



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월18일
(11) 등록번호 10-1164048
(24) 등록일자 2012년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/32 (2006.01) C12Q 1/26 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2004-7018213
(22) 출원일자(국제) 2003년05월16일
심사청구일자 2008년03월05일
(85) 번역문제출일자 2004년11월11일
(65) 공개번호 10-2004-0106531
(43) 공개일자 2004년12월17일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2003/005178
(87) 국제공개번호 WO 2003/097864
국제공개일자 2003년11월27일
(30) 우선권주장
10221845.5 2002년05월16일 독일(DE)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
US05447847 A1*
US04820399 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌자체스트라쎄 124
(72) 발명자
호른카리나
독일 64665 알스바흐-헨라인 알테 베르크슈트라쎄 91
히네스요아힘
독일 64673 츠빙겐베르크 로다우어 슈트라쎄 50
아
크나페볼프강-라인홀트
독일 67071 루트비히스하펜 크리스토프-크뢰베라
트-슈트라쎄 116
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 18 항

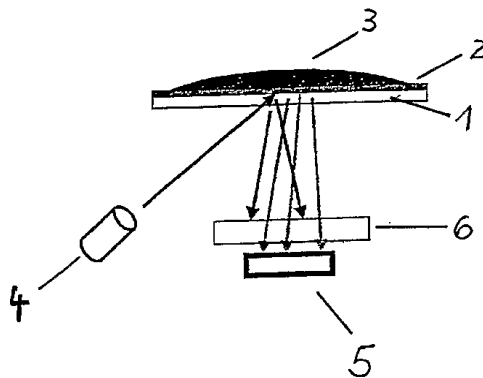
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 비-재생성 효소-보조효소 복합체를 포함하는 방법 및 시약시스템

(57) 요약

본 발명은, 시료 내 존재하는 분석대상물질에 대한 화학양론적 반응 상대로서 효소-보조효소 복합체의 사용을 포함하는, 효소 반응을 이용하여 시료 내 분석대상물질을 검출하기 위한 방법 및 시약 시스템에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(30) 우선권주장

10221840.4 2002년05월16일 독일(DE)

10221846.3 2002년05월16일 독일(DE)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 보조효소와 반응할 수 있는 매개자의 부재 하에서 반응이 수행되는 것을 특징으로 하는 효소 반응에 의한 시료 내 분석대상물질의 검출 방법:

(a) 보조효소의 재생이 일어나지 않도록, 효소-보조효소 복합체가 시료 내 존재하는 분석대상물질에 대하여 적어도 화학양론적인 양으로 사용되고, 데하이드로게나아제가 효소로서 사용되는 효소-보조효소 복합체를 함유하는 검출 시약과 시료를 접촉시키는 단계, 및

(b) 효소-보조효소 복합체의 변화를 통해 분석대상물질의 반응을 검출하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 데하이드로게나아제가 글루코스 데하이드로게나아제 (E.C.1.1.1.47), 락테이트 데하이드로게나아제 (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), 말레이트 데하이드로게나아제 (E.C.1.1.1.37), 글리세롤 데하이드로게나아제 (E.C.1.1.1.6), 알코올 데하이드로게나아제 (E.C.1.1.1.1) 또는 L-아미노산 데하이드로게나아제 (E.C.1.4.1.5)와 같은 아미노산 데하이드로게나아제에서 선택된 데하이드로게나아제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 플라빈, 니코틴 및 퀴논 유도체에서 선택된 보조효소가 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

청구항 4은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제 3 항에 있어서, 보조효소가 FAD, FADH₂, FMN, FMNH₂, 보조효소 Q, PQQ, NAD⁺, NADH/H⁺, NADP⁺ 및 NADPH/H⁺에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 보조효소의 변화가 광학적 방법에 의해 검출되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

청구항 6은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제 5 항에 있어서, 보조효소의 변화가 흡광, 형광, CD (원편광이색성), ORD (광학적 회전 분산) 또는 굴절률의 측정에 의해 검출되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 보조효소의 변화가 형광 측정에 의해 검출되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효소-보조효소 복합체가 내부에 포매된 젤 매트릭스가 검출 시약으로서 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 젤 매트릭스의 층 두께가 ≤50 μm 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 광증합가능한 물질을 기재로 한 젤 매트릭스가 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 체액 중 분석대상물질이 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 혈중 글루코스의 측정이 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 분석대상물질의 반응 시간이 ≤ 5 초 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효소-보조효소 복합체가 분석대상물질에 대해 화학양론적 반응물로서 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

하기 (a) 및 (b) 를 포함하는, 시료 내 분석대상물질의 검출을 위한 시약 시스템으로서,

(a) 시료를 수용하도록 구성된 지지체, 및

(b) 효소-보조효소 복합체를 포함하고, 효소-보조효소 복합체의 양이 시료 내에 존재하는 분석대상물질의 최대 농도에 대해 적어도 화학양론적인 양으로 제공되는 지지체 상에 제공되는 검출 시약으로서, 적어도 화학양론적인 양으로 제공된다는 것은, 분석대상물질과 반응하는 효소-보조효소 복합체의 분자 수가 시료 내 존재하는 분석대상물질의 최대 농도와 비례하도록 조절되는 것을 의미하는 것인 검출시약,

상기 효소-보조효소 복합체가 분석 대상 물질과 반응에 참여할 수 있도록 선택되고 구성되며, 상기 검출 시약이 보조효소와 반응하는 것이 가능한 매개자를 포함하지 않는 것인 시약 시스템.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 효소-보조효소 복합체가 젤 매트릭스 내에 포매된 것을 특징으로 하는 시약 시스템.

청구항 18

제 16 항 또는 제 17 항에 있어서, 지지체가 적어도 부분적으로라도 광학적으로 투명한 것을 특징으로 하는 시약 시스템.

청구항 19

제 16 항 또는 제 17 항에 있어서, 지지체가 본질적으로 평면 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 시약 시스템.

청구항 20

제 16 항 또는 제 17 항에 있어서, 지지체가 복수의 상이한 검출 시약을 함유하는 것을 특징으로 하는 시약 시스템.

청구항 21

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 16 항에서 정의된 시약 시스템이 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

청구항 22은(는) 설정등록료 납부시 포기되었습니다.

제 9 항에 있어서, 젤 매트릭스의 층 두께가 $\leq 5 \mu\text{m}$ 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

삭제

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 효소 반응을 통해 시료 내 분석대상물질(analyte)을 검출하는 방법 및 시약 시스템으로서, 시료 내 존재하는 분석대상물질에 대한 비-재생성(non-regenerable), 특히 화학양론적 반응물로서 효소-보조효소 복합체의 사용을 포함하는 방법 및 시약 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 효소적 방법에 의한 분석대상물질, 예를 들면 혈중 글루코스의 검출은 공지되어 있다. 이들은, 측정될 분석대상물질을 적절한 효소 및 보조효소와 접촉시키고, 효소는 촉매적 양으로 사용하는 것을 포함한다. 보조효소의 환원 또는 산화 시 제조되는 산화환원 대등물(redox equivalent)은 매개자(mediator)로 이동되고, 이는 이어서 추가 단계에서 전기화학적으로 또는 측광적으로 검출된다. 보정(calibration)은 측정치와 측정될 분석대상물질의 농도 사이의 직접적인 연관성을 제공한다.

[0003] Sierra 등 (Anal. Chem. 69 (1997), 1471-1476)은 글루코스 옥시다아제의 고유 형광을 기초로 한 혈중 글루코스의 측정에 대해 기술하였다. 상기 방법에서도, 효소가 보조효소 FAD와 함께 촉매적 양으로 사용되며, 산화환원 대등물은 매개자인 산소로 이동된다.

[0004] Narayanaswamy 등 (Analytical Letters 21 (7) (1988), 1165-1175)은 글루코스 측정을 위한 글루코스 데하이드로게나아제 및 NAD의 형광 측정에 대해 기술한다. 이 경우, 효소는 촉매적, 즉 비-화학양론적 양으로 사용된다. 형광 측정은 용액 중 유리 NADH를 검출한다.

[0005] 선행기술의 검출 시스템에서 요구되는 전기화학적으로 활성인 물질(매개자)을 통해서는 측정될 분석대상물질을 간접적으로만, 즉 복수의 화학 반응을 통해서만 측정할 수 있다. 상기 목적에 있어서는, 반응 속도를 최적화하기 위해서 관련된 물질의 농도 조정이 종종 불가피하게 복잡해진다. 더욱이, 필요한 전기화학적 활성 물질이 장기간의 저장 하에서 불안정해지는 위험이 있다.

[0006] 매개자는 또한 종종 효소-보조효소 시스템에 비해 상당히 과량으로 사용되어야 한다. 보조효소는 반응성이 높아서, 예를 들어 매개자가 < 1 %의 적은 양이라도 분해되거나, 또는 예를 들어 포장재로부터 휘발된 물질 등의 외래 물질에 노출되면, 효소 활성이 급격히 감소한다. 이는 분석대상물질의 측정에 있어 오류 신호를 유발할 수 있다. 또다른 단점은, 분석대상물질에 대한 측정 시간이 보통 몇 초 대, 예를 들면 글루코스는 > 4 초 대이고, 필요한 시료 부피가 예를 들어 > 0.5 μ l 으로 크다는 것이다.

[0007] 본 발명이 기초로 하는 목적은 기술한 선행기술의 단점을 적어도 일부라도 피하는 것이었다. 특히, 매개자 또는/ 및 지시약의 부재 하에서도 신뢰성 있는 측정 결과를 나타내는, 분석대상물질의 효소적 검출을 위한 비-민감성의 신속한 방법을 제공하도록 의도되었다.

[0008] 상기 목적은, 효소-보조효소 복합체를 평소대로 촉매로서 사용하는 대신, 화학양론적 반응물로서 사용함으로써 달성된다. 분석대상물질의 검출은 단일 반응 단계만을 필요로 하며, 따라서 극히 빠르다. 더 이상 안정성이 낮고 간섭받기 쉬운 경향이 높은 복합 반응 혼합물의 사용에 수반되는 매개자 및 지시약을 사용할 필요가 없다.

발명의 상세한 설명

[0009] 따라서, 본 발명의 한 관점은, 하기 단계를 포함하는, 효소 반응에 의한 시료 내 분석대상물질의 검출 방법이다:

[0010] (a) 보조효소의 재생이 일어나지 않는, 효소-보조효소 복합체 함유 검출 시약과 시료를 접촉시키는 단계, 및

[0011] (b) 효소-보조효소 복합체 내 변화를 통해 분석대상물질의 반응을 검출하는 단계.

[0012] 본 발명의 또다른 관점은, 하기를 포함하는, 시료 내 분석물질의 검출을 위한 시약 시스템이다:

[0013] (a) 보조효소의 재생이 일어나지 않는, 효소-보조효소 복합체 함유 검출 시약, 및

- [0014] (b) 검출 시약을 수용하는 지지체.
- [0015] 본 발명은, 분석대상물질의 간단한 정성적 또는 정량적 측정을 바람직하게는 ≤ 5 초, 특히 바람직하게는 ≤ 1 초, 가장 바람직하게는 ≤ 0.1 초의 매우 짧은 반응 시간 내에 가능하게 한다. 반응은 측정 중에 보조효소의 재생이 일어나지 않는 조건 하에서 수행된다. 더욱이, 효소-보조효소 복합체 분자 하나는 분석대상물질의 단일 분자와만 반응할 수 있다. 따라서, 반응은 보조효소의 재생을 유발하는 매개자 또는 기타 물질의 부재 하에서 유리하게 수행된다.
- [0016] 검출 시약은 효소-보조효소 복합체를, 목적하는 시험 형식에 따라 분석대상물질의 정성적 또는/ 및 정량적 측정을 가능하게 하기에 충분한 양으로 함유한다. 특히, 분석대상물질의 정량적 측정에 있어서, 효소-보조효소 복합체는, 효소-보조효소 복합체의 반응 분자의 수가 시료 내 존재하는 분석대상물질의 농도와 비례하는 양으로 사용된다. 효소-보조효소 복합체는 특히 바람직하게는 시료 내 존재하는 분석대상물질에 대해 적어도 화학양론적인 양으로, 바람직하게는 분석대상물질에 대해 화학양론적 과량으로 사용된다. 이와 관련하여, "적어도 화학양론적인 양으로"란 표현은, 시료 내에서 예상되는 분석대상물질의 농도에 있어, 분석대상물질과 반응하는 효소-보조효소 복합체의 분자 수가 시료 내 존재하는 분석대상물질의 농도와 비례하도록, 시료의 크기가 효소-보조효소 복합체의 분자 수에 대해 조정되는 것을 의미한다. "화학양론적 양"은 바람직하게는, 효소-보조효소 복합체의 분자 수가 조사대상인 시료 내에서 예상되는 분석대상물질 분자의 최대치에 비례함을 의미한다.
- [0017] 상기 방법 및 검출 시스템은 매우 적은 양의 시료, 예를 들면 $\leq 1 \mu\text{l}$, 특히 $\leq 0.1 \mu\text{l}$ 의 시료 부피를 사용할 수 있게 한다. 시료는 또한 경우에 따라 검출 시약과 접촉시키기 전에 희석시킬 수 있다.
- [0018] 본 발명의 방법 및 검출 시스템은 임의의 분석대상물질, 예를 들면 혈액, 혈청, 혈장 또는 소변과 같은 체액 뿐만 아니라, 용출액 시료 또는 식품에서의 파라미터를 측정하기에 적합하다. 상기 방법은 또한, 예를 들면 큐벳(cuvette) 내에서 습식 시험으로서, 또는 적절한 시약 지지체 상에서 건식 시험으로서 수행할 수 있다.
- [0019] 측정할 수 있는 분석대상물질은 효소-보조효소 복합체와의 반응, 특히 산화환원 반응을 거칠 수 있는 임의의 생물학적 또는 화학적 물질로서, 예를 들면 글루코스, 락트산, 말산, 글리세롤, 알코올, 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 아스코르브산, 시스테인, 글루타티온, 펩타이드 등이다.
- [0020] 효소 반응은 바람직하게는, 효소-보조효소 복합체 내 보조효소가 환원되거나 산화되는 산화환원 반응이다. 상기 종류의 반응에 바람직하게 사용되는 효소는 옥시도리덕타아제이다. 특히 바람직하게 사용되는 효소는, 예를 들면 글루코스 데하이드로게나아제 (E.C.1.1.1.47), 락테이트 데하이드로게나아제 (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), 말레이트 데하이드로게나아제 (E.C.1.1.1.37), 글리세롤 데하이드로게나아제 (E.C.1.1.1.6), 알코올 데하이드로게나아제 (E.C.1.1.1.1) 또는 아미노산 데하이드로게나아제, 예를 들면 L-아미노산 데하이드로게나아제 (E.C.1.4.1.5)에서 선택된 데하이드로게나아제이다. 또다른 적당한 효소는, 예를 들면 글루코스 옥시다아제 (E.C.1.1.3.4.) 또는 콜레스테롤 옥시다아제 (E.C.1.1.3.6)와 같은 옥시다아제이다.
- [0021] 본 발명의 목적을 위한 보조효소는 바람직하게는 효소에 공유결합되거나 비-공유결합되고, 분석대상물질의 전환에 의해 변화, 예를 들면 산화되거나 환원되는 유기 분자이다. 보조효소의 바람직한 예는 플라빈, 니코틴 및 퀴논 유도체, 예를 들면 플라빈 뉴클레오타이드 유도체, 예컨대 FAD, FADH_2 , FMN, FMNH_2 등, 니코틴 뉴클레오타이드 유도체, 예컨대 NAD^+ , NADH/H^+ , NADP^+ , NADPH/H^+ 등, 또는 유비퀴논, 예컨대 보조효소 Q, PQQ 등이다.
- [0022] 분석대상물질과의 반응을 통한 보조효소의 변화는 원칙적으로 임의 방식으로 검출할 수 있다. 원칙적으로 이를 위해서는, 효소적 반응을 검출하기 위한 당업계에 공지된 모든 방법을 사용할 수 있다. 그러나, 보조효소의 변화는 바람직하게는 광학적 방법에 의해 검출한다. 광학적 검출 방법은, 예를 들면 흡광, 형광, 원편광이색성 (CD), 광학적 회전 분산 (ORD), 굴절률 등의 측정을 포함한다. 보조효소의 변화는 특히 바람직하게는 형광 측정에 의해 검출한다. 형광 측정은 매우 민감하며, 소형화된 시스템 내에서 저농도의 분석대상물질이라도 검출할 수 있게 한다.
- [0023] 본 발명의 방법 또는 검출 시스템은 액상 시험을 포함하며, 이 경우 시약은 예를 들어 수성 또는 비수성 액체 중의 용액 또는 현탁액의 형태로, 또는 분말 또는 동결건조물로서 존재한다. 그러나, 본 발명의 방법 및 검출 시스템은 바람직하게는 건식 시험을 포함하며, 이 경우 시약은 지지체에 도포된다. 지지체는 예를 들어

조사할 시료 액체로써 흡윤되는 흡수제 또는/및 팽윤성 물질을 포함하는 시험 스트립을 포함할 수 있다.

[0024] 특히 바람직한 한 구현예에서는, 사용되는 검출 시약이, 효소-보조효소 복합체가 포매된 젤 매트릭스이다. 젤 매트릭스는 바람직하게는 층 두께가 $\leq 50 \mu\text{m}$, 특히 $\leq 5 \mu\text{m}$ 이며, 지지체, 예를 들면 적어도 부분적으로라도 광학적으로 투명한 지지체에 도포된다. 젤 매트릭스는 공지된 건식 시험 시스템 (예를 들면, AccuChek Active)에서처럼 하나 이상의 가용성 중합체를 함유하는 매트릭스일 수 있고, 나이프(knife) 도포 및 건조에 의해 제조할 수 있다. 매트릭스는 바람직하게는, 예를 들면 아크릴계 단량체, 예컨대 아크릴아미드 또는/및 폴리에틸렌 글리콜 디아크릴레이트와 같은 아크릴계 에스테르, 또는 비닐방향족 단량체, 예컨대 4-비닐벤젠설폰산, 또는 이들의 조합과 같은 광중합가능한 물질을 기재로 한 구조를 갖는 중합체이다. 상기 종류의 젤 매트릭스는, 효소, 광중합가능한 단량체 및 경우에 따라 보조효소, 광개시제 또는/및 미반응 성분을 함유하는 시약을 함유하는 액체를, 적어도 부분적으로라도 광학적으로 투명한 지지체, 예를 들면 플라스틱 시이트에 도포하고, 예를 들면 반대면으로부터 UV광을 조사(irradiation)하여, 단량체 또는 단량체들의 중합이 지지체 상에서 소정의 층 두께까지 일어나도록 함으로서 제조할 수 있다. 층 두께는, 흡수성 물질을 시약에 첨가함으로써, 또는/및 조사 시간 또는 강도를 통해 조절할 수 있다. 과량의 액체 시약은 중합 후에 제거하고 재사용할 수 있다 (예를 들면, 도 2를 참조).

[0025] 반면, 젤 매트릭스는 또한 통상의 코팅 절차에 의해 제조될 수 있는데, 이 경우 액상 시약을 지지체에 도포하고, 적합한 방법을 사용하여, 예를 들어 나이프를 사용하여 목적하는 두께로 한 후, 완전히 중합시킨다.

[0026] 중합 또는 젤 매트릭스 내에 포매시킴으로써 포집시킨 후에는, 효소는 보호된 미세환경 내에 있다. 중합체 성 젤 매트릭스가 충분히 가교되면, 효소 분자는 고정된 형태로 존재한다. 그러나, 저분자량 물질 또는 글루코스 또는 기타 분석대상물질 또는 다르게는 보조효소는 중합체 네트워크를 통해 자유롭게 확산될 수 있다.

[0027] 효소는 매트릭스 내 중합에 의해 보조효소와 함께 포함될 수 있거나, 중합 후에 매트릭스가 보조효소의 용액과 접촉하여, 적절한 효소-보조효소 복합체가 형성된다. 젤 매트릭스 내 효소의 농도는 바람직하게는 측정될 분석대상물질과의 화학양론적 반응에 충분히 높도록, 그리고 반응에 의해 변화되는 보조효소의 직접적인 측정이 가능하도록 선택할 수 있다. 반응은 밀리초 또는 마이크로초 대에서 일어날 수 있는 단일 촉매 반응, 예를 들면 산화환원 반응으로만 이루어진다. 반응에 의해 변화하는 보조효소는 효소의 활성 중심에 결합됨으로써, 그리고 경우에 따라 추가적으로 젤 매트릭스 내에 포매됨으로써 간접적인 영향으로부터 최적으로 보호된다.

실시예

[0034] 실시예 1: 큐벳 내 글루코스 데하이드로게나아제 (GlucDH)/ NAD^+ 시스템에서의 글루코스의 화학양론적 검출

[0035] 100 mg/ml의 GlucDH를 pH 7의 완충액에 용해시키고, 적절한 양의 NAD^+ 와 혼합한다. 증가하는 양의 글루코스를 첨가하면, 형광의 증가를 UV 램프 (여기 파장 366 nm) 하에서 육안으로 검출할 수 있다 (도 5A 및 5B).

[0036] 효소 시스템을 갖는 용액은 글루코스 없이 형광을 발광하지 않는다. 또한 글루코스 및 NAD^+ 도 형광을 발광하지 않는다.

[0037] 실시예 2: 중합체 필름 내 GlucDH/ NAD^+ 시스템에서의 글루코스 검출

[0038] 하기 물질의 현탁액을 플라스틱 시험관 내에서 혼합하였다.

[0039] 제형 1

물질	양 [g]	중량 [%]
아크릴아미드	2.5	22.02
메틸렌비스아크릴아미드	0.7	6.17
2,2-디메톡시-2-페닐아세토페논	0.05	0.44
글리세롤	5	44.05
히드록시에틸 메타크릴레이트	1.4	12.33
메틸 메타크릴레이트	0.4	3.52
크로다시닉 0 용액, pH 8, 0.3 g/1000 ml	1	8.81
N,N'-(1,2-디히드록시에틸렌)비스아크릴아미드	0.3	2.64
합계	11.35	100

[0041] 상기 현탁액 0.5 ml를 GlucDH의 용액 (100 mg/ml) 0.5 ml와 혼합하고, 혼합물을 초음파 배쓰 내에서 기포가 없도록 균질화하였다.

[0042] 맑은 용액을 125 mm 두께의 코로나-처리된 폴리카보네이트 시이트 상에 붓고, 통상적 발광 장치 (Isel UV 발광 장치 2)로써 20 분간 조사하였다. 상기 시이트를 물로써 간략하게 세척한 후, 공기 중에서 건조하였다.

[0043] 수득한 층 두께는 < 2 μm 이었다. 새로 제조한 글루코스/NAD⁺ 용액 (GKL-3 용액, 300 mg/dl 글루코스, 1 ml /6.4 mg의 NAD⁺)을 필름 상에 점적하였다. UV 램프 하에서 강한 형광을 즉시 볼 수 있었다.

[0044] 실시예 3: 층 두께에 영향을 미치기 위해 UV 흡수제를 첨가

[0045] 보다 나은 식별을 위해 청색 염료 (최대 흡수광 ~ 650 nm)를 함유하는 중합체 층을 제조하였다 (제형 2). 추가 실험에서, 초기 제형에 UV 흡수제로서 황색 염료를 혼합하였다 (제형 3).

[0046] 제형 2

물질	양	중량 [%]
아크릴아미드	37.5 g (0.53 몰)	25.78
폴리에틸렌 글리콜 디아크릴레이트, Mw ≈ 575 g/몰	52.5 g (약 0.96 몰)	36.10
크로다시닉 0 용액 (0.3 g/1 l)	50 g	34.38
4-비닐벤젠설포산	5 g	3.44
2,2-디메톡시-2-페닐아세트페논 광개시제	350 mg	0.24
뉴 메틸렌 블루 N	100 mg	0.06
합계	145.45 g	100

[0048] 혼합물을 교반에 의해, 그리고 초음파 배쓰 처리에 의해 균질화하고, 피펫으로 140 μm Pokalon 시이트 (코로나-처리, 단계 4) 상에 분포시키고, UV 발광 장치 (Actina U4, W. Lemmen GmbH)로써 1 분간 조사하였다.

[0049] 수득한 층 두께를 스크루 게이지로써 측정한 결과, 240.5 μm 이었다.

[0050] 제형 3

물질	양	중량 [%]
제형 2	1 ml	약 99.99
모르단트 옐로우 7 (686 번) (UV 흡수제)	0.0001 g	0.001
합계	약 1.0001 g	100

[0052] 혼합물을 시이트 상에 분포시킨 후, 상술한 바와 같이 중합하였다. 수득한 층 두께를 스크루 게이지로써 측정한 결과, 79.3 μm 이었다.

[0053] 상기 실험은, 층 두께에 영향을 미칠 수 있다는 것을 나타낸다. 나머지는 모두 동일한 반응 조건 하에서, UV 흡수제가 없는 층 두께는 240.5 μm이었고 (상기 참조); UV 흡수제 (모르단트 옐로우 7)가 있는 층 두께는 겨우 79.3 μm이었다.

도면의 간단한 설명

[0028] 본 발명을 하기의 도면 및 실시예로써 추가 설명한다.

[0029] 도 1 은 본 발명의 검출 시스템의 제 1 구현예를 나타낸다. 시약 층 (2), 예를 들면 효소-보조효소 복합체를 갖는 젤 매트릭스를 광학적으로 투명한 지지체 (1)에 도포한다. 효소-보조효소 복합체는, 분석대상물질의 측정 중에 보조효소의 재생이 일어날 수 없도록 하는 형태를 갖는다. 시료 (3), 예를 들면 혈액을 시약 층에 놓는다. 시료 (3)에 함유된 분석대상물질과, 시약 층 (2)에 함유된 효소-보조효소 복합체 사이의 효소적 반응의 측정을 광학적 방법으로 실시한다. 광원 (4), 예를 들어 레이저 또는 LED로부터의 빛을 후면으로

부터 (지지체를 통해) 시약 층 (2)으로 비춘다. 시료의 후면으로부터 비춘 흡광 또는 형광을 검출기 (5)로 검출한다. 경우에 따라, 특히 형광 검출에 있어서, 광학 필터 소자 (6)를 검출기 전면에 놓아, 형광 여기광 (fluorescence-exciting light)이 새어나감을 차단한다.

[0030] 도 2 는 본 발명의 검출 시스템의 제조를 나타낸다. 액상 시약 (12)을, 예를 들면 광학적으로 투명한 지지체 (11), 예를 들어 플라스틱 시이트의 제 1 위치 (13)에 도포한다. 액상 시약 (12)을 광원 (14)으로부터의 빛으로써 아래에서부터 지지체 (11)를 통해 제 2 위치에서 조사한다. 동시에, 지지체를 화살표로 표시된 방향 (15)으로 이동시킨다. 중합된 시약 층 (16)을 지지체 (11) 상에 직접 형성시킨다. 과량의 액상 시약이 중합체 층 (16) 위에 존재한다. 중합된 시약 층 (16)의 두께는 시약 조성, 빛을 비추는 시간 및 강도, 및 지지체 (11)의 물성을 통해 조절될 수 있다.

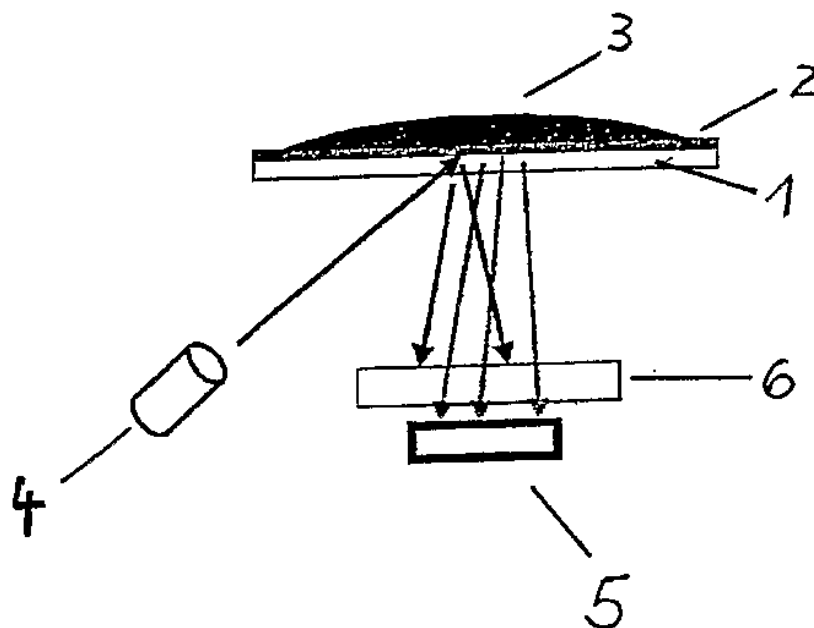
[0031] 도 3 은 아래로부터의 형광-기재 센서의 구현예를 나타낸다. 중합된 시약 층, 예를 들면 도 2의 연속적 공정에 의해 제조된 것을 절단하고, 공지 기술을 사용하여 센서 (21) 내로 도입할 수 있다. 시료를 상부측에 도포한 후, 여기광(exciting light) (23), 예를 들면 UV광을 아래의 광원으로부터 비춘다. 시약 층 (22) 내에서 분석대상물질과 효소-보조효소 복합체와의 반응을 통해 생성된 형광 (24), 예를 들면 청색광을 검출기로 검출한다.

[0032] 지지체에 복수의 (동일하거나 상이한) 시약을 적용하는 것 또한 가능하다. 디스크 형태의 상기와 같은 구현예의 한 예가 도 4 에 나타나 있다. 복수의 시약점 (reagent spot) (32)이 광학적으로 투명한 지지체 (31) 상에 위치해 있다.

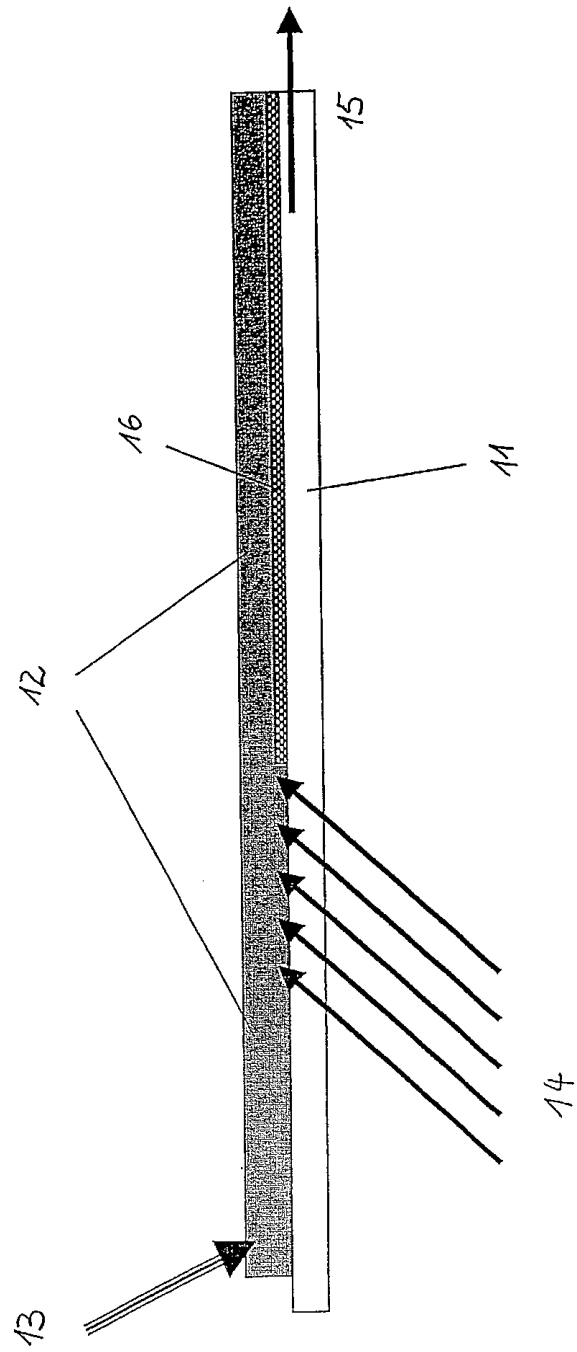
[0033] 도 5A 및 5B 는, CCD 카메라 하에서 글루코스 농도의 증가에 따른 본 발명의 검출 시스템 (글루코스 데하이드로게나아제 및 NAD^+)의 형광을 나타낸다.

도면

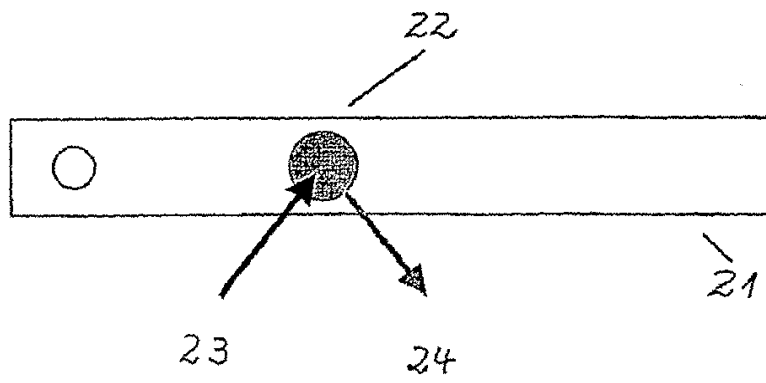
도면1



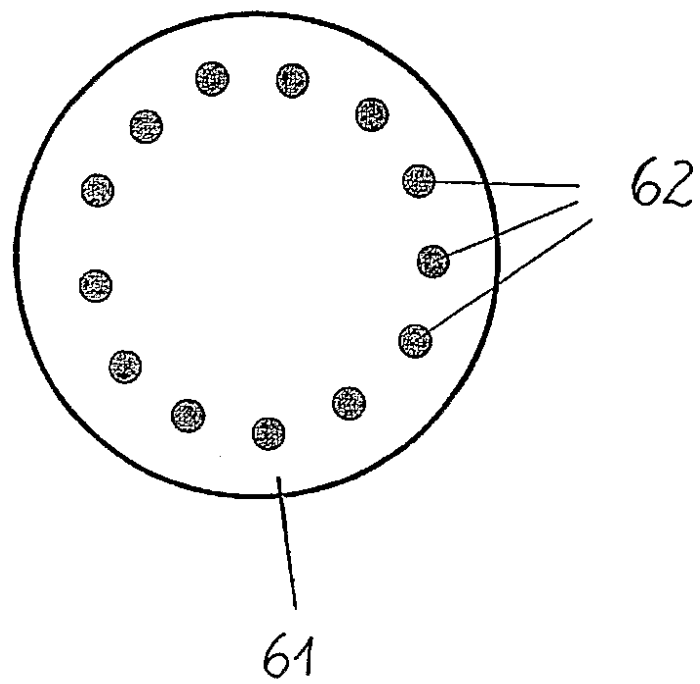
도면2



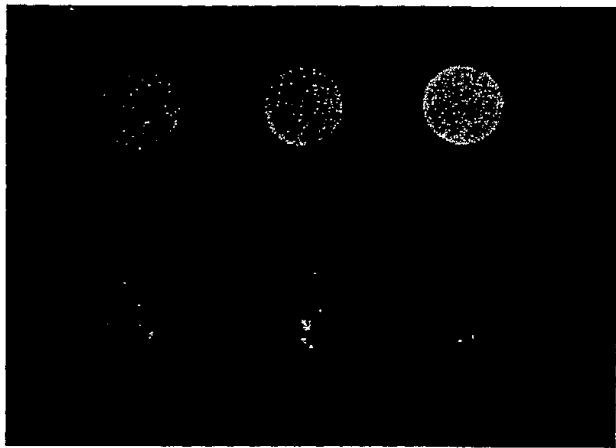
도면3



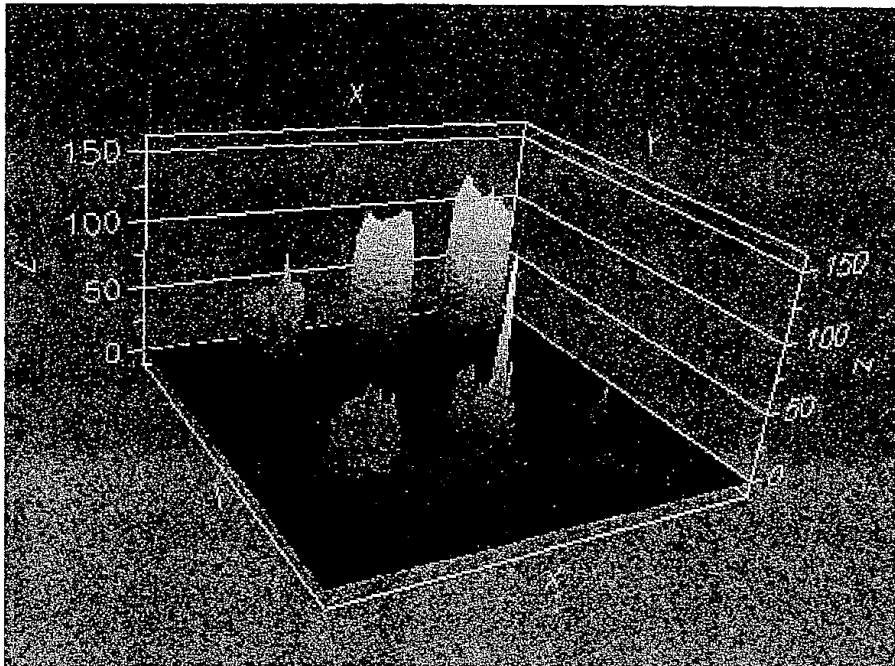
도면4



도면5



A



B