



공개특허 10-2022-0103851



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0103851  
(43) 공개일자 2022년07월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12Q 1/689* (2018.01) *G01N 33/52* (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
*C12Q 1/689* (2018.05)  
*G01N 33/52* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2021-0006000  
(22) 출원일자 2021년01월15일  
심사청구일자 2021년01월15일

- (71) 출원인  
강원대학교산학협력단  
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)  
(72) 발명자  
임기택  
강원도 춘천시 후석로 325 춘천포스코더샵아파트  
112동 2308호  
강글리 케야  
강원대학교 농업생명과학대학 1호관 307동 206호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
구현서

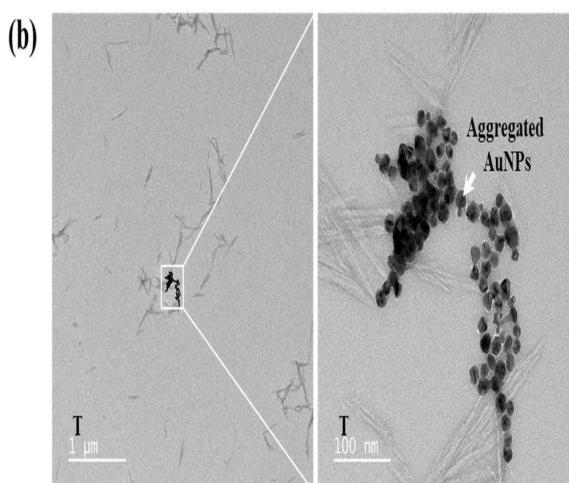
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **셀룰로오스 나노 결정으로 캡핑된 금 나노 입자를 유효성분으로 포함하는 비색 반응을 이용한 병원균 검출용 조성물 및 그 방법**

### (57) 요 약

본 발명은 셀룰로오스 나노 결정으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)를 유효성분으로 포함하는 비색 반응을 이용한 병원균 진단용 조성물 및 그 방법에 관한 것으로, 본 발명의 조성물 및 방법은 상호 작용하는 입자의 표면 전하 밀도를 기반으로 환경 친화적이고 비용 효율적이며 생체 적합성이 있으며 신속한 감지 시스템을 제공한다. 또한 본 발명의 개발된 물질이 병원성 DNA의 비색 검출을 위한 바이오 센서로 적용될 수 있다.

**대 표 도** - 도5b



(52) CPC특허분류  
 C12Q 2563/149 (2013.01)  
 C12Q 2563/155 (2013.01)  
 G01N 2333/31 (2013.01)

(72) 발명자

**헵 두타 사안**

강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 농업생명  
 과학대학 1호관 307동 207호

**디네쉬 파텔**

강원대학교 농업생명과학대학 1호관 307동 206호

이) 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345306818
과제번호	2019R1D1A3A03103828
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업(후속연구지원)
연구과제명	줄기세포 다분화 증진용 3D 나노하이브리드-멀티채널 자동화 바이오리액터 기술개발
기여율	1/1
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2019.11.01 ~ 2022.10.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

셀룰로오스 나노 결정으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)를 유효성분으로 포함하는 비색 반응을 이용한 병원균 검출용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)는 2,2,6,6-테트라메틸페리딘-1-페페리디닐옥시(TEMPO) 산화된 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자 (AuNP)인 것을 특징으로 하는 비색 반응을 이용한 병원균 검출용 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 병원균은 항생제 내성균인 것을 특징으로 하는 비색 반응을 이용한 병원균 검출용 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 병원균은 메티실린 내성 황색 포도상 구균인 것을 특징으로 하는 비색 반응을 이용한 병원균 검출용 조성물.

#### 청구항 5

병원균 DNA를 인 비트로에서 프로브와 하이브리다이제이션시키고,

상기 하이브리다이제이션된 복합체를 2,2,6,6-테트라메틸페리딘-1-페페리디닐옥시(TEMPO) 산화된 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자 (AuNP)와 혼합한 후 색 변화를 확인하는 단계를 포함하는 병원균을 검출하는 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)는 2,2,6,6-테트라메틸페리딘-1-페페리디닐옥시(TEMPO) 산화된 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자 (AuNP)인 것을 특징으로 하는 병원균을 검출하는 방법.

#### 청구항 7

제5항에 있어서,

상기 방법은 NaCl 용액 존재 하에서 수행하는 것을 특징으로 하는 병원균을 검출하는 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 NaCl 용액은 6mM 내지 10mM 농도인 것을 특징으로 하는 병원균을 검출하는 방법.

#### 청구항 9

제5항에 있어서,

상기 병원균은 메티실린 내성 황색 포도상 구균인 것을 특징으로 하는 병원균을 검출하는 방법.

### 청구항 10

병원균 DNA를 인 비트로에서 프로브와 하이브리다이제이션시키고,

상기 하이브리다이제이션된 복합체를 2,2,6,6-테트라메틸페리딘-1-페페리디닐옥시(TEMPO) 산화된 셀룰로오스 나노 결정(TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)와 혼합한 후 초 고해상도 투과 전자 현미경으로 모니터하여 상기 하이브리다이제이션된 복합체와 2,2,6,6-테트라메틸페리딘-1-페페리디닐옥시(TEMPO) 산화된 셀룰로오스 나노 결정(TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)의 응집이 관찰되는 경우에 표적 병원균 DNA를 포함한다고 판단하는 것을 특징으로 하는 병원균을 검출하는 방법.

### 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 방법은 6mM 내지 10mM의 NaCl 존재 하에서 모니터링하는 것을 특징으로 하는 병원균을 검출하는 방법.

### 청구항 12

제10항에 있어서,

상기 병원균은 메티실린 내성 황색 포도상 구균인 것을 특징으로 하는 병원균을 검출하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 셀룰로오스 나노 결정으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)를 유효성분으로 포함하는 비색 반응을 이용한 병원균 검출용 조성물 및 그 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 메티실린 내성 황색 포도상 구균(MRSA)의 증폭되지 않은 병원성 DNA 올리고머의 비색 검출을 위해 2,2,6,6-테트라메틸페리딘-1-페페리디닐옥시(TEMPO) 산화된 셀룰로오스 나노 결정(TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)를 합성하여 평가를 수행하였다.

## 배경 기술

[0002] 미생물 특히 병원성 박테리아는 공중 위생과 밀접한 관련을 가지고 있으며, 다양한 질병과 식중독 사고의 요인이 되고 있다.

[0003] 특히 농식품의 식중독 사고는 최근 10여년간 세계적으로 증가하고 있는 추세이다. 이에 따라 식중독균 오염을 조기에 신속하게 진단하여 식중독의 발생을 방지하고 식중독 발생에 따른 사회적 비용을 감소시킬 수 있는 진단 방법 및 센서에 대한 요구가 늘어나고 있다.

[0004] 종래의 배양 및 생화학적 검사를 통한 진단 방법의 경우에는 3~5일 정도의 시간이 소용되는 방식으로서 농식품의 섭취 전 사전 측정 및 진단을 통한 식중독 사고를 방지하기에는 적합하지 않다.

[0005] 또한, 종래의 센서는 방사선 동위 원소나 형광체를 표지로 이용하는 항원항체를 이용한 면역검사, 비표지식 바이오센서로 표면 플라스몬 공진 바이오센서, 전반사 일립소미트리 바이오센서, 광 도파로 바이오센서 등의 광학 바이오 센서들이 주목 받고 있다.

[0006] 그러나 이와 같은 바이오 센서는 고가의 광학 측정 장비가 필요하다는 단점이 있어서, 보다 경제적인 방식으로 병원성 박테리아를 측정할 수 있는 방법에 대한 요구가 계속되고 있다.

[0007] 금, 은, 백금, 팔라듐 등의 금속 나노입자는 여러 가지 촉매, 방부제, 화학 및 바이오센서 등으로 널리 사용되고 있으며, 이러한 금속 나노입자는 금속 이온의 수용액으로부터 금속을 환원시켜 제조한다.

[0008] 그런데, 생성된 금속 나노입자를 안정화시키지 않으면, 금속 나노입자가 서로 결합하여 금속 덩어리를 형성하여 나노입자의 크기가 균일하지 못하게 되며, 나노입자의 단위 무게당 표면적이 감소하는 단점이 있다.

[0009] 금 나노 입자(AuNP) 기반 비색계 바이오 센서는 높은 종횡비, 특정 스펙트럼 흡수, DNA 및 단백질에 대한 결합 능력을 포함한 그들의 독특한 특성으로 인하여 의약 분야에서 진단 도구키트로 사용된다.

- [0010] AuNP의 염 유도 표면 플라스몬 공명 (SPR) 스펙트럼 특성은 단일 및 이중 가닥 DNA 분자를 검출하기 위해 광범위하게 연구되었다.
- [0011] AuNPs 응집을 기반으로 수년에 걸쳐 수많은 현장 진료 나노 바이오 센서가 개발되었다.
- [0012] AuNP 기반 바이오 센서에 의한 병원성 감염의 검출은 피부 패치의 상처 치유 적용에 상당한 관심을 받았다. 이러한 패치는 종종 병원성 세포 용해 및 누출을 유발한다.
- [0013] 피부 감염에서 새로운 병원체의 유전 물질을 현장에서 빠르게 식별하면 적절한 약물을 선택하는 데 도움이 될 수 있다.
- [0014] 바이오 센서에 의한 병원성 핵산 감지는 매우 유익한 응용 분야이다. 핵산의 AuNP 기반 비색 검출은 조정 가능한 화학적 특성을 가진 생체 적합성 캡핑제와의 접합에서 이러한 응용을 위해 구현이 될 수 있다.
- [0015] 탄수화물 코팅 AuNP는 녹색 화학 기반 진단 접근 방식을 지원하기 위해 채택되었다. 글리코 -AuNP는 매우 안정적이고 생체 적합성이 있으며 합성이 쉬우며 표적 분자의 현저한 검출 한계를 나타낸다.
- [0016] 텍스트린으로 덮인 AuNP는 최대  $0.01 \text{ ng}/\mu\text{L}$  농도의 결핵균으로부터 IS16110 유전자의 전기 화학적 검출에도 사용되었다.
- [0017] 포도당 -AuNP는 또한 광범위한 치료 학적 응용을 가지고 있다. 따라서 glyco-AuNP는 복잡한 생물학적 환경에서도 DNA 검출에 큰 잠재력을 가지고 있다.
- [0018] 셀룰로스 나노 결정(CNC)은 고 강성, 저밀도, 잘 정의된 크기, 특정 형태, 제어되고 조정 가능한 표면 화학, 환경적 지속 가능성 및 예상되는 저렴한 비용과 같은 고유한 특성으로 인해 캡핑 및 안정화제로 사용하는 매크로 유사체 중성 다당류에 비해 몇 가지 장점이 있다.
- [0019] CNC 속성은 표면 기능화를 통해 쉽게 조정할 수 있다. 카르복실화 CNC에서 개선된 금속 흡착 특성이 관찰되었다.
- [0020] [선행 특허 문헌]
- [0021] 대한민국 특허공개번호 제10-2018-0049978호
- [0022] 대한민국 특허공개번호 제10-2012-0089928호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0023] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 병원성 박테리아를 신속하면서도 간단하게 실시간으로 현장에서 육안으로 센싱할 수 있으며 복잡한 고가의 광학측정 장비를 필요로 하지 않는 병원성 박테리아의 진단을 위한 병원성 DNA 올리고머의 비색 검출을 위한 신규한 금 나노입자를 제공하는 것이다.
- [0024] 본 발명의 다른 목적은 신규한 금 나노입자를 이용하여 병원성 박테리아를 신속하면서도 간단하게 실시간으로 현장에서 육안으로 센싱할 수 있으며 복잡한 고가의 광학 측정 장비를 필요로 하지 않는 병원성 박테리아의 진단 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0025] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)를 유효성분으로 포함하는 비색 반응을 이용한 병원균 검출용 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에 있어서,
- [0027] 상기 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)는 2,2,6,6-테트라메틸페리딘-1-페페리디닐옥시(TEMPO) 산화된 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자 (AuNP)인 것이 바람직 하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0028] 본 발명의 다른 구현예에 있어서,
- [0029] 상기 병원균은 항생제 내성균인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서,
- [0031] 상기 병원균은 메티실린 내성 황색 포도상 구균인 것이 바람직하나 본 발명의 목적하고자 하는 효과를 달성할 수 있는 다른 모든 병원균이 포함될 수 있다.
- [0032] 또 본 발명은 병원균 DNA를 인 비트로에서 프로브와 하이브리다이제이션시키고, 상기 하이브리다이제이션된 복합체를 2,2,6,6-테트라메틸페리딘-1-페리디닐옥시(TEMPO) 산화된 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자 (AuNP)와 혼합한 후 후 색 변화를 확인하는 단계를 포함하는 병원균을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 색 변화는 NaCl 용액 존재 하에서 적색 → 청색으로 관찰될 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0034] 상기 색 변화는 분광 광도계를 사용하여 400-700 nm 범위에서 상기 TC-AuNP의 흡광도를 측정하여 확인할 수도 있으며,
- [0035] UV 가시 스펙트럼에서 적색 이동을 촉진하는 결과를 통하여도 확인할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 있어서,
- [0037] 상기 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)는 2,2,6,6-테트라메틸페리딘-1-페리디닐옥시(TEMPO) 산화된 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자 (AuNP)인 것이 바람직하나 본 발명의 목적하고자 하는 효과를 달성할 수 있는 기타 다른 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)도 본 발명의 보호 범위에 포함된다.
- [0038] 본 발명의 다른 구현예에 있어서,
- [0039] 상기 방법은 NaCl 용액 존재 하에서 수행하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0040] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서,
- [0041] 상기 NaCl 용액은 6mM 내지 10mM 농도인 것이 바람직하고, 실시예에서는 6mM 또는 8mM에서 수행되었다.
- [0042] 본 발명의 일 구현예에 있어서,
- [0043] 상기 병원균은 메티실린 내성 황색 포도상 구균인 것이 바람직하나 본 발명의 목적하고자 하는 효과를 달성할 수 있는 다른 모든 병원균이 포함될 수 있다.
- [0044] 또한 본 발명은 병원균 DNA를 인 비트로에서 프로브와 하이브리다이제이션시키고, 상기 하이브리다이제이션된 복합체를 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)와 혼합한 후 초 고해상도 투과 전자 현미경으로 모니터하여 하이브리다이제이션된 복합체를 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자(AuNP)의 응집이 관찰되는 경우에 표적 병원균 DNA를 포함한다고 판단하는 것을 특징으로 하는 병원균을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예에 있어서,
- [0046] 상기 방법은 NaCl 존재 하에서 수행하는 것이 바람직하며, 상기 방법은 6mM 내지 10mM의 NaCl 존재 하에서 모니터링하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예에 있어서,
- [0048] 상기 병원균은 메티실린 내성 황색 포도상 구균인 것이 바람직하나 본 발명의 목적하고자 하는 효과를 달성할 수 있는 다른 모든 병원균이 포함될 수 있다.
- [0050] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0051] 본 발명자들은 병원성 DNA의 비색 검출을 위한 TC 안정화 AuNP의 잠재적인 응용을 합성하고 평가했다.
- [0052] 본 발명자들은 높은 병원성 효율성으로 인해 비색 검출을 위해 MRSA에서 병원성 DNA를 가져왔다.
- [0053] 본 발명자들은 2-3 분 이내에 최대 20 fM의 표적 병원성 DNA 올리고머를 성공적으로 감지했다.
- [0054] 이하에서 상술하면,

- [0055] 본 발명에서 본 발명자들은 메티실린 내성 황색 포도상 구균 (MRSA)의 증폭되지 않은 병원성 DNA 올리고머의 비색 검출을 위해 2,2,6,6- 테트라메틸페페리딘 -1- 퍼페리디닐옥시(TEMPO) 산화된 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자 (AuNP)를 합성했다.
- [0056] 제작된 TEMPO-CNCs-AuNP(TC-AuNP)는 UV 가시 분광법, 투과 전자 현미경 (TEM), 원자력 현미경(AFM) 및 동적 광산란 (DLS) 기술로 특성을 살펴보았다.
- [0057] 합성된 AuNP의 평균 직경은 ~ 30nm였다. TC-AuNPs 수용액은 안정적이었고 520nm에서 흡수 피크를 나타냈다. TC-AuNPs와 표적 및 비 표적 DNA의 표면 전하 간의 화학적 상호 작용은 이온 조건 하에서 비색계 차이를 결정했다.
- [0058] AuNP의 응집으로 인해 이온 조건 하에서 표적 DNA가 있는 TC-AuNPs 용액에서 극적인 색상 변화 (Red → Blue)가 관찰되었다.
- [0059] 그러나, 전하된 모이어티의 더 나은 차폐 효과로 인해 유사한 조건에서 TC-AuNPs 용액을 사용하는 비 표적 DNA에서는 가시화된 색상 변화가 발생하지 않았다. TC-AuNP의 비색 검출 한계는 병원성 DNA에 대해 20 fM으로 낮게 입증되었다.
- [0060] 따라서 TEMPO 산화 CNC 캡핑 AuNP의 합성은 병원성 DNA의 비색 검출을 위한 바이오 센서로서 효율적이고 용이하다.
- [0061] 이온 조건 하에서 TC 안정화 AuNP의 존재 하에서 표적 및 비 표적 병원성 DNA의 비색 검출에 대한 도식적 표현을 도 1에 나타내었다.

### 발명의 효과

- [0062] 개발된 AuNP 기반 바이오 센서의 특성은 합성 공정에 사용되는 캡핑 재료의 영향을 많이 받는다. 따라서 합성된 AuNP의 검출 특성을 향상시키기 위해 우수하고 조정 가능한 특성을 가진 적합한 캡핑제를 선택해야 한다.
- [0063] 이를 위해 CNC는 우수하고 조정 가능한 물리 화학적 특성으로 인해 이상적인 재료로 간주되었으며, 균질하고 안정적인 AuNP 용액은 카르복실화된 기능화된 CNC의 존재하에 얻어졌다.
- [0064] 본 발명의 합성된 AuNP의 안정성이 보호 층의 형성으로 인해 이온 조건 하에서 ssDNA 프로브가 있을 때 증가했다는 점에 주목하는 것이 흥미로웠다.
- [0065] TEM 이미지에서 관찰된 바와 같이 TC-AuNP의 응집으로 인해 이온 조건 하에서 표적 배지에서 색 변화(적색 → 청색)가 관찰되었다.
- [0066] 비 타겟 미디어에서는 색상 변화가 발생하지 않았다.
- [0067] 이온 조건 하에서 TC-AuNPs의 안정화 및 불안정화는 매체 색상의 변화를 담당한다.
- [0068] 색상 변화는 병원성 DNA의 검출 한계가 20 fM인 표적 배지에서 3 분 이내에 쉽게 시작화할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 접근 방식은 상호 작용하는 입자의 표면 전하 밀도를 기반으로 환경 친화적이고 비용 효율적이며 생체 적합성이 있으며 신속한 감지 시스템을 제공한다. 또한 본 발명의 개발된 물질이 병원성 DNA의 비색 검출을 위한 바이오 센서로 적용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0070] 도 1은 TEMPO-CNC로 안정화된 AuNP(TC-AuNP)를 사용하여 표적 및 비 표적 메티실린 내성 황색 포도상 구균 (MRSA) DNA의 합성 및 비색 검출에 대한 그림,
- 도 2는 합성된 TEMPO-CNCs-AuNP (TC-AuNP)의 화학적 및 형태학적 특성을 나타낸 그림,
- (a) TC 및 TC-AuNP의 해당 디지털 사진이 있는 UV-vis 스펙트럼;
  - (b) 물에 분산된 TC-AuNP의 UHR-TEM 형태;
  - (c) 물에 분산된 TC-AuNP의 AFM 형태; 흰색 화살표와 빨간색 화살표는 AuNP 및 TC를 나타냄,
- 도 3은 TC-AuNP의 응집 패턴을 나타낸 그림,
- (a) NaCl 농도가 증가함에 따라,

(b) 0.25pM ssDNA 프로브가 있는 경우, ssDNA 프로브가있는 경우 A620/A520 비율,  
 (c) 해당하는 A620/A520 비율로 ssDNA 프로브의 농도가 증가하는 경우,  
 도 4는 병원성 DNA의 분광 및 비색 검출을 나타내는 그림,  
 (a) 20 fM의 비 표적 및 표적 DNA 존재하에 스펙트럼 및 상응하는 비색 변화.  
 (b) 20 fM dsDNA 및 20 fM ssDNA의 염 농도가 증가하는 TC-AuNP의 응집 패턴을 나타낸 그림,  
 도 5는 (a) 비 표적 및 (b) 표적 DNA의 존재 하에서 TC-AuNP의 UHR-TEM 이미지를 나타낸 그림,  
 도 6은 병원성 DNA의 염기 서열 특이 적 검출을 위해 표적 및 비 표적 DNA와 TEMPO-CNC 안정화 AuNP (TC-AuNPs)의 상호 작용에 대해 제안 된 메커니즘의 예시를 나타낸 그림,  
 도 7은 TC-AuNP의 합성에 대한 개략도,  
 도 8은 0 초에서 TC-AuNP의 응집 패턴, 및  
 도 9는 표시된 시간 간격 후 혼성화 된 DNA의 아가로스 겔 전기 영동을 나타내는 그림.

### **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0071] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0072] 실시예 1 재료
- [0073] 금 (III) 염화물 삼수화물 (HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, 99.9 % 미량 금속 기준)과 아가로스는 미국 Sigma-Aldrich에서 구입했으며 추가 경제없이 사용했다. TEMPO-CNC는 캐나다의 Cellulose Lab에서 받았으며 얻은대로 사용했다. ssDNA 프로브, 표적 및 비 표적 DNA는 대한민국 대전에 있는 바이오니아 ® Inc.에서 구입하였다.
- [0075] 실시예 2. TC-AuNP의 합성
- [0076] TC-AuNPs의 합성은 이전에 보고된 내용을 일부 수정을 통해 수행되었다 (Bartoszewicz, B., Bujno, K., Liszewska, M., Budner, B., Bazarnik, P., Pociński, T., Jankiewicz, B.J., 2018. Effect of citrate substitution by various α-hydroxycarboxylate anions on properties of gold nanoparticles synthesized by Turkevich method. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 549, 25–33).
- [0077] 요약하면, 1mM HAuCl<sub>4</sub>의 스톡 용액(50 mL)을 수성 매질에서 준비하고 어두운 조건에서 연속적인 기계적 교반으로 90 ° C까지 가열한 다음 500 μL의 TEMPO-CNCs 용액을 첨가했다.
- [0078] 필요한 양의 1M NaOH 용액을 혼합하여 혼합 용액의 pH ~ 7을 조정했다. 색상의 변화 (노란색 → 빨간색)는 반응이 완료되었음을 나타낸다.
- [0080] 실시예 3. TC-AuNP의 특성화
- [0081] 분광 광도계 (Softmax Pro Molecular Device, Version 7, California)를 사용하여 400–700 nm 범위에서 TC 및 TC-AuNP의 흡광도를 측정했다.
- [0082] TC-AuNPs의 형태는 0.12 nm의 해상도와 원자력 현미경 (AFM) (Nanoscope 5 Bruker, USA)의 초 고해상도 투과 전자 현미경 (UHR-TEM, AARM 1300S, Jeol, Japan)으로 모니터링되었다.
- [0083] TC-CNC 및 TC-AuNP의 동적 광 산란 (DLS) 및 제타 전위 (ζ) 값은 입자 크기 분석기 (Malvern Panalytical, UK; Zetasizer Ver 7.13)를 사용하여 측정되었다.
- [0085] 실시예 4. 분석 과정
- [0086] 합성된 TC-AuNPs의 안정성은 실온에서 NaCl (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10mM)의 다양한 농도의 존재 하

에서 평가되었으며, 용액의 흡수 스펙트럼은 분광 광도계로 측정되었다.

[0087] 유사한 농도의 NaCl 존재 하에서 TC-AuNPs의 응집 패턴에 대한 ssDNA의 효과는 TC-AuNP를 0.25pM의 ssDNA 프로브와 함께 RT에서 10 분 동안 인큐베이션한 다음 앞서 설명한대로 NaCl을 첨가하여 평가했다.

[0088] 흡수 스펙트럼은 RT에서 10 분 동안 배양한 후 기록되었다. TC-AuNP의 응집 패턴에서 ssDNA의 농도 증가 효과를 연구하기 위해 나노 입자를 0.25, 0.5, 0.75 및 1 pM의 ssDNA와 함께 10 분 동안 배양한 후 다음 10 분 동안 NaCl 처리했다. 흡수 스펙트럼은 620 nm 및 520 nm 파장에서 기록되었다.

#### 실시예 5. 증폭되지 않은 S. aureus ssDNA의 검출

[0091] 초순수에 용해된 표적 및 비 표적 DNA 올리고머를 RT에서 15 분 동안 동일한 양의 ssDNA 프로브와 함께 배양하여 혼성화를 허용한 다음 배양된 DNA 5 μL를 105 μL의 TC-AuNPs에 첨가하였다. 혼합물 용액을 RT에서 10 분 동안 추가로 배양하였다. NaCl 용액(8mM)을 색이 변할 때까지 혼합 용액에 서서히 첨가하였다.

[0092] 본 발명에 사용 된 DNA 염기 서열은 표 1에 나열되어 있다.

#### 표 1

Sample	Sequences
ssDNA probe	5' ATT ATG GCT CAG GTA CTG CTA TCC ACC-3' '
Target DNA	5' GGA TAG CAG TAC CTG AGC CAT AAT CAT-3' '
Non-target DNA	5' AGA TGA TTA TGG CTC AGG TAC TGC TAT -3' '

[0095] 표 1은 본 발명에 사용된 DNA 서열의 리스트를 나타낸 표

#### 실시예 6. DNA 혼성화 결정

[0098] 프로브와 표적 및 비 표적 DNA의 혼성화는 2 % 아가로스 겔 전기 영동으로 분석되었다. 겔 이미지는 분자 이미저(Molecular Imager® Chemi DocTM XRS + Imaging System)를 사용하여 캡처되었다.

[0100] 상기 실시예의 결과를 하기에 기재한다.

#### TC-AuNP의 특성

[0102] TC 및 TC-AuNPs 용액의 UV 가시 스펙트럼이 도 2a에 나와 있다.

[0103] TC 용액에서는 흡수 피크가 관찰되지 않은 반면 TC-AuNPs 용액은 520nm에서 흡수 피크를 나타내어 AuNP의 존재를 나타낸다. HAuCl4와 NaOH 사이의 산화 환원 반응은 AuNP를 생성했다. 이것은 노란색에서 빨간색 용액으로의 색상 변화로 나타난다.

[0104] 합성된 TC-AuNPs 용액은 균일하고 안정적이었다. TC 및 TC-AuNPs 솔루션의 사진은 도 2a의 삽입에 제공된다.

[0105] TC 및 TC-AuNPs 용액의 표면 전하, 유체 역학적 반경 및 다 분산 지수(PDI)는 표 2에 나와 있다.

[0106] TC의 표면 전하와 유체 역학 반경은 각각  $-36.9 \pm 10.4$  mV 및  $107.4 \pm 57.86$  nm였으며 PDI 값은 각각 0.20 ± 4.7이다.

[0107] TC-AuNPs 용액의 표면 전하와 유체 역학 반경은 각각  $-43.4 \pm 7.5$  mV 및  $1841 \pm 7.0$  nm였으며, PDI 값은 각각 0.51 ± 0.9이다.

[0108] 표면 전하 및 유체 역학 반경의 이러한 향상은 TC가 AuNP에 부착되었기 때문이다. 증가된 PDI는 합성된 TC-AuNP의 다 분산 특성을 나타낸다.

[0109] 합성된 AuNP의 초 고해상도 투과 전자 현미경(UHR-TEM) 이미지는 도 2b에 나와 있다. 합성된 AuNP의 크기는 약

30nm였으며 매질에 잘 분산되어 있다.

[0110] TC는 생성된 TC-AuNP 주변에 분산되었다. 형성된 AuNP 주변의 TC 분포는 DLS 측정에서 관찰된 것처럼 높은 유체 역학적 반경의 원인이 된다.

[0111] 용액 pH는 나노 물질의 분산에 중요한 역할을 한다. TC의 표면 전하와 배지의 pH 7.0은 형성된 AuNP의 잘 분산되고 균질한 용액을 촉진했다.

[0112] TC-AuNP의 AFM 이미지는 도 2c에 나와 있다. 합성된 나노 입자의 평균 크기는 약 40nm였다. TC-AuNPs의 합성에 대한 개략도는 도 7에 나와 있다.

**표 2**

Sample	$\zeta$ -potential (mV)	Average Size (nm)	Polydispersity index (PDI)
TC	-36.9±10.4	107.4±57.86	0.20±4.70
TC-AuNPs	-43.4±7.5	1841±7.0	0.59±0.9

[0113]

[0114] 표 2는 AuNP의 물리 화학적 특성; 샘플의 제타 전위  $\zeta$ , 평균 입자 크기 및 다 분산 지수 (PDI)을 나타낸 표.

[0116] ssDNA 프로브가 있거나 없는 TC-AuNPs의 염 유도 응집

[0117] NaCl 용액의 농도 ( $0 \rightarrow 10\text{mM}$ )가 다른 상태에서 합성된 TC-AuNP의 UV-visible 스펙트럼은 도 3a에 나와 있다.

[0118] 순수한 TC-AuNP는 520nm에서 흡수 피크를 보였으며, 이는 매체에서 NaCl 용액의 농도를 증가시켜 더 높은 파장으로 이동했다. 이 적색 이동은 나노 입자 사이의 전자 접합이 증가하여 TC-AuNPs의 응집으로 이어졌기 때문이다.

[0119] NaCl 용액의 농도가 다른 경우 TC-AuNPs 용액의 비색 변화는 도 3a의 삽입 부분에 나와 있다. NaCl 용액의 5mM 농도까지 현저한 색 변화가 관찰되지 않았으며, 이는 TC-AuNP의 안정성 한계를 나타낸다.

- [0120] 그러나 5mM 농도의 NaCl 용액에서 색의 변화 (적색 → 청색)가 관찰되었다. 이 색상의 변화는 TC-AuNP의 염 유발 응집으로 인해 스펙트럼에서 적색 이동을 일으켰다.
- [0121] 0 시간에 다른 농도의 NaCl 용액이 존재할 때 TC-AuNPs 용액의 비색 변화는 도 8a 및 b에 나와 있다. 0 시간에 TC-AuNPs 용액에서 눈에 띄는 색 변화가 관찰되지 않았다.
- [0122] TC-AuNPs와 ssDNA의 흡광도 값 ( $A_{620} / A_{520nm}$ )의 변화는 NaCl 용액의 농도 ( $0 \rightarrow 10mM$ )가 다른 상태에서 TC-AuNP를 통합한 것이다(도 3b).
- [0123] TC-AuNPs 및 ssDNA 통합 TC-AuNPs 배지 모두에서 최대 5mM 농도의 NaCl 용액까지 흡광도 값의 유의한 변화가 관찰되지 않아 안정성 한계를 보여주었다.
- [0124] 그러나 5mM 농도의 NaCl 용액 후 ssDNA 통합 TC-AuNPs 배지에 비해 TC-AuNPs에서 이 값의 더 큰 변화가 발생하여 차폐로 인해 ssDNA 프로브가 있는 경우 ssDNA 프로브 ref의 쿠딩의 효과로 인하여 TC-AuNPs의 응집 경향이 더 낮음을 보여준다.
- [0125] ssDNA 프로브의 전자 환경은 장벽 역할을 하며 이온 조건이 있는 상태에서 TC-AuNP의 응집을 방지한다.
- [0126] 여러 다른 농도의 NaCl 용액 존재하에서 TC-AuNPs 및 ssDNA 통합된 TC-AuNPs 매질의 비색 변화는 도 3b의 삽입에 나타내었다.
- [0127] TC-AuNPs 용액은 3mM 농도의 NaCl을 첨가한 후 색상 변화를 나타냈다. 대조적으로, ssDNA 통합 TC-AuNPs에서 최대 5mM 농도의 NaCl에서는 이러한 색상 변화가 관찰되지 않아 더 나은 안정성을 입증했다.
- [0128] 다양한 농도의 ssDNA에 대한  $A_{620}/A_{520}$  값은 6mM 농도의 NaCl의 존재하에 TC-AuNPs를 포함하고 있다(도 3c).
- [0129] 본 발명에서 본 발명자들은 이 농도에서 NaCl의 효과로 인해 ssDNA 통합 TC-AuNPs 매체의 비색 변화를 모니터링하기 위해 NaCl의 6 mM 농도를 선택했다.
- [0130]  $A_{620}/A_{520}$  값의 감소는 용액에서 ssDNA 프로브 농도를 증가시킴으로써 관찰되었으며, 이는 ssDNA 프로브의 더 나은 차폐 효과를 나타낸다.
- [0131] 6mM 농도의 NaCl이 존재하는 ssDNA 통합 TC-AuNPs 용액의 다양한 농도에서의 비색 변화는 도 3c의 삽입에 표시된다. 더 높은 농도의 ssDNA에서 색 변화 (빨간색 → 파란색)에 대한 내성이 발생하여 프로브의 향상된 장벽 효과로 인해 TC-AuNP의 안정성을 보여준다.
- [0133] 병원성 DNA의 비색 검출
- [0134] 8mM NaCl 용액의 존재 하에서 표적 DNA (20 fM)가 있거나 없는 TC-AuNP의 UV- 가시광 흡수 스펙트럼은 도 4a에 나와 있다.
- [0135] 표적 매체는 535nm에서 흡수 피크를 보였으며, 이는 비 표적 매체에서 더 높은 파장(540nm)으로 이동하여 TC-AuNP의 응집을 나타낸다. 파장의 이러한 변화는 표적 조건에서 프로브 DNA의 낮은 차폐 효과로 인해 응집을 유발했다.
- [0136] 이 응집은 전자 접합을 유도하고 UV 가시 스펙트럼에서 적색 이동을 촉진한다.
- [0137] 8mM NaCl 용액의 존재하에 표적 DNA가 있거나 없는 TC-AuNPs의 비색 변화는 도 4a의 삽입에 표시된다.
- [0138] TC-AuNP의 응집으로 인해 표적 배지에서 상당한 색상 변화(적색 → 청색)가 관찰되었다. 이에 비해 비 타겟 매체에서는 이러한 색상 변화가 발생하지 않았다.
- [0139] 표적 DNA (20 fM)가 있거나 없는 TC-AuNP의  $A_{620}/A_{520}$  값의 변화는 분광 광도계로 평가되었으며 그 결과는 도 4b에 나와 있다.
- [0140] 표적 DNA가 TC-AuNP의 응집을 나타내는 비 표적 DNA보다 높은 값을 나타내는 것을 보는 것은 흥미로웠다. 이것은 하이브리드 ssDNA 프로브의 열악한 차폐 효과와 이온 조건 하에서 표적 매질의 보완 표적에 기인한다.
- [0141] ssDNA 프로브와 표적 및 비 표적 병원성 DNA의 서로 다른주기의 혼성화는 겔 전기 영동 기법으로 모니터링되었으며 그 결과는 도 9에 나와 있다.

[0142] 표적 DNA는 ssDNA 프로브와 혼성화되었고, 혼성화되지 않은 비-표적 DNA보다 더 큰 강도를 나타냈다.

[0144] 병원성 DNA가 있거나 없는 TC-AuNP의 UHR-TEM 분석

[0145] ssDNA의 응집 거동은 8mM의 존재하에 표적 DNA(20 fM)가 있거나 없는 TC-AuNP를 통합했다.

[0146] NaCl 용액은 UHR-TEM으로 평가하였으며 그 결과는 도 5a와 b와 같다. 비 표적 매체는 TC-AuNP의 잘 분산된 특성을 보여준다.

[0147] TC-AuNPs의 응집이 표적 매체에서 관찰되는 반면. UHR-TEM 이미지는 비 표적 및 표적 매체에서 분산되고 응집된 TC-AuNP를 명확하게 보여 주어 각각 색상 변화를 유발한다.

[0148] 이 결과는 NaCl이 dsDNA의 존재하에 TC-AuNP를 불안정화한 반면 ssDNA는 AuNP를 안정화했음을 나타낸다.

[0149] 얻어진 결과를 바탕으로 이온 조건 하에서 TC-AuNP와 DNA의 상호 작용 메커니즘에 대한 모식적 모델을 제안하였으며, 그 모델은 도 6과 같다.

[0150] 합성된 TC-AuNP의 불안정화는 NaCl의 존재 하에서 발생했다. TC-AuNPs의 염 유도 응집은 용량 의존적 방식으로 ssDNA에 의해 방지된다.

[0151] 그러나 dsDNA의 존재 하에서는 차폐 효과가 관찰되지 않아 TC-AuNP의 응집을 유발했다. 이 차이는 TC-AuNP의 비색 변화에서 제어 인자로서 DNA 구조의 효과를 나타낸다.

[0152] ssDNA의 경우, 음으로 하전된 CNC와 인산염 사이의 정전기적 반발에 의해 DNA의 음으로 하전된 인산염 그룹이 TC-AuNP에서 멀어지는 반면, 질소 염기의 방향은 인력을 통해 하전된 CNC를 향하여 발생해서 보호층 형성을 유도하였다.

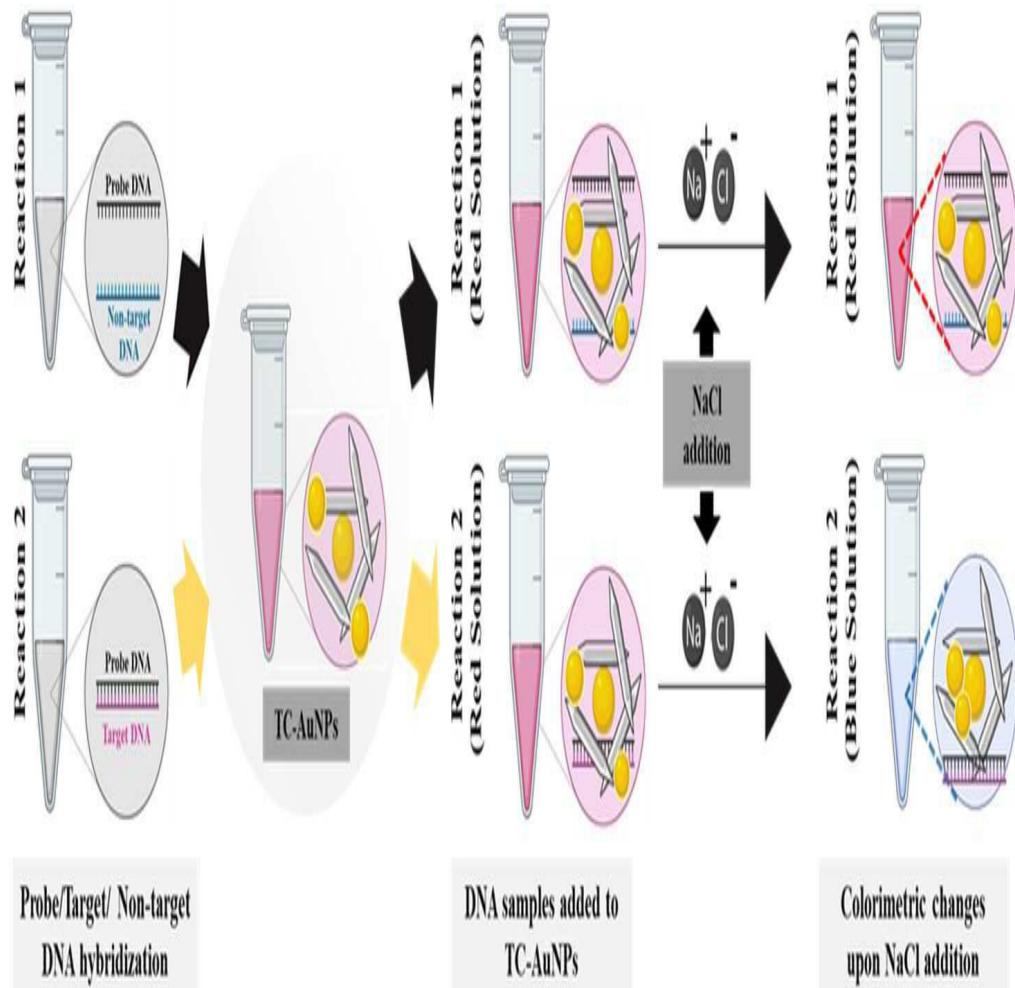
[0153] 이 층은 NaCl에 대한 장벽 역할을하며 TC-AuNP의 불안정화를 방지한다.

[0154] dsDNA의 경우 모든 질소 염기는 각각의 단위로 뚫렸다. 따라서 dsDNA의 질소 염기와 대전된 CNC 사이에 정전기 인력이 발생하지 않아 TC-AuNP 주변의 보호 층 형성이 제한되었으며 NaCl이 쉽게 불안정화되어 응집되어 결과적으로 색상이 변했다.

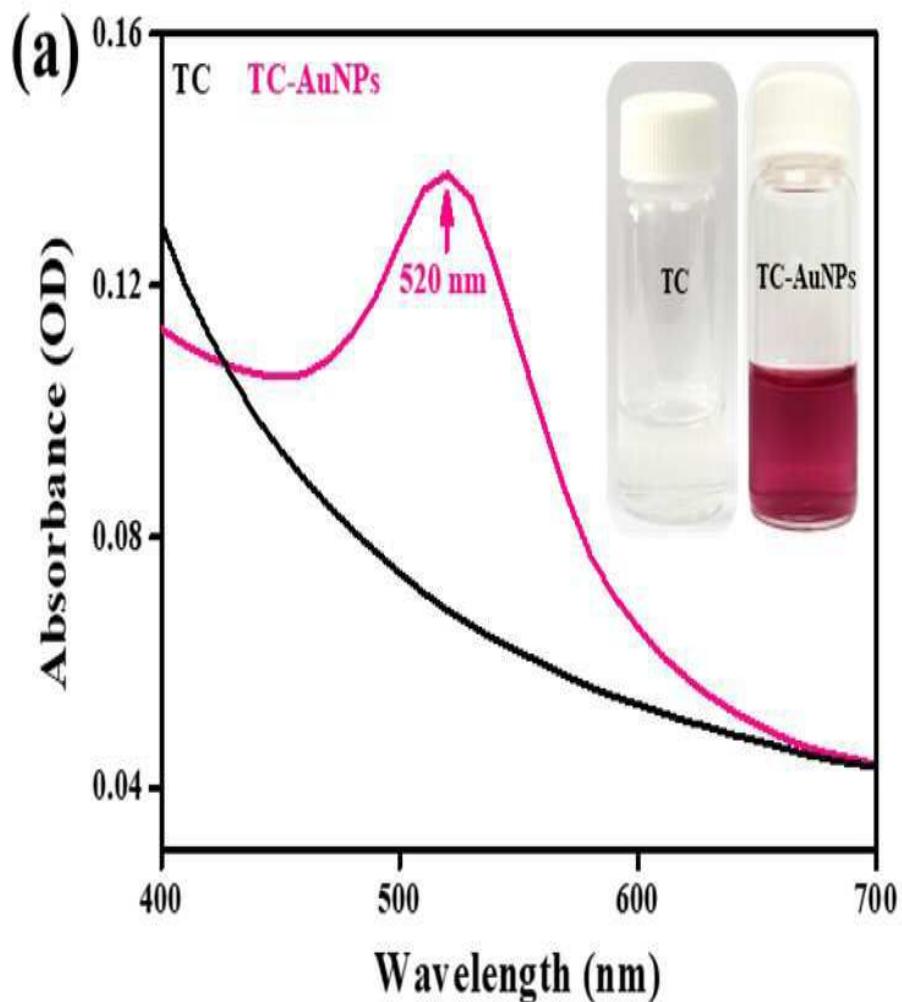
[0155] 본 발명자들은 합성된 TC-AuNP가 나노 셀룰로오스와 AuNP의 고유한 특성으로 인해 생체 분자의 검출에 유망한 잠재력을 가지고 있음을 강조한다.

## 도면

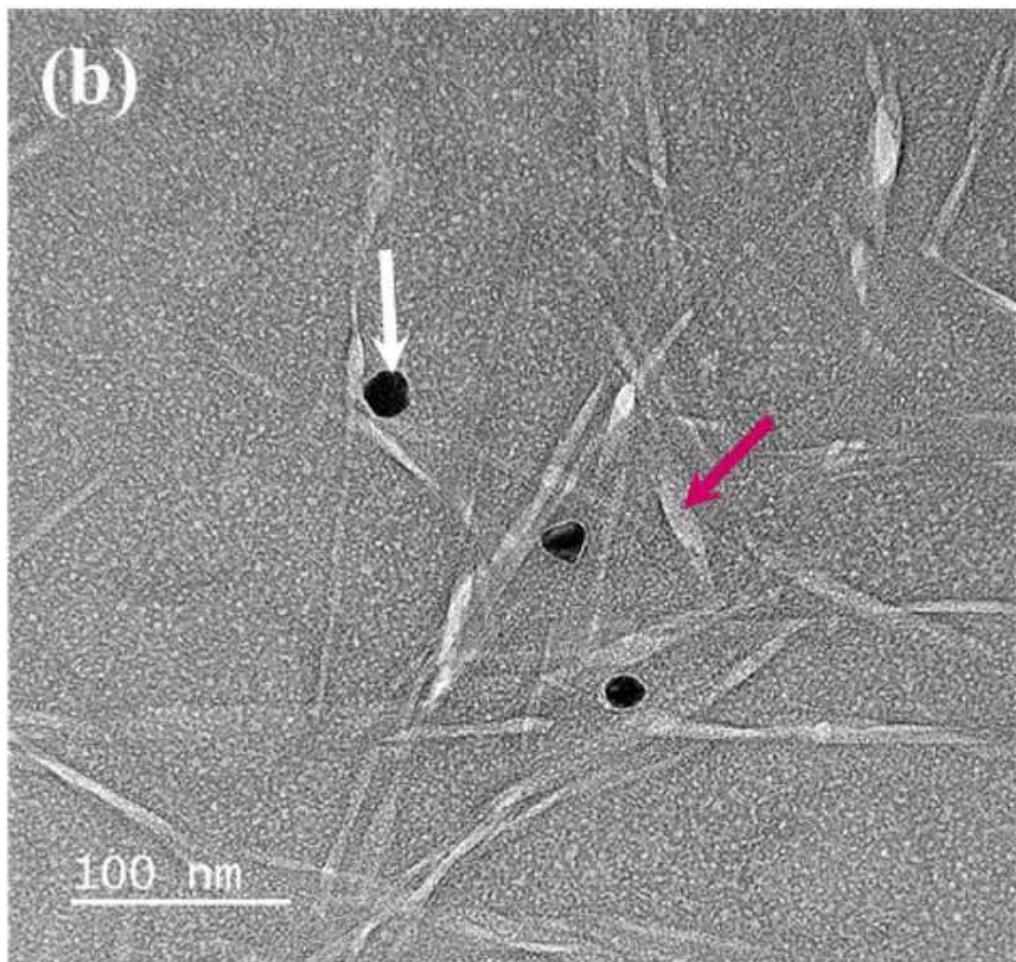
## 도면 1



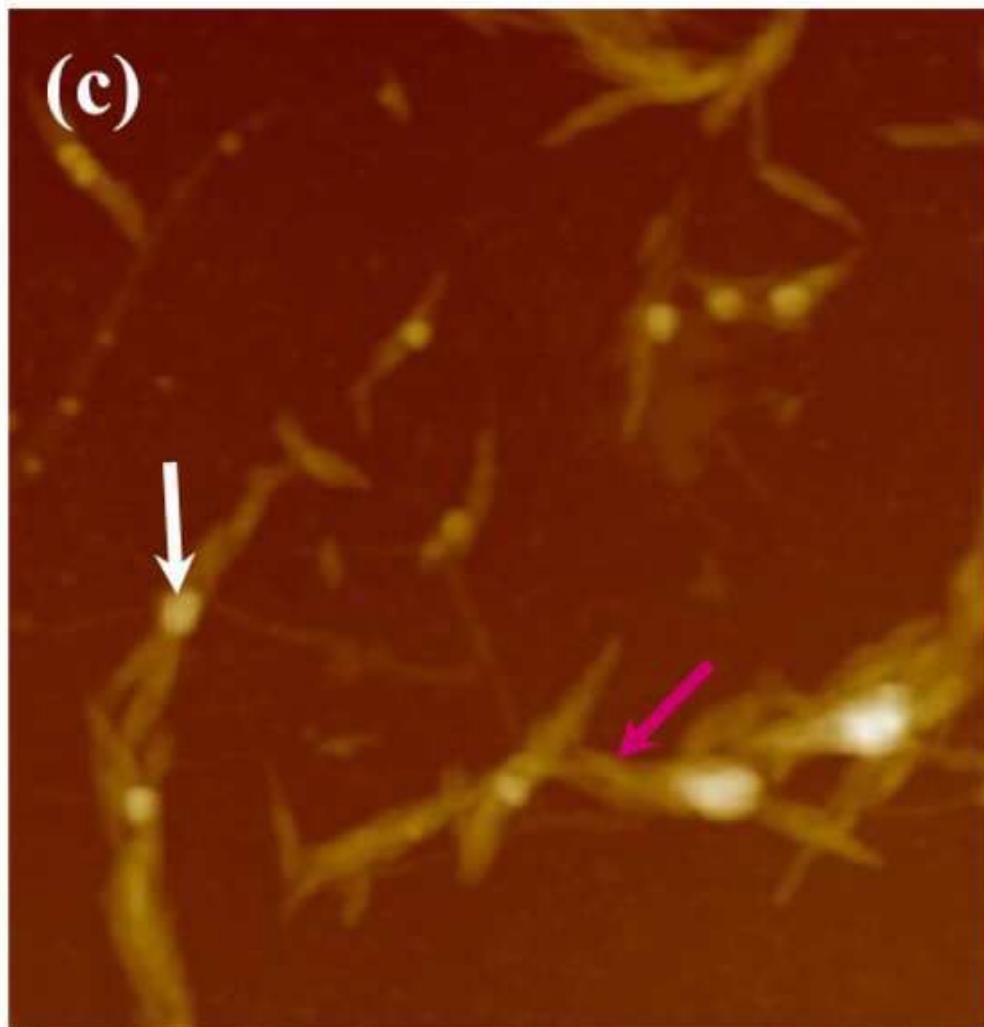
도면2a



도면2b



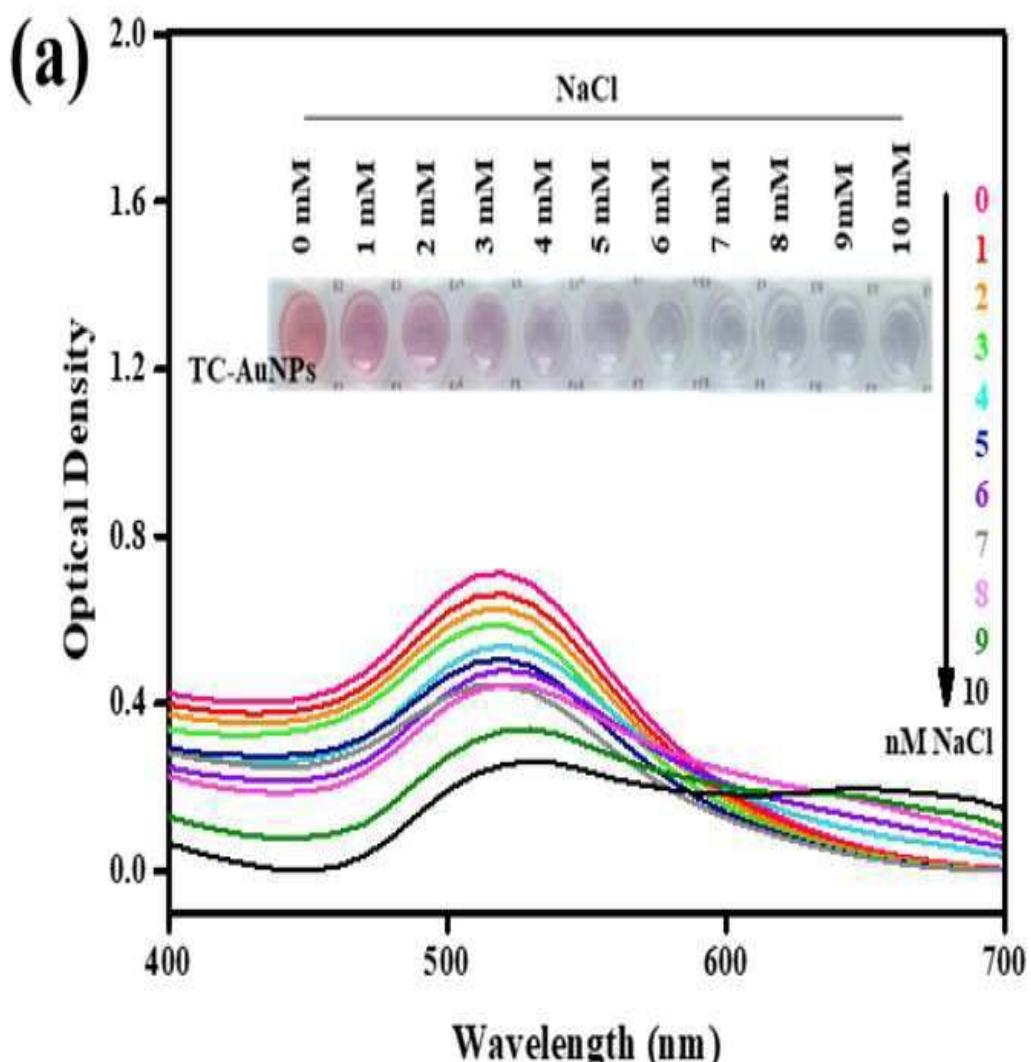
도면2c



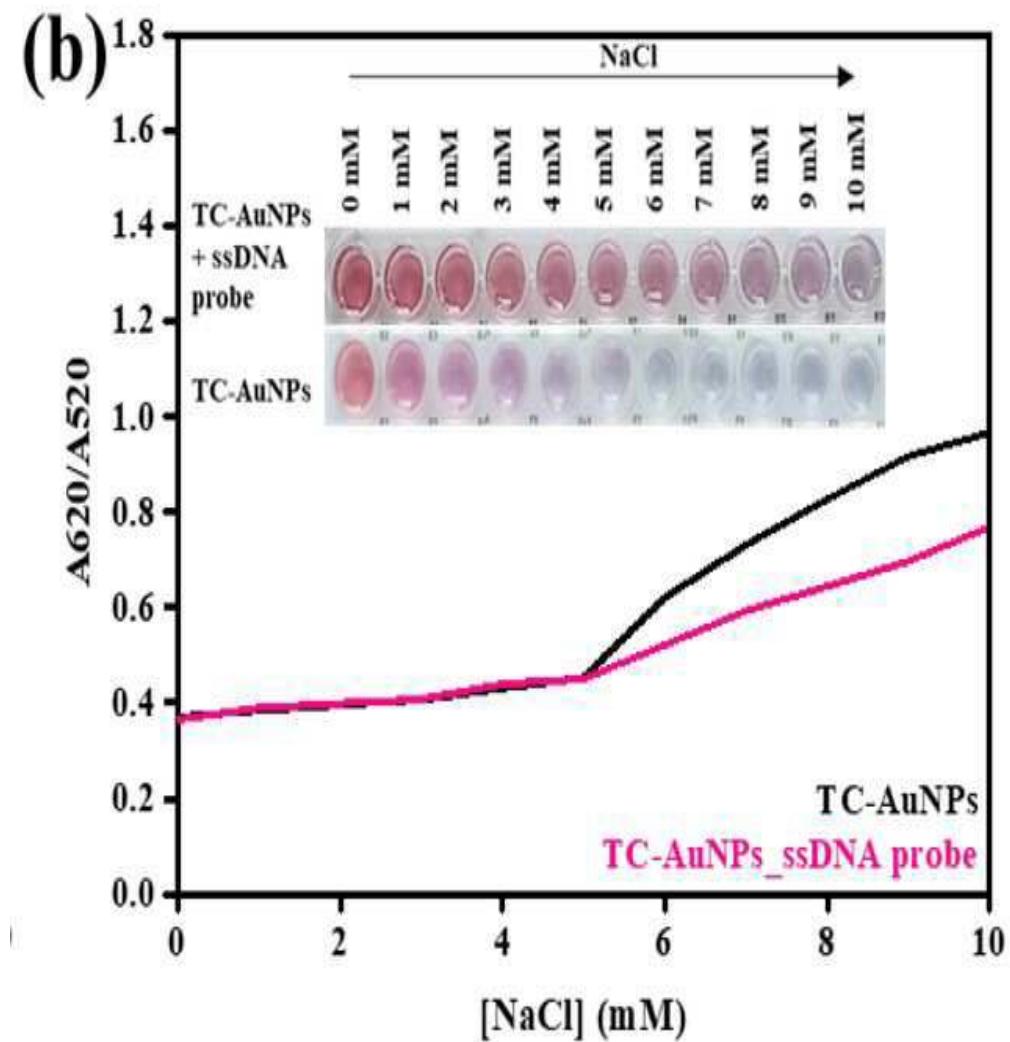
0.0

2.0 μm

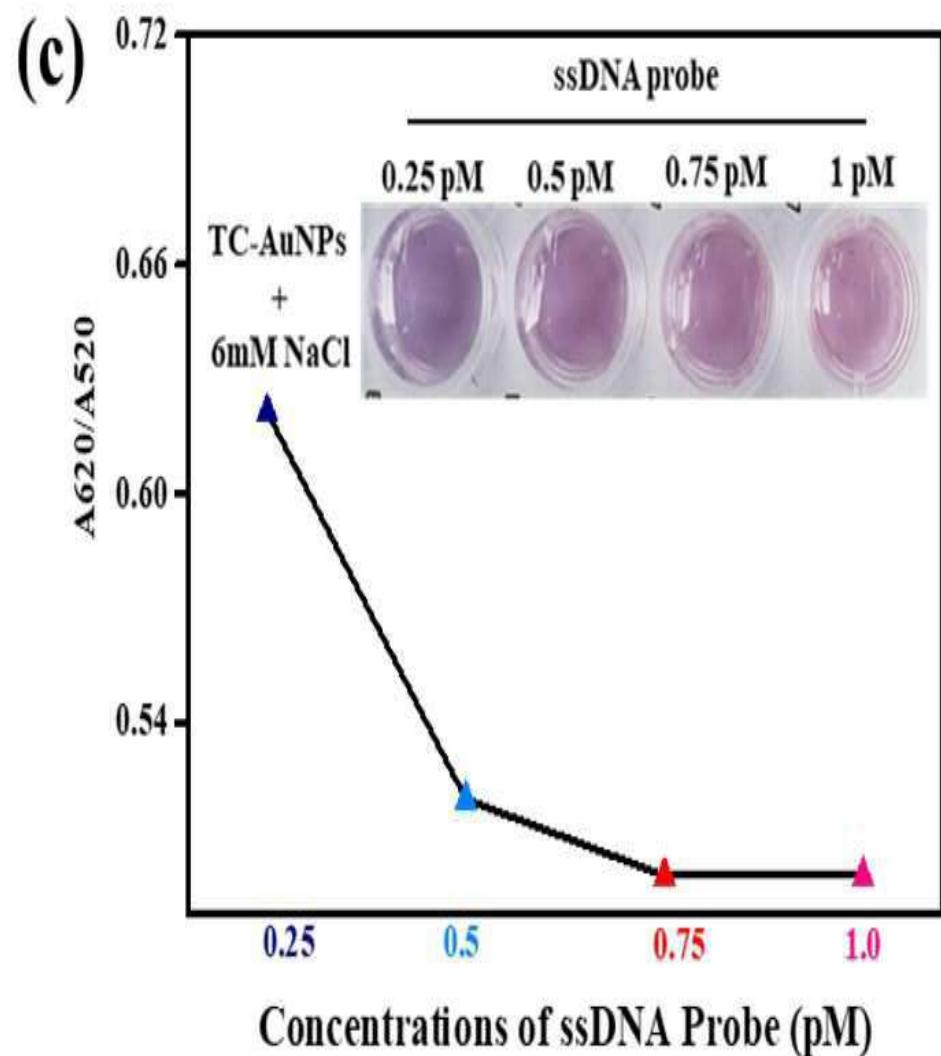
도면3a



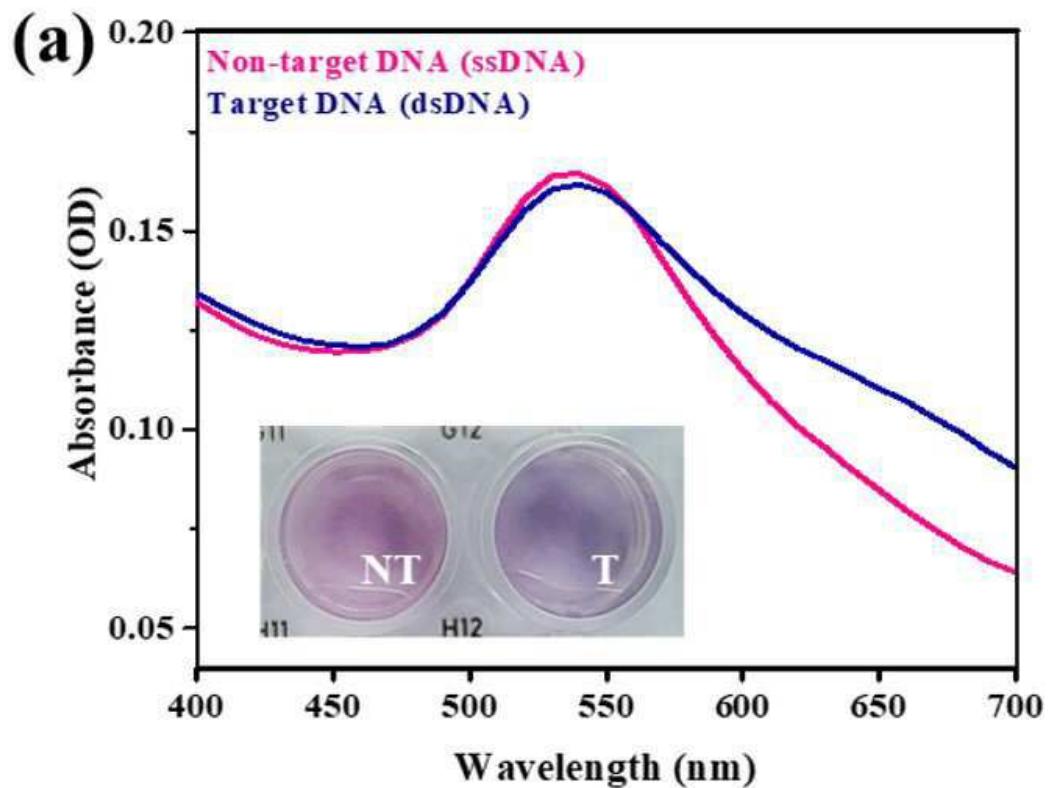
도면3b



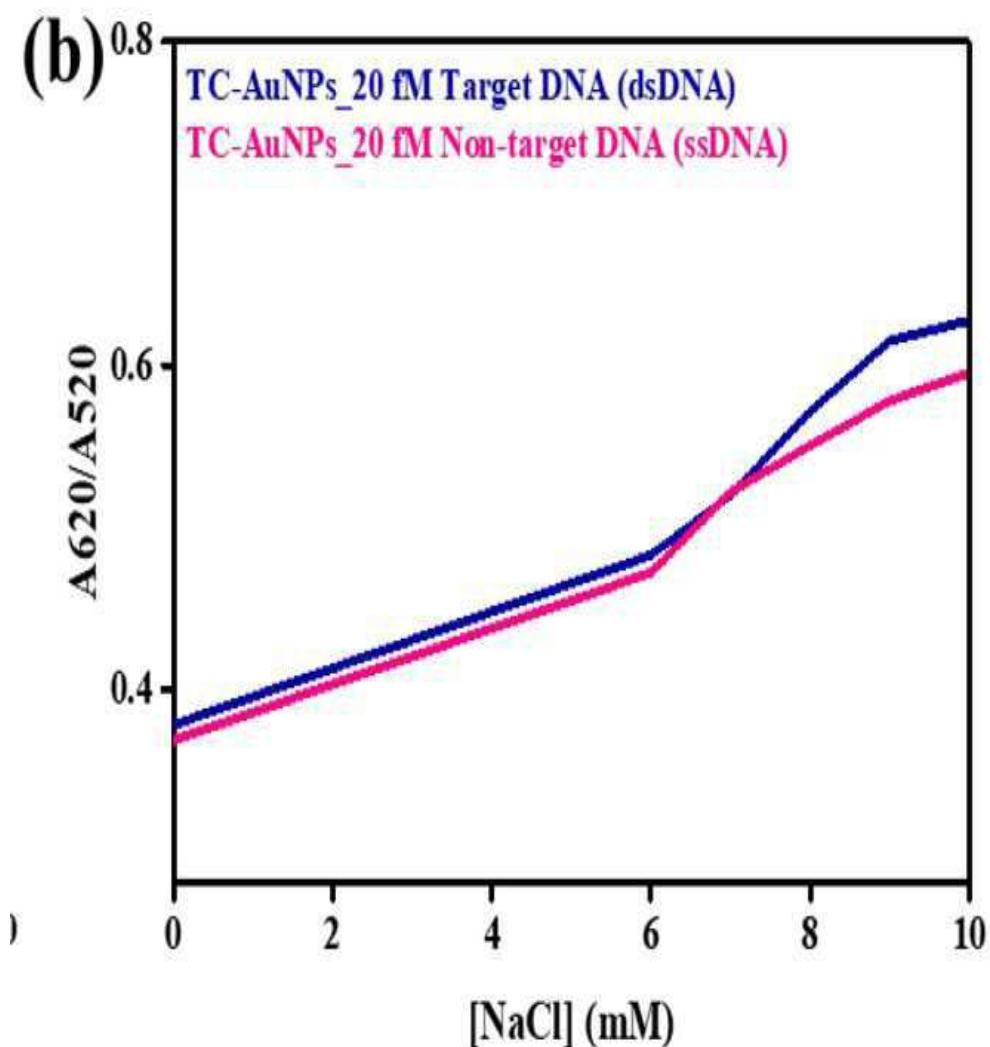
도면3c



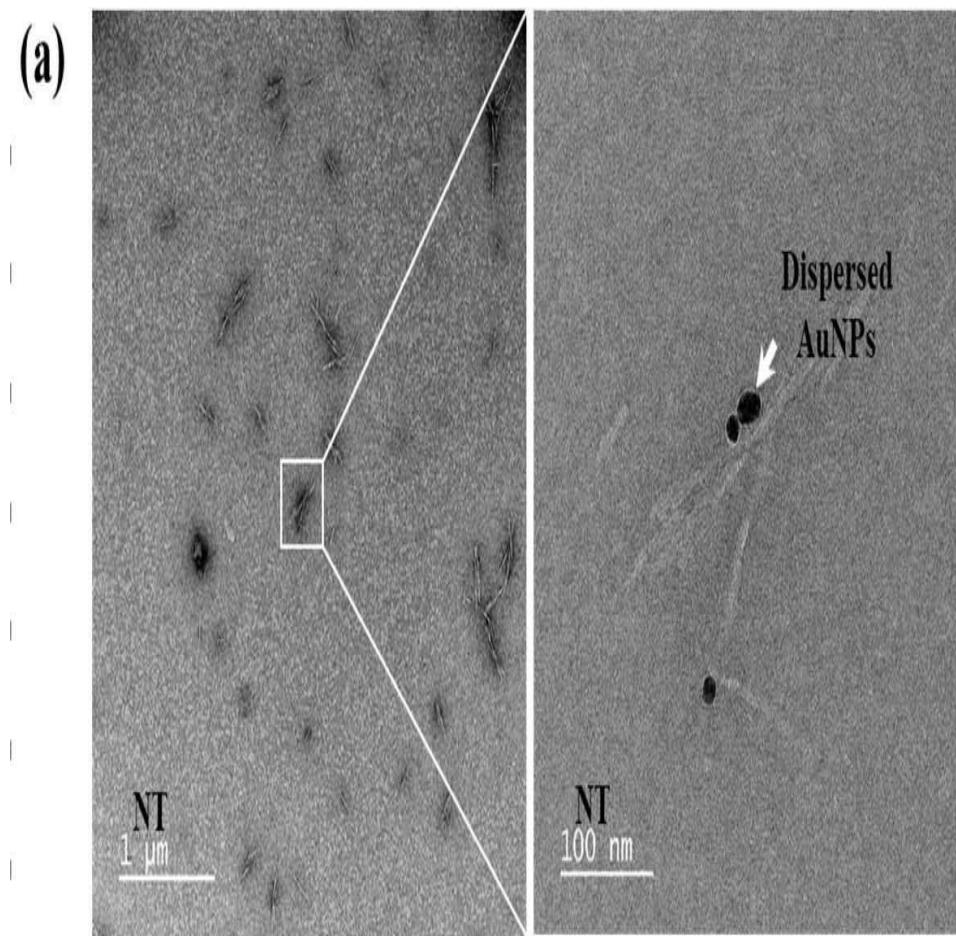
도면4a



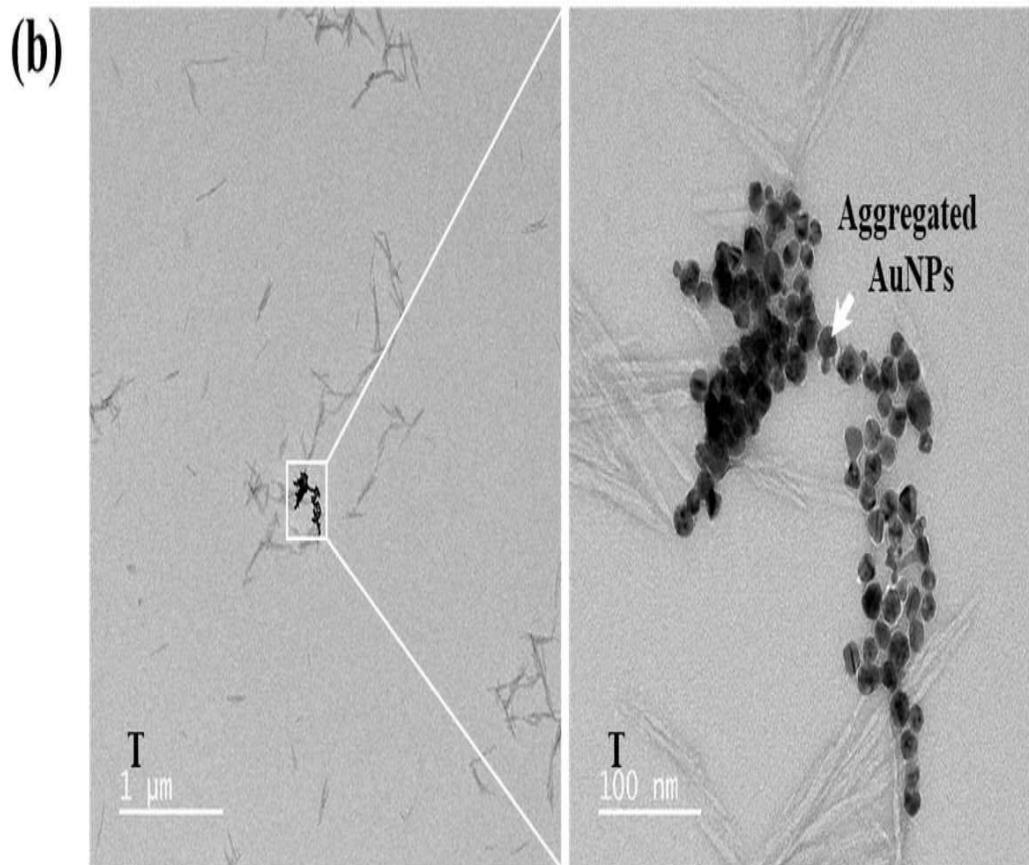
도면4b



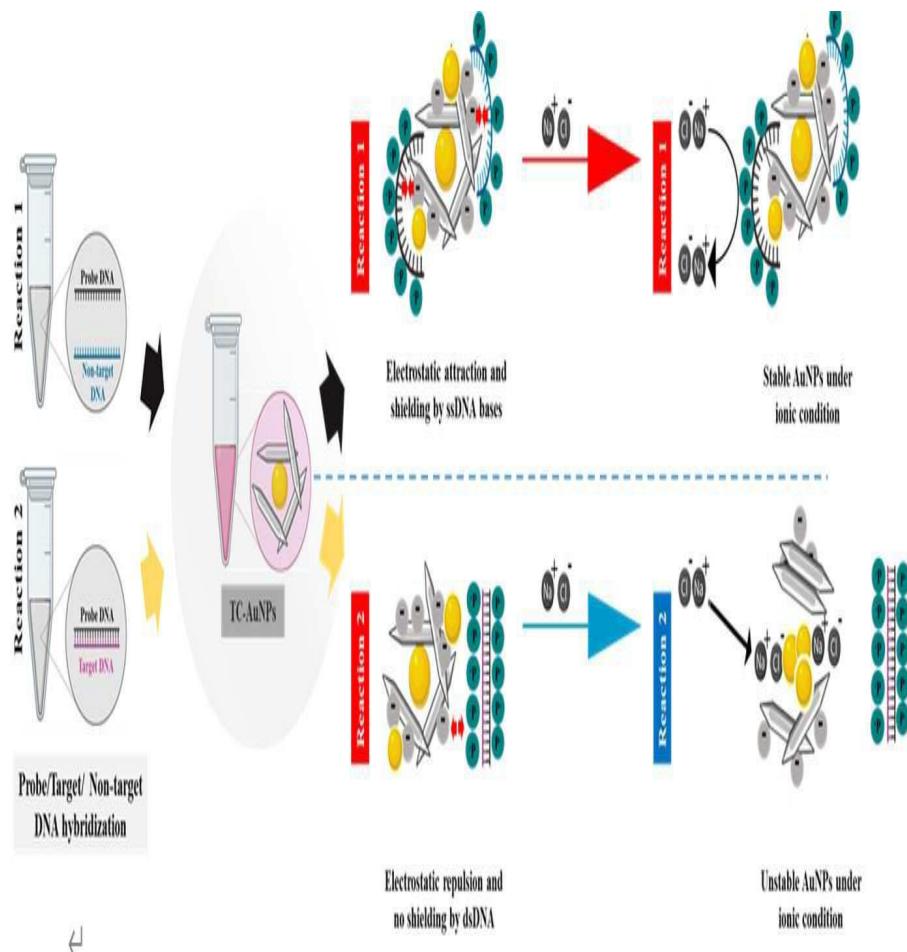
도면5a



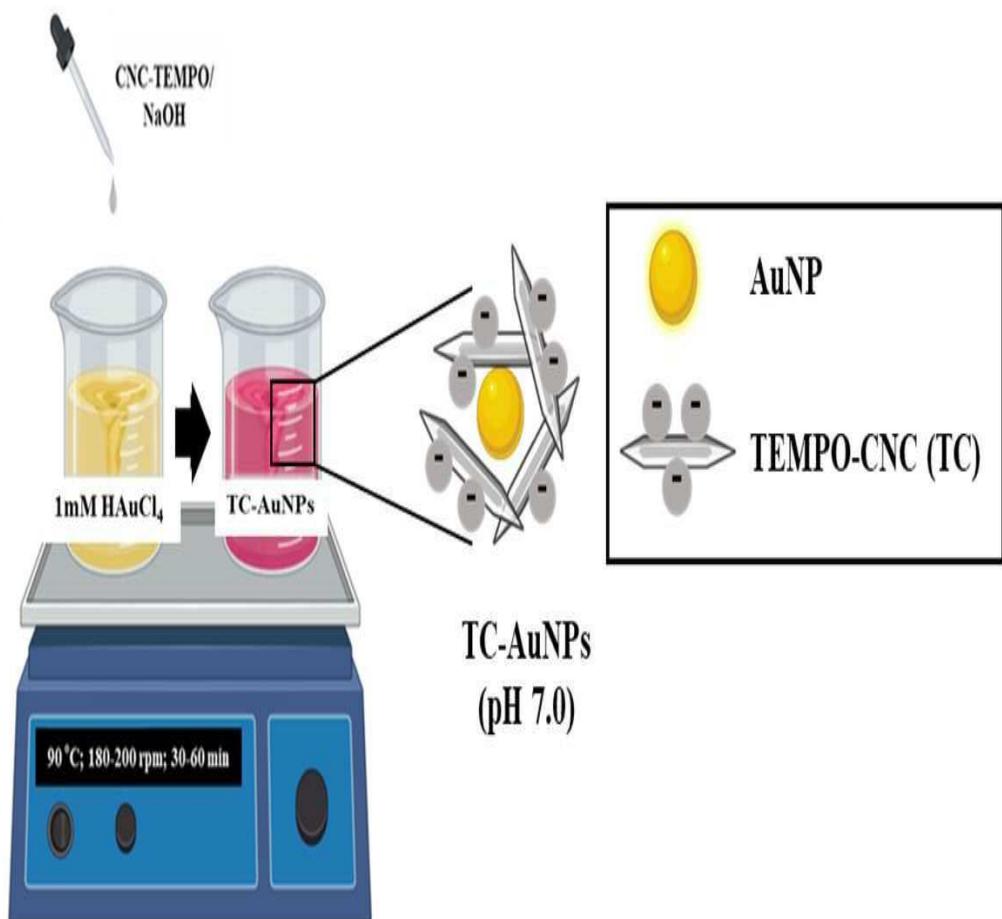
도면5b



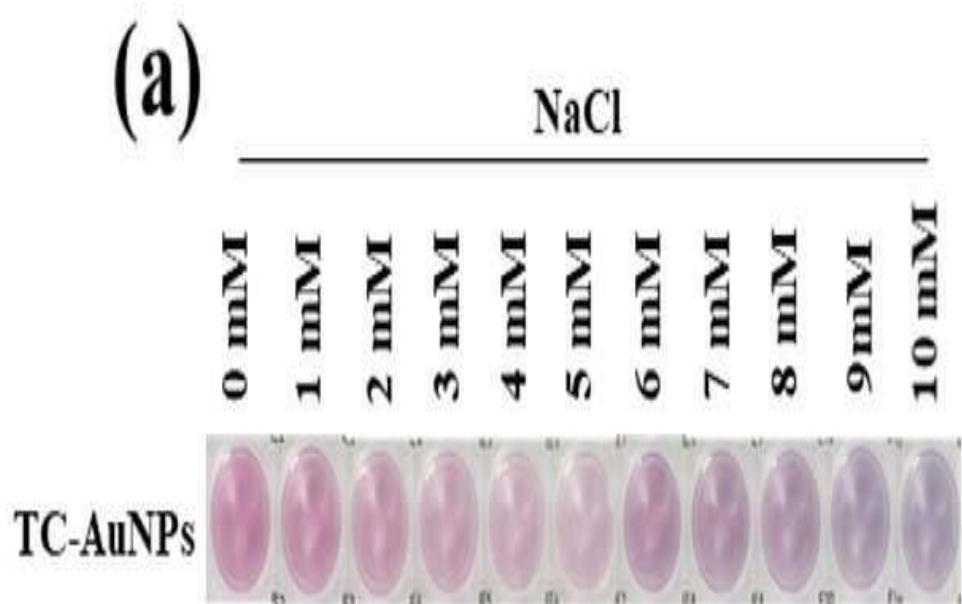
## 도면6



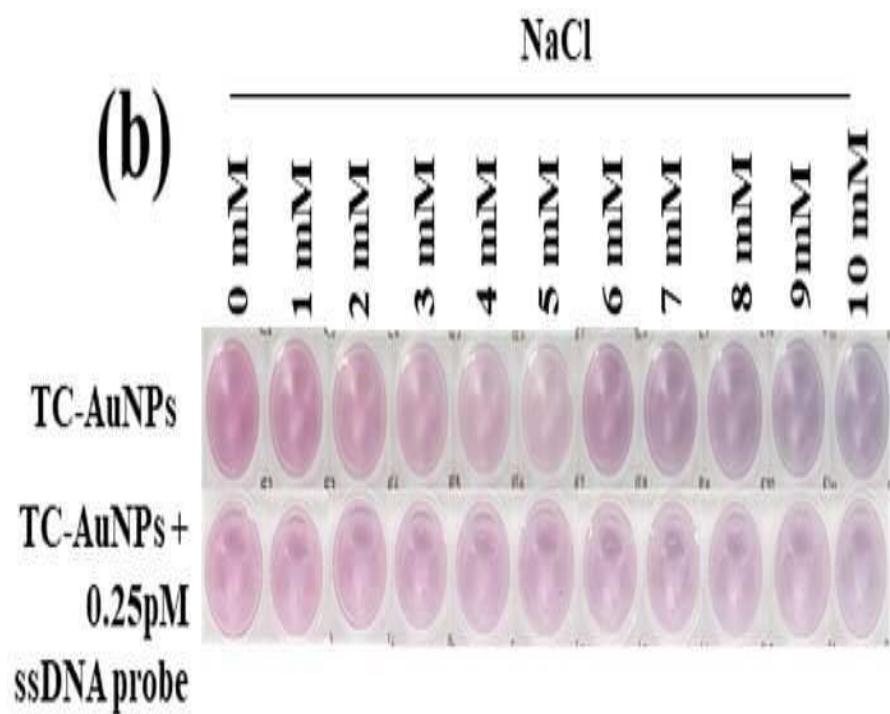
도면7



도면8a



### 도면8b



도면9

