(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0121496
(43) 공개일자 2020년10월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) *C12Q 1/689* (2018.01)
G01N 33/543 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56916 (2013.01)
C12Q 1/689 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0044109
(22) 출원일자 2019년04월16일
심사청구일자 2019년04월16일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
황병희
인천광역시 연수구 해돋이로120번길 16, 213동 1203호(송도동, 송도풍림아이원2단지아파트)
박성진
인천광역시 서구 청라한울로 95, 303동 1501호(청라동, 청라제일풍경채)
(74) 대리인
특허법인충현

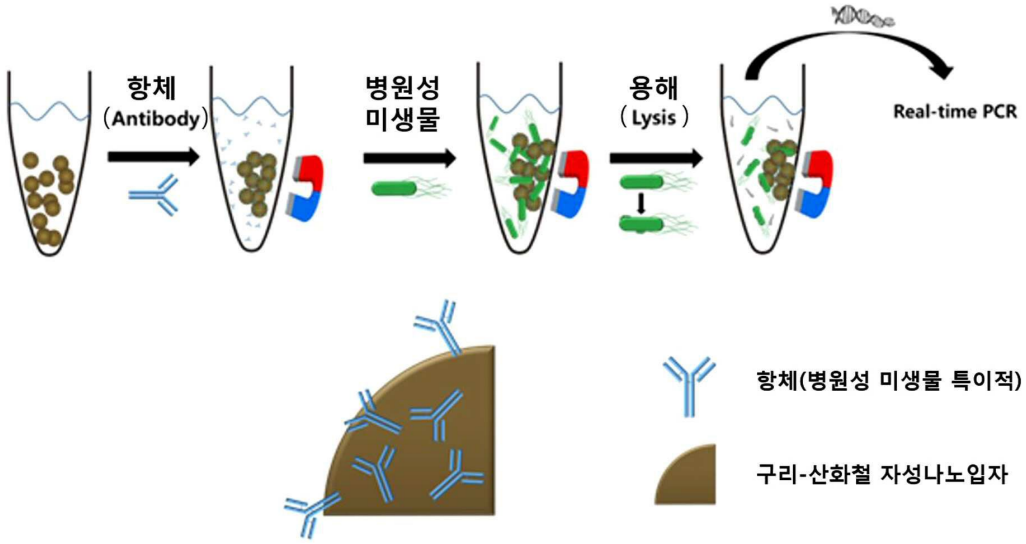
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **항체 고정화 자성나노입자를 포함하는 병원성 미생물 분리검출용 복합체 및 이를 이용한 병원성 미생물 분리 및 검출방법**

(57) 요 약

본 발명은 병원성 미생물 분리검출용 복합체 및 이를 이용해 병원성 미생물의 전처리 분리 및 검출하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 병원성 미생물을 신속하게 분리하고 정확하게 검출함으로써 식품, 축산물 등의 위생관리, 원인균 진단 및 질병 진단에 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/54326 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
C12Q 2531/113 (2013.01)
G01N 2469/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1C1B1014836
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 신진연구자지원사업
연구과제명 비바이러스 유전자치료 나노어셈블리 피부전달 기술개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.01 ~ 2019.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 C0535262
부처명 중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명 중소기업기술정보진흥원
연구사업명 맞춤형 기술파트너 지원사업
연구과제명 식품 위생검사 병원균 신속검출을 위한 전처리융합 검출기술개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2017.10.20 ~ 2018.07.19

명 세 서

청구범위

청구항 1

구리-산화철 자성나노입자; 및

상기 자성나노입자 표면에 고정되어 병원성 미생물과 특이적으로 결합하는 항체;를 포함하는 병원성 미생물 분리검출용 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 자성나노입자는 $CuFe_2O_4$인 것을 특징으로 하는 병원성 미생물 분리검출용 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항체는 항-살모넬라 H 항체 또는 항-살모넬라 O 항체인 것을 특징으로 하는 병원성 미생물 분리검출용 복합체.

청구항 4

1) 구리-산화철 자성나노입자를 초음파 처리하는 단계;

2) 상기 초음파 처리된 구리-산화철 자성나노입자에 항체를 고정화하여 복합체를 얻는 단계; 및

3) 상기 복합체로부터 미반응 물질을 제거하는 단계;를 포함하는 병원성 미생물 분리검출용 복합체의 제조방법.

청구항 5

Ⅰ) 제1항에 따른 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 분석 대상 시료와 접촉시키는 단계;

Ⅱ) 자성을 인가하여 상기 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 분리하는 단계; 및

Ⅲ) 상기 병원성 미생물 분리검출용 복합체와 특이적으로 결합한 병원성 미생물을 분리 및 검출하는 단계;를 포함하는 병원성 미생물 분리 및 검출 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 Ⅰ) 단계는 60 내지 80분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 병원성 미생물 분리 및 검출 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 (Ⅱ) 단계에서 자성은 영구자석 또는 전자석을 통해 인가되는 것을 특징으로 하는 병원성 미생물 분리 및 검출방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 (Ⅲ) 단계는 (ⅰ) 상기 병원성 미생물 분리검출용 복합체에 결합된 병원성 미생물을 용해(Lysis)하는 단계; 및

(ⅱ) 상기 (ⅰ)로부터 얻은 용해된 용액을 원심분리하고, 상층액을 얻어 병원성 미생물에 대하여 Real time-PCR

을 이용하여 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 병원성 미생물 분리 및 검출 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 병원성 미생물 분리검출용 복합체 및 이를 이용해 병원성 미생물의 전처리 분리 및 검출하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 병원성 미생물을 신속하게 분리하고 정확하게 검출함으로써 식품, 축산물 등의 위생관리, 원인균 진단 및/또는 질병 진단에 사용될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 과학 기술의 발달에도 불구하고 병원성 미생물에 의해 유발되는 질병들을 완전히 예방하는 것은 여전히 어려운 일로 여겨지고 있다. 예를 들면, 식중독은 자연독, 식품의 부패 및 식품 중 세균의 혼입에 의해 야기되는데, 이 중에서도 자연독이나 음식물의 부패는 예방이 용이한 반면 세균이 혼입되어 오염되는 경우는 육안으로 관찰되지 않고, 전문적인 방법에 의존하지 않고는 검출이 매우 곤란하여 가장 예방이 어렵다.

[0003] 최근에는 식당, 주문 배달업, 급식 센터, 패스트푸드점 등 대량으로 음식물을 공급하는 시설과 이를 이용하는 소비자가 증가함에 따라, 식품 내 병원성 미생물 오염정도를 관리하는데 더욱 어려움을 겪고 있다.

[0004] 병원성 미생물에 감염되어 식중독이 발생할 경우 심한 구토, 설사, 복통, 고열 등과 같이 그 증상이 심각하고, 시설을 통한 집단 감염이 많으며, 감염 후에도 장기적인 치료가 이루어져야하고, 치료가 어려운 경우도 많아 병원성 미생물을 조기에 발견하여 예방하는 것이 절실히 필요한 실정이다.

[0005] 병원성 미생물을 검출, 확인하는 기존 방법으로는 채취한 검체를 선택배지를 이용하여 배양하고, 배지에 형성된 콜로니를 육안으로 관찰하거나, 기타 확인 수단을 이용하여 확인하는 방법 등이 있으며, 최근에는 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 검사법이 개발되어 사용되고 있다. 중합효소연쇄반응은 아주 적은 양의 DNA만을 갖고서도 특정 부위의 DNA 서열을 기하급수적으로 증폭할 수 있는 간단하고 편리한 장점을 가지고 있다. 이는 일반적인 검사법인 배지를 이용한 배양법 (96시간 이상 소요) 또는 효소결합면역측정법(Enzyme-Linked ImmumoSorbent Assay:48시간 소요)에 비하여 확정 실험의 단계를 생략할 정도의 정확성과 신속성(24시간 소요)을 가지지만, 충분한 유전자 농도를 확보하기 위해 식품에 감염된 병원성 미생물을 증식시키는 과정이 필수적으로 수반되어야 하므로, 16 내지 20 시간의 증균배양 시간이 소모될 수 있다는 단점이 있다. 따라서 여러 성분들이 혼재되어 있는 실제 샘플에서 병원성 미생물만을 단순한 과정만으로 검출가능한 농도로 신속하게 분리하여 짧은 시간에 정확한 검사를 가능하게 하는 새로운 기술의 개발이 절실하다.

[0006] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 일본 공개특허공보 제2008-530993호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 식품 및 축산물의 위생관리 및 질병진단을 위해 병원성 미생물을 신속하게 분리하고 정확하게 검출할 수 있는 기술을 발명하고자 예의 노력을 하였다. 그 결과, 병원성 미생물과 특이적으로 결합을 형성하는 항체를 추가적인 화학반응 없이 손쉽게 고정화할 수 있는 자성나노입자 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 고안하였고, 이를 이용하여 시료 내에 존재하는 병원성 미생물을 신속하게 분리하여 정확하게 검출함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 시료로부터 병원성 미생물을 신속하게 분리하고 정확하게 검출할 수 있는 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 대량으로 생산할 수 있는 제조방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 사용하여 시료로부터 병원성 미생물을 신속하게 분리하고 검출하는 방법을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 자성나노입자 표면에 병원성 미생물과 결합하는 항체를 추가적인 화학반응 없이 손쉽게 고정함으로써, 식품 또는 축산물로부터 병원성 미생물을 신속하게 분리하고, 정확하게 검출할 수 있는 병원성 미생물 분리검출용 복합체 또는 이를 이용하는 병원성 미생물 분리 및 검출 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 시료로부터 병원성 미생물을 분리 및 검출하기 위한 신규 물질 및 방법을 발굴하고자 노력한 결과, 구리-산화철 자성나노입자와 병원성 미생물에 특이적인 항체를 이용하여 추가적인 화학반응을 필요로 하지 않으면서 고정화 효율이 현저히 우수한 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 제공하고, 이를 이용하여 시료로부터 병원성 미생물을 효과적으로 분리 및 검출 가능함을 확인하였다.

[0015] 본 발명의 일 측면은 구리-산화철 자성나노입자; 및 상기 자성나노입자 표면에 고정되어 병원성 미생물과 특이적으로 결합하는 항체;를 포함하는 병원성 미생물 분리검출용 복합체에 관한 것이다.

[0016] 본 발명에서 '자성나노입자'는 강자성을 띄는 입자로 일반적으로 수 나노미터에서 수백 나노미터의 크기를 갖는 입자를 의미한다. 이러한 '자성나노입자'에 생물학적 기능성을 부여하기 위해서는 표면에 생체분자 등을 고정화하는 과정이 필수적이다. 이는 추가적인 화학반응을 필요로 하기 때문에 추가적인 비용과 시간, 노력을 소모해야하므로 이를 생략할 수 있다면 자성나노입자의 활용에 큰 장점을 가진다. 본 발명에서는 일반적으로 사용하는 자성나노입자인 산화철에 구리, 코발트, 니켈 등의 양이온성 금속이온들을 첨가하여 제작한 구리-산화철, 코발트-산화철, 니켈-산화철 자성나노입자들과 항체와 같은 단백질에 존재하는 히스티딘과 같은 음이온성 아미노산들의 상호작용을 이용하여 추가적인 화학반응 없는 고정화가 가능하다는 것을 확인하였다. 이를 이용하여 항체 또는 링커와 자성나노입자들의 고정화 효율을 확인한 결과 후술하는 실험에서와 같이 효율적으로 항체 또는 링커를 고정하기 위하여 구리-산화철 자성나노입자인 것이 다른 자성나노입자를 활용하는 것보다 3 내지 6배 더 바람직하다. 상기 구리-산화철 자성나노입자는 가장 바람직하게 $CuFe_2O_4$로 표시되는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 병원성 미생물 분리검출용 복합체는 표면을 개질하거나 코팅하는 등의 유해한 용매를 사용해야 하는 과정을 생략할 수 있고, 종래 자성나노입자보다 더 많은 항체 또는 링커를 고정할 수 있다는 점에서 현저한 장점을 갖는다.

[0018] 상기 자성나노입자는 클러스터 형태일 수 있고, 평균 직경은 특별히 한정되지 않으나 10 내지 2000 nm인 것이 바람직하며, 외부에서 인가되는 자성에 의해 분리되기 위해서는 50 nm 이상인 것이 바람직하다.

[0019] 상기 병원성 미생물 혹은 질병의 바이오마커는 상기 항체에 의해 결정되므로, 특별히 이에 한정되지 않으나, 대장균(*E. coli*), 살모넬라 속(*Salmonella*), 쉬겔라 속(*Shigella*), 엔테로박테리아세 속(*Enterobacteriaceae*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 모락셀라 속(*Moraxella*), 헬리코박터 속(*Helicobacter*) 및 스테노트로포모나스 속(*Stenotrophomonas*), 리스테리아 속(*Listeria*), 스타필로코코스 속(*Staphylococcus*), 비브리오 속(*Vibrio*) 및 바이러스, 암이나 면역 질환 등의 질병 바이오마커들 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게 대장균(*E. coli* 0157:H7), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*), 쉬겔라 디센테리에(*Shigella dysenteriae*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 모락셀라 카타랄리스(*Moraxella catarrhalis*), 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 및 스테노트로포모나스 말토필리아(*Stenotrophomonas maltophilia*), 리스테리아 모노사이토젠(*Listeria monocytogene*), 스타필로코커스 아루레우(*Staphylococcus aureus*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 비브리오 벌리피쿠스(*Vibrio vulnificus*), 노로바이러스(*Norovirus*), Human Immunodeficiency Virus, Human Epithelial Growth Factor Receptor 2, 인터페론(Interferons) 및 인터루킨(Interleukins)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 가장 바람직하게는 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*)일 수 있다.

[0020] 즉, 본 발명의 병원성 미생물 분리검출용 복합체는 식중독을 유발하는 병원성 미생물인 살모넬라 엔테리티디스

의 표면에 위치한 항원에 특이적으로 결합하여, 액상 또는 고상의 시료 내에 존재하는 병원성 미생물의 존재를 분리하거나 농축할 수 있을 뿐 아니라 검출할 수 있다.

[0021] 따라서, 상기 항체는 상기 병원성 미생물과 특이적으로 결합하는 것이라면 특별히 한정되지 않으나, 가장 바람직하게는 항-살모넬라 H 항체 또는 항-살모넬라 O 항체일 수 있다.

[0022] 상기 구리-산화철 자성나노입자는 항체와 직접적으로 결합할 수 있고, 이는 링커를 부가하거나, 추가 표면 개질하는 등의 부가적인 공정없이도 다른 자성나노입자를 사용할 때보다 고정화되는 효율이 3 내지 6 배 이상 증진시킬 수 있다는 점에서 바람직하다.

[0023] 상기 구리-산화철 자성나노입자와 항체 사이에 링커를 더 포함할 수 있으나, 부가되는 공정단계 대비 고정화효율에 차이가 없으므로, 공정 편리성과 비용 효율적인 측면에서 상기 구리-산화철 자성나노입자는 항체를 직접 결합시키는 것이 바람직하다.

[0024] 상기 링커는 당업계에 공지된 나노입자 표면에 고정화될 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명에 따른 병원성 미생물 분리검출용 복합체는 자석에 영향을 받는 자성의 성질을 가지면서 병원성 미생물을 특이적으로 분리 및 검출할 수 있는 성질을 함께 가지는 나노미터 크기 수준의 다기능성 입자이다. 이를 이용하면 여러 다른 성분들이 혼재되어 있는 액체, 고체 등의 다양한 식품 및 임상 샘플들으로부터 병원성 미생물의 존재 유무를 정성/정량적으로 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 병원성 미생물을 분리하는데 동시에 적용할 수 있다. 본 발명은 시료에서 병원성 미생물을 1~3 시간 이내에 고속으로 분리 및 검출할 수 있다. 이는 기존 병원성 미생물을 검출하는 전과정을 단순화함으로써 시료 전처리의 정확성, 재현성 및 신뢰성을 향상시켰으며, 미량의 병원성 미생물을 고속으로 검출할 수 있는데 현저한 장점을 갖는다.

[0026] 상기 자성은 영구자석 또는 전자석을 통해 인가할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 '정량적'은 본 발명의 병원성 미생물 분리검출용 복합체와 결합된 병원성 미생물의 양을 수치적으로 검출할 수 있음을 의미한다. 구체적으로 자성 하에서 병원성 미생물과 결합된 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 분리하고, 열처리를 통해 병원성 미생물을 복합체로부터 분리 및 용해(lysis)한 후, DNA를 추출하여 Real-tim PCR을 통해 Ct value를 병원성 미생물 농도로 환산함으로써 확인할 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에 따르면 본 발명의 병원성 미생물 분리검출용 복합체에 의해 검출되는 병원성 미생물의 정량적 검출범위는 4.0×10^3 개 내지 1.6×10^9 개의 세포인 것으로 확인되었다.

[0029] 본 발명의 다른 측면은 다음 단계를 포함하는 병원성 미생물 분리검출용 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0030] 1) 구리-산화철 자성나노입자를 초음파 처리하는 단계;

[0031] 2) 상기 초음파 처리된 구리-산화철 자성나노입자에 항체를 고정화하여 복합체를 얻는 단계; 및

[0032] 3) 상기 복합체로부터 미반응 물질을 제거하는 단계.

[0033] 상기 1) 단계는 구리-산화철 자성나노입자를 초음파 처리하는 단계이다. 구체적으로 상기 구리-산화철 자성나노입자에 초음파를 가하여 자성나노입자 클러스터의 콜로이드를 형성하는 단계이다.

[0034] 상기 2) 단계는 상기 초음파를 통해 클러스터화된 구리-산화철 자성나노입자에 항체를 고정화하여 복합체를 얻는 단계이다. 즉, 상기 초음파 처리에 의해 클러스터화된 구리-산화철 자성나노입자에, 병원성 미생물을 특이적으로 인식하여 결합할 수 있는 항체를 고정화하여, 병원성 미생물을 분리 및 검출하도록 하는 단계이다.

[0035] 상기 2) 단계는 10 내지 40℃, 1 내지 60분 동안 수행될 수 있고, 바람직하게는 15 내지 30℃, 5 내지 15분 동안 수행되는 것일 수 있는데, 상기 하한치 및 상한치 내에서 수행되는 것이 자성나노입자에 항체를 가장 효율적으로 고정화할 수 있다. 해당 업계에서 자성나노입자의 표면에 고정화되는 항체의 양은, 검출범위 및 검출효율과 관련성이 높으므로, 유해한 용매를 사용하는 표면개질이나 치환 및 코팅 과정 없이 단 1%라도 항체를 더 고정화할 수 있음은 유의미한 의미를 갖는다.

[0036] 상기 1) 단계를 수행하고 나서, 2) 단계를 수행하기 전, 상기 초음파 처리된 구리-산화철 자성나노입자 표면에 링커를 고정화하는 단계를 더 포함할 수 있다. 링커를 포함하는 경우, 상기 항체 배향성이 향상될 수 있으나, 부가적인 화학 공정 단계가 요구됨에도 불구하고, 항체를 직접 결합시킬 때와 고정화 비율에 큰 차이가 없으므로 공정 편리성과 비용효율 측면에서 상기 구리-산화철 자성나노입자와 항체를 직접 결합시키는 것이 가장 바람

직하다.

[0037] 상기 링커는 당업계에 공지된 나노입자 표면에 고정화될 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다.

[0038] 최종적으로 3) 단계는 상기 복합체로부터 미반응 물질을 제거하는 단계으로, 당업계에서 일반적으로 사용되는 방법이라면 특별히 제한되지 않으나, 예컨대 외부에서 자성을 인가하여 상기 복합체를 분리한 후, 용액을 제거하고 PBS 완충액을 첨가한 다음 다시 자성을 인가하여 용액만을 제거하는 반복과정으로 수행될 수 있다.

[0039] 본 발명의 병원성 미생물 분리검출용 복합체는, 구리-산화철 자성나노입자에 병원성 미생물과 특이적으로 결합을 형성하는 항체를 고정화하여 제조되는 것이 바람직하다.

[0040] 본 발명의 병원성 미생물 분리검출용 복합체는 구리-산화철 자성나노입자에 병원성 미생물과 특이적으로 결합하는 항체를 직접 고정화하거나, 서열번호 1로 표시되는 변형된 단백질 A의 BC 도메인을 고정시킨 후 항체를 고정함으로써, 항체의 활성을 유지하면서 구리-산화철 자성나노입자에 고정되는 항체의 고정화 양이 크게 증가되어, 본 발명에 의한 항체가 고정된 자성나노입자를 이용하여 병원성 미생물을 실제 식품 또는 축산물로부터 초고속으로 정확하게 분리 및 검출할 수 있다는 효과를 갖는다.

[0041] 본 발명의 다른 측면은 하기 단계를 포함하는 병원성 미생물 분리 및 검출 방법에 관한 것이다.

[0042] Ⅰ) 상기 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 분석 대상 시료와 접촉시키는 단계;

[0043] Ⅱ) 자성을 인가하여 상기 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 분리하는 단계; 및

[0044] Ⅲ) 상기 병원성 미생물 분리검출용 복합체와 특이적으로 결합한 병원성 미생물을 검출하는 단계.

[0045] 우선 상기 Ⅰ) 단계와 같이 상기 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 분석 대상 시료와 접촉시킨다.

[0046] 상기 분석 대상 시료는 병원성 미생물이 서식하는 것으로 의심될 수 있는 모든 대상을 포함하며, 바람직하게는 식품 또는 축산물일 수 있다.

[0047] 본 발명의 검출방법에 의한 병원성 미생물의 정량적 검출범위는 4.0×10^3 개 내지 1.6×10^9 개의 세포인 것으로 확인되었다.

[0048] 상기 Ⅰ) 단계는 10 내지 120분 동안 수행될 수 있고, 바람직하게는 50 내지 120분 동안 수행될 수 있으며, 비용 및 시간면에서 60 내지 80분 동안 수행되는 것이 가장 바람직하다.

[0049] 다음, 상기 Ⅱ) 단계에서와 같이, 자성을 인가하여 상기 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 분리한다. 구체적으로 상기 Ⅰ) 단계로부터 얻은 결과물의 일부분에 자성을 인가하면, 해당 부위에 본 발명에 따른 병원성 미생물 분리검출용 복합체가 모이게 되어, 분리할 수 있게 된다.

[0050] 상기 병원성 미생물 혹은 질병의 바이오마커는 상기 항체에 의해 결정되므로, 특별히 이에 한정되지 않으나, 대장균(*E. coli*), 살모넬라 속(*Salmonella*), 쉬겔라 속(*Shigella*), 엔테로박테리아세 속(*Enterobacteriaceae*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 모락셀라 속(*Moraxella*), 헬리코박터 속(*Helicobacter*) 및 스테노트로포모나스 속(*Stenotrophomonas*), 리스테리아 속(*Listeria*), 스타필로코코스 속(*Staphylococcus*), 비브리오 속(*Vibrio*) 및 바이러스, 암이나 면역 질환 등의 질병 바이오마커들 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게 대장균(*E. coli* O157:H7), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*), 쉬겔라 디센테리에(*Shigella dysenteriae*), 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 모락셀라 카타랄리스(*Moraxella catarrhalis*), 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 및 스테노트로포모나스 말토필리아(*Stenotrophomonas maltophilia*), 리스테리아 모노사이토젠(*Listeria monocytogene*), 스타필로코커스 아루레우(*Staphylococcus aureus*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 비브리오 벌리피쿠스(*Vibrio vulnificus*), 노로바이러스(*Norovirus*), Human Immunodeficiency Virus, Human Epithelial Growth Factor Receptor 2, 인터페론(Interferons) 및 인터루킨(Interleukins)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 가장 바람직하게는 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*)일 수 있다.

[0051] 즉, 본 발명의 병원성 미생물 분리검출용 복합체는 식중독을 유발하는 병원성 미생물인 살모넬라 엔테리티디스의 표면에 위치한 항원에 특이적으로 결합하여, 액상 또는 고상의 시료 내에 존재하는 병원성 미생물의 존재를 분리하거나 농축할 수 있을 뿐 아니라 검출할 수 있다.

[0052] 따라서, 상기 항체는 상기 병원성 미생물과 특이적으로 결합하는 것이라면 특별히 한정되지 않으나, 가장 바람

직하게는 항-살모넬라 H 항체 또는 항-살모넬라 O 항체일 수 있다.

[0053] 상기 (Ⅱ) 단계에서 자성은 영구자석 또는 전자석을 통해 인가되는 것일 수 있다.

[0054] 상기 (Ⅲ) 단계는 (ⅰ) 상기 병원성 미생물 분리검출용 복합체에 결합된 병원성 미생물을 용해(Lysis)하는 단계; 및 (ii) 상기 (ⅰ)로부터 얻은 용해된 용액을 원심분리하고, 상층액을 얻어 병원성 미생물에 대하여 Real time-PCR을 이용하여 분석하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.

[0055] 상기 (ⅰ) 단계에서 용해는 가열을 통해 수행될 수 있고, 이때 온도는 50 내지 150℃일 수 있다.

발명의 효과

[0056] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0057] (ⅰ) 본 발명은 시료로부터 병원성 미생물을 신속하게 분리하고 정확하게 검출할 수 있는 병원성 미생물 분리검출용 복합체 및 이의 제조방법을 제공한다.

[0058] (ii) 또한, 본 발명은 상기 병원성 미생물 분리검출용 복합체를 사용하여 시료로부터 병원성 미생물을 분리하고 검출하는 방법을 제공한다.

[0059] (iii) 본 발명의 병원성 미생물 분리검출용 복합체 및 이를 이용해 병원성 미생물을 분리 및 검출하는 방법은 다량의 성분들이 혼재되어 있는 액상 또는 고상의 식품이나 임상샘플에 실제 활용할 수 있으며, 이 방법을 통해 상기 식품으로부터 병원성 미생물을 간단한 과정을 통해 신속하고 정확하게 분리 및 검출할 수 있는 기능을 보이며 이 기능을 이용하여 식품의 오염 정도를 빠르게 확인하여 식중독 감염을 예방하거나 병원성 미생물에 의한 질병이 발생한 경우 병원성 미생물을 신속하게 분리 검출하여 정밀치료에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 본 발명에 따른 자성나노입자-항체 복합체의 구조와 작용원리를 개략적으로 도시한 도면이다.

도 2는 실시예 1, 비교예 1 내지 3으로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체에 고정화된 항체 농도를 확인하기 위하여 BCA 단백질 정량분석한 결과이다.

도 3은 실시예 1로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체와 용액의 혼합물에 자성을 인가하여 용액과 분리하는 과정을 시간별로 촬영한 사진이다.

도 4A는 실시예 1_4, 실시예 1_8, 실시예 1_12, 실시예 1_16, 실시예 1_20, 실시예 1_24로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체에서 고정화된 항체의 양을 측정하여 나타낸 그래프이다(N = 4).

도 4B는 실시예 1_4, 실시예 1_8, 실시예 1_12, 실시예 1_16, 실시예 1_20, 실시예 1_24로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체에서 항체의 고정효율(immobilization efficiency, %)을 계산하여 나타낸 그래프이다(N = 4).

도 5는 실시예 1_8에서 자성나노입자와 항체의 고정화 시간에 따른 자성나노입자-항체 복합체의 병원성 미생물 검출효율을 분석한 결과이다(N = 4).

도 6은 다양한 온도 조건 하에서, 실시예 1_8로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체의 병원성 미생물 검출효율을 분석한 결과이다(N = 4).

도 7은 다양한 시간 조건 하에서 실시예 1_8에서 자성나노입자와 항체의 고정화 시간에 따른 자성나노입자-항체 복합체의 병원성 미생물 검출효율을 분석한 결과이다(N = 4).

도 8은 실시예 1로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체의 선형성 및 검출한계를 측정한 결과이다.

도 9는 무작위 10개의 표본에 실시예 1로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체를 처리하고 Real-time PCR 분석으로 병원성 미생물을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0062] **실험방법**

[0063] **<단백질 농도 측정>**

[0064] 본 발명에 따른 복합체로부터 용출된 단백질 및 항체 농도를 브래드포드(Bradford) 분석법으로 측정하였다. 표준 용액은 10 μg/ml, 5 μg/ml, 2.5 μg/ml, 1.25 μg/ml, 0 μg/ml 농도의 Bovine Serum Albumin 용액을 사용하였다. 100 ㎕ 샘플과 Bradford 시약 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)을 각각 96-웰 플레이트에 넣었다. 실온에서 5 분 동안 반응시키고, 595 nm에서 OD(optical density)를 측정하여 결과를 확인하였다.

[0065] **<real-time PCR에 의한 핵산분석>**

[0066] 병원성 미생물과 반응시킨 본 발명에 따른 복합체를 500 ㎕의 PBS 완충액으로 2 회 세척하고 증류수(DW) 200 ㎕를 첨가하였다. 상기 혼합액을 가열하여 100℃에서 10분간 세포를 용해(lysis)하였다. 15분간 얼음에 방치하였다. 이후 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액을 DNA 시료로 사용하였다. 상기 DNA 시료를 대상으로 Real-time PCR을 시행하여, 연속적으로 Ct value를 계산하였다.

[0067] 구체적으로 Real-time PCR과 data분석은 QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo-Fisher Scientific, Inc., Walthan, MA, USA)을 이용하여 시행하였다. Cycle threshold(Ct) value는 QuentStudio 3 system에 의해 자동적으로 계산되었다. 열수 추출된 병원성 미생물 DNA 2 μl에 PCR mixture 18 μl를 넣은 후 파이펫을 이용하여 기포가 생기지 않도록 혼합하였다. PCR 혼합물은 Thunderbird SYBR qPCR mix(Toyobo, Osaka, Japan), 두 개의 프라이머 (Bioneer Co., Daejeon, Korea), ROX reference dye 및 증류수를 포함하고 구체적인 조성은 하기 표 1과 같다. Real-time PCR은 Forward primer로는 5'-CTCACCAGGAGATTACAACATGG-3' 염기서열을, reverse primer로는 5'-AGCTCAGACCAAAAGTGACCATC-3' 염기서열을 사용하였다. cycling 순서는 다음과 같이 진행하였다. 먼저 95℃에서 10분간 유지하고, 이후 95℃에서 15초, 60℃에서 60초를 반복하였다.

표 1

[0068]

시약	Reaction volume	Final concentration
SYBR qPCR Mix	10 μl	1 x
Forward primer	6 pmol	0.3 μM
Reverse primer	6 pmol	0.3 μM
ROX reference dye	0.4 μl	0.1 x
DNA	2 μl	
증류수(Distilled water)	잔량(5.6 μl)	
총	20 μl	

[0069] **실시예**

[0070] **<실시예 1> 자성나노입자-항체 복합체 제조**

[0071] 구리-산화철 자성나노입자($CuFe_2O_4$, <100 nm, Cu-FMNP)(Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)을 50 mM PBS(pH 7.0; Genomicbase, Inc., Seoul, Korea) 완충액에 1 mg/ml 농도가 되도록 혼합한 후, 약 3분 동안 초음파 수조에서 반응시켰다. 상기 초음파를 가한 혼합물을 500 ㎕로 세분하고, 자석을 사용해 구리-산화철 자성나노입자를 제외한 PBS 완충액을 제거하였다. 여기에 다양한 농도의 항체(1 μg/ml, 2 μg/ml, 3 μg/ml, 4 μg/ml, 5 μg/ml 및 6 μg/ml)를 각각 4 ㎕ 넣고, 496 μl의 PBS 완충액을 첨가한 후, 회전진탕기를 사용하여 25℃에서 10분 동안 항온 처리하여, 자성나노입자와 항체의 미생물 검출용 복합체를 제조하였다. 상기 복합체로부터 미반응 물질을 제거하기 위하여, 자석을 사용하여 PBS 완충액으로 2차례 세척하였다. 항체는 Anti-salmonella Omnivalent 항체(ab78688, abcam)를 사용하였다.

[0072] 상기 미생물 검출용 복합체 용액에서의 실제 항체 농도를 계산하면, 각각 4 ng/ml, 8 ng/ml, 12 ng/ml, 16 ng/ml, 20 ng/ml, 24 ng/ml이 사용되었으므로, 실시예 1_4, 실시예 1_8, 실시예 1_12, 실시예 1_16, 실시예 1_20, 실시예 1_24로 표기하였다.

[0073] 이때, 자성나노입자와 결합하지 않은 항체는 Bradford 분석법(Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)으로 측정하였다.

[0074] **<비교예 1> 코발트-산화철 자성나노입자-항체 복합체 제조**

[0075] 구리-산화철 자성나노입자($CuFe_2O_4$, <100 nm, Cu-FMNP)(Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) 대신에 코발트-산화철 자성나노입자($CoFe_2O_4$, <100 nm, Co-FMNP)(Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)를 사용한 것을 제외하고는 모두 실시예 1과 동일하게 하여 코발트-산화철 자성나노입자-항체 복합체를 제조하였다.

[0076] **<비교예 2> 니켈-산화철 자성나노입자-항체 복합체 제조**

[0077] 구리-산화철 자성나노입자($CuFe_2O_4$, <100 nm, Cu-FMNP)(Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) 대신에 니켈-산화철 자성나노입자($LiFe_2O_4$, <100 nm, Li-FMNP)(Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)를 사용한 것을 제외하고는 모두 실시예 1과 동일하게 하여 니켈-산화철 자성나노입자-항체 복합체를 제조하였다.

[0078] **<비교예 3> 산화철 자성나노입자-항체 복합체 제조**

[0079] 구리-산화철 자성나노입자($CuFe_2O_4$, <100 nm, Cu-FMNP)(Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) 대신에 산화철 자성나노입자(Fe_2O_4, <100 nm, Li-FMNP)(Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)를 사용한 것을 제외하고는 모두 실시예 1과 동일하게 하여 산화철 자성나노입자-항체 복합체를 제조하였다.

[0080] **<시험예 1> 자성나노입자 종류별 항체 고정화 효율 분석**

[0081] 실시예 1에 따라 제조된 자성나노입자-항체 복합체와 비교예 1 내지 3으로부터 제조된 복합체의 항체 고정화 효율을 확인하기 위하여 BCA 단백질 정량분석을 실시하였다.

[0082] 도 2는 실시예 1, 비교예 1 내지 3으로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체에 고정화된 단백질 농도를 확인하기 위하여 BCA 단백질 정량분석한 결과이다. 이에 따르면 여러 자성나노입자 중에서 구리-산화철 자성나노입자가 가장 효율적으로 항체를 고정화함(산화철 1g 당 3 mg의 항체가 고정됨)을 알 수 있다. 이와 같은 결과를 통해 다른 자성나노입자에 의해 구리-산화철 자성나노입자가 3 내지 6배 이상 항체의 고정 용량이 높은 것을 확인할 수 있다.

[0083] **<시험예 2> 자성나노입자-항체 복합체와 용액의 분리 소요 시간**

[0084] 실시예 1으로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체가 용액과 혼합되어 있을 때, 자성을 인가함에 따라 용액과 분리되는데 소요되는 시간을 측정하고, 과정을 촬영하였다.

[0085] 도 3은 실시예 1으로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체와 용액의 혼합물에 자성을 인가하여 용액과 분리하는 과정을 시간별로 촬영한 사진이다. 이에 따르면 구리-산화철 자성나노입자는 자석을 통해 인가된 자성으로 약 1분 내에 용액과 분리가능함을 확인하였다.

[0086] **<시험예 3> 실시예 1로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체의 최적의 조건 분석**

[0087] 1) 고정화되는 항체의 양 분석

[0088] 실시예 1_4, 실시예 1_8, 실시예 1_12, 실시예 1_16, 실시예 1_20, 실시예 1_24로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체에 있어서, 고정되는 최적의 항체 양을 확인하고자 하였다. 또한, 구리-산화철 자성나노입자에 부착되는 고정화 효율(immobilization efficiency, %)도 분석하였다. 항체의 농도는 Bradford 분석법(Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 전체 항체의 양에서 고정화되지 않은 항체의 양을 뺀 뒤 전체 항체 양을 나누어서 계산하였다.

[0089] 도 4A는 실시예 1_4, 실시예 1_8, 실시예 1_12, 실시예 1_16, 실시예 1_20, 실시예 1_24로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체에서 고정화된 항체의 양을 측정하여 나타낸 그래프이다(N = 4). 도 4B는 실시예 1_4, 실시예 1_8, 실시예 1_12, 실시예 1_16, 실시예 1_20, 실시예 1_24로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체에서 항체의 고정효율(immobilization efficiency, %)을 계산하여 나타낸 그래프이다(N = 4).

[0090] 도 4A를 살펴보면, 실시예 1_12, 실시예 1_16, 실시예 1_20 및 실시예 1_24에 따른 구리-산화철 자성나노입자-항체 복합체는 포화되어 더 이상 항체가 고정되지 못함을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 구리-산화철 자성나노입자-항체 복합체의 제조과정에 1 내지 10 ng/ml 농도의 항체가 사용되는 것이 바람직하고, 4 내지 8 ng/ml 농도의 항체가 사용되는 것이 고정화효율 측면에서 더욱 바람직함을 확인하였다.

[0091] 도 4B를 살펴보면 항체의 고정화 효율은 첨가된 항체(Added Ab)의 총양에 대한 자성나노입자에 고정된 항체(Immobilized Ab) 양을 백분율한 것으로, 실시예 1_8로부터 제조된 구리-산화철 자성나노입자-항체 복합체가 가

장 우수함을 확인하였다.

[0092] 2) 고정화되는 최적 시간 분석

[0093] 실시예 1_8에 따라 구리-산화철 자성나노입자와 항체가 고정화 되는데 필요한 최적의 시간을 분석하고자 하였다. 실험은 다음과 같이 수행하였다.

[0094] 자성나노입자와 항체의 고정화 시간을 각각 10, 20, 30, 40, 50 및 60 분으로 달리한 것을 제외하고는 실시예 1_8과 모두 동일하게 하여 구리-산화철 자성나노입자-항체 복합체를 제조하였다.

[0095] -80℃에 동결건조되어 있던 *Salmonella enteritidis*를 세포 스탁에서 파이펫을 이용하여 15 mL 튜브에 있는 10 mL Luria-Bertani(LB) 배지에 접종하였다. 접종한 LB 배지는 37℃ 배양기에서 125 rpm 의 속도로 배양시키고, 200 nm에서의 광학밀도가 2.295일 때, 수득한 후 1.6×10^4 배 희석하여 병원성 미생물 시료를 준비하였다. 다음으로, 상술한 바와 같이 고정화 시간을 달리하여 제조된 자성나노입자-항체 복합체를 첨가하였다. 상온에서 볼텍스를 이용해 다양한 온도(4℃, 25℃, 37℃)에서 40분 동안 각각 반응시켜 자성나노입자-항체 복합체와 병원성 미생물 간의 항체-항원 반응을 유도하였다. 40분 뒤 반응이 완결된 시료를 자석에 1분 동안 놓아두면 자성나노입자와 반응을 한 병원성 미생물이 자석 방향으로 끌려오게 된다. 반응된 병원성 미생물을 자성나노입자-항체 복합체와 분리하기 위해, 미반응 물질이 포함된 상층액을 파이펫으로 조심스럽게 2차례에 걸쳐 제거하였다. 상술한 바와 같이 검출온도에 따라 얻은 각각의 병원성 미생물과 반응시킨 복합체를 real-time PCR을 이용해 ct value를 계산하였다.

[0096] 도 5는 실시예 1_8에서 자성나노입자와 항체의 고정화 시간에 따른 자성나노입자-항체 복합체의 병원성 미생물 검출효율을 분석한 결과이다(N = 4). 이에 따르면 자성나노입자와 항체를 고정화하는 시간은 10분이면 충분한 것으로 확인되었다.

[0097] **<시험예 4> 실시예 1로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체의 병원성 미생물 최적 검출 온도 및 시간**

[0098] 1) 병원성 미생물 최적 검출 온도

[0099] 우선, -80℃에 동결건조되어 있던 *Salmonella enteritidis*를 세포 스탁에서 파이펫을 이용하여 15 mL 튜브에 있는 10 mL Luria-Bertani(LB) 배지에 접종하였다. 접종한 LB 배지는 37℃ 배양기에서 125 rpm 의 속도로 배양시키고, 200 nm에서의 광학밀도가 2.295일 때, 수득한 후 1.6×10^4 배 희석하여 병원성 미생물 시료를 준비하였다. 상기 실시예 1_8로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체를 첨가한 후 상온에서 볼텍스를 이용해 다양한 온도(4℃, 25℃, 37℃)에서 40분동안 각각 반응시켜 자성나노입자-항체 복합체와 병원성 미생물 간의 항체-항원 반응을 유도하였다. 40분 뒤 반응이 완결된 시료를 자석에 1분 동안 놓아두면 자성나노입자와 반응을 한 병원성 미생물이 자석 방향으로 끌려오게 된다. 반응된 병원성 미생물을 자성나노입자-항체 복합체와 분리하기 위해, 미반응 물질이 포함된 상층액을 파이펫으로 조심스럽게 2차례에 걸쳐 제거하였다. 상술한 바와 같이 검출온도에 따라 얻은 각각의 병원성 미생물과 반응시킨 복합체를 real-time PCR을 이용해 ct value를 계산하였다.

[0100] 도 6은 다양한 온도 조건 하에서, 실시예 1_8로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체의 병원성 미생물 검출효율을 분석한 결과이다(N = 4). 이에 따르면 검출온도가 25℃일 때, 병원성 미생물과 항체의 결합이 효율적으로 활성화됨을 확인하였다. 즉 25℃는 병원성 미생물과 특이적으로 결합하는 항체가 효율적으로 활성화되는 온도라고 여겨진다.

[0101] 2) 병원성 미생물 최적 검출 시간

[0102] 우선, -80℃에 동결건조되어 있던 *Salmonella enteritidis*를 세포 스탁에서 파이펫을 이용하여 15 mL 튜브에 있는 10 mL Luria-Bertani(LB) 배지에 접종하였다. 접종한 LB 배지는 37℃ 배양기에서 125 rpm 의 속도로 배양시키고, 600 nm에서의 광학밀도가 1.979일 때, 수득한 후 1.6×10^4 배 희석하여 병원성 미생물 시료를 준비하였다. 상기 실시예 1_8로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체를 첨가한 후 상온에서 볼텍스를 이용해 25℃에서 다양한 시간동안(20, 40, 60, 80 및 120 분) 각각 반응시켜 자성나노입자-항체 복합체와 병원성 미생물 간의 항체-항원 반응을 유도하였다. 반응이 완결된 시료를 자석에 1분 동안 놓아두면 자성나노입자와 반응을 한 병원성 미생물이 자석 방향으로 끌려오게 된다. 반응된 병원성 미생물을 자성나노입자-항체 복합체와 분리하기 위해, 미반응 물질이 포함된 상층액을 파이펫으로 조심스럽게 2차례에 걸쳐 제거하였다. 상술한 바와 같이 검출온도에 따라 얻은 각각의 병원성 미생물과 반응시킨 복합체를 real-time PCR을 이용해 Ct value를 계산하였다.

[0103] 도 7은 다양한 시간 조건 하에서 실시예 1_8에서 자성나노입자와 항체의 고정화 시간에 따른 자성나노입자-항체

복합체의 병원성 미생물 검출효율을 분석한 결과이다(N = 4). 이에 따르면 시간이 증가함에 따라 Ct value가 점차 감소함을 확인하였다. 즉 실시예 1_8로부터 제조된 구리-산화철 자성나노입자-항체 복합체는 병원성 미생물과 반응을 형성하는데 60분의 시간이 소요됨을 알 수 있다.

[0104] **<시험예 5> 병원성 미생물 농도에 따른 실시예 1로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체의 검출한계 분석**

[0105] 다양한 농도의 병원성 미생물 시료를 준비하였다. 병원성 미생물 시료의 제조 과정은 다음과 같았다. -80℃에 동결건조되어 있던 *Salmonella enteritidis*를 세포 스탁에서 파이펫을 이용하여 15 mL 튜브에 있는 10 mL Luria-Bertani(LB) 배지에 접종하였다. 접종한 LB 배지는 37℃ 배양기에서 125 rpm 의 속도로 하룻밤 동안 배양시켰다. *Salmonella enteritidis* 균의 수는 600 nm에서의 광학 밀도를 이용하여 측정하고, 10^9를 곱하여 측정하였다. 4,000 g로 20분 동안 원심분리하여 침전된 세포들을 제외한 상층액을 모두 제거하고, PBS 완충액에 세포들을 현탁하였다. 이들을 각각 4배의 연속희석(Dilution rate)을 시행하여 2288000, 572000, 143000, 35750, 8937.5, 2234.375 cells/ml 농도의 병원성 미생물 시료를 준비하고, 상기 실시예 1로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체를 첨가한 후 상온에서 볼텍스를 이용해 1 시간동안 반응시켜 자성나노입자-항체 복합체와 병원성 미생물 간의 항체-항원 반응을 유도하였다. 한 시간 뒤 반응이 완결된 시료를 자석에 1분 동안 놓아두면 자성나노입자와 반응을 한 병원성 미생물이 자석 방향으로 끌려오게 된다. 반응된 병원성 미생물을 자성나노입자-항체 복합체와 분리하기 위해, 미반응 물질이 포함된 상층액을 파이펫으로 조심스럽게 2차례에 걸쳐 제거하였다. 이후 각 표본을 DNA 추출을 시행한 후, Real-time PCR을 시행하여, 연속적으로 Ct value를 계산하였다. 앞서 실험을 통해 가장 우수한 항체 고정화효율을 갖는 실시예를 확인하였고, 최종 고정화되는 항체의 양은 모두 동일하므로 실시예 1이라고 통칭하였으나, 본 실험에서 사용한 자성나노입자-항체 복합체는 실시예 1_8이다.

[0106] 도 8은 실시예 1로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체의 선형성 및 검출한계를 측정한 결과이다. 이에 따르면 병원성 미생물에 대한 검출한계는 약 13000 개의 세포까지 측정가능한 것으로 판단할 수 있다. 이를 바탕으로 실시예 1로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체의 병원성 미생물 검출범위는 1.3×10^4 개 내지 2.3×10^6 개의 세포인 것으로 판단할 수 있었다.

[0107] **<시험예 6> 실제 샘플을 이용한 분석**

[0108] 실제 식품(우유(액체 제형), 과자(고체 제형))으로부터, 상기 제작한 본 발명의 병원성 미생물 검출용 복합체를 적용하여 정확도를 비교하였다. 구체적으로 액체 제형인 우유 25 ml와 고체 제형인 과자(쿠키) 25 g을 준비하고, 이들 각각 100 ml LB 배지에 혼합하여 6 시간동안 37℃, 125 rpm으로 배양하여 우유 표본, 과자 표본을 5개씩 준비하였다.

[0109] 다음, -80℃에 동결건조되어 있던 *Salmonella enteritidis*를 세포 스탁에서 파이펫을 이용하여 15 mL 튜브에 있는 10 mL Luria-Bertani(LB) 배지에 접종하였다. 접종한 LB 배지는 37℃ 배양기에서 125 rpm 의 속도로 하룻밤 동안 배양시켰다. 이때, *Salmonella enteritidis* 균의 수는 600 nm에서의 광학 밀도를 이용하여 측정하고, 10^9를 곱하여 측정된, 정량적으로 정확한 양을 알 수 있는 병원성 미생물 시료($1.6 * 10^6$ 세포/ml)를 준비하였다.

[0110] 상기 우유 표본(No 1~5)과 과자 표본(No 6~10) 중에서 무작위로 5 개의 표본에만 상기 병원성 미생물 시료를 첨가하였다. 여기서 과자 표본의 경우 원심분리한 후, 상층액만을 채취하여 병원성 미생물 시료를 첨가하여 총 10개의 시료를 제조하였다. 각 표본을 DNA 추출을 시행한 후, Real-time PCR을 시행하여, 연속적으로 Ct value를 계산하였다.

[0111] 앞서 실험을 통해 가장 우수한 항체 고정화효율을 갖는 실시예를 확인하였고, 최종 고정화되는 항체의 양은 모두 동일하므로 실시예 1이라고 통칭하였으나, 본 실험에서 사용한 자성나노입자-항체 복합체는 실시예 1_8이다.

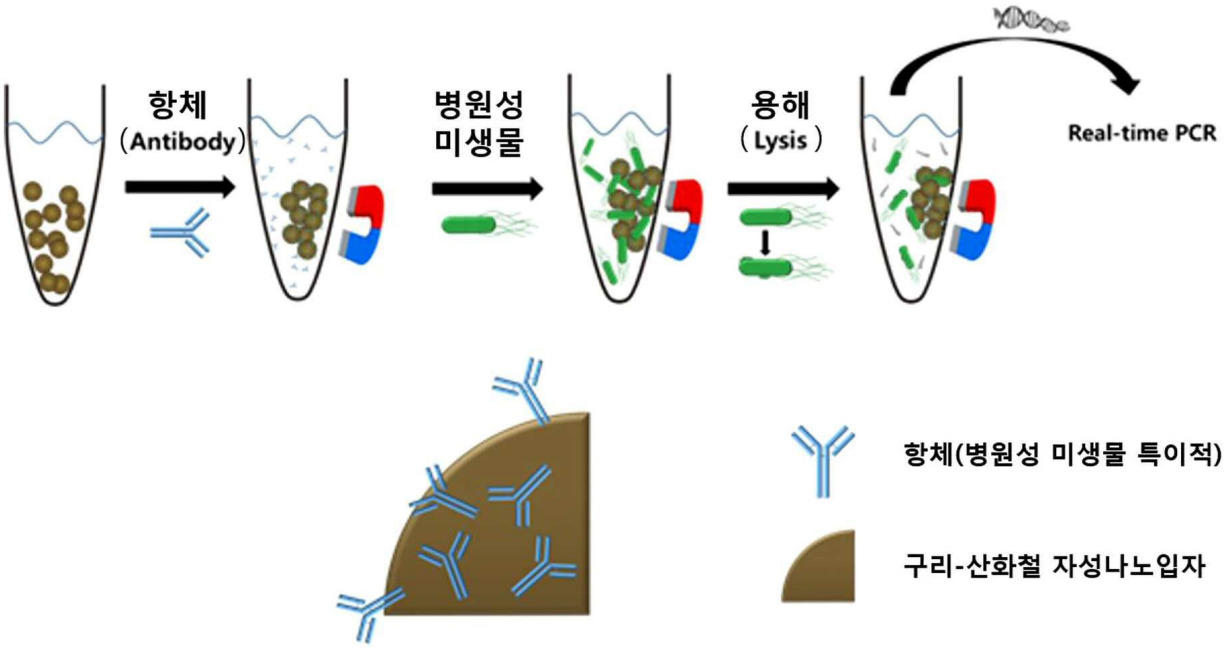
[0112] 도 9는 무작위 10개의 표본에 실시예 1로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체를 처리하고 Real-time PCR 분석으로 병원성 미생물을 측정한 결과이다. 이에 따르면, 1, 2, 3, 9, 10 표본에는 병원성 미생물이 첨가되었고, 4, 5, 6, 7, 8 표본에는 병원성 미생물이 첨가되지 않음을 빠르고, 정확히 검출하였다. 병원성 미생물이 존재하는 표본과 그렇지 않은 표본은 통계적으로 유의미한 차이를 분명히 나타냄을 확인하였다. 또한, 1, 2, 3, 9, 10 표본은 서로 동량의 병원성 미생물이 첨가되었음을 알 수 있다.

[0113] 따라서 본 발명에 따른 실시예 1로부터 제조된 자성나노입자-항체 복합체는 10개의 식품 표본에서 병원성 미생물을 정확도 100%로 검출하였다.

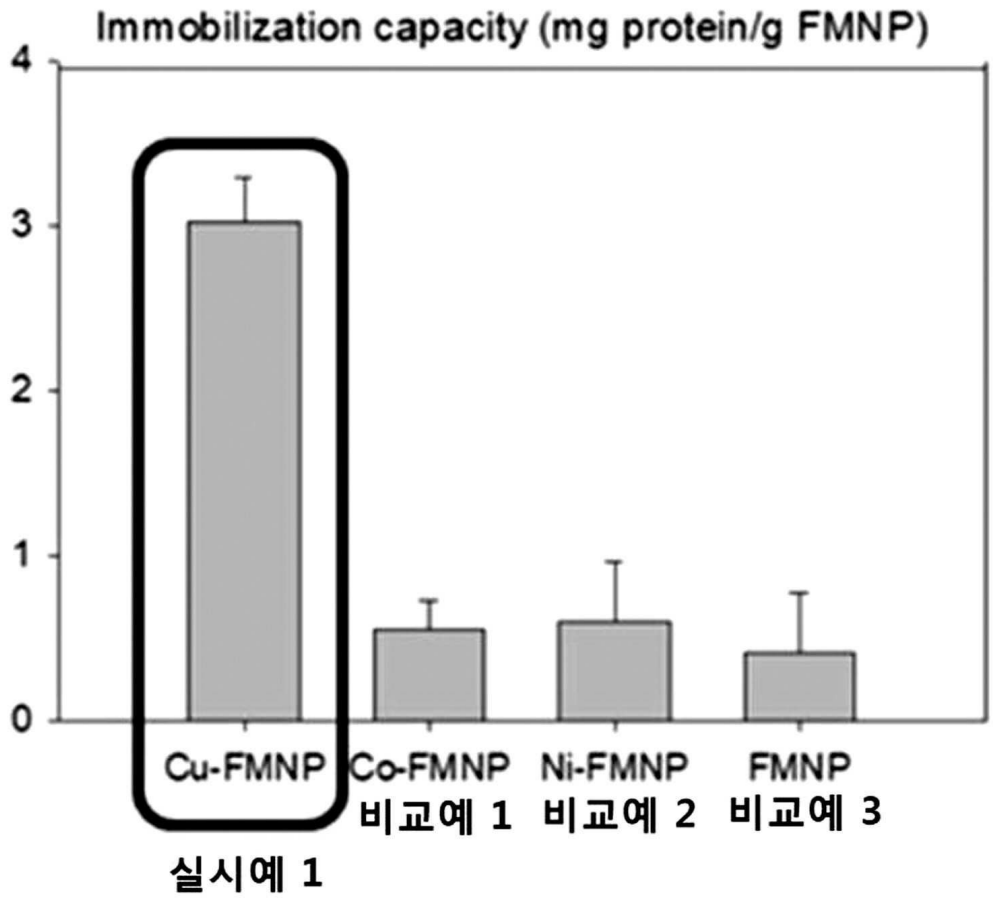
[0114] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



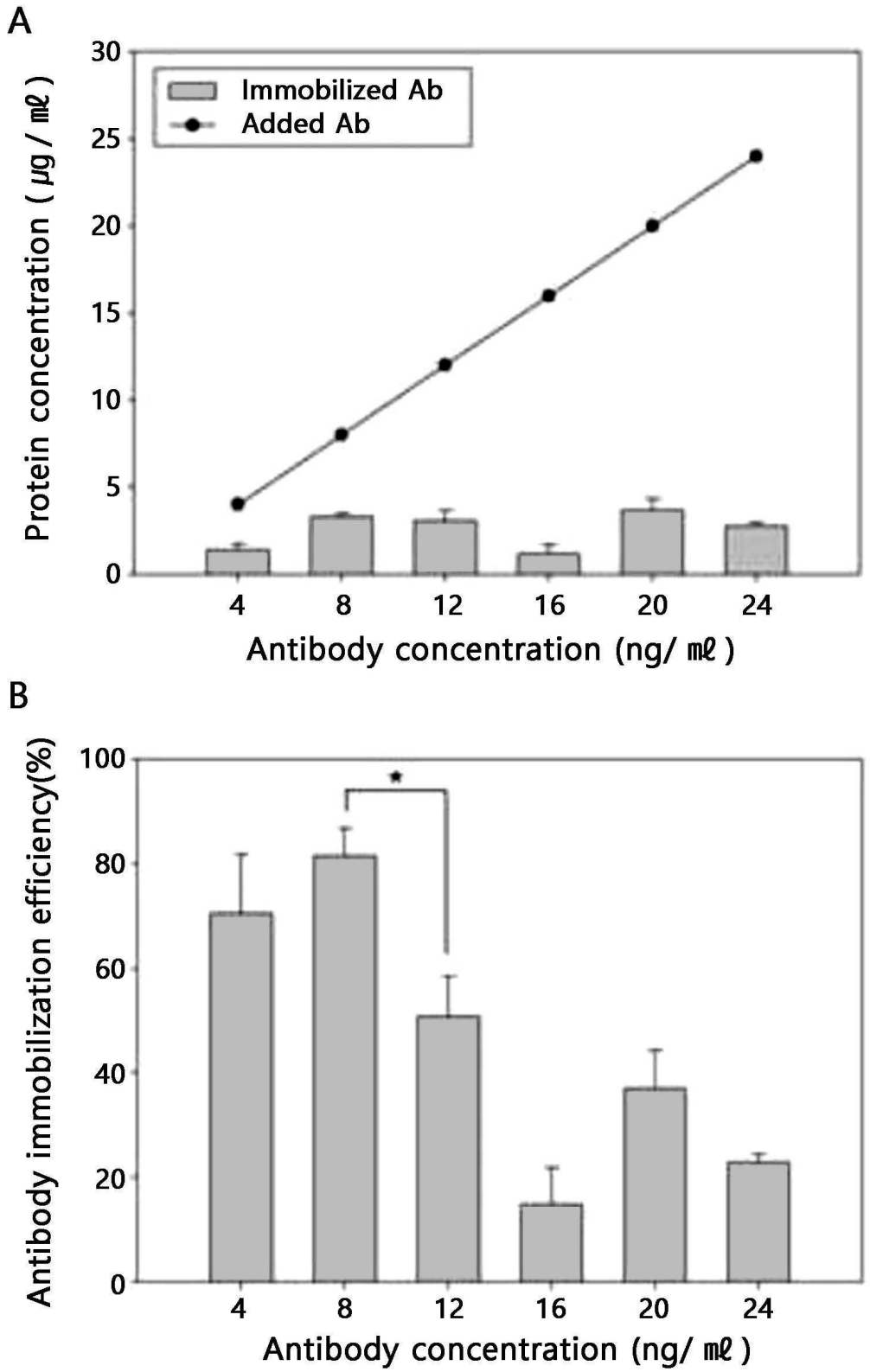
도면2


Immobilization capacity (mg protein/g FMNP)
4
3
2
1
0
Cu-FMNP
Co-FMNP
Ni-FMNP
FMNP
실시예 1
비교예 1
비교예 2
비교예 3

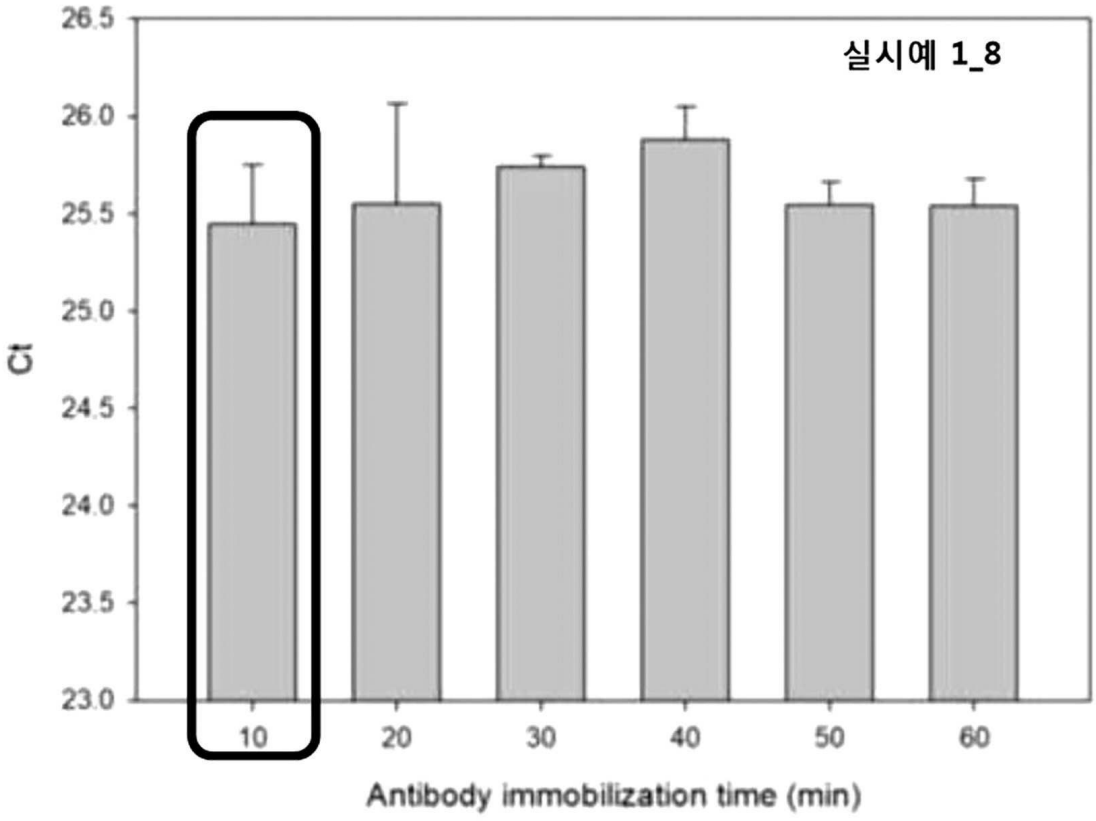
도면3


자성에 의한 분리과정
시간
(sec)
0 sec
20 sec
40 sec
60 sec
상층액 분리 후

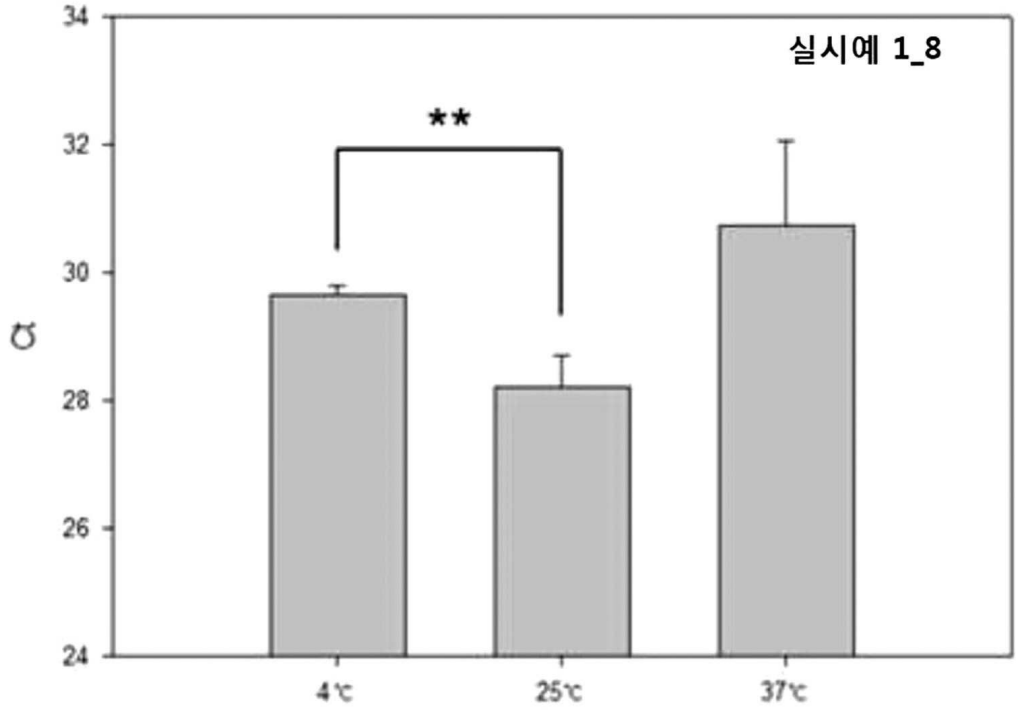
도면4


A
Immobilized Ab
Added Ab
Protein concentration (㎍ / ㎖)
30
25
20
15
10
5
0
4
8
12
16
20
24
Antibody concentration (ng/ ㎖)
B
Antibody immobilization efficiency(%)
100
80
60
40
20
0
*
4
8
12
16
20
24
Antibody concentration (ng/ ㎖)

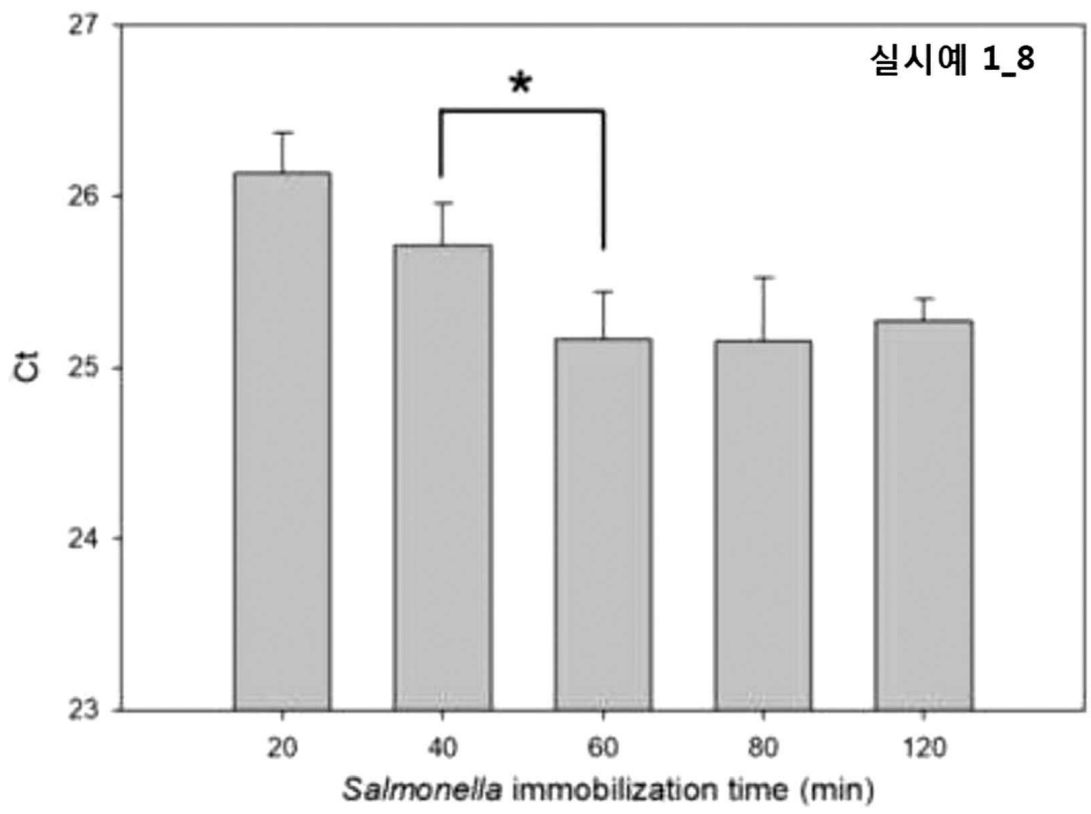
도면5


실시예 1_8
26.5
26.0
25.5
25.0
24.5
24.0
23.5
23.0
Ct
10
20
30
40
50
60
Antibody immobilization time (min)

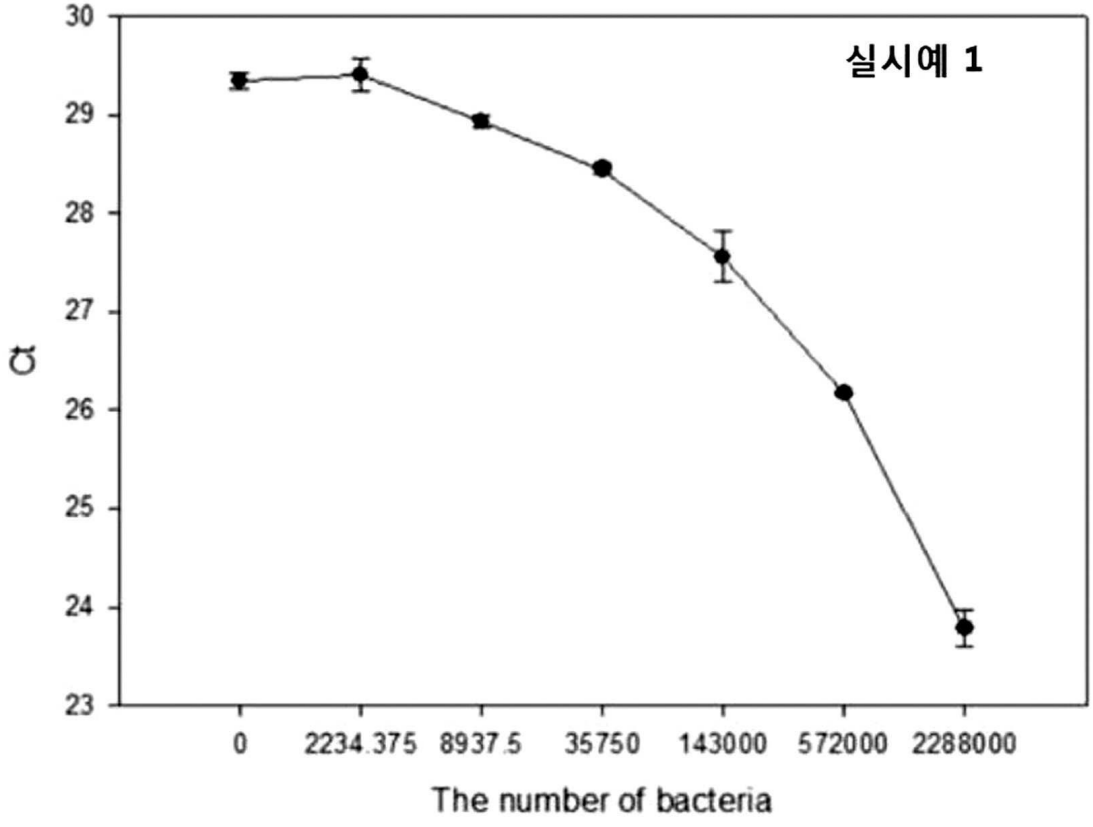
도면6


실시예 1_8
34
32
30
28
26
24
Ct
**
4℃
25℃
37℃

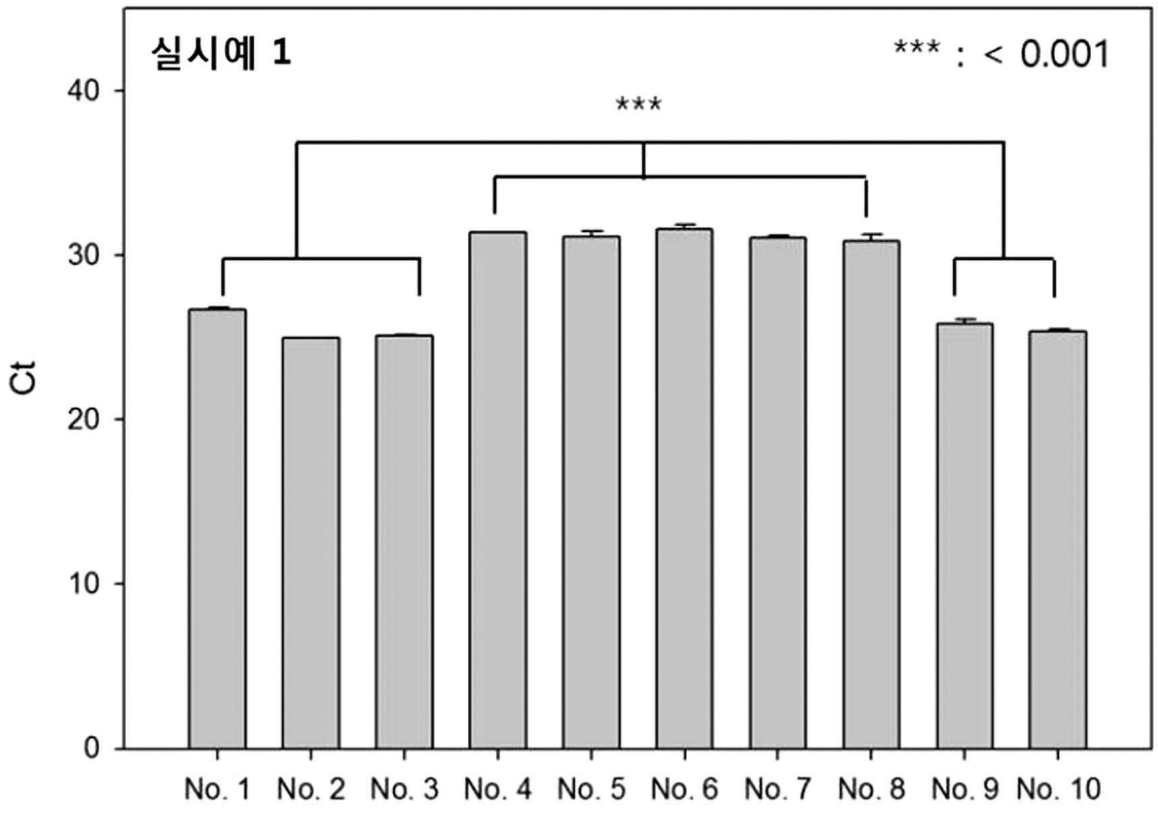
도면7


실시예 1_8
*
Ct
27
26
25
24
23
20
40
60
80
120
Salmonella immobilization time (min)

도면8


실시예 1
Ct
30
29
28
27
26
25
24
23
0
2234.375
8937.5
35750
143000
572000
2288000
The number of bacteria

도면9


실시예 1
*** : < 0.001
***
Ct
40
30
20
10
0
No. 1
No. 2
No. 3
No. 4
No. 5
No. 6
No. 7
No. 8
No. 9
No. 10