



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0142231

(43) 공개일자 2024년09월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/543 (2006.01) G06N 20/00 (2019.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/54388 (2021.08)

G06N 20/00 (2021.08)

(21) 출원번호 10-2023-0036962

(22) 출원일자 2023년03월21일

심사청구일자 2023년03월21일

(71) 출원인

대한민국(농촌진흥청장)

전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

오미화

전라북도 완주군 이서면 콩쥐팍쥐로 1500

이은선

전라북도 완주군 이서면 콩쥐팍쥐로 1500

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 항생제 검출 센서

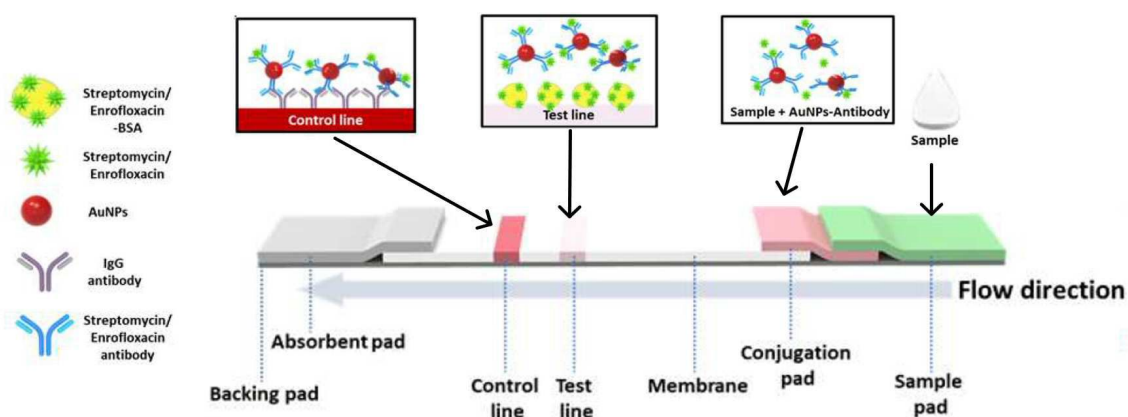
(57) 요약

본 발명은 항생제 검출 센서, 항생제 검출 방법 및 항생제 검출 센서를 이용한 항생제 검출 방법을 제공한다.

항생제 검출 센서는 샘플 패드, 컨จู게이트 패드, 멤브레인 패드 및 흡수 패드가 순차적으로 연결된 구조를 포함하는 측방유동면역에 기반한 항생제 검출 센서를 포함한다.

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



항생제 검출 센서 제작 방법은 항생제에 결합할 수 있는 1차 항체가 포함된 용액과 나노 입자가 포함된 용액을 섞는 제1단계; 상기 제1단계 후의 용액을 원심분리 한 뒤, 상층액을 제거하여 상기 나노 입자에 연결되지 않는 상기 1차 항체를 제거하는 제2단계; 상기 1차 항체가 연결된 나노 입자를 블로킹 용액에 넣는 제3단계; 상기 제3단계 후의 블로킹 용액을 원심분리 한 뒤, 상층액을 제거하여 펠릿(pellet)을 모으는 제4단계; 상기 펠릿을 녹인 후 상기 컨쥬게이트 패드에 도포하는 제5단계; 및 상기 컨쥬게이트 패드에 상기 샘플 패드 및 상기 멤브레인 패드를 연결하는 제6단계를 포함한다.

항생제 검출 센서를 이용한 항생제 검출 방법은 분석장치가 제1항의 항생제 검출 센서를 사용한 결과 영상을 입력받는 단계; 상기 분석장치가 상기 항생제 검출 센서의 테스트 라인 및 컨트롤 라인에 나타난 신호 값을 측정하는 단계; 상기 분석장치가 상기 측정된 신호 값을 분석모델에 입력하는 단계; 및 상기 분석장치가 상기 분석모델의 출력값을 기초로 상기 항생제의 농도를 측정하는 단계;를 포함한다.

(72) 발명자

허윤석

인천광역시 연수구 랜드마크로 110, 109동 1904호
(송도동, 호반베르디움 EDU CITY)

유진곤

서울특별시 강동구 천호대로188길 26, 206호 (둔촌동, 동호리츠빌아파트)

무나라

인천광역시 미추홀구 경인남길118번길 40, 501호

한수빈

인천광역시 미추홀구 경인남길 122, 용현래미안 305호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395072523
과제번호	PJ014238042022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농축산물생산현장의안전관리기술개발
연구과제명	축산물 생산단계 중 위해요소 오염 저감기술 개발(4공동)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국립축산과학원/인하대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

샘플 패드, 컨쥬게이트 패드, 멤브레인 패드 및 흡수 패드가 순차적으로 연결된 구조를 포함하는 측방유동면역에 기반한 항생제 검출 센서에 있어서,

상기 샘플 패드는 피검사자의 샘플을 수용하고,

상기 컨쥬게이트 패드는 항생제에 결합할 수 있는 1차 항체가 연결된 나노 입자를 포함하고,

상기 멤브레인 패드는 상기 컨쥬게이트 패드에서 상기 흡수 패드 방향으로 순차적으로 형성된 테스트 라인 및 컨트롤 라인을 포함하고,

상기 테스트 라인에는 상기 1차 항체에 결합할 수 있는 상기 항생제가 고정되어 있고,

상기 컨트롤 라인에는 상기 1차 항체에 결합할 수 있는 2차 항체가 고정되어 있고,

상기 항생제는 스트렙토마이신 또는 엔로플록사신인,

항생제 검출 센서.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 나노입자는 1nm 내지 35nm 크기를 가지는 금 나노입자인(AuNPs), 항생제 검출 센서.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 컨쥬게이트 패드에 풍마된 1차 항체의 농도는 1ug/ml 내지 2ug/ml인, 항생제 검출 센서.

청구항 4

샘플 패드, 컨쥬게이트 패드, 멤브레인 패드 및 흡수 패드가 순차적으로 연결된 구조를 포함하는 항생제 검출 센서 제작 방법에 있어서,

항생제에 결합할 수 있는 1차 항체가 포함된 용액과 나노 입자가 포함된 용액을 섞는 제1단계;

상기 제1단계 후의 용액을 원심분리 한 뒤, 상층액을 제거하여 상기 나노 입자에 연결되지 않는 상기 1차 항체를 제거하는 제2단계;

상기 1차 항체가 연결된 나노 입자를 블로킹 용액에 넣는 제3단계;

상기 제3단계 후의 블로킹 용액을 원심분리 한 뒤, 상층액을 제거하여 펠릿(pellet)을 모으는 제4단계;

상기 펠릿을 녹인 후 상기 컨쥬게이트 패드에 도포하는 제5단계; 및

상기 컨쥬게이트 패드에 상기 샘플 패드 및 상기 멤브레인 패드를 연결하는 제6단계를 포함하는,

항생제 검출 센서 제작 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 1차 항체가 포함된 용액은 1차 항체의 농도가 1ug/ml 내지 2ug/ml 인, 항생제 검출 센서 제작 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 블로킹 용액은 소혈청알부민(BSA)을 포함하는 보레이트(borate) 완충용액(buffer)인, 항생제 검출 센서 제작방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 소혈청알부민의 농도는 10%이고, 상기 보레이트 완충용액은 pH가 9인, 항생제 검출 센서 제작방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 펠릿을 녹이는 것은 상기 펠릿에 소혈청알부민 및 수크로오스(Sucrose)가 포함된 보레이트(borate) 완충용액을 넣어 O.D.(Optical Density)가 8이 되도록 녹이는 것을 포함하는, 항생제 검출 센서 제작방법.

청구항 9

제4항에 있어서

상기 5단계는, 상기 펠릿을 녹인 후 상기 컨주게이트 패드에 12시간 동안 도포하는 단계인, 항생제 검출 센서 제작방법.

청구항 10

분석장치가 제1항의 항생제 검출 센서를 사용한 결과 영상을 입력받는 단계;

상기 분석장치가 상기 항생제 검출 센서의 테스트 라인 및 컨트롤 라인에 나타난 신호 값을 측정하는 단계;

상기 분석장치가 상기 측정된 신호 값을 분석모델에 입력하는 단계; 및

상기 분석장치가 상기 분석모델의 출력값을 기초로 상기 항생제의 농도를 측정하는 단계;를 포함하는, 항생제 검출 센서를 이용한 항생제 검출 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 분석모델은 회귀 분석에 기반한 모델인, 항생제 검출 센서를 이용한 항생제 검출 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 항생제 검출 센서는 엔로플록사신을 검출하는 센서이고,

상기 분석모델은 아래의 수학적식을 이용해 상기 엔로플록사신의 농도에 대한 정보를 출력하는 모델인, 항생제 검출 센서를 이용한 항생제 검출 방법.

[수학적식]

- ① $y = -0.0105x + 0.4661$ ($0.205 \leq y \leq 0.466$)
- ② $y = -0.0036x + 0.2944$ ($0.115 < y \leq 0.205$)
- ③ $y = -0.001x + 0.1639$ ($0.067 < y \leq 0.115$)
- ④ $y = -0.0001x + 0.0794$ ($0.060 < y \leq 0.067$)
- ⑤ $y = -0.0007x + 0.163$ ($0.026 < y \leq 0.060$)

상기 수학적식에서 y는 T/C 비율을 의미함. T/C 비율은 테스트 라인에 나타난 신호 값을 컨트롤 라인에 나타난 신호 값으로 나눈 비율을 의미함. 수학적식에서 x는 항생제 농도를 의미함.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 분석장치가 상기 측정된 항생제 농도에 따른 피검사자의 위험도를 출력하는 단계;를 더 포함하는, 항생제 검출 센서를 이용한 항생제 검출 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 피검사자의 위험도를 출력하는 단계는 상기 피검사의 항생제 농도에 따라 상기 피검사자를 보통(moderate), 중간(intermediate) 또는 위험(risk) 중 하나로 분류한 결과를 출력하는 단계인, 항생제 검출 센서를 이용한 항생제 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 이하 설명하는 기술은 항생제 검출 센서 및 분석장치에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 식품 안정성에 대한 소비자의 관심이 높아지면서, 축산물에 유해물질, 그 중에서도 항생제를 검출하는 기술들이 개발되고 있다.

[0003] 항생제 중에서도 아미노글리코사이드(aminoglycoside)계 항생제인 스트렙토마이신(Streptomycin)은 토양 미생물인 방선균 중 하나인 스트렙토미세스속(*Streptomyces griseus*)으로부터 처음으로 분리되어 시판된 항생제이다. 스트렙토마이신은 다른 아미노글리코사이드계 항생제와 같이 청신경, 신장에 대한 독성을 갖고 있다. 이에 스트렙토마이신은 난청, 신장 장애 등의 다양한 증상이 나타나는 부작용을 유발한다.

[0004] 또 다른 항생제로 플루오로퀴놀론(Fluoroquinolone)계 항생제인 엔로플록사신(Enrofloxacin)은 박테리아 감염 치료에 사용되는 항생제로 1983년 날리딕스산(Nalidixic acid)으로부터 합성되었으며, 1991년 Bayer사에서 Baytril이라는 이름으로 판매를 시작했음. 엔로플록사신과 같은 항생제는 힘줄파괴이나 신경손상과 같은 심각한 부작용을 가지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 미국 공개특허공보 2021/0172945 A1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 종래 유해물질을 분석하기 위해서 GC-MS(Gas chromatography-mass spectrometry), LC-MS/MS(Liquid chromatography-mass spectrometry) 및 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)등의 방법이 이용되고 있었다. 하지만 방법은 항생제 검출에 많은 시간이 필요하다. 또한 이 방법은 가축 도축 후 검사를 실시하여 만약 잔류 유해물질이 검출되면 도축된 육류를 폐기해야한다는 문제점이 있었다.

[0007] 이하 설명하는 기술은 이러한 문제점을 해결하기 위해 측방유동면역(lateral flow immunoassay, LFIA) 기반의 항생제 검출 센서를 제공한다. 또한 이하 설명하는 기술은 항생제 검출 센서 측정 결과를 기초로 검출된 항생제의 농도를 정확하게 측정할 수 있는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 이하 설명하는 기술은 샘플 패드, 컨쥬게이트 패드, 멤브레인 패드 및 흡수 패드가 순차적으로 연결된 구조를 포함하는 측방유동면역에 기반한 항생제 검출 센서를 제공한다.

[0009] 상기 샘플 패드는 피검사자의 샘플을 수용하고, 상기 컨쥬게이트 패드는 항생제에 결합할 수 있는 1차 항체가 연결된 나노 입자를 포함하고, 상기 멤브레인 패드는 상기 컨쥬게이트 패드에서 상기 흡수 패드 방향으로 순차

적으로 형성된 테스트 라인 및 컨트롤 라인을 포함하고, 상기 테스트 라인에는 상기 1차 항체에 결합할 수 있는 상기 항생제가 고정되어 있고, 상기 컨트롤 라인에는 상기 1차 항체에 결합할 수 있는 2차 항체가 고정되어 있고, 상기 항생제는 스트렙토마이신 또는 엔로플록사신을 포함한다.

[0010] 이하 설명하는 기술은 샘플 패드, 컨쥬게이트 패드, 멤브레인 패드 및 흡수 패드가 순차적으로 연결된 구조를 포함하는 항생제 검출 센서 제작 방법을 제공한다. 항생제 검출 센서 제작 방법은 항생제에 결합할 수 있는 1차 항체가 포함된 용액과 나노 입자가 포함된 용액을 섞는 제1단계; 상기 제1단계 후의 용액을 원심분리 한 뒤, 상층액을 제거하여 상기 나노 입자에 연결되지 않는 상기 1차 항체를 제거하는 제2단계; 상기 1차 항체가 연결된 나노 입자를 블로킹 용액에 넣는 제3단계; 상기 제3단계 후의 블로킹 용액을 원심분리 한 뒤, 상층액을 제거하여 펠릿(pellet)을 모으는 제4단계; 상기 펠릿을 녹인 후 상기 컨쥬게이트 패드에 도포하는 제5단계; 및 상기 컨쥬게이트 패드에 상기 샘플 패드 및 상기 멤브레인 패드를 연결하는 제6단계를 포함한다.

[0011] 이하 설명하는 기술은 항생제 검출 센서를 이용한 항생제 검출 방법을 제공한다.

[0012] 항생제 검출 센서를 이용한 항생제 검출 방법은 분석장치가 항생제 검출 센서를 사용한 결과 영상을 입력받는 단계; 상기 분석장치가 상기 항생제 검출 센서의 테스트 라인 및 컨트롤 라인에 나타난 신호 값을 측정하는 단계; 상기 분석장치가 상기 측정된 신호 값을 분석모델에 입력하는 단계; 및 상기 분석장치가 상기 분석모델의 출력값을 기초로 상기 항생제의 농도를 측정하는 단계;를 포함한다.

발명의 효과

[0013] 이하 설명하는 기술을 이용하면 별도의 장비가 없이도 간편하고 신속하게 항생제의 농도를 측정할 수 있다.

[0014] 이하 설명하는 기술을 이용하면 비전문가도 최소한의 장비로 항생제를 검출할 수 있다.

[0015] 이하 설명하는 기술을 이용하면 항생제 검출 센서의 측정 결과를 기초로 항생제의 농도를 정확하게 측정할 수 있다.

[0016] 이하 설명하는 기술을 이용하면 도축 전에 유해물질을 확인하여 불필요한 축산물 폐기를 막을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도1은 항생제 검출 센서의 예이다.

도2는 분석모델이 항생제 농도를 측정할 때 이용되는 식에 대한 그래프이다.

도3은 스트렙토마이신 검출 센서를 최적화하기 위한 실험예이다.

도4는 제작된 스트렙토마이신 검출 센서의 검출한계를 파악한 실험결과이다.

도5는 실제 시료를 스트렙토마이신 검출 센서에 적용하여 검출한계를 파악한 실험결과이다.

도6은 엔로플록사신 검출 센서 제작시 사용한 1차 항체의 농도에 따른 센서의 성능을 평가한 결과이다.

도7은 엔로플록사신 검출 센서의 검출한계를 파악한 실험결과이다.

도8은 실제 시료를 엔로플록사신 검출 센서에 적용하여 검출한계를 파악한 실험결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명의 일 양상은 항생제 검출 센서를 제공한다.

[0019] 도1은 항생제 검출 센서의 예이다.

[0020] 항생제 검출 센서는 측방유동면역에 기반한 센서일 수 있다.

[0021] 항생제 검출 센서는 샘플 패드(Sample pad), 컨쥬게이트 패드(Conjugate pad), 멤브레인 패드(Membrane pad) 및 흡수 패드(Absorbent pad)가 순차적으로 연결된 구조를 포함한다. 피검사자의 샘플(Sample)은 샘플 패드에 수용된 후, 컨쥬게이트 패드, 멤브레인 패드 및 흡수 패드 순서로 확산 이동할 수 있다.

[0022] 항생제 검출 센서는 샘플 패드, 컨쥬게이트 패드, 멤브레인 패드 및 흡수 패드가 동일한 지지체 상에 순차적으로 연결된 구조를 포함할 수 있다.

[0023] 지지체는 샘플 패드, 컨쥬게이트 패드, 멤브레인 패드 및 흡수 패드를 지지하거나 운반할 수 있다. 지지체는 멤

브레인 패드를 통해 확산하는 피검사자의 샘플이 지지체를 통해 누출되지 않도록 액체 불투과성물질로 구성될 수 있다. 예를 들어 지지체는 유리; 중합체물질(폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리부타디엔, 폴리비닐클로라이드, 폴리아미드, 폴리카르보네이트, 에폭시드, 메타크릴레이트 및 폴리멜라민) 등을 포함할 수 있다.

[0024] 항생제 검출 센서는 스트렙토마이신(Streptomycin) 또는 엔로플록사신(Enrofloxacin)을 검출하기 위한 센서일 수 있다.

[0025] 샘플 패드는 피검사자의 샘플을 수용한다.

[0026] 샘플은 분석하고자 하는 항생제를 함유한 것으로 의심되는 생물학적 물질을 의미할 수 있다. 예를 들어 샘플은 혈액, 간질액, 타액, 점안 렌즈 유체, 뇌척수액, 땀, 소변, 젖, 복수, 점액, 비강유체(nasalfuid), 객혈, 관절 혈액, 복강액, 질액, 월경분비물, 양수, 및 정액을 포함할 수 있다. 샘플은 생리적 유체와 같은 어떠한 생물학적 공급원으로부터도 유래될 수 있다.

[0027] 샘플 패드는 피검사자의 샘플을 수용하기에 충분한 다공성을 갖는 물질로 구성될 수 있다. 예를 들어 다공성 물질은 섬유성 종이, 셀룰로오스 물질로 된 미세 기공 멤브레인, 셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트와 같은 셀룰로오스 유도체, 니트로셀룰로오스, 유리섬유, 천연발생의 면(cotton), 나일론과 같은 직물 또는 다공성 겔 등을 포함할 수 있다.

[0028] 컨쥬게이트 패드는 항생제에 결합할 수 있는 1차 항체가 연결된 나노 입자를 포함할 수 있다.

[0029] 컨쥬게이트 패드는 샘플 패드로부터 확산되어 이동되는 샘플을 수용할 수 있다. 컨쥬게이트 패드는 샘플 패드와 마찬가지로 확산 이동이 가능한 물질로 구성될 수 있다.

[0030] 1차 항체는 항생제에 결합할 수 있는 항체일 수 있다. 즉 1차 항체는 검출하고자 하는 항생제를 항원으로 하여 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. 따라서 1차 항체는 스트렙토마이신 또는 엔로플록사신에 특이적인 결합하는 항체(Streptomycin/Enrofloxacin Antibody)일 수 있다.

[0031] 1차 항체의 농도는 1ug/ml 또는 2ug/ml 일 수 있다. 또는 1차 항체의 농도는 1 내지 10 ug/ml 일 수 있다.

[0032] 1차 항체는 단일 클론 항체(monoclonal antibody) 또는 다중 클론 항체(polyclonal antibody)일 수 있다.

[0033] 나노 입자(nanoparticle)는 검출 가능한 표지로서 작용한다.

[0034] 나노 입자는 금속의 나노 입자 일 수 있다. 일 실시예로 나노 입자는 금 나노 입자(AuNPs)일 수 있다 또는 나노 입자는 은(Ag), 백금(Pt), 팔라듐(Pd), 이리듐(Ir), 로듐(Rh), 루테튬(Ru)의 귀금속; 티타늄(Ti), 지르코늄(Zr), 하프늄(Hf), 바나듐(V), 나이오븀(Nb), 탄탈럼(Ta), 크로뮴(Cr), 몰리브데늄(Mo), 텅스텐(W), 루테튬(Ru), 오스뮴(Os)의 전이금속; 철(Fe), 니켈(Ni), 코발트(Co)등의 금속; 산화마그네슘(MgO), 이산화티타늄(TiO2), 오산화바나듐(V2O5), 산화아연(ZnO)의 금속산화물을 포함하는 입자일 수 있다.

[0035] 나노 입자는 35nm의 크기를 가지는 금 나노 입자일 수 있다. 또는 나노 입자는 1nm 내지 100nm의 크기를 가지는 나노 입자일 수 있다.

[0036] 1차 항체가 연결된 나노 입자를 “나노 입자-항체 컨쥬게이트(Conjugate)” 라고 부를 수 있다. 1차 항체와 나노 입자는 이온결합, 공유결합, 배위 결합, 수소결합 및 반데르발스 결합으로 연결되어 있을 수도 있다.

[0037] 나노 입자-항체 컨쥬게이트는 샘플 패드로부터 확산되어 이동된 피검사자의 샘플에 있는 항생제와 결합할 수 있다. 예를 들어 1차 항체가 스트렙토마이신에 결합하는 항체인 경우 나노 입자-항체 컨쥬게이트는 피검사자의 샘플에 있는 스트렙토마이신과 결합할 수 있다.

[0038] 항생제와 결합된 나노 입자-항체 컨쥬게이트는 컨쥬게이트 패드에서 멤브레인 패드로 확산 이동될 수 있다. 또한 항생제와 결합되지 않는 나노 입자-항체 컨쥬게이트도 컨쥬게이트 패드에서 멤브레인 패드로 확산 이동될 수 있다.

[0039] 멤브레인 패드는 컨쥬게이트 패드에서 흡수 패드 방향으로 순차적으로 형성된 테스트 라인(Test line) 및 컨트롤 라인(Control line)을 포함할 수 있다.

[0040] 테스트 라인에는 1차 항체에 결합할 수 있는 항생제가 고정되어 있다. 예를 들어 스트렙토마이신 검출 센서라면 테스트 라인에는 스트렙토마이신이 고정되어 있을 수 있다.

- [0041] 테스트 라인에는 항생제가 소혈청알부민(BSA)과 함께 고정되어 있을 수 있다.
- [0042] 컨쥬게이트 패드에서 확산 이동된 나노 입자-항체 컨쥬게이트에 항생제가 결합되어 있지 않다면, 테스트 라인에 있는 항생제는 나노 입자-항체 컨쥬게이트의 확산 이동을 방해한다. 왜냐하면 나노 입자-항체 컨쥬게이트의 1차 항체가 테스트 라인의 항생제와 결합되어 고정되기 때문이다.
- [0043] 반대로 컨쥬게이트 패드에서 확산 이동된 나노 입자-항체 컨쥬게이트에 항생제가 결합되어 있다면, 테스트 라인에 있는 항생제는 나노 입자-항체 컨쥬게이트의 확산 이동을 방해하지 못한다. 왜냐하면 나노 입자-항체 컨쥬게이트의 1차 항체에 이미 항생제가 결합되어 있어, 테스트 라인의 항생제에 결합할 수 없기 때문이다.
- [0044] 컨트롤 라인에는 1차 항체에 결합할 수 있는 2차 항체(IgG antibody)가 고정되어 있다.
- [0045] 이에 컨쥬게이트 패드에서 확산 이동된 나노 입자-항체 컨쥬게이트는 컨트롤 라인의 2차 항체에 결합되어 고정된다. 이를 통해 컨쥬게이트 패드에 있는 나노 입자-항체 컨쥬게이트가 제대로 확산 이동되었는지 확인할 수 있다.
- [0046] 멤브레인 패드는 컨쥬게이트 패드로부터 확산 이동되는 피검사자의 샘플 물질을 통과시킬 수 있는 물질을 포함할 수 있다.
- [0047] 예를 들어 멤브레인 패드는 예를 들어, 천연, 합성, 또는 합성에 의해 변형된 천연 발생 물질, 예를 들어 폴리사카라이드(예: 셀룰로오스 물질, 종이, 셀룰로오스 아세테이트 및 니트로셀룰로오스와 같은 셀룰로오스 유도체); 폴리에테르 술폰; 폴리에틸렌; 나일론; 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF); 폴리에스테르; 폴리프로필렌; 실리카; 비닐 클로라이드, 비닐클로라이드-프로필렌 공중합체 및 비닐 클로라이드-비닐 아세테이트 공중합체와 같은 중합체와 함께 다공성 중합체 매트릭스에 균일하게 분산된 무기 물질, 예를 들어 불활성화된 알루미늄, 규조토, MgSO₄, 또는 다른 무기미분 물질; 자연 발생(예: 면) 및 합성(예: 나일론 또는 레이온) 천; 다공성 겔, 예를 들어 실리카겔, 아가로스, 텍스트란 및 젤라틴; 중합체 필름, 예를 들어 폴리아크릴아미드; 등의 물질로부터 형성될 수 있다.
- [0048] 바람직하게는 상기 멤브레인은 중합체 물질, 예를 들어 니트로셀룰로오스, 폴리에테르술폰, 폴리에틸렌, 나일론, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리에스테르 및 폴리프로필렌을 포함할 수 있다.
- [0049] 흡수 패드는 멤브레인 패드를 통해 이동하는 피검사자의 샘플을 받아들일 수 있다. 흡수 패드는 멤브레인 패드를 통한 모세관 작용 및 유체의 확산 유동을 촉진하는데 도움을 줄 수 있다.
- [0050] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 스트렙토마이신을 검출하는 센서의 검출한계는 5ppb이다. 또한 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 엔로플록사신을 검출하는 센서의 검출 한계는 20ppb이다.
- [0052] 본 발명의 일 양상은 항생제 검출 센서를 제작하는 방법을 제공한다.
- [0053] 항생제 검출 센서 제작 방법은 전술한 측방유동면역에 기반한 항생제 검출 센서를 제작하는 방법일 수 있다.
- [0054] 항생제 검출 센서 제작 방법은 크게 1단계 내지 6단계를 포함할 수 있다.
- [0055] 항생제 검출 센서 제작 방법은 항생제에 결합할 수 있는 1차 항체가 포함된 용액과 나노 입자가 포함된 용액을 섞는 제1단계; 상기 제1단계 후의 용액을 원심분리 한 뒤, 상층액을 제거하여 상기 나노 입자에 연결되지 않는 상기 1차 항체를 제거하는 제2단계; 상기 1차 항체가 연결된 나노 입자를 블로킹 용액에 넣는 제3단계; 상기 제3단계 후의 블로킹 용액을 원심분리 한 뒤, 상층액을 제거하여 펠릿(pellet)을 모으는 제4단계; 상기 펠릿을 녹인 후 상기 컨쥬게이트 패드에 도포하는 제5단계; 및 상기 컨쥬게이트 패드에 상기 샘플 패드 및 상기 멤브레인 패드를 연결하는 제6단계를 포함할 수 있다.
- [0056] 제1 단계는 1차 항체가 포함된 용액과 나노 입자가 포함된 용액을 섞는 단계일 수 있다.
- [0057] 1차 항체는 전술한 목표 항생제에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 즉 1차 항체는 엔로플록사신 또는 스트렙토마이신에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.
- [0058] 1차 항체의 농도는 1 내지 100 ug/ml 일 수 있다. 나노 입자는 1nm 내지 100nm 크기를 가지는 금 나노 입자일 수 있다. 용액을 섞기 위해서 Rotator가 이용될 수 있다.
- [0059] 일 실시예로 엔로플록사신에 특이적 반응을 하는 1차 항체 1ug/ml 20uL와 35nm 크기를 가지는 금 나노 입자 용

액 20ml을 실온에서 30분간 30rpm으로 Rotator에서 섞을 수 있다. 또는 스트렙토마이신에 특이적 반응을 하는 1차 항체 2ug/ml 20ul와 35nm의 크기를 가지는 금 나노 입자 용액 20ml을 실온에서 30분간 30rpm으로 Rotator에서 섞을 수 있다. 이를 통해 1차 항체와 금 나노 입자가 연결된 접합체를 제작할 수 있다.

- [0060] 제2단계는 1단계 후의 용액을 원심분리 한 뒤, 상층액을 제거하여 나노 입자에 연결되지 않는 1차 항체를 제거하는 단계일 수 있다.
- [0061] 일 실시예로 1단계 후의 용액을 6000rpm 30분 4 ℃ 조건에서 원심분리 한 뒤, 상층액을 제거할 수 있다.
- [0062] 제3단계는 1차 항체가 연결된 나노 입자를 블로킹 용액에 넣는 단계일 수 있다.
- [0063] 블로킹 용액은 비 특이적 결합을 막기 위해 이용된다. 블로킹 용액은 소 혈청 알부민(BSA)을 포함할 수 있다. 블로킹 용액은 블로킹에 최적화된 pH를 가지는 버퍼를 기반으로 제작된 용액일 수 있다.
- [0064] 일 실시예로 블로킹 용액은 10% 소혈청알부민(BSA) 100uL와 pH 9.0의 20mM borate buffer 900uL을 혼합하여 제작될 수 있다.
- [0065] 제작된 블로킹 용액에 1차 항체가 연결된 나노 입자를 넣은 뒤 반응시킬 수 있다.
- [0066] 일 실시예로 제작된 블로킹 용액에 1차 항체가 연결된 나노 입자를 넣은 뒤 30분간 30rpm조건의 Rotator에서 반응시킬 수 있다.
- [0067] 제4단계는 제3단계 후의 블로킹 용액을 원심분리 한 뒤, 상층액을 제거하여 펠릿을 모으는 단계일 수 있다.
- [0068] 일 실시예로 제3단계 후의 블로킹 용액을 10,000rpm, 15분, 4 ℃로 설정해 원심분리 한 뒤, 상층액을 제거할 수 있다.
- [0069] 제3단계 및 제4단계는 반복 수행될 수 있다. 일 실시예로 4단계가 끝난 후의 펠릿을 다시 블로킹 용액에 넣어 섞은 뒤, 다시 원심분리하여 펠릿을 수집할 수 있다.
- [0070] 펠릿을 모으기 위해서 소혈청 알부민이 이용될 수 있다. 일 실시예로 BSA가 이용될 수 있다. BSA의 농도는 0.1% 내지 10%일 수 있다.
- [0071] 제5단계는 펠릿을 녹인 후 컨쥬게이트 패드에 도포하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0072] 펠릿은 일정한 O.D(Optical Density)값을 가지도록 녹일 수 있다. 예를 들어 펠릿이 1내지 10의 값을 가지도록 녹일 수 있다. 바람직하게는 O.D. 값이 8이 되도록 녹일 수 있다.
- [0073] 펠릿을 녹이기 위해서 소혈청알부민(BSA) 및 수크로오스(Sucrose)가 포함된 용액을 이용할 수 있다. 일 실시예로 1% BSA, 5% Sucrose, Borate Buffer용액을 이용할 수 있다.
- [0074] 펠릿을 녹인 후, 컨쥬게이트 패드에 도포하는 것은 12시간 동안 진행될 수 있다.
- [0075] 제6단계는 컨쥬게이트 패드에 상기 샘플 패드 및 상기 멤브레인 패드를 연결하는 단계일 수 있다.
- [0077] 본 발명의 일 양상은 항생제 분석장치가 항생제의 농도를 분석하는 방법을 제공한다.
- [0078] 항생제 농도 분석 방법은 분석장치가 항생제 검출 센서를 사용한 결과 영상을 입력 받는 단계; 상기 분석장치가 상기 항생제 검출 센서의 테스트 라인 및 컨트롤 라인에 나타난 신호 값을 측정하는 단계; 상기 분석장치가 상기 측정된 신호 값을 분석모델에 입력하는 단계; 및 상기 분석장치가 상기 분석모델의 출력 값을 기초로 상기 항생제의 농도를 측정하는 단계; 를 포함한다. 더 나아가 항생제 농도 분석 방법은 분석장치가 측정된 항생제 농도에 따른 피검사자의 위험도를 출력할 수 있다.
- [0079] 분석장치는 물리적으로 다양한 형태로 구현될 수 있다. 예를 들어 분석장치는 기기, PC, 노트북, 스마트기기, 서버 또는 데이터처리 전용 칩셋 등의 형태를 가질 수 있다.
- [0080] 분석장치는 전술한 항생제 농도 분석 방법을 실행하는데 필요한 데이터 및 모델을 입력 받는 입력장치를 포함할 수 있다. 예를 들어 입력장치는 키보드, 마우스 터치스크린 등을 포함할 수 있다. 또는 입력장치는 USB, CD등을 통해 데이터 및 모델을 입력 받는 구성을 포함할 수 있다.
- [0081] 분석장치는 전술한 항생제 농도 분석 방법을 실행하는데 필요한 데이터 및 모델을 저장하는 저장장치를 포함할

수 있다. 예를 들어 저장장치는 하드디스크, SSD와 같은 물리적인 장치를 포함할 수 있다.

- [0082] 분석장치는 전술한 항생제 농도 분석 방법을 실행하는데 필요한 연산을 수행하는 연산장치를 포함할 수 있다. 예를 들어 연산장치는 데이터를 처리하고 일정한 연산을 처리하는 CPU, GPU등과 같은 물리적인 장치를 포함할 수 있다.
- [0083] 분석장치는 분석결과를 출력하는 출력장치를 포함할 수 있다. 예를 들어 출력장치는 디스플레이, 문서를 출력하는 장치 등을 포함할 수 있다. 출력장치는 측정된 항생제 농도에 따른 피검사자의 위험도를 출력할 수 있다.
- [0084] 항생제 검출 센서를 사용한 결과 영상은 전술한 항생제 검출 센서를 사용한 결과를 촬영한 영상을 의미할 수 있다. 일 실시예로 항생제 검출 센서는 스트랩토마이신 또는 엔로플록사신을 검출하는 센서를 사용한 결과를 촬영한 영상일 수 있다.
- [0085] 영상을 촬영하기 위해서 카메라와 같은 촬영장치가 이용될 수도 있다. 분석장치는 촬영장치를 통해 직접 결과 영상을 촬영할 수도 있으나, 별도의 촬영장치가 촬영한 영상을 전송받을 수도 있다.
- [0086] 테스트 라인 및 컨트롤 라인에 나타난 신호 값은 항생제 검출 센서의 금 나노 입자에 의해 생성된 신호일 수 있다. 예를 들어 테스트 라인 및 컨트롤 라인에 나타난 신호 값은 항생제 검출 센서에 나타난 색상의 세기를 포함할 수 있다.
- [0087] 분석장치는 테스트 라인 및 컨트롤 라인에 나타난 신호 값을 측정하기 위해서 객체 인식 모델을 이용할 수 있다. 객체 인식 모델은 테스트 라인 및 컨트롤 라인에 나타난 신호를 측정하는데 이용되는 모델일 수 있다. 예를 들어 객체 인식 모델은 항생제 검출 센서에서 테스트 라인의 및 컨트롤 라인의 위치를 인식하는 모델일 수 있다. 또는, 객체 인식 모델은 결과 영상에서 테스트 라인 및 컨트롤 라인의 RGB값을 계산하여 신호 값을 측정하는 모델일 수 있다.
- [0088] 객체 인식 모델은 기계학습에 기반한 모델일 수 있다. 객체 인식 모델은 사전에 다량의 학습데이터를 통해 학습된 모델을 수 있다. 예를 들어 객체 인식 모델은 종래 이용되던 YOLO(You Only Look Once)와 같은 모델일 수 있다.
- [0089] 분석모델은 테스트 라인 및 컨트롤 라인에 나타난 신호 값을 입력 받아 항생제 농도를 분석하는 모델일 수 있다.
- [0090] 분석모델은 회귀 분석에 기반한 모델일 수 있다.
- [0091] 일 실시예로 분석모델은 엔로플록사신의 농도를 측정하기 위해서 수학적 1 및 도2에 기반한 모델일 수 있다.

수학적 1

- ① $y = -0.0105x + 0.4661$ ($0.205 \leq y \leq 0.466$)
- ② $y = -0.0036x + 0.2944$ ($0.115 < y \leq 0.205$)
- ③ $y = -0.001x + 0.1639$ ($0.067 < y \leq 0.115$)
- ④ $y = -0.0001x + 0.0794$ ($0.060 < y \leq 0.067$)
- ⑤ $y = -0.0007x + 0.163$ ($0.026 < y \leq 0.060$)

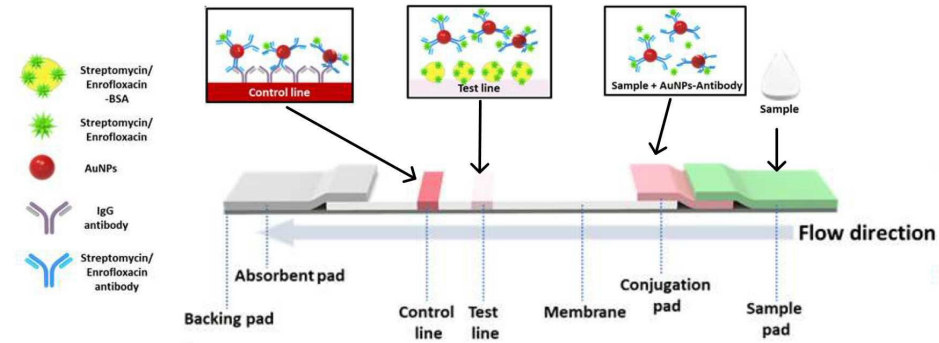
- [0092]
- [0093] 수학적1에서 y 는 T/C 비율을 의미한다. T/C 비율은 테스트 라인에 나타난 신호 값을 컨트롤 라인에 나타난 신호 값으로 나눈 값을 의미할 수 있다. 수학적1에서 x 는 엔로플록사신 농도를 의미한다.
- [0094] 분석장치는 항생제 농도에 따른 피검사자의 위험도 출력할 수 있다. 일 실시예로 분석장치는 항생제 농도에 따라 피검사자를 보통(moderate), 중간(intermediate) 및 위험(risk) 중 하나로 분류한 결과를 출력하는 것일 수 있다.
- [0096] 실시예 - [엔로플록사신 및 스트랩토마이신 검출센서 제작]
- [0097] 엔로플록사신 검출 센서를 제작한 실시예를 본다. 스트랩토마이신 검출 센서를 제작한 실시예는 엔로플록사신 검출 센서 제작 실시예 비교할 때 사용한 항생제의 농도만 다를 뿐 나머지 조건은 동일하다. 이하 엔로플록사신 검출 센서를 제작한 실시예를 중심으로 설명한다.

- [0098] 1차 항체는 엔로플록사신에 특이적 반응을 하는 항체(ENR-Ab)를 이용하였다.
- [0099] 1차 항체 1 μ g/ml 20 μ L와 35nm크기의 금 나노 입자(AuNPs) 20 mL를 실온에서 30rpm 조건의 rotator에서 30분간 반응시켰다. 이를 통해 1차 항체와 금 나노 입자를 연결하여 1차 항체-금 나노 입자 접합체(ENR-Ab-AuNPs)를 제작하였다.
- [0100] 반응하지 않은 1차 항체(ENR-Ab)를 제거하기 위해 접합체(ENR-Ab-AuNPs) 용액을 6,000rpm, 4 °C 조건에서 30분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하였다.
- [0101] 상층액을 제거한 뒤, 비특이적 결합을 막기위해 블로킹 용액(Blocking solution)을 넣고 실온에서 30분간 30rpm 조건으로 rotator에서 반응하였다. 블로킹 용액은 10% 소혈청알부민(BSA) 100 μ L 와 pH 9.0의 20mM borate buffer 900 μ L를 포함한다. 이 후 10,000 rpm, 15분, 4 °C 로 조건으로 원심분리 한 후 상층액을 제거하였다.
- [0102] 상층액을 제거한 뒤, 다시한번 블로킹 용액(Blocking solution)을 넣고 실온에서 30분간 30rpm으로 조건으로 rotator에서 반응하였다. 이후 10,000 rpm, 15분, 4 °C 로 조건으로 원심분리 한 후 상층액을 제거하였다.
- [0103] 상층액을 제거한 뒤, 1%의 BSA를 사용하여 펠릿(Pellet)을 수집하였다.
- [0104] 이후 최종 O.D. 값이 8이 되도록 1%의 BSA, 5% Sucrose, borate Buffer를 첨가하였다.
- [0105] 컨쥬게이트 패드에 용액을 균등하게 도포한 뒤 12시간 동안 건조하여 스트립을 제작하였다. 제작된 스트립에 샘플 패드와 흡수 패드와 결합한 뒤, 4mm크기로 절단하여 LFIA센서를 제작하였다.
- [0106] 스트렙토마이신 검출 센서를 제작하는 경우 1차 항체를 스트렙토마이신에 특이적인 반응을 하는 항체를 이용했다는 점 및 1차 항체의 농도가 1 μ g/ml이 아닌 2 μ g/ml을 이용했다는 것을 제외하면 모든 과정에서 엔로플록사신 검출 센서 제작 방법과 동일하다.
- [0108] 실험예 1- [스트렙토마이신 검출 센서 최적화]
- [0109] 도3은 스트렙토마이신 검출 센서를 최적화하기 위한 실험예이다. 스트렙토마이신 검출 센서를 최적화하기 위해 다양한 조건에서 실험이 진행되었다.
- [0110] 도3(A)는 스트렙토마이신 검출 센서 제작시 사용한 1차 항체의 농도(Antibody Concentration)에 따른 센서의 성능을 평가한 결과이다. 각각 0, 1, 2, 3 및 4 μ g/mL 농도의 1차 항체를 각각 금 나노 입자와 연결시켜 스트렙토마이신 검출 센서를 제작한 결과이다.
- [0111] 도3(A)에서 보듯이 2 μ g/ml농도의 스트렙토마이신 1차 항체를 금 나노 입자와 연결하여 사용하였을 때 가장 최적의 결과가 나온 것을 확인할 수 있다.
- [0112] 도3(B)는 스트렙토마이신 검출 센서 제작시 사용한 블로킹 용액(Blocking solution)의 종류와 pH에 따른 센서의 성능을 평가한 결과이다. 실험에 이용된 블로킹 용액의 종류는 10mM Phosphate buffer (PB), 10 mM Phosphate-buffered saline (PBS) 및 20mM borate buffer이며 각각 pH 7, 8 및 9를 가진다.
- [0113] 도3(B)에서 보듯이 pH 9.0을 가지는 20 mM borate buffer를 이용하여 블로킹 용액(Blocking solution)을 만들었을 때가 가장 최적의 결과가 나온 것을 확인할 수 있다.
- [0114] 도3(C) 및 도3(D)는 전개액으로 쓰이는 Tween20과 NaCl이 센서의 성능에 영향을 주는 것을 분석한 실험결과이다.
- [0115] 도3(C) 및 도3(D)에서 보듯이 5% Tween 20과 150 mM NaCl로 진행하였을 때 최적의 결과가 나타난 것을 확인할 수 있다.
- [0117] 실험예 2 - [스트렙토마이신 검출 센서 검출능]
- [0118] 제작된 스트렙토마이신 검출 센서의 검출능을 확인하기 위한 실험이 진행되었다.
- [0119] 도4는 제작된 스트렙토마이신 검출 센서의 검출한계를 파악한 실험결과이다. 전개액에 스트렙토마이신을 각각 0, 1, 5, 10, 15, 20, 20 및 100 ppb를 첨가한 후 각각 제작된 스트렙토마이신 검출 센서에 적용하였다.

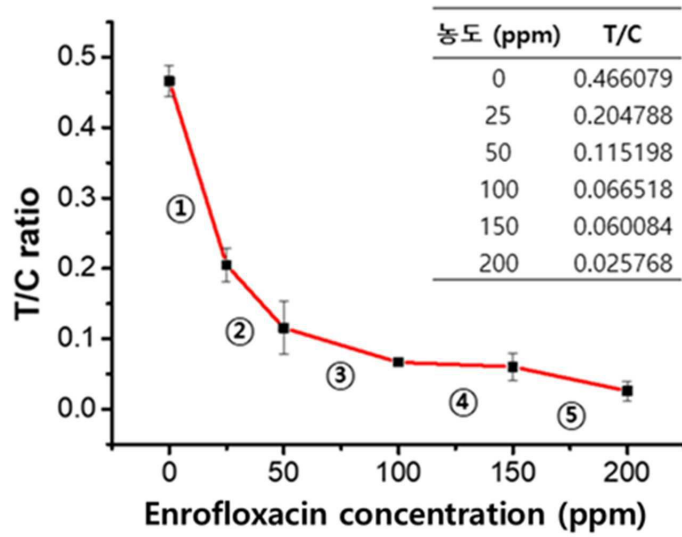
- [0120] 도4에서 볼 수 있듯이 검출 한계가 5ppb인 것을 확인할 수 있다. 또한 22ppb까지 검출할 수 있는 것을 확인할 수 있다.
- [0121] 도5는 실제 시료를 스트렙토마이신 검출 센서에 적용하여 검출한계를 파악한 실험결과이다.
- [0122] 도5(A)는 실제 시료로 돼지 혈액(Pig Blood serum)에 스트렙토마이신을 첨가한 것을 이용한 것이다. 구체적으로 먼저 전처리를 위해 돼지 혈액을 실온에서 30분간 둔 후 3000 rpm, 10분간 실온에서 원심분리를 이용해 혈청으로 분리하였다. 분리된 혈청에 스트렙토마이신 0, 1, 5, 10, 20, 22, 50 및 100 ppb를 넣은 뒤 검출 센서에 적용하였다.
- [0123] 도5(A)에서 보듯이 돼지 혈청 샘플을 10분간 스트렙토마이신 검출 센서에 적용한 결과, 검출한계는 5 ppb로 나타났다으며 20 ppb까지 검출할 수 있는 것을 확인할 수 있다.
- [0124] 도5(B)는 실제 시료로 돼지 소변에 스트렙토마이신을 첨가한 것을 이용한 결과이다. 구체적으로 먼저 돼지 소변의 전처리를 위해 5000 rpm, 5분간 원심분리를 사용했으며 매트릭스 효과(Matrix effect)를 줄이기 위해 50배 희석하여 실험을 진행하였다. 이후 마찬가지로 희석한 돼지 소변에 스트렙토마이신 0, 1, 5, 10, 20, 22, 50 및 100ppb를 넣고 검출 센서에 적용하였다.
- [0125] 도5(B)에서 보듯이 돼지 소변 샘플을 10분간 스트렙토마이신 검출 센서에 적용한 결과, 검출한계가 5 ppb로 나타났다으며 22 ppb까지 검출할 수 있는 것을 확인할 수 있다.
- [0127] 실험예 3 - [엔로플록사신 검출 센서 최적화]
- [0128] 엔로플록사신 검출 센서의 최적화를 위해 다양한 조건에서 실험이 진행되었다.
- [0129] 도6은 엔로플록사신 검출 센서 제작시 사용한 1차 항체의 농도에 따른 센서의 성능을 평가한 결과이다. 각각 0, 0.5, 1 및 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 1차 항체를 각각 금 나노 입자에 연결시켜 엔로플록사신 검출 센서를 제작한 결과이다.
- [0130] 도6에서 보듯이 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 엔로플록사신 1차 항체를 금 나노 입자와 연결하여 사용하였을 때 가장 최적의 결과가 나온 것을 확인할 수 있다.
- [0132] 실험예 4 - [엔로플록사신 검출 센서 검출능]
- [0133] 제작된 엔로플록사신 검출 센서의 검출능을 확인하기 위한 실험이 진행되었다.
- [0134] 도7은 엔로플록사신 검출 센서의 검출한계를 파악한 실험결과이다. 전개액에 엔로플록사신을 각각 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 20, 50 및 75ppb를 첨가한 후 각각 엔로플록사신 검출 센서에 적용하였다.
- [0135] 도7에서 볼 수 있듯이 엔로플록사신 검출 센서의 검출 한계가 20ppb인 것을 확인할 수 있다. 또한 최대 50ppb까지 검출할 수 있는 것을 확인할 수 있다.
- [0136] 도8은 실제 시료를 엔로플록사신 검출 센서에 적용하여 검출한계를 파악한 실험결과이다.
- [0137] 도8은 실제 시료로 우유에 엔로플록사신을 첨가한 것을 이용한 것이다. 구체적으로 별도의 전처리 과정 없이 우유에 0, 0.1, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 및 75 ppb의 엔로플록사신을 첨가하였다. 이후 엔로플록사신 검출 센서에 적용한 뒤, 10분간 두었다.
- [0138] 도8에서 보듯이 엔로플록사신 검출 센서의 검출 한계가 20ppb인 것을 확인할 수 있다. 또한 최대 50ppb까지 검출할 수 있는 것을 확인할 수 있다.
- [0140] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다.
- [0141] 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

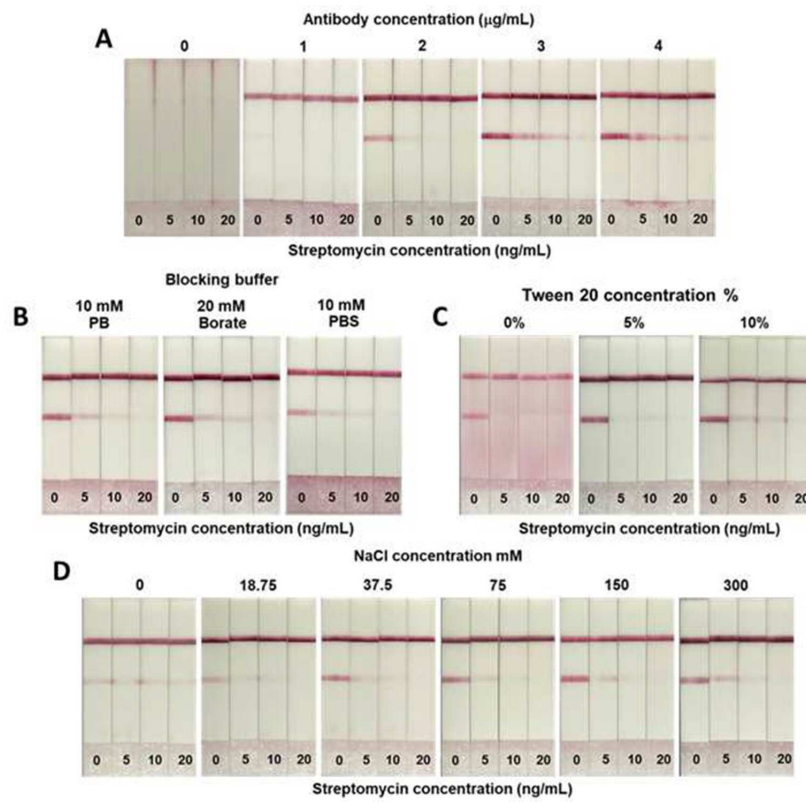
도면1



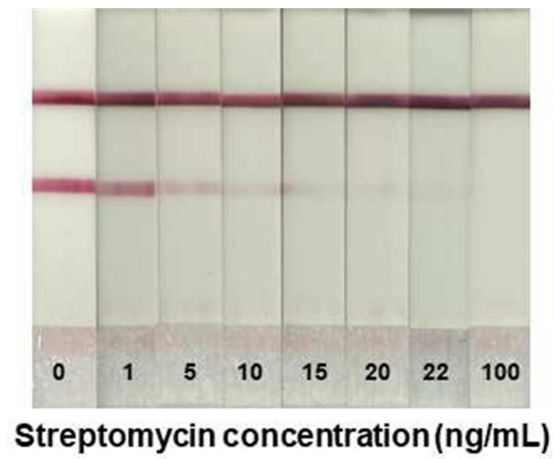
도면2



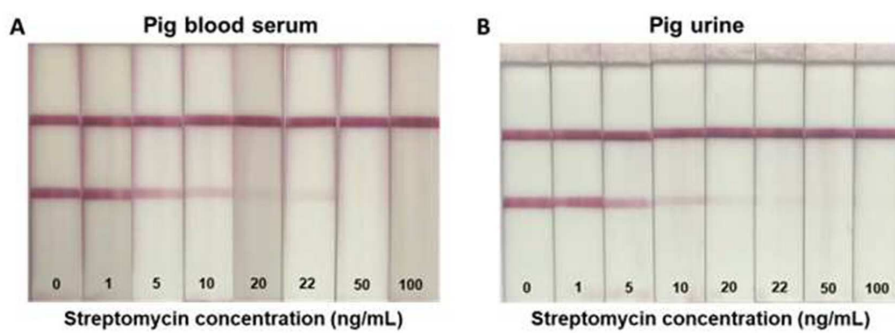
도면3



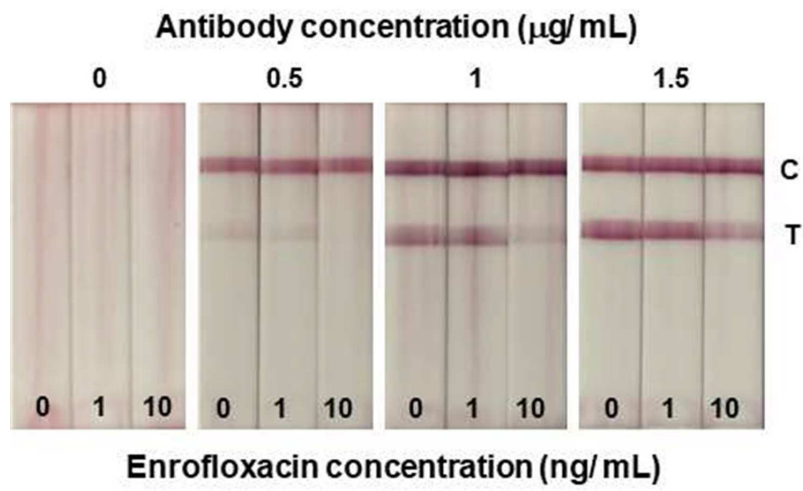
도면4



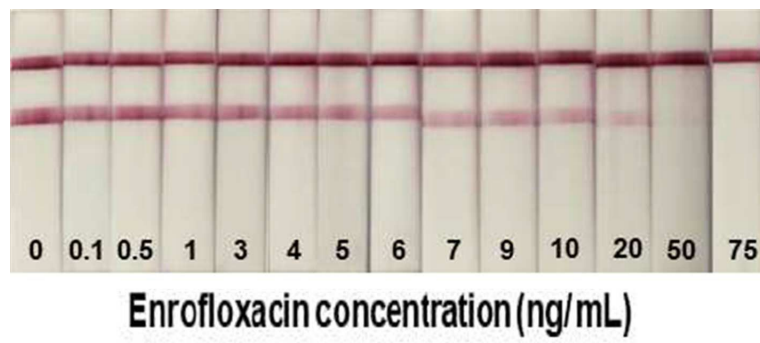
도면5



도면6



도면7



도면8

