

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일

2019 년 1 월 31 일 (31.01.2019)

WIPO | PCT

WO 2019/022385 A1

(51) 국제특허분류:

C12Q 1/6834 (2018.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2018/007022

(22) 국제출원일:

2018 년 6 월 21 일 (21.06.2018)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0093681 2017 년 7 월 24 일 (24.07.2017) KR

(71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로55길 48, Seoul (KR).

(72) 발명자: 박용양 (PARK, Woong-Yang); 06519 서울시 서초구 신반포로33길 66, 102동 207호, Seoul (KR). 유창은 (YOO, Chang Eun); 03357 서울시 은평구 통일로 796, 109동 1305호, Seoul (KR). 김연정 (KIM, Yeon Jeong); 05841 서울시 송파구 충민로 5, B동 913호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 리앤록 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING MUTATION OF GENE USING AGGREGATION OF GOLD NANOPARTICLE

(54) 발명의 명칭: 금 나노입자의 응집을 이용한 유전자의 변이를 검출하는 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for detecting mutation of a gene, using a catalyst or enzyme controlling a concentration of a compound having influence on the generation of metal nanoparticles. Being capable of detecting mutation of a gene with high sensitivity to the extent of femtomolar levels even in the absence of a separate detector, a method for detecting mutation of a gene according to one embodiment can identify the existence of particular mutations of genes extracted from various samples such as tissues, blood, etc., and can utilize the information in monitoring personalized treatment and prognosis.

(57) 요약서: 금속 나노입자의 생성에 영향을 주는 화합물 농도를 조절하는 촉매 또는 효소를 이용하여 유전자의 변이를 검출하는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에 따른 유전자의 변이를 검출하는 방법에 의하면, 별도의 검출 장비 없이도 유전자의 변이를 펩토몰 농도까지 고감도로 검출이 가능하므로, 조직, 혈액과 같은 다양한 시료에서 추출된 유전자의 특정 변이의 존재 여부를 확인하고, 이를 개인별 맞춤 치료 및 예후 모니터링에 이용할 수 있다.



WO 2019/022385 A1

명세서

발명의 명칭: 금 나노입자의 응집을 이용한 유전자의 변이를 검출하는 방법

기술분야

- [1] 금 나노입자의 응집을 이용한 유전자의 변이를 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 특정 유전자의 변이를 검출하는 일반적인 방법은 검출하고자 하는 변이와 상보적인 유전자 가닥을 이용하여 변이 유전자를 포획(capture)한 다음, 나노입자나 화합물의 변화를 이용하여 검출 신호를 발생시키는 순서로 이루어진다.
- [3] 금 나노입자는 그 크기 및 응집 상태에 따라 다양한 물리적인 특성을 나타내는데, 특히 가시광선 영역에서 흡광도의 차이가 두드러지게 나타난다. 이러한 특성을 이용하여 금 나노입자는 세포, 단백질, 유전자와 같은 다양한 바이오물질의 검출에 이용되고 있다. 그러나, 가시광선 영역이어서 검출한계가 상대적으로 낮으며, 금 나노입자의 생성 조건 조절이 매우 까다롭다는 문제가 있다.
- [4] Xue Bai 등의 논문은 나노입자에 검출하고자 하는 표적에 상보적인 유전자를 고정화시킨 후 표적을 포획한 다음, 입자의 크기를 증가시키고, 이에 따라 변화하는 흡광도를 측정하여 유전자 변이를 검출하는 기술을 개시하고 있다.
- [5] Paola Valentini 등의 논문은 나노입자에 검출하고자 하는 표적에 상보적인 유전자를 고정화시킨 후 표적을 포획한 다음, 이를 다시 자성 입자에 포획하여 자성 입자 주변에 금 나노입자의 농도를 증가시키는 유전자 변이 검출 기술을 개시하고 있다.
- [6] 미국 공개특허 제2010-0075335호는 나노입자에 검출하고자 하는 표적에 상보적인 유전자를 고정화시킨 후 표적을 포획한 다음, 이온 강도를 조절하여 응집을 형성시킴으로써 유전자 변이를 검출하는 기술을 개시하고 있다.
- [7] 상기 기술들은 모두 나노입자를 이용하여 유전자 변이를 검출하는데, 가시광선 영역에서 검출하기 때문에 검출한도 (limit of detection: LOD)가 나노몰(nanomolar) 내지 피코몰(picomolar) 수준이어서 형광에 비해 상대적으로 높지 않다.
- [8] 따라서, 표적의 결합 여부에 따라 나노입자의 물리적, 화학적 상태변화를 일으켜 흡광도를 변화시키거나, 특정 화합물의 농도를 변화시켜 신호를 증폭시킴으로써 검출을 가능하게 하는 기술이 필요하다.
- [9] (특허문헌 1) 미국 공개특허공보 제2010-0075335호.
- [10] (비특허문헌 1) Xue Bai 등, Biosensors and Bioelectronics, 2010, vol. 25, pp. 1984-1988.

- [11] (비특허문헌 2) Paola Valentini 등, ACS Nono, 2013, 7 (6), pp. 5530-5538.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 일 양상은 금속 나노입자의 생성에 영향을 주는 화합물 농도를 조절하는 촉매 또는 효소를 이용하여 유전자의 변이를 검출하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [13] 일 양상은 유전자의 변이를 검출하는 방법, 보다 구체적으로
- [14] 변이 유전자의 변이 부분을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 고체 지지체에 고정화된 제1 프로브를 표적 물질과 접촉시켜 제1 혼성화 반응시키는 단계;
- [15] 상기 변이 유전자의 변이 부분을 포함하지 않는 뉴클레오티드 서열에 상보적이고, 환원제를 산화시키는 촉매 또는 효소가 연결된 제2 프로브를 상기 제1 혼성화 반응물과 접촉시켜 제2 혼성화 반응시키는 단계;
- [16] 상기 제2 혼성화 반응물에 환원제를 접촉시켜 상기 촉매 또는 효소에 의해 상기 환원제를 산화시키는 단계;
- [17] 산화 후 남아있는 환원제를 금속 이온 용액과 접촉시켜 금속 나노입자를 생성하는 단계; 및
- [18] 상기 생성된 금속 나노입자의 색깔을 대조군과 비교하여 유전자의 변이가 존재하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 유전자의 변이를 검출하는 방법을 제공한다.
- [19] 일 구체예에 따른 유전자 변이를 검출하는 방법은 금속 나노입자의 생성에 영향을 주는 화합물 농도를 조절하는 촉매 또는 효소를 이용하여 유전자 변이를 검출하는 방법일 수 있다.
- [20] 상기 금속 나노입자의 생성에 영향을 주는 화합물은 금속 나노입자의 생성 또는 응집을 증가, 촉진, 감소, 또는 억제시키는 화합물을 의미할 수 있고, 구체적으로 금속 이온 용액을 환원시키는 환원제일 수 있다. 금속 나노입자의 생성에 영향을 주는 화합물은 시트르산 나트륨 (sodium citrate), 아스코르브산 나트륨 (sodium ascorbate), 하이드로퀴논 (hydroquinone), 테트라히드로붕산나트륨 (sodium borohydride), 글루코스 (glucose), 과산화수소 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 등일 수 있고, 예를 들어 과산화수소(H_2O_2)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [21] 상기 화합물 농도를 조절하는 촉매 또는 효소는 화합물을 분해시키는 촉매 또는 효소일 수 있다. 따라서, 상기 촉매 또는 효소에 의해 금속 나노입자의 생성에 영향을 주는 화합물의 농도를 조절할 수 있다. 농도가 조절된 화합물은 결과적으로 금속 나노입자의 생성에 영향을 주기 때문에, 상기 촉매 또는 효소를 이용하여 검출감도를 증가시킬 수 있다.
- [22] 일 구체예에 따른 유전자의 변이를 검출하는 방법은 변이 유전자의 변이

부분을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 고체 지지체에 고정화된 제1 프로브를 표적 물질과 접촉시켜 제1 혼성화 반응시키는 단계를 포함한다.

- [23] 용어, "변이(mutation)"란 "돌연변이"와 상호교환적으로 사용되며, 유전자의 뉴클레오티드 서열의 변화로 유전정보가 변하면서 유전형질이 달라지는 현상을 의미할 수 있다. 구체적으로, 변이는 유전자의 하나 이상의 염기의 결실(deletion), 치환(substitution), 삽입(insertion) 등에 의해 발생할 수 있다. 변이의 종류는, 예를 들어, 미스센스 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 침묵 돌연변이, 프레임쉬프트 돌연변이 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [24] 용어, "변이 유전자(mutant gene)"란 유전자의 뉴클레오티드 서열 일부에 변이가 일어난 것을 의미할 수 있다. 변이 유전자는 유전자의 변이 여부를 확인하고자 하는 개체로부터 유래된 변이 유전자일 수 있다. 상기 개체는 척추동물일 수 있고, 구체적으로 포유류, 양서류, 파충류, 조류 등일 수 있고, 보다 구체적으로 인간(*Homo sapiens*)을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [25] 용어, "상보적(complementary)"은 뉴클레오티드 또는 핵산, 예를 들어 이중 가닥 DNA 분자의 2개의 가닥 간의 혼성화 또는 염기 짝지음을 의미할 수 있다.
- [26] 용어, "뉴클레오티드(nucleotide)"란 DNA나 RNA 같은 핵산을 이루는 단위체로서, 염기 하나, 오탄당 하나, 한 개 이상의 인산으로 구성되어 있다. 뉴클레오티드를 구성하는 염기에는 퓨린 계열인 아데닌 (A), 및 구아닌 (G)과 피리미딘 계열의 시토신 (C), 티민 (T), 및 우라실 (U)이 있고, 뉴클레오티드를 구성하는 오탄당으로는 리보오스(ribose)와 데옥시리보오스(deoxyribose)가 있다. 뉴클레오티드를 구성하는 염기와 오탄당의 종류, 결합한 인산의 수에 따라 뉴클레오티드의 종류는 다양하게 나눌 수 있다.
- [27] 용어, "프로브(probe)"란 특정 염기 서열에 대해 상보적으로 결합할 수 있는, 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA, DNA, PNA (peptide nucleic acid), LNA (locked nucleic acid) 등의 핵산 단편을 의미한다. 프로브는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [28] 상기 프로브는 포스포르아미다이트(phosphoramidite) 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 혼입할 수 있는 추가의 특징의 예로 메틸화, 캡화, 하나 이상의 핵산을 동족체로의 치환 및 핵산 간의 변형 등이 있으나, 이에 제한하지 않는다.
- [29] 상기 제1 프로브는 변이 유전자의 변이 부분을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상기 제1 프로브는 변이 유전자의

변이 부분을 포함하는 뉴클레오티드 서열 또는 그 단편에 상보적인 뉴클레오티드 서열과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 99.9% 이상의 상동성(homology)을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있으나, 검출 특이성을 증가시키기 위하여 99% 이상의 상동성을 나타내는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 용어, "상동성"은 핵산 서열 간의 유사도를 나타내기 위한 것이다. 상기 제1 프로브는 5개 이상, 10개 이상, 10개 내지 1000개, 10개 내지 500개, 10개 내지 300개, 10개 내지 100개, 10개 내지 50개, 10개 내지 30개, 15개 내지 500개, 15개 내지 300개, 15개 내지 200개, 15개 내지 100개, 15개 내지 50개, 15개 내지 30개의 뉴클레오티드를 갖는 것일 수 있으나, 검출 특이성을 증가시키기 위하여 적절한 길이를 선택할 수 있다.

- [30] 상기 제1 프로브는 고체 지지체에 고정화되어 있다. 상기 고체 지지체는 자성 비드 (magnetic bead), 실리카 비드 (silica bead), 고분자 비드 (polymer bead) 등일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [31] 상기 제1 프로브는 DNA, RNA, PNA, LNA 등일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [32] 용어, "표적 물질(target material)"이란 변이 유전자인지 여부를 확인하기 위한 물질을 의미할 수 있고, 구체적으로 생물학적 시료로부터 추출한 핵산일 수 있다.
- [33] 상기 생물학적 시료는 유전자의 변이 여부를 확인하고자 하는 개체로부터 분리된 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [34] 상기 핵산은 DNA, 또는 RNA일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [35] 상기 접촉은 인큐베이션(incubation)에 의한 접촉일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [36] 용어, "혼성화 반응(hybridization reaction)"이란 서로 다른 두 개의 단일 가닥 핵산이 혼성화하여 이중 가닥의 핵산이 형성되는 반응을 의미할 수 있다. 서로 다른 두 개의 단일 가닥 핵산이 서열 상보성이 높으면 안정된 이중 가닥이 형성될 수 있다.
- [37] 상기 혼성화 반응은 당해 기술분야에 공지된 방법으로 수행할 수 있고, 구체적으로 혼성화 용액에서 수행될 수 있다. 상기 혼성화 용액은 당해 기술분야에 공지된 것을 사용할 수 있다. 상기 혼성화 용액은, 예를 들어, 살린 소듐 시트레이트 (saline sodium citrate: SSC), 폴리솔베이트 20 (Tween 20) 등을 포함하는 용액일 수 있다.
- [38] 상기 제1 혼성화 반응은 반응 시간 및 반응 온도를 혼성화 반응을 수행하기에 적절하게 선택할 수 있다. 예를 들어, 반응 시간은 1분 내지 24시간, 10분 내지 24시간, 10분 내지 20시간, 10분 내지 15시간, 10분 내지 10시간, 10분 내지 5시간, 30분 내지 24시간, 30분 내지 20시간, 30분 내지 15시간, 30분 내지 10시간, 30분

내지 5시간, 1시간 내지 24시간, 1시간 내지 20시간, 1시간 내지 15시간, 1시간 내지 10시간, 1시간 내지 5시간, 1시간 내지 3시간일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 반응 온도는 5 내지 35°C, 5 내지 30°C, 5 내지 25°C, 10 내지 35°C, 10 내지 30°C, 10 내지 25°C, 10 내지 20°C일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [39] 일 구체예에 따른 유전자의 변이를 검출하는 방법은 변이 유전자의 변이 부분을 포함하지 않는 뉴클레오티드 서열에 상보적이고, 환원제를 산화시키는 촉매 또는 효소가 연결된 제2 프로브를 제1 혼성화 반응물과 접촉시켜 제2 혼성화 반응시키는 단계를 포함한다.
- [40] 상기 제2 프로브는 변이 유전자의 변이 부분을 포함하지 않는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 따라서, 상기 제1 혼성화 반응 단계에서 표적 물질이 제1 프로브와 혼성화된 경우에만, 제2 프로브는 제1 혼성화 반응물에 포함된 표적 물질과 혼성화될 수 있다.
- [41] 상기 제2 프로브는 5개 이상, 10개 이상, 10개 내지 1000개, 10개 내지 500개, 10개 내지 300개, 10개 내지 100개, 10개 내지 50개, 10개 내지 30개, 15개 내지 500개, 15개 내지 300개, 15개 내지 200개, 15개 내지 100개, 15개 내지 50개, 15개 내지 30개의 뉴클레오티드를 갖는 것일 수 있으나, 검출 특이성을 증가시키기 위하여 적절한 길이를 선택할 수 있다.
- [42] 상기 제2 프로브는 환원제를 산화시키는 촉매 또는 효소가 연결되어 있다.
- [43] 상기 환원제를 산화시키는 촉매는 요오드화칼륨 (KI), 인산 (H_3PO_4), 이산화망가니즈 (MnO_2) 등일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [44] 상기 과산화수소를 분해하는 효소는 카탈라제 (catalase), 옥시다제 (oxidase), 페록시다제 (peroxidase) 등일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [45] 상기 제2 프로브는 환원제를 산화시키는 촉매 또는 효소가 고정화된 나노입자에 고정화된 것일 수 있다. 상기 나노입자의 종류는 금속 나노입자, 자성 나노입자, 실리카 나노입자 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [46] 상기 제2 프로브는 DNA, RNA, PNA, LNA 등일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [47] 상기 제2 혼성화 반응은 반응 시간 및 반응 온도를 혼성화 반응을 수행하기에 적절하게 선택할 수 있다. 예를 들어, 반응 시간은 1분 내지 24시간, 10분 내지 24시간, 10분 내지 20시간, 10분 내지 15시간, 10분 내지 10시간, 10분 내지 5시간, 30분 내지 24시간, 30분 내지 20시간, 30분 내지 15시간, 30분 내지 10시간, 30분 내지 5시간, 30분 내지 3시간, 30분 내지 2시간, 30분 내지 1시간, 30분일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 반응 온도는 0 내지 35°C, 0 내지 30°C, 0 내지 25°C, 0 내지 20°C, 0 내지 15°C, 0 내지 10°C, 0 내지 5°C, 1 내지 10°C, 1 내지 5°C, 3 내지 10°C, 3 내지 5°C일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [48] 일 구체예에 따른 유전자의 변이를 검출하는 방법은 제2 혼성화 반응 후, 고염 용액(high salt solution)으로 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다.

- [49] 상기 고염 용액은 SSC (saline sodium citrate), 또는 PBS (phosphate buffer saline)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [50] 상기 세척에 의하여 제2 혼성화 반응에 참여하지 않은 반응물이 제거될 수 있다. 제2 혼성화 반응 후 고염 용액으로 세척하면, 표적 물질과 결합하지 않은 효소들은 모두 제거된다. 즉, 표적 물질이 변이 유전자인 경우에 제2 프로브에 의해 효소가 결합되고, 그 표적 물질에 결합된 효소가 다음 단계에서 환원제를 산화시키는 역할을 할 수 있다. 반면, 표적 물질이 변이 유전자가 아니라면 제2 프로브가 결합하지 못해 효소가 결합되지 못하고, 세척에 의해 효소가 제거되어, 다음 단계에서 환원제를 산화시키지 못한다.
- [51] 일 구체예에 따른 유전자의 변이를 검출하는 방법은 제2 혼성화 반응물에 환원제를 접촉시켜 상기 촉매 또는 효소에 의해 상기 환원제를 산화시키는 단계를 포함한다.
- [52] 상기 단계에서, 제2 혼성화 반응물에 포함된 촉매 또는 효소, 즉 환원제를 산화시키는 촉매 또는 효소에 의해 환원제가 산화될 수 있고, 예를 들어 과산화수소가 분해될 수 있다. 과산화수소 분해 반응식의 비제한적인 예는 식 1과 같다.
- [53] [식 1]
- [54]
$$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$$
- [55] 상기 제2 혼성화 반응물에 접촉시키는 환원제, 예를 들어 과산화수소의 농도는 0.01 내지 100 μM , 0.1 내지 100 μM , 1 내지 100 μM , 1 내지 90 μM , 1 내지 80 μM , 1 내지 70 μM , 1 내지 60 μM , 10 내지 60 μM , 15 내지 60 μM , 30 내지 60 μM 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 환원제의 농도가 60 μM 을 초과하는 경우, 환원제의 농도에 따른 금속 나노입자의 색깔 또는 흡광도의 변화가 작아 검출이 어려울 수 있다.
- [56] 상기 제2 혼성화 반응물에 접촉시키는 환원제, 예를 들어 과산화수소는 MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 버퍼에 용해된 것을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 MES는 과산화수소의 반응을 도와주는 약한 환원제, 또는 금속 나노입자의 안정성을 높여주는 안정제의 역할을 할 수 있다.
- [57] 일 구체예에 따른 유전자의 변이를 검출하는 방법은 산화 후 남아있는 환원제를 금속 이온 용액과 접촉시켜 금속 나노입자를 생성하는 단계를 포함한다.
- [58] 상기 금속 이온 용액은 금 이온 용액, 또는 은 이온 용액일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [59] 상기 금속 나노입자는 금 나노입자, 또는 은 나노입자일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [60] 상기 생성된 금속 나노입자는 환원제의 농도에 따라 색깔 및 흡광 특성이 달라질 수 있다. 예를 들어, 환원제의 농도가 높은 경우 금 이온의 환원이 빠르게 일어나 비교적 일정한 크기의 큰 금 나노입자가 형성되어 보라색 계열의 색깔을

띄게 되고, 농도가 낮은 경우 환원이 느리게 일어나 크기의 편차가 큰 금 나노입자가 형성되어 파란색 계열의 색깔을 띄게 될 수 있다 (Roberto de la Rica 등, Nature Nanotechnology, 2012, 7, 821-824).

- [61] 따라서, 표적 물질이 변이 유전자인지 여부 및 그 양에 따라 촉매 또는 효소에 의해 환원제의 양이 조절되고, 조절된 환원제의 농도에 따라 색깔 및 흡광 특성이 다른 금속 나노입자를 얻을 수 있다.
- [62] 일 구체예에 따른 유전자의 변이를 검출하는 방법은 생성된 금속 나노입자의 색깔을 대조군과 비교하여 유전자의 변이가 존재하는지 여부를 확인하는 단계를 포함한다.
- [63] 상기 대조군은 검출하고자 하는 변이 유전자가 없는 시료에 대해 동일한 단계들을 수행하여 생성된 금속 나노입자의 색깔일 수 있다. 상기 검출하고자 하는 변이 유전자가 없는 시료에 대해 상기 방법을 수행하면, 제1 및 제2 혼성화 반응물이 생성되지 않을 수 있다. 제2 혼성화 반응물이 생성되지 않으면 환원제를 분해시키는 촉매 또는 효소가 작용하지 않아 환원제가 분해되지 않을 수 있다. 분해되지 않고 남아 있는 환원제는 농도가 높아 금속 이온 용액과 반응하여 변이 유전자가 있는 경우와 다른 색깔 및 흡광 특성을 가지는 금속 나노입자를 생성할 수 있다.
- [64] 상기 금속 나노입자의 색깔은 육안에 의해 확인할 수 있다. 일 구체예에 따른 방법에 의하면 육안으로 50 fM의 표적 물질에 대해서까지 유전자의 변이를 검출할 수 있다.
- [65] 상기 금속 나노입자의 색깔은 흡광도 측정에 의해 확인하는 것일 수 있다. 흡광도의 측정은 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 수행할 수 있고, 예를 들어 흡광도 측정 장치를 사용할 수 있다. 상기 흡광도는 450 내지 650 nm, 500 내지 600 nm, 예를 들어 550 nm에서 측정할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 일 구체예에 따른 방법에 의하면 흡광도 측정으로 5 fM의 표적 물질에 대해서까지 유전자의 변이를 검출할 수 있다.
- [66] 금속 나노입자는 일반적으로 검출한계가 낮은 반면, 일 구체예에 따른 방법에 의하면 촉매 또는 효소를 이용하여 특정 화합물의 농도를 조절하고, 그 화합물의 농도에 따라 색깔 및 흡광 특성이 다른 금속 나노입자를 생성할 수 있으므로, 육안으로도 펨토몰(femtomolar) 농도까지 검출이 가능한 바 검출한계가 매우 높다.

발명의 효과

- [67] 일 구체예에 따른 유전자의 변이를 검출하는 방법에 의하면, 별도의 검출 장비 없이도 유전자의 변이를 펨토몰 농도까지 고감도로 검출이 가능하므로, 조직, 혈액과 같은 다양한 시료에서 추출된 유전자의 특정 변이의 존재 여부를 확인하고, 이를 개인별 맞춤 치료 및 예후 모니터링에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [68] 도 1은 과산화수소의 농도가 각각 0, 15, 30, 45, 60, 75, 또는 90 μM 일 때, 금 이온 용액과 인큐베이션한 결과를 나타낸 사진이다.
- [69] 도 2는 과산화수소의 농도가 각각 0, 15, 30, 45, 60, 75, 또는 90 μM 일 때, 금 이온 용액과 인큐베이션 후, 550 nm에서 흡광도를 측정한 결과이다.
- [70] 도 3은 일 구체예에 따른 유전자 변이의 검출 방법을 나타낸 모식도이다.
- [71] 도 4는 카탈라제에 의한 과산화수소의 분해, 및 과산화수소에 의한 금 나노입자의 생성을 나타낸 도면이다 (Roberto de la Rica 등, Nature Nanotechnology, 2012, 7, 821-824).
- [72] 도 5는 변이가 있는 표적 (TM)과 변이가 없는 표적 (TW)의 농도에 따른 금 나노입자의 생성을 나타낸 사진이다.
- [73] 도 6은 변이가 있는 표적 (TM)과 변이가 없는 표적 (TW)의 농도에 따라 대조군 대비 흡광도 변화량을 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [74] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[75]

- [76] 실시예 1: 제1 프로브가 고정화된 고체 지지체의 제조

- [77] 자성 비드 (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1) 100 μl 를 에펜도르프 튜브에 넣고 자석을 이용해 용액을 제거하였다. 남은 비드에 세척 용액 100 μl (1X TE 버퍼, 1M NaCl)을 가하여 섞은 뒤 자석을 이용해 비드를 분리하고 용액을 제거하는 과정을 2회 반복하였다. 남은 비드에 세척 용액 150 μl 와 제1 프로브 10 μM 용액 50 μl 를 가한 뒤 상온에서 1시간 동안 혼합하였다. 여기에 블로커(Blocker) 100 μM 용액 10 μl 를 가하고 한 시간 더 혼합하였다. 다시 1mM 비오틴 용액 30 μl 를 가하고 한 시간 더 혼합하였다. 자석을 이용해 비드를 분리한 후, 남은 비드에 세척 용액 100 μl 를 가하여 섞은 뒤 자석을 이용해 비드를 분리하고 용액을 제거하는 과정을 2회 반복하였다. 남은 비드에 보관 용액 100 μl (1X TE 버퍼, 0.05% Tween 20)를 가하여 섞은 후, 자석을 이용해 비드를 분리한 뒤 용액을 제거하는 과정을 2회 반복하였다. 남은 비드에 보관 용액 100 μl 를 넣고 잘 섞은 뒤 냉장 보관하였다. 하기 표 1에 제1 프로브 서열 및 블로커 서열을 나타내었다.

- [78] [표1]

명칭	서열번호	서열
제1 프로브	1	5'-GGC CCG CCC AAA ATC TGT- Biotin 3'
블로커	2	5'-TTT TT-Biotin 3'

[79]

- [80] 실시예 2: 과산화수소 농도에 따라 생성된 금 나노입자의 흡광도 변화
- [81] 상기 실시예 1에서 제작된 비드 10 μ l를 혼성화 용액 (6 $\times$ SSC 및 0.05% Tween 20)에서 2시간 동안 인큐베이션 후, 3 $\times$ SSC로 세척하였다. 용액을 제거하고 6mM MES 버퍼에 들어있는 과산화수소(H_2O_2)를 각각 0, 15, 30, 45, 60, 75, 또는 90 μ M 농도로 넣었다. 1시간 동안 인큐베이션 후, 자석을 이용해 비드를 분리하고 남은 용액을 96-웰 플레이트로 옮겼다. 여기에 증류수에 금 이온을 용해시킨 금 이온 용액 (200 μ M)을 넣고, 1시간 동안 인큐베이션 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [82] 도 1은 과산화수소의 농도가 각각 0, 15, 30, 45, 60, 75, 또는 90 μ M일 때, 금 이온 용액과 인큐베이션한 결과를 나타낸 사진이다.
- [83] 도 2는 과산화수소의 농도가 각각 0, 15, 30, 45, 60, 75, 또는 90 μ M일 때, 금 이온 용액과 인큐베이션 후, 550 nm에서 흡광도를 측정한 결과이다.
- [84] 도 1 및 2에 나타낸 바와 같이, 과산화수소의 농도가 60 μ M 이하에서는 색깔의 차이가 보이며 550nm에서 흡광도가 증가하였다. 그러나, 과산화수소의 농도가 60 μ M 이상인 경우 색깔 변화 및 흡광도의 변화가 거의 일어나지 않았다.
- [85] 따라서, 과산화수소의 농도에 따라 금 나노입자의 물성 및 이에 따른 흡광도가 변화하는 것을 확인할 수 있었다.
- [86]
- [87] 실시예 3: 변이를 가지는 유전자의 검출
- [88] 상기 실시예 1에서 제작된 비드 10 μ l를 혼성화 용액 (6 $\times$ SSC 및 0.05% Tween 20) 50 μ l로 2회 세척하였다. 세척 후, 변이가 있는 표적 (Target Mutant: TM)과 변이가 없는 표적 (Target Wild: TW)을 각각 농도 별로 혼성화 용액(6 $\times$ SSC 및 0.05% Tween 20)과 혼합하여 50 μ l를 만든 후, 비드와 2시간 동안 15 $^{\circ}$ C에서 혼성화하였다. 3 $\times$ SSC 및 0.05% Tween 20 용액 50 μ l로 세척 후, 문헌(Anal. Chem. 2013, 85, 6945-6952)에 따라 합성된 카탈라제(catalase)를 스트렙토아비딘이 고정화된 나노입자와 결합된 제2 프로브와 1시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 혼성화하였다. 이때 혼성화 용액은 동일한 것을 사용하였다. 3 $\times$ SSC 용액 50 μ l로 세척 후 용액을 제거하고, 6mM MES 버퍼에 들어있는 60 μ M 과산화수소 용액 100 μ l를 넣었다. 1시간 동안 인큐베이션 후 용액을 96-웰 플레이트로 옮겼다. 여기에 증류수에 금 이온을 용해시킨 200 μ M 금 이온 용액 100 μ l를 넣고 1시간 동안 인큐베이션 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 변이가 있는 표적 (TM) 및 변이가 없는 표적 (TW)의 농도가 0 μ M인 것을 음성대조군으로 사용하였다. 하기 표 2에 변이가 있는 표적 (TM), 변이가 없는 표적 (TW), 및 제2 프로브의 서열을 나타내었다.

[89] [표2]

명칭	서열번호	서열
변이가 있는 표적 (TM)	3	5'-GGC GGG CCA AAC TGC T-3'
변이가 없는 표적 (TW)	4	5'-GGC TGG CCA AAC TGC T-3'
제2 프로브	5	5'Biotin - TTC CGC ACC CAG CAG TTT-3'

[90] 도 3은 일 구체예에 따른 유전자 변이의 검출 방법을 나타낸 모식도이다.

[91] 도 4는 카탈라제에 의한 과산화수소의 분해, 및 과산화수소에 의한 금 나노입자의 생성을 나타낸 도면이다.

[92] 도 5는 변이가 있는 표적 (TM)과 변이가 없는 표적 (TW)의 농도에 따른 금 나노입자의 생성을 나타낸 사진이다.

[93] 도 6은 변이가 있는 표적 (TM)과 변이가 없는 표적 (TW)의 농도에 따른 음성대조군 대비 흡광도 변화량을 나타낸 그래프이다. 이때, 음성대조군은 TM 및 TW의 농도가 0 μ M인 시험군이다.

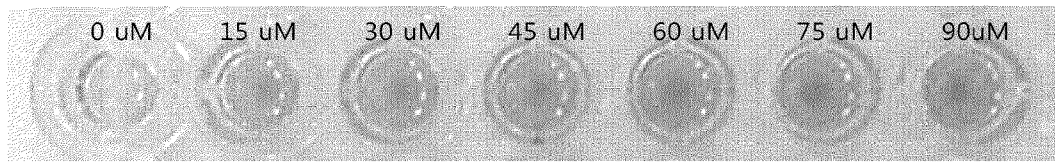
[94] 도 5 및 6에 나타낸 바와 같이, 육안으로 50fM까지 변이가 있는 표적 (TM)의 검출이 가능하였으며, 흡광도 측정으로는 5fM 수준까지 검출이 가능하였다.

청구범위

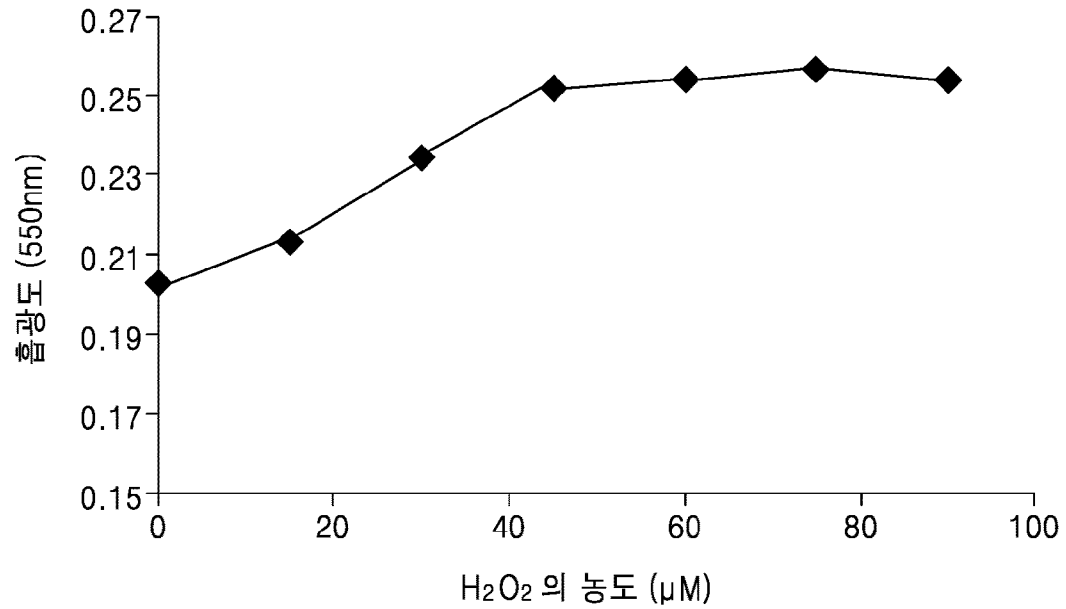
- [청구항 1] 변이 유전자의 변이 부분을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 고체 지지체에 고정화된 제1 프로브를 표적 물질과 접촉시켜 제1 혼성화 반응시키는 단계;
상기 변이 유전자의 변이 부분을 포함하지 않는 뉴클레오티드 서열에 상보적이고, 환원제를 산화시키는 촉매 또는 효소가 연결된 제2 프로브를 상기 제1 혼성화 반응물과 접촉시켜 제2 혼성화 반응시키는 단계;
상기 제2 혼성화 반응물에 환원제를 접촉시켜 상기 촉매 또는 효소에 의해 상기 환원제를 산화시키는 단계;
산화 후 남아있는 환원제를 금속 이온 용액과 접촉시켜 금속 나노입자를 생성하는 단계; 및
상기 생성된 금속 나노입자의 색깔을 대조군과 비교하여 유전자의 변이가 존재하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 유전자의 변이를 검출하는 방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 고체 지지체는 자성 비드, 실리카 비드, 또는 고분자 비드인 것인 방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 제1 및 제2 프로브는 각각 DNA, RNA, PNA, 또는 LNA인 것인 방법.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 표적 물질은 생물학적 시료로부터 추출한 핵산인 것인 방법.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 뇨인 것인 방법.
- [청구항 6] 청구항 4에 있어서, 상기 핵산은 DNA, 또는 RNA인 것인 방법.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 환원제는 시트르산나트륨, 아스코르브산나트륨, 하이드로퀴논, 테트라히드로붕산나트륨, 글루코스, 또는 과산화수소인 것인 방법.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 환원제를 산화시키는 효소는 카탈라제 (catalase), 옥시다제 (oxidase), 또는 페록시다제 (peroxidase)인 것인 방법.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 제2 프로브는 상기 환원제를 산화시키는 촉매 또는 효소가 고정화된 나노입자에 고정화된 것인 방법.
- [청구항 10] 청구항 1에 있어서, 제2 혼성화 반응 후, 고염 용액으로 세척하는 단계를 더 포함하는 방법.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 고염 용액은 SSC (saline sodium citrate), 또는 PBS (phosphate buffer saline)인 것인 방법.
- [청구항 12] 청구항 1에 있어서, 상기 제2 혼성화 반응물에 접촉시키는 환원제의 농도는 1 내지 100 μ M인 것인 방법.
- [청구항 13] 청구항 1에 있어서, 상기 제2 혼성화 반응물에 접촉시키는 환원제는 MES

- (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 버퍼에 용해된 것인 방법.
- [청구항 14] 청구항 1에 있어서, 상기 금속 이온 용액은 금 이온 용액, 또는 은 이온 용액인 것인 방법.
- [청구항 15] 청구항 1에 있어서, 상기 금속 나노입자는 금 나노입자, 또는 은 나노입자인 것인 방법.
- [청구항 16] 청구항 1에 있어서, 상기 대조군은 검출하고자 하는 변이 유전자가 없는 시료에 대해 동일한 단계들을 수행하여 생성된 금속 나노입자의 색깔인 것인 방법.
- [청구항 17] 청구항 1에 있어서, 상기 금속 나노입자의 색깔은 육안에 의해 확인하는 것인 방법.
- [청구항 18] 청구항 1에 있어서, 상기 금속 나노입자의 색깔은 흡광도 측정에 의해 확인하는 것인 방법.

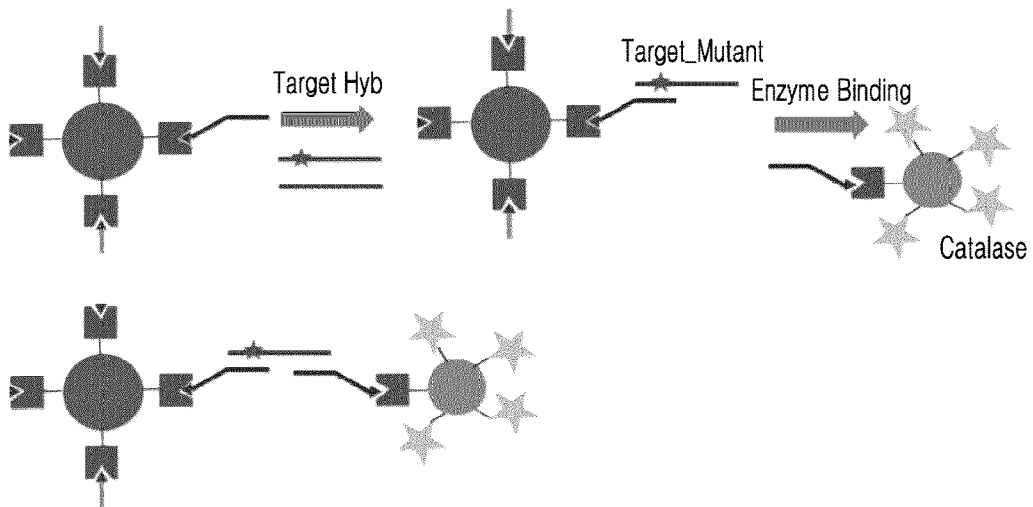
[도1]



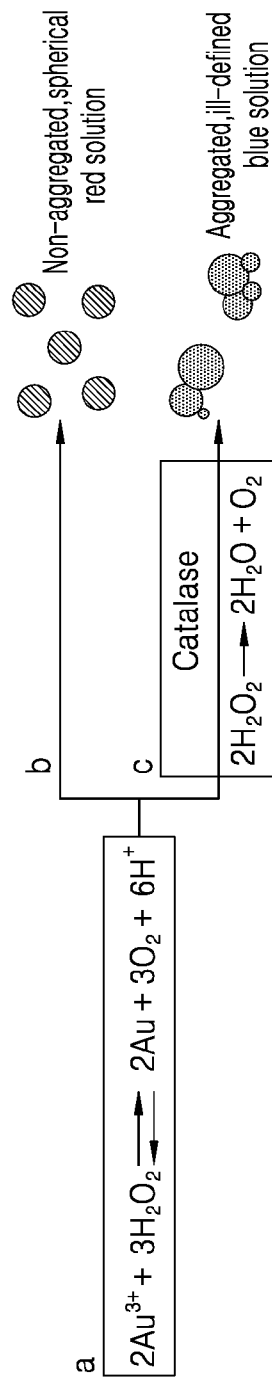
[도2]



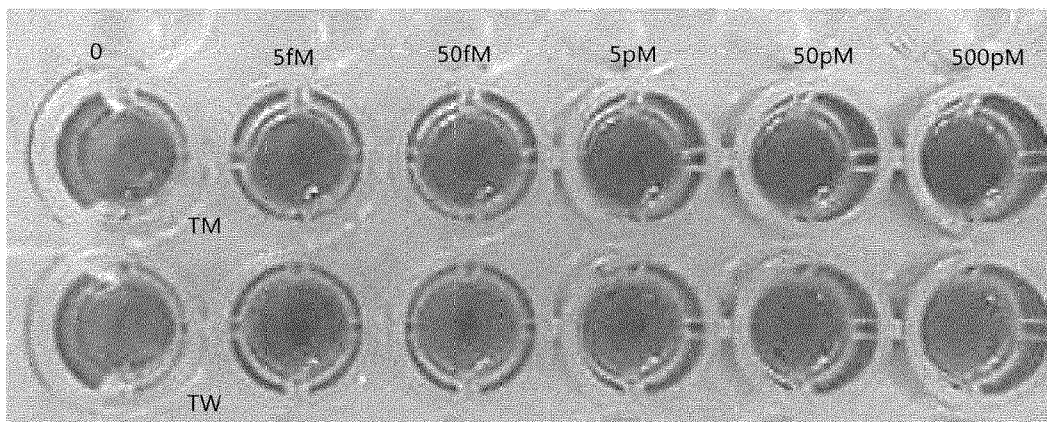
[도3]



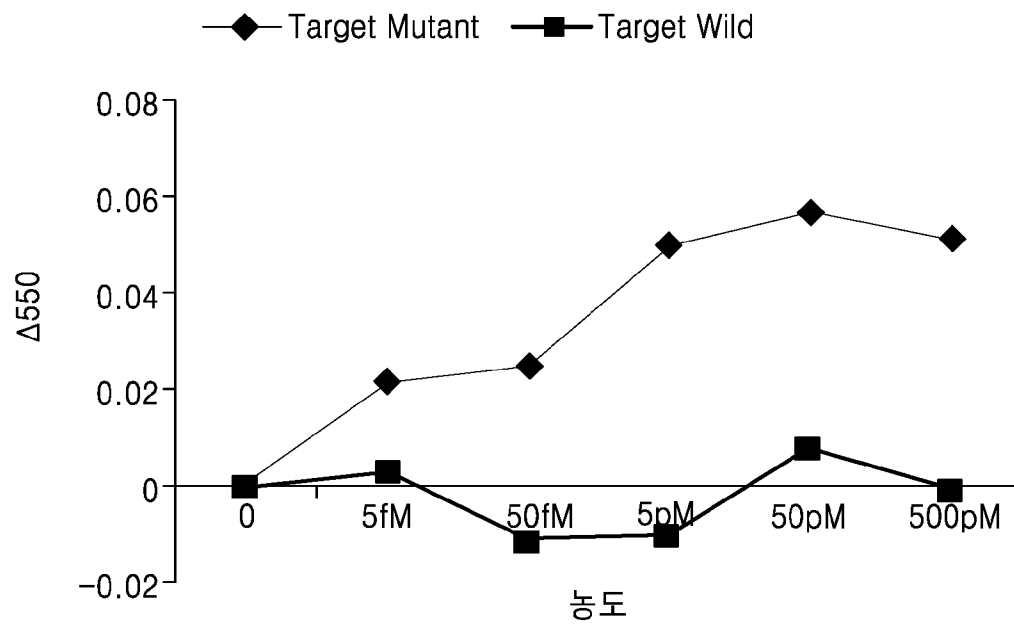
[도4]



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/007022

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6834(2018.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6834; B82Y 15/00; C12Q 1/68; G01N 21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: mutant gene, nucleotides, support body, probe, hybridization, reducing agent, catalyst, enzyme, oxidation, metal nanoparticle, detection, color, sample

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2013-0065159 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 19 June 2013 See paragraphs [0024], [0039]-[0040]; claims 1, 9; figures 1, 5; and table 1.	1-18
Y	DE LA RICA, Roberto et al., "Plasmonic ELISA for the Ultrasensitive Detection of Disease Biomarkers with the Naked Eye", Nature Nanotechnology, 2012, vol. 7, no. 12, pages 821-824 See page 821; and figures 1-3.	1-18
A	KR 10-2014-0097679 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 07 August 2014 See abstract; claims 1-8 and figures 1-2.	1-18
A	JP 4347049 B2 (NANOSPHERE INC.) 21 October 2009 See abstract; and claims 1-16.	1-18
A	US 2010-0075335 A1 (RAMOS FRANCO TAVARES, Jose Ricardo et al.) 25 March 2010 See abstract; and claims 1-25.	1-18
A	CHEN, Feng et al., "Catalase-functionalized SiO ₂ Nanoparticles Mediate Growth of Gold Nanoparticles for Plasmonic Biosensing of Attomolar MicroRNA with the Naked Eye", 2016, vol. 6, no. 19, pages 15709-15715 See abstract; and page 15711.	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 NOVEMBER 2018 (02.11.2018)

Date of mailing of the international search report

02 NOVEMBER 2018 (02.11.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/007022

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0065159 A	19/06/2013	NONE	
KR 10-2014-0097679 A	07/08/2014	KR 10-1488436 B1	04/02/2015
JP 4347049 B2	21/10/2009	AU 2000-56378 A1	31/01/2001
		AU 2000-56378 B2	19/01/2006
		AU 2001-32795 A1	24/07/2001
		AU 2001-32795 B2	01/07/2004
		AU 2001-55203 A1	08/10/2001
		AU 2001-81248 A1	13/03/2002
		AU 2002-30593 A1	18/06/2002
		AU 2002-363062 B2	22/03/2007
		AU 2004-254367 A1	13/01/2005
		AU 2004-254367 B2	19/06/2008
		AU 2005-325273 A1	27/07/2006
		AU 2005-325273 B2	02/07/2009
		AU 2006-200261 A1	09/02/2006
		AU 2006-200274 A1	09/02/2006
		AU 2007-202906 A1	12/07/2007
		AU 2010-202492 A1	08/07/2010
		AU 774593 B2	01/07/2004
		CA 02262018 A1	05/02/1998
		CA 02376623 A1	04/01/2001
		CA 02396113 A1	19/07/2001
		CA 02402955 A1	04/10/2001
		CA 02418502 A1	07/03/2002
		CA 02463323 A1	01/05/2003
		CA 02529898 A1	13/01/2005
		CA 02565166 A1	27/07/2006
		CA 2376623 C	19/04/2011
		CA 2396113 C	07/04/2009
		CA 2402955 C	09/03/2010
		CN 101001960 A	18/07/2007
		CN 101198707 A	11/06/2008
		EP 0918885 A1	11/12/2002
		EP 0918885 B1	11/04/2007
		EP 1198591 A1	24/04/2002
		EP 1198591 B1	16/03/2011
		EP 1294930 A2	26/03/2003
		EP 1294930 B1	30/03/2011
		EP 1301625 A2	16/04/2003
		EP 1301625 B1	03/11/2010
		EP 1356109 A2	29/10/2003
		EP 1362121 A2	19/11/2003
		EP 1379693 A2	14/01/2004
		EP 1379693 B1	20/05/2009
		EP 1478774 A2	24/11/2004
		EP 1649055 A2	26/04/2006
		EP 1649055 B1	20/05/2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/007022

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		EP 1747295 A2	31/01/2007
		EP 1747295 B1	11/01/2012
		EP 1818417 A2	15/08/2007
		EP 1818417 A3	20/01/2010
		EP 1818417 B1	12/02/2014
		JP 2000-516460 A	12/12/2000
		JP 2003-503699 A	28/01/2003
		JP 2004-194669 A	15/07/2004
		JP 2004-501340 A	15/01/2004
		JP 2004-515208 A	27/05/2004
		JP 2004-525607 A	26/08/2004
		JP 2005-514900 A	26/05/2005
		JP 2005-525084 A	25/08/2005
		JP 2006-288406 A	26/10/2006
		JP 2007-525970 A	13/09/2007
		JP 2007-537450 A	20/12/2007
		JP 2008-000143 A	10/01/2008
		JP 2008-029351 A	14/02/2008
		JP 2008-067711 A	27/03/2008
		JP 4146239 B2	10/09/2008
		JP 4245664 B2	25/03/2009
		US 2002-0127574 A1	12/09/2002
		US 2002-0137058 A1	26/09/2002
		US 2002-0137070 A1	26/09/2002
		US 2002-0137071 A1	26/09/2002
		US 2002-0137072 A1	26/09/2002
		US 2002-0146720 A1	10/10/2002
		US 2002-0155442 A1	24/10/2002
		US 2002-0155458 A1	24/10/2002
		US 2002-0155459 A1	24/10/2002
		US 2002-0155461 A1	24/10/2002
		US 2002-0155462 A1	24/10/2002
		US 2002-0160381 A1	31/10/2002
		US 2002-0164605 A1	07/11/2002
		US 2002-0172953 A1	21/11/2002
		US 2002-0182611 A1	05/12/2002
		US 2002-0182613 A1	05/12/2002
		US 2002-0192687 A1	19/12/2002
		US 2003-0022169 A1	30/01/2003
		US 2003-0044805 A1	06/03/2003
		US 2003-0049630 A1	13/03/2003
		US 2003-0049631 A1	13/03/2003
		US 2003-0054358 A1	20/03/2003
		US 2003-0059777 A1	27/03/2003
		US 2003-0068622 A1	10/04/2003
		US 2003-0087242 A1	08/05/2003
		US 2003-0124528 A1	03/07/2003
		US 2003-0143538 A1	31/07/2003
		US 2003-0148282 A1	07/08/2003
		US 2003-0180783 A1	25/09/2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/007022

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2003-0207296 A1	06/11/2003
		US 2004-0072231 A1	15/04/2004
		US 2004-0110220 A1	10/06/2004
		US 2004-0219520 A1	04/11/2004
		US 2005-0037397 A1	17/02/2005
		US 2006-0040286 A1	23/02/2006
		US 2006-0051798 A1	09/03/2006
		US 2006-0068378 A1	30/03/2006
		US 2009-0325812 A1	31/12/2009
		US 2010-0081134 A1	01/04/2010
		US 6361944 B1	26/03/2002
		US 6417340 B1	09/07/2002
		US 6495324 B1	17/12/2002
		US 6506564 B1	14/01/2003
		US 6582921 B2	24/06/2003
		US 6610491 B2	26/08/2003
		US 6645721 B2	11/11/2003
		US 6673548 B2	06/01/2004
		US 6677122 B2	13/01/2004
		US 6682895 B2	27/01/2004
		US 6709825 B2	23/03/2004
		US 6720147 B2	13/04/2004
		US 6720411 B2	13/04/2004
		US 6730269 B2	04/05/2004
		US 6740491 B2	25/05/2004
		US 6750016 B2	15/06/2004
		US 6759199 B2	06/07/2004
		US 6767702 B2	27/07/2004
		US 6773884 B2	10/08/2004
		US 6777186 B2	17/08/2004
		US 6812334 B1	02/11/2004
		US 6818753 B2	16/11/2004
		US 6828432 B2	07/12/2004
		US 6861221 B2	01/03/2005
		US 6878814 B2	12/04/2005
		US 6902895 B2	07/06/2005
		US 6903207 B2	07/06/2005
		US 6962786 B2	08/11/2005
		US 6969761 B2	29/11/2005
		US 6974669 B2	13/12/2005
		US 6984491 B2	10/01/2006
		US 6986989 B2	17/01/2006
		US 7098320 B1	29/08/2006
		US 7169556 B2	30/01/2007
		US 7208587 B2	24/04/2007
		US 7250499 B2	31/07/2007
		US 7259252 B2	21/08/2007
		US 7323309 B2	29/01/2008
		US 8323888 B2	04/12/2012
		WO 01-00876 A1	04/01/2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/007022

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		WO 01-00876 A9	26/07/2001
		WO 01-51665 A2	19/07/2001
		WO 01-51665 A3	30/01/2003
		WO 01-73123 A2	04/10/2001
		WO 01-73123 A3	01/08/2002
		WO 01-73123 B1	04/03/2004
		WO 02-079490 A2	10/10/2002
		WO 02-079490 A3	06/02/2003
		WO 02-18643 A2	07/03/2002
		WO 02-18643 A3	04/09/2003
		WO 03-035829 A2	01/05/2003
		WO 2005-003394 A2	13/01/2005
		WO 2005-003394 A3	28/07/2005
		WO 2006-078289 A2	27/07/2006
		WO 2006-078289 A3	08/02/2007
		WO 98-04740 A1	05/02/1998
US 2010-0075335 A1	25/03/2010	EP 2145023 A2	20/01/2010
		PT 103730 A	04/11/2008
		WO 2008-135929 A2	13/11/2008
		WO 2008-135929 A3	31/12/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6834(2018.01)i																							
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6834; B82Y 15/00; C12Q 1/68; G01N 21/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 변이 유전자, 뉴클레오티드, 지지체, 프로브, 혼성화, 환원제, 촉매, 효소, 산화, 금속 나노입자, 검출, 색깔, 시료																							
C. 관련 문헌 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">카테고리*</th> <th style="width: 70%;">인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th style="width: 20%;">관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>KR 10-2013-0065159 A (고려대학교 산학협력단) 2013.06.19 단락 [0024],[0039]-[0040]; 청구항 1,9; 도면 1,5; 및 표 1 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>DE LA RICA, ROBERTO 등, "Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye", Nature Nanotechnology, 2012, 7권, 12호, 페이지 821-824 페이지 821; 및 도면 1-3 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>KR 10-2014-0097679 A (고려대학교 산학협력단) 2014.08.07 요약; 청구항 1-8; 및 도면 1-2 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>JP 4347049 B2 (NANOSPHERE INC.) 2009.10.21 요약; 및 청구항 1-16 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>US 2010-0075335 A1 (RAMOS FRANCO TAVARES, JOSE RICARDO 등) 2010.03.25 요약; 및 청구항 1-25 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>CHEN, FENG 등, "Catalase-functionalized SiO2 nanoparticles mediate growth of gold nanoparticles for plasmonic biosensing of attomolar microRNA with the naked eye", 2016, 6권, 19호, 페이지 15709-15715 요약; 및 페이지 15711 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-18</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	Y	KR 10-2013-0065159 A (고려대학교 산학협력단) 2013.06.19 단락 [0024],[0039]-[0040]; 청구항 1,9; 도면 1,5; 및 표 1 참조.	1-18	Y	DE LA RICA, ROBERTO 등, "Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye", Nature Nanotechnology, 2012, 7권, 12호, 페이지 821-824 페이지 821; 및 도면 1-3 참조.	1-18	A	KR 10-2014-0097679 A (고려대학교 산학협력단) 2014.08.07 요약; 청구항 1-8; 및 도면 1-2 참조.	1-18	A	JP 4347049 B2 (NANOSPHERE INC.) 2009.10.21 요약; 및 청구항 1-16 참조.	1-18	A	US 2010-0075335 A1 (RAMOS FRANCO TAVARES, JOSE RICARDO 등) 2010.03.25 요약; 및 청구항 1-25 참조.	1-18	A	CHEN, FENG 등, "Catalase-functionalized SiO2 nanoparticles mediate growth of gold nanoparticles for plasmonic biosensing of attomolar microRNA with the naked eye", 2016, 6권, 19호, 페이지 15709-15715 요약; 및 페이지 15711 참조.	1-18
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																					
Y	KR 10-2013-0065159 A (고려대학교 산학협력단) 2013.06.19 단락 [0024],[0039]-[0040]; 청구항 1,9; 도면 1,5; 및 표 1 참조.	1-18																					
Y	DE LA RICA, ROBERTO 등, "Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye", Nature Nanotechnology, 2012, 7권, 12호, 페이지 821-824 페이지 821; 및 도면 1-3 참조.	1-18																					
A	KR 10-2014-0097679 A (고려대학교 산학협력단) 2014.08.07 요약; 청구항 1-8; 및 도면 1-2 참조.	1-18																					
A	JP 4347049 B2 (NANOSPHERE INC.) 2009.10.21 요약; 및 청구항 1-16 참조.	1-18																					
A	US 2010-0075335 A1 (RAMOS FRANCO TAVARES, JOSE RICARDO 등) 2010.03.25 요약; 및 청구항 1-25 참조.	1-18																					
A	CHEN, FENG 등, "Catalase-functionalized SiO2 nanoparticles mediate growth of gold nanoparticles for plasmonic biosensing of attomolar microRNA with the naked eye", 2016, 6권, 19호, 페이지 15709-15715 요약; 및 페이지 15711 참조.	1-18																					
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																							
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																							
국제조사의 실제 완료일 2018년 11월 02일 (02.11.2018)		국제조사보고서 발송일 2018년 11월 02일 (02.11.2018)																					
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516 																					

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0065159 A	2013/06/19	없음	
KR 10-2014-0097679 A	2014/08/07	KR 10-1488436 B1	2015/02/04
JP 4347049 B2	2009/10/21	AU 2000-56378 A1	2001/01/31
		AU 2000-56378 B2	2006/01/19
		AU 2001-32795 A1	2001/07/24
		AU 2001-32795 B2	2004/07/01
		AU 2001-55203 A1	2001/10/08
		AU 2001-81248 A1	2002/03/13
		AU 2002-30593 A1	2002/06/18
		AU 2002-363062 B2	2007/03/22
		AU 2004-254367 A1	2005/01/13
		AU 2004-254367 B2	2008/06/19
		AU 2005-325273 A1	2006/07/27
		AU 2005-325273 B2	2009/07/02
		AU 2006-200261 A1	2006/02/09
		AU 2006-200274 A1	2006/02/09
		AU 2007-202906 A1	2007/07/12
		AU 2010-202492 A1	2010/07/08
		AU 774593 B2	2004/07/01
		CA 02262018 A1	1998/02/05
		CA 02376623 A1	2001/01/04
		CA 02396113 A1	2001/07/19
		CA 02402955 A1	2001/10/04
		CA 02418502 A1	2002/03/07
		CA 02463323 A1	2003/05/01
		CA 02529898 A1	2005/01/13
		CA 02565166 A1	2006/07/27
		CA 2376623 C	2011/04/19
		CA 2396113 C	2009/04/07
		CA 2402955 C	2010/03/09
		CN 101001960 A	2007/07/18
		CN 101198707 A	2008/06/11
		EP 0918885 A1	2002/12/11
		EP 0918885 B1	2007/04/11
		EP 1198591 A1	2002/04/24
		EP 1198591 B1	2011/03/16
		EP 1294930 A2	2003/03/26
		EP 1294930 B1	2011/03/30
		EP 1301625 A2	2003/04/16
		EP 1301625 B1	2010/11/03
		EP 1356109 A2	2003/10/29
		EP 1362121 A2	2003/11/19
		EP 1379693 A2	2004/01/14
		EP 1379693 B1	2009/05/20
		EP 1478774 A2	2004/11/24
		EP 1649055 A2	2006/04/26
		EP 1649055 B1	2009/05/20

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		EP 1747295 A2	2007/01/31
		EP 1747295 B1	2012/01/11
		EP 1818417 A2	2007/08/15
		EP 1818417 A3	2010/01/20
		EP 1818417 B1	2014/02/12
		JP 2000-516460 A	2000/12/12
		JP 2003-503699 A	2003/01/28
		JP 2004-194669 A	2004/07/15
		JP 2004-501340 A	2004/01/15
		JP 2004-515208 A	2004/05/27
		JP 2004-525607 A	2004/08/26
		JP 2005-514900 A	2005/05/26
		JP 2005-525084 A	2005/08/25
		JP 2006-288406 A	2006/10/26
		JP 2007-525970 A	2007/09/13
		JP 2007-537450 A	2007/12/20
		JP 2008-000143 A	2008/01/10
		JP 2008-029351 A	2008/02/14
		JP 2008-067711 A	2008/03/27
		JP 4146239 B2	2008/09/10
		JP 4245664 B2	2009/03/25
		US 2002-0127574 A1	2002/09/12
		US 2002-0137058 A1	2002/09/26
		US 2002-0137070 A1	2002/09/26
		US 2002-0137071 A1	2002/09/26
		US 2002-0137072 A1	2002/09/26
		US 2002-0146720 A1	2002/10/10
		US 2002-0155442 A1	2002/10/24
		US 2002-0155458 A1	2002/10/24
		US 2002-0155459 A1	2002/10/24
		US 2002-0155461 A1	2002/10/24
		US 2002-0155462 A1	2002/10/24
		US 2002-0160381 A1	2002/10/31
		US 2002-0164605 A1	2002/11/07
		US 2002-0172953 A1	2002/11/21
		US 2002-0182611 A1	2002/12/05
		US 2002-0182613 A1	2002/12/05
		US 2002-0192687 A1	2002/12/19
		US 2003-0022169 A1	2003/01/30
		US 2003-0044805 A1	2003/03/06
		US 2003-0049630 A1	2003/03/13
		US 2003-0049631 A1	2003/03/13
		US 2003-0054358 A1	2003/03/20
		US 2003-0059777 A1	2003/03/27
		US 2003-0068622 A1	2003/04/10
		US 2003-0087242 A1	2003/05/08
		US 2003-0124528 A1	2003/07/03
		US 2003-0143538 A1	2003/07/31
		US 2003-0148282 A1	2003/08/07
		US 2003-0180783 A1	2003/09/25

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2003-0207296 A1	2003/11/06
		US 2004-0072231 A1	2004/04/15
		US 2004-0110220 A1	2004/06/10
		US 2004-0219520 A1	2004/11/04
		US 2005-0037397 A1	2005/02/17
		US 2006-0040286 A1	2006/02/23
		US 2006-0051798 A1	2006/03/09
		US 2006-0068378 A1	2006/03/30
		US 2009-0325812 A1	2009/12/31
		US 2010-0081134 A1	2010/04/01
		US 6361944 B1	2002/03/26
		US 6417340 B1	2002/07/09
		US 6495324 B1	2002/12/17
		US 6506564 B1	2003/01/14
		US 6582921 B2	2003/06/24
		US 6610491 B2	2003/08/26
		US 6645721 B2	2003/11/11
		US 6673548 B2	2004/01/06
		US 6677122 B2	2004/01/13
		US 6682895 B2	2004/01/27
		US 6709825 B2	2004/03/23
		US 6720147 B2	2004/04/13
		US 6720411 B2	2004/04/13
		US 6730269 B2	2004/05/04
		US 6740491 B2	2004/05/25
		US 6750016 B2	2004/06/15
		US 6759199 B2	2004/07/06
		US 6767702 B2	2004/07/27
		US 6773884 B2	2004/08/10
		US 6777186 B2	2004/08/17
		US 6812334 B1	2004/11/02
		US 6818753 B2	2004/11/16
		US 6828432 B2	2004/12/07
		US 6861221 B2	2005/03/01
		US 6878814 B2	2005/04/12
		US 6902895 B2	2005/06/07
		US 6903207 B2	2005/06/07
		US 6962786 B2	2005/11/08
		US 6969761 B2	2005/11/29
		US 6974669 B2	2005/12/13
		US 6984491 B2	2006/01/10
		US 6986989 B2	2006/01/17
		US 7098320 B1	2006/08/29
		US 7169556 B2	2007/01/30
		US 7208587 B2	2007/04/24
		US 7250499 B2	2007/07/31
		US 7259252 B2	2007/08/21
		US 7323309 B2	2008/01/29
		US 8323888 B2	2012/12/04
		WO 01-00876 A1	2001/01/04

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2018/007022

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		WO 01-00876 A9	2001/07/26
		WO 01-51665 A2	2001/07/19
		WO 01-51665 A3	2003/01/30
		WO 01-73123 A2	2001/10/04
		WO 01-73123 A3	2002/08/01
		WO 01-73123 B1	2004/03/04
		WO 02-079490 A2	2002/10/10
		WO 02-079490 A3	2003/02/06
		WO 02-18643 A2	2002/03/07
		WO 02-18643 A3	2003/09/04
		WO 03-035829 A2	2003/05/01
		WO 2005-003394 A2	2005/01/13
		WO 2005-003394 A3	2005/07/28
		WO 2006-078289 A2	2006/07/27
		WO 2006-078289 A3	2007/02/08
		WO 98-04740 A1	1998/02/05
US 2010-0075335 A1	2010/03/25	EP 2145023 A2	2010/01/20
		PT 103730 A	2008/11/04
		WO 2008-135929 A2	2008/11/13
		WO 2008-135929 A3	2008/12/31