(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0059341
(43) 공개일자 2025년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 33/553* (2006.01)
G01N 33/563 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54326 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0146312
(22) 출원일자 2024년10월24일
심사청구일자 2024년10월24일
(30) 우선권주장
1020230143126 2023년10월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이재범
경기도 화성시 동탄순환대로21길 54, 1331동 204호(청계동, 동탄역 센트럴 푸르지오)
원유광
대전광역시 유성구 유성대로822번길 29, 401호 (장대동)
원미지
대전광역시 유성구 유성대로822번길 29, 401호 (장대동)
(74) 대리인
특허법인오암

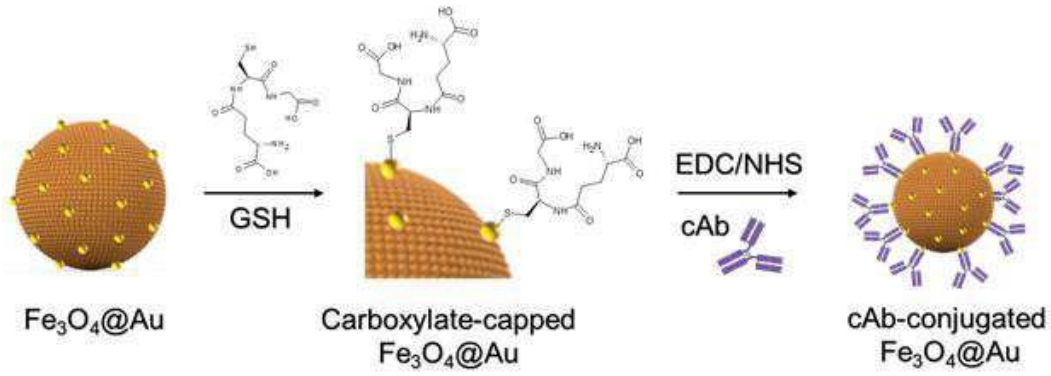
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **마그네토플라즈모닉 나노비드 기반 면역분석 입자와 이의 제조 방법, 및 이를 포함하는 키트**

(57) 요 약

본 발명은 산화철 나노입자 코어 및 상기 코어의 표면에 다수의 금 나노입자가 위성(satellite) 구조로 배치된 마그네토플라즈모닉 나노비드; 및 상기 금 나노입자 상에 공유 결합되며, 표적항원을 선택적으로 인식하여 결합하는 포획항체;를 포함하는 면역분석 입자와 이의 제조 방법, 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/553 (2013.01)
G01N 33/563 (2019.05)
G01N 2470/04 (2021.08)
G01N 2800/26 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1425177425
과제번호 S3371263
부처명 중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명 중소기업기술정보진흥원
연구사업명 지역특화산업육성+(R&D)
연구과제명 마그네토플라즈모닉 나노입자 기반 패혈증 진단기기 및 마이데이타 플랫폼 개발
과제수행기관명 (주)그레비티
연구기간 2023.04.01 ~ 2024.03.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415187310
과제번호 20025720
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술기획평가원
연구사업명 나노융합혁신제품기술개발사업
연구과제명 키랄성 나노구조체를 이용한 바이오 센싱 디바이스 기술 개발
과제수행기관명 ㈜이안하이텍
연구기간 2024.01.01 ~ 2024.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2710003661
과제번호 00333541
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 0~2D-FeSe 층상구조의 비정상적인 밴드갭 불안정성 및 이 특성을 이용한 센싱, 에너지 응용 가능성 탐구
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2024.05.01 ~ 2029.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

산화철 나노입자 코어 및 상기 코어의 표면에 다수의 금 나노입자가 위성(satellite) 구조로 배치된 마그네토플라즈모닉 나노비드; 및

상기 금 나노입자 상에 공유 결합되며, 표적항원을 선택적으로 인식하여 결합하는 포획항체;

를 포함하는 면역분석 입자.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 산화철 나노입자의 평균 직경은 100 내지 500 ㎚이고, 금 나노입자의 평균 직경은 1 내지 50 ㎚인, 면역분석 입자.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 면역분석 입자는 패혈증 진단용인, 면역분석 입자.

청구항 4

제 1항, 제 2항 또는 제 3항의 면역분석 입자를 포함하는, 키트.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 키트는 상기 표적항원을 선택적으로 인식하여 결합하며, 형광 표지되거나 또는 효소가 결합된 표지항체를 더 포함하는 것인, 키트.

청구항 6

제 1항, 제 2항 또는 제 3항의 면역분석 입자의 제조 방법으로,

a) 산화철 나노입자 분산액에 금 전구체 용액 및 표면안정제 용액을 첨가하여 반응용액을 준비하는 단계;

b) 상기 반응용액의 온도를 0 내지 20℃로 낮추고 환원제 용액을 첨가하고 초음파 처리하여 마그네토플라즈모닉 나노비드를 제조하는 단계;

c) 상기 금 나노입자의 표면을 카르복실기로 기능화시키는 단계; 및

d) 상기 기능화된 카르복실기에 포획항체를 공유 결합시키는 단계;

를 포함하는 면역분석 입자의 제조 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 금 전구체는 염화금, 염화금산, 염화금산칼륨, 염화금산나트륨, 브롬화금산칼륨, 브롬화금산나트륨 및 이들의 수화물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 면역분석 입자의 제조 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 금 전구체 용액의 농도는 0.01 내지 1 M인, 면역분석 입자의 제조 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 금 전구체는 산화철 나노입자 1 몰에 대하여 0.1 내지 10 몰로 첨가되는, 면역분석 입자의 제조 방법.

청구항 10

제 6항에 있어서,

상기 표면안정제는 구연산, 구연산나트륨, 구연산칼륨 및 구연산암모늄으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 면역분석 입자의 제조 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 표면안정제 용액의 농도는 1 내지 500 mM인, 면역분석 입자의 제조 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서,

상기 표면안정제는 산화철 나노입자 1 몰에 대하여 0.01 내지 5 몰로 첨가되는, 면역분석 입자의 제조 방법.

청구항 13

제 6항에 있어서,

상기 환원제는 수소화붕소나트륨, 수소화붕소알루미늄, 트리아세토붕소산나트륨, 시안화붕소화수소나트륨, 옥살산나트륨, 옥살산칼륨, 히드라진 및 히드로퀴논으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 면역분석 입자의 제조 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 환원제 용액의 농도는 0.01 내지 1 M인, 면역분석 입자의 제조 방법.

청구항 15

제 13항에 있어서,

상기 환원제는 산화철 나노입자 1 몰에 대하여 0.01 내지 5 몰로 첨가되는, 면역분석 입자의 제조 방법.

청구항 16

제 6항에 있어서,

상기 c) 단계는 글루타치온을 이용하여 수행되는, 면역분석 입자의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 마그네토플라즈모닉 나노비드 기반 면역분석 입자와 이의 제조 방법, 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 패혈증(Sepsis)은 신체가 감염에 대응하는 과정에서 생기는 과도한 면역 반응으로, 신체 조직과 장기에 손상을 일으킬 수 있는 생명을 위협하는 응급 질환이다. 감염이 혈류를 타고 전신으로 퍼지면 면역계가 극도로 활성화

되어 염증 반응을 유발하며, 이로 인해 혈압이 급격히 떨어지고 장기 기능 부전(organ failure)이 발생할 수 있다.

[0003] 이에 따라, 패혈증은 조기 진단과 신속한 치료가 생존율을 높이는 데 필수적이다. 패혈증을 조기에 발견하면 감염을 효과적으로 통제하고 장기 손상을 막을 수 있는 치료를 바로 시작할 수 있다.

[0004] 조기 진단의 핵심은 혈류에 나타나는 바이오마커(예: 인터루킨-6(IL-6), C-반응성 단백질(CRP), PCT(Procalcitonin) 등)를 빠르고 정확하게 검출하는 것이다.

[0005] 기존 패혈증 진단 방법으로는 혈액 배양 검사, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 등이 있으나, 상기 혈액 배양 검사는 감염 원인을 정확히 파악할 수 있지만 결과가 나오기까지 48시간에서 72시간 이상 소요될 수 있어 치료가 지연될 위험이 있고, PCR은 감염 원인균을 신속히 확인할 수 있지만, 비용이 높고 모든 감염원에 대해 적용 가능하지 않다는 단점이 있다.

[0006] 이에 따라, 간단한 방법으로 액체생 검체(소변, 혈액)로부터 패혈증 표적항원의 직접 검출이 가능하며, 진단 시간을 단축할 수 있는 패혈증 진단 방법의 개발이 여전히 필요한 실정이다.

[0007] 한편, 타켓 검출 방법에 대한 유사 선행문헌으로는 대한민국 등록특허공보 제10-1661315호가 제시되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-1661315호 (2016.10.04)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 본 발명은 간단한 방법으로 액체생 검체(소변, 혈액)로부터 패혈증 표적항원의 직접 검출이 가능하며, 진단 시간을 단축할 수 있는 마그네토플라즈모닉 나노비드 기반 면역분석 입자와 이의 제조 방법, 및 이를 포함하는 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 다만 상기 목적은 예시적인 것으로, 본 발명의 기술적 사상은 이에 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 양태는 산화철 나노입자 코어 및 상기 코어의 표면에 다수의 금 나노입자가 위성(satellite) 구조로 배치된 마그네토플라즈모닉 나노비드; 및 상기 금 나노입자 상에 공유결합되며, 표적항원을 선택적으로 인식하여 결합하는 포획항체;를 포함하는 면역분석 입자에 관한 것이다.

[0012] 상기 일 양태에 있어, 상기 산화철 나노입자의 평균 직경은 100 내지 500 ㎚이고, 금 나노입자의 평균 직경은 1 내지 50 ㎚일 수 있다.

[0013] 상기 일 양태에 있어, 상기 면역분석 입자는 패혈증 진단용일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 일 양태는 전술한 면역분석 입자를 포함하는, 키트에 관한 것이다.

[0015] 상기 다른 일 양태에 있어, 상기 키트는 상기 표적항원을 선택적으로 인식하여 결합하며, 형광 표지되거나 또는 효소가 결합된 표지항체를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 또 다른 일 양태는 전술한 면역분석 입자의 제조 방법으로,

[0017] a) 산화철 나노입자 분산액에 금 전구체 용액 및 표면안정제 용액을 첨가하여 반응용액을 준비하는 단계; b) 상기 반응용액의 온도를 0 내지 20℃로 낮추고 환원제 용액을 첨가하고 초음파 처리하여 마그네토플라즈모닉 나노비드를 제조하는 단계; c) 상기 금 나노입자의 표면을 카르복실기로 기능화시키는 단계; 및 d) 상기 기능화된 카르복실기에 포획항체를 공유 결합시키는 단계;를 포함하는 면역분석 입자의 제조 방법에 관한 것이다.

[0018] 상기 또 다른 일 양태에 있어, 상기 금 전구체는 염화금, 염화금산, 염화금산칼륨, 염화금산나트륨, 브롬화금산

칼륨, 브롬화금산나트륨 및 이들의 수화물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0019] 상기 또 다른 일 양태에 있어, 상기 금 전구체 용액의 농도는 0.01 내지 1 M일 수 있다.

[0020] 상기 또 다른 일 양태에 있어, 상기 금 전구체는 산화철 나노입자 1 몰에 대하여 0.1 내지 10 몰로 첨가될 수 있다.

[0021] 상기 또 다른 일 양태에 있어, 상기 표면안정제는 구연산, 구연산나트륨, 구연산칼륨 및 구연산암모늄으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0022] 상기 또 다른 일 양태에 있어, 상기 표면안정제 용액의 농도는 1 내지 500 mM일 수 있다.

[0023] 상기 또 다른 일 양태에 있어, 상기 표면안정제는 산화철 나노입자 1 몰에 대하여 0.01 내지 5 몰로 첨가될 수 있다.

[0024] 상기 또 다른 일 양태에 있어, 상기 환원제는 수소화붕소나트륨, 수소화붕소알루미늄, 트리아세토붕소산나트륨, 시안화붕소화수소나트륨, 옥살산나트륨, 옥살산칼륨, 히드라진 및 히드로퀴논으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0025] 상기 또 다른 일 양태에 있어, 상기 환원제 용액의 농도는 0.01 내지 1 M일 수 있다.

[0026] 상기 또 다른 일 양태에 있어, 상기 환원제는 산화철 나노입자 1 몰에 대하여 0.01 내지 5 몰로 첨가될 수 있다.

[0027] 상기 또 다른 일 양태에 있어, 상기 c) 단계는 글루타치온을 이용하여 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따른 마그네토플라즈모닉 나노비드 기반 면역분석 입자는 자성과 플라즈모닉 특성을 갖춘 마그네토플라즈모닉 나노비드를 이용하여 높은 민감도와 특이성을 제공한다. IL-6와 같은 패혈증 바이오마커를 민감하게 검출할 수 있으며, 낮은 농도에서도 탐지가 가능하여 조기 진단에 유리하고, 포획항체가 금 나노입자에 공유 결합되어 특이적 항원 결합이 가능하고 비특이적 결합을 최소화하여 정확한 분석 결과를 제공한다.

[0029] 또한, 자성 코어를 사용하여 샘플 내에서 나노비드를 신속하게 분리 및 농축할 수 있어 빠른 분석이 가능하며, 이는 패혈증과 같은 응급 상황에서 매우 중요한 역할을 한다.

[0030] 또한, 형광, 화학발광, 비색과 같은 다양한 검출 방식을 선택적으로 사용할 수 있어, 분석 환경에 따라 최적의 검출 방법을 적용할 수 있으며, 기존의 PCR 등의 고가 분자 진단법보다 비용 효율적이고, 제조 공정이 간단하여 추가 장비 없이도 진단이 가능하며, 현장 진단에 적합한 키트 형태로 제공될 수 있어 사용 편의성이 높다.

[0031] 나아가, 혈액, 혈장, 소변 등 다양한 생체 시료에서 바이오마커를 검출할 수 있어, 패혈증을 포함한 여러 질병의 진단에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 발명의 일 예에 따른 마그네토플라즈모닉 나노비드 기반 면역분석 입자의 제조 방법을 간략하게 도시한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 예에 따른 면역분석 입자의 샌드위치 면역 분석 구조를 간략하게 도시한 것이다.

도 3은 본 발명의 일 예에 따른 마그네토플라즈모닉 나노비드의 제조 방법을 간략하게 도시한 것이다.

도 4는 제조예 1에 따른 산화철 나노입자(좌)와 마그네토플라즈모닉 나노비드(우)의 주사전자현미경(SEM) 이미지이며, 삽입도는 투과전자현미경(TEM) 이미지이다.

도 5는 제조예 1에 따른 산화철 나노입자(검은 실선)와 마그네토플라즈모닉 나노비드(붉은 점선)의 자외선-가시광선 분광(UV-Vis spectroscopy) 분석 그래프이다.

도 6은 제조예 1에 따른 금 코팅 전 산화철 나노입자의 SEM 이미지이다.

도 7은 제조예 1에 따른 금 코팅 후 마그네토플라즈모닉 나노비드의 SEM 이미지이다.

도 8은 제조예 1에 따른 금 코팅 전 산화철 나노입자의 TEM 이미지이다.

도 9 및 10은 각각 제조예 1에 따른 금 코팅 후 마그네토플라즈모닉 나노비드의 TEM 이미지이다.

도 11은 제조예 2에 따른 각 성분 용액의 용량을 증량시켜 제조된 마그네토플라즈모닉 나노비드의 SEM 이미지이다.

도 12는 제조예 1, 3 및 4에 따른 서로 다른 금 전구체 농도로 제조된 마그네토플라즈모닉 나노비드의 SEM 이미지이다.

도 13은 각각 비교제조예 1(25℃) 또는 제조예 1(10℃)에 따른 온도 조건에서 환원제 용액을 첨가하여 제조된 마그네토플라즈모닉 나노비드의 SEM 이미지이다.

도 14는 샌드위치 면역 분석을 이용한 질병 특이적 항원의 포획, 분리, 농축 및 검출 과정을 두 단계로 나누어 도시한 것이다.

도 15는 ECL 기질을 사용하여 IL-6 항원을 검출하는 과정(좌)과 루미놀 기반 ECL 반응에서 발생한 청색 화학발광의 PL 스펙트럼(우)을 나타낸 것이다.

도 16 내지 18은 IL-6 항원의 농도에 따른 신호 강도와 선형 범위를 나타낸 그래프이다.

도 19는 Fe_3O_4@Au 나노자임(NZs)의 농도가 IL-6 검출 민감도에 미치는 영향을 비교한 도면이다.

도 20은 ECL 기질을 추가한 후 IL-6 농도에 따른 신호 강도의 시각적 변화를 나타낸 도면이다.

도 21은 비오틴-결합된 항-IL-6 항체의 양이 IL-6 검출에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 22는 HRP-스트렙타비딘(HRP-streptavidin)의 양이 IL-6 검출에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 23은 PBS-T, 혈청, 소변 등 다양한 샘플 매트릭스에서 IL-6 검출의 특이성과 회수율을 비교한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하 본 발명에 따른 마그네토플라즈모닉 나노비드 기반 면역분석 입자와 이의 제조 방법, 및 이를 포함하는 키트에 대하여 상세히 설명한다. 다음에 소개되는 도면들은 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 예로서 제공되는 것이다. 따라서, 본 발명은 이하 제시되는 도면들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 이하 제시되는 도면들은 본 발명의 사상을 명확히 하기 위해 과장되어 도시될 수 있다. 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

[0034] 본 발명의 일 양태는 산화철 나노입자 코어 및 상기 코어의 표면에 다수의 금 나노입자가 위성(satellite) 구조로 배치된 마그네토플라즈모닉 나노비드; 및 상기 금 나노입자 상에 공유 결합되며, 표적항원을 선택적으로 인식하여 결합하는 포획항체;를 포함하는 면역분석 입자에 관한 것이다.

[0035] 본 발명에 따른 마그네토플라즈모닉 나노비드 기반 면역분석 입자는 자성과 플라즈모닉 특성을 갖춘 마그네토플라즈모닉 나노비드를 이용하여 높은 민감도와 특이성을 제공한다. IL-6와 같은 패혈증 바이오마커를 민감하게 검출할 수 있으며, 낮은 농도에서도 탐지가 가능하여 조기 진단에 유리하고, 포획항체가 금 나노입자에 공유 결합되어 특이적 항원 결합이 가능하고 비특이적 결합을 최소화하여 정확한 분석 결과를 제공한다.

[0036] 또한, 자성 코어를 사용하여 샘플 내에서 나노비드를 신속하게 분리 및 농축할 수 있어 빠른 분석이 가능하며, 이는 패혈증과 같은 응급 상황에서 매우 중요한 역할을 한다.

[0037] 또한, 형광, 화학발광, 비색과 같은 다양한 검출 방식을 선택적으로 사용할 수 있어, 분석 환경에 따라 최적의 검출 방법을 적용할 수 있으며, 기존의 PCR 등의 고가 분자 진단법보다 비용 효율적이고, 제조 공정이 간단하여 추가 장비 없이도 진단이 가능하며, 현장 진단에 적합한 키트 형태로 제공될 수 있어 사용 편의성이 높다.

[0038] 나아가, 혈액, 혈장, 소변 등 다양한 생체 시료에서 바이오마커를 검출할 수 있어, 패혈증을 포함한 여러 질병의 진단에 널리 활용될 수 있다.

[0039] 이하, 본 발명의 일 예에 따른 마그네토플라즈모닉 나노비드 기반 면역분석 입자에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0040] 먼저, 상기 마그네토플라즈모닉 나노비드는 도 3에 도시된 것과 같이 산화철 나노입자 코어와 코어의 표면에 위

성(satellite) 구조로 배치된 다수의 금 나노입자를 포함한다.

[0041] 구체적인 일 예시로, 상기 마그네토플라즈모닉 나노비드는 산화철 나노입자의 평균 직경이 100 내지 500 ㎚이고, 금 나노입자의 평균 직경은 1 내지 50 ㎚일 수 있으며,

[0042] 보다 구체적으로는, 상기 산화철 나노입자는 평균 직경이 150 내지 300 ㎚인 것일 수 있고, 그 형상은 구형일 수 있다. 또한, 상기 금 나노입자 위성의 평균 직경은 3 내지 40 ㎚, 더욱 구체적으로는 5 내지 30 ㎚일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 아울러, 상기 마그네토플라즈모닉 나노비드는 하나의 산화철 나노입자 코어의 표면에 10개 이상의 금 나노입자 위성이 배치된 것일 수 있으며, 보다 구체적으로는 10 내지 50개, 보다 좋게는 10 내지 30개의 금 나노입자 위성이 배치된 것일 수 있다. 반면, 후술하는 마그네토플라즈모닉 나노비드의 제조 방법과 달리 25℃ 이상의 온도에서 환원제 용액을 첨가하여 제조된 마그네토플라즈모닉 나노비드는 금 전구체의 환원 반응이 빠르게 유도되어 대량 생산 시 산화철 나노입자의 코어에 금 나노입자 위성이 균일하게 형성되지 않을 수 있으며, 금 씨드의 생성 빈도가 적어 금 나노입자 위성의 수가 10개 미만일 수 있어 면역분석 입자로 적합하지 않을 수 있다.

[0044] 본 발명의 일 예에 있어, 상기 포획항체는 다양한 생체 시료(혈액, 혈장, 소변 등)에서 특정 표적항원을 선택적으로 인식하고 결합하는 역할을 하는 것으로, 이를 이용해 특정 표적항원이 존재하는지, 즉 특정 질병이 존재하는지 여부를 확인하고 정확한 진단이 가능하도록 한다.

[0045] 상기 포획항체는 특정 항원에 대해 높은 특이성을 가지며, 금 나노입자에 공유 결합되어 표면에 안정적으로 고정될 수 있다. 이로 인해 포획항체는 나노입자 표면에서 쉽게 탈락하지 않고, 분석의 신뢰성을 높일 수 있다. 또한, 포획항체가 금 나노입자에 결합된 덕분에 플라즈모닉 특성을 활용하여 신호를 증폭시켜 미량의 항원도 민감하게 검출할 수 있어 조기 진단에 매우 유리하다는 장점이 있다.

[0046] 특히, 상기 면역분석 입자는 패혈증 진단용일 수 있으며, 이 경우 포획항체는 IL-6 항원을 인식하고 결합하여 높은 민감도와 특이성을 바탕으로 빠르고 정확하게 패혈증을 진단할 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 다른 일 양태는 전술한 면역분석 입자를 포함하는 키트에 관한 것으로, 상기 키트는 상기 표적항원을 선택적으로 인식하여 결합하며, 형광 표지되거나 또는 효소가 결합된 표지항체를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0048] 도 2에 도시된 것과 같이, 샘플 내에 표적항원이 존재할 경우, 상기 면역분석 입자는 표적항원과 선택적으로 결합하고, 이어서 표지항체가 표적항원의 다른 결합 부위에 결합하여 샌드위치 구조를 형성할 수 있다. 이 샌드위치 구조는 표적항원의 존재 여부를 시각적 신호(형광, 비색 등) 또는 화학적 신호(화학발광 등)로 변환할 수 있으며, 이를 통해 질병의 유무를 신속하고 정확하게 진단할 수 있다. 이러한 구조적 배열은 특히 낮은 농도의 표적항원도 민감하게 검출할 수 있도록 하여 조기 진단에 유리한 진단 방식을 제공할 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명의 다른 일 양태는 전술한 면역분석 입자의 제조 방법에 관한 것으로, a) 산화철 나노입자 분산액에 금 전구체 용액 및 표면안정제 용액을 첨가하여 반응용액을 준비하는 단계; b) 상기 반응용액의 온도를 0 내지 20℃로 낮추고 환원제 용액을 첨가하고 초음파 처리하여 마그네토플라즈모닉 나노비드를 제조하는 단계; c) 상기 금 나노입자의 표면을 카르복실기로 기능화시키는 단계; 및 d) 상기 기능화된 카르복실기에 포획항체를 공유 결합시키는 단계;를 포함할 수 있다.

[0050] 이처럼, 본 발명의 일 예에 따른 면역분석 입자의 제조 방법은 산화털 나노입자와 금 전구체가 함유된 반응용액에 환원제 첨가 시 반응 온도를 적절하게 제어함으로써 금 전구체의 환원 속도가 적절히 조절되어 대량 생산 공정에서도 균일한 코어-위성 구조를 가지는 마그네토플라즈모닉 나노비드를 효과적으로 제조할 수 있으며, 이후 금 나노입자의 표면을 카르복실기로 기능화시키고, 포획항체를 공유 결합시켜 높은 민감도와 특이성을 가지는 면역분석 입자를 제공한다.

[0051] 이하, 본 발명의 일 예에 따른 면역분석 입자의 제조 방법에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0052] 먼저, a) 산화철 나노입자 분산액에 금 전구체 용액 및 표면안정제 용액을 첨가하여 반응용액을 준비하는 단계를 수행할 수 있다.

[0053] 본 발명의 일 예에 있어, 상기 산화철 나노입자 분산액은 마그네토플라즈모닉 나노비드의 코어가 되는 물질인 산화철 나노입자가 분산매에 분산된 것으로, 필요에 따라 산화철 나노입자의 형태와 크기를 조절하여 사용할 수 있다. 비 한정적인 일 예시로, 본 발명에 사용된 산화철 나노입자는 평균 직경이 100 내지 500 ㎚인 것일 수 있

으며, 보다 구체적으로는 150 내지 300 ㎚인 것일 수 있고, 그 형상은 구형일 수 있다. 이때, 상기 분산매는 탈이온수, 정제수 또는 증류수 등의 물일 수 있으며, 특별히 산화철 나노입자의 농도를 제한하지 않으나 구체적으로 예를 들면 0.01 내지 50 ㎎/㎖, 보다 좋게는 0.1 내지 20 ㎎/㎖, 더욱 좋게는 0.3 내지 10 ㎎/㎖일 수 있다. 또한, 산화철 나노입자가 분산매 내 잘 분산되도록 하기 위하여 초음파처리를 1 내지 60분 동안 수행할 수 있으며, 보다 좋게는 5 내지 30분 동안 수행할 수 있다.

[0054] 본 발명의 일 예에 있어, 상기 금 전구체 용액은 금 나노입자 위성의 전구물질을 함유하는 용액으로, 구체적으로 예를 들면 상기 금 전구체는 염화금, 염화금산, 염화금산칼륨, 염화금산나트륨, 브롬화금산칼륨, 브롬화금산나트륨 및 이들의 수화물 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 이때, 상기 금 전구체가 용해된 용매는 탈이온수, 정제수 또는 증류수 등의 물일 수 있으며, 특별히 금 전구체의 농도를 제한하지 않으나 구체적으로 예를 들면 금 전구체 용액의 농도는 0.01 내지 1 M일 수 있으며, 보다 좋게는 20 내지 500 mM, 더욱 좋게는 50 내지 200 mM일 수 있다. 또한, 그 첨가량은 산화철 나노입자 1 몰(mol)에 대하여 0.1 내지 10 몰로 첨가될 수 있으며, 보다 좋게는 0.5 내지 8 몰, 더욱 좋게는 1 내지 5 몰로 첨가될 수 있다. 이와 같은 범위에서 마그네토플라즈모닉 나노비드가 효과적으로 제조될 수 있다.

[0055] 본 발명의 일 예에 있어, 상기 표면안정제 용액은 산화철 나노입자와 금 나노입자의 표면을 안정화시켜 코어-위성 구조를 가지는 마그네토플라즈모닉 나노비드가 보다 효과적으로 제조될 수 있도록 하기 위한 것으로, 구체적으로 예를 들면 상기 표면안정제는 구연산, 구연산나트륨, 구연산칼륨 및 구연산암모늄 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 이때, 상기 표면안정제가 용해된 용매는 탈이온수, 정제수 또는 증류수 등의 물일 수 있으며, 특별히 표면안정제의 농도를 제한하지 않으나 구체적으로 예를 들면 표면안정제 용액의 농도는 1 내지 500 mM일 수 있으며, 보다 좋게는 5 내지 150 mM, 더욱 좋게는 10 내지 50 mM일 수 있다. 또한, 그 첨가량은 산화철 나노입자 1 몰(mol)에 대하여 0.01 내지 5 몰로 첨가될 수 있으며, 보다 좋게는 0.05 내지 3 몰, 더욱 좋게는 0.1 내지 1 몰로 첨가될 수 있다. 이와 같은 범위에서 마그네토플라즈모닉 나노비드가 효과적으로 제조될 수 있다.

[0056] 이처럼 각 용액이 준비되면, 산화철 나노입자 분산액에 금 전구체 용액 및 표면안정제 용액을 첨가할 수 있으며, 5 내지 100분 동안, 보다 좋게는 10 내지 60분 동안 초음파처리를 수행하여 산화철 나노입자의 표면에 Au^{3+} 이온이 부착되도록 할 수 있다.

[0057] 다음으로, b) 상기 반응용액의 온도를 0 내지 20℃로 낮추고 환원제 용액을 첨가하고 초음파 처리하여 마그네토플라즈모닉 나노비드를 제조하는 단계를 수행할 수 있다, 상세하게, 얼음욕조 등을 이용하여 반응용액의 온도를 낮출 수 있으며, 반응온도는 0 내지 20℃일 수 있고, 보다 좋게는 5 내지 15℃일 수 있다, 이와 같은 범위에서 금 전구체의 환원 속도가 적절히 조절되어 대량 생산 공정에서도 균일한 마그네토플라즈모닉 나노비드가 형성될 수 있다. 반면, 반응온도가 20℃를 초과하는 경우 금 전구체의 환원 반응이 빠르게 유도되어 대량 생산 시 산화철 나노입자의 코어에 금 나노입자 위성이 균일하게 형성되지 않을 수 있으며, 반응온도가 0℃ 미만일 시 용매인 물의 냉각을 유도하여 반응 저하를 유도할 뿐만 아니라 반응속도가 느려져 금 나노입자 위성의 성장 저하를 유도할 수 있다.

[0058] 이후 반응온도가 0 내지 20℃로 조절된 후 상기 반응용액에 환원제 용액을 첨가할 수 있다. 이때, 환원제 용액을 넣은 즉시 금 시드가 형성되어 검붉은색으로 변함에 따라 환원제 주입 후 빠르게 초음파 처리하여 주는 것이 바람직하며, 초음파처리는 1 내지 30초, 보다 좋게는 3 내지 20초 동안 수행될 수 있다.

[0059] 한편, 상기 환원제 용액은 산화철 나노입자의 표면에 부착된 Au^{3+} 이온을 환원시켜 산화철 나노입자 코어의 표면에 금 나노입자 위성을 형성하기 위한 것으로, 구체적으로 예를 들면 상기 환원제는 수소화붕소나트륨, 수소화붕소알루미늄, 트리아세토붕소산나트륨, 시안화붕소화수소나트륨, 옥살산나트륨, 옥살산칼륨, 히드라진 및 히드로퀴논 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 이때, 상기 환원제가 용해된 용매는 탈이온수, 정제수 또는 증류수 등의 물일 수 있으며, 특별히 환원제의 농도를 제한하지 않으나 구체적으로 예를 들면 환원제 용액의 농도는 0.01 내지 1 M일 수 있으며, 보다 좋게는 20 내지 500 mM, 더욱 좋게는 50 내지 200 mM일 수 있다. 또한, 그 첨가량은 산화철 나노입자 1 몰(mol)에 대하여 0.01 내지 5 몰로 첨가될 수 있으며, 보다 좋게는 0.05 내지 3 몰, 더욱 좋게는 0.1 내지 1 몰로 첨가될 수 있다. 이와 같은 범위에서 산화철 나노입자의 표면에 부착된 Au^{3+} 이온이 잘 환원되어 마그네토플라즈모닉 나노비드가 효과적으로 제조될 수 있다.

[0060] 이후, c) 상기 금 나노입자의 표면을 카르복실기로 기능화시키는 단계를 수행할 수 있다. 본 단계는 금 나노입자 위성에 포획항체를 결합시키기 위한 연결기를 결합시키기 위한 것으로, 예를 들면 도 2에 도시된 것과 같이,

글루타치온을 이용하여 수행될 수 있다.

[0061] 다음으로, d) 상기 기능화된 카르복실기에 포획항체를 공유 결합시키는 단계를 수행할 수 있다. 본 단계는 실질적으로 표적항원과 결합되어 질병을 진단할 수 있는 포획항체를 결합시키기 위한 단계로, 상기 기능화된 카르복실기와 포획항체의 아민을 화학적으로 반응시켜 공유 결합시킬 수 있는 방법이라면 특별히 한정하지 않고 사용할 수 있으며, 구체적인 일 예시로 EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) 커플링 또는 DCC(Dicyclohe xylcarbodiimide)) 커플링 등의 반응을 사용할 수 있다.

[0063] 이하, 실시예를 통해 본 발명에 따른 마그네토플라즈모닉 나노비드 기반 면역분석 입자와 이의 제조 방법, 및 이를 포함하는 키트에 대하여 더욱 상세히 설명한다. 다만 하기 실시예는 본 발명을 상세히 설명하기 위한 하나의 참조일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니며, 여러 형태로 구현될 수 있다.

[0064] 또한 달리 정의되지 않은 한, 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업자 중 하나에 의해 일반적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 설명에 사용되는 용어는 단지 특정 실시예를 효과적으로 기술하기 위함이고 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 또한 명세서에서 특별히 기재하지 않은 첨가물의 단위는 중량%일 수 있다.

[0065] **[특성 평가 방법]**

[0066] 필드 방출 주사 전자 현미경(FE-SEM, Merlin Compact, Carl Zeiss, 독일), 투과 전자 현미경(TEM, Tecnai G2 F30 S-TWIN, FEI Company, 미국), 고해상도 투과 전자 현미경(HR-TEM, JEM-3010, JEOL, 일본), 에너지 분산 X선 분광기(EDS, AZtech Energy_X-MaxN, OXFORD, 영국) 및 원자 힘 현미경(AFM, Park Systems, 대한민국)을 사용하여 재료의 표면과 구조적 특성을 분석하였다. X선 광전자 분광기(XPS, MultiLab 2000, Thermo Scientific, 미국)와 X선 회절 분광기(XRD, MiniFlex II, Rigaku, 일본)를 사용하여 재료의 조성과 표면 전자 특성을 특성화하였으며, 30 kV의 발생기 전압에서 Cu 타겟(λ = 1.540598 Å)을 사용하여 수행되었으며, 스캔 속도는 분당 0.05° 였다.

[0067] **[제조예 1]**

[0068] 산화철(Fe_3O_4) 나노입자 1 mg을 1 mℓ의 탈이온수(DIW)에 분산시킨 뒤 초음파처리를 10분 동안 진행하여 나노입자가 확실히 용액 내에서 분산되도록 하였다. 이 산화철 나노입자 분산액에 100 ㎕의 $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ 수용액(농도 25 mM)와 100 ㎕ 구연산삼나트륨 수용액(농도 20 mM)을 넣고 30분간 초음파처리를 하여 Au^{3+} 이온이 산화철 나노입자 표면에 부착되도록 하였다. 그 후, 반응용액의 온도를 10℃가 되도록 낮춘 다음 20 ㎕의 $NaBH_4$ 수용액(농도 100 mM)을 추가로 넣고 30분 동안 초음파 처리하였다. 반응용액은 $NaBH_4$를 넣은 후 즉각적으로 Au 시드가 형성되어 검붉은 색으로 변하였다.

[0069] 반응 종료 후 최종 생성물은 자석 분리를 이용하여 탈이온수로 3번 세척한 다음, 진공오븐 60℃에서 6 시간 동안 건조시켰다.

[0070] **[제조예 2]**

[0071] 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, 각 용액의 농도는 제조예 1과 같게 하되, 용액의 첨가량을 각각 2배, 3배, 10배 증량하여 마그네토플라즈모닉 나노비드를 제조한 것 외 모든 과정을 제조예 1과 동일하게 진행하였다.

표 1

[0072]

	산화철 나노입자 분산액	$HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ 수용액	구연산삼나트륨 수용액	$NaBH_4$ 수용액
2배	200 ㎕(1 mg/mℓ)	200 ㎕(25 mM)	200 ㎕(25 mM)	40 ㎕(100 mM)
3배	300 ㎕(1 mg/mℓ)	300 ㎕(25 mM)	300 ㎕(25 mM)	60 ㎕(100 mM)
10배	1 mℓ(1 mg/mℓ)	1 mℓ(25 mM)	1 mℓ(25 mM)	200 ㎕(100 mM)

[0073] **[제조예 3]**

[0074] $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ 수용액(농도 20 mM) 100 ㎕를 사용한 것 외 모든 과정을 제조예 1과 동일하게 진행하였다.

[0075] **[제조예 4]**

[0076] $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ 수용액(농도 30 mM) 100 ㎕를 사용한 것 외 모든 과정을 제조예 1과 동일하게 진행하였다.

[0077] **[비교제조예 1]**

[0078] 반응 용액의 온도를 25℃에서 진행한 것 외 모든 과정을 제조예 1과 동일하게 진행하였다.

[0079] **[마그네토플라즈모닉 나노비드 특성 평가]**

[0080] 도 4는 제조예 1에 따른 금 코팅 전 산화철 나노입자(bare Fe_3O_4 NC)(좌)와 마그네토플라즈모닉 나노비드(우)의 주사전자현미경(SEM) 이미지이며, 삽입도는 투과전자현미경(TEM) 이미지이다. 특히 TEM 이미지를 참조하면 산화철 나노입자의 표면에 금 나노입자 위성이 부착된 것을 확인할 수 있다.

[0081] 도 5는 제조예 1에 따른 금 코팅 전 산화철 나노입자(검은 실선)와 금 코팅된 마그네토플라즈모닉 나노비드(붉은 점선)의 자외선-가시광선 분광(UV-Vis spectroscopy) 분석 그래프로, 550 ㎚ 파장 주변에서 나타나는 플라즈몬 공진 피크는 금 나노입자의 형성을 나타내며, 400 ㎚ 파장 주변에서 나타나는 넓은 피크는 Fe_3O_4 나노입자에서 비롯된다.

[0082] 도 6 내지 10은 각각 제조예 1에 따른 금 코팅 전 산화철 나노입자와 금 코팅된 마그네토플라즈모닉 나노비드의 SEM 이미지와 TEM 이미지로, 산화철 나노입자의 표면에 금 나노입자 위성이 부착된 것을 확인할 수 있다.

[0083] 도 11은 제조예 2에 따른 각 성분 용액의 용량을 증량시켜 제조된 마그네토플라즈모닉 나노비드의 SEM 이미지로, 증량 후에도 균일하게 산화철 나노입자 코어의 표면에 금 나노입자 위성이 부착되는 것을 확인할 수 있다.

[0084] 도 12는 제조예 1과 제조예 3 및 4에 따른 서로 다른 금 전구체 농도로 제조된 마그네토플라즈모닉 나노비드의 SEM 이미지로, 모든 마그네토플라즈모닉 나노비드에서 산화철 나노입자의 표면에 금 나노입자 위성이 부착된 것을 확인할 수 있으며, 특히 금 전구체의 농도가 25 mM 이상인 제조예 1 및 4의 경우 금 나노입자 위성의 빈도가 제조예 3 대비 높은 것을 확인할 수 있다.

[0085] 도 13은 각각 25℃ 또는 10℃의 온도 조건에서 환원제 용액을 첨가하여 제조된 마그네토플라즈모닉 나노비드의 SEM 이미지로, 25℃ 이상의 온도에서 반응을 진행한 비교제조예 1의 경우 금 나노입자 위성의 크기가 다소 불균일하고, 균일하게 금나노입자 위성이 부착되지 않은 것을 확인할 수 있다.

[0086] **[실시예]**

[0087] 1단계: 나노입자 표면 준비 (GSH 기능화)

[0088] Fe_3O_4@Au 나노자임을 카복실기(-COOH)로 기능화하는 과정은 AuNPs 표면에서 Au-S 결합을 통해 수행되었다.

[0089] 먼저, 0.307 g의 L-글루타치온 환원형(M = 307.32 g/mol)을 10 mL의 탈이온수(DIW)에 용해하여 L-글루타치온(GSH) 원액(0.1 M)을 준비하였다. 제조예 1에서 준비된 Fe_3O_4@Au 나노입자 10 mg(1 mg/mL = 10 mL)을 20 mL의 빈 바이알에 소분하고, 이 용액에 상기 GSH 원액 1 mL를 추가하였다. 혼합물 내의 최종 GSH 농도는 0.01 M였다.

[0090] 이 혼합물을 상온의 초음파 처리기에서 하룻밤 동안 배양하였다(초음파 처리는 처음 30분 동안 진행). 초음파 처리 후 입자의 분산성을 정기적으로 확인하였다.

[0091] GSH 처리가 끝난 후 입자는 자석을 사용하여 DIW로 4-6회 세척하고 2 mL의 DIW에 재분산하였다(최종 농도: 5 mg/mL). 기능화의 효과를 확인하기 위해 Zeta 전위를 측정(기능화 전후)하였다.

[0092] 2단계: Fe_3O_4-Au-GSH 나노입자의 항체 결합

[0093] 1 mL의 Fe_3O_4@Au-GSH 프로브(나노자임(NZs), 5 mg/mL)를 1.5 mL 원심분리 튜브에 넣었다. 영구 자석을 사용하여 NZs를 분리하고 상층액을 버렸다. 1 mL의 MES(2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid) 완충 용액을 추가하고 철저히 혼합하였다. NZs를 3회 세척한 후 0.5 mL의 MES 완충 용액에 재분산하였다.

[0094] NZs의 COOH 그룹은 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 염산염(EDC)-N-하이드록시숙신이미드(NHS)

반응을 통해 활성화되었다. 50 μL의 EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, 100 mg/mL)와 50 μL의 NHS(N-Hydroxysuccinimide, 100 mg/mL)를 추가한 후, 혼합물을 즉시 15분 동안 혼합하였다.

[0095] 반응 후, 활성화된 NZs를 자석을 사용하여 분리하고, MES 완충 용액으로 3회 세척하였다.

[0096] 100 μg의 항-IL-6 항체 용액(항-IL-6, 단클론(MQ2-13A5, BD Biosciences), 비결합형)을 NZs에 추가하고 중간 속도로 2시간 동안 혼합하였다.

[0097] 반응 후, 남아있는 NHS 에스터 그룹은 0.5 mL의 30 mM 하이드록실아민 용액을 사용하여 중화시켰고, 중간 속도로 30분 동안 혼합하였다.

[0098] 마지막으로, 1 mL의 PBS-T(Phosphate-Buffered Saline with Tween 20) 완충 용액을 추가하고, 결합된 NZs는 PBS-T 완충 용액을 사용하여 3회 더 세척하였다. NZs 용액은 1 mL의 PBS-T 완충 용액에 분산되어 4℃에서 저장되었다.

[0099] 3단계: 샘플에서 IL-6의 포집 및 분리

[0100] NZs는 PBS-T 완충 용액을 사용하여 저장 농도(5000 μg/mL)에서 활성 농도(25 μg/mL)로 희석되었다.

[0101] 흰색 96 웰 플레이트에 희석된 결합된 NZs 프로브(25 μg/mL) 100 μL를 준비하였다. 각 웰에 PBS-T 기준액에 있는 IL-6 항원의 알려진 농도의 50 μL를 추가하였다. 1-10 ng/mL IL-6에서 선형성이 관찰되었다(부피: 50 μL). 플레이트를 밀봉하고 37℃에서 90분 동안 배양하였다(회전 속도: 250 rpm). 배양 단계 후, 자석을 사용하여 NZs를 웰의 바닥으로 모으고 상층액을 버렸다. 수집된 NZs를 PBS-T 완충 용액으로 3회 세척하였으며, 100 μL의 PBS-T에 재분산하였다.

[0102] 다음으로, 각 웰에 비오틴-결합된(biotinylated) 항-IL-6 항체(원액 1 mg/mL 용액에서 500배 희석, 총량: 웰당 50 ng)를 50 μL 추가하였다. 플레이트를 밀봉하고 37℃에서 60분 동안 배양하였다(250 rpm). 그 후, 자석을 사용하여 NZs를 수집하고 PBS-T로 3회 세척하였다.

[0103] 다음으로, 각 웰에 HRP-스트렙타비딘 결합체(2.5 μg/mL에서 20배 희석, 총량: 웰당 6.25 ng)를 50 μL 추가하였다. 플레이트를 밀봉하고 37℃에서 60분 동안 배양하였다(250 rpm).

[0104] 마지막으로, 자석을 사용하여 NZs를 수집하고 PBS-T로 4-5회 세척한 후, TBS(pH = 8.0) 50 μL에 재분산하였다.

[0105] 4단계: 화학발광 검출 및 정량화

[0106] ECL(Electrochemiluminescence) 기질(BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD))을 A 용액과 B 용액을 100:1 비율로 혼합하여 준비한 후 기질을 상온에서 15분 동안 방치하였다.

[0107] 각 웰에 ECL 기질 150 μL를 추가하고, 기질과 NZs를 섞기 위해 피펫으로 위아래로 혼합하였다.

[0108] 기질 추가 후 3분 이상 지연시킨 후 화학발광 강도(428 nm에서)를 측정하였다. 신호는 기질 추가 후 3분에서 8분 사이에 가장 안정적이며, 시간이 지나면 감소하였다.

[0109] 도 15는 ECL 기질을 사용하여 IL-6 항원을 검출하는 과정(좌)과 루미놀 기반 ECL 반응에서 발생한 청색 화학발광의 PL 스펙트럼(우)으로, 검출 과정에서 Au 나노입자(Au NPs)가 촉매로 작용할 때, 그들의 촉매 활성으로 인해 생기는 배경 잡음(배경 간섭)을 줄이는 것이 중요한데, TMB(테트라메틸벤지딘, TMB) 반응과 비교하여 루미놀 기반 ECL 기질이 이러한 배경 간섭을 더 잘 억제할 수 있음을 나타낸다.

[0110] 도 16은 IL-6 항원의 농도에 따른 신호 강도와 선형 범위를 나타낸 것으로, 빨간색 영역으로 표시된 것과 같이 1~10 ng/mL 사이에서 IL-6 농도에 비례하는 선형적인 신호 강도 증가가 나타났다.

[0111] 도 17은 IL-6 항원의 농도에 따른 신호 강도를 선형 그래프로 나타낸 것으로, 검출 한계(LOD)는 0.174 ng/ml였다.

[0112] 도 18은 대조군(black)과 서로 다른 농도의 IL-6 항원의 신호 강도를 그래프화한 것으로, 이 역시 신호 강도가 농도의 증가에 따라 증가함을 시각적으로 확인할 수 있었다.

[0113] 도 19는 Fe_3O_4@Au 나노자임(NZs)의 농도가 IL-6 검출에 미치는 영향을 나타낸 그래프로, NZs 농도를 25 μg/mL에서 50 μg/mL로 증가시켰을 때, 검출 한계(LOD)가 0.17 ng/mL에서 0.79 ng/mL로 높아졌으며, 이는 농도가 높

아질수록 검출이 덜 민감해질 수 있음을 의미한다.

[0114] 도 20은 ECL 기질을 추가한 후 IL-6 농도에 따른 신호 강도가 시간이 지남에 따라 어떻게 변화하는지를 분석한 그래프로, ECL 기질을 추가한 후 3분이 지나면 신호가 안정적으로 유지되며, 8분까지 안정적인 신호가 유지되었다(안정적인 신호 영역). 즉, 신호가 3분 이후에 안정화되므로, 3분 내지 8분의 짧은 시간 내에 신뢰성 있는 데이터를 얻을 수 있음을 보여준다.

[0115] 도 21은 비오틴-결합된 항-IL-6 항체의 양이 IL-6 검출에 미치는 영향을 보여주는 그래프로, 신호 강도(검정선)는 항체의 양이 50 ng까지 증가할 때, 신호 강도가 빠르게 증가하여 약 8 x 10^5 cps에 도달하였으며, 그 이후 항체의 양을 증가시켜도 신호 강도는 상대적으로 안정적으로 유지되었다. 신호/빈 신호 비율(파란색선)은 항체의 양이 50 ng까지 증가할 때 크게 향상되었으나, 50 ng을 초과하면 감소하는 경향이 나타났다.

[0116] 도 22는 HRP-스트렙타비딘(HRP-streptavidin)의 양이 IL-6 검출에 미치는 영향을 보여주는 그래프로, 신호 강도(검정선)는 HRP-스트렙타비딘의 양이 증가할 때 상대적으로 일정하게 유지되었다. 신호/빈 신호 비율(파란색선)은 6.5 ng까지 매우 높게 유지되지만, 그 이후로 HRP-스트렙타비딘의 양이 증가하면서 비율이 급격히 감소하였다.

[0117] 도 23은 MagLISA 분석이 다양한 매트릭스(예: PBS-T, 혈청(Serum), 소변(Urine))에서 특이성(Specificity)을 어떻게 나타내는지를 보여주는 것으로, IL-6 농도가 동일한 조건에서의 신호 강도와 회수율(Recovery%)을 비교하였다.

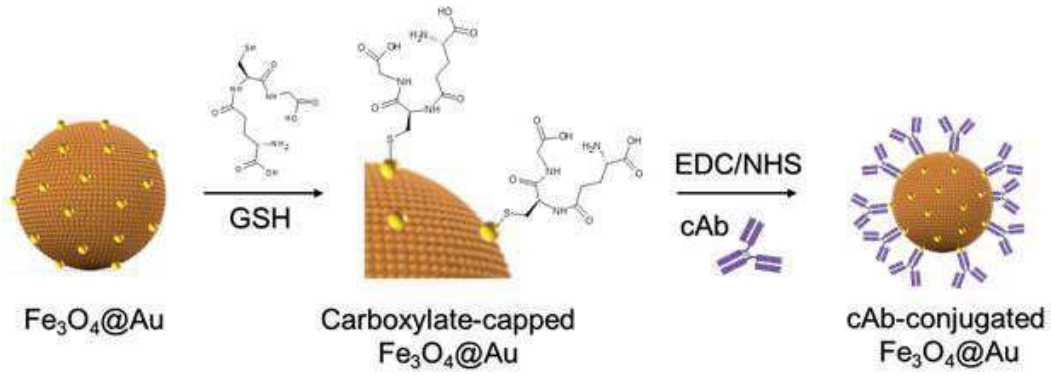
[0118] 그 결과, MagLISA 분석은 PBS-T, 혈청, 소변 매트릭스 모두에서 잘 작동하며, 소변과 PBS-T에서 더 높은 회수율을 보여주었다(혈청 77.8%, 소변 96.2%). 혈청에서는 회수율이 낮아지지만, 이는 배경 단백질과의 비특이적 상호작용 때문일 수 있다.

[0119] 이상과 같이 특정된 사항들과 한정된 실시예를 통해 본 발명이 설명되었으나, 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다.

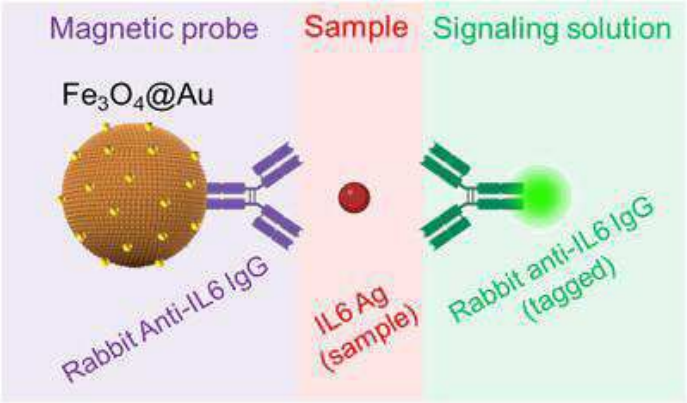
[0120] 따라서, 본 발명의 사상은 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등하거나 등가적 변형이 있는 모든 것들은 본 발명 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

도면

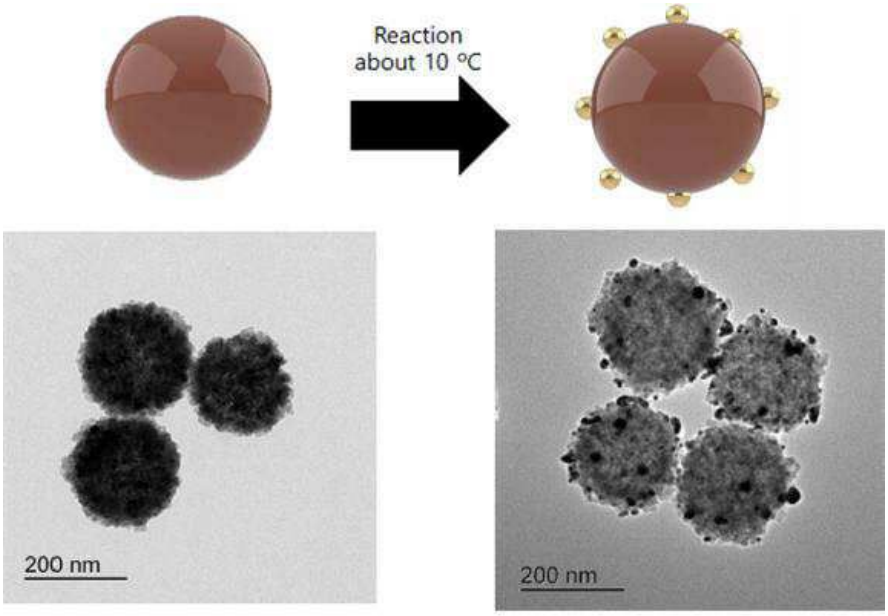
도면1



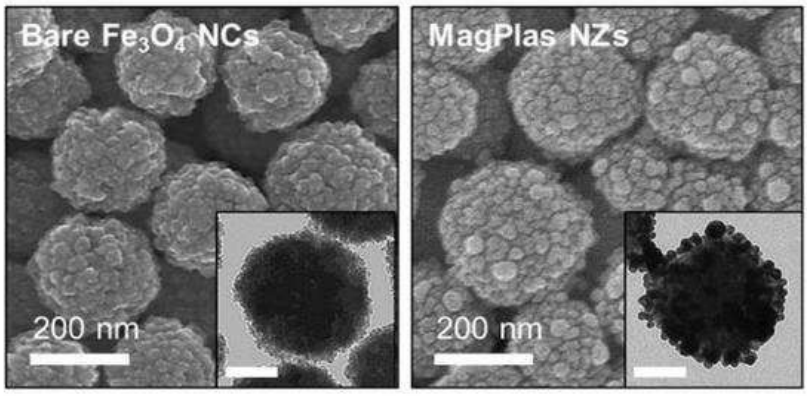
도면2


Magnetic probe
Sample
Signaling solution
Fe_3O_4@Au
Rabbit Anti-IL6 IgG
IL6 Ag
(sample)
Rabbit anti-IL6 IgG
(tagged)

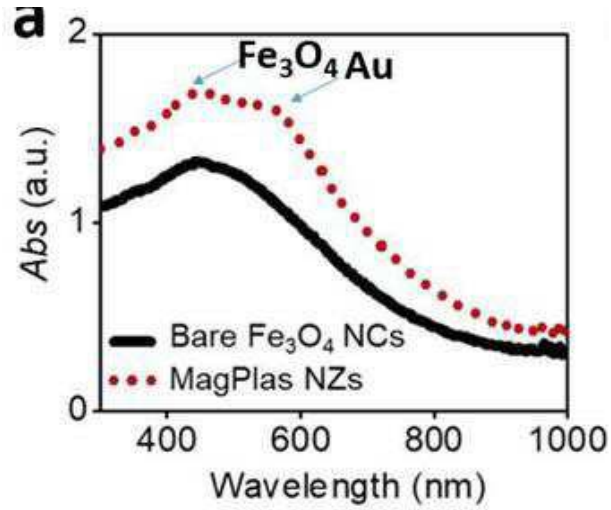
도면3


Reaction
about 10 °C
200 nm
200 nm

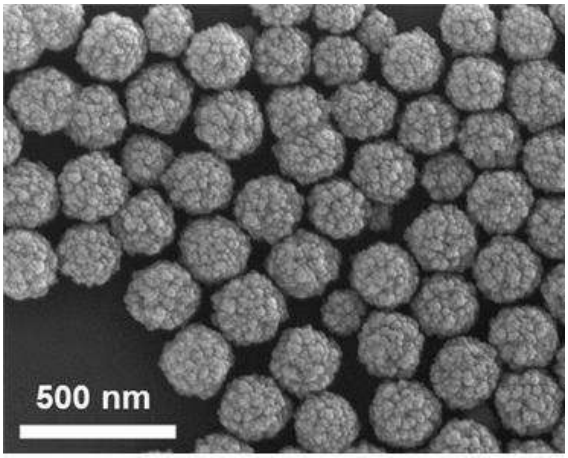
도면4


Bare Fe_3O_4 NCs
MagPlas NZs
200 nm
200 nm

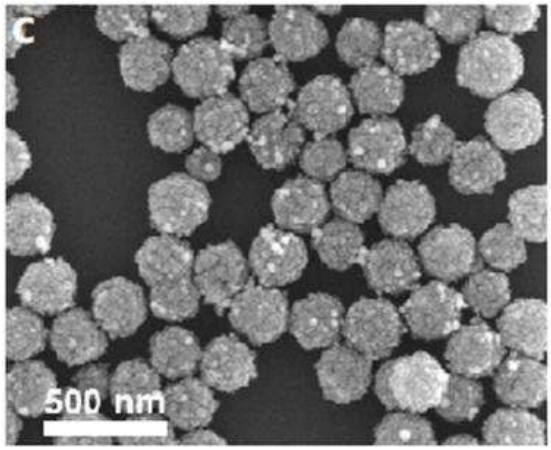
도면5


a
2
1
0
Abs (a.u.)
Fe3O4 Au
Bare Fe3O4 NCs
MagPlas NZs
400
600
800
1000
Wavelength (nm)

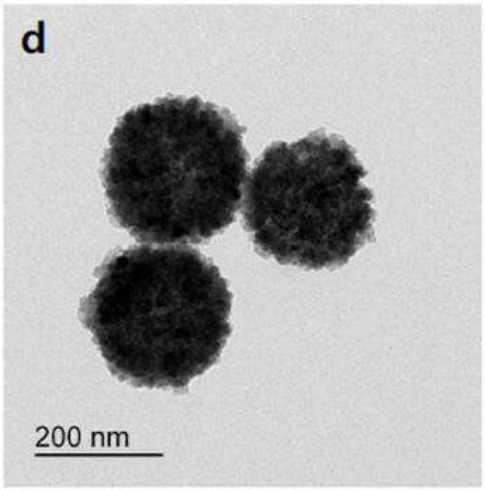
도면6


500 nm

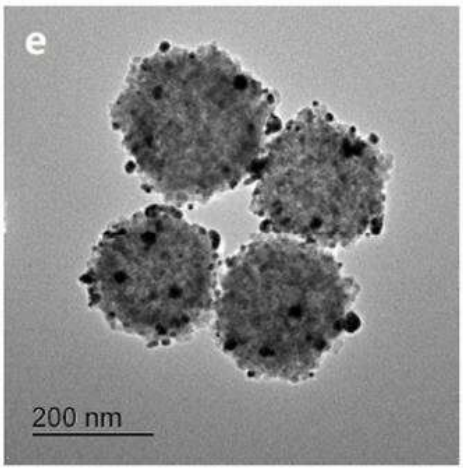
도면7


c
500 nm

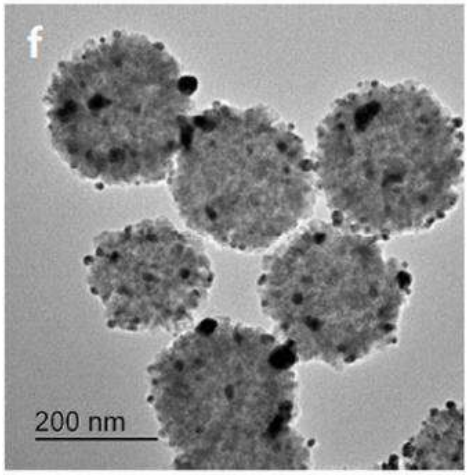
도면8



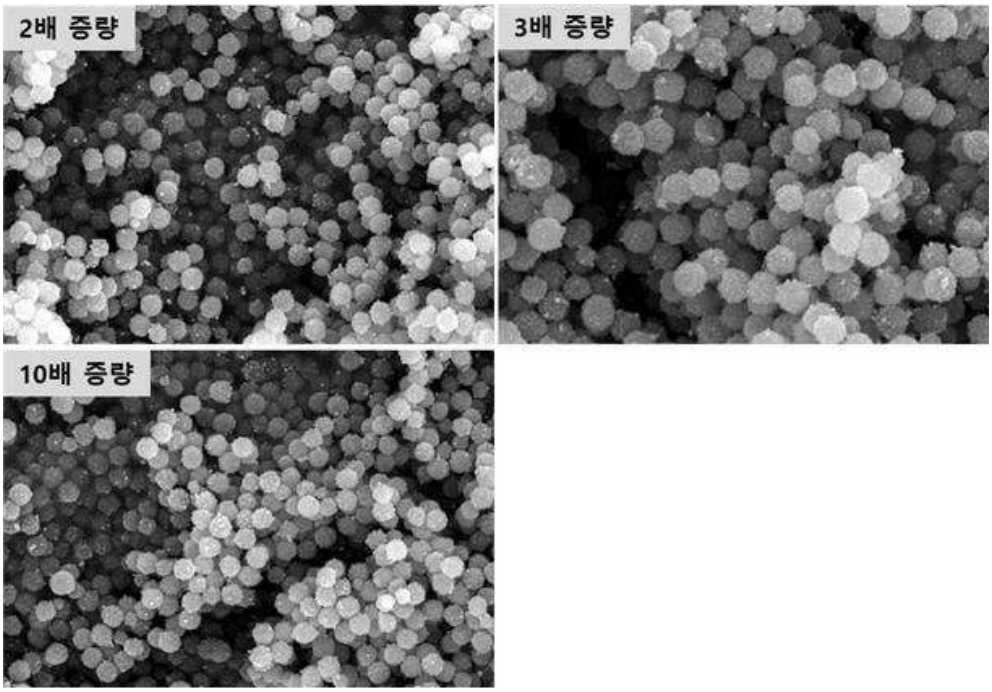
도면9



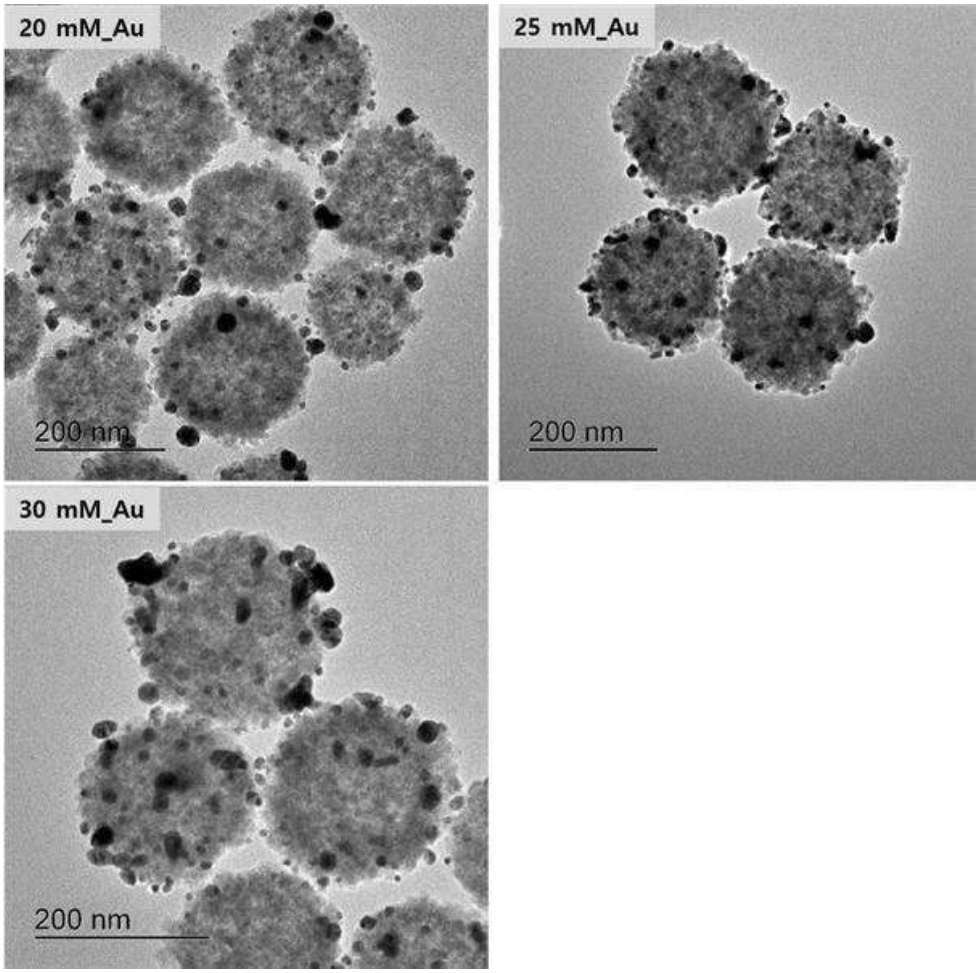
도면10



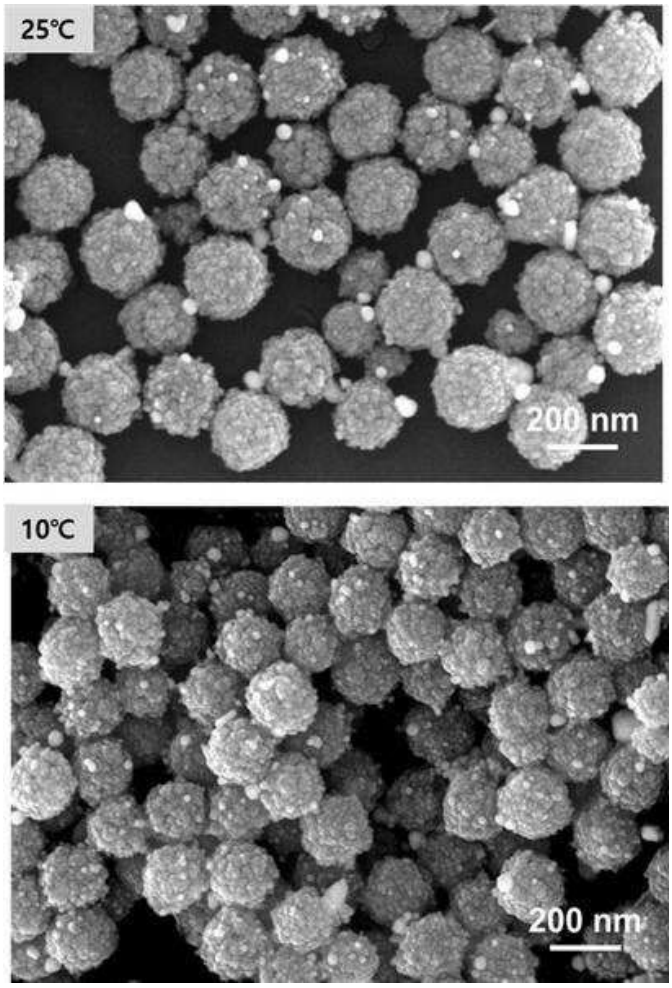
도면11



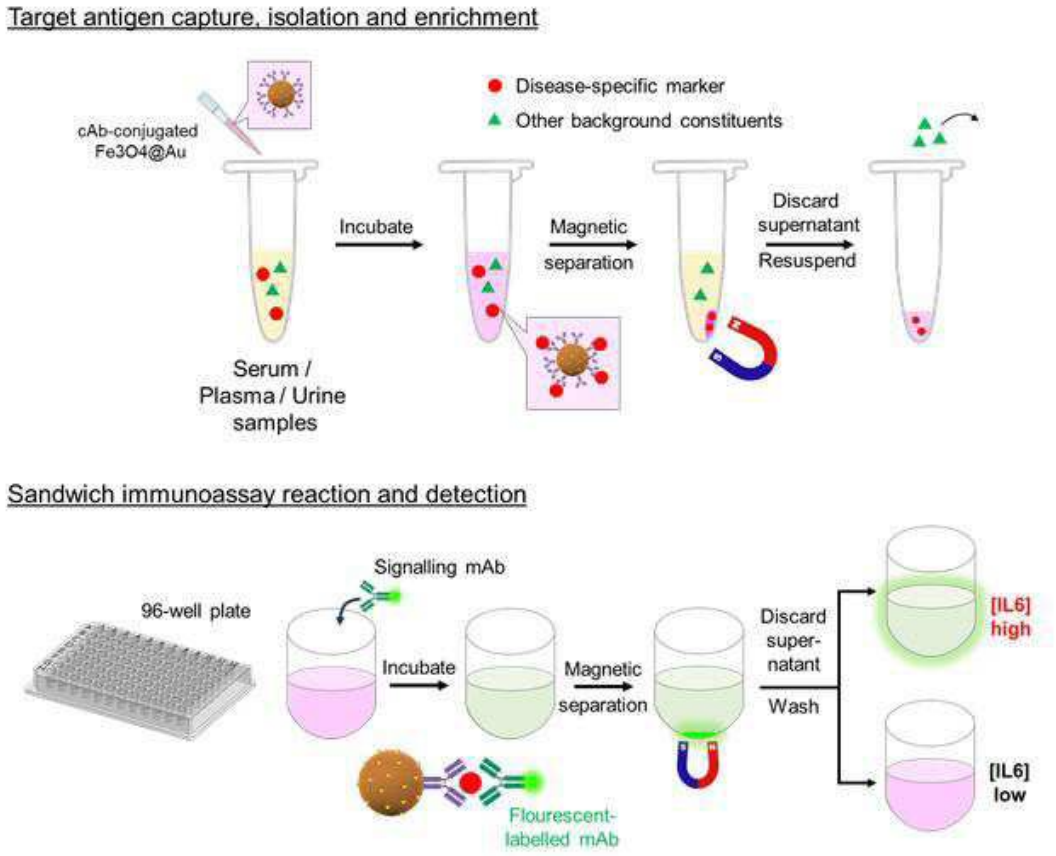
도면12



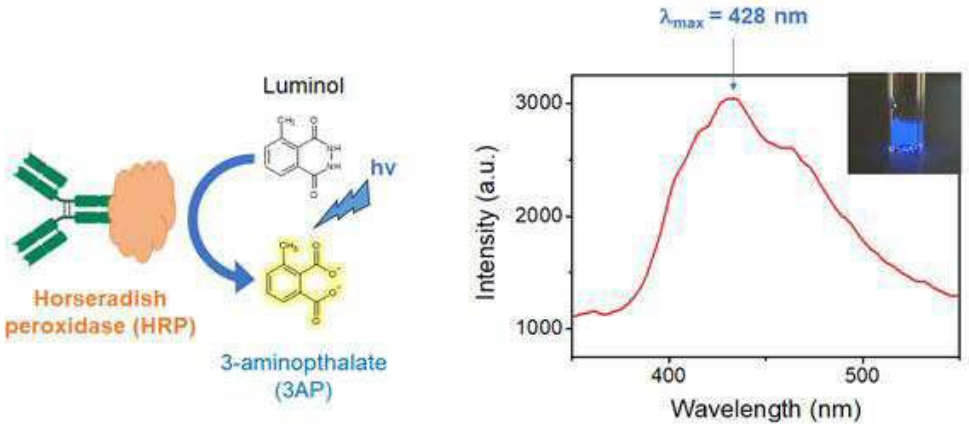
도면13



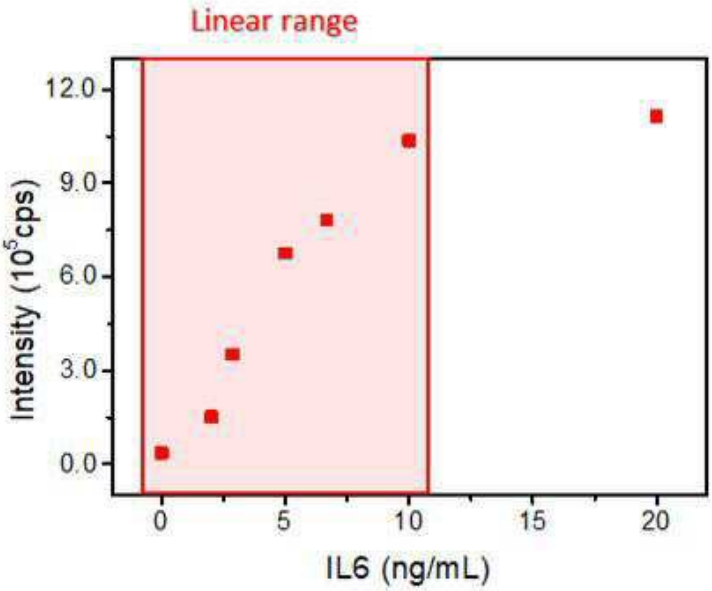
도면14


Target antigen capture, isolation and enrichment
cAb-conjugated Fe3O4@Au
Disease-specific marker
Other background constituents
Incubate
Magnetic separation
Discard supernatant
Resuspend
Serum / Plasma / Urine samples
Sandwich immunoassay reaction and detection
96-well plate
Signalling mAb
Incubate
Magnetic separation
Discard super-natant
Wash
[IL6] high
[IL6] low
Flourescent-labelled mAb

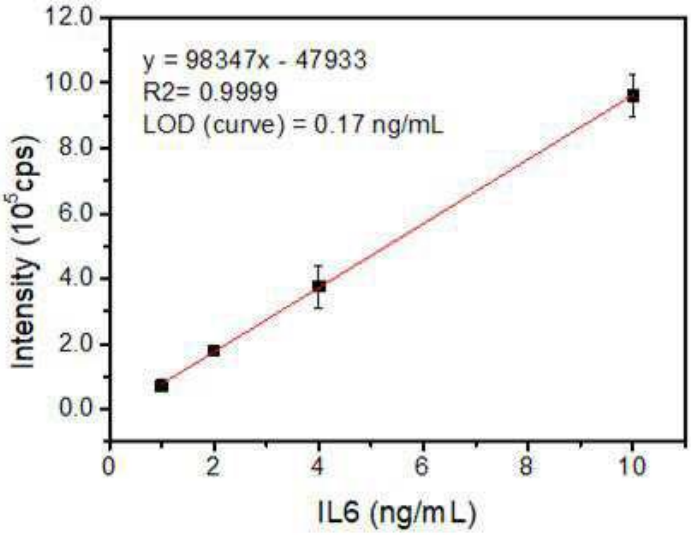
도면15


Luminol
hv
Horseradish peroxidase (HRP)
3-aminopthalate (3AP)
λmax = 428 nm
Intensity (a.u.)
3000
2000
1000
400
500
Wavelength (nm)

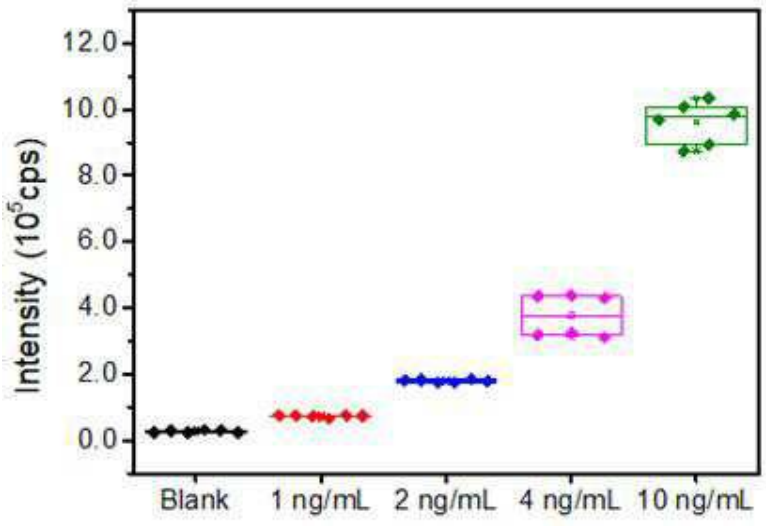
도면16


Linear range
Intensity (10^5cps)
12.0
9.0
6.0
3.0
0.0
0
5
10
15
20
IL6 (ng/mL)

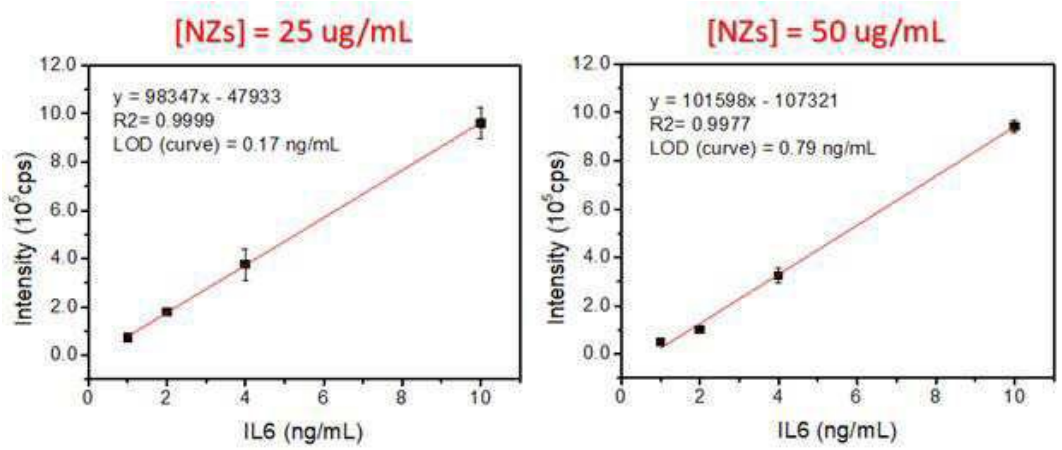
도면17


y = 98347x - 47933
R2= 0.9999
LOD (curve) = 0.17 ng/mL
Intensity (10^5cps)
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
0
2
4
6
8
10
IL6 (ng/mL)

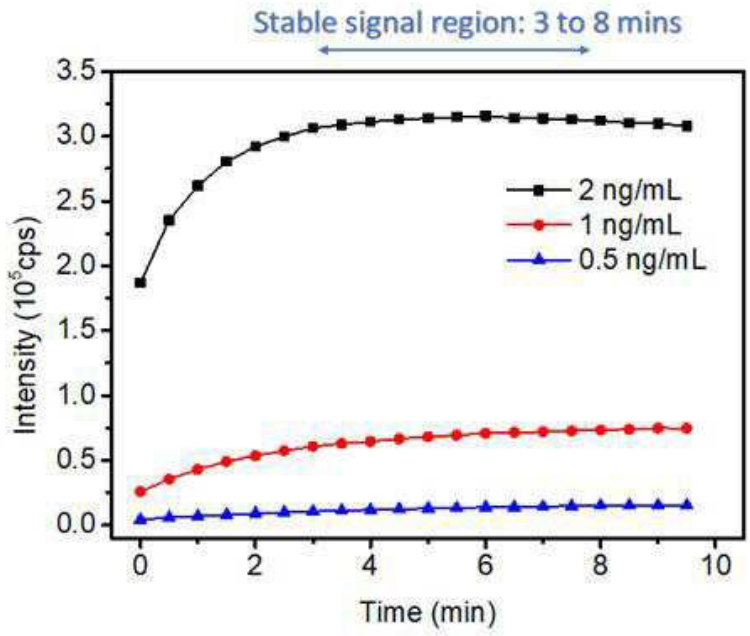
도면18


Intensity (10^5cps)
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
Blank
1 ng/mL
2 ng/mL
4 ng/mL
10 ng/mL

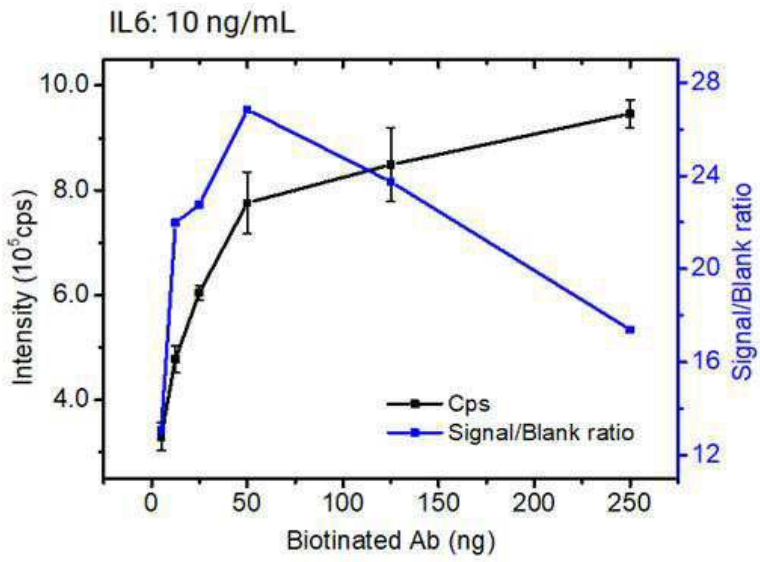
도면19


[NZs] = 25 ug/mL
y = 98347x - 47933
R2= 0.9999
LOD (curve) = 0.17 ng/mL
Intensity (10^5cps)
IL6 (ng/mL)
[NZs] = 50 ug/mL
y = 101598x - 107321
R2= 0.9977
LOD (curve) = 0.79 ng/mL
Intensity (10^5cps)
IL6 (ng/mL)

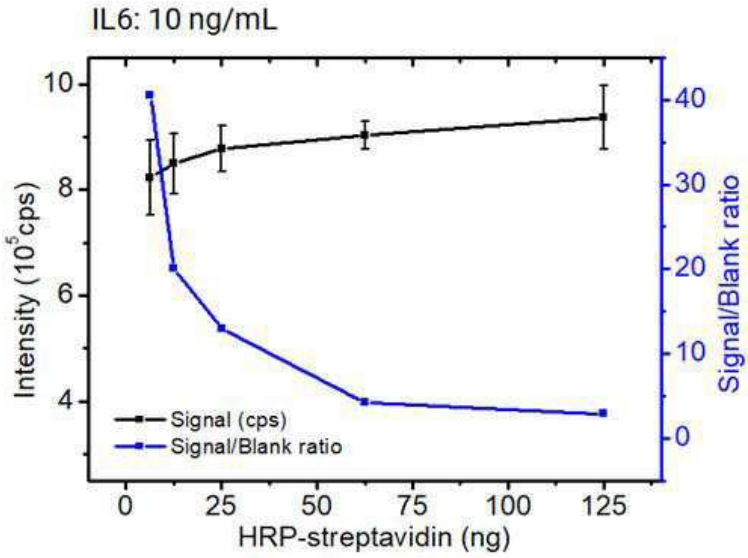
도면20


Stable signal region: 3 to 8 mins
Intensity (10^5cps)
Time (min)
2 ng/mL
1 ng/mL
0.5 ng/mL

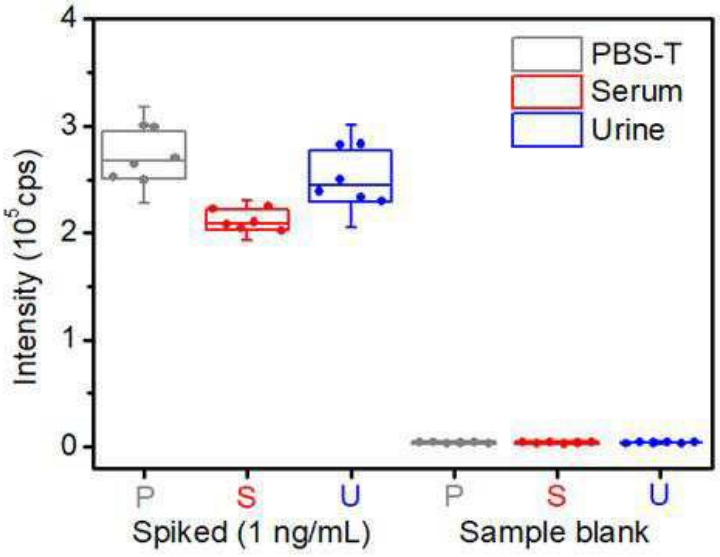
도면21


IL6: 10 ng/mL
Intensity (10^5cps)
Signal/Blank ratio
Biotinated Ab (ng)
Cps
Signal/Blank ratio

도면22


IL6: 10 ng/mL
Intensity (10^5cps)
Signal/Blank ratio
HRP-streptavidin (ng)
Signal (cps)
Signal/Blank ratio
0
25
50
75
100
125
4
6
8
10
0
10
20
30
40

도면23


Intensity (10^5cps)
PBS-T
Serum
Urine
P
S
U
P
S
U
Spiked (1 ng/mL)
Sample blank
0
1
2
3
4