



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월04일
(11) 등록번호 10-2248503
(24) 등록일자 2021년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6806 (2018.01) C12Q 1/686 (2018.01)
B82Y 5/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6806 (2018.05)
C12Q 1/686 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0155866
(22) 출원일자 2019년11월28일
심사청구일자 2019년11월28일
(56) 선행기술조사문헌
JP2007097551 A*
JP2012510296 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이태운
서울특별시 광진구 아차산로 503-23 광장청구아파트 104동 808호
진비용
대전 유성구 대학로141번길 45, 201호
(74) 대리인
특허법인주원

전체 청구항 수 : 총 3 항

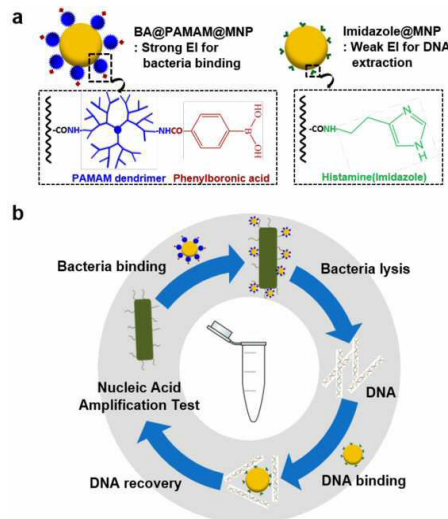
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 핵산 증폭 분석용 시료 전처리 방법

(57) 요약

본 발명은 핵산 증폭 분석용 시료 전처리 방법 및 키트에 관한 것으로, 본 발명에 따른 시료 전처리 방법은 병원 체 농축 및 유전물질 추출을 하나의 튜브에서 진행함에 따라 보다 많은 유전물질을 얻음으로써 분자진단기술을 이용한 검출기술의 민감도를 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B82Y 5/00 (2013.01)

C12Q 2563/155 (2013.01)

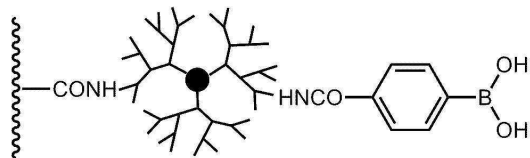
명세서

청구범위

청구항 1

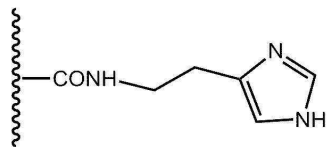
- 1) 하기 화학식 1로 표시되는 제1 자성나노입자를 제조하는 단계;
- 2) 하기 화학식 2로 표시되는 제2 자성나노입자를 제조하는 단계;
- 3) 상기 제1 자성나노입자로 분리된 샘플을 처리하여 병원체를 제거하는 단계;
- 4) 상기 샘플로부터 상기 병원체가 부착된 제1 자성나노입자를 분리하는 단계;
- 5) 상기 분리된 병원체를 용해시켜 DNA를 추출하는 단계;
- 6) 상기 추출된 DNA에 상기 제2 자성나노입자를 투입하는 단계;
- 7) 상기 제2 자성나노입자가 DNA에 부착되는 단계; 및
- 8) 상기 DNA가 부착된 제2 자성나노입자로부터 DNA를 용출시키는 단계;를 포함하고, 1) 내지 8) 단계는 단일 튜브에서 분석되는 것을 특징으로 하는 핵산 증폭 분석용 시료 전처리 방법

[화학식 1]



{상기 화학식 1에서,  은 자성나노입자이며,  은 폴리아미도아민(polyamidoamine; PAMAM)이다.}

[화학식 2]



{상기 화학식 2에서,  은 자성나노입자이다.}

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

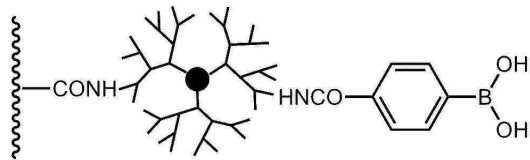
제1항에 있어서, 상기 병원체는 박테리아, 균류 또는 바이러스를 포함하는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 하는 핵산 증폭 분석용 시료 전처리 방법

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 제1 자성나노입자를 포함하는 조성물; 및

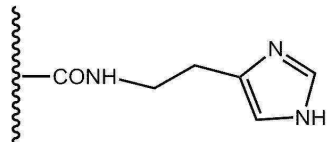
하기 화학식 2로 표시되는 제2 자성나노입자를 포함하는 조성물;을 포함하고, 병원체 농축 및 DNA 추출이 단일 튜브에서 분석되는 것을 특징으로 하는 핵산 증폭 분석용 시료 전처리용 키트

[화학식 1]



{상기 화학식 1에서,  은 자성나노입자이며,  은 폴리아미도아민(polyamidoamine; PAMAM)이다.}

[화학식 2]



{상기 화학식 2에서,  은 자성나노입자이다.}

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단일 튜브 기반 핵산 증폭 분석용 시료 전처리 방법 및 시료 전처리 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 감염병 진단을 위해 채취한 시료들 내에는 감염병을 일으키는 원인물질인 병원체 외에 다른 물질들이 존재하며, 이는 분자진단기술을 이용한 검출단계에서 저해 요소가 될 수 있다. 이를 해결하기 위한 기존 방법으로는, 1) 고속 원심분리법을 이용하여 원인물질을 분리하는 방법과 2) 세포 배양 기술을 이용하여 원인물질의 양을 늘리는 방법들이 있으나, 원인물질이 극미량인 경우 적용이 어렵다. 이에 병원체를 분리하기 위한 다양한 방법들이 개발되고 있으나, 대부분의 병원체 분리 기술은 생화학적 친화성을 기반으로 한 항원-항체를 이용하는 방식으로, 이는 감염성 질환 원인물질을 분리하기 위한 항체가 존재하지 않는 경우, 원인물질이 여러 표현형을 가져 단일 항체 사용이 어려운 경우 및 존재하는 항체의 친화도가 분리에 적용하기 어려운 경우들이 존재한다.

[0003] 한편, 검출 기술의 민감도를 증가시켜 극미량의 병원균을 검출해내기 위해서는 시료의 순도를 높일 수 있는 샘플 내 병원체의 농축이 필수적이다. 이에 표적 병원체의 신속한 농축을 위해 원심분리, 자기분리 및 미세유체분

리에 기초한 비 배양 방법이 개발되었다. 최근, 병원체 농축과 DNA 추출이 통합된 방법이 개발되었으며, 그 예로, 하나의 마이크로 칩에 병원체 농축 및 DNA 추출이 통합되어 10^3 CFU/mL의 검출한계를 갖는 마이크로 칩 기반 원스텝 방법이 개발되었다(Biosens Bioelectron 2018, 99, 62-69). 그러나 이 방법은 DNA 추출 처리 시간은 감소시켰으나, 병원체 농축을 및 DNA 회수율이 낮아 검출 감도가 낮은 한계가 있었다. 또 다른 예로는, 샘플 처리과정이 통합된 원심 마이크로 장치가 보고되었으나(Biosens Bioelectron 2019, 136, 132-139), 대량 샘플 처리(>1 mL)가 불가능하며, 검출한계가 높은 한계가 있었다(최대 10^2 CFU/mL). 따라서 전체 공정이 통합된 단일 튜브 분석에서 시료 손실 및 처리 시간을 줄이고 대량의 시료를 처리할 수 있으며, 교차 오염을 방지할 수 있는 기술이 요구된다.

[0004] 한편, 자성나노입자는 외부 자기장 존재 시에만 자성의 특성을 갖는 초상자성을 띠는 물질로, 세포의 분리, 유전자 클로닝, 바이오센서, MRI 등 의학분야에 널리 적용되고 있다. 이러한 자성나노입자의 표면을 지질이나 폴리머 등으로 안정화시킨 후 다양한 리간드를 도입할 경우 DNA/RNA, 단백질, 박테리아, 바이러스, 암세포 등을 간단한 자석만으로 효과적으로 분리할 수 있다.

[0005] 이에 본 발명자는 자성나노입자를 이용하여 병원체 원인물질의 분리 기술과 병원체 유전물질의 추출 기술을 통합한 기술을 개발하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기 문제점을 해결하기 위해 본 발명은 병원체 분리 및 유전물질의 분리가 단일 튜브에서 가능하여 간단하고 신속하며 검출 감도가 향상된 핵산 증폭 분석용 시료 전처리 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

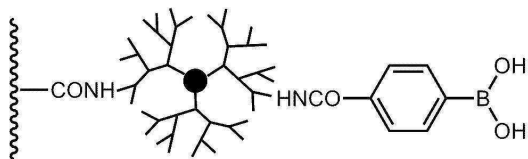
[0008] 또한, 다른 측면에서 본 발명은 핵산 증폭 분석용 시료 전처리 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 1) 제1 자성나노입자를 제조하는 단계; 2) 제2 자성나노입자를 제조하는 단계; 3) 상기 제1 자성나노입자로 샘플을 처리하여 병원체를 제거하는 단계; 4) 상기 샘플로부터 상기 병원체가 부착된 제1 자성나노입자를 분리하는 단계; 5) 상기 분리된 병원체를 용해시켜 DNA를 추출하는 단계; 6) 상기 추출된 DNA에 상기 제2 자성나노입자를 투입하는 단계; 7) 상기 제2 자성나노입자가 DNA에 부착되는 단계; 및 8) 상기 DNA가 부착된 제2 자성나노입자로부터 DNA를 용출시키는 단계;를 포함하는 핵산 증폭 분석용 시료 전처리 방법을 제공한다.

[0011] 상기 제1 자성나노입자는 카르복실기로 기능화된 자성나노입자-폴리아미도아민(polyamidoamine)-페닐보론산(phenylboronic acid)으로 이루어지며, 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 한다.

[0012] [화학식 1]

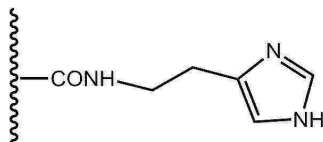


[0013]

[0014] {상기 화학식 1에서,  은 자성나노입자이며,  은 폴리아미도아민(polyamidoamine; PAMAM)이다.}

[0015] 상기 제2 자성나노입자는 카르복실기로 기능화된 자성나노입자-히스타민(histamin)으로 이루어지며, 하기 화학식 2로 표시되는 것을 특징으로 한다.

[0016] [화학식 2]



[0017]

- [0018] {상기 화학식 2에서, $\{$ 은 자성나노입자이다.}
- [0019] 또한 상기 제2 자성나노입자는 전하-가역적 특성을 가지며, DNA와 바인딩 특성을 갖는다.
- [0020] 상기 핵산 증폭 분석용 시료 전처리 방법은 단일 튜브에서 분석되는 것을 특징으로 하며, 상기 병원체는 박테리아, 균류 또는 바이러스를 포함한다.
- [0021] 또한 다른 측면에서 본 발명은 카르복실기로 기능화된 자성나노입자-폴리아미도아민(polyamidoamine)-페닐보론산(phenylboronic acid)으로 이루어진 제1 자성나노입자를 포함하는 조성물; 및 카르복실기로 기능화된 자성나노입자-히스타민(histamin)으로 이루어진 제2 자성나노입자를 포함하는 조성물;을 포함하는 핵산 증폭 분석용 시료 전처리용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따른 핵산 증폭 분석용 시료 전처리 방법은 병원체 농축 및 유전물질 추출을 하나의 튜브에서 진행함에 따라 보다 많은 유전물질을 얻음으로써 분자진단기술을 이용한 검출기술의 민감도를 증가시킬 수 있으며, 기존의 배양법 및 PCR 방법의 한계를 극복하여 각종 감염성 질환의 원인물질을 빠르고 신속하게 분리할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 a) 제1 자성나노입자와 제2 자성나노입자의 구조 및 b) 본 발명에 따른 시료 전처리 방법의 순서도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 시료 전처리 방법의 순서도를 나타낸 것이다.
- 도 3은 제1 자성나노입자와 제2 자성나노입자의 ATR-FT-IR 그래프를 나타낸 것이다.
- 도 4는 a) 제타전위 측정 및 동적광산란분석법을 이용한 입자들의 유체역학적 반경을 측정한 그래프, b) PAMAM@MNPs와 BA@PAMAM@MNPs의 pH 변화에 따른 제타전위 측정 그래프, c) 및 d) X선광전자분석법을 이용한 자성나노입자들에 결합된 PAMAM 덴드리머와 페닐보론산의 결합비율 분석 그래프를 나타낸 것이다.
- 도 5는 a) BA@PAMAM@MNPs의 DNA 흡착 방지 메커니즘, b) 병원체 결합 효율 측정 그래프 및 c) DNA 분리 효율 측정 그래프를 나타낸 것이다.
- 도 6은 Imidazole@MNPs의 pH 변화에 따른 제타전위 측정 그래프를 나타낸 것이다.
- 도 7은 a) Imidazole@MNPs의 DNA 회수 성능 평가 그래프, b) PBS에서의 *S. Typhimurium* 검출 그래프, c) 인간 소변에서의 *S. Typhimurium* 검출 그래프 및 d) 인간 소변에서의 *B. ovis*, *S. Typhimurium* 및 *E. coli* 검출 그래프를 나타낸 것이다.
- 도 8은 우유에서의 *S. Typhimurium* 검출 그래프를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 본 발명을 설명함에 있어, 관련된 공지 구성 또는 기능에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략한다.
- [0027] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 달리 언급하지 않는 한, 하기 용어의 의미는 하기와 같다:
- [0028] 본 명세서에서 사용된 용어 "자성나노입자"는 이하 "MNPs"와 동일한 것으로 이해되어야 한다.
- [0029] 본 명세서에서 사용된 용어 "폴리아미도아민" 또는 "polyamidoamine"은 이하 "PAMAM"과 동일한 것으로 이해되어야 한다.
- [0030] 본 명세서에서 사용된 용어 "페닐보론산" 또는 "phenylboronic acid"는 이하 "BA"와 동일한 것으로 이해되어야 한다.
- [0031] 본 명세서에서 사용된 용어 "PAMAM@MNPs"는 카르복실기로 기능화된 자성나노입자-폴리아미도아민으로 이루어진 자성나노입자를 의미한다.
- [0032] 본 명세서에서 사용된 용어 "BA@PAMAM@MNPs"는 카르복실기로 기능화된 자성나노입자-폴리아미도아민-페닐보론산

으로 이루어진 자성나노입자를 의미한다.

[0033] 본 명세서에서 사용된 용어 "Imidazole@MNPs"는 카르복실기로 기능화된 자성나노입자-히스타민으로 이루어진 자성나노입자를 의미한다.

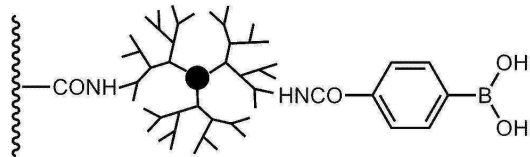
[0034] 본 명세서에서 사용된 용어 "정전기적 상호작용" 또는 "electrostatic interaction"은 이하 "EI"와 동일한 것으로 이해되어야 한다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 용어 "단일 튜브 이중-EI 전략" 또는 "dual-EI strategies of a single tube"는 이하 "DESIGN"과 동일한 것으로 이해되어야 한다.

[0037] 본 발명은 1) 제1 자성나노입자를 제조하는 단계; 2) 제2 자성나노입자를 제조하는 단계; 3) 상기 제1 자성나노입자로 샘플을 처리하여 병원체를 제거하는 단계; 4) 상기 샘플로부터 상기 병원체가 부착된 제1 자성나노입자를 분리하는 단계; 5) 상기 분리된 병원체를 용해시켜 DNA를 추출하는 단계; 6) 상기 추출된 DNA에 상기 제2 자성나노입자를 투입하는 단계; 7) 상기 제2 자성나노입자가 DNA에 부착되는 단계; 및 8) 상기 DNA가 부착된 제2 자성나노입자로부터 DNA를 용출시키는 단계;를 포함하는 핵산 증폭 분석용 시료 전처리 방법을 제공한다(도 1b 및 도 2 참조).

[0038] 상기 제1 자성나노입자는 카르복실기로 기능화된 자성나노입자-폴리아미도아민(polyamidoamine)-페닐보론산(phenylboronic acid)으로 이루어지며, 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.

[0039] [화학식 1]

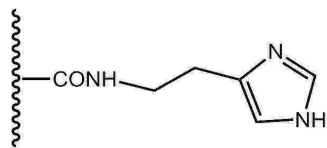


[0040]

[0041] {상기 화학식 1에서, 은 자성나노입자이며, 은 폴리아미도아민(polyamidoamine; PAMAM)이다.}

[0042] 상기 제2 자성나노입자는 카르복실기로 기능화된 자성나노입자-히스타민(histamin)으로 이루어지며, 하기 화학식 2로 표시될 수 있다. 또한 상기 제2 자성나노입자는 전하-가역적 특성을 가지며, DNA와 바인딩 특성을 갖는다.

[0043] [화학식 2]



[0044]

[0045] {상기 화학식 2에서, 은 자성나노입자이다.}

[0046] 상기 핵산 증폭 분석용 시료 전처리 방법은 단일 튜브에서 병원체의 분리와 유전물질의 분리가 가능하며, 상기 병원체는 박테리아, 균류 또는 바이러스를 포함한다.

[0048] 또한 다른 측면에서 본 발명은 카르복실기로 기능화된 자성나노입자-폴리아미도아민(polyamidoamine)-페닐보론산(phenylboronic acid)으로 이루어진 제1 자성나노입자를 포함하는 조성물; 및 카르복실기로 기능화된 자성나노입자-히스타민(histamin)으로 이루어진 제2 자성나노입자를 포함하는 조성물;을 포함하는 핵산 증폭 분석용 시료 전처리용 키트를 제공한다.

[0050] 도 1a를 참조하면, PAMAM@MNPs는 EDC 커플링 반응을 통해 PAMAM 덴드리머와 카르복실기로 기능화된 MNPs가 직접 가교되어 제조되며, BA@PAMAM@MNPs는 BA가 PAMAM@MNPs와 아미드 결합을 형성하여 제조된다. Imidazole@MNPs는 EDC 커플링 반응을 통해 아미노기(-NH₂)를 갖는 이미다졸 프로브인 히스타민(histamine)이 카르복실기로 기능화된 MNPs와 가교되어 공유결합하여 제조된다.

[0051] 병원체의 표면에는 당단백질들이 분포되어 있으며, 이는 음전하를 띠고 있다. 그러므로 자성나노입자가 양전하

를 가지게 되면 음전하를 띠는 병원체와 결합할 수 있다. 그러나 이 경우 음전하를 가지는 유전물질도 함께 결합되어 유전물질의 추출에 치명적인 약점을 갖는다. 이에 본 발명은 양전하를 띠는 PAMAM 위에 유전물질의 결합과 분리를 용이하게 하기 위한 페닐보론산을 결합시킴으로써, 병원체와 강한 결합은 가능하나, 유전물질의 경우 결합력이 떨어지는 제1 자성나노입자를 이용하였다. 또한, 이미다졸기를 갖는 제2 자성나노입자는 pH의 변화에 따라 전하가 역전되는 특성을 가져 DNA 추출에 이용할 수 있다.

[0053] 이하에서, 본 발명의 실시예를 들어 구체적으로 설명하지만, 본 발명의 하기 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0055] **실시예 1. BA@PAMAM@MNPs 제조**

[0056] 1-1) PAMAM@MNPs 제조예

[0057] 자성나노입자(이하, MNPs로 약기함)는 카르복실기로 기능화된 자성나노입자(Carboxyl-Adembeads 0213, Ademtech SA, FESSAC, France)를 이용하였다.

[0058] 먼저, MNPs 5 μ L를 활성화 완충액($1\times$, Product #: 10101, Ademtech SA, FESSAC, France) 500 μ L로 1회 세척하였다. 이어서, 8.1 mg/mL EDC/NHS (EDC:NHS=1:1, w/w)를 함유하는 $1\times$ 활성화 완충액 500 μ L를 MNPs가 들어있는 튜브에 첨가하고 550 rpm, 37 $^{\circ}$ C 조건하에서 3시간 동안 배양한 후, MNPs를 자성 침전시켜 상청액을 제거하고 $1\times$ 활성화 완충액 500 μ L에 재분산시켰다. 이어서, polyamidoamine dendrimer generation 3.0 (이하, PAMAM G.3으로 약기함; PAMAM G.3:MNPs의 카르복실기는 몰비 약 5임) 용액 12.0 μ L를 첨가한 후, 550 rpm, 37 $^{\circ}$ C 조건하에서 3시간 동안 연속 배양하였다. 그 후 수득한 PAMAM@MNPs를 탈 이온수 500 μ L로 2회 세척하고 탈 이온수 500 μ L에 분산시켜 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0059] 1-2) BA@PAMAM@MNPs 제조예

[0060] 7.3 mg/mL Phenylboronic acid (이하, BA로 약기함)를 실온에서 6시간 동안 교반하면서 50 mg/mL EDC/NHS (EDC:NHS=1:1, w/w)로 처리하여 활성화시켰다. 활성화된 BA 용액 1.0 mL를 상기 수득된 PAMAM@MNPs가 들어있는 튜브에 첨가한 후, 550 rpm, 37 $^{\circ}$ C 조건하에서 16시간 동안 배양하였다. 그 후 수득한 BA@PAMAM@MNPs를 탈 이온수 500 μ L로 2회 세척하고 탈 이온수 500 μ L에 분산시켜 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0062] **실시예 2. Imidazole@MNPs 제조**

[0063] 상기 PAMAM@MNPs 제조방법과 동일하게 MNPs를 8.1 mg/mL EDC/NHS (EDC:NHS=1:1, w/w)로 처리하여 활성화시킨 후 히스타민 용액 1.0 mL(10.0 mg/mL in $1\times$ 활성화 완충액)를 직접 첨가하고, 550 rpm, 37 $^{\circ}$ C 조건하에서 19시간 동안 배양하였다. 얻어진 Imidazole@MNPs를 탈 이온수 500 μ L로 2회 세척하고 탈 이온수 500 μ L에 분산시켜 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0065] **실시예 3. 자성나노입자 특성평가**

[0066] 상기 제조된 자성나노입자들을 감쇠전반사시료분석법(ATR-FT-IR spectroscopy), 제타전위측정법, 동적광산란분석법(Dynamic lightscattering), X선광전자분석법(X-ray photoelectron spectroscopy)을 이용하여 분석하였다.

[0067] 도 3은 자성나노입자들의 ATR-FT-IR 그래프를 나타낸 것으로, 1730 cm^{-1} 에서 카르복실기 피크가 나타났고, 1646 cm^{-1} 에서 PAMAM 덴드리머의 아마이드 결합 피크가 나타났으며, 1384 cm^{-1} , 1417 cm^{-1} , 1570 cm^{-1} 에서 페닐보론산 피크가 관찰됨에 따라 BA@PAMAM@MNPs가 잘 제조되었음을 확인하였다. 또한, 1677 cm^{-1} 에서 아마이드 결합 피크, 1625 cm^{-1} 에서 히스타민 피크가 관찰됨에 따라 Imidazole@MNPs가 잘 제조되었음을 확인하였다.

[0068] 도 4a는 제타전위 측정 및 동적광산란분석법을 이용한 입자들의 유체역학적 반경을 측정한 그래프를 나타낸 것이다. 도 4a를 참조하면, PAMAM 덴드리머의 결합에 의해 제타전위가 -24.2 ± 0.62 mV에서 46.03 ± 0.58 mV로 증가됨을 확인할 수 있으며, 페닐보론산의 결합에 의해 37.8 ± 0.12 mV로 감소함을 확인하였다. 이는 PAMAM 구조에 존재하는 아미노 그룹의 일부에 페닐보론산이 결합되었기 때문이다. 도 4b는 PAMAM@MNPs와 BA@PAMAM@MNPs의 pH 변화에 따른 제타전위 값의 변화를 측정한 그래프로, pH가 감소함에 따라 제타전위 값이 증가하는 것을 확인할 수 있으며, 이는 카르복실기의 해리반응과 아미노기의 가수분해에 기인한다. PAMAM@MNPs의 제타전위 값이 BA@PAMAM@MNPs의 제타전위 값보다 상대적으로 높으며, 둘 다 등전점(isoelectric points)은 8.0으로 나타났다.

[0069] 도 4c 및 도 4d는 X선광전자분석법을 이용하여 자성나노입자들에 결합된 PAMAM 덴드리머와 페닐보론산의 결합비율을 분석한 것으로, N1s PAMAM@MNPs 400.88 eV, BA@PAMAM@MNPs 399.03 eV는 PAMAM 구조의 아미노 그룹과 아미노

이드 결합을 나타내는 반면, N 원자 종류의 비율은 3.38%(PAMAM@MNPs)에서 4.35%(BA@PAMAM@MNPs)로 증가하였다 (하기 표 1 참조). BA@PAMAM@MNPs의 페닐보론산의 존재는 0.63% B 원자값과 결합에너지 190.78 eV로 확인할 수 있다. N과 B 원자 종들의 양에 따르면, [BA]/[PAMAM] 분자비는 대략 9.5로, 이는 MNPs 표면에 위치한 PAMAM 구조 한 분자에 9.5개의 페닐보론산 분자들이 결합된 것을 의미한다. 이는 PAMAM 덴드리머 구조의 표면에 위치한 아미노 그룹 29.7%가 페닐보론산으로 대체되었음을 의미한다.

표 1

	Fe2p	Cl1s atomic/%	O1s atomic/%	N1s atomic/%	B1s atomic/%
MNPs	0.29	80.67	18.8	0.24	0
PAMAM@MNPs	0.14	16.44	16.44	3.38	0
BA@PAMAM@MNPs	0.22	79.74	15.05	4.35	0.63
Imidazole@MNPs	1.92	82.61	16.63	0.48	0

실시예 4. 세균 배양, DNA 추출 및 정량 PCR

Nutrient broth 배지(BD DifcoTM, BD company, NJ, USA)에서 배양된 *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (이하, *S. Typhimurium*로 약기함; ATCC 14028)과 *Escherichia coli* (이하, *E. coli*로 약기함; ATCC 25922), 및 5% 양 혈액(MB cell) 함유 *Brucella* broth에서 배양된 *Brucella ovis* (이하, *B. ovis*로 약기함; ATCC 25840)의 밤새 배양액을 연속 희석하여 각각의 유기체 5×10^4 CFU를 얻었다. 세포를 인산완충식염수(이하, PBS로 약기함; 1×, pH=7.4), 건강한 성인의 소변 및 신선한 우유 1 mL 및 10 mL에 각각 접종하였다. DESIGN 분석으로 각 병원체로부터 양성 대조군 DNA를 분리한 후 DNA를 80℃에서 NaHCO₃ (pH=10.6) 함유 용리 완충액 100 μL로 용리시키고 분석 전에는 -20℃에서 보관하였다. 대조 시험에서, QIAamp DNA 키트(QIAGEN Korea Ltd.)를 이용하여 분리된 병원성 박테리아로부터 gDNA를 추출하고, 용리 완충액 100 μL로 용리시키고 분석 전에는 -20℃에서 보관하였다. DNA의 양은 AriaMx Real-Time PCR 시스템(Agilent Technologies, Inc. CA, USA)을 사용하여 정량 PCR (quantitative PCR; 이하, qPCR로 약기함)로 분석하였다. 증폭 반응은 최종 반응 부피가 20 μL이며, 반응 혼합물은 추출된 DNA 샘플 5 μL, Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR 마스터 믹스 시약 (Agilent Technologies, Inc. CA, USA) 10 μL, 각 프라이머 25 pmol 및 탈 이온수를 포함한다. 증폭 과정은 10분간 95℃의 초기 전배양 사이클(pre-incubation cycle)에 이어 10초간 95℃의 45 사이클, 20초간 58℃(*S. Typhimurium* 및 *E. coli*) 또는 60℃(*B. ovis*), 20초간 72℃, 및 마지막으로 30초간 40℃의 냉각 단계로 진행하였다.

실시예 5. PAMAM@MNPs 및 BA@PAMAM@MNPs의 박테리아 포획 성능평가

4-1) 1단계

먼저, 탈 이온수에 저장된 PAMAM@MNPs 및 BA@PAMAM@MNPs (300 μg/mL, 500 μL)를 자성으로 침전시켜 상청액을 제거한 후, *S. Typhimurium* 현탁액 (10^3 CFU/mL in 1× PBS, 1.0 mL)을 즉시 첨가하여 gentle vortexing 하였다. 균일하게 분산된 현탁액을 890 rpm의 진탕 조건하에서 40분 동안 실온에서 배양하여, 정전기적 상호작용을 통해 MNPs를 박테리아 세포 표면에 부착시켰다. 상청액 내 결합되지 않은 박테리아 세포를 자성으로 수집하고 QIAamp DNA 키트로 DNA를 추출한 후 추출된 DNA 샘플을 qPCR로 정량하였다.

4-2) 2단계

PAMAM@MNPs 및 BA@PAMAM@MNPs가 용해물에서 추출된 DNA와 결합된 후 용해물의 상청액을 수집하고 QIAamp DNA 키트를 이용하여 DNA 추출한 후 qPCR로 유전자를 검출하였다.

4-3) 3단계

튜브 내 샘플을 탈 이온수로 세척하고, 10 mM NaHCO₃ (pH=10.6) 함유 용리 완충액을 사용하여 각 MNPs의 표면으로부터 결합된 DNA를 용리시킨 후 qPCR로 검출하였다.

도 5를 참조하여 설명하면, 도 5a는 BA@PAMAM@MNPs의 DNA 흡착 방지 메커니즘을 나타낸 것으로, PAMAM@MNPs의 경우 강한 정전기적 상호작용을 통해 DNA가 PAMAM@MNPs에 부착되어 분리가 어려운 반면, BA@PAMAM@MNPs의 경우 BA가 컨쥬게이션 됨에 따라 전하가 없는 BA 프로브가 DNA와 직접 상호작용 하지 않고, 분자 크기 효과로 인해

PAMAM 전하를 차폐하여 PAMAM과 DNA 간의 정전기적 상호작용을 효과적으로 차단함에 따라 DNA 흡착을 방지할 수 있다.

[0083] 도 5b는 병원체 결합 효율을 나타낸 것으로, 상용 키트의 Cq 값은 31.08 ± 0.27 로 나타났다. PAMAM@MNPs 및 BA@PAMAM@MNPs의 경우 초기 카피 수가 너무 작아 Cq 값이 측정되지 않았으며, 이는 대부분의 *S. Typhimurium*이 각각의 자성나노입자에 결합되어 있음을 의미한다. 이를 통해 PAMAM@MNPs 및 BA@PAMAM@MNPs가 *S. Typhimurium*에 효과적으로 결합함에 따라 소수의 *S. Typhimurium*만이 상청액에 남아 있음을 확인하였다.

[0084] 도 5c는 *S. Typhimurium*이 붙은 PAMAM@MNPs 및 BA@PAMAM@MNPs에 세포용해액을 넣어 DNA를 추출한 DNA 용해물에서 DNA 분리 효율을 나타낸 것으로, PAMAM@MNPs의 경우 Cq 값이 측정되지 않았으며 이를 통해 강한 DNA 흡착이 이루어짐을 알 수 있었다. 반면, 상용 키트의 Cq 값 31.08 ± 0.27 과 비교하여, BA@PAMAM@MNPs의 경우 Cq 값이 31.47 ± 0.12 로 측정됨에 따라 대부분의 DNA가 MNPs 표면에 흡착되지 않고 DNA 용해물에 분산되어 있음을 알 수 있었다.

[0085] 3단계 후 PAMAM@MNPs 및 BA@PAMAM@MNPs에 대한 Cq 값은 측정되지 않았으며, 이를 통해 회수된 DNA의 카피 수가 낮음을 알 수 있다. 그러나, PAMAM@MNPs의 경우 PAMAM 표면과 DNA 사이의 강한 흡착 상호작용으로 인해 용리 완충액을 통해 DNA가 PAMAM@MNPs 표면으로부터 분리되기 어려운 반면, BA@PAMAM@MNPs의 경우 대부분의 DNA가 BA@PAMAM@MNPs에 흡착되지 않아 매우 소량의 DNA가 회수된다. BA@PAMAM@MNPs는 PAMAM의 $-NH_2$ 를 BA로 대체함에 따라 양전하가 다소 감소하지만 정전기력을 차폐하여 PAMAM@MNPs에 비해 효과적으로 DNA 흡착을 방지할 수 있다.

[0087] **실시예 6. Imidazole@MNPs의 제타전위 측정 및 DNA 회수 성능평가**

[0088] Imidazole@MNPs는 기능화된 이미다졸 프로브에 의해 낮은 pH에서 DNA 분자를 정전기적으로 흡착할 수 있고, 조절된 pH 조건하에서 이미다졸기의 전하-가역적 특성에 따라 높은 pH에서 DNA를 용출시킬 수 있다.

[0089] Imidazole@MNPs의 pH 변화에 따른 제타전위를 측정한 결과, 도 6에서 보는 바와 같이, pH 변화(9.5~3)에 따른 제타전위 값은 증가하였으며, 이는 이미다졸의 양자화가 낮은 pH에서 발생하기 때문이다. 그러나 이미다졸 양자화와 자성나노입자와의 결합비율에 따라 낮은 표면 전하를 가지며, 제조된 Imidazole@MNPs는 낮은 pH(3~4)에서 거의 0인 제타전위 값을 갖는 것으로 나타났다. 이는 DNA와 Imidazole@MNPs의 밀어내는 힘은 낮은 pH에서 빠르게 줄어드는 것을 의미하며, 이의 결과로서, DNA는 MNPs 표면에 약하게 흡착된다. 그 후 높은 pH 용액(pH 10.6)을 사용하면 Imidazole@MNPs는 강한 음전하를 가져 DNA와 MNPs 사이에 밀어내는 힘이 강해지면서 DNA가 떨어져 나오게 된다. DNA의 등전점은 pH 5이기 때문에 pH 3에서는 중성 전하를 띠며, 이러한 흡착과정은 Imidazole@MNPs의 양전하와 DNA의 중성전하 사이의 약한 정전기적 상호작용에 따른다.

[0090] DNA 회수 성능을 평가하기 위해 먼저, HCl 용액 (pH=1.5)과 10 mM $NaHCO_3$ (pH=10.6) 용액을 탈 이온수에서 제조하였다. HCl 용액을 사용하여 10 mM Tris HCl 용액을 pH 3.0으로 조정하였다. 상청액을 제거한 후, Imidazole@MNPs를 Tris HCl 용액 (10 mM, pH=3.0) 500 μ L에 재분산시켰다. DNA 함유 세포 용해물을 수득하기 위해, 농도별(1000, 100, 10 및 5 CFU) *S. Typhimurium* 현탁액 200 μ L를 QIAamp DNA 미니 키트를 사용하여 DNA 추출에 적용하였다. 이어서, 무수 에탄올 200 μ L를 DNA 함유 세포 용해물 튜브에 첨가하여 DNA를 침착시켰다. HCl (pH=1.5) 30 μ L를 사용하여 용해물의 pH를 3 내지 4로 조정하였다. 그 다음 Tris HCl (10 mM, pH=3.0)에 분산된 Imidazole@MNPs 500 μ L를 DNA 흡착용 샘플에 첨가한 후 20분 동안 실온의 890 rpm 진탕 조건하에서 20분 동안 배양하였다. 상청액을 버리고 $1 \times$ PBS 500 μ L로 1회 세척한 후, $NaHCO_3$ (10 mM, pH=10.6) 100 μ L를 첨가하여 20분 동안 80 $^{\circ}$ C, 890 rpm의 진탕 조건하에서 Imidazole@MNPs를 재분산시켜 DNA를 용출시켰다. 용리된 DNA 용액을 qPCR로 분석하였다.

[0091] Imidazole@MNPs의 DNA 회수 성능을 평가한 결과, 도 7a에 제시된 바와 같이, 상용 키트와 Imidazole@MNPs 모두 100 CFU/mL에서 5 CFU/mL로 갈수록 Cq 값이 점차 증가했다. 그러나, Imidazole@MNPs는 상용 키트와 비교하여 10 CFU/mL 및 100 CFU/mL에서 낮은 Cq 값을 나타내었으며, 5 CFU/mL에서도 검출됨에 따라 DNA 회수가 잘 되었음을 알 수 있다.

[0093] **실시예 7. 단일 튜브 이중-EI 전략(DESIGN) 분석 성능평가**

[0094] DESIGN 분석은 박테리아 농축 및 DNA 추출의 두 단계로 구성된다 (도 2 참조). 먼저, 300 μ g/mL BA@PAMAM@MNPs (1 mL 샘플의 경우 500 μ L, 10 mL 샘플의 경우 1000 μ L)를 사용하여 박테리아를 농축하였다. BA@PAMAM@MNPs를 자성으로 제거한 후, 890 rpm 진탕 조건하에 실온(25 $^{\circ}$ C)에서 PBS, 인간 소변 및 우유에서 각각

의 박테리아 현탁액(10^2 , 10^1 및 5 CFU)을 40분 동안 배양하였다. MNPs 표면의 양전하를 통해 용액으로부터 BA@PAMAM@MNPs에 결합된 표적 박테리아를 자성으로 분리하고, MNPs를 세척 완충제로 1회 세척하였다. 농축된 세포를 PBS 200 μ L에 재현탁 시킨 후, proteinase K 20 μ L 및 용해 완충액(guanidine thiocyanate) 200 μ L로 처리하였다. 혼합 용액을 56°C에서 10분간 가열한 후, 무수 에탄올 200 μ L 및 HCl (pH=1.5) 30 μ L를 첨가하였다. 이어서, 샘플을 Imidazole@MNPs와 혼합하고, 이를 Tris-HCl (pH=3) 500 μ L에 현탁시켰다. 혼합물을 진탕 조건하에 20분 동안 실온에서 배양하였다. 상청액을 자성으로 제거하고 PBS로 1회 세척하였다. Imidazole@MNPs 표면상의 양전하를 통해 Imidazole@MNPs에 결합된 용액으로부터 표적 DNA를 자성으로 분리하고 MNPs를 PBS로 1회 세척하였다. MNPs에 결합된 DNA를 q분리하기 위해 용리 완충액(NaHCO₃ 함유, pH=10.6) 100 μ L를 첨가한 후, 진탕 조건하에서 20분간 80°C에서 배양하였다. 용리된 DNA를 다운 스트림 분석을 위해 수집하였다. 추출된 DNA는 추후 사용시까지 -20°C에 보관하였으며, DNA 용액 5 μ L를 qPCR 분석에 사용하였다.

[0095] 도 7b는 PBS (1 mL)에서 검출을 수행한 것으로, DESIGN 분석은 5 CFU 수준에서 Cq 값을 갖는 반면, 상용 키트는 10 CFU 수준에서 높은 오차 변화를 보였으며, 5 CFU 수준에서 Cq 값이 나타나지 않았다. 이는 상용 키트의 저농도에서의 불안정성에 기인하는 것으로 사료된다.

[0096] 도 7c는 인간 소변(10 mL)에서 BA@PAMAM@MNPs 유무에 따른 박테리아 농축 성능을 평가한 것이다. 상용 키트는 DNA 추출을 위해 200 μ L 수준의 양이 필요하며, 주어진 10 mL의 샘플에서 상용 키트는 농축없이 1000 CFU/10 mL에서 Cq 값이 34.62 ± 2.22 로 나타났으며, 100 CFU/10 mL에서는 Cq 값이 측정되지 않았다. 반면, BA@PAMAM@MNPs와 상용 키트를 결합한 경우 1000 CFU/10 mL (31.59 ± 0.16) 및 100 CFU/10 mL (34.68 ± 0.65)의 Cq 값이 나타났으며, 이를 통해 안정성 및 신속성을 함께 보유함을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 통해 실제 샘플에서 DNA가 아닌 박테리아를 특이적으로 표적하는 BA@PAMAM@MNPs의 성능을 확인함에 따라 DESIGN 분석을 임상 진단에 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

[0097] 도 7d는 인간 소변에서 5 내지 100 CFU/10 mL *B. ovis*, *S. Typhimurium* 및 *E. coli*를 대상으로 진단 성능을 평가한 것이다. 상용 키트는 모든 시험에 대해 박테리아 농도 100 CFU/10 mL 이하에서 소변 샘플 10 mL로부터 Cq 값이 생성되지 않았으나, DESIGN 분석은 모든 시험에서 5 CFU/10 mL까지 성공적인 검출이 가능하였다.

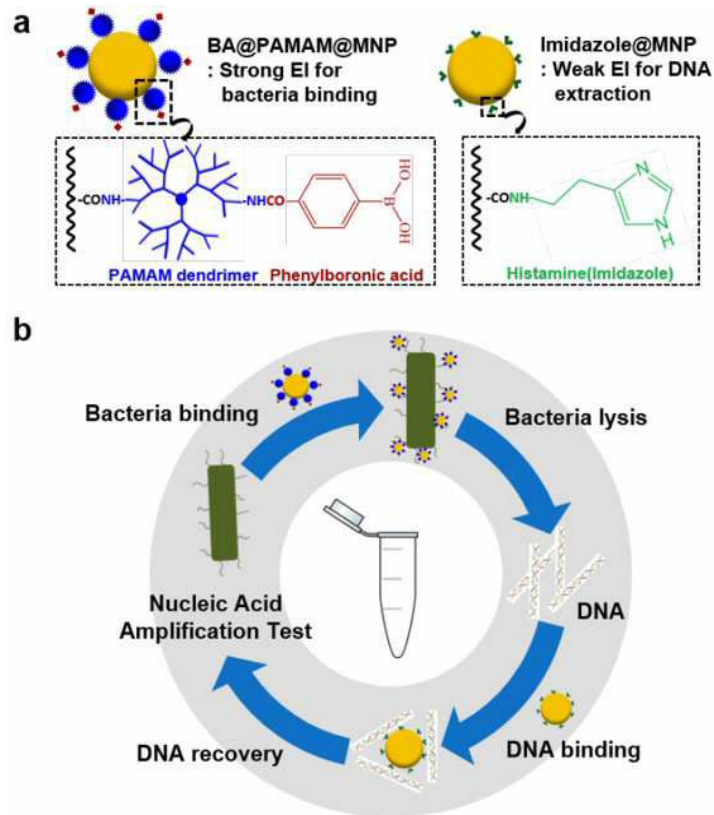
[0099] **실시예 8. 우유에서의 *S. Typhimurium* 검출**

[0100] 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 신선한 우유 10 mL에서 *S. Typhimurium* 검출을 수행하였다. 도 8에서 볼 수 있듯이, 상기 소변 샘플에서와 마찬가지로 검출한계 5 CFU/10 mL를 나타내어 성공적으로 *S. Typhimurium*을 검출할 수 있음을 확인하였다.

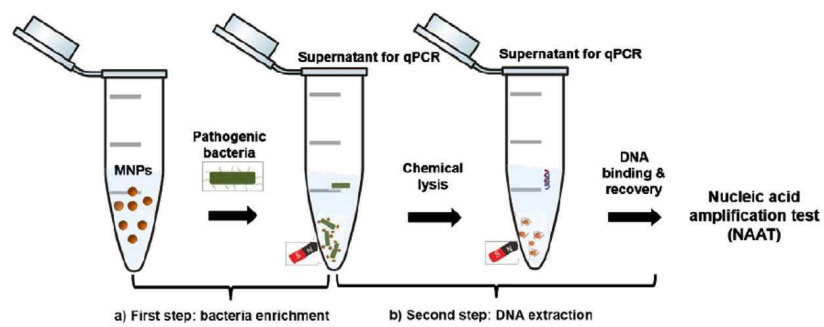
[0102] 이상, 본 발명을 예시적으로 설명하였으며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 명세서에 개시된 실시예들은 본 발명을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 사상과 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술은 본 발명의 권리범위에 포함하는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

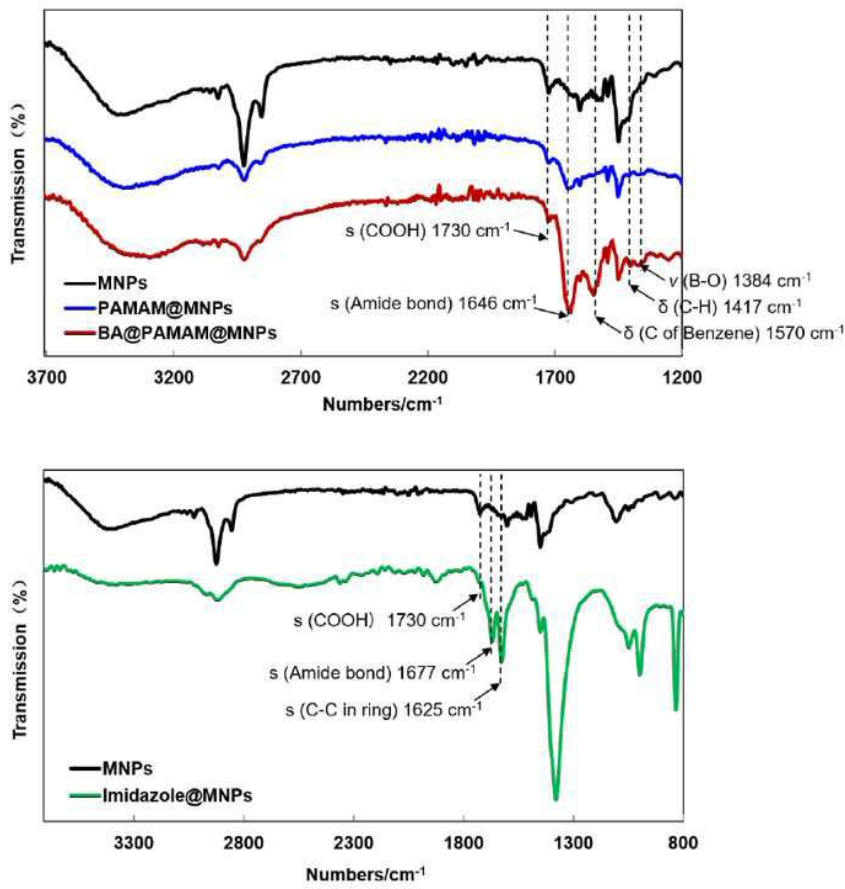
도면1



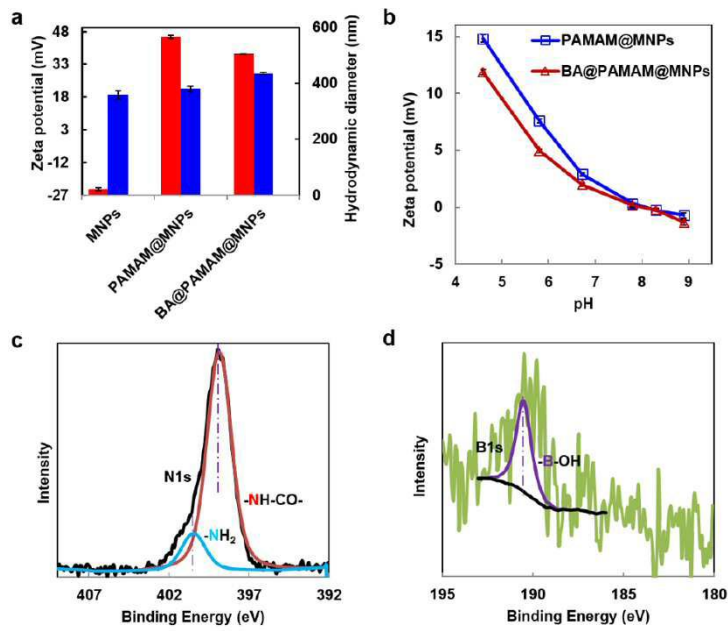
도면2



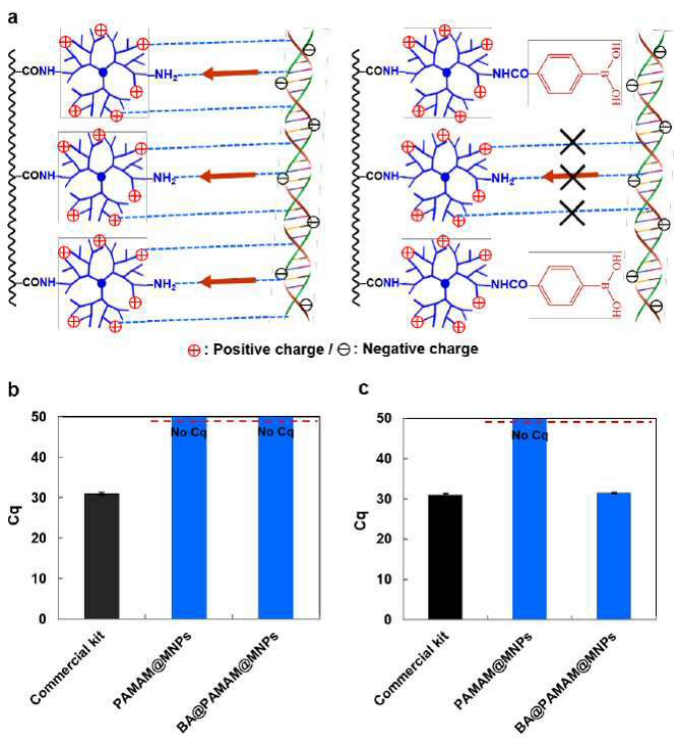
도면3



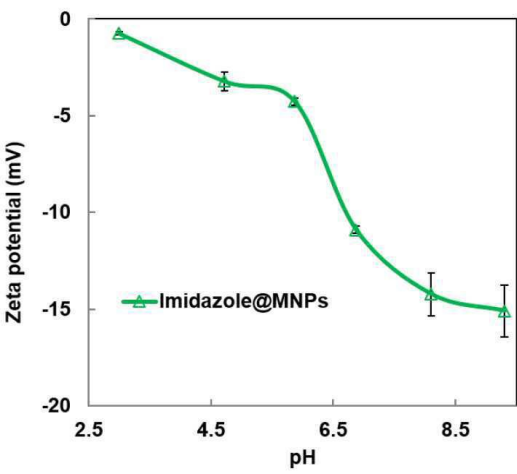
도면4



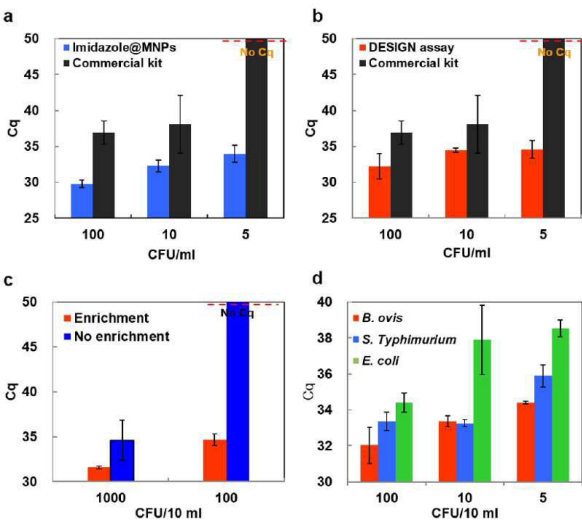
도면5



도면6



도면7



도면8

