

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0127170 (43) 공개일자 2014년11월03일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/535 (2006.01) C12N 9/96 (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-0048007 (22) 출원일자 2014년04월22일 심사청구일자 2014년04월22일 (30) 우선권주장 1020130044478 2013년04월22일 대한민국(KR)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) (72) 발명자 김중배 서울 강남구 역삼로 309, 101동 1501호 (역삼동, 래미안펜타빌) 홍성길 서울 성북구 안암로 145, 화공생명공학과 (안암동5가, 고려대학교) (74) 대리인 특허법인충현	

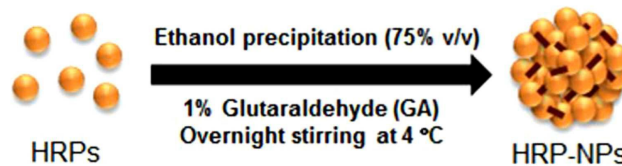
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 효소결합 면역흡착 검사법을 위한 가교결합된 나노효소입자 및 이것의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 가교결합 나노효소입자를 제작하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 초기 농도가 설정된 효소를 제공하고, 그 효소를 석출시킨 후에 효소간의 가교결합을 유도하여 장기간 안정적으로 활성을 유지할 수 있는 가교결합 나노효소입자의 제조방법 및 그 효소결합 면역흡착 검사법의 용도를 제공하는 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20118510020020-11-1-000

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국에너지기술평가원

연구사업명 에너지국제공동연구사업

연구과제명 이산화탄소의 전환 공정 개발을 위한 효소 고정화 및 안정화

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.12.01 ~ 2013.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012K001385

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신기술 융합형 성장동력사업

연구과제명 고효성, 고안정 나노-단백질 원천기술 개발 및 ELISA에서의 응용

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.07.01 ~ 2013.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 완충용액에 효소를 용해시켜 효소 용액을 제조하는 단계;
 - (b) 상기 용액에 석출제를 첨가하여 상기 효소를 석출시키는 단계;
 - (c) 상기 (b)의 용액에 가교제를 첨가하여 상기 석출된 효소를 가교결합시키는 단계; 및
 - (d) 상기 가교결합된 효소를 15 내지 20 시간동안 3 내지 5℃에서 교반하는 단계
- 를 포함하는 효소결합 면역흡착 검사법(ELISA)을 위한 가교결합 나노효소입자의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 상기 효소 용액의 초기 농도는 0.5 내지 10 mg/ml인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 효소는 양고추냉이 과산화효소, 당산화효소, 알칼라인 포스파타아제, 카탈라제, 페록시다아제, 티로시나아제, 수퍼록사이드 디스뮤타아제, 리파아제인로 구성된 군에서 선택되는 하나 또는 그 이상인 제조방법

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 효소가 양고추냉이 과산화효소인 경우에, 그 효소 용액의 초기 농도는 3.5~4.5mg/ml인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 완충용액은 인산나트륨 수용액, 인산칼륨 수용액, 탄산수소나트륨 수용액, 2-N-모폴리노에탄설폰산 수용액, 4-2-하이드록시에틸-1-1-피페라진에탄설폰산 수용액으로 구성된 군에서 선택되는 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 석출제는 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 부틸알콜, 아세톤, 폴리에틸렌글리콜, 암모늄 설페이트, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐 포스페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 설페이트, 포타슘 포스페이트 및 이들의 수용액을 단독 또는 혼합한 것으로 구성된 군에서 선택되는 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 가교제는 이소시아네이트, 디안히드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-(3-디메틸 아미노프로필카보디이미드), 글루타르알데하이드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미드 에스테르) 및 디에시드 클로라이드로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상인 제조 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 의하여 제조된 가교결합 나노효소입자.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 가교결합 나노효소입자의 크기는 50 내지 200nm인 것을 특징으로 가교결합 나노효소입자.

청구항 10

제8항에 의한 가교결합 나노효소입자를 포함하는 효소결합 면역흡착검사법(ELISA)용 진단 키트.

청구항 11

가교결합 나노효소입자를 이용한 효소결합 면역흡착 검사법(ELISA)으로서,

- (a) 제8항에 의한 가교결합 나노효소입자를 준비하는 단계;
 - (b) 상기 나노효소입자에 항체를 결합하는 단계;
 - (c) 상기 항체와 혼합된 나노효소입자에 항원을 주입하는 단계;
 - (d) 상기 항체와 항원을 반응시키는 단계; 및
 - (e) 상기 반응된 항원 농도를 측정하는 단계
- 를 포함하는 효소결합 면역흡착 검사법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 항체 하나에 다량의 가교결합 나노효소입자가 결합되는 것을 특징으로 하는 효소결합 면역흡착 검사법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 가교결합 나노효소입자를 제작하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로, 효소의 초기농도를 조절하여 최종 나노효소입자의 크기를 조절하고, 이를 이용하여 효소결합 면역흡착 검사법에 사용하기 위한 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

최근 나노구조 물질의 합성이 다양한 분야에서 주목을 받고 있다. 특히, 나노크기의 효소는 바이오 센서, 바이오 연료전지, 효소컬럼, 효소면역 흡착 분석법 (ELISA), 바이오 정화기기, 방오용 도료 등 다양한 분야에 사용될 수 있는데, 이때 효소의 안정성이 문제가 된다. 효소의 안정성을 높이기 위해 다양한 구조의 나노구조물질이 사용되는데, 이러한 방법은 합성방법이 번거로운 단점이 존재하고, 크기 및 모양이 균일하지 못한 단점이 있다.

[0003]

효소의 안정성을 향상시키기 위해 다양한 방법이 제안되어 왔다. 그 중 대표적인 방법이 가교결합에 의한 효소

안정화 기법이다. 가교결합에 의한 효소 안정화 기법은 아주 오래된 역사를 지니고 있고, 그 예로서 단순 가교결합에 의한 가교결합효소(crosslinked enzymes, CLEs), 석출과 가교결합을 통해 합성되는 효소가교결합체(crosslinked enzyme aggregates, CLEAs), 그리고 효소 결정 후 가교결합하는 효소가교결합결정체(crosslinked enzyme crystals, CLECs) 등을 들 수 있다. 이러한 접근방식은 간단한 합성 방법이 장점이지만, 크기 조절이 힘들며, 최종 크기가 마이크로미터(μm)에서 밀리미터(mm) 수준으로 크기가 커서 효소와 반응기질의 물질전달저항이 크다는 문제점이 있다. 또한, 교반조건에서 취약한 안정성으로 말미암아 반복적인 재사용이 어려운 단점이 존재한다.

[0004] 다양한 면역분석법 중에 하나인 효소결합 면역흡착 검사(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)는 항체(antibody)의 항원(antigen)에 대한 특이성과 효소의 기질 선택성 및 촉매 반응을 기반으로 하여 바이러스, 병원균 등의 다양한 항원의 유무 및 정량화를 실현하는데 사용되는 면역분석법의 일종이다. 분석하고자 하는 항원을 탐지하기 위해서 효소결합면역흡착검사에서는 효소가 표지된 항체(enzyme conjugated antibody)를 이용한다.

[0005] 효소결합 면역흡착 검사는 효소표지항체가 탐지한 항원의 양을 효소반응의 신호로 나타내는 메커니즘을 기반으로 하는데, 종래의 기존의 효소결합 면역흡착 검사에서는 항체 하나에 하나의 효소가 결합되어있어 감도를 향상시키는 데 문제점이 있었다. 이러한 점은 극미량의 탐지가 요구되는 일부 항원의 경우, 몸에 해로울 정도로 많은지 적은지를 판단하는데 오류가 많았기 때문에 면역검사를 진행하는데 어려움이 있었다. 따라서 이를 해결하고자, 항체 하나에 다량의 효소를 결합하여 감도를 향상시키고자 하는 연구가 진행되어 왔다. 하지만 이 경우, 감도가 향상되지만 효소 응집체의 크기가 크고 균일하지 않고, 효소 안정성이 떨어져 효소결합 면역흡착 검사 결과의 재현성이 떨어지는 문제가 발생하였다. 따라서, 검출 신호의 재현성 향상을 위하여 균일한 크기를 가지는 효소 입자를 기반으로 한 고 안정성, 고감도의 면역분석법이 절실하게 요구되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명은 크기가 작고 균일한 가교결합 나노효소입자 및 이것의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 이러한 가교결합 나노효소입자를 효소면역분석법(ELISA)에 응용하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상술한 문제를 해결하고자, 본 발명자들은 예의 노력한 결과, 효소의 초기 농도를설정한 후, 그 효소를 석출시키고, 가교결합시킴으로써 효소의 안정성을 향상시킬 수 있음을 발견함으로써, 이에 기초하여 종래보다 크기가 작고 균일한 효소를 제조하는 방법을 제안하였다.

[0009] 본 발명의 일 양태로서, 효소결합 면역흡착 검사법(ELISA)을 위한 가교결합 나노효소입자의 제조 방법을 제공할 수 있다.

[0010] 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:

[0011] (a) 완충용액에 효소를 용해시켜 효소 용액을 제조하는 단계;

[0012] (b) 상기 효소 용액에 석출제를 첨가하여 상기 효소를 석출시키는 단계;

[0013] (c) 상기 (b)의 효소 용액에 가교제를 첨가하여 석출된 효소를 가교결합시키는 단계; 및

[0014] (d) 상기 가교결합된 효소를 15-20시간동안 3~5℃에서 교반하는 단계.

[0015] 상기에서 효소 용액의 초기 농도는 효소의 종류에 따라 달라질 수 있으며, 이 초기 농도에 따라 최종 산물의 크

기가 달라질 수 있다.

- [0016] 상기 효소는 양고추냉이 과산화효소, 당산화효소, 알칼라인 포스파타아제, 카탈라제, 페록시다아제, 티로시나아제, 수페록사이드 디스뮤타아제, 리파아제인 것을 특징으로 한다.
- [0017] 상기 (a) 단계 효소 용액의 초기 농도의 범위가 0.5~10 mg/ml인 것을 특징으로 한다.
- [0018] 또다른 구체예로서, 본 발명은 양고추냉이 과산화효소(HRP)를 사용하는 경우 초기 농도는 3.5~4.5mg/ml로 하는 것이 바람직하다.
- [0019] 본 발명의 또다른 구체예로서, 본 발명은 상기와 같은 방법에 의하여 제조된 가교결합된 나노효소입자를 제공할 수 있다. 상기 가교결합된 나노효소입자의 크기는 1마이크로미터 이하일 수 있으며, 바람직하게는 50~200nm인 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명의 또다른 구체예로서, 본 발명은 가교결합 나노효소입자를 포함하는 효소면역분석(ELISA)용 진단 키트를 제공할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 다른 양태로서, 가교결합 나노효소입자를 이용한 효소면역분석법(ELISA)을 제공할 수 있으며, 다음의 단계를 포함한다.
- [0022] (a) 가교결합 나노효소입자를 준비하는 단계;
- [0023] (b) 상기 나노효소입자와 항체를 결합하는 단계;
- [0024] (c) 상기 항체와 혼합된 나노효소입자에 항원을 주입하는 단계;
- [0025] (d) 상기 항체와 항원을 반응시키는 단계; 및
- [0026] (e) 상기 반응된 항원 농도를 측정하는 단계.

발명의 효과

- [0027] 본 발명의 가교결합된 나노효소입자는 초기 효소의 농도에 의하여 최종 생성된 나노효소입자의 크기를 조절할 수 있어서, 효소 활성을 안정적으로 유지하면서도 작고 균일한 효소입자를 합성할 수 있는 방법을 제공할 수 있다. 또한 합성시에 효소의 농도를 조절함으로써 다양한 크기의 가교결합 나노효소입자를 합성하는 것이 가능하여 필요에 따른 크기의 선택을 통해 다양한 분야로의 응용이 가능하다. 또한 추출과 가교결합의 두 단계의 쉬운 합성과정을 통해 가교결합 나노효소입자의 합성이 가능해, 다른 나노구조물질을 이용한 고정화 방법에 비해 대량으로 생산할 수 있다. 본 발명에서 가교결합 나노효소입자를 ELISA 분야에 대한 응용 실험을 진행하였으나, 이러한 본 발명에 따른 가교결합 나노효소입자 방식으로 다양한 효소를 고정화하여 바이오 센서, 바이오 연료전지, 효소컬럼, 바이오 정화기기, Antifouling용 도료 (방오제) 등 다양한 분야에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 가교결합 나노효소입자의 합성 방법에 대한 모식도이다.
- 도 2는 초기 효소의 농도에 따른 가교결합 나노효소입자의 크기 변화를 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 40°C에서 보관된 가교결합 나노효소입자의 안정성을 보여주는 그래프이다.
- 도 4는 가교결합 나노효소입자의 초기 농도에 따른 ELISA signal을 보여주는 그래프이다.
- 도 5는 가교결합 나노효소입자를 이용하여 검출이 가능한 항원의 농도를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 효소의 초기농도를 조절하여 최종 나노효소입자의 크기를 조절하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 가교결합 나노효소입자를 제조하는 단계는 크게 (1) 효소의 초기농도를 설정하는 단계 (1) 효소에 석출화제를 첨가하여 효소를 석출하는 단계, (3) 상기 석출된 효소에 가교결합제를 첨가하여 효소간 가교결합을 형성하는 단계를 포함한다.
- [0031] 본 발명의 특징은 효소의 초기 농도를 조절함에 따라 최종 생성되는 나노효소입자의 크기가 달라진다는데 있다. 본 발명은 나노 수준의 입자로 1 마이크로미터 이하의 작고 균일한 나노입자를 만들 수 있다는데 특징이 있다. 상기에서 효소의 초기 농도는 효소에 따라 달라질 수 있다. 즉, 효소 용액의 초기 농도는 0.5~10 mg/ml일 수 있다. 특히, 본 발명에서 ELISA에 주로 사용되는 양고추냉이 과산화효소에 대하여 초기 농도를 3.5 내지 4.5 mg/ml로 하는 것이 바람직하다.
- [0032] 본 발명의 제시된 가교결합 나노효소입자는 석출과 가교결합을 통해 효소의 안정성을 높일 수 있는 기술이다. 석출과 가교결합이 진행됨으로써 효소간의 효과적인 가교결합이 진행될 수 있어서 효소의 유탈(leaching)과 구조적 변형을 효과적으로 방지하여 효소의 안정성을 획기적으로 향상시킨다. 또한 석출과 가교결합의 두 단계의 쉬운 합성과정을 통해 가교결합 나노효소입자의 합성이 가능해, 다른 나노구조물질을 이용한 고정화 방법에 비해 대량으로 생산할 수 있다. 더불어 합성시에 효소의 농도를 조절함으로써 다양한 크기의 가교결합 나노효소입자를 합성하는 것이 가능하여 필요에 따른 크기의 선택을 통해 다양한 분야로의 응용이 가능하다. 특히, 최적화된 크기에서 ELISA 분야로의 응용이 가능하다.
- [0033] 본 발명의 다른 양태로서, 효소결합 면역흡착 검사법(ELISA)에 응용가능한 가교결합된 나노효소입자를 제공할 수 있다.
- [0034] 상기 가교결합된 나노효소입자는 양고추냉이 과산화효소, 당산화효소, 알칼라인 포스포타아제, 카탈라제, 페록시다아제, 티로시나아제, 수퍼옥사이드 디스뮤타아제, 리파아제 일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 효소로서 양고추냉이 과산화효소(HRP)가 바람직하다.
- [0036] 본 발명의 구체예에서는, 이러한 HRP의 초기 농도를 다양화하여(0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/ml), 본 발명에 따른 방법에 의하여 가교결합된 나노효소입자를 제조하였다(실시예 2). HRP의 경우 초기 농도가 4.0 mg/ml에서 크기가 균일하고 안정성이 높았다. 본 발명자들은 이 HRP를 이용하여 ELISA를 수행하였다.
- [0037] 본 발명에 따른 가교결합된 나노효소입자는 그 크기가 50 내지 200 nm인 것이 바람직하다.
- [0038] 도 1을 참조하여 본 발명에 따른 가교결합 나노효소입자의 합성 과정을 설명하고자 한다. 본 발명에서는 양고추냉이 과산화효소 (horseradish peroxidase, HRP)를 완충액에 용해시켜 사용하였다. 이 효소의 석출은 에탄올을 사용하였지만 암모늄설페이트 (ammonium sulphate)와 같은 석출제를 사용할 수도 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 상기에서 효소를 용해시키는 완충액은 아민기가 없는 인산나트륨 수용액, 인산칼륨 수용액, 탄산수소나트륨 수용액, 2-N-모폴리노 에탄설펜산 수용액, 4-2-하이드록시에틸-1-1-피페라진에탄설펜산 수용액의 하나일 수 있으며, 아민기를 포함하지 않는 수용액이면, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 상기에서 가교결합제는 이소시아네이트, 디안히드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 글루타르알데하이드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미드 에스테르) 및 디에시드 클로라이드로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0041] 상기에서 효소는 양고추냉이 과산화효소, 당산화효소, 알칼라인 포스파타아제, 카탈라제, 페록시다아제, 티로시나아제, 수페록사이드 디스뮤타아제, 리파아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 상기 석출화제는 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 2-프로판올, 부틸알콜, 아세톤, 폴리에틸렌글리콜, 암모늄 설페이트, 소듐 클로라이드, 소듐 설페이트, 소듐 포스페이트, 포타슘 클로라이드, 포타슘 설페이트, 포타슘 포스페이트 및 이들의 수용액을 단독 또는 혼합한 것일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명은 또한 가교결합나노효소입자를 이용하여 효소결합 면역흡착 검사법(ELISA)을 제공할 수 있다. 본 발명에 따른 ELSIA는, 본 발명에 따라 제조된 가교결합 나노효소입자를 준비하는 단계; 상기 나노효소입자에 항체를 결합시키는 단계; 상기 항체와 혼합된 나노효소입자에 항원을 주입하는 단계; 상기 항체와 항원을 반응시키는 단계; 및 상기 반응된 항원 농도를 측정하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 본 발명에 따른 가교결합 나노효소입자에 결합된 항체 하나에 다량의 가교결합 나노효소입자가 결합되는 것을 특징으로 한다.
- [0044] 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.

실시예 1

[0045] 가교결합 나노효소 입자의 합성

- [0046] 도1은 가교결합 나노효소입자의 합성 과정을 나타낸다. 양고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase, HRP)를 사용하였고, 효소의 석출은 에탄올을 사용하였지만 암모늄설페이트(ammonium sulphate)와 같은 석출제를 사용할 수도 있다. 특정 무게의 양고추냉이 과산화효소를 0.5 ml의 의 인산나트륨(Sodium phosphate) 버퍼 (100 mM, pH7.0) 에 용해시킨 뒤, 1000rpm의 자성 교반 상태에서 1.5 ml의 에탄올을 첨가하였고, 이때 에탄올의 최종 농도는 75%이다. 5분간 1000 rpm 자성 교반 시킨 뒤, 글루타알데히드를 첨가하여 최종 농도가 1%가 되게 하고, 1000 rpm에서 추가로 5분간 자성교반 시킨다. 그 후에, 4도씨에서 17시간 동안 자성 교반 속도를 200rpm으로 낮추어 교반시킨다. 17시간이 경과하면, 원심분리를 10000 rpm에서 10분간 진행하고 상층액을 제거한 후에 2 ml의 인산나트륨(Sodium phosphate) 버퍼 (100 mM, pH 7.0)를 첨가함으로써 합성을 종료한다.

실시예 2

[0047] 나노효소입자의 크기 조절

- [0048] 도2에서는 양고추냉이 과산화효소의 초기 농도를 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml, 8mg/ml 로 조절하였고, 이후 합성은 상기 실시예 1의 방법과 동일하게 진행되었다. Size 측정은 동적광산란법(dynamic light scattering)을 이용한 입자분석장치를 통해 진행되었고, 그 결과 양고추냉이 과산화효소의 초기 농도가 4 mg/ml 일 경우 가장 큰 크기의 입자가 합성이 되었다. 그 결과는 표1과 같다.

표 1

[0049]

초기 HRP의 농도에 따른 HRP-NP 크기 및 반응속도 상수

HRP concentration (mg/mL)	Size (nm)	Specific activity (A655/min/ng)	Km (mM)	Vmax (A655/s)
Free HRP	NA	0.052	2.31 ± 0.13	0.028 ± 0.0001
0.5	24.4 ± 5.3	0.024	2.40 ± 0.03	0.013 ± 0.0001
1.0	25.5 ± 5.9	0.026	3.15 ± 0.02	0.019 ± 0.0003
2.0	59.5 ± 14.3	0.029	4.06 ± 0.02	0.026 ± 0.0001
4.0	75.8 ± 18.2	0.032	5.12 ± 0.18	0.037 ± 0.0002
8.0	64.8 ± 15.8	0.027	3.73 ± 0.15	0.025 ± 0.0030

실시예 3

[0050]

나노효소입자의 안정성 측정

[0051]

도3에서는 입자의 크기가 가장 큰 4 mg/ml의 양고추냉이 가교결합 나노효소입자(HRP-NP)를 이용하여 비교반상태에서 40°C에 보관하며, 1시간마다 TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)를 이용한 HRP의 활성을 측정하며 활성의 저하가 생기는지에 대한 실험을 진행하였고, 그 결과 3시간 동안 유리효소(Free HRP)는 활성이 감소하는 반면, HRP-NP의 활성은 90%이상에서 활성이 유지되는, 즉 안정성이 향상된 것을 알 수 있었다. 40°C에 안정성 실험을 진행하였고, 그 결과 안정성이 향상된 것을 알 수 있었다.

실시예 4

[0052]

ELISA를 이용한 항원 검출 범위와 최소 항원 검출 농도 측정

[0053]

도4에서는 효소결합 면역흡착 분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)실험을 진행하였다. 가교결합 나노효소입자 표면에는 글루타알데히드에 의해 생성된 알데히드가 존재하는데, 여기에 항체(Fc specific antibody)와 1시간 30분간 섞어주어 항체의 아민기와 가교결합 나노효소입자의 알데히드가 결합이 일어나도록 한다. 그리고 또한 96-well plate에 항체(Fab specific antibody)를 17시간 동안 흡착시키고, 이후에 항원(human immunoglobulin G, hIgG)을 주입하고 37°C에서 1시간 30분 동안 반응을 시킨다. 여기에 항체가 결합된 가교결합 나노효소입자를 주입하고 37°C에서 1시간 30분동안 반응을 시킨다. 마지막으로, TMB 용액을 넣고 반응시키며 655 nm 흡광을 측정하는 방식으로 실험을 진행하였고, 그 결과 항원 농도 0.5 ng/ml의 검출한계를 나타내었다. 또한 0.5 ~ 10 µg의 항원검출 범위가 확인되었다. 도4에서는 크기가 다른 가교결합 나노효소입자를 사용하여, 크기에 따른 ELISA signal을 비교하였다. 그 결과, 초기 HRP의 농도가 4mg/ml일 경우에 ELISA signal이 가장 크게 나타났다.

실시예 5

[0054]

ELISA를 이용한 검출 가능한 항원 농도의 측정

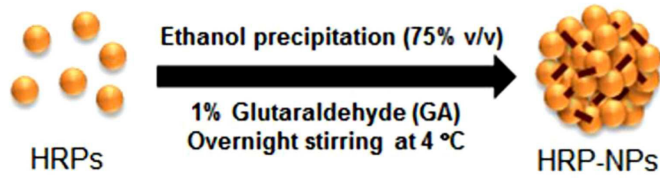
[0055]

도5에서는 도4에서 가장 큰 ELISA signal을 나타낸 4mg/ml의 가교결합 나노효소입자를 사용하여 ELISA 실험에 대한 결과를 보여준다. 가교결합 나노효소입자 표면에는 글루타알데히드에 의해 생성된 알데히드가 존재하는데, 여기에 항체(Fc specific antibody)와 1시간 30분간 섞어주어 항체의 아민기와 가교결합 나노효소입자의 알데히드가 결합이 일어나도록 한다. 그리고 또한 96-well plate에 항체(Fab specific antibody)를 17시간동안 흡착시키고, 이후에 항원(human immunoglobulin G, hIgG)을 다양한 농도로 주입하고 37 °C에서 1시간 30분 동안 반응을 시킨다. 여기에 항체가 결합된 가교결합 나노효소입자를 주입하고 37°C에서 1시간 30분동안 반응을

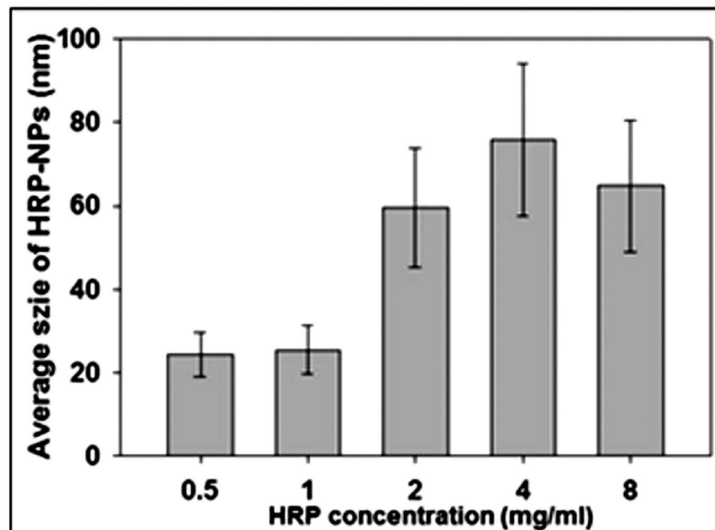
시킨다. 마지막으로, TMB 용액을 넣고 반응시키며 655nm 흡광을 측정하는 방식으로 실험을 진행하였고, 그 결과 항원 농도 0.5ng/ml의 검출한계를 나타내었다.

도면

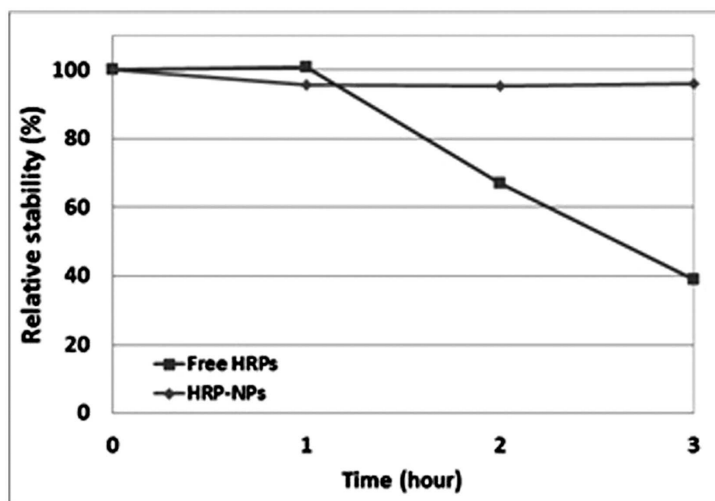
도면1



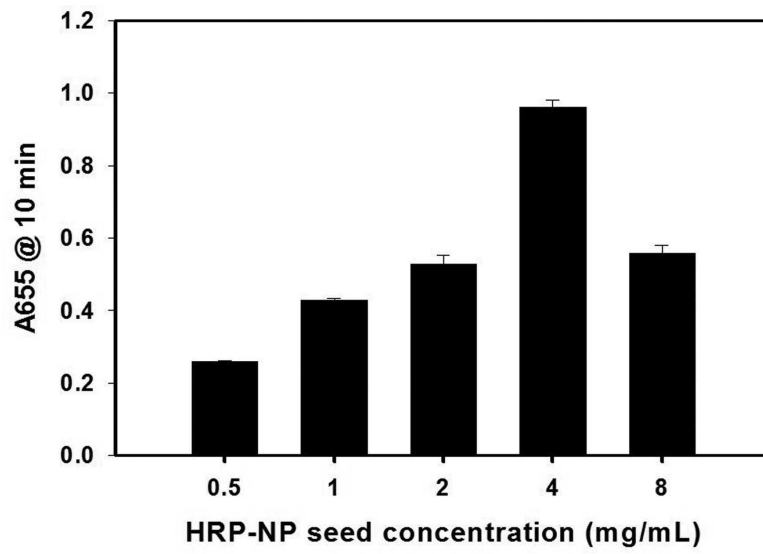
도면2



도면3



도면4



도면5

