	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2012-0038657 2012년04월24일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/52</i> (2006.01) (21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	(71) 출원인 한국과학기술원 대전 유성구 구성동 373-1 (72) 발명자 박현규 대전광역시 유성구 대학로 291, 한국과학기술원 생명화학공학과 5101호 (구성동) 박기수 대전광역시 유성구 대학로 291, 한국과학기술원 생명화학공학과 2107호 (구성동) 김문일 대전광역시 유성구 대학로 291, 한국과학기술원 생명화학공학과 2107호 (구성동) (74) 대리인 이처영		

전체 청구항 수 : 총 15 항

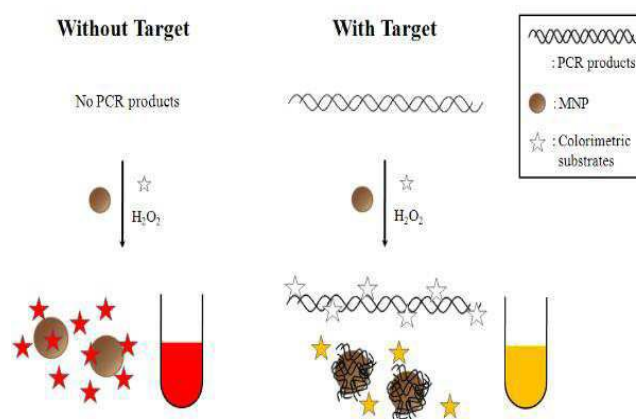
(54) 발명의 명칭 과산화효소 활성을 가지는 자성 나노입자 기반의 발색반응 현상을 이용한 핵산 및 생체물질 검출방법

### (57) 요약

본 발명은 과산화효소 (peroxidase) 활성을 가지는 자성 나노입자에 의한 발색반응 현상을 이용하여 핵산을 검출하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 핵산 증폭산물이 존재하는 경우, 핵산이 자성 나노입자에 흡착하고 발색반응 기질과 상호작용함으로써 자성 나노입자의 촉매작용을 저해하며, 이로 인해 발색반응이 감소하게 되는 현상을 이용한 표적 핵산을 검출하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 자성나노입자를 이용한 핵산을 검출하는 방법은 표적핵산을 단시간 내에 육안으로 간단하게 확인할 수 있고, 본 핵산 검출방법을 이용한 자성나노입자 기반 발색 센서를 제공함으로써 현장진단 관련 장치 및 시스템을 개발할 수 있으며, 다양한 원인균 감염 진단, 유전자 재조합 생물체 (GMO; genetically modified organisms) 검사, 법의학 수사 등에 보편적으로 활용될 수 있어 유용하다. 또한, 본 발명에 따른 자성나노입자를 이용한 검출방법은 핵산의 검출뿐만 아니라 다른 생체 물질 및 화학 물질의 검출에도 적용될 수 있다.

### 대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0080602

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업-중견연구자지원사업-도약연구지원(도전연구)사업

연구과제명 초고감도 생체물질 진단을 위한 등온/정량 핵산증폭 원천 핵심기술의 개발

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2010.03.01 ~ 2011.02.28

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

다음의 단계를 포함하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산의 검출방법:

- (a) 표적핵산의 증폭산물을 제조하는 단계;
- (b) 상기 증폭산물과 자성 나노입자 용액의 혼합용액을 제조하는 단계;
- (c) 상기 혼합용액에 발색반응 기질을 첨가하여 발색반응을 유도하는 단계; 및
- (d) 상기 발색반응에 따른 색 변화를 관찰하는 단계.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 발색반응 기질은 TMB(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 및 OPD(o-phenylenediamine)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산의 검출방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (b)단계에서 상기 유전자 증폭산물과 5mg/ml의 자성 나노입자 용액을 7-9:1의 부피비로 혼합하는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산의 검출방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 자성 나노입자의 크기는 11-15nm인 것을 특징으로 하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산의 검출방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 자성 나노입자 용액의 용매는 무기용매인 것을 특징으로 하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산의 검출방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 자성 나노입자 용액의 농도는 4-6 mg/ml인 것을 특징으로 하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산의 검출방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 색 변화는 핵산 증폭산물과 자성 나노입자 용액의 혼합용액이 기질의 첨가에 의해 노란색을 나타내는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산의 검출방법.

### 청구항 8

다음의 단계를 포함하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산 검출용 조성물의 제조방법:

- (a) 표적핵산의 증폭산물을 제조하는 단계;
- (b) 상기 증폭산물과 자성 나노입자 용액의 혼합용액을 제조하는 단계; 및
- (c) 상기 혼합용액에 발색반응 기질을 첨가하여 핵산 검출용 조성물을 수득하는 단계.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 발색반응 기질은 TMB(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 및 OPD(o-phenylenediamine)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산 검출용 조성물의 제조방법.

#### 청구항 10

제8항에 있어서, 상기 (b)단계에서 상기 유전자 증폭산물과 5mg/ml의 자성 나노입자 용액을 7-9:1의 부피비로 혼합하는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산 검출용 조성물의 제조방법.

#### 청구항 11

제8항에 있어서, 상기 자성 나노입자의 크기는 11-15nm인 것을 특징으로 하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산 검출용 조성물의 제조방법.

#### 청구항 12

제8항에 있어서, 상기 자성 나노입자 용액의 용매는 무기용매인 것을 특징으로 하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산 검출용 조성물의 제조방법.

#### 청구항 13

제8항에 있어서, 상기 자성 나노입자 용액의 농도는 4-6 mg/ml인 것을 특징으로 하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산 검출용 조성물의 제조방법.

#### 청구항 14

표적핵산의 증폭산물, 자성 나노입자 용액 및 발색반응 기질을 함유하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산 검출용 조성물.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 발색반응 기질은 TMB(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 및 OPD(o-phenylenediamine)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산 검출용 조성물.

### 명세서

### 기술분야

본 발명은 과산화효소 (peroxidase) 활성을 가지는 자성 나노입자에 의한 발색반응 현상을 이용하여 핵산을 검

출하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 핵산 증폭산물이 존재하는 경우, 핵산이 자성 나노입자에 흡착하고 발색반응 기질과 상호작용함으로써 자성 나노입자의 촉매작용을 저해하며, 이로 인해 발색반응이 감소하게 되는 현상을 이용한 표적 핵산을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0002]

## 배경 기술

[0003]

대부분의 유전자 진단은, 표적 유전자를 중합연쇄반응(PCR; polymerase chain reaction) 기법으로 증폭한 후 전기영동(electrophoresis)을 통하여 젤 밴드의 유무를 확인함으로써 수행되고 있다. 이러한 기존의 전기영동을 기반으로 하는 진단 방법은 진단 시간이 길고 숙련된 기술을 요구하기 때문에 일반 병원이나 진단이 필요한 현장에서 직접 수행하기 어려운 문제점이 있었다.

[0004]

이러한 문제점을 해결하기 위하여 현장에서 신속, 간편하게 육안으로 핵산을 진단할 수 있는 발색 진단 기술이 제안되어 왔으며, 이를 위하여 공액고분자 (Jung *et al.* *Adv. Funct. Mater.*, 18:701-708, 2008) 혹은 금속 나노입자 등이 이용되어 오고 있다. 그 중에서도 금 나노입자 콜로이드 용액을 이용하여 PCR 증폭 산물을 포함한 핵산을 색 전이 방법으로 탐지하는 기술이 주목받고 있으며, 이를 위해 프루브(probe) 올리고뉴클레오타이드로 기능화된 금 나노 입자를 이용하며, 표적핵산 (target DNA) 존재 시, 프루브 올리고뉴클레오타이드와의 혼성화(hybridization)에 의해 교차결합(cross-linking)을 형성하게 되고, 이로 인하여 콜로이드 용액이 색 전이를 보이게 된다 (Elghanian *et al.*, *Science*, 277(5329): 1078-1081, 1997). 그 외에도 단일가닥 DNA와 이중가닥 DNA의 금 나노입자에 대한 서로 다른 정전기적 성질을 이용하여 증폭된 핵산을 색 전이로 탐지하는 방법들이 보고되고 있다 (Li, H. X. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 126:10958-10961, 2004). 하지만, 금 나노 입자의 색 전이를 이용한 표적 핵산 진단 방법은 여러 문제점을 가지고 있다. 첫 번째로 표적 핵산의 진단 전에 금 나노입자 표면에 프로브 DNA를 붙이는 과정이 필요하며, 이 과정은 시간이 오래 걸리고 숙련된 기술을 요구한다. 두 번째로 표적 핵산과 금 나노 입자의 반응 뒤에 색 전이를 유발하기 위해 용액 속에 염을 첨가해야한다. 하지만, 이 과정에서 색 전이 현상이 염 농도에 매우 민감하기 때문에 잘못된 진단 결과를 유도할 수 있으며, 이를 방지하기 위해서는 오랜 시간의 최적화 과정이 필요하다.

[0005]

한편, 자성 나노입자가 과산화효소 활성을 가진다는 사실이 알려져 있다(Gao *et al.*, *Nat. Nanotechnol.* 2:577 - 583, 2007). 이러한 사실을 토대로 증폭된 핵산산물이 자성 나노입자의 과산화효소 활성을 저해시키는 원리를 규명하고 이를 이용한 핵산 검출방법을 제공하고자 한다.

[0006]

이에, 본 발명자들은 전술한 종래 기술들의 문제점을 해결하며 육안으로 쉽고 간편하게 표적 물질의 유무를 감지할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 기질 혼합 용액 내에 표적 DNA로부터 증폭된 핵산이 존재하는 경우에는 핵산이 자성입자의 과산화효소 활성을 저해하여 증폭된 핵산이 존재하지 않을 때와 비교할 때, 색 차이를 나타내는 것을 확인함과 아울러, 이 방법은 자성 나노입자에 DNA를 표지하는 과정이나 추가적인 염의 첨가 과정이 필요 없고 빠르고 간단하게 핵산을 진단할 수 있다는 것을 확인함으로써, 핵산의 유무를 DNA 서열에 관계없이 범용적으로 진단할 수 있는 자성 나노입자 기반 발색 센서를 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007]

본 발명의 목적은 자성 나노입자 용액에 핵산분자가 존재하면 음전하를 띄는 핵산이 이온결합에 의해 자성 나노입자에 흡착하고, 발색반응 기질용액을 첨가할 경우에 핵산이 양전하를 띄는 발색반응 기질과 정전기적으로 상호작용함으로써 자성 나노입자와 발색반응 기질의 접촉이 제한되어 자성 나노입자의 과산화효소 활성이 저해되므로, 핵산분자와 자성 나노입자 용액의 혼합물에 기질을 첨가하여 발색반응을 유도하고 색 변화를 측정함으로써, 핵산을 검출하는 방법을 제공하는 데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0008]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

- [0009] (a) 표적핵산의 증폭산물을 제조하는 단계;
- [0010] (b) 상기 증폭산물과 자성 나노입자 용액의 혼합용액을 제조하는 단계;
- [0011] (c) 상기 혼합용액에 발색반응 기질을 첨가하여 발색반응을 유도하는 단계; 및
- [0012] (d) 상기 발색반응에 따른 색 변화를 관찰하는 단계를 포함하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한,
- [0014] (a) 표적핵산의 증폭산물을 제조하는 단계;
- [0015] (b) 상기 증폭산물과 자성 나노입자 용액의 혼합용액을 제조하는 단계; 및
- [0016] (c) 상기 혼합용액에 발색반응 기질을 첨가하여 핵산 검출용 조성물을 수득하는 단계를 포함하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산 검출용 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 표적핵산의 증폭산물, 자성 나노입자 용액 및 발색반응 기질을 함유하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산 검출용 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따른 자성나노입자를 이용한 핵산을 검출하는 방법은 표적핵산을 단시간 내에 육안으로 간단하게 확인할 수 있고, 본 핵산 검출방법을 이용한 자성나노입자 기반 발색 센서를 제공함으로써 현장진단 관련 장치 및 시스템을 개발할 수 있으며, 다양한 원인균 감염 진단, 유전자 재조합 생물체 (GMO; genetically modified organisms) 검사, 법의학 수사 등에 보편적으로 활용될 수 있어 유용하다. 또한, 본 발명에 따른 자성나노입자를 이용한 검출방법은 핵산의 검출뿐 아니라 다른 생체 물질 및 화학 물질의 검출에도 적용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 과산화효소 활성을 가지는 자성 나노입자에 의한 발색반응 현상을 이용한 표적핵산을 검출하는 원리를 나타낸 개략도이다.
- 도 2는 서로 다른 기능기를 가진 자성나노입자에 DNA 를 첨가하였을 때 자성 나노입자의 과산화효소 활성이 저해되어 결과적으로 감소된 발색반응 현상을 나타낸 사진과 자외선 및 가시광선 분광분석법으로 스캔한 결과 그래프이다 (a: 수산기의 자성 나노입자, b: 아민기의 자성 나노 입자, c: 덴드리머의 자성 나노 입자).
- 도 3은 수산기의 자성나노입자에 서로 다른 농도의 표적 핵산을 첨가하였을 때 자성 나노입자의 과산화효소 활성이 저해되어 결과적으로 감소된 발색반응 현상을 나타낸 사진과 자외선 및 가시광선 분광분석법으로 스캔한 결과 그래프이다 (도 3 A). 자성나노입자 센서를 이용해서 감지 가능한 핵산 농도를 확인하기 위한 calibration 곡선이다 (도 3 B).
- 도 4는 표적핵산의 증폭산물의 길이가 각각 200bp, 600bp 및 1200bp 일 때, 자성나노입자의 과산화효소 활성이 저해되어 결과적으로 감소된 발색반응 현상을 자외선 및 가시광선 분광분석법으로 스캔한 결과 그래프이다.
- 도 5는 외부 자력을 이용한 자성 나노입자의 효율적 분리 및 재사용 가능 여부를 자외선 및 가시광선 분광분석법으로 스캔한 결과 그래프이고 숫자는 재사용 되어진 회수를 나타낸다(C: 대조군, T: 실험군).
- 도 6는 표적 핵산에 의한 자성 나노입자의 과산화효소 활성 저해 원리 이해를 위해 나노 드랍 (Nanodrop) 분광 분석법에 의해 측정된 상층부 및 자성나노입자에 흡착된 표적 핵산의 양을 나타내는 표이며 (도 6 A), 도 6의 B 는 표적핵산의 증폭산물이 존재하지 않는 대조군 샘플 (도 6 B (1)), 표적 핵산의 증폭 산물을 가한 샘플 (도 6 B (3)) 및 표적 핵산의 증폭 산물을 가한 후 자성나노입자를 상층액으로부터 분리하여 상층액을 제거한 뒤 다시 사용한 샘플 (도 6 B (2))의 발색반응에 의해 나타난 색 차이를 자외선 및 가시광선 분광분석법으로 스캔한 결과 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0021] 본 발명에서는 자성 나노입자가 과산화효소 활성을 가진다는 공지의 사실(Gao *et. al.*, *Nat. Nanotechnol.* 2:577 - 583, 2007) 을 토대로, PCR 을 통해 증폭된 핵산산물이 자성 나노입자의 과산화효소 활성을 저해시킨다는 원리를 규명하였으며, 이를 이용하여 표적 핵산의 존재 유무를 검출할 수 있음을 확인하였다.
- [0022] 본 발명은 일 관점에서, (a) 표적핵산의 증폭산물을 제조하는 단계; (b) 상기 증폭산물과 자성 나노입자 용액의 혼합용액을 제조하는 단계; (c) 상기 혼합용액에 발색반응 기질을 첨가하여 발색반응을 유도하는 단계; 및 (d) 상기 발색반응에 따른 색 변화를 관찰하는 단계를 포함하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산을 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 자성 나노입자의 발색반응 기질은 어느 것이나 쓸 수 있고, TMB(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 및 OPD(o-phenylenediamine)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게는 음전하를 띄는 표적 핵산과의 전기적 결합을 통해서 자성나노입자로의 접근을 최대한 저해할 수 있는 양전하를 띄는 OPD (o-phenylenediamine)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계에서 상기 유전자 증폭산물과 5mg/ml의 자성 나노입자 용액을 7-9:1의 부피비로 혼합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 자성 나노입자의 크기는 11-15nm인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 자성 나노입자 용액의 용매는 무기용매라면 제한 없이 사용할 수 있으며, 물을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 자성 나노입자 용액의 농도는 4-6 mg/ml인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 색 변화는 표적핵산의 증폭산물과 자성 나노입자 용액의 혼합용액에 기질용액을 첨가한 경우에, 자성 나노입자의 발색반응으로 노란색으로 변화되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 표적핵산의 증폭산물을 제조하는 단계; (b) 상기 증폭산물과 자성 나노입자 용액의 혼합용액을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 혼합용액에 발색반응 기질을 첨가하여 핵산 검출용 조성물을 수득하는 단계를 포함하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산 검출용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명은 또 다른 관점에서, 표적핵산의 증폭산물, 자성 나노입자 및 발색반응 기질을 함유하는 자성 나노입자의 발색반응을 이용한 핵산 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명에 따른 핵산 검출방법은 데옥시리보오스-포스페이트 (deoxyribose-phosphate) 기본 골격구조로 인해 음전하를 띄는 표적핵산의 특성을 이용한다. 구체적으로는, 검사용액 내에 음전하를 띄는 표적 핵산이 양전하를 띄는 발색반응 기질과 정전기적으로 상호작용함으로써 발색반응 기질이 자성나노입자로 접근하는 것을 방해하고, 또 다른 한편으로는 표적 핵산이 이온결합에 의해 자성나노입자에 흡착함으로써 발색 기질이 자성나노입자와 직접적으로 접촉하는 것을 저해하게 되고, 결과적으로 효소-기질 복합체 형성을 제한하게 된다. 이로 인하여 자성 나노 입자는 감소된 과산화효소 활성을 가지게 되고, 감소된 발색반응 기질의 산화로 인하여, 발색반응 기질의 흡수파장에서 줄어든 흡광도를 나타내게 되며, 이러한 색 차이를 통하여 표적 핵산의 존재 유무를 진단할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에서는, 발색반응 기질로써 음전하를 띄는 표적 핵산과의 전기적 결합을 통해서 자성나노입자로의 접근을 최대한 저해할 수 있는 양전하를 띄는 OPD (o-phenylenediamine)를 사용하였다. 음전하를 띄는 표적 핵산이 양전하를 띄는 발색반응 기질 OPD와 정전기적으로 상호작용하고 자성 나노입자와 이온결합을 함으로써, 발색반응 기질 OPD가 자성 나노입자와 접촉하는 것이 저해되어 효소-기질 복합체의 형성이 저해되고, 결국 감소된 발색반응 기질의 산화로 인하여 발색반응 기질 OPD의 흡수파장 450nm에서 줄어든 흡광도를 나타내게 되며, 이러한 색 차이를 통하여 표적 핵산의 존재 유무를 진단할 수 있다는 것을 규명하였다.
- [0033] 본 발명에서는 자성 나노입자의 감소된 과산화효소 활성에 대한 상기 자성 나노입자와 표적핵산과의 이온결합의 영향을 알아보기 위하여, 자성 나노입자는 다양한 기능기(수산기, 아민기, 텐드리머)를 가지도록 화학적으로 합성되었으며, 그 결과, 기능기에 따른 차이점을 발견할 수 없었다. 본 발명에 있어서, 자성 나노입자는 수산기,



아민기 및 덴드리머 중 선택되는 기능기를 가질 수 있으며, 합성이 가장 용이한 수산기의 자성나노입자를 이용하여 핵산 검출을 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에서는, (a) 단계의 표적 핵산으로 임상적으로 유용한 비노생식기 감염균 중의 하나인 *Chlamydia trachomatis* 을 선택하고, 실제 임상 샘플을 이용하여 *Chlamydia trachomatis* 의 독성 단백질을 발현하는 유전자부분을 증폭하였다. Primer 3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)) 프로그램을 사용하여 디자인된 프라이머를 이용하여 PCR 증폭이 수행되며 표적 핵산의 증폭 산물을 수득할 수 있고, 수득된 증폭산물은 DNA 정제 키트 (QIAGEN) 를 이용하여 프라이머, buffer의 염 및 dNTPs를 제거함으로 순수하게 정제된 증폭 핵산 산물을 얻을 수 있었다. 또한, (c)단계에서는 혼합용액 45  $\mu$ l에 95  $\mu$ l 0.2 M sodium acetate buffer (pH 4.0), 40  $\mu$ l 60 mM OPD 및 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) 를 차례로 첨가한 후에, 43℃에서 30분간 반응시킴으로써 발색 반응을 관찰하였다.

[0035] 본 발명에 따르면, 표적 핵산이 존재하는 샘플은 검사용액 내에 음전하를 띄는 표적 핵산이 양전하를 띄는 발색 반응 기질 OPD와 정전기적으로 상호작용함으로써 발색반응 기질이 자성나노입자로 접근하는 것을 방해하고, 또 다른 한편으로는, 표적 핵산이 이온결합에 의해 자성나노입자에 흡착함으로써 발색반응 기질 OPD가 자성나노입자와 직접적으로 접촉하는 것을 제한하게 되며, 결과적으로 효소-기질 복합체 형성을 저해하게 된다. 이로 인하여 자성 나노입자는 감소된 과산화효소 활성을 가지게 되고, 감소된 발색반응 기질의 산화로 인하여, 발색반응 기질 OPD의 흡수파장 450nm에서 줄어든 흡광도를 나타내고 노란색을 나타낸다. 반면, 표적 핵산이 존재하지 않는 대조군 샘플은 자성 나노입자의 과산화효소 활성을 저해하는 요소가 없으므로, 발색반응 기질 OPD가 충분히 산화되어, 발색반응 기질의 흡수파장 450 nm에서 높은 흡광도를 나타내고 붉은 색을 나타내게 된다. 이러한 색 차이를 이용하여 표적 핵산을 손쉽게 검출할 수 있다(도 1).

[0036] 본 발명에 따른, 자성 나노입자의 발색반응 현상을 이용한 핵산 검출방법은 PCR 등의 증폭공정을 통해 수득한 표적핵산을 자성 나노입자 용액과 혼합한 후, 발색반응 기질 용액의 첨가를 통해 이루어지며, 표적핵산의 과산화효소 활성 저해를 통해 결과적으로 감소된 발색반응 현상을 나타내게 되고, 이러한 색 차이를 이용하여 표적 핵산을 손쉽게 검출하는 것에 그 특징이 있다. 결국, 표적핵산이 존재할 경우, 특정 유전자의 프라이머가 PCR 증폭을 일으켜 표적핵산의 증폭산물이 생성되게 되고, 증폭된 표적 핵산은 용액 내의 발색 기질과 정전기적으로 상호작용함으로써 발색 기질이 자성나노입자로 접근하는 것을 방해하고, 또 다른 한편으로는, 표적 핵산이 이온결합에 의해 자성나노입자에 흡착함으로써 발색반응 기질이 자성나노입자와 직접적으로 접촉하는 것을 제한하게 되며, 결과적으로 효소-기질 복합체 형성을 저해하게 된다. 이로 인해 자성 나노 입자는 감소된 과산화효소 활성을 가지게 되고, 발색 기질의 흡수파장에서 줄어든 흡광도를 나타내며 색 변화를 나타내게 된다. 반면, 표적 핵산이 존재하지 않을 경우, PCR 증폭이 일어나지 않게 되어, 자성 나노입자의 과산화효소 활성을 저해시킬 인자가 존재하지 않게 되므로 발색반응 기질의 흡수파장에서 높은 흡광도를 나타낸다.

[0037] 본 발명의 다른 실시예에서는, 서로 다른 기능기를 가진 자성나노입자에 DNA 를 첨가하였을 때 자성 나노 입자의 과산화효소 활성이 저해되어 결과적으로 감소된 발색반응 현상을 확인한 결과, 세 가지 다른 기능기의 자성 나노 입자에서 올리고뉴클레오타이드 존재에 따라 발색기질 OPD의 흡수파장 450nm에서 흡광도가 감소됨을 확인할 수 있었으나, 기능기에 따른 차이점은 볼 수 없었다. 그리하여 제작이 가장 용이한 수산기의 자성나노입자를 선택하여 추가적인 실험을 수행하였다(도 2).

[0038] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 수산기의 자성나노입자에 서로 다른 농도의 표적 핵산을 첨가하였을 때 발색 반응의 차이를 확인하기 위하여, 증폭 산물을 정제하여 각각 다른 농도로 자성 나노입자와 각각 반응시킨 후, 발색반응 용액을 첨가해 주고 43℃에서 30분간 반응시킴으로써 일어난 발색 반응을 자외선 및 가시선 분광분석법을 이용하여 흡광도를 측정하였다. 증폭된 핵산 존재 시 자성 나노 입자의 과산화효소 활성을 저해하여 발색 기질 OPD의 흡수파장 450nm에서 감소되어진 흡광도를 나타내었으며, 증폭 핵산의 농도에 따라 선형적으로 흡광도가 변화하는 것을 관찰할 수 있었다 (도 3).

[0039] 또한, 표적핵산의 증폭산물의 길이에 따라 발색반응의 차이가 나타나는지를 확인하기 위하여 표적 핵산을 각각 200bp, 600bp 및 1200bp 길이로 달리하여 자성 나노입자와 각각 반응시킨 후, 발색 반응 용액을 첨가해 주고 43℃에서 30분간 반응시킴으로써 일어난 발색 반응을 자외선 및 가시광선 분광분석법을 이용하여 흡광도를 측정하였으나 증폭된 핵산의 길이에 상관없이 자성 나노입자의 과산화효소 활성을 저해하여 발색반응 기질 OPD의 흡수파장 450nm에서 감소된 흡광도를 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 자성 나노입자 기반 센서는 상기 증폭산물의 길이에 상관없이 보편적으로 적용될 수 있다는 것을 나타낸다 (도 4).

[0040] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 자성 나노입자를 이용하여 핵산을 검출한 후에 자성 나노입자를 분리하여 재



사용할 수 있는지 확인하기 위하여, 핵산 물질과 자성 나노입자를 혼합한 후, 발색반응 용액을 첨가하여 43℃에서 30분간 반응시킨 뒤 외부 자력을 이용하여 자성 나노입자를 손쉽게 분리하고 0.1 M PBS (pH 8) 을 이용하여 자성 나노 입자에 흡착된 핵산물질을 제거해 주었다. 이 과정은 이온 교환 반응에 기반을 둔 것으로 손쉽게 자성 나노입자에 붙은 핵산물질을 제거할 수 있었으며, SYBR green fluorescence dye를 이용하여 DNA 제거를 확인할 수 있었다. 상기 과정을 통하여 분리된 자성 나노입자(C)는 여러 번의 재사용 후에도 과산화효소 활성을 유지하며, DNA가 존재하는 샘플(T)과 색 차이를 보임을 확인할 수 있었다(도 5).

[0041] 도 6은 표적 핵산에 의한 자성 나노입자의 과산화효소 활성 저해 원리 이해를 위해 나노 드랍 (Nanodrop) 분광 분석법에 의해 측정된 상층부 및 자성나노입자에 흡착된 표적 핵산의 양을 나타내는 표이며 (도 6A), 상기 표에 나타나 있듯이, 용액 내에 존재하는 표적 핵산의 40% 만이 자성나노입자에 결합됨을 확인할 수 있었다. 그리고, 자외선 및 가시광선 분광분석법을 통하여 표적핵산의 증폭산물이 존재하지 않는 대조군 샘플은 자성 나노 입자에 의한 발색 반응을 통해 발색반응 기질 OPD의 흡수과장 450nm에서 높은 흡광도를 나타냄을 확인할 수 있었다 (도 6B의 (1)). 반면, 표적 핵산의 증폭 산물을 가한 샘플은 표적 핵산의 과산화효소 활성 저해를 통해 감소된 흡광도를 나타내었다 (도 6B의 (3)). 그러나 표적 핵산의 증폭 산물을 가한 후 자성나노입자를 상층액으로부터 분리하여 상층액을 제거한 뒤 다시 사용한 샘플은 상기 표적 핵산의 증폭산물을 가한 샘플(도 6B의 (3))의 감소된 흡광도에 비해 40 % 만이 감소됨을 확인할 수 있었다 (도 6B의 (2)). 이 결과는 자성 나노입자의 과산화효소 활성이 자성나노입자에 흡착된 표적핵산뿐만 아니라 용액 내에 존재하는 표적 핵산에 의해 서로 다른 두 가지 형태로 제한됨을 나타내는 것이다.

[0042] 본 발명에서, 표적핵산은 질병과 관련된 유전자, 감염 (세균성, 바이러스성 등)과 관련된 유전자, 유전자 재조합 생물체 (GMO; genetically modified organisms)에 관련된 유전자, 법의학 수사를 위한 유전자 또는 이들의 하나 이상의 혼합물을 포함한다. 따라서, 본 발명은 신속하고 간편하게 보편적으로 핵산을 감지할 수 있는 진단 방법을 제공할 뿐만 아니라 현장진단을 위한 바이오센서로 이용될 수 있는 가능성을 제공한다. 또한, 위 현상을 이용하여 핵산의 검출뿐 아니라, 생체물질 및 화학물질의 검출에도 적용될 수 있다.

[0043] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0044] 특히 하기 실시예에서는 핵산의 검출만을 확인하였으나, 표적 물질에 의한 자성 나노입자의 과산화효소 활성 저해에 따른 색 변화를 관찰하는 본 발명을 이용하여 핵산 이외에 생체물질 또는 화학물질을 검출할 수 있음은 당업자에게 자명한 사항이라고 할 것이다.

## 실시예 1

[0045] 자성 나노입자의 발색반응 현상을 이용한 핵산 검출

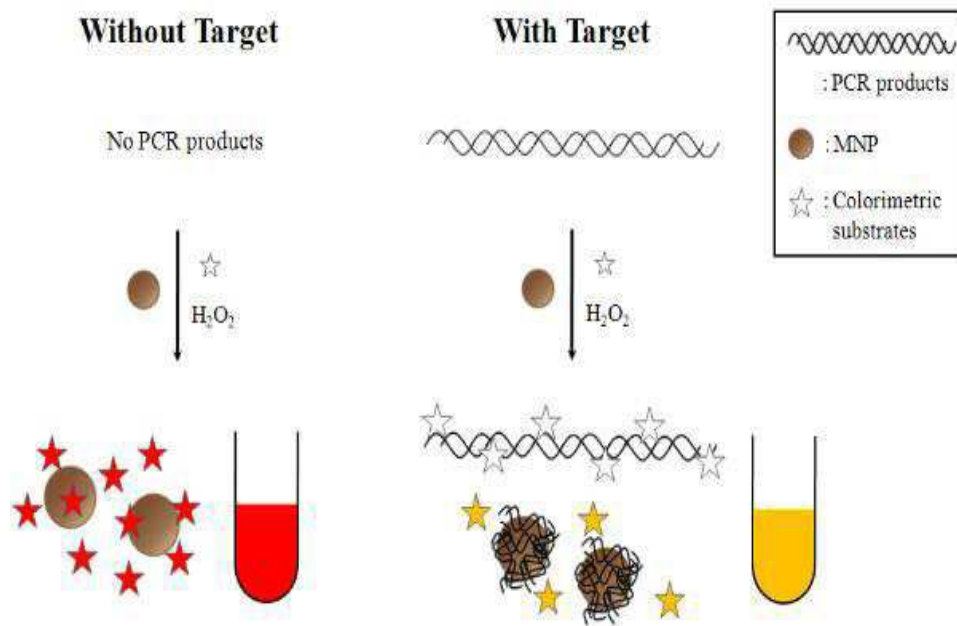
[0046] 1-1. 표적핵산의 증폭산물 제조

[0047] 비노생식기 감염균인 *Chlamydia trachomatis* 유전자의 증폭은 PCR 방법을 사용하여 수행되었다. 상기과 같이 선정된 프라이머를 이용하여 600 bp의 최종 증폭 산물을 얻었다. 실제 환자의 샘플에서 추출한 *C.trachomatis* 유전자, 0.42  $\mu$ M의 프라이머쌍 (서열번호 1 및 서열번호 2), 1X PCR reaction buffer (30 mM Tris-HCl, 30 mM KCl, 30 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 1.07 mM dNTPs 및 4 U i-starMAX™ II DNA polymerase (Intronbio, Korea) 로 이루어진 반응 혼합물을 Perkin-Elmer 9200 thermo-cycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT)를 사용하여 증폭시켰다. 94℃에서 5분간 heating 하여 이중가닥 DNA를 denaturation 시킨 뒤, 94℃에서 30초, 55° C에서 30초, 72℃에서 1분간의 사이클을 35번 반복한 뒤, 72℃에서 7분간의 마지막 extension 과정을 거쳐 핵산 증폭 과정을 마쳤다. PCR 산물은 아가로오스 전기영동 (agarose gel electrophoresis)을 이용하여 PCR 여부와 사이즈를 확인하였다. 수득된 증폭산물은 DNA 정제 키트(QIAGEN)를 이용하여 프라이머, buffer의 염 및 dNTPs를 제거함으로써 순수하게 정제된 증폭 핵산 산물을 얻을 수 있었다.

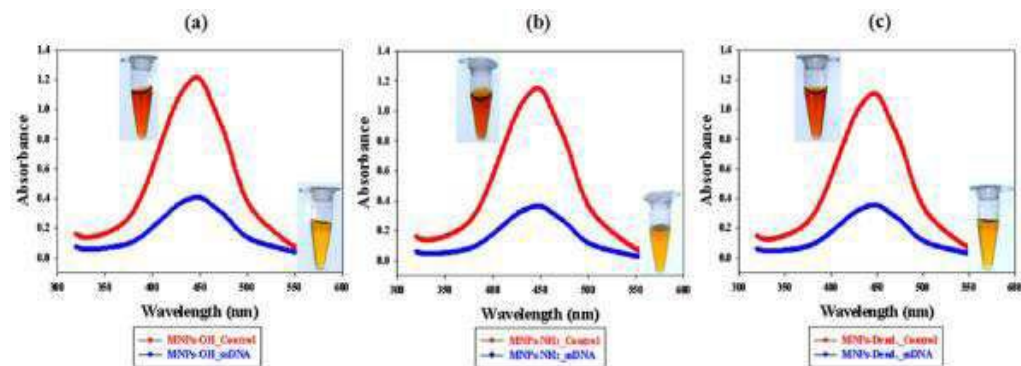
- [0048] 서열번호 1 : 5'-CCATCTTCTTTGAAGCGTTGT-3' (Forward primer)
- [0049] 서열번호 2 : 5'-ACAGGATGACTCAAGGAATAG-3' (Reverse primer)
- [0050] 1-2. 증폭된 표적핵산과 자성 나노입자 용액의 혼합용액 제조
- [0051] 상기 실시예 1-1에서 제조된, *Chlamydia trachomatis* 유전자 증폭산물 40  $\mu$ l (100-600 nM) 과 자성 나노입자 용액 5  $\mu$ l (5 mg/ml) 을 혼합하여 혼합용액을 제조하였다. 또한, 자성 나노입자는 하기의 방법에 의해 제조된 것을 사용하였다. 13 nm 자성 나노입자는 0.25 M  $\text{Fe}^{2+}$  및  $\text{Fe}^{3+}$  ions ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}=2$ ) 을 물에 녹여서 수용액을 만든 후, 80 ° C에서 끓여 주면서, 1 M 수산화나트륨을 첨가하여 환원시켜 제조하였다 (Gao *et al.* *J. Magn. Magn. Mater.*, 293,1;48-54, 2005). 제조된 자성 나노입자는 투과 전자 현미경 (TEM; Transmission Emission Microscopy)을 이용하여 크기가 결정되고, 원소 분석기 (Element analyzer) 및 표면 전하 측정기 (Zetasizer) 를 통하여 분석되어졌다. 여기서 사용된 자성 나노입자는 13  $\pm$  2 nm의 크기를 가지고, 자성 나노입자는 5 mg/ml의 농도로 0.2 M acetate buffer에 분산시켜 보관되었다.
- [0052] 1-3. 혼합용액에 발색반응 용액을 첨가하여 자성 나노입자의 발색반응 유도
- [0053] 상기 실시예 1-2에서 제조된 혼합용액 45  $\mu$ l에 95  $\mu$ l 0.2 M sodium acetate buffer (pH 4.0), 40  $\mu$ l 60 mM OPD 및 20  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 mM)를 차례로 넣어 준 뒤, 43°C 조건에서 30분 반응시켜 주었다.
- [0054]
- [0055] 1-4. 자성 나노입자의 발색반응에 의한 색 차이 관찰
- [0056] 상기 실시예 1-3에서의 자성 나노입자와 발색반응 용액을 이용한 산화반응을 통해 발생된 색의 차이를 관찰한 결과, PCR 증폭 산물이 존재하지 않을 경우에는 발색 기질 OPD의 흡수파장 450 nm에서 높은 흡광도를 나타내며 붉은 색을 나타내었다. 반면, 표적 핵산의 존재에 의해 PCR 이 일어난 경우에는 표적핵산의 자성나노입자의 과산화효소 활성 저해를 통해서 발색기질 OPD의 흡수파장 450 nm에서 감소된 흡광도를 나타내며 노란색을 타내는 것을 확인하였다.
- [0057] 1-5. 자성나노입자의 효율적인 분리 및 재사용
- [0058] 상기 실시예 1-4를 통하여 핵산 존재 유/무를 확인한 후, 자력을 이용하여 자성 나노입자를 효율적으로 분리하고 0.1 M PBS buffer (pH 8) 을 이용하여 세척한 뒤, 발색반응 용액을 첨가하여 재사용 가능 여부를 실험하였으며, 상기 과정을 통하여 분리된 자성 나노입자는 여러 번의 재사용 후에도 과산화효소 활성을 유지하며 DNA 존재를 검출하기에 충분한 색 차이를 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [0059] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

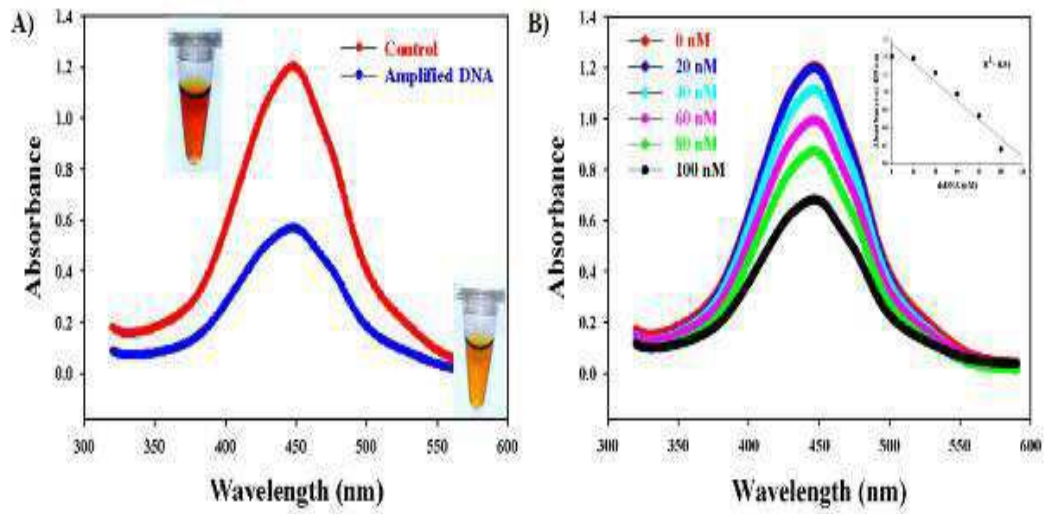
도면1



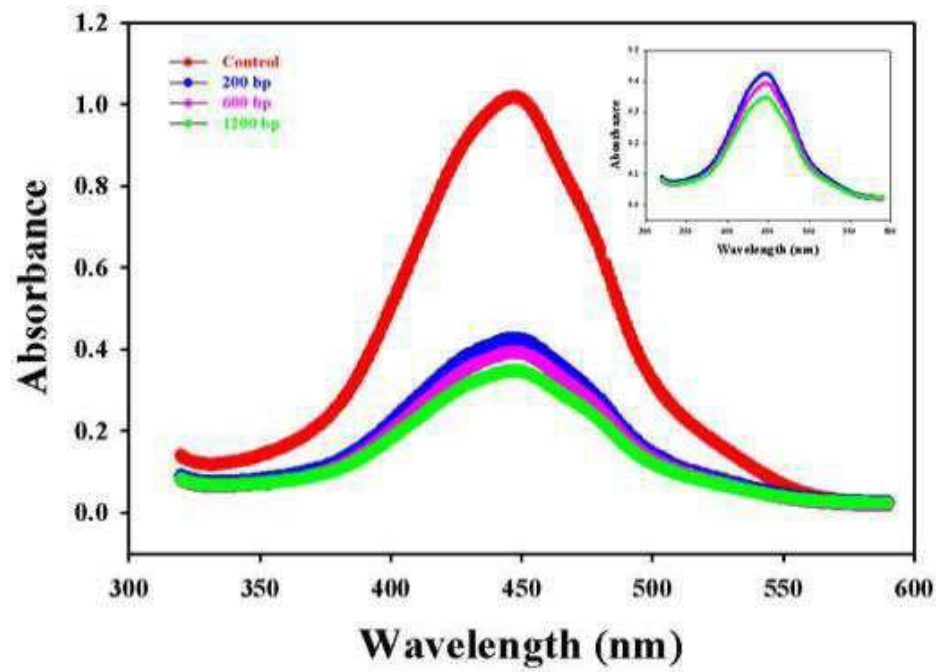
도면2



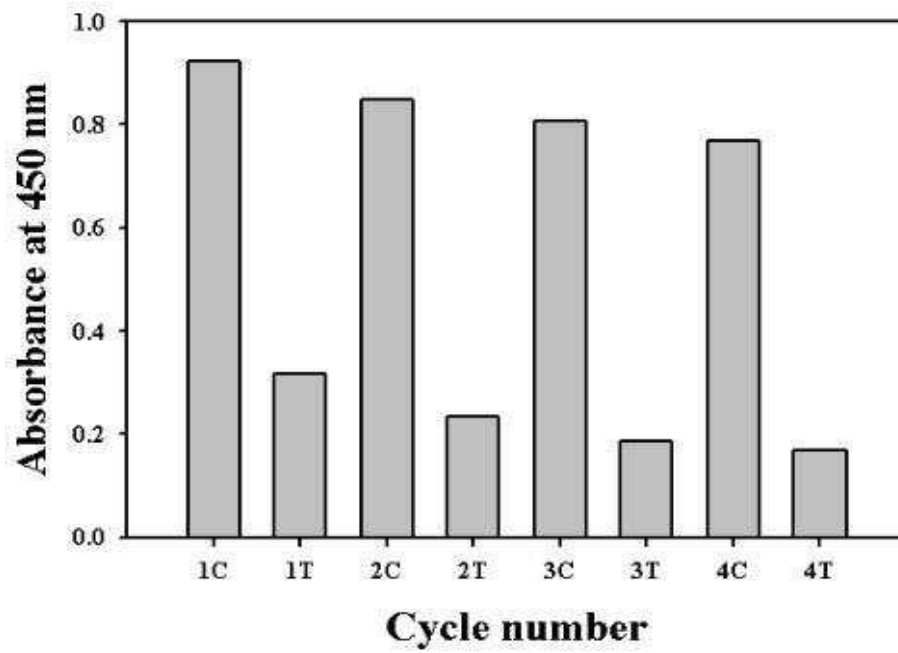
도면3



도면4



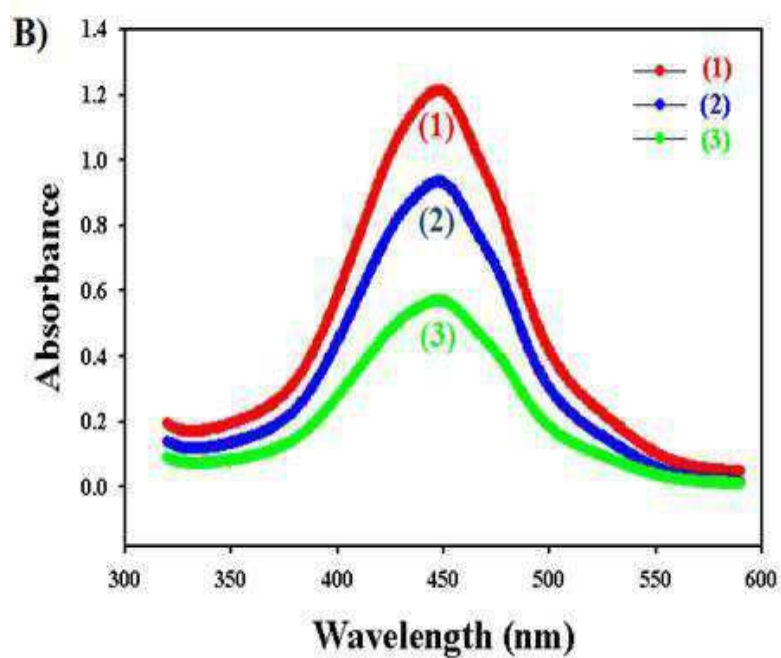
도면5



도면6

A)

	The amount of DNA
In the solution (ng/μl)	$26.8 \pm 0.5$
On the particle (ng/μl)	$19.4 \pm 0.5$



서열 목록

<110> Korea Advanced Institute of Science and Technology

<120> Method for Detecting Nucleic Acids and Biomolecules by Using  
Magnetic Nanoparticles Having Peroxidase Activity

<130> P10-B237

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ccatcttctt tgaagcgttg t 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

acaggatgac tcaaggaata g 21