



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월16일
(11) 등록번호 10-2021663
(24) 등록일자 2019년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56983 (2013.01)
G01N 21/78 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0124227
(22) 출원일자 2017년09월26일
심사청구일자 2017년09월26일
(65) 공개번호 10-2019-0035235
(43) 공개일자 2019년04월03일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110124489 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
부산대학교 산학협력단
부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2 (장전동, 부산대학교)
(72) 발명자
이재범
경기도 화성시 동탄순환대로21길 54, 1331동 204호 (청계동, 동탄2신도시 센트럴 푸르지오)
오상진
대구광역시 동구 호반길 17(방촌동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
남건필, 박종수, 차상윤

전체 청구항 수 : 총 7 항

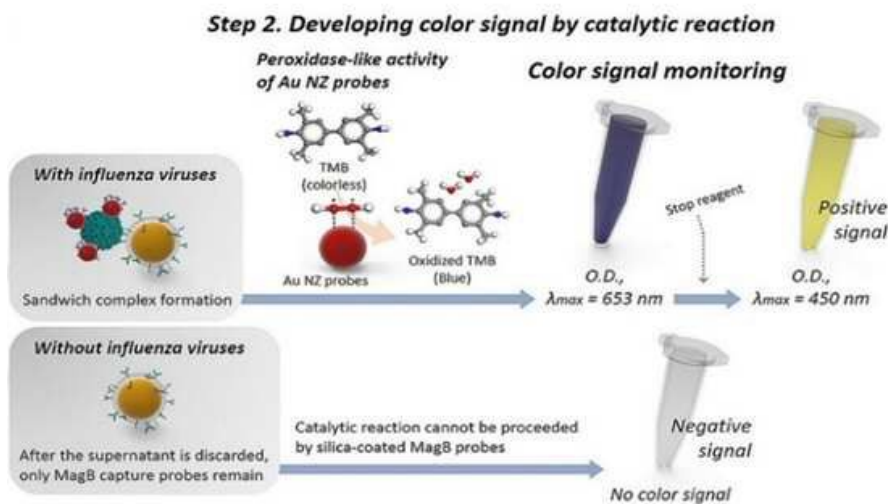
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법

(57) 요약

본 발명의 자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법은 과산화효소-유사 활성을 갖는 금속 나노입자의 표면에 항체들이 결합된 구조를 갖는 나노자임과, 자성비드를 코어로 하고 표면에 항체들이 결합된 자성 구조체를, 미지의 진단 시료와 혼합하는 단계; 진단 시료, 나노자임 및 자성 구조체를 포함하는 혼합물에서, 자성체를 이용하여 자성 구조체를 포함하는 분석 시료를 분리하는 단계; 및 분리된 분석 시료에 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 및 과산화수소를 혼합하여, 나노자임의 금속 나노입자가 TMB의 산화반응을 일으켜 유색을 나타내는 경우 진단 시료에 타겟 물질이 포함되어 있고, TMB가 고유의 무색을 나타내는 경우 진단 시료에 타겟 물질이 미포함 됨으로 판별하는 단계를 포함한다.

대표도 - 도4



- (52) CPC특허분류
G01N 33/54326 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
G01N 33/553 (2013.01)
G01N 2333/11 (2013.01)
- (72) 발명자
김정효
 부산광역시 동래구 명안로18번길 129-5(안락동)
좌반판
 경상남도 밀양시 삼랑진읍 삼랑진로 1268-50
- (56) 선행기술조사문헌
 KR1020150001375 A
 KR1020170034504 A
 EP03096140 A1*
 Shasha Wang et al, Anal Bioanal Chem (2016), vol. 408, pp. 1015-1022.
 Lizeng Gao et al, Nature Nanotechnology (2007), vol. 2, pp. 577-583.
 Yujun Song et al, Advanced Materials (2010), vol. 22, pp. 2206-2210.
 Huimin Jia et al, Nanoscale (2016), vol. 8, pp. 5938-5945.
 Syed Rahin Ahmed et al, Scientific Reports (2017.03.), 7:44495 | DOI: 10.1038/srep44495, pp. 1-11.
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016012072
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	마그네토플라즈모닉 나노입자 기반 항원 직접검출 현장진단형 결핵 진단키트 및 기기 개발
연구과제명	중견연구자지원사업
기 여 율	1/1
주관기관	밀양캠퍼스 산학협력본부
연구기간	2017.06.01 ~ 2018.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

용액 내에서, 과산화효소-유사 활성을 갖는 금속 나노입자의 표면에 항체들이 결합된 구조를 갖는 나노자임과, 자성비드를 코어로 하고 표면에 TMB와 반응하지 않도록 하는 활성 블로킹 코팅층을 포함하고 상기 블로킹 코팅층 표면에 항체들이 결합된 자성 구조체를, 미지의 진단 시료와 혼합하는 단계;

상기 진단 시료, 상기 나노자임 및 상기 자성 구조체를 포함하는 혼합물에서, 자성체를 이용하여 자성 구조체를 포함하는 분석 시료를 분리하는 단계; 및

분리된 분석 시료에 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 및 과산화수소를 혼합하여, 나노자임의 금속 나노입자가 TMB의 산화반응을 일으켜 유색을 나타내는 경우 진단 시료에 타겟 물질이 포함되어 있고, TMB가 고유의 무색을 나타내는 경우 진단 시료에 타겟 물질이 미포함 됨으로 판별하는 단계를 포함하고,

상기 진단 시료에 타겟 물질이 포함된 경우,

상기 분석 시료에는 상기 자성 구조체가 상기 타겟 물질을 매개로 하여 나노자임과 연결된 샌드위치 구조의 복합체가 포함되고, 상기 복합체에 포함된 나노자임의 금속 나노입자에 의해서 TMB가 산화되어 유색을 나타내며,

상기 진단 시료에 타겟 물질이 불포함된 경우,

상기 분석 시료에는 독립된 자성 구조체가 포함되고, 상기 자성 구조체는 상기 활성 블로킹층에 의해 효소유사 활성이 차단되어 TMB의 산화 반응이 일어나지 않고 TMB가 고유의 무색을 나타내는 것을 특징으로 하는,

자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 자성비드는

철(Fe), 코발트(Co), 니켈(Ni), 산화철, 산화코발트 및 산화니켈 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는,

자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 활성 블로킹층은

3-아미노프로필트리메톡시실란(3-aminopropyltrimethoxysilane, APTMS), 테트라에틸 오르토실리케이트(Tetraethyl orthosilicate, TEOS), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 덱스트란(dextran),

BSA(bovine serum albumin), 폴리에틸렌글리콜 실란[poly(ethylene glycol) silane] 및 실리카 중에서 선택된 적어도 어느 하나로 형성된 것을 특징으로 하는,

자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 자성비드는 산화철(Fe_3O_4)로 이루어지고,

상기 활성 블로킹층은 테트라에틸 오르소실리케이트(Tetraethyl orthosilicate, TEOS)로 형성된 것을 특징으로 하는,

자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 자성비드는 100 nm 내지 10 μ m의 크기를 갖는 것을 특징으로 하는,

자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 타겟 물질은 인플루엔자 바이러스인 것을 특징으로 하는,

자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 금속 나노입자는

백금(Pt), 금(Au), 은(Ag), 팔라듐(Pd), 루테튬(Ru), 로듐(Rh) 구리(Cu), 니켈(Ni), 철(Fe), 아연(Zn) 및 코발트 (Co) 중 선택된 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는,

자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 초민감도 비색계 센싱 시스템에서 자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질(protein)을 감지하는 기술은 의료 분야에서 질병 진단을 위해 중요한 기술이다. 특히, 보균자나 비보균자를 구분하거나, 감염 질병의 조기 진단, 병의 진행률 등을 알기 위해서는 체내에 미량으로 존재하는 단백질 바이오 마커를 감지할 수 있는, 민감도가 높고 선택성 또한 높은 진단 방법이 필요하다. 단백질의 감지를 위해서 효소 면역 측정법이 가장 널리 알려져 있다. 효소 면역 측정법은 과정이 매우 간편하고 많은 연구가 진행되어 있는 반면에, 다원 표적 분석이 어렵고, 비교적 민감도, 재현성이 낮은 단점이 있다. 효소 면역 측정법의 단점인 낮은 민감도를 개선하기 위해서, DNA로 개질된 항체를 이용하거나 리포솜(liposome)이 이용된 immune-

PCR/liposome-PCR assay등이 개발되었고, 이들은 고민감도/다중항원 탐지 등이 가능하지만 과정이 복잡하고 비효율적인 단점이 있다.

[0003] 최근 들어, 많은 과학자들이 질병의 검출 및 진단을 위해서 나노물질들을 응용에 대한 관심이 높아지고 있다. 예를 들어, 다양한 나노 물질들의 모양, 크기에 따른 과학적, 전기전도성, 형광 특성 및 자성 특성 등을 이용하여 분석하고자 하는 바이오마커의 결합 반응을 전기화학, 형광, 발색, SPR 등 다양한 물리화학적 방법으로 표적 질병을 검출하고 진단하는 연구들이 진행되고 있으며, 이들 또한 초고민감도/선택성으로 검출하는 것을 목표로 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 일 목적은 새로운 플랫폼을 갖는 고감도 및 고선택성의 자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 목적을 위한 자성비드 기반의 효소 모방 나노자임을 이용한 타겟 물질의 검출 방법은 과산화효소-유사 활성을 갖는 금속 나노입자의 표면에 항체들이 결합된 구조를 갖는 나노자임과, 자성비드를 코어로 하고 표면에 항체들이 결합된 자성 구조체를, 미지의 진단 시료와 혼합하는 단계; 상기 진단 시료, 상기 나노자임 및 상기 자성 구조체를 포함하는 혼합물에서, 자성체를 이용하여 자성 구조체를 포함하는 분석 시료를 분리하는 단계; 및 분리된 분석 시료에 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 및 과산화수소를 혼합하여, 나노자임의 금속 나노입자가 TMB의 산화반응을 일으켜 유색을 나타내는 경우 진단 시료에 타겟 물질이 포함되어 있고, TMB가 고유의 무색을 나타내는 경우 진단 시료에 타겟 물질이 미포함 됨으로 판별하는 단계를 포함한다.

[0006] 일 실시예에서, 상기 진단 시료에 타겟 물질이 포함된 경우, 상기 분석 시료에는 상기 자성 구조체가 상기 타겟 물질을 매개로 하여 나노자임과 연결된 샌드위치 구조의 복합체가 포함되고, 상기 복합체에 포함된 나노자임의 금속 나노입자에 의해서 TMB가 산화될 수 있다.

[0007] 일 실시예에서, 상기 자성비드는 과산화효소-유사 활성을 갖고, 상기 자성 구조체는 상기 자성비드의 표면에 코팅된 활성 블로킹층을 더 포함하며, 상기 자성 구조체의 항체들은 상기 활성 블로킹층의 표면에 결합될 수 있다. 이때, 상기 진단 시료에 타겟 물질이 불포함된 경우, 상기 분석 시료에는 독립된 자성 구조체가 포함되고, 상기 자성 구조체는 상기 활성 블로킹층에 의해 과산화효소-유사 활성이 차단되어 TMB의 산화 반응이 일어나지 않고 TMB가 고유의 무색을 나타낼 수 있다.

[0008] 일 실시예에서, 상기 자성비드는 철(Fe), 코발트(Co), 니켈(Ni), 산화철, 산화코발트 및 산화니켈 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0009] 일 실시예에서, 상기 활성 블로킹층은 3-아미노프로필트리메톡시실란(3-aminopropyltrimethoxysilane, APTMS), 테트라에틸 오르토실리케이트(Tetraethyl orthosilicate, TEOS), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 덱스트란(dextran), BSA(bovine serum albumin), 폴리에틸렌글리콜 실란[poly(ethylene glycol) silane] 및 실리카 중에서 선택된 적어도 어느 하나로 형성될 수 있다.

[0010] 일 실시예에서, 상기 자성비드는 산화철(Fe₃O₄)로 이루어지고, 상기 활성 블로킹층은 테트라에틸 오르토실리케이트(Tetraethyl orthosilicate, TEOS)로 형성된 것일 수 있다.

[0011] 일 실시예에서, 상기 자성비드는 100 nm 내지 10 μm의 크기를 가질 수 있다.

[0012] 일 실시예에서, 상기 타겟 물질은 인플루엔자 바이러스일 수 있다.

[0013] 일 실시예에서, 상기 금속 나노입자는 백금(Pt), 금(Au), 은(Ag), 팔라듐(Pd), 루테튬(Ru), 로듐(Rh) 구리(Cu), 니켈(Ni), 철(Fe), 아연(Zn) 및 코발트(Co) 중 선택된 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0014] 상기에서 설명한 본 발명에 따르면, 기존 방법에 비해 간단히 항체로 표면 개질된 자성비드, 금속 나노입자와

표적 질병의 항원 혹은 바이러스를 반응 용기에 넣은 뒤 혼합하고 분리하여 발색되는 신호의 세기를 관측하여 그 변화를 통해 질병을 검출할 수 있어 검출 방법이 매우 단순하지만 고 민감도/선택성을 갖는 장점이 있다. 특히, 본 발명에서는 금속 나노입자가 과산화효소-유사(oxidase-like) 활성을 갖는 동시에 자성비드 중에서도 산화철 자성비드가 과산화효소-유사 활성을 갖는다는 특성을 발견하고 이를 이용하여 금속 나노입자로 나노자임을 구성하고, 산화철 자성비드의 과산화효소-유사 활성을 억제하기 위해서 활성 블로킹층을 도입하여 자성 구조체를 구성함으로써 바이러스 존재 여부에 따라 착색 물질이 나타내는 색을 통해서 용이하게 바이러스 존재 여부를 판별할 수 있는 장점이 있다.

[0015] 본 발명에서는 실제로 타겟 물질로서 인플루엔자 바이러스를 본 검출 시스템을 통해 확인하였다. 인플루엔자는 세계적으로 가장 심각하고 유행이 빠른 질병으로 계절마다 수만명의 희생자를 야기하며 일반적인 환경에서도 쉽게 전염되는 발병 중에 하나이고, 다양한 변종들이 많기 때문에 질병의 정확한 진단이 요구된다. 본 발명은 이러한 수요에 부합할 수 있는, 새로운 검출 방법으로 인플루엔자 바이러스 뿐만 아니라 다양한 많은 질병들의 고 감도 및 고 선택성을 갖는 검출 시스템으로 널리 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명에 따른 타겟 물질의 검출을 위해 이용되는 나노자임 및 이의 준비를 설명하기 위한 도면이다.
 도 2는 본 발명에 따른 타겟 물질의 검출을 위해 도 1의 나노자임과 함께 이용되는 자성 구조체 및 이의 준비를 설명하기 위한 도면이다.
 도 3은 도 1 및 도 2에서 설명한 나노자임 및 자성 구조체들을 이용하여 타겟 물질을 포획하는 것을 설명하기 위한 도면이다.
 도 4는 타겟 물질의 유무에 따른 컬러 신호 검출을 설명하기 위한 도면이다.
 도 5는 본 발명에서 이용된 나노입자와 자성비드의 특성 평가 결과들을 나타낸 도면이다.
 도 6은 본 발명에서 이용된 나노입자와 자성비드의 과산화효소-유사 활성 평가 결과들을 나타낸 도면이다.
 도 7 및 도 8은 본 발명에 따른 바이러스 검출 민감성 및 선택성을 평가한 결과를 나타낸 도면들이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 대해 상세히 설명한다. 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 본문에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0018] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시 예를 설명하기 위해 사용된 것으로서 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0019] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0020] 도 1은 본 발명에 따른 타겟 물질의 검출을 위해 이용되는 나노자임 및 이의 준비를 설명하기 위한 도면이고, 도 2는 본 발명에 따른 타겟 물질의 검출을 위해 도 1의 나노자임과 함께 이용되는 자성 구조체 및 이의 준비를 설명하기 위한 도면이다.

[0021] 먼저 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 검출 방법에서 이용되는 나노자임은 금속 나노입자를 코어로 하고 그 표면에 항체가 결합된 구조를 갖는다. 이때, 항체는 본 발명에서 검출하고자 하는 대상인 타겟 물질과 선택적으로 결합하는 수용체(receptor)의 역할을 할 수 있다.

- [0022] 본 발명의 금속 나노입자는 그 자체가 과산화효소-유사(oxidase-like) 활성을 갖는다. 그 자체가 과산화효소-유사 활성을 갖는 금속 나노입자를 형성하는 물질의 예로서는, 백금(Pt), 금(Au), 은(Ag), 팔라듐(Pd), 루테튬(Ru), 로듐(Rh) 구리(Cu), 니켈(Ni), 철(Fe), 아연(Zn), 코발트 (Co) 등을 들 수 있다. 이들은 각각 단독으로 또는 2 이상이 조합되어 이용될 수 있다.
- [0023] 일 실시예에서, 금속 나노입자는 금(Au) 나노입자일 수 있다.
- [0024] 일 실시예에서, 타겟 물질이 인플루엔자 바이러스일 수 있고, 상기 인플루엔자 바이러스와 결합하는 항체가 금속 나노입자의 표면에 결합될 수 있다. 항체는 금속 나노입자와 정전기적 인력에 의해서 결합될 수 있는데, 금속 나노입자의 표면이 (+) 전하를 나타내고, (-) 전하 특성을 갖는 항체가 용이하게 금속 나노입자의 표면에 결합될 수 있다. 금속 나노입자의 표면을 (-) 전하 특성을 갖도록 하는 경우 과산화효소-유사 활성이 매우 낮은 반면, (+) 전하 특성을 갖도록 안정화시키는 경우 과산화효소-유사 활성이 현저 높기 때문에 금속 나노입자는 (+) 전하 특성을 갖도록 표면을 안정화시키는 것이 가장 바람직하다.
- [0025] 도 2를 도 1과 함께 참조하면, 본 발명에 따른 검출 방법에서 이용된 자성 구조체는 자성비드를 코어로 하고, 그 표면에 활성 블로킹층이 형성되고, 활성 블로킹층의 표면에 항체가 결합된 구조를 갖는다.
- [0026] 본 발명에서의 자성비드는 그 자체가 과산화효소-유사 활성을 갖는 나노자임인 동시에 자성을 가지고 있으며, 과산화효소-유사 활성이 그 표면에 형성된 활성 블로킹층에 의해서 차단된다. 다만, 활성 블로킹층에 의해서는 과산화효소-유사 활성만 제어될 뿐, 자성비드 그 자체의 자성은 유지한다.
- [0027] 본 발명의 자성비드를 형성하는 물질의 예로서는, 철(Fe), 코발트(Co), 니켈(Ni), 산화철, 산화코발트, 산화니켈 등을 들 수 있고, 이들은 각각 단독으로 또는 2 이상이 조합된 합금 또는 합금산화물 형태일 수 있다. 상기 자성비드의 크기는 100 nm 내지 10 μ m일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 활성 블로킹층을 형성하는 물질의 예로서는, 3-아미노프로필트리메톡시실란(3-aminopropyltrimethoxysilane, APTMS), 테트라에틸 오르토실리케이트(Tetraethyl orthosilicate, TEOS), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG), 덱스트란(dextran), BSA(bovine serum albumin), 폴리에틸렌글리콜 실란[poly(ethylene glycol) silane], 실리카 등을 들 수 있다. 이들은 각각 단독으로 또는 2 이상이 조합되어 이용될 수 있다.
- [0029] 자성 구조체에서도, 활성 블로킹층으로 표면이 코팅된 자성비드와 항체는 정전기적 인력에 의해서 결합될 수 있는데, 활성 블로킹층의 표면이 (+) 전하를 나타내고 (-) 전하 특성을 갖는 항체를 용이하게 활성 블로킹층 표면에 결합시킬 수 있다.
- [0030] 일 실시예에서, 자성 구조체의 자성비드는 산화철(Fe_3O_4)로 형성될 수 있다. 이때, 활성 블로킹층은 TEOS로 형성될 수 있다. 활성 블로킹층은 산화철 나노클러스터의 표면에 TEOS를 코팅함으로써 형성할 수 있다. 이때, TEOS의 말단 작용기인 OH가 활성 블로킹층의 최외각에 배치되는데, OH와는 쉽게 결합하면서 말단 작용기가 (+) 전하를 나타내는 화합물을 이용하여 활성 블로킹층의 표면에 항체를 결합시킬 수 있다. 예를 들어, 활성 블로킹층의 표면에 말단 작용기가 (+)를 나타내는 APTES((3-aminopropyl)triethoxy silane)를 결합시키고, 이와 같이 표면이 (+) 전하 특성을 갖는 활성 블로킹층의 표면에 (-) 전하 특성을 갖는 항체를 용이하게 결합시킬 수 있다.
- [0031] 상기 나노자임은 표면의 항체가 타겟 물질과 반응하여 결합하면서 금속 나노입자 그 자체의 과산화효소-유사 활성에 의해 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)과 과산화수소의 존재 하에 TMB의 화학 반응을 일으키고, 반응된 TMB에 의해서 나타나는 컬러의 변화를 통해서 타겟 물질의 유무를 판별할 수 있다. 이때, 상기 자성 구조체는 활성 블로킹층에 의해서 자성비드의 과산화효소-유사 활성을 잃게 되므로, TMB의 화학 반응을 일으키지는 않으므로 TMB 고유의 무색이 나타난다. 이에 대해서는 도 3 및 도 4를 참조하여 후술하기로 한다.
- [0032] 도 3은 도 1 및 도 2에서 설명한 나노자임 및 자성 구조체들을 이용하여 타겟 물질을 포획하는 것을 설명하기 위한 도면이고, 도 4는 타겟 물질의 유무에 따른 컬러 신호 검출을 설명하기 위한 도면이다.
- [0033] 도 3 및 도 4를 참조하면, 본 발명에 따른 타겟 물질의 검출을 위해서 도 1 및 도 2에서 설명한 것과 같은 나노자임 및 자성 구조체들이 준비되면 이들을 미지의 진단 시료와 혼합한다.
- [0034] 미지의 진단 시료 내에 항체와 결합할 수 있는 바이러스가 존재하는 경우, 바이러스는 나노자임 및 자성 구조체들과 반응하여 샌드위치 구조의 복합체를 형성한다. 예를 들어, 나노자임의 코어로부터 순차적으로, 나노자임의

항원과 자성 구조체의 항원 사이에 바이러스가 개재되어 있는 형태의 샌드위치 구조의 복합체를 형성할 수 있다.

- [0035] 미지의 진단 시료와 나노자입 및 자성 구조체들을 혼합하여 반응시킨 후, 자성체를 이용하여 자성 구조체를 포함하는 분석 시료를 농축하여 분리해낸다. 자성 구조체가 자성을 갖기 때문에 자성체에 의해서 농축 및 분리될 수 있는데, 미지의 진단 시료 내에 바이러스가 존재하는 경우에는 분석 시료의 자성 구조체는 나노자입 및 바이러스와 결합된 구조가 된다. 또한, 미지의 진단 시료 내에 바이러스가 부존재하는 경우에는 분석 시료의 자성 구조체는 독립적이다.
- [0036] 분석 시료에 대해서 TMB와 과산화수소를 가하여 반응시키면, 샌드위치 구조의 복합체가 존재하는 경우 유색으로 컬러가 변화하고, 독립적인 자성 구조체만이 존재하는 경우 무색을 나타낸다.
- [0037] 분석 시료의 자성 구조체가 바이러스를 매개로 하여 나노자입과 결합된 상태인 경우에는 나노자입에 포함된 금속 나노입자의 과산화효소-유사 활성에 의해서 과산화수소를 이용하여 TMB를 산화시킬 수 있는데, 산화된 TMB에 의해서 유색을 나타낼 수 있다. 이때의 산화된 TMB는 λ_{\max} 가 650~655 nm인 청색을 나타낼 수 있다. 이후에, 정지제(stop reagent)로서 강산을 첨가하면 λ_{\max} 가 450 nm인 노란색을 나타낼 수 있다. 하지만, 앞서 설명한 것과 같이 바이러스의 부존재로 인해서 분석 시료에 자성 구조체가 독립적으로 존재하는 경우에는 TMB의 산화반응이 일어나지 않으므로 컬러변화 없이 무색을 나타낼 수 있다. 즉, 나노자입 및 자성 구조체를 이용한 바이러스의 검출 방법을 통해서, TMB와 과산화수소를 도입한 후에 유색을 나타내는지 무색을 나타내는지를 통해서 최초의 미지의 진단 시료 내에 바이러스가 존재하는지 여부를 판단할 수 있다.
- [0038] 상기에서 설명한 바에 따르면, 도 1 내지 도 4에서 설명한 본 발명은, 기존 방법에 비해 간단히 항체로 표면 개질된 자성비드, 금속 나노입자와 표적 질병의 항원 혹은 바이러스를 반응 용기에 넣은 뒤 혼합하고 분리하여 발색되는 신호의 세기를 관측하여 그 변화를 통해 질병을 검출할 수 있어 검출 방법이 매우 단순하지만 고 민감도/선택성을 갖는 장점이 있다. 특히, 본 발명에서는 금속 나노입자가 과산화효소-유사 활성을 갖는 동시에 자성 비드 중에서도 산화철 자성비드가 과산화효소-유사 활성을 갖는다는 특성을 발견하고 이를 이용하여 금속 나노입자로 나노자입을 구성하고, 산화철 자성비드의 과산화효소-유사 활성을 억제하기 위해서 활성 블로킹층을 도입하여 자성 구조체를 구성함으로써 바이러스 존재 여부에 따라 착색 물질이 나타내는 색을 통해서 용이하게 바이러스 존재 여부를 판별할 수 있는 장점이 있다.
- [0039] 이하에서는, 구체적인 실험 및 제조된 나노자입 및 자성 구조체들의 특성 평가를 통해서 본 발명을 보다 상세하게 설명하기로 한다. 하기의 구체적인 실험에서 이용된 각각의 물질의 입수 경로는 다음과 같다.
- [0040] 하이드로젠 테트라클로로아우레이트(III) 트리하이드레이트(hydrogen tetrachloroaurate (III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)), 시스테인(cysteamine), 소듐 보로하이드라이드(sodium borohydride (NaBH_4)), 철(III) 클로라이드 헥사하이드레이트(iron(III) chloride hexahydrate($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)), 트리소듐 시트레이트 디하이드레이트(trisodium citrate dihydrate), 에틸렌글리콜(ethylene glycol), 소듐 아세테이트 언하이드로스(sodium acetate anhydrous (NaAc)), 암모늄 하이드록사이드(ammonium hydroxide (NH_4OH , 28-30wt%)), 테트라에틸 오르쏘실리케이트(tetraethyl orthosilicate (TEOS, 99%)), 3-아미노프로필 트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxy silane (APTES, 99%)), 소혈청알부민(bovine serum albumin (BSA)), 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, T4444)), 및 TMB 기체의 정지제(stop reagent for TMB substrate)는 Sigma-Aldrich(회사명, 미국)에서 구입하였다.
- [0041] The ECL™ anti-mouse IgG-HRP(겨자무과산화효소(horseradish peroxidase (HRP))는 GE Healthcare(회사명, 영국)에서 구입하였으며, Goat anti-rabbit IgG-HRP는 Santa Cruz Biotechnology(회사명, 캐나다)에서 구입하였다. 쥐의 단클론 항체(mouse monoclonal antibody)인 Anti-Influenza A virus HA antibody(Ab66189)와, 인플루엔자 A 바이러스 HA H1과 인플루엔자 A/뉴칼레도니아/20/99(H1N1)를 위한 다클론의 항체인 Anti-swine influenza A HA antibody(Ab91530)는 Abcam(회사명, 영국)에서 구입하였다. 재조합 인플루엔자 바이러스 A/뉴칼레도니아/20/99(H1N1)(Cat No.: 11683-V08H)와 anti-H3(H3N2) antibody HA MAbs (Lot: HB04N0160)은 Sino Biological(회사명, 중국)에서 구입하였다. 임상적 독립 인플루엔자 바이러스 A/요코하마/110/2009(H3N2)는 일본의 요코하마 건강 연구소(Yokohama City Institute of Health)의 C. 카와카미 박사(Dr. C. Kawakami)로부터 입수하였다.
- [0042] 모든 실험들은 초순도 탈이온수(high purity deionized (DI) water, >18 MΩ)와 PBS(phosphate-buffered

saline, 1 M, pH 7.4)를 이용하여 수행하였다. PBS(1 M, pH 7.4)는 BD Biosciences(회사명, 캐나다)로부터 얻었고, 이를 사용하기 전에 0.01 M로 희석하였다. 기관감사위원회(institutional review board) 인증된 타액(saliva), 소변(urine) 및 혈청(serum)은 항-간섭효과 실험(anti-interference effect test, IRB Protocol No. 14-157)을 위해 이용되었다.

[0043] **AuNZ-Ab2의 준비**

[0044] 표면이 양전하를 나타내는 금속 나노입자(AuNP)를, 시스테인의 존재 하에 HAuCl₄와 화학 반응시켜 얻었다.

[0045] 표면이 양전하를 나타내는 금속 나노입자에 대해서, Anti-swine influenza A HA antibody(Ab91530, Ab2)를 결합시켜 Ab2-콘주게이트드 금속 나노입자(AuNZ-Ab2)를 준비하였다. Ab2를 결합시켜 AuNZ-Ab2를 제조하는 공정은 *Ahmed, S. R.; Kim, J.; Suzuki, T.; Lee, J.; Park, E. Y., Biotechnology and bioengineering 2016, 113(10), 2298-2303.*에 따라 수행하였다.

[0046] **AuNZ-Ab3의 준비**

[0047] AuNZ-Ab2를 얻는 공정과 실질적으로 동일한 공정을 통해서, Ab2를 Anti-H3 (H3N2) antibody HA MAb인 Ab3으로 대체하여 AuNZ-Ab3을 준비하였다.

[0048] **MagNB-Ab1의 준비**

[0049] **(1) Fe₃O₄의 표면에 아민 기능화된 실리카로 코팅된 자성비드의 준비**

[0050] 단분산된 Fe₃O₄ 나노클러스터(FNCs)를 용매열(solvothermal) 공정을 이용하여 합성하였고, 이는 AMO Life Science Inc.(Amo-Mag™, 한국)에서 구입할 수 있다. FNCs의 합성은, 먼저 FeCl₃·6H₂O (4.0 mmol)와 트리소듐 시트레이트(trisodium citrate (0.68 mmol))를 균질 용액이 형성될 때까지, 20 mL의 에틸렌글리콜에 용해시켰다. 그 다음, NaAc 1.20 g을 혼합 용액에 혼합하고, 30분 이상 격렬하게 교반시켜 전구체 용액을 준비하였다. 상기 전구체 용액을 Teflon-lined stainless-steel autoclave (50 mL capacity)에 넣었다. 오토클레이브는 단단히 밀봉되었고, 200℃에서 10시간동안 가열하였다. 이후, 상온까지 자연적으로 냉각시킨 후, 갈색 파우더를 자석을 이용하여 모아, 에탄올과 탈이온수를 이용하여 몇 번 세정하여, FNCs를 얻었다.

[0051] 이와 같이 합성된 FNCs에 대해서 다음과 같은 공정을 통해 활성 블로킹층을 형성하였다. 구체적으로, 0.6 mL의 FNCs 수용액(농도 25 mg/mL)을 4 mL의 에탄올에 희석하고 200 μL의 암모니아(28%)를 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 초음파 처리한 후, 250 μL의 TEOS를 기계적 교반 조건 하에서 혼합물에 주입하였다. 4시간이 경과한 후, APTES(125 μL)를 첨가하여 아민-기능화 시키고 기계적 교반 조건에서 상온에서 4 시간을 더 기계적 교반하는 공정을 수행하였다. 그 후에, 용액을 90℃에서 1시간동안 환류 시켰고, FNCs의 표면에 아민 기능화된 실리카로 코팅된 최종 생성물(MagNB)을 에탄올과 물을 이용하여 몇 번 세정한 후, 60℃에서 6시간동안 진공 조건 하에서 건조하였다.

[0052] **(2) 실리카 코팅된 Fe₃O₄의 표면에 Ab1의 도입**

[0053] 상기와 같이 준비된 MagNB에 대해서 하기와 같은 공정을 통해서 Anti-Influenza A virus HA antibody(Ab6618 9)인 Ab1을 기능화시켰다. 구체적으로, MagNB를 물로 3번 린스하고, 0.01 M PBS(1 mg/mL)에 다시 분산시켰다. 4 μg의 Ab1을 1 mL의 MagNB 현탁액에 혼합하고, 150 rpm의 온화한 흔들림(shaking) 조건에서 15℃에서 4시간 동안 배양(incubation)하였다. 이 단계에서, Ab1은 이온성 및 소수성 상호작용의 조합에 의해서 MagNBs의 표면에 흡수되었다. MagNB의 잔류하는 활성 자리는 0.01 M PBS에 0.01% BSA의 100 μL에 의해서 블로킹되었다. Ab1가 결합된 MagNB인 MagNB-Ab1를 자석을 이용하여 분리한 후, 상층액은 버리고 침전물은 PBS로 린스하였다. MagNB-Ab1은 최종적으로 PBS에 다시 넣고, 4℃에서 저장하였다.

[0054] **MagNB-Ab3의 준비**

[0055] Anti-H3 (H3N2) antibody HA MAb을 Ab3으로 하여, Ab1을 MagNB에 도입하는 공정과 실질적으로 동일한 공정을 수행하여 MagNB-Ab3 또한 준비하였다.

[0056] **평가 실험1: AuNZ와 MagNB의 과산화효소-유사(peroxidase-like) 촉매 활성**

[0057] 과산화수소에 의한 TMB의 산화로부터 과산화효소-유사 촉매 활성을 조사하였다. 전형적인 실험은 탈이온수에 TMB와 500 mM의 과산화수소(TMB와 과산화수소의 부피비는 3:7임)를 혼합하여 준비한 실험용액(working

solution)을 이용하여 AuNZ와 MagNB 각각의 5.0×10^{-11} M로 상온에서 수행하였다.

[0058] 실험용액을 첨가하고, 5분 동안 배양한 후에, 컬러 반응은 UV-Vis 분광기를 이용하여 653 nm에서 측정하였다. 시간과 농도 의존 측매 활성을 변화시키기 위해서, AuNZ는 0.2×10^{-11} M에서 20×10^{-11} M까지 농도를 변화시키고 MagNB는 0.5×10^{-11} M에서 5.2×10^{-11} M까지 농도를 변화시켜 상기에서 설명한 것과 실질적으로 동일한 조건으로 과산화효소-유사 측매 활성을 평가하였다.

[0059] **평가 실험2: 인플루엔자 바이러스의 검출**

[0060] **(2-1) MagNB-Ab1과 AuNZ-Ab2의 반응**

[0061] 인플루엔자 A/뉴칼레도니아/20/99(H1N1)의 농도를 5×10^{-15} g/mL 내지 5×10^{-6} g/mL까지 변화시킨 각각의 희석액을 pH 7.4 PBS(0.01 M)을 이용하여 준비하여 검출 실험을 수행하였다.

[0062] H1N1 바이러스의 HA에 대항하는 단클론 Abs는, 선택적인 인식 및 타겟팅을 위해 MagNBs 상에 콘쥬게이트되도록 선택되어 MagNB-Ab1를 형성하였다. 100 μ l의 MagNB-Ab1(10^{-3} g/mL)과 다양한 농도의 바이러스를 100 μ l 분취하여 이들을 에펜도르프 튜브에서 혼합하여 인플루엔자 바이러스를 검출하였다. MagNB-Ab1은 배양되는 동안 오직 디자인된 바이러스에 콘쥬게이트 될 수 있어(37°C에서 1시간동안, 150 rpm으로 흔들), MagNB-Ab1-바이러스 복합체가 된다. PBS로 3시간동안 세정 공정을 수행하여 다른 모이어티들은 제거하고, 최종적으로 100 μ l의 PBS에 재분산 시켰다.

[0063] 이후에, AuNZ-Ab2의 100 μ l를, 37°C에서 1시간동안 흔들어주면서 배양하면서 MagNB-Ab1-바이러스 복합체 용액에 주입하였다. 이에 따라, 최종적으로 샌드위치 구조를 갖는 면역복합체(immunocomplex)인 MagNB-Ab1-바이러스-Ab2-AuNZ가 형성되었다. 생성된 면역복합체는 자성 분리에 의해서 적어도 3번 PBS로 세정하였다.

[0064] 실험용액을 면역복합체에 첨가하였고, 25°C에서 10분 동안 배양시킴으로써, 청색으로 변화하였다. 10분 후에, 10%의 황산 용액 50 μ l를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 이어서, 외부 자성체를 이용하여 면역복합체를 모았고, 상등액 150 μ l는 새로운 96-웰 플레이트에 이동시켜, 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 기록하였다.

[0065] **(2-2) MagNB-Ab3과 AuNZ-Ab3의 반응**

[0066] 뿐만 아니라, MagNB-Ab3과 AuNZ-Ab3을 이용한 이러한 센싱 플랫폼은 직접적으로 환자로 부터 격리된 임상 표면에 직접 이용되었다(인플루엔자 바이러스 A/요코하마/110/2009(H3N2)를 이용함).

[0067] **(2-3) 분석 및 검출 방법**

[0068] H3N2 바이러스의 표준 용액을 사람의 혈청으로 순차적으로 희석하고 $6 \square \times 10^{-1}$ 에서부터 $6 \square \times 10^6$ PFU mL⁻¹로부터 검출을 위해 이용하였다. LOD는 *Apostol, I.; Miller, K. J.; Ratto, J.; Kelner, D. N., Analytical biochemistry 2009, 385(1), 101-106*에서 사용한 표준 편차법을 따라 계산하였다. 복합체 매트릭스 내에서 바이러스를 검출하기 위해서, 타액, 소변 및 혈청을 HN1의 10^{-9} g/mL와 H3N1 바이러스 10^5 PFU mL⁻¹과 함께 혼합하였다.

[0069] MagNB-Ab들과 AuNZ-Ab들(MagNB-Ab1과 AuNZ-Ab2이나, MagNB-Ab3과 AuNZ-Ab3)은 상기에서 설명한 프로토콜에 따라 타겟 바이러스를 포획하고 확인하기 위해서 이들 복합체 시료에 동시에 첨가되었다. 동일한 과정은 바이러스를 제외한 음성 대조군(negative controls)에 대해서도 수행하였다.

[0070] 상기의 실험 결과들은, 하기와 같은 장비를 이용하여 분석하였다. 흡광도는 UV-Vis 분광기(S3100(상품명), Scinco(회사명), 대전, 한국)를 이용하여 측정하였고, 표면 포텐셜과 크기 분포는 제타-사이저(a zeta-sizer, ZS Nano, Malvern Instruments(회사명), Malvern, U.K.)를 이용하여 수행하였다. 형태와 크기는 HRTEM(high resolution transmittance electron microscopy, JEM-2100F(상품명), JEOL, Ltd.(회사명), Tokyo, Japan)과 FESEM(field-emission scanning electron microscopy, S-4700(상품명), Hitachi(회사명), Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

[0071] 화학 반응은 FT-IR 분광기(Fourier Transform Infrared spectroscopy, JASCO, FT-IR 6300, Tokyo, Japan)를 이용하여 모니터링 하였으며, 자성 측정은 SQUID 마그네토미터(superconducting quantum interference device

magnetometer, Quantum Design(회사명) MPMS XL-7(상품명), USA)를 이용하여 상온에서 수행하였다. 면역복합체의 흡광도는 필터 기반 멀티모드 마이크로플레이트 리더(filter-based multimode microplate reader, Infinite F500(상품명), TECAN, Ltd(회사명), Mannedorf, Switzerland)를 통해 측정하였다.

[0072] **분석 및 특성 평가 결과**

[0073] **(1) 구조 분석**

[0074] 상기에서 준비된 산화철 나노클러스터(FNC), 산화철 자성비드(MagNB), MagNB-Ab1 및 MagNB-Ab3과, 금속 나노입자(AuNP), AuNZ-Ab2 및 AuNZ-Ab3에 대해서 특성 평가를 수행하였다. 그 결과를 도 5에 나타낸다.

[0075] 도 5는 본 발명에서 이용된 나노입자와 자성비드의 특성 평가 결과들을 나타낸 도면이다.

[0076] 도 5에서, (a)는 FNC의 TEM 이미지이고, (b)는 MagNB의 TEM 이미지이며, (c)는 FNC, MagNB, MagNB-Ab1 및 MagNB-Ab3 각각의 제타 포텐셜을 나타낸 그래프이다. 또한, 도 5의 (d)는 AuNP의 TEM 이미지이고, (e)는 AuNP와 AuNZ-Ab1 각각의 UV-Vis 스펙트럼이며, (f)는 AuNP, AuNZ-Ab2 및 AuNZ-Ab3 각각의 제타 포텐셜을 나타낸 그래프이다. 도 5에서, (g) 및 (h)는 항체 콘주게이션을 통한 ELISA 형성을 설명하기 위한 모식도와 그 결과를 나타낸 것이다.

[0077] 도 5의 (a)를 참조하면, 용매열적으로 생성된 FNC가 좁은 크기 분산을 갖는 상대 표준 편차가 5.3%으로, 평균 크기가 220 nm인 구형을 갖는 것을 확인할 수 있다. (b)에서 나타난 것과 같이 FNC의 표면에 실리카층을 형성한 경우에는, 그 크기가 270 nm까지 증가한 것을 확인할 수 있는데, 이는 실리카층의 두께가 20 내지 30 nm로 FNC 표면에 형성된 것을 의미하며, 실리카층이 형성되었다고 하여 이들의 모폴리지가 변화하는 것은 아니고 높은 단분산성을 그대로 유지하고 있는 것으로 볼 수 있다.

[0078] 다만, 제타 포텐셜 측정 결과인 도 5의 (c)를 참조하면, FNC가 -35.3 mV인 반면, 아미노기를 갖는 실란화 후의 MagNB의 경우에는 28.9 mV까지 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있다. 반면, Ab1을 결합시킨 경우, 다시 18.1 mV로 감소하고, Ab3을 결합시킨 경우 22.1 mV로 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0079] 결과를 도면으로 도시하지 않았으나, FT-IR 분광 분석 결과, MagNB의 표면에서 NH₂와 SiO₂의 존재를 확인할 수 있다. 마그네타이트의 경우에 560과 630 cm⁻¹ 사이에서 넓고 강한 흡수 밴드를 나타내는 것을 통해서 자성을 가지고 있음을 확인할 수 있는데, 마그네타이트 입자의 표면에 실란 폴리머를 형성한 경우, FNC 표면에 형성된 APTES의 Si-O-Si 밴드에 대응하는 1064 cm⁻¹에서 밴드를 확인할 수 있다. APTES의 NH₂ 작용기와 OH 사이에서 C-N 결합이 형성됨에 의해서 1231 cm⁻¹에서 밴드가 나타나는 것을 확인할 수 있다. APTES 분자의 존재에 의해서, C-H 스트레칭 결합이 2911 cm⁻¹과 2980 cm⁻¹에서 나타나고, C-H 가위 진동은 1395 cm⁻¹에 나타난다. 그러므로, FNC의 표면이 APTES로 개질된 것을 확인할 수 있다.

[0080] MagNB의 자성은 SQUIS를 이용하여 상온에서 평가하였는데, 외부에서 인가된 자기장에 의한 MagNB들 사이의 상호작용을 통해서 합성된 MagNB가 높은 포화 자성화(Ms=60 emu/g)와 함께 초상자성을 가진 것과 같이 거동하는 것을 확인할 수 있다.

[0081] 이와 달리, 도 5의 (d) 및 (e)를 참조하면, 구형의 AuNP는 UV-Vis 스펙트럼에서 527 nm에서 흡수 피크를 갖는 높은 단분산성을 갖고 크기가 30 nm로 합성된 것을 확인할 수 있다. AuNP와 AuNZ-Ab2를 비교하면, 흡수 피크가 527 nm에서 529 nm으로 이동하고, 이러한 흡수 피크의 이동은 AuNN-Ab1이 응집 현상 없이 AuNP의 표면에 안정적으로 Ab1이 결합된 것에 의한 것이다. 뿐만 아니라, 도 5의 (f)에서의 제타 포텐셜 그래프를 참조하면, AuNP는 +36.53 mV이고, AuNZ-Ab2는 +22.9 mV이며, AuNZ-Ab3은 +25.9 mV인 것을 확인할 수 있다.

[0082] 도 5의 (g)를 참조하면, 일반적인 ELISA 구조에서는 기체가 되는 나노입자에 항체가 결합되어 있고, 나노입자에 결합된 항체가 anti-mouse IgG-HRP를 포획할 수 있는 경우, anti-mouse IgG-HRP에 결합된 HRP와 과산화수소에 의해서 TMB가 산화되어 이에 의해서 컬러가 나타난다. 반면, 나노입자에 항체가 결합되어 있지 않는 경우에는 anti-mouse IgG-HRP가 존재하지 않으므로 TMB가 산화될 수 없다. 즉, 반드시 anti-mouse IgG-HRP를 포획하는 항체가 나노입자에 결합되어 있어야만 HRP 및 과산화수소에 의한 TMB의 산화에 의해서 색이 변화하게 된다.

[0083] 도 5의 (h)을 참조하면, MagNB의 경우에는 450 nm에서 흡광도가 전혀 나타나지 않는 반면, MagNB-Ab1와 MagNB-Ab3을 이용한 경우에는 0.4 이상의 값을 나타내고, AuNP의 경우에도 흡광도가 나타나지 않는 반면, AuNZ-Ab2나 AuNZ-Ab3를 이용한 경우에는 0.8 이상의 흡광도가 나타나는 것을 확인할 수 있다. 이를 통해서, Ab1과 Ab3이

MagNB의 표면에 완전히 콘쥬게이트 되어 있음을 알 수 있고, Ab2와 Ab3이 AuNP의 표면에 콘쥬게이트되어 있음을 확인할 수 있다.

[0084] (2) 과산화효소-유사 활성 평가

[0085] MagNB와 AuNZ의 과산화효소-유사 활성 특성을 평가하기 위해서 TMB와 과산화수소를 이용하여 과산화효소 기체의 산화 반응을 촉매하였다. 그 결과를 도 6에 나타낸다.

[0086] 도 6은 본 발명에서 이용된 나노입자와 자성비드의 과산화효소-유사 활성 평가 결과들을 나타낸 도면이다.

[0087] 도 6에서, (a)는 TMB와 과산화수소만 혼합된 시료, 이에 추가적으로 AuNZ 또는 MagNB를 첨가한 상태의 시료들의 육안으로 확인할 수 있는 컬러를 나타내고, (b)는 (a)에서의 3가지 시료 각각에서의 파장변화에 따른 흡광도 변화를 10초마다 측정하여 나타낸 그래프이고, (c)는 AuNZ의 농도 변화에 따른 653 nm에서의 흡광도 변화를, (d)는 MagNB의 농도 변화에 따른 653 nm에서의 흡광도 변화를 나타낸 그래프이다.

[0088] 도 6의 (a) 및 (b)를 참조하면, TMB와 과산화수소만이 혼합된 상태에서는 무색을 나타내고, 이는 TMB에 아무런 변화가 없음을 의미한다. 하지만, AuNZ를 혼합한 경우에는 653 nm에서 최대 흡광도를 갖는 청색을 나타내고, MagNB를 혼합한 경우에는 변화를 인지할 수 있을 만큼 변화가 나타나지는 않는 것을 확인할 수 있다.

[0089] 그림에도 불구하고, 도 6의 (c) 및 (d)를 (a) 및 (b)와 함께 참조하면, MagNB 또한 도 6의 (d)에서 보는 바와 같이 AuNZ에 비해서는 현저하게 작은 변화이기는 하지만 어느 정도의 과산화효소-유사 활성 특성이 있어 흡광도가 변화하는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명에서는 MagNB에 의해서 TMB와 과산화수소의 시스템이 영향을 받아 TMB가 산화되는 것을 원천적으로 방지하기 위해서 MagNB의 표면에 과산화효소-유사 활성을 차단하는 활성 블로킹층이 반드시 필요하다는 것을 확인하였으며, 활성 블로킹층의 일례로서 실리카층을 형성하여 과산화효소-유사 활성을 차단할 수 있음 또한 확인할 수 있었다.

[0090] (3) 인플루엔자 바이러스 검출의 민감성 및 선택성 평가

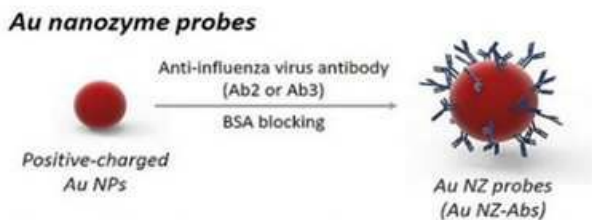
[0091] H1N1 인플루엔자 바이러스의 농도를 5×10^{-15} 에서 5×10^{-6} g/mL의 범위로 다양하게 조절하여 검출의 민감성을 분석하였다. 또한, 임상적 독립 H3N2 바이러스의 농도(PFU/mL)를 변화하여 검출의 민감성을 분석하였다. 그 결과를 도 7에 나타낸다.

[0092] 도 7에서, (a)가 H1N1 인플루엔자 바이러스를 이용한 경우이고, (b)가 임상적 독립 H3N2 바이러스를 이용한 경우로서, 이들 각각에서 농도의 변화에 따른 450 nm에서의 흡광도의 변화가 선형적으로 증가한다는 것을 확인할 수 있다. 또한, 이 결과를 통해서 H1N1의 경우 이의 농도가 적어도 44.2×10^{-15} g/mL인 경우 검출 가능하고, 5.0×10^{-12} g/mL 이상인 경우에는 유색을 나타내므로 육안으로 관별할 수 있음을 알 수 있다. H3N2의 경우에는 적어도 2.5 PFU/mL인 경우 검출 가능한 것을 알 수 있다.

[0093] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자는 하기의 특허 청구 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

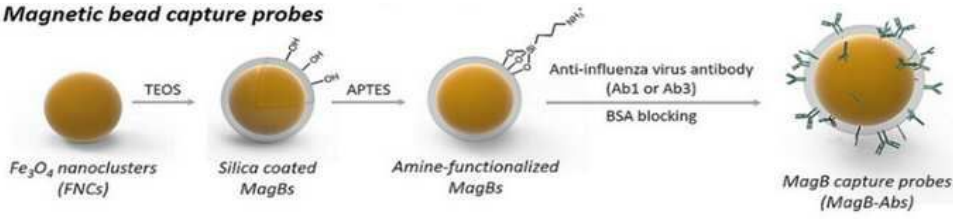
도면

도면1



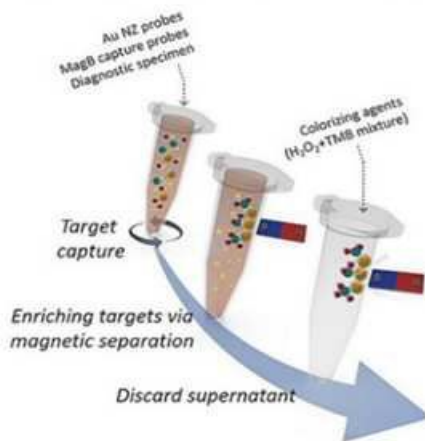
도면2

Magnetic bead capture probes



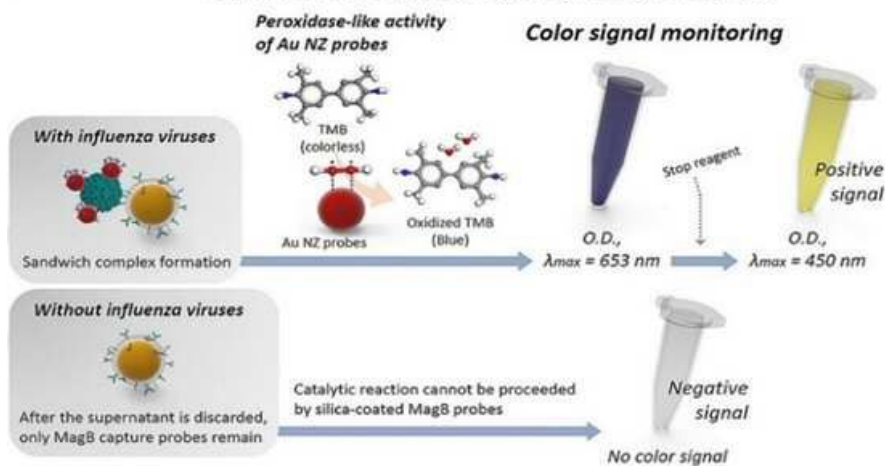
도면3

Step 1. Capturing & Magnetic enriching

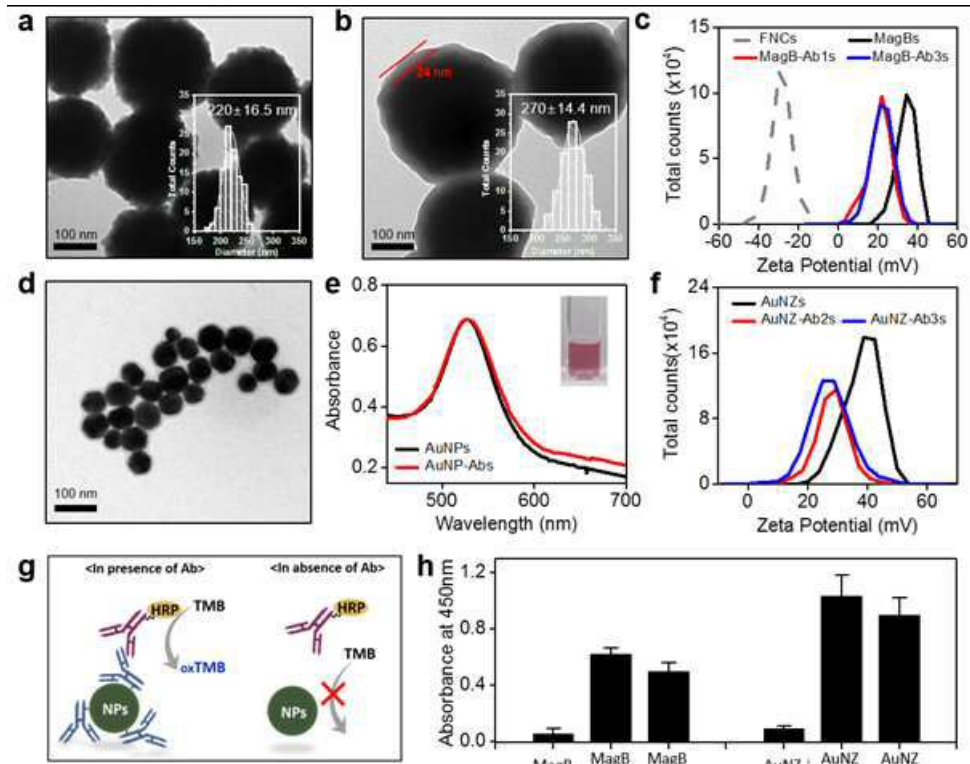


도면4

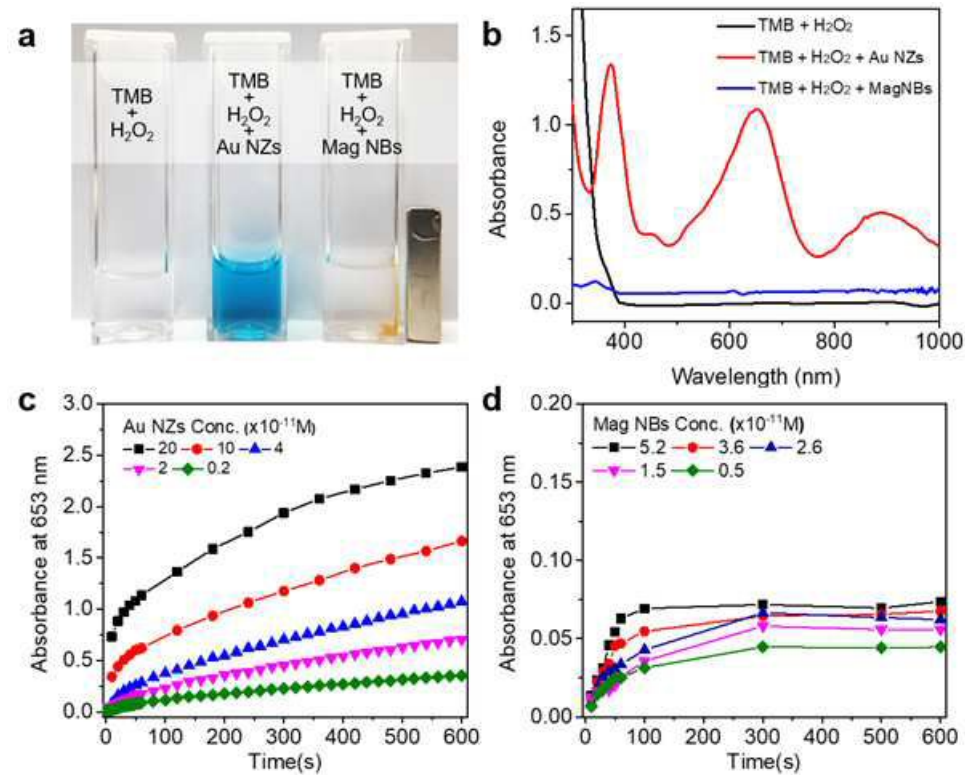
Step 2. Developing color signal by catalytic reaction



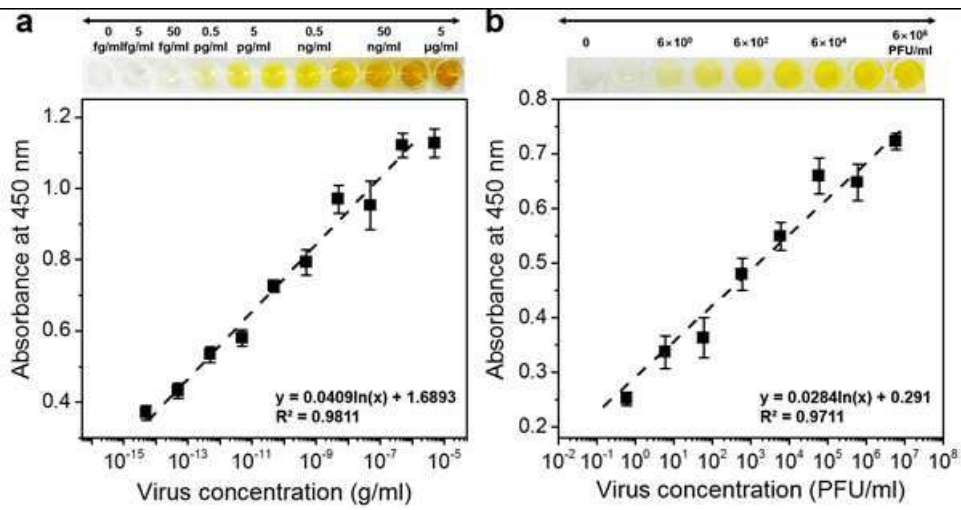
도면5



도면6



도면7



도면8

