



(51) 국제특허분류:

C12Q 1/6816 (2018.01)

C12Q 1/6883 (2018.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2021/016288

(22) 국제출원일:

2021년 11월 10일 (10.11.2021)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2020-0157354 2020년 11월 23일 (23.11.2020) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)

[KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 임동권 (LIM, Dong-Kwon); 06274 서울시 강남구 언주로 203, 2004호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 파도특허법인 유한회사 (PADO IP LAW PLLC); 06194 서울시 강남구 테헤란로78길 16, 9층 (대치동, 노벨빌딩), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

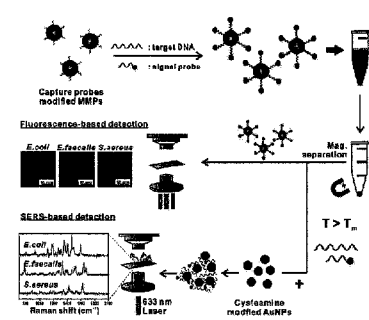
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING BIOMATERIAL USING MAGNETIC MICROPARTICLES AND SURFACE-ENHANCED RAMAN SIGNALS

(54) 발명의 명칭: 자성 마이크로입자와 표면증강라만 신호를 이용한 바이오물질 검출 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for the simultaneous detection of multiple biomaterials using Raman signals and magnetic microparticles (MMP) modified with a target capture probe. More specifically, the method comprises a step in which the modified MMP is hybridized with a biomaterial-specific target sequence to be detected and a signal probe, fluorescence signals are detected from each of a solution containing the hybridized MMP and a signal probe emitted from the MMP solution, and then metal nanoparticles are added to the emitted signal probe to detect Raman signals, and thus, the method can specifically detect two or more types of biomaterials with high sensitivity. The present invention is characterized in that fluorescence signals and Raman signals can be obtained with high sensitivity, a step for separating and then washing MMPs is simple, thus enabling multiple detection using various probes, and a hybridization step and a signal detection step are separated, thus reducing non-specific binding and increasing biomaterial detection efficiency.

(57) 요약서: 본 발명은 타겟 캡처 프로브로 개질된 자성 마이크로입자(magnetic microparticles, MMP)를 포함하는 라만 신호를 이용한 바이오물질 다중 검출방법 등에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 상기 개질된 MMP를 검출하고자 하는 바이오물질 특이적 타겟 서열 및 신호 프로브와 혼성화하고, 상기 혼성화된 MMP를 포함하는 용액 및 상기 MMP 용액으로부터 방출된 신호 프로브로부터 형광 신호를 각각 검출하고, 이후 상기 방출된 신호 프로브에 금속 나노입자를 첨가하여 라만 신호를 검출하는 단계를 포함함으로써, 높은 민감도로 2종 이상의 바이오물질을 특이적으로 검출할 수 있다. 본 발명은 형광 신호 및 라만 신호를 고감도로 수득할 수 있고, MMP를 분리 후 세척하는 단계가 간단하여 다양한 프로브를 사용해 다중 검출이 가능하며, 혼성화 단계와 신호 검출 단계를 분리함으로써 비특이적인 결합을 감소시키고, 바이오물질 탐지 효율을 높일 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 자성 마이크로입자와 표면증강라만 신호를 이용한 바이오물질 검출 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 타겟 캡처 프로브로 개질된 자성 마이크로입자와 표면증강라만신호를 이용한 검출방법 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 자성 마이크로입자(magnetic microparticles, MMP)는 세포 분리(cell separation), 단백질 정제(protein purification), 및 단백질 또는 핵산 바이오마커의 검출을 위한 분석 프로토콜의 주요 인자로서, 다양한 목적으로 이용되어왔다. MMP는 내부에 초상자성(superparamagnetic) 나노입자를 포함하는 단분산 마이크로 크기의 폴리스티렌 입자로서, 액상에서 자유롭게 분산된 상태이며, 외부 자기장을 걸어줌으로써 액상으로부터 빠르게 분리될 수 있다. 또한, 카복실이나 아민과 같은 MMP 표면에 다양한 표면 화학(surface chemistry)을 가지므로, MMP를 항체 또는 핵산을 포함하도록 변형함으로써 간단한 세포 분석, 면역분석(immunoassay), 및 핵산 검출의 분야에서 활용할 수 있다.
- [3] 분석 과정에 있어서, 타겟을 단백질이나 핵산에 결합한 후, 신호 전달(signal transduction)은 필수적이며, MMP 또는 MMP에서 방출된 신호 분자를 이용하여 광학, 분광법을 포함한 다양한 신호를 직접적으로 측정할 수 있다. MMP는 다가성(multivalency)이며 MMP에서 신호 분자가 풍요로운 상태(enriched state)에 있는바, 높은 민감도로 상기 타겟을 검출할 수 있다. 종래에 MMP에서 직접적으로 보낸 형광 신호를 포함한 현장 진단(point-of-care diagnostics, POCD)에서 병원균 유래 DNA 검출하기 위한 MMP의 잠재적인 활용에 대해 연구되었으며, 스캐노메트릭법(scanometric method)으로 MMP에서 방출된 바코드(bar-code) DNA를 검출함으로써 500 zeptomolar 민감도 수준으로 타겟 DNA를 검출할 수 있는 MMP 기반 검출 시스템에 대해 보고된 바 있다. 또한 MMP에서 방출된 DNA 바코드를 검출하기 위해 질량 분석법(mass spectrometry)을 이용함으로써 aM 민감도를 갖는 바코드 DNA 매개 바이오분자 검출에 대해 보고된 바 있다. 상기 연구들은 추가적인 신호 증폭 방법을 포함 또는 제외한 것으로서, MMP의 특이적인 특성에 강하게 의존한 분석법으로 볼 수 있다.
- [4] MMP를 사용한 다양한 분석에도 불구하고, 신호 판독으로서 라만 산란(Raman scattering)은 아직 널리 이용되지 않았다. 이는 형광 신호와 비교하여 라만 산란이 낮은 신호 강도를 가지기 때문이다. 그러나, 라만 신호는 표면 증강 라만 분산을 이용함으로써 크게 증가할 수 있으며, 라만 분산은 신호 전달에 있어 전도유망한 방법일 뿐만 아니라, MMP 기반 분석에 있어 신호 증폭에 좋은

전략이 될 수 있다. 그러나, 라만 분산과 형광신호 간의 분석 능력에 대한 시스템적인 비교는 아직 상세히 조사되지 않았다.

- [5] 따라서, 본 발명은 패혈증(sepsis)을 유발하는 것으로 알려진 주요 병원균인 *Escherichia coli*(*E. coli*), *Enterococcus faecalis*(*E. faecalis*), 및 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)와 같은 세균의 핵산 타겟을 선별하였다. 패혈증의 경우, 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)과 같은 종래의 효소적 증폭 방법(enzymatic amplification method) 또는 배양-기반 방법(culture-based method)에 의존하지 않는 간단하고, 빠르고, 탄탄한 분석법에 대한 강한 수요가 존재한다. 세균 배양은 시간이 많이 소요되고 PCR은 효소적 증폭 방법으로서 허위 양성(false-positive)이 발생하는 경향이 있기 때문이다. 이러한 점에서, 라만 산란을 포함하는 MMP 기반 분석은 신뢰성 있는 비효소적 증폭 방법이자 분석 전략으로서 전도유망하다.

- [6] 본 발명은 타겟 캡처 프로브(capture probe) DNA 서열 및 형광 염료로 개질된 신호프로브(signal probe) DNA 서열을 고안했으며, 양 서열은 타겟 DNA 서열에 대해 반상보적(half-complementary) 서열이다(도 2). 형광 신호는 i) MMP를 포함하는 용액으로부터 직접 측정되거나, ii) 상기 MMP 용액으로부터 방출된 신호 프로브에 의해 측정될 수 있다. 상기 방출된 신호 프로브는 표면 증강 라만 산란(Surface-enhanced Raman scattering, SERS)을 이용하여 정량화될 수 있다. 상기 전략에 기초하여, 형광 및 라만 산란 간의 민감도 및 다중진단능력과 같은 분석 능력에 대한 엄격한 비교를 통해 본 발명자는 SERS를 포함한 MMP-기반 방법이 민감도 및 다중진단능력의 관점에서 세균 타겟 DNA를 검출하는데 전도유망한 신규 전략임을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

- [7] [선행기술문헌] 한국 등록특허 공개 10-2156165호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 타겟 캡처 프로브로 개질된 자성 마이크로입자를 포함하는 바이오물질 다중 검출방법을 제공하는 것이다.
- [9] 또한, 본 발명의 다른 목적은 타겟 캡처 프로브로 개질된 자성 마이크로입자를 포함하는 세균 감염성 질환을 진단하기 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.
- [10] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 바이오물질 다중 검출방법을 제공한다.
- [12] (a) 타겟 캡처 프로브로 개질된 자성 마이크로입자(magnetic microparticles, MMP)를 제조하는 단계;

- [13] (b) 상기 타겟 캡처 프로브로 개질된 MMP를 검출하고자 하는 바이오물질 특이적 타겟서열 및 신호 프로브와 혼성화하는 단계;
- [14] (c) 상기 혼성화된 MMP를 포함하는 용액 및 상기 MMP 용액으로부터 방출된 신호 프로브로부터 형광 신호를 각각 검출하는 단계; 및
- [15] (d) 상기 방출된 신호 프로브에 금속 나노입자를 첨가하여 라만(SERS) 신호를 검출하는 단계.
- [16] 본 발명의 일 구현 예로서, 상기 타겟 캡처 프로브와 신호 프로브는 각각 상기 타겟 서열과 반상보적(half-complementary)인 것일 수 있다.
- [17] 본 발명의 다른 구현 예로서, 상기 (a) 단계의 MMP는 종류가 다른 2개 이상의 타겟 캡처 프로브로 개질된 것으로서, 2종 이상의 타겟 서열에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [18] 본 발명의 다른 구현 예로서, 상기 (b) 단계에서 혼성화 시간은 3 시간 내지 12 시간이고, 0.15 M 내지 0.3 M 농도의 염을 처리하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 혼성화시간은 3 시간이고, 염의 농도는 0.3 M일 수 있다.
- [19] 본 발명의 다른 구현 예로서, 상기 (c) 단계의 방출된 신호 프로브는 상기 혼성화된 MMP 용액에 자기장을 걸어 분산되고, 상기 타겟 서열의 T_m (melting temperature)보다 높은 온도로 가열됨으로써 방출되는 것일 수 있다.
- [20] 본 발명의 다른 구현 예로서, 상기 검출방법은 최소 검출한계가 30 fM, 즉 3×10^{-14} M일 수 있다.
- [21] 본 발명의 다른 구현 예로서, 상기 금속 나노입자의 표면을 시스테인(cysteamine), APTES(3-Aminopropyl)triethoxysilane), APTMS(3-Aminopropyl)trimethoxysilane, AEAPTMS(N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine, MPTMS(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane, MPTES((3-Mercaptopropyl)triethoxysilane), MPA(mercaptopropionic acid), MHA(6-mercaptophexanoic acid), BDT(1,4-benzenedithiol), MBA(4-mercaptobenzoic acid), 및 MBIA(2-mercaptobenzoimidazole- 5-carboxylic acid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상으로 개질한 것일 수 있다.
- [22] 본 발명의 다른 구현 예로서, 상기 신호 프로브는 형광물질, 발색물질, 또는 화학발광물질로 표지된 것일 수 있다.
- [23] 본 발명의 또 다른 구현 예로서, 상기 형광물질은 ATTO 계열 염료, 시아닌(Cyanine) 계열 염료, FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein),

ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 및 써아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

- [24] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 검출방법은 웰, 채널, 튜브, 또는 이들의 조합에서 수행되는 것일 수 있다.
- [25] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 바이오물질은 단백질, 세포, 바이러스, 핵산, 유기분자, 및 무기분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [26]
- [27] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 세균 감염성 질환을 진단하기 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [28] (a) 타겟 캡처 프로브로 개질된 자성 마이크로입자(magnetic microparticles, MMP)를 제조하는 단계;
- [29] (b) 상기 타겟 캡처 프로브로 개질된 MMP를 검출하고자 하는 바이오물질 특이적 타겟 서열 및 신호 프로브와 혼성화하는 단계;
- [30] (c) 상기 혼성화된 MMP를 포함하는 용액 및 상기 MMP 용액으로부터 방출된 신호 프로브로부터 형광 신호를 각각 검출하는 단계; 및
- [31] (d) 상기 방출된 신호 프로브에 금속 나노입자를 첨가하여 방출되는 라만(SERS) 신호를 검출하는 단계.
- [32] 본 발명의 일 구현 예로서, 상기 타겟 캡처 프로브와 신호 프로브는 각각 상기 타겟 서열과 반상보적(half-complementary)인 것일 수 있다.
- [33] 본 발명의 다른 구현 예로서, 상기 (a) 단계 이전에, 세균 감염성 질환이 의심되는 환자샘플에서 유전체 DNA를 추출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [34] 본 발명의 또 다른 구현 예로서, 상기 환자샘플은 혈액, 혈청, 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [35] 본 발명의 다른 구현 예로서, 상기 (a) 단계의 MMP는 종류가 다른 2개 이상의 타겟 캡처 프로브로 개질된 것으로서, 2종 이상의 타겟 서열에 특이적으로 결합하여, 상기 타겟 서열을 포함하는 미생물을 각각 원인균으로 하는 2종 이상의 세균 감염성 질환을 진단하는 것일 수 있다.
- [36] 본 발명의 다른 구현 예로서, 상기 (d) 단계 이후에, 상기 바이오물질에 의한 형광 신호 또는 라만 신호의 정보를 이용하여 세균 감염성 질환 원인균의 존재 여부 또는 상기 원인균의 종류를 판정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [37] 본 발명의 다른 구현 예로서, 상기 세균 감염성 질환은 패혈증, 부비동염, 폐렴, 식중독, 이질, 결핵, 녹농균 감염, 농가진, 화농성 질환, 급성 피부염, 균혈증, 심내막염, 장염, 골관절염, 골수염, 요로감염, 뇌염, 뇌막염, 및 신장염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

- [38] 본 발명의 다른 구현 예로서, 세균은 그람 양성균, 그람 음성균 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

발명의 효과

- [39] 본 발명은 타겟 캡처 프로브로 개질된 자성 마이크로입자(magnetic microparticles, MMP)를 포함하는 라만 신호를 이용한 바이오물질 다중 검출방법 등에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 상기 개질된 MMP를 검출하고자 하는 바이오물질 특이적 타겟 서열 및 신호 프로브와 혼성화하고, 상기 혼성화된 MMP를 포함하는 용액 및 상기 MMP 용액으로부터 방출된 신호 프로브로부터 형광 신호를 각각 검출하고, 이후 상기 방출된 신호 프로브에 금속 나노입자를 첨가하여 라만 신호를 검출하는 단계를 포함함으로써, 높은 민감도로 2종 이상의 바이오물질을 특이적으로 검출할 수 있다. 본 발명은 형광 신호 및 라만 신호를 고감도로 수득할 수 있고, MMP를 분리 후 세척하는 단계가 간단하여 다양한 프로브를 사용해 다중 검출이 가능하며, 혼성화 단계와 신호 검출 단계를 분리함으로써 비특이적인 결합을 감소시키고, 바이오물질 탐지 효율을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [40] 도 1은 세균 타겟 DNA 검출을 위한 MMP 기반 분석을 나타낸 것이다. 타겟 캡처 프로브로 개질된 MMP가 바이오물질 타겟서열 및 신호 프로브와 혼성화하고, 상기 신호 프로브와 혼성화된 MMP가 자기장에서 분리된다. 형광 및 SERS 기반 검출 방법을 통해 상기 MMP의 형광 강도 및 방출된 신호를 측정할 수 있다.
- [41] 도 2는 혼성화 조건에 따른 형광 신호의 영향을 나타낸 것이다. (A)는 타겟 결합 과정을 나타낸 것이고, (B)는 혼성화 시간(0, 1, 3, 6, 12 시간)에 따른 타겟 DNA의 혼성화 후 MMP의 형광 강도 및 이미지를 나타낸 것이며, (C)는 염도(타겟이 없는 경우, 0.15 M NaCl, 0.3 M NaCl)에 따른 타겟 DNA의 혼성화 후 MMP의 형광 강도 및 이미지를 나타낸 것이다. 이 때, scale bar는 5 μ m이다.
- [42] 도 3(A)는 타겟 캡처 프로브와 상보적인 Cy5로 개질된 DNA (5'-Cy5 dye-GTGCCAATGATCTTCGCTCG-3')를 이용하여 MMP에서 타겟 캡처 프로브의 양을 정량화하는 실험 기법을 나타낸 것이고, (B)는 Cy5-DNA 서열의 보정 곡선을 나타낸 것이며, (C) COOH-기능화된 MMP, Cy5-DNA 혼성화된 MMP, 및 Cy5-DNA를 방출한 후의 MMP의 B/F 및 형광 이미지를 나타낸 것이다.
- [43] 도 4(A)는 Cys-AuNP의 TEM 이미지를 나타낸 것이고, (B)는 Cys-AuNP의 UV-Vis 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- [44] 도 5(A)는 세균 유전체 DNA의 추출 방법 및 타겟 DNA의 디자인을 도식화한 것이고, (B)는 600 nm에서 측정한 37 °C에서 tryptic soy broth medium에 배양된 *E. coli*의 생장 곡선을 나타낸 것이며, (C)는 상기 추출된 *E. coli* 유전체 DNA의 UV-Vis 스펙트럼을 나타낸 것이다.

- [45] 도 6(A)는 신호 프로브 용액(5'-ATTO488 dye-GGATTTTCGACAGGATATTA-3' (*E. coli*), 5'-ATTO590 dye-TGGTTAAACTTTTTGCCTTA-3' (*E. faecalis*), 및 5'-ATTO647 dye-TCACAAACAGATAATGGCGT-3' (*S. aureus*)) (10^{-7} M)의 형광 이미지를 나타낸 것이고, (B)는 MMP 단독, 타겟을 제외한 MMP, 각 세균의 타겟 DNA와 혼성화한 MMP의 B/F 및 형광 이미지를 나타낸 것이다.
- [46] 도 7(A)는 신호 프로브 용액(5'-ATTO488 dye-GGATTTTCGACAGGATATTA-3', 5'-cy5 dye-GGAT TTTTCGACAGGATATTA-3', 5'-ATTO590 dye-TGGTTAAACTTTTTGCCTTA-3', 및 5'-ATTO647 dye-TCACAAACAGATAATGGCGT-3') (10^{-6} M)의 SERS 스펙트럼을 나타낸 것이고, (B)는 혼합된 신호 프로브 용액(5'-ATTO488 dye-GGATTTTCGACAGGATATTA-3', 5'-ATTO590 dye-TGGTTAAACTTTTTGCCTTA-3', 5'-ATTO647 dye-TCACAAACAGATAATGGCGT-3', and 5'-cy5 dye-GGAT TTTTCGACAGGATATTA-3', 5'-ATTO590 dye-TGGTTAAACTTTTTGCCTTA-3', 5'-ATTO647 dye-TCACAAACAGATAATGGCGT-3')의 SERS 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- [47] 도 8은 형광 기반 검출 및 SERS 기반 검출의 민감도를 비교한 것이다. (A)는 형광 및 SERS의 분석 기법을 나타낸 것이고, (B)는 신호 프로브와 혼성화한 MMP의 형광 강도 및 이미지와, 방출된 신호 프로브의 형광 강도를 나타낸 것이며, (C)는 타겟 DNA 농도에 따른 방출된 신호 프로브의 SERS 스펙트럼을 나타낸 것이고, (D)는 (C) 스펙트럼으로부터 선별된 라만 이동(Raman shift)의 SERS 강도를 나타낸 것이다. 이 때, scale bar는 5 μ m이다.
- [48] 도 9는 단일 타겟 DNA에 대한 형광 기반 및 SERS 기반 검출의 다중진단 분석을 나타낸 것이다. (A)는 단일 타겟(*E. coli*, *E. faecalis*, 및 *S. aureus*)의 형광 기반 및 SERS 기반 검출을 포함하는 다중진단 분석 전반을 나타낸 것이고, (B)는 단일 신호 프로브(ATTO 488;*E. coli*, ATTO 590;*E. faecalis*, and ATTO 647;*S. aureus*)를 혼성화한 bead의 형광 강도 및 이미지를 나타낸 것이며, (C)는 방출된 신호 프로브의 형광 강도를 나타낸 것이고, (D)는 세균 타겟 DNA(10^{-9} M)의 SERS 스펙트럼을 나타낸 것이다. 각 신호 프로브의 참고 스펙트럼(Reference spectrum)은 점선으로 나타냈다. 상기 참고 스펙트럼은 10 μ L로 측정하고, 100 μ L의 신호 프로브(10^{-7} M) 및 100 μ L의 Cys-AuNP (O.D. 1.0)와 혼합함으로써 응집하였으며, 1800 rpm으로 15 분동안 원심분리하였다. 이 때, scale bar는 5 μ m이다.
- [49] 도 10은 다양한 타겟 농도(10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M, 10^{-14} M, 타겟이 없는 경우)에서 *E. faecalis* 타겟 DNA에 대한 세 번의 독립적인 분석으로부터 얻은 라만 스펙트럼을 반복 측정한 결과이다. (A)는 1st 시도, (B)는 2nd 시도, (C)는 3rd 시도를 나타낸다. (D)는 상기 세 번의 독립적인 분석으로부터 선별된 라만 이동(Raman shift (1333.29, 1520.53, and 1640.75 cm^{-1}))의 강도를

나타낸 것이다.

[50] 도 11은 다수의 타겟 DNA에 대한 다중진단 분석을 나타낸 것이다. (A)는 다수의 타겟 DNA의 다중진단 분석 전반을 나타낸 것이고, (B)는 다수의 신호 프로브를 혼성화한 bead의 형광 강도 및 이미지를 나타낸 것이며, (C)는 다수의 방출된 신호 프로브의 형광 강도를 나타낸 것이고, (D)는 다수의 타겟 DNA의 SERS 스펙트럼을 나타낸 것이다. 이 때, scale bar는 5 μm 이다.

[51] 도 12는 *E. coli* 유전체 DNA의 검출에 관한 것이다. (A)는 형광 및 SERS 기반 방법으로 *E. coli* 유전체 DNA를 검출하기 위한 실험 과정을 나타낸 것이고, (B)는 신호 프로브 및 방출된 신호 프로브와 혼성화된 bead의 형광 강도를 나타낸 것이며, (C)는 *E. coli* 유전체 DNA(30 pM ~ 30 fM)의 농도에 따른 SERS 스펙트럼을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[52] 본 발명자들은 바이오물질 다중 검출방법에 대해 예의 연구한 결과, 캡처 프로브로 개질된 자성 마이크로입자와 금속 나노입자를 포함하는 검출방법의 높은 민감도 및 다중진단능력을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[53]

[54] 본 발명에서 용어, “바이오물질(bio materials)”이란, 특정 기질을 나타내는 생체 분자로서, 타겟 분자(target molecules), 또는 애널라이트(analytes)와 동일한 의미로 해석될 수 있다. 상기 생체 분자는 단백질, 세포, 바이러스, 핵산, 유기 분자 또는 무기 분자일 수 있다. 상기 단백질의 경우, 항원, 항체, 기질 단백질, 효소, 조효소 등 어떠한 바이오 물질이라도 가능하며, 상기 핵산의 경우, DNA(gDNA 및 cDNA), RNA, PNA, LNA 또는 이들의 조합일 수 있으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 상기 바이오물질은 바람직하게는 박테리아, 바이러스, 곰팡이균, 진균, 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있다.

[55] 본 발명에서 용어, “타겟 서열(target sequence)”은 검출하고자 하는 상기 바이오물질에 특이적인 특정 핵산 서열로 나타낸 것이다.

[56] 본 발명에서 용어, “프로브(probe)”는 상기 타겟 서열에 특이적으로 결합할 수 있는 수개 내지 수백개의 염기로 이루어진 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어 상기 타겟 서열의 존재유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA 프로브, 이중쇄 DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다.

[57] 본 발명에서 용어, “타겟 캡처 프로브(capture probe)”는 상기 바이오물질의 특정 영역을 인식하고 그에 특이적으로 결합할 수 있는 분자적 성질의 화학적 또는 생물학적 제제를 의미한다.

[58] 본 발명에서 용어, “신호 프로브(signal probe)”는 상기 타겟 서열에

반상보적(half-complementary)인 서열을 포함하는 프로브로서, 상기 신호 프로브가 그의 타겟 서열에 결합된 경우, 검출가능한 신호를 생성할 수 있으며, 상기 신호 프로브가 그의 타겟 서열에 결합되지 않은 경우, 신호를 전혀 또는 거의 생성하지 않거나 상이한 신호를 생성할 수 있다. 일례로, 신호 프로브는 형광물질 및 퀀처 부분을 포함하는 형광 발생 또는 형광 프로브이며, 타겟 서열과 혼성화하는 경우 형광 변화가 일어난다.

- [59] 상기 형광물질은 ATTO 계열 염료, 시아닌(Cyanine) 계열 염료, FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(terramethylrhodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 및 씨아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [60] 본 발명에서 용어, "혼성화(hybridization)"는 상보적인 단일가닥 핵산들이 이중가닥 핵산을 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 2개의 핵산 가닥 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match; 정합) 일어나거나 또는 일부 부정합(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성 정도는 혼성화 조건에 따라 달라질 수 있다.
- [61]
- [62] 본 발명에서 용어, "금속 나노 입자"는 금속으로 이루어진 나노 크기의 입자를 의미한다. 상기 금속은 금, 은, 구리 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니며, 이 기술분야에서 널리 사용되고 있는 금속은 어느 것이나 제한없이 사용될 수 있다. 상기 금속 나노 입자의 직경은 0.1 nm 이상 1000 nm 이하의 크기일 수 있으며, 바람직하게는 금 나노 입자(gold nano particle, AuNP)일 수 있다. 상기 금 나노 입자는 제조가 가능하고 입자의 크기 조절이 용이하며 생체안정성이 높고 세포독성도가 낮은 장점을 갖는다.
- [63] 본 발명에서 용어, "라만 산란(Raman scattering)"은 빛이 어떤 매질을 통과할 때 빛의 파장을 변화시켜 빛의 일부가 진행 방향에서 이탈해 다른 방향으로 진행하는 현상을 의미한다. 본 발명에서 용어, "라만 분광법"은 시료에 단파장의 레이저를 조사하여 산란된 빛을 검출하여 분자 수준의 정보를 얻어내는 유용한 분광법으로, 기존의 적외선(Infrared) 분광법에서 얻을 수 있는 정보와 서로 상보적인 화학구조 정보를 얻을 수 있는 방법으로 생화학/화학/소재 분야에

광범위하게 사용되고 있으며, 적외선 분광법에 비해 시료 측정이 매우 간단하다. 라만 분광법은 분자들의 진동 상태(vibrational state)에 대한 정보를 제공한다. 대부분의 경우, 흡수된 광선(radiation)이 동일한 파장에서 재-방사(re-radiated)되는데, 이를 레일레이 산란(Rayleigh scattering) 또는 탄성 산란(elastic scattering)의 과정이라고 한다. 이때, 재-방사된 광선간의 에너지 차이는 이들 간의 파장에서의 이동(shift)으로 나타나고 이러한 차이의 정도는 파수(파장의 역수)의 단위로서 측정되어 라만 이동(Raman shift)으로 표현된다. 만일 투사 광선이 단파장이고 레이저를 그 소스로 이용하는 경우, 주파수 상에 차이를 가지는 산란된 광선(빛)은 레일레이 산란된 광선(빛)과 좀 더 용이하게 구별될 수 있다. 즉, 라만 쉬프트는 분자의 진동 주파수에 해당한다. 따라서, 라만 분광법은 적외선 분광법과 같이 분자의 진동 형태, 회전상태에 대한 정보를 얻기 위해 사용되지만 적외선 분광법에서와는 다른 메커니즘과 선택 규칙에 근거하며 측정방법도 다르다.

- [64] 본 발명의 일 구체예로서, 표면-증강 라만 산란(surface-enhanced Raman scattering, SERS) 신호를 측정하는 단계를 포함하는 세균 감염성 질환을 진단하기 위한 정보제공방법을 제공한다. 상기 단계에서는, 프로브의 말단에 결합된 형광물질 또는 라만 활성 물질만을 분리하여 라만 신호를 측정할 수 있다. 이 때, 조사되는 빛의 파장은 400 cm^{-1} 내지 800 cm^{-1} 영역일 수 있다. 예를 들어, 상기 빛의 파장은 400 cm^{-1} 내지 800 cm^{-1} , 420 cm^{-1} 내지 800 cm^{-1} , 450 cm^{-1} 내지 800 cm^{-1} , 480 cm^{-1} 내지 790 cm^{-1} , 또는 488 cm^{-1} 내지 785 cm^{-1} 일 수 있다. 또한, 상기 빛의 파장은 514 nm 파장을 갖는 Ar^+ 레이저, 633 nm 파장을 갖는 He-Ne 레이저 또는 785 nm 파장을 갖는 다이오드 레이저일 수 있다. 즉, 라만 신호로부터 특정 피크가 관찰되면 개체가 세균 감염성 질환을 가지고 있는 것으로 판단할 수 있으며, 상기 세균 감염성 질환은 패혈증, 부비동염, 폐렴, 식중독, 이질, 결핵, 녹농균 감염, 농가진, 화농성 질환, 급성 피부염, 균혈증, 심내막염, 장염, 골관절염, 골수염, 요로감염, 뇌염, 뇌막염, 또는 신장염일 수 있다. 상기와 같은 방법을 통하여 타겟 서열을 검출할 수 있으며, 정량적인 검출도 가능하다.
- [65] 본 발명에서 "진단"이란 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.
- [66] 본 발명에서 용어, "다중(multiplexing) 검출 또는 진단"이란, 1개 또는 그 이상 종류의 바이오물질을 동시에 검출하는 것을 의미한다.
- [67]
- [68] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자

한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[69]

[70] 실시예 1. 재료, 기기 및 DNA 정보

[71] 모든 올리고뉴클레오타이드는 Integrated DNA Technologies (IDT Inc., Coralville, IA, USA)에서 구매했다. Dynabeads (M-270 carboxylic acid)는 BBI Solutions invitrogen (Madison, Waltham, Massachusetts WI, USA)에서 수득했다. N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC), 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) hydrate, Ethanolamine, sodium dodecyl sulfate (SDS), Gold(III) chloride trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), cysteamine, 및 sodium borohydride (NaBH_4)는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 수득했다. Sodium phosphate monobasic dihydrate (NaH_2PO_4), sodium phosphate dibasic anhydrate (Na_2HPO_4) 및 sodium chloride (NaCl)은 DAEJUNG (Siheung, South Korea)에서 수득했다. *Escherichia coli* (KCCM 11234)는 Korean Culture Centre of Microorganisms (KCCM, Daejeon, South Korea)에서 수득했다. 상기 *E. coli*는 tryptic soy broth (Difco, Detroit, MI)에서 증식했다. 상기 *E. coli* 유전체 DNA는 DNA purification kit 및 automated instrument (MX-8L Apintech, Seoul)로부터 추출하였다.

[72]

소멸 스펙트럼(Extinction spectra)은 Ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrometer (SCINCO, South Korea)로 수득하였다. 투과형 전자 현미경(transmission electron microscope, TEM) (H-7100, Hitachi, Tokyo, Japan)은 나노분자를 특성화하는데 사용하였다. 명시야(bright field) 및 형광 이미지(fluorescence images)는 X 20 air objective 및 X 100 oil immersion lens objective (N.A. 1.3)를 갖춘 현미경(Olympus, DP80, Tokyo, Japan) 및 EzScan (NOST, South Korea) software를 이용하여 기록하였다. Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Inc, Winooski, USA)은 형광 강도를 측정하기 위해 사용하였다. MX-8L nucleic acid extractor (Apintech, Seoul)를 사용하여 DNA 추출(DNA extraction)을 수행하였다.

[73]

[74] 세균 특이적 프로브 서열을 고안하기 위해, 본 발명자들은 *E. coli*, *E. faecalis*, 및 *S. aureus*의 타겟 서열(40 bp)을 선별하였다. 세균 서열은 NCBI database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 수득하였고, 서열 정렬(gene alignment)는 Mega 5 program을 사용하여 수동으로 수행하였다. 프라이머 특이성에 대한 실리코 테스트(silico tests)는 NCBI BLAST tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)을 이용하여 수행하였다. 상기 타겟 서열은 하기 표 1과 같다.

[75] [표1]

<i>E. coli</i> 타겟 서열	서열번호 1	5'-TTTTGGCAACAGGGCTAGGTTAATATCCTGTCG AAAATCC-3' (T _m ; 65.5 °C)
<i>E. faecalis</i> 타겟 서열	서열번호 2	5'-GTGCCAATGATCTTCGCTCGTAAGGCAAAAAG TTTAACCA-3' (T _m ; 65.5 °C)
<i>S. aureus</i> 타겟 서열	서열번호 3	5'-CTTCAGAACCACTTCTATTTACGCCATTATCTG TTTGTGA-3' (T _m ; 63.5 °C)

[76]

[77] 상기 타겟 서열과 반상보적인 타겟 캡처 프로브(capture probe) 서열은 서열의 3' 말단에 아민기, A10 스페이서, 및 짧은 폴리에틸렌 기로 개질되었다. 상기 타겟 캡처 프로브는 하기 표 2와 같다.

[78] [표2]

<i>E. coli</i> 캡처 프로브	서열번호 4	5'-ACCTAGCCCTGTTGCCAAAA-PEG-A ₁₀ -NH ₂ -3'
<i>E. faecalis</i> 캡처 프로브	서열번호 5	5'-CGAGCGAAGATCATTGGCAC-PEG-A ₁₀ -NH ₂ -3'
<i>S. aureus</i> 캡처 프로브	서열번호 6	5'-AAATAGAAGTGGTTCTGAAG-PEG-A ₁₀ -NH ₂ -3'

[79]

[80] 형광 기반 검출을 위해, 하기 표 3에 기재한 신호 프로브 서열을 사용하였다. 또한, Cy5 개질된 *E. coli* 신호 프로브(5'-Cy5 dye-GGATTTTCGACAGGATATTA-3', 서열번호 10)를 추출된 유전체 DNA의 형광 기반 검출에 사용하였고, Cy5로 개질된 *E. faecalis* 신호 프로브 (5'-Cy5 dye-GTGCCAATGATCTTCGCTCG-3', 서열번호 11)를 MMP에 개질할 캡처 프로브의 수를 정량화하기 위해 사용하였다.

[81] [표3]

<i>E. coli</i> 신호 프로브	서열번호 7	5'-ATTO488 dye-GGATTTTCGACAGGATATTA-3'
<i>E. faecalis</i> 신호 프로브	서열번호 8	5'-ATTO590 dye-TGGTTAACTTTTGCCTTA-3'
<i>S. aureus</i> 신호 프로브	서열번호 9	5'-ATTO647 dye-TCACAAACAGATAATGGCGT-3'

[82]

[83] SERS 기반 검출을 위해, ATTO488로 개질된 *E. coli* 신호 프로브를 Cy5로 대체하였다. 이는 ATTO488가 ATTO590 및 ATTO647에 비해 낮은 SERS 강도를 가져 SERS 기반 검출에 부적합한 것으로 고려되기 때문이다. 따라서, *E. coli* 신호 프로브는 5'-cy5 dye-GGATTTTCGACAGGATATTA-3'(서열번호 10)이고, *E. faecalis* 및 *S. aureus*의 신호 프로브는 형광 기반 분석의 신호 프로브와 동일하게 사용하였다.

[84]

[85] 실시예 2. 타겟 캡처 프로브(capture probes)로 개질된 MMPs의 제작

[86] 타겟 캡처 프로브로 개질된 MMP를 EDC 커플링 방법을 이용하여 제작하였다. 먼저 100 μ L의 carboxylic acid-modified dynabeads (MMPs) (30 mg/mL)를 100 μ L의 25 mM MES buffer를 10 분 동안 첨가하여 세척하였다. 자기장을 2 분간 걸어주어 상기 MMP를 분산시키고 상층액을 제거하였다. 상기 단계를 2 - 3 번 반복하였다. 아민으로 개질한 DNA 올리고뉴클레오타이드 (*E. faecalis* 캡처 프로브, 10^{-4} M, 60 μ L)를 MMP 용액 (30 mg/ml, 100 μ L)에 첨가하였다. 상온에서 30 분동안 느린 기울기 회전으로 배양한 후, EDC (100 mM in MES buffer, 30 μ L) 용액을 MMP 용액에 첨가하고, 느린 기울기 회전으로 밤새 배양하였다. 이후, PBS, pH 8.0에서 60 분간 느린 기울기 회전으로 상온에서 50 mM ethanolamine 로 세척하였다. 상기 세척 단계는 PBS로 4 번 반복하였다. 이후, 타겟 캡처 프로브로 개질된 MMPs를 증류수(10 mL)에 재분산하고, MMP에 있는 타겟 캡처 프로브의 양을 형광계로 측정하였다(도 3).

[87]

[88] 실시예 3. 금 나노입자(AuNP)로 개질된 시스테아민(cysteamine) 합성

[89] AuNP로 개질된 시스테아민(Cys-AuNPs)을 제조하기 위해, 200 mL의 HAuCl₄·3H₂O 용액(111.5 mg/200 mL의 증류수, 1.42 mM)를 2 mL의 시스테아민 용액 (164 mg/10 mL의 증류수, 213 mM)에 첨가하였다. 이 때, 용액의 색은 노랑에서

오렌지색으로 변화하였다. 충분히 혼합한 후, 상기 용액을 50 μ L NaBH₄ 용액(37.8 mg/10 mL의 증류수, 10 mM)에 첨가하고, 밤새 혼합하였다. 이 때, 용액의 색은 오렌지색에서 붉은 와인색으로 변화하였다. 이후, 상기 용액을 1,800 rpm에서 15 분간 원심분리하였다. UV-Vis 소멸 스펙트럼은 530 nm에서 기록하였다. TEM을 이용하여 Cys-AuNPs의 직경을 측정한 결과, 30.6 nm $\pm$ 4.1 nm이었다(도 4).

[90]

[91] 실시예 4. *E. coli* 유전체 DNA 추출

[92] *E. coli*를 tryptic soy broth (Difco, Detroit, MI)에 증식시키고, 37 °C에서 배양하였다. *E. coli*가 성장 곡선의 정지기(stationary phase)에 도달한 때, 6000 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 침전물을 sterile saline에서 재분산하고, 농축하였다. 상기 농축된 *E. coli* 유전체 DNA를 bead beating을 사용하는 MX-8L cell-free DNA purification kit를 이용하여 추출하였다. 상기 DNA는 고농도의 guanidinium thiocyanate 존재 하에서 silica bead에 강하게 결합하였고, 잔여물은 컬럼에 남았으며, 다른 바이오품질(단백질, RNA 등)은 결합하지 못하므로, 유전체 DNA만 분리되었다. 상기 추출된 유전체 DNA에서 beads를 제거하기 위해 12,000 rpm에서 3 분간 원심분리하였다. *E. coli* 유전체 DNA의 물농도는 260 nm 흡광도에서 측정하였으며, Beer-Lambert의 법칙을 적용하여 계산하였다. *E. coli* 유전체 DNA의 몰 추출 계수 (molar extinction coefficient) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=E.coli>) 는 $8.36 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 였다. 예를 들어, *E. coli* 유전체 DNA 용액이 100 번 희석되어, 흡광도가 0.84인 경우, 유전체 DNA의 물농도는 1 nM이다. Beer-Lambert 법칙이 아닌 empirical rule을 사용하여 계산한 *E. coli* 유전체 DNA의 물농도는 1.32 nM이었다. 상기 두 계산법을 적용하여 계산한 몰 농도에는 거의 차이가 없었다. 따라서, Beer-Lambert 법칙을 적용하여 *E. coli* 유전체 DNA의 물농도를 계산하였다(도 5).

[93]

[94] 실시예 5. 형광 측정 조건

[95] 신호 프로브와 혼성화한 MMP의 형광 이미지를 GFP, TRITC, 및 Cy5 filters를 포함한 현미경을 이용하여 각각 획득하였다. MMP의 ATTO 488, ATTO 590, 및 ATTO 647 신호는 0.5 초, 0.25 초, 및 2 초동안 노출된 GFP filter (518-559 nm), TRITC filter (572-638 nm), 및 Cy5 filter (665-715 nm)로 검출하였다. 신호 프로브 용액으로부터 형광 강도를 측정하기 위해, 상기 용액을 특정 파장(500 nm (ATTO 488), 610 nm (ATTO 590), and 650 nm (ATTO 647))으로 들뜨게 하고, 각각 530 nm, 640 nm, 및 680 nm의 파장에서 강도를 기록하였다(도 6).

[96]

[97] 실시예 6. SERS 측정 조건

[98] SERS 스펙트럼은 $\times 60$ objective (N.A. 0.7) (Olympus, Tokyo, Japan)의 도립 라만 현미경(inverted Raman microscope (NOST, South Korea))을 이용하여 수집하였고,

633 nm 레이저 (6.7 mW, 1 초의 노출 시간)를 조사한 용액으로부터 수득하였다. 분산된 라만 신호는 분광계(FEX-MD, NOST, South Korea) (1200 g nm^{-1} grating)로 향하여, 최종적으로 spectroscopy charge-coupled device (CCD) camera (Andor (DV401A-DVF), Belfast, North Ireland)에 도달하는 confocal motorized pinhole ($100 \mu\text{m}$)로 검출하였다. RAON Scan (NOST, South Korea) software가 라만 스펙트럼을 수득하는데 사용되었다.

[99] 각 SERS 스펙트럼을 위해, MMP($100 \mu\text{L}$)로부터 방출된 신호 프로브 용액을 $100 \mu\text{L}$ 의 AuNP(OD 1.0)로 개질된 시스테아민과 5 분간 부드럽게 흔들며 혼합하고, 상기 용액을 $1,800 \text{ rpm}$ 에서 15 분간 원심분리하였다. 침전물을 포함하는 상기 원심분리한 용액을 라만 분석을 위해 커버 글라스(cover glass)의 well silicone isolator (2 mm diameter)에 옮겼다.

[100] Cy5, ATTO 488, ATTO 590, 및 ATTO 647의 주요 SERS 피크는 순수 또는 혼합된 상태(ATTO 488, ATTO 590, ATTO 647 또는 Cy5, ATTO 590, ATTO 647)에서 수득하였다. 라만 스펙트럼은 민감도 또는 다중진단능력 관점에서 비교하였다. Cy5의 주요 라만 산란 피크는 1187.08 , 1359.22 , 1465.1 , 및 1594.19 cm^{-1} 에서 선별되었다. ATTO 590의 주요 라만 산란 피크는 1333.29 , 1520.53 , 및 1640.75 cm^{-1} 에서 선별되었다. ATTO 647의 주요 라만 산란 피크는 1423.6 , 및 1626.82 cm^{-1} 에서 선별되었다(도 7).

[101]

[102] 실험결과 1. 세균 타겟 DNA 검출을 위한 MMP 기반 분석 디자인

[103] 핵산 검출을 위한 자성 마이크로입자(Magnetic microbead, MMP) 기반 분석은 다양한 방면에서 유용하고 간단한 방법이다. MMP는 초상자성으로 혼합 용액에서 자유롭게 분산될 수 있어 효율적으로 타겟 DNA와 혼성화할 수 있고, 외부 자기장을 걸어줌으로써 빠르게 분산될 수 있다. 본 발명에서는 상술한 MMP의 장점을 활용하여, 도 1에 도시한 바와 같이 MMP 기반 핵산 타겟 검출 방법을 고안하였다.

[104] 먼저, MMP를 타겟 DNA 서열과 반상보적인 타겟 캡처 프로브로 개질하였다. MMP는 타겟 서열 및, 타겟 서열과 반상보적인 (형광이 태그된) 신호 프로브 서열과 혼성화할 수 있다. MMP의 형광 강도는 쉽게 측정될 수 있으며, 형광 강도는 분석물의 타겟 DNA 양과 연관되어 있다. 형광 신호 강도는 MMP 용액의 농도를 95°C ($> T_m$)로 높임으로써 방출된 신호 프로브로 측정할 수 있다. 또한, 형광 프로브를 AuNP로 개질된 시스테아민(Cys-AuNPs)과 혼합함으로써 방출된 신호 프로브에서 형광 분자의 SERS 신호를 측정함으로써 SERS-기반 검출도 가능하다. 상기 방법으로, 본 발명은 bead에서 형광, 용액에서 형광, 및 SERS 강도와 같은 형태에 따른 분석 능력을 엄밀히 비교하였다. 또한, 최적화된 분석 플랫폼은 간단한 핵산 검출 전략을 위해 활용될 것이다.

[105]

[106] 실험결과 2. MMP에서 타겟 캡처 프로브 DNA(capture DNA) 양의 정량화

- [107] 먼저, EDC 커플링(coupling)을 사용하여 카복실기(COOH)-코팅된 자성 마이크로입자(MMP)의 커플링 반응을 통해 MMP를 아민이 개질된 타겟 캡처 프로브로 개질하였다(도 3). 상세한 제조과정은 실시예 2에서 상술하였다.
- [108] 성공적으로 결합되었는지 여부와 MMP에서 타겟 캡처 프로브의 양을 확인하기 위해, Cy5 염료를 포함한 상보적인 DNA 서열을 MMP에서 타겟 캡처 프로브와 3 시간동안 0.3M PBS에서 혼성화하였고, 과량의 결합되지 않은 Cy5 염료를 포함한 DNA 서열을 0.15M PBS를 이용하여 5 번 세척하였다. 이후, 용액을 95 °C까지 가열함으로써 MMP로부터 혼성화된 Cy5 서열을 방출하였다. 방출된 Cy5 DNA 서열의 형광 강도를 측정하고, Cy5 DNA 서열의 양을 계산하였다(도 3A).
- [109] Cy5 DNA 서열(1000, 500, 100, 50, 및 10 pM)과 수득한 보정 곡선(calibration curve)을 사용함으로써, Cy5 DNA 서열의 농도를 결정하였고, MMP 당 타겟 캡처 프로브의 양과 수를 계산하였다. 따라서, MMP 당 타겟 캡처 프로브 DNA의 수는 1.2×10^4 로 계산되었고, 이는 MMP의 결합 능력에 적합한 수치이다.
- [110]
- [111] **실험결과 3. 분석 조건의 최적화**
- [112] 타겟 핵산을 효율적으로 검출하기 위해서는 혼성화 시간, 염도와 같은 분석 조건이 매우 중요하다. 본 발명은 양 광학 신호를 포함하는 MMP 기반 분석 능력을 비교하기 전에 분석 조건을 최적화하였다. 도 2A에 나타낸 바와 같이, MMP(100 μ L, 0.03 mg/ml)의 희석액, 신호 프로브(50 μ L, 10^{-6} M, 5'-ATTO590 dye-TGGTTAACTTTTGCCTTA-3', 서열번호 8), 및 타겟 DNA (15 μ L의 10^{-8} M ~ 10^{-9} M 최종 농도, 5'-GTGCCAATGATCTTCGCTCGTAAGGCAAAAAGTTTAACCA-3'; *E. faecalis* 타겟 DNA, 서열번호 2)를 모두 혼합한 후, phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) 및 2 M NaCl을 첨가하여 최종 농도로 10 mM PB 및 0.3 M NaCl을 제조하였다. 이후, 상기 용액을 95 °C에서 2 분간 가열하고, 혼성화 시간(0, 1, 3, 6, 및 12 시간)을 다르게 하여 상온에서 혼합하였다. 최종적으로, 상층액을 제거하여 MMP를 분리하고, 0.15 M PBS buffer에서 5 번 세척하고, 10 μ L의 0.15 M PBS buffer를 첨가하였다. MMP로부터 ATTO590 염료의 형광 강도가 수득되었다($\lambda_{ex} = 610$ nm, $\lambda_{em} = 640$ nm).
- [113] 형광 강도는 혼성화 시간이 증가할수록 선형적으로 증가하였다. 형광 강도는 3시간 혼성화 시간부터 시작하여 12시간 배양시간일 때 포화상태에 이르렀다(도 2B). 3 시간 및 12 시간간 강도 차이가 약 20%이기 때문에, 3시간의 혼성화 시간은 전체적인 분석 시간을 고려했을 때 상대적으로 합리적이었다.
- [114] 염 (NaCl) 농도 또한 타겟 DNA를 효율적으로 혼성화함에 있어 필수적인 조건이다. 상술한 모든 조건을 동일하게 하고, 10 mM PB에서 0 M, 0.15 M, 0.3 M NaCl로 염의 농도만 달리하였다. 도 2C에 나타낸 바와 같이, 0.15 M NaCl에서 혼성화된 형광 강도가 0.3 M NaCl에서 수득한 결과보다 22.4 % 낮았다. 예상한

바와 같이, 높은 염 조건이 혼성화 수득률이 더 높았다. 상술한 결과들을 기초로, 본 발명에서는 MMP 기반 분석으로 혼성화 시간 3 시간, NaCl 농도 0.3 M을 채택하였다.

[115]

[116] 실험결과 4. 형광 및 SERS간 분석 능력 비교

[117] 본 발명은 두 개의 다른 광학 신호를 포함하는 MMP 기반 분석의 능력을 비교하였다. 먼저, 신호 프로브의 농도(10^{-6} M)를 고정된 상태에서, 타겟 농도의 범위(10^{-9} , 10^{-12} , 10^{-15} , 10^{-18} M)를 변화하며 MMP 기반 분석의 민감도(sensitivity)을 조사하였다(최적화된 분석 조건은 실험결과 3에서 상술하였다.).

[118] [표4]

<i>E. faecalis</i> 타겟 서열	서열번호 2	5'-GTGCCAATGATCTTCGCTCGTAAGGCAAAAAG TTTAACCA-3' (T_m ; 65.5 °C)
<i>E. faecalis</i> 캡처 프로브	서열번호 5	5'-CGAGCGAAGATCATTGGCAC-PEG-A ₁₀ -NH ₂ -3'
<i>E. faecalis</i> 신호 프로브	서열번호 8	5'-ATTO590 dye-TGGTTAACTTTTTGCCTTA-3'

[119]

[120] 형광 측정을 위해, 타겟 및 신호 프로브와 혼성화한 MMP 용액의 형광 강도를 측정하고, 이어서 MMP로부터 방출된 신호 프로브의 형광 강도를 측정하였다(도 8A). 도 8B에서 나타낸 바와 같이, MMP 용액의 형광 강도는 타겟 DNA의 농도가 감소함에 따라 상당히 감소하였다. 10^{-11} M의 타겟 농도의 경우, 형광 강도는 대조군(타겟이 없음)과 차이가 없었으며, 이는 형광 기반 방법의 검출 한계(0.1 nM)를 나타낸다. MMP의 형광 이미지는 MMP 용액에서 수득한 결과에 부합하였다. 방출된 신호 프로브 용액의 형광 강도 역시 동일한 경향을 보였으나, MMP의 강도보다는 낮았다.

[121]

SERS 기반 측정을 위해, 방출된 신호 프로브를 Cys-AuNP와 혼합하여 응집체(aggregate)를 형성하였다. 라만 스펙트럼은 633 nm 레이저를 조사함으로써 응집체 용액으로부터 측정하였다. 도 8C에 나타낸 바와 같이, 신호 프로브(ATTO 590)의 SERS 스펙트럼은 10^{-14} M의 타겟 DNA 농도에서도 명확하게 확인되었다. 세 개의 주요 라만 피크(1333.29, 1520.53 and 1640.75 cm^{-1})의 신호 강도는 다양한 타겟 농도(10^{-9} M ~ 10^{-14} M)로부터 수득되었으며, 이는 SERS 기반 검출의 넓은 동적 범위를 보여준다(도 8D). 상기 결과는 SERS 기반 검출의 우수한 민감도를 나타내며, 이는 바이오분석 분야에서 모든 분석에 있어 중요한 능력이다. 또한, 재현성(reproducibility) 또한 모든 분석에 있어 매우

중요한 문제이다. 본 발명자들은, SERS의 용액 기반 측정이 신호 재현성을 매우 향상시킨다는 점을 발견하였다. 신호 재현성을 측정하기 위해, 동일한 타겟 및 다양한 농도에 대한 세 번의 독립적인 측정이 수행되었고, 그 결과 방출된 신호 프로브 및 Cys-AuNP 혼합물로부터 동일한 SERS 스펙트럼을 보여주었다(도 6).

[122]

[123] 실험결과 5. 단일 타겟 DNA에 대한 다중진단능력(multiplexing capability)

[124] 민감도와 함께, 다중진단능력은 바이오분석 분야의 발전에 있어 매우 중요한 능력이다. 이러한 점에서, MMP 당 고농도의 타겟 캡처 프로브 DNA 서열을 가지는바, MMP의 사용은 매우 바람직하다. 이 때, 1.2×10^4 프로브 DNA 서열이 단일 MMP에 개질될 수 있다는 점을 특히 주의해야 한다. 세균 타겟 DNA를 위한 MMP의 다중진단능력을 증명하기 위해, MMP에 세 개의 다른 타겟 캡처 프로브가 개질되어야 하며, 이들은 각각 그들의 고안된 타겟 서열(*E. coli*, *E. faecalis*, 및 *S. aureus*)과 결합할 수 있어야 한다(도 9A). 동시에 다양한 타겟 서열을 검출하기 전에, 본 발명은 세 개의 다른 타겟 캡처 프로브로 개질된 MMP를 사용하여 단일 타겟 서열을 검출하는 방법에 대해 먼저 조사하였다. *E. coli*, *E. faecalis*, 및 *S. aureus* 검출을 위해, ATTO 488, ATTO 590, 및 ATTO 647 염료를 포함한 단일 프로브를 사용하였고, 현미경에서 GFP, TRITC, CY5 filter를 이용하여 형광 이미지를 획득하였다(도 7). 선별된 filter 세트는 단일 프로브 내에서 고안된 형광 염료에 적합하였다.

[125] 세 개의 타겟 캡처 프로브로 개질된 MMP를 단일 타겟(10^{-9} M)과 0.3 M PBS에서 3 시간동안 혼성화하였다. 일반적인 세척 단계를 수행한 후, MMP 용액의 형광 강도를 측정하였다. 도 9B에서 나타낸 바와 같이, 정확한 타겟 서열이 존재하는 경우에만(*E. coli* (1), *E. faecalis* (2), 및 *S. aureus* (3)) 강한 형광 강도가 획득되었다. 타겟이 없는 경우(4), 형광 신호는 관찰되지 않았다. MMP의 형광 이미지 역시 용액 기반 측정 결과, 즉 방출된 단일 프로브의 강도와 부합했다. 방출된 신호 프로브에서 획득한 결과는 MMP 기반 형광 측정 결과와 일치하였다(도 9C). 최종적으로, Cys-AuNP 및 단일 프로브의 혼합물로부터 획득한 SERS 스펙트럼은 ATTO 488, ATTO 590, 및 ATTO 647 염료의 전형적인 라만 스펙트럼과 부합하였다. 도 9D의 스펙트럼의 점선은 참조로서 각 염료의 라만 스펙트럼을 나타낸다. 모든 상기 결과는 다중진단 분석에서 중요한 시작점인 고안된 타겟에 대한 MMP의 특이적 결합 능력을 나타낸다. 라만 활성 분자의 선택 또한 분석의 민감도에 있어 중요하다. SERS를 위해, ATTO 488, ATTO 590, 및 ATTO 647 염료 및 금 나노입자를 633 nm로 여기(excitation)하였다. ATTO 488 염료 (400 - 534 nm)의 흡수 스펙트럼은 633 nm 여기상태에서 공명(resonance)을 일으키지 않았다. 도 10에서 나타낸 바와 같이, ATTO 488의 SERS 스펙트럼의 강도는 ATTO 590, 및 ATTO 647 염료의 강도에 비해 매우 약했다. 이는 다중진단 분석을 위한 바람직한 조건이 아니다. 상기 한계를 극복하기 위해, 633 nm 레이저 여기에서 cy5 염료가 높은 라만

단면(cross-section)을 가지고 1187.08, 1359.22, 및 1465.7 cm^{-1} 에서 뚜렷한 라만 피크를 보이는데, ATTO 488를 cy5 염료 ($\lambda_{\text{abs}} = 650 \text{ nm}$)로 대체하였다(도 10).

[126]

[127] 실험결과 6. 다수의 타겟 DNA에 대한 다중진단능력

[128] 다음으로, 다수의 타겟 DNA에 대한 MMP 기반 분석을 수행하였다. 형광 신호에 대한 다중진단능력을 입증하기 위해, 다수의 타겟 캡처 프로브로 개질된 MMP를 제조하고, 두 개의 타겟 서열의 혼합물과 혼성화하였다(*E. Coli* (1) 및 *E. faecalis* (2), 또는 *E. Coli* (1) 및 *S. aureus* (3), 또는 *E. faecalis* (2) 및 *S. aureus* (3))(도 11A). 분석(1.0 nM 타겟 농도, 0.3 M PBS, 3 시간 배양)을 수행한 후, 분석 결과는 도 11B와 같다. MMP 프로브는 *E. faecalis* (2) 또는 *S. aureus* (3)의 혼합물임에도 선택적으로 *E. Coli* (1) 타겟과 결합하였다. MMP 프로브는 또한 *E. Coli* (1) 또는 *S. aureus* (3)의 혼합물임에도 선택적으로 *E. faecalis* (2) 타겟과 결합하였다. 그러나, 이 경우에 분석 동안 비특이적 결합이 존재하기 때문에 증가된 형광 강도가 관찰될 수 있다. *S. aureus* (3) 타겟에 대해서, MMP 프로브는 *E. Coli* (1) 또는 *E. faecalis* (2)의 혼합물임에도 선택적으로 *S. aureus* (3) 타겟과 결합하였다. 방출된 프로브 용액의 형광 강도는 동일한 결과를 나타냈으나, *E. faecalis* (2) 타겟 검출에서 관찰된 현저한 비특이적 결합 신호는 상당히 감소하였다. 형광 신호를 포함한 MMP 기반 분석은 높은 정확도의 결과를 보일뿐 아니라, 세 개의 다른 타겟에 대해서 우수한 다중진단능력을 갖는다.

[129] SERS 기반 신호를 사용한 다중진단능력 역시 두 개의 타겟 서열의 혼합물을 이용하여 조사하였다(*E. Coli* (1) 및 *E. faecalis* (2), 또는 *E. Coli* (1) 및 *S. aureus* (3), 또는 *E. faecalis* (2) 및 *S. aureus* (3)). MMP로부터 신호 프로브가 방출된 후, 단일 프로브 및 Cys-AuNP의 혼합물로부터 SERS 스펙트럼을 획득하였다. 상술한 바와 같이, SERS 리포터로서, *E. Coli* (1) 타겟에는 cy5 염료를, *E. faecalis* (2) 타겟에는 ATTO 590 염료를, *S. aureus* (3) 타겟에는 ATTO 647 염료를 사용하였다. 도 11D에 도시한 바와 같이, *E. Coli* (1) 및 *E. faecalis* (2), *E. Coli* (1) 및 *S. aureus* (3), 또는 *E. faecalis* (2) 및 *S. aureus* (3)로부터 획득한 SERS 스펙트럼은 매우 복잡하였다. cy5, ATTO 590, 및 ATTO 647 염료의 특이한 라만 스펙트럼 패턴은 스펙트럼 중복(spectral overlap)에 의해 쉽게 구별되지 않았다. 상기 결과는 다중진단 분석을 위한 SERS 리포터의 선택에 있어서, 서로 중복되지 않도록 하는 것이 가장 중요하다는 점을 나타낸다. 상업적인 형광 염료는 구조적으로 유사하고 복잡한 화학적 구조를 가지므로 스펙트럼 중복을 피할 수 없다. 따라서, 4,4'-dipyridyl, 4-azobis(pyridine) 또는 alkyne dye와 같이 높은 라만 단면(Raman cross-section)을 가지는 간단한 화학적 구조들이 라만 리포터로서, 특히 다중진단 라만 기반 분석에 있어서 바람직할 것이다.

[130]

[131] 실험결과 7. *E. coli*. 유전체 DNA의 검출

[132] MMP 기반 분석 능력을 실제 세균 타겟에 적용하기 위해, 추출된 *E. coli*의

유전체 DNA를 위한 양 광학 신호를 포함한 분석의 민감도를 조사하였다. 도 12A는 유전체 DNA를 추출하는 과정이 도시되어 있다. 상세한 추출 방법 및 추출된 *E. coli*의 농도를 결정하는 방법은 실시예 4에 상술하였다. *E. coli*의 농도를 30 pM, 3.0 pM, 300 fM, 및 30 fM으로 조정하고, 이후 동일한 분석 프로토콜에 따라 민감도를 비교하였다. 이 경우, 양 광학 신호를 정확하게 비교하기 위해 cy5 염료와 결합된 신호 프로브를 사용하였다.

- [133] 도 6B에 나타난 바와 같이, 형광 신호는 MMP에서 명확하게 관찰되었으며, 300 fM의 타겟 농도에서 신호 프로브가 방출되었다. 상기 결과의 표준 편차는 세 개의 독립적인 분석 결과의 강도 편차이다. 형광 신호의 민감도(300 fM)는 상술한 결과(ATTO 590 염료 및 *E. faecalis* 타겟으로부터 수득한 결과)와 비교하여 3×10^3 배 더 높았다. 이 때, Cy5의 물 추출 계수가 ATTO 590의 계수보다 2 배 더 높다는 점을 특히 주의해야 한다. 도 12C에 도시한 바와 같이, SERS 기반 분석은 30 fM의 타겟 농도에서 cy5의 명확한 라만 스펙트럼을 수득할 수 있으며, 타겟 샘플이 없는 경우, 신호도 관찰되지 않았다. 모든 상기 결과는 양 광학 신호를 포함한 MMP 기반 분석이 실제 세균 샘플에서도 핵산 타겟을 검출하는데 우수한 능력을 가진다는 점을 나타낸다. 상기 전체 분석 과정을 수행하는데 4 시간이 소요되었으며, 이는 패혈증의 발병을 방지하기 위해 세균을 규명하는 매우 중요한 과정이다. 단일 타겟 검출에 있어, SERS-기반 신호는 형광 기반 신호보다 우수했으나, SERS를 이용한 다중진단 분석은 라만 리포터의 고안이 중요하므로, 이는 더 실용적인 진단을 위한 MMP 기반 분석의 향후 개발 방향이 될 것이다.

[134]

- [135] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 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.

청구범위

- [청구항 1] (a) 타겟 캡처 프로브로 개질된 자성 마이크로입자(magnetic microparticles, MMP)를 제조하는 단계;
 (b) 상기 타겟 캡처 프로브로 개질된 MMP를 검출하고자 하는 바이오물질 특이적 타겟서열 및 신호 프로브와 혼성화하는 단계;
 (c) 상기 혼성화된 MMP를 포함하는 용액 및 상기 MMP 용액으로부터 방출된 신호 프로브로부터 형광 신호를 각각 검출하는 단계; 및
 (d) 상기 방출된 신호 프로브에 금속 나노입자를 첨가하여 라만(SERS) 신호를 검출하는 단계;
 를 포함하는 바이오물질 다중 검출방법에 관한 것으로서,
 상기 타겟 캡처 프로브와 신호 프로브는 각각 상기 타겟 서열과 반상보적(half-complementary)인 것을 특징으로 하는, 바이오물질 다중 검출방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 (a) 단계의 MMP는 종류가 다른 2개 이상의 타겟 캡처 프로브로 개질된 것으로서, 2종 이상의 타겟 서열에 특이적으로 결합하는, 바이오물질 다중 검출방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
 상기 (b) 단계에서 혼성화 시간은 3 시간 내지 12 시간이고, 0.15 M 내지 0.3 M 농도의 염을 처리하는 것을 특징으로 하는, 바이오물질 다중 검출방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
 상기 (c) 단계의 방출된 신호 프로브는 상기 혼성화된 MMP 용액에 자기장을 걸어 분리되고, 상기 타겟 서열의 T_m (melting temperature)보다 높은 온도로 가열됨으로써, MMP로부터 신호물질이 방출되는 것을 특징으로 하는, 바이오물질 다중 검출방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
 상기 검출방법은 최소 검출한계가 30 fM인 것을 특징으로 하는, 바이오물질 다중 검출방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
 상기 금속 나노입자의 표면을 시스테아민(cysteamine), APTES(3-Aminopropyl)triethoxysilane), APTMS(3-Aminopropyl)trimethoxysilane, AEAPTMS(N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine, MPTMS(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane, MPTES((3-Mercaptopropyl)triethoxysilane), MPA(mercaptopropionic acid), MHA(6-mercaptohexanoic acid), BDT(1,4- benzenedithiol),

MBA(4-mercaptobenzoic acid), 및 MBIA(2-mercaptobenzoimidazole-5-carboxylic acid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상으로 개질한 것을 특징으로 하는, 바이오물질 다중 검출방법.

[청구항 7]

제1항에 있어서,
상기 신호 프로브는 형광물질, 발색물질, 또는 화학발광물질, 라만 신호물질로 표지되어 있는, 바이오물질 다중 검출방법.

[청구항 8]

제7항에 있어서,
상기 형광물질은 ATTO 계열 염료, 시아닌(Cyanine) 계열 염료, FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(terramethylrhodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 및 써아디카르보시아닌(thiadibenzocyanine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 바이오물질 다중 검출방법.

[청구항 9]

제1항에 있어서,
상기 검출방법은 웰, 채널, 튜브, 또는 이들의 조합에서 수행되는 것인, 바이오물질 다중 검출방법.

[청구항 10]

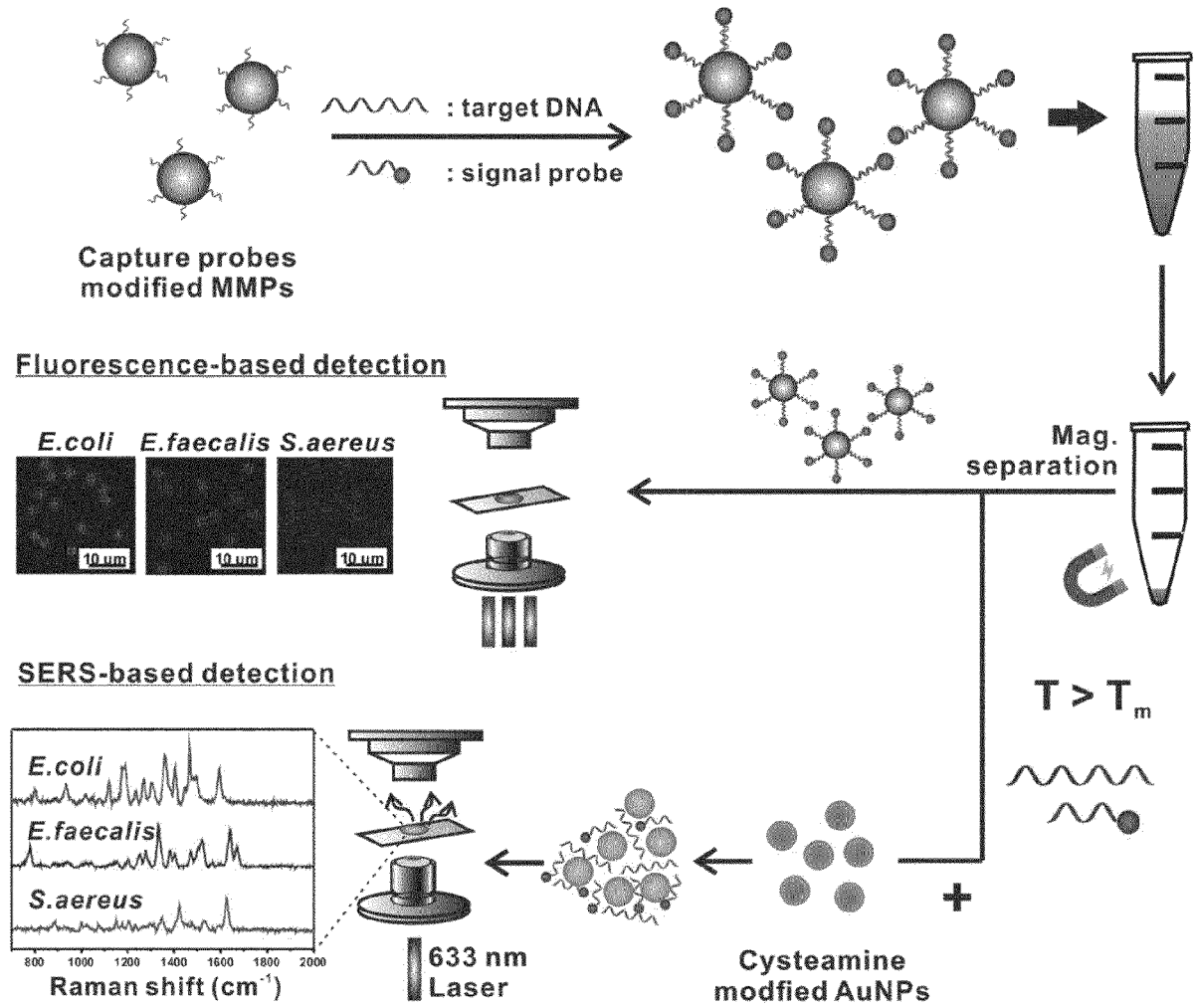
제1항에 있어서,
상기 바이오물질은 단백질, 세포, 바이러스, 핵산, 유기분자, 로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 바이오물질 다중 검출방법.

[청구항 11]

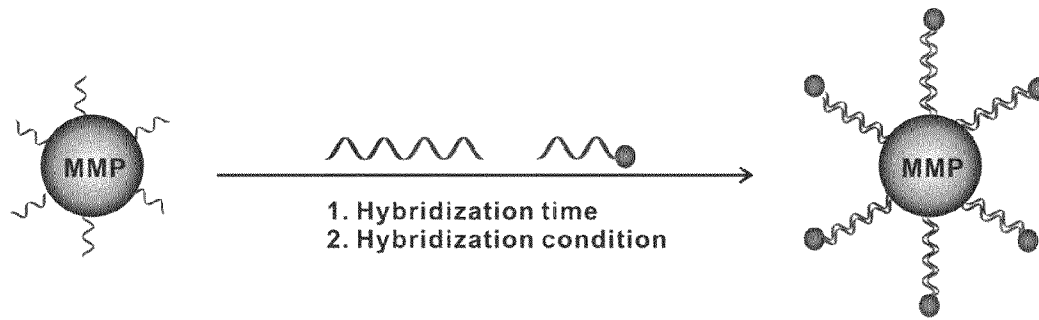
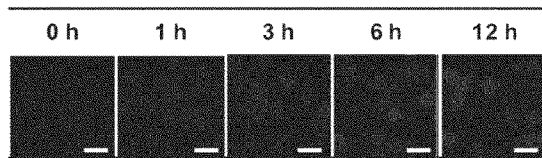
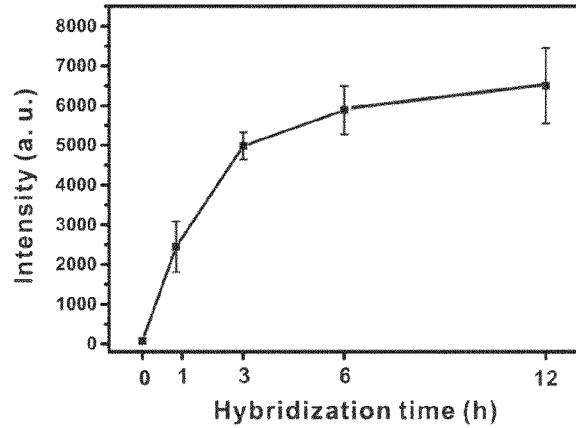
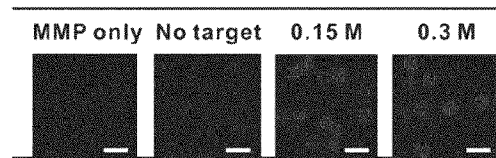
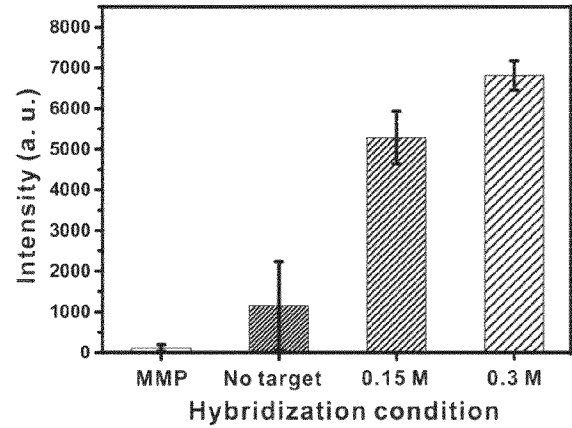
(a) 타겟 캡처 프로브로 개질된 자성 마이크로입자(magnetic microparticles, MMP)를 제조하는 단계;
(b) 상기 타겟 캡처 프로브로 개질된 MMP를 검출하고자 하는 바이오물질 특이적 타겟 서열 및 신호 프로브와 혼성화하는 단계;
(c) 상기 혼성화된 MMP를 포함하는 용액 및 상기 MMP 용액으로부터 방출된 신호 프로브로부터 형광 신호를 각각 검출하는 단계; 및
(d) 상기 방출된 신호 프로브에 금속 나노입자를 첨가하여 방출되는 라만(SERS) 신호를 검출하는 단계;
를 포함하는 세균 감염성 질환을 진단하기 위한 정보제공방법에 관한 것으로서,
상기 타겟 캡처 프로브와 신호 프로브는 각각 상기 타겟 서열과

- 반상보적(half-complementary)인 것을 특징으로 하는, 정보제공방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 (a) 단계 이전에, 세균 감염성 질환이 의심되는 환자샘플에서 유전체 DNA를 추출하는 단계를 포함하는, 정보제공방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 환자샘플은 혈액, 혈청, 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 정보제공방법.
- [청구항 14] 제11항에 있어서,
상기 (a) 단계의 MMP는 종류가 다른 2개 이상의 타겟 캡처 프로브로 개질된 것으로서, 2종 이상의 타겟 서열에 특이적으로 결합하여, 상기 타겟 서열을 포함하는 미생물을 각각 원인균으로 하는 2종 이상의 세균 감염성 질환을 진단하기 위한 정보제공방법.
- [청구항 15] 제11항에 있어서,
상기 (d) 단계 이후에, 상기 바이오물질에 의한 형광 신호 또는 라만 신호의 정보를 이용하여 세균 감염성 질환 원인균의 존재 여부 또는 상기 원인균의 종류를 판정하는 단계를 포함하는, 정보제공방법.
- [청구항 16] 제11항에 있어서,
상기 세균 감염성 질환은 패혈증, 부비동염, 폐렴, 식중독, 이질, 결핵, 녹농균 감염, 농가진, 화농성 질환, 급성 피부염, 균혈증, 심내막염, 장염, 골관절염, 골수염, 요로감염, 뇌염, 뇌막염, 및 신장염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 정보제공방법.
- [청구항 17] 제11항에 있어서,
세균은 그람 양성균, 그람 음성균 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 정보제공방법.

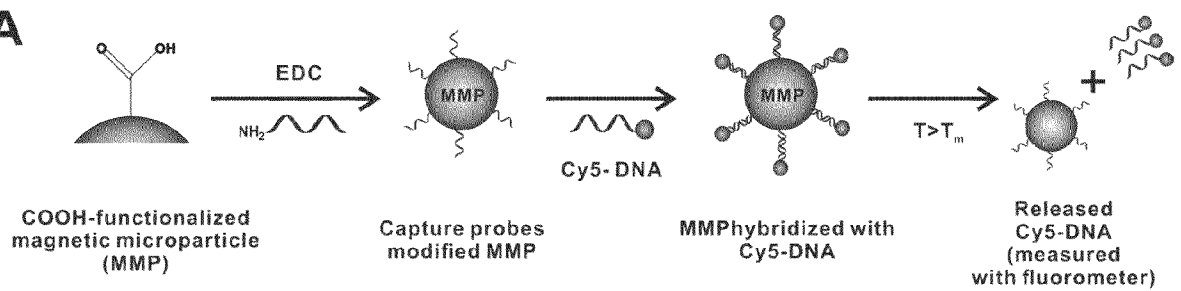
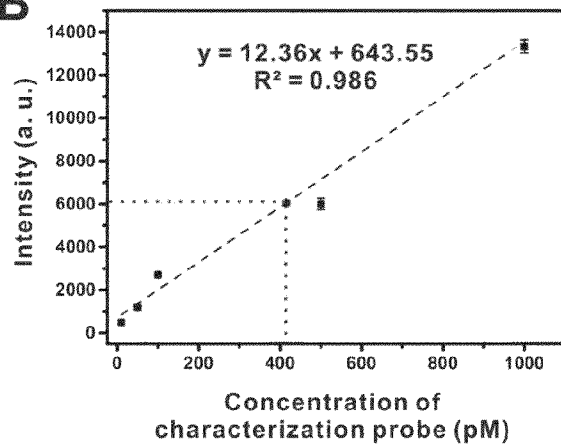
[도1]



[도2]

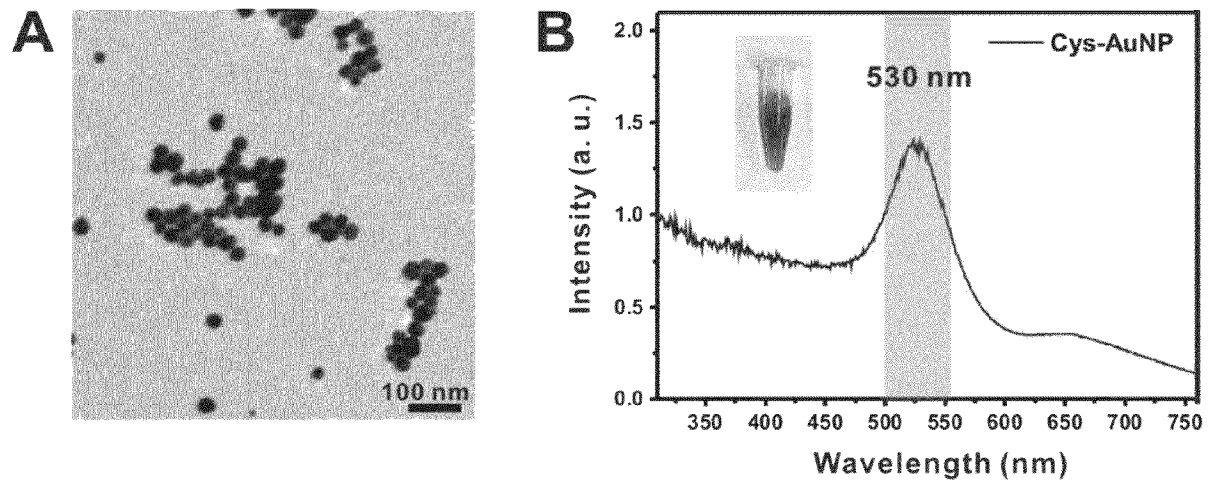
A**B****C*** target concentration : 10^{-9} M

[도3]

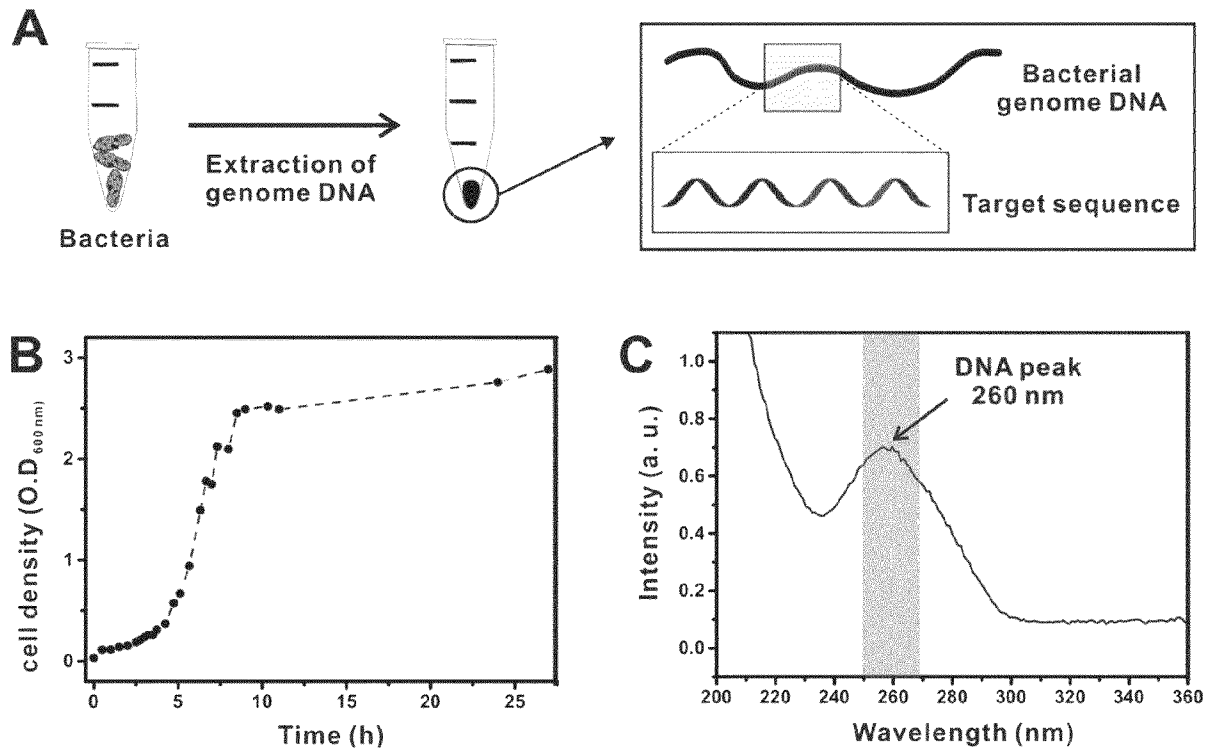
A**B****C**

	B/F	Cy5 filter
COOH-functionalized magnetic microparticles (MMPs)		
MMPs hybridized with Cy5-DNA		
MMPs after Cy5-DNA are released		

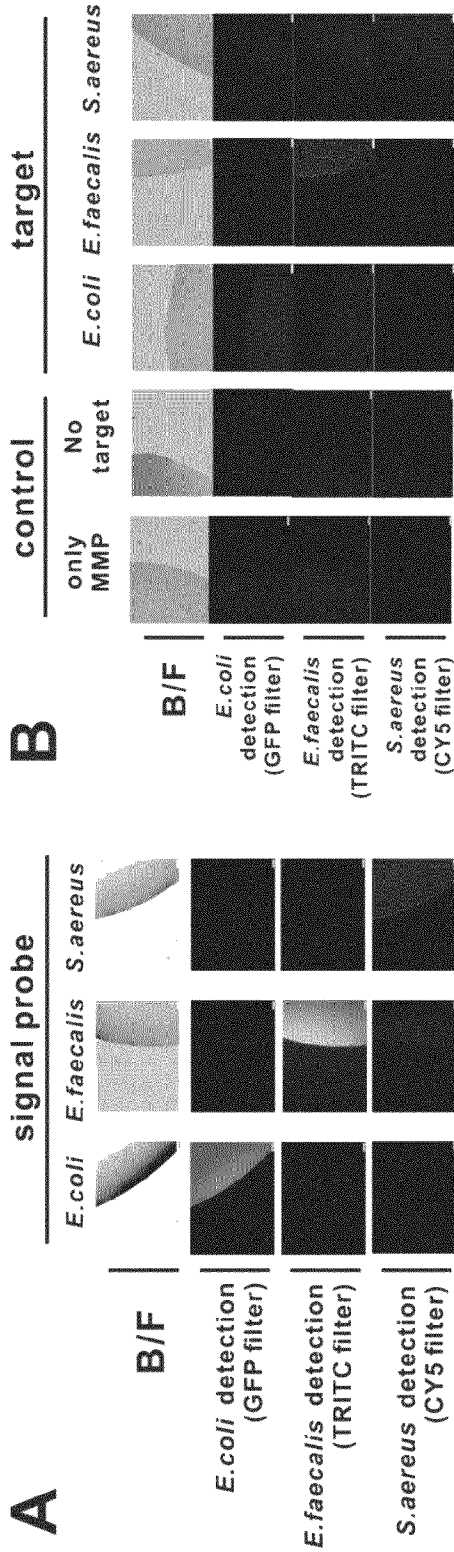
[도4]



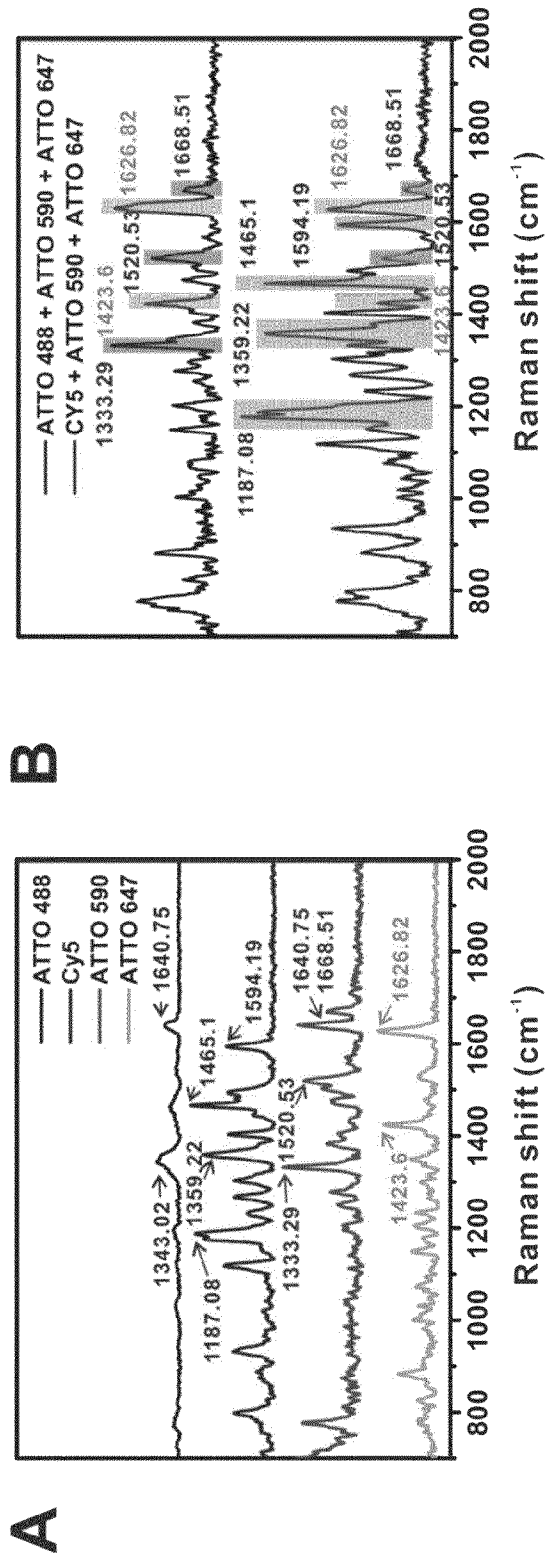
[도5]



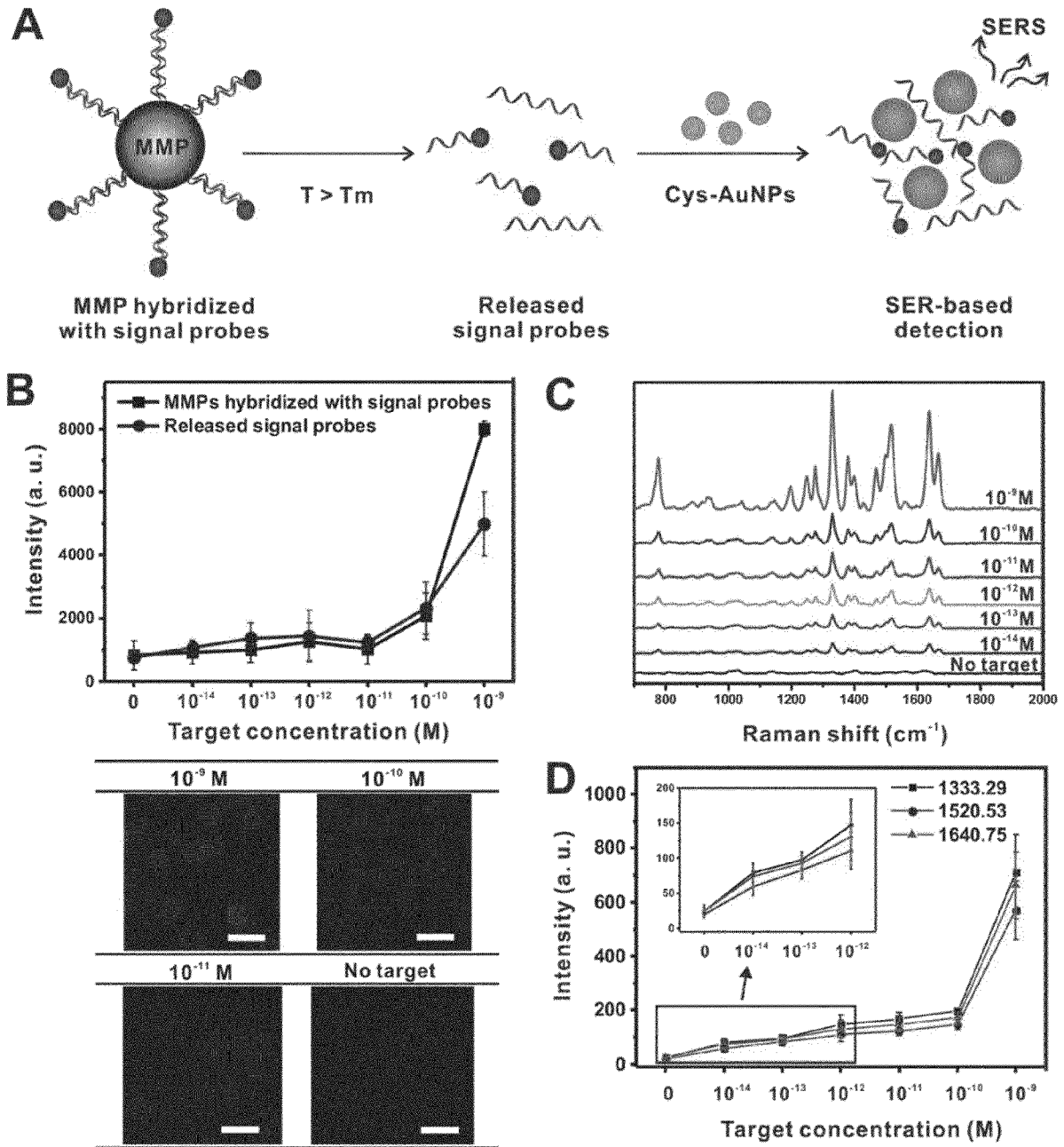
[도6]



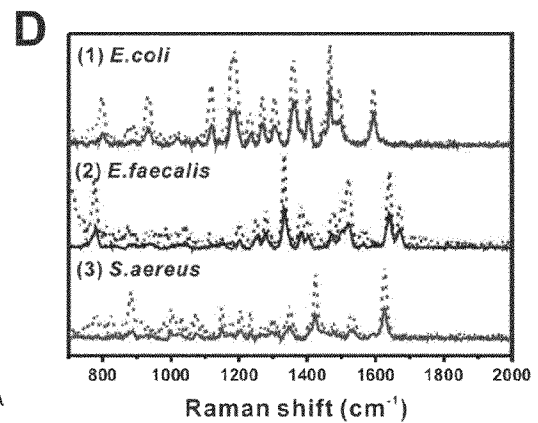
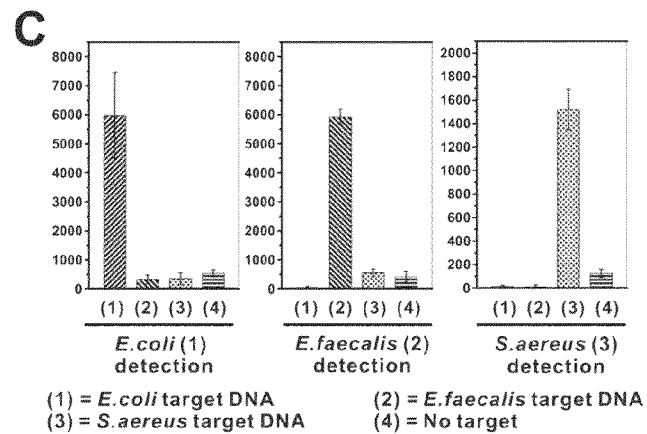
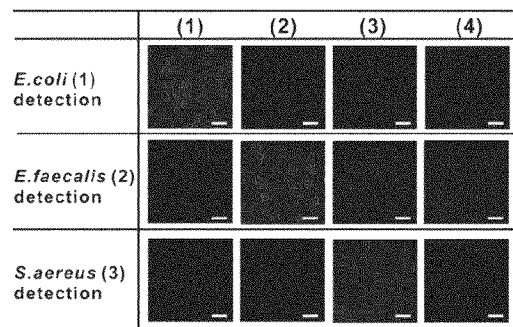
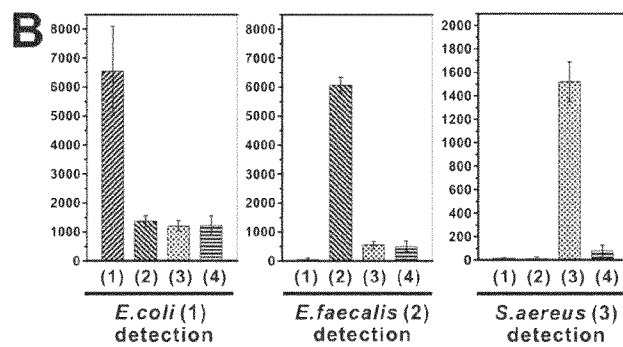
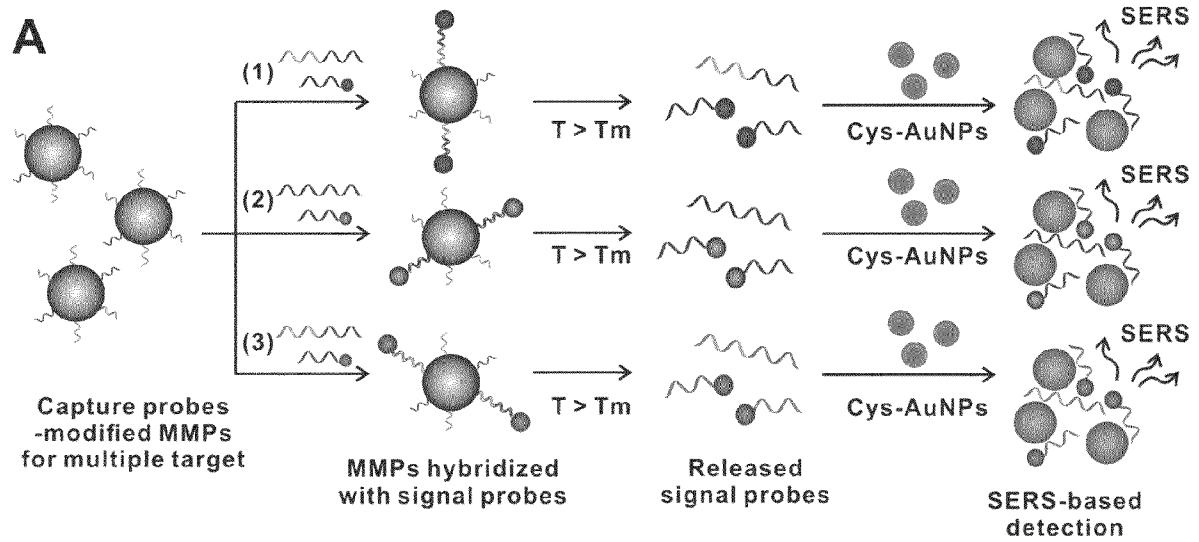
[도7]



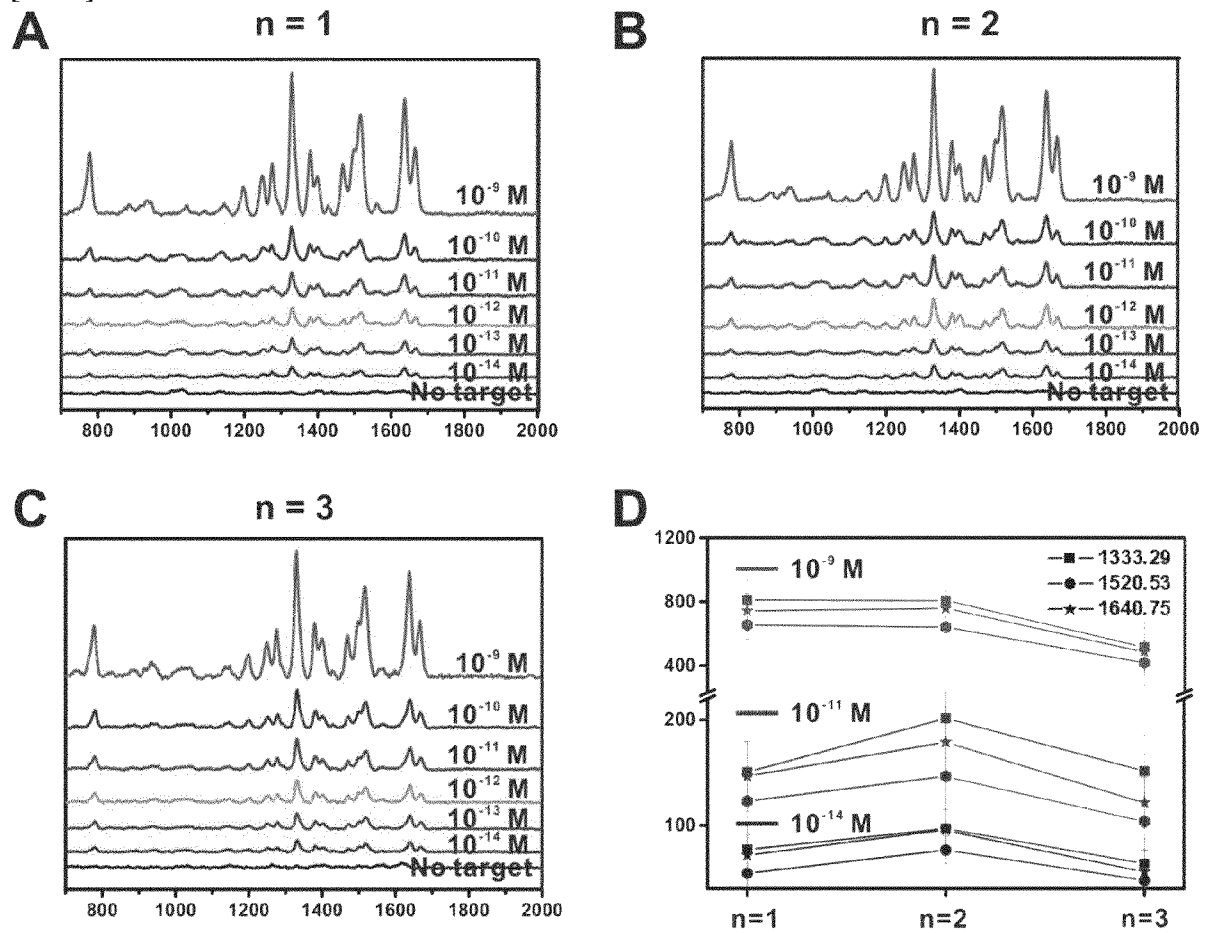
[도8]



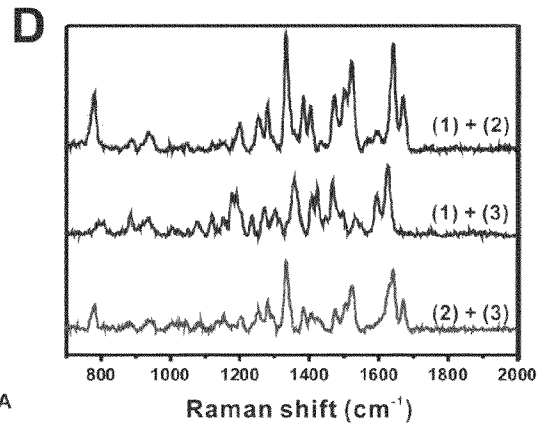
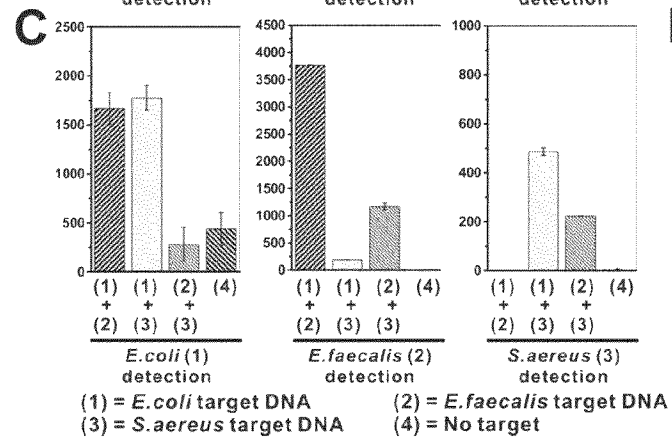
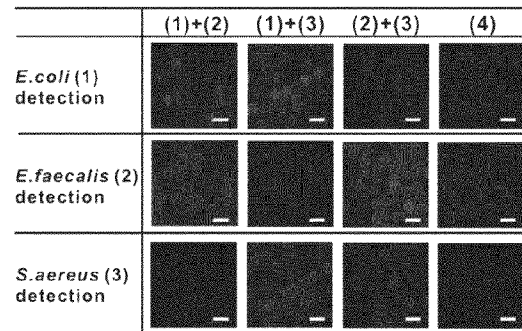
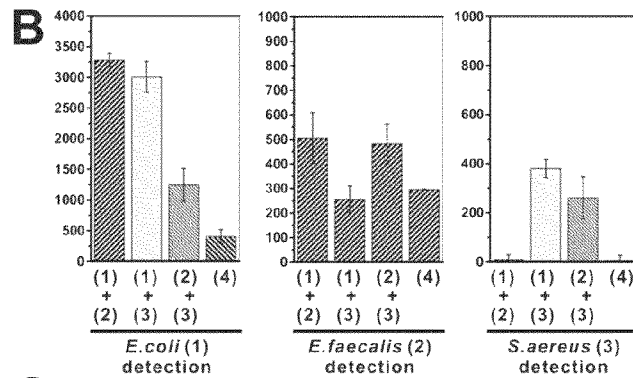
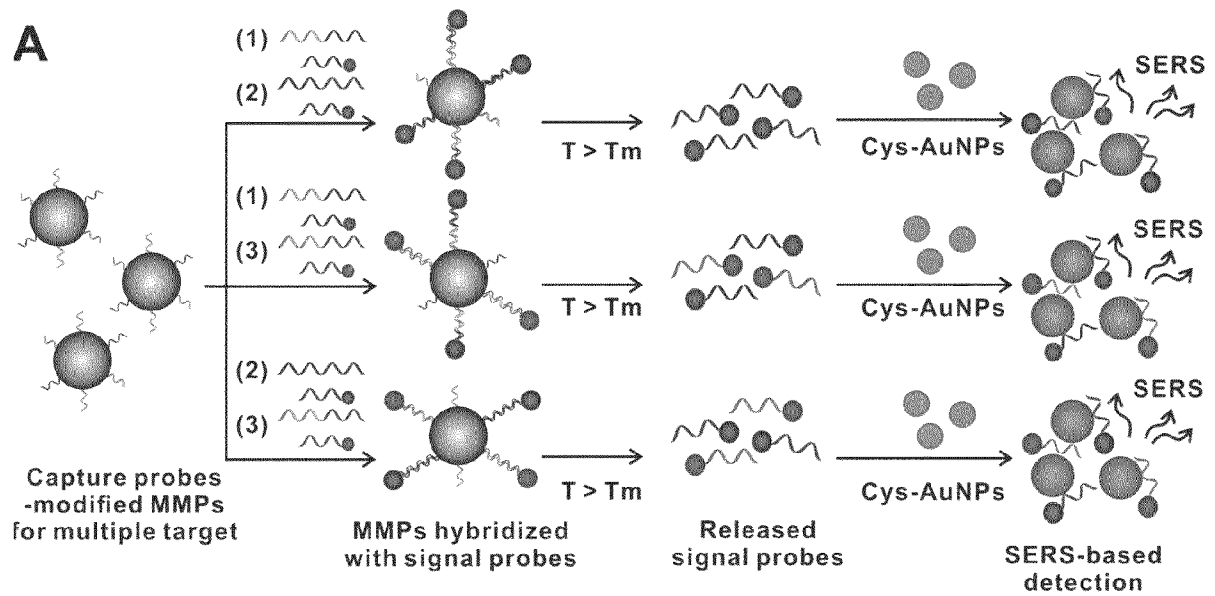
[도9]



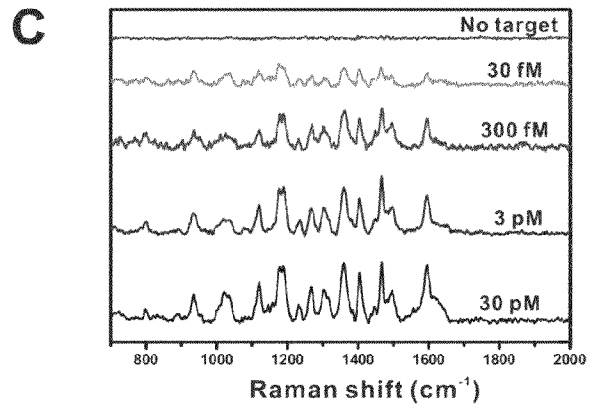
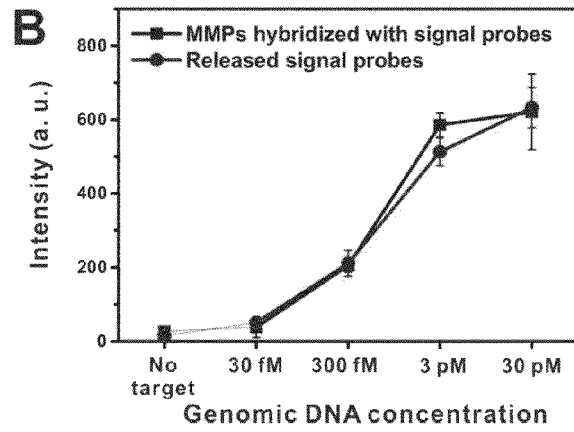
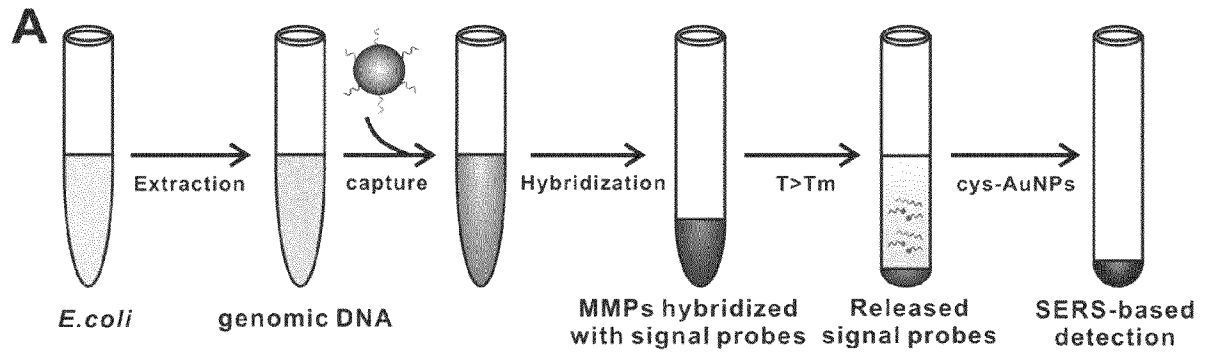
[도10]



[도11]



[도12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/016288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6816(2018.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/6816(2018.01); G01N 21/00(2006.01); G01N 21/65(2006.01); G01N 33/543(2006.01); G01N 33/569(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 자성 마이크로입자(magnetic microparticle), 바이오물질(biomolecule), 타겟 캡처 프로브(target capture probe), 신호 프로브(signal probe), 형광 신호(fluorescence signal), 라만 신호(Raman signal)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	김봉수. 금 나노선을 이용한 다중 병원균 진단센서 개발. 과학과 기술. May 2010, pp. 56-58. non-official translation (KIM, Bongsu. Development of Multi-Pathogen Diagnostic Sensor using Gold Nanowires. The Science & Technology.) See entire document.	1-17
A	KR 10-1712429 B1 (KOREA CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al.) 08 March 2017 (2017-03-08) See entire document.	1-17
A	KR 10-2016-0119318 A (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY ERICA CAMPUS) 13 October 2016 (2016-10-13) See entire document.	1-17
A	KR 10-2016-0086768 A (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY ERICA CAMPUS et al.) 20 July 2016 (2016-07-20) See entire document.	1-17
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 March 2022		Date of mailing of the international search report 02 March 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/016288**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2015-0008291 A (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY ERICA CAMPUS) 22 January 2015 (2015-01-22) See entire document.	1-17
X	HWANG, M. J. et al. Comparative study of fluorescence and surface-enhanced Raman scattering with magnetic microparticle-based assay for target bacterial DNA detection. Sensors and Actuators B: Chemical . (electronic publication) 01 November 2020, vol. 329, thesis no. 129134 (pp. 1-10). See abstract; pages 3-5; formula 1; and figures 2 and 3. ※ This document is a document declaring non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty by the applicant in an earlier national application.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/016288

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/016288

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR	10-1712429	B1	08 March 2017	None	
KR	10-2016-0119318	A	13 October 2016	KR	10-1839849 B1 21 March 2018
KR	10-2016-0086768	A	20 July 2016	KR	10-1860543 B1 24 May 2018
				US	2018-0024147 A1 25 January 2018
				WO	2016-111538 A2 14 July 2016
				WO	2016-111538 A3 09 September 2016
KR	10-2015-0008291	A	22 January 2015	KR	10-1486149 B1 26 January 2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6816(2018.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6816(2018.01); G01N 21/00(2006.01); G01N 21/65(2006.01); G01N 33/543(2006.01); G01N 33/569(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 자성 마이크로입자(magnetic microparticle), 바이오물질(biomolecule), 타겟 캡처 프로브(target capture probe), 신호 프로브(signal probe), 형광 신호(fluorescence signal), 라만 신호(Raman signal)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	김봉수, '금 나노선을 이용한 다중 병원균 진단센서 개발', 과학과 기술, 2010.05, 56-58 페이지 전체 문헌	1-17
A	KR 10-1712429 B1 (대한민국(관리부서 질병관리본부장) 등) 2017.03.08 전체 문헌	1-17
A	KR 10-2016-0119318 A (한양대학교 에리카산학협력단) 2016.10.13 전체 문헌	1-17
A	KR 10-2016-0086768 A (한양대학교 에리카산학협력단 등) 2016.07.20 전체 문헌	1-17
A	KR 10-2015-0008291 A (한양대학교 에리카산학협력단) 2015.01.22 전체 문헌	1-17
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년03월02일(02.03.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년03월02일(02.03.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	HWANG, M. J. 등, 'Comparative study of fluorescence and surface-enhanced Raman scattering with magnetic microparticle-based assay for target bacterial DNA detection', Sensors and Actuators B: Chemical, (전자공개)2020.11.01, 329권, 논문번호 129134(1-10 페이지) 초록; 페이지 3-5; 도식 1; 도면 2, 3 ※ 위 문헌은 선국내출원에서 출원인에 의해 `신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외`가 선언된 문헌임.	1-17

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2021/016288

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1712429 B1	2017/03/08	없음	
KR 10-2016-0119318 A	2016/10/13	KR 10-1839849 B1	2018/03/21
KR 10-2016-0086768 A	2016/07/20	KR 10-1860543 B1	2018/05/24
		US 2018-0024147 A1	2018/01/25
		WO 2016-111538 A2	2016/07/14
		WO 2016-111538 A3	2016/09/09
KR 10-2015-0008291 A	2015/01/22	KR 10-1486149 B1	2015/01/26