

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0164448

(43) 공개일자 2022년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 27/327 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)

B82Y 15/00 (2017.01) B82Y 40/00 (2017.01)

(52) CPC특허분류

G01N 27/3278 (2013.01)

G01N 27/3277 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0068457

(22) 출원일자 2022년06월03일

심사청구일자 2022년06월03일

(30) 우선권주장

1020210072648 2021년06월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인

기초과학연구원

대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

조윤경

울산광역시 울주군 범서읍 대리로 15-17, 703동
305호

조나단 사바테 델 리오

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, 404동
301호

(74) 대리인

특허법인 플러스

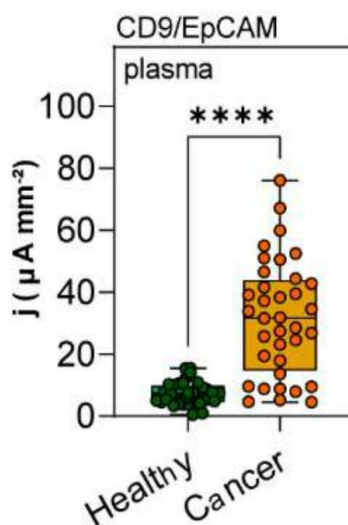
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 나노구조화된 금속막, 이의 제조방법 및 용도

(57) 요약

본 발명은 나노 다공성을 가지며 나노 구조화된 금속 막 및 이의 용도에 관한 것으로, 나노 다공성을 가지며 나노 구조화된 금속 막은 금속 나노 그레인(grain)이 불규칙적으로 응집되어 막의 두께 방향으로 뻗어나가는 줄기를 포함하는 형태로 나노 구조화되고, 줄기 간의 공극에 의해 나노 다공성을 갖는다.

대표도 - 도23



(52) CPC특허분류

G01N 33/5438 (2013.01)

B82Y 15/00 (2013.01)

B82Y 40/00 (2013.01)

G01N 2333/5446 (2013.01)

G01N 2333/70503 (2013.01)

G01N 2333/70596 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711101393
과제번호	IBS-R020-D1
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	기초과학연구원
연구사업명	기초과학연구단사업
연구과제명	첨단연성물질연구단
기 여 율	1/1
과제수행기관명	기초과학연구원
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

나노 다공성을 가지며 나노 구조화된 금속 막이며,

상기 금속 막은 금속 나노 그레인(grain)이 불규칙적으로 응집되어 막의 두께 방향으로 뻗어나가는 줄기를 포함하는 형태로 나노 구조화되고, 상기 줄기 간의 공극에 의해 나노 다공성을 갖는, 금속 막.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 줄기를 포함하는 형태는 산호초 형상인 금속 막.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 금속 막의 RMS(root-mean-square) 거칠기는 200 내지 500nm인 금속 막.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 막의 두께는 1 내지 5 μ m인 금속 막.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 금속 나노 그레인의 평균 크기는 10 내지 50nm인 금속 막.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 금속 막의 금속은 FCC(Face Centered Cubic) 결정 구조를 가지며, 상기 금속 나노 그레인은 {111}, {110} 및 {100}에서 하나 이상 선택되는 저지수면의 파셋(facet)을 갖는 금속 막.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 금속 막의 금속은 구리(Cu), 은(Ag), 팔라듐(Pd), 백금(Pt), 로듐(Rh) 및 금(Au)에서 하나 이상 선택되는 금속인, 금속 막.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 따른 금속 막을 작동 전극(working electrode)으로 포함하는 전기화학적 바이오센서.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 작동 전극은 하기 식 1을 만족하는 방오횟성을 갖는 전기화학적 바이오센서.

(식 1)

$$R_{ct}(20)/R_{ct}(0) \leq 1.5$$

(식 1에서, R_{ct} 는 1%의 소 혈청 알부민(BSA)을 함유하는 용액과의 접촉시 전하 이동 저항(charge transfer Resistance)이며, $R_{ct}(0)$ 는 접촉 직후의 전하 이동 저항, $R_{ct}(20)$ 은 접촉 후 20시간이 흐른 시점에서의 전하 이동 저항을 의미한다)

청구항 10

제 8항에 있어서,

0 내지 $50 \mu\text{M}$ 의 동일 몰 농도 범위로 페로시아나화물/페리시아나화물 레독스 페어를 함유하는 용액을 기준 용액으로 하여, 상기 기준 용액의 농도에 따른 산화 피크 전류값($\mu\text{A} \cdot \text{mm}^{-2}$)의 기울기인 민감도는 $10 \mu\text{Amm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ 이상인 전기화학적 바이오센서.

청구항 11

제 8항에 있어서,

상기 표적 물질은 암세포 유래 세포외 소포체를 포함하는 전기화학적 바이오센서.

청구항 12

제 8항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 눈물, 세비액, 소변, 침, 복강 세척액, 골반 내 유체액, 낭종액, 뇌척수막 액, 양수, 선액, 체장액, 림프액, 흉수, 유두 흡인물, 기관지 흡인물, 활액 또는 뇌척수액인 전기화학적 바이오센서.

청구항 13

생물학적 샘플에 함유된 질병 지표와 특이적으로 결합하는 캡처용 수용체로 기능화된 제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 따른 금속 막을 작동 전극(working electrode)으로 포함하는 전극 부재가 위치하는 기판을 포함하는 검출 키트.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 검출 키트는, 샌드위치 결합을 형성하기 위한 검출용 수용체가 보관된 용기를 더 포함하는 검출 키트.

청구항 15

제 8항에 따른 바이오센서를 이용한 질병 지표의 검출 방법.

청구항 16

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 따른 금속 막을 포함하는 표면증강 라만 분광용 기판.

청구항 17

베이스 금속막에 양이온성 계면활성제, 염소 소스 및 상기 베이스 금속막의 금속과 동종의 금속을 함유하는 금속전구체를 포함하는 시딩 용액을 접촉시키는 단계; 및

하기 조건의 스텝 시간대전류법(step chronoamperometry)을 이용하여 상기 시딩 용액과 접촉하는 상기 베이스 금속막을 나노구조화 및 나노다공화하는 단계;를 포함하는 금속막의 나노구조화 방법:

(조건)

전압 인가시 단위 사이클 : 양의 전압(V_+)과 음의 전압(V_-)의 순차적 인가

V_+ 크기 및 V_+ 인가 시간(t_+) : 1.0 내지 1.5V 및 0.5 내지 3msec

V_- 크기 및 V_- 인가 시간(t_-) : -1.0 내지 -1.5V 및 $0.8t_+$ 내지 $3t_+$

단위 사이클 반복 횟수 : 10,000 내지 30,000회.

청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 양이온성 계면활성제는 4급 암모늄염인 금속막의 나노구조화 방법.

청구항 19

제 17항에 있어서,

상기 금속전구체는 염소화합물(chlorine-containing compound)인 금속막의 나노구조화 방법.

청구항 20

제 17항에 있어서,

상기 조건으로 스텝 시간대전류법이 수행된 후, 또는 마지막으로 인가되는 단위 사이클의 음의 전압 인가시, -1.0 내지 -1.5V의 전압이 5 내지 30sec 동안 인가되는 금속막의 나노구조화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노구조화된 금속막, 이의 제조방법 및 용도에 관한 것으로, 상세하게, 나노 다공성을 가지며 나노 구조화된 금속막, 이의 제조방법 및 바이오 센서로의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전기화학적 바이오센서는 다양한 물질을 검출할 수 있으며, 대부분의 상용 바이오센서는 전기화학적 바이오센서에 속한다.

[0003] 전기화학적 바이오센서는 작업 전극 상에서 목적하는 물질의 산화/환원 반응에 의해 발생하는 전류를 측정하여, 목적하는 물질의 존재 여부나 농도를 검출한다.

[0004] 전기화학적 바이오센서는 통상 목적하는 물질과 특이적으로 결합하는 수용체가 구비되는 작업 전극(working electrode), 기준 전극(reference electrode) 및 상대 전극(counter electrode)의 3전극 시스템에 기반한다. 기관에 나노 전극을 형성한 나노칩 형태의 센서 플랫폼은 센서의 소형화를 가능하게 하고 휴대성을 가져 현장에서 신속하게 바이오 마커를 검출하는데 유리하다.

[0005] 그러나, 피, 소변등과 같이 생체에서 수득되는 생체 샘플은 바이오 마커 이외에도 다량의 다양한 생체 물질들을 함유하고 있다. 이에, 채취된 생체 샘플을 바로 이용하기 보다는, 분리, 농축 및 정제등의 과정을 거치는 것이 통상적이며, 이에 복잡한 전처리 공정과 함께 다량의 생체 샘플이 필요한 문제점이 있다.

[0006] 분리, 농축 및 정제를 거치지 않고 미량의 채취된 생체 샘플로부터 바이오 마커를 바로 검출하기 위해서는 민감도가 향상됨과 동시에 단백질이나 분자등의 비특이적 흡착에 의한 바이오파울링(biofouling)이 억제된 작업 전극의 개발되어야 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2017-0077685호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 넓은 표면적을 가지면서도 제한된 확산이 발생하여 바이오파울링이 억제될 수 있는 금속 막

및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 향상된 민감도를 가지며 바이오파울링이 억제된 전극 및 이러한 전극을 포함하는 바이오 센서 및 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 향상된 민감도를 가지며 바이오파울링이 억제된 바이오센서를 이용한 바이오 마커의 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명에 따른 금속 막은 나노 다공성을 가지며 나노 구조화된 금속 막이며, 금속 막은 금속 나노 그레인 (grain)이 불규칙적으로 응집되어 막의 두께 방향으로 뻗어나가는 줄기를 포함하는 형태로 나노 구조화되고, 상기 줄기 간의 공극에 의해 나노 다공성을 갖는다.

[0012] 일 구체예에 있어, 상기 줄기를 포함하는 형태는 산호초 형상일 수 있다.

[0013] 일 구체예에 있어, 상기 금속 막의 RMS(root-mean-square) 거칠기는 200 내지 500nm일 수 있다.

[0014] 일 구체예에 있어, 상기 막의 두께는 1 내지 5 μ m일 수 있다.

[0015] 일 구체예에 있어, 상기 금속 나노 그레인의 평균 크기는 10 내지 50nm일 수 있다.

[0016] 일 구체예에 있어, 상기 금속 막의 금속은 FCC(Face Centered Cubic) 결정 구조를 가지며, 상기 금속 나노 그레인 {111}, {110} 및 {100}에서 하나 이상 선택되는 저지수면(low index plane)의 파셋(facet)을 가질 수 있다.

[0017] 일 구체예에 있어, 상기 금속 막의 금속은 구리(Cu), 은(Ag), 팔라듐(Pd), 백금(Pt), 로듐(Rh) 및 금(Au)에서 하나 이상 선택되는 금속일 수 있다.

[0018] 본 발명은 상술한 금속 막을 작동 전극(working electrode)으로 포함하는 바이오센서를 포함한다.

[0019] 일 구체예에 있어, 상기 작동 전극은 하기 식 1을 만족하는 방오횡성을 가질 수 있다.

[0020] (식 1)

[0021] $R_{ct}(20)/R_{ct}(0) \leq 1.5$

[0022] 식 1에서, R_{ct} 는 1%의 소 혈청 알부민(BSA)을 함유하는 용액과의 접촉시 전하 이동 저항(charge transfer Resistance)이며, $R_{ct}(0)$ 는 접촉 직후의 전하 이동 저항, $R_{ct}(20)$ 은 접촉 후 20시간이 흐른 시점에서의 전하 이동 저항을 의미한다.

[0023] 일 구체예에 있어, 0 내지 50 μ M의 동일 몰 농도 범위로 페로시아화물/페리시아화물 레독스 페어를 함유하는 용액을 기준 용액으로 하여, 상기 기준 용액의 농도에 따른 산화 피크 전류값($\mu A \cdot mm^{-2}$)의 기울기인 민감도는 10 $\mu A mm^{-2} mM^{-1}$ 이상일 수 있다.

[0024] 일 구체예에 있어, 상기 표적 물질은 암세포 유래 세포의 세포체를 포함할 수 있다.

[0025] 일 구체예에 있어, 상기 생물학적 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 눈물, 세비액, 소변, 침, 복강 세척액, 골반 내 유체액, 낭종액, 뇌척수막 액, 양수, 선액, 체장액, 림프액, 흉수, 유두 흡인물, 기관지 흡인물, 활액 또는 뇌척수액을 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명은 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표와 특이적으로 결합하는 캡처용 수용체로 기능화된 상술한 금속 막을 작동 전극(working electrode)으로 포함하는 전극 부재가 위치하는 기판을 포함하는 검출 키트를 포함한다.

[0027] 일 구체예에 있어, 상기 검출 키트는, 샌드위치 결합을 형성하기 위한 검출용 수용체가 보관된 용기를 더 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명은 상술한 바이오센서를 이용한 질병 지표의 검출 방법을 포함한다.

[0029] 본 발명은 상술한 금속 막을 포함하는 표면증강 라만 분광용 기판을 포함한다.

[0030] 본 발명은 금속막의 나노구조화 방법을 포함한다.

[0031] 본 발명에 따른 금속막의 나노구조화 방법은 베이스 금속막에 양이온성 계면활성제, 염소 소스 및 상기 베이스

금속막의 금속과 동종의 금속을 함유하는 금속전구체를 포함하는 시딩 용액을 접촉시키는 단계; 및 하기 조건의 스텝 시간대전류법(step chronoamperometry)을 이용하여 상기 시딩 용액과 접촉하는 상기 베이스 금속막을 나노구조화 및 나노다공화하는 단계;를 포함한다.

- [0032] (조건)
- [0033] 전압 인가시 단위 사이클 : 양의 전압(V+)과 음의 전압(V-)의 순차적 인가
- [0034] V+ 크기 및 V+ 인가 시간(t+): 1.0 내지 1.5V 및 0.5 내지 3msec
- [0035] V- 크기 및 V- 인가 시간(t-) : -1.0 내지 -1.5V 및 0.8t+ 내지 3t+
- [0036] 단위 사이클 반복 횟수 : 10,000 내지 30,000회.
- [0037] 일 구체예에 있어, 상기 양이온성 계면활성제는 4급 암모늄염일 수 있다.
- [0038] 일 구체예에 있어, 상기 금속전구체는 함염소화합물일 수 있다.
- [0039] 일 구체예에 있어, 상기 시딩 용액에 함유된 계면활성제 : 염소 소스 : 금속전구체의 물비는 1 : 1 내지 3 : 0.001 내지 0.1일 수 있다.
- [0040] 일 구체예에 있어, 상기 조건으로 스텝 시간대전류법이 수행된 후, 또는 마지막으로 인가되는 단위 사이클의 음의 전압 인가시, -1.0 내지 -1.5V의 전압이 5 내지 30sec 동안 인가될 수 있다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명에 따른 금속막은 산호초 형상으로 나노구조화됨과 동시에 나노다공성을 가져, 현저하게 향상된 표면적을 가지면서도 단백질등과 같은 생물학적 물질에 의한 오염(바이오파울링)이 방지될 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 금속막의 제조방법은 시딩 용액의 도포 및 스텝 시간대전류법의 수행이라는 극히 간단하고 용이하며 저가의 방법을 통해 고도로 나노구조화되고 나노 다공화된 금속막을 단시간에 대량생산할 수 있는 장점이 있다.
- [0043] 본 발명에 따른 금속막이 구비된 전기화학적 바이오센서는 인체에서 얻어진 극미량의 생물학적 샘플로부터 질병 지표를 높은 특이성과 민감도로 검출할 수 있는 장점이 있으며, 바이오 파울링으로부터 자유로워 혈장이나 소변 등 인체로부터 얻어진 생물학적 샘플을 직접적으로 분석할 수 있는 장점이 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서를 이용한 질병 지표 검출 방법은 극미량의 생물학적 샘플로 질병 지표의 검출이 가능하며, 생물학적 샘플의 전처리나 희석, 질병 지표의 농축 없이 생물학적 샘플 그 자체로부터 질병 지표의 검출이 가능하고, 높은 특이성과 민감도로 질병 지표의 검출이 가능한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 R_{ct} 를 산출하기 위해 사용된 나이퀴스트(Nyquist) 등가 회로를 도시한 모식도이다.
- 도 2는 제조된 NSG 전극 칩을 관찰한 광학 사진이다.
- 도 3은 스텝 시간대전류법을 이용한 금 전극의 나노구조화시, 다양한 용액 하 측정된 양극 전류를 도시한 도면이다.
- 도 4는 나노구조화 전(왼쪽)/후(오른쪽)의 작동 전극을 관찰한 사진이다.
- 도 5는 스텝 시간대전류법을 이용한 금 전극의 나노구조화시, 스텝 전압의 반복 횟수에 따른 금 전극 표면을 관찰한 주사전자현미경 관찰 사진이다.
- 도 6은 스텝 시간대전류법을 이용한 금 전극의 나노구조화시, 스텝 전압의 반복 횟수에 따른 금 전극의 단면을 관찰한 주사전자현미경 관찰 사진이다.
- 도 7은 20,000회(60sec)의 스텝 전압이 인가되어 제조된 NSG 전극 표면을 배율을 달리하며 관찰한 주사전자현미경 사진이다.
- 도 8은 금 전극의 나노 구조화 전(왼쪽)/ 후(오른쪽) 원자력 현미경(AFM) 토포그래피 이미지이다
- 도 9는 나노구조화 전 편평한 금 전극(Au), NSG 전극(NSG), 전극 기능화를 통해 L-시스테인으로 개질된 NSG 전

극(NSG-Cys), 전극 기능화를 통해 L-시스테인 및 항체로 기능화된 NSG 전극(NSG-Cys-Ab)의 접촉각을 측정 도시한 도면이다.

도 10은 시딩 용액과 스텝 시간대전류법을 이용한 전극의 나노구조화 기작을 나타낸 모식도이다.

도 11은 작업전극에 전압을 일정 속도로 주사하며 이에 따른 전류의 변화를 측정한 순환 전압-전류도(cyclic voltammograms)이다.

도 12는 산성 매질 하 나노구조화 전 평면 전극(Au) 및 NSG 전극(NSG)의 순환 전압-전류도(cyclic voltammograms)를 도시한 도면이다.

도 13은 2.5mM의 등물 페로시아노칼륨과 페리시아노칼륨 용액 내 스캔 속도에 따른 평면 전극(Au), NSG 전극(NSG)의 순환 전압-전류도(cyclic voltammograms)를 도시한 도면이다.

도 14는 스캔 속도의 제곱근 대비 산화 및 환원 피크 전류(정점 전류 밀도)를 도시한 랜들-세빅 플롯(Randles-Sevcik plot)이다.

도 15는 스텝 시간대전류법을 이용한 전극 나노구조화시 산화 전위를 1.2V, 1.25V, 1.3V로 달리하여 제조된 NSG 전극 및 평면 전극의 네모파 스캔 전압-전류도(square-wave scan voltammogram)를 도시한 도면이다.

도 16은 NSG 전극 및 레퍼런스인 평면 전극에 대한 스침 입사 X선 회절 결과(Grazing incidence X-ray diffraction spectrogram)를 도시한 도면이다.

도 17은 NSG 전극 및 평면 전극의 생물학적 오염(biofouling) 거동을 테스트한 결과로, BSA 또는 인간 혈장 매질에서 시간에 따른 전극의 Rct를 도시한 도면이다.

도 18은 평면 전극 및 NSG 전극을 이용한 페로시아노화물의 전기화학적 검출시, 피크 전류 밀도 대 페로시아노화물 농도를 도시한 도면이다

도 19는 전기활성 침전물의 전형적인 전압전류 산화 피크(voltammetric oxidation peaks)를 도시한 도면이다.

도 20은 NSG 전극 칩 또는 평면 전극 칩에서 PBS나 인간 혈장에 스파이크된 IL6 농도에 따른 산화 피크 전류 밀도를 도시한 도면이다.

도 21은 NSG 전극 칩 또는 평면 전극 칩을 사용하여 인간 혈장에 스파이크된 EV 입자 농도에 따른 산화 피크 전류 밀도를 도시한 도면이다.

도 22는 CD9-캡춰된 EV를 검출하기 위한 검출 항체 CD9⁺ 또는 EpCAM⁺를 검출한 것으로, 검출 에세이 별 전기화학적 전류 밀도 값을 도시한 것이다.

도 23은 CD9-캡춰된 EV를 검출하기 위한 검출 항체 EpCAM⁺를 검출한 것으로, 혈장 샘플 별 전기화학적 전류 밀도 값을 도시한 것이다.

도 24는 NSG 바이오센서의 수신자 조작 특성 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하 첨부한 도면들을 참조하여 본 발명의 나노구조화된 금속 막, 이의 제조방법 및 이의 용도를 상세히 설명한다. 다음에 소개되는 도면들은 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 예로서 제공되는 것이다. 따라서, 본 발명은 이하 제시되는 도면들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 이하 제시되는 도면들은 본 발명의 사상을 명확히 하기 위해 과장되어 도시될 수 있다. 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

[0047] 또한 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.

[0048] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 제1, 제2 등의 용어는 한정적인 의미가 아니라 하나의 구성 요소를 다른 구성 요소와 구별하는 목적으로 사용된다.

- [0049] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 포함하다 또는 가지다 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 또는 구성 요소가 존재함을 의미하는 것이고, 특별히 한정하지 않는 한, 하나 이상의 다른 특징들 또는 구성요소가 부가될 가능성을 미리 배제하는 것은 아니다.
- [0050] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서, 막(층), 영역, 구성 요소 등의 부분이 다른 부분 위에 또는 상에 있다고 할 때, 다른 부분과 접하여 바로 위에 있는 경우뿐만 아니라, 그 중간에 다른 막(층), 다른 영역, 다른 구성 요소 등이 개재되어 있는 경우도 포함한다.
- [0051] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서, 특별히 한정되지 않는 한 %는 중량%를 의미하고, 용액은 수용액을 의미한다.
- [0052] 본 발명에 따른 금속 막은 나노 구조화되고 나노 다공성을 갖는 금속 막이며, 금속 나노 그레인(grain)이 불규칙적으로 응집되어 막의 두께 방향으로 뻗어나가는 줄기를 포함하는 형태로 나노 구조화되고, 줄기 간의 공극에 의해 나노 다공성을 갖는다.
- [0053] 금속 막에서 서로 대향하는 두 면 중 일 면을 하부면으로, 하부면의 대향면을 상부면으로 하고, 하부면에서 상부면으로의 최단 거리 방향을 두께 방향으로 한다. 금속 막이 기재 상에 위치하는 경우, 하부면은 금속 막에서 기재와 접하는(인접하는) 면에 해당할 수 있다.
- [0054] 나노 그레인들이 막의 면내 방향(in-plane direction)으로는 불규칙적으로 응집되되, 적어도 막의 법선 방향(plane normal direction)으로 방향성 있는 응집이 이루어져, 하부면에서 상부면으로 뻗어나가는 줄기를 포함하는 형태로 나노 구조화된 것일 수 있다.
- [0055] 상세하게, 금속막은 하부면에서 상부면으로 뻗어나가는 줄기로부터 줄기와 상이한 방향으로 다시 나노 그레인(나노 결정립)들의 방향성 있는 응집이 이루어지며 미세 가지들이 형성된 산호 형태로 나노구조화된 것일 수 있다. 즉, 금속막은 산호초 형상일 수 있다.
- [0056] 금속 막은 산호 형태를 이루는 줄기간, 줄기와 줄기로부터 랜덤하게 뻗어나간 가지들 간, 가지와 가지간의 미세 공극에 의해 나노 다공성을 가질 수 있다.
- [0057] 금속 나노 그레인의 평균 크기는 10 내지 50nm, 구체적으로 10 내지 40nm, 보다 구체적으로 10 내지 30nm 수준일 수 있다. 미세한 금속 나노 그레인은 미세 줄기와 미세 가지를 형성할 수 있으며, 이에 의해 공극 또한 보다 미세화될 수 있다.
- [0058] 금속 나노 그레인의 평균 크기는 금속 막을 이루는 평균 금속 결정 크기를 의미할 수 있다. 금속 나노 그레인의 평균 크기는 금속 막의 스침 입사 X선 회절 패턴에 기반하여 셰러 방정식을 통해 산출된 것일 수 있다.
- [0059] 이때, 금속 막의 하부면에서 상부면으로 갈수록 줄기의 굵기가 가늘어질 수 있으며, 줄기와 가지를 이루는 금속 나노 그레인들의 크기가 작아질 수 있다.
- [0060] 금속 막은 하부면을 포함하는 하부 영역에서 금속 그레인들이 연속적으로 이어져 있는 연속체일 수 있으며, 하부 영역에서 상부면을 포함하는 상부 영역으로 갈수록 미세 공극의 크기가 작아질 수 있다. 이때, 하부 영역은 금속막의 두께 t_0 를 기준으로 하부면에서 $0.05t_0$ 내지 $0.30t_0$ 두께까지의 영역을 의미할 수 있다.
- [0061] 나노 다공성과 나노 구조화에 의해 거친 표면을 가짐에 따라, 금속 막의 두께 t_0 는, 막의 단면을 1000배 내지 5000배의 저배율 주사전자현미경으로 관찰하여 측정된 거시적 두께를 의미할 수 있다.
- [0062] 나노 구조화에 의해 증진된 표면적을 가질 수 있으며, 이와 동시에 하부 영역에도 용이한 확산에 의해 목적하는 물질이 원활히 유입될 수 있도록, t_0 는 수 마이크로미터 오더, 구체적으로 1 내지 $9\mu\text{m}$, 보다 구체적으로 1 내지 $5\mu\text{m}$, 보다 더 구체적으로 1 내지 $4\mu\text{m}$ 수준일 수 있다.
- [0063] 금속 막의 RMS(root-mean-square) 거칠기는 200 내지 500nm, 구체적으로 250nm 내지 450nm일 수 있다. 통상적 금속 증착에 의해 제조되는 평탄한 금속 박막이 갖는 RMS 표면 거칠기는 1~2nm 수준이다. 금속막의 현저하게 높은 RMS 거칠기는 나노 구조화와 나노 다공성에 의한 것이다. 금속 막의 RMS 거칠기는 원자력 현미경을 통해 측정된 것일 수 있으며, 적어도 $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ 이상의 영역에 대해 측정된 측정값에 기반한 것일 수 있다.
- [0064] 금속 막에서, 금속은 FCC 결정 구조를 가질 수 있으며, 이때, 산호초 구조를 형성하는 금속 나노 그레인은 {111}, {110} 및 {100}에서 하나 이상 선택되는 저지수면의 파셋을 가질 수 있다. 구체적으로 FCC 결정 구조를 갖는 금속 나노 그레인은 {111} 파셋, {110} 파셋, {100} 파셋 또는 이들의 조합을 가질 수 있다. 구체예로, 금

속 막의 금속이 금(Au)인 경우, 금속 나노 그래인은 {111} 파셋, {110} 파셋 및 {100} 파셋을 모두 가질 수 있으며, 이중 {110} 파셋이 가장 풍부할 수 있다.

- [0065] 이때, 금속 나노 그래인의 파셋 결정면은 산성 매질 하 수행되는 네모파 전압전류법에 의해 얻어지는 전압-전류도(voltammograms)에서 산화 전류 피크의 중심 위치를 통해 결정될 수 있으며, 산화 전류 피크 값을 통해 각 파셋의 풍부함 정도가 결정될 수 있다.
- [0066] 금속 막의 전기화학적 표면적은, 금속막의 산성 매질 하 순환전류전압법을 이용하여 얻어진 음의 피크로부터 산출된 면적을 기하학적 면적으로 나눈 비인 거칠기 계수로 대표될 수 있다. 금속 막의 거칠기 계수는 150 이상, 180 이상 또는 200 이상일 수 있으며, 실질적으로 300 이하, 또는 250이하일 수 있다.
- [0067] 금속 막의 금속, 또는 금속 나노 그래인의 금속은 금속 막의 용도를 고려하여, 해당 용도에 통상적으로 사용되는 금속일 수 있다. 일 예로, 전기화학적 바이오 센싱 플랫폼의 용도를 고려할 때, 금속은 Au, Pt, Pd, Rh, Ag 등을 포함하는 귀금속일 수 있다. 일 예로, 금속 막이 SERS 활성 구조(Surface-Enhanced Raman Scattering active structure)로 사용되는 SERS 센싱 플랫폼의 용도를 고려할 때, 금속은 플라즈모닉 금속, 일 예로, Au, Ag, Pt 또는 Pd등과 같은 귀금속일 수 있다.
- [0068] 본 발명은 상술한 금속 막을 작업 전극으로 포함하는 전기화학적 바이오센서를 포함한다.
- [0069] 이와 독립적으로, 본 발명은 상술한 금속 막을 SERS 활성 구조로 포함하는 표면 증강 라만 분광용 기판(substrate)을 포함한다. 금속 그래인의 응집에 의한 금속 그래인간 형성되는 나노갭 및/또는 가지나 줄기 형태로 응집된 응집체 간의 나노갭은 핫 스팟(hot-spot)을 형성할 수 있다.
- [0070] 상술한 금속막은 나노구조화에 의해 증대된 표면적을 가진과 동시에 나노 다공성에 의해 바이오 파울링이 방지된다. 이에, 금속 막이 작업 전극으로 구비되는 전기화학적 바이오센서나 금속 막이 SERS 활성 구조로 구비된 표면 증강 라만 분광용 기판은, 생체에서 얻어진 생물학적 샘플의 전처리(추출, 농축, 희석등) 없이, 소변, 혈액, 침등과 같은 액상의 생물학적 샘플 그 자체를 바로 분석하여, 질병 지표로 사용되는 생화학 물질의 존재 및 함량을 검출할 수 있다.
- [0071] 금속 막은 그 표면에 질병 지표로 사용되는 생화학 물질인 표적 물질과 특이적으로 결합하는 하나 이상의 수용체가 결합되어, 그 표면이 수용체로 기능화된 것일 수 있다. 수용체는 복수의 관능기를 갖는 링커를 통해 금속 막에 고정될 수 있다. 링커의 관능기로 히드록시기, 카복시기, 아민기, 티올기등을 들 수 있으며, 링커는 제1관능기를 통해 금속 막과 결합하고, 제2관능기를 통해 수용체와 결합할 수 있다. 링커의 일 예로, L-시스테인등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0072] 수용체와 표적 물질간의 특이적 결합은 이온 결합, 공유 결합, 수소 결합, 배위 결합 또는 비공유 결합에 의한 것일 수 있으며, 구체적으로, 효소-기질 결합, 항원-항체 결합, 단백질-단백질 결합, DNA간의 상보적 결합, 또는 비오틴(biotin)-아비딘(avidin) 결합일 수 있다. 목적하는 표적 물질 별 표적 물질과 특이적으로 결합하는 수용체의 구체 물질들은 바이오 센싱 분야에서 이미 주지된 것이다. 일 예로, 표적 물질이 IL6등과 같은 가용성 단백질 염증 마커인 경우 기 알려지거나 시판되는 항-IL6 검출 항체등을 수용체로 사용할 수 있고, 표적 물질이 암세포 유래 세포의 세포표지인 경우 기 알려진 CD9 캡처 항체등을 수용체로 사용할 수 있다.
- [0073] 전기화학적 바이오센서는 절연성 기재; 및 절연성 기재의 일 면에 구비된 상술한 금속 막을 포함하는 작동전극, 기준전극 및 상대전극을 포함할 수 있다. 작동전극 이외의 기준전극 및 상대전극은 단순 평면 전극일 수 있으며, 통상의 증착 공정과 리소그래피 공정으로 나노 패턴화된 미세 전극일 수 있다. 각 전극별로 외부와의 전기적 접속을 위한 패드(접속 단자)가 구비될 수 있으며, 독립적으로 전위가 인가될 수 있는 다수개의 작동전극이 구비되고, 다수개의 작동전극에 대해 공통의 단일한 기준전극과 공통의 단일한 상대전극이 구비될 수 있다. 작동전극의 크기는 작동전극과 동일한 면적을 갖는 원으로 환산한 직경 기준 100 μm 내지 800 μm 수준일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 절연성 기재는 유리등과 같은 비정질, 실리콘산화물이나 실리콘 등과 같은 무기물, 폴리프로필렌이나 폴리에틸렌등과 같은 유기물등, 바이오센싱 분야에서 분석 플랫폼을 지지하기 위해 통상적으로 사용하는 물질이면 족하다.
- [0074] 작동 전극은 하기 식 1을 만족하는 방오 특성을 가질 수 있다.
- [0075] (식 1)
- [0076] $R_{ct}(20)/R_{ct}(0) \leq 1.5$

- [0077] 식 1에서, R_{ct} 는 1%의 소 혈청 알부민(BSA)을 함유하는 용액과의 접촉시 전하 이동 저항(charge transfer Resistance)이며, $R_{ct}(0)$ 는 접촉 직후의 전하 이동 저항, $R_{ct}(20)$ 은 접촉 후 20시간이 흐른 시점에서의 전하 이동 저항을 의미한다. 이때, 작동 전극은 L-시스테인으로 개질된 전극일 수 있다
- [0078] $R_{ct}(20)$ 과 $R_{ct}(0)$ 는 실질적으로 동일할 수 있다. 이때, 실질적으로 동일하다 함은 일정 시간이 지난 시점에서의 전하 이동 저항값을 기준이 되는 초기 전하 이동 저항 값으로 나눈 비가 1.5 이하, 1.4 이하, 1.3 이하, 1.2 이하, 1.1 이하 또는 측정 오차 범위 내에서 1에 이름을 의미할 수 있다.
- [0079] 식 1의 결과는 작동 전극으로 작용하는 금속 막이 바이오 파울링으로부터 실질적으로 자유로움을 의미한다.
- [0080] 이와 함께 또는 이와 독립적으로, 작동 전극(L-시스테인으로 개질된 작동 전극)은 혈장(plasma)과의 접촉이 20 시간 지속된 시점에서 0.5 KΩ이하, 0.4 KΩ이하, 또는 0.3KΩ이하의 전하 이동 저항(R_{ct})을 가질 수 있다. 또한, 혈장과의 접촉 2시간 시점에서의 전하 이동 저항은 혈장과의 접촉 20시간 시점에서의 전하 이동 저항과 실질적으로 동일할 수 있다.
- [0081] 이때, 전하 이동 저항(R_{ct})는 페로시안화물 및 페리시안화물의 레독스 페어를 등몰 농도를 함유하는, 1%의 소 혈 정 알부민(BSA Bovine Serum Albumin) 용액 또는 혈장을 매질로, 패러데이 전기화학적 임피던스 분광법을 이용하여 산출된 것일 수 있다.
- [0082] 작동 전극은 향상된 민감도를 가질 수 있다. 상세하게, 0 내지 50 μM 의 동일 몰 농도 범위로 페로시안화물/페리시안화물 레독스 페어를 함유하는 용액을 기준 용액으로 하여, 기준 용액의 농도에 따른 산화 피크 전류값($\mu\text{A} \cdot \text{mm}^{-2}$)의 기울기인 민감도는 10 $\mu\text{Amm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ 이상, 12 $\mu\text{Amm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ 이상, 또는 14 $\mu\text{Amm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ 이상일 수 있다. 산화 피크 전류값은 0.02Vs⁻¹의 스캔 속도로 0V에서 0.6V 사이의 네모파 전압전류법(squared wave voltammetry)을 사용하여 얻어진 것일 수 있다. 이때, 작동 전극은 L-시스테인으로 개질된 전극일 수 있다
- [0083] 표적 물질은 암세포 유래 세포의 소포체일 수 있으며, 이때, 전기화학적 바이오센서는 암 검출을 위한 전기화학적 바이오센서일 수 있다. 검출하고자 하는 질병인 암은 전립선암을 포함할 수 있다. 그러나, 본 발명에서 전기화학적 바이오센서에서 검출 가능한 질병이 암이나 전립선암으로 한정될 수 없음은 자명하며, 해당 질병의 질병 지표로 알려진 물질을 표적 물질로 설정하고, 해당 표적 물질과 특이적으로 결합하는 것으로 알려진 수용체를 이용하여 작동 전극을 기능화하여 해당 표적물질 검출함으로써, 해당 질병의 보유 유무를 판별할 수 있는 기초 자료를 제공할 수 있다.
- [0084] 본 발명은 상술한 금속 막을 작동 전극으로 포함하는 전극 부재가 위치하는 기관을 포함하는 검출 키트를 포함한다. 작동 전극을 포함하는 전극 부재가 위치하는 기관은 상술한 전기화학적 바이오센서에 대응할 수 있으며, 이에, 검출 키트는 앞서 금속 막에서 상술한 모든 내용 및 전기화학적 바이오센서에서 상술한 모든 내용을 포함한다.
- [0085] 본 발명에 따른 검출 키트는 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표와 특이적으로 결합하는 캡처용 수용체로 기능화된 상술한 금속 막을 작동 전극(working electrode)으로 포함하며, 작동 전극을 포함하는 전극 부재가 위치하는 기관을 포함할 수 있다.
- [0086] 기관상, 다수개의 작동 전극이 서로 이격 배열되어 작동 전극의 어레이를 이룰 수 있으며, 어레이를 이루는 작동 전극 별로 외부와의 전기적 연결을 위한 패드(접속 단자)가 구비될 수 있다. 다수개의 작동 전극이 구비된 경우, 단일한(공통의) 상대전극과 단일한(공통의) 기준전극이 구비될 수 있다. 즉, 다수개의 작동 전극은 작동 전극과 이격 위치하는 상대전극과 기준전극을 공유할 수 있다.
- [0087] 필요시, 검출 키트는 패드를 포함한 전극 부재가 형성된 기관과 함께, 샌드위치 결합을 형성하기 위한 검출용 수용체가 보관된 용기를 더 포함할 수 있다. 용기는 병, 통, 봉지, 튜브, 앰플등과 같은 형태일 수 있으며, 부분적으로 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 용기는 기계적, 접착성, 또는 기타수단에 의해 용기에 부착되고, 필요시 외력에 의해 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 포함할 수 있다.
- [0088] 필요시, 검출 키트는 작동 전극(어레이를 이루는 경우, 작동 전극 각각)과 전기적으로 연결되고, 기준전극 및 상대전극 각각과 전기적으로 연결되는 연결선; 상기 연결선을 통해 기 설정된 전기 신호를 인가하고 전기 신호에 따른 전기적 반응(ex. 전류)를 검출하고, 검출된 전기적 반응을 처리하여 질병 지표의 유무나 농도 또는 질

병 보유 (가능성) 여부를 산출하는 처리부; 및 전기 신호 발생을 위한 전력을 제공하는 전력원; 및 처리부에서 산출된 결과를 출력하는 출력부;등을 포함할 수 있다.

[0089] 처리부에 의해 전극에 인가되는 전기 신호는 전압전류법, 구체적으로 순환 전압전류법을 수행하기 위한 전기 신호로, 설정된 전압 범위를 설정된 스캔 속도로 스캔하는 전기 신호일 수 있다. 처리부는 전기 신호의 인가와 함께, 작동 전극에서 발생하는 전기화학적 산화 전류를 검출하여, 산화 전류밀도 피크의 최대값 또는 산화 전류밀도 피크에서 피크 면적값(적분값)을 산출하고, 산출된 산화전류밀도 값(최대값이나 면적값)을 기준으로 질병 보유 유무나 질병 보유 가능성을 산출하여, 출력부에 송신할 수 있다. 이때, 산출부에는 해당 질병을 보유하지 않은 건강한 사람의 질병 지표 값(산화전류밀도 값)과 해당 질병을 보유한 환자의 질병 지표 값(산화전류밀도 값)이 기 저장되어 있을 수 있으며, 측정된 값(산화전류밀도 값)과 기 저장된 기준값들을 통해 질병 보유 유무나 질병 보유 가능성이 산출될 수 있다. 처리부에 의해 전극에 인가되는 전기 신호는 순환전압전류법을 수행하기 위한 전기 신호일 수 있으며, 상세한 내용은 후술하는 검출 방법을 참고한다. 출력부는 산출부에서 송신한 결과를 수신하여 이를 LED 패널등과 같은 디스플레이 부재들을 통해 시각적 인지 가능하도록 출력할 수 있다. 전력원은 출력부, 처리부등에 전력을 제공함과 동시에, 출력부를 통해 전극 부재에 인가되는 전기 신호의 생성을 위한 전력 또한 제공할 수 있다. 이때, 필요시 처리부는 전력원으로부터 제공된 전압(또는 전류)를 이용하여 기 설정된 전기신호로 생성할 수 있는 통상의 신호 생성 회로를 포함할 수 있음은 물론이다.

[0090] 본 발명은 상술한 바이오센서를 이용한 질병 지표(바이오센서에서 상술한 표적 물질에 상응)의 검출 방법을 포함한다.

[0091] 질병 지표의 검출 방법은 질병 지표와 특이적으로 결합하는 캡처용 수용체(바이오센서에서 상술한 수용체에 상응)로 기능화된 바이오센서의 작동 전극에 질병 지표를 함유할 수 있는 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계; 생물학적 샘플과 접촉한 작동전극에 검출용 수용체를 접촉시키는 단계; 및 전압전류법을 이용하여 전기화학적 산화 전류 밀도를 측정하는 단계;를 포함한다.

[0092] 생물학적 샘플은 생체에서 얻어지거나 생체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미할 수 있다. 생물학적 샘플의 일 예로, 혈액(개전혈whole blood), 혈장(plasma), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 골반 내 유체액(pelvic fluids), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)등을 들 수 있다.

[0093] 생체에서 얻어진 생물학적 샘플이 혈액, 혈청, 혈장, 눈물, 세비액, 소변, 침, 복강 세척액, 골반 내 유체액, 낭종액, 뇌척수막 액, 양수, 선액, 췌장액, 림프액, 흉수, 유두 흡인물, 기관지 흡인물, 활액, 또는 뇌척수액등과 같은 액상인 경우, 생물학적 샘플은 추출, 농축, 희석등과 같은 전처리가 수행되지 않은 상태일 수 있다.

[0094] 그러나, 생체에서 얻어져 별도의 전처리가 수행되지 않은 상태로 분석될 수 있는 것은, 작동 전극이 갖는 높은 검출 민감도 및 바이오 파울링 능력에 의해 갖는 특징적 장점으로, 본 발명이 전기화학적 바이오센싱 분야에서 통상적으로 행해지는 전처리가 수행된 샘플의 분석을 배제하는 것은 아니다.

[0095] 작동 전극과 접촉하는 생물학적 샘플의 양은 수(1~8) μL 수준의 극미량이면 족하며, 이 또한, 작동 전극이 갖는 높은 검출 민감도에 의해 가능한 것이다. 이때, 작동 전극 상 또는 작동 전극의 둘레를 따라 수 μL 수준의 극미량의 생물학적 샘플이 담길 수 있는 웰이 결합될 수 있음은 물론이다.

[0096] 검출용 수용체는 질병 지표와 결합된 캡처용 수용체 또는 캡처용 수용체에 결합된 질병 지표와 특이적으로 결합하는 수용체일 수 있다. 검출용 수용체는 효소가 결합된 수용체일 수 있으며, 질병 지표와 특이적으로 결합하는 1차 검출용 수용체 및 1차 검출용 수용체와 특이적으로 결합하는 2차 검출용 수용체를 포함할 수 있다. 검출용 수용체는 구체 질병 지표를 고려하여, 해당 질병 지표의 검출을 위해 통상적으로 사용하는 수용체를 사용하면 족하다. 일 예로, 질병 지표가 암세포 유래 세포의 소포체인 경우 검출용 수용체로 EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule)등을 들 수 있다. 구체 질병 지표, 구체 검출용 수용체, 구체 캡처용 수용체에 따른 특이적 결합 종류를 고려하여, 검출용 수용체나 캡처용 수용체는 기능화된 상태일 수 있다. 기능화의 일 예로, 비오틴화나 아비딘화등을 들 수 있다. 필요시, 캡처용 수용체나 검출용 수용체는, 전기화학적 바이오센싱 분야에

서 전기화학적 산화 또는 환원을 용이하게 발생시키기 위해 사용되는 통상의 효소가 결합된 것일 수 있다.

- [0097] 전압전류법, 구체적으로 순환 전압전류법을 이용하여 작동 전극에서 발생하는 전기화학적 산화 전류밀도를 측정함으로써, 목적하는 질병 지표를 검출할 수 있으며, 기 확보된 질병 보유자의 질병 지표 검출 값이나, 기 확보된 질병 지표 농도에 따른 전기화학적 산화 전류 밀도값을 이용하여, 질병 보유 여부를 판별할 수 있는 판별 기준이 제공될 수 있다.
- [0098] 상세하게, 순환 전압전류법은 일정 전압 윈도우로 전압을 스캔하여 수행될 수 있다. 일 예로, 순환 전압전류법은 개방회로 전위 대비 $-0.5 \sim 0.5V$ 범위에서 0.05 내지 $0.5Vs^{-1}$ 의 스캔 속도로 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 전기화학적 산화 전류 밀도는 산화 전류밀도 피크의 최대값 또는 산화 전류밀도 피크에서 피크 면적값(적분값)을 의미할 수 있다.
- [0099] 본 발명의 전기화학적 바이오센서, 검출 키트 또는 검출 방법에서, 작동 전극이 반드시 질병 지표(표적 물질)과 특이적으로 결합하는 수용체로 기능화되어야만 하는 것은 아니다. 알려진 바와 같이, 작동 전극에 질병 지표(표적 물질)가 결합하고 작동 전극에 결합된 질병 지표에 수용체가 결합하는 직접적(direct) 검출 또한 가능하며, 상술한 바와 같이, 수용체와 질병 지표(표적 물질)간의 샌드위치 결합을 통한 비직접적(indirect) 검출 또한 가능함은 물론이다. 당업자라면 ELISA를 통해 알려진 표적 물질과 수용체간의 결합과 검출 방식(직접적 검출, 비직접적 검출등)을 본 발명의 전기화학적 바이오센서, 검출 키트 또는 검출 방법에 용이하게 응용 및 적용할 수 있다.
- [0100] 상술한 전기화학적 바이오센서, 검출 키트 또는 검출 방법은 암 검출용일 수 있다. 암 검출용 전기화학적 바이오센서, 검출 키트 또는 검출 방법에서, 질병 지표는 암세포 유래 세포외 소포체일 수 있고, 캡처용 수용체는 CD9, 검출용 수용체는 EpCAM일 수 있으며, 생물학적 샘플은 소변 또는 혈장일 수 있다. 암 검출용 전기화학적 바이오센서, 검출 키트 또는 검출 방법에서, 수신자 조작 특성값(AUC)은 0.90 이상일 수 있다. 이때, 암은 전립선 암을 포함할 수 있다.
- [0101] 본 발명은 상술한 금속 막의 제조방법을 포함한다.
- [0102] 본 발명에 따른 금속 막의 제조방법은 평면 금속막인 베이스 금속막과 양이온성 계면활성제, 염소 소스 및 베이스 금속막의 금속과 동종의 금속을 함유하는 금속전구체를 포함하는 시딩 용액을 접촉시키고, 하기 조건의 스텝 시간대전류법(step chronoamperometry)을 이용하여 베이스 금속막을 나노구조화 및 나노다공화하는 단계;를 포함한다.
- [0103] (조건)
- [0104] 전압 인가시 단위 사이클(스텝 전압) : 양의 전압($V+$)과 음의 전압($V-$)의 순차적 인가
- [0105] $V+$ 크기 및 $V+$ 인가 시간($t+$) : 1.0 내지 $1.5V$ 및 0.5 내지 $3msec$
- [0106] $V-$ 크기 및 $V-$ 인가 시간($t-$) : -1.0 내지 $-1.5V$ 및 $0.8t+$ 내지 $3t+$
- [0107] 단위 사이클 반복 횟수 : $10,000$ 내지 $30,000$ 회, 구체적으로 $15,000$ 내지 $25,000$ 회
- [0108] 스텝 시간대전류법 수행시, 단위 사이클(스텝 전압)에서는 염소 이온의 흡착-금속 막의 비 등방적 금속 에칭(산화)-비 등방적 금속 이온의 환원이 발생하며, 단위 사이클이 반복되며, 비 등방적 에칭과 비 등방적 금속 이온의 환원이 반복적으로 이루어져 최종적으로 상술한 산호초 형태의 금속막이 제조될 수 있다.
- [0109] 상세하게, 시딩 용액 내 양이온성 계면활성제에 의해 베이스 금속막에는 패시베이션 층이 형성될 수 있다. 패시베이션 층은 염소 이온이 주로 우선적 흡착 장소에 흡착되는 것을 돕고 금속 이온의 환원시 불균질한 핵생성 장소 제공을 돕는다.
- [0110] 시간대전류법 수행시, 양이온성 계면활성제의 패시베이션 층이 형성된 금속 막에 염소 소스로부터 제공되는 염소 이온이 금속 막의 우선적 흡착 사이트(킹크, 공공등의 표면 결합 사이트)에 흡착되고, 우선적 흡착 사이트에 주로 흡착된 염소 도움으로 베이스 금속막의 표면이 전기 산화되어, 비 등방적으로 에칭된다. 이후 인가되는 전위의 극성이 달라지며 금속전구체의 금속 이온이 금속으로 환원되고, 전기 산화에 의해 금속 막 표면에 형성된 크레바스(crevasses)가 우선적 핵 생성 장소로 작용하며 비 등방적 핵생성이 발생한다. 전압 스텝의 인가가 반복될수록 비 등방적 전기 산화와 비 등방적 전기 환원에 의한 비균질성이 커지며 베이스 금속막의 나노 구조화와 나노 다공화가 동시에 이루어지게 된다. 또한, 전기 산화와 전기 환원은 금속 막 표면에서 발생하는 표면 반응이며, 반응에 요구되는 물질 확산이 전제되어야 하고, 전압 스텝의 인가가 반복되며 표면 금속 입자들의 용

집체가 시딩 용액 쪽으로 성장해 나가는 형태를 가진다. 이에 따라 나노 다공화 및 나노 구조화된 금속 막은 막의 두께 방향으로 뻗어나가는 줄기 형태, 구체적으로 산호초 형태를 갖게 된다.

[0111] 양이온성 계면활성제는 4급 암모늄염일 수 있으며, 4급 암모늄염은 에스테르를 포함하는 4급 암모늄염(EQ; ester-containing quaternary ammonium salt)이나 아마이드 및 에스테르를 포함하는 4급 암모늄염(amide group and ester group in Quaternary Ammonium salts)을 포함할 수 있다. 구체적으로, 4급 암모늄염은 세틸트리메틸 암모늄 클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride, CTAC), 도데실트리메틸암모늄 브로마이드(dodecyltrimethylammonium bromide, DTAB), 세틸트리메틸암모늄브로마이드(CTAB)등과 같은 C12 이상의 탄화수소 체인을 갖는 지방족 암모늄 염일 수 있다. 이때, 4급 암모늄염의 음이온이 CTAC와 같이 염소인 경우 계면활성제에 의해서도 염소가 공급될 수 있어 유리하다.

[0112] 금속전구체는 금속 막과 동종의 금속을 함유하는 함염소화합물일 수 있다. 일 예로, 금속 막이 금 막인 경우 금속 전구체는 금 전구체일 수 있고, 염화금산칼륨(KAuCl₄), 염화금산나트륨(NaAuCl₄), 염화금산(HAuCl₄), 염화금(AuCl), 염화금(III)(AuCl₃)등과 같은 염소를 함유하는 금 전구체일 수 있다. 실질적으로, 금속전구체는 전기 산화시 생성되는 에칭 산물을 함유하는 화합물일 수 있다. 일 예로, 금속 막이 금 막인 경우, 에칭 산물은 AuCl₄⁻ 수 있고, 금 전구체는 염화금산칼륨, 염화금산나트륨, 염화금산(HAuCl₄)등과 같이 AuCl₄⁻를 함유하는 화합물일 수 있다.

[0113] 스텝 전압이 반복적으로 인가되며 원활한 나노 구조화가 발생하고 바이오 파울링이 억제되는 나노 다공화가 금속막 전체적으로 균질하게 발생할 수 있도록, 시딩 용액에 함유된 양이온성 계면활성제 : 염소 소스 : 금속전구체의 몰비는 1 : 1 내지 3 : 0.001 내지 0.1 수준일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0114] 상술한 조건으로 스텝 시간대전류법이 수행된 후, 또는 마지막으로 인가되는 단위 사이클의 음의 전압 인가시, 금속막에 -1.0 내지 -1.5V의 전압이 5 내지 30sec 동안 인가되며, 전기 환원이 수행될 수 있다. 이러한 전기 환원에 의해 나노 구조화되고 나노 다공화된 금속막이 안정적으로 금속 표면을 제공할 수 있다.

[0115] 염소 이온종을 함유하는 물의 전기분해가 발생하지 않는 범위에, 표준환원전위가 위치하는 금속이라면, 상술한 시딩 용액과 스텝 시간대전류법을 이용한 나노 구조화 및 나노 다공화가 이루어질 수 있다. 이러한 금속의 실질적인 예로, 구리(Cu), 은(Ag), 팔라듐(Pd), 백금(Pt), 로듐(Rh), 금(Au)등을 들 수 있다.

[0116] 이하, 인체에 무해하고, 우수한 전기촉매 특성을 가져 전기화학적 센싱 분야에서 주목받고 있으며, 플라스모닉 특성을 갖는 대표적 금속인 금을 대상으로, 금 박막의 나노 다공화 및 나노 구조화의 예를 제공하나, 금속 막의 물질이 대상이 단지 금으로 한정될 수 없음은 물론이다.

[0117] 평면 전극이 구비된 칩 제조

[0118] 평면(planar) 전극을 4인치 소다-라임 유리 웨이퍼 상에 표준 리소그래피 공정을 사용하여 클린룸에서 제작하였으며, 4개의 작업 전극을 포함하는 44개의 칩(1.5 x 0.9mm)을 제조하였다.

[0119] 먼저, 전자빔 증착법(FC-2000, Temescal)으로 20nm의 티타늄과 400nm의 금을 증착하였다. 스핀 코팅(4000rpm, 500rpm⁻¹, 1분)을 통해 1.3μm 두께의 포토레지스트(AZ[®] 5214 E, MicroChemicals GmbH)를 도포하고, 핫 플레이트(105℃에서 90초)로 용매를 증발시켰다. 이후 블랭크 유리에 부착된 Mylar 마스크(Advance Reproductions, USA)를 사용하여 마스크 얼라이너(MA/BA6, SUSS MicroTec Korea Co. Ltd.)(h-line 405 nm, 90 mJcm⁻²)에서 노광하고, 포토레지스트를 현상(AZ[®] MIF 326, MicroChemicals GmbH)하여 패턴을 전사하였다. 이후 노출된 금층을 금 에천트(cat# 651818-500ML, Sigma-Aldrich)로 1분간 식각하고, 완충 산화물 에칭제(BOE 7:1, MicroChemicals GmbH)로 40초 동안 처리하여 티타늄층을 벗겨냈다. 이후, 잔류하는 포지티브 포토레지스트를 이소프로필알코올로 제거하고, 웨이퍼에 2μm 두께의 포토레지스트(SU-8 2002, K1 Solution)를 스핀코팅(3000rpm, 500rpm⁻¹, 1min)하였다. 네거티브 포토레지스트의 프리-베이킹(65℃에서 1.5분 및 95℃에서 3분) 후, 웨이퍼를 마스크 정렬기(i-라인 365nm, 120mJcm⁻²)에 노출시키고, 현상(SU-8 현상액, K1 솔루션) 전, 전기 접점을 열고 전극의 감지 영역을 제한하기 위해, 신속하게 포스트-베이킹(65℃에서 1.5분 및 95℃에서 1.5분)을 수행하였다. 마지막으로 칩을 이소프로필 알코올로 세척하고 네거티브 포토레지스트를 하드-베이킹(180℃에서 3시간)하여 추가로 경화시켰다. 다이싱 동안 칩을 보호하고 보관 중에 칩을 깨끗하게 유지하기 위해 포지티브 포토레지스트

보호 층을 스핀 코팅하였으며, 사용 전, 칩을 아세톤으로 헹구고 0.5mbar 및 50mW의 O₂ 플라즈마(Cute, Femto Science)에서 2분 동안 클리닝하였다.

[0120] 작동 전극의 나노구조화

[0121] 시딩 용액을 제조하기 위해, 222mM 염화나트륨 스톡 용액 밀리리터당 36mg의 CTAC(TCI, cat# H0082, lot# 4LL50-MN)를 용해시켰다. 이후 제조된 용액을 염화금산 10mM 액(스톡은 4℃에서 암소에 보관)과 혼합하여, 최종적으로 CTAC 100mM, NaCl 200mM 및 HAuCl₄ 1mM의 농도를 갖는 시딩 용액을 제조하였다. 제조된 용액은 실온의 암실에 보관되었다.

[0122] 포토리소그래피를 이용하여 제조된 금 작동 전극에 10 μL의 시딩 용액을 부가하고, 스텝 전압(step voltage)의 20,000 사이클 및 1ms 동안 1.2V 인가 후 2ms 동안 -1.2V 인가의 스텝 전압으로 구성된 스텝 시간대전류법(step chronoamperometry)을 수행한 후, 마지막으로, -1.2V에서 10초 동안 시간대전류법 단계를 인가하여, 나노구조화된 전극(이하, NSG 전극)을 제조하였다.

[0123] 전기화학적 설정 및 측정

[0124] 모든 전기화학적 프로세스 및 측정은, 외부 백금 와이어를 상대 전극으로 사용하고 누출이 방지된 소형 Ag/AgCl 전극(cat# 544 ET072-1, Qrins)을 기준전극으로 사용한 3-전극 구성을 이용하여, potentiostat-galvanostat EC-Lab(저전류 옵션이 있는 VSP 모델, BioLogic, France)에서 수행되었다. 작동전극으로 포토리소그래피를 이용하여 제조된 원형 금 전극(Φ = 0.45mm, 도 2 왼쪽) 또는 시딩 용액을 이용하여 나노구조화된 원형 금 전극(도 2 오른쪽)을 사용하였다.

[0125] 포토리소그래피를 이용하여 제조된 원형 금 전극의 경우, 레이저 절단된 양면 접착 테이프(DFM 200 clear 150 POLY H-9 V-95, FLEXcon)를 이용하여, 전극에서 샘플 배양을 위한 5-10 μL의 리저버를 형성하였다.

[0126] 전기화학적 표면적

[0127] 전극은 0.1Vs⁻¹의 스캔 속도로 H₂SO₄ 0.5M의 산성 용액에서 0V에서 1.6-1.8V까지 순환전류전압법(CV, Cyclic voltammetry)에 의해 스캔되었으며, 약 0.9V에서의 환원 곡선 아래의 면적(전하)을 누적(integration)하였다. 음극 피크(cathodic peak)는 환원된 금의 양에 비례하였으며, 이에 따라 전극의 표면적에 비례하였다. 문헌에 따라, 400 μCcm⁻²의 비 전하 이동(specific charge transfer)을 가정하여 전극 면적을 산출하고, 이를 기하학적 영역과 비교하여 거칠기 계수(roughness factor)를 산출하였다.

[0128] 표면 및 토포그래피(topography) 특성

[0129] 전극 표면의 토포그래피 특성은 SEM(S-4800, Hitachi High-Technologies) 및 AFM(DI-3100, Veeco)을 사용하여 수행되었다. SEM 관찰 전, 스퍼터 코팅을 이용하여 샘플에 5nm 금층을 코팅하였다. 이미징은 7kV의 가속 전압 및 3-4mm 작동 거리에서 수행되었다. NSG 전극 거칠기 및 형태는 반경 곡률이 10 nm 미만이고 알루미늄 반사 코팅(300AL-G-10, Woomyoung Inc.)을 갖는 실리콘 AFM 팁을 사용하여 비접촉 탭핑 모드의 AFM(atomic force microscope)을 이용하여 수행되었다.

[0130] 접촉각 측정

[0131] 표면 에너지 분석은 수 접촉각 측정을 통해 수행되었다. 샘플 표면에 1 μL의 물방울을 떨어뜨리고 이미지를 즉시 기록하였다. 이미지는 ImageJ 1.53e로 분석되었으며, 7점 수동 선택 절차를 사용하여 액적의 모양을 구로 근사하였다. 접촉각은 다음 공식: $\theta = 2 \cdot \text{atan}\left(\frac{2h}{l}\right)$ 을 사용하여 계산되었다. θ=접촉각(rad), h=액적의 높이, l=액적 베이스의 길이

[0132] X-선 회절을 이용한 결정 크기 측정

[0133] '평면 전극이 구비된 칩 제조' 공정과 유사하게, 유리 웨이퍼상 Ti/Au(20/400 nm)를 증착한 후, 다이싱하여 칩(1cm x 1.5cm)을 제조하고, 4mm 정사각형의 측면 개구부가 있는 접착 테이프를 표면에 부착하여 작업 전극 영역을 규정하였다. '작동 전극의 나노구조화'와 동일한 공정을 이용하여 X-선 회절용 NSG 전극을 제조하였다.

[0134] Cu Kα₍₁₊₂₎ 소스를 사용한 스침각 X-선 회절(grazing incidence X-ray diffraction, rucker D8 Discovery)을 통해 샘플을 분석하였으며, 입사각 ω는 1° , 2θ 범위는 30° - 80° 였다.

- [0135] 결정 크기(crystallite size)는 Au(220) 피크의 FWHM(full width at half maximum)과 셰리 방정식을 사용하여 산출되었다. 셰리 방정식 : $\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$, 이때, τ =결정 도메인의 평균 크기, K = 무차원 형상 계수(0.94), λ =X-선 파장(1.5418Å), β =라인 브로드닝(rad), θ =브래그 각도(°)
- [0136] 금 결정면의 전기화학적 관찰
- [0137] '작동 전극의 나노구조화'에서 수행된 공정과 동일하되, 산화 전압으로 1.20V, 1.25V 또는 1.3V를 사용하고, 필요시 마지막에 수행되는 -1.2V에서 10초 동안의 환원 단계를 생략(환원 단계가 생략된 샘플은 *로 표시)하여 NSG 전극의 금 결정면을 분석하기 위한 추가 NSG 전극을 제조하였다.
- [0138] NSG 전극에서 금 결정면(crystalline gold faces) 형성의 관찰은 0.02 Vs⁻¹의 스캔 속도로 0 V에서 1.3 V까지 스캔하는 네모파 전압전류법(squared wave voltammetry)(펄스 높이 30 mV, 펄스 너비 100ms, 스텝 높이 4mV)를 이용하여 H₂SO₄ 0.5 M의 산성 매질에서 수행되었다.
- [0139] 전극 기능화
- [0140] 일정한 진탕 하, 전극 칩을 L-시스테인(L-cysteine) 10mM의 용액에 24시간 동안 담그고, 초순수로 린싱하였다. 인산완충생리식염수(PBS pH=8) 내 2.5% 글루타르알데히드 용액을 칩 표면에 드롭-캐스팅하고 30분 동안 인큐베이션한 후 칩을 린싱 및 건조하였다.
- [0141] PBS 중 20 µgmL⁻¹의 항-IL6(Thermo Fisher Scientific, cat# CHC1263, lot# 172402) 또는 항-CD9(BD Pharmingen, cat# 555370, lot# 9014503) 용액을 준비하고, 속 빈 세라믹 바늘을 이용하여 전극에 도포하고, 4 °C의 물-포화 분위기에서 밤새 배양하였다. 인큐베이션 후, 전극을 30분 동안 셰이커에서 PBS Tween 20 0.05%로 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다.
- [0142] 이후, HCl을 사용하여 pH 7.4로 조정된 PBS 중 1M 에탄올아민(Sigma-Aldrich, cat# E9508) 10 µL를 각 전극에 드롭 캐스트하고 실온에서 30분 동안 인큐베이션하여 미반응 모이어티를 중화시켰다. 마지막으로, 칩을 사용하기 전, 칩은 실온에서 1% BSA로 1시간 동안 인큐베이션되었다.
- [0143] NSG 전극의 생물학적 오염(biofouling) 거동
- [0144] NSG 전극(L-시스테인으로 개질된 전극) 표면의 생물학적 오염 거동은 패러데이 전기화학적 임피던스 분광법을 이용하여 분석되었다. 패러데이 전기화학적 임피던스 분광시, 페로시아화물 K₄Fe(CN)₆ 및 페리시아화물 K₃Fe(CN)₆을 2.5mM의 등몰 농도를 함유하는, 1%의 소 혈정 알부민(BSA Bovine Serum Albumin) 또는 인간 혈장(human plasma)의 서로 다른 두 종류의 매질(media)을 사용하였다. 측정은 개방 회로 전위에 대해(vs. open circuit potential) 5mV의 진폭으로 0.1MHz에서 0.1Hz까지 수행되었다. NSG 전극의 R_{ct}는 도 1에 도시된 나이퀴스트(Nyquist) 등가 회로를 이용하여 산출되었다. 도 1의 등가회로에서, R_s는 용액의 저항을, 정위상 요소(비이상적 커패시턴스, constant phase element, CPE)는 이중층 커패시턴스(Cd1)를 모델링하는 데 사용되었으며, 병렬로 연결된 R_{ct} 및 Warburg 요소(Z_w)는 용액에서 전기 활성 종의 확산을 모델링하는데 사용되었다.
- [0145] 레독스 분자(redox molecules)의 전기화학적 검출
- [0146] NSG 전극(L-시스테인으로 개질된 전극)의 전기화학적 산화환원 특성을 살피기 위해, 레독스 페어로 동일 몰 농도의 페로시아화물 K₄Fe(CN)₆ 및 페리시아화물 K₃Fe(CN)₆을 사용하였다. 상이한 농도(50, 25, 5, 2.5, 0.5, 0.25, 0.05, 0.025, 0.005, 0.0025 및 0mM)를 갖는 페로시아화물/페리시아화물의 전기화학적 검출은 0.02Vs⁻¹의 스캔 속도로 0V에서 0.6V 사이의 네모파 전압전류법(squared wave voltammetry)을 사용하여 수행되었다. 네모파 전압전류법에서, 펄스 높이는 30mV, 펄스 폭은 100ms, 스텝 높이는 4mV였으며, NSG 전극의 대조군으로 평면 금 전극(나노 구조화 전 포토리소그래피 공정으로 제조된 전극)을 사용하였다.
- [0147] LNCaP 암세포의 세포 배양, 세포의 소포체(EV; Extracellular Vesicles) 분리/농축, 및 EV 표준
- [0148] 표준용 EV는 LNCaP 세포 상층액에서 추출되었고, 20nm 양극 산화 알루미늄 멤브레인 필터를 포함하는 디스크 내부의 원심력 여과에 의해 농축되었다. LNCaP 세포는 ATCC에서 얻었고 5% Exo-Free FBS(Systems Biosciences, Inc.) 및 1% 항생제/항진균제가 보충된 Roswell Park 673 Memorial Institute 배지(Gibco, Thermo Fisher

Scientific)에서 배양되었고, 37℃ 온도 및 5% CO₂에서 48시간 동안 인큐베이션되었다. 세포 배양 상층액을 채취하여 300xg에서 10분간 원심분리하고, 2000xg에서 15분간 원심분리하여 죽은 세포와 세포 잔해물을 완전히 제거하였다. 상층액은 450 nm 필터를 통해 여과되었다.

[0149] 분리 및 농축된 EV를 사용하여 EV 표준을 준비했다. EV는 나노입자 추적 분석(Nanosight NS500, Malvern Instruments)에 의해 입자 수를 측정하기 위해 PBS에서 재구성되었고, 보정 곡선을 준비하기 위해, 다양한 희석율로 PBS 또는 인간 혈장 샘플에 스파이킹되었다.

[0150] 임상 샘플

[0151] 암환자의 생체시료 및 데이터는 한국바이오뱅크네트워크 회원인 부산대학교병원 바이오뱅크에서 제공받았다. 연구 프로토콜은 부산대학교병원 IRB(IRB 1802-004-063)의 검토 및 승인을 받았다. 건강한 기증자의 혈장 샘플은 영남대학교 의료원의 자원 봉사자로부터 얻었다(IRB 2018-04-011). 모든 피험자로부터 서면 동의를 받은 후 생체 표본을 수집했다. 샘플 수집 2시간 이내에, 소변을 4℃에서 10분 동안 500xg로 원심분리하여 세포 파편을 제거하고 분석할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 분석시 소변 샘플을 해동하고 4℃에서 15분 동안 2500xg에서 원심분리하고 침전된 펠렛을 제거했다. 각각 3mL의 혈액 샘플은 진공 EDTA 수집 튜브로 수집되었고, 수집 2시간 이내에 처리되었다. 혈액 샘플은 300xg에서 10분 동안 및 2000xg에서 10분 동안, 4℃에서 원심분리하여 세포와 파편을 제거하고, 사용전까지 -80℃에서 보관하였다.

[0152] NSG 전극을 사용한 전기화학적 효소 샌드위치 검출

[0153] IL6 검출 에세이에 사용된 시약, 희석액 및 세척 단계는 모두 에세이 완충액(PBS 중 1% BSA 및 0.05% Tween 20)에서 수행되었다.

[0154] IL6(Thermo Fisher Scientific, cat# CHC1263)을 PBS 및 인간 혈장에 다양한 농도로 스파이킹하고, 20 μL을 전극 칩에서 2시간 동안 인큐베이션했다. 비오틴화된 항-IL6 검출 항체(Thermo Fisher Scientific, cat# CHC1263)를 1 μg mL⁻¹로 희석하고 전극 칩에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 에세이를 완료하기 위해, 겨자무과산화효소(HRP; horseradish peroxidase)-스트렙타비딘(Thermo Fisher Scientific, cat# CHC1263)을 에세이 완충액으로 1:400으로 희석하고 30분 동안 인큐베이션했다. HRP 멤브레인 서브스트레이트(Enhanced One-Component HRP Membrane Substrate, Sigma-Aldrich, cat# T9455)(침전된 전기활성 시약, Precipitating TMB)를 칩에서 1분 동안 인큐베이션했다. 상술한 각 단계에서 단계가 수행된 후, 전극 칩을 에세이 완충액이 있는 셰이킹 페트리 접시에서 15분 동안 세척하였다.

[0155] 전극 칩은 칩의 내부에 구비된 상대 전극 및 기준 전극(의사 기준전극)을 사용하여 개방 회로 전위 대(vs. open circuit potential) -0.5와 0.5V의 전압 범위에서 0.1Vs⁻¹의 스캔 속도로 순환 전압 전류법에 의해 개별적으로 조사되었다. 다른 보정 곡선은 혈장 대신 PBS에서 IL6을 스파이크하고 비교를 위해 편평한 리소그래피 금 전극 칩(나노구조화되지 않은 전극 칩, 평면 전극으로도 통칭)을 사용하여 얻어졌다.

[0156] 세포 배양 배지 및 혈장에서 EV를 검출하기 위해, CD9 캡처 항체 및 비오틴화된 CD9(Abcam, monoclonal, clone# MEM-61, cat# ab28094, lot# GR280437-1) 1 μg mL⁻¹, 검출 항체로 비오틴화 CD81(LSBio, cat# LS-C134650, clone# 1.3.3.22) 1 μg mL⁻¹ 또는 비오틴화된 EpCAM(R&D Systems, cat# DY960, lot#1336382) 1 μg mL⁻¹를 사용하여 동일한 에세이로 EV를 검출하였다. Tween 20은 분석 중 EV의 지질막이 파괴되는 것을 방지하기 위해 에세이에서 완전히 제거되었다. 표준은 LNCaP 세포 배양 상층액에서 추출한 농축 EV 샘플을 희석하거나 다양한 희석액으로 인간 혈장에 스파이킹하여 준비하였다.

[0157] 건강한 기증자 및 전립선암 환자의 임상 소변 및 혈장 샘플은 어떠한 전처리 없이, 샘플을 칩에서 직접 배양하여 동일한 방식으로 분석하였다.

[0158] 효소 면역 분석법(ELISA)

[0159] ELISA는 96웰 플레이트(cat# 3364, Corning)에서 수행되었다. 모든 볼륨은 각 단계 후에 PBS 내 0.1% BSA 200 μL로 두 번 세척되었다. 먼저, 4 μg mL⁻¹의 항-CD9 항체(BD Biosciences, cat# 555370, 클론 M-L13) 50 μL를 4℃에서 밤새 배양하였다. 200 μL의 1% BSA로 3시간 동안 블로킹한 후, 50 μL의 샘플을 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 500ngmL⁻¹의 비오틴화된 항-CD9(Abcam, cat# ab28094) 50 μL 또는 항-EpCAM(R&D 시스템,

cat# DY960)을 1시간 동안 인큐베이션하였다. 마지막으로, 50 μ L의 HRP-스트렙타비딘(0.1% BSA에 1:500으로 희석)을 30분 동안 인큐베이션하였다. 50 μ L의 정지 용액을 첨가한 후, 흡광도를 450 nm에서 측정하였다(Infinite 200 PRO NanoQuant Microplate Readers from Tecan, Tecan).

[0160] 통계 분석

[0161] 통계 분석은 Prism 9.1.0(GraphPad)으로 수행되었다. 각각 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 및 **** $p < 0.0001$ 의 p-값과 함께, $\alpha = 0.05$ (신뢰 수준 95%)는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 도 22 및 도 23에 표시된 데이터는 양측 언페어드 모수 웰치 t 테스트(two-tailed unpaired parametric Welch's t-test)로 분석되었다. confidence interval을 계산하기 위해 Wilson/Brown 방법을 사용하여 ROC 곡선(도 24)을 구성하였다.

[0162] 도 2는 제조된 전극 칩을 관찰한 광학 사진으로, 센서 칩에 4개의 작업 전극(W)이 구비되는 경우이다. 도 2의 광학사진에서 오른쪽 상부에 삽입된 도면은 광학사진에서 사각으로 표시된 부분을 확대 관찰한 사진이다. 도 2의 예는 원형의 작업전극(W), 원형의 작업전극(W)과 일정거리 이격되어 작업전극(W) 둘레를 감싸는 링 형태의 기준전극(R), 기준전극(R)과 일정거리 이격되어 기준전극(R)의 둘레를 감싸는 상대전극(C)이 동심 구조를 이루는 형태이다. 이때, 작업전극(W) 각각은 외부와의 전기적 연결을 위한 패드와 연결되었으며, 각 기준전극(R)들은 서로 전기적으로 연결되어 단일한 패드와 연결되었고, 상대전극(C)들 또한 서로 전기적으로 연결되어 단일한 패드와 연결되었다.

[0163] 도 3은 스텝 시간대전류법을 이용한 금 전극의 나노구조화시, 다양한 용액 하 측정된 양극(anodic) 전류(만)을 도시한 도면이다. 상세하게, 'NaCl+CTA+HAuCl₄'는 제조된 시딩 용액을 이용한 예이며, 'NaCl+CTA'는 시딩 용액에서 염화금산을 제외한 용액을 이용한 예이고, 'NaCl+HAuCl₄'는 시딩 용액에서 계면활성제를 제외한 용액을 이용한 예이며, 'CTA+HAuCl₄'는 시딩 용액에서 염화나트륨을 제외한 용액을 이용한 예이고, '1-component'는 NaCl 단독, CTA 단독 또는 HAuCl₄ 단독을 함유하는 용액을 이용한 예이다.

[0164] 편평한 전극에서 금을 전기 산화하고 에칭하기 위해 염소를 함유하는 염화나트륨을 사용하였으며, 전기 환원 동안 금의 핵생성 및 성장을 도모하되, 우선적인 성장 방향을 통제하기 위해, 금 전구체와 계면활성제를 사용하였다.

[0165] 스텝 시간대전류법이 수행되며 금의 전기 산화와 전기 환원에 의한 양극 전류와 음극 전류가 발생하였다. 시딩 용액을 사용한 경우, 산화 및 환원에 의한 전류가 시간에 따라 증가하되, 1분 이내에 안정적인 전류에 도달함을 알 수 있다. 양극 전류는 사용 가능한 전기 활성 영역과 관련이 있으며, 시간에 따른 전류의 증가는 나노구조의 성장을 나타낸다. 금전구체와 계면활성제 및 염화물염 모두를 함유하는 시딩 용액에서 금의 전기 산화와 전기 환원이 반복되며 나노 구조가 활발히 발달함을 알 수 있으며, 이는 금전구체와 계면활성제 및 염화물염의 세 가지 구성 요소 중 하나 또는 두 개만 포함하는 용액에서는 관찰되지 않는 과정이었다.

[0166] 도 4는 나노구조화 전(왼쪽)/후(오른쪽)의 작동 전극을 관찰한 사진으로, 스케일 바의 크기는 250 μ m이다. 도 4를 통해 알 수 있듯이, 제조된 NSG 전극은 나노구조와 및 나노다공화에 의해 균질하게 어두운 착색을 나타내었다.

[0167] 도 5는 스텝 시간대전류법을 이용한 금 전극의 나노구조화시, 스텝 전압의 반복 횟수에 따른 금 전극 표면을 관찰한 주사전자현미경 관찰 사진(스케일 바 = 1 μ m)이다. 도 6은 스텝 시간대전류법을 이용한 금 전극의 나노구조화시, 스텝 전압의 반복 횟수에 따른 금 전극의 단면을 관찰한 주사전자현미경 관찰 사진(스케일 바 = 2 μ m)이다. 도 7은 20,000회(60sec)의 스텝 전압이 인가되어 제조된 NSG 전극 표면을 배율을 달리하며 관찰한 주사전자현미경 사진으로, 각 사진 상부에 표시된 x숫자는 해당 사진의 배율을 의미한다. 고배율 사진(x150,000)에서 저배율 사진(x1000) 순으로 스케일 바는 300nm, 500nm, 1 μ m, 5 μ m, 10 μ m 및 50 μ m이다.

[0168] 미세구조를 살펴보면, 나노구조화전 증착에 의해 형성된 편평한 막 형태의 금 전극은 금 그레인들로 이루어진 다결정체였다. 이러한 다결정체의 입계(grain boundary)는 우선적인 에칭 사이트로 작용하여 금 전극의 전기 산화에 의한 에칭시 큰 크레바스(crevasses)가 형성되며, 이러한 큰 크레바스는 금 전극의 전기 환원시 우선적인 핵생성 장소로 작용한다.

[0169] 이러한 전기 산화 및 전기 환원이 매우 빠르게 반복되며, 도 5 내지 6에 도시한 바와 같이 금 나노전극의 나노구조화 및 나노 다공화가 진행됨을 알 수 있다.

[0170] 또한, 도 5 내지 도 7을 통해, 스텝 시간대전류법이 완료되었을 때, 최종적으로 금 그레인들이 랜덤하게 응집되

되 전극의 두께 방향으로 줄기가 뺀어진 산호초 형태로 나노구조화되고 산호초 형태의 금 그레인 응집체들간의 빈 공간에 의해 나노다공화된 금 전극(NSG 전극)이 제조됨을 알 수 있다. 또한 도 7의 저배율-고배율 SEM 관찰을 통해 이러한 나노 구조화 및 나노 다공화가 전극 표면 전체에서 균질하게 발생함을 확인하였다.

[0171] NSG 전극 표면에 대한 주사전자현미경 관찰 사진을 통해, 산호초 형태의 응집을 이루는 금 그레인들(금 결정들)의 평균 크기가 약 20nm 수준임을 확인하였다. 또한, 금의 전기 산화 및 전기 환원은 전극의 표면 반응임에 따라, 기재와 접하는 전극의 바닥면을 포함한 하부 영역은 나노구조화 및 나노다공화 후에도 연속적인 막 형태를 유지함을 알 수 있다.

[0172] 도 8은 금 전극의 나노 구조화 전(왼쪽)/ 후(오른쪽) 원자력 현미경(AFM) 토포그래피 이미지이다(스케일 바 = 1 μ m). AFM을 이용하여 측정된 rms(root-mean-square) 거칠기는, 나노구조화 전 편평한 금 전극의 경우 1.2 ± 0.3 nm였으며, NSG 전극의 경우 340 ± 90 nm로, 나노구조화에 의해 표면 거칠기가 극도로 크게 증가함을 확인하였다. 극도로 증가된 표면 거칠기에 의해 NSG 전극은 소수성 특성을 나타내었다.

[0173] 도 9는 나노구조화 전 편평한 금 전극(Au), NSG 전극(NSG), 전극 기능화를 통해 L-시스테인으로 개질된 NSG 전극(NSG-Cys), 전극 기능화를 통해 L-시스테인 및 항체로 기능화된 NSG 전극(NSG-Cys-Ab)의 접촉각을 측정 도시한 도면이다. Au, NSG, NSG-Cys, NSG-Cys-Ab의 접촉각은 순차적으로 72° , 105° , 39° , 43° 였다. 편평한 금 박막 상태에서 72° 의 접촉각을 갖던 전극이, 증가된 표면 거칠기에 의해 105° 로 소수성이 증가하고, 다시 L-시스테인이나 항체로 기능화되며 친수화(39° , 43°)됨을 알 수 있다.

[0174] 도 10은 시딩 용액과 스텝 시간대전류법을 이용한 전극의 나노구조화 기작을 나타낸 모식도이며, 도 11은 나노구조화 기작을 살펴기 위해, 작업전극에 전압을 일정 속도로 주사하며 이에 따른 전류의 변화를 측정한 순환 전압-전류도(cyclic voltammograms)이다. 도 10에서, 바이레이어 형성 단계(①), 염소 흡착에 의한 에드레이어 형성 단계(②), 전극 에칭 단계(③) 및 금 환원 단계(④)를 모식도로 나타내었으며, 도 11에서 사이클 반복 횟수(1~20회)에 따른 전압-전류밀도 그래프에 각 단계를 같이 도시하였다.

[0175] 도 10에 도시한 바와 같이, 양이온성 계면활성제는 금 박막의 표면에 흡착되며, 전극 표면을 전기적으로 부동태화(passivation)하는 조밀하고 균질한 바이레이어(bilayer)를 형성한다(①). 이와 함께, 용액 내 양이온성 계면활성제는 염화금산과 배위하는 미셀을 형성할 수 있다. 이후 양 전위 인가시 전기화학적으로 유도된 흡착에 의해 염소(chloride) 에드레이어(adlayer)가 형성된다(②). 이때 염소는 전극 표면에서의 스텝 에지(step edges)이나 키크(kink), 공공(vacancies)등과 같이 우선적 흡착 장소에 흡착되어 에드레이어를 형성할 수 있다. 양이온성 계면활성제와 염소가 공-흡착된 전극이 산화를 위한 온셋 전위에 도달하는 경우, 전극은 염소에 의해 에칭(③)되고, 반응 $Au + 4Cl^- \rightarrow AuCl_4^- + 3e^-$ ($E^0=1.002V$)에 의해 에칭 산물로 염화금산이 생성된다. 우선적 염소 흡착 장소에 의해 염소 에드레이어가 형성됨에 따라 에칭 프로세스는 비등방적이며, 이러한 비등방적 에칭에 의해 나노구조로 성장하는 핵생성 장소들이 생성된다. 새로이 용해된 염화금산은 용액내 미셀형 양이온성 계면활성제과 빠르게 배위하여, 염화금산이 전극 표면으로부터 멀리 확산되는 것을 방지한다. 스캔율의 극성이 바뀌며 미셀형 양이온성 계면활성제-AuCl₄가 환원되고, 약 0.6V 전위에서 전극 표면에 증착된다(④). 전극 표면에 형성된 계면활성제 바이레이어에 의해 과전위(overpotential)가 요구되며, 에칭시 발생하는 반응의 역반응이 이루어진다. 양이온성 계면활성제-AuCl₄의 환원 또한, 계면활성제 층이 덜 치밀하고 표면 에너지가 보다 낮은 금 파셋(facet)에서 우선적으로 및 비등방적으로 발생하고, 결정면의 모서리들의 곡률이 증가한다. 이는 미셀에 대한 접근 용이성을 증가시키고, 금 종(species)의 환원 속도를 증가시키며, 보다 효율적인 성장을 촉진한다. 이 과정이 반복되며 점점 더 큰 표면이 형성됨에 따라, 음극 전류(cathodic current)는 각 사이클이 반복되며 크게 증가한다(도 10의 ④ 영역에서 1st cycle과 20th cycle 참고).

[0176] 도 12는 산성 매질 하 나노구조화 전 평면 전극(Au) 및 NSG 전극(NSG)의 순환 전압-전류도(cyclic voltammograms)를 도시한 도면이다. 전극의 전기화학적 산화 후, 전기 환원 동안 음극 피크를 적분함으로써, 전극의 표면적을 산출할 수 있다. 도 12의 음극 피크(약 0.87V에 피크 중심이 위치하는 음극 전류 피크)의 면적을 통해 산출된 NSG 전극의 거칠기 계수(roughness factor)는 200 이상이였다.

[0177] 도 13은 2.5mM의 등물 페로시아노칼륨과 페리시아노칼륨 용액 내 스캔 속도에 따른 평면 전극(Au), NSG 전극(NSG)의 순환 전압-전류도(cyclic voltammograms)를 도시한 도면이다. 이때, 도 13의 우측 도면은 평면 전극의 CV 결과를 확대 도시한 도면이다. 도 14는, 도 13의 순환 전압-전류도로부터, 스캔 속도의 제곱근 대비 산화 및 환원 피크 전류(정점 전류 밀도)를 도시한 랜들-세빅 플롯(Randles-Sevcik plot)이다(도에서 Au=평면 전극,

NSG=NSG 전극).

- [0178] 레독스 페어인 페로시아화칼륨과 페리시아화칼륨의 산화/환원은 두 전극 모두에서 동적 확산 제한(diffusion-limited kinetic)으로 가역적인 산화환원 반응을 나타내나, 평면 전극보다 NSG 전극에서 보다 증가된 전류밀도를 가졌다. 이는 전극 키네틱을 향상시키는 거칠기와 다공성을 모두 갖는 전극 표면의 형태로 인해 발생하며, 누적 기공 부피 및 크기에 따라 달라질 수 있다. 느린 스캔 속도와 더 긴 시간 스케일 실험에서, 전극 키네틱은 더 큰 확산층에 의해 지배되었다. 이를 통해 공정이 확산 제한적이며, 대부분의 전극이 평면 전극과 유사한 반무한(semi infinite) 평면 확산층을 나타냈다. 반면, 확산층이 더 작아지며 전극의 나노구조 및 나노포어 크기와 비슷해지는 빠른 스캔 속도에서, 향상된 전극 키네틱은 전극의 형상으로부터 기인한 것이다.
- [0179] 도 15는 스�텝 시간대전류법을 이용한 전극 나노구조화시 산화 전위를 1.2V, 1.25V, 1.3V로 달리하여 제조된 NSG 전극 및 평면 전극(도의 Au)의 네모파 스캔 전압-전류도(square-wave scan voltammogram)를 도시한 도면이다. 이때, *는 '금 결정면의 전기화학적 관찰'에서 상술한 바와 같이, 환원 과정을 거치지 않은 전극을 의미한다.
- [0180] 금 전극 표면에서의 산화물 애드레이어 형성은 결정 면의 선택성을 나타낸다. 즉, 전압전류법에서의 산화 피크는 각 결정 파셋(crystalline facet) 방향에 따라 서로 다른 에너지를 가지며, 알려진 바와 같이, Au{111} 파셋의 산화 에너지가 Au{110} 파셋의 산화 에너지보다 크고, Au{110} 파셋의 산화 에너지가 Au{100} 파셋의 산화 에너지보다 크다($Au\{100\} < Au\{110\} < Au\{111\}$).
- [0181] 1.2V의 산화 전위 조건에서 제조된 NSG 전극을 살펴보면, 레퍼런스로 제시된 평면 전극 대비 Au{100}, Au{111} 파셋 및 Au{110} 파셋 모두 크게 증가한 것을 알 수 있으며, 나아가, NSG 전극은 Au{100} 및 Au{111} 파셋 대비 Au{110} 파셋이 다량 존재함을 알 수 있다.
- [0182] 도 16은 NSG 전극(도의 NSG) 및 레퍼런스인 평면 전극(도의 Au)에 대한 스침 입사 X선 회절 결과(Grazing incidence X-ray diffraction spectrogram)를 도시한 도면이다. NSG 전극이 면심입방체(fcc) 구조의 금속성 금의 구조(JCPDS, 카드 번호 04-0784)를 가짐을 확인하였다. NSG 전극은 평면 전극에 비해 증가된 피크 강도를 나타냈다. 이는 NSG 전극의 두께 증가에 기인한 것으로 해석할 수 있다.
- [0183] NSG 전극에서, 결정질 도메인(crystalline domain)의 평균 크기는 21 ± 4 nm로, 주사전자현미경(SEM)으로 관찰된 그레인 크기와 비슷했다.
- [0184] X-선 회절 패턴에서, 평면 전극과 NSG 전극 모두 Au{110}의 결정 방향이 가장 풍부했으며, 이는 도 15를 통해 살핀 전기화학적 결정면 관찰 결과와 부합한다. 그러나, NSG 전극에서 평면 전극보다 상대적으로 Au{100} 및 Au{111}이 더 풍부했다. 또한, Au{111} 및 Au{100}의 풍부함은 상대적 Au{110} 피크의 풍부함보다는 작았는데, 이는 이 파셋의 금 원자간 거리가 양이온성 계면활성제의 양이온 헤드를 수용할 수 있을 만큼 충분히 큰 동공(cavity)을 제공하기 때문인 것으로 해석할 수 있다.
- [0185] 도 17은 NSG 전극(도의 NSG) 및 평면 전극(도의 Au)의 생물학적 오염(biofouling) 거동을 테스트한 결과로, BSA 1% 매질(도의 BSA) 또는 인간 혈장 매질(도의 Plasma)에서 시간에 따른 전극의 R_{ct} 를 도시한 도면이다. 서로 상이한 매질 내에서 전극과 확산성 레독스 분자간의 전하 이동에 대한 저항을 도시한 도 17을 살펴보면, 평면 전극의 경우 BSA의 흡착에 의해 R_{ct} 가 초기값 대비 4000% 이상 증가하는 반면, NSG 전극의 경우 노출 20 시간이 흐른 시점에서도 R_{ct} 가 거의 열화되지 않고 초기값을 유지하는 것을 알 수 있다.
- [0186] 혈장 매질에서도 동일한 경향이 관찰되었으며, NSG 전극은 평면 전극 보다 10배 낮은 R_{ct} 를 나타냈다. NSG 전극의 생물학적 오염 방지 기능은 전극 전체에 걸친 나노 기공에 의해 생물학적 오염 단백질의 확산이 제한됨에 따른 것으로, 생물학적 오염 단백질의 확산이 제한되며 생물학적 오염 단백질의 흡수와 전기 활성 부위의 차단이 방지된 것이다.
- [0187] 도 18은 평면 전극(도의 Au) 및 NSG 전극(도의 NSG)을 이용한 페로시아화물의 전기화학적 검출시, 피크 전류 밀도 대 페로시아화물 농도를 도시한 도면이다. 전압전류법을 이용한 페로시아화물의 검출은 표면쪽으로는 확산 대비 빠른 전자 이동으로 산화 환원 반응을 유도한다. 평면 전극에서 이 반응에 대한 확산 프로파일은 평면이다. 반면 NSG 전극의 경우 불규칙한 표면에서의 방사상 기여에 의해, 민감도(sensitivity)가 평면 전극의 $6 \mu A mm^{-2} mM^{-1}$ 에서 $14 \mu A mm^{-2} mM^{-1}$ 로 증가된다. 그러나 낮은 농도에서, 반응이 발생하기 전에 활성 종(active species)이 다공 구조 전체로 확산할 시간이 충분하지 않아, 검출 한계(LOD, limit of detection)는 0.3mM(평면 전극)에서 0.1mM(NSG 전극)로 약간 향상되었다.

- [0188] 혈장에서 일반적으로 발견되는 가용성 단백질 염증 마커인 IL6 검출을 위해 적절한 생체 수용체로 NSG 전극의 표면을 기능화하여 면역친화성 바이오센서를 제조하였다. 상세하게, '전극 기능화' 및 'NSG 전극을 사용한 전기화학적 효소 샌드위치 검출'에서 상술한 바에 따라, IL6 검출을 위한 항체-기능화된 NSG 전극 칩을 이용하였으며, 단백질 검출은 분석 말기에 전기 활성 침전물을 생성하여 IL6 농도에 비례하는 큰 전류 출력을 생성하는 ELISA로 수행되었다.
- [0189] 도 19는 전기활성 침전물의 전형적인 전압전류 산화 피크(voltammetric oxidation peaks)를 도시한 도면이다.
- [0190] 도 20은 NSG 전극 칩 또는 평면 전극 칩에서 PBS나 인간 혈장에 스파이크된 IL6 농도에 따른 산화 피크 전류 밀도를 도시한 도면이다. 도 20에서 NSG는 PBS에 IL6이 스파이크되고 NSG 전극 칩을 사용한 결과이며, Au는 PBS에 IL6이 스파이크되고 평면 전극 칩을 사용한 결과이고, NSG(plasma)는 인간혈장에 IL6이 스파이크되고 NSG 전극 칩을 사용한 결과이며, Au(plasma)는 인간혈장에 IL6이 스파이크되고 평면 전극 칩을 사용한 결과를 의미한다. 도 20에서 여러 바는 표준 편차를 의미하며, 도 20의 우측 도면은 평면 전극 칩 결과를 확대 도시한 것이다.
- [0191] 평면 전극 칩의 LOD는 31pgmL^{-1} 였으며, NSG 전극 칩의 LOD는 1pgmL^{-1} 로 NSG 전극이 평면 전극보다 17배 더 높은 감도를 가짐을 알 수 있다.
- [0192] 주목할 부분은 인간 혈장에서 동일한 측정을 수행되었을 때 NSG 전극이 구비된 칩이 갖는 견고성이다. 평면 전극 칩의 경우 인간 혈장 매질에서 완전히 부동태화되었고 도 20의 오른쪽 확대도와 같이 IL6의 검출이 실질적으로 불가능했다. 그러나, NSG 전극은 1에서 10pgmL^{-1} 로 LOD만이 약간 증가되었을 뿐, 인간 혈장 매질에서도 안정적이고 선형적으로 IL6가 검출됨을 확인할 수 있다.
- [0193] 혈장과 같은 생물학적 샘플과 접촉하는 전극 표면은 부동태화 다층을 형성하는 단백질을 매우 빠르게 흡착한다. 나아가, 단백질 흡착은 더 큰 표면적을 갖는 나노구조화된 표면에서 더욱 촉진된다. 이러한 이유로, 단지 나노구조화로 표면적을 증가시킨 전극에서 생물학적 샘플을 이용한 분석시 예상치 않은 낮은 감도가 나타난다. 그러나, NSG 전극과 같이 나노구조화와 함께 나노다공화되어 표면 아래로 다량의 나노 다공성을 갖는 경우, 이러한 오염 단백질의 센싱 영역으로의 확산 및 부동태화를 방지할 수 있다.
- [0194] NSG 전극의 생물학적 오염 방지 특성과 초고감도 감지능을 이용하여, 최소 침습적 암 진단을 위한 유망한 바이오마커 후보인 tEV(tumour-derived EV)를 희석되지 않은 혈장에서 검출하였다. 상세하게, 전립선 림프절 암종(LNCAp) 세포 배양 상청액 스파이크 인간 혈장을 샘플로 사용하고, EV 관련 바이오마커인 항-CD9로 NSG 전극을 기능화하여 표면에서 EV를 캡처한 다음 특정 검출 항체를 사용하여 EV에서 특정 바이오마커의 존재를 조사하였다.
- [0195] 도 21은 NSG 전극 칩 또는 평면 전극 칩을 사용하여 인간 혈장에 스파이크된 EV 입자 농도에 따른 산화 피크 전류 밀도를 도시한 도면이다. 여러 바는 표준 편차를 의미한다. EV 정량화를 위해 CD9 및 CD81을 검출하고, tEV 정량화를 위해 종양 관련 항원인 EpCAM을 검출했다. 도 21에서 NSG CD9/CD9은 NSG 전극을 사용하고 특정 검출 항체로 CD9을 사용한 경우를, NSG CD9/CD81은 NSG 전극을 사용하고 특정 검출 항체로 CD81을 사용한 경우를, NSG CD9/EpCAM은 NSG 전극을 사용하고 특정 검출 항체로 EpCAM을 사용한 경우를, Au CD9/CD9은 평면 전극을 사용하고 특정 검출 항체로 CD9을 사용한 경우를 의미한다.
- [0196] NSG 바이오센서는 $5\mu\text{L}$ 에 불과한 극소량의 혈장 샘플에서 EV를 검출할 때, 총 EV($\text{CD9}^+\text{EV}$) 관련 $60\text{ 소포}\mu\text{L}^{-1}$ 의 LOD를 나타냈으며, tEV(EpCAM^+EV) 관련 $250\text{ 소포}\mu\text{L}^{-1}$ 의 LOD를 나타냈다.
- [0197] 평면 전극의 경우 혈장 샘플을 분석하는 동안 전극은 전기적으로 부동태화되었으며, ELISA를 이용하는 경우 $50\mu\text{L}$ 의 샘플이 필요하하고, PBS 매질에서 총 EV의 경우 $700\text{ 소포}\mu\text{L}^{-1}$ 의 LOD를 가졌으며, tEV의 경우 $8000\text{ 소포}\mu\text{L}^{-1}$ 의 LOD를 가졌다.
- [0198] NSG 바이오센서를 이용하여 임상 샘플에서의 tEV 검출 여부를 테스트하기 위해, 54-82세의 전립선암(II, III 및 IV기) 환자를 포함하는 소규모 코호트($n = 10$)의 소변을 이용하여, 소변 샘플 내 총 EV($\text{CD9}^+\text{EV}$)와 tEV(EpCAM^+EV)를 검출하고 이를 도 22에 도시하였다. 도 22는 CD9-캡춰된 EV를 검출하기 위한 검출 항체 CD9^+ 또는 EpCAM^+ 를 검출한 것으로, 검출 에세이 별 전기화학적 전류 밀도 값을 도시한 것이다. 5개의 생물학적 샘플 및 샘플별 4개의 작동 전극 각각을 이용한 측정을 통해 20개의 측정 결과를 확보하였다($n=20$). 25th에서 75th

까지 박스가 확장되었으며, 중간선은 중앙값(median)을 나타내며 수염(whisker)은 최소값에서 최대값까지 확장되었다.

[0199] 도 22의 소변내 CD9⁺EV 검출 결과에서, 총 EV 레벨은 전립선암 환자와 건강한 사람 간 유의미한 차이가 없었다. 반면, EpCAM⁺EV 검출 결과에서, 전립선암 환자의 소변에서 tEV 레벨이 유의미하게 높았다($p < 0.0001$).

[0200] NSG 바이오센서를 이용하여, 66-82세의 전립선암(II, III, IV기) 환자를 포함하는 더 큰 코호트($n = 18$)의 혈장으로부터 tEV(EpCAM⁺EV)를 검출하고 이를 도 23에 도시하였다. 도 23은 CD9-캡춰된 EV를 검출하기 위한 검출 항체 EpCAM⁺를 검출한 것으로, 혈장 샘플 별 전기화학적 전류 밀도 값을 도시한 것이다. 9개의 생물학적 샘플 및 샘플별 4개의 작동 전극 각각을 이용한 측정을 통해 36개의 측정 결과를 확보하였다($n=36$). 25th에서 75th까지 박스가 확장되었으며, 중간선은 중앙값을 나타내며 수염은 최소값에서 최대값까지 확장되었다.

[0201] 혈장을 이용한 검출시에도, 건강한 사람보다 전립선암 환자에서 EpCAM⁺EV 수준이 유의미하고 크게 높았다($p < 0.0001$).

[0202] 도 24는 NSG 바이오센서의 건강한 사람과 암환자간의 분류 능력을 보이는 수신자 조작 특성 그래프이다. urine CD9/CD9은 임상 샘플이 소변이고 특정 검출 항체로 CD9을 이용한 경우를, urine CD9/EpCAM은 임상 샘플이 소변이고 특정 검출 항체로 EpCAM을 이용한 경우를, plasma CD9/EpCAM은 임상 샘플이 혈장이고 특정 검출 항체로 EpCAM을 이용한 경우를 의미한다. urine CD9/CD9의 수신자 조작 특성 그래프의 값(AUC)은 0.5450에 불과하였으나, urine CD9/EpCAM의 AUC는 0.9100, plasma CD9/EpCAM의 AUC는 0.9005로, 극히 우수한 검출 특이도와 민감도를 가짐을 확인할 수 있다. 나아가, 동일한 임상 샘플에서 CD9⁺EV 또는 EpCAM⁺EV의 ELISA 검출로는 건강한 사람과 암환자를 구별할 수 없었다.

[0203] 도 22 내지 24를 통해, NSG 바이오센서로 측정된 혈장 내 EpCAM⁺EV 레벨(전류밀도)이 소변 내 EpCAM⁺EV 레벨보다 10배 가까이 컸으나, 소변과 혈장에서의 AUC는 0.91과 0.90으로, 두 경우가 유사한 검출 특이도와 민감도를 가졌다.

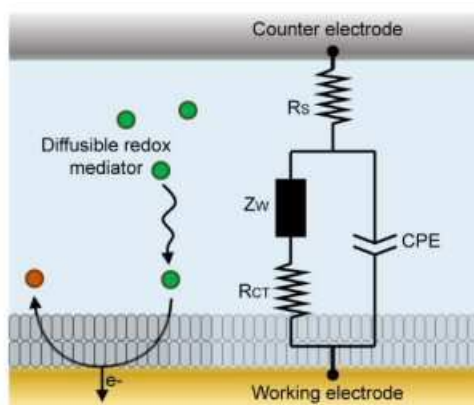
[0204] 특히 이러한 결과는 임상 샘플(소변, 혈장)의 희석이나 전처리 단계 없이 NSG 전극으로 직접 분석되었으며, 이는 복잡한 매트릭스에서 마커를 초고감도로 검출할 수 있는 바이오센싱 플랫폼으로의 유용성을 시사한다.

[0205] 이상과 같이 본 발명에서는 특정된 사항들과 한정된 실시예 및 도면에 의해 설명되었으나 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다.

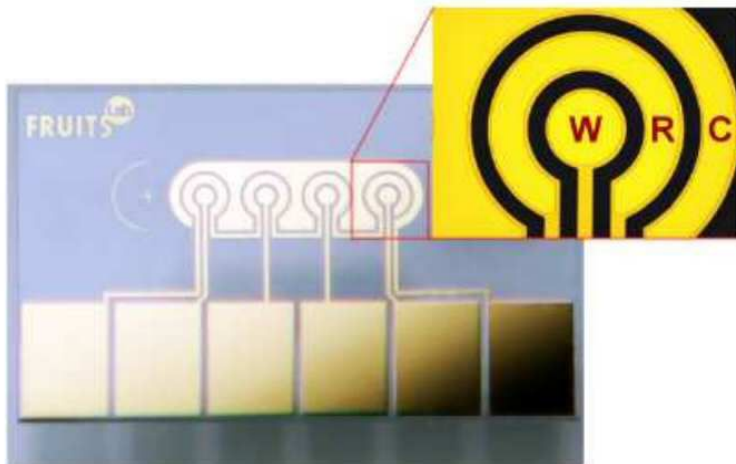
[0206] 따라서, 본 발명의 사상은 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등하거나 등가적 변형이 있는 모든 것들은 본 발명 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

도면

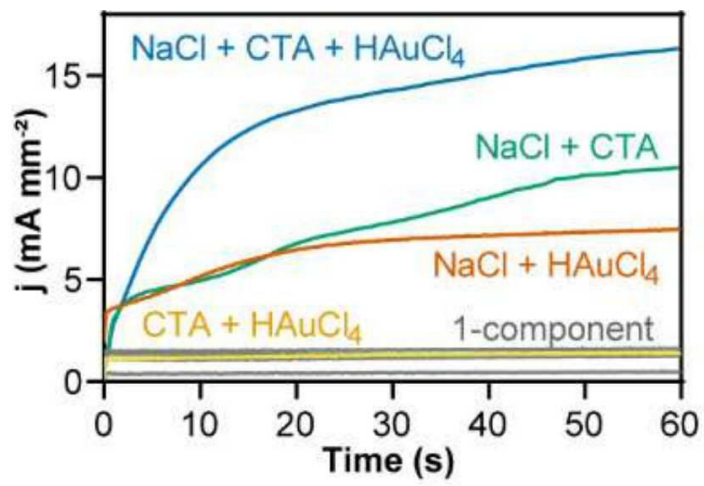
도면1



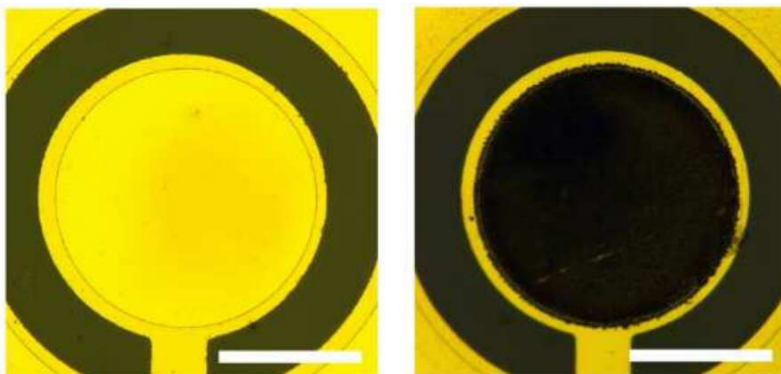
도면2



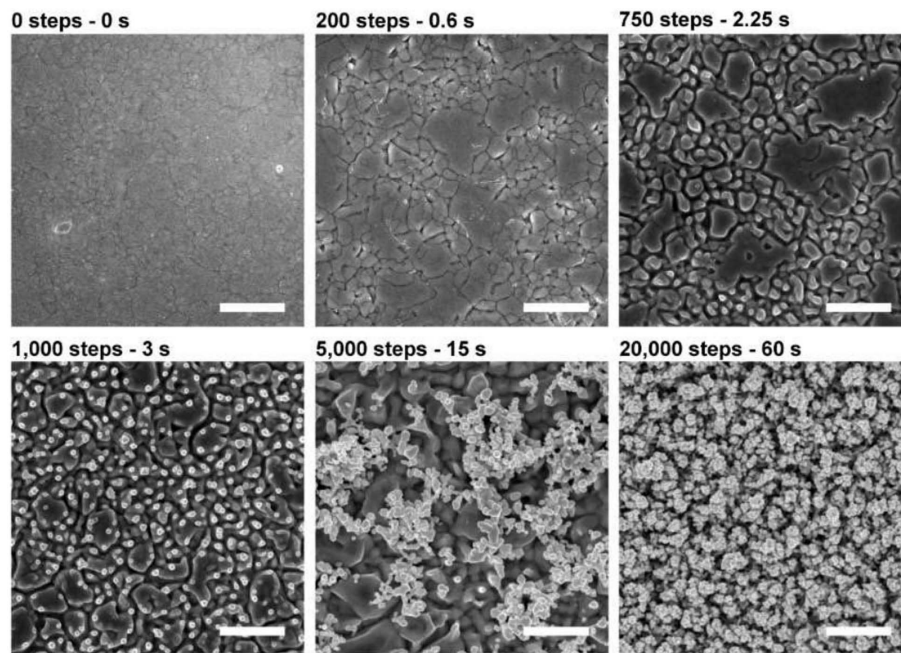
도면3



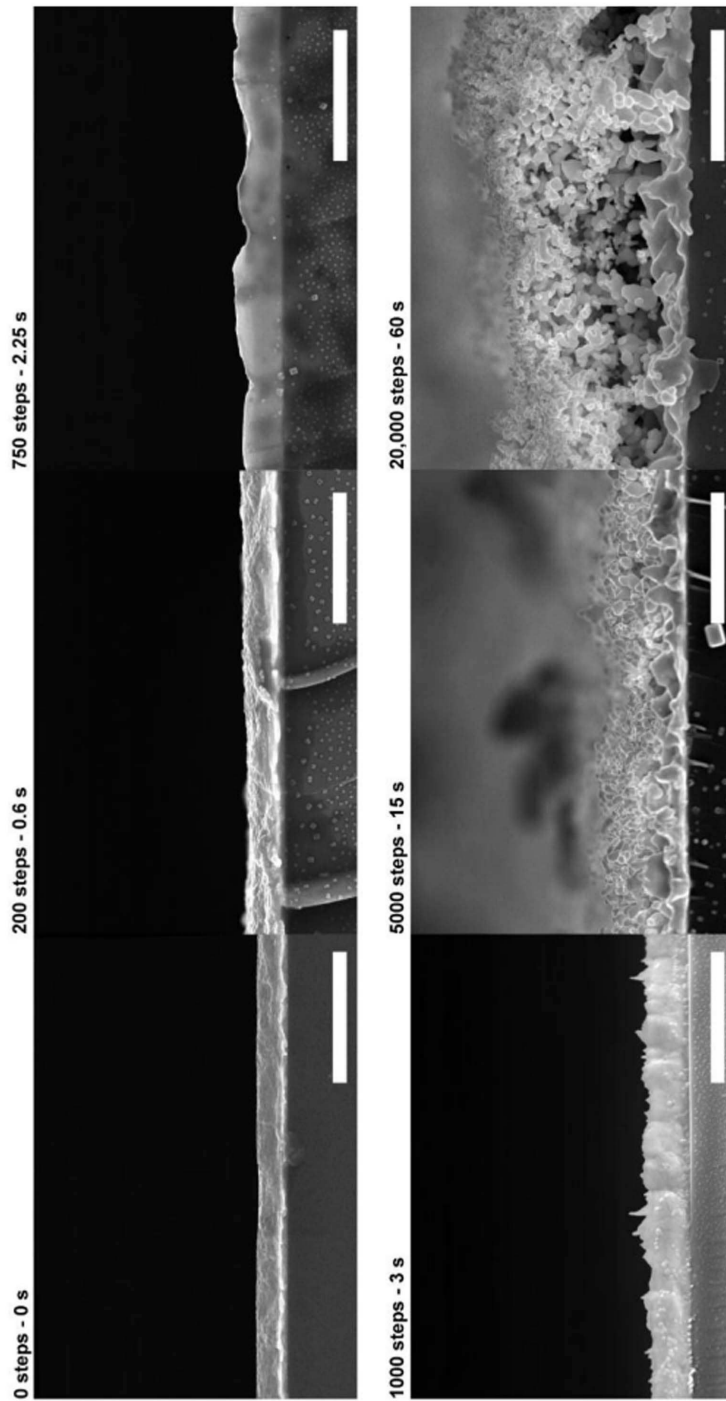
도면4



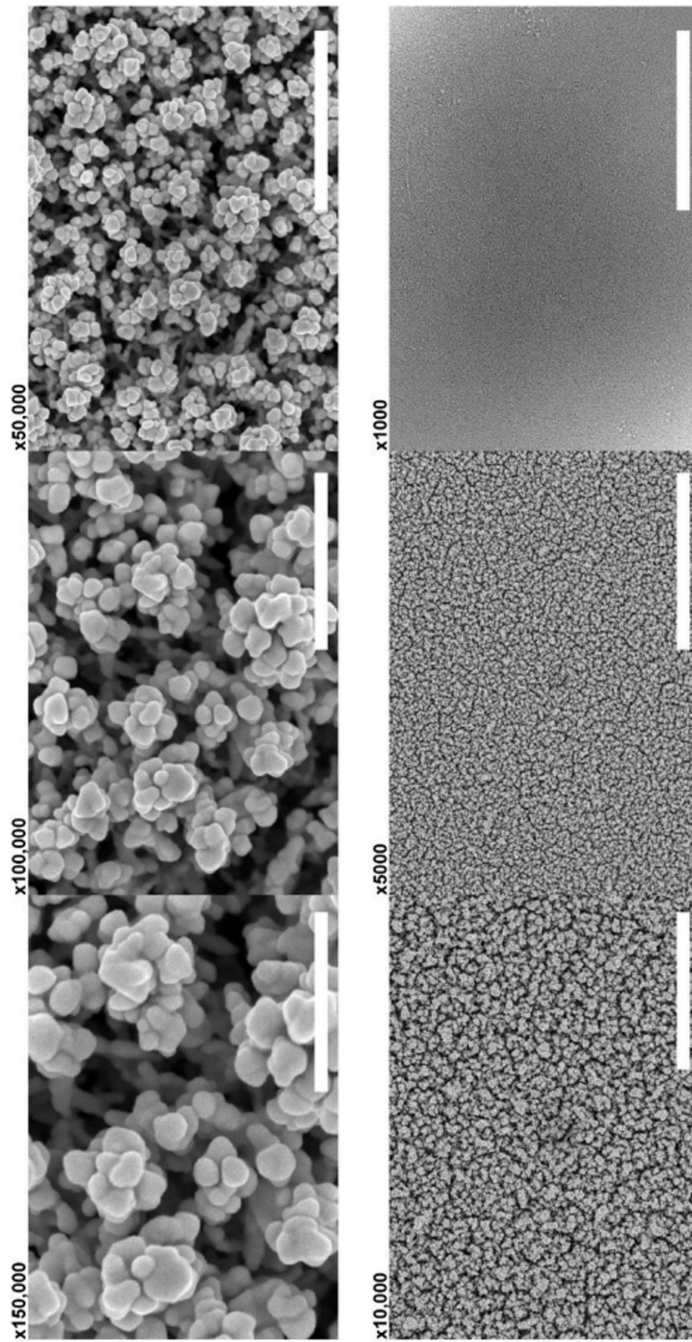
도면5



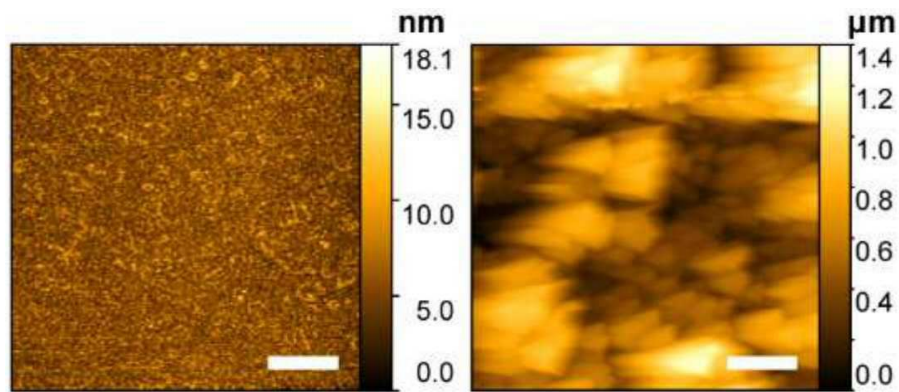
도면6



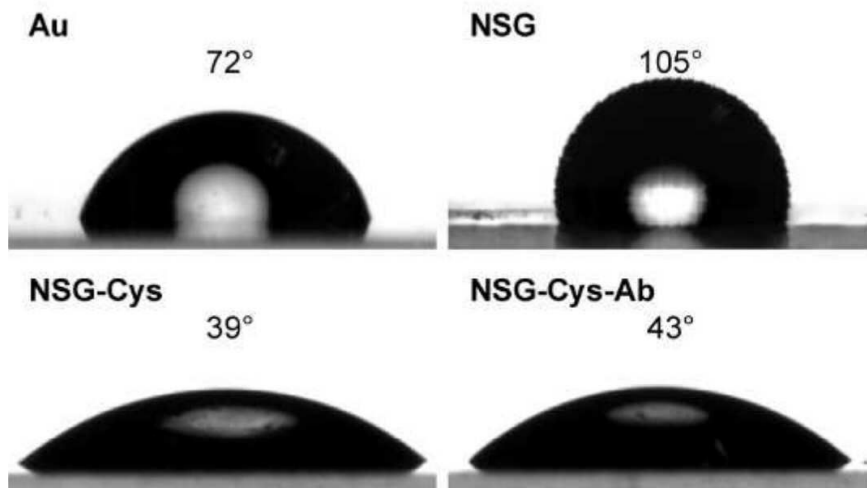
도면7



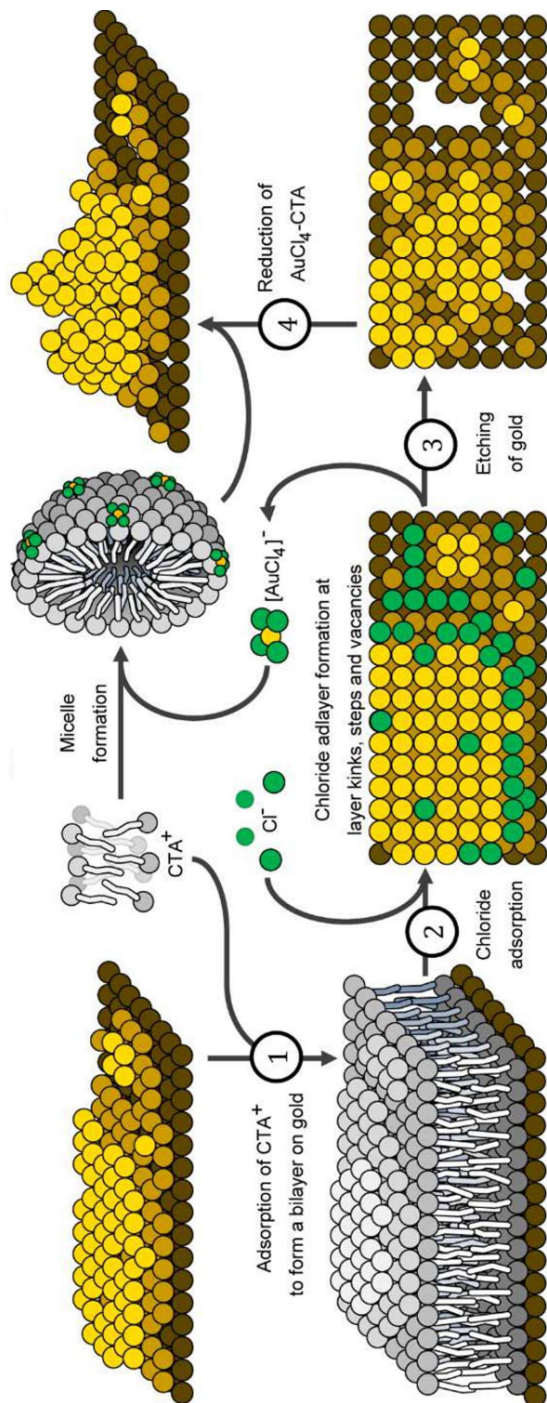
도면8



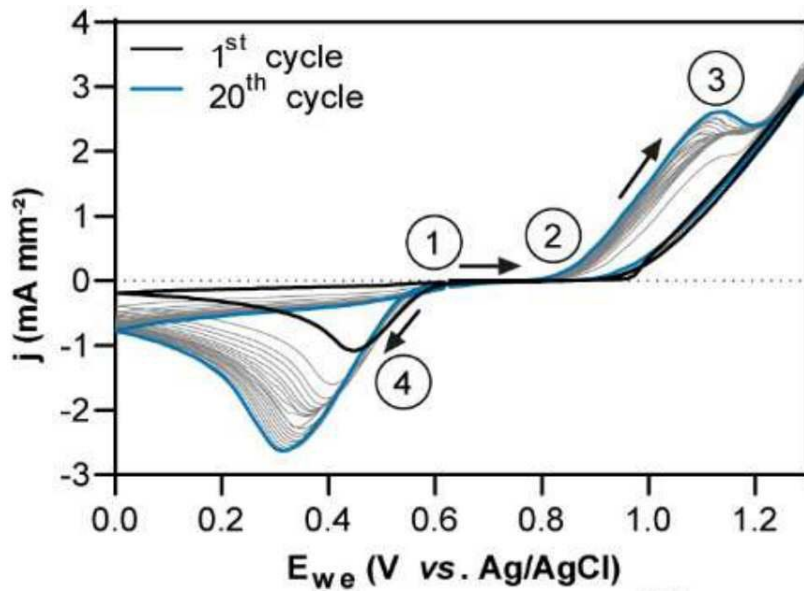
도면9



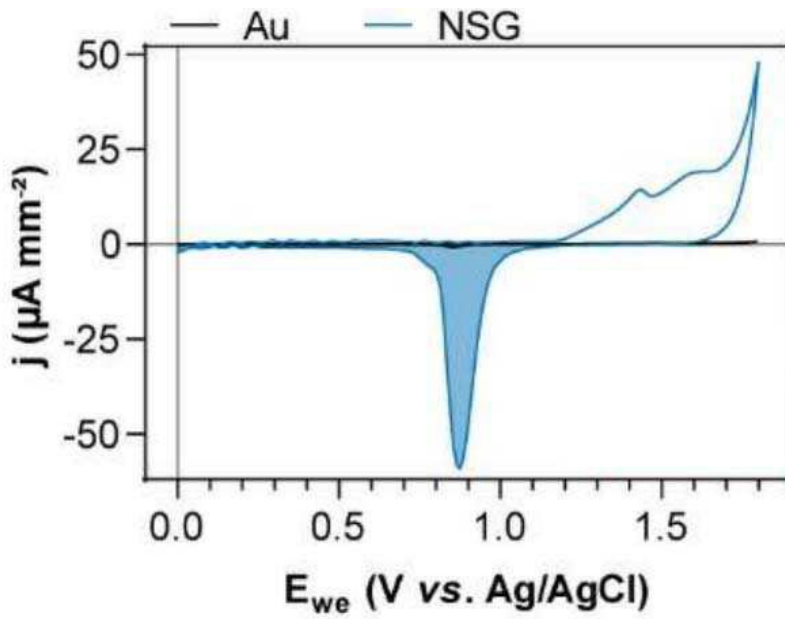
도면10



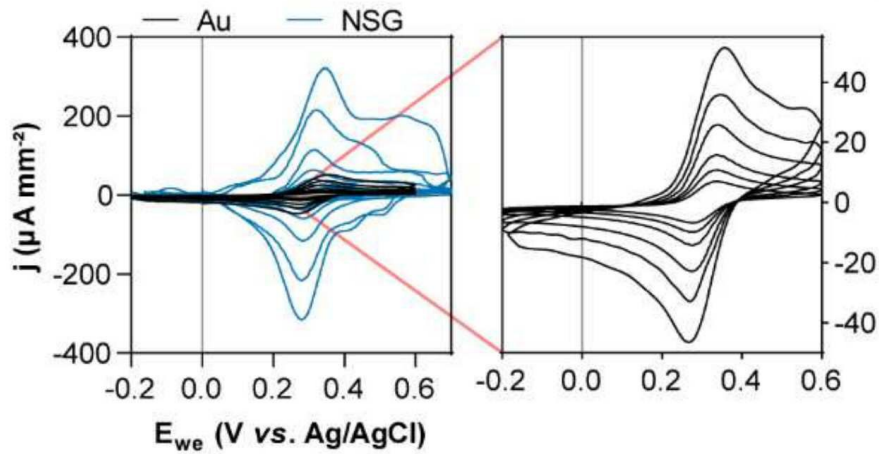
도면11



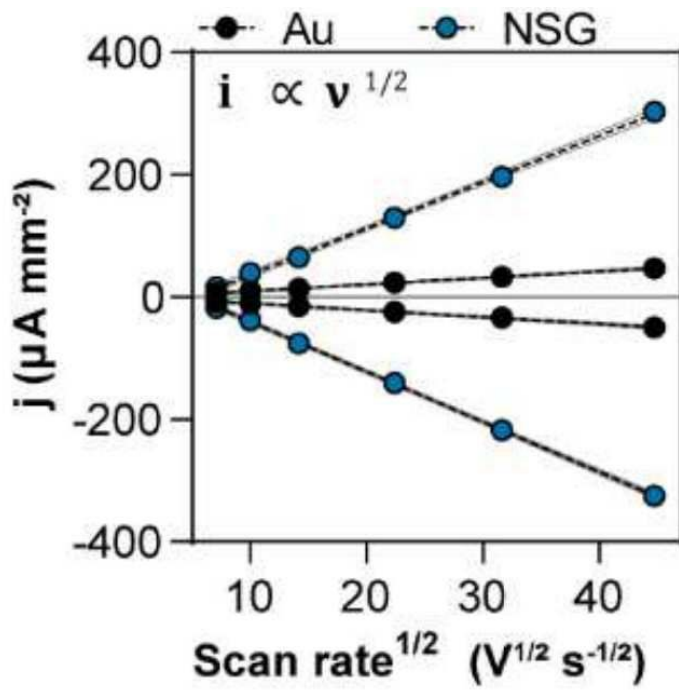
도면12



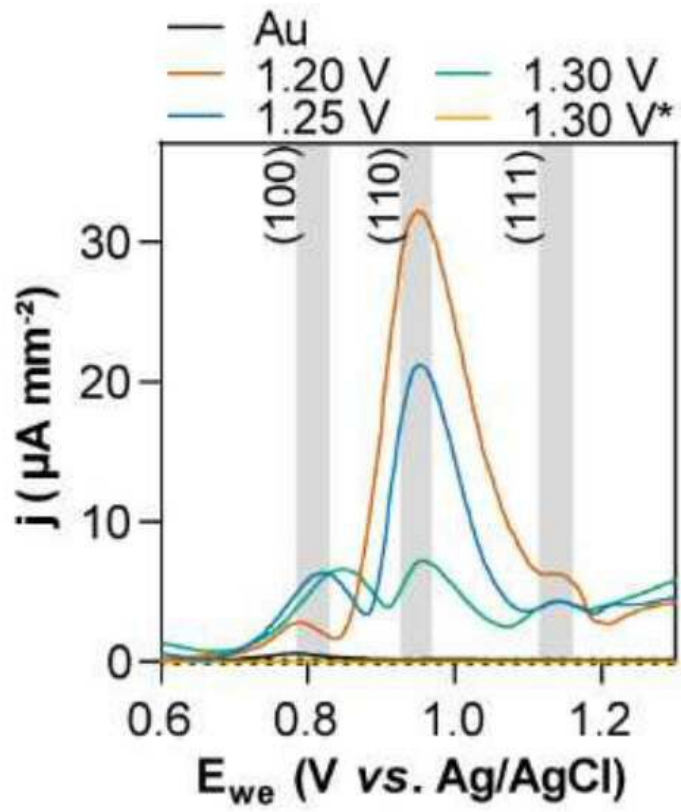
도면13



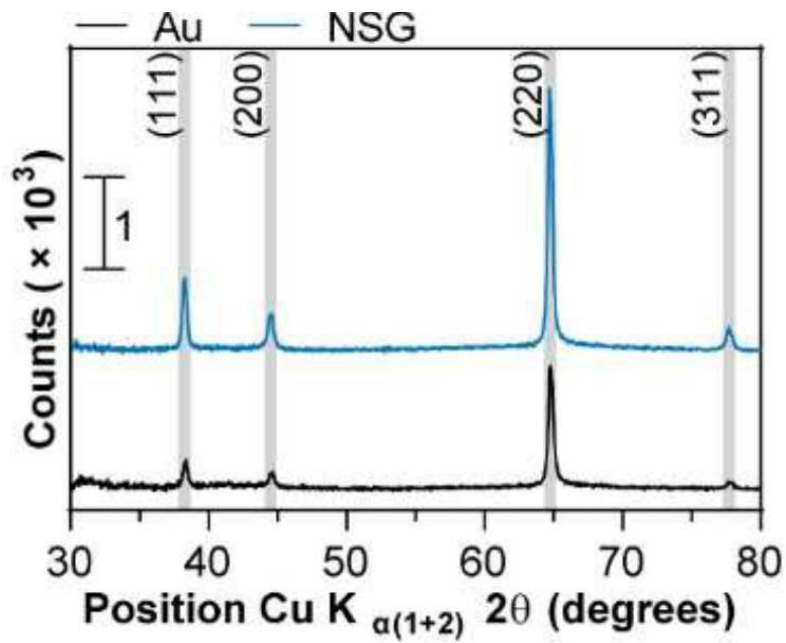
도면14



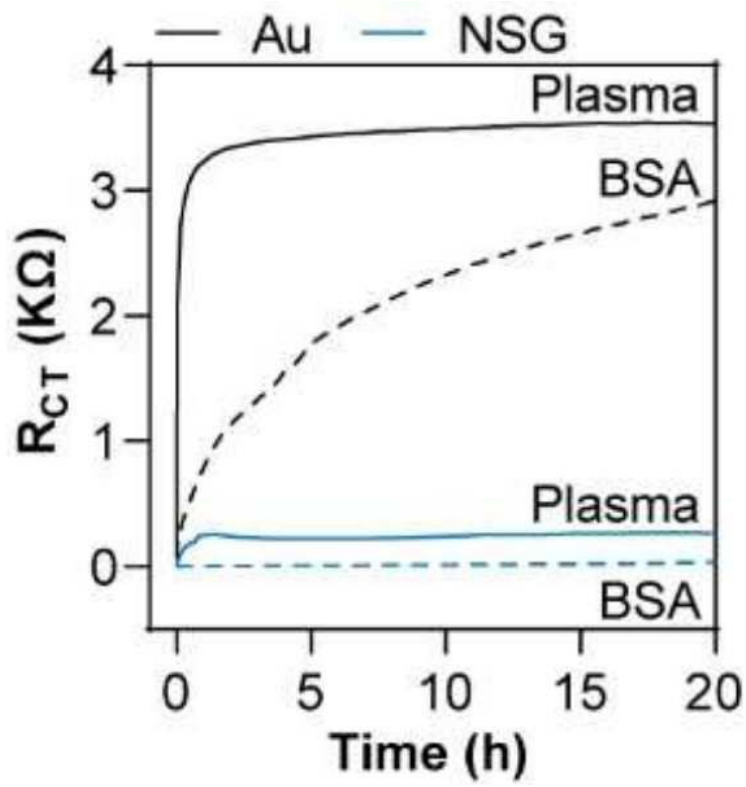
도면15



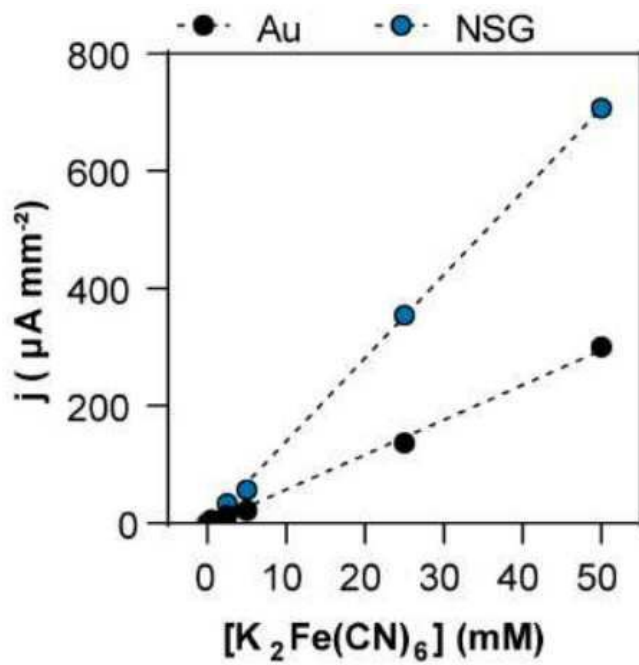
도면16



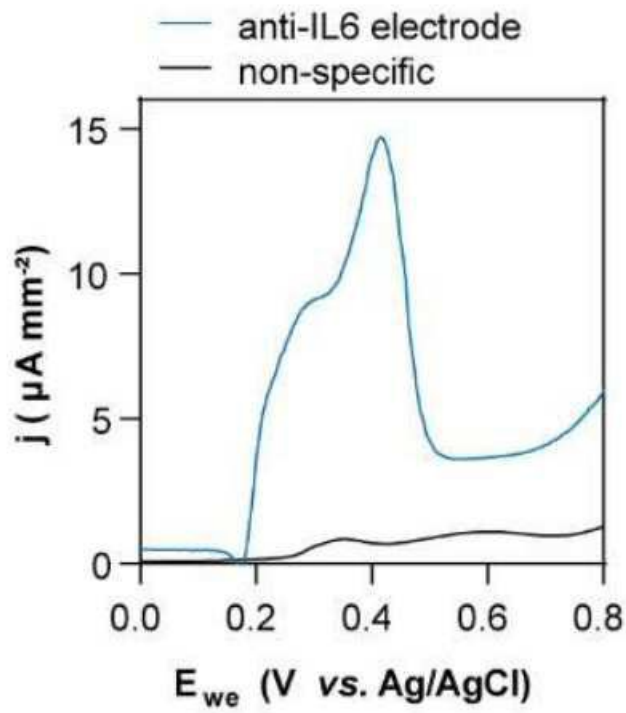
도면17



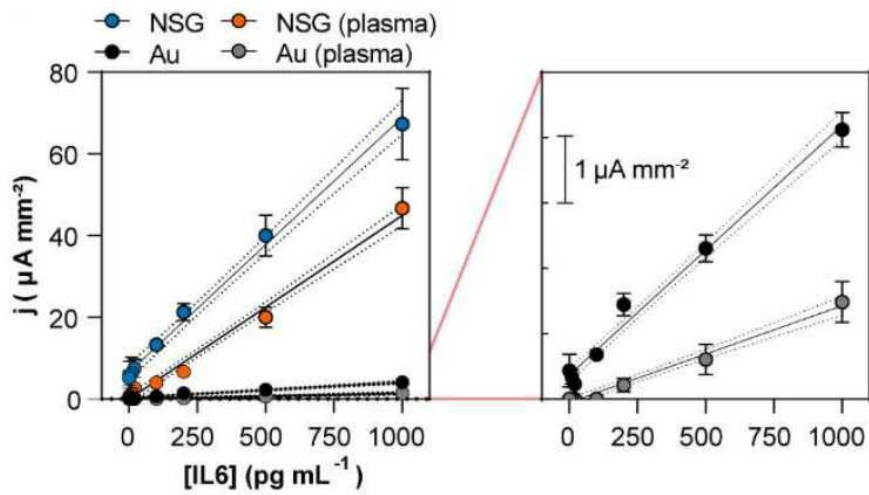
도면18



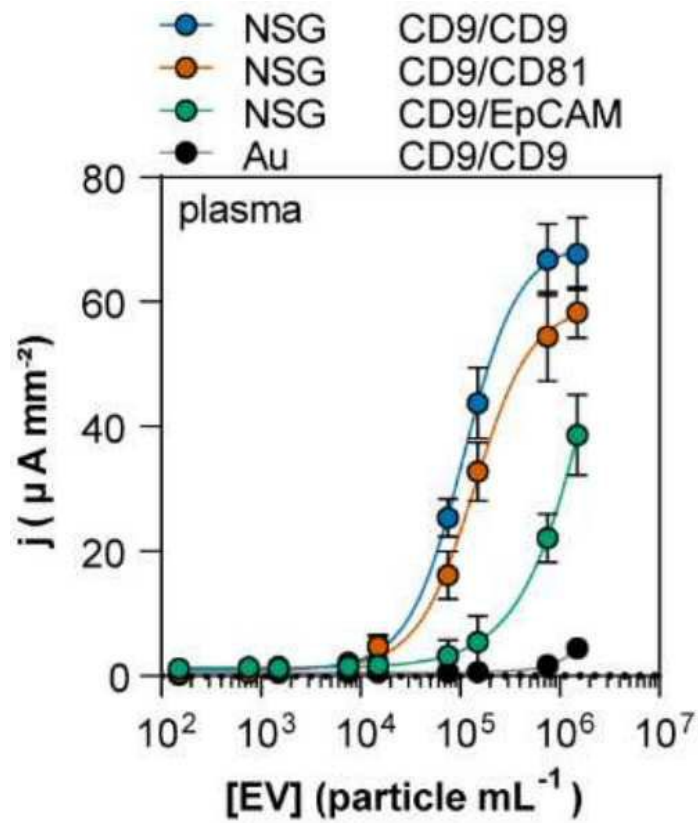
도면19



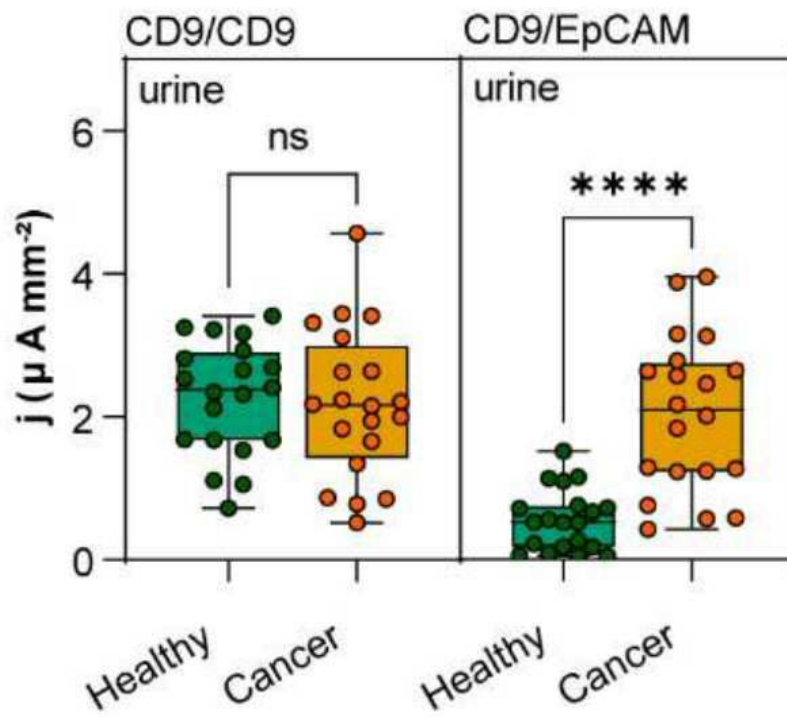
도면20



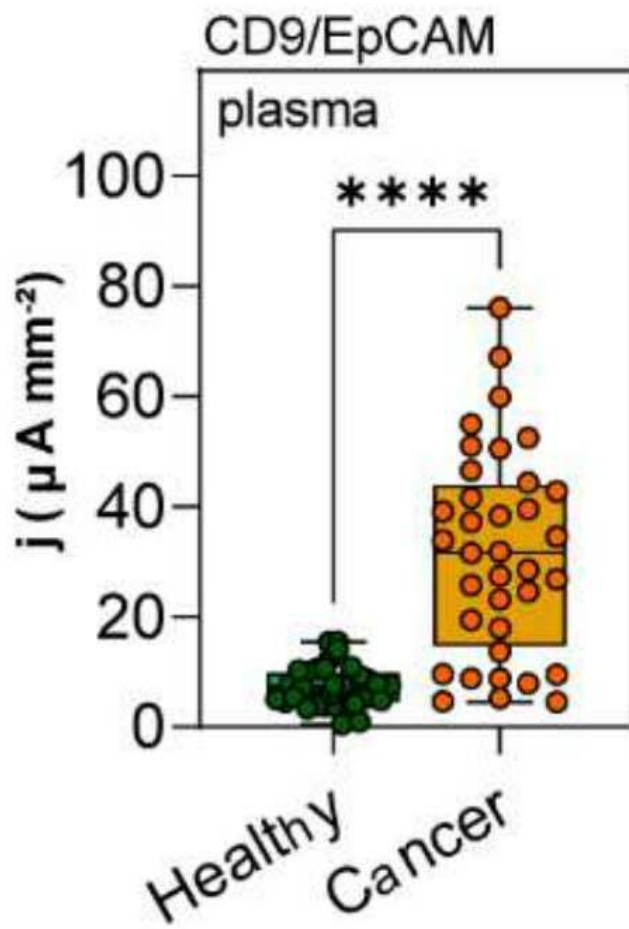
도면21



도면22



도면23



도면24

