



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월18일

(11) 등록번호 10-2034381

(24) 등록일자 2019년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/553 (2006.01)

G01N 33/569 (2017.01) G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/54346 (2013.01)

G01N 33/553 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0051740

(22) 출원일자 2018년05월04일

심사청구일자 2018년05월04일

(56) 선행기술조사문헌

Angew. Chem. Int. Ed., (2006), 45, pp
6900-6904

과학과 기술, (2007), Vol. 40, No. 6, pp 38-40

KR1020020062283 A

KR1020110107498 A

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

김영근

서울특별시 강남구 압구정로61길 37, 72동 1109호

김향래

서울특별시 관악구 낙성대역길 19, 101-501

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 누리

전체 청구항 수 : 총 20 항

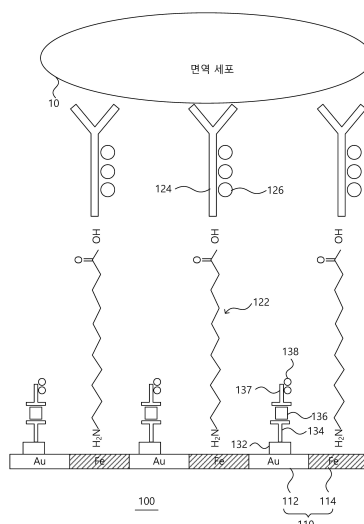
심사관 : 양경식

(54) 발명의 명칭 다층 나노선 복합체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명의 일 실시예에 따른 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법은, 제1 금속 및 제2 금속이 교번하여 적층된 다층 나노선을 준비하는 단계; 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자를 상기 제2 금속에 부착하는 단계; 상기 다층 나노선의 상기 제1 금속에 싸이올기(thiol's group)로 처리된 제1 항체를 부착하는 단계; 및 상기 제2 금속에 상기 고분자의 카르복실기를 통하여 상기 제2 항체를 부착하는 단계를 포함한다. 상기 제2 항체는 형광체를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/56966 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

G01N 2333/555 (2013.01)

(72) 발명자

전유상

서울특별시 송파구 동남로 225, 103동 1301호

남다연

인천광역시 부평구 길주남로 143, 111동 907호

김유진

경기도 성남시 분당구 미금로 63, 309동 1701호

신현무

서울특별시 양천구 지양로10길 8, 1동 502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014M3A7B4052192

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 고품질 치료용 나노섬유 기반 3차원 복합구조 담체 및 전달 원천기술개발

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교

연구기간 2014.09.01 ~ 2019.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A15053002

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 바코드 나노선 기반 면역검지 플랫폼 개발

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

제1 금속 및 제2 금속이 교번하여 적층된 다층 나노선을 준비하는 단계;
양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자를 상기 제2 금속에 부착하는 단계;
상기 다층 나노선의 상기 제1 금속에 싸이올기(thiol's group)로 처리된 제1 항체를 부착하는 단계; 및
상기 제2 금속에 상기 고분자의 카르복실기를 통하여 상기 제2 항체를 부착하는 단계를 포함하고,
상기 제2 항체는 형광체를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 2

제1 항에 있어서,
상기 제1 금속은 금이고,
상기 제2 금속은 Fe, Ni, Co 중에서 적어도 하나를 포함하는 강자성재료인 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 3

제1 항에 있어서,
양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자는 에틸기 혹은 폴리에틸렌글리콜로 연결되는 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 4

제3 항에 있어서,
양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자는 11-아미노운데칸산(11-aminoundecanoic acid)인 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 5

제4 항에 있어서,
상기 싸이올기(thiol's group)의 처리는 상기 고분자의 아민기와 반응할 수 있는 2-Iminothiolane 또는 SATA (N-succinimidyl-S-acetylthioacetate)를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 6

제1 항에 있어서,
상기 제1 항체는 상기 제2 항체보다 선반응시키는 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 7

제5 항에 있어서,
상기 제2 항체는 EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) 그리고 sulfo NHS(sulfo-N-hydroxysulfosuccinimide)와 혼합된 후 상기 고분자에 결합하는 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 8

제1 항에 있어서,

상기 다층 나노선의 상기 제1 금속의 두께는 20 nm 내지 50 nm이고,

상기 다층 나노선의 상기 제2 금속의 두께는 20 nm 내지 50 nm인 것을 정의로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 9

제1 금속 및 제2 금속이 교번하여 적층된 다층 나노선;

상기 제2 금속에 부착되고 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자;

상기 다층 나노선의 상기 제1 금속에 싸이올기(thiol's group)로 처리된 후 부착된 제1 항체; 및

상기 제2 금속에 상기 고분자의 카르복실기를 통하여 부착된 상기 제2 항체;를 포함하고,

상기 제2 항체는 형광체를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체.

청구항 10

제9 항에 있어서,

상기 제1 항체는 면역물질과 제1 보조 항체와 샌드위치 결합하고,

상기 제1 보조 항체는 보조 형광체를 포함하고,

상기 제2 항체는 면역 세포와 결합하고,

상기 제2 항체의 형광체는 외부 광을 제공받아 제1 형광을 제공하고,

상기 제1 항체의 보조 형광체는 상기 제2 항체의 형광체의 제1 형광을 제공받아 제2 형광을 제공하는 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체.

청구항 11

제9 항에 있어서,

상기 제1 금속은 금이고,

상기 제2 금속은 Fe, Ni, Co 중에서 적어도 하나를 포함하는 강자성재료인 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체.

청구항 12

제9 항에 있어서,

양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자는 에틸기 혹은 폴리에틸렌글리콜로 연결되는 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체.

청구항 13

제9 항에 있어서,

양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자는 11-아미노운데칸산(11-aminoundecanoic acid)인 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복합체.

청구항 14

제9 항에 있어서,

상기 다층 나노선의 상기 제1 금속의 두께는 20 nm 내지 50 nm이고,

상기 다층 나노선의 상기 제2 금속의 두께는 20 nm 내지 50 nm인 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 나노선 복

합체.

청구항 15

제1 금속 및 제2 금속이 교번하여 적층된 다층 나노선, 상기 제1 금속에 부착된 제1 항체, 및 상기 제2 금속에 부착된 고분자, 형광체를 포함하고 상기 고분자에 부착된 제2 항체를 포함하는 나노선 복합체를 준비하는 단계;

면역 세포를 포함하는 면역 세포 용액을 준비하는 단계;

상기 나노선 복합체와 상기 면역 세포 용액을 혼합하여 제1 혼합 용액을 생성하고 상기 면역 세포와 상기 제2 항체를 반응시키는 단계;

보조 형광체를 포함하는 제1 보조 항체를 상기 나노선 복합체와 상기 면역 세포 용액이 혼합된 혼합 용액에 투입하여 제2 혼합 용액을 생성하고, 상기 면역 세포가 방출한 면역 물질, 제1 항체, 및 제1 보조 항체를 샌드위치 결합시키는 단계; 및

여기광을 제2 혼합 용액에 조사하여 상기 형광체를 발광시키고 상기 형광체의 발광에 의한 상기 보조 형광체의 발광을 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 방법.

청구항 16

제15 항에 있어서,

상기 제1 항체와 샌드위치 결합하지 않은 상기 제1 보조 항체를 제거하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 방법.

청구항 17

제15 항에 있어서,

상기 면역 세포와 상기 제2 항체가 반응하지 않은 나노선 복합체를 제거하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 방법.

청구항 18

제15 항에 있어서,

상기 면역 세포는 CD8 양성 T 세포이고,

상기 면역 물질은 IFN- γ 인 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 방법.

청구항 19

제 15 항에 있어서,

상기 제1 금속은 금이고,

상기 제2 금속은 Fe, Ni, Co 중에서 적어도 하나를 포함하는 강자성재료인 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 방법.

청구항 20

제15 항에 있어서,

양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자는 에틸기 혹은 폴리에틸렌글리콜로 연결되는 것을 특징으로 하는 면역물질 검지 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 제1 금속과 제2 금속이 교대로 적층된 다층구조의 나노선을 활용하여 세포 및 생체분자 검지를 위한

[0001]

면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 상기 다층 나노선에 세포 포집용 항체와 생체분자 검지용 항체가 제1 금속과 제2 금속 각각에 선택적으로 동시에 탑재되어 있는 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 체외진단 면역물질 검지법(in vitro diagnosis of immunological substances)은 인체의 면역정도(immunity)를 나타내는 면역세포(immune cell) 또는 면역물질(immunological substances)의 수치를 측정하는 검사로 정량적 분석은 면역체계 작동정도(immunity)를 검사하는 적절한 지표로서 사용되고 있다. 그러나 체외진단 면역물질 검지법(in vitro diagnosis of immunological substances)에서, 면역세포포집(capturing immune cells), 면역세포자극(stimulation of immune cells), 면역물질(예를 들어, 사이토카인) 검지 등의 각 과정에서 세포의 분리작업이 필요하다. 각 검사과정이 복잡하고 개별공정에 따른 검사 장비가 달라 시간과 비용의 문제가 있다.
- [0003] 예를 들어, 인터페론감마(interferon gamma, IFN- γ)와 같은 사이토카인을 검출하기 위하여 샌드위치 효소결합 면역분석법(sandwich Enzyme-linked immunosorbent assay; sandwich ELISA), 효소결합면역점분석법(Enzyme-linked immunospot, ELISPOT), 유세포분석기(flow cytometry) 등이 사용되고 있다. 이들 분석법들은 면역세포에서 배출되는 면역물질(예를 들어, 사이토카인)을 직접적으로 검지하는 것이 아닌 혈액 속에 분포해 있는 사이토카인을 간접적으로 검출한다. 따라서 검사의 오류 발생가능성이 높을 뿐 아니라 환자에게서 다량의 혈액을 필요로 한다. 이들 분석법은 고가의 비용 및 많은 시간을 소요한다는 단점이 있음에도, 현존하는 기술 중에서 대체할 만한 효율적인 검출 방식이 마땅치 않다.
- [0004] 이러한 문제를 해결하기 위해 최근 검지 민감도(sensitivity)가 높은 나노소재를 다양한 관점에서 사용하고 있다. 대표적으로 자기적 특성을 가지는 코어, 생체친화적(biocompatible) 재료를 셸로 쌓은 코어-셸(core-shell) 구조의 나노입자, 자체 형광 autofluorescence)을 가지고 있는 양자점(quantum dot)이 응용되고 있다. 그러나, 나노입자의 경우 단일 항체만을 표면에 수식(conjugation)할 수 있으며, 2종 이상의 항체를 수식하게 되면 항체들 간의 간섭현상으로 인해 표면수식효율(conjugation efficiency) 및 항체작용 능력(antibody binding efficiency)에 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 해결하고자 하는 일 기술적 과제는 생체분자 검지용 항체 및 세포 포집용 항체가 탑재된 다층구조 나노선 복합체를 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 해결하고자 하는 일 기술적 과제는 생체분자 검지용 항체 및 세포 포집용 항체가 탑재된 다층구조 나노선 복합체의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 해결하고자 하는 일 기술적 과제는 생체분자 검지용 항체 및 세포 포집용 항체가 탑재된 다층구조 나노선 복합체를 이용한 면역세포 포집 및 면역세포에서 분비되는 생체분자를 동시에 검지하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 일 실시예에 따른 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법은, 제1 금속 및 제2 금속이 교번하여 적층된 다층 나노선을 준비하는 단계; 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자를 상기 제2 금속에 부착하는 단계; 상기 다층 나노선의 상기 제1 금속에 싸이올기(thiol's group)로 처리된 제1 항체를 부착하는 단계; 및 상기 제2 금속에 상기 고분자의 카르복실기를 통하여 상기 제2 항체를 부착하는 단계를 포함한다. 상기 제2 항체는 형광체를 포함한다.
- [0009] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 제1 금속은 금이고, 상기 제2 금속은 Fe, Ni, Co 중에서 적어도 하나를 포함하는 강자성재료일 수 있다.
- [0010] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자는 에틸기 혹은 폴리에틸렌글리콜로 연결될 수 있다.
- [0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자는 11-아미노운데칸산(11-

aminoundecanoic acid)일 수 있다.

- [0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 싸이올기(thiol's group)의 처리는 상기 고분자의 아민기와 반응할 수 있는 2-Iminothiolane 또는 SATA (N-succinimidyl-S-acetylthioacetate)를 이용하여 수행될 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 제1 항체는 상기 제2 항체보다 선반응시킬 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 제2 항체는 EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) 그리고 sulfo NHS(sulfo-N-hydroxysulfosuccinimide)와 혼합된 후 상기 고분자에 결합할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 다층 나노선의 상기 제1 금속의 두께는 20 nm 내지 50 nm이고, 상기 다층 나노선의 상기 제2 금속의 두께는 20 nm 내지 50 nm일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 따른 면역물질 검지 나노선 복합체는, 제1 금속 및 제2 금속이 교번하여 적층된 다층 나노선; 상기 제2 금속에 부착되고 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자; 상기 다층 나노선의 상기 제1 금속에 싸이올기(thiol's group)로 처리된 후 부착된 제1 항체; 및 상기 제2 금속에 상기 고분자의 카르복실기를 통하여 부착된 상기 제2 항체;를 포함한다. 상기 제2 항체는 형광체를 포함한다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 제1 항체는 면역물질과 제1 보조 항체와 샌드위치 결합하고, 상기 제1 보조 항체는 보조 형광체를 포함하고, 상기 제2 항체는 면역 세포와 결합하고, 상기 제2 항체의 형광체는 외부 광을 제공받아 제1 형광을 제공하고, 상기 제1 항체의 보조 형광체는 상기 제2 항체의 형광체의 제1 형광을 제공받아 제2 형광을 제공할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 제1 금속은 금이고, 상기 제2 금속은 Fe, Ni, Co 중에서 적어도 하나를 포함하는 강자성재료일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자는 에틸기 혹은 폴리에틸렌글리콜로 연결될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자는 11-아미노운데칸산(11-aminoundecanoic acid)일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 다층 나노선의 상기 제1 금속의 두께는 20 nm 내지 50 nm이고, 상기 다층 나노선의 상기 제2 금속의 두께는 20 nm 내지 50 nm일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 따른 면역물질 검지 방법은, 제1 금속 및 제2 금속이 교번하여 적층된 다층 나노선, 상기 제1 금속에 부착된 제1 항체, 및 상기 제2 금속에 부착된 고분자, 형광체를 포함하고 상기 고분자에 부착된 제2 항체를 포함하는 나노선 복합체를 준비하는 단계; 면역 세포를 포함하는 면역 세포 용액을 준비하는 단계; 상기 나노선 복합체와 상기 면역 세포 용액을 혼합하여 제1 혼합 용액을 생성하고 상기 면역 세포와 상기 제2 항체를 반응시키는 단계; 보조 형광체를 포함하는 제1 보조 항체를 상기 나노선 복합체와 상기 면역 세포 용액이 혼합된 혼합 용액에 투입하여 제2 혼합 용액을 생성하고, 상기 면역 세포가 방출한 면역 물질, 제1 항체, 및 제1 보조 항체를 샌드위치 결합시키는 단계; 및 여기광을 제2 혼합 용액에 조사하여 상기 형광체를 발광시키고 상기 형광체의 발광에 의한 상기 보조 형광체의 발광을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 제1 항체와 샌드위치 결합하지 않은 상기 제1 보조 항체를 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 면역 세포와 상기 제2 항체가 반응하지 않은 나노선 복합체를 제거하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 면역 세포는 CD8 양성 T 세포이고, 상기 면역 물질은 IFN- γ 일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 제1 금속은 금이고, 상기 제2 금속은 Fe, Ni, Co 중에서 적어도 하나를 포함하는 강자성재료일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자는 에틸기 혹은 폴리에틸렌글리콜로 연결될 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 일 실시예에 따른 다층구조 나노선 복합체는 생체친화적(biocompatible) 재료로 구성되어 있으며, 작용기(functional group)를 포함하고 있는 유기 분자 및 항체에 의해 안정적으로 생체 기능화(biofunctionalization)되어 있다. 다층구조 나노선 복합체는 생체분자 검지용 항체 및 세포 포집용 항체가 탑재된다. 세포 포집용 항체는 형광체를 포함하고, 생체분자 검지용 항체는 면역 물질을 개재하여 보조 생체 분자 검지용 항체와 샌드위치 결합한다. 다층구조 나노선 복합체의 세포 포집용 항체는 면역세포(immune cell)를 포함한 타겟 세포를 포집할 수 있다. 또한, 세포 포집용 항체가 결합하는 특정 면역세포는 항원 등의 자극(예, antigenic stimulation)에 의해 면역 물질을 방출한다. 이에 따라, 다층구조 나노선 복합체의 생체분자 검지용 항체는 방출된 면역물질과 외부에서 주입된 보조 생체 분자 검지용 항체와 샌드위치 결합한다. 외부에서 제공된 여기 광은 형광체를 제1 파장 대역에서 발광시키고, 형광체의 발광은 보조 생체 분자 검지용 항체에 부착된 보조 형광체를 제2 파장 대역에서 형광공명에너지전달(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상에 의하여 발광시킬 수 있다. 이에 따라, 제2 파장 대역의 발광 세기를 검출하면, 면역 물질의 농도가 고민감도로 검지될 수 있다. 따라서, 다층구조 나노선 복합체는 질병 진단 및 면역치료 등 다양한 바이오 메디컬 분야에 활용될 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에 따른 다층구조 나노선 복합체는 고가의 유세포분석장비가 아니라도 형광을 측정할 수 있는 다양한 장비를 통해서 면역물질을 진단할 수 있다.

[0030] 특히 본 발명은 선행 문헌인 Langmuir Vol 22, pp 105828-10534 (2006), ACS Nano Vol 7, pp 9771-9779 (2013)의 제안 방법을 넘어서서 이중의 항체를 층 선택적으로, 동시에 수식 하였을 뿐 아니라 형광체간의 에너지 전달 현상을 활용하여 높은 정확도와, 효율성을 가진 면역 검사 기법을 제시할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역물질 검지 방법을 설명하는 개념도이다.

도 2a 내지 2d는 본 발명의 다른 실시예에 따른 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법을 설명하는 도면들이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역물질 검지 방법을 설명하는 흐름도이다.

도 4a 및 도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역물질 검지 방법을 설명하는 개념도들이다.

도 5는 유세포분석기로 측정한 면역 세포 포집용 항체의 포집효율을 나타내는 그래프들이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노선 복합체의 면역물질(IFN- γ)의 농도에 따른 상대 형상의 세기를 나타내는 그래프이다.

도 7은 본 발명을 위해 전기도금법으로 제조한 철/금 다층 나노선의 해상도투과전자현미경(High resolution transmission electron microscopy, HRTEM) 사진 및 에너지분산형 분광분석법(EDS) 사진이다.

도 8은 푸리에변형적외선분광(FTIR) 및 제타 전위(zeta potential)를 나타내는 결과들이다.

도 9는 형광물질이 결합된 바코드 나노선의 발광 결과이다.

도 10은 나노선 복합체를 나타내는 공초점 레이저 현미경 이미지들이다.

도 11은 형광체와 보조 형광체 사이의 형광공명에너지전달(FRET) 현상을 확인하기 위해 액셉터(acceptor)의 형광을 블리칭(bleaching)시킨 이 후 도너(donor)의 형광세기 증가를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 다층 나노선은 생체 친화적 재료(biocompatible materials)로 구성되고, 두 금속이 교차로 적층된 구조를 포함한다. 상기 다층 나노선은 그 응용성이 매우 클 것으로 기대됨에도 불구하고, 2종 이상의 항체를 동시에 고정화(conjugation)하여 검체(specimen)를 분석하는 것이 어려워 그 응용성이 제한되어 있었다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노선 복합체는 제1 금속과 제2 금속이 교대로 적층된 다층 나노선을 포함한다. 상기 다층 나노선의 제1 금속에 생체분자 검지용 항체가 수식되고, 상기 다층 나노선의 제2 금속에 세포 포집용 항체가 수식된다. 상기 세포 포집용 항체는 형광체를 포함하고 면역 세포와 결합한다. 상기 생체분자 검지용 항

체는 면역물질 및 외부에서 주입되고 보조 형광체를 포함하는 생체분자 검지용 항체가 샌드위치결합을 수행한다. 또한, 외부에서 제공되는 광은 형광체를 발광시키고, 상기 형광체의 발광은 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상에 의하여 상기 보조 형광체의 발광을 유도한다. 즉, 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상을 이용하여, 면역물질을 검지할 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 제1 금속(Au) 및 제2 금속(Fe)이 교번하여 적층된 나노선을 준비된다. 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 동시에 가지는 고분자는 상기 제2 금속(Fe)에 부착된다. 상기 나노선의 상기 제1 금속(Au)에 싸이올기(thiol's group)로 처리된 제1 항체(생체분자 검지용 항체)가 부착된다. 상기 제2 금속(Fe)에 상기 고분자의 카르복실기를 통하여 형광체를 포함하는 상기 제2 항체(면역 세포 포집용 항체)가 부착된다. 외부에서 제공되는 여기 광은 형광체를 발광시키고, 상기 형광체의 발광은 제1 항체(생체분자 검지용 항체)에 샌드위치 결합하는 제1 항체(생체분자 검지용 항체)에 포함된 보조 형광체의 발광을 형광공명에너지전이 현상에 의하여 유도한다.

[0035] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 실험 조건, 물질 종류 등에 의하여 본 발명이 제한되거나 한정되지는 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0036] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역물질 검지 방법을 설명하는 개념도이다.

[0037] 도 1을 참조하면, 면역물질 검지 나노선 복합체(100)는, 제1 금속(112) 및 제2 금속(114)이 교번하여 적층된 다층 나노선(110); 상기 제2 금속(114)에 부착되고 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자(122); 상기 다층 나노선(110)의 상기 제1 금속(112)에 싸이올기(thiol's group)로 처리된 후 부착된 제1 항체(134); 및 상기 제2 금속(114)에 상기 고분자(122)의 카르복실기를 통하여 부착된 상기 제2 항체(124);를 포함한다. 상기 제2 항체(124)는 형광체(126)를 포함한다. 상기 제1 항체(134)는 면역물질(인터페론 γ)과 보조 형광체(138)를 포함하는 제1 보조 항체(137)와 샌드위치 결합한다. 상기 제2 항체(124)는 면역 세포와 결합한다. 상기 제2 항체(124)의 형광체(126)는 여기 광을 제공받아 제1 형광을 제공하고, 상기 제1 보조 항체(137)의 보조 형광체(138)는 상기 제2 항체(124)의 형광체(126)의 제1 형광을 제공받아 제2 형광을 제공한다. 제1 항체는 생체분자 검지용 항체이고, 상기 제2 항체는 면역 세포 포집용 항체일 수 있다.

[0038] 제2 항체(124)는 상기 면역 세포(예를 들어, $CD8^+$ T 세포)를 포집한다. 상기 면역 세포(10)는 상기 제2 항체(124) 또는 항원의 자극에 의하여 면역물질(136)을 분비한다. 상기 면역물질(136)은 인터페론 γ 일 수 있다. 상기 면역물질(136)은 제1 항체(134)와 결합한다. 또한, 상기 면역물질(136)은 보조 형광체(138)를 포함하는 제1 보조 항체(137) 및 제1 항체(134)와 샌드위치 결합을 수행한다. 제1 보조 항체(137)는 보조 형광체(138)가 부착된 점과 항원 결합 부위가 다른 것을 제외하면 상기 제1 항체(134)와 동일할 수 있다. 여기 광원은 상기 제2 항체(124)의 형광체(126)를 발광시킨다. 형광체(126)와 보조 형광체(138)가 평균적으로 10 나노미터 이내의 가까운 거리에 있을 때, 공명에 의해 에너지가 전달될 수 있다. 이에 따라, 상기 보조 형광체(138)가 발광할 수 있다. 한편, 형광체(126)와 보조 형광체(138)가 수백 나노미터 이상의 먼 거리에 있을 때, 공명에 의해 에너지는 전달되지 않는다. 상기 형광체(126)는 BV421(상표명)이고, 상기 보조 형광체(138)는 Alexa Fluor 488 (상표)일 수 있다.

[0039] 상기 제1 금속은 금이고, 상기 제2 금속은 Fe, Ni, Co 중에서 적어도 하나를 포함하는 강자성재료일 수 있다. 상기 다층 나노선의 상기 제1 금속의 두께는 20 nm 내지 50 nm이고, 상기 나노선의 상기 제2 금속의 두께는 20 nm 내지 50 nm일 수 있다.

[0040] 고분자는 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가질 수 있다. 상기 고분자는 에틸기 혹은 폴리에틸렌글리콜로 연결될 수 있다. 상기 고분자는 11-아미노운데칸산(11-aminoundecanoic acid)일 수 있다.

[0041] 이에 따라, 면역물질 검지 나노선 복합체(100)는 특정 면역세포에서 분비되는 면역물질(136)만을 선택적으로 검출하고 면역물질(136)의 양을 보조 형광체(138)의 발광의 세기로 제공할 수 있다. 이 면역물질 검지 방법은 통상적인 방법으로 검출할 수 없는 영역인 724 pg/mL의 면역물질(인터페론 γ) 농도를 검출할 수 있다.

[0042] 도 2a 내지 2d는 본 발명의 다른 실시예에 따른 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법을 설명하는 도면들이다.

[0043] 도 2a 내지 2d를 참조하면, 면역물질 검지 나노선 복합체의 제조 방법은, 제1 금속 및 제2 금속이 교번하여 적

층된 다층 나노선(110)을 준비하는 단계; 양 끝단에 카르복실기와 아민기를 가지는 고분자(122)를 통하여 상기 제2 금속(114)에 부착하는 단계; 상기 다층 나노선(110)의 상기 제1 금속(112)에 싸이올기(thiol's group, 132)로 처리된 제1 항체(134)를 부착하는 단계; 및 상기 제2 금속(114)에 상기 고분자의 카르복실기를 통하여 형광체(126)를 포함하는 상기 제2 항체(124)를 부착하는 단계를 포함한다.

[0044] [다층구조 나노선의 합성]

[0045] 도 2a를 참조하면, 바코드(barcode) 형태의 철/금 (Fe/Au) 다층 나노선(110)의 합성은 하나의 도금조 안에서 펄스전기도금(pulsed electrodeposition) 방법을 통해 수행되었다. 도금조에 사용될 탈이온수 기반의 용액은 전구체인 황산철 7수화물(iron sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.16 M), 칼륨디시아노금(I)(potassium dicyanoaurate (I), $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$, 0.01 M), 그리고 완충제인 붕산(boric acid, H_3BO_3 , 0.80 M)을 포함한다.

[0046] 양극산화 알루미늄(anodized aluminium oxide, AAO)은 전기도금이 진행될 나노 틀(nanotemplate)로 사용된다. 나노 틀은 직경이 수백 나노미터인 복수의 세공을 포함한다. 상기 나노 틀의 한쪽 면에 300 nm의 은(Ag)을 전자빔증착기(e-beam evaporator)로 증착시킨다. 증착된 은(Ag)은 전기도금의 작업 전극(working electrode)으로 이용될 수 있으며, 백금(Pt) 전극판을 상대 전극(counter electrode)으로 사용한다.

[0047] 단일 욕(Single bath) 상태의 제1 금속(금)과 제2 금속(철)을 번갈아 환원시키기 위해 각각 10 mA/cm^2 , 1 mA/cm^2 의 전류 밀도를 펄스형태로 인가하였다. 나노 틀(nanotemplate)에 다층 나노선(110)이 합성된다.

[0048] 작업 전극은 요오드(I) 계열 은부식액으로 제거될 수 있다. 이후 수산화나트륨(sodium hydroxide, NaOH, 1M)으로 양극산화 알루미늄 나노틀을 선택적으로 제거할 수 있다. 제2 금속(철)의 두께는 20nm 내지 50nm일 수 있다. 제1 금속(금)의 두께는 20nm 내지 50nm일 수 있다.

[0049] 원심분리기를 이용하여 탈이온수로 5회 이상 세척하여 상기 나노틀 내부에 존재하였던 다층 나노선(110)을 얻는다. 분산된 다층 나노선 용액은 표면의 생체기능화 과정을 위해서 인산화완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)로 용액치환을 하였다.

[0050] [다층 나노선 표면기능기 처리 및 특성 분석]

[0051] 다층 나노선(110)의 표면 처리는 아민기와 카르복실기를 양 끝단에 동시에 가지고 있는 11-아미노운데칸산(11-aminoundecanoic acid)을 제2 금속(철)에 추가함으로 이루어진다. 11-아미노운데칸산은 양단에 아민기와 카르복실기를 가질 수 있다. 구체적으로, 11-아미노운데칸산을 인산화완충용액에 6 mM로 용해시킨다. 그 뒤 1 mL의 인산화완충용액에 분산된 다층 나노선(110)과 아미노운데칸산 용액 1 mL를 1:1 비율로 섞는다. 이 후 혼합 용액을 상온에서 8시간 이상 셰이커로(shaker) 혼합시킨다. 11-아미노운데칸산의 아민기는 제2 금속(철)의 표면에 부착된다. 반응이 종료된 이후, 원심분리기를 이용한 세척법을 이용하여 잔여물을 제거한다.

[0052] [다층 나노선의 제1 금속(금)의 항체 복합화 방법]

[0053] 이중의 두 항체를 각기 상기 다층 나노선(110)의 다른 부위에 수식하기 위해 두 가지 화학반응을 이용하였다. 면역물질 검지용 항체(제1 항체)의 표면에 싸이올기(thiol's group)를 수식하기 위해 2-이미노싸이올레인 (2-iminothiolane, traut's reagent)을 2 mg/mL의 농도로 용액을 제작한다. 이후, 이 용액에서 50 μL 를 취하여, 면역물질 검지용 항체(제1 항체) 50 μL 와 혼합한다. 상온에서 2시간 반응한 후, 스핀 디솔팅컬럼(spin desalting columns)을 이용하여 세척한다.

[0054] 싸이올기가 처리된 면역물질 검지용 항체(제1 항체)와 충분히 분산되어 있는 다층 나노선 용액 0.5 mL, 에틸렌디아민사아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 0.5 mL를 2시간 동안 상온에서 반응시켜 제1 금속(금)에 항체 수식을 하였다. 상기 다층 나노선(110)의 제1 금속(112)은 싸이올기가 처리된 면역물질 검지용 항체(제1 항체)와 결합한다. 면역물질 검지용 항체(제1 항체)와 다층 나노선(110)의 제1 금속(금)의 결합반응이 종료되면, 인산화완충용액으로 3회 이상 세척한다.

[0055] [다층 나노선의 제2 금속(철)의 항체 복합화 방법]

[0056] 면역 세포 포집용 항체(제2 항체, 124)를 제2 금속(철)에 선택적 수식 과정을 진행한다. 이 경우에는 면역 세포 포집용 항체(124) 30 μL , EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) 0.4 mL, sulfo NHS(sulfo-N-hydroxysulfosuccinimide) 0.5 mL를 다층 나노선 용액과 혼합하여 2시간 동안 상온에서 셰이커로 반응시킨다. 싸이올기가 먼저 수식된 면역물질 검지용 항체(제1 항체)를 우선적으로 제1 금속(금)에 반

응시키는 과정으로 인해 두 번째 수식 과정을 겪는 면역 세포 포집용 항체(제2 항체) 입장에서 입체 장애(steric hindrance)를 유발할 수 있다. 따라서 입체 장애는 면역 세포 포집용 항체(제2 항체)가 제2 금속(철)에 선택적으로 부착되는데 결정적인 역할을 할 수 있다. 면역 세포 포집용 항체(제2 항체)는 형광체(126)를 포함한다. 상기 형광체는 BV421(상표명)일 수 있다.

[0057] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역물질 검지 방법을 설명하는 흐름도이다.

[0058] 도 4a 및 도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역물질 검지 방법을 설명하는 개념도들이다.

[0059] 도 3, 도 4a 및 도 4b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 면역물질 검지 방법은: 제1 금속(112) 및 제2 금속(112)이 교번하여 적층된 다층 나노선(110), 상기 제1 금속(112)에 부착된 제1 항체(134), 및 상기 제2 금속에 부착된 고분자, 형광체를 포함하고 상기 고분자에 부착된 제2 항체를 포함하는 나노선 복합체(100)를 준비하는 단계(S110); 면역 세포(10)를 포함하는 면역 세포 용액을 준비하는 단계(S120); 상기 나노선 복합체(100)와 상기 면역 세포 용액을 혼합하여 제1 혼합 용액을 생성하고 상기 면역 세포(10)와 상기 제2 항체(124)를 반응시키는 단계(S130); 보조 형광체(138)를 포함하는 제1 보조 항체(137)를 상기 나노선 복합체(100)와 상기 면역 세포 용액이 혼합된 제1 혼합 용액에 투입하여 제2 혼합 용액을 생성하고 상기 면역 세포가 방출한 면역 물질(138), 제1 항체(134), 및 제1 보조 항체(137)를 샌드위치 결합시키는 단계(S150); 및 여기광을 제2 혼합 용액에 조사하여 상기 형광체(126)를 발광시키고 상기 형광체의 발광에 의한 상기 보조 형광체(138)의 발광을 검출하는 단계(S170)를 포함한다.

[0060] 나노선 복합체(100)가 준비된다(S110). 나노선 복합체(100)의 제조는 위에서 설명한 바와 같다.

[0061] 사람의 혈액에서 분리한 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 중 면역 세포 포집용 항체가 결합하는 특정 면역세포를 분리할 수 있다. 즉, 면역 세포 용액은 혈액에서 원리분리법을 통하여 특정 면역 세포(말초혈액단핵세포)를 포함도록 분리될 수 있다. 피콜-하이팩 밀도구배 원심분리법(Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation)을 이용하여 말초혈액 중 말초혈액단핵세포를 분리한다. 말초혈액단핵세포를 포함하는 면역 세포 용액이 준비된다(S120).

[0062] 면역 세포는 CD8 양성 T 세포일 수 있다. CD8 양성 T 세포(CD8⁺ T cells)를 포집하기 위한 CD8 분자에 대한 제2 항체(면역 세포 포집용 항체)를 결합시킨 나노선 복합체(100)을 면역 세포 용액(말초혈액단핵세포 용액)과 혼합하여 제1 혼합 용액을 생성한 후, 섭씨 4도에서 1시간 동안 반응시킨다(S130).

[0063] 또한 CD8양성 T 세포와 나노선 복합체(100)의 면역 세포 포집용 항체의 포집효율 및 특이성을 확인하기 위하여, CD8양성 T 세포를 구분할 수 있는 형광 표지(label)된 CD3 분자에 대한 항체와 혼합하여 반응시에 같이 반응시킬 수 있다.

[0064] 소정 시간 경과 후 CD8양성 T 세포와 반응하지 않은 나노선 복합체(100)를 제거할 수 있다. 반응하지 않은 나노선 복합체(100)를 제거는 원심 분리기를 이용하여 수행할 수 있다(S140). 원심 분리기에 의하여 반응하지 않은 나노선 복합체(100)를 제거한 후, 반응한 나노선 복합체(100)는 PBS로 2회 세척될 수 있다.

[0065] 보조 형광체(138)를 포함하는 제1 보조 항체(137)를 상기 나노선 복합체(100)와 상기 면역 세포 용액이 혼합된 제1 혼합 용액에 투입하여 제2 혼합 용액을 생성한다. 이에 따라, 상기 면역 세포(10)가 방출한 면역 물질(138), 제1 항체(134), 및 제1 보조 항체(137)는 샌드위치 결합된다(S150). 제1 보조 항체(137)는 제1 항체(134)와 동일하나 보조 형광체(138)를 포함하지 않을 수 있다. 제1 보조 항체(137)는 보조 IFN- γ 검지용 항체이고, 보조 IFN- γ 검지용 항체는 다른 에피토프(epitope, 항체인식부위)에 반응하는 보조 형광체(138)를 포함할 수 있다. 상기 보조 형광체(138)는 Alexa Fluor 488 (상표) 형광물질일 수 있다. 제1 항체, 상기 보조 항체, 및 면역 물질은 샌드위치 결합을 수행한다.

[0066] 상기 제1 항체(134)와 샌드위치 결합하지 않은 상기 제1 보조 항체(137)를 제거할 수 있다(S160). 구체적으로, 샌드위치 결합하지 않은 상기 제1 보조 항체(137)를 제거는 원심 분리기를 이용하여 수행할 수 있다. 원심 분리기에 의하여 샌드위치 결합하지 않은 상기 제1 보조 항체(137)를 제거한 후, 반응한 나노선 복합체(100)는 PBS로 세척될 수 있다.

[0067] 여기광을 제2 혼합 용액에 조사하여 상기 형광체(126)를 발광시키고 상기 형광체의 발광에 의한 상기 보조 형광체(138)의 발광을 검출한다(S170). 여기광은 자외선 영역이고, 형광체(126)에 의한 발광 스펙트럼은 420nm에서 최대값을 가질 수 있다. 보조 형광체(138)에 의한 발광 스펙트럼은 500nm에서 최대값을 가질 수 있다.

- [0068] 공초점레이저현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM)과 광발광(Photoluminescence, PL) 장비는 상기 보조 형광체의 형광을 검출하고 분석한다.
- [0069] [면역세포 포집 효율 분석]
- [0070] 피콜-하이팩 밀도구배 원심분리법(Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation)을 이용하여 말초혈액 중 말초혈액단핵세포를 분리한다. 나노선 복합체(100)의 면역 세포 포집용 항체(제2 항체)가 결합하는 특정 면역세포의 포집 효율은 유세포분석기로 분석한다. 이를 위해, CD8 양성 T 세포($CD8^+$ T cells)를 포집하기 위한 CD8 분자에 대한 제2 항체(면역 세포 포집용 항체)를 결합시킨 나노선 복합체(100)를 말초혈액단핵세포와 혼합하여 4°C에서 1시간 동안 반응시킨다.
- [0071] 또한 CD8양성 T 세포와 결합하는 면역 세포 포집용 항체의 포집효율 및 특이성을 확인하기 위해, CD8양성 T 세포를 구분할 수 있는 형광표지 된 CD3 분자에 대한 항체와 혼합하여 상기 반응시에 같이 반응시킨다.
- [0072] 1시간 경과 후 CD8양성 T 세포와 반응하지 않은 나노선 복합체(100)를 제거하기 위해 PBS로 2회 세척하고, 유세포분석기로 나노선 복합체(100)에 결합된 면역 세포 포집용 항체의 포집효율을 측정한다.
- [0073] 도 5는 유세포분석기로 측정한 면역 세포 포집용 항체의 포집효율을 나타내는 그래프들이다.
- [0074] 도 5를 참조하면, x 축은 나노선 복합체(100)에 부착되어 있는 형광체(BV421)의 형광세기를 나타낸다. 즉, x축은 나노선 복합체(100)의 양에 비례한다. y 축은 염색된 CD8양성 T 세포의 염료(형광표지 된 CD3 분자)의 형광세기를 나타낸다. 즉, y 축은 CD8양성 T 세포의 개수에 비례한다. 나노선 복합체(100)의 양이 증가함에 따라 형광체(BV421)과 CD8양성 T 세포에 부착된 형광이 모두 보이는 네모 안으로 결과들이 이동(shifting)한다. 따라서, CD8양성 T 세포의 포집(capture)가 수행되고 있다. 여기서, 1 AU 는 나노선의 임의 농도를 지칭하는 것으로, 실측정값은 1 AU 당 2.75 $\mu\text{g/mL}$ 수준으로 기존 나노소재 기반 바이오 센서 대비 매우 적은 양의 나노선만이 사용되었다.
- [0075] CD3 항체는 CD3 및 CD4 T 셀을 포집할 수 있다. 나노선 복합체의 농도는 0, 5 AU, 10 AU, 20 AU, 40 AU, 및 80 AU에서 측정되었다. 이 때 네모 박스는 나노선 복합체의 세포 포집 효율을 나타낸다.
- [0076] CD8 분자에 대한 면역 세포 포집용 항체가 결합된 나노선 복합체의 양이 5 AU에서 80 AU로 증가함에 따라, 형광체(BV421)의 형광세기는 증가한다. 이에 따라, $CD8^+$ T 세포의 포집효율은 0.13 에서 95.2 % 로 증가함을 확인함으로써 나노선 복합체의 세포 포집 성능을 검증하였다.
- [0077] [생체분자 정량 분석을 통한 검지 민감도 분석]
- [0078] 나노선 복합체(100)에 인터페론- γ (IFN- γ)를 정량 분석하여 면역물질 검지 민감도를 측정하였다. 나노선 복합체(100)의 양을 687.5 ng 로 고정시킨 이후, 면역 물질인 IFN- γ 의 양을 조절한 후, IFN- γ 를 나노선 복합체 용액에 혼합하여, 상온에서 2시간 동안 항원항체 반응을 유도시킨다. 나노선 복합체(100)의 제1 항체(IFN- γ 검지용 항체)는 면역 물질인 IFN- γ 와 반응한다.
- [0079] 반응하지 못한 남은 면역 물질(IFN- γ)는 인산화완충용액으로 세척하여 제거된다.
- [0080] 이어서, 나노선 복합체(100)에 부착된 IFN- γ 검지용 항체와 다른 에피토프(epitope, 항체인식부위)에 반응하는 AF488 형광물질을 갖고 있는 보조 IFN- γ 검지용 항체는 IFN- γ 를 개재하여 샌드위치 결합한다.
- [0081] 이어서, 상온에서 2시간 반응한 후, 반응하지 못한 남은 보조 IFN- γ 검지용 항체는 인산화완충용액으로 세척하여 잔유물을 제거한다.
- [0082] 최종 반응이 완료된 나노선 복합체 용액은 200 μL 에 모두 분산시킨다. 검지된 면역물질의 정량분석은 multi-detection microplate reader의 상대적인 형광값(relative fluorescence unit)의 세기를 비교하여 수행된다. 이 때, 보조 형광체(AF488 형광물질)의 형광검지 파장대는 535 nm이다.
- [0083] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노선 복합체의 면역물질(IFN- γ)의 농도에 따른 상대 형상의 세기를 나타내는 그래프이다.
- [0084] 도 6을 참조하면, 이 경우 매우 소량(5 AU)의 나노선 복합체(100)의 농도(13.75 $\mu\text{g/mL}$)임에도 불구하고 IFN- γ 의 검지한계(limit of detection, LOD)는 724 pg/mL이다. 이러한 검지한계는 상용 면역 검지 장치의 검지 한계보다 낮다.

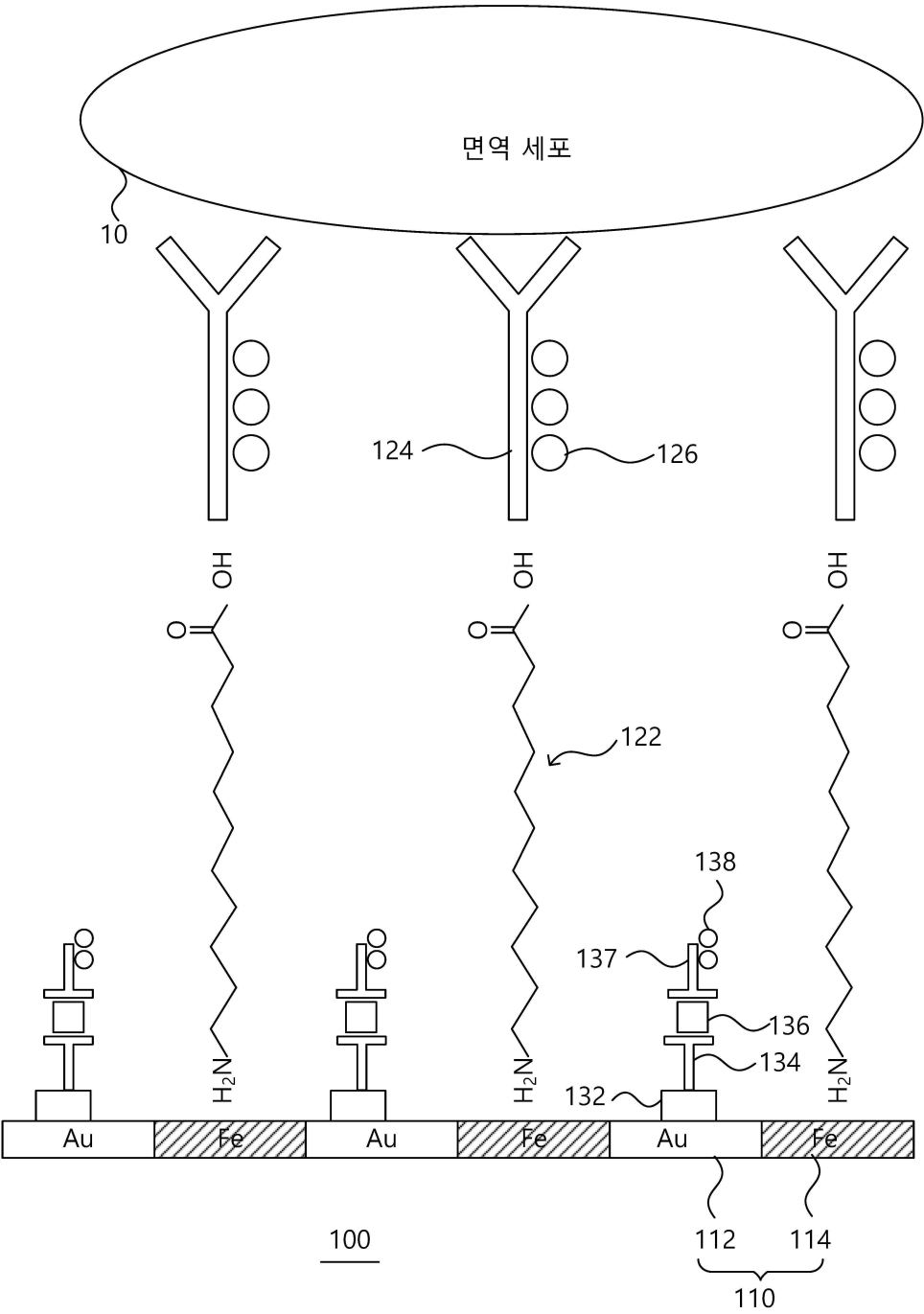
- [0085] 도 7은 본 발명을 위해 전기도금법으로 제조한 철/금 다층 나노선의 해상도투과전자현미경(High resolution transmission electron microscopy, HRTEM) 사진 및 에너지분산형 분광분석법(EDS) 사진이다.
- [0086] 도 7을 참조하면, 다층 나노선은 교번하여 적층된 20 nm의 철층과 20nm의 금층을 포함한다. 에너지분산형 분광 분석법 데이터를 참조하면, 철의 중량 퍼센트와 금의 중량 퍼센트는 일정한 주기를 가진다. 이에 따라, 철/금 다층 나노선의 구조가 확인된다.
- [0087] 도 8은 푸리에변형적외선분광(FTIR) 및 제타 전위(zeta potential)를 나타내는 결과들이다.
- [0088] 도 8을 참조하면, 나노선(110)의 표면 처리는 아민기와 카르복실기를 양 끝단에 동시에 가지고 있는 11-아미노운데칸산(11-aminoundecanoic acid)을 제2 금속(철)에 수행한다. FTIR 결과를 참조하면, 표면 처리 되기 전의 나노선에서 검출되지 않은 NH₂ 피크와 COO⁻ 피크가 검출된다. 따라서, 표면기능기 처리 전후의 차이를 통해 아민기와 철층의 결합에 의해 카르복실기로 코팅된 다층 나노선임을 알 수 있다.
- [0089] 도 9는 형광물질이 결합된 바코드 나노선의 발광 결과이다.
- [0090] 도 9를 참조하면, 제2 항체에 결합된 항광체(BV421)의 형광 스펙트럼은 425에서 피크를 보인다. 또한, 제1 보조 항체에 결합된 보조 형광체(AF488)의 형광 스펙트럼은 500nm에서 피크를 보인다. 여기광의 파장은 405 nm이다.
- [0091] 도 10은 나노선 복합체를 나타내는 공초점 레이저 현미경 이미지들이다.
- [0092] 도 10의 상부 이미지를 참조하면, 제2 항체에 결합된 항광체(BV421)는 나노 복합체의 제2 금속(철)에서만 형광을 나타낸다. 즉, 항광체(BV421)가 결합되어 있는 면역 세포(CD8⁺ T cells)에 대한 세포 포집용 항체(제2 항체)가 입체 장애와 선택적 화학반응에 의해 제2 금속(철)에만 선별적으로 부착된다.
- [0093] 도 10의 하부 이미지를 참조하면, 나노 복합체의 제1 금속(금)에 선택적으로 고정화된 IFN- γ 검지용 항체가 IFN- γ 와의 항원항체 결합 후, Alexa Fluor 488 (AF488) 형광물질이 결합되어 있는 보조 IFN- γ 검지용 항체가 샌드위치결합을 이룬 것을 나타낸다.
- [0094] 공초점레이저현미경 이미지이다.
- [0095] 도 11은 형광체와 보조 형광체 사이의 형광공명에너지전달(FRET) 현상을 확인하기 위해 억셉터(acceptor)의 형광을 블리칭(bleaching)시킨 이 후 도너(donor)의 형광세기 증가를 확인한 결과이다.
- [0096] 도 11을 참조하면, FRET 효율은 14.4 퍼센트이다.
- [0097] 이상에서는 본 발명을 특정의 바람직한 실시예에 대하여 도시하고 설명하였으나, 본 발명은 이러한 실시예에 한정되지 않으며, 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 특허청구범위에서 청구하는 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 실시할 수 있는 다양한 형태의 실시예들을 모두 포함한다.

부호의 설명

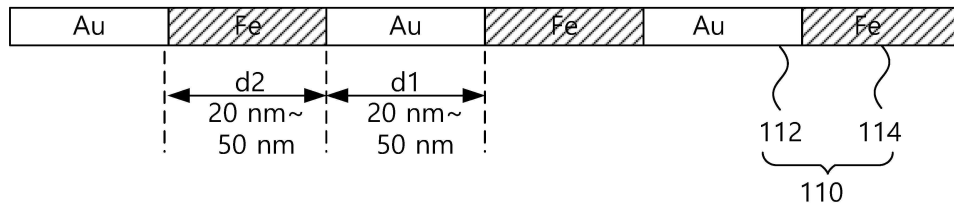
- [0098] 110: 다층 나노선
112: 제1 금속
114: 제2 금속
122: 고분자
124: 제2 항체
126: 형광체
134: 제1 항체
137: 보조 항체
138: 보조 형광체

도면

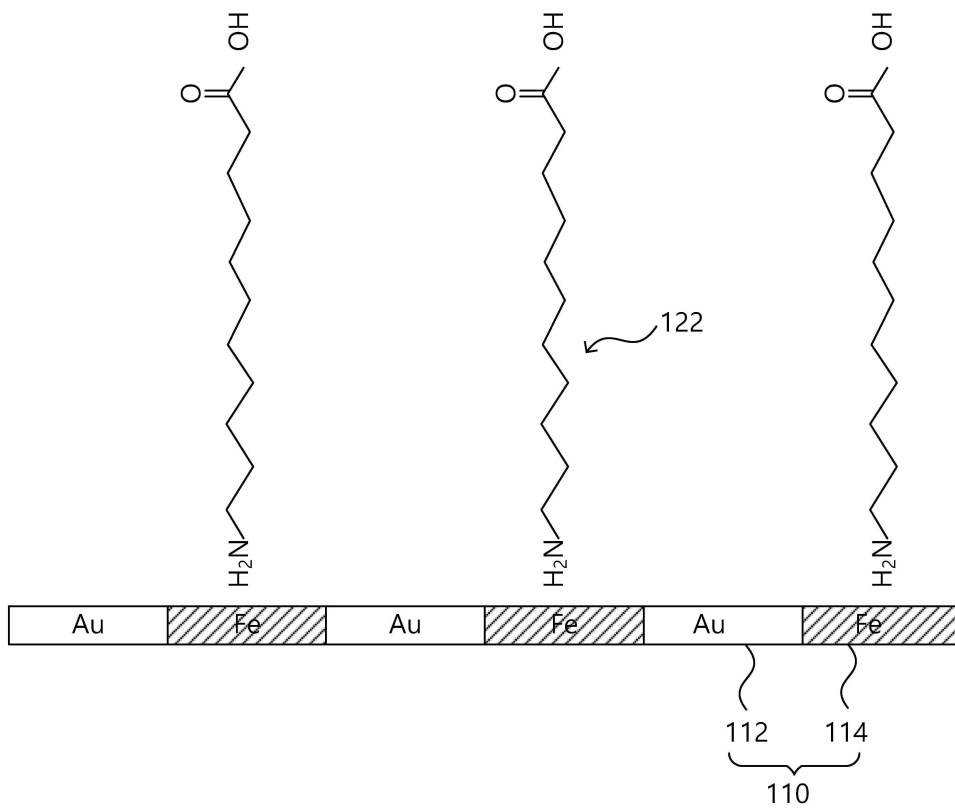
도면1



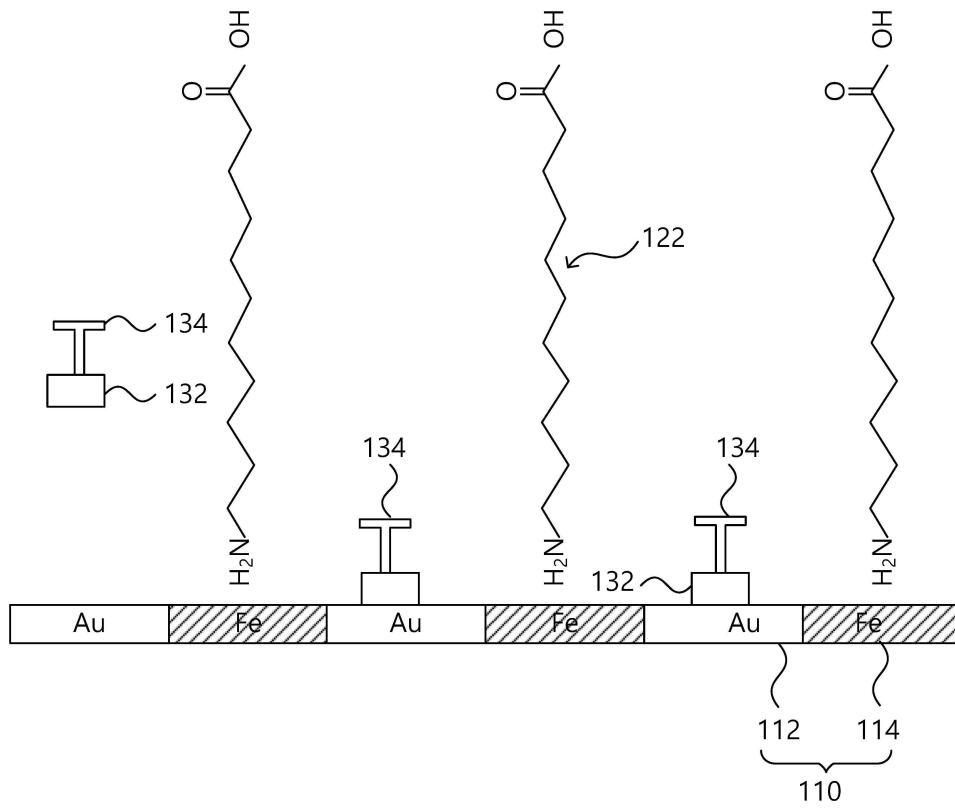
도면2a



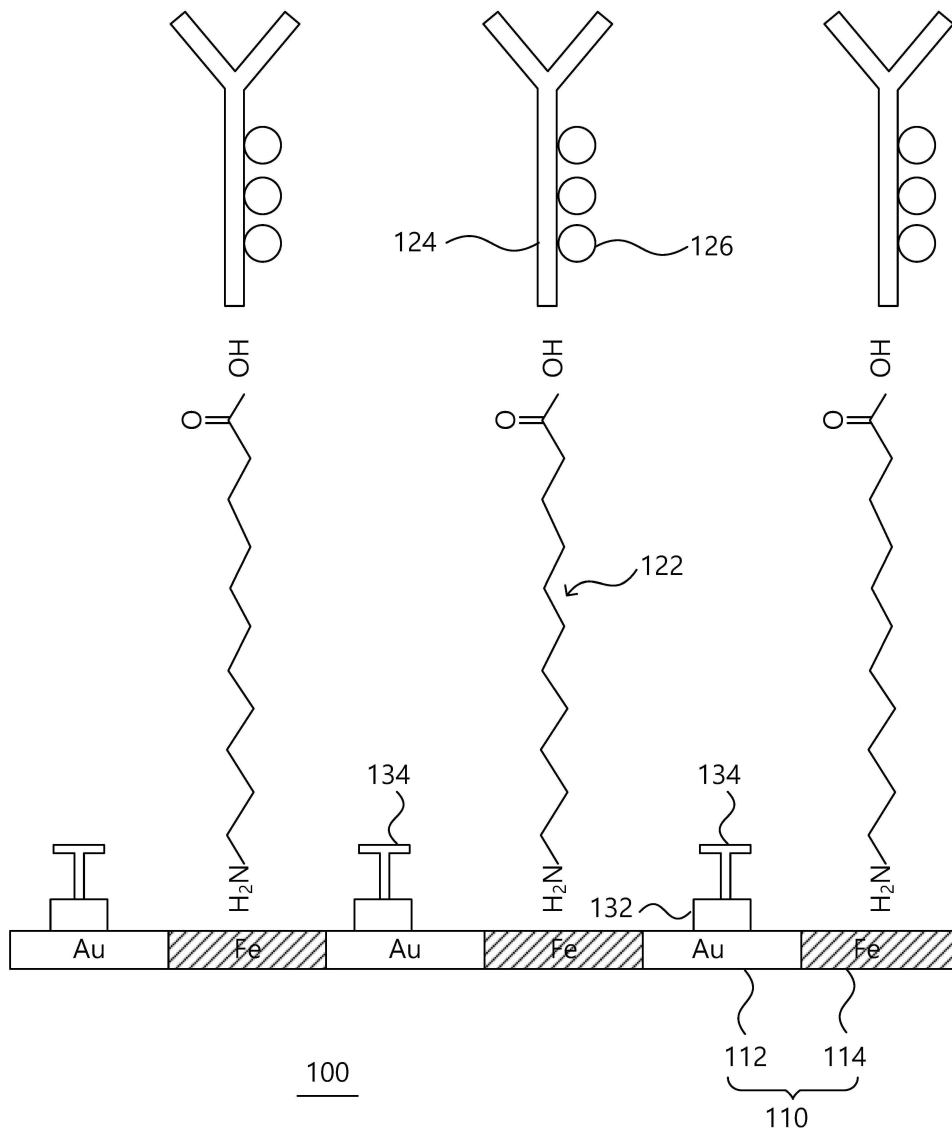
도면2b



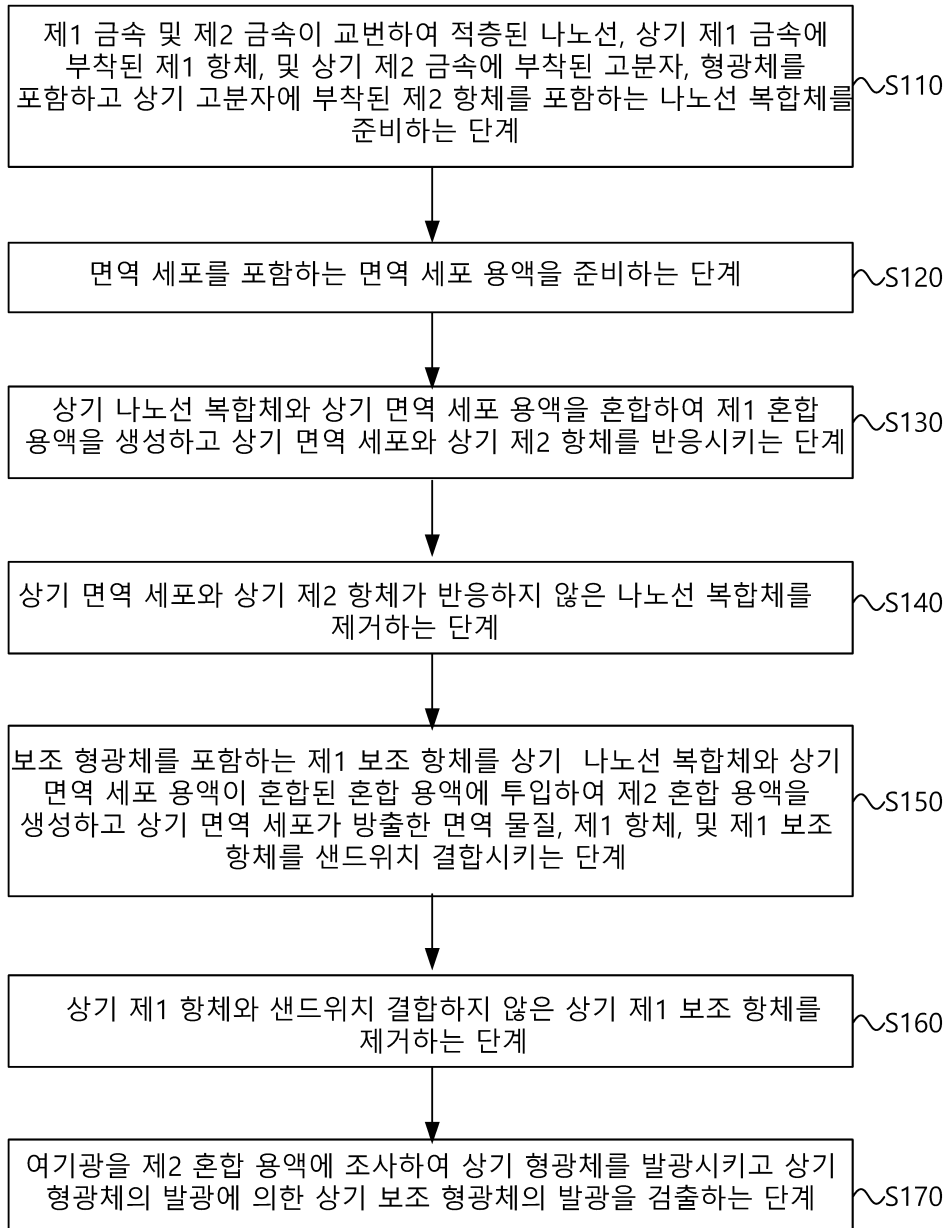
도면2c



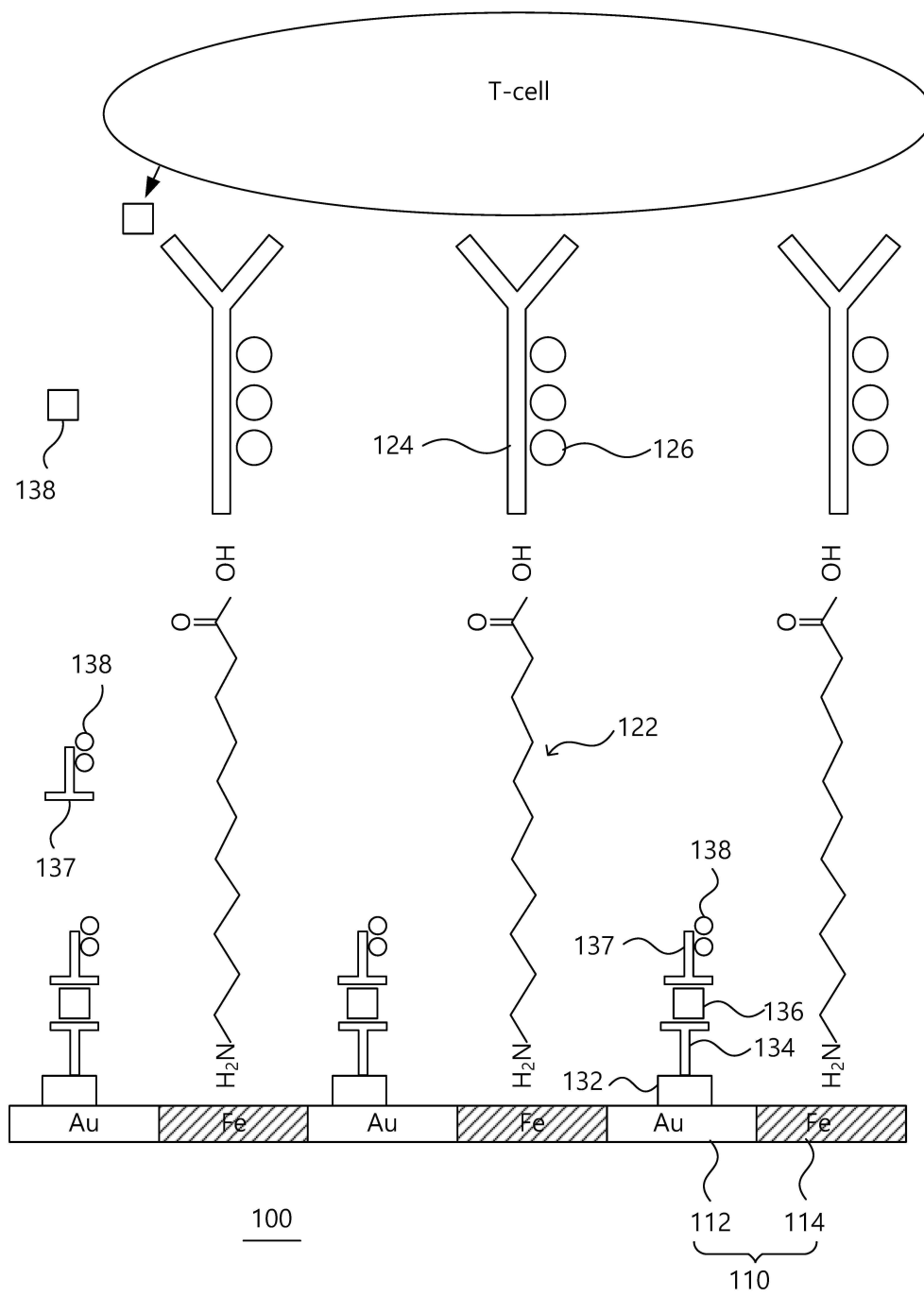
도면2d



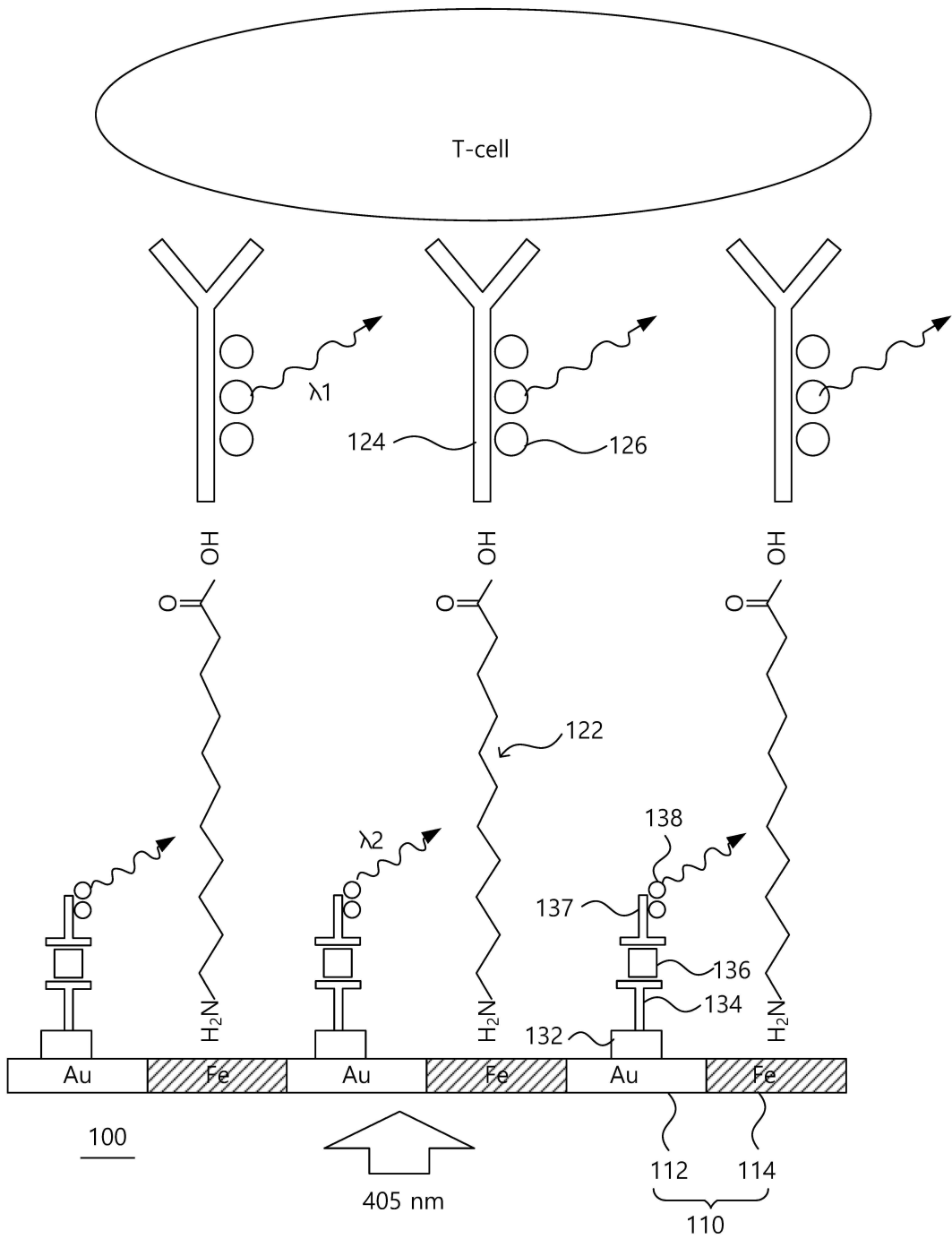
도면3



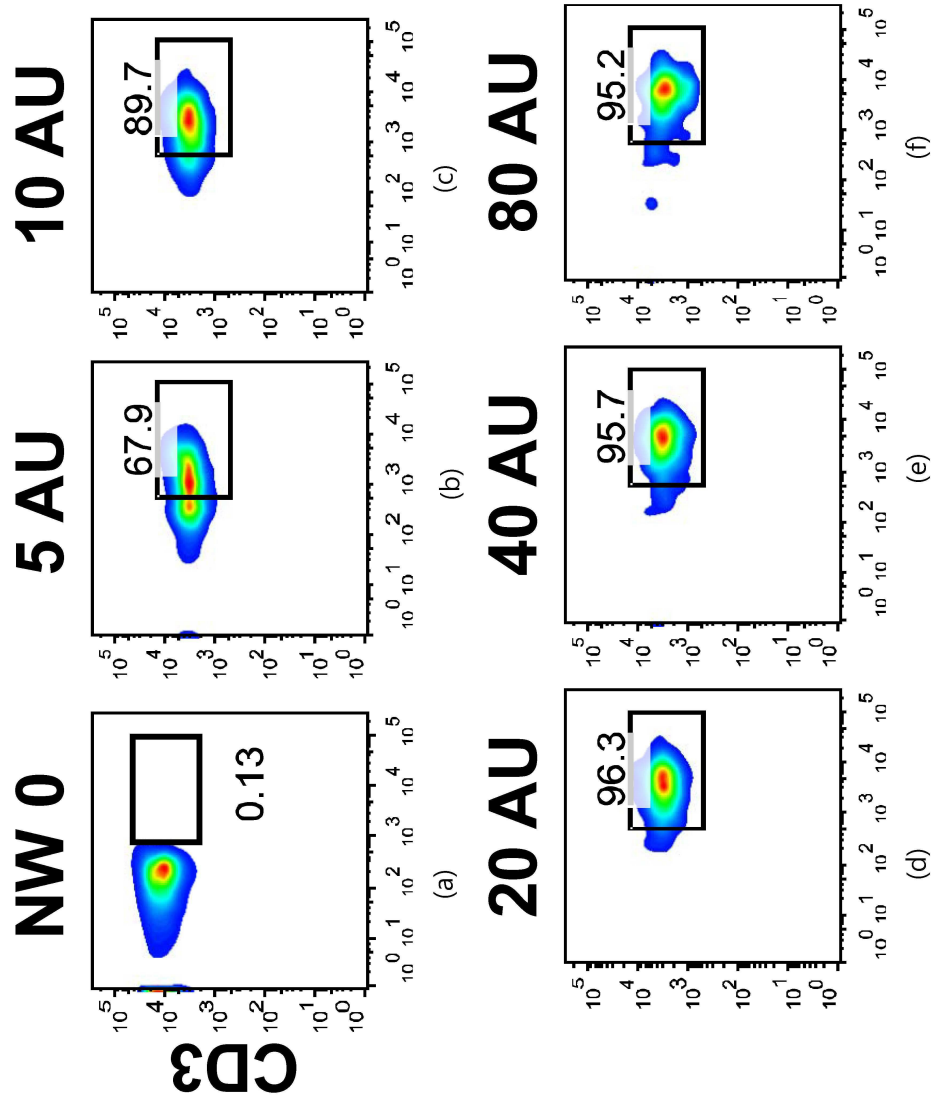
도면4a



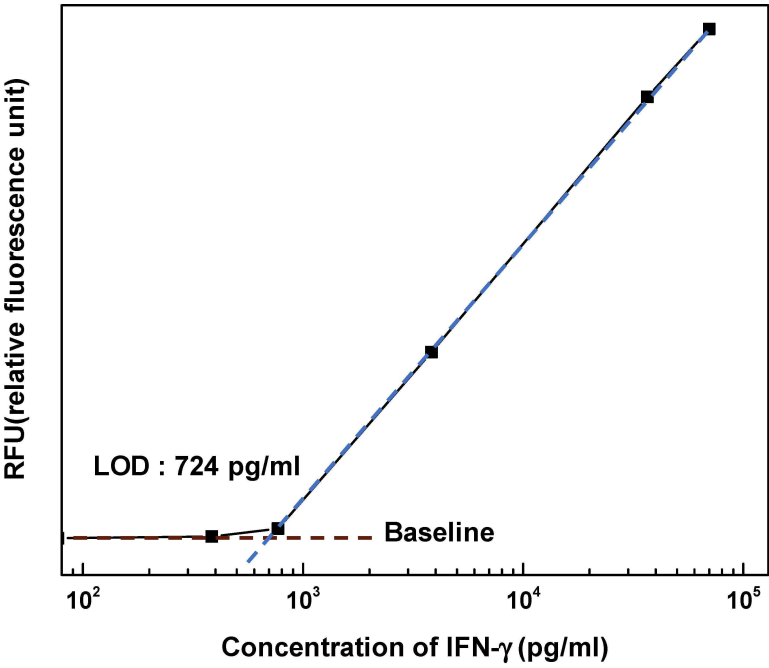
도면4b



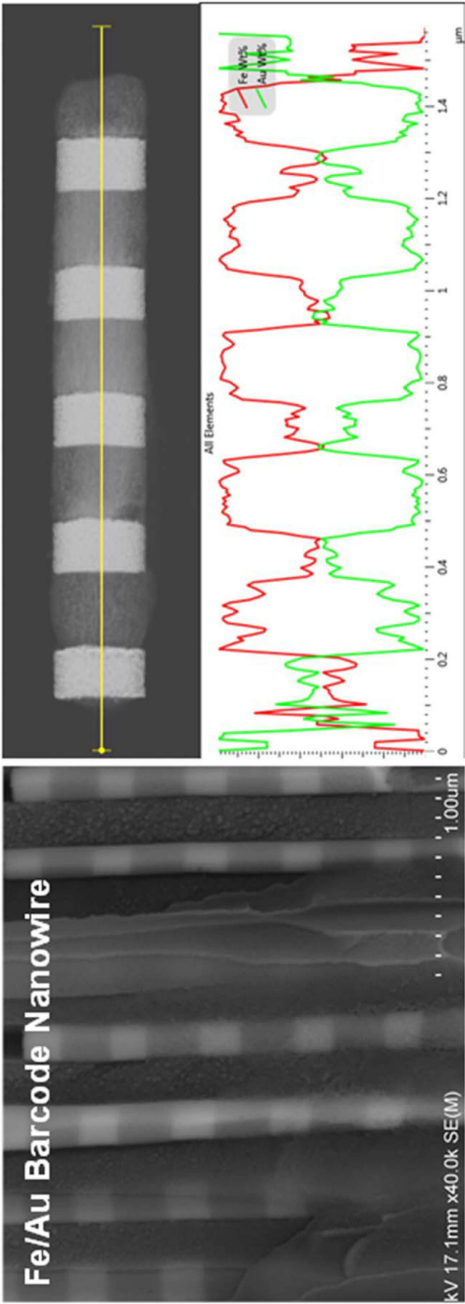
도면5



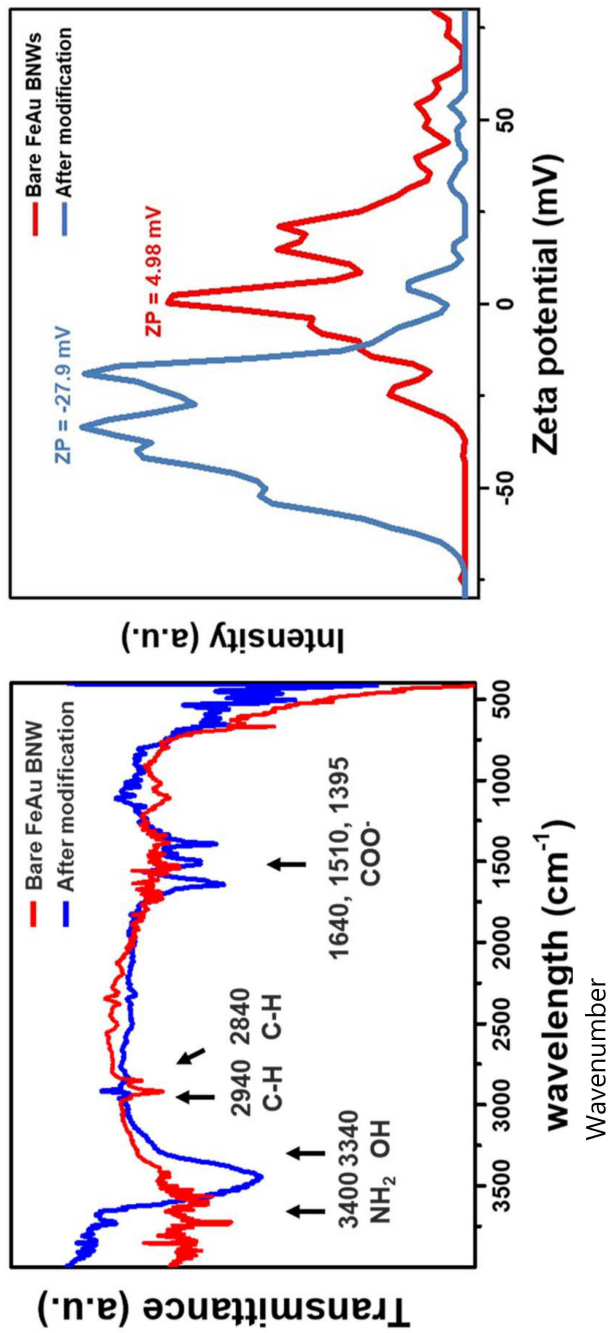
도면6



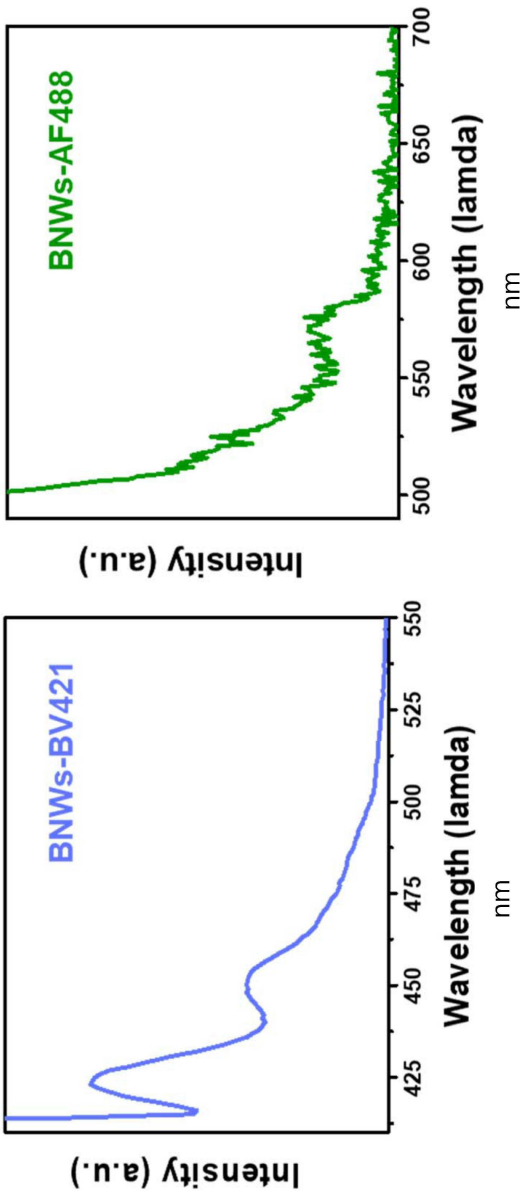
도면7



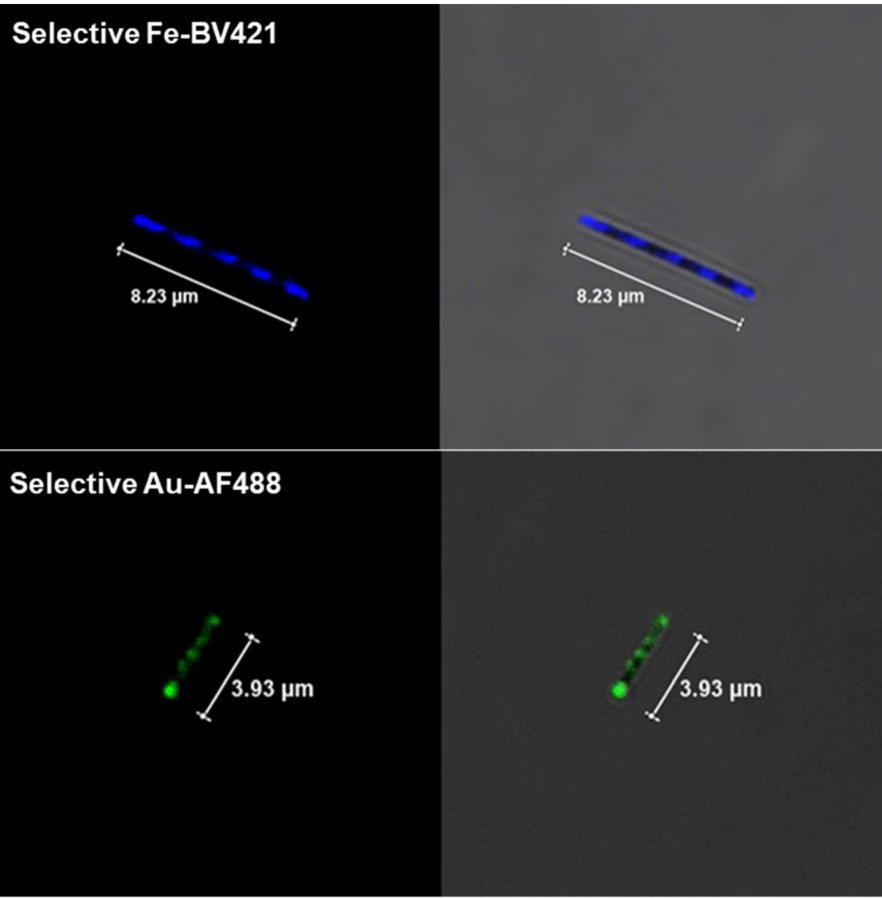
도면8



도면9



도면10



도면11

