



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월02일

(11) 등록번호 10-1524109

(24) 등록일자 2015년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/53 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01) G01N 33/563 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0030337

(22) 출원일자 2014년03월14일

심사청구일자 2014년03월14일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020110124489 A*

보건의료기술진흥사업 최종보고서, 결핵항원 특이 항체를 이용한 결핵 조기 진단용 항체 단백질 칩 개발 (2010.4.30.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

중앙대학교 산학협력단

서울 동작구 흑석동 221

부산대학교 산학협력단

부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2 (장전동, 부산대학교)

(72) 발명자

김화중

대전광역시 서구 둔산남로 127, 304동 903호 (둔산동, 목련아파트)

박태정

경기도 김포시 김포대로926번길 46, 305동 1401호 (북변동, 풍년마을삼성아파트)

이재범

경기도 화성시 동탄공원로 21-42 (능동)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 김승오

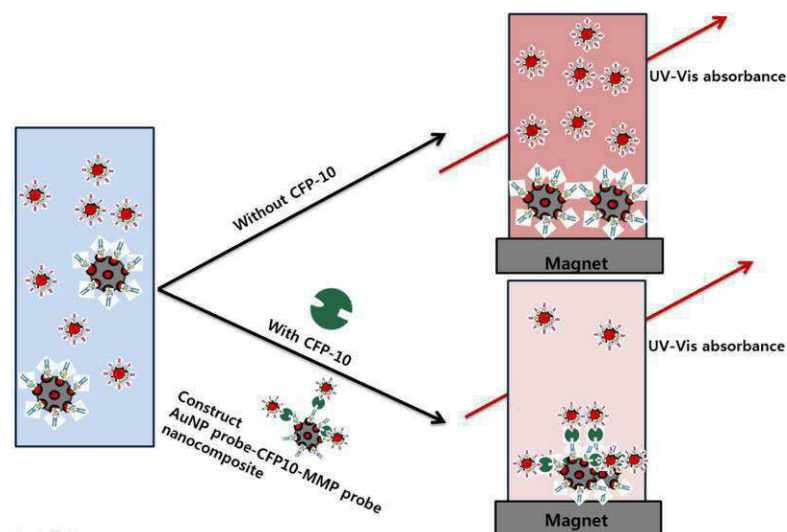
(54) 발명의 명칭 결핵균 특이항원에 대한 항체가 결합되어 있는 나노 - 바이오센서 및 이를 이용한 결핵균 검출 진단법

(57) 요약

본 발명은 나노 - 바이오센서를 이용한 결핵진단법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 결핵균 분비항원에 대한 항체가 결합되어 있는 금 나노프로브 및 자기 마이크로프로브로 구성된 나노 - 바이오센서 및 이를 이용한 결핵균 검출방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 결핵균에 대한 감염 우려가 없고, 고가의 장비가 필요없이 간편하고 효율적으로 결핵균을 검출하여 결핵을 조기에 진단할 수 있다.

대표도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A110191

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 액체배양 시스템 기반 결핵균 조기검출법 개발

기 여 율 2/3

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C0862010013

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 임상검체로부터 다중항원 검출을 통한 결핵의 신속진단법 개발

기 여 율 1/3

주관기관 중앙대학교 산학협력단

연구기간 2013.07.01 ~ 2016.07.01

명세서

청구범위

청구항 1

다음에 함유하는 결핵균 검출용 나노 - 바이오센서.

- (i) 금속 결합성 단백질이 결합된 결핵균 분비항원에 대한 항체가 고정되어 있는 금속 나노프로브; 및
- (ii) 표면에 금 클러스터 입자가 코팅되어 있는 자성 마이크로비드에 금속 결합성 단백질이 결합되어 있고, 상기 항체와 다른 에피토프를 가지는 결핵균 분비항원에 대한 항체가 결합되어 있는 자기 마이크로프로브.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 결핵균 유래 항원은 CFP - 10인 것을 특징으로 하는 결핵균 검출용 나노 - 바이오센서.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 CFP - 10의 항체는 서열번호 3 또는 5로 표시되는 중쇄와 서열번호 4 또는 6으로 표시되는 경쇄를 가지는 것을 특징으로 하는 결핵균 검출용 나노 - 바이오센서.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 금속은 금, 은, 백금, 구리 및 아연으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 결핵균 검출용 나노 - 바이오센서.

청구항 7

삭제

청구항 8

다음 단계를 포함하는 결핵균의 검출방법:

- (a) 제1항 및 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항의 나노 - 바이오센서에 결핵균 분비항원이 포함된 배양 여과액을 접촉시켜, 자기 마이크로프로브의 항체 - 결핵균 항원 - 금 나노프로브의 항체로 구성된 나노복합체를 형성시키는 단계; 및
- (b) 상기 형성된 나노복합체를 자석으로 분리한 다음, 흡광도를 측정하는 단계.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 (a)단계의 배양 여과액은 결핵균이 포함되지 않고, 결핵균 분비항원만이 포함된 것을 특

정으로 하는 결핵균의 검출방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 (b)단계 이후에 결핵균 분비항원의 존재 유무 또는 결핵균 분비항원의 농도를 분석하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 결핵균의 검출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노 - 바이오센서를 이용한 결핵진단법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 결핵균 분비항원에 대한 항체가 결합되어 있는 금 나노프로브 및 자기 마이크로프로브로 구성된 나노 - 바이오센서 및 이를 이용한 결핵균 검출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 결핵은 마이코박테리움 튜베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)의 감염으로 유발되는 질병으로, 우리나라 법정전염병 중 발병률 1위를 기록하는 병이다. 그러므로, 결핵에 감염된 것으로 의심되는 환자로부터 단기간 내에 신뢰할 수 있는 정보를 얻는, 조기 진단 및 치료가 무엇보다 중요하다.

[0003] 결핵을 진단하기 위한 통상적인 방법으로는 튜베르쿨린 피부반응검사(Tuberculin skin test, TST)법이 있으나, 특이성이 낮아 결핵 감염 여부기준에 신빙성이 감소하였다. 그러나 민감도가 높고 저렴하다는 장점으로 여전히 널리 사용되고 있다. 배양법 또한 많이 사용되고 있는데, 이는 다양한 결핵 진단방법 중 신뢰도가 가장 높은 검사로, 결핵균을 증식시켜 결핵을 확진하는 검사이다. 그러나 균을 분리하여 배양하기 때문에 실험자의 감염 위험성을 배제할 수 없으며, 균을 배양하는 데에 걸리는 시간이 최소 4 - 6주 소요되어 조기진단 할 수 없다는 단점이 있다.

[0004] 최근에는 액체 배지를 이용한 BACTEC 시스템 또는 MGIT(*Mycobacteria Growth Indicator Tube*)법이 시행되고 있다. 이러한 방법은 액체 배지를 이용함으로써 배양기간을 단축시켜, 약 2주 정도면 결핵균의 증식을 확인할 수 있지만 비정형 결핵균과 감별하기 위한 추가 확진 시험이 필요한 단점이 있다. 또한 방사선 동위원소 사용에 따른 폐기물 처리문제, 결핵균의 감염우려, 고가의 장비 필요 등의 문제점이 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 결핵균이 증식하면서 분비하는 항원을 함유하는 배양 여과액으로부터 상기 결핵균 분비항원에 대한 항체가 결합되어 있는 금 나노프로브 및 자기 마이크로프로브로 구성된 나노 - 바이오센서를 이용하여 감염우려 없이 배양액내에서 결핵균 특이항원을 검출함으로써 결핵균 증식 유무를 효율적이고 빠르게 검출할 수 있는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 결핵균 검출용 나노 - 바이오센서 및 이를 이용한 결핵균 분비항원의 검출을 통해 결핵균을 검출하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0007]

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 결핵균 분비항원에 대한 항체가 고정되어 있는 금속 나노프로브 및 상기 항체가 고정되어 있는 자기 마이크로프로브로 구성된 결핵균 검출용 나노 - 바이오센서를 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, 서열번호 3 또는 5의 아미노산 서열을 가지는 중쇄와 서열번호 4 또는 6의 아미노산 서열을 가지는 경쇄를 포함하는 CFP - 10에 대한 항체를 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, (a) 상기 나노 - 바이오센서에 결핵균 유래 항원이 함유된 배양 여과액을 접촉시켜, 자기 마이크로프로브의 항체 - 결핵균 항원 - 금 나노프로브의 항체로 구성된 나노복합체를 형성시키는 단계; 및 (b) 상기 형성된 나노복합체를 자석으로 분리한 다음, 흡광도를 측정하는 단계를 포함하는 결핵균의 검출방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 결핵균에 대한 감염 우려가 없고, 고가의 장비가 필요없이 간편하고 효율적으로 결핵균을 검출하여 결핵을 조기에 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 결핵균 배양용 실린지 필터가 장착된 50ml(위) 및 15ml(아래) 이중 실린지 필터가 장착된 결핵균 배양용 튜브(Artificial Filter Cap Tube)를 나타낸 것이다.

도 2는 결핵균 배양용 이중 실린지 필터가 장착된 튜브 50ml용 부품 구성도를 나타낸 것이다(1: 50ml 배양튜브; 2: 50ml 배양튜브캡; 3: 실린지필터; 4: 실러).

도 3은 결핵균 배양용 이중 실린지 필터가 장착된 튜브 50ml용 조립 상태 및 배양 튜브캡의 확대도를 나타낸 것이다(A: 리브; B: 실린지 필터 조립부).

도 4는 폐닝과정에 따른 과지항체의 CFP - 10에 대한 결합력을 나타낸 것이다.

도 5는 CFP - 10 항원 또는 anti - myc 항체를 이용한 ELISA 분석을 나타낸 것이다. {(a): CFP - 10 ELISA, (b): c - myc ELISA}

도 6은 선별된 항체의 서열을 분석한 것이다. {(a): CFP - 10[G2] 서열분석; (b): CFP - 10[G3] 서열분석}

도 7은 샌드위치 ELISA를 통한 항원 검출능력을 나타낸 것이다.

도 8은 자기영동 면역분석법을 이용한 배양액 내의 표적항원 탐지에 대한 개념도를 나타낸 것이다.

도 9는 자기영동 면역분석법과 BACTEC MGIT 배양 시스템과의 비교시험 결과를 통한 AFT(Artificial Filter Cap Tube) 배양 성능 테스트 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0014] 나아가, 도면에서의 다양한 요소와 영역은 개략적으로 그려진 것이다. 따라서, 본 발명의 기술적 사상은 첨부한 도면에 그려진 상대적인 크기나 간격에 의해 제한되지 않는다.

[0015] 본 명세서에서 전체적으로, 용어 AFT(Artificial filter cap tube)는 이중 실린지 필터가 장착된 결핵균 배양용 튜브를 의미한다.

[0016] 본 발명은 일 관점에서, 결핵균 분비항원에 대한 항체가 고정되어 있는 금속 나노프로브 및 상기 항체가 고정되어 있는 자기 마이크로프로브를 함유하는 결핵균 검출용 나노 - 바이오센서에 관한 것이다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에서는 공지된 상온합성법으로 합성된 금 나노입자에 금 결합성 단백질(gold binding protein)이 결합된 항체를 부착하였고, 자기 마이크로프로브에도 상기 항체를 부착하기 위하여 금속 클러스터를 표면에 붙인 후 결핵균 분비항원에 대한 항체를 부착하였다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 항체는 결핵균에 특이적인 항체이고, 바람직하게는 CFP - 10에 대한 항체인 것을 특징으

로 할 수 있으며, 상기 CFP - 10에 대한 항체는 서열번호 3 또는 5로 표시되는 중쇄와 서열번호 4 또는 6으로 표시되는 경쇄를 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 금속은 금, 은, 백금, 구리 및 아연으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있고, 금을 사용하는 것이 바람직하다.

[0020] 본 발명은 다른 관점에서, 서열번호 3 또는 5의 아미노산 서열을 가지는 중쇄와 서열번호 4 또는 6의 아미노산 서열을 가지는 경쇄를 포함하는 CFP - 10에 대한 항체에 관한 것이다.

[0021] 본 발명의 다른 실시예에서는 CFP - 10 항원에 대한 파지항체를 인간항체 - 파지 라이브러리를 이용하여 선별하였고, 3회의 패닝(panning)으로 결합력이 높은 것을 선별하여 항원인식부위의 서열을 분석하고 항원과의 결합력을 분석하여 최종적으로 2종의 항체를 수득하였다.

[0022] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 나노 - 바이오센서에 결핵균 분비항원이 포함된 배양 여과액을 접촉시켜, 자기 마이크로프로브의 항체 - 결핵균 항원 - 금 나노프로브의 항체로 구성된 나노복합체를 형성시키는 단계; 및 (b) 상기 형성된 나노복합체를 자석으로 분리한 다음, 흡광도를 측정하는 단계를 포함하는 결핵균의 검출방법에 관한 것이다.

[0023] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 충남대학교병원으로부터 제공받은 임상환자의 객담 검체 샘플을 이용하여 결핵진 단테스트를 실시하였다. 샘플이 양성을 나타내는 시기가 다르기 때문에, 상용화되어 사용되고 있는 MGIT에 동시 배양을 실시하였다. 즉, MGIT에서 양성반응이 확인되면, 이중 실린지 필터가 장착된 결핵균 배양용 튜브에서의 배양도 멈추고 샘플링을 실시하였으며, 분비된 결핵균 특이항원을 자기영동 면역분석법으로 분석하였다. 이때 상기 샘플링한 배양 여과액은 결핵균이 포함되지 않고, 결핵항원이 포함된 것을 특징으로 한다.

[0024] 먼저 배양 여과액을 회석하여 결핵균 분비항원에 대한 항체가 결합되어 있는 자기 마이크로프로브와 반응시킨 후, 상기 항체가 결합되어 있는 금 나노프로브와 반응하도록 첨가하여 샌드위치 구조의 나노복합체를 형성하였다. 반응용기 바닥에 자석을 대어 나노복합체를 분리한 후, 흡광도 측정하였다. 흡광도 측정은 복합체를 형성하지 않은 금 나노프로브를 측정한 것이며, 10개의 검체를 분석한 결과, 민감도 80%, 특이도 100%를 나타내었다.

[0025] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0026] 실시예 1: 이중 실린지 필터가 장착된 결핵균 배양용 튜브 제작

[0027] 결핵균 배양을 위한 50ml 및 15ml 일회용 이중 실린지 필터가 장착된 결핵균 배양용 튜브(Artificial filter cap tube, AFT)를 제작하였다. 배양 튜브는 상용화된 부품을 그대로 사용하였고, 캡만 신규로 디자인하여 제작하였다(도 1).

[0028] 제작된 배양 튜브는 샘플링시 결핵균의 분비된 항원만을 수득하기 위한 상등액을 얻고자 결핵균 제거를 위한 실린지 필터만 교환해 주면 반복적으로 샘플링이 가능하도록 설계 및 제작하였다.

[0029] 1 - 1: 50ml 튜브 제작

[0030] 도 1에 나타난 바와 같이, 배양 튜브와 실린지 필터(syringe filter)사이에 밀봉 부분을 추가하여 누수성을 개선하였고(도 2), 실린지 필터를 배양 튜브캡이 지지할 수 있도록 "A"표시 리브를 3개소 추가하였다. 또한 실린지 필터의 외경(30.3mm)은 배양 튜브캡 나사의 골지름(292.66mm)보다 크기 때문에, 나사부를 강제 압입으로 통과하여, 배양 튜브캡의 실린지필터 조립부("B"로 표시)는 실린지필터 외경과 같게하여 억지로 끼워맞춤 상태를 유지하였다(도 3).

[0031] 1 - 2: 15ml 튜브 제작

[0032] 15ml 배양 튜브를 사용하였으며, 튜브캡 나사의 골지름(17.3mm)과 실린지 필터의 외경이 다른 것(17.1mm)을 제외하고는 실시예 1 - 1과 동일하게 실시하여 15ml 튜브를 제작하였다.

[0033] 실시예 2: 결핵균 항원 CFP - 10의 재조합단백질 생산과 정제

[0034] 재조합 항원 CFP - 10을 생산하기 위하여, *M. tuberculosis*의 유전체 DNA를 주형으로 하여, CFP - 10 - F'(서열번호 1) 및 과 CFP - 10 - R'(서열번호 2)를 이용하여 PCR반응을 수행하여 유전자를 증폭시켰다(Shin *et al.*, *Clin. Vaccine Immunol.*, 15:1788, 2008):

[0035] [서열번호 1] CFP - 10 - F - 5' - GGCCGGGGATCCATGGCAGAGATGAAGACCG - 3' BamHI

[0036] [서열번호 2] CFP - 10 - R' - 5' - GGCCGGGAATTCGAAGCCCATTTGCGAGGAC - 3' EcoRI

[0037] (밑줄 친 부분은 제한효소 부위를 나타낸다).

[0038] 증폭한 PCR 산물은 제한효소 BamHI과 EcoRI을 이용하여 절단하고 pET28a(노바젠, Gibbstown, 미국)의 BamHI / EcoRI 위치에 삽입하였다. 재조합 플라스미드는 *Escherichia coli* BL21(DE3)에 형질전환시킨 후, 37°C에서 OD₆₀₀ 값이 0.4 내지 0.5가 되는 시점에서 최종농도 1mM이 되도록 이소프로필 - β - D - 티오갈락토피라노사이드(isopropyl - β - D - thiogalactopyranoside, IPTG)를 첨가하여 과발현을 유도하였다. 배양액을 원심분리하여 배양된 대장균 세포를 모으고 20mM Tris - HCl 버퍼(pH 8.0, 0.5M NaCl, 20mM 이미다졸(imidazole) 및 1mM 페닐 메틸설포닐 플루오라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)로 현탁시켰다. 그 후, 음파처리하여 세포를 파쇄하고 니켈 - NTA(nickel - nitrilotriacetic acid, Ni - NTA) 아가로스 크로마토그래피법(인비트로젠, Carlsbad, 미국)으로 정제하였다.

[0039] 실시예 3: CFP - 10 항원에 대한 항체 선별 및 생산

[0040] 3 - 1: 항체 스크리닝

[0041] CFP - 10 항원에 대한 파지 항체는 인간항체 - 파지 라이브러리를 이용하여 선별하였다(Hong *et al.*, *Sens. Actuat. B - Chem.*, 156:271, 2011). 면역튜브(Immunotube)에 10μg / ml의 농도의 CFP - 10 항원을 2ml을 코팅하였고, 코팅된 항원에 라이브러리를 반응시켜 초기 결합 파지를 선별하는 바이오패닝(Biopanning)에서 투여된 라이브러리 내 파지의 총수는 약 2×10¹³ CFU로 사용하였다. 비특이적 파지의 제거를 위해 10회의 세척과정 후에 남아있는 파지를 XL - 1Blue 대장균주에 감염시켜 파지를 증폭한 후 1차 sub - 라이브러리를 얻었으며, sub - 라이브러리를 이용한 항원 - 파지 반응 및 검색 과정을 총 3회 실시하였다.

[0042] 파지 항체(polyclones)가 CFP - 10 항원을 인식하는지 여부를 확인하기 위하여 CFP - 10 항원 또는 anti - myc 항체를 코팅한 플레이트(plate)에 제조된 파지를 반응시키고 ELISA 분석을 실시하였다(도 5). 가해진 파지항체의 수를 나타내는 myc 분석치는 유사하게 나타나고 있고, 이 파지항체들이 CFP - 10에 대하여 보이는 결합력은 3회 패닝(panning)과정 동안 급격히 증가함을 알 수 있었으며, 3차 패닝(panning)에서 높은 결합력을 보이는 것을 확인하였다(도 4).

[0043] 96개의 단일클론을 선택하여 분석한 결과 높은 비율로 CFP - 10에 결합하는 항체들을 확인하였으며, 이중 시그널이 강한 모노파지(monophage) 65종의 서열을 분석하였고, 각 모노파지(monophage)의 항원인식부위의 서열을 분석하고 항원과의 결합력을 분석하여 최종적으로 2종의 항체를 선별 및 서열을 분석하였다.

[0044] 그 결과, 선별된 CFP - 10에 대한 항체는 CFP - 10[G2]_{HC}와 (서열번호 3)의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄와 CFP - 10[G2]_{LC}(서열번호 4)의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄로 구성되는 항체(도 6의 (a)) 및 CFP - 10[G3]_{HC}(서열번호 5)의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄와 CFP - 10[G3]_{LC}(서열번호 6)의 아미노산 서열로 표시되는 중쇄로 구성되는 항체(도 6의 (b))인 것을 확인하였다. 또한, 상기 중쇄 CFP - 10[G2]_{HC}(서열번호 3)의 가변부위는 서열번호 7의 아미노산 서열로 구성된 CDR1 부위, 서열번호 8의 아미노산 서열로 구성된 CDR2 부위, 서열번호 9의 아미노산 서열로 구성된 CDR3 부위를 포함하고, 상기 경쇄 CFP - 10[G2]_{LC}(서열번호 4)의 가변부위는 서열번호 10의 아미노산 서열로 구성된 CDR1 부위, 서열번호 11의 아미노산 서열로 구성된 CDR2 부위, 서열번호 12의 아미노산 서열로 구성된 CDR3 부위를 포함하고, 상기 중쇄 CFP - 10[G3]_{HC}(서열번호 5)의 가변부위는 서열번호 13의 아미노산 서열로 구성된 CDR1 부위, 서열번호 14의 아미노산 서열로 구성된 CDR2 부위, 서열번호 15의 아미노산 서열로 구성된 CDR3 부위를 포함하고 상기 경쇄 CFP - 10[G3]_{LC}(서열번호 6)의 가변부위는 서열번호 16의 아미노산 서열로 구성된 CDR1 부위, 서열번호 17의 아미노산 서열로 구성된 CDR2 부위, 서열번호 18

의 아미노산 서열로 구성된 CDR3 부위를 포함하는 것으로 분석하였다(도 6).

3-2: 항원 - 항체 반응 테스트

항원 검출능력은 샌드위치(sandwich) ELISA로 분석하였다. anti - CFP - 10 항체는 2000배로 코팅버퍼(coating buffer)에 희석하여 ELISA 플레이트에 부착하였고, 블리킹(blocking)한 후, 해당 항원을 첨가하여 반응을 유도하였다. 검출항체는 충남대학교 의과대학에서 생산한 rabbit anti - CFP - 10 항체를 사용하였고, anti - CFP - 10 항체를 포획 항체(capture antibody)로 사용할 때 더 낮은 농도를 검출할 수 있음을 확인하였다(도 7).

3-3: 실제 샘플을 이용한 항원 - 항체 반응 테스트

개발한 항체의 특이성을 측정하기 위해서 BCG, *M. avium* complex 를 비롯한 Mycobacteria의 배양액에 존재하는 항원을 검출한 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 결핵균 배양액에서만 CFP - 10 항원이 특이적으로 검출된 것을 확인하였다.

표 1

[CFP-10항원에 대한 항체 특이성]

Mycobacteria	ELISA OD value for Anti-CFP-10
<i>M. tuberculosis</i> CF	0.2359
<i>M. avium</i> CF	0.0557
<i>M. kansasii</i> CF	0.0427
BCG CF	0.0369
<i>M. intracellulare</i> CF	0.0583
<i>M. abscessus</i> CF	0.0380

실시예 4: 금 나노프로브 제조 및 자기 마이크로프로브 제조

4-1: 금 나노프로브 제조

파이토 케미칼(phytochemicals)을 환원제로 이용한 상온합성법으로 직경 25nm의 금 나노입자를 제조하였다(특허 출원번호: 10-2009-0104313, J.W Lee *et al.*, *J. Mater. Chem.*, 21:13316, 2011). 사염화금산(HAuCl₄ · 3H₂O, 1mM)을 증류수 20ml에 녹여 염화금산 용액을 제조하고, 0.01M의 갈산용액(Gallic acid)에 이소플라본(Isoflavon) 10mg을 녹인 파이토 케미칼 혼합용액을 제조하였다. 상기 염화금산 용액을 교반하면서, 파이토 케미칼 혼합용액 300μl를 첨가하여 2시간 동안 교반하여 금 나노입자를 제작하였다.

상기 금 나노입자 용액 7.5ml에 금 결합성 단백질(Gold Binding Protein, GBP)이 결합된 상기 CFP - 10[G2] 항체(32μg / ml) 100μl를 넣고 혼합한 후, 37℃에서 100rpm으로 30분간 부드럽게 교반하여 항체가 코팅된 금 나노입자를 제조하였다. 몽침현상 및 비특이적 흡착을 막기 위하여 BSA용액(1mg / ml) 700μl을 섞어준 후, 다시 37℃에서 100rpm으로 1시간 동안 교반하였다.

4-2: 자기 마이크로프로브 제조

금 결합성 단백질(gold binding protein)이 결합된 항체를 마이크로 비드의 표면에 코팅하기 위하여 자기 마이크로프로브의 표면에 금 클러스터 입자를 붙였다. 마이크로 비드(인비트로젠, Carlsbad, 미국) 300μl(10mg /

ml)를 자기 분리시켜 반응 용기의 벽에 모으고, 같은 부피의 0.01M PBS 완충액(pH 7.4)으로 세척해주는 과정을 3회 반복하였다. 세척한 비드에 실시예 2에서 제작한 파이트 케미칼 혼합용액 300 μ l를 넣고, 20분간 초음파처리한 후, 1.27mM의 염화금산 용액 2ml를 첨가하고, 다시 20분간 초음파 처리하였고, 3회의 세척과정을 끝으로 금 클러스터(cluster)가 붙은 자기 마이크로 비드를 제작하였다. 상기 마이크로 비드는 1ml의 PBS용액에 재현탁 시키고, 금 결합성 단백질(Gold Binding Protein, GBP)이 결합된 상기 anti - CFP - 10[G3]항체(0.255mg / ml) 100 μ l를 넣고 혼합한 후, 37℃에서 100rpm으로 부드럽게 교반하였다. 마이크로 비드의 표면에 붙은 금 클러스터에 고정화되지 않은 항체를 제거하기 위하여, 3회 세척하였고, 비특이적 흡착을 방지하기 위하여 BSA용액(1mg / ml) 1ml를 첨가하였다. 다시 3회 세척하여 BSA를 제거한 후, 8ml의 PBS용액에 재분산하였다.

[0056] 실시예 5. 나노 - 바이오센서를 이용한 자기영동 면역반응과 이를 이용한 CFP - 10 항원의 검출

[0057] 실시예 4 - 2에서 제작한 자기 마이크로프로브(0.375mg / ml, 2.62~4.50 $\times 10^8$ 비드 / ml) 500 μ l와 결핵균 배양 희석액 150 μ l(배양액: PBS용액을 1:2로 희석한 것)를 반응용기에 넣은 후, 실시예 4-1에서 제작한 금 나노프로브(~4.25 $\times 10^{11}$ 입자/ml) 500 μ l를 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 천천히 교반하였다.

[0058] 반응용기 내에서는 면역반응에 의해 하나의 자기 마이크로프로브에 다수의 CFP - 10 표적항원과 금 나노프로브가 샌드위치 구조로 결합한 나노복합체가 형성되며, 나노복합체의 수는 넣어준 CFP - 10 항원의 정량에 비례하게 된다. 반응용기 바닥에 자석을 대어 형성된 나노복합체(금 나노프로브 - CFP - 10 항원 - 자기 마이크로프로브)를 분리하였고, 남아있는 금 나노프로브를 자외선 - 가시광선 분광기(UV - vis spectrometer)를 이용하여 흡광도를 측정하여 농도를 분석하였다(도 8).

[0059] 실시예 6. 이중 실린지 필터가 장착된 결핵균 배양용 튜브(Artificial filter cap tube)와 자기영동 면역분석법을 이용한 결핵진단테스트

[0060] 결핵진단테스트를 위하여 임상환자의 객담 검체 샘플을 MGIT(Mycobacterium growth indicator tube) 및 실시예 1에서 제작한 이중 실린지 필터가 장착된 결핵균 배양용 튜브(Artificial filter cap tube, AFT)에 동시 배양하였다. 이때, MGIT 배양기의 결과는 각 샘플이 양성을 나타내는 시기가 다르기 때문에 그 시기를 지정해 주기 위함이다. 즉, MGIT에서 양성반응이 확인되면, AFT 배양기의 샘플도 배양을 멈추고 샘플링을 하였고, 배양액 내 균들이 잘 배양되어 분비한 결핵균 특이항원 CFP - 10을 자기영동 면역분석법으로 분석하였다.

[0061] 객담 검체의 전처리는 4% NaOH를 객담의 2 - 3배 부피로 첨가 후 점성이 사라질때까지 불택성하였고, 멸균된 PBS로 세척 후 원심분리(4,000rpm, 4℃, 20분)하여 수득한 펠렛(pellet)을 PBS로 재 희석시키는 방법으로 진행하였다.

[0062] 액체 배양 검사는 MGIT 960 system을 이용하여 진행하였으며, MGIT에 7H9 브로스(broth) 7ml과 MGIT 보충물, PANTA 혼합물 800 μ l를 첨가하고, 객담 전처리 샘플을 500 μ l접종하여 배양을 하였다. AFT에서의 배양은 MGIT로부터 브로스 배지(broth media)를 AFT에 옮겨담고, MGIT 보충물과 PANTA 혼합물 800 μ l를 첨가한 후 객담 전처리 샘플 및 대조군(멸균된 PBS 1X)을 각 500 μ l씩 접종하여 진행하였다. 그 후, 샘플을 취하여 필터를 이용해 배양 여과액을 얻은 후 자기영동 면역분석법으로 진단하였고, 그 결과 MGIT 양성 판독 결과와 비교하였다.

[0063] 10개의 검체를 배양하였으며, 검체는 5개의 결핵균(Mycobacterium Tuberculosis, Mtb) 및 5개의 비결핵 항산균(Non - Tuberculosis Mycobacteria, NTM) 판정샘플로 구성하였다. 표 2과 도 9에 나타난 바와 같이, 10개의 임상 검체를 통한 비교 분석에서 자기영동 면역분석법에 대한 진단은 민감도 80%, 특이도 100%를 나타내었다.

표 2

[자기영동 면역분석 진단결과]

자기영동 면역분석 진단 결과 (검체 수)	접종 균주 (전체 검체 = 10)	
	Mtb	NTM
양성	4	0
음성	1	5
전체	5	5

[0064]

[0065]

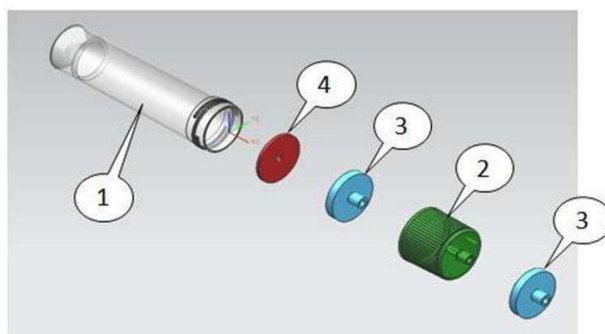
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

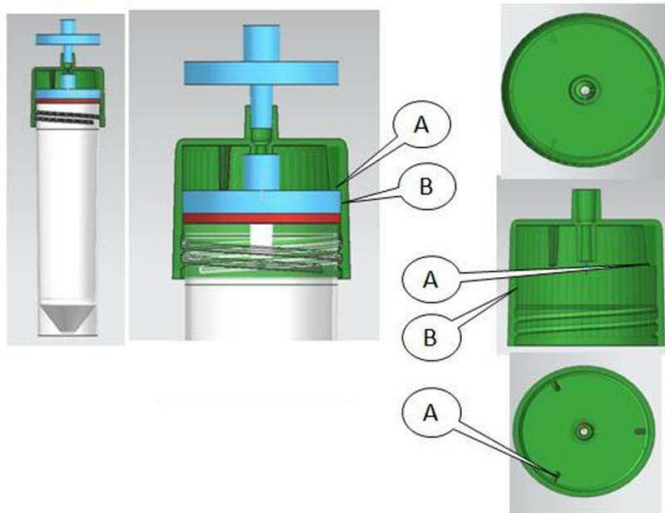
도면1



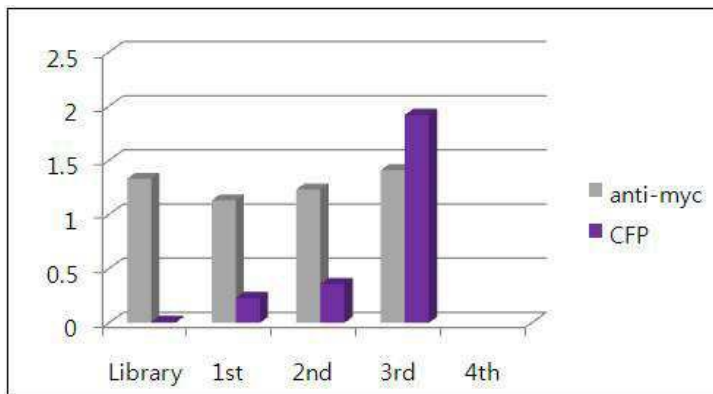
도면2



도면3



도면4

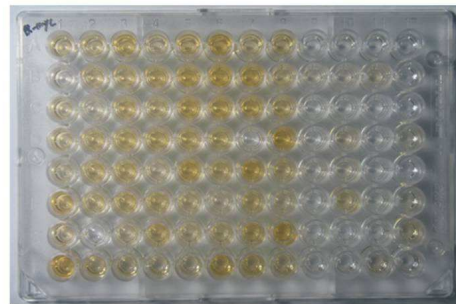


도면5

(a)

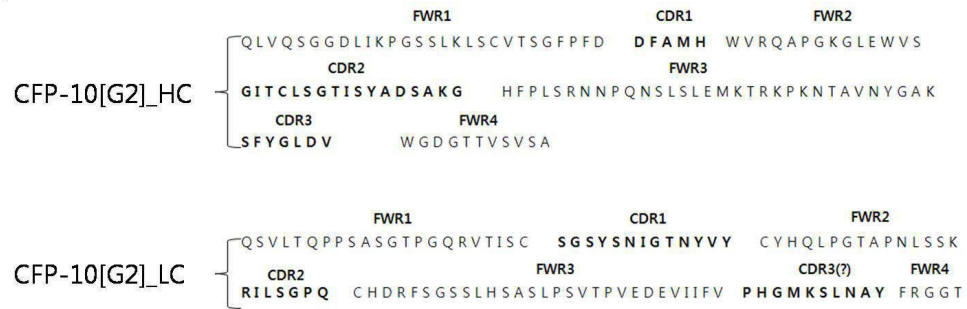


(b)



도면6

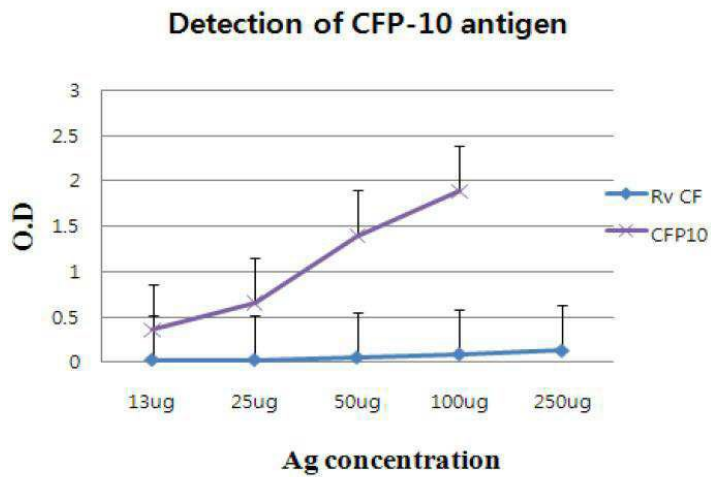
(a)



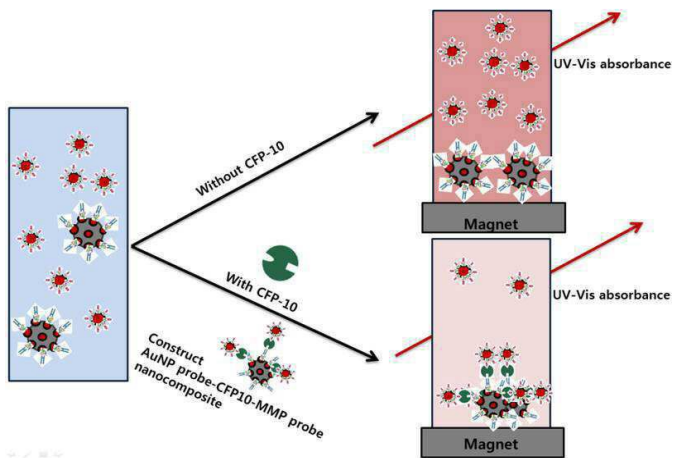
(b)



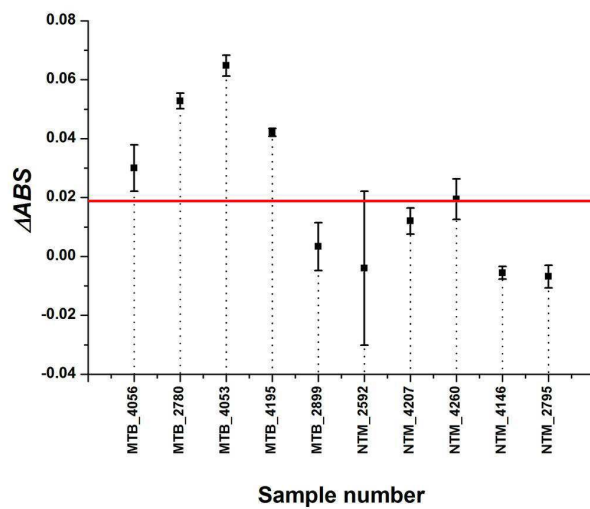
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> ChungNam University Industry academic cooperation foundation
 Chung-Ang University Industry academic cooperation foundation
 PuSan University Industry academic cooperation foundation
- <120> Nano biosensor bound with antibody against Mycobacterium tuberculosis specific antigen and Method for Detecting Mycobacterium tuberculosis Using the Same

<130> P14-B056

<160> 6

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> CFP-10-F'

<400> 1

ggccggggat ccatggcaga gatgaagacc g

31

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> CFP-10-R'

<400> 2

ggccggggaat tcgaagccca ttgcgagga c

31

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> CFP-10[G2]_HC

<400> 3

Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Asp Leu Ile Lys Pro Gly Ser Ser Leu

1 5 10 15

Lys Leu Ser Cys Val Thr Ser Gly Phe Pro Phe Asp Asp Phe Ala Met

20 25 30

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly

35 40 45

Ile Thr Cys Leu Ser Gly Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Ala Lys Gly

50 55 60

His Phe Pro Leu Ser Arg Asn Asn Pro Gln Asn Ser Leu Ser Leu Glu

65 70 75 80

Met Lys Thr Arg Lys Pro Lys Asn Thr Ala Val Asn Tyr Gly Ala Lys

85 90 95

Ser Phe Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Asp Gly Thr Thr Val Ser Val
 100 105 110

Ser Ala

<210> 4

<211> 101

<212> PRT

<213> CFP-10[G2]_LC

<400> 4

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Tyr Ser Asn Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Tyr Val Tyr Cys Tyr His Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Asn Leu Ser
 35 40 45

Ser Lys Arg Ile Leu Ser Gly Pro Gln Cys His Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Ser Leu His Ser Ala Ser Leu Pro Ser Val Thr Pro Val Glu Asp
 65 70 75 80

Glu Val Ile Ile Phe Val Pro His Gly Met Lys Ser Leu Asn Ala Tyr
 85 90 95

Phe Arg Gly Gly Thr
 100

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> CFP-10[G3]_HC

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
Ala Phe Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Gly Ile Ala Asp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser

115

<210> 6

<211> 97

<212> PRT

<213> CFP-10[G3]_LC

<400> 6

Leu Thr His Leu Pro Ser Thr Ser Gly Thr Pro Glu Gln Arg Val Ile

1 5 10 15
Met Ser Cys Ser Gly Ser Ala Pro Asp Arg Ile Tyr Thr Val Asn Trp

20 25 30

Tyr Leu Arg Ser Arg Thr Gly Pro Leu Thr Pro His Leu Ser Asn Asn

35 40 45

Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly

50 55 60

Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala

65 70 75 80

Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Phe Gly Gln

85 90 95

Gly