(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0096329
(43) 공개일자 2018년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*G01N 33/569* (2017.01) *G01N 33/52* (2006.01)
*G01N 33/543* (2006.01) *G01N 33/553* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*G01N 33/56961* (2013.01)
*G01N 33/52* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0022907
(22) 출원일자 2017년02월21일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
**경희대학교 산학협력단**
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
**양성익**
경기도 수원시 영통구 매영로 366, 722동 1101호 (영통동, 현대아파트)
**조은민**
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동)
**강동진**
경상남도 양산시 물금읍 백호로 91, 104동 2001호 (반도유보라4차아파트)
(74) 대리인
**특허법인 하나**

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **자성 나노입자를 이용한 곰팡이의 분리 및 검출 방법**

## (57) 요 약

본 발명의 일 실시예는 (a) 곰팡이에 특이적으로 결합하는 타겟팅 모이어티(moiety)를 포함하는 자성 나노입자 및 분석 대상 시료를 접촉시키는 단계; (b) 자성을 인가(apply)하여 상기 나노입자를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 나노입자와 특이적으로 결합한 곰팡이를 검출하는 단계;를 포함하는 곰팡이의 분리 및 검출 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류
***G01N 33/54326*** (2013.01)
***G01N 33/54346*** (2013.01)
***G01N 33/553*** (2013.01)
*G01N 2333/37* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013001350008
부처명 환경부
연구관리전문기관 환경산업기술원
연구사업명 생활공감 환경보건기술개발사업
연구과제명 표면증강라만분광법과 물질기반 생물정보 분석기법을 이용한 실내 부유진균 측정분석기술
기 여 율 1/2
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2013.09.01 ~ 2015.06.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2016M3A7B4909776
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 나노·소재원천기술개발사업
연구과제명 생활 환경 곰팡이 모니터링 시스템 개발
기 여 율 1/2
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2016.08.01 ~ 2021.07.31

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

(a) 곰팡이에 특이적으로 결합하는 타겟팅 모이어티(moiety)를 포함하는 자성 나노입자 및 분석 대상 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 자성을 인가(apply)하여 상기 나노입자를 분리하는 단계; 및

(c) 상기 나노입자와 특이적으로 결합한 곰팡이를 검출하는 단계;를 포함하는 곰팡이의 분리 및 검출 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 곰팡이는 아스퍼질러스 속(*Aspergillus spp.*), 페니실리움 속(*Penicillium spp.*), 알터나리아 속(*Alternaria spp.*), 후자리움 속(*Fusarium spp.*), 및 에피코쿰 속(*Epicoccum spp.*)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 곰팡이의 분리 및 검출 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 자성 나노입자의 표면은 머캅도헥사데카노익 산(Mercaptohexadecanoic acid, MHDA), 시스타민, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 덱스트란, 폴리비닐피롤리돈, 알부민, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌이민, 키토산, 히아루론산, 폴리락틱글라이코릭산(PLGA), 폴리락틱산, 폴리락타이드, 폴리글라이콜릭산, 폴리아미노산, 폴리아세탈, 폴리오써칼본에이트, 폴리칼본에이트, 폴리칼보락톤 폴리아크릴산, 폴리메타아크릴산, 폴리사카라이드, 폴리케탈, 폴리에테르, 폴리아마이드, 폴리말레익안하드라이드, 폴리메틸비닐에테르 또는 상기 고분자의 공중합체에 의해 코팅처리된 곰팡이의 분리 및 검출 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 자성 나노입자는MxOy(단, M은 금속, O는 산소, x와 y는 정수를 나타낸다)를 포함하는 곰팡이의 분리 및 검출 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 타겟팅 모이어티는 항체 또는 이의 단편인 곰팡이의 분리 및 검출 방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 영구자석 또는 전자석을 통해 상기 자성을 인가하는 곰팡이의 분리 및 검출 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 흡광 광도법 또는 비색표 대조법을 통해 곰팡이를 정량하는 곰팡이의 분리 및 검출 방법.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 곰팡이에 특이적으로 결합하는 자성 나노입자를 이용한 곰팡이의 분리 및 검출 방법에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0002] 실내 공기는 오염원의 하나로서 곰팡이(mold, fungi)를 포함하며, 곰팡이는 생물학적 유해인자로서의 실내 공기질을 악화시킬 수 있다. 곰팡이는 곰팡이 독소(mycotoxin)를 방출할 수 있으며, 이는 헌집증후군(sick buikding syndrome; SBS)의 원인으로 알려져 있다.

[0003] 2000년대 이후 천식, 아토피피부염, 알레르기비염 등의 알레르기질환이 지속적으로 증가하고 있으며, 알레르기질환의 발병에는 환자개인의 유전적 요인뿐만 아니라, 실내환경요인(곰팡이, 진드기 대소변과 사체, 동물의 털과 피부 부스러기, 신종 화학물질 및 환경영향물질 등) 등이 복합적으로 작용할 수 있다.

[0004] 실내의 공기 중에는 상대적으로 무해한 곰팡이뿐만 아니라 유해한 곰팡이들이 동시에 존재한다. 공기 중에 존재하는 생물학적 유해인자에 대한 정확한 평가를 위해서는 전체 곰팡이 농도보다 인체에 유해한 곰팡이들에 대한 선택적인 종류 및 농도 분석 기술이 요구된다. 따라서 유해 곰팡이를 일반 곰팡이와 다른 물질로부터 분리시키고 이를 효율적으로 검출하는 기술이 필요하다.

[0005] 따라서, 본 발명자들은 기존의 곰팡이 종 분석 방법과 달리 전문적인 지식 없이도 신속하고 정확하게 목적하는 곰팡이를 분리 및 검출하는 방법을 도출하고자 하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 신속하고 간편하게 실내 공기 중 곰팡이를 분리 및 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 일 측면에 따르면, (a) 곰팡이에 특이적으로 결합하는 타겟팅 모이어티(moiety)를 포함하는 자성 나노입자 및 분석 대상 시료를 접촉시키는 단계; (b) 자성을 인가(apply)하여 상기 나노입자를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 나노입자와 특이적으로 결합한 곰팡이를 검출하는 단계;를 포함하는 곰팡이의 분리 및 검출 방법이 제공된다.

[0008] 일 실시예에 있어서, 상기 곰팡이는 아스퍼질러스 속(*Aspergillus spp.*), 페니실리움 속(*Penicillium spp.*), 알터나리아 속(*Alternaria spp.*), 후자리움 속(*Fusarium spp.*), 및 에피코쿰 속(*Epicoccum spp.*)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.

[0009] 일 실시예에 있어서, 상기 자성 나노입자의 표면은 머캅도헥사데카노익 산(Mercaptohexadecanoic acid, MHDA), 시스타민, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 덱스트란, 폴리비닐피롤리돈, 알부민, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌이민, 키토산, 히아루론산, 폴리락틱글라이코릭산(PLGA), 폴리락틱산, 폴리락타이드, 폴리글라이콜릭산, 폴리아미노산, 폴리아세탈, 폴리오써칼본에이트, 폴리칼본에이트, 폴리칼보락톤 폴리아크릴산, 폴리메타아크릴산, 폴리사카라이드, 폴리케탈, 폴리에테르, 폴리아마이드,폴리말레익안하드라이드, 폴리메틸비닐에테르 또는 상기 고분자의 공중합체에 의해 코팅 처리될 수 있다.

[0010] 일 실시예에 있어서, 상기 자성 나노입자는MxOy(단, M은 금속, O는 산소, x와 y는 정수를 나타낸다)를 포함할 수 있다.

[0011] 일 실시예에 있어서, 상기 타겟팅 모이어티는 항체 또는 이의 단편일 수 있다.

[0012] 일 실시예에 있어서, 상기 (b) 단계에서 영구자석 또는 전자석을 통해 상기 자성을 인가할 수 있다.

[0013] 일 실시예에 있어서, 상기 (c) 단계에서 흡광 광도법 또는 비색표 대조법을 통해 곰팡이를 정량할 수 있다.

### 발명의 효과

[0014] 본 발명의 일 측면에 따르면, 실내 공기 중 채취한 유해 곰팡이 *Aspegillus* 속 등의 분리 및 검출에 활용 가능하다. 상기 곰팡이의 분리 및 검출 방법은 기존의 곰팡이 검출 방법에 비해 검출시간이 적게 소요될 뿐만 아니라 전문적 지식 없이도 신속하고 정확하게 곰팡이를 분리해낼 수 있다.

[0015] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0016] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위하여서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0017] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0018] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다. 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.

[0019] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 또한, 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5' 에서 3' 방향으로 씌여지고, 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽, 아미노에서 카르복실 방향으로 씌여진다. 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명의 일 측면에 따르면, (a) 곰팡이에 특이적으로 결합하는 타겟팅 모이어티(moiety)를 포함하는 자성 나노입자 및 분석 대상 시료를 접촉시키는 단계; (b) 자성을 인가(apply)하여 상기 나노입자를 분리하는 단계; 및 (c) 상기 나노입자와 특이적으로 결합한 곰팡이를 검출하는 단계;를 포함하는 곰팡이의 분리 및 검출 방법이 제공된다.

[0022] 자성을 띄는 나노입자를 코팅시킨 후 겉표면을 아민기($-NH_2$), 카복실기(-COOH)로 치환시킬 수 있다. 항체의 N말단은 상기 나노입자 겉표면에 펩타이드 결합을 할 수 있다. 항체가 코팅된 자성 나노입자는 여러 종이 혼합된 곰팡이 시료와 반응될 때 상기 항체와 특이적으로 결합하는 곰팡이와 결합될 수 있다. 상기 결합물을 산화철 나노입자의 자성을 이용해 분리할 수 있으며 다양한 방법을 통해 검출하고 확인할 수 있다.

[0023] 상기 곰팡이는 현미경적(microscopic) 진균을 의미한다. 이 용어는 임의의 주어진 수의 이들 종을 의미하는 것으로 제한되지 않으며, 아직 발견되지 않았지만 나중에 당업자에 의해 확인되어서 이 속(genus) 내에 포함될 수 있는 종이 배제되는 것은 아니다. 예컨대, 상기 곰팡이는 아스퍼질러스 속(*Aspergillus spp.*), 페니실리움 속(*Penicillium spp.*), 알터나리아 속(*Alternaria spp.*), 후자리움 속(*Fusarium spp.*), 및 에피코쿰 속(*Epicoccum spp.*)로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 상기 “타겟팅 모이어티(targeting moiety)”는 타겟 미생물의 표면에 존재하는 항원에 결합할 수 있는 모든 물질을 의미할 수 있다. 상기 타겟팅 모이어티는 단백질, 펩타이드, 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 보다 바람직하게는 펩타이드, 항체 또는 이의 단편을 포함하며, 가장 바람직하게는 항체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다.

[0025] 상기 타겟팅 모이어티는 항체의 Fab 및 Fc 부위를 포함하며, 이 Fab 부위를 통하여 타겟 미생물의 표면 항원과 비공유결할 수있다. 상기 “Fab 부위”는 타겟 미생물의 표면 항원(예컨대, 수용체)과 상호작용하는 항체의 일 부위를 의미한다. 일반적으로, 파파인으로 전장 항체를 절단하면 Fab 부위와 Fc 부위 두 부위를 얻게 된다. 하나의 클래스에서 모든 항체의 Fab 부위는 거의 동일한 특성이 있다.

[0026] 일 실시예에서 상기 Fab 부위는 IgG의 Fab 부위를 의미할 수 있다. 한편, 상기 타겟 미생물의 표면 항원과 결합하는 특성을 갖는 범위 내에서는 Fab 부위는 통상적인 Fab 부위의 일부 서열일 수도 있다.

[0027] 또한, 상기 타겟팅 모이어티는 항체의 Fab 부위를 포함하는 항체, 앱타머, 폴리펩타이드, 펩타이드, 리간드, 렉

틴, 당, 지질, 당지질 또는 핵산이며, 보다 바람직하게는, 항체의 Fab 부위를 포함하는 항체, 앱타머 또는 리간드이며, 가장 바람직하게는 항체일 수 있다.

[0028] 상기 타겟팅 모이어티가 Fab 부위를 포함하는 항체인 경우에는, 타겟팅 모이어티로서 전장 항체가 이용될 수 있다. 상기 전장 항체는 폴리클론 또는 단일클론 항체를 포함할 수 있다. 세포의 특정 표면 분자에 결합하는 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan , CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0029] 예컨대, 상기 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 상기 폴리클로날 항체는 항원으로서의 세포 표면 분자를 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 후, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 수득할 수 있다.

[0030] 상기 자성 나노입자의 표면은 머캅도헥사데카노익 산(Mercaptohexadecanoic acid, MHDA), 시스타민, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 덱스트란, 폴리비닐피롤리돈, 알부민, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌이민, 키토산, 히아루론산, 폴리락틱글라이코릭산(PLGA), 폴리락틱산, 폴리락타이드, 폴리글라이콜릭산, 폴리아미노산, 폴리아세탈, 폴리오써칼본에이트, 폴리칼본에이트, 폴리칼보락톤 폴리아크릴산, 폴리메타아크릴산, 폴리사카라이드, 폴리케탈, 폴리에테르, 폴리아마이드, 폴리말레익안하드라이드, 폴리메틸비닐에테르 또는 상기 고분자의 공중합체에 의해 코팅처리될 수 있다.

[0031] 상기 자성 나노입자는MxOy(단, M은 금속, O는 산소, x와 y는 정수를 나타낸다)를 포함할 수 있다.

[0032] 상기 (b) 단계에서 영구자석 또는 전자석을 통해 상기 자성을 인가할 수 있다.

[0033] 상기 (c) 단계에서 흡광 광도법 또는 비색표 대조법을 통해 곰팡이를 정량할 수 있다.

[0034] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0035] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.