



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년08월25일

(11) 등록번호 10-1547058

(24) 등록일자 2015년08월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/563 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0021077

(22) 출원일자 2014년02월24일

심사청구일자 2014년02월24일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020060094416 A

KR1020090112342 A

KR1020090110159 A

(73) 특허권자

순천대학교 산학협력단

전라남도 순천시 매곡동 315

(72) 발명자

김항건

광주광역시 동구 의재로109번길 38(학동)

이호빈

경상남도 양산시 삼호로 86, 108동 106호(삼호동, 해인그린빌아파트)

이상돈

경기도 광주시 행정타운로 123, 102동 1405호(회덕동, 벽산아파트)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 6 항

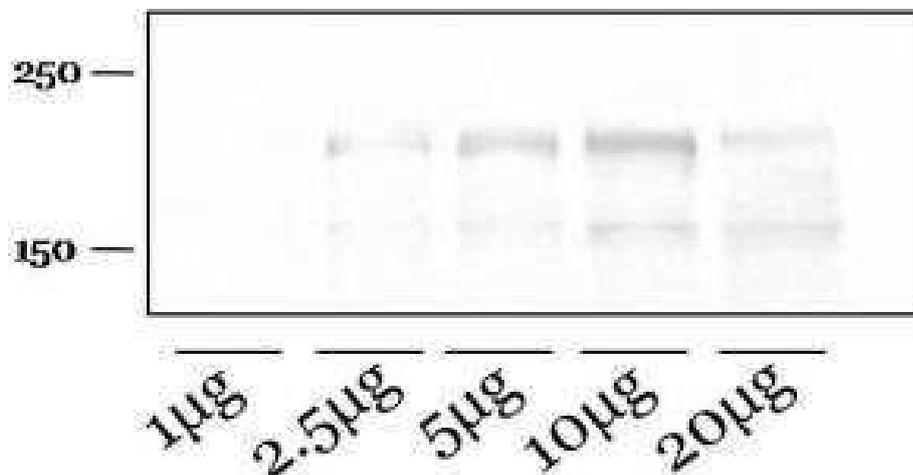
심사관 : 김승오

(54) 발명의 명칭 **마이크로스피어 비드 및 이를 이용한 단백질의 정량방법**

**(57) 요약**

본 발명은 마이크로스피어 비드 및 이를 이용한 단백질의 정량방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 특정 단백질에 특이적으로 반응할 수 있는 단일클론 항체가 결합된 비드와 형광이 표지된 마이크로스피어를 결합시킨 마이크로스피어-비드를 이용하여 미량으로 존재하는 단백질을 정량할 수 있다. 1개의 시료로 동시에 여러 개의 단백질에 대한 정량분석이 가능하고, 극미량의 농도 및 다양한 농도의 생체분자 분석을 가능하게 하여, 단백질의 분석, 질병 진단, 치료제 개발 등에서 유용하게 활용할 수 있다.

**대표도** - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-0330

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 산학협력선도대학(LINC)

연구과제명 Microsphere-Bead 방식을 이용한 사용자 맞춤형 단백질 정량분석용 Kit 개발

기여율 1/1

주관기관 순천대학교 산학협력단

연구기간 2013.08.01 ~ 2014.01.31

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

표적 단백질 항체가 결합된 마이크로스피어 비드; 및  
상기 비드를 인식할 수 있는 검출항체(detection antibody)를 포함하는 단백질 정량분석 키트.

**청구항 2**

제1항에 있어서,  
상기 표적 단백질은  $\delta$ -카테닌 단백질인 것을 특징으로 하는 단백질 정량분석 키트.

**청구항 3**

제1항에 있어서,  
상기 검출항체는 피코에리트린(phycoerythrin, PE)이 표지된 것을 특징으로 하는 단백질 정량분석 키트.

**청구항 4**

표적 단백질 항체를 마이크로스피어 비드와 함께 혼합하고, pH 7.4의 PBS를 첨가하여 마이크로스피어 비드에 표적 단백질 항체를 결합시키는 단계; 및  
금속분리기(magnetic separator)로 표적 단백질 항체가 결합된 마이크로스피어 비드를 30-60초간 침전시킨 후, 침전된 마이크로스피어 비드를 수득하는 단계;를 포함하는 표적 단백질 항체가 결합된 마이크로스피어-비드의 제조방법.

**청구항 5**

제4항에 있어서,  
상기 표적 단백질은  $\delta$ -카테닌 단백질인 것을 특징으로 하는 마이크로스피어-비드의 제조방법.

**청구항 6**

제4항에 있어서,  
상기 마이크로스피어는 폴리스티렌(Polystyrene), 알지네이트(Alginate), 폴리 락타이드(Poly lactide, PLA), 광경화성 포토폴리머(Photopolymer) 고분자인 폴리 에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(Poly ethylene glycol diacrylate, PEG-DA), 폴리 프로필렌 푸마레이트(Poly propylene fumarate, PPF), 폴리 프로필렌 푸마레이트(Poly propylene fumarate, PPF) / 디에틸 푸마레이트(diethyl fumarate, DEF), 펜타에리트리톨 트리아크릴레이트(Pentaerythritol triacrylate), 또는 트리메틸올프로판 트리아크릴레이트(Trimethylolpropane triacrylate) 고분자인 것을 특징으로 하는 마이크로스피어-비드의 제조방법.

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 마이크로스피어-비드 및 이를 이용한 단백질의 정량방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 단백질을 정량적으로 분석하기 위한 많은 방법이 개발되고 있고, 환자로부터 혈액 시료(혈청, 혈장)와 같은 복합 유체에서 단백질의 분석은 진단에서 본질적으로 중요하다.

[0003] 특정한 단백질의 정량 분석 방법으로는 효소면역분석법(Enzyme Immunoassay, EI), 효소결합 면역분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), 방사능 면역분석법(Radioimmunoassay, RIA), 형광 면역분석법(Fluorescence Immunoassay, FIA), DNA, RNA 또는 계층 분석법과 같은 바이오어세이 등이 잘 알려져 있다. 이들은 피검물 연구 검출, 인간을 대상으로 하거나 수의학 분야의 진단 분야, 법의학적 진단, 환경 분석, 식품 분석 및 대기 또는 수중의 위험 물질의 바이오디펜스 스크리닝 등의 분야에서 중요한 역할을 한다.

[0004] 하지만 이러한 방법들은 대부분 샌드위치 분석방식을 택하며, 높은 민감도 (sensitivity)를 가지나 여러 개의 샘플을 모아야 실험의 수행이 가능하며, 시간이 오래 걸리고 여러 단계의 지루한 과정을 거쳐야 한다는 단점이 있다. 또한 가장 민감도(sensitivity)가 높은 방사능 면역분석법의 경우 방사능 물질에 의한 위험이 문제가 된다.

[0005] 이 중에서도 ELISA는 항체에 효소를 결합시켜 항원-항체 반응을 확인하는 방법으로, 그 방법이 간단하고 비용이 많이 들지 않으며 다량 분석이 가능하여 현재 가장 널리 쓰이고 있는 분석 방법의 하나가 되고 있다. 특히, 이 방법은 방사능 면역분석법과 같이 매우 민감한 반응이면서도 방사능을 사용하지 않는다는 잇점이 있어서 그 사용이 증가되고 있는 방법이다.

[0006] 그러나, 기존의 ELISA 방식을 이용한 분석방법으로는 한 번에 한 개의 단백질에 대한 분석값만 얻을 수 있기 때문에 여러 개의 단백질을 분석하려면 시료, 시간, 노동력, 소모품의 소비가 많이 필요할 뿐만 아니라, 한 개의 시료에서 각각을 분석하는 것이 아니기 때문에 결과값을 절대적으로 신뢰하기 어렵다는 문제가 있다.

[0007] 한편, 여러 질환에 대한 분자병태생리학적 이해가 증진되면서 질환의 진단 및 치료에 그 질환에 특이적인 마커나 타겟들이 점차 이용되기 시작하였다. 따라서 침습적 방법을 통해 얻어지는 세포나 조직 또는 비침습적 방법을 통해 얻어지는 여러 체액 등에 미량으로 존재하는 질환 마커 또는 타겟 단백질을 좀 더 빠른 시간 내에, 더 쉽고 표준화된 방법으로 정량분석 할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 특히, 한 개의 시료에서 한 개의 단백질만 분석할 수 있는 single-plex 방식이 아니라 한 개의 시료에서 여러 개의 단백질을 동시에 분석할 수 있는 multi-plex 방식의 분석 방법의 개발이 의료 편의성, 시료 채취 시 환자의 수고 경감 등의 이유로 실험실 및 임상 현장에서 요구되고 있다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 10-2009-0110159

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 표적 단백질 항체가 결합된 마이크로스피어 비드; 및 상기 비드를 인식할 수 있는 검출항체(detection antibody)를 포함하는 단백질 정량분석 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 표적 단백질 항체를 마이크로스피어 비드와 함께 혼합하고, pH 7.4의 PBS를 첨가하여 마이크로스피어 비드에 표적 단백질 항체를 결합시키는 단계; 및 금속분리기(magnetic seperator)로 표적 단백질 항체가 결합된 마이크로스피어 비드를 30~60초간 침전시킨 후, 침전된 마이크로스피어 비드를 수득하는 단계;를 포함하는 표적 단백질 항체가 결합된 마이크로스피어-비드의 제조방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 표적 단백질 항체가 결합된 비드; 및 이 비드를 인식할 수 있는 phycoerythrin, PE이 표지된 검출항체(detection antibody)를 포함하는 단백질 정량분석 키트를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 표적 단백질은  $\delta$ -카테닌 단백질일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 검출항체는 피코에리트린(phycoerythrin, PE)이 표지된 것일 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 표적 단백질 항체를 비드와 함께 배양하여 비드에 항체를 결합시키는 단계; 및
- [0015] 상기 항체가 결합된 비드를 분리하는 단계를 포함하는 마이크로스피어-비드의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 표적 단백질은  $\delta$ -카테닌 단백질일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 마이크로스피어는 폴리스티렌(Polystyrene), 알지네이트(Alginate), 폴리락타이드(Poly lactide, PLA), 광경화성 포토폴리머(Photopolymer) 고분자인 폴리 에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(Poly ethylene glycol diacrylate, PEG-DA), 폴리 프로필렌 푸마레이트(Poly propylene fumarate, PPF), 폴리 프로필렌 푸마레이트(Poly propylene fumarate, PPF) / 디에틸 푸마레이트(diethyl fumarate, DEF), 펜타에리트리톨 트리아크릴레이트(Pentaerythritol triacrylate), 또는 트리메틸올프로판 트리아크릴레이트(Trimethylolpropane triacrylate) 고분자일 수 있다.
- [0018] 나아가 본 발명은 마이크로스피어-비드에 표적 단백질을 포함하는 시료를 처리하는 단계; 및 항체에 결합된 표적 단백질의 수준을 측정하여 정량하는 단계를 포함하는 마이크로스피어-비드를 이용한 단백질의 정량방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 마이크로스피어-비드는, 표적 단백질 항체가 결합된 비드; 및 피코에리트린(phycoerythrin, PE)이 표지된 검출항체(detection antibody)가 유기적으로 결합되어 있는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 표적 단백질은  $\delta$ -카테닌 단백질일 수 있다.

**발명의 효과**

- [0021] 본 발명에 따르면 특정 단백질에 특이적으로 반응할 수 있는 단일클론 항체가 결합된 비드와 형광이 표지된 마이크로스피어를 결합시킨 마이크로스피어-비드를 이용하여 미량으로 존재하는 단백질을 정량할 수 있다. 1개의 시료로 동시에 여러 개의 단백질에 대한 정량분석이 가능하고, 극미량의 농도 및 다양한 농도의 생체분자 분석을 가능하게 하여, 단백질의 분석, 질병 진단, 치료제 개발 등에서 유용하게 활용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0022] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 Western blot법을 이용한 M6A 세포 용해액 내  $\delta$ -카테닌 단백질 검출 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 마이크로스피어-비드법을 이용한 M6A 세포 용해액 내  $\delta$ -카테닌 단백질 검출 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 마이크로스피어-비드법을 이용한 M6A 세포 용해액 내  $\delta$ -카테닌 단백질 검출 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 Western blot법을 이용한 세포 배양 배지 내  $\delta$ -카테닌 단백질 검출 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 마이크로스피어-비드법을 이용한 세포 배양 배지 내  $\delta$ -카테닌 단백질 검출 결과를 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0023] 본 발명은 마이크로스피어 비드 및 이를 이용한 단백질의 정량방법에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에 따르면 형광 단백질을 표지한 마이크로스피어(Microsphere)와 표적 단백질에 대한 항체를 붙인 비드(Bead)를 결합시킨 키트를 제작하고, 이를 시료(혈장, 혈청 등 체액시료 또는 세포, 조직 추출액)와 반응시키면 1개의 시료로 동시에 여러 개의 단백질에 대한 정량분석 결과를 얻을 수 있다.
- [0025] 이에 본 발명에서는 마이크로스피어-비드(Microsphere-Bead)를 이용한 맞춤형 단백질 정량분석용 키트를 개발하

고자 한다. 이를 위해 특정 단백질에 특이적으로 반응할 수 있는 단일클론 항체가 결합된 비드를 제조하고, 여기에 결합할 수 있는 피코에리트린(phycoerythrin, PE)이 표지된 검출항체를 비드 검출에 사용할 수 있다. 이렇게 제조된 키트를 이용해 미량으로 존재하는 단백질을 정량할 수 있도록 하였다.

[0026] 본 발명의 마이크로스피어-비드 방식을 이용한 단백질 정량 방법은 multi-plex 분석이 가능한 플랫폼으로, 표적 단백질 바이오마커를 정량화하기 위해 마이크로스피어와 비드를 결합한 새로운 검출법을 통하여, 극미량의 농도 및 다양한 농도의 생체분자 분석을 가능하게 하여, 단백질의 분석, 질병 진단, 치료제 개발 등에서 유용하게 활용할 수 있는 분석 방법이다.

[0027] 보다 구체적으로,  $\delta$ -카테닌 단백질의 항체를 결합시킨 마이크로스피어-비드를 제작하였고, 이를 이용하여 세포 내, 세포 외에 미량으로 존재하는  $\delta$ -카테닌 단백질을 정량할 수 있으며, 이를 응용해 비침습적 방법으로 얻을 수 있는 사람 체액 시료의 단백질을 정량적으로 분석할 수 있다.

[0028] 따라서, 본 발명은 표적 단백질 항체가 결합된 비드; 및 형광 단백질이 표지된 마이크로스피어가 유기적으로 결합되어 있는 마이크로스피어-비드를 포함하는 단백질 정량분석 키트를 제공한다.

[0029] 본 발명에 용어 "표적 단백질"은 마이크로스피어-비드를 사용하여 시료 내에 존재하고 있는지 여부를 검출하고자 하는 물질로서, 표적 단백질의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없다. 보다 구체적으로, 상기 표적 단백질은 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로 예를 들어, 효소, 항체, 항원, 펩타이드, 미생물 유래 단백질, 동식물 세포 및 기관 유래 단백질일 수 있다. 보다 구체적으로 상기 표적 단백질은  $\delta$ -카테닌 단백질인 것이 바람직하다.

[0030] 본 발명에서 용어 "시료"란 검출하고자 하는 표적 단백질이 들어 있는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 생체시료 등을 모두 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0031] 상기 마이크로스피어는 폴리스티렌(Polystyrene), 알지네이트(Alginate), 폴리 락타이드(Poly lactide, PLA), 광경화성 포토폴리머(Photopolymer) 고분자인 폴리 에틸렌 글리콜 디아크릴레이트(Poly ethylene glycol diacrylate, PEG-DA), 폴리 프로필렌 푸마레이트(Poly propylene fumarate, PPF), 폴리 프로필렌 푸마레이트(Poly propylene fumarate, PPF) / 디에틸 푸마레이트(diethyl fumarate, DEF), 펜타에리트리톨 트리아크릴레이트(Pentaerythritol triacrylate), 또는 트리메틸올프로판 트리아크릴레이트(Trimethylolpropane triacrylate) 고분자로 제조된 것일 수 있다.

[0032] 한편, 본 발명은 표적 단백질 항체를 비드와 함께 배양하여 비드에 항체를 결합시키는 단계; 및 상기 항체가 결합된 비드를 분리하는 단계를 포함하는 마이크로스피어-비드의 제조방법을 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 마이크로스피어-비드에 표적 단백질을 포함하는 시료를 처리하는 단계; 및 항체에 결합된 표적 단백질의 수준을 PE이 표지된 검출항체를 이용하여 측정하여 정량하는 단계를 포함하는 마이크로스피어-비드를 이용한 단백질의 정량방법을 제공한다.

[0034] 표적 단백질을 포함하는 시료를 마이크로스피어-비드와 접촉시키면 시료 내의 단백질과 마이크로스피어-비드의 특이적인 결합반응이 일어난다. 표적 단백질과 마이크로스피어-비드 간의 직접적인 결합을 통해 복합체를 형성하는 반응이 일어나거나, 또는 시료 단백질의 효소작용에 의해 마이크로스피어-비드가 변형 또는 수식되는 반응을 포함한 결합이 일어날 수 있다.

[0035] 이 때, 검출항체와의 결합이 방해되어 PE의 형광신호강도가 약화되게 된다.

[0036] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는  $\delta$ -카테닌 단백질에 대한 단일클론 항체가 결합되어 있는 비드를 제작하였고, 이렇게 제조된 비드에 상기 비드를 인식할 수 있는 피코에리트린(phycoerythrin, PE)이 표지된 검출항체를 이용하여 검출하였다.

[0037] 그리고, 단백질을 정량하기 위하여 마이크로스피어-비드와 상보적인 서열을 갖는  $\delta$ -카테닌 단백질이 포함된 시료를 접촉시켜서 특이적인 결합 반응을 수행하였다. 단백질 정량 결과를 확인하기 위하여, 본 발명에 따른 마이크로스피어-비드 방식으로  $\delta$ -카테닌 단백질을 정량 분석한 결과와 종래의 Western blot을 이용하여 분석한 결과를 비교 분석하였다.

[0038]  $\delta$ -카테닌 과발현 세포주인 M6A 세포 용해액 내  $\delta$ -카테닌 단백질을 검출하기 위해 질량별(1, 2.5, 5, 10, 20 $\mu$ g) Western blot을 수행한 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 1 $\mu$ g 수준에서는 주어진 조건의 Western blot으로 검출이 어렵다는 것을 확인할 수 있었다.

- [0039] 이러한 결과와 비교하여,  $\delta$ -카테닌 과발현 세포주인 M6A 세포 용해액 내  $\delta$ -카테닌 단백질을 검출하기 위해 본 발명의 마이크로스피어-비드 방식으로 분석한 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 마이크로스피어 비드를 제작할 때 사용하는 d-카테닌 항체의 양이 5, 8, 12 ug 중 5 ug 일 때 가장 직선성이 좋은 정량결과를 보였으며, 검출 항체의 회석 비율은 도 3에 나타낸 바와 같이 1:1, 1:10 모두에서 비슷한 직선성 및 비슷한 양상의 직선의 방정식이 구해졌지만 검출의 민감도를 고려한다면 1:1의 회석비율이 가장 적합한 것을 확인할 수 있었다.
- [0040] 또한, 세포 배양 배지 내의  $\delta$ -카테닌 단백질을 검출하기 위해 Western blot을 수행한 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, M6A 세포의 배양 시간이 증가함에 따라 세포 배지로 분비된 d-카테닌 단백질의 양이 늘어나는 것을 알 수 있었지만 이를 위해서는 매우 높은 농도의 d-카테닌 항체 회석액 1:100의 사용이 필요함을 알 수 있었다.
- [0041] 이러한 결과와 비교하여, 세포 배양 배지 내의  $\delta$ -카테닌 단백질을 검출하기 위해 본 발명의 마이크로스피어-비드 방식으로 분석한 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 6, 24, 72 h 시간 동안 M6A 세포를 배양한 배양액 내의 d-카테닌 단백질의 양을 정량적으로 분석할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0042] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 일 실시예를 제공한다. 다만, 하기의 실시예들은 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명이 아래의 실시예에 의해서 한정되는 것은 아니다.
- [0043] **<실시예 1>**
- [0044]  **$\delta$ -카테닌(catenin) 항체가 결합된 비드 제조**
- [0045] 실험에 사용한 모든 버퍼 용액은 사용하기 전 상온에 보관하였고, 비드는 반응시키는 동안 알루미늄 포일로 감싸 가능한 한 빛에 노출되지 않도록 하였다.
- [0046]  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관된 EDAC와 S-NHS를 꺼내, 상온의 데시케이터에 사용 약 1시간 전부터 넣어두었다.
- [0047] Stock 비드 농도는  $1.25 \times 10^7$  비드s/ml( $10 \times$ )이다.
- [0048]  $1 \times \text{scale} = 1.25 \times 10^6$  비드s/ml
- [0049] **<1-1> 활성화된 비드 제조**
- [0050] 항체가 결합되지 않은(uncoupled) 비드를 30초간 Vortex하고 15초간 초음파 처리하였다.  $1 \times \text{scale}$ 의 커플링 반응을 위해 분산된 COOH 비드  $100 \mu\text{l}$  ( $1.25 \times 10^6$  비드s/ml)를 EP 튜브에 넣은 후, 튜브를 magnetic separator에 30 ~ 60초간 두어 비드를 침전시키고, 상등액을 제거하였다. 이때, 비드가 흩어지지 않게 주의한다. 다음으로 튜브를 magnetic separator에서 떨어뜨려,  $100 \mu\text{l}$ 의 비드 세척 버퍼를 넣고 30초간 vortex 하였다.
- [0051] 다음으로 튜브를 다시 magnetic separator에 30 ~ 60초간 두어 비드를 침전시키고, 상등액을 제거하였다. 이때, 비드가 흩어지지 않게 주의한다. 다음으로 튜브를 magnetic separator에서 떨어뜨려,  $80 \mu\text{l}$ 의 비드 활성화 버퍼를 넣고 30초간 vortex 하였다.
- [0052]  $50 \text{mg/ml}$ 의 S-NHS를 비드 활성화 버퍼에 녹인 용액  $10 \mu\text{l}$ 를 비드가 있는 튜브에 넣고 vortex로 부드럽게 섞는다. 이때, S-NHS 용액은 사용 직전에 만든다.
- [0053] 그리고,  $50 \text{mg/ml}$ 의 EDAC를 비드 활성화 버퍼에 녹인 용액  $10 \mu\text{l}$ 를 비드가 있는 튜브에 넣고 vortex로 부드럽게 섞는다. 이때, EDAC용액은 사용 직전에 만든다.
- [0054] 튜브를 알루미늄 포일로 싸 후, 실온에서 20분간 흔들었다.
- [0055] pH 7.4 PBS  $150 \mu\text{l}$ 를 첨가하고 빠른 속도에서 10초간 vortex 한 후, 튜브를 magnetic separator에 30 ~ 60초간 두어 비드를 침전시키고, 상등액을 제거하였다. 이때, 비드가 흩어지지 않게 주의한다.
- [0056] 위의 과정을 다시 반복하여 pH 7.4 PBS  $150 \mu\text{l}$ 를 첨가하고 빠른 속도에서 10초간 vortex 한 후, 튜브를 magnetic separator에 30 ~ 60초간 두어 비드를 침전시키고, 상등액을 제거하였다.

- [0057] 활성화된 비드를 pH 7.4 PBS 100 $\mu$ l에 분산시키고, 중간속도로 30초간 활성화된 비드를 vortex하였다.
- [0058] **<1-2>  $\delta$ -카테닌 항체 결합된 비드 제조**
- [0059] 준비한  $\delta$ -카테닌 항체 5 $\mu$ g을 상기 <1-1>에서 제조한 활성화된 비드에 넣고, pH 7.4 PBS를 넣어 총 부피를 500  $\mu$ l로 한 후, Vortex로 섞으며 커플링 반응을 진행하였다. 실온에서 2시간동안 흔들어 섞으며 둔다.
- [0060] 튜브를 magnetic separator에 30 ~ 60초간 두어 비드를 침전시키고, 상등액을 제거하였다. 이때, 비드가 흩어지지 않게 주의한다. 다음으로 튜브를 magnetic separator에서 떨어뜨려, 항체가 결합된 비드를 pH 7.4 PBS 500 $\mu$ l에 분산시켰다.
- [0061] 다음으로 튜브를 다시 magnetic separator에 30 ~ 60초간 두어 비드를 침전시키고, 튜브를 magnetic separator에서 떨어뜨려, 항체가 결합된 비드를 블로킹(Blocking) 버퍼 250 $\mu$ l에 분산시켰다. 중간 속도로 15초간 비드를 Vortex 하였다. 튜브를 알루미늄 포일로 싸 후, 실온에서 30분간 흔들었다.
- [0062] 다음으로 다시 튜브를 magnetic separator에 30 ~ 60초간 두어 비드를 침전시키고, 상등액을 제거하였다. 이때, 비드가 흩어지지 않게 주의한다. 튜브를 magnetic separator에서 떨어뜨려, 항체가 결합된 비드를 저장 버퍼 500 $\mu$ l에 분산시켰다. 중간 속도로 20초간 비드를 Vortex 하였다.
- [0063] 다음으로 다시 튜브를 magnetic separator에 30 ~ 60초간 두어 비드를 침전시키고, 튜브를 magnetic separator에서 떨어뜨려, 항체가 결합되고 세척된 비드를 저장 버퍼 150 $\mu$ l에 분산시켰다.
- [0064] Coulter Z2 counter나 Hemocytometer를 사용하여 비드 농도를 결정하였고, 2~8 $^{\circ}$ C 암소에 항체가 결합된 비드를 저장하였다.
- [0065] **<실시에 2>**
- [0066] **Magpix 측정 프로토콜**
- [0067] 모든 측정 구성물과 샘플은 사용 전에 실온에 놔두고, 정량적인 피펫을 사용하고, bubble이 생기지 않게 주의하였다. 에세이 배양(Assay incubation)은 암소에서 진행하였고, 빛에 노출되지 않도록 알루미늄 포일이나 다른 장비를 이용하여 감싼다.
- [0068] **<2-1> 항체가 결합된 비드와 샘플 준비**
- [0069] 96 웰 플레이트 기준 500 비드/well 이상이 되도록 희석시키기 위한 항체가 결합된 비드와 세척 버퍼의 부피를 계산하고, 알맞은 크기의 튜브에 필요한 세척 버퍼 부피를 취해 넣는다.
- [0070] 항체가 결합된 비드 stock을 중간 속도로 20초간 Vortex 한 후, 조심스럽게 뚜껑을 열고, 뚜껑에 묻어있을 수 있는 모든 액체를 피펫으로 바이알(vial) 내에 옮긴다.
- [0071] 세척 버퍼가 들어있는 튜브에 항체가 결합된 비드 stock을 필요량 취해서 넣고 vortex하여 희석 및 혼합하였다. 항체가 결합된 비드 stock은 세척 버퍼에 의해 well당 최종부피 50 $\mu$ l로 보정되었다. 여기서, 손실 최소화를 위해 200 ~ 300 $\mu$ l 용량의 피펫을 사용하여 stock 바이알로부터 비드를 취한다.
- [0072] 알루미늄 포일로 감싸 희석된 비드를 빛으로부터 보호하고, 사용 전에 실온 수준의 온도로 맞춘다.
- [0073] 사용하지 않는 측정 플레이트의 웰을 실링 테이프로 덮고, 필터 플레이트를 프리웨팅하는데, 200 $\mu$ l의 세척 버퍼로 프리웨팅한 후, 흡입 여과로 액체를 제거한다. 다음으로 필터 플레이트 아래에 깨끗한 종이 타월을 놓고 남아있는 액체를 빨아들여 완전히 건조시킨다. 플랫 바닥 플레이트(flat bottom plate)를 사용할 경우에는 이러한 일련의 과정을 생략한다.
- [0074] 희석된 비드를 15초간 중간속도로 vortex 하고, 에세이(assay) 플레이트 당 50 $\mu$ l 씩 넣는다. 세척 버퍼 200 $\mu$ l로 플레이트를 2회 세척하였다.
- [0075] 샘플 및 blank(Detection Ab diluent)를 5초간 vortex 한 후, 각각 50 $\mu$ l씩 플레이트의 처리된 웰에 넣는다. 다음으로 새로운 실링 테이프로 웰을 덮은 후, 어둡게 하여 15 ~ 18시간(overnight) 실온에서 흔들어 주었다.

[0076] 여기서, 비드/샘플 혼합물을 완전히 분산시키기 위해 900 ~ 1100rpm으로 30초간 흔들어 주고, 튀는 것을 막기 위해 천천히 속도를 올렸다. 그리고 300 ~ 450rpm으로 속도를 줄여 배양하였다.

[0077] <2-2> 검출 항체의 준비와 첨가

[0078] 상기 <2-1>에서 밤새 배양이 끝난 에세이 플레이트의 실링 테이프를 떼어낸 후, 200 $\mu$ l 세척 버퍼/well로 3회 세척하였다.

[0079] 검출 항체를 5초간 vortex 한 후 well당 25 $\mu$ l씩 넣었다.

[0080] 실링 테이프를 붙이고 어렵게 하여 30분간 실온에서 흔들어 준 후, 비드와 검출 항체 혼합물의 완전한 분산을 위해 900 ~ 1100rpm으로 30초간 흔들었다. 그리고 300 ~ 450rpm으로 속도를 줄여 배양하였다.

[0081] <2-3> Streptavidin-PE(SA-PE)의 준비와 첨가

[0082] 검출 항체를 배양하는 동안, 아래 표 1을 이용하여 SA-PE와 검출 항체 희석액의 필요량을 계산하여 100 $\times$  SA-PE stock을 1 $\times$ 로 만들었다. SA-PE는 사용 10분전에 준비한다.

표 1

웰 수	100 $\times$ SA-PE stock( $\mu$ l)	검출 항체 희석액( $\mu$ l)	총 부피( $\mu$ l)
96	60	5,940	6,000
48	30	2,970	3,000

[0084]

[0085] 계산된 부피의 Bio-Plex 검출 항체 희석액을 튜브에 넣었다. 100 $\times$  SA-PE stock을 5초 간 Vortex 한 후, 1 $\times$ 로 만들기 위한 부피의 100 $\times$  SA-PE stock을 취해 튜브에 넣고 vortex 하였다. 각 웰에 필요한 100 $\times$  SA-PE stock은 0.5 $\mu$ l이며, 이것은 최종적으로 50 $\mu$ l로 보정된다.

[0086] 검출 항체의 배양이 끝난 에세이 플레이트의 실링 테이프를 떼어 낸 후, 바로 SA-PE를 넣는다. 1 $\times$ 로 희석된 SA-PE를 5초간 vortex 후 웰당 50 $\mu$ l 씩 넣는다. 실링 테이프를 붙이고 어렵게 하여 10분간 실온에서 흔들었다. 비드와 SA-PE 혼합물의 완전한 분산을 위해 900 ~ 1100rpm으로 30초간 흔들었다. 그리고 300 ~ 450rpm으로 속도를 줄여 배양하였다.

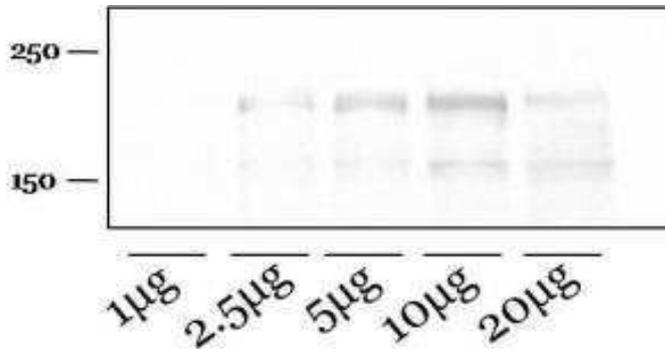
[0087] SA-PE 배양이 끝난 에세이 플레이트의 실링 테이프를 떼어 낸 후, 200 $\mu$ l 세척 버퍼/well로 3회 세척하였다. 플레이트 리딩을 위한 비드 분산을 위해 125 $\mu$ l의 재현탁(Resuspension) 버퍼를 각 웰에 넣은 후, 실링 테이프를 덮고 900 ~ 1100rpm으로 30초간 흔들었다.

[0088] 실링 테이프를 제거한 후 측정하였다.

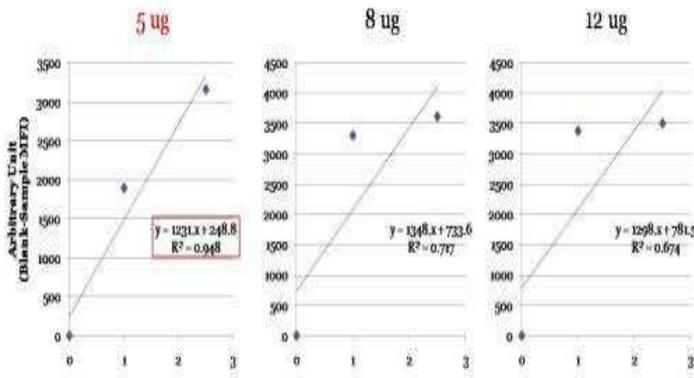
[0089] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

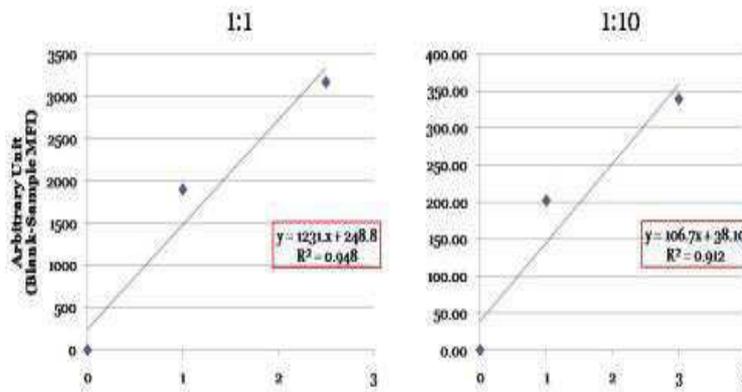
도면1



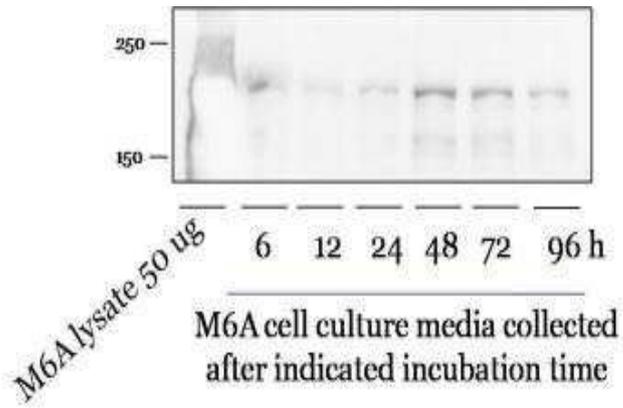
도면2



도면3



도면4



도면5

