

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0111529

(43) 공개일자 2023년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/54393 (2013.01)

G01N 33/5302 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0007489

(22) 출원일자 2022년01월18일

심사청구일자 2022년01월18일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

박민

서울특별시 마포구 토정로4길 26, 1층1호(합정동)

김미연

경기도 하남시 하남대로 895, 103동 902호 (덕풍동, 라인아파트)

(74) 대리인

강현욱

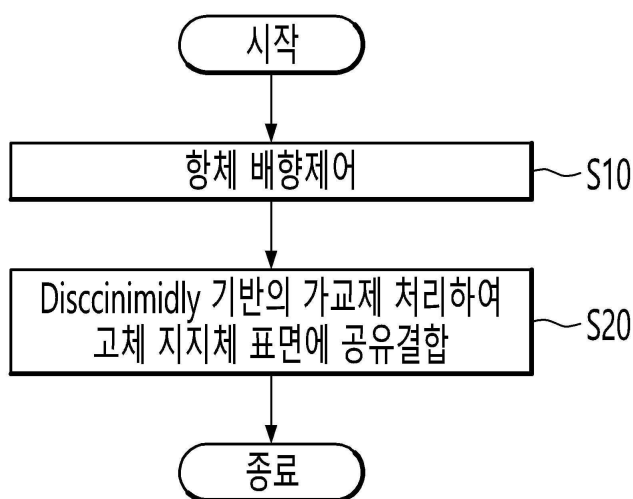
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 면역 바이오센서, 이를 포함하는 면역 바이오 키트, 상기 면역 바이오 센서의 분자 인식층 제조방법 및 상기 면역 바이오센서의 재생방법

(57) 요약

본 발명의 면역 바이오센서는 분자 인식층을 포함하고, 분자 인식층은 생체 물질에 특이적으로 결합하는 배향제어된 항체가 공유결합으로 고정되어 있는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/6854 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345334440
과제번호	NRF-2021R1I1A3055700
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	학문균형발전지원사업
연구과제명	NADH 산화효소 표면발현을 통한 직접전자전달 NADH 바이오센서 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2024.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

분자 인식층을 포함하고,

상기 분자 인식층은 생체 물질에 특이적으로 결합하는 배향제어된 항체가 공유결합으로 고정되어 있는 것을 특징으로 하는,

면역 바이오센서.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 분자 인식층은 세 번 이내 반복사용이 가능한 것을 특징으로 하는,

면역 바이오센서.

청구항 3

제1항에 있어서

상기 분자 인식층은 세번 반복사용 시,

450 nm의 파장에서 TMB 반응의 광학 밀도(OD) 값이 최초 면역반응 시 OD 값의 70% 이상으로 나타나는 것을 특징으로 하는

면역 바이오센서.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 분자 인식층은

Z-도메인이 자가 표지된(autodisplaying) 대장균의 외부 세포막(outer membrane)을 포함하는 것을 특징으로 하는

면역 바이오센서.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 생체 물질은 항원, 항체, 펩타이드, 단백질, 박테리아, 바이러스, 및 진균으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는

면역 바이오센서.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 면역 바이오센서는 SPR(SURFACE PLASMON RESONANCE) 바이오센서, QCM (QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE) 바이오센서, SAW(SURFACE ACOUSTIC WAVE) 바이오센서 및 FPW(FLEXURAL PLATE WAVE) 바이오센서로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는,

면역 바이오센서.

청구항 7

분자인식층을 포함하고, 상기 분자인식층은 생체 물질에 특이적으로 결합하는 배향제어된 항체가 공유결합으로 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 면역 바이오센서; 및

트윈-20(tween-20) 및 글리신 용액이 함유된 면역 바이오센서 재생용 버퍼를 포함하는 생체 물질 검출용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 면역 바이오센서 재생용 버퍼는

상기 버퍼의 총 함량을 기준으로 2%의 트윈-20(tween-20) 및 0.1M 글리신이 함유된 것을 특징으로 하는.

생체 물질 검출용 키트.

청구항 9

항체를 배향제어 하는 항체 배향제어단계;

상기 배향제어된 항체를 Disccinimidly(디숙신이미딜) 기반의 가교제 처리하여 고체 지지체 표면에 공유결합 시키는 화학적 고정단계를 포함하는,

면역 바이오센서용 분자 인식층 제조 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 항체 배향제어단계는

Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막을 고체 지지체 표면에 코팅하는 단계; 및

상기 코팅된 고체 지지체 표면에 항체를 처리하는 단계를 포함하는,

면역 바이오센서용 분자 인식층 제조 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 화학적 고정단계는

디숙신이미딜 글루타레이트(disuccinimidyl glutarate, DSG), 디숙신이미딜 수베레이트 (disuccinimidyl suberate, DSS) 및 폴리(에틸렌 글리콜)일화 비스(설포숙신이미딜)수베레이트 (poly(ethylene glycol)ylated bis(sulfosuccinimidyl)suberate, BS(PEG)₅) 중 적어도 어느 하나를 처리하는 단계를 포함하는,

면역 바이오센서용 분자 인식층 제조 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 DSG를 31 μ M의 농도로 처리하는 하는 단계를 포함하는

면역 바이오센서용 분자 인식층 제조 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 DSS를 500 μ M의 농도로 처리하는 하는 단계를 포함하는

면역 바이오센서용 분자 인식층 제조 방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 BS(PEG)₅를 125 μM의 농도로 처리하는 하는 단계를 포함하는

면역 바이오센서용 분자 인식층 제조 방법.

청구항 15

분자인식층을 포함하고, 상기 분자인식층은 생체 물질에 특이적으로 결합하는 배향제어된 항체가 공유결합으로 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 면역 바이오센서를 이용하여 면역 반응을 수행한 후,

트윈-20(tween-20) 및 0.1M 글리신이 함유된 면역 바이오센서 재생용 버퍼로 상기 면역 바이오센서를 세척하는 단계를 포함하는,

면역 바이오센서의 재생방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역 바이오센서, 이를 포함하는 면역 바이오 키트, 상기 면역 바이오 센서의 분자 인식층 제조방법 및 상기 면역 바이오센서의 재생방법에 관한 것이다. 구체적으로, 재사용이 가능한 면역 바이오센서, 이를 포함하는 면역 바이오 키트, 상기 면역 바이오 센서의 분자 인식층 제조방법 및 상기 면역 바이오센서의 재생방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역 바이오센서의 분자 인식층은 바이오센서의 주요 구성요소 중 하나로 분석대상 물질을 선택적으로 인식하고 분석대상 물질과 특이적 결합 및 항원-항체반응이 일어나는 곳이다. 일반적으로 분자 인식층은 면역 바이오센서 표면에 고정된 항체로 구성된다.

[0003] 면역 바이오센서의 감도를 향상시키기 위해서는 항체와 항원 간의 반응이 충분히 일어날 수 있도록 항체의 항원 결합 부위가 최대한으로 노출되어야 한다. 하지만, 항체를 2차원적 기질에 무작위로 고정시킬 경우, 고정화된 항체들 중에서 결합에 적합한 배향을 갖는 항체가 20% 미만으로 나타나는 것으로 알려졌다. 따라서, 항체의 항원 결합 부위가 최대한으로 노출될 수 있도록 하는 항체 고정화 기술이 요구된다.

[0004] 한편, 바이오센서는 바이오 물질들 간의 특이적이고 안정한 결합력을 신호검출의 원리로 분석한다. 그러나 이와 같이 특이적이고 안정한 결합에 기인하여 현재까지 개발된 바이오센서들은 한번 사용하면 재생이 불가능한 한계가 있어 비경제적인 문제점이 있다. 한 번의 특이적 결합반응이 유도되고 나면 사용된 바이오센서의 표면은 비가역적으로 측정 대상물에 의하여 변형되기 때문이다.

[0005] 따라서, 경제적 효과를 위한 방안으로 바이오센서를 재생할 수 있는 연구가 진행되고 있으나, 바이오 물질을 인지할 수 있는 분자 인식층 전체가 제거되는 문제점이 발생하여 분자 인식층을 새로 형성하기 위한 추가의 시간 및 비용이 소요되고 있다. 이에, 보다 경제적인 효과를 도출할 수 있는 재사용 가능한 바이오센서에 대한 기술 개발이 요구된다.

[0006] 한편, 전술한 배경기술은 반드시 본 발명의 출원 전에 일반 공중에게 공개된 공지기술이라 할 수는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2200173호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 일 실시예는 결합을 위한 항체 배향이 적합한 동시에 재사용이 가능하도록 구성된 분자 인식층을 포함하는 면역 바이오센서 및 상술한 분자 인식층의 제조방법을 제공하는 데에 목적이 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 일 실시예는 상술한 면역 바이오센서를 포함하는 생체 검출용 키트를 제공할 수 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 일 실시예는 상술한 면역 바이오센서를 재사용할 수 있는 면역 바이오센서의 재생방법을 제공하는 데에 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상술한 기술적 과제를 달성하기 위한 기술적 수단으로서, 본 발명의 면역 바이오센서는 분자 인식층을 포함하고, 상기 분자 인식층은 생체 물질에 특이적으로 결합하는 배향제어된 항체가 공유결합으로 고정되어 있는 것을 특징으로 한다.

[0012] 예컨대, 분자 인식층은 세번 이내 반복사용이 가능한 것을 특징으로 할 수 있다.

[0013] 예컨대, 분자 인식층은 세번 반복사용 시, 450 nm의 파장에서 TMB 반응의 광학 밀도(OD) 값이 최초 면역반응 시 OD 값의 70% 이상으로 나타나는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0014] 예컨대, 분자 인식층은 Z-도메인이 자가 표지된(autodisplaying) 대장균의 외부 세포막(outer membrane)을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0015] 예컨대, 생체 물질은 항원, 항체, 펩타이드, 단백질, 박테리아, 바이러스, 및 진균으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016] 예컨대, 면역 바이오센서는 SPR(SURFACE PLASMON RESONANCE) 바이오센서, QCM (QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE) 바이오센서, SAW(SURFACE ACOUSTIC WAVE) 바이오센서 및 FPW(FLEXURAL PLATE WAVE) 바이오센서로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0017] 본 발명의 생체 물질 검출용 키트는 분자 인식층을 포함하고, 상기 분자인식층은 생체 물질에 특이적으로 결합하는 배향제어된 항체가 공유결합으로 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 면역 바이오센서, 트윈-20(tween-20) 및 글리신 용액이 함유된 면역 바이오센서 재생용 버퍼를 포함한다.

[0018] 예컨대, 면역 바이오센서 재생용 버퍼는 버퍼의 총 함량을 기준으로 2%의 트윈-20(tween-20) 및 0.1M 글리신이 함유된 것을 특징으로 할 수 있다.

[0019] 본 발명의 면역 바이오센서용 분자 인식층 제조방법은 항체를 배향제어 하는 항체 배향제어단계, 배향제어된 항체를 Disuccinimidyl(디숙신이미딜) 기반의 가교제 처리하여 고체 지지체 표면에 공유결합 시키는 화학적 고정단계를 포함한다.

[0020] 예컨대, 항체 배향제어단계는 Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막을 고체 지지체 표면에 코팅하는 단계 및 코팅된 고체 지지체 표면에 항체를 처리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0021] 예컨대, 화학적 고정단계는 디숙신이미딜 글루타레이트(disuccinimidyl glutarate, DSG), 디숙신이미딜 수베레이트 (disuccinimidyl suberate, DSS) 및 폴리(에틸렌 글리콜)일화 비스(설포숙신이미딜)수베레이트 (poly(ethylene glycol)ylated bis(sulfosuccinimidyl)suberate, BS(PEG)₅) 중 적어도 어느 하나를 처리하는 단계를 포함할 수 있다.

[0022] 예컨대, 면역 바이오센서용 분자 인식층 제조 방법은 DSG를 31 μM의 농도로 처리하는 하는 단계를 포함할 수 있다.

[0023] 예컨대, 면역 바이오센서용 분자 인식층 제조 방법은 DSS를 500 μM의 농도로 처리하는 하는 단계를 포함할 수 있다.

[0024] 예컨대, 면역 바이오센서용 분자 인식층 제조 방법은 BS(PEG)₅를 125 μ M의 농도로 처리하는 하는 단계를 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 면역 바이오센서 재생방법은 분자인식층을 포함하고, 상기 분자인식층은 생체 물질에 특이적으로 결합하는 배향제어된 항체가 공유결합으로 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 면역 바이오센서를 이용하여 면역 반응을 수행한 후, 트윈-20(tween-20) 및 0.1M 글리신이 함유된 면역 바이오센서 재생용 버퍼로 상기 면역 바이오센서를 세척하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

[0026] 진술한 본 발명의 과제 해결 수단 중 어느 하나에 의하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 바이오센서는 한 번의 특이적 결합반응이 유도된 후 여러 차례 반복적으로 재사용할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 바이오센서는 반복 사용 시 분자 인식층 전체가 제거되어 재사용 때마다 분자 인식층을 새로 형성하여야 하는 문제점을 방지할 수 있다.

[0028] 본 발명에서 얻을 수 있는 효과는 이상에서 언급한 효과들로 제한되지 않으며, 언급하지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 바이오센서용 분자 인식층 제조방법을 나타낸 순서도이다.

도 2는 도 1의 항체 배향제어(S10)단계의 순서도이다.

도 3a 내지 3h는 가교제의 종류에 따른 OD값 및 1차 HRP 처리 시 면역분석 값을 참조로 사용하여 계산된 상대 OD값을 나타낸 것이다.

도 4는 각각의 가교제를 최적의 농도로 처리하였을 경우 1차 HRP 처리 시 면역분석 값을 참조로 사용하여 계산된 450 nm 파장에서의 상대 OD 값을 나타내는 도면이다.

도 5는 최적의 가교제 조건을 이용한 재생 면역 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막(OM) 및 일반 대장균을 기반으로 한 면역분석 결과를 나타낸 것으로, 재생 처리 횟수에 따른 면역분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 SPR 바이오센서용 분자 인식층에 대한 SPR 반응 신호값을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0031] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 구성을 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0032] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.

[0033] 본 발명은 재사용이 가능한 면역 바이오센서를 제공하는 특징이 있다.

[0034] 면역 바이오센서란, 바이오센서 중에서 특이적인 항원-항체 결합반응을 이용하는 분자 인식층을 포함하고 있는 바이오센서로, 시료 내의 분석 대상물을 센서 표면에 선택적으로 흡착한 후, 흡착량을 전기신호로 출력하는 모든 기기를 말한다.

[0035] 면역 바이오센서는 여러 성분이 함유된 시료 내에서 분석 대상물만을 선택적으로 인식 및 흡착하는 분자 인식층(molecular recognition layer), 인식된 흡착량을 전기신호화 하는 신호 변환기(signal transducer) 및 신호를

발생시키는 신호 발생층(signal-generating part)으로 구성된다.

- [0036] 분자 인식층은 인식 및 흡착하고자 하는 분석 대상물을 선택적으로 인지하는 항체를 센서 표면에 결합시킨 것이며, 분자 인식층에 고정된 항체는 분석 대상물을 특이적으로 흡착 또는 결합하게 되고, 이와 같이 분자 인식층에 분석 대상물이 흡착 또는 결합하면 다양한 물리적인 변화가 발생한다. 신호 변환기는 상기와 같이 분자 인식층에 결합된 항체와 분석 대상물 간의 특이적 결합에 의하여 발생한 물리적 변화를 전기 신호화시키는 장치로서, 신호화된 물리적 변화는 신호 발생층(signal-generating part)을 통해 수치화 또는 이미지화 된다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 바이오센서는 분자 인식층, 신호 변환기, 신호 발생층으로 구성될 수 있다.
- [0038] 면역 바이오센서를 이용하여 분석 대상 물질의 검출 효율을 증진시키기 위해서는, 항체가 적합한 배향을 가진 상태로 분자 인식층에 충분한 밀도로 고정되어야 한다.
- [0039] 이에, 본 발명의 분자 인식층은 Z-도메인이 자가 표지된(autodisplaying) 대장균의 외부 세포막(outer membrane)과 생체 물질에 특이적으로 결합하는 항체로 구성될 수 있다.
- [0040] 타겟 분석대상 물질인 타겟 항원과 결합하는 특이적 항체는 Y자 형태의 구조를 가지며, 항원과 결합하는 부위는 이중의 2개 말단 Fab 영역과 항원과 결합하지 않는 다른쪽 가지의 말단 Fc 영역으로 구성된다. 항체와 항원간의 반응이 충분히 일어나기 위해서는 항체의 Fab 영역이 최대한으로 노출되어야 한다. 즉, 항체의 Fab 영역이 바깥쪽의 방향으로 배향되어야 한다.
- [0041] 단백질 A(protein A)는 항체 결합 단백질로서 이뮤노글로불린(Immunoglobulin, Ig) 등의 면역 단백질과 선택적 친화성이 높은 단백질이다. 단백질 A는 스태필로코커스 아우레우스(staphylococcus aureus) 유래의 막 결합 단백질로 5개의 도메인을 가지고 있으며, 이중 B 도메인에서 유래한 Z-도메인은 항체 Fc 부분과의 결합 특이성을 갖는다.
- [0042] 단백질 A의 Z-도메인은 단백질 A가 미생물의 세포 외벽 표면에 발현 가능하면서도, 다양한 면역 단백질, 특히 IgG 등과 특이적이고 강력한 친화성을 나타내는 부위로서, 미생물로부터 발현시켜 정제하여 사용할 수도 있고, 또는 합성하여 사용할 수도 있다. 본 발명에 따른 단백질 A의 Z-도메인은 서열번호 1로 기재된 펩타이드 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 서열번호 2의 염기서열(폴리뉴클레오타이드)에 의해 코딩되는 것일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막은 표면발현기술을 이용하여 Z-도메인을 대장균의 외막에 발현한 것이다.
- [0044] 자가 표지(Autodisplay)는 일종의 표면발현기술 중 하나로, 그람 음성 박테리아의 외막(outermembrane)에 타겟 단백질을 AIDA-I(adhesin involved in diffuse adherence)과 같은 자동트랜스퍼(autotransporter)에 융합하여 발현시킨다. 이때 타겟 단백질의 N-말단은 신호 펩타이드와 연결되고, C-말단은 링커, β 과 연결되어 발현된다. 신호 펩타이드는 발현된 단백질이 내막(inner membrane)을 통과하여 페리플라즘(periplasm)으로 이동할 수 있게 한다. 이렇게 발현된 타겟 단백질은 별도의 인위적인 처리 박테리아의 외부 세포막(outermembrane)에 β -barrel을 통해 C-말단이 고정된 타입 Va 분비 기작(secretion mechanism)을 통해 정착하게 된다.
- [0045] IgG 결합능을 가지는 Z-도메인이 자가 표지를 통하여 대장균 외부 세포막에 발현되면, Z-도메인의 방향은 항상 같은 구조를 이루기에, 여기에 항체(capture antibody)를 처리하게 되면 항체의 Fc부분이 대장균의 외부 세포막 쪽으로 배향되어 항원 결합부위를 노출시킬 수 있게 되므로, 궁극적으로 항체의 배향 조절을 통해 바이오센서의 감도를 향상시킬 수 있다.
- [0046] 즉, 본 발명의 분자 인식층은 Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막에 배향제어 된 항체가 결합된 상태로 구성될 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명의 분자 인식층은 Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막과 배향제어 된 항체가 공유결합을 이룬 상태로 고정될 수 있다. 구체적으로, 디숙신이미딜(Dicccinimidly) 기반의 가교제에 의해 공유결합을 이룬 상태로 화학적 고정될 수 있다. 이에 대한 자세한 내용은 후술하도록 한다.
- [0048] 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 바이오센서의 상술한 분자 인식층 외에 신호 변환기 및 신호 발생층은 종래 면역 바이오센서의 구조 및 제조방법이 동일할 수 있다.
- [0049] 한편, 본 발명의 면역 바이오센서는 항원-항체의 면역 반응을 이용하여 분석대상물질을 검출할 수 있는 것으로, SPR(SURFACE PLASMON RESONANCE) 바이오센서, QCM(QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE) 바이오센서, SAW(SURFACE ACOUSTIC WAVE) 바이오센서 또는 FPW(FLEXURAL PLATE WAVE) 바이오센서일 수 있고, 바람직하게는 SPR(SURFACE

PLASMON RESONANCE) 바이오센서일 수 있다.

- [0050] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 바이오센서용 분자 인식층 제조방법을 나타낸 순서도이다.
- [0051] 도 1을 참조하면, 본 발명의 분자 인식층 제조방법은 항체를 배향제어 하는 항체 배향제어(S10) 단계, 배향제어된 항체를 Disccinimidy 기반의 가교제 처리하여 고체 지지체 표면에 공유결합 시키는 화학적 고정(S20) 단계를 포함한다.
- [0052] 항체 배향제어(S10)단계는 항체의 항원이 결합하는 Fab 부분이 노출될 수 있도록 항체의 배향을 제어하는 단계일 수 있다.
- [0053] 도 2는 도1의 항체 배향제어(S10)단계의 순서도이다.
- [0054] 도 2를 참조하면, 항체 배향제어(S10)단계는 Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막을 고체 지지체 표면에 코팅(S11)하는 단계 및 코팅된 고체 지지체 표면에 항체를 처리(S12)하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0055] Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막을 고체 지지체 표면에 코팅(S11)하는 단계는 항체의 Fc 부분이 대장균의 외부 세포막 쪽으로 배향되도록 하기 위한 단계일 수 있다.
- [0056] Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막을 고체 지지체 표면에 코팅(S11)하는 단계는 단백질 A의 Z 도메인 코딩 유전자를 발현 벡터에 클로닝하고, 발현 벡터 미생물로서 대장균을 선택하여 형질전환시킨 뒤, 형질전환된 대장균을 배양하여 대장균의 외부 세포막에 단백질 A의 Z 도메인이 발현된 대장균을 제조한 후, 대장균으로부터 Z 도메인이 자가 표지된 외부 세포막을 분리한 다음, 이를 고체 지지체 표면 상에 코팅하는 방식으로 수행될 수 있다.
- [0057] 코팅된 고체 지지체 표면에 항체를 처리(S12)하는 단계는 생체 물질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 고체 지지체 표면에 결합시키기 위한 단계일 수 있다.
- [0058] 항체를 처리하면, 항체의 Fc 부분은 Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막 쪽으로 배향되어 결합될 수 있다. 이때, Z-도메인과 항체는 수소결합을 통해 2차 결합으로 결합될 수 있다.
- [0059] 항체의 배향제어가 완료되면, 배향제어된 항체를 Disccinimidy 기반의 가교제로 처리하여 화학적 고정(S20)할 수 있다.
- [0060] 화학적 고정(S20)단계는 Z-도메인과 항체 사이에 공유결합을 형성시키기 위한 단계일 수 있다.
- [0061] 공유결합은 2차 결합보다 강한 결합력을 형성하므로, 화학적 가교에 의한 공유 고정화는 Z-도메인과 항체 사이에 보다 강한 결합을 제공할 수 있다. 하지만, 가교제 처리 시, 가교제가 항체의 항원과 결합하는 부위에 결합하면 항원 결합 친화도가 감소할 수 있다. 따라서, 항원 결합 친화도를 감소시키지 않으며 강한 결합을 제공하도록 하는 화학적 가교제를 사용하여야 한다.
- [0062] 이에, 본 발명의 화학적 고정(S20)단계는 Disccinimidy 기반의 가교제를 처리하는 방식으로 수행될 수 있다.
- [0063] Disccinimidy 기반의 가교제로는 디숙신이미딜 글루타레이트 (disuccinimidyl glutarate, DSG), 디숙신이미딜 수베레이트(disuccinimidyl suberate, DSS) 및 폴리(에틸렌 글리콜)일화 비스(설포숙신이미딜)수베레이트 (poly(ethylene glycol)ylated bis(sulfosuccinimidyl)suberate, BS(PEG)₅)가 사용될 수 있다.
- [0064] Disccinimidy 기반의 가교제는 항체의 항원과 결합하는 부위에 결합하지 않아, 항체의 항원 결합 활성에 영향을 미치지 않을 수 있다. 구체적으로, 항체가 항원을 감지 및 포착하는 활성이 유지될 수 있다.
- [0065] 또한, Disccinimidy 기반의 가교제는 항체의 방향제어를 유지시킬 수 있다.
- [0066] 나아가, Disccinimidy 기반의 가교제는 Z-도메인과 항체 사이에 공유결합을 형성시키므로, 면역 바이오센서 재사용 시, 분자 인식층을 재생 버퍼로 처리하더라도, Z-도메인과 항체 사이의 결합력이 유지될 수 있다. 구체적으로, 반복 사용 시 Z-도메인과 항체 사이의 결합력 감소에 의해 항체가 이탈하여 재사용 때마다 분자 인식층을 재형성해야 하는 문제를 방지할 수 있다.
- [0067] 이때, 가교제의 종류에 따라 적절한 농도로 가교제를 처리하여야 한다. 예를 들어, DSG 가교제를 사용할 경우에는, 31 μ M의 농도로 처리하고, DSS 가교제를 사용할 경우에는 500 μ M의 농도로 처리, BS(PEG)₅ 가교제를 사용할 경우에는 125 μ M의 농도로 처리하는 것이 적절할 수 있다.

- [0068] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 생체 물질 검출용 키트는 재사용 가능한 면역 바이오센서 및 면역 바이오센서 재생용 버퍼로 구성될 수 있다.
- [0069] 본 발명의 면역 바이오센서는 생체 물질에 특이적으로 결합하는 배향제어된 항체가 공유결합으로 고정되어 있는 분자 인식층을 포함한다. 본 발명은 상술한 분자 인식층을 포함하므로, 반복 사용이 가능하다.
- [0070] 본 발명의 면역 바이오센서 재생용 버퍼는 트윈-20(tween-20) 및 글리신 용액이 함유된다. 면역 바이오 센서 재생용 버퍼 총 함량 기준 트윈-20은 2%(w/w)의 농도로 함유될 수 있으며, 글리신은 0.1M 농도로 함유될 수 있다. 이때, 글리신은 pH가 2.5로 유지될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 면역 바이오센서 재생용 버퍼는 상술한 농도의 유효성분을 함유하도록 구성되므로, 재사용 시, 면역 바이오센서에 코팅되어 있는 Z-도메인 및 이에 결합되어 있는 항체의 구조가 심하게 변형되는 것을 방지할 수 있다.
- [0072] 한편, 여기서 검출하고자 하는 생체 물질은 통상적으로 면역 바이오센서를 이용하여 검출할 수 있는 모든 물질을 의미하며, 이에 제한되지는 않으나, 항원, 항체, 펩타이드, 단백질, 박테리아, 바이러스, 진균류 등 일 수 있다.
- [0073] 또한, 본 발명의 생체 검출용 키트에 적용 가능한 시료는 생물체로부터 분리되거나 환경 중에서 얻어진 모든 시료일 수 있으며, 예컨대, 혈액, 체액, 세포, 조직 등의 생체 시료 또는 음용수, 토양 등도 포함될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 바이오센서 재생방법은 생체 물질에 특이적으로 결합하는 배향제어된 항체가 공유결합으로 고정되어 있는 분자 인식층을 포함하는 면역 바이오센서를 이용하여 면역 반응을 수행한 후, 트윈-20(tween-20) 및 0.1M 글리신이 함유된 면역 바이오센서 재생용 버퍼로 상기 면역 바이오센서를 세척하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 면역 바이오센서는 생체 물질에 특이적으로 결합하는 배향제어된 항체가 공유결합으로 고정되어 있는 분자 인식층을 포함하므로, 항체의 항원과 결합하는 부위를 보다 많이 노출시킬 수 있고, 이에 민감도가 향상될 수 있다.
- [0076] 또한, 본 발명의 면역 바이오센서는 배향제어된 항체가 화학적으로 고정되므로, 한번의 특이적 결합반응이 유도된 후에도 반복 사용이 가능할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 면역 바이오센서용 분자 인식층 제조방법은 항체를 배향제어하는 단계를 포함하므로, 항체의 항원과 결합하는 부위를 보다 많이 노출시킬 수 있다.
- [0078] 또한, 본 발명의 면역 바이오센서용 분자 인식층 제조방법은 배향제어된 항체를 Discinimidy 기반의 가교제 처리하여 고체 지지체 표면에 공유결합 시키는 화학적 고정단계를 포함하므로, 배향제어된 항체를 보다 단단하게 결합시킬 수 있으며, 반복 사용 시 항원과의 결합 친화도가 감소하는 것을 방지할 수 있다.
- [0079] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0080] <준비예>

[0081] 시약준비

[0082] 하기 본 발명의 실험에서 사용된 시약은 다음과 같다. GA, DSS, DSG, BS(PEG)₅, HRP(Materials Horseradish peroxidase), CRP(C-reactive protein), 인간 IgG (hIgG), 트윈-20, 트리톤 X-100, 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드(IPTG), 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 글리신 및 염산은 머크사(Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. 토끼 폴리클로날 항-HRP 항체, 토끼 폴리클로날 항-CRP 항체, 플루오레세인 이소티오시아네이트가 결합된 염소 폴리클로날 항-CRP(anti-CRP(FITC)) 항체 및 플루오레세인 이소티오시아네이트가 표지된 염소 폴리클로날 항-인간(anti-human(FITC)) 항체는 Abcam사 (Cambridge, UK)로부터 구입하여 사용하였다. LPS 용액(대전, 한국)에서 인산 완충 식염수(PBS)를 취하여 항체 용해 버퍼로 사용하였고, 96 웰 마이크로 플레이트는 SPL Life Science(포천, 한국)사로부터 구입하여 사용하였다. 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 기질 키트는 Thermo Fisher Scientific 사(Waltham, US)에서 입수하여 사용하였다.

[0083] <실험방법>

[0084] ① Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 배양 및 외부 세포막의 분리

[0085] S. aureus에서 단백질 A의 B-도메인으로부터 PCR로 증폭하여 제작한 펩타이드인 Z-도메인을 클로닝하여 Z-도메인이 자가 표지된 벡터인 pET-Z-18-3을 제조하였다. Z-도메인이 자가 표지된 pET-Z-18-3 플라스미드를 대장균 (BL21(DE3))으로 일렉트로포레이션 방법을 통해 형질감염시켰다. 형질감염된 대장균은 37℃에서 암피실린이 함유된 LB(Luria-Bertani) 배지로 12시간 이상 배양하였고, 이후 100배 희석한 신선한 LB 배지를 이용하여 세척하였다. 형질감염된 대장균의 배양은 600nm의 파장에서 OD가 0.7이 될 때까지 교반하면서 배양하였다. 자가 표지된 Z-도메인의 발현유도(induction)을 위해, 1 mM IPTG를 상기 대장균에 첨가하고 30℃에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 세포를 수집하고 PBS로 세척하였다. Z-도메인이 발현된 대장균으로부터 외부 세포막을 분리하기 위해, 먼저 대장균의 세포벽인 단단한 펩티도글리칸 층을 200 µg/mL의 리소자임(lysozyme)을 처리하여 가수분해시켜 스페로플라스트(spheroplast) 형태가 되도록 하였다. 또한, 리소자임의 페리플라즘(periplasm)으로의 침투를 돕기 위해 20 mM sucrose 및 0.2 mM EDTA를 처리하여 삼투작용이 증가하도록 하였고, 세포막 표면의 전하를 조절하였다. 페로플라스트(spheroplast 형성 후) 대장균의 외부 세포막 50 mM Tris-HCl pH 8.0에서 10 mM MgCl₂를 포함한 2 % Triton X-100 용액을 첨가하여 리포솜으로 분리하였고, 분리된 외부 세포막 입자들은 20,000 rpm으로 연속적인 원심분리를 수행하여 최종적으로 외부 세포막을 분리하였으며 PBS 버퍼로 용해시켰다.

[0086] ② 대장균 세포 및 그 외부 세포막을 기반으로 한 재생 분석(Regenerative assays)

[0087] 대장균 세포 기반의 재생 가능성 여부의 분석을 위해, Z-도메인이 자가 표지된 대장균 세포를 OD 600의 값이 1.0이 되도록 PBS로 현탁시켰다. 이후 1.0 µg/mL 농도의 항-HRP 항체가 함유된 PBS 용액에 Z-도메인이 자가 표지된 대장균 세포 100 µL를 첨가하여 1시간 동안 반응시키고 PBS로 대장균 세포를 3회 세척하였다. 이후, 항체의 공유 고정화를 위해 100 µL의 가교제를 첨가하였다. 그 다음, 10-ng/mL HRP를 첨가하고 1시간 동안 반응시키고, 다시 세척한 후 pH 2.5에서 2%의 트윈-20 및 0.1M 글리신이 함유된 재생 버퍼 100 µL를 첨가하여, 대장균 세포에 고정된 항체로부터 분석물만을 용리시켰다. 재생반응 후, 대장균 세포를 3회 세척한 다음, 100 µL의 PBS로 현탁시켰다. 공유 고정화된 항체를 가진 재생된 대장균 세포는 다시 HRP 면역 분석을 위한 새로운 고체 지지체로 사용하였다. 결합된 HRP의 정량분석을 위해 발색반응용 TMB 용액을 사용하였다. 100 µL의 TMB 용액을 대장균 세포에 30분 동안 처리하고 2M의 황산용액으로 반응을 중지시켰다. 이후, 마이크로 플레이트 판독기(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 450 nm의 파장에서 OD 값을 측정하였다.

[0088] 또한, 대장균의 외부 세포막(OM; outer cell membrane)을 기반으로 한 재생분석은 다음과 같은 방법을 통해 수행하였다.

[0089] 상기 방법으로 분리한 외부 세포막 300 µg/mL를 96 웰 마이크로플레이트에 분주하고 2시간 동안 배양하여 마이크로플레이트 표면 상에 외부 세포막이 형성되도록 하였다. 이후 외부 세포막 층이 마이크로플레이트 표면 상에 형성되면 PBS로 3회 세척하고 1.0 µg/mL 농도의 항-HRP 항체를 1시간 동안 반응시켰다. 이후 상기 마이크로플레이트를 세척하고, 고정화를 위해 가교제를 처리하였다. 면역 복합체 형성 후, 재생 버퍼를 첨가하여 2분 동안 반응시키고, 용출된 항체와 항원을 바로 세척하였다. 공유 고정화된 항체를 가진 재생된 OM 층은 면역 바이오센서의 새로운 고체 지지체로 사용되었다. 결합된 HRP의 정량분석을 위해 TMB 용액을 처리하고, 황산 용액으로 반응을 중지시킨 후 450 nm 파장에서 OD 값을 측정하였다. 여기서, 모든 검사는 세 번 반복되었다.

[0090] ③ 표면 플라즈몬 공명분석 (SPR; surface plasmon resonance 분석)

[0091] SPR 분석을 위해 ICLUEBIO 기업(한국 성남시)의 시판되는 SPR 바이오센서 시스템을 사용하였다. 또한, OM 기반의 재생 바이오센싱 분석을 위해 베어 골드 칩(bare gold chip)을 사용하였다. 골드 칩 표면에 면역친화성 층이 형성되도록 300 µg/mL 농도의 분리한 OM 용액을 2시간동안 처리하였다. 나머지 OM 분리 입자는 PBS로 세척하였다. OM 층이 형성되면 1 µg/mL의 항-CRP 항체를 처리하여 상기 OM 층의 자동 표지된 Z-도메인과 결합되도록 하였다. 세척 후, 항체의 공유 고정화를 위해 가교제를 처리하였다. 그런 뒤, CRP 샘플을 30분 동안 처리하였다. 자동 표시된 Z 도메인이 있는 OM 면역 친화성 층의 재생을 위해, 재생용 버퍼는 2분 동안 처리되었다. 재생 단계에 따라 SPR 바이오센서의 골드 칩에 재생된 OM 층을 사용하여 CRP 바이오센싱을 4회 반복했다. CRP 처리 전 SPR 신호로부터 CRP 처리 후의 SPR 신호 값을 차감하여 CRP를 정량화 하였고, 재생물은 OM 층 형성 후 SPR 신호와 재생 후 SPR 신호를 비교하여 계산하였다.

[0092] <실시예 1>

[0093] 최적의 화학적 고정화 조건 규명

[0094] <1-1> 최적의 가교제 종류 확립

- [0095] 본 출원의 발명자들은 항원 결합 활성의 감소 없이 항체의 화학적 고정화를 위한 효과적인 가교제를 찾기 위해 다양한 스페이서 암, 디숙신이미딜 글루타레이트(DSG), 디숙신이미딜 수베레이트(DSS) 및 폴리(에틸렌 글리콜) 일화 비스(에틸렌 글리콜)일화 비스(설포숙신이미딜)수베레이트(BS(PEG)₅)를 테스트했다. 이때, 비교를 위해 단백질 고정에 가장 많이 사용되는 가교제인 글루타르알데히드(GA)도 함께 사용하여 테스트했다.
- [0096] 또한, Fc 영역 결합 활성을 갖는 Z-도메인은 E. coli의 OM에 자동 표시되었고 E. coli 세포는 면역분석의 고체 지지체로 사용되었다.
- [0097] 최적의 가교제 종류를 확립하기 위한 실험은 다음과 같이 수행되었다. 자세한 처리조건은 실험방법 ② 에 개시하였다.
- [0098] 1) 포획항체를 방향제어하고, GA, DSG, DSS, BS(PEG)₅를 처리하여 화학적 고정화 진행하였다.
- [0099] 2) 세척 후, 10ng/mL의 HRP를 첨가하여 반응시키고, 450 nm의 파장에서 TMB 반응의 광학 밀도(OD)를 측정하였다.
- [0100] 3) 이후, 재생용 버퍼를 처리하여 재생을 수행하였다.
- [0101] 4) 재생 후 2)에서와 동일한 농도의 HRP를 처리하고 결합된 HRP를 TMB 반응으로 정량하였다.
- [0102] 도 3a 내지 3h는 가교제의 종류에 따른 OD값 및 첫 번째 HRP 처리를 참조로 사용하여 계산된 상대 OD값을 나타낸 것이다.
- [0103] 도 3a를 참조하면, GA를 각기 다른 농도로 처리하였을 경우, 1차 HRP 처리 시 OD값(1st HRP)은 전체적으로 균일한 OD 값을 나타낸다. 이는 고정화된 포획 항체에 대한 GA 처리가 항체의 항원 결합 활성에 영향을 미치지 않았음을 의미한다.
- [0104] 도 3a의 재생 단계 시 OD 값(Regeneration) 및 HRP 2차 처리 시 OD값(2nd HRP)을 1차 HRP 처리 OD 값에 대한 상대값은 도 3b와 같이 계산되었다.
- [0105] 도 3b를 참조하면, 모든 재생 단계 상대 OD 값(■)은 25%에도 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이는 포획 항체로부터 분석물이 효과적으로 용출되었음을 알 수 있다.
- [0106] 재생된 대장균 세포에 HRP 2차 처리 시 상대 OD 값(●)은 125 μM 이하의 농도에서 재생 단계 상대 OD 값(■)과 거의 유사하게 나타났다. 250 μM 이상의 농도에서는 상대 OD 값(●)이 증가하였으나, 500 μM에서 53%의 상대 OD 값(●)을 보인 후 감소했다. 이는 GA 처리 시, 항HRP 항체가 화학적으로 고정화되지 않아 재생 버퍼에 의해 항원과 함께 용출되었음을 의미한다. 이러한 결과를 통해 GA 처리는 Z-도메인 결합 항체를 화학적 결합으로 고정하는 데 적합하지 않음을 알 수 있다.
- [0107] 도 3c를 참조하면, DSG를 각기 다른 농도로 처리하였을 경우, 1차 HRP 처리 시 OD값(1st HRP)은 0.66과 0.85 사이에서 전체적으로 균일한 OD 값을 나타낸다. 이를 통해, DSG 처리가 항체의 항원 결합 활성에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.
- [0108] 도 3c의 재생 단계 시 OD 값(Regeneration) 및 2차 HRP 처리 시 OD값(2nd HRP)을 1차 HRP 처리 OD 값에 대한 상대값은 도 3d와 같이 계산되었다.
- [0109] 도 3d를 참조하면, 모든 재생 단계 상대 OD 값(■)은 30%에도 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이는 포획 항체로부터 분석물이 효과적으로 용출되었음을 알 수 있다.
- [0110] 2차 HRP 처리 시 상대 OD값(●)은 GA 처리 때보다 71%(125 μM)~89%(31 μM) 사이의 상대적으로 높은 상대 OD 값(●)을 나타냈다. 이는 DSG 처리가 GA 처리보다 더 효과적으로 항-HRP 항체를 화학적으로 고정하기 때문에 고정된 포획 항체가 재생 완충액에 의해 모두 용출되지 않았음을 의미한다.
- [0111] 도 3e를 참조하면, DSS를 각기 다른 농도로 처리하였을 경우, 1차 HRP 처리 시 OD값(1st HRP)은 0.53에서 0.58 사이의 전체적으로 균일한 OD 값을 보여주었다. 이를 통해, DSS 처리가 항체의 항원 결합 활성에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

- [0112] 도 3e의 재생 단계 시 OD 값(Regeneration) 및 HRP 2차 처리 시 OD값(2nd HRP)을 1차 HRP 처리 OD 값에 대한 상대값은 도 3f와 같이 계산되었다.
- [0113] 도 3f를 참조하면, 모든 재생 단계 상대 OD 값(■)은 50%에도 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이는 포획 항체로부터 분석물이 효과적으로 용출되었음을 알 수 있다.
- [0114] 재생된 대장균 세포에 HRP 2차 처리 시 상대 OD 값(●)은 GA 처리 때보다 93%(1mM)에서 120%(250 μM)의 더 높은 상대 OD 값(●)을 나타냈다. 이는 DSS 처리가 GA 처리보다 더 효과적으로 항-HRP 항체를 화학적으로 고정하기 때문에 고정된 포획 항체가 재생 완충액에 의해 모두 용출되지 않았음을 의미한다.
- [0115] 도 3g를 참조하면, BS(PEG)₅를 각기 다른 농도로 처리하였을 경우, 다른 가교제와 마찬가지로, 1차 HRP 처리 시 OD값(1st HRP)은 0.84와 0.98 사이에서 전체적으로 균일한 OD 값을 나타낸다. 이를 통해, BS(PEG)₅ 처리가 항체의 항원 결합 활성화에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.
- [0116] 도 3g의 재생 단계 시 OD 값(Regeneration) 및 HRP 2차 처리 시 OD값(2nd HRP)을 1차 HRP 처리 OD 값에 대한 상대값은 도 3h와 같이 계산되었다.
- [0117] 도 3h를 참조하면, 모든 재생 단계 상대 OD 값(■)은 25%에도 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이는 포획 항체로부터 분석물이 효과적으로 용출되었음을 알 수 있다.
- [0118] 재생된 대장균 세포에 HRP 2차 처리 시 상대 OD 값(●)은 GA처리 때보다 45%(16 μM)에서 70%(1mM) 사이의 더 높은 상대 OD 값(●)을 나타냈다. 이는 DSS 처리가 BS(PEG)₅ 처리보다 더 효과적으로 항-HRP 항체를 화학적으로 고정하기 때문에 고정된 포획 항체가 재생 완충액에 의해 모두 용출되지 않았음을 의미한다.
- [0119] **<1-2> 최적의 가교제 농도 확립**
- [0120] 상기 시험 및 도 3a 내지 3h를 참조하면, GA, DSG, DSS 및 BS(PEG)₅의 최적 농도는 각각 500, 31, 500 및 125 μM으로 나타난다. 이에, 본 출원의 발명자들은 각각의 가교제의 최적의 농도를 확립하기 위해 GA, DSG, DSS 및 BS(PEG)₅의 농도를 각각 500, 31, 500 및 125 μM로 첨가한 뒤, HRP 면역분석을 수행하였다. 이때, HRP 면역분석은 두 번의 재생 단계로 세 번 반복되었다.
- [0121] 도 4는 각각의 가교제를 최적의 농도로 처리하였을 경우, 1차 HRP 처리 시의 OD 값을 참조로 사용하여 계산된 450nm 파장에서의 상대 OD 값을 나타내는 도면이다.
- [0122] 도 4를 참조하면, 가교제의 종류에 관계없이 모든 재생 단계의 상대 OD 값(1st Regeneration, 2nd Regeneration)은 40% 미만의 값으로 나타났다. 이는 재생 버퍼에 의해 항체 결합 분석물이 효과적으로 용출되었음을 알 수 있다.
- [0123] GA 처리 시, 2차 HRP 단계의 상대 OD 값(2nd HRP) 및 3차 HRP 단계의 상대 OD 값(3rd HRP)은 각각 62% 및 56%로 재생 횟수가 증가함에 따라 상대 OD 값이 감소하는 것으로 나타났다.
- [0124] DSG 처리 시, 2차 HRP 단계의 상대 OD 값(2nd HRP) 및 3차 HRP 단계의 상대 OD 값(3rd HRP)은 각각 83% 및 87%로 유사한 값으로 나타났다.
- [0125] DSS 처리 시, 2차 HRP 단계의 상대 OD 값(2nd HRP) 및 3차 HRP 단계의 상대 OD 값(3rd HRP)은 각각 101% 및 100%로 유사한 값으로 나타났다.
- [0126] BS(PEG)₅ 처리 시, 2차 HRP 단계의 상대 OD 값(2nd HRP) 및 3차 HRP 단계의 상대 OD 값(3rd HRP)은 각각 79% 및 81%로 유사한 값으로 나타났다.
- [0127] 이를 통해, 디숙신이미딜 기반 가교제를 처리할 경우 2차 HRP 단계의 상대 OD 값(2nd HRP) 및 3차 HRP 단계의 상대 OD 값(3rd HRP)이 유사하게 나타남을 확인하였다. 이는 디숙신이미딜 기반 가교제가 항체의 항원 결합 활성화에 영향을 미치지 않고, 공유 결합에 의해 포획 항체를 효과적으로 고정시킴을 의미한다.

[0128] 특히, DSS를 500 μ M 농도로 처리할 경우에 2차 HRP 단계의 상대 OD 값(2nd HRP) 및 3차 HRP 단계의 상대 OD 값(3rd HRP)이 1차 HRP 단계 때와 거의 비슷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 2차, 3차 면역반응 시, 1차 면역반응 때와 거의 동일한 수준으로 항원 항체 반응이 일어나는 것을 의미할 수 있다. 즉, DSS를 500 μ M 농도로 처리하는 것이 항체의 항원 결합 활성에 영향을 미치지 않고, 공유 결합에 의해 포획 항체를 가장 효과적으로 고정시킴을 알 수 있다.

[0129] **<1-3> 최적의 가교제 조건을 이용한 재생 면역 분석**

[0130] 최적 조건으로 공유 고정화되고 방향제어 된 항체를 사용하여 재사용 면역분석을 수행하였다. 실험은 다음과 같은 순서로 진행되었다.

[0131] 1) 항-HRP 항체가 Z-도메인에 결합한 후, 최적 조건의 가교제, 500 μ M의 DSS를 화학적 고정을 위해 처리하였다.

[0132] 2) 20ng/mL의 HRP를 처리하고 퍼옥사이드 존재 하에 TMB와 반응시켜 정량화 하였다.

[0133] 3) HRP 면역분석 후 재생을 위해 pH 2.5에서 100mM 글리신 완충액에서 2% 트윈-20을 처리하여 분석물을 용리하였다.

[0134] 4) HRP 면역분석을 세번의 재생 단계로 네번 반복하였다.

[0135] 도 5는 최적의 가교제 조건을 이용한 재생 면역 분석결과를 나타낸 그래프이다.

[0136] 또한, 도 5를 참조하면, 1차, 2차, 3차 및 4차 HRP 면역 측정 시 OD 값(HRP treatment)은 각각 0.52, 0.52, 0.50 및 0.22으로 나타났다. 1차 HRP 면역분석 값과 비교하여, 2차 및 3차 HRP 면역분석 값은 100%에 상당히 근접하였다. 이에 반해, 4차 HRP 면역분석 값은 1차 HRP 면역분석 값에 비해 43% 감소하였다. 이때, 4차와 1차 HRP 면역분석 사이의 Student's t-test의 p value 값은 0.0001 미만이었다. 0.05 보다 작은 이 p value 값은 4차 HRP 면역분석이 이전 면역분석과 통계적으로 유의한 차이가 있음을 나타낸다. 즉, 3차 HRP 면역분석까지는 면역분석 값이 1차 HRP 면역분석 값과 거의 유사할 수 있으나, 4차 면역분석부터는 통계적으로 유의미하게 다른 결과 값이 나올 수 있는 우려가 있음을 알 수 있었다.

[0137] 한편, 재생 단계의 OD 값(Regeneration)은 1차부터 3차까지 순서대로 0.06, 0.05, 0.03이었다. 1차 HRP 면역 측정의 OD 값과 비교하여 1차 내지 3차 재생 단계의 OD 값(Regeneration)은 각각 12, 9, 5%였으며 각 재생 단계와 1차 HRP 면역 측정 사이의 모든 p value 값은 0.0001 미만이었다.

[0138] 이러한 데이터를 통해 방향 제어가 있는 자동 표시 Z-도메인 결합 항체에 대한 DSS 처리는 공유 결합을 통해 효과적으로 고정될 수 있으며 공유 고정 및 방향 제어 캡처 항체가 있는 대장균 세포는 고체 지지체로서 재생 면역분석에 적합한 것을 확인하였다.

[0139] 한편, 대장균 세포 기반의 면역분석에서 분석 횟수와 재생처리의 횟수가 증가할수록 OD 450값이 감소하는 것으로 나타났는데, 이는 버퍼 교체와 세척을 위한 원심분리 과정에서 야기되는 세포의 손실에서 발생하는 문제점인 것으로 사료된다. 따라서 계속적인 면역분석과 재생처리의 반복은 고형의 지지체인 대장균 세포의 손실을 일으키고 이는 전반적인 OD 450값의 감소를 일으키게 된다.

[0140] **<실시예 2>**

[0141] **Z-domain이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막 및 일반 대장균의 외부 세포막 기반의 면역분석**

[0142] 본 출원의 발명자들은 Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막과 항체를 배향제어하고 화학적으로 고정할 경우와 일반 대장균 세포에 항체를 배향제어하고 화학적으로 고정할 경우의 면역 분석을 수행하였다.

[0143] 본 실험은 다음과 같은 순서로 수행되었다.

[0144] 1) 대장균의 외부 세포막 코팅 후, 포획 항체 및 DSS의 순차적 처리에 의해 공유 고정화되고 방향 제어된 분자 인식층을 형성하였다.

[0145] 2) 20ng/mL의 HRP를 처리하고 TMB 처리로 정량하였다.

[0146] 3) 면역검정은 네번의 재생 단계로 다섯번 반복하였다.

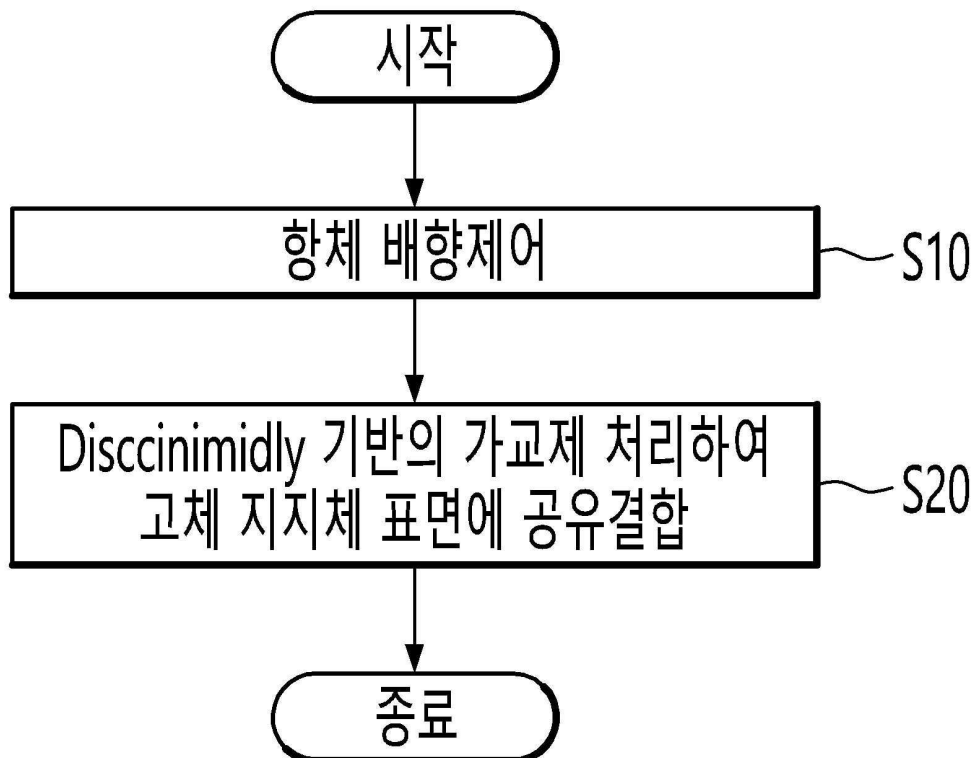
[0147] 도 6의 (a)는 Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막(OM)을 기반으로 한 면역분석 결과를 나타낸 것으로, 재생 처리 횟수에 따른 면역분석 결과를 나타낸 그래프이다.

- [0148] 도 6의 (a)를 참조하면, 1차 내지 5차 HRP 면역분석 시, OD 값(HRP treatment)은 각각 0.38, 0.35, 0.36, 0.35, 0.35으로 나타났다. 1차 HRP 면역 분석값과 비교하여 2차 내지 5차 면역 분석까지의 상대 OD 값은 각각 93, 96, 93 및 93%으로 나타났다.
- [0149] 이를 통해, 모든 HRP 면역검정이 안정적인 신호를 보였고 재생 면역검정이 5차 HRP 처리까지 편차 10% 미만으로 검증되었음을 확인할 수 있었다.
- [0150] 재생 단계의 OD 값은 모두 0.01 미만이었으며, 1차 HRP 면역 분석과 비교하여 재생 단계의 상대 OD 값과 p-값은 각각 2% 및 0.001 미만이었다. 이러한 결과는 신호가 재생 단계 후 2% 미만으로 통계적으로 유의하게 감소되었음을 나타낸다.
- [0151] 도 6의 (b)는 일반 대장균의 외부 세포막을 기반으로 한 면역분석 결과를 나타낸 것으로, 재생 처리 횟수에 따른 면역분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0152] 도 6의 (b)를 참조하면, 모든 HRP 면역 측정 및 재생 단계의 OD 값과 p-값은 각각 0.01 및 0.001 미만이었다.
- [0153] 이러한 결과를 통해 DSS의 처리가 방향 제어 포획 항체와 Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막은 공유 결합을 형성하고, 이에 두 물질 간 결합력이 향상되어 효과적으로 고정되어 분자 인식층으로서 재생 면역분석에 적합함을 확인하였다. 또한, 가교제와 재생 완충제를 모두 처리하여도 포획 항체의 분석물 결합 활성을 유지함을 확인하였다.
- [0154] <실시예 3>
- [0155] **본 발명의 분자 인식층SPR 바이오센서 적용 및 이의 재생능 분석**
- [0156] 상기 실시예에서 분리한 Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막과 항체를 화학적 고정된 분자 인식층을 제조하였고, 이를 SPR 바이오센서에 적용한 뒤, 재생능을 분석하였다.
- [0157] 분자 인식층은 본 발명의 면역 바이오센서용 분자 인식층 제조방법과 동일하게 제조되었으며, 재생 버퍼로는 2% tween-20 이 포함된 0.1 M 글리신 용액(pH 2.5)을 사용한 사용하였다.
- [0158] 분석대상 물질로는 급성 염증성 CRP를 선택하여 사용하였다. CRP는 골관절염, 류마티스성 관절염, 감염, 혈관염, 종양과 같은 염증성 질환 진단을 위한 바이오 마커로 널리 사용되고 있다.
- [0159] 먼저, SPR 바이오센서의 표면 상에 대장균의 외부 세포막(OM)을 코팅처리한 후, 항-CRP 항체를 1시간 동안 첨가하여 반응시켰다. 이후, DSS를 첨가하여 화학적 고정시키고, 농도 100ng/mL의 CRP를 첨가하여 반응시켰다. 반응 후, CRP를 측정한 다음, SPR 바이오센서는 재생 버퍼인 2% tween-20 이 포함된 0.1 M 글리신 용액(pH 2.5)로 세척하여 재생처리 하였다. 재생처리 후, CRP에 대한 분석을 수행하였고, 이러한 재생 단계를 5회 반복하였으며, CRP 바이오 센싱 분석은 5 회 반복 수행하였다. 이때 자동 표지된 Z-도메인이 없는 외부 세포막 층으로 코팅된 SPR 바이오센서를 대조군으로 사용하였다. SPR 반응은 재생 처리 중에 계속적으로 모니터링 하였다.
- [0160] 도 7은 SPR 바이오센서용 분자 인식층에 대한 SPR 반응 신호값을 확인한 것으로, 도 7의 (a)는 Z-도메인이 자가 표지된 대장균의 외부 세포막(OM)을 이용한 실험군의 결과를 나타낸 것이고, 도 7의 (b)는 Z-도메인이 표지되지 않은 일반 대장균의 외부 세포막(OM)을 이용한 대조군의 결과를 나타낸 것이다.
- [0161] 도 7의 (a)를 참조하면, 항-CRP 처리 시 SPR 반응값은 11.85 A.U 증가하였고, DSS 처리 후 SPR 반응값은 3.82 A.U 증가하였다. 이를 통해, DSS 처리에 의해 항체가 대장균의 외부 세포막에 결합되고, 항체와 자동 표지된 Z-도메인 사이에 공유 결합이 형성되었음을 확인할 수 있다.
- [0162] 1차에서 5차 CPR 처리 시 SPR 반응값은 각각 7.62, 7.59, 8.33, 8.05 및 8.21 A.U로 계산되었다. 2차에서 5차까지의 CRP 처리에서 상대 신호는 1차 CRP 처리와 비교하여 각각 100, 109, 106 및 108%였다. 이를 통해 5번의 재생 바이오 센싱 신호가 10% 편차 미만의 안정적인 신호를 나타냄을 알 수 있었다. 또한, SPR 바이오센싱의 반복성은 4.27%의 변동계수로 계산되었다. 이러한 결과는 본 발명의 분자 인식층의 재생이 좋은 반복성을 나타낸다는 것을 의미한다.
- [0163] 한편, 재생 단계의 경우 재생 버퍼 처리 중에 높은 SPR 응답이 모니터링되었다. 이는 재생 버퍼의 조성과 농도가 다른 PBS 기반 용액과 다르기 때문이다. 모든 SPR 반응은 버퍼의 조성이나 농도에 영향을 받지 않도록 세척 단계 후 동일한 PBS 용액을 사용하여 측정되었다.

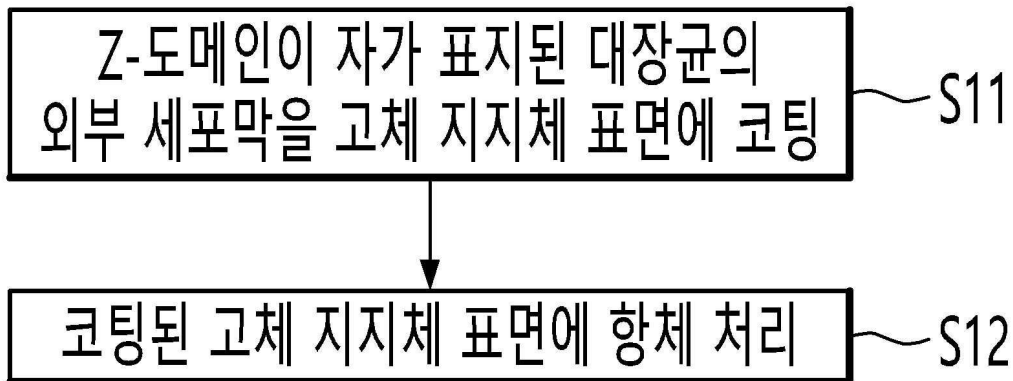
- [0164] 면역친화층 반응의 SPR 반응과 비교하여, 1차에서 5차 재생 단계까지의 신호는 각각 0.63, 0.36, 0.32, 0.09 및 0.58 A.U.로 계산되었다. 모든 신호는 첫 번째 CRP 처리의 신호와 비교하여 8% 미만이었다. 이를 통해, 바이오센서의 분자 인식층이 성공적으로 재생되었음을 알 수 있다. 즉, 방향 제어되고 공유 고정화된 분자 인식층이 SPR 바이오센서에 형성되었고, 상기 분자 인식층은 재생 단계에 의해 재사용 가능하다는 것을 알 수 있다.
- [0165] 도 7의 (b)를 참조하면, 대장균의 외부 세포막 형성 후 SPR 반응값은 0.12 및 2.78 A.U만 변경되었다. 항-CRP와 DSS를 순차적으로 처리했을 때, 항체 처리는 항체와 결합하는 자동 표시 Z-도메인이 없었기 때문에 자동 표시 벡터가 있는 대장균의 외부 세포막과 비교하여 1.5% 미만의 신호 변화를 보였다.
- [0166] 고정된 항체는 없었지만 DSS는 외부 세포막의 다른 막 단백질을 고정할 수 있으므로 SPR 반응은 2.78 A.U만큼 변경되었다. DSS 처리 후, 1차에서 5차 CRP 처리까지 증가된 SPR 반응은 1.02, 0.91, 0.93, 0.68, 0.66 A.U.로 나타났다. 첫 번째부터 다섯번째까지의 재생 단계는 각각 0.86, 0.32, 0.53, 0.67, 0.68 A.U.으로 나타났다. 모든 신호는 자동 표시되는 Z-도메인이 있는 분자 인식층을 사용한 CRP 처리와 비교하여 15% 미만이었다.
- [0167] 따라서 본 출원의 발명자들은 바이오센서에 적용된 Z-도메인이 자가 표시된 대장균의 외부 세포막은 항체 또는 분석물질의 비특이적 결합을 효율적으로 방지함을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 5배의 재생 능력으로 SPR 바이오센서에서 공유 고정화되고 방향 제어된 항체를 갖는 재생 분자 인식층이 성공적으로 형성되었음을 확인할 수 있었다. 즉, 5회 재생 및 5회 CRP 측정이 가능하므로 최소 4개의 추가 SPR 칩과 분자 인식층 형성에 소요되는 시간 및 비용을 절감할 수 있는 효과를 도출함을 알 수 있었다. 또한, SPR 바이오센서용 자가 표시기술에 의한 항체의 방향 제어는 감도를 향상시키는 것으로 확인되었다. Z-도메인의 자가 표지에 의한 항체의 방향 제어 외에 가교제 처리에 의한 공유 고정화 역시 분자 인식층의 안정성을 증가시킬 수 있으므로 비용과 시간을 절감하면서 민감하고 재생적인 바이오센싱을 실현할 수 있음을 확인하였다.
- [0168] 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

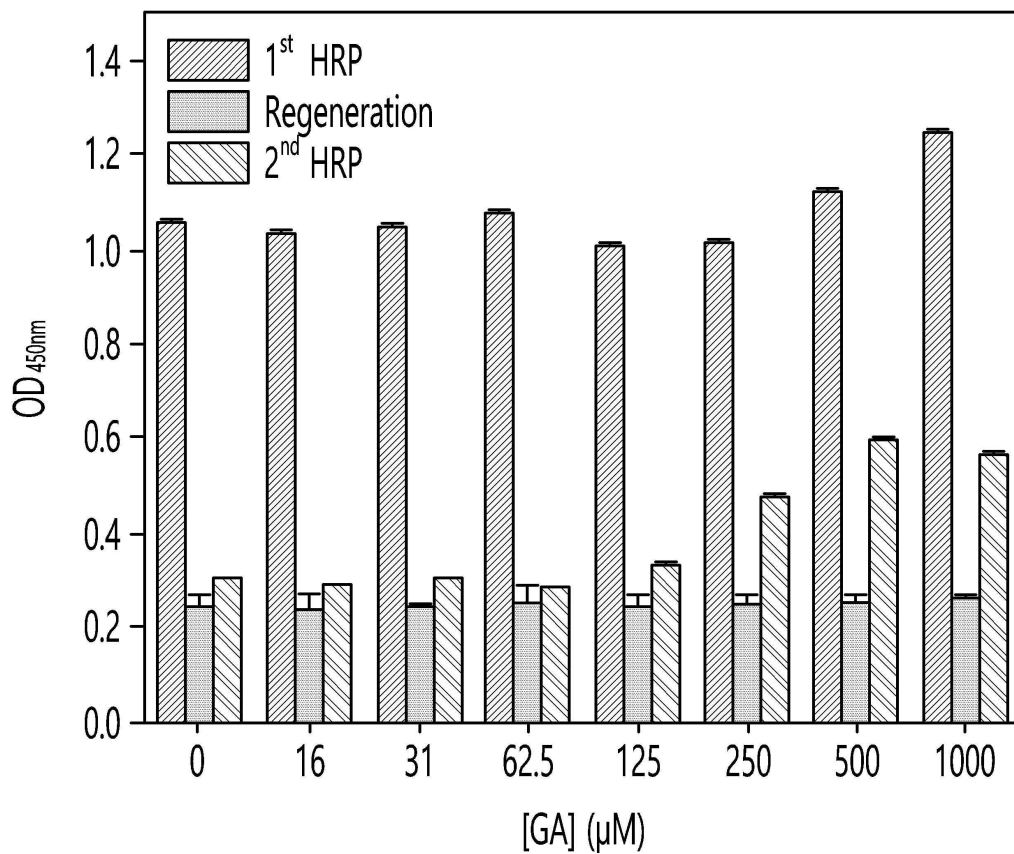
도면1



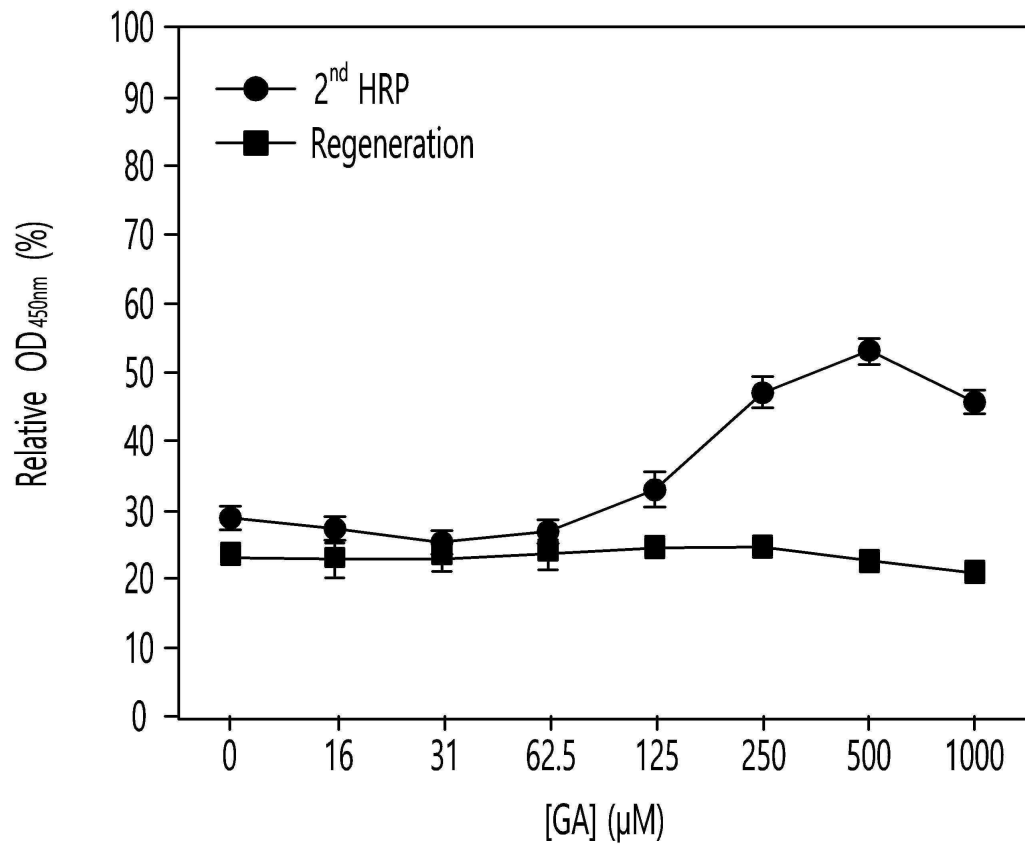
도면2



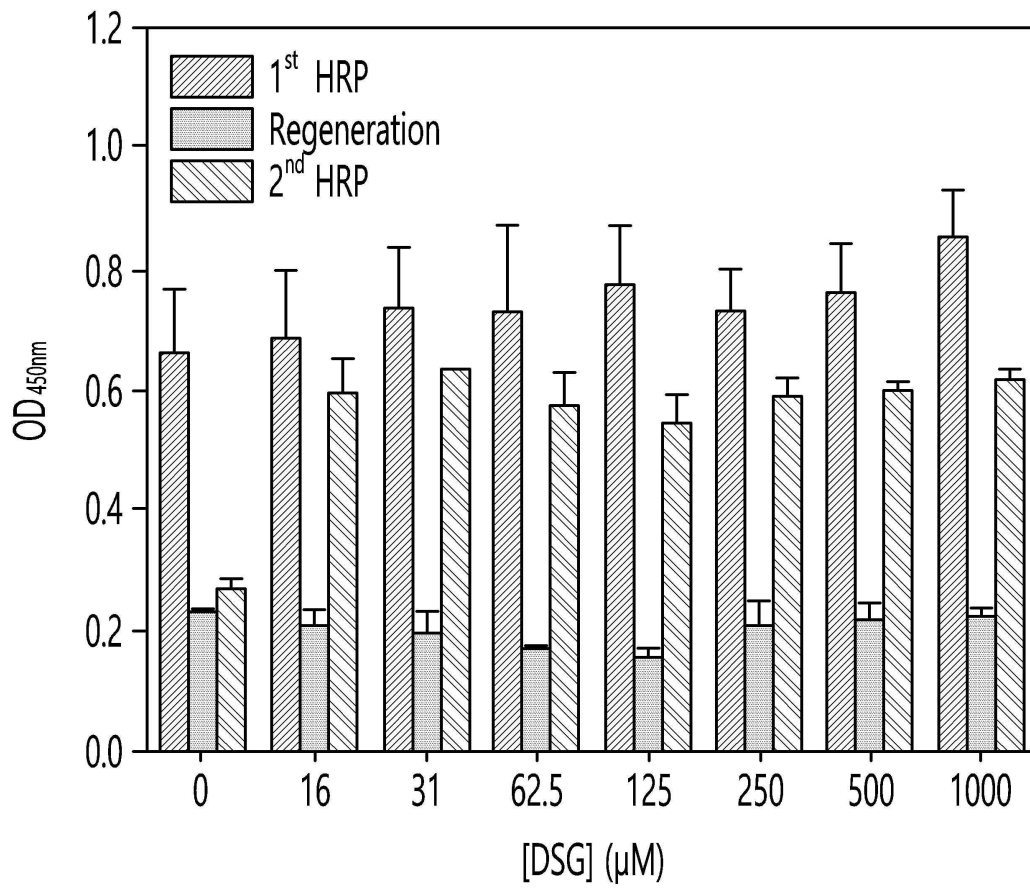
도면3a



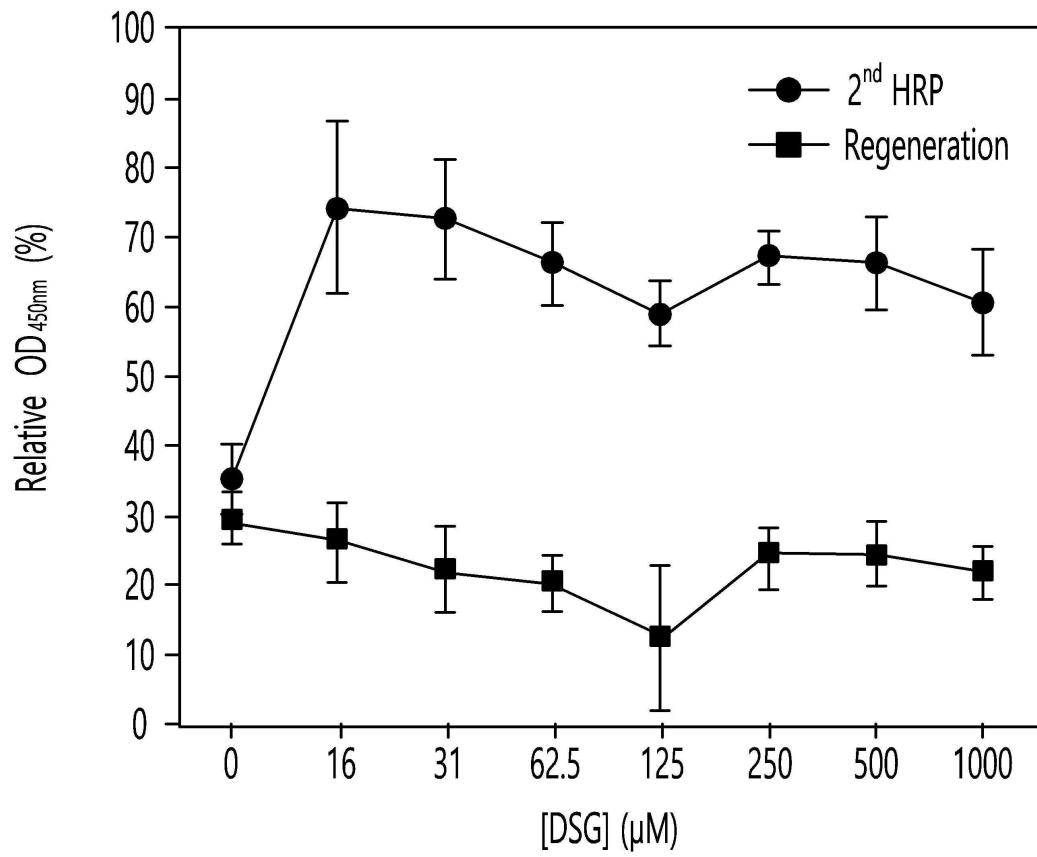
도면3b



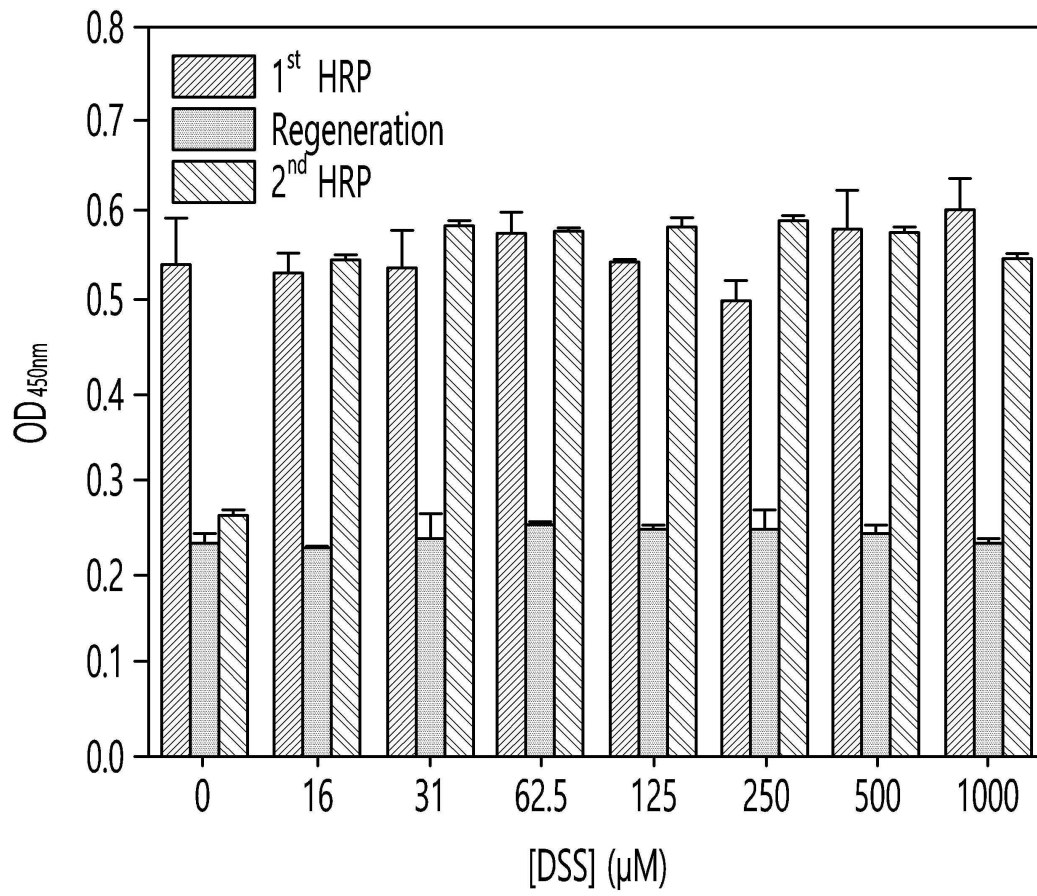
도면3c



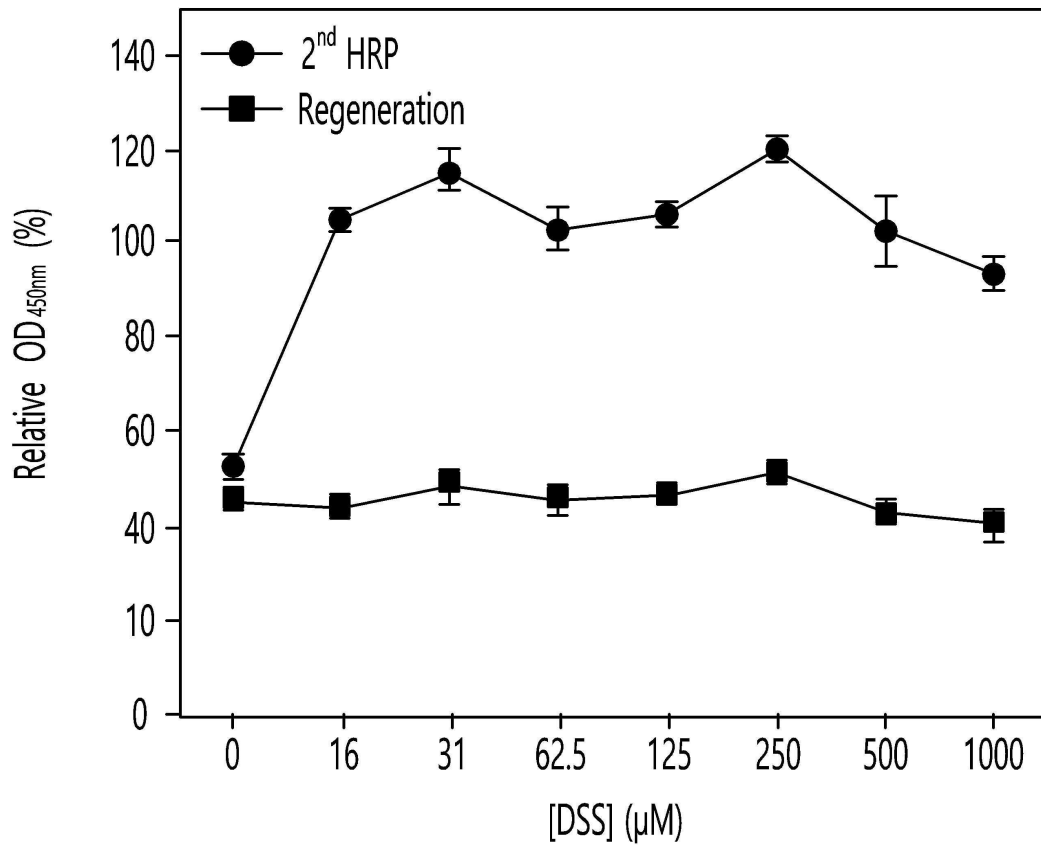
도면3d



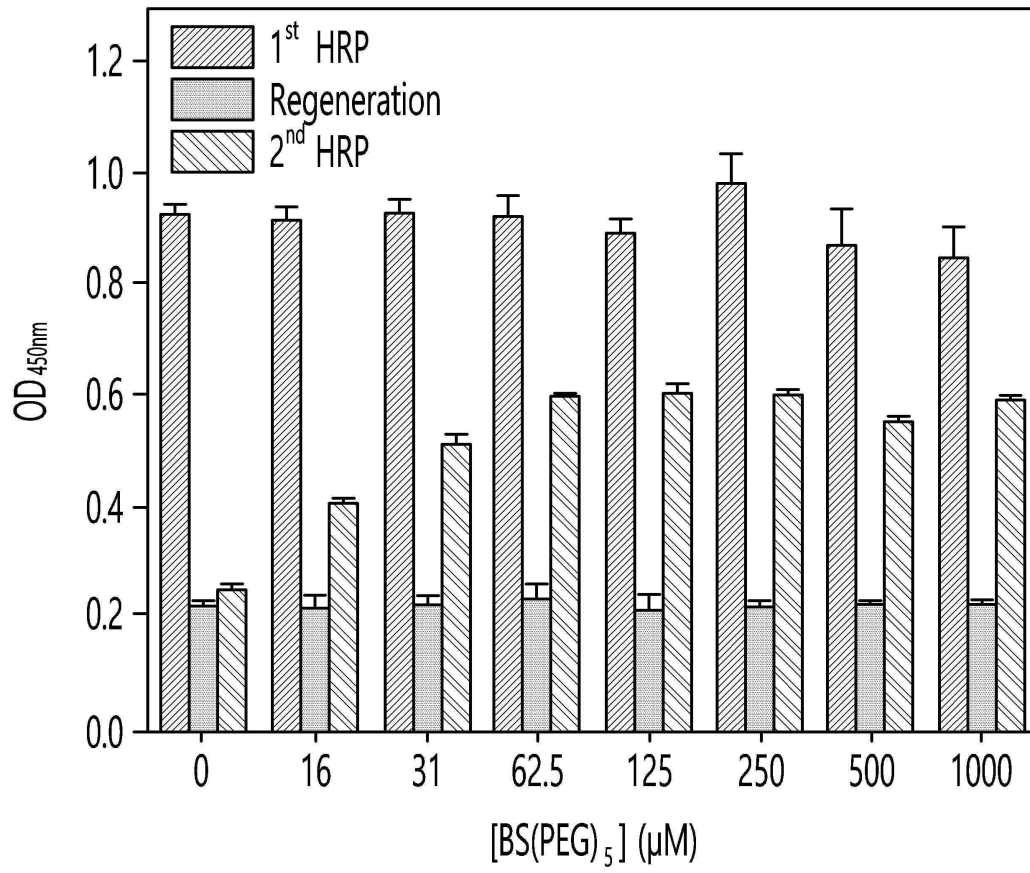
도면3e



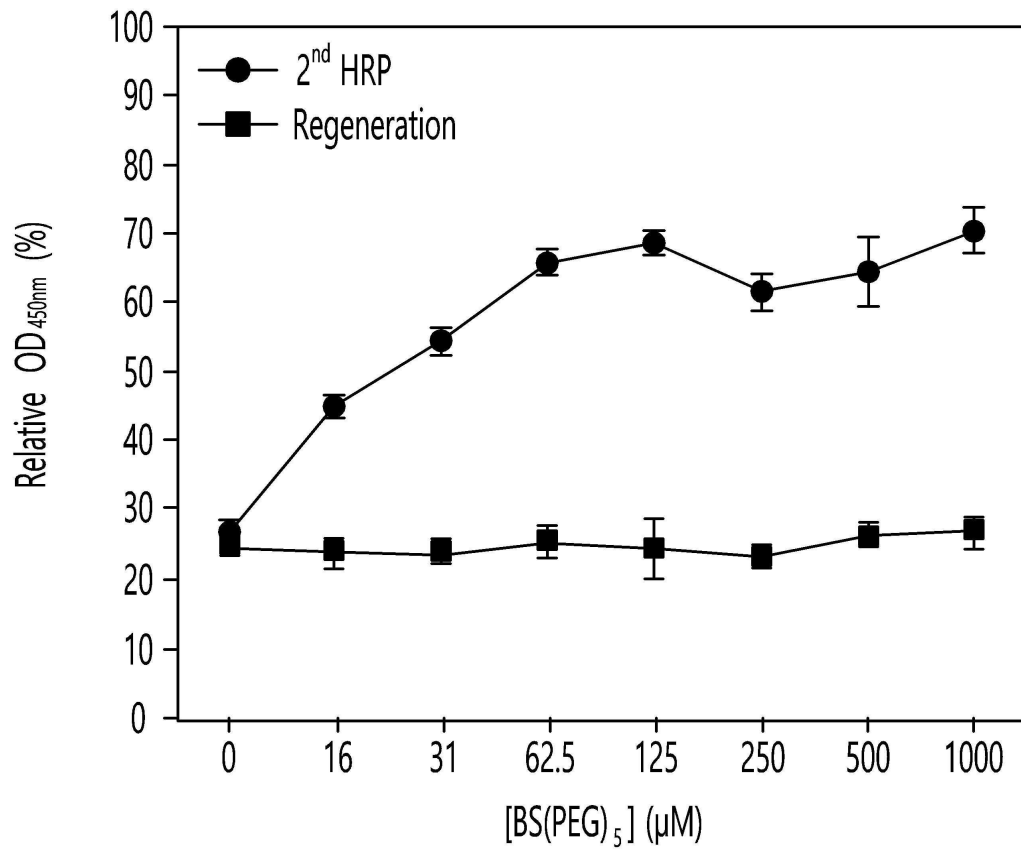
도면3f



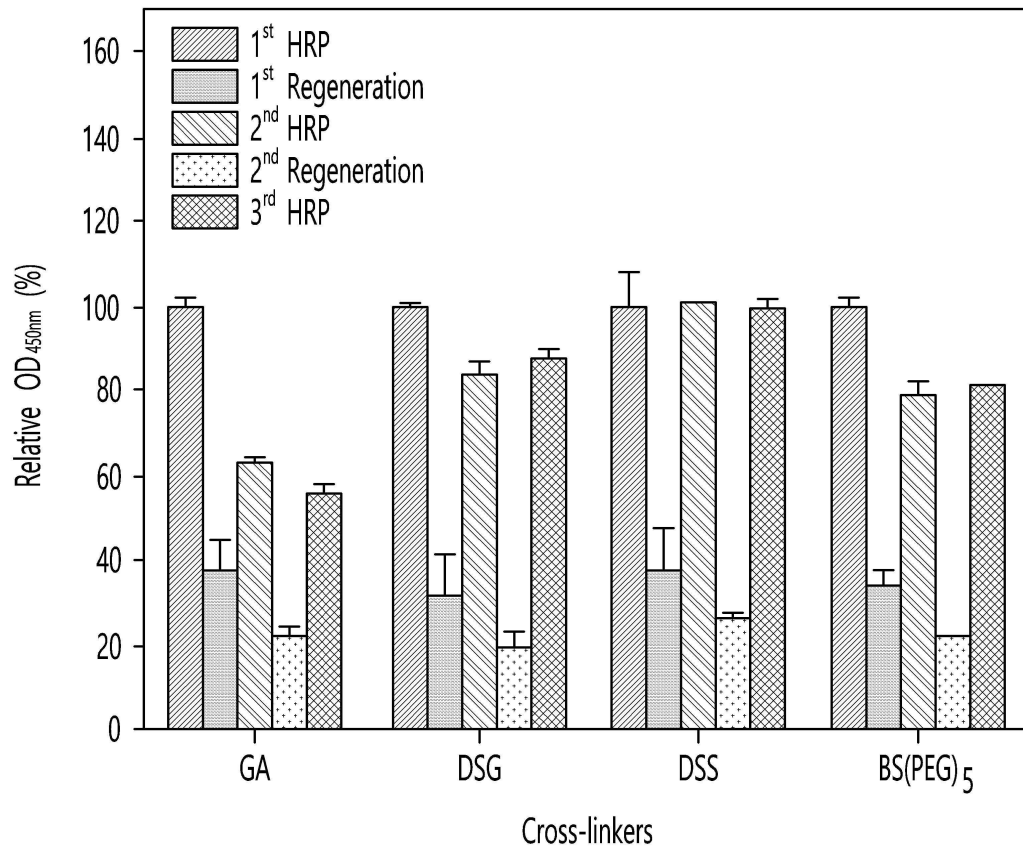
도면3g



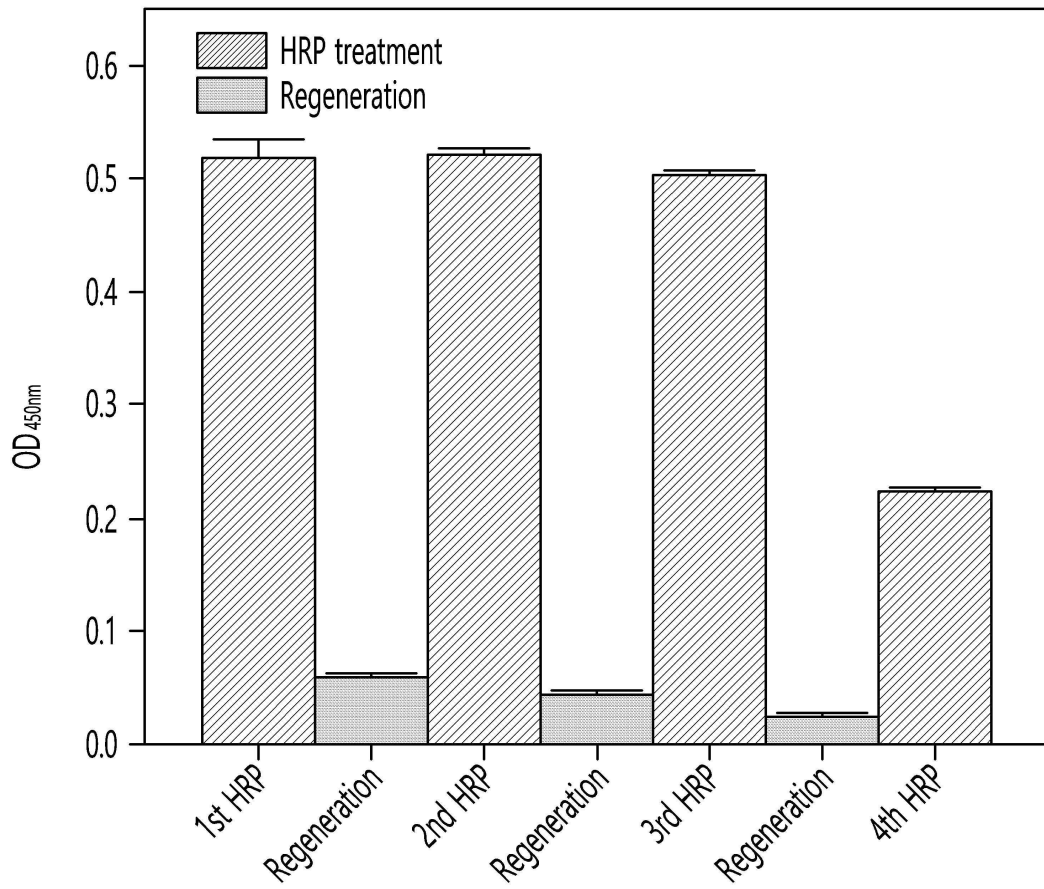
도면3h



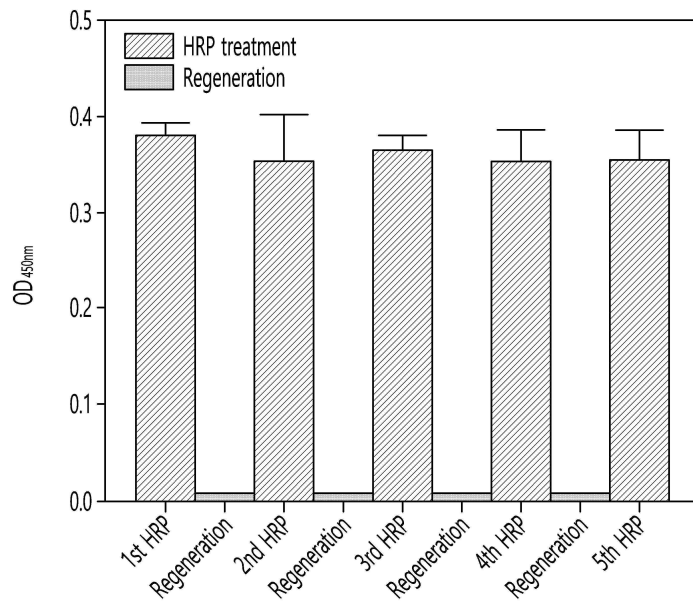
도면4



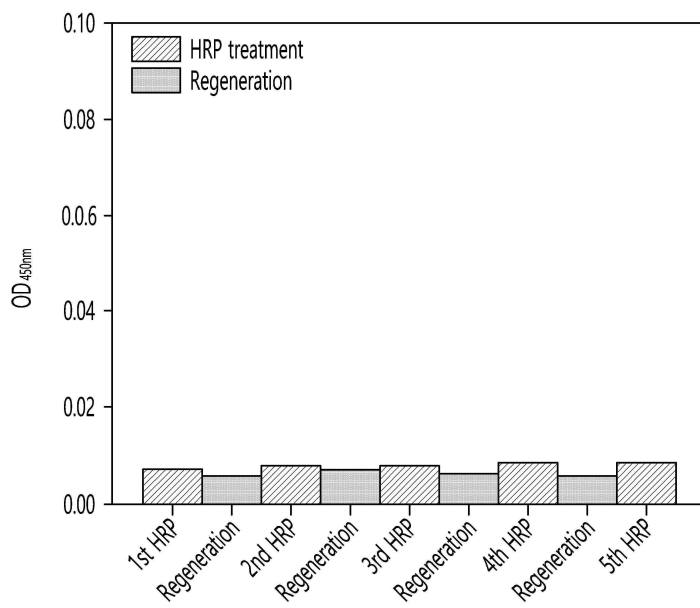
도면5



도면6

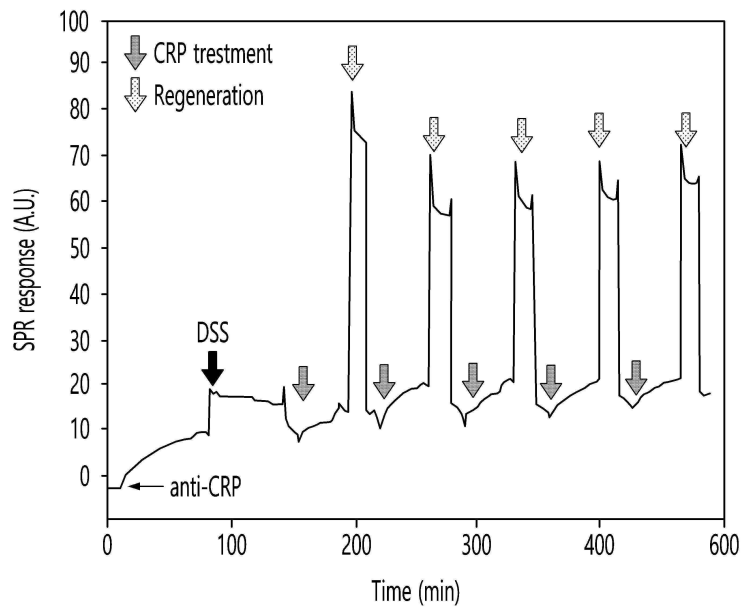


(a)

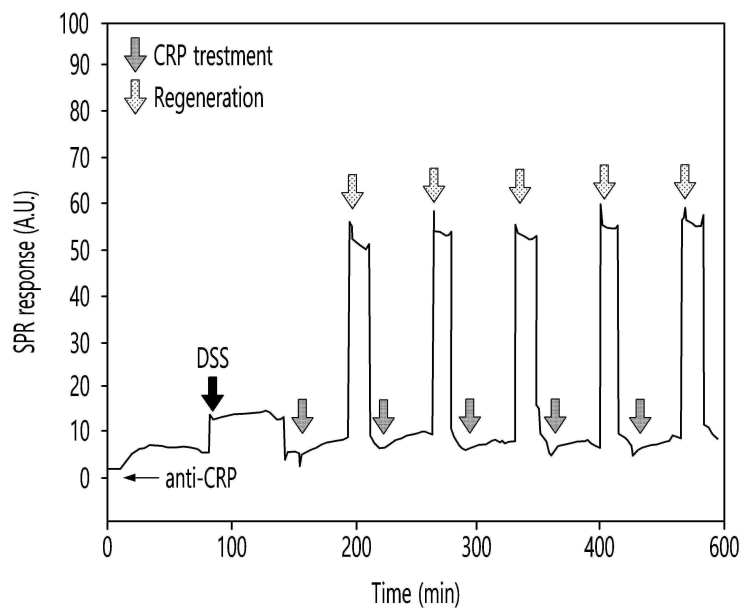


(b)

도면7



(a)



(b)

서열목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Hallym University
- <120> An immune biosensor, an immune bio kit including the same, a method of manufacturing a molecular recognition layer of the immune biosensor and a method of regenerating the immune biosensor.
- <130> P210059KR

<160> 2
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Protein sequence of Z-domain
 <400> 1

Val Ala Leu Ala Ser Pro Ala Ser Asn Leu Tyr Ser Pro His Glu Ala

1	5	10	15
Ser Asn Leu Tyr Ser Gly Leu Gly Leu Asn Gly Leu Asn Ala Ser Asn			
20	25	30	
Ala Leu Ala Pro His Glu Thr Tyr Arg Gly Leu Ile Leu Glu Leu Glu			
35	40	45	
His Ile Ser Leu Glu Pro Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Ser Asn Gly			
50	55	60	
Leu Gly Leu Gly Leu Asn Ala Arg Gly Ala Ser Asn Ala Leu Ala Pro			
65	70	75	80

His Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Ser Glu Arg Leu Glu Leu Tyr Ser			
85	90	95	
Ala Ser Pro Ala Ser Pro Pro Arg Ser Glu Arg Gly Leu Asn Ser Glu			
100	105	110	
Arg Ala Leu Ala Ala Ser Asn Leu Glu Leu Glu Ala Leu Ala Gly Leu			
115	120	125	
Ala Leu Ala Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Leu Glu Ala Ser Asn Ala Ser			
130	135	140	
Pro Ala Leu Ala Gly Leu Asn Ala Leu Ala Pro Arg Ala Leu Tyr Ser			

145	150	155	160
<210> 2			
<211> 174			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			

<220><223> Protein sequence of Z-domain

<400> 2

gtagacaaca aattcaacaa agaacaacaa aacgcgttct atgagatctt acatttacct	60
aacttaaacg aagaacaacg aaacgccttc atccaaagtt taaaagatga cccaagccaa	120
agcgctaacc ttttagcaga agctaaaaag cttaatgatg ctcaggcgcc gaaa	174