(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0075112
(43) 공개일자 2023년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 33/544 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56983 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0161390
(22) 출원일자 2021년11월22일
심사청구일자 2021년11월22일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
신관우
서울특별시 강남구 선릉로 221, 404동 1204호
편나윤
경기도 의정부시 동일로 397, 202동 1104호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅

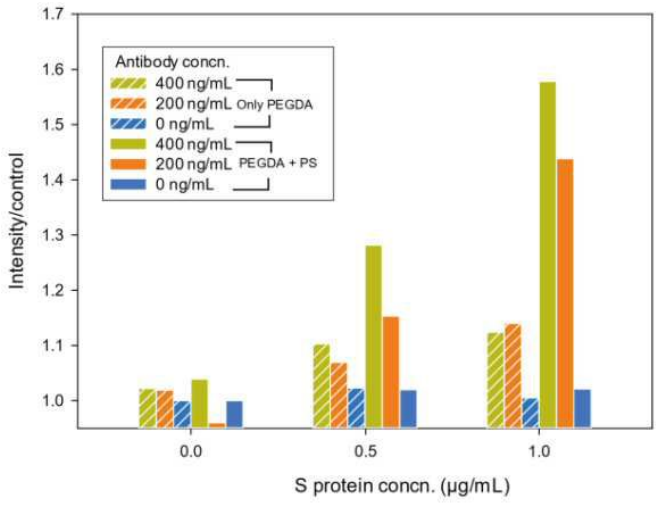
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **수화젤 센서를 포함하는 바이러스 감염 진단용 키트**

(57) 요 약

본 발명은 수화젤(hydrogel) 센서를 포함하는 바이러스 감염 진단용 키트에 관한 것으로서, 상기 수화젤 센서는 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(polyethyleneglycol diacrylate; PEGDA) 및 폴리스티렌 나노입자(Polystyrene nanoparticles; PSNPs)를 포함하여 항원 단백질이 고정됨으로써 검출 민감도를 증가시키므로, 이를 효과적으로 바이러스 검출 및 감염 여부의 진단에 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도3a



(52) CPC특허분류
G01N 33/544 (2013.01)
(72) 발명자
권오선
경기도 용인시 수지구 신봉2로 72, 221동 504호
김창호
서울특별시 노원구 노원로 29, 2동 605호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345331324
과제번호 2018R1A6A1A03024940
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 분자 자가 조립 기반 기능성 인공세포 구현
기 여 율 10/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711110551
과제번호 2019R1A2C2084638
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 바이오 분자 소재의 다차원 계층 구조 연구
기 여 율 10/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711141374
과제번호 2021K1A4A8A02079222
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 해외우수연구기관협력허브구축(R&D)
연구과제명 서강-하버드-SDU BioHybrid 공동 연구센터
기 여 율 30/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2021.07.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345330700
과제번호 2020R1A6C101A192
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국기초과학지원연구원
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 핵심연구지원센터 조성 지원 과제(첨단 바이오계면 핵심연구지원센터)
기 여 율 10/100
과제수행기관명 서강대학교산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2021400000
과제번호 20214000000500
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국에너지기술평가원
연구사업명 에너지인력양성사업(RCMS)
연구과제명 녹색성장을 위한 CCUS 전문인력양성
기 여 율 40/100
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2021.04.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(polyethyleneglycol diacrylate; PEGDA) 및 폴리스티렌 나노입자(Polystyrene nanoparticles; PSNPs)를 포함하는 수화젤(hydrogel) 센서를 포함하는 바이러스 감염 진단용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 수화젤 센서는 PEGDA를 2 내지 15 중량% 포함하는 것인, 바이러스 감염 진단용 키트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 수화젤 센서는 PSNPs를 0.01 내지 15.00 중량% 포함하는 것인, 바이러스 감염 진단용 키트.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 수화젤 센서는 광개시제를 포함하며 UV 조사에 의해 경화된 것인, 바이러스 감염 진단용 키트.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 수화젤 센서는 항원 단백질이 고정된 형태인 것인, 바이러스 감염 진단용 키트.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 수화젤 센서는 PEGDA 및 PSNPs를 포함하는 수화젤을 스트립에 도포 후 경화시킨 형태로 제공되는 것인, 바이러스 감염 진단용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 스트립은 조립형 또는 일체형인 것인, 바이러스 감염 진단용 키트.

청구항 8

폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(polyethyleneglycol diacrylate; PEGDA) 및 폴리스티렌 나노입자(Polystyrene nanoparticles; PSNPs)를 포함하는 수화젤(hydrogel) 센서를 이용하여, 대상체로부터 분리된 시료의 접촉 시 반응 여부를 확인하는 검출 단계를 포함하는 것인, 바이러스에 의한 감염 여부 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 수화젤 센서는 광개시제를 포함하며 UV 조사에 의해 경화된 것인, 바이러스에 의한 감염 여부 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 수화젤 센서는 항원 단백질이 고정된 형태인 것인, 바이러스에 의한 감염 여부 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 수화젤 센서는 PEGDA 및 PSNPs를 포함하는 수화젤을 스트립에 도포 후 경화시킨 형태로 제공되는 것인, 바이러스에 의한 감염 여부 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 스트립은 조립형 또는 일체형인 것인, 바이러스에 의한 감염 여부 진단을 위한 정보 제

공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 수화젤(hydrogel) 센서를 포함하는 바이러스 감염 진단용 키트에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(polyethyleneglycol diacrylate; PEGDA) 및 폴리스티렌 나노입자(Polystyrene nanoparticles; PSNPs)를 포함하는 수화젤 센서, 및 상기 수화젤 센서에 고정된 항원 단백질을 포함하는 바이러스 감염 진단용 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] COVID(Coronavirus disease)-19를 검출하기 위한 기존의 방법은 RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)을 이용한 분석 방법이다. 이러한 방법은 고가의 분석 장비를 이용해야 하고 전처리가 필수적이며, 숙련된 전문가가 오랜 시간에 걸쳐 수행해야 한다는 한계점이 있었다.

[0003] 반면에 항원-항체 반응을 이용하여 스트립(POCT(Point-of-care testing) device)에 전개시키는 측방유동면역분석(Immunoassay lateral flow strip) 방법을 사용하는 경우에는 소요되는 비용이 저렴하고 전처리가 불필요하며, 검출 방법이 간단하므로 누구나 쉽게 조작할 수 있고, 결과가 신속하게 도출된다는 장점이 있다.

[0004] 이러한 방법에 적용하기 위하여, SARS-COV-2 스파이크 단백질(spike protein; S protein)을 검출 표적으로 하는 항체를 이용함으로써 측방유동면역분석에 적용하는 방법이 연구되었다.

[0005] 이 방법에서 주로 반응이 진행되는 막의 소재로는 친수성을 띄는 니트로셀룰로스(Nitrocellulose)가 사용된다. 단순 흡착으로 단백질이 막에 고정되는 경우 주로 정전기적 인력을 통해 단백질이 고정되는데, 소수성의 단백질 또는 고분자량의 단백질의 경우 막에 대한 낮은 결착력(Binding capacity)을 가질 수 있고, 이러한 이유 때문에 비교적 낮은 검출 민감도를 나타낼 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 스파이크 단백질(spike protein; S protein)을 고정화시키기 위한 결합 부위(binding site)를 증가시키기 위하여 검출 키트 내의 검사선(test line) 위치에 수화젤(hydrogel)을 사용함으로써, 빠르고 쉬운 교차결합(crosslinking)을 달성하고 생물학적으로 안정하며, 물리적인 조작이 용이하고 표면적을 증가시킴으로써 검출 민감도가 상승하는 것을 확인하였다.

[0007] 이에, 본 발명의 목적은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(polyethyleneglycol diacrylate; PEGDA) 및 폴리스티렌 나노입자(Polystyrene nanoparticles; PSNPs)를 포함하는 수화젤 센서를 포함하는 바이러스 감염 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트 및 폴리스티렌 나노입자를 포함하는 수화젤 센서를 이용하여, 대상체로부터 분리된 시료의 접촉 시 반응 여부를 확인하는 검출 단계를 포함하는 것인, 바이러스에 의한 감염 여부 진단을 위한 정보 제공 방법이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트 및 폴리스티렌 나노입자를 포함하는 수화젤 센서의 바이러스에 의한 감염 여부 진단 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 수화젤(hydrogel) 센서를 포함하는 바이러스 감염 진단용 키트에 관한 것으로, 본 발명에 따른 수화젤 센서는 친수성 단백질 및 소수성 단백질 모두를 고정시킬 수 있으므로 다양한 바이오마커에 대하여 높은 검출 민감도를 나타낸다.

[0011] 본 발명자들은 폴리스티렌 나노입자(Polystyrene nanoparticles; PSNPs)를 포함하는 PEGDA(polyethyleneglycol diacrylate; 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트) 수화젤에 진단용 항원으로 바이러스 스파이크 단백질(spike protein; S protein)을 고정시킴으로써 바이러스 감염 진단용 키트에 사용할 경우 검출 민감도가 증가하는 것을

확인하였다.

[0012] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0013] 본 발명의 일 양태는 PEGDA 및 PSNPs를 포함하는 수화젤 센서를 포함하는 바이러스 감염 진단용 키트이다.

[0014] 본 발명에 있어서 상기 수화젤 센서는 PEGDA를 2 내지 15 중량% 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 2 내지 12 중량%, 2 내지 10 중량%, 2 내지 8 중량%, 5 내지 15 중량%, 5 내지 12 중량%, 5 내지 10 중량%, 5 내지 8 중량%, 8 내지 15 중량%, 또는 8 내지 12 중량%, 예를 들어, 8 내지 10 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명에 있어서 상기 수화젤 센서는 PSNPs를 0.01 내지 15.00 중량% 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 1.00 내지 15.00 중량%, 1.00 내지 10.00 중량%, 1.00 내지 5.00 중량%, 2.00 내지 15.00 중량%, 2.00 내지 10.00 중량%, 2.00 내지 5.00 중량%, 5.00 내지 15.00 중량%, 또는 10.00 내지 15.00 중량%, 예를 들어, 12.00 내지 15.00 중량% 인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다,

[0016] 상기 PSNPs의 직경은 100 내지 10000 nm인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에 있어서 상기 수화젤 센서는 광개시제를 포함하며 UV 조사에 의해 경화된 것일 수 있다.

[0018] 상기 수화젤 센서는 광개시제를 0.1 내지 5.0 중량% 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 0.5 내지 2.0 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 상기 광개시제는 2-하이드록시-2-메틸프로피오페논(2-Hydroxy-2-methylpropiophenone)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명에 있어서 상기 수화젤 센서는 항원 단백질이 고정된 형태인 것일 수 있다. 상기 항원 단백질은 바이러스 표면 단백질인 것일 수 있고, 상기 바이러스 표면 단백질은 바이러스 스파이크 단백질, 피막 단백질(Envelope protein), 뉴클레오캡시드 단백질(Nucleocapsid protein), 헤마글루티닌(HA), 및 F 단백질(F protein)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 바이러스 스파이크 단백질인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명에 있어서 상기 수화젤 센서는 PEGDA 및 PSNPs를 포함하는 수화젤을 스트립에 도포 후 경화시킨 형태로 제공되는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 수화젤 센서는 스트립의 검사선에 적용됨으로써 시료가 스트립을 따라 전개됨에 따라 시료 중 표적 물질을 검사선에 고정시키는 원리에 따라 검출용 키트가 작동된다.

[0023] 상기 스트립은 샘플 패드(sample pad), 반응 패드(washing pad, reaction membrane, 주로 NC membrane 소재) 및 흡수 패드(Wick pad)로 이루어진 통상적으로 사용되는 것과 같은 구성의 조립형 스트립인 것일 수 있고, 이 경우 반응 패드를 중심으로 양쪽 말단에 각각 샘플 패드와 흡수 패드가 부착되며, 샘플 패드로부터 흡수 패드로의 방향으로 시료가 전개되면 반응 패드의 중앙에 표시된 검사선으로부터 검출 결과를 확인하는 과정에 따라 사용될 수 있다.

[0024] 또한 상기 스트립은 단 하나의 부속으로 실시되는 구성의 일체형 스트립인 것일 수 있고, 이 경우 스트립 한쪽 말단의 시료 접촉부를 시료가 위치하는 곳에 투입 또는 접촉시켜 흡수시키고, 흡수된 시료가 시료 접촉부로부터 이격되어 위치한 검사선까지 전개되면 검사선으로부터 검출 결과를 확인하는 과정에 따라 사용될 수 있다.

[0025] 상기 검출용 키트는 표적에 해당하는 바이오마커에 특이적인 검출항체를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 검출항체는 미리 스트립에 함침시켜 건조시킨 상태로 적용될 수 있고, 또는 별도의 용액으로 구성되어 시료와 동시에 또는 순차적으로 스트립에 전개되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 상기 검출용 키트로부터 측정되는 검출 결과의 확인을 용이하게 하기 위하여, 상기 검출항체는 발색효소, 형광물질, 자성체, 염색물질, 양자점(Quantum dot), 상자성 입자(super paramagnetic particles), 초상자성입자(ultrasuper paramagnetic particles), 및 방사성동위원소로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 표지물질로 표지된 것일 수 있고, 예를 들어, 발색효소로 표지된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 다른 양태는 PEGDA 및 PSNPs를 포함하는 수화젤 센서를 이용하여, 대상체로부터 분리된 시료의 접촉 시 반응 여부를 확인하는 검출 단계를 포함하는 것인, 바이러스에 의한 감염 여부 진단을 위한 정보 제공 방법이다.

[0028] 본 발명에 있어서 상기 수화젤 센서는 PEGDA를 2 내지 15 중량% 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 2 내지 12 중량%, 2 내지 10 중량%, 2 내지 8 중량%, 5 내지 15 중량%, 5 내지 12 중량%, 5 내지 10 중량%, 5 내지 8 중량%, 8 내지 15 중량%, 또는 8 내지 12 중량%, 예를 들어, 8 내지 10 중량% 포함하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에 있어서 상기 수화젤 센서는 PSNPs를 0.01 내지 15.00 중량% 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 1.00 내지 15.00 중량%, 1.00 내지 10.00 중량%, 1.00 내지 5.00 중량%, 2.00 내지 15.00 중량%, 2.00 내지 10.00 중량%, 2.00 내지 5.00 중량%, 5.00 내지 15.00 중량%, 또는 10.00 내지 15.00 중량%, 예를 들어, 12.00 내지 15.00 중량% 인 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다,

[0030] 본 발명에 있어서 상기 수화젤 센서는 광개시제를 포함하며 UV 조사에 의해 경화된 것일 수 있다.

[0031] 상기 수화젤 센서는 광개시제를 0.1 내지 5.0 중량% 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 0.5 내지 2.0 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 상기 광개시제는 2-하이드록시-2-메틸프로피오페논인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명에 있어서 상기 수화젤 센서는 항원 단백질이 고정된 형태인 것일 수 있다. 상기 항원 단백질은 바이러스 표면 단백질인 것일 수 있고, 상기 바이러스 표면 단백질은 바이러스 스파이크 단백질, 피막 단백질, 뉴클레오캡시드 단백질, 헤마글루티닌, 및 F 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 바이러스 스파이크 단백질인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에 있어서 상기 수화젤 센서는 PEGDA 및 PSNPs를 포함하는 수화젤을 스트립에 도포 후 경화시킨 형태로 제공되는 것일 수 있고, 상기 스트립은 조립형 또는 일체형인 것일 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서 상기 검출 단계는 대상체로부터 분리된 시료 내 바이오마커가 수화젤 센서, 또는 상기 수화젤 센서에 고정된 항원 단백질에 결합하는지의 여부를 확인함으로써 수행되는 것일 수 있다.

[0036] 상기 검출용 키트는 표적에 해당하는 바이오마커에 특이적인 검출항체를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 검출항체는 미리 스트립에 함침시켜 건조시킨 상태로 적용될 수 있고, 또는 별도의 용액으로 구성되어 시료와 동시에 또는 순차적으로 스트립에 전개되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 상기 검출용 키트로부터 측정되는 검출 결과의 확인을 용이하게 하기 위하여, 상기 검출항체는 발색효소, 형광물질, 자성체, 염색물질, 양자점, 상자성 입자, 초상자성입자, 및 방사성동위원소로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 표지물질로 표지된 것일 수 있고, 예를 들어, 발색효소로 표지된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 상기 대상체로부터 분리된 시료는 혈청, 세포 및 조직으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 상기 시료 내 바이오마커는 표적 바이러스 유래의 항원 단백질 특이적인 항체인 것일 수 있고, 예를 들어, 중화항체인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0040] 본 발명은 수화젤(hydrogel) 센서를 포함하는 바이러스 감염 진단용 키트에 관한 것으로서, 상기 수화젤 센서는 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(polyethyleneglycol diacrylate; PEGDA) 및 폴리스티렌 나노입자(Polystyrene nanoparticles; PSNPs)를 포함하여 항원 단백질이 고정됨으로써 검출 민감도를 증가시키므로, 이를 효과적으로 바이러스 검출 및 감염 여부의 진단에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 알지네이트(alginate)-니켈 수화젤의 단백질 검출 결과를 보여주는 사진이다.

도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 아가로오스(agarose) 및 Ni-NTA 레진 수화젤을 이용한 단백질 검출 결과를 보여주는 사진이다.

도 1c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 PEGDA(polyethyleneglycol diacrylate; 폴리에틸렌글리콜 디아크

릴레이트) 수화젤을 이용한 단백질 검출 결과를 보여주는 사진이다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 폴리스티렌 나노입자(Polystyrene nanoparticles; PSNPs)를 포함하는 PEGDA 수화젤의 표면을 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope; SEM)을 이용하여 배율 X 1,000으로 촬영한 사진이다.

도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 PSNPs를 포함하는 PEGDA 수화젤의 표면을 SEM을 이용하여 배율 X 30,000으로 촬영한 사진이다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 PEGDA 수화젤의 PSNPs 포함 여부에 따른 바이러스 스파이크 단백질 검출 강도를 비교한 그래프이다.

도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 PEGDA 수화젤의 바이러스 스파이크 단백질 검출을 위한 PSNPs 최소 함량을 확인한 그래프이다.

도 3c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 PEGDA 수화젤의 PSNPs 함량에 따른 스파이크 단백질 특이적인 항체의 검출 강도를 비교한 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 일반 스트립(상) 및 PSNPs를 포함하는 PEGDA 수화젤 센서를 포함하는 스트립(하)의 모식도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 일반 스트립(좌) 및 PSNPs를 포함하는 PEGDA 수화젤 센서를 포함하는 스트립(우)을 이용하여 스파이크 단백질 특이적인 항체의 검출 민감도를 확인한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0043] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[0045] **실시예 1: 적합한 수화젤 소재의 탐색**

[0046] **1-1. 알지네이트-니켈 수화젤**

[0047] 2%의 알지네이트 용액을 제조하여 96 웰 플레이트(Well plate)에 넣고, 산화 니켈과 질산을 통해 합성한 질산니켈 용액을 플레이트에 추가하여 이온 교차결합(crosslinking)을 유도하였다. 각 웰에 스파이크 단백질(spike protein; S protein)을 1.0 ug/ml 농도로 포함하는 PBS(phosphate buffered saline) 용액을 첨가하고, 비특이적인 흡착을 막기 위하여 블로킹 버퍼(blocking buffer)를 첨가하여 20분 간격으로 시간을 늘려가며 실시하였다.

[0048] 그 후 스파이크 단백질에 대한 특이적인 1차 항체인 스파이크 단백질 중화 항체(S protein Neutralizing Ab, Y biologics), 및 HRP가 콘쥬게이션(conjugation)된 1차 항체에 특이적인 2차 항체(HRP Anti-Nab conjugate, Y biologics)를 각각 1시간 동안 처리하였으며, 각 스텝 사이에는 PBST(phosphate buffer saline + tween-20) 용액(solution)으로 5회 세척을 실시하였다. 결과를 확인하기 위한 색의 변화를 관찰하기 위해서는 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 용액을 반응시켜 색 변화를 일으키고 10분 후 HCl 처리를 하여 반응을 종결시켰다.

[0049] 도 1a에서 확인할 수 있듯이, 알지네이트(alginate)-니켈 수화젤은 PBS 용액에 의해 열화(degradation)되는 양상을 나타냈고, 바탕색(background color)이 너무 진하여 사용하기에 적합하지 않은 것으로 판단하였다.

[0051] **1-2. 아가로오스 및 Ni-NTA 레진 수화젤**

[0052] 아가로스와 Ni-NTA 비드(bead)를 TAE 버퍼에 혼합하고 가열(heating)하여 96 웰 플레이트에서 열을 식혀 젤을 형성하였다. 이후 각 웰에 스파이크 단백질(spike protein; S protein)을 0.5 및 1.0 ug/ml 농도로 포함하는 PBS 용액을 각각 투입하였다. 이후 실시예 1-1과 동일한 방법으로 스파이크 단백질에 대한 항체 반응을 수행하

였다.

[0053] 도 1b에서 확인할 수 있듯이, 아가로오스(agarose) 및 Ni-NTA 레진 수화젤은 PBS 용액에 의해 열화되지는 않았으나, 상기 실시예 1-1의 알지네이트-니켈 수화젤의 경우와 마찬가지로 바탕색이 너무 진하여 사용하기에 적합하지 않은 것으로 판단하였다.

[0055] **1-3. PEGDA 수화젤**

[0056] 광개시제인 2-하이드록시-2-메틸프로피오페논(2-Hydroxy-2-methylpropiophenone)이 1% 포함된 PEGDA(polyethyleneglycol diacrylate; 폴리에틸렌글리콜 디아크릴레이트) 8% 수용액을 96 웰 플레이트에 넣고 1분 동안 365 nm 파장의 UV 램프(lamp)를 통해 UV를 조사하여 UV 교차결합(UV crosslinking)을 수행하여 수화젤을 제조하였다. 이후 각 웰에 스파이크 단백질(spike protein; S protein)을 0.5 및 1.0 ug/mL을 포함하는 여러 농도 조건으로 투입하였다. 이후 실시예 1-1과 동일한 방법으로 스파이크 단백질에 대한 항체 반응을 수행하였다.

[0057] 도 1c에서 확인할 수 있듯이, PEGDA 수화젤은 PBS 용액에 의해 열화되지 않았으나, 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의하여 단백질을 고정시키기 위한 결합은 약하게 나타났다. 바탕색은 연하게 나타났으나 발색 색도(color intensity) 또한 약하게 나타나는 문제가 있었다.

[0058] 다만, PEGDA 수화젤은 다른 수화젤들과는 달리 HRP 접합 항체(antibody; Ab)와의 교차 반응성을 나타내지 않는 불활성 특성(inert property)으로 인하여 사용 가능성이 있을 것으로 판단되었다.

[0060] **실시예 2: 최적화 수화젤의 제조 및 확인**

[0061] 첨가물로서 수화젤에 쉽게 결합 가능한 폴리스티렌 나노입자(Polystyrene nanoparticles; PSNPs)를 선택하였다. 단백질은 물리화학적 힘에 의해 고정될 수 있고, 특히 소수성 상호작용에 의해 고정될 수 있으므로, 내구성, 화학적 및 면역학적으로 불활성한 폴리스티렌을 이용하여 수화젤의 단백질 결합력을 높이고자 하였다.

[0062] 이 경우, 수화젤에 효과적으로 고정되지 않는 친수성 부위가 결여된 표적 단백질을, 수화젤에 포함된 PSNPs에 의한 소수성 상호작용에 의하여 고정시킬 수 있을 것으로 예상하였다.

[0063] 구체적으로, 최종 농도가 PEGDA 8%, PSNPs가 2%가 되도록 혼합하여 수화젤을 제조하고 2-하이드록시-2-메틸프로피오페논 1%를 광개시제로 첨가한 용액에 대하여 365 nm 파장의 UV 램프를 통해 경화시켜 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope; SEM)으로 배율 X 1,000 및 X 30,000으로 관찰하였다.

[0064] 도 2a 및 2b에서 확인할 수 있듯이, 수화젤에 폴리스틸렌 나노입자를 분산시켜 경화시킴으로써 수화젤이 폴리스틸렌 나노입자를 고정하는 것을 확인하였다.

[0065] 이어서 수화젤의 제조 조건을 달리하여 아래와 같은 방법으로 ELISA 테스트를 수행하였다.

[0066] 두 개의 웰 플레이트에 각각 PSNPs가 포함된 또는 포함되지 않은 PEGDA 젤(gel)을 35 uL씩 투입하고 경화시킨 후 증류수로 5회 세척(washing)을 진행하였다. 스파이크 단백질을 각 농도별로 투입하여 2시간 동안 흡착에 의해 고정시키고, 비특이적인 흡착을 방지하기 위해 블로킹 버퍼(blocking buffer)를 2시간 동안 처리하였다. 이후 실시예 1-1과 동일한 방법으로 스파이크 단백질에 대한 항체 반응을 수행하였다.

[0067] 첫째로 PSNPs 포함 여부에 따른 스파이크 단백질의 검출 강도를 확인하기 위하여, PSNPs를 15 중량% 포함하는 수화젤을 이용하여 1차 항체가 0, 200 또는 400 ng/ml일 때 0.0, 0.5, 및 1.0 ug/ml의 농도에 해당하는 스파이크 단백질의 검출 강도를 확인하였다.

[0068] 도 3a에서 확인할 수 있듯이, 1차 항체의 농도가 동일할 때 PSNPs를 포함하는 수화젤을 이용한 스파이크 단백질의 검출 강도가 PSNPs를 포함하지 않은 수화젤을 이용한 경우 대비 높게 나타났다.

[0069] 동일한 항체와 항원 조건에서 더 강한 검출 강도를 보이므로, PSNPs가 포함된 수화젤이 스파이크 단백질을 더 잘 고정시키는 것으로 확인되었다.

[0070] 둘째로 스파이크 단백질의 검출을 위한 수화젤에 포함되는 PSNPs의 최소 농도를 탐색하기 위하여, PSNPs의 함량을 각각 0.0, 0.1, 0.3, 0.6, 1.0, 1.5 및 2.0 중량%로 설정하여 스파이크 단백질 1 ug/ml, 및 1차 항체 200

ng/ml 조건 하에서 검출 정도를 확인하였다.

[0071] 도 3b에서 확인할 수 있듯이, 수화젤에 포함된 PSNPs는 농도가 0.1 중량%일 때부터 검출이 가능하고 농도 의존적으로 검출 강도가 증가하였다.

[0072] 동일한 항체 농도 조건에서 PSNPs의 농도 의존적으로 스파이크 단백질의 검출 강도가 증가하므로, PSNPs를 포함하는 수화젤이 스파이크 단백질을 더 잘 고정시키는 것으로 확인되었다.

[0073] 셋째로 수화젤에 포함되는 PSNPs의 최적 농도를 탐색하기 위하여, PSNPs를 1 및 15 중량% 포함하는 수화젤에 대하여 스파이크 단백질 2 ug/mL, 및 1차 항체 0, 5, 10, 30, 50, 100, 및 200 ng/mL 조건 하에서 검출 정도를 확인하였다.

[0074] 도 3c에서 확인할 수 있듯이, 수화젤에 함유된 PSNPs의 농도가 15 중량%인 경우의 검출 한계 농도가 수화젤에 함유된 PSNPs의 농도가 1 중량%인 경우 대비 낮아져 최소 5 ng/ml에서도 육안으로 검출 가능한 것으로 나타났다.

[0075] 동일한 스파이크 단백질 농도 조건에서 수화젤의 PSNPs의 농도가 높을수록 검출 가능한 항체의 검출 한계 농도가 낮아지는 것으로 확인되었다.

[0077] **실시예 3: 최적화 수화젤을 적용한 스트립의 제조 및 확인**

[0078] 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane; NC membrane)에 검사선 및 대조선(control line)을 표시하였다.

[0079] 구체적으로, 시험군 스트립을 제조함에 있어서 NC 멤브레인 상에 존재하는 검사선의 위치에는 수화젤을 2 uL 도포한 후 365 nm 파장의 UV 램프로 경화시키고, 고정되지 않은 입자와 고분자를 제거하기 위해 꼼꼼하게 증류수로 세척 후 건조시켰다. 스트립이 완전히 건조된 후, 검사선 위에 스파이크 단백질을 도포하고 다시 건조시켜 단백질을 고정하였다. 대조선의 위치에는 Anti-NAb 항체(Y biologics)를 도포 후 건조시켜 고정하였다.

[0080] 대조군 스트립을 제조함에 있어서는, 상기 시험군 스트립의 제조 방법과 동일하게 수행하되 검사선은 수화젤의 도포 없이 단백질을 도포한 후 건조하는 방식으로 표시하였다.

[0081] 스트립의 조립은 NC 멤브레인의 말단에서 부착 부위마다 각 패드의 일정 부분이 겹치도록 샘플 패드(sample pad) 및 반응 패드(washing pad), 흡수 패드(Wick pad)를 순차적으로 부착하여 수행하였다.

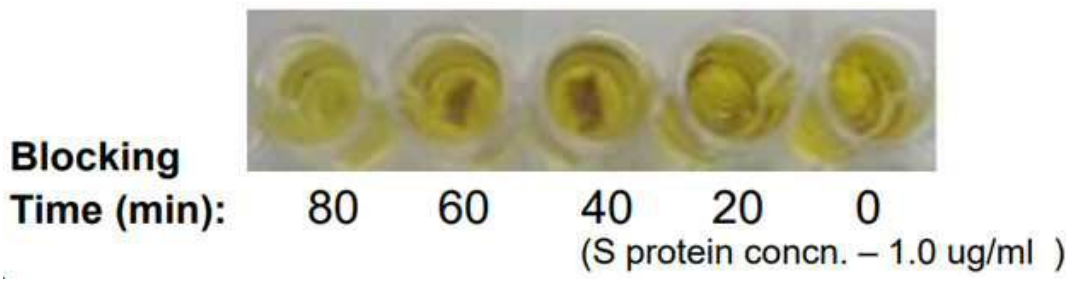
[0082] 샘플 패드는 비특이적인 흡착을 막기 위해 미리 BSA 용액(solution)으로 블로킹하여 검사선과 대조선이 완전히 건조된 후 NC 멤브레인의 한 쪽 말단에 부착하여 사용하였다. 반응 패드도 블로킹 처리를 하여 샘플 패드와 일정 부분 겹치도록 부착하였다. 이어서 NC 멤브레인의 다른 한 쪽 말단에 마찬가지로 일정 부분이 겹치도록 흡수 패드를 부착하여 도 4와 같이 키트를 제조하였다.

[0083] 제조된 각 스트립의 샘플 패드에 스파이크 단백질 중화(S protein Neutralizing) 항체 용액을 40 μL씩 흘려주어 반응 패드에서 반응시키고 2차 항체와 TMB 용액을 차례로 흘려주어 15분 후 검출 여부를 관찰하였다.

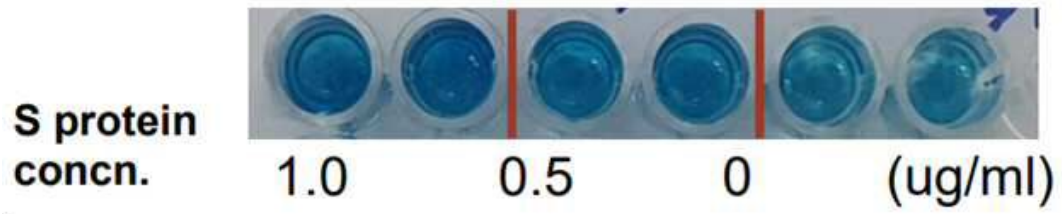
[0084] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 같은 항체 농도 500 ng/ml 조건에서 시험군 스트립에서는 검사선 위치에 선명한 밴드가 관찰되었으나, 대조군 스트립에서는 희미하게 관찰되었다.

도면

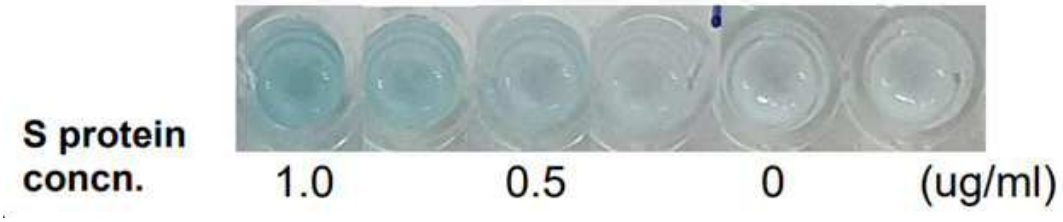
도면1a



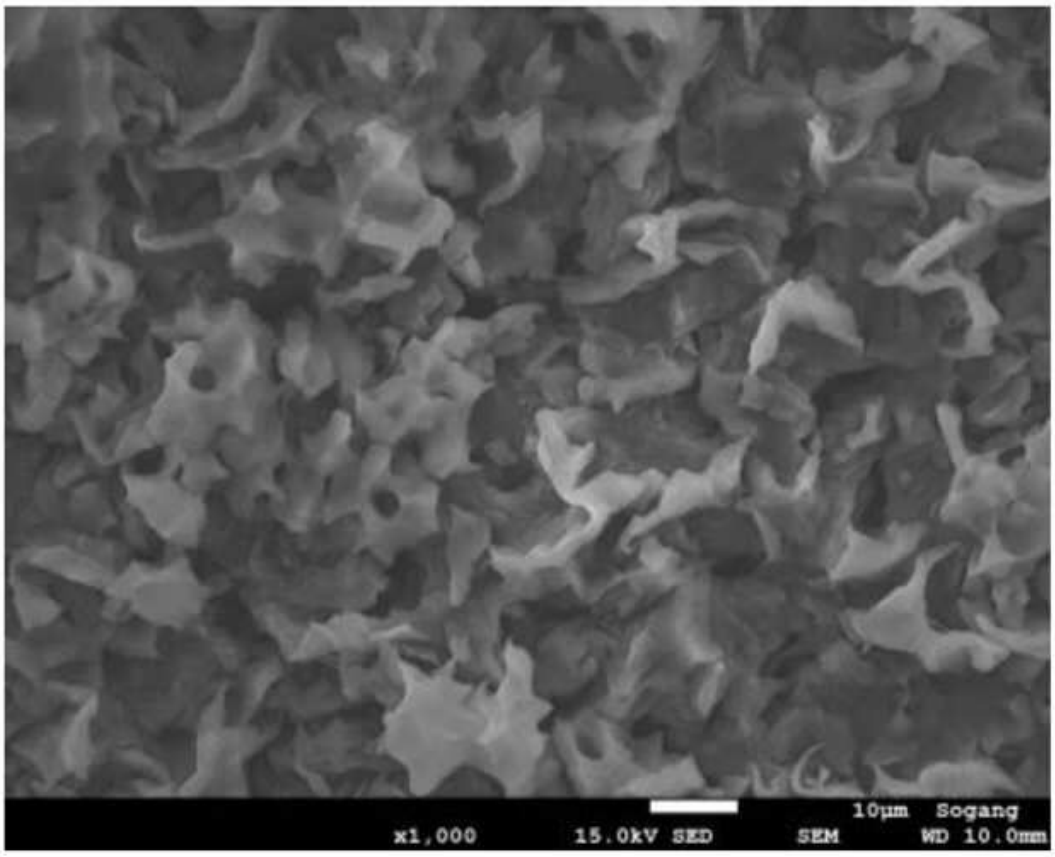
도면1b



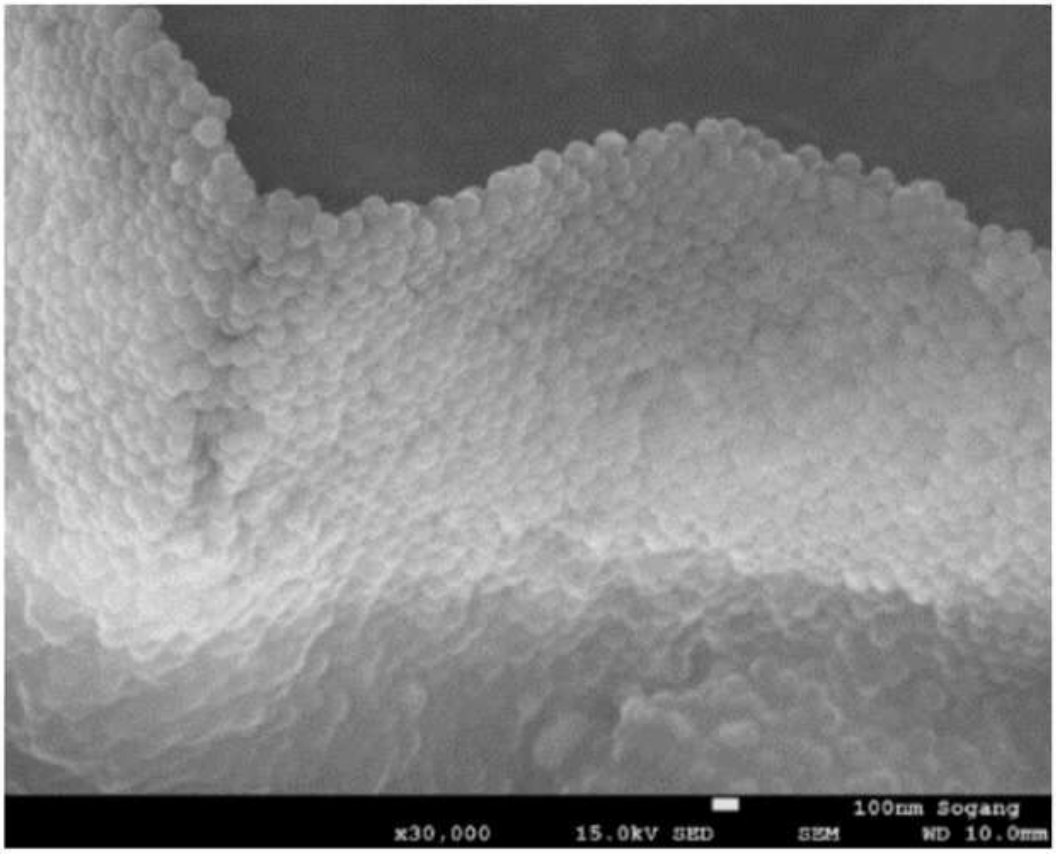
도면1c



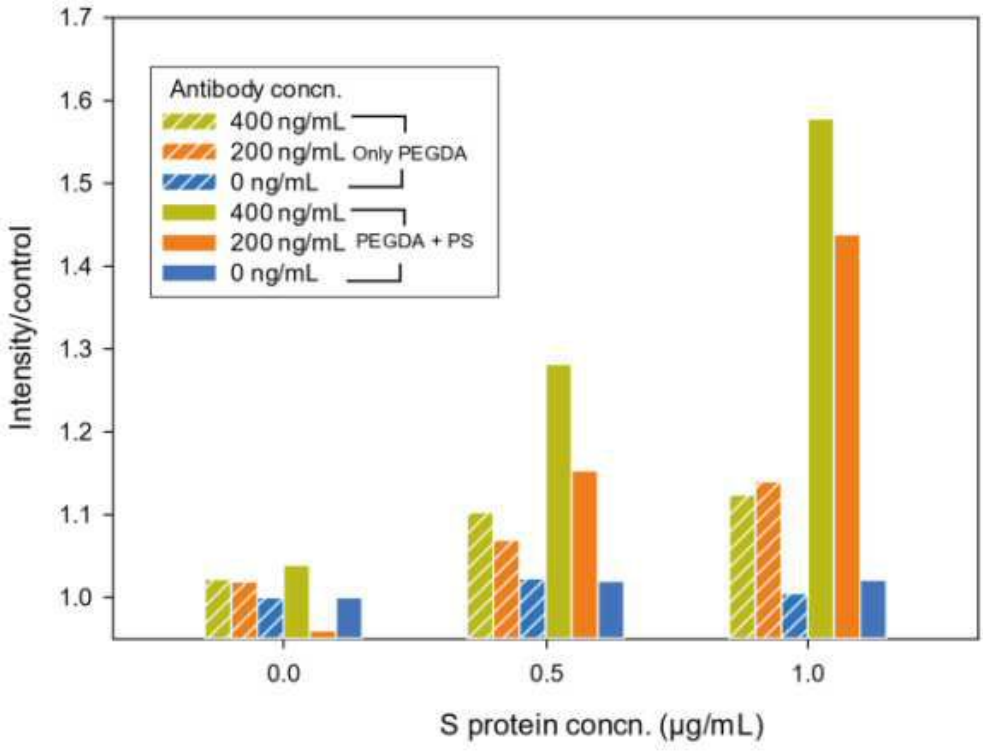
도면2a



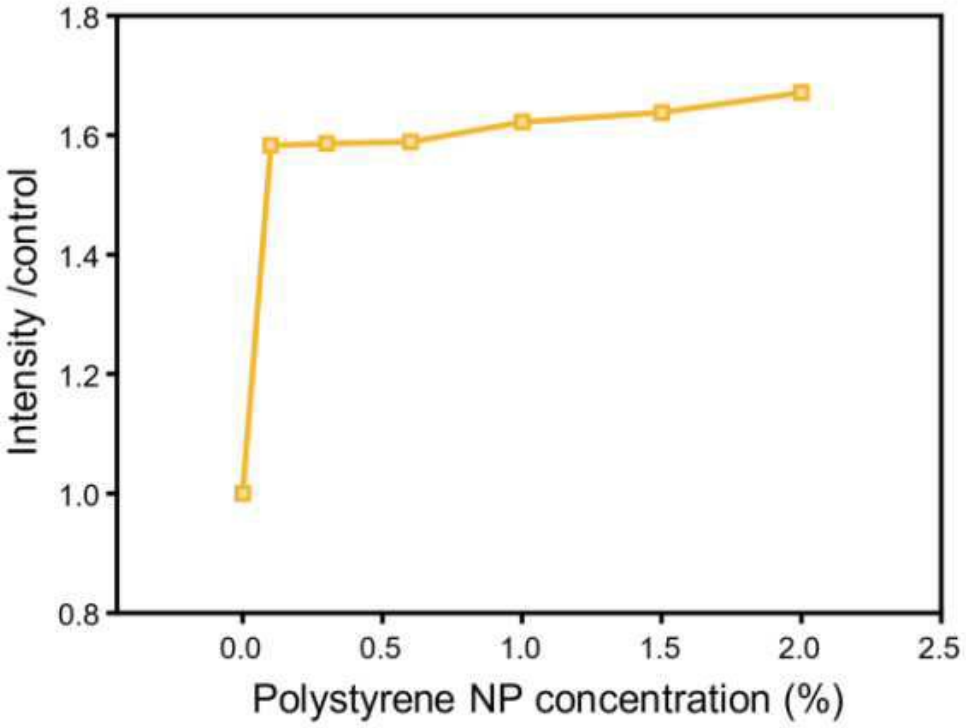
도면2b


x30,000
15.0kV SED
SEM
100nm Sogang
WD 10.0mm

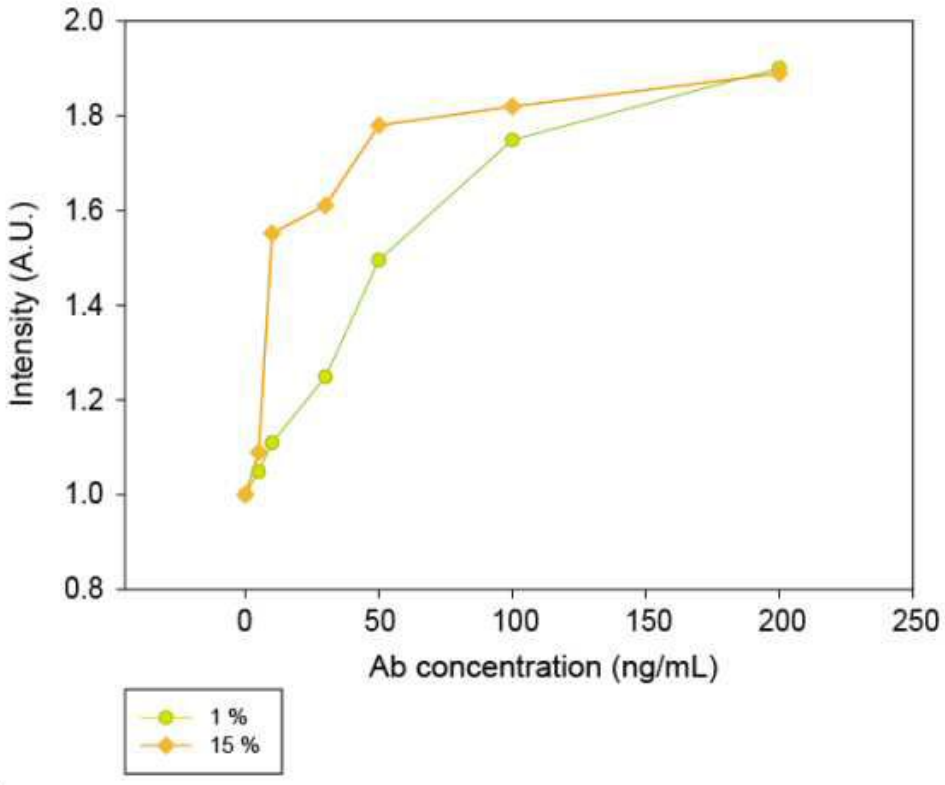
도면3a


Antibody concn.
400 ng/mL
200 ng/mL Only PEGDA
0 ng/mL
400 ng/mL
200 ng/mL PEGDA + PS
0 ng/mL
Intensity/control
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.0
0.5
1.0
S protein concn. (μg/mL)

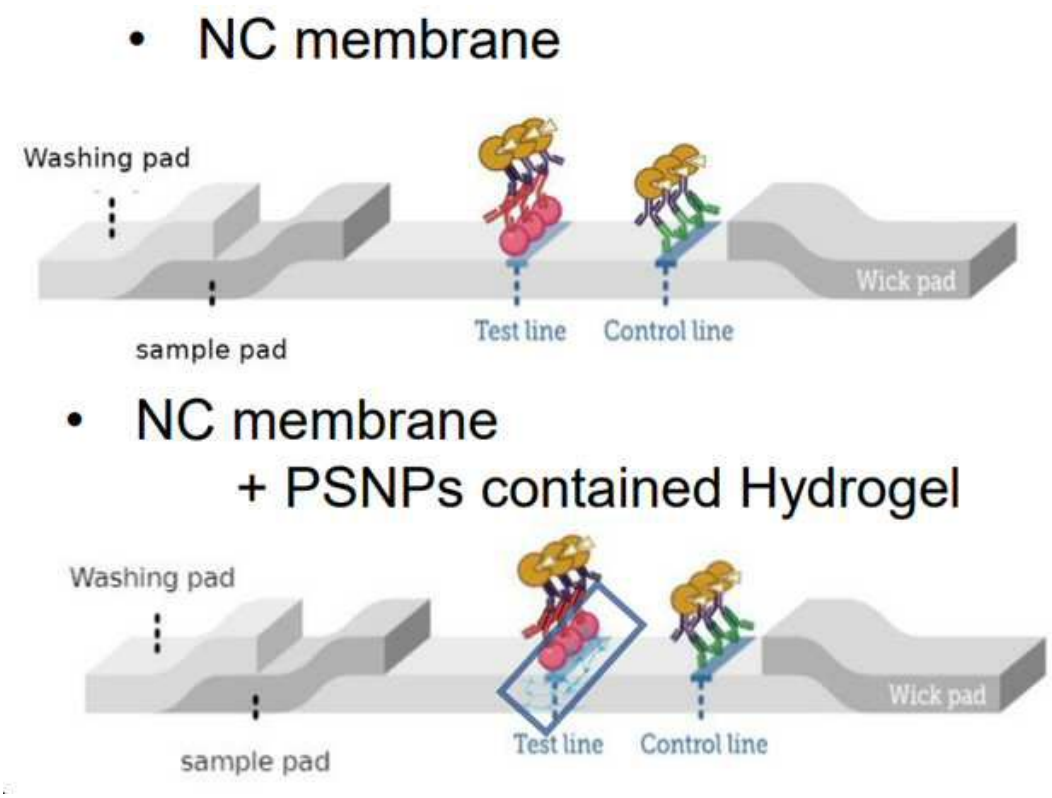
도면3b


Intensity /control
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
Polystyrene NP concentration (%)

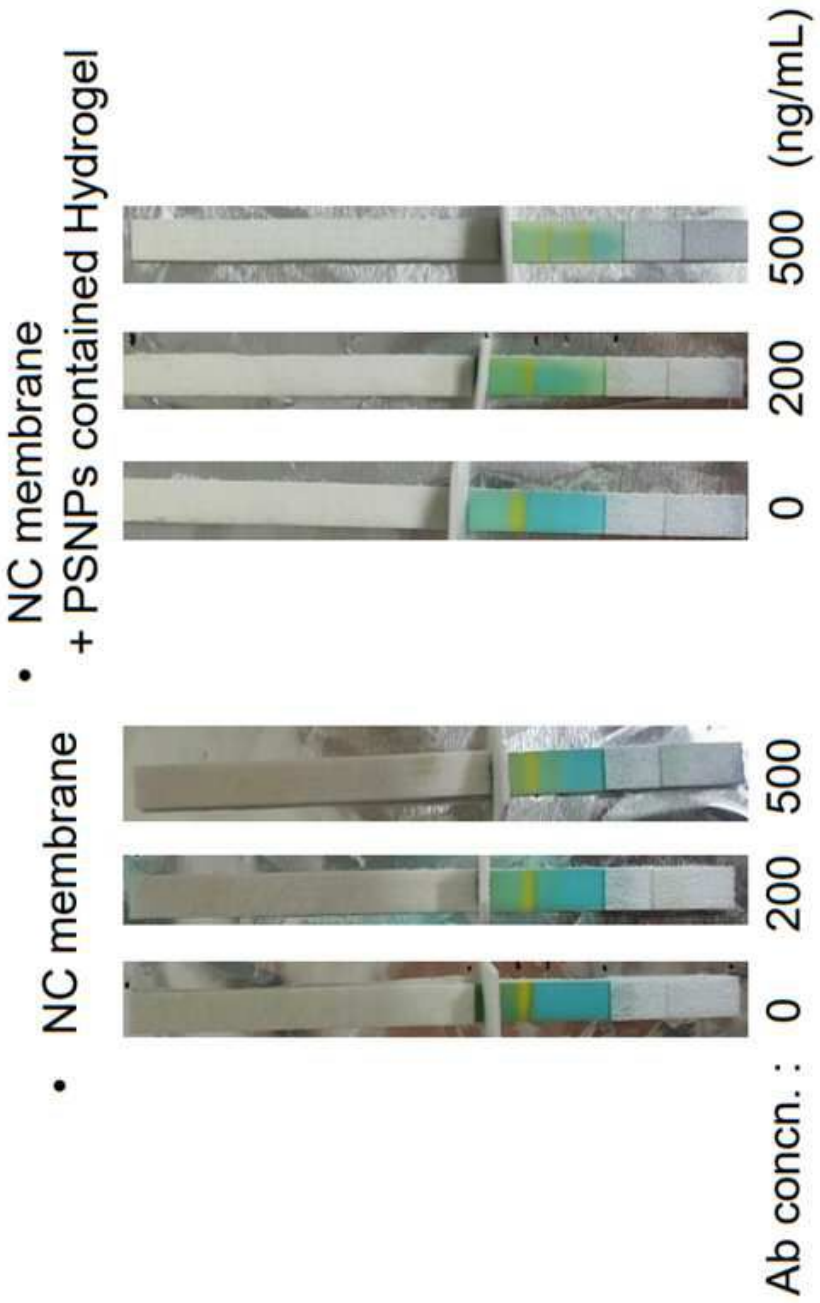
도면3c


Intensity (A.U.)
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0
50
100
150
200
250
Ab concentration (ng/mL)
1 %
15 %

도면4


• NC membrane
Washing pad
Wick pad
sample pad
Test line
Control line
• NC membrane
+ PSNPs contained Hydrogel
Washing pad
Wick pad
sample pad
Test line
Control line

도면5


• NC membrane
+ PSNPs contained Hydrogel
0
200
500
(ng/mL)
• NC membrane
Ab concn. : 0
200
500