

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2017/200308 A1

2017 년 11 월 23 일 (23.11.2017) WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

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.

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/005148

(22) 국제출원일:

2017 년 5 월 18 일 (18.05.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0060797 2016 년 5 월 18 일 (18.05.2016) KR

(71) 출원인: 광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 61005 광주 시 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR).

(72) 발명자: 김민곤 (KIM, Min Gon); 61005 광주시 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원, Gwangju (KR). 오현경 (OH, Hyunkyung); 61005 광주시 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원, Gwangju (KR).

(74) 대리인: 신용현 등 (SHIN, Yong Hyun et al.); 06158 서울시 강남구 테헤란로 437 삼성빌딩 2층, Seoul (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,

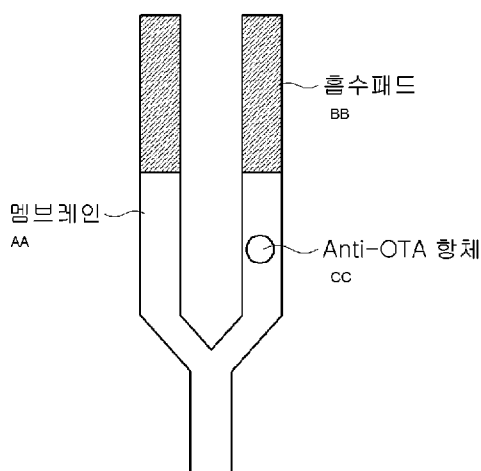
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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 제21조(3))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING ANTIGEN ON MEMBRANE BY USING FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER IMMUNOASSAY

(54) 발명의 명칭: 멤브레인상에서 형광 공명 에너지 전이 면역 분석법을 이용한 항원 검출방법



AA ... Membrane
BB ... Absorption pad
CC ... Anti-OTA antibody

(57) Abstract: A method for detecting an antigen according to an embodiment of the present invention comprises the steps of: (a) contacting an antibody against an antigen to be detected with a specimen containing an antigen to be detected on a diagnostic device to react the antibody and the sample, the diagnostic device being formed of a membrane containing the antibody at one end thereof and the specimen at another end thereof; (b) irradiating light on the antigen-antibody conjugate formed in step (a) to give rise to fluorescence resonance energy transfer to obtain a resulting spectrum; and (c) analyzing the spectrum obtained in step (b) to determine the presence or absence of the antigen to be detected and to measure a concentration of the antigen.

(57) 요약서: 본 발명의 일 실시예에 따른 항원 검출방법은 (a) 검출대상 항원에 대한 항체가 일단에 함유되어 있는 멤브레인으로 형성된 진단기의 타단에 검출대상이 되는 항원이 함유된 시료를 접촉시켜 상기 항체와 반응시키는 과정; (b) 상기 (a)과정에 의해 형성된 항원-항체 복합체에 광을 조사함으로써 형광 공명 에너지 전이를 야기하고, 이에 따른 스펙트럼을 얻는 과정; 및 (c) 상기 (b)과정에서 획득한 스펙트럼을 분석함으로써 검출 대상 항원의 존재를 판단하고 농도를 측정하는 과정을 포함한다.

WO 2017/200308 A1

명세서

발명의 명칭: 멤브레인상에서 형광 공명 에너지 전이 면역 분석법을 이용한 항원 검출방법

기술분야

- [1] 본 발명은 형광 공명 에너지 전이 면역 분석법을 이용한 항원 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 멤브레인 상에서 특정 항원들과 특이적인 결합을 하는 각각의 항체들을 사용하여 이를 항원들과 결합시켜 형광 공명 에너지 전이 현상을 발생시키고 이를 이용한 항원 검출방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 종래 항원 검출을 위해서 주로 사용되고 있는 방법으로는 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)이 있는 데, 이는 항원/항체 반응의 면역기법을 이용함으로써, 감도가 뛰어나고 신속 간편하면서도 경제적인 분석법으로서 널리 실용화되고 있다. 일반적으로 알려진 간접 효소면역측정법은 항원이 되는 물질을 바닥에 코팅한 다음, 세포배양 상등액을 첨가하여 상등액에 존재하는 항체를 항원과 결합시키고, 이어서 항원과 결합한 항체를 인식하는 또 다른 항체-효소접합체를 이용하여 발색시킴으로써, 원하는 항체를 생산하는 세포주인지 여부를 확인한다.
- [4] 그러나, 이러한 방법은 실험의 단순성에 비해 많은 단점을 지니고 있다. 첫째로, 검출대상 물질을 정량적으로 분석하기 위해서는 직접경합 효소면역측정법 또는 간접경합 효소면역측정법이 사용되는데, 직접경합 효소면역측정법은 검출대상물질과 검출대상물질-효소접합체에 대한 경합반응이 발생하고, 간접경합 효소면역측정법에서는 생산된 단클론 항체가 코팅된 검출대상물질-효소접합체 및 검출대상물질과 경합반응이 잘 일어나는 항체를 생산하는 융합세포주를 선별해야 하지만, 간접경합 효소면역측정법의 경우 항체의 경합능력을 확인하는 단계가 없기 때문에 최종적으로 생산되는 항체가 검출대상물질에 대한 경합능력을 갖추고 있다고 보장할 수 없다. 둘째로, 간접 효소면역측정법은 검출대상물질이 단백질과 같은 분자량이 큰 물질인 경우에만 적합하다고 할 수 있다. 이는, 분자량이 큰 물질이 효소면역측정법 이용 시 코팅이 용이하기 때문이며, 저분자물질 (예, 아플라톡신, 오크라톡신, 제랄레논 등 곰팡이 독소, 네오테린, 마이오테린과 같은 바이오마커, 다환 방향족 탄소, 마약류 등)은 코팅이 잘 되지 않기 때문에 간접 효소면역측정법을 사용하기에 적합하지 않다. 따라서, 검출대상물질이 저분자 물질인 경우, 간접 효소면역측정법을 이용한다면 저분자 물질들을 직접 코팅할 수는 없고, 분자량이 큰 단백질, 즉 코팅이 가능한 물질을 담체로서 검출대상물질과 결합시켜 코팅하여야 한다. 이후 세포배양 상등액을 반응시키면 항원을

인식하는 항체도 결합할 수 있지만, 담체를 인식하는 부분의 항체, 또한 항원과 담체의 사이를 인식하는 항체도 존재할 수 있고, 이러한 항체들이 2차 항체에 의해 발색을 야기하게 된다. ELISA 방법 외에도 항체를 이용한 항원 검출 방법에는, 측류 면역분석법 (lateral flow immunoassay, LFA), 전기화학적 면역분석법 (electrochemical immunoassay), 압전 면역센서 (piezoelectric immunosensors) 및 형광 극성 면역분석법 (fluorescence polarization immunoassays) 등이 존재한다.

[5] 특히, 검출 대상이 되는 저분자 항원 중에서도 곰팡이 독소 (mycotoxin)는 곰팡이가 생산하는 2차 대사 산물로서, 사람과 가축에 질병이나 이상생리작용을 유발하며, 곡류, 견과류 및 곰팡이가 번식하기 쉬운 식품에서 주로 발생한다. 따라서, 식품류에서 곰팡이 독소 오염은 피할 수 없는 현상이고, 농산물과 그들 생산품에 대한 검사가 필수적이다.

[6] 곰팡이 독소는 크게 생산균에 따라 아스페르길루스 (*Aspergillus*) 속, 페니실륨 (*Penicillium*) 속, 및 푸사리움 (*Fusarium*) 속 곰팡이 독소 등으로 구분한다. 또한, 대표적인 예로서, 아플라톡신 (Aflatoxin), 오크라톡신 A (Ochratoxin, OTA) 및 제랄레논 (zearalenone)을 들 수 있으며, 이러한 곰팡이 독소들은 강력한 병원성 물질로서, 일반적으로 물에서의 용해도가 매우 낮으며, 클로로포름, 메탄올, 아세토니트릴 등과 같은 극성 유기용매에 잘 용해된다. 특히, 세계적 농산물 수출입량의 급격한 증가로 인해서 곰팡이 독소들의 검출에 대한 관심도가 높아지고 있음에도 불구하고, 기존의 분석방법으로는 많은 시료들 중에서 곰팡이 독소를 효과적으로 검출함에 있어서, 장비, 인력 등의 측면에서 많은 제약이 따르는 실정이고, 따라서 이를 효율적으로 분석할 수 있는 방법의 도입이 절실히 요구되고 있다.

[7]

[8] 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.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명은 이러한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 다양한 항원/항체 복합체에서 항체의 형광특성을 멤브레인을 이용하여 보다 효과적으로 검출하고, 2개 이상의 항원이 존재하는 경우에 동시에 검출할 수 있는 항원 검출방법을 제공하는 데 있다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 위 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 따른 항원 검출방법은 (a)

검출대상 항원에 대한 항체가 일단에 함유되어 있는 멤브레인으로 형성된 진단기의 타단에 검출대상이 되는 항원이 함유된 시료를 접촉시켜 상기 항체와 반응 시키는 과정; (b) 상기 (a)과정에 의해 형성된 항원-항체 복합체에 광을 조사함으로써 형광 공명 에너지 전이를 야기하고, 이에 따른 스펙트럼을 얻는 과정; 및 (c) 상기 (b) 과정에서 획득한 스펙트럼을 분석함으로써 검출 대상 항원의 존재를 판단하고 농도를 측정하는 과정을 포함한다.

- [13] 상기 진단기는 상기 시료를 접촉하여 상기 시료를 주입할 수 있는 시료접촉부와 상기 항체가 함유되어 있는 테스트 라인과 시료의 투입여부를 확인하는 콘트롤 라인을 포함하는 반응 멤브레인과 상기 반응멤브레인의 다운 스트림에 접촉하여 형성되어 상기 접촉된 시료를 흡수하는 흡수패드를 포함할 수 있다.
- [14] 상기 반응멤브레인은 하나의 시료접촉부에서 분리되어 두 개 이상의 가지로 분기되어 형성될 수 있다.
- [15] 상기 항원은 300 ~ 400nm 에서 흡수 파장을 갖는 곰팡이 독소, 바이오마커 또는 다환 방향족 탄소일 수 있다.
- [16] 상기 곰팡이 독소는 아플라톡신(Aflatoxin), 오크라톡신 A(Ochratoxin, OTA) 또는 제랄레논일 수 있다.
- [17] 상기 바이오마커는 네옵테린 (neopterin), 바이옵테린 (biopterin), 니코틴아미드아데닌디뉴클레오티드 (NADH) 또는 니코틴아미드아데닌디뉴클레오티드 인산 (NADPH)일 수 있다.
- [18] 상기 다환 방향족 탄소는 벤조피렌, 디벤조안트라센, 피렌 또는 벤조플루오렌일 수 있다.
- [19] 상기 (a) 과정은 항원-항체 반응 후에 진단기를 건조시키는 과정을 더 포함할 수 있다.
- [20] 상기 (a) 과정은 항원-항체 반응 후에 버퍼용액을 접촉시켜 워싱하는 과정을 더 포함할 수 있다.
- [21] 상기 형광 스펙트럼 분석은 상기 항원의 형광 스펙트럼 중 최대 형광 세기를 나타내는 파장에서의 형광세기와 상기 항체의 형광 스펙트럼 중 최대 형광 세기를 비교분석함으로써 수행될 수 있다.
- [22] 상기 형광 스펙트럼 분석은 상기 항체의 형광 스펙트럼 중 최대 형광 세기를 나타내는 파장에서의 형광세기($I_{\text{항체}}$)에 대한 상기 항원의 형광 스펙트럼 중 최대 형광 세기를 나타내는 파장에서의 형광 세기($I_{\text{항원}}$)의 비율인 $I_{\text{항원}}/I_{\text{항체}}$ 를 계산하여 수행될 수 있다.

[23]

발명의 효과

- [24] 본 발명에 의한 항원 검출방법에 따르면 다음과 같은 효과가 있다.
- [25] 첫째, 멤브레인상에서 검출대상이 되는 항원이 존재하는 시료를 접촉시켜

색상이 짙은 시료의 경우에도 형광 스펙트럼 관찰이 용이하므로, 커피나 와인 등의 시료내의 항원을 용이하게 검출할 수 있다.

[26] 둘째, 멤브레인 진단기를 다단으로 구성하여 시료 내에 다양한 항원이 존재하는 경우에 한번의 시료채취로도 각 항원의 존재를 판단할 수 있어 다중 진단이 가능하다.

[27] 셋째, 통상적인 competitive ELISA 방식에서는 항원의 농도가 커짐에 따라 검출할 수 있는 신호의 세기가 낮아 지는 반면에 형광 공명 에너지 전이방법으로 사용함으로써 항원의 농도가 클수록 검출 신호가 커짐으로써 정량적인 분석이 가능하다.

[28]

도면의 간단한 설명

[29] 도 1은 면역크로마토그래피 분석 스트립의 대표적 구현 예를 보여주는 도면이다.

[30] 도 2는 본 발명에 따른 항원 검출방법에서 사용되는 멤브레인 진단기를 간략하게 나타낸 도면이다.

[31] 도 3은 본 발명에 따른 항원 검출방법에서 OTA검출과정을 간략히 나타낸 도면이다.

[32] 도 4은 본 발명에 따른 항원 검출방법에서 사용할 수 있는 다양한 멤브레인 진단기의 형태를 나타낸 도면이다.

[33] 도 5는 본 발명에 따른 항원 검출방법에 따른 실험과정을 나타낸 도면이다.

[34] 도 6은 본 발명에 따른 항원 검출방법에 따라 항원유무에 따른 스펙트럼 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[35] 도 7은 본 발명에 따른 항원 검출방법에 따라 항원농도에 따른 스펙트럼 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[36] 도 8은 본 발명에 따른 항원 검출방법에 따라 항원농도에 따른 형광강도를 나타낸 그래프이다.

[37] 도 9은 본 발명에 따른 항원 검출방법에 따라 항원농도에 따른 형광강도의 비를 나타낸 그래프이다.

[38] 도 10은 본 발명에 따른 항원검출 방법에 따라 OTA를 첨가한 커피시료의 스펙트럼 측정결과를 나타낸 그래프이다.

[39]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[40] 여기서 사용되는 전문용어는 단지 특정 실시예를 언급하기 위한 것이며, 본 발명을 한정하는 것을 의도하지 않는다. 여기서 사용되는 단수 형태들은 문구들이 이와 명백히 반대의 의미를 나타내지 않는 한 복수 형태들도 포함한다. 명세서에서 사용되는 "포함하는"의 의미는 특정 특성, 영역, 정수, 단계, 동작, 요소 및/또는 성분을 구체화하며, 다른 특정 특성, 영역, 정수, 단계, 동작, 요소,

성분 및/또는 군의 존재나 부가를 제외시키는 것은 아니다.

- [41] 다르게 정의하지는 않았지만, 여기에 사용되는 기술용어 및 과학용어를 포함하는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 의미와 동일한 의미를 가진다. 보통 사용되는 사전에 정의된 용어들은 관련기술문헌과 현재 개시된 내용에 부합하는 의미를 가지는 것으로 추가 해석되고, 정의되지 않는 한 이상적이거나 매우 공식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [42] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예에 의한 항원 검출방법에 대하여 설명하기로 한다.
- [43]
- [44] 형광 공명 에너지 전이 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)이란 두 개의 서로 다른 파장 영역을 갖는 형광물질이 서로 인접하였을 경우, 하나의 형광을 일으키는 에너지 (donor)가 다른 형광물질에 전달되는 공명 현상이 발생함으로써 다른 형광 (acceptor or quencher)이 발생하는 현상을 이용한 것이다. FRET 현상은 장거리 쌍극자-쌍극자 상호작용에 의하여 하나의 들뜬 염료분자에서 다른 염료분자로 비복사 과정을 통해 에너지가 전이되는 물리적인 현상이며, 이때 에너지를 주는 분자를 공여체 (donor)라 하고 에너지를 받는 분자를 수용체 (acceptor or quencher)라고 한다.
- [45] 특정 파장의 빛을 사용하여 공여체 분자를 들뜨게 했을 때, 주위에 수용체 분자가 가까이 존재할 경우, 공여체 분자의 에너지가 수용체 분자로 전이되어 공여체 분자의 형광이 감소되는 동시에 수용체 분자의 형광이 나타나거나, 또는 공여체 분자의 형광이 감소되는 현상만 나타난다. 이러한 에너지 전이현상은 공간적으로 공여체와 수용체가 1~10nm 정도의 거리에 존재할 경우 발생되는데, 에너지 전이가 발생되기 위한 기본적인 요건은 우선 공여체 분자의 형광 스펙트럼과 수용체 분자의 흡수스펙트럼이 서로 중첩되어야 한다는 점이다. 항체와 같은 단백질의 경우에는, 트립토판 (tryptophan, Trp)이 존재함으로써 인해 260nm ~ 290nm, 대략 280nm에서 최고 흡수파장을 가지며, 또한 이러한 파장대에서 빛을 야기시켰을 때 300nm ~ 400nm, 대략 340nm 근처에서 가장 강한 형광시그널을 나타낸다. 따라서, 전술한 바와 같이, 형광특성을 갖는 항원, 예를 들어 아플라톡신, 오클라톡신, 제랄레논 등과 같은 곰팡이 독소들의 흡수파장과 단백질인 항체의 형광스펙트럼이 서로 중첩된다는 사실을 알 수 있으며, 이러한 현상을 응용할 경우, 형광특성을 갖는 항원들을 검출할 수 있는 방법을 제공할 수 있게 된다.
- [46] 면역크로마토그래피 분석(immunochromatographic assay, ICA)은 생물학적 물질 또는 화학적 물질이 서로 특이적으로 부착하는 성질을 이용하여 분석 물질을 단시간에 정성 및 정량적으로 검사할 수 있는 방법으로, 분석 스트립을 플라스틱 하우징 내부에 장착해 조립한 형태의 면역분석 키트가 일반적으로 사용된다. 도 1은 면역크로마토그래피 분석 스트립의 대표적 구현 예를 보여주는 도면이다.

도 1에 도시된 바와 같이, 면역크로마토그래피 분석에 사용되는 분석 스트립은 접착성 플라스틱 지지체(60) 상에 검체 패드(40), 컨쥬게이트 패드(30), 신호검출 패드(20) 및 흡수 패드(50)를 포함하여 이루어진다. 상기 검체 패드(40)는 액상 검체(또는 분석시료)를 흡수하고 액상 검체의 균일한 유동을 보장한다. 상기 컨쥬게이트 패드(30)는 상기 액상 검체에 함유되어 있는 분석물질과 특이적으로 결합하는 유동성 컨쥬게이트를 포함하고 있으며, 상기 검체 패드(40)를 통해 도입된 액상 검체가 상기 컨쥬게이트 패드(30)를 통과하면서 분석물질과 유동성 컨쥬게이트 사이의 특이적 결합이 이루어진다. 상기 신호검출 패드(20)는 통상 검출영역(detection zone)(21)과 대조영역(control zone)(22)을 포함하여 이루어진다. 상기 검출영역(21)은 상기 액상 검체에 분석물질이 존재하는지의 여부를 확인하기 위한 영역이며, 상기 대조영역(22)은 액상 검체가 상기 검출영역(21)을 정상적으로 통과하였는지의 여부를 확인하기 위한 영역이다. 상기 신호검출 패드(20)의 상부에, 흡수 패드(50)가 위치한다. 상기 흡수 패드(50)는 상기 신호검출 패드(20)를 통과한 액상 검체를 흡수하며, 상기 분석 스트립에서의 상기 액상 검체의 모세관 유동을 도와준다. 정리하면, 상기 분석 스트립은 접착성 플라스틱 지지체(60)에 검체 패드(40), 컨쥬게이트 패드(30), 신호검출 패드(20) 및 흡수 패드(50) 순서로 부착하여, 액상 검체를 검체 패드(40)로부터 신호검출 패드(20)를 경유해, 흡수 패드(50)까지 이동시키고, 신호검출 패드(20)에서의 신호검출을 통해 면역분석을 수행한다. 변형된 다른 방법으로는 상기 컨쥬게이트와 신호검출물질을 하나의 다공성 패드에 통합하기도 한다. 그리고, 검체 패드, 컨쥬게이트 패드, 신호검출 패드 및 흡수 패드는 서로 중첩되어 배치되거나 또는 일정한 간격을 두고 플라스틱 지지체에 배열되기로 한다. 후자의 경우, 액상검체가 다른 매개체를 이용하여 모세관 현상으로 검체 패드와 컨쥬게이트 패드, 신호검출 패드로 이동한다. 이와 같이 멤브레인으로 구성되는 신호검출 패드에서 크로마토 기법을 통하여 검출하는 경우 색이 진한 커피나 홍차, 와인 등의 샘플을 사용할 수 있는 이점이 존재한다.

[47] 즉, 본 발명자들은 항원들과 특이적인 결합을 하는 각각의 항체를 사용하여 이를 항원들과 멤브레인 상에서 반응시켜 형광 공명 에너지 전이 현상을 발생시키고, 이에 의해서 항원의 존재 여부를 판독할 수 있는 항원 검출 방법을 개발하였다. 본 발명의 일 실시예에 따른 항원 검출 방법은 (a) 검출대상 항원에 대한 항체가 일단에 함유되어 있는 멤브레인으로 형성된 진단기의 타단에 검출대상이 되는 항원이 함유된 시료를 접촉시켜 상기 항체와 반응 시키는 과정, 상기 (a)과정에 의해 형성된 항원-항체 복합체에 광을 조사함으로써 형광 공명 에너지 전이를 야기하고, 이에 따른 스펙트럼을 얻는 과정 및 (c) 상기 (c)과정에서 획득한 스펙트럼을 분석함으로써 검출 대상 항원의 존재를 판단하고 농도를 측정하는 과정을 포함한다.

[48] 본 발명에 따른 항원 검출 방법을 사용하여 검출 가능한 항원으로는, FRET 현상을 야기할 수 있는 항원이라면 제한 없이 검출가능하며, 이에 제한되는 것은

아니지만, 300~400nm 에서 흡수 과장을 갖는 곰팡이 독소, 바이오마커 또는 다환 방향족 탄소를 예로 들 수 있다. 특히, 상기 곰팡이 독소의 구체적인 예로는 아플라톡신 (Aflatoxin), 오크라톡신 A (Ochratoxin, OTA) 또는 제랄레논 (zearalenone)을 들 수 있고, 상기 바이오마커의 구체적인 예로는 네옵테린 (neopterin), 바이옵테린 (biopterin), 니코틴아미드아데닌디뉴클레오티드 (NADH) 또는 니코틴아미드아데닌디뉴클레오티드 인산 (NADPH)을 들 수 있으며, 상기 다환 방향족 탄소의 구체적인 예로는 벤조피렌, 디벤조안트라센, 피렌 또는 벤조플루오렌을 들 수 있다.

- [49] 특히, 항체 단백질의 트립토판 잔기는 280nm에서 최대 흡수특성을 나타내며, 330nm에서 최대 방출특성을 나타내는 바, 형광 스펙트럼의 분석은 280nm 파장의 광을 사용한 여기 (excitation) 및 330nm에서의 방출 스펙트럼 관찰에 의해서 수행될 수 있다. 즉, 시료 중에 곰팡이 독소가 존재하는 경우에는 곰팡이 독소와 항체와의 결합에 의해서 소광 (quenching) 현상이 발생하는 바, 시료 중에 곰팡이 독소가 높을수록 그 소광의 정도가 더욱 커지고, 이에 따른 330nm에서의 형광 강도 감소 현상도 더욱 두드러지게 된다. 이와는 대조적으로, 시료 중에 곰팡이 독소가 존재하지 않는 경우에는 이러한 소광 현상이 발생되지 않고, 따라서 330nm에서의 형광 강도가 더 커지게 된다.
- [50] 그러므로, 상기 형광 스펙트럼의 분석은 상기 항원의 형광 스펙트럼 중 최대 형광 세기를 나타내는 파장에서의 형광 세기 혹은 상기 항체의 형광 스펙트럼 중 최대 형광 세기를 나타내는 파장에서의 형광 세기를 분석함으로써 수행될 수 있다.
- [51] 또 다른 방법으로는, 상기 형광 스펙트럼의 분석은 상기 항체의 형광 스펙트럼 중 최대 형광 세기를 나타내는 파장에서의 형광 세기 ($I_{\text{항체}}$)에 대한 상기 항원의 형광 스펙트럼 중 최대 형광 세기를 나타내는 파장에서의 형광 세기 ($I_{\text{항원}}$)의 비율 ($I_{\text{항원}}/I_{\text{항체}}$)을 측정함으로써 수행될 수도 있다.
- [52] 곰팡이 독소로 OTA를 예를 들어 항원 검출과정을 보다 자세하게 설명한다. 도 2는 본 발명에 따른 항원 검출방법에서 사용되는 멤브레인 진단기를 간략하게 나타낸 도면이다. 도 3은 본 발명에 따른 항원 검출방법에서 OTA검출과정을 간략히 나타낸 도면이다. OTA를 예를 들어 항원 검출과정을 설명한다. 본 발명에서는 멤브레인으로 형성된 진단기에 검출대상의 항원인 OTA에 결합할 수 있는 Anti-OTA 항체를 함유시킨 뒤에 일단에 시료를 접촉시키게 되면 일정 시간 후에 이동하여 Anti-OTA 항체에 접촉하게 된다. Anti-OTA 항체의 경우에는 280nm에서 최대 흡수 특성을 나타내며, 330nm에서 최대 방출특성을 나타낸다. 이 때 형광 스펙트럼의 분석은 280nm파장의 광을 사용한 여기(excitation) 및 330nm에서의 방출 스펙트럼의 관찰에 의해 수행될 수 있다. 도 4은 본 발명에 따른 항원 검출방법에서 사용할 수 있는 다양한 멤브레인 진단기의 형태를 나타낸 도면이다. 도 4에 도시한 바와 같이 멤브레인을 여러 갈래로 나누어 각각의 가지마다 별도의 항원에 반응할 수 있는 항체를 위치시킨 후 진단을

수행하게 되면 다양한 항원의 존재 여부를 한번의 진단으로 통하여 검출하는 것이 가능하다.

- [53] 이하 실시예를 통하여 본 발명에 대하여 보다 자세하게 설명한다. 도 5는 본 발명에 따른 항원 검출방법에 따른 실험과정을 나타낸 도면이다.

나이트로셀룰로오스 멤브레인 (180 membrane card, Millipore, HF180MC100) 위쪽에 흡수패드 (Absorbent Pad (AP222), PALL, Grade 222) 를 부착 후 커터기 (automatic belt loop cutter, CuTex, TBC-50) 를 사용하여 일정 간격 (3.8mm) 으로 잘라 스트립을 준비하였다. Anti-OTA를 2mM의 Borate buffer(pH 8.5)에 녹여 0.44mg/ml로 준비하였다. 항원 (ochratoxin A, Sigma, O1877) 은 100% 메탄올 (methanol, Millipore, 106007) 에 녹여 준비하고, 25mM MES (pH 6) (MES, Sigma, M8250) + 0.3% Tween-20 (Tween20, Sigma, P1379) 조성으로 버퍼를 준비하였다. 제조된 스트립에 항체를 1 μ l 떨어뜨리고, 항온항습기를 사용하여 약 37°C의 온도에서 약 15분간 건조시킨다. 별도로 항원 10 μ l와 버퍼 90 μ l을 혼합하여 반응 용액(검출대상시료)을 microplate well에 준비한다. 스트립 상의 항체가 다 건조된 후에 해당 스트립을 버퍼가 준비된 microplate well에 위치시키고, 상온에서 약 15분간 반응시킨다. 별도의 microplate well에 버퍼 100 μ l를 준비한 후에 항원과 스트립상의 항체와 반응이 완료되고 나면 스트립을 버퍼가 준비된 microplate well에 위치시키고 다시 상온에서 약 15분간 반응시킨다. 모든 반응이 완료되고 난 후 항온항습기에서 다시 약 37°C에서 약 15분간 다시 건조시킨다. 건조된 스트립을 마이크로 리더기(Infinite 200 PRO NanoQuant Microplate Readers from TECAN)를 통하여 형광을 측정하였다. 도 6는 본 발명에 따른 항원 검출방법에 따라 스펙트럼을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 6에 도시한 바와 같이 OTA가 존재하지 않는 경우에는 330nm에서의 피크가 감소하고 방출 스펙트럼인 440nm의 피크가 증가하는 것을 알 수 있다.

- [54] 또한 항원 농도에 따라 스펙트럼 검출결과를 확인하기 위해 동일한 방법으로 항원의 농도를 1~1000 ng/ml로 달리하여 실험을 진행하였다. 도 7은 본 발명에 따른 항원 검출방법에 따라 항원농도에 따른 스펙트럼 측정 결과를 나타낸 그래프이다. (a)는 전체 파장영역에서의 스펙트럼을 분석한 그래프이다. (b)는 330nm 부근 영역, (c)는 440nm 부근 영역에서의 스펙트럼을 분석한 그래프이다. 도 7에 도시한 바와 같이 OTA의 농도가 증가할수록 330nm 부근의 방출 스펙트럼이 감소하고 항체에 의해 생성되는 330nm의 빛이 다시 항원에 의해 흡수되는 것을 알 수 있다. 또한 OTA의 농도가 증가할수록 440nm 부근의 방출 스펙트럼이 증가하는 것을 알 수 있다.

- [55] 또한, 항원의 양을 정량적으로 확인할 수 있도록 OTA 농도에 따른 330nm에서의 형광강도와 440nm에서의 형광강도를 도 8에 나타내었다. 도 8에 도시한 바와 같이, (a)에서는 330nm에서 형광강도는 항원의 농도가 증가함에 따라 그 양이 감소하여 정량적으로 측정하기 어려운 것을 알 수 있다. 그러나 (b)에 도시한 바와 같이 440nm에서의 형광강도는 항원의 농도가 증가함에 따라 그

강도가 증가하는 것을 알 수 있으며, 도 9에 도시된 바와 같이, 330nm에서의 형광강도에 대한 440nm에서의 형광강도의 비로 이를 나타내면 보다 항원의 양에 따른 측정값의 민감도를 향상시켜 정량측정에 더욱 효과적이다.

- [56] 또한, 본 발명에서는 멤브레인 진단기를 사용하여 크로마토그래피 방식을 채택하고 있으므로 용액 방식의 형광 공명 에너지 전이현상을 이용한 방법에서는 측정하기 어려운 커피를 시료로 사용하여 OTA의 존부를 검출하였다. OTA를 커피액에 첨가하여 시료를 제조하였고 그 외에는 상기 실험과 동일한 방법으로 수행하였다. 도 10은 본 발명에 따른 항원검출 방법에 따라 OTA를 첨가한 커피시료의 스펙트럼 측정결과를 나타낸 그래프이다. 도10에 도시한 바와 같이, 진한 색을 띠는 커피 시료내에서도 OTA에 대한 형광강도의 변화를 확인할 수 있었다.

[57]

- [58] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예를 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다.

- [59] 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변경된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

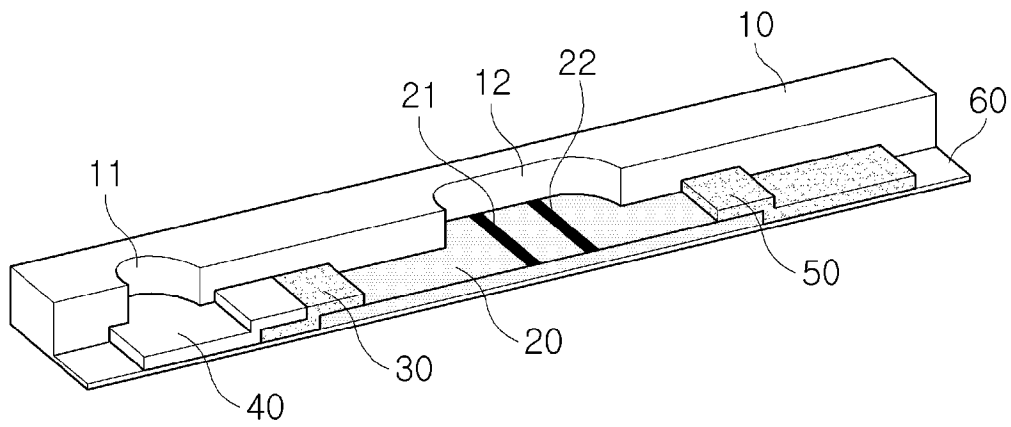
[60]

청구범위

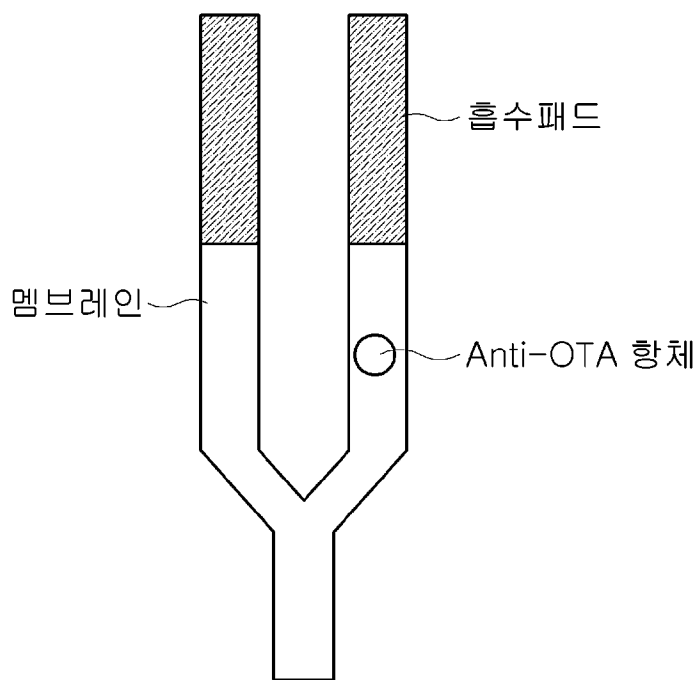
- [청구항 1] (a) 검출대상 항원에 대한 항체가 일단에 함유되어 있는 멤브레인으로 형성된 진단기의 타단에 검출대상이 되는 항원이 함유된 시료를 접촉시켜 상기 항체와 반응 시키는 과정;
(b) 상기 (a)과정에 의해 형성된 항원-항체 복합체에 광을 조사함으로써 형광 공명 에너지 전이를 야기하고, 이에 따른 스펙트럼을 얻는 과정; 및
(c) 상기 (b)과정에서 획득한 스펙트럼을 분석함으로써 검출 대상 항원의 존부를 판단하고 농도를 측정하는 과정을 포함하는 항원 검출방법.
- [청구항 2] 청구항1에 있어서,
상기 진단기는 상기 시료를 접촉하여 상기 시료를 주입할 수 있는 시료접촉부와 상기 항체가 함유되어 있는 테스트 라인과 시료의 투입여부를 확인하는 콘트롤 라인을 포함하는 반응 멤브레인과 상기 반응멤브레인의 다운 스트림에 접촉하여 형성되어 상기 접촉된 시료를 흡수하는 흡수패드를 포함하는 항원 검출방법.
- [청구항 3] 청구항1에 있어서,
상기 반응멤브레인은 하나의 시료접촉부에서 분리되어 두 개 이상의 가지로 분기되어 형성되는 것을 특징으로 하는 항원 검출방법.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 항원은 300 ~ 400nm 에서 흡수 파장을 갖는 곰팡이 독소, 바이오마커 또는 다환 방향족 탄소인 것을 특징으로 하는 항원 검출방법.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서,
상기 곰팡이 독소는 아플라톡신(Aflatoxin), 오크라톡신 A(Ochratoxin, OTA) 또는 제랄레논 인 것을 특징으로 하는 항원 검출방법.
- [청구항 6] 청구항 4에 있어서,
상기 바이오마커는 네옵테린 (neopterin), 바이옵테린 (biopterin), 니코틴아미드아데닌디뉴클레오티드 (NADH) 또는 니코틴아미드아데닌디뉴클레오티드 인산 (NADPH)인 것을 특징으로 하는 항원 검출 방법.
- [청구항 7] 청구항 4에 있어서,
상기 다환 방향족 탄소는 벤조피렌, 디벤조안트라센, 피렌 또는 벤조플루오렌 인 것을 특징으로 하는 항원검출방법.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서,
상기 (a) 과정은 항원-항체 반응 후에 진단기를 건조시키는 과정을 더 포함하는 항원 검출방법.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서,
상기 (a) 과정은 항원-항체 반응 후에 버퍼용액을 접촉시켜 워싱하는 과정을 더 포함하는 항원 검출방법.

- [청구항 10] 청구항 1에 있어서,
상기 형광 스펙트럼 분석은 상기 항원의 형광 스펙트럼 중 최대 형광 세기를 나타내는 파장에서의 형광세기와 상기 항체의 형광 스펙트럼 중 최대 형광 세기를 비교분석함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 항원 검출 방법.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서,
상기 형광 스펙트럼 분석은 상기 항체의 형광 스펙트럼 중 최대 형광 세기를 나타내는 파장에서의 형광세기($I_{\text{항체}}$)에 대한 상기 항원의 형광 스펙트럼 중 최대 형광 세기를 나타내는 파장에서의 형광세기($I_{\text{항원}}$)의 비율인 $I_{\text{항원}}/I_{\text{항체}}$ 를 계산하여 수행되는 것을 특징으로 하는 항원 검출방법.

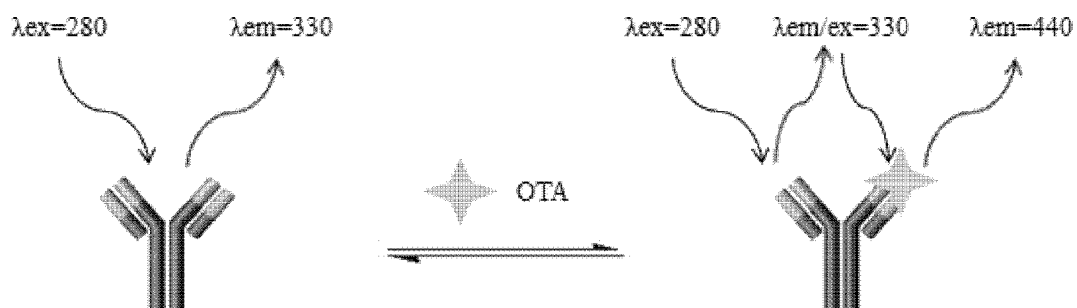
[도1]



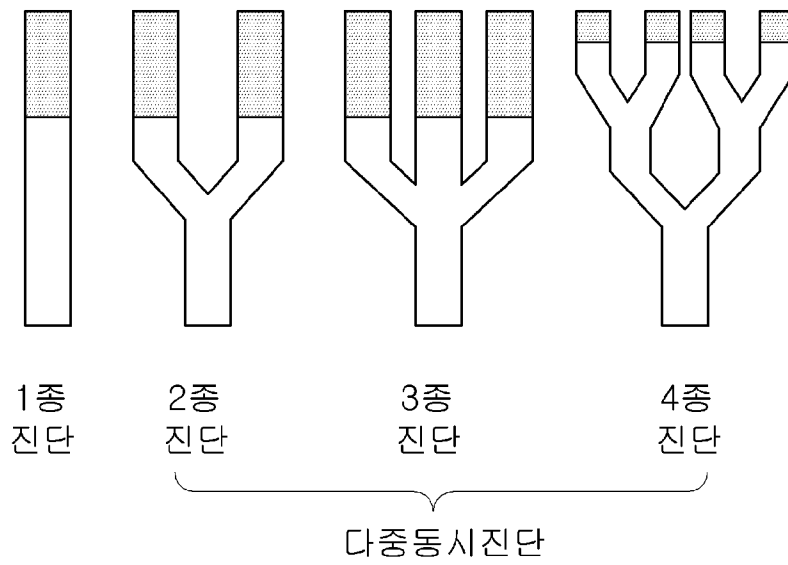
[도2]



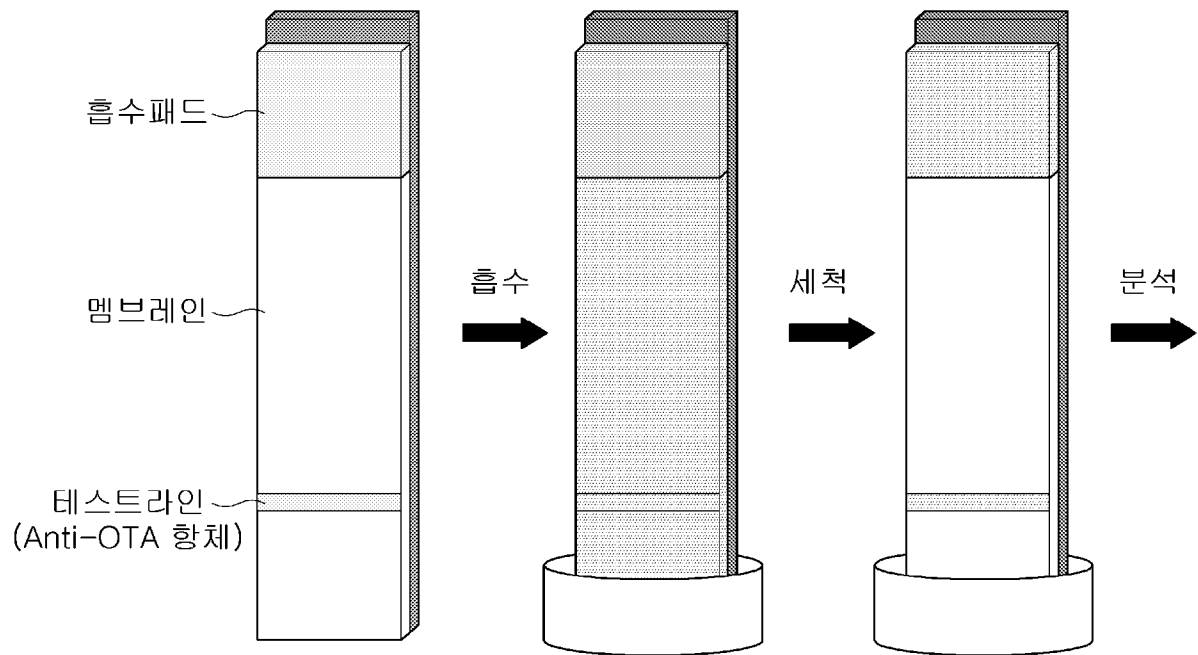
[도3]



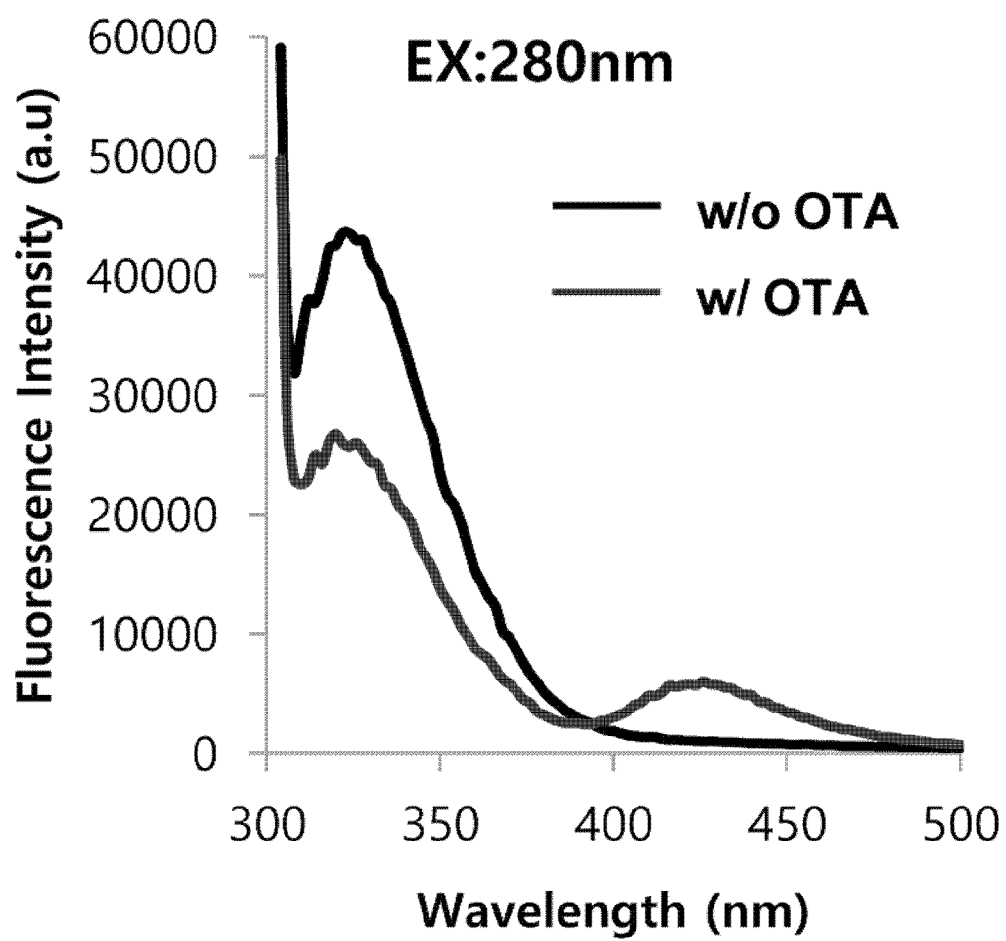
[도4]



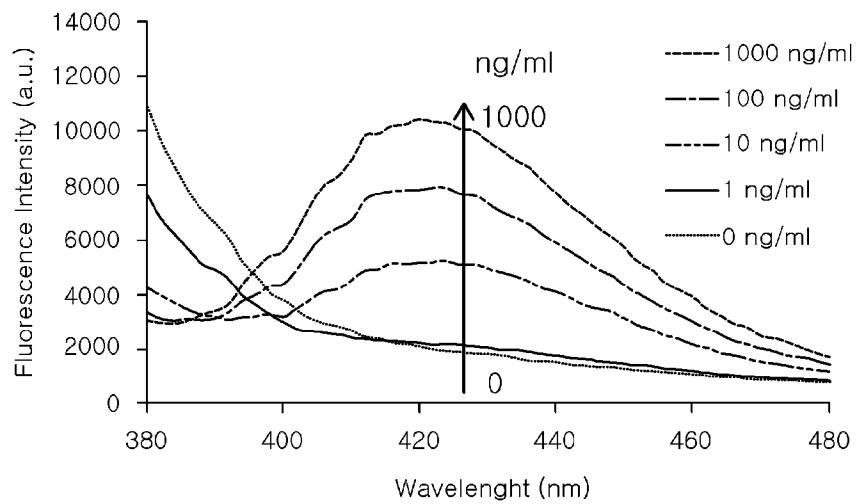
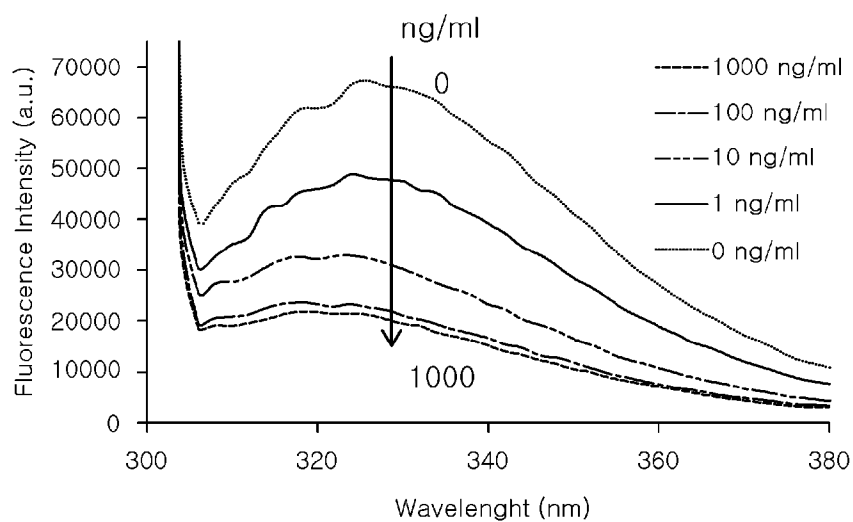
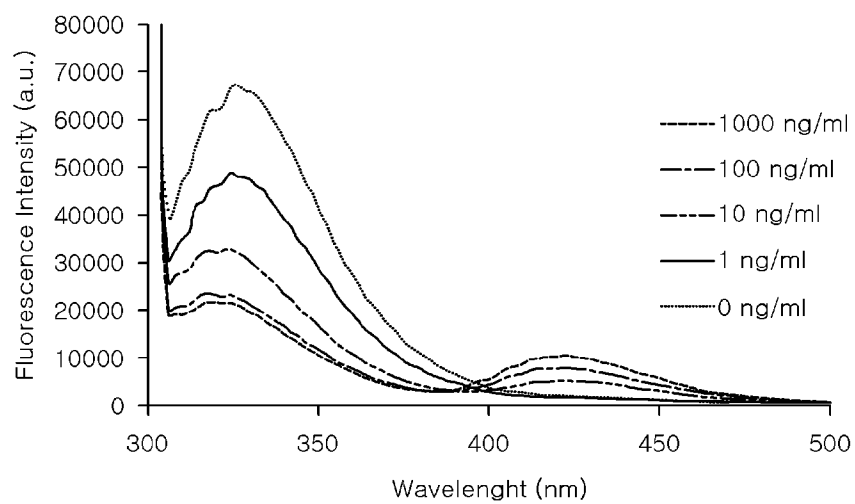
[도5]



[도6]

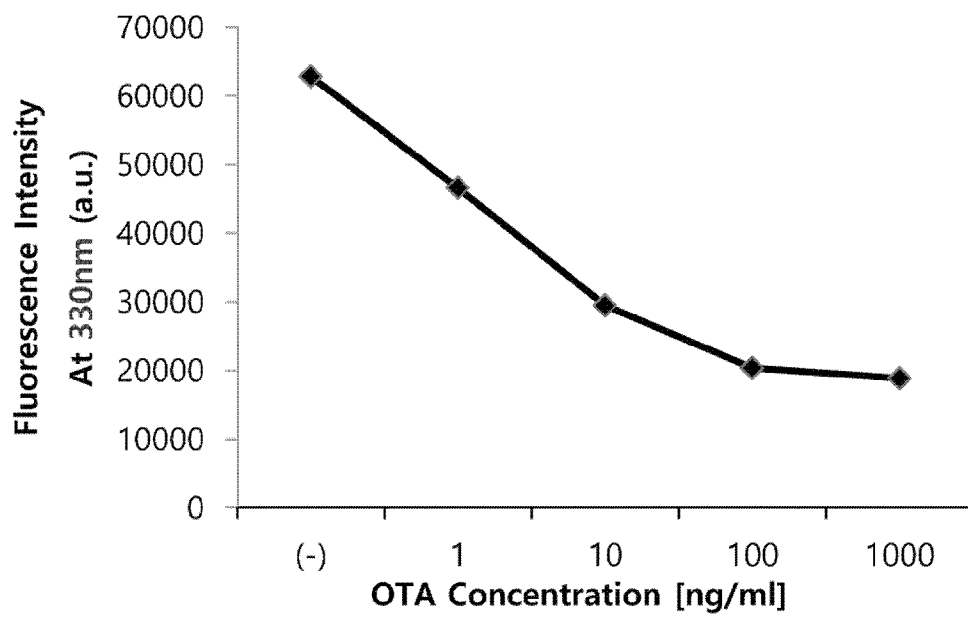


[도7]

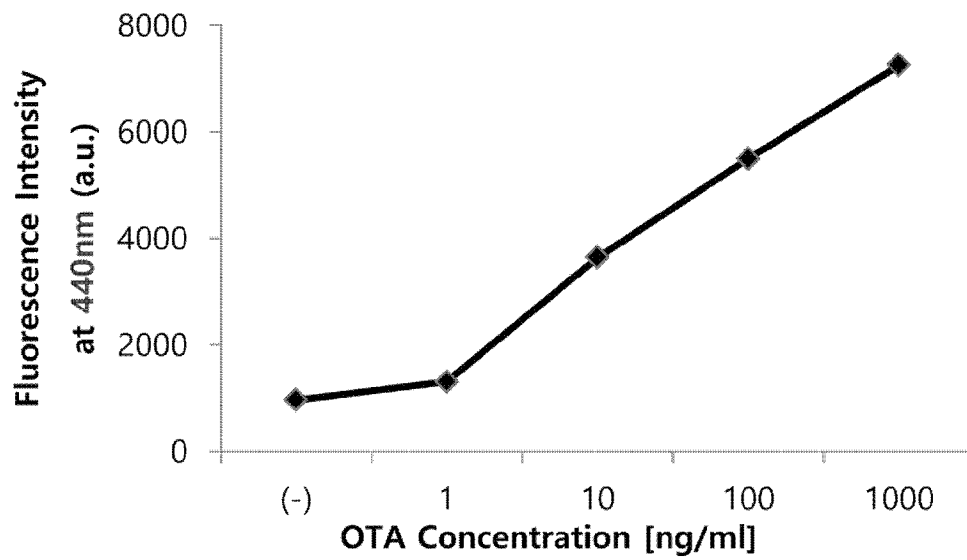


[도8]

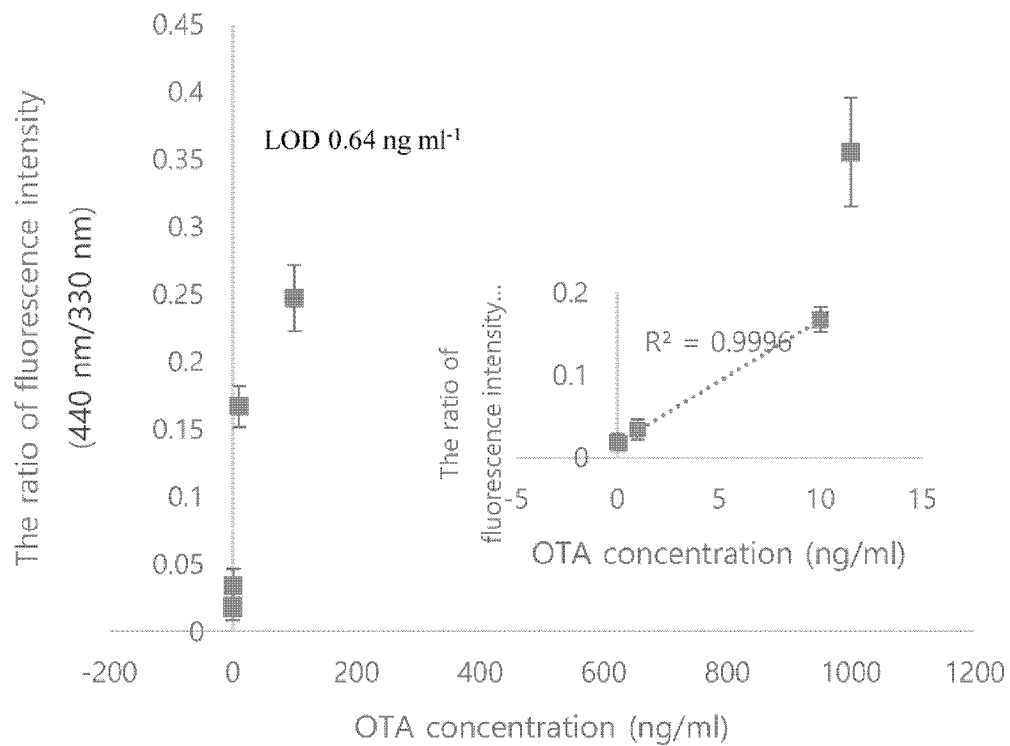
(a)



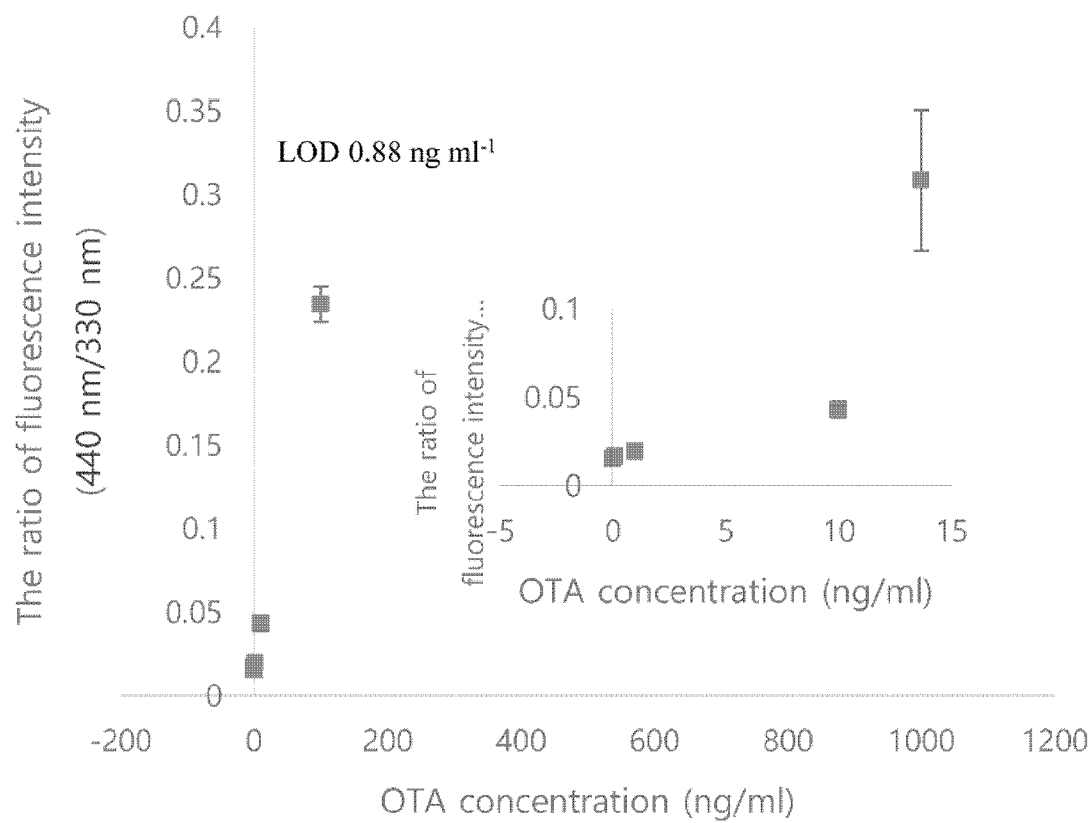
(b)



[도9]



[도10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/005148**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/558(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 21/64(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)

G01N 33/53; G01N 21/78; G01N 33/542; G01N 33/533; G01N 33/535; G01N 33/543; G01N 33/558; G01N 33/68; G01N 21/64

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) & Keywords: antibody, antigen, membrane, spectrum, analysis strip, fluorescent resonance energy transition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2014-0058305 A (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 14 May 2014 See claims 1-5 and 8-9.	1-11
Y	JP 2007-064766 A (JAPAN ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE & TECHNOLOGY HOKURIKU et al.) 15 March 2007 See claim 1; paragraphs [0018]-[0020], [0027]-[0028], [0037]-[0038] and [0043]; figures 1 and 3-4.	1-11
Y	JP 2013-120120 A (KONICA MINOLTA MEDICAL & GRAPHIC INC.) 17 June 2013 See claims 1-2; paragraphs [0024]-[0025], [0031]-[0032] and [0037]; figure 1.	1-11
A	KR 10-2013-0037648 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY et al.) 16 April 2013 See claims 1-12; figure 2.	1-11
A	LI, Taihua et al., "Label-free Homogeneous FRET Immunoassay for the Detection of Mycotoxins that Utilizes Quenching of the Intrinsic Fluorescence of Antibodies", Biosensors and Bioelectronics, (Electronic publishing) 02 November 2012, vol. 42, pages 403-408 See the entire document.	1-11



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

30 AUGUST 2017 (30.08.2017)

Date of mailing of the international search report

30 AUGUST 2017 (30.08.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/005148

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0058305 A	14/05/2014	KR 10-1547463 B1 KR 10-2014-0141560 A US 2014-0127827 A1	26/08/2015 10/12/2014 08/05/2014
JP 2007-064766 A	15/03/2007	JP 4179419 B2	12/11/2008
JP 2013-120120 A	17/06/2013	NONE	
KR 10-2013-0037648 A	16/04/2013	CN 103890583 A CN 103890583 B KR 10-1471932 B1 US 2014-0287439 A1 WO 2013-051890 A2 WO 2013-051890 A3	25/06/2014 16/03/2016 11/12/2014 25/09/2014 11/04/2013 04/07/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/558(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 21/64(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/53; G01N 21/78; G01N 33/542; G01N 33/533; G01N 33/535; G01N 33/543; G01N 33/558; G01N 33/68; G01N 21/64

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) & 키워드: 항체, 항원, 멤브레인, 스펙트럼, 분석 스트립, 형광 공명 에너지 전이

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2014-0058305 A (광주과학기술원) 2014.05.14 청구항 1-5 및 8-9 참조.	1-11
Y	JP 2007-064766 A (JAPAN ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE & TECHNOLOGY HOKURIKU 등) 2007.03.15 청구항 1; 단락 [0018]-[0020], [0027]-[0028], [0037]-[0038] 및 [0043]; 도면 1 및 3-4 참조.	1-11
Y	JP 2013-120120 A (KONICA MINOLTA MEDICAL & GRAPHIC INC.) 2013.06.17 청구항 1-2; 단락 [0024]-[0025], [0031]-[0032] 및 [0037]; 도면 1 참조.	1-11
A	KR 10-2013-0037648 A (한국생명공학연구원 등) 2013.04.16 청구항 1-12; 도면 2 참조.	1-11
A	LI, TAIHUA 등, 'Label-free homogeneous FRET immunoassay for the detection of mycotoxins that utilizes quenching of the intrinsic fluorescence of antibodies', Biosensors and Bioelectronics, (전자공개)2012.11.02, 제42권, 403-408 페이지 전체 문헌 참조.	1-11

☐ 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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 08월 30일 (30.08.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 08월 30일 (30.08.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



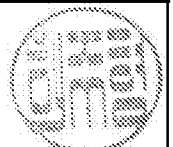
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0058305 A	2014/05/14	KR 10-1547463 B1 KR 10-2014-0141560 A US 2014-0127827 A1	2015/08/26 2014/12/10 2014/05/08
JP 2007-064766 A	2007/03/15	JP 4179419 B2	2008/11/12
JP 2013-120120 A	2013/06/17	없음	
KR 10-2013-0037648 A	2013/04/16	CN 103890583 A CN 103890583 B KR 10-1471932 B1 US 2014-0287439 A1 WO 2013-051890 A2 WO 2013-051890 A3	2014/06/25 2016/03/16 2014/12/11 2014/09/25 2013/04/11 2013/07/04