



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년10월12일
(11) 등록번호 10-0921237
(24) 등록일자 2009년10월05일

(51) Int. Cl.

G01N 35/00 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0141680

(22) 출원일자 2007년12월31일

심사청구일자 2007년12월31일

(65) 공개번호 10-2009-0073669

(43) 공개일자 2009년07월03일

(56) 선행기술조사문헌

김남수 외, 직접결합방식 수정진동자 면역센서에 의한 C-Reactive Protein 검출, 한국생물공학회지, v.22, no.6, 2007, pp443-446

Kurosawa et al., Immunosensor for C-reactive protein using anti-CRP monoclonal antibody and its F(AB')₂ fragment immobilized quartz crystal microbalance, Freq Cont Symposium and PDA Exh, 29-31 May 2002

(73) 특허권자

한국식품연구원

경기도 성남시 분당구 백현동 516

(72) 발명자

김남수

서울 동대문구 답십리2동 두산아파트 107-402

조용진

서울 송파구 송파동 미성아파트 2동 1102호

손동화

경기 성남시 분당구 금곡동 청솔마을한라아파트 308동 1402호

(74) 대리인

황이남

전체 청구항 수 : 총 9 항

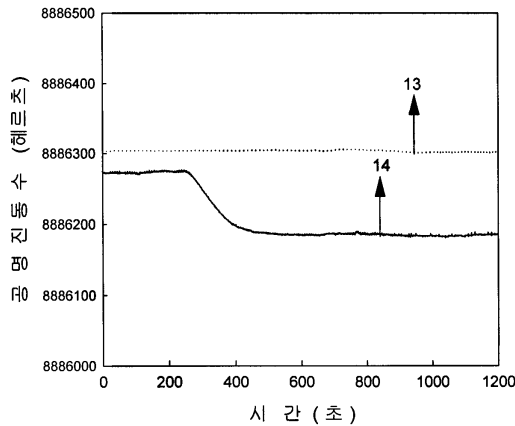
심사관 : 유창용

(54) C-반응성 단백 측정용 수정진동자 면역센서 측정장치 및 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질 고감도 측정방법

(57) 요약

본 발명은 바이오마커(biomarker)의 하나인 C-반응성 단백(C-reactive protein)을 측정할 수 있는 C-반응성 단백질 측정용 수정진동자 면역센서 측정장치 및 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

반응완충용액 조(1),

상기 반응완충용액 조(1)와 연결되며, 상기 반응완충용액 조 내부의 반응완충용액을 하기 반응셀(4) 내부의 수정진동자 센서 칩에 고정화된 C-반응성 단백질에 공급하기 위한 공급수단(2),

상기 공급수단(2)과 연결되며, 상기 공급수단(2)으로부터 공급되는 반응완충용액과 C-반응성 단백질 항체 및 C-반응성 단백을 포함하는 검체를 반응셀(4) 내부의 수정진동자 센서 칩에 고정화된 C-반응성 단백질에 공급하기 위한 시료주입구(3),

상기 시료주입구(3)를 통해 반응완충용액과 C-반응성 단백질 항체 및 C-반응성 단백을 포함하는 검체가 공급되며 항원인 C-반응성 단백질이 고정화된 전극의 센서 칩을 포함하는 수정진동자(7), 상기 수정진동자 센서 칩을 보호하기 위한 오링(6) 및 상기 수정진동자(7) 및 오링(6)을 감싸면서 조인트(8)로 연결된 홀더(5)가 구비된 반응셀(4),

상기 반응셀(4) 내부의 수정진동자를 진동시키고, 수정진동자의 진동을 진동측정기(11)로 전송하기 위해 수정진동자(7)와 연결된 발진모듈(10),

상기 발진모듈(10)을 통해 반응셀(4) 내부의 수정진동자(7)의 진동을 측정하는 진동측정기(11),

상기 진동측정기(11)와 연결되어 수정진동자(7)의 센서 칩 전극에 고정화된 C-반응성 단백질의 진동수 변화를 나타내는 컴퓨터(12) 및

상기 반응셀(4) 내부에 공급되는 반응완충용액과 C-반응성 단백질 항체 및 C-반응성 단백을 포함하는 검체의 폐액을 포집하는 폐액조(9)를 포함하는 것을 특징으로 하는 C-반응성 단백질 측정용 수정진동자 면역센서 측정장치.

청구항 2

수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정에 있어서,

(1)항원인 C-반응성 단백질이 고정화된 수정진동자 센서 칩에 반응완충용액을 첨가하여 정상상태에서의 진동수(F1)를 얻는 단계,

(2)상기 (1)단계 후 항원인 C-반응성 단백질이 고정화된 수정진동자 센서 칩에 C-반응성 단백질 항체와 C-반응성 단백을 포함하는 검체의 혼합물을 가하여 경합면역반응이 일어난 후 정상상태에서의 진동수(F2)를 얻는 단계,

(3)상기 (1)단계에서 얻은 진동수(F1)와 상기 (2)단계에서 얻은 진동수(F2)로부터 진동수 변화($\Delta F = F1 - F2$)의 측정단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 수정진동자 센서 칩에 항원인 C-반응성 단백질의 고정화는

(a)C-반응성 단백질에 인산완충용액을 가하여 C-반응성 단백을 포함하는 인산완충용액을 얻는 단계,

(b)설포석신이미딜 6-[3-{2-피리딜디치오}프로피온아미도]헥사노에이트(sulfosuccinimidyl 6-[3-{2-pyridyldithio}propionamido]hexanoate) 수용액을 상기 (a)단계의 인산완충용액과 반응시키는 단계,

(c)상기 (b)단계에서 얻은 용액에 디티오프레이트(dithiothreitol) 용액을 첨가하여 반응시키는 단계,

(d)상기 (c)단계에서 얻은 용액을 수정진동자 센서 칩의 전극 표면에 도포하고 건조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 수정진동자 센서 칩에 항원인 C-반응성 단백질의 고정화는

(가)C-반응성 단백질에 인산완충용액을 가하여 C-반응성 단백질의 농도가 0.5~2.5mg/ml인 인산완충용액을 얻는 단계,

(나)10~30mM의 설포석신이미딜 6-[3-{2-피리딜디치오}프로피온아미도]헥사노에이트 수용액 10~50 μ l을 상기 (가)단계의 인산완충용액 10~50 μ l과 30~90분간 반응시키는 단계,

(다)상기 (나)단계에서 얻은 용액에 디티오프레이틀 용액 10~30 μ l을 첨가하여 10~50분간 반응시키는 단계,

(라)상기 (다)단계에서 얻은 용액 10~15 μ l을 수정진동자 센서 칩의 전극 표면에 도포하고 실온에서 30~90분간 건조하고 증류수 및 0.05~0.15몰 인산완충용액으로 3~7회 세척하는 단계로 실시하는 것을 특징으로 하는 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 반응완충용액은 0.05~0.15몰농도(M)이고, pH가 7.0인 인산완충용액인 것을 특징으로 하는 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법.

청구항 6

제2항에 있어서, C-반응성 단백질 항체는 쥐(rat), 마우스(mouse), 토끼, 원숭이 또는 사람의 포유동물의 C-반응성 단백을 사용하여 제조한 항체 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법.

청구항 7

제2항에 있어서, (1)단계의 진동수(F1) 측정은 C-반응성 단백질이 고정화된 수정진동자 센서 칩에 반응완충용액을 첨가하여 5~20분 후 정상상태에서의 진동수(F1)를 측정하는 것을 특징으로 하는 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법.

청구항 8

제2항에 있어서, (2)단계의 진동수(F2) 측정은 C-반응성 단백질이 고정화된 수정진동자 센서 칩에 C-반응성 단백질 항체와 C-반응성 단백을 포함하는 검체의 혼합물을 가하여 경합면역반응이 일어난 다음 2~20분 후 정상상태에서의 진동수(F2)를 측정하는 것을 특징으로 하는 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법.

청구항 9

제2항에 있어서, C-반응성 단백질 항체와 C-반응성 단백을 포함하는 검체의 혼합물은 C-반응성 단백질 항체와 C-반응성 단백을 포함하는 검체가 1:9~9:1의 부피비로 혼합되는 것을 특징으로 하는 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 바이오마커(biomarker)의 하나인 C-반응성 단백질(C-reactive protein)을 측정할 수 있는 C-반응성 단백질 측정용 수정진동자 면역센서 측정장치 및 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 최근 건강기능식품법이 발효되면서 국내에서도 천연물을 기반으로 식품소재 및 가공식품을 제조하고 이를 건강기능식품으로 인정받을 수 있는 문호가 개방되었다. 그러나 이를 위해서는 건강기능식품의 기능성, 예를 들면 심혈관계 질환예방, 노화억제, 암 예방, 비만방지, 면역조절, 위·장관 질환예방 등의 건강기능식품의 기능성을 과학적으로 입증하는 자료를 제시해야 하므로 식품기능성 평가의 중요성은 점점 증대되고 있고 그 결과로서 기능성평가 분야의 사업화 가능성도 매우 높은 실정이다.

<3> 식품의 기능성평가 분야에는 위의 6대 기능성 유형을 중심으로 생체외(in vitro) 및 생체내(in vivo) 기능성 평가와 임상실험이 포함되어 있다.

- <4> 생활수준의 향상과 그로 인한 생활방식의 다양화, 활동 감소, 과잉영양 등으로 인해 전 세계적으로 질병의 패턴이 감염성질환에서 만성퇴행성질환으로 변화하고 있다. 사이언스지(The Science)에 현대인 사망의 주원인이 흡연 및 비만에 따른 암과 심혈관계 질환이라고 보도되었고, 네이처지(The Nature)에는 성인 사망원인의 50% 정도가 심혈관계 질환에 기인한다고 인용된 바 있다. 따라서 식품산업의 측면에서 볼 때 심혈관계 질환을 예방할 수 있는 식품개발의 필요성이 점차 높아지고 있으며 이를 위해서는 식품소재 및 기능성식품의 심혈관계 기능성 평가를 효율적이고 신속하게 행할 수 있는 검색법, 특히 생체내 검색법 개발의 필요성이 증대되고 있다.
- <5> 식품소재 및 기능성식품의 심혈관계 기능성을 생체 내에서 검색할 수 있는 새로운 방법의 하나는 동물모델에서 식품의 급여가 심혈관계 바이오마커(biomarker)의 혈액 내 변화에 미치는 영향을 측정하는 것이다. 이 때 심혈관계 질환예방과 관련된 식품기능성은 크게 관상동맥질환 개선, 혈압강하, 혈전 및 동맥경화 개선의 4대 범주로 구분해볼 수 있고 이와 관련된 바이오마커로는 C-반응성 단백(C-reactive protein), 엘디엘(low density lipoprotein, LDL), 피브리노겐(fibrinogen), 안기오텐신 II(angiotensin II), 카디악 트로포닌(cardiac troponin) 등이 주목되고 있다.
- <6> 상기 바이오마커 중에서 C-반응성 단백질은 관상동맥질환, 고혈압 등에 대한 주요 지표물질의 하나로 알려지고 있으며, 포유동물의 간에서 인터류킨-6 (interleukin-6) 및 인터류킨-1베타(interleukin-1 β)에 의한 유도 자극으로 합성되는 분자질량 118 킬로달톤(kilodalton, kDa) 정도의 펜타머 단백질이다(*Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 19, p. 1193, 2004; *Clinical Chemistry*, Vol. 47, p. 403, 2001; *New England Journal of Medicine*, Vol. 340, p. 448, 1999; *Biochemical Journal*, Vol. 327, p. 425, 1997).
- <7> 기존에는 C-반응성 단백을 측정하기 위하여 효소면역분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 주로 이용하여 왔으며 그 측정법이 잘 정립되어 있고 측정에 따른 감도도 상당히 좋은 것으로 알려지고 있다 (*American Journal of Cardiology*, Vol. 1, p. 155, 2005; *American Journal of Veterinary Research*, Vol. 1, p. 62, 2005; *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, Vol. 18, p. 280, 2004).
- <8> 그러나 다른 모든 광도측정법에서와 같이 효소면역분석법에서 얻어지는 반응신호는 반응용액과 혈액, 타액 등 다양한 검체에 존재하는 착색물질에 의한 측정저해를 받을 수 있고 표지효소를 사용하여 측정과정이 복잡한 문제점이 있으므로(*Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 121, p. 606, 2007; *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 11, p. 881, 1996) 이를 해결하여 C-반응성 단백을 착색물질에 의한 측정저해를 받지 않으면서도 간편하고 고감도로 분석할 수 있는 새로운 측정방법의 개발이 필요한 실정이다.
- <9> 앞에서 살펴본 바와 같이 C-반응성 단백을 측정하는 기존방법은 측정저해현상이 나타날 수 있고 분석과정이 복잡한 문제점이 있어 효율성이 떨어지며 경제적 측면에서도 C-반응성 단백질에 대한 상용화 분석 키트(kit)가 한 키트 당 수십만 원 이상의 고가여서 결과적으로 식품기능성을 평가하는 바이오마커의 하나인 C-반응성 단백질의 일상적 측정을 어렵게 만드는 한 원인이 되고 있다. 따라서 이를 개선하여 식품소재 및 기능성식품의 급여가 실험동물의 혈액 내 C-반응성 단백질의 농도변화에 미치는 영향을 간편하고 신속하게, 측정저해현상을 최소화하면서 측정할 수 있는 C-반응성 단백질의 고감도 측정을 위한 새로운 현장적응성 측정기술개발이 긴요한 실정이며 이에 대한 필요성이 끊임없이 제기되어 왔다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <10> 본 발명은 바이오마커(biomarker)의 하나인 C-반응성 단백질(C-reactive protein)을 측정할 수 있는 C-반응성 단백질 측정용 수정진동자 면역센서 측정장치 및 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법을 제공하고자 한다.

과제 해결수단

- <11> 본 발명의 바이오마커 측정용 수정진동자 면역센서 측정장치는 바이오마커를 고감도로 측정하기 위해 바이오센서 변환기(transducer)의 하나인 수정진동자(quartz crystal microbalance) 센서 칩에 C-반응성 단백질에 대한 항체를 고정화하는 대신 항원이자 측정대상물질인 C-반응성 단백을 고정화하고 여기에 미리 최적화한 일정농도의 바이오마커에 대한 항체와 농도별 C-반응성 단백을 포함하는 검체를 가하여 경합면역반응을 일으킴에 의하여 C-반응성 단백을 측정하는 수정진동자 면역센서의 감도를 획기적으로 향상시켜 검출한계(limit of detection, LOD)가 피코몰(pM) 농도 수준인 C-반응성 단백질 측정용 수정진동자 면역센서 측정장치 및 수정진동자 면역센서를

이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법을 제공하고자 한다.

효 과

- <12> 본 발명은 관상동맥질환, 고혈압 및 염증에 대한 주요한 바이오마커의 하나로 알려지고 있는 C-반응성 단백을 비표지 면역센서의 하나인 수정진동자 면역센서를 사용하여 세계적 수준의 감도에서 측정할 수 있어 특정한 생체내 식품기능성을 해당 바이오마커를 사용하여 신속하게 실시간대에서 평가할 수 있다.
- <13> 본 발명은 C-반응성 단백질 이외에 항후 엘디엘, 피브리노겐, 안기오텐신 II 등 실험동물의 혈액 등에 다양한 농도범위로 존재하는 바이오마커에 대한 고속 동시측정에 필요한 식품기능성 평가와 관련된 기반기술을 확립할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <14> 본 발명은 C-반응성 단백질 측정용 수정진동자 면역센서 측정장치를 나타낸다.
- <15> 본 발명의 C-반응성 단백질 측정용 수정진동자 면역센서 측정장치는 도 1에 나타내었다.
- <16> 도 1을 참조하여 본 발명의 C-반응성 단백질 측정용 수정진동자 면역센서 측정장치를 설명하고자 한다.
- <17> 본 발명의 C-반응성 단백질 측정용 수정진동자 면역센서 측정장치는 반응완충용액 조(1),
- <18> 상기 반응완충용액 조(1)와 연결되며, 상기 반응완충용액 조 내부의 반응완충용액을 하기 반응셀(4) 내부의 수정진동자 센서 칩에 고정화된 C-반응성 단백질에 공급하기 위한 공급수단(2),
- <19> 상기 공급수단(2)과 연결되며, 상기 공급수단(2)으로부터 공급되는 반응완충용액과 C-반응성 단백질 항체 및 C-반응성 단백을 포함하는 검체를 반응셀(4) 내부의 수정진동자 센서 칩에 고정화된 C-반응성 단백질에 공급하기 위한 시료주입구(3),
- <20> 상기 시료주입구(3)를 통해 반응완충용액과 C-반응성 단백질 항체 및 C-반응성 단백을 포함하는 검체가 공급되며 항원인 C-반응성 단백질이 고정화된 전극의 센서 칩을 포함하는 수정진동자(7), 상기 수정진동자 센서 칩을 보호하기 위한 오링(6) 및 상기 수정진동자(7) 및 오링(6)을 감싸면서 조인트(8)로 연결된 홀더(5)가 구비된 반응셀(4),
- <21> 상기 반응셀(4) 내부의 수정진동자를 진동시키고, 수정진동자의 진동을 진동측정기(11)로 전송하기 위해 수정진동자(7)와 연결된 발진모듈(10),
- <22> 상기 발진모듈(10)을 통해 반응셀(4) 내부의 수정진동자(7)의 진동을 측정하는 진동측정기(11),
- <23> 상기 진동측정기(11)와 연결되어 수정진동자(7)의 센서 칩 전극에 고정화된 C-반응성 단백질이 C-반응성 단백질 항체와 결합할 때 발생하는 진동수 변화를 나타내는 컴퓨터(12) 및
- <24> 상기 반응셀(4) 내부에 공급되는 반응완충용액과 C-반응성 단백질 항체 및 C-반응성 단백을 포함하는 검체의 폐액을 포집하는 폐액조(9)를 포함한다.
- <25> 상기에서 반응완충용액은 본 발명의 C-반응성 단백질 측정용 수정진동자 면역센서 측정장치를 이용하여 C-반응성 단백을 측정하기 위한 정상상태의 진동수를 얻기 위해 사용한다.
- <26> 상기 반응완충용액은 0.05~0.15몰농도(M)인 인산완충용액을 사용할 수 있다.
- <27> 상기 반응완충용액은 pH가 7.0인 인산완충용액을 사용할 수 있다.
- <28> 상기 반응완충용액은 0.05~0.15몰농도(M)이고, pH가 7.0인 인산완충용액을 사용할 수 있다.
- <29> 상기에서 공급수단(2)은 펌프(pump)를 사용할 수 있다.
- <30> 상기에서 공급수단(2)은 미세분주펌프(micro-dispensing pump)를 사용할 수 있다.
- <31> 상기에서 반응완충용액 조, 공급수단, 시료 주입구, 반응셀, 폐액조는 서로 반응완충용액이 흐를 수 있는 관으로 연결될 수 있다.
- <32> 상기에서 반응완충용액 조, 공급수단, 시료 주입구, 반응셀, 폐액조는 서로 반응완충용액이 흐를 수 있는 튜브(tube)로 연결될 수 있다.

- <33> 상기에서 반응원충용액 조, 공급수단, 시료 주입구, 반응셀, 폐액조는 서로 반응원충용액이 흐를 수 있는 모세관(capillary tube)으로 연결될 수 있다.
- <34> 상기에서 시료주입구(3)는 반응셀(4) 내부의 수정진동자에 고정화된 항원인 C-반응성 단백질과 반응할 수 있는 반응액으로서 C-반응성 단백질 항체 및 C-반응성 단백을 포함하는 검체가 공급된다.
- <35> 상기 시료주입구(3)의 루프(loop) 용량은 20~500마이크로리터(μl)인 것을 사용할 수 있다.
- <36> 상기에서 반응셀(4)은 조인트(8)로 연결된 홀더(5)가 구비되어 있으며, 상기 홀더(5) 내부의 중심부에서 항원인 C-반응성 단백질이 고정화되어 있는 수정진동자(7) 센서 칩이 있으며, 상기 수정진동자 센서 칩에는 C-반응성 단백질이 고정화된 전극이 있으며, 상기 전극 주위에는 반응액이 누수되는 것을 방지하기 위한 오링(O-ring)(6)이 있다.
- <37> 상기 수정진동자 센서 칩은 에이-티컷(AT-cut)을 사용할 수 있으며 고유공명진동수(fundamental resonant frequency)는 8~10메가헤르쯔(MHz)이다.
- <38> 상기 반응셀 내부의 명목용량(nominal capacity)은 100~200마이크로리터(μl)인 것을 사용할 수 있다.
- <39> 본 발명은 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법을 나타낸다.
- <40> 본 발명은 수정진동자 면역센서를 포함하는 측정장치를 이용하여 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법을 제공할 수 있다.
- <41> 본 발명은 도 1과 같은 수정진동자 면역센서를 포함하는 측정장치를 이용하여 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법을 제공할 수 있다.
- <42> 본 발명은 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정에 있어서, (1)항원인 C-반응성 단백질이 고정화된 수정진동자 센서 칩에 반응원충용액을 첨가하여 정상상태에서의 진동수(F1)를 얻는 단계,
- <43> (2)상기 (1)단계 후 항원인 C-반응성 단백질이 고정화된 수정진동자 센서 칩에 C-반응성 단백질 항체와 C-반응성 단백을 포함하는 검체의 혼합물을 가하여 경합면역반응이 일어난 후 정상상태에서의 진동수(F2)를 얻는 단계,
- <44> (3)상기 (1)단계에서 얻은 진동수(F1)와 상기 (2)단계에서 얻은 진동수(F2)로부터 진동수 변화($\Delta F = F1 - F2$)의 측정단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 수정진동자 면역센서를 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법을 나타낸다.
- <45> 상기에서 수정진동자 센서 칩에 항원인 C-반응성 단백질의 고정화는 하기 (a)단계 내지 (d)단계를 이용하여 실시할 수 있다.
- <46> (a)C-반응성 단백질에 인산원충용액을 가하여 C-반응성 단백을 포함하는 인산원충용액을 얻는 단계, (b)설포석신 이미딜 6-[3-{2-피리딜디치오}프로피온아미도]헥사노에이트(sulfosuccinimidyl 6-[3-{2-pyridyldithio}propionamido]hexanoate) 수용액을 상기 (a)단계의 인산원충용액과 반응시키는 단계, (c)상기 (b)단계에서 얻은 용액에 디티오프레톨(dithiothreitol) 용액을 첨가하여 반응시키는 단계, (d)상기 (c)단계에서 얻은 용액을 수정진동자 센서 칩의 전극 표면에 도포하고 건조하는 단계.
- <47> 상기에서 수정진동자 센서 칩에 항원인 C-반응성 단백질의 고정화는 하기 (가)단계 내지 (라)단계를 이용하여 실시할 수 있다.
- <48> (가)C-반응성 단백질에 인산원충용액을 가하여 C-반응성 단백질의 농도가 0.5~2.5mg/ml인 인산원충용액을 얻는 단계, (나)10~30mM의 설포석신이미딜 6-[3-{2-피리딜디치오}프로피온아미도]헥사노에이트 수용액 10~50 μl 을 상기 (가)단계의 인산원충용액 10~50 μl 과 30~90분간 반응시키는 단계, (다)상기 (나)단계에서 얻은 용액에 디티오프레톨 용액 10~30 μl 을 첨가하여 10~50분간 반응시키는 단계, (라)상기 (다)단계에서 얻은 용액 10~15 μl 을 수정진동자 센서 칩의 전극 표면에 도포하고 실온에서 30~90분간 건조하고 증류수 및 0.05~0.15몰 인산원충용액으로 3~7회 세척하는 단계.
- <49> 상기에서 반응원충용액은 0.05~0.15몰농도(M)인 인산원충용액을 사용할 수 있다.
- <50> 상기에서 반응원충용액은 pH가 7.0인 인산원충용액을 사용할 수 있다.
- <51> 상기에서 반응원충용액은 0.05~0.15몰농도(M)이고, pH가 7.0인 인산원충용액을 사용할 수 있다.
- <52> 상기에서 (1)단계의 진동수(F1) 측정은 C-반응성 단백질이 고정화된 수정진동자 센서 칩에 반응원충용액을 첨가하

여 5~20분 후 정상상태에서의 진동수(F1)를 측정할 수 있다.

- <53> 상기에서 (2)단계의 진동수(F2) 측정은 C-반응성 단백질이 고정화된 수정진동자 센서 칩에 C-반응성 단백질 항체와 C-반응성 단백을 포함하는 검체의 혼합물을 가하여 경합면역반응이 일어난 다음 2~20분 후 정상상태에서의 진동수(F2)를 측정할 수 있다.
- <54> 상기에서 C-반응성 단백질 항체와 C-반응성 단백을 포함하는 검체의 혼합물은 C-반응성 단백질 항체와 C-반응성 단백을 포함하는 검체가 1:9~9:1의 부피비로 혼합된 것을 사용할 수 있다.
- <55> 상기에서 C-반응성 단백질 항체는 쥐(rat), 마우스(mouse), 토끼, 원숭이 또는 사람의 포유동물의 C-반응성 단백을 사용하여 제조한 항체 중에서 선택된 어느 하나인 것을 사용할 수 있다. 이때 쥐(rat), 마우스(mouse), 토끼, 원숭이 또는 사람의 포유동물의 C-반응성 단백을 사용하여 C-반응성 단백질 항체를 제조하는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진자가 적의 선택하여 실시할 수 있으므로 이에 대한 자세한 내용은 생략하기로 한다.
- <56> 상기에서 C-반응성 단백질 항체는 시중에서 상품으로 판매되고 있는 것을 사용할 수 있으며, 이러한 상품화된 C-반응성 단백질 항체의 일례로 R&D Systems사(Minneapolis, MN, USA)의 단클론성 C-반응성 단백질 항체를 사용할 수 있다.
- <57> 상기에서 C-반응성 단백을 측정하기 위한 검체는 C-반응성 단백질이 반응완충용액에 용해된 표준용액, 혈액, 혈청(blood serum), 혈장(blood plasma), 타액, 체액, 간 등 조직추출물 중에서 선택된 어느 하나인 것을 사용할 수 있다.
- <58> 본 발명은 C-반응성 단백을 측정하기 위한 장치로서 반응완충용액 조 및 폐액 조, 미세분주펌프, 시료 주입구, 반응셀, 발진모듈, 진동수측정기 및 개인용 컴퓨터를 포함하는 수정진동자 면역센서 측정장치를 나타낸다.
- <59> 또한 본 발명은 수정진동자 면역센서 측정장치, 일례로 도 1로 나타낼 수 있는 수정진동자 면역센서 측정장치를 이용한 C-반응성 단백질의 측정방법을 나타낸다.
- <60> 본 발명의 수정진동자 면역센서 측정장치를 이용한 C-반응성 단백질의 측정방법은 반응셀 내부의 수정진동자의 센서 칩 전극에 항원으로서의 C-반응성 단백질에 대한 고정화 단계; 최적화된 농도의 항원이 고정화된 수정진동자 센서 칩에 최적화된 C-반응성 단백질 항체와 농도별 C-반응성 단백을 포함하는 검체를 가하여 경합면역반응을 일으킴에 의하여 수정진동자 면역센서의 감도를 획기적으로 증진시키는 단계를 포함하는, 식품기능성 평가에 필요한 주요한 바이오마커 단백질의 하나인 C-반응성 단백을 고감도로 측정하는 방법을 제공한다.
- <61> 상기 반응셀 내부의 수정진동자의 센서 칩 전극에 항원으로서의 C-반응성 단백질에 대한 고정화 단계 이후에 반응셀에 장착되는 수정진동자 센서 칩에 항원으로서의 C-반응성 단백을 농도별로 고정화하고 여기에 C-반응성 단백질 항체를 농도별로 가하면서 항체의 결합에 따른 센서신호를 측정하여 고정화에 사용된 C-반응성 단백질 및 반응셀에 가하는 C-반응성 단백질 항체의 농도를 최적화하는 단계를 추가로 더 포함할 수 있다.
- <62> 본 발명자들은 수정진동자의 압전특성을 이용하여 심혈관계 식품기능성 평가와 관련된 바이오마커 단백질인 C-반응성 단백질에 대한 실시간대의 고감도 측정방법을 검토한 결과, 수정진동자 면역센서 측정장치, 일례로 도 1로 나타낼 수 있는 수정진동자 면역센서 측정장치를 사용하고, 수정진동자 센서 칩에 최적화된 농도로 항원인 C-반응성 단백을 고정화하여 반응셀에 장착하고 여기에 최적화된 농도의 C-반응성 단백질 항체와 농도별 C-반응성 단백을 포함하는 검체의 혼합물을 가하여 경합면역반응을 일으킴에 의하여 표지효소를 사용하는 효소면역분석법과는 다르게 비표지적으로 C-반응성 단백을 피코 몰 수준의 검출한계로 측정할 수 있다는 사실을 발견하였다. 이러한 사실로부터 예의 연구를 거듭한 결과 C-반응성 단백을 고감도로 측정할 수 있고 아울러 기타의 식품기능성 바이오마커의 고감도 측정에 보편적으로 적용할 수 있는, 연속형의 수정진동자 면역센서 측정시스템을 사용하고 수정진동자 센서 칩에 최적화된 농도로 항원으로서의 C-반응성 단백을 고정화하며 여기에 최적화된 농도의 C-반응성 단백질 항체와 농도별 C-반응성 단백을 포함하는 검체의 혼합물을 가하여 비표지적으로 경합면역반응을 일으킴을 주요한 특징으로 하는 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- <63> 상기에서 기타의 식품기능성 바이오마커로는 엘디엘, 피브리노겐, 안기오텐신 II, 카디악 트로포닌 등의 심혈관계 바이오마커와 노화억제, 암 예방, 비만방지, 면역조절, 위·장관 질환예방 등과 관련된 바이오마커 단백질을 대상으로 할 수 있다.
- <64> 이하 본 발명을 단계별로 보다 상세히 설명하고자 한다.

- <65> 본 발명은 심혈관계 식품기능성을 평가하는데 필요한 주요한 바이오마커의 하나인 C-반응성 단백을 고감도로 측정하기 위하여 도 1의 구성을 지니는 연속형의 수정진동자 면역센서 측정시스템을 구성하고 반응 셀에 장착되는 수정진동자 센서 칩에 C-반응성 단백 항체를 고정화하는 대신 항원으로서의 C-반응성 단백을 고정화함에 의하여 항원과 항체간의 면역반응의 정도를 크게 증대시킬 수 있다. 그 다음으로 최적화된 농도의 항원이 고정화된 수정진동자 센서 칩에 최적화된 농도의 C-반응성 단백 항체와 농도별 C-반응성 단백을 포함하는 검체의 혼합물을 가하여 결합면역반응을 일으키는 간단한 공정에 의하여 C-반응성 단백을 고감도로 측정할 수 있다.
- <66> (i) 항원으로서의 C-반응성 단백질의 고정화
- <67> 도 1과 같은 수정진동자 면역센서 측정장치의 반응 셀에 장착하는 수정진동자 센서 칩에 항원으로서의 C-반응성 단백질의 고정화는 다음의 (1)단계 내지 (3)단계와 같이 실시할 수 있다.
- <68> (1)반응셀 내부의 수정진동자 센서 칩의 감응부위인 금 전극 표면을 전극선이 닿지 않도록 주의하며 가성소다에 침지, 증류수로 세척, 염산에 침지, 증류수로 세척, 염산으로 처리 및 증류수로 세척한 후 건조한다. 일례로 반응셀 내부의 수정진동자 센서 칩의 감응부위인 금 전극 표면을 전극선이 닿지 않도록 주의하며 0.8~1.5몰농도(M) 가성소다와 0.8~1.5몰농도(M)의 염산으로 각각 3 내지 7분간 순차적으로 담가 처리하고, 그 사이에 각각 증류수로 세척한다. 이 후 pH가 0.5~1.0인 진한 염산을 0.5~1.5분간 처리한 후 증류수로 다시 세척하고 대류 오븐에서 10~30분간 건조할 수 있다.
- <69> (2)동결건조 상태로 있는 C-반응성 단백질에 0.05~0.15몰농도의 인산완충용액(phosphate buffer saline, PBS, 0.05 내지 0.15 몰농도의 염화나트륨 함유)을 가하여 용액으로 회수한 후 C-반응성 단백질의 농도가 0.5~2.5mg/ml인 인산완충용액을 얻는다. 그런 다음 상기 C-반응성 단백질의 농도가 0.5~2.5mg/ml인 인산완충용액 10~50 μ l 에 증류수에 용해한 10~30밀리몰농도(mM)의 설포석신이미딜 6-[3-{2-피리딜디티오}프로피온아미도]헥사노에이트(sulfosuccinimidyl 6-[3-{2-pyridyldithio}-propionamido]hexanoate) 용액 10~50 μ l를 티올화 가교 화제(thiolation cross-linker)로 가하여 30~90분간 반응시킨다. 이 후 반응액 중의 C-반응성 단백질의 이황화 결합을 환원하여 티올기를 노출시키기 위하여 디티오트레이톨(dithiothreitol) 용액 10~30 μ l를 10~50분간 처리한다.
- <70> (3)상기 (2)에서 얻은 용액 5~15 μ l를 상기 (1)의 수정진동자 센서 칩의 전극 표면에 고르게 도포한 후 실온에서 30~90분간 건조하고 증류수 및 반응완충용액인 0.05~0.15몰농도인 인산완충용액(pH 7.0)으로 3~7회 연속하여 씻어준다.
- <71> (ii) 수정진동자 면역센서 측정장치의 신호특성 평가
- <72> 본 발명의 수정진동자 면역센서가 식품기능성 바이오마커에 대한 현장 및 워크스테이션 장치로서 발전하기 위해서는 센서신호의 안정성을 확보하고 측정시간을 최소화하여야 하는데, 본 공정은 이러한 목적을 효율적으로 달성하기 위하여 수정진동자 면역센서 측정시스템을 구성하고 그 신호특성을 평가하기 위한 것으로서 그 구체적인 방법은 다음과 같다.
- <73> 도 1과 같은 수정진동자 면역센서 측정장치의 작동은 반응완충용액 조(1)에 저장되어 있는 반응완충용액을 공급 수단인 미세분주펌프(2)에 의하여 모세관튜브로 연결된 반응완충용액 조(1), 미세분주펌프(2), 시료주입구(3), 반응셀(4)을 통과하여 폐액 조(9)로 흐르게 하여 행하며 이 때 반응완충용액의 유속(flow rate)은 20~230 μ l/min 이고 시료주입구(3)의 루프(loop) 용량은 20~500 μ l이다. 수정진동자 면역센서 측정장치의 작동 중에 발전 모듈(10)을 통하여 전자기적 힘이 가해지면 상기 공정 (i)에 의하여 C-반응성 단백질이 고정화된 수정진동자 센서 칩은 2~10분 후 반응완충용액의 흐름에 따른 정상상태(steady-state)에서 공명진동수(F₁)로 진동하게 되는데, 여기에 C-반응성 단백질 항체가 포함된 검체를 주입하여 면역반응에 의한 센서 칩 표면의 질량축적이 발생하면 센서 칩의 진동수가 감소하면서 진동수변화가 나타나기 시작하여 2~20분 후 정상상태의 공명진동수(F₂)에 이르며 이로부터 센서반응에 해당하는 진동수변화(frequency shift, ΔF)를 계산할 수 있다($\Delta F = F_1 - F_2$). 이와 같은 수정진동자 면역센서 측정시스템 작동 중의 시간에 따른 센서신호는 진동수측정기(11)로 실시간으로 측정된 후 개인용 컴퓨터(12)에 화상으로 표시되어 진다.
- <74> 상기의 수정진동자 면역센서 측정장치를 작동할 때의 센서신호의 특이성, 안정성 및 측정시간을 알아보기 위하여 도 1의 수정진동자 면역센서 측정장치의 반응셀 내부 수정진동자 센서 칩에 C-반응성 단백질 대신 소 혈청 알부민을 2mg/ml의 농도로 고정화하고 R&D Systems사(Minneapolis, MN, USA)의 단클론성 C-반응성 단백질 항체를 250 μ g/ml의 농도로 시료 주입구를 통하여 가하면서 수정진동자 센서 칩에 고정화된 소 혈청 알부민에 상기의 C-

반응성 단백질 항체가 결합하는 정도를 측정된 결과, 도 2의 도면부호 13에서 볼 수 있는 것처럼 항체의 비 선택적 흡착이 거의 발생하지 않는 것으로 나타나 센서반응의 특이성이 뛰어났다. 아울러 도 2의 도면부호 14에 나타나 있는 것처럼 소 혈청 알부민 대신 2mg/ml 농도의 C-반응성 단백을 도 1의 수정진동자 면역센서 측정장치의 반응셀 내부 수정진동자 센서 칩에 고정화하고, C-반응성 단백질 항체를 250 μ g/ml의 농도로 시료 주입구를 통하여 가한 경우에는 면역반응의 결과로서 발생하는 시간의 경과에 따른 공명진동수 변화패턴이 매우 안정적이었고 정상상태의 센서신호를 얻는데 소요되는 시간도 3~5분에 불과하여 본 발명에서 구상한 연속형의 수정진동자 면역센서 측정장치가 본 발명의 궁극적 목표인 수정진동자의 압전특성을 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정을 위한 효율적 측정장치임을 확인할 수 있다.

<75> (iii) 고정화에 사용된 C-반응성 단백질 및 반응 셀에 가하는 C-반응성 단백질 항체 농도의 최적화

<76> 상기 공정 (i)에 의하여 제조한 C-반응성 단백을 고정화한 수정진동자 센서 칩과 이를 장착한 반응 셀을 포함하는 도 1의 수정진동자 면역센서 측정장치를 사용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법을 확립하기 위하여 본 공정에서는 항원으로서의 C-반응성 단백질 농도를 변화시키면서 수정진동자 센서 칩에 고정화하고 여기에 면역반응에 의하여 결합하는 C-반응성 단백질 항체 농도를 변화시키면서 시료 주입구를 통하여 가할 때 나타나는 항체의 결합정도를 측정하여 고정화에 사용된 C-반응성 단백질 및 반응 셀에 가하는 C-반응성 단백질 항체 농도를 최적화하며 그 구체적인 방법은 다음과 같다.

<77> 항원으로서의 C-반응성 단백을 반응완충용액인 0.05~0.15몰농도의 인산완충용액(pH 7.0)을 사용하여 C-반응성 단백질의 농도가 0.5~2.5mg/ml인 인산완충용액을 제조하여 상기 공정 (i)에 의하여 C-반응성 단백을 도 1의 수정진동자 면역센서 측정장치의 반응셀 내부의 수정진동자 센서 칩 전극에 고정화한다. 이 후 미세분주펌프를 작동하여 20~230 μ l/min의 유속으로 반응완충용액 조에 저장되어 있는 반응완충용액을 유선을 통하여 흘려주는데, 이와 같은 시스템 안정화는 반응완충용액이 흐르는 수정진동자 면역센서 칩의 공명진동수가 정상상태에 이를 때까지 5~20분간 수행한다. 시스템 안정화가 이루어지면 C-반응성 단백질 항체를 반응완충용액에 용해시켜 C-반응성 단백질 항체의 농도가 1~1000 μ g/ml인 반응완충용액을 제조하여 20~500 μ l의 루프가 부착되어 있는 시료 주입구를 통하여 가할 때 반응 셀에 장착된 수정진동자 센서 칩에서 면역반응의 결과로서 나타나는 질량축적에 의한 진동수변화를 센서신호로 측정하여 고정화에 사용된 C-반응성 단백질 및 반응셀에 가하는 C-반응성 단백질 항체 농도를 최적화한 결과, 후술하는 본 발명의 실시예 2에 나타나 있는 것처럼 반응셀의 수정진동자 센서 칩의 전극에 고정화된 C-반응성 단백질의 농도는 2mg/ml, 반응셀의 수정진동자 센서 칩의 전극에 고정화된 C-반응성 단백질에 가하는 C-반응성 단백질 항체의 농도는 250 μ g/ml이 적절한 것으로 나타났다.

<78> (iv) 최적화된 농도의 고정화항원과 C-반응성 단백질 항체를 사용하는 경합면역반응에 의한 센서의 감도 증진

<79> 상기 공정 (iii)에서 도출한 최적화 조건하에서 본 발명의 궁극적 목적인 수정진동자의 압전특성을 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정방법을 확립하기 위하여, 도 1의 수정진동자 면역센서 측정장치의 반응셀 내부 수정진동자 센서 칩에 항원인 C-반응성 단백을 고정화한 후 C-반응성 단백질 항체와 측정대상물질인 C-반응성 단백질의 혼합물을 시료 주입구를 통하여 반응셀 내부에 주입하면서 C-반응성 단백질 항체에 대하여 센서 칩에 고정화된 C-반응성 단백질과 검체 중의 농도별 C-반응성 단백질이 경합면역반응을 행한 결과로서 나타나는 센서반응으로서의 진동수변화를 측정한다. 이를 통하여 비표지 특성인 본 발명의 수정진동자 면역센서에 의한 C-반응성 단백질 측정 시의 검출한계를 확인하여 C-반응성 단백질의 고감도 측정을 완료하는데 그 구체적인 방법은 다음과 같다.

<80> 항원으로서의 C-반응성 단백을 반응완충용액인 0.05 내지 0.15 몰 농도의 인산완충용액(pH 7.0)을 사용하여 C-반응성 단백질의 농도가 2mg/ml인 인산완충용액을 수정진동자 센서 칩에 상기 공정 (i)에 의하여 고정화하여 도 1의 수정진동자 면역센서 측정장치의 반응셀에 장착한 후 반응완충용액을 흘려보내 시스템 안정화를 행한다. 그 직후 C-반응성 단백질 항체(R&D Systems사(Minneapolis, MN, USA)의 단클론성 C-반응성 단백질 항체)를 반응완충용액을 사용하여 C-반응성 단백질 항체의 농도가 250 μ g/ml인 용액에 0.5피코몰농도(pM)~300나노몰농도(nM)의 농도별 C-반응성 단백을 가한 검체(타액)를 혼합하여 1~10분이 경과한 후 20~500마이크로리터(μ l)의 루프가 부착되어 있는 시료 주입구를 통하여 가한다. C-반응성 단백질 항체에 대하여 센서 칩에 고정화된 C-반응성 단백질과 검체 중의 농도별 C-반응성 단백질이 경합면역반응을 행한 결과로서 나타나는 센서반응으로서의 진동수변화를 측정하며 이를 통하여 비표지 특성인 본 발명의 수정진동자 면역센서에 의한 C-반응성 단백질 측정 시의 검출한계를 설정한다. 그 결과, 본 발명의 실시예에서와 같이 C-반응성 단백질에 대한 검출한계는 1.1 피코 몰 농도의 고감도로 나타났다.

<81> 이하 본 발명의 내용을 실시예 및 시험예를 통하여 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로 본 발명의 권리범위가 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.

- <82> <실시에 1>
- <83> 수정진동자 센서 칩에 상기 공정 (i)에서와 같이 항원으로서의 C-반응성 단백을 고정화하는 대신 C-반응성 단백 항체(R&D Systems사(Minneapolis, MN, USA)의 단클론성 C-반응성 단백 항체)를 고정화하여 도 1의 수정진동자 면역센서 측정장치의 반응셀에 장착하고 일정농도의 C-반응성 단백을 시료 주입구를 통하여 가하면서 센서 칩에 고정화된 C-반응성 단백 항체와의 직접결합면역반응을 행하였을 때의 수정진동자 면역센서의 감도를 비교목적으로 아래와 같이 측정하였다.
- <84> 이 때 반응완충용액으로는 매트릭스 효과를 최대한 배제할 수 있는 이온강도인 0.10 몰농도의 인산완충용액(pH 7.0)을 사용하였고 C-반응성 단백 항체의 고정화는 아래와 같이 수행하였다. 즉 센서 칩의 감응부위인 금 전극 표면을 전극선이 닿지 않도록 주의하며 1.2몰농도의 가성소다와 동일 농도의 염산으로 각각 5분간 순차적으로 담가 처리하고 그 사이에 각각 증류수로 세척하였다. 이 후 pH가 0.5인 진한 염산으로 1분간 처리한 후 증류수로 다시 세척하고 대류 오븐에서 20분간 건조하였다. 동결건조 상태로 있는 C-반응성 단백 항체에 0.10몰농도의 인산완충용액(PBS)을 가하여 용액으로 회수한 후 미리 최적화한 농도인 50 μ g/ml의 농도가 되도록 PBS로 희석한 항체용액 30 μ l에 증류수에 용해한 동량의 20밀리몰농도(mM)의 설포석신이미딜 6-[3-(2-피리디디치오}프로피온아미도]헥사노에이트를 티올화 가교화제로 가하여 60분간 반응시켰다. 이 후 반응액 중의 C-반응성 단백 항체의 이황화 결합을 환원하여 티올 기를 노출시키기 위하여 디티오트레이톨 용액 20 μ l를 30분간 처리하였다. 상기와 같이 제조한 티올화 항체 10 μ l를 수정진동자의 감응부위인 금 전극 표면에 고르게 도포한 후 실온에서 60분간 건조하고 증류수 및 반응완충용액으로 5회 연속하여 씻어주었다.
- <85> 도 1의 수정진동자 면역센서 측정장치를 통하여 199 μ l/min의 유속으로 반응완충용액을 흘려보내 주면서 정상상태의 공명진동수 F1을 측정하였다. 여기에 측정대상물질로서의 C-반응성 단백질이 각각 106나노몰농도 및 424나노몰농도로 포함된 검체를 200마이크로리터(μ l)의 루프가 부착된 시료 주입구로 가하여 면역반응의 결과로서 센서 칩 표면에서 발생하는 질량축적에 따른 진동수감소를 추적하여 정상상태의 공명진동수 F2를 측정하고 이로부터 진동수변화 $\Delta F(F1 - F2)$ 를 측정한 결과, C-반응성 단백질 농도가 각각 106나노몰농도 및 424나노몰농도인 경우 센서반응으로서의 진동수변화는 각각 16.87Hz 및 29.63Hz에 불과하였고 C-반응성 단백질 농도가 이보다 낮으면 유의미한 센서반응이 나타나지 않았다.
- <86> 본 실시예 1에서 볼 수 있는 것처럼 수정진동자 센서 칩에 C-반응성 단백질에 대한 항체를 고정화하여 도 1의 수정진동자 면역센서 측정시스템을 직접결합방식으로 작동하면 센서의 감도가 매우 낮게 나타났으므로 C-반응성 단백질의 고감도 측정을 행하기 위해서는 이를 개선하는 새로운 측정방법의 확립이 절실한 것으로 나타났다.
- <87> <실시에 2>
- <88> 직접결합방식으로 작동하는 연속형의 수정진동자 면역센서 측정장치에 의한 C-반응성 단백질 측정 시 센서감도가 실시예 1에서와 같이 매우 낮게 나타나는 문제점을 개선하여 C-반응성 단백질에 대한 고감도 측정을 가능하게 하기 위하여 상기 공정 (iii)과 (iv)에 나타나 있는 바와 같이 경합반응에 의한 센서의 감도증진을 행하는데 필요한, 고정화에 사용된 항원으로서의 C-반응성 단백질 및 도 1의 수정진동자 면역센서 측정장치의 시료 주입구를 통하여 반응셀에 가하는 C-반응성 단백질 항체의 농도 최적화를 다음과 같이 행하였다.
- <89> 이 때 반응완충용액으로는 0.10 몰농도의 인산완충용액(pH 7.0)을 사용하였고 C-반응성 단백질의 고정화는 아래와 같이 행하였다. 즉 센서 칩의 감응부위인 금 전극 표면을 전극선이 닿지 않도록 주의하며 1.2 몰농도의 가성소다와 동일 농도의 염산으로 각각 5분간 순차적으로 담가 처리하고 그 사이에 각각 증류수로 세척하였다. 이 후 pH가 0.5인 진한 염산으로 1분간 처리한 후 증류수로 다시 세척하고 대류 오븐에서 20분간 건조하였다. 동결건조 상태로 있는 C-반응성 단백질에 0.10 몰농도의 PBS를 가하여 용액으로 회수한 후 1mg/ml 및 2mg/ml의 농도가 되도록 PBS로 희석한 용액 30 μ l에 증류수에 용해한 동량의 20밀리몰농도(mM)의 설포석신이미딜 6-[3-(2-피리디디치오}프로피온아미도]헥사노에이트를 티올화 가교화제로 가하여 60분간 반응시켰다. 이 후 반응액 중의 C-반응성 단백질의 이황화 결합을 환원하여 티올 기를 노출시키기 위하여 디티오트레이톨 용액 20마이크로리터(μ l)를 30분간 처리하였다. 상기와 같이 제조한 티올화 C-반응성 단백질 10마이크로리터(μ l)를 수정진동자의 감응부위인 금 전극 표면에 고르게 도포한 후 실온에서 60분간 건조하고 증류수 및 반응완충용액으로 5회 연속하여 씻어주었다.
- <90> 도 1의 수정진동자 면역센서 측정장치를 통하여 199마이크로리터/분(μ l/min)의 유속으로 반응완충용액을 흘려보내 주면서 정상상태의 공명진동수 F1을 측정하였다. 여기에 C-반응성 단백질 항체(R&D Systems사(Minneapolis, MN, USA)의 단클론성 C-반응성 단백질 항체)를 각각 10 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml 및 500 μ g

/ml 농도로 포함한 검체를 200마이크로리터(μl)의 루프가 부착된 시료 주입구로 가하여 면역반응 결과로서 센서 칩 표면에서 발생하는 질량축적에 따른 진동수감소를 추적하여 정상상태의 공명진동수 F2를 측정하고 이로부터 진동수변화 $\Delta F(F1 - F2)$ 를 측정하였다.

<91> 그 결과, 고정화에 사용된 C-반응성 단백질의 농도는 표 1에서와 같이 2mg/ml의 경우 센서신호가 높아 적정하였고 반응셀에 가하는 C-반응성 단백질 항체의 농도는 센서신호의 크기와 항체의 사용량을 고려하여 250마이크로그램/밀리리터($\mu\text{g/ml}$)이 적정한 것으로 나타났으며 이를 토대로 실시예 3에서와 같이 C-반응성 단백질에 대한 고감도 측정을 행할 수 있었다.

<92> 표 1.

<93>

C-반응성 단백질에 대한 항체 (마이크로그램/밀리리터($\mu\text{g/ml}$))	진동수변화(Hz) ¹⁾	
	C-반응성 단백질(밀리그램/밀리리터(mg/ml))	
	1	2
10	13.83 \pm 0.12	6.42 \pm 0.11
25	19.15 \pm 0.17	12.46 \pm 0.22
50	24.23 \pm 0.89	24.71 \pm 0.15
100	32.49 \pm 0.39	60.26 \pm 0.12
250	56.18 \pm 0.35	71.78 \pm 0.27
500	182.67 \pm 0.22	195.29 \pm 0.11

<94> ¹⁾ 인접한 측정시간대의 다섯 개의 값을 평균하고 표준편차 표시.

<95> <실시예 3>

<96> 본 발명의 궁극적 목적인 수정진동자의 압전특성을 이용한 C-반응성 단백질의 고감도 측정은 수정진동자 센서 칩에 고정화하여 도 1의 수정진동자 면역센서 측정장치의 반응셀에 장착한 항원으로서의 C-반응성 단백질과 C-반응성 단백질 항체의 최적화 농도에서, 측정대상물질인 농도별 C-반응성 단백질을 C-반응성 단백질 항체와 섞어 시료 주입구를 통하여 가하면서 C-반응성 단백질 항체에 대하여 센서 칩에 고정화된 C-반응성 단백질과 검체 중의 C-반응성 단백질이 결합면역반응을 행한 결과로서 나타나는 센서반응으로서의 진동수변화를 측정하여 아래와 같이 행하였다. 이 때 반응완충용액으로는 0.10 몰농도의 인산완충용액(pH 7.0)을 사용하였고 C-반응성 단백질의 고정화는 아래와 같이 행하였다. 즉 센서 칩의 감응부위인 금 전극 표면을 전극선이 닿지 않도록 주의하며 1.2 몰농도의 가성소다와 동일 농도의 염산으로 각각 5분간 순차적으로 담가 처리하고 그 사이에 각각 증류수로 세척하였다. 이 후 pH가 0.5인 진한 염산으로 1분간 처리한 후 증류수로 다시 세척하고 대류 오븐에서 20분간 건조하였다. 동결건조 상태로 있는 C-반응성 단백질에 0.10 몰농도의 PBS를 가하여 용액으로 희석한 후 C-반응성 단백질의 농도가 2mg/ml이 되도록 PBS로 희석한 용액 30마이크로리터(μl)에 증류수에 용해한 동량의 20밀리 몰농도의 설펀실아미드 6-[3-(2-피리디디치오)프로피온아미드]헥사노에이트를 티올화 가교화제로 가하여 60분간 반응시켰다. 이 후 반응액 중의 C-반응성 단백질의 이황화 결합을 환원하여 티올기를 노출시키기 위하여 디티오프레이틀 용액 20마이크로리터(μl)를 30분간 처리하였다. 상기와 같이 제조한 티올화 C-반응성 단백질 10마이크로리터(μl)를 수정진동자의 감응부위인 금 전극 표면에 고르게 도포한 후 실온에서 60분간 건조하고 증류수 및 반응완충용액으로 5회 연속하여 씻어주었다.

<97> 도 1의 수정진동자 면역센서 측정장치를 통하여 199마이크로리터/분($\mu\text{l/min}$)의 유속으로 반응완충용액을 흘려보내 주면서 정상상태의 공명진동수 F1을 측정하였다. 여기에 C-반응성 단백질 항체(R&D Systems사(Minneapolis, MN, USA)의 단클론성 C-반응성 단백질 항체)를 250 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 포함한 반응완충용액에 C-반응성 단백질을 각각 0.0011나노몰농도, 0.0053나노몰농도, 0.011나노몰농도, 0.053나노몰농도, 0.11나노몰농도, 0.53나노몰농도, 1.06나노몰농도, 5.3나노몰농도, 10.6나노몰농도, 53나노몰농도, 106나노몰농도 및 212나노몰농도로 포함한 검체(타액)를 혼합한 후 5분이 경과하면 200마이크로리터의 루프가 부착된 시료 주입구로 주입하여 결합면역반응을 행하고 그 결과로서 센서 칩 표면에서 발생하는 질량축적에 따른 진동수감소를 추적하여 정상상태의 공명진동수 F2를 측정하고 이로부터 진동수변화 $\Delta F(F1 - F2)$ 를 측정하였다.

<98> 그 결과, 표 2에서와 같이 0.0011 나노 몰(1.1 피코 몰)농도에서도 진동수변화 비율인 Fr값이 0.8283에 불과하며 항체만 주입한 경우와 비교하여 진동수변화도 9Hz 정도 낮은 것으로 나타나 검출한계가 1.1 피코 몰농도에

이르는 것으로 나타났다. 상기의 센서감도는 자기면역센서 및 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance) 면역센서에 의하여 측정된 바이오마커 검출감도보다 우수한 것으로 평가되었으며(*Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 22, p. 973, 2007; *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 21, p. 1141, 2006; *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 21, p. 1631, 2006), 본 발명을 통하여 심혈관계 식품기능성을 평가하는데 필요한 주요한 바이오마커의 하나인 C-반응성 단백에 대한 실시간대의 고감도 측정이 이루어졌음을 잘 보여 주었다.

표 2.

C-반응성 단백(nM)	Fr ¹⁾
0	- ²⁾
0.0011	0.8283
0.0053	0.6236
0.0110	0.5177
0.0530	0.4727
0.1100	0.4507
0.5300	0.3574
1.0600	0.3080
5.3000	0.2499
10.6000	0.2049
53.0000	0.1581
106.0000	0.1354
212.0000	0.1023

¹⁾ 진동수변화 비율 = $\Delta F_{\text{항체} + \text{측정대상물질}} / \Delta F_{\text{항체}}$.

²⁾ 센서 시스템에 항체만 주입하였을 때의 진동수변화는 $90.17 \pm 0.35\text{Hz}$.

상술한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만 해당 기술 분야의 숙련된 당업자라면 하기의 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

산업이용 가능성

본 발명에 의해 관상동맥질환, 고혈압 및 염증에 대한 주요한 바이오마커의 하나로 알려지고 있는 C-반응성 단백을 신속하게 실시간대에서 평가할 수 있을 뿐만 아니라 향후 C-반응성 단백 이외에 엘디엘, 피브리노겐, 안기오텐신 II 등 실험동물의 혈액 등에 다양한 농도범위로 존재하는 바이오마커에 대한 고속 동시측정에 필요한 식품기능성 평가와 관련된 기반기술을 확립할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 C-반응성 단백을 측정하기 위한 수정진동자 면역센서 측정장치의 개략도이다.

도 2는 C-반응성 단백질과 소 혈청 알부민이 각각 고정화된 수정진동자 센서 칩에 C-반응성 단백질 항체가 결합하는 정도를 나타낸 그래프이다.

<도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>

- 1 : 반응완충용액 조
- 2 : 공급수단(미세분주펌프)
- 3 : 시료 주입구
- 4 : 반응셀(flow-through cell)
- 5 : 홀더
- 6 : 오링(O-ring)
- 7 : 수정진동자
- 8 : 조인트
- 9 : 폐액조
- 10 : 발진모듈

