



(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

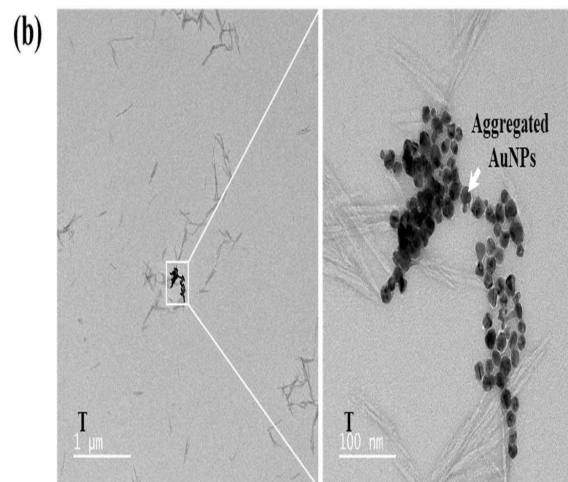
전체 청구항 수 : 총 12 항

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

(57) 요약

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.

대표도 - 도5b



(52) CPC특허분류

C12Q 2563/149 (2013.01)

C12Q 2563/155 (2013.01)

G01N 2333/31 (2013.01)

(72) 발명자

**렘 두타 사얀**

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

기 여 율 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-테트라메틸피페리딘-1-피페리디닐옥시(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-테트라메틸피페리딘-1-피페리디닐옥시(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-테트라메틸피페리딘-1-피페리디닐옥시(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-테트라메틸피페리딘-1-피페리디닐옥시(TEMPO) 산화된 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자 (AuNP)와 혼합한 후 초 고해상도 투과 전자 현미경으로 모니터링하여 상기 하이브리다이제이션된 복합체와 2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-피페리디닐옥시(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- 테트라메틸피페리딘 -1- 피페리디닐옥시 (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 소요되는 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 일립소메트리 바이오센서, 광 도파로 바이오센서 등의 광학 바이오 센서 들이 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 의학 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 ng/ $\mu$ 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-테트라메틸피페리딘-1-피페리디닐옥시(TEMPO) 산화된 셀룰로오스 나노 결정 (TEMPO-CNCs)으로 캡핑된 금 나노 입자 (AuNP)인 것이 바람직하나 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-테트라메틸피페리딘-1-피페리디닐옥시(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-테트라메틸피페리딘-1-피페리디닐옥시(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 모니터링하여 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-테트라메틸피페리딘 -1- 피페리디닐옥시(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 시각화할 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 패턴 을 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 정제없이 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 (Bartosewicz, B., Bujno, K., Liszewska, M., Budner, B., Bazarnik, P., Pociński, T., Jankiewicz, B.J., 2018. Effect of citrate substitution by various  $\alpha$ -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 스톱 용액(50 mL)을 수성 매질에서 준비하고 어두운 조건에서 연속적인 기계적 교반으로 90 ° C까지 가열한 다음 500  $\mu$ L의 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 ( $\zeta$ ) 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.

[0090] 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

[0097] 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 Doc™ XRS + Imaging System)를 사용하여 캡처되었다.

[0100] 상기 실시예의 결과를 하기에 기재한다.

[0101] 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. HAuCl<sub>4</sub>와 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  $0.20 \pm 4.7$ 이다.

[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  $0.51 \pm 0.9$ 이다.

[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 분산 되고 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	$-36.9 \pm 10.4$	$107.4 \pm 57.86$	$0.20 \pm 4.70$
TC-AuNPs	$-43.4 \pm 7.5$	$1841 \pm 7.0$	$0.59 \pm 0.9$

[0113]

[0114] 표 2는 AuNP의 물리 화학적 특성; 샘플의 제타 전위 값, 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 → 10mM)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.

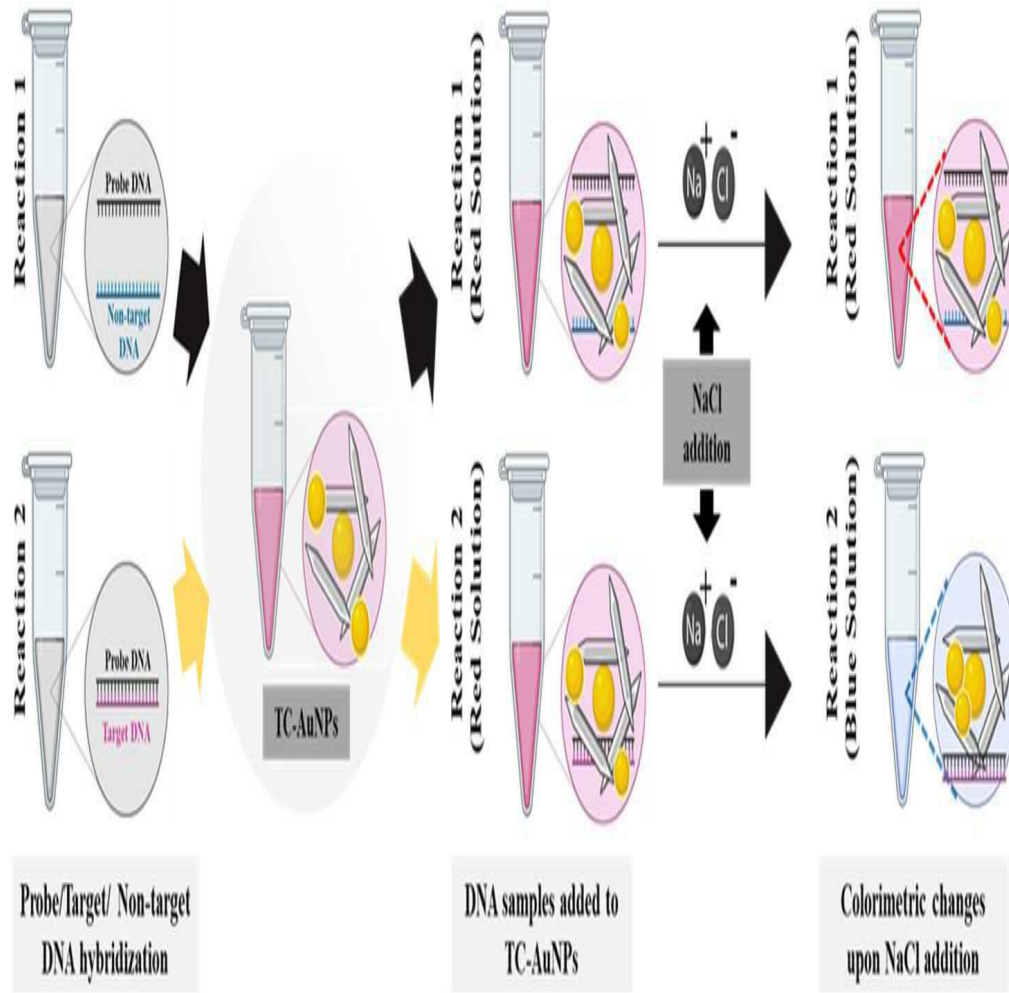
[0119] NaCl 용액의 농도가 다른 경우 TC-AuNPs 용액의 비색 변화는 도 3a의 삽입 부분에 나와 있다. NaCl 용액의 5mM 농도까지 현저한 색 변화가 관찰되지 않았으며, 이는 TC-AuNP의 안정성 한계를 나타낸다.

- [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 → 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 설딩의 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.

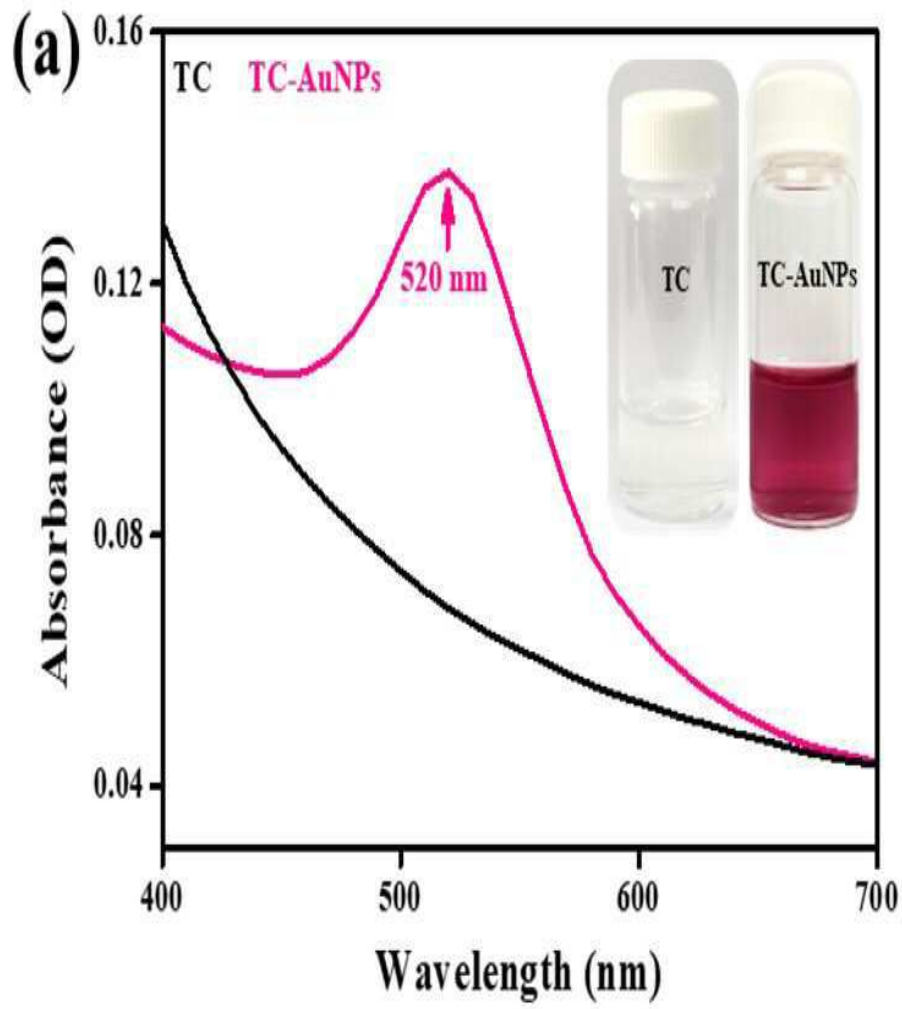
- [0142] 표적 DNA는 ssDNA 프로브와 혼성화되었고, 혼성화되지 않은 비-표적 DNA보다 더 큰 강도를 나타냈다.
- [0144] 병원성 DNA가 있거나 없는 TC-AuNP의 UHR-TEM 분석
- [0145] ssDNA의 응집 거동은 8mM의 존재하에 표적 DNA(20 fM)가 있거나 없는 TC-AuNP를 통합했다.
- [0146] NaCl 용액은 UHR-TEM으로 평가하였으며 그 결과는 도 5a와 b와 같다. 비 표적 매체는 TC-AuNP의 잘 분산된 특성을 보여준다.
- [0147] TC-AuNPs의 응집이 표적 매체에서 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 묶였다. 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

도면1

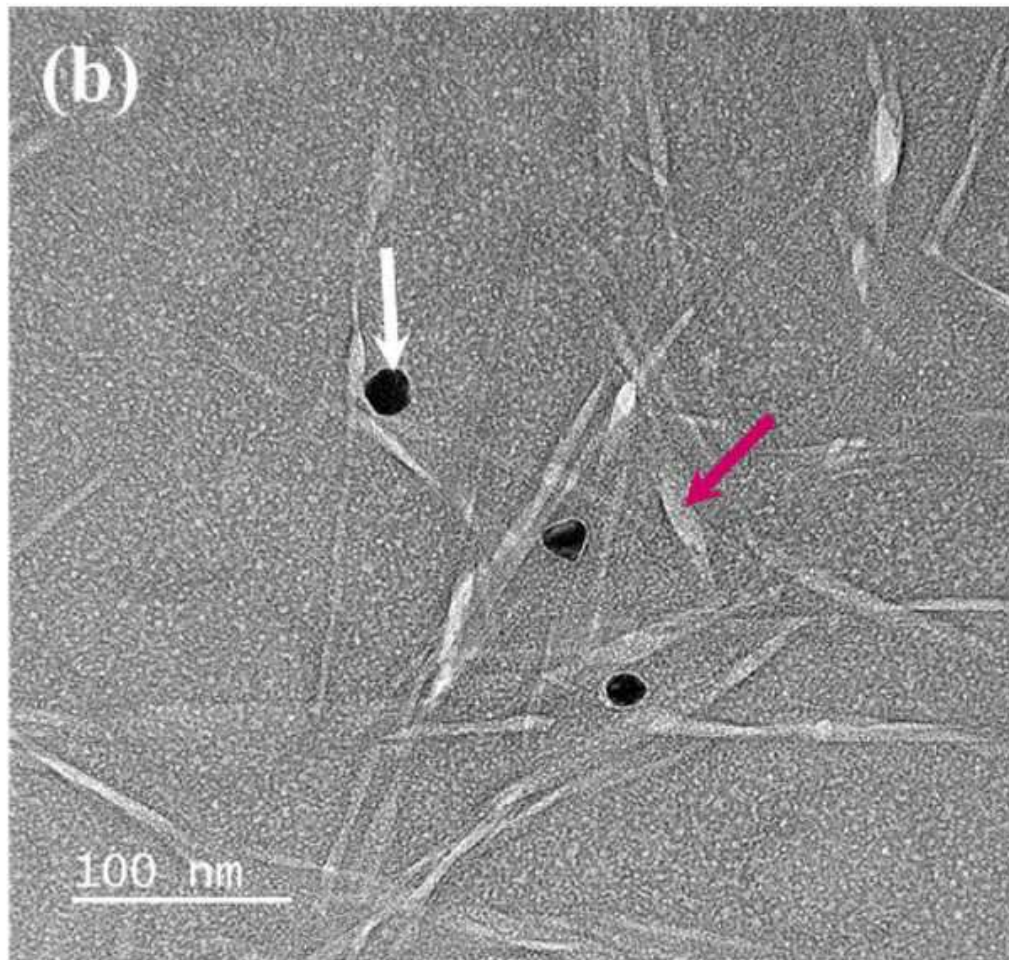


도면2a



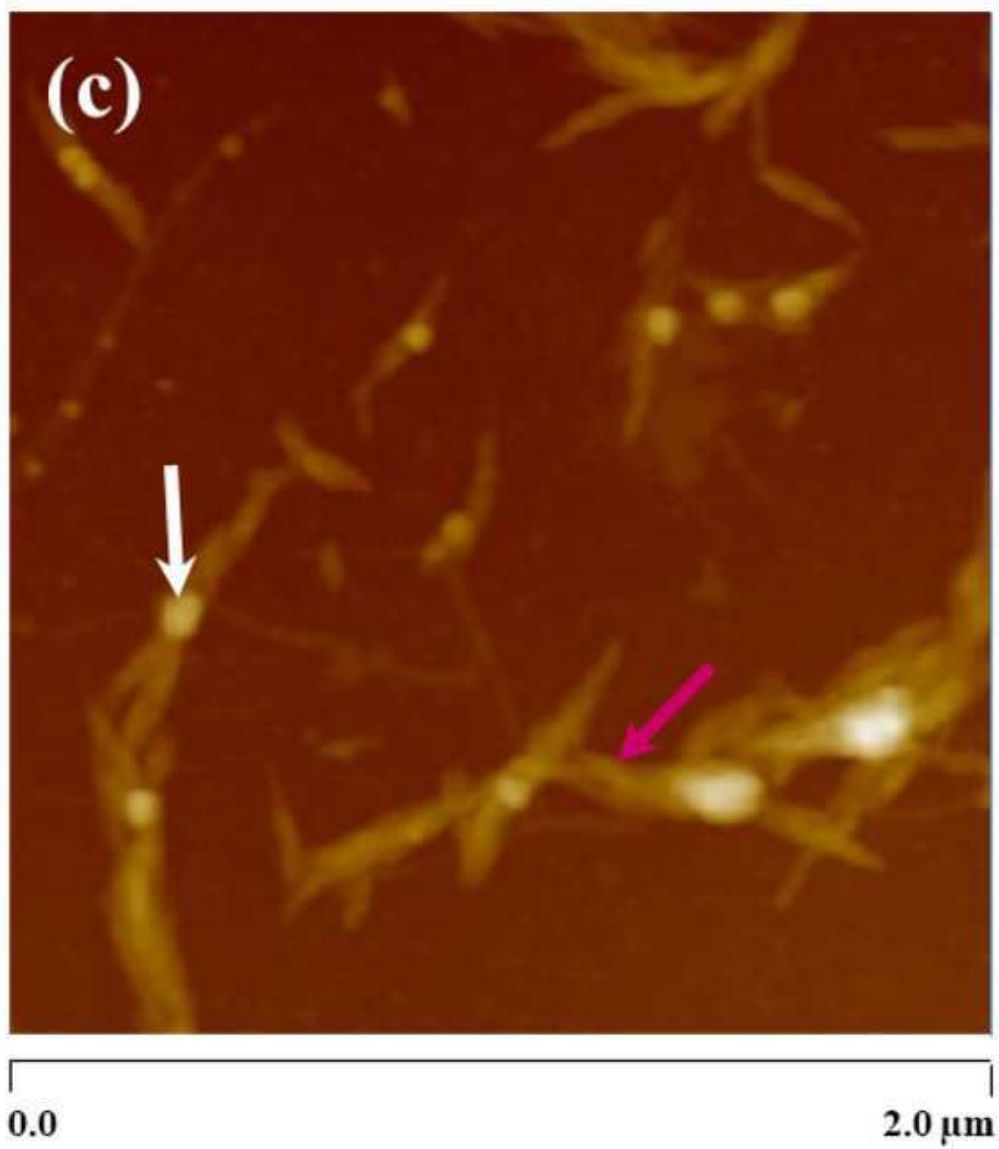


도면2b

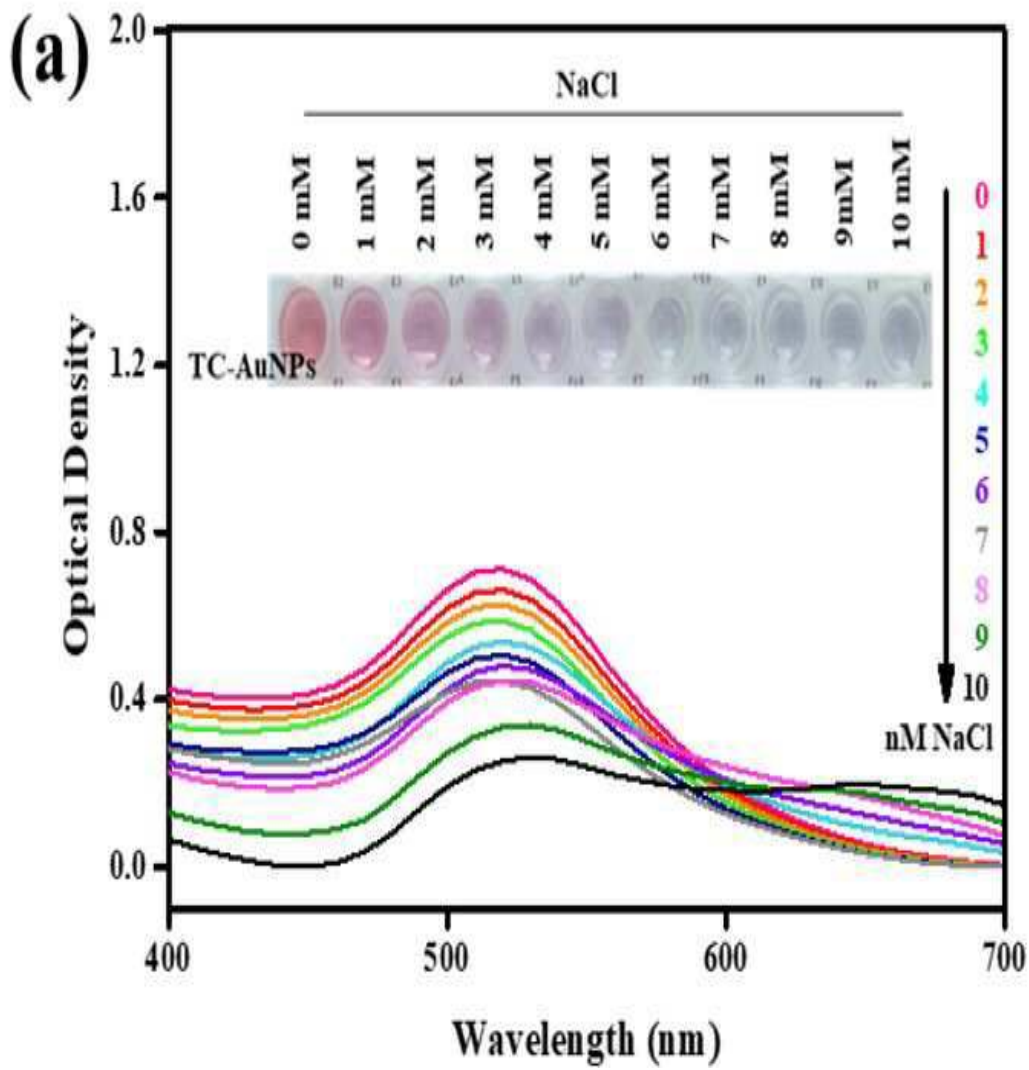




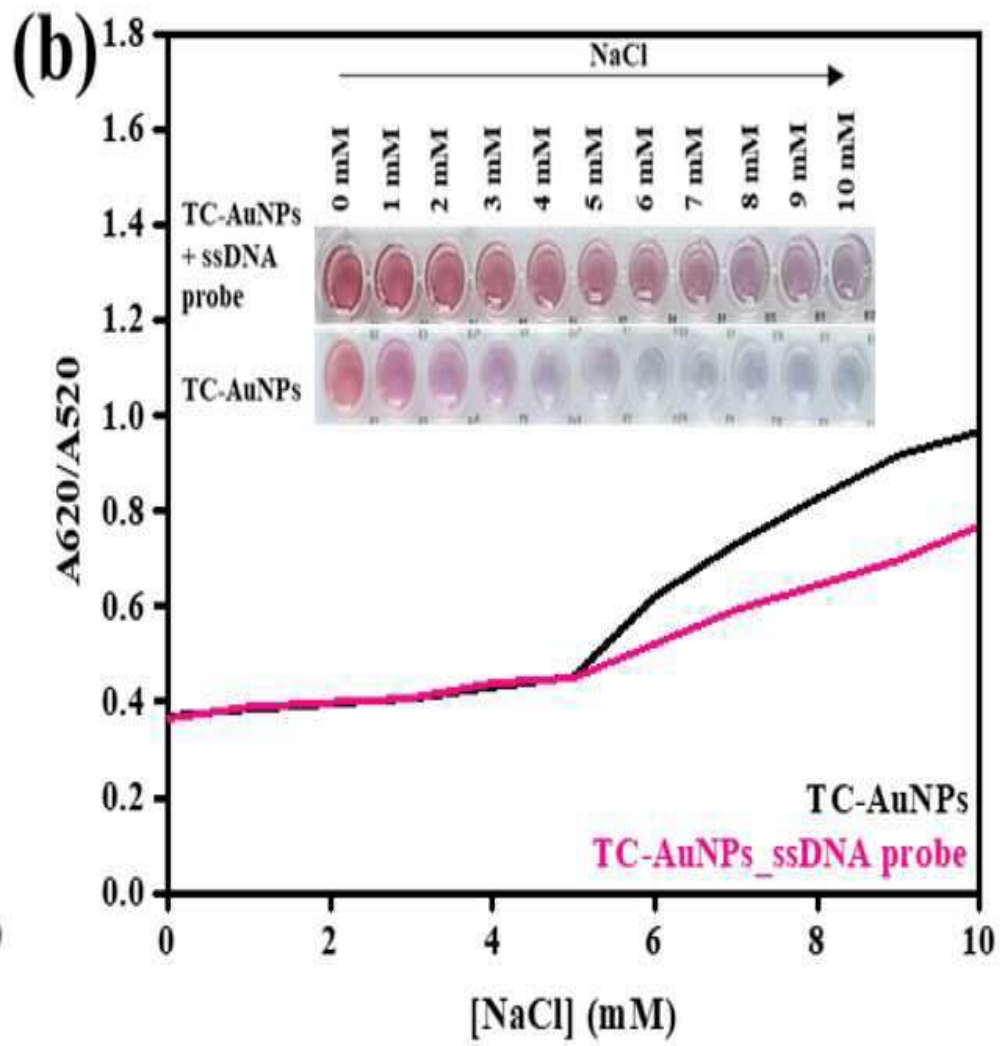
도면2c



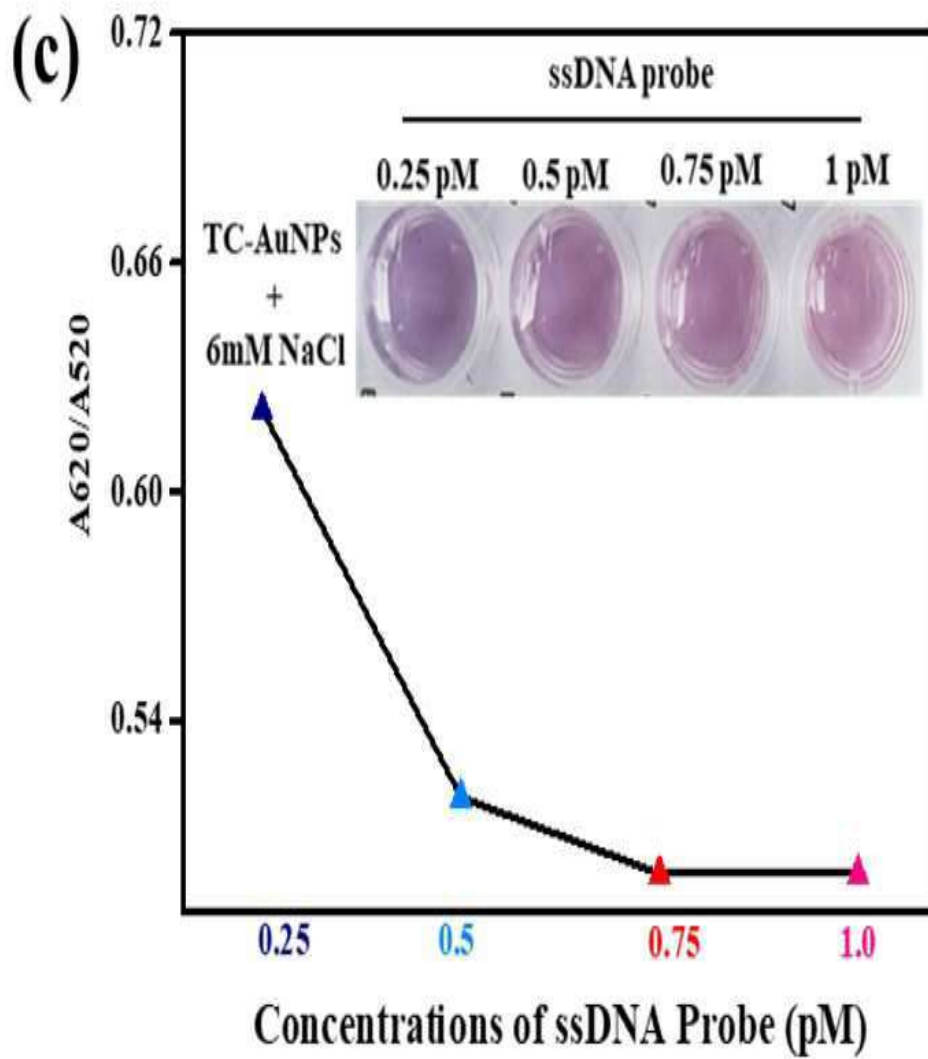
도면3a



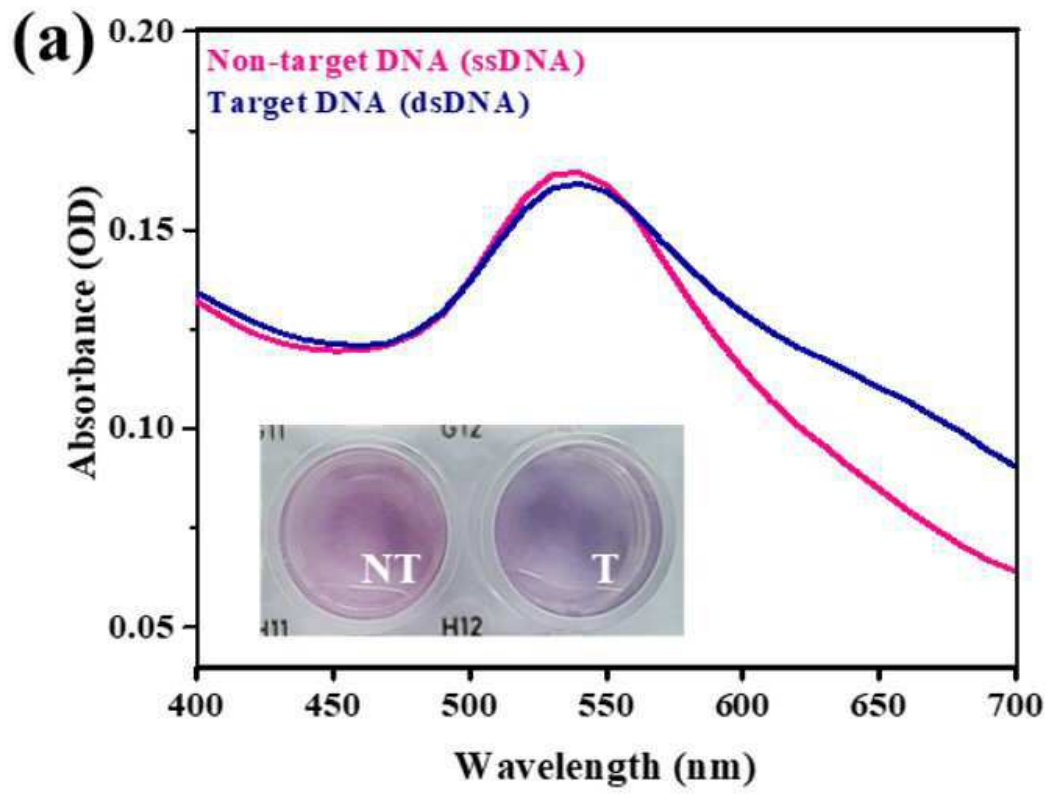
도면3b



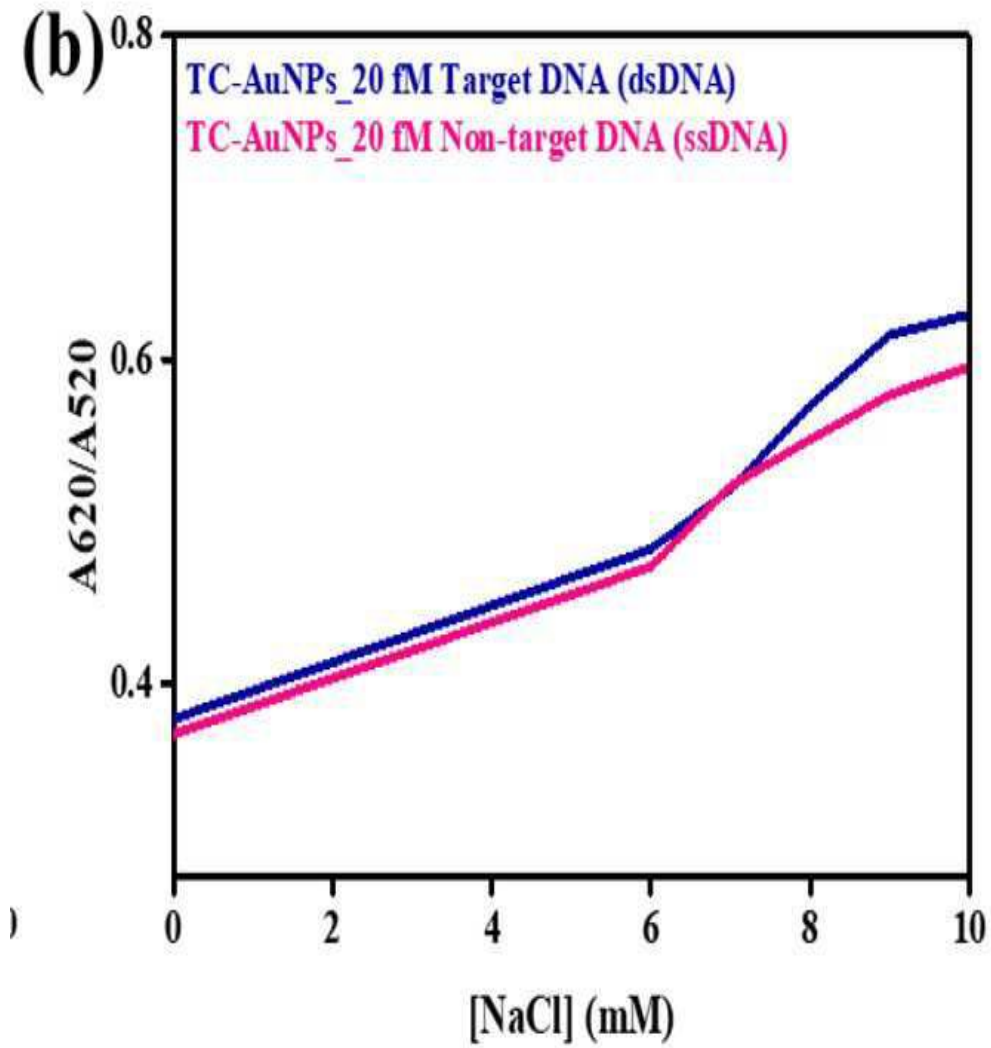
도면3c



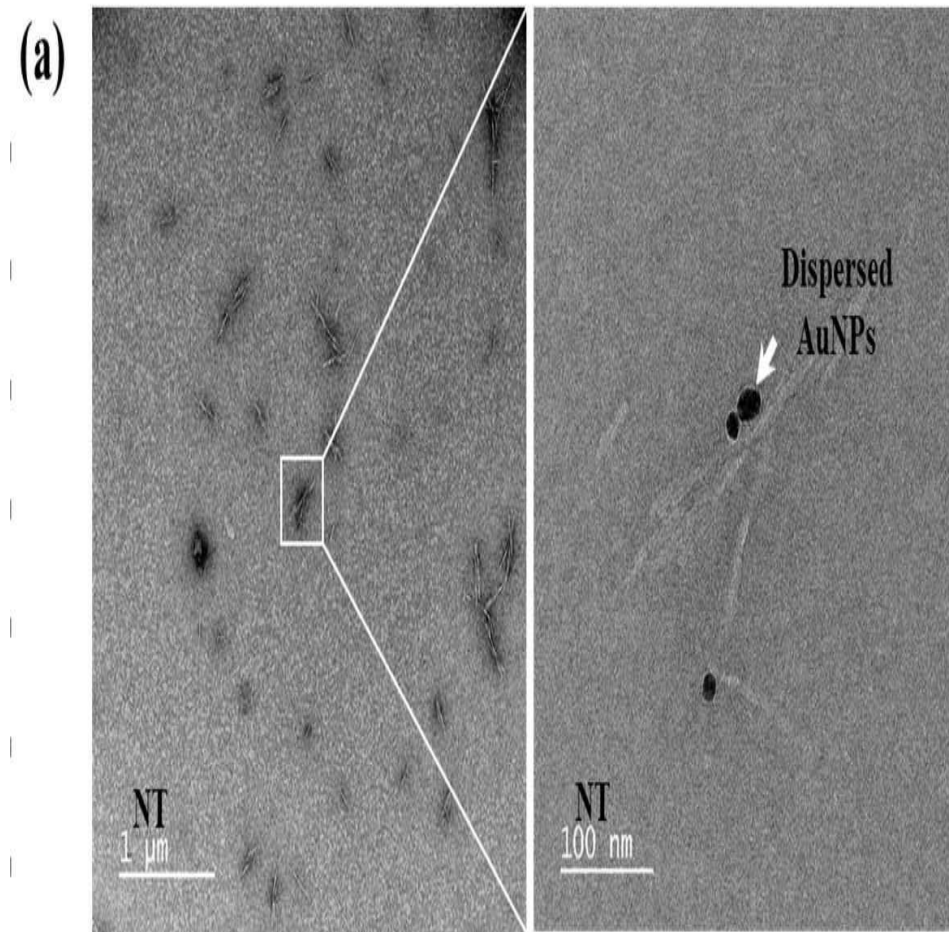
도면4a



도면4b

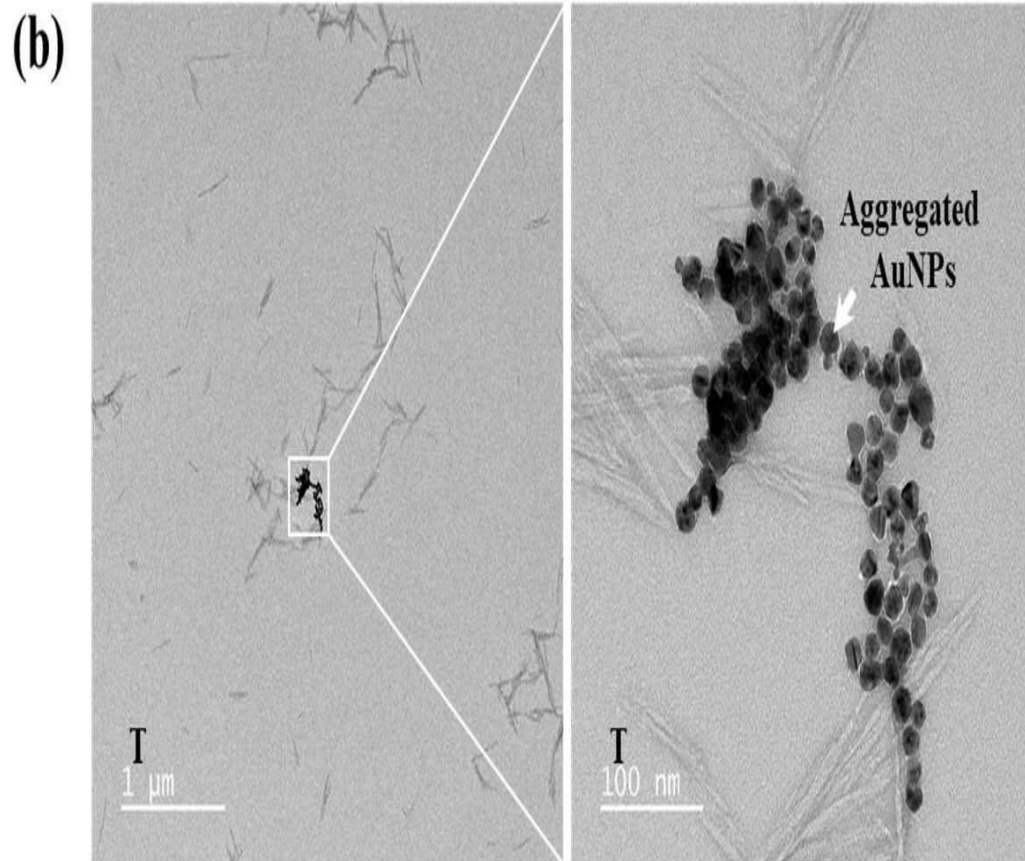


도면5a

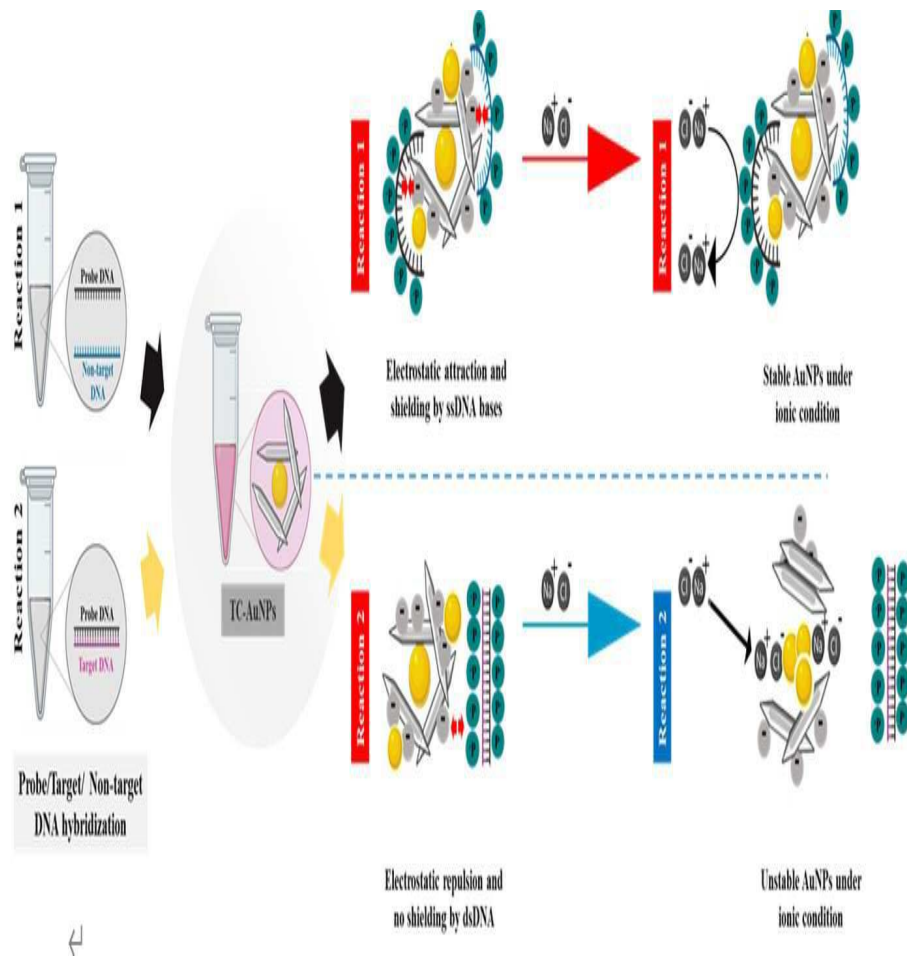




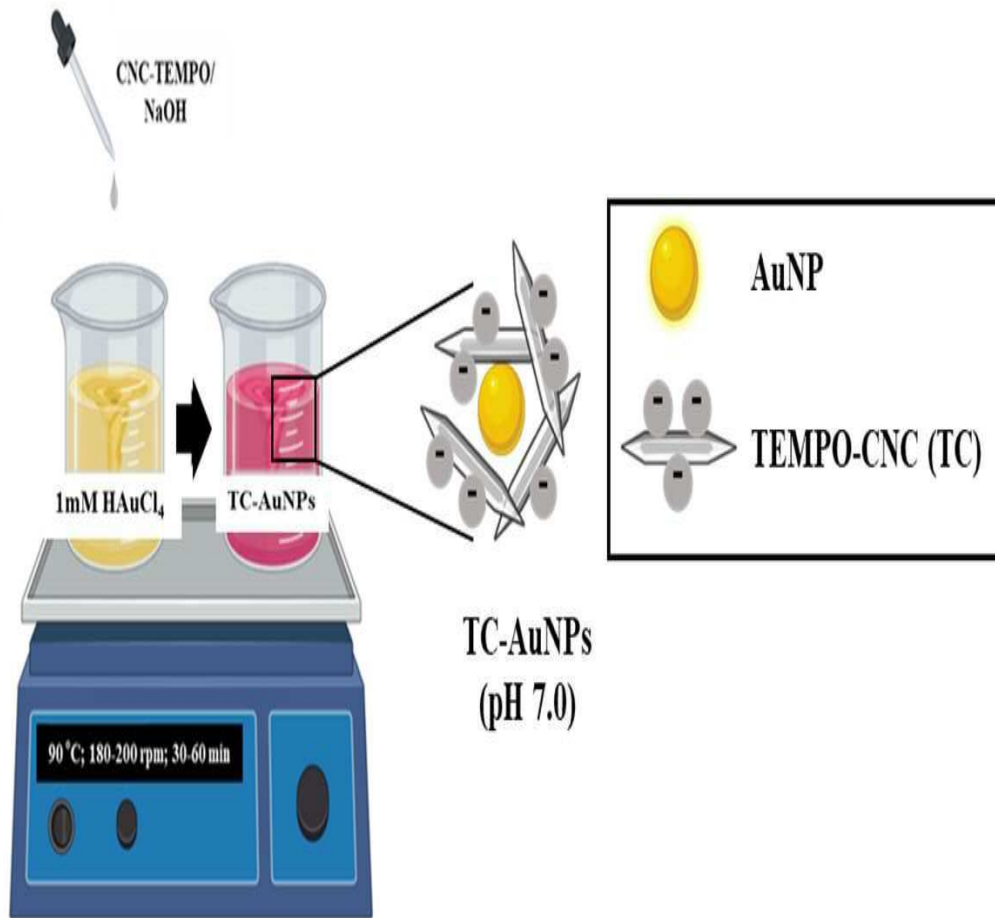
도면5b



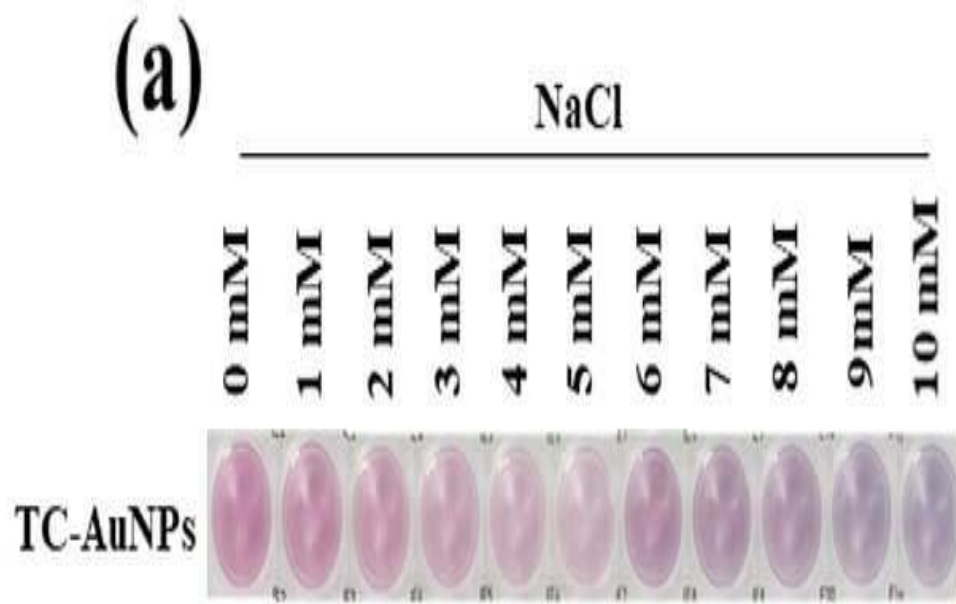
도면6



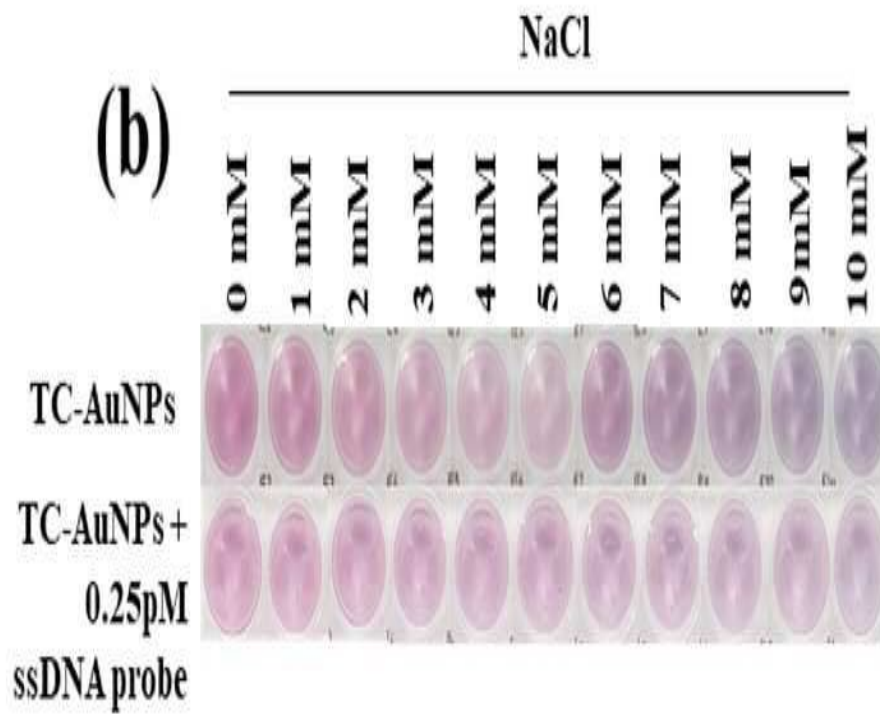
도면7



도면8a



도면 8b



도면9

