

명세서

발명의 명칭: 표면-증강 라만 산란 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조방법, 이에 따른 표적 물질 검출용 기관 및 이를 이용한 표적 물질 검출 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조방법, 이에 따른 표적 물질 검출용 기관 및 이를 이용한 표적 물질 검출 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 표면 증강 라만 산란(Surface enhanced Raman scattering, SERS)는 가장 유망한 분석 방법 중 하나로, 분석하고자 하는 물질이 거칠게 처리된 금속과 같은 라만 활성물질 표면에 흡착되거나 수백 나노미터 이내의 거리에 위치할 때, 상기 표면의 거칠기에 의해 제공되는 표면 플라즈몬에 의해 일반 라만 세기에 비해 104 내지 106 배 이상 증가된 세기의 분석물질의 라만 산란을 측정하는 분광법을 의미한다.
- [4] 라만 방출 스펙트럼의 파장은 샘플 내의 광 흡수 분자의 화학 조성 및 구조 특성을 나타내므로, 이러한 라만 신호를 분석하면 분석 대상 물질을 직접적으로 분석할 수 있다.
- [5] 나아가, 단백질의 분석에 있어서, 현재까지는 단백질의 내재적인 SERS 신호를 검출하는 종래의 연구 결과들은 시료 내에 단일 단백질을 내포하고 있거나, 분리 및 정제된 단백질을 대상으로 응용한 사례가 대부분 이었다. 그러나, 실제 생체 시료에는 복잡한 물질들이 혼재되어 있고, 검출 전에 표적 단백질을 분리/정제하는 과정은 복잡하고 많은 양의 시료를 필요로 한다. 상기 표적 단백질을 사전에 분리/정제하기 위한 간단한 방법은 항체 등을 이용하여 면역학적인 결합을 이용하는 것이 있다. 예를 들면, 금속입자 표면에 표적 단백질에 특이적인 항체를 결합하고, 상기 항체에 표적 단백질을 결합한 복합입자를 이용해왔다.
- [6] 한편, SERS 신호는 나노 갭과의 거리에 따라 기하급수적으로 감소하는 특성이 있는데, 상술한 복합입자는 금속 입자의 표면과 표적 단백질과의 소정 거리를 갖고 있어, 검출 민감도가 낮아지는 문제가 있었다.
- [7] 아울러, 강한 민감도를 가지는 나노 구조체를 제작하기 위해서는 Focused ion-beam lithography, E-beam lithography, ion-milling 등 제조 시간 및 비용이 높은 고성능의 장비가 필요로 한다는 점에서 상용화되지 못하고 있다.
- [8] 따라서, 별도의 단백질 분리/정제 과정이 없고, 제조 공정이 간편한 센서 등의 제조방법이 필요한 실정이며, 균일한 신호 검출이 가능한 바이오 센서 등이

필요한 실정이다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 제조 공정이 용이한 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조방법, 이에 따른 표적 물질 검출용 기관 및 이를 이용한 표적 물질 검출 방법을 제공하고자 한다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은,
 [13] 바이오 리셉터가 부착된 기관을 표적 물질이 포함된 시료액에 담지하여, 표적 물질 및 바이오 리셉터가 결합된 1차 포획 구조체를 형성하는 단계;
 [14] 1차 포획 구조가 형성된 기관을 원심분리기 내부에 배치하고, 금속 나노입자를 포함하는 용액을 원심분리기에 투입하는 단계; 및
 [15] 원심분리기를 작동시켜, 표적 물질의 표면에 금속 나노입자를 코팅하는 2차 포획 구조체를 형성하는 단계; 를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조방법을 제공한다.

[16]

[17] 또한, 본 발명은,
 [18] 바이오 리셉터가 부착된 기관;
 [19] 바이오 리셉터에 의해 포획된 표적 물질;
 [20] 표적 물질을 캡핑하는 금속 나노입자; 및
 [21] 금속 나노입자에 부착된 라만 염료; 를 포함하며,
 [22] 상기 표적 물질은 바이오 리셉터 및 금속 나노입자 사이에 샌드위치 되어 포획 구조체가 형성되는 것인, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관을 제공한다.

[23]

[24] 또한, 본 발명은,
 [25] 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관을 이용하여 표적 물질을 검출하는 것을 특징으로 하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질을 검출 방법을 제공한다.

[26]

발명의 효과

[27] 본 발명의 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조방법에 따르면, 원심분리를 이용하여, 표적 물질의 표면에 금속 나노입자를 신속하고, 균일하게 코팅할 수 있다.

[28] 또한, 금속 나노입자를 표적물질에 직접 코팅함으로써, 금속 입자의 표면과 표적 물질의 거리를 줄일 수 있고, 이에 따라 표적 물질의 검출 민감도를 높일 수 있으며, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질을 용이하게 검출할 수 있다.

[29]

도면의 간단한 설명

[30] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조 과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

[31] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조 과정을 나타내는 순서도이다.

[32] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 모식도를 나타내는 도면이다.

[33] 도 4는 기관에 표적 단백질 부착 과정을 나타내는 모식도이다.

[34] 도 5는 본 발명의 실시예에서, 원심분리 기반의 나노입자 부착 과정을 나타낸 도면이다((a) 원심분리 전, (b) 원심분리 후).

[35] 도 6의 왼쪽은 원심분리 후에 기관의 주사전자 현미경(SEM) 사진이며, 도 6의 오른쪽은 원심분리 후에 기관의 암시야 현미경 사진이다.

[36] 도 7(a)는 원심분리 과정을 나타낸 모식도이며, 도 7(b)는 원심분리 반복(사이클 수)에 따른 기관의 색변화와 SEM 사진이며, 도 7(c)는 원심분리 반복(사이클 수)에 따른 표적 단백질의 SERS 신호를 나타낸 그래프이다.

[37] 도 8(a)는 2 μ m씩 검출 스팟을 옮겨가면서 총 120 μ m까지의 스펙트럼을 분석한 결과를 나타내는 그래프이며, 도 8(b)는 무작위로 설정한 검출 스팟에서 스펙트럼을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[38] 도 9는 실시예와 비교예에서 제조한 단백질 센서를 이용하여 표적 단백질의 신호를 검출한 결과를 나타내는 그래프이다((a) 실시예, (b) 비교예).

[39]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[40] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다.

[41] 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[42] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.

- [43] 본 발명에서, “포함한다” 또는 “가지다” 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [44]
- [45] 본 발명은 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조방법, 이에 따른 표적 물질 검출용 기관 및 이를 이용한 표적 물질 검출 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 금속 나노입자를 면역학적으로 부착된 표적 물질 위에 원심분리 공정을 이용한 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조방법, 이에 따른 표적 물질 검출용 기관 및 이를 이용한 표적 물질 검출 방법에 관한 것이다.
- [46] 특히, 본 발명의 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조방법에 따르면, 원심분리를 이용하여, 표적 물질의 표면에 금속 나노입자를 신속하고, 균일하게 코팅할 수 있다.
- [47] 또한, 금속 나노입자를 표적물질에 직접 코팅함으로써, 금속 입자의 표면과 표적 물질의 거리를 줄일 수 있고, 이에 따라 표적 물질의 검출 민감도를 높일 수 있으며, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질을 용이하게 검출할 수 있다.
- [48]
- [49] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다. 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조 과정을 개략적으로 나타낸 도면이며, 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조 과정을 나타내는 순서도이다.
- [50] 도 1과 도 2를 참조하면, 본 발명에 따른 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조방법은,
- [51] 바이오 리셉터가 부착된 기관을 표적 물질이 포함된 시료액에 담지하여, 표적 물질 및 바이오 리셉터가 결합된 1차 포획 구조체를 형성하는 단계(S110);
- [52] 1차 포획 구조가 형성된 기관을 원심분리기 내부에 배치하고, 금속 나노입자를 포함하는 용액을 원심분리기에 투입하는 단계(S120); 및
- [53] 원심분리기를 작동시켜, 표적 물질의 표면에 금속 나노입자를 코팅하는 2차 포획 구조체를 형성하는 단계(S130); 를 포함한다.
- [54] 본 발명에서 사용된 용어, "바이오 리셉터가 부착된 기관" 이라 함은, 기관의 표면 처리에 의하여, 바이오 리셉터가 고정된 기관을 의미할 수 있다.
- [55] 바이오 리셉터가 부착된 기관은, 표면개질 물질과 바이오 리셉터를 포함하는 용액에 기관을 담지하여, 상기 기관에 바이오 리셉터를 부착하는 단계; 및 기관의 표면 중, 바이오 리셉터가 부착되지 않은 부분에 블로킹 분자를 부착하는 단계; 에 의해 제조된 것일 수 있다.

- [56] 여기서, 표면개질 물질이라 함은, 바이오 리셉터를 기판에 용이하게 부착시키기 위한 것으로, APTES(3-Aminopropyl)triethoxysilane), APTMS(3-Aminopropyl)trimethoxysilane, cysteamine, AEAPTMS(N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine, MPTMS(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane, MPTES((3-Mercaptopropyl)triethoxysilane), MPA(mercaptopropionic acid), MHA(6-mercaptophexanoic acid), BDT(1,4-benzenedithiol), MBA(4-mercaptobenzoic acid), MBIA(2-mercaptobenzoimidazole-5-carboxylic acid)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니나, 일 구체예로 APTES 일 수 있다.
- [57] 예를 들면, 기판을 아민기(-NH₂) 로 개질된 기판을 준비할 수 있으며, 다른 양태로서, 추가적인 처리를 통해 티올기(-SH) 를 바이오 리셉터의 고정을 위한 결합기로 사용할 수 있다.
- [58] 나아가, "바이오 리셉터" 는 표적 물질에 특이적이며, 기판에 고정되어 표적 물질을 포획할 수 있는 것으로, 표적 물질에 대해 결합-친화도(binding-affinity)를 갖는 물질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 바이오 리셉터는 "항체(antibody)" 일 수 있으며, 상기 항체는 아미노산과 당사슬로 결합된 단백질로 표적 물질에 결합할 수 있는 물질을 의미한다.
- [59] 상기 바이오 리셉터는 그 종류에 제한되는 것은 아니나, 일 구체예로, 단백질, 항체, 압타머, 효소, 핵산, DNA, RNA, 세포, 세포모방체(biometric), 단백질, 유기화합물 및 폴리머로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 이는 표적 물질의 종류에 따라 적절한 바이오 리셉터가 선택될 수 있다. 예를 들면, 표적 물질이 cyt C 일 때, 바이오 리셉터는 단백질 항체일 수 있다.
- [60] 특정 양태로서, 기판의 표면 개질을 위한 물질과 바이오 리셉터를 포함하는 용액 안에 기판을 침지하여, 바이오 리셉트가 부착된 기판을 준비할 수 있다.
- [61] 상기 기판은 실리콘(Si), 갈륨비소(GaAs), 유리(glass), 석영(Quartz) 및 폴리머(polymer)로 이루어진 군 으로부터 선택되는 어느 하나의 비금속 물질일 수 있다. 반드시 이로 제한되는 것은 아니나, 일 구체예로 기판은 유리(glass) 일 수 있다.
- [62] 한편, 바이오 리셉터가 부착되지 않은 기판에 블로킹 분자들이 결합될 수 있다. 블로킹 분자는 BSA(Bovine Serum Albumin), 세인(casein) 및 탈지유(skim milk) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 블로킹 분자는 일 구체예로 BSA(Bovine Serum Albumin) 일 수 있다.
- [63] 블로킹 분자들은 기판 표면 상에 부착되어 바이오 리셉터의 배향을 보다 일정하게 유지시키는 역할을 수행할 수 있다. 이에 따라, 바이오 리셉터의 결합 부위가 용이하게 노출되어 표적물질과의 결합이 촉진될 수 있다.
- [64] 또한, 블로킹 분자들은 바이오 리셉터가 위치하지 기판의 나머지 사이트들(site)에 결합되어, 금속 나노입자들이 기판 또는 바이오 리셉터와 직접

결합하는 것을 방지할 수 있다.

[65]

[66] 다음으로, 본 발명에 따른 원심분리 코팅을 수행하기 위하여, 기관 또는 1차 포획 구조가 형성된 기관은 원심분리기 내부에 배치된다. 여기서 기관이 설치되는 원심분리기라 함은 원심분리용 튜브를 의미할 수 있으며, 기관은 원심분리기 바닥에서 떨어지게 배치되는 것이 바람직하다. 보다 상세하게는 원심분리용 튜브의 밑면을 편평하게 하기 위하여 PDMS 등의 소재로 이루어진 서포트를 튜브 밑면에 위치시키고, 상기 기관을 편평하게 올려둘 수 있다.

[67] 나아가, 1차 포획 구조가 형성된 단백질의 표면에 금속 나노입자를 코팅하기 위하여, 상기 원심분리기(또는 원심분리용 튜브에) 금속 나노입자를 포함하는 용액을 투입할 수 있다.

[68] 상기 용액 내에 포함되는 금속 나노입자는, 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt) 및 알루미늄(Al)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니나, 일 구체예로 금속 나노입자는 금(Au) 나노입자 일 수 있다. 본 발명에 따른 기관은 상기 금속으로 제조할 경우 신호 증폭능 및 신호 균일성이 우수한 이점이 있다.

[69] 한편, 금속 나노입자의 직경은, 평균 10 내지 100 nm 범위일 수 있으며, 금속 나노입자의 직경은, 20 내지 95 nm, 40 내지 90 nm, 60 내지 95 nm 또는 평균 80 nm 일 수 있다. 예컨대, 금속 나노입자의 직경이 10 nm 미만인 경우, 원심분리를 통해 나노입자를 가라앉히는 과정이 불가능할 수 있으며, 금속 나노입자의 직경이 100 nm 초과하는 경우, 일반적으로 합성 가능한 나노입자의 범위로 보기 어려울 수 있다.

[70] 상기 금속 나노입자를 포함하는 용액의 농도는, 평균 1×10^9 내지 1×10^{12} particles/ml 범위일 수 있다. 금속 나노입자를 포함하는 용액의 농도가 1×10^9 particles/ml 미만인 경우, 표적물질의 표면에 충분한 양의 나노입자가 코팅되지 않을 수 있으며, 1×10^{12} particles/ml 를 초과하는 경우, 용액 내 나노입자의 농도가 너무 높아서, 표적물질의 표면에 나노입자가 과도하게 쌓이는 문제가 발생할 수 있다. 다시 말해서, 원심분리기를 이용하여, 금속 나노입자를 표적 물질의 표면에 코팅할 때, 상기 금속 나노입자 용액의 농도를 제어함으로써 기관에 형성되는 금속층의 두께를 조절할 수 있다.

[71]

[72] 원심분리기 내에 기관 배치 및 금속 나노입자의 용액 투입이 완료되면, 원심분리기를 작동시켜 표적 물질 표면에 금속 나노입자 코팅을 수행할 수 있다.

[73] 보다 구체적으로, 2차 포획 구조체를 형성하는 단계는, 원심분리기를 1,000×g 내지 6,000×g 범위에서, 2 내지 5 분 범위에서 작동시킬 수 있다. 일 구체예로, 평균 80 nm 의 금 나노입자를 1,000×g 에서 3분동안 수행할 수 있다.

[74] 이러한 원심분리 과정을 거쳐, 2차 포획 구조체를 형성하는 단계에서, 표적 물질은 바이오 리셉터 및 금속 나노입자 사이에 샌드위치 되어 포획 구조체가

형성될 수 있다. 즉, "샌드위치 면역 복합체"를 형성할 수 있다. 본 발명에서 "샌드위치 면역 복합체"란 항체-항원-항체 반응을 통해 결합된 면역복합체를 의미하는 것으로, 항원이 항체 중간에 삽입되어 샌드위치 모양을 나타냄에 따라 명명되었다. 본 발명에서, 상기 샌드위치 면역 복합체는 바이오 리셉터-표적 물질-금속 나노입자의 구조를 포함할 수 있다. 이때, 원심분리에 의해서 금속 나노입자가 튜브 바닥면 위의 표적 물질에 접근하게 되고, 이후 표적물질과 금속 나노입자 사이의 정전기적, 소수성 상호작용, 수소결합, 반데르발스 힘 (van der Waals forces), 구조적 장벽 (steric hindrance)에 의해 표적물질에 나노입자가 부착되어 코팅될 수 있습니다.

- [75] 특히, 종래에는 표적 물질과 금속 나노입자가 항체에 의해 수십 nm의 간격을 유지하는 것이 대부분이었으나, 본 발명에서는 금속 나노입자가 표적 물질에 직접적으로 코팅됨으로써, 표적 물질과 금속 나노입자가 1 nm 미만의 간격을 형성하고 있어, 매우 우수한 SERS 신호를 증폭 및 향상시킬 수 있다.
- [76] 상술한 원심분리 과정인 2차 포획 구조체를 형성하는 단계는, 3번 이상 반복 수행할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 원심분리 과정은 3번 내지 7번, 3번 내지 6번, 3번 내지 5번 또는 4번 반복 수행할 수 있다. 특정 양태로서, 원심분리의 반복 과정이 증가할수록 후술하게 되는 SERS 기반 표적 물질 검출 과정에서 신호 또한 증가할 수 있다. 다만, 약 4 번 정도의 과정 반복 이후에는 신호 증가폭이 포화되므로, 검출 제한의 용이성과 경제성을 고려하였을 때 상기 원심분리 과정은 바람직하게 4번 반복 수행할 수 있다.
- [77] 아울러, 2차 포획 구조체를 형성하는 단계 이후, 상기 금속 나노입자의 표면에 라만 염료(Raman dye)를 부착하는 단계를 더 포함할 수 있다. 라만 염료는 표면 증강 라만 산란(Surface-Enhanced Raman Scattering: SERS) 분광법을 통한 검출을 위한 것으로, 라만 활성 유기 화합물을 의미하며, 이 기술분야에서 널리 사용되는 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있다.
- [78] 예를 들면, MGITC(Malachite green isothiocyanate), RBITC(rhodamine B isothiocyanate), 로다민6G, 아데닌, 4-아미노-피라졸(3,4-d)피리미딘, 2-루오로아데닌, N6-벤조일아데닌, 키네티, 디메틸-알릴-아미노-아데닌, 제아틴(zeatin), 브로모-아데닌, 8-아자-아데닌, 8-아자구아닌, 4-머캅토피리딘, 6-머캅토피린, 4-아미노-6-머캅토피라졸로(3,4-d)피리미딘, 8-머캅토피아데닌, 9-아미노-아크리딘 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다.
- [79]
- [80] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 모식도를 나타내는 도면이다.
- [81] 도 3을 참조하면, 본 발명에 따른 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관(110)은
- [82] 바이오 리셉터(120)가 부착된 기관(110);

- [83] 바이오 리셉터(120)에 의해 포획된 표적 물질(130);
- [84] 표적 물질(130)을 캡핑하는 금속 나노입자(140); 및
- [85] 금속 나노입자(140)에 부착된 라만 염료(미도시); 를 포함하며,
- [86] 상기 표적 물질(130)은 바이오 리셉터(120) 및 금속 나노입자(140) 사이에 샌드위치 되어 포획 구조체가 형성되는 것을 특징으로 한다.
- [87] 여기서, "바이오 리셉터(120)가 부착된 기관(110)" 이라 함은, 기관(110)의 표면 처리에 의하여, 바이오 리셉터(120)가 고정된 기관(110)을 의미할 수 있다.
- [88] 바이오 리셉터(120)가 부착된 기관(110)은, 표면개질 물질에 의해서 표면개질된 기관(110)일 수 있으며, 예를 들면, 아민기(-NH₂) 로 개질된 기관에 바이오 리셉터(120)가 부착된 기관일 수 있다.
- [89] 나아가, "바이오 리셉터" 는 표적 물질에 특이적이며, 기관(110)에 고정되어 표적 물질(130)을 포획할 수 있는 것으로, 표적 물질(130)에 대해 결합-친화도(binding-affinity)를 갖는 물질을 포함할 수 있다. 예를 들면, 바이오 리셉터(120)는 "항체(antibody)" 일 수 있으며, 상기 항체는 아미노산과 당사슬로 결합된 단백질로 표적 물질(130)에 결합할 수 있는 물질을 의미한다.
- [90] 상기 바이오 리셉터(120)는 그 종류에 제한되는 것은 아니나, 일 구체예로, 단백질 항체, 압타머, 효소, 핵산, DNA, RNA, 세포, 세포모방체(biometric), 단백질, 유기화합물 및 폴리머로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 이는 표적 물질의 종류에 따라 적절한 바이오 리셉터가 선택될 수 있다. 예를 들면, 표적 물질이 cyt C 일 때, 바이오 리셉터는 단백질 항체일 수 있다.
- [91] 아울러, 상기 기관(110)은 실리콘(Si), 갈륨비소(GaAs), 유리(glass), 석영(Quartz) 및 폴리머(polymer)로 이루어진 군 으로부터 선택되는 어느 하나의 비금속 물질일 수 있다. 반드시 이로 제한되는 것은 아니나, 일 구체예로 기관은 유리(glass) 일 수 있다.
- [92] 한편, 기관(110)의 표면 중, 바이오 리셉터(120)가 부착되지 않은 부분에 블로킹 분자(121)를 더 포함할 수 있다. 블로킹 분자(121)는 BSA(Bovine Serum Albumin), 카세인(casein) 및 탈지유(skim milk) 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 블로킹 분자(121)는 일 구체예로 BSA(Bovine Serum Albumin) 일 수 있다.
- [93] 아울러, 금속 나노입자(140)는, 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt), 주석(Sn), 인듐(In), 갈륨(Ga), 탈륨(Tl), 납(Pb), 비스무트(Bi) 및 알루미늄(Al)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니나, 일 구체예로 금속 나노입자(140)는 금(Au) 나노입자 일 수 있다.
- [94] 한편, 금속 나노입자(140)의 직경은, 평균 10 내지 100 nm 범위일 수 있으며, 금속 나노입자(140)의 직경은, 20 내지 95 nm, 40 내지 90 nm, 60 내지 95 nm 또는 평균 80 nm 일 수 있다. 예컨대, 금속 나노입자의 직경이 10 nm 미만인 경우, 원심분리를 통해 나노입자를 가라앉히는 과정이 불가능할 수 있으며, 금속 나노입자의 직경이 100 nm 초과하는 경우, 일반적으로 합성 가능한 나노입자의

범위로 보기 어려울 수 있다.

- [95] 이때, 금속 나노입자(140)에 의해 표적 물질상에 금속층이 형성될 수 있으며, 상기 금속층은 평균 10 내지 100 nm 두께일 수 있다.
- [96] 종래에는 표적 물질(130)과 금속 나노입자(140)가 항체에 의해 수십 nm의 간격을 유지하는 것이 대부분이었으나, 본 발명에서는 금속 나노입자(140)가 표적 물질(130)에 직접적으로 코팅됨으로써, 표적 물질(130)과 금속 나노입자(140)가 1 nm 미만의 간격을 형성하고 있어, 매우 우수한 SERS 신호를 증폭 및 향상시킬 수 있다.
- [97]
- [98] 본 발명은 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기판을 이용하여 표적 물질을 검출 방법을 제공한다.
- [99] 상기 표적 물질의 검출은, SERS 분광법을 통해 수행될 수 있다. 이 경우, 상기 기판에 표적 물질이 결합됨에 발생하는 라만산란의 세기 증폭을 측정하여 표적물질의 정량 분석을 수행할 수 있다.
- [100] 참고로, SERS는 빛이 물질에 입사할 때 분자의 진동 상태에 따라 다르게 발생하는 고유한 SERS 신호를 금속 나노입자 표면에서 증폭하여 얻는 것이다. 물질마다 가지는 특이적이 SERS 신호는 생체 물질 등을 정성적으로 측정하는데 최근 많이 이용되고 있다. 본 발명에 따르면, 표면증강 라만산란법(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)을 통해 평균 500 내지 2000 cm^{-1} 파장영역의 라만 신호(Raman signals) 강도를 측정하여 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기판에 위치하는 표적 물질을 검출할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 기판에 평균 785 nm 레이저를 조사하여 SERS 신호를 측정할 수 있다.
- [101] 상기 표적 물질은 단백질, 핵산, DNA, RNA, 효소, 유기분자, 바이러스, 세포외소낭 (extracellular vesicles), 미세소낭 (Microvesicles), 엑소좀 (Exosomes), 세포, 지방, 대사물질 또는 병원균인 일 수 있으며, 구체적으로 표적 물질은 단백질일 수 있으며, 일 구체예로, 단백질일 수 있다.
- [102]
- [103] 즉, 본 발명은 원심분리를 통해 금속 나노입자를 표적물질과 부착시킴으로써 SERS 신호를 강화시켜 검출 민감도를 향상시킬 수 있는바, (a)표적물질과 특이적으로 결합하는 바이오 리셉터가 부착된 기판과 표적물질을 반응시켜 1차 포획 구조체(바이오 리셉터-표적물질)를 형성시키는 단계; 및 (b)상기 1차 포획 구조체가 형성된 기판을 금속 나노입자를 포함하는 용액의 존재 하에서 원심분리하여 바이오 리셉터-표적물질-금속 나노입자의 샌드위치 구조를 갖는 2차 포획 구조체를 형성하는 단계;를 포함하는, 표적물질 검출을 위한 SERS 신호 개선 방법을 제공할 수 있다.
- [104] 본 발명에서 SERS 신호 “개선”은 신호 증폭의 의미를 포함하고, 증폭된 SERS 신호는 표적물질의 검출 민감도 향상에 기여할 수 있다.

[105] 또한, 본 발명은 상기 SERS 신호 개선 방법을 이용하여 표적물질을 검출하는 방법을 제공한다.

[106]

발명의 실시를 위한 형태

[107] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 보다 상세히 설명한다.

[108] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[109]

[110] <실시예> 단백질 센서의 제조

[111] 1단계: 표적 단백질의 부착

[112] 항원-항체반응을 위한 표적 단백질을 기관에 고정화시키기 위하여 사용된 유리 기관 단백질 칩의 표면처리방법은 "One-step antibody immobilization-based rapid and highly-sensitive sandwich ELISA procedure for potential in vitro diagnostics." (Scientific reports, 2014, 4, 4407.)에서 소개된 방법을 응용하였다.

[113] 도 4를 참조하여, 기관에 표적 단백질의 부착 과정을 설명하도록 한다.

[114] 먼저, 커버 글라스 5 cm × 5 cm 를 물과 알코올로 세척하고, 건조하였다. 이후, 상기 기관의 표면을 수산화(hydroxylate)하기 위하여 피라냐 용액(용액(H₂SO₄:H₂O₂ = 7:3(v/v)) 에 30분 동안 담지하고, 물로 세척한 후, 1% 의 3-아미노프로필트리메톡시실란(3-Aminopropyltrimethoxysilane, APTMS)과 8 μg/ml 의 항체 희석액을 섞은 에탄올 용액에 30분 동안 담지하여 표면을 유기 실란(organosilane), 즉, 기관을 아민기로 기능화하고 바이오 리셉터를 부착시켰다.

[115] 이후, 1% 의 BSA(bovine serum albumin) 용액에 30분 동안 담지하여 항체가 부착되지 않은 부분의 APTES 를 블로킹(blocking) 하였다. 그리고, 항원인 cyt C가 포함된 용액 안에 기관을 담가 면역학적 결합을 유도하여, 표적 단백질이 부착된 기관을 제조하였다.

[116]

[117] 2단계: 나노입자의 부착

[118] 도 5는 본 발명의 실시예에서, 원심분리 기반의 나노입자 부착 과정을 나타낸 도면이다((a) 원심분리 전, (b) 원심분리 후).

[119] 도 5를 참조하면, 원심분리용 튜브의 밑면을 편평하게 하기 위하여 PDMS 등의 소재로 이루어진 서포트를 튜브 밑면에 위치시키고, 1단계에서 제조한 표적 단백질 항원이 결합된 기관을 편평하게 올려놓는다.

[120] 그리고, 80 nm 의 평균 직경을 갖는 금 나노입자(BBI gold) 콜로이드 용액을 상기 튜브 안에 400 μl 채우고 원심분리 하였다. 이때, 원심분리 조건은 1,000×g 에서 3분으로 설정하였다.

[121] 다음으로, 제작된 단백질 센서를 튜브에서 꺼내고 증류수로 세척한 이후, 질소

가스로 건조시켰다.

- [122] 도 6의 왼쪽은 원심분리 후에 기관의 주사전자 현미경(SEM) 사진이며, 도 6의 오른쪽은 원심분리 후에 기관의 암시야 현미경 사진이다. 도 6에서 볼 수 있듯이, 1 단계의 기관에 금 나노입자가 균일하게 부착된 것을 확인할 수 있다.

[123]

[124] <비교예>

- [125] 금 나노입자에 항체를 고정하고, 항원인 cyt C를 부착시켜 단백질 센서를 제조하였다.

- [126] 보다 구체적으로, 피라냐 용액($H_2SO_4:H_2O_2 = 7:3(v/v)$)으로 세척된 유리 기관에 금 나노입자 용액을 제공하고, 건조시킨 후 10 mM MPA(mercaptopropionic acid)를 12시간동안 처리하고, 세척하였다. 다음으로, 0.2 M의 EDC와 0.2 M의 NHS를 1:1로 혼합한 용액을 1시간 동안 처리하고, 세척하는 과정을 통해 항체가 붙을 수 있는 기관을 제작하였다. 그리고, 0.1 mg/ml 항체를 1시간 처리한 후 세척하여 기관 상에 항체를 도입하였다.

- [127] 이후, 블로킹을 위해 1%(w/v) BSA를 20분 동안 처리한 후 항원인 cyt C를 부착시켜 단백질 센서를 제조하였다.

[128]

[129] <실험예>

- [130] 실험예 1. 원심분리 과정의 반복을 통한 신호 증폭

- [131] 단백질 센서 제조시 원심분리 과정을 반복하여, 표적 단백질이 부착된 기관에 나노입자 부착 과정을 반복하였다. 그리고, 반복 과정(사이클 수)에 따른 기관의 SEM 사진과 가시적인 색을 확인하였으며, 표적 단백질의 SERS 신호를 측정하였다.

- [132] 그 결과는 도 7에 나타내었다.

- [133] 도 7(a)는 원심분리 과정을 나타낸 모식도이며, 도 6(b)는 원심분리 반복(사이클 수)에 따른 기관의 색변화와 SEM 사진이며, 도 6(c)는 원심분리 반복(사이클 수)에 따른 표적 단백질의 SERS 신호를 나타낸 그래프이다.

- [134] 도 7(a), (b)를 참조하면, 나노입자의 부착 과정을 반복함에 따라 부착된 나노입자의 수가 점진적으로 많아지는 것을 SEM 사진과 가시적인 색으로 확인할 수 있었다.

- [135] 그리고, 도 7(c)를 참조하면, 원심분리 반복(사이클 수) 증가에 따라 표적 단백질의 SERS 신호 또한 증가하는 양상을 보였고, 3번 정도의 과정 반복 이후에는 신호 증가폭이 줄어드는 것을 확인하였다.

- [136] 즉, 3번 정도의 과정 반복으로 충분한 신호 증폭이 가능함을 알 수 있었다.

[137]

- [138] 실험예 2. 나노입자 코팅의 균일성 분석

- [139] 금 나노입자를 APTES를 통해 아민기가 도입된 표면에 적용하고 4-aminothiophenol(4-ATP)를 처리하여 SERS 프로브 표면을 코팅시켰다.

- [140] 그리고, 스펙트럼을 분석하였다. 보다 구체적으로, 2 μ m씩 검출 스팟을 옮겨가면서 총 120 μ m까지의 스펙트럼을 분석하였고, 무작위로 설정한 검출 스팟에서 스펙트럼을 분석하였다. 이에 대한 결과는 도 8에 나타내었다.
- [141] 도 8(a)는 2 μ m씩 검출 스팟을 옮겨가면서 총 120 μ m까지의 스펙트럼을 분석한 결과를 나타내는 그래프이며, 도 8(b)는 무작위로 설정한 검출 스팟에서 스펙트럼을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [142] 도 8을 참조하면, 2 μ m씩 검출 스팟을 옮겨가면서 총 120 μ m까지의 스펙트럼을 분석해본 결과, 기관에서 도출된 4-ATP의 신호는 매우 균일하게 나타났다.
- [143] 아울러, 무작위로 설정한 검출 스팟에서 신호를 얻은 결과에서도 같은 결과를 나타냈으며 이를 통해 본 발명 기법이 균일한 기관 제작 기법임을 확인할 수 있었다.
- [144]
- [145] **실험예 3. 표적 단백질의 신호 검출**
- [146] 실시예와 비교예에서 제조한 단백질 센서를 이용한 표면증강 라만산란법(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)을 통해 C-반응 단백질(표적 단백질)의 신호를 검출하였다.
- [147] 구체적으로, 라만 현미경(Nicolet Raman spectrometer (Almecca XR))을 사용하여 표면증강 라만산란법 스펙트라(SERS spectra)를 관찰하였으며, 이를 이용하여, 항원 신호 검출 효율을 계산하였다.
- [148] 그리고, 그 결과는 도 9에 나타내었다.
- [149] 도 9는 실시예와 비교예에서 제조한 단백질 센서를 이용하여 표적 단백질의 신호를 검출한 결과를 나타내는 그래프이다((a) 실시예, (b) 비교예).
- [150]
- [151] 항원 신호 검출 효율 계산 방법은 하기 [식 1]을 통하여 계산할 수 있다.
- [152] [식 1]
- [153]
$$S_{total} = W_{ab} \times S_{ab} + W_{cytc} \times S_{cytc}$$
- [154] 여기서, S_{total} 은 조합된 신호를 의미하며,
- [155] W_{ab} 는, 항체의 신호에 대한 가중치이며, S_{ab} 는 항체의 신호이고,
- [156] W_{cytc} 는 항원의 신호에 대한 가중치이며, S_{cytc} 는 항원의 신호이다.
- [157]
- [158] 단백질 센서를 통해 검출된 신호는 항원 (cytochrome c)의 라만 신호와 항체의 신호의 선형적 조합으로 나타날 것이다. 따라서, 먼저 항체만 부착된 경우에서 항체의 SERS 신호를 획득하고, 개별적으로 얻은 항원 (cytochrome c)의 라만 신호와 항체의 신호를 선형적으로 조합하여 검출된 신호와 가장 비슷한 신호를 찾는 실험을 수행했다.
- [159] 그 결과, 실시예에서 제조한 단백질 센서가 비교예에서 제조한 단백질 센서 대비 항원 신호 검출 효율이 우수한 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, 비교예의 경우 항원의 신호를 3.61% 정도만 포함하고 있는 반면, 본 발명의

실시예를 통해 검출한 신호는 이보다 약 6배 가량 높은 항원의 신호를 포함하고 있었다.

- [160] 결론적으로, 본 발명의 단백질 센서는 금 나노입자 단일층이 표적 단백질과 직접적으로 부착되어, 금 나노입자와 표적 항원간(표적 단백질)의 간격이 좁아, 비교에 대비 신호 검출 효율이 우수한 것으로 판단된다.

[161]

[162] [부호의 설명]

[163] 100: 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관

[164] 110: 기관

[165] 120: 바이오 리셉터

[166] 121: 블로킹 분자

[167] 130: 표적 물질

[168] 140: 금속 나노입자

[169]

산업상 이용가능성

- [170] 본 발명은 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조방법 등에 관한 것으로서, 본 발명의 제공으로 표적 물질의 검출 민감도를 향상시킬 수 있는바 본 발명은 분자진단검사법 등에 널리 이용될 것으로 기대된다.

청구범위

- [청구항 1] 바이오 리셉터가 부착된 기판을 표적 물질이 포함된 시료액에 담지하여, 표적 물질 및 바이오 리셉터가 결합된 1차 포획 구조체를 형성하는 단계; 1차 포획 구조가 형성된 기판을 원심분리기 내부에 배치하고, 금속 나노입자를 포함하는 용액을 원심분리기에 투입하는 단계; 및 원심분리기를 작동시켜, 표적 물질의 표면에 금속 나노입자를 코팅하는 2차 포획 구조체를 형성하는 단계; 를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기판의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 바이오 리셉터가 부착된 기판은, 표면개질 물질과 바이오 리셉터를 포함하는 용액에 기판을 담지하여, 상기 기판에 바이오 리셉터를 부착하는 단계; 및 기판의 표면 중, 바이오 리셉터가 부착되지 않은 부분에 블로킹 분자를 부착하는 단계; 에 의해 제조된 것인, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기판의 제조방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 블로킹 분자는, BSA(Bovine Serum Albumin), 카세인(casein) 및 탈지유(skim milk)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기판의 제조방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 금속 나노입자를 포함하는 용액의 농도는, 평균 1×10^9 내지 1×10^{12} particles/ml 범위인, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기판의 제조방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 2차 포획 구조체를 형성하는 단계는, 원심분리기를 1,000xg 내지 6,000xg 범위에서, 2 내지 5 분 범위에서 작동시키는 것을 특징으로 하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기판의 제조방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 2차 포획 구조체를 형성하는 단계는, 3번 이상 반복 수행하는 것을 특징으로 하는 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기판의 제조방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 2차 포획 구조체를 형성하는 단계에서, 표적 물질은 바이오 리셉터 및 금속 나노입자 사이에 샌드위치 되어 포획 구조체가 형성되는 것인, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기판의 제조방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,

- 2차 포획 구조체를 형성하는 단계 이후,
상기 금속 나노입자의 표면에 라만 염료를 부착하는 단계를 더 포함하는,
표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
금속 나노입자는, 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt), 주석(Sn), 인듐(In), 갈륨(Ga),
탈륨(Tl), 납(Pb), 비스무트(Bi) 및 알루미늄(Al)으로 이루어진 군으로부터
선택되는 하나 이상인, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질
검출용 기관의 제조방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
금속 나노입자의 직경은, 평균 10 내지 100 nm 범위인 것을 특징으로 하는
표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관의 제조방법.
- [청구항 11] 바이오 리셉터가 부착된 기관;
바이오 리셉터에 의해 포획된 표적 물질;
표적 물질을 캡핑하는 금속 나노입자; 및
금속 나노입자에 부착된 라만 염료; 를 포함하며,
상기 표적 물질은 바이오 리셉터 및 금속 나노입자 사이에 샌드위치 되어
포획 구조체가 형성되는 것인, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적
물질 검출용 기관.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
기관의 표면 중, 바이오 리셉터가 부착되지 않은 부분에 블로킹 분자를 더
포함하는 것인 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
블로킹 분자는, BSA(Bovine Serum Albumin), 카세인(casein) 및
탈지유(skim milk)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인,
표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용 기관.
- [청구항 14] 제11항에 있어서,
금속 나노입자는, 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt) 및 알루미늄(Al)으로 이루어진
군으로부터 선택되는 하나 이상인, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의
표적 물질 검출용 기관.
- [청구항 15] 제12항에 따른 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출용
기관을 이용하여 표적 물질을 검출하는 것을 특징으로 하는, 표면-증강
라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질을 검출 방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
표면증강 라만산란법(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)을 통해
평균 500 내지 2000 cm^{-1} 파장영역의 라만 신호(Raman signals) 강도를
측정하여 표적 물질을 검출하는 단계를 포함하는, 표면-증강 라만
산란(SERS) 기반의 표적 물질을 검출 방법.
- [청구항 17] 제15항에 있어서,

상기 표적 물질은 단백질, 핵산, DNA, RNA, 효소, 유기분자, 바이러스, 세포외소낭 (extracellular vesicles), 미세소낭 (Microvesicles), 엑소좀 (Exosomes), 세포, 지방, 대사물질 또는 병원균인, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 표적 물질 검출 방법.