



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0068996
(43) 공개일자 2023년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 21/65 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)
G01J 3/44 (2006.01) G01N 21/552 (2014.01)
G01N 33/574 (2006.01) B82Y 15/00 (2017.01)
B82Y 40/00 (2017.01)

(52) CPC특허분류

G01N 21/658 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2022-0137120

(22) 출원일자 2022년10월24일

심사청구일자 2022년10월24일

(30) 우선권주장

1020210154725 2021년11월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

심상준

서울특별시 영등포구 의사당대로 127, 102동 1401호

이종욱

서울특별시 구로구 경인로67길 33, 101동 1102호

김우현

경기도 남양주시 미금로 16, 109동 401호

(74) 대리인

정은열, 김태훈

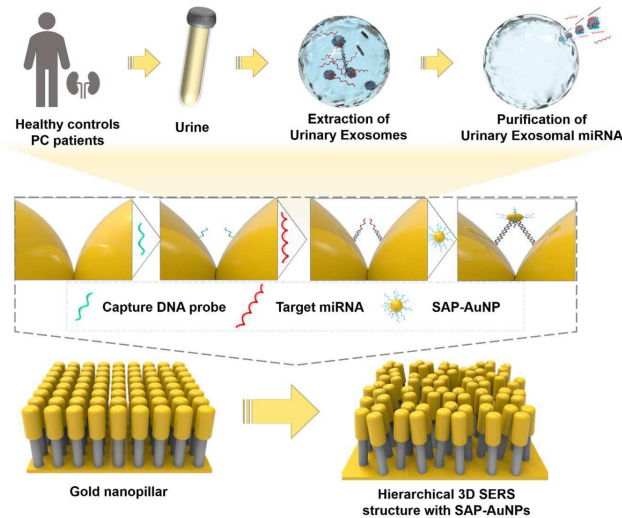
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서

(57) 요약

본 발명은 고감도 전립선암 진단용 표면 강화 라만 산란 기반 바이오센서와 이를 이용한 전립선암 유래 표적 바이오마커의 검출 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01J 3/4412 (2013.01)
G01N 21/554 (2013.01)
G01N 33/57434 (2013.01)
B82Y 15/00 (2013.01)
B82Y 40/00 (2013.01)
C12Q 2563/137 (2013.01)
C12Q 2563/155 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711130822
과제번호	2019R1A2C3009821
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	생물분자 유도 비대칭성 나노입자 합성을 이용한 광학기반 정밀의료용 난치성 질환
액체생검 바이오 플랫폼 개발	
기 여 율	9/10
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711135261
과제번호	2020R1A5A1018052
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	나노-광 융합 바이오의료 진단 연구센터
기 여 율	1/10
과제수행기관명	중앙대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

헤드-플록키드(head-flocked) 금속 나노 필러 구조체, 상기 금속 나노 필러 구조체의 헤드에 연결된 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브, 및 상기 금속 나노필러 구조체의 헤드 나노 겹 사이에 위치한 검출 프로브가 접합된 금속 나노입자를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 신호가 증폭된 SERS 기반 3D 계층적 나노기판;

상기 나노기판이 부착되는 라만 현미경; 및

상기 라만 현미경으로 증폭된 라만 신호를 측정하는 측정부를 포함하는, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 금속 나노 필러 구조체는 금속 판 및 금속 나노필러(헤드)로 구성된 것인, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 금속은 금, 은, 백금 및 알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 헤드-플록키드 나노 필러 구조체는 나노 필러 헤드 사이의 거리를 줄여 강화된 SERS 신호를 생성하는 것이 특징인, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 금속 나노입자는 7 내지 50nm의 크기를 갖는 것인, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 나노 겹은 3 내지 20nm인 것인, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 바이오마커는 DNA, miRNA 또는 펩타이드인 것인, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 miRNA는 miRNA-10a, miRNA-21 또는 이들의 조합인 것인, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 프로브는 75bp 내지 150bp로 이루어진 것인, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 포획 프로브와 검출 프로브의 말단은 각각 티올 그룹으로 변형된(modified) 것인, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 프로브는 DNA 또는 LNA를 포함하는 것인, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 바이오센서는 엑소좀 유래 miRNA의 특이적 결합으로 발생하는 레일리 산란 스펙트럼의 변화를 측정하여 엑소좀 유래 miRNA 단백질을 검출하는 것을 특징으로 하는 것인, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 바이오센서는 아토몰(aM) 내지 나노몰(nM)의 광범위한 범위에서 전립선암 유래 표적 바이오마커를 검출하는 것이 특징인, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계를 포함하는, 고감도 전립선암 진단 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 바이오마커 혼합물은 혈액 또는 소변인 것인, 고감도 전립선암 진단 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 바이오마커 혼합물은 엑소좀 유래 miRNA를 포함하는 것인, 고감도 전립선암 진단 방법.

청구항 17

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 바이오센서를 이용하여 전립선암 유래 표적 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 전립선암 유래 표적 바이오마커 검출 방법.

청구항 18

헤드-플록키드(head-flocked) 금속 나노 필러 구조체, 상기 금속 나노 필러 구조체의 헤드에 연결된 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브, 및 상기 금속 나노필러 구조체의 헤드 나노 갭 사이에 위치한 검출 프로브가 접합된 금속 나노입자를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 신호가 증폭된 SERS 기반 3D 계층적 나노기판;

상기 나노기판이 부착되는 라만 현미경; 및

상기 라만 현미경으로 증폭된 라만 신호를 측정하는 측정부를 포함하는, 고감도 전립선암 유래 표적 바이오마커 검출용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서와 이를 이용한 전립선암 유래 표적 바이오마커의 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 전립선암(PC)은 전 세계적으로 남성에서 두 번째로 흔한 악성 종양으로, 암 관련 사망 원인의 다섯 번째이다. PC의 진단 및 예후를 위해 혈청 전립선 특이 항원(PSA) 검사가 현재 표준이다. 그러나, 많은 연구에서 PC에 대한 PSA 검사의 특이성과 정확성이 부족하여 최대 76%의 높은 위양성률이 발생한다고 보고되고 있다(Mazzucchelli et al. 2000; Thompson et al. 2006; Woolf 1995). 이러한 높은 위양성 비율 때문에 많은 수의 불필요한 생검을 증가시켜 왔다. 또한, PSA를 바이오마커로 사용하여 나태한 PC와 공격적인 PC를 구별할 수 없어 과잉 진단 및 과잉 치료의 가능성이 증가하였다. 따라서 새로운 PC 특이적 바이오마커를 이용한 정확하고 신뢰성 있는 PC 진단 플랫폼의 개발이 시급한 실정이다.

[0004] 최근 연구에 따르면, 종양 유래 엑소솜은 종양 성장, 전이 및 종양 혈관신생을 포함한 암 발병기전에 관하여 통찰력을 가진다고 보고된다. 이러한 나노소포는 종양 미세환경에서 세포간 통신을 매개하고 암 특이적 분자 표지(단백질 및 핵산 포함)를 종양 세포에서 원격 정상 세포로 전달함으로써, 표적 세포의 악성 형질전환을 유도하는 것으로 알려져 있다. 또한, 종양 세포는 정상 세포보다 10배 이상 많은 엑소솜을 분비하는 것으로 알려져 있다(Pan et al. 2019). 이러한 종양 진행에 관여함을 뒷받침하는 증거로 엑소솜, 특히 엑소솜 miRNA에 존재하는 구성요소에 대한 집중적인 연구가 이어졌다.

[0005] 엑소솜 miRNA는 작은 비암호화 단일 가닥 RNA로, 전사 후 단계에서 유전자 발현을 조절한다. 그 중에서도 소변 엑소솜 miRNA는 대규모 양과 함께 안정성으로 PC 진단을 위한 새로운 바이오마커로 조사되었다(Kim et al. 2021). 또한, 엑소솜 miRNA 중 엑소솜 miRNA-21(miR-21)은 PC용 종양유전자로 확인되었으며, 이는 p53 네트워크를 통해 여러 종양 관련 유전자의 발현을 조절하여 PC 세포 증식 및 침입을 촉진한다고 보고된다(Gao et al. 2016; Zhan et al. 2018). 또한 최근 PC에서 exosomal miRNA-10a(miR-10a)가 발암성 miRNA로 밝혀져(Zimta et al. 2019) 정상 세포에서 암 줄기세포로의 전환을 유도하여 암세포에서 방출된다고 보고된다(Ngalame et al. 2018). 따라서 이러한 이유로 많은 연구에서 PC 진단을 위한 miR-10a 및 miR-21 검출 플랫폼을 개발했다.

[0006] 혈액 또는 생체 유체에서 miRNA를 검출하는 기존의 방법에는 Northern blotting(Varallyay et al. 2008), qRT-PCR(Varkonyi-Gasic et al. 2007; Wang and Yang 2010), 마이크로어레이(Zhao et al. 2012) 및 형광이 포함된다. 그러나, 이러한 방법은 형광 표지를 사용하기 때문에 시간이 많이 걸리고 긴 프로토콜과 높은 비용이 필요하다. 또한, 기존 방법은 민감도가 낮아 생체유체(aM에서 fM까지)를 포함하는 엑소솜에서 전립선암 진단을 위해 추가 증폭 과정이 필요하거나 다량의 샘플을 활용해야 하는 문제점이 있다(Campuzano et al. 2014; Labib et al. 2013). 따라서 전처리 과정이 간단하고 고감도, 고선택성, 넓은 동적 검출 범위로 전립선암 진단을 위한 우수한 성능의 센싱 플랫폼의 개발은 여전히 시급한 상황이다.

[0008] 한편, 귀금속 기질 또는 나노입자를 이용하는 표면 강화 라만 산란(Surface-enhanced Raman scattering, SERS) 기반 광학 바이오센서는 흡착된 개별 바이오 분석물(단백질, DNA 및 RNA)에 대한 특정 "지문" 스펙트럼 프로파일을 제공하기 때문에 유망한 기술로 많은 주목을 받았다. 금속 나노구조로부터의 신호는 국부적인 표면 플라즈

본 공명을 통해 강화되지 않은 라만 신호에 비해 6 내지 14배 크기로 증폭된다(Lee et al. 2015; Nguyen et al. 2016; Willets 2009). 그러나 SERS의 적용 가능성은 강한 배경 신호로 인해 복잡한 임상 샘플, 특히 표적 생체 분자의 농도가 매우 낮은 경우에 제한적이다(Li et al. 2013). 따라서, 임상 샘플에서 라벨이 없는 SERS 검출을 사용하려면 충분히 높은 감도와 선택성을 가진 SERS 바이오센서를 개발하는 것이 필수적이다.

[0009] 그 중에서도 3D 플라즈몬 나노구조는 3D 플라즈몬 나노구조에 입사되는 전기장이 나노필름, 나노돔과 같은 2D 플라즈몬 기질에 비해 국부적인 표면 플라즈몬 효과를 통해 전자기 "핫스팟"이라고 불리는 SERS 활성 부위에서 극적으로 증폭되기 때문에 더 높은 SERS 효과를 제공할 수 있다(Wang et al. 2015; Wang et al. 2018). 이러한 향상 효과는 개별 분자에서 라만 스펙트럼 지문을 인식할 수 있게 하여 기존의 라만 신호에서 낮은 감도와 여러 분석 물질 식별의 어려움을 극복하게 한다(Lin et al. 2014; Wang et al. 2017). 따라서 이 독특한 특성을 분자 지문 특이성과 단일 분자 감도를 병합하여 여러 miRNA를 감지하는 기능을 제공할 수 있다(Li et al. 2013).

[0010] 이러한 배경하에, 본 발명에서는 헤드-플록 금 나노필러 구조체 기반으로 자기 조립 DNA 프로브 집합 금 나노입자(SAP-AuNPs)를 사용하여 3D 계층적 나노 바이오센서를 제작한 후, 이러한 바이오센서가 소변 샘플에서 PC 관련 엑소좀 miRNA의 라벨이 없고 정량적 검출에 매우 효과적인 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 하나의 목적은 헤드-플록키드(head-flocked) 금속 나노 필러 구조체, 상기 금속 나노 필러 구조체의 헤드에 연결된 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 DNA 프로브, 및 상기 금속 나노필러 구조체의 헤드 나노 갭 사이에 위치한 검출 DNA 프로브가 접합된 금속 나노입자를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 신호가 증폭된 SERS 기반 3D 계층적 나노기관; 상기 나노기관이 부착되는 라만 현미경; 및 상기 라만 현미경으로 증폭된 라만 신호를 측정하는 측정부를 포함하는, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 바이오센서를 이용하여 전립선암 유래 표적 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 전립선암 유래 표적 바이오마커 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 헤드-플록키드(head-flocked) 금속 나노 필러 구조체, 상기 금속 나노 필러 구조체의 헤드에 연결된 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 DNA 프로브, 및 상기 금속 나노필러 구조체의 헤드 나노 갭 사이에 위치한 검출 DNA 프로브가 접합된 금속 나노입자를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 신호가 증폭된 SERS 기반 3D 계층적 나노기관; 상기 나노기관이 부착되는 라만 현미경; 및 상기 라만 현미경으로 증폭된 라만 신호를 측정하는 측정부를 포함하는, 고감도 전립선암 유래 표적 바이오마커 검출용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0017] 본 발명은 헤드-플록키드(head-flocked) 금속 나노 필러 구조체, 상기 금속 나노 필러 구조체의 헤드에 연결된 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브, 및 상기 금속 나노필러 구조체의 헤드 나노 갭 사이에 위치한 검출 프로브가 접합된 금속 나노입자를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 신호가 증폭된 SERS 기반 3D 계층적 나노기관; 상기 나노기관이 부착되는 라만 현미경; 및 상기 라만 현미경으로 증폭된 라만 신호를 측정하는 측정부를 포함하는, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서를 제공할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 금속 나노 필러 구조체는 금속 판 및 금속 나노필러(헤드)로 구성된 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 금속은 금, 은, 백금 및 알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.

- [0020] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 헤드-플록키드 나노 필터 구조체는 나노 필터 헤드 사이의 거리를 줄여 강화된 SERS 신호를 생성하는 것이 특징일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 금속 나노입자는 7 내지 50nm의 크기를 갖는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 나노 갭 은 3 내지 20nm인 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 바이오마커는 DNA, miRNA 또는 펩타이드인 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 miRNA는 miRNA-10a 또는 miRNA-21인 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 프로브는 75bp 내지 150bp로 이루어진 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 포획 프로브와 검출 프로브의 말단은 각각 티올 그룹으로 변형된(modified) 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 프로브는 DNA 또는 LNA를 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 바이오센서는 엑소좀 유래 miRNA의 특이적 결합으로 발생하는 레일리 산란 스펙트럼의 변화를 측정하여 엑소좀 유래 miRNA 단백질을 검출하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 바이오센서는 아토몰(aM) 내지 나노몰(nM)의 광범위한 범위에서 전립선암 유래 표적 바이오마커를 검출하는 것이 특징일 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 상기 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 바이오센서를 이용하여 전립선암 유래 표적 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 전립선암 유래 표적 바이오마커 검출 방법을 제공할 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 헤드-플록키드(head-flocked) 금속 나노 필터 구조체, 상기 금속 나노 필터 구조체의 헤드에 연결된 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브, 및 상기 금속 나노필러 구조체의 헤드 나노 갭 사이에 위치한 검출 프로브가 접합된 금속 나노입자를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 신호가 증폭된 SERS 기반 3D 계층적 나노기판; 상기 나노기판이 부착되는 라만 현미경; 및 상기 라만 현미경으로 증폭된 라만 신호를 측정하는 측정부를 포함하는, 고감도 전립선암 유래 표적 바이오마커 검출용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서를 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명에 따른 SERS 기반의 라벨이 없는 바이오센서는 표적 miRNA에 의해 유도된 플라즈몬 헤드 플록키드(head-flocked) 금 나노필러 SERS 기질과 SAP-AuNP의 자가 조립으로 3D 계층적 나노 아키텍처를 구축한 후, 이로 인해 생성된 3D 나노 아키텍처의 균일하고 풍부한 나노갭은 표적 miRNA의 고유한 SERS 지문 피크의 강렬한 확대에 이어져 표적 miRNA에 대한 초민감성(~10 aM) 및 단일 뉴클레오타이드 수준에서의 특이적 검출 성능을 나타내고, 나아가, PC 진단용 SERS 센서의 임상 정확도는 PC 관련 요 엑소좀 miRNA의 차등 발현 분석을 사용하여 PC 환자를 건강한 대조군과 구별하며, 특히, 진단 성능은 기존 qRT-PCR보다 훨씬 우수하여 PC 진단을 위한 SERS 기반 miRNA 센서의 잠재력을 가지므로, 본 발명의 3D SERS 센서가 생체 유체에서 단백질 또는 무세포 핵산과 같은 다양한 질병 관련 miRNA 및 기타 미량 바이오마커를 검출하기 위한 다목적 플랫폼 역할을 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 본 발명의 바이오센서 모식도이다.
- 도 2는 15nm 금속 나노입자 및 금속 나노입자(SAP-AuNP)의 UV 가시 스펙트럼, SAP-AuNP의 XPS 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- 도 3은 (A) SAP-AuNP가 없는 헤드 플록 금 나노필러, (B) 5 nm, (C) 15 nm, (D) 30 nm 및 (E) 50 크기의 금속

나노입자(SAP-AuNP) 자가조립 후 계층적 3D SERS 구조의 SEM 이미지이다.

도 4는 표적 miRNA가 있고, 또는 없는 15 nm SAP-AuNP의 SEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 5는 SAP-AuNP와 나노필러 구조체 헤드 사이에 형성된 플라즈몬 핫스팟이 갭에 위치한 miRNA의 라만 신호를 크게 증폭하는 것을 나타낸 도이다.

도 6은 (A) 5 nm, (B) 15 nm, (C) 30 nm 및 (D) 50 nm SAP-AuNP가 나노필러에 부착된 계층적 3D SERS 구조의 근거리장 분포의 수치 시뮬레이션을 나타낸 도이다.

도 7은 3D 계층적 SERS 기판을 기반으로 하는 본 발명의 SERS 센서가 miR-10a 및 miR-21에 대한 miRNA 부착에 대한 응답으로 지문 피크 및 스펙트럼에서 균질한 SERS 신호 강도를 나타내는 것을 확인한 도이다.

도 8은 miR-10a(1143cm^{-1}) 및 miR-21(1376cm^{-1})에 대한 특성 피크의 상대 표준 편차(RSD)를 나타낸 도이다.

도 9는 다른 처리 조건에서 (A) miR-10a 및 (B) miR-21의 라만 스펙트럼 변화를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 3D SERS 바이오센서가 PC 관련 엑소좀 miRNA의 표지 없는 검출에 필요한 다른 miRNA 서열과의 교차 반응성 및 교차 하이브리드화 없이 단일 뉴클레오티드 수준의 특이성을 가지는 것을 확인한 도이다.

도 11은 농도 구배에 걸쳐 측정된 miRNA 샘플의 SERS 스펙트럼을 확인한 도이다.

도 12는 소변 샘플에서 엑소좀 miRNA를 추출한 후, 본 발명의 라벨이 없는 3D SERS 바이오센서로 측정된 SERS 스펙트럼과 qRT-PCR 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 본 발명의 3D SERS 센서를 이용한 (A) miR-10a 및 (B) miR-21 기반 진단의 감도, 특이성 및 정확도를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0038] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0040] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0042] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 헤드-플록키드(head-flocked) 금속 나노 필러 구조체, 상기 금속 나노 필러 구조체의 헤드에 연결된 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브, 및 상기 금속 나노필러 구조체의 헤드 나노 갭 사이에 위치한 검출 프로브가 접합된 금속 나노입자를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 신호가 증폭된 SERS 기반 3D 계층적 나노기관; 상기 나노기관이 부착되는 라만 현미경; 및 상기 라만 현미경으로 증폭된 라만 신호를 측정하는 측정부를 포함하는, 고감도 전립선암 진단용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서를 제공한다.

[0043] 본 발명에서 용어, “바이오센서”는 효소와 항체 같은 생물학적 물질과 흔히 복잡한 혼합물 중에서 검출하고자 하는 분자 사이의 특별한 반응을 이용한 센싱을 위한 장치로서, 면역센서와 혼용되어 사용될 수 있으며, 본 발명의 바이오센서는 전립선암 유래 표적 바이오마커를 검출하여 전립선암을 진단하기 위한 것일 수 있다.

[0044] 상기 바이오센서는 SERS 기반의 무표지(label-free)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0046] 본 발명에서 용어, “표면-증강 라만 산란(SERS) 신호가 증폭된 SERS 기반 3D 계층적 나노기관”은 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 전립선암 유래 표적 바이오마커를 검출할 수 있도록 하기 위한 기관으로, 헤드-플록키드(head-flocked) 금속 나노 필러 구조체, 상기 금속 나노 필러 구조체의 헤드에 연결된 전립선암 유래 표적 바

이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브, 및 상기 금속 나노필러 구조체의 헤드 나노 갭 사이에 위치한 검출 프로브가 접합된 금속 나노입자를 포함할 수 있다. 상기 “3D 계층적 나노기관”은 헤드-플록키드 금속 나노필러 구조체 헤드에 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브가 결합되고, 상기 나노필러 헤드 사이의 나노 갭에 검출 프로브가 접합된 자기조립 금속 나노입자가 위치함으로써, 3D 계층 구조를 가지는 나노기관을 의미한다.

- [0048] 본 발명에서 용어, “헤드-플록키드(head-flocked) 금속 나노 필러 구조체”는 기둥 모양의 금속 나노필러가 세워질 수 있도록 하는 얇은 판 형태의 금속판과 그 위에 세워진 형태의 금속 나노필러(금속헤드)로 구성된 구조체로서, 보다 증폭된 라만 신호를 측정할 수 있도록 하기 위하여 상기 금속 나노 필러의 헤드가 모인 구조인 구조체를 말한다. 구체적으로, 도 1의 모식도에서 확인할 수 있는 바와 같이, 각각의 금속 나노필러가 모세관 현상으로 모인 형상을 가지는 구조체를 의미할 수 있다.
- [0049] 상기 헤드-플록키드 나노 필러 구조체는 나노 필러 헤드 사이의 거리를 줄여 강화된 SERS 신호를 생성하는 것이 특징일 수 있다.
- [0050] 상기 금속은 금, 은, 백금 및 알루미늄으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있으며, 구체적으로는 금일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [0052] 상기 금속 나노 필러 구조체의 헤드에는 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 하프(half) 포획 프로브가 연결된 것일 수 있다.
- [0053] 발명에서 용어, “표적 바이오마커”는 생체에서 수득한 분리된 형태의 검출 또는 진단하고자 하는 바이오마커를 의미하는 것으로서, 일 예로 DNA, miRNA 또는 펩타이드일 수 있고, 다른 예로 miRNA일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 상기 miRNA는 microRNA로, mRNA의 안정성과 번역 모두에 영향을 주어 다세포 유기체에서 유전자 발현의 전사 후 조절에 관여하는 짧은(20-24 nt) 비암호화 RNA이다. 상기 miRNA는 일 예로 엑소좀 유래일 수 있으며, 다른 예로 전립선암을 가지는 개체에서 수득된 엑소좀 유래 miRNA일 수 있다.
- [0055] 상기 엑소좀은 세포 내에서 생성되어 외부로 방출되는 소낭(extracellular vesicles, EVs)의 일종으로, 진행성 물에서 세포간 정보교환을 통해 분비되는 50 내지 150nm 크기의 소포체이다.
- [0056] 상기 엑소좀 유래 miRNA는 miRNA-10a, miRNA-21 또는 이들의 조합일 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 상기 miRNA-10a와 miRNA-21은 NCBI 등을 통해 공지된 서열을 포함할 수 있다.
- [0057] 상기 전립선암 유래 표적 바이오마커는 전립선암을 가지는 개체의 분리된 시료, 예컨대 혈장 또는 소변 등에 포함된 것으로서, 구체적으로는 소변일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 상기 용어, “포획 프로브”는 결합 프로브, 캡처 프로브 등으로 혼용되어 사용될 수 있으며, 검출하고자 하는 표적 또는 타겟 바이오마커에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있고, 그 중에서도 하프(half) 포획 프로브는 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 서열에서 절반에 해당하는 서열을 가지는 프로브를 말한다.
- [0060] 상기 포획 프로브는 DNA 또는 LNA를 포함하는 것일 수 있다.
- [0061] 상기 용어, “LNA”는 센서의 감도와 선택성을 더욱 향상시키기 위하여 도입한 것으로서, 0-메틸렌 브릿지(0-methylene bridge)를 통해 2'-산소와 4'-탄소 사이에 고정된 키메릭 리보스 링(chimeric ribose ring)의 모이 어티를 포함할 수 있다. 이러한 LNA의 구조는 바이오센서의 혼성화 특이성(hybridization specificity), 듀플렉스 안정성(duplex stability) 및 결합 친화성(binding affinity)을 향상시킬 수 있다.
- [0062] 상기 포획 프로브는 전립선암 유래 바이오마커, 일 예로는 miRNA-10a 또는 miRNA-21에 특이적으로 결합하는 프로브일 수 있으며, 75bp 내지 150bp일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0064] 상기 금속 나노입자는 상기 금속 나노필러 구조체의 헤드 나노캡 사이에 위치한 것으로서, 검출 프로브가 접합된 것이 특징일 수 있다.
- [0065] 상기 금속 나노입자는 7 내지 50nm, 구체적으로는 10 내지 20nm의 크기를 갖는 것일 수 있으며, 이러한 금속 나노입자 크기에서 다른 나노입자 크기 대비 매우 우수한 SERS 반응이 나타나는 것이 특징일 수 있다.
- [0066] 상기 나노캡은 나노필러 구조체의 헤드가 모아지면서 생긴 나노미터 크기의 벌어진 틈을 의미하는 것으로서, 일 예로 3 내지 20nm일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 상기 금속은 금(Au), 구리(Cu), 백금(Pt) 및 팔라듐(Pd)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 일 예로 금일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [0068] 본 발명에서 용어, “검출 프로브”는 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 프로브로, 상기 금속 나노입자에 접합 또는 결합된 것일 수 있다.
- [0069] 상기 “전립선암 유래 표적 바이오마커”는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0070] 상기 검출 프로브는 검출하고자 하는 표적 또는 타겟 바이오마커에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있고, 그 중에서도 하프(half) 포획 프로브는 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 서열에서 절반에 해당하는 서열을 가지는 프로브를 말한다.
- [0071] 상기 검출 프로브는 DNA 또는 LNA를 포함하는 것일 수 있다.
- [0072] 상기 포획 DNA 프로브와 검출 DNA 프로브의 말단은 각각 티올 그룹으로 변형된(modified) 것일 수 있다. 이는 포획 프로브는 금속 나노필러 구조체의 헤드에 검출 프로브는 금속 나노입자에 효과적으로 접합되기 위함이다.
- [0074] 상기에서 용어, “라만 현미경”은 상기 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 전립선암 유래 바이오마커 검출용 기관을 유리 슬라이드와 같은 슬라이드에 고정시켜 라만 이미징에 의해 분석할 수 있는 장치를 말하며, “라만 신호를 측정하는 측정부”는 상기 기관에 혈장이나 소변과 같은 생체액을 처리하여 그 속에 포함된 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브에 결합된 후, SERS 신호 태그에 의해 발생된 라만 신호를 측정할 수 있는 장치를 말한다.
- [0076] 상기 바이오센서는 엑소솜 유래 miRNA의 특이적 결합으로 발생하는 레일리 산란 스펙트럼의 변화를 측정하여 엑소솜 유래 miRNA 단백질을 검출하는 것일 수 있다.
- [0077] 또한, 상기 바이오센서는 아토몰부터 나노몰RK지의 매우 적은 함량 범위에서 광범위한 범위까지의 엑소솜 유래 miRNA를 검출하는 것이 특징일 수 있다.
- [0078] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 바이오센서는 엑소솜 유래 miRNA에 대해 낮은 검출 한계에서도 검출하는 것이 특징일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [0080] 본 발명은 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계를 포함하는, 고 감도 전립선암 진단 방법을 제공할 수 있다.
- [0081] 상기에서 용어, “표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 바이오센서”, “바이오마커” 및 “SERS”는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0082] 상기 용어, “전립선암”은 전립선에서 발생하는 암으로, 대부분은 전립선 세포에서 발생하는 선암(샘세포의 암)이다. 종양 조직의 분화 정도와 세포의 특성 등에 따라 유형을 구분하는데, 널리 쓰이는 분류 방식은 도널드 글리슨이라는 병리학자가 제시한 것으로, 분화도가 가장 좋은 1등급부터 최하인 5등급까지로 나뉘며, 분화가 잘 되어 있을수록 예후도 좋다고 보고된다.
- [0084] 본 발명은 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 바이오센서를 이용하여 전립선암 유래 표적 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 전립선암 유래 표적

바이오마커 검출 방법을 제공한다.

- [0085] 상기에서 용어, “표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 바이오센서”, “바이오마커” 및 “SERS”는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0086] 상기 검출 방법은 표면증강 라만산란법(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)으로 평균 500 내지 2000 cm^{-1} 파장영역의 라만 신호(Raman signals) 강도를 측정하여 전립선암 유래 표적 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0087] 보다 구체적으로는 상기 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 전립선암 유래 표적 바이오마커 검출용 기판을 라만 현미경에 고정시키는 단계; 표적 바이오마커를 포함하는 혈장 또는 소변에 첨가하는 단계; 및 라만 신호 측정부로 라만신호를 수집 및 처리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0089] 또한, 본 발명은 다른 양태로서, 본 발명은 상기 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 전립선암 유래 표적 바이오마커 검출용 기판을 이용하여 전립선암 유래 표적 바이오마커를 검출하는 단계; 및 상기 전립선암 유래 표적 바이오마커에 대한 라만 신호를 확인하여 전립선암을 진단하는 단계;를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 전립선암 진단 방법을 제공할 수 있다.
- [0090] 상기에서 용어, “표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 바이오센서”, “바이오마커” 및 “SERS”는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0092] 또한, 본 발명은 다른 양태로서, 본 발명은 헤드-플록키드(head-flocked) 금속 나노 필러 구조체, 상기 금속 나노 필러 구조체의 헤드에 연결된 전립선암 유래 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브, 및 상기 금속 나노필러 구조체의 헤드 나노 갭 사이에 위치한 검출 프로브가 접합된 금속 나노입자를 포함하는, 표면-증강 라만 산란(SERS) 신호가 증폭된 SERS 기반 3D 계층적 나노기판; 상기 나노기판이 부착되는 라만 현미경; 및 상기 라만 현미경으로 증폭된 라만 신호를 측정하는 측정부를 포함하는, 고감도 전립선암 유래 표적 바이오마커 검출용 표면-증강 라만 산란(SERS) 바이오센서를 제공한다.
- [0093] 상기에서 용어, “표면-증강 라만 산란(SERS) 기반의 바이오센서”, “바이오마커”, “SERS”, “포획 프로브”, “금속 나노입자”, “검출 프로브”, “라만 현미경”, 및 “라만 신호 측정부”는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0095] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0097] **실험예 1: 화학물질 및 재료**
- [0098] 달리 명시되지 않는 한, 이 실험에 사용된 모든 화학물질은 한국 시그마 알드리히에서 구입하였다. 그 외, Au 펠렛($\varnothing$ 3×3 mm, 99.99 %)은 신우메탈(한국)에서 구입하였다. 1.5mL DNA LoBind 튜브는 에펜도르프(Eppendorf)에서 제공받았다. Ambion® 뉴클레이즈-프리 물(nuclease-free water)은 써모 피셔 사이언티픽 코리아(Thermo Fisher Scientific Korea)에서 구입하였다. 모든 용액은 초순수(18.2m Ω /cm)로 준비하였다. DNA 프로브와 표적 miRNA 서열은 바이오니어(Bioneer, 한국)에서 제공받았다. 총 엑소좀 RNA 분리 키트(Invitrogen™)는 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)에서 구입하였다.
- [0100] **실험예 2: 계층적 3D SERS 기판 준비**
- [0101] 먼저, 헤드 플록키드(head-flocked) 금 나노필러 구조체는 종전 공지된 바와 같이 마스크 없는 반응성 이온 에칭과 전자빔 증발로 제조하였다(Lee et al. 2019). 구체적으로, 실리콘 나노 필러 몰드(mold)를 마스크리스(maskless) RIE 공정을 사용하여 제조하였는데, 이러한 방식은 필름 마스크 없이 화학적으로 반응하는 플라즈마를 사용하는 건식 에칭으로, 구체적인 조건은 플라즈마 Lab100 장치 (영국 옥스포드) 플레이트 전력은 110W, SF6

대 02 유량 비율은 1.12, 속도는 초당 3nm, 챔버 압력은 36mTorr이다.

[0102] 상기 RIE 공정 후, SERS 스펙트럼에 미치는 영향을 방지하기 위해, 실리콘 표면 잔류물을 산소 플라즈마 노출로 물리적으로 제거하였다. 이후, 실리콘 몰드를 금속화하기 위해, 실리콘 나노필러 표면에 전자빔 증발로 금을 증착하고, 실리콘 나노필러 기판 위에 추가로 금을 코팅하였다. 그 결과, 도 1에서 확인할 수 있듯이, 금 나노필러로 용액을 처리하는 동안 플라즈모닉 헤드-플로킹(Plasmonic head-flocking) 현상을 확인할 수 있었다(도 1).

[0103] 다음으로, DNA 프로브를 나노 구조에 완전히 접합하기 위해 제조업체의 프로토콜에 따라 DTT를 사용하여 프로브의 티올 그룹을 활성화하였다. 활성화된 포획 프로브(1 μ M)를 황산나트륨(30mM)이 포함된 접합 완충액과 혼합 후, 기질을 30°C에서 12시간 동안 혼합물과 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 기질을 탈이온수로 세척하고 N₂로 불어 건조시켰다. 또한, 금 표면에 다른 핵산이 비특이적으로 흡착하는 것을 방지하기 위해, 6-mercaptop-1-hexanol(MCH) 단층을 나노필러 기질에 처리하였다. 프로브가 결합된 기질을 MCH 용액(10 μ M)에서 실온에서 3시간 동안 인큐베이션하고, 2X 식염수-시트르산나트륨 완충액(SSC) 및 0.2% SDS를 포함하는 세척 완충액으로 세척하였다. 그런 다음, 기판을 한 번 더 철저히 세척하고 N₂로 건조시켰다. 다음으로, 센서의 민감도 또는 특이도를 평가하기 위해, 1 aM ~ 1 μ M 농도의 인간 혈청에 표적 miRNA를 첨가하여 샘플을 준비하였다. 그런 다음, 기질을 30°C에서 12시간 동안 인큐베이션한 다음 세척하고 N₂ 건조를 수행하였다. 마지막으로, SAP-AuNP를 miRNA와 혼성화하기 위해, 2X SSC 및 SAP-AuNP(10nm)를 포함하는 혼성화 완충액으로 기질을 30°C에서 6시간 동안 뉴클레아제가 없는 물에서 배양한 다음, DI 세척 및 SERS 측정을 위한 N₂ 건조를 수행하였다.

[0105] 실험예 3: 계층적 3D SERS 나노센서의 수치 시뮬레이션

[0106] 나노센서에 대한 수치 모델링 및 시뮬레이션을 Lumerical FDTD 시뮬레이션(Lumerical Inc.)를 사용하여 수행하고, 센서의 치수 정보는 GeoGebra 그래픽 계산기를 사용하여 계산하였다. 구체적으로, 상기 시뮬레이션은 나노필러 헤드 사이의 간격에 배치된 다양한 크기의 SAP-AuNP로 수행하였으며, 타원형 모양의 상단에 금이 증착된 두 개의 실리콘 나노필러 구조체를 250nm의 거리에 배치하였다. 나노필러 구조체는 젖음이 발생한 후, 모세관력으로 서로를 향해 약간 기울어졌다. 금 나노필러 헤드 사이의 거리는 10nm로 설정하였다. 나노프로브 프로브 DNA 프로브는 표적 miRNA 사이의 상보적 혼성화로 나노필러 구조체 헤드 사이의 틈(갭)에 부착되었다. 이 시뮬레이션에서는 SAP-AuNP의 4가지 다른 크기(5, 15, 30 및 50 nm)를 확인하였으며, 이 때 SAP-AuNP와 나노필러 구조체 헤드 사이의 거리는 miRNA의 크기와 동일한 8 nm로 고정하였다. 785 nm 파장의 편광된 평면파 광을 나노필러 구조체에 직접 입사되도록 하였다. 시뮬레이션 메쉬 크기는 1 nm로 설정하고 입사광의 주파수는 3.82×10^{14} Hz였다(Ding et al. 2016).

[0108] 실험예 4: DNA 프로브 설계 및 SAP-AuNP 합성

[0109] miRNA 포획과 검출을 위한 반(half)-상보적 DNA 프로브를 각 표적 miRNA에 특이적으로 결합하도록 설계하였다. 먼저, 포획 DNA 프로브를 헤드 플록키드(head-flocked) 나노필러 구조체에 결합하고, 검출 프로브를 금 나노입자(AuNP)에 부착하였다. 이 때 DNA 프로브 사이에 3개 이상의 염기가 중복되는 것을 방지하기 위해, OligoAnalyzer® Tool(Integrated DNA Technologies, USA)을 사용하여 최적의 혼성화를 위한 T_m 값을 계산하였다. 표적 miRNA 및 해당 DNA 프로브에 대한 서열 정보는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0110] DNA 프로브 및 표적 miRNA의 서열

miRNA designation	Sequence (5' →3')	Length (nt)
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	22
miR-21 A	UAGCAUAUCAGACUGAUGUUGA	22
miR-21 B	UAGCUUAUCAGACUGAUCUUGA	22
miR-10a	UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG	23
miR-10a A	UACCAUGUAGAUCGAAUUUGUG	23
miR-10a B	UACCCUGUAGAUCGAAUCUGUG	23
Probe DNA designation	Sequence (5' →3')	Length (nt)
miR-10a capture probe	TCTACAGGGTA-C6-thiol	11
miR-10a detection probe	thiol-C6-CACAAATTCGGA	12

miR-21 capture probe	CTGATAAGCTA-C6-thiol	11
miR-21 detection probe	thiol-C6-TCAACATCAGT	11

[0111] 금 나노필러 구조체와 AuNP에 각각의 DNA 프로브를 접합하기 위해 티올(thiol) 그룹으로 포획 프로브의 5'-말단과 검출 프로브의 3'-말단을 각각 변형하였다(modification).

[0112] SAP-AuNP의 제작을 위한 AuNP는 트리소듐 시트레이트(trisodium citrate)를 사용하여 HAuCl₄ 용액의 화학적 환원으로 합성하였다(Turkevich et al. 1951). 구체적으로, NP를 DNA 검출 프로브와 접합하기 전에 제조업체의 프로토콜에 따라 실온에서 15분 동안 10 μ L 1.0 N 1,4-디티오트레이톨(DTT) 용액을 인큐베이션하여 티올이 불성화 되도록 변형된 DNA 검출 프로브를 활성화하였다. 이 후 과량의 DTT 및 티올-단편을 에틸 아세테이트(50 μ L)로 3회 추출하여 제거하였다. 동시에 시트레이트-AuNPs는 0.1M BSPP 용액을 시트레이트-AuNP 콜로이드에 첨가하여 부드럽게 흔들면서 비스(p-설포네이토펜일)페닐포스핀 이수화물 이칼륨(BSPP)으로 교환되도록 하였다. 원심분리로 과량의 BSPP를 AuNP를 초순수로 세척하였다. 다음으로, AuNP를 DNA의 티올 그룹과 접합하기 검출 DNA 프로브와 BSPP 코팅된 AuNP의 혼합물(110:1)을 실온에서 밤새 배양하였다(Hill et al. 2009). 이후 인큐베이션된 용액을 실온에서 10분 동안 6000 rpm에서 원심분리하여 결합되지 않은 검출 DNA 프로브를 분리하였다. 검출 DNA 프로브-AuNP 용액을 10mM PB, 0.01% 나트륨 도데실 설페이트(SDS) 및 1.0M NaCl의 최종 농도 pH 7로 완충하였다. 이 후, 합성된 SAP-AuNP를 UV/가시광선 분광광도계(Shimadzu UV-3600, Japan)와 X선 광전자 분광기(ULVAC-PHI X-TOOL, Japan)로 특성화하였다.

[0114] 실험예 5: 인간 소변에서 엑소좀 분리 및 엑소좀 miRNA 정제

[0115] 본 발명에서 사용된 인간 소변 샘플을 고려대학교 안암병원(대한민국 서울)에서 입수하였다. 임상 연구의 프로토콜은 고려대학교 안암병원의 IRB(Institutional Review Board)의 승인을 받았다(IRB No. 2016AN0287). 또한 본 발명에 모집된 모든 피험자는 IRB 승인 동의서에 서명하였다. 비뇨기 엑소좀은 이전에 보고된 프로토콜에 따라 분리하였다(Fernandez-Llama et al. 2010). 구체적으로, 전립선암(PC) 환자와 건강한 대조군으로부터 인간 소변 샘플(30mL)을 수집하고 4°C에서 10분 동안 200 x g에서 원심분리 후 4°C에서 20분 동안 2000 x g에서 원심분리하여 세포, 세포 파편 및 미세세포를 폐기하였다. 무세포 소변을 수득한 후, 이 샘플을 DTT(200mg/mL)로 37°C에서 10분 동안 17000xg에서 추가로 원심분리하여 소변 단백질을 제거하였다. 엑소좀을 포함하는 상등액을 10kDa 분자량 컷오프 멤브레인(Amicon Ultra, Merck Millipore, USA)이 있는 15mL 원심 필터로 500 μ L 최종 부피로 하여 농축하였다. 이후 크기 배제 크로마토그래피(qEV column, Izon Science Ltd., New Zealand)를 사용하여 상기 농축된 상등액에서 엑소좀을 분리하였다. 또한 샘플의 용출은 제조사의 프로토콜에 따라 0.5mL 분획에서 인산염 완충 식염수(PBS)를 사용하여 샘플 용출을 수행하고, 농축 엑소좀을 포함하는 분획 7 내지 11을 수집하였다. 상기 용출액은 0.5mL 원심 필터(Amicon Ultra, Merck Millipore)를 사용하여 ~200 μ L의 최종 부피로 추가 농축하였다. 다음으로, 제조업체가 제공한 프로토콜에 따라 Total Exosome RNA 및 Protein Isolation Kit(Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 농축된 엑소좀에서 Exosomal miRNA를 추출하였다. 상기 miRNA를 포함하는 정제된 용액(10 μ L)을 5x SSC로 200 μ L로 희석하였다.

[0117] 실험예 6: 3D SERS 바이오센서를 이용한 엑소좀 miRNA 검출

[0118] SERS 기판에 miRNA를 포함하는 샘플을 인큐베이션한 후 기판을 실리콘 젤로 슬라이드 유리에 고정하였다. miRNA의 SERS 신호는 맞춤형 라만 현미경(NOST, Korea)으로 측정하였다. 785 nm 파장 여기 레이저는 직립 현미경(Eclipse Ni-U, Nikon)에 설치된 대물 렌즈(TU Plan ELWD 100x 공기 대물 렌즈, Nikon, Japan; 개구수 0.6, 작동 거리 0.56 mm)로 집속되었다. 레이저 파워는 PM100 파워미터(Thorlabs, USA)로 10.67 mW로 조정하였다. 신호는 30번의 누적으로 0.5초 노출 시간 동안 샘플을 레이저에 노출시켜 생성되었다. 공초점 슬릿 크기와 ND(Neutral Density) 필터 비율은 각각 120 μ m 및 16%로 설정되었다. 라만 신호는 Newton 920 전하 결합 소자(CCD) 카메라(Andor Technology, UK)에 연결된 FEX 분광기(NOST)를 사용하여 처리되었다. 각 매핑 측정에 대한 라만 매핑은 1 μ m 단계 크기의 50 $\times$ 50 μ m² 정사각형 영역에서 수행되었다. 획득한 데이터는 RAON-Vu 소프트웨어(NOST), Sigmaplot 10 소프트웨어(Systat Software Inc., CA, USA) 및 Origin 8 소프트웨어(OriginLab, MA, USA)로 분석하였다.

[0120] **실험예 7: 정량적 역전사 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR) 분석**

[0121] qRT-PCR 방법으로 임상 샘플의 소변 엑소솜 miRNA 발현 수준을 정량화하였다. 최적화된 제조업체 조건에서 TaqMan miRNA 역전사 키트(Applied Biosystems, USA)로 소변 엑소솜(1-10ng, 15 μ L 반응 부피)에서 총 RNA의 역전사를 수행하였다. Real-time qPCR은 Step One Plus real-time PCR 시스템(Applied Biosystems)에서 TaqMan Universal PCR master mix II(2 $\times$, Applied Biosystems)와 함께 TaqMan miRNA 분석 키트를 사용하여 수행하였다. 이 때, 단계 사이클 조건은 10분 동안 95 $^{\circ}$ C, 15초 동안 95 $^{\circ}$ C 및 1분 동안 60 $^{\circ}$ C의 40 사이클이 연속하여 수행하였다. 이후 SDS 소프트웨어(v2.0.1; Applied Biosystems)를 사용하여 miRNA의 주기 임계값(Ct) 값을 얻었으며, miRNA의 상대적 발현 수준은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 내인성 대조군 RNA(U6 RNA)에 의해 정규화하였다(Folini et al. 2010).

[0123] **실시예 1: 계층적 3D 플라즈몬 나노필러 구조체와 SERS 바이오센서의 준비 및 특성화**

[0124] SERS로 엑소솜 miRNA의 임상 수준 검출에 충분한 감도를 보장하기 위해서는 고밀도 플라즈몬 핫스팟이 있는 플라즈몬 나노필러 구조를 제작하여 근거리장의 강력한 증폭을 생성하는 것이 필수적이다. 이를 위해, 표적 소변 엑소솜 miRNA의 매개를 통해 플라즈몬 헤드 플록키드 금 나노필러 SERS 기질과 자가 조립 DNA 프로브가 접합된 금 나노 입자(SAP-AuNPs) 기반의 SERS 바이오 센서를 제작하여 수많은 강력한 전자기장 증폭을 유도하는 직접 3D 핫스팟을 생성하였다.

[0125] 먼저, 이전 연구를 따라 실리콘 웨이퍼의 마스크리스 반응성 이온 에칭과 전자빔 증발로 플라즈몬 금 나노필러 구조체를 제조하였다(Kim et al. 2019b; Lee et al. 2019). 이 탄성 나노필러 구조체가 Wenzel 상태(즉, 용매에 완전히 젖음)일 때, 나노필러 사이에 생성된 탄성-모세관 힘은 나노필러 헤드를 구동하여 기관의 전체 표면에 걸쳐 플라즈몬 핫스팟을 형성하고 모이도록 하였다(Wang et al. 2018). 여기에 SERS 센서의 감도를 높이고 임상 적용 가능성을 향상시키기 위하여, SAP-AuNP를 추가로 적용하여 주기적 나노필러와 SAP-AuNP 사이의 3D 공간으로 플라즈몬 핫스팟을 확장하는 계층적 플라즈몬 나노구조를 제조하였다. 이렇게 계층적 나노구조를 형성한 후, miRNA를 검출하기 위해 샌드위치 하이브리드화 방법, 즉 두 개의 하프(half)-complementary DNA 프로브인 포획(capture) 및 검출(detection) 프로브를 사용하여 표적 miRNA를 인식하여 다양한 물질을 포함하는 복잡한 생체 유체 환경에서 표적 서열이 인식되도록 하여 오류를 줄일 수 있도록 하였다. 간접 생체 분자(Afzalnia and Mirzaee 2020; Goldman et al. 2013; Kim et al. 2019a). 표적 miRNA가 존재할 때, 반-상보적 DNA 검출 프로브 가닥으로 기능화된 SAP-AuNP는 AuNP와 나노기둥 헤드 사이의 공간에 표적 miRNA를 가두어 3D 핫스팟을 형성한다.

[0126] 먼저, AuNP에 대한 검출 DNA 프로브의 접합은 UV-가시광선 스펙트럼의 이동과 X선 광전자 분광법(XPS)의 피크 정보로 확인하였다. 도 2에서 확인할 수 있는 것과 같이, 말단에 티올기가 있는 DNA 프로브는 Au-S 결합으로 AuNP에 고정화되어 SAP-AuNP를 형성하였다. 검출 프로브가 AuNP 표면에 결합됨에 따라 UV 가시 스펙트럼은 519 nm에서 520.5 nm로 적색 이동되었다(도 2A). 또한, SAP-AuNP의 XPS 스펙트럼에서 Au4f 및 S2p 피크의 존재는 DNA가 AuNP에 고정화되어 Au-S 결합이 생성되었음을 의미한다(도 2B). 이러한 결과는 miRNA를 확인하기 위한 SAP-AuNP가 성공적으로 합성되었음을 나타낸다.

[0127] 한편, 계층적 나노구조에서 SAP-AuNP에 의한 향상 효과를 확인하기 위해, 3D FDTD(finite-difference time-domain) 시뮬레이션을 수행하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, FE-SEM(field-emission scanning electron microscope) 이미지로 관찰한 결과, 헤드 플록키드(head-flocked) 금 나노필러 구조체에서 표적 miRNA와 포획 DNA 프로브 및 SAP-AuNP의 하이브리드화에 의해, 3D 계층 구조가 생성되는 것을 확인하였다(도 1, 도 3 내지 4). 이러한 SEM 이미지로 본 발명의 구조는 두 개의 나노 필러(기둥)가 서로를 향해 기울어져 있고, 하나의 SAP-AuNP가 나노 기둥 헤드 사이의 간격 위에 배치되는 것을 확인할 수 있었다. 그 결과, SAP-AuNP와 나노필러 구조체 헤드 사이에 형성된 플라즈몬 핫스팟이 갭에 위치한 miRNA의 라만 신호를 크게 증폭하는 것을 알 수 있었다(도 5A, 5B)(Zhang et al. 2018). 특히, SAP-AuNP 크기가 전기장 증폭에 미치는 영향을 4가지 크기의 SAP-AuNP(5, 15, 30, 50 nm 크기)로 확인하였는데, 도 6에서 확인할 수 있는 것과 같이, 시뮬레이션 결과에서 15nm SAP-AuNP가 갭에서 가장 강한 근거리장 향상을 유도하는 것을 확인할 수 있었다(도 5 및 도 6). 또한, 15nm SAP-AuNP가 맨 헤드 플록키드(bare head-flocked) 나노필러 구조체 구조보다 4배 더 강력한 SERS 향상 효과를 가짐을 확인하였다(도 5 및 도 6). 이는 나노입자의 표면 곡률로 인한 것으로서, AuNP 크기가 증가함에 따라 입자 표면의 불록함이 감소하여 나노 입자에 대한 빛의 흡수 또는 비탄성 산란이 감소하여 표면 전자기장을 약화시키고 전체 SERS 강도를 낮추며, 대조적으로, 5nm SAP-AuNP의 경우 AuNP의 크기가 AuNP와 나노기둥 헤드 사이

의 간격(~8nm, 22-뉴클레오타이드 miRNA의 길이에 해당)에 비해 상당히 작기 때문에 결과적으로 플라스몬 결합 효과에 의해 유도된 근거리 증폭의 부재하기 때문인 것으로 확인하였다. 이러한 결과로 SAP-AuNP가 SERS 신호 향상에 크게 기여하여 플라스몬 나노 아키텍처에서 miRNA 검출에 대한 감도를 향상시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

[0128] 다음으로, 시뮬레이션의 정당성을 평가하기 위하여, miR-21을 사용하여 SERS 신호의 실험적 측정을 수행하였다. 먼저, miR-21에 고유한 1376cm^{-1} 피크에서의 라만 강도는 나노 입자 크기가 다른 계층적 나노 아키텍처의 다양한 구성에서 비교하였다. 그 결과, 다양한 크기의 SAP-AuNP를 추가하면 시뮬레이션 결과에 표시된 추세에 따라 신호가 향상되었으며, 그 중에서도 가장 강한 신호는 15nm 크기의 SAP-AuNP에서 생성되는 것을 확인하였다. 실제로 15nm 크기의 SAP-AuNP는 SAP-AuNP가 없는 헤드 플록키드(head-flocked) 나노필러 구조체보다 2.9배 더 강한 신호 향상을 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 본 발명의 계층적 나노구조에서 유도된 3D 플라스몬 핫스팟이 더 강한 SERS 신호를 증폭하며, 이러한 신호 증폭으로 생체 유체에 극도로 미량으로 존재하는 miRNA를 포함한 표적 바이오마커의 라벨 없는 직접 검출을 가능하게 함을 시사한다.

[0130] 실시예 2: 본 발명의 SERS 바이오센서의 miRNA 센싱 성능 평가

[0131] 시간이 지남에 따라 SERS의 감도가 향상되었으나 분석물의 정량화에서 낮은 재현성과 균일성의 문제가 발생하였다(Jarvis et al. 2008). 따라서 miRNA 정량화에서 계층적 구조를 기반으로 하는 본 발명의 3D SERS 센서를 활용하기 위해, PC와 관련된 두 개의 miRNA(miR-10a 및 miR-21)를 사용하여 센서의 균일성을 평가하였다. 그 결과, 도 8에 도시된 바와 같이, 본 발명의 3D SERS 나노구조 기반 센서는 작은 표준 편차(SD)로 100nM 농도의 두 miRNA에 대한 기관의 매핑 영역(2500포인트)에 걸쳐 높은 신호 균일성을 나타내는 것을 확인하였다. 특히, SERS 스펙트럼은 두 개의 miRNA가 서로 다른 서열과 염기 비율을 가지기 때문에 서로 다른 피크 강도를 나타내는데, miR-10a는 1143cm^{-1} 위치에서 일관되게 강한 피크를 생성하며, miR-21은 Adenine CH3 변형에 대해 1376cm^{-1} 에서 특징적인 피크를 보이는 것을 확인하였다. (Kim et al. 2019b). 이는 정상 라만 스펙트럼에서도 나타나므로 이를 각 miRNA의 대표적인 지문 피크로 선택하였다. 하기 표 2는 miR-10a 및 miR-21에 대한 SERS 지문 피크에 대한 설명이다.

표 2

[0132] miR-10a 및 miR-21에 대한 SERS 지문 피크

Target miRNA	Wavenumber (cm^{-1})	Assignment
miR-10a	825	Adenine ring deformation
	930	Ribose vibration
	1143	Adenine C-N vibration
	1290	Cytosine C-N vibration
	1410	Adenine ring stretching
	1490	Guanine ring stretching
miR-21	730	Adenine ring breathing
	880	Adenine ring breathing
	995	Guanine ring stretching
	1240	Cytosine/Uracil ring stretching
	1376	Adenine ring stretching/C-H bending

[0133] miR-10a(1143cm^{-1}) 및 miR-21(1376cm^{-1})에 대한 특성 피크의 상대 표준 편차(RSD)는 각각 5.52 및 4.92%였다(도 8). 신호 균일성은 본 발명의 SERS 센서 표면에서 $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ 의 정사각형 영역에 대한 라만 강도의 매핑과 $1\mu\text{m}$ 직경의 레이저 스폿 크기로 추가로 확인되었다(도 7C 및 7D). 3D 계층적 SERS 기관을 기반으로 하는 본 발명의 SERS 센서는 miR-10a 및 miR-21에 대한 miRNA 부착에 대한 응답으로 지문 피크 및 스펙트럼에서 균질한 SERS 신호 강도를 나타냈다. 또한, 표적 miRNA가 없는 3D SERS 플랫폼의 DNA 프로브 및 배경 SERS 신호의 라만 활성으로 인해, 표적 miRNA의 SERS 스펙트럼에 대한 교란이 확인되지 않았다(도 9). 이러한 결과는 본 발명의 SERS 센서가 정확하고 신뢰할 수 있는 진단 결과를 가지기 위해 필요한, miRNA 검출을 위한 균일하고 재현 가능

한 SERS 신호를 생성함을 나타낸다.

[0135] 한편, 인체에는 2,300개의 miRNA가 존재하는 것으로 추정되며(Alles et al. 2019), 그 중 일부는 상동 miRNA 패밀리 그룹으로 분류되고 패밀리 그룹의 구성원 간에는 1개 또는 2개의 뉴클레오티드만 차이가 있는 것으로 보고된다(Dong et al. 2014, Garcia-Rico et al. 2018, Ye et al. 2019). 따라서, 이들 miRNA 사이의 높은 서열 상동성으로 인해, 질병 진단에 적용하기 위한 miRNA 바이오센서는 단일 뉴클레오티드 차이를 갖는 miRNA의 특이적 구별을 필요로 한다. 이러한 측면에서 본 발명의 SERS 바이오 센서의 특이성을 평가하기 위해, 완벽하게 일치하는 표적 miRNA의 신호 강도에서 SERS 신호 강도를 두 개의 서로 다른 단일 염기 불일치 miRNA(유형 A 및 유형 B)와 비교하였다. 구체적으로, 상기 표 1에서 확인할 수 있는 것과 같이, A형 miRNA는 검출 프로브에 상보적인 서열에 단일 불일치 부위가 있는 반면, B형 miRNA는 포획 프로브-상보적 서열에 단일 불일치가 있다(표 1). miR-10a의 경우 1143 cm^{-1} 및 miR-21의 경우 1376 cm^{-1} 의 SERS 신호 강도를 측정하고 단일 염기 불일치 miRNA와 완전히 일치하는 것을 비교하였다(도 10). 그 결과, 도 10에서 확인할 수 있는 것과 같이, 동일한 농도(100nM)에서 강렬한 SERS 신호는 완벽하게 일치하는 표적 miRNA에서만 얻은 반면, 모든 단일 염기 불일치 miRNA(유형 A 및 B 모두)는 인식할 수 있는 SERS 신호를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 본 발명의 3D SERS 바이오센서가 PC 관련 엑소좀 miRNA의 표지 없는 검출에 필요한 다른 miRNA 서열과의 교차 반응성 및 교차 하이브리드화 없이 단일 뉴클레오티드 수준의 특이성을 가짐을 나타낸다.

[0136] 다음으로, 엑소좀은 체액에 극소량 존재하기 때문에 엑소좀 miRNA를 감지하는 센서는 매우 높은 감도를 필요로 하며 이상적으로는 대퇴골 감지 한계 아래에서 필요하다(Blondal et al. 2013; Max et al. 2018; Wang et al. 2020). 따라서, 생체 유체 환경에서 PC 관련 miRNA를 표적으로 하는 본 발명의 3D SERS 바이오 센서의 검출 한계 및 동적 검출 범위를 확인하였다. 구체적으로, 각각의 표적 miRNA 샘플을 인간 혈청에서 100 nM에서 1 aM으로 순차적으로 희석하여 제조하고, 대조군으로 비특이적 miRNA 서열을 제조하였다(표 1). 그런 다음 농도 구배에 걸쳐 측정된 miRNA 샘플의 SERS 스펙트럼을 도 11에 나타냈다. 그 결과, 도 11에서 확인할 수 있는 것과 같이, 각 miRNA의 SERS 지문 피크에서의 신호는 결핍 농도(~10 aM)에서도 검출되었으며, 이를 통해 본 발명의 3D SERS 바이오센서가 표적 miRNA에 대한 검출 한계가 현저히 낮음을 확인할 수 있었다. 특히, miR-10a 및 miR-21에 대한 각 지문 피크 강도는 10 aM에서 100 nM까지의 넓은 농도 범위의 좋은 선형 상관 관계를 가짐을 확인하였다. miRNA 농도와 SERS 강도의 정량적 상관 관계를 확인하기 위해 miRNA 특정 피크 강도를 표적 miRNA 농도에 맞춰 선형 회귀를 플로팅했다. 이 때, 선형 회귀 방정식은 다음과 같다.

$$y = 22920 \log x + 1529.6, R^2 = 0.968$$

[0137] miR-10a를 위한 식: , 및

$$y = 23039 \log x + 5118.1, R^2 = 0.970$$

[0138] miR-21을 위한 식: ,

[0139] 여기서 x는 miRNA 농도임.

[0140] 표적 miRNA에 대한 모든 선형 회귀는 대표적인 SERS 피크 강도와 miRNA 농도의 로그 사이에 우수한 상관관계($R^2 > 0.96$)를 나타냈다. 평가된 검출 한계는 화학적 표지 없이 miR-10a 및 miR-21 모두에 대해 낮았다. 이전에 보고된 무표지 SERS 센서(Kim et al. 2019b) 및 형광 또는 전기화학 센서를 포함한 기타 증폭 방법(Chen et al. 2020; Li et al. 2020; Liu et al. 2020; Wan et al. 2020, Zhang et al. 2017) 대비, 본 발명의 3D SERS 바이오센서 1,000배 이상의 낮은 검출 한계를 보임을 확인하였다(하기 표 3).

표 3

[0141] miRNA 검출에 대한 다른 문헌과 검출 한계 비교

Detection method	Target	Detection limit	Ref.
Fluorescence	let-7a	70.9 fM	Chen et al., 2020
Fluorescence	miR-21	55 fM	Li et al., 2020
Electrochemiluminescence	let-7a	120 fM	Liu et al., 2020
Electrochemical	miR-486-5p	10 fM	Wan et al., 2020
SERS	miR-141	100 fM	Zhang et al., 2017

SERS	miR-10b, 21, 373	3.53, 2.17, 2.16 fM	Kim <i>et al.</i> , 2019b
SERS	miR-10a, 21	10 aM	This work

[0143] 이러한 본 발명의 바이오센서의 우수한 검출 한계는 3D 플라즈몬 핫스팟에서 유도된 탁월한 전기장 향상과 계층적 나노 아키텍처의 3D 핫스팟 내부의 표적 miRNA의 감금에서 비롯된 것으로 해석할 수 있다. 따라서, 소변에 있는 뇨 엑소좀 miRNA의 회소성과 PC 환자와 건강한 개인 사이의 농도 차이가 크다는 점을 고려할 때 (Bryzgunova et al. 2016), 감지 한계가 매우 낮고 동적 범위가 넓은 본 발명의 SERS 센서는 진단 응용을 위한 뇨로 엑소좀 miRNA의 검출에 적합함을 시사한다.

[0145] 실시예 3: 소변 샘플에서 PC 환자의 임상적 구별

[0146] PC 환자의 소변 엑소좀에는 miRNA를 비롯한 고유한 PC 특이적 바이오마커가 포함되어 있으며, 여기서 엑소좀 miRNA는 PC의 초기 단계 진단과 환자 예후 및 치료에 대한 맞춤형 접근에서 특히 중요한 바이오마커이다. 비뇨기 엑소좀 miRNA에 대한 관심이 증가하고 있음에도 불구하고, PC 진단을 위한 실용적인 비뇨 엑소좀 miRNA 기반 바이오센서의 개발은 소변의 복잡한 구성 및 엑소좀의 낮은 농도와 같은 몇 가지 중요한 단점으로 인해 여전히 도전적인 상태이다(Leung et al. 2021, Li et al. 2019).

[0147] PC 진단에 있어 잠재력이 있음을 확인하기 위해, 본 발명의 라벨이 없는(무표지) 3D SERS 시스템을 적용하여 10명의 PC 환자와 5명의 건강한 대조군으로부터 얻은 임상 소변 샘플에서 엑소좀 miRNA를 정량화하였다(표 4).

표 4

[0148] 소변 검체의 임상적 특징 요약

Characteristics	Category	Healthy controls (n=5)	PC patients (n=10)
Age (years)	≤ 30	3 (60 %)	-
	31-69	2 (40 %)	3 (30 %)
	≥ 70	-	7 (70 %)
	Mean ± SD	29.6 ± 1.9	73.3 ± 7.0
Prostate-specific antigen (ng/mL)	≤ 4.0	4 (80 %)	5 (50 %)
	4.1-10.0	1 (20 %)	1 (10 %)
	10.1-20.0	-	1 (10 %)
	≥ 20.0	-	2 (20 %)
	Mean ± SD	1.84 ± 1.59	37.55 ± 90.04
Gleason score	< 7	-	1 (10 %)
	≥ 7	-	7 (70 %)
	Not available	-	2 (20 %)
Cancer stage	IV	-	10 (100 %)

[0149] 이후, 종양 세포에서 소변으로 방출된 정제된 엑소좀을 표면 단백질 발현 및 형태학적 이미지를 분석하였다. 그 결과 확인된 투과전자현미경 이미지는 비뇨기 엑소좀의 형태가 직경이 30~100 nm인 구형임을 보여주었다. 정제된 엑소좀에 대한 웨스턴 블로팅 결과는 엑소좀 관련 단백질 마커(ALIX 및 CD9)가 PC 환자와 건강한 대조군 모두의 뇨 엑소좀에 존재하는 반면, 비 엑소좀 마커(calnexin)는 부재하는 것으로 확인되었다.

[0150] 다음으로, 소변 샘플에서 엑소좀 miRNA를 추출한 후, 본 발명의 라벨이 없는 3D SERS 바이오센서로 측정된 SERS 스펙트럼과 qRT-PCR 결과를 도 12에 나타내었다. 도 12는 상자 플롯으로 표시된다. 그 결과, 도 12에서 확인할 수 있는 것과 같이, qRT-PCR과 3D SERS 센서의 측정 결과에서 건강한 대조군보다 PC 환자에서 표적 miRNA의 발현 수준이 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 PC에서 두 miRNA의 농도 증가를 보고하는 문헌과 일치한다(Foj et al. 2017; Worst et al. 2020). 두 임상 그룹 간의 엑소좀 miRNA 발현 수준의 통계적으로 유의한 차이를 평가하기 위한 p-값을 계산하였다. 그 결과, qRT-PCR과 본 발명의 3D SERS 센서 모두 miRNA 농도와 PC 발생 사이에서 동일한 경향을 나타내었으나, qRT-PCR은 두 miRNA에 대해 0.01보다 큰 p-값을 가졌던 반면(miR-10a:

0.12, miR-21: 0.067), 본 발명의 무표지 SERS 3D 바이오센서의 p-값은 0.01 미만이었다(miR-10a: 0.0068, miR-21: 0.0035). p-값이 낮을수록 그룹 간에 통계적으로 더 유의한 차이가 있음을 고려할 때 (Berkson 2003; Lenzi et al. 2021), 이 결과는 본 발명의 3D SERS 센서가 miRNA의 농도와 PC 발생의 관계를 qRT-PCR보다 더 명확하게 보여주고 질병 진단에 대한 임상적 신뢰도가 더 높음을 시사하는 것이다.

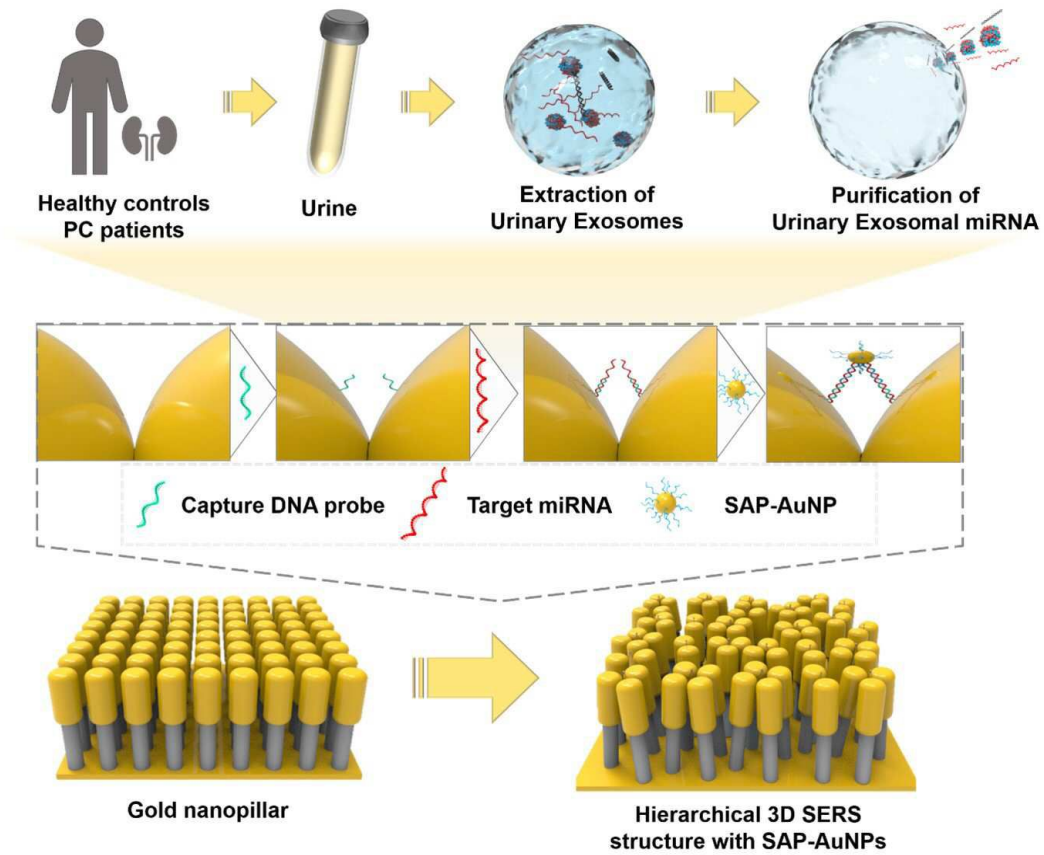
[0151] 마지막으로, ROC(수신기 작동 특성) 플롯을 사용하여 본 발명의 3D SERS 바이오센서를 사용한 PC 진단의 임상적 민감도와 선택성을 추가로 평가하였다. ROC 그래프에서 AUC(area under the curve)는 진단 성능을 나타내며, 여기서 중요하지 않은 진단 방법은 AUC가 0.5에 가까우며 값이 1이면 양성 및 음성 샘플 간의 완벽한 구별을 나타낸다(Berrar and Flach 2012). 그 결과 도 12c에서 확인할 수 있듯이, miR-10a 및 miR-21을 사용한 PC 진단을 위한 qRT-PCR 및 본 발명의 SERS 바이오센서의 ROC 곡선에서, 본 발명의 3D SERS 바이오센서가 PC 환자의 진단을 위해 뛰어난 고감도와 선택성을 가지고 있음을 보여준다. 표적 miRNA에 대한 본 발명의 3D SERS 바이오센서의 AUC는 miR-10a의 경우 0.96(95% 신뢰 구간(CI) 0.87-1.00)이고, miR-21의 경우 0.98(95% CI: 0.91-1.00)인 반면, qRT-PCR은 miR-10a의 경우 각각 0.88(95% CI: 0.70-1.00), miR-21의 경우 0.88(95% CI: 0.71-1.00)이었다. 결국, 본 발명의 3D SERS 바이오센서를 사용한 miRNA 기반 PC 진단은 miR-10a 및 miR-21 모두에 대해 0.93의 정확도를 가지며(도 13), 이는 다른 문헌에서 보고된 혈청 PSA 기반 PC 진단의 정확도보다 크게 향상된 결과이다. 따라서 이러한 결과는 본 발명의 계층적 SERS 기질을 사용하는 표지 없는 3D SERS 바이오센서가 엑소좀 유래 노 miRNA를 효과적으로 검출함으로써 PC를 진단하는 데 있어 탁월한 임상 잠재력을 가짐을 입증하는 것이다.

[0153] 종합하면, 본 발명의 SERS 기반의 라벨이 없는 바이오센서는 표적 miRNA에 의해 유도된 플라즈몬 헤드 플록키드(head-flocked) 금 나노필러 SERS 기질과 SAP-AuNP의 자가 조립으로 3D 계층적 나노 아키텍처를 구축한 후, 이로 인해 생성된 3D 나노 아키텍처의 균일하고 풍부한 나노갭은 표적 miRNA의 고유한 SERS 지문 피크의 강렬한 확대로 이어져 표적 miRNA에 대한 초민감성(~10 aM) 및 단일 뉴클레오타이드 수준에서의 특이적 검출 성능을 나타낸다. 나아가, PC 진단용 SERS 센서의 임상 정확도는 PC 관련 요 엑소좀 miRNA의 차등 발현 분석을 사용하여 PC 환자를 건강한 대조군과 구별함으로써 검증되었다. 특히, 본 발명의 바이오센서의 진단 성능은 기존 qRT-PCR보다 훨씬 우수하여 PC 진단을 위한 SERS 기반 miRNA 센서의 잠재력을 시사한다. 따라서 본 발명의 3D SERS 센서가 생체 유체에서 단백질 또는 무세포 핵산과 같은 다양한 질병 관련 miRNA 및 기타 미량 바이오마커를 검출하기 위한 다목적 플랫폼 역할을 할 것으로 기대된다.

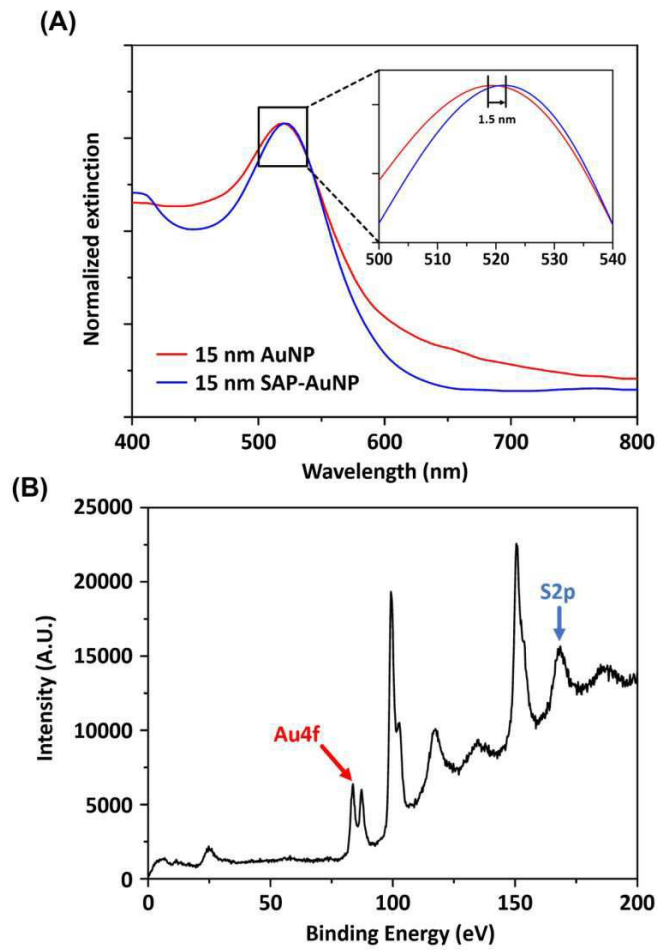
[0155] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

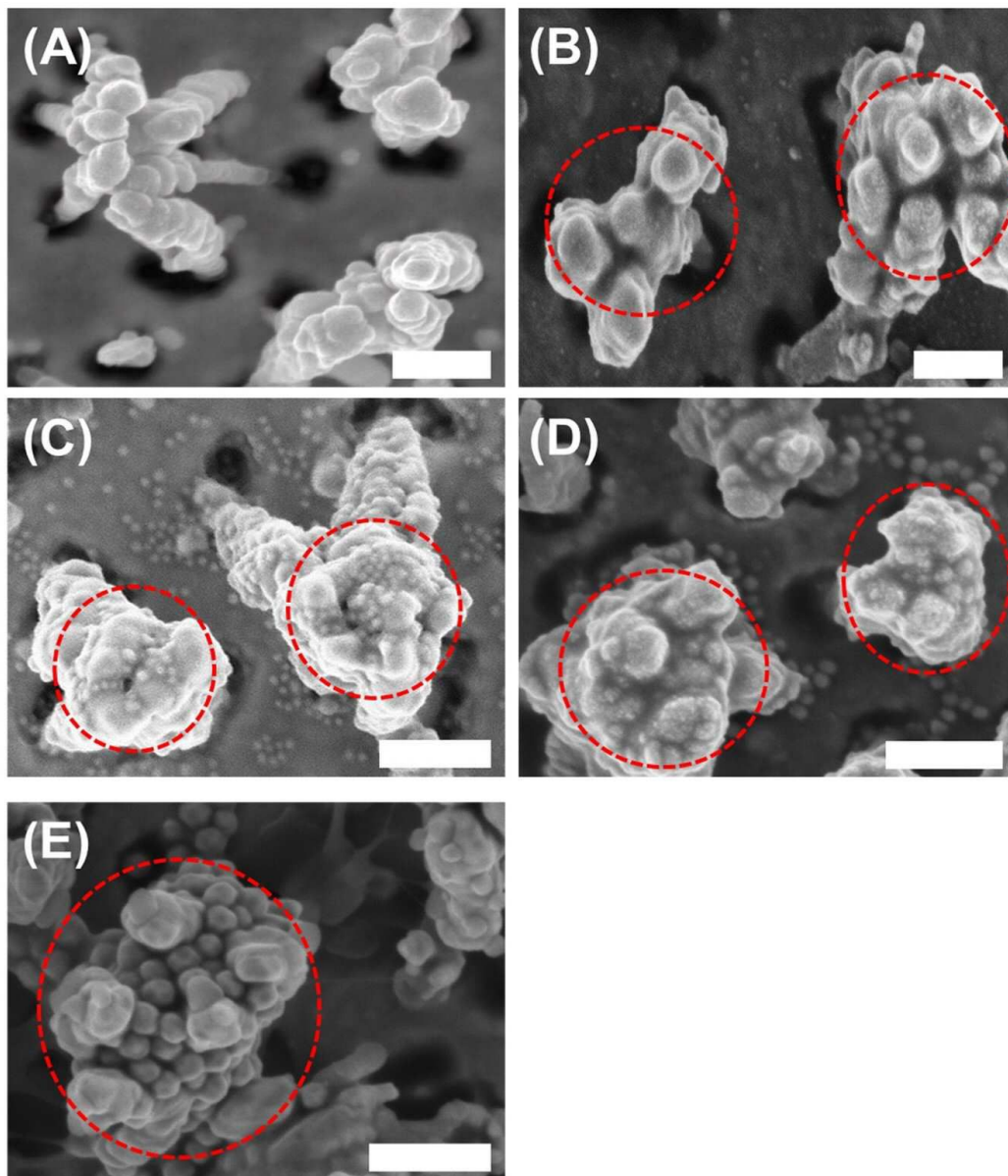
도면1



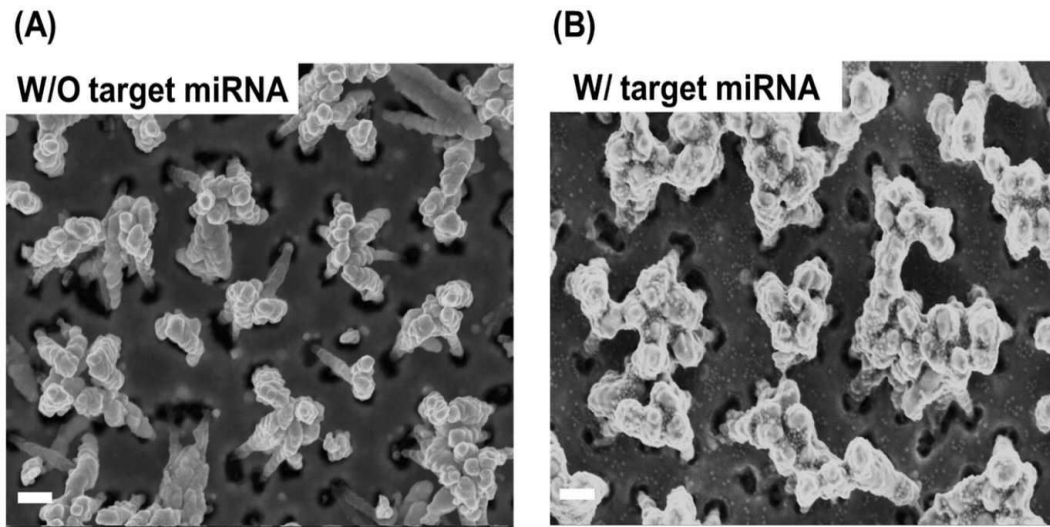
도면2



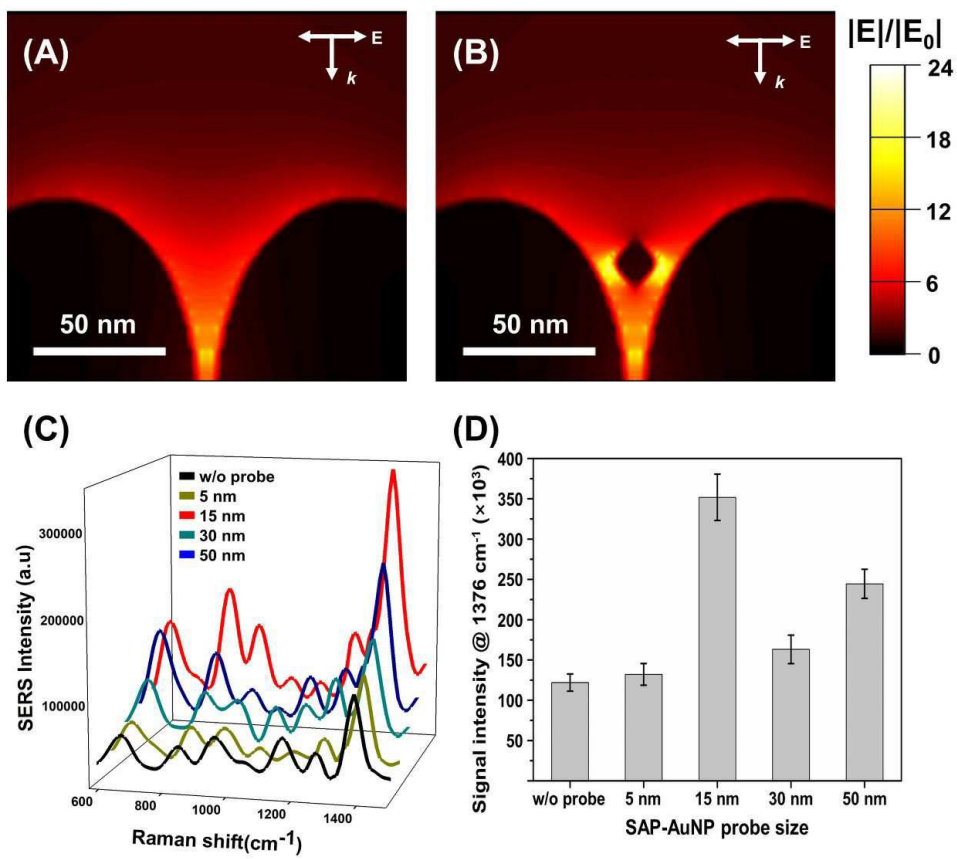
도면3



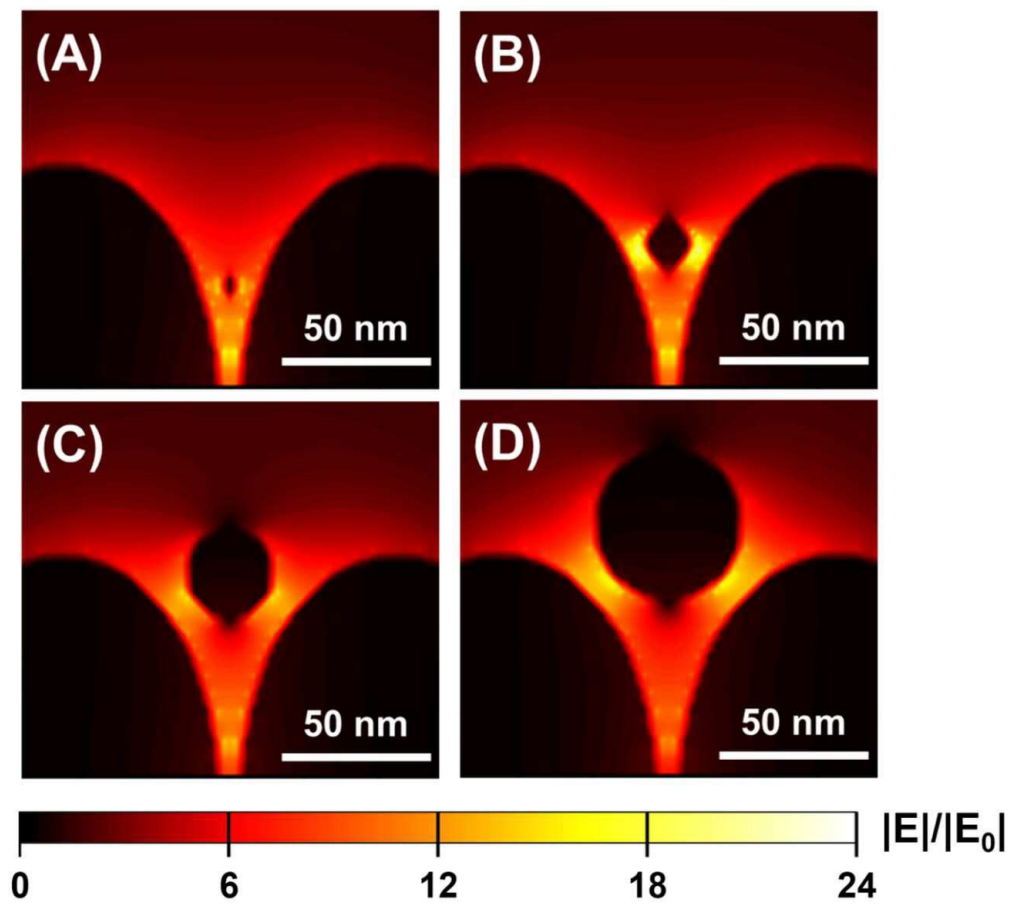
도면4



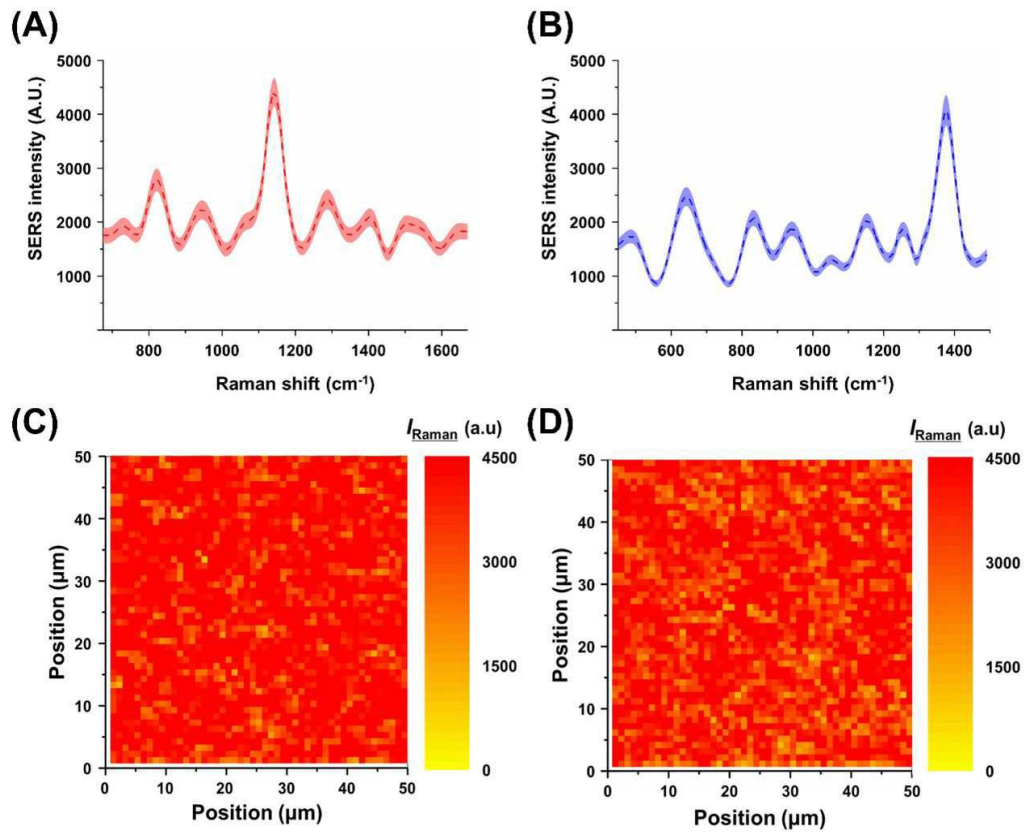
도면5



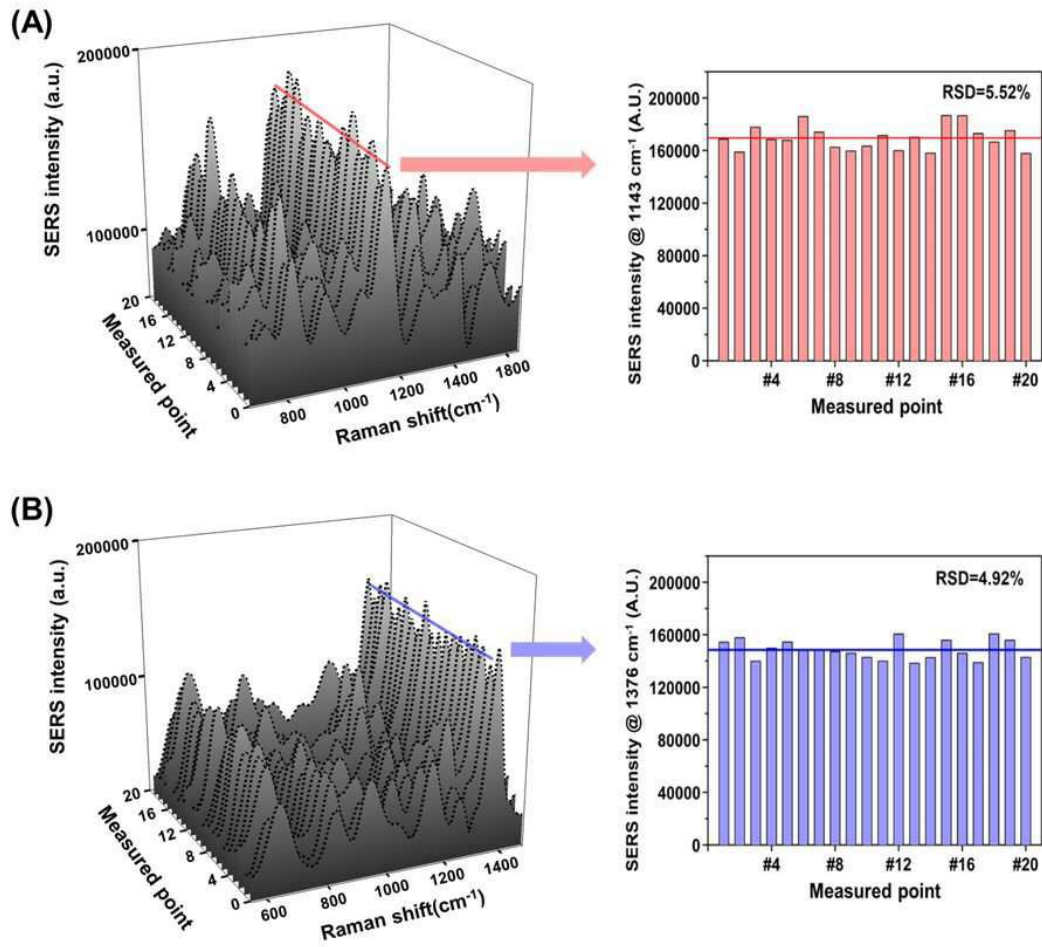
도면6



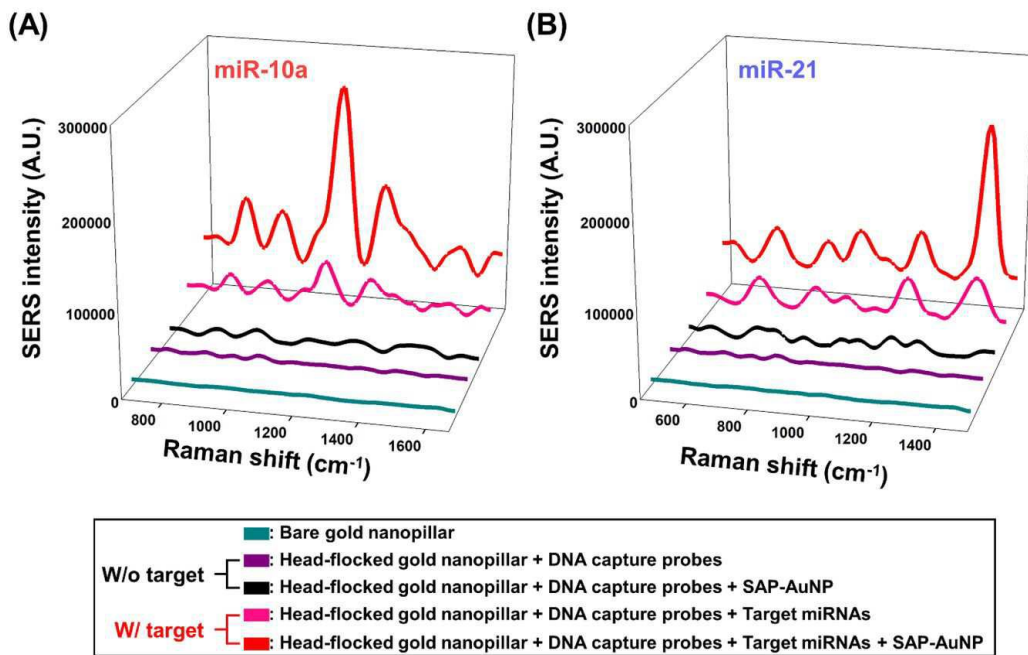
도면7



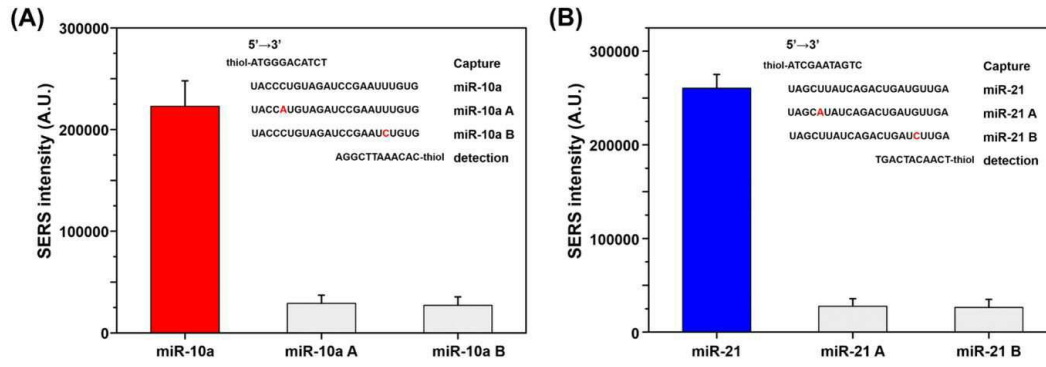
도면8



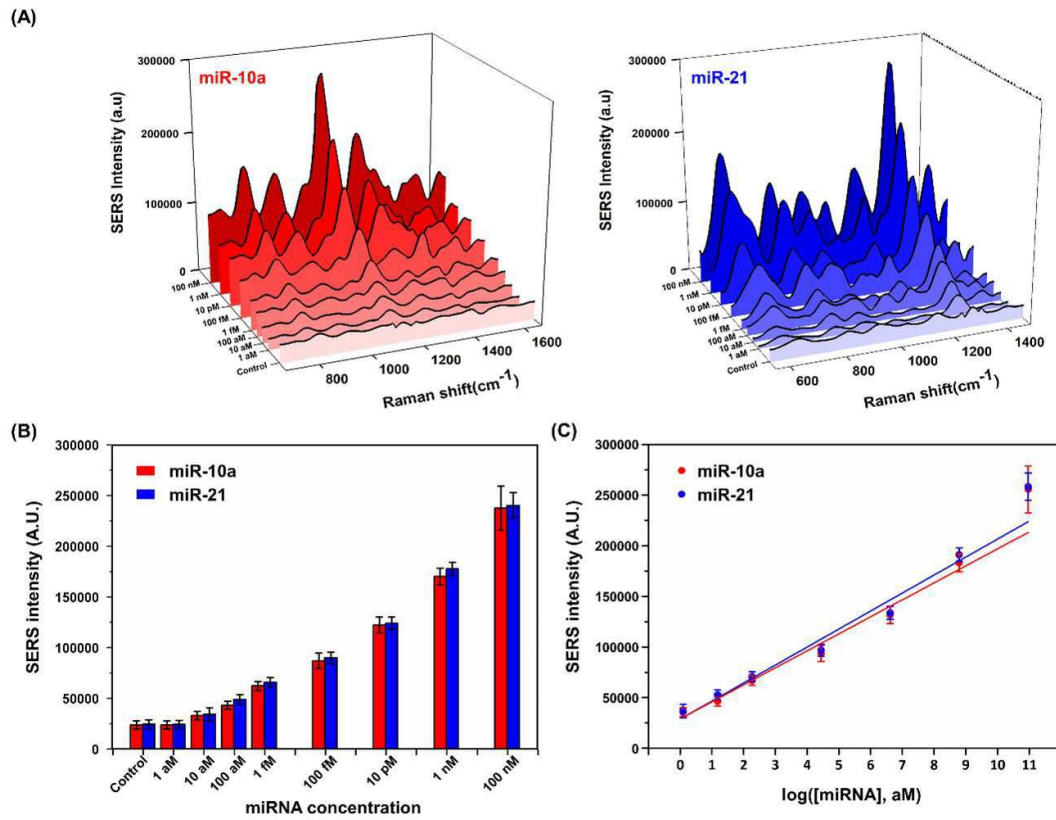
도면9



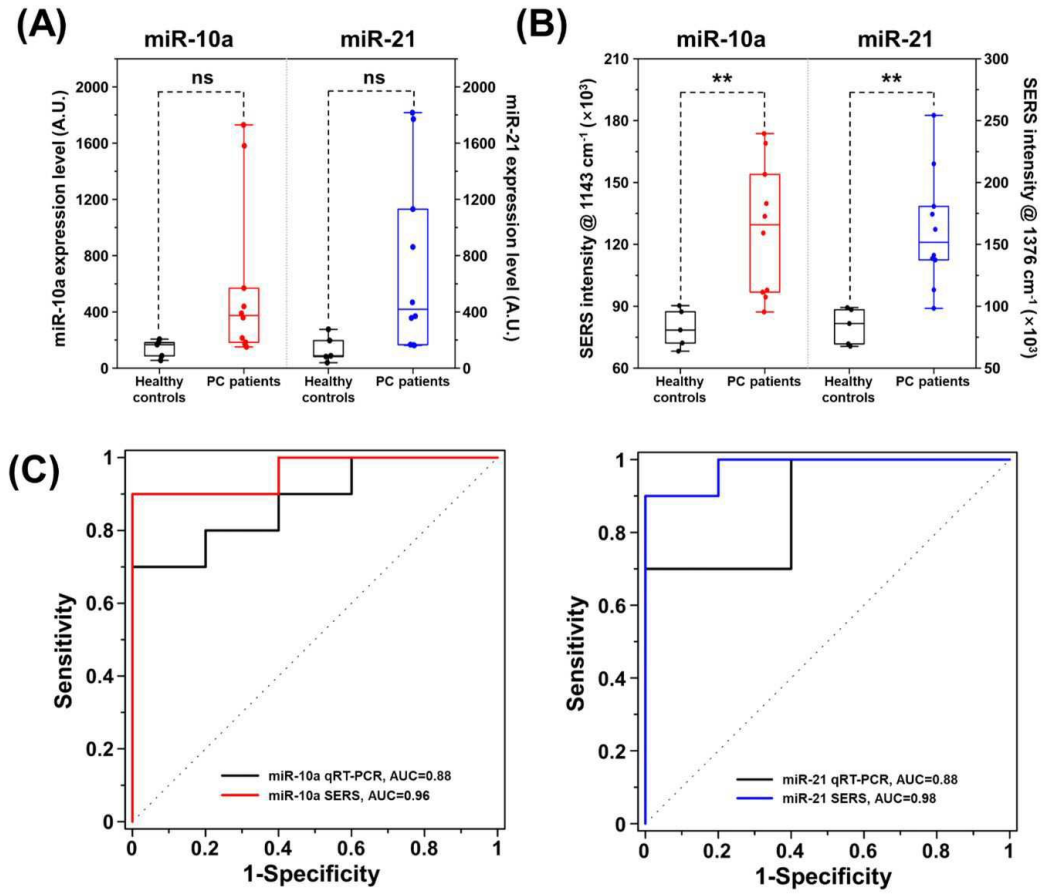
도면10



도면11



도면12



도면13

(A)

		Prediction	
		PC	Normal
Reference	PC	9	1
	Normal	0	5

SE=0.9
SP=1
Acc=0.93

(B)

		Prediction	
		PC	Normal
Reference	PC	9	1
	Normal	0	5

SE=0.9
SP=1
Acc=0.93