



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0096470
(43) 공개일자 2018년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/64 (2006.01) C12N 15/115 (2010.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/6486 (2013.01)
C12N 15/115 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0113510
(22) 출원일자 2017년09월05일
심사청구일자 2017년09월05일
(30) 우선권주장
1020170023071 2017년02월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
손아정
서울특별시 마포구 백범로 230, 102동 604호(신공덕동, 브라운스톤 공덕 아파트)
채빌리
서울특별시 용산구 새창로 70 삼성래미안아파트 113동 1103호
임현정
서울특별시 마포구 월드컵북로9길 33 (성산동) 성산해승빌 302호
(74) 대리인
손민

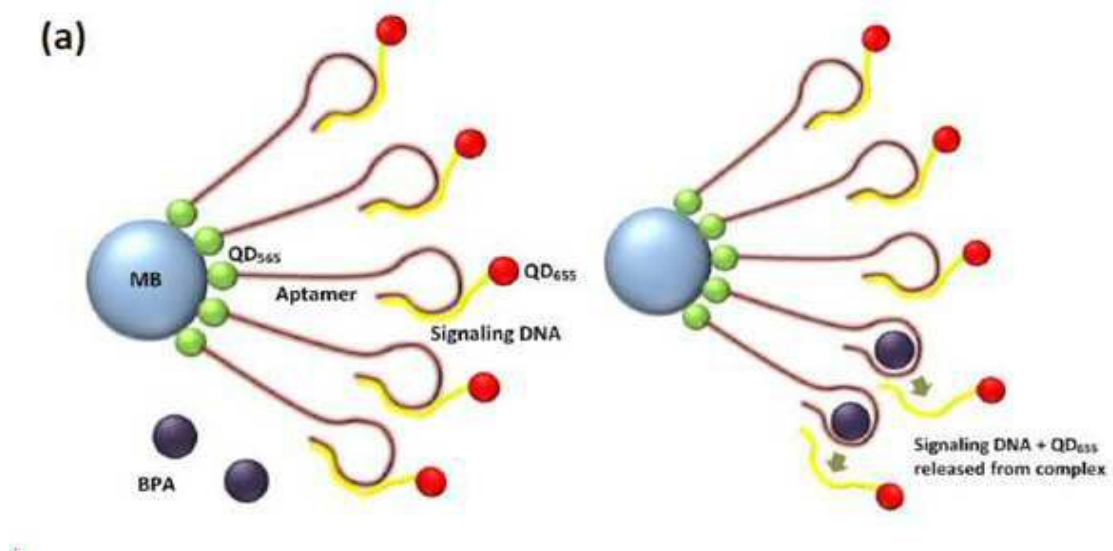
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치

(57) 요약

본 발명은 비스페놀 에이에 특이적으로 결합하는 애프타머를 포함하는 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치 및 이를 이용하여 비스페놀 에이를 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 분석 장치는 오염 환경에서 채집된 소량의 시료를 현장에서도 실험실 환경과 유사한 정도로 분석할 수 있어, 보다 즉각적이고 정확한 비스페놀 에이의 검출 및 정량화를 가능케하는 효과를 가진다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 2310/16 (2013.01)

C12Q 2525/205 (2013.01)

G01N 2021/6482 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A1A1003129

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업(학술진흥)-사회문제해결을 위한 시민연구사업-생활·환경 기술개발사업

연구과제명 마이크로 플루이딕스 기반 환경호르몬 감지시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.11 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

(a) (i) 자성입자, 제1표지 물질, 제2표지 물질, 및 비스페놀 에이에 특이적으로 결합하는 앵타머를 포함하는 제1복합체;

(ii) 투입구를 구비하며, 상기 제1복합체와 비스페놀 에이가 반응하여 상기 자성입자, 제1표지 물질, 비스페놀 에이, 및 앵타머를 포함하는 제2복합체를 형성하고, 제2표지 물질은 제2복합체로부터 분리되는 반응을 수행하는 반응 용기; 및

(iii) 상기 반응 용기에서 상기 제2복합체를 수집하는 수단

을 포함하는 반응부; 및

(b) 상기 제1표지 물질 및 제2표지 물질에서 발생된 신호를 검출하는 수단을 구비한 검출부를 포함하는, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1복합체는 상기 반응 용기 내에 구비된 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 앵타머는 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제2복합체를 수집하는 수단은 상기 반응 용기에 ON/OFF 방식으로 자력을 인가하는 자력원을 구비하여, 상기 제2복합체를 수집할 수 있는 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 반응부는 (iv) 제2복합체를 형성하지 않은 제1복합체 및 비스페놀 에이, 및 상기 분리된 제2표지 물질을 제거하는 제거 수단을 추가로 구비하는 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 제거 수단은

세척 용액을 포함하는 세척 용액 용기; 및

상기 세척 용액 용기로부터 세척 용액을 상기 반응 용기로 이동시키는 수단을 추가로 구비하여,

상기 이동된 세척 용액으로 상기 제2복합체를 형성하지 않은 제1복합체 및 비스페놀 에이, 및 분리된 제2표지 물질을 제거하는 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 세척 용액에 의한 제거는 1 내지 5회 수행하는 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 반응부는 (v) 상기 반응 용기를 진동시키는 동력원을 추가로 구비하는 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 동력원은 상기 반응 용기를 교반시켜 상기 제2복합체의 침전을 방지하는 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 검출부는 제1표지 물질 및 제2표지 물질로부터 신호를 발생시키는 신호 발생 수단을 추가로 구비하는 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 신호 발생 수단은 레이저 발광 다이오드(LED), 레이저 다이오드(LD), 수직 공동 표면 발광 레이저(vertical-cavity surface-emitting laser), 반도체 다이오드, 또는 수은 램프를 포함하는 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 제1표지 물질, 및 제2표지 물질은 각각 양자점(quantum dot), 형광 염료(dye), 방사능표지(radiolabel), 또는 전기화학적 작용기(electrochemical functional group)인 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 검출부는 상기 검출된 제1표지 물질에 대한 제2표지 물질의 신호의 변화로부터 비스페놀 에이의 농도를 연산할 수 있는 연산 수단을 추가로 구비하는 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 검출부는 상기 연산 수단에 의해 연산된 비스페놀 에이의 농도를 출력할 수 있는 수단을 추가로 구비하는 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 장치는 방열판 또는 팬을 추가로 구비하는 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 장치는 상기 제2복합체를 수집하는 수단, 상기 신호 발생 수단, 및 상기 검출부를 ON/OFF 제어하는 제어부를 추가로 구비하는 것인, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치.

청구항 17

채집된 시료를 투입구에 투입하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치를 이용한 비스페놀 에이 검출 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 시료를 투입구에 투입하는 단계는 채집된 시료; 및 자성입자, 제1표지 물질, 제2표지 물질, 및 비스페놀 에이에 특이적으로 결합하는 앵타머를 포함하는 제1복합체를 동시, 또는 순차적으로 투입하는 단계인 것인, 비스페놀 에이 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비스페놀 에이에 특이적으로 결합하는 앵타머를 포함하는 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치에 관한 것이다. 또한, 상기 장치를 이용하여 비스페놀 에이를 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 비스페놀 에이 (Bisphenol A, BPA)는 1890 년대와 1900 년대 초 사이에 처음으로 합성 및 보고되어, 현재까지, 통조림 식품의 내부 라이닝, 영수증을 위한 감열지, 전자 제품을 위한 플라스틱 하우징, 장난감 및 아기 젖병에 이르기까지 다양한 분야에서 활용되었다. 그러나, 비스페놀 에이가 내분비 교란 화합물이며, 내분비계에서 에스트로겐 수용체에 결합함으로써 에스트로겐 호르몬을 모방하기 때문에 심각한 건강 문제를 야기할 수 있음이 밝혀졌다. 대표적으로 비스페놀 에이에 의한 것으로 알려진 질환에는 유아와 어린이의 생식 및 발달 장애, 신경 질환, 암, 비만, 당뇨병 및 심혈관 질환 등이 있다.

[0004] 비스페놀 에이가 초래하는 환경 및 공중 보건에 의한 영향이 명백해지면서, 비스페놀 에이의 사용이 금지되었으나, 이미 폐수 처리 공장의 유출물 또는 매립지의 침출수에 의한 강과 저수지의 비스페놀 에이 오염은 계속되고 있는 상황이다.

[0005] 특히, 비스페놀 에이는 매우 낮은 농도(10^{-10} 내지 10^{-8} moles/L (0.02 내지 2.28 ng/ml 또는 ppb))에 의해서도 상기와 같은 건강상의 위험을 초래하는 것으로 알려져 있어, 그 위험성이 더 크다. 이에, 비스페놀 에이에 의한 물 공급원의 끊임없는 오염은 환경 및 공공 보건 기관의 주요 관심사 중 하나가 되었다.

[0007] 이에, 비스페놀 에이 오염을 검출하기 위한 실험실 기반 및 휴대용 비스페놀 에이 검출 및 정량 분석의 중요성이 점차 대두되었다. 기존의 실험실 기반 분석은 질량 분석을 이용한 가스 크로마토그래피 (GC-MS), 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC) 및 최근의 DNA Y 접합 감지 방법 등이 알려져 있으나, 항체의 안정성에 크게 의존하고 아날로그 화합물과의 비특이적 결합 및 이온 종으로부터의 간섭에 영향을 받기 쉬운 문제점이 있다. 한편, 기존의 전기 화학적 검출은 스크린에 인쇄된 전극(screen-printed electrodes)을 통한 휴대성을 갖지만, 간섭종(interfering species)에 취약한 문제점이 있다.

[0009] 비스페놀 에이의 검출을 위한 하나의 방법으로서, 비스페놀 에이를 검출하기 위한 앵타머가 개발되고 있는데, 예를 들어, 한국공개특허 제2010-0093205호에는 비스페놀 에이와 특이적으로 결합하는 두 개의 앵타머를 포함하는 비스페놀 에이 검출용 키트가 개시되어 있다. 그러나, 구조적으로 두개의 페놀 화합물이 결합된 형태를 나타내는 비스페놀 에이는 비교적 단순한 구조를 나타내는데 반하여, 이를 검출하기 위한 앵타머는 대체로 다수의 스템-루프(stem-loop) 구조를 갖는 복잡한 2차원적 구조를 나타내므로, 상기 앵타머에 의한 비스페놀 에이의 검출감도가 낮다는 문제점이 제기되었다. 그러나, 아직까지는 이러한 문제점의 해결방안이 도출되지 않고 있는 실정이다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 이전 연구를 통하여, 비스페놀 에이를 보다 높은 검출 감도로 검출할 수 있는 14개의 뉴클레오타이드로 구성된 신규한 앵타머를 개발한 바 있다.

[0013] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 상기 앵타머를 이용하여 환경에서 비스페놀 에이이 존재하는 농도 수준(<1 ng/ml 또는 ppb)에서 비스페놀 에이 검출이 가능하고, 휴대성을 지녀 현장에서 비스페놀 에이를 검출할 수 있는 소형 나노 앵타머 분석 장치를 개발하고자 노력한 결과, 상기 앵타머를 이용한 비스페놀 에이를 검출할 수 있는 휴대용 분석 장치를 개발하고, 상기 분석 장치가 실험실 기반의 비스페놀 에이 정량 분석 결과와 동등한 수준으로 비스페놀 에이를 검출할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 하나의 목적은 (a) (i) 자성입자, 제1표지 물질, 제2표지 물질, 및 비스페놀 에이에 특이적으로 결합하는 앵타머를 포함하는 제1복합체;

[0016] (ii) 투입구를 구비하며, 상기 제1복합체와 비스페놀 에이이 반응하여 상기 자성입자, 제1표지 물질, 비스페놀 에이, 및 앵타머를 포함하는 제2복합체를 형성하고, 제2표지 물질은 제2복합체로부터 분리되는 반응을 수행하는 반응 용기; 및

[0017] (iii) 상기 반응 용기에서 상기 제2복합체를 수집하는 수단

[0018] 을 포함하는 반응부; 및

[0019] (b) 상기 제1표지 물질 및 제2표지 물질에서 발생된 신호를 검출하는 수단을 구비한 검출부를 포함하는, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치를 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 다른 하나의 목적은 채집된 시료를 투입구에 투입하는 단계를 포함하는, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치를 이용한 비스페놀 에이 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기 목적을 달성하기 위한, 본 발명의 하나의 양태는 (a) (i) 자성입자, 제1표지 물질, 제2표지 물질, 및 비스페놀 에이에 특이적으로 결합하는 앵타머를 포함하는 제1복합체;

[0023] (ii) 투입구를 구비하며, 상기 제1복합체와 비스페놀 에이이 반응하여 상기 자성입자, 제1표지 물질, 비스페놀 에이, 및 앵타머를 포함하는 제2복합체를 형성하고, 제2표지 물질은 제2복합체로부터 분리되는 반응을 수행하는 반응 용기; 및

[0024] (iii) 상기 반응 용기에서 상기 제2복합체를 수집하는 수단

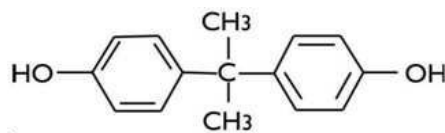
[0025] 을 포함하는 반응부; 및

[0026] (b) 상기 제1표지 물질 및 제2표지 물질에서 발생된 신호를 검출하는 수단을 구비한 검출부를 포함하는, 비스페

놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치를 제공하는 것이다.

- [0028] 본 발명자들은 보다 높은 검출감도로 비스페놀 에이를 검출할 수 있는 기술을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 비스페놀 에이를 검출할 수 있는, 서열번호 1의 염기서열로 구성된 앵타머를 개발하였다 (한국 출원 제 10-2016-0038955호).
- [0029] 상기 개발된 앵타머는 비스페놀 에이에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 종래의 앵타머 보다는 작은 크기와 단순한 2차원적 구조를 갖고, 종래의 앵타머와 비교하여, 종래의 앵타머 보다도 비스페놀 에이에 대하여 높은 검출감도를 나타낸다.
- [0030] 이에, 본 발명자들은 상기 개발된 앵타머를 이용하여, 비스페놀 에이의 오염이 의심되는 환경에서 시료를 채취하여, 현장에서 직접 비스페놀 에이를 검출할 수 있는 휴대용 분석 장치를 개발하였다.
- [0032] 본 발명에 따른 휴대용 분석 장치는 자성입자, 표지 물질, 및 상기 앵타머를 포함하는 복합체를 구성하여, 비스페놀 에이의 결합 여부에 따라 변화하는 신호를 측정함으로써, 실험실 외부 환경에서도 높은 감도로 비스페놀 에이를 검출할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0033] 구체적으로, QD₆₅₅ 캡슐화 자성입자 (MB)는 비스페놀 에이 특이적 앵타머와 공유결합을 형성함으로써 결합되며, 신호 DNA-QD₆₅₅ 접합체와 혼성화된 다 (도 1a). 비스페놀 에이에 노출될 경우 (배양), 신호 DNA-QD₆₅₅ 접합체가 앵타머로부터 방출되어 제거된다 (행균). 이런 방법으로, QD₆₅₅에서 감소된 형광 신호(형광 측정)는 BPA 농도를 나타낸다. 즉, BPA 농도가 증가함에 따라, 대응하는 측정된 형광은 감소한다.
- [0035] 본 발명의 분석 장치는 수중에 미량으로 존재하는 비스페놀 에이를 현장에서 보다 신속하게 측정할 수 있도록 고선택성을 가지는 앵타머를 포함하여, 비스페놀 에이와의 결합, 세척, 분리, 측정까지의 전 과정을 동시에 진행할 수 있는 휴대용 소형 장치이다.
- [0037] 본 발명의 용어, "비스페놀 에이(Bisphenol A, BPA)"는 폴리카보네이트나 에폭시 수지 같은 플라스틱 제조의 원료로 사용되는 하기 화학식 1의 화합물을 의미한다. 상기 비스페놀 에이는 환경호르몬의 일종으로 확인되어, 이를 효과적으로 검출하여야 할 필요성이 대두되고 있다.

화학식 1



- [0039]
- [0041] 본 발명의 용어, "앵타머(aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오타이드의 일종을 의미한다. 상기 앵타머는 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩타이드, 화합물, 중합체 등의 다양한 물질을 표적분자로서 사용할 수 있고, 단백질보다 안정성이 우수하며, 구조가 간단하면서도, 핵산으로 구성되어 합성이 용이하기 때문에, 다양한 표적분자를 검출하는 방법에 이용되고 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 앵타머는 서열번호 1의 염기서열로 구성되고, 비스페놀 에이와 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0043] 상기 서열번호 1의 염기서열을 갖는 앵타머는 종래의 앵타머에 비하여 단순한 2차원적 구조를 나타내고, 이로

인하여 표적물질인 비스페놀 에이에 대하여 증가된 검출감도를 나타낼 수 있다.

- [0045] 본 발명의 용어, "자성입자"는 자성을 띠는 물질로서, 본 발명의 목적상, 제1표지 물질, 앵타머, 및 제2표지 물질과 결합된 복합체를 형성할 수 있으며, 비스페놀 에이와 앵타머의 결합 여부와 관계 없이, 제1표지 물질과 결합하여 제1표지 물질로부터 일정한 신호를 방출할 수 있다면, 구체적인 재질, 종류나 크기 등에 제한 없이 이용될 수 있다. 본 발명의 분석 장치는 반응 용기의 내부 또는 외부에 위치한 자력원을 추가로 포함하여, 상기 자성입자를 수집함으로써, 비스페놀 에이의 검출을 보다 정확하고 용이하게 수행할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 용어, "표지물질"은 육안 또는 센서를 이용하여 감지할 수 있는 신호를 발생시키는 물질을 의미한다. 상기 신호는 발광 등과 같이 표지물질의 내재적 특성에 의해 자체적으로 발생할 수 있는 것이거나, 형광 등과 같이 외부의 자극에 의해 발생하는 것일 수 있다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 표지물질은 특별히 이에 제한되지 않으나, 양자점 (Quantum dot), 효소, 콜로이드 금 (Colloid gold), 전기화학적 작용기(electrochemical functional group), 형광물질(Fluorescence materials), 방사능 표지, 형광 염료 또는 색소(Dye) 등이 사용될 수 있다.
- [0049] 상기 효소는 표지물질로서 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, HRP(Horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(Alkaline phosphatase), 글루코오스 옥시다아제(Glucose Oxidase), 루시페라아제(luciferase), 베타-D-갈락토시다아제(β -D-galactosidase), 말산탈수소효소(MDH: malate dehydrogenase), 아세틸콜린에스터라아제(acetylcholinesterase), 또는 이들과 유사한 활성을 나타내는 유사체 등이 될 수 있고, 상기 유사체는 H_2O_2 를 생성하는 나노물질 등이 될 수 있다.
- [0050] 또한, 형광물질 역시 표지물질로서 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 플루오르신이소티옥시아네이트(fluoresceine isothiocyanate), 피코빌리프로테인(phycobilli proteins), 6-카르복시플루오레세인(6-carboxyfluorescein), 헥사클로로-6-카르복시플루오레세인(hexachloro-6-carboxyfluorescein), 테트라클로로-6-카르복시플루오레세인(tetrachloro-6-carboxyfluorescein), FAM(5-carboxy fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichloroflorescein), Cy3(cyanine-3), Cy5(cyanine-5), 6-카르복시테트라메틸-로다민(6-carboxytetramethyl-rhodamine), TAMRA(5-Carboxytetramethylrhodamine), BHQ3(black hole quencher 3) 등을 사용할 수 있다.
- [0051] 방사능 표지 역시 표지물질로서 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, ^{125}I , ^{131}I , ^{14}C , ^3H 등을 사용할 수 있다.
- [0053] 본 발명자들은 비스페놀 에이의 결합 여부에 따라 변화하는 신호(빛)를 측정함으로써, 비스페놀 에이를 검출하고자 하였다.
- [0054] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 변화하는 빛을 전기적 전하(전자)로 변환하여, 피드백 캐패시터의 전압 강하(또는 전하 적분기 출력의 전압 강하)값으로 비스페놀 에이의 존재에 따른 신호 변화를 측정하였다 (도 3 및 5의 a).
- [0056] 본 발명의 분석 장치는 "제1표지 물질" 및 "제2표지 물질"을 이용하여, 비스페놀 에이를 검출할 수 있다. 구체적으로, 자성입자에 결합되어 비스페놀 에이의 결합 여부와 관계 없이 일정한 신호를 방출할 수 있는 "제1표지 물질" 및 비스페놀 에이의 결합 전에는 직접 또는 간접적으로 비스페놀 에이 검출을 위한 앵타머에 결합하지만, 시료 내 존재하는 비스페놀 에이가 앵타머에 결합할 경우, 앵타머로부터 분리되는 "제2표지 물질"이 본 발명의 분석 장치에 이용된다.
- [0057] 본 발명에서는, 비스페놀 에이의 존재 유무에 따른 제1표지 물질 및 제2표지 물질의 신호 변화를 측정함으로써, 비스페놀 에이를 검출하는 것일 수 있다.
- [0058] 본 발명의 일 구체적인 양태에서, 상기 제1표지 물질, 및 상기 제2표지 물질은 각각 양자점(quantum dot), 형광 염료(dye), 방사능표지(radiolabel), 또는 전기화학적 작용기(electrochemical functional group)인 것인 비스

페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치를 제공한다.

- [0060] 본 발명의 용어, "제1복합체"는 시료가 투입되기 전, 본 발명의 분석 장치에 구비되는 복합체로서, 자성입자-제1표지 물질-애타머-제2표지 물질의 구조로 구성된 복합체이다. 상기 제1복합체는 본 발명의 분석 장치의 반응 용기 내에 구비될 수 있으나, 반응 용기 외부에 별도로 구비될 수도 있다.
- [0061] 본 발명의 용어, "제2복합체"는 시료에 포함된 비스페놀 에이가 상기 제1복합체와 반응하여 형성되는 복합체로서, 비스페놀 에이가 애타머와 결합하여, 자성입자-제1표지 물질-애타머-비스페놀 에이의 구조를 갖는 제2복합체가 형성되고, 애타머에 결합되어 있던 제2표지 물질은 비스페놀 에이의 결합으로 인해, 제1복합체에서 분리되어, 제2복합체에 포함되지 않는다. 다시 말해, 비스페놀 에이의 존재로 인해 제2복합체의 형성 시에, 제2표지 물질에서 방출되는 신호는 감소하게 된다.
- [0063] 본 발명의 일 구체적인 양태에서, 상기 제1복합체는 상기 반응 용기 내에 구비된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 본 발명의 용어, "반응 용기"는 제1복합체 및 비스페놀 에이가 반응하여, 제2복합체를 형성하는 반응이 수행되는 본 발명의 분석 장치의 일 구성 요소이다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 반응 용기로서 큐벳(Cuvette)을 이용하였으나, 제1복합체 및 비스페놀 에이가 반응하여, 제2복합체를 형성하고, 그에 따른 신호의 변화를 측정할 수 있다면, 반응 용기는 당업계에서 사용되는 것으로 제한 없이 사용될 수 있다. 본 발명 분석 장치의 반응 용기로서, 투명한 재질 (유리, 플라스틱 등)의 바이얼(vial), 마이크로플루이드스 칩 (microfluidics chip), 스트립(strip), 또는 다양한 형태의 용기 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 본 발명에서, 상기 제2복합체를 수집하는 수단은 시료 내 존재하는 비스페놀 에이로 인하여 형성된 제2복합체를 반응 용기 내 특정 부위에 모으는 과정을 통해, 반응 용기 내 제2복합체를 형성하지 않은 다른 물질로부터 제2복합체를 분리해내는 수단을 의미한다. 이와 같은 제2복합체의 분리로 인해, 비스페놀 에이의 결합에 따라 분리되는 제2표지 물질에서 방출하는 신호를 제거하여 보다 정확한 비스페놀 에이의 검출이 가능하다. 상기 제2복합체를 수집하는 방법은, 제2복합체의 전기 화학적 성질, 무게, 크기 등을 이용하여 제2복합체를 수집할 수 있는 한, 제한 없이 사용될 수 있다. 또한, 상기 제2복합체를 수집하는 수단은 제2복합체 뿐만 아니라, 제1복합체도 함께 수집할 수 있으나, 제1복합체로부터 분리된 제2표지 물질은 상기 수단에 의해 수집되지 않는다.
- [0068] 본 발명의 일 구체적인 양태에서, 상기 제2복합체를 수집하는 수단은 상기 반응 용기에 ON/OFF 방식으로 자력을 인가하는 자력원을 구비하여, 상기 제2복합체를 수집할 수 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0069] 상기 제2복합체를 수집하는 수단으로 자력원이 이용될 경우, 복합체에 포함된 자성입자에 자력을 인가함으로써, 의도하는 복합체만을 반응 용기의 특정 부위에 모을 수 있고, 이로 인해 뒤에 이루어지는 세척 및 형광 측정 과정에서 보다 용이하고 정확한 신호의 검출이 가능하다.
- [0071] 또한, 본 발명의 일 구체적인 양태에서, 상기 반응부는 (iv) 제2복합체를 형성하지 않은 제1복합체 및 비스페놀 에이, 및 상기 분리된 제2표지 물질을 제거하는 제거 수단을 추가로 구비하는 것일 수 있다.
- [0072] 본 발명에서, 상기 제거 수단을 포함함으로써, 제2복합체가 아닌 다른 물질에서 방출되는 신호를 제거할 수 있다.
- [0074] 상기 제거 수단은 그 방법에 제한되지 않으나, 구체적으로,
- [0075] 세척 용액을 포함하는 세척 용액 용기; 및
- [0076] 상기 세척 용액 용기로부터 세척 용액을 상기 반응 용기로 이동시키는 수단을 추가로 구비하여, 상기 이동된 세척 용액으로 상기 제2복합체를 형성하지 않은 제1복합체 및 비스페놀 에이, 및 분리된 제2표지 물질을 제거하는

제거 수단일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 상기 세척 용액에 의한 제거는 1 내지 5회 수행하는 것일 수 있다.

- [0078] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 소형 연동 펌프 및 관절형 자석을 이용하여 제2복합체의 수집 및 세척(헹굼, rinse)을 수행하였는데, 구체적으로, 상기 자석을 큐벳의 표면 근처에 배치하여, 제2복합체를 수집하는 한편, 연동 펌프를 이용하여, Tris-HCl로 큐벳을 헹구는 과정을 수행하였다. 특히, 상기 헹구는 과정을 두 번 수행한 경우, 측정된 형광 신호가 보다 일정한 것을 확인하였다 (도 9의 c).
- [0080] 본 발명의 일 구체적인 양태에서, 상기 검출부는 제1표지 물질 및 제2표지 물질로부터 신호를 발생시키는 신호 발생 수단을 추가로 구비하는 것일 수 있다.
- [0081] 본 발명의 목적상, 상기 신호 발생 수단은 제1복합체 또는 제2복합체에 포함된 제1표지 물질 및 제2표지 물질로부터 육안 또는 센서를 통해 인식할 수 있는 신호를 발생시킬 수 있다면, 신호의 종류나 크기, 신호의 발생 방법에는 특별한 제한 없이 본 발명의 신호 발생 수단에 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 신호 발생 수단은 레이저 발광 다이오드(LED), 레이저 다이오드(LD), 수직 공동 표면 발광 레이저(vertical-cavity surface-emitting laser), 반도체 다이오드, 또는 머큐리 램프를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0083] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 분석 장치는 상기 신호 발생 수단으로서 LED 어레이를 이용하였으며, 제1표지 물질 및 제2표지 물질의 여기(excitation)를 유도하여, 신호를 발생시키고, 상기 발생된 신호는 전하 적분기를 이용하여 측정하였다 (도 1의 b).
- [0085] 본 발명에서, 상기 표지 물질에서 발생된 신호를 검출하는 수단은 상기 표지 물질에서 발생하는 신호를 검출 및 측정할 수 있는 한, 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 신호를 검출하는 수단은 발생하는 신호의 종류에 따라, 상기 발생된 신호의 농도, 크기(amplitude), 전류 또는 전압, 색, 광량, 픽셀 등을 측정할 수 있는 한 특별히 제한되지 않는다.
- [0087] 본 발명의 일 구체적인 양태에서, 상기 표지 물질에서 발생된 신호를 검출하는 수단은 포토 다이오드 및 전하 적분기 (또는 charge amplifier) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0089] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명의 분석 장치는 포토 다이오드 및 이로부터의 출력을 측정하기 위한 전하 적분기 (charge integrator)를 구비한다. 상기 포토 다이오드는 비스페놀 에이와 앵타머의 결합에 따라 발생하는, 제2표지 물질에 의한 신호를 전기적 전하로 변환하고, 상기 변환된 전하를 피드백 커패시터에 축적함으로써, 피드백 커패시터의 전압 강하를 발생시킨다. 상기 발생된 전압 강하로부터 본 발명의 분석 장치를 이용하는 사용자는 비스페놀 에이의 존재 유무를 검출하고 정량화 할 수 있다. 상기 전하 적분기의 출력은 0V 내지 5V으로, 마이크로 컨트롤러 보드 아날로그 핀으로 판독 가능하며, 판독된 값을 LCD에 표시할 수 있다.
- [0091] 본 발명의 일 구체적인 양태에서, 상기 반응부는 (v) 상기 반응 용기를 진동시키는 동력원을 추가로 구비하는 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 상기 동력원은 상기 반응 용기를 교반시켜 상기 제2복합체의 침전을 방지하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0093] 본 발명의 분석 장치는 상기 동력원을 포함함으로써, 제2복합체를 형성하는 과정(배양) 및 발생된 신호를 측정하는 과정(형광 측정)에서 형성된 복합체가 침전하는 것을 방지하고, 그로 인하여 보다 높은 감도로 비스페놀 에이를 검출 및 정량화할 수 있는 이점이 있다.

- [0095] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명자들은 진동이 가해지지 않은 경우와 진동이 가해진 경우의 배양 및 형광 측정의 결과를 비교한 결과, 진동이 있는 경우, 복합체 침전을 방지할 수 있을 뿐만 아니라, 일정한 수준의 형광 신호를 얻을 수 있음을 확인하였으며, 이로부터 본 발명의 분석 장치의 비스페놀 에이의 검출 효율을 높일 수 있음을 확인하였다 (도 7의 c 및 8의 a).
- [0097] 본 발명의 일 구체적인 양태에서, 상기 검출부는 상기 검출된 제1표지 물질에 대한 제2표지 물질의 신호의 변화로부터 비스페놀 에이의 농도를 연산할 수 있는 연산 수단을 추가로 구비하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0099] 본 발명의 분석 장치는 제1복합체에 포함된 앵타머가 비스페놀 에이와 결합함으로써 제2표지 물질이 상기 복합체로부터 분리되므로, 비스페놀 에이의 존재로 인해 감소하는 제2표지 물질의 신호를 측정함으로써 비스페놀 에이를 검출 및 정량화할 수 있다.
- [0100] 본 발명의 상기 연산 수단은 시료의 투입 전, 제1복합체에 포함된 제1표지 물질 및 제2표지 물질의 신호와 시료의 투입 후, 상기 시료에 포함된 비스페놀 에이에 의해 형성된 제2복합체의 제1표지 물질 및 제2표지 물질의 신호를 비교하여, 비스페놀 에이를 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 정량화할 수 있다. 즉, 제2표지 물질은 비스페놀 에이의 양이 많을 수록 제1복합체에서 많이 분리되어 제2복합체에서 발생하는 신호가 감소하게 되므로, 비스페놀 에이의 존재 유무에 관계 없이 일정한 신호를 방출하는 제1표지 물질에 대한 상대값으로부터 시료에 존재하는 비스페놀 에이의 양을 계산할 수 있다.
- [0101] 본 발명의 연산 수단은, 시료의 투입 전 미리 제1복합체에서 발생하는 제1표지 물질 및 제2표지 물질의 신호가 각각 참조값으로 설정되어 있을 수 있고, 상기 참조값을 기준으로, 시료 내 비스페놀 에이의 투입 후에 생기는 신호의 변화를 측정할 수 있다.
- [0103] 본 발명의 일 구체적인 양태에서, 상기 검출부는 상기 연산 수단에 의해 연산된 비스페놀 에이의 농도를 출력할 수 있는 수단을 추가로 구비하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 출력 수단은 본 발명의 분석 장치에 크기 및 모양은 제한 없이 형성될 수 있으나, 바람직하게는 LCD 디스플레이 창일 수 있다.
- [0105] 본 발명의 일 구체적인 양태에서, 상기 장치는 상기 방열판 또는 팬을 추가로 구비하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0107] 본 발명의 일 구체적인 양태에서, 상기 장치는 상기 제2복합체를 수집하는 수단, 상기 신호 발생 수단, 및 상기 검출부를 ON/OFF 제어하는 제어부를 추가로 구비하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0109] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 분석 장치는 연동식 펌프, 서보 모터 및 관절형 자석, 진동 모터 및 LCD 배열 등을 제어할 수 있는 제어 장치를 추가로 구비하여, 필요에 따라 본 발명의 분석 장치에서 수행되는 반응을 조절하였다 (도 6).
- [0111] 본 발명의 실시예에서, 본 발명자들은 환경 관련 농도 (<1 ng/ml 또는 ppb)에서 비스페놀 에이를 검출할 수 있는 손바닥 크기의 분석 장치를 제작 및 시연했다(실시예 1, 도 1 및 2).
- [0112] 빈 큐벳, 양자점 및 자성입자를 이용한 기준점 결정 실험 결과, 본 발명의 분석 장치는 QD₅₆₅ 및 QD₆₅₅의 농도를 각각 10^{-3} $\mu\text{mole/l}$ 내지 10^{-1} $\mu\text{mole/l}$ 및 10^{-5} $\mu\text{mole/l}$ 내지 10^{-1} $\mu\text{mole/l}$ 로 측정할 수 있음을 보여주었다. 큐벳의 진동은 형광 측정 과정에서, 측정된 신호의 표준 편차의 감소뿐만 아니라 배양 과정에서 발생할 수 있는 MB-QD-BPA 복합체의 침전 방지에도 유용했다.

- [0114] 본 발명의 분석 장치의 형광 측정 성능 평가는 0.0005 내지 1 ng/ml (ppb)의 비스페놀 에이를 포함하는 샘플에서 시스템 외부 배양 및 행균으로 수행되었다. 형광 측정 결과 $y = -0.24 \log_{10}(x) + 5.40$, $r^2 = 0.91$ (진동 없는 경우) 및 $y = -0.15 \log_{10}(x) + 5.76$, $r^2 = 0.75$ (진동 있는 경우)의 선형 회귀 곡선을 나타냈다. 동일한 샘플에 대한 형광 측정은 본 발명의 분석 장치에 대해, $r = 0.91$ 의 상관 계수로 상업용 분광 형광 측정기를 통해 수행되었다.
- [0115] 실시예를 통해, 30분의 배양 기간과 이중 행균주기가 시스템 내부 배양과 행균에 적절하다고 결정하여, 시스템 내부 배양 및 분석에 사용한 비스페놀 에이의 샘플 (0.0005 ng/ml 내지 1 ng/ml 또는 ppb)의 후속 분석 결과에서, $y = -0.20 \log_{10}(x) + 2.32$, $r^2 = 0.89$ (진동 없는 경우) 및 $y = -0.21 \log_{10}(x) + 2.81$, $r^2 = 0.90$ (진동 있는 경우)의 선형 회귀 곡선을 산출하였다.
- [0116] 행균을 포함하는 시스템 외부 및 시스템 내부 배양 (상업용 분광 형광 측정기로 측정) 사이의 상관 계수는 $r = 0.92$ 인 것으로 확인하였다. 본 발명 분석 장치 (시스템 내부 배양 및 행균)와 실험실 프로토콜 (상업적 분광 형광 측정기를 이용한 시스템 외부 배양 및 행균)에 의한 비스페놀 에이 검출 사이의 상관 계수는 0.72였다.
- [0118] 상기 실시예의 결과는 본 발명의 분석 장치를 사용하여 실험실 프로토콜과 동등성을 구현할 수 있다는 것을 의미한다(도 10).
- [0120] 본 발명의 다른 하나의 양태는 채집된 시료를 투입구에 투입하는 단계를 포함하는, 상기 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치를 이용한 비스페놀 에이 검출 방법을 제공하는 것이다.
- [0121] 상기에서 설명한 용어의 정의 및 장치의 구성이 본 발명의 비스페놀 에이 검출 방법에도 동일하게 적용되는 자명하다.
- [0123] 비스페놀 에이의 오염이 의심되는 현장에서 비스페놀 에이를 검출 및 정량화하고자 하는 사용자는, 본 발명의 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치를 이용함으로써, 현장에서 비스페놀 에이를 검출하고 결과를 확인할 수 있다.
- [0125] 본 발명의 분석 장치를 사용하는 사용자는 i) 현장에서 채집된 시료를 투입구에 투입하여, 본 발명의 분석 장치의 반응 용기 내에 구비된 제1복합체와 상기 투입된 시료 내 비스페놀 에이이 반응을 일으키게 하거나; ii) 별도로 구비된 제1복합체와 시료를 동시, 또는 순차적으로 투입하여 함께 투입된 제1복합체 및 시료 내 비스페놀 에이이 반응을 일으키게 할 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0127] 본 발명의 일 구체적인 양태는, 상기 시료를 투입구에 투입하는 단계는 채집된 시료 및 자성입자, 제1표지 물질, 제2표지 물질, 및 비스페놀 에이에 특이적으로 결합하는 앵타머를 포함하는 제1복합체를 동시, 또는 순차적으로 투입하는 단계인 것인, 비스페놀 에이 검출 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [0129] 본 발명에 따른 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치는 비스페놀 에이를 특이적으로 검출할 수 있는 앵타머를 포함하여, 시료의 운반을 필요로 하지 않고, 비스페놀 에이이 저농도로 존재하는 오염 환경에서도 실험실과 유사한 수준으로 비스페놀 에이를 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0131]

도 1a는 본 발명에 따른 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치의 비스페놀 에이(BPA)를 검출하는 메커니즘에 관한 도이다. 비스페놀 에이를 검출하기 위한 애플타머를 포함하는 복합체를 도시하였다.

도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 제어부를 포함하지 않는, 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치의 평면도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 전하 적분기의 개략도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 전하 적분기의 PCB 레이아웃을 나타낸 도이다.

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치의 작동 개요이다.

도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치의 사진이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 제어부를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치의 기준점을 설정한 결과를 나타낸 도이다. 도 7의 a는 다섯 개의 개별 빈 반응 용기의 표준화된 출력 신호 (CH2 / CH1)를 나타낸 도이다. 도 7의 b는 반응 용기 내의 시약 볼륨에 대한 표준화 된 출력 신호를 나타낸 도이다. 도 7의 c는 빈 반응 용기 및 Tris-HCl 완충액이 채워진 반응 용기에 대한 표준화된 출력 신호 (진동 유무 포함)를 나타낸 도이다. 도 7의 d는 본 발명에 따른 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치로 측정된 Tris-HCl 완충액에서 연속 희석된 QD₅₆₅ (CH1) 및 QD₆₅₅ (CH2)의 전압 구배를 나타낸 도이다. 도 7의 e는 상용화된 상업적 분광 형광 측정기로 측정된 Tris-HCl 완충액에서의 QD₅₆₅ 및 QD₆₅₅ 연속 희석된 시료의 형광을 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명에 따른 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치가 아닌 실험실 환경에서 배양하여 행균 과정을 거친 후의 결과를 나타낸 도이다. 도 8의 a는 0, 5, 15, 30 분에 진동이 없는 경우의 시료 (왼쪽) 및 진동이 있는 경우의 시료 (오른쪽)를 나타낸 도이다. 도 8의 b는 진동이 없는 상태, c는 진동이 있는 상태의 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치의 형광 측정을 수행한 결과를 나타낸 도이다. 도 8의 d는 상업적 분광 형광 측정기에 의한 형광 측정 결과를 나타낸 도이다. 도 8의 e는 본 발명의 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치와 상업용 분광 형광 측정기 사이의 형광 측정 상관 관계를 나타낸 도이다.

도 9는 다른 세 농도(0.5, 1.0, 5.0 ng/ml)의 비스페놀 에이의 표준화된 형광 (F655/F565)을 배양 시간(5, 15, 30, 45분)에 따라 나타낸 도이다. 도 9의 a는 진동이 없는 상태, 및 b는 진동이 있는 상태의 결과이다. 도 9의 c는 행균 주기(1.0 ng/mL)에 따른 표준화된 형광을 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명에 따른 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치에서 배양하여 행균 과정을 거친 후의 결과를 나타낸 도이다. 도 10의 a는 진동이 없는 상태, b는 진동이 있는 상태에서의 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치에 의한 형광 측정 결과를 나타낸 도이다. 도 10의 c는 상업적 분광 형광 측정기에 의한 형광 측정 결과를 나타낸 도이다. 도 10의 d는 시스템 외부 및 시스템 내부의 배양 및 행균 과정의 상관 관계를 나타낸 도이다. 도 10의 e는 본 발명에 따른 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치와 실험실 프로토콜 (시스템 외부 배양 + 행균 + 상업 분광 형광 측정기) 사이의 상관 관계를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0132]

이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 좀 더 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0134]

실시예 1: 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치의 설계

[0136]

본 발명자들은 휴대가 가능하여, 오염 환경에서 직접 비스페놀 에이를 검출할 수 있는 분석 장치를 개발하고자, 비스페놀 에이를 특이적으로 검출할 수 있는 애플타머를 포함하는 분석 장치로서, 단일 반응 용기(큐벳)에서 반응 및 분석을 수행할 수 있는 장치를 설계하였다 (도 1 및 2).

- [0137] 본 발명의 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치를 이용한 비스페놀 에이의 검출은 (i) 배양, (ii) 행균 및 (iii) 형광 측정의 세 단계로 수행될 수 있다. 이를 위한 본 발명 분석 장치의 구성 요소는 다음과 같다.
- [0139] 상기 분석 장치는 주요 구성 요소로서,
- [0140] (i) 큐벳 홀더,
- [0141] (ii) 시약을 옮기기 위한 소형 연동식 펌프 (Dolomite Miniature Peristaltic Pump, 3 V DC, 0.12 W, 0.45 ml/분, Dolomite Centre Ltd, Royston, UK),
- [0142] (iii) 서보 모터 (TowerPro SG90 Servo, 4.8 V, 대만)에 장착된 관절형(articulated) 자석 (Neodymium, D42-N52, Disc 1/4 "× 1/8", K & J Magnetics Inc, 펜실베이니아, USA),
- [0143] (iv) 시약 교반을 위한 진동 모터 (Model Z7AL2B1690002, ~12,000 rpm, Jinlong Machinery and Electronics Co. Ltd, 중국),
- [0144] (v) 양자점 여기(excitation)를 위한 LED 어레이 (10W, 400 - 405nm, Epiled, 중국),
- [0145] (vi) 한 쌍의 검출용 포토다이오드 (S6430-01 및 S6429-01, Hamamatsu Photonics KK, 일본), 및
- [0146] (vii) 포토다이오드로부터의 출력을 측정하기 위한 전하 적분기(charge integrator)를 포함할 수 있다. 상기 LED 어레이에는 과열을 방지하기 위한 방열판 및 팬을 추가로 장착하였다.
- [0148] 또한, 상기의 구성 요소는 16 ×2 LCD 및 키패드를 통해 Arduino 호환 Mega2560 마이크로 컨트롤러 보드 (Arduino compatible Mega2560 microcontroller board)에서 제어될 수 있다(도 5의 a).
- [0150] 상기 전하 적분기는 맞춤 설계하여 제작하였으며, 저비용의 정밀 연산 증폭기 LTC1051, Linear Technologies, 미국), 10 μF 피드백 커패시터, 및 2KΩ 피드백 저항 (도 3 및 4)을 포함하여 설계하였다.
- [0151] 상기 전하 적분기 내 포토 다이오드를 이용하여 비스페놀 에이와 앵타머의 결합 여부에 따라 변화하는 신호를 전기적 전하(전자)로 변환하고, 상기 변환된 전하는 피드백 커패시터에 축적되어 피드백 커패시터의 전압 강하 (또는 전하 적분기 출력의 전압 강하)를 발생시킨다.
- [0152] 전하 적분기의 출력은 0V 내지 5V이며, 상기 출력된 전압은 데이터 로거(data logger; PCS10, 4-Channel Recorder, Velleman, UK)를 사용하여 기록하였다. 540nm 및 660nm 포토 다이오드의 전압 출력(전하 적분기를 통한)은 상기 데이터 레코더에 의해 각각 CH1 및 CH2로 기록하였다.
- [0153] 상기 측정된 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치의 표준화 된 출력 신호는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{표준화된 출력 신호(Normalized output signal)} = \frac{\text{CH2의 전압구배 (Voltage gradient of CH2)}}{\text{CH1의 전압구배 (Voltage gradient of CH1)}}$$

[0154]

- [0156] 상기 전압 구배는 시간 동안 전하 적분기로부터의 출력 전압의 변화를 나눔으로써 계산하였다.

- [0158] 상기 양자점 여기(excitation)를 위한 LED 어레이에 직렬 포텐서미터(potentiometer)가 있는 병렬 9V 라인을 통해 전원을 공급하였다. 포텐서미터는 LED 어레이의 최종 전압을 결정하며, 9V 라인 (5V 전압 레귤레이터, LM7805A, Fairchild Semiconductor, 미국)은 팬 및 전하 적분기에 전원을 공급한다. 전기 계전기 (Electrical relays; TQ2-5V, Matsushita Electric Works, 일본)는 LED 어레이를 전환하고 전하 적분기를 리셋하는데 이용된다.

- [0160] 본 발명의 분석 장치를 작동하는 중에 사용자는 제어부를 통해 연동식 펌프, 서보 모터 및 관절형 자석, 진동 모터 및 LCD 배열 등을 제어할 수 있다(도 6).
- [0162] 상기 배양 및 형광 측정 단계에서 시료의 균질성을 유지하기 위해 진동 모터를 사용하였다. 상기 진동 모터를 이용한 교반은 플라스틱 피벗에 반응 용기(큐벳) 홀더를 매달아 더욱 쉽게 할 수 있다. 형광 측정 중에 배경 조명을 최소화하기 위해 캡을 큐벳 위에 놓았다.
- [0164] 상기와 같은 구성을 갖는 본 발명의 나노 애플타머 분석 장치는 손바닥 크기와 유사한 정도의 소형의 장치이다(도 5의 b).
- [0166] **실시예 2: 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치의 기준점 결정**
- [0168] 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치의 기준점 결정(baseline characterization)은 실제 비스페놀 에이 검출 및 정량화 전에 미리 분석 장치의 작동 한계를 설정하기 위해 필요하다. 이에, 본 발명자들은 기준점 결정 실험을 다음과 같은 단계로 수행하였다.
- [0170] (i) 빈(empty) 큐벳의 형광 측정 반응
- [0171] (ii) 다양한 시약 부피에 대한 반응(Tris-HCl buffer)
- [0172] (iii) 형광 측정 중 큐벳 진동
- [0173] (iv) 양자점 단독의 형광 측정 (QD₅₆₅ 및 QD₆₅₅)
- [0174] (v) 복합체의 침강을 최소화하기 위한 큐벳 진동
- [0175] (vi) MB-QD₅₆₅ 복합체 단독의 형광 측정
- [0177] 상기의 단계를 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0179] **실시예 2-1: 빈(empty) 큐벳의 형광 측정 반응**
- [0180] 본 발명자들은 실시예에서 UV/가시 범위 세미-마이크로 큐벳 (Kartell®, Millan, Italy)을 사용하였다. 상기 큐벳은 폴리메틸메타크릴레이트 (polymethylmethacrylate, PMMA)로 만들어졌기 때문에 개개의 큐벳에 약간의 변형이 있을 수 있으며 이는 형광 측정 중에 변수를 초래할 수 있다.
- [0182] 따라서, 본 발명의 분석 장치의 이용 전에 빈 큐벳의 배경 광학 결정(background optical characterization)의 수행이 요구되었다.
- [0184] 이를 위해, 먼저, 5개의 서로 다른 빈 큐벳을 본 발명 분석 장치에 삽입하여 형광 측정 단계 (큐벳 당 3회)를 수행하였다. 상기 형광 측정 단계는 UV-LED에 의한 조명과 포토 다이오드에 의한 측정으로 구성된다. 540nm 및 660nm 포토다이오드의 전압 출력(전하 적분기를 통한)은 데이터 레코더 (PCS10, 4-Channel Recorder, Velleman, UK)를 이용하여 각각 CH1과 CH2로 기록하였다. 표준화된 출력 신호를 계산 및 비교하였다.
- [0186] **실시예 2-2: 다양한 시약 용량에 대한 반응**

- [0187] 또한, 본 발명자들은 비스페놀 에이의 검출을 위한 형광 측정에 있어서, 큐벳 내 최적의 시약 부피를 결정하기 위해, Tris-HCl 완충액 (0.02 mole/l, pH 8, 0.005% SDS)으로 채운 큐벳을 준비하였다.
- [0188] 상기 Tris-HCl 완충액은 0.02 mole/l의 Tris-HCl (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA), 0.02 mole/l의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Daejung, Gyeong-gi, Korea), 0.04 mole/l의 KCl (Duksan, Gyeong-gi, Korea) 및 0.1 mole/l의 NaCl (Junsei, Tokyo, Japan)으로 구성된다. 또한, 최종 농도 0.005% (V/V)가 되도록 Tris-HCl 완충액 (0.02 mole/l, pH 8)에 도데실 황산나트륨(sodium dodecyl sulfate, SDS, Sigma-Aldrich Co.)을 첨가하였다. 100 μ L 내지 1000 μ L 사이의 다양한 부피의 Tris-HCl 완충액 (0.02 mole/l, pH 8, 0.005% SDS)을 포함하는 큐벳을 본 발명 분석 장치에 삽입하여 형광 측정을 수행하고 표준화된 출력 신호를 비교하였다.
- [0190] 실시예 2-3: 형광 측정 중 큐벳 진동의 영향 확인
- [0191] 본 발명 분석 장치로 형광 측정하는 동안의 큐벳 진동의 배경 효과(background effect)를 확인하기 위해, 빈 큐벳과 1000 μ L의 Tris-HCl 버퍼를 채운 큐벳을 비교하였다. 형광 측정은 진동이 있을 때와 없을 때 (세 번 반복) 수행하였고 그에 따라 얻어진 표준화된 출력 신호를 비교하였다.
- [0193] 실시예 2-4: 양자점 단독 형광 측정
- [0194] 본 발명 분석 장치의 형광 측정 범위를 확인하고자, 본 발명자들은 Tris-HCl 완충액의 연속 희석된 양자점을 이용하였다.
- [0195] 구체적으로, 상업용 카복실 양자점 QD₅₆₅ 및 QD₆₅₅ (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 8 μ M 스톡으로 구입하였다. 실시예에 이용되는 시험 샘플은 최종 QD 농도가 10^{-1} μ mole/l 내지 10^{-6} μ mole/l이고 큐벳에서의 부피가 1000 μ L 였다.
- [0196] 상기 시험 샘플을 본 발명 분석 장치 및 상업적 분광 형광 측정기 (Molecular devices, SpectroMax M2 microplate reader, Sunnyvale, USA)에 각각 적용하여 형광을 측정 하였다. 상기 양자점의 여기 및 방출 파장은 각각 QD₅₆₅의 경우 360 nm 및 570 nm, QD₆₅₅의 경우 360 nm 및 660 nm였다.
- [0198] 실시예 2-5: 큐벳 진동에 의한 복합체 침전의 최소화 효과 확인
- [0199] 배양 또는 형광 측정 중 복합체의 자성입자의 무게로 인한 침전을 최소화할 수 있도록, 큐벳을 진동시킬 수 있는 동력원을 본 발명 분석 장치에 포함하였다.
- [0201] 200 μ L의 시료를 상기 동력원에 의한 진동이 있거나, 또는 동력원에 의한 진동이 없는 상태에서 0, 5, 15 및 30분 동안 각각 배양했다. 이에 따른 침전 정도를 비교하기 위해 배양 후 사진을 찍었다.
- [0203] 실시예 2-6: MB-QD₅₆₅ 복합체 단독 형광 측정
- [0204] 본 발명자들은 자성입자가 양자점보다 유의적으로 크고 무겁기 때문에, 본 발명 분석 장치의 형광 측정을 방해할 가능성이 있어, 자성입자의 존재하에서 형광 측정을 검사 하였다.
- [0206] 구체적으로, 아민화된 자성입자(MB, Invitrogen)를 카복실화된 QD₅₆₅와 공유 결합시켜 MB-QD₅₆₅ 복합체를 형성시켰다. 이 복합체를 Tris-HCl 완충액으로 희석하여 최종 용적을 1000 μ L로 하였다. 본 발명 분석 장치에 의한 형광 측정은 동일한 복합체를 가진 세 개의 시험 샘플을 진동이 있거나 없는 조건으로 세 번 반복하여 수행 하였다.

[0208] 실시예 3: 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치에 의한 비스페놀 에이의 검출 및 정량화

[0210] 본 발명 분석 장치가 비스페놀 에이(BPA)를 검출하고 정량화 할 수 있는 능력을 다음과 같은 단계로 확인하였다.

[0212] (i) MB-QD-BPA 복합체의 시스템 내(on-system) 형광 측정 (시스템 외부 배양(off-system incubation) 및 행균)

[0213] (ii) 시스템 내 배양 기간의 최적화

[0214] (iii) 시스템 내 행균 주기의 최적화

[0215] (iv) 시스템 내 배양, 행균 및 형광 측정

[0217] 상기의 단계를 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0219] 실시예 3-1: MB-QD-BPA 복합체의 형광 측정 (시스템 외부 배양 및 행균)

[0220] MB-QD565-앵타머-QD₆₅₅ 복합체는 BPA 특이적 앵타머 (24bp, NH₂-C₆-T₁₀-GGATAGCGGGTTC, 서열번호 1)를 사용하여 준비하였다.

[0221] 구체적으로, QD₆₅₅로 표지된 신호 프로브 (30 bp, NH₂-C₆-T₁₀-TATCCACCTGACCACCCAC, 서열번호 2)를 비스페놀 에이와의 배양 전에 MB-QD₆₅₅ 복합체와 혼성화시켰다.

[0223] 비스페놀 에이는 메탄올 (덕산, 한국)을 저장 용액으로 하여 용해시킨 후, 0 ng/ml 내지 1.0 ng/ml (ppb)의 다양한 농도를 달성하기 위해, 상기 비스페놀 에이 저장 용액을 탈 이온수에서 연속 희석시켰다.

[0225] 상기 준비된 MB-QD₅₆₅-앵타머-QD₆₅₅ 복합체는 2시간 동안 벤치 셰이커 (Eppendorf, MixMate, Hamburg, Germany)에서 0, 0.0005, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 ng/ml (ppb) 농도의 비스페놀 에이와 배양하여, 최종적으로, MB-QD-BPA 복합체를 형성하였다.

[0227] 배양 후, 상기 형성된 MB-QD-BPA 복합체를 자석 (Invitrogen, DynaMag TM -2)을 이용하여 수동으로 분리하고 Tris-HCl 완충액으로 행구어 부피가 200 μ L 인 시료 (시험 샘플)를 준비하였다.

[0229] 상기에서 준비된 시험 샘플을 상업적 분광 형광 측정기 (spectrofluorometer, SpectraMax M2 microplate reader, Molecular Devices, CA, USA)로 측정하였다. 이를 통해 반응이 성공적으로 완료되었는지도 확인 가능하다.

[0231] 이어서, 본 발명 분석 장치에 의한 형광 측정을 위해 상기 시험 샘플을 Tris-HCl 완충액으로 5 배 희석하여 최종 부피가 1000 μ L인 시료를 준비하였다.

[0233] 실시예 3-2: 시스템 내부 배양 기간의 최적화

[0234] 본 발명 분석 장치에 의한 시스템 내 배양 기간(on-system incubation duration)을 최적화하기 위해, 세 가지 농도의 비스페놀 에이(즉, 0.5, 1.0, 5.0 ng/ml 또는 ppb)를 포함하는 시험 샘플을 제조하였다. 각각의 농도에

서 시험 샘플을 진동이 있거나 없는 상태에서 5, 15, 30, 45 분 동안 배양했다.

[0236] 배양 후, 상기 시험 샘플을 상용화된 상업 분광 형광 측정기 (SpectraMax M2 microplate reader)를 통해 여기 용 360 nm, 및 방출용 570 nm(QD₅₆₅), 또는 660 nm(QD₆₅₅) 파장에서 형광을 측정 하였다. 형광 측정의 결과는 하기와 같은 방법으로 표준화된 형광으로 나타내었다,

$$\text{표준화된 출력 신호(Normalized output signal)} = \frac{\text{CH2의 전압구배(Voltage gradient of CH2)}}{\text{CH1의 전압구배(Voltage gradient of CH1)}}$$

[0238] .

[0240] 실시예 3-3: 시스템 내 행굼주기(on-system rinsing cycle)의 최적화

[0241] 동량의 비스페놀 에이 (1.0 ng/ml 또는 ppb)를 포함하는 네 개의 샘플을 제조하고 30 분 동안 시스템 내부(on-system) 배양하였다.

[0243] 시스템 내부 배양 후, 소형 연동 펌프와 관절형 자석을 통해 시스템 내 행굼을 수행하였다.

[0244] 구체적으로, 상기 자석을 큐벳의 표면 근처에 배치하여 MB-QD-BPA 복합체를 수집하도록 하는 한편, 연동 펌프를 이용하여, Tris-HCl 완충액으로 큐벳을 행구었다. 각 행굼 과정 후, 상기 복합체는 상기 큐벳을 진동시켜 재현탁하였다. 단일 및 이중 행굼 사이클을 수행하였고 그 결과로 얻어진 표준화된 형광을 측정 및 비교하였다.

[0246] 실시예 3-4: 시스템 내부 배양, 행굼 및 형광 측정

[0247] 본 실시예에서는, 본 발명 분석 장치의 시스템 내부 배양, 행굼 및 형광 측정을 수행 할 수 있는 능력을 확인하고자 하였다.

[0249] 먼저, MB-QD 복합체를 상기 실시예와 동일하게 준비하였다. 상기 준비된 복합체를 본 발명 분석 장치의 반응 용기에서 30분 동안 0, 0.0005, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 ng/ml (ppb)의 비스페놀 에이와 함께 진동을 가하여 배양하였다.

[0250] 배양 후, 관절형 자석과 소형 연동 펌프를 작동시켜 Tris-HCl 완충액을 상기 반응이 수행된 반응 용기로 이동시킨 후, 이중 행굼 사이클을 수행하였다.

[0251] 행굼 후, 상기 복합체를 형광 측정 전에 최종 부피가 1000 μ L가 되도록 5 배 희석시켰다. 본 발명 분석 장치에 의한 표준화된 출력 신호를 상업적 분광 형광 측정기에 의한 출력 신호와 비교하였다.

[0253] 상기 실시예 실험에 따른 결과는 하기 실험예와 같이 분석하였다.

[0255] 실험예 1: 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치의 기준점 결정

[0257] 실험예 1-1: 형광 측정 중 빈 큐벳의 반응

[0258] 5 개의 개별 빈 큐벳의 평균 표준화 출력 신호 및 표준 편차는 각각 0.5561-0.5986 및 0.0007-0.0025 범위 내였

다 (도 7의 a). 즉, 본 발명 분석 장치에 의한 반복된 형광 측정 보다 개별 빈 큐벳 간에서 더 많은 변화를 확인하였다.

[0260] 실험예 1-2: 다양한 시약 용량에 따른 반응 결과

[0261] 600 μ L 미만의 시약 부피를 갖는 경우, 형광 측정의 결과 얻어진 표준화된 출력 신호가 변동하는 것을 확인하였다 (도 7의 b).

[0262] 반면, 시약 부피가 600 μ L 이상으로 증가하는 경우, 상기 출력 신호 결과가 상대적으로 일정한 값 (0.5628 ± 0.0037)을 갖는 것을 확인하였다.

[0264] 따라서, 일관된 형광 측정 결과를 얻을 수 있도록, 이후의 실시예에서는 1000 μ L 시약 부피를 사용하여 본 발명 분석 장치의 형광 측정을 수행하였다. 상기 장치 내 반응 용기에서의 반응이 일어나는 시약의 부피는 200 μ L이므로 본 발명 분석 장치로 형광 측정을 하기 전에 5 배 희석시켰다.

[0266] 실험예 1-3: 형광 측정 중 큐벳 진동에 의한 영향 확인

[0267] 본 발명자들은 형광을 측정하는 동안 큐벳의 진동의 유무가 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 그 결과, 빈 큐벳은 진동이 없을 경우와 있을 경우 각각 0.5510과 0.5776의 표준화된 출력 신호를 나타내었다(도 7의 c 및 표 1).

표 1

표 1. 빈 큐벳 및 Tris-HCl 버퍼가 포함된 큐벳의 표준화된 출력 신호

CH2/CH1	MEAN	STD
빈 큐벳 (진동 없음)	0.5510	0.0033
빈 큐벳 (진동 있음)	0.5776	0.0018
Tris-HCl 버퍼 (진동 없음)	0.5460	0.0030
Tris-HCl 버퍼 (진동 있음)	0.5561	0.0011

[0269]

[0271] Tris-HCl 완충액으로 채워진 큐벳의 경우, 각 결과는 0.5460과 0.5561로 유사했다. 예상대로, 진동이 있는 상태의 빈 큐벳 (0.0018)의 표준 편차는 진동이 없는 빈 큐벳(0.0033)보다 낮았다.

[0273] 상기와 유사한 경향을 Tris-HCl 완충액으로 채워진 큐벳에서도 관찰하였다. 구체적으로, 진동이 있는 큐벳의 출력 신호는 0.0011로 진동이 없는 큐벳의 출력 신호(0.0030)와 비교하여 더 낮은 표준 편차를 가짐을 확인하였다.

[0275] 상기와 같은 결과로부터, 비스페놀 에이 검출을 위한 형광 측정 과정에서 반응 용기에 진동을 가할 경우, 측정된 출력 신호의 표준 편차가 감소하는 것을 확인하였다.

[0277] 실험예 1-4: 양자점 단독의 형광 측정

[0278] 본 발명의 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치로 QD₅₆₅와 QD₆₅₅의 농도를 측정하였으며, 그 결과 값은 전압 구배로서 확인하였다.

[0280] 그 결과, 양자점 QD₅₆₅와 QD₆₅₅의 농도는 각각 10^{-3} $\mu\text{mole/l}$ 내지 10^{-1} $\mu\text{mole/l}$ 및 10^{-5} $\mu\text{mole/l}$ 내지 10^{-1} $\mu\text{mole/l}$ 임을 확인하였다(도 7의 d).

[0281] 측정 범위 내의 각 농도에서 QD₆₅₅는 QD₅₆₅보다 높은 전압 구배 (형광)를 나타내었다. QD₅₆₅의 선형 회귀 곡선은 10^{-3} $\mu\text{mole/l}$ 내지 10^{-1} $\mu\text{mole/l}$ 의 농도 범위에 대해 $\log_{10}(y) = 0.55 \log_{10}(x) + 0.59$ ($r^2 = 0.96$)로 표시되었으며, QD₆₅₅에 대한 선형 회귀 곡선은 10^{-5} $\mu\text{mole/l}$ 내지 10^{-1} $\mu\text{mole/l}$ 의 농도 범위에 대해 $\log_{10}(y) = 0.64 \log_{10}(x) + 1.68$ ($r^2 = 0.95$)로 표시되었다.

[0283] 본 발명자들의 예상대로, 상업용 분광 형광 측정기로 동일한 샘플을 형광 측정한 결과, 본 발명의 분석 장치에 비해 가파른 선형 회귀 기울기를 나타내었다 (도 7의 e). QD₅₆₅의 선형 회귀 곡선은 10^{-4} $\mu\text{mole/l}$ 내지 10^{-1} $\mu\text{mole/l}$ 농도 범위에 대해 $\log_{10}(y) = 1.01 \log_{10}(x) + 5.33$ ($r^2 = 0.999$)로 표시되었다. QD₆₅₅에 대한 선형 회귀 곡선은 10^{-5} $\mu\text{mole/l}$ 내지 10^{-1} $\mu\text{mole/l}$ 의 농도 범위에 대해 $\log_{10}(y) = 1.03 \log_{10}(x) + 5.99$ ($r^2 = 0.997$)로 표시되었다.

[0285] 실험예 1-5: 큐벳 진동에 의한 복합체 침전의 최소화

[0286] 진동이 있는 상태의 배양과 진동이 없는 상태의 배양을 각각 진행한 후, 샘플의 침전 정도를 비교하였다 (도 8의 a).

[0287] 0분(음성 대조군)의 경우, 5분의 배양 시간 동안 샘플의 침전에 큰 차이가 나타나지 않는 것을 확인하였다. 그러나, 15분간 배양한 샘플의 경우, 진동을 가하지 않았을 때, 복합체의 침전이 확인되었으며, 30분이 경과하자, 침전이 완료되고 상등액이 투명해지는 것을 확인하였다.

[0289] 이러한 결과로부터, 본 발명자들은 본 발명의 분석 장치를 이용한 비스페놀 에이의 검출시, 반응 용기에 진동을 가함으로써, 배양 및 형광 측정을 보다 용이하게 하는 한편, 비스페놀 에이의 검출 효율을 높일 수 있음을 확인하였다.

[0291] 실험예 1-6: MB-QD₅₆₅ 복합체 단독의 형광 측정

[0292] MB-QD₅₆₅ 복합체를 포함하는 세 가지 시험 샘플은 서로 유사한 표준화된 출력 신호를 나타냈다 (표 2). 진동 유무에 따른 총 평균값은 0.4610과 0.4527였다. 진동이 있는 경우, 표준 편차는 0.0016 내지 0.0042였다. 이는 진동이 없는 경우의 표준 편차인 0.0034 내지 0.0123보다 작았다. 진동이 있는 경우의 형광 측정은 진동이 없는 경우와 비교하여 낮은 표준 편차를 나타내었다.

[0294] 이러한 결과는 반응 용기에 가해지는 진동이 샘플 내 MB-QD₅₆₅ 복합체의 응집 및 침전을 방지함으로써, 보다 일관된 형광 측정을 가능하게 하기 때문인 것으로 보여진다.

표 2

표 2. 진동 유무에 따른 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치를 통한 MB-QD₅₆₅ 복합체의 표준화된 출력 신호(CH2/CH1)

진동 없음					
CH2/CH1	1	2	3	Average	std
#1	0.4652	0.4598	0.4546	0.4599	0.0053
#2	0.4637	0.4597	0.4570	0.4601	0.0034
#3	0.4504	0.4382	0.4258	0.4382	0.0123
Average				0.4527	0.0129
진동 있음					
CH2/CH1	1	2	3	Average	std
#1	0.4665	0.4721	0.4730	0.4705	0.0035
#2	0.4611	0.4652	0.4695	0.4653	0.0042
#3	0.4491	0.4461	0.4465	0.4472	0.0016
Average				0.4610	0.0110

[0296]

[0298] 실험예 2: 비스페놀 에이 검출을 위한 휴대용 분석 장치를 이용한 비스페놀 에이의 검출 및 정량화

[0300] 실험예 2-1: MB-QD-BPA 복합체의 형광 측정 (시스템 외부 배양 및 행균)

[0301] 본 발명의 분석 장치를 이용하여 시스템 외부에서 배양되고 행균진 샘플의 비스페놀 에이 (0.0005 내지 1 ng/ml (ppb))를 검출하고 정량화 하였다 (도 8의 b 및 c). 그 결과 얻어진 표준화된 출력 신호의 선형 회귀 곡선은 진동이 없는 경우, $y = -0.24 \log_{10}(x) + 5.40$, $r^2 = 0.91$ 이었다. 진동이 있는 경우, 선형 회귀 곡선은 $y = -0.15 \log_{10}(x) + 5.76$, $r^2 = 0.75$ 이었다.

[0303] 상기 실시예의 결과와 마찬가지로, 진동이 있는 경우의 형광 측정값은 진동이 없는 경우보다 훨씬 작은 표준 편차를 나타내었다. 진동이 있는 상태에서 낮은 r^2 는 0.0005 ng/ml (ppb)에서의 측정에 기인하였다.

[0305] 본 발명의 분석 장치로 형광을 측정한 결과는 동일한 샘플 (도 8의 d)을 사용하여 상업적 분광기로 측정한 결과와 일치했다. 상업적 분광 형광 측정기로 측정한 선형 회귀 곡선은 $r^2 = 0.98$ 인 $-1.42 \log_{10}(x) + 16.08$ 이었다.

[0307] 본 발명 분석 장치와 상업용 분광 형광 측정기 간의 형광 측정 상관 관계를 동일한 시스템 외부(off-system; 실험실) 배양 및 행균 과정을 거친 샘플을 이용하여 확인하였다 (도 8의 e). 상관 계수 r 은 0.91이었다.

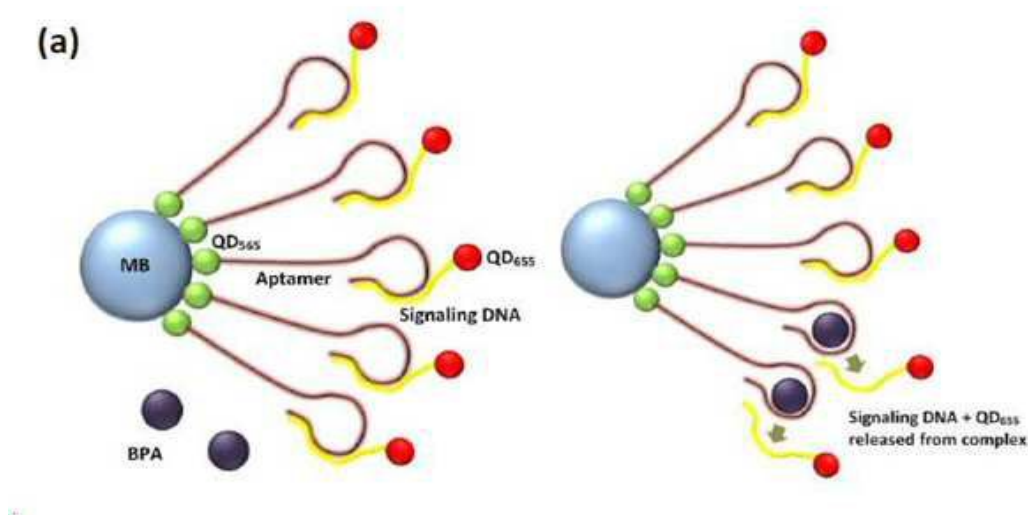
- [0309] 상기와 같은 결과로부터, 본 발명자들은 본 발명의 분석 장치로 얻은 결과가 상업용 분광 형광 측정기에 의한 형광 측정 결과와 동일한 것을 확인하였으며, 본 발명의 분석 장치로 실험실 환경에서와 동등한 수준으로 비스페놀 에이를 검출할 수 있음을 확인하였다.
- [0311] 실험예 2-2: 시스템 내부 배양 기간의 최적화
- [0312] 진동을 가하는 배양에 있어서, 충분한 배양을 위해 최소 30분이 필요하다 (빨간 점선 상자, 도 9의 b). 비스페놀 에이의 농도가 증가함에 따라 표준화된 형광은 감소하였다.
- [0314] 그러나, 진동이 없는 경우, 45 분이 경과해도 반응에 따른 경향을 관찰할 수 없었다 (도 9의 a).
- [0315] 이로부터, 본 발명 분석 장치를 이용한 비스페놀 에이의 검출 시에, 진동을 가함으로써, 복합체의 침전을 방지하여 성공적인 비스페놀 에이의 검출을 수행할 수 있음을 확인하였다.
- [0317] 실험예 2-3: 시스템 내 행굼 주기의 최적화
- [0318] 본 발명자들은 본 발명 분석 장치를 이용한 비스페놀 에이의 검출에 최적화된 행굼 주기(rinse cycle)를 확인하고자 하였다.
- [0320] 그 결과, 단일 행굼 주기와 비교하여, 이중 행굼 주기의 경우, 표준화된 형광은 일관된 결과를 나타내는 것을 확인하였다(도 9의 c). 특히, 샘플 #2, #3 및 #4는 이중 행굼 사이클 후에 2.771 ($\pm$ 0.877)의 유사한 결과를 나타냈다.
- [0322] 따라서, 이중 행굼 주기를 이후의 시스템 내 행굼에 사용하였다.
- [0324] 실험예 2-4: 시스템 내부 배양, 행굼 및 형광 측정
- [0325] 본 발명의 분석 장치를 이용하여, 다양한 비스페놀 에이 농도에 대해 배양, 행굼 및 형광을 측정한 결과, 시스템 외부에서 샘플을 배양하고 행굼어 낼 때와 유사한 반응을 나타내는 것을 확인하였다 (도 10의 a 및 b).
- [0326] 진동이 없는 경우, 선형 회귀 곡선은 $y = -0.20\log_{10}(x) + 2.32$, $r^2 = 0.89$ 였고, 진동이 있는 경우, 선형 회귀 곡선은 $y = -0.21\log_{10}(x) + 2.81$, $r^2 = 0.90$ 이었다.
- [0328] 예상대로, 진동이 있는 경우의 형광 측정의 표준 편차는 진동이 없는 경우보다 상당히 작았다. 도 10의 c는 상업용 분광 형광 측정기로 측정한 동일 시스템 내부 배양 및 행굼 샘플의 표준화된 형광을 나타낸다. 해당 형광은 $y = -0.27\log_{10}(x) + 6.30$, $r^2 = 0.89$ 로 주어지는 선형 회귀 곡선을 나타내었다.
- [0330] 시스템 내 및 시스템 외부 배양 및 행굼 사이의 동등성을 확립하고자 상관 관계를 조사하였다 (도 10의 d). 두 경우 모두 형광 측정을 상업적 분광기로 수행하였다.
- [0331] 그 결과 비스페놀 에이의 농도가 0.0005 ng/ml 내지 1 ng/ml (ppb) 인 경우, 시스템 외부 및 시스템 내부 배양 및 행굼에 대한 상관 계수는 $r=0.92$ 였다.
- [0333] 마지막으로, 본 발명자들은 본 발명 분석 장치 (시스템 내부 배양 + LED 어레이 / 포토 다이오드를 통한 형광 측정)를 사용하여 실험실 프로토콜 (시스템 외부 배양 + 행굼 + 상업용 분광기)을 사용한 비스페놀 에이 검출

및 정량 결과를 비교하였다. 그 결과, 상관 계수가 $r = 0.72$ 인 것을 확인하였다 (도 10의 e).

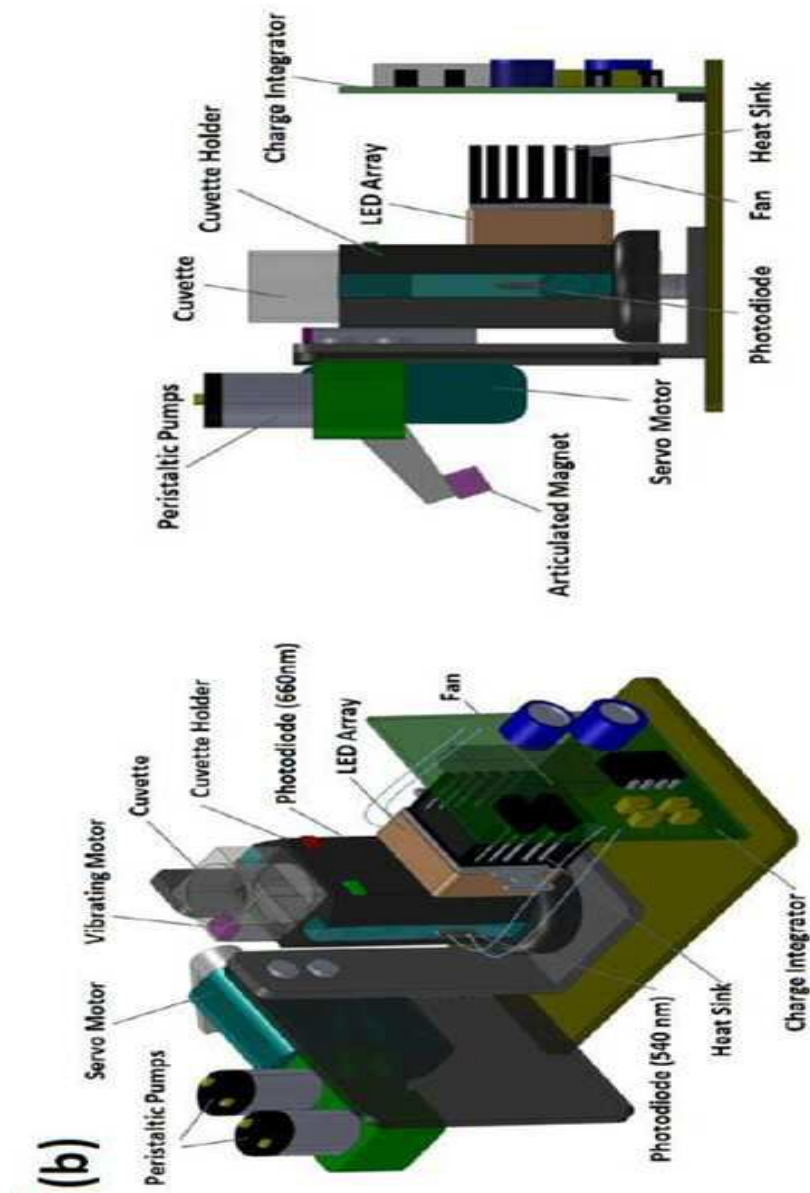
- [0335] 상기 실시예의 결과로부터 본 발명의 분석 장치에서 시료를 배양하고 행군 결과가 실험실 프로토콜로 동일한 작업을 수행한 결과와 유사한 것을 확인하였다.
- [0336] 이로부터 소형화된 본 발명의 분석 장치로도 충분히 채집된 시료를 배양하고 형광을 측정함으로써 비스페놀 에이를 검출할 수 있음을 확인하였다.
- [0337] 즉, 본 발명의 분석 장치가 기존의 실험실 프로토콜을 대체할 수 있으며, 환경 관련 농도 (<1 ng/ml 또는 ppb)에서 소형화된 장치로도 비스페놀 에이를 검출 및 정량할 수 있는 시스템을 구현할 수 있음을 의미한다.
- [0339] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

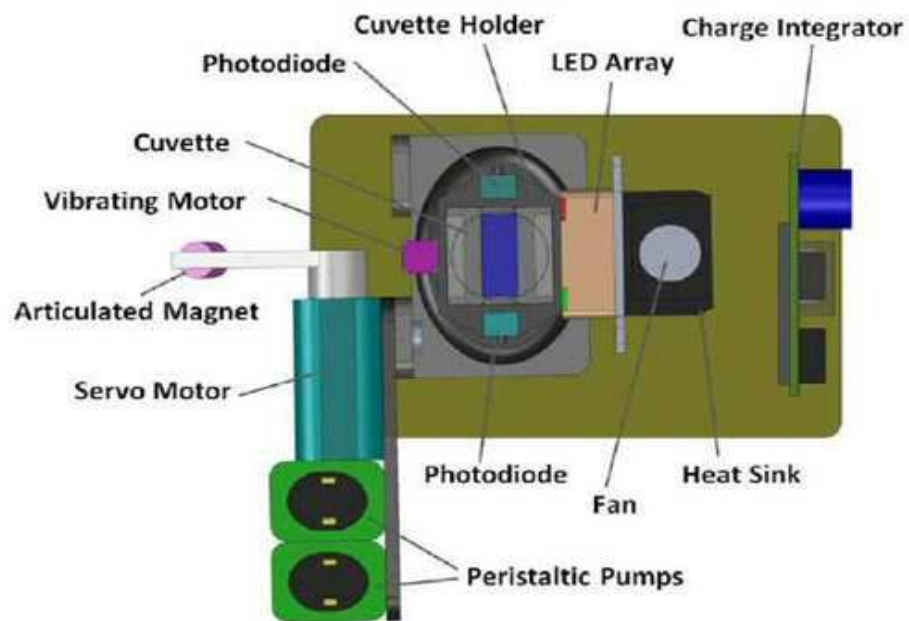
도면1a



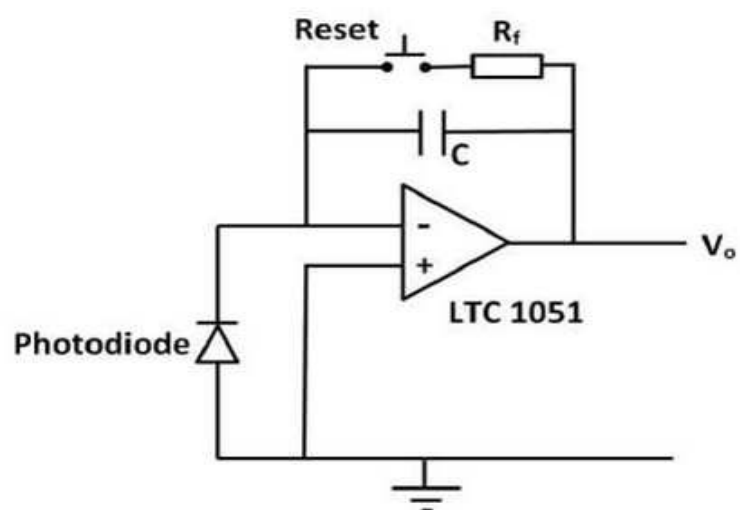
도면1b



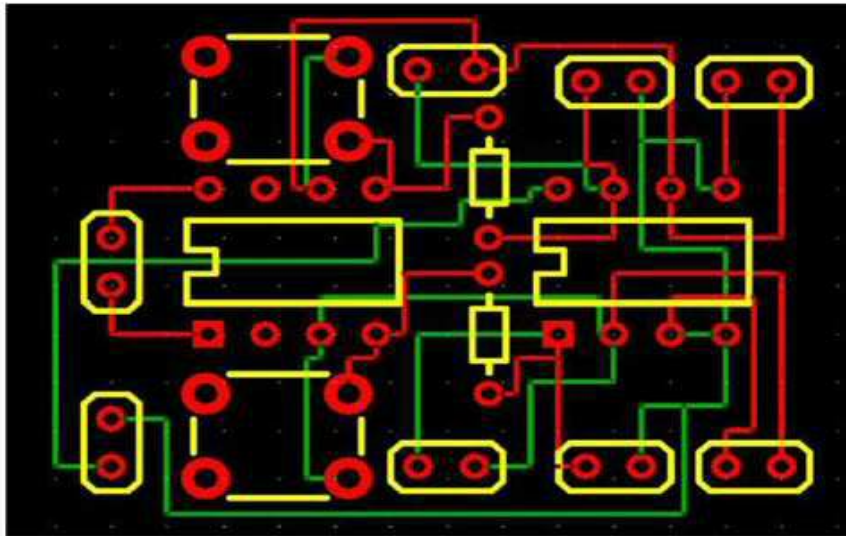
도면2



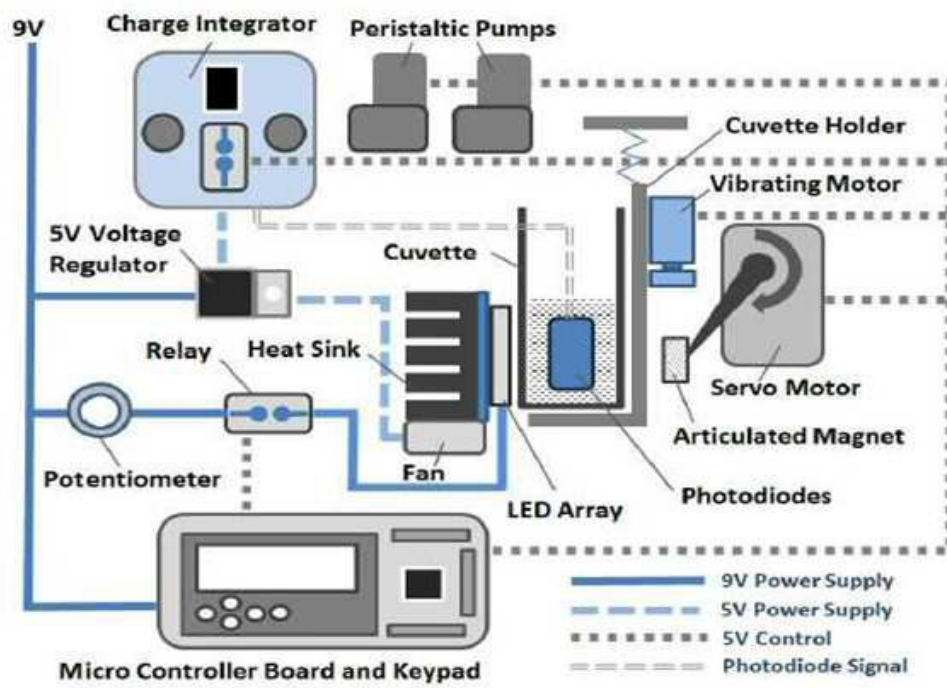
도면3



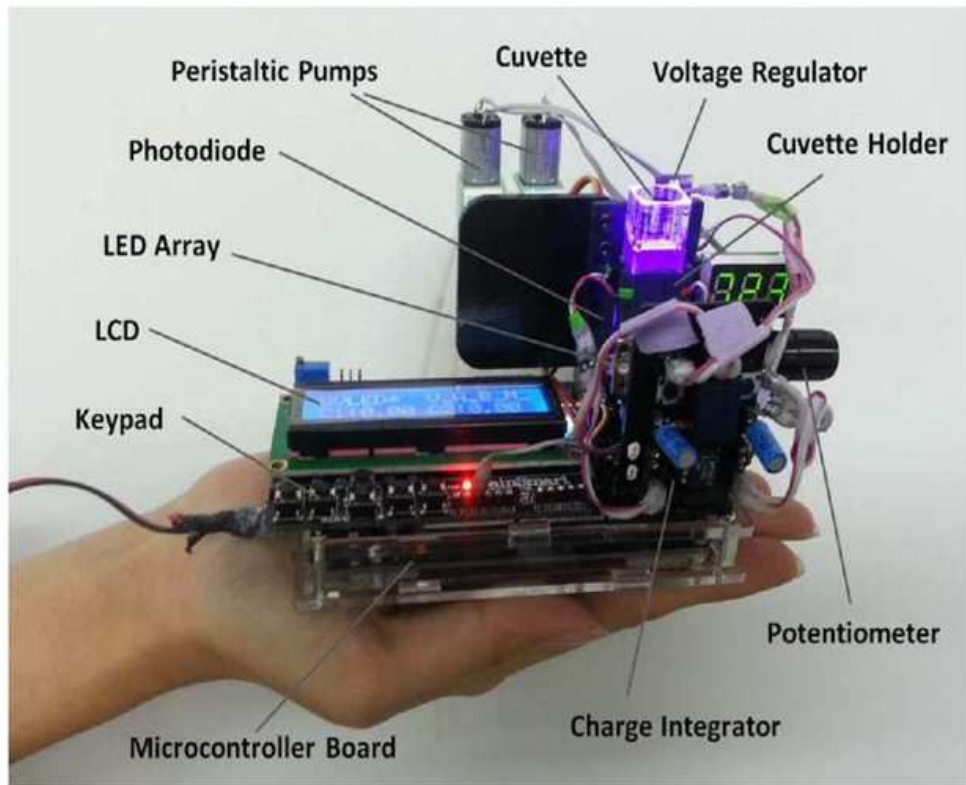
도면4



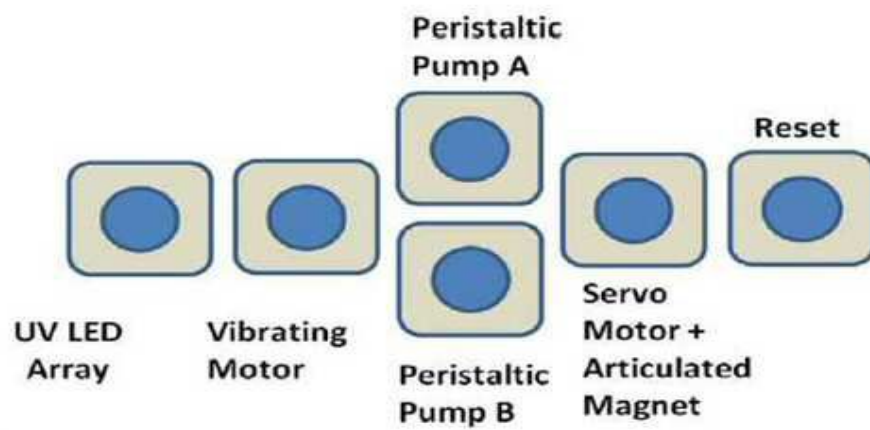
도면5a



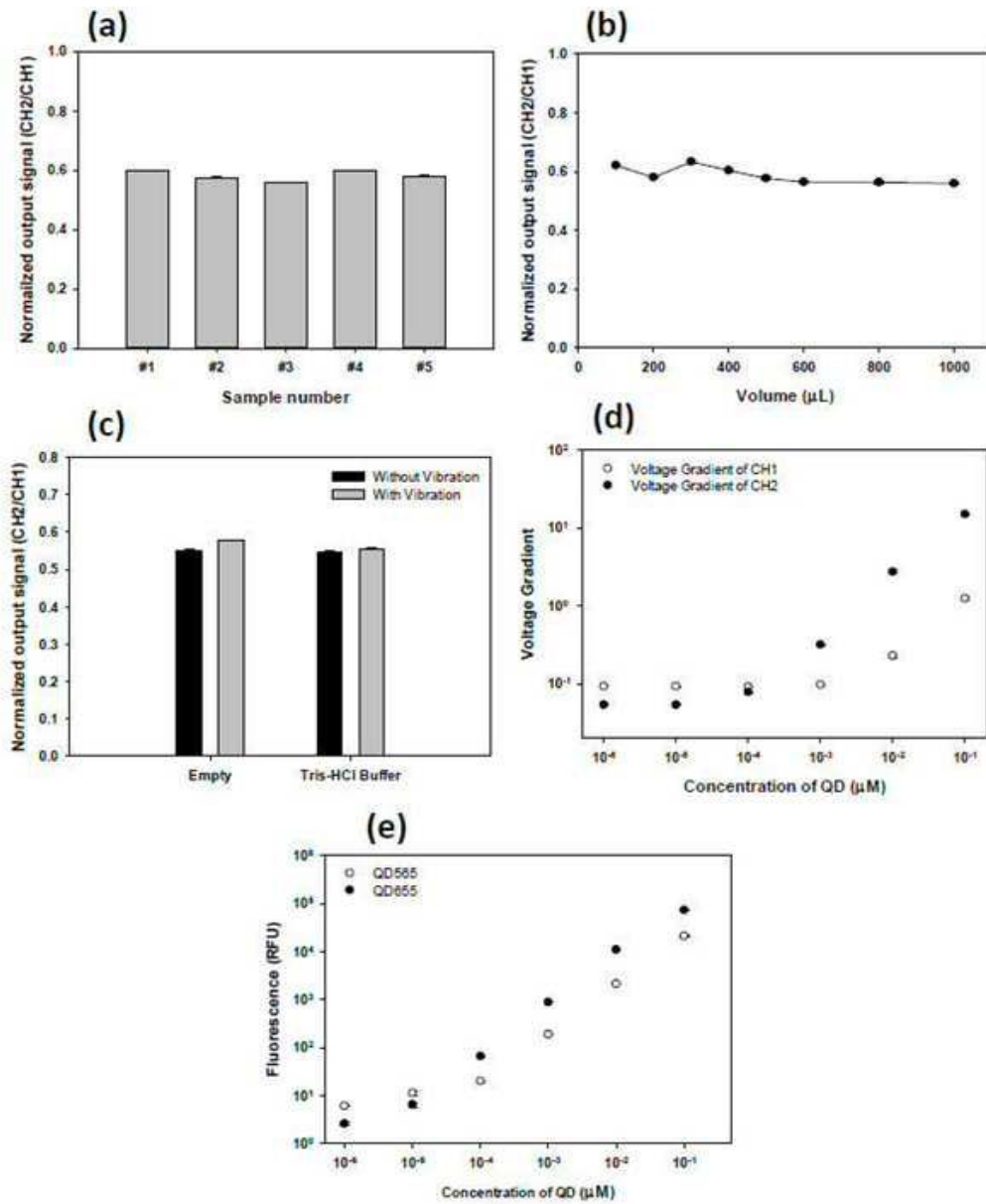
도면5b



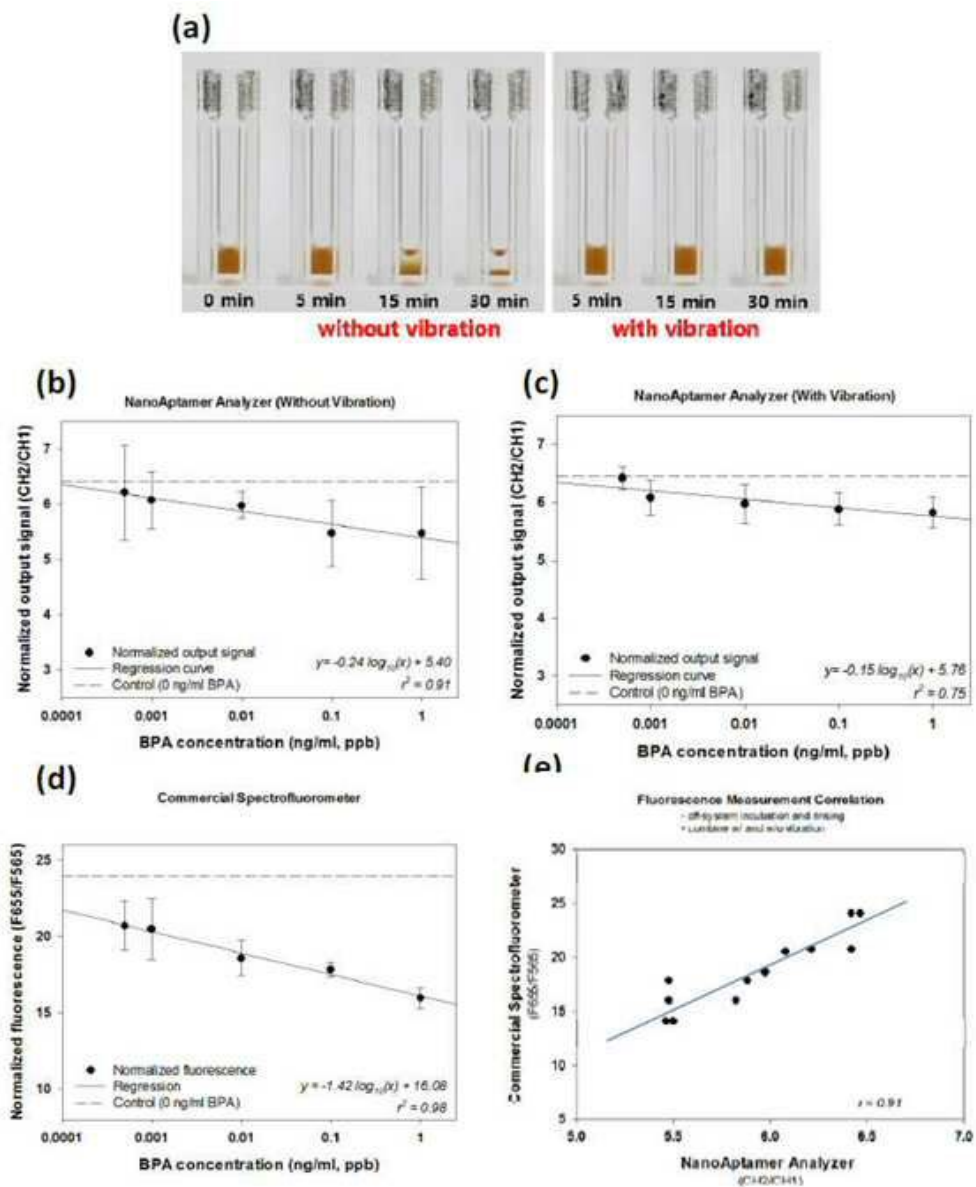
도면6



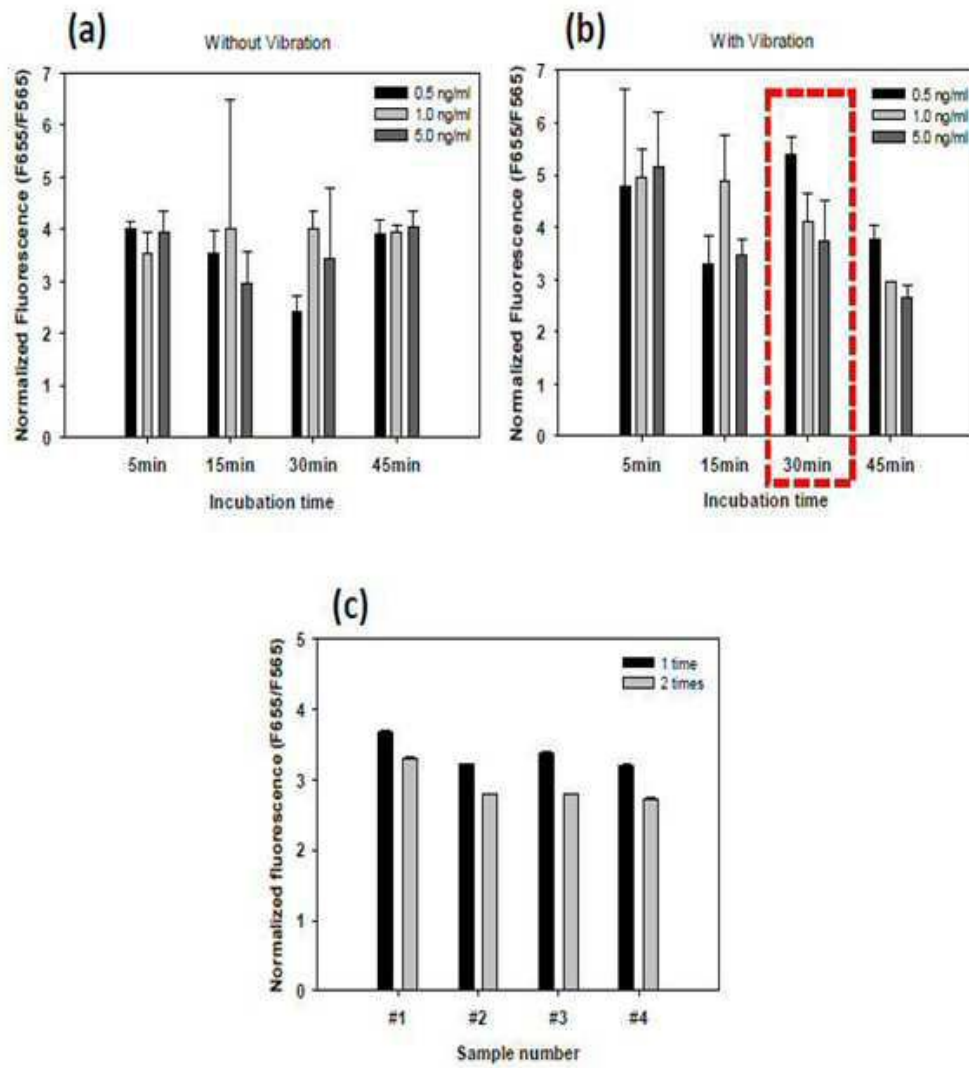
도면7



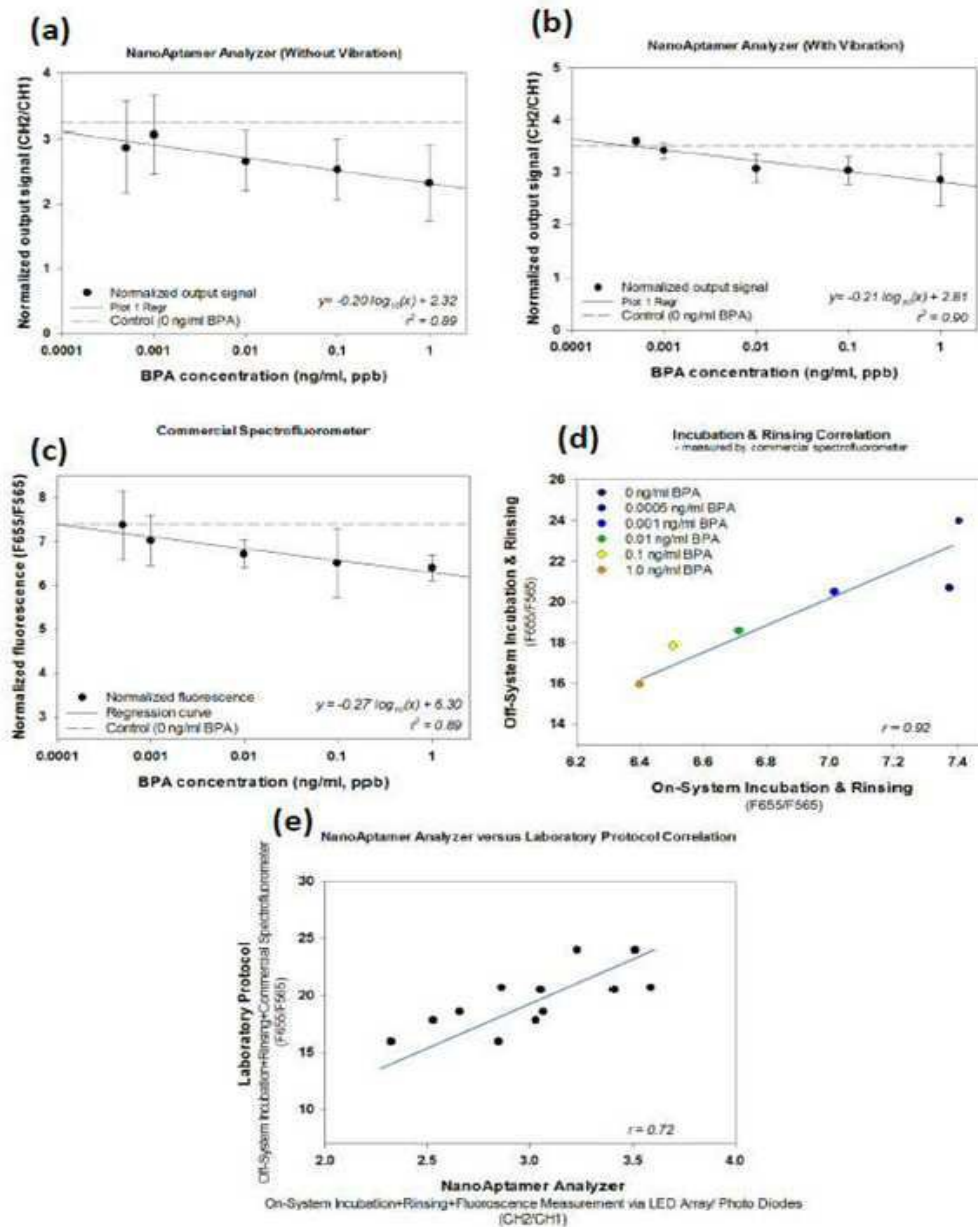
도면8



도면9



도면10



서열목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- Korea University Research and Business Foundation
- <120> A Portable NanoAptamer Analyzer for Detection of Bisphenol A
- <130> KPA170156-KR-P1
- <150> KR 10-2017-0023071
- <151> 2017-02-21
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aptamer for BPA
 <400> 1
 cccccctttt ggatagcggg ttcc 24
 <210
 > 2
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 2
 cccccctttt tatccacct gaccaccac 30