(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0138823
(43) 공개일자 2022년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) *B01L 3/00* (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54388 (2021.08)
B01L 3/5023 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0041828
(22) 출원일자 2022년04월04일
심사청구일자 2022년04월04일
(30) 우선권주장
1020210044872 2021년04월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
주식회사 블루베리엔에프티
충청북도 증평군 증평읍 광장로 473-3
경남제약 주식회사
경상남도 의령군 의령읍 구룡로4남길 79 (경남제약 주식회사)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 영등포구 의사당대로 127, 102동 1401호
이종욱
서울특별시 구로구 경인로67길 33, 101동 1102호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 10 항

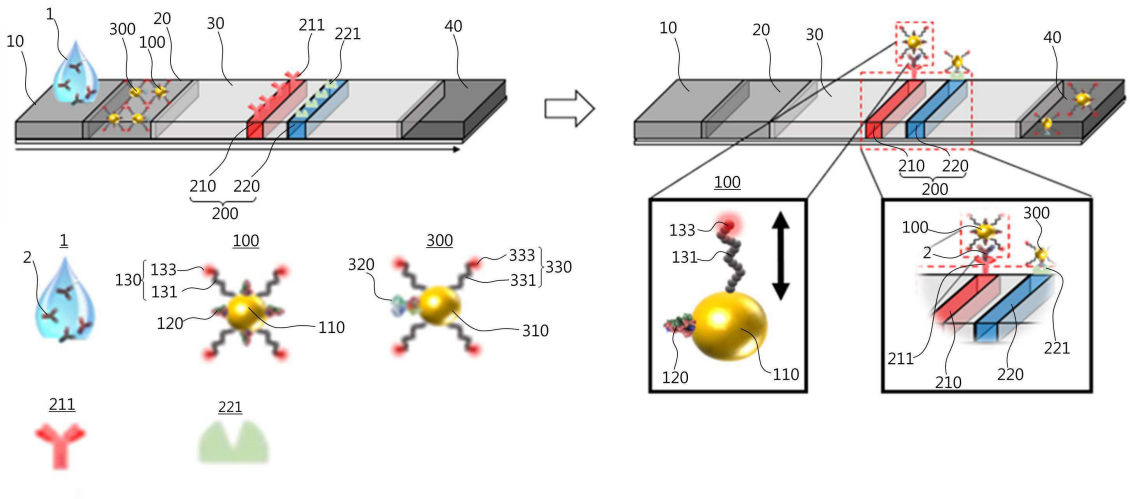
(54) 발명의 명칭 **코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립**

(57) 요 약

본 발명은 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립에 관한 것으로, 샘플패드(sample pad, 10), 접합패드(conjugation pad, 20), 멤브레인(membrane, 30), 및 흡수패드(absorbent pad, 40)가 순차적으로 연결된 측면유동면역분석 스트립에 있어서, 제1 금속 나노입자(110), 제1 금속 나노입자(110)의 표면에 결합되고 샘

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



플패드(10)에 로딩된 샘플(1) 내의 코로나 19 바이러스 항체(2)와 제1 항원-항체 반응을 통해 특이적으로 결합하는 탐지항원(120), 및 일단이 제1 금속 나노입자(110)에 결합된 제1 스페이서(131) 및 제1 스페이서(131)의 타단에 결합된 제1 형광표지자(133)를 포함하는 제1 형광단(130)을 포함하고, 접합패드(20)에 배치되는 타겟 프로브(100), 및 탐지항원(120)에 결합된 상기 코로나 19 바이러스 항체(1)와 제2 항원-항체 반응을 통해 특이적으로 결합하는 타겟 포획물질(211)이 고정된 테스트 라인(210)을 포함하고, 멤브레인(30) 상에 배치되는 반응부(200)를 포함한다.

(52) CPC특허분류
G01N 33/582 (2013.01)
G01N 33/587 (2013.01)
B01L 2300/069 (2013.01)

(72) 발명자
김상기
충청남도 천안시 서북구 불당17길 14, 106동 802호
전명진
경기도 수원시 영통구 영통로 498, 128동 1004호

배건우
서울특별시 강남구 언주로 702, 11층

명 세 서

청구범위

청구항 1

샘플패드(sample pad), 접합패드(conjugation pad), 멤브레인(membrane), 및 흡수패드(absorbent pad)가 순차적으로 연결된 측면유동면역분석 스트립에 있어서,

제1 금속 나노입자, 상기 제1 금속 나노입자의 표면에 결합되고 상기 샘플패드에 로딩된 샘플 내의 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2) 항체와 항원-항체 반응을 통해 특이적으로 결합하는 탐지항원, 및 일단이 상기 제1 금속 나노입자에 결합된 제1 스페이서 및 상기 제1 스페이서의 타단에 결합된 제1 형광표지자를 포함하는 제1 형광단을 포함하고, 상기 접합패드에 배치되는 타겟 프로브; 및

상기 탐지항원에 결합된 상기 코로나 19 바이러스 항체와 특이적으로 결합하는 타겟 포획물질이 고정된 테스트라인을 포함하고, 상기 멤브레인 상에 배치되는 반응부;를 포함하는 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 탐지항원은, 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2)의 뉴클레오캡시드 (nucleocapsid) 단백질, 및 스파이크(spike) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 제1 형광표지자는, Cy3(Cyanine 3)인 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립.

청구항 4

청구항 1에 있어서

상기 제1 형광단은,

상기 제1 스페이서의 일단에 도입된 티올기(thiol group);를 더 포함하는 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 제1 스페이서는, 단일 가닥 DNA, 및 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 단일 가닥 DNA는, 서열번호 1 내지 서열번호 4 중 어느 하나의 염기서열로 이루어지는 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 제1 스페이서는, 5㎚ ~ 15㎚의 길이를 가지는 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 타겟 포획물질은, 항-인간 면역글로불린G(anti-human IgG)인 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

제2 금속 나노입자, 상기 제2 금속 나노입자의 표면에 결합된 대조군 탐지물질, 및 일단이 상기 제2 금속 나노입자에 결합된 제2 스페이서 및 상기 제2 스페이서의 타단에 결합된 제2 형광표지자를 포함하는 제2 형광단을 포함하고, 상기 접합패드에 배치되는 대조군 프로브;를 더 포함하고,

상기 반응부는,

상기 대조군 탐지물질과 특이적으로 결합하는 대조군 포획물질이 고정된 대조군 라인을 더 포함하는 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 대조군 탐지물질은, 스트렙트아비딘(streptavidin) 단백질이고,

상기 대조군 포획물질은, BSA-비오틴(Bovine serum albumin-biotin) 중합체인 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립에 관한 것으로, 보다 상세하게는 측면유동면역분석 스트립(Lateral Flow Assay Strip) 상에 코로나 19 바이러스 항체에 특이적으로 결합하는 항원, 및 형광표지자가 이중으로 라벨링된 프로브가 적용되어 비색법과 형광법으로써 미량의 코로나 바이러스 항체를 정확하고 신속하게 검출할 수 있는 기술에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 최근 코로나 19 바이러스를 검출 및 진단하는 대표적인 방법으로서 PCR 기술이 사용되고 있다. PCR을 이용한 검출 및 진단 방법은 증폭된 반응산물을 전기영동(Electrophoresis)으로 확인하고, 최종적으로 염기서열분석(DNA

sequencing)을 시행해야 한다. 이러한 PCR 진단의 경우, 중합효소 연쇄반응기(Thermocycler)와 같은 전문적인 장비와 이를 운용할 수 있는 전문인력이 필요하며, 염기서열분석에 고비용 및 고기술력이 요구된다. 또한, 이러한 일련의 과정들을 수행하기 위해서는 많은 시간이 소요되고, 육안으로 식별 가능한 검출법이 아니기 때문에 분석 장비가 갖춰지지 않은 현장에서 활용되기가 어려운 문제점이 있다.

[0004] 바이러스 또는 유전자를 단시간 내에 효과적으로 검출하기 위한 방안으로서, 측면유동면역분석법 (Lateral Flow Assay, LFA)이 있다. 하기선행기술문헌의 특허문헌에 개시된 바와 같이, LFA 기술은 항원-항체 반응을 기반으로 하여 LFA 스트립 내에 포함된 프로브에서 발생하는 형광 또는 비색 신호를 측정함으로써 질병의 바이오마커를 진단한다. 이러한 LFA 기술은 대형 장비가 별도로 필요하지 않다는 장점으로 인해 현장 진단에는 매우 유용하다. 그러나 민감도와 정확도가 떨어지는 문제가 코로나 19 진단에 사용되기 어렵다.

[0005] 이에 종래 LFA 스트립의 문제점을 해결하기 위한 방안이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-1702117 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일 측면은 항원 및 형광 염료가 이중으로 라벨링된 금속 나노입자 프로브를 통해 측면유동면역분석법 (Lateral Flow Assay, LFA) 상에서 비색법과 형광법을 동시에 진행하여 감염 초기에 매우 낮은 농도로 존재하는 코로나 19 바이러스 항체를 위양성, 위음성 결과 없이 정확하고 신속하게 검지하여 현장 진단에 응용할 수 있는 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 실시예에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립은 샘플패드(sample pad), 접합패드(conjugation pad), 멤브레인(membrane), 및 흡수패드(absorbent pad)가 순차적으로 연결된 측면유동면역분석 스트립에 있어서, 제1 금속 나노입자, 상기 제1 금속 나노입자의 표면에 결합되고 상기 샘플패드에 로딩된 샘플 내의 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2) 항체와 항원-항체 반응을 통해 특이적으로 결합하는 탐지항원, 및 일단이 상기 제1 금속 나노입자에 결합된 제1 스페이서 및 상기 제1 스페이서의 타단에 결합된 제1 형광표지자를 포함하는 제1 형광단을 포함하고, 상기 접합패드에 배치되는 타겟 프로브; 및 상기 탐지항원에 결합된 상기 코로나 19 바이러스 항체와 특이적으로 결합하는 타겟 포획물질이 고정된 테스트 라인을 포함하고, 상기 멤브레인 상에 배치되는 반응부;를 포함할 수 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립에 있어서, 상기 탐지항원은, 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2)의 뉴클레오캡시드 (nucleocapsid) 단백질, 및 스파이크 (spike) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립에 있어서, 상기 제1 형광표지자는, Cy3(Cyanine 3)일 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립에 있어서, 상기 제1 형광단은, 상기 제1 스페이서의 일단에 도입된 티올기(thiol group);를 더 포함할수 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립에 있어서, 상기 제1 스페이서는, 단일 가닥 DNA, 및 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립에 있어서, 상기 단일 가닥 DNA는, 서열번호 1 내지 서열번호 4 중 어느 하나의 염기서열로 이루어질 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립에 있어서, 상기 제1 스페이서는, 5㎚ ~ 15㎚의 길이를 가질 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립에 있어서, 상기 타겟 포획물질은, 항-인간 면역글로불린G(anti-human IgG)일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립에 있어서, 제2 금속 나노입자, 상기 제2 금속 나노입자의 표면에 결합된 대조군 탐지물질, 및 일단이 상기 제2 금속 나노입자에 결합된 제2 스페이서 및 상기 제2 스페이서의 타단에 결합된 제2 형광표지자를 포함하는 제2 형광단을 포함하고, 상기 접합패드에 배치되는 대조군 프로브;를 더 포함하고, 상기 반응부는, 상기 대조군 탐지물질과 특이적으로 결합하는 대조군 포획물질이 고정된 대조군 라인을 더 포함할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립에 있어서, 상기 대조군 탐지물질은, 스트렙트아비딘(streptavidin) 단백질이고, 상기 대조군 포획물질은, BSA-비오틴(Bovine serum albumin-biotin) 중합체일 수 있다.

[0021] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

[0022] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 발명자가 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따르면, 금속 나노입자를 이용한 비색 신호를 통해서 육안으로 코로나 19 바이러스 감염 여부를 별도의 장비 없이도 쉽게 진단할 수 있고, 나아가 증강된 형광 신호를 이용하여 이중으로 감염 여부를 확인함으로써 더 정확한 코로나 19의 진단을 수행할 수 있다. 이를 통해, 종래 코로나 19 확진에 필요했던 PCR 기반의 진단에 비해서 빠른 진단이 가능한, 코로나 19 조기 진단 기술에 응용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립 및 그 검출 메커니즘을 설명하는 도면이다.

도 2는 도 1에 도시된 타겟 프로브의 이중 라벨링(Dual-labeling) 과정을 설명하는 도면이다.

도 3은 실시예 1에 따라 합성된 금 나노입자의 투과전자현미경(Transmision Electron Microscope, TEM) 이미지이다.

도 4는 실시예 1에 따라 합성된 금 나노입자의 UV 스펙트럼이다.

도 5는 실시예 3에서 사용된 단일 가닥 DNA의 염기서열을 나타내는 표이다.

도 6은 실시예 3에 따라 제조된 Cy3-ssDNA-SH기가 결합된 금 나노입자(금 나노입자-Cy3 복합체)의 전기영동 처리 결과이다.

도 7은 실시예 3에 따라 제조된 금 나노입자-Cy3 복합체의 단일 가닥 DNA 길이에 따른 형광 신호 세기 그래프이다.

도 8a 내지 도 8e는 실시예 3에 따라 제조된 금 나노입자-Cy3 복합체의 NaCl의 농도(5mM ~ 40mM)에 따른 형광 신호 세기 그래프로서, 도 8a는 5mM NaCl에서, 도 8b는 10mM NaCl에서, 도 8c는 20mM NaCl에서, 도 8d는 30mM NaCl에서, 도 8e는 40mM NaCl에서의 형광 신호 세기이다.

도 9는 실시예 4에 따라 제조된 Cy3-PEG-SH기가 결합된 금 나노입자(금 나노입자-Cy3 복합체)의 전기영동 처리 결과이다.

도 10은 실시예 4에 따라 제조된 금 나노입자-Cy3 복합체의 PEG 길이에 따른 형광 신호 세기 그래프이다.

도 11a 내지 도 11c는 실시예 5에 따른 이중 라벨링 프로브 제작 단계별 금 나노입자의 UV 스펙트럼 변화를 나타내는 그래프로서, 도 11a는 Cy3-ssDNA-SH기가 결합된 금 나노입자의 UV 스펙트럼이고, 도 11b는 Cy3-PEG-SH기가 결합된 금 나노입자의 UV 스펙트럼이며, 도 11c는 이중 라벨링된 금 나노입자의 UV 스펙트럼이다.

도 12는 실시예 5에서 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 코로나 항원의 농도를 최적화하기 위한 농도별 신호 세기 측정 결과이다.

도 13은 실시예 5에서 금 나노입자에 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 코로나 항원을 접합하는 pH 조건을 최적화하기 위한 pH별 신호 세기 측정 결과이다.

도 14는 실시예 5에서 스파이크 RBD(Spike Receptor Binding Domain) 코로나 항원의 농도를 최적화하기 위한 농도별 신호 세기 측정 결과이다.

도 15는 실시예 5에서 금 나노입자에 스파이크 RBD(Spike Receptor Binding Domain) 코로나 항원을 접합하는 pH 조건을 최적화하기 위한 pH별 신호 세기 측정한 결과이다.

도 16은 실시예 6에서 접합패드(conjugation pad)의 전처리를 최적화하기 위한 버퍼(buffer) 안정성 실험 결과이다.

도 17은 실시예 7에서 샘플의 유동을 야기하는 샘플 버퍼(sample buffer)의 첨가량을 최적화하기 위한 실험 결과이다.

도 18은 실시예 7에 따른 DNA 이중 라벨링 프로브 기반 테스트 스트립의 형광법을 활용한 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2) 항체 검지 결과이다.

도 19는 실시예 7에 따른 PEG 이중 라벨링 프로브 기반 테스트 스트립의 형광법을 활용한 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2) 항체 검지 결과이다.

도 20은 실시예 7에 따른 테스트 스트립의 민감도 측정 결과이다.

도 21은 실시예 8에 따른 DNA 이중 라벨링 프로브 기반 테스트 스트립의 비색법을 활용한 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2) 항체 검지 결과이다.

도 22는 실시예 8에 따른 PEG 이중 라벨링 프로브 기반 테스트 스트립의 비색법을 활용한 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2) 항체 검지 결과이다.

도 23은 실시예 8에서 혈청(Serum) 내 소량의 항체와 샘플 버퍼(sample buffer)의 희석 비율을 최적화하기 위한 실험 결과이다.

도 24는 실시예 9에 따른 테스트 스트립의 특이도 검증 결과이다.

도 25는 실시예 9에 따른 테스트 스트립의 재현성 검증 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 명세서에서 각 도면의 구성요소들에 참조번호를 부가함에 있어서, 동일한 구성 요소들에 한해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 번호를 가지도록 하고 있음에 유의하여야 한다. 또한, "제1", "제2" 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하기 위해 사용되는 것으로, 구성요소가 상기 용어들에 의해 제한되는 것은 아니다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.

[0028] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.

[0030] 도 1은 본 발명에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립 및 그 검출 메커니즘을 설명

하는 도면이고, 도 2는 도 1에 도시된 타겟 프로브의 이중 라벨링(Dual-labeling) 과정을 설명하는 도면이다.

[0031] 도 1 내지 도 2에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립은 샘플패드(sample pad, 10), 접합패드(conjugation pad, 20), 멤브레인(membrane, 30), 및 흡수패드(absorbent pad, 40)가 순차적으로 연결된 측면유동면역분석 스트립에 있어서, 제1 금속 나노입자(110), 제1 금속 나노입자(110)의 표면에 결합되고 샘플패드(10)에 로딩된 샘플(1) 내의 코로나 19 바이러스 항체(2)와 항원-항체 반응을 통해 특이적으로 결합하는 탐지항원(120), 및 일단이 제1 금속 나노입자(110)에 결합된 제1 스페이서(131) 및 제1 스페이서(131)의 타단에 결합된 제1 형광표지자(133)를 포함하는 제1 형광단(130)을 포함하고, 접합패드(20)에 배치되는 타겟 프로브(100), 및 탐지항원(120)에 결합된 상기 코로나 19 바이러스 항체(2)와 특이적으로 결합하는 타겟 포획물질(211)이 고정된 테스트 라인(210)을 포함하고, 멤브레인(30) 상에 배치되는 반응부(200)를 포함한다.

[0033] 본 발명은 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립에 관한 것이다. 대표적인 코로나 바이러스 진단법으로 사용되는 RT-PCR 기술은 분석에 장 시간이 소요되고 전문 장비 및 인력이 요구되기 때문에 현장 진단에 적용이 곤란하다. 이에 단시간에 바이러스를 검출할 수 있는 측면유동면역분석법(Lateral Flow Assay, LFA)을 코로나 바이러스 현장 진단에 활용할 수 있으나, 민감도와 정확도가 떨어지는 문제가 있는바, 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로서 본 발명이 안출되었다.

[0034] 구체적으로, 본 발명에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립은, 샘플패드(sample pad, 10), 접합패드(conjugation pad, 20), 멤브레인(membrane, 30), 및 흡수패드(absorbent pad, 40)가 순차적으로 연결된 센서 스트립으로서, 타겟 프로브(100), 및 반응부(200)를 포함한다.

[0036] 샘플패드(10)는 외부로부터 로딩되는 샘플(1)을 수용하여 확산 흐름이 가능한 패드로서, 다공성 물질로 이루어질 수 있다. 이러한 다공성 물질은 섬유성 종이, 셀룰로오스 물질로 된 미세 기공 멤브레인, 셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트와 같은 셀룰로오스 유도체, 니트로셀룰로오스, 유리섬유, 면(cotton), 나일론 등과 같은 직물 또는 다공성 겔 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0037] 한편, 샘플(1)은 분석 대상인 코로나 19 바이러스 항체(2)를 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 물질이다. 일례로, 사람의 혈액, 타액, 점액 등일 수 있다. 이러한 샘플(1)은 소정의 버퍼(buffer)와 함께 샘플패드(10)에 로딩될 수 있다. 여기서, 버퍼는 모세관을 통한 샘플(1)의 유동을 용이하게 한다.

[0039] 접합패드(20)는 샘플패드(10)에서부터 확산되어 이동하는 샘플(1)을 수용하고, 타겟 프로브(100)가 배치된다. 접합패드(20)는 샘플패드(10)와 마찬가지로 샘플(1)의 확산 흐름이 가능한 물질로 이루어진다.

[0041] 멤브레인(30)은 접합패드(20)로부터 확산되어 이동하는 샘플(1)이 통과하는 영역을 제공한다. 일례로, 멤브레인(30)은 니트로셀룰로오스, 폴리에테르술폰, 폴리에틸렌, 나일론, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리에스테르 및 폴리프로필렌 등을 포함할 수 있다. 다만, 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 샘플(1)이 통과할 수 있는 소재이기만 하면 특별한 제한은 없다.

[0043] 흡수패드(40)는 멤브레인(30)에 연결되어 멤브레인(30)을 통과한 샘플(1)을 받아들이는 패드이다. 이러한 흡수패드(40)는 멤브레인(30)을 통한 모세관 작용 및 유체의 확산 유동을 촉진할 수 있다.

[0045] 샘플패드(10), 접합패드(20), 멤브레인(30), 및 흡수패드(40)는 순차적으로 연결된다. 여기서, 샘플패드(10), 접합패드(20), 멤브레인(30), 및 흡수패드(40)는 서로 인접하는 2개가 서로 맞닿거나 겹쳐지거나, 또는 어느 하나에 다른 하나가 삽입될 수 있다. 또한, 샘플패드(10), 접합패드(20), 멤브레인(30), 및 흡수패드(40)는 동일한 지지체 상에 배열될 수도 있다. 지지체는 샘플패드(10), 접합패드(20), 멤브레인(30), 및 흡수패드(40)를 지지할 수 있는 소재로 이루어지는데, 확산하여 이동하는 샘플(1)이 지지체를 통해 누출되지 않도록 액체 불투과

성 소재인 것이 바람직하다. 일례로, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리부타디엔, 폴리비닐클로라이드, 폴리아미드, 폴리카르보네이트, 에폭시드, 메타크릴레이트 및 폴리멜라민 등과 같은 고분자물질, 유리 등일 수 있다.

[0047] 타겟 프로브(100)는 샘플(1) 내의 코로나 19 바이러스 항체(2)를 탐지하는 프로브이다. 이러한 타겟 프로브(100)는 제1 금속 나노입자(110), 탐지항원(120), 및 제1 형광단(130)을 포함한다.

[0048] 제1 금속 나노입자(110)는 탐지항원(120) 및 제1 형광단(130)이 이중으로 라벨링되는 금속 나노입자이다. 이러한 나노입자의 금속으로는 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt), 팔라듐(Pd), 이리듐(Ir), 로듐(Rh), 루테늄(Ru), 티타늄(Ti), 지르코늄(Zr), 하프늄(Hf), 바나듐(V), 나이오븀(Nb), 탄탈럼(Ta), 크로뮴(Cr), 몰리브데늄(Mo), 텅스텐(W), 루테늄(Ru), 오스뮴(Os), 철(Fe), 니켈(Ni), 코발트(Co), 산화마그네슘(MgO), 이산화티타늄(TiO_2), 오산화바나듐(V_2O_5), 산화아연(ZnO) 등을 포함할 수 있다. 다만, 금속 나노입자가 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 바람직하게는 금 나노입자일 수 있다.

[0049] 탐지항원(120)은 코로나 19 바이러스 항체(2)와 항원-항체 반응을 통해 특이적으로 결합하는 항원이다. 여기서, 항원은 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2)의 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질, 및 스파이크(spike) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 이러한 항원은 정전기적 결합을 통해 제1 금속 나노입자(110)의 표면에 결합될 수 있다. 따라서, 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 단백질, 및 스파이크(spike) 단백질 중 적어도 하나 이상이 제1 금속 나노입자(110)의 표면에 다수 개 결합될 수 있다.

[0050] 제1 형광단(130)은 제1 스페이서(131), 및 제1 형광표지자(133)를 포함한다. 금속 나노구조체와 형광표지자의 거리를 적절하게 유지할 경우, 표면 플라즈몬 에너지가 공명을 통해 형광 에너지로 전달되어 형광이 증폭되는 금속 증강 형광 현상 Metal Enhanced Fluorescence, MEF)이 발생하며, 형광 신호의 비약적인 상승을 통해 바이오센서의 검지 한계를 대폭 낮추어 민감도를 높일 수 있다. 이러한 MEF 현상은 금속 나노구조체와 형광표지자 사이의 거리에 매우 민감하게 영향을 받는다.

[0051] 제1 스페이서(131)는 MEF 현상을 유도하기 위해, 제1 금속 나노입자(110)와 제1 형광표지자(133) 사이의 거리를 일정하게 유지한다. 여기서, 제1 스페이서(131)의 일단은 제1 금속 나노입자(110)에 결합되고, 제1 스페이서(131)의 타단은 제1 형광표지자(133)에 결합되어, 제1 금속 나노입자(110)와 제1 형광표지자(133) 사이의 거리를 항상 균일하게 유지시킨다. 여기서, 제1 형광표지자(133)는 형광물질로서, 엄벨리페론(umbelliferone), 플루오레신(fluorescein), 플루오레신이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate; FITC), 로다민(rhodamine), 탐라(TAMRA), 디클로로트리아지닐아민플루오레신(dichlorotriazinylamine fluorescein), 단실클로라이드(dansyl chloride), 양자점(quantum dots), 피코에리스린(phycoerythrin), FAM(fluorecein amidite) 등을 포함하는 플루오세인계(fluorescein), 알렉사플로어계(alexa fluor) 및 Cy3, Cy5, Cy7, 인도시아닌그린을 포함하는 시아닌계(cyanine) 등일 수 있고, 그 중 1종 또는 그 이상을 조합하여 사용할 수 있다. 다만, 제1 형광표지자(133)가 반드시 상기 물질에 한정되는 것은 아니고, 바람직하게는 Cy3(Cyanine 3)를 사용할 수 있다. 한편, 제1 스페이서(131)의 일단을 제1 금속 나노입자(110)의 표면에 부착시키기 위해서, 제1 스페이서(131)의 일단에 부착매개자가 도입될 수 있는데, 그 일례로 티올기(thiol group)일 수 있다.

[0052] 여기서, 제1 스페이서(131)는 단일 가닥 DNA, 및 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. DNA는 가닥 내에서 염기 간의 거리가 항상 정확하게 유지되기 때문에, 염기 개수를 조절하여 그 길이를 예측 가능하게 조절할 수 있다. 또한, 특정한 염기서열은 주변의 형광표지자에서 발생하는 형광 세기와 DNA 가닥의 경도에도 영향을 줄 수 있다. 이에 본 발명에서는 효과적으로 MEF를 발생시킬 수 있도록, 단일 가닥 DNA의 염기서열을 설계하고, 이를 제1 스페이서(131)로 채택한다.

[0053] 제1 스페이서(131)로 제공될 수 있는 단일 가닥 DNA는, 5'에서 3' 방향으로 하기 서열번호 1 내지 서열번호 4 중 어느 하나의 염기서열로 이루어질 수 있다.

[0054] [서열번호 1]

[0055] ggaagttttt

[0056] [서열번호 2]

[0057] ggaagttttt ttttttttt

[0058] [서열번호 3]

[0059] ggaagttttt ttttttttt ttttttttt ttttt

[0060] [서열번호 4]

[0061] ggaagttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt

[0062] 여기서, 5' 말단에 제1 형광표지자(133)가, 3' 말단에 부착매개자가 각각 도입될 수 있다.

[0063] 한편, 제1 스페이서(131)는 PEG로도 구현될 수 있다. PEG는 강도가 세기 때문에, 제1 금속 나노입자(110)와 제1 형광표지자(133) 사이의 거리를 적절하게 유지할 수 있다.

[0064] 이러한 단일 가닥 DNA 및 PEG 기반의 제1 스페이서(131)는 3㎚ ~ 33㎚의 길이를 가질 수 있는데, 바람직하게는 5㎚ ~ 15㎚, 더욱 바람직하게는 8㎚ ~ 13㎚가 적합하다.

[0065] 한편, 제1 금속 나노입자(110)에 라벨링되는 제1 형광단(130)은 적어도 하나 이상으로, 다수 개의 제1 형광단(130)이 제1 금속 나노입자(110)에 결합되는 경우에, 제1 형광단(130)은 각각 동일한 단일 가닥 DNA, 또는 PEG 기반의 제1 스페이서(131)를 포함하거나, 또는 그 중 일부는 단일 가닥 DNA 기반의 제1 스페이서(131)를 포함하고 다른 일부는 PEG 기반의 제1 스페이서(131)를 포함할 수 있다.

[0067] 반응부(200)는 멤브레인(30) 상에 배치되는 영역으로서, 테스트 라인(test line, 210)을 포함한다. 테스트 라인(210)에는 타겟 포획물질(211)이 고정된다. 여기서, 타겟 포획물질(211)은, 타겟 프로브(100)의 탐지항원(120)에 결합된 코로나 19 바이러스 항체(2)와 특이적으로 결합하는 물질이다. 이러한 타겟 포획물질(211)은 항-인간 면역글로불린G(anti-human IgG)일 수 있다. 따라서, 샘플패드(10)에 주입된 샘플(1) 내에 코로나 19 바이러스 항체(2)가 존재하는 경우, 샘플(1)이 접합패드(20)까지 확산 유동하면서 타겟 프로브(100)의 탐지항원(120)에 코로나 19 바이러스 항체(2)가 결합되고, 그 타겟 프로브(100)가 샘플(1)과 함께 멤브레인(30)을 따라 이동하다가 타겟 프로브(100)에 결합된 코로나 19 바이러스 항체(2)가 테스트 라인(210)에 고정된 타겟 포획물질(211)에 포획되어, 검출 신호가 발생하게 된다. 여기서, 검출 신호는 비색, 및 MEF에 의해 증강된 형광 신호로서, 육안, 비색 스캐너 및 형광 스캐너를 통해 신호를 분석할 수 있다.

[0069] 한편, 본 발명에 따른 코로나 19 바이러스 항체 검출용 측면유동면역분석 스트립은 정상적인 반응여부를 확인하기 위하여, 대조군 프로브(300)를 포함할 수 있다.

[0070] 대조군 프로브(300)는 제2 금속 나노입자(310), 대조군 탐지물질(320), 및 제2 형광단(330)을 포함하고, 제2 형광단(330)은 제2 스페이서(331) 및 제2 형광표지자(333)를 포함한다. 대조군 프로브(300)의 제2 금속 나노입자(310), 제2 스페이서(331), 및 제2 형광표지자(333)는 각각, 전술한 타겟 프로브(100)의 제1 금속 나노입자(110), 제1 스페이서(131), 및 제1 형광표지자(133)에 대응되므로, 이에 대한 자세한 설명은 생략하고, 차이점 위주로 설명한다.

[0071] 대조군 탐지물질(320)은 제2 금속 나노입자(310)의 표면에 결합되되, 샘플(1) 내의 코로나 19 바이러스 항체(2)와 반응하지 않는 물질로서, 일례로 스트렙트아비딘(streptavidin) 단백질일 수 있다.

[0072] 여기서, 반응부(200)는 대조군 라인(control line, 220)을 더 포함할 수 있고, 대조군 라인(220)에는 대조군 탐지물질(320)과 특이적으로 결합하는 대조군 포획물질(221)이 고정된다. 따라서, 샘플(1)과 함께 유동하는 대조군 프로브(300)가 대조군 포획물질(221)에 의해 포획되어, 검출 신호가 발생하게 된다.

[0073] 대조군 포획물질(221)은, 스트렙트아비딘(streptavidin) 단백질과 특이적으로 결합하는 BSA-비오틴(Bovine serum albumin-biotin) 중합체일 수 있다.

[0075] 종합적으로, 본 발명은 코로나 19 바이러스를 효과적으로 진단할 수 있는 플랫폼으로써 광학 기반 바이오센서를 이용한 것이며, 보다 상세하게는 항원 및 형광 염료가 이중으로 라벨링된 프로브를 통해 측면유동면역분석법(Lateral Flow Assay, LFA) 상에서 비색법과 형광법을 동시에 진행하여 감염 초기에 매우 낮은 농도로 존재하는 코로나 19 바이러스 항체(SARS-CoV-2 IgG)를 위양성, 위음성 결과 없이 정확하고 신속하게 검지하여 현장 진단

에 응용할 수 있는 기술에 관한 것이다. 본 발명에서는 검지 소요 시간을 줄이고 현장 진단이 가능한 혈액 기반 신규 코로나 바이러스 진단법을 제시하고자 한다. 또한, 혈액에 존재하는 극미량의 코로나 19 항체를 검지하기 위해 광에 대한 민감도가 높은 새로운 입자를 LFA에 적용하고자 한다. 나아가, 다양한 코로나 바이러스 항원 및 그에 대응하는 항체에 대한 결합 친화성을 비교/분석함으로써 코로나 19의 발병과 유의성 높은 바이오마커를 탐색하고 진단의 정확성을 높이고자 한다. 본 발명에 따르면, 금속 나노입자를 이용한 비색 신호를 통해서 육안으로 코로나 19 바이러스 감염 여부를 별도의 장비 없이도 쉽게 진단할 수 있고, 나아가 증강된 형광 신호를 이용하여 이중으로 감염 여부를 확인함으로써 더 정확한 코로나 19의 진단을 수행할 수 있다. 이를 통해, 종래 코로나 19 확진에 필요했던 PCR 기반의 진단에 비해서 빠른 진단이 가능한, 코로나 19 조기 진단 기술에 응용할 수 있다.

[0077] 이하에서는 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0079] 실시예 1. 40nm 금 나노입자(AuNP)의 합성

[0080] 40nm 금 나노입자는 시트르산나트륨(Trisodium citrate)을 이용한 금 이온의 환원 방식을 이용하여 제작하였다. 1mM 농도의 염화금산($HAuCl_4$) 수용액 10㎖을 가열하여 끓인 후, 용액이 끓기 시작했을 때 2.27μM 농도의 시트르산나트륨 수용액 1㎖를 넣고 5분간 더 가열하였다. 이후 용액을 상온까지 냉각시키고, 멤브레인 필터(Cellulose acetate filter, Advantec)를 이용하여 여과하였다. 제조된 나노입자의 크기는 UV-Vis 분광법과 TEM을 이용하여 분석하였다.

[0081] 도 3은 실시예 1에 따라 합성된 금 나노입자의 투과전자현미경(Transmision Electron Microscope, TEM) 이미지로, 그 TEM 이미지를 통해 합성한 금 나노입자가 40nm임을 확인할 수 있다. 40nm의 금 나노입자는 이중 모드 LFA에서 높은 적색 비색 신호뿐만 아니라 우수한 금속 증강 형광을 나타낼 수 있다. 비색 검사의 경우, 금 나노입자의 직경을 증가시킴으로써 신호 가시성을 개선할 수 있으나 코로나 단백질이 정전기력에 의해 결합하는 효율이 감소한다. 또한, 형광 검사의 경우, 산란 효율성이 Mie 이론에 의해 금 나노입자의 사이즈가 증가할수록 증가하며 40nm에서 고점에 도달한다. 즉, 이중 모드 LFA 금 나노입자의 최적 크기는 40nm임을 시사한다.

[0082] 도 4는 실시예 1에 따라 합성된 금 나노입자의 UV 스펙트럼이다. 사이즈에 따른 금 나노입자의 특정 LSPR peak 파장대를 UV를 이용하여 측정하였다. 측정된 파장은 529nm이며 이를 통해 금 나노입자의 사이즈가 40nm임을 확인할 수 있다. 또한, 시트레이트로 이루어진 금 나노입자의 표면을 Bis(p-Sulfonatophenyl)Phenylphosphine(BSPP)로 치환하여 금 나노입자의 안정성을 높였다. BSPP로 코팅한 금 나노입자는 효과적으로 음전하를 띄어 정전기력 반발력을 통해 금 나노입자끼리 응집이 일어나지 않는다.

[0084] 실시예 2. 40nm 금 나노입자의 salt aging 진행

[0085] MEF 현상을 이용하여 강한 형광 신호를 형성하기 위해서, 금 나노입자 상에 Cy3와 티올기가 결합된 DNA 단일 가닥 및 PEG를 결합시켰다. 이를 위해서, 40nm 금 나노입자 용액 10㎖(OD 1)에 0.020g의 Bis(p-Sulfonatophenyl)Phenylphosphine (BSPP)를 첨가하고, 12시간 동안 반응시켜 금 나노입자를 안정화시켰다. 이후, 0.040g의 NaCl을 첨가하여 금 나노입자들의 응집을 유도한 후, 15분 동안 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 0.5mM BSPP가 혼합된 증류수 1㎖를 첨가하여 응집을 풀어준 후 0.5㎖ 메탄올을 첨가하여 입자들이 균일하게 섞이도록 하고 6000 rpm에서 1시간 동안 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 0.5mM BSPP가 혼합된 TBE(Tris-Borate-EDTA) buffer 1㎖를 첨가하여 salt aging을 진행하였다.

[0087] 실시예 3. 금 나노입자 표면에 Cy3-DNA 결합

[0088] MEF 효과를 통해 Cy3 형광 신호를 극대화시킬 수 있는 Cy3와 금 나노입자 간의 거리를 확인하기 위해서, 도 5와 같은 다양한 염기 서열을 가지는 DNA 단일 가닥(ssDNA)을 이용하였다. 도 5는 실시예 3에서 사용된 단일 가닥 DNA의 염기서열을 나타내는 표이다. 이를 참고로, 각 DNA의 5' 말단에는 Cy3, 3' 말단에는 티올기가 결합되어 있어, Au-S 결합을 통해 금 나노입자 상에 결합할 수 있다. 단순히 뉴클레오타이드의 개수를 변경함으로서 DNA 합성을 쉽게 할 수 있다는 장점을 활용하여 금 나노입자와 형광체 사이의 거리를 유지하기 위해 단일 가닥 DNA

염기서열을 설계하였다. MEF를 효과적으로 야기하기 위해 40nm 금 나노입자와 spectral overlap(금 나노입자의 LSPR peak와 형광체의 excitation/emission 스펙트럼이 겹치는 것)이 가장 우수한 형광체로 Cy3를 선정하였다. 금 나노입자와 Cy3의 거리를 유지할 수 있는 스페이서로서, 단일 가닥 DNA는 5nm, 10nm, 15nm, 20nm로 설계하였다. DNA의 뉴클레오타이드 중 티민(T)이 금 나노입자와의 결합력이 가장 낮기 때문에 각 단일 가닥 DNA는 티민을 통해 거리를 일정하게 조절하였다. 또한, Cy3 쪽의 5개의 염기서열은 'GGAAG'를 적용하여다. 'GGAAG'는 파이 겹침을 통해 Cy3의 형광 신호를 증가시키며 티민을 적용하였을 때 DNA의 구조가 일정한 직선을 유지하도록 하였다.

[0089] 금 나노입자 상에 DNA를 결합시키기 위해서, ssDNA 100μM 2㎕에 디티오트레이톨(Dithiothreitol, DTT) 0.4㎕를 첨가하고 15분 동안 반응시켜 DNA의 티올기를 활성화한 후, 금 나노입자 용액 (40nm, 0.4nM 200㎕)에 첨가한 후 0.6M NaCl를 첨가하여 12시간 이상 상온에서 반응시켰다. 이후 6000 rpm으로 15분간 원심분리를 3번 진행하여 상등액을 제거하였다. 금 나노입자 상에 DNA의 결합 여부는 전기영동 상에서의 이동 속도 변화를 통해서 확인하였다.

[0090] 도 6은 실시예 3에 따라 제조된 Cy3-ssDNA-SH기가 결합된 금 나노입자(금 나노입자-Cy3 복합체)의 전기영동 처리 결과이다. 전기영동을 실행하기 위해 500㎖ 삼각플라스크에 2g의 아가로스와 0.5X TBE buffer 100㎖를 혼합하였다. 그 후, 해당 플라스크를 2분 30초 동안 가열한 후 정사각형의 겔 트레이에 50㎖를 로딩하고 약 30분 동안 상온에서 유지시켜 겔을 형성하였다. 300㎖의 0.5X TBE buffer를 전기영동 포트 주입한 후 형성된 겔을 결합하였다. 왼쪽 6개의 lane에 10㎕의 Cy3-ssDNA-SH가 결합되지 않은 금 나노입자와 2㎕의 글리세롤을 혼합하여 로딩하고, 오른쪽 6개의 lane에 10㎕의 Cy3-ssDNA-SH가 결합된 금 나노입자와 2㎕의 글리세롤을 혼합하여 로딩하였다. 240V에서 20분 동안 전기영동을 실시한 결과 왼쪽 6개의 lane에 주입한 나노 프로브는 오른쪽에 주입한 나노 프로브보다 질량이 작고 가볍기 때문에 상대적으로 이동 속도가 빨라 빨간색 라인이 좀 더 아래에 형성되었다.

[0091] 또한, DNA의 길이에 따른 Cy3 형광의 세기 변화는 마이크로플레이트 리더 (Infinite M200 Pro, Tecan)를 통해 확인하였으며, 이를 통해 MEF 효과를 극대화시킬 수 있는 DNA 염기 서열과 NaCl의 농도를 결정하였다.

[0092] 도 7은 실시예 3에 따라 제조된 금 나노입자-Cy3 복합체의 단일 가닥 DNA 길이에 따른 형광 신호 세기 그래프이다. 10nm 길이의 단일 가닥 DNA로 금 나노입자와 형광체 사이의 거리를 조절했을 때 가장 형광 신호가 높게 측정되었다. 금 나노입자와 형광체 사이의 거리가 가까우면, 금 나노입자가 형광체의 형광 에너지를 흡수하여 형광체의 발산을 방해하며, 금 나노입자와 형광체 사이의 거리가 멀어지면 금 나노입자의 LSPR 에너지가 형광체에 효과적으로 전달되지 않아 MEF 효과가 감소하여 형광 신호가 감소한다.

[0093] 도 8a 내지 도 8e는 실시예 3에 따라 제조된 금 나노입자-Cy3 복합체의 NaCl의 농도(5mM ~ 40mM)에 따른 형광 신호 세기 그래프로서, 도 8a는 5mM NaCl에서, 도 8b는 10mM NaCl에서, 도 8c는 20mM NaCl에서, 도 8d는 30mM NaCl에서, 도 8e는 40mM NaCl에서의 형광 신호 세기이다. NaCl을 첨가하여 단일 가닥 DNA를 좀 더 펴지게 하여 금 나노입자와 형광체 사이의 거리를 일정하기 유지하였다. 도 8a 내지 도 8e를 참고로, 5mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM의 NaCl을 첨가하여 형광 신호 세기를 비교한 결과, 대부분 10nm의 길이에서 가장 형광 신호 세기가 강했으며 NaCl의 농도를 높일수록 형광 신호 세기가 증가하였다. 단, 40mM 이상의 NaCl 농도에서는 금 나노입자의 안정성이 급격하게 감소하였다.

[0095] 실시예 4. 금 나노입자 표면에 Cy3-PEG 결합

[0096] MEF 효과를 통해 Cy3 형광 신호를 극대화시킬 수 있는 Cy3와 금 나노입자 간의 거리를 유지하기 위해 Cy3 및 티올기가 결합되어 있는 PEG를 이용하였다. Au-S 결합을 통해 금 나노입자 상에 결합할 수 있다. 금 나노입자 상에 PEG를 결합시키기 위해서, Cy3-PEG-SH(200㎍/㎖) 15㎕를 금 나노입자 용액 (40nm, 0.4nM, 10mM borate buffer with 0.08% SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)) 1㎖에 첨가하고 18시간 동안 상온에서 반응시켰다. 이후 6000 rpm으로 20분간 원심분리를 3번 진행하여 상등액을 제거하였다.

[0097] 금 나노입자 상에 PEG의 결합 여부는 전기영동 상에서의 이동 속도 변화를 통해서 확인하였다. 도 9는 실시예 4에 따라 제조된 Cy3-PEG-SH기가 결합된 금 나노입자(금 나노입자-Cy3 복합체)의 전기영동 처리 결과이다. 전기영동을 실행하기 위해 500㎖ 삼각플라스크에 2g의 아가로스와 0.5X TBE buffer 100㎖를 혼합하였다. 그 후, 해당 플라스크를 2분 30초 동안 가열한 후 정사각형의 겔 트레이에 50㎖를 로딩하고 약 30분 동안 상온에서 유지시켜 겔을 형성하였다. 300㎖의 0.5X TBE buffer를 전기영동 포트 주입한 후 형성된 겔을 결합하였다. 왼쪽 3개

의 lane에 10㎕의 Cy3-PEG-SH가 결합되지 않은 금 나노입자와 2㎕의 글리세롤을 혼합하여 로딩하고, 오른쪽 3개의 lane에 10㎕의 Cy3-ssDNA-SH가 결합된 금 나노입자와 2㎕의 글리세롤을 혼합하여 로딩하였다. 240V에서 15분 동안 전기영동을 실시한 결과 왼쪽 3개의 lane에 주입한 나노 프로브는 오른쪽에 주입한 나노 프로브보다 질량이 작고 가볍기 때문에, 상대적으로 이동 속도가 빨라 빨간색 라인이 좀 더 아래에 형성되었다.

[0098] 또한, PEG의 길이에 따른 Cy3 형광의 세기 변화는 마이크로플레이트 리더 (Infinite M200 Pro, Tecan)를 통해 확인하였으며, 이를 통해 MEF 효과를 극대화시킬 수 있는 PEG의 길이를 결정하였다. 도 10은 실시예 4에 따라 제조된 금 나노입자-Cy3 복합체의 PEG 길이에 따른 형광 신호 세기 그래프이다. PEG는 단일 가닥 DNA와 달리 강도가 강하여 금 나노입자와 형광체 사이의 거리를 일정하게 유지할 수 있으며, 2K(12nm) 길이의 PEG로 금 나노입자와 형광체 사이의 거리를 조절했을 때 가장 형광 신호가 높게 측정되었다.

[0100] 실시예 5. 이중 라벨링된 프로브 제작

[0101] DNA 및 PEG가 결합된 금 나노용액에 (Borate buffer (pH 9), 0.2nM 300㎕)에 N(nucleocapsid) 단백질(30 kDa, 200 ㎍/㎖) 12㎕, S RBD(Spike Receptor Binding Domain) 단백질(50kDa, 200㎍/㎖) 20㎕, 대조군 프로브로서 스트렙트아비딘(streptavidin, 50kDa, 200㎍/㎖) 20㎕를 첨가한 후 20분 동안 반응시켰다. 이후, 6000 rpm으로 10분간 원심분리를 3번 진행하여 상등액을 제거한 후, 비 특이적인 결합을 막기 위해 BSA(10mg/㎖) 60㎕를 해당 용액에 첨가한 후 15분 동안 반응시켰다. 최종적으로, 원심분리를 3번 진행하여 상등액을 제거한 후, 항원과 Cy3가 동시에 결합된 이중 라벨링된 프로브를 제작하였다.

[0102] 이중 라벨링된 프로브의 형성은 UV-Vis 스펙트럼의 변화를 통해서 확인할 수 있다. 도 11a 내지 도 11c는 실시예 5에 따른 이중 라벨링 프로브 제작 단계별 금 나노입자의 UV 스펙트럼 변화를 나타내는 그래프로서, 도 11a는 Cy3-ssDNA-SH기가 결합된 금 나노입자의 UV 스펙트럼이고, 도 11b는 Cy3-PEG-SH기가 결합된 금 나노입자의 UV 스펙트럼이며, 도 11c는 이중 라벨링된 금 나노입자의 UV 스펙트럼이다. 도 11a 내지 도 11c는 이중 라벨링 나노 프로브를 제작하는 과정에 따른 금 나노입자의 UV 스펙트럼의 변화를 보여주는 결과이며, 금 나노입자의 표면을 Cy3-DNA 및 Cy3-PEG로 개질하였을 때 프로브의 사이즈가 증가하여 금 나노입자 대비 약 2.5nm의 red-shift가 발생하였고, 항원을 접할 시킬 때, 리간드가 접합된 프로브 대비 3nm의 red-shift가 발생하였다. 이를 통해 금 나노입자의 표면에 형광체와 항원이 접합되었음을 알 수 있다.

[0103] 도 12는 실시예 5에서 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 코로나 항원의 농도를 최적화하기 위한 농도별 신호 세기 측정 결과이다. DNA 및 PEG가 결합된 금 나노 용액에(Borate buffer(pH 9), 0.2nM 300㎕)에 N 단백질(30kDa, 200㎍/㎖) 0㎕, 1㎕, 2㎕, 4㎕, 8㎕, 12㎕, 16㎕를 첨가하고 20분 동안 반응시켰다. 이후, 6000 rpm으로 10분간 원심분리를 3번 진행하여 상등액을 제거한 후, 후술하는 실시예 6에 따라 제작된 테스트 스트립을 사용하여 비색 테스트를 진행하였다. 각 테스트 스트립의 테스트 라인과 컨트롤 라인의 비색 신호를 측정한 후, 각 조건에서의 컨트롤 라인의 비색 신호 대비 테스트 라인의 비색 신호 세기 비를 측정함. 그 결과, 12㎕의 N 단백질을 첨가하였을 때 비색 신호 세기 비가 가장 높았다.

[0104] 도 13은 실시예 5에서 금 나노입자에 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 코로나 항원을 접합하는 pH 조건을 최적화하기 위한 pH별 신호 세기 측정 결과이다. DNA 및 PEG가 결합된 금 나노 용액(0.2nM 300㎕)의 pH를 5부터 11까지 다 변화한 후, N 단백질(30kDa, 200㎍/㎖) 12㎕를 첨가하여 20분 동안 반응시켰다. 이후, 6000 rpm으로 10분간 원심분리를 3번 진행하여 상등액을 제거한 후 비색 테스트를 진행하였다. 각 테스트 스트립의 테스트 라인과 컨트롤 라인의 비색 신호를 측정한 후, 각 조건에서의 컨트롤 라인의 비색 신호 대비 테스트 라인의 비색 신호 세기 비를 측정하였다. 그 결과, pH 9에서 비색 신호 세기 비가 가장 높았다.

[0105] 도 14는 실시예 5에서 스파이크 RBD(Spike Receptor Binding Domain) 코로나 항원의 농도를 최적화하기 위한 농도별 신호 세기 측정 결과이다. DNA 및 PEG가 결합된 금 나노 용액(Borate buffer(pH 7.4), 0.2nM 300㎕)에 S RBD 단백질 (50kDa, 200㎍/㎖) 0㎕, 2㎕, 4㎕, 8㎕, 16㎕, 20㎕, 24㎕를 첨가하고 20분 동안 반응시켰다. 이후, 6000 rpm으로 10분간 원심분리를 3번 진행하여 상등액을 제거한 후 비색 테스트를 진행하였다. 각 테스트 스트립의 테스트 라인과 컨트롤 라인의 비색 신호를 측정한 후, 각 조건에서의 컨트롤 라인의 비색 신호 대비 테스트 라인의 비색 신호 세기 비를 측정하였다. 그 결과, 20㎕의 S RBD 단백질을 첨가하였을 때 비색 신호 세기 비가 가장 높았다.

[0106] 도 15는 실시예 5에서 금 나노입자에 스파이크 RBD(Spike Receptor Binding Domain) 코로나 항원을 접합하는 pH 조건을 최적화하기 위한 pH별 신호 세기 측정한 결과이다. DNA 및 PEG가 결합된 금 나노 용액(0.2nM 300㎕)

의 pH를 5부터 11까지 변화시킨 후, S RBD 단백질(50kDa, 200㎍/㎖) 20㎕를 첨가하여 20분 동안 반응시켰다. 이후, 6000 rpm으로 10분간 원심분리를 3번 진행하여 상등액을 제거한 후 비색 테스트를 진행하였다. 각 테스트 스트립의 테스트 라인과 컨트롤 라인의 비색 신호를 측정한 후, 각 조건에서의 컨트롤 라인의 비색 신호 대비 테스트 라인의 비색 신호 세기 비를 측정하였다. 그 결과, pH 7.4에서 비색 신호 세기 비가 가장 높았다.

[0108] 실시예 6. 테스트 스트립 제작

[0109] SARS-CoV-2 항체의 검지에 이용하는 테스트 스트립은 도 1과 같이 구성하였다. 먼저, 바이오 제트 디스펜서(XYZ platform, Biojet 3000kit, BioDot)를 이용하여 니트로셀룰로스 멤브레인(2.5cm × 4mm) 상에 2차 항체(anti-human IgG, 2 mg/㎖, 0.7 ㎕/cm)와 BSA-biotin(1.2mg/㎖, 0.5 ㎕/cm)를 고정시킨 후 37℃에서 3시간 동안 건조시켰고, 샘플패드(0.8cm × 4mm)에는 1% BSA, 0.5% Tween-20이 함유된 PBS 용액으로 전처리를 37℃에서 2시간 동안 진행하였으며, 접합패드(1cm × 4mm)에는 10% sucrose, 1% BSA, 0.5% Tween-20이 함유된 10mM Borate 용액으로 전처리를 37℃에서 1시간 동안 진행하였다. 그 다음, 이중 라벨링된 프로브 10㎕를 접합패드에 로딩한 후 37℃에서 1시간 동안 건조시켰다. 이후, 샘플패드(0.8cm x 4mm), 접합패드, 니트로셀룰로스 맴브레인 및 흡수패드(2cm x 4mm)를 서로 2mm 정도 겹쳐지도록 결합시킴으로써 하나의 테스트 스트립을 형성하였다.

[0110] 도 16은 실시예 6에서 접합패드(conjugation pad)의 전처리를 최적화하기 위한 버퍼(buffer) 안정성 실험 결과이다. 이중 모드 LFA에서 원활한 흐름과 이중 라벨링 된 나노 프로브의 안정성을 확보하기 위해 conjugate pad를 각각 10%(w/v) sucrose, 1%(w/v) BSA, 0.05% Tween-20(v/v)이 함유된 borate buffer와 10%(w/v) sucrose, 1%(w/v) BSA, 0.05% Tween-20(v/v)이 함유된 PBS buffer에 1시간 동안 전처리하였다. 접합패드를 37℃에서 1시간 동안 건조시킨 후, 이중 라벨링 된 나노 프로브 10㎕를 접합패드에 로딩하여 1시간 동안 건조시켰다. 도 16의 왼쪽의 그림은 borate buffer에서 반응시킨 접합패드에서 건조된 이중 라벨링 된 나노 프로브이며, 오른쪽의 그림은 PBS buffer에서 반응시킨 접합패드에서 건조된 이중 라벨링 된 나노 프로브이다. 상기 왼쪽의 그림은 나노 프로브의 안정성이 유지되어 빨간색을 띄는 반면, 오른쪽의 그림은 PBS 내에 존재하는 NaCl의 농도가 건조 시 급격하게 증가하고, 그에 따라 나노 프로브의 안정성이 감소하여 회색을 띄는 결과를 나타냈다. 그 결과에 따라, 테스트 스트립에서 이중 라벨링 된 나노 프로브의 안정성을 확보하기 위해 borate buffer에서 전처리를 진행하였다.

[0112] 실시예 7. 측면유동면역분석법을 이용한 SARS-CoV-2 항체의 검지

[0113] 샘플패드에 각각 anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid 항체 및 anti-SARS-CoV-2 spike RBD 항체가 포함된 시료 10㎕를 로딩한 후 샘플 버퍼(sample buffer) (PBS, 0.05% BSA, 0.1% Tween 20)를 60㎕ 로딩하여, 모세관 압력을 통해 시료를 테스트 스트립을 따라 이동시켰다. 15분 후 테스트 라인 및 컨트롤 라인에 적색의 선이 생성되었는지 육안으로 확인 및 형광 스캐너 장비(Typhoon FLA 9500, GE Healthcare Life Sicence)를 활용하여 형광을 확인하였다.

[0114] 도 17은 실시예 7에서 샘플의 유동을 야기하는 샘플 버퍼(sample buffer)의 첨가량을 최적화하기 위한 실험 결과이다. 이중 모드 LFA에서 모세관 현상을 야기 위한 샘플버퍼에 첨가하는 Tween-20의 양을 최적화하였다. 0%(v/v), 0.1%(v/v), 0.5%(v/v), 1%(v/v), 2%(v/v), 5%(v/v)의 Tween-20을 PBS buffer에 첨가한 후, 비색 신호를 비교하였다. 각 조건에서의 컨트롤 라인의 비색 신호 대비 테스트 라인의 비색 신호 세기 비를 측정한 결과, 0.5%(v/v)의 Tween-20을 PBS buffer에 첨가하였을 때 가장 높은 결과를 나타냈다. 0.5%(v/v) 미만의 Tween-20 조건에서는 테스트 스트립의 모세관 현상이 약했으며 1% 이상의 Tween-20 조건에서는 과도한 양의 계면활성제에 따라 이중 라벨링된 나노 프로브의 안정성이 감소하여 흐름의 원활하지 않았다.

[0115] 도 18은 실시예 7에 따른 DNA 이중 라벨링 프로브 기반 테스트 스트립의 형광법을 활용한 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2) 항체 검지 결과이다. 도 18은 Cy3-DNA가 개질된 나노 프로브에 따른 이중 모드 LFA를 진행한 결과를 나타낸다. 왼쪽의 그림은 비색 신호를 나타내고, 오른쪽의 그림은 형광 신호를 나타낸다.

[0116] 도 19는 실시예 7에 따른 PEG 이중 라벨링 프로브 기반 테스트 스트립의 형광법을 활용한 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2) 항체 검지 결과이다. 도 19는 Cy3-PEG가 개질된 나노 프로브에 따른 이중 모드 LFA를 진행한 결과를 나타낸다. 왼쪽의 그림은 비색 신호를 나타내고, 오른쪽의 그림은 형광 신호를 나타낸다.

[0117] 도 20은 실시예 7에 따른 테스트 스트립의 민감도 측정 결과이다. 최적의 조건에서 100pg/㎖부터 10㎍/㎖까지의

다양한 타겟 농도를 이중 모드 LFA에 적용하여 비색 및 형광 신호를 관찰하였다. 비색 테스트의 경우, 타겟의 농도가 1㎍/㎖ 이상에서 빨간색 띠가 나타나는 것을 빠르고 쉽게 관찰하였다. 반면 형광 테스트의 경우, 타겟의 농도가 1ng/㎖ 이상에서 녹색 형광이 방출된 것을 관찰하였으며, 이는 더 낮은 농도로 대상을 측정할 수 있음을 시사한다. 이러한 결과는 단순하고 빠르게 진단할 수 있는 동시에 정량적인 분석이 가능하며 거짓 음성 결과를 효과적으로 방지할 수 있는 이중 모드 LFA의 장점을 입증하는 것이다. 또한, 코로나 바이러스 외에 다른 감염성 바이러스 및 다중 검지 플랫폼을 구축할 수 있는 가능성을 시시한다.

[0119] 실시예 8. 혈청(Serum)에서 측면유동면역분석법을 이용하여 SARS-CoV-2 항체의 검지

[0120] Anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid 항체 및 anti-SARS-CoV-2 spike RBD 항체를 Serum에 spiking하여 희석 배율을 최적화 한 후(1:100), 샘플패드에 각각 Serum sample과 0.7㎕와 sample buffer(PBS, 0.05% BSA, 0.1% Tween 20)를 69.3㎕ 로딩하여, 모세관 압력을 통해 시료를 테스트 스트립을 따라 이동시켰다.

[0121] 도 21은 실시예 8에 따른 DNA 이중 라벨링 프로브 기반 테스트 스트립의 비색법을 활용한 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2) 항체 검지 결과이다. Serum에 타겟을 혼합시킨 후, Cy3-DNA가 개질된 나노 프로브에 따른 LFA를 진행한 결과, 테스트 존에서 적색의 라인이 형성되었다. ImageJ를 통해 테스트 라인과 컨트롤 라인의 비색 신호 세기 비를 구했으며, 샘플버퍼와 타겟을 함유한 serum의 비를 1:0부터 1:10,000까지 다변화하여 비색 신호를 발생시켰다.

[0122] 도 22는 실시예 8에 따른 PEG 이중 라벨링 프로브 기반 테스트 스트립의 비색법을 활용한 코로나 19 바이러스(SARS-CoV-2) 항체 검지 결과이다. Serum에 타겟을 혼합시킨 후, Cy3-PEG가 개질된 나노 프로브에 따른 LFA를 진행한 결과, 테스트 존에서 적색의 라인이 형성되었다. ImageJ를 통해 테스트 라인과 컨트롤 라인의 비색 신호 세기 비를 구했으며, 샘플 buffer와 타겟을 함유한 serum의 비를 1:0부터 1:10,000까지 다변화하여 비색 신호를 발생시켰다.

[0123] 도 23은 실시예 8에서 혈청(Serum) 내 소량의 항체와 샘플 버퍼(sample buffer)의 희석 비율을 최적화하기 위한 실험 결과이다. 항체를 함유하고 있는 serum을 PBS로 희석한 비율에 따른 컨트롤 라인의 비색 신호 대비 테스트 라인의 비색 신호 세기 비를 구했으며, serum을 100배 희석하였을 때 가장 이상적인 결과를 나타냈다. Serum 내에는 LFA의 흐름을 방해하는 다양한 요소들이 존재하며 serum을 PBS로 희석해서 이러한 문제점을 해결할 수 있다. 그러나 serum을 PBS로 과도하게 희석하면 serum 내의 타겟의 농도도 감소하기 때문에 LFA상에서 검출이 어려울 수 있다. 따라서, 희석 비율을 최대한 낮추고 신호 세기 비가 일정하게 유지되는 1:100을 최적의 희석 비율로 선정하였다.

[0125] 실시예 9. Dual-mode 측면유동면역분석법을 이용한 특이도 및 재현성 검증

[0126] 샘플패드에 anti-SARS-CoV-2 IgG 외에, SFTV 및 Dengue antibody 등 10㎕를 로딩한 후 상기의 샘플 버퍼 60㎕를 로딩하여, 비색 및 형광 신호의 유무를 관찰하였다. 또한, 반복 실험을 통해 테스트 라인 및 컨트롤 라인에 적색의 선이 생성되었는지 형광이 관찰되었는지 지속적으로 관찰하였다.

[0127] 도 24는 실시예 9에 따른 테스트 스트립의 특이도 검증 결과이다. 타겟 항체와 중증열성혈소판감소증후군(SFTSV) 항체, 뎅기 바이러스 항체, 조류인플루엔자A(H7N9) 항체, 정상인 항체 등을 이중 모드 LFA에 로딩하여 특이도를 관찰하였다. 실험 결과, 타겟이 함유한 테스트에서 비색 및 형광 신호가 관찰되었으며 다른 항체를 로딩하였을 때는 항원-항체 상호작용의 실패로 인해 신호가 측정되지 않았다. 이 결과는 SARS-CoV-2와 다른 바이러스 사이에 교차반응이 없었음을 나타내며 이중모드 LFA의 특이도가 우수하다는 것을 의미한다.

[0128] 도 25는 실시예 9에 따른 테스트 스트립의 재현성 검증 결과이다. 이중 모드 LFA의 재현성을 테스트하기 위해 10개 이상의 같은 샘플로 컨트롤 라인의 비색 및 형광 신호 대비 테스트 라인의 비색 및 형광 신호 세기 비를 측정하였다. 10개의 테스트가 일정한 신호 세기 비를 보여주었으며 이는 개발한 이중 모드 LFA가 양호한 재현성을 만족한다는 것을 보여준다.

[0130] 이상 본 발명을 구체적인 실시예를 통하여 상세히 설명하였으나, 이는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명은 이에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상 내에서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의

해 그 변형이나 개량이 가능함이 명백하다.

[0131] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속한 것으로 본 발명의 구체적인 보호 범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

부호의 설명

[0133] 1: 샘플 2: 코로나 19 바이러스 항체

10: 샘플패드 20: 접합패드

30: 멤브레인 40: 흡수패드

100: 타겟 프로브 110: 제1 금속 나노입자

120: 탐지항원 130: 제1 형광단

131: 제1 스페이서 133: 제1 형광표지자

200: 반응부 210: 테스트 라인

211: 타겟 포획물질 220: 대조군 라인

221: 대조군 포획물질 300: 대조군 프로브

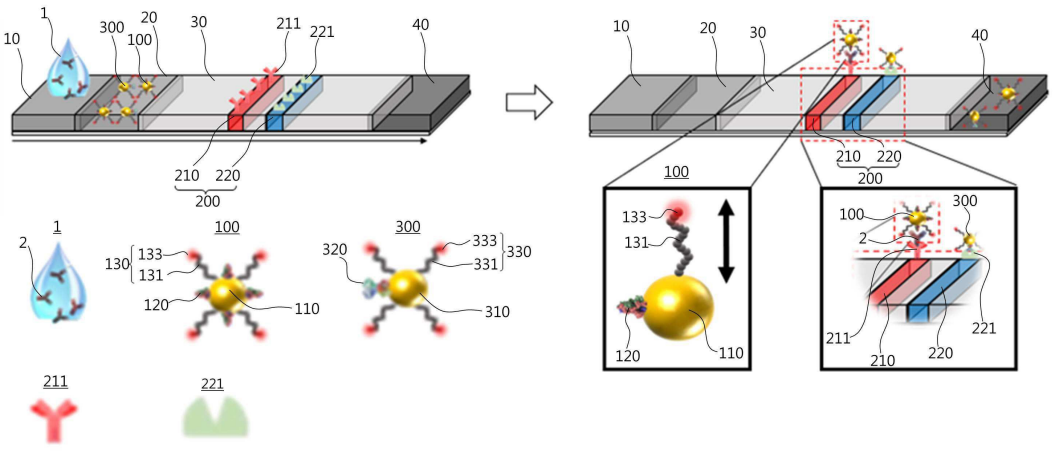
310: 제2 금속 나노입자 320: 대조군 탐지물질

330: 제2 형광단 331: 제2 스페이서

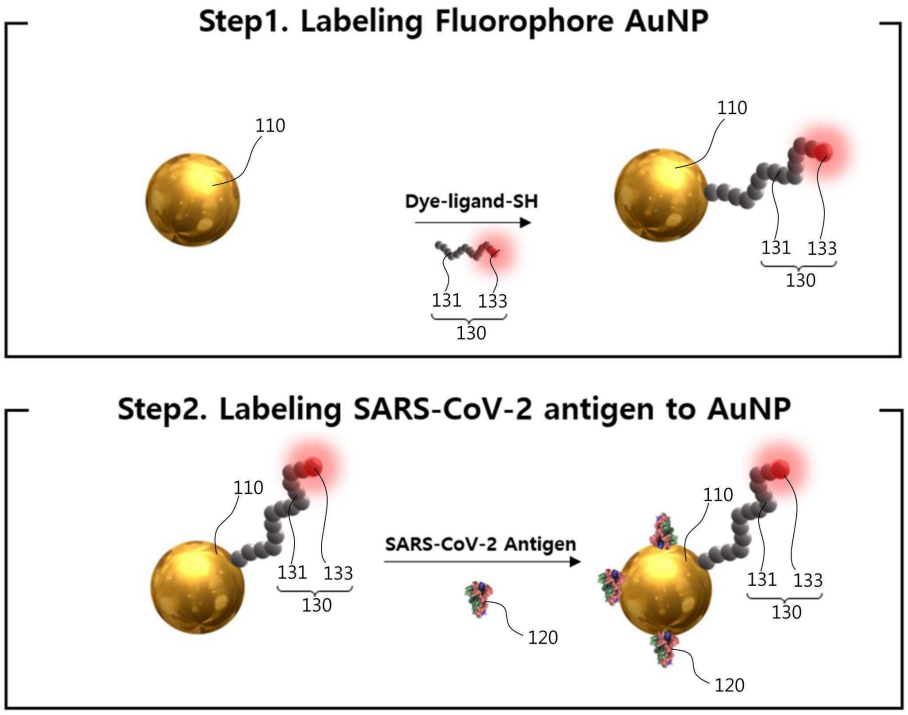
333: 제2 형광표지자

도면

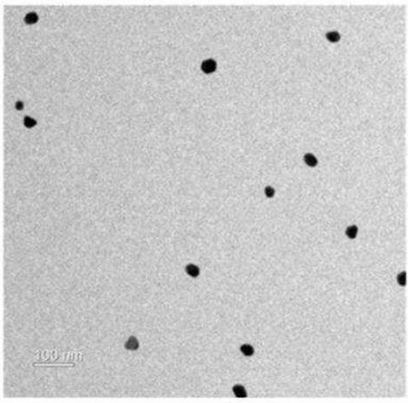
도면1



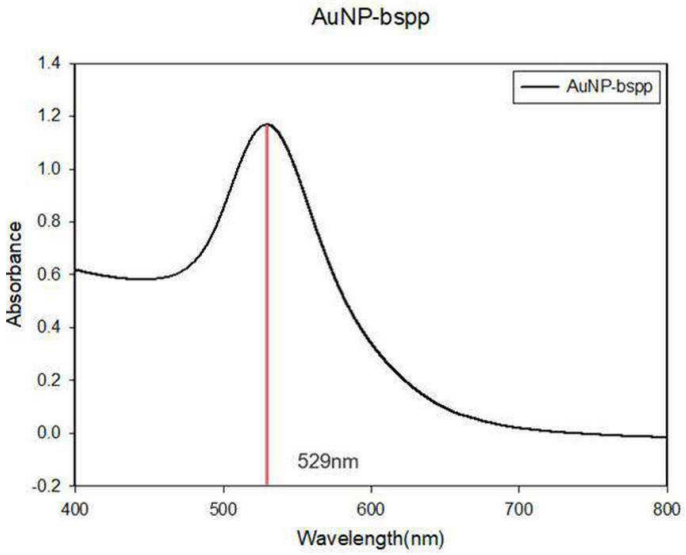
도면2


Step1. Labeling Fluorophore AuNP
110
Dye-ligand-SH
131 133
130
110
131 133
130
Step2. Labeling SARS-CoV-2 antigen to AuNP
110
131 133
130
SARS-CoV-2 Antigen
120
110
131 133
130
120

도면3



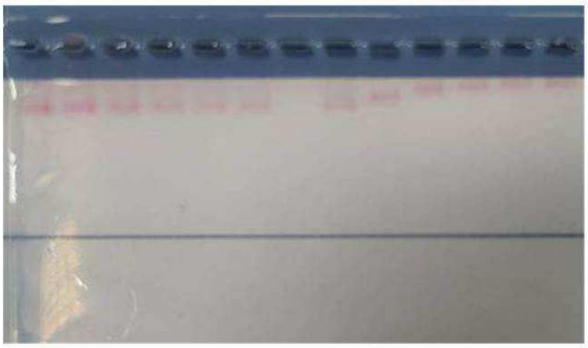
도면4



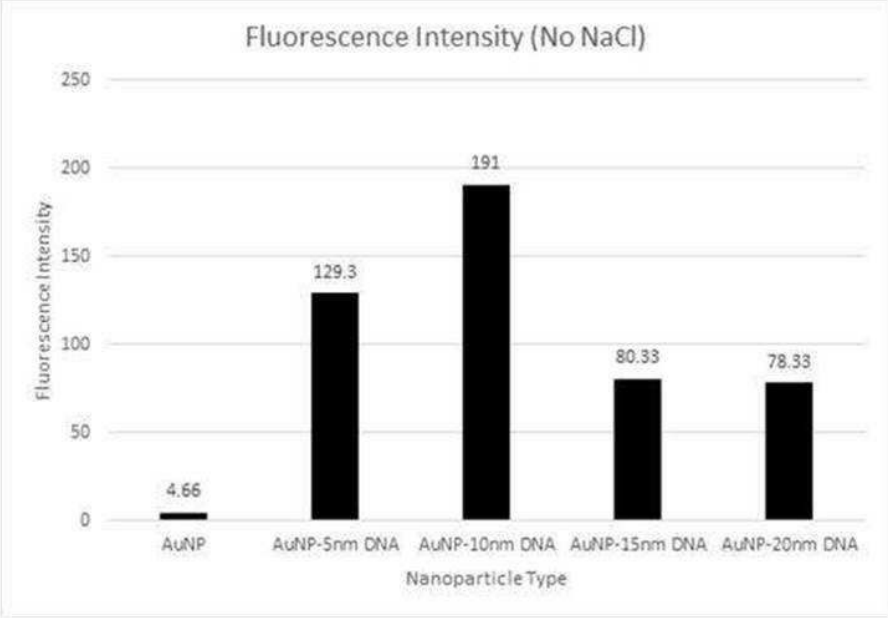
도면5

ssDNA의 길이	Cy3-(5')-ssDNA-(3')-SH의 sequence
5nm	Cy3-(5')-GGAAGTTTTT-(3')-SH
10nm	Cy3-(5')-GGAAGTTTTTTTTTTTTT-(3')-SH
15nm	Cy3-(5')-GGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-(3')-SH
20nm	Cy3-(5')-GGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-(3')-SH

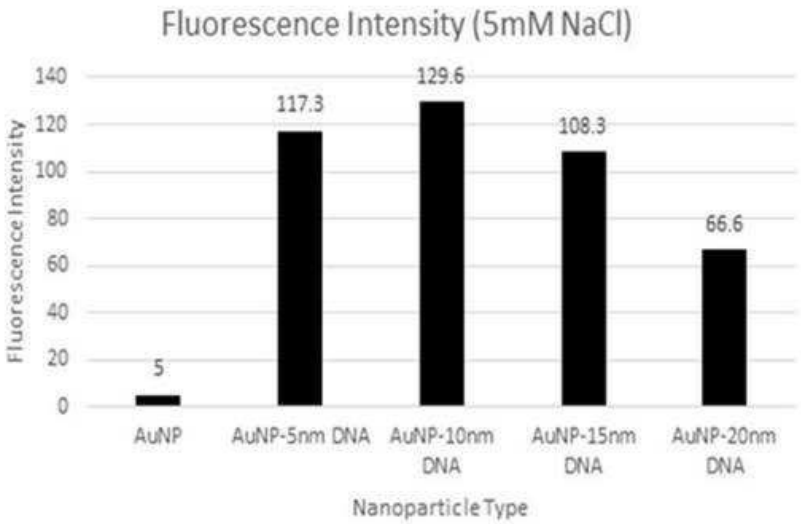
도면6



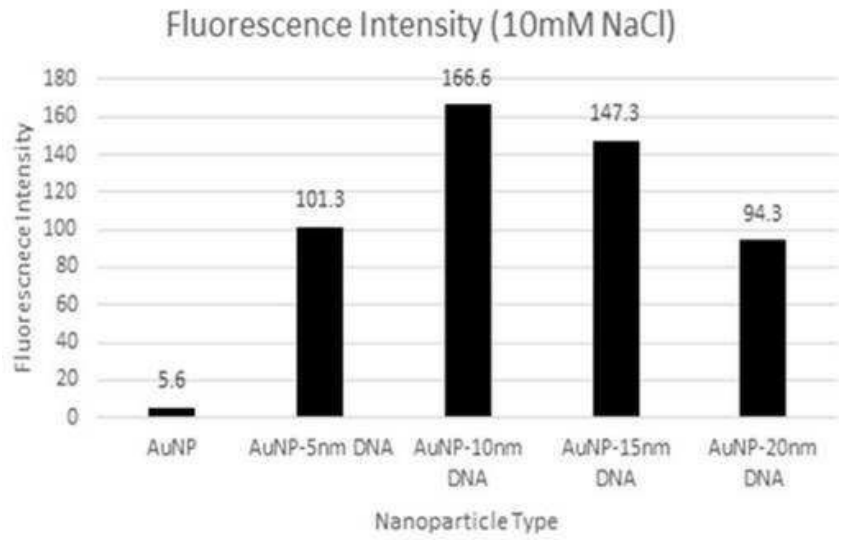
도면7


Fluorescence Intensity (No NaCl)
250
200
150
100
50
0
Fluorescence Intensity
4.66
129.3
191
80.33
78.33
AuNP
AuNP-5nm DNA
AuNP-10nm DNA
AuNP-15nm DNA
AuNP-20nm DNA
Nanoparticle Type

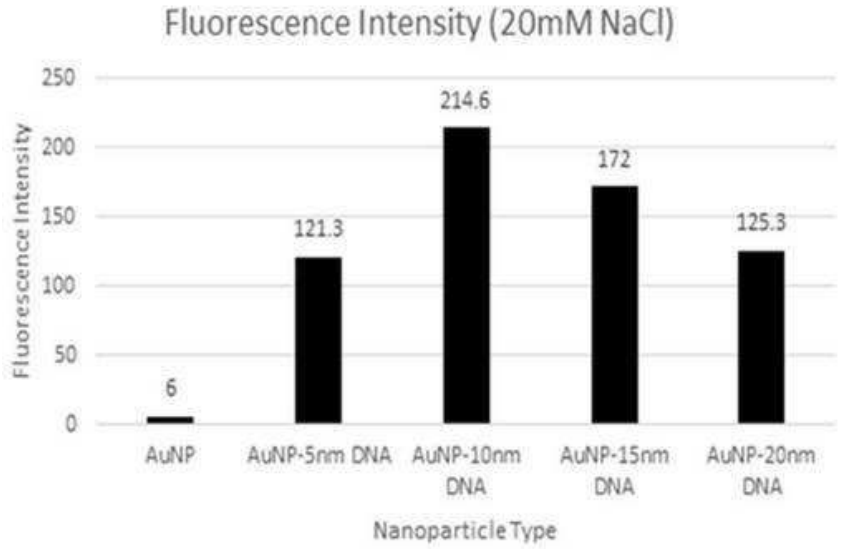
도면8a


Fluorescence Intensity (5mM NaCl)
140
120
100
80
60
40
20
0
Fluorescence Intensity
5
117.3
129.6
108.3
66.6
AuNP
AuNP-5nm DNA
AuNP-10nm DNA
AuNP-15nm DNA
AuNP-20nm DNA
Nanoparticle Type

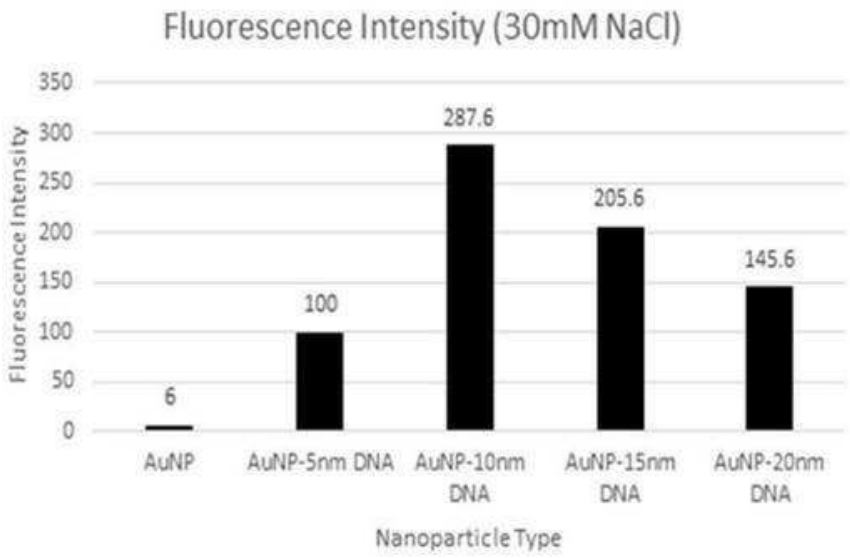
도면8b


Fluorescence Intensity (10mM NaCl)
Fluorescnece Intensity
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
166.6
147.3
101.3
94.3
5.6
AuNP
AuNP-5nm DNA
AuNP-10nm DNA
AuNP-15nm DNA
AuNP-20nm DNA
Nanoparticle Type

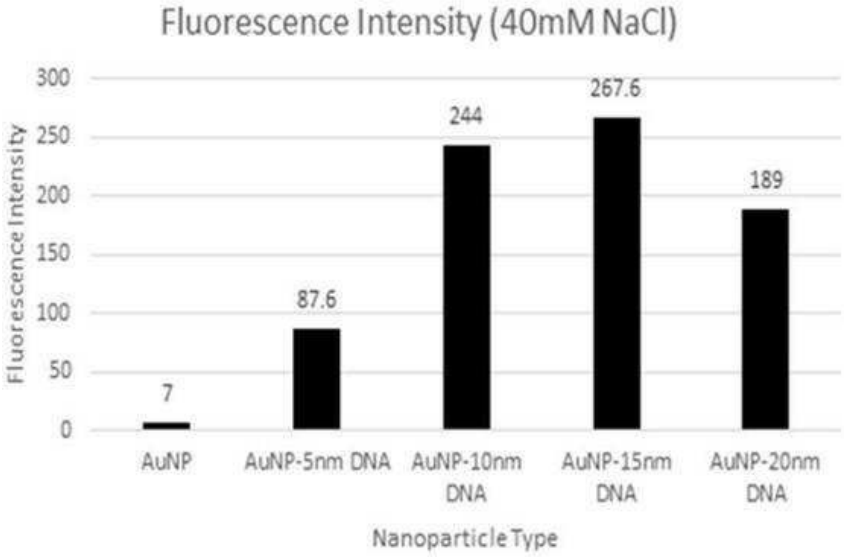
도면8c


Fluorescence Intensity (20mM NaCl)
Fluorescence Intensity
250
200
150
100
50
0
214.6
172
121.3
125.3
6
AuNP
AuNP-5nm DNA
AuNP-10nm DNA
AuNP-15nm DNA
AuNP-20nm DNA
Nanoparticle Type

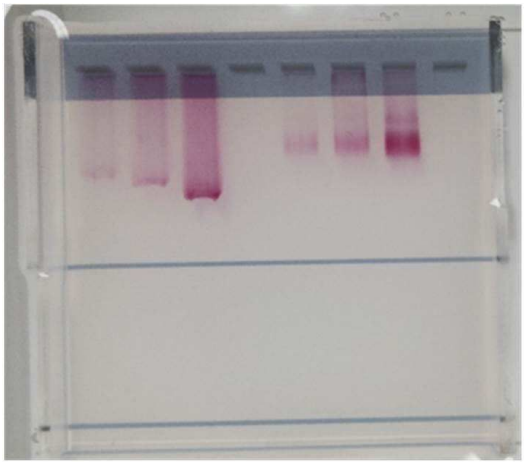
도면8d



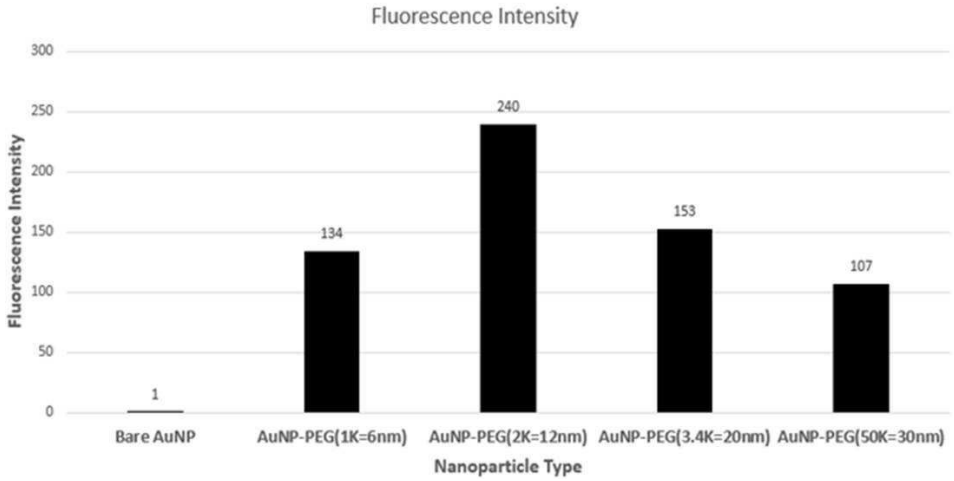
도면8e



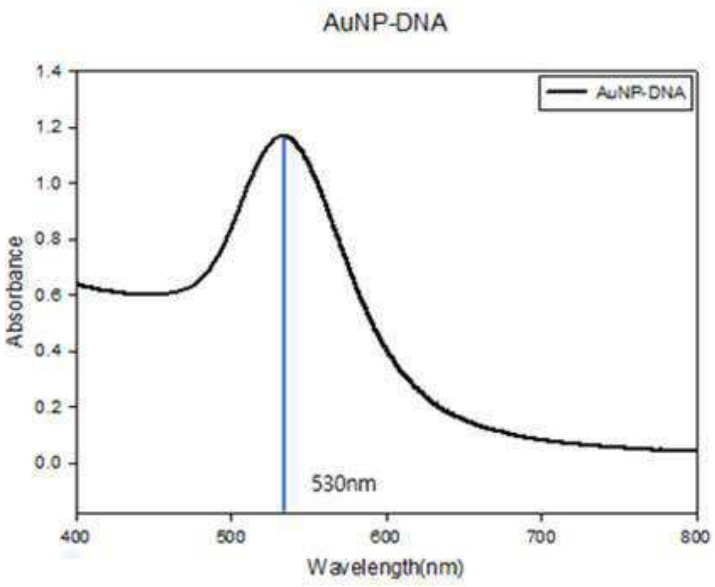
도면9



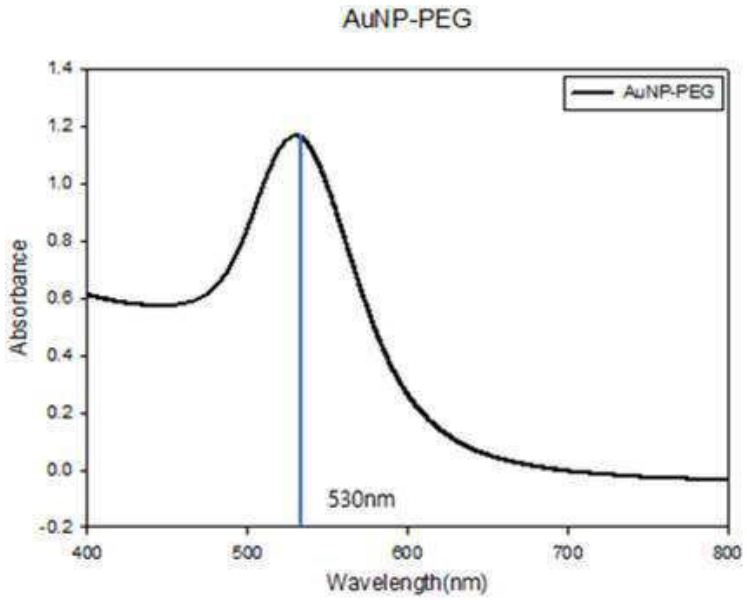
도면10


Fluorescence Intensity
Fluorescence Intensity
300
250
200
150
100
50
0
1
134
240
153
107
Bare AuNP
AuNP-PEG(1K=6nm)
AuNP-PEG(2K=12nm)
AuNP-PEG(3.4K=20nm)
AuNP-PEG(50K=30nm)
Nanoparticle Type

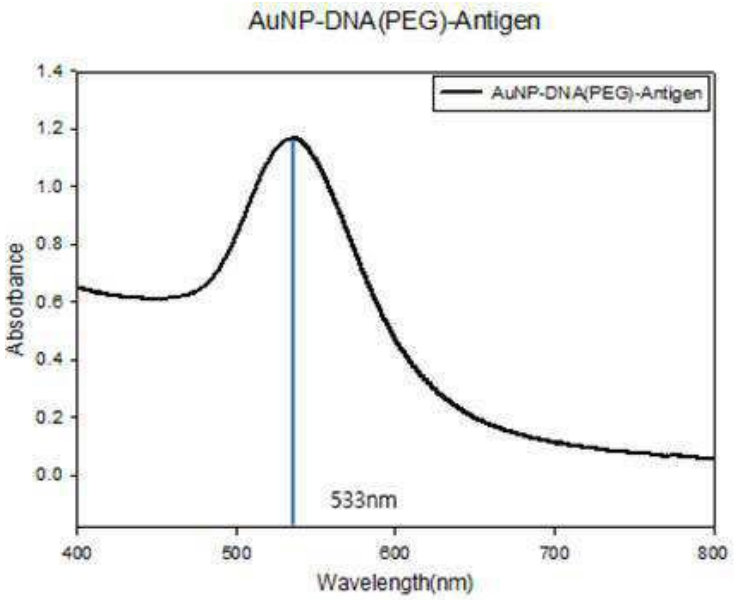
도면11a


AuNP-DNA
AuNP-DNA
Absorbance
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
530nm
400
500
600
700
800
Wavelength(nm)

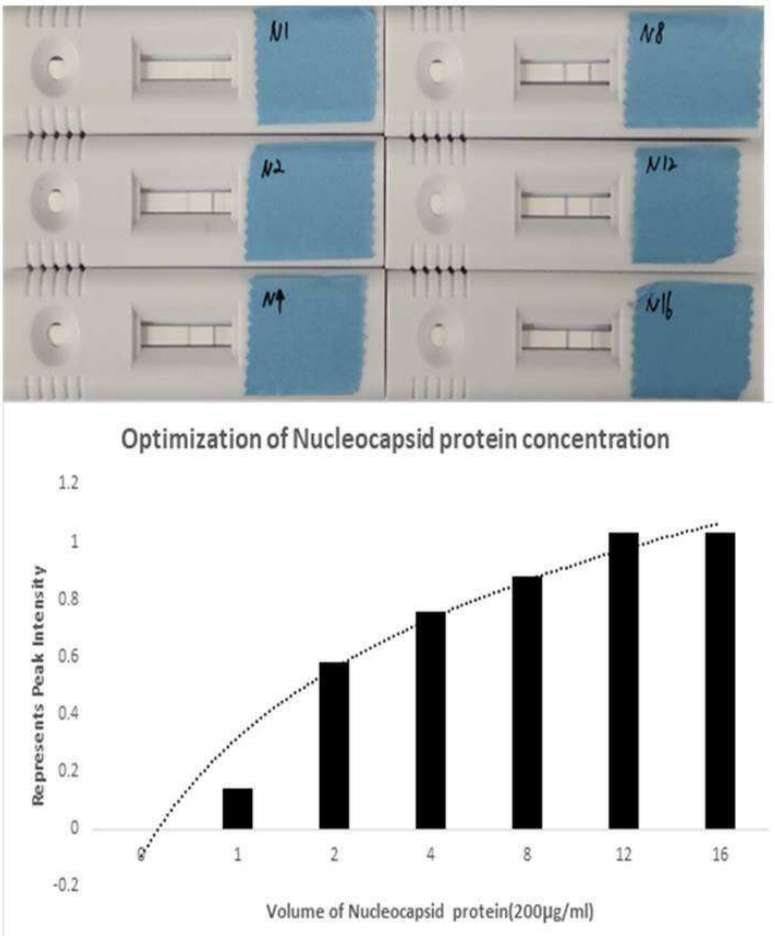
도면11b


AuNP-PEG
AuNP-PEG
Absorbance
Wavelength(nm)
530nm
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
400
500
600
700
800

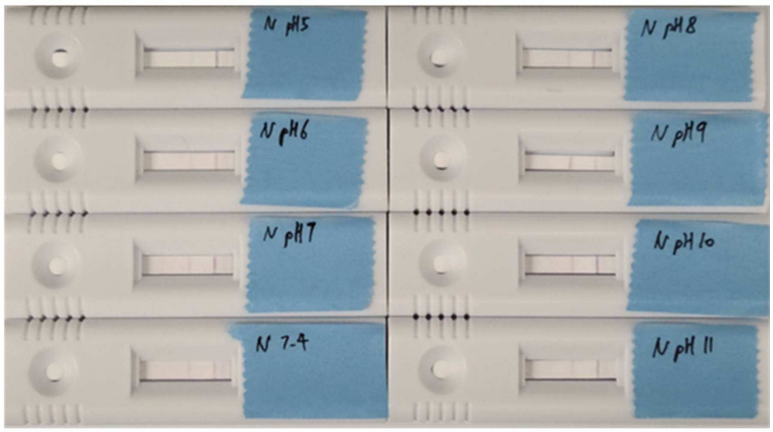
도면11c


AuNP-DNA(PEG)-Antigen
AuNP-DNA(PEG)-Antigen
Absorbance
Wavelength(nm)
533nm
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
400
500
600
700
800

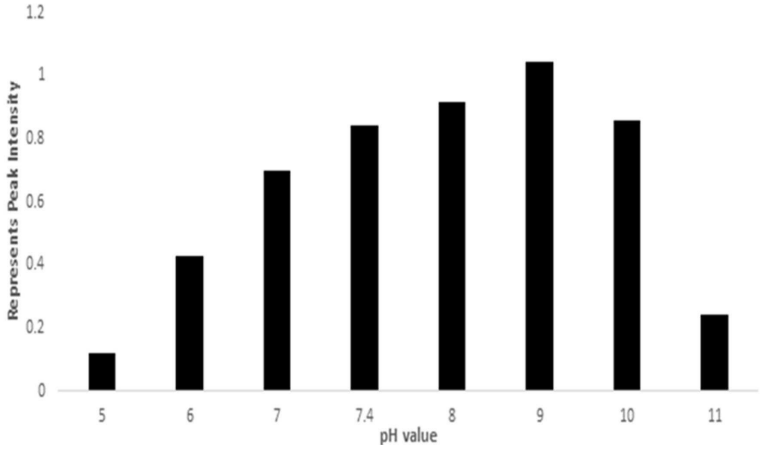
도면12


N1
N8
N2
N12
N4
N16
Optimization of Nucleocapsid protein concentration
Represents Peak Intensity
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
0
1
2
4
8
12
16
Volume of Nucleocapsid protein(200μg/ml)

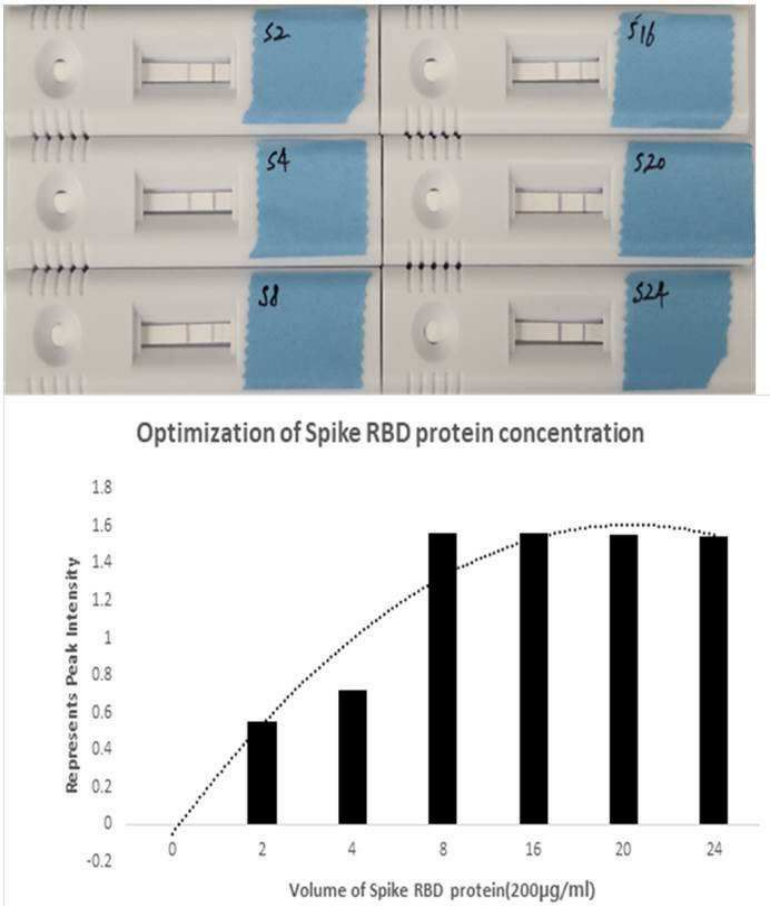
도면13



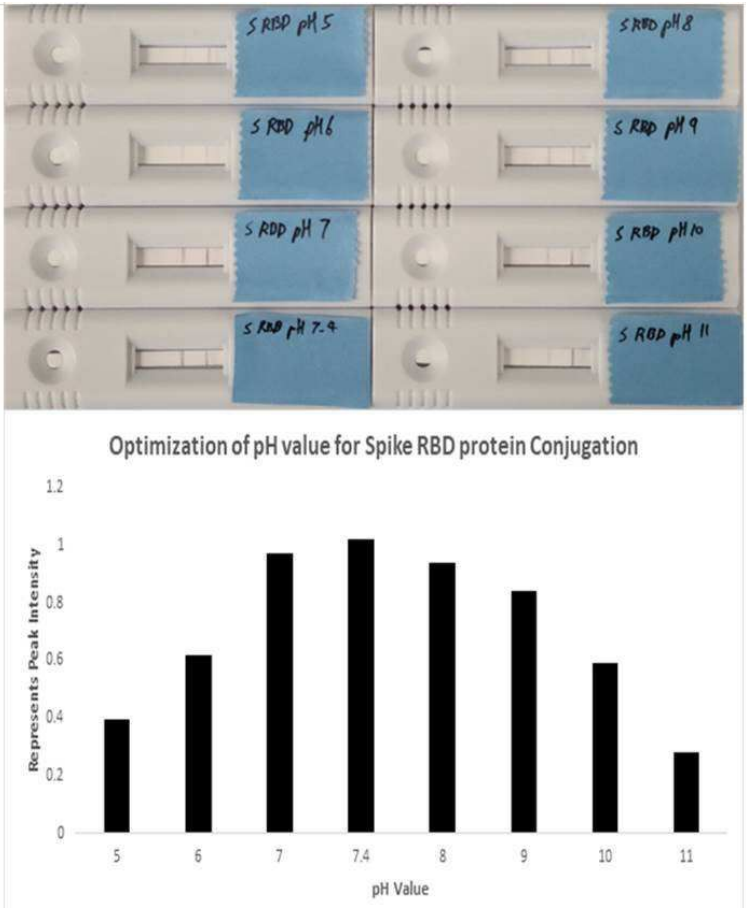
Optimization of pH value for Nucleocaspid protein Conjugation



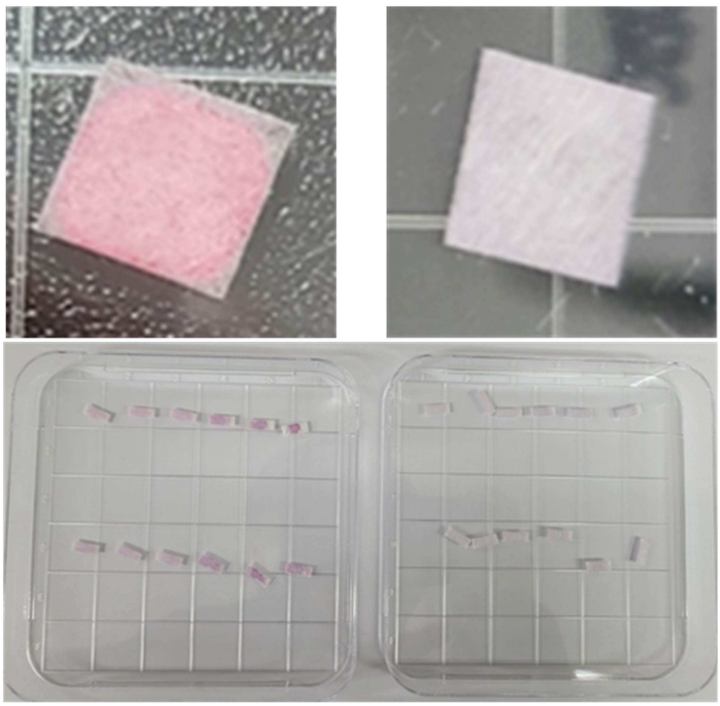
도면14


S2
S16
S4
S20
S8
S24
Optimization of Spike RBD protein concentration
Represents Peak Intensity
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
0
2
4
8
16
20
24
Volume of Spike RBD protein(200μg/ml)

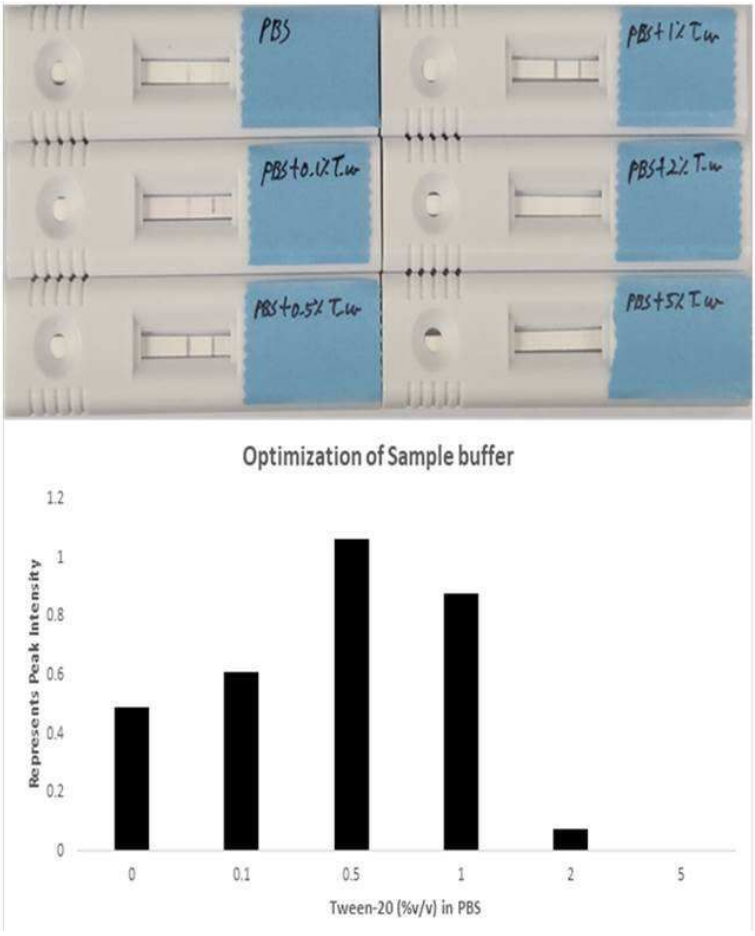
도면15


S RBD pH 5
S RBD pH 6
S RBD pH 7
S RBD pH 7.4
S RBD pH 8
S RBD pH 9
S RBD pH 10
S RBD pH 11
Optimization of pH value for Spike RBD protein Conjugation
Represents Peak Intensity
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
5
6
7
7.4
8
9
10
11
pH Value

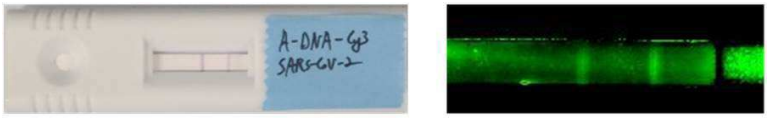
도면16



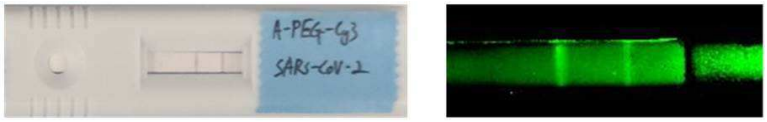
도면17



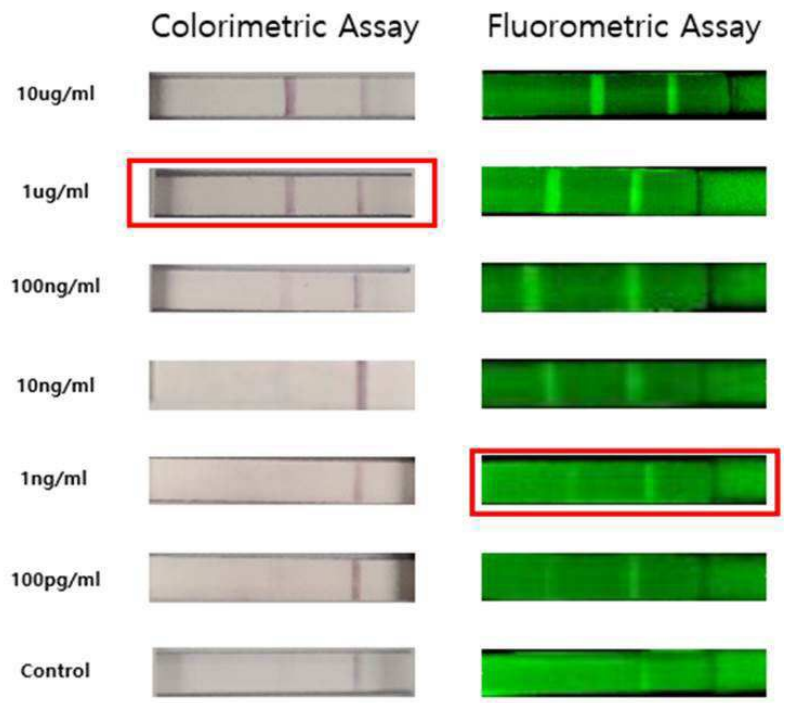
도면18



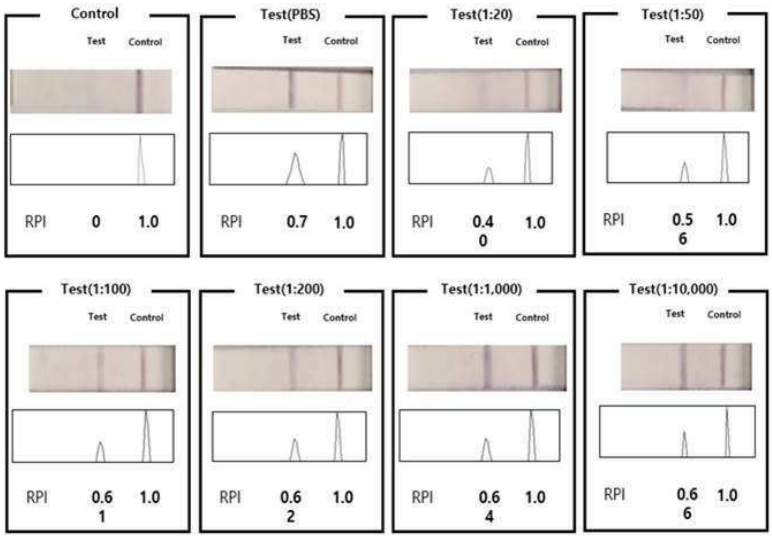
도면19



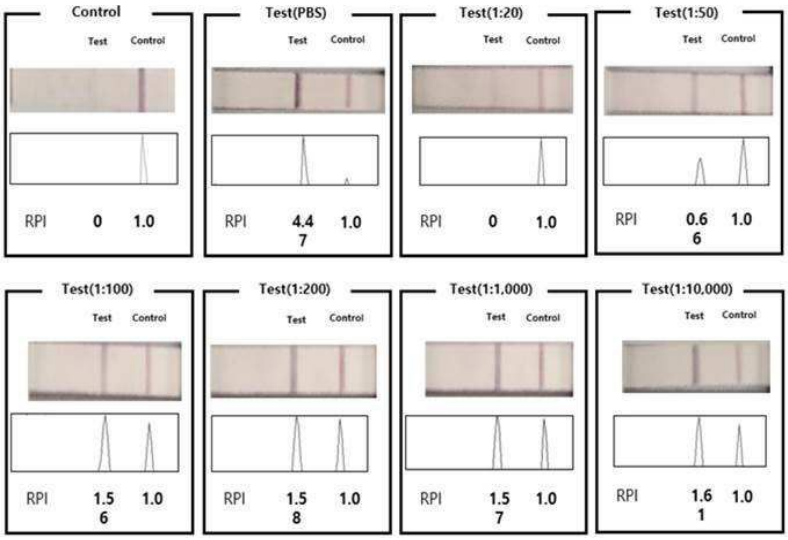
도면20


Colorimetric Assay
Fluorometric Assay
10ug/ml
1ug/ml
100ng/ml
10ng/ml
1ng/ml
100pg/ml
Control

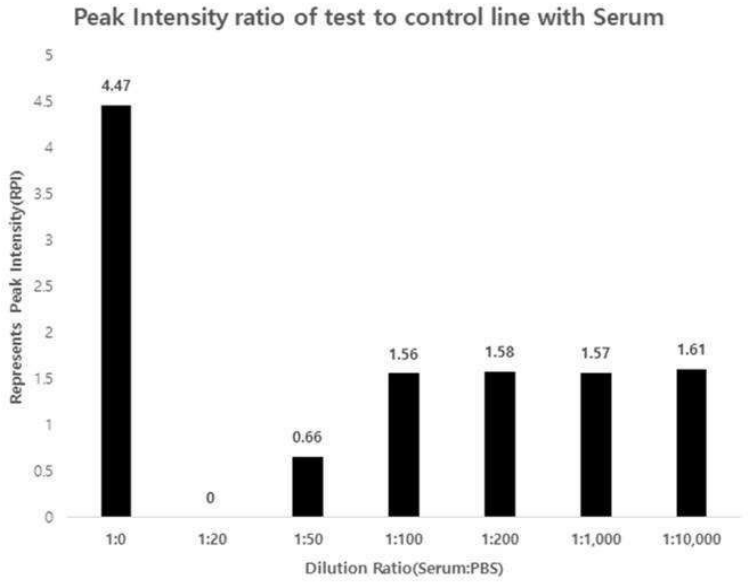
도면21


Control
Test
Control
RPI 0 1.0
Test(PBS)
Test
Control
RPI 0.7 1.0
Test(1:20)
Test
Control
RPI 0.4 0 1.0
Test(1:50)
Test
Control
RPI 0.5 6 1.0
Test(1:100)
Test
Control
RPI 0.6 1 1.0
Test(1:200)
Test
Control
RPI 0.6 2 1.0
Test(1:1,000)
Test
Control
RPI 0.6 4 1.0
Test(1:10,000)
Test
Control
RPI 0.6 6 1.0

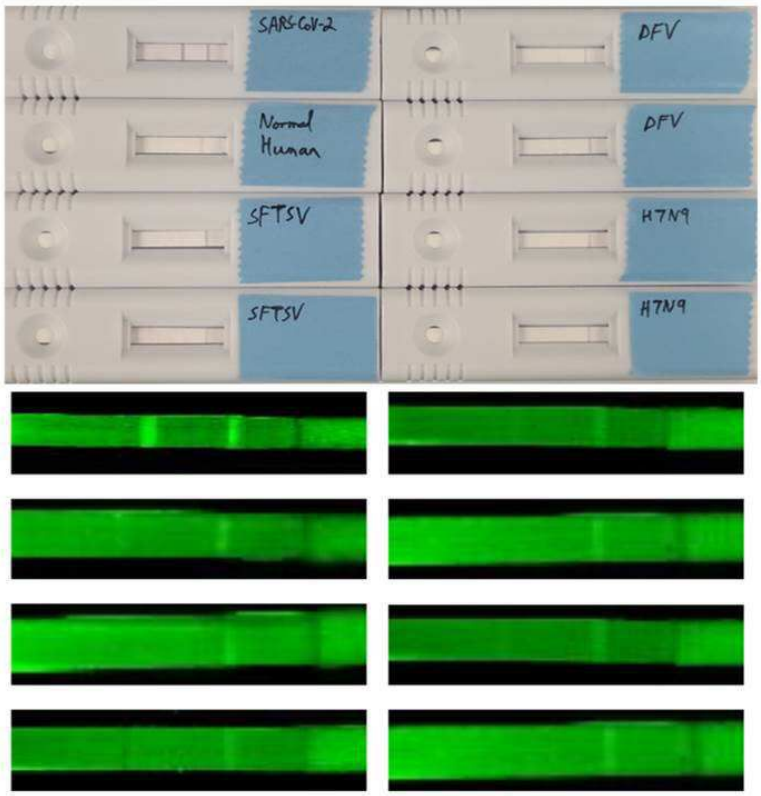
도면22


Control
Test
Control
RPI 0 1.0
Test(PBS)
Test
Control
RPI 4.47 1.0
Test(1:20)
Test
Control
RPI 0 1.0
Test(1:50)
Test
Control
RPI 0.66 1.0
Test(1:100)
Test
Control
RPI 1.56 1.0
Test(1:200)
Test
Control
RPI 1.58 1.0
Test(1:1,000)
Test
Control
RPI 1.57 1.0
Test(1:10,000)
Test
Control
RPI 1.61 1.0

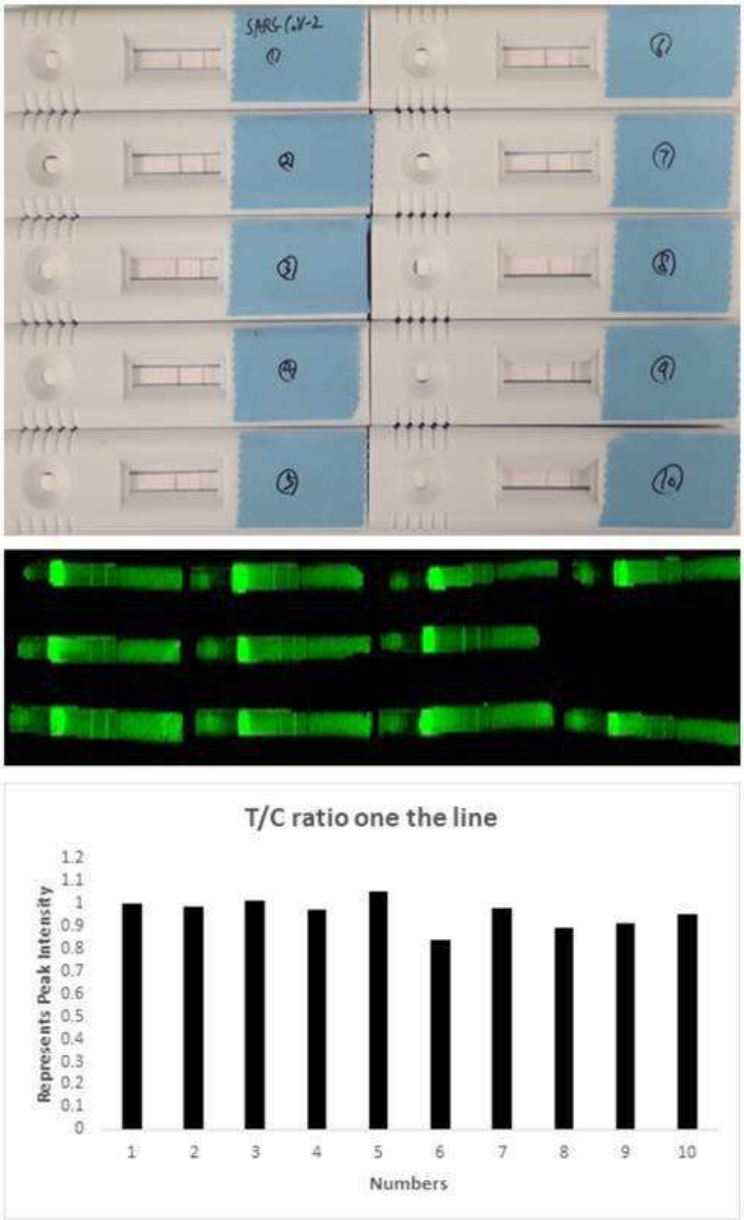
도면23


Peak Intensity ratio of test to control line with Serum
Represents Peak Intensity(RPI)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
4.47
0
0.66
1.56
1.58
1.57
1.61
1:0
1:20
1:50
1:100
1:200
1:1,000
1:10,000
Dilution Ratio(Serum:PBS)

도면24



도면25



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> LATERAL FLOW ASSAY STRIP FOR DETECTION OF COVID-19 ANTIBODY

<130> JKP1647R1

<150> KR 10-2021-0044872

<151> 2021-04-06

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ssDNA

<400> 1

ggaagttttt 10

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> ssDNA

<400> 2

ggaagttttt tttttttttt 20

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ssDNA

<400> 3

ggaagttttt tttttttttt tttttttttt ttttt 35

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ssDNA

<400> 4

ggaagttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 50