



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0056511
(43) 공개일자 2013년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)
(21) 출원번호 10-2011-0122152
(22) 출원일자 2011년11월22일
심사청구일자 2011년11월22일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
주식회사 엘지생활건강
서울특별시 종로구 새문안로 58 (신문로2가)
(72) 발명자
구만복
서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3 (이문동)
이지은
서울특별시 강서구 강서로26길 57, 광명빌라 302호 (화곡동)
김지훈
서울특별시 성북구 북악산로27길 28, 105호 (종암동)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 11 항

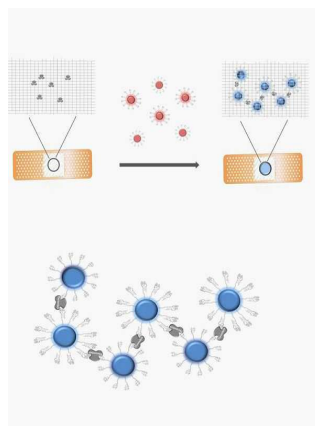
(54) 발명의 명칭 섬유 상 앵타머-금나노입자 복합체를 이용한 표적물질의 검출방법

(57) 요약

본 발명은 섬유 상 앵타머-금나노입자 복합체를 이용한 표적물질의 검출방법에 관한 것으로서, 섬유(fabric) 소재의 지지체 상에 검출하고자 하는 샘플을 고정화시키고, 앵타머-금 나노입자 복합체 용액을 분무하여 지지체 표면의 색을 육안으로 판단하는 단계를 포함하는 표적물질의 검출방법에 관한 것이다.

특히, 본 발명에 따른 표적물질의 검출방법은 앵타머와 금 나노입자의 혼합 비율 및 앵타머-금 나노입자 복합체 농도의 조절을 통해 특별한 증폭 과정 및 기기 사용 없이 섬유 소재 지지체 상에서 미량의 표적물질을 육안으로 판별 가능하며, 어느 장소에든 다양한 표적물질에 대해 빠르고 매우 간편한 방식으로 존재 여부를 판별할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

섬유(fabric) 소재의 지지체 상에 검출하고자 하는 샘플을 올려놓고, 앵타머-금 나노입자 복합체 용액을 분무하여 지지체 표면의 색을 육안으로 판단하는 단계를 포함하는 표적물질의 검출방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

섬유(fabric)는 면, 모, 리넨, 석면, 유리섬유, 합성섬유, 탄소섬유, 셀룰로오스계 펄프, 고분자 나노 섬유 또는 부직포인 표적물질의 검출방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

앵타머-금 나노입자 복합체는 제1 앵타머와 금 나노입자의 복합체 및 제2 앵타머와 금 나노입자의 복합체를 포함하는 표적물질의 검출방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

앵타머-금 나노입자 복합체는 금 나노입자와 앵타머를 1: 8 내지 22의 몰수비로 혼합하여 제조한 표적물질의 검출방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

앵타머-금 나노입자 복합체의 농도는 6 내지 16 nM인 표적물질의 검출방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

표적물질은 단백질, 세포, 펩타이드, 핵산, 지질, 무기 화합물, 저분자 유기 물질, 금속이온, 호르몬 또는 항생제인 표적물질의 검출방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

단백질은 트롬빈, IgG 또는 PDGF-BB(platelet-derived growth factor-BB)인 표적물질의 검출방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

검출 가능한 표적물질의 양은 0.001 pmol 이상인 표적물질의 검출방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

표적물질 존재 시 지지체의 표면이 푸른색으로 변화하는 표적물질의 검출방법.

청구항 10

섬유 소재의 지지체 및 앵타머-금 나노입자 복합체를 포함하는 표적물질 검출용 키트.

청구항 11

섬유 소재의 지지체 및 앵타머-금 나노입자 복합체를 포함하는 표적물질 검출용 센서.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 섬유 상 앵타머-금나노입자 복합체를 이용한 표적물질의 검출방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현장검사(Point-of-care, POC) 진단방법은 환자와 같은 장소에서 행해지는 진단 검사로, 환자가 검사장소에 있는 동안 결과를 알 수 있는 특성을 지녀, 진단 및 치료의 신속화를 가능케 한다. 이러한 장점은 병원 방문이전 가정에서의 간편 진단의 수요 증가와 맞물려, POC 진단 시장의 큰 성장이 기대되고 있으며, 대표적으로 혈당 검사, 응고 검사, 당뇨병 관련 검사, 임신 진단, 약물 남용 진단 등 여러 분야에 실제 적용되고 있는 실정이며, 최근에는 바이오 마커를 기반으로 한 간편한 암 진단까지 확대되고 있다.

[0003] 이러한 POC 진단을 위한 바이오 리셉터로는 대다수 항체가 쓰여 왔으나, 항체는 화학적 불안정성, 높은 단가 및 고정화 시 표적 물질에 대한 친화력 감소 등의 문제점을 지니고 있다. 이러한 단점들의 극복하는 방향으로 최근 제 3세대 분자 인식 물질인 앵타머를 이용한 진단에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004] 앵타머는 올리고뉴클레오타이드 물질로서 단일 사슬의 DNA나 RNA로 이루어져 있으며, 단백질, 펩타이드, 핵산, 지질, 무기 화합물, 저분자 유기 물질, 금속이온, 항생제뿐만 아니라 세포에 이르는 다양한 표적 물질과 친화력을 갖는 특이성이 지니며, SELEX라 불리는 과정을 거쳐 *in vitro* 상에서 쉽고 값싸게 선별해낼 수 있다. 또한, 화학적으로 합성이 가능하고 열과 pH 변화에 대하여 비교적 유연하기 때문에 항체를 대체하는 분자인식 물질로 각광받고 있다.

[0005] 앵타머를 이용한 POC 진단용 대표적 센서는 금 나노입자를 이용한 스트립기반 비색분석법(colorimetric)을 들 수 있다. 금 나노입자는 수용액 상에서 표면 플라즈몬 공명 현상으로 인해 고유의 붉은색을 나타낸다. 이 색은 금 나노입자 사이의 거리에 따라 변화한다. 금 나노입자 사이의 거리가 가까워지면 각 금 나노입자가 갖는 표면 플라즈몬이 결합하여 붉은색에서 푸른색으로 색 변화가 일어난다. 바이오센서 분야의 응용 도구로써 금 나노입자는 고유의 물리적, 화학적 특성뿐만 아니라 높은 표면적을 가지고 있기 때문에 다양한 물질로 표면 변형이 가능하다. 따라서, 금 나노입자 표면에 감지 물질을 고정화하여 표적 물질을 진단/검출하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 이러한 색 변화는 수용액 상에서 이루어지므로 많은 양의 시료와 금 나노입자가 필요할 뿐만 아니라 고감도의 검출을 위해서는 결국 자외-가시선 분광광도계(UV-vis spectrophotometer)와 같은 장비가 추가

적으로 필요하다. 그래서 위의 금 나노입자 비색분석법을 활용한 센서를 개발하는 연구가 진행되고 있다.

[0006] 기존의 스트립 형태로 제작된 센서는 항체를 이용한 샌드위치 분석법(sandwich assay)과 비슷한 방법으로 스트립 표면의 컨트롤 영역에는 금 나노입자에 고정된 앵타머 시퀀스에 상보적인 DNA 시퀀스를, 테스트 영역에는 표적 물질에 특이적으로 결합하는 또 다른 앵타머 시퀀스를 고정화하여 프로브로 작용한다. 따라서, 테스트 시료를 스트립에 주입하면 표적 물질이 테스트 영역의 고정화된 앵타머 시퀀스와 결합하여 그 영역에 머물게 되므로 이 표적물질과 금 나노입자에 고정화된 이차적인 DNA 앵타머가 결합하여 테스트 영역에 금 나노입자 고유의 붉은색이 발현된다. 표적 물질이 없다면 테스트 영역에는 금 나노입자가 결합하지 못하여 붉은색이 나타나지 않고, 컨트롤 영역에만 금 나노입자의 앵타머가 상보적인 DNA 시퀀스와 결합하여 붉은색이 발현된다. 이러한 스트립 센서는 고감도의 표적 물질 진단이 가능하나, 스트립의 디자인이 복잡할 뿐만 아니라 그에 따라 생산 단가도 높아지는 단점을 지니고 있다.

[0007] 트롬빈은 응집 반응 과정에서 피브리노겐을 피브린으로 바꾸는 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 혈액 응집에 연관된 반응들을 촉진시키는 단백질이다. 혈액 응집 반응 장애는 장기적으로 심장 발작, 심장 마비와 같은 심각한 질환을 일으키는 원인이 된다. 그리고 트롬빈은 혈관 경련을 일으켜 혈관 출혈로 이어지게 만드는 잠재적인 주 요소이다. 출혈된 뇌동맥류의 혈액이 뇌동맥 근처에서 응고되면서 분비된 트롬빈으로 인해 장기적으로 심각한 혈관 폐색과 경화가 일어나 결과적으로 뇌경색을 일으킬 수 있다. 따라서, 트롬빈은 인체 내에서 일어날 수 있는 비정상적인 혈액 응집 반응과 연관된 다양한 질병을 진단할 수 있는 주요한 바이오 마커이다.

[0008] 트롬빈과 같은 단백질 진단을 위해 기존에 흔히 사용되고 있는 기술은 방사면역측정법(radio-immunoassay), 효소면역분석법(ELISA), 형광(fluorescence), 표면향상라만분광법(SERS) 등이 있다. 이는 정확하고 민감한 단백질 진단이 가능할지라도 여전히 샘플을 정제하고 배양하거나 분리하는 과정 등이 필요하여 많은 시간과 비용이 든다. 또한, 고가의 장비와 그 장비를 다루고 분석할 전문 인력이 필요하여 실험실 조건에서 이루어져야 한다는 한계점이 있다.

[0009] 금 나노입자를 활용한 비색 분석법을 센서에 적용한 선행연구를 살펴보면, 셀룰로오스 페이퍼에 금 나노입자를 코팅하여 휴대가 가능하면서 적은 시료로 쉽게 표적물질을 감지할 수 있게 만들었다[비특허문헌 1]. 그러나 효소를 처리해야 하고 민감도가 떨어지는 단점이 있다.

[0010] 스트립 바이오센서[비특허문헌 2], 또한 고감도의 단백질 검출이 가능하지만 스트립을 제작하는 과정이 복잡하고 별도로 스트립 리더기가 필요하다는 한계점을 가지고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) W. Zhao, M. Monsur All, S. D. Aguirre, M. A. Brook, and Y. Li, Anal. Chem. 80 (2008) 8431-8437

(비특허문헌 0002) H. Xu, X. Mao, Q. Zeng, S. Wang, A.-N. Kawde, and G. Liu, Anal. Chem. 81 (2009) 669-675

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 이에, 본 발명자들은 기존 기술과 같이 복잡한 디자인 및 제작 과정 없이 일반적인 섬유(또는 일회용 의료밴드)를 지지체로 하고 앵타머-금 나노입자 복합체를 사용하여 표적물질을 육안으로 단시간 내에 판별 가능한 검출방법을 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 앵타머가 고정화된 금 나노입자를 이용하여 다른 감지물질에 비해 안정적으로 다양한 표적물질을 고감도로 감지하면서, 간편하고 저렴한 섬유 표면 상에서 수 분 이내로 빠르게 반응이 일어나 다른

별도의 측정 기구 없이 육안으로 색 변화를 관찰할 수 있는 표적물질의 검출방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은
- [0015] 섬유(fabric) 소재의 지지체 상에 검출하고자 하는 샘플을 올려놓고, 앵타머-금 나노입자 복합체 용액을 분무하여 지지체 표면의 색을 육안으로 판단하는 단계
- [0016] 를 포함하는 표적물질의 검출방법을 제공한다.
- [0017] 상기 과제를 해결하기 위한 다른 수단으로서, 본 발명은
- [0018] 섬유 소재의 지지체 및 앵타머-금 나노입자 복합체를 포함하는 표적물질 검출용 키트 또는 센서를 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명은 금 나노입자에 고정화한 서로 다른 두 개의 앵타머가 함께 표적물질에 결합하여 금 나노입자 사이의 거리가 가까워져서 나타나는 색 변화를 이용하여 표적물질을 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0020] 특히, 본 발명은 앵타머를 금 나노입자에 고정화하여 기존의 앵타머와 금 나노입자 간의 흡착 방식을 이용한 색도 분석 보다 안정한 조건에서 더 높은 민감도를 갖는 색도 분석이 가능하다. 또한, 앵타머와 금 나노입자의 혼합 비율 및 앵타머-금 나노입자 복합체 농도 조절을 통해 특별한 증폭 과정 및 기기 사용 없이 섬유 소재 지지체 상에서 미량의 표적 물질을 육안으로 판별 가능케 함으로써, 기존의 검출 키트의 복잡한 제작 과정의 단점을 해결하였다. 더불어, 어느 장소에든 다양한 표적물질에 대해 빠르고 매우 간편한 방식으로 존재 여부를 판별할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 섬유 기반의 간편한 표적물질의 검출과정을 나타낸 모식도와 응집된 금 나노입자를 확대한 것이다.
- 도 2는 실시예 1에 따른 금 나노입자에 앵타머가 고정화된 복합체를 나타낸 것이다[좌: TBA15 고정화된 금 나노입자 복합체, 우: TBA29 고정화된 금 나노입자 복합체]
- 도 3은 표적물질과 결합 전 앵타머-금 나노입자 복합체로서 안정화된 모습을 나타낸 것이다.
- 도 4는 생성한 금 나노입자를 TEM(Transmission Electron Microscopy)으로 확인한 결과이다.
- 도 5는 일회용 의료밴드 상에서 다양한 혼합비율을 갖는 앵타머-금 나노입자 복합체에 따라 금 나노입자의 색 변화 정도를 관찰한 결과이다.
- 도 6은 일회용 의료밴드 상에서 다양한 농도의 앵타머-금 나노입자 복합체에 따라 금 나노입자의 색 변화 정도를 관찰한 결과이다.
- 도 7은 섬유 지지체 및 일회용 의료밴드 상에서 다양한 농도의 표적 물질에 따라 금 나노입자의 색 변화 정도를 관찰한 결과이다.
- 도 8은 섬유 지지체 및 또는 일회용 의료밴드 상에서 앵타머가 고정화된 금 나노입자의 특이성을 보여주기 위해 표적 물질과 다른 단백질에 대한 색 변화를 비교한 결과이다.
- 도 9는 섬유 지지체 및 일회용 의료밴드 상에서 소변 검사(urine test)로 표적 물질의 농도에 따라 금 나노입자의 색 변화 정도를 보여주는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명은 섬유(fabric) 소재의 지지체 상에 검출하고자 하는 샘플을 올려놓고, 앵타머-금 나노입자 복합체 용액을 분무하여 지지체 표면의 색을 육안으로 판단하는 단계를 포함하는 표적물질의 검출방법에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에서, 섬유(fabric)는 면, 모, 리넨, 석면, 유리섬유, 합성섬유(나일론, 아크릴, 폴리에스테르, 스팅크스 등), 탄소섬유, 셀룰로오스 계열 펄프, 고분자 나노섬유 또는 부직포 등으로, 이에 제한되지 않는다. 특히, 본 발명은 상기 섬유로서 간편하게 구입할 수 있는 의료용 거즈, 일회용 패드, 일회용 의료밴드, 생리대, 기저귀 등을 사용할 수 있어 어디서나 표적물질 검출이 가능한 장점이 있다.
- [0024] 상기 앵타머는 표적물질 검출을 위한 것이며, 본 발명에서는 두 가지 앵타머를 사용해야 한다.
- [0025] 따라서, 상기 앵타머-금 나노입자 복합체는 제1 앵타머-금 나노입자 복합체 및 제2 앵타머-금 나노입자 복합체를 포함한다.
- [0026] 상기 앵타머-금 나노입자 복합체는 금 나노입자와 앵타머를 1: 8 내지 22의 몰수비로 혼합하여 앵타머-금 나노입자 복합체를 제조하는 것이 바람직하다. 앵타머가 너무 작게 사용되면 앵타머로 인해 금나노입자가 안정화되는 효과가 떨어지는 문제가 있고, 앵타머가 너무 많이 사용되면 경제적인 면에서 효율이 떨어지는 문제가 있다..
- [0027] 상기 앵타머-금 나노입자 복합체의 농도, 즉 제1 앵타머-금 나노입자 복합체 및 제2 앵타머-금 나노입자 복합체의 농도의 합이 6 내지 16 nM인 것이 바람직하며, 복합체 농도가 낮으면 섬유 상에서 색이 너무 연하게 나타나 색도 분석이 어려우며, 복합체 농도가 높으면 경제적인 면에서 효율이 떨어진다.
- [0028] 본 발명에서 표적물질은 단백질, 세포, 펩타이드, 핵산, 지질, 무기 화합물, 저분자 유기 물질, 금속이온, 호르몬 또는 항생제일 수 있으며, 상기 단백질은 한 표적물질에 대해 두 가지 앵타머가 개발된 것으로 트롬빈, IgG 또는 PDGF-BB(platelet-derived growth factor-BB) 등 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명에 따른 표적물질의 검출방법은 미량의 표적물질도 검출가능한 장점을 가진다. 검출 가능한 표적물질의 양은 표적물질이 많을수록 검출이 용이한 것이 자명하므로, 바람직하게는 0.01 pmol 이상이며, 보다 바람직하게는 0.015 이상, 더욱 바람직하게는 0.02 이상이 적합하다.
- [0030] 예를 들면, 표적물질의 검출은 질병의 진단 혹은 몸 상태의 진단을 위해 사용될 수 있으며, 이러한 진단을 위해서 검체대상물질로부터 표적물질을 본 발명에 따른 방법으로 검출할 수 있고, 검체대상물질은 혈액, 림프액, 조직액 등의 체액, 뇨, 콧물, 눈물, 타액, 땀, 피지, 고름 등일 수 있다.
- [0031] 본 발명에 따른 표적물질의 검출방법은 표적물질 존재 시 지지체의 표면이 푸른색으로 변화하며, 표적물질이 존재하지 않을 때에는 지지체 표면이 붉은색을 유지한다.
- [0032] 이하, 본 발명에 따른 표적물질의 검출방법의 한 예로서, 트롬빈을 검출하는 과정을 첨부된 도 1을 참조하여 구체적으로 설명한다.
- [0033] 앵타머가 고정화된 금 나노입자 복합체는 구(球)에 가까운 형태로서, 금 나노입자 표면에 3차 구조를 갖는 표적물질 검출용 앵타머가 고정화되어 있는 형태이다[도 2 참조].
- [0034] 버퍼 용액을 이용하여 적절한 농도로 만든 앵타머-금 나노입자 복합체 검출 시료는 수용액 상에서 고정화된 앵타머로 인해 금 나노입자 하나 하나 안정화되어 있으므로 금 나노입자 고유의 표면 플라스몬 공명 현상에 의해 붉은색을 띠고 있다[도 3 참조]. 검출할 표적 물질인 트롬빈이 묻어있는 패브릭 또는 일회용 의료밴드에 부착된 거즈 위에 이러한 앵타머-금 나노입자 복합체 검출 시료를 처리하면, 서로 다른 금 나노입자에 고정화된 두 가지의 앵타머가 하나의 표적물질의 서로 다른 결합 부위에 각각 결합할 수 있으므로 표적물질과 앵타머-금 나노입자 복합체 간에 서로 응집되는 것과 같은 반응이 일어난다. 이러한 표적물질과 앵타머 사이의 친화력에 의해 금나노입자 사이의 거리가 가까워지므로 각 금 나노입자가 갖는 표면 플라스몬이 결합하여 검출 시료의 색이 푸른색으로 변한다.
- [0035] 본 발명은 또한, 섬유 소재의 지지체 및 앵타머-금 나노입자 복합체를 포함하는 표적물질 검출용 키트에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명은 또한, 섬유 소재의 지지체 및 앵타머-금 나노입자 복합체를 포함하는 표적물질 검출용 센서에 관한 것이다.

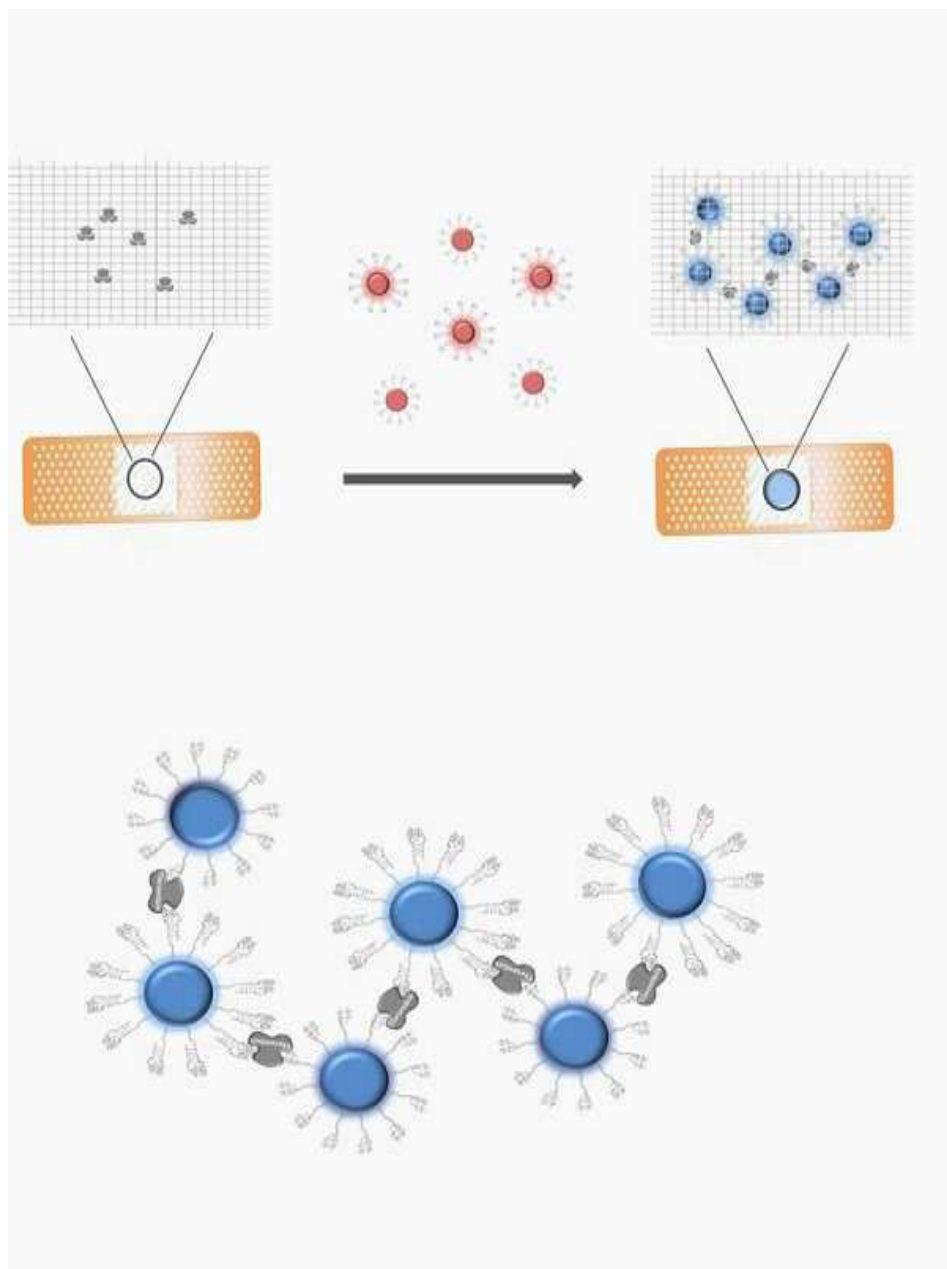
- [0037] 본 발명에서 상기 표적물질 검출용 키트 또는 센서의 형태는 특별히 제한되지 않고, 본 발명에 따른 섬유 소재의 지지체 및 앵타머-금 나노입자 복합체를 포함하는 형태라면 제한 없이 가능하다. 또한, 상기 앵타머-금 나노입자 복합체는 제1 앵타머-금 나노입자 복합체 및 제2 앵타머-금 나노입자 복합체를 포함할 수 있다.
- [0038] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0039] **제조예 1**
- [0040] 1) 금 나노입자 제조
- [0041] 앵타머-금 나노입자 복합체를 만드는데 이용하기 위해 시트레이트로 안정화된 금 나노입자를 생성하였다. 큰 비커에 HCl과 HNO₃를 3:1 비율로 섞어서 왕수를 만들어 준비한 뒤, 금 나노입자를 만드는데 사용할 200 ml 플라스크와 자석을 적어도 15분 이상 담가두어 오염물질을 제거하였다. 위와 같이 준비한 플라스크에 3차 증류수를 98 ml 넣고 핫플레이트 위에서 저어주면서 50 mM의 HAuCl₄ 용액을 2 ml 첨가하여 HAuCl₄의 최종 농도가 1 mM이 되도록 하였다. 이 용액이 끓기 시작하면 빠르게 38.8 mM의 소듐 시트레이트 용액을 10 ml 첨가하였다. 그러면 용액의 색이 밝은 노란색에서 짙은 붉은색으로 1분 안에 변화하였다. 20분 더 끓인 뒤에는 상온에서 식을 때까지 저으면서 놔두었다. 이 용액은 0.45 μ m 니트로셀룰로오스 필터 페이퍼를 이용하여 여과하여 만드는 과정에서 응집된 금 나노입자 혹은 그 외의 불순물을 제거하였다.
- [0042] 도 4에서 제시한 바와 같이 생성된 금 나노입자는 TEM(Transmission Electron Microscopy)을 이용하여 크기와 모양을 확인하였다. 완성된 금 나노입자는 4 °C에 냉장 보관하였다.
- [0043] 2) 앵타머 제작
- [0044] 앵타머-금나노입자 복합체를 만드는데 이용할 앵타머는 기존에 연구된 트롬빈 앵타머 15-mer와 29-mer 두 가지(이하 TBA 15, TBA 29로 각각 명명)[GenoTech (GenoTech Co., Korea)에서 합성, 정제됨]에 티올-변형하여 합성하였다.
- [0045] TBA 15
- [0046] 5' -thiol(C6)-TTT TTT TTT TTT TTT GGT TGG TGT GGT TGG-3' (서열번호 1)
- [0047] TBA 29
- [0048] 5' -thiol(C6)-TTT TTT TTT TTT TTT AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT-3' (서열번호 2)
- [0049] 3) 앵타머-금 나노입자 복합체 제조
- [0050] 앵타머-금 나노입자 복합체를 보관할 두 개의 바이알(vial)은 12 M NaOH에 1 시간 이상 담가둔 뒤 DW로 씻어서 준비하였다. 두 개의 원심분리용 튜브에 각각 50 μ l의 TBA 15와 TBA 29를 5 μ l씩 넣고, 500 mM 아세트산 버퍼(pH 5.2) 0.5 μ l와 10 mM TCEP 1 μ l를 첨가하여 1시간 동안 상온에서 티올-변형된 DNA를 활성화시켰다. 위에서 준비한 바이알에는 각각 미리 준비해둔 금 나노입자 1 ml씩 넣고, 활성화시킨 TBA15와 TBA29앵타머를 각각 첨가한 뒤 적당히 손으로 병을 흔들어 섞어주었다. 상기 바이알들은 마개로 막은 뒤 어두운 곳에서 16 시간 이상 보관하였다. 그 후에 500 mM 프리스-아세테이트 버퍼(pH 8.2)를 10.2 μ l 천천히 첨가하여 이 버퍼의 최종 농도가 5 mM이 되도록 하였다. 그 후에 1 M NaCl 용액을 102 μ l 천천히 첨가하여 섞어준 뒤 최소 하루 이상 어두운 곳에 보관하였다. 생성된 TBA15-AuNP 복합체와 TBA29-AuNP 복합체[도 2] 두 가지의 용액은 원심분리용 튜브에 각각 옮겨 담아 16,000 g에서 25분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 뒤 5.0 mM Tris-HCl 버퍼로 3번 세척한 뒤, 같은 버퍼 1 ml에 앵타머-금 나노입자 복합체를 재부유(resuspension)시킨 뒤 4 °C에 냉장 보관하였다.
- [0051] **실시예 1: 섬유 소재의 지지체를 이용하여 표적물질 검출**

- [0052] 본 발명에서는 금 나노입자에 고정화한 서로 다른 두 개의 앵타머가 함께 표적 물질에 결합하여 금 나노입자 사이의 거리가 가까워져서 나타나는 색 변화를 이용하여 색도 센서를 개발하였다.
- [0053] 상기 제조예 1에서 합성한 두 가지의 앵타머-금 나노입자 복합체를 버퍼용액(Thrombin binding buffer pH 7.4 contained 140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.02% Tween 20)을 이용하여 적절한 농도로 검출 시약을 제조하였다. 이 시약을 표적물질인 트롬빈이 묻어있는 패브릭 또는 일회용 의료밴드에 부착된 거즈 위에 뿌리면 트롬빈의 존재 유무에 따라 10 ~ 15분 이내에 색 변화의 유무가 나타났다.
- [0054] 앵타머와 금 나노입자의 효율적인 사용과 고감도의 표적 물질 검출을 위하여 금 나노입자와 앵타머 사이의 비율, 앵타머-금 나노입자 복합체의 농도에 대한 조건을 최적화하였다.
- [0055] 우선, 금 나노입자와 TBA15 앵타머가 각각 1:10, 1:20, 1:30 몰수비로 혼합 고정화된 시료와 금 나노입자와 TBA29 앵타머가 각각 1:10, 1:20, 1:30 몰수비로 혼합 고정화된 시료를 만들어 가장 고감도로 표적 물질을 검출해내는 비율을 발견하였다.
- [0056] 그 결과, 금 나노입자와 앵타머가 1:10의 몰수비로 혼합되어 만들어진 앵타머 고정화된 금 나노입자의 표적 물질 검출 능력이 가장 뛰어난 것을 확인하였고[도 5], 1:10 혼합 비율의 금 나노입자를 최적의 조건으로 사용하였다. 이때, 상기 표적물질의 양은 0.025 pmol이다.
- [0057] 또한, TBA15앵타머-금 나노입자 복합체, TBA29 앵타머-금 나노입자 복합체 각각 4, 6, 8 nM로 만들어(두 가지 복합체 합 의 농도가 8 nM, 12 nM, 16 nM로 만들어) 색 변화를 육안으로 잘 확인할 수 있으면서도 고감도로 표적 물질을 검출할 수 있는 농도를 발견하였다.
- [0058] 그 결과, 12 nM의 복합체 용액을 사용시에 육안으로 확인한 색 변화를 관찰할 수 있으면서도 고감도로 표적물질을 검출하는 능력을 보여주었다[도 6]. 따라서, 표적물질 검출 시에 12 nM의 복합체 용액을 최적의 조건으로 사용하였다. 이때, 상기 표적물질의 양은 0.2 pmol이다.
- [0059] **시험예 1**
- [0060] 상기 실시예 1에서 최적화된 조건으로 실험을 실시하였다.
- [0061] 표적물질의 농도에 따라 금 나노입자의 색 변화 정도를 보기 위해 패브릭 또는 일회용 의료밴드 상에서 각 10 pmol부터 검출한계 농도까지의 트롬빈에 금 나노입자 용액을 처리하여 색 변화를 관찰하였다.
- [0062] 그 결과, 표적물질의 농도가 낮아짐에 따라 금 나노입자가 푸른색으로 변하는 정도도 약해지는 것을 알 수 있다[도 7].
- [0063] **시험예 2**
- [0064] 상기 실시예 1에서 최적화된 조건으로 실험을 실시하였다.
- [0065] 앵타머 고정화된 금 나노입자가 특이적으로 트롬빈만을 검출한다는 것을 증명하기 위해, 표적물질로 트롬빈 대신 BSA(Bovine Serum Albumin), HSA(Human Serum Albumin), 그리고 IgG를 이용하여 금 나노입자 용액을 처리하였을 때 색 변화를 비교 관찰하였다. 상기 표적물질의 양은 20 pmol이었다.
- [0066] 그 결과, 트롬빈에서만 푸른색으로 변화된 것으로 보아 이 특성화된 금 나노입자는 트롬빈에 특이적으로 결합하여 검출할 수 있다는 것을 확인할 수 있다[도 8].
- [0067] **시험예 3**
- [0068] 상기 실시예 1에서 최적화된 조건으로 실험을 실시하였다.
- [0069] 검출해야 할 샘플이 표적 물질 외에 다른 다양한 물질을 포함하는 혼합용액일 때에도 앵타머 고정화된 금 나노입자가 특이적으로 트롬빈을 검출한다는 것을 증명하기 위해 소변에 표적 물질인 트롬빈을 첨가하여 검출한계농도를 측정하였다.
- [0070] 그 결과, 트롬빈이 없는 컨트롤 영역에서는 여전히 붉은색을 띄는 반면 트롬빈이 첨가된 소변(urine) 샘플에서

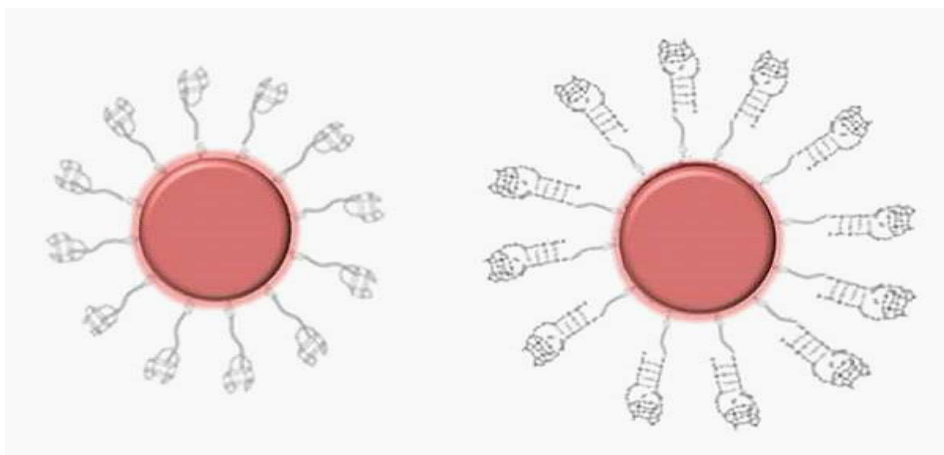
는 양에 의존적으로(dose-dependent) 푸른색으로 변화된 것을 확인할 수 있다[도 9].

도면

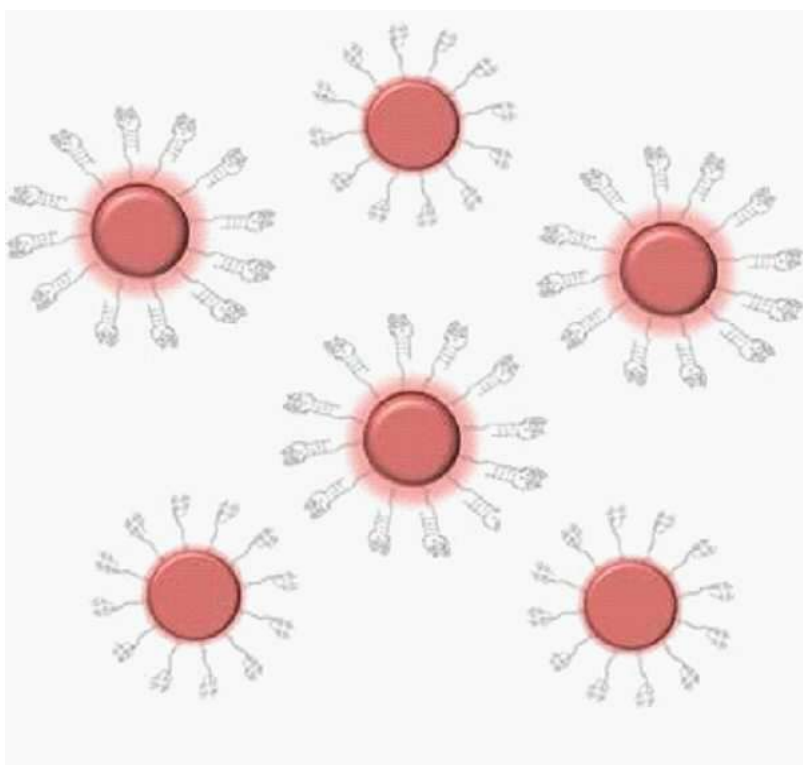
도면1



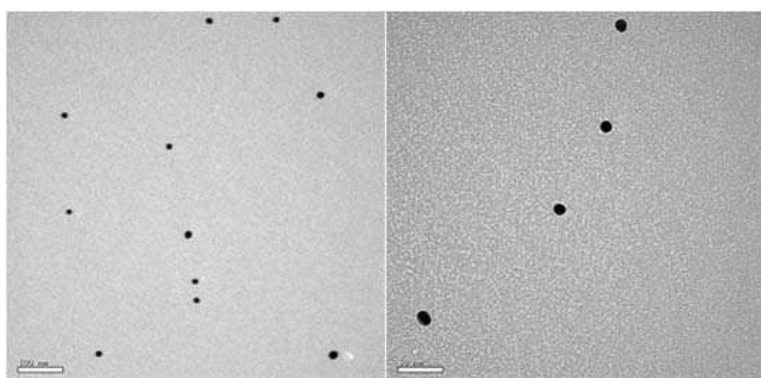
도면2



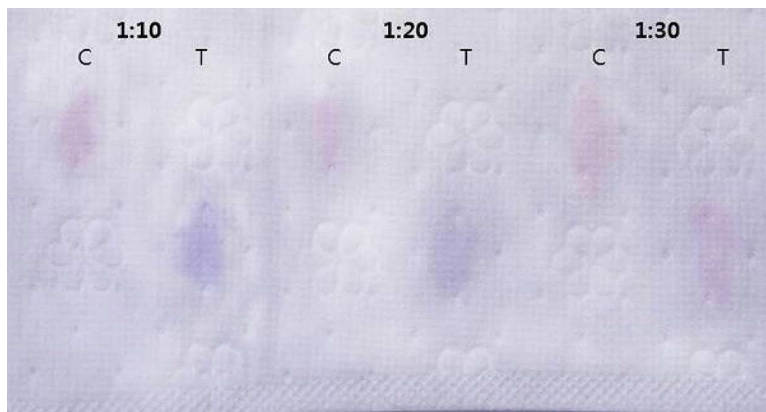
도면3



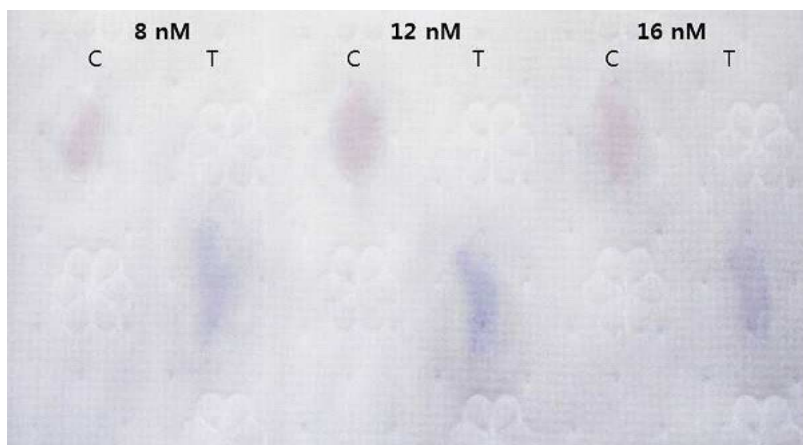
도면4



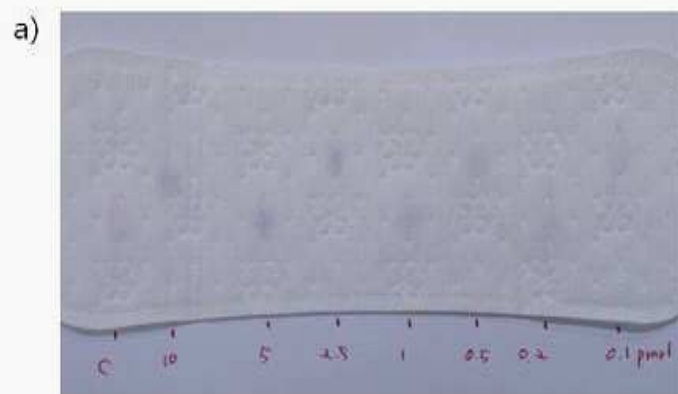
도면5



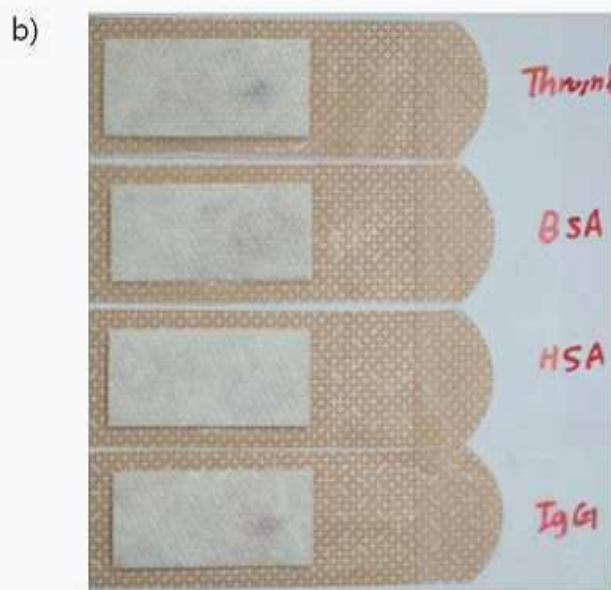
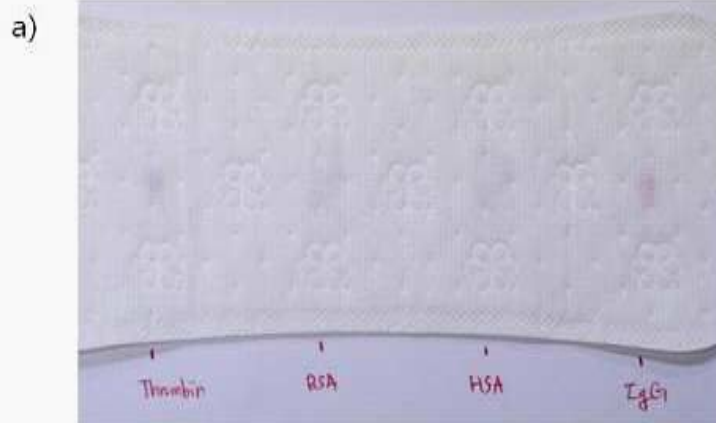
도면6



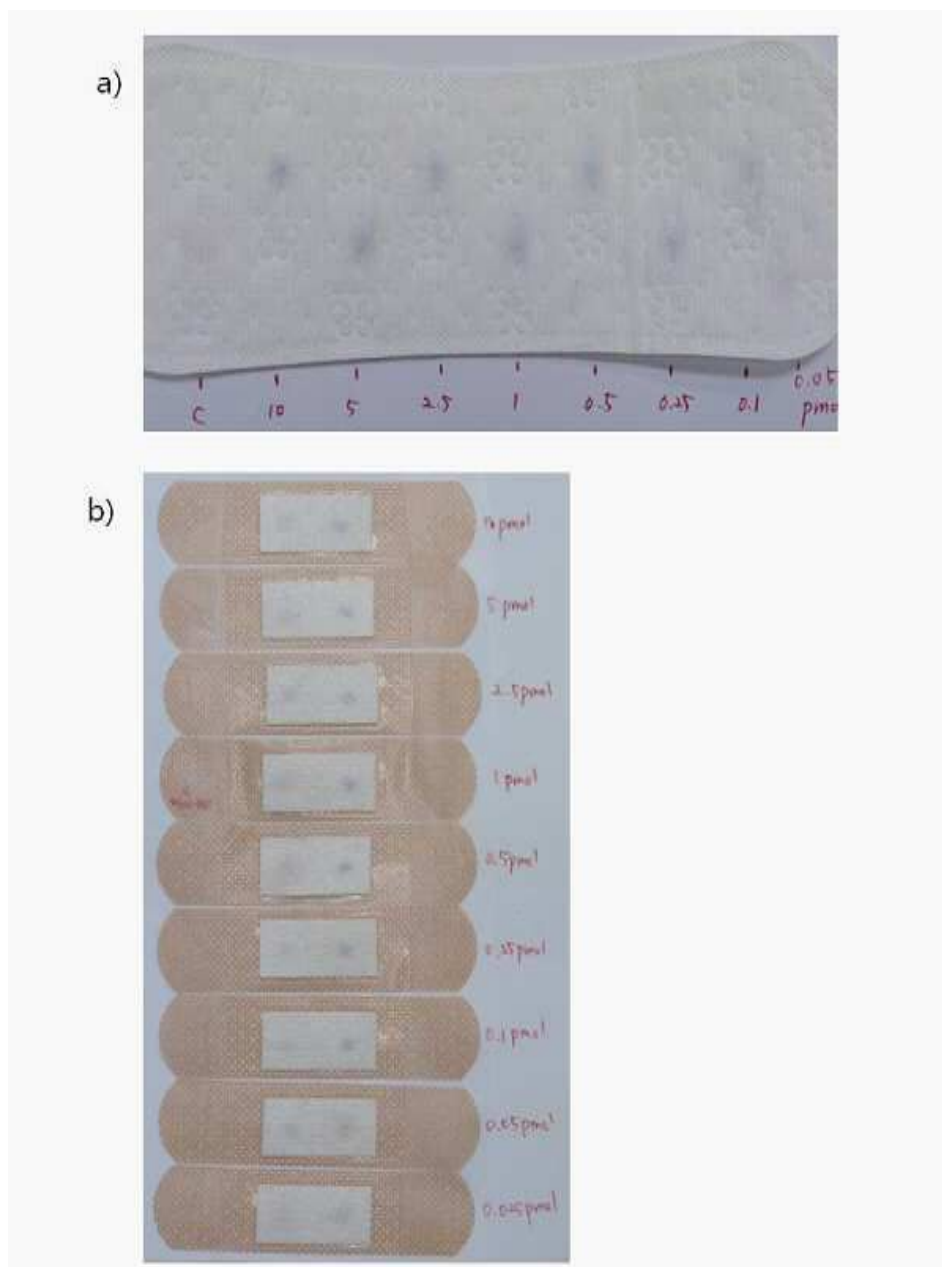
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Detection method of target material using aggregation of aptamer-conjugated gold nanoparticles on fabric
- <160> 2
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 30
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> TBA 15

<400> 1

tttttttttt tttttggttg gtgtggttgg 30

<210> 2

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TBA 29

<

400> 2

tttttttttt ttttttagtcc gtggtagggc aggttgggggt gact 44