(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0131290
(43) 공개일자 2016년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/25 (2006.01) *C12N 15/115* (2010.01)
G01N 21/25 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/25 (2013.01)
C12N 15/115 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0063302
(22) 출원일자 2015년05월06일
심사청구일자 2015년05월06일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김주훈
서울특별시 서초구 남부순환로 2183, 201동 1105호(방배동, 방배래미안타워)
박세진
서울특별시 송파구 올림픽로 99, 133동 1401호(잠실동, 잠실엘스)
김준명
경기도 동두천시 행선로 100-21, 101동 1101호(생연동, 에이스아파트)
(74) 대리인
특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 17 항

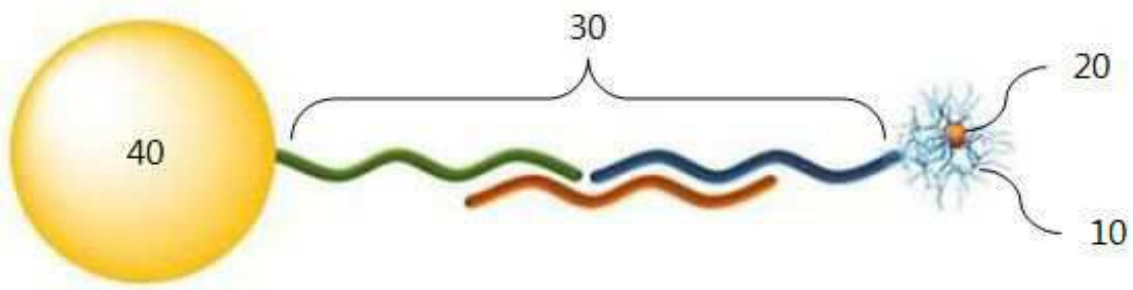
(54) 발명의 명칭 **생체 효소 기작을 배제한 ATP 측정용 기능성 미세 자성 입자 및 이를 이용한 ATP 측정 방법**

(57) 요 약

본 발명의 일 실시예는 덴드리머; 상기 덴드리머 내부에 위치하는 금속 나노입자; 상기 금속 나노입자에 연결되고 ATP와 선택적으로 결합하는 앱타머; 및 상기 앱타머에 연결되는 자성 비드;를 포함하는 ATP 측정용 미세 자성 입자를 제공한다.

또한, 본 발명의 다른 일 실시예는 (a) 상기 ATP 측정용 미세 자성 입자에 ATP를 첨가하여 금속 나노 입자를 포함한 덴드리머를 이탈시키는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 이탈된 상기 금속 나노 입자를 포함한 상기 덴드리머를 이용하여 비색법에 의한 색 변화를 측정하는 단계;를 포함하는 ATP 측정 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 21/251 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 C0186777
부처명 중소기업청
연구관리전문기관 한국산학연협회
연구사업명 산학연 도약 기술 개발 사업
연구과제명 생체 효소 기작을 배제한 ATP 측정용 기능성 미세자성입자 개발
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

덴드리머;

상기 덴드리머 내부에 위치하는 금속 나노입자;

상기 금속 나노입자에 연결되고 ATP와 선택적으로 결합하는 앱타머; 및

상기 앱타머에 연결되는 자성 비드;를 포함하는 ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 덴드리머가 말단에 아민기를 가지는 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 금속 나노입자가 백금 나노입자인 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 백금 나노입자가 백금 원자 8개 내지 300개로 이루어진 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 백금 나노입자가 캡슐화된 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 자성 비드가 코어로서의 구형지지체; 상기 코어의 표면에 형성된 자성물질막; 및 상기 자성물질막에 형성된 금막;을 포함하는 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 구형지지체의 직경이 1㎛ 내지 100㎛의 범위인 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 구형지지체가 폴리머로 이루어진 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 폴리머가 폴리메타크릴산 메틸 또는 그 공중합체인 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 폴리머가 폴리스티렌 또는 그 공중합체인 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 자성물질막이 상자성 금속 또는 금속 산화물로 이루어진 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 상자성 금속이 니켈인 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 금속 산화물이 산화철인 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 14

제6항에 있어서,

상기 자성물질막의 두께가 20㎚ 내지 20,000㎚의 범위인 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 15

제6항에 있어서,

상기 금막의 두께가 2㎚ 내지 10㎚의 범위인 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 16

제6항에 있어서,

상기 자성 비드의 비중이 1g/㎤ 내지 3g/㎤의 범위인 것을 특징으로 하는, ATP 측정용 미세 자성 입자.

청구항 17

(a) 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자에 ATP를 첨가하여 금속 나노 입자를 포함한 덴드리머를 이탈시키는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 이탈된 상기 금속 나노 입자를 포함한 상기 덴드리머를 이용하여 비색법에 의한 색 변화를 측정하는 단계;를 포함하는 ATP 측정 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생체 효소 기작을 배제한 ATP 측정용 기능성 미세 자성 입자 및 이를 이용한 ATP 측정 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] ATP(adenosine triphosphate)는 세포 내에서 효소를 촉매로 하는 다수의 반응에서 조효소로서 기능하여 당을 생성하는 등 세포 대사에서 다방면으로 중요한 역할을 수행한다.

[0003] 이러한 세포 내 ATP 양을 측정함으로써 대사 기능을 평가하는 것은 의약 스크리닝 및 독성학적 안정성 테스트에 필수적인 세포독성 측정방법으로 널리 이용되고 있다.

[0004] 또한, ATP 모니터링은 의약품, 생물학적 응답조절물질(biological respense modifier, BRM) 및 생물학적 화합물에 대한 세포파괴, 세포분열 및 증식효과를 평가하는 데 이용될 수 있다.

[0005] ATP의 합성량은 인체 내 세포의 건강 상태에 따라서 달라질 수 있다. 따라서, 정상적인 세포에서는 ATP의 레벨이 정확하게 조절될 수 있으나, 손상된 세포에서는 ATPase와 같은 ATP-변환효소를 세포 외부로 방출시킴으로써 ATP 합성이 감소될 뿐만 아니라 내재성 ATP의 급격한 고갈을 초래하여 세포 대사에 악영향을 미칠 수 있다.

[0006] 따라서, 세포 내 ATP 양에 대한 빠르고 정확한 측정은 세포독성 상태를 결정하는데 중요한 요인이 되며, 현재까지 세포 내 ATP를 측정할 수 있는 다수의 기술이 개발되어 왔다.

[0007] 예를 들어, ATP가 글리세롤을 인산화시켜 생성되는 물질의 흡광도 또는 형광도를 측정하는 방법이 개발되어 있으나, 이러한 방법은 세포를 파괴해야만 세포 내의 ATP를 측정할 수 있기 때문에, 연속적으로 살아있는 세포 내의 ATP 변화를 측정할 수 없다는 문제점이 있다.

[0008] 한편, 최근에는 형광 공명 에너지 전이(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)라는 현상을 유발하는 형광 센서를 유전자 도입을 이용하여 세포 내에서 발현시켜 세포 내의 ATP 변화를 실시간으로 측정할 수 있는 방법이 개발되었으나, 형광 이미징을 위해서는 여기광을 지속적으로 쬐어 주어야 하므로 장시간의 ATP 측정에는 한계가 있다는 문제점이 있다.

[0009] 이러한 문제점들을 개선하기 위하여 최근에는 반딧불에서 추출한 루시페아라제(luciferase)를 이용하는 방법이 개발되었다. 반딧불에서 추출한 루시페라아제는 ATP를 이용하여 루시페린(luciferin)이라는 기질을 산화시켜 560㎚ 파장을 갖는 빛을 발산하는 특성을 나타낸다. 상기 방법은 루시페라아제의 이러한 특성을 이용하여 루시페라아제를 발현하는 유전자를 세포 내에 도입하여 세포 내 ATP를 측정하는 방법이다. 이러한 발광 리포터를 이용하는 방법은 여기광을 필요로 하지 않기 때문에 장시간 세포 내의 ATP를 측정하는 데 유용하다.

[0010] 그러나, 생체 효소를 사용하여 세포 내 ATP를 측정하는 방법은 생체 효소의 특성상 장기간 보관하는 경우나 고온의 환경 등에서는 변성의 우려가 있기 때문에, 생체 효소를 사용하지 않고 세포 내 ATP를 측정하는 방법에 대한 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 생체 효소에 비해 향상된 촉매 활성을 지니고, 변성의 우려가 없으며, 생체 적합성 및 자성 세기 특성이 우수한 ATP 측정용 미세 자성 입자 및 이를 이용한 ATP 측정 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 일 측면은 덴드리머; 상기 덴드리머 내부에 위치하는 금속 나노입자; 상기 금속 나노입자에 연결되고 ATP와 선택적으로 결합하는 앱타머; 및 상기 앱타머에 연결되는 자성 비드;를 포함하는 ATP 측정용 미세 자성 입자를 제공한다.

[0013] 일 실시예에 있어서, 상기 덴드리머가 말단에 아민기를 가질 수 있다.

[0014] 일 실시예에 있어서, 상기 금속 나노입자가 백금 나노입자일 수 있다.

[0015] 일 실시예에 있어서, 상기 백금 나노입자가 백금 원자 8개 내지 300개로 이루어질 수 있다.

[0016] 일 실시예에 있어서, 상기 백금 나노입자가 캡슐화될 수 있다.

[0017] 일 실시예에 있어서, 상기 자성 비드가 코어로서의 구형지지체; 상기 코어의 표면에 형성된 자성물질막; 및 상기 자성물질막에 형성된 금막;을 포함할 수 있다.

[0018] 일 실시예에 있어서, 상기 구형지지체의 직경이 1㎛ 내지 100㎛의 범위일 수 있다.

[0019] 일 실시예에 있어서, 상기 구형지지체가 폴리머로 이루어질 수 있다.

[0020] 일 실시예에 있어서, 상기 폴리머가 폴리메타크릴산 메틸 또는 그 공중합체일 수 있다.

[0021] 일 실시예에 있어서, 상기 폴리머가 폴리스티렌 또는 그 공중합체일 수 있다.

[0022] 일 실시예에 있어서, 상기 자성물질막이 상자성 금속 또는 금속 산화물로 이루어질 수 있다.

[0023] 일 실시예에 있어서, 상기 상자성 금속이 니켈일 수 있다.

[0024] 일 실시예에 있어서, 상기 금속 산화물이 산화철일 수 있다.

[0025] 일 실시예에 있어서, 상기 자성물질막의 두께가 20nm 내지 20,000nm의 범위일 수 있다.

[0026] 일 실시예에 있어서, 상기 금막의 두께가 2nm 내지 100nm의 범위일 수 있다.

[0027] 일 실시예에 있어서, 상기 자성 비드의 비중이 1g/㎤ 내지 3g/㎤의 범위일 수 있다.

[0028] 또한, 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 다른 일 측면은 (a) 본 발명의 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자에 ATP를 첨가하여 금속 나노 입자를 포함한 덴드리머를 이탈시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 이탈된 상기 금속 나노 입자를 포함한 상기 덴드리머를 이용하여 비색법에 의한 색 변화를 측정하는 단계;를 포함하는 ATP 측정 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 일 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자는 덴드리머, 금속 나노 입자, 앱타머, 자성 비드를 포함함으로써 생체 효소 기작을 배제하면서 생체 효소보다 높은 촉매 활성을 지니고, 열 안정성 및 저장 안정성이 향상된 ATP 측정용 조성물을 제공할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자는 자성 비드의 금속 쉘의 최외층을 금으로 제작하여 생체 적합성 및 자성 세기 특성이 우수한 ATP 측정용 조성물을 제공할 수 있다.

[0031] 나아가, 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 ATP 측정 방법은 ATP를 첨가함으로써 이탈되는 금속 나노 입자를 포

함한 덴드리머 촉매를 이용하여 비색법에 의한 색 변화를 측정함으로써 생체 효소 기작을 배제한 ATP 측정 방법을 제공할 수 있다.

[0032] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자를 도식화한 것이다.

도 2는 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 ATP 측정 방법을 도식화한 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자에 포함된 백금 나노입자의 적외선-가시광선 분광(UV-Vis) 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자에 포함된 촉매와 반응한 TMB 용액의 적외선-가시광선 분광(UV-Vis) 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 따른 촉매의 비색법 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 따른 촉매의 열처리 전 비색법 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 따른 촉매의 열처리 후 비색법 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자에 포함된 촉매의 시간 경과에 따른 침전 여부를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자에 포함된 자성 비드에 형광 표지된 DNA가 부착되기 전(좌)과 부착된 후(우)의 형광 현미경 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자에 ATP를 추가한 후(좌)와 추가하기 전(우)의 비색법 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예 및 비교예에 따른 촉매의 TEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자에 포함된 자성 비드의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자에 포함된 자성 비드의 EDS 및 TEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자에 포함된 자성 비드의 표면을 EDS에 의해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0035] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0036] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[0037] ATP 측정용 미세 자성 입자

[0038] 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자가 덴드리머(10); 상기 덴드리머(10) 내부에 위치하는 금속 나노입자(20); 상기 금속 나노입자(20)에 연결되고 ATP와 선택적으로 결합하는 앱타머(30); 및 상기 앱타머(30)에 연결되는 자성 비드(40);를 포함할 수 있다.

[0039] 상기 덴드리머(10)와 상기 금속 나노입자(20)가 결합된 구성은, 과산화수소를 산화제로 사용하여 TMB(3,3,5,5-tetramethylbenzidine) 기질을 산화시키는 반응을 이용한 비색법 측정에 있어서, 촉매로서 기능함으로써 신호를 증폭시킬 수 있고, 상기 앱타머(30)는 ATP를 포획하는 기능을 수행할 수 있으며, 상기 자성 비드(40)는 본 발명의 실시예에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자의 합성 여부를 측정하기 위한 물질로서의 기능을 수행할 수 있다.

[0040] 본 명세서에서 사용된 용어 “덴드리머”란, 중심에서부터 나뭇가지 모양의 일정한 단위구조가 반복적으로 뻗어 나오는 고분자로, 중심이 비어 있고 외부는 다양한 화학 단위와 반응할 수 있는 반응기가 존재하는 고분자를 의미한다.

[0041] 또한, 상기 덴드리머(10)의 열린 구조로 인해 촉매 반응에 관여하는 금속 나노 입자의 출입이 자유로운 특성을 이용하여 상기 덴드리머(10)를 전달자로 사용함으로써 높은 촉매 활성을 유지할 수 있다. 즉, 덴드리머(10)는 전달자로서의 기능을 수행하고, 금속 나노입자(20)가 촉매로서의 기능을 수행할 수 있다.

[0042] 본 명세서에서 사용된 용어 “비색법”이란, 미지의 시료용액 및 기지의 표준용액에 적당한 시약을 가하는 등으로 착색시켜 양자의 색깔의 농도와 색조를 투과광이나 반사광으로 비교하여 정성 및/또는 정량 분석하는 방법을 의미하며, 본 명세서에서는 덴드리머(10) 내부에 위치하는 금속 나노입자(20)를 촉매로 하여 과산화수소에 의한 TMB 기질 의 산화 반응이 진행되어 생성된 푸른색 산화물의 농도를 육안으로 관찰하는 방법을 의미한다.

[0043] 상기 덴드리머(10) 내부에 위치하는 금속 나노입자(20)를 구성하는 금속 이온의 양과 용액 내 덴드리머의 화학량론적 양을 조절하면 생성되는 금속 나노입자의 크기를 제어할 수 있다.

[0044] 상기 덴드리머(10)는 말단에 아민기, 카르복실기, 하이드록실기, 티올기 등의 작용기를 가질 수 있으나, 이에 한정되지 않고 다양한 소수성 및 친수성 작용기를 함유할 수 있다. 바람직하게는 말단에 아민기를 가질 수 있으며, 더욱 바람직하게는 폴리아미도아민(PAMAM) 덴드리머일 수 있다. 상기 덴드리머(10)가 말단에 아민기를 가지는 경우, 선상 폴라아민에 비해 다량의 금속 나노입자(20)를 대칭적으로 고정화시킬 수 있다.

[0045] 상기 폴리아미도아민 덴드리머는 1 내지 10의 세대를 가지는 덴드리머로, 바람직하게는 6세대의 폴리아미도아민 덴드리머가 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 명세서 사용된 용어 “세대”란, 덴드리머가 성장하는 단계를 의미하는 것으로, 일정하게 반복되는 단위 구조가 추가될 때마다 한 세대가 증가하고, 한 세대가 증가할 때마다 덴드리머의 직경이 약 1nm씩 증가하며, 반응기를 가지는 분지수가 증가한다.

[0046] 일 실시예에 있어서, 상기 금속 나노입자(20)가 백금 나노입자일 수 있다. 백금 나노입자를 사용하여 비색법에 의한 색 변화를 관찰하는 경우, TMB 기질과의 반응성에 있어서 우수한 선택성을 부여할 수 있기 때문에 보다 뚜렷한 색 변화를 관찰할 수 있다.

[0047] 일 실시예에 있어서, 상기 백금 나노입자가 백금 원자 8개 내지 300개, 바람직하게는 50개 내지 260개, 더욱 바람직하게는 240개로 이루어진 클러스터일 수 있다. 도 11을 참조하면, 상기 백금 원자의 개수가 증가할수록 백금 나노입자의 크기가 증가하며, 하기 실험예 1에 따르면 백금 나노입자의 크기가 증가할수록 비색법에 의한 색 변화를 관찰하는 경우, TMB 기질과의 반응성에 있어서 촉매 활성이 증가하여 보다 뚜렷한 색 변화를 관찰할 수 있다.

[0048] 일 실시예에 있어서, 상기 백금 나노입자가 캡슐화될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 “캡슐화”란, 금속 나노입자가 규칙적인 분지구조를 가진 덴드리머의 분지들에 의해 둘러싸인 것을 의미하며, 상기 캡슐화에 의해 생체 효소에 비해 시간 경과나 온도의 변화 등 환경 변화에 따른 변성의 우려가 감소할 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 사용된 용어 “앱타머”란, 단일 및/또는 이중 나선의 DNA 또는 RNA 형태로 표적 단백질과의 3차원적 결합을 통해 단백질의 상호작용을 억제하는 생고분자 물질을 의미하며, 본 명세서에서는 표적 분자인 ATP 및 자성 비드(40)와 선택적으로 결합할 수 있는 물질, 바람직하게는 DNA를 의미할 수 있다.

[0050] 일 실시예에 있어서, 상기 자성 비드(40)가 코어로서의 구형지지체; 상기 코어의 표면에 형성된 자성물질막; 및 상기 자성물질막에 형성된 금막;을 포함하고, 상기 구형지지체, 자성물질막, 및 금막은 명확한 층상 구조를 형

성할 수 있다.

[0051] 자성 비드를 이용하여 검출 대상 물질의 양을 측정하기 위한 방법으로, 자성 비드 상에 분리 농축된 검출 대상 물질로 인해 발생하는 형광 세기를 측정하는 방법이 사용될 수 있다. 구체적으로, 적정 파장의 입사광을 자성 비드에 조사하여 방출되는 현광을 광학 현미경으로 측정하고, 그 세기를 자성 비드의 면적으로 나누어 현광 세기의 밀도를 계산하는 방법이 사용될 수 있다. 이러한 과정을 수행하기 위해서는 자성 비드의 크기가 광학 현미경으로 관측 조작이 가능한 ㎛ 단위의 일정한 크기를 갖고, 균일한 형태의 구형일수록 바람직하다.

[0052] 도 12를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드(40)가 균일한 크기를 가지는 구형의 물질일 수 있다.

[0053] 상기 자성 비드(40)가 금속으로만 이루어진 경우, 비중이 증가하여 사용상의 불편함이 따르고, 제조 비용이 증가하게 되는 점을 개선하기 위해 자성 비드(40)의 내부에 상대적으로 비중이 낮고, 비용이 저렴한 구형지지체가 포함될 수 있다.

[0054] 바람직하게는, 상기 구형지지체의 직경이 1㎛ 내지 100㎛의 범위를 가지는 폴리머로 이루어질 수 있고, 더욱 바람직하게는, 상기 폴리머가 폴리메타크릴산 메틸 또는 그 공중합체이거나, 폴리스티렌 또는 그 공중합체일 수 있다.

[0055] 상기 자성물질막은 상기 자성 비드(40)에 강한 자성을 부여함으로써, 용액에 분산되어 사용된 후, 외부 자기력을 인가하여 회수 및 분리함으로써 재활용될 수 있다.

[0056] 바람직하게는, 상기 자성물질막의 두께가 20nm 내지 20,000nm의 범위인 상자성 금속 또는 금속 산화물로 이루어질 수 있고, 더욱 바람직하게는, 니켈 또는 산화철로 이루어질 수 있다.

[0057] 상기 자성물질막의 두께가 증가함에 따라 상기 자성 비드(40)의 자성 세기가 증가할 수 있다. 자성 비드(40)의 자성 세기가 충분하기 위해서는 일정 두께 이상의 자성물질막이 형성되어야 한다. 상기 구형지지체의 직경이 1㎛인 경우 자성물질막은 20nm 이상의 두께가 필요하며, 구형지지체의 직경이 증가하면 자성물질막의 두께도 증가해야 한다. 다만, 자성물질막의 두께가 제한 없이 증가하게 되면 상기 자성 비드(40)의 비중이 과도하게 증가하여, 직경 100㎛의 구형지지체의 경우 자성물질막의 두께는 최대 20,000nm가 될 수 있다.

[0058] 상기 금막은 자체 형광이 존재하지 않고, 비활성 금속으로서 반응성이 낮으며, 비특이적 결합을 최소화시킬 수 있어 바탕 형광을 최소화시킴으로써 분석 정확도를 향상시킬 수 있다.

[0059] 또한, 상기 금막은 자성 비드(40)의 외부를 완벽히 덮어 내부의 구형지지체 코어와 자성 물질막이 외부에 노출되지 않도록 할 수 있다. 나아가, 상기 자성 비드(40)의 최외면의 금 원자와 상기 앱타머(30)에 포함된 황 원자 간의 우수한 결합력을 통해 자성 비드(40)의 표면에 앱타머(30)를 용이하게 도입 및 고정시킬 수 있다.

[0060] 바람직하게는, 상기 금막의 두께가 2nm 내지 100nm의 범위일 수 있다. 상기 금막의 두께가 2nm 미만이면 내부의 구형지지체 코어와 자성 물질막이 외부에 노출될 수 있으며, 100nm 초과이면 상기 자성 비드(40)의 비중이 과도하게 증가하고 제조 비용이 증가할 수 있다.

[0061] 바람직하게는, 상기 자성물질막이 구형지지체 직경 대비 0.02 내지 0.2의 비율로 막이 형성될 수 있다. 구형지지체 직경 대비 자성물질막이 상기 범위로 형성되는 경우, 충분한 자성을 가지면서 동시에 낮은 비중을 유지할 수 있다.

[0062] 바람직하게는, 상기 자성 비드(40)의 비중이 1g/㎤ 내지 3g/㎤의 범위일 수 있다. 자성 비드(40)의 비중이 금속 또는 금속 산화물에 비해 낮게 유지됨으로써, 분석 기법을 수행함에 있어서 유체에 혼합되어 이동, 선별, 수집되는 과정이 효과적으로 수행될 수 있다.

[0063] 도 13및 도 14를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드(40)가 구형지지체, 자성물질막, 금막으로 이루어진 층상구조이며, 최외층이 금막으로 이루어진 구조임을 확인할 수 있다.

[0064] ATP 측정 방법

[0065] 도 2를 참조하면, 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 ATP 측정 방법이 (a) 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 ATP 측정용 미세 자성 입자에 ATP를 첨가하여 금속 나노 입자를 포함한 덴드리머(10)를 이탈시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 이탈된 상기 금속 나노 입자를 포함한 덴드리머(10)를 이용하여 비색법에 의한 색 변

화를 측정하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0066] 상기 (a) 단계에서, 상기 ATP 측정용 미세 자성 입자의 앱타머(30)가 ATP와 결합을 하게 되면 덴드리머(10) 내부에 결합된 금속 나노입자(20) 촉매는 ATP 유도 치환(ATP-induced dislpacement) 반응에 의하여 상기 미세 자성 입자로부터 분리될 수 있다.

[0067] 상기 (b) 단계에서, 이탈된 상기 덴드리머(10) 내부에 결합된 금속 나노입자(20) 촉매를 TMB 용액 및 과산화수소와 혼합하여 비색법을 수행하면 TMB 기질이 산화되어 푸른색을 띠는 산화물이 생성될 수 있다.

[0068] 이하, 본 발명의 실시예에 관하여 상세히 설명하기로 한다.

[0069] 실시예 1

[0070] 6세대 PAMAM 덴드리머(10㎛M) 용액에 K_2PtCl(2400㎛M)을 첨가하여 76시간 동안 혼합하고, 20배 몰량을 초과하는 양(20-fold molar excess)의 $NaBH_4$를 서서히 가하였다. 이후, HCl을 가하여 중화반응을 진행시키고, 24시간 동안 환원시킨 후, 24시간 동안 투석시켜, 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매(백금 원자 240개)를 제조하였다.

[0071] 비교예 1

[0072] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매를 제조하되, 출발물질로 K_2PtCl(80㎛M)을 사용하여 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매(백금 원자 8개)를 제조하였다.

[0073] 비교예 2

[0074] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매를 제조하되, 출발물질로 K_2PtCl(150㎛M)을 사용하여 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매(백금 원자 15개)를 제조하였다.

[0075] 비교예 3

[0076] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매를 제조하되, 출발물질로 K_2PtCl(550㎛M)을 사용하여 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매(백금 원자 55개)를 제조하였다.

[0077] 비교예 4

[0078] 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매를 제조하되, 출발물질로 K_2PtCl(1200㎛M)을 사용하여 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매(백금 원자 120개)를 제조하였다.

[0079] 실험예 1 : 백금 나노입자의 크기에 따른 적외선-가시광선(UV-Vis) 분광 분석 및 비색법에 의한 색 변화 측정

[0080] 상기 실시예 1 및 비교예 1~4에 따라 제조된 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매에 포함된 백금 나노입자 및 TMB 용액에 대한 적외선-가시광선 분광 분석을 수행하고, 각각의 흡광도를 측정하여 그 결과를 하기 도 3 및 도 4에 나타내었고, TMB 기질에 대한 각각의 촉매 활성을 비색법을 이용한 색 변화를 관찰하여 그 결과를 하기 도 5에 나타내었다.

[0081] 도 3을 참조하면, 백금 나노입자 내에 포함되는 백금 원자의 수가 증가할수록, 즉, 백금 나노입자의 크기가 커질수록 백금 나노입자의 특징적인 260㎚에서 흡광 스펙트럼이 일정하게 증가하는 것을 확인하였다.

[0082] 또한, 도 4를 참조하면, 백금 나노입자의 크기가 커질수록, TMB 용액의 특징적인 652㎚에서 흡광 스펙트럼이 빠른 시간 내에 증가하는 것을 확인하였다.

[0083] 나아가, 도 5를 참조하면, 백금 나노입자의 크기가 커질수록, 비색법에 의한 색 변화가 뚜렷해지는 것을 확인하였다.

[0084] 따라서, 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자의 크기가 커짐에 따라 TMB 기질에 대한 촉매 활성이 증가하는 것으로 분석된다.

[0085] 비교예 5

[0086] 상기 실시예 1에 따라 제조된 촉매 대신에, 생체 효소인 호스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroidase, HRP)가 포함된 완충 용액을 준비하였다.

[0087] 비교예 6

[0088] 촉매가 포함되지 않은 완충 용액을 준비하였다.

[0089] 실험예 2 : 열처리 여부에 따른 촉매 활성 측정

[0090] 상기 실시예 1 및 비교예 5~6에 따라 제조된 촉매를 열처리 전과 후로 나누어 비색법에 의한 색 변화를 측정하였고, 그 결과를 각각 하기 도 6 및 도 7에 나타내었다.

[0091] 도 6을 참조하면, 열처리 전에는 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매와 생체 효소인 HRP는 모두 TMB 기질에 대한 비색법 측정에 따라 색 변화가 관찰되었고, 이는 촉매 활성이 나타나는 것으로 분석된다.

[0092] 그러나, 도 7을 참조하면, 열처리 후에는 생체 효소인 HRP는 TMB 기질에 대한 촉매 활성이 급격하게 감소하여 비색법 측정에 따른 색 변화가 관찰되지 않은 반면에, 본 발명의 일 실시예에 따른 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매는 촉매 활성이 유지됨을 확인하였다.

[0093] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매는 생체 효소에 비해 열 안정성이 우수한 것으로 분석된다.

[0094] 실험예 3 : 촉매의 종류에 따른 촉매 활성 측정

[0095] 상기 실시예 1 및 비교예 5에 따라 제조된 촉매의 활성도를 미카엘리스 상수(Michaelis constant, K_M) 값을 구하여 측정하였고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0096]

촉매	기질	K_M(mM)
실시예 1	TMB	0.091
	H_2O_2	80.25
비교예 5	TMB	0.434
	H_2O_2	3.70

[0097] 표 1을 참조하면, 본 발명의 실시예에 따른 촉매가 생체 효소인 HRP에 비해 약 21배 향상된 활성을 보이며, 최대 활성을 나타내기 위해서는 보다 많은 양의 과산화수소가 필요한 것으로 분석된다.

[0098] 실험예 4 : 시간 경과에 따른 침전 여부 측정

[0099] 상기 실시예 1에 따라 제조된 촉매를 상온에서 보관하여 1개월, 2개월, 4개월 경과 후 백금 나노입자의 침전여부를 측정하였고, 그 결과를 하기 도 8에 나타내었다.

[0100] 도 8을 참조하면, 본 발명의 실시예에 따른 촉매는 상온에서 장기간 보관하여도 침전이 생기지 않으므로, 생체효소에 비해 저장 안정성이 우수한 것으로 분석된다.

[0101] 실시예 2

[0102] 상기 실시예 1에 따라 제조된 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매에 5' 말단 인산화된 올리고뉴클레오티드, EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), 및 이미다졸을 첨가하여 DNA를 고정화시키고, 이후 폴리메타크릴산 메틸 구형지지체(직경 50㎛), 니켈막(두께 500㎚), 및 금막(두께 30㎚)이 순차로 적층된 자성 비드를 첨가하여 ATP 측정용 미세 자성 입자를 제조하였다.

[0103] 실험예 5 : 미세 자성 입자의 합성 여부 및 작동 여부 분석

[0104] 상기 실시예 2에 따라 제조된 ATP 측정용 미세 자성 입자의 합성 과정을 제타 포텐셜(zeta potential) 값의 측정을 통해 분석하여 그 결과를 하기 표 2에 나타내었고, 자성 비드와 앱타머의 결합 여부를 형광 표지를 통해 관찰하여 그 결과를 하기 도 9에 나타내었다.

[0105] 나아가, ATP 측정용 미세 자성 입자의 작동 여부를 비색법을 통해 분석하여 그 결과를 하기 도 10에 나타내었다.

표 2

[0106]

식별 기호	제타 포텐셜(mV)
1	-17.2
2	-20.4
3	-15.4
4	-17.8

[0107] 상기 표 2에서, 각각의 식별기호는 합성 과정에서 하기와 같은 상태를 의미한다. (1 : 자성 비드만 존재, 2 : 자성 비드에 DNA가 고정화, 3 : DNA가 고정화된 자성 비드에 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자가 도입된 ATP 측정용 미세 자성 입자, 4 : ATP 측정용 미세 자성 입자에 ATP를 처리)

[0108] 표 2를 참조하면, 자성 비드에 DNA를 첨가하면 제타 포텐셜 값이 -17.2mV에서 -20.4mV로 값이 이동하는 것을 확인하였다. 이는 DNA가 자성 비드에 고정되었고, DNA에 포함된 인산염에 의해 음의 방향으로 값이 이동된 것으로 분석된다.

[0109] 나아가, 도 9를 참조하면, 형광 표지를 포함하는 DNA를 자성 비드만이 존재하는 용액에 첨가하기 전에는 어떠한 물질도 확인되지 않는 반면에, 형광 표지를 포함하는 DNA를 첨가한 후에는 형광 물질이 확인되었다. 이를 통해 DNA가 자성 비드에 고정된 것을 확인하였다.

[0110] 다음으로, DNA가 고정된 자성 비드에 덴드리머 내부에 캡슐화된 백금 나노입자 촉매를 첨가하면 제타 포텐셜 값이 -20.4mV에서 -15.4mV로 값이 이동하는 것을 확인하였다. 이는 촉매가 DNA에 고정되었고, 덴드리머 말단의 아민기의 영향을 받아 양의 방향으로 값이 이동된 것으로 분석된다. 또한, ATP 측정용 미세 자성 입자가 합성된 것으로 분석된다.

[0111] 합성된 ATP 측정용 미세 자성 입자에 ATP를 첨가하면 제타 포텐셜 값이 -15.4㎷에서 -17.8㎷로 값이 이동하는 것을 확인하였다. 이는 ATP 유도 치환 반응에 의해 촉매가 이탈되고, ATP가 DNA와 결합하여 음의 방향으로 값이 이동된 것으로 분석된다.

[0112] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0113] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

부호의 설명

[0114] 10 : 덴드리머

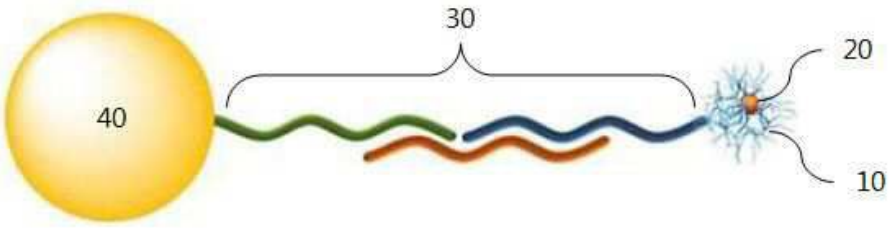
20 : 금속 나노 입자

30 : 앱타머

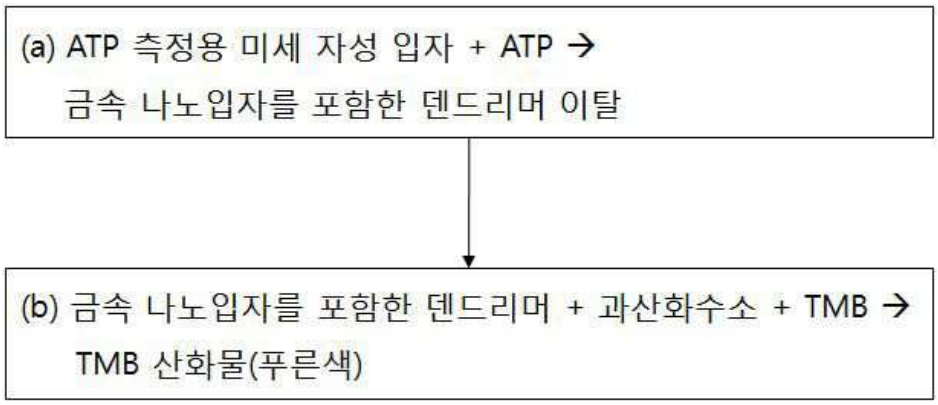
40 : 자성 비드

도면

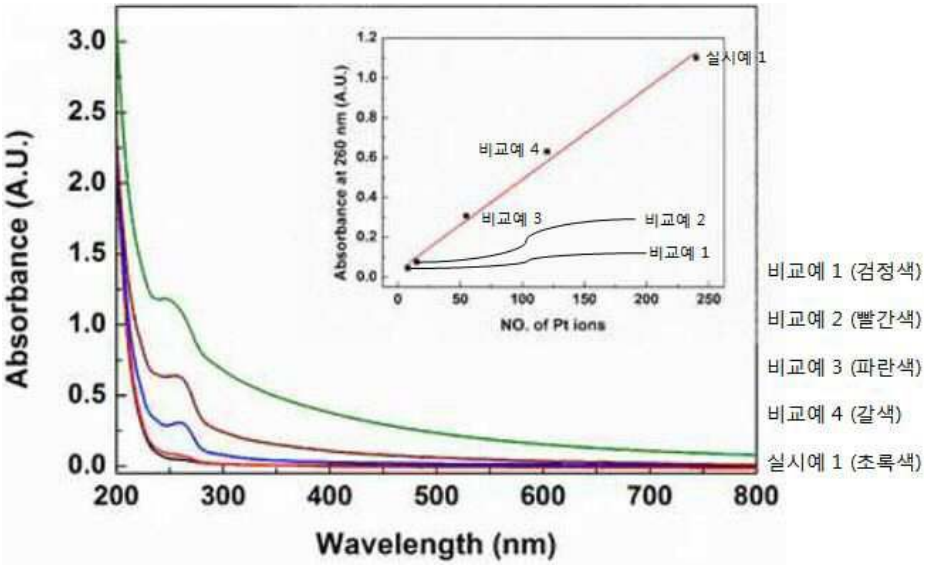
도면1



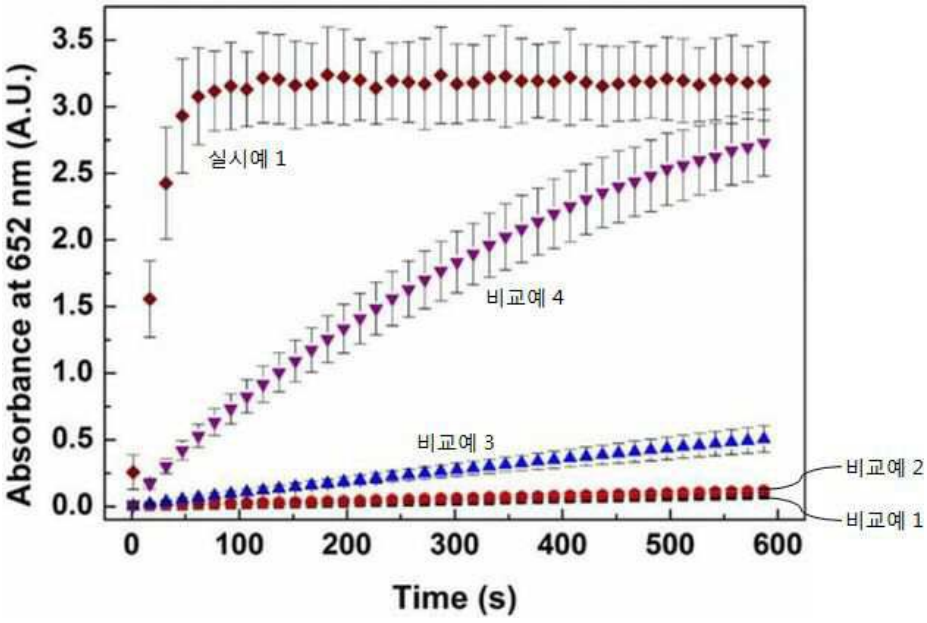
도면2



도면3


Absorbance (A.U.)
Wavelength (nm)
Absorbance at 260 nm (A.U.)
NO. of Pt ions
실시예 1
비교예 4
비교예 3
비교예 2
비교예 1
비교예 1 (검정색)
비교예 2 (빨간색)
비교예 3 (파란색)
비교예 4 (갈색)
실시예 1 (초록색)

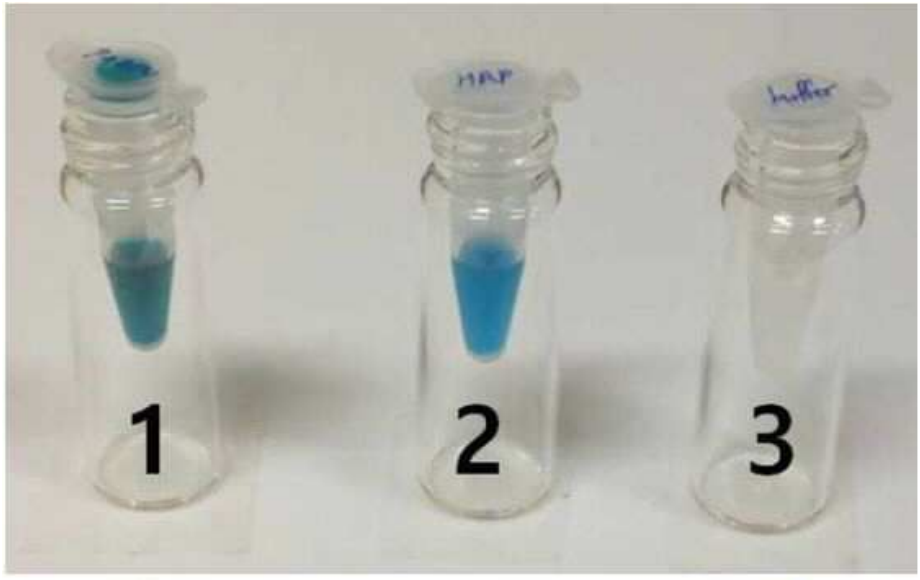
도면4


Absorbance at 652 nm (A.U.)
Time (s)
실시예 1
비교예 4
비교예 3
비교예 2
비교예 1

도면5

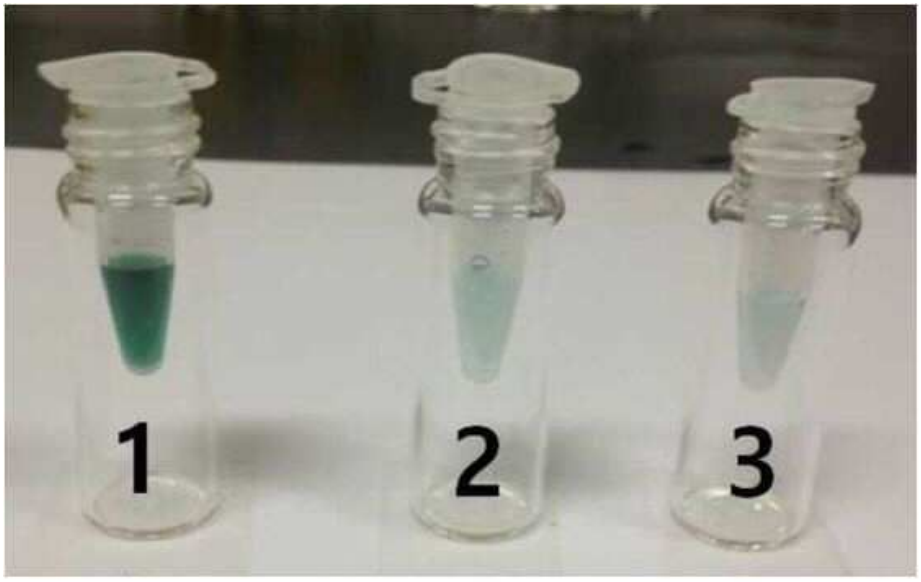

비교예 1
비교예 2
비교예 3
비교예 4
실시예 1

도면6



실시예 1 비교예 5 비교예 6

도면7

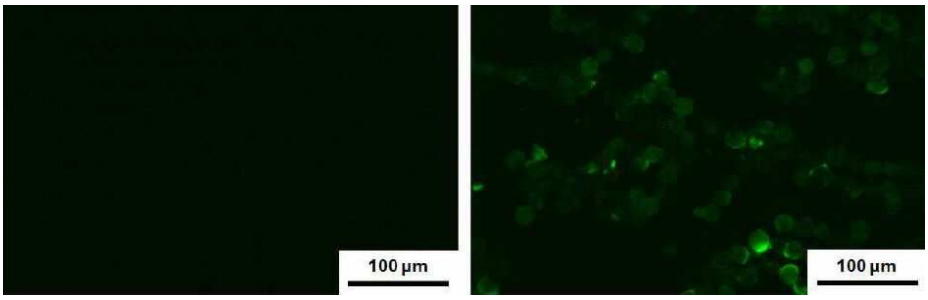


실시예 1 비교예 5 비교예 6

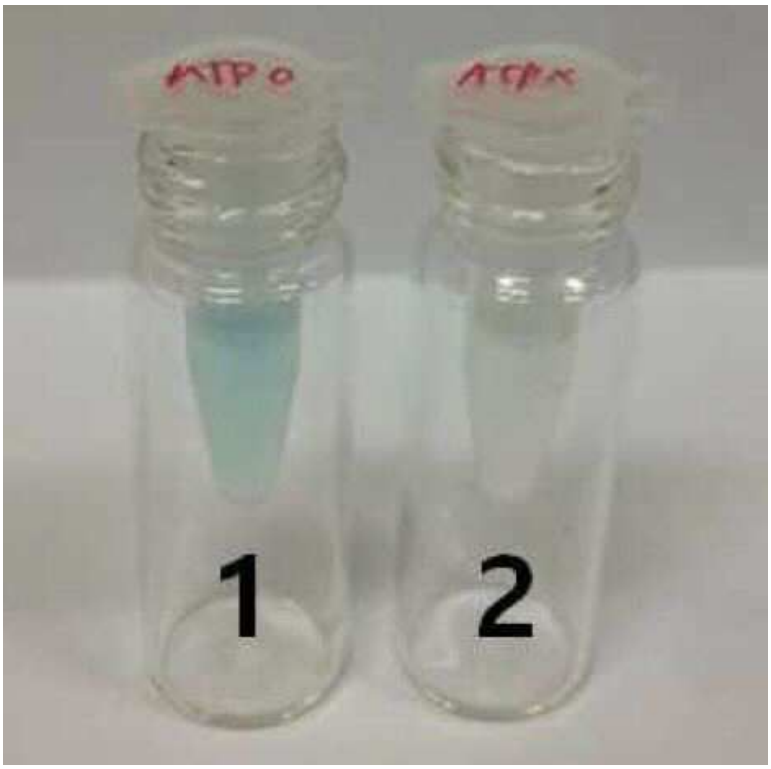
도면8



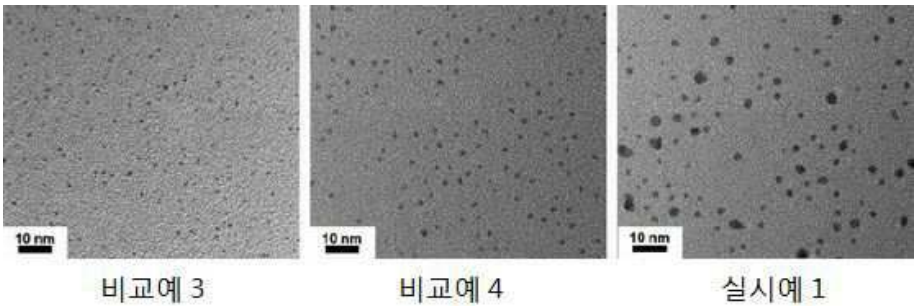
도면9



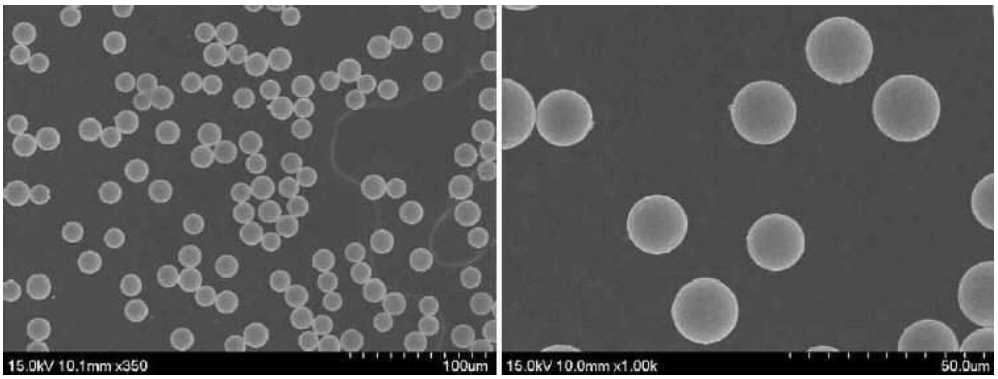
도면10



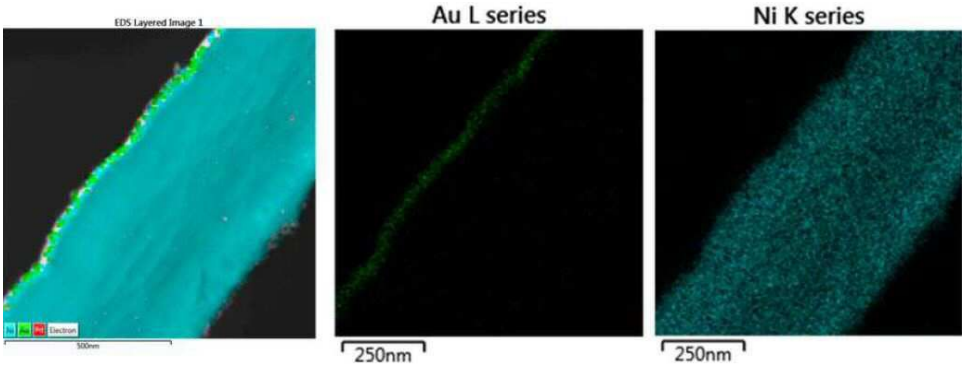
도면11



도면12



도면13



도면14

