



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년03월13일
(11) 등록번호 10-1114507
(24) 등록일자 2012년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
COIB 31/02 (2006.01) GOIN 33/53 (2006.01)
GOIN 33/535 (2006.01) GOIN 33/58 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0048137
(22) 출원일자 2010년05월24일
심사청구일자 2010년05월24일
(65) 공개번호 10-2011-0128606
(43) 공개일자 2011년11월30일
(56) 선행기술조사문헌
Anal. Chem. Vol.80, 2008, pages 2250-2254

(73) 특허권자
한국과학기술원
대전 유성구 구성동 373-1
(72) 발명자
박현규
대전광역시 유성구 대학로 291, 한국과학기술원
응용공학동 생명화학공학과 5101호 (구성동)
이진우
경상북도 포항시 남구 효자동 포항공과대학교 환
경공학동 화학공학과 425호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 임도경

(54) 발명의 명칭 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체 및 그 제조방법

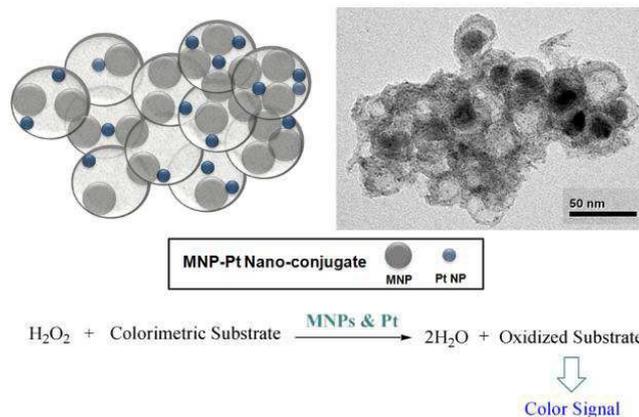
(57) 요약

본 발명은 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 효소를 이용하는 효소면역측정법(ELISA), 바이오 센서 또는 발색 진단 센서에서 과산화효소의 대체물로 이용 가능한 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

상기 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체의 제조방법은 (a) 자성 나노입자를 다공성 탄소에 고정시켜 자성 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계; 및 (b) 플래티늄 나노입자를 상기 자성 나노입자-다공성 탄소 복합체에 고정시켜 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계를 포함한다.

본 발명에 따르면, 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체는 기존의 자성 나노입자만 사용한 경우에 비해 비약적으로 향상된 과산화효소로서의 높은 활성을 나타내므로, 단독 또는 유기 효소와 같이 고정화함으로써, 면역진단의 고감도 무기 신호 유도체로서 이용가능하고, 효소의 대상 기질이 되는 물질의 고감도 발색 진단을 나타낼 수 있는 효과가 있으며, 재사용이 가능하여 경제적이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김문일

대전광역시 유성구 대학로 291, 한국과학기술원 응
용공학동 생명화학공학과 2107호 (구성동)

예영진

경상북도 포항시 남구 효자동 포항공과대학교 환경
공학동 화학공학과 419호

박관우

대전광역시 유성구 대학로 291, 한국과학기술원 응
용공학동 생명화학공학과 2107호 (구성동)

특허청구의 범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체의 제조방법:

- (a) 자성 나노입자를 다공성 탄소에 고정시켜 자성 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계; 및
- (b) 플래티늄 나노입자를 상기 자성 나노입자-다공성 탄소 복합체에 고정시켜 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 다공성 탄소는 MSU-F, SNU-1, CMK-3 및 CMK-5로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a)단계의 고정은 $Fe(NO_3)_3$ 을 에탄올에 침전시킨 후, 불활성 가스 분위기에서 증착 과정을 수행하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (b)단계의 고정은 $H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$ 를 1M수산화나트륨(NaOH) / 에틸렌글리콜(Ethylene glycol) 용액에 침전시킨 후, 불활성 가스 분위기에서 증착 과정을 수행하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 제조되고, 과산화효소 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-활성 다공성 탄소 복합체의 제조방법:

- (a) 제5항의 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 유기 실란을 반응시켜 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계; 및
- (b) 상기 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 가교결합제를 반응시켜 표면에 알데하이드가 활성화된 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-활성 다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 유기 실란은 APTES(Aminopropyl triethoxysilane) 및 APTMS(Aminopropyl trimethoxysilane)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 가교 결합제는 글루타르알데하이드(Glutaraldehyde), 덱스트란 알데하이드(Dextran aldehyde) 및 N-하이드록시설포석시니마이드(N-hydroxysulfosuccinimide)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제6항의 방법에 의해 제조된 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-활성 다공성 탄소 복합체.

청구항 10

제9항의 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-활성 다공성 탄소 복합체를 항체와 반응시키는 단계를 포함하는 면역 진단방법.

청구항 11

제5항의 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 산화 효소를 집적시키는 단계를 포함하는 산화 효소-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 산화 효소는 포도당 산화효소, 콜레스테롤 산화효소, 갈락토스 산화효소, 피루베이트 산화효소 및 알코올 산화효소로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제11항의 방법에 의해 제조된 산화 효소-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체.

청구항 14

제13항의 산화 효소-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체를 발색기질과 반응시키는 단계를 포함하는 발색 진단 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 발색기질은 ABTS, TMB, OPD(o-Phenylenediamine dihydrochloride), DAB(3,3'-diaminobenzidine), AmPlex-Red 및 이들의 혼합 물질로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 효소를 이용하는 효소면역측정법(ELISA), 바이오 센서 또는 발색 진단 센서에서 과산화효소의 대체물로 이용 가능한 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 최근 의학 기술의 비약적인 발전은 어떤 질병이라도 조기에만 발견하면 완치가 가능한 사회를 만들어가고 있기 때문에 인간 질병의 조기 진단은 갈수록 중요해지고 있다. 대표적인 진단 분야의 하나인 체외진단 (in vitro diagnostic: IVD)은 질병 진단, 병인 확인, 치료 방향 결정 및 치료 효과의 추적관찰, 질병 경과 판단, 질병 조기진단 및 예방, 환자 예후 판정 등을 목적으로 혈액, 뇨, 타액 등 인체에서 유래하는 시료를 검체로 하여 특정 지표 물질을 검출하거나 정량 분석하는 검사이다. 전 세계 체외진단 시장 가치는 2007년 370억 달러 (약 60조 원)를 기록했으며 2012년에는 500억 달러에 달할 전망이다(Global In Vitro Diagnostics (IVD) Market: An Analysis, Global Information Inc., 2009/01; Medical Product Outsourcing (www.mpo-mag.com)).
- [0003] 2006년에 발행된 보건산업기술동향에서 전주홍 박사의 분자진단검사법 개발 및 기술 연구동향에 따르면, 전체 체외진단 시장은 여러 가지 세부 분야로 구분될 수 있는데 20% 내외의 시장 점유율을 차지하고 있는 주된 분야 들은 면역검사, 당뇨검사(포도당검사), 임상화학 분야이다. 항원-항체 반응의 검출로 대표되는 면역진단법은 오랜 기간 동안 다양한 진단 범위와 고감도의 검출 기술이 개발되어 왔으며, 혈액의 면역반응을 통한 암, HIV 등의 다양한 질병진단을 위해 널리 사용되고 있다.
- [0004] 현재 면역진단을 위해 가장 널리 사용되고 있는 방법은 효소 반응에 기반을 둔 ELISA(효소결합 면역흡수 진단법) 방법이다. 2007년에 한국바이오협회에 특별기고된 정유진, 이영미 및 정상진 저서의 면역분석에 기초한 바이오센서 기술에 따르면, ELISA 기술은 1971년에 처음 개발되었고, 1979년에는 형광기질을 사용하여 감도를 증가시킨 형광기반검출법으로 발전하였으며, 현재까지도 상업화된 면역진단키트의 대부분이 ELISA의 방식을 사용하고 있다. 그 원리는 항원 물질과 결합하는 일차 항체와 이차 항체와 이와 결합하는 이차 항체-효소 결합체를 이용하여 특정 기질과 효소간의 반응을 일으켜 항원 또는 항체의 유무를 고감도로 검출하는 방식이다. 이 방법은 간편하고 저렴하다는 장점이 있기 때문에 면역진단 분야에서 가장 많이 사용되고 있다. 이러한 ELISA 기술에 있어서, 이차 항체-효소 결합체에 가장 널리 사용되고 있는 효소는 과산화효소(peroxidase) 혹은 인산화효소(phosphatase) 등의 유기 효소이다. 하지만 이러한 효소 반응을 통한 목적 물질의 검출 방법은 효소 반응만으로는 신호를 증폭시키는 효과가 충분히 크지 않기 때문에 그 민감도가 충분히 높지 않다는 단점이 있다. 또한, 기존의 ELISA 방법에서 사용되는 유기 효소는 시간에 따라 효소 활성이 떨어지는 효소 안정성에 문제가 있을 뿐만 아니라, 주변 환경이나 반응 조건에 따라 효소 활성이 크게 변하여 결과적으로 진단의 신뢰성에 치명적인 문제를 야기할 수 있다는 단점이 있다.
- [0005] 또한, 유기 과산화효소는 면역진단의 신호 유도체로서 사용될 뿐만 아니라 다양한 산화 효소(Oxidase)와 결합된 형태의 바이오센서로서 널리 사용되고 있다. 검출하고자 하는 대상 물질이 시료에 존재할 때, 대상 물질을 기질로 이용하는 산화 효소의 반응을 통해 과산화수소 (H₂O₂)가 발생하고, 유기 과산화효소가 이를 환원시키면서 동시에 특정 기질을 산화시켜 발색 혹은 전기 시그널을 유도함으로써 대상 물질을 검출한다. 현재 건강 검진의 주요 대상 물질인 혈당, 콜레스테롤, 갈락토스, 간 기능인자 (GPT, GOT) 등을 과산화효소와 각 산화 효소와의 결합을 통해 검출하는 간편한 키트 혹은 바이오센서가 Roche 등의 다국적기업 혹은 국내 바이오벤처 기업에 의해 제품으로 개발 및 시판되고 있다. 그러나 상기 바이오센서에서도 유기 효소는 시간에 지남에 따라 효소 활성이 떨어지는 문제가 있으며, 주변 환경이나 반응 조건에 따라 효소 활성이 크게 변하여 결과적으로 진단의 신뢰성에 치명적인 문제를 야기할 수 있다는 단점이 있다.
- [0006] 위와 같은 유기 효소의 문제점을 해결하기 위하여 다양한 형태의 효소 유사체들이 개발되어지고 있다. 특히 최근 자성 나노입자가 과산화효소의 활성을 갖고 있음이 발표되었다. (Gao et al., *Nat. Nanotechnol.*, 2, 577-583, 2007) 이들은 자성 나노입자의 새로운 특성을 발견함과 동시에, 그 입자 표면에 항체를 부착시킴으로써 표적 단백질을 포획 및 분리 후 자체적인 과산화효소로의 활성에 의한 시그널을 얻음으로써 새로운 면역진단 시스템 개발의 가능성을 보여주었다. 또한 자성 나노입자는 무기물이기 때문에, 반응 시간에 따른 필연적인 불안정성을 가지고 있는 유기 과산화효소보다 산도, 온도 등의 외부조건에 대해 더 안정적인 물질이므로, 기존 유기 효소의 대체물로서 각광을 받고 있다.
- [0007] 한편, 자성 나노입자의 과산화효소로서의 활성을 이용한 포도당 및 과산화수소 발색 진단 센서에 대한 연구가 발표되었다. (Wei and Wang, *Anal. Chem.*, 80, 2250-2254, 2008) 이들은 두 가지의 반응 튜브를 사용하여, 첫 번째 튜브에서 포도당 산화 효소와 포도당과의 반응을 통해 과산화수소를 생성하고, 이를 자성 나노입자와 ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) 가 포함된 두 번째 튜브에 투입

시켜 포도당 유무를 색으로 진단함으로써, 자성 나노입자가 과산화효소 대체물로서 사용될 수 있음을 증명하였다.

[0008] 그러나 상기 자성 나노입자는 단위 개체 당 활성 및 민감도가 부족하며 분리 및 재사용이 용이하지 않고, 다른 유기 효소와의 접근성이 부족한 문제점이 있다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 플래티늄 나노입자를 자성 나노입자와 함께 다공성 카본의 기공 안에 집적시킬 경우, 과산화효소의 활성이 비약적으로 향상됨으로써, 과산화효소의 대체물로 효소를 이용한 효소면역측정법, 바이오센서 또는 발색진단센서에서 이용할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 효소면역측정법, 바이오센서 또는 발색진단센서에서 과산화효소의 대체물로 이용 가능하며, 안정성 및 민감도가 우수한 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 자성 나노입자를 다공성 탄소에 고정시켜 자성 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계; 및 (b) 플래티늄 나노입자를 상기 자성 나노입자-다공성 탄소 복합체에 고정시켜 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소를 제조하는 단계를 포함하는 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조되고 과산화효소 활성을 가지는 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 유기 실란을 반응시켜 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계 및 상기 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 가교결합제를 반응시켜 표면에 알데하이드가 활성화된 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계를 포함하는 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-활성 다공성 탄소 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-활성 다공성 탄소 복합체 및 이를 항체와 반응시키는 단계를 포함하는 면역 진단 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 산화 효소를 집적시키는 단계를 포함하는 산화 효소-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 산화 효소-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체 및 이를 발색기질과 반응시키는 단계를 포함하는 발색 진단 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따르면, 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체는 기존의 자성 나노입자만 사용한 경우에 비해 비약적으로 향상된 과산화효소로서의 높은 활성을 나타내므로, 단독 또는 유기 효소와 같이 고정화함으로써, 면역진단의 고감도 무기 신호 유도체로서 이용가능하고, 효소의 대상 기질이 되는 물질의 고감도 발색 진단을 나타낼 수 있는 효과가 있으며, 재사용이 가능하여 경제적이다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체의 반응기작을 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 자성 나노입자-다공성 탄소 복합체(MSU-F-C)[(A): 10 wt% Magnetite in MSU-F-C (MMC-10), (C): 20 wt% Magnetite in MSU-F-C (MMC-20)] 및 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체 [(B) 10 wt% Magnetite and 10 wt % Platinum in MSU-F-C (MMC-10/Pt-10), (D) 20 wt% Magnetite and 10 wt % Platinum in MSU-F-C (MMC-20/Pt-10)] 의 XRD 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 질소 흡착 실험의 그래프이다 [(A): MSU-F-C, MMC-10, MMC-10/Pt-10 사이의 기공 성질의 비교, (B): MSU-F-C, MMC-20, MMC-20/Pt-10 의 비교].

도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 자성 나노입자 운반체의 (A)과산화효소로서의 활성을 측정한 사진과 (B)흡광도 그래프이다 [(1): Free MNPs, (2): MMC-10/Pt-10, (3): MMC-20/Pt-10, (4): MMC-10, (5): MMC-20, (6): MSU-F-C/Pt-10, (7): MMS-20, (20wt% Magnetite in MSU-F silica) (8): MSU-F-C].

도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 자성 나노입자 운반체의 Steady-state kinetics에 대한 그래프이다[(A): TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)를 기질로 사용, (B): H₂O₂ (B) 를 기질로 사용].

도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 산화 효소-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체로 대상 기질을 색변화로써 측정 및 정량하는 반응식을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0020] 본 발명에서는 플래티늄 나노입자 및 자성나노입자를 다공성 탄소의 기공안에 집적시켜 제조한 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체는 과산화효소 활성이 우수하므로, 이를 효소면역측정법, 바이오센서 또는 발색진단센서에서 이용할 수 있다는 것을 확인하고자 하였다.

[0021] 본 발명에서는, 플래티늄 나노입자를 자성 나노입자와 함께 다공성 탄소의 기공 안에 집적시켰다. 그 결과 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에서 과산화효소의 활성이 비약적으로 향상되는 것을 확인하였다.

[0022] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 상기 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체가 효소면역측정법, 바이오센서 및 발색진단센서에서 과산화효소를 대신하여 이용할 수 있다는 것을 확인 할 수 있었다.

[0023] 따라서, 본 발명은 일관점에서, (a) 자성 나노입자를 다공성 탄소에 고정시켜 자성 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계; 및 (b) 플래티늄 나노입자를 상기 자성 나노입자-다공성 탄소 복합체에 고정시켜 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소를 제조하는 단계를 포함하는 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0024] 본 발명에 있어서, 다공성 탄소는 15~25nm 정도의 큰 기공과 2~7nm 정도의 작은 기공 크기를 제공하여 결과적으로 기공 안에 5~15nm 크기의 자성 나노입자와 1~10nm 크기의 플래티늄 나노입자를 고밀도로 집적한 형태의 무기 과산화효소 유사체를 구성할 수 있게 하고, 또한 남아 있는 기공 안에 다양한 유기 효소를 고정화함으로써 간편한 유·무기 복합체를 구현할 수 있게 하였다. 또한, 자성 나노입자와 플래티늄 나노입자와의 상승 효과를 이용해 과산화효소로서의 활성을 증가시키고, 고정화된 효소와 자성 나노입자 및 플래티늄 나노입자의 연계반응을 통하여 효소의 대상 기질의 유무와 농도를 비색반응을 통하여 쉽고 빠르게 정량할 수 있는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 있어서, 다공성 탄소는 MSU-F, SNU-1(2 nm의 연결된 기공을 가지고 있는 다공성 탄소, 서울대 제조, *Chem. Commun.*, 1999, 2177-2178), CMK-3 (다공성 실리카를 주형으로 만든, 균일한 3 nm의 기공을 가지고 있는 다공성 탄소, 카이스트 제조, *J. Phys. Chem. B*, 103, 1999, 7743-7746), CMK-5(2-D 형태의 정돈된 기공을 가지고 있는 다공성 탄소, 카이스트 제조, *Nature*, 412, 2001, 169-172)등으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하고, 바람직하게는 MSU-F를 사용할 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 자성나노입자란 강자성을 띠는 입자로서 일반적으로 크기는 약 10nm이다. 종류로는 산화철 (Fe₂O₃, Fe₃O₄), Ferrite(Fe₃O₄에서 Fe 하나가 다른 자성관련 원자로 바뀐 형태, CoFe₂O₄, MnFe₂O₄ 등), 합금(자성

원자들로 인해 나타나는 산화문제, 전도성 및 안정성을 높이기 위해 귀금속과 합금시킨 것, FePt, CoPt 등)등이 있다. 실질적으로 응용할 때는 이러한 자성입자를 분말형태로 이용하는 것이 아니라 액체에 분산시킨 형태를 만들어서 여러 분야에 사용하게 되는데 이는 용액(ferrofluid)을 만들었을 때 자기장이 가해지면 그 자기장이 있는 부분만 자기력선을 따라서 뿔뿔하게 솟아오르게 되는 현상을 보이기 때문이다. 산업적인 응용을 고려할 때 이와 같이 자기장을 이용하면 비용면에서 아주 낮아지게 되고 자기장의 세기와 방향을 변화시킴으로써 자유자재로 조절할 수도 있는 장점을 가진다. 이때, ferrofluid에서 자성입자들이 서로 엉기지 말고 잘 분산되어 있어야 하기 때문에 적절한 계면 활성제라든가 자성입자 표면에 탄화수소 고리를 붙임으로서 분산을 잘 되게 해야 하며, 제조방법은 공침법이 주로 사용된다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 (a)단계의 자성 나노입자-다공성 탄소 복합체의 제조는 $Fe(NO_3)_3$ 를 침전시킨 뒤, 불활성 가스 조건에서 3~5시간 동안 350~450 °C에서 증착함으로써 균일하게 침전된 자성 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조할 수 있으며, 상기 불활성가스로 H_2 (4%)/Ar가스를 예시할 수 있다. 본 발명에 있어서, 증착 과정을 3시간 미만으로 수행할 경우 산화철(Fe_3O_4) 전구체가 환원이 완벽히 되지 않을 가능성이 있고, 5시간을 초과하여 수행될 경우 산화철(Fe_3O_4)의 응집 현상으로 인한 크기 증가로 다공성 탄소의 기공을 막을 수 있으며, 증착 온도가 350°C미만일 경우 순수한 Fe_3O_4 가 아닌 Fe_2O_3 등의 다른 산화철과의 혼합 물질이 합성될 수 있고, 450°C를 초과할 경우 역시 순수한 Fe_3O_4 가 아닌 Fe 등의 물질과 혼합 물질이 합성되는 문제가 발생할 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 (b)단계의 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소의 제조는 $H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$ 를 침전시킨 뒤, 불활성 가스 조건에서 2~4시간 동안 150~170 °C에서 증착함으로써 균일하게 침전된 플래티늄 나노입자-자성 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조하였으며, 상기 불활성가스로 Ar 가스를 예시할 수 있다. 본 발명에 있어서, 증착 과정이 2시간 미만으로 수행될 경우 플래티늄 전구체가 플래티늄 금속으로 충분히 환원되지 않을 수 있고, 4시간을 초과할 경우 플래티늄 나노입자의 크기가 커져 촉매 활성을 저해할 수 있으며, 증착 온도가 150°C미만일 경우 플래티늄 전구체가 플래티늄 금속으로 충분히 환원되지 않을 수 있고, 170°C를 초과할 경우 플래티늄 나노입자의 크기가 커질 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, 자성 나노입자를 다공성 탄소 안에 균일하게 증착시킴으로써 상기 자성 나노입자-다공성 탄소 복합체는 간편하게 생성할 수 있으며, 상기 플래티늄 나노입자 또한 탄소 안에 고정화함으로써, 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 무기 복합체를 생성할 수 있다. 상기 증착은 고온증착법을 이용하는 것이 바람직하다.

[0029] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조되고 과산화효소 활성을 가진 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 관한 것이다.

[0030] 본 발명에 있어서, 고정화를 수행함으로써 유기 과산화효소를 사용하지 않고, 색을 이용한 고감도의 정량 분석이 가능한 무기 복합체인 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소를 개발할 수 있었다.

[0031] 한편, 상기 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 무기 복합체에 아민기를 결합시키고, 글루타르알데하이드를 반응시킴으로써, 표면에 알데하이드를 활성화시킬 경우 면역 진단에 이용할 수 있음을 예측할 수 있다.

[0032] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 제5항의 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 유기 실란을 반응시켜 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 가교결합제를 반응시켜 표면에 알데하이드가 활성화된 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-활성 다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계를 포함하는 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-활성 다공성 탄소 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0033] 상기 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계는 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 다양한 작용기 (Amine-, vinyl-, chloro-, epoxy-, etc)를 코팅할 수 있는 유기 실란군에서 바람직하게는 APTES(Aminopropyl triethoxysilane) 혹은 APTMS (Aminopropyl trimethoxysilane)등의 아민기를 표면에 도입할 수 있는 실란(silane)물질을 반응시키는 것을 특징으로 한다.

[0034] 또한, 아민-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-활성 다공성 탄소 복합체를 제조하는 단계는 상기 아민기가 결합

된 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 bifunctionality를 가지고 있는 Glutaraldehyde, Dextran aldehyde, 및 sulfo-NHS(N-hydroxysulfosuccinimide)등의 가교결합제(cross-linker)군에서 바람직하게는 Glutaraldehyde를 반응시켜 표면의 aldehyde가 활성화된 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-활성 다공성 탄소 복합체를 제조하는 것을 특징으로 한다.

[0035] 본 발명의 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체는, 자성 나노입자만 사용한 경우에 비해 비약적으로 향상된 과산화효소로서의 활성을 얻음으로써, 고감도 면역 진단을 위한 효과적인 무기 신호 유도체로서 응용될 수 있다. 과산화효소는 본질적으로 유기 효소이므로 시간에 따른 필연적인 단백질 구조의 변성과 활성의 감소가 있지만, 본 발명의 무기 복합체는 과산화효소 대신 회수가 가능한 무기 자성 나노입자를 사용하기 때문에 보다 안정적인 시스템이며 추가적인 플래티늄 나노입자의 사용은 과산화효소로서의 활성 증가를 위한 시너지효과를 일으킨다. 또한, 다공성 탄소에 집적함으로써 단위 개체당 활성을 높여 고감도 정량 분석이 가능하며, 자력을 이용한 보다 효율적인 분리와 재사용이 가능하다. 한편, 유기 효소와의 다공성 탄소 복합체를 이용한 연계 반응을 통한 중요한 물질의 정량 분석은 육안을 통한 색 차이로 손쉽게 가능하기 때문에 경제적으로 우수한 방법이다.

[0036] 본 발명의 개발된 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소는 이에 특정 항체를 결합시킴으로써 질병의 진행에 대한 특정 정보를 제공하는 질병의 원인이 되는 단백질, DNA, 병원균 등의 면역진단의 신호 유도체로서 사용할 수 있다.

[0037] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 산화 효소를 집적시키는 단계를 포함하는 산화 효소-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0038] 본 발명에 있어서, 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소를 유기 과산화효소를 같이 고정화함으로써, 포도당, 갈락토스, 콜레스테롤, 간 기능인자 (GPT, GOT) 등 소분자 물질에 대한 효소의 대상 기질의 유무를 알 수 있고 농도를 측정할 수 있다. 유기 효소의 효율적인 고정화를 위해서 CLEA (Cross-linked enzyme aggregate) 형태의 포집 방식을 사용하였고, CLEA 방식의 포집을 위하여, 먼저 효소를 물리적 흡착을 통해 기공 안에 흡착시킨 후 glutaraldehyde 를 사용하여 효소끼리 가교결합을 통하여 기공 안에 효소 분자 덩어리를 만들었다. 만들어진 효소 분자 덩어리는 기공 안에서 잘 빠져나가지 않아 효소 분자의 손실을 줄일 수 있으며, 효소의 3차원 구조 변형을 억제해 효소의 활성을 보다 안정적으로 유지할 수 있다 (Kim et al., Biotechnol. Bioeng. 96(2): 210-218, 2007).

[0039] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것이 아니라는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0040] 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체 제조 및 면역 진단에의 응용

[0041] <단계 1> MSU-F 다공성 탄소 제조

[0042] MSU-F 다공성 탄소는 MSU-F 다공성 실리카를 주형으로 카본 전구체를 투입함으로써 제조하였다. (Lee et al., Chem. Comm. 2674-2675 (2002)). 다공성 실리카는 실리카 나트륨 (sodium silica) 과 구조를 유도하는 계면활성제를 100℃ 반응시켜 제조하였으며(Kim et al., Chem. Comm. 1661-1662 (2000)), 제조된 다공성 실리카는 소성로(한결산업 PHF-C-10/27)를 이용하여 600℃에서 4시간 동안 소성시킨 후 사용하였다.

[0043] <단계 2> 자성 나노입자의 다공성 탄소에의 고정화

[0044] 자성 나노입자의 다공성 탄소에의 고정화는 Fe(NO₃)₃을 에탄올과 잘 섞어주면서 에탄올의 증발을 통해 침전시킨 후, H₂ (4%)/Ar가스하에서 4시간 동안 400 ℃에서 증착함으로써 균일하게 침전된 자성 나노입자-다공성 탄소 복

합체인 MMC-10과 MMC-20을 제조할 수 있었으며, TEM (JEOL JEM-1011) 사진을 통하여 무기 물질의 탄소의 기공 안에서의 존재를 확인하여 이를 도 1에 나타내었고, XRD (Rigaku D/Max 2500)를 측정하여 나노입자 크기를 확인하여 도 2의 (A)와 (C)에 나타내었다. 또한, 질소 흡착 실험을 통한 분석을 통해 자성 나노입자의 고정화 후에 다공성 탄소(MSU-F-C)와 비교하여 기공 부피 및 표면적이 줄어드는 것을 확인할 수 있으며, 이를 도 3에 나타내었다.

[0045] <단계 3> 플래티늄 나노입자의 자성 나노입자-다공성 탄소에서의 고정화

[0046] MMC-10과 MMC-20에서의 플래티늄 나노입자의 고정화는 $H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$ 을 1M NaOH / Ethylene glycol 용액에 침전시킨 후, Ar 가스하에서 3시간 동안 160 °C 증착함으로써 균일하게 침전된 플래티늄 나노입자-자성 나노입자-다공성 탄소 복합체인 MMC-10/Pt-10과 MMC-20/Pt-10을 제조하였으며, 도 1의 TEM 사진과 도 2의 (B), (D)에서 XRD를 통하여 나노입자 크기를 확인한 결과를 나타내었다. 또한, 질소 흡착 실험을 통한 분석을 통해 자성 나노입자와 플래티늄 나노입자의 고정화 후에 다공성 탄소(MSU-F-C) 및 자성 나노입자-다공성 탄소(MMC-10, MMC-20)와 비교하여 기공 부피 및 표면적이 크게 줄어드는 것을 확인할 수 있으며, 이를 도 3에 나타내었다. 또한, 이 실험을 통해 계산된 표면적과 기공 부피를 정리한 내용을 표 1에 나타내었다.

표 1

기공 크기 및 볼륨

[0047]

	BET Surface area(m ² /g)	Pore volume(cm ³ /g)
MSU-F-C(다공성 탄소)	910	1.50
MMC-10	747	1.19
MMC-10/Pt-10	672	1.08
MMC-20	619	0.92
MMC-20/Pt-10	579	0.87

[0048] *BET: Brunauer-Emmett-Teller

[0049] <단계 4> 플래티늄 나노입자-자성 나노입자-다공성 탄소 복합체의 면역 진단에서의 응용

[0050] 제조된 플래티늄 나노입자-자성 나노입자-다공성 탄소 복합체에 APTES (Aminopropyl triethoxysilane)을 반응시킴으로써 아민 반응기를 붙였다. 위 무기 복합체에 glutaraldehyde를 반응시킴으로써 무기 복합체의 표면에 Aldehyde를 활성화시켰으며, 이후 특정 항체의 아민과 반응을 통해 항체와 제조된 무기 복합체와 결합시켰다. 위 제조된 플래티늄 나노입자-자성 나노입자-다공성 탄소-항체 복합체를 이용해 항체의 대상 물질의 발색진단에 응용하였다. 무기 복합체의 과산화효소로서의 활성을 관찰하기 위해, TMB를 발색 기질로 사용하여 과산화효소로서의 활성을 실험하였다. 실험 결과 모든 과산화효소 유사체로부터 활성을 얻었으며, 특히 플래티늄 나노입자가 적절한 비율로 자성 나노입자와 함께 고정화된 경우 (MMC-10/Pt-10) 가장 높은 활성을 얻었다. 본 발명의 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 무기 복합체를 비롯한 여러 가지 자성 나노입자 운반체들의 과산화효소로서의 활성을 측정한 사진(A)과 흡광도 스캐닝(Cary 100 Conc UV-Visible spectrophotometer (Varian, Palo Alto, CA)의 결과(B)를 도 4에 나타내었다. 이를 보다 정확히 분석하기 위한 Steady state kinetics를 통한 효소반응 매개변수의 관찰을 통해 플래티늄의 높은 과산화효소로서의 활성을 확인하였으며, 자성 나노입자와 같이 고정화된 경우, 가장 높은 과산화효소로서의 활성을 관찰하여 도 5에 나타내었고, Lineweaver-Burk plot을 이용해 계산한 과산화효소로서의 반응 매개변수(Catalytic Parameters)를 정리한 값을 표 2에 나타내었다.

표 2

[0051]

효소반응 매개변수(Catalytic parameters)의 비교

	기질	K_m (mM)	V_{max} ($\mu M s^{-1}$)
MMC-10	TMB	0.174	0.203
MMC-10	H ₂ O ₂	41	54

MMC-10/Pt-10	TMB	0.733	1.125
MMC-10/Pt-10	H ₂ O ₂	7	221
MMC-20	TMB	0.524	0.403
MMC-20	H ₂ O ₂	131	180
MMC-20/Pt-10	TMB	1.795	1.874
MMC-20/Pt-10	H ₂ O ₂	18	258
MSU-F-C/Pt-10	TMB	2.861	1.401
MSU-F-C/Pt-10	H ₂ O ₂	14	222
Free MNPs	TMB	0.173	0.172
Free MNPs	H ₂ O ₂	185	282

실시예 2

[0052] 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소-산화 효소 복합체의 제조 및 발색 센서로의 응용

[0053] <단계 1> 산화 효소를 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체에 고정화

[0054] 포도당 산화 효소, 콜레스테롤 산화 효소, 갈락토스 산화 효소, Pyruvate 산화 효소 등 각각 건강검진의 주요 인자가 되는 포도당, 콜레스테롤, 갈락토스, 간 기능인자 (GPT, GOT) 들을 대상 기질로 하는 산화 효소를 위 개발된 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체(MMC-10/Pt-10, MMC-20/Pt-10)에 CLEA 방법을 통하여 집적시켰다. 이를 위해 먼저 효소의 물리적 흡착을 인큐베이션(incubation)을 이용하여 250 rpm에서 1시간 동안 수행한 후, 0.1 % 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)를 사용한 가교 결합을 통하여 효소활성을 안정화시켰고, 기공 밖으로의 누출을 막았다. 이를 통하여 본 발명의 자성 나노입자의 장점 (자력을 이용한 간편한 분리 및 회수)을 가지면서, 보다 높은 과산화효소로서의 활성을 얻을 수 있는 자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소 복합체를 제조할 수 있었고, 이를 이용한 다양한 유기 효소의 다공성 탄소에의 추가적인 고정화를 통한 유? 무기 복합체의 구성과 대상 물질의 비색 센서 및 반응 기작의 모식도를 도 6에 나타내었다.

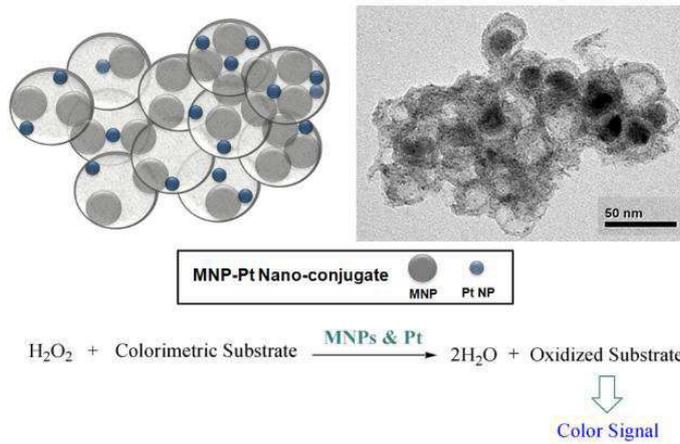
[0055] <단계 2> 산화 효소-자성 나노입자-플래티늄 나노입자-다공성 탄소의 발색 센서로의 응용

[0056] 특정 농도의 발색 기질 (ex: ABTS, TMB, Amplex-Red)을 0.2 M, pH 4.0의 소듐 아세테이트 완충용액(Sodium acetate buffer)에 45℃ 혹은 실온(Room temperature) 조건에서 투입하여 반응물 안의 H₂O₂ 양을 발색 반응으로 측정하였다. 특정 대상 기질만 있을 때 발색되는 것을 확인할 수 있었고, 그에 따른 흡광도 스캐닝을 확인할 수 있었다. 또한 위 바이오센서는 자성을 이용해 20-30초 안에 간편하게 회수될 수 있고, 본래의 활성을 약 20-30회 재사용 동안 유지함을 확인할 수 있었다.

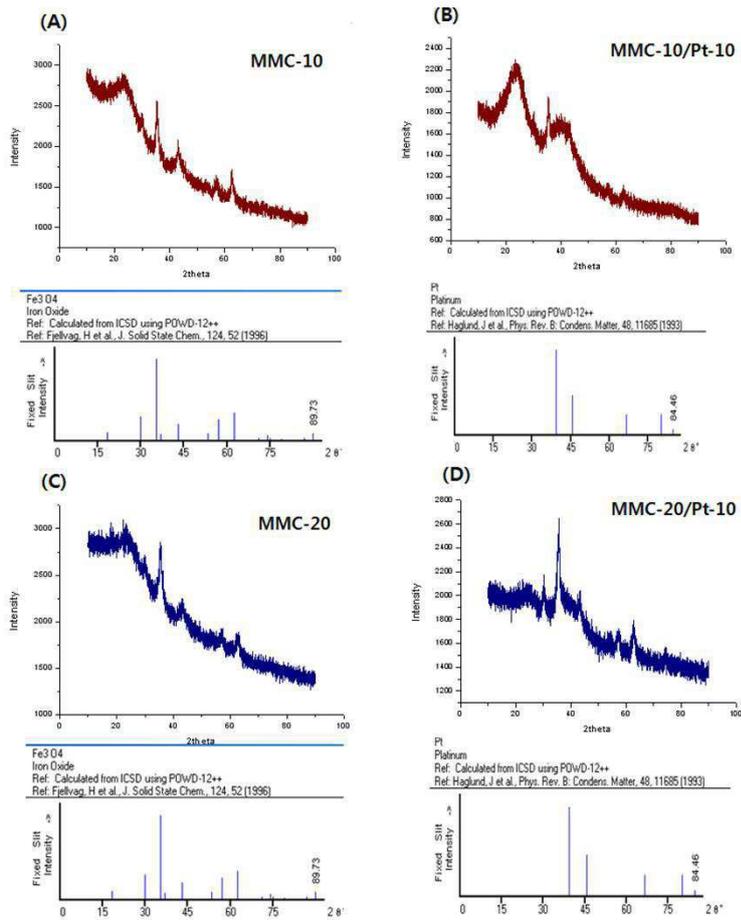
[0057] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 첨가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

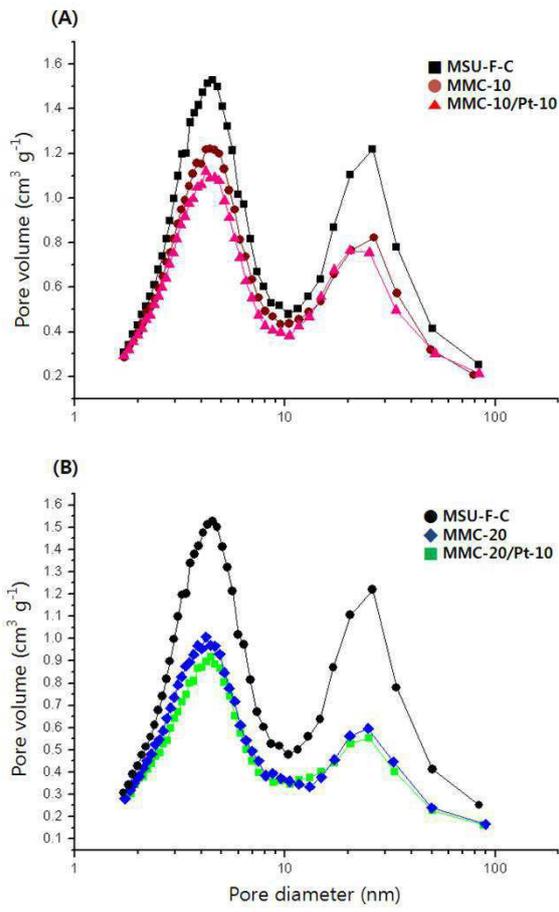
도면1



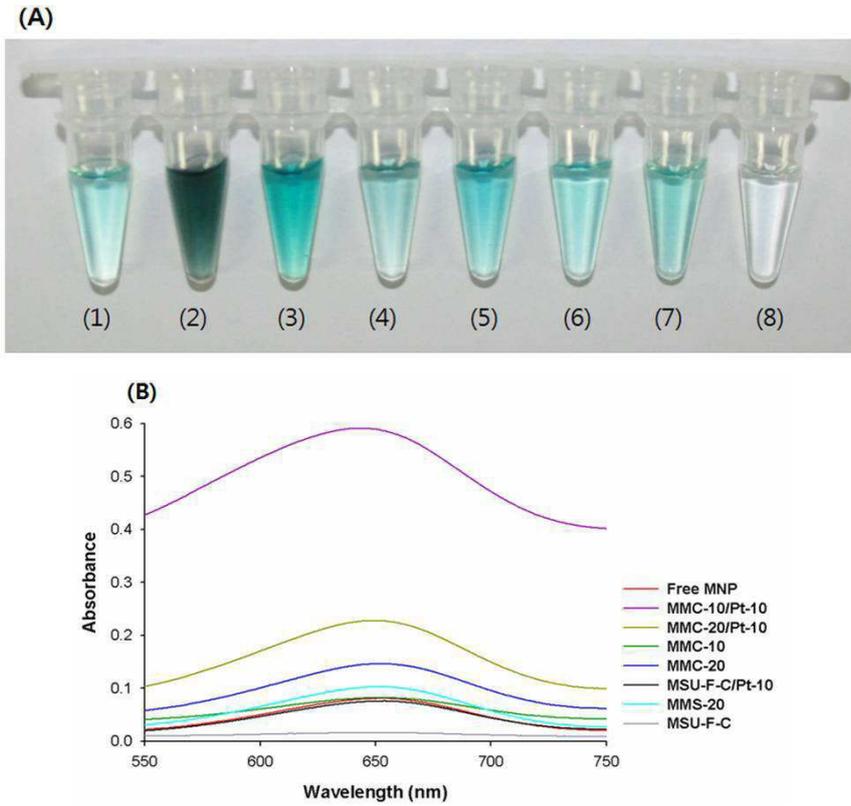
도면2



도면3



도면4



도면5

