

|                                                                                   |                                                         |                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A)                      | (11) 공개번호 10-2016-0046085<br>(43) 공개일자 2016년04월28일                                                                                                     |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>G01N 33/573 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)              | (71) 출원인<br>서강대학교산학협력단<br>서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) | (72) 발명자<br>오병근<br>서울특별시 은평구 서오릉로 258 102동 501호(갈현동, 우남아파트)<br>최진하<br>서울특별시 성북구 오패산로16가길 40 115동 801호(하월곡동, 꿈의숲푸르지오아파트)<br>모교성<br>서울특별시 강남구 선릉로141길 12 |
| (21) 출원번호 10-2014-0141432<br>(22) 출원일자 2014년10월20일<br>심사청구일자 2014년10월20일          | (74) 대리인<br>이준혁                                         |                                                                                                                                                        |

전체 청구항 수 : 총 16 항

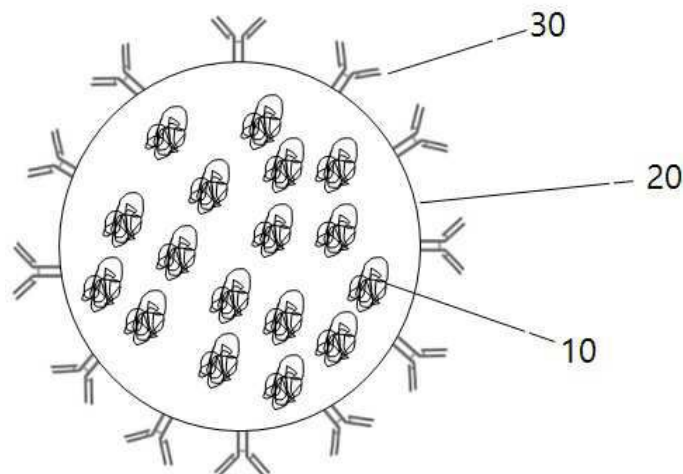
(54) 발명의 명칭 **효소 면역 측정용 효소 불 및 이의 제조방법**

### (57) 요약

본 발명은 간편하고 신속하게 타겟물질을 고감도로 감지할 수 있는 효소 면역 측정용 효소 불 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 효소면역 측정용 효소불은 내부에 많은 양의 효소를 캡슐화하고 있고, 또한 내부로 기질이 유입될 수 있어 많은 양의 효소가 기질과 반응할 수 있으므로 항원 검출의 감도를 높일 수 있다. 또한, 본 발명의 효소불은 생분해성이고, 탈용매법으로 쉽게 제조할 수 있고, 또한, 효소불은 항체, 약물, 형광물질과 같은 다양한 물질과 효과적으로 결합될 수 있으므로 적용범위가 매우 광범위하다.

**대표도** - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20062005374

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술연구

연구과제명 양자소재를 이용한 전기적 측정 시스템 기반의 나노탐침형 뇌 센서 개발

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2014.08.01 ~ 2015.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20114010203096

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국에너지기술평가원

연구사업명 에너지인력양성

연구과제명 [RCMS]고효율 에너지 나노소재공정 고급트랙

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.08.01 ~ 2014.07.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

효소 ;

자기 집합체(self-aggregates)를 형성하여 상기 효소를 내부에 담지하는 알부민 응집체(파티클) ; 및

상기 알부민 응집체(파티클) 표면에 부착된 항체를 포함하는 효소면역 측정용 효소볼.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 나노파티클은 표면이 가교제로 코팅된 것을 특징으로 하는 효소면역 측정용 효소볼.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 효소볼은 내부로 상기 효소와 특이적으로 반응하는 기질이 유입될 수 있는 것을 특징으로 하는 효소면역 측정용 효소볼.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 효소는 상기 알부민 나노 응집체에 1~30중량% 담지된 것을 특징으로 하는 효소면역 측정용 효소볼.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 알부민은 소혈청 알부민, 인간혈청 알부민 또는 이의 단편인 것을 특징으로 하는 효소면역 측정용 효소볼.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 알부민 응집체는 크기가 100~300nm인 것을 특징으로 하는 효소면역 측정용 효소볼.

#### 청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 효소는 알부민 응집체에 분산되어 존재하는 것을 특징으로 하는 효소면역 측정용 효소볼.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 효소는 모트립신, 트립신, 서브틸리신, 파파인, 리파아제, 홀세라디쉬 페록시다아제, 소이빈 페록시다아제, 클로로 페록시다아제, 망가네이제 페록시다아제, 티로시나아제, 락카아제, 셀룰라아제, 사이클라네이즈, 락타아제, 수크라아제, 오가노포스포히드로라아제, 클로리네스테라아제, 글루코스 옥시다아제, 알코올 데히드로제나아제, 글루코스 데히드로제나아제, 히드로제나아제 및 글루코스 이소머라아제로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 효소면역 측정용 효소볼.

#### 청구항 9

알부민을 물에 녹인 후 여기에 효소를 주입하여 혼합물을 제조하는 단계 ;

상기 혼합물을 탈용매화하여 효소가 내부에 담지된 알부민 응집체를 제조하는 단계 ; 및

상기 응집체 표면에 항체를 결합시키는 단계를 포함하는 효소면역 측정용 효소볼 제조방법.

#### 청구항 10

제 9항에 있어서, 탈용매화 단계는 상기 혼합물에 알코올류를 적하하는 것을 특징으로 하는 효소면역 측정용 효소볼 제조방법.

#### 청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 방법은 상기 알부민 응집체 제조 단계 이후에 가교제를 첨가하여 반응시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 효소면역 측정용 효소불 제조방법.

#### 청구항 12

제 9항에 있어서, 상기 알부민 100중량부 대비 효소 1~30중량부를 주입하는 것을 특징으로 하는 효소면역 측정용 효소불 제조방법.

#### 청구항 13

제 9 항에 있어서, 상기 방법은 상기 탈용매화 과정 중에 상기 혼합물의 pH를 조절하여 생성되는 알부민 응집체의 크기를 제어하는 것을 특징으로 하는 효소면역 측정용 효소불 제조방법.

#### 청구항 14

제 9 항에 있어서, 상기 항체를 결합시키는 단계는 스트렙타비딘을 상기 응집체 용액에 주입하여 반응시키는 단계 ; 및 상기 반응 후에 비오틴이 결합된 항체를 주입하여 반응시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 효소면역 측정용 효소불 제조방법.

#### 청구항 15

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 효소불과 항체가 고정된 자성 미세입자를 분석 대상 항원이 함유된 용액에 첨가하여 항원-항체 반응시키는 단계 ;

자력을 이용하여 항원-항체 반응물을 분리 및 세척하는 단계 ; 및

상기 효소불 내에 담지된 효소와 특이적으로 반응하는 기질 용액에 상기 항원-항체 반응물을 첨가하는 단계를 포함하는 항원 검출방법.

#### 청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 첨가단계는 상기 기질이 상기 효소 불 내부로 유입되어 효소 불 내부에 다수 존재하는 상기 효소와 반응하는 것을 특징으로 하는 항원 검출방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 효소 면역 측정용 효소 불 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 자세하게는 본 발명은 간편하고 신속하게 타겟물질을 고감도로 감지할 수 있는 효소 면역 측정용 효소 불 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 면역분석법(immunoassay)이란 시료의 분석과정에서 항체를 이용하는 기술을 의미한다. 초기에는 연구자들이 주로 단백질의 검출이나 정량을 위하여 이 방법을 사용하였으나, 최근에는 항체기술의 발전으로 저분자 화합물, 탄수화물, 지질 등의 분석 및 각종 미생물의 분석에도 활용하고 있다. 면역분석법은 그 검출 원리 및 방법에 따라 방사성 동위원소를 사용하여 신호를 검출하는 방사면역분석법(RIA: radio immunoassay), 효소에 의한 신호증폭을 사용하는 효소면역측정법(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, 혹은 EIA: enzyme immunoassay), 형광을 이용하여 검출하는 형광항체법(FA: fluorescence antibody technique), 화학발광을 사용하는 화학발광면역측정법(CLIA: chemiluminescence immunoassay) 등으로 나눌 수 있으며, 그 밖에도 표지물질의 사용 방법이나 기질의 종류에 따라 다양한 분류가 가능하다.

[0003] 여러 가지 면역분석법 중 현재 가장 많이 사용되고 있는 방법이 효소면역측정법이며, 상기 분석법은 항체의 활용 방법에 따라 직접효소면역측정법(Direct ELISA), 간접효소면역측정법(Indirect ELISA) 및 샌드위치효소면역측정법(Sandwich ELISA)의 3가지로 세분할 수 있다. 직접효소면역측정법은 고체표면에 고정된 항원에 효소와 연

결된 항체(Enzyme-linked Antibody)가 결합하면 효소가 기질의 반응을 촉매 함으로써 신호를 생성하게 된다.

- [0004] 간접효소면역측정법은 1차로 주항체(primary antibody)가 항원에 특이적인 결합을 하고, 2차로 효소가 연결된 보조항체(secondary antibody)가 주항체를 인식하여 결합한다. 이 상태에서 보조항체에 연결되어 있는 효소가 기질의 반응을 촉매 하여 신호를 내게 된다. 마지막으로, 가장 널리 사용되는 형태인 샌드위치 효소 면역측정법은 검출하려는 하나의 항원에 대하여, 인식부위(epitope)가 다른 2종의 항체를 사용하는 것이며, 검출하고자 하는 항원에 대한 높은 선택성을 나타내어 진단용으로도 많이 사용이 되고 있다. 하지만 상기 방법들을 사용하는 많은 연구자는 점점 더 높은 검출감도를 요구하고 있다(Yolken RH et al., J Clin Microbiol 10:317-21,1979).
- [0005] 도 1은 종래의 단일효소 결합항체를 이용한 샌드위치효소면역측정법을 나타낸 것이다. 상기 방법은 하나의 효소에 대하여 하나의 항체가 결합하므로, 효소와 기질의 반응에 의한 신호의 증폭에 한계가 있어, 저농도의
- [0006] 항원을 검출하기 어려운 문제가 있었다. 이를 해결하기 위해, 금과 실리카 등 다양한 종류의 나노입자들을 항체나 효소 표면에 결합시켜 사용하는 시도가 있었으나(Y. Wu, C. Chen, S. Liu, Anal. Chem., 81, 1600 (2009), H. S. Kim, B. K. Oh, BioChip J., 8, 1 (2014)), 여전히 간편하고 신속하게 타겟물질을 고감도로 감지할 수 있는 효소 면역 측정법에 대한 기술개발 요구가 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 간편하고 신속하게 타겟물질을 고감도로 감지할 수 있는 효소 면역 측정법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 하나의 양상은
- [0009] 효소 ;
- [0010] 자기 집합체(self-aggregates)를 형성하여 상기 효소를 내부에 담지하는 알부민 나노 응집체(파티클) ; 및
- [0011] 상기 알부민 나노 응집체(파티클) 표면에 부착된 항체를 포함하는 효소면역 측정용 효소볼에 관계한다.
- [0012] 다른 양상에서 본 발명은
- [0013] 알부민을 물에 녹인 후 여기에 효소를 주입하여 혼합물을 제조하는 단계 ;
- [0014] 상기 혼합물을 탈용매화하여 효소가 내부에 담지된 알부민 나노 응집체(파티클)를 제조하는 단계 ; 및
- [0015] 상기 응집체 표면에 항체를 결합시키는 단계를 포함하는 효소면역 측정용 효소볼 제조방법에 관계한다.
- [0016] 또 다른 양상에서, 본 발명은
- [0017] 상기 효소볼과 항체가 고정된 자성 미세입자를 분석 대상 항원이 함유된 용액에 첨가하여 항원-항체 반응시키는 단계 ;
- [0018] 자력을 이용하여 항원-항체 반응물을 분리 및 세척하는 단계 ; 및
- [0019] 상기 효소볼 내에 담지된 효소와 특이적으로 반응하는 기질 용액에 상기 항원-항체 반응물을 첨가하는 단계를 포함하는 항원 검출방법에 관계한다.

### 발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 효소면역 측정용 효소볼은 내부에 많은 양의 효소를 캡슐화하고 있고, 또한 내부로 기질이 유입될 수 있어 많은 양의 효소가 기질과 반응할 수 있으므로 항원 검출의 감도를 높일 수 있다. 또한, 본 발명의 효소볼은 생분해성이고, 탈용매법으로 쉽게 제조할 수 있고, 또한, 효소볼은 항체, 약물, 형광물질과 같은 다양한 물질과 효과적으로 결합될 수 있으므로 적용범위가 매우 광범위하다.

### 도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 종래의 단일효소 결합항체를 이용한 샌드위치효소면역측정법을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 효소면역 측정용 효소볼의 개념도이다.
- 도 3은 도 2의 효소볼을 제조하는 방법을 나타낸다.
- 도 4는 효소면역 측정을 이용한 항원 검출 방법을 나타낸다.
- 도 5는 실시예 1에서 제조한 효소볼의 TEM 사진이다.
- 도 6은 실시예 1과 비교예 1에서 pH를 달리하여 효소볼과 나노입자를 제조하고 크기를 측정한 것이다.
- 도 7은 실시예 1, 비교예 1, 2에 대해(동일한 물 값에 대해) 450nm에서 UV-vis 분광기로 흡수율을 측정한 것이다.
- 도 8은 흡수율 1을 달성하기 위해 필요한 실시예 1의 효소볼과 비교예 2의 HRP 물수를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명은 하기의 설명에 의하여 모두 달성될 수 있다. 하기의 설명은 본 발명의 바람직한 구체 예를 기술하는 것으로 이해되어야 하며, 본 발명이 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 도 2는 본 발명의 효소면역 측정용 효소볼의 개념도이다. 도 2를 참고하면, 상기 효소볼은 효소(10), 알부민 응집체(피티클)(20) 및 항체(30)를 포함한다.
- [0024] 상기 효소(10)는 본 발명에 사용될 수 있는 효소는 통상적인 ELISA 방법에 사용될 수 있는 것이면 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들면, 상기 효소는 상기 효소는 모트립신, 트립신, 서브틸리신, 파파인, 리파아제, 홀세라디쉬 페록시다아제, 소이빈 페록시다아제, 클로로 페록시다아제, 망가네이제 페록시다아제, 티로시나아제, 락카아제, 셀룰라아제, 사일라네이즈, 락타아제, 수크라아제, 오가노포스포히드로라아제, 클로리네스테라아제, 글루코스 옥시다아제, 알코올 데히드로제나아제, 글루코스 데히드로제나아제, 히드로제나아제 및 글루코스 이소머라아제로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0025] 상기 효소(1)는 상기 알부민 응집체(20)(파티클)에 분산되어 존재할 수 있다.
- [0026] 상기 알부민 응집체(파티클)(20)는 자기 집합체를 형성하며 상기 효소를 내부에 담지한다.
- [0027] 상기 알부민은 소혈청 알부민, 인간혈청 알부민 또는 이의 단편일 수 있다.
- [0028] 상기 알부민은 생체 세포나 체액중에 넓게 분포되어 있는 단순 단백질로 글로불린과 함께 세포의 기초 물질을 구성한다. 상기 알부민은 응집성이 있어 자기 집합체(self-aggregates)를 형성할 수 있다. 또한, 상기 알부민은 응집되면서 상기 효소를 내부에 가두어 저장(entrap)할 수 있다. 상기 알부민은 응집되면서 나노입자(particle)를 형성할 수 있다.
- [0029] 상기 효소(10)는 상기 알부민 나노 응집체(20)에 1~30중량%, 바람직하게는 10중량% 담지될 수 있다.
- [0030] 상기 효소를 내부에 담지하는 상기 알부민 응집체(20)는 크기가 100~300nm, 바람직하게는 150~250nm 일 수 있다.
- [0031] 상기 알부민 응집체(20)는 내부로 상기 효소(10)와 특이적으로 반응하는 기질이 유입될 수 있다. 추가로 설명할 내용이 있으면 기재하여 주세요.
- [0032] 상기 항체(30)는 타겟물질인 항원과 면역반응을 수행하는 것으로서, 검출하려는 항원의 종류에 따라 적절하게 부착될 수 있다.
- [0033] 상기 항체(30)가 상기 알부민 응집체(20) 표면에 용이하게 부착되도록 링커(40)가 이들 사이에 위치될 수 있다. 예를 들면, 상기 링커(40)로 스트렙타비딘(41)과 비오틴(42)의 결합을 활용할 수 있다. 상기 스트렙타비딘(41) 분자는 4개의 비오틴(42)과 결합할 수 있고, 스트렙타비딘(41)과 비오틴(42)의 결합은 물리적으로나 화학적으로 안정하기 때문에, 항체와 알부민 응집체 사이에 링커로 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명은 상기 알부민 응집체 표면에 가교제를 코팅하여 알부민 나노 응집체의 안정성을 높일 수 있다.
- [0035] 상기 가교제는 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)일 수 있다.
- [0036] 다른 양상에서, 본 발명은 효소면역 측정용 효소볼 제조방법에 관계한다. 도 3은 도 2의 효소볼을 제조하는 방

법을 나타낸다.

- [0037] 도 3을 참고하면, 본 발명의 효소불 제조방법은 혼합물을 제조하는 단계, 알부민 응집체를 제조하는 단계 및 상기 응집체 표면에 항체를 결합시키는 단계를 포함한다.
- [0038] 상기 혼합물을 제조하는 단계는 상기 알부민과 효소를 물에 혼합하는 단계이다. 상기 단계는 상기 알부민 100중량부 대비 효소 1~30중량%, 바람직하게는 10중량%를 혼합할 수 있다.
- [0039] 상기 알부민 응집체 제조 단계는 알부민을 나노파티클로 입자화하면서 내부에 상기 효소를 담지하는 단계이다. 상기 알부민의 응집 및 입자화는 탈용매(디졸베이션(desolvation))법을 이용하여 입자 응집을 유도하여 안정적이고 균일한 크기의 입자를 제작할 수 있다. 상기 혼합물의 탈용매는 에탄올을 상기 혼합물이 불투명해질 정도로 소정량 적정하여 수행할 수 있다.
- [0040] 상기 방법은 상기 탈용매화 과정 중에 상기 혼합물의 pH를 조절하여 생성되는 알부민 응집체(파티클)의 크기를 제어할 수 있다. 상기 혼합물의 pH는 6~8일 수 있다. 상기 혼합물의 pH가 높을수록 알부민 응집체의 크기를 줄일 수 있다.
- [0041] 상기 방법은 상기 알부민 응집체를 제조한 후 가교제를 첨가하여 반응시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0042] 상기 항체를 결합하는 단계는 응집체 표면에 항체를 결합시키는 단계이다.
- [0043] 상기 항체는 링커를 사용하여 상기 알부민 응집체에 결합시킬 수 있는데, 예를 들면, 상기 링커로는 스트렙타비딘과 비오틴을 사용할 수 있다.
- [0044] 좀 더 구체적으로는, 상기 항체를 결합시키는 단계는 스트렙타비딘을 상기 응집체(파티클) 용액에 주입하여 반응시키는 단계 ; 및 상기 반응 후에 비오틴이 결합된 항체를 주입하여 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0045] 도 3을 참고하면, 알부민 응집체(20) 표면에 스트렙타비딘을 부착시킨 후(41), 비오틴이 결합된 항체를 주입하여 스트렙타비딘과 비오틴의 결합을 유도하여 항체(30)를 응집체 표면(20)에 부착할 수 있다.
- [0046] 도 4는 효소면역 측정을 이용한 항원 검출 방법을 나타낸다. 도 4를 참고하면, 상기 방법은 항원-항체 반응 단계, 분리 단계 및 효소 반응 단계를 포함한다.
- [0047] 상기 항원-항체 반응 단계는 분석 대상 타겟 항원이 함유된 용액에 상기 효소불(100)과 항체가 고정된 자성 미세입자(200)를 첨가하여 반응시키는 단계이다.
- [0048] 상기 효소불(100)은 앞에서 상술한 효소불을 사용할 수 있다.
- [0049] 상기 자성 미세 입자(200)는 자력을 가진 공지된 입자를 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 자성입자 표면에는 분석대상 항원에 특이적인 항체(210)가 고정된다.
- [0050] 상기 항원-항체 반응은 상기 효소불(100)과 자성미세입자(200)과 항원에 각각 특이적으로 결합한다.
- [0051] 도 4를 참고하면, 본 발명은 항원-항체 반응 이후에 자력을 가해 미반응된 잔류물과 항원-항체 반응물을 분리하고 이를 세척하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0052] 상기 효소반응은 상기 항원-항체 반응물과 상기 효소불 내에 담지된 효소와 특이적으로 반응하는 기질을 혼합하는 단계이다. 예를 들면, 상기 기질이 함유된 용액에 상기 항원-항체 반응물을 첨가하면, 상기 기질이 상기 효소불 내부로 침투하여 효소와 반응한다. 상기 효소반응에 의해 효소가 발색하여 항원의 존재 여부를 확인할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 효소불은 내부에 많은 양의 효소를 캡슐화하고 있고, 또한 내부로 기질이 유입될 수 있으므로 종래 공지된 효소면역법에 비해 기질과 반응하는 효소의 양이 수 십배 이상 많으므로 항원 검출의 신호를 높일 수 있다. 또한, 본 발명의 효소불은 반응에 참여할 수 있는 효소의 양이 많으므로 저농도의 항원에도 쉽게 효소반응이 일어날 수 있으므로 민감도를 높일 수 있다.
- [0054] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해 바람직한 실시 예를 제시하지만, 하기의 실시 예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0055] 실시예 1
- [0056] 효소볼의 합성
- [0057] BSA(bovine serum albumin, 20 mg/ml, 100 )를 pH 8로 적정한 후, 여기에 HRP(horseradish peroxidase) 용액 (25 mg/ml, 8 )을 혼합하였다. 믹서로 교반 중에 에탄올을 용액이 불투명해질때까지 떨어뜨렸으며, 상기 혼합물을 12시간 이상 가교시켰다. 다음으로, 4%의 글루타르알데히드 용액을 상기 불투명 용액에 첨가하였다. 생성된 입자들을 탈이온수로 1 ; 10 정도로 희석하였다.
- [0058] 이어서, 1mg/ml의 스트렙타비딘을 아민 활성화된 상기 효소볼 용액에 주입하였다. 이어서 3시간 동안 상온에서 인큐베이션시켰다. 반응 후에, 효소볼을 원심분리기로 분리한 후 0.05%의 트윈 20(tween 20)을 함유하는 PBS용액에 재분산시켰다. 다음으로, 비오틴이 결합된 anti-PSA를 상기 효소볼에 첨가하였다. 4℃에서 3시간 동안 인큐베이션시켜 비오틴과 스트렙타비딘을 반응시켜 항체가 결합된 효소볼을 수득하였다.
- [0059] 항체가 고정된 자성미세입자의 제조
- [0060] Dynabeads M-280(Tosyl기 활성화)를 물에 분산시켰다. 분산액 33.3 $\mu$ l(30 mg/ml)를 1.5ml 튜브로 옮겼다. 상등액을 제거하고, 0.1M의 보레이트 버퍼(pH 9.5) 용액을 상기 용액에 첨가하여 토실기(tosyl group)를 아민기로 치환하였다. 상기 용액을 2분정도 격렬하게 혼합한 후 자석 위에 놓았다. 상등액을 제거하고 상기 치환 단계를 반복하였다. 자성미세입자를 분리한 후에 0.1M 1ml 보레이트 버퍼와 anti-PSA 용액(2mg/ml)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 37℃ 정도로 인큐베이션시켜 항체를 자성입자에 고정하였다. 상기 결합 반응 후에 분리하는 자력을 이용하였다. 상등부를 다시 제거하고, 세척을 하였다. 0.5% BSA(100ml PBS버퍼용액)를 블로킹 버퍼로 첨가한 후 37℃에서 1시간 정도 인큐베이션하였다. 이어서, 자력에 의한 분리를 수행하였다. 최종 수득물을 다시 0.1% BSA(100ml PBS버퍼) 용액에 재분산시켜 4℃에 보관하였다.
- [0061] PSA의 검지
- [0062] 앞에서 제조된 자성미세입자와 효소볼을 PSA 용액에 첨가하였다. 상기 혼합물을 37℃에서 25분간 인큐베이션하였다. 자력으로 상등액을 분리한 후 제거하였다. 1ml의 세척 버퍼(10 mM PBS solution containing 0.1% BSA and 0.05% Tween 20, pH 7.4)를 분리된 각 생성물에 첨가하였다. 상등액을 제거하고 세척단계를 다시 수행하였다. 250 $\mu$ l의 증류수를 첨가한 후 다시 인큐베이션하였다. 반응 후에 혼합물을 자석 위에 놓은 다음 30분 동안 상온에서 TMB 용액과 반응시켰다. 상기 반응을 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 사용하여 중지시켰다. 생성물을 450nm에서 UV-vis 분광기로 흡수율을 측정하였다.
- [0063] 비교예 1
- [0064] 비교예 1은 실시예 1의 효소볼 제조에서 HRP를 첨가하지 않고 BSA(bovine serum albumin)만을 사용하여 나노 입자를 제조한 것을 제외하고 실시예 1과 동일하게 수행하였다.
- [0065] 비교예 2
- [0066] 비교예 2는 실시예 1에서 사용한 HRP를 별도의 효소볼 합성 없이 기질인 TMB 용액과 반응시켰다. 이어서, 반응물을 450nm에서 UV-vis 분광기로 흡수율을 측정하였다.
- [0067] 도 5는 실시예 1에서 제조한 효소볼의 TEM 사진이다. 도 5를 참고하면, 알부민 입자가 응집화되면서 효소를 내부에 캡슐화한 구형의 효소볼이 제조되었음을 확인할 수 있다.
- [0068] 도 6은 실시예 1과 비교예 1에서 pH를 달리하여 효소볼과 나노입자를 제조하고 크기를 측정한 것이다.
- [0069] 도 6을 참고하면, 실시예 1의 효소볼은 pH가 작아질수록 입자 사이즈가 작아짐을 확인할 수 있다. 또한, 실시예 1의 효소볼은 비교예 1의 입자에 비해 좀 더 큰 사이즈를 가지는데, 이것은 내부에 효소를 다수 함유하기 때문이다.
- [0070] 도 7은 실시예 1, 비교예 1, 2에 대해(동일한 몰 값에 대해) 450nm에서 UV-vis 분광기로 흡수율을 측정한 것이

다. 도 6을 참고하면, 실시예 1이 비교예 1 및 2 보다 40 배 이상 높은 흡수율, 즉 신호 감도를 보여준다. 이것은 비교예 1, 2에 비해 실시예 1이 훨씬 많은 효소를 내부에 담지하고 있어 효소반응이 더욱 활발하게 일어나기 때문이다.

[0071] 도 8은 흡수율 1을 달성하기 위해 필요한 실시예 1의 효소볼과 비교예 2의 HRP 물수를 나타낸 것이다. 도 8을 참고하면, 450nm 파장대의 가시광을 흡수하는 데 HRP 물수가 200배 더 필요함을 확인할 수 있다.

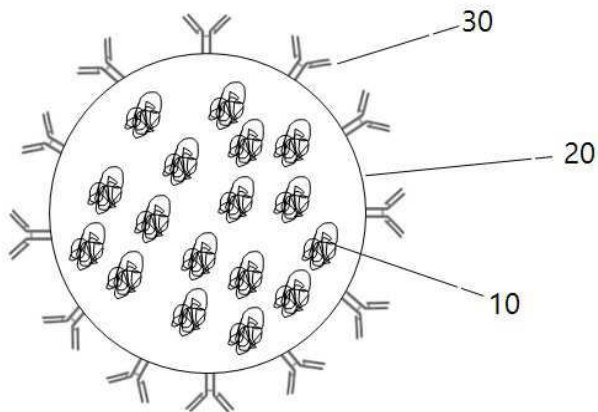
[0072] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속하는 것으로, 본 발명의 구체적인 보호범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

## 도면

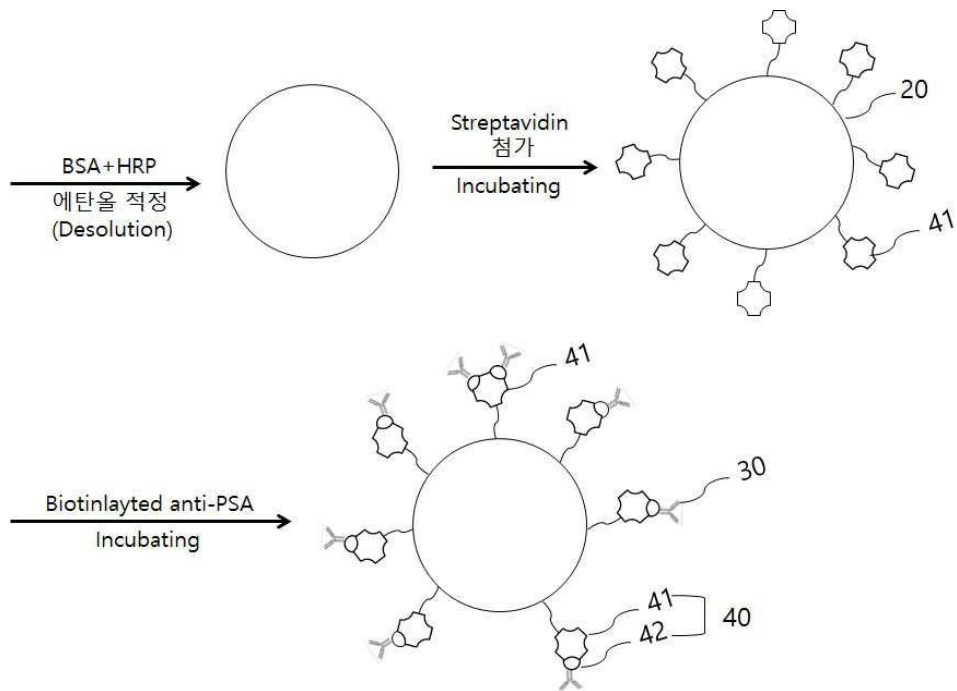
### 도면1



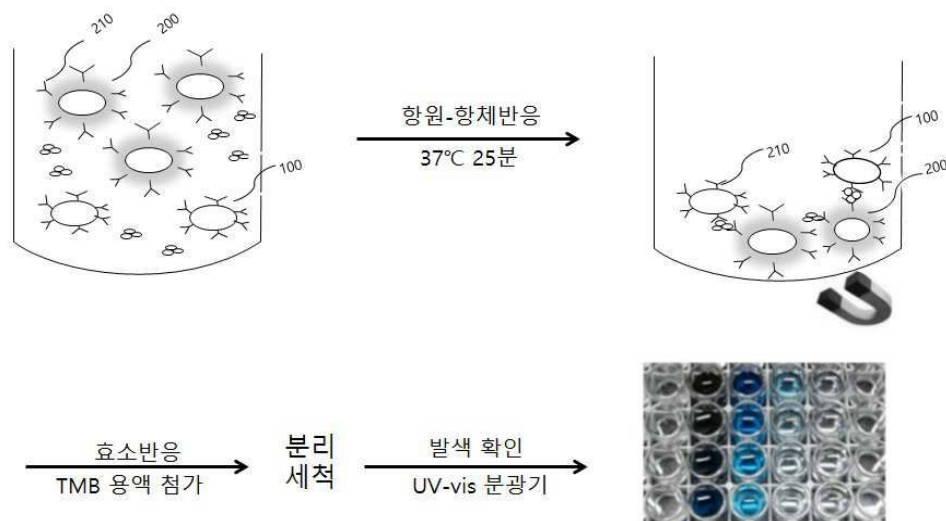
### 도면2



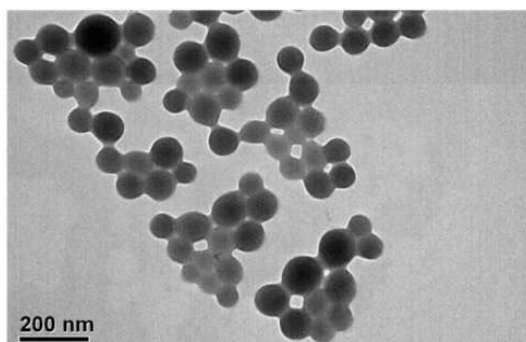
도면3



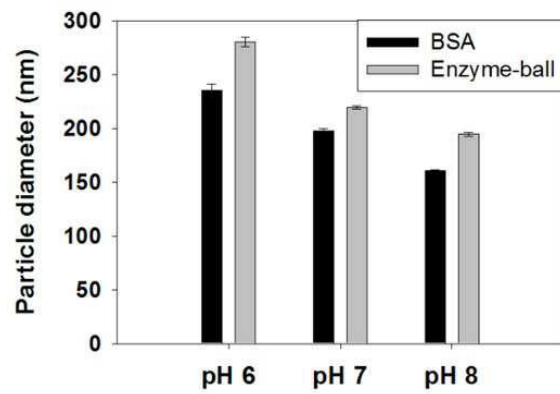
도면4



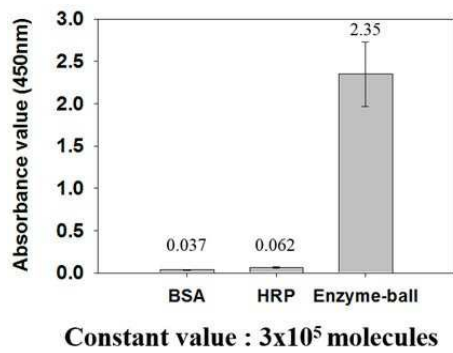
도면5



도면6



도면7



도면8

