



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2016년10월28일  
 (11) 등록번호 10-1670032  
 (24) 등록일자 2016년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12Q 1/26 (2006.01) G01N 21/78 (2006.01)  
 G01N 33/52 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2013-0056950  
 (22) 출원일자 2013년05월21일  
 심사청구일자 2013년05월21일  
 (65) 공개번호 10-2013-0130640  
 (43) 공개일자 2013년12월02일  
 (30) 우선권주장  
 1020120054343 2012년05월22일 대한민국(KR)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020110033575 A\*  
 KR1020110128128 A  
 KR100616426 B1  
 KR1020040093048 A  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 고려대학교 산학협력단  
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)  
 광주과학기술원  
 광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동)  
 (72) 발명자  
 김중배  
 서울 강남구 역삼로 309, 101동 1501호 (역삼동, 래미안벤처빌)  
 김민곤  
 광주광역시 북구 첨단과기로 123(오룡동) 광주과학기술원 물리학과  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 특허법인이룸리온, 특허법인리온

전체 청구항 수 : 총 9 항

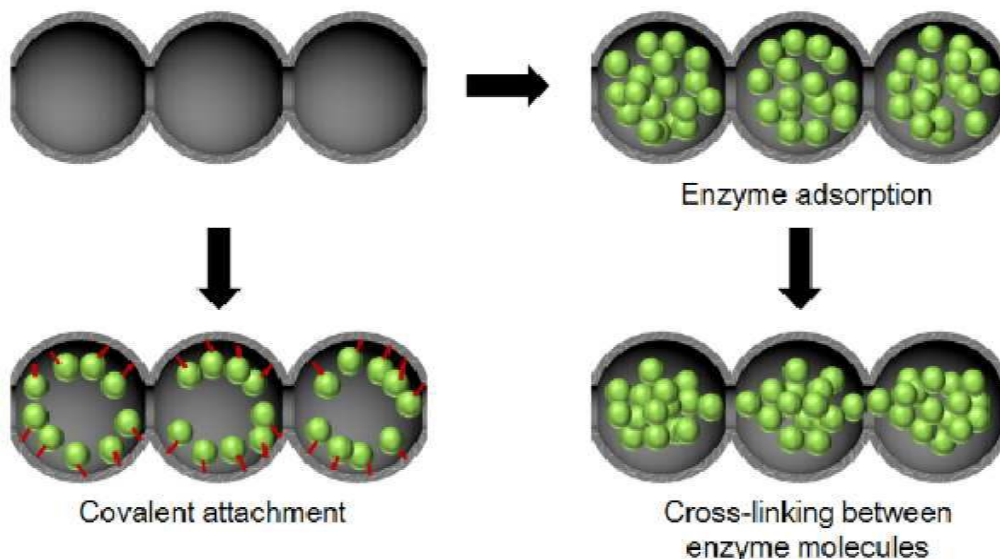
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **광학 바이오센서**

**(57) 요약**

본 발명은 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 효소의 복합체를 포함하는 광학 바이오센서 및 이것의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 광학 바이오센서는 발색제가 흐르지 않고 한 곳에 집중되어 있으므로 민감도가 현저하게 향상된다. 또한 시간이 지날수록 발색강도가 더욱 강해지므로 정량적 판단 및 정성적 분석이 가능하다.

**대표도** - 도4



(72) 발명자

**정효암**

광주광역시 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원

**위영호**

경기 광명시 광명로848번길 51, 1동 101호 (광명동, 은행연립)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011K000833

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 교육과학기술부

연구사업명 신기술 융합형 성장동력사업

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

기여율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.07.01 ~ 2012.06.30

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 산화 효소의 복합체; 및 발색효소를 포함하는 광학 바이오센서로서,

상기 산화효소는 상기 다공성 담체의 기공 내부에 흡착, 또는 공유결합 또는 가교결합에 의하여 고정화되며,

시료가 상기 다공성 담체 내로 유입되어 상기 담체 내에서 상기 시료와 상기 효소의 반응에 의한 발색반응신호가 일어나고,

상기 발색반응 신호는 상기 담체 내에서 농축되며,

상기 산화효소가 글루코스 옥시다제이고 상기 발색효소가 겨자무 과산화효소이고,

상기 글루코스 옥시다제 및 상기 겨자무 과산화효소는 2:8 내지 4:6의 중량비로 포함되는 스트립 형태의 광학 바이오센서.

#### 청구항 2

다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 발색효소의 복합체, 및 산화효소를 포함하는 광학 바이오센서로서,

상기 산화효소는 상기 다공성 담체의 기공 내부에 흡착, 또는 공유결합 또는 가교결합에 의하여 고정화되며,

시료가 상기 다공성 담체 내로 유입되어 상기 담체 내에서 상기 시료와 상기 효소의 반응에 의한 발색반응신호가 일어나고,

상기 발색반응 신호는 상기 담체 내에서 농축되며,

상기 산화효소가 글루코스 옥시다제이고 상기 발색효소가 겨자무 과산화효소이고,

상기 글루코스 옥시다제 및 상기 겨자무 과산화효소는 2:8 내지 4:6의 중량비로 포함되는 스트립 형태의 광학 바이오센서.

#### 청구항 3

다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 산화효소 및 발색효소의 복합체를 포함하는 광학 바이오센서로서,

상기 산화효소는 상기 다공성 담체의 기공 내부에 흡착, 또는 공유결합 또는 가교결합에 의하여 고정화되며,

시료가 상기 다공성 담체 내로 유입되어 상기 담체 내에서 상기 시료와 상기 효소의 반응에 의한 발색반응신호가 일어나고,

상기 발색반응 신호는 상기 담체 내에서 농축되며,

상기 산화효소가 글루코스 옥시다제이고 상기 발색효소가 겨자무 과산화효소이고,

상기 글루코스 옥시다제 및 상기 겨자무 과산화효소는 2:8 내지 4:6의 중량비로 포함되는 스트립 형태의 광학 바이오센서.

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

**청구항 6**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다공성 담체는 실리카, 알루미나, 니오비움, 탄탈륨, 지르코늄, 티타늄 및 비닐고분자로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 스트립 형태의 광학 바이오센서.

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

제 3 항에 따른 광학 바이오센서를 제조하는 방법에 있어서,

- (1) 다공성 담체의 기공내부에 산화효소 및 발색효소를 2:8 내지 4:6의 중량비로 흡착시키는 단계; 및
- (2) 상기 다공성 담체-산화효소-발색효소 복합체를 센서표면에 도포하는 단계;를 포함하고,

상기 발색효소는 겨자무 과산화효소이고, 상기 산화효소는 글루코스 옥시다제인 스트립 형태의 광학 바이오센서를 제조하는 방법.

**청구항 22**

제 3 항에 따른 광학 바이오센서를 제조하는 방법에 있어서

- (1) 다공성 담체의 기공내부에 산화효소-발색효소를 2:8 내지 4:6의 중량비로 흡착시키는 단계;
- (2) 상기 효소가 흡착된 다공성 담체에 가교결합제를 첨가하여 효소간에 가교결합을 형성하여 다공성 담체-산화효소-발색효소의 복합체를 형성하는 단계; 및
- (3) 상기 다공성 담체-산화효소-발색효소의 복합체를 센서표면에 도포하는 단계; 를 포함하고,

상기 발색효소는 겨자무 과산화효소이고, 상기 산화효소는 글루코스 옥시다제인 스트립 형태의 광학 바이오센서를 제조하는 방법.

**청구항 23**

제 3 항에 따른 광학 바이오센서를 제조하는 방법에 있어서

- (1) 다공성 담체의 기공내부에 산화효소 및 발색효소를 2:8 내지 4:6의 중량비로 공유결합으로 고정화시키는 단계; 및
- (2) 상기 다공성 담체-산화효소-발색효소의 복합체를 센서표면에 도포하는 단계; 를 포함하고,

상기 발색효소는 겨자무 과산화효소이고, 상기 산화효소는 글루코스 옥시다제인 스트립 형태의 광학 바이오센서를 제조하는 방법.

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

제22항에 있어서, 상기 가교결합제는 글루타릭 디알데하이드, 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르) 및 디에시드 클로라이드로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 스트립 형태의 광학 바이오센서를 제조하는 방법.

**청구항 27**

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다공성 담체는 실리카, 알루미늄, 니오비움, 탄탈륨, 지르코늄, 티타늄 및 비닐고분자로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 그 이상인 것을 특징으로 하는 스트립 형태의 광학 바이오센서를 제조하는 방법.

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 광학 바이오센서에 관한 것으로, 보다 상세하게는 효소가 담지된 다공성 담체를 사용하여 효소반응에 의한 발색반응 신호를 농축시킴으로서 민감도를 현저하게 향상시켜 손쉽게 정량적 판단 및 정성적 분석이 가능한 광학 바이오센서에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 신체의 체액(혈액소변 등)에 저농도로 존재하는 질병지표물질(대사물질단백질세포 등)의 측정은 일반적으로 효소반응과 항원-항체 부착과 같은 생물학적 반응을 이용하여 수행된다. 효소와 항체는 그 반응상대물질을 선택적으로 인지하는 반응특이성이 매우 높을 뿐만 아니라 또한 반응효율이 높아 고감도로 분석물질을 측정할 수 있다. 이와 같은 반응특성을 이용하여 진단시스템을 개발함으로써 질병을 일으키는 지표물질을 조기 탐지하고 증세 초기에 적절한 치유될 수 있도록 하는 방안의 강구는 매우 중요하다. 그러나 대부분의 진단시스템들은 시약과 기기의 취급을 요구하기 때문에 그 사용이 실험실 내로 제한되었을 뿐만 아니라 또한 진단수행을 위해 전문지식이 요구되었다.

[0003] 최근 면역분석의 한 범주로서, 인간의 질병 증세 및 진도에 대한 예측을 가능하게 하는 호르몬, 단백질, 그리고 미생물과 같은 지표물질들에 대해 병원이나 응급실 등 의료현장에서의 검사뿐만 아니라 가정에서 조차 자가진단의 필요성이 급격히 요구되고 있다.

[0004] 이를 위해 전문지식이나 복잡한 과정이 요구되지 않고 사용이 간편하며 수행시간이 짧은 면역분석시스템의 고안이 필요하다. 이러한 진단 성능은 일반적으로 세공성 멤브레인을 감응단백질(예: 항원 혹은 항체)의 고정화모체로 사용하는 면역 크로마토그래피 방법에 의해 성취될 수 있다. 분석물질이 포함된 시료를 멤브레인 스트립 하단으로부터 흡수시키면 세공을 통한 모세관현상에 의해 분석물질은 고정화된 감응단백질 층으로 운반되어 고체 표면에서 항원과 항체간의 부착반응이 야기되고 비결합된 성분들은 유체흐름에 의해 분리된다. 이와 같은 원리에 기초한 멤브레인 스트립 면역 크로마토그래피 기술은 유체의 측면 흐름(lateral flow)을 이용하여 반응성분들의 물질전달을 가속시킴으로써 분석물질의 측정 신속성과 단지 시료 첨가만으로 진단수행이 완료되는 1단계 측정의 간편성을 제공한다.

[0005] 이러한 자가진단시스템의 수요는 최근 임신과 배란 검사용 자가진단시약 시장규모의 급격한 성장에 잘 반영되고 있고, 더욱이 향후 인터넷을 이용한 원격진단 및 처방 체계의 구축이 예측되므로 성인병 등 정기적 진단이 요구되는 질병에 대한 홈 모니터링 시스템이 보건체계의 핵심적인 요소로서 요구될 전망이다.

[0006] 그러나 현재의 가정용 검사시약은 대부분 단순한 면역 크로마토그래피 분석과 육안으로 발색 유무를 확인하여 그 정성결과를 판독하는 수준에 머물러 있으므로 고감도 정량을 요구하는 성인병 등 대부분의 질병에 대한 지표물질들(단백질 마커 등)의 분석에 부적합하다. 정량분석에 이용될 수 있는 기존 방법으로써 골드 콘쥬게이트로부터 발생하는 발색신호는 기존의 광학적 신호변환수단을 이용하여 색조밀도(optical density)로 전환될 수 있지만 실험실에서 널리 사용되는 효소면역분석법에 비해 측정민감도가 낮은 단점을 갖는다.

[0007] 이와 같이 현장진단 시 민감도가 낮은 단점은 형광물질이나 방사선 동위원소와 같이 고감도 표지물질을 이용하여 극복될 수 있다. 실제로 탐지항체를 형광물질로 표지하여 멤브레인 스트립 면역 크로마토그래피 분석을 수행하고 그 정량결과를 형광탐지기로 해독하는 면역분석시스템이 개발되었다. 이 기술은 높은 민감도를 제공할 뿐만 아니라 위해요소가 없기 때문에 최근 응급실 등에서 사용할 수 있는 현장용 면역진단기기들에 응용된 바 있다. 그러나 형광 탐지장비가 상대적으로 너무 고가이고 소지할 수 있을 정도의 소형화가 어렵기 때문에 주로 병원의 임상검사실이나 연구실 등에 제한적으로 사용되고 있는 실정으로서 실험실용 효소면역분석방법과 비교해 볼 때 분석시간이 짧다는 것 외에는 큰 이점이 없다.

[0008] 나아가, 실험실용 효소면역분석은 면역반응의 각 공정마다 면역결합체를 미반응물질로부터 분리시키기 위한 세척과정을 필히 요구하고 더욱이 신호발생을 위해 효소반응을 별도로 수행하여야 한다. 따라서, 이러한 다단계의 복잡한 공정은 현장진단 시 이용되기 어려운 문제점이 있다.

[0009] 그러므로 값비싼 장비나 시약을 도입하지 않고서도 매우 높은 민감도를 가지면서 손쉽게 시료를 분석할 수 있는

광학 바이오센서가 절실히 요구되었다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0010] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 해결하려는 과제는 민감도를 현저하게 향상함으로써 손쉽게 정량적 판단 및 정성적 분석이 가능한 광학 바이오센서를 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0011] 이하 본 발명을 첨부된 도면을 참조하여 보다 상세히 설명한다.
- [0012] 본 발명은 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 효소의 복합체를 포함하는 광학 바이오센서 및 이것의 제조방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 구체예로서, 본 발명에 따른 광학 바이오센서는 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 산화효소 복합체, 및 발색효소를 포함할 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 산화효소 복합체, 및 발색효소를 포함하는 광학 바이오센서를 제조하는 방법으로서, 다음의 단계를 포함한다:
- [0015] (1) 다공성 담체의 기공내부에 산화효소를 흡착시키는 단계;
- [0016] (2) 상기 다공성 담체-산화효소의 복합체를 센서표면에 도포하는 단계;
- [0017] (3) 상기 센서표면을 건조시키는 단계; 및
- [0018] (4) 상기 센서표면에 발색효소를 도포하는 단계.
- [0019] 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 산화효소 복합체, 및 발색효소를 포함하는 광학 바이오센서를 제조하는 방법으로서, 다음의 단계를 포함한다:
- [0020] (1) 다공성 담체의 기공내부에 산화효소를 흡착시키는 단계;
- [0021] (2) 상기 효소가 흡착된 다공성 담체에 가교결합제를 첨가하여 효소 간에 가교결합을 형성하여 다공성 담체-산화효소의 복합체를 형성하는 단계;
- [0022] (3) 상기 다공성 담체-산화효소의 복합체를 센서표면에 도포하는 단계;
- [0023] (4) 상기 센서표면을 건조시키는 단계; 및
- [0024] (5) 상기 센서표면에 발색효소를 도포하는 단계.
- [0025] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 산화효소 복합체, 및 발색효소를 포함하는 광학 바이오센서를 제조하는 방법으로서, 다음의 단계를 포함한다:
- [0026] (1) 다공성 담체의 기공내부에 산화효소를 공유결합으로 고정화시키는 단계;
- [0027] (2) 상기 다공성 담체-산화효소의 복합체를 센서표면에 도포하는 단계;
- [0028] (3) 상기 센서표면을 건조시키는 단계; 및
- [0029] (4) 상기 센서표면에 발색효소를 도포하는 단계.
- [0030] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명에 따른 광학 바이오센서는 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 발색효소 복합체, 및 산화효소를 포함할 수 있다.

- [0031] 또한, 본 발명의 일 구체예로서, 본 발명은 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 발색효소 복합체, 및 산화효소를 포함하는 광학 바이오센서를 제조하는 방법으로서, 다음의 단계를 포함한다:
- [0032] (1) 다공성 담체의 기공내부에 발색효소를 흡착시키는 단계;
- [0033] (2) 상기 다공성 담체-발색효소의 복합체를 센서표면에 도포하는 단계;
- [0034] (3) 상기 센서표면을 건조시키는 단계; 및
- [0035] (4) 상기 센서표면에 산화효소를 도포하는 단계.
- [0036] 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 발색효소 복합체, 및 산화효소를 포함하는 광학 바이오센서를 제조하는 방법으로서, 다음의 단계를 포함한다:
- [0037] (1) 다공성 담체의 기공내부에 발색효소를 흡착시키는 단계;
- [0038] (2) 상기 효소가 흡착된 다공성 담체에 가교결합제를 첨가하여 효소 간에 가교결합을 형성하여 다공성 담체-발색효소의 복합체를 형성하는 단계;
- [0039] (3) 상기 다공성 담체-발색효소의 복합체를 센서표면에 도포하는 단계;
- [0040] (4) 상기 센서표면을 건조시키는 단계; 및
- [0041] (5) 상기 센서표면에 산화효소를 도포하는 단계.
- [0042] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 발색효소 복합체, 및 산화효소를 포함하는 광학 바이오센서를 제조하는 방법으로서, 다음의 단계를 포함한다:
- [0043] (1) 다공성 담체의 기공내부에 발색효소를 공유결합으로 고정화시키는 단계;
- [0044] (2) 상기 다공성 담체-발색효소의 복합체를 센서표면에 도포하는 단계;
- [0045] (3) 상기 센서표면을 건조시키는 단계; 및
- [0046] (4) 상기 센서표면에 산화효소를 도포하는 단계.
- [0047] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명에 따른 광학 바이오센서는 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 산화효소 및 발색효소 복합체를 포함할 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명의 일 구체예로서, 본 발명은 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 산화효소 및 발색효소 복합체를 포함하는 광학 바이오센서를 제조하는 방법으로서, 다음의 단계를 포함한다:
- [0049] (1) 다공성 담체의 기공내부에 산화효소 및 발색효소를 흡착시키는 단계; 및
- [0050] (2) 상기 다공성 담체-산화효소-발색효소 복합체를 센서표면에 도포하는 단계.
- [0051] 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명은 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 산화효소 및 발색효소 복합체를 포함하는 광학 바이오센서를 제조하는 방법으로서, 다음의 단계를 포함한다:
- [0052] (1) 다공성 담체의 기공내부에 산화효소-발색효소를 흡착시키는 단계;
- [0053] (2) 상기 효소가 흡착된 다공성 담체에 가교결합제를 첨가하여 효소간에 가교결합을 형성하여 다공성 담체-산화효소-발색효소의 복합체를 형성하는 단계; 및
- [0054] (3) 상기 다공성 담체-산화효소-발색효소의 복합체를 센서표면에 도포하는 단계.



- [0055] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 다공성 담체 및 상기 다공성 담체의 기공 내부에 담지된 산화효소 및 발색효소 복합체를 포함하는 광학 바이오센서를 제조하는 방법으로서, 다음의 단계를 포함한다:
- [0056] (1) 다공성 담체의 기공내부에 산화효소 및 발색효소를 공유결합으로 고정화시키는 단계; 및
- [0057] (2) 상기 다공성 담체-산화효소-발색효소의 복합체를 센서표면에 도포하는 단계.
- [0058] 상기 산화효소는 글루코스 옥시다제, 콜레스테롤 옥시다제, 폴리페놀 옥시다제, 모노아민 옥시다제, 잔틴 옥시다제, 시토크롬 옥시다제, 아스코르브산 옥시다제, 및 D-아라비노노-1,4-락톤 옥시다제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 그 이상일 수 있다
- [0059] 상기 발색효소는 과산화 효소(peroxidases), 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase, AP), 티로시나아제(tyrosinase), 라카아제(laccase), 아세틸콜린에스트라제(acetylcholinesterase) 및  $\beta$ -갈락토시다아제( $\beta$ -galactosidase)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 그 이상일 수 있다.
- [0060] 상기 다공성 담체는 실리카, 알루미늄, 니오비움, 탄탈륨, 지르코늄, 티타늄 및 비닐고분자로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 그 이상일 수 있다.
- [0061] 상기 가교결합제는 글루타릭 디알데하이드, 디이소시아네이트, 디안히드라이드, 디에폭사이드, 디알데하이드, 디이미드, 1-에틸-3-디메틸 아미노프로필카보디이미드, 비스(이미도 에스테르), 비스(석신이미딜 에스테르) 및 디에시드 클로라이드로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 그 이상일 수 있다.
- [0062] 상기 담체에 담지된 산화효소 및 발색효소 복합체에 있어서, 상기 산화효소 대 상기 발색효소는 1:9 내지 9:1의 비율일 수 있다. 바람직하게는, 상기 산화효소가 글루코스 옥시다제이고, 상기 발색효소가 겨자무 과산화효소인 경우에, 상기 글루코스 옥시다제 대 겨자무 과산화효소는 2:8 내지 4:6의 비율일 수 있다.

**발명의 효과**

- [0063] 본 발명의 광학 바이오센서 다공성 효소 담체에 의하여 발색제가 흐르지 않고 한 곳에 집중되어 있으므로 민감도가 현저하게 향상되며 효소 담체가 수용할 수 있는 정량의 시료가 효소 담체에 수용되어 반응하게 되므로 측정 재현성도 향상 되고 효소담체가 적셔질 수 있는 소량의 시료로 분석이 가능하다. 이러한 효과는 시간이 지날수록 발색강도가 더욱 강해지므로 손쉽게 정량적 판단 및 정성적 분석이 가능하다. 또한 측정하고자 하는 물질 또는 환경에 따라 다양한 종류의 효소발색기질을 사용할 수 있으므로 센서의 활용범위를 넓힐 수 있다는 장점이 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0064] 도 1은 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 스트립 센서의 모식도이다.
- 도 2는 본 발명에 사용될 수 있는 다공성 실리카의 TEM 사진이다.
- 도 3a는 혈당측정을 위한 두 효소(글루코스 옥시다제(GOx), 겨자무 과산화효소(HRP))를 다양한 비율(GOx:HRP = 10:0, 7:3, 5:5, 3:7, 0:10)로 함께 고정화하여 준비한 다공성 실리카를 멤브레인에 도포하여 포도당과 발색제가 포함된 시료를 흘린 후 3분 뒤의 사진이고, 도 3b는 도포된 부분의 화소를 수치화한 그래프이다.
- 도 4는 효소-다공성 담체 복합체를 합성하는 방식을 설명한 모식도로 단순흡착, 공유결합, 및 효소 입자간 가교결합을 이용한 나노효소반응기 방식을 설명한 모식도이다.
- 도 5는 40℃의 200 rpm 교반 조건 아래에서 유리된 콜레스테롤 옥시다제(free cholesterol oxidase, free-COx), 다공성 실리카에 단순흡착한 콜레스테롤 옥시다제(adsorption cholesterol oxidase, ADS-COx), 나노효소반응기를 통해 다공성 실리카에 고정화한 콜레스테롤 옥시다제(nanoscale enzyme reactor cholesterol oxidase, NER-COx)의 시간에 따른 안정성을 나타낸 그래프이다.
- 도 6a는 멤브레인을 통하여 시료가 흐르는 상태에서 시간에 따라 유리 효소(우)나 효소가 고정된 다공성 실리카(좌)가 도포된 영역의 시간에 따른 발색 사진이며, 도 6b는 효소가 도포된 부분의 화소를 측정하고 이를 수치화

하여 나타낸 그래프이다.

도 7a는 효소가 담지된 다공성 실리카를 이용하여 콜레스테롤의 농도별로 측정된 결과이고, 도 7b는 각각의 결과의 화소를 측정하고 이를 수치화하여 나타낸 그래프이다.

도 8a는 발색효소가 고정된 다공성 실리카를 도포하고 글루코스 옥시다제를 첨가한 뒤 포도당과 발색제가 포함된 시료를 흘린 후 3분 뒤의 사진이고, 도 8b는 도포된 부분의 화소를 측정하고 이를 수치화한 그래프이다.

도 9a는 혈당측정을 위한 두 효소(글루코스 옥시다제(GOx), 겨자무 과산화효소(HRP))를 나노효소반응기 기법을 통하여 다양한 비율(GOx:HRP = 10:0, 7:3, 5:5, 3:7, 0:10)로 함께 고정화하여 준비한 다공성 실리카를 멤브레인 에 도포하여 포도당과 발색제가 포함된 시료를 흘린 후 3분 뒤의 사진이고, 도 9b는 도포된 부분의 화소를 수치화한 그래프이다.

도 10a는 도 9의 GOx:HRP를 3:7로 함께 나노효소반응기 방식을 이용하여 고정화한 다공성 실리카를 이용하여 다양한 농도의 포도당을 흘려주어 시간에 따른 발색을 확인한 사진이고, 도 10b는 효소가 고정된 실리카가 도포된 부분의 화소를 수치화한 그래프이다.

도 11은 도 9의 GOx:HRP를 3:7로 단순흡착 방식(ADS) 나노효소반응기 방식(NER)을 이용하여 고정화한 다공성 실리카와 유리된 GOx와 HRP를 센서 표면에 도포한 위치를 도식화한 것(좌)과 중앙에 10 mM의 포도당을 흘려주고 3분 뒤 발색을 확인한 사진이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0065] 도 1은 본 발명의 일실시에에 따른 콜레스테롤 측정용 스트립 센서의 모식도이다. 구체적으로 도 1의 좌측 샘플 패드에는 시료(혈액)가 주입되고 상기 시료는 모세관 현상에 따라 기질패드(substrate pad)로 이동하게 된다. 이 때 기질패드는 발색제의 발색기작을 위한 N,N-비스(4-설포부틸)-3,5-디메틸아닐린 - 디소시움 솔트(MADB) 및 4-아미노안티피린(AAP)을 포함한다. 상기 기질패드에 포함된 MADB 및 AAP는 시료를 따라 분석패드로 이동한다.

[0066] 본 발명의 한 구체예에 따르면, 효소는 콜레스테롤 옥시다제가 사용될 수 있다.

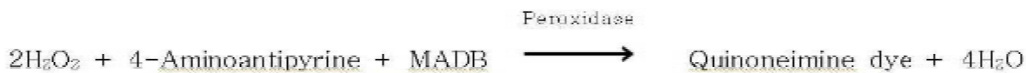
[0067] 이 경우에, 상기 분석패드는 다공성 담체(다공성 실리카)의 내부에 다수의 콜레스테롤 옥시다제가 담지되어 있으며, 시료가 분석패드의 다공성 담체 공극 내부로 유입되면 하기 반응식 1과 같은 반응이 발생한다. 반응식 3은 MADB와 AAP의 산화결합반응에 발색제 생성에 대한 이해를 돕기 위해 반응식 2를 부분적으로 화학구조식을 이용하여 나타내었다.

[0068] [반응식 1]



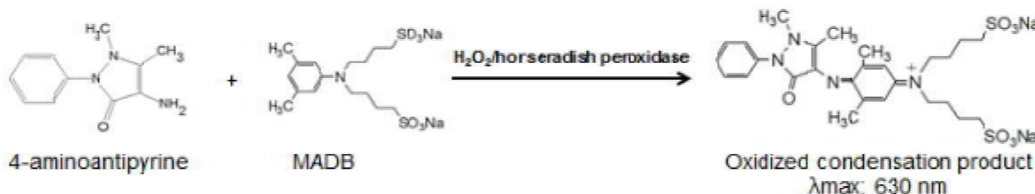
[0069]

[0070] [반응식 2]



[0071]

[0072] [반응식 3]



[0073]

[0074] 구체적으로 시료의 콜레스테롤은 다공성 담체 내부에 고정된 콜레스테롤 옥시다제에 의해 과산화수소를 생성한다(반응식 1). 이와 같이 생성된 과산화수소는 HRP에 의해 반응식 2와 같이 MADB와 AAP가 산화결합된 발색제(Quinoneimine dye)를 생성하는데 쓰이게 된다(반응식 2,3). 이 발색제는 630 nm에서 측정이 가능한 파란색을

뛰는데 이 색깔의 변화를 측정하여 시료의 양을 정량적으로 측정할 수 있다.

[0075] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 효소는 글루코스 옥시다제가 사용될 수 있다. 이 경우에, 상기 분석패드는 다공성 담체(다공성 실리카)의 내부에 다수의 글루코스 옥시다제가 담지되어 있으며, 시료가 분석패드의 다공성 담체 공극 내부로 유입되면 하기 반응식 4와 같은 반응이 발생하고, 이후의 반응은 앞서 설명한 콜레스테롤 옥시다제의 반응식 2 및 3과 동일하다. 즉, 시료의 글루코스가 다공성 담체 내부에 고정된 글루코스 옥시다제에 의해 과산화수소를 생성하면(반응식 4), 생성된 과산화수소는 HRP에 의해 반응식 2와 같이 MADB와 AAP가 산화결합된 발색제(Quinoneimine dye)를 생성하는데 쓰이게 된다(반응식 2,3).

[0076] [반응식 4]



[0077]

[0078] 다공성 담체의 구조 및 물성을 잘 조절하여 상기 발색제가 다공성 담체 밖으로 벗어나기 어렵게 함으로써, 반응식 1과 2에 의해 생성된 발색제가 담체의 공극 내부에 대부분 남아있게 한다. 상기 발색제가 다공성 담체 밖으로 벗어나게 되면 발색제가 넓게 분산되어 광학적 신호를 감소시킬 뿐만 아니라 측정 재현성을 저하시키는 문제점을 야기한다. 따라서, 센서 표면 외부로 발색제가 이동하지 않고 센서 표면 내부에 계속 머무르므로 발색강도가 매우 강할 뿐 아니라 최소한의 시료의 양만으로도 최대한의 발광을 가능하게 한다. 한편, 다공성 담체의 내부에 콜레스테롤 옥시다제 등의 옥시다제 뿐만 아니라, HRP 또는 발색전구체가 동시에 존재하는 것 역시 가능하다.

[0079] 본 발명에 사용될 수 있는 다공성 담체는 효소, 발색전구체, 항체, 금속입자, 유전자, 화합물 등을 고정화할 수 있으면서, 동시에 효소, 시료, 발색전구체 등이 흘러들어갈 수 있고, 효소 반응에 의해 생성된 발색제가 효율적으로 남아있으며, 외부로 색변화가 관찰될 수 있을 정도로 투명한 것이면 제한 없이 사용될 수 있다.

[0080] 바람직하게는 상기 다공성 담체는 실리카, 알루미늄, 니오비움, 탄탈륨, 지르코늄, 티타늄 및 디비닐 벤젠 고분자로부터 선택되는 어느 하나 이상의 재질일 수 있다.

[0081] 한편, 본 발명의 다공성 담체는 공극의 내부에 효소나 발색전구체 등과 공유결합을 형성할 수 있는 작용기를 포함할 수 있다. 이를 위하여 효소를 담지하기 전에 다공성 담체의 공극 내부 및 담체표면에 작용기를 형성하는 전처리 공정을 더 수행할 수 있다. 상기 작용기는 공극의 내부 및 담체의 표면에 형성되어 효소와 공유결합을 수행할 수 있는 것이면 종류의 제한 없이 사용될 수 있으나 바람직하게는 아미노기, 카르복시기, 알데하이드기, 에폭시기, 수산화기, 황화수소기 등일 수 있다.

[0082] 상기 작용기와의 결합을 통해 효소는 공극의 내부 및 담체의 표면에 담지 또는 결합될 수 있다.

[0083] 본 발명의 바람직한 일구현예에 따르면, 상기 효소는 담체의 기공내부에 단순흡착 될 수 있다. 또한 기공내부가 효소와 공유결합 할 수 있는 작용기를 가진 경우 효소는 기공내부에 공유결합 될 수 있다.

[0084] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 효소는 단순흡착 후 가교결합에 의해 효소가교결합체를 형성할 수 있다. 구체적으로 기공내부에 포함된(흡착 또는 기공내부벽과 공유결합) 효소들에 대하여 가교결합체를 첨가하면 기공내부에 흡착된 효소들 간에 가교결합이 형성되어 효소가교결합체가 형성된다. 그 결과 가교결합된 효소집적체는 다공성 담체의 기공 입구의 크기보다 더 커지게 되며 그 결과 현저하게 많은 양의 효소가 다공성 담체의 내부에 담지될 수 있을 뿐 아니라 시간이 경과하여도 상기 기공 내부에 효소 집합체가 위치하게 되므로 다공성 담체의 내부를 효소와 공유결합 할 수 있는 작용기를 형성하도록 개질하지 않아 다공성 담체와 효소간의 공유결합과 같은 직접적인 결합관계가 형성되지 않는다 하더라도 효소 집합체가 다공성 담체 내부에 장기간 구비될 수 있는 것이다.

[0085] 나아가, 다공성 담체의 기공들이 만족 된 경우 가교결합 된 효소집합체가 외부로 유출되지 않을 수 있으며, 기공내부가 개질된 경우에는 효소 간 가교결합 뿐만 아니라 가교결합 된 효소와 담체 사이에 공유결합이 형성될 수도 있다.

[0086] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 다공성 담체의 기공 내부로 발색제가 담지되어 다공성 담체 내부에 발색제가 결합될 수 있으며, 효소는 이후에 담체 기공으로 흘러들어갈 수 있다.

[0087] 한편, 본 발명의 일 구체예로서, 본 발명에 따른 광학 바이오센서는 스트립 형태의 센서를 사용할 수 있으며,

시료가 모세관 현상에 의해 흐를 수 있는 재질이면 제한 없이 사용될 수 있다. 바람직하게는 니트로 셀룰로스일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 특히, 스트립 재질로는 다공성 멤브레인이 사용될 수 있는데, 시메트릭 멤브레인(symmetric membrane) 또는 어시메트릭 멤브레인(asymmetric membrane)이 사용될 수 있다. 멤브레인에는 미세포어가 존재하여 시료 등이 모세관 현상에 의하여 멤브레인의 반대편 끝으로 이동할 수 있게 된다. 미세포어의 크기에 따라 시료의 이동속도가 달라지는데, 포어 크기가 크면 속도가 느려지고 포어 크기가 작으면 속도가 빨라진다. 상기 시메트릭 멤브레인은 미세포어의 크기가 동일한 것이고, 어시메트릭 멤브레인은 미세포어의 크기가 상이한 것을 의미한다. 상기 어시메트릭 멤브레인은 반대편 끝으로 갈수록 포어 사이즈가 커진다.

[0088] 본 발명의 광학 바이오센서는 우선 발색신호 측정형 광학 바이오센서의 제작에 이용될 수 있다. 이와 같은 바이오센서는 기존의 마이크로 웰을 단백질 고정화모체로 이용하는 효소면역분석(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)에서와 같이 효소반응을 멤브레인 스트립 상에서 독립적으로 구현함으로써 높은 측정민감도를 나타낼 뿐만 아니라 일반적인 면역 크로마토그래피 분석 시와 동일하게 속성측정에 이용될 수 있다. 발색 측정형 센서는 시료 내 분석물질 농도에 비례하여 멤브레인 상에서 발생하는 발색신호 세기를 광 반사 계측법(reflectance photometry)으로 측정할 수 있다. 따라서 비교적 민감한 정량 수단으로 기존에 사용되던 형광측정형 시스템과 비교하여 저가일 뿐만 아니라 신호측정을 위해 소형의 신호탐지 장비를 사용할 수 있어 현장진단을 위한 적용이 가능하다.

[0089] 발색신호 발생을 위해 사용될 수 있는 효소는 일반적인 효소면역분석시 사용되는 과산화효소(peroxidase), 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase, AP) 티로시나아제(tyrosinase), 라카아제(laccase), 아세틸콜린 에스트라제(acetylcholine esterase) 또는  $\beta$ -갈락토시다아제( $\beta$ -galactosidase) 등으로 이 효소들은 촉매반응의 결과로 발색을 나타내며 이와 같은 목적으로 사용될 수 있는 기질이 각 효소마다 다양하다. 예를 들어, 과산화효소를 사용할 경우에는 과산화수소의 존재 하에서 발색용 기질(chromogenic substrate)로써 멤브레인 상에 침착될 수 있는 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine, TMB), 디아미노벤지딘(diaminobezidine, DAB), ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 그리고 4-클로로-1-나프톨(4-chloro-1-naphthol, 4CIN) 등을 사용할 수 있으며 AP를 사용할 경우 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt)/NBT(nitro-blue tetrazolium chloride) 등을 사용할 수 있다. 각각의 기질은 최적 반응조건이 다르기 때문에 바이오센서의 분석특성 및 요구조건을 고려하여 적절한 기질을 선택할 수 있다.

[0090] 시료의 분석에 사용되는 효소, 유전자, 항체, 금속, 화합물 등을 다공성 담체에 담지하고 시료가 다공성 담체를 통과하면서 발색반응 등 신호발생반응이 수행될 수 있다.

[0091] 효소의 표지방법으로 위에서처럼 효소를 직접 탐지항체와 중합하여 사용하는 방법 외에 탐지항체에 특이한 제2항체-효소 콘쥬게이트를 이용하는 간접적인 방법을 이용할 수도 있다.

[0092] 신호발생을 위한 또 다른 방법으로 스트렙트아비딘(streptavidin)과 비오틴(biotin) 간의 결합반응을 이용할 수 있으며, 전형적으로 스트렙트아비딘을 탐지항체와 중합시키고 비오틴을 효소와 중합시켜 사용한다. 스트렙트아비딘과 비오틴 반응은 일반적으로 항원-항체 반응과 비교하여 친화력이 높으므로 제2항체를 사용하는 방법에 비해 신호증폭효과를 얻을 수 있는 장점이 있으나 추가 성분들을 도입해야 하는 부담이 있다. 분석시스템 구성 시 이러한 신호발생방법의 변화는 분석 시 요구하는 분석물질의 측정하한농도, 측정농도 범위, 분석 소요시간, 그리고 경제성 등 요구조건에 따라 선택할 수 있다.

[0093] 발색신호 측정형 바이오센서의 제작 시 신호발생을 위해 효소 촉매반응의 대안으로써 골드와 실버 간 촉매반응과 같은 화학반응을 이용할 수도 있으며 대표적인 반응성분으로써 골드 콜로이드와 실버 아세테이트를 들 수 있다. 상기 골드 콜로이드와 실버 아세테이트를 다공성 담체 내부에 도입하면 기존에 골드 발색이 육안으로 확인되지 않아 측정할 수 없었던 저 농도의 분석물질에 대해서도 분석이 가능하다는 장점을 제공한다. 발생된 발색신호는 효소를 이용한 경우와 동일하게 반사광 탐지방법에 의해 측정될 수 있다.

[0094] 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**

[0095] **다공성 담체의 기공내부에 담지된 산화효소 및 발색효소의 복합체 제작**

[0096] 다공성 담체의 기공내부에 담지된 산화효소 및 발색효소의 복합체를 제작하였다. 구체적으로 도 2와 같은 다공성 실리카 입자 5 mg에 인산염 완충용액(100 mM phosphate buffer((pH 7.0))에 녹인 글루코스 옥시다제 (glucose oxidase, GOx)과 겨자무 과산화효소(horseradish peroxidase, HRP)를 다양한 비율(GOx:HRP = 10:0, 7:3, 5:5, 3:7, 0:10)으로 2 ml(10 mg/ml)를 넣어 1시간 동안 200 rpm으로 교반시켰다. 그 뒤 원심분리를 통해 흡착되지 않은 효소를 제거하고, 인산염 완충용액으로 세척하였다. 그 뒤 복합체를 포함하는 용액을 트리스 완충용액(100 mM tris buffer(pH 7.6))를 이용해 30분 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 다시 인산염 완충용액을 이용하여 씻어주었다. 모든 처리가 끝난 효소고정화 물질들은 4°C에서 보관하여 다공성 담체의 기공내부에 담지된 산화효소 및 발색효소의 복합체를 제조하였다.

**실시예 2**

[0097] **다공성 담체의 기공내부에 담지된 산화효소 및 발색효소의 복합체를 이용한 혈당측정**

[0098] 상기 실시예 1에서 제작한 산화효소 및 발색효소의 복합체 2 μl (50 mg/ml)을 멤브레인에 각각 도포하여 건조시킨 후 50 mM의 AAP, MADB를 포함한 10 mM의 포도당을 흘려준 후 1분간 반응을 진행하였다. 도 3a는 1분 후의 각 시료의 발색 반응을 비교한 사진으로 글루코스 옥시다제와 겨자무 과산화효소가 3:7의 비율로 고정화한 나노효소반응기 방식의 시료가 가장 높은 발색반응을 보이고 있다. 반면 유리된 상태의 글루코스 옥시다제와 겨자무 과산화효소를 이용한 시료(우)의 경우 발색체가 모두 따라 올라가 신호를 측정할 수 없었다. 도 3b는 효소가 고정된 실리카 입자가 도포된 부분의 화소를 수치화하여 그래프로 나타낸 것으로 GOx:HRP가 3:7로 섞어 고정화한 시료가 월등히 높음을 확인할 수 있었다.

**실시예 3**

[0099] **나노효소반응기 방법(nanoscale enzyme reactors, NERs)에 따라 효소-다공성 실리카 입자 복합체 제조**

[0100] 도 4와 같은 본 발명에 따른 효소 입자간 가교결합을 이용한 나노효소반응기 방법(nanoscale enzyme reactors, NERs)에 따라 효소-다공성 실리카 입자 복합체를 제조하였다. 구체적으로 도 2와 같은 다공성 실리카 입자 5 mg에 인산염 완충용액(100 mM phosphate buffer((pH 7.0))에 녹인 콜레스테롤 옥시다제(cholesterol oxidase) 용액 2 ml(10 mg/ml)를 넣어 1시간 동안 200 rpm으로 교반시켰다. 그 뒤 원심분리를 통해 흡착되지 않은 효소를 제거하고, 0.1 v/v%의 글루타릭 디알데하이드 용액을 1 ml을 첨가한다. 그 뒤 가교결합제의 충분한 반응을 위하여 상온에서 1시간 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 인산염 완충용액으로 세척하였다. 그 뒤 복합체를 포함하는 용액을 트리스 완충용액(100 mM tris buffer(pH 7.6))를 이용해 30분 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 다시 인산염 완충용액을 이용하여 씻어주었다. 모든 처리가 끝난 효소고정화 물질들은 4°C에서 보관하여 효소-다공성 실리카 입자 복합체인 나노효소반응기(NERs)를 제조하였다.

**실시예 4**

[0101] **효소가 담지된 다공성 실리카의 안정성 측정**

[0102] 상기 실시예 3에서 제작한 나노효소반응기의 활성은 계면활성제(triton-X 100)에 녹인 콜레스테롤의 산화 반응을 이용하여 측정되었다. 도 5는 40°C의 200 rpm 교반조건에서 free COx, ADS-COx 및 NER-COx의 안정성을 보여 준다. 각 샘플은 40°C의 200 rpm 교반조건에서 보관하며 정해진 시간에 각 샘플의 일부를 채취하여 활성을 측정하였다. free COx의 경우 4시간 만에 초기 활성의 50%에 미치지 못하는 활성을 보였고 ADS의 경우에도 15시간 만에 초기 활성의 50% 이하로 떨어졌지만, NER-COx의 경우 60시간 이후에도 초기 활성의 70%를 유지하였다. 이를 통해 본 발명의 효소가 담지된 다공성 실리카의 안정성이 매우 증대된 것을 확인할 수 있다.

**실시예 5**

[0103] **효소-다공성 실리카 입자 복합체를 이용한 시간에 따른 콜레스테롤 검출**

[0104] 도 1의 스트립을 이용하여 콜레스테롤 1.5 mg/ml에 대한 시간에 따른 화소의 변화를 관찰하였다(도 6 참조). NER-COx(좌)의 경우 50 mg/ml 다공성 실리카의 농도를 4 μl를 효소 영역에 도포하였고 유리효소(우)의 경우 7 U/ml의 콜레스테롤 옥시다제를 1 μl 도포하여 건조시켰다. 기질패드 위에 50 mM 3-(4-모르폴리노)프로판 설펜 산 완충용액(MOPS buffer pH 5.0)에 녹인 20 mM의 N,N-비스(4-설포부틸)-3,5-디메틸아닐린-디소시움염(MADB), 20 mM의 4-아미노안티피린(AAP), 20 U/ml 겨자무 과산화효소(horseradish peroxidase, HRP)를 패드에 도포한

뒤 60 °C에서 15분 건조시킨 후 측정하고자 하는 콜레스테롤을 유기용매인 5% 1-메틸-2 피롤리돈과 PBS에 용해된 계면활성제 테시트(Thesit) 2%에 농도별로 녹인 후 100 μl를 샘플패드에 로딩했다. 그 뒤 정해진 시간에 따라 멤브레인의 사진을 찍어 변화를 관찰 한 뒤 효소가 도포된 지점의 화소를 측정하여 수치화 하였다. MADB는 건조상태에서 다른 발색기질과 비교하여 상대적 안정성이 우수하지만 용해성이 높으므로 광학 센서용 스트립에서 사용할 경우 용액의 흐름에 따라 발색신호도 함께 흐르게 되어 정확한 신호를 보여줄 수 없다는 단점이 있다. 그러나 수용성 발색기질이 아니라 하더라도 효소가 고정된 다공성 실리카를 이용함으로써 신호가 축적되고 이로 인하여 광학 센서의 감도를 증대시킬 수 있을 뿐 아니라 스트립 자체의 안정성 역시 향상시킬 수 있을 것으로 기대한다. 도 7a에서 보는 바와 같이 스트립 센서를 이용하여 측정할 경우 MADB발색신호는 효소 담지된 다공성 실리카 영역에서 흐르지 않고 축적되어 콜레스테롤 농도에 따른 신호를 확인 할 수 있다. 이와 같은 방식으로 콜레스테롤의 농도에 따라 측정하여 도 7b의 검정 곡선(calibration curve)을 작성하였다.

**실시예 6**

[0105] **효소-다공성 실리카 입자 복합체를 이용한 혈당측정**

[0106] 도 1의 스트립에서 포도당 농도에 따른 화소의 변화를 관찰하여 혈당을 측정하였다(도 8 참조). NER-HRP 50 mg/ml 다공성 실리카의 농도로 4 μl를 효소 영역에 도포하였고 혈당측정을 위해 글루코스 옥시다제의 경우 2 KU/ml의 글루코스 옥시다제 1 μl 도포하여 건조시켰다. 기질패드 위에 20 mM MADB, AAP를 측정하고자 하는 포도당을 PBS pH 7.0 완충용액에 농도별로 녹인 후 100 μl를 샘플패드에 로딩했다. 3분의 시간이 지난 후 멤브레인의 사진을 찍어 변화를 관찰 한 뒤 효소가 도포된 지점의 화소를 측정하여 수치화하였다. 이와 같은 방식으로 포도당의 농도에 따라 화소를 측정하여 도 8b의 멤브레인에 따른 포도당의 검정 곡선(calibration curve)를 작성하였다.

**실시예 7**

[0107] **나노효소반응기 방법(nanoscale enzyme reactors, NERs)에 따른 효소 co-immobilization-다공성 실리카 입자 복합체 제조**

[0108] 도 4와 같은 본 발명에 따른 나노효소반응기 방법(nanoscale enzyme reactors, NERs)에 따라 혈당 측정에 사용되는 두 효소를 co-immobilization한 효소-다공성 실리카 입자 복합체를 제조하였다. 구체적으로 도 2와 같은 다공성 실리카 입자 5 mg에 인산염 완충용액(100 mM phosphate buffer((pH 7.0))에 녹인 글루코스 옥시다제(glucose oxidase, GOx)과 겨자무 과산화효소(horseradish peroxidase, HRP)를 다양한 비율(GOx:HRP = 10:0, 7:3, 5:5, 3:7, 0:10)으로 10 mg/ml, 2 ml를 넣어 1시간 동안 200 rpm으로 교반시켰다. 그 뒤 원심분리를 통해 흡착되지 않은 효소를 제거하고, 0.1 v/v%의 글루타릭 디알데하이드 용액을 1 ml을 첨가한다. 그 뒤 가교결합제의 충분한 반응을 위하여 상온에서 1시간 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 인산염 완충용액으로 세척하였다. 그 뒤 복합체를 포함하는 용액을 트리스 완충용액(100 mM tris buffer(pH 7.6))를 이용해 30분 동안 200 rpm에서 교반시켜준 후 다시 인산염 완충용액을 이용하여 씻어주었다. 모든 처리가 끝난 효소고정화 물질들은 4°C에서 보관하여 co-immobilization한 효소-다공성 실리카 입자 복합체인 나노효소반응기(NERs-GOx&HRP)를 제조하였다.

**실시예 8**

[0109] **나노효소반응기 방법(nanoscale enzyme reactors, NERs)에 따른 효소 co-immobilization-다공성 실리카 입자 복합체 통한 이용한 혈당측정**

[0110] 상기 실시예 7에서 co-immobilization 한 효소-다공성 실리카 입자 복합체 2 μl (50 mg/ml)을 멤브레인에 각각 도포하여 건조시킨 후 50 mM의 AAP, MADB를 포함한 10 mM의 포도당을 흘려준 후 1분간 반응을 진행하였다. 도 9a는 1분 후의 각 시료의 발색 반응을 비교한 사진으로 글루코스 옥시다제와 겨자무 과산화효소가 3:7의 비율로 고정화한 나노효소반응기 방식의 시료가 가장 높은 발색반응을 보이고 있다. 도 9b는 효소가 고정된 실리카 입자가 도포된 부분의 화소를 수치화하여 그래프로 나타낸 것으로 GOx:HRP가 3:7로 섞어 고정화 한 시료가 월등히 높음을 확인할 수 있었다.

[0111] 도 10a는 상기 합성한 GOx:HRP가 3:7로 제작한 나노효소반응기를 이용하여 포도당 농도와 시간에 따른 발색 정도를 확인한 사진이고, 도 10b는 이를 수치화하여 그래프로 나타낸 것이다.

**실시예 9**

[0112] 넓은 센서 표면에서 효소 co-immobilization-다공성 실리카 입자 복합체 통한 이용한 혈당측정

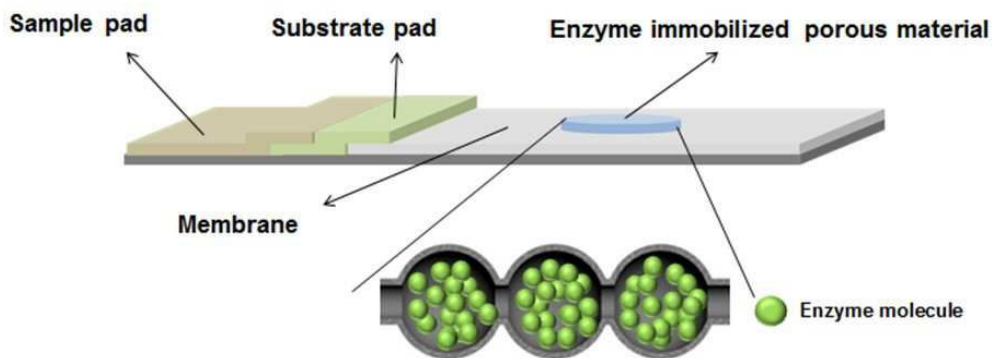
[0113] 상기 실시예 1과 실시예 7에서 단순흡착 방식과 나노효소반응기 방식을 통해co-immobilization 한 효소-다공성 실리카 입자 복합체 10  $\mu$ l(50 mg/ml)과 유리된 GOx와 HRP의 혼합물 10  $\mu$ l(GOx: 1 U/ml, HRP: 1 U/ml)을 멤브레인으로 이루어진 센서 표면에 각각 도포하여 건조시킨 후 50 mM의 AAP, MADB를 포함한 10 mM의 포도당을 흘려 준 후 3분간 반응을 진행하였다. 유리된 효소의 경우 용액의 흐름을 따라 발색제가 번져나가 원하는 위치에서의 신호가 거의 나타나지 않은 반면 ADS나 NER 시료의 경우 발색제가 침전되어 신호가 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

**산업상 이용가능성**

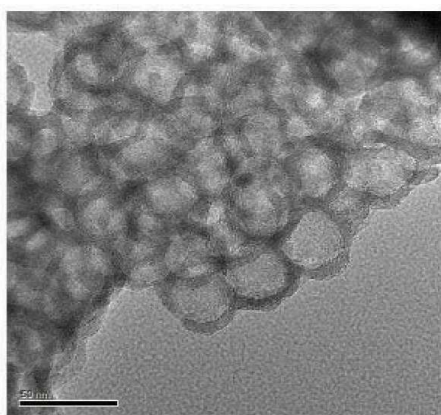
[0114] 본 발명의 광학 바이오센서는 혈당센서, 콜레스테롤센서, 임신진단센서, 고혈압진단센서, 심근경생진단센서, 암진단센서, 환경독성물질 진단센서, 유린센서 등 광학 바이오센서가 적용되는 분야에 널리 활용될 수 있다.

**도면**

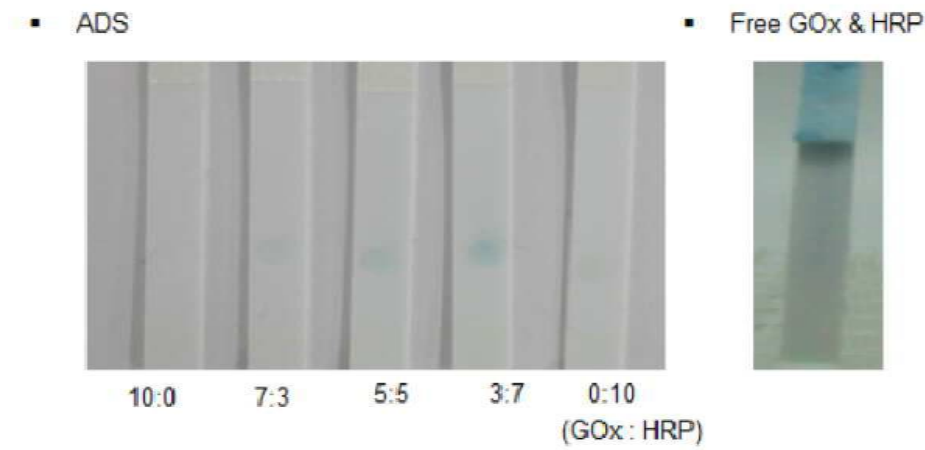
**도면1**



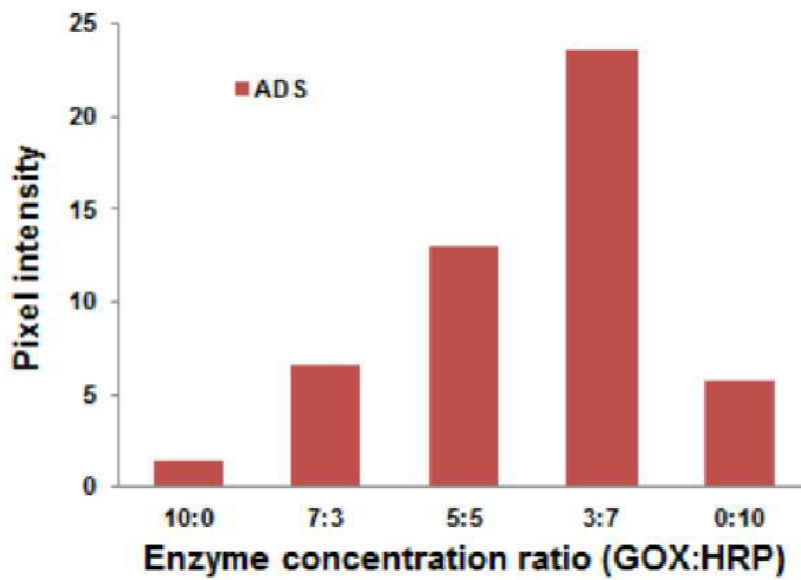
**도면2**



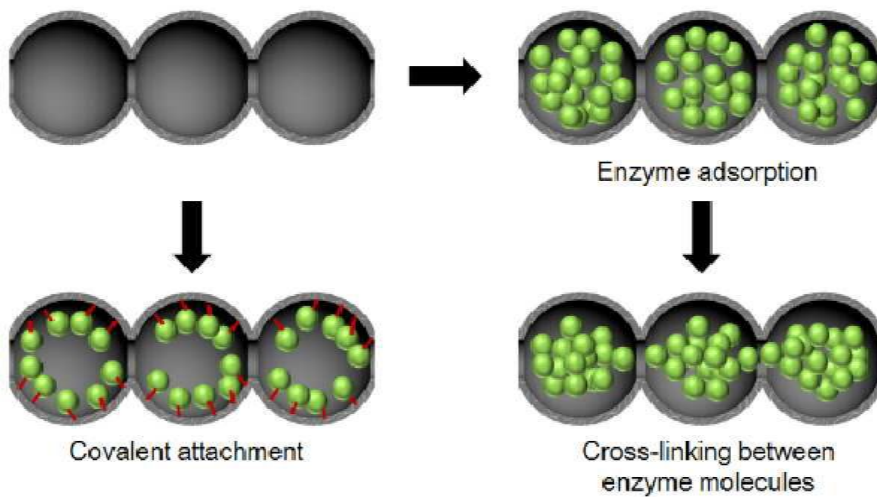
도면3a



도면3b

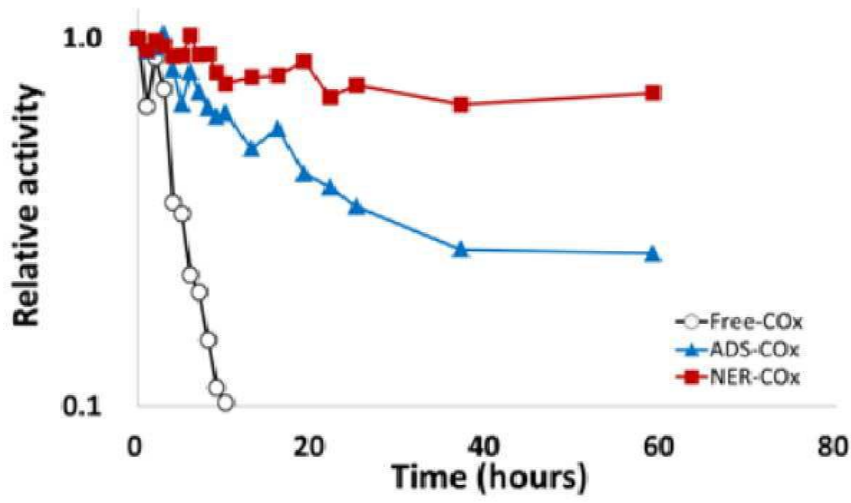


도면4

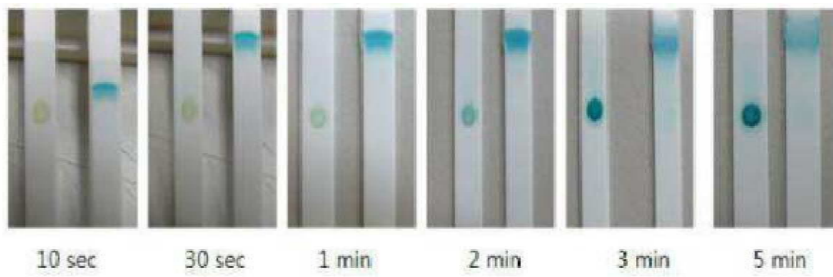




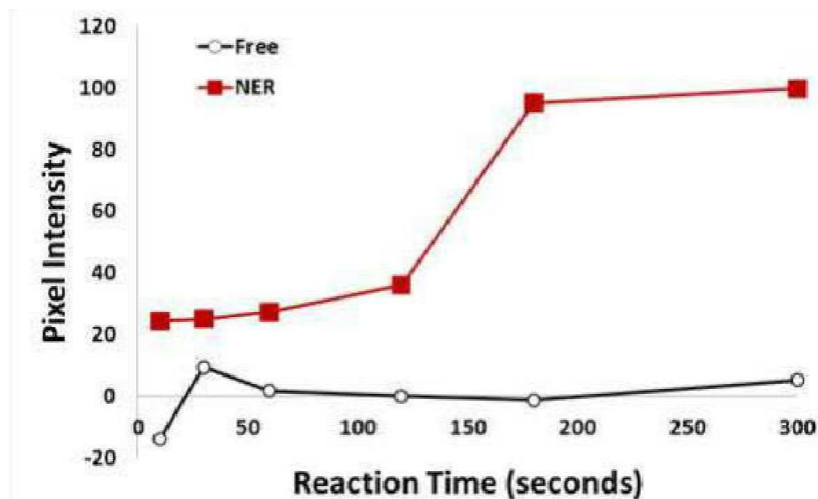
도면5



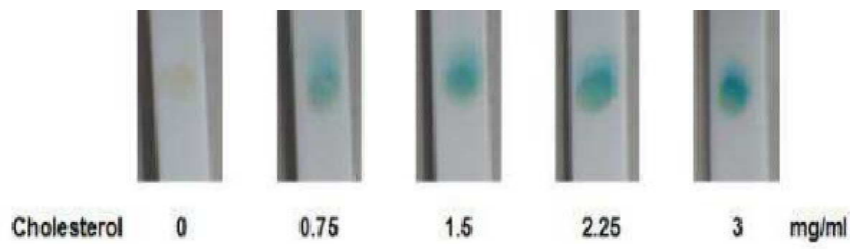
도면6a



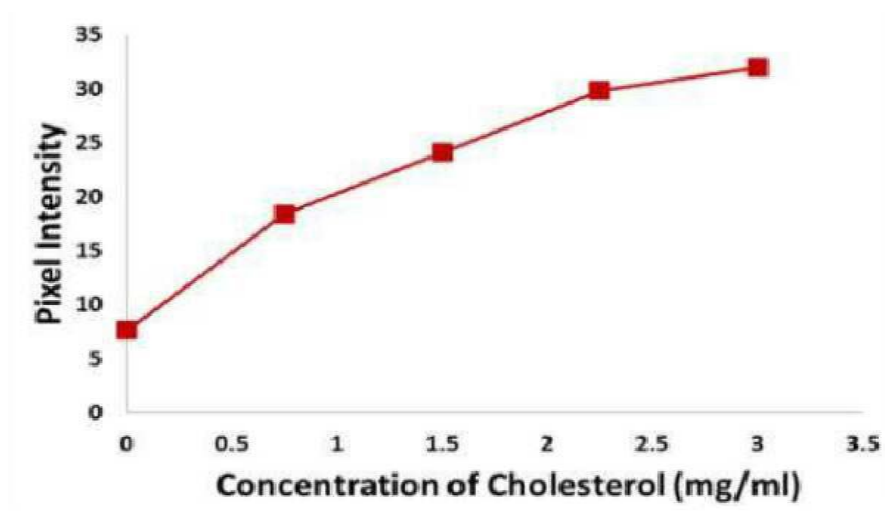
도면6b



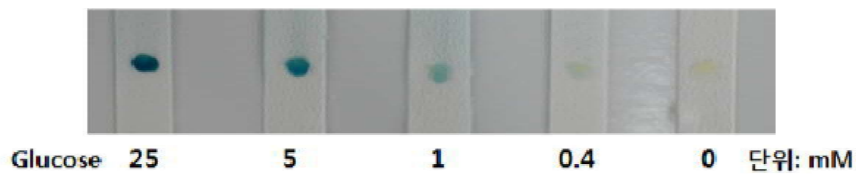
도면7a



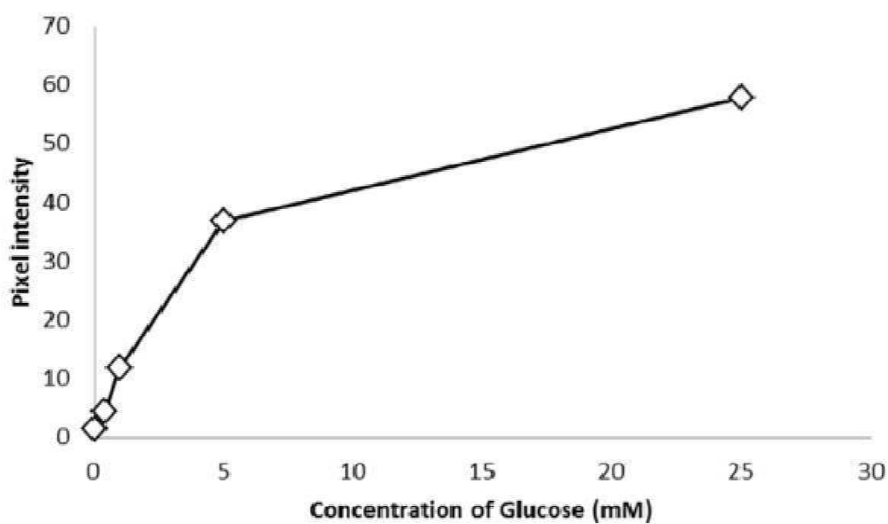
도면7b



도면8a

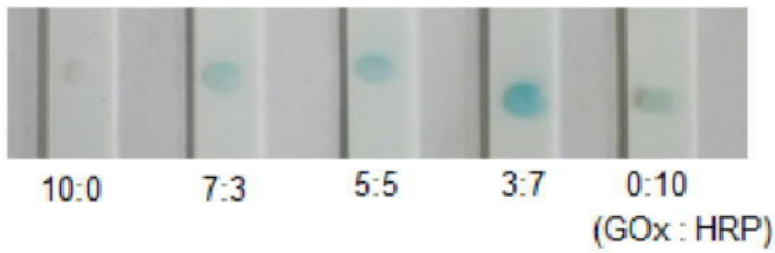


도면8b

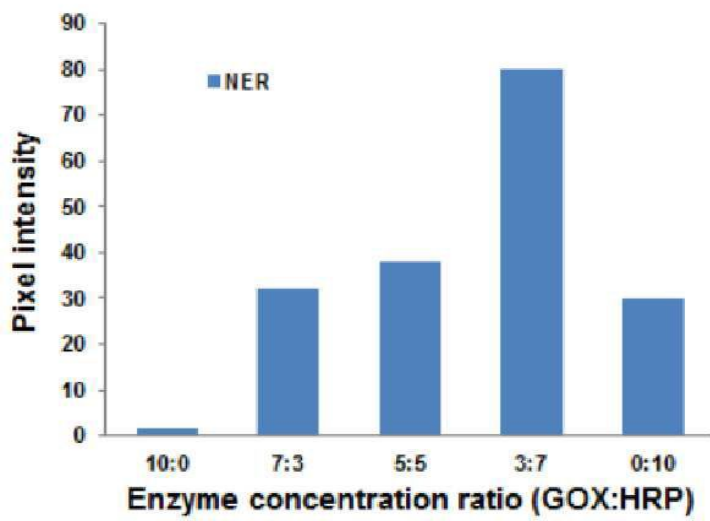


도면9a

- NER

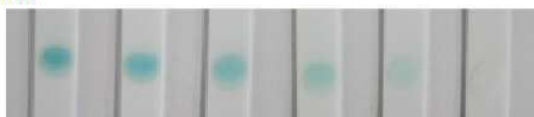


도면9b

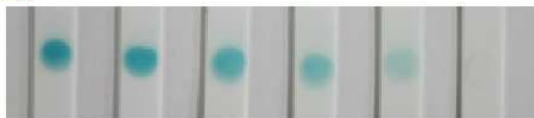


도면10a

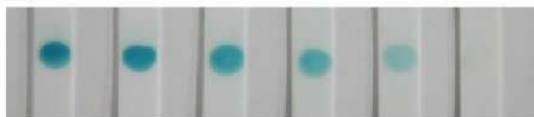
- 2 min



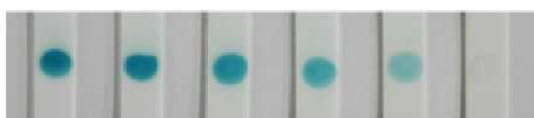
- 3 min



- 4 min

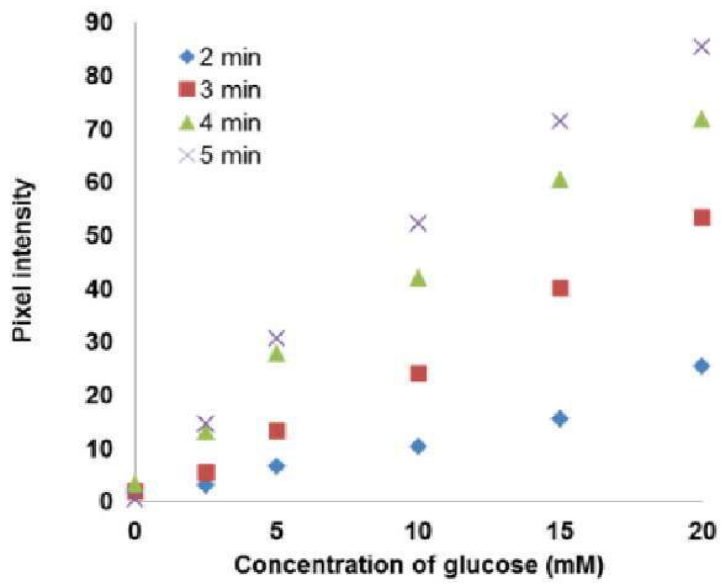


- 5 min



Glucose 20 15 10 5 2.5 0 단위: mM

도면10b



도면11

