ahn, D. J. et al., *Macromolecules* **2005**, *38*, 9366.
8. Ahn, D. J. and Kim, J.-M. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8976.
9. Kim, J.-M. and Ahn, D. J. et al., *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1118.
10. Lee, S.-H. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4179.
11. Jelinek, R. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 10000.
12. Kim, J.-M. and Ahn, D. J. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17580