(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0090035
(43) 공개일자 2010년08월13일

(51) Int. Cl.
G01N 33/22 (2006.01) *G01N 33/24* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0009283
(22) 출원일자 2009년02월05일
심사청구일자 2009년02월05일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(주) 인우 코퍼레이션
서울특별시 송파구 방이동 50-8
(72) 발명자
김승욱
서울 노원구 공릉2동 737번지 삼익아파트 104동 905호
신현용
서울특별시 관악구 신림4동 503-7호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
황이남

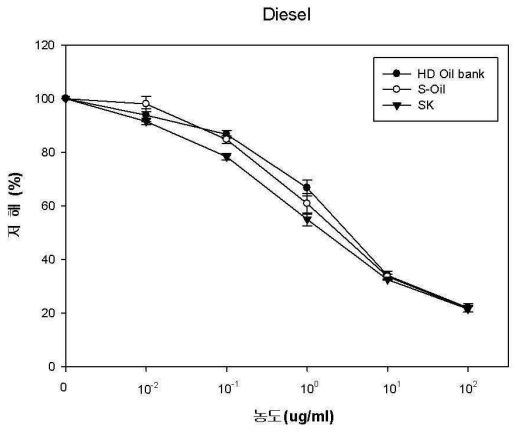
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 효소면역학적 방법을 이용한 유류제품의 이력 추적 및 식별방법

(57) 요 약

본 발명은 유류 제품의 이력 추적 및 식별 방법과 식별제를 제공한다. 보다 구체적으로 본 발명의 유류제품에 친유성기와 친수성기가 동시에 존재하는 식별제를 첨가하는 단계, 상기 유류제품으로부터 계면활성제를 이용하여 식별제를 추출하는 단계 및 상기 식별제를 특이적인 항체를 이용하여 효소-면역학적 방법(ELISA;enzyme-linked immunosorbent assay)으로 검출하는 단계를 포함하는 유류제품의 이력 추적 및 식별 방법을 제공한다. 본 발명을 이용하면, 소량의 식별제도 신속하게 정량적으로 검출 가능하므로 상기 방법 정확하고 신속한 고감도 유류검출시스템으로 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

김영주

서울특별시 영등포구 여의도동 45-15 서린빌딩 811

공성욱

서울특별시 송파구 방이동 173-3 두레빌라 가동 102호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	T0701322
부처명	(주)인우코퍼레이션
연구사업명	연구용역
연구과제명	(2단계BK)유류 식별제 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2008년 4월 1일 ~ 2009년 3월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

유류제품에 친유성기와 친수성기가 동시에 존재하는 식별제를 첨가하는 단계;

상기 유류제품으로부터 계면활성제를 이용하여 식별제를 추출하는 단계; 및

상기 추출된 식별제를 특이적인 항체를 이용하여 효소-면역학적 방법으로 검출하는 단계를 포함하는 유류제품의 이력 추적 및 식별 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유류제품은 가솔린 또는 디젤유인 것을 특징으로 하는 유류제품의 이력 추적 및 식별 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 식별제는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)인 것을 특징으로 하는 유류제품의 이력 추적 및 식별 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 특이적인 항체는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산과 운반체 단백질(carrier protein)의 복합체에 의해 생성된 토끼 유래의 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 항체인 것을 특징으로 하는 유류제품의 이력 추적 및 식별 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 운반체 단백질은 키홀림펫헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin ; KLH) 또는 소혈청알부민 (Bovine Serum Albumin; BSA)인 것을 특징으로 하는 유류제품의 이력 추적 및 식별 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 효소-면역학적 방법은 별도로 준비된 항원물질과의 경쟁반응을 이용하여 저해율을 측정하는 것을 특징으로 하는 유류제품의 이력 추적 및 식별 방법.

청구항 7

2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)를 포함하는 친유성과 친수성기가 동시에 존재하는 것을 특징으로 하는 유류 식별제.

청구항 8

2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)과 운반체 단백질(carrier protein)의 복합체를 이용하여 제조된 토끼 유래 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 항체를 포함하는 유류제품로부터의 식별제 검출 키트.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유류 제품의 이력 추적 및 식별 방법과 식별제에 관한 것으로 보다 구체적으로 본 발명의 유류제품에

친유성기와 친수성기가 동시에 존재하는 식별제를 첨가하는 단계, 상기 유류제품으로부터 계면활성제를 이용하여 식별제를 추출하는 단계 및 상기 식별제를 특이적인 항체를 이용하여 효소-면역학적 방법(ELISA;enzyme-linked immunosorbent assay)으로 검출하는 단계를 포함하는 유류제품의 이력 추적 및 식별 방법과 식별제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 고유가의 지속과 에너지 세제개편에 따른 유가상승이 지속됨에 따라서 유사석유제품의 불법유통이 증가함으로써 고액의 세금포탈, 석유유통시장의 혼란, 소비자의 피해발생 및 대기오염의 부작용을 가중시키고 있다. 또한 지속적인 품질검사에도 불구하고 유사석유제품의 불법영업행위가 감소되지 않아 불법판매 행위에 대한 우려와 민원발생이 증가하고 있다. 뿐만 아니라, 석유화학기술의 발전으로 인한 석유정제기술의 고도화로 각 정유사의 품질경쟁 및 유지에 많은 비용이 소요되고 있다.

[0003] 이에 따라 국내 석유제품의 건전한 유통질서를 확립하고 소비자의 권익을 보호하기 위한 품질관리 강화의 필요성이 요구되고 있다. 이에 각 정유사의 브랜드화 및 품질의 유지확인을 위해 석유제품 식별제의 도입이 이루어졌으며, 초기에는 가솔린에 첨가되기 시작하여 현재는 LPG 및 경유까지 확대되고 있는 추세이다.

[0004] 이러한 식별제를 석유 제품 제조 회사에서 제품을 유통시키기 전에 석유 제품에 일정 농도로 첨가해 놓는 경우 유통 중에 정량적인 검출이 가능하여 식별제의 농도를 확인해 보면, 다른 회사의 저가품 또는 면세품 등과 혼합되었는지 여부를 확인할 수 있다. 그러나 일부 주유소 또는 유통업자들에 의해서 검출 능력을 무능화시킴으로써 비정상적인 유통과정과 불법적인 이득을 취하고 있다.

[0005] 그러므로 석유 제품에 첨가되어 석유 제품을 표지하는 데 사용되는 식별제(marker)는 첫째, 염료와는 근본적으로 다른 물질이어야 하고 , 둘째, 석유 연료에 높은 용해도를 보이며 액체 형태로 만들 수 있어야 하며, 셋째, 색상이 없어야 하며, 넷째, 표지된 연료로부터 쉽게 추출될 수 있어야 하며, 다섯째, 연료에 첨가되어도 연료의 형상에 변화가 없어야 하며, 여섯째, 실험실적 방법으로 용이하고 간편하게 사용량에 따라 ppm 단위로 확인될 수 있어야 한다.

[0006] 식별제의 역할은 화학, 물리학적으로 동일 또는 유사한 액체를 명확히 구분하는 데 있으며, 일례로 연료를 표지하는 것은 상업적 이유뿐만 아니라 안정성 면에서 명확한 상표명과 등급을 표시해야 할 필요가 있기 때문이다. 따라서, 석유 제품을 표지하기 위한 식별제로서, 상기와 같이 석유 제품용 식별제에 요구되는 조건을 만족시키며, 기존의 식별제들에서 나타나는 단점이 제거된 더욱 우수한 식별제에 대한 필요성은 계속 있어 왔다.

[0007] 이러한 식별제를 검출하기 위하여 기존에는 산-염기 반응 등 특이적인 화학 반응을 유도하여 유류제품 내 식별제를 검출하는 방법을 사용해 왔다(특허출원번호 10-1993-0003716, 특허출원번호 10-2007-0088049, 특허출원번호 10-2004-7002923 등).

[0008] 그러나 상기 방법의 경우 유류제품 내에 저농도의 식별제가 함유되어 있으면 검출이 불가능하고, 식별제와 검출제 간의 특유의 결합반응을 통하여 식별제 검출이 수행되므로 식별제 검출 반응 후의 반응물은 폐기되어야 하며, 유류제품에 포함된 식별제는 각 정유사별로 거의 전국에 공통적으로 사용될 수 밖에 없어, 혼합된 휘발유의 경우 경로를 추적하기가 어렵다는 단점이 있을 뿐만 아니라, 각 정유사에서 생산하는 유류제품의 조성 및 화학적 성질의 차이로 인해서 식별제를 첨가함으로써 나타나는 물성의 변화, 발색 또는 화학반응 등으로 각 정유사에 맞는 각기 다른 식별제를 사용해야할 뿐만 아니라, 각기 다른 검출제를 사용해야만 한다는 단점이 있었다.

[0009] 그러나 식별제에 특이적인 항체를 이용하여 식별제의 특정부분을 특이하게 인지하고 이에 결합하여 식별제를 검출하는 효소-면역검출방법 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; ELISA)을 이용한 유류제품의 이력추적 및 식별방법은 유류제품에서 식별제 검출하는데 사용된 바 없을 뿐만 아니라 기존의 문제점을 해결할 수 있다. 더욱이 현재까지 항체의 응용 분야는 단백질 또는 효소의 검출용으로 사용되는 것으로 제한되어 왔으며, 화학물질을 검출하는 방법으로는 극히 제한적으로 사용되어 왔다.

[0010] 따라서, 본 발명자들은 산-염기반응과 높은 식별물질의 사용 농도와 같은 기존의 화학적 표지물질과 차별성을 가지기 위해 높은 감도의 식별제와 신속히 검출할 수 있는 식별제 시스템을 개발하기 위해 효소-면역검출방법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; ELISA)를 이용한 고감도와 신속성 갖춘 유류제품의 이력추적 및 검출방법과 식별제를 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 효소면역학적 방법을 이용한 유류제품의 이력 추적 및 식별 방법을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 목적은 친유성과 친수성기가 동시에 존재하는 것을 특징으로 하는 유류 식별제를 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 목적은 상기 유류식별제에 대한 항체를 포함하는 유류제품로부터의 식별제 검출 키트를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0014] 본 발명의 일양태는 유류제품에 친유성기와 친수성기가 동시에 존재하는 식별제를 첨가하는 단계; 상기 유류제품으로부터 계면활성제를 이용하여 식별제를 추출하는 단계; 및 상기 식별제를 특이적인 항체를 이용하여 효소-면역학적 방법으로 검출하는 단계를 포함하는 유류제품의 이력 추적 및 식별 방법에 관한 것이다.

[0015] 본원에 사용되는 용어, 이력 추적은 유류제품이 생산되어 이동하고 판매되는 동안의 정보를 추적하는 것을 말하는 바, 예를 들어, 유류제품이 혼합되는 경우 혼합된 유류제품의 종류 및 함량 등의 정보 등을 말한다.

[0016] 본원에 사용되는 용어, 효소-면역학적 방법(ELISA;Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)에서는 예컨대 96 well plate 각각의 구멍에 표준 리간드(항원)를 고정시키고 용액상의 수용체나 단백질을 가하여 결합을 유도한다. 결합된 수용체의 양은 수용체에 특이적으로 작용하는 항체를 가하여 결정하는데, 이때 가해진 1차 항체의 양은 색깔을 유도할 수 있는 2차 항체를 가하여 결정한다. 이들 2차 항체는 항체의 꼬리 부분을 인지하는 항체인데, 2차 항체의 꼬리에는 알칼린 포스파타제나 peroxidase 등의 효소(enzyme)가 연결되어 있고, 이들 효소의 작용으로 용액 속에 색깔을 유도하는 것이다. 항체에 효소를 결합시켜 항원-항체 반응을 확인하는 방법으로 그 방법이 간단하고 비용이 많이 들지 않으며 다량 분석이 가능하다.

[0017] 본원에 사용된 용어, 경쟁적 효소-면역학적 방법(competitive ELISA)은 시료에 들어있는 표준 리간드(항원)와 항체와의 결합은 시료 내 표준 리간드(항원)와 경쟁 관계에 있는 96 well plate 상의 표준 리간드(항원)와 상기 동일한 항체의 결합을 방해한다. 따라서, 경쟁적 효소-면역학적 방법은 96 well plate 상의 표준 리간드(항원)의 양은 고정되어 있으므로 시료 내 표준 리간드(항원)의 함량이 높을수록 저해율(%)이 감소하는 원리를 이용한 것으로(i.e., competes for binding) ELISA의 변형이다. 따라서, 본 발명에서의 경쟁적 효소-면역학적 방법은 별도로 준비된 항원물질과의 경쟁반응을 이용하여 저해율을 측정하는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 구체적인 예에 따르면 본 발명은 경쟁적 효소-면역학적 방법을 이용하여 식별제를 검출하였다. 본 발명의 효소-면역학적 방법에 따라 antigen과 결합하는 antibody 1 를 넣어주고 여기에 antibody 1 에 결합할 enzyme-liked antibody를 넣어준다. 그 다음 세척 후 substrate를 넣어주면 이 효소는 색을 띤 product를 생성한다.

[0019] 상기 유류제품에는 본원의 식별제가 혼합될 수 있는 어떤 유류제품, 예를 들어, 가솔린, 디젤연료, 연료유, 케로센 및 등유 등이 포함될 수 있으나 바람직하게는 가솔린 또는 디젤유이다.

[0020] 본원에 사용되는 용어, 식별제(maker)는 확인하고자 하는 액체 내에서 용해된 후, 표지된 액체에 대해서 효소-면역학적 방법을 통해 검출될 수 있는 물질을 말한다. 식별제는 항체와 결합하여 육안으로 식별할 수 있는 색을 발색하고, 이러한 색으로부터 그 농도를 육안으로 정성적으로 결정하거나, ELISA reader로 정량적으로 결정할 수 있다. 세금이 높게 부과된 연료를 세금이 낮게 부과된 연료로 희석시킬 때와 같이 희석 여부가 의심될 때 정량적 측정이 특히 중요하다.

[0021] 본 발명의 식별제는 유류제품에 가용성을 가져야 하는 바 친유성기를 가지는 동시에 수용액 상의 효소-면역학적 방법으로 검출되기 위해 친수성기도 가져야 한다.

[0022] 보다 구체적으로 친수성기에 따라 구체적인 예를 들면, 카르복실기를 가진 화학물질 식별제로는 Acifluorfen, Dicamba, Picloram, Fluroxypyr, Triclopyr 등이 있고, 이외에 벤젠고리와 카르복실기를 기본 골격으로 가지고 가진 식별제로는 Atrazine, Acetochlor, Chlorpyrifos, Acetamiprid, Imidacloprid, Thiamethoxam 등이 있으며, 아민기를 포함하는 화합물로 Imidacloprid, Bentazon 등이 있다.

[0023] 가장 바람직하게는, 상기 식별제는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)일 수 있다. 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)은 벤젠링과 카르복실기를 함께 가지고 있어 친유성 및 친수성의 특징을 가지고 있는 화학물질이다.

[0024] 식별제 제조방법은 보다 구체적으로 도 1에 도시된 방법에 따른다.

[0025] 본 발명의 식별제는 일반적으로 고체 또는 액체상 성상을 나타내며, 직접 연료에 첨가할 수도 있지만, 점도, 취급의 용이성 등을 고려하면, 적절한 용매에 용해시킨 용약의 형태로 사용할 수 있다. 취급 등의 용이성을 위해 액체 형태로 사용하는 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 식별제를 함유하는 액상의 현탁액을 제조하기 위해서, 상기 식별제를 유기 용매 중에 용해시키거나 희석시켜서 유류제품들에 대하여 높은 용해성을 갖는 비수성 용액을 제조할 수 있다. 일반적으로 액체 유류제품들과 사용하기에 적절한 용매들은 방향족 및 비양자성 용매들이다.

[0027] 본 발명의 식별제 사용 농도는 유류제품으로부터 농축 형태로 적절하게 추출되기 전까지는 유류 제품 내에서 발견될 수 없는 방식 및 농도로 사용되는 것이 바람직하다. 저농도(10ppm이하)의 식별제가 사용되는 경우, 식별제의 색상은 거의 검출되지 않을 뿐만 아니라, 투명하고 무색인 유류 제품에서조차 거의 검출 불가능한 색상을 나타낸다.

[0028] 표지된 유류 제품 내에 존재하는 식별제의 최종 함량은 여러가지의 요소에 따라 좌우된다. 최종적으로 표지된 액체 유류제품에서 식별제는 적게 첨가될수록 휘발유 또는 디젤의 물성에 영향이 적으므로 저농도의 식별제를 검출하는 특성을 지니는 것이 바람직하다. 이는 기존의 방법에 비해서 식별제 함량이 상대적으로 낮은 것이다. 일반적으로는 이보다는 다소 많은 양, 예를 들면, 10ppb~100ppm 농도에서는 정량적으로 식별제를 검출할수 있지만 100ppm 이상이 되면 오히려 식별제를 정량적으로 검출하기가 어려우므로 표지되지 않은 유류제품 중에서 희석되어야 한다.

[0029] 본 발명의 효소-면역학적 방법을 실시하기 전에 식별제를 추출하여 효소-면역학적 방법의 효율을 높이기 위하여 계면활성제를 사용한다. 보통 1분자 속에 친유기와 친수기가 함께 들어 있는 양쪽 친매성(親媒性)인 물질은 계면활성제가 될 수 있다. 예를 들어, 비누, 알킬벤젠술폰산염, 고급아민할로겐화물, 제사암모늄염, 알킬피리디늄염, 폴리에틸렌글리콜류 등이 계면활성제에 속한다.

[0030] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 계면활성제를 첨가하여 유류제품에서 식별제를 추출후 효소-면역학적 방법으로 검출이 가능하였다.

[0031] 상기 식별제에 특이적인 항체는 식별제와 운반체 단백질(carrier protein)을 반응시켜 생성된 복합체를 immunization을 하여 수득한 것을 말한다. 식별제는 항원으로서 자체적으로는 immunogenicity가 없는 바 운반체 단백질(carrier protein)을 이용하여 컨쥬게이션(conjugation)시켜 만든 복합체를 immunization을 하여 수득할 수 있다(도 1 참고).

[0032] 보다 바람직하게는 본 발명의 식별제가 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산인 경우 상기 식별제에 특이적인 항체는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산과 운반체 단백질(carrier protein)의 복합체에 의해 생성될 수 있으며 상기 복합체를 immunization을 하여 수득한 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 항체일 수 있다. 상기 복합체를 수득할 수 있다면 immunization 대상은 한정되지 않지만 바람직하게는 토끼인바, 상기 식별제에 특이적인 항체는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산과 운반체 단백질(carrier protein)의 복합체를 immunization을 하여 수득한 토끼 유래의 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 항체일 수 있다.

[0033] 운반체 단백질을 결합시켜 수득하는 펩티드-단백질 컨쥬게이트(Peptide-protein conjugates)는 펩티드에 대한 항체를 생산하기 위해 사용된다. 펩티드만으로는 충분한 면역 반응을 이끌어내기에 너무 작기 때문에 많은 에피토프(epitopes)를 포함하는 운반체 단백질들 사용하여 T-헬퍼 세포(T-helper cells)을 자극하거나 B-세포(B-cell)을 유도하도록 한다. 운반체 단백질에는 예를 들어, 키홀림펫헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin ; KLH) 또는 소혈청알부민 (Bovine Serum Albumin; BSA), OVA, Thyroglobulin 등이 있다. 본 발명에 있어서도, 식별제와 결합하여 복합체(식별제-단백질 컨쥬게이트)를 형성하는 운반체 단백질을 사용하여 항체를 생산해 내는 바, 본 발명은 구체적인 실시예에서 키홀림펫헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin ; KLH) 또는 소혈청알부민 (Bovine Serum Albumin; BSA)을 사용하였다.

[0034] 상기 복합체의 immunization을 통해 항체를 수득하고 특이적 항체만을 선별하는 과정을 거쳐 poly(mono) clonal 항체를 얻었다.

[0035] 본 발명의 다른 양태는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)를 포함하는 친유성과 친수성기가 동시에 존재하는 것을 특징으로 하는 유류 식별제에 관한 것이다.

[0036] 본 발명의 또 다른 양태는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)과 운반체 단백질(carrier protein)의 복합체를 이용하여 제조된 토끼 유래 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 항체를 포함하는 유류제품로부터의 식별제 검출 키트에 관한 것이다.

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

효 과

[0038] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명은 효소-면역학적 방법으로 식별제를 검출하는 바, 기존의 식별제 검출방법과 현격히 구별되는 특징을 가지는 바,

[0039] 첫째, 기존의 방법에 비하여 저농도의 식별제도 신속하게 검출할 수 있는 신속성과 고감도를 갖춘 유류제품의 이력추적 및 검출 방법이다.

[0040] 둘째, 소량의 시료만으로도 식별제 검출 여부가 가능하다. 기존의 방법의 경우 다량의 시료가 필요하나 본원 방

법의 경우 이보다 소량의 시료만으로도 식별제의 정성적 검출은 물론 정량적 검출이 가능하다.

[0041] 셋째, 기존의 방법은 식별제와 검출제 간의 특유의 결합반응을 나타내는 바 식별제 검출 반응 후의 반응물은 폐기되어야 하나, 본원과 같이 효소-면역학적 방법을 통해 검출하는 경우 검출 후의 시료는 다시 사용할 수 있어 경제적인 면에서도 유리하다.

[0042] 넷째, 기존 방법의 경우 유류제품에 포함된 식별제는 각 정유사별로 거의 전국에 공통적으로 사용될 수 밖에 없어, 혼합된 휘발유의 경우 경로를 추적하기가 어렵다는 단점이 있으나 본원 방법을 이용하면 다양한 식별제의 개발이 가능하고, 각 지역별로 다양한 식별제를 사용하여, 효소-면역학방법으로 검출할 수 있으며, 지역별로 다르게 첨가된 식별제의 검출을 이용하여 불법으로 혼합된 휘발유의 경로를 쉽게 파악할 수 있는 장점을 가진다.

[0043] 다섯째, 기존 방법의 경우 각 정유사에서 생산하는 유류제품의 조성 및 화학적 성질의 차이로 인해서 식별제를 첨가함으로써 나타나는 물성의 변화, 발색 또는 화학반응 등으로 각 정유사에 맞는 각기 다른 식별제를 사용해야할 뿐만 아니라, 각기 다른 검출제를 사용해야만 한다. 그러나 본원 방법은 모든 정유사에서 생산하는 유류제품에 동일하게 이용할 수 있어서 각기 다른 식별제의 검출방법의 통일성 확보에 기여하고, 다양한 시료에 대한 동일한 검출방법으로 검출의 효용성을 높일 수 있다.

[0044] 따라서 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 소량의 식별제를 첨가하더라도 정확하고 신속한 유류검출이 가능한바 고감도, 신속성 및 편의성을 가진 유류검출시스템으로서 불법 유류유통 및 세금포탈 등 각종 불법행위를 억제하는데 크게 기여할 것으로 예상된다.

[0045] 또한, 본 발명을 이용하면 유류제품의 이력추적 및 타사의 정유제품과의 혼합 여부 들을 확인할 수 있으므로 정상적 유류유통은 물론 식별제 개발 및 분석기술의 선진화를 꾀할 수 있을 것으로 예상된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0046] 시료: Dichloromethane, N-hydroxysuccinimide, 2.4.5-T, DMF , N,N-dicyclohexyl carbodiimide, 0.2M borate buffer,

[0047] **실시예 1 : active ester의 합성 및 hapten-protein 복합체(항원과 운반체 단백질과의 복합체) 제작**

[0048] ① active ester의 합성

[0049] Dichloromethane(5ml; Fluka 02575)에 N-hydroxysuccinimide(38.05mg-0.33mmol: aldrich 130672: aldrich 197122)을 용해 시킨 후 소량의 dichlormethane에 녹인 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)를 첨가하였다 그 다음에 (2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)의 카르복실기와 결합하고 단백질의 아민기와 결합하는 링커 역활의 N,N-dicyclohexyl carbodiimide(68.09mg-0.33mmol: Bio Basic INC. DB0397)을 차례로 첨가하였다. 반응용액을 실온에서 3시간 동안 반응시킨 다음 원심분리기(4,000rpm, 10min) 돌린 후 질소가스 사용하여 용매를 휘발. 휘발 시킨 후 얻어진 시료가 active ester 이다.

[0050] ② hapten-protein conjugation

[0051] 0.2M borate buffer 1ml 에 10mg의 소혈청알부민 (BSA; bovine Serum Albumin)를 용해 시킨 후 0.1ml의 Dimethylformamide (DMF)를 떨어뜨리면서 세게 교반시켰다. 여기에 active ester(3.1mg)을 녹인 Diemthylformamide(0.15ml: aldrich 494488)용액을 20분에 걸쳐 천천히 떨어뜨린 후 실온에서 1시간, 4℃에서 하룻밤 교반 (교반시 랩을 사용하여 밀봉)한다. 그 다음 그 액체를 투석튜브에 넣고 2 L의 Phosphate buffer saline (ph 7.4) 을 이용하여 4℃에서 3일간 투석한다. (투석액은 24시간마다 새로운 phosphate buffer saline으로 전액 교환한다.)

[0052] ※ 투석방법

[0053] 투석튜브를 잘라서 한쪽면에 플라스틱 집게로 집은 후 증류수에 넣어서 비닐을 개봉한다. 투석할 용액을 투석튜브에 넣어 나머지부분도 집는다. PBS용액 2L(2~3회 교환/1일)가 담긴 곳에 앞에서 만든 투석 장치 넣고 마그네틱바로 돌려 주면서 2~3일 냉장고에서 수행한다. (PBS용액 미리 준비해서 냉장고 보관 후 사용)

[0054] ※ PBS(phosphate buffer saline) 제조

[0055] 1. 조성(1L기준); Nacl (8g), KCl (0.2g), Na_2HPO_4 (1.44g), KH_2PO(0.24g)

[0056] 2. 적당량의 3차증류수에 위의 조성대로 시료를 녹인 후에 NaOH로 pH7.4로 맞추고 3차 증류를 첨가 하면서 총 부피를 1L를 맞춘다.

[0057] ※ 0.2M borate buffer 제조

[0058] Borax(M.W 381.37: aldrich B0127) 0.96g(0.5M)에 적당량의 3차 증류수를 넣고 녹인후 50mL을 맞춘다.

[0059] 0.1M HCl 로 pH8.3을 맞추고 100mL에 정용한다.

[0060] ③ 항체의 제조

[0061] Pre-immune serum 2ml 및 토끼 2마리를 준비하였고, complete Freund's Adjuvant(CFA) 1mg을 토끼에 주입하였다. 4주 경과 후 incomplete Freund's Adjuvant(IFA) 500㎍을 섞어 만든 emulsion을 토끼에 주입하여 1차 면역과정을 거쳤다. 5주 후에 1ml serum을 1차 채혈 하고 1차 ELISA 테스트를 하였다. 6주 후에 incomplete Freund's Adjuvant(IFA) 500㎍을 섞어 만든 emulsion을 토끼에 주입하여 2차 면역과정을 거쳤다. 7주 후에 1ml serum을 2차 채혈을 하고 2차 ELISA 테스트를 하였다. 8주 후에 incomplete Freund's Adjuvant(IFA) 500㎍을 섞어 만든 emulsion을 토끼에 주입하여 3차 면역과정을 거쳤다. 9주 후에 50 ml serum을 최종 채혈 하고 최종 ELISA 테스트를 하였다.

[0062] 일차적으로 상기 방법으로 생성된 항체에서 affinity column purification (Pierce #44667)을 이용하여 항체를 제외한 불순물을 제거하였다. 순수 분리된 항체 중에서 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)에 특이적 항체만을 선별하기 위하여 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)와 결합된 BSA 를 아민기를 가지는 실리카 담체에 고정화 한 후에 순수 분리된 항체와 반응한다. 반응이 끝난후 실리카와 결합된 항체는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)에 특이적 항체이므로, 이렇게 얻어진 항체를 이용하여 효소면역반응에 사용하였다.

[0063] affinity column purification kit와 실리카를 이용하여 항체를 정제시 낮은 pH 버퍼를 이용하여 항체를 추출하는데, 낮은 pH에 의해서 항체의 활성이 낮아질 수 있으므로 pH 7.4의 PBS 버퍼에 DIALYSIS TUBING (sigma D0530)을 담가두고, DIALYSIS TUBING 안에 추출되는 항체용액이 들어가도록 하여 빠르게 pH를 중성으로 회복하도록 추출방법을 디자인 하였다.

[0064] **실시예 2. 유류제품에의 식별제 첨가 및 추출 과정**

[0065] 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 500mg을 1ml의 IPA(isoprophylalcohol)에 녹였다. (500000ppm) 녹인 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)를 휘발유 또는 디젤유에 희석하여 각각의 농도를 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ppm 농도로 만들었다.

[0066] 휘발유 또는 디젤에서의 식별제 추출은 TBS 용액에 0.1~0.3%의 계면활성제 종류인 tween 20을 첨가하고 휘발유 또는 디젤 시료부피의 1/10부피로 첨가후 vortexing 30초를 후 20-30분간 정체후(거품제거 등) ELISA로 반응하여 검출한다.

[0067] **실시예 3 : 경쟁적 효소-면역반응**

[0068] 제 1도의 실험결과로부터 만들어진 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)와 키홀림펫헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin ; KLH)이 아미노결합하여 형성된 복합체를 이용하여 토끼로부터 생산된 항체를 이용하여 경쟁적 효소-면역반응을 수행하였다.

[0069] 플레이트 상 각 웰에 coating solution 1으로 희석시킨 100 ㎕ 상기 항원을 넣고, 4℃ 밤새 혹은 37℃ 2시간 동안 인큐베이션시킨 다음, coating solution 1을 제거하였다. 각 웰에 300 ㎕ blocking solution 2을 넣고, 4℃ 밤새 혹은 37℃ 0.5 ~ 1 동안 인큐베이션시킨 다음, blocking solution을 제거하였다. 300 ㎕ TBS-T buffer3로 세척하고, 종이타월로 부드럽게 톡톡쳐서 남아있는 solution을 제거하여 완벽히 건조시켰다. 100 ㎕의 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)가 포함된 시료(가솔린 또는 디젤)와 100 ㎕ 항체가 희석된 용액 (1% skim milk 를 포함하는 TBS-T)을 각 웰에 넣고 실온에서 30분간 흔들어주면서 반응시켰다. 플레이트 위에 올린다음 종이타월로 톡톡쳐서 남아있는 solution을 제거하여 완벽히 건조시켰다. 300 ㎕ TBS-T buffer로 각 웰을 세척한 후, 남아있는 solution을 제거여 완벽히 건조시켰고 이러한 과정들을 세번 반복하였다. 1차 항체와 결합되도록 100 ㎕ HRP- 표지된 2차 항제(pierce #31460) 100 ㎕를 넣고 37℃ 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트 위에 올린다음 종이타월로 톡톡쳐서 남아있는 solution을 제거하여 완벽히 건조시켰다. 300 ㎕ TBS-T buffer로 각 웰을 세척한 후, 남아있는 solution을 제거여 완벽히 건조시켰고 이러한 과정들을 5번 반복하였다. 각 웰에 100 ㎕ TMB substrate(pierce 34021)을 넣었다. 약 10분(혹은 발색하기 적절한 시간) 후에 100 ㎕ stop solution(1N HCl)을 넣었다. ELISA reader로 492nm 에서 흡광도를 측정하였다.

[0070] 1 Coating solution: 32mM Na2CO3, 68mM NaHCO3

[0071] 2 Blocking solution: 1% non fat dry skim milk or 1% Bovine serum albumin in PBS

[0072] 3 TBS-T buffer: 0.1M Tris-buffered saline (pH7.4) with 0.1% Tween 20

[0073] 상기 본원의 효소-면역학적 방법을 이용하여 각 정유사별로 휘발유와 디젤의 조성이 모두 다른 경우 검출시 첨가된 식별제의 간섭의 존부를 알아보았다. 이를 위해 여러 정유사의 휘발유와 디젤을 사용하였는바, 시료는 현대오일뱅크, S-oil, SK 정유사의 가솔린 및 디젤유를 이용하였다.

[0074] 각 정유사의 가솔린 및 디젤유의 표준시료 농도는 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 100ppb, 10ppb, 0ppb 로 제작하여 측정한 결과 신속하게 낮은 농도까지도 검출되어 정확한 측정값을 가졌다(제 2도-제 5도).

[0075] 결론적으로, 제 1도에 의한 복합체를 이용하여 성공적으로 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 항체가 생성되었고, 생성된 항체를 이용하여 경쟁적 효소-면역반응을 수행하여 표준시료 농도를 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 100ppb, 10ppb, 0ppb 농도에서 검량선이 제작되어, 미지의 시료로부터 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 또는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)의 농도 측정을 신속하게 낮은 농도까지도 검출이 가능하였다(제 2도-제 5도).

[0076]

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 active ester의 합성과정 및 hapten-protein 복합체(항원과 운반체 단백질과의 복합체) 제작과정을 도시

한 것이다.

[0078] 도 2는 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 를 이용한 현대오일뱅크, S-Oil 과 SK 디젤(diesel)의 경쟁적 효소-면역반응 결과를 도시한 것이다.

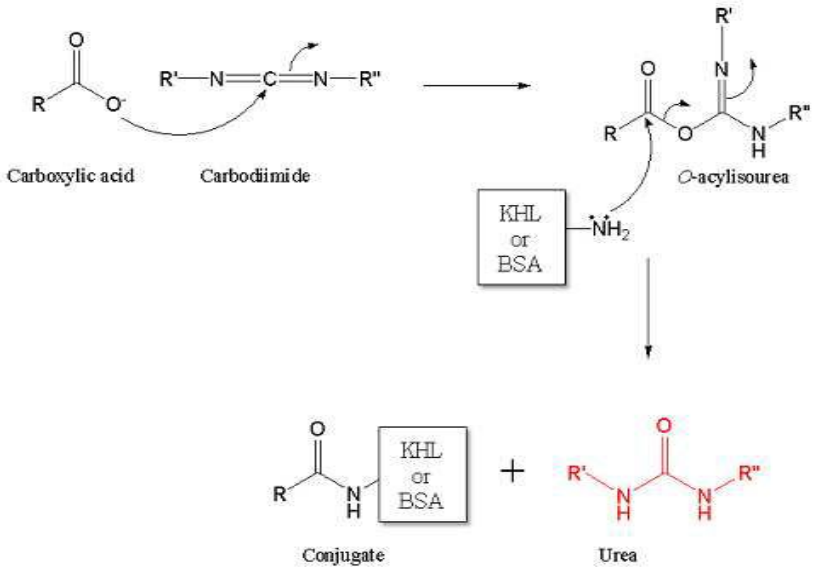
[0079] 도 3은 2,4,5-트리클로로페녹시아세트산 (2,4,5-Tichlorophenoxyacetic acid) 를 이용한 현대오일뱅크, S-Oil 과 SK 가솔린(gasoline)의 경쟁적 효소-면역반응 결과를 도시한 것이다.

[0080] 도 4는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 를 이용한 현대오일뱅크, S-Oil 과 SK 디젤의 경쟁적 효소-면역반응을 도시한 것이다.

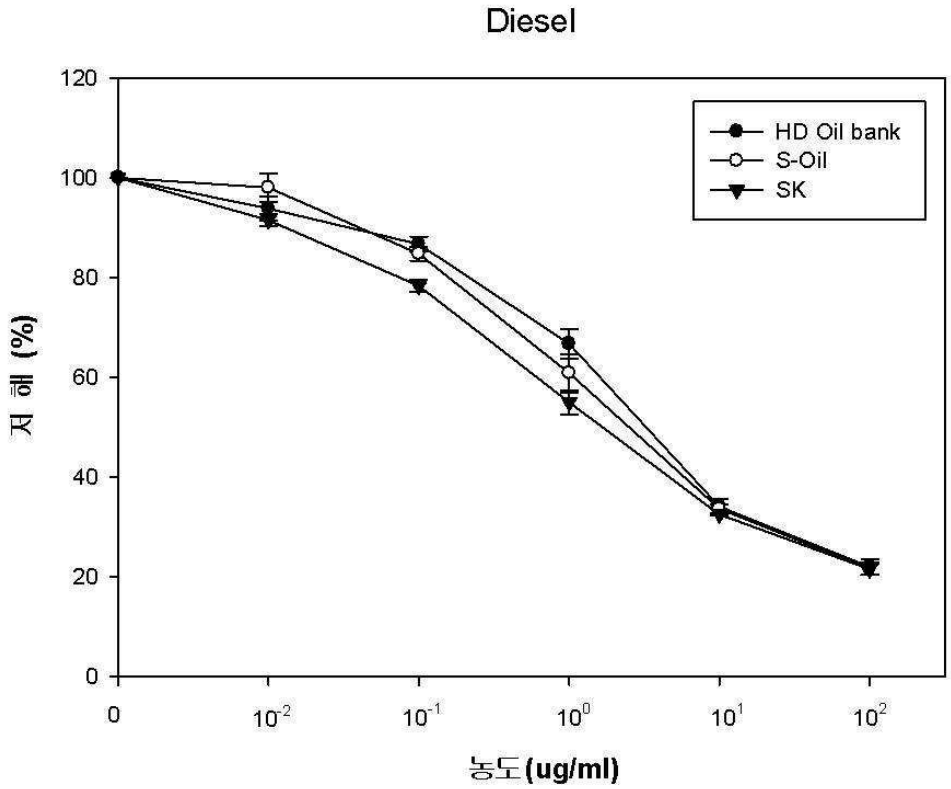
[0081] 도 5는 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 를 이용한 현대오일뱅크, S-Oil 과 SK 가솔린의 경쟁적 효소-면역반응을 도시한 것이다.

도면

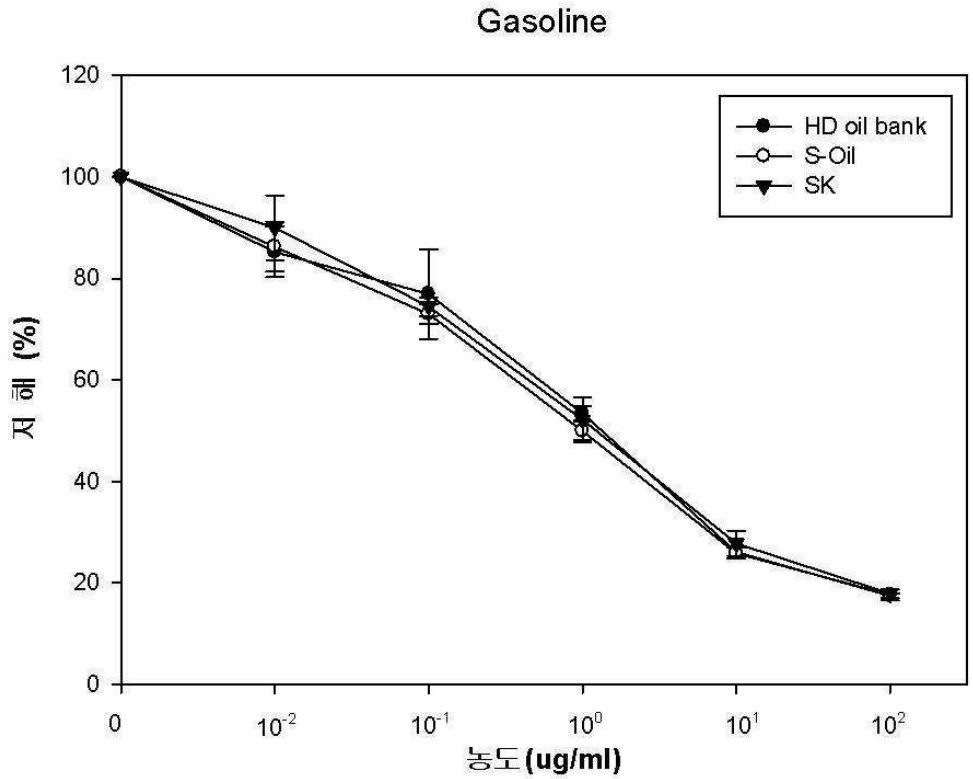
도면1



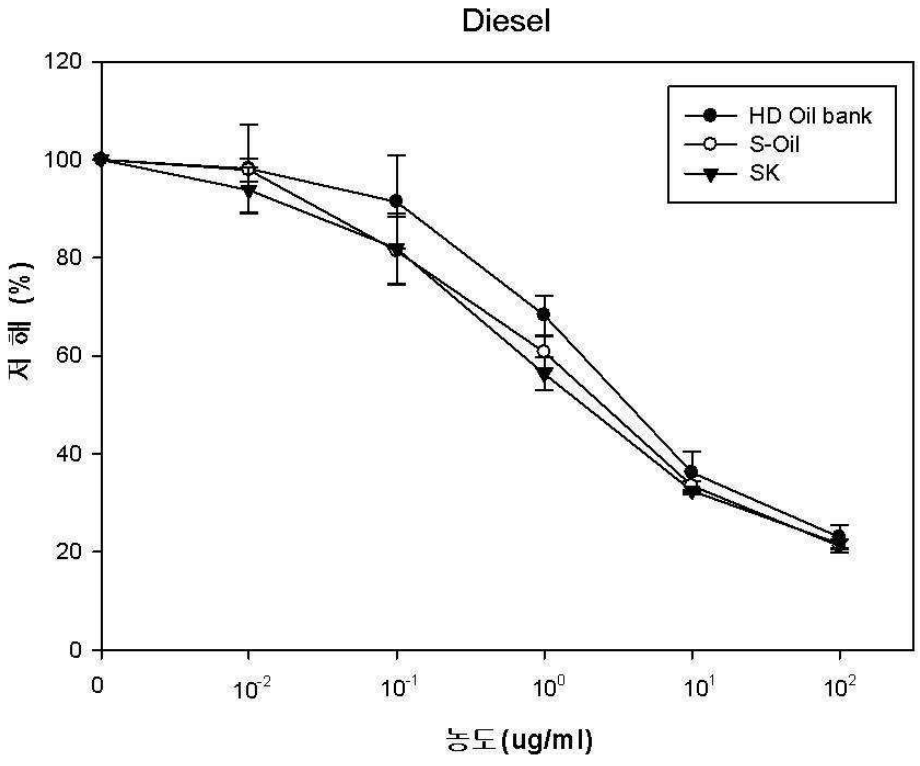
도면2


Diesel
HD Oil bank
S-Oil
SK
저 해 (%)
농도(ug/ml)
120
100
80
60
40
20
0
0
10-2
10-1
100
101
102

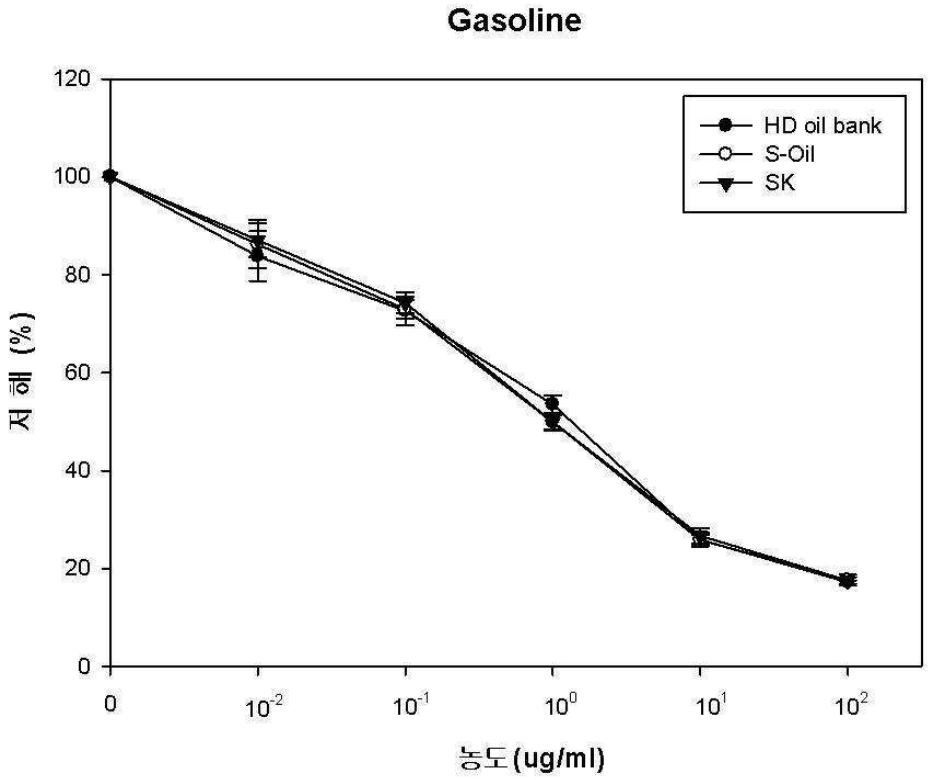
도면3


Gasoline
HD oil bank
S-Oil
SK
저 해 (%)
농도 (ug/ml)
0
20
40
60
80
100
120
0
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}

도면4


Diesel
HD Oil bank
S-Oil
SK
저 해 (%)
농도 (ug/ml)
0
20
40
60
80
100
120
0
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}

도면5


Gasoline
120
100
80
60
40
20
0
저 해 (%)
0
10-2
10-1
100
101
102
농도(ug/ml)
HD oil bank
S-Oil
SK