

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2014-0094035 2014년07월30일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>G01N 33/53</i> (2006.01) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/551</i> (2006.01) <i>G01N 33/52</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0144410 (22) 출원일자 2012년12월12일 심사청구일자 2012년12월12일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) (72) 발명자 김승욱 서울 노원구 공릉로46길 32, 104동 905호 (공릉동, 삼익아파트) 이희욱 경기 고양시 일산서구 송산로 420-81, (가좌동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 한양특허법인	

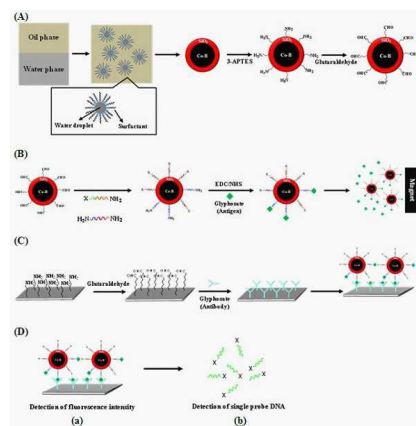
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 DNA 라벨 형광 자성 코어/셸 나노입자를 이용하는 바이오액티브 물질의 검출방법

(57) 요약

본 발명은 형광 자성 입자의 특성과 기능을 나노-바이오 센서를 통한 검출 시스템 등에 이용하기 위하여 입자표면을 개질하고, DNA를 접목하여 항원-항체 반응에 적용한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 입자표면이 개질되고 DNA가 접목된 형광 자성 코어/셸 나노입자 및 이를 이용한 형광과 DNA 검출에 의한 정량분석 방법에 관한 것이다. 본 발명의 바이오액티브 물질의 검출방법은 형광 자성 코어/셸 나노입자를 이용하여 낮은 농도의 시료를 짧은 시간 동안 검출 및 정량이 가능하므로, 가공식품과 농산물의 잔류농약 등의 바이오액티브 물질의 분석시간 및 분석 비용을 감소시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박철환

서울 성북구 동소문로29길 63, B동 402호 (동선동 5가, 동선빌라)

송윤석

경기 부천시 원미구 계남로 329, 503호 (춘의동, 아태리치빌아파트)

이자현

서울특별시 구로구 고척2동 대우 푸르지오아파트 110동 403호

정다운

서울 서대문구 모래내로 143, 1205호 (남가좌동, 창덕에버빌)

특허청구의 범위

청구항 1

a)워터-인-오일(Water-in-oil) 방식으로 자성 물질과 붕소 수소화물을 반응시켜 자성 물질-붕소 코어 부를 형성하고, 상기 코어에 실리카를 코팅하여 코어를 감싸는 셸 부를 형성하고, 상기 코어 및 셸로 형성된 입자에 형광 물질 및 실리카를 첨가하여 최외각 셸 부를 형성함으로써 형광 자성 코어/셸 나노입자를 제조하고, 상기 최외각 셸의 표면을 $-NH_2$, -바이오틴(-biotin), $-COOH$ 및 $-CHO$ 로 이루어진 군부터 선택되는 1종의 치환기로 개질하는 단계;

b)동일한 농도의 이중 표적 DNA 와 이중 탐침 DNA의 혼합물을, 상기 형광 자성 코어/셸 나노입자와 혼합하여 상기 형광 자성 코어/셸 나노입자의 최외각 셸 표면 부에 이중 표적 DNA와 이중 탐침 DNA를 결합시킨 후, 항원으로서 바이오액티브 물질을 형광 자성 코어/셸 나노입자에 고정화시키는 단계;

c)상기 형광 자성 코어/셸 나노입자에 고정화된 항원과 자유 항원의 경쟁적 효소면역학적 반응에 의해, 항체가 고정화된 기관에 상기 형광 자성 코어/셸 나노입자를 고정화하는 단계; 및

d)상기 기관 표면에 고정화된 형광 자성 코어/셸 나노입자의 형광 강도를 측정하고 단일 탐침 DNA를 분리하여 농도를 검출하여 자유 항원인 바이오액티브 물질의 농도를 정량적으로 확인하는 단계를 포함하는, 바이오액티브 물질의 검출방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 자성물질은 Co, Mn, Fe, Ni, Gd 또는 Mo인 것을 특징으로 하는, 바이오액티브 물질의 검출방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 자성물질은 코발트(Co)인 것을 특징으로 하는, 바이오액티브 물질의 검출방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 형광물질은 아크리딘 염료(Acridine dye), 시아닌 염료(Cyanine dye), 플루오론 염료(Fluorone dye), 옥사진 염료(Oxazin dye), 페난쓰리딘 염료(Phenanthridine dye) 또는 로다민 염료(Rhodamine dye)인 것을 특징으로 하는, 바이오액티브 물질의 검출방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 형광물질은 로다민 6G인 것을 특징으로 하는, 바이오액티브 물질의 검출방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 형광 자성 코어/셸 나노입자의 크기는 10 nm 내지 100 nm 인 것을 특징으로 하는, 바이오액티브 물질의 검출방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 바이오액티브 물질은 카르복실기 잔기를 갖는 것을 특징으로 하는, 바이오액티브 물질의 검출방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 바이오액티브 물질은 글라이포세이트(glyphosate), 2, 4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid)인 것을 특징으로 하는, 바이오액티브 물질의 검출방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 형광 자성 코어/셸 나노입자의 최외각 셸의 표면은 1차적으로 아민기로 개질된 후, 2차적으로 알데하이드기로 개질되는 것을 특징으로 하는, 바이오액티브 물질의 검출방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 기관의 표면은 1차적으로 아민기로 개질된 후, 2차적으로 알데하이드기로 개질되는 것을 특징으로 하는, 바이오액티브 물질의 검출방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 형광성을 가지는 자성 나노입자의 합성 및 이를 이용하는 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 DNA 라벨 형광 자성 나노입자의 합성 및 이를 이용하는 바이오액티브 물질의 검출방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 형광 자성 나노입자를 기초로 한 기술은 생물분석, 생물 의학적 응용, 특히 고속대량 스크리닝(ultra-high throughput screening), 검출 칩을 기초로 한 기술, 멀티 탐침 검출 시스템 등 다양한 분야에서 응용 가능하므로 매우 유망한 기술이다. 그 중에서도 특히, 마이크로어레이(microarray), 마이크로스팟(microspot) 기술에 사용되는 칩 센서에 있어서, 각각의 반응되는 공간 해상도(spatial resolution)는 매우 중요하며, 따라서 고 특이적 또는 비 특이적으로 사용되는 형광 표식과 검출 기술이 미소량 샘플의 분석과 고체상에서의 제한된 측정 등에 활용된다.

[0003] 이러한 응용을 위하여 현재까지 이루어진 많은 분석 방법들에 대한 개발은 형광에 의해 검출되는 멀티 DNA 탐침이 혼합된 DNA 검출을 기초로 하고 있다. 그러나 많은 분야에서 사용됨에도 불구하고, 형광 검출 시스템은 종종 분광영역이 넓게 중복되어 나타나기 때문에 고 난이도의 다양한 분석에 제약이 있다.

[0004] 따라서, 비형광 검출 방법으로 센서 표면에 항원, 항체, 또는 다양한 탐침 검출이 가능한 물질을 고정화하여 DNA가 융합된 물질을 실시간으로 모니터링하여 검출하는 방법이 개발되었다. 그러나 이러한 전형적인 면역학적 측정 방식은 표식의 비효율성, 낮은 형광 강도, 낮은 광안정성 등 때문에 문제점을 안고 있다. 따라서, 단순하고 민감한 면역학적 분석 방법은 쉽고 정량적으로 검출 가능하며, 빠른 처리를 할 수 있는 면역학적 측정 방식의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 한편, 자성 입자들(특히 산화철)은 생화학적 생산물의 분산, MRI (magnetic resonance imaging), 표적약물전달, 바이오센서 등과 같은 바이오 의학에 넓게 활용되고 있으며, 액상환경에서 화학적인 안전성이 있고, 잘 분산이 되며 일정한 크기를 가지고 있어 더 많은 응용에 활용되고 있다. 그러나 자성입자는 생물학적 환경에 직접적으로 노출되면 이방성의 쌍극자 인력과 생분해 때문에 응집이 일어나게 된다.

[0006] 상기 자성 입자의 예로서 코발트 입자를 들 수 있다. 코발트 입자는 산화철의 3배 내지 4배의 포화자성을 가지고 있는데, 벽면에 계면활성제 또는 고분자와 코팅되었을 때 비자성 산화 코발트 형태가 된다. 또한, 코발트 입자는 강자성 응집 때문에 분산이 잘 되지 않으며 공기 상에서 산화가 불안정하게 일어나게 된다.

[0007] 상기 살펴본 자성입자의 응집 현상 및 산화 문제를 방지하고, 보다 다양한 분야에 이용할 수 있는 나노입자에 관하여 다양한 연구가 이루어지고 있다.

[0008] 한편, 글라이포세이트(Glyphosate)는 잡초, 나뭇잎, 나무 등 다양한 식물을 제거하는 제초제 뿐 만 아니라 살충제로 사용되는 화학물질이며, 다이옥신과 같은 생물의 내분비계 교란물질(endocrine disrupting chemicals; EDC) 중 하나이다. 따라서, 글라이포세이트를 매우 낮은 농도까지 검출할 수 있는 분석방법이 필요하다.

[0009] 따라서, 본 발명자는 균일한 자성을 가지는 형광 자성 입자를 이용하여 잔류농약 등의 바이오액티브 물질을 검출하는 방법을 개발하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 2012-0105324 A

(특허문헌 0002) KR 2012-0072404 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 상기 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 입자의 입계 크기와 균일성을 늘리면서 응집 현상을 방지하고 자성의 성질을 그대로 유지하면서 자체 형광을 발현시킨 형광자성입자를 합성하고, 이를 이용한 잔류농약 등의 바이오액티브 물질을 검출하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0013] a)워터-인-오일(Water-in-oil) 방식으로 자성 물질과 붕소 수소화물을 반응시켜 자성 물질-붕소 코어 부를 형성하고, 상기 코어에 실리카를 코팅하여 코어를 감싸는 셸 부를 형성하고, 상기 코어 및 셸로 형성된 입자에 형광 물질 및 실리카를 첨가하여 최외각 셸 부를 형성함으로써 형광 자성 코어/셸 나노입자를 제조하고, 상기 최외각 셸의 표면을 $-NH_2$, -바이오틴(-biotin), $-COOH$ 및 $-CHO$ 로 이루어진 군부터 선택되는 1종의 치환기로 개질하는 단계;
- [0014] b)동일한 농도의 이중 표적 DNA와 이중 탐침 DNA의 혼합물을 준비하여, 상기 형광 자성 코어/셸 나노입자와 혼합하여 상기 형광 자성 코어/셸 나노입자의 최외각 셸 표면 부에 이중 표적 DNA와 이중 탐침 DNA를 결합시킨 후, 항원으로서 바이오액티브 물질을 형광 자성 코어/셸 나노입자에 고정화하는 단계;
- [0015] c)상기 형광 자성 코어/셸 나노입자에 고정화된 항원과 자유 항원인 바이오액티브 물질의 경쟁적 효소-면역학적 반응에 의해, 항체가 고정화된 기판에 상기 형광 자성 코어/셸 나노입자를 고정화하는 단계; 및
- [0016] d)상기 기판 표면에 고정화된 형광 자성 코어/셸 나노입자의 형광 강도를 측정하고 단일 탐침 DNA를 분리하여 농도를 측정하여 자유 항원인 바이오액티브 물질의 농도를 정량적으로 확인하는 단계를 포함하는, 바이오액티브 물질의 검출방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명의 바이오액티브 물질의 검출방법은 형광 자성 코어/셸 나노입자를 이용하여 낮은 농도의 시료를 짧은 시간 동안 검출 및 정량이 가능하므로, 가공식품과 농산물의 잔류농약의 분석시간 및 분석 비용을 감소시킬 수 있다.
- [0018] 최근 잔류농약 식품의 수입제한조치가 일본, 유럽 국가를 중심으로 크게 증가하고 있으며, 우리나라의 농산물 및 식품의 수입이 증가하고 있어, 본 발명의 형광 자성 입자를 수입 농식품의 검역용으로 사용하면 소규모의 인력과 장비로 다수의 식품을 규제하여 국민의 건강 지킴에 크게 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1A~1D는 본 발명의 바이오액티브 물질의 검출방법을 단계별로 도시한 것이다.
- 도 2a는 실시예 1에서 얻은 입자에 대한 XPS(X-ray photoelectron spectroscopy) 측정 결과를 나타낸 것이고,
- 도 2b는 실시예 1에서 얻은 입자의 SEM 사진이며,
- 도 2c는 VSM(vibrating sample magnetometer)로 300K에서 측정한 실시예 1 및 실시예 2에서 얻은 입자의 장의 존적(field-dependent) 자기화 곡선이고,
- 도 2d는 실시예 1에서 얻은 입자에 대한 FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectroscopy) 표면 분석 결과이다.
- 도 3a는 실시예 2에서 얻은 형광 측정 후 분리한 이중 표적/탐침 DNA에 대하여 UV-visible spectroscopy(260nm)로 측정한 광학 밀도(O.D: optical density)값과 이중 표적/탐침 DNA의 농도의 관계를 나타낸 것이다

도 3b는 실시예 2에서 얻은 형광 자성입자(FMP)의 농도에 따른 이중 표적/탐침 DNA의 농도 변화를 나타낸 것이다.

도 4a는 실시예 4에서 얻은 기관 표면에 고정화된 형광 자성 코어/셸 나노입자의 형광 강도와 자유 글라이포세이트의 농도의 관계를 나타낸 것이다.

도 4b는 실시예 4에서 얻은 기관 표면에 고정화된 형광 자성 코어/셸 나노입자의 형광 강도를 3D 이미지로 나타낸 것이다.

도 5a는 실시예 4에서 형광 측정 후 분리한 단일 탐침 DNA에 대하여 UV-visible spectroscopy(260nm)로 측정된 광학 밀도(O.D: optical density)값과 단일 탐침 DNA의 농도의 관계를 나타낸 것이다.

도 5b는 실시예 4에서 분리한 단일 탐침 DNA의 농도와 자유글라이포세이트의 농도의 관계를 나타낸 것이다.

도 6은 자유 글라이포세이트와, 항원이 고정화된 형광자성입자를 경쟁적 반응을 통하여 글라이포세이트 항체와 결합시키기 위해, 항원이 고정화된 형광자성입자를 동일한 농도로 각각의 농도가 다른 자유 글라이포세이트와 혼합하는 것을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은 형광 자성 입자의 특성과 기능을 나노-바이오 센서를 통한 검출 시스템 등에 이용하기 위하여 입자표면을 개질하고, DNA를 접목하여 항원-항체 반응에 적용한 것이다. 보다 상세하게, 본 발명은 입자표면이 개질되고 DNA가 접목된 형광 자성 코어/셸 나노입자 및 이를 이용한 형광과 DNA 검출에 의한 바이오액티브 물질의 검출방법을 제공한다.

[0022] 구체적으로, 본 발명은, a)워터-인-오일(Water-in-oil) 방식으로 자성 물질과 붕소 수소화물을 반응시켜 자성 물질-붕소 코어 부를 형성하고, 상기 코어에 실리카를 코팅하여 코어를 감싸는 셸 부를 형성하고, 상기 코어 및 셸로 형성된 입자에 형광 물질 및 실리카를 첨가하여 최외각 셸 부를 형성함으로써 형광 자성 코어/셸 나노입자를 제조하고, 상기 최외각 셸의 표면을 -NH₂, -바이오틴(-biotin), -COOH 및 -CHO로 이루어진 군부터 선택되는 1종의 치환기로 개질하는 단계;

[0023] b)동일한 농도의 이중 표적 DNA와 이중 탐침 DNA의 혼합물을 준비하여, 상기 형광 자성 코어/셸 나노입자와 혼합하여 상기 형광 자성 코어/셸 나노입자의 최외각 셸 표면 부에 이중 표적 DNA와 이중 탐침 DNA를 결합시킨 후, 항원으로서 바이오액티브 물질을 형광 자성 코어/셸 나노입자에 고정화하는 단계;

[0024] c)상기 형광 자성 코어/셸 나노입자에 고정화된 항원과 자유 항원인 바이오액티브 물질의 경쟁적 효소-면역학적 반응에 의해, 항체가 고정화된 기관에 상기 형광 자성 코어/셸 나노입자를 고정화하는 단계; 및

[0025] d)상기 기관 표면에 고정화된 형광 자성 코어/셸 나노입자의 형광 강도를 측정하고 단일 탐침 DNA를 분리하여 농도를 측정하여 자유 항원인 바이오액티브 물질의 농도를 정량적으로 확인하는 단계를 포함하는, 바이오액티브 물질의 검출방법에 관한 것이다.

[0026] 상기 a)단계에서 워터-인-오일(Water-in-oil) 방식으로 자성 물질과 붕소 수소화물을 반응시켜 자성 물질-붕소 코어 부를 형성하는 것은, 자성 물질과 붕소의 결합에 의해 자성 물질 간 결합을 통해 입자가 형성되는 효과가 있기 때문이다.

[0027] 상기 워터-인-오일(Water-in-oil) 방식은 분산매가 오일상(oil phase)이고 분산질이 수상(water phase)인 2상계 중에서 자성 물질과 붕소 수소화물을 반응시킴으로써 자성 물질과 붕소가 결합한 자성 물질-붕소 코어 부를 형성하는 과정이다.

[0028] 상기 자성 물질로는 Co, Mn, Fe, Ni, Gd, Mo 등이 있으며, 바람직하게는 코발트(Co)를 사용할 수 있으나, 반드시 이에 한정되지는 않는다.

- [0029] 상기 형광 물질로는 다양한 형광 염료계열 중 아크리딘 염료(Acridine dye), 시아닌 염료(Cyanine dye), 플루오론 염료(Fluorone dye), 옥사진 염료(Oxazin dye), 페난쓰리딘 염료(Phenanthridine dye), 로다민 염료(Rhodamine dye) 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 로다민 염료(Rhodamine dye) 계열인 로다민 6G(rhodamine 6G)를 사용할 수 있으나, 반드시 이에 한정되지는 않는다. 형광 물질로 로다민 6G(rhodamine 6G)를 사용하는 경우 수용성 및 유기 용매에 잘 분산이 될 뿐만 아니라, 다양한 형광 염료계열 중 형광이 가장 밝게 측정되는 등의 장점이 있다.
- [0030] 상기 최외각 셀의 표면을 개질하는 치환기로는 $-NH_2$, -바이오틴(-biotin), $-COOH$, $-CHO$ 등이 있다.
- [0031] 바람직하게는, 상기 형광 자성 코어/셀 나노입자의 최외각 셀의 표면은 1차적으로 아민기로 개질된 후, 2차적으로 알데하이드기로 개질되어, 후술하는 이중 표적/탐침 DNA의 아민기와와의 결합을 통해 이중 표적/탐침 DNA가 형광 자성 코어/셀 나노입자와 결합할 수 있도록 한다.
- [0032] 상기 형광 자성 코어/셀 나노입자의 크기는 10 nm 내지 100 nm 인 것이 바람직하며, 15 nm 내지 90 nm인 것이 더욱 바람직하다.
- [0033] 상기 b)단계는, 상기와 같이 합성된 형광 자성 코어/셀 나노입자를 나노-바이오 검출 시스템에 적용하기 위하여 이중 표적 DNA와 이중 탐침 DNA를 상기 형광 자성 코어/셀 나노입자에 고정화하여 특정 항원의 유도를 가능하게 하는 단계이다.
- [0034] 상기 이중 표적 DNA는 아민기를 가진 표적 DNA와, 단일 결합되는 아민기를 가진 DNA를 동일한 농도로 혼합하여 반응시킴으로써 준비할 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 이중 탐침 DNA는 결합 잔기가 없는 탐침 DNA와, 단일 결합되는 아민기를 가진 DNA를 동일한 농도로 혼합하여 반응시킴으로써 준비할 수 있다.
- [0036] 상기 이중 표적 DNA와 이중 탐침 DNA의 각각의 아민기는 형광 자성 코어/셀 나노입자의 알데하이드기와 결합하여 이민 결합을 형성함으로써, 이중 표적 DNA와 이중 탐침 DNA는 형광 자성 코어/셀 나노입자에 결합할 수 있다. 이중 표적 DNA와 이중 탐침 DNA가 함께 결합된 형광 자성 코어/셀 나노입자는 원심분리를 통해 분리할 수 있다.
- [0037] 상기 이중 표적 DNA와 이중 탐침 DNA가 결합된 형광 자성 코어/셀 나노입자는 항원인 바이오엑티브 물질과 반응하여 항원을 고정화한다.
- [0038] 항원인 바이오엑티브 물질에는 특별한 제한이 없으며 항체가 존재하기만 하면항원으로 이용할 수 있다.
- [0039] 상기 바이오엑티브 물질의 예로 글라이포세이트(glyphosate), 2, 4-디클로로페녹시아세트산(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산(2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid) 등을 들 수 있다.
- [0040] 상기 글라이포세이트는 한쪽에 인산기, 그리고 반대편에 카르복실기 잔기로 이루어진 분자 구조를 갖고 있어, 형광 자성 코어/셀 나노입자의 표면에 컨쥬게이션(conjugation)되어 있는 DNA의 $-NH_2$ 기와 카르복실기가 이민 반응을 함으로써 결합될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 일 구체예에서는, 상기 형광 자성 코어/셀 나노입자에 결합된 표적 DNA의 아민기는 항원인 글라이포세이트의 카르복실기와 아미드 결합을 형성함으로써, 형광 자성 코어/셀 나노입자에 글라이포세이트가 고정화된 다. 상기 글라이포세이트가 고정화된 형광 자성 코어/셀 나노입자는 자석을 이용하여 분리할 수 있다.
- [0042] 상기 c)단계는, 상기 형광 자성 코어/셀 나노입자에 고정화된 항원과 자유 항원인 바이오엑티브 물질의 경쟁적 효소면역학적 반응에 의해, 항체가 고정화된 기관에 상기 형광 자성 코어/셀 나노입자를 고정화하는 단계이다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에서는, 항원인 잔류농약을 검출하기 위하여, 기관의 표면을 1차적으로 아민기로 개질한 후, 2차적으로 알데하이드기로 개질하여, 항체 단백질이 기관에 고정화될 수 있도록 한다. 보다 상세하게, 개질

된 기관 표면의 알데하이드기와 항체 단백질의 아민기가 결합하여 이민 결합을 형성함으로써 기관 표면에 항체 단백질이 고정화된다.

[0044] 상기 항체 단백질에 대해 특별한 제한은 없으나, 표면이 개질된 기관에 부착된 잔기와 결합되는 잔기를 갖는 것이 바람직하다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에서는, 항체 단백질은 아민기를 가짐으로써 알데하이드기로 표면이 개질된 기관과 결합된다.

[0046] 상기 기관에 대해 특별한 제한은 없으나, 실리콘 기관이 바람직하다.

[0047] 본 발명의 일 실시예에서, 항원이 글라이포세이트인 경우, 글라이포세이트 항체(glyphosate antibody)는 글라이포세이트와 수용체 단백질인 BSA(bovine serum albumin)과 EDA(ethylenediamine)의 형태인 (glyphosate-BSA-EDA)을 면역원으로 하여 토끼로부터 생산하였다.

[0048] 상기 d)단계는, 기관 표면에 고정화된 형광 자성 코어/셸 나노입자의 형광 강도를 측정하고, 형광 자성 코어/셸 나노입자에 결합된 단일 탐침 DNA를 분리하여 농도를 측정하여 자유 항원인 바이오액티브 물질의 농도를 정량적으로 확인하는 단계이다.

[0049] 상기 형광 강도의 측정에는 CLSM(confocal laser scanning microscopy) 등을 사용할 수 있다. 또한, UV-Visible spectroscopy를 사용하여 단일 탐침 DNA 농도 곡선을 얻어 항원의 농도를 정량적으로 구할 수 있다. 이때 파장은 260nm인 것이 바람직하다.

[0050] 상기와 같이 단일 탐침 DNA의 농도를 측정함으로써, 바이오액티브 물질의 농도를 정량적으로 확인할 수 있다. 바이오액티브 물질의 농도가 높을수록 단일 탐침 DNA의 농도가 낮게 측정되며, 바이오액티브 물질의 농도가 낮을수록 단일 탐침 DNA의 농도는 높게 측정된다.

[0051] 본 발명의 일 실시예에서는, 자성 물질로 코발트 (cobalt)를 사용하였으며, 형광 염료는 로다민 6G(rhodamine 6G)를 사용하였으며, 글라이포세이트(glyphosate)를 검출대상으로 하였다.

[0052] 이하, 실시예 및 시험예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0053] <실시예 1> 표면 개질된 형광 자성 Co-B/SiO₂/염료 입자의 합성

[0054] 도 1A와 같이 워터-인-오일(water-in-oil) 방식으로 Triton X-100 1.77ml, n-hexanol 1.6ml 및 cyclohexane 7.7ml를 30분 동안 혼합한 후 0.4M NaBH₄ 0.2ml를 넣은 다음 1M CoCl₂·6H₂O 0.2ml를 넣고 15분 동안 반응시켰다. 이때, 오일상 안에 존재하는 코발트 입자들은 이온간 반발력에 의해 이중 층으로 성장하게 되고 층 사이에 -B(OH)₄가 흡착에 의해 결합됨으로써 코발트-붕소 입자가 형성된다. 코발트-붕소(Co-B) 입자의 크기는 워터-인-오일(water-in-oil) 방식으로 인하여 그 크기가 균일하게 된다.

[0055] 그 다음 TEOS 0.1ml를 넣고 30분 동안 교반한 후 Ammonia(28%) 0.1ml를 넣고 12시간 반응시켰다. 반응 결과 코어로 성장한 코발트-붕소입자 표면에 스토브방법(Stober method)에 의해 얇은 두께의 실리카 층인 셸이 형성된 코어/셸 형태인 Co-B/SiO₂ 입자를 수득하였다.

[0056] 상기 Co-B/SiO₂ 입자를 에탄올 8ml에 초음파 장치로 잘 분산시킨 후 3차 증류수 1.6ml, 염료인 로다민 6G 1mM을 첨가하여 혼합시켰다. 그 다음 TEOS 50 μ l, 암모니아(28%) 50 μ l를 넣어 40℃상에서 20시간 동안 어두운 곳에서 반응시켰다. 그 결과 코어/셸 입자의 표면은 실리카의 형태를 띠게 되는데 이것은 암모니아의 촉매 작용으로 인하여 부분적인 가수 분해가 일어나 TEOS 분자가 염료를 가두게 되고 다시 실리카 표면을 형성하기 때문이다.

[0057] 상기와 같이 얻은 형광 자성 Co-B/SiO₂/로다민 6G 입자의 표면 개질을 위하여 반응 후 상태를 유지하고 3-APS(3-Aminopropyltriethoxysilane) 0.1ml를 넣고 50℃상에서 20시간을 더 반응시켰다. 그 결과 입자의 실리카 층의 표면은 아민기로 개질되었다. 아민기로 표면 개질된 입자를 세척하고, 0.1mM 인산염 버퍼액 (pH8.0) 90ml

에 분산시켜 4℃에서 대기시킨 후, 64℃에서 20분 동안 방치시킨 2.6M 글루타알데하이드 용액을 함께 넣고 4℃에서 1시간 반응시켰다. 이 용액을 다시 20℃에서 1시간 더 반응시킨 후 3차 증류수로 세척하였고, 그 결과 입자의 표면은 알데하이드기로 개질되었다.

[0058] <실시예 2> 이중 표적 DNA 와 이중 탐침 DNA의 결합 및 항원의 고정화

[0059] 도 1b와 같이 PBS 버퍼액 (pH 7.4) 76 μ l에 9.8 nM인 아민기를 가진 표적 DNA 12 μ l와 9.8 nM인 단일 결합되는 아민기를 가진 DNA 12 μ l를 혼합하여 95℃에서 5분간 동안 반응시킨 후 상온에서 천천히 식혔다. 동일한 방법으로 9.8 nM인 결합 잔기가 없는 탐침 DNA 12 μ l와 9.8 nM인 단일 결합되는 아민기를 가진 DNA 12 μ l를 혼합하여 95℃에서 5분 동안 반응시킨 후 상온에서 천천히 식혔다. 용해온도보다 약간 높은 온도에서 DNA가 안정화된 후 온도를 천천히 낮추면 단일 DNA는 수소결합에 의하여 이중 나선 구조로 조합이 일어난다. 이를 통해서 이중 탐침 DNA와 이중 표적 DNA를 형성시킬 수 있다.

[0060] 이와 같이 얻은 동일한 농도로 구성된 두 종류의 이중 탐침/표적 DNA를 이중 탐침 DNA 60 μ l: 이중 표적 DNA 30 μ l(=2:1)의 비율로 혼합한 후, 형광자성입자와 혼합하여 초음파 장치에서 15분 동안 분산시키고 4℃상에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 결과 형광자성입자의 표면에 존재하는 알데하이드기가 표적 DNA의 아민기와 결합함으로써 이중 탐침 DNA 및 이중 표적 DNA가 형광자성입자와 결합하게 된다.

[0061] 이중 탐침 DNA 및 이중 표적 DNA가 결합된 형광자성입자를 원심분리에 의해 용액으로부터 분리한 후, 1mM의 항원인 글라이포세이트(glyphosate) 200 μ l를 첨가하고 0.1M EDC, 0.1M NHS를 같이 혼합시켜 4℃에서 2시간 동안 반응시킴으로써 표적 DNA에 있는 아민기와 글라이포세이트의 카르복실기가 아마이드 결합을 하여 항원(antigen)인 글라이포세이트를 형광자성입자에 고정화하였다.

[0062] <실시예 3> 형광자성입자에 고정화된 항원과 자유 항원의 경쟁적 효소면역학적 반응에 의한 형광자성입자의 고정화

[0063] 항원이 고정화된 형광자성입자를 원심분리로 분리하였다. 그 다음, 자유 항원인 글라이포세이트(glyphosate)를 각각 1nM 부터 10,000nM 농도로 제조하여 일정한 양으로 항원이 고정화된 형광자성입자(glyphosate-dsDNA-형광자성입자) 200 μ l를 넣고 분산시켰다.

[0064] 도 1c와 같이 일정한 크기(2.5×1cm)로 실리카 기판을 자른 후 H₂O₂ 35% 용액 100ml에 넣고 25℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 증류수로 3번 세척한 다음 120℃에서 2시간 동안 건조시켰다.

[0065] 상기 실리카 기판에 UV를 조사하여 산화시켜 기판 표면에 -OH기를 형성시켰다. 아세톤 90ml에 3-APS(3-Aminopropyltriethoxysilane) 10ml를 혼합한 후 다시 실리콘 기판을 넣고 50℃에서 2시간 동안 반응시키고, 60℃에서 2시간 동안 건조시키면 기판 표면은 아민기로 개질되었다.

[0066] 표면이 아민기로 개질된 기판을 4℃의 0.1mM 인산염 버퍼액(pH8.0) 90ml 중에 대기시킨 후, 64℃에서 20분 동안 처리한 글루타알데하이드 용액 7.2ml과 4℃에서 1시간 반응시켰다. 이 용액을 다시 20℃에서 1시간 더 반응시킨 후 3차 증류수로 세척하여 기판의 표면을 알데하이드기로 개질하였다.

[0067] 0.1mg/ml의 글라이포세이트 항체 단백질을 기판 위에 뿌린 후 상온 상에서 2시간 동안 방치한 후, 1mM PBS 버퍼액(pH 7.0)로 기판을 2~3회 세척하였다. 그 결과, 항체 단백질에 있는 아민기와 기판 표면의 알데하이드기가 결합되어 항체가 기판 표면에 고정화된다.

[0068] 이와 같이 얻은 항체가 고정화된 기판 위에, 1nM, 10nM, 100nM, 1,000nM, 10,000nM의 농도로 각각 준비한 자유 글라이포세이트(free glyphosate)와, 동일한 농도의 항원이 고정화된 형광자성입자를 각각 혼합하여 2시간 동안 경쟁적 효소면역반응을 수행한 다음, 1mM PBS 버퍼액(pH 7.4)과 0.3%(v/v) Tween-20 혼합 버퍼액으로 세척하였다(도 6).

[0069] <실시예 4> 기판 표면에 경쟁적 효소면역반응으로 고정화된 형광자성입자의 형광 강도 측정, 및 단일 탐침 DNA의 분리 및 단일 탐침 DNA의 농도 검출

- [0070] 실시예 3으로부터 얻은 기관 위에 결합된 형광자성입자를 CLSM(confocal laser scanning microscopy)로 확인하고, 자유 글라이포세이트의 농도에 따라 측정된 형광강도를 도 4a와 같이 나타냈다.
- [0071] 1mM PBS 버퍼액(pH 7.4) 1ml에 형광자성입자가 고정화된 실리카 기관을 담근 다음 95℃에서 20분 동안 반응시킨다. 그 결과 기관에 고정화된 형광자성입자에 결합되어 있는 이중 탐침 DNA가 높은 온도에서 이중나선 DNA 가닥이 풀리면서 단일 탐침 DNA로 분리되며, 분리 즉시 바로 온도가 낮아지기 전에 실리카 기관을 제거하였다.
- [0072] 이때 분리된 단일 탐침 DNA를 UV-visible spectroscopy (260nm)로 광학 밀도(O.D: optical density) 값을 측정하여 단일 탐침 DNA 농도와 상관관계를 도 5a에 나타냈다.
- [0073] 또한, 자유 글라이포세이트의 농도와 단일 탐침 DNA 농도의 상관관계를 도 5b에 나타냈다. 자유 글라이포세이트의 농도가 높아질수록 단일 탐침 DNA의 농도는 감소하는 것으로 나타났으며, 자유 글라이포세이트의 농도가 낮아질수록 단일 탐침 DNA의 농도는 증가하는 것으로 나타났다(도 5b).
- [0074] 이는 자유 글라이포세이트의 농도가 낮을수록 동일한 양으로 혼합된 형광자성입자에 고정화된 항체와 기관에 고정화된 항체 간의 결합이 증가하게 되고, 그에 따라 형광 강도도 증가하고, 형광자성입자에서 분리되는 단일 탐침 DNA(single probe DNA)의 농도도 증가하기 때문이다.
- [0075] [시험예 1] 형광자성입자의 성분 분석, 자성도, 균일도, 및 표면 개질 분석
- [0076] 1. XPS 패턴 측정
- [0077] 실시예 1에서 얻어진 입자를 XPS(X-ray photoelectron spectroscopy)를 이용하여 패턴을 측정하여 도 2a에 나타냈다. 이를 살펴보면, 표준 결합에너지를 갖는 순수한 코발트 금속 (778.2 eV), 비결정질의 붕소 (187.2 eV) 상태와 비교했을 때 실시예 1의 입자들은 도 2a와 같이 $\text{Co}_{2\text{P}_{3/2}}$ (782.1-797.4 eV), $\text{B}_{1\text{s}}$ (192.7 eV)의 결합 에너지를 갖는 것을 확인하였고 $\text{Si}_{2\text{p}}$ (102.8 eV), $\text{O}_{1\text{s}}$ (531.6 eV)의 결합 에너지를 갖는 것을 확인하였다. 즉, 이를 통하여 자성을 갖는 Co-B 입자가 존재하는 것을 알 수 있다.
- [0078] 2. SEM 이미지 측정
- [0079] 실시예 1에서 얻어진 입자를 SEM(scanning electron microscope)로 촬영하여 도 2b에 나타내었다.
- [0080] 이를 살펴보면, 실시예 1의 입자는 매우 균일한 구형체로서, 크기는 약 50nm이며, 입자의 표면이 매우 거친 것을 알 수 있다.
- [0081] 3. 자기화(magnetization) 측정
- [0082] VSM(vibrating sample magnetometer)로 300K에서 측정한 실시예 1 및 실시예2에서 얻어진 입자의 장의존적(field-dependent) 자기화 곡선을 도면 2c에 나타내었다.
- [0083] 300K의 자기 히스테리시스(magnetic hysteresis) 곡선은 보자력(coercivity)을 거의 보여주지 않고 강한 자기장에서도 수렴하지 않는데, 이는 입자가 자성의 특성을 가짐을 나타낸다.
- [0084] 300K 상에서 단위 질량당 포화모멘트 (saturation moment per unit mass M_s)는 13.5 emu/g, 보자력(coercivity)은 40.371 Oe가 되는 것을 확인하였다.
- [0085] 4. FT-IR 표면 측정
- [0086] 실시예 1에서 얻어진 입자를 FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)로 표면을 분석하여 도 2d에 나타내었다.
- [0087] 도 2d와 같이 아민기로 표면을 개질 하기 전(a)과 아민기로 개질 후(c)는, 알데하이드기로 개질 후(c)와 파장수

(wavenumber)가 다른 것을 확인하였다. 이로부터 자성을 가지는 Co-B/SiO₂ 입자 표면이 아민기 및 알데하이드기로 개질된 것을 알 수 있다.

[0088] [시험예 2] 형광자성입자의 농도에 따른 이중 표적/탐침 DNA 결합의 영향

[0089] 실시예 2에서 얻어진 형광자성입자(FMP)의 농도에 따른 이중 표적/탐침 DNA의 농도 변화를 도 3b에 나타내었다.

[0090] 형광자성입자(FMP)의 농도가 0.01중량%부터 0.20중량%까지 증가함에 따라 이중 표적/탐침 DNA의 농도는 증가하였으며, 형광자성입자의 최적 농도는 0.10중량%인 것을 확인하였다.

[0091] [시험예 3] 형광 비교 검출

[0092] CLSM(confocal laser scanning microscopy) 측정 장비로 실시예 3의 기판 표면에 고정화된 형광 자성 코어/셸 나노입자의 형광 강도를 측정하고, 그 결과를 도 4a에 나타내었다.

[0093] 도 4a에서 자유 글라이포세이트(free glyphosate)의 농도가 낮아질수록 형광 강도가 증가하는 것을 확인하였으며, 도 4b와 같이 3D(three-dimensional) 이미지로도 자유 글라이포세이트의 농도 별로 형광 강도가 확연히 차이가 나는 것을 확인하였다.

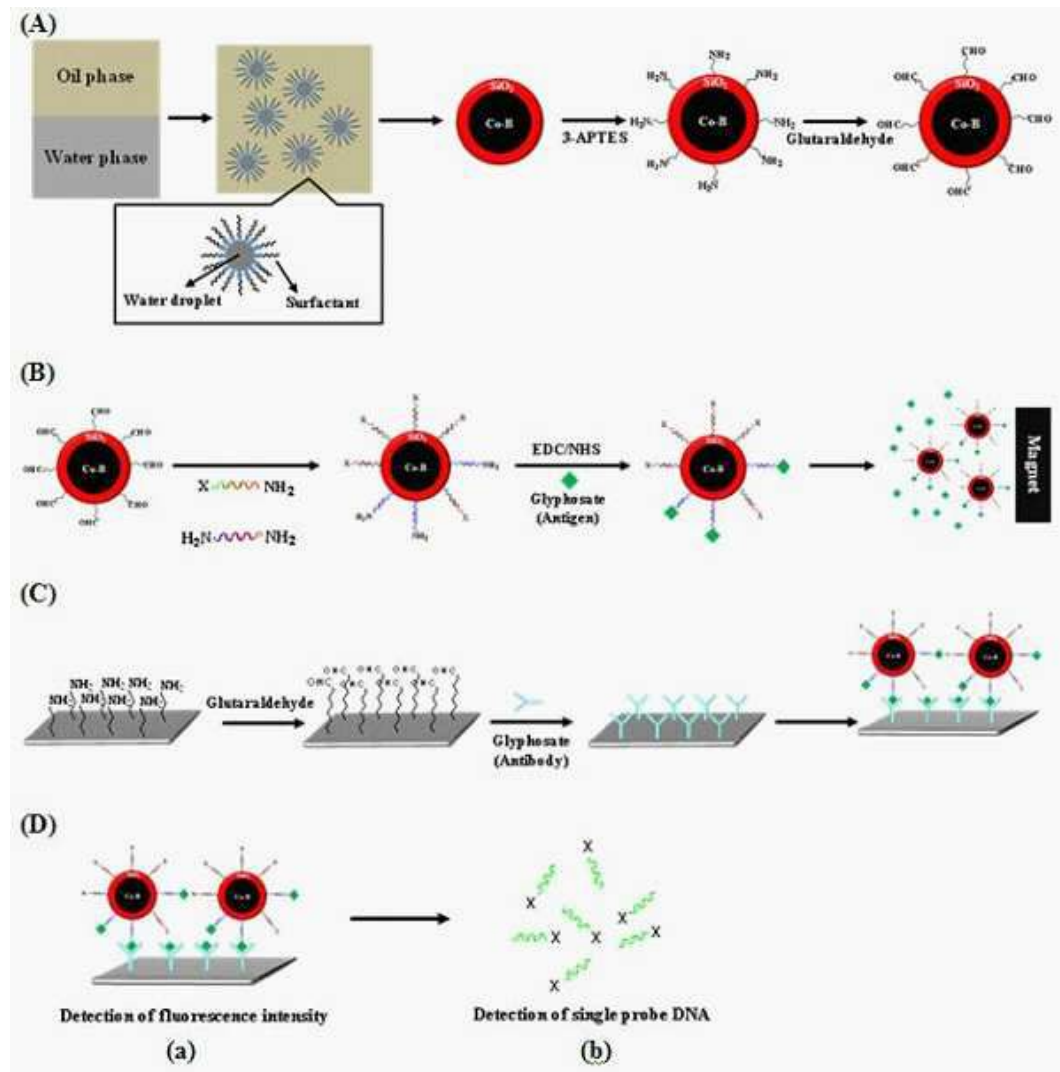
[0094] [시험예 4] 탐침 DNA 비교 검출

[0095] 실시예 4와 같이, 형광 측정 후 분리한 단일 탐침 DNA에 대하여 UV-visible spectroscopy(260nm)로 광학 밀도(O.D: optical density)값을 측정하여 그 결과를 도 5a에 나타냈다.

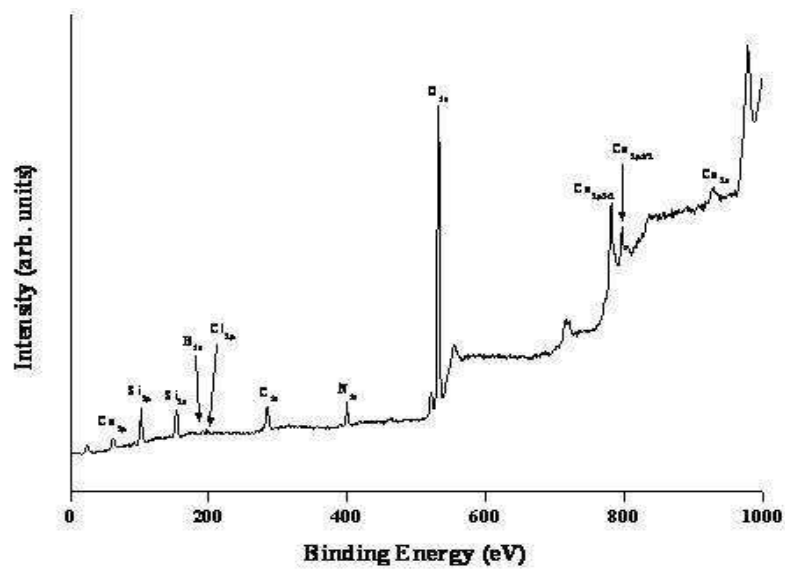
[0096] 도 5b와 같이 자유 글라이포세이트의 농도가 낮아질수록 단일 탐침 DNA의 농도가 증가하는 것을 확인하였다.

도면

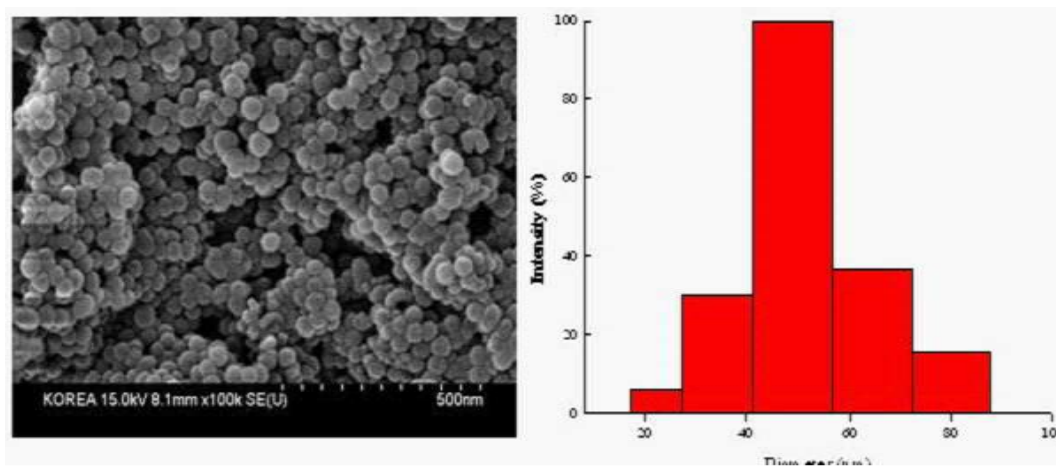
도면1



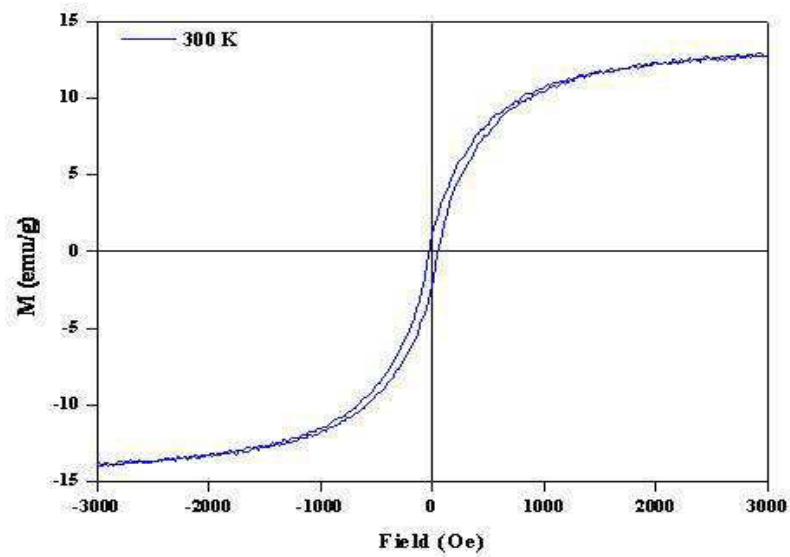
도면2a



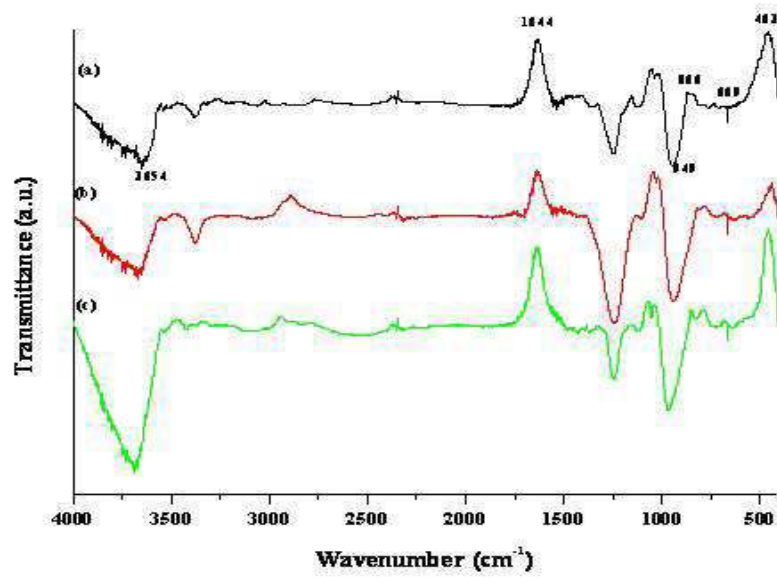
도면2b



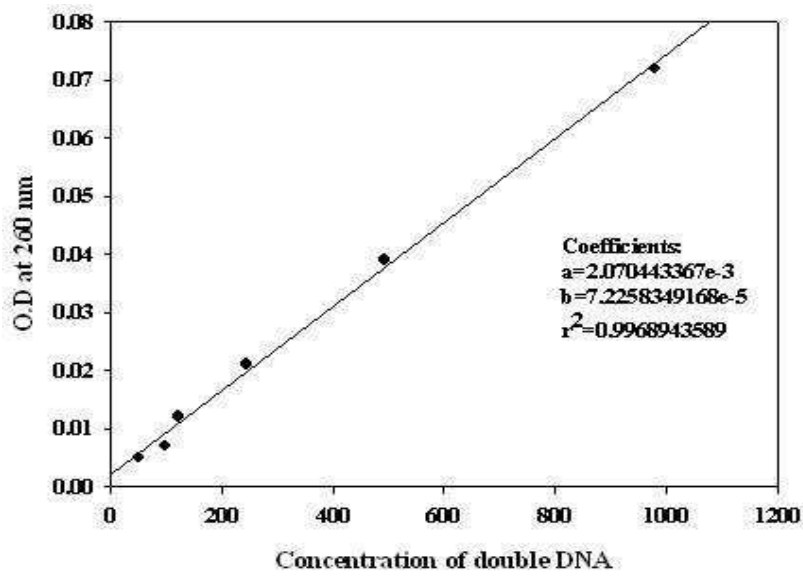
도면2c



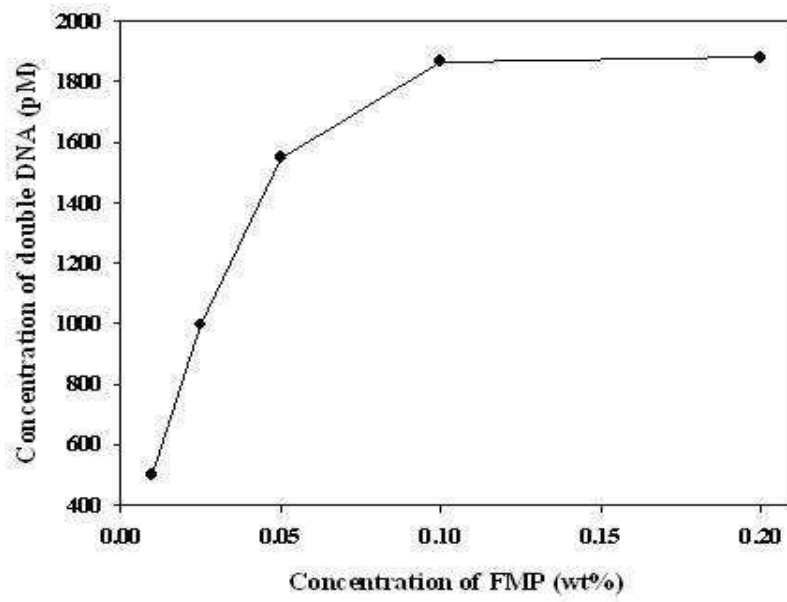
도면2d



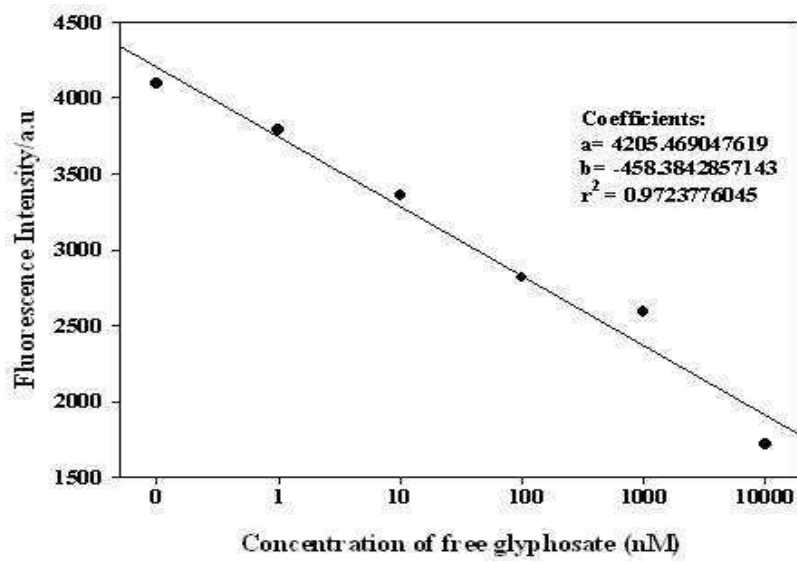
도면3a



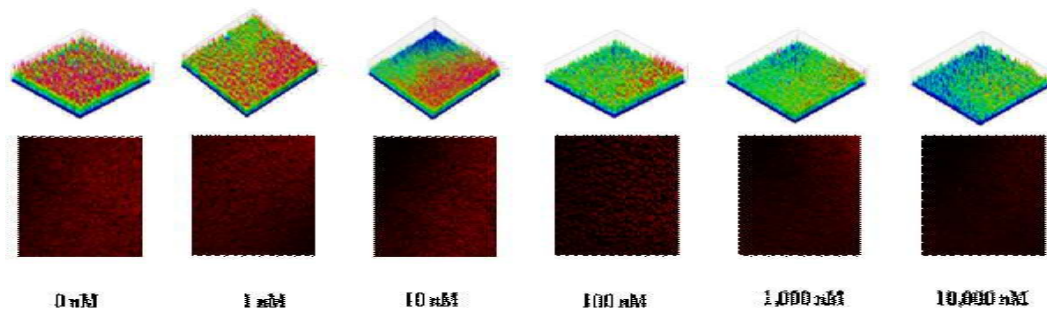
도면3b



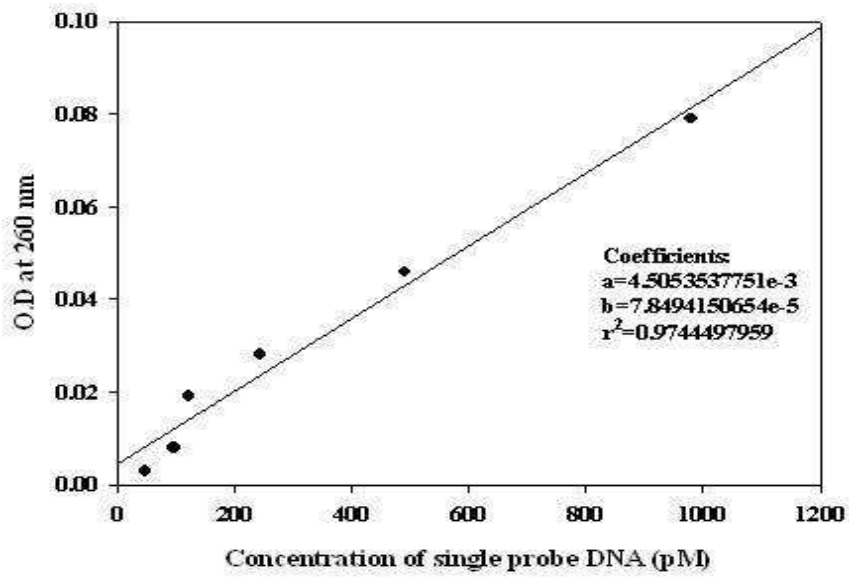
도면4a



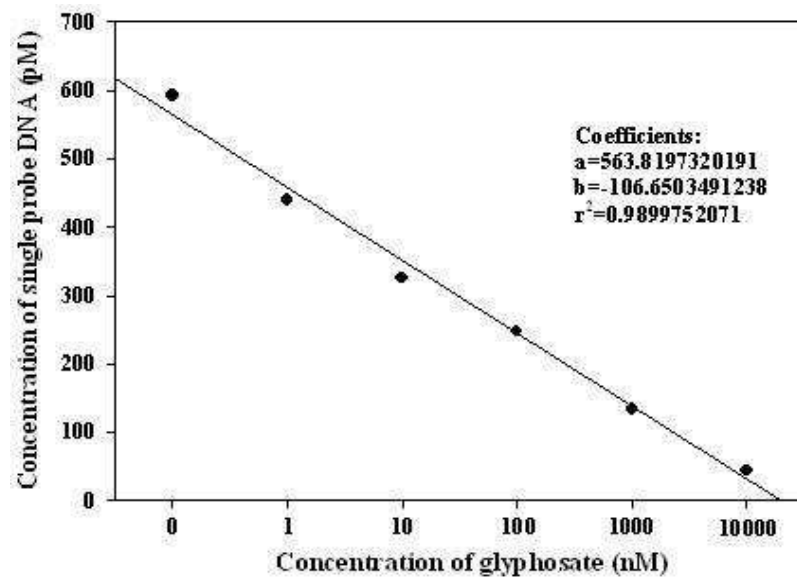
도면4b



도면5a



도면5b



도면6

