

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0080395
(43) 공개일자 2025년06월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/64 (2006.01) *G01N 33/533* (2006.01)
G01N 33/538 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 21/6428 (2013.01)
G01N 21/6486 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0168113
(22) 출원일자 2023년11월28일
심사청구일자 2023년11월28일
- (71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
- (72) 발명자
박종남
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
박정훈
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인리채

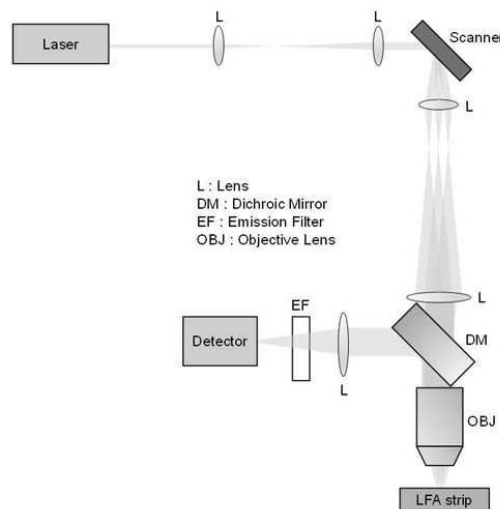
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 측면 흐름 분석 시스템

(57) 요약

본 발명은 LFA 분석 시스템에 관한 것으로, 상세하게는 샘플패드, 컨จู게이션패드, 멤브레인 및 흡수패드를 포함하는 LFA(Lateral Flow Assay) 스트립; 상기 LFA 스트립에 레이저 광을 조사하는 광원; 상기 레이저의 광초점을 상기 멤브레인의 컨트롤 라인 또는 테스트 라인 상으로 조절하는 조절부; 상기 테스트 라인의 각 포인트에서 방출된 형광 세기를 측정하여 각 픽셀에 대응시켜 이미지를 획득하는 검출부;를 포함하고, 상기 컨จู게이션패드에 포함되는 프로브는 란타늄 이온이 도핑된 형광 입자로 표지된 것일 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

G01N 33/533 (2013.01)

G01N 33/538 (2013.01)

G01N 33/54388 (2021.08)

G01N 2021/6439 (2013.01)

G01N 2021/6463 (2013.01)

(72) 발명자

김정모

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

최유하

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415184155

과제번호 KD000310

부처명 산업통상자원부

과제관리(전문)기관명 (재단)범부처전주기의료기기연구개발사업단

연구사업명 범부처전주기의료기기연구개발(산업부)

연구과제명 무릎연골재생을 위한 마이크로전달체 기반 치료물질 능동정밀전달 의료기기 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 한국마이크로의료로봇연구원

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711198709

과제번호 00264980

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 뇌과학선도융합기술개발

연구과제명 다중스케일 연계영상기반 비침습적 뇌신경 소기관망 광학영상 기술 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 울산과학기술원

연구기간 2023.07.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

샘플패드, 컨쥬게이션패드, 멤브레인 및 흡수패드를 포함하는 LFA(Lateral Flow Assay) 스트립;

상기 LFA 스트립에 레이저 광을 조사하는 광원;

상기 레이저의 광초점을 상기 멤브레인의 컨트롤 라인 또는 테스트 라인 상으로 조절하는 조절부;

상기 테스트 라인의 각 포인트에서 방출된 형광 세기를 측정하여 각 픽셀에 대응시켜 이미지를 획득하는 검출부;를 포함하고,

상기 컨쥬게이션패드에 포함되는 프로브는 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자로 표시된 것인, LFA 분석 시스템.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 프로브는 상기 형광 입자 표면의 양친매성 고분자에 결합된 것인, LFA 분석 시스템.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 레이저 광원은 적외선을 조사하는 것인, LFA 분석 시스템.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자는 적외선 여기 하에 적외선을 방출하는 것인, LFA 분석 시스템.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조절부는 레이저 광의 방향을 조절하는 미러 스캐너; 및 초점을 조절하는 하나 이상의 렌즈를 포함하는, LFA 분석 시스템.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 형광 입자는 Yb^{3+} 및 Tm^{3+} ; Yb^{3+} 및 Er^{3+} ; Yb^{3+} , Nd^{3+} 및 Er^{3+} ;으로 이루어진 군에서 선택된 란탄족 이온의 조합으로 도핑된 것인, LFA 분석 시스템.

청구항 7

청구항 2에 있어서, 상기 양친매성 고분자는 가지 말단이 적어도 일부가 카르복실기이고, 상기 프로브는 항체인, LFA 분석 시스템.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 분석 대상인 시료가 체액인, LFA 분석 시스템.

청구항 9

샘플패드, 컨쥬게이션패드, 멤브레인 및 흡수패드를 포함하는 LFA(lateral flow assay) 분석 방법에 있어서,

상기 컨쥬게이션패드에 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자로 표지된 프로브를 처리하는 단계;

레이저 광을 초점을 상기 멤브레인의 컨트롤 라인 또는 테스트 라인 상으로 조절하는 단계;

상기 테스트 라인의 각 포인트에서 검출된 형광 세기를 각 픽셀에 대응시켜 이미지를 획득하는 단계;를 포함하는, LFA 분석 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 처리 전 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자를 양친매성 고분자와 교반하여 표면 개질하는 단계;를 더 포함하는, LFA 분석 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 양친매성 고분자는 가지 말단이 적어도 일부가 카르복실기이고, 상기 프로브는 항체인, LFA 분석 방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 레이저는 적외선을 조사하는 것인, LFA 분석 방법.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자는 적외선 여기 하에 적외선을 방출하는 것인, LFA 분석 방법.

청구항 14

청구항 9에 있어서, 상기 형광 입자는 Yb^{3+} 및 Tm^{3+} ; Yb^{3+} 및 Er^{3+} ; Yb^{3+} , Nd^{3+} 및 Er^{3+} ;으로 이루어진 군에서 선택된 란탄족 이온의 조합으로 도핑된 것인, LFA 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 LFA 분석 시스템에 관한 것으로, 의료 진단 분야 등에서 활용될 수 있다.

배경 기술

[0002] 측면 흐름 분석기법(Lateral Flow Assay, 이하 LFA로 표현)은 바이오마커의 식별을 위해 널리 사용되는 방법의 하나로, 종래 나노미터 (nm) 크기의 금 입자로 표지된 프로브와 대상 시료에 포함된 항원과의 면역 반응을 기반으로 한다. 시료에 포함된 항원은 샘플패드(sample pad)에 있는 금 입자에 결합되어 있는 프로브와 결합하고, 멤브레인을 통해 흡수패드(adsorbent pad)로 이동하는 과정에서, 항원과 결합한 금 입자 결합 프로브는 테스트 라인(test line)에 위치한 프로브와 결합하고, 나머지 금 입자는 컨트롤 라인(control line)에 위치한 프로브와 결합함으로써, 두 라인 모두에 금 입자가 위치하게 된다. 시료에 대상 항원이 포함되어 있지 않을 경우, 금 입

자에 결합되어 있는 프로브는 컨트롤 라인에 위치한 프로브와만 결합함으로써, 컨트롤 라인에만 금 입자가 위치하게 되는 원리이다.

[0003] 나노미터 크기의 금 입자는 플라즈몬 공명 현상으로 인해 붉은색을 제외한 빛을 흡수하여 육안으로 붉은색으로 관찰되므로, 사용자는 각 라인에서 금 입자의 존재 유무를 붉은선이 형성됨을 통해 확인할 수 있다. 시료 속 항원의 농도가 줄어들면, 항원과 결합하는 금 입자의 양, 즉 테스트 라인의 프로브와 결합하는 금 입자의 양이 점차적으로 줄어들어 결과선의 붉은선이 없어진다. 테스트 라인의 붉은선이 배경과 구별할 수 없을 때까지 없어졌을 때의 시료에 포함된 항원의 농도가, 금 입자를 활용한 LFA 기술의 항원 검출 한계 농도를 결정하게 된다. 그런데 종래의 금 입자를 활용한 LFA 기술의 항원 검출 한계 농도(Limit of detection)는 0.5~10 ng/ml 근방으로, 특정 질병의 경우, 예를 들어 심근경색의 경우 혈중 바이오마커의 한 종류인 Troponin T의 경우 시료 속 극미량(0.01 ng/ml)의 항원의 존재 유무를 사전에 검출해야 해당 질병을 예방할 수 있는 것과 비교하여 낮은 농도이다. 이에 종래의 금 입자 기반 LFA 기술의 검출 한계를 극복할 수 있는 대안이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2015-0053386호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 검출 한계 농도가 우수한 LFA 분석 시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 본 발명은 검출 한계 농도가 우수한 LFA 분석 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 1. 샘플패드, 컨จู게이션패드, 멤브레인 및 흡수패드를 포함하는 LFA(Lateral Flow Assay) 스트립; 상기 LFA 스트립에 레이저 광을 조사하는 광원; 상기 레이저의 광초점을 상기 멤브레인의 컨트롤 라인 또는 테스트 라인 상으로 조절하는 조절부; 상기 테스트 라인의 각 포인트에서 방출된 형광 세기를 측정하여 각 픽셀에 대응시킨 이미지를 획득하는 검출부;를 포함하고, 상기 컨จู게이션패드에 포함되는 프로브는 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자로 표지된 것인, LFA 분석 시스템.
- [0008] 2. 위 1에 있어서, 상기 프로브는 상기 형광 입자 표면의 양친매성 고분자에 결합된 것인, LFA 분석 시스템.
- [0009] 3. 위 1에 있어서, 상기 레이저 광원은 적외선을 조사하는 것인, LFA 분석 시스템.
- [0010] 4. 위 1에 있어서, 상기 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자는 적외선 여기하에 적외선을 방출하는 것인, LFA 분석 시스템.
- [0011] 5. 위 1에 있어서, 상기 조절부는 레이저 광의 방향을 조절하는 미러 스캐너; 및 초점을 조절하는 하나 이상의 렌즈를 포함하는, LFA 분석 시스템.
- [0012] 6. 위 1에 있어서, 상기 형광 입자는 Yb^{3+} 및 Tm^{3+} ; Yb^{3+} 및 Er^{3+} ; Yb^{3+} , Nd^{3+} 및 Er^{3+} ;으로 이루어진 군에서 선택된 란탄족 이온의 조합으로 도핑된 것인, LFA 분석 시스템.
- [0013] 7. 위 2에 있어서, 상기 프로브는 항체인, LFA 분석 시스템.
- [0014] 8. 위 1에 있어서, 분석 대상인 시료가 체액인, LFA 분석 시스템.
- [0015] 9. 샘플패드, 컨จู게이션패드, 멤브레인 및 흡수패드를 포함하는 LFA(lateral flow assay) 분석 방법에 있어서, 상기 컨จู게이션패드에 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자로 표지된 프로브를 처리하는 단계; 레이저 광의 초점을 상기 멤브레인의 컨트롤 라인 또는 테스트 라인 상으로 조절하여 조사하는 단계; 상기 테스트 라인의 각 포인트에서 검출된 형광 세기를 각 픽셀에 대응시켜 이미지를 획득하는 단계;를 포함하는, LFA 분석 방법.
- [0016] 10. 위 9에 있어서, 상기 처리 전 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자를 양친매성 고분자와 교반하여 표면 개질하

는 단계;를 더 포함하는, LFA 분석 방법.

- [0017] 11. 위 10에 있어서, 상기 양친매성 고분자는 가지 말단의 적어도 일부가 카르복실기이고, 상기 프로브는 항체인, LFA 분석 방법.
- [0018] 12. 위 9에 있어서, 상기 레이저는 적외선을 조사하는 것인, LFA 분석 방법.
- [0019] 13. 위 9에 있어서, 상기 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자는 적외선 여기 하에 적외선을 방출하는 것인, LFA 분석 방법.
- [0020] 14. 위 9에 있어서, 상기 형광 입자는 Yb^{3+} 및 Tm^{3+} ; Yb^{3+} 및 Er^{3+} ; Yb^{3+} , Nd^{3+} 및 Er^{3+} ;으로 이루어진 군에서 선택된 란탄족 이온의 조합으로 도핑된 것인, LFA 분석 방법.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 LFA 분석 시스템은 란탄족 도핑된 형광 입자에 레이저 포인트 스캐닝 이미징 기법을 적용하여 단위 면적당 여기 세기를 높여, 발광 되는 빛의 세기가 우수하다.
- [0022] 본 발명의 LFA 분석 시스템은 적외선 여기-방출이 가능한 란탄족 도핑된 형광 입자를 사용하고, 여기에 레이저 포인트 이미징 스캐닝으로 적외선을 조사 및 검출함으로써 검출 한계를 낮출 수 있어 민감도를 현저히 향상시킬 수 있다.
- [0023] 본 발명의 LFA 분석 시스템은 양친매성 고분자를 통해 형광 입자와 프로브가 결합되어 수용액 및 이온 강도가 높은 용액(예: 혈액)에서 안정적으로 분산되며, 이는 제조 과정에서 리간드 탈착으로 인한 프로브의 손실이 적다.
- [0024] 본 발명의 LFA 분석 시스템은 적외선을 여기함으로써 여기 파장에 대한 배경(예: 멤브레인)의 자가형광 현상으로 인한 잡음을 줄여 테스트 라인의 프로브에 결합된 형광 입자의 신호 대 잡음비가 우수하며, 매질에 대한 산란이 적고 양친매성 고분자에 의해 여기된 빛은 흡수되지 않아 형광 입자의 발광에 효과적으로 기여한다.
- [0025] 본 발명의 LFA 분석 시스템은 적외선을 검출 파장으로 함으로써 매질에 대한 산란의 정도가 낮아 깊은 곳의 형광신호까지 검출이 가능하다. 또한 해당 파장에 대한 적혈구 내 헤모글로빈의 흡수가 적어 혈액에서도 발광 신호가 우수하다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 본 실시예에서 란탄족 도핑된 형광 입자를 투과전자현미경을 이용해 이미징한 것이다.
- 도 2는 본 실시예에서 사용된 양친매성 고분자를 이용하여 표면 처리된 형광 입자의 예를 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 실시예에서 양친매성 고분자를 이용한 표면 처리법으로 제조된 교질 입자를 투과전자현미경을 이용해 이미징한 것이다.
- 도 4는 레이저 포인트 이미징 스캐닝 방식으로 LFA 스트랩을 검출하는 개략도를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 실시예에서 적외선을 사용할 때의 란탄족 도핑된 형광 입자(UCNP)와 배경에서의 신호를 비교한 것이다.
- 도 6은 본 실시예에서 코로나 모사 단백질 항원의 농도별로 컨트롤 라인 및 테스트 라인에서의 신호를 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 LFA(Lateral Flow Assay) 분석 시스템에 관한 것으로, 구체적으로 샘플패드, 컨쥬게이션패드, 멤브레인 및 흡수패드를 갖는 LFA 스트립; 레이저 광을 조사하는 광원; 상기 레이저의 광초점을 상기 멤브레인의 컨트롤 라인 또는 테스트 라인 상으로 조절하는 조절부; 상기 테스트 라인의 각 포인트에서 방출된 형광 세기를 측정하여 각 픽셀에 대응시킨 이미지를 획득하는 검출부를 포함하고, 상기 컨쥬게이션패드에 포함되는 프로브는 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자로 표지될 수 있다.
- [0028] LFA는 액체 샘플에서 대상 물질을 감지할 수 있는 분석 기법으로, 대상 시료가 "샘플패드(sample pad)"에 포함

되어 LFA 스트립을 따라 흐르는 작동 방식이다.

- [0029] LFA 스트립의 "결합패드(conjugate pad)"에는 대상 물질과 결합 가능한 프로브가 신호를 발생할 수 있는 입자 등으로 표지된다. 상기 표지된 프로브는 대상 물질에 결합하여 시험 결과를 생성하는데 사용된다.
- [0030] "멤브레인(membrane)"은 결합패드에서 나온 입자가 이동하여 반응이 일어나는 부분으로, 대상 물질의 존재를 확인하는 "테스트 라인(test line)"과 실험의 유효성을 확인하기 위한 "컨트롤라인(control line)"이 포함된다.
- [0031] 대상 물질이 존재하는 경우 상기 테스트 라인에 고정된 프로브에 결합하고 상기 표지로부터 발생하는 신호를 통해 이를 검출할 수 있다.
- [0032] 상기 프로브는 분석 대상이 되는 물질에 따라 이와 반응 가능한 것으로 선택될 수 있으며, 예컨대 항체, 단백질, 핵산, 리간드, 화합물, 효소, 나노입자 등일 수 있다.
- [0033] 상기 분석에 사용되는 시료는 예컨대 혈액, 타액, 소변, 땀으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 체액, 약물, 식품 등일 수 있다.
- [0034] "흡수패드(adsorbent pad)"는 상기 멤브레인을 통과한 샘플이 이동하여 흡수됨으로써 처리되는 부분이다.
- [0035] 본 발명 시스템에서 상기 컨จู게이션패드의 프로브는 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자를 통해 표지된다. 본 발명에 따른 형광 입자는 (i) 낮은 에너지의 긴 파장의 빛을 흡수하여 그보다 짧은 파장의 빛을 방출하는 상향 변환 형광 현상 및 (ii) 높은 에너지의 짧은 파장의 빛을 흡수해서 그보다 긴 파장의 빛을 방출하는 형광 현상을 모두 나타낸다. 이를 통해 본 발명 시스템은 빛을 육안으로 확인하는 종래 금 나노 입자(gold nano particle) 기반 LFA와 비교하여 검출 한계 농도를 향상시킬 수 있다.
- [0036] 상기 란탄족 이온은 La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Pm^{3+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} , Lu^{3+} 중에서 선택된 것일 수 있고, 하나 이상의 종류의 조합으로 이루어진 것일 수 있다.
- [0037] 상기 광원은 LFA 스트립의 멤브레인에서 생성되는 형광 신호의 검출이 가능하도록 상기 형광 입자에 빛을 여기시키는 역할을 한다. 본 실시예에서 광원은 레이저 광을 조사하는 것일 수 있다. 레이저는 램프나 LED와 비교하여 형광 입자에 도달 가능한 여기 세기가 높은 이점이 있다.
- [0038] 본 발명 시스템은 레이저의 광초점을 만들어 도달 면적을 줄임으로써 더욱 높은 단위 면적 당 여기 세기를 얻는다. 유기 형광체는 높은 여기 세기에서 광표백이 되어 더 이상 형광을 내지 못하고, QD(quantum dot)의 경우에는 높은 여기 세기에서 형광이 증가하지 않고 포화되는 반면, 본 발명 시스템의 란탄족 도핑된 형광 입자는 광안정성이 높아 이러한 방식을 통해 여기 세기가 높아짐에 따라 발광 세기를 효과적으로 높일 수 있고 이에 따라 진단 키트에서 측정할 수 있는 항원의 농도 범위가 비약적으로 증가하게 된다.
- [0039] 상기 조절부는 광원에서 발생한 레이저 광의 초점을 컨트롤 라인 또는 테스트 라인 상으로 조절한다. 상기 조절부는 광의 이동 경로를 변경하기 위한 미러 및 초점을 조절하는 렌즈를 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 조절은 상기 광초점을 테스트 라인 상에서 이동시키는 것을 포함한다. 구체적으로 상기 조절부는 스캐너(scanner)를 이용해 레이저 광을 컨트롤 라인 또는 테스트 라인 영역에서 이동시키는 것일 수 있다. 이는 입사된 빛을 반사시키면서 반사 각도를 조절하는 미러 스캐너(mirror scanner)를 이용하는 것일 수 있다. 예컨대 갈바노 미러(Galvano mirror)가 사용될 수 있다.
- [0041] 본원 도 4를 참고하면, 상기 조절부는 빛의 크기나 초점을 조절하기 위한 하나 이상의 렌즈, 광의 방향을 변경 및 조절하는 미러 스캐너, LFA 스트립에 빛을 모으는 대물렌즈를 포함할 수 있다.
- [0042] 상기 검출부는 상기 형광 입자에서 발생하는 신호의 세기를 검출한다. 구체적으로 상기 검출부는 테스트 라인의 각 포인트에서 형광 세기를 측정하여 각 픽셀에 대응시켜 이미지를 획득하는 것일 수 있다. 상기 검출부는 광전 증폭관(Photo Multiplier Tube; PMT)을 이용할 수 있다. 이는 종래 LFA 분석 방식에서 사용하는 대면적 형광 현미경 방식이 대면적으로 광원을 조사하고 대면적의 형광 세기를 카메라의 여러 픽셀에 한 번에 대입하는 것과 달리, 단일 픽셀에 각 포인트의 검출 세기를 대입하며 민감도를 훨씬 높일 수 있다.
- [0043] 상기 검출부는 형광 입자에서 방출되는 형광 신호를 필터링하기 위한 필터, 생성된 형광 신호를 반사시키기 위한 색선택 미러를 포함할 수 있다. 상기 필터는 적외선 영역의 발광 빛만을 검출하기 위한 형광 밴드패스 필터일 수 있다.

- [0044] 본 발명 시스템에서 상기 레이저 광원은 적외선을 여기시키는 것일 수 있다. 상기 란탄족 이온 도핑된 형광 입자는 형광 빛의 파장보다 긴 파장의 여기 빛을 사용할 수 있어 적외선 여기 하에서 형광을 일으키는 것이 가능하다.
- [0045] 적외선 여기는 자가형광(autofluorescence) 현상을 거의 일으키지 않기 때문에, 테스트 라인에서 형광 신호와 배경의 신호 대비를 높임으로써, 본 발명 시스템의 검출 한계 농도를 상승시킨다. 또한, 적외선은 자외선 및 가시광선의 경우보다 매질에 대한 산란의 정도가 낮아 상대적으로 더 깊은 곳의 형광체를 검출할 수 있어 한계 검출농도를 상승시킨다.
- [0046] 구체적으로 상기 란탄족 이온 도핑된 형광 입자는 적외선 여기 하에서 적외선을 방출하는 구성으로 사용될 수 있다.
- [0047] 하기 표 1에서 적외선 여기-발광하는 란탄족 이온의 조합과 여기(EX) 및 방출(EM) 파장의 범위를 나타내었으며, 이는 예시적으로 기재된 것일 뿐 이에 제한되는 것은 아니다.

표 1

Lanthanide ion Combination	Yb ³⁺ , Tm ³⁺	EX ~ 976 nm / EM ~ 800 nm
	Yb ³⁺ , Er ³⁺	EX ~ 976 nm / EM ~ 1550 nm
	Yb ³⁺ , Nd ³⁺ , Er ³⁺	EX ~ 808nm, 976 nm / EM ~ 1550 nm

- [0048]
- [0049] 상기 형광 입자는 예컨대 NaYF₄, LaPO₄ 및 YVO₄로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있고, 이는 란탄족 이온 도핑 시 발광 효율이 우수한 이점이 있다.
- [0050] 적외선 여기-발광이 가능한 란탄족 이온 도핑된 형광 입자를 사용함으로써 상기 레이저 포인트 방식을 통해 단위 면적 당 높은 세기로 여기된 빛이 효과적으로 신호 세기 증가에 기여하여 검출 한계 농도를 현저히 높일 수 있다. 이와 비교하여, 예컨대 자외선이 사용되는 경우에는 자가형광에 의해 배경에서의 잡음이 함께 증가하므로 상기 레이저 포인트 방식을 이용한 신호 세기 향상 측면에서 이점이 없다.
- [0051] 또한 적외선은 가시광선에 비해 혈액 내 적혈구의 헤모글로빈에 의한 흡수가 적으므로 분석 대상 시료가 혈액인 경우에 검출되는 발광 신호를 높임으로써 더 우수한 검출 한계 농도를 가질 수 있다.
- [0052] 본 발명 시스템은 상기 멤브레인의 테스트 라인에도 동일하게 적용하는 것일 수 있다.
- [0053] 상기 프로브는 상기 형광 입자 표면의 양친매성 고분자에 결합된 것일 수 있다. 상기 양친매성 고분자는 친수성 작용기와 친유성 작용기를 동시에 포함하는 고분자를 의미한다.
- [0054] 구체적으로 상기 형광 입자는 표면의 친유성 리간드가 양친매성 고분자의 친유성 작용기와 반데르발스 인력(van der Waals forces)으로 결합된 것일 수 있다. 상기 형광 입자는 유기 용매 기반에서 합성되므로 통상적으로 그 표면에 친유성 리간드를 포함한다.
- [0055] 상기 형광 입자 표면의 친유성 리간드는 예컨대 C₁ 내지 C₃₀, C₁ 내지 C₂₀, C₅ 내지 C₃₀, C₅ 내지 C₂₀, 또는 C₅ 내지 C₁₀인 직쇄형 또는 분지형 알킬기, 알케닐기 또는 알카이닐기일 수 있다 또는 C₆ 내지 C₄₀, C₆ 내지 C₃₀, 또는 C₆ 내지 C₂₀인 아릴기일 수 있다.
- [0056] 상기 양친매성 고분자의 친유성 부분은 예컨대 C₁ 내지 C₃₀, C₁ 내지 C₂₀, C₅ 내지 C₃₀, C₅ 내지 C₂₀, 또는 C₅ 내지 C₁₀인 직쇄형 또는 분지형 알킬기, 알케닐기 또는 알카이닐기일 수 있다. 또는 C₆ 내지 C₄₀, C₆ 내지 C₃₀, 또는 C₆ 내지 C₂₀인 아릴기일 수 있다.
- [0057] 상기 양친매성 고분자의 친수성 부분은, 가지 말단의 적어도 일부가 카르복실기(carboxylic group)인 것일 수 있고, 상기 프로브는 항체일 수 있다. 상기 카르복실기는 항체의 아미노기(amino group)와 펩타이드 결합(peptide bond)을 형성함으로써 상기 형광 입자를 양친매성 고분자를 매개로 상기 프로브에 결합시킬 수 있다.
- [0058] 상기 양친매성 고분자로 연결된 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자 및 프로브는, 여러 이온들이 복합적으로 용해되어 있는 예컨대 혈액에서 안정적으로 분산되는 이점이 있다. 또한 상기 고분자는 통상적으로 자외선과 달리

적외선 영역의 빛은 흡수하지 않으므로, 전술한 적외선 여기-발광을 이용한 시스템과의 조합에서 여기된 적외선을 효과적으로 형광 입자의 발광 신호로 사용하게 할 수 있다.

[0059] 본 발명은 샘플패드, 컨주게이션패드, 멤브레인 및 흡수패드를 포함하는 LFA(lateral flow assay) 분석 방법에 있어서, 상기 컨주게이션패드에 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자로 표시된 프로브를 처리하는 단계; 레이저 광을 초점을 상기 멤브레인의 컨트롤 라인 또는 테스트 라인 상으로 조절하는 단계; 상기 테스트 라인의 각 포인트에서 검출된 형광 세기를 각 픽셀에 대응시켜 이미지를 획득하는 단계;를 포함하는, LFA 분석 방법에 관한 것을 포함한다.

[0060] 상기 방법에서 레이저는 적외선을 조사하는 것일 수 있다.

[0061] 상기 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자는 적외선 여기하에 적외선을 방출하는 것일 수 있고, 구체적으로 상기 형광 입자는 Yb^{3+} 및 Tm^{3+} ; Yb^{3+} 및 Er^{3+} ; Yb^{3+} , Nd^{3+} 및 Er^{3+} ;으로 이루어진 군에서 선택된 란탄족 이온의 조합으로 도핑된 것일 수 있다.

[0062] 상기 LFA 분석에 있어 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자, 레이저 광원, 이의 컨트롤 라인 또는 테스트 라인 상으로의 광초점 조절, 테스트 라인의 각 포인트에서 검출된 형광 세기를 각 픽셀에 대응시킨 이미지의 획득과 관련하여 전술한 시스템에서 설명된 사항은 모두 본원의 방법에 그대로 적용된다.

[0063] 상기 조절 단계는 전술한 시스템을 이용해 테스트 라인 상에서 레이저 광을 스캐닝하는 것을 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명 방법은 상기 처리 전 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자를 양친매성 고분자와 교반하여 표면 개질하는 단계를 포함할 수 있다. 구체적으로 이는 유기 용매 속 란탄족 이온이 도핑된 형광 입자와 양친매성 고분자에 탈이온수를 추가하면서 빠르게 교반하는 것일 수 있다.

[0065] 본 발명 방법은 상기 교반을 통해서 형광 입자의 친유성 리간드를 양친매성 고분자의 친유성 부분과 결합하게 할 수 있다. 도 3을 참고하면, 상기 양친매성 고분자의 친수성 부분은 입자의 밖으로 뻗어 나오게 되며 이러한 구조는 수용액에서 교질 입자의 분산을 안정적이게 한다.

[0066] 상기 양친매성 고분자는 가지 말단이 적어도 일부가 카복실기이고, 상기 프로브는 항체일 수 있으며, 상기 카복실기가 항체의 아미노기와 펩타이드 결합을 형성하게 하는 것일 수 있다.

[0067] 본 발명 방법은 상기 제조 과정에서 수용액 속 고분자와 형광 입자의 중량비를 조절함으로써, 교질 입자에서 밖으로 뻗어있는 카복실기의 양을 증가시킬 수 있다. 이를 통해 입자에 결합되는 항체의 양을 늘림으로써 테스트 라인에서 항체와 면역 반응이 일어날 확률을 높여 검출 한계 농도를 더욱 향상시킬 수 있다.

[0068] 종래에는 이러한 형광 입자 표면의 리간드를 카복실기가 있는 리간드로 치환(ligand exchange) 하는 방법을 통해 항체와 연결하였다. 이러한 리간드 치환 방식은 유체 속 염(salt) 성분 및 농도에 따라, 염과 리간드의 입자 표면과의 친화성 경쟁에 의해, 리간드가 입자에서 떨어져 나갈 수 있어 제조과정에서 상당수의 입자들이 버려진다. 그러나 본 발명 방법에서는 입자가 분산된 용매의 염 등 외부 요인에 의한 리간드 탈락이 거의 없고, 이온 강도가 높은 용액, 예컨대 혈액에서도 안정적으로 분산시킬 수 있다.

[0069] 본 발명 방법은 상기 멤브레인의 테스트 라인에도 동일하게 적용하는 것일 수 있다.

[0070] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0071] 제조예 1: 란탄족 도핑 형광 입자 제조

[0072] 본 발명의 예시로 제시된 란탄족 도핑된 코어셸 형광 입자 (코어: $\text{NaYF}_4\text{:Yb/Tm}$, 셸: NaYF_4) (도 1) 제조예는 아래와 같다.

[0073] 우선, $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Ln} = \text{Y/Yb/Tm}$, 총 1.0mmol)를 5 mL의 메탄올 (Methanol, ACS reagent, $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich)에 용해시켜 전구체 용액을 만든다. 이 후 6 mL의 올레산 (oleic acid, 90%, tech grade, Sigma-Aldrich) 과 15 mL의 1-옥타데센 (1-octadecene, 90%, tech grade, Sigma-Aldrich)에 전구체 용액을 혼합한다. 전구체 용액을 제조할 때에, 메탄올에 용해시키는 $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 의 용량은 합성하고자 하는 란탄족의 비율에 따라 결정한다. 예를 들어, $\text{NaYF}_4\text{:}40\%\text{Yb}^{3+}$, $2\%\text{Tm}^{3+}$ 형광 입자를 합성하고자 하는 경우, Thulium(III) chloride

hexahydrate($\text{TmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99.99%, Sigma-Aldrich) 전구체 0.02 mmol, Ytterbium(III) chloride hexahydrate ($\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99.998%, Sigma-Aldrich) 전구체 0.40 mmol 및 Yttrium(III) chloride hexahydrate ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99.99%, Sigma-Aldrich) 전구체 0.58 mmol를 넣으며, 이 때, 전구체의 총 양은 1.0 mmol로 일정하게 유지한다.

[0074] 혼합된 용액을 둥근 바닥 플라스크에 넣은 후, 아르곤 보호 하에서 10분 동안 사전 탈기했다. 이 후, 해당 용액을 170℃까지 약 13° C/min의 속도로 가열한 후에, 30분 동안 유지하여 Ln-올리에이트 복합체를 형성시켰다. 형성된 복합체 용액을 50℃까지 냉각시켰다.

[0075] 이 후, 4.0 mmol의 Ammonium fluoride (NH_4F , >99.99%, trace metal basis, Sigma-Aldrich) 과 2.5 mmol의 Sodium hydroxide (NaOH , anhydrous, >97%, Sigma-Aldrich)을 메탄올 용액 5 ml에 용해시켜 두 번째 전구체 용액을 준비했다. 해당 전구체 용액을 Ln-올리에이트 복합체가 들어있는 플라스크에 첨가하고 50℃에서 30분 동안 교반하였다.

[0076] 그런 다음, 혼합액을 아르곤 보호 하에 150℃까지 약 2.5 °C/분의 속도로 가열하고 20분 동안 유지하였다. 그 후, 아르곤 보호 하에 용액을 300℃까지 약 7.5℃/min 의 속도로 가열하고, 1시간 30분 동안 유지하여, 입자를 성장시킨다.

[0077] 그 후, 입자가 들어있는 용액을 실온으로 냉각시켰다. 해당 용액에 안티솔벤트 (예:에탄올)를 첨가하여 생성된 나노 결정을 석출시킨 후에, 원심분리를 통해 수집하였다. 수집된 나노 입자는 사이클로헥산 (Cyclohexane, Anhydrous, 99.5%, Sigma-Aldrich) 과 에탄올 (Ethanol, ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Supelco)을 혼합 용제를 이용하여 2번 이상 세척한 후 사이클로헥산에 재분산시켜 코어 입자를 제조했다.

[0078] 코어 나노 입자에 셸 (본 예시: NaYF_4)을 성장시키는 방법은 아래와 같다.

[0079] 먼저 셸 전구체를 합성하는 방법은 아래와 같다. 먼저, Yttrium(III) chloride hexahydrate($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99.99%, Sigma-Aldrich) 전구체 1.0 mmol를 메탄올(Methanol, ACS reagent, ≥99.8%, Sigma-Aldrich) 5 ml에 녹인 후 올레산(oleic acid, 90%, tech grade, Sigma-Aldrich) 6 ml와 1-옥타데센(1-octadecene, 90%, tech grade, Sigma-Aldrich) 15 ml가 들어 있는 둥근 바닥 플라스크에 넣었다.

[0080] 해당 용액을 아르곤 흐름 하에서 10분 동안 사전 탈기한 후, 혼합물을 약 13℃/min의 속도로 170℃까지 가열하고 170℃에서 30 분 동안 유지하여 Ln-올리에이트 복합체를 형성시켰다. 그런 다음 용액을 50℃까지 냉각시켰다.

[0081] 다음으로, Ammonium fluoride (NH_4F , >99.99%, trace metal basis, Sigma-Aldrich) 4.0 mmol과 Sodium hydroxide (NaOH , anhydrous, >97%, Sigma-Aldrich) 2.5 mmol를 메탄올 용액 5 ml에 용해시킨다. 해당 용액을 플라스크에 첨가하고 50℃에서 30분 동안 교반했다.

[0082] 그런 다음, 용액을 약 2.5 °C/분의 속도로 150℃까지 가열하고 아르곤 보호 하에 150℃에서 20분 동안 유지하여 용액 상에 남아 있는 메탄올과 물을 제거했다. 이렇게 형성된 셸 전구체 용액을 실온으로 냉각했다.

[0083] 그 후, 미리 합성해 둔 사이클로헥산 (농도: 약 20 mg/ml)에 분산되어 있는 코어 나노입자 현탁액 1.5 ml를 올레산 (oleic acid, 90%, tech grade, Sigma-Aldrich) 6 ml와 1-옥타데센 (1-octadecene, 90%, tech grade, Sigma-Aldrich) 6 ml가 들어 있는 둥근 바닥 플라스크에 첨가했다. 혼합물을 약 13℃/분의 속도로 170℃까지 가열하고 아르곤 흐름 하에서 약 10 분 동안 사전 탈기했다. 그 후, 170℃에서 30분 동안 유지했다. 이어서, 생성된 용액을 약 7.5℃/분의 속도로 300℃까지 가열했다.

[0084] 그런 다음, 앞서 준비한 셸 전구체 0.25 ml를 300℃로 가열되어 있는 코어 입자 용액이 들어 있는 플라스크에 주입하고 300℃에서 4분간 유지했다. 해당 주입 절차를 약 16 회 가량 반복하여, 코어 입자에 셸을 성장시켰다.

[0085] 그런 다음, 용액을 실온으로 냉각한 후, 안티솔벤트(예:에탄올)를 용액에 첨가하여 합성된 코어-셸 입자를 석출시켰다. 사이클로헥산(Cyclohexane, Anhydrous, 99.5%, Sigma-Aldrich)과 에탄올(Ethanol, ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Supelco)을 이용하여 2번 세척한 후, 최종적으로 사이클로헥산에 분산시킴으로써, 본 발명의 예시로 제시된 란탄족 도핑된 코어셸 나노 입자 ($\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Tm}@\text{NaYF}_4$)를 얻었다.

[0086] **제조예 2: 란탄족 도핑 형광 입자의 표면 개질**

[0087] 앞서 만들어진 란탄족 도핑된 형광 입자의 표면을 양친매성 고분자로 표면 개질하는 방법의 제조예는 아래와 같

다. 본 발명의 제조예에서는 poly(styrene)-*b*-poly (acrylic acid) (PS-*b*-PAA, Mn = 16000-*b*-3500, PDI = 1.02, Polymer Source) 양친매성 고분자를 형광 입자 표면 개질에 사용했다. 앞서 합성된 란탄족 도핑된 형광 입자 약 2 mg을 건조시킨 후, PS-*b*-PAA 고분자 약 4 mg와 함께 테트라하이드로푸란 (Tetrahydrofuran, Samchun) 5 ml에 용해시켜 1200 rpm으로 교반했다. 이 후, 용액을 약 1400 rpm으로 교반하면서 탈이온수 약 5 ml를 2.5 ml/분의 속도로 용액에 첨가했다. 혼합물을 30분 정도 추가적으로 1200 rpm에서 교반한 후, 13000 rpm에서 10분 동안 원심 분리했다. 상층액은 제거하고, 펠렛 (pellet)을 탈이온수를 이용하여 2번 세척하면 양친매성 고분자로 표면 개질된 란탄족 도핑된 형광 입자를 얻었다. 표면 개질된 해당 입자의 전자 현미경 사진은 도 3에 나타나 있다. 해당 입자는 추후 사용처에 따라 탈이온수, 혹은 인산완충생리식염수 (phosphate-buffered saline, PBS) 혹은 계면활성제가 추가된 탈이온 수 등에 현탁하여 사용하거나 보관한다.

[0088] 해당 제조예에 사용된 고분자 및 형광입자의 표면 구조를 도 2에 도식화하여 나타내었다. 도 2에 도식화된 내용은 해당 제조예의 이해를 돕기 위하여 제시된 것이므로 도식화된 고분자의 종류 및 입자의 표면 구조로 해당 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0089] 제조예 3: 코로나 진단키트 제작

[0090] 코로나 진단키트 테스트를 위하여 란탄족 도핑된 형광 입자와 항코로나 항체(anti-SARS-Cov-2 antibody, IgM, Fapon)의 콘주게이션을 진행했다. 앞서 제작된 양친매성 고분자로 표면 개질된 란탄족 도핑된 형광 입자 100 μg을 0.1 M MES(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 200 μl에 희석시키고 EDC (ethylene dichloride) 70 μg (10mg/ml, 7 μl)과 Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) 160 μg (20mg/ml, 8 μl)를 넣고 상온에서 30분 동안 반응시켜 카르복실기를 활성화시켰다.

[0091] 이후 13000 rpm에서 10분동안 원심 분리하여 상층액 제거 후 인산완충생리식염수(PBS)로 세척했다. 항코로나 항체를 30 μg을 첨가하여 3시간 동안 반응시키고 같은 방식으로 세척을 진행하여 잔류하는 항체를 제거하고 항코로나 항체가 표면에 콘주게이션된 형광 입자만을 채취했다. 이후 이 입자는 보관용액 (3% BSA-Bovine Serum Albumin, 0.01% Tween 20(계면활성제), PBS)에 희석하여 보관했다.

[0092] 이 후, 항코로나 항체가 콘주게이션된 형광입자를 콘주게이션 패드에 적정량 희석하여 도포하고, 37℃ 항온기에서 30 분 간 건조시켰다. 해당 콘주게이션 패드를 이후 진단 키트로 사용한다.

[0093] 진단키트의 멤브레인에는 두 가지 항체를 도포했다. 테스트 라인에는 항코로나 항체를 고농도로 도포하는데, 이는 형광입자에 콘주게이션한 항체와 항원 내 서로 다른 결합 부위를 인식하므로 진단키트 상에서 항원이 존재할 때 샌드위치의 형태로 항원을 인식한다. 항원이 존재할 때에만 인식하기 때문에, 테스트 라인의 역할을 한다.

[0094] 컨트롤 라인에는 항마우스 항체 (anti-mouse IgG antibody)를 도포하는데, 이는 항코로나 항체의 불변영역(C region)을 인식한다. 따라서, 항원의 유무와 상관없이 형광입자에 콘주게이션된 항체를 인식하므로, 실험의 오류를 확인하기 위한 컨트롤 라인으로써의 역할을 한다. 두 가지 항체가 도포된 멤브레인은 37℃ 항온기에서 1시간 동안 건조했다.

[0095] 위와 같은 방식으로 만들어진 멤브레인 및 콘주게이션 패드를 이용하여 키트를 조립하였다.

[0096] 실험예 1: 적외선 여기 하에서의 신호 대 잡음 분석

[0097] 코로나 모사 단백질 항원(SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein)을 앞서 만들어진 키트의 샘플패드에 100 μl씩 첨가하였다. 항원 첨가 후 약 15 분이 지난 후, 테스트 라인의 프로브에 결합된 란탄족 도핑된 형광 입자와 멤브레인의 배경 상에 적외선 레이저 (파장=약 976 nm)을 조사하여 테스트 라인과 멤브레인에서 발생하는 형광 신호를 측정하여 도 5의 이미지를 얻었다.

[0098] 도 5는 도 4에 도식화된 광학 장치를 이용하여 얻을 수 있는데 그 실험에 대한 구체적인 설명은 아래와 같다.

[0099] 구체적으로, 적외선 레이저는 2개의 렌즈 조합에 의해 시준된 후, 갈바노 미러에 의해 반사된다. 반사된 레이저는 스캔 렌즈, 튜브 렌즈, 색 선별 거울 (Dichroic mirror, FF875-Di01, Semrock)을 통과한다. 그 후, 대물렌즈를 통해 만들어진 레이저 초점을 LFA 스트립의 테스트라인에 고정한다. 본 실험예에서는 갈바노 미러의 회전 각도, 화각, 형광 신호 수집력을 고려하여 0.3의 개구수를 가진 대물렌즈를 이용하였다. 976 nm 레이저에 의해 여기된 형광 입자에서는 형광이 발생하고, 발생한 형광은 대물렌즈에 의해 수집된 후, 색선별거울 (dichroic mirror)에 의해 반사된다. 반사된 형광은 밴드패스 필터를 통과하면서 적외선 형광 (파장=800 nm)만이 선별되고, 디텍터 (본 실험예에서는 광전증폭장치)에 의해 형광 세기가 전기 신호로 치환된다. 갈바노 미러를 움직여 한 픽셀에서 측정되는 신호를 2차원 면의 각 픽셀에 대입함으로써 도 5의 이미지를 얻는다. 도 5에서 보

이는 것과 같이, 멤브레인에서의 배경과 테스트 라인과의 경계가 뚜렷하게 나오는 것을 통해 적외선 여기 하에서 멤브레인에서 자가형광 현상이 거의 발생하지 않는 것을 확인할 수 있다.

[0100] 실험예 2: 코로나 모사 단백질 항원의 농도별 검출 효과 확인

[0101] 항원의 농도별 검출 효과를 확인하기 위하여, 키트의 샘플 패드에 첨가하는 코로나 모사 단백질 항원(SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein)의 농도를 달리하여, 앞선 실험예 1과 같은 실험을 진행하여 도 6을 얻었다.

[0102] 항원의 농도가 달라짐에 따라, 테스트 라인에서 적외선(800 nm) 영역대의 형광 세기가 순차적으로 달라지는 것을 확인할 수 있다. 이 후, 항원의 농도에 따라 얻어진 형광 이미지에서 테스트 라인 영역의 각 픽셀의 신호를 평균값을 계산하여 표 2의 대조군(블로킹이 되지 않은 키트) 열에 제시하였다.

[0103] 알려진 항원의 농도에 따라 측정되는 형광 세기를 여러 번 측정하면 항원 농도에 따른 형광 세기 교정 곡선을 만들 수 있다. 미지의 항원 농도가 첨가된 경우라도, 이렇게 만들어진 교정 곡선을 참조하면 사용된 항원 농도를 역산해낼 수 있다.

[0104] 실험예 3: 블로킹을 통한 검출 한계 농도 향상

[0105] 도 6 및 표 2를 참고하면, 코로나 모사 단백질을 전혀 넣지 않은 경우에도, 테스트 라인에서 형광 신호가 측정된 것을 볼 수 있다. 이는 형광 입자와 멤브레인 위 항체와의 NSB(non-specific binding)에 의한 것으로, 검출 한계 농도를 악화시키는 결과로 이어진다.

[0106] 본 발명의 실시예에서는 멤브레인의 블로킹 여부를 조절함으로써 NSB를 감소시켜 항원이 없을 때의 불특정형광의 발생을 줄임으로써 검출 한계 농도를 향상시켰다. 본 실험예에서 사용된 멤브레인 블로킹 방법의 예시는 다음과 같다. 항체가 도포된 멤브레인을 완전 건조시킨 후 블로킹 용액(1% BSA, 0.01% Tween 20, PBS) 200 ml에서 30분 동안 느린 속도에서 교반시키고 37℃에서 3시간 동안 건조하였고 실험예 1과 같은 방식으로 진단키트로 제작하여 항원에 따른 신호 변화를 측정하였다.

[0107] 하기 표 2의 멤브레인 블로킹 키트 열의 값을 보면, 항원을 넣지 않은 경우, 블로킹 시 1.0의 평균 형광 신호를 보이며, 이는, 1 pg/ml의 항원을 넣은 경우인 1.1의 평균 형광 신호보다 낮아, 1 pg/ml까지의 농도에서도 측정이 가능함을 확인할 수 있다. 블로킹을 하지 않은 경우에는 항원을 넣지 않은 경우의 평균 형광 신호인 2.2가 1 pg/ml의 항원을 넣은 경우인 1.9 보다 높으므로, 1 pg/ml까지 낮은 항원 검출 한계 농도를 가질 수 없음을 확인하였다.

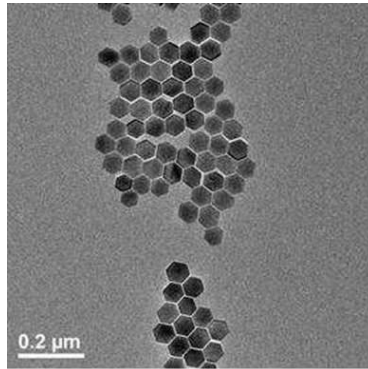
[0108] 따라서, 블로킹 여부를 통해, 항원 검출 한계 농도를 추가적으로 향상시키는 것이 가능함을 확인할 수 있다. 블로킹 이외에도, 사용되는 형광 입자의 농도, 버퍼의 조성, 멤브레인에 부착시키는 항체의 비율, 형광 입자와 결합하는 항체 비율을 추가적으로 조절하여 최적화할 시 더 우수한 한계 검출 농도를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

표 2

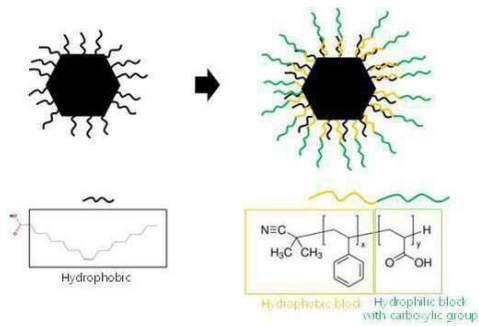
코로나 모사 단백질 항원의 농도 (pg/ml)	표준화된 평균신호(a.u.)	
	멤브레인 블로킹 키트	대조군(블로킹이 되지 않은 키트)
10000	167.8	166.6
1000	40.5	22.5
100	2.9	3.3
10	1.6	2.4
1	1.1	1.9
0	1.0	2.2

도면

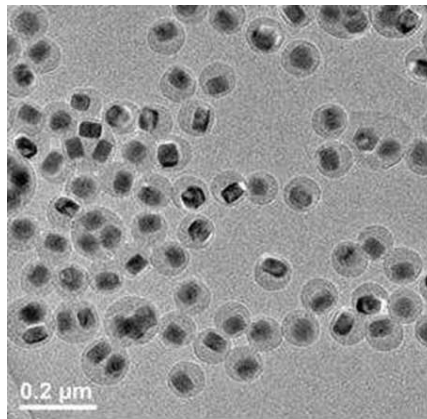
도면1



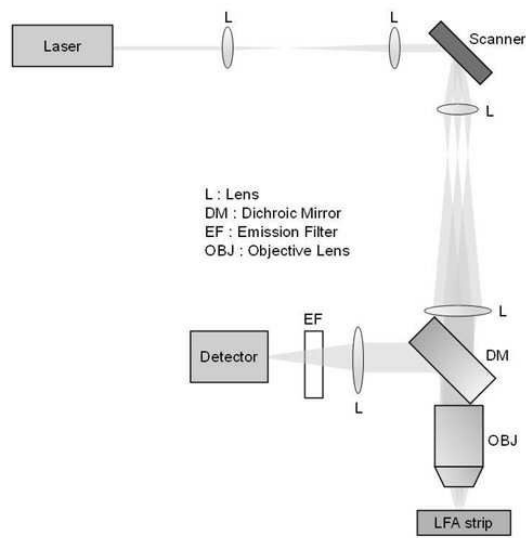
도면2



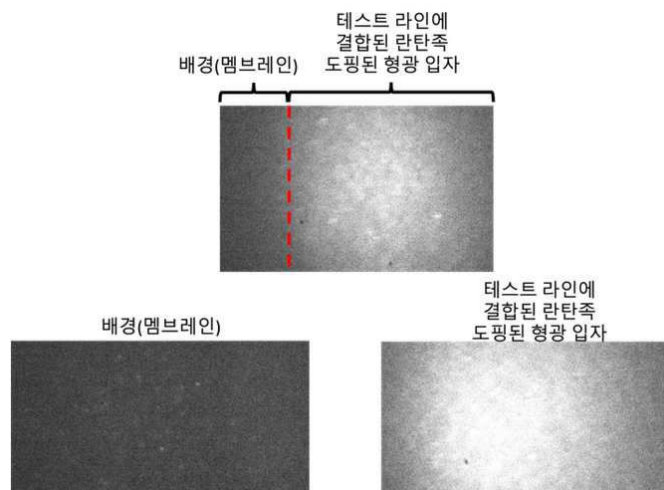
도면3



도면4



도면5



도면6

