

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0011338 (43) 공개일자 2013년01월30일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0072418 (22) 출원일자 2011년07월21일 심사청구일자 2011년07월21일	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교) 연세대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동) (72) 발명자 김동하 서울특별시 마포구 성미산로23안길 8, 노블레스아파트 501호 (연남동) 이지은 대구광역시 달서구 구마로36길 20, 그린맨션 208동 306호 (본동) 정경화 경기도 부천시 오정구 원종로93번길 51, 201동 805호 (원종동, 동제이지안2차아파트) (74) 대리인 특허법인엠에이피에스	

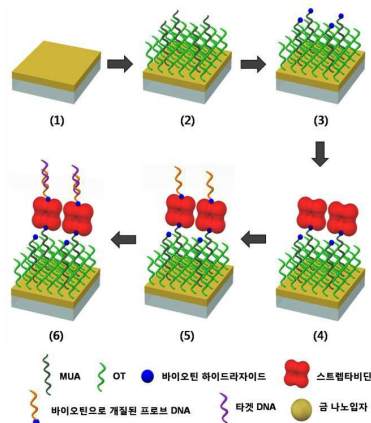
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 DNA 혼성화 결합 감지 센서, 및 그의 제조 방법

(57) 요약

표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR) 현상, 또는 표면 플라즈몬 공명의 커플링(coupling) 현상을 이용하여 DNA 혼성화 결합 여부를 감지하는 DNA 혼성화 결합 감지 센서, 상기 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법, 및 DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA의 검출 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10816
부처명	서울시정개발연구원
연구사업명	서울시 산학연 협력사업 (기술기반구축사업)
연구과제명	나노 기술을 이용한 바이오 융합산업 혁신 클러스터
주관기관	연세대학교 산학협력단, 이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2006.08.01 ~ 2011.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

기재 상에 형성된 금 박막 상에 자기조립 단분자층(self-assembled monolayer; SAM)을 형성하는 단계;
 상기 자기조립 단분자층에 바이오틴을 고정시켜 바이오틴 층을 형성하는 단계;
 상기 바이오틴 층에 스트렙타비딘을 고정시켜 스트렙타비딘 층을 형성하는 단계; 및,
 상기 스트렙타비딘 층에 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA를 고정시키는 단계;
 를 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
 상기 자기조립 단분자층은 티올기, 카르복실기, 아민기, -OH 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택되는 작용기를 가지는 자기조립 단분자층 형성용 화합물을 이용하여 형성되는 것인, DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
 상기 바이오틴은 바이오틴 하이드라자이드, NHS-바이오틴 (N-Hydroxysuccinimide-biotin) 또는 D-바이오틴을 포함하는 것인, DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
 상기 자기조립 단분자층에 바이오틴을 고정시켜 바이오틴 층을 형성하는 단계는, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물이 포함하는 작용기와 상기 바이오틴이 가지는 작용기 간의 반응을 통하여 공유결합을 형성함으로써 상기 자기조립 단분자층에 상기 바이오틴이 고정화되는 것을 포함하는 것인, DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,
 상기 기재 상에 형성된 금 박막 상에 은 콜로이드층을 형성하는 단계를 추가 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,
 상기 은 콜로이드층을 형성하는 단계는, 상기 기재 상에 형성된 금 박막 상에 상기 자기조립 단분자층을 형성한 후, 상기 기재를 은 이온-함유 전구체 용액에 침지시켜 상기 은 이온을 환원시킴으로써 은 콜로이드층을 형성하는 것을 포함하는 것인, DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 스트렙타비딘 층에 금 나노입자를 도입하는 단계를 추가 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 금 나노입자는 시트레이트(citrate) 리간드에 의하여 표면-개질된 것인, DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 기재 상에 형성된 금 박막 상에 은 콜로이드층을 형성하는 단계와 상기 스트렙타비딘 층에 금 나노입자를 도입하는 단계를 추가 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법.

청구항 10

기재 상에 형성된 금 박막 상에 형성된 자기조립 단분자층(self-assembled monolayer; SAM);

상기 자기조립 단분자층에 고정된 바이오틴을 포함하는 바이오틴 층;

상기 바이오틴 층에 고정된 스트렙타비딘을 포함하는 스트렙타비딘 층; 및,

상기 스트렙타비딘 층에 고정된 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA;

를 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 자기조립 단분자층은 티올기, 카르복실기, 아민기, -OH 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 작용기를 가지는 탄화수소 사슬을 포함하는 자기조립 단분자층 형성용 화합물을 이용하여 형성되는 것인, DNA 혼성화 결합 감지 센서.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 바이오틴은 바이오틴 하이드라자이드, NHS-바이오틴 (N-Hydroxysuccinimide-biotin) 또는 D-바이오틴을 포함하는 것인, DNA 혼성화 결합 감지 센서.

청구항 13

제 10 항에 있어서,

상기 기재 상에 형성된 금 박막과 상기 자기조립 단분자층 사이에 형성된 은 콜로이드층을 추가로 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서.

청구항 14

제 10 항에 있어서,

상기 스트렙타비딘 층에 도입된 금 나노입자를 추가 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 금 나노입자는 1 nm 내지 20 nm 크기를 가지는 것인, DNA 혼성화 결합 감지 센서.

청구항 16

제 10 항에 있어서,

상기 기재 상에 형성된 금 박막과 상기 자기조립 단분자층 사이에 형성된 은 콜로이드층과 상기 스트렙타비딘 층에 도입된 금 나노입자를 추가로 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서.

청구항 17

타겟 DNA를 포함하는 DNA 샘플을 제 10 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서에 반응시킴으로써, 상기 DNA 샘플로부터 상기 센서에 포함되는 프로브 DNA와 상보적 서열을 가지는 타겟 DNA를 검출하는 것을 포함하는, DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA 검출 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

상기 DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA 검출 방법은, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR) 현상을 이용하여 DNA 혼성화 결합을 감지하는 것을 포함하는 것인, DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA 검출 방법.

청구항 19

타겟 DNA를 포함하는 DNA 샘플을 제 13 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서에 반응시킴으로써, 상기 DNA 샘플로부터 상기 센서에 포함되는 프로브 DNA와 상보적 서열을 가지는 타겟 DNA를 검출하는 것을 포함하는, DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA 검출 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA 검출 방법은, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR)의 커플링(coupling) 현상을 이용하여 DNA 혼성화 결합을 감지하는 것을 포함하는 것인, DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA 검출 방법.

명세서

기술 분야

- [0001] 본원은, DNA 혼성화 결합 감지 센서, 상기 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법, 및 DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA의 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR) 현상은 나노 크기 귀금속 표면 전자의 집단적인 진동 운동이 가지는 고유의 벡터와 외부에서 입사하는 빛의 벡터가 일치하는 조건에서 공명이 일어남으로써 증폭된 장(field)이 유도되는 현상으로서, 광학적 바이오센싱(optical biosensing) 분야에서 넓은 응용폭을 가지는 현상이다.
- [0003] 상기 SPR현상은 단백질-단백질 결합, DNA-DNA결합 등 분자 간의 상호 작용에 따른 굴절률 변화를 측정함으로써, 전혈, 혈청 등의 샘플 내에 있는 핵산이나 단백질 등을 정량화 할 수 있으며, 상기 상호 작용의 동역학 변수 또한 측정할 수 있어 기존의 EIA, ELISA, RIA 등의 방법을 대체할 기술로서 주목 받고 있다. 구체적으로, 상기 SPR 현상은, 극미량 생체물질의 선택적 초고감도 센싱, 질병진단, 생체분자간 상호작용을 이용한 신약개발, 군사적 목적으로서의 바이오테러 방지, 농수산물의 잔류농약 검출을 통한 식품안전성 평가, 및 수질 오염 평가 등에 이용될 수 있다. 예를 들어, 대한민국 특허출원 10-2009-0011836호는 표면 플라즈몬 공명 장치를 이용한 수은 이온 검출용 DNA 기반 바이오센서에 대하여 개시하고 있다.
- [0004] 그러나, 상기 SPR 현상을 DNA 혼성화 결합(DNA hybridization)을 감지하기 위한 목적으로 확장 응용한 예는 종래에 없었으며, 또한, 타분야에 광학적 바이오센싱 목적으로 상기 SPR 현상을 이용한 경우에도 상기 SPR 현상 자체만으로는 감지(sensing) 능력이 충분하지 못하다는 문제점이 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 상기한 종래 기술의 문제점들을 해결하기 위하여, 본 발명자들은, 상기 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR) 현상은 DNA 혼성화 결합(DNA hybridization)을 감지하기 위한 목적으로도 확장 응용될 수 있는 것이며, 또한, 상기 표면 플라즈몬 공명의 커플링(coupling) 현상을 유도하여 광학적 바이오센싱 목적의 센서에 적용할 경우 상기 센서의 감지 능력을 크게 향상시킬 수 있음을 발견하여 본원을 완성하였다.
- [0006] 이에, 본원은, DNA 혼성화 결합 감지 센서, 상기 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법, 및 DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA의 검출 방법을 제공하고자 한다.
- [0007] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본원의 제 1 측면은, 기재 상에 형성된 금 박막 상에 자기조립 단분자층(self-assembled monolayer; SAM)을 형성하는 단계; 상기 자기조립 단분자층에 바이오틴을 고정시켜 바이오틴 층을 형성하는 단계; 상기 바이오틴 층에 스트렙타비딘을 고정시켜 스트렙타비딘 층을 형성하는 단계; 및, 상기 스트렙타비딘 층에 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA를 고정시키는 단계: 를 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법을 제공한다.
- [0009] 본원의 제 2 측면은, 기재 상에 형성된 금 박막 상에 형성된 자기조립 단분자층(self-assembled monolayer; SAM); 상기 자기조립 단분자층에 고정된 바이오틴을 포함하는 바이오틴 층; 상기 바이오틴 층에 고정된 스트렙타비딘을 포함하는 스트렙타비딘 층; 및, 상기 스트렙타비딘 층에 고정된 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA: 를 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서를 제공한다.

[0010] 본원의 제 3 측면은, 타겟 DNA를 포함하는 DNA 샘플을 본원의 제 2 측면에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서에 반응시킴으로써, 상기 DNA 샘플로부터 상기 센서에 포함되는 프로브 DNA와 상보적 서열을 가지는 타겟 DNA를 검출하는 것을 포함하는, DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본원에서는, 기재 상에 형성된 금 박막 상에 형성된 자기조립 단분자층(SAM); 상기 자기조립 단분자층에 고정된 바이오틴을 포함하는 바이오틴 층; 상기 바이오틴 층에 고정된 스트렙타비딘을 포함하는 스트렙타비딘 층; 및, 상기 스트렙타비딘 층에 고정된 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA: 를 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서를 제조하여 DNA 혼성화 결합 여부 확인에 이용함으로써, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR) 현상이 DNA 혼성화 결합 여부 확인에 효과적으로 이용될 수 있도록 하였다.

[0012] 특히, 본원에서는, 상기 DNA 혼성화 결합 감지 센서에 은 콜로이드층, 또는 다양한 크기의 금 나노입자가 추가 포함되도록 하여 DNA 혼성화 결합 감지 센서를 제조하여 DNA 혼성화 결합 여부 확인에 이용함으로써, 표면 플라즈몬 공명(SPR)의 커플링 현상이 DNA 혼성화 결합 여부 확인에 효과적으로 이용될 수 있도록 하였으며, 이로써 상기 센서의 감지 능력이 크게 증가될 수 있도록 하였다.

[0013] 본원의 표면 플라즈몬 공명(SPR)의 커플링 현상을 이용하는 센서는, DNA 혼성화 결합 감지 센서의 원리로서만 국한되는 것은 아니며, 다양한 화학 물질, 바이오 물질을 검출하고, 이를 통해 다양한 질병을 진단하기 위한 센서를 제조하고 이용하는 데 있어서도 확장적으로 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본원의 일 구현예에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서를 제조하는 과정, 및 상기 센서의 프로브 DNA와 타겟 DNA의 DNA 혼성화 결합을 이용하여 상기 타겟 DNA를 검출하는 과정을 연속적으로 나타낸 모식도이다.

도 2는 본원의 일 구현예에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서로서, 도 2a 내지 도 2c는 각각 실시예 1 내지 3에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서를 나타낸 모식도이다.

도 3은 본원의 일 구현예에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서 표면의 원자힘현미경(AFM) 사진으로서, 도 3a 내지 도 3d는 각각 실시예 1 내지 4에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서 표면의 원자힘현미경(AFM) 사진이다.

도 4는 투과전자현미경(TEM) 사진으로서, 도 4a는 본원의 실시예 3에서 사용된 5 nm 크기의 금 나노입자의 TEM 사진이고, 도 4b는 본원의 실시예 4에서 사용된 15 nm 크기의 금 나노입자의 TEM 사진이며, 도 4c는 본원의 실시예 3에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서 표면의 TEM 사진이고, 도 4d는 본원의 실시예 4에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서 표면의 TEM 사진이다.

도 5는 본원의 일 구현예에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서에서의 DNA 혼성화 결합 여부를 확인하기 위한 시간-반사율(time-reflectivity) 그래프로서, 도 5a 내지 도 5d는 각각 실시예 1 내지 실시예 4에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 시간-반사율 그래프이다.

도 6은 본원의 일 구현예에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서에서의 DNA 혼성화 결합 여부를 확인하기 위한 공명각-반사율(incident angle-reflectivity) 그래프로서, 도 6a, 도 6c, 도 6e, 및 도 6g는 각각 실시예 1 내지 실시예 4에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 공명각-반사율 그래프이고, 도 6b, 도 6d, 도 6f, 및 도 6h는 각각 도 6a, 도 6c, 도 6e, 및 도 6g를 확대한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다.

[0016] 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 구현예 및 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

- [0017] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0018] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로서 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 또한, 본원 명세서 전체에서, "~하는 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [0019] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다.
- [0020] 본원의 제 1 측면은, 기재 상에 형성된 금 박막 상에 자기조립 단분자층(self-assembled monolayer; SAM)을 형성하는 단계; 상기 자기조립 단분자층에 바이오틴을 고정시켜 바이오틴 층을 형성하는 단계; 상기 바이오틴 층에 스트렙타비딘을 고정시켜 스트렙타비딘 층을 형성하는 단계; 및, 상기 스트렙타비딘 층에 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA를 고정시키는 단계: 를 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법을 제공한다.
- [0021] 본원의 제 1 측면과 관련하여, 도 1에서는 본원의 일 구현예에 따라 DNA 혼성화 결합 감지 센서를 제조하는 과정, 및 상기 센서의 프로브 DNA와 타겟 DNA의 DNA 혼성화 결합을 이용하여 상기 타겟 DNA를 검출하는 과정을 모식도로써 연속적으로 나타내고 있다. 구체적으로, 도 1을 참조하면, (1)은 금 박막이 형성된 기재, (2)는 상기 금 박막이 형성된 기재 상에 자기조립 단분자층(SAM)이 형성된 것, (3)은 상기 자기조립 단분자층에 바이오틴 층이 형성된 것, (4)는 상기 바이오틴 층에 스트렙타비딘 층이 형성된 것, (5)는 상기 스트렙타비딘 층에 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA가 고정된 것, (6)은 상기 프로브 DNA와 샘플 DNA가 DNA 혼성화 결합을 형성한 것을 나타낸다.
- [0022] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 기재 상에 형성된 금 박막은 SPR 또는 SPR 커플링 현상 유도를 위하여 약 1 nm 내지 약 50 nm, 약 1 nm 내지 약 40 nm, 약 1 nm 내지 약 30 nm, 약 1 nm 내지 약 20 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 10 nm 두께를 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 자기조립 단분자층은 티올기, 카르복실기, 아민기, 및 -OH로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 작용기를 포함하는 자기조립 단분자층 형성용 화합물을 이용하여 형성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물은 티올기, 카르복실기, 아민기 및 -OH 로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 작용기를 포함하는, 탄화수소 사슬, 벤젠 고리 또는 알킬벤젠 고리를 포함하는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 일 구현예에 있어서, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물은 적어도 하나의 티올기를 포함하고, 카르복실기, 아민기 및 -OH로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 작용기를 더 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물은 하나의 티올기와 카르복실기, 아민기 또는 -OH를 더 포함하는, 탄화수소 사슬, 벤젠 고리 또는 알킬벤젠 고리를 포함하는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 예를 들어, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물에 포함된 상기 탄화수소 사슬의 탄소수는 1 이상, 3 이상 또는 6 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물에 포함된 상기 탄화수소 사슬의 탄소수는 1 내지 20, 1 내지 18, 1 내지 16, 1 내지 14, 1 내지 12, 1 내지 10, 1 내지 8, 1 내지 6, 1 내지 4, 3 내지 20, 3 내지 18, 3 내지 16, 3 내지 14, 3 내지 12, 3 내지 10, 3 내지 8, 3 내지 6, 6 내지 20, 6 내지 18, 6 내지 16, 6 내지 14, 6 내지 12, 또는 6 내지 10일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 예를 들어, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물에 포함된 상기 알킬벤젠 고리는 탄소수 1 내지 6의 알킬기를 가지는 벤젠 고리를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 알킬벤젠 고리는 메틸벤젠 고리, 에틸벤젠 고리, 프로필벤젠 고리, 부틸벤젠 고리, 펜틸벤젠 고리, 헥실벤젠 고리 또는 이들의 이성질체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 자기조립 단분자층은, 단백질이나 DNA 등이 금 박막에 비특이적 흡착이 되는 것을 방지함으로써 금 박막을 보호할 수 있고, 또한 다음 단계인 상기 자기조립 단분자층에 바이오틴을 고정시켜 바이오틴 층을 형성하는 단계에 있어서 바이오틴이 고정화를 위한 반응을 일으킬 수 있도록 하는데 적합한 반응을 도입하기 위해서도 유

용하게 작용할 수 있으나, 본원이 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0028] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물은, 옥테인티올(octanethiol: OT), 머캅토운데카노산(mercaptoundecanoic acid: MUA), 시스테아민(cysteamine), 4-메틸벤젠티올 (4-methylbenzene thiol: MBT), 4-에틸벤젠티올, 머캅토프로피온산 (Mercaptopropionic acid: MPA), 4-머캅토펜올 (mercaptophenol) 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본원의 일 실시예에 있어서, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물은 OT와 MUA를 3:1의 부피비로 포함하며 에탄올을 용매로서 포함하는 혼합 용액일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 OT와 MUA는 각각 말단에 티올기를 포함하며, 이는 금 박막에 강한 공유 결합을 형성할 수 있으므로, 상기 OT와 MUA를 포함하는 혼합 용액에 금 박막이 형성된 기재를 침지하는 것 만으로도 자기조립 단분자층을 형성할 수 있다. 다만, 금 박막이 형성된 기재의 표면 상에 잘 정렬되는 자기조립 단분자층을 형성하기 위해서는 최소한 6시간 침지하는 것이 바람직하며, 예를 들어, 24시간 동안 침지할 수 있다. 상기 MUA는 이후 단계에서 바이오틴이 고정화를 위한 반응을 일으킬 수 있도록 하는데 적합한 반응기 중 하나인 카르복실기를 도입할 목적으로 자기조립 단분자층 형성용 화합물에 포함되는 것이다. 한편, 상기 OT는 카르복실기를 포함하지 않는 물질인데, 상기 MUA에 상기 OT를 혼합하여 자기조립 단분자층 형성용 화합물을 조성함으로써, 상기 자기조립 단분자층에 포함되는 카르복실기의 양을 조절할 수 있다. 이를 통해 상기 자기조립 단분자층 상에 추후 형성되는 바이오틴 층의 밀도를 조절하여, 추후 스트렙타비딘의 흡착 과정에서 발생할 수 있는 입체 장애를 막을 수 있다는 장점이 있으나, 본원이 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 바이오틴은 바이오틴 하이드라자이드, NHS-바이오틴 (N-Hydroxysuccinimide-biotin) 또는 D-바이오틴을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바이오틴(Biotin)은 비타민의 B군에 해당하는 물질로서, 244.31 g/mol의 작은 분자량을 가지며, 물질과 물질 간의 결합을 위한 가교제(cross-linker)로서 널리 사용된다. 바이오틴이 가교제로서 사용될 경우 가교 결합에 사용되는 작용기로는 아민기, 설포하이드릴기, 카르복실기, 하이드록실기 등이 있으며, 이러한 작용기에 공유 결합할 수 있는 물질을 포함하도록 개질된 바이오틴을 이용하여 단백질이나 항원-항체를 바이오틴 층의 표면에 고정화시킬 수 있다.
- [0030] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 자기조립 단분자층에 바이오틴을 고정시켜 바이오틴 층을 형성하는 단계는, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물이 포함하는 작용기와 상기 바이오틴이 가지는 작용기 간의 반응을 통하여 공유결합을 형성함으로써 상기 자기조립 단분자층에 상기 바이오틴이 고정화되는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 필요한 경우, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물이 포함하는 작용기와 상기 바이오틴이 가지는 작용기 간의 반응을 통하여 공유결합을 형성을 촉진하기 위하여 커플링제(coupling reagent)를 추가로 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 커플링제는 EDC [1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide], sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 예를 들어, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물이 MUA를 포함하는 경우 상기 화합물은 카르복실기를 포함하게 되며, 상기 MUA의 카르복실기는 커플링제(coupling reagent) 존재 하에서 바이오틴 하이드라자이드의 하이드라자이드 그룹과 공유결합을 형성할 수 있다. 상기 커플링제는, 예를 들어, EDC와 sulfo-NHS를 포함하는 EDC/sulfo-NHS 커플링제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 EDC/sulfo-NHS 커플링제를 이용하는 경우, 1 mM 농도의 바이오틴 하이드라자이드, EDC, 및 sulfo-NHS를 1:1:1의 몰 비로 PBS 용액에서 혼합하여 반응시킬 수 있다. 이 경우, 상기 바이오틴을 충분히 포화시키기 위하여 반응 시간을 3시간 이상이 되도록 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 또한, D-바이오틴은 말단이 카르복실기로 되어있어, 아민기를 가진 자기조립 단분자층에 EDC 와 sulfo-NHS 를 이용하여 D-바이오틴을 고정시킬 수 있으며, NHS-바이오틴의 경우 sulfo-NHS 사용 없이 EDC 만으로 자기조립 단분자층과 반응시킬 수 있다.
- [0033] 상기와 같이 바이오틴 층이 형성된 후에는, 상기 바이오틴 층 상에 스트렙타비딘 층을 형성한다. 스트렙타비딘 (Streptavidin)은 4량체 단백질로서, 바이오틴과 특이적 결합을 형성하기 때문에(K_a 약 10^{13} M^{-1}), 바이오틴과 함께 바이오센서 제조에 널리 응용되고 있다. 스트렙타비딘과 바이오틴이 특이적 결합을 형성하는 원동력으로는 반데르발스 힘, 스트렙타비딘 단백질의 표면 고리 구조, 및 수소 결합 등 다양한 요인을 들 수 있으며, 스트렙타비딘에 포함되는 각각의 단량체가 하나의 바이오틴에 결합할 수 있다. 스트렙타비딘은 구형 단백질이므로, 단백질이 센서에 부착될 때 일반적으로 가장 크게 문제되는 배향(orientation) 문제를 해결할 수 있다. 또한, 스트렙타비딘은 4개의 결합 자리(binding site)를 가지고 있기 때문에, 표면 부착 시 노출되는 방향에 상관없이 강력한 센서로서 작용할 수 있다. 본원의 DNA 혼성화 결합 감지 센서를 제조함에 있어서, 상기 바이오틴 층 상

에 스트렙타비딘 층을 형성하기 위하여, 예를 들어, 10^{-6} M 농도의 스트렙타비딘 용액을 약 3시간 동안 처리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0034] 상기와 같이 스트렙타비딘 층이 형성된 후에는, 상기 스트렙타비딘 층에 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA를 고정시킨다. 앞서 설명한 바와 같이 스트렙타비딘과 바이오틴은 특이적 결합을 형성하는데, 이에 반해 스트렙타비딘과 DNA는 특이적 결합을 형성할 수 없다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 예를 들어, 프로브 DNA의 5' 말단을 바이오틴으로 개질시켜 사용할 수 있다. 상기와 같은 개질을 통하여, 스트렙타비딘과 바이오틴의 특이적 결합력을 이용하여 프로브 DNA를 스트렙타비딘 층에 고정화할 수 있게 되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 상기 과정을 순차적으로 거침으로써, 금 박막이 형성된 기재; 자기조립 단분자층; 바이오틴 층; 스트렙타비딘 층; 및 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA: 를 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서를 제조할 수 있다.
- [0036] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법은 상기 기재 상에 형성된 금 박막 상에 은 콜로이드층을 형성하는 단계를 추가 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 은 콜로이드층을 형성하는 단계는, 예를 들어, 상기 기재 상에 형성된 금 박막 상에 상기 자기조립 단분자층을 형성한 후, 상기 기재를 은 이온-함유 전구체 용액에 침지시켜 상기 은 이온을 환원시킴으로써 은 콜로이드층을 형성하는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 이온-함유 전구체는 특별히 제한되지 않으며 은 이온-함유 무기산염 또는 유기산염을 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 은 이온-함유 전구체는 질산은, 아세트산은(silver acetate) 또는 황산은을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 은 이온-함유 전구체 용액은 물을 용매로서 포함할 수 있으며, 물 외에 알코올류 또는 유기 용매 등 다른 용매를 추가 포함할 수 있다. 상기 은 콜로이드층의 두께는 특별히 제한되지 않으나, 나노미터 두께, 예를 들어, 약 1 nm 내지 약 10 nm, 약 1 nm 내지 약 5 nm, 약 1 nm 내지 약 3 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 2 nm 의 두께를 가지도록 하는 것이 SPR 현상 또는 SPR 커플링 현상 유도에 유리하다.
- [0037] 상기 일 구현예에 따르면, 금 박막이 형성된 기재; 자기조립 단분자층; 바이오틴 층; 스트렙타비딘 층; 및 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA: 를 포함하며, 상기 기재 상에 형성된 금 박막 상에 은 콜로이드층을 추가 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서를 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법은 상기 스트렙타비딘 층에 금 나노입자를 도입하는 단계를 추가 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 금 나노입자는 시트레이트(citrate) 리간드에 의하여 표면-개질된 금 나노입자를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 금 나노입자는, SPR 현상 또는 SPR 커플링 현상 유도를 위하여, 약 1 nm 내지 약 20 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 15 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 10 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 5 nm 크기를 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 방법은, 상기 기재 상에 형성된 금 박막 상에 은 콜로이드층을 형성하는 단계 및 상기 스트렙타비딘 층에 금 나노입자를 도입하는 단계를 추가 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본원의 제 2 측면은, 기재 상에 형성된 금 박막 상에 형성된 자기조립 단분자층(self-assembled monolayer; SAM); 상기 자기조립 단분자층에 고정된 바이오틴을 포함하는 바이오틴 층; 상기 바이오틴 층에 고정된 스트렙타비딘을 포함하는 스트렙타비딘 층; 및, 상기 스트렙타비딘 층에 고정된 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA: 를 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서를 제공한다.
- [0042] 예를 들어, 상기 기재 상에 형성된 금 박막은 약 1 nm 내지 약 50 nm, 약 1 nm 내지 약 40 nm, 약 1 nm 내지 약 30 nm, 약 1 nm 내지 약 20 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 10 nm 두께일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 자기조립 단분자층은 티올기, 카르복실기, 아민기, -OH 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 작용기를 가지는 자기조립 단분자층 형성용 화합물을 이용하여 형성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구현예에 있어서, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물은 적어도 하나의 티올기를 포함하고, 카르복실기, 아민기, -OH 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 작용기를 하나 이상 더 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화

합물은 하나의 티올기와 카르복실기, 아민기 또는 -OH를 더 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구현예에 있어서, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물은 티올기, 카르복실기, 아민기, -OH 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 작용기를 함유하는, 탄화수소 사슬, 벤젠 고리 또는 알킬벤젠 고리를 포함하는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 자기조립 단분자층은, 단백질이나 DNA 등이 금 박막에 비특이적 흡착이 되는 것을 방지함으로써 금 박막을 보호할 수 있고, 또한 다음 단계인 상기 자기조립 단분자층에 바이오틴을 고정시켜 바이오틴 층을 형성하는 단계에 있어서 바이오틴이 고정화를 위한 반응을 일으킬 수 있도록 하는데 적합한 반응기를 도입하기 위해서도 유용하게 작용할 수 있으나, 본원이 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 본원의 제 1 측면에서 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물과 관련하여 기술된 내용은 모두 본원의 제 2 측면에도 적용될 수 있으며, 편의상 중복 기재를 생략한다.

[0044] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 자기조립 단분자층에 고정된 바이오틴은, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물이 포함하는 작용기와 상기 바이오틴이 가지는 작용기 간의 반응을 통하여 공유결합을 형성함으로써 상기 자기조립 단분자층에 상기 바이오틴이 고정화되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 필요한 경우, 상기 자기조립 단분자층 형성용 화합물이 포함하는 작용기와 상기 바이오틴이 가지는 작용기 간의 반응을 통하여 공유결합을 형성을 촉진하기 위하여 커플링제(coupling reagent)를 추가로 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 커플링제는 EDC [1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide], sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 바이오틴은 바이오틴 하이드라자이드, NHS-바이오틴 (N-Hydroxysuccinimide-biotin) 또는 D-바이오틴을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바이오틴(Biotin)은 비타민의 B군에 해당하는 물질로서, 244.31 g/mol의 작은 분자량을 가지며, 물질과 물질 간의 결합을 위한 가교제(cross-linker)로서 널리 사용된다. 바이오틴이 가교제로서 사용될 경우 가교 결합에 사용되는 작용기로는 아민기, 설포하이드릴기, 카르복실기, 하이드록실기 등이 있으며, 이러한 작용기에 공유 결합할 수 있는 물질을 포함하도록 개질된 바이오틴을 이용하여 단백질이나 항원-항체를 바이오틴 층의 표면에 고정화시킬 수 있다.

[0046] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 혼성화 결합 감지 센서는 상기 기재 상에 형성된 금 박막과 상기 자기조립 단분자층 사이에 형성된 은 콜로이드층을 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 은 콜로이드층의 두께는 특별히 제한되지 않으나, 나노미터 두께, 예를 들어, 약 1 nm 내지 약 10 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 5 nm, 약 1 nm 내지 약 3 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 2 nm의 두께를 가지도록 하는 것이 SPR 현상 유도에 유리하다.

[0047] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 혼성화 결합 감지 센서는 상기 스트렙타비딘 층에 도입된 금 나노입자를 추가 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 금 나노입자는, 약 1 nm 내지 약 20 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 15 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 10 nm, 또는 약 1 nm 내지 약 5 nm 크기를 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 혼성화 결합 감지 센서는 상기 기재 상에 형성된 금 박막과 상기 자기조립 단분자층 사이에 형성된 은 콜로이드층과 상기 스트렙타비딘 층에 도입된 금 나노입자를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 본원의 제 3 측면은, 타겟 DNA를 포함하는 DNA 샘플을 본원의 제 2 측면에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서에 반응시킴으로써, 상기 DNA 샘플로부터 상기 센서에 포함되는 프로브 DNA와 상보적 서열을 가지는 타겟 DNA를 검출하는 것을 포함하는, DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA 검출 방법을 제공한다.

[0050] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA 검출 방법은, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR) 현상을 이용하여 DNA 혼성화 결합을 감지하는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 상기 표면 플라즈몬 공명(SPR) 현상은 나노 크기 귀금속 표면 전자의 집단적인 진동 운동이 가지는 고유의 벡터와 외부에서 입사하는 빛의 벡터가 일치하는 조건에서 공명이 일어남으로써 증폭된 장(field)이 유도되는 현상으로서, 광학적 바이오센싱(optical biosensing) 분야에서 넓은 응용폭을 가지는 현상이다. 굴절률이 다른 두 매질의 경계면에 빛을 입사시킬 경우, 높은 굴절률을 가진 매질로부터 들어오는 빛은 일부 반사되고 일부 굴절된다. 그러나 어떤 특정한 입사각, 즉, 두 매질의 굴절률 비에 따라 결정되는 "임계각" 이상에서는 모든 빛이 굴절됨 없이 전부 반사된다. 이 경우, 거의 모든 빛이 반사되지만, 소멸파(Evanescent wave)라고 불리는 전자

기과 성분은 굴절률이 낮은 매질로 한 파장 정도의 매우 짧은 거리만큼 파고들어 간다. 이와 관련하여, 두 매질 사이에 매우 얇은 금속 박막이 코팅되어 있을 경우, p-편광이며 단색광인 빛을 입사시키면, 특정한 입사각에서 반사되는 빛이 금속 박막에 흡수되면서 세기가 현저히 줄어드는 현상이 발생한다. 이러한 현상이 표면 플라즈몬 공명(SPR) 현상이며, 이때의 입사각을 공명각 또는 SPR각이라고 한다. 공명각(SPR각)은 표면 플라즈몬 층의 굴절률 변화에 따라 달라지므로, 이러한 SPR 현상을 감지할 수 있는 광학 장치를 이용하여 단백질 결합이나 항원-항체 반응 등을 검출할 수 있다. 예를 들어, 본원에서는, 상기 표면 플라즈몬 공명(SPR) 현상을 이용하여 DNA 혼성화 결합을 감지함으로써 타겟 DNA 검출하는 방법을 일 구현예로서 제시하고 있으나, 본원이 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 혼성화 결합을 이용하는 타겟 DNA 검출 방법은, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR)의 커플링(coupling) 현상을 이용하여 DNA 혼성화 결합을 감지하는 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 상기 SPR의 커플링 현상은, 본원에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서 중에서도 특히 은 콜로이드층을 추가로 포함하는 센서, 금 나노입자를 추가 포함하는 센서, 및 은 콜로이드층 및 금 나노입자를 추가 포함하는 센서의 작용 원리로서 적용될 수 있다. SPR 현상을 일으킬 수 있는 두 금속 나노입자의 거리가 가까워지면 상기 금속 나노입자 표면에 생성되어 있는 SPR 장(field)의 일부가 겹치게 되면서 플라즈몬 공명 에너지가 강한 영향을 받게 되고, 이에 따라 장이 증폭되는데, 이를 SPR의 커플링 현상이라고 한다. 상기 SPR의 커플링 현상은 금속 나노입자 간의 거리에 의존적이다. 구체적으로, 두 금속 나노입자 간의 거리가 상기 입자의 지름보다 작은 범위 내로 가까워지면 커플링 현상이 일어나면서 장이 증폭되고, 입자 고유의 흡수 파장 값이 변화하게 된다.

[0054] 상기 SPR의 커플링 현상을 바탕으로, 본원에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서에서는 상기 센서에 은 콜로이드층 및/또는 다양한 크기의 금 나노입자가 추가 포함되도록 함으로써, 상기 SPR의 커플링 현상을 유도하여 SPR 신호를 증폭하고, 이로 인해 상기 센서의 감지 능력이 더욱 증가될 수 있도록 하였으나, 본원이 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 이하, 본원에 대하여 실시예 및 실험예들을 이용하여 좀더 구체적으로 설명하지만, 본원이 이에 제한되는 것은 아니다.

[실시예]

<실시예 1>

DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조, 및 상기 센서를 이용한 타겟 DNA의 검출

[0059] 우선, 금 박막이 형성된 기재를 형성하기 위하여, SF10 유리 기재에 10^{-6} Torr 진공 조건에서 금 박막을 코팅시켰다. 상기 SF10 유리 기재 상에 금 박막을 코팅하기에 앞서 크롬을 0.01 nm/s 속도로 2 nm 두께로 코팅하였고, 상기 크롬층 상에 0.1 nm/s 속도로 50 nm 두께의 금을 코팅하였다.

[0060] 다음으로, 상기 금 박막이 형성된 기재 상에 자기조립 단분자층(SAM)을 형성하기 위하여, 에탄올 용매에 1 mM 농도의 옥테인티올(OT)과 1 mM 농도의 머캅토운데카노산(MUA)을 3:1의 부피비로서 포함하는 혼합 용액을 제조한 뒤, 상기 금 박막이 형성된 기재를 상기 혼합 용액에 24 시간 침지하였다. 이후, 상기 금 박막이 형성된 기재 상에 화학적으로 결합되지 않은 흡착물을 제거하기 위하여, 에탄올을 이용하여 1 분 간 세척하였다.

[0061] 다음으로, 상기 자기조립 단분자층(SAM)에 바이오틴을 고정시켜 바이오틴 층을 형성하기 위하여, 상기 자기조립 단분자층(SAM)과 금 박막이 형성된 기재를 10 mM PBS 버퍼 용액에서 만든 1 mM 농도의 바이오틴 하이드라자이드의 용액에 3 시간 동안 침지하였다. 이 때, 상기 자기조립 단분자층(SAM) 중의 상기 머캅토운데카노산(MUA)에 포함된 작용기인 카르복실기와 상기 바이오틴 하이드라자이드의 하이드라자이드 그룹이 공유 결합을 형성하는 것을 촉진하기 위하여, EDC/NHS 커플링제를 이용하였다. 상기 EDC/NHS 커플링제는 EDC와 sulfo-NHS를 포함하는 것으로서, 상기 EDC, 상기 sulfo-NHS, 및 상기 바이오틴 하이드라자이드의 몰 비는 1: 1: 1이었다. 상기 바이오틴 하이드라자이드와 상기 EDC/NHS 커플링제를 포함하는 용액에서 3 시간 동안 침지 과정을 거친 뒤, 화학적

으로 결합되지 않은 흡착물을 제거하기 위하여 PBS 버퍼 용액을 이용하여 5분 간 세척하였다.

[0062] 다음으로, 상기 바이오틴 층에 스트렙타비딘을 고정시켜 스트렙타비딘 층을 형성하기 위하여, 상기 바이오틴 층이 형성된 기재를 10 mM PBS 버퍼에서 만든 10^{-6} M 스트렙타비딘 용액에 3 시간 침지하였다. 그 후, 화학적으로 결합되지 않은 흡착물을 제거하기 위하여 PBS 버퍼 용액을 이용하여 5분 간 세척하였다.

[0063] 다음으로, 상기 스트렙타비딘 층에 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA를 고정시키기 위하여, 상기 스트렙타비딘 층이 형성된 기재를 10 mM PBS 버퍼에서 만든 10^{-7} M 프로브 DNA 용액에 1 시간 침지하였다. 본 실시예 1에서 사용한 상기 프로브 DNA의 서열은 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TGT ACG TCA CAA CTA-3'였다. 상기 스트렙타비딘 층에 상기 프로브 DNA를 고정시키기 위하여, 스트렙타비딘과 바이오틴의 특이적 결합력을 이용하였으며, 이를 위해 상기 프로브 DNA의 5' 말단이 바이오틴으로 개질되도록 미리 처리하였다. 상기 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA 용액에서 1 시간 동안 침지 과정을 거친 뒤, 화학적으로 결합되지 않은 흡착물을 제거하기 위하여 PBS 버퍼 용액을 이용하여 5분 간 세척하였다. 이로써, 금 박막이 형성된 기재; 자기조립 단분자층; 바이오틴 층; 스트렙타비딘 층; 및 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA: 를 포함하는, DNA 혼성화 결합 감지 센서를 완성하였다.

[0064] 이후, 상기과 같이 제조된 DNA 혼성화 결합 감지 센서를 이용하여 타겟 DNA를 검출하는 실험을 수행하였다. 본 실시예 1에서 사용한 상기 프로브 DNA의 서열은 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TGT ACG TCA CAA CTA-3'였으므로, 타겟 DNA의 서열은 상기 프로브 DNA 서열의 일부 또는 전부에 상보적인 서열을 포함하게 되며, 구체적으로, 본 실시예 1에서 사용한 상기 타겟 DNA의 서열은 5'-TAG TTG TGA CGT ACA-3'였다. 상기 DNA 혼성화 결합 감지 센서를 이용하여 상기 타겟 DNA를 검출하기 위하여, 상기 DNA 혼성화 결합 감지 센서를 10 mM PBS 버퍼에서 만든 10^{-7} M 타겟 DNA 용액에 1 시간 침지하였다. 그 후, 화학적으로 결합되지 않은 흡착물을 제거하기 위하여 PBS 버퍼 용액을 이용하여 5분 간 세척하였다.

[0065] <실시예 2>

[0066] 은 콜로이드층을 추가 포함하는 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조, 및 상기 센서를 이용한 타겟 DNA의 검출

[0067] 본 실시예 2는, 앞서 설명한 실시예 1과 비교할 때, 은 콜로이드층을 추가 포함하는 센서를 제조하여 타겟 DNA의 검출에 이용하였다는 점을 제외하고는 모두 동일한바, 이하 중복되는 기재는 생략하고, 상기 은 콜로이드 층을 추가 포함시키는 과정에 대한 설명을 기재하였다.

[0068] 본 실시예 2에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 과정에서는, 실시예 1과는 달리 금 박막이 형성된 기재 상에 은 콜로이드층을 추가 포함하는 센서를 제조하기 위하여, 실시예 1의 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 과정 중 두 번째 단계인 자기조립 단분자층(SAM)의 형성 과정만 일부 수정하였다. 이하, 이에 대한 구체적인 설명을 기재하였다.

[0069] 본 실시예 2에서는, 금 박막이 형성된 기재 상에 자기조립 단분자층(SAM)을 형성하기 위하여, 에탄올 용매 중 1 mM 농도의 머캅토엔테카노산(MUA) 용액을 제조한 뒤, 상기 금 박막이 형성된 기재를 상기 용액에 6 시간 침지하였다. 그 후, 상기 기재에 은 콜로이드층을 추가 포함시키기 위하여, 상기 기재를 에탄올 용매에 은 이온-함유 전구체인 AgNO_3 를 3.0 중량% 포함하는 에탄올 용액에 1 시간 침지하였다. 그 후, 에탄올 용매에 0.01 M 농도의 수소화붕소나트륨을 포함하는 환원제 용액을 제조하고, 상기 기재를 상기 환원제 용액에 20 분 간 침지하여 은 이온을 환원시켰다. 그 후, 상기 금 박막이 형성된 기재 상에 화학적으로 결합되지 않은 흡착물을 제거하기 위하여, 에탄올을 이용하여 1 분 간 세척하였다.

[0070] 이외의 DNA 혼성화 결합 감지 센서 제조 과정은 실시예 1과 동일하게 수행하였으며, 이와 같이 제조된 본 실시예 2에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서를 이용하여 타겟 DNA를 검출하는 실험 또한 실시예 1과 동일하게 수행하였다.

[0071] <실시예 3>

[0072] 5 nm 크기의 금 나노입자를 추가 포함하는 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조, 및 상기 센서를 이용한 타겟 DNA

의 검출

- [0073] 본 실시예 3은, 앞서 설명한 실시예 1과 비교할 때, 5nm 크기의 금 나노입자를 추가 포함하는 센서를 제조하여 타겟 DNA의 검출에 이용하였다는 점을 제외하고는 모두 동일한바, 이하 중복되는 기재는 생략하고, 상기 5nm 크기의 금 나노입자를 추가 포함시키는 과정에 대한 설명을 기재하였다.
- [0074] 본 실시예 3에 따른 DNA혼성화 결합 감지 센서의 제조 과정에서는, 실시예 1과는 달리 스트렙타비딘 층에 도입된 5 nm 크기의 금 나노입자를 추가 포함하는 센서를 제조하기 위하여, 실시예 1의 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 과정 중 세 번째 단계인 스트렙타비딘 층 형성 단계와 네 번째 단계인 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA를 고정시키는 단계 사이에 하나의 단계를 추가 포함시켰다. 이하, 추가 포함된 단계에 대하여 구체적인 설명을 기재하였다.
- [0075] 본 실시예 3에서 추가 포함된 단계는 15 nm 크기의 금 나노입자를 추가 포함시키기 위한 것으로서, 우선, 원하는 크기의 금 나노입자를 형성하기 위하여 Au를 포함하는 용액을 제조하였다. 구체적으로, 증류수 88.46 mL에 0.01 M 농도의 HAuCl_4 용액을 2.54 mL 첨가하였고, 상기 용액을 1분 간 강하게 교반하였다. 그 후, 38.8 mM 농도의 시트르산 나트륨(sodium citrate) 용액 2 mL를 추가로 첨가한 후, 1분 간 교반하며 반응시켰다. 그 후, 38.8 mM농도의 시트르산 나트륨을 용매로 하여 제조한 0.075 중량%의 NaBH_4 용액 1 mL를 추가로 첨가한 후, 5분 간 강하게 교반하였다. 합성된 금 나노입자는, 약 5 nm 크기를 가졌으며, 시트르산 나트륨 용액의 처리로 인하여 시트레이트(citrate) 코팅된 상태의 것이었다. 상기 합성된 금 나노입자를 포함하는 용액은, 증류수에 희석하여 5 부피% 농도가 되도록 한 뒤, 본 실시예 3의 센서 제조에 사용하였다.
- [0076] 다음으로, 상기 합성된 약 5 nm 크기의 금 나노입자는, 본 실시예 3의 DNA 혼성화 결합 감지 센서 중 스트렙타비딘 층에 도입되었다. 구체적으로, 실시예 1의 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 과정 중 세 번째 단계인 스트렙타비딘 층 형성 단계까지 거친 기재를, 상기 합성된 약 5 nm 크기의 금 나노입자를 포함하는 용액에 30분 간 침지하였다. 그 후, 화학적으로 결합되지 않은 흡착물을 제거하기 위하여 PBS 버퍼 용액을 이용하여 5분 간 세척하였다.
- [0077] 이외의 DNA 혼성화 결합 감지 센서 제조 과정은 실시예 1과 동일하게 수행하였으며, 이와 같이 제조된 본 실시예 3에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서를 이용하여 타겟 DNA를 검출하는 실험 또한 실시예 1과 동일하게 수행하였다.
- [0078] <실시예 4>
- [0079] 15 nm 크기의 금 나노입자를 추가 포함하는 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조, 및 상기 센서를 이용한 타겟 DNA의 검출
- [0080] 본 실시예 4는, 앞서 설명한 실시예 1과 비교할 때, 15nm 크기의 금 나노입자를 추가 포함하는 센서를 제조하여 타겟 DNA의 검출에 이용하였다는 점을 제외하고는 모두 동일한바, 이하 중복되는 기재는 생략하고, 상기 15nm 크기의 금 나노입자를 추가 포함시키는 과정에 대한 설명을 기재하였다.
- [0081] 본 실시예 4에 따른 DNA혼성화 결합 감지 센서의 제조 과정에서는, 실시예 1과는 달리 스트렙타비딘 층에 도입된 15 nm 크기의 금 나노입자를 추가 포함하는 센서를 제조하기 위하여, 실시예 1의 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 과정 중 세 번째 단계인 스트렙타비딘 층 형성 단계와 네 번째 단계인 바이오틴으로 개질된 프로브 DNA를 고정시키는 단계 사이에 하나의 단계를 추가 포함시켰다. 이하, 추가 포함된 단계에 대하여 구체적인 설명을 기재하였다.
- [0082] 본 실시예 4에서 추가 포함된 단계는 15 nm 크기의 금 나노입자를 추가 포함시키기 위한 것으로서, 우선, 원하는 크기의 금 나노입자를 형성하기 위하여 Au를 포함하는 용액을 제조하였다. 구체적으로, 증류수 148.5 mL에 25.4 mM 농도의 HAuCl_4 용액을 1.5 mL 첨가하였고, 상기 용액을 강하게 교반하면서 130℃ 내지 140℃까지 가열하였다. 그 후, 170 mM 농도의 시트르산 나트륨(sodium citrate) 용액 0.9 mL를 추가로 첨가한 후, 교반하며 반응시켰다. 그 후, 38.8 mM농도의 시트르산 나트륨을 용매로 하여 제조한 0.075 중량%의 NaBH_4 용액 1 mL를

추가로 첨가한 후, 5분 간 강하게 교반하여 용액의 색이 보라색에서 붉은색으로 변하게 하였다. 용액의 색이 붉은색이 된 뒤, 15분 간 추가 가열하고, 상온으로 식혔다. 이와 같이 합성된 금 나노입자는, 약 15 nm 크기를 가졌으며, 시트르산 나트륨 용액의 처리에 의하여 시트레이트(citrate) 리간드로 표면-개질된 상태의 것이었다. 상기 합성된 금 나노입자를 포함하는 용액은, 증류수에 희석하여 10 부피% 농도가 되도록 한 뒤, 본 실시예 4의 센서 제조에 사용하였다.

[0083] 다음으로, 상기 합성된 약 15 nm크기의 금 나노입자는, 본 실시예 4의 DNA 혼성화 결합 감지 센서 중 스트렙타비딘 층에 도입되었다. 구체적으로, 실시예 1의 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 제조 과정 중 세 번째 단계인 스트렙타비딘 층 형성 단계까지 거친 기재를, 상기 합성된 약 15 nm 크기의 금 나노입자를 포함하는 용액에 30분 간 침지하였다. 그 후, 화학적으로 결합되지 않은 흡착물을 제거하기 위하여 PBS 버퍼 용액을 이용하여 5분 간 세척하였다.

[0084] 이외의 DNA 혼성화 결합 감지 센서 제조 과정은 실시예 1과 동일하게 수행하였으며, 이와 같이 제조된 본 실시예 4에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서를 이용하여 타겟 DNA를 검출하는 실험 또한 실시예 1과 동일하게 수행하였다.

[실험예]

<실험예 1>

DNA 혼성화 결합 감지 센서의 표면 형태 분석

[0088] 실시예 1 내지 실시예 4에 따라 제조된 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 표면 형태를 분석하기 위하여, 원자힘현미경(Atomic Force Microscopy; AFM)과 전자투과현미경(Transmission Electronic Microscopy; TEM)을 이용하여 관찰하였으며, 그 관찰 결과를 각각 도 3 및 도 4에 나타내었다.

[0089] 도 3은 본원의 상기 실시예들에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서 표면의 원자힘현미경(AFM) 사진으로서, 도 3a 내지 도 3d는 각각 실시예 1 내지 4에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서 표면의 원자힘현미경(AFM) 사진이다. 도 3a에서는 2 nm 내지 3 nm 크기의 거칠기(roughness)가 관찰되었고, 도 3b에서는 5nm 크기의 은 콜로이드 입자가 금 박막 상에 형성되어 있는 것이 관찰되었으며, 도 3c 및 도 3d에서는 각각 5nm 및 15nm 크기의 금 나노입자가 도입되어 센서 표면에 조밀하게 코팅되어 있음이 관찰되었다.

[0090] 도 4는 투과전자현미경(TEM) 사진으로서, 도 4a는 본원의 실시예 3에서 사용된 5 nm 크기의 금 나노입자의 TEM 사진이고, 도 4b는 본원의 실시예 4에서 사용된 15 nm 크기의 금 나노입자의 TEM 사진이며, 도 4c는 본원의 실시예 3에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서 표면의 TEM 사진이고, 도 4d는 본원의 실시예 4에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서 표면의 TEM 사진이다. 도 4a 및 도 4b의 TEM 사진을 통하며, 실시예 3 및 실시예 4의 금 나노입자의 크기가 각각 5 nm 및 15 nm임을 확인할 수 있었다. 도 4c 및 도 4d의 TEM 사진은, 실시예 3 및 실시예 4에서 제조된 센서를 실리카 에칭용액인 플루오린화 수소산(HF)에 담가 바이오틴-스트렙타비딘-금 나노입자의 다층박막을 분리한 뒤 촬영한 것이다. 도 4c 및 도 4d 모두에서, 스트렙타비딘 층에 금 나노입자가 묻치지 않고 균일하게 도포되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0091] 상기 TEM 사진 중 도 4c 및 도 4d의 TEM 사진을 imageJ 소프트웨어를 이용하여 추가 분석함으로써, 금 나노입자의 조밀도를 계산하였다. 그 결과, 5 nm 크기 금 나노입자의 조밀도가 15 nm 크기 금 나노입자의 조밀도에 비하여 약 24 배 정도 더 큰 조밀도를 나타내었다.

<실험예 2>

SPR 신호 변화(time-reflectivity) 측정을 통한, DNA 혼성화 결합 감지 센서에서의 DNA 혼성화 결합 여부 확인 실험

[0094] 상기 실시예 1 내지 실시예 4에 따라 제조된 DNA 혼성화 결합 감지 센서에서의 DNA 혼성화 결합 여부를 확인하

기 위하여 시간에 따른 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR) 신호 변화를 측정하였으며, 그 결과를 도 5에 시간-반사율(time-reflectivity) 그래프로 나타내었다.

[0095] SPR 신호 변화를 측정하기 위한 장치로는 크레취만 배치(Kretschmann configuration)를 사용하였다. 구체적으로, 프리즘 위에 금 박막 층이 노출되는 배향으로 금 박막이 코팅된 유리 기재를 고정시키고, 그 위에 플로우 셀(flow cell)을 장착하여, 펌프를 이용해 용액이 표면 플라즈몬 층으로 주입되거나 배출되는 장치를 만들었다.

[0096] 그 후, 상기 장치를 이용하여, 빛의 입사각을 고정시킨 상태에서 시간에 따른 빛의 반사율의 변화를 측정하였다. 센서 표면에 어떠한 물질이 고정되면, 빛의 굴절률에 변화가 생겨 SPR 신호에서 변화가 감지된다.

[0097] 도 5는 본원의 일 구현예에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서에서의 DNA 혼성화 결합 여부를 확인하기 위한 시간-반사율(time-reflectivity) 그래프로, 도 5a 내지 도 5d는 각각 실시예 1 내지 실시예 4에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 시간-반사율 그래프이다.

[0098] 도 5에서, 시간이 지남에 따라 반사율이 계단식으로 증가하는 것으로 보아, 바이오틴 층, 스트렙타비딘 층 등 센서를 구성하는데 필요한 각 층이 순차적으로 형성되었다는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 금 나노입자를 추가 포함하는 센서의 데이터인 도 5c 및 도 5d를 참조하면, 스트렙타비딘 층이 형성된 후 금 나노입자가 상기 스트렙타비딘 층에 흡착되면서, 급격한 반사율의 변화가 관찰되었다. 실시예 3에서는 5 nm 크기의 금 나노입자를 포함하는 용액을 5 부피% 농도로서 사용하였고, 실시예 4에서는 15 nm 크기의 금 나노입자를 포함하는 용액을 10 부피% 농도로서 사용하였는데, 이처럼 실시예 3에서는 실시예 4에 비하여 2배 더 희석된 금 나노입자 용액을 사용하였음에도 측정된 반사율 변화는 30% 정도에 그쳤음이 도 5c 및 도 5d에서 관찰되었다. 이러한 결과는, 실시예 3의 5nm 크기의 금 나노입자의 조밀도가 실시예 4의 15 nm 크기의 금 나노입자의 조밀도에 비하여 크게 높기 때문에 가능한 것이며, 이는 도 4c 및 도 4d의 TEM 사진을 통해서도 확인된 바이다.

[0099] 실시예 1 내지 실시예 4에 따라 제조된 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 프로브 DNA에 타겟 DNA가 혼성화 결합되었는지 여부, 즉, 센서에 대하여 타겟 DNA가 흡착되었는지 또는 탈착되었는지 여부는 1차적으로는 도 4의 그래프를 통하여 알 수 있으며, 2차적으로는 랭뮤어 모델(Langmuir model)을 이용한 계산을 통하여 알 수 있다. 구체적으로, 랭뮤어 모델에서 흡착 현상을 나타내는 공식은 다음과 같다 (1):

$$(1) R_a(t) = (R_{\max} - R_0)(1 - e^{-(k_{on}c_0 + k_{off})(t - t_0)}) + R_0$$

[0100] 상기 식(1)에서 상기 R_a 는 흡착에 대한 반사율을 의미하며, 이는 시간에 의존하는 값이다. 또한, 상기 식(1)에서 상기 $R_{\max}$ 는 농도가 c_0 인 타겟 분자가 최대 커버리지(coverage)를 나타낼 때의 최대 반사율을 의미하며, 상기 R_0 는 흡착이 시작되기 전의 백그라운드 반사율을 의미한다.

[0102] 한편, 랭뮤어 모델에서 탈착 현상을 나타내는 공식은 다음과 같다 (2):

$$(2) R_d(t) = (R_{\max} - R_0)e^{-k_{off}(t - t_a)} + R_0$$

[0103] 상기 식(2)에서 상기 R_d 는 탈착에 대한 반사율을 의미하며, 상기 t_a 는 세척이 시작되는 시간을 의미한다. 본원의 도 5의 시간-반사율 그래프에서 얻은 데이터를 상기 식(2)에 대입하여 탈착 속도 상수인 k_{off} 값을 먼저 계산할 수 있고, 이 값을 상기 식(1)에 대입함으로써 흡착 속도 상수인 k_{on} 값을 계산할 수 있다. 이와 같이 계산한 k_{off} 값, 및 k_{on} 값을 하기 식(3)에 대입하면, 친화도 상수(affinity constant)인 K_a 값을 계산할 수 있다:

$$(3) K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}}$$

[0105] 본원의 도 5의 시간-반사율 그래프에서 얻은 데이터를 상기 식(2)에 대입하여 k_{off} 값을 먼저 계산하고, 이 값을 상기 식(1)에 대입함으로써 k_{on} 값을 계산한 뒤, 상기 k_{off} 값, 및 k_{on} 값을 상기 식(3)에 대입함으로써 K_a 값을 계

산하여, 하기 표 1로서 정리하여 나타내었다:

표 1

	실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4
$k_{off} (s^{-1})$	4.367×10^{-5}	2.600×10^{-5}	7.550×10^{-2}	1.850×10^{-5}
$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	3.550×10^3	3.997×10^3	1.941×10^6	4.388×10^3
$K_a (M^{-1})$	8.129×10^7	1.537×10^8	2.570×10^7	2.372×10^8

상기 표 1을 참조하면, 친화도 상수인 K_a 값은 실시예 4에서 가장 큰 값으로 나타났으며, 실시예 2, 실시예 1, 실시예 3 순으로 K_a 값이 감소하였다. 이러한 결과는, 15nm 크기의 금 나노입자를 추가 포함하는 센서인 실시예 4의 센서에서 DNA 혼성화 결합이 가장 효율적으로 일어났으며, 그 다음으로는 은 콜로이드층을 추가 포함하는 센서인 실시예 2의 센서에서 DNA 혼성화 결합이 효율적이었음을 의미한다. 이는, 실시예 1의 센서와는 달리, 실시예 2 및 실시예 4의 센서는 각각 은 콜로이드층 및 금 나노입자를 추가 포함함으로써 표면 플라즈몬 공명(SPR)의 커플링(coupling) 현상을 일으키기 때문에 나타난 결과이다. 실시예 3의 센서의 경우, 금 나노입자를 추가 포함함으로써 SPR의 커플링 현상을 일으킬 수 있기는 하지만, 5 nm 크기의 금 나노입자가 지나치게 조밀하게 분포되어 있어서 DNA 혼성화 결합에 입체적 장애로서 작용하게 되어, 결과적으로 실시예 1의 센서보다도 낮은 K_a 값을 나타내게 된 것으로 해석할 수 있다. 실시예 2의 센서의 경우에는, 은 콜로이드 입자가 조밀하게 분포되어 있기는 하지만, 실시예 3의 금 나노입자와는 달리 상기 은 콜로이드 입자는 DNA 혼성화 결합이 일어나는 위치에서 멀리 떨어진 기재 부근에 존재하기 때문에, DNA 혼성화 결합에 입체적 장애로서 작용하지 않은 것으로 해석된다.

<실험예 3>

SPR 신호 변화(incident angle-reflectivity) 측정을 통한, DNA 혼성화 결합 감지 센서에서의 DNA 혼성화 결합 여부 확인 실험

실시예 1 내지 실시예 4에 따라 제조된 DNA 혼성화 결합 감지 센서에서의 DNA 혼성화 결합 여부를 확인하기 위하여 빛의 입사각에 따른 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR) 신호 변화를 측정하였으며, 그 결과를 도 6에 공명각-반사율(incident angle-reflectivity) 그래프로서 나타내었다.

구체적으로, 도 1의 모식도에 나타난 센서 제조 및 상기 센서를 이용한 타겟 DNA 검출 과정의 각각의 단계에서, 공명각에 따른 반사율의 변화를 측정하여 도 6에 나타내었다. 도 6을 참조하면, 각각의 단계를 거침에 따라 공명각이 더 큰 각도로 이동(red-shift)되는 것이 확인된다.

본 실험예 3은, 센서 표면에 어떠한 물질이 고정되면, 표면 플라즈몬 층의 굴절률이 변화되어 공명각의 위치가 변화하게 된다는 원리를 이용한 것이다. 프렌셀 방정식(Fresnel equation)에 따르면, 공명각은 표면에 흡착되는 물질의 유전율 상수, 및 흡착 두께에 의존적으로 변화하는 것이므로, 상기 공명각에 관한 데이터가 있고 상기 흡착된 물질의 유전율 상수를 알고 있는 경우라면, 이 값들을 프렌셀 방정식에 대입함으로써 흡착 두께를 계산할 수 있다.

본 실험예 3에서는, 상기 공명각에 관한 데이터가 도 6에 그래프로서 나타나있고 상기 흡착된 물질의 유전율 상수를 알고 있는 경우에 해당되어, 프렌셀 방정식 계산을 위한 Winspill 3.02 소프트웨어에 상기 값들을 대입함으로써 흡착 두께를 계산할 수 있었다.

특히, 실시예 1에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 공명각에 관한 데이터인 도 6a, 및 이를 확대한 것인 도 6b를 참조하여 계산된, 상기 센서를 구성하는 각 층들의 두께는 하기 표 2로서 정리하여 나타내었다:

표 2

[0116]

DNA 혼성화 결합 감지 센서의 층	두께 (nm)
금 박막층	52.52
자기조립 단분자층(SAM)	1.5
바이오틴 층	0.92
스트렙타비딘 층	1.55
프로브 DNA	1.56
타겟 DNA	1.7

[0117]

한편, 도 6c는 실시예 2에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 공명각에 관한 데이터이며, 도 6d는 이를 확대한 것이다. 상기 공명각 데이터를 프렌즈넬 방정식 계산을 위한 Winspall 3.02 소프트웨어에 대입하여 흡착 두께를 계산하고, 이 값을 상기 표 2의 값과 대조함으로써 실시예 2의 센서에만 포함되어 있는 은 콜로이드층의 두께를 계산할 수 있다. 이와 같이 계산된 은 콜로이드층의 두께는 1.3 nm 였다.

[0118]

한편, 도 6e는 실시예 3에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 공명각에 관한 데이터이며, 도 6f는 이를 확대한 것이다. 또한, 도 6g는 실시예 4에 따른 DNA 혼성화 결합 감지 센서의 공명각에 관한 데이터이며, 도 6h는 이를 확대한 것이다. 도 6e 내지 도 6h를 참조하면, 센서에 금 나노입자가 도입되는 경우 공명각의 변화가 다른 단계에 비하여 크게 일어나게 되며, 이는 금 나노입자의 도입에 따라 SPR 커플링 현상이 유도되기 때문인 것으로 추측된다. 또한, 금의 유전율 상수 값이 유전체의 유전율 상수 값 보다 크고 음의 값을 가지므로 공명각의 변화가 크게 나타나며, 특히 금 박막 표면의 거칠기가 커질수록 SPR 커브의 폭이 넓게 퍼지게 된다. 도 6e 내지 도 6h에서, 금 나노입자가 도입된 후 커브의 모양이 바뀌는 것을 통하여, 금 나노입자가 스트렙타비딘 층에 성공적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다.

[0119]

한편, 실시예 1 내지 실시예 4 각각에 있어서, DNA 혼성화 결합에 따른 공명각의 변화($\Delta\theta$)에 대한 민감도를 하기 표 3으로서 나타내었다:

표 3

[0120]

		실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4
$\Delta\theta$	프로브 DNA	0.0906	0.0518	0.133	0.208
	타겟 DNA	0.0683	0.0378	0.0721	0.0859

[0121]

상기 표 3을 참조하면, 실시예 1의 경우 공명각의 변화가 미미하였는데, 이는 프로브 DNA와 타겟 DNA의 DNA 혼성화 결합이 센서 중 금 박막으로부터 생기는 표면 플라즈몬의 장과 상당히 떨어진 거리에서 일어난다는 점, 및 실시예 1에서는 극미량(10^{-7} M)의 프로브 DNA와 타겟 DNA를 사용했다는 점에서 기인한 것으로 해석될 수 있다.

[0122]

한편, 실시예 4의 경우, 공명각의 변화는 실시예 1의 경우와 비교하여 125.8 %가 증가하였다. 이는, 실시예 4의 경우 금 박막층이 형성하는 표면 플라즈몬 장과 15 nm 크기의 금 나노입자가 형성하는 표면 플라즈몬 장이 커플링 현상을 유발하게 됨에 따라 SPR 신호가 증가되었기 때문인 것으로 해석될 수 있다.

[0123]

한편, 실시예 2의 경우, 센서의 하층에 위치하여 DNA 혼성화 결합이 형성되는 센서의 상층과 거리가 멀어서 입체적 장애를 구성하지 않기 때문에, 상기 표 1에 나타난 바와 같이 실시예 3에 비하여 큰 K_a 값을 가질 수 있었으나, 상기 표 3에 나타난 공명각의 변화($\Delta\theta$)에 있어서는 실시예 3에 비하여 작은 값을 나타내었다. 이는, 실시예 2의 경우, 표면 플라즈몬 장의 커플링 현상이 DNA 혼성화 결합이 일어나는 위치와 먼 곳에서 일어나기 때문인 것으로 추측된다.

[0124]

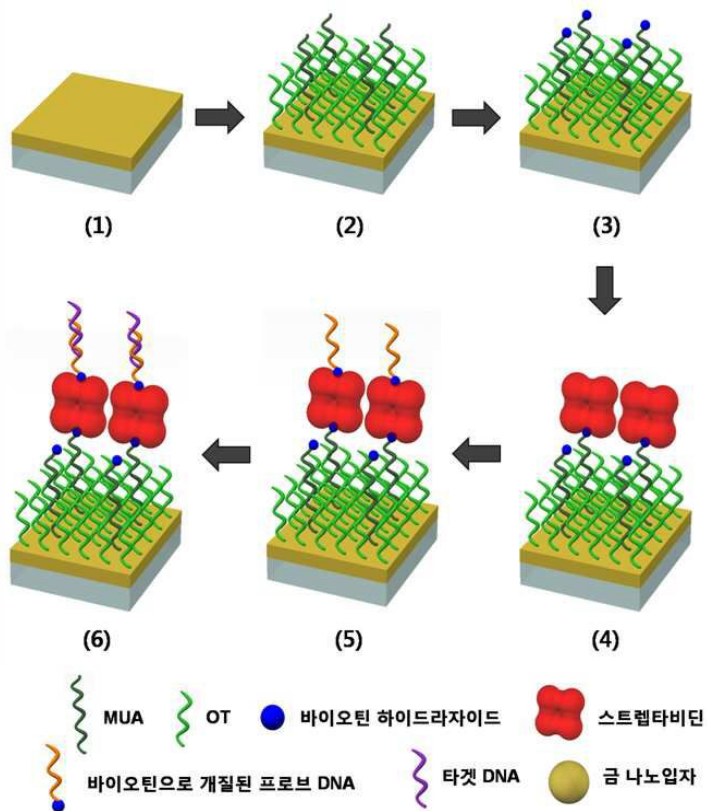
진술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된

것으로 설명되어 있는 구성요소들도 결합된 형태로 실시될 수도 있다.

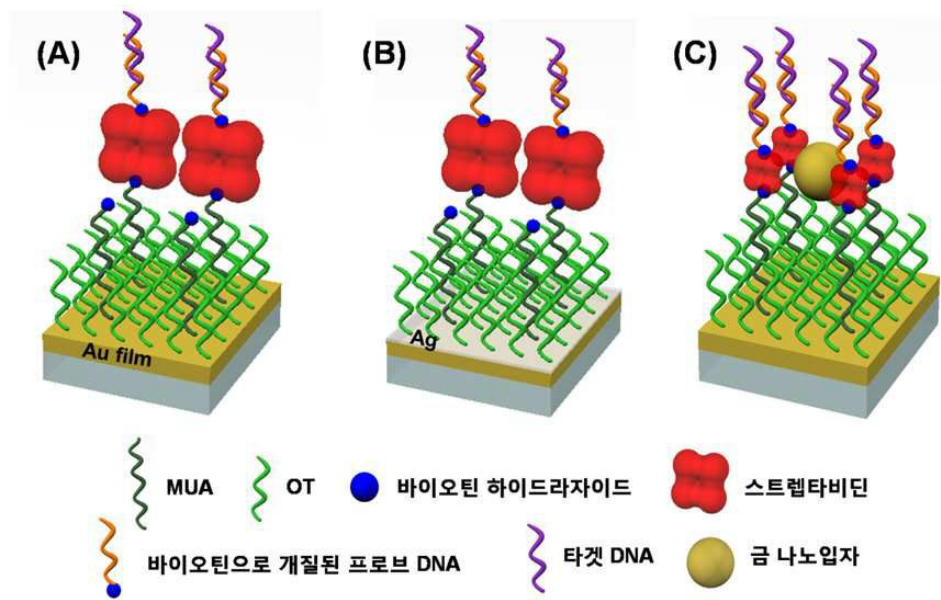
[0125] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

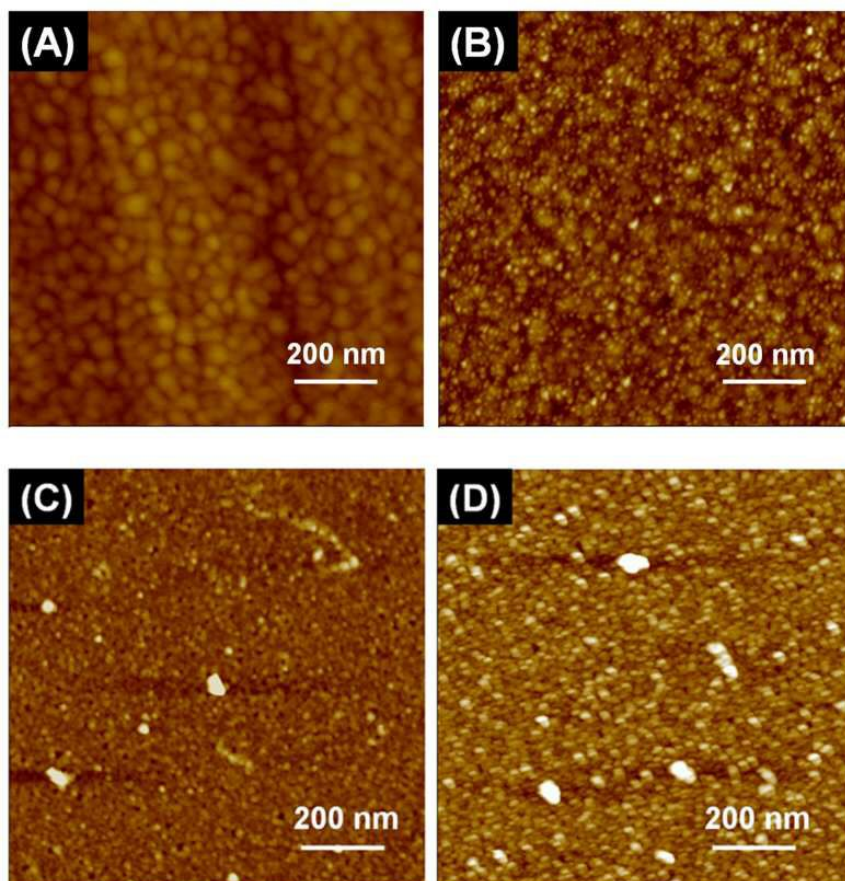
도면1



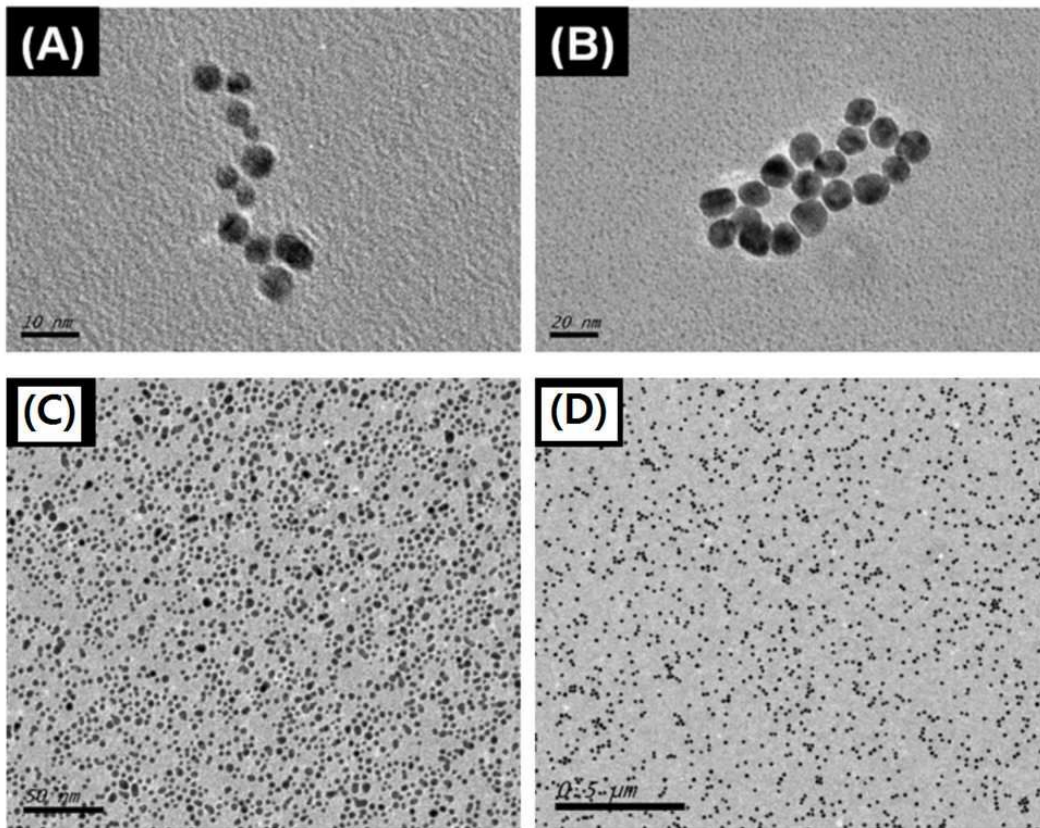
도면2



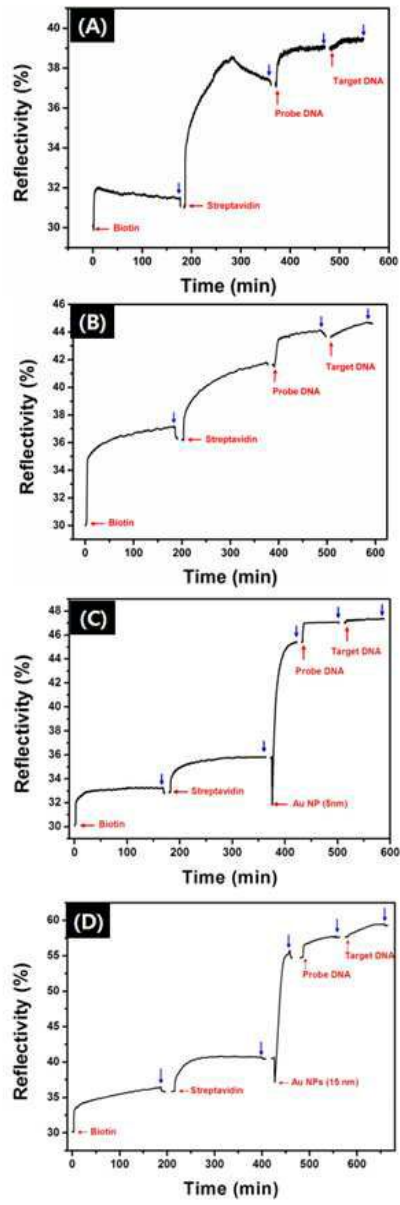
도면3



도면4



도면5



도면6

