



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(45) 공고일자

2007년07월09일

(11) 등록번호

10-0737246

(24) 등록일자

2007년07월03일

(21) 출원번호 10-2005-0101722

(65) 공개번호

10-2007-0045439

(22) 출원일자 2005년10월27일

(43) 공개일자

2007년05월02일

심사청구일자 2005년10월27일

(73) 특허권자

한국해양연구원

경기 안산시 상록구 사동 1270번지

신라대학교 산학협력단

부산 사상구 패법동 산 1-1 신라대학교내

(72) 발명자

이택건

경기 안성시 아양동 아양주공아파트 106-105

염승식

경남 거제시 신현읍 양정리 1084번지 고려 4차 아파트 504-1303

우선옥

경남 거제시 신현읍 양정리 1084번지 고려 4차 아파트 504-1303

김동균

경남 진주시 망경동 한보아파트 102-1504

황현식

경기 수원시 장안구 율전동 삼성아파트 207-1605

이석찬

경기 수원시 권선구 구운동 삼환아파트 5-801

최인순

부산 해운대구 좌동 1414번지 건영1차 307동 902호

(74) 대리인

조현동

진천웅

(56) 선행기술조사문헌

The Analyst, vol.127, pp.93-97.(2002.)

심사관 : 김정태

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 항-비스페놀 항혈청을 포함하는 비스페놀 검출용바이오센서 및 비스페놀 검출방법

(57) 요약

본 발명은 내분비계장애물질 중의 하나인 비스페놀(bisphenol-A, BPA)을 검출하기 위한 항-비스페놀 항혈청(anti-BPA antiserum)을 포함하는 비스페놀 검출용 바이오센서 및 비스페놀 검출방법에 관한 것으로, 비스페놀과 단백질의 결합체로 면역반응시킨 마우스로부터 분리된 항-비스페놀 항혈청을 포함하는 비스페놀 검출용 바이오센서 및 비스페놀과 단백질의 결합체를 제조하는 단계; 상기 결합체를 마우스에 주사하여 면역반응시켜 항-비스페놀 항혈청을 제조하는 단계; 그리고 상기 항-비스페놀 항혈청과 비스페놀이 포함된 해양유기오염물질을 항원 항체 반응시키는 단계를 포함하는 비스페놀 검출 방법에 의하는 경우, 고가의 장비를 필요로 하는 해양유기오염물질의 화학적인 분석에 있어서 비스페놀과 같은 내분비계장애물질이 포함되어 있는지 여부를 정확하고 간단하게 확인할 수 있는 효과가 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

삭제

청구항 3.

전달 단백질(carrier protein)로 사용될 양이온화된 보바인 혈청알부민(cationized bovine serum albumin; cBSA)이나 오브알부민(ovalbumin; OVA)을 10 mg/ml의 농도가 되도록 증류수에 녹이고, 비스페놀은 결합 완충액(conjugation buffer)에 0.5 mg/ml의 농도가 되도록 준비하며, 상기 비스페놀 500 μ l과 상기 전달 단백질 200 μ l을 혼합한 후, 50 μ l의 커플링 용액을 첨가하여 실온에서 2 시간 동안 결합 반응을 수행한 다음, 그 농도가 1 μ g/ml이 되도록 맞추어서 비스페놀과 단백질의 결합체를 제조하는 단계;

상기 결합체를 마우스에 주사하여 면역반응시킨 후, 혈액을 채취한 다음, 상기 혈액을 원심분리하여 항-비스페놀 항혈청을 제조하는 단계;

상기 항-비스페놀 항혈청을 0.1%(w/v) skim milk/PBST를 이용해서 100,000배로 희석시키는 단계;

상기 희석된 항-비스페놀 항혈청 100 μ l과 비스페놀이 포함된 해양유기오염물질 50 μ l을 항원 항체 반응시키는 단계; 및

상기 반응에 의한 발색반응을 마이크로플레이트 판독기(Microplate reader)를 이용하여 490 nm에서 흡광도 측정하는 단계를 포함하는 비스페놀 검출 방법.

청구항 4.

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 비스페놀(bisphenol-A, BPA)을 검출하기 위한 바이오센서에 관한 것으로 특히, 항-비스페놀 항혈청(anti-BPA antiserum)을 포함하는 비스페놀 검출용 바이오센서 및 비스페놀 검출방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 비스페놀과 단백질의 결합체로 면역반응시킨 마우스로부터 분리된 항-비스페놀 항혈청을 항원 항체반응을 이용하여 비스페놀을 검출하는 것이다.

오늘날 해양수계는 가정과 산업체로부터 배출되는 인공합성 화학물질과 오폐수로 인해 수중 생태계 그 존재 자체가 위협받고 있다. 이에 세계 각국에서는 수중 환경에 존재하는 환경오염물질의 현황과 이를 관리하기 위한 다양한 기술적 방법과 제도적 장치를 마련하고 있다.

국내에서 환경오염물질을 검출할 수 있는 바이오센서의 개발은 수질 모니터링, 토양독성 모니터링, 가스독성 모니터링 등을 위해 연구되고 있다. 특히 생물학적인 바이오센서로는 물벼룩, 해조류, 어류 등을 이용하는 방법과, 대장균, 바실러스, 슈도모나스, 살모넬라 등의 미생물에서 비롯된 유전자 재조합 미생물을 이용하는 방법 등이 주를 이루고 있다. 이 중에서 물벼룩, 해조류, 어류 등을 이용하는 방법은 생물체의 유지, 보관 등의 문제로 인하여 일회용 탐지기능만을 제공할 수밖에 없다는 단점이 있다. 한편, 유전자 재조합 미생물을 이용하는 방법에 있어서는 현재까지 생물학적 빛(bioluminescence)과 녹색형광(green fluorescence)을 표지유전자로 사용하는 연구가 활발히 진행 중에 있다. 그리고, 최근에는 DNA 칩을 이용한 마이크로어레이(microarray) 기법도 적용되고 있다.

그러나, 해양유기오염물질 연구를 위한 박테리아 DNA 칩(bacterial DNA chip)의 개발과 이러한 박테리아 유전자와 형광 또는 발광 유전자를 이용한 바이오센서 개발 연구가 최근에 이루어지고 있다고는 하지만, 실질적으로 현장에서 ng 또는 pg 수준으로 해양유기오염물질을 검출할 수 있는 바이오센서는 아직까지 개발되지 않고 있는 실정이다. 또한, 지금까지의 해양유기오염물질에 관한 연구는 담수를 중심으로하는 유기오염물질의 생태위해성 평가기법 및 이에 대한 모니터링만이 주로 이루어지고 있으며, 해양을 대상으로 하는 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

이와 같은 종래의 해양유기오염물질의 연구는 복잡한 시료 전처리 외에도 HPLC, FPLC 또는 GC-MS 등의 분석방법이 이용되었으나 고가의 장비와 인력, 그리고 많은 분석비 요구가 단점으로 지적되어 왔다. 따라서 해양유기오염물질을 손쉽게 빠르게 검출할 수 있는 바이오센서의 개발은 반정량적으로 대량의 시료를 스크리닝할 수 있어, 화학적인 분석의 비용을 절감하고 처리 시료를 늘릴 수 있는 중요한 기술로 인식되고 있다.

현재, 해양유기오염물질 검출에 관한 일부 분자생물학적 연구가 시작되었으나 면역학적 정성 정량에 대한 연구가 부분적으로만 이루어지고 있을 뿐이며(Szekacs, *et.al.*, 1999; Dickert, *et.al.*, 2000; Kim, *et.al.*, 2001; Scharnweber, *et.al.*, 2001; Lee, *et. al.*, 2002), 이것들도 주로 ELISA에 의한 분석 및 Molecular imprints, 단클론 항체 개발 등의 연구에 관한 것이 전부이다. SDI(Newark, DE)나 Biosense Co. 등의 회사에 의해 일부가 상품화되기도 했지만, 이들에 의해 시판되고 있는 키트는 주로 모든 종류의 광범위한 유기오염물질에 동시에 작용하는 것으로, 이를 사용해서는 유기오염물질 중에 구체적으로 어떤 성분이 들어있는지를 정확히 알 수 없다는 문제점이 있다.

현재 독소를 비롯한 각종 유해물질의 신속한 검출 방법으로 가장 많이 사용하고 있는 것이 항원-항체 이용법이지만, 이러한 유해물질의 경우 항체를 생산하기가 쉽지 않아, 아직까지 초기단계의 연구만이 이루어져 있는 실정이다. 따라서, 이제 는 해양유기오염물질에 들어있는 유해 물질 성분을 구체적으로 특정하여 정확히 검출할 수 있는 기술이 필요하고, 이를 위해서 해양유기오염물질에 들어있는 각 성분대 대한 항체 개발이 요구되고 있는 시점이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상술한 바와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 항-비스페놀 항혈청(anti-BPA antiserum)을 포함하는 비스페놀 검출용 바이오센서 및 비스페놀 검출방법을 제공하기 위한 것이다. 이를 통하여, 고가의 장비를 필요로 하는 해양유기오염물질의 화학적인 분석에 있어서 비스페놀과 같은 내분비계장애물질이 포함되어 있는지 여부를 정확하고 간단하게 확인하는 것을 본 발명의 목적으로 한다.

발명의 구성

상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 비스페놀(bisphenol-A) 검출용 바이오 센서는, 비스페놀과 단백질의 결합체로 면역반응시킨 마우스로부터 분리된 항-비스페놀 항혈청(anti-BPA antiserum)을 포함하는 것을 특징으로 한다. 여기서, 상기 단백질은 오브알부민(ovalbumin; OVA) 또는 양이온화된 보바인 혈청알부민(cationized bovine serum albumin; cBSA)인 것이 바람직하다.

상기한 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 비스페놀 검출 방법은, 비스페놀과 단백질의 결합체를 제조하는 단계; 상기 결합체를 마우스에 주사하여 면역반응시켜 항-비스페놀 항혈청을 제조하는 단계; 및 상기 항-비스페놀 항혈청과 비스페놀이 포함된 해양유기오염물질을 항원 항체 반응시키는 단계;를 포함한다. 그리고, 여기서 상기 항원 항체 반응시키는 단계는 마이크로 플레이트를 이용한 간접 효소면역측정법(ELISA)이나 상기 간접 효소면역측정법에 의한 발색도를 측정하는 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 비스페놀 검출 방법일 수 있다.

이러한 본 발명은 천연 여성호르몬 중의 하나인 비스페놀(bisphenol-A, BPA)을 검출할 수 있는 바이오 센서 및 이를 이용한 해양유기오염물질 검출 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 비스페놀과 같은 해양유기오염물질을 쥐에 주사하여 혈청으로부터 항체를 생산하고, 생산된 항체와 해양유기오염물질의 반응에 의해 발색되는 정도를 측정함으로써 비스페놀을 검출하는 방법이다.

비스페놀은 에스트로겐 작용을 나타내는 화학물질로서 폴리카보네이트 플라스틱을 만드는데 사용되며 청량음료 캔이나 치아보합제, 많은 플라스틱 등의 구성물로 존재하고 있다. 비스페놀은 고압증기 멸균기(autoclave)에서 중합체가 파괴되거나 불완전하게 중합되기 때문에 플라스틱에서 용출된다. 또한, 비스페놀은 플라스틱 치아 충전제 특히, 어린이 치아 코팅제인 폴리카보네이트 플라스틱으로도 사용되는 것이다.

본 발명에 따른 비스페놀 검출용 바이오 센서는 다음 과정을 거쳐 제작된다. 먼저, 비스페놀과 전달 단백질(carrier protein)과의 결합체(conjugate)를 제조한다. 전달 단백질로는 오브알부민(ovalbumin; OVA)이나 양이온화된 보바인 혈청알부민(cationized bovine serum albumin; cBSA) 등을 사용할 수 있다. 그리고, 이렇게 제조된 cBSA-비스페놀 결합체를 마우스에 피하 및 근육에 주사하여 면역반응시킨 후 혈액을 채취하여 항-비스페놀 항혈청(anti-BPA antiserum)을 분리한다.

이와 같이 cBSA-BPA로 면역반응시킨 쥐로부터 획득한 상기 항-비스페놀 항혈청의 역가를 알아보기 위해, OVA-BPA를 코팅시킨 마이크로역가 플레이트를 이용하여 간접 ELISA를 실시한 결과, 본 발명에 따른 상기 항-비스페놀 항혈청은 결합체로 사용한 cBSA 단백질 또는 OVA 단백질보다 cBSA-BPA와 특이적으로 반응을 하는 것으로 나타났다. 즉, 본 발명에 따른 상기 항-비스페놀 항혈청은 해양유기오염물질의 하나인 비스페놀과 특이적으로 반응하는 것이다.

또한, 상기한 간접 ELISA 방법에 따라 비스페놀을 포함하는 해양유기오염물질을 기질로 사용하여 발색도를 측정한 경우, 본 발명에 따른 항-비스페놀 항혈청의 비스페놀에 대한 감도 역시 매우 높은 것으로 나타나, 상기 항-비스페놀 항혈청을 현장에서 적용하였을 때, 비스페놀과 단백질 결합체를 약 0.025 ng의 농도까지 효과적으로 감지할 수 있는 것으로 확인되었다.

이하에서는 본 발명의 바람직한 하나의 실시형태를 첨부된 도면을 참고로 하여 구체적으로 설명한다. 본 발명은 하기의 실시예에 의하여 보다 더 잘 이해 될 수 있으며, 하기의 실시예는 본 발명의 예시 목적을 위한 것이고, 첨부된 특허청구범위에 의하여 한정되는 보호범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

실시예 1: 비스페놀(bisphenol-A)-단백질 결합체(conjugate)의 제조

정제된 비스페놀은 Sigma에서 구입하였으며, 단백질과의 결합은 결합 키트(Imject^R PharmaLinkTM Immunogen kit, Pierce)를 사용하였다. 즉, 전달 단백질(carrier protein)로 사용될 양이온화된 보바인 혈청알부민(cationized bovine serum albumin; cBSA)과 오브알부민(ovalbumin; OVA)을 10 mg/ml의 농도가 되도록 증류수에 녹이고, 비스페놀은 결합 완충액(conjugation buffer; 0.1 M MES, 0.15 M NaCl, pH 4.7)에 0.5 mg/ml의 농도가 되도록 준비하였다.

결합(conjugation)을 위하여 500 μ l의 비스페놀과 200 μ l의 전달 단백질 용액을 혼합한 후, 50 μ l의 커플링 용액을 첨가하여 실온에서 2 시간 동안 결합 반응을 수행하였다. 반응 중에 약간의 침전물이 형성되기는 하였으나 침전물은 원심 분리하여 제거하였다. 반응이 끝난 후 결합이 되지 않은 비스페놀과 전달 단백질 용액에 남아 있는 EDTA는 탈염 컬럼(D-SaltTM desalting column)을 사용하여 제거하였다.

비스페놀-전달 단백질 결합체는 SDS-PAGE를 통하여 확인하였으며, BCA 단백질정량 용액(BCA protein assay reagent, Pierce)을 이용한 단백질 정량 후 에세톤 침전법을 사용하여 그 농도가 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 맞추어 적정량을 분주하여 20°C에 보관하였다.

실시에 2: 면역반응(Immunization)

4 주령의 BALB/c 마우스를 사용하여 다클론 항혈청(polyclonal antiserum)을 제조하였다. 면역반응에는 3차 면역까지 보조제로 임젝트 알룸 (Imject^R Alum, Pierce)를 사용하였으며 네 번째 면역에서는 보조제를 사용하지 않았다.

각 면역반응에는 쥐 한 마리당 100 μg 의 cBSA-BPA 결합체가 되도록 멸균된 PBS에 희석하여 사용하였으며, 피하 및 근육(Subcutaneous, intradermal injection) 경로로 주사하였다. 면역반응은 10 일에 한 번씩 실시하였다. 총 4 회의 면역 반응 후 항체 역가(titer)를 측정하기 위해 채혈한 후, 혈액을 원심 분리하여 상층의 혈청만을 사용하였다.

실시에 3: 효소면역진단법(ELISA)

① OVA-BPA 결합체의 고정화

OVA-BPA 결합체의 고정화는 코팅 완충용액(0.2 M 탄산염 완충액, pH 9.4)으로 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 희석한 OVA-BPA 결합체를 96-웰 마이트로역가 플레이트에 200 μl 씩 분주한 후 37 °C에서 2시간 반응시켜 실시하였다. 반응 후, 블로킹(blocking)을 위하여 PBST에 1 %(w/v)의 non fat dry skim milk 용액을 만들고, 각 웰에 100 μl 씩 분주하여 37 °C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 블로킹 후 마이크로 플레이트는 PBST로 3 회 세척하였다.

② OVA-BPA 결합체를 이용한 간접 ELISA

항혈청 역가측정은 OVA-BPA 결합체가 코팅된 웰의 대조구로 OVA (1 $\mu\text{g}/\text{well}$)와 cBSA (1 $\mu\text{g}/\text{well}$)를 사용하였다. 일차 항체 결합을 위하여 cBSA-BPA로 면역 반응시킨 쥐에서 채취한 항혈청을, 0.1 %(w/v) skim milk/PBST를 이용해서 1/500 부터 1/500000까지 serial 희석하여 100 μl 씩 분주한 후 37 °C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 각 항원에 대하여 2 회씩 실시하였으며, 항혈청을 넣지 않는 웰을 반대 대조구로 사용하였다. 반응이 끝난 후, PBST로 3 회 세척하였다.

이차 항체로는 염소 항-마우스 IgG-HRP 결합체(goat anti-mouse HRP conjugate, Sigma)를 0.1 %(w/v) skim milk/PBST로 1000 배 희석하여 사용하였다. 각 웰에 100 μl 씩 분주하여 37 °C에서 2 시간 동안 반응시킨 후 PBST로 세척하고, 이어서 50 μl 의 기질(4 mg OPD and 5 μl hydrogen peroxide in citrate-phosphate buffer)을 각 웰에 넣고 10분 후에 발색반응을 관찰한 후, 100 μl 의 반응중지 용액 (1N의 H_2SO_4)을 사용하여 발색반응을 중지시켰다. 마이크로플레이트 판독기(Microplate reader)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

위에서 실시한 실험을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

결과에 1: 항-비스페놀 항혈청(anti-BPA antiserum)의 역가 측정

cBSA-BPA로 면역 반응시킨 쥐로부터 획득한 항혈청의 역가를 알아보기 위해, OVA-BPA, cBSA 및 OVA를 코팅시킨 마이크로역가 플레이트를 이용하여 간접 ELISA를 실시하였다. 도 1은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따라 ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)를 이용하여 항-비스페놀 항혈청(anti-bisphenol-A antiserum)의 역가 변화를 측정한 그래프이다.

여기에서 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 항-비스페놀 항혈청은 OVA 또는 cBSA 단백질만이 있는 것에 비하여, 비스페놀이 결합된 OVA-BPA와 특이적으로 반응한다는 것을 알 수 있고, 상기 OVA-BPA는 희석 농도 전반에 걸쳐서 OVA 또는 cBSA 단백질에 비해 본 발명에 따른 항-비스페놀 항혈청과 현저히 강하게 반응하는 것을 확인할 수 있다(도 1 참조).

결과에 2: 현장 적용을 위한 항-비스페놀 항혈청(anti-BPA antiserum)의 감도 측정

상기한 간접 ELISA 방법에 따라 비스페놀을 포함하는 해양유기오염물질을 기질로 사용하여 발색도를 측정한 경우, 본 발명에 따른 항-비스페놀 항혈청의 비스페놀에 대한 감도 역시 매우 높은 것으로 나타났다. 도 2는 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따라 ELISA를 이용하여 항-비스페놀 항혈청의 발색도를 측정한 결과도이다.

즉, 상기 항-비스페놀 항혈청을 현장에서 적용하였을 때, 비스페놀과 단백질 결합체를 1/100,000 희석하는 조건에서도 상당히 높은 흡광도 값($OD_{490} > 0.1$)을 보이는 것으로 보아, 이 혈청은 비스페놀에 대해 높은 감도를 갖는다는 것을 알 수 있다(도 2참조). 다음 표 1은 비스페놀과 단백질 결합체의 희석비율에 따른 항-비스페놀 항혈청의 감도 변화를 측정한 표이다

[표 1: 비스페놀과 단백질 결합체의 희석비율에 따른 항-비스페놀 항혈청의 감도 변화]

	Blank	OVA-bisphenol	cBSA	OVA
100	0.038	0.223	0.199	0.034
500	0.038	0.246	0.192	0.036
1000	0.036	0.237	0.145	0.036
5000	0.035	0.208	0.087	0.034
10000	0.035	0.179	0.048	0.034
50000	0.038	0.121	0.046	0.036
100000	0.036	0.085	0.044	0.038
500000	0.036	0.046	0.041	0.036
0	0.035	0.038	0.038	0.037

이와 같이, 본 발명은 항-비스페놀 항혈청을 현장에서 적용하였을 때에, 별도의 계산식에 의하면 비스페놀과 단백질 결합체를 약 0.025 ng의 농도까지 효과적으로 감지할 수 있는 것으로 확인되었다. 이상의 결과로부터, 본 발명에 따라 제작된 항-비스페놀 항혈청 및 이를 이용한 비스페놀 검출 방법은 비스페놀을 비롯한 해양오염물질의 조기 정밀 검정에 효과적임을 확인할 수 있다.

발명의 효과

상술한 바와 같은 본 발명에 따르면, 비스페놀(bisphenol-A)과 단백질의 결합체로 면역반응시킨 마우스로부터 분리된 항-비스페놀 항혈청(anti-BPA antiserum)을 포함하는 비스페놀 검출용 바이오센서 및 비스페놀과 단백질의 결합체를 제조하는 단계; 상기 결합체를 마우스에 주사하여 면역반응시켜 항-비스페놀 항혈청을 제조하는 단계; 그리고 상기 항-비스페놀 항혈청과 비스페놀이 포함된 해양유기오염물질을 항원 항체 반응시키는 단계를 포함하는 비스페놀 검출 방법을 제공할 수 있다.

이와 같은 본 발명에 따른 비스페놀 검출용 바이오센서 및 이를 이용한 비스페놀 검정법은 아직까지 전세계에서 체계적으로 시도되거나 개발되지 않은 새로운 기술로서, 고가의 장비를 필요로 하는 해양유기오염물질의 화학적인 분석에 있어서 비스페놀과 같은 내분비계장애물질이 포함되어 있는지 여부를 정확하고 간단하게 확인할 수 있는 효과가 있다. 또한, 본 발명에 따른 항원 항체 반응을 이용한 독성 물질 검출 방법은 반정량적으로 대량의 시료를 스크리닝할 수 있기 때문에, 다른 유해독소의 조기 정밀 진단에도 적용 가능하여 그 활용 가능성은 매우 높은 것이다.

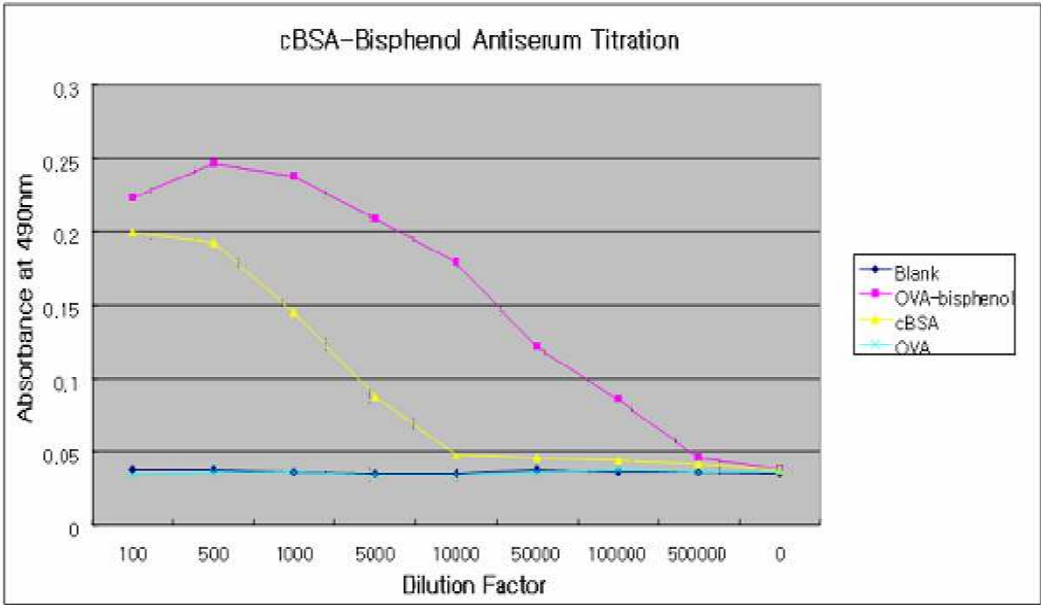
도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따라 ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)를 이용하여 항-비스페놀 항혈청(anti-bisphenol-A antiserum)의 역가 변화를 측정한 그래프이고,

도 2는 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따라 ELISA를 이용하여 항-비스페놀 항혈청의 발색도를 측정한 결과도이다.

도면

도면1



도면2

