



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0072829
(43) 공개일자 2019년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01) G01N 33/543 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6834 (2018.05)
G01N 33/543 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0173911
(22) 출원일자 2017년12월18일
심사청구일자 2017년12월18일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
봉기완
서울특별시 마포구 백범로37길 12, 111동 1304호
노윤호
경기도 과천시 별양로 111, 503동 303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열

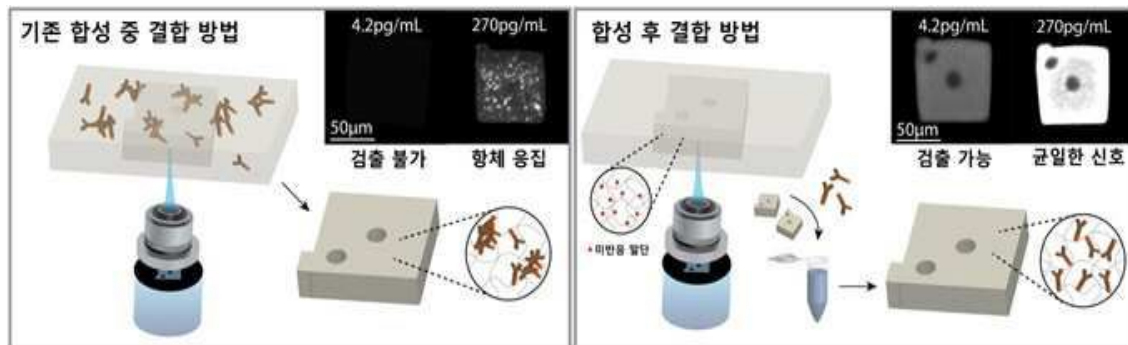
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자

(57) 요약

본 발명은 표적 생체 분자를 높은 정확도로 고감도 검출하기 위한, 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 관한 것으로, 구체적으로 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 단계를 포함하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 관한 것으로서, 본 발명에 따르면, 현저히 향상된 높은 효율로 프로브를 탑재할 수 있고, 탑재된 프로브를 균일하게 분포시킬 수 있으며, 미반응 말단에 의한 생체분자의 검출 저해라는 잠재적인 문제를 해결할 수 있다. 또한 검출 감도를 향상시킬 수 있고, 높은 감도로 핵산, 단백질 등의 표적 생체 분자를 다중 검출하여 질병을 진단하거나 약물을 선별하는데 활용될 수 있는바, 분자진단 등 의료진단 분야에 있어서, 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

G01N 33/54346 (2013.01)

C12Q 2563/149 (2013.01)

C12Q 2563/155 (2013.01)

(72) 발명자

문현준

경기도 수원시 권선구 서호서로33번길 37-3

이현지

경기도 용인시 수지구 신봉2로 26, 110동 1603호

김현웅

서울특별시 성북구 안암로9가길 55

문석준

경기도 성남시 수정구 위례동로 15, 5703동 1104호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1C1A1A02037452

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구자지원사업(유형Ⅱ)

연구과제명 생체 분자의 고감도 다중 검출을 위한 적층 엔코드 하이드로젤 입자의 개발

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.07.01 ~ 2018.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A5A1010148

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 나노-생체유체 검사 연구단

기 여 율 50/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 단계를 포함하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 합성된 수화겔 입자에 잔존하는 미반응 말단을 이용하여 프로브를 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 프로브가 라디칼 반응 또는 용액 상 전자의 이동을 통해 합성된 수화겔 입자에 가교되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 프로브가 라디칼 반응을 통해 합성된 수화겔 입자에 가교되는 경우, UV 조사를 통한 광개시제의 개시 또는 열에너지를 이용한 온도개시제의 개시를 통해 공유결합이 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 프로브가 용액 상 전자의 이동을 통해 합성된 수화겔 입자에 가교되는 경우, 수용액 또는 극성 용매의 전자가 친핵체로 작용하여 공유결합이 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 0 내지 90 °C에서 가교가 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 프로브는 DNA, RNA 또는 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 수화겔 입자는 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형 디자인으로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 코드는 기하학적 코드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 기하학적 코드는 여러 종류의 도형의 조합을 이용하여 구성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 수화겔 입자가 기능성 나노 입자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자.

청구항 13

코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형 디자인으로 구성된 것을 특징으로 하는 부호화된 수화겔 입자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 표적 생체 분자를 높은 정확도로 고감도 검출하기 위한, 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 관한 것으로, 구체적으로 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 단계를 포함하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 진단 의학, 약물 선별, 분자 생화학 분야에서 핵산, 단백질 등의 생체 분자를 정확하게 고감도 검출 하는 기술의 필요성이 대두되고 있다.

[0004] 부호화된 수화겔 입자(encoded hydrogel particle)는 생체 분자의 고감도 다중 검출이 가능하여 많은 주목을 받고 있다. 부호화된 수화겔 입자는 생체분자를 검출하는 프로브를 탑재하며 탑재된 프로브 식별을 위한 코드를 포함하고 있다. 부호화된 입자를 활용하면 한 번의 검출 과정에서 다수의 생체 분자를 동시에 포획하는 다중 검출이 가능하며, 3차원의 입자 공간에서 프로브와 표적 생체 분자가 상호작용하며 고감도 검출이 이루어진다.

[0005] 부호화된 수화겔 입자를 합성하는 방법 중 하나인 유체 리소그래피(flow lithography)는 다양한 기능과 형태를 가진 파티클을 합성하는 기술로 많은 주목을 받고 있다. 유체 리소그래피는 미세 유체 흐름의 패턴링과 포토마스크를 투과하는 자외선을 이용하여 다기능성 비대칭 입자를 합성하는 공정이다. 미세 채널 내부에서 유체는 낮은 레이놀즈 수(Re)를 가져 인접한 서로 다른 흐름이 혼합되지 않고 흐르며 다종의 평행 흐름으로 구조화될 수 있다. 또한 전구체 유체에 포토마스크를 투과하며 패턴링된 UV를 조사하여 선택적인 중합반응을 일으켜 포토마스크 모양과 동일한 파티클을 합성할 수 있다. 중합될 전구체 유체에 항체나 핵산과 같이 생체 분자와 결합하는 물질을 포함시키면 생체분자를 검출에 사용할 수 있는 파티클을 합성할 수 있다.

[0006] 기존의 부호화된 수화겔 입자의 합성은 전구체 유체에 직접 생체분자 검출용 프로브를 혼합하고 합성 과정에서 가교시키는 방법으로 이루어진다. 하지만 이 방법은 다음과 같은 문제점을 야기한다. 유체 리소그래피 공정의 경우 합성 시간이 매우 짧기 때문에 전구체에 포함된 단량체 중 약 10% 정도만 고분자로 중합되어, 넣어준 프로브의 10% 정도만 입자에 가교된다. 이는 프로브 탑재의 낮은 수율을 야기하며, 검출 성능의 한계를 초래한다. 또한, (대부분의 프로브는 전구체에 쉽게 분산되지 않는 문제를 갖는다. 특히, 전구체와 상용성이 낮은 프로브(예를 들어, 항체)의 경우 장시간 혼합해 주어야 하며, 혼합 과정 후에도 응집된 상태로 입자에 가교될 수 있다. 프로브가 응집된(비균일한) 상태로 존재할 경우, 생체 분자를 포획하는 부분이 노출되지 않기 때문에 검출 능력이 저하된다. 고감도의 검출을 위해서는 다수의 프로브가 균일하게 탑재되어야 하는데, 앞서 언급한 문제로 인해 검출 성능이 저하된다.

[0007] 기존의 입자의 합성은 액상 고분자가 가교되어 네트워크를 형성하며 이루어지는데, 상기 언급한바와 같이, 액상 고분자의 가교 반응의 수율은 대략 10%로 낮으며, 낮은 수율에서 네트워크 상에 일종의 결함이 존재한다. 이 결함은 두 개 이상의 반응기를 갖는 단량체의 반응기 중 하나 이상이 미반응된 상태로 네트워크에 남는 경우를 포함한다. 합성된 입자에는 상당량의 미반응된 반응기(미반응 말단)가 남는데, 이는 생체 분자의 검출 성능을 저해하는 또 다른 요인이다. 미반응 말단은 반응성이 높기 때문에 표적 생체분자의 비특이적 결합(false-positive signal)을 초래할 수 있으며, 이 외에도 검출 과정에서 사용될 핵심 물질(예: 표적 생체 분자, 형광 물질, reporter, 세포 등)이 미반응 말단과 반응하여 고정화(immobilization)되어 생체분자의 검출을 저해하는 요인으로 작용할 수 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 상술한 바와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하고자 예의 노력한 결과, 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형으로 디자인된 부호화된 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 탑재함으로써, 높은 정확도 및 검출 감도로 표적 생체 분자를 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) US 20120316082 A1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 단계를 포함하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 단계를 포함하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자를 제공한다.

[0014] 본 발명은, 또한 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형 디자인으로 구성된 것을 특징으로 하는 부호화된 수화겔 입자를 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 따르면, 현저히 향상된 높은 효율로 프로브를 탑재할 수 있고, 탑재된 프로브를 균일하게 분포시킬 수 있으며, 미반응 말단에 의한 생체분자의 검출 저해라는 잠재적인 문제를 해결할 수 있다. 또한 검출 감도를 향상시킬 수 있고, 높은 감도로 핵산, 단백질 등의 표적 생체 분자를 다중 검출하여 질병을 진단하거나 약물을 선별하는데 활용될 수 있는바, 분자진단 등 의료진단 분야에 있어서, 널리 활용될 수 있다.

[0017] 구체적으로, 본 발명의 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 따르면, 100%에 이르도록 프로브를 수화겔 입자에 결합시킬 수 있고, 미반응 말단으로 인해 초래될 수 있는 표적 생체 분자의 비특이적 결합(false-positive signal)을 방지하며 검출에 사용될 핵심 물질의 고정화로 인한 검출 성능의 저하 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라, 표적 생체 분자의 검출 감도를 증가시키고, 검출 시간은 단축시킬 수 있으며, 특이도를 향상시킬 수 있고, 표적 생체 분자의 포획 성능을 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명의 수화겔 입자의 합성 과정 및 합성 후 입자 내부에 남아있는 미반응 말단을 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 수화겔 입자의 합성 후 남아있는 미반응 말단을 이용한 프로브의 결합 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 수화겔 입자의 치수 및 코드 영역의 개요도이다.
- 도 4의 A는 시간에 따라 티올-엔 반응을 통해 프로브가 붙는 키네틱스(kinetics)를 나타내고, 도 4의 B는 기존 입자와 티올-엔 입자의 형광 신호를 비교하여 나타낸 것이다.
- 도 5의 A는 염(NaCl) 농도에 따른 기존의 입자와 티올-엔 입자의 형광 신호를 비교하여 나타낸 것이고, 도 5의 B는 특이도 시험 결과이다.
- 도 6의 A는 반응 시간에 따른 기존의 입자와 티올-엔 입자의 형광 신호를 비교하여 나타낸 것이고, 도 6의 B는 검출 감도 시험 결과로, 가로축과 평행한 그래프는 각각의 대조군(control) 입자에서 나오는 신호의 표준 편차를 3배한 값이다.
- 도 7은 기존의 입자와 티올-엔 입자의 항체 응집 정도를 비교하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0022] 본 발명은 일 관점에서 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 단계를 포함하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법에 관한 것이다. 프로브의 원활한 탑재, 표적 생체 분자의 자유로운 물질 전달이 가능하도록 수화겔 입자의 공극 크기를 결정하여, 가용 범위의 공극이 구성된 수화겔 입자를 사용한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 합성된 수화겔 입자에 잔존하는 미반응 말단을 이용하여 프로브를 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다. 구체적으로, 미반응 말단의 탄소-탄소 이중결합($C=C$)과 프로브의 작용기 사이의 공유 결합에 의해, 합성된 수화겔 입자에 프로브가 결합한다(도 1 및 2).
- [0024] 본 발명에 있어서, 프로브가 라디칼 반응 또는 자발적으로 이루어지는 용액 상 전자의 이동을 통해 합성된 수화겔 입자에 가교되는 것을 특징으로 할 수 있고, 프로브가 라디칼 반응을 통해 합성된 수화겔 입자에 가교되는 경우, UV 조사를 통한 광개시제의 개시 또는 열에너지를 이용한 온도개시제의 개시를 통해 공유결합이 이루어지고, 프로브가 용액 상 전자의 이동을 통해 합성된 수화겔 입자에 가교되는 경우, 수용액 또는 극성 용매의 전자가 친핵체로 작용하여 공유결합이 이루어지는 것을 특징으로 할 수 있다. 아울러, 바람직하게는 탑재할 프로브가 가장 안정적으로 보존될 수 있는 적합한 온도인, 0 내지 90 °C에서 가교가 이루어지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서, 용어 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 프로브는 DNA, RNA, 단백질 또는 차후 프로브를 결합하기 위한 화학적 반응기를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 전구체 유체를 주입하여 정지 유체 리소그래피(stop flow lithography, SFL)를 통해 수화겔 입자를 합성하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 전구체 유체를 채널 안으로 흘려준 뒤, 마스크를 이용하여 채널 안 유체에 UV를 조사시켜, 수화겔 입자 합성 후 프로브를 결합시킨 본 발명의 수화겔 입자를 제조한다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 전구체 유체는 메타아크릴레이트기(methacrylate group) 또는 아크릴레이트기(acrylate group)를 함유하는 광경화성 모노머 및 광개시제를 포함할 수 있다. 광경화성 모노머는 일례로, 폴리에틸렌글리콜 모노머, MPC(2-methacryloyloxyethyl phosphoryl choline) 모노머, 또는 그 혼합물일 수 있다. 이때, 전구

체 유체는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)과 같은 공극제 (Porogen) 및 탈이온수(DI water)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 한편, 전구체 안의 광경화성 모노머는 서로 다른 종류로, 복수 개가 포함될 수도 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 수화겔 입자는 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형 디자인으로 구성된 것을 특징으로 할 수 있고, 코드는 기하학적 코드를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 기하학적 코드는 여러 종류의 도형의 조합을 이용하여 구성하는 것을 특징으로 할 수 있다. 미반응 말단은 수화겔 입자에 걸쳐 분포하므로, 종래와 같이 코드 영역과 프로브 영역을 나누어 설계할 경우 코드 영역의 신호가 검출 신호와 중첩될 수 있는 문제가 있으나, 본 발명은 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형으로 디자인된바 상기와 같은 문제를 해결할 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, 수화겔 입자가 기능성 나노 입자를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0031] 본 발명은 또 다른 관점에 있어서, 상기 방법에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 관한 것이다.

[0032] 본 발명은 다른 관점에 있어서, 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형 디자인으로 구성된 것을 특징으로 하는 부호화된 수화겔 입자에 관한 것이다.

[0034] [실시예]

[0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0037] 실시예 1: 엔코드 수화겔 입자의 합성 및 프로브 탑재

[0038] 1-1: 미세유체 장치의 제작

[0039] 수화겔 입자 합성을 위한 미세유체 장치를 오토캐드(AutoCAD, Autodesk, 미국)를 이용하여 설계하고, 포토마스크 필름(Han&All Technology, 한국)에 프린트하였다. 입자는 검출 신호가 밝게 나오면서 코드 구현을 위해 9개의 영역으로 나눌 수 있는 크기인, 가로와 세로 50um, 높이 20um으로 설계되었다(도 3). 음성 포토레지스트 SU-8 25(Microchem, 미국)로 코팅된 실리콘 웨이퍼를 이용하여 일반적인 포토리소그래피 공정으로 SU-8 마스터 몰드를 제작하였다. 미세유체 장치의 패턴을 포함하는 SU-8 마스터의 두께를 24 μm로 설계하였다. 10:1의 비율로 경화제와 혼합된 PDMS(Polydimethylsiloxane, Sylgard 184, Corning, 미국)를 SU-8 마스터 몰드에 부어, 70℃에서 8시간 동안 경화시켰다. 경화 공정 후에, 생검 펀치(직경 1 mm)로 구멍이 뚫린 패널로의 유체의 주입을 위하여 PDMS 슬랩(slab)을 SU-8 마스터 및 구멍으로부터 제거하였다. 그리고 나서, PDMS 슬랩을 부분적으로 경화된 PDMS-코팅된 슬라이드(20분, 70℃)와 결합시켰다. 최종적으로, 완전한 경화를 위하여 PDMS 장치를 밤새 굳혔다.

[0041] 1-2: 수화겔 입자의 합성

[0042] 정지 유체 리소그래피(Stop Flow Lithography, SFL)를 통해 수화겔 입자를 합성하였다(K. W. Bong et al., Lab Chip, 2011, 11, 743-747). 간략하게, SFL을 수행하기 위하여, 미세유체 장치 내 유체의 흐름을 제어하기 위한 광원 및 압력 조절기(ITV0031-3BL, SMC pneumatics, 일본)로서 UV 발광 다이오드(Thorlabs, 영국)를 사용하였다. 동기화된 방식으로 UV LED 및 압력 조절기를 제어하기 위하여 자체 제작된 회로 보드 및 랩뷰(LabView, National Instrument, 미국) 코드를 사용하였다. 역전 현미경(Axiovert 200, Zeiss, 독일)에 탑재된 필름 포토마스크(Hanall Technology, 한국)를 통해 UV LED에 의해 수화겔 입자를 합성하였다. SFL 동안, 전구체 용액이 채널 안에 정지할 때, UV(4 mW/cm²)의 주기적 방출(50 ms)에 의해 입자를 합성하였다.

[0043] 전구체 용액은 20% (v/v) PEG700DA(polyethylene glycol diacrylate, Sigma Aldrich, 미국), 공극제(porogen)로서 40% (v/v) PEG200(Polyethylene glycol, Sigma Aldrich), 광개시제로서 5% Darocur 1173(Sigma Aldrich), 35% 탈이온수(DI water)로 구성되었다. 합성된 수화겔 입자를 5x PBS 완충용액(Sigma Aldrich) 및

0.05% (v/v) 트윈-20(Sigma Aldrich)으로 구성된 200 μ L의 혼합물(5x PBST 완충용액)로 미리 채워진 마이크로 튜브관에 수집하였다. 수집된 입자를 약 1분 동안 볼텍싱하고 원심분리하였다. 그 후 150 μ L의 상청 완충용액을 제거하고, 같은 부피의 새로운 5x PBST에 재부유하여 입자를 행구었다. 행구는 단계를 5번 반복하였다. 최종적으로, 사용 전에, 140 μ L의 5x PBST에 수화젤 입자를 저장하였다.

[0044] miRNA 검출을 위하여, 종래의 방법을 이용하여 miRNA 검출용 수화젤 입자를 합성하였다(Y. H. Roh et al., Analyst, 2016, 141, 4578-4586). 20% (v/v) PEG700DA, 40% (v/v) PEG200, 5% (v/v) 광개시제 및 35% (v/v) 3x Tris EDTA (TE) 완충용액(Sigma aldrich)으로 구성된 전구체 용액을 9:1의 부피비로 아크리다이트-개질된 ssDNA 올리고머(Integrated DNA technologies)와 혼합하였다. 그 후 상기와 같이 동일한 UV 강도 및 노출 시간 조건으로 수화젤 입자를 제조하였다.

[0046] 1-3: 프로브 탑재

[0047] 수화젤 입자에 ssDNA 프로브를 고정시키기 위하여, 티올-엔 마이클 첨가 반응을 이용하였다. 활성 메르캅토기(sulfhydryl group)를 형성하기 위하여, 티올-변형 ssDNA 올리고머(Integrated DNA technologies, 미국)를 0.5M 트리스[2-카르복시에틸] 포스파인(Tris[2-carboxyethyl] phosphine, Thermo Fisher Scientific, 미국)에서 환원시켰다. 그 후, 환원된 올리고머를 ~7 입자/ μ L의 농도로 140 μ L 완충용액에 부유된 수화젤 입자와 혼합시켰다. 최종 혼합 용액을 열 교반기(thermo shaker, Hangzhou Allsheng Instruments Co. Ltd, 중국)에서 37 $^{\circ}$ C의 일정한 온도에서 1,500 rpm으로 교반하면서 배양하였다. 모든 잠재적인 오염을 방지하기 위하여, 뉴클레아제가 존재하지 않는 물, 오토클레이브된 피펫 팁 및 마이크로튜브를 사용하였다.

[0049] 실시예 2: 프로브가 탑재된 수화젤 입자에 대한 분석

[0050] 2-1: miRNA 검출 분석(miRNA detection assay)

[0051] miRNA 검출은 총 부피 50 μ L에 대해서 수행하였다. 먼저, 1x TE 완충용액(Sigma Aldrich) 및 0.05% (v/v) 트윈-20으로 구성된 40 μ L 1xTET 완충용액을 각각의 마이크로튜브에 가하고, 5 μ L의 타겟 miRNA를 첨가해 주었다. miRNA 분석방법의 검출 감도는 miRNA, NaCl의 농도 및 혼성화 시간을 달리하여 평가하였다. 혼합물을 열 교반기에서 95 $^{\circ}$ C로 5분 동안 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 이후에, 프로브가 탑재된 수화젤 입자 및 기존 수화젤 입자(타겟 당 ~50 입자)을 마이크로튜브에 첨가하였다. 타겟 miRNA가 수화젤 입자 중 프로브와 혼성화되도록, 분석 마이크로튜브를 열 교반기에서 15분 내지 90분 동안 55 $^{\circ}$ C에서 1500 rpm으로 교반하면서 배양하였다.

[0052] NaCl 농도에 따른 효과를 관찰하기 위하여, 혼성화 완충용액 내 NaCl의 최종 농도를 50 mM 내지 350 mM으로 조정하였다. 55 $^{\circ}$ C에서 90분 동안 분석을 진행하였다. 혼성화 후에, 수화젤 입자를 50 mM NaCl을 함유하는 350 μ L의 1x TET로 3회 세척하고, 그 다음 245 μ L의 라이게이션 혼합물을 첨가하였다. 라이게이션 혼합물은 1350 μ L 1x TET, 150 μ L 10x NE 완충용액 2 (New England Biolabs, 미국), 250 nM ATP (New England Biolabs), 40 nM 유니버설 어댑터(Integrated DNA technologies), 및 800 U ml⁻¹ T4 DNA 리가아제(Thermo Fisher Scientific)로 구성되었다. 그리고 나서, 혼합물을 1500 rpm으로 교반하면서 열 교반기에서 45분 동안 21.5 $^{\circ}$ C에서 혼성화하였다. 또 다른 세척 단계 후에, 1xTE에 10배 희석된 스트렙타비딘-피코에리쓰린(streptavidin-phycoerythrin, SA-PE; Life Technologies, 미국)을 첨가하였다. 최종 배양 단계는 21.5 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 수행하였다. 세척 단계 후, 1xTET에 부유된 50 μ L의 수화젤 입자를 이미지 분석을 위해 사용하였다.

[0054] 2-2: 이미지 분석(image analysis)

[0055] 디지털 일안 반사식 (DSLR) 카메라(Eos 6D, Canon, 일본)를 이용하여 수화젤 입자의 RGB 형광 이미지를 얻었다. 프로그 영역으로부터 타겟 신호의 강도를 평가하기 위한 모노크롬 형광 이미지를 위하여, 과학 상보형 금속-산화-반도체(scientific complementary metal-oxide-semiconductor, sCMOS) 카메라(Prime, Photometrics, 미국)를 사용하였다. 두 카메라 모두 역전 현미경(Axiovert 200, Zeiss)에 연결하였다. 입자를 이미징하기 위하여 큐브 세트를 통해 LED 램프(HXP 120 V, Zeiss)를 필터링하였다. 다양한 분석 시간 및 NaCl 농도의 신호를 얻기 위하여, 1000 ms 노출 시간으로 4.5 mW/cm² LED 강도를 이용하였다. 분석 민감도 측정을 위하여, 300 ms 노출

시간으로 11 mW/cm² LED 강도를 이용하였다. 이미지 J 소프트웨어(National Institute of Health, 미국)를 이용하여 모노크롬 형광 이미지를 분석하였다.

[0057] 2-3: 분석 결과

[0058] 프로브를 전구체에 포함시켜 수화겔 입자를 제조하는 종래의 방법을 이용하여 제조된 수화겔 입자(이하, "기존의 입자"이라 함)에 비해, 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 탑재하여 제조된 수화겔 입자(이하, "티올-엔 입자"이라 함)의 경우, 프로브(single strand DNA)가 8.2배 이상 더 많이 결합한 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[0059] 또한, 핵산 검출에 있어서, NaCl의 농도를 50 mM 내지 350 mM로 달리하여 분석한 결과, NaCl 농도가 높아질수록 검출 감도는 증가하지만 검출 특이도는 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 기존의 입자와 달리, 낮은 NaCl 농도(200 mM)에서 최적의 신호를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다(도 5의 A).

[0060] 아울러, 처음에 들어가는 1XTET의 양이 25 µL로 4 종류의 마이크로RNA(let-7a, let-7b, let-7c 및 let-7d)가 1000 amol씩 첨가되고, 이 때 NaCl의 농도는 200 mM인 것을 제외하고는 miRNA 검출과 동일한 방법으로 특이도 시험을 수행한 결과, 최대 교차 반응성이 25%에서 15%로 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 5의 B).

[0061] 또한, 핵산 검출에 있어서, 분석 시간을 달리하여 분석한 결과, 티올-엔 입자는 동일한 형광 신호를 기존의 입자 보다 3배 이상 빠르게 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다(도 6의 A).

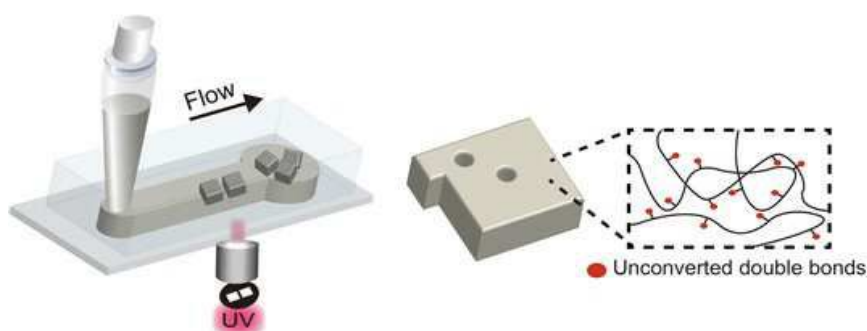
[0062] 아울러, 처음에 들어가는 1XTET의 양이 40 µL로, 기존 입자는 350 mM, 티올-엔 입자는 200 mM의 NaCl 농도로 각각 50, 100, 500, 1000 및 5000 amol을 스파이크-인(spike-in)하여 신호를 검출한 뒤, 타겟 농도에 따른 형광 신호 그래프를 외삽(extrapolation)하여 검출 감도를 확인한 결과, 티올-엔 입자(3.4 amol)의 경우, 검출 감도(limit of detection)가 기존의 입자(4.9 amol) 보다 향상된 것을 확인할 수 있었다(도 6의 B).

[0063] 또한, 단백질 검출에 있어서, 기존의 입자는 항체가 전구체와 상용성이 좋지 않아 응집하는 현상이 발생하였으나, 티올-엔 입자의 경우 응집현상이 해결되어 이에 따라 검출 감도도 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 7).

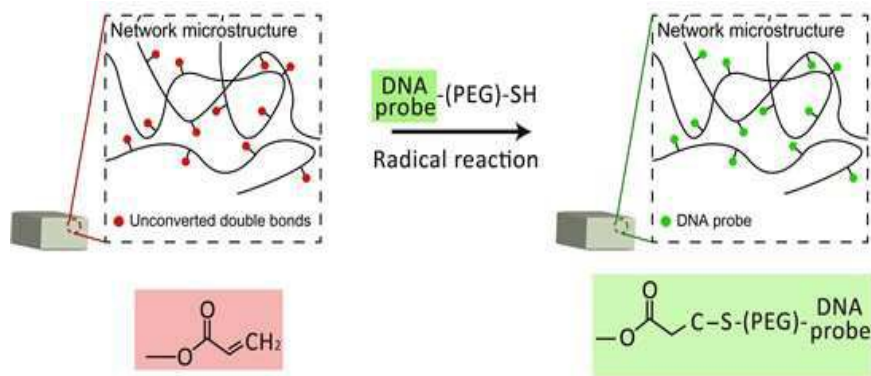
[0065] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

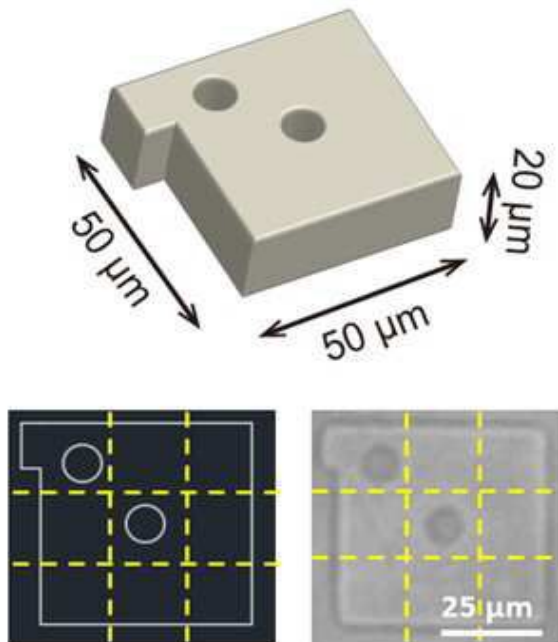
도면1



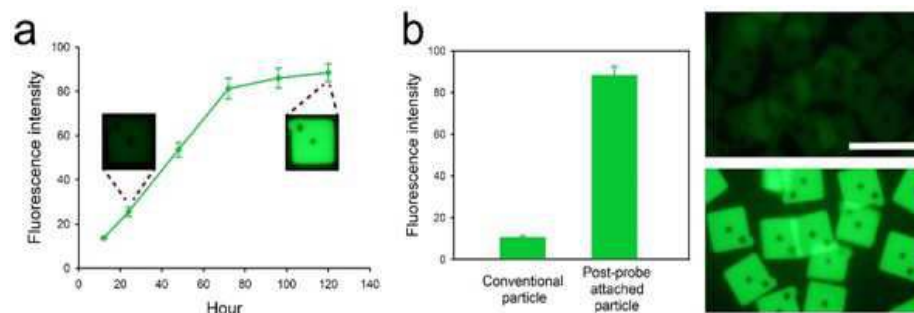
도면2



도면3

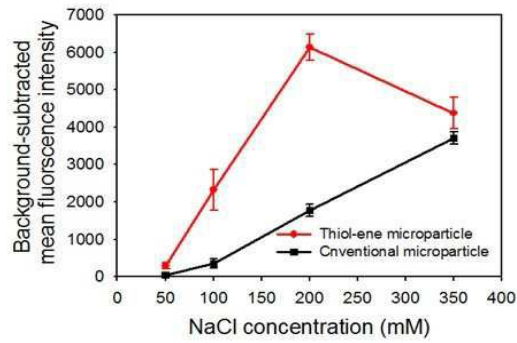


도면4

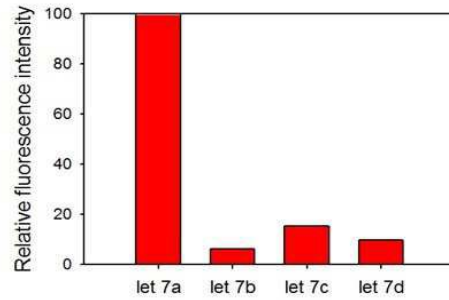


도면5

(A) NaCl concentration



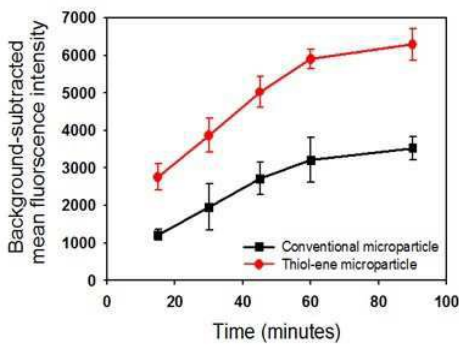
(B) Specificity test



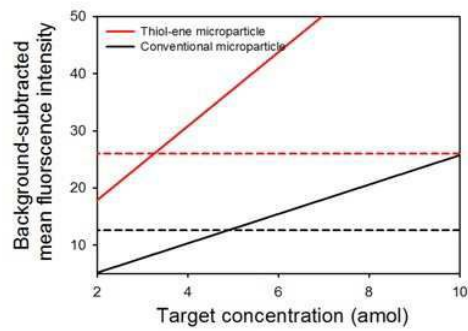
7a : UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
 7b : UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU
 7c : UGAGGUAGUAGGUUGUAUGUU
 7d : AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU

도면6

(A) Assay time



(B) Limit of Detection



도면7

