

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0130384
(43) 공개일자 2011년12월05일

(51) Int. Cl.
G01N 33/553 (2006.01) *G01N 33/573* (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2011-7011682

(22) 출원일자(국제출원일자) 2011년05월20일
심사청구일자 2011년05월23일

(85) 번역문제출일자 2011년05월23일

(86) 국제출원번호 PCT/KR2011/003730

(87) 국제공개번호 WO/2011/145908
국제공개일자 2011년11월24일

(30) 우선권주장
1020100047750 2010년05월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자
김중배
서울특별시 강남구 역삼2동 래미안펜타빌아파트
101동 1501호
오민규
서울특별시 강남구 압구정동 신현대아파트
104-605
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인주원

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 효소가 집적된 미세튜브를 이용한 정량분석법

(57) 요약

본 발명은 효소, 앵타머, 항체, 미세튜브 및 자석비드 또는 기관을 이용한 분석대상 정량분석법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 자석비드 또는 기관 (magnetic bead)에 분석대상결합 앵타머 또는 항체를 결합시키고 이를 분석하고자 하는 분석대상 용액에 넣어 분석대상과 결합시킨 후 자력에 의해 분리한 다음, 상기 분석대상의 정량분석을 위해 효소가 집적된 미세튜브 표면에 상기 분석대상에 선택적으로 결합하는 또 다른 앵타머 또는 항체를 결합시키고, 이를 상기 앵타머 또는 항체가 결합된 자석비드 또는 기관과 결합시켜 제조한 복합체 복합체를 효소반응을 통해 정량분석한다. 이를 통해 저농도 분석대상 진단이 가능해지고, 효소가 집적된 미세튜브의 신호증폭효과를 이용하여 정량이 어려웠던 종래의 검출법을 극복할 수 있다.

(72) 발명자

이혜진

경기도 안산시 상록구 사1동 숲속마을요진1차아파트 107동 603호

김병찬

서울특별시 성북구 하월곡동 39-1번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090082314

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관 연구지원부

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 고활성, 고안정 나노-단백질 원천기술 개발 및 ELISA에서의 응용

기여율 1/3

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2009.07.10 ~ 2010.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 K2060100000209E010000210

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 연구지원부

연구사업명 해외우수연구기관유치사업

연구과제명 [2단계1차]바텔연구소 유치활용을 통한 급성 호흡기 감염 및 중증 패혈증 조기진단용 나

노바이오 시스템 개발

기여율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2009.07.01 ~ 2010.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090075638

부처명 한국학술진흥재단

연구관리전문기관 연구지원부 3-3

연구사업명 (이공)일반연구자지원-기본연구

연구과제명 트립신 가수분해와 바이오연료전지를 위한 나노효소코팅의 안정성 및 활성 기작에 대한

연구

기여율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

- (A) 자석비드 (magnetic bead) 또는 기관과 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체를 혼합하여, 상기 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체가 상기 자석비드 또는 기관의 표면에 결합된 앵타머/항체1-자석비드/기관을 제조하는 단계;
- (B) 상기 앵타머/항체1-자석비드/기관을 분석대상이 함유된 피시험 용액에 첨가하여, 상기 분석대상이 상기 앵타머/항체1-자석비드/기관의 상기 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체에 결합된 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관을 제조하는 단계;
- (C) 상기 피시험 용액으로부터 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관을 분리하는 단계;
- (D) 효소와 미세튜브를 혼합하여 상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 집적된 효소-미세튜브를 제조하는 단계;
- (E) 상기 분석대상에 결합하는 제 2 분석대상결합 앵타머 또는 항체와 상기 효소-미세튜브를 혼합하여, 상기 제 2 분석대상결합 앵타머 또는 항체가 상기 효소-미세튜브의 상기 효소에 결합된 앵타머/항체2-효소-미세튜브를 제조하는 단계;
- (F) 상기 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관과 상기 앵타머/항체2-효소-미세튜브를 혼합하여, 상기 앵타머/항체2-효소-미세튜브의 상기 제 2 분석대상결합 앵타머 또는 항체가 상기 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관의 상기 분석대상에 결합된 자석비드/기관-앵타머/항체1-분석대상-앵타머/항체2-효소-미세튜브를 제조하는 단계;
- (G) 상기 자석비드/기관-앵타머/항체1-분석대상-앵타머/항체2-효소-미세튜브를 분리하는 단계; 및
- (H) 상기 분리된 자석비드/기관-앵타머/항체1-분석대상-앵타머/항체2-효소-미세튜브의 상기 효소를 정량분석 하는 단계를 포함하는 분석대상 정량분석법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단계 (A)의 상기 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체와 상기 자석비드 또는 기관의 결합은 스트렙타비딘 (streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphhydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 단계 (D)의 상기 효소와 상기 미세튜브의 결합은 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphhydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 단계 (A) 이후 단계 (B) 이전에, 상기 앵타머/항체1-자석비드/기관 중 자석비드 또는 기관 표면의 미반응 결합부위를 보호하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 단계 (B) 이후 단계 (C) 이전에, 상기 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관 중 자석비드 또는 기관 표면의 미반응 결합부위를 보호하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 단계 (E) 이후 단계 (F) 이전에, 상기 앵타머/항체2-효소-미세튜브 중 미세튜브 또는 효소의 미반응 결합 부위를 보호하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 자석비드 또는 기판은 표면에 중성 카르복시기($-COOH$), 그의 이온($-COO^-$), 중성 아민기($-NH_2$), 그의 이온($-NH^+$ 또는 $-NH_3^+$), 중성 티올기($-SH$), 및 그의 이온($-S^-$)으로 이루어진 군에서 선택된 작용기를 구비한 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 미세튜브는 표면에 중성 카르복시기($-COOH$), 그의 이온($-COO^-$), 중성 아민기($-NH_2$), 그의 이온($-NH^+$ 또는 $-NH_3^+$), 중성 티올기($-SH$), 및 그의 이온($-S^-$)으로 이루어진 군에서 선택된 작용기를 구비한 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 단계 (A) 이전에, 자석비드 또는 기판과 EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 용액을 혼합하여 반응시킨 후, 상기 자석비드 또는 기판을 자력으로 고정시키고, 미반응 EDC 용액을 제거하는 단계를 추가로 포함한 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 단계 (D) 이전에, 미세튜브와 EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 용액을 혼합하여 반응시킨 후, 미반응 EDC 용액을 제거하는 단계를 추가로 포함한 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 11

청구항 1에 있어서,

상기 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 제 2 분석대상결합 앵타머는 그 서열을 구성하는 염기의 수가 10 내지 250 개인 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 12

청구항 1에 있어서,

상기 단계 (D)의 미세튜브는 산(acid)으로 처리한 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 13

청구항 1에 있어서,

상기 분석대상은 트롬빈인 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

상기 제 1 분석대상결합 앵타머는 서열 5'-GGT TGG TGT GGT TGG -3'의 트롬빈 특이성 DNA 앵타머인 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 15

청구항 13에 있어서,

상기 제 2 분석대상결합 앵타머는 서열 5'- AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT -3'의 트롬빈 특이성 DNA 앵타머인 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 16

청구항 13에 있어서,

상기 효소는 포도당 산화효소 (glucose oxidase)인 것을 특징으로 하는 분석대상 정량분석법.

청구항 17

자석비드 또는 기관 (magnetic bead)와 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체를 혼합하여, 상기 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체가 상기 자석비드 또는 기관의 표면에 결합된 앵타머/항체1-자석비드/기관, 및 효소와 미세튜브를 혼합하여 상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 집적된 효소-미세튜브를 제조하고 목적 분석대상에 결합하는 제 2 분석대상결합 앵타머 또는 항체와 상기 효소-미세튜브를 혼합하여, 상기 제 2 분석대상결합 앵타머 또는 항체가 상기 효소-미세튜브의 상기 효소에 결합된 앵타머/항체2-효소-미세튜브를 포함하는 청구항 1 내지 청구항 16 중 어느 한 청구항의 분석대상 정량분석법에 사용되는 분석센서.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

상기 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체와 상기 자석비드 또는 기관의 결합은 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 분석센서.

청구항 19

청구항 17에 있어서,

상기 효소와 상기 미세튜브의 결합은 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 분석센서.

청구항 20

청구항 17에 있어서,

상기 앵타머/항체1-자석비드/기관 중 자석비드 또는 기관 표면의 미반응 결합부위는 보호처리된 것을 특징으로 하는 분석센서.

청구항 21

청구항 17에 있어서,

상기 앵타머/항체2-효소-미세튜브 중 미세튜브 또는 효소의 미반응 결합부위는 보호처리된 것을 특징으로 하는 분석센서.

청구항 22

청구항 17에 있어서,

상기 자석비드 또는 기관은 표면에 중성 카르복시기(-COOH), 그의 이온(-COO-), 중성 아민기(-NH₂), 그의 이온(-NH- 또는 -NH₃⁺), 중성 티올기(-SH), 및 그의 이온(-S-)으로 이루어진 군에서 선택된 작용기를 구비한 것을 특징으로 하는 분석센서.

청구항 23

청구항 17에 있어서,

상기 미세튜브는 표면에 중성 카르복시기(-COOH), 그의 이온(-COO-), 중성 아민기(-NH₂), 그의 이온(-NH- 또는 -NH₃⁺), 중성 티올기(-SH), 및 그의 이온(-S-)으로 이루어진 군에서 선택된 작용기를 구비한 것을 특징으로 하는 분석센서.

청구항 24

청구항 17에 있어서,

상기 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 제 2 분석대상결합 앵타머는 그 서열을 구성하는 염기의 수가 10 내지 250 개인 것을 특징으로 하는 분석센서.

청구항 25

청구항 17에 있어서,

상기 미세튜브는 산(acid)으로 처리한 것을 특징으로 하는 분석센서.

청구항 26

청구항 17에 있어서,

상기 분석대상은 트롬빈인 것을 특징으로 하는 분석센서.

청구항 27

청구항 26에 있어서,

상기 제 1 분석대상결합 앵타머는 서열 5'- GGT TGG TGT GGT TGG -3'의 트롬빈 특이성 DNA 앵타머인 것을 특징으로 하는 분석센서.

청구항 28

청구항 26에 있어서,

상기 제 2 분석대상결합 앵타머는 서열 5'- AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT -3'의 트롬빈 특이성 DNA 앵타머인 것을 특징으로 하는 분석센서.

청구항 29

청구항 26에 있어서,

상기 효소는 포도당 산화효소 (glucose oxidase)인 것을 특징으로 하는 분석센서.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 효소, 앵타머 또는 항체, 자석비드 또는 기관, 및 미세튜브를 이용한 정량분석법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 자석비드 (magnetic bead) 또는 기관에 분석대상 결합 앵타머 또는 항체를 결합시키고 이를 분석하고자 하는 피시험 용액에 넣어 분석대상과 결합시킨 후 분리한 다음, 상기 분석대상의 정량분석을 위해 효소가 집적된 미세튜브 표면에 상기 분석대상에 선택적으로 결합하는 또 다른 앵타머 또는 항체를 결합시키고, 이를 상기 앵타머 또는 항체가 결합된 자석비드 또는 기관과 결합시켜 제조한 복합체를 효소반응을 통해 정량분석

한다. 이를 통해 분석대상의 농도가 낮아도 진단할 수 있고, 효소가 집적된 미세튜브의 신호증폭효과를 이용하여 정량이 어려웠던 종래 검출법의 단점을 극복할 수 있다.

배경 기술

[0002] 검출하고자 하는 단백질에 결합하는 두 종류의 항체를 이용하여 단백질을 검출 및 정량하는 방법인 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)는 목적단백질과 그에 결합하는 항체, 효소가 결합된 항체를 이용하여 진단하는 방법으로, 그 방법이 간단하고 비용이 많이 들지 않으며 다량 분석이 가능하여 현재 가장 널리 쓰이고 있는 항원-항체 분석법이다. 특히 이 방법은 방사능면역시험법 (RIA, Radio Immuno-Assay)과 같이 매우 민감한 반응이면서도 RIA에서처럼 방사능을 사용하지 않는다는 이점이 있어서 그 사용이 증가되고 있다.

[0003] 그러나, 종래의 ELISA는 효소가 결합되어 있는 항체에 의해 측정이 이루어지고 이때 항체에 결합되어 있는 효소는 한 분자에 해당한다. 따라서 효소에 의한 반응이 크지 않고 효소의 활성도가 저해되었을 경우 정확한 진단과 높은 신호를 얻기 어렵다.

[0004] 그리고, ELISA를 하기 위해 사용되는 효소와 항체 모두 온도 등 주위 환경에 민감하여 실온에 방치되거나 다른 외부 요인에 의해 변형되기 쉬우며, 그 결과 활성도가 낮아지거나 심하면 활성도를 완전히 잃게 된다. 그런데, 검출 및 정량단계로 이루어지는 진단은 일반적으로 오랜 시간이 걸리므로 이러한 안전성이 큰 문제가 되고 있다. 이는 정확하게 단백질을 진단하였어도 항체에 결합된 효소가 활성을 잃게 되면 정확한 신호증폭을 나타내지 못하여 정확한 진단이 어렵기 때문이다. 결과적으로, 온도에 안정하고 실온에서도 장기보관이 가능하며 연속 사용이 가능한 진단용 물질과 효소는 생명공학, 의료진단, 환경분야 및 여러 다양한 분야에 있어서 절실히 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 자석비드 또는 기관에 앵타머1 또는 항체1을 결합하여 분석대상을 포획하고 이를 분리한 후, 또 다른 앵타머2 또는 항체2를 효소가 집적된 미세튜브에 결합시켜 앵타머/항체2-효소가 집적된 미세튜브를 제조한 다음, 이를 분리된 상기 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관과 혼합하여 상기 분석대상을 매개체로 효소가 고정된 미세튜브-앵타머/항체2-분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관 복합체를 제조하고 이 복합체를 용액 상에서 분리한 후, 분리된 복합체의 효소반응을 통하여 그 양을 측정하는 분석대상 정량분석법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0006] 본 발명은 또한 상기 분석대상 정량분석법의 방법에 따라 제조되고 상기 정량분석법에 사용되는 것을 특징으로 하는 분석대상 분석센서를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 분석대상 정량분석법은 상기 상술한 바와 같은 목적을 달성하기 위하여, 다음과 같은 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다:

[0008] (A) 자석비드 (magnetic bead) 또는 기관과 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체를 혼합하여, 상기 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체가 상기 자석비드 또는 기관의 표면에 결합된 앵타머/항체1-자석비드/기관을 제조하는 단계;

[0009] (B) 상기 앵타머/항체1-자석비드/기관을 분석대상이 함유된 피시험 용액에 첨가하여, 상기 분석대상이 상기 앵타머/항체1-자석비드/기관의 상기 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체에 결합된 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관을 제조하는 단계;

[0010] (C) 상기 피시험 용액으로부터 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관을 분리하는 단계;

[0011] (D) 효소와 미세튜브를 혼합하여 상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 집적된 효소-미세튜브를 제조하는 단계;

[0012] (E) 상기 분석대상에 결합하는 제 2 분석대상결합 앵타머/항체와 상기 효소-미세튜브를 혼합하여, 상기 제 2 분석대상결합 앵타머/항체가 상기 효소-미세튜브의 상기 효소에 결합된 앵타머/항체2-효소-미세튜브를 제조하는 단계;

[0013] (F) 상기 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관과 상기 앵타머/항체2-효소-미세튜브를 혼합하여, 상기 앵타머/

항체2-효소-미세튜브의 상기 제 2 분석대상결합 앵타머 또는 항체가 상기 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관의 상기 분석대상에 결합된 자석비드/기관-앵타머/항체1-분석대상-앵타머/항체2-효소-미세튜브를 제조하는 단계;

- [0014] (G) 상기 자석비드/기관-앵타머/항체1-분석대상-앵타머/항체2-효소-미세튜브를 분리하는 단계; 및
- [0015] (H) 상기 분리된 자석비드/기관-앵타머/항체1-분석대상-앵타머/항체2-효소-미세튜브의 상기 효소를 정량분석 하는 단계.
- [0016] 또한, 상기 단계 (A)의 상기 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체와 상기 자석비드 또는 기관의 결합은 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphhydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합에 의해 이루어질 수 있다.
- [0017] 또한, 상기 단계 (D)의 상기 효소와 상기 미세튜브의 결합은 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphhydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합에 의해 이루어질 수 있다.
- [0018] 또한, 상기 단계 (C)의 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관이 분석대상-앵타머/항체1-자석비드인 경우 상기 피시험 용액으로부터 자력으로 분리하는 것이 바람직하다.
- [0019] 또한, 상기 단계 (G)의 자석비드/기관-앵타머/항체1-분석대상-앵타머/항체2-효소-미세튜브가 자석비드-앵타머/항체1-분석대상-앵타머/항체2-효소-미세튜브인 경우 자력으로 분리하는 것이 바람직하다.
- [0020] 또한, 본 발명의 분석대상 정량분석법은 상기 단계 (A) 이후 단계 (B) 이전에, 상기 앵타머/항체1-자석비드/기관 중 자석비드 또는 기관 표면의 미반응 결합부위를 보호하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 분석대상 정량분석법은 상기 단계 (B) 이후 단계 (C) 이전에, 상기 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관 중 자석비드 또는 기관 표면의 미반응 결합부위를 보호하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명의 분석대상 정량분석법은 상기 단계 (E) 이후 단계 (F) 이전에, 상기 앵타머/항체2-효소-미세튜브 중 미세튜브 또는 효소의 미반응 결합부위를 보호하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 자석비드 또는 기관은 표면에 중성 카르복시기($-COOH$), 그의 이온($-COO^-$), 중성 아민기($-NH_2$), 그의 이온($-NH^+$ 또는 $-NH_3^+$), 중성 티올기($-SH$), 및 그의 이온($-S^-$)으로 이루어진 군에서 선택된 작용기를 구비하는 것이 바람직하다.
- [0024] 또한, 상기 미세튜브는 표면에 중성 카르복시기($-COOH$), 그의 이온($-COO^-$), 중성 아민기($-NH_2$), 그의 이온($-NH^+$ 또는 $-NH_3^+$), 중성 티올기($-SH$), 및 그의 이온($-S^-$)으로 이루어진 군에서 선택된 작용기를 구비하는 것이 바람직하다.
- [0025] 또한, 본 발명의 효소는 상기 미세튜브 표면에 가교결합에 의해 집적되는 것이 바람직하다.
- [0026] 또한, 본 발명의 미세튜브 표면에 집적된 효소 사이의 가교결합은 염, 아민 결합 2 관능성 화합물, 또는 염 및 아민 결합 2 관능성 화합물에 의해 이루어질 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명의 분석대상 정량분석법은 상기 단계 (A) 이전에, 자석비드 또는 기관과 EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 용액을 혼합하여 반응시킨 후, 미반응 EDC 용액을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명의 분석대상 정량분석법은 상기 단계 (D) 이전에, 미세튜브와 EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 용액을 혼합하여 반응시킨 후, 미반응 EDC 용액을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 분석대상 정량분석법은 상기 미세튜브와 EDC 용액을 혼합하여 반응시킨 후 원심분리로 미반응 EDC 용액을 제거할 수 있다.

- [0030] 또한, 상기 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 제 2 분석대상결합 앵타머는 그 서열을 구성하는 염기의 수가 10 내지 250 개인 것이 바람직하다.
- [0031] 또한, 상기 단계 (D)의 미세튜브는 산(acid)으로 처리한 것이 바람직하다.
- [0032] 또한, 본 발명의 분석대상 정량분석법은 상기 단계 (A) 이후 세척하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 분석대상 정량분석법은 상기 단계 (C) 이후 세척하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 분석대상 정량분석법은 상기 단계 (D) 이후 세척하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명의 분석대상 정량분석법은 상기 단계 (G) 이후 세척하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 분석대상 정량분석법은 상기 앵타머/항체1-자석비드/기관 중 자석비드 또는 기관 표면의 미반응 결합부위를 보호하는 단계 이후 세척하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 분석대상 정량분석법은 효소-미세튜브 중 미세튜브 표면의 미반응 결합부위를 보호하는 단계 이후 세척하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 분석대상은 트롬빈일 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 제 1 분석대상결합 앵타머는 서열 5'- GGT TGG TGT GGT TGG -3'의 트롬빈 특이성 DNA 앵타머인 것이 바람직하다.
- [0040] 또한, 상기 제 2 분석대상결합 앵타머는 서열 5'- AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT -3'의 트롬빈 특이성 DNA 앵타머인 것이 바람직하다.
- [0041] 또한, 상기 효소는 포도당 산화효소 (glucose oxidase)인 것이 바람직하다.
- [0042] 한편, 본 발명의 분석대상 정량분석법에 사용되는 분석센서는
- [0043] 자석비드 또는 기관 (magnetic bead)와 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체를 혼합하여, 상기 제 1 분석대상결합 앵타머 또는 항체가 상기 자석비드 또는 기관의 표면에 결합된 앵타머/항체1-자석비드/기관, 및
- [0044] 효소와 미세튜브를 혼합하여 상기 효소가 상기 미세튜브의 표면에 집적된 효소-미세튜브를 제조하고 목적 분석대상에 결합하는 제 2 분석대상결합 앵타머 또는 항체와 상기 효소-미세튜브를 혼합하여, 상기 제 2 분석대상결합 앵타머 또는 항체가 상기 효소-미세튜브의 상기 효소에 결합된 앵타머/항체2-효소-미세튜브
- [0045] 를 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0046] 본 발명의 분석대상 정량분석법은 분석대상과 특정 앵타머 또는 항체 사이의 면역원성 능력과 안정성을 기초로 한다. 분석대상의 검출은 앵타머 또는 항체가 결합된 자석비드 또는 기관에 의해 특이적 결합으로 이루어진다. 상기 앵타머 또는 항체 결합 자석비드 또는 기관의 사용은 다양한 성분을 함유한 환경에서 특정한 분석대상을 분리해 내는 데 유용하다. 그리고 앵타머 또는 항체는 분석대상에 강한 친화도를 가지는 장점이 있다. 또한, 효소가 집적된 미세튜브는 오랜 기간 동안 활성도를 유지할 수 있으므로, 효소를 실온에 방치할 경우 그 활성도가 떨어져 효소반응을 일으키지 못하는 종래의 단점을 극복할 수 있다. 또한 효소분자 한 개가 효소반응을 일으키는 것이 아니라, 미세튜브에 집적된 수많은 효소들이 효소반응을 함으로써 기존의 효소반응보다 높은 신호를 나타내며 따라서 저 농도의 분석대상까지 검출 및 정량이 가능하다. 이러한 개념을 기초로 한 본 발명의 면역학적 분리 및 효소집적에 의한 신호증폭효과를 이용한 정량분석법은 분석대상 검출에 있어서, 결합의 특이성 및 분리의 신속성, 편리성, 안정성을 개선하고, 검출의 민감도와 정확성을 제고하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 트롬빈을 분석대상으로 한 본 발명 분석대상 정량분석법의 일 실시예의 과정을 도시한 개략도이다.
- 도 2는 최적 앵타머/항체2-효소-미세튜브의 농도를 측정한 그래프이다.
- 도 3은 목적 분석대상이 존재하는 경우와 그렇지 않은 경우 자력에 의한 분리결과를 촬영한 사진이다.
- 도 4는 목적 분석대상이 존재하는 경우와 그렇지 않은 경우 자력에 의한 분리후의 자석비드 및 그 복합체를 촬

영한 SEM사진이다.

도 5는 본 발명 정량분석법을 이용한 트롬빈 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6 및 도 7은 전압전류측정기를 이용하여 트롬빈을 전기화학적으로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 분석대상 분석센서의 열 안정성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 발명의 실시를 위한 형태

[0049] 이하, 본 발명의 바람직한 실시 예에 대하여 첨부도면을 이용하여 설명한다. 또한, 하기의 설명은 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위하여 제공된 것일뿐 이러한 특정 사항들 없이도 본 발명이 실시될 수 있음은 이 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명하다 할 것이다. 그리고 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0050] 본 발명자는 자석비드 또는 기관에 결합된 분석대상 검출 앵타머 또는 항체를 이용한 면역자력학적 접근이, 높은 효율로 목적분석대상을 검출 및 분리할 수 있음을 발견했다. 나아가 효소가 집적된 미세튜브의 신호증폭효과를 이용하여 검출 및 분리된 분석대상을 진단 및 정량분석할 수 있음을 발견하였다.

[0051] 본 발명에서 검출 및 정량분석하고자 하는 분석대상은 단백질, 항원, 세포와 같은 바이오 입자 또는 유무기 입자 등 분석할 가치가 있는 모든 입자를 대상으로 한다.

[0052] 그리고, 본 발명에서 사용된 앵타머는 펩티드, 작은 분자, 핵산과의 결합 및 다양한 화학반응의 촉매작용과 같은 원하는 기능을 위해, 특정 표적분자에 대해 선택된 단일가닥 핵산 리간드이다. 앵타머는 항원-항체 결합체에 비견될 만한 높은 친화도로 표적분자와 특이적 결합을 이룬다. 앵타머는 항체에 비해 여러 장점을 가지고 있어, 분석대상의 친화도 분석에서 항체의 매력적인 대안이 된다. 즉, 앵타머는 보다 작고 안정적이며, 화학적 개질이 보다 용이하고, 지수적 증대(SELEX)에 의한 리간드의 체계적인 전개(evolution)를 통하여 스크리닝될 수 있으며, 생체 외에서 대량으로 합성될 수 있다.

[0053] 종래의 ELISA는 효소가 결합되어 있는 항체에 의해 측정이 이루어지고 이때 항체에 결합되어 있는 효소는 한 분자에 해당한다. 따라서 효소에 의한 반응이 크지 않고 효소의 활성도가 저해되었을 경우 정확한 진단과 높은 신호를 얻기는 어렵다. 그러나 효소가 고정화된 미세튜브에 목적분석대상을 인식하는 앵타머 또는 항체를 결합시켜 이를 반응에 이용하면 종래의 ELISA에 비해 높은 신호를 낼 수 있고 효소의 안정화 역시 제고된다.

[0054] 이에 본 발명자는 효소가 고정화된 미세튜브에 목적분석대상을 인식할 수 있는 앵타머 또는 항체를 결합하여 자석비드 또는 기관에 결합된 목적 분석대상을 진단하고 정량하는 데 사용하는 방법을 개발하였다. 이는 고정화된 효소의 신호증폭현상에 의해 기존의 ELISA 방법으로는 검출할 수 없었던 ml 당 1ng까지의 분석대상도 검출 및 정량이 가능함을 확인하였다.

[0055] 도 1은 트롬빈을 분석대상으로 한 본 발명 분석대상 정량분석법의 일 실시예의 과정을 도시한 개략도이다.

[0056] 본 발명의 분석대상 정량분석법은 먼저, 존재 및 그 양을 분석하고자 하는 목적 분석대상의 포획을 위해 자석비드 또는 기관에 상기 분석대상과 결합하는 앵타머 또는 항체를 결합하는 것으로부터 시작된다. 여기서 자석비드 또는 기관과 분석대상결합 앵타머 또는 항체의 결합은 상기 결합을 위해 생명과학 분야에서 공지된 방법이라면 제한 없이 사용될 수 있는데, 먼저 상기 자석비드 또는 기관의 표면에 중성 카르복시기(-COOH), 그의 이온(-COO⁻), 중성 아민기(-NH₂), 그의 이온(-NH⁺ 또는 -NH₃⁺), 중성 티올기(-SH), 및 그의 이온(-S⁻)으로 이루어진 군에서 선택된 작용기를 구비하게 하는 것이 바람직하다.

[0057] 예컨대, 자석비드 또는 기관과 EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 용액을 혼합하여 반응시킴으로써, 상기 자석비드 또는 기관의 표면에 카르복실기를 작용기로서 구비케 하고, 상기 자석비드 또는 기관을 자력으로 고정시킨 후, 미반응 EDC 용액을 제거한다.

[0058] 이렇게 표면에 작용기를 구비한 자석비드 또는 기관과 앵타머 또는 항체의 구체적인 결합방법으로는, 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphydrylamine) 커플링, 또

는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합 등을 예로 들 수 있고, 특히 아마이드 바인딩 (amide binding)이 바람직하다. 상기 아마이드 바인딩은 자석비드 또는 기관의 카르복실기(-COOH)와 앵타머 5' 말단 또는 항체의 아민기(-NH₂)가 결합함으로써 이루어지는 반응이다.

- [0059] 나아가, 상기 앵타머 또는 항체 결합 후에 자석비드 또는 기관 표면에 존재하는 미반응 작용기가 이후 반응에 예기치 못한 결과를 야기하는 것을 방지하기 위해 BSA (bovine serum albumin) 등으로 보호(blocking)하는 것이 바람직하다.
- [0060] 상기 과정을 거쳐 수득한 앵타머 또는 항체가 결합된 자석비드 또는 기관, 즉 앵타머/항체1-자석비드 또는 기관은 자력으로 분리한 후 분석하고자 하는 분석대상이 함유된 피시험 용액과 혼합하여, 상기 분석대상이 상기 앵타머/항체1-자석비드/기관의 상기 앵타머1 또는 항체1에 결합된 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관을 제조한다.
- [0061] 이처럼 분석대상을 포획한 후에도 마찬가지로, 상기 분석대상 결합 후에 자석비드 또는 기관 표면에 존재하는 미반응 작용기가 이후 반응에 예기치 못한 결과를 야기하는 것을 방지하기 위해 BSA 등으로 보호하는 것이 바람직하다.
- [0062] 한편, 분석대상으로부터 신호를 발생시키기 위한 효소를, 상기 분석대상과 상호작용하는 또 다른 앵타머 또는 항체와 결합시킨다.
- [0063] 본 발명의 정량분석법에서 검출 또는 정량분석하고자 하는 분석대상은 별도의 제한 없이 모든 분석대상을 그 대상으로 할 수 있다.
- [0064] 상기 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관은 본 발명의 최종 분석신호 발생원인 효소가 집적된 미세튜브와의 결합을 위해, 분석대상과 결합하는 또 다른 앵타머2 또는 항체2를 효소가 집적된 미세튜브에 결합시킨다. 여기서 미세튜브란 크기가 밀리미터 단위보다 작고 튜브 형태를 가진 모든 물질을 가리킨다. 본 발명에서는 특히 탄소나노튜브가 바람직하고, 특히 효소를 집적하기 전에 산(acid) 용액에 침지시켰다 꺼내는 산 처리를 거치는 것이 더욱 바람직하다.
- [0065] 그리고, 미세튜브와 효소의 결합은 상기 앵타머/항체1-자석비드/기관에서 자석비드 또는 기관과 앵타머 또는 항체의 결합의 경우와 동일하다.
- [0066] 즉, 먼저 상기 미세튜브의 표면에 중성 카르복시기(-COOH), 그의 이온(-COO⁻), 중성 아민기(-NH₂), 그의 이온(-NH⁺ 또는 -NH₃⁺), 중성 티올기(-SH), 및 그의 이온(-S⁻)으로 이루어진 군에서 선택된 작용기를 구비하게 하는 것이 바람직한데, 예컨대 미세튜브와 EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 용액을 혼합하여 반응시킴으로써, 상기 미세튜브의 표면에 카르복실기를 작용기로서 구비케 한다.
- [0067] 그리고, 이렇게 표면에 작용기를 구비한 미세튜브와 효소의 구체적인 결합방법으로는, 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 커플링, 설프하이드릴아민(sulphydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합 등을 예로 들 수 있고, 특히 아마이드 바인딩 (amide binding)이 바람직하다.
- [0068] 이러한 효소에 상기 목적 분석대상에 특이적인 앵타머 또는 항체를 결합시킨다. 그러나, 상기 앵타머/항체와 효소의 결합물이 종전 ELISA에서와 같이 단일항체-단일효소의 방식이면서 유리된 형태라면 본 발명의 효과를 충분히 발현하기 어렵다. 즉, 목적 분석대상과 결합하는 항체 또는 앵타머에 결합된 효소가 한 분자라면 상기 효소의 활성 저하 내지는 실패시, 목적 분석대상과 결합하더라도 신호를 포착할 수 없어 정확한 분석이 불가능하다. 특히, 유리 형태의 효소라면 전술한 활성 저하 내지 실패의 가능성이 높아 큰 단점으로 작용한다.
- [0069] 따라서, 본 발명에서는 먼저 미세튜브에 신호발생 효소를 다량 결합시키고, 이 효소에 앵타머 또는 항체를 결합시켰다. 이렇게 미세튜브에 결합된 효소는 유리 형태가 아니어서 안정성이 제고되며, 다량의 효소로 인해 일부 효소가 활성 저하 내지 실패되더라도 충분한 신호를 발생시킬 수 있고, 목적 분석대상의 농도가 극히 낮더라도 검출이 가능한 장점이 있다.
- [0070] 이처럼 미세튜브에 효소를 다량 결합시키기 위해 본 발명은 특히 효소들 사이를 가교결합시키는 것을 특징으로 한다.

- [0071] 일반적으로, 효소는 물 속에서 한 분자씩 떨어져 존재하나 암모늄 설페이트와 같은 염을 첨가하면 수 개씩 뭉쳐 엉김(aggregation) 내지 침전(precipitation)이 일어나게 된다. 이러한 현상을 일으키는 염 종류에는 염화나트륨(sodium chloride), 황산나트륨(sodium sulfate), 인산나트륨(sodium phosphate), 염화칼륨(potassium chloride), 황산칼륨(potassium sulfate), 인산칼륨(potassium phosphate) 등을 예로 들 수 있다
- [0072] 뿐만 아니라, 글루타르알데히드와 같이 효소의 아민기와 반응하는 작용기를 2개 이상 가진 아민 결합 2 관능성 화합물을 첨가하면 효소 사이에 개입하여 양쪽 효소들과 서로 결합함으로써 가교결합을 형성할 수 있다. 이러한 현상을 일으키는 2 관능성 화합물 종류에는 글루타르알데히드(glutaraldehyde), 비스(이미도에스테르)[bis(imido esters)], 비스(석신이미딜에스테르)[bis(succinimidyl esters)], 디이소시아네이트(diisocyanate) 및 디에시드클로라이드(diacid chloride) 등을 들 수 있다.
- [0073] 이러한 화합물들을 첨가하면 상기 미세튜브에 효소를 더 많이 집적할 수 있어 신호 증폭효과를 더욱 더 제고할 수 있다.
- [0074] 나아가, 상기 앵타머 또는 항체 결합 후에 미세튜브 표면에 존재하는 미반응 작용기가 이후 반응에 예기치 못한 결과를 야기하는 것을 방지하기 위해 BSA (bovine serum albumin) 등으로 보호(blocking) 하는 것이 바람직하다.
- [0075] 이렇게 앵타머2 또는 항체2가 결합된 효소가 집적된 미세튜브는 원심분리 등 공지의 방법에 의하여 분리한 후, 상기 제조된 분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관과 함께 혼합되어 목적 분석대상을 매개체로 미세튜브-효소-앵타머/항체2-분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관의 형태의 복합체를 이루게 되고 이를 자력을 이용하여 분리해 낸다.
- [0076] 분리된 미세튜브-효소-앵타머/항체2-분석대상-앵타머/항체1-자석비드/기관은 상기 효소 고유의 반응을 통해 신호가 증폭되고 이를 통해 목적 분석대상의 존재 및 정량을 신속, 정확하게 파악할 수 있다.
- [0077] 나아가, 본 발명의 정확한 분석을 위해 각 단계 이후에 완충액 등으로 세척하는 것이 바람직한데, 특히 상기 앵타머/항체1-자석비드/기관 제조단계, 효소-미세튜브 제조단계, 자력에 의한 분리단계, 자석비드 또는 기관 또는 미세튜브 표면의 미반응 결합부위 보호단계 이후 세척하는 것이 더욱 바람직하다. 상기 단계 외에도 세척단계를 수행하는 것이 가능함은 물론이다.
- [0078] 이하, 본 발명의 실시예에 대하여 설명한다.
- [0079] **실시예**
- [0080] 실시예 1: 앵타머1-자석비드의 제조
- [0081] 분석대상을 트롬빈으로 한 경우, 제 1 트롬빈결합 앵타머가 결합된 자석비드를 EDC 커플링법 (Mahmoud et al. 2005)으로 다음과 같이 제작하였다. 자석비드 ($10 \mu\text{l}$, $7-12 \times 10^9$ 비드/ml)를 0.01 M의 NaOH 수용액 및 탈이온수로 세척했다. 세척 후, 용액을 자석 위에 1 분 동안 놓아 세척용액을 제거했다. 이어서, EDC [N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride] 용액 ($500 \mu\text{l}$, 20 mg/ml)을 첨가하고, 4 °C에서 30 분 동안 교반 (200 rpm)하며 배양했다. 배양 후, EDC 용액을 제거하고 나서 자석비드를 PBS (phosphate buffered saline) 용액 (10 mM, pH 7.4) 1000 μl 에 재현탁시키고, 제 1 트롬빈결합 앵타머 (5'-NH₂-GGT TGG TGT GGT TGG -3', 20 μl , 100 μM . Geno-Tech Co. 한국)와 혼합한 다음 실온에서 1 시간 동안 교반 (200 rpm)하며 배양했다. 배양 후, 자석비드 및 제 1 트롬빈결합 앵타머의 혼합액을 자석 위에 1 분 동안 놓아, 미결합 앵타머를 제거했다. 결합된 앵타머의 양은 분광계로 260 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 앵타머가 결합된 자석비드 (앵타머1-자석비드)를 1000 μl 의 10 mM PBS (pH 7.4)로 3 회 세척하였다. 이어서, 자석비드 표면의 미반응 카르복실기를 보호하기 위해, 1000 μl 의 보호용액 (0.1 % BSA [bovine serum albumin] 및 0.05 % Tween 20)을 첨가하고, 실온에서 교반 (200 rpm)하며 배양하였다. 배양 후, 상기 용액을 자석 위에 1 분 동안 놓아 보호용액을 제거하고, 1000 μl 의 10 mM PBS 용액 (pH 7.4)으로 3 회 세척하고 나서, 앵타머가 결합된 자석비드 (앵타머1-자석비드)를 10 μl 의 10 mM PBS 용액 (pH 7.4)에 재현탁시켰다.
- [0082] 실시예 2: 분석대상-앵타머1-자석비드의 제조
- [0083] 실시예 1의 앵타머1-자석비드를 이용하여 트롬빈을 다음과 같이 검출하였다. 트롬빈 (Abcam. USA)을 함유한 PBS 용액 (트롬빈 농도 : 1 ng ~ 1 $\mu\text{g/ml}$)에 실시예 1의 앵타머1-자석비드 ($10 \mu\text{l}$, $0.7-1.2 \times 10^8$ 비드)를 현탁시켰다. 트롬빈 분석대상의 검출을 위해, 혼합액을 실온에서 1 시간 동안 교반(200 rpm)하면서 배양하였다. 배양

후, 트롬빈-애타머1-자석비드 복합체를 자석으로 분리하고, 상층액(supernatant)은 포획된 트롬빈의 양을 Micro BCA 법으로 측정하기 위해 별도의 튜브로 옮겼다. 트롬빈-애타머1-자석비드 복합체를 1000 μ l의 10 mM PBS 용액 (pH 7.4)으로 5 회 세척하고 나서, 1000 μ l의 보호용액 (0.1 % BSA 및 0.05 % Tween 20)을 첨가하고, 실온에서 교반 (200 rpm)하며 배양하였다. 배양 후, 상기 용액을 자석 위에 1 분 동안 놓아 보호용액을 제거하고, 1000 μ l의 10 mM PBS 용액 (pH 7.4)으로 3 회 세척하고 나서, 트롬빈-애타머1-자석비드 복합체를 1000 μ l의 10 mM PBS 용액 (pH 7.4)에 재현탁시켰다.

[0084] 실시예 3: 애타머2-효소-미세튜브의 제조

[0085] 탄소나노튜브를 미세튜브로 하고, 포도당 산화효소를 집적효소로 한 경우, 제 2 트롬빈결합 애타머가 결합된 애타머2-효소-미세튜브를 다음과 같이 제조하였다. 탄소나노튜브 (다수 벽체형, 외경 30 $\square$ 15 nm, 길이 1~5 μ m, 순도 > 95 %)를 Nanolab, Inc. (Newton, MA, USA)로부터 구입하고, 상기 탄소나노튜브 100 mg을 H₂SO₄ (98 %, 7.5 ml) 및 HNO₃ (70 %, 2.5 ml)를 함유한 산 용액에 첨가한 후, 실온에서 교반하면서 하룻 밤 동안 처리하였다. 상기 처리한 탄소나노튜브를 탈이온수로 세척하고 80 $^{\circ}$ C 진공오븐에서 건조시켰다. 이어서, EDC 커플링 법으로 카르복실화된 탄소나노튜브에 포도당 산화효소 (Sigma-Aldrich, USA)를 다음과 같이 결합시켰다. 탄소나노튜브 표면에 작용기를 도입하기 위해, 산 처리된 탄소나노튜브 (0.1 mg)를 탈이온수에 현탁시키고, 이어서 MES (2-[N-morpholino] ethane sulfonic acid) 완충액 (0.1 M, pH 6.5) 0.4 ml, EDC 용액 (10 mg/ml) 0.2 ml 및 NHS(N-hydroxysuccinimide) 용액 (50 mg/ml) 0.4 ml를 혼합하고, 실온에서 30 분 동안 교반 (200 rpm)하며 배양했다. 배양 후 EDC 용액 등을 원심분리로 제거하고 나서, PB (phosphate buffer, 0.1 M, pH 7.4)에 재현탁하여 농도를 2 mg/ml로 조정하였다. 그런 다음, 포도당 산화효소 용액 (10 mg/ml) 0.5 ml를 탄소나노튜브 혼합액 1 ml에 첨가하고, 실온에서 1 시간 동안 교반 (100 rpm)하면서 배양했다. 배양 후, 암모늄 설페이트 65 % 수용액 0.67 ml를 첨가하고 30 분 동안 배양했다. 가교결합을 위해 제조된 효소-미세튜브를 글루타르알데히드 35 μ l로 처리하고, 4 $^{\circ}$ C에서 하룻 밤 동안 교반 (50 rpm)하며 배양했다. 상기 배양된 효소-미세튜브를 PB (0.1 M, pH 7.4)로 원심분리를 통하여 세척하였다. 최종 효소-미세튜브를 PB (0.1 M, pH 7.4)으로 3 회 세척하고, 원심분리로 분리하였다.

[0086] 또 다른 트롬빈결합 애타머2를 최종 효소-미세튜브에 결합시키기 위해 EDC 활성화반응을 재실행한다. 최종 효소-미세튜브를 1 ml의 탈이온수에 재현탁하였다. 이어서 MES 완충액 (0.1 M, pH 6.5) 0.4 ml, EDC 용액 (10 mg/ml) 0.2 ml 및 NHS 용액 (50 mg/ml) 0.4 ml를 혼합하고, 실온에서 30 분 동안 교반 (200 rpm)하며 배양했다. 배양 후, EDC 용액을 제거하고 나서 효소-미세튜브를 PBS 용액 (10 mM, pH 7.4) 950 μ l에 재현탁시키고, 제 2 트롬빈결합 애타머 (29 bases, 5'-NH₂-AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT-3' 50 μ l, 50 μ M, Geno-Tech Co. 한국)와 혼합한 다음 실온에서 1 시간 동안 교반 (200 rpm)하며 배양했다. 배양 후, 효소-미세튜브 및 제 2 트롬빈결합 애타머의 혼합액을 원심분리를 통해 미결합 애타머를 제거했다. 결합된 애타머의 양은 분광계로 260 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 애타머가 결합된 효소-미세튜브 (애타머2-효소-미세튜브)를 1000 μ l의 10 mM PBS (pH 7.4)로 3 회 세척하였다. 이어서, 효소와 미세튜브의 미반응 카르복실기를 보호하기 위해, 1000 μ l의 보호용액 (0.1 % BSA 및 0.05 % Tween 20)을 첨가하고, 실온에서 교반 (200 rpm)하며 배양하였다. 배양 후, 원심분리를 통해 보호용액을 제거하고, 1000 μ l의 10 mM PBS 용액 (pH 7.4)으로 3 회 세척하고 나서, 0.1 M Tris-HCl 완충액 (0.1 M, pH 7.4)으로 재세척하고, 30 분 동안 Tris-HCl 완충액 (0.1 M, pH 7.4)으로 교반 (100 rpm)하면서 배양하여 보호했다. 애타머가 결합된 효소-미세튜브를 1000 μ l의 10 mM PBS 용액 (pH 7.4)에 재현탁시켰다.

[0087] 실시예 4: 분석대상의 분석

[0088] 포획된 트롬빈의 검출을 위해, 실시예 2의 트롬빈-애타머1-자석비드 (0.1mg/ml) 1 ml를 실시예 3의 애타머-효소-미세튜브 (1.5 mg/ml) 1 ml와 함께 1 시간 동안 200 rpm으로 교반하면서 배양했다. 자석장치 위에 1분간 정지한 다음 분리하고, 세척 완충액 (0.1 % BSA 및 0.05 % Tween 20을 함유한 10 mM PBS)으로 3 회 세척 후, 제조된 면역 복합체를 통상적인 GO 분석법 (Bergmeyer et al. 1974) 으로 측정했다.

[0089] 전체 면역 분석법은 실온에서 수행되었으며, 전기화학적인 방법을 통한 분석도 함께 진행되었다.

[0090] 구체적으로, 0.1 mg의 자석비드를 통해 검출될 수 있는 최대 양인 1 μ g의 트롬빈 검출을 위해 요구되는 애타머2-효소-미세튜브의 농도를 조사하기 위하여, 실시예 3의 애타머2-효소-미세튜브의 농도를 변화시켜 가면서 실험하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 트롬빈이 존재하지 않는 경우 (다른 분석대상이 존재할 경우)에는 애타머2-효소-미세튜브의 농도가 증가하여도 그 반응신호가 증가하지 않음을 확인함으로써 분석대상 결합 애타머가

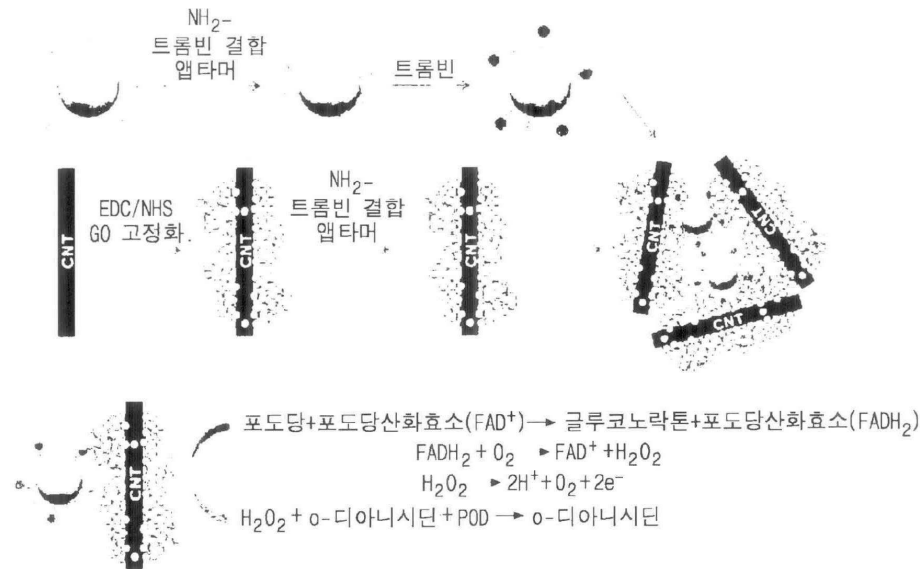
특이적으로 목적 분석대상에만 결합하는 것을 알 수 있었다.

- [0091] 더하여 본 발명에서의 검출한계 및 정량화 능력을 평가하기 위해, PBS로 희석한 다양한 농도 (1000 ng, 500 ng, 100 ng, 10 ng, 1 ng 또는 0 ng/ml)의 트롬빈 샘플에서의 분석이 실시되었다. 이와 같이 수득된 다양한 농도의 분석대상이 결합된 트롬빈-애타머1-자석비드는 상기 기술된 도 2에서 최적화된 농도의 애타머2-효소-미세튜브에 의해 정량되었다.
- [0092] 상기 미세튜브-효소-애타머2-분석대상-애타머1-자석비드의 형태의 복합체는 상기 복합체 중 효소인 포도당 산화 효소에 의해 포도당의 첨가에 따른 효소반응 (도 1)을 일으키며 이때의 반응을 통해 신호가 증폭되고 이를 통해 트롬빈의 존재 및 정량을 신속, 정확하게 파악할 수 있었다.
- [0093] 도 3은 실제 시료가 분리된 상태를 촬영한 사진이다. 왼쪽의 BSA대조군은 목적 분석대상인 트롬빈이 존재하지 않고 다른 단백질인 BSA가 존재하기 때문에 목적 분석대상과 선택적으로 결합하는 애타머와 결합을 이루지 못한다. 따라서 애타머1-자석비드 및 애타머2-효소-미세튜브와 복합체를 이루지 못하기 때문에 애타머2-효소-미세튜브는 함께 분리되지 못하는 것이다. 하지만 오른쪽의 실시예인 목적 분석대상 트롬빈이 존재하는 경우에는 트롬빈을 매개체로 애타머1-자석비드와 애타머2-효소-미세튜브가 샌드위치 결합을 이루게 된다. 따라서 자석비드가 자력에 의해 분리되면서 이때 복합체를 이룬 자석비드-애타머1-목적단백질(트롬빈)-애타머2-효소-미세튜브 복합체가 자석쪽으로 분리되는 것이다. 그리고, 이렇게 분리된 애타머2-효소-미세튜브 양에 따라 목적단백질의 농도를 정량할 수 있다.
- [0094] 도 4는 도 3과 같은 자력에 의한 분리단계 후 세척과정을 통해 복합체를 이룬 시료들만 분리해 SEM (Scanning electron microscope: 주사전자현미경)으로 촬영한 사진이다. 왼쪽 시료인 BSA대조군시료는 세척과정에서 분산되어 있던 애타머2-효소-미세튜브는 제거된다. 그리고 애타머1-자석비드만 회수할 수 있다. 오른쪽 실시예 트롬빈 시료는 맑게 분리된 상등액만 제거되고 자석비드-애타머1-목적단백질(트롬빈)-애타머2-효소-미세튜브 복합체를 회수할 수 있다. 이를 SEM을 통해 관찰한 결과 목적 분석대상이 없는 경우 아주 미세하고 비특이적 결합으로 인한 미량의 미세튜브 복합체만 보일 뿐 대부분 자석비드만 보이는 반면, 오른쪽에 트롬빈이 존재하는 경우 자석비드와 미세튜브가 서로 엉켜있는 모습을 볼 수 있다. 위쪽 행은 10000 배율로 관찰하였을 때의 모습이고 아래 행은 30000 만배의 고배율로 관찰했을때의 모습이다.
- [0095] 도 5는 상기 복합체 시료 용액 10 μ l를 아크릴 큐벳에 넣고 990 μ l의 반응액 (포도당 100 mg/ml, o-Dianisidine 10 mg/ml 및 퍼옥시데이즈 [Sigma-Aldrich, USA] 3.79 mg/ml의 혼합물)을 첨가한 본 발명 정량분석법의 결과를 나타내고, 도 6 및 도 7은 Ag/AgCl 기준전극, 유리탄소 작용전극, 백금 상대전극으로 구성된 전압전류측정기로 전기화학적으로 분석한 결과를 나타낸다.
- [0096] 실시예 5: 안정성테스트
- [0097] 실시예 1와 실시예 3에서 제조된 각각의 애타머1-자석비드와 애타머2-효소-미세튜브를 40 $^{\circ}$ C의 고온에 보관하면서 실시예 4의 분석대상 분석을 수행하였다. 고온에 보관했던 물질들로 다시 상온에서 분석대상을 정량한 결과 그 활성이 100 시간 동안 90 % 이상 유지되는 것을 도 8로부터 확인할 수 있었다. 비교예는 암모늄 설페이트와 글루타르알데하이드 처리를 하지 않은 것으로서 이 경우에는 미세튜브 위에 효소가 한 층으로만 형성된다. 그 결과 쉽게 안정성을 잃어버리는 것을 확인할 수 있다.
- [0098] 본 발명에서는 목적 분석대상의 존재 여부 및 그 양을 조사하기 위하여, 상기 분석대상에 결합하는 두 종류의 애타머 또는 항체를 각각 다른 물질에 결합시키고 분석대상을 매개체로 이들을 결합한 복합체를 제조하였다. 이 복합체는 자석비드 또는 기관의 자력에 의해 쉽고 빠르게 분리될 수 있고, 효소가 고정화된 미세튜브에 의해 적은 양으로도 큰 신호 증폭효과를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 또한 1 μ g의 분석대상부터 0.5 ng까지 넓은 범위의 분석대상을 검출 및 정량할 수 있다는 장점이 있으며, 종래 ELISA의 안정성에 대한 단점을 보완 및 개선함으로써 저 농도의 분석대상을 검출 및 정량할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0099] 이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대해서 도시하고 설명하였으나, 본 발명은 상술한 특징의 실시예에 한정되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본원 발명의 요지를 벗어남이 없이 다양한 변형 실시가 가능함을 알 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명의 범위는 위의 실시예에 국한해서 해석되어서는 안되며, 후술하는 특허청구범위 뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 할 것이다.
- [0100] 본 발명은 한국연구재단의 바텔연구소 유치활용을 통한 급성 호흡기 감염 및 중증 폐혈증 조기진단용 나노바이오 (K2060100000209E010000210), 한국과학재단의 고활성, 고안정 나노-분석대상 원천기술 개발 및 ELISA에서의 응용 (과제번호:R0911491, 과제고유번호: 20090082314) 및 한국연구재단의 트립신 가수분해와 바이오연료전지를

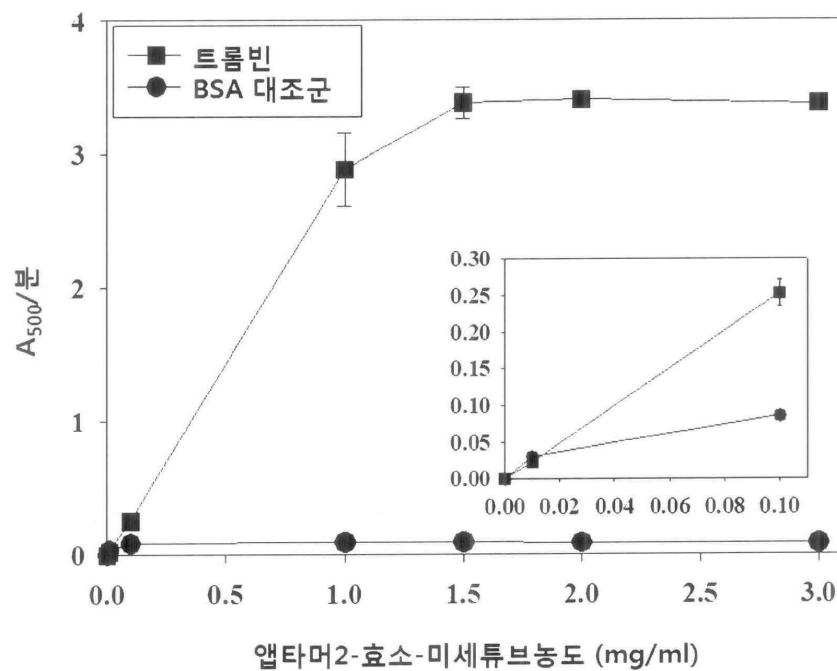
위한 나노효소코팅의 안정성 및 활성 기작에 대한 연구 (과제번호:R0904822, 과제고유번호: 20100016464)의 지원을 받아 수행되었습니다.

도면

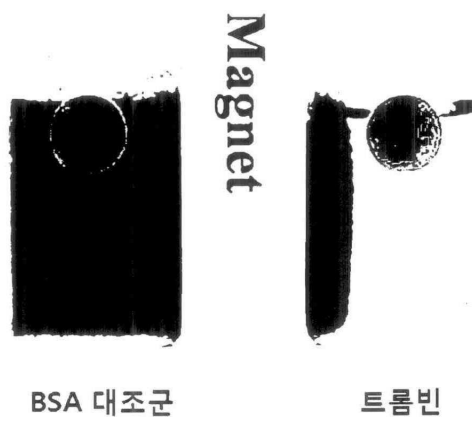
도면1



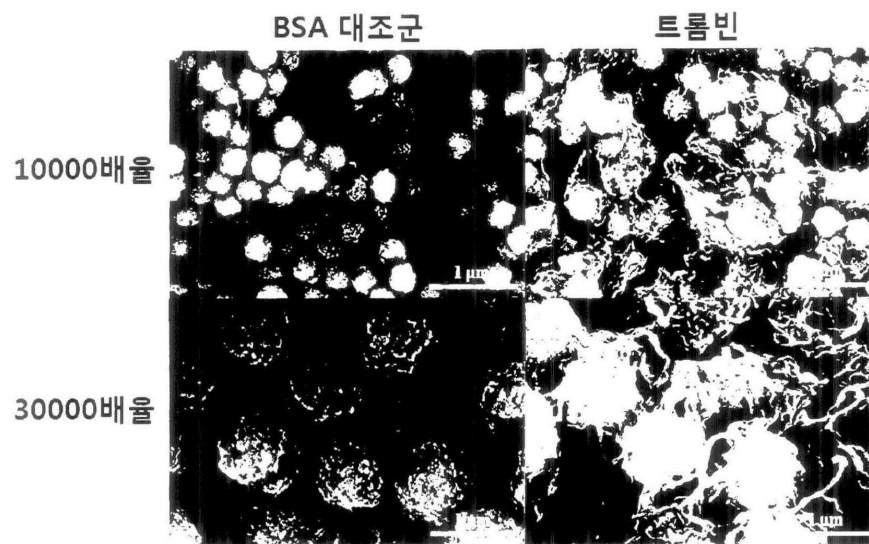
도면2



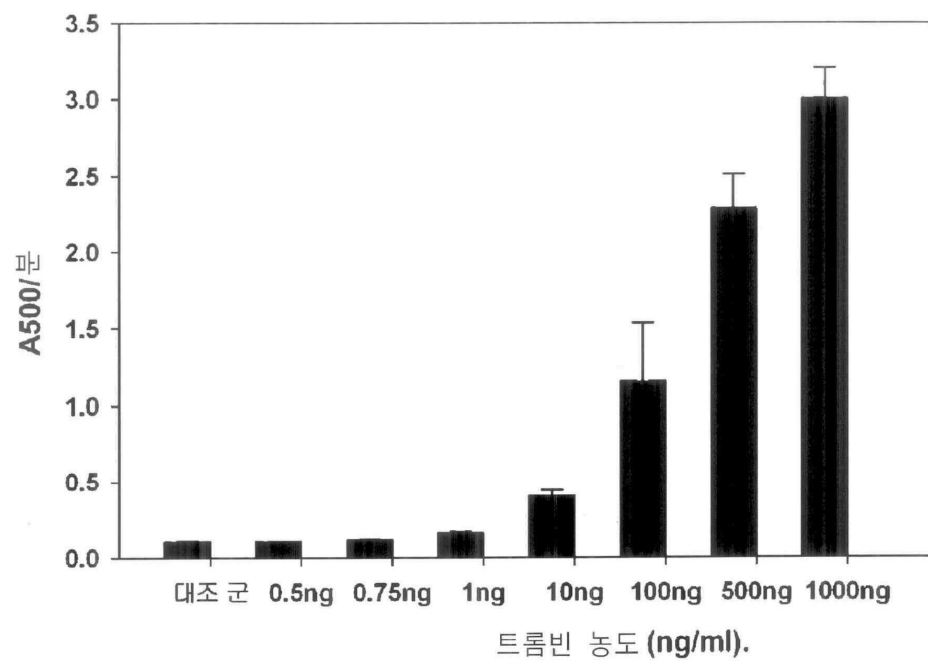
도면3



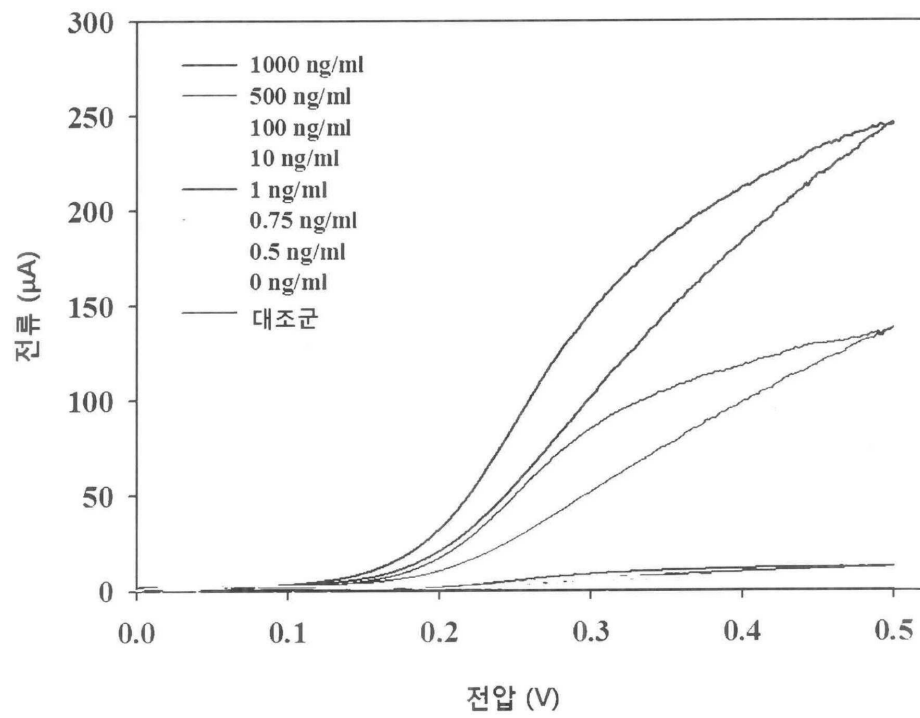
도면4



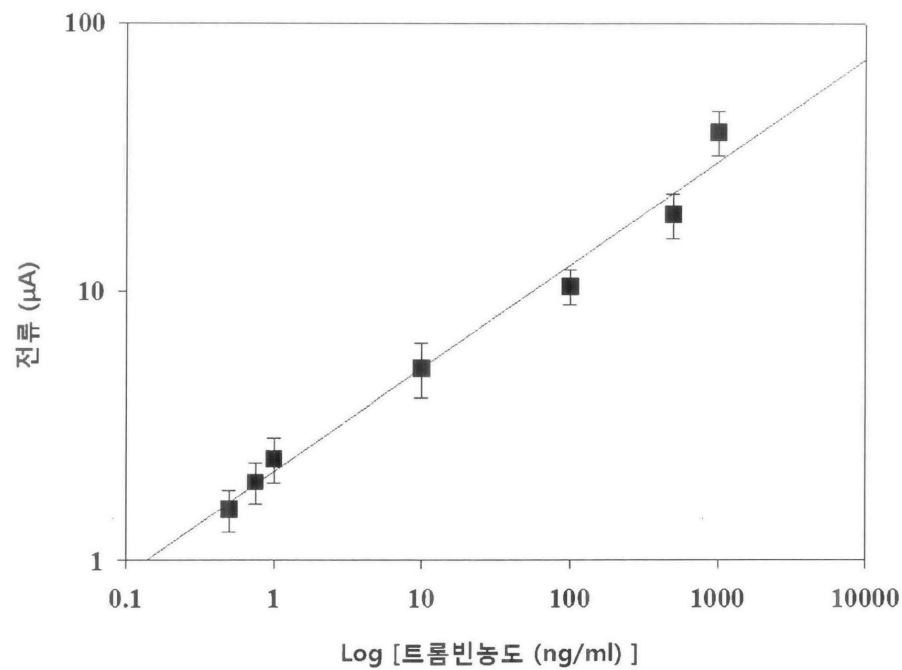
도면5



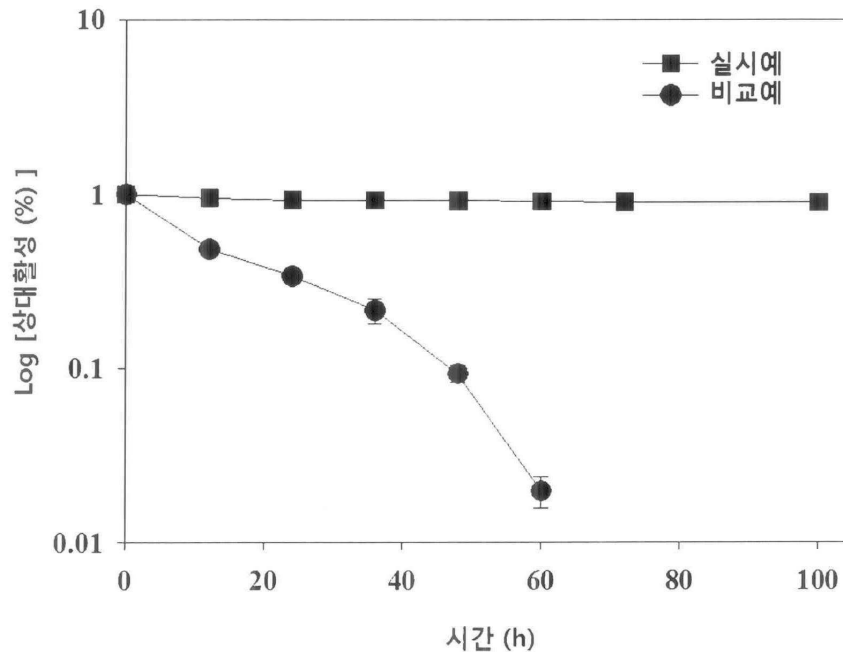
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Korea University Industry and Academy Cooperation
- <120> Quantitative Analysis Using Minute Tube with Accumulated Enzyme
- <130> M09-7373-FD
- <160> 2
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 15
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Aptamer1 for Thrombin
- <400> 1
- ggttggtgtg gttgg 15
- <210> 2
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Aptamer2 for Thrombin
- <400> 2
- agtccgtggt agggcaggtt ggggtgact 29