(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0019767
(43) 공개일자 2021년02월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 21/65* (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54346 (2013.01)
G01N 21/65 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0098793
(22) 출원일자 2019년08월13일
심사청구일자 2019년08월13일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김영근
서울특별시 강남구 압구정로61길 37, 72동 1109호(압구정동, 한양아파트)
김유진
경경기도 성남시 분당구 미금로 63, 308동 1904호(구미동, 무지개마을신한.건영아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

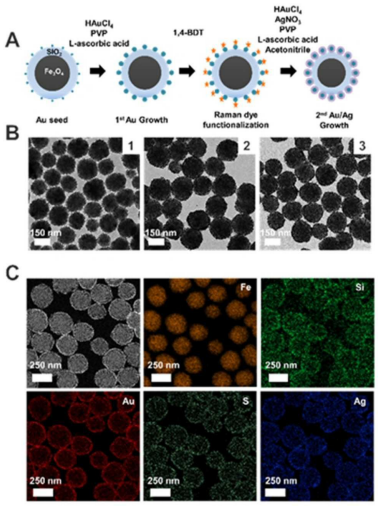
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **자성-광학 복합 나노구조체**

(57) 요 약

본 발명은 자성-광학 복합 나노구조체에 관한 것으로, 자성-광학 복합 나노구조체는 제 1 코어-쉘 나노입자 및 제 2 코어-쉘 나노입자의 이종 나노입자들로 구성되어 자성과 광학 기능을 동시에 구현할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/54326 (2013.01)
G01N 33/553 (2013.01)
(72) 발명자
박범철
서울특별시 성동구 마장로 137, 213동 802호(상왕십리동, 텐즈힐)
김명수
경기도 수원시 권선구 세권로316번길 15, 345동 1202호(권선동, 권선3단지 상록아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2019R1A2C3006587
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야 기초연구사업 중견연구
연구과제명 금속 및 금속산화물 기반 항암 면역치료용 복합스캐폴드 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 10080408
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원
연구사업명 핵심소재원천기술개발사업
연구과제명 복합기능 나노입자를 활용한 고감도 체외진단 혁신기술 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

자성 나노입자에 세라믹 쉘을 형성하여 제1 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계;

상기 제1 코어-쉘 나노입자에 금 나노입자를 부착시켜 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계;

상기 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자의 상기 금 나노입자를 1차 성장시키는 단계;

상기 1차 성장된 금 나노입자 상에 라만 분자를 기능화시켜 라만 분자가 기능화된 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계; 및

상기 라만 분자가 기능화된 코어-쉘 나노입자의 라만 분자가 기능화된 금 나노입자에 금, 은 또는 금-은 합금 쉘을 형성하여 제2 코어-쉘 나노입자를 형성하는 단계;를 포함하는

자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

자성 나노입자는 FeO, Fe_2O_3, Fe_3O_4, $CoFe_2O_4$, $NiFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$, TiO_2, ZrO_2, CeO_2, Al_2O_3 및 MgO로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 금속산화물 나노입자인 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

자성 나노입자의 평균 입경은 10 내지 500 nm인 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

세라믹은 실리카, 티타니아, 지르코니아, 알루미나 및 제올라이트로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것인 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계는

제1 코어-쉘 나노입자의 쉘 표면에 기능기를 도입하는 단계; 및

상기 기능기에 금 나노입자 시드를 결합시키는 단계를 포함하는 것인 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

기능기는 아민기(-NH), 싸이올기(-SH), 카르복실기(-COOH), 하이드록실기(-OH) 및 도파민으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것인 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

금 나노입자를 1차 성장시키는 단계에서 상기 성장된 금 나노입자의 평균 입경은 5 내지 50 nm인 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

라만 분자가 기능화된 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계에서, 라만 분자는 BDT(1,4-벤젠디티올), FAM(플루오레세인), 답실(Dabcyl), TRIT(테트라메틸 로다민 아이소티올), NBD(7-니트로벤즈 2-1,3-다이아졸), 텍사스 레드(Texas Red) 염료, 프탈산, 테레프탈산, 아이소프탈산, 크레실 패스트 바이올릿, 크레실 블루 바이올렛, 브릴리언트(brilliant) 크레실 블루, 파라-아미노벤조산, 에리트로신, 비오틴, 다이곡시 게닌(digoxigenin), 5-카복시-4',5'-다이클로로-2',7'-다이메톡시, 플루오레세인, 5-카복시-2',4',5',7'-테트 라클로로플루오레세인, 5-카복시플루오레세인, 5-카복시 로다민, 6-카복시로다민, 6-카복시테트라메틸 아미노 프탈로시아닌, 아조메틴, 시아닌, 크산틴, 석신일플루오레세인, 아미노아크리딘, 양자점, 탄소 나노튜브, 탄소 동소체, 시아나이드, 티올, 클로린, 브롬, 메틸, 인, 황 및 시아닌 염료(Cy3, Cy3.5, Cy5) 및 로다민으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것인 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

금, 은 또는 금-은 합금 쉘을 형성하는 단계에서, 금 이온 전구체 용액 및 은 이온 전구체 용액의 금 이온 및 은 이온의 농도는 각각 0.01 mM 내지 1 M이고,

상기 금 이온 전구체 용액 및 은 이온 전구체 용액의 중량비는 1 : 0 내지 0: 1 인 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

금 이온 전구체 용액만을 사용하거나, 또는 금 이온 전구체 용액 및 은 이온 전구체 용액의 혼합 용액에서 금 이온 및 은 이온의 혼합 함량 대비 금 이온의 함량비가 50 몰% 이상이면 쉘은 에피텍셜한 성장 패턴을 나타내는 것인 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

에픽텍셜하게 성장된 제2 코어-쉘 나노입자의 크기는 5 nm 내지 100 nm 인 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 12

제 9 항에 있어서,

은 이온 전구체 용액만을 사용하거나, 또는 금 이온 전구체 용액 및 은 이온 전구체 용액의 혼합 용액에서 금 이온 및 은 이온의 혼합 함량 대비 은 이온의 함량비가 50 몰%를 초과하면 쉘은 은 아일랜드(island)로 성장하는 것인 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

은 아일랜드로 성장된 제2 코어-쉘 나노입자의 크기는 5 nm 내지 500 nm인 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법.

청구항 14

자성 나노입자 코어 및 세라믹 쉘을 포함하는 제1 코어-쉘 나노입자; 및

금 나노입자 코어 및 금, 은 또는 금과 은의 합금인 쉘을 포함하는 제2 코어-쉘 나노입자를 포함하며,

상기 제 1 코어-쉘 나노입자의 쉘 표면에 형성된 기능기에 제2 코어-쉘 나노입자가 결합되어 있고,

상기 금 나노입자 코어는 라만 분자로 기능화되어 있는 자성-광학 복합 나노구조체.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

제2 코어-쉘 나노입자는 상기 제1 코어-쉘 나노입자의 표면보다 내부에 위치하고 있는 것인 자성-광학 복합 나노구조체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자성-광학 복합 나노구조체에 관한 것으로, 자성-광학 복합 나노구조체는 제1 코어-쉘 나노입자 및 제2 코어-쉘 나노입자의 이종 나노입자들로 구성되어 자성과 광학 기능을 동시에 구현할 수 있다.

배 경 기 술

[0003] 기존 체외진단 생체분자 검지법으로 효소결합면역분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), 유세포분석기(flow cytometry) 등이 사용되고 있는데, 상기 분석법을 이용할 경우 수입 제품을 사용하므로 고가의 비용 및 많은 시간을 소요한다는 단점을 가진다. 뿐만 아니라, 유기 형광체는 라이프 타임이 짧으며, 안정성이 떨어진다는 측면에서 검사의 오류 발생 가능성이 크다.

[0004] 이러한 문제를 해결하기 위해 최근 검지 민감도가 높은 나노 소재를 다양한 관점에서 사용하고 있다. 그 중에서도 표면증강라만산란(SERS) 현상을 이용한 생체분자 또는 생체물질 검지는 다양한 형태의 금, 은 나노입자를 이용하여 응용되고 있다(특허문헌 1). 그러나, 상기 방법은 자기적(magnetic) 특성이 있지 않기 때문에 포획하고자 하는 분자 또는 단백질을 단독적으로 분리할 수 없다.

[0005] 따라서 자기적 특성을 가지는 비드(bead)를 사용하고 있으나, 상기 비드를 사용한 방법은 포획하고자 하는 특정 분자 및 단백질을 추출하는 데 공정이 복잡하다는 문제점을 가진다.

[0006] 대안으로 제시되었던 금속 및 금속산화물이 복합된 다기능성 나노입자는 그 응용성이 매우 클 것으로 기대됨에

도 불구하고, 단일 나노입자 내에서 균일한 자기적 특성과 광학적 특성을 동시에 가지는 것이 어려워 그 응용성이 제한되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허공보 제10-2009-0030775호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 표면증강라만산란(Surface-Enhanced Raman Scattering; SERS) 신호를 지닌 귀금속(금 및/또는 은) 및 자성 나노입자로 구성된 다양한 형태의 다기능성 자성-광학 복합 나노구조체 및 이의 제조방법, 상기 나노구조체를 이용한 세포 영상 및 생체분자 또는 생체물질 검지 능력을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 자성 나노입자에 세라믹 쉘을 형성하여 제1 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계;

[0012] 상기 제1 코어-쉘 나노입자에 금 나노입자를 부착시켜 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계;

[0013] 상기 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자의 상기 금 나노입자를 1차 성장시키는 단계;

[0014] 상기 1차 성장된 금 나노입자 상에 라만 분자를 기능화시켜 라만 분자가 기능화된 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계; 및

[0015] 상기 라만 분자가 기능화된 코어-쉘 나노입자의 라만 분자가 기능화된 금 나노입자에 금, 은 또는 금-은 합금 쉘을 형성하여 제2 코어-쉘 나노입자를 형성하는 단계;를 포함하는 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 전술한 제조 방법에 의해 제조되고,

[0018] 자성 나노입자 코어 및 실리카 쉘을 포함하는 제1 코어-쉘 나노입자; 및

[0019] 금 나노입자 코어 및 금, 은 또는 금과 은의 합금인 쉘을 포함하는 제2 코어-쉘 나노입자를 포함하며,

[0020] 상기 제 1 코어-쉘 나노입자의 쉘 표면에 형성된 기능기에 제2 코어-쉘 나노입자가 결합되어 있고,

[0021] 상기 금 나노입자 코어는 라만 분자로 기능화되어 있는 자성-광학 복합 나노구조체를 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 자성-광학 복합 나노구조체를 포함하는 분석물 검출용 키트, 분자진단 칩 또는 영상진단용 조성물을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 전술한 자성-광학 복합 나노구조체의 표면에 검출하고자 하는 분석물과 결합할 수 있는 바이오 분자를 기능화하는 단계;

[0026] 상기 기능화된 자성-광학 복합 나노구조체를 하나 이상의 분석물을 포함하는 시료에 노출시키는 단계; 및

[0027] 라만 분광법을 이용하여 자성-광학 복합 나노구조체에 결합된 분석물을 확인하는 단계를 포함하는, 분석물을 검

출 또는 영상화하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에서는 자성 나노입자 표면에 귀금속 나노입자 시드를 화학적 결합하고, 상기 귀금속 나노입자 시드들을 성장시켜 다양한 구조의 다기능성 나노입자를 제조하는 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명에서는 금 이온 전구체 및 은 전구체의 함량 비율을 조절하여 다양한 구조를 가지는 자성-광학 복합 나노구조체를 제조할 수 있다.

[0031] 상기 본 발명에 따른 자성-광학 복합 나노구조체는 라만 분자 및 생체 친화적 유기 분자로 기능화되어 있으므로, 특이적으로 생체분자 또는 생체물질의 포획 및 검지를 가능하게 할 뿐만 아니라, 세포 영상을 가능하게 할 수 있다.

[0032] 따라서 본 발명의 복합 나노구조체는 질병 진단 및 세포 분리와 영상 등 다양한 바이오 메디컬 분야에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명에 따른 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 과정 모식도(A), 상기 모식도에서 각각의 단계의 투과전자현미경(Transmission Electron Microscopy, TEM) 사진(B), 및 (S3)의 투과전자현미경 사진 및 에너지 분산형 분광분석법(Energy Dispersive X-ray Spectroscopy, EDX) 사진(C)을 나타낸다.

도 2는 금 이온 전구체 및 은 이온 전구체의 비율에 따라 제조된 복합 나노구조체의 투과전자현미경 사진(A), 상기 복합 나노구조체의 저배율 투과전자현미경 사진, 에너지 분산형 분광분석법 사진 및 금/은 원자 백분율(atomic percent) 표(B), 및 복합 나노구조체의 합성 원리 모식도(C)를 나타낸다.

도 3은 1차 성장된 금 나노입자에 1,4-BDT의 기능화 없이 2차 성장을 진행하였을 경우 균일한 2차 금/은 쉘을 형성하는 것을 확인한 투과전자현미경 사진을 나타낸다.

도 4는 산화철 나노입자 상에 부착되어 있는 은 아일랜드를 제외한 금/은 나노입자의 투과전자현미경 사진의 입도분포(size distribution), 및 2차 성장한 금/은의 에픽택셜 성장을 나타내는 고해상도 투과전자현미경 사진과 Fast Fourier Transformation(FFT) 회절 사진을 나타낸다.

도 5는 금 이온 전구체 및 은 이온 전구체의 비율에 따른 광학적 특성을 자외선가시광선분광기(UV-Vis Spectrometer)로 확인한 결과(A), 및 1차 금 성장, 2차 금/은 성장 단계에 따른 광학적 특성 변화를 자외선가시광선분광기로 확인한 결과(B)를 나타낸다.

도 6은 2차 성장에서 금 이온 전구체 및 은 전구체의 비율에 따라 제조된 복합 나노구조체의 레이저 633 nm 파장에 대한 표면증강라만산란 신호 세기 측정 결과(A), 1,4-BDT의 지문 피크 중 하나인 1562cm^{-1}에서의 표면증강라만산란 신호 세기를 7번 측정하여 신호 신뢰성을 확인한 평가 결과(B), 2차 성장에서 금 이온 전구체 및 은 전구체의 비율에 따라 제조된 복합 나노구조체의 레이저 785 nm 파장에 대한 표면증강라만산란 신호 세기 측정 결과(C) 및 1,4-BDT의 지문 피크 중 하나인 1067cm^{-1}에서의 표면증강라만산란 신호 세기를 7번 측정하여 신호 신뢰성을 확인한 평가 결과(D)를 나타낸다.

도 7은 상기 금 이온 전구체 및 은 이온 전구체의 비율을 1:1로 하였을 때, 즉 (S3) 복합 나노구조체를 이용한 U87MG, MCF7, HeLa 세포 영상 결과를 나타낸다.

도 8은 인플루엔자 A 바이러스 검지 항체가 표면기능화된 복합 나노구조체(S3)와 인플루엔자 A 바이러스 포획 항체가 기능화된 Au 기판을 이용한 인플루엔자 A 항원 농도에 따른 주사전자현미경 사진(A), 인플루엔자 A 항원 농도에 따른 25 μm^2 면적에 따른 표면증강라만산란 신호 세기(B)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0037] 본 발명은 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법은 (A) 자성 나노입자에 세라믹 쉘을 형성하여 제1 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계(이하, 제1 코어-쉘 나노입자 제조 단계);

[0038] (B) 상기 제1 코어-쉘 나노입자에 금 나노입자를 부착시켜 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계(이하, 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자 제조 단계);

[0039] (C) 상기 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자의 상기 금 나노입자를 1차 성장시키는 단계(이하, 1차 성장 단계);

[0040] (D) 상기 1차 성장된 금 나노입자 상에 라만 분자를 기능화시켜 라만 분자가 기능화된 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계(이하, 라만 분자가 기능화된 코어-쉘 나노입자 제조 단계); 및

[0041] (E) 상기 라만 분자가 기능화된 코어-쉘 나노입자의 라만 분자가 기능화된 금 나노입자에 금, 은 또는 금-은 합금 쉘을 형성하여 제2 코어-쉘 나노입자를 형성하는 단계(이하, 2차 성장 단계)를 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 (A) 제1 코어-쉘 나노입자 제조 단계는 자성 나노입자에 세라믹 쉘을 형성하여 자성 나노입자-세라믹 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계이다.

[0044] 상기 단계는 자성 나노입자를 포함하는 제1 용액에 세라믹 전구체 용액을 혼합하여 수행할 수 있으며, 상기 단계를 통해 제1 코어-쉘 나노입자를 포함하는 제2 용액을 제조할 수 있다.

[0045] 일 구체예에서, 자성 나노입자는 상기 제1 코어-쉘 나노입자의 코어를 형성한다. 상기 자성 나노입자는 금속산화물 나노입자일 수 있으며, 상기 금속산화물은 FeO, Fe_2O_3, Fe_3O_4, $CoFe_2O_4$, $NiFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$, TiO_2, ZrO_2, CeO_2, Al_2O_3 및 MgO로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 본 발명에서는 상기 금속산화물을 사용하여 최종 제조되는 복합 나노구조체에 자성을 부여할 수 있다.

[0046] 상기 자성 나노입자는 자성 나노입자들의 클러스터로 구성될 수 있다.

[0047] 이러한 자성 나노입자 또는 클러스터의 평균 입경은 후술한 제2 코어-쉘 나노입자보다 크다면 제한되지 않으나, 예를 들어, 10 내지 500 nm, 50 내지 400 nm, 또는 100 내지 200 nm일 수 있다. 또한, 상기 자성 나노입자 또는 클러스터는 구형일 수 있다. 본 발명에서 용어 '구형'은 한 점에서 같은 거리에 있는 모든 점으로 이루어진 입체 모양이라는 수학적 정의의 구뿐 아니라, 외견상 둥글게 생긴 형상의 것을 모두 포괄할 수 있다.

[0048] 일 구체예에서, 세라믹 쉘은 자성 나노입자를 보호하는 역할을 수행할 수 있다.

[0049] 상기 세라믹은 실리카, 티타니아, 지르코니아, 알루미나 및 제올라이트로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으며, 본 발명에서는 실리카를 사용할 수 있다. 상기 실리카를 사용할 경우 쉘을 실리카 쉘로 표현할 수 있다.

[0050] 이러한 쉘의 두께는 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어, 쉘의 두께를 1 내지 100 nm, 또는 1 내지 20 nm로 조절할 수 있다.

[0051] 일 구체예에서, 세라믹 쉘은 자성 나노입자와 세라믹 전구체의 반응을 통해 형성될 수 있다. 이때, 세라믹 전구체로 알콕시화합물을 사용할 수 있으며, 구체적으로 테트라에톡시실란(TEOS)를 사용할 수 있다.

[0052] 본 발명에서 (B) 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자 제조 단계는 상기 제1 코어-쉘 나노입자에 금 나노입자를 부착시켜 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계이다.

[0053] 상기 단계는 제1 코어-쉘 나노입자의 쉘 표면에 기능기를 도입하는 단계; 및 상기 기능기에 금 나노입자 시드를 결합시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0054] 구체적으로, 상기 단계는 단계 (A)에서 제조된 제2 용액에 기능기 함유 화합물을 첨가하여 수행할 수 있으며, 상기 단계를 통해 쉘 표면에 기능기가 도입된 자성 나노입자-세라믹 코어-쉘 나노입자를 포함하는 제3 용액을 제조할 수 있다. 그리고, 상기 제3 용액에 금 나노입자를 첨가하여 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자를

포함하는 제4 용액을 제조할 수 있다.

[0055] 일 구체예에서, 세라믹 쉘 표면에 기능기를 도입하며, 상기 기능기는 금 나노입자 시드와 다중결합을 형성하게 된다.

[0056] 일 구체예에서, 상기 기능기는 아민기(-NH), 싸이올기(-SH), 카르복실기(-COOH), 하이드록실기(-OH) 및 도파민으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 구체적으로, 상기 기능기는 아민기일 수 있으며, 제 1 코어-쉘 나노입자와 아민기 함유 화합물을 반응시켜, 상기 쉘 표면에 아민기를 도입할 수 있다.

[0057] 일 구체예에서, 상기 기능기는 금 나노입자 시드와 결합하여, 상기 제1 코어-쉘 나노입자 상에 금 나노입자 시드가 부착될 수 있다.

[0058] 이때, 금 나노입자 시드는 당업계의 일반적인 제조방법을 통해 제조될 수 있으며, 구체적으로, 수용액 상에서 금 이온 전구체 용액 및 환원제를 이용하여 합성할 수 있다.

[0059] 상기 금 이온 전구체로는 염화금 수화물(gold chloride trihydrate, $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$), 포타슘 염화금 화합물(Potassium gold(III) chloride), $K(AuCl_4)$ 및 금시안화포타슘(Potassium dicyanoaurate, $KAu(CN)_2$) 으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있으며, 환원제로는 하이드로퀴논(hydroquinone), 소듐보로하이드라이드(NaBH4) 소듐 아스코르베이트(sodium ascorbate) 및 하이드록실아민(hydroxyl amine)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.

[0060] 상기 환원제는 수용액 상에서 금을 환원시키는 환원제로 작용할 뿐만 아니라, 합성된 금 나노입자의 주위에 음전하를 부여할 수 있다. 따라서, 환원된 금 나노입자 시드는 표면 음전하로 인해 수용액 상에서 잘 분산되어 있으며, 아민기 등의 기능기와 만나 강하게 결합할 수 있다. 따라서, 상기 금 나노입자 시드는 제1 코어-쉘 나노입자의 세라믹 쉘 표면의 기능기와 강한 결합을 형성하여, 상기 제1 코어-쉘 나노입자에 금 나노입자 시드가 부착될 수 있다.

[0061] 본 발명에서 (C) 1차 성장 단계는 상기 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자의 상기 금 나노입자를 1차 성장시키는 단계이다.

[0062] 상기 단계는 상기 (B)에서 제조된 제4 용액에 금 이온 전구체 용액을 첨가하여 수행할 수 있으며, 상기 단계를 통해 제5 용액을 제조할 수 있다.

[0063] 환원제에 의해 환원된 금 나노입자 시드는 그 크기가 너무 작으며, 낮은 광학적 특성 때문에 산업적인 이용에 한계를 가진다. 따라서, 본 발명에서는 작은 금 나노입자 시드의 크기와 광학적 특성을 더 크게 만들기 위해, 세라믹 쉘 표면에 부착되는 상기 금 나노입자 시드를 시드로 이용하여 상기 시드를 중심으로 나노입자를 성장시킬 수 있다.

[0064] 일 구체예에서, 상기 단계는 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자를 금 이온 전구체 용액, 환원제 및 안정화제와 혼합하여 수행할 수 있으며. 금 이온 전구체의 자기 핵 성장을 억제하기 위하여, 금 이온 전구체를 여러 번에 걸쳐 혼합할 수 있다. 상기 금 이온 전구체로는 전술한 종류를 사용할 수 있으며, 환원제로는 하이드로퀴논(hydroquinone), 소듐보로하이드라이드(NaBH4) 소듐 아스코르베이트(sodium ascorbate) 및 하이드록실아민(hydroxyl amine)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있고, 안정화제로는 PVP(폴리비닐피롤리돈) 및 SDS(소듐 도데실 설페이트)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.

[0065] 일 구체예에서, 금 나노입자의 성장은 금 이온 전구체의 함량을 달리하여 조절할 수 있으며, 성장된 금 나노입자의 평균 입경은 5 내지 50 nm 일 수 있다.

[0066] 본 발명에서 금 나노입자 시드의 성장은 상기 금 나노입자 시드를 상기 제1 코어-쉘 나노입자의 세라믹 표면에 부착시킨 후, 1차 성장시켜 상기 금 나노입자가 세라믹 표면에 맞닿아 성장하므로 단단하게 고정되어, 경제적이고 공정이 쉬운 장점을 가진다. 또한, 금 나노입자를 성장시키면 상기 나노입자 간의 네트워킹이 일어나 세라믹 표면에서 결코 떨어질 수 없는 튼튼한 구조를 형성할 수도 있다.

[0067] 본 발명에서 (D) 라만 분자가 기능화된 코어-쉘 나노입자 제조 단계는 상기 1차 성장된 금 나노입자 상에 라만 분자를 기능화시켜 라만 분자가 기능화된 코어-쉘 나노입자를 제조하는 단계이다.

[0068] 상기 단계는 상기 단계 (C)에서 제조된 제5 용액을 라만 분자 용액과 혼합하여 수행할 수 있으며, 상기 단계를 통해 라만 분자가 기능화된 코어-쉘 나노입자를 포함하는 제6 용액을 제조할 수 있다.

[0069] 본 발명에서는 라만 분자를 사용하여, 상기 라만 분자와 후술할 제2 코어-쉘 나노입자 사이의 표면증강라만산란(Surface-Enhanced Raman Scattering; SERS) 현상을 이용한 세포 영상 그리고 생체분자 검지를 가능하게 할 수 있다. 특히, 라만 분자는 제2 코어-쉘 나노입자의 쉘의 형상에 큰 영향을 미칠 수 있는데, 라만 분자를 사용함으로써 원하는 모양의 복합 나노구조체의 제조가 가능하다.

[0070] 라만 분자는 BDT(1,4-벤젠디티올), FAM(플루오레세인), 답실(Dabcyl), TRIT(테트라메틸 로다민 아이소티올), NBD(7-니트로벤즈 2-1,3-다이아졸), 텍사스 레드(Texas Red) 염료, 프탈산, 테레프탈산, 아이소프탈산, 크레실 패스트 바이올릿, 크레실 블루 바이올렛, 브릴리언트(brilliant) 크레실 블루, 파라-아미노벤조산, 에리트로신, 비오틴, 다이곡시 게닌(digoxigenin), 5-카복시-4',5'-다이클로로-2',7'-다이메톡시, 플루오레세인, 5-카복시-2',4',5',7'-테트 라클로로플루오레세인, 5-카복시플루오레세인, 5-카복시 로다민, 6-카복시로다민, 6-카복시테트라메틸 아미노 프탈로시아닌, 아조메틴, 시아닌, 크산틴, 석신일플루오레세인, 아미노아크리딘, 양자점, 탄소 나노튜브, 탄소 동소체, 시아나이드, 티올, 클로린, 브롬, 메틸, 인, 황 및 시아닌 염료(Cy3, Cy3.5, Cy5) 및 로다민으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으며, 상기 라만 분자 용액에서 라만 분자의 농도는 0.01 mM 내지 1 M일 수 있다. 또한, 상기 라만 분자 용액의 용매는 알코올, 물 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[0071] 본 발명에서 (E) 2차 성장 단계는 상기 라만 분자가 기능화된 코어-쉘 나노입자의 라만 분자가 기능화된 금 나노입자에 금, 은 또는 금-은 합금 쉘을 형성하는 단계이다. 상기 단계를 통해, 제2 코어-쉘 나노입자가 형성되며, 최종적으로 자성-광학 복합 나노구조체가 제조될 수 있다.

[0072] 상기 단계는 단계 (D)에서 제조된 제6 용액을 금 이온 전구체 용액 및/또는 은 이온 전구체 용액과 혼합하여 수행할 수 있으며, 상기 단계를 통해 금, 은 또는 금-은 합금 쉘이 형성된 자성-광학 복합 나노구조체를 포함하는 제7 용액을 제조할 수 있다. 상기 자성-광학 복합 나노구조체에서 금 나노입자 및 상기 금 나노입자에 형성된 금, 은 또는 금-은 합금 쉘을 제2 코어-쉘 나노입자라 표현할 수 있다.

[0073] 일 구체예에서, 제6 용액에 금 이온 전구체 용액 및/또는 은 이온 전구체 용액 외에 환원제, 자기 핵 형성 억제제 및 안정화제 등을 추가로 혼합할 수 있다. 상기 금 이온 전구체, 환원제, 금의 자기 핵 형성 억제제 및 안정화제로 전술한 종류를 사용할 수 있으며, 은 이온 전구체로 $AgNO_3$ 및 $AgClO_4$로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다. 또한, 은의 자기 핵 형성 억제제로 아세토니트릴을 사용할 수 있다.

[0074] 일 구체예에서, 금 이온 전구체 용액 및 은 이온 전구체 용액의 금 및 은의 농도는 각각 0.01 mM 내지 1 M일 수 있다. 또한, 상기 금 이온 전구체 용액 및 은 이온 전구체 용액의 중량비는 1 : 0 내지 0: 1 일 수 있다.

[0075] 본 발명에서는 라만 분자에 의해, 금 이온 전구체 용액 및 은 이온 전구체 용액의 함량에 따라 금 및/또는 은의 다른 2차 성장 결과를 가져올 수 있다.

[0076] 예를 들어, 금 이온 전구체 용액만을 사용하거나, 또는 금 이온 전구체 용액 및 은 이온 전구체 용액의 혼합 용액에서 금 이온 및 은 이온의 혼합 함량 대비 금 이온의 함량비가 50 몰% 이상이면, 즉, 함량(몰)이 Au ≥ Ag이면, 쉘은 에피텍셜한 성장 패턴을 나타낼 수 잇다. 즉, 균일한 금 쉘 및 금-은 합금 쉘이 형성될 수 있다. 특히, 상기 혼합 용액에서 금 이온의 함량이 증가할수록 보다 에피텍셜한 성장 패턴을 나타낼 수 있다.

[0077] 한편, 은 이온 전구체 용액만을 사용하거나, 또는 금 이온 전구체 용액 및 은 이온 전구체 용액의 혼합 용액에서 금 이온 및 은 이온의 혼합 함량 대비 은 이온의 함량비가 50 몰%를 초과하면, 즉 함량(몰)이 Ag > Au이면, 쉘은 결정성 아일랜드(crystalline island)로 성장할 수 있으며, 은 아일랜드 쉘이 국부적으로 성장할 수 있다.

[0078] 에피텍셜한, 즉, 균일한 금-은 합금 쉘 또는 금 쉘이 형성될 때, 금-은 나노입자들 간의 네트워킹(플라즈몬 커플링)이 발생할 수 있다. 이때, 에피텍셜한 성장은 금 나노입자 상에 균일한 박막층이 형성되는 것을 의미하며, 결정성 아일랜드는 금 나노입자의 핵을 중심으로 반구형으로 쉘이 형성되는 것을 의미한다. 본 발명에서는 2차 성장된 금속을 쉘로 표현할 수 있다.

[0079] 일 구체예에서, 에픽텍셜하게 성장된 제2 코어-쉘 나노입자의 크기는 5 nm 에서 100 nm 일 수 있다. 또한, 은 아일랜드로 성장된 제2 코어-쉘 나노입자의 크기는 5 nm 내지 500 nm일 수 있다.

[0081] 또한, 본 발명은 전술한 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 방법에 의해 제조된 자성-광학 복합 나노구조체에 관한 것이다.

[0082] 본 발명에 따른 자성-광학 복합 나노구조체는 자성 나노입자 코어 및 세라믹 쉘을 포함하는 제1 코어-쉘 나노입자; 및

[0083] 금 나노입자 코어 및 금, 은 또는 금과 은의 합금인 쉘을 포함하는 제2 코어-쉘 나노입자를 포함할 수 있다.

[0084] 일 구체예에서, 상기 제1 코어-쉘 나노입자의 쉘 표면에 형성된 기능기에 제2 코어-쉘 나노입자가 결합되어 있을 수 있다. 이때, 상기 제2 코어-쉘 나노입자들은 서로 맞닿아 연결된 네트워크를 형성할 수 있다. 구체적으로, 나노복합체의 제조시 제1 코어-쉘 나노입자의 쉘 표면의 기능기를 통해서 결합된 금 나노입자는 1차 성장 및 2차 성장을 통해 성장하여 네트워킹을 이룰 수 있다.

[0085] 또한, 상기 금 나노입자 코어는 라만 분자로 기능화되어 있을 수 있다.

[0086] 일 구체예에서, 상기 제2 코어-쉘 나노입자의 쉘은 코어를 감싸는 균일한 두께의 쉘의 형상을 가질 수 있으며, 또는 코어 상에 은 아일랜드만 국부적으로 형성된 형상을 가질 수 있다.

[0088] 또한, 본 발명은 전술한 자성-광학 복합 나노구조체를 포함하는 분석물 검출용 키트, 분자진단 칩 또는 영상진단용 조성물에 관한 것이다.

[0089] 또한, 본 발명은 자성-광학 복합 나노구조체의 표면에 검출하고자 하는 분석물과 결합할 수 있는 바이오분자를 기능화하는 단계;

[0090] 상기 기능화된 자성-광학 복합 나노구조체를 하나 이상의 분석물을 포함하는 시료에 노출시키는 단계; 및

[0091] 라만 분광법을 이용하여 자성-광학 복합 나노구조체에 결합된 분석물을 확인하는 단계를 포함하는, 분석물을 검출 또는 영상화하는 방법에 관한 것이다.

[0092] 본 발명에 따른 자성-광학 복합 나노구조체는 검출하고자 하는 분석물을 인식할 수 있는 바이오분자가 기능화되어, 각종 생체분자들을 검출하는데 응용될 수 있는 프로브로 사용될 수 있다.

[0093] 일 구체예에서, 검출하고자 하는 분석물은 아미노산, 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 글리코프로테인, 리포프로테인, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 핵산, 당, 탄수화물, 올리고사카라이드, 폴리사카라이드, 지방산, 지질, 호르몬, 대사산물, 사이토카인, 케모카인, 수용체, 신경전달물질, 항원, 알레르겐, 항체, 기질, 대사산물, 보조인자, 억제제, 약물, 약학물, 영양물, 프리온, 독소, 독물, 폭발물, 살충제, 화학무기제, 생체유해성 제제, 방사선동위원소, 비타민, 헤테로사이클릭 방향족 화합물, 발암물질, 돌연변이유발요인, 마취제, 암페타민, 바르비투레이트, 환각제, 폐기물 또는 오염물일 수 있다. 또한, 분석물이 핵산일 경우 상기 핵산은 유전자, 바이러스 RNA 및 DNA, 박테리아 DNA, 곰팡이 DNA, 포유동물 DNA, cDNA, mRNA, RNA 및 DNA 단편, 올리고뉴클레오티드, 합성 올리고뉴클레오티드, 개질된 올리고뉴클레오티드, 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산, 자연적 및 합성핵산일 수 있다.

[0094] 일 구체예에서, 분석물을 인식할 수 있는, 본 발명에 따른 복합 나노구조체의 표면에 결합될 수 있는 바이오 분자는 항체, 항체 단편, 유전조작 항체, 단일 쇄항체, 수용체 단백질, 결합 단백질, 효소, 억제제 단백질, 렉틴, 세포 유착 단백질, 올리고뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드, 핵산 또는 압타머일 수 있다

[0095] 일 구체예에서, 상기 라만 분광법은 표면 증강 라만 분광법(SERS), 표면증강 공명 라만 분광법(SERRS), 또는 하이퍼-라만 및/또는 비간섭성 반스톡스 라만분광법(CARS)일 수 있다.

[0096] 표면증강라만산란 기술은 기본적으로 낮은 power의 레이저를 사용하기 때문에, 시료에 대해 비파괴적이다. 또한, 프로브의 제작 기술 발전과 더불어 생체 적합성이 뛰어난 재료를 이용하여 세포 및 생체 내에서의 질병 진단에 다각도로 적용될 수 있다. 세포 및 생체 내에서 프로브의 이동 및 생체 적합성을 높이기 위해 프로브의 표면을 고분자 리간드나 실리카와 같은 생체 적합성 물질로 코팅할 수 있다. 또한, 바이오 물질간의 특이적 반응(DNA hybridization, 항원-항체반응 등)을 이용하여 세포 및 생체 내에서 특정 질병에 대한 고감도 진단이 가능하다. 또한 신원확인, 혈연관계 확인, 세균이나 세포 동정 또는 동식물의 원산지 확인에 사용할 수 있다.

[0097] 따라서, 본 발명에 따른 복합 나노구조체를 사용한 비파괴 표면증강 라만 분석기술은 살아 있는 세포 및 생체 내에서 특정 질병에 대한 실시간 모니터링 및 치료약물 개발분야에 활용될 수 있다.

[0098] 나아가, 본 발명에 따른 복합 나노구조체는 SERS 신호가 극대화 될 수 있는 미세구조를 재현성 있게 확보할 수 있으므로, 매우 신뢰도 높은 유용한 초고감도 생체 분자 분석법에 사용될 수 있으며, 체외 진단법 외에도 생체

내 이미징 기술로도 매우 유용하다.

[0100] **실시예**

[0101] **실시예 1. 자성-광학 나노 복합구조체 제조**

[0102] **1. 자철석(magnetite, Fe_3O_4) 나노입자 합성**

[0103] 자철석(magnetite, Fe_3O_4) 나노입자의 합성은 폴리올 방법을 통해 수행하였다.

[0104] 염화철 6수화물(iron chloride hexahydrate, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$)은 철 이온 전구체로, 에틸렌 글리콜(ethylene glycol, EG)은 환원제이면서 용매로, 아세트산 나트륨(sodium acetate, NaOAc), H_2O은 가수분해를 도와주는 보조제로 사용하였다.

[0105] EG 50 mL에 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 2 mmol, NaOAc 6 mmol, H_2O 150 mmol을 넣고, 3구 플라스크에 넣은 후 기계적 스터어링(mechanical stirring)을 해주면서 15분 동안 200℃까지 빠르게 가열하였다. 반응 시간을 3시간 30분으로 유지하고, 냉각시킨 후, 에탄올을 이용해서 세척하였다.

[0107] **2. 금(Au) 나노입자 합성**

[0108] 염화금 수화물(gold chloride trihydrate, $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$)은 금 이온 전구체로, 수소화붕소나트륨(sodium borohydride, $NaBH_4$)은 환원제로, 구연산 나트륨(trisodium citrate)은 안정화제로, H_2O는 용매로 사용하였다.

[0109] H_2O 50mL에 $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$의 농도를 0.25 mM, 구연산 나트륨의 농도를 0.25 mM 로 맞추고, 차가운 H_2O 1.5 mL(0.1 M $NaBH_4$ 포함)을 넣었다. 상온에서 자기 교반(magnetivc stirring)을 유지한 채로 반응시켰다(금 나노입자 용액 제조).

[0111] **3. 금 나노입자가 부착된 코어-쉘 나노입자 제조**

[0112] 산화철 나노입자에 스토버(Stφber) 방법을 이용해 실리카(silica) 쉘(shell)을 형성하였다.

[0113] 에탄올(ethanol), 물(H_2O)은 용매로, 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP)는 안정화제로, 수산화 암모늄(ammonium hydroxide, NH_4OH) 용액은 촉매제로, 에틸 실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS)는 실리카 전구체로 사용하였다.

[0114] 에탄올 50 mL, H_2O 7.5 mL, NH_4OH 2.5 mL 및 PVP 400 mg을 섞은 후, 상기 용액 내에 산화철 나노입자 25 mg을 넣어 산화철 나노입자가 섞인 균일한 혼합 용액을 제조하였다. 상기 혼합 용액에 TEOS 0.050 mL을 넣은 후, 상온에서 1시간 30분 동안 셰이킹(shaking) 하였다. 그리고 에탄올로 세척하고 에탄올 10 mL에 분산시켰다. 이를 통해, 산화철 나노입자-실리카 코어-쉘 나노입자가 합성되었다(제2 용액 제조).

[0116] 상기 산화철 나노입자-실리카 코어-쉘 나노입자에 금 나노입자를 부착하였다.

[0117] (3-아미노프로필)트리에톡시실란(3-Aminopropyl)triethoxysilane, APTES)은 아민기($-NH_2$)의 전구체로, 2-프로판올(2-propanol)은 용매로 사용하였다.

[0118] 산화철 나노입자-실리카 코어-쉘 나노입자를 포함하는 에탄올 4 mL(산화철 나노입자 2.5 mg/ml 포함)을 2-프로판올 10 mL로 용매 치환하고, APTES 0.050 mL을 넣고 셰이킹 하였다. 그리고, 80℃에서 4시간 동안 음파처리(sonication) 한 후, H_2O로 세척하고, H_2O 5 mL에 분산시켰다(제3 용액 제조).

[0119] 상기 아민기가 표면에 기능화된 산화철-실리카 코어-쉘 나노입자를 포함하는 제3 용액 5 mL와 2.에서 제조된 금 나노입자 용액 30 mL를 혼합하고 16 시간 동안 흔들어주었다. 그리고 후처리로 PVP 1 wt%가 녹아있는 H_2O를 안

정화제로 넣은 후 균일하게 세이킹을 진행한 뒤, H_2O로 세척하고 H_2O 20 mL에 분산시켰다(제4 용액 제조).

[0121] **4. 자성-광학 복합 나노구조체 제조**

[0122] 산화철 나노입자 상의 금 나노입자를 1차 성장시키기 위해, PVP는 안정화제로, 사염화금산 수화물($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$)은 금 이온 전구체로, 아스코르브산(L-ascorbic acid)은 환원제로, H_2O은 용매로 사용하였다.

[0123] 5 mM $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$를 포함하는 H_2O 용액을 준비하였다. 제4 용액인 금 나노입자들이 부착된 자성 나노입자 용액 0.4 mL(산화철 나노입자 0.5 mg/ml 포함), H_2O 3.6 mL(1wt% PVP 포함), 20 mM 아스코르브산 수용액 0.080 mL이 균일하게 혼합되도록 세이킹 하였다. 그리고 자기 핵 형성(self-nucleation) 억제를 위해 10분마다 5 mM $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ 용액을 0.02 mL씩 6번에 나눠 넣어주었다. 상온에서 세이킹하면서 1시간 동안 반응하였다. H_2O로 세척하고, H_2O 4 mL에 분산시켰다(제5 용액 제조).

[0124]

[0125] 그 후, 1,4-벤젠 디티올(1,4-benzenedithiol, 1,4-BDT)을 사용하여 라만 분자 기능화를 진행하였다.

[0126] 제5 용액인 1차 성장된 금 나노입자가 부착된 산화철 나노입자를 포함하는 용액을 1 mM 1,4-BDT을 포함하는 에탄올 용액 0.040 mL에 넣고 1시간 30분 동안 상온에서 스터어링을 유지한 채로 반응시켰다. H_2O로 세척하고 H_2O 0.4 mL에 분산시켰다(제6 용액).

[0128] 라만 분자가 기능화된 1차 성장된 금 나노입자를 금 그리고 은을 성분으로 지니는 2차 쉘로 성장시켰다.

[0129] 2차 성장시키기 위해, PVP는 안정화제로, AgCl는 생성 억제제로, 아스코르브산은 환원제로, 아세토니트릴(acetonitrile)은 Ag의 자기 핵 형성 억제제로, $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$은 금 이온 전구체로, $AgNO_3$은 은 이온 전구체로 사용하였다.

[0130] 즉, 라만 분자가 기능화 된 1차 성장된 금 나노입자 용액(제6 용액)에 H_2O 3.6 mL(PVP 1wt% 포함), 20 mM 아스코르브산 수용액 0.080 mL을 균일하게 혼합되도록 세이킹 하였다. 그리고 5 mM $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ 수용액과 5 mM $AgNO_3$ 수용액을 준비하였다. 상기 수용액들의 총합은 0.08 mL로 고정하고, 비율을 1:0 (S1), 2:1 (S2), 1:1 (S3), 1:2 (S4), 0:1 (S5)로 조절하여 10분마다 수용액을 0.02 mL씩 4번 나눠 넣어주었다. 반응은 상온에서 세이킹하면서 40분간 행하였다. H_2O로 세척하고, H_2O 4 mL에 분산시켰다(제7 용액 제조).

[0132] **비교예 1.**

[0133] 라만 분자로 기능화하지 않은 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 자성-광학 나노 복합구조체를 제조하였다.

[0135] **실험예 1. 자성-광학 복합 나노구조체의 물리적 특성**

[0136] 도 1에서 (A)는 본 발명에 따른 자성-광학 복합 나노구조체의 제조 과정(단계) 모식도이고, (B)는 상기 모식도에서 각각의 단계의 투과전자현미경(Transmission Electron Microscopy, TEM) 사진이며, (C)는 (S3)으로 제조 시 투과전자현미경 사진 및 Fe, Si, Au, S(라만 분자에 있는 싸이올기(-SH)) 및 Ag의 에너지 분산형 분광분석법(Energy Dispersive X-ray Spectroscopy, EDX) 사진을 나타낸다.

[0137] 상기 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 자성-광학 복합 나노구조체는 자성 나노입자 코어 및 실리카 쉘을 포함하는 제1 코어-쉘 나노입자; 및 금 나노입자 코어 및 금과 은의 합금인 쉘을 포함하는 제2 코어-쉘 나노입자를 포함하며, 상기 제1 코어-쉘 나노입자의 쉘 표면에 형성된 기능기에 제2 코어-쉘 나노입자가 결합된 것을 확인할 수 있다.

[0139] 또한, 도 2에서 (A)는 금 이온 전구체 및 은 이온 전구체의 비율에 따라 제조된 복합 나노구조체의 투과전자현미경 사진이고, (B)는 상기 복합 나노구조체의 저배율 투과전자현미경 사진, 에너지 분산형 분광분석법 사진 및 금/은 원자 백분율(atomic percent) 표이며, (C)는 복합 나노구조체의 합성 원리 모식도를 나타낸다.

[0140] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, 금 이온은 균일한 쉘을 형성하면서 2차 성장하는 반면, 은 이온은 덤벨 구조로 은 아일랜드만 국부적으로 형성하는 것을 확인할 수 있다.

[0141] 라만 분자가 존재하지 않은 비교예 1의 경우, 모든 제조된 나노입자가 균일한 쉘을 형성하면서 성장하는 것을 볼 때(도 3 참조), 상기 라만 분자에 의해 금 및/또는 은 이온의 2차 성장이 조절되어 원하는 형상의 복합 나노구조체를 제조할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0143] 또한, 도 4는 제2 코어-쉘 나노입자의 투과전자현미경 사진의 입도분포(size distribution), 및 (S3)에서 2차 성장한 금/은의 성장을 나타내는 고해상도 투과전자현미경 사진과 Fast Fourier Transformation(FFT) 회절 사진을 나타낸다.

[0144] 상기 도 4에 나타난 바와 같이, 금 나노입자 시드는 1차 성장 및 2차 성장을 통해 평균 입경이 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0146] 또한, 도 5에서 (A)는 금 이온 전구체 및 은 이온 전구체의 비율에 따른 광학적 특성을 자외선가시광선분광기(UV-Vis Spectrometer)로 확인한 결과를 나타내고, 및 (B)는 1차 금 성장, 2차 금/은 성장 단계에 따른 광학적 특성 변화를 자외선가시광선분광기로 확인한 결과를 나타낸다.

[0147] 상기 도 5에 나타난 바와 같이, 밀집된 금/은 나노입자에 의해 구조특이적 광학 특성을 가지는 것을 확인할 수 있다.

[0149] **실험예 2. 자성-광학 복합 나노구조체를 활용한 암세포 영상**

[0150] 실시예에서 제조된 자성-광학 복합 나노구조체를 커버글라스(cover glass) 위에 건조시켜, 단일 나노구조체에 대한 표면증강라만산란(SERS) 신호 세기를 공초점 라만 현미경(Confocal Raman Microscopy)을 이용하여 측정하였다. 이때, 100배 대물렌즈, 레이저 파장은 633 nm 와 785 nm 를 사용하였다. 레이저 파장 633 nm 조사 시 레이저 파워는 0.993 mW, 획득 시간(acquisition time)은 1 초로 측정하였다. 레이저 파장 785 nm 조사 시, 레이저 파워는 4.36 mW, 획득 시간(acquisition time)은 10 초로 측정하였다.

[0151] 도 6(A)는 2차 성장시 금 이온 전구체 및 은 이온 전구체의 비율에 따른 단일 나노복합체에 대한 레이저 파장 633 nm 조사 하에서 표면증강라만산란 신호 세기 결과로, 표면증강라만산란 신호는 1,4-benzenedithiol의 지문 피크인 735 cm^{-1}, 1067 cm^{-1}, 1562 cm^{-1}에서 확인되었다.

[0152] 도 6(B)는 2차 성장시 금 이온 전구체 및 은 이온 전구체의 비율에 따른 단일 나노복합체에 대한 1,4-benzenedithiol의 지문 피크 중 하나인 1562 cm^{-1}에서의 표면증강라만산란 신호 세기를 7번 측정하여 신호 신뢰성을 확인한 평가 결과를 나타낸다.

[0153] 도 6(C)는 2차 성장시 금 이온 전구체 및 은 이온 전구체의 비율에 따른 단일 나노복합체에 대한 레이저 파장 785 nm 조사 하에서 표면증강라만산란 신호 세기 결과로, 표면증강라만산란 신호는 1,4-benzenedithiol의 지문 피크인 735 cm^{-1}, 1067 cm^{-1}, 1562 cm^{-1}에서 확인되었다.

[0154] 도 6(D)는 2차 성장시 금 이온 전구체 및 은 이온 전구체의 비율에 따른 단일 나노복합체에 대한 1,4-benzenedithiol의 지문 피크 중 하나인 1067 cm^{-1}에서의 표면증강라만산란 신호 세기를 7번 측정하여 신호 신뢰성을 확인한 평가 결과를 나타낸다.

[0155] 결과, (S1), (S2), (S3)에 해당하는 복합 나노구조체는 균일한 쉘을 형성하여 은 함량이 증가함에 따라 표면증강라만산란 신호 세기가 증가하는 것을 확인할 수 있다. 반면, (S5)에 해당하는 복합 나노구조체는 은 함량이

가장 높은데도 불구하고 표면증강라만산란 신호 세기가 (S2), (S3), (S4)에 비해 낮게 측정되었는데, 이는 은 아일랜드가 국부적으로 형성되면서 덤벨 구조로 형성되기 때문이다.

[0156] (S3)에 해당하는 복합 나노구조체의 카르복실기 표면기능화를 위해, SH-PEG-COOH(molecular weight 5000, MW 5000), H_2O를 용매로, sodium dodecyl sulfate(SDS)를 안정화제로 사용하였다.

[0157] 복합 나노구조체 용액 1 mL(0.01 % SDS)(산화철 나노입자 0.05 mg/mL 포함), 5 mg/mL SH-PEG-COOH 0.2 mL을 균일하게 혼합하고, 16시간 동안 셰이킹 하였다. 그리고 H_2O로 세척하고, H_2O 1 mL에 분산하였다. 이후 세포 영상을 하는데 이용되는 펩타이드인 cyclo(-RGDyK)를 기능화하였다. 구체적으로, 상기 복합 나노구조체를 포함하는 H_2O 기반 용액 1 mL을 50 mM MES buffer 1 mL에 용매를 치환하고, 1-ethyl-3-(-3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(EDC)(20 mM) 용액 0.1 mL, sulfo-N-hydroxysulfosuccinimide(NHS)(20 mM) 용액 0.1 mL을 혼합하고 최소 10분 이상 셰이킹 하였다. 그리고 H_2O로 세척하고, H_2O 0.2 mL에 분산하였다. 이후에 cyclo(-RGDyK)(1 mM) 수용액 0.2 mL을 넣어 스터어링을 최소 6시간 동안 진행하였다. 그리고 H_2O 또는 phosphate buffer saline(PBS)로 세척하고, 0.5 mL의 용액에 분산시켰다.

[0158] 상기 cyclo(-RGDyK)로 표면기능화된 (S3) 복합 나노구조체를 HeLa, U87MG 세포, MCF7 세포와 최소 3시간 동안 배양 (incubation)하고, 고정(fixation)하였다. 그리고 세포 영상은 공초점 라만 현미경을 통하여 진행하였다. 이때 HeLa 세포의 경우, 레이저 파장은 785 nm, 레이저 파워는 4.36 mW, 획득 시간(acquisition time)은 0.05초로 측정하였고, U87MG 세포와 MCF7 세포의 경우, 레이저 파장은 633 nm, 레이저 파워는 3.9 mW, 획득 시간은 0.03초로 측정하였다.

[0159] 도 7는 U87MG, MCF7, HeLa 암세포 영상 결과를 나타낸다.

[0160] 상기 도 7에 나타난 바와 같이, 자성-광학 복합 나노구조체가 수용액 상에서 세포 영상 프로브로서 이용가능한 것을 확인할 수 있다.

[0161] 구체적으로, 도 7(A)는 암세포 영상 프로브로서의 응용 개략도를 보여준다. cyclo(-RGDyK)로 표면기능화된 (S3) 복합 나노구조체를 세포와 함께 배양한 뒤, 세척 및 고정하고 레이저를 조사하여 세포 영상화를 진행하였다.

[0162] 도 7(B)는 인테그린 αvβ3가 높은 수치로 발현되는 U87MG 세포를 영상화한 결과로, cyclo(-RGDyK)의 인테그린 αvβ3에 특정하게 결합하는 수용체에 의해 상기 암세포가 (S3) 복합 나노구조체에 의해 영상화된 것을 보여준다. 빨강색 점들은 나노입자가 있는 부위를 의미하며, 상기 도를 통해 상당수의 복합 나노구조체가 세포의 표면에 부착된 것을 확인할 수 있다.

[0163] 도 7(C)는 인테그린 αvβ3가 낮은 수치로 발현되는 MCF7 세포를 영상화한 결과로, 상기 암세포가 (S3) 복합 나노구조체에 의해 영상화가 된 결과를 보여준다. 빨강색 점들은 나노입자가 있는 부위를 의미하며, 상기 도를 통해 복합 나노구조체가 세포의 표면에 미부착된 것을 확인할 수 있다.

[0164] 도 7(D)는 U87MG 세포의 표면에 부착된 (S3) 복합 나노구조체에 의해 영상화된 암세포의 특정 부위에 해당하는 표면증강라만산란(SERS) 신호 세기를 보여준다. 세포가 아닌 다른 부분은 (S3) 복합 나노구조체에 의한 표면증강라만산란 신호가 나타나지 않은 것을 확인하였으며, 세포 표면에는 (S3) 복합나노구조체에 의한 표면증강라만산란 신호가 높게 나타난 것을 확인할 수 있다.

[0165] 또한, 도 7(E)는 HeLa 세포를 영상화한 결과로, cyclo(-RGDyK)의 인테그린 αvβ3에 특정하게 결합하는 수용체에 의해 상기 암세포가 (S3) 복합 나노구조체에 의해 영상화된 결과를 보여준다. 빨강색 점들이 나노입자가 있는 부위를 의미하며, 상당수의 복합 나노구조체가 세포의 표면에 부착된 것을 확인할 수 있다.

[0166] 상기 도 7의 결과를 통해, 다양한 암세포에 적용 가능한 (S3) 복합 나노구조체의 응용성을 확인할 수 있다. 또한, 다양한 레이저의 파장(633 nm 및 785 nm)에서의 (S3) 복합 나노구조체의 응용성을 확인할 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 복합 나노구조체는 수용액 분산성이 우수하며, 세포 영상 프로브로서 이용가능한 것을 확인할 수 있다.

[0168] **실험예 3. 자성-광학 복합 나노구조체를 활용한 면역검지**

[0169] (S3)에 해당하는 복합 나노구조체의 카르복실기 표면기능화를 위해, SH-PEG-COOH(molecular weight 5000, MW

5000), H_2O를 용매로, sodium dodecyl sulfate(SDS)를 안정화제로 사용되었다.

[0170] 복합 나노구조체 용액 1 mL(0.01 % SDS), 0.2 mL SH-PEG-COOH(5 mg/mL)을 균일하게 혼합하고, 16시간 동안 세이킹 하였다. 그리고 H_2O로 세척하고, H_2O 1 mL(0.2 mg/mL) 에 분산하였다.

[0171] 이후 인플루엔자 A 면역 검지를 하는데 이용되는 인플루엔자 A 검지 항체로 기능화하였다. 구체적으로, 상기 복합 나노구조체를 포함하는 H_2O 기반 용액 1 mL을 MES buffer 1 mL(50 mM)에 용매 치환하고, 1-ethyl-3-(-3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(EDC) (20 mM) 용액 0.1 mL, sulfo-N-hydroxysulfosuccinimide(NHS)(20 mM) 용액 0.1 mL을 혼합하고 최소 10분 이상 세이킹 하였다. 그리고 H_2O로 세척하고, H_2O 0.2 mL에 분산하였다. 이후 phosphate buffer saline 기반 특정 항원 검지항체 용액 0.1 mL(0.5 mg/mL)을 넣어 스터어링을 최소 16시간 이상 진행하였다. 그리고 phosphate buffer saline을 이용하여 세척하고, 0.5 mL의 PBS 용액 (0.4 mg/mL) 에 분산시켰다.

[0173] 항체-항원 샌드위치 결합을 위한 기판은 Au 기판에 특정 항원 포획항체를 기능화 하였다. 구체적으로, 4 mm * 4 mm Au 기판을 3-Mercaptopropionic acid 수용액 0.1 mL(10 mM) 및 H_2O를 넣고 최소 12시간 이상 세이킹 하였다. 그리고 MES buffer 1 mL(50 mM)에 용매 치환하고, 1-ethyl-3-(-3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(EDC) (20 mM) 용액 0.1 mL, sulfo-N-hydroxysulfosuccinimide(NHS)(20 mM) 용액 0.1 mL을 혼합하고 최소 20분 이상 세이킹 하였다. 이후 PBS로 세척하고, PBS 용액 1mL 인플루엔자 A 포획 항체 용액 0.1 mL(0.05 mg/mL)을 넣고, 상온에서 최소 12시간 이상 세이킹 하였다. 그리고 1% bovine serum albumin의 PBS 용액 1 mL 환경 하에서 보관하였다.

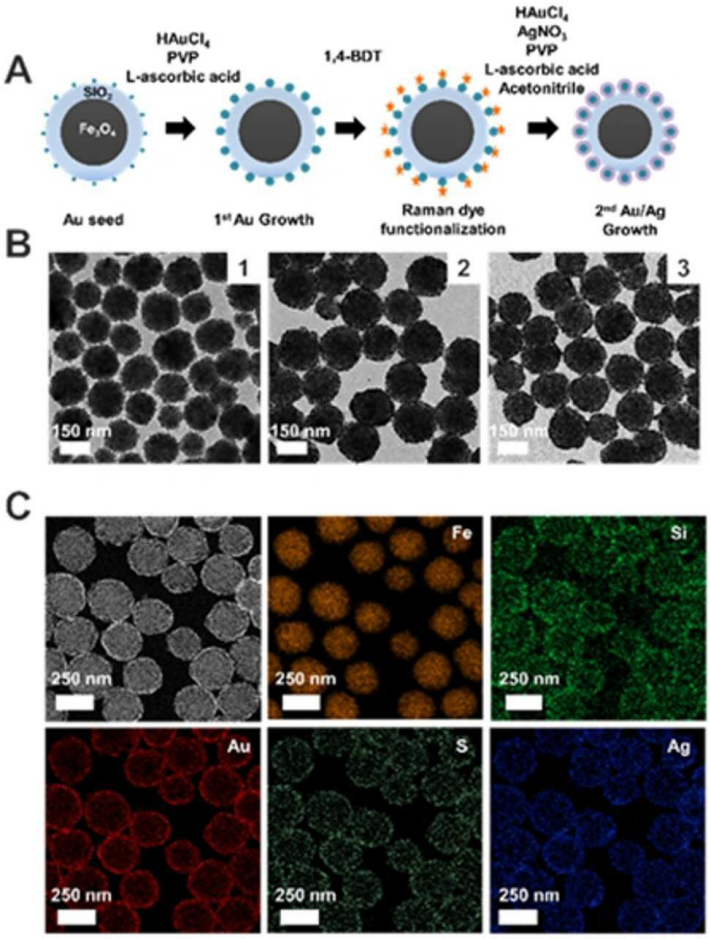
[0174] 인플루엔자 A 검지항체가 기능화된 복합 나노구조체와 특정 항원을 세이킹하여 자성 분리(magnetic separation)를 한 뒤, 특정 항원에 대한 포획 항체가 기능화된 Au 기판과 반응해주었다. 그리고 Tween 20의 PBS 용액을 이용하여 세척하였다. 건조 시킨 이후에, 100배 대물렌즈, 레이저 파장은 785 nm 로 하여, 1 μm2 면적 당 획득 시간을 1초로 하여, 항원 농도 별 25 μm2 면적에 따른 표면증강라만산란 신호 세기를 측정하였다.

[0175] 도 8(A)는 인플루엔자 A 바이러스 검지 항체가 표면 기능화된 복합 나노구조체와 인플루엔자 A 바이러스 포획 항체가 기능화된 Au 기판을 이용한 인플루엔자 A 항원 농도에 따른 주사전자현미경 사진을 나타내고, (B)는 인플루엔자 A 항원 농도에 따른 25 μm^2 면적에 따른 표면증강라만산란 신호 세기를 나타낸다.

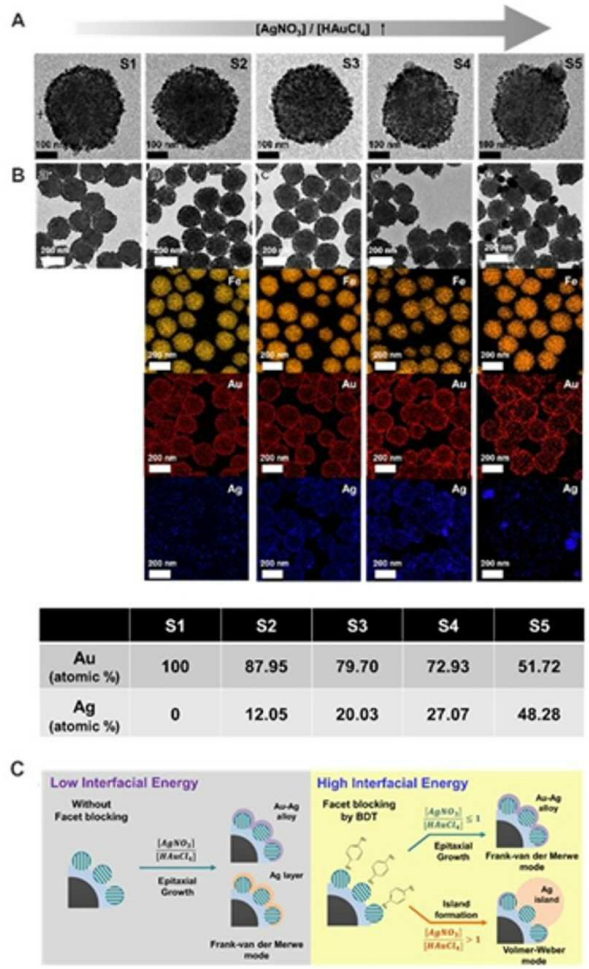
[0176] 상기 도 8에 나타난 바와 같이, 검지 항체가 기능화된 (S3) 복합구조체가 Au 기판에 인플루엔자 A 항원 농도가 높을수록 많이 결합되는 것을 확인할 수 있으며, 이에 높은 표면증강라만산란 신호를 동일한 Au 기판 면적에 대해서 얻을 수 있다. 이를 이용하여 질병진단, 바이오칩 등 다각도로 진단 시장에 응용 가능성을 확인할 수 있다.

도면

도면1

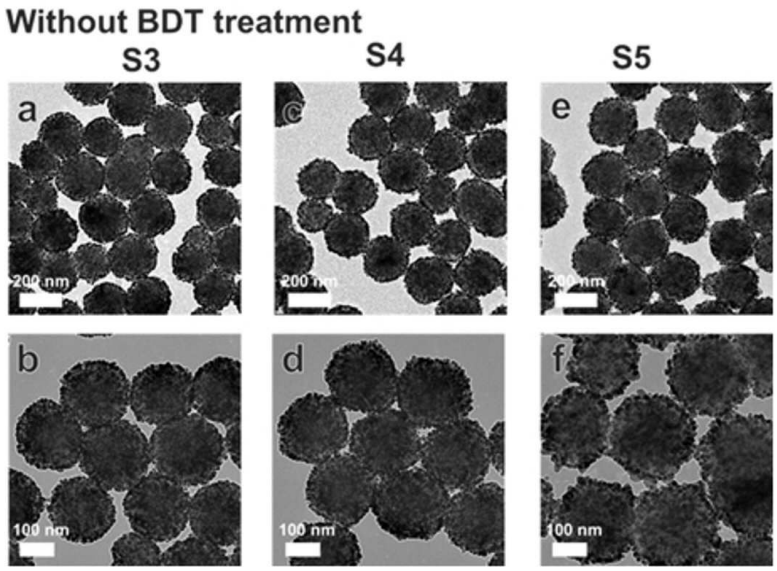

A
HAuCl4
PVP
L-ascorbic acid
1,4-BDT
HAuCl4
AgNO3
PVP
L-ascorbic acid
Acetonitrile
SiO2
Fe3O4
Au seed
1st Au Growth
Raman dye functionalization
2nd Au/Ag Growth
B
1
2
3
150 nm
150 nm
150 nm
C
250 nm
Fe
Si
Au
S
Ag

도면2

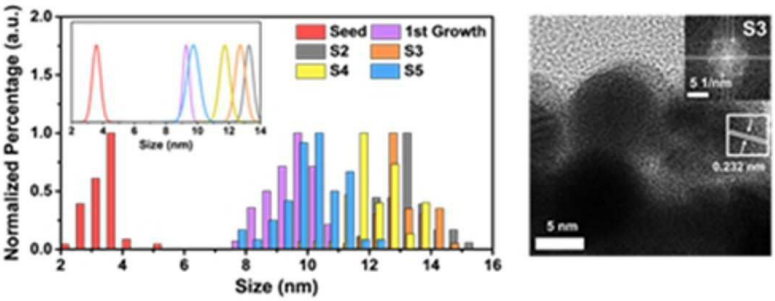


	S1	S2	S3	S4	S5
Au (atomic %)	100	87.95	79.70	72.93	51.72
Ag (atomic %)	0	12.05	20.03	27.07	48.28

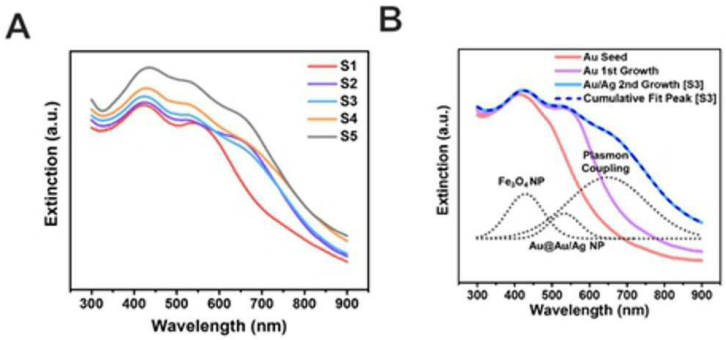
도면3



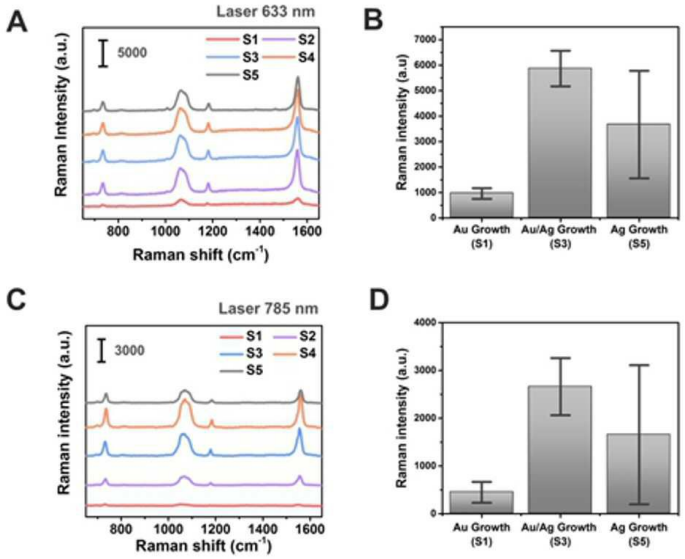
도면4


Normalized Percentage (a.u.)
Size (nm)
Seed
1st Growth
S2
S3
S4
S5
S3
5 1/nm
0.232 nm
5 nm

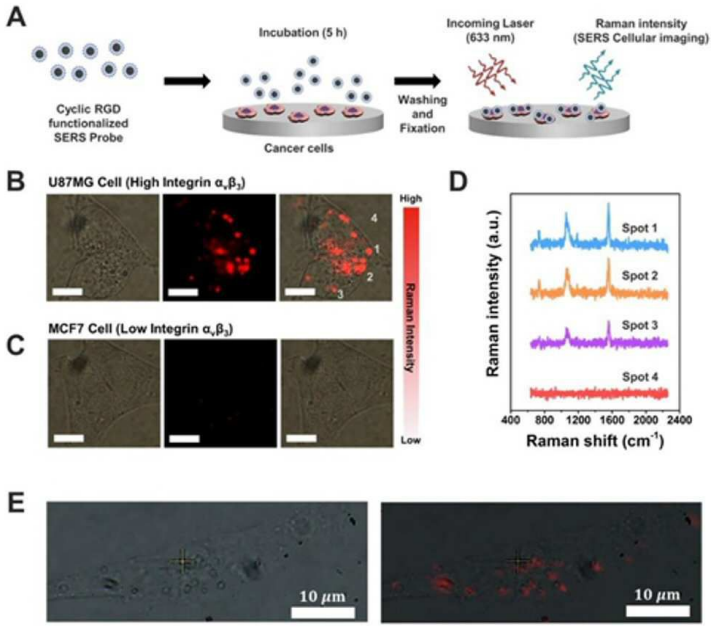
도면5


A
B
Extinction (a.u.)
Wavelength (nm)
S1
S2
S3
S4
S5
Au Seed
Au 1st Growth
Au/Ag 2nd Growth [S3]
Cumulative Fit Peak [S3]
Plasmon Coupling
Fe3O4 NP
Au@Au/Ag NP

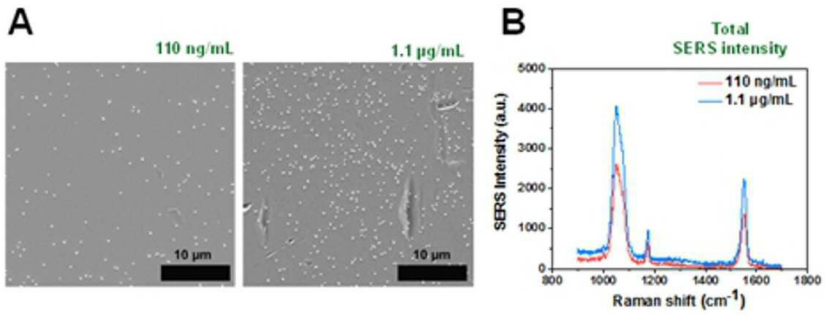
도면6


A
Laser 633 nm
5000
S1
S2
S3
S4
S5
Raman Intensity (a.u.)
Raman shift (cm-1)
B
Raman intensity (a.u)
Au Growth (S1)
Au/Ag Growth (S3)
Ag Growth (S5)
C
Laser 785 nm
3000
D

도면7


A
Incubation (5 h)
Incoming Laser (633 nm)
Raman intensity (SERS Cellular imaging)
Cyclic RGD functionalized SERS Probe
Washing and Fixation
Cancer cells
B
U87MG Cell (High Integrin $\alpha_v\beta_3$)
High
Raman intensity
Low
C
MCF7 Cell (Low Integrin $\alpha_v\beta_3$)
D
Raman intensity (a.u.)
Spot 1
Spot 2
Spot 3
Spot 4
400 800 1200 1600 2000 2400
Raman shift (cm^{-1})
E
10 μm
10 μm

도면8


A
110 ng/mL
1.1 μg/mL
10 μm
10 μm
B
Total SERS intensity
110 ng/mL
1.1 μg/mL
SERS Intensity (a.u.)
5000
4000
3000
2000
1000
0
800 1000 1200 1400 1600 1800
Raman shift (cm^{-1})