



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0076897
(43) 공개일자 2019년07월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) G01N 1/40 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/5695 (2013.01)
G01N 1/4044 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0167278
(22) 출원일자 2018년12월21일
심사청구일자 2018년12월21일
- (30) 우선권주장
1020170178159 2017년12월22일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
주식회사 수젠텍
대전광역시 유성구 테크노2로 187, 216호(용산동, 미건테크노빌드2차)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
- (72) 발명자
김은경
대전광역시 유성구 가정로 63, 103동 1202호(신성동, 럭키하나아파트)
이선희
대전광역시 유성구 배울2로 24, 305동 1403호(관평동, 대덕테크노밸리3단지아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 플러스

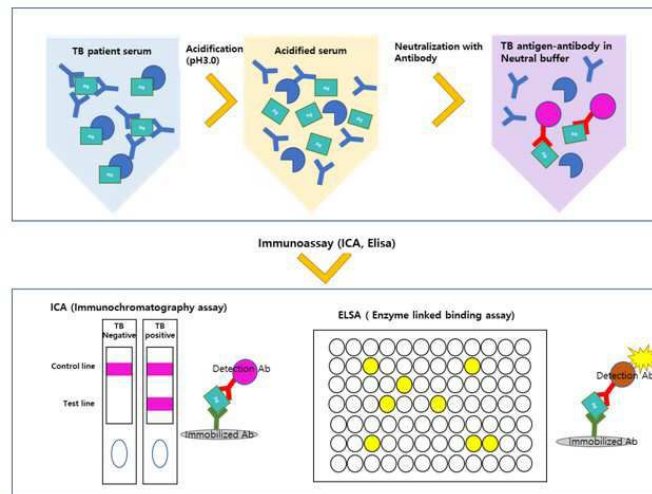
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 결핵 진단 방법

(57) 요약

본 발명의 결핵 진단 방법은 피검체의 샘플에 산성 물질을 처리하여 결핵 항원 복합체로부터 항원을 해리하는 전처리 과정을 통해 샘플내 유리 결핵 항원을 증가시켜 결핵 항원과 검출 항체의 반응성의 향상시킬 수 있어 결핵의 현장 진단이 가능하고, 신속하고 간단한 검출 방법으로서 현장 진단에 즉시 활용이 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2333/35 (2013.01)

(72) 발명자

유승범

대전광역시 서구 문정로90번길 60, 105동 605호(탄방동, 한우리아파트)

손미진

대전광역시 유성구 지족로 362, 311동 504호(지족동, 반석마을아파트3단지)

김바울

대전광역시 대덕구 덕암북로4번길 157, 301호(덕암동, 삼진빌라)

김화중

대전광역시 중구 서문로 96, 208동 2104호(문화동, 센트럴파크2단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C1553

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 감염병위기대응기술개발사업 (난치성 결핵 극복기술개발)

연구과제명 다중항원 검출을 통한 결핵의 현장 진단기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2016.05.26 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

피검체로부터 채취된 샘플에 포함된 결핵 항원 복합체로부터 항원을 해리시키기 위해 산성 물질을 처리하는 단계;

해리된 항원을 포함한 샘플 또는 해리된 항원을 중화시키기 위해 중화 시약을 처리하는 단계; 및

해리된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 처리하는 단계;

를 포함하는 결핵 진단 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 피검체로부터 채취된 샘플은 혈액(전혈, 혈장, 혈청), 소변, 객담, 침, 관절액, 구강점막액(oral mucosal transudate) 및 뇌하수체로 이루어진 군에서 선택되는 것인 결핵 진단 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 항원은 Mpt64, Esat6(the 6-kDa early secreted antigenic target), Cfp10(the 10-kDa culture filtrate protein), Ag85(the antigen 85 complex), Ag85A, Ag85B, Ag85C, HspX, LAM 및 38kDa 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 결핵 진단 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 산성 물질은 글리신 버퍼(glycine buffer), 시트르산염 버퍼(citrate buffer) 및 아세트산염 버퍼(acetate buffer) 로 이루어진 군에서 선택되는 결핵 진단 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 산성 물질의 pH는 2.0 내지 4.0인 결핵 진단 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 중화 시약을 처리하는 단계는 염기성 버퍼 용액 또는 염기성 버퍼 건조패드를 사용하여 수행되는 것인 결핵 진단 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 항체를 처리하는 단계는 항체-표지체 접합체가 처리된 건조 패드를 사용하여 수행되는 것인 결핵 진단 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 중화 시약을 처리하는 단계 및 상기 항체를 처리하는 단계는 염기성 버퍼 용액에 항체-표지체 접합체가 첨가된 용액; 또는 염기성 버퍼 용액에 항체-표지체 접합체가 첨가된 용액을 동결건조한 고상물을 사용하여 동시에 수행되는 것인 결핵 진단 방법.

청구항 9

피검체로부터 채취된 샘플에 포함된 결핵 항원 복합체로부터 항원을 해리시키기 위한 산성 시약;

해리된 항원을 중화시키기 위한 중화 시약; 및

항체가 고정된 고형체(solid phase)를 포함한 결핵 검사용 키트.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 키트는 면역크로마토그래피 키트 또는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 키트인 결핵 검사용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 결핵 여부를 진단할 수 있는 결핵 자유 항원의 비율을 증가시켜 결핵의 신속한 현장진단이 가능한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵균(mycobacterium tuberculosis)의 감염에 의한 감염증인 결핵은 전 세계적으로 발병률이 높고 사망률도 높은 질병으로 알려져 있다. 결핵을 발병 초기에 진단하여 치료하지 못하는 경우 사망에 이를 가능성이 높아 다양한 결핵 진단 방법에 대한 연구가 필요하다.

[0003] 결핵의 진단 방법으로 여러 가지 방법이 알려져 있다. 튜베르쿨린 피부 반응 검사(tuberculin skin test, TST)는 높은 민감도를 가지고 저렴하나 특이성이 낮아 결핵 진단의 신뢰도가 낮은 단점이 있다. 결핵균 배양 방법은 신뢰도가 가장 높은 검색 방법이나 결핵균을 분리 및 배양하기 때문에 위험성이 높고 배양 기간이 길어 진단 결과를 얻기까지 매우 오랜 시간이 걸리는 단점이 있다. 최근에는 액체 배지를 이용하여 배양 기간을 단축시키는 방법이 도입되고 있으나 비정형 결핵균과 감별을 위한 추가 확진 시험이 필요한 문제가 있다. 핵산증폭법(nucleic acid amplification)의 방법은 신속하고 높은 민감도를 보이며 약제 내성도 구별 가능하나 고가의 장비와 인력이 요구되기 때문에 결핵 진단 제품의 요구가 높은 저소득 국가에서 사용하기 어려운 문제가 있다.

[0004] 결핵의 빠른 진단 및 치료를 위해서는 현장진단(point of care test, POCT)이 가능한 결핵진단방법이 필요하다. 결핵의 현장진단 방법 중 하나인 현미경을 이용한 도말 염색은 훈련된 전문 인력과 실험실이 필요하며 민감도가 낮아 진단의 정확성이 낮다. 혈청학적 결핵 진단 방법은 환자의 혈액이나 혈청을 채취해 결핵균의 감염에 의해

생성된 항체를 진단하는 방법으로 현재 신속하고 저렴한 항체 진단 제품이 상업화되어 있고 수분내에 결과 확인이 가능하며 전문 인력이 필요없는 장점이 있으나 활동결핵과 잠복결핵의 구별이 어렵고 민감도가 매우 낮다. 결핵균의 항원을 통한 진단 방법은 객담, 혈청, 소변이나 뇌하수체에 있는 결핵균 항원 검출을 통해 결핵을 진단하는 방법으로 여러 제품이 있으나 결핵균 배양이 필요하거나 정확도, 민감도 등이 낮은 경우가 있다. 결핵균 항원 검출을 통한 결핵 진단 방법의 예로 한국 등록특허 제10-1524109호 등이 있다.

[0005] 본 발명은 이러한 결핵의 진단 방법의 문제를 해결하기 위해, 결핵에 감염된 환자에서 형성된 항원 복합체를 간단한 방법으로 해리시키고 항원 복합체의 해리에 의해 증가된 자유 항원을 이용하여 간단하고 신속하게 결핵 현장 진단이 가능한 방법을 제공하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국 등록특허 제10-1524109호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 결핵의 현장 진단을 위해 피검자로부터 채취한 시료에 포함된 항원 복합체로부터 항원을 해리시켜 자유 항원을 증가시키고 증가된 자유 항원을 이용하여 결핵의 현장 진단이 가능한 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 피검체로부터 채취한 샘플에 산성 물질을 처리한 후, 결핵균의 분비 항원에 대한 항체를 처리하는 결핵 진단 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 피검체로부터 채취한 샘플에 포함된 결핵 항원 복합체로부터 항원을 해리시키기 위한 산성 시약, 해리된 항원을 중화시키기 위한 중화 시약 및 항체가 고정된 고형체(solid phase)를 포함한 결핵 검사용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 높은 정확도 및 민감도를 가진 결핵의 현장 진단 방법을 제공할 수 있다. 본 발명의 결핵 진단 방법은 간단하고 신속하며 현장진단에 즉시 적용 가능할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 결핵 진단 방법의 과정을 보여준다(TB patient serum; 결핵 환자 혈청).

도 2는 본 발명의 일 실시예에서 사용한 면역크로마토그래피 스트립(Immunochromatography strip)의 라미네이션 구조를 보여준다.

도 3은 본 발명의 결핵 진단 방법에 따른 결핵 진단 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하에서 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다. 본 명세서에서 사용되는 용어는 따로 정의하지 않는 경우 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 내용으로 해석되어야 할 것이다. 본 명세서의 도면 및 실시예는 통상의 기술자가 본 발명을 쉽게 이해하고 실시하기 위한 것으로 도면 및 실시예에서 발명의 요지를 흐릴 수 있는 내용은 생략될 수 있으며, 본 발명이 도면 및 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명은 결핵을 현장 진단할 수 있는 방법에 관한 것으로 피검체로부터 채취한 샘플에 산성 물질을 처리한 후, 결핵균의 분비 항원에 대한 항체를 처리하는 결핵 진단 방법 또는 결핵 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있다.

[0014] 구체적으로 본 발명은 피검자의 샘플(시료)을 채취하는 단계, 샘플에 산성 물질을 처리하는 단계, 샘플을 중화

시키는 단계 및 결핵균 특이 항원에 대한 항체를 처리하는 단계를 포함하는 결핵 진단 방법을 제공할 수 있다.

- [0015] 본 발명에서 피검자는 결핵에 감염되었거나 감염 가능성이 존재하는 사람 및 동물을 포함하고, 결핵을 진단하기 위한 대상 전체를 의미할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 피검자의 샘플(또는 시료)은 혈액(전혈, 혈장, 혈청), 소변, 객담, 침, 관절액, 구강점막액(oral mucosal transudate) 및 뇌하수체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다. 피검자의 샘플은 결핵균에 의해 생성되는 결핵균 항원 복합체가 존재할 수 있는 샘플을 모두 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 산성 물질은 피검자의 샘플에 포함되어 있는 결핵균 항원 복합체로부터 결핵균 항원을 해리시키기 위한 물질 전반을 포함할 수 있다. 산성 물질은 글리신 버퍼(glycine buffer), 시트르산염 버퍼(citrate buffer), 및
- [0018] 아세트산염 버퍼(acetate buffer)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상이고 글리신 버퍼가 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다. 결핵균 항원 복합체로부터 결핵균 항원을 해리시킬 수 있는 산성 물질이면 특별히 제한되지 않고 사용할 수 있다. 본 발명에서 결핵균 항원 복합체는 결핵균 항원이 다른 생체분자, 화합물 또는 인공 물질과 결합하여 형성될 수 있는 복합체를 의미할 수 있다. 예를 들어, 항원-항원 복합체나 항원-항체 복합체가 대표적이나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명에서 산성 물질의 pH는 1.0 내지 6.0, 1.0 내지 5.5, 1.0 내지 5.0, 1.0 내지 4.5, 1.0 내지 4.0, 2.0 내지 6.0, 2.0 내지 5.5, 2.0 내지 5.0, 2.0 내지 4.5 바람직하게는 2.0 내지 4.0이다. 본 발명에서 산성 물질의 농도는 0.05 내지 2.0M, 0.05 내지 1.5M, 0.05 내지 1.0M, 0.05 내지 0.5M, 0.05 내지 0.1M, 0.1 내지 2M, 0.1 내지 1.5M, 0.1 내지 1.0M, 0.1 내지 0.9M, 0.1 내지 0.8M, 0.1 내지 0.7M, 0.1 내지 0.6M, 0.1 내지 0.5M, 바람직하게는 0.05 내지 2.0이다. 산성 물질의 농도는 항원 복합체의 종류에 따라 항원-항원 또는 항원-항체의 결합세기가 다를 수 있고, 사용하는 중화시약의 종류에 따라 달라질 수 있다.
- [0020] 항원-항원 복합체의 예로 Ag85A, Ag85B 및 Ag85C와 같은 Ag85 복합체(Ag85 complex)가 있고 Ag85 복합체는 숙주 세포(host cell)의 피브로넥틴(fibronectin) 및 엘라스틴(Elastin) 단백질과 결합하여 결핵균의 감염 활동에 기여하는 것으로 알려져 있다. 항원-항원 복합체의 또 다른 예로 CFP-10과 ESAT6은 RD1 유전자에서 함께 발현되는 CFP-10 및 ESAT6 단백질로 이들이 헤테로다이머(heterodimer)를 이루어 형성된 CFP10/ESAT6가 있으며, CFP10/ESAT6는 결핵균의 병원성에 기여하는 것으로 알려져 있다.
- [0021] 항원-항체 복합체는 결핵 환자의 혈액과 같은 체액에서 형성되는 면역 복합체(immune complex)로 결핵균이 분비하는 분비항원에 특이적이 IgG, IgA, IgM 등의 발현으로 인해 형성되는 복합체를 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 결핵균 항원 복합체로부터 해리되는 결핵균 분비 항원은 Mpt64, Esat6(the 6-kDa early secreted antigenic target), Cfp10(the 10-kDa culture filtrate protein), HspX(14kDa), 38kDa 단백질(38kDa protein), LAM 및 Ag85(the antigen 85 complex)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에서 결핵균 항원 특이 항체는 Monoclonal(또는 polyclonal) anti-CFP10 antibody, Monoclonal(또는 polyclonal) anti-Ag85A antibody, Monoclonal(또는 polyclonal) anti-Ag85B antibody, Monoclonal(또는 polyclonal) anti-Ag85C antibody, Monoclonal(또는 polyclonal) anti-ESAT6 antibody, Monoclonal(또는 polyclonal) anti-HspX(14kDa) antibody, Monoclonal(또는 polyclonal) anti-Mpt64 antibody, Monoclonal(또는 polyclonal) anti-38kDa antibody 및 Monoclonal(또는 polyclonal) anti-LAM antibody 로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 결핵 진단 방법은 보다 구체적으로 다음과 같은 방법으로 이루어질 수 있다.
- [0025] 본 발명의 결핵 진단 방법은 피검체로부터 샘플을 채취하는 단계, 샘플에 포함된 결핵 항원 복합체로부터 항원을 해리시키기 위해 산성 물질을 처리하는 단계, 해리된 항원을 포함한 샘플 또는 해리된 항원을 중화시키기 위해 중화 시약을 처리하는 단계 및 해리된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 처리하는 단계를 포함하는 방법일 수 있다.
- [0026] 피검체로부터 샘플을 채취하는 단계는 샘플의 종류(객담, 소변, 혈액 등)에 따라 공지의 검출 방법을 통해 진행될 수 있으며 특별히 제한되는 것은 아니다.

- [0027] 피검체로부터 채취한 샘플에는 결핵균 항원에 의해 형성된 항원 복합체가 존재할 수 있고 항원 복합체로부터 항원을 해리시키기 위해 산성 물질을 처리하는 단계를 진행한다. 산성 물질을 샘플에 처리하게 되면 항원 복합체로부터 항원이 해리되게 되고 샘플에 자유 항원(free antigen)이 증가하게 된다. 자유 항원의 증가에 의해, 이후 처리될 결핵균 항원에 특이적인 항체에 의한 항원-항체 반응도 증가하여 결핵 진단의 정확성 및 민감도가 향상될 수 있다.
- [0028] 피검체로부터 채취한 샘플에 산성 물질을 처리한 후 중화 단계를 거치게 되는데, 산성의 샘플 또는 샘플에 포함된 항원을 중화시키게 된다. 중화 단계는 자유항원과 항체를 반응시키기 위해 적합한 환경 제공을 위해 필요하다. 중화를 위한 중화 시약은 염기성 물질이면 특별히 제한되지 않으며 앞서 사용한 산성 물질, 항원의 종류, 이후 처리할 항체의 종류 등에 따라 적절히 사용할 수 있다. 중화 시약은 예를 들어 TRIS(tris-[hydroxymethyl]-aminomethane), 카보네이트(carbonate) 및 보레이트(borate)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 샘플과 중화 시약은 1:1 내지 1:10 부피비로 반응시키는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니며, 사용 시약과 샘플의 산성 정도에 따라 적절하게 조절할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 중화 시약의 pH는 8.0 내지 10.5, 8.0 내지 11.0, 9.0 내지 10.0, 9.0 내지 10.5, 9.0 내지 11.0, 바람직하게는 8.0 내지 10.0이다.
- [0030] 본 발명에서 중화 시약의 농도는 0.02 내지 0.5M, 0.02 내지 0.4M, 0.02 내지 0.3M, 0.02 내지 0.2M, 0.03 내지 0.5M, 0.03 내지 0.4M, 0.03 내지 0.3M, 0.03 내지 0.2M, 0.04 내지 0.5M, 0.04 내지 0.4M, 0.04 내지 0.3M, 0.04 내지 0.2M, 0.05 내지 0.5M, 0.05 내지 0.4M, 0.05 내지 0.3M, 0.05 내지 0.2M, 0.06 내지 0.5M, 0.06 내지 0.4M, 0.06 내지 0.3M, 0.06 내지 0.2M, 0.07 내지 0.5M, 0.07 내지 0.4M, 0.07 내지 0.3M, 0.07 내지 0.2M, 0.08 내지 0.5M, 0.08 내지 0.4M, 0.08 내지 0.3M, 0.08 내지 0.2M, 0.09 내지 0.5M, 0.09 내지 0.4M, 0.09 내지 0.3M, 0.09 내지 0.2M, 0.1 내지 0.5M, 0.1 내지 0.4M, 0.1 내지 0.3M, 0.1 내지 0.2M이다. 중화 시약의 농도는 사용하는 산성 물질 및 결핵 항원 복합체의 종류에 따라 다를 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 결핵 항원 중 Ag85를 검출하기 위해 산성 물질로 0.05 내지 2.0M의 글라이신 처리시 중화시약으로 0.1 내지 0.5M의 트리스(TRIS)를 처리할 때 Ag85의 검출 효과가 현저히 상승할 수 있다. 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 결핵 항원 중 CFP10을 검출하기 위해 산성 물질로 0.05 내지 1.0M의 글라이신 처리시 중화시약으로 0.02 내지 0.2M의 트리스(TRIS)를 처리할 때 CFP10의 검출 효과가 현저히 상승할 수 있다. 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 결핵 항원 중 ESAT6를 검출하기 위해 산성 물질로 0.05 내지 1.0M의 글라이신 처리시 중화시약으로 0.02 내지 0.2M의 트리스(TRIS)를 처리할 때 ESAT6의 검출 효과가 현저히 상승할 수 있다.
- [0032] 중화 단계 이후 또는 중화 시약 처리와 함께 샘플에 항체를 처리하여 샘플에 포함된 자유 항원을 포함한 결핵균 항원과 항원-항체 반응을 유도할 수 있다. 항체의 검출 대상인 결핵균 항원의 종류에 따라 적절하게 선택할 수 있으며 특별히 제한되는 것은 아니다. 항체는 항원의 검출을 위한 검출 항체(detection antibody)로서 항원과 복합체를 이루는 다른 단백질들과 경쟁 반응을 유도하게 된다. 항체는 표지체(indicator)가 결합된 표지 항체(labeled antibody)가 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다. 표지 항체는 항체-표지체 접합체로 표기될 수 있다. 표지체는 금나노입자, 페록시다아제(peroxidase)와 같은 효소, 형광물질(fluorescent substance), 라텍스 비드(latex bead), 셀룰로오스 나노 비드와 같은 다양한 염색 물질을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 항체 처리 후 샘플의 항원과 항체가 결합한 것을 검출하기 위해 면역 검출 단계를 수행할 수 있다. 면역 검출을 위한 방법은 특별히 제한되지 않으며 공지의 다양한 면역 검출 방법을 사용하여 항체와 결핵균 항원간의 결합을 통한 결핵 여부를 진단할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 중화 버퍼(neutralization buffer)내 항원-검출 항체를 면역크로마토그래피(immunochromatography)나 마이크로플레이트(microplate)에 고정된 또 다른 항체(immobilized antibody)와 반응시키고 세척 및 발색 반응을 통해 결핵의 감염 여부를 최종적으로 확인할 수 있다.
- [0034] 본 발명은 이상의 결핵 진단 방법을 수행할 수 있고, 결핵의 현장진단에 사용할 수 있는 결핵 진단용 키트를 제공할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 결핵 진단용 키트는 피검체로부터 채취한 샘플에 포함된 결핵 항원 복합체로부터 항원을 해리시키기 위한 산성 시약, 해리된 항원을 중화시키기 위한 중화 시약 및 항체가 고정된 고형체(solid phase)를 포함할 수

있다.

[0036] 본 발명에서 결핵 진단용 키트는 항체가 고정된 고형체나 항원-항체 반응을 위해 사용하는 물질인 항체, 효소, 표지물질(방사능 물질, 형광 물질 등) 등의 종류에 따라 면역크로마토그래피 키트, ELISA(enzyme-linked immunosorbant assay) 키트 또는 경쟁 어세이(competition assay) 키트로 제작할 수 있다.

[0037] 본 발명의 결핵 진단용 키트는 필요에 따라 결핵 항원에 특이적이거나 고정화된 항체와 결합할 수 있는 항체를 더 포함할 수 있다.

[0039] 이하에서 본 발명을 실시하기 위한 실시예에 대하여 설명한다. 실시예는 본 발명을 실시하기 위한 하나의 예시에 해당하는 것으로서 본 발명이 실시예에 의해 한정 해석되어서는 안된다.

실시예 1

[0040] (1) 면역크로마토그래피법을 이용한 결핵 진단

[0041] 결핵에 걸린 피검체로부터 채취한 혈청 또는 혈장 샘플을 산성물질인 pH 2.0~4.0의 1.0M 글라이신(glycine)에 1/10(샘플/산성물질)의 부피비로 섞은 후 30분 이내로 전처리하여 반응시켰다.

[0042] 글라이신에 반응시킨 샘플에 포함된 자유 항원 검출을 통한 결핵 진단을 위해 면역크로마토그래피 테스트기를 다음과 같이 제조하였다.

[0043] - 항체 고정화 : NC 멤브레인 상에 항체를 라인 형태로 분주하여 건조하고 고정시켰다.

[0044] - 중화 패드 구성 : pH 8.0의 100mM Tris-HCl, 0.5~2.0% 카제인(casein), 0.5~2% 계면활성제(Tween20, Triton X-100), 20~500mM NaCl을 처리한 버퍼를 제조하고, 유리섬유(glass fiber)에 적셔 건조시켜 중화 패드를 구성하였다.

[0045] - 중화 버퍼 : pH 8.0 이상의 100mM Tris-HCl, 0.5~2.0% 카제인(casein), 0.5~2% 계면활성제(Tween20, Triton X-100), 20~500mM NaCl을 처리한 버퍼를 제조하였다.

[0046] - 항체-금 접합체(gold-antibody conjugate) 제조 : 40~60nm 크기의 금콜로이드(colloidal gold)에 마우스 유래 항 결핵항원단일클론항체를 1~10 μ g/ml로 반응시키고, 블로킹 시약(blocking agent)로 카제인이나 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 0.1~1.0%로 처리한 후 세척하여 정제된 항 결핵항체-금 접합체를 얻었다.

[0047] - 접합체 패드(conjugate pad)의 제조 : 항 결핵항체-금 접합체를 수크로스(sucrose)와 BSA가 첨가된 인산 완충액(phosphate buffer)에 적정 농도로 처리하고 0.45 μ m 필터로 여과한 후 접합체 패드에 적시고 건조시켜 패드를 구성하였다.

[0048] - 면역크로마토그래피 스트립의 제조 : 항체 고정화 NC 멤브레인, 중화 패드, 항체-금 접합체가 처리된 접합체 패드를 사용하여 도 2와 같이 면역크로마토그래피 스트립을 제조하였다.

[0049] (2) 면역크로마토그래피법을 이용한 결핵 진단

[0050] 결핵에 걸린 피검체로부터 채취한 혈청 또는 혈장 샘플을 산성물질인 pH 2.0~4.0의 1.0M 글라이신(glycine)에 1/10(샘플/산성물질)의 부피비로 섞은 후 30분 이내로 전처리하여 반응시켰다.

[0051] 글라이신에 반응시킨 샘플에 포함된 자유 항원 검출을 통한 결핵 진단을 위해 면역크로마토그래피 테스트기를 다음과 같이 제조하였다.

[0052] - 항체 고정화 : NC 멤브레인 상에 항체를 라인 형태로 분주하여 건조하고 고정시켰다.

[0053] - 중화 항체 : pH 8.0의 100mM Tris-HCl, 0.5~2.0% 카제인(casein), 0.5~2% 계면활성제(Tween20, Triton X-100), 20~500mM NaCl을 처리한 버퍼를 제조하고, 40~60nm 크기의 금콜로이드(colloidal gold)에 마우스 유래 항 결핵항원단일클론항체를 1~10 μ g/ml로 반응시키고, 블로킹 시약(blocking agent)로 카제인이나 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 0.1~1.0%로 처리한 후 세척하여 정제된 항 결핵항체-금 접합체를 첨가한 후 안정제로서 PEG, dextran, PVA, sucrose, trehalose, mannitol 등의 성분을 적량 추가하였다. 이와 같이 액상의 중화 항체 내지 이를 추가적으로 16~48시간 동안 동결건조를 진행하여 건조된 중화 항체를 제조하였다.

[0054] - 면역크로마토그래피 스트립의 제조 : 항체 고정화 NC 멤브레인 및 크로마토그래피를 위한 Glass fiber 내지

cellulose Pad류들을 사용하여 도 2 와 동일한 구조의 면역크로마토그래피 스트립을 제조하였다.

- [0056] 이 상에서 제조한 면역크로마토그래피 스트립에 글라이신으로 전처리한 피검체의 샘플 자체 또는 전처리한 피검체의 샘플과 중화 버퍼 내지 전처리한 피검체의 샘플과 중화 항체를 적정 비율로 섞어 처리하고, 결핵 항원 검출 결과 여부를 확인하였다(도 3).
- [0057] 결핵 항원인 CFP-10 검출을 위해 항체로 항CFP-10 항체를 사용하였다.
- [0058] 결핵 항원 검출 결과, 글라이신으로 전처리한 샘플의 경우 면역크로마토그래피 스트립의 검사선 위치에서 뚜렷한 밴드가 나타나 결핵 항원이 검출됨을 확인할 수 있었다. 그러나, 글라이신으로 전처리하지 않은 샘플의 경우 검사선 위치에서 밴드가 거의 나타나지 않아 결핵 항원의 검출 정도가 매우 낮았다.
- [0059] 결핵 항원으로 Ag85 검출을 위해 항 Ag85 항체를 사용한 경우(실시에 2~34 참조)에도 글라이신으로 전처리한 샘플의 경우 면역크로마토그래피 스트립의 검사선 위치에서 뚜렷한 밴드가 나타나 결핵 항원이 검출됨을 확인할 수 있었으나, 글라이신 전처리가 없는 샘플의 경우 검사선 위치에서 밴드가 거의 나타나지 않아 결핵 항원의 검출 정도가 매우 낮았다.
- [0060] 이러한 결과는 일반적인 항원-항체 반응으로는 정확한 결핵 여부 판별이 어려운 환자(결핵 항원 복합체에 의해 검출 항원이 충분하지 않은 환자 등)라도 본 발명의 결핵 진단 방법으로는 정확한 진단이 가능한 것을 보여준다.
- [0061] 또한, 면역크로마토그래피 스트립은 간단하게 제조할 수 있고 제조비용도 저렴하여 현장 진단에 본 발명의 결핵 진단 방법을 즉시 적용하여 활용할 수 있다.
- [0062] [실시에 2 내지 실시에 34]
- [0063] 실시에 1과 같은 방법으로 결핵 항원 검출을 실시하였다. 사용한 산성물질, 중화시약, 항체 및 검출여부는 아래 [표 1], [표 2], [표 3], [표 4]에 나타내었다.
- [0064] 검출여부는 총 20개의 면역크로마토그래피 스트립에서 검사선에 나타난 밴드(결핵 항원 복합체에서 해리된 결핵 항원과 사용 항체의 결합에 의해 나타남)의 수를 통해 확인하였고, 아래 식에 따라 계산한 결과 60% 이상인 경우 검출강도를 높음으로 하였고, 20% 이상 60% 미만에서 검출강도는 낮음으로 하였고, 20% 미만은 검출되지 않음으로 하였다.
- [0065] $\text{검출강도} = [\text{검사선에 밴드가 나타난 면역크로마토그래피 스트립 수} / \text{총 면역크로마토그래피 스트립 수}] * 100$
- [0066] (현장 진단에 사용하기 위해서는 육안으로 즉시 판별할 수 있는지 여부가 중요하므로, 검사선의 밴드의 나타남 여부는 육안으로 판별하였다.

표 1

		실시에 2	실시에 3	실시에 4	실시에 5	실시에 6	실시에 7	실시에 8	실시에 9	실시에 10
샘플 부위	채취	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)
	종류	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine
산성 물질	농도	0.05M	0.1 M	0.5 M	0.5 M	1 M	1 M	1.5M	2M	2M
	pH	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
중화 시약	종류	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS
	농도	0.05M	0.05M	0.1M	0.2M	0.1M	0.2M	0.3M	0.5M	0.8M
	pH	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
산성물질/ 중화시약 반응비(v/v)		1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
항체		항-Ag85B	항-Ag85B	항-Ag85B	항-Ag85B	항-Ag85B	항-Ag85B	항-Ag85B	항-Ag85B	항-Ag85B
검출강도		검출되지 않음	낮음	높음	높음	높음	높음	높음	높음	낮음

[0068] [표 1]의 결과에 따르면, Glycine의 농도가 0.5~2.0M, TRIS의 농도 범위가 0.1~0.5M일 때 결핵-항원 복합체에서 Ag85B의 효과적인 해리 및 검출이 가능함을 확인할 수 있었다.

표 2

[0069]

		실시예 11	실시예 12	실시예 13	실시예 14	실시예 15	실시예 16	실시예 17	실시예 18	실시예 19
샘플 부위	채취	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)
산성 물질	종류	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine
	농도	0.02M	0.05M	0.05M	0.1 M	0.1 M	0.5 M	1 M	1M	2M
	pH	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
중화 시약	종류	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS
	농도	0.01M	0.01M	0.02M	0.02M	0.05M	0.1M	0.2M	0.4M	0.4M
	pH	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
산성물질/ 중화시약 반응비(v/v)		1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
항체		항-CFP10	항-CFP10	항-CFP10	항-CFP10	항-CFP10	항-CFP10	항-CFP10	항-CFP10	항-CFP10
검출강도		검출되지 않음	낮음	높음	높음	높음	높음	높음	낮음	검출되지 않음

[0070] [표 2]의 결과에 따르면, Glycine의 농도가 0.05~1.0M, TRIS의 농도 범위가 0.02~0.2M일 때 결핵-항원 복합체에서 CFP10의 효과적인 해리 및 검출이 가능함을 확인할 수 있었다.

표 3

[0071]

		실시예 20	실시예 21	실시예 22	실시예 23	실시예 24	실시예 25	실시예 26	실시예 27	실시예 28
샘플 부위	채취	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)	혈청(10) 혈장(10)
산성 물질	종류	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine
	농도	0.02M	0.05M	0.05M	0.1 M	0.1 M	0.5 M	1 M	1M	2M
	pH	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
중화 시약	종류	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS
	농도	0.01M	0.01M	0.02M	0.02M	0.05M	0.1M	0.2M	0.4M	0.4M
	pH	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
산성물질/ 중화시약 반응비(v/v)		1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
항체		항-ESAT6	항-ESAT6	항-ESAT6	항-ESAT6	항-ESAT6	항-ESAT6	항-ESAT6	항-ESAT6	항-ESAT6
검출강도		검출되지 않음	낮음	높음	높음	높음	높음	높음	낮음	검출되지 않음

[0072] [표 3]의 결과에 따르면, Glycine의 농도가 0.05~1.0M, TRIS의 농도 범위가 0.02~0.2M일 때 결핵-항원 복합체에서 ESAT6의 효과적인 해리 및 검출이 가능함을 확인할 수 있었다.

표 4

[0073]

		실시예 29	실시예 30	실시예 31	실시예 32	실시예 33	실시예 34
샘플 채취 부위		혈청(10)혈장(10)	혈청(10)혈장(10)	혈청(10)혈장(10)	혈청(10)혈장(10)	혈청(10)혈장(10)	혈청(10)혈장(10)
산성 물질	종류	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine	Glycine
	농도	0.1M	0.1M	0.1 M	0.1 M	0.1 M	0.1 M
	pH	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
중화 시약	종류	Borate	Carbonate	Borate	Carbonate	Borate	Carbonate
	농도	0.05M	0.05M	0.05M	0.05M	0.05M	0.05M
	pH	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
산성물질/중화시약		1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
반응비(v/v)							
항체		항-Ag85B	항-Ag85B	항-CFP10	항-CFP10	항-ESAT6	항-ESAT6
검출강도		높음	높음	높음	높음	높음	높음

[0074]

[표 4]의 결과에 따르면 중화시약으로 Borate 및 Carbonate를 사용하였을 때도 결핵 항원 복합체로부터 Ag85B, CFP10 및 ESAT6의 효과적인 해리 및 검출이 가능함을 확인할 수 있었다.

[0076]

이상의 결과를 통해, 산성물질처리 및 중화시약의 처리에 의해 결핵 항원 복합체로부터 결핵 항원(CFP10, Ag85, ESAT6)을 효과적인 해리 및 검출이 가능함을 확인할 수 있었다.

도면

도면1

