



## 도 1

## 명세서

## 기술분야

본 발명은 일반적으로 분자 센서 및 분자 상호작용을 탐지하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 형광 중합체 복합체 및 바이오센싱 적용에서 복합체를 사용하는 방법에 관한 것이다.

## 배경기술

효소 결합 면역흡수 분석법 (즉, ELISA)은 광범위한 범위의 단백질, 항체, 세포, 바이러스 등의 존재 및 생물학적 활성을 동정하는데 가장 폭넓게 사용되고 수용되는 기술이다. ELISA는 먼저 분석물 바이오분자가 표면에 부착된 항체에 결합하는 다-단계 "샌드위치 분석"이다. 이후 두번째 항체가 바이오분자에 결합한다. 몇몇 경우, 두번째 항체는 후속하여 증폭 반응을 "전개하는" 촉매 효소에 부착된다. 다른 경우, 이러한 두번째 항체는 비오틴화되어 세번째 단백질 (예컨대, 아비딘 또는 스트렙타비딘)에 결합된다. 이 단백질은 증폭된 비색 변화에 대해 화학적 캐스캐이드를 생성하는 효소에 부착되거나, 형광 태깅(tagging)을 위해 형광체(fluorophore)에 부착된다.

이의 광범한 사용에도 불구하고, ELISA에는 수많은 단점이 존재한다. 예를 들어, 다-단계 공정은 시약 및 전개 시간 둘 모두에 대한 정밀한 제어가 요구되므로, 시간 소모적이고 "오류(false-positives)"를 초래하기 쉽다. 추가로, 비특이적으로 흡착된 시약을 제거하기 위해 신중한 세척이 요구된다.

형광성 공명 에너지 전달 (즉, FRET) 기술은 중합효소 사슬 반응계(PCT) 유전자 시퀀싱 및 면역검정 둘 모두에 적용되어 왔다. FRET는 오프(off)-상태에서 켜짐(quenched)되는 염료의 형광성을 활성화하기 위해 분석물 바이오분자의 동중 결합을 사용한다. FRET 기술의 전형적인 예에서, 형광 염료는 항체에 결합되고(F-Ab), 이러한 양체(diad)는 켜침(quencher)에 연결된 항원에 결합된다(Ag-Q). 결합된 복합체(F-Ab:Ag-Q)는 에너지 전달에 의해 켜짐(즉, 비-형광성)된다. Q에 구속되지 않은 동일한 분석물 항원(Ag)의 존재하에, Ag-Q 양체는 비교 농도인  $[Ag-Q]/[Ag]$ 에 의해 결정된 평형 결합 가능성에 의해 결정된 바에 따라 양적으로 대체된다. 이는 FRET 기술을 항원의 특성이 이미 잘 규정된 정량 분석으로 제한하며, Q에 항원을 연결시키는 화학은 신규한 각 경우에 대해 수행되어야 한다.

다른 FRET 기질 및 분석법이 미국특허 제 6,291,201호 및 하기 문헌에 기술되어 있다: Anne 등, "High Throughput Fluorogenic Assay for Determination of Botulinum Type B Neurotoxin Protease Activity", Analytical Biochemistry, 291, 253-261 (2001); Cummings 등, "A Peptide Based Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay for Bacillus Anthracis Lethal Factor protease", Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 6603-6606 (2002); 및 Mock 등, "Progress in Rapid Screening of Bacillus Anthracis Lethal Activity Factor", Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 6527-6529 (2002).

분자내적으로 켜짐된 형광 기질을 적용하는 다른 분석이 하기 문헌에 기재되어 있다: Zhong 등, "Development of an Internally Quenched Fluorescent Substrate for Escherichia Coli Leader Peptidase", Analytical Biochemistry 255, 66-73 (1998); Rosse 등, "Rapid Identification of Substrates for Novel Proteases Using a Combinatorial Peptide Library", J. Comb. Chem., 2, 461-466 (2000); 및 Thompson 등, "A BODIPY Fluorescent Microplate Assay for Measuring Activity of Calpains and Other proteases", Analytical Biochemistry, 279, 170-178 (2000). 또한 형광 편광의 변화를 측정하여 분석물의 양을 정량하는데 사용하는 분석이 개발되어 왔다. 참고문헌 [예를 들어 Levine 등, "Measurement of Specific Protease Activity Utilizing Fluorescence Polarization", Analytical Biochemistry 247, 83-88 (1997)]. 참고문헌 [Schade 등, "BODIPY- $\alpha$ -Casein, a pH-Independent Protein Substrate for Protease Assays Using Fluorescence Polarization", Analytical Biochemistry 243, 1-7 (1996)].

그러나, 높은 민감성으로 생물학적 관련 분자를 신속하고 정밀하게 탐지하고 정량하려는 요구가 여전히 존재한다.

## 발명의 상세한 설명

## 발명의 개요

본 발명의 첫번째 측면에 따라, 생물학적 인식 사건을 탐지하기 위한 센서를 제조하는 방법이 제공된다. 이 방법은 비오틴화된 형광 중합체 및 비오틴-결합 단백질을 수용액에서 조합하여 복합체를 형성하는 것을 포함하며, 여기서 복합체는 비어 있는 비오틴-결합 부위를 포함한다. 비오틴화된 형광 단백질 (예컨대, 피코에리트린 또는 피코빌리슘)은 비오틴화된 형광 중합체 및 비오틴-결합 단백질과 조합될 수 있다. 복합체는 고체 지지체(예컨대, 미소구체, 나노입자 또는 비드)의 표면 상에 배치될 수 있다. 고체 지지체는 실리카 또는 라텍스 미소구체일 수 있다. 고체 지지체의 표면은 암모늄 작용기를 포함할 수 있다. 비오틴 결합 단백질은 아비딘, 스트렙타비딘 및 뉴트라비딘으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

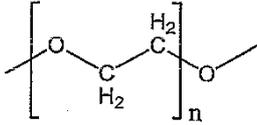
상기 기술된 방법은 추가로 폴리뉴클레오티드 서열, 펩티드 핵산 서열 또는 폴리펩티드 서열을 포함하는 비오틴화된 바이오컨쥬게이트를 용액에 첨가하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 비오틴화된 바이오컨쥬게이트는 복합체의 비어 있는 비오틴 결합 부위에 결합된다. 한 구체예에 따라, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트는 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열을 포함하고, 생물학적 인식 사건은 표적 분석물에 대한 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열의 핵산 하이브리드화이다. 이 구체예에 따른 방법은 또한 켄처 및 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열을 포함하는 제 2 바이오컨쥬게이트를 용액에 첨가하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 켄처는 형광 중합체를 증폭된 슈퍼-켄칭할 수 있고, 제 2 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열은 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열에 하이브리드화될 수 있다. 제 2 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열은 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열에 상보적일 수 있다.

대안적인 구체예에 따라, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트는 폴리펩티드 서열 및 형광 중합체를 증폭된 슈퍼-켄칭할 수 있는 켄처를 포함하고, 생물학적 인식 사건은 폴리펩티드 서열의 효소 유도된 절단이다.

본 발명의 두번째 측면에 따라, 비오틴화된 형광 중합체 및 비오틴 결합 단백질의 복합체를 포함하는 생물학적 인식 사건을 탐지하기 위한 센서가 제공되고, 여기서 복합체는 비어 있는 비오틴 결합 부위를 포함한다. 복합체는 고체 지지체(예컨대, 미소구체, 나노입자 또는 비드)의 표면에 배치될 수 있다. 고체 지지체는 실리카 또는 라텍스 미소구체일 수 있다. 폴리뉴클레오티드 서열, 펩티드 핵산 서열 또는 폴리펩티드 서열을 포함하는 비오틴화된 바이오컨쥬게이트가 복합체에 결합될 수 있다. 예를 들어, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트는 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열을 포함할 수 있고, 생물학적 인식 사건은 표적 분석물에 대한 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열의 핵산 하이브리드화일 수 있다. 대안적으로, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트는 폴리펩티드 서열 및 켄처를 포함할 수 있고, 여기서 켄처는 형광 중합체를 증폭된 슈퍼-켄칭할 수 있으며, 생물학적 인식 사건은 폴리펩티드 서열의 효소 유도된 절단이다. 비오틴 결합 단백질은 아비딘, 스트렙타비딘 또는 뉴트라비딘일 수 있다. 고체 지지체의 표면은 암모늄 작용기를 포함할 수 있다. 또한 센서는 비오틴화된 형광 중합체 및 비오틴-결합 단백질과 복합체를 형성하는 비오틴화된 형광 단백질 (예컨대, 피코에리트린 또는 피코빌리슘)을 포함할 수 있다.

또한 고체 지지체 상에 배치된 비오틴화된 형광 중합체, 비오틴 결합 단백질 및 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 복합체를 포함하는 센서가 제공되며, 여기서 비오틴화된 바이오컨쥬게이트는 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열을 포함하고, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트는 추가로 형광 중합체를 증폭된 슈퍼-켄칭할 수 있는 켄처를 포함한다. 이 구체예에 따라, 폴리뉴클레오티드 서열은 비오틴화된 바이오컨쥬게이트 상에서 켄처 및 비오틴 사이에 위치한다. 샘플을 센서와 조합(예컨대, 용액에서)하는 것을 포함하여, 상기 기술된 센서를 사용하여 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법이 또한 제공된다. 이 구체예에 따라, 표적 분석물은 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열에 하이브리드화될 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 표적 분석물 및 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 하이브리드화는 형광성의 증가를 동반하면서 고체 지지체의 표면으로부터 켄처의 분리를 증가시킨다.

추가적인 구체예에 따라, 상기 기술된 고체 지지체 상에 배치된 형광 중합체 복합체를 포함하는 센서는 추가로 리간드, 및 테더(tether) 상의 제 1 및 제 2 위치에 컨쥬게이션된 비오틴 부분을 포함하는 비오틴화된 바이오컨쥬게이트를 포함할 수 있고, 여기서 리간드는 형광 중합체를 증폭된 슈퍼-켄칭할 수 있는 켄처 부분을 포함하며, 리간드는 생물학적 인식 사건에 참여할 수 있다. 이 구체예에 따라, 제 1 및 제 2 위치 사이에 있는 테더의 일부가 생물학적 인식 사건의 발생이 형광성의 증가를 동반하면서 고체 지지체의 표면으로부터 켄처의 분리를 초래하도록 하는 길이 및 유연성을 지닌다. 리간드는 폴리펩티드 서열을 포함할 수 있다. 제 1 및 제 2 위치 사이에 있는 테더의 일부는 하기 화학식으로 표시되는 반복 단위를 포함할 수 있다:



상기 식에서, n은 양의 정수이다. 상기 기술된 센서를 사용하여 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법이 또한 제공된다. 표적 분석물은 포자, 세포, 세균 또는 바이러스일 수 있다. 상기 기술된 센서 및 고체 지지체 상에 배치된 다수의 표적 부분들을 포함하는 제 2 고체 지지체를 포함하는 생물학적 인식 사건을 탐지하기 위한 센싱 시스템(sensing system)이 또한 제공되며, 여기서 리간드는 표적 부분과 상호작용할 수 있어서 켄처가 형광 물질로부터 분리되고, 이로써 형광 중합체의 형광성이 증가한다. 제 2 고체 지지체는 미소구체(예컨대, 실리카 또는 라텍스 미소구체), 나노입자 또는 비드일 수 있다. 또한 센싱 시스템을 샘플과 조합하는 것을 포함하여, 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법이 제공되며, 여기서 표적 분석물은 리간드를 인식하고 상호작용할 수 있고, 표적 분석물과 리간드의 상호작용은 형광성의 감소를 초래한다. 리간드는 폴리펩티드를 포함할 수 있고, 생물학적 인식 사건은 리간드의 폴리펩티드와 폴리펩티드를 포함하는 표적 분석물과의 상호작용일 수 있다.

본 발명의 세번째 측면에 따라, 샘플을 뉴클레오티드 서열, 펩티드 핵산 서열 또는 폴리펩티드 서열을 포함하는 비오틀화된 바이오컨쥬게이트 및 상기 기술된 형광 중합체 복합체를 포함하는 센서와 조합하는 것을 포함하여, 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법이 제공된다. 비오틀화된 바이오컨쥬게이트가 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열을 포함할 때, 이 방법은 추가로 샘플을 켄처 및 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열을 포함하는 제 2 바이오컨쥬게이트와 조합하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 켄처는 형광 중합체를 증폭된 슈퍼-켄칭할 수 있으며, 제 2 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열은 비오틀화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열에 하이브리드화될 수 있다. 이 구체예에 따라, 표적 분석물은 비오틀화된 바이오컨쥬게이트 또는 제 2 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열에 하이브리드화될 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 제 2 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열은 비오틀화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열에 상보적일 수 있다. 추가의 구체예에 따라, 비오틀화된 바이오컨쥬게이트가 센서에 복합체화되도록 센서 및 비오틀화된 바이오컨쥬게이트가 조합되고, 샘플이 후속하여 센서/비오틀화된 바이오컨쥬게이트 복합체와 인큐베이션되며, 제 2 바이오컨쥬게이트가 후속하여 인큐베이션된 샘플에 첨가되도록 조합된다. 대안적인 구체예에 따라, 표적 분석물의 뉴클레오티드 서열은 이중-가닥 핵산을 포함할 수 있다. 대안적인 구체예에 따라, 이 방법은 추가로 인큐베이션된 샘플을 제 2 바이오컨쥬게이트의 존재하에 샘플 중의 이중-가닥 핵산을 용융시키기에 충분한 온도로 가열하고, 샘플을 냉각시켜 듀플렉스가 형성되도록 하는 것을 포함한다. 샘플에 존재하는 표적 분석물 및 제 2 바이오컨쥬게이트 간의 듀플렉스의 형성은 형광성의 증가를 초래한다. 대안적으로, 비오틀화된 바이오컨쥬게이트는 폴리펩티드 서열 및 켄처를 포함할 수 있고, 표적 분석물은 폴리펩티드 서열을 절단할 수 있는 효소(예컨대, β-세크레타아제)일 수 있다.

본 발명의 네번째 측면에 따라, 표면 상에 수용체에 대한 다수의 리간드를 포함하는 세균 포자 또는 바이러스; 세균 포자 또는 바이러스의 표면 상에 배치된 형광 중합체 또는 형광 중합체 복합체; 리간드에 대한 수용체에 컨쥬게이션된 켄처를 포함하는 다수의 바이오컨쥬게이트를 포함하는 표적 생물학적 종을 탐지하기 위한 센서가 제공되며, 여기서 수용체 및 리간드가 상호작용하고, 수용체 및 리간드의 상호작용이 형광 중합체의 형광성의 증폭된 슈퍼-켄칭을 초래한다. 또한, 샘플을 상기 기술된 센서와 함께 인큐베이션하는 것을 포함하여, 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법이 제공되며, 여기서 표적 분석물은 수용체를 인식하고 상호작용하며, 표적 분석물과 수용체와의 상호작용은 형광성의 증가를 초래한다. 표적 분석물은 표면 상에 수용체에 대한 다수의 리간드를 포함하는 세균 포자 또는 바이러스일 수 있다.

도면의 간단한 설명

본 발명은 첨부된 도면을 참조로 보다 잘 이해될 수 있다:

도 1은 QTL을 함유하는 DNA를 QTL을 함유하는 DNA의 DNA에 대해 상보적인 염기 서열을 지니는 표적 분석물을 탐지하기 위해 사용하는 본 발명에 따른 검정을 설명한다;

도 2a 내지 2c는 유연성 있는 테더를 지니는 QTL 바이오컨쥬게이트를 다가 분석물을 탐지하기 위해 사용하는 본 발명에 따른 검정을 설명한다;

도 3은 본 발명에 따른 다가 항원 비드(MAB)의 합성을 설명한다;

도 4는 본 발명에 따른 형광 중합체 태깅된(tagged) 비활성화된 표적의 합성 및 사용을 설명한다;

도 5는 뉴트라비딘 및 중합체 반복 단위의 혼합물을 복합시키고, 이후 생성된 중합체-단백질 복합체를 정전 상호작용에 의해 암모늄 작용기화된 미소구체의 표면상에 증착시키는 본 발명의 하나의 구체예에 따른 센서 구성의 개략도를 나타낸다;

도 6은 켄처 표지된 표적을 센싱 미소구체의 표면 상의 상보적인 포획 가닥에 대한 표적과 경쟁시키는 DNA 탐지용 검정을 나타낸다;

도 7은 다양한 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드의 혼합물에 의해 PPE 형광성을 켄칭하는 것을 나타내는 그래프이다; 및

도 8은 PNA-기재 포획 가닥으로 로딩된 미소구체 센서를 이용한 미스매치 분석을 나타내는 그래프이다.

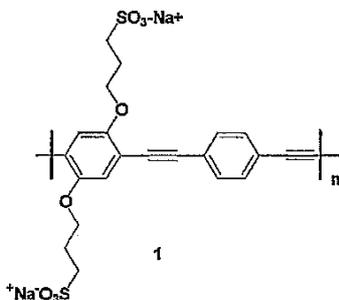
발명의 상세한 설명

형광 중합체(P)와 결합하여 이를 켄칭하는 켄처(Q)에 태더링된(T) 표적 생물학적 분자에 대한 리간드(L)를 포함하는 바이오컨쥬게이트가 본원에 그 전체가 참조로서 포함된 미국특허 출원 제 09/850,074호에 기술되어 있다. 이러한 바이오컨쥬게이트 ("QTL 바이오컨쥬게이트"로서 칭해짐)는 예를 들어, 전자 전달 또는 에너지 전달 켄칭에 의해 형광 다중전해질을 슈퍼-켄칭시키는 이점을 지닌다. 형광 중합체(P)는 일반적으로 형광 중합체의 전하와 반대되는 전하를 지니는 QTL 바이오컨쥬게이트와 결합 복합체를 형성할 수 있다. QTL 바이오컨쥬게이트는 공유 테더를 통해 특정 바이오분자에 특이적인 리간드(L)에 결합되는 켄처(Q)를 포함한다. QTL 바이오컨쥬게이트의 리간드와 바이오분자와의 결합은 QTL 바이오컨쥬게이트를 형광 중합체로부터 분리시키거나, 용이하게 탐지가 가능한 방법으로 이의 켄칭을 개질시킴으로써, 형광성의 변화에 의해 바이오분자가 감지될 수 있게 한다. 이러한 방식으로, 바이오분자가 매우 저 농도에서 탐지될 수 있다.

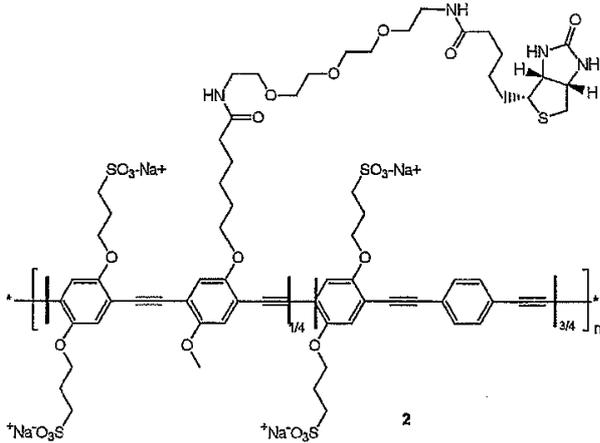
또한 라텍스 또는 실리카 비드 또는 나노입자와 같은 지지체 상에서 형광 중합체를 코팅하는 것이 슈퍼-켄칭을 증가시키고, 동시에 단백질 또는 핵산과 같은 거대분자와의 비특이적인 상호작용으로 인한 형광성의 변화를 감소시킬 수 있음이 입증되었다. 결과적으로, 동일한 입자상에 함께 위치하는 형광 중합체 및 수용체를 적용시켜 QTL과 형광 중합체와의 상호작용이 QTL 컨쥬게이트의 L 부분이 특이적인 수용체와 결합함에 의해 매개되도록 하는 검정이 고안되었다. 이러한 유형의 검정이 본원에 그 전체가 참조로서 포함된 미국특허 출원 제 10/098,387호 (2002년 3월 18일 출원)에 기술되어 있다. 이러한 검정은 통상적으로 분석물이 표면 결합 수용체의 표면에 의해 인식되는 서열 L로 구성되거나 이를 함유하는 경쟁 검정이다. 따라서, L과 수용체의 결합이 중합체 또는 중합체 앙상블로부터 형광성의 변화를 거의 또는 전혀 생성하지 않는다. 그러나, 수용체와의 결합에 의한 QTL의 결합은 형광성의 켄칭을 초래한다.

**1. 용액 및 지지된 포맷 형태의 센싱용 예비-형성된 중합체-단백질 복합체.**

상기 기술된 대로, QTL-중합체 슈퍼켄칭 검정은 다음이온성 폴리페닐렌 에티닐렌 (1):



또는 비오틴화된 폴리페닐렌 에티닐렌(2):



와 같은 형광 중합체 및 라텍스 또는 실리카 비드 또는 나노입자와 같은 지지체 상의 수용체를 함께 위치시킴에 의해 구성되었다. 전형적으로, 수용체는 항체, 단백질, 올리고뉴클레오타이드 또는 그밖의 리간드일 수 있다. 수용체 및/또는 중합체는 비오틴-아비딘 결합에 의해 지지체에 부착될 수 있다. 하나의 비오틴-결합 단백질(아비딘, 뉴트라비딘 또는 스트렙타비딘)이 중합체 또는 수용체를 첨가하기에 앞서 지지체에 공유적으로 연결될 수 있다.

본 발명에 따라, 비오틴화된 형광 중합체(예컨대, 중합체 2)를 비오틴-결합 단백질과 용액에서 초기 복합시키는 것을 포함하여, 형광 중합체 및 수용체를 함께 위치시키는 대안적인 수단이 제공된다. 중합체 2는 여러 개의 이용가능한 비오틴을 함유하나, 사용되는 각각의 단백질에서 네 개의 비오틴-결합 부위 중 하나 또는 많아야 두개와 결합할 수 있을 뿐이다. 이는 부분적으로 PPE 중합체의 큰 세그먼트의 "강체 로드(rigid rod)" 특성에 기인한다.

그러나, 수용액에서 뉴트라비딘과 같은 비오틴 결합 단백질에 상기 중합체 2와 같은 비오틴화된 형광 중합체를 첨가하는 것은 단백질에 의한 중합체의 가교를 초래한다. 중합체 2에 대하여, 이러한 가교는 중합체 형광성의 보통의 증가 및 빛 산란에 의해 표시되는 앙상블 크기의 현저한 증가를 수반한다. 비오틴-결합 단백질 대 중합체의 비에 따라서, 첨가되는 정확한 서열 뿐 아니라 생성된 비오틴화된 형광 중합체의 앙상블 및 비오틴-결합 단백질이 항체, 단백질, 올리고뉴클레오타이드 또는 펩티드와 같은 특이적인 비오틴화된 수용체에 부착되는데 사용될 수 있는 적당한 갯수의 비어 있는 비오틴-결합 부위를 함유할 수 있다. 비오틴 작용기화된 수용체가 켄처를 함유할 때(수용체 또는 수용체-QTL 복합체의 일부로서), 효과적인 중합체 형광성의 켄칭이 일어날 수 있다.

비오틴 결합 단백질/비오틴화된 형광 중합체 앙상블은 고체 지지체의 위에 코팅될 수 있다. 예를 들어, 뉴트라비딘:중합체 2 앙상블이(즉, 1 뉴트라비딘:15 중합체 반복 단위) 4차 암모늄기로 작용기화된 라텍스 미소구체 상에 코팅되었다. 생성된 미소구체는 고도로 형광성이었다. 이 형광성은 비오틴-켄처 켄츄게이트의 첨가에 의해 특이적으로 켄칭될 수 있었다. 대조적으로, 비오틴을 함유하지 않은 켄처의 첨가는 최소의 비특이적인 켄칭을 초래하였다. 켄칭은 동일한 조성 용액-상 뉴트라비딘:중합체 2 앙상블에 대하여 관찰된 것에 비해 다소 개선되었다.

따라서, 용액 또는 지지된 포맷 형태의 예비형성된 중합체-비오틴-결합 단백질 복합체는 센싱 응용을 위한 기초를 제공한다. 둘 모두의 "플랫폼"에서, 복합체가 특정 이점을 제공한다. 먼저, 수용체 및 중합체의 밀접한 근접성이 확보된다. 둘째로, 앙상블이 단백질, 소형 유기 분자 및 무기 이온과 같은 시약과 덜 비특이적인 상호작용을 일으킨다. 추가로, 분석의 광범한 조정이 가능하다. 예를 들어, 하나 이상의 하기 파라미터가 변경될 수 있다: 비오틴-결합 단백질 대 비오틴화된 중합체의 비; 중합체 상의 비오틴 밀도; 첨가 서열; 또는 사용되는 특이적인 비오틴-결합 단백질. 이러한 방식으로 분석이 특정한 응용에 대해 조정될 수 있다. 추가로, 복합체의 전체 전하는 중합체 상의 하전된 결가지기(side group) 또는 비오틴 결합 단백질을 변화시킴에 의해 조정될 수 있다. 따라서, 복합체는 다른 단백질에 대한 비특이적 결합, 다른 바이오분자(예컨대, DNA 또는 RNA)에 대한 비특이적 결합, 또는 하전된 표면 또는 중성 표면에 대한 비특이적 결합을 개선하거나 제거하기 위해 선택될 수 있다.

## 2. 형광 중합체 슈퍼켄칭을 기초로 단일 가닥 및 듀플렉스 DNA의 검정

형광 다중전해질을 이용한 센싱은 올리고뉴클레오타이드-올리고뉴클레오타이드 인식에 사용될 수 있다. 예를 들어, 단일 가닥 DNA의 QTL-기재 센싱이 최근에 보고되었다 [참고문헌: Kushon 등, Langmuir, 18, 7245-7249 (2002)]. 가장 단순

한 경우, 단일 가닥 "표적" DNA 서열을 상보적인 "포획" 단일 가닥에 결합시켜 중합체 또는 중합체 앙상블의 형광성을 조절(켄칭 또는 개선)할 수 있다. 한가지 접근 방법은 "표적" 서열에 상보적인 DNA의 비오틴화된 포획 가닥을 사용하는 것을 포함한다. 알려지지 않은 양의 표적 분석물의 존재하에 켄처-태킹된 표적(DNA-QTL)을 알려진 양으로 사용하는 경쟁 검정이 개발되어 왔다. 이러한 검정에서, 비오틴화된 포획 가닥은 형광 다중전해질, 및 아비딘, 스트렙타비딘 또는 뉴트라비딘과 같은 비오틴 결합 단백질질을 함유하는 비드 지지체에 결합되었다. 비오틴화된 포획 가닥과 (비오틴-아비딘 결합을 통한) 비드의 결합은 중합체 형광성을 거의 또는 전혀 변화시키지 않는다. 유사하게, 비오틴화된 포획 가닥-표적 분석물 듀플렉스와 비드의 결합은 형광성을 거의 또는 전혀 변화시키지 않았다. 그러나, 비오틴화된 포획 가닥-QTL 듀플렉스와 비드 또는 DNA-QTL과 미리 결합된 비오틴화된 포획 가닥의 결합은 중합체 형광성의 강력한 켄칭을 야기하였다.

비드에 미리 결합된 비오틴화된 포획 가닥에 대한 DNA-QTL 및 표적 분석물간의 직접 경쟁은 DNA-QTL과 포획 가닥의 보다 빠른 (동력학) 결합으로 인해 (표지되지 않은 분석물과 비교하여) 낮은 검정 민감성을 초래하였다. 그러나, 분석물과 비드-결합된 포획 가닥, 이어서 DNA-QTL을 첨가하는 단계식 결합은 민감하고 단순한 정량적인 검정을 제공하였다. 비오틴화된 포획 가닥, DNA-QTL 및 분석물 단일 가닥 DNA를 예비-인큐베이션하고, 이 혼합물을 형광 중합체로 코팅된 비드에 노출시킴에 의해 유사한 민감한 검정이 또한 획득되었다. 후자의 분석 둘 모두에 대하여, 형광성의 정도는 단일 가닥 분석물 DNA의 농도가 증가함에 따라 증가한다.

상기 기술된 검정은 단일 가닥 DNA를 사용하고, 표적 분석물과 동일한 염기 서열을 함유하는 DNA-QTL의 사용을 포함한다. 대안적인 검정 포맷이 도 1에 도시되어 있다. 이 검정 포맷은 표적 분석물에 상보적인 염기 서열을 지니는 DNA-QTL을 사용하는 것을 포함한다.

도 1에 도시된 대로, 에너지 전달 또는 전자 전달 켄처는 가닥의 한 말단에 공유적으로 연결되어 DNA-QTL을 생성할 수 있다. 또한 도 1에 도시된 대로, 표적 분석물과 동일한 서열을 지니고 가닥의 한 말단 상에 비오틴을 갖는 비오틴화된 가닥은 포획 가닥으로서 사용될 수 있다. 비오틴화된 포획 가닥과 형광 중합체-코팅된 비드와의 결합은 중합체로부터의 형광성의 정도를 거의 또는 전혀 변화시키지 않는다. 그러나 DNA-QTL 및 비드-결합된 포획 가닥간의 듀플렉스 형성은 DNA-QTL 상에서의 중합체 및 켄처간의 근접한 결합으로 인해 중합체 형광성의 켄칭을 초래한다.

단일 가닥 분석물 DNA의 검정을 수행하기 위해, 분석물(알려지지 않은 수준) 및 DNA-QTL을 비오틴화된 표적을 함유하는 비드의 현탁액과 혼합할 수 있다. 표적 분석물 및 DNA-QTL간의 듀플렉스 형성은 "비어 있는" DNA-QTL를 제거함으로써, 표적의 부재하에 발생할 중합체의 켄칭을 억제한다. 이러한 방식으로, 단일 가닥 분석물에 대한 단순하고 균질한 정량적 검정이 제공될 수 있다.

상기 기술된 검정 재료는 또한 듀플렉스로서 존재하는 표적 분석물을 센싱하는 단순하고 균질한 포맷을 제공할 수 있다. 예를 들어, 분석물 및 분석물에 상보적인 염기 서열을 지니는 듀플렉스 DNA-QTL을 함유하는 샘플을 함께 위치하는 형광 중합체 및 비오틴화된 포획 시약을 함유하는 고체 지지체 (예컨대, 비드의 현탁액)에 첨가하고, 충분한 온도까지 가열하여 듀플렉스의 "용융"을 제공할 수 있다. 이는, 혼합물의 온도를 주위 온도로 회복한 후, DNA-QTL과 단일 가닥 분석물의 접합(pairing) 및 샘플 중의 표적 가닥의 수준에 비례하는 형광성 켄칭의 약화를 야기한다.

사전에 보고되고 상기 기술된 것과 유사한 검정이 펩티드 핵산의 비오틴화된 포획 가닥 (즉, 비오틴화된 PNA)을 사용하여 구성될 수 있다. 비오틴화된 PNA는 표적 분석물 DNA 또는 DNA-QTL의 상보적인 서열과 접합됨에 있어서 유사한 선택성을 나타내나 보다 강력한 듀플렉스를 제공하고, 따라서 단일 가닥 표적 분석물에 대한 검정에서 보다 큰 민감성을 제공할 수 있다. 포획 가닥으로서 비오틴화된 PNA를 사용하는 이점은 보다 강력한 DNA-PNA 결합이 가닥-침입에 의해 듀플렉스 표적에 대한 주위 온도에서의 균질한 검정의 기초를 제공한다는 점이다.

DNA 탐지의 또 다른 대안적인 방법은 비오틴화된 DNA-QTL의 사용을 포함한다. 켄주게이트 중의 비오틴 및 켄처는 반대되는 말단에 정위된다. 비오틴-결합 단백질질을 함유하는 중합체-코팅된 미소구체에 노출시, 비오틴-DNA-QTL은 비오틴을 통해 표면에 부착되어 진다. 또한, 사용되는 켄처의 일반적인 소수성으로 인해, 켄처는 표면 상에 놓인 중합체를 켄칭시키면서, 표면 상에서 켄처 표지된 말단들을 역폴딩(fold back)시킨다. 그러나, 표적 가닥의 존재하에, 비오틴-DNA-QTL은 DNA 듀플렉스로 하이브리드화된다. DNA 듀플렉스는 단일 가닥 DNA에 비해 비교적 강체인 것으로 알려져 있다. 따라서, 듀플렉스의 형성은 DNA가 표적에 용이하게 하이브리드화됨에 따라 비오틴-DNA-QTL이 표면 상에서 역폴딩될 수 없기 때문에 켄처 및 표면간의 거리를 증가시킬 수 있다. 결과적으로, 켄칭의 정도가 감소될 수 있다.

### 3. 길고 유연성 있는 테더(예컨대, 친수성 중합 테더)를 사용한 센싱 포맷

상기 설명한 대로, 형광 중합체 또는 중합체 앙상블의 켄칭/비켄칭을 기초로 하는 바이오센싱에 사용되는 QTL 컨쥬게이트는 통상적으로 켄쳐(Q); 테더(T); 및 리간드 또는 수용체(L)의 세 가지 성분으로 구성된다. 에너지 전달이든 전자 전달이든간에, 슈퍼켄칭의 정도는 형광 중합체 또는 중합체 앙상블에 대한 켄쳐의 근접성에 의존한다. 감지되는 생물학적 인식 사건의 민감성 정도는 통상적으로 인식 사건과 켄쳐 및 중합체 앙상블을 분리하는 거리 변화의 커플링에 따라 달라진다.

중합체/QTL 슈퍼-켄칭 상호작용에 기초한 바이오센싱에 대한 초기의 접근 방법에서, 중합체(용액, 또는 미소구체 또는 나노입자와 같은 지지체에 결합됨)는 비특이적인 상호작용(일반적으로, 쿨롱 인력 및 소수성 상호작용)에 의해 QTL과 결합된다. 형광성의 "턴-오프(turn-off)" 검정에서, 생물학적 인식 사건에서 방출된 QTL 및 중합체의 결합은 형광성의 켄칭을 초래한다. 대안적으로, QTL과 특이적인 수용체의 결합은 예비-결합된 중합체와 QTL의 분리를 초래하여, 형광성의 "턴-온(turn-on)"을 감지할 수 있다. 이 검정 플랫폼은 표적 분석물 및 합성 QTL에 따라 직접 검정 및 경쟁 검정 둘 모두에서 사용될 수 있다.

대안적인 센싱 플랫폼에서, 형광 중합체 및 수용체(즉, QTL 바이오컨쥬게이트의 리간드 "L"에 대한 수용체) 둘 모두는 미크론 크기 또는 서브 미크론 크기의 라텍스 비드, 실리카 미소구체, 나노입자 또는 표면과 같은 고체 지지체 상에 함께 위치한다. 이 경우 QTL과 수용체의 특정 결합은 QTL의 방출이 형광성의 턴 온을 초래하는 동안 형광성의 켄칭을 야기시킨다. 상기 논의된 센싱 접근 방법 둘 모두에서, QTL 컨쥬게이트는 일반적으로 최소 길이의 테더를 사용하여 QTL이 중합체 또는 중합체 앙상블에 결합될 때 형광 중합체와 켄쳐 및 QTL의 리간드 부분 둘 모두의 밀접한 근접성을 제공한다.

대안적인 접근 방법은 길고 유연성 있는 테더를 지니는 QTL 컨쥬게이트를 포함한다. 도 2a 내지 도 2c에 도시된 대로, 켄쳐를 포함하는 인식 분자로부터 비오틴 "커넥터(connector)"를 분리시키는 "유연성 있는" 테더의 구성은 비오틴-결합 단백질 및 형광 중합체를 함유하는 비드 "플랫폼"에 결합될 수 있는 QTL을 초래한다.

도 2a 내지 도 2c에 도시된 대로, 형광 중합체로 코팅되고 이용가능한 아비딘 또는 스트렙타비딘 수용체 부위를 지니는 고체 지지체(비드로 나타냄)는 길고 유연성 있는 테더를 지니는 비오틴닐화된 켄쳐에 복합될 수 있다. 결과적으로, 형광성이 켄칭된다(도 2b). 그러나 인식 분자와 결합하는 분석물의 존재는 형광 지지체로부터 켄쳐를 제거하여 형광성을 증가시킬 수 있다(도 2c).

유연성 있는 테더는 다양한 형태로 존재할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 유연성 있는 테더는 도 2a에 도시된 대로 폴리(에틸렌 글리콜)(즉, PEG) 선형 사슬로 구성된다. 한 실시예에서, 비오틴은 ~75개의 반복 단위를 지니는 PEG 테더에 의해 수용체로부터 분리된다. 만약 이 사슬이 충분히 신장된 형태로 존재한다면, 비오틴 커넥터 및 수용체 간의 거리는 ~278 앙스트롬이 될 것이다.

수성 매질에서 PEG 사슬은 다소 붕괴될 것이고, 붕괴되거나 감긴 상태에서, 켄쳐-표지된 수용체는 비드-결합된 형광 중합체의 비교적 밀접한 근접성을 야기할 수 있다. 이는 QTL의 비오틴이 결합된 비오틴-결합 단백질 부위로부터 비교적 멀리 떨어질 수 있는(비드의 표면 상에서) 중합체 영역으로부터의 형광성을 켄칭시킬 수 있다. 사슬 말단에 위치한 켄쳐-수용체 및 표면 상의 형광 중합체 간의 상호작용의 정도는 표면 및 켄쳐-수용체 상의 전하를 변화시키거나, 켄쳐-수용체의 소수성을 변화시키거나 현탁액에 첨가되는 시약에 의해 조정될 수 있다.

유연성 있는 사슬은, 이것이 표면으로부터 충분히 멀어지게 신장될 때, 켄쳐-표지된 수용체가 중합체로부터 지나치게 멀어져서 현저한 켄칭을 허용할 수 없을 정도로 충분히 긴 것이 바람직하다. 비드 표면 상의 수용체-켄쳐 및 형광 중합체 간의 결합이 약하기 때문에, 큰 분석물의 첨가는 수용체-켄쳐의 제거 및 중합체의 켄칭 반경 밖의 거리로의 PEG의 신장을 초래할 수 있다. 큰 다가 분석물에 대하여, 센싱은 동일 비드 또는 다중 비드로부터 다중 수용체-켄쳐를 제거함에 의해 증폭될 수 있다. 따라서, 이 검정 포맷은 특히 포자, 세포, 세균 또는 바이러스와 같이 비교적 큰 분석물에 적합하다.

#### 4. QTL 바이오센싱을 위한 기재로서의 다가 항원 비드

본 발명의 추가의 구체예에 따라, 검정은 표적 단백질 분석물의 존재하에 상이하게 상호작용하는 두 개의 성분을 추가로 포함하는 상기 기술된 길고 유연성 있는 테더를 지니는 컨쥬게이트 및 동일한 비드를 사용하여 구성될 수 있다. 이 경우, 검정은 특히 상기 섹션 3에서 지시된 반응을 유도하지 않으나 형광 중합체로부터 제거되지 않으면서 수용체-켄쳐 앙상블에 결합될 수 있는 소형 단백질 분석물에 적합하다. 이 경우, 성분 중의 하나는 상기 섹션 3에 기술된 비오틴-결합 단백질 및 비오틴-유연성 있는 테더-수용체 켄쳐 "QTL-성분"을 함유하는 형광 중합체 코팅된 비드이다. 두번째 성분은 표면이 수용체를 인식하는 표적 항원의 다중 복사체로 "장식된(decorated)" 중합체 비드 또는 미소구체일 수 있다(즉, "다가 항원 비드" 또는 MVAB). MVAB는 도 3에 도시되어 있다.

도 3에 도시된 대로, 비오틴화된 항원은 비오틴 결합 단백질로 작용기화된 중합체 비드와 복합체화되어 본 발명에 따른 다가 항원 비드를 형성할 수 있다.

다가 항원 비드를 비오틴-유연성 있는 테더-수용체-켄처를 함유하는 비드의 현탁액에 첨가하는 것은 비드의 표면으로부터 켄처-수용체를 제거함에 의해 단백질로부터의 형광성을 턴 온시킨다. 후속적인 표적 분석물의 첨가는 수용체에 대한 경쟁 및 MVAB의 대체에 의해 형광성의 켄칭을 초래한다. 이 검정은 알려진 양의 MVAB 및 알려지지 않은 양의 표적 단백질 분석물을 동시에 형광 중합체를 함유하는 비드의 현탁액에 첨가하는 직접 경쟁 방식으로 수행될 수 있다. 형광성 켄칭의 정도는 분석물 농도의 직접 측정치를 제공한다. 또한 이 검정은 표적 분석물에 이어 MVAB 또는 그 반대로 형광 중합체-수용체 코팅된 비드를 연속하여 처리함에 의해 대체 경쟁 검정으로서 수행될 수 있다.

### 5. 형광 중합체 또는 중합체-양상블-태깅된 표적에 의한 QTL 센싱.

항원성 반응 부위 및 화학적 반응 부위 둘 모두로 구성된 표면 상에서 반복되는 패턴을 지니는 세균 포자 및 바이러스와 같은 크고 강한 생물학적 중은 대안적인 중합체 슈퍼-켄칭 검정을 제공한다. 도 4에 개략적으로 도시된 대로, 이 유형의 비활성화된 표적은 반응하여 형광 중합체 또는 형광 중합체 양상블의 표면에 공유적으로 연결되거나 다르게 부착될 수 있다.

도 4에 도시된 대로, 형광 중합체는 비활성화된 표적 (예컨대, 세균 포자)에 공유적으로 결합되어 작용기화된 비활성화된 표적을 형성할 수 있다. 형광 포자가 도 4에 도시되어 있다. 부착의 정도는 표적에 대한 수용체의 결합 부위가 접근가능하게 남아 있는 정도로 제어될 수 있다.

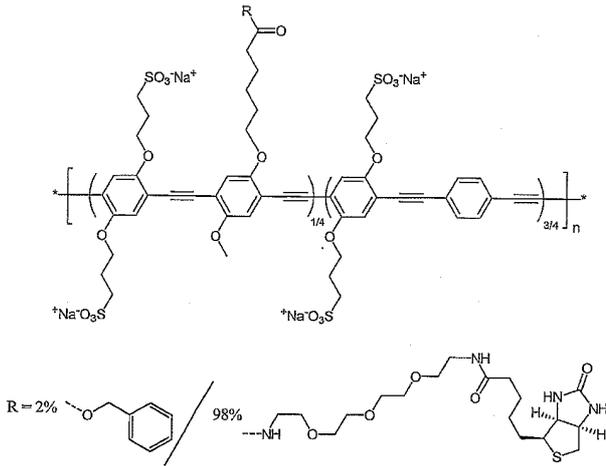
도 4에 도시된 대로, 작용기화된 비활성화된 표적 (즉, 형광 포자)는 고도로 형광성이다. 수용체-켄처 QTL 바이오센서 키트의 첨가는 (예컨대, 수용체는 항체, 항체 단편 또는 펩티드 또는 다른 소형 분자 결합제와 같은 결합 시약일 수 있다) 형광 표적의 형광성을 켄칭하면서 이에 결합한다. 도 4에 도시된 대로, 각각의 태깅된 표적은 여러 분자의 수용체-켄처 키트 키트를 수용할 수 있다. 또한 도 4에 도시된 대로, 표지된 표적의 첨가는 수용체 결합 부위의 "희석(dilution)" 및 형광 태깅된 표적으로부터의 수용체-켄처 키트 키트의 제거를 초래한다. 결과적으로, 형광성의 증가가 관찰될 수 있다.

상기 기술된 검정의 민감성은 키트 키트의 구조 및 태깅되고 태깅되지 않은 표적에 대한 이의 친화력을 조절하면서 표적 상의 형광 중합체의 코팅 정도를 조정함에 의해 조절될 수 있다. 앞서 여러 개의 QTL 중합체 슈퍼켄칭 검정에서 지시한 대로, 실제 경쟁은, 켄처-결합제 QTL과 표지된 표적의 예비-인큐베이션으로부터 QTL, 표적 및 표지된 표적의 직접 결합에 이르기까지 수 개의 상이한 방식으로 수행될 수 있다.

### 용액 및 지지된 포맷 형태의 센싱용 예비-형성된 중합체-단백질 복합체

#### 실시예 1 - 용액 형태의 센싱용 중합체-단백질 복합체의 제조

56.5mmol의 아비딘(비오틴 결합 단백질, BBP) 및 848mmol의 비오틴화된 PPE 중합체(1)를 총 11.3mL의 부피로 함께 혼합하고 CRT에서 24시간 동안 인큐베이션시켜 QTL 용액 센서("센서 SS")를 제조하였다. 중합체 및 BBP를 비오틴-아비딘 상호작용을 통해 서로 복합체화하여 안정한 실체를 형성하였다. 이에 따라 제조된 용액 센서는 각 실험의 초기에 완충액으로 적합하게 희석되었다. 중합체(1)의 구조는 하기에 도시된다:



**중합체 1의 구조**

**실시예 2 - 고체-용액 계면에서 센싱용 예비-형성된 단백질-중합체 복합체의 적용**

이 실시예에서, 중합체-단백질 앙상블은 4차 암모늄으로 작용기화되고 0.55 마이크론의 직경을 지니는 폴리스티렌 미소구체(MS) 위에 2단계 공정으로 코팅되었다 (InterFacial Dynamics Corporation). 1단계에서, 용액 중의 소정량의 중합체 (1)를 뉴트라비딘(또 다른 BBP)의 용액에 첨가하여 중합체 반복 단위(PRU) 대 BBP의 최종 비가 5:1이 되게 하였다. 이 용액을 주위 조건하에 30분 동안 인큐베이션하였다. 2단계에서, 중합체/단백질 혼합물을 폴리스티렌 미소구체에 첨가하고, 2시간 동안 pH=7에서 인큐베이션한 다음, 디아필터링하고(diafiltered), 인산염 완충 염수로 교환하였다. 중합체 및 단백질 코팅 밀도를 정량하기 위해 형광차 분광기(Difference fluorescence spectroscopy)를 사용하였다.

예측되는 중합체 코팅 밀도는  $4.75 \times 10^6$  PRU/MS이고, 예측되는 단백질 코팅 밀도는 PPE-B에 대해  $9.5 \times 10^5$  뉴트라비딘/MS이다. 미소구체의 표면에 중합체/단백질 혼합물을 코팅할 때, 구체는 플루오레세인 표지된 비오틴 유도체를 사용한 결합 실험으로부터 결정되듯이, 구체 당  $\sim 1.3 \times 10^5$  비오틴 결합 부위를 지니는 것으로 측정되었다.

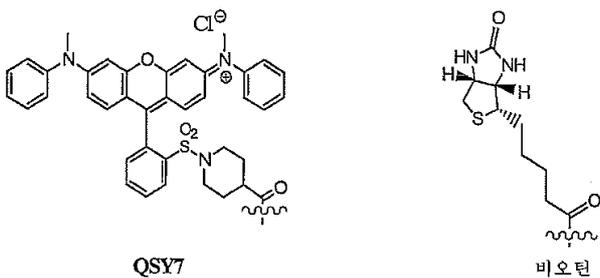
도 5는 뉴트라비딘 및 형광 중합체의 혼합물이 복합체화되고, 생성된 복합체가 고체 지지체 상에 코팅되는 상기 기술된 센서 구성의 개략도를 도시한다. 상기 기술된 대로, 중합체 반복 단위 대 뉴트라비딘의 비는 5:1일 수 있다. 도 5에 도시된 대로, 복합체는 정전 상호작용에 의해 암모늄 작용기화된 미소구체의 표면 상에 증착될 수 있다.

**실시예 3 - 실시예 1에서 제조된 QTL 용액 센서를 사용한 효소 활성의 센싱 ("센서 SS")**

384-웰 플레이트에 존재하는 검정 완충액 중의  $5\mu\text{l}$ 의 400nM BSEC-1(구조는 하기에 도시됨) 용액에  $5\mu\text{l}$ 의 검정 완충액에 용해된 30ng의  $\beta$ -세크레타아제 효소를 첨가하였다. BSEC-1은 하기 도시된 펩티드 구조를 지닌다:

(QSY7)-T-E-E-I-S-E-V-N-L-D-A-E-F-(K-비오틴)-OH 서열번호: 1

상기에서, "QSY7" 및 "비오틴"은 하기 구조로 표시된다:

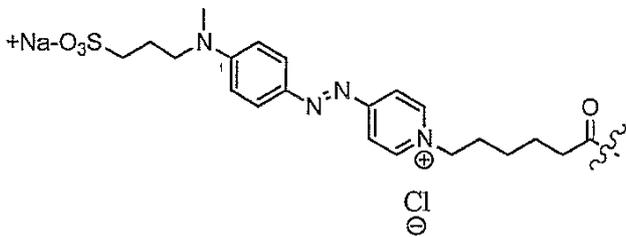


세 개의 혼합물을 제조하고, CRT에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 대조군 웰은 펩티드만을 함유하고 효소를 함유하지 않는다. 인큐베이션 후, 상기 용액 센서의 100배 희석액을 20 $\mu$ l로 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 미소구체 리더 내부에서 진탕하였으며, 중합체를 440nm에서 자극하고 530nm에서의 방출 강도를 475nm 차단 필터를 사용하여 측정함에 의해 웰을 프로빙하였다. 대조군 웰은 5,400 $\pm$ 200의 평균 RFU 수치를 나타내었고, 효소를 함유하는 샘플 웰은 8,350 $\pm$ 200의 평균 RFU 수치를 나타내었다. 형광성의 차이는 효소 활성의 측정치였다.

비록 BSEC-1이 상기 기술되었으나, 다른 폴리펩티드가 또한  $\beta$ -세크레타아제 효소 활성을 검정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 대안적인 구체예에 따라,  $\beta$ -세크레타아제 효소 활성의 검정에 BSEC-3이 사용될 수 있다. BSEC-3은 하기 도시된 폴리펩티드 구조를 지닌다:

(AZO)-T-E-E-I-S-E-V-N-L-D-A-E-F-(K-비오틴)-OH 서열번호: 2

상기 펩티드 구조에서, "QSY7" 및 "비오틴"은 상기에서 정의된 바와 같고, "AZO"는 하기 화학식으로 표시되는 구조를 지닌다:



AZO

**실시예 4 - BBP 상의 추가 비오틴-결합 부위를 사용하여 중합체-단백질 복합체와 복합할 수 있는 비오틴-R-피코에리트린을 사용한 검정**

실시예 3으로부터의 검정 성능은 소량의 비오틴-R-피코에리트린(BRPE)을 지니는 상기 실시예 1에 기술된 QTL 용액 센서를 도핑함에 의해 개선되었다. 생성된 용액 센서("센서 YY")는 각 실험의 초기에 40 $\mu$ l의 혼합물 중의 250fmol의 BRPE를 제공하는 비율로 "센서 SS"의 마스터 원액의 200배 희석액을 BRPE와 함께 인큐베이션함에 의해 제조되었다. 검정 완충액 중의 5 $\mu$ l의 300nM BSEC-3 용액에 5 $\mu$ l의 검정 완충액 중의 30ng의  $\beta$ -세크레타아제 효소를 첨가하였다. BSEC-3은 상기 기술된 폴리펩티드 구조를 지닌다. 대조군 및 샘플 혼합물을 CRT에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 40 $\mu$ l의 도핑된 용액 센서(센서 YY)를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 플레이트 리더 내부에서 60초 동안 진탕하였으며, 중합체를 440nm에서 자극하고 576nm에서의 방출 강도를 475nm 차단 필터를 사용하여 측정함에 의해 웰을 프로빙하였다. 대조군 웰은 5,200 $\pm$ 200의 평균 RFU 수치를 나타내었고, 효소를 함유하는 샘플 웰은 14,500 $\pm$ 200의 평균 RFU 수치를 나타내었다. 이렇게 관찰된 차이는 효소 활성의 측정치였다.

**실시예 5 - 형광 중합체 슈퍼켄칭을 기초로 단일 가닥 및 이중 가닥 DNA의 검정**

하기 데이터는 DNA 탐지에 대한 QTL 검정의 특이성을 입증한다. 사용된 접근 방법은 켄처 표지된 표적과 센싱 미소구체의 표면 상의 상보적인 포획 가닥에 대한 표적과의 경쟁을 포함한다.

도 7은 다양한 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오티드의 혼합물에 의한 PPE 형광성의 켄칭을 도시하는 그래프이다. 도 7로부터 알 수 있는 바와 같이, 최소의 켄칭이 DNA-QTL 및 미소구체 표면의 비특이적인 상호작용으로 인해 관찰된다. 대조적으로, DNA-QTL 컨쥬게이트 및 포획 가닥의 특이적 상호작용은 비특이적인 켄칭 이상의 현저한 켄칭을 초래하였다. 사용된 포획 가닥(즉, ALF-포획, 구조는 하기 도시됨)은 탄저균 치사 인자(ALF)를 코딩하는 서열의 영역에 상보적인 서열을 포함하는 비오틴닐화된 DNA 포획 가닥이었다.

17-mer 및 20-mer DNA-QTL을 사용한 결과가 도 7에 도시되어 있다. 도 7에 도시된 모든 실험은 25 $^{\circ}$ C에서 96-웰 플레이트(웰 당 200mL V<sub>t</sub>)에서 수행되었다. 각 경우에, 20pmol의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드의 혼합물이 첨가되었다.

도 7에 언급된 폴리펩티드는 하기와 같이 정의된다:

- ALF- 포획 :
- 5'-비오틴-TAA ATA CCA TTA AAA ATG CA-3' 서열번호 : 3
- ALF- 표적 :
- 5'-TGC ATT TTT AAT GGT ATT TA-3' 서열번호 : 4
- DNA-QTL (20-mer):
- 5'-TGC ATT TTT AAT GGT ATT TA-QSY7-3' 서열번호 : 5
- DNA-QTL (17-mer):
- 5'-ATT TTT AAT GGT ATT TA-QSY7-3' 서열번호 : 6

상기에서, "비오틴" 및 "QSY7"은 상기에서 정의된 바와 같다. 상보적이지 않은 DNA 올리고뉴클레오티드는 도 7에서 "NC"로서 표시된다.

도 7로부터 알 수 있는 바와 같이, ALF-포획 가닥 및 DNA-QTL 둘 모두의 존재는 켈칭에서 현저한 증가를 야기하였다. 이러한 켈칭의 증가는 DNA-QTL 및 ALF-포획 가닥의 하이브리드화의 결과이다. 더욱이, 비오틴화된 ALF-포획 가닥은 미소구체의 표면 상에서 형광 중합체 및 비오틴 결합 단백질과 복합체를 형성한다. 따라서 DNA-QTL 및 ALF-포획 가닥의 하이브리드화는 켈칭에 대해 형광 중합체와의 밀접한 근접성을 초래하여 증폭된 슈퍼켈칭을 야기시킨다.

#### 실시예 6 - 단일 뉴클레오티드 DNA 미스매치에 대한 지지된 중합체-단백질 복합체의 이용

하기 실시예는 센서(예컨대, 실시예 2에 기술된 센서)가 심지어 단일 뉴클레오티드 DNA 미스매치의 존재를 탐지하기 위해 사용될 수 있음을 입증한다. 이 실시예에 사용된 접근 방법은 켈칭 표지된 표적과 센싱 미소구체의 표면 상의 상보적인 포획 가닥에 대한 표적과의 경쟁을 포함한다.

도 8은 하기 도시된 구조를 지니는 PNA-기재 포획 가닥("PAN-Cap"로 표시됨)으로 로딩된 미소구체 센서를 이용한 미스매치 검정을 도시하는 그래프이다. 실험은 40°C에서 총 200 $\mu$ l의 웰 부피로 수행되었다.

상기 실험에 사용되고 도 8에 언급된 폴리펩티드는 하기와 같이 정의된다:

- ALF 표적 :
- 5'-TGC ATT TTT AAT GGT ATT TA-3' 서열번호 : 7
- G-T 미스매치:
- 5'-TGC ATT TTT GAT GGT ATT TA-3' 서열번호 : 8
- T-T 미스매치:
- 5'-TGC ATT TTT IAT GGT ATT TA-3' 서열번호 : 9
- C-T 미스매치:
- 5'-TGC ATT TTT CAT GGT ATT TA-3' 서열번호 : 10
- 이중 미스매치 :
- 5'-TGC ATA TTT AAT GGA ATT TA-3' 서열번호 : 11
- DNA-QTL:
- 5'-ATT TTT AAT GGT ATT TA-QSY7-3' 서열번호 : 12
- PNA- 포획 :
- 비오틴 -TAA ATA CCA TTA AAA-Lys-NH<sub>2</sub> 서열번호 : 13

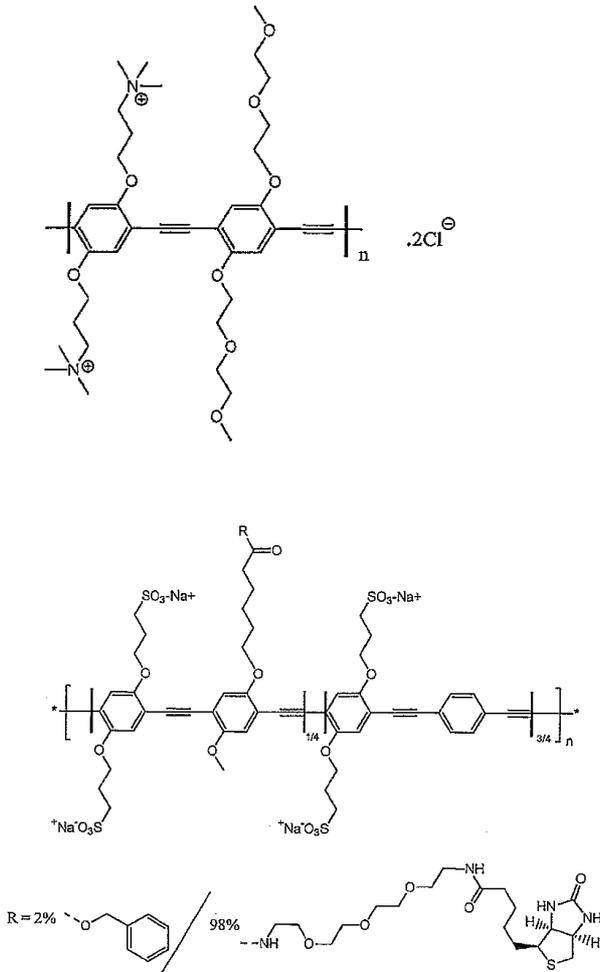
상기에서, "비오틴" 및 "QSY7"은 상기에서 정의된 바와 같다.

도 8로부터 알 수 있는 바와 같이, 표적 양의 증가에 따른 상대 형광성의 증가가 AA 이중 미스매치 표적을 제외한 모든 표적에 대해 관찰되었다. 그러나, 표적 양의 증가에 따라 관찰되는 증가된 형광성의 양이 완전 상보적 표적의 경우에 훨씬 높았다.

고체 지지체는 바이오검정에 사용하기 적합한 임의의 재료로부터 제조될 수 있다. 또한 고체 지지체는 임의의 크기, 외형 및 형태일 수 있다. 고체 지지체를 제조하는 재료 및 고체 지지체의 크기, 외형 및 형태는 수행될 검정의 요건에 따라 다양할 수 있다. 고체 지지체의 예로는 미소구체, 나노입자 및 비드가 있으나, 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 실리카 또는 라텍스 미소구체가 고체 지지체로서 사용될 수 있다.

고체 지지체의 표면은 작용기를 포함할 수 있다. 고체 지지체는 작용기를 포함하는 재료로부터 제조될 수 있거나, 대안적으로 상기 기를 함유하지 않는 고체 지지체의 표면이 당 분야에 공지된 기술을 사용하여 상기 기를 함유하도록 작용기화될 수 있다. 상기 설명한 대로, 고체 지지체의 표면은 암모늄 작용기를 포함할 수 있다 (예컨대, 고체 지지체의 표면이 암모늄 작용기를 포함하여 작용기화될 수 있다). 고체 지지체 표면은 또한 하전된 반응기, 중성 반응기 및 카르복실레이트 반응기를 포함하나 이로 제한되지 않는 다른 작용기를 포함하거나, 이를 포함하여 작용기화될 수 있다.

복합체에 사용된 형광 중합체는 중성이거나, 양으로 또는 음으로 하전되거나, 쯔비터 이온성인 컨쥬게이션된 중합체일 수 있다. 또한 형광 중합체는 J-형 응집 거동을 나타내는 펜던트 형광 염료를 지니는 비컨쥬게이션된 백본을 포함하는 측쇄 중합체일 수 있다. 예시적인 형광 중합체의 구조가 하기에 제공된다:



자극된 형광 중합체로부터 방사성 에너지를 흡수하여 형광성을 켜칠 수 있는 임의의 부분이 켜쳐로서 사용될 수 있다. 예시적인 켜쳐로는 중성이거나, 양으로 또는 음으로 하전되거나, 쯔비터 이온성인 중, 비형광 또는 형광 중, 유기, 무기, 유기금속, 생물학적 또는 중합성 중, 또는 에너지 또는 전자-전달 종이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 구체예에 따

라, 켄처는 상기 기술된 QSY-7 또는 Azo 염료와 같은 비형광 소분자 염료이다. 한 구체예에 따라, 켄처는 형광 중합체를 증폭된 켄칭할 수 있다 (즉, 슈퍼켄칭). 추가의 구체예에 따라, 켄처는 형광 물질로부터 흡수된 방사성 에너지를 형광성으로서 재방출시킬 수 있다.

형광 중합체 복합체는 추가로 비오틴화된 형광 단백질을 포함할 수 있다. 비오틴화된 형광 단백질은 비오틴 결합 단백질의 비어 있는 비오틴 결합 부위에 결합될 수 있다. 예시적인 형광 단백질로는 피코에리트린 및 피코빌리숨이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 비오틴화된 형광 단백질은 비오틴화된 R-피코에리트린(BRPE)일 수 있다. 형광 단백질의 존재하에, 형광 중합체의 자극된 발색단은 복합체에서 이의 에너지를 형광 단백질 분자에 전달할 수 있다. 이후 형광 단백질 분자는 이 에너지를 보다 효과적으로 재방출시킬 수 있다. 예를 들어, BPRE를 포함하는 형광 중합체 복합체의 사용은 날카롭고, 적색 이동하는 형광 시그널을 초래할 수 있다. 복합체로부터의 형광 방출은 켄처를 포함하는 바이오컨쥬게이트가 복합체에 결합될 때 (예컨대, 켄처를 포함하는 비오틴화된 바이오컨쥬게이트가 복합체에 결합되거나, 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열 및 켄처를 포함하는 제 2 바이오컨쥬게이트가 복합체에 결합된 포획 가닥에 하이브리드화될 때) 켄칭될 수 있다.

상기 명세서는 설명을 위해 제공된 실시예를 이용하여 본 발명의 원리를 교시하나, 당업자라면 상기 기술의 이해로부터 형식 및 상세에 있어서의 다양한 변화가 본 발명의 진정한 범위를 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

**(57) 청구의 범위**

**청구항 1.**

비오틴화된(biotinylated) 형광 중합체 및 비오틴-결합 단백질을 수용액에서 조합하여 비어 있는 비오틴-결합 부위를 포함하는 복합체를 형성하는 것을 포함하여, 생물학적 인식 사건을 탐지하기 위한 센서를 제조하는 방법.

**청구항 2.**

제 1항에 있어서, 비오틴화된 형광 단백질을 비오틴화된 형광 중합체 및 비오틴-결합 단백질과 조합하는 것을 추가로 포함함을 특징으로 하는 방법.

**청구항 3.**

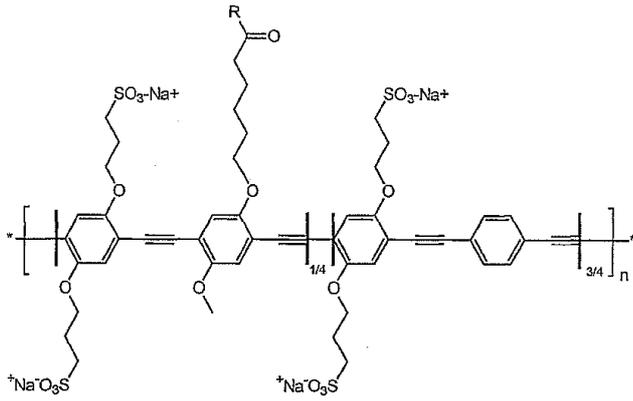
제 2항에 있어서, 형광 단백질이 피코에리트린 또는 피코빌리숨임을 특징으로 하는 방법.

**청구항 4.**

제 1항에 있어서, 복합체를 고체 지지체의 표면 상에 배치시키는 것을 추가로 포함함을 특징으로 하는 방법.

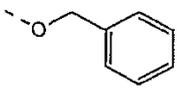
**청구항 5.**

제 1항에 있어서, 형광 중합체가 하기 화학식에 의해 표시되는 반복 단위를 포함함을 특징으로 하는 방법:

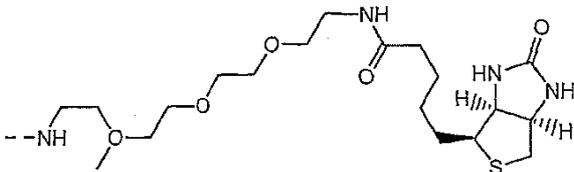


상기 식에서, n은 양의 정수이고,

치환기 "R"은 하기 화학식



및/또는 하기 화학식에 의해 표시된다:



### 청구항 6.

제 4항에 있어서, 고체 지지체가 미소구체, 나노입자 또는 비드를 포함함을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7.

제 4항에 있어서, 고체 지지체의 표면이 암모늄 작용기, 카르복실레이트 작용기, 하전된 반응기 및 중성 반응기로 구성된 군으로부터 선택된 작용기를 포함함을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8.

제 1항에 있어서, 비오틴 결합 단백질이 아비딘, 스트렙타비딘 및 뉴트라비딘으로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 9.

제 1항에 있어서, 용액에 뉴클레오티드 서열, 펩티드 핵산 서열 또는 폴리펩티드 서열을 포함하는 비오틴화된 바이오컨쥬게이트를 첨가하는 것을 추가로 포함하고,

여기서 비오틴화된 바이오컨쥬게이트는 복합체에 결합됨을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 10.

제 9항에 있어서, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트가 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열을 포함하고, 생물학적 인식 사건이 표적 분석물에 대한 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 서열 또는 펩티드 핵산 서열의 핵산 하이브리드화임을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 11.

제 9항에 있어서, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트가 폴리펩티드 서열, 및 형광 중합체를 증폭된 슈퍼-퀀칭(super-quenching)할 수 있는 켄처(quencher)를 포함하고, 생물학적 인식 사건이 폴리펩티드 서열의 효소 유도된 절단임을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 12.

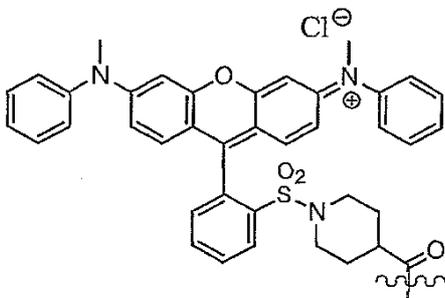
제 10항에 있어서, 켄처 및 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열을 포함하는 제 2 바이오컨쥬게이트를 용액에 첨가하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 켄처는 형광 중합체를 증폭된 슈퍼-퀀칭할 수 있고, 제 2 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열은 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열에 하이브리드화될 수 있음을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 13.

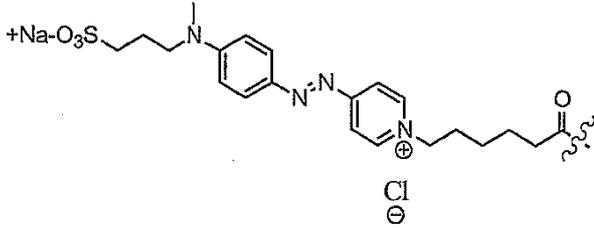
제 12항에 있어서, 제 2 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열이 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열에 상보적임을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 14.

제 11항에 있어서, 켄처가 하기 화학식

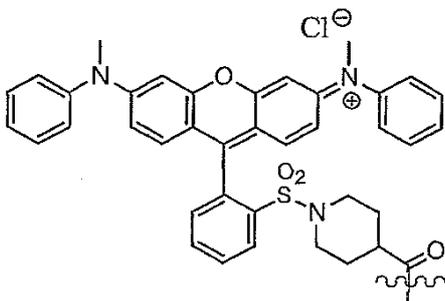


또는 하기 화학식으로 표시되는 구조를 지님을 특징으로 방법:

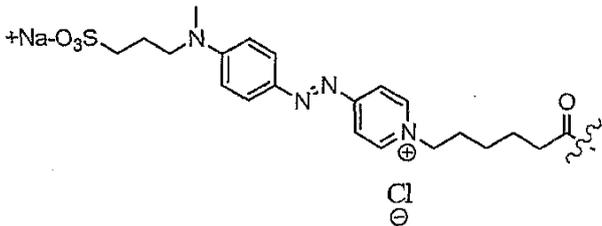


청구항 15.

제 12항에 있어서, 켈처가 하기 화학식



또는 하기 화학식으로 표시되는 구조를 지님을 특징으로 하는 방법:



청구항 16.

비오틴화된 형광 중합체 및 비오틴 결합 단백질의 복합체를 포함하는 생물학적 인식 사건을 탐지하기 위한 센서로서, 복합체가 비어 있는 비오틴 결합 부위를 포함하는 생물학적 인식 사건을 탐지하기 위한 센서.

청구항 17.

제 16항에 있어서, 고체 지지체를 추가로 포함하며,

여기서 복합체는 고체 지지체의 표면 상에 배치됨을 특징으로 하는 센서.

청구항 18.

제 16항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 서열, 펩티드 핵산 서열 또는 폴리펩티드 서열을 포함하는 비오틴화된 바이오컨쥬게이트를 추가로 포함하며,

여기서 비오틴화된 바이오컨쥬게이트는 복합체에 결합됨을 특징으로 하는 센서.

### 청구항 19.

제 18항에 있어서, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트가 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 생물학적 인식 사건이 표적 분석물에 대한 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열의 핵산 하이브리드화임을 특징으로 하는 센서.

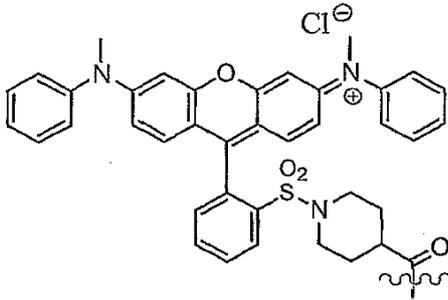
### 청구항 20.

제 18항에 있어서, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트가 폴리펩티드 서열 및 켄처를 포함하고,

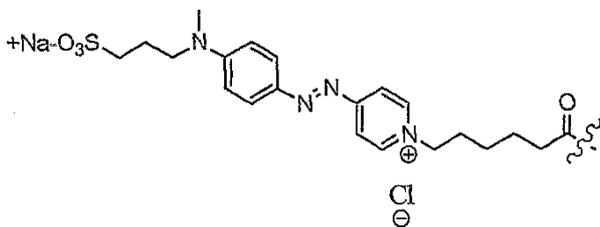
여기서 켄처는 형광 중합체를 증폭된 슈퍼-켄칭할 수 있고, 생물학적 인식 사건은 폴리펩티드 서열의 효소 유도된 절단을 특징으로 하는 센서.

### 청구항 21.

제 20항에 있어서, 켄처가 하기 화학식



또는 하기 화학식으로 표시되는 구조를 지님을 특징으로 하는 센서:



### 청구항 22.

제 16항에 있어서, 비오틴 결합 단백질이 아비딘, 스트렙타비딘 및 뉴트라비딘으로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 센서.

**청구항 23.**

제 17항에 있어서, 고체 지지체가 미소구체, 나노입자 또는 비드를 포함함을 특징으로 하는 센서.

**청구항 24.**

제 17항에 있어서, 고체 지지체의 표면이 암모늄 작용기, 카르복실레이트 작용기, 하전된 반응기 및 중성 반응기로 구성된 군으로부터 선택된 작용기를 포함함을 특징으로 하는 센서.

**청구항 25.**

제 17항에 있어서, 복합체가 리간드, 및 테더(tether) 상의 제 1 및 제 2 위치에 컨쥬게이션된 비오틴 부분을 포함하는 비오틴화된 바이오컨쥬게이트를 추가로 포함하고,

여기서 리간드는 켄처 부분을 포함하며,

켄처 부분은 형광 증합체를 증폭된 슈퍼-켄칭할 수 있고,

리간드는 생물학적 인식 사건에 참여할 수 있으며,

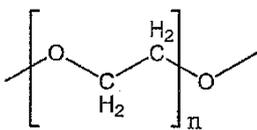
제 1 및 제 2 위치 사이에 있는 테더의 일부는 생물학적 인식 사건의 발생이 형광성의 증가를 동반하면서 고체 지지체의 표면으로부터 켄처의 분리를 초래하도록 하는 길이 및 유연성을 지님을 특징으로 하는 센서.

**청구항 26.**

제 25항에 있어서, 리간드가 폴리펩티드 서열을 포함함을 특징으로 하는 센서.

**청구항 27.**

제 25항에 있어서, 제 1 및 제 2 위치 사이의 테더의 일부가 하기 화학식으로 표시되는 반복 단위를 포함함을 특징으로 하는 센서:



상기 식에서, n은 양의 정수이다.

**청구항 28.**

제 27항에 있어서, n이 70 내지 80임을 특징으로 하는 센서.

**청구항 29.**

제 27항에 있어서, n이 75임을 특징으로 하는 센서.

### 청구항 30.

제 25항에 있어서, 테더가 완전히 신장된 상태에서 250Å 이상의 길이를 지님을 특징으로 하는 센서.

### 청구항 31.

제 16항에 있어서, 비오틴화된 형광 단백질을 추가로 포함하고,

여기서 비오틴화된 형광 단백질은 비오틴화된 형광 중합체 및 비오틴-결합 단백질과 함께 복합체를 형성함을 특징으로 하는 센서.

### 청구항 32.

제 31항에 있어서, 형광 단백질이 피코에리트린 또는 피코빌리슘임을 특징으로 하는 센서.

### 청구항 33.

샘플을, 폴리뉴클레오티드 서열, 펩티드 핵산 서열 또는 폴리펩티드 서열을 포함하는 비오틴화된 바이오컨쥬게이트 및 제 16항의 센서와 조합시키는 것을 포함하여, 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법.

### 청구항 34.

제 33항에 있어서, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트가 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열을 포함하고,

상기 방법이 샘플을 켜쳐 및 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열을 포함하는 제 2 바이오컨쥬게이트와 조합하는 것을 추가로 포함하며,

여기서 켜쳐는 형광 중합체를 증폭된 슈퍼-켄칭할 수 있고,

제 2 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열은 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열에 하이브리드화될 수 있으며,

표적 분석물은 비오틴화된 바이오컨쥬게이트 또는 제 2 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열에 하이브리드화될 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함함을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 35.

제 34항에 있어서, 제 2 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열이 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열에 상보적임을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 36.

제 33항에 있어서, 비오틴화된 바이오켄주게이트가 폴리펩티드 서열을 포함하고 추가로 켄처를 포함하며, 여기서 비오틴화된 바이오켄주게이트와 복합체와의 결합은 형광 중합체의 형광성을 켄칭하고, 표적 분석물은 폴리펩티드 서열을 절단할 수 있는 효소임을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 37.

샘플을 제 25항의 센서와 조합시키는 것을 포함하여, 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법.

#### 청구항 38.

제 37항에 있어서, 리간드가 폴리펩티드 서열을 포함함을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 39.

제 37항에 있어서, 표적 분석물이 포자, 세포, 세균 및 바이러스로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 40.

제 25항의 센서, 및

고체 지지체의 표면 상에 배치된 다수의 표적 부분을 포함하는 제 2 고체 지지체를 포함하는 생물학적 인식 사건을 탐지하기 위한 센싱 시스템(sensing system)으로서,

비오틴화된 바이오켄주게이트의 리간드가 표적 부분과 상호작용하여 켄처가 형광제로부터 분리되고, 이에 따라 형광 중합체의 형광성이 증가하는 생물학적 인식 사건을 탐지하기 위한 센싱 시스템.

#### 청구항 41.

제 40항에 있어서, 리간드가 폴리펩티드 서열을 포함함을 특징으로 하는 센싱 시스템.

#### 청구항 42.

제 40항에 있어서, 제 2 고체 지지체가 미소구체, 나노입자 또는 비드임을 특징으로 하는 센싱 시스템.

#### 청구항 43.

제 40항의 센싱 시스템을 샘플과 조합하는 것을 포함하여, 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법으로서,

표적 분석물이 리간드를 인식하고 이와 상호작용할 수 있고, 표적 분석물과 리간드의 상호작용이 형광성의 감소를 초래하는 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법.

#### 청구항 44.

제 43항에 있어서, 리간드가 폴리펩티드를 포함하고, 생물학적 인식 사건이 리간드의 폴리펩티드와 폴리펩티드를 포함하는 표적 분석물과의 상호작용을 포함함을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 45.

제 34항에 있어서, 샘플을 비오틴화된 바이오컨쥬게이트 및 제 2 바이오컨쥬게이트와 함께 인큐베이션하고, 센서를 인큐베이션된 샘플에 첨가하는 것을 포함함을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 46.

제 34항에 있어서, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트가 센서에 복합체화되도록 센서 및 비오틴화된 바이오컨쥬게이트가 조합되고, 샘플이 후속하여 센서/비오틴화된 바이오컨쥬게이트 복합체와 인큐베이션되며, 제 2 바이오컨쥬게이트가 후속하여 인큐베이션된 샘플에 첨가됨을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 47.

제 46항에 있어서, 표적 분석물의 뉴클레오티드 서열이 이중-가닥 핵산을 포함하고,

상기 방법이 인큐베이션된 샘플을 제 2 바이오컨쥬게이트의 존재하에 샘플 중의 이중-가닥 핵산을 용융시키기에 충분한 온도까지 가열하고,

듀플렉스가 형성되도록 샘플을 냉각시키는 것을 추가로 포함하며,

여기서 샘플 중에 존재하는 표적 분석물 및 제 2 바이오컨쥬게이트 간의 듀플렉스 형성은 형광성의 증가를 초래함을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 48.

제 46항에 있어서, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트가 펩티드 핵산 서열을 포함함을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 49.

세균 포자 또는 바이러스의 표면 상의 수용체에 대한 다수의 리간드를 포함하는 세균 포자 또는 바이러스,

세균 포자 또는 바이러스의 표면 상에 배치된 형광 중합체 또는 형광 중합체 복합체, 및

리간드에 대한 수용체에 컨쥬게이션된 켄처를 포함하는 다수의 바이오컨쥬게이트를 포함하는 표적 생물학적 종을 탐지하기 위한 센서로서, 수용체 및 리간드가 상호작용하고 수용체 및 리간드의 상호작용이 형광 중합체의 형광성의 증폭된 슈퍼-켄칭을 야기시키는 표적 생물학적 종을 탐지하기 위한 센서.

#### 청구항 50.

샘플을 제 49항의 센서와 함께 인큐베이션하는 것을 포함하여, 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법으로서,

샘플 중의 표적 분석물이 수용체를 인식하고 이와 상호작용하고, 샘플 중의 표적 분석물과 수용체의 상호작용이 형광성의 증가를 초래하는 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법.

### 청구항 51.

제 50항에 있어서, 표적 분석물이 세균 포자 또는 바이러스의 표면 상의 수용체에 대한 다수의 리간드를 포함하는 세균 포자 또는 바이러스를 포함함을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 52.

제 17항에 있어서, 비오틴화된 바이오컨쥬게이트가 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열을 포함하고 추가로 형광 중합체를 증폭된 슈퍼-퀀칭할 수 있는 켄처를 포함하며, 폴리뉴클레오티드 서열이 비오틴화된 바이오컨쥬게이트 상에서 켄처 및 비오틴 사이에 위치함을 특징으로 하는 센서.

### 청구항 53.

샘플을 제 52항의 센서와 조합시키는 것을 포함하여, 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법으로서,

표적 분석물이 비오틴화된 바이오컨쥬게이트의 폴리뉴클레오티드 또는 펩티드 핵산 서열에 하이브리드화될 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 하이브리드화가 고체 지지체의 표면으로부터 켄처의 분리 증가 및 형광성의 동반적인 증가를 초래하는 샘플 중의 표적 분석물의 존재 및/또는 양을 탐지하는 방법.

### 청구항 54.

제 6항에 있어서, 고체 지지체가 실리카 또는 라텍스 미소구체를 포함함을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 55.

제 23항에 있어서, 고체 지지체가 실리카 또는 라텍스 미소구체를 포함함을 특징으로 하는 센서.

### 청구항 56.

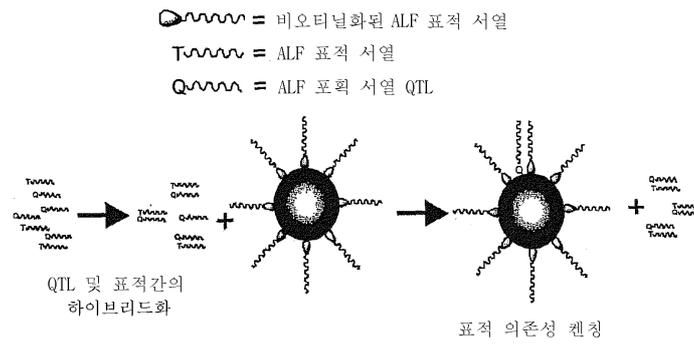
제 40항에 있어서, 제 2 고체 지지체의 표면이 암모늄 작용기, 카르복실레이트 작용기, 하전된 반응기 및 중성 반응기로 구성된 군으로부터 선택된 작용기를 포함함을 특징으로 하는 센싱 시스템.

### 청구항 57.

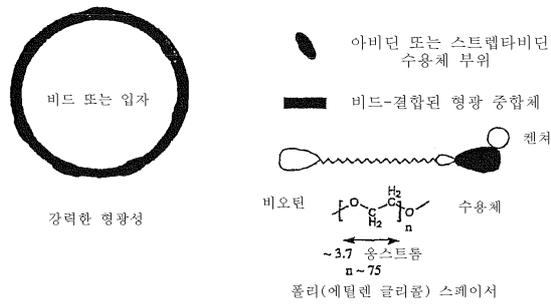
제 42항에 있어서, 제 2 고체 지지체가 실리카 또는 라텍스 미소구체를 포함함을 특징으로 하는 센싱 시스템.

도면

도면1



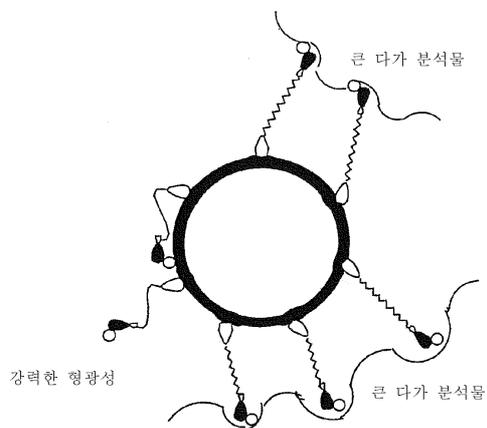
도면2a



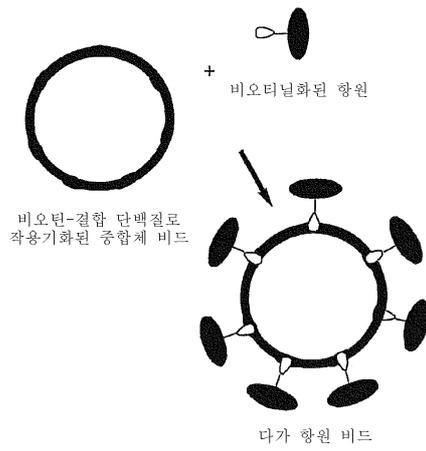
도면2b



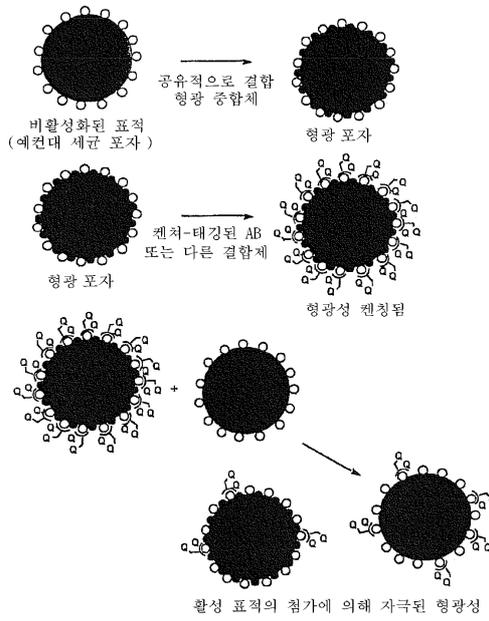
도면2c



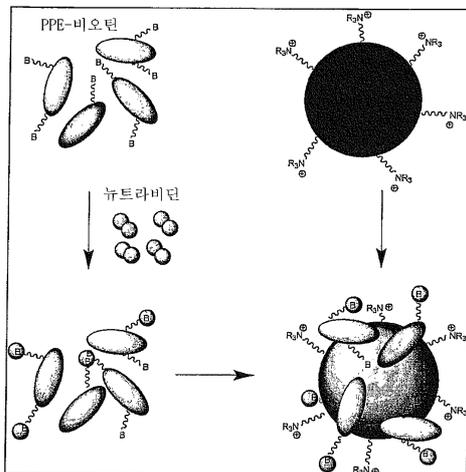
도면3



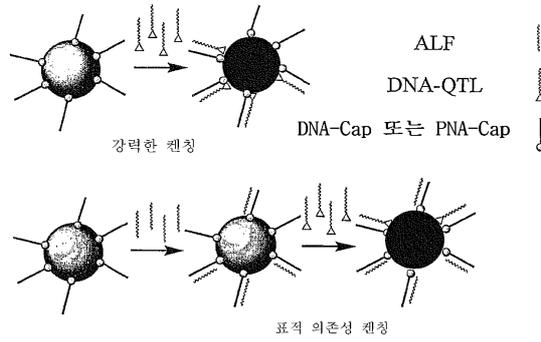
도면4



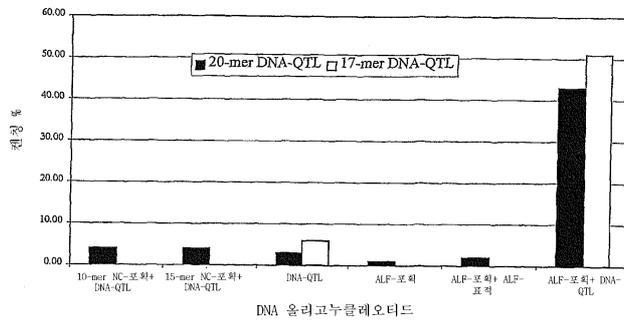
도면5



도면6



도면7



도면8

