(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0127280
(43) 공개일자 2012년11월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 11/00 (2006.01) *G01N 33/573* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0049846
(22) 출원일자 2012년05월10일
심사청구일자 2012년05월10일
(30) 우선권주장
1020110043981 2011년05월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김중배
서울특별시 강남구 역삼2동 래미안펜타빌아파트 101동 1501호
황상연
경기도 광명시 광명7동 상우1차아파트 101동 1908호
엄지영
인천광역시 부평구 산곡4동 경남4차아파트 406동 1001호
(74) 대리인
특허법인리온

전체 청구항 수 : 총 22 항

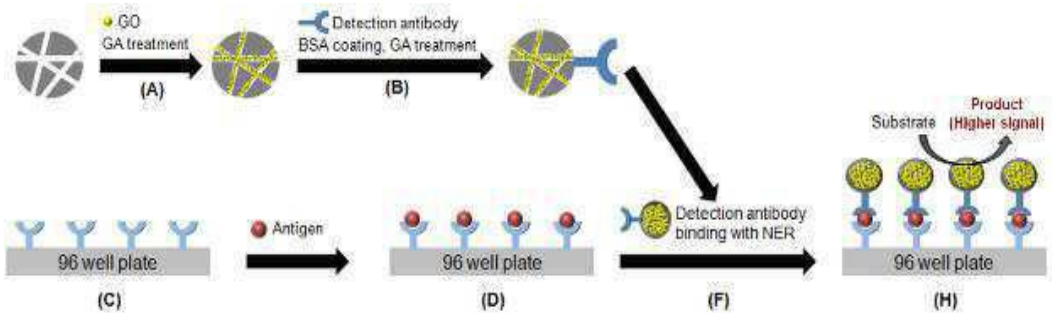
(54) 발명의 명칭 **효소면역측정용 효소-담체 복합체 및 그 제조방법**

(57) 요 약

본 발명의 효소면역측정용 효소-담체 복합체는 효소 한 분자가 효소반응을 일으키는 것이 아닌 다공성 입자에 담지된 고집적된 효소들에 의한 효소반응은 기존의 효소반응에 비해 향상된 신호를 얻을 수 있어 저농도의 항원까지 검출 및 정량이 가능할 뿐 아니라 오랜기간동안 안정하게 보관할 수 있다.

또한, 효소-담체 복합체의 형상을 무정형이 아닌 항체의 접근 시 입체장애가 거의 발생하지 않는 형상을 사용하므로 반응기의 표면에 항체가 쉽게 컨쥬게이트 될 수 있을 뿐 아니라, 컨쥬게이트된 항체들이 용이하게 항원과 결합할 수 있다. 이를 통해 무정형의 효소-담체 복합체에 비하여 약 1/50 이하의 항원농도에 대하여 면역반응을 수행할 수 있다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011K000833
부처명	교육과학기술부
연구사업명	신기술 융합형 성장동력사업
연구과제명	고활성, 고안정 나노-단백질 원천기술 개발 및 ELISA에서의 응용
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.07.01 ~ 2012.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20118510020020-11-1-000
부처명	한국에너지기술평가원
연구사업명	에너지국제공동연구사업
연구과제명	이산화탄소의 전환공정 개발을 위한 효소 고정화 및 안정화
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.12.01 ~ 2012.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

볼록한 다공성 담체; 및

상기 다공성 담체의 공극 내부에 담지된 효소를 포함하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 다공성 담체의 외부 표면적 중 오목부의 입구 표면적이 99% 이하인 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 오목부의 깊이가 100㎚ 이하인 것을 특징으로 하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 다공성 담체의 단면의 형상은 구형, 타원형 또는 다각형인 것을 특징으로 하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 다공성 담체는 항체가 다공성 담체의 표면에 결합이 용이하도록 볼록부를 포함하는 것을 특징으로 하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 다공성 담체의 크기는 0.1 ~ 50 ㎛인 것을 특징으로 하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 다공성 담체의 재질은 실리카, 카본, 폴리스티렌, 키토산, 마그네슘 및 제올라이트로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 다공성 담체의 공극의 크기는 1 ~ 1000㎚ 인 것을 특징으로 하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 다공성 담체의 표면은 항체가 다공성 담체의 공극내부로 유입되는 것을 차단하고 다공성 담체가 고르게 분산되도록 하기 위하여 분산제로 코팅된 것을 특징으로 하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 효소는 모트립신, 트립신, 서브틸리신, 파파인, 리파아제, 홀세라디쉬 페록시다아제, 소이빈 페록시다아제, 클로로 페록시다아제, 망가네이제 페록시다아제, 티로시나아제, 락카아제, 셀룰라아제, 사일라네이즈, 락타아제, 수크라아제, 오가노포스포히드로라아제, 클로리네스테라아제, 글루코스 옥시다아제, 알코올 데히드로제나아제, 글루코스 데히드로제나아제, 히드로제나아제 및 글루코스 이소머라아제로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 효소는 담체의 공극내부에 흡착된 것을 특징으로 하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 12

제1항에 있어서

상기 효소는 담체의 공극내부에 공유결합된 것을 특징으로 하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 효소는 다공성 담체의 공극 내부에 담지되며 직경이 공극의 입구 크기보다 큰 가교결합된 효소집적체를 포함하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 다공성 담체는 만곡된 공극을 포함하여 가교결합된 효소집적체가 유출되지 않는 것을 특징으로 하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 15

제1항에 있어서

상기 효소는 효소간 가교결합체를 형성하면서 담체와 공유결합된 것을 특징으로 하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 효소면역측정용 효소-담체 복합체; 및

상기 효소면역측정용 효소-담체 복합체의 표면에 컨쥬게이트된 항체를 포함하는 복합체.

청구항 17

(1) 볼록한 다공성 담체의 공극 내부에 효소를 첨가하는 단계;

(2) 상기 다공성 담체의 표면에 항체가 컨쥬게이트 되도록 항체를 첨가하는 단계;를 포함하는 복합체의 제조방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 (1) 단계와 (2) 단계 사이에, 항체가 다공성 담체의 공극내부로 유입되는 것을 차단하고 다공성 담체가 고르게 분산되도록 하기 위하여 다공성 담체의 표면을 분산제로 코팅하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 복합체의 제조방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 분산제는 소혈청알부민(Bovine serum albumin), 인간혈청알부민(Human serum albumin), 무지방 우유(skimmed milk)로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 복합체의 제조방법.

청구항 20

제17항에 있어서,

상기 담체의 공극 내부는 효소와 공유결합될 수 있는 작용기를 포함하는 것을 특징으로 하는 복합체의 제조방법.

청구항 21

제17항에 있어서,

상기 (1) 단계와 (2) 단계 사이에 가교결합제를 첨가하여 가교결합된 효소집적체를 형성하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 복합체의 제조방법.

청구항 22

제16항의 복합체를 이용한 효소면역측정방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 효소면역측정용 효소-담체 복합체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 종래의 단일효소 결합 항체 기반 면역분석법을 이용하여 정량이 되지 않던 저농도 항원을 검출할 수 있는 효소-담체 복합체 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역분석법(immunoassay)이란 시료의 분석과정에서 항체를 이용하는 기술을 의미한다. 초기에는 연구자들이 주로 단백질의 검출이나 정량을 위하여 이 방법을 사용하였으나, 최근에는 항체기술의 발전으로 저분자 화합물, 탄수화물, 지질 등의 분석 및 각종 미생물의 분석에도 활용하고 있다. 면역분석법은 그 검출 원리 및 방법에 따라 방사성 동위원소를 사용하여 신호를 검출하는 방사면역분석법(RIA: radio immunoassay), 효소에 의한 신호증폭을 사용하는 효소면역측정법(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, 혹은 EIA: enzyme immunoassay), 형광을 이용하여 검출하는 형광항체법(FA: fluorescence antibody technique), 화학발광을 사용하는 화학발광면역측정법(CLIA: chemiluminescence immunoassay) 등으로 나눌 수 있으며, 그 밖에도 표지물질의 사용 방법이나 기질의 종류에 따라 다양한 분류가 가능하다.

[0003] 여러 가지 면역분석법 중 현재 가장 많이 사용되고 있는 방법이 효소면역측정법이며, 상기 분석법은 항체의 활용 방법에 따라 직접효소면역측정법(Direct ELISA), 간접효소면역측정법(Indirect ELISA) 및 샌드위치효소면역 측정법(Sandwich ELISA)의 3가지로 세분할 수 있다. 직접효소면역측정법은 고체표면에 고정된 항원에 효소와 연결된 항체(Enzyme-linked Antibody)가 결합하면 효소가 기질의 반응을 촉매 함으로써 신호를 생성하게 된다.

[0004] 간접효소면역측정법은 1차로 주항체(primary antibody)가 항원에 특이적인 결합을 하고, 2차로 효소가 연결된 보조항체(secondary antibody)가 주항체를 인식하여 결합한다. 이 상태에서 보조항체에 연결되어 있는 효소가 기질의 반응을 촉매 하여 신호를 내게 된다. 마지막으로, 가장 널리 사용되는 형태인 샌드위치효소면역측정법은 검출하려는 하나의 항원에 대하여, 인식부위(epitope)가 다른 2종의 항체를 사용하는 것이며, 검출하고자 하는 항원에 대한 높은 선택성을 나타내어 진단용으로도 많이 사용이 되고 있다. 하지만 상기 방법들을 사

용하는 많은 연구자는 점점 더 높은 검출감도를 요구하고 있다(Yolken RH et al., J Clin Microbiol 10:317-21,1979).

[0005] 한편, 도 1은 종래의 단일효소 결합항체를 이용한 샌드위치효소면역측정법을 나타낸 것이다. 상기 방법은 하나의 효소에 대하여 하나의 항체가 결합하므로, 효소와 기질의 반응에 의한 신호의 증폭에 한계가 있어, 저농도의 항원을 검출하기 어려운 문제가 있었다. 또한, 효소자체가 안정하지 못하므로 장시간 사용하기 어려운 문제가 있었다. 결국 기존의 면역분석법은 항체를 통하여 정확하게 항원을 검출하였어도 항체에 결합된 효소가 활성을 잃게 되면 일관된 신호를 얻기가 어렵고, 항체에 결합된 효소의 양이 적어 기질과 반응한 후 낮은 신호를 나타내어 저농도의 항원을 측정하기 어려운 문제가 있었다. 따라서 검출 신호의 일관된 결과 도출과 향상된 신호 검출을 위하여 고안정성, 고감도의 면역분석법이 절실하게 요구되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상술한 문제를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 첫 번째 해결하려는 과제는 항체당 결합된 효소비를 증가시키는 것을 통해 검출신호를 현저히 증폭하여 저농도의 항원을 용이하게 검출해낼 수 있는 효소면역측정용 효소-담체 복합체를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 두 번째 해결하려는 과제는 본 발명의 효소-담체 복합체의 표면에 항체가 결합된 복합체 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 세 번째 해결하려는 과제는 본 발명의 복합체를 이용하여 통상의 단일효소항체에 비하여 현저하게 낮은 농도의 항원을 용이하게 검출해낼 수 있는 효소면역측정법(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 상술한 문제를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 첫번째 해결하려는 과제는 볼록한 다공성 담체; 및 상기 다공성 담체의 공극 내부에 담지된 효소를 포함하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 다공성 담체의 외부 표면적 중 오목부의 입구 표면적이 99% 이하일 수 있으며, 상기 오목부의 깊이는 100㎚ 이하일 수 있다.

[0011] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 다공성 담체의 단면의 형상은 구형, 타원형 또는 다각형일 수 있다.

[0012] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 다공성 담체는 항체가 다공성 담체의 표면에 결합이 용이하도록 볼록부를 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 다공성 담체의 크기는 0.1 ~ 50 ㎛일 수 있다.

[0014] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 다공성 담체의 재질은 실리카, 카본, 폴리스티렌, 키토산, 마그네슘 및 제올라이트로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0015] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 다공성 담체의 공극의 크기는 1 ~ 1000nm일 수 있다.

[0016] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 다공성 담체의 표면은 항체가 다공성 담체의 공극내부로 유입되는 것을 차단하고 다공성 담체가 고르게 분산되도록 하기 위하여 분산제로 코팅될 수 있다.

[0017] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 효소는 모트립신, 트립신, 서브틸리신, 파파인, 리파아제, 홀세라디쉬 페록시다아제, 소이빈 페록시다아제, 클로로 페록시다아제, 망가네이제 페록시다아제, 티로시나아제, 락카아제, 셀룰라아제, 사일라네이즈, 락타아제, 수크라아제, 오가노포스포히드로라아제, 클로리네

스테라아제, 글루코스 옥시다아제, 알코올 데히드로제나아제, 글루코스 데히드로제나아제, 히드로제나아제 및 글루코스 이소머라아제로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0018] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 효소는 담체의 공극내부에 흡착되거나 담체내부의 작용기와 공유결합될 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 효소는 다공성 담체의 공극 내부에 담지되며 직경이 공극의 입구 크기보다 큰 가교결합된 효소집적체를 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 다공성 담체는 만곡된 공극을 포함하여 가교결합된 효소집적체가 유출되지 않을 수 있다.

[0021] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 효소는 효소간 가교결합체를 형성하면서 담체와 공유결합될 수 있다.

[0022] 본 발명의 두번째 및 세번째 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 효소면역측정용 효소-담체 복합체; 및 상기 효소면역측정용 효소-담체 복합체의 표면에 컨쥬게이트된 항체를 포함하는 복합체 및 이를 이용한 효소면역측정방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, (1) 볼록한 다공성 담체의 공극 내부에 효소를 첨가하는 단계; 및 (2) 상기 다공성 담체의 표면에 항체가 컨쥬게이트 되도록 항체를 첨가하는 단계;를 포함하는 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (1) 단계와 (2) 단계 사이에, 항체가 다공성 담체의 공극내부로 유입되는 것을 차단하고 다공성 담체가 고르게 분산되도록 하기 위하여 다공성 담체의 표면을 분산제로 코팅하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 분산제는 소혈청알부민(Bovine serum albumin), 인간혈철알부민(Human serum albumin), 무지방 우유(skimmed milk)로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0026] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 담체의 공극 내부는 효소와 공유결합될 수 있는 작용기를 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 (1) 단계와 (2) 단계 사이에 가교결합제를 첨가하여 가교결합된 효소집적체를 형성하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0028]

[0029] 본 발명에 사용된 용어를 설명한다.

[0030] 용어 "볼록한 담체"라 함은 외부에서 관찰 시 오목한 부분이 50%를 초과하지 않는 담체를 말한다. 일반적으로 구형, 육면체, 다면체, 반구 및 초승달 형상도 포함된다.

[0031] 용어 "공극"이라 함은 다공성 담체의 기공으로서 적어도 두 지점 이상의 방향으로 외부로 통한 경우를 의미한다.

[0032] 용어 "오목부"라 함은 볼록한 담체에 움푹 파인 부분이나 구멍을 낸 듯한 구조를 말하며, 공극과의 차이는 외부와 한 방향으로 통한 경우를 의미한다.

[0033] 용어 "볼록부"라 함은 담체 표면중 일부가 볼록하게 솟아오른 구조를 의미한다.

발명의 효과

[0034] 본 발명의 효소면역측정용 효소-담체 복합체는 효소 한 분자가 효소반응을 일으키는 것이 아닌 다공성 입자에 담지된 고집적된 효소들에 의한 효소반응은 기존의 효소반응에 비해 향상된 신호를 얻을 수 있어 저농도의 항원까지 검출 및 정량이 가능할 뿐 아니라 오랜기간동안 안정하게 보관할 수 있다.

[0035] 또한, 효소-담체 복합체의 형상을 무정형이 아닌 항체의 접근 시 입체장애가 거의 발생하지 않는 형상

을 사용하므로 복합체의 표면에 항체가 쉽게 컨쥬게이트 될 수 있을 뿐 아니라, 컨쥬게이트된 항체들이 용이하게 항원과 결합할 수 있다. 이를 통해 무정형의 효소-담체 복합체에 비하여 약 1/50 이하의 항원농도에 대하여 면역반응을 수행할 수 있다.

[0036] 결국, 본 발명의 단백질 검출 및 정량법은 항원과 특정 항체 사이의 특이적 결합과 구형의 다공성 입자 내 효소의 안정성을 기초로 한다. 상기 항체를 결합한 구형 효소-담체 복합체는 항체의 노출이 효과적으로 이루어져 목적 항원과의 결합을 용이하게 한다. 또한 효소가 담지된 효소-담체 복합체는 효소 한 분자가 효소반응을 일으키는 것이 아닌 다공성 입자에 담지된 고집적된 효소들에 의한 효소반응은 기존의 효소반응에 비해 향상된 신호를 얻을 수 있어 저농도의 항원까지 검출 및 정량이 가능하다. 이러한 개념을 기초로 한 본 발명의 구형 입자 사용에 따른 항원-항체 결합의 용이성 및 효소-담체 복합체에 의한 신호 향상에 의한 정량법은 목적 항원 검출함에 있어 결합의 용이성과 안정성을 보유하고, 검출의 민감도와 정확성을 향상시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 종래의 단일효소를 이용한 ELISA 방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 무정형의 실리카 다공성 담체의 SEM 사진 및 효소-담체 복합체-결합항체 복합체를 나타내는 모식도이다.

도 3a는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 구형 실리카 다공성 담체의 SEM 사진 및 TEM 사진이고, 도 3b는 구형효소-담체-결합항체 복합체를 나타내는 모식도이다.

도 4는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 구형 다공성 담체를 이용한 ELISA 방법을 나타낸 모식도이다.

도 5는 UV/Vis 분광계를 이용한 ADS, CA, 그리고 NER의 활성을 측정한 그래프이다.

도 6은 실온에서 PB 완충용액 안에서 200 rpm으로 교반시켜주면서 그 활성을 측정한 그래프이다.

도 7은 단일효소 결합 항체 기반 면역분석법과 효소-담체 복합체 기반 면역분석법(실시예 3)을 이용하여 목적항원인 hIgG의 농도에 따른 신호를 확인한 결과이다.

도 8은 비교예 1의 무정형 매조셀룰러폼(mesocellular form)을 사용하여 제조한 검출항체-효소-담체 복합체를 이용하여 목적항원인 hIgG의 농도에 따른 신호를 확인한 결과이다.

도 9는 구형 다공성 실리카 입자를 이용한 검출항체-효소-담체 복합체 기반 면역분석법의 결합능을 확인하기 위해 목적항원을 인간 면역 글로불린 G(human immunoglobulin G, hIgG), 토끼 면역 글로불린 G(rabbit immunoglobulin G, rIgG), 쥐 면역 글로불린 G(mouse immunoglobulin G, mIgG) 등의 세 가지 항원에 대한 선택적 면역분석법에 대한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0039] 상술한 바와 같이 기존의 면역분석법은 항체를 통하여 정확하게 항원을 검출하였어도 항체에 결합된 효소가 활성을 잃게 되면 일관된 신호를 얻기가 어렵고, 항체에 결합된 효소의 양이 적어 기질과 반응한 후 낮은 신호를 나타내어 저농도의 항원을 측정하기 어려운 문제가 있었다.

[0040] 이에 본 발명에서는본 발명의 첫번째 해결하려는 과제는 볼록한 다공성 담체; 및 상기 다공성 담체의 공극 내부에 담지된 효소를 포함하는 효소면역측정용 효소-담체 복합체를 제공하여 상술한 문제의 해결을 도모하였다. 이를 통해 본 발명의 효소면역측정용 효소-담체 복합체는 효소 한 분자가 효소반응을 일으키는 것이 아닌 다공성 입자에 담지된 고집적된 효소들에 의한 효소반응은 기존의 효소반응에 비해 향상된 신호를 얻을 수 있어 저농도의 항원까지 검출 및 정량이 가능할 뿐 아니라 오랜기간동안 안정하게 보관할 수 있다. 또한, 효소-담체 복합체의 형상을 무정형이 아닌 항체의 접근 시 입체장애가 거의 발생하지 않는 형상을 사용하므로 반응기

의 표면에 항체가 쉽게 컨쥬게이트 될 수 있을 뿐 아니라, 컨쥬게이트된 항체들이 용이하게 항원과 결합할 수 있다. 이를 통해 무정형의 효소-담체 복합체에 비하여 약 1/50 이하의 항원농도에 대하여 면역반응을 수행할 수 있다.

[0041] 먼저, 본 발명에 사용될 수 있는 다공성 담체를 설명한다. 본 발명에 사용될 수 있는 다공성 담체는 통상적으로 효소를 담지하는데 사용되는 다공성 담체라면 제한없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 내부에 1 ~ 1000nm 크기의 다수의 기공을 갖는 담체일 수 있으며, 기공의 크기에 따라 마이크로포러스(microporous, pore < 2 nm), 메조포러스(mesoporous, 2 nm < pore < 50 nm), 메크로포러스(macroporous, pore > 50 nm) 물질로 구분할 수 있다.

[0042] 바람직하게는 상기 다공성 담체는 실리카, 카본, 폴리스티렌, 키토산, 마그네슘 및 제올라이트로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 재질일 수 있으며, MPS (mesoporous silica), MCM (mobil composition of matter), SBA (Santa Barbara materials), OMC (ordered mesoporous carbon), SCMS (supplementary cementitious materials)의 형태로 사용할 수 있으며, 바람직하게는 MCF (mesocellular foam)일 수 있다.

[0043]

[0044] 한편, 도 2는 실리카 다공성 담체의 TEM 사진으로서 내부에 효소가 담지될 수 있는 다수의 공극을 가지고 있으며 그 형상은 무정형이다. 그런데, 상기 도 2와 같이 다공성 담체의 형상이 무정형인 경우에는 담체의 표면에 결합된 항체 중 일부 항체는 담체 자체의 입체장애로 인하여 항원과 반응하기 어려워진다. 그 결과 무정형 다공성 담체에 결합된 다수의 항체 중 일부 항체만이 항원과 결합할 수 있으므로, 저농도의 항원에 적용하기 어려운 문제가 있었다.

[0045] 이에, 본 발명의 다공성 담체는 입체장애가 거의 없어 항체와 쉽게 결합할 수 있으며, 결합된 항체가 입체장애가 없이 항원과 쉽게 결합할 수 있다. 이를 위해 본 발명의 다공성 담체는 볼록한 형상을 가지며 볼록한 형상은 상술한 정의와 같이 외부에서 관찰 시 오목한 부분이 50%를 초과하지 않는 담체를 말한다. 예를 들어 담체가 초승달 형상인 경우 초승달의 볼록한 부분이 오목한 부분보다 더 큰 것을 의미한다. 이를 통해 담체의 외부에 결합된 항체가 거의 입체장애가 없이 항원과 결합할 수 있다. 한편, 상기 다공성 담체의 외부 표면적 중 오목부의 입구 표면적이 99% 이하이다.

[0046] 일반적으로 항체의 길이는 15nm 정도이며 항원과의 결합부위를 가진다. 따라서, 오목부의 깊이가 대략 100 nm이하라면, 담체의 오목부 내부에 항체가 결합되더라도 오목부에 항체와 결합할 수 있는 작용기로 개질하는 방법 등을 통해 항원과의 결합부위는 오목부 외부에 위치할 수 있으므로 항원과 결합이 용이할 수 있다. 그러나 오목부의 깊이가 100 nm를 초과하면 항체의 결합부위가 오목부 외부에 위치하기 어려우므로 입체장애로 인하여 항원과 결합이 매우 어려울 수 있다. 따라서, 오목부의 깊이는 항체의 길이를 고려하여 100nm 이하를 가질 수 있다. 한편, 오목부의 형상은 반구형, U자형, 직사각형 등 여러가지 형상을 가질 수 있으며, 오목부의 깊이는 오목부가 없다고 가정할 때 담체의 연장선에서 오목부 까지의 가장 긴 길이를 의미한다. 이 경우 오목부의 형상이 반구라면 반지름이 깊이에 해당하고 U자형이라면 가장 싶은 부분이 깊이에 해당할 것이다. 한편, 상기 범위 내의 오목부의 개수는 1개 또는 복수개일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 오목부를 포함하지 않을 수 있다.

[0047] 이를 위하여 본 발명의 볼록한 다공성 담체의 단면형상은 구형, 단면의 형상이 타원형(럭비공 형상), 반달형, 초승달형, 삼각형, 사각형 및 다각형일 수 있으며, 이를 통해 담체-항체-항원간의 입체장애를 최소화하여 효소활성을 극대화할 수 있다. 구체적으로 도 8은 무정형 다공성 담체를 사용한 ELISA 결과이고, 도 7은 동일한 조건에서 구형 다공성 담체를 사용한 ELISA 결과로서, 무정형 다공성 담체에 비하여 대략 50배 가량 낮은 농도에서 항원을 검출해낼 수 있다.

[0048] 한편, 담체와 항체와의 결합가능성을 높이고 이후 항원과의 결합가능성을 높이기 위하여 본 발명의 다공성 담체는 표면에 볼록부를 더 포함할 수 있다.

[0049] 한편, 본 발명의 다공성 담체는 공극의 내부에 효소와의 공유결합을 형성할 수 있는 작용기를 포함할 수 있다. 이를 위하여 담체에 효소를 담지하기 전에 다공성 담체의 공극에 작용기를 형성하는 전처리 공정을 더 수행할 수 있다. 상기 작용기는 공극의 내부 및 담체의 표면에 형성되어 효소와 공유결합을 수행할 수 있는 것

이면 종류의 제한이 없이 사용될 수 있으나 바람직하게는 아미노기, 카르복시기, 알데하이드기, 에폭시기, 수산화기, 황화수소기 등일 수 있다.

[0050] 상기 작용기와의 결합을 통해 효소는 공극의 내부 및/또는 담체의 표면에 담지 또는 결합될 수 있다.

[0051] 다음, 다공성 담체의 공극에 담지되는 효소를 설명한다. 본 발명에 사용될 수 있는 효소는 통상적인 ELISA 방법에 사용될 수 있는 것이면 제한없이 사용될 수 있으나 바람직하게는 목적에 따라 키모트립신, 트립신, 서브틸리신, 파파인, 리파아제, 홀세라디쉬 페록시다아제, 소이빈 페록시다아제, 클로로 페록시다아제, 망가네이제 페록시다아제, 티로시나아제, 락카아제, 셀룰라아제, 사일라네이즈, 락타아제, 수크라아제, 오가노포스포히드로라아제, 클로리네스테라아제, 글루코스 옥시다아제, 알코올 데히드로제나아제, 글루코스 데히드로제나아제, 히드로제나아제, 글루코스 이소머라아제 및 이들의 혼합물을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 상기 효소는 담체의 기공내부에 단순흡착될 수 있다. 또한 기공내부가 효소와 공유결합할 수 있는 작용기를 가진 경우 효소는 기공내부에 공유결합될 수 있다.

[0053]

[0054] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면. 상기 효소는 가교결합에 의해 효소집합체를 형성할 수 있다. 구체적으로 기공내부에 포함된(흡착 또는 기공내부벽과 공유결합) 효소들에 대하여 가교결합제를 첨가하면 기공내부에 흡착된 효소들 및 흡착되지 않은 효소들간에 가교결합이 형성되어 효소집적체가 형성된다. 그 결과 가교결합된 효소집적체는 다공성 담체의 기공 입구의 크기보다 더 커지게 되며 그 결과 현저하게 많은 양의 효소가 다공성 담체의 내부에 담지될 수 있을 뿐 아니라 시간이 경과하여도 상기 기공 내부에 효소 집합체가 위치하게 되므로 다공성 담체의 내부를 효소와 공유결합할 수 있는 작용기를 형성하도록 개질하지 않아 다공성 담체와 효소간의 공유결합과 같은 직접적인 결합관계가 형성되지 않는다 하더라도 효소 집합체가 다공성 담체 내부에 장기간 구비될 수 있는 것이다.

[0055] 나아가, 다공성 담체의 기공들이 만곡된 경우 가교결합된 효소집합체가 외부로 유출되지 않을 수 있으며, 기공내부가 개질된 경우에는 효소간 가교결합 뿐만 아니라 가교결합된 효소와 담체 사이에 공유결합이 형성될 수도 있다.

[0056] 한편, 본 발명의 효소면역측정용 효소-담체 복합체는 담체의 표면에 효소 및/또는 항체와 결합할 수 있는 작용기 또한 포함할 수 있다. 이를 통해 항체를 담체의 표면에 결합시키는 것을 용이하게 수행할 수 있다.

[0057] 다음, 효소-담체 복합체(다공성 담체)의 표면에 결합된 다수의 항체를 포함하는 효소-담체 복합체-결합항체 복합체를 설명한다. 본 발명에 사용되는 항체는 검출하려는 항원의 종류에 따라 적절한 항체를 부착할 수 있다. 바람직하게는 polyclonal antibody, monoclonal antibody, Fab, scFv(single chain fv) 등의 항체를 1종 이상 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 또한, 동일한 종류의 항체 또는 다양한 종류의 항체를 부착할 수 있으므로 한 종류의 항원이 아니라 다양한 종류의 항원을 검출하는데도 유용하게 사용될 수 있다.

[0059] 한편, 바람직하게는 상기 항체를 담체의 표면에 용이하게 부착시키기 위하여 담체의 표면에 항체와 결합할 수 있는 작용기를 포함할 수 있다. 상기 작용기는 공극의 내부에 형성된 작용기와 동일한 종류일 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 상기 항체가 담체의 공극 내부로 유입되는 것을 차단하고 담체가 고르게 분산되도록 하여 항체의 효과적인 결합을 유도하기 위하여 다공성 담체의 표면에 코팅막을 더 포함할 수 있으며, 또한 이 코팅막을 담체표면에 먼저 고정화한 후 항체를 고정화 함으로써 항체의 외부 노출을 용이하게 도와준다. 이 경우 코팅제(분산제)로는 소혈청알부민(Bovine serum albumin, BSA), 인간혈청알부민 (Human serum albumin, HSA), 무지방 우유 (Skimmed milk) 등을 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

[0061] 상술한 복합체를 제고하기 위하여, 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, (1) 볼록한 다공성 담체의

공극 내부에 효소를 첨가하는 단계; (2) 상기 다공성 담체의 표면에 항체가 컨쥬게이트 되도록 항체를 첨가하는 단계;를 포함하는 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0062] 먼저, (1) 단계로서 볼록한 다공성 담체의 공극 내부에 효소를 첨가하여 공극내부에 효소를 담지한다. 이를 위하여 전처리 단계로서 상기 다공성 담체의 공극의 내부 및 담체의 표면에 효소 및 항체와의 공유결합을 형성할 수 있는 작용기를 형성하는 단계를 더 포함하면 효소와 공극간 공유결합이 형성되고, 개질공정이 수행되지 않으면 단순흡착될 수 있다.

[0063] 다음 (2) 단계와 (3) 단계 사이에, 상기 볼록한 다공성 담체에 가교결합제를 첨가하여 다공성 담체의 기공의 입구크기보다 큰 가교결합된 효소집적체를 형성한다. 이를 통해 공극의 작용기와 효소간의 공유결합 및 효소간의 가교결합이 형성되어 담지되는 효소의 양을 극대화할 수 있을 뿐 아니라 장시간 경과 후 효소가 이탈하거나 변성되는 것을 최소화할 수 있다.

[0064] 한편, 다공성 담체에 먼저 가교결합제를 첨가한 후 효소를 첨가하는 경우에는 담체 공극 내부에 있는 작용기에만 가교결합제가 결합하기 때문에 가교결합제가 있는 부분에만 효소가 결합을 하여 담체 내부에 붙어있게 되고 또한 효소간의 가교결합은 발생하지 않으므로, 효소담지량 및 효소안정성이 감소하게 된다. 결국, 단순흡착(ADS)나 공유결합(CA)은 구형 실리카 입자에 높은 담지량을 이루어 낼 수 없을 뿐만 아니라 고정화된 효소들이 안정성 실험을 하는 동안 구형 실리카 입자에서 쉽게 유출된다. 반면에 흡착 후 가교결합을 한 효소-담체 복합체(NER)의 경우 구형 실리카 입자 안의 공극에 효소 집합체가 꽉 차있기 때문에 높은 담지량을 보여주고 또한 꽉 들어찬 효소 집합체들은 가교결합에 의해 실리카 입자 밖으로 쉽게 유출되지 않는다.

[0065] 나아가, 다공성 담체의 기공들이 만곡된 경우 가교결합된 효소집합체가 외부로 유출되지 않을 수 있으며, 기공내부가 개질된 경우에는 효소간 가교결합 뿐만 아니라 가교결합된 효소와 담체 사이에 공유결합이 형성될 수도 있다.

[0066] 다음, (2) 단계로서 상기 다수의 효소가 담지된 다공성 담체의 표면에 다수의 항체를 컨쥬게이트시켜 복합체를 제조한다. 한편 (1) 단계와 (2) 단계 사이에 다공성 담체의 균일한 분산과 공극의 내부에 항체가 유입되는 것을 방지하기 위하여 분산제를 미리 첨가하여 담체의 코팅공정을 수행할 수 있으며 그 후 상기 항체를 결합시킬 수 있다. 이 때 사용가능한 분산제로는 소혈청알부민(Bovine serum albumin, BSA) 등을 사용할 수 있다.

[0067] 결국, 발명의 효소면역측정용 효소-담체 복합체는 통상의 단일효소항체를 대체하여 효소면역측정방법(ELISA)에 사용될 수 있으며, 직접효소면역측정법, 간접효소면역측정법 및 샌드위치효소면역측정법 등에 제한없이 사용될 수 있다.

[0068] 구체적으로, 도 4는 본 발명의 효소-담체 복합체의 표면을 항체와 결합시킨 후 이를 이용하여 효소면역측정을 수행하는 일례이다. 먼저, (A) 내부의 공극에 다수의 효소를 담지한 다공성 담체를 제조하여 효소-담체 복합체를 제조하는 단계, (B) 목적 항원에 결합하는 검출항체를 상기 (A)단계에서 제조된 다공성 담체의 표면에 결합하여 [항체-효소-담체 복합체 복합체]를 제조하는 단계, (C) Well plate에 목적 단백질과 결합하는 결합항체를 넣어, well plate 표면에 흡착시키는 단계, (D) 상기 결합항체가 흡착된 well plate에 항원이 함유된 용액을 넣고, 항원이 상기 결합항체에 결합된 [결합항체-항원]을 유도하는 단계, (E) 상기 (D)단계에서 미반응 항원 용액을 제거하는 단계, (F) 상기 (E)단계에서 well plate에 고정화된 [결합항체-항원]에 상기 (B)단계에서 제조된 효소면역측정용 [항체-효소-담체 복합체 복합체]를 넣어, 결합항체-항원-효소면역측정용 효소-담체 복합체 복합체를 제조하는 단계, (G) 상기 (F)단계에서 미반응된 효소면역측정용 효소-담체 복합체를 제거하는 단계 및 (H) 상기 단계에서 얻은 결합항체-항원-효소면역측정용 효소-담체 복합체 복합체의 다량의 효소-기질 반응을 통해 얻은 고감도 신호를 통한 목적 항원을 정량 분석하는 단계를 포함하여 효소면역측정을 수행할 수 있다.

[0069] 이를 통해 통상의 단일효소 결합항체에 비하여 항체 당 결합된 효소비를 증가시킴으로써 현저하게 낮은 농도의 항원을 용이하게 검출해낼 수 있을 뿐 아니라 효소의 안정성을 확보할 수 있는 것이다.

[0070] 이하 본 발명을 실시예를 중심으로 보다 상세히 설명한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0071] <준비예 1> 효소흡착을 위한 구형 다공성 실리카 입자의 분석

[0072] 효소를 흡착시키기 위해 구형의 다공성 실리카 입자(일본, Fuji Silysia, 도 3a)를 준비하였다. 입자의 형태를 분석하기 위해 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)과 투사전자현미경(scanning electron microscope, TEM) 그리고 공극부피의 분석은 비표면적 측정방법(Brunauer-Emmett-Teller method, BET)를 이용하였다.

[0073] 도 3a의 상단은 다공성 실리카 입자의 SEM 사진으로, 이것을 통해 실리카 입자가 구형임을 확인하고, 입자의 크기가 약 4.0 ± 0.3 μm 이고, 도 3a의 하단은 TEM 사진으로 공극이 실리카 입자내에 무질서하게 분포되어 있음을 알 수 있었다. BET 방법으 측정한 공극의 크기가 대략 30 nm임을 확인하였다.

[0074] <준비예 2> 아미노기가 결합된 구형 다공성 실리카 입자의 제조

[0075] 구형 다공성 실리카 입자는 메조포러스(mesoporous)와 같은 window-cell 구조가 아니기 때문에 효소를 단순 흡착법을 포집시킬 경우, 효소 침출(leach)의 문제점이 발생할 수 있다. 그래서 이를 해결하기 위해 구형 다공성 실리카 입자의 표면과 공극에 아미노기를 활성화시켰다. 구체적으로, 준비예 1의 구형 다공성 실리카 1 g과 3-아미노프로필트리메톡시실란(3-aminopropyltrimethoxysilane, APTMS, 0.5 g, 2.79 mmol)을 무수 톨루엔(anhydrous toluene)에 넣었다. 그리고 이 혼합물을 상온, 아르곤(argon)상에서 24시간 동안 교반시켰다. 교반이 끝난 혼합물은 여과시킨 후, 톨루엔(toluene)으로 세척을 해준 뒤 상온, 진공에서 14시간 동안 건조시켰다.

[0076] <실시예 1> 효소 흡착을 이용한 효소고정방법(Enzyme adsorption, ADS)에 따라 효소-구형 다공성 실리카 입자 복합체를 제조

[0077] 효소 흡착을 이용한 효소고정방법(Enzyme adsorption, ADS)에 따라 효소-구형 다공성 실리카 입자 복합체를 제조하였다. 구체적으로 준비예 2의 구형 다공성 실리카 입자 5 mg을 인산나트륨 완충용액(100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0), PB)에 녹인 당산화효소(glucose oxidase, GOx) 용액 25 mg/ml, 1.5 ml를 넣어 2시간 동안 200 rpm으로 교반시켰다. 그 뒤 GOx를 흡착시킨 구형 다공성 실리카 입자 복합체를 포함하는 용액을 트리스 완충용액(100 mM Tris buffer(pH 8.0))을 이용해 30분 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 다시 PB를 이용하여 씻어주었다. 모든 처리가 끝난 효소고정화 물질들은 4℃에서 보관하여 효소흡착-구형 다공성 실리카 입자 복합체(ADS)를 제조하였다.

[0078] <실시예 2> 공유결합방법(Covalent attachment, CA)에 따라 효소-구형 다공성 실리카 입자 복합체를 제조

[0079] 공유결합방법에 따라 효소-구형 다공성 실리카 입자 복합체를 제조하였다. 구체적으로 효소와의 공유결합을 위해 0.1% 글루타르알데하이드 용액을 1.5 ml을 첨가하여 1시간 동안 200 rpm에서 교반시켰다. 효소와의 공유결합을 위해 PB에 녹인 GOx 용액 25 mg/ml, 1.5 ml를 넣어 2시간 동안 200 rpm으로 교반시켰다. 그 뒤 GOx를 공유결합 시킨 준비예 2의 구형 다공성 실리카 입자 복합체를 포함하는 트리스 완충용액(100 mM Tris buffer(pH 8.0))을 이용해 30분 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 다시 PB를 이용하여 씻어주었다. 모든 처리가 끝난 효소고정화 물질들은 4℃에서 보관하여 공유결합된 효소-구형 다공성 실리카 입자 복합체(CA)를 제조하였다.

[0080] <비교예 1> 무정형의 메조셀룰러폼(Mesocellular foam, MCF)의 제조와 이를 이용한 검출항체-효소-담체 복합체의 제조

[0081] 무정형의 메조셀룰러폼(Mesocellular foam, MCF)은 구체적으로 삼중 블록 공중합체(Triblock Copolymer)인 폴리(에틸린옥사이드)-블록-폴리(프로필렌옥사이드)-블록(에틸렌옥사이드)(poly(ethylene oxide)-*block*-poly(propylene

[0082] oxide)-*block*-poly(ethylene oxide) triblock copolymer, P123, 2.0 g, 0.4 mmol)을 상온에서 염화수소 용액(1.6 M, 120 mmol)에 녹인다. 그리고 불화암모늄(Ammonium fluoride, 23 mg, 17 mmol)과 1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene, TMB, 2.0 g, 17 mmol)을 넣어준 후 20시간동안 35-40℃에 놓아두었다. 그 후 24시간 동안 120 ℃에 놓아두었다. 그 후 혼합액은 여과를 거쳐 공기중에서 건조시켜 도 2의 무정형메조셀룰러폼(Mesocellular foam, MCF)을 제조하였다. 상기 과정으로 만든 MCF 6 mg에 PB에 녹인 GOx 용액 4 mg/ml을 넣어 30분 동안 250 rpm으로 교반시켰다. 그 뒤 원심분리를 통해 흡착되지 않은 효소를 제거하고, 0.5 v/v%의 글루타르알데하이드 용액을 첨가한 후 상온에서 1시간동안 200 rpm에서 교반시켰다. 모든 처리가 끝난 효소고정화 물질들은 4℃에서 보관하여 효소-매조셀룰러폼 복합체인 효소-담체 복합체(NER)를 제조하였다. 상기의 나노효소 반응기에 인산나트륨 실레인 완충용액(10 mM Sodium phosphate buffered silane(pH 7.4), PBS)에 검출항체를 1 mg/ml의 농도로 희석하여 넣어준 후, 상온에서 배양을 하고, 혼합액을 원심분리를 통해 미결합 검출항체를 제거했다. 그리고 검출항체가 결합된 효소-담체 복합체를 트리스 완충용액(100 mM Tris buffer(pH 8.0))으로 세척하였다. 그리고 트리스 완충용액(100 mM Tris buffer(pH 8.0))을 넣어 1시간 동안 250 rpm으로 교반 시킨 후 PBS로 세척해준다. 완성된 복합체는 탈지유용액(skimmed milk, 1% in PBS)에 넣어 4℃에서 보관하여 도 2의 무정형 효소-담체 복합체-결합항체 복합체를을 제조하였다. 무정형메조셀룰러폼(Mesocellular foam, MCF)의 크기는 대략 500㎛이고, 공극의 외부직경의 평균은 대략 11.8㎚이고 공극의 내부직경은 25.5㎚를 나타내었다.

[0083] <실시예 3> 효소-담체 복합체 방법(Nanoscale enzyme reactors, NERs)에 따라 효소-구형 다공성 실리카 입자 복합체를 제조

[0084] 효소-담체 복합체 방법(Nanoscale enzyme reactors, NERs)에 따라 효소-구형 다공성 실리카 입자 복합체를 제조하였다. 준비예 2의 구형 다공성 실리카 입자 5 mg에 PB에 녹인 GOx 용액 25 mg/ml, 1.5 ml를 넣어 2시간 동안 200 rpm으로 교반시켰다. 그 뒤 원심분리를 통해 흡착되지 않은 효소를 제거하고, 0.5 v/v%의 글루타르알데하이드 용액을 1.5 ml을 첨가하였다. 그 뒤 가교결합제의 충분한 반응을 위하여 상온에서 3시간 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 PB로 세척해주었다. 그 뒤 복합체를 포함하는 용액을 트리스 완충용액(100 mM Tris buffer(pH 8.0))를 이용해 30분 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 다시 PB를 이용하여 씻어주었다. 모든 처리가 끝난 효소고정화 물질들은 4℃에서 보관하여 효소-구형 다공성 실리카 입자 복합체인 효소-담체 복합체(NER)를 제조하였다.

[0085] <실시예 4> 효소-구형 다공성 실리카 입자 복합체의 효소활성 및 안정성 측정

[0086] 상기 실시예 1 ~ 3 및 비교예 1을 통해 제조된 각각의 효소-구형 다공성 실리카 입자 복합체의 효소활성을 UV/Vis 분광계를 이용하여 측정하였다. 구체적으로 우선 효소-구형 다공성 실리카 입자 복합체를 100 mM PB 에 0.02 mg/ml로 희석시켜 준비하였다. 그리고 10 mg o-dianisidine(ODS)를 1.5 ml의 증류수에 녹인 후 PB를 이용하여 ODS 용액이 0.2 mM이 되도록 희석시켰다. 준비된 ODS 용액에 D-glucose를 넣어 용액 안의 D-glucose의 농도가 1.7 w/v%인 용액을 만들었다.

[0087] 페록시다아제(Peroxidase, POD)는 PB에 녹여 3.8 mg/ml이 되도록 제조하였다. 이렇게 만들어진 세 가지 혼합 기질용액을 이용하여 효소 활성을 측정하였다. 효소 활성을 측정하기 위해 890 ㎕ ODS 용액, 10 ㎕ POD 용액 그리고 100 ㎕의 GOx가 고정화된 구형 다공성 실리카 입자 복합체용액을 섞어 500 nm 파장에서 UV/Vis 분광계로 흡광도를 측정하였다.

[0088] 도 5는 UV/Vis 분광계를 이용한 ADS, CA, 그리고 NER의 활성을 측정한 그래프로서, ADS, CA, 그리고 NER의 활성(A500/min)은 각각 구형 실리카 입자 당 5.0, 9.4, 그리고 12.3이다. NER(실시예 3)의 활성이 ADS(실시예 1)보다 2.3배 크고 CA(실시예 2)보다 1.5배 더 크게 나왔다. 안정성 또한 각각의 샘플의 활성에서도 NER은 다른 것들에 비해 확연히 좋은 결과를 보여준다. 도 6은 실온에서 PB 완충용액 안에서 200 rpm으로 교반시켜주면서 그 활성을 측정한 그래프로서 14일 후에 ADS와 CA의 활성이 각각 초기 활성 대비 22% 그리고 60%인 반면, NER(실시예 3)은 초기 활성의 100%를 유지하는 것을 볼 수 있다. 이러한 결과들은 구형 실리카 입자에 GOx의 고정화 전략에 따라 다름을 설명할 수 있다. 단순흡착(실시예 1)나 공유결합(실시예 2)은 구형 실리카 입

자에 높은 담지량을 이루어 낼 수 없을 뿐만 아니라 고정화된 효소들이 안정성 실험을 하는 동안 구형 실리카 입자에서 쉽게 유출된다. 반면에 흡착 후 가교결합을 수행 한 효소-담체 복합체(실시예 3)의 경우 구형 실리카 입자 안의 공극에 효소 집합체가 꽉차있기 때문에 높은 담지량을 보여주고 또한 꽉 들어찬 효소 집합체들은 가교결합에 의해 구형 실리카 입자 밖으로 쉽게 유출되지 않는다.

[0089] <실시예 5> 검출항체-효소-담체 복합체의 제조

[0090] 실시예 1 ~ 3 및 비교예 1의 효소-담체 복합체에 검출항체가 결합된 검출항체-효소-담체 복합체를 도 4와 같이 제조하였다. 효소가 집적된 효소-담체 복합체를 PB 완충용액에 1 mg/ml로 희석한다. 항체의 효과적인 결합을 위해 0.1 w/v% 소혈청알부민(Bovine serum albumin, BSA)용액 500 μl를 넣고 30분간 약하게 교반을 시켜주었다. 그 후 아민기가 처리된 실리카 입자 표면에 항체를 고정시키기 위해 0.05 v/v%의 글루타르알데하이드 용액을 500 μl를 넣고 10분간 약하게 교반을 시켜준 후 PB로 세척해준다. 그 후 인산나트륨 실레인 완충용액(10 mM Sodium phosphate buffered silane(pH 7.4), PBS)에 검출항체를 0.2 mg/ml의 농도로 희석하여 500 μl를 넣어준 후, 2시간 동안 약하게 교반하고, 혼합액을 원심분리를 통해 미결합 검출항체를 제거했다. 그리고 검출항체가 결합된 효소-담체 복합체를 PBS로 세척하였다. 그리고 트리스 완충용액(100 mM Tris buffer(pH 8.0))을 넣어 1시간 동안 약하게 교반시킨 후 500 μl의 보호용액(0.1 w/v% BSA)을 첨가하여 4℃에서 보관하였다.

[0091] <실시예 6> 목적 항원의 분석

[0092] 도 4는 효소-담체 복합체를 이용한 목적항원의 검출 과정을 설명하는 개략도이다. Well plate에 목적항원과 결합하는 항체(결합항체)를 탄산수소나트륨 완충용액(100 mM sodium bicarbonate buffer(pH 9.4))에 10 μg/ml의 농도로 희석하여 각 well에 25 μl씩 넣고 4℃ 에서 14시간 동안 결합항체를 well plate에 흡착시킨다. 그 후 각 well에 3 w/v% BSA 용액(100 μl)을 넣고 1시간 동안 약하게 교반을 시켜준다. Well 안의 용액을 모두 제거하고, 150 μl의 세척용액(0.05% Tween-20 in 10 mM PBS(pH 7.4), PBST)으로 5번 세척을 해준다. 검출한계를 확인하기 위해, 세척용액으로 희석한 다양한 농도의 목적 항원 용액(10-0.0001 μg/ml)을 50 μl씩 넣어 37℃에서 1시간 동안 배양시켜 항원-항체 결합을 유도한다. 배양 후 150 μl의 세척용액을 넣어 5번 세척하여 결합되지 않은 목적 항원을 제거한다. 그 후, 목적 항원과 특이적으로 결합하는 검출항체-효소-담체 복합체 용액을 세척용액에 100 μg/ml의 농도로 희석하여 50 μl씩 넣고, 37℃ 에서 30분 동안 배양시켜 결합항체-항원-검출항체-효소-담체 복합체 복합체를 유도한다. 그 후 세척용액으로 10번 세척하여 미반응한 검출항체-효소-담체 복합체를 제거한다. 목적 단백질을 정량하기 위해 50 μl의 기질용액(100 μM amplex red, 0.2 U/mL HRP, 100 mM glucose)을 넣어준 후 plate reader에서 교반을 하면서 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0093] 비교를 위해 일반적으로 사용되는 하나의 항체에 하나의 효소가 결합된 단일효소 결합항체(GO conjugated antibody)를 이용하여 위와 같은 방법으로 실험을 진행하였다. 도 7은 단일효소 결합 항체 기반 면역분석법과 효소-담체 복합체 기반 면역분석법(NER-GO/amino-PS-30, 실시예 3)을 이용하여 목적항원인 hIgG의 농도에 따른 신호를 확인한 결과이다. 단일효소 결합 항체를 이용하는 종래의 면역분석법에 비해 높은 신호를 나타냄을 확인할 수 있었다. 이는 항체 한 분자 당 효소의 결합비가 효소-담체 복합체를 이용할 경우가 단일효소 결합 항체에 비해 높기 때문이다(고감도 면역분석법). 효소-담체 복합체 기반면역분석법의 경우 검출한계가 0.5 ng/mL hIgG(3.3 pM)이며, 종래의 면역분석법의 경우 10 ng/mL hIgG(67 pM)이다. 이를 통해 효소-담체 복합체기반 면역분석법을 통하여 종래의 분석법에 비해 50배의 민감도를 향상시킴을 알 수 있었다.

[0094] 도 8은 비교예 1의 무정형 매조셀룰러폼(mesocellular form)을 사용하여 제조한 검출항체-효소-담체 복합체를 이용하여 목적항원을 분석한 결과이다. 결과에서 알 수 있듯이 검출한계가 10 ng/mL hIgG(67 pM)임을 알 수 있다. 이를 구형 다공성 실리카 입자를 이용한 효소-담체 복합체를 이용한 검출한계(0.5 ng/mL hIgG(3.3 pM)) 보다 민감도가 50배 낮은 것을 알 수 있다. 이는 구형의 실리카 입자가 무정형의 입자에 비해 결합항체와 항원의 결합 기회를 증가시켜 더 높은 민감도를 보임을 알 수 있었다.

[0095] <실시예 7> 구형 다공성 실리카 입자를 이용한 검출항체-효소-담체 복합체 기반 면역분석법의 선택적 결합확인

[0096] 도 9는 실시예 3의 구형 다공성 실리카 입자를 이용한 검출항체-효소-담체 복합체 기반 면역분석법의 결합능을 확인하기 위해 목적항원을 인간 면역 글로불린 G(human immunoglobulin G, hIgG), 토끼 면역 글로불린 G(rabbit immunoglobulin G, rIgG), 쥐 면역 글로불린 G(mouse immunoglobulin G, mIgG) 등의 세 가지 항원에 대한 선택적 면역분석법에 대한 결과이다. 결과 그래프에서 알 수 있듯이 상기 실시예 3에서 제작된 검출항체-효소-담체 복합체는 hIgG만 선택적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

산업상 이용가능성

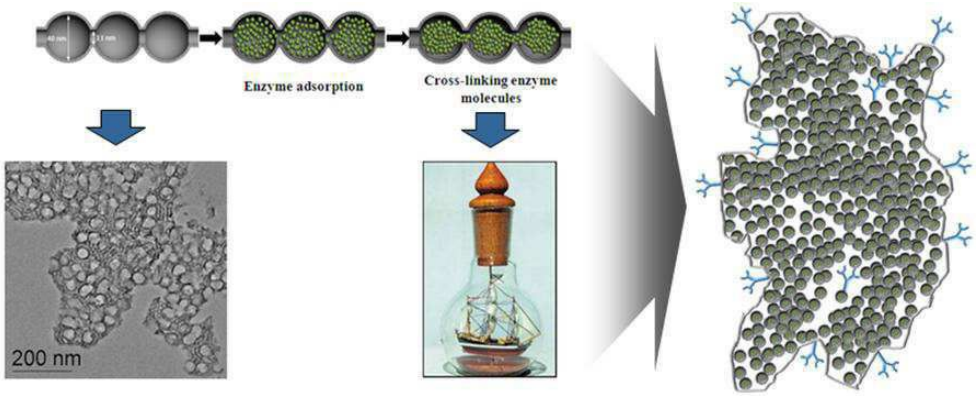
[0097] 본 발명의 효소면역측정용 효소-담체 복합체 및 이를 이용한 효소면역측정방법은 면역측정분야에서 활용될 수 있다.

도면

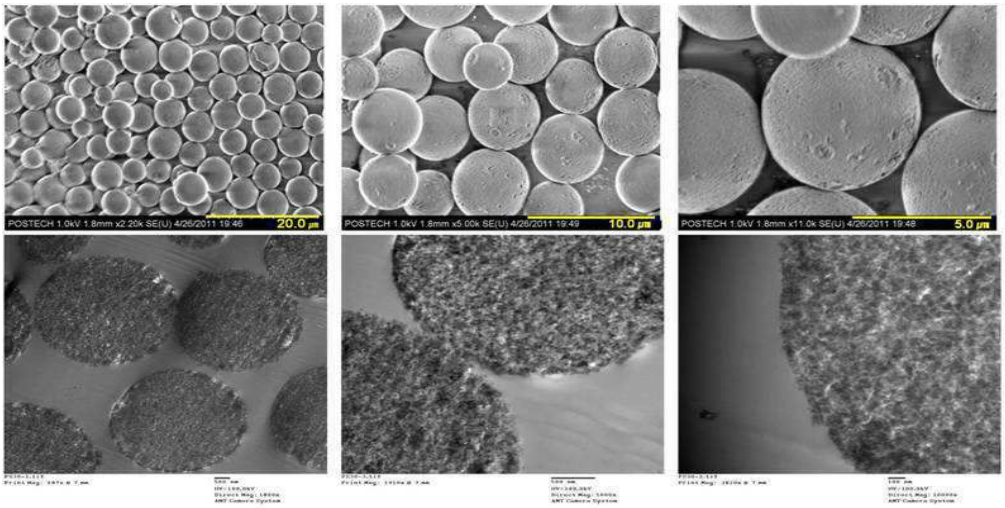
도면1



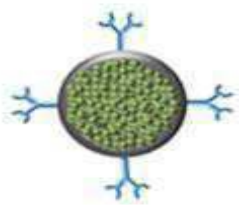
도면2



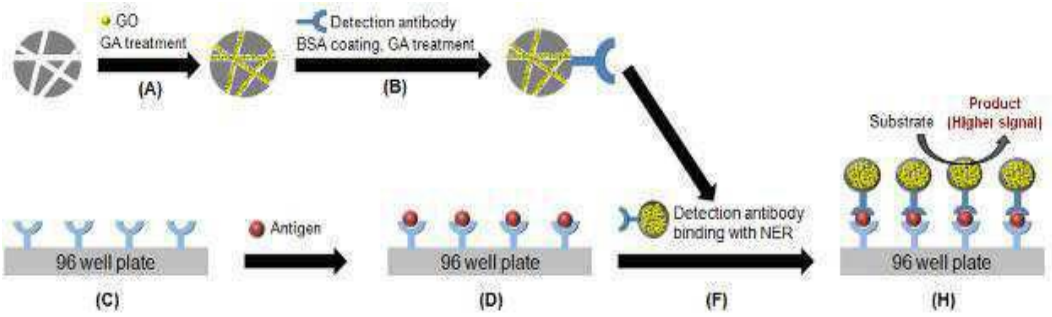
도면3a



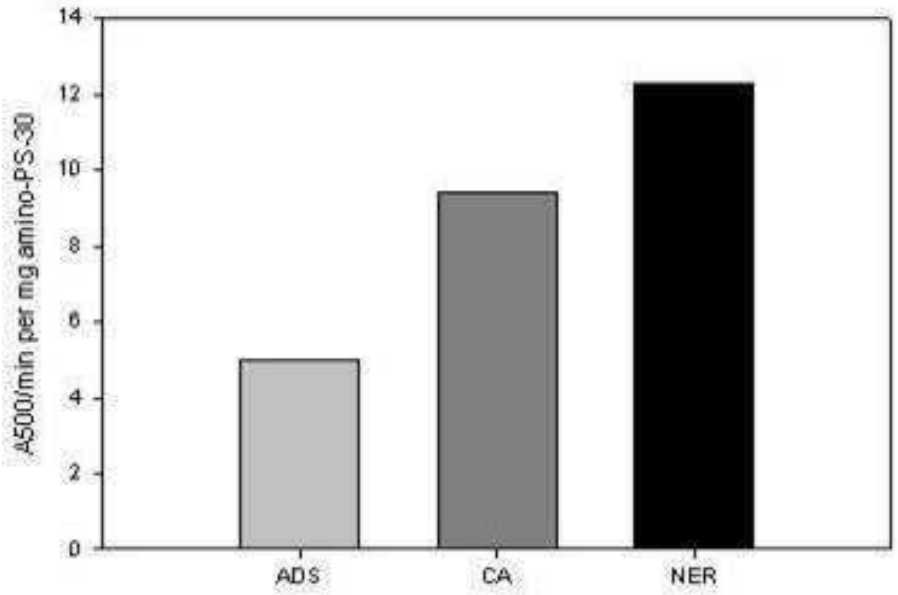
도면3b



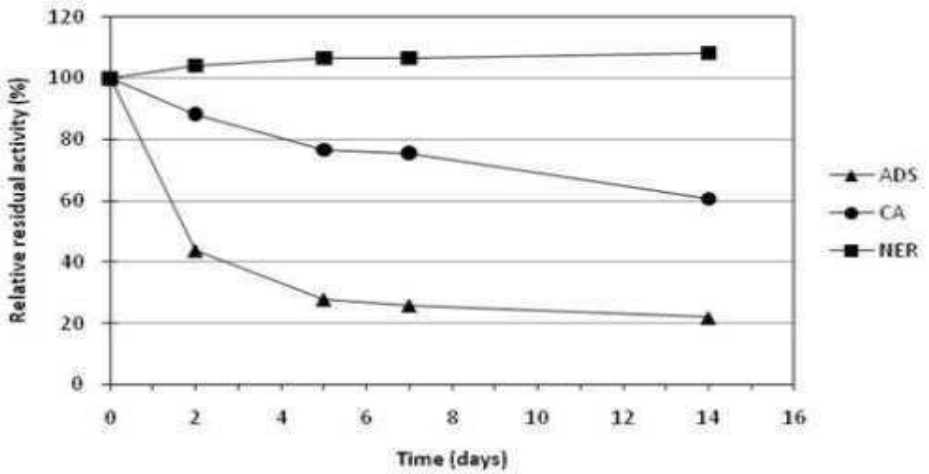
도면4



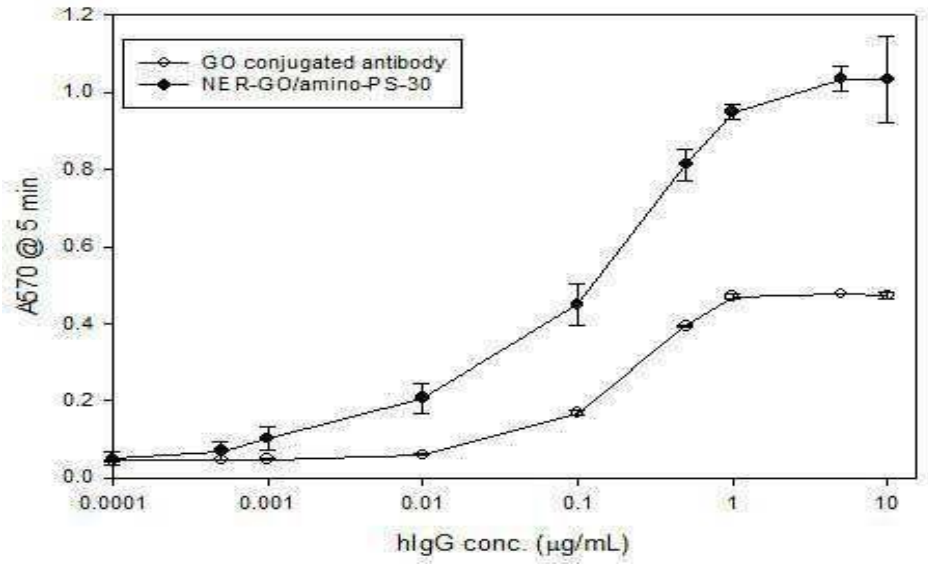
도면5


A500/min per mg amino-PS-30
14
12
10
8
6
4
2
0
ADS
CA
NER

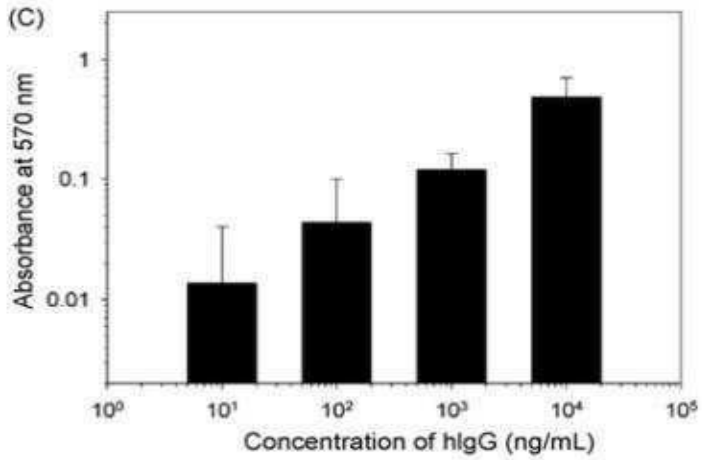
도면6


Relative residual activity (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Time (days)
ADS
CA
NER

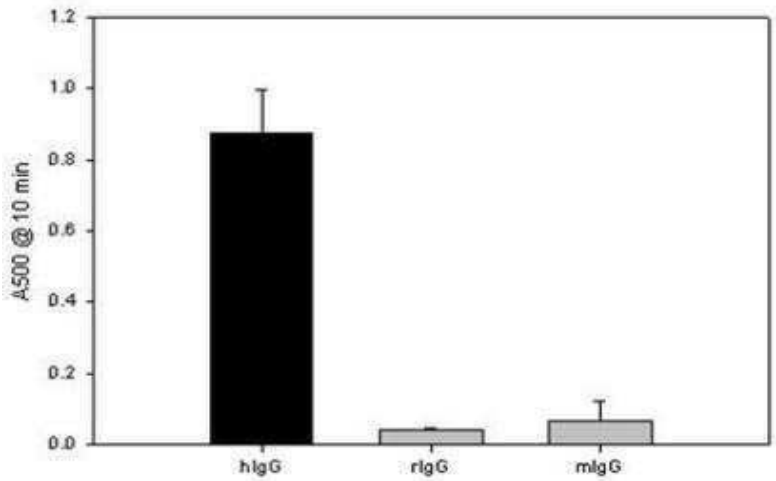
도면7


GO conjugated antibody
NER-GO/amino-PS-30
A570 @ 5 min
hIgG conc. (μg/mL)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10

도면8


(C)
Absorbance at 570 nm
Concentration of hIgG (ng/mL)
1
0.1
0.01
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
10⁵

도면9


A500 @ 10 min
hIgG
rIgG
mIgG
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2