(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0068605
(43) 공개일자 2022년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/553 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/553 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0155545
(22) 출원일자 2020년11월19일
심사청구일자 2020년11월19일

(71) 출원인
한국기술교육대학교 산학협력단
충청남도 천안시 동남구 병천면 충절로 1600 (한국기술교육대학교내)
(72) 발명자
박승경
경기도 용인시 수지로 탄천산로 6, 203동 304호
지샨 (아흐마드) 칸
충남 천안시 동남구 충절로 1600
이마드 바라캇
충청남도 천안시 동남구 병천면 충절로 1600
(74) 대리인
특허법인(유한) 대아

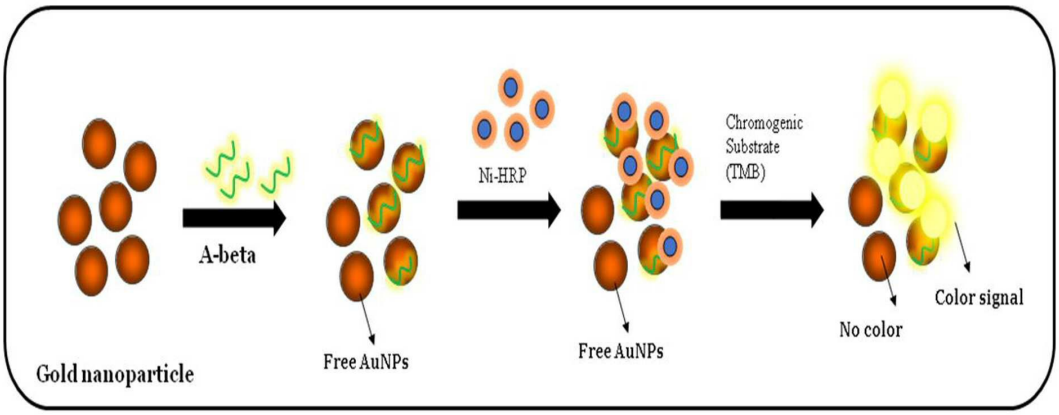
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **금속-HRP를 포함한 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법**

(57) 요 약

본 발명은 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 관한 것으로, 피검시료 내의 베타 아밀로이드 농도를 쉽고 빠르게 확인함으로써 알츠하이머병 진단에 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/581 (2013.01)
G01N 33/6896 (2013.01)
G01N 2333/4709 (2013.01)
G01N 2800/2821 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

금 나노입자;

금속 이온-HRP(horseradish peroxide); 및

TMB 기질;을 포함하는,

베타 아밀로이드 검출용 바이오마커.

청구항 2

금 나노입자; 금속 이온-HRP; 및 TMB 기질;을 포함하고,

베타 아밀로이드는 상기 금 나노입자에 특이적으로 결합하며,

상기 금속 이온-HRP은 금 나노입자-베타 아밀로이드 컨쥬게이트에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는,

베타 아밀로이드 검출용 바이오마커.

청구항 3

금 나노입자; 금속 이온-HRP; 및 TMB 기질;을 포함하고,

상기 금속 이온은 구리, 니켈, 아연, 카드뮴 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는,

베타 아밀로이드 검출용 바이오마커.

청구항 4

금 나노입자에 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 첨가하는 단계(1단계);

1단계의 용액에 금속 이온-HRP를 첨가하는 단계(2단계);

2단계의 용액에 TMB 기질을 첨가하는 단계(3단계); 및

3단계의 용액의 흡광도를 측정하여 베타 아밀로이드의 농도를 확인하는 단계(4단계);를 포함하는 것을 특징으로 하는,

베타 아밀로이드 농도의 확인방법.

청구항 5

금 나노입자에 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 첨가하는 단계(1단계);

1단계의 용액에 금속 이온-HRP를 첨가하는 단계(2단계);

2단계의 용액에 TMB 기질을 첨가하는 단계(3단계); 및

3단계의 용액의 흡광도를 측정하여 베타 아밀로이드의 농도를 확인하는 단계(4단계);를 포함하고,

상기 베타 아밀로이드는 0 초과 10 nM/L이하의 농도에서 검출될 수 있고, 검출한계(LOD)는 0.22 nM/L 인 것을 특징으로 하는,

베타 아밀로이드 농도의 확인방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 금속-HRP를 포함한 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 금 나노입자, 금속-HRP 및 TMB 기질을 포함하는 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커와 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 노화에 의해 발생하는 대표적 질병 중의 하나인 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 또는 치매 관련 신경계 질환은 신경세포의 퇴화와 이로 인한 인지, 기억능력의 상실을 가져오는 질환으로서, 가족력에 의한 유전적인 경우와 65세 이상 노인에서 주로 발생하는 퇴행성 뇌질환으로 나눌 수 있다. 상기 질환은 사회의 노령화에 따라 급속하게 증가하는 추세로서, 조기진단, 예방 및 치료에 대한 필요성이 시급한 실정이다. 하지만, 신경 세포 퇴화와 기억 및 인지 능력의 상실에 대한 정확한 원인이 밝혀지지 않아 확실한 진단의 기준도 제시되지 않고 있다. 다만, 사망한 환자의 사후 뇌조직 연구에 의하면 신경세포 주변에 비정상적인 노인성 플라그(senile plague)의 형성이 다량 검출되는 현상이 대표적 특징으로 알려져 있다. 특히, 상기 노인성 플라그는 베타 아밀로이드(β-Amyloid)라는 펩타이드의 비정상적인 축적이 원인으로 알려지면서 알츠하이머병 또는 치매 관련 신경계 질환의 연구 분야에서 가장 핵심적인 목표물질로 간주되어 주목을 받고 있으며, 이러한 질병의 진단, 예방 및 치료의 연구에 새로운 화두로 떠오르고 있다.

[0004] 현재 사용되는 알츠하이머병 바이오마커로는 뇌척수액의 베타-아밀로이드 농도 측정과 아밀로이드 양전자 단층촬영(positron emission tomography)이 있다. 하지만 이들 바이오마커는 비싼 가격과 침습성 등의 한계로 인해 활용도가 크게 떨어지는 문제가 제기되고 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 알츠하이머병의 중요 지표인 베타 아밀로이드를 쉽고 빠르게 확인할 수 있는 바이오마커를 개발하였고, 이를 이용하여 피검시료 내 베타 아밀로이드의 농도를 확인할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국 공개특허공보 제10-2020-0117965호 (2020.10.14. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은, 알츠하이머병의 진단을 위해 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커를 제공하는데 있다.

[0009] 또한, 본 발명은 알츠하이머병의 진단을 위해 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커를 이용하여 시료 내의 베타 아밀로이드 농도를 쉽고 빠르게 확인할 수 있는 베타 아밀로이드 농도 확인방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제(들)로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제(들)는 이하의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 일 측면에 따르면, 본 발명은 금 나노입자, 금속 이온-HRP 및 TMB 기질

을 포함하는, 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은, 본 발명은 금 나노입자, 금속 이온-HRP 및 TMB 기질을 포함하고, 상기 베타 아밀로이드는 상기 금 나노입자에 특이적으로 결합하며, 상기 금속 이온-HRP는 금 나노입자-베타 아밀로이드 컨쥬게이트에 특이적으로 결합하는, 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은, 금 나노입자; 금속-HRP; 및 TMB 기질;을 포함하고, 상기 금속은 구리, 니켈, 아연, 카드뮴 중 선택된 어느 하나인 것, 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커를 제공한다.

[0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명은 금 나노입자에 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 첨가하는 단계(1단계); 1단계의 용액에 금속-HRP를 첨가하는 단계(2단계); 2단계의 용액에 TMB 기질을 첨가하는 단계(3단계); 및 3단계의 용액의 흡광도를 측정하여 베타 아밀로이드의 농도를 확인하는 단계(4단계);를 포함하는, 베타 아밀로이드 농도의 확인방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 금 나노입자에 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 첨가하는 단계(1단계); 1단계의 용액에 금속-HRP를 첨가하는 단계(2단계); 2단계의 용액에 TMB 기질을 첨가하는 단계(3단계); 및 3단계의 용액의 흡광도를 측정하여 베타 아밀로이드의 농도를 확인하는 단계(4단계);를 포함하고, 상기 베타 아밀로이드는 0 초과 10 nM/L이하의 농도에서 검출될 수 있고, 검출한계(LOD)는 0.22 nM/L 인, 베타 아밀로이드 농도의 확인방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 따르면, 피검시료 내의 베타 아밀로이드 농도를 쉽고 빠르게 확인하여 알츠하이머병을 진단에 활용할 수 있는 효과가 있다.

[0020] 또한, 본 발명의 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 따르면, 적은 양의 피검시료로도 높은 민감도로 확인할 수 있는 효과가 있다.

[0021] 또한, 본 발명의 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 따르면, 복잡한 합성이나 생체 분자의 추출이 필요하지 않고, 항체를 사용하지 않고도 피검시료 내의 베타 아밀로이드 농도를 확인할 수 있는 효과가 있다.

[0022] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1는 본 발명의 일 실시예에 따른 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커의 원리를 도식화 한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 베타 아밀로이드 농도 확인방법의 공정흐름도이다.

도 3은 금 나노 입자와 다양한 금속 이온 (Cu, Ni, Zn 및 Cd)의 최소 응집 농도(MAC)를 확인하기 위하여, 금속 이온의 농도에 대한 흡광도 비(A_{650}/A_{525})를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 구리 이온 및 니켈 이온의 베타 아밀로이드($A\beta_{1-40}$)와의 결합력을 확인하기 위한 것으로, 금속 이온 결합 예측 및 도킹 서브에 의한 분석결과(도 4a)와 베타 아밀로이드에 결합한 금속 이온에 의한 분석결과(도 4b)를 나타내었다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 금 나노입자의 크기 및 베타 아밀로이드($A\beta_{1-40}$)의 농도에 따른 금 나노입자와의 결합력을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 베타 아밀로이드($A\beta_{1-40}$), 베타 아밀로이드-금 나노입자(AuNP-$A\beta_{1-40}$) 및 금 나노입자-베타 아밀로이드-니켈-HRP의 UV-Vis 스펙트럼과 나노-제타사이저 분석결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 베타 아밀로이드 농도에 따른 흡광도를 나타낸 표준곡선(standard curve) 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[0026] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것을 달성하는 방법은 첨부된 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다.

[0027] 그러나 본 발명은 이하에 개시되는 실시예들에 의해 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0028] 또한, 본 발명을 설명함에 있어 관련된 공지 기술 등이 본 발명의 요지를 흐리게 할 수 있다고 판단되는 경우 그에 관한 자세한 설명은 생략하기로 한다.

[0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0031] **베타 아밀로이드 검출용 바이오마커**

[0032] 본 발명의 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커는, 금 나노입자, 금속-HRP(horseradish peroxide) 및 TMB 기질을 포함한다.

[0033] 베타 아밀로이드는 알츠하이머병의 중요지표로서 본 발명에 따른 바이오마커를 사용하여 베타 아밀로이드가 검출되면 이를 알츠하이머병의 진단에 활용할 수 있다.

[0034] 금 나노입자는 입자의 크기가 1 ~ 100 nm 인 것으로, 본 발명의 기술분야에서 알려진 통상의 것을 사용할 수 있다. 바람직하게는 나노 입자의 직경이 1 ~ 25 nm 일 수 있다.

[0035] 베타 아밀로이드는 상기 금 나노입자에 특이적으로 결합하여 베타 아밀로이드-금 나노입자 컨쥬게이트를 형성할 수 있다. 양전하 값을 갖는 베타 아밀로이드는 음전하를 띄는 금 나노입자 표면과 정전기력에 의한 결합을 형성한다. 따라서 금 나노입자에 베타 아밀로이드가 포함된 피검시료를 첨가하여 접촉하게 하면, 피검시료 내의 베타 아밀로이드가 금 나노입자에 결합하게 된다.

[0036] 금속-HRP은 상기 금 나노입자-베타 아밀로이드 컨쥬게이트에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 금속은 베타 아밀로이드와 특이적으로 결합할 수 있는 것으로, 구리, 니켈, 아연, 카드뮴 중 선택된 어느 하나인 것이 바람직하고, 그 중 구리 또는 니켈이 더욱 바람직하며, 니켈이 가장 바람직하다. 상기 HRP는 TMB 기질과 결합하여 황색으로 발색반응을 한다.

[0037] 도 4a에서 확인할 수 있듯이, 베타 아밀로이드에는, 구리 이온에 대한 5 개의 결합 부위가 있고, 니켈 이온에 대한 8개의 결합 부위가 있다. 따라서, 본 발명의 금속-HRP으로 니켈-HRP을 사용할 경우, 하나의 베타 아밀로이드에 대하여 8개의 니켈-HRP이 결합하여 친화력이 가장 우수하므로, 발색반응이 잘 일어날 수 있다.

[0038] 또한, 금 나노입자와 베타 아밀로이드의 결합과, 베타 아밀로이드와 금속-HRP 의 결합은 농도 의존적이다. 따라서, 베타 아밀로이드의 농도가 높을수록, 금 나노입자에 더 많은 베타 아밀로이드가 결합할 수 있고, 이 금 나노입자에 결합된 베타 아밀로이드에 더 많은 금속-HRP가 결합할 수 있다.

[0039] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커의 이용방법을 도식화한 것이다. 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 과량의 금 나노입자에 첨가하면, 피검시료에 포함되어 있는 베타 아밀로이드는 양전하 값을 가지므로 음전하를 띄는 금 나노입자 표면과 정전기력에 의한 결합을 형성한다. 이 때, 니켈-HRP을 첨가하면, 상기 베타 아밀로이드-금 나노입자의 베타 아밀로이드에 니켈-HRP의 금속이 특이적으로 결합한다. 이 용액을 인산염 완충액으로 원심 분리하여 세척한 후, 상청액을 버리고 TMB기질을 첨가하고 배양한다. 그 결과 HRP와 TMB 기질이 반응하여 발색한다. 또한, 베타 아밀로이드와 금 나노입자의 결합과, 금속-HRP과 베타 아밀로이드의 결합은 농도 의존적이므로, 베타 아밀로이드의 농도가 높을수록, 더 많은 금속-HRP가 결합하여 더 진한 황색을 띄게 된다.

[0041] **베타 아밀로이드 농도의 확인방법**

[0042] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 베타 아밀로이드 농도 확인방법의 공정흐름도를 나타낸 것이다.

[0043] 도 2을 참조하면, 우선 금 나노입자에 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 첨가한다(S100).

[0044] 상기 피검시료는 혈액, 뇌 척수액, 콧물, 타액 등의 생체유체를 사용하여 제조할 수 있다. 피검시료는 사용할 베타 아밀로이드 농도에 따른 흡광도의 검정곡선의 베타 아밀로이드 농도 내에 포함되도록 제조하는 것이 바람직하다.

[0045] 베타 아밀로이드는 알츠하이머병의 중요지표로서 본 발명에 따른 바이오마커를 사용하여 베타 아밀로이드가 검출되면 이를 알츠하이머병의 진단에 활용할 수 있다.

[0046] 금 나노입자는 입자의 크기가 1 ~ 100 nm 인 것으로, 본 발명의 기술분야에서 알려진 통상의 것을 사용할 수 있다. 바람직하게는 나노 입자의 직경이 1 ~ 25 nm 일 수 있다. 또한, 상기 금 나노입자는 과량으로 투입한다.

[0047] 베타 아밀로이드는 상기 금 나노입자에 특이적으로 결합하여 금 나노입자-베타 아밀로이드 컨쥬게이트를 형성할 수 있다. 양전하 값을 갖는 베타 아밀로이드는 음전하를 띄는 금 나노입자 표면과 정전기력에 의한 결합을 형성한다. 따라서 금 나노입자에 피검시료를 첨가하여 접촉하게 하면, 피검시료 내의 베타 아밀로이드가 금 나노입자에 결합하여 금 나노입자-베타 아밀로이드 컨쥬케이트(결합체)를 형성한다.

[0049] 다음, 상기 S100 에서 얻은 용액에 금속-HRP를 첨가한다(S200).

[0050] 금속-HRP은 상기 금 나노입자-베타 아밀로이드 컨쥬케이트에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 금속은 베타 아밀로이드와 특이적으로 결합할 수 있는 것으로, 구리, 니켈, 아연, 카드뮴 중 선택된 어느 하나인 것이 바람직하고, 그 중 구리 또는 니켈이 더욱 바람직하며, 니켈이 가장 바람직하다.

[0052] 다음, 상기 S200 에서 얻은 용액에 TMB 기질을 첨가한다(S300).

[0053] 상기 TMB 기질은 HRP에 대한 기질로서, TMB 기질은 HRP와 결합하여 황색으로 발색반응을 한다.

[0054] 베타 아밀로이드와 금 나노입자의 결합과, 금속-HRP과 베타 아밀로이드의 결합은 농도 의존적이다. 따라서, 베타 아밀로이드의 농도가 높을수록, 금 나노입자에 더 많은 베타 아밀로이드가 결합할 수 있고, 베타 아밀로이드-금 나노입자에 더 많은 금속-HRP가 결합하여, TMB기질을 첨가했을 때 더 진한 황색을 나타낼 수 있다.

[0056] 다음, 상기 S300 에서 얻은 용액의 흡광도를 측정하여 베타 아밀로이드의 농도를 확인한다(S400).

[0057] 흡광도는 통상의 흡광도 측정기를 이용할 수 있고, 시료의 흡광도를 측정하여, 검정곡선과 비교하여 해당하는 베타 아밀로이드 농도를 확인할 수 있다.

[0058] 상기 베타 아밀로이드는 0 초과 10 nM/L이하의 농도에서 검출될 수 있고, 검출한계(LOD)는 0.22 nM/L 일 수 있다.

[0060] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0062] **실시예**

[0063] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 실험 재료

[0066] 금 나노입자: 구연산으로 씌워진(Citrate-capped) 금 나노입자는 Turkvich 방법에 따라 $HAuCl_4$의 구연산 삼 나트륨 환원(trisodium citrate reduction)을 사용하여 화학적으로 합성되었다. 제조에 필요한 유리기구들은 오염 방지를 위해 질산과 염산을 1:3 비율로 혼합한 Aqua regia 용액으로 세척 후 건조하였다. 38.8mM 구연산삼나트륨 1mL를 1mM $HAuCl_4$의 20mL 비등 용액에 분배했다. 용액을 30 분 동안 끓여서 wine-red solution을 생성하고 0.45 ㎛ 멤브레인 필터로 여과하고 4 ℃ 어두운 곳에서 보관하였다. 합성된 나노 입자는 SEM을 통해 분석되었고 크기 추정을 위해 이미지가 캡처되었다.

[0067] 피검시료의 준비: 베타 아밀로이드는 Genscript (Piscataway, New Jersey, United States)에서 구입한 $A\beta_{1-40}$를 사용하였다. 단량체 $A\beta_{1-40}$ 를 얻기 위해 동결 건조된 샘플을 HFIP에 희석했다. $A\beta_{1-40}$ 용액(2 mg/mL)의 획득된 용액을 실온에서 16 시간 동안 배양하였다. HFIP의 용매는 질소 가스에 의해 증발되었고 $A\beta_{1-40}$ 은 DMSO에서 재구성되었다. 형성된 $A\beta_{1-40}$ 단량체 용액(약 10 μM)의 스톡 용액은 -20 ℃에서 보관되었다.

[0068] Ni-HRP 및 TMB는 Thermo Scientific에서 구입했다. Milli-Q 물 (Millipore M-Q 정화 시스템, 18.2 MΩ cm)이 모든 실험에 사용되었다. 용액의 pH는 HCl 또는 NaOH (0.01 M) 용액으로 조정되었다.

[0070] 실시예 1: 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커를 위한 금속이온

[0071] (1) 금 나노입자는 여러 금속이온과 다양한 농도에서 응집한다. 금 나노입자(AuNP)의 응집은 금 나노입자의 응집을 나타내는 적색에서 청색으로 최소 수준의 색 변화를 일으키는 금속 이온을 선택하기 위해 연구되었다. 구연산 캡이 달린 20nm 금 나노입자는 구연산 나트륨을 사용하여 $HAuCl_4$를 환원시켜 제조하였다. 다양한 농도의 금속이온(Cu, Ni, Zn 및 Cd)을 금 나노입자 200 μL와 혼합하고 10 분 동안 배양하였다. 금 나노입자의 최소 응집 농도를 분석하기 위해 분광 광도계로 측정하였다. 분석은 650nm와 525nm에서 흡광도 비율을 취하여 수행하였다.

[0072] 도 3은 금 나노 입자와 다양한 금속 이온 (Cu, Ni, Zn 및 Cd)의 최소 응집 농도(MAC)를 나타낸 것이다. 도 3에 따르면, Cu와 Ni는 금 나노입자로의 최소 응집을 유발한다. 즉, Cd와 Zn의 경우에 8ppm에서 응집이 관찰된 반면, Cu와 Ni의 경우에 14ppm에서 금 나노입자 응집을 유도하는 것을 보여준다. 따라서, 12ppm Cu 및 Ni는 금 나노입자에서 $A\beta_{1-40}$ 및 HRP의 버링으로 인한 색상 변화 및 신호 손실로 이어질 수 있는 응집을 일으키지 않고, 금 나노입자에 최적의 결합과 더 많은 이온 장식을 제공한다. 금 나노입자의 응집이 본질적으로 협력적이라는 점을 고려하면, 모든 금 나노입자가 MAC 이전에 금속 이온으로 덮여있음을 나타낸다. 이것은 Ni 및 Cu로 금 나노입자 응집을 유도하기 위해 더 많은 이온이 필요하다는 것을 나타내므로, 베타 아밀로이드($A\beta_{1-40}$)와 추가 분석을 위해 Ni 및 Cu를 선택하였다.

[0073] (2) 베타 아밀로이드($A\beta_{1-40}$)과 Cu 및 Ni 이온의 결합 잠재력은 Metal Ion-Binding 사이트 예측 및 도킹 서버 (http://bioinfo.cmu.edu.tw/MIB/)를 사용하여 검증되었다. 또한, $A\beta_{1-40}$에 대한 Cu와 Ni 이온의 결합능 분석을 위해 고분해능 전자 분무 이온화 질량 분석법(HR ESI-MS)을 실시하였다.

[0074] 도 4a는 MIB 서버에 의한 Ni 및 Cu를 사용한 $A\beta_{1-40}$의 예측 및 도킹 분석결과를 나타낸다. 도 4a에 따르면, $A\beta_{1-40}$은 8 개의 체인으로 구성되고, 도킹 예측 및 에너지 점수(1.6 결합 컷오프 한계)는 $A\beta_{1-40}$의 5 개 사슬이 Cu와 결합할 수 있는 반면, Ni는 $A\beta_{1-40}$의 8 개 사슬 모두와 결합할 수 있음을 보여주었다. 이는 Ni이 $A\beta_{1-40}$에 대해 더 높은 친화성을 가짐을 나타낸다.

[0075] 도 4b는 (ⅰ) $A\beta_{1-40}$, (ii) Cu와 혼합된 $A\beta_{1-40}$, 및 (iii) Ni과 혼합된 $A\beta_{1-40}$ 대하여 ESI-MS 테스트한 결과이다. 이에 따르면, $A\beta_{1-40}$ 펩타이드가 구리 이온보다 니켈 이온에 대해 더 높은 친화성을 가지고 있음을 보여주었다. 따라서, MIB 예측 및 ESI-MS 결과를 기반으로 베타 아밀로이드 검출 및 농도측정을 위해 니켈 이온을 사용하는 것이 가장 적합함을 확인하였다.

[0077] 실시예 2: UV-Vis 스펙트럼과 Zetasizer Nano에 의한 $A\beta_{1-40}$, AuNP 및 Ni-HRP의 접합 분석

[0078] 5 가지 농도의 $A\beta_{1-40}$(0, 100 nM/L, 500 nM/L, 1 μM/L 및 1.5 μM/L)을 200 μL의 AuNP(0.5 nM/L)와 혼합하고 5 분 동안 배양하였다. 상온에서 14,000 rpm으로 10 분 동안 4 ℃에서 원심 분리한 후 상층액을 버리고 펠릿을 200μL 인산 완충액(50mM/L Na phosphate, 150mM/L NaCl)에 재현탁하고 분광 광도계로 분석하였다. 그 후, $A\beta_{1-40}$ 1 μM/L를 200 μL의 AuNP와 함께 배양하고 원심 분리한 후 상층액을 버렸다. $A\beta_{1-40}$와 AuNP을 결합시킨 후, 100 μL의 Ni-HRP(용액에서 12ppm의 최종 농도를 얻기 위해 희석됨)를 복합체에 첨가했다. 다시, AuNP-$A\beta_{1-40}$와 Ni-HRP의 용액을 원심 분리하고 200 μL 인산완충액(phosphate buffer)에 재현탁 했다. AuNP-$A\beta_{1-40}$ 및 AuNP-$A\beta_{1-40}$-Ni-HRP는 모두 UV-Vis 스펙트럼 측정으로 분석되었다. 또한, AuNP-$A\beta_{1-40}$ 및 AuNP-$A\beta_{1-40}$-Ni-HRP의 입자 크기는 제타사이저(Zetasizer)를 사용하여 측정되었다.

[0079] 도 5는 AuNP의 크기와 AuNP에 대한 $A\beta_{1-40}$의 결합력을 나타낸 것이다. 도 5의 (ⅰ)과 (ii)에 따르면, SEM에 의해 관찰된 합성된 AuNPs 나노 입자의 직경은 ~ 25nm이었다. (iii)에 따르면 $A\beta_{1-40}$와 AuNP의 결합은 농도 의존적임을 알 수 있다. AuNPs 용액에 $A\beta_{1-40}$을 추가하면 정규화된 흡광도(Absorbance)는 525nm에서 $A\beta_{1-40}$의 양이 증가함에 따라 농도 의존적 추세로 증가하였다. (iv)의 흡광도 차(Change in absorbance at 525 nm)는 AuNP-$A\beta_{1-40}$샘플의 UV-Vis 스펙트럼 값에서 AuNP 만(AuNP only)의 샘플의 UV-Vis 스펙트럼 값을 빼서 계산하였다. 이는 1 μM의 $A\beta_{1-40}$을 추가한 후 포화되어 AuNP의 모든 결합 부위가 $A\beta_{1-40}$이 차지하고 있음을 나타낸다.

[0080] AuNP-$A\beta 1_{1-40}$에 대한 Ni-HRP의 결합을 평가하기 위해 AuNP에 1μM/L $A\beta_{1-40}$을 첨가하고 AuNP-$A\beta_{1-40}$을 원심 분리하여 분리한 후 Ni-HRP를 혼합물에 첨가하고, 원심 분리 정제, 재구성하고, 분광 광도계 및 나노 제타사이저로 분석하였다.

[0081] 도 6은 AuNP, AuNP-$A\beta_{1-40}$, AuNP-$A\beta_{1-40}$-Ni-HRP에 대한 (ⅰ) UV-Vis 스펙트럼과 (ii) 나노 제타사이저 분석결과이다. 이에 따르면, (ⅰ) AuNP-$A\beta_{1-40}$-Ni-HRP의 흡광도는 AuNP-$A\beta_{1-40}$ 흡광도보다 높고, (ii) 나노 제타사이저는 $A\beta_{1-40}$ 과 Ni-HRP를 첨가함에 따라 평균 직경의 증가를 보였다. 코팅되지 않은 AuNP의 크기는 ~ 25nm이었고, 각각 $A\beta_{1-40}$ 및 Ni-HRP를 추가하면 ~ 28nm 및 ~ 35nm로 증가했다.

[0083] 실시예 3: 베타 아밀로이드($A\beta_{1-40}$)의 검출

[0084] 표준 샘플 내 $A\beta_{1-40}$ 과 혈청(sigma Aldrich) 내의 $A\beta_{1-40}$ 을 다음과 같은 방법으로 확인하였다. $A\beta_{1-40}$의 다양한 농도(0-10 nM)에 대해, 100 μL의 $A\beta_{1-40}$을 원심분리 튜브의 AuNPs 용액(200 μL)에 첨가하고 실온에서 5 분 동안 배양한 후 원심 분리하고 상층액을 버렸다. 그 후, 100 μL의 Ni-HRP를 펠릿에 첨가하고 5 분 동안 배양하였다. 이 복합체를 인산염 완충액으로 4 ℃에서 5 분 동안 14,000rpm에서 3 회 원심 분리하여 세척했다. 최종 세척 후, 상청액을 버리고 100 μL TMB를 분배하고 37 ℃ 암실에서 5 분 더 배양했다. 100 μL의 2 M/L H2SO4를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 이 용액을 96 웰 플레이트에 피펫팅하고 흡광도 값을 마이크로 플레이트 리더로 450nm에서 측정했다.

[0085] 도 7은 본 발명에 따른 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 베타 아밀로이드 농도의 확인방법의 성능을 나타낸 것이다. (i) 피팅된 곡선을 보여주는 삽화의 표준 샘플 및 (ii) 피팅된 곡선을 보여주는 삽화의 혈청 샘플에서 $A\beta_{1-40}$의 검출 결과이다. 오차 막대는 5회 반복 실험의 표준 편차를 나타내며 피팅 곡선과 함께 표시되었다. 도 7의 (i)을 참조하면, 0 내지 10 nM / L 범위의 다양한 농도의 $A\beta_{1-40}$을 사용하여 표준 곡선을 생성하고 검출한계(LOD)를 얻었다. 450 nm에서의 흡광도는 $A\beta_{1-40}$ 농도가 5 nM/L 까지 증가함에 따라 증가한 다음 포화된다. LOD는 LOD = 3*(σ/slope), (여기서, σ=standard deviation of intercept (SDI))에 의해 표준 곡선으로부터 계산되었다. σ와 slope는 각각 0.026359와 0.39177로 나타났다. 따라서 표준 곡선의 LOD는 0.22 nM/L이다.

[0086] 도 7의 (ii)은 실제 적용 가능성을 평가하기 위해 0-10 nM/L 범위의 다양한 농도로 혈청에 스파이크된 $A\beta_{1-40}$에 대한 흡광도 기반 곡선을 나타낸 것이다. 혈청 샘플로 얻은 곡선의 σ는 0.026866이고 slope는 0.3733이었으며

LOD는 0.237501 nM/L으로 기존의 방법들에 비해 그 성능이 우수함을 확인하였다.

[0087] μM/L ~ 0.5 nM/L 범위의 감도를 제공하는 $A\beta_{1-40}$의 다른 금 나노 입자 기반 비색계 검출, 기타 비색계 센서 또는 현장 진료 방법과 비교하면, 본 발명의 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 베타 아밀로이드 농도의 확인 방법은 두 배 이상의 LOD 수준을 제공하여 민감도가 뛰어남을 알 수 있다.

[0088] 본 발명에 따른 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 베타 아밀로이드 농도의 확인방법은 1) 복잡한 합성 또는 생체 분자의 추출이 필요하지 않고 빠르고(~ 30 분) 간단한 분석이고, 2) 적은 양의 피검시료를 필요로 하며(100 μL 샘플), 3) 금 나노입자에 대한 베타 아밀로이드의 높은 친화성으로 인해 민감도와 선택성이 우수하고, 4) 항체를 사용하지 않고, 5) 친환경적이며, 6) 간단한 장비로 확인할 수 있어 저가로 수행할 수 있는 장점이 있다. 또한, 표준 샘플 및 혈청 샘플에서 각각 0.22 nM/L 및 0.237501 nM/L의 LOD를 얻어 뛰어난 성능을 확인하였다.

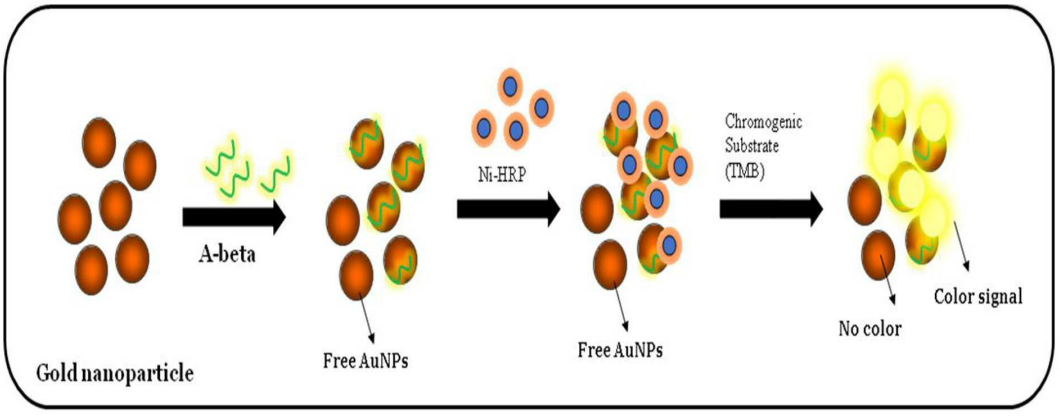
[0090] 지금까지 본 발명에 따른 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 관한 구체적인 실시예에 관하여 설명하였으나, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않는 한도 내에서는 여러 가지 실시 변형이 가능함은 자명하다.

[0091] 그러므로 본 발명의 범위는 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 안 되며, 후술하는 특허청구범위뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 한다.

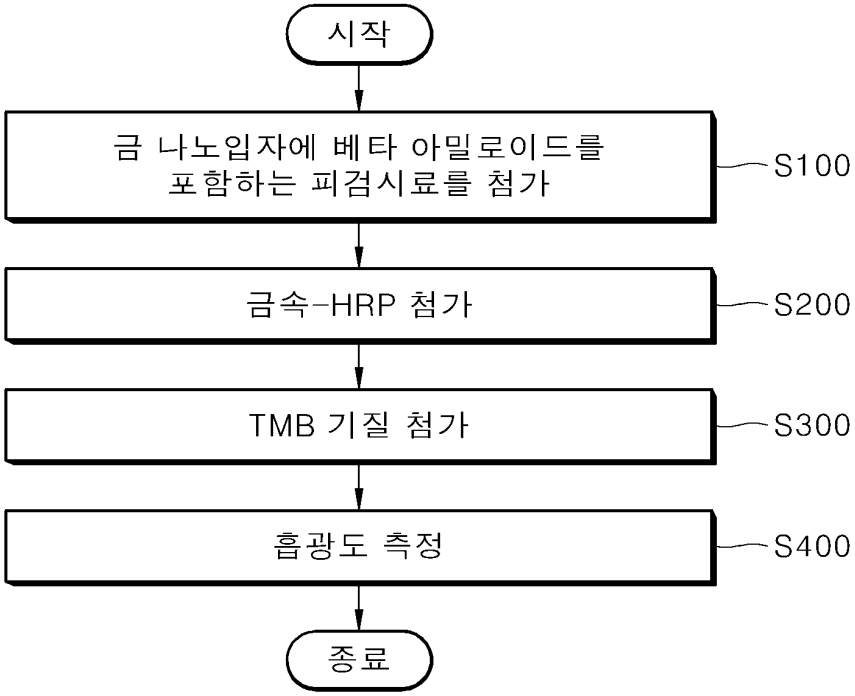
[0092] 즉, 전술된 실시예는 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로 이해되어야 하며, 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술될 특허청구범위에 의하여 나타내어지고, 그 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

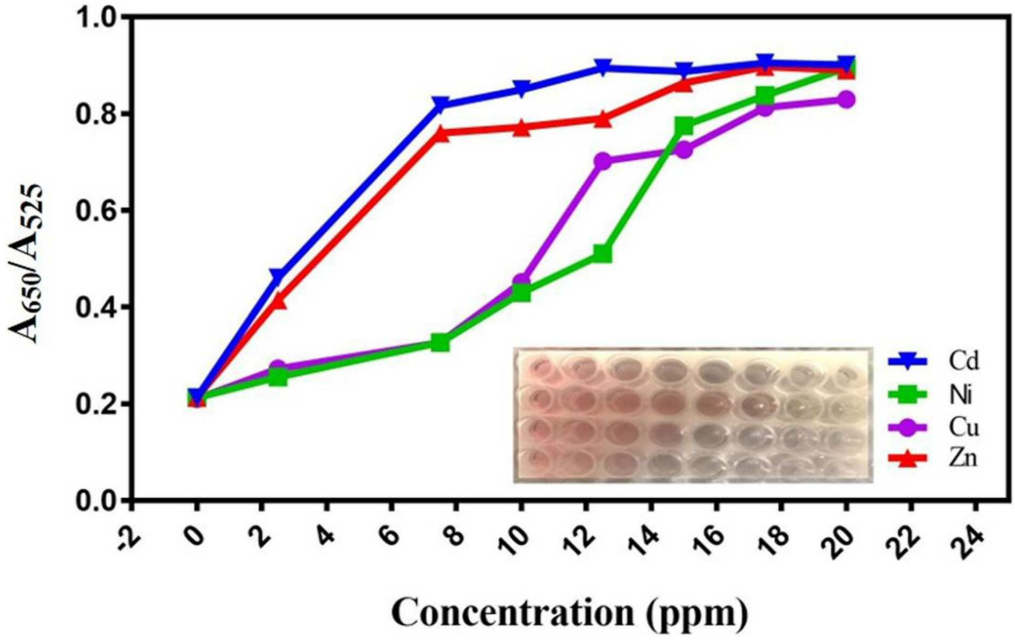
도면1



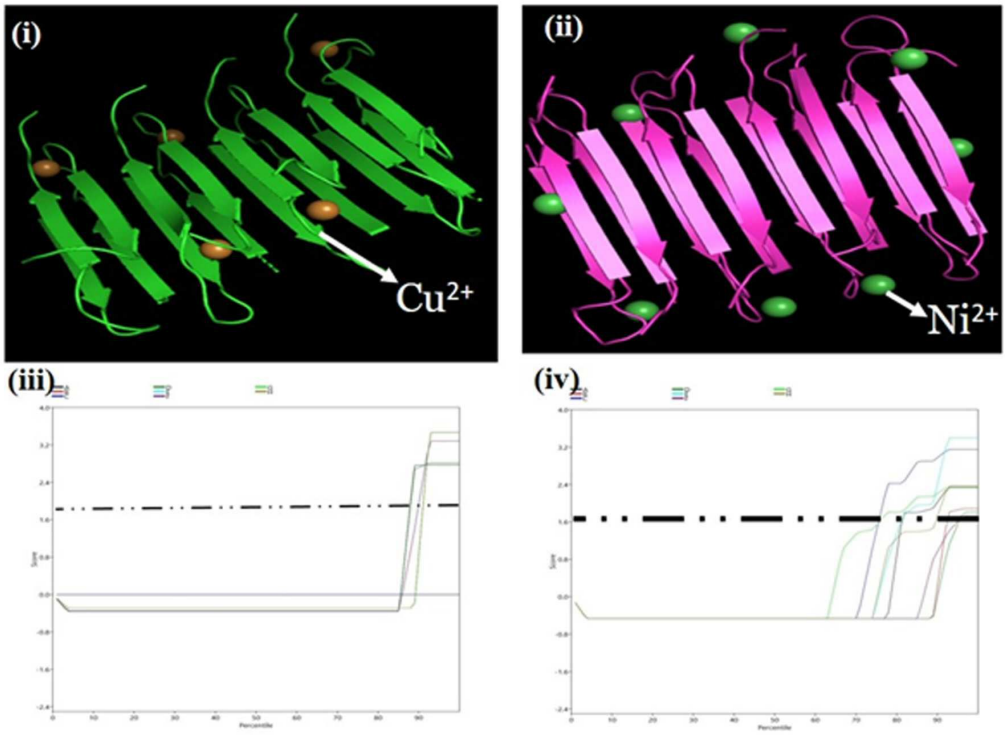
도면2


시작
금 나노입자에 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 첨가
S100
금속-HRP 첨가
S200
TMB 기질 첨가
S300
흡광도 측정
S400
종료

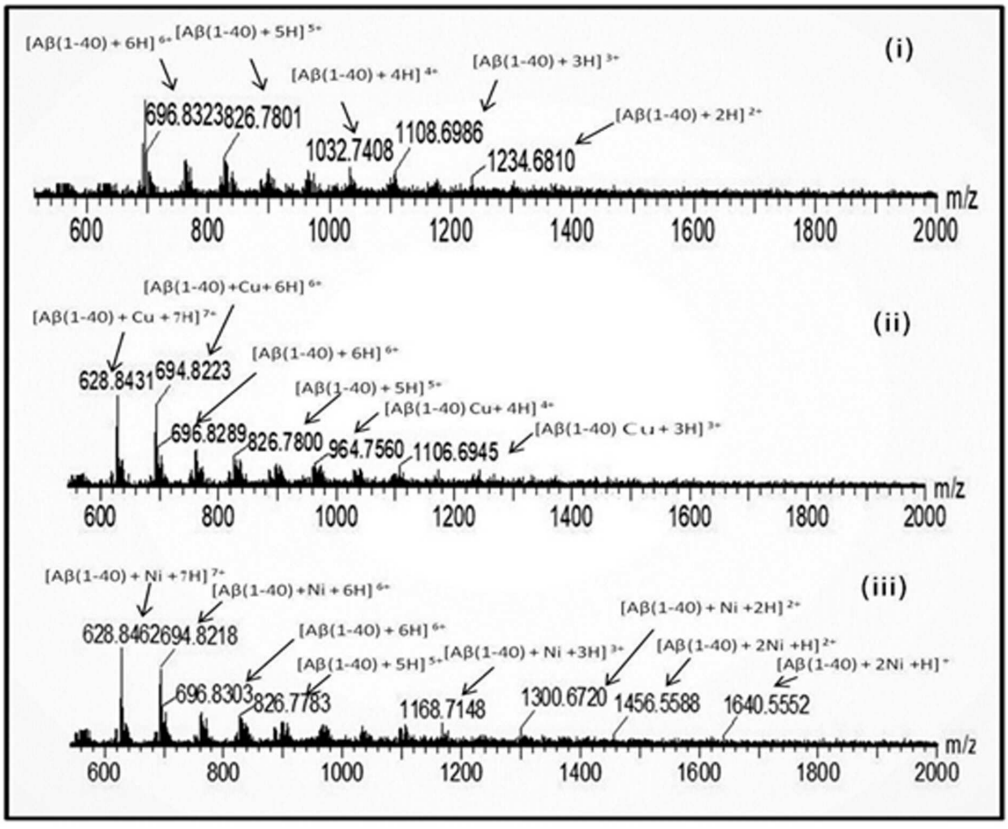
도면3


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
A650/A525
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
Concentration (ppm)
Cd
Ni
Cu
Zn

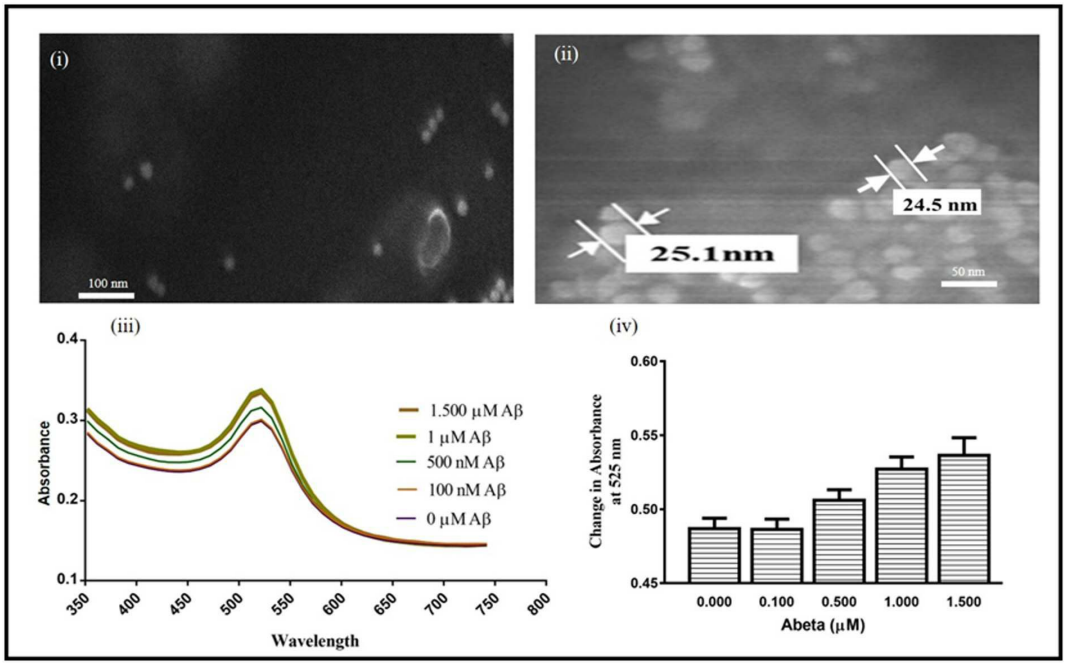
도면4a


(i)
Cu2+
(ii)
Ni2+
(iii)
(iv)

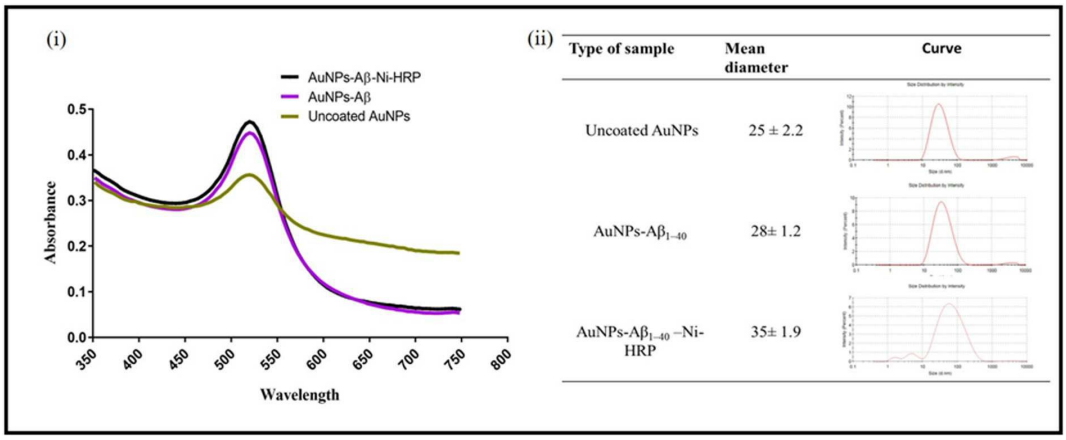
도면4b


(i)
[Aβ(1-40) + 6H] 6+
[Aβ(1-40) + 5H] 5+
[Aβ(1-40) + 4H] 4+
[Aβ(1-40) + 3H] 3+
[Aβ(1-40) + 2H] 2+
696.8323
826.7801
1032.7408
1108.6986
1234.6810
m/z
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
(ii)
[Aβ(1-40) + Cu + 7H] 7+
[Aβ(1-40) + Cu + 6H] 6+
[Aβ(1-40) + 6H] 6+
[Aβ(1-40) + 5H] 5+
[Aβ(1-40) Cu + 4H] 4+
[Aβ(1-40) Cu + 3H] 3+
628.8431
694.8223
696.8289
826.7800
964.7560
1106.6945
(iii)
[Aβ(1-40) + Ni + 7H] 7+
[Aβ(1-40) + Ni + 6H] 6+
[Aβ(1-40) + Ni + 3H] 3+
[Aβ(1-40) + Ni + 2H] 2+
[Aβ(1-40) + 2Ni + H] 2+
[Aβ(1-40) + 2Ni + H] +
628.8462
694.8218
696.8303
826.7783
1168.7148
1300.6720
1456.5588
1640.5552

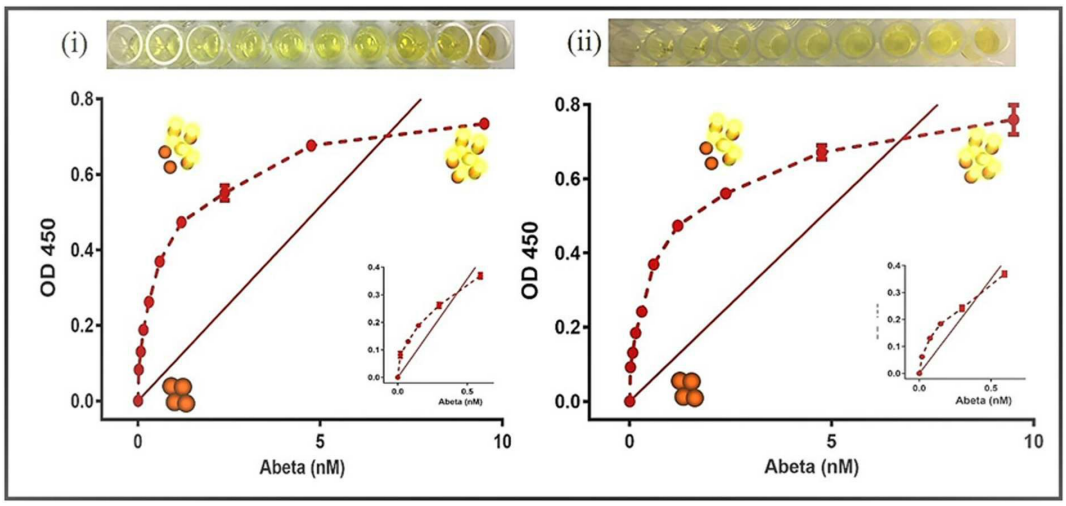
도면5


(i)
100 nm
(ii)
24.5 nm
25.1nm
50 nm
(iii)
Absorbance
Wavelength
1.500 μM Aβ
1 μM Aβ
500 nM Aβ
100 nM Aβ
0 μM Aβ
(iv)
Change in Absorbance at 525 nm
Abeta (μM)
0.000
0.100
0.500
1.000
1.500

도면6


(i)
AuNPs-Aβ-Ni-HRP
AuNPs-Aβ
Uncoated AuNPs
Absorbance
Wavelength
(ii)
Type of sample
Mean diameter
Curve
Uncoated AuNPs
25 ± 2.2
AuNPs-Aβ1–40
28± 1.2
AuNPs-Aβ1–40 –Ni-HRP
35± 1.9

도면7


(i)
(ii)
OD 450
Abeta (nM)