



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년02월12일
(11) 등록번호 10-1232499
(24) 등록일자 2013년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2006.01) G01N 21/77 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7018026
(22) 출원일자(국제) 2006년12월13일
심사청구일자 2008년12월30일
(85) 번역문제출일자 2008년07월22일
(65) 공개번호 10-2008-0083682
(43) 공개일자 2008년09월18일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/012000
(87) 국제공개번호 WO 2007/079893
국제공개일자 2007년07월19일

(30) 우선권주장
10 2005 062 377.8 2005년12월23일 독일(DE)

(56) 선행기술조사문헌
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003,
vol.377, No. 3, pp469-477.

전체 청구항 수 : 총 24 항

(73) 특허권자
바이엘 크롭사이언스 아게
독일 40789 몬하임 알프레드-노벨-스트라세 50

(72) 발명자
부르마이스테르, 옌스
독일 51061 쾰른 안 데르 루텐 5
도른, 잉그마르
독일 50668 쾰른 우르술라가르텐 슈트라세 29
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
위혜숙, 양영준, 양영환

심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 마이코톡신을 확인하는 장치 및 방법

(57) 요약

본 발명은 마이코톡신을 확인하는 장치 및 방법 및 상기 방법을 수행하기에 적합한 키트에 관한 것이다.

(72) 발명자

라베, 우베

일본 145-0071 도쿄 오타꾸 테넨초푸 3-13-1

호이제르-한, 이솔데

독일 51375 레버쿠젠 뉘펠데르 슈트라세 22

특허청구의 범위

청구항 1

a) 특이성 또는 친화성 결합 파트너 또는 이들 둘 다가 도파로 상에 마이코톡신 및 결합 파트너에 대한 화학적 또는 생화학적 인식 요소로서 공간적으로 분리된 방식으로 고정되어 있는, 제2 광학적으로 투명한 층 (b)의 상단에 있는 제1 광학적으로 투명한 도파층 (a) ((b)가 (a)보다 낮은 굴절률을 가짐)를 포함하는 박막 도파로를 제공하는 단계,

b) 결합 파트너를 표지하는 데에 표지 요소를 사용하는, 경쟁 결합을 위한 마이코톡신(들)-함유 샘플 및 결합 파트너를 상기 박막 도파로 상에 고정된 결합 파트너에 적용하는 단계,

c) 표지된 결합 파트너를 소산장(evanescent field)에 의해 여기시키고, 샘플의 마이코톡신과, b)의 결합 파트너와 또는 이들 둘 다와 박막 도파로 상에 고정된 결합 파트너의 상호작용에 의한 소산장 중의 신호를 검출하는 단계, 및

d) 샘플 중에 존재하는 마이코톡신(들)의 양을 검출하는 단계

를 포함하는, 경쟁 면역분석에 의한 마이코톡신의 신속한 검출 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 하기의 화학식 I의 유기인산, 화학식 II의 유기포스폰산 및 그들의 염을 포함하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 단층 또는 다층을 박막 도파로에 적용하는 것을 **특징으로 하는** 방법.

<화학식 I>



<화학식 II>



(식 중, R은 C₁₀ 내지 C₂₄의 알킬기임)

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 R이 비분지 C₁₀ 내지 C₂₀의 알킬기를 포함하는 군으로부터 선택된 유기인산, 유기포스폰산, 유기인산염 및 유기포스폰산염을 포함하는 군으로부터 선택된 하나 이상을 사용하는 것을 **특징으로 하는** 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, TiO₂, ZnO, Nb₂O₅, Ta₂O₅, HfO₂ 및 ZrO₂를 포함하는 군으로부터 선택된 산화물을 포함하는 광학적으로 투명한 도파층 (a)를 포함하는 박막 도파로를 사용하는 것을 **특징으로 하는** 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 결합 파트너가 항-마이코톡신 항체, 항-마이코톡신-항체 접합체, 마이코톡신, 마이코톡신 접합체, 항-마이코톡신 항체의 단편, 마이코톡신-결합 펩티드, 마이코톡신-결합 안티칼린스, 마이코톡신-결합 압타머, 마이코톡신-결합 스피에겔머 및 마이코톡신-결합 전사된 중합체를 포함하는 군으로부터 선택되는 것을 **특징으로 하는** 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 표지 요소가 단백질에 의해 마이코톡신에 결합되는 것을 **특징으로 하는** 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 샘플이 곡류, 와인, 주스, 과일 및 곡류, 와인, 주스 또는 과일을 함유하는 제품을 포함하는 군으로부터 선택된 인간 또는 동물을 위한 식품 품목 또는 용매 또는 용매 혼합물로 추출된 상

기 식품 품목 또는 제품의 추출물인 것을 **특징으로 하는** 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 샘플이 신호의 검출 15 분 미만 전, 화학적 또는 생화학적 인식 요소 또는 결합 파트너로서 고정된 결합 파트너와 함께 배양된 것을 **특징으로 하는** 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 마이코톡신이 아플라톡신, 오크라톡신, 에르고트 알칼로이드, 파툴린, 및 테옥시니발레놀, 니발레놀, 제랄레논, T-2 독신, HT-2 독신 및 푸모니신을 포함하는 군으로부터 선택된 푸사리움 독신을 포함하는 군으로부터 선택된 것을 **특징으로 하는** 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 마이코톡신을 곡류 추출물 중에서 심지어 0.1 pM 내지 100 nM 마이코톡신의 범위로 검출하는 것을 **특징으로 하는** 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 검출이 면역분석으로 행해지는 것을 **특징으로 하는** 방법.

청구항 12

a) 하나 이상의 마이코톡신, 마이코톡신 접합체 또는 이들 둘 다가 도파로 상에 결합 파트너에 대한 화학적 또는 생화학적 인식 요소로서 공간적으로 분리된 방식으로 고정되어 있는, 제2 광학적으로 투명한 층 (b)의 상단에 있는 제1 광학적으로 투명한 도파층 (a) ((b)가 (a)보다 낮은 굴절률을 가짐)를 포함하는 박막 도파로를 제공하는 단계,

b) 결합 파트너를 표지하는 데에 표지 요소를 사용하는, 경쟁 결합을 위한 마이코톡신(들)-함유 샘플 및 결합 파트너를 상기 a)의 고정된 마이코톡신 또는 마이코톡신 접합체에 적용하는 단계,

c) 표지된 결합 파트너를 소산장에 의해 여기시키고, 상기 b)의 결합 파트너와 박막 도파로 상에 고정된 마이코톡신 또는 마이코톡신 접합체의 상호작용에 의한 소산장 중의 신호를 검출하는 단계, 및

d) 샘플 중에 존재하는 마이코톡신(들)의 양을 검출하는 단계

를 포함하는, 간접적 경쟁 면역분석에 의한 마이코톡신의 신속한 검출 방법.

청구항 13

제2 광학적으로 투명한 층 (b)의 상단에 있는 제1 광학적으로 투명한 도파층 (a) ((b)는 (a)보다 낮은 굴절률을 가짐)를 포함하는 박막 도파로를 갖는 것을 **특징으로 하는**, 제12항에 따르는 방법을 수행하는 장치.

청구항 14

제13항에 있어서, 제2 광학적으로 투명한 층 (b)의 상단에 있는 제1 광학적으로 투명한 도파층 (a) ((b)는 (a)보다 낮은 굴절률을 가짐)를 포함하는 박막 도파로의 광학적으로 투명한 층 (b)가 유리 및 석영을 포함하는 군으로부터 선택된 실리케이트로부터, 또는 폴리카르보네이트, 폴리이미드, 폴리메타크릴레이트, 폴리스티렌, 시클릭 폴리올레핀 및 시클릭 폴리올레핀 공중합체를 포함하는 군으로부터 선택된 투명한 플라스틱으로부터 만들어진 것을 **특징으로 하는** 장치.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 광학적으로 투명한 도파층 (a)가 40 nm 내지 1000 nm 범위의 두께를 갖는 것을 **특징으로 하는** 장치.

청구항 16

제13항 또는 제14항에 있어서, 여기광이 하나 이상의 격자구조를 사용하여 광학적으로 투명한 도파층 (a)로 커플링 되는 것을 **특징으로 하는** 장치.

청구항 17

제16항에 있어서, 여기광을 커플링해 들어오는데 사용 가능한 격자구조가 200 nm 내지 1000 nm 범위의 주기를 가지는 것을 **특징으로 하는** 장치.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 격자가 3 nm 내지 60 nm 범위의 변조 전달 인자를 갖는 것을 **특징으로 하는** 장치.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 여기광이 300 nm 내지 1100 nm 범위의 파장을 갖는 것을 **특징으로 하는** 장치.

청구항 20

제13항 또는 제14항에 있어서, 하기의 화학식 I의 유기인산, 화학식 II의 유기포스폰산 및 그들의 염을 포함하는 군으로부터 선택된 하나 이상의 단층 또는 다층을 박막 도파로에 적용하는 것을 **특징으로 하는** 장치.

<화학식 I>



<화학식 II>



(식 중, R은 C₁₀ 내지 C₂₄의 알킬기임)

청구항 21

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 인식 요소가 단일 측정 필드가 0.001 mm² 내지 6 mm² 범위의 넓이를 갖는 100,000개 이하의 측정 필드로 2차원의 배열로 적용되는 것을 **특징으로 하는** 장치.

청구항 22

제13항 또는 제14항에 있어서, cm² 당 10 초과 측정 필드를 박막 도파로에 적용하는 것을 **특징으로 하는** 장치.

청구항 23

a) 하나 이상의 마이코톡신 또는 마이코톡신 접합체 또는 이들 둘 다가 도파로 상에 결합 파트너에 대한 화학적 또는 생화학적 인식 소자로서 공간적으로 분리된 방식으로 고정되어 있는, 제2 광학적으로 투명한 층 (b)의 상단에 있는 제1 광학적으로 투명한 도파층 (a) ((b)는 (a)보다 낮은 굴절률을 가짐)를 포함하는 하나 이상의 박막 도파로

b) 상기 a)의 고정 마이코톡신에 적용되고 이에 의해 인식되는 결합 파트너

를 포함하는, 간접적 경쟁 면역분석에 의한 마이코톡신의 신속한 검출을 위한 키트.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 키트가 형광 표지 결합 파트너를 포함하는 시약을 포함하는 것을 **특징으로 하는** 키트.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 마이코톡신을 검출하는 장치 및 방법 및 상기 방법을 수행하기에 적합한 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이코톡신의 검출은 넓은 적용 분야, 예를 들어, 식품 및 사료 분야, 환경 분석, 농작물 보호 및 생화학 연구

를 포함한다.

[0003] 마이코톡신은 매우 상이한 화학 구조를 가지는, 곰팡이에 의해 생성되는 독소이다. 마이코톡신은 곡물, 오일 함유 씨 및 과일과 같은 농산물에서 발견되고, 인간 및 동물의 중독을 초래할 수도 있다. 지금까지 대략 25개의 구조 유형으로 구분되고, 상이한 유독성 작용을 나타내는 300개가 넘는 상이한 마이코톡신이 확인되었다. 독소의 유형에 따라, 마이코톡신은 급성 또는 만성 중독을 가져올 수 있다. 마이코톡신의 일반적인 군은 아플라톡신(aflatoxins), 오크라톡신(ochratoxins), 에르고트 알칼로이드(ergot alkaloids), 파툴린(patulin) 및 푸사리움(fusarium) 독신이다. 데옥시니발레놀(deoxynivalenol), 제랄레논(zearalenone), 니발레놀(nivalenol), T-2-/HT2 독신 및 푸모니신은 곡물 중에서 종종 발견되기 때문에 푸사리움 독신 중 특히 중요하다. 따라서, 마이코톡신, 예를 들어 야외 진균의 독소, 예를 들어 푸사리움 독신 또는 저장 진균의 독소에 대한 검사는 음식의 질을 확보하기 위해 곡물 창고, 곡물-매매 및 곡물-가공 상점, 예를 들어, 제분소, 맥아 제조소, 사료제조 사업, 농업 사업, 상담실, 대학 또는 정부 부처, 예를 들어 소비자 보호원에서 수행해야만 한다.

[0004] 마이코톡신을 검출하기 위한 많은 방법이 선행기술에 기술되었다. 예를 들어, 마이코톡신은 형광 기재, 흡수 또는 질량 분석계 검출과 함께 사용할 수도 있는 HPLC와 같은 크로마토그래피 방법에 의해 검출된다. 예를 들어, 곡물 샘플의 HPLC 분석에 앞서, 분석 대상물은 보통 농축되고 면역친화성 컬럼에 의해 정제된다. HPLC를 기초로 하는 모든 방법은 큰 자본 지출, 상대적으로 복잡한 샘플 취급 및 분석의 장기화라는 단점을 가진다. 상기 단점 때문에, HPLC를 기초로 하는 검출 방법은, 예를 들어, 곡물을 생산, 수송, 거래 또는 가공하는 상점에서의 곡물 샘플의 신속, 저렴 및 간단한 분석에 있어서 적합하지 않다. HPLC를 기초로 하는 분석은 전문화된, 분석 실험실에서 대신 수행된다. 결론적으로, 실제로, 결과는 수 일이 지체된 후에만 얻을 수 있다.

[0005] 마이코톡신을 검출하는 대체 방법은 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay (효소 연관 면역흡착제 검사법)) 기술이다. ELISA는 예를 들어, 마이코톡신에 특이적으로 결합하는 포획 항체로 도포된 웰을 갖는 미량역가 플레이트(microtiter plate)와 함께 제공된다. ELISA의 단점은 30 분이 넘는 상대적으로 긴 분석을 초래할 수도 있는 많은 피펫, 세척 및 배양 단계이다. 이는 분석 실험실 외부의 현장에서 신속하게 분석을 수행하지 못하게 한다. 더욱이, 각 미량역가 플레이트는 한가지 유형의 항체로만 보통 도포되기 때문에, 상기 분석은 복수의 검사 대상을 동시에 검출하는 것을 허용하지 않는다.

[0006] 마이코톡신을 검출하는 다른 방법은 측방 유동 검사법 (LFA)이다. 마이코톡신은, 예를 들어, 검사할 샘플을 모세관력으로 니트로셀룰로스 스트립 전체를 통해 끌어 올려 니트로셀룰로스 스트립 상에서 직접적, 경쟁적 면역 분석법을 행하는 LFA에 의해 검출될 수 있다. 상기 방법은 단지 정성적인 마이코톡신의 검출만을 허용하는 단점이 있다. 이 검사법의 다른 단점은 각 마이코톡신에 대해 별개의 스트립을 필요로 한다는 점이다.

[0007] 선행기술은 또한, 예를 들어, 문헌[M. M. Ngundi et al., Anal. Chem. 2005, 77, 148-154]에 의해 기술된 마이코톡신을 검출하는 방법의 개발에 대한 연구를 포함한다. 이 방법은 오크라톡신 A를 유리 슬라이드 상에 고정시켜 오크라톡신 A를 검출하는 간접적, 경쟁 면역분석법을 수행하는 것을 포함한다. 오크라톡신 A에 대한 형광 표지 항체 및 측정할 샘플의 혼합물을 결합하지 않은 항체를 세척하여 제거한 후 판독할 수 있는 슬라이드에 적용한다. 상기 방법은 세척 단계 및 10 내지 20 분의 배양 시간 및 또한 결과를 판독하기 위한 복잡한 형광 영상 시스템을 필요로 하는 단점이 있다. 결과적으로, 분석 실험실 바깥의 현장에서 수행할 수 있다는 점을 기초로 하여 신속한 검사를 개발하는 것이 불가능하다.

[0008] 따라서, 마이코톡신을 검출하는 선행기술에서 알려진 방법은 복잡한 판독 장치 때문에 큰 자본 지출을 필요로 하고, 많은 수동적 단계를 포함하거나 또는 분석 실험실 외부에서 사용될 수 없다.

발명의 상세한 설명

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 상기 선행기술의 하나 이상의 상술한 불이익을 극복하는 방법, 특히 신속, 저렴 및 수행하기 용이한 방식으로 샘플 중에서 마이코톡신을 검출하는 것을 가능하게 하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 상기 목적은 하기의 단계를 포함하는 마이코톡신의 신속한 검출 방법에 의해 달성된다:

[0011] a) 도파로 특이성 및/또는 친화적 결합 파트너가 마이코톡신 및/또는 결합 파트너에 대한 화학적 또는 생화학적 인식 요소로서 공간적으로 분리된 방식으로 고정되어 있는, 제2 광학적으로 투명한 층 (b)의 상단에 있는 제1 광학적으로 투명한 도파층 (a) ((b)가 (a)보다 낮은 굴절률을 가짐)를 포함하는 박막 도파로를 제공하는 단계,

- [0012] b) 마이코톡신(들)-함유 샘플 및 결합 파트너를 상기 박막 도파로 상에 고정된 결합 파트너에 적용하는 단계,
- [0013] c) 샘플로부터의 마이코톡신 및/또는 결합 파트너와 박막 도파로 상에 고정된 결합 파트너의 상호작용에 의한 소산장 중의 신호를 검출하는 단계,
- [0014] d) 샘플 중에 존재하는 마이코톡신(들)의 양을 측정하는 단계.
- [0015] 본 발명은 또한 마이코톡신을 검출하는 방법을 수행하는 장치에 관한 것이다.
- [0016] 추가적인 대상 물질은 마이코톡신을 검출하는 방법을 수행하기 적합한 키트이다.
- [0017] 본 발명의 추가적인 유리한 실시태양은 종속항으로부터 얻어진다.
- [0018] 놀랍게도, 마이코톡신을 검출하는 본 발명의 방법은 용이하게 및 전문화된 분석 실험실 외부에서 수행될 수 있다는 것을 알았다. 반드시 분석을 위해 실험실로 샘플을 넘길 필요 없이, 본 발명의 방법은 신속한 검사의 방식으로 수행하는 것을 가능하게 한다. 더욱이, 본 발명의 방법에 따른 마이코톡신 검출은 유리하게도 경우에 따라 몇 번의 세척단계만을 필요로 한다. 이것은, 세척 단계를 수행하는 것이 시간-소모적이고, 분석의 결과를 얻을 때까지의 시간이 늘어나고, 분석의 결과를 왜곡시킬 수도 있거나 또는 특히 주의하지 않고 부적절하게 수행할 때 심지어 검출을 완전히 불가능하게 할 수도 있다는 점에서 특히 유리하다.
- [0019] 본 발명의 방법의 상기 유리한 특성들을 합치면 식품 품목, 예를 들어, 곡물 창고, 곡물 거래 또는 곡물-가공 상점에서 마이코톡신을 검출하는 것을 가능하게 한다. 특히, 상기 방법은 용이하고 신속하게 수행할 수 있고, 이것은 전문 실험실의 전문화된 분석가가 아닌 자에게조차 상기 방법을 수행하는 것을 가능하게 한다.
- [0020] 상기 방법의 바람직한 실시태양은 박막 도파로를 기초로 하는 소산장 바이오칩, 바람직하게는 박막 도파로를 기초로 하는 평면 광학 도파로 바이오칩의 형태로 박막 도파로를 사용한다.
- [0021] 광학 도파로는 전형적으로 유전체인 도파층과 접하는 매질의 광학 특성에서의 변화를 검출하는 데 사용할 수 있는 신호 변환기의 일종이다. 광이 도파층 내에서 도파 모드로 전송될 때, 광 필드는 매질/도파로 계면에서 급격하게 감소하지 않고 오히려 도파로 주변의 검출 매질 중에서 지수적으로 감소한다. 이 지수적으로 감소하는 광 필드는 소산장이라 불리운다. 소산장 내에서의 도파로와 접하는 매질의 광학 특성의 변화는 적합한 측정 기구를 사용하여 검출할 수 있다.
- [0022] 도파로 계면에 고정된 인식 요소의 경우에 있어서, 검출 매질의 광학 특성이 도파로와의 계면에서 변화할 때, 상기 인식 요소에 대한 결합 또는 반응이 검출될 수 있다는 점에서 신호 변환기로써 도파로를 사용하는 것이 유리하다.
- [0023] 따라서, 상기 검출을 수행할 때 시간을 아끼고, 절차를 간략화하는 것이 모두 가능하다.
- [0024] 따라서, 신호 또는 표지된 요소는 신호 변환기 또는 박막 도파로의 표면상에서 직접적으로, 매질, 예를 들어 분석할 샘플의 광학적 특성의 변화를 통해, 예를 들어, 흡광, 형광, 인광, 발광 등에서의 변화에 의해 검출할 수 있다.
- [0025] 소산장에서의 형광 신호를 검출하는 것이 바람직하다. 결합 파트너, 예를 들어, 마이코톡신, 마이코톡신 접합체, 항체 접합체 또는 항체를 표지하는데 있어서 본 발명에 따라 사용할 수도 있는 표지 요소는 바람직하게는 유기 형광물질, 나노입자, 형광 나노입자, 비드, 형광 비드, 형광 단백질 또는 다른 신호 분자 또는 단위 또는 다양한 표지 요소의 임의의 조합이다. 발광 가능한 방식으로 표지한 결합 파트너를 사용하는 것이 바람직하다. 바람직한 표지 요소는 유기 형광물질 및/또는 형광 단백질이다.
- [0026] 본 발명의 방법에 따르면, 바람직하게는 형광 표지 결합 파트너는 소산장에 의해 여기될 수도 있다. 바람직한 실시태양에 있어서, 소산장은 두베넥(Duvenek) 외의 US 5,959,292에 기술된 평면 광학 도파로에 의해 생성된다. 등방으로 발광된 형광은 적합한 기구를 사용하여 검출할 수도 있다. 다른 실시태양에 있어서, 도파로 내로 커플링하여 들어간 형광은 적합한 광학 요소에 의해 도파로에서 재차 커플링되어 나올 수도 있고, 적합한 광학 기구를 사용하여 검출할 수도 있다.
- [0027] 특히 바람직하게는, 신호의 검출 이전에 형광 표지 결합 파트너 또는 표지 결합 파트너를 함유하는 샘플 또는 용액을 세척하는 것은 바람직하게는 제한될 수 있거나, 심지어 전체가 생략될 수도 있다. 보통 사용되는 세척 단계의 다양한 완충액을 제공하는 것이 또한 생략될 수 있기 때문에, 간략화된 방식뿐만 아니라 적은 시간으로 마이코톡신을 검출하는 것이 가능해진다.

- [0028] 사용 가능한 박막 도파로는 TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 및/또는 ZrO_2 를 포함하는 군으로부터 선택된, 바람직하게는 TiO_2 , Ta_2O_5 및/또는 Nb_2O_5 를 포함하는 군으로부터 선택된 산화물을 포함하는 광학적으로 투명한 도파층 (a)을 포함하는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 광학적으로 투명한 도파층 (a)는 TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 또는 ZrO_2 , 바람직하게는 TiO_2 , Ta_2O_5 또는 Nb_2O_5 로 만들어진다. 오산화탄탈의 사용은 특히 형광 신호의 검출에 있어서 특히 바람직하다는 것이 입증되었다.
- [0029] 특정 실시태양은 박막 도파로, 특히 TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 및/또는 ZrO_2 를 포함하는 군으로부터 선택된 산화물, 단층 또는 다층의 하기의 화학식 I의 유기인산 및/또는 화학식 II의 유기포스폰산 및/또는 그들의 염을 포함하는 광학적으로 투명한 도파층 (a)에 적용하는 것을 포함한다.
- [0030] <화학식 I>
- [0031] $\text{R-OPO}_3\text{H}_2$
- [0032] <화학식 II>
- [0033] $\text{R-PO}_3\text{H}_2$
- [0034] (식 중, R은 C_{10} 내지 C_{24} 의 알킬기임)
- [0035] 유기인산 및/또는 유기포스폰산, 바람직하게는 유기인산염 및/또는 유기포스폰산염 (여기서, R은 비분지 C_{10} 내지 C_{20} 의 알킬을 포함하는 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 비분지 C_{12} 내지 C_{18} 의 알킬기를 포함하는 군으로부터 선택됨), 바람직하게는 도데실인산, 도데실인산염, 옥타데실포스폰산염 및/또는 옥타데실포스폰산을 포함하는 군으로부터 선택된 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0036] 수용액으로부터의 수용성 염에 의해 박막 도파로에 적용할 수도 있는 유기인산 또는 유기인산염을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0037] 바람직한 실시태양에 있어서, 유기인산 및/또는 유기포스폰산, 바람직하게는 유기인산염을 박막 도파로, 특히 소산장 바이오칩, 바람직하게는 평면 광학 도파로 바이오칩에 단층으로 적용한다. 이들은 침지 공정으로 적용될 수도 있다.
- [0038] 단층은 접촉촉진층으로서 산화물로부터 만들어진 광학적으로 투명한 층에 적용될 수도 있다. 바람직하게는, 유기인산 및/또는 유기포스폰산은 인식 요소, 특히 단백질 또는 단백질에 결합한 인식 요소와 상호작용할 수 있고, 상기 인식 요소가 바이오칩에 결합하는 것을 촉진할 수 있다.
- [0039] 사용가능한 결합 파트너는 바람직하게는 항-마이코톡신 항체, 항 마이코톡신-항체 접합체, 마이코톡신, 마이코톡신 접합체, 항-마이코톡신-항체의 단편, 마이코톡신-결합 펩티드, 마이코톡신 결합 안티칼린, 마이코톡신-결합 압타머, 마이코톡신 결합 스피겔머 및/또는 마이코톡신-결합 전사된(imprinted) 중합체, 바람직하게는 항-마이코톡신 항체, 항-마이코톡신-항체 접합체, 마이코톡신 및/또는 마이코톡신 접합체를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0040] 각각의 경우에 있어서, 결합 파트너는 다른 결합 파트너에 특이적으로 및/또는 친화적으로 결합한다. 예를 들어, 박막 도파로에 적용된 항-마이코톡신 항체는 상기 박막 도파로 상에 고정된 마이코톡신에 친화성을 갖고 결합한다. 마찬가지로, 박막 도파로 상에 고정된 항-마이코톡신 항체는 상기 박막 도파로에 적용된 마이코톡신 또는 마이코톡신 접합체에 친화성을 갖고 결합한다. 여기서 결합 특이성은 사용된 친화성 파트너에 의존한다. 따라서, 사용 가능한 교차 반응성 항-마이코톡신 항체는 상응하는 마이코톡신, 예를 들어, 푸모신의 군에 친화성을 갖고 결합하지만, 예를 들어 특별한 푸모신 B1에 대한 항체에 비해 특이성이 낮다. 고정된 결합 파트너는 또한 인식 요소 또는 "포획 분자"로 불리운다.
- [0041] 항-마이코톡신-항체 접합체 및 마이코톡신 접합체는, 예를 들어 단백질 및 항-마이코톡신 항체 또는 마이코톡신으로부터 형성될 수도 있다.
- [0042] 바람직한 실시태양, 예를 들어, 간접적, 경쟁적인 검사에 있어서, 고정된 결합 파트너는 마이코톡신 접합체이다. 마이코톡신 접합체는 바람직하게는 단백질, 예를 들어, 소 혈청 알부민 (BSA)에 결합한 마이코톡신으로부터 형성될 수도 있다. 그러한 마이코톡신-BSA 접합체를 사용하는 특별한 이점은 마이코톡신을 박막 도

파로에 결합시키는 것이 단백질 및 유기인산 및/또는 유기포스폰산 사이의 상호 작용에 의해 향상될 수 있다는 점이다. 이것은 상기 박막 도파로에 대한 인식 요소의 접촉을 향상시킬 수도 있다.

[0043] 표지 요소, 예를 들어, 형광 염료 또는 형광물질은 결합 파트너, 예를 들어, 항-마이코톡신 항체 또는 마이코톡신에 직접 결합하거나, 또는 스페이서 요소, 예를 들어 단백질 또는 알킬 쇠 또는 폴리에틸렌 글리콜 쇠를 통해 결합할 수도 있다. 표지 요소, 예를 들어, 형광 염료 또는 형광물질은 바람직하게는 단백질을 통해 마이코톡신에 결합된다. 적합한 단백질의 예는 BSA이다. BSA에 의한 형광물질의 마이코톡신에의 결합은 결합 파트너, 예를 들어 항체에 표지 요소의 결합을 현저하게 향상시킬 수도 있다. 예를 들어, 형광물질을 마이코톡신에 결합시키는 복잡한 방법을 피하는 것을 가능하게 하는 것은 직접적으로 또 다른 이점을 만들어낸다. 직접적인 경쟁적 검사에서 사용될 수도 있는 고정된 항-마이코톡신 항체를 위한 바람직한 결합 파트너는, 예를 들어, 형광 표지 마이코톡신-BSA 접합체이다.

[0044] 마이코톡신은 원칙적으로 박막 도파로에 모두 적용하는 것이 가능한 샘플, 용액 또는 다른 매질에 있어서 검출될 수도 있다. 바람직한 실시태양에 있어서, 샘플은 인간 또는 동물 식품이다. 마이코톡신은 바람직하게는 곡물, 곡물 제품, 와인, 주스 또는 과일 및/또는 곡물, 와인, 주스 및/또는 과일을 함유한 제품에서 본 발명의 방법에 따라 검출한다. 분석할 샘플, 예를 들어 식품 품목 또는 제품은 여기서 박막 도파로에 적용 또는 용매 또는 용매 혼합물로 추출할 수도 있고, 이 때는 추출된 추출물이 사용될 수도 있다. 상기 추출물은 희석된 또는 농축된 형태로 사용하는 것이 가능할 수도 있다.

[0045] 마이코톡신은 용매 또는 용매 혼합물로 처리하여 연구할 샘플, 예를 들어, 곡물 또는 다른 식품 품목으로부터 제거할 수도 있다. 예를 들어, 마이코톡신은 분쇄 및, 이어서 물 또는 유기 용매 또는 용매 혼합물, 예를 들어, 선택적으로 완충 물질, 염, 산 또는 염기 및 기타 첨가제와 혼합할 수도 있는 물 및 유기 용매의 혼합물, 예를 들어, 물 및 메탄올 또는 에탄올 또는 물 및 아세트니트릴의 혼합물로 추출하여 곡물 샘플로부터 제거될 수도 있다. 마이코톡신을 추출하는 다른 방법은 당업자에게 공지되었다. 얻어진 용해된 마이코톡신은 직접적으로 또는 박막 도파로 또는 칩 상의 희석 또는 농축 후에 분석될 수도 있다.

[0046] 항-마이코톡신 항체, 항-마이코톡신-항체 접합체, 마이코톡신 및/또는 마이코톡신 접합체, 바람직하게는 둘 이상의 상이한 것들을 포함하는 군으로부터 선택되는 것이 바람직한 "포획 분자"로 지칭되는 사용가능한 인식 요소는 공유적으로 또는 비공유적으로, 예를 들어, 소수성 흡착에 의해 박막 도파로 표면 또는 칩 표면 상에 고정될 수도 있다. 그들은 예를 들어, 스폿(spot)이라 불리는 측정 필드를 거쳐 인식 요소를 박막 도파로 표면 또는 칩 표면에 적용하여, 즉 스폿팅(spotting)이라고 불리우는 공정에 의해 고정될 수도 있다. 스폿팅 용액, 바람직하게는 인식 요소로 결합 파트너(들)를 함유하는 완충 용액, 스팟터라고 불리우는 자동 적용을 위한 장치를 사용하는 것이 바람직하다. 인식 요소가 상기 박막 도파로 또는 칩에 접합하는 것이 가능하게 하기 위해 박막 도파로 또는 칩을 1시간 이상, 바람직하게는 수 시간 스폿팅한 후에 배양하는 것이 바람직하다.

[0047] 스폿팅 후에 바이오칩을 단백질 용액, 바람직하게는 사용가능한 차단용 단백질 용액, 예를 들어, BSA의 용액으로 한 시간 이상, 바람직하게는 2시간 내지 6시간, 특히 바람직하게는 3시간 내지 4시간 동안 바이오칩을 처리하는 것이 바람직하다. 용액을 제거한 후, 박막 도파로 또는 바이오칩은 건조 및 저장될 수도 있다.

[0048] 샘플 및 바람직하게는 형광 표지한 결합 파트너는 박막 도파로, 바람직하게는 소산장 바이오칩, 바람직하게는 평면 광학 도파로 바이오칩 상의 고정된 인식 요소에 동시 또는 연속적으로 적용할 수도 있다. 따라서, 바람직하게는 형광 표지 결합 파트너, 예를 들어 하나 이상의 바람직하게는 형광 표지 마이코톡신, 마이코톡신 접합체 또는 항체를 샘플, 예를 들어 추출물의 칩 상에서의 배양 전 또는 도중에 하나 이상의 마이코톡신에 첨가하는 것이 가능하다. 또한, 예를 들어, 표지된, 바람직하게는 형광 표지 마이코톡신, 마이코톡신 접합체 또는 하나 이상의 마이코톡신에 대한 항체와의 혼합물 중 분석할 샘플의 추출물을 칩에 적용하는 것이 또한 가능하다.

[0049] 특히 바람직하게는, 샘플은 박막 도파로 및/또는 결합 파트너 상에 화학적 또는 생화학적 인식 요소로서 고정된 결합 파트너로 신호의 검출 전에 15분 미만, 바람직하게는 10분 미만, 특히 바람직하게는 5분 미만 본 발명의 방법에 따라 배양될 수도 있다.

[0050] 이것은 표지된 마이코톡신 항체의 용액과 적용된 마이코톡신 접합체와 함께 때때로 2 시간 이하의 배양 시간을 필요로 하는 공지의 방법, 또는 샘플을 표지된 항-마이코톡신 항체로 사전배양할 필요가 있는 방법에 비해 크게 유리하다. 이것은 공지의 방법보다 본 발명의 방법에 의해 더욱 신속하게 마이코톡신을 측정하는 것을 가능하게 한다. 더욱 구체적으로, 배양 시간을 상당히 줄일 수 있다. 특별히 바람직한 실시태양에 있어서, 배양 시간은 10 분보다 적거나 또는 심지어 단지 5 분일 수도 있다. 특히 세척 단계를 생략할 수도 있는 추가적인 이

점과 합쳐져서, 이것은 본 발명의 방법이 20 분 미만 내, 바람직하게는 15 분 미만 내, 특히 바람직하게는 10 분 미만 내에 결과를 얻는 것을 가능하게 한다.

- [0051] 본 발명의 방법을 사용하여 마이코톡신을 정량적으로 및 바람직하게는 적은 편차로 측정할 수도 있다. 예를 들어, 재현성의 척도인 "연구실 간의 변이 계수"는 50% 미만, 바람직하게는 40% 미만일 수도 있다. 또한, 반복성의 척도인 "연구실 내의 변이 계수"는 20% 미만일 수도 있다. 식품 품목, 예를 들어 곡류, 곡물 제품 또는 와인 중 마이코톡신을 측정하는 표준화된 및 간단한 방법의 틀 내에서 본 발명의 방법을 사용하는 것을 가능하게 한다.
- [0052] 검출가능한 마이코톡신은 바람직하게는 아플라톡신, 오크라톡신, 에르고트 알칼로이드, 파툴린 및/또는 푸사리움 독신을 포함하는 군으로부터, 예를 들어, 데옥시니발레놀, 니발레놀, 제랄레논, T-2 독신, HT-2 독신, 오크라톡신 A 및/또는 푸모니신을 포함하는 군으로부터 선택된다. 푸모니신은 바람직하게는 푸모니신 B1, 푸모니신 B2 및/또는 푸모니신 B3를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0053] 따라서, 사용 가능한 결합 파트너는 바람직하게는 아플라톡신, 오크라톡신, 에르고트 알칼로이드, 파툴린 및/또는 푸사리움 독신을 포함하는 군으로부터, 예를 들어 데옥시니발레놀, 니발레놀, 제랄레논, T-2 독신, HT-2 독신, 오크라톡신 A 및/또는 푸모니신, 및 아플라톡신, 오크라톡신, 에르고트 알칼로이드, 파툴린 및/또는 푸사리움 독신을 포함하는 군으로부터 선택된, 예를 들어 데옥시니발레놀, 니발레놀, 제랄레논, T-2 독신, HT-2 독신 및/또는 푸모니신을 포함하는 군으로부터 선택된 마이코톡신에 대한 항체를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0054] 사용된 면역분석의 유형에 따라, 결합 파트너 중 하나, 예를 들어 간접적 경쟁 면역분석의 경우에 있어서의 하나 이상의 마이코톡신은 박막 도파로 상에 인식 요소로 고정된 반면 다른 하나의 결합 파트너, 예를 들어 간접적 경쟁 면역분석의 경우에 있어서 하나 이상의 항-마이코톡신 항체는 샘플 전 또는 동시에 박막 도파로에 적용된다. 여기에 첨가된 결합 파트너는 바람직하게는 발광적으로, 바람직하게는 형광물질로 표시된다.
- [0055] 사용가능한 결합 파트너는 바람직하게는 데옥시니발레놀, 니발레놀, 제랄레논, T-2 독신, HT-2 독신, 오크라톡신 A 및/또는 푸모니신 B1, 푸모니신 B2 및/또는 푸모니신 B3, 및 데옥시니발레놀, 니발레놀, 제랄레논, T-2 독신, HT-2 독신, 오크라톡신 A 및/또는 푸모니신 B1, 푸모니신 B2 및/또는 푸모니신 B3를 포함하는 군으로부터 선택된 마이코톡신에 대한 항체를 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0056] 바람직하게는, 마이코톡신에 대한 단일클론 항체, 예를 들어 항-푸모신 B1, 항-푸모신 B2 또는 항-푸모신 B3가 여기서 사용될 수도 있다. 푸모신의 군에 대한 항체 작용 또한 사용될 수도 있다. 사용 가능한 결합 파트너, 바람직하게는 마이코톡신에 대한 항체는 단독으로 또는 혼합물로 사용될 수도 있고, 교차 반응성 항체를 사용하는 것 또한 가능하다.
- [0057] 본 발명의 방법의 특별한 이점은 본 발명의 방법이 증가한 민감도로 마이코톡신을 검출할 수 있다는 사실에서 생겨난다. 예를 들어, 마이코톡신은 특히 인간 또는 동물의 식품 품목, 예를 들어 곡류, 와인, 주스, 과일 및/또는 이들의 제품, 또는 상기 식품 품목 또는 제품의 추출물에서, 나노몰 또는 피코몰의 마이코톡신 농도 범위에서도 검출할 수도 있다. 예를 들어, 마이코톡신은 곡류 추출물에서 심지어 0.1 pM 내지 100 nM 범위의 마이코톡신, 바람직하게는 1 pM 내지 1 nM 범위의 마이코톡신이 검출가능할 수도 있다. 더욱 구체적으로, 1 nM 미만의 농도, 바람직하게는 100 pM 미만, 바람직하게는 10 pM 미만, 특히 바람직하게는 1 pM 미만의 마이코톡신을 검출할 수도 있다.
- [0058] 또한, 마이코톡신은 곡류 추출물 중에서 10^{-4} ppb 내지 10,000 ppb의 범위의 마이코톡신, 곡류 중에서 10^{-2} ppb 내지 10,000 ppb 범위 내의 마이코톡신을 검출할 수도 있다. 바람직하게는, 마이코톡신은 곡류 추출물 중에서 ≤ 0.1 ppb의 범위의 마이코톡신, 바람직하게는 ≤ 0.01 ppb의 범위의 마이코톡신, 특히 바람직하게는 $\leq 10^{-4}$ ppb의 범위 내의 마이코톡신, 곡류 중에서 ≤ 0.1 ppb 범위 내의 마이코톡신, 바람직하게는 ≤ 0.01 ppb 범위 내의 마이코톡신, 특히 바람직하게는 $\leq 10^{-4}$ ppb 범위 내의 마이코톡신이 검출가능할 수도 있다.
- [0059] 이것은 측정할 식품 품목에 존재하는 마이코톡신을 분석 실험실 외부에서 이전보다 더욱 정확하게 측정하는 것을 가능하게 한다.
- [0060] 본 발명의 방법은 둘 이상의 마이코톡신, 바람직하게는 2 내지 1000 개의 마이코톡신, 바람직하게는 5 내지 100 개의 마이코톡신을 검출하는 것을 가능하게 한다. 더욱 구체적으로, 마이코톡신을 동시에 측정하는 것이 가능하다. 이것은 대부분이 한번에 하나의 마이코톡신만을 검출하는 것을 허용하는 공지된 방법에 비해 큰 이점이

다.

- [0061] 마이코톡신을 검출하는 방법의 바람직한 실시태양은 특이성 및/또는 친화성 결합 파트너를 마이코톡신 및/또는 결합 파트너에 대한 화학적 또는 생화학적 인식 요소로서, 제2 광학적으로 투명한 층 (b) 상단에 있는 제1 광학적으로 투명한 도파층 (a) ((b)는 (a)보다 낮은 굴절률 가짐)를 포함하는 박막 도파로의 표면상에 공간적으로 분리된 방식으로 고정하기 위해 제공된다. 분석할 샘플 및 바람직하게는 형광물질-표지 결합 파트너는 그 다음 동시 또는 연속적으로 첨가될 수도 있다. 박막 도파로 상에 고정된 결합 파트너, 샘플의 마이코톡신(들) 및/또는 바람직하게는 형광물질-표지 결합 파트너 사이의 특이성 및/또는 친화성 상호작용은 소산장에서의 신호 변화로서 검출될 수도 있다. 샘플 중의 마이코톡신의 존재는 소산장에서의 신호의 변화를 생성한다.
- [0062] 본 발명에 따르면, 마이코톡신은 분석, 예를 들어 면역분석에 의해 칩 상에서 검출될 수도 있다. 마이코톡신의 검출은 바람직하게는 면역분석, 바람직하게는 경쟁 면역분석, 예를 들어 직접적 또는 간접적 경쟁 면역분석, 특히 바람직하게는 간접적 경쟁 면역분석에 의해 수행한다.
- [0063] 직접적 경쟁 면역분석에 의한 마이코톡신의 검출 방법의 바람직한 실시태양은 마이코톡신에 대한 화학적 또는 생화학적 인식 요소로서 항-마이코톡신 항체를 제2 광학적으로 투명한 층 (b) 상단에 있는 제1 광학적으로 투명한 층 (a) ((b)는 (a)보다 낮은 굴절률을 가짐)를 포함하는 박막 도파로의 표면상에 공간적으로 분리된 방식으로 고정하는 것을 제공할 수도 있다. 바람직하게는 형광물질-표지 마이코톡신 또는 바람직하게는 형광물질-표지 마이코톡신-BSA 접합체는 다음으로 분석할 샘플과 동시에 또는 전에 첨가할 수도 있다. 박막 도파로 상에 고정된 항-마이코톡신 항체, 샘플의 마이코톡신(들) 및/또는 바람직하게는 형광물질-표지 마이코톡신 또는 마이코톡신-BSA 접합체 사이의 상호작용은 소산장 중에서의 신호 변화로서 검출될 수도 있다.
- [0064] 직접적 경쟁 면역분석의 경우에 있어서, 바람직하게는 둘 이상의 상이한 항-마이코톡신 항체는 공유적으로 또는 비공유적으로, 예를 들어 스포팅으로 칩 표면 상에 고정될 수도 있다. 예를 들어, 바람직하게는 형광 표지한 마이코톡신 또는 마이코톡신 접합체와의 혼합물 중 연구할 샘플의 추출물을 칩에 적용하는 것은 상기 칩 상에 가용 항체 결합 자리를 두고 경쟁하는 상기 표지 또는 비표지 마이코톡신 또는 마이코톡신 접합체를 초래한다. 형광 표지 마이코톡신은 칩 상의 추출물의 배양 전 또는 도중에 첨가될 수도 있다. 고정된 항체에 결합한 표지한 마이코톡신의 양은 추출물 중에 존재하는 마이코톡신의 양에 반비례한다.
- [0065] 검출은 또한 샌드위치 분석의 방식으로 행해질 수도 있다. 이 경우에 있어서, 표지된 마이코톡신 또는 마이코톡신 접합체보다는 오히려 칩 상에 고정된 항체의 고정된 복합체에 결합한 표지한 검출 항체 및 마이코톡신이 사용된다. 샌드위치 분석법에서, 항체에 결합한 형광물질의 양은 추출물 중의 마이코톡신의 농도에 비례한다.
- [0066] 간접적 경쟁 면역분석에 의한 마이코톡신의 검출을 위한 방법의 다른 바람직한 실시태양은 마이코톡신 또는 바람직하게는 형광물질-표지 마이코톡신-BSA 접합체를 화학적 또는 생화학적 인식 요소로서 공간적으로 분리된 방식으로 제2 광학적으로 투명한 층 (b)의 상단에 있는 제1 광학적으로 투명한 도파층 (a) ((b)는 (a)보다 낮은 굴절률을 가짐)를 포함하는 박막 도파로의 표면상에 고정하기 위해 제공할 수도 있다. 그 다음 바람직하게는 형광물질-표지 항-마이코톡신 항체가 분석할 샘플과 동시에 또는 전에 첨가될 수도 있다. 박막 도파로 상에 고정된 마이코톡신 또는 바람직하게는 형광물질-표지 마이코톡신-BSA 접합체, 샘플의 마이코톡신 및/또는 바람직하게는 형광물질-표지 항-마이코톡신 항체 사이의 상호 작용은 소산장 중에서의 신호 변화로서 검출될 수도 있다.
- [0067] 본 발명에 따르면, 마이코톡신은 또한 간접적 경쟁 면역분석에 의해 또한 검출될 수도 있다. 이 경우에 있어서, 마이코톡신 또는 마이코톡신-접합체, 예를 들어 마이코톡신-단백질 접합체, 바람직하게는 마이코톡신-BSA 접합체는 칩 상에 고정될 수도 있다. 바람직하게는 형광 표지 항-마이코톡신-항체와의 혼합물 중 연구할 샘플의 추출물을 칩에 적용하는 것은 고정된 마이코톡신 및 용액 중 마이코톡신이 형광 표지 항체의 가용 결합 자리를 두고 경쟁하는 결과를 초래한다. 형광 표지 항-마이코톡신 항체는 칩 상의 추출물의 배양 전 또는 도중에 첨가될 수도 있다. 이 경우에 있어서, 결합된 표지 항체의 양은 추출물 중에 존재하는 마이코톡신의 양에 반비례한다.
- [0068] 또한, 상기 신호는 바람직하게는 판독 장치에 의해 소산장 중에서 검출될 수 있다. 상기 판독 장치는, 예를 들어, 강하고 저렴한 판독 장치일 수도 있다.
- [0069] 적합한 소프트웨어가 샘플 중에서 존재하는 마이코톡신의 양을 계산하는 것뿐만 아니라 신호 세기, 예를 들어 형광 세기를 구하는 데 사용될 수도 있다.

- [0070] 본 발명의 방법, 특히 수행하기 용이하고, 강하고 저렴한 판독 장치로 동시에 그리고 정량적으로 다수개의 마이크로톡신을 검출할 수 있는 가능성을 갖는 방법의 조합에 의해 제공되는 이점은 분석 실험실의 외부에서 용이하고, 신속하게 마이크로톡신을 검출하는 것을 가능하게 한다.
- [0071] 본 발명은 또한 마이크로톡신의 검출 방법을 수행하기 위한 장치에 관한 것이다.
- [0072] 마이크로톡신의 검출 방법을 수행하는 장치는 박막 도파로, 바람직하게는 제2 광학적으로 투명한 층 (b)의 상단에 있는 제1 광학적으로 투명한 도파층 (a) ((b)는 (a)보다 낮은 굴절률을 가짐)를 포함하는 박막 도파로를 기초로 하는 평면 광학 도파로 바이오칩을 갖는다. 인식 요소는 바람직하게는 층 (a)에 고정된다.
- [0073] 적합한 평면 광학 도파로의 예는 WO 01/92870 또는 미국 5,959,292에 기재되었다.
- [0074] 상기 장치의 바람직한 실시태양에 있어서, 박막 도파로, 바람직하게는 평면 광학 도파로 바이오칩의 상기 광학적으로 투명한 층 (b)는 실리콘에이트, 예를 들어, 유리 또는 석영으로부터, 또는 바람직하게는 폴리카르보네이트, 폴리이미드, 폴리메타크릴레이트, 폴리스티렌, 시클릭 폴리올레핀 및/또는 시클릭 폴리올레핀 공중합체, 바람직하게는 시클릭 폴리올레핀 또는 시클릭 폴리올레핀 공중합체를 포함하는 군으로부터 선택된 투명한 플라스틱으로부터 만들어질 수도 있다. 광학적으로 투명한 층 (b)를 제조하기 적합한 플라스틱의 예는 WO 03/020488 중에 기술되었다.
- [0075] 예를 들어 폴리카르보네이트, 폴리이미드, 아크릴레이트, 특히 폴리메틸 메타크릴레이트, 또는 폴리스티렌을 포함하는 군으로부터 선택된 투명한 열가소성 또는 주입가능한 플라스틱이 바람직하다.
- [0076] 상기 장치의 특정 실시태양에 있어서, 광학적으로 투명한 도파층 (a)는 TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 및/또는 ZrO_2 을 포함하는 군으로부터 선택된, 바람직하게는 TiO_2 , Ta_2O_5 및/또는 Nb_2O_5 를 포함하는 군으로부터 선택된 산화물을 포함할 수도 있다. 몇몇의 상기 산화물의 조합이 또한 사용될 수도 있다. TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 또는 ZrO_2 , 바람직하게는 TiO_2 , Ta_2O_5 또는 Nb_2O_5 로 만들어진 광학적으로 투명한 도파층 (a)가 바람직하다. 오산화탄탈을 사용하는 것이 특히 바람직함이 입증되었다.
- [0077] 바람직한 실시태양에 있어서, 특히 광학적으로 투명한 층 상에 TiO_2 , ZnO , Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , HfO_2 및/또는 ZrO_2 를 포함하는 군으로부터 선택된 산화물을 포함하는 상기 박막 도파로는 하기의 화학식 I의 유기인산 및/또는 화학식 II의 유기포스폰산 및/또는 그들의 염의 단층 또는 다층을 포함한다.
- [0078] <화학식 I>
- [0079] $R-OPO_3H_2$
- [0080] <화학식 II>
- [0081] $R-PO_3H_2$
- [0082] (식 중, R은 C_{10} 내지 C_{24} 의 알킬기임)
- [0083] 바람직하게 사용 가능한 것은 유기인산 및/또는 유기포스폰산, 바람직하게는 유기인산염 및/또는 유기포스폰산염인데, 여기서 R은 비분지 C_{10} 내지 C_{20} 알킬을 포함하는 군으로부터, 바람직하게는 비분지 C_{12} to C_{18} 알킬을 포함하는 군으로부터, 바람직하게는 도데실인산, 도데실인산염, 옥타데실포스폰산염 및/또는 옥타데실포스폰산을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0084] 수용액으로부터 수용성 염으로 박막 도파로에 적용할 수 있는 유기인산 또는 유기인산염이 바람직하다.
- [0085] 바람직한 실시태양에 있어서, 상기 유기인산 및/또는 유기포스폰산, 바람직하게는 유기인산염은 단층으로 박막 도파로, 특히 소산장 바이오칩, 바람직하게는 평면 광학 도파로 바이오칩에 적용한다.
- [0086] 상기 단층은 산화물로 만들어진 광학적으로 투명한 층에 접착-향상 층으로 적용될 수도 있다. 바람직하게는, 유기인산 및/또는 유기포스폰산은 인식 요소, 특히 운반 단백질과 커플링한 인식 요소와 상호 작용할 수 있고, 상기 인식 요소의 바이오칩에의 결합을 향상시킬 수 있다.
- [0087] 상기 장치의 바람직한 형태에 있어서, 상기 유기인산 및/또는 유기포스폰산, 바람직하게는 유기인산염은 박막 도파로, 바람직하게는 산화물로 만들어진 광학적으로 투명한 층에 접착-향상층으로 적용한다. 상기 접착-향상

층은 인식 요소의 박막 도파로 또는 바이오칩에의 결합을 향상시킬 수도 있다.

- [0088] 접착-향상층은 200 nm 미만, 바람직하게는 20 nm 미만의 두께를 가지는 것이 바람직하다.
- [0089] 여기광은 바람직하게는 하나 이상의 격자구조를 사용하여 광학적으로 투명한 도파층 (a)로 커플링 되어 들어간다.
- [0090] 격자구조는 바람직하게는 임의의 형태, 예를 들어 사각형, 삼각형 또는 반원형의 릴리프 격자, 또는 필수적으로 평면인 광학적으로 투명한 층 (a) 중에서 굴절률의 주기적인 조절을 하는 상 격자 또는 부피 격자이다. 상기 격자구조는 균일한 주기의 회절 격자일 수도 있거나, 또는 다중 회절 격자일 수도 있다. 상기 격자구조는 공간 중에서 광학적으로 투명한 도파층 (a) 내로 커플링 되어 들어가는 여기광의 전파 방향과 수직으로 또는 평행하게 변하는 다양한 주기성을 가질 수도 있다.
- [0091] 200 nm 내지 1000 nm, 바람직하게는 200 nm 내지 400 nm의 범위의 주기를 갖는 여기광의 인커플링 (incoupling)을 위해 사용 가능한 격자구조가 바람직하다. 또한, 격자의 변이 전송 인자는 3 nm 내지 60 nm, 바람직하게는 10 nm 내지 40 nm의 범위인 것이 바람직하다. 제1 광학적으로 투명한 도파층 (a) 두께에 대한 변이 전송 인자의 비가 0.4 이하인 것이 바람직하다. 마찬가지로, 굴절률 변이는 층 a와 층 b 사이의 계면 및 층 a와 분석 매질의 계면 모두에서 표명되는 것이 바람직하다.
- [0092] 40 nm 내지 1000 nm, 바람직하게는 40 nm 내지 300 nm, 더욱 바람직하게는 80 nm 내지 200 nm의 범위의 두께를 갖는 광학적으로 투명한 도파층 (a)가 바람직하다.
- [0093] 층 (a) 및 (b) 사이의 굴절률의 차이는 바람직하게는 ≥ 0.2 , 바람직하게는 ≥ 0.5 , 및 더욱 바람직하게는 0.56이다.
- [0094] 여기광은 바람직하게는 300 nm 내지 1100 nm, 바람직하게는 300 nm 내지 800 nm, 더욱 바람직하게는 500 nm 내지 700 nm의 범위 내의 파장을 가진다.
- [0095] 적합한 여기광은 격자구조를 통해 커플링될 수도 있고, 이의 층 (a)에서 안내되는 인커플링된 광의 전파 방향으로 하류에는, 다양한 마이크로톡신이 검출되는 측정 구역들의 다수개의 어레이를 함유하는 층 (a)의 변이되지 않는 영역이 있다. 그의 도파광의 전파 방향으로 하류에, 유리하게는 그의 하류 측정 구역들의 다른 어레이와 함께 하나 이상의 추가의 격자구조가 있을 수 있다. 별법으로, 측정 구역들의 하나의 어레이 또는 다수개의 어레이들이 층 (a)의 변이 영역 내에 있을 수도 있다.
- [0096] 바람직하게는, 측정 구역들의 어레이의 인커플링된 여기광의 전파 방향으로 하류에, 상기 어레이에 대해 특이적인 구조인, 상기 여기광을 아웃커플링(outcoupling)하는 격자구조가 있고, 상기 격자구조는 각 어레이에 특이적으로, 인커플링된 여기광의 전파 방향에 수직으로 형성되거나 또는 박막 도파로 전체를 가로질러 연장되는 것이 가능하다.
- [0097] 장치는 매우 많은 수의 개별적인 측정 필드를 가질 수도 있다. 장치의 바람직한 실시태양에 있어서, 화학적 또는 생화학적 인식 요소로서의 특이성 및/또는 친화성 결합 파트너는 단일 측정 필드 또는 스포트가 바람직하게는 0.001 mm^2 내지 6 mm^2 , 바람직하게는 0.1 mm^2 내지 1 mm^2 의 범위의 넓이를 갖는 100,000개 이하의 측정 필드 또는 스포트에 2차원 배열로 적용된다.
- [0098] 제품 센티미터 당 10 초과, 바람직하게는 50 초과 측정 필드가 박막 도파로 또는 바이오칩에 적용되는 것이 바람직하다.
- [0099] 본 발명은 또한 마이크로톡신의 검출을 위한 키트에 관한 것이다. 상기 키트는 제2 광학적으로 투명한 층 (b) 상단에 있는 제1 광학적으로 투명한 도파층 (a)를 포함하는 하나 이상의 박막 도파로 ((b)는 (a)보다 낮은 굴절률을 가짐)를 포함하는데, 상기 도파로에는 공간적으로 분리된 방식으로 마이크로톡신 및/또는 결합 파트너에 대한 화학적 또는 생화학적 인식 원소로 특정 및/또는 친화성 결합 파트너가 고정되어 있다.
- [0100] 키트는 바람직하게 표지 결합 파트너를 포함하는 하나 이상의 시약을 추가로 포함할 수도 있다. 키트는 또한 바람직하게는 표지 결합 파트너를 포함하는 다수개의 시약 또는 다른 표지 결합 파트너들의 혼합물을 포함하는 하나의 시약을 포함할 수도 있다. 키트는 추가로 청구항들 중 어느 하나에 청구된 검출을 시행하는 데 필요한 완충액 및/또는 용매를 포함할 수도 있다. 본 발명은 또한 검출 장치를 포함하는 키트를 제공할 수도 있다.
- [0101] 키트는 마이크로톡신의 신속한 검출에 사용될 수도 있다.

[0102] 본 발명을 설명하는 것으로 작용하는 실시예가 하기에 주어진다.

실시예

[0103] 실시예 1

[0104] 소산장 바이오칩 상에서 간접적 경쟁 면역분석으로 제랄레논을 측정하기 위한 표준 커브의 구축

[0105] 18 nm의 격자 깊이의 광학 격자가 새겨진 유리로 만들어지고, 오산화탄탈의 155 nm의 층이 제공된, 외부 면적이 1 cm x 2 cm인 일곱개의 바이오칩 (리히텐슈타인(Liechtenstein)의 우낙시스(Unaxis))은 n-헵탄/이소프로판올 (9:1) 중 500 μ M의 옥타데실포스폰산의 용액에 침지하여 옥타데실포스폰산으로 도포하였다. 제랄레논 및 소 혈청 알부민 (ZEA-BSA, ZEA:BSA 비율 = 50:1 (오스트리아 툴른의 바이오퓨어(Biopure) 제조)의 접합체 및 염료 디라이트(DyLight) 647 (독일의 피어스(Pierce)) (DyLight 647-BSA)로 표지한 BSA 분자를 "바이오칩 어레이어" (독일의 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)) 유형의 스포터의 도움으로 바이오칩에 적용하였다. 스포팅 용액은 0.1% BSA 및 0.1% 트윈(Tween) 20을 함유한 PBS (137 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 중 5×10^{-4} mg/ml의 농도의 디라이트 647-BSA, 0.1% BSA 및 0.1% 트윈 20을 함유한 PBS 중 0.5 mg/ml BSA-ZEA 접합체를 포함한다. 스포트들은 두 개의 필드 (어레이)로 각 경우 10 개의 디라이트 647-BSA 스포트 및 BSA-ZEA 접합체 스포트의 새로 교대되는 열들로 칩에 적용하였다.

[0106] 스포트는 높은 습도 (40%)에서 밤새 배양되었고, 상기 바이오칩은 그 다음 4 시간 동안 PBS 중 BSA의 3% 세기 용액으로 처리하였다. 측정 챔버는 분리된 반응 챔버를 가진 두 개의 어레이가 각 칩 상에 형성되도록 하는 방식으로 칩에 적용하였다. 0 μ g/l 내지 31 μ g/l 범위의 다양한 농도의 제랄레논 수용액을 제조하였고, 단일클론의 항-제랄레논 항체 (베를린 바이오테즈(Biotex))로 혼합하고, 디라이트 647로 표지하여, 각 경우에 있어서 1 nM 항체 용액을 제조하였다.

[0107] 각 경우 상이한 농도의 혼합물을 측정 챔버로 도입하고, 상기 바이오칩을 추가적인 처리 단계 없이 "미노플루오 (Minifluo) IV" 형광 관독기 (독일의 바이에르 테크놀로지 서비스(Bayer Technology Services))상에서 10 분 이하 동안 측정하였다. 각 제랄레논 스포트에 대해 얻어진 상기 형광 세기는 특정 스포트의 위아래의 디라이트 647-BSA 스포트의 형광 세기의 평균으로 나누었다. 어레이의 모든 40 개의 스포트의 형광 세기의 평균을 측정 하였다. 얻어진 농도-의존 형광 세기는 오리진(Origin) 7G (미국의 오리진 랩 코퍼레이션(Origin Lab Corporation)) 컴퓨터 프로그램의 도움으로 S자형 핏으로 피팅하였다.

[0108] 샘플의 형광 세기의 측정은 ZEA 농도를 각각 S자형 커브에서의 최대 형광 세기의 80% 및 20%에 상응하는 0.4 ppb 내지 4 ppb 제랄레논 범위 내로 정량화할 수 있으며, 이는 용액에 사용된 1 nM 내지 10 nM 범위 ZEA 농도에 상응함을 발견하였다.

[0109] 실시예 2

[0110] 데옥시니발레논 (DON) 및 오염된 사료 곡류 샘플을 측정하기 위한 표준 커브의 구축

[0111] 광학 격자 (18 nm의 격자 깊이)가 새겨진 유리로 만들어지고, 오산화탄탈의 층 (155nm)이 제공된, 외부 면적이 1 cm x 2 cm인 15 개의 바이오칩 (리히텐슈타인의 우낙시스)을 옥타데실포스폰산으로 도포하였다 (그들을 n-헵탄/이소프로판올 (9:1) 중 옥타데실포스폰산의 용액에 침지하여). 데옥시니발레논 및 소 혈청 알부민 (DON-BSA, DON:BSA 비율 = 100:1, 오스트리아 툴른의 바이오퓨어 제조)의 접합체 및 개 IgG (미국 록랜드(Rockland))를 나노플로터 (독일의 GeSiM) 유형의 스포터의 도움으로 바이오칩에 적용하였다. 스포팅 용액은 트레할로스(trehalose)를 함유하는 PBS (137 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 중 0.2 mg/ml 농도의 개 IgG, 및 트레할로스를 함유하는 PBS 중 1 mg/ml 농도의 BSA-DON 접합체로 이루어진다. 스포트는 두 개의 필드 (어레이) 사이에 각 경우 12 개의 개 IgG 스포트 및 12 개의 BSA-DON 접합체 스포트의 열로 된 2개의 열의 형태로 칩에 적용하였다.

[0112] 스포트는 37 °C에서 1 시간 동안 배양되었고, 상기 바이오칩은 그 다음 4 시간 동안 PBS 중 BSA의 용액으로 처리하였다. 측정 챔버는 분리된 반응 챔버를 가진 두 개의 어레이 각 칩 상에 형성되도록 하는 방식으로 칩에 적용하였다. 5 g의 오염되지 않은 밀가루를 5 분 동안 물 중 70% 메탄올(v/v)의 용액으로 진탕하여 추출하였다. 추출물을 원심분리하고, 그 다음 BSA, 카세인, 저지방 건우유 분말, 트윈 20, 폴리에틸렌 글리콜 및 수크로스를 함유한 트리스 시트레이트 완충액 (pH 7.4)으로 1:4 (v/v, 추출물:완충액)의 비율로 희석시켰다. 다양한 농도 (15 내지 150 μ g/l)의 데옥시니발레논 용액을 제조하였고, 디라이트 647로 표지된 단일 클론의 항

-데옥시니발레놀 항체와, 및 마찬가지로 디라이트 647로 표지된 단일 클론의 염소 항-개 IgG 항체와 혼합하여, 각 경우에서 1 nM 항체 용액을 제조하였다.

[0113] 각 경우 상이한 농도의 용액을 측정 챔버로 도입하였고, 상기 바이오칩은 추가적인 처리 단계 없이 "미노플루오 (Minifluo) IV" 형광 판독기 (독일의 바이에르 테크날리지 서비스)상에서 10 분 이하 동안 측정되었다. 각 데옥시니발레놀 스포트에 대해 얻어진 상기 형광 세기는 특정 스포트의 위아래의 개 IgG의 형광 세기의 평균으로 나누었다. 어레이의 모든 12 개의 DON 스포트의 표준화된 형광 세기의 평균을 측정하였다. 얻어진 농도 의존성 표준화된 형광 세기를 컴퓨터 프로그램의 도움으로 지수 핏으로 핏팅하였다.

[0114] 상기에 보인 추출 방법과 유사하게, 5 g의 DON-오염 사료 곡류 샘플 (독일의 코링 (Coring)에서 인증한 526 ppb DON)을 추출하였고, 추출물을 희석하였다. 300 μ l의 희석된 추출물에 디라이트 647로 표지한 단일 클론의 항-데옥시니발레놀 항체 및 마찬가지로 디라이트 647로 표지한 단일 클론의 염소 항-개 IgG 항체를 각 경우에서 1 nM 항체 용액을 제조하는 방식으로 첨가하였다. 각 경우의 100 μ l 용액을 측정 챔버로 도입하였고, 상기 바이오칩은 추가적인 처리 단계 없이 "미노플루오 (Minifluo) IV" 형광 판독기 (독일의 바이에르 테크날리지 서비스)상에서 10 분 이하 동안 측정되었다. 각 데옥시니발레놀 스포트에 대해 얻어진 상기 형광 세기는 특정 스포트의 위아래의 개 IgG의 형광 세기의 평균으로 나누었다. 어레이의 모든 12 개의 DON 스포트의 표준화된 형광 세기의 평균을 측정하였다. 얻어진 형광 세기를 상술한 표준 커브의 도움으로 사료 곡류 중 DON 농도로 전환하였고, 3 번의 측정으로 590 ppb의 평균을 얻었다.