(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017 년 7 월 20 일 (20.07.2017)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/123037 A1

(51) 국제특허분류:
B01L 3/00 (2006.01) *C01G 7/00* (2006.01)
C12Q 1/44 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/000453

(22) 국제출원일: 2017 년 1 월 13 일 (13.01.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0005352 2016 년 1 월 15 일 (15.01.2016) KR

(71) 출원인: **경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY)** [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: **심원보 (SHIM, Won-bo)**; 50976 경상남도 김해시 월산로 112-34, 1001 동 1601 호, Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: **최규환 (CHOI, Kyu Whan)**; 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12 층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

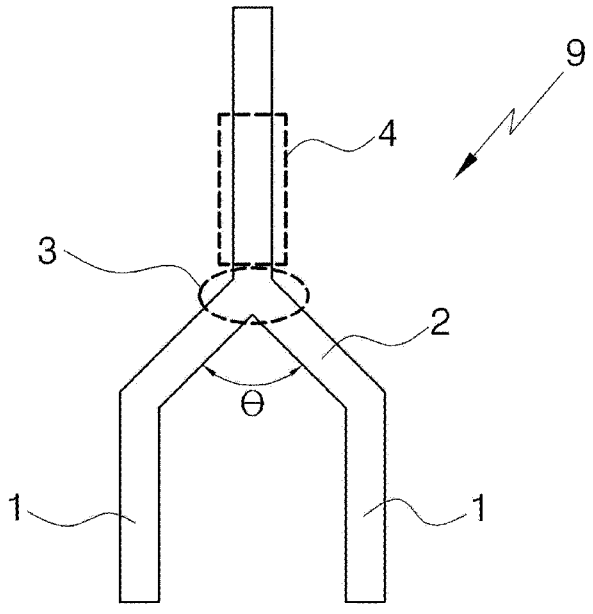
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: KIT FOR DETECTING RESIDUAL PESTICIDE COMPRISING INVERTED Y-SHAPED DIAGNOSTIC STRIP AND METHOD FOR DETECTING RESIDUAL PESTICIDE USING SAME KIT

(54) 발명의 명칭 : 역 Y 자 형태의 진단 스트립을 포함하는 잔류농약 검출용 키트 및 상기 키트를 이용한 잔류농약 검출 방법

[도1]



(57) Abstract: The present invention relates to an inverted Y-shaped diagnostic strip, a kit for detecting residual pesticide comprising the inverted Y-shaped diagnostic strip, and a method for detecting residual pesticide using the kit, the inverted Y-shaped diagnostic strip having a structure of connecting to each other: a plurality of separated sample processing parts (1) into which different samples are introduced; a plurality of separated moving parts (2) which are connected to one side of each of the sample processing parts, and through which a sample flowing through the sample processing part moves; a connection part (3) in which one sides of the plurality of moving parts are connected to each other; and a reaction part (4) which is connected to the connection part, and in which the result of a sample reaction is shown. The use of the kit for detecting residual pesticide of the present invention can rapidly and simply diagnose whether or not there is residual pesticide and simply quantify the residual pesticide. Therefore, it is considered that the kit for detecting residual pesticide may be effectively used as a biosensor in food and environmental monitoring fields in the future.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2017/123037 A1

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

본 발명은 서로 다른 시료가 투입되도록 분리된 다수개의 시료 처리부(1); 상기 각 시료 처리부의 일측과 연결되며, 시료 처리부를 통과하여 유입된 시료가 이동되는 분리된 다수개의 이동부(2); 상기 다수개의 이동부 일측이 서로 연결되는 연결부(3); 및 상기 연결부와 이어지며, 시료 반응의 결과가 나타나는 반응부(4);가 연결된 구조를 갖는 역 Y 자 형태의 진단 스트립, 상기 역 Y 자 형태의 진단 스트립을 포함하는 잔류농약 검출용 키트 및 상기 키트를 이용한 잔류농약 검출 방법에 관한 것으로, 본 발명의 잔류농약 검출용 키트를 이용하면 신속하고 간단하게 잔류농약 유무를 진단할 수 있고 간단한 정량까지 할 수 있어, 추후 식품 및 환경 모니터링 분야에서 바이오센서로 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

명세서

발명의 명칭: 역 Y자 형태의 진단 스트립을 포함하는 잔류농약 검출용 키트 및 상기 키트를 이용한 잔류농약 검출 방법

기술분야

[1] 본 발명은 역 Y자 형태의 진단 스트립을 포함하는 잔류농약 검출용 키트 및 상기 키트를 이용한 잔류농약 검출 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 화학물질의 개발은 인구 증가와 식량난 등의 문제를 해결하기 위해 많은 발전을 해왔다. 특히 화학물질로 이루어져 있는 농약은 비료의 개발을 시작으로 살충제, 제초제 등 인간생활의 편의와 농작물의 생산량 증가를 위하여 많이 개발되고 발전해왔다. 이로 인하여, 많은 농약이 농작물의 대량생산과 품질 향상을 위하여 다양하게 개발되고 그 사용량이 증가되었으나, 이러한 농약의 편의성과 오남용으로 인하여 화학물질이 인간의 건강과 삶에 해로운 영역까지도 침범하게 되었다. 자연환경의 오염, 해충의 내성 증가, 새로운 해충의 출현 등의 문제를 야기시키고 있으며 현재 알려진 내분비계 교란물질(endocrine disrupting chemicals, EDC)의 다수를 농약으로 인한 화학물질이 차지하고 있다.

[3] 이에 세계 각국에서는, 농약 오남용으로 인한 농작물 또는 농산물에 존재하는 농약의 잔류량을 규제 및 강화하게 되었으며 농약의 안정사용기준을 제한함으로써 각국의 국민들의 식품에 대한 안정성을 사전에 지키고 있다.

[4] 일반적으로 잔류농약의 검출 방법은 액체크로마토그래피(liquid chromatography, LC), 기체크로마토그래피(gas chromatography, GC), 질량분광기(mass spectroscopy, MS) 등 분석 장비를 통해 잔류농약의 허용 농도를 측정한다. 특히 LC와 GC는 검출 감도가 매우 높고 정확하며 많은 성분을 동시에 분석할 수 있는 장점이 있지만 분석 시료의 전처리에 따른 시간이 많이 소비가 되며 전문적인 인력, 고가의 장비, 전처리를 위한 많은 비용 등의 단점이 있어 이러한 단점을 보완하고 발전시키기 위하여 새로운 잔류농약 분석법들이 개발되고 있다.

[5] 본 발명자들은 기존에 보고되어 있는 아세틸콜린에스터라제 효소와 그의 기질인 아세틸싸이올콜린 반응에 금 나노입자가 엉기는 특성을 이용하여, 잔류농약을 검출할 수 있는 역 Y자 형태의 스트립을 제조하였다.

[6] 한편, 한국등록특허 제1050421호에는 금 나노입자에 두 종류의 이중 DNA를 고정화하여 효소-면역반응으로 잔류농약을 검출하는 '잔류 농약 검출용 키트 및 이를 이용한 잔류농약 검출방법'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2009-0046466호에는 아세틸콜린에스터라제로 코팅된 막을 가지는 스트립과 잔류 농약 검출반응을 확인하기 위한 발색용 효소 기질을 포함하는

'아세틸콜린에스터라제를 이용한 잔류 농약 검출용 키트 및 이를 이용한 잔류 농약 검출방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 역 Y자 형태의 진단 스트립을 포함하는 잔류농약 검출용 키트 및 상기 키트를 이용한 잔류농약 검출 방법에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 아세틸콜린에스터라제 효소와 그의 기질 반응물에 금 나노입자가 엉기는 현상을 이용하여 시료 내 잔류농약을 효과적으로 검출할 수 있는 진단 스트립을 개발하고자, 역 Y자 형태의 진단 스트립에 상기 효소-기질 반응물과 금 나노입자의 엉김현상이 최적화로 구현될 수 있는 조건들을 찾음으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[8] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서로 다른 시료가 투입되도록 분리된 다수개의 시료 처리부(1); 상기 각 시료 처리부의 일측과 연결되며, 시료 처리부를 통과하여 유입된 시료가 이동되는 분리된 다수개의 이동부(2); 상기 다수개의 이동부 일측이 서로 연결되는 연결부(3); 및 상기 연결부와 이어지며, 시료 반응의 결과가 나타나는 반응부(4);가 연결된 구조를 갖는 역 Y자 형태의 진단 스트립을 제공한다.

[9] 또한, 본 발명은 상기 역 Y자 형태의 진단 스트립을 포함하는 잔류농약 검출용 키트를 제공한다.

[10] 또한, 본 발명은 상기 잔류농약 검출용 키트를 이용한 시료 내 잔류농약 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

[11] 본 발명의 역 Y자 형태의 진단 스트립은 비색용 물질을 사용하지 않고 금 나노입자의 엉김 현상을 이용하여 시료 내 잔류농약을 진단하는 것으로, 분광광도계 등의 분석기를 이용하지 않고 간단하게 잔류농약 유무를 진단할 수 있어 시간을 절약할 수 있으며 휴대가 간편한 형태로 현장에서 사용하기 편리한 장점이 있고 간단한 정량까지 할 수 있어, 추후 식품 및 환경 모니터링 분야에서 바이오센서로 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

도면의 간단한 설명

[12] 도 1은 본 발명의 역 Y자 형태의 진단 스트립의 평면도이다.

[13] 도 2는 본 발명의 역 Y자 형태의 진단 스트립을 포함하는 잔류농약 검출용 키트의 분해사시도이다.

[14] 도 3은 본 발명의 잔류 농약 검출을 위한 스트립 형태 및 구성도를 나타낸 것으로, a)는 실제 스트립을 제작하여 케이스에 적용했을 시의 모습이며, b)는 실제 스트립 구성 상태를 나타낸 것이며, c)는 농약에 의해 효소

아세틸싸이올콜린 에스터라제가 억제되지 않았을 때 금 나노입자가 "A"로 표시된 역 Y 형태의 스트립 꼭지점으로부터 엉기는 것을 나타낸 모식도이며, d)는 실제 농약 검출 유무를 테스트한 결과를 나타낸 도식이다.

[15] 도 4는 잔류 농약 검출을 위한 스트립 센서를 이용한 실험 과정의 도식이다.

[16] 도 5는 역 Y자 스트립의 다양한 채널 각도에 따른 금 나노입자의 엉김현상 정도를 확인한 결과이다. Type 1=180°; Type 2=180°; Type 3=120°; Type 4=104°; Type 5=90°; Type 6=80°; Type 7=72°; Type 8=64°; Type 9=60°.

[17] 도 6은 니트로셀룰로스 멤브레인의 공극(pore) 크기에 따른 금 나노입자의 엉김현상을 확인한 결과이다.

[18] 도 7은 잔류 농약 검출을 위한 스트립 센서에서 아세틸콜린에스터라제 효소 사용양 최적화를 위해, 농약 처리(A)와 무처리(B) 조건에서 다양한 농도의 효소 처리에 따른 금 나노입자의 엉김 정도를 확인한 결과이다.

[19] 도 8은 최적화된 조건을 이용하여 실제 역 Y자의 교차로에서 금 나노입자의 엉김현상을 광학현미경을 통해 확인한 사진이다.

[20] 도 9는 말라옥손의 농도별 민감도 실험 결과이다.

[21] 도 10은 시마진의 농도별 민감도 실험 결과이다.

[22] 도 11은 아트라진의 농도별 민감도 실험 결과이다.

[23] 도 12는 시아나진의 농도별 민감도 실험 결과이다.

[24] 도 13은 EPN, 카보퓨란 및 디클로르보스에 대한 기준치 농도(100ppb)에 대해 추가 실험을 실시한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[25] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[26] 서로 다른 시료가 투입되도록 분리된 다수개의 시료 처리부(1);

[27] 상기 각 시료 처리부의 일측과 연결되며, 시료 처리부를 통과하여 유입된 시료가 이동되는 분리된 다수개의 이동부(2);

[28] 상기 다수개의 이동부 일측이 서로 연결되는 연결부(3); 및

[29] 상기 연결부와 이어지며, 시료 반응의 결과가 나타나는 반응부(4);가 연결된 구조를 갖는 역 Y자 형태의 진단 스트립을 제공한다.

[30] 도 1에 개시한 바와 같이, 본 발명의 역 Y자 형태의 진단 스트립에서 상기 시료 처리부(1)는 각기 다른 시료가 들어있는 용액에 시료 처리부를 직접 담그거나, 시료를 떨어뜨려 시료가 투입되도록 하는 부위이며; 상기 이동부(2)는 투입된 시료가 시료 처리부를 통화하여 이동되는 부위이다.

[31] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 진단 스트립에 있어서, 시료 처리부와 이동부의 개수는 각각 2개 또는 그 이상일 수 있고, 바람직하게는 각각 2개의 시료 처리부 및 이동부로 구성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[32] 또한, 본 발명의 상기 연결부(3)는 이동부의 일측이 60~104°의 각도(θ)로 서로 연결되는 것을 특징으로 한다. 이동부간의 상기 연결 각도(θ)는 본 발명의 역 Y자

진단 스트립의 반응부에서 띠가 확인되는 각도로, 반응결과의 on/off가 명확하게 구분되는 최적화된 각도(θ)는 64°이나, 이에 제한되지 않는다.

[33] 또한, 본 발명의 상기 반응부(4)는 연결부와 이어지는 부위로, 연결부에서 만난 양 방향의 시료들이 반응하여 그 반응물이 이동되면서 시각적으로 상태를 표시하는 띠가 형성되는 부위이다.

[34] 또한, 본 발명의 상기 역 Y자 형태의 진단 스트립(9)을 구성하는 시료 처리부(1), 이동부(2), 연결부(3) 및 반응부(4)는 멤브레인 재질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "멤브레인"은 시료 물질이 통과할 수 있는 어떠한 다양한 물질로도 제조될 수 있다. 예를 들어, 천연, 합성, 또는 합성에 의해 변형된 천연 발생 물질, 예를 들어 폴리사카라이드(예: 셀룰로스 물질, 종이, 셀룰로스 아세테이트 및 니트로셀룰로스와 같은 셀룰로스 유도체); 폴리에테르 술폰; 폴리에틸렌; 나일론; 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF); 폴리에스테르; 폴리프로필렌; 실리카; 비닐 클로라이드, 비닐 클로라이드-프로필렌 공중합체 및 비닐 클로라이드-비닐 아세테이트 공중합체와 같은 중합체와 함께 다공성 중합체 매트릭스에 균일하게 분산된 무기 물질, 예를 들어 불활성화된 알루미나, 규조토, $MgSO_4$, 또는 다른 무기미분 물질; 자연 발생(예: 면) 및 합성(예: 나일론 또는 레이온) 천; 다공성 겔, 예를 들어 실리카겔, 아가로스, 덱스트란 및 젤라틴; 중합체 필름, 예를 들어 폴리아크릴아미드; 등의 물질로부터 형성될 수 있다. 바람직하게는 상기 멤브레인은 중합체 물질, 예를 들어 니트로셀룰로스, 폴리에테르술폰, 폴리에틸렌, 나일론, 폴리비닐리덴 플루오라이드, 폴리에스테르 또는 폴리프로필렌일 수 있고, 가장 바람직하게는 니트로셀룰로스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[35] 또한, 상기 진단 스트립의 반응부는 시료 반응 결과물이 반응부의 길이 방향으로 4cm 길이를 80~100초의 속도로 흘러가게 하는 공극 크기를 갖는 멤브레인 재질일 수 있으며, 보다 바람직하게는 4cm 길이를 90초의 속도로 흘러가게 하는 공극 크기를 갖는 멤브레인 재질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 시료 반응물의 흐름 속도가 80~100초보다 빠르거나 느린 경우에 반응부에서 띠 형성이 용이하지 않을 수 있다.

[36] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 역 Y자 형태의 진단 스트립을 포함하는 잔류농약 검출용 키트를 제공한다. 구체적으로, 본 발명의 상기 잔류농약 검출용 키트는

[37] 역 Y자 형태의 진단 스트립을 지지하는 하부 기판(6);

[38] 상기 하부 기판에 형성되는 역 Y자 형태의 진단 스트립(9);

[39] 상기 진단 스트립의 반응부 일부와 맞닿도록 연결된 흡수패드(5); 및

[40] 상기 진단 스트립의 반응부를 확인할 수 있는 개구부(8)가 형성되는 상부 기판(7);을 포함하여 구성되는 잔류농약 검출용 키트이다.

[41] 도 2에 개시한 바와 같이, 본 발명의 잔류농약 검출용 키트의 흡수패드(5)는 반응부의 일부와 맞닿도록 연결된 부위로, 역 Y자 형태의 진단 스트립에서

시료의 이동을 위한 유체의 이동력에 시너지를 주기 위해 구성된 것으로, 유체 흡수 기능을 갖는 것을 특징으로 한다.

[42] 본 발명의 하부 기판(6)은 상기 역 Y자 형태의 진단 스트립(9)을 지지하는 역할을 하며, 상부 기판(7)은 반응부(4)의 결과를 확인할 수 있도록 중앙에 상하로 관통되어 형성된 개구부(8)가 형성된 것으로, 개구부의 형태는 반응부의 띠를 확인할 수 있는 크기 및 모양이면 어떠한 것으로도 제한되지 않는다.

[43] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 잔류농약 검출용 키트를 이용한 시료 내 잔류농약 검출 방법을 제공한다. 상기 잔류 농약 검출 방법은 구체적으로는, 잔류농약 함유가 의심되는 시료를 준비하는 단계; 및 본 발명의 잔류농약 검출용 키트에 상기 시료를 처리하여 반응부에서 결과를 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[44] 본 발명의 상기 잔류농약은 말라옥손(Malaoxon), 아트라진(Atrazine), 시마진(Simazine), 시아나진(Cyanazine), EPN, 카보퓨란(Carbofuran) 또는 디클로르보스(Dichlorvos)와 같은 유기인계 농약 또는 카바메이트계 농약일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[45] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 잔류농약 검출 방법에 있어서, 상기 잔류농약 검출용 키트의 시료 처리부는 한쪽은 나노입자를, 다른 쪽은 효소, 기질 및 의심시료를 투입할 수 있다.

[46] 상기 나노입자는 검출가능한 표지로서 작용하는 나노입자를 의미한다. 상기 나노입자는 바람직하게는 금속의 나노입자이며, 상기 금속으로는 예를 들어, 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt), 팔라듐(Pd), 이리듐(Ir), 로듐(Rh), 루테늄(Ru)의 귀금속; 티타늄(Ti), 지르코늄(Zr), 하프늄(Hf), 바나듐(V), 나이오븀(Nb), 탄탈럼(Ta), 크로뮴(Cr), 몰리브데늄(Mo), 텅스텐(W), 루테늄(Ru), 오스뮴(Os)의 전이금속; 철(Fe), 니켈(Ni), 코발트(Co) 등의 금속; 산화마그네슘(MgO), 이산화티타늄(TiO2), 오산화바나듐(V2O5), 산화아연(ZnO)의 금속산화물 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 나노입자는 가장 바람직하게는 금(Au) 나노입자이다.

[47] 또한, 본 발명의 상기 효소와 기질은 서로 반응하여 그 반응산물이 나노입자와 엉길 수 있는 특징을 가진 것으로, 이에 한정하지 않으나, 예를들면, 상기 효소는 아세틸콜린에스터라제일 수 있고, 기질은 아세틸싸이올콜린일 수 있다. 상기 아세틸콜린에스터라제는 2.0~3.0mU의 농도로 사용할 수 있고, 바람직하게는 2.5mU의 농도로 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[48] 본 발명의 잔류농약 검출 방법은 아세틸콜린에스터라제 효소와 그의 기질인 아세틸싸이올콜린과의 반응물에 금 나노입자가 엉기는 현상을 이용한 것으로서, 검출하고자 하는 시료 내에 농약이 존재하면, 농약이 아세틸콜린에스터라제 효소를 비활성화시켜 효소-기질 반응물이 생성되지 않고, 금 나노입자의 엉김 현상이 발생하지 않기 때문에, 반응부에 어떠한 띠도 나타나지 않으나, 시료 내에 농약이 존재하지 않으면 아세틸콜린에스터라제

효소가 활성화되어 효소-기질 반응물이 생성되고, 금 나노입자의 엉김 현상이 발생하기 때문에, 반응부에 띠가 나타나는 현상을 이용한 것이다.

[49]

[50] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[51]

[52] **재료 및 방법**

[53] **1. 재료 및 시약**

[54] 니트로셀룰로스 멤브레인 HF075, HF090, HF120, HF180 및 HF240은 Millipore(미국)에서, 아세틸콜린에스터라제(AChE)와 아세틸싸이올콜린(acethylthiolcholine)은 Sigma(미국)에서, 20nm 금 나노입자는 BBE(영국)에서, 말라옥손(Malaoxon), 아트라진(Atrazine), 시마진(Simazine), 시아나진(Cyanazine), EPN, 카보퓨란(Carbofuran) 및 디클로르보스(Dichlorvos)는 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

[55] 금 나노입자 엉김에 따른 스트립 상에 형성된 띠는 삼성 NX 200 카메라로 이미지를 촬영하였고, 분석은 Image J 프로그램(http://imagej.nih.gov/ij/)을 사용하였다.

[56]

[57] **2. 역 Y자 형태의 테스트 스트립의 제조**

[58] 역 Y자 형태의 스트립은 최근 보고된 Tear-off 기법을 이용하여 제작하였다(Lab Chip, 2015, 15, 3006-3012). 그 방법은 Craft-cutter기를 이용하여 A4 종이를 패터닝(patterning)하고 패터닝 된 A4 종이를 니트로셀룰로스를 녹일 수 있는 유기용매에 적용하고, 적용된 A4 종이를 스탬프처럼 이용하여 니트로셀룰로스 막에 적용시킨 후 건조하고 A4 종이를 제거하여 완료하였다.

[59] 다음 과정으로는 역 Y자 형태의 스트립을 1% 소혈청알부민(BSA)을 이용하여 블록킹하여 비특이적 반응을 억제하였다.

[60]

[61] **3. 농약 분석 방법**

[62] 농약 검출 분석은 최종 제작된 잔류농약 검출용 스트립을 이용하여 수행되었으며, 스트립의 a쪽 가지에는 20nm의 금 나노입자를, b쪽 가지에는 아세틸콜린에스터라제, 아세틸싸이올콜린(ATC) 및 농약을 넣어주고(도 4) 동시에 흘려주어 금 나노입자 엉김 유무를 확인하였다.

[63]

[64] **실시예** 1. 잔류농약 검출을 위한 스트립의 최적화 - 채널 각도

[65] 역 Y자 형태의 스트립에서, 금 나노입자와 효소-기질-시료 반응물이 만나는 곳(채널)의 각도를 다양하게 제조하여 농약 검출 정도를 실험한 결과, 잔류농약 검출용 스트립에 반응선(또는 띠)이 생성되기 위한 조건으로는 채널의 각도가 중요한 영향을 끼친다는 것을 확인할 수 있었다. 다양한 각도의 실험 결과,

60~104°의 각도에서 금 나노입자의 엉김현상을 확인할 수 있었으나, 특히, 64°의 각도에서 금 나노입자의 엉김현상이 크게 발생함을 알 수 있었고, 역 Y자 형태의 스트립 센서의 최적화된 채널 각도는 64°로 결정하였다(도 5).

[66]

[67] **실시예** 2. 잔류농약 검출을 위한 스트립의 최적화 - 멤브레인 재질

[68] 채널 각도의 결정 후, 멤브레인 재질을 선정하는 실험을 수행하였다. 일반적으로 니트로셀룰로스 멤브레인 스트립은 4cm 길이를 기준으로 유체의 흘러오는 속도에 따라 스트립의 구성을 구분하는 것이 일반적이다. 즉, HF075는 75초에 4cm를 다 적신다는 것을 의미하여, HF240은 240초에 4cm를 다 적신다는 것을 의미한다.

[69] 본 발명에서는 HF075, HF090, HF120, HF180 및 HF240을 이용하여 스트립을 제작하여 실험하였다. 그 결과, HF075 및 HF090을 이용하여 제작한 스트립에서 농약 무처리에 따른 반응선(금 나노입자의 엉김현상)이 확인되었으나, HF075를 이용한 스트립에서는 농약을 처리한 경우에도 반응선이 미세하게 나타나는 경향을 보여주어 검출이 제한됨을 확인할 수 있었다(도 6). 결과적으로, 금 나노입자의 엉김현상이 가장 잘 나타나며 on/off 시그널 대비가 최적화된, 4cm를 90초에 완전히 적실 수 있는 능력을 가진 니트로셀룰로스 멤브레인 스트립을 최적화된 멤브레인 재질로 선택하였다(도 6).

[70]

[71] **실시예** 3. 잔류농약 검출을 위한 스트립의 최적화 - 효소 사용양

[72] 다음으로는 금 나노입자를 엉기게 하는 효소 반응을 유도하는 효소의 사용양에 대한 최적화 실험을 실시하였다. 실험은 금 나노입자 전개 부분에 금 나노입자 10^{12}개를 포함하는 50㎕의 용액을 전개하였고, 효소 반응이 일어나는 부분에서는 분해 후 엉기게 하는 기질인 아세틸싸이올콜린 100uM을 고정하여 아세틸콜린에스터라제를 0, 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10, 100 및 1,000mU의 다양한 농도로하여 말라옥손 100ppb을 처리한 후, 나타나는 반응선의 강도를 분석하였다.

[73] 그 결과, 말라옥손 100ppb가 적용된 경우, 아세틸콜린에스터라제가 2.5mU 이하일 때 농약에 의해 효소가 비활성화되어 기질을 분해하지 못하고 금 나노입자가 엉기지 않는 것을 확인할 수 있었고(도 7A), 농약을 적용하지 않은 경우에는 효소가 활성화되어 어떠한 농도에서도 금 나노입자가 엉김을 확인할 수 있었다(도 7B). 이에, 본 발명에서는 잔류농약 검출을 위한 스트립에 적용할 최적의 효소 양을 2.5mU으로 선정하였다.

[74]

[75] **실시예** 4. 최적화된 조건으로 제작된 잔류농약 검출 스트립의 농약 검출 분석

[76] 상기의 실시예들을 통해 최적화한 조건(채널각도 64°, HF090, 효소양 2.5mU)으로 제작된 역 Y자 형태의 잔류농약 검출 스트립 센서를 이용하여, 말라옥손 100ppb를 적용시킨 센서와 적용시키지 않은 센서의 결과를

광학현미경(Olympus BX43, Olympus, 미국)으로 확인하였다.

[77] 그 결과, 도 8에서 보여지는 것처럼, 말라옥손을 처리한 스트립 센서에서는 금 나노입자의 엉김이 발생하지 않아 반응선이 나타나지 않음을 관찰할 수 있었다.

[78]

[79] **실시예** 5. 잔류농약 검출 스트립의 농약 검출 민감도 분석

[80] 최적화된 조건으로 제작된 잔류농약 검출 스트립을 다양한 종류의 농약으로 테스트하여 검출 민감도를 확인하였다. 사용한 농약은 말라옥손, 시마진, 아트라진 및 시아나진이며, 각 농약은 기준치 농도 미만까지의 농도로 하여 실험을 실시하였다. 일반적으로 농약의 경우, 한국식품의약품안전처(KFDA)의 기준이 100~500ppb이다.

[81] 말라옥손, 시마진, 아트라진 및 시아나진을 0, 10ppb, 50ppb, 100ppb, 1ppm, 10ppm 및 100ppm의 농도로 처리하고 스트립 상에서 금 나노입자의 엉김현상을 관찰한 결과, 본 발명의 스트립이 상기 4 종류의 농약에 대해 모두 기준치 미만의 농도(50ppb)까지도 분명하게 구분할 수 있음을 확인할 수 있었다(도 9 내지 도 12).

[82] 또한, 상기 농약 외 추가로 3종(EPN, 카보퓨란 및 디클로르보스)에 대한 100ppb 농도 적용 실험 결와에서도 금 나노입자의 엉김 현상이 확인되지 않음을 확인할 수 있었다(도 13).

[83]

[84] **실시예** 6. 농약 첨가 농작물 시료에서의 잔류농약 검출 분석

[85] 보다 실제적인 발명 검증을 위하여 실제 시료인 상추에 농약을 적용하여 본 발명의 잔류농약 검출 스트립의 농약 검출 유무를 테스트하였다. 분무기를 이용하여 말라옥손을 각 농도별로 상추에 적용시킨 후 6시간 흐른 뒤에 시료를 각 1g씩 절편하여 에틸알코올을 이용하여 부유한 후 부유액을 이용하여 스트립에 적용시켰다.

[86] 그 결과 아래 표 1에서 확인할 수 있듯이, HPLC(Ultimate 3000, Thermo scientific, 미국)를 이용한 잔류농약의 검출법과 비교하여도 해당 결과에 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다.

[87] [표1]

농약 적용 상추 시료를 이용한 HPLC 분석과 진단 스트립을 이용한 분석 결과 비교

Malaoxon spiked (ng/mL, n = 3)	HPLC		LF-CHIP	
	Detected malaoxon concentration (μg/mL)	Recoveries (%)	Detected malaoxon concentration (μg/mL)	Recoveries (%)
0	ND	-	ND	-
100	0.1039	103.9	0.0964 ± 0.0024	96.4 ± 2.4
1000	0.9263 ± 0.0393	92.6 ± 0.04	0.9977 ± 0.0030	99.8 ± 0.4
10000	9.9237 ± 0.0535	99.2 ± 0.05	9.9708 ± 0.0371	99.7 ± 0.4
100000	97.3273 ± 0.3173	97.3 ± 0.3	100.6744 ± 1.8050	100.7 ± 1.8

[88]

[89] [부호의 설명]

[90] 1: 시료 처리부 2: 이동부

[91] 3: 연결부 4: 반응부

[92] 5: 흡수패드 6: 하부 기판

[93] 7: 상부 기판 8: 개구부

[94] 9: 진단 스트립

청구범위

[청구항 1] 서로 다른 시료가 투입되도록 분리된 다수개의 시료 처리부(1);
상기 각 시료 처리부의 일측과 연결되며, 시료 처리부를 통과하여 유입된 시료가 이동되는 분리된 다수개의 이동부(2);
상기 다수개의 이동부 일측이 서로 연결되는 연결부(3); 및
상기 연결부와 이어지며, 시료 반응의 결과가 나타나는 반응부(4);가 연결된 구조를 갖는 역 Y자 형태의 진단 스트립.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 다수개의 이동부 일측이 서로 연결되는 각도(θ)는 60~104°인 것을 특징으로 하는 역 Y자 형태의 진단 스트립.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 반응부의 재질은 시료 반응 결과물이 반응부의 길이 방향으로 4cm 길이를 80~100초의 속도로 흘러가게 하는 공극 크기를 갖는 멤브레인인 것을 특징으로 하는 역 Y자 형태의 진단 스트립.

[청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 역 Y자 형태의 진단 스트립을 포함하는 잔류농약 검출용 키트.

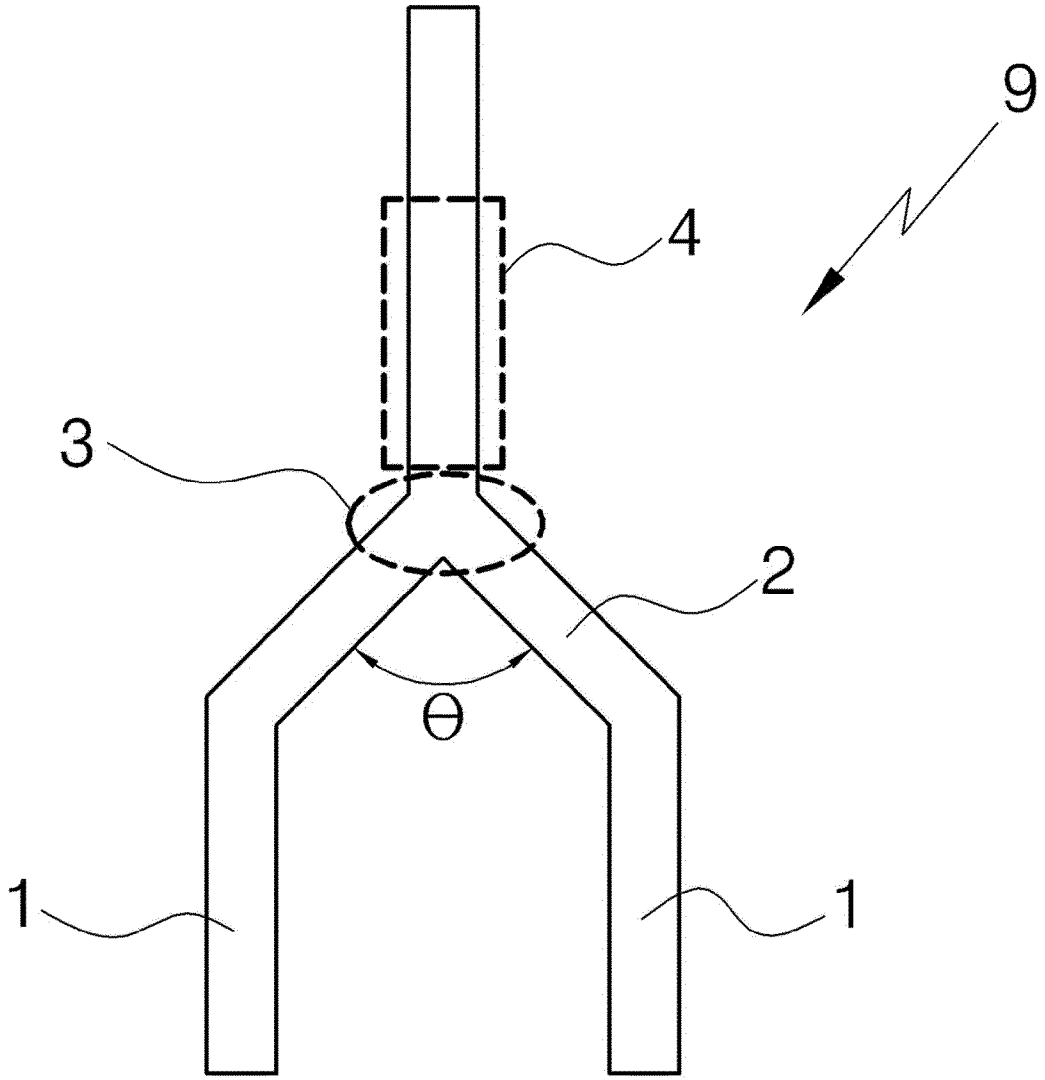
[청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 잔류농약 검출용 키트는
역 Y자 형태의 진단 스트립을 지지하는 하부 기판(6);
상기 하부 기판에 형성되는 역 Y자 형태의 진단 스트립(9);
상기 진단 스트립의 반응부 일부와 맞닿도록 연결된 흡수패드(5); 및
상기 진단 스트립의 반응부를 확인할 수 있는 개구부(8)가 형성되는 상부 기판(7);을 포함하여 구성되는 잔류농약 검출용 키트.

[청구항 6] 잔류농약 함유가 의심되는 시료를 준비하는 단계; 및
제4항의 잔류농약 검출용 키트에 상기 시료를 처리하여 반응부에서 결과를 확인하는 단계를 포함하는, 시료 내 잔류농약의 검출 방법.

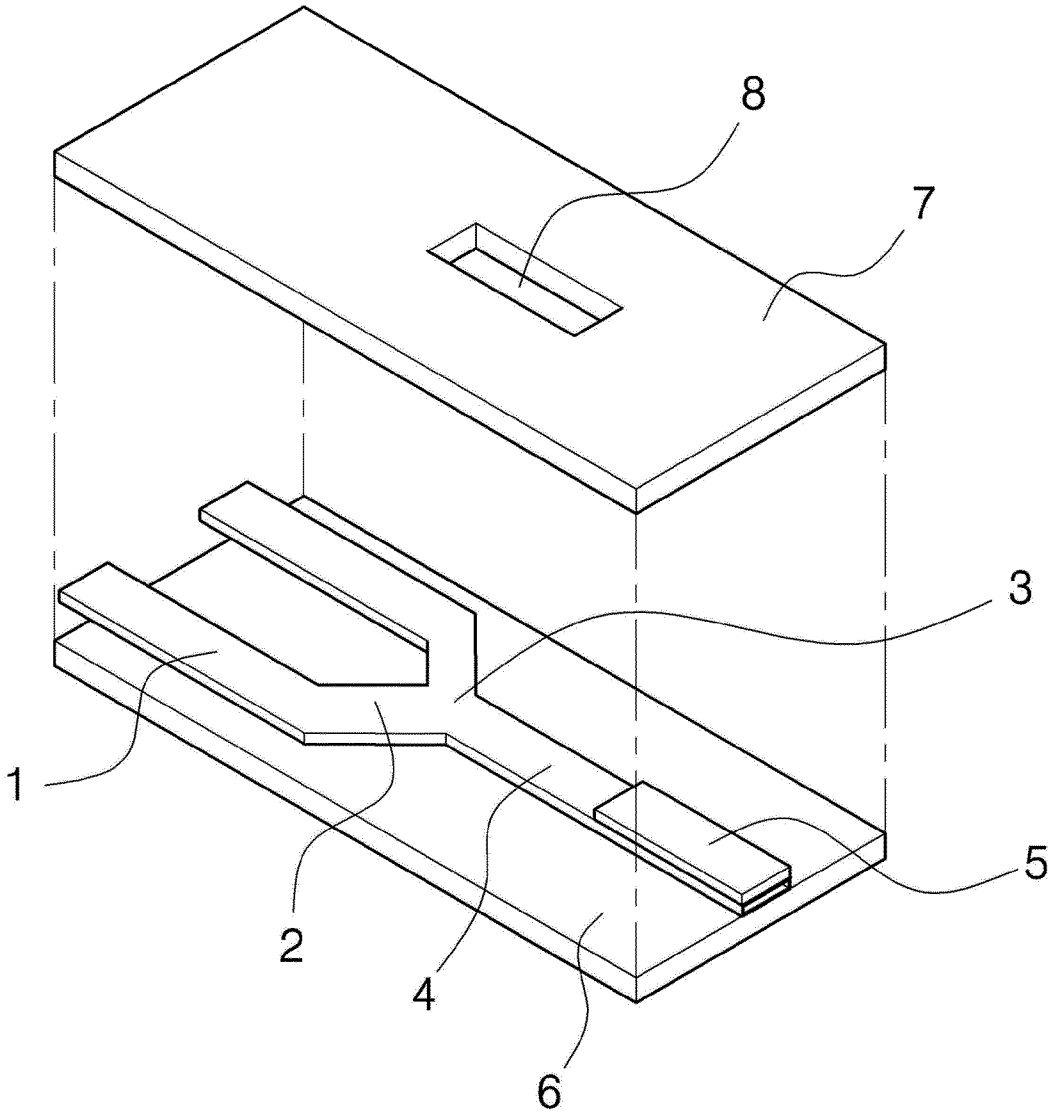
[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 잔류농약은 유기인계 농약 또는 카바메이트계 농약인 것을 특징으로 하는 시료 내 잔류농약의 검출 방법.

[청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 잔류농약 검출용 키트의 시료 처리부는 한쪽은 나노입자를, 다른 쪽은 효소, 기질 및 의심시료를 투입하는 것을 특징으로 하는 시료 내 잔류농약의 검출 방법.

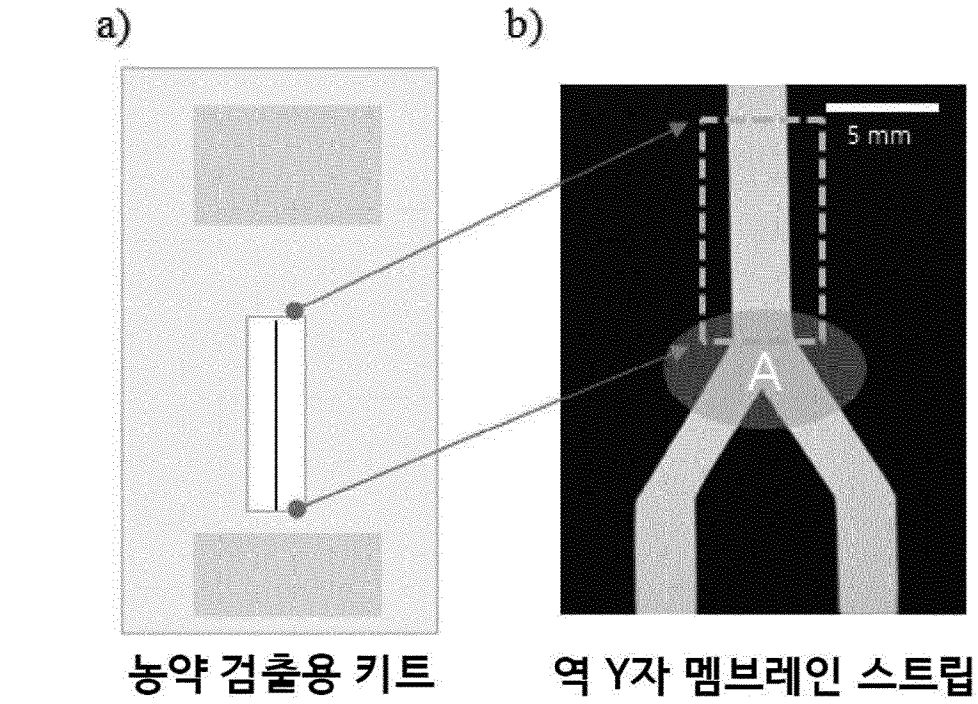
[도1]



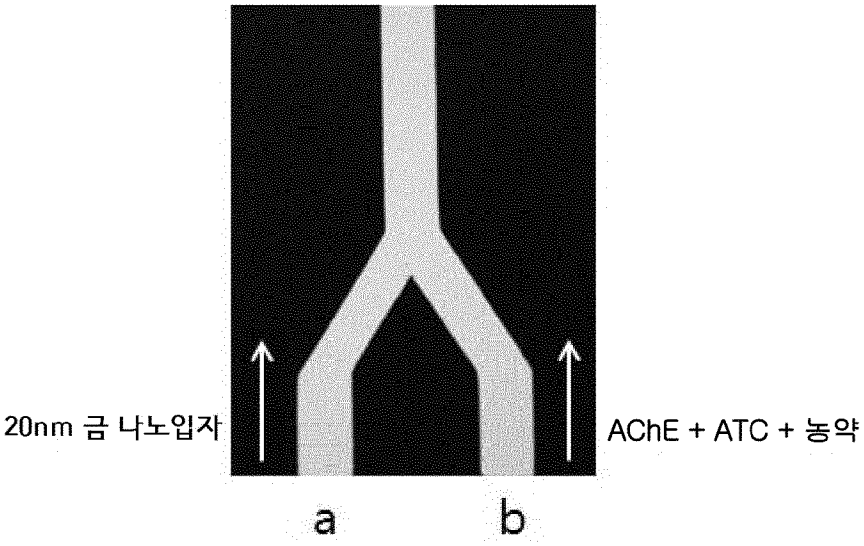
[도2]



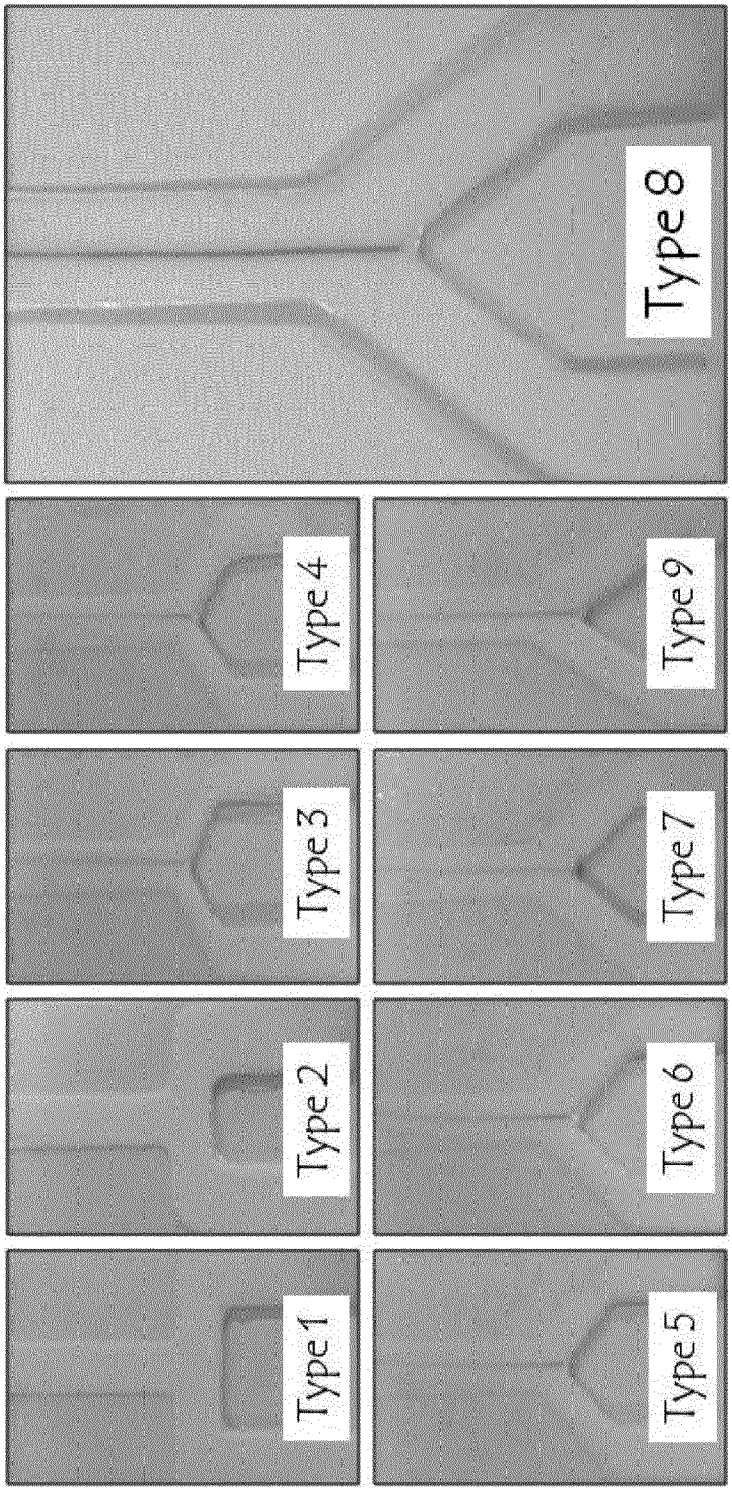
[도3]



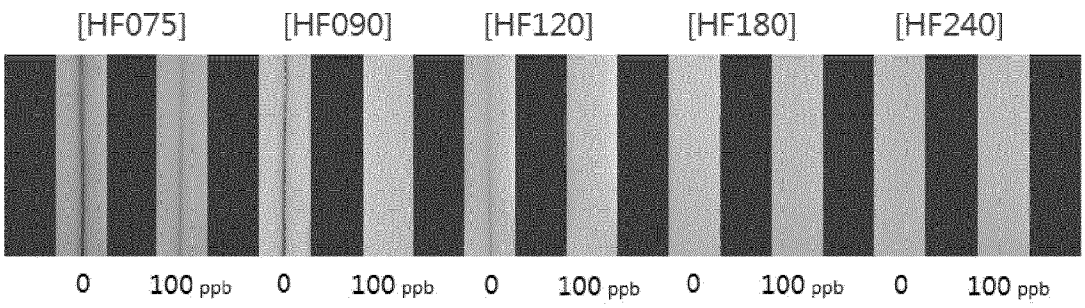
[도4]



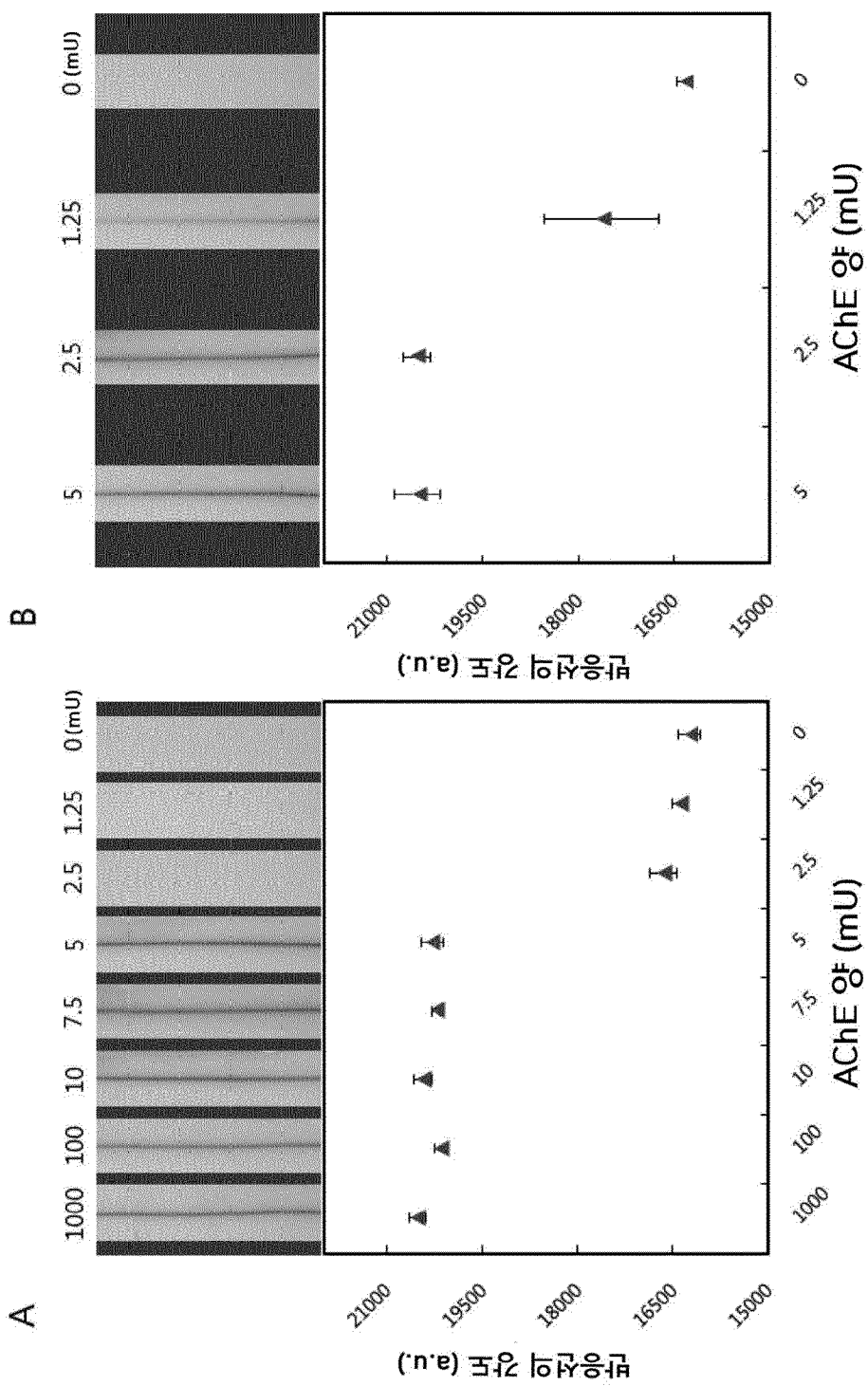
[도5]


Type 8
Type 4
Type 9
Type 3
Type 7
Type 2
Type 6
Type1
Type 5

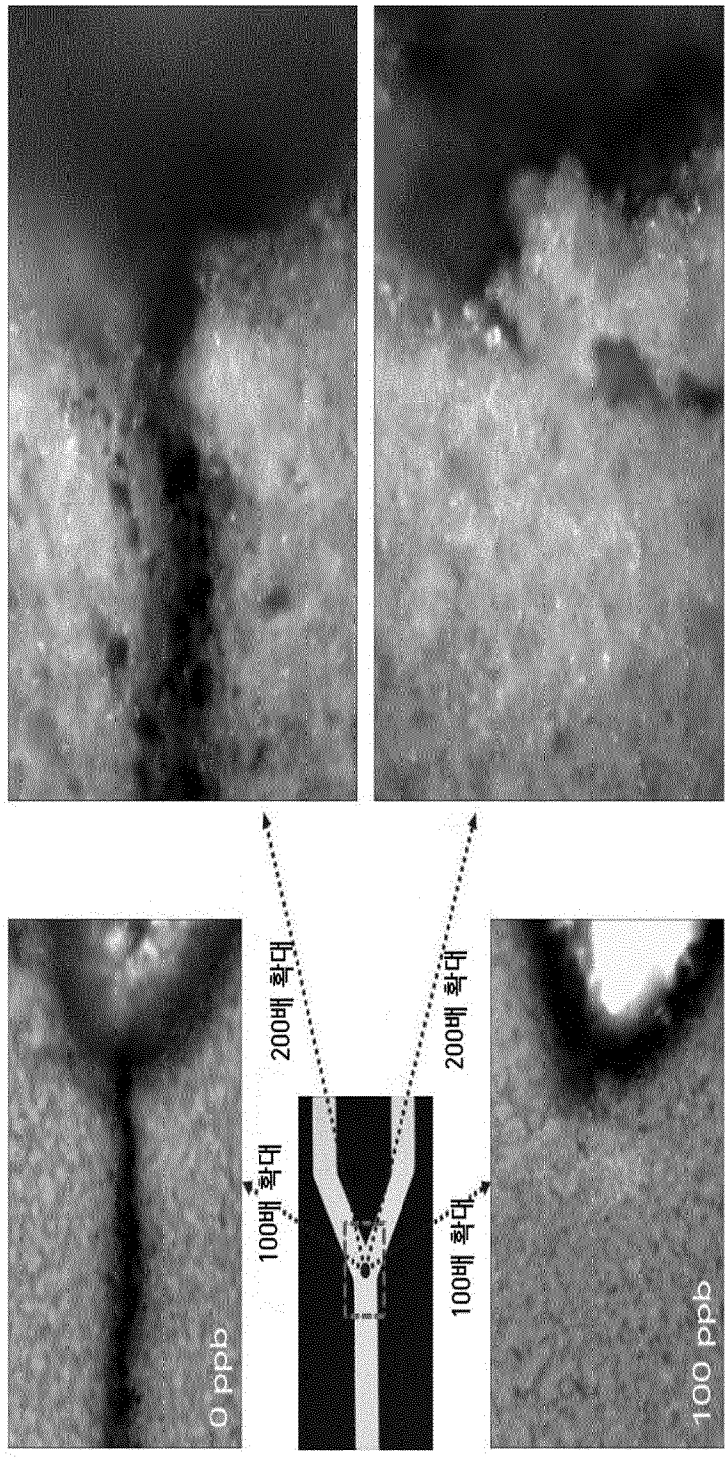
[도6]


[HF075]
[HF090]
[HF120]
[HF180]
[HF240]
0
100 ppb
0
100 ppb
0
100 ppb
0
100 ppb
0
100 ppb

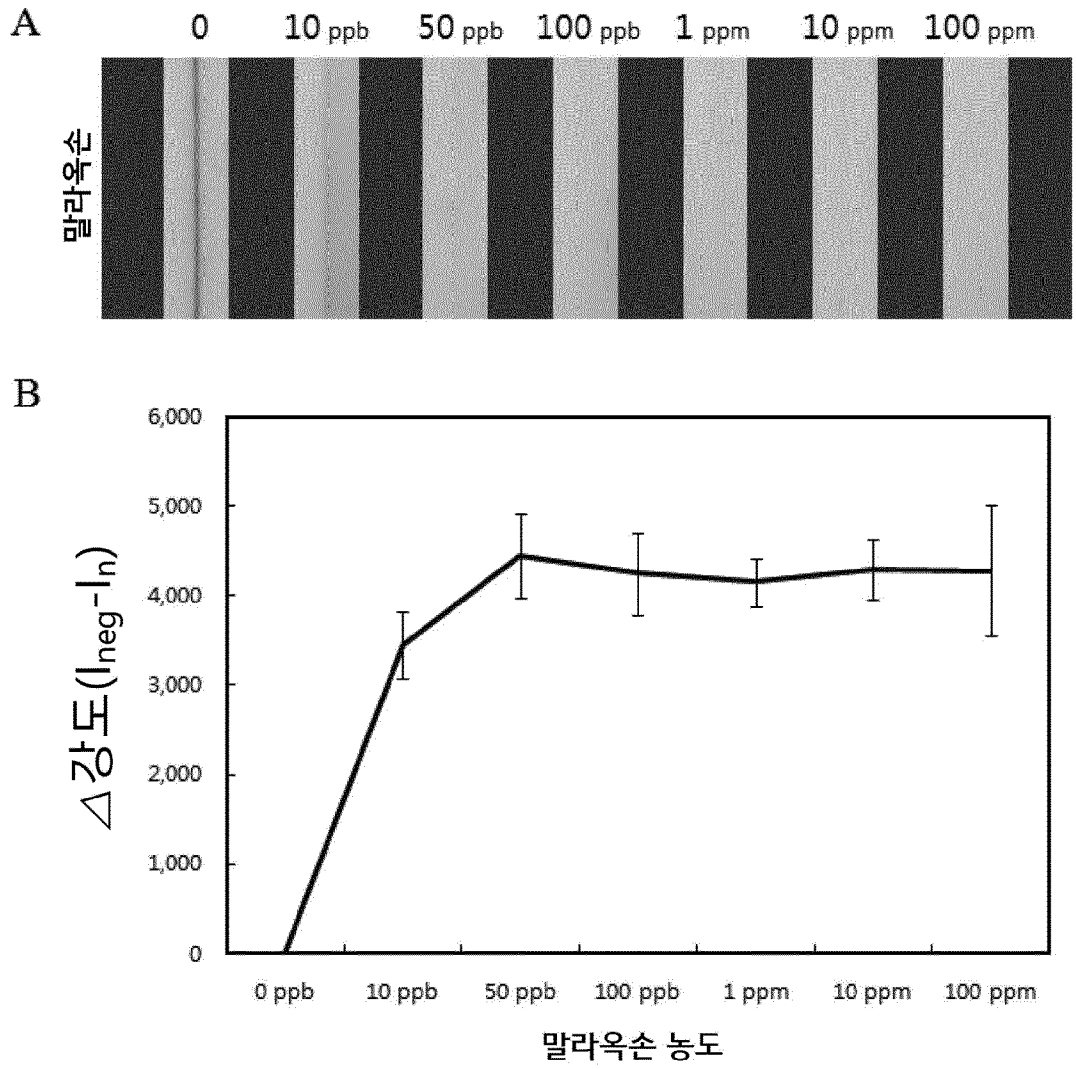
[도7]


A
B
1000
100
10
7.5
5
2.5
1.25
0 (mU)
5
2.5
1.25
0 (mU)
21000
19500
18000
16500
15000
반응신의 강도 (a.u.)
AChE 양 (mU)

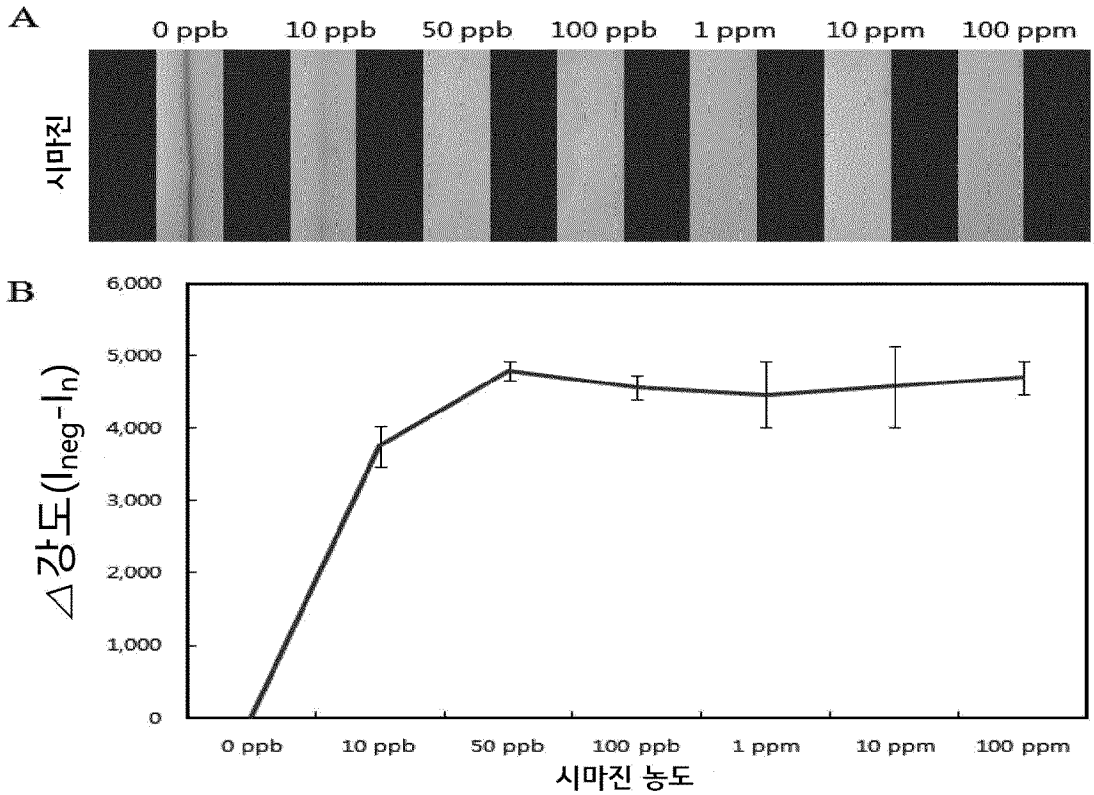
[도8]



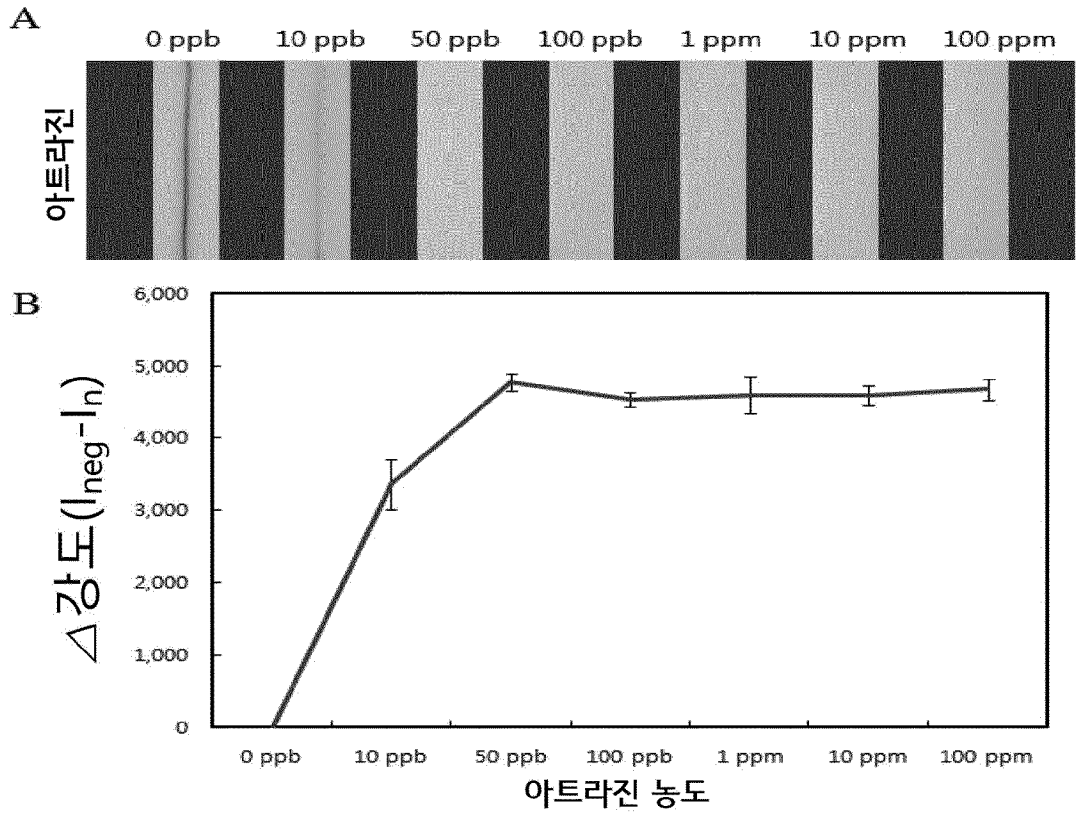
[도9]


A
0
10 ppb
50 ppb
100 ppb
1 ppm
10 ppm
100 ppm
말라옥손
B
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
△강도(Ineg-In)
0 ppb
10 ppb
50 ppb
100 ppb
1 ppm
10 ppm
100 ppm
말라옥손 농도

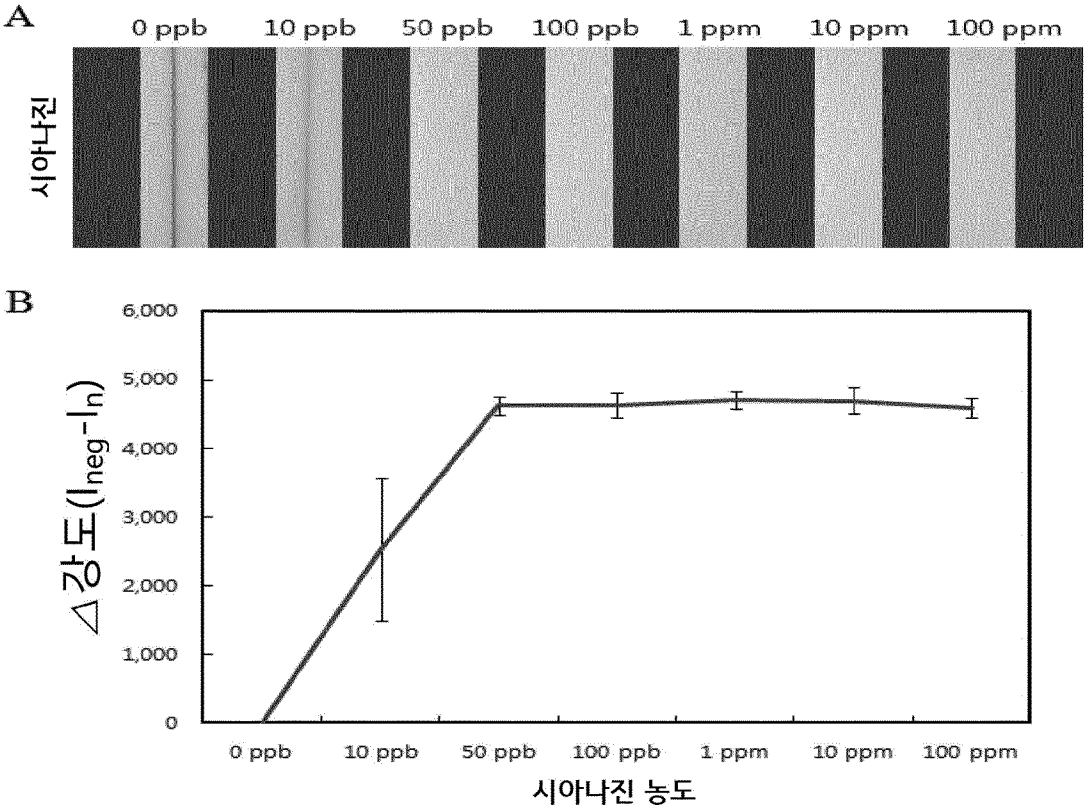
[도10]


A
0 ppb
10 ppb
50 ppb
100 ppb
1 ppm
10 ppm
100 ppm
시마진
B
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
△강도(Ineg-In)
0 ppb
10 ppb
50 ppb
100 ppb
1 ppm
10 ppm
100 ppm
시마진 농도

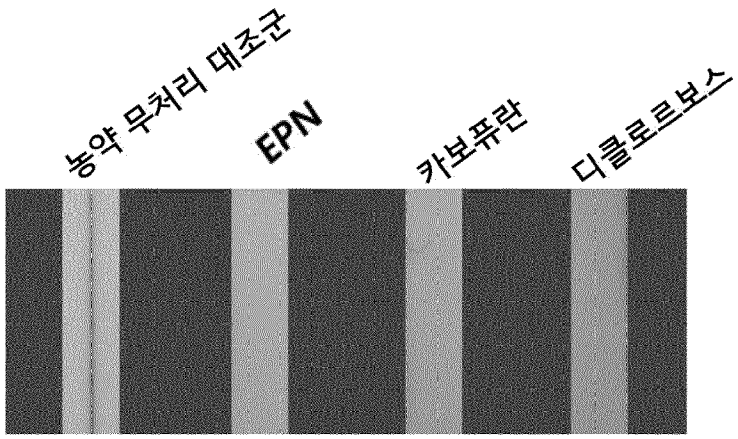
[도11]


A
0 ppb
10 ppb
50 ppb
100 ppb
1 ppm
10 ppm
100 ppm
아트라진
B
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
△강도(Ineg-In)
0 ppb
10 ppb
50 ppb
100 ppb
1 ppm
10 ppm
100 ppm
아트라진 농도

[도12]


A
0 ppb
10 ppb
50 ppb
100 ppb
1 ppm
10 ppm
100 ppm
시아나진
B
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
△강도(Ineg-In)
0 ppb
10 ppb
50 ppb
100 ppb
1 ppm
10 ppm
100 ppm
시아나진 농도

[도13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/000453

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B01L 3/00(2006.01)i, C12Q 1/44(2006.01)i, C01G 7/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B01L 3/00; B81B 1/00; B01L 3/02; B01J 19/00; G02B 6/126; G02B 6/136; C12Q 1/44; C01G 7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & google & Keywords: sample, sample treatment part, moving part, connection part, reaction part, diagnosis strip, reversed Y shape, detection kit, remaining pesticide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2006-116479 A (NAGANO KEIKI CO., LTD. et al.) 11 May 2006 See paragraphs [0034], [0037]; and figure 2.	1-2
Y		4-8
A		3
Y	SHIN, K. -S. et al., "Miniaturized Fluorescence Detection Chip for Capillary Electrophoresis Immunoassay of Agricultural Herbicide Atrazine", Analytica Chimica Acta, vols. 573-574, 2006, pages 164-171. See page 164, left column-page 165, right column, line 2; and figure 3.	4-8
Y	TEKIN, H. C. et al., "Ultrasensitive Protein Detection: A Case for Microfluidic Magnetic Bead-based Assays", Lab on a Chip, vol. 13, 2013, pages 4711-4739. See page 4721, left column; page 4722, lines 20-24; and figure 10.	5-8
A	WO 93-20939 A1 (BIOTRACK, INC.) 28 October 1993 See the entire document.	1-8
A	US 2014-0341500 A1 (HON HAI PRECISION INDUSTRY CO., LTD.) 20 November 2014 See the entire document.	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 JUNE 2017 (02.06.2017)	**02 JUNE 2017 (02.06.2017)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea	
Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2017/000453

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2006-116479 A	11/05/2006	JP 4621475 B2	26/01/2011
WO 93-20939 A1	28/10/1993	AU 3976793 A	18/11/1993
		CA 2109704 A1	28/10/1993
		CA 2109704 C	12/12/2000
		DE 69320437 T2	11/02/1999
		EP 0593714 A1	27/04/1994
		EP 0593714 A4	21/06/1995
		EP 0593714 B1	19/08/1998
		ES 2123050 T3	01/01/1999
		JP 06-509279 A	20/10/1994
		JP 2944216 B2	30/08/1999
		US 5223219 A	29/06/1993
US 2014-0341500 A1	20/11/2014	TW 201443500 A	16/11/2014
		US 2016-0147015 A1	26/05/2016
		US 9297957 B2	29/03/2016
		US 9513441 B2	06/12/2016

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/000453

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

B01L 3/00(2006.01)i, C12Q 1/44(2006.01)i, C01G 7/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

B01L 3/00; B81B 1/00; B01L 3/02; B01J 19/00; G02B 6/126; G02B 6/136; C12Q 1/44; C01G 7/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & google & 키워드: 시료, 시료 처리부, 이동부, 연결부, 반응부, 진단 스트립, 역 Y자, 검출 키트, 잔류 농약

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JP 2006-116479 A (NAGANO KEIKI CO., LTD. 등) 2006.05.11 단락 [0034], [0037]; 및 도면 2 참조.	1-2
Y		4-8
A		3
Y	SHIN, K.-S. 등, "Miniaturized fluorescence detection chip for capillary electrophoresis immunoassay of agricultural herbicide atrazine", Analytica Chimica Acta, 573-574권, 2006, 페이지 164-171. 페이지 164, 좌측 칼럼-페이지 165, 우측 칼럼, 2행; 및 도면 3 참조.	4-8
Y	TEKIN, H. C. 등, "Ultrasensitive protein detection: a case for microfluidic magnetic bead-based assays", Lab on a Chip, 13권, 2013, 페이지 4711-4739. 페이지 4721, 좌측 칼럼; 페이지 4722, 20-24행; 및 도면 10 참조.	5-8
A	WO 93-20939 A1 (BIOTRACK, INC.) 1993.10.28 전문 참조.	1-8
A	US 2014-0341500 A1 (HON HAI PRECISION INDUSTRY CO., LTD.) 2014.11.20 전문 참조.	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2017년 06월 02일 (02.06.2017)	2017년 06월 02일 (02.06.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
조한솔
전화번호 +82-42-481-5580

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/000453

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2006-116479 A	2006/05/11	JP 4621475 B2	2011/01/26
WO 93-20939 A1	1993/10/28	AU 3976793 A	1993/11/18
		CA 2109704 A1	1993/10/28
		CA 2109704 C	2000/12/12
		DE 69320437 T2	1999/02/11
		EP 0593714 A1	1994/04/27
		EP 0593714 A4	1995/06/21
		EP 0593714 B1	1998/08/19
		ES 2123050 T3	1999/01/01
		JP 06-509279 A	1994/10/20
		JP 2944216 B2	1999/08/30
		US 5223219 A	1993/06/29
US 2014-0341500 A1	2014/11/20	TW 201443500 A	2014/11/16
		US 2016-0147015 A1	2016/05/26
		US 9297957 B2	2016/03/29
		US 9513441 B2	2016/12/06