



등록특허 10-2497598



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월09일
(11) 등록번호 10-2497598
(24) 등록일자 2023년02월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/553 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/553 (2013.01)
G01N 33/54373 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7006173
- (22) 출원일자(국제) 2015년08월13일
심사청구일자 2020년08월07일
- (85) 번역문제출일자 2017년03월06일
- (65) 공개번호 10-2017-0040331
- (43) 공개일자 2017년04월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/045041
- (87) 국제공개번호 WO 2016/025703
국제공개일자 2016년02월18일

(30) 우선권주장
62/037,071 2014년08월13일 미국(US)
62/082,468 2014년11월20일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

JP2005195440 A*

JP2010286331 A*

MURSHID, N. et al., Gold plating of silver nanoparticles for superior stability and preserved plasmonic and sensing prop, Chemical Communications, Vol.49, No.97, 2013.12.18, pp.11355-11357.*

JP2009150708 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

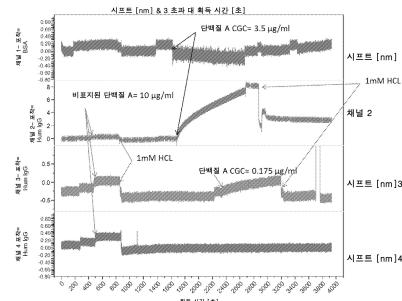
전체 청구항 수 : 총 48 항

심사관 : 정아영

(54) 발명의 명칭 **플라즈몬 특이적-결합 상대 검정에서 신호 증폭 방법****(57) 요약**

본 발명은 샘플에서 표적 분석물의 극미량을 검출하기 위한 상기 장치의 이용 방법 및 분석물 검출 장치에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 분석물 결합 상대에 콘주게이트된 복수의 복합 금속성 나노구조체 및 복수의 포집 분자가 고정화된 금속성 나노층을 함유하는 표면을 포함하는 분석물 검출 장치를 제공한다. 복합 나노구조체의 제조

(뒷면에 계속)

대 표 도

방법이 또한 기재된다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/54393 (2013.01)

(72) 발명자

아론 케니스 피.

미국 캘리포니아주 94110 샌프란시스코 페어 오크
스 스트리트 201

크렐 애서

미국 앨라배마주 35222 버밍엄 에섹스 로드 818

명세서

청구범위

청구항 1

국소 표면 플라즈몬 공명 (LSPR) 분석물 검출 장치로서,

표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 상대에 커플링된 복합 금속성 나노구조체를 포함하는 복수의 검출 콘주케이트로서, 상기 복합 금속 나노구조체가 은 코어 및 금 코팅물을 포함하는 것인, 복수의 검출 콘주케이트;

금속성 나노층을 함유하는 표면; 및

상기 금속성 나노층 상에 고정화되고 상기 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 복수의 포집 분자 를 포함하는 것인, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 2

국소 표면 플라즈몬 공명 (LSPR) 분석물 검출 장치로서,

표적 분석물에 커플링된 복합 금속성 나노구조체를 포함하는 복수의 검출 콘주케이트로서, 상기 복합 금속 나노구조체가 은 코어 및 금 코팅물을 포함하는 것인, 복수의 검출 콘주케이트;

금속성 나노층을 함유하는 표면; 및

상기 금속성 나노층 상에 고정화되고 상기 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 복수의 포집 분자 를 포함하는 것인, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 복합 금속성 나노구조체가 구형 나노입자이고 5 nm 내지 200 nm의 직경을 갖는, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 복합 금속성 나노구조체가 구형 나노입자이고 10 nm 내지 100 nm의 직경을 갖는, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 복합 금속성 나노구조체가 10 nm 내지 800 nm의 모서리 길이 및 1 nm 내지 100 nm의 두께를 갖는 나노플레이트인, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 복수의 검출 콘주케이트가 동결건조된 펠렛 또는 비드의 형태인, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 표면이 칩, 웨, 비드, 또는 벽, 커버, 및/또는 큐벳의 최하부인, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 금속성 나노층이 금속성 필름인, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 금속성 필름이 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 카드뮴, 아연 또는 이들의 복합체를 포함하는, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 금속성 필름이 금을 포함하는, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 금속성 나노층이 상기 표면상에서 고정화된 복수의 금속성 나노구조체를 포함하는, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 복수의 금속성 나노구조체가 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 카드뮴, 아연 또는 이들의 복합체를 포함하는, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 상기 복수의 금속성 나노구조체가 금 나노구조체인, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 14

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 복합 나노구조체가 구형 나노입자, 피라미드 나노입자, 육각형 나노입자, 나노쉘, 나노튜브, 나노막대, 나노점, 나노섬, 나노와이어, 또는 이들의 조합으로부터 선택된 기하학적 형태를 갖는, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 상기 결합 상대 및/또는 포집 분자가 항체, 항원, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 핵단백질, 앱타머, 리간드, 수용체, 또는 합텐인, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 16

제 1 항에 있어서, 상기 결합 상대가 표적 분석물의 제1 에피토프를 인식하는 항체이고 상기 포집 분자가 표적 분석물의 제2 에피토프를 인식하는 상이한 항체인, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 17

제 2 항에 있어서, 상기 포집 분자가 항체, 항원, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 핵단백질, 앱타머, 리간드, 수용체, 또는 합텐인, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 18

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 표적 분석물이 감염성 질환, 생리적 상태, 또는 병태와 관련된 마커 또는 항원인, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 19

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 표적 분석물이 갯과 사상충, 고양이 백혈병 바이러스, 갯과 파보바이러스, C-반응성 단백질, 람풀편모충, 에를리치아 항원 또는 항체, 보렐리아 항원 또는 항체, 아나플라즈마 항원 또는 항체, 암 항원, 심장 마커 항원, 갑상선 자극 호르몬, 티록신, 트로포닌, 또는 뇌성 나트륨이뇨펩티드인, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 20

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 표적 분석물의 피코그램 양을 검출하는 민감성을 갖는, LSPR 분석물 검출 장치.

청구항 21

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 복합 금속성 나노구조체가 515 nm 내지 670 nm의 피크 흡광도를 갖는, LSPR 분석물을 검출 장치.

청구항 22

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 복합 금속성 나노구조체가 520 nm 내지 560 nm의 피크 흡광도를 갖는, LSPR 분석물을 검출 장치.

청구항 23

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 복합 금속성 나노구조체가 금으로 이루어진 것을 제외하고는 상기 장치와 동일한 제2 장치에 비해 현저하게 더 큰 민감성을 제공하는, LSPR 분석물을 검출 장치.

청구항 24

샘플에서 표적 분석물을 검출하는 국소 표면 플라즈몬 공명 (LSPR) 방법으로서,

상기 샘플을 복수의 검출 콘주게이트와 혼합하는 단계로서, 상기 콘주게이트가 상기 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 상대에 커플링된 은 코어 및 금 코팅물을 포함하는 복합 금속성 나노구조체를 포함하여, 해당 표적 분석물이 상기 샘플에 존재하는 경우라면, 분석물-검출 콘주게이트 복합물을 형성하는, 단계;

상기 혼합물을 금속성 나노층을 함유하는 표면과 접촉시키는 단계로서, 복수의 포집 분자는 상기 금속성 나노층 상에서 고정화되어, 해당 표적 분석물이 상기 샘플에 존재하는 경우라면, 상기 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는, 단계;

자외선-가시광선-적외선 스펙트럼 내의 파장 범위의 광원에 상기 표면을 노출시키는 단계; 및

상기 표면으로부터 광학적 신호를 측정하는 단계로서, 상기 광학적 신호의 변화가 상기 샘플에서 상기 표적 분석물의 존재를 표시하는, 단계.

를 포함하는, 샘플에서 표적 분석물을 검출하는 LSPR 방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 상기 광학적 신호가 반사율, 흡광도 스펙트럼, 산란 스펙트럼, 또는 방출 스펙트럼인, LSPR 방법.

청구항 26

제 24 항에 있어서, 상기 광학적 신호의 변화가 스펙트럼 피크 파장 시프트를 포함하는, LSPR 방법.

청구항 27

제 24 항에 있어서, 상기 표적 분석물의 나노그램 양의 상기 존재가 검출되는, LSPR 방법.

청구항 28

제 24 항에 있어서, 상기 표적 분석물의 피코그램 양의 상기 존재가 검출되는, LSPR 방법.

청구항 29

제 24 항에 있어서, 상기 표적 분석물의 팬토그램 양의 상기 존재가 검출되는, LSPR 방법.

청구항 30

제 24 항에 있어서, 상기 표면이 원심 로터 속에 편입된 큐벳의 벽 및 최하부인, LSPR 방법.

청구항 31

제 24 항에 있어서, 상기 금속성 나노층이 금속성 필름인, LSPR 방법.

청구항 32

제 31 항에 있어서, 상기 금속성 필름이 금을 포함하는, LSPR 방법.

청구항 33

제 24 항에 있어서, 상기 금속성 나노층이 상기 표면상에서 고정화된 복수의 금속성 나노구조체를 포함하는, LSPR 방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 상기 복수의 금속성 나노구조체가 금 나노구조체인, LSPR 방법.

청구항 35

제 24 항에 있어서, 상기 복합 나노구조체가 구형 나노입자, 피라미드 나노입자, 육각형 나노입자, 나노튜브, 나노쉘, 나노막대, 나노섬, 나노점, 나노와이어, 또는 이들의 조합으로부터 선택된 기하학적 형태를 갖는, LSPR 방법.

청구항 36

제 24 항에 있어서, 상기 복합 금속성 나노구조체가 515 nm 내지 670 nm의 피크 흡광도를 갖는, LSPR 방법.

청구항 37

제 24 항에 있어서, 상기 복합 금속성 나노구조체가 520 nm 내지 560 nm의 피크 흡광도를 갖는, LSPR 방법.

청구항 38

국소 표면 플라즈몬 공명 (LSPR) 검정 복합물로서,

결합 상대에 커플링된 복합 금속성 나노구조체를 포함하는 검출 콘주케이트로서, 상기 복합 금속성 나노구조체가 은 코어 및 금 코팅물을 포함하는 것인, 검출 콘주케이트;

표적 분석물; 및

포집 문자가 고정화되는 금속성 나노층-코팅된 비드로서, 상기 검출 콘주케이트에서 결합 상대는 상기 표적 분석물 상에서 제1 에피토프에 결합되고, 상기 포집 문자는 상기 표적 분석물 상에서 제2 에피토프에 결합되어, 상기 검출 콘주케이트, 표적 분석물, 및 포집 문자를 포함하는 복합물을 형성하는 것인, 금속성 나노층-코팅된 비드

를 포함하는, LSPR 검정 복합물.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 상기 결합 상대가 항체이고 상기 포집 문자는 이와 다른 항체인, LSPR 검정 복합물.

청구항 40

제 38 항에 있어서, 상기 금속성 나노층이 금속성 필름인, LSPR 검정 복합물.

청구항 41

제 40 항에 있어서, 상기 금속성 필름이 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 카드뮴, 아연 또는 이들의 복합체를 포함하는, LSPR 검정 복합물.

청구항 42

제 41 항에 있어서, 상기 금속성 필름이 금을 포함하는, LSPR 검정 복합물.

청구항 43

제 38 항에 있어서, 상기 금속성 나노층이 상기 비드 상에서 고정화된 복수의 금속성 나노구조체를 포함하는, LSPR 검정 복합물.

청구항 44

제 43 항에 있어서, 상기 복수의 금속성 나노구조체가 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 카드뮴, 아연 또는 이들의 복합체를 포함하는, LSPR 검정 복합물.

청구항 45

제 44 항에 있어서, 상기 복수의 금속성 나노구조체가 금 나노구조체인, LSPR 검정 복합물.

청구항 46

제 38 항에 있어서, 상기 표적 분석물의 피코그램 양을 검출하는 민감성을 갖는, LSPR 검정 복합물.

청구항 47

제 38 항에 있어서, 상기 복합 금속성 나노구조체가 515 nm 내지 670 nm의 피크 흡광도를 갖는, LSPR 검정 복합물.

청구항 48

제 38 항에 있어서, 상기 복합 금속성 나노구조체가 520 nm 내지 560 nm의 피크 흡광도를 갖는, LSPR 검정 복합물.

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2014년 8월 13일 출원된 미국 가출원 번호 62/037,071 및 2014년 11월 20일 출원된 미국 가출원 번호 62/082,468의 우선권을 주장하고, 이를 각각은 본원에서 그 전체가 참고로 편입된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 샘플에서 표적 분석물 검출용 시스템 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 샘플에서 극미량의 표적 분석물을 검출할 수 있는 국소 플라즈몬 공명-기반된 분석물 검출 시스템을 제공한다.

배경 기술

- [0005] 현재 면역검정 및 생체 분자 결합 검정은 전형적으로 검정을 수행하기 위해 복잡한 장비 및 다중 단계가 필요하다. 상기 불균질 검정 수행에 관여된 민감성 및 복합성의 부족은 비표지된 특이적 결합 상대로부터 표지된 것을 분리하기 위해 구체적 필요성으로 발생시킨다.
- [0006] 귀금속 나노입자의 국소 표면 플라즈몬 공명 (LSPR) 특성에 기반된 검정을 개발하기 위한 시도가 있어 왔다 (Tokel et al., Chem Rev., Vol. 114: 5728-5752, 2014). LSPR은 입사광에 의해 유도된 나노미터-크기 구조체에서 전자의 집합 진동이다. 금속성 나노입자는 그 바로 가까이에서 굴절률 변화에 대해 강한 전자기 반응을 갖고 따라서 나노입자의 공명 주파수에서 시프트는 나노입자 표면에 대한 분자 결합의 지표로서 측정될 수 있다. 비록 금속성 나노입자, 특히 금 나노입자가 결합 이벤트를 검출하기 위해 진단적 검정에서 이용되고 있어도, 상기 검정은 일반적으로 낮은 민감성으로 시달리고 순차적인 결합 이벤트의 동력학을 정량적으로 모니터링하기 위해 사용될 수 없다.
- [0007] 따라서, 균질한 포멧을 사용하면서 증가된 민감성을 제공하는 개선된 검정 방법이 필요하다. 표준 실험실 기술, 예컨대 분광학을 이용하는 검정이 또한 요망될 것이다.
- [0008] 발명의 요약
- [0009] 본 발명은, 부분적으로, 복합 금속성 나노구조체가 금속성 나노층 표면에 분자의 결합에 의해 유도된 광학적 신호를 강화시킬 수 있다는 발견에 기반된다. 관측된 증폭은 특이적 생체분자 결합 이벤트의 민감성을 크게 증가시켜 이로써 생체 분자의 하위-피코그램 양이 검출될 수 있다. 따라서, 본 발명은 샘플에서 극미량의 분석물을 검출하기 위한 분석물 검출 장치 및 상기 장치의 이용 방법을 제공한다.
- [0010] 한 구현예에서, 분석물 검출 장치는 복수의 검출 콘주케이트, 금속성 나노층을 함유하는 표면, 및 복수의 포집 분자를 포함하고, 여기에서 포집 분자는 금속성 나노층 상에서 고정화되고 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있다. 분석물 검출 장치가 샌드위치 검정 포멧으로 구성된 구현예에서, 검출 콘주케이트는 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 상대에 커플링된 복합 금속성 나노구조체를 포함한다. 분석물 검출 장치가 직접 경쟁적 검정 포멧으로 구성된 구현예에서, 검출 콘주케이트는 표적 분석물에 커플링된 복합 금속성 나노구조체.
- [0011] 검출 콘주케이트에서 복합 금속성 나노구조체는 일반적으로 적어도 2 귀금속, 전이 금속, 알칼리 금속, 란탄계 열, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 카드뮴, 철, 니켈, 및 아연으로부터 선택된 적어도 2종의 금속을 포함한다. 특정 구현예에서, 각각의 복합 금속성 나노구조체는 제1 금속의 코어 및 제2 금속의 코팅물을 포함한다. 일부 구현예에서, 코어는 금 코팅물이 있는 은 또는 구리일 수 있다. 다른 구현예에서, 제1 금속의 코어는 코팅 이후 용해될 수 있어 이로써 제2 코팅물 금속으로 구성된 중공 구조체가 생긴다.
- [0012] 표면 상에서 증착된 금속성 나노층은 금속성 필름일 수 있거나 또는 표면 상에서 고정화된 복수의 금속성 나노구조체로 구성될 수 있다. 금속성 나노층은 또한 귀금속 또는 전이 금속으로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 금속성 나노층은 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 카드뮴, 아연 또는 이들의 복합체를 포함한다. 한 구현예에서, 금속성 나노층은 금을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 금속성 나노층은 은을 포함한다. 추가의 또 다른 구현예에서, 금속성 나노층은 금 나노층으로 중첩된 은 나노층을 포함한다.
- [0013] 본 발명은 또한 본원에서 기재된 분석물 검출 장치를 이용하여 샘플에서 표적 분석물의 검출 방법을 제공한다. 한 구현예에서, 상기 방법은 복수의 검출 콘주케이트와 샘플을 혼합하는 단계, 복수의 포집 분자가 고정화된 금속성 나노층을 갖는 표면과 혼합물을 접촉시키는 단계, 자외선-가시광선-적외선 스펙트럼 내의 괴장 범위에서 광원에 표면을 노출시키는 단계; 및 표면으로부터 광학적 신호를 측정하는 단계로서, 광학적 신호에서 변화가 샘플에서 표적 분석물의 존재를 표시하는, 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 샘플내 표적 분석물의 패토그램 내지 나노그램 양을 검출할 수 있다.
- [0014] 본 발명은 결합 상대에 커플링된 복합 금속성 나노구조체를 포함하는 검출 콘주케이트; 표적 분석물; 및 포집 분자가 고정화된 금속성 나노층-코팅된 비드를 포함하는 검정 복합물을 포함하고, 여기에서 검출 콘주케이트에서 결합 상대는 표적 분석물 상에서 제1 에피토프에 결합되고 그리고 포집 분자는 표적 분석물 상에서 제2 에피토프에 결합되어, 그렇게 함으로써 검출 콘주케이트, 표적 분석물, 및 포집 분자를 포함하는 복합물을 형성한다. 일부 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 금-코팅된 은 나노구조체 또는 금-코팅된 구리 나노구조체이고 그리고 비드 상에서 금속성 나노층 코팅물은 금을 포함한다.
- [0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에서 기재된 검출 장치 및 방법에서 사용을 위하여 복합 금속성 나노구조체의

제조 방법을 제공한다. 한 구현예에서, 상기 방법은 폴리머와 염화금산의 혼합물을 포함하는 제1 용액을 제조하는 단계, 은 또는 구리 나노구조체를 포함하는 제2 용액을 제조하는 단계, 및 일정 시기 동안 제2 용액으로 제1 용액을 배양하는 단계로서, 수득한 혼합물이 금-코팅된 은 나노구조체 또는 금-코팅된 구리 나노구조체를 포함하는, 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 환원제, 예컨대 아스코르브산이 반응 혼합물에 부가되어 생산된 나노구조체의 양을 증가시킨다. 한 구현예에서, 제1 용액내 폴리머는 폴리비닐피롤리돈이다. 또 다른 구현예에서, 제1 용액내 폴리머는 폴리비닐 알코올이다.

도면의 간단한 설명

[0016]

도 1. 소 혈청 알부민 (BSA)-커플링된 금 나노층 센서 (채널 1) 및 인간 IgG-커플링된 금 나노층 센서 (채널 2-4)에 대하여 피크 파장내 시프트 대 획득 시간의 플롯. 화살표는 비표지된 단백질 A, 1 mM HCl, 또는 콜로이드 성 금 (CGC)으로 표지된 단백질 A의 주입 순차 및 농도를 표시한다.

도 2. 항-CRP C7 항체-커플링된 금 나노층 센서에 대하여 피크 파장내 시프트 대 획득 시간의 플롯. 화살표는 상이한 채널에서 CRP의 0 내지 100 ng/ml 농도 (CRP 부하), 1 μ g/ml 비표지된 항-CRP C6 항체, 또는 콜로이드 성 금으로 표지된 3 μ g/ml 항-CRP C6 항체 (C6-CGC)의 주입 순차를 표시한다. 센서 표면이 비표지된 항-CRP C6 항체로 점거되는 경우 추가 C6-CGC 결합은 관측되지 않았다.

도 3. 항-CRP C7 항체-커플링된 금 나노층 센서에 대하여 피크 파장내 시프트 대 획득 시간의 플롯. 화살표는 상이한 채널에서 CRP의 0 내지 100 ng/ml 농도 (CRP 부하), 콜로이드성 금으로 표지된 1 μ g/ml 항-CRP C6 항체 (C6-CGC), 3 μ g/ml C6-CGC, 또는 1 mM HCl (산)의 주입 순차를 표시한다.

도 4A. 도 3의 다양한 C6-CGC 농도에서 10 ng/ml CRP로 부하된 항-CRP C7 항체-커플링된 금 나노층 센서의 반사율 스펙트럼.

도 4B. 콜로이드성 금으로 표지된 3 μ g/ml 항-CRP C6 항체 (C6-CGC)의 도입 이후 CRP의 3개 농도 중 하나로 배양된 항-CRP C7 항체-커플링된 금 나노층 센서에 대하여 피크 파장내 시프트 대 획득 시간의 플롯. 오른쪽의 표는 C6-CGC의 도입 이후 피크 분석 700 초를 묘사한다.

도 5. 항-CRP C7 항체-커플링된 금 나노층 센서에 대하여 피크 파장내 시프트 대 획득 시간의 플롯. 화살표는 상이한 채널에서 CRP의 0 내지 100 ng/ml 농도 (최소화된 배양 시간으로 CRP 부하), 콜로이드성 금으로 표지된 3 μ g/ml 항-CRP C6 항체 (C6-CGC), 또는 1 mM HCl (산)의 주입 순차를 표시한다.

도 6. 콜로이드성 금으로 표지된 3 μ g/ml 항-CRP C6 항체 (C6-CGC)의 즉각적인 도입 이후 도 5에서 미량에 대하여 피크 파장내 시프트 대 획득 시간의 플롯. 오른쪽의 표는 CRP 배양으로 수득된 피크 시프트 (도 4B에서 보여준 값)에 비교시 C6-CGC의 도입 이후 피크 분석 700 초를 묘사한다.

도 7. 금-코팅된 은 나노구조체에 콘주게이트된 C6 항-CRP 항체 및 CRP의 3 농도 중 하나로 배양된 항-CRP C7 항체-커플링된 금 나노층 센서에 대하여 피크 파장내 시프트 대 획득 시간의 플롯. 대조군은 C7 항체 대신 고정화된 소 혈청 알부민 (BSA)을 갖는 금 나노층 센서이었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

본 발명은, 부분적으로, LSPR-기반 검정에서 유의미한 증폭이 복합 금속성 나노구조체-표지된 결합 상대로 달성될 수 있다는 발견에 기반된다. 따라서, 본 발명은 LSPR-표면, 예를 들면, 금속성 나노층을 함유하는 표면, 금속성 나노층에 고정화된 복수의 포집 분자, 및 생체분자에 커플링된 복합 금속성 나노구조체를 포함하는 복수의 검출 콘주게이트를 포함하는 분석물 검출 장치를 제공한다.

[0018]

분석물 검출 장치는 샌드위치 검정 포맷 또는 직접 경쟁적 검정 포맷으로 구성될 수 있다. 예를 들어, 한 구현예에서, 샌드위치 검정 포맷에서 분석물 검출 장치는 하기를 포함한다: (i) 복수의 검출 콘주게이트 (여기에서 콘주게이트는 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 상대에 커플링된 복합 금속성 나노구조체를 포함한다), (ii) 금속성 나노층을 함유하는 표면, 및 (iii) 복수의 포집 분자 (여기에서 포집 분자는 금속성 나노층 상에서 고정화되고 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있다). 또 다른 구현예에서, 직접 경쟁적 검정 포맷에서 분석물 검출 장치는 하기를 포함한다: (i) 복수의 검출 콘주게이트 (여기에서 콘주게이트는 표적 분석물에 커플링된 복합 금속성 나노구조체를 포함한다), (ii) 금속성 나노층을 함유하는 표면, 및 (iii) 복수의 포집 분자 (여기에서 포집 분자는 금속성 나노층 상에서 고정화되고 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있다).

[0019]

본 발명의 분석물 검출 장치는 금속성 나노층을 함유하는 표면을 포함한다. 표면은 임의의 적합한 크기 및

형태, 예컨대 칩, 웰, 큐벳, 또는 비드일 수 있다. 일부 구현예에서, 표면은 직사각형 칩이다. 다른 구현예에서, 표면은 디스크이다. 특정 구현예에서, 표면은 큐벳 (예를 들면, 원통형 또는 직사각형 큐벳)의 최하부, 커버, 및/또는 내부 벽이다. 추가의 다른 구현예에서, 표면은 비-금속성 입자의 배열이다. 표면은, 비제한적으로, 유리, 석영, 규소, 실리카, 폴리스티렌, 그래파이트, 페브릭 (예를 들면 폴리에틸렌 페브릭), 메쉬, 또는 막 (예를 들면 라텍스, 폴리비닐, 나일론, 또는 폴리에스테르 막)을 포함하여, 다양한 물질로부터 제조될 수 있다.

[0020] 금속성 나노층은 바람직하게는 표면상에서 증착된다. 금속성 나노층은, 일부 구현예에서, 특정 표면의 전체 표면적을 커버할 수 있다. 다른 구현예에서, 금속성 나노층은 단지 표면의 부분상에서 증착될 수 있다. 예를 들어, 표면은 복수의 패인곳 또는 웨들을 함유할 수 있고 금속성 나노층은 패인곳 또는 웨들 내에 증착된다. 다른 구현예에서, 금속성 나노층은 표면을 거친 복수의 이격된 증착물로서 표면에 적용될 수 있다. 금속성 나노층의 광학적 특성은 나노층의 두께 및/또는 나노구조체의 성질을 다양화함으로써 조정될 수 있다. 한 구현예에서, 나노층은 금속성 나노섬으로 구성된다. 또 다른 구현예에서, 나노층은 나노막대로 구성된다. 본 발명의 장치 및 방법에서 사용을 위하여 금속성 나노층의 적합한 두께는 약 0.5 nm 내지 약 100 nm, 약 5 nm 내지 약 30 nm, 또는 약 3 nm 내지 약 10 nm를 포함한다. 본 발명의 장치 및 방법에서 사용될 수 있는 금속성 나노층 코팅물을 갖는 예시적 표면은 미국 특허 공개 번호 2006/0240573에 기재된 표면을 포함하고, 이로써 그 전체가 참조로 편입된다.

[0021] 특정 구현예에서, 금속성 나노층은 금속성 필름이다. 기재 표면 상에서 금속성 필름의 증착 방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지되고, 비제한적으로, 원자 층 증착, 필스 레이저 증착, 드롭 캐스팅, 기상 증착, 및 흡착을 포함한다. 참고, 예를 들면, Atanasov et al., Journal of Physics: Conference Series 514 (2014); Walters and Parkin, Journal of Materials Chemistry, 19: 574-590, 2009; 및 Gupta et al., J. Appl. Phys. 92, 5264-5271, 2002, 각각의 이들은 본원에서 그 전체가 참조로 편입된다. 금속성 필름은 다른 성분을 포함할 수 있고, 예를 들면 금속성 필름은 폴리머 필름, 랑류어-블로젯 필름 또는 옥사이드 필름일 수 있다. 일부 구현예에서, 금속성 필름은 2 층을 포함하고, 여기에서 각 층은 상이한 금속을 포함한다. 예로써, 금속성 필름은 금 층으로 중첩된 은 층을 포함할 수 있다.

[0022] 다른 구현예에서, 금속성 나노층은 표면에 고정화된 복수의 금속성 나노구조체를 포함한다. 작용성 화학기, 예컨대 시아나이드, 아민, 티올, 카복실, 알데하이드 또는 말레이미드를 부가하기 위해 시약으로 표면 물질을 처리함으로써, 및 금속성 나노구조체를 처리된 표면과 반응시킴으로써 금속성 나노구조체는 표면에 고정화될 수 있다. 금속성 나노구조체는 높은 친화도를 갖는 상기 작용성 화학기에 결합하는 것으로 공지된다. 일부 구현예에서, 금속성 나노층을 포함하는 금속성 나노구조체는 구형 나노입자이다. 상기 나노입자는 약 300 nm 미만, 약 200 nm 미만, 또는 약 150 nm 미만인 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 구형 나노입자는 직경 약 5 nm 내지 약 200 nm, 약 10 nm 내지 약 100 nm, 또는 약 20 nm 내지 약 60 nm를 갖는다. 특정 구현예에서, 금속성 나노층을 창출하기 위해 사용된 금속성 나노구조체의 크기는 검출 콘주게이트에서 사용된 복합 나노구조체의 크기와 유사하다. 상기 구현예에서, 나노구조체의 2 세트의 크기 조화는 반사율, 방출 또는 산란 스펙트럼에서 최적의 광장 시프트를 제공할 수 있다.

[0023] 금속성 나노층 (금속성 필름 또는 복수의 금속성 나노구조체)는 귀금속 또는 이의 복합체로 구성될 수 있다. 다른 구현예에서, 금속성 나노층 (금속성 필름 또는 복수의 금속성 나노구조체)는 전이 금속 또는 이의 복합체로 구성될 수 있다. 특정 구현예에서, 금속성 나노층은 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 루테늄, 로듐, 오스뮴, 이리듐, 티타늄, 크로뮴, 카드뮴, 아연, 철, 코발트, 니켈, 및 이들의 복합체로부터 선택된 금속을 포함한다. 한 특정 구현예에서, 금속성 나노층 (예를 들면 금속성 필름 또는 복수의 금속성 나노구조체)는 금을 포함한다. 또 다른 특정 구현예에서, 금속성 나노층 (예를 들면 금속성 필름 또는 복수의 금속성 나노구조체)는 은을 포함한다. 특정 구현예에서, 금속성 나노층 (예를 들면 금속성 필름 또는 복수의 금속성 나노구조체)는 금 및 은 또는 금 및 구리의 복합체를 포함한다. 알칼리 금속 (예를 들면, 리튬, 나트륨, 칼륨, 루비듐, 세슘, 및 프란슘) 또는 란탄계열 (예를 들면, 란탄, 세륨, 프라세오디뮴, 네오디뮴, 프로메튬, 사마륨, 유로퓸, 가돌리늄, 테르븀, 디스프로슘, 홀뮴, 에르븀, 틀륨, 이테르븀, 및 루테튬)의 사용은 LSPR 피크의 세기를 개선할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 금속성 나노층 (금속성 필름 또는 복수의 금속성 나노구조체)는 하나 이상의 알칼리 금속 또는 란탄계열로 구성될 수 있다. 다른 구현예에서, 금속성 나노층 (금속성 필름 또는 복수의 금속성 나노구조체)는 귀금속과 알칼리 금속 또는 란탄계열의 조합으로 구성될 수 있다.

[0024] 본 발명의 분석물 검출 장치는 표면 상에서 증착된 금속성 나노층에 고정화된 복수의 포집 분자를 추가로 포함한다. 포집 분자는 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "특이적 결합"은 높

은 친화도, 예를 들면, 적어도 10^{-6} M의 친화도를 갖는 표적 분자에 결합을 언급한다. 일부 구현예에서, 포집 분자는, 비제한적으로, 항체 또는 이들의 단편 (예를 들면, Fv, Fab, (Fab)₂, 단일 쇄, CDR 등), 항원, 수용체, 리간드, 폴리뉴클레오티드, 앱타머, 폴리펩티드, 다당류, 리포폴리사카라이드, 글리코펩티드, 지질단백질, 또는 핵단백질을 포함하여 핵텐 및 다른 소분자, 약물, 호르몬, 생물학적 거대분자이다. 특정 구현예에서, 복수의 포집 분자는 항체이다. 다른 구현예에서, 복수의 포집 분자는 항원이다.

[0025]

금속성 나노층 또는 나노구조체에 분자 고정화 방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지된다. 상기 방법은 칸주게이션 화학, 예컨대 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카보디이미드 하이드로클로라이드 (EDC), 설포-NHS 커플링, 소수성 결합 또는 티오에테르 화학성질에 관여한 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 분자는 간접적으로 더 큰 담체 분자 또는 단백질을 통해 금속성 나노층 또는 나노구조체에 커플링될 수 있다. 분자가 작은, 예컨대 호르몬, 약물, 및 10 kD 미만의 다른 소분자인 경우 상기 간접 커플링은 특히 유용하다. 바람직하게는, 담체 단백질은 표적 분석물과 특이적 상호작용할 수 있다.

[0026]

본 발명의 분석물 검출 장치는 복수의 검출 콘주게이트를 또한 포함할 수 있다. 검출 콘주게이트는 검정 입체배치에 따라 표적 분석물 또는 포집 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 상대에 커플링된 금속성 나노구조체를 포함한다. 예를 들어, 장치가 샌드위치 검정 포맷에서 구성된 구현예에서, 검출 콘주게이트는 표적 분석물을 특이적으로 결합할 수 있는 결합 상대에 커플링된 또는 콘주게이트된 금속성 나노구조체를 포함한다. 장치가 직접 경쟁적 검정 포맷에서 구성된 다른 구현예에서, 검출 콘주게이트는 표적 분석물에 커플링된 또는 콘주게이트된 금속성 나노구조체를 포함한다.

[0027]

결합 상대는, 비제한적으로 핵텐 및 다른 소분자, 약물, 호르몬, 생물학적 거대분자 예컨대 항체 또는 이들의 단편 (예를 들면, Fv, Fab, (Fab)₂, 단일 쇄, CDR 등), 항원, 수용체, 리간드, 폴리뉴클레오티드, 앱타머, 폴리펩티드, 다당류, 리포폴리사카라이드, 글리코펩티드, 지질단백질, 또는 핵단백질을 포함하여, 포집 분자로서 분자의 동일한 유형일 수 있다. 일부 구현예에서, 결합 상대는 포집 분자로서 분자의 동일한 유형이지만, 그러나 바람직하게는 포집 분자의 결합 부위와 상이한 위치에서 표적 분석물에 결합한다. 예로써, 결합 상대 및 포집 분자 둘 모두는 표적 분석물을 인식하는 항체일 수 있지만, 그러나 결합 상대가 표적 분석물을 결합하는 에피토프는 포집 분자가 표적 분석물을 결합하는 에피토프에서 분리되고 에피토프와 이상적으로 비-중첩하고 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 결합 상대는 표적 분석물의 제1 에피토프를 인식하는 항체이고 그리고 포집 분자는 표적 분석물의 제2 에피토프를 인식하는 상이한 항체이다.

[0028]

검출 콘주게이트에서 금속성 나노구조체는 귀금속 또는 이의 복합체로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 검출 콘주게이트에서 금속성 나노구조체는 전이 금속 또는 이의 복합체로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 검출 콘주게이트에서 금속성 나노구조체는 귀금속 또는 전이 금속과 조합으로 알칼리 금속 또는 란탄계열을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 검출 콘주게이트에서 금속성 나노구조체는 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 루테늄, 로듐, 오스뮴, 이리듐, 티타늄, 크로뮴, 카드뮴, 아연, 철, 코발트, 니켈, 및 이들의 복합체로부터 선택된 금속을 포함한다. 한 구현예에서, 금속성 나노구조체는 금 나노구조체이다. 또 다른 구현예에서, 금속성 나노구조체는 은 나노구조체이다.

[0029]

바람직한 구현예에서, 검출 콘주게이트에서 금속성 나노구조체는 복합 금속성 나노구조체이다. "복합 금속성 나노구조체"는 적어도 2 귀금속, 전이 금속, 알칼리 금속, 또는 란탄계열을 포함하는 나노구조체를 언급한다. 2 이상의 금속은 합금으로서 함께 혼합될 수 있거나, 또는 2 이상의 금속이 나노구조체의 독립된 부분에서 존재할 수 있다. 예를 들어, 1 금속은 나노구조체의 코어를 형성할 수 있고, 반면에 제2 금속은 나노구조체의 외부 셀 또는 코팅물을 형성한다. 일부 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 루테늄, 로듐, 오스뮴, 이리듐, 티타늄, 크로뮴, 카드뮴, 아연, 철, 코발트, 및 니켈로부터 선택된 적어도 2종의 금속을 포함한다. 다른 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 카드뮴, 철, 니켈, 및 아연으로부터 선택된 적어도 2종의 금속을 포함한다. 한 특정 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 금 및 은을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 금 및 구리를 포함한다. 추가의 또 다른 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 은 및 구리를 포함한다.

[0030]

일부 구현예에서, 각각의 복합 금속성 나노구조체는 제1 금속과 제2 금속의 합금이다. 특정 구현예에서, 각각의 복합 금속성 나노구조체는 제1 금속의 코어 및 제2 금속의 코팅물을 포함한다. 한 구현예에서, 코어는 은이고 코팅물은 금이다. 또 다른 구현예에서, 코어는 구리이고 코팅물은 금이다. 또 다른 구현예에서, 코어는 은이고 코팅물은 구리이다. 일부 구현예에서, 각각의 복합 금속성 나노구조체는 유전체 코어 (예를 들면 이산화규소,

금 황화물, 이산화티타늄, 실리카, 및 폴리스티렌), 제1 금속의 제1 코팅물, 및 제2 금속의 제2 코팅물을 포함한다. 한 특정 구현예에서, 코어는 실리카이고, 제1 코팅물 (즉 내부 코팅물)은 은 코팅물이고, 제2 코팅물은 금 코팅물 (즉 외부 코팅물)이다. 또 다른 구현예에서, 코어는 실리카이고, 제1 코팅물 (즉 내부 코팅물)은 구리 코팅물이고, 제2 코팅물은 금 코팅물 (즉 외부 코팅물)이다.

[0031] 일부 구현예에서, 제1 금속을 포함하는 코어는 용해된 다음 제2 금속으로 코팅 공정을 거쳐 제2 금속으로 구성된 중공 구조체를 창출한다. 예를 들어, 금 나노입자를 갖는 은 코어의 코팅물은 은 코어 주변에 금 쉘을 생기게 하고 그리고 은 코어는 그 다음 용해 또는 분해되어 중공 나노금 쉘 구조체의 형성을 초래한다.

[0032] 금속성 나노구조체는 구형 나노입자 뿐만 아니라 나노플레이트 및 나노쉘을 포함한다. 나노플레이트는 그의 두께 초과인 측면 치수 (예를 들면 모서리 길이)를 갖는다. 나노플레이트는 나노디스크, 나노다각형, 나노육각형, 나노큐브, 나노링, 나노스타, 및 나노프리즘을 포함한다. 일부 구현예에서, 복합 나노구조체를 포함하는, 금속성 나노구조체는 구형 나노입자, 피라미드 나노입자, 육각형 나노입자, 나노튜브, 나노쉘, 나노막대, 나노점, 나노섬, 나노와이어, 나노디스크, 나노큐브, 또는 이들의 조합으로부터 선택된 기하학을 갖는다. 불규칙한 형태를 포함하여, 다른 형태가 또한 가능하다. 특정 구현예에서, 금속성 나노구조체의 크기 및 형태는 균일하지 않다 - 즉 금속성 나노구조체는 나노구조체의 상이한 형태 및 크기의 불균질 혼합물이다.

[0033] 구형 나노입자에 대하여, 적합한 직경 범위는 약 5 nm 내지 약 200 nm, 약 10 nm 내지 약 100 nm, 및 약 20 nm 내지 약 60 nm를 포함한다. 나노플레이트에 대하여, 모서리 길이는 약 10 nm 내지 약 800 nm, 약 20 nm 내지 약 500 nm, 약 내지 50 nm 내지 약 200 nm, 약 30 nm 내지 약 100 nm, 또는 약 10 nm 내지 약 300 nm일 수 있다. 나노플레이트의 두께는 약 1 내지 약 100 nm, 약 5 nm 내지 약 80 nm, 약 10 nm 내지 약 50 nm, 또는 약 5 nm 내지 약 20 nm 범위일 수 있다.

[0034] 일부 구현예에서, 나노플레이트는 2 초과의 종횡비를 갖는다. 종횡비는 모서리 길이 대 두께의 비이다. 바람직하게는, 나노플레이트는 약 2 내지 약 25, 약 3 내지 약 20, 약 5 내지 약 10, 약 2 내지 약 15, 또는 약 10 내지 약 30의 종횡비를 갖는다.

[0035] 결합 상대 또는 표적 분석물은 금속성 나노층에 포집 분자의 고정화를 위하여 상기 기재된 바와 같이 유사한 방법을 이용하여 금속성 나노구조체 (예를 들면 복합 나노구조체)에 커플링 또는 콘주케이트될 수 있다. 상기 방법은, 비제한적으로, EDC 칸쥬케이션 화학, 설포-NHS 커플링, 소수성 결합 또는 티오에테르 화학성질을 포함한다. 결합 상대 또는 표적 분석물은 티올, 아민, 디티올, 아크릴 포스포르아미다이트, 아자이드, 또는 알킨을 포함하는 다양한 화학 작용기를 통해 금속성 나노구조체에 커플링될 수 있다.

[0036] 일부 구현예에서, 금속 또는 표면 상에서 증착된 금속성 나노층에서 이용된 금속은 금속 또는 검출 콘주케이트에서 금속성 나노구조체가 제작된 금속과 동일할 수 있다. 예를 들어, 한 구현예에서, 표면 상에서 증착된 금속성 나노층은 금 필름 또는 복수의 금 나노구조체를 포함하고 그리고 검출 콘주케이트는 금 나노구조체를 포함한다. 다른 구현예에서, 표면 상에서 증착된 금속성 나노층에서 이용된 금속은 금속 또는 검출 콘주케이트에서 금속성 나노구조체를 창출하기 위해 사용된 금속과 상이하다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 표면 상에서 증착된 금속성 나노층은 은 필름 또는 복수의 은 나노구조체를 포함하고 그리고 검출 콘주케이트는 은 나노구조체를 포함한다. 다른 구현예에서, 표면 상에서 증착된 금속성 나노층은 금 필름 또는 복수의 금 나노구조체를 포함하고 그리고 검출 콘주케이트는 은 나노구조체를 포함한다. 특정 구현예에서, 표면 상에서 증착된 금속성 나노층은 금 필름 또는 복수의 금 나노구조체를 포함하고 그리고 검출 콘주케이트는 복합 나노구조체를 포함한다. 관련 구현예에서, 복합 나노구조체는 금-코팅된 은 나노구조체를 포함한다. 다른 특정 구현예에서, 표면 상에서 증착된 금속성 나노층은 금 필름 또는 복수의 금 나노구조체를 포함하고 그리고 검출 콘주케이트는 금-코팅된 구리나노구조체를 포함하는 복합 나노구조체를 포함한다. 추가의 다른 구현예에서, 표면 상에서 증착된 금속성 나노층은 금 필름 또는 복수의 금 나노구조체를 포함하고 그리고 검출 콘주케이트는 금-코팅된 마그네타이트 나노구조체를 포함하는 복합 나노구조체를 포함한다. 추가의 다른 구현예에서, 표면 상에서 증착된 금속성 나노층은 금 필름 또는 복수의 금 나노구조체를 포함하고 그리고 검출 콘주케이트는 금 및 알칼리 금속 또는 란탄계열을 포함하는 복합 나노구조체를 포함한다.

[0037] 본 발명은 또한 본원에서 개시된 바와 같이 본 발명의 분석물 검출 장치를 포함하는 키트를 포함한다. 한 구현예에서, 키트는 (i) 복수의 포집 분자가 고정화된 금속성 나노층을 함유하는 표면 및 (ii) 본원에서 기재된 바와 같이 복수의 검출 콘주케이트를 포함하는 조성물을 포함한다. 특정 구현예에서, 조성물은 표면으로부터 별도로 포장되어 이로써 검출 방법의 성능 동안 표면과 후속 접촉될 수 있다. 일부 구현예에서, 복수의 검출 콘주케이트를 포함하는 조성물은, 예를 들어, 펠렛 또는 비드의 형태로 동결건조된다. 관련 구현예에서, 금속성 나노

층을 함유하는 표면은 칩, 디스크, 또는 큐벳일 수 있다. 한 특정 구현예에서, 금속성 나노층을 함유하는 표면은 원심 로터와 함께 사용을 위하여 적응된 큐벳이다. 상기 구현예에서, 금속성 나노층은 큐벳의 커버, 최하부 및/또는 벽상에 증착될 수 있다.

[0038] 특정 구현예에서, 본원에서 기재된 분석물 검출 시스템의 모든 성분은 원심 로터 또는 디스크 내에 함유된다. 예를 들어, 로터 또는 디스크는 고정화된 포집 분자를 함유하는 금속성 나노층 표면 및 복수의 검출 콘주케이트가 배치된 하나 이상의 반응 챔버를 함유할 수 있다. 한 구현예에서, 금속성 나노층 표면은 반응 챔버의 최하부에 위치한 칩이다. 또 다른 구현예에서, 금속성 나노층은 반응 챔버의 바닥 상에서 직접적으로 증착된다. 추가의 또 다른 구현예에서, 금속성 나노층 표면은 금속성 나노층으로 코팅된 비드 (예를 들면 플라스틱 비드)이다. 모든 상기 구현예에서, 포집 분자는 금속성 나노층 표면에 고정화된다. 관련 구현예에서, 복수의 검출 콘주케이트는 동결건조된 조성물의 형태, 예컨대 동결건조된 비드 또는 펠렛으로 존재한다.

[0039] 대안적 구현예에서, 포집 분자는, 콜로이드성 서스펜션인, 금속성 나노구조체에 콘주케이트된다. 복수의 검출 콘주케이트는 시험 샘플의 존재하에 서스펜션에 부가된다. 만일 표적 분석물이 샘플에서 존재하면, 복합물 형성은 광학적 신호의 변화 (예를 들면, 혼탁된 나노구조체의 퍼크 흡광도 파장의 시프트)를 초래하는 포집 분자를 함유하는 혼탁된 나노구조체와 검출 콘주케이트 사이에서 발생할 것이다.

[0040] 따라서, 일부 구현예에서, 키트는 하나 이상의 반응 챔버를 갖는 로터 또는 디스크를 포함하고, 여기에서 각 반응 챔버는 (i) 본원에서 기재된 바와 같이 복수의 검출 콘주케이트를 포함하는 동결건조된 조성물 및 (ii) 금속성 나노층으로 코팅된 비드를 포함하고, 여기에서 복수의 포집 분자는 금속성 나노층에 고정화된다. 상기 키트는 1-단계 분석물 검출 검정을 제공하여 이로써 시험 샘플은 로터 또는 디스크와 접촉되고, 그리고 로터 또는 디스크에 대한 원심력의 적용은 샘플이 복수의 검출 콘주케이트 및 고정화된 포집 분자를 함유하는 금속성 나노층-코팅된 비드와 혼합되는 반응 챔버에 시험 샘플을 전달한다. 로터 또는 디스크가 1 초과 반응 챔버를 함유하는 구현예에서, 검출 콘주케이트 및 포집 분자는 선택될 수 있어 이로써 상이한 분석물이 각 반응 챔버에서 검출될 수 있다. 만일 로터가 다중 반응 챔버를 포함하면 이들 로터-포맷 검출 장치는 샌드위치 검정 포맷, 직접 경쟁적 포맷, 또는 둘 모두로 구성될 수 있다.

[0041] 본원에서 논의된 임의의 유형의 금속성 나노층 또는 금속성 나노구조체는 이들 로터-포맷 검출 장치와 함께 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 비드 상에서 금속성 나노층 코팅물은 금 나노층이고 그리고 검출 콘주케이트에서 금속성 나노구조체는 금 나노구조체이다. 다른 구현예에서, 비드 상에서 금속성 나노층 코팅물은 은 나노층이고 그리고 검출 콘주케이트에서 금속성 나노구조체는 은 나노구조체이다. 추가의 다른 구현예에서, 비드 상에서 금속성 나노층 코팅물은 금 나노층이고 그리고 검출 콘주케이트에서 금속성 나노구조체는 은 나노구조체이다. 한 구현예에서, 비드 상에서 금속성 나노층 코팅물은 금 나노층으로 중첩된 은 나노층이고 그리고 검출 콘주케이트에서 금속성 나노구조체는 금 나노구조체이다. 특정 구현예에서, 비드 상에서 금속성 나노층 코팅물은 금 나노층이고 그리고 검출 콘주케이트에서 금속성 나노구조체는 복합 나노구조체이다. 예를 들어, 한 구현예에서, 복합 나노구조체는 금-코팅된 은 나노구조체이다. 또 다른 구현예에서, 복합 나노구조체는 금-코팅된 구리 나노구조체이다.

[0042] 본 발명의 키트는 시험 샘플에서 분석물을 검출하는 장치를 사용하기 위한 설명서, 생물학적 샘플을 수집하기 위한 장치 또는 도구, 및/또는 고형 물질, 예컨대 토양, 음식, 및 생물학적 조직으로부터 샘플을 수득하기 위한 추출 베퍼를 또한 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명은 또한 샘플에서 표적 분석물의 검출 방법을 제공한다. 한 구현예에서, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (i) 본원에서 기재된 바와 같이 복수의 검출 콘주케이트와 시험 샘플을 혼합하는 단계; (ii) 금속성 나노층을 함유하는 표면과 혼합물을 접촉하는 단계로서, 여기에서 본원에서 기재된 바와 같이 복수의 포집 분자는 금속성 나노층에 고정화된, 단계; (iii) 자외선-가시광선-적외선 스펙트럼 내의 파장 범위에서 광원에 표면을 노출시키는 단계; 및 (iv) 표면으로부터 광학적 신호를 측정하는 단계로서, 여기에서 광학적 신호에서 변화가 샘플에서 표적 분석물의 존재를 표시하는, 단계.

[0044] 일부 구현예에서, 검출 방법은 샌드위치 검정이다. 상기 구현예에서, 검출 콘주케이트는 분석물-검출 콘주케이트 복합물을 형성하는 샘플에서 존재하면 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 상태에 커플링된 금속성 나노구조체를 포함한다. 금속성 나노층 표면에 고정화된, 복수의 포집 분자는 또한 샘플에서 존재하면 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있다. 금속성 나노층은 광원에 노출되고 그리고 광학적 신호는 측정되고, 여기에서 광학적 신호에서 변화는 샘플에서 분석물의 존재를 표시한다. 설명으로써, 표적 분석물을 함유하는 샘플이 복수의 검출 콘주케이트와 혼합된 경우, 표적 분석물은 검출 콘주케이트에서 결합 상태에 결합하여 분석물-검출

콘주케이트 복합물을 형성한다. 이들 복합물은 차례로 분석물을 통해 금속성 나노층 표면에 고정화된 복수의 포집 분자에 결합하여 그렇게 함으로써 검출 콘주케이트에서 금속성 나노구조체를 금속성 나노층 표면에 매우 근접하게 한다. 금속성 나노층 표면에 의해 흡수된 또는 산란된 광의 양은 복합물에서 금속성 나노구조체의 근접에 의해 영향을 받고 따라서, 샘플에서 표적 분석물의 존재를 표시하는, 퍼크 흡광도 파장에서 향상된 시프트를 생산한다.

[0045] 다른 구현예에서, 검출 방법은 경쟁적 검정이다. 상기 구현예에서, 검출 콘주케이트는 당해 표적 분석물에 커플링된 금속성 나노구조체를 포함한다. 샌드위치 검정 방법에서와 같이, 금속성 나노층 표면에 고정화된, 복수의 포집 분자는 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있다. 이러한 유형의 검정에서, 검출 콘주케이트는 초기에 포집 분자에 결합할 것이다. 만일 표적 분석물을 함유하는 샘플이 이를 초기 복합물과 혼합되면, 샘플에서 비표지된 또는 자유 표적 분석물은 포집 분자에 대한 결합을 위하여 검출 콘주케이트와 경쟁할 것이다. 이러한 유형의 검정에서 광학적 신호의 변화는 금속성 나노층 표면으로부터 검출 콘주케이트내 금속성 나노구조체의 변위에서 비롯될 것이고, 이는 비례하여 퍼크 흡광도 파장에서 파장 시프트를 감소시킨다

[0046] 시험 샘플은, 환경적인 또는 음식 샘플로부터 제조된 생물학적 샘플 또는 추출물을 포함하여, 임의의 유형의 액체 샘플일 수 있다. 한 특정 구현예에서, 시험 샘플은 생물학적 샘플이다. 생물학적 샘플은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 전혈, 혈장, 혈청, 타액, 소변, 늑막 삼출, 땀, 담즙, 뇌척수액, 대변 물질, 질액, 정액, 안구렌즈 유체, 점액, 활막 유체, 복막 유체, 양수, 생검 조직, 타액, 및 세포성 용해물. 생물학적 샘플은 질환 병태, 예컨대 암, 감염성 질환 (예를 들면, 바이러스-, 박테리아-, 기생충- 또는 진균-감염), 심혈관 질환, 대사성 질환, 자가면역 질환 등을 갖는 것으로 의심되는 인간 대상체 또는 동물 대상체로부터 수득될 수 있다. 생물학적 샘플은 또한 일상적인 의료 검진을 경험하는 건강한 대상체 (예를 들면 인간 또는 동물)로부터 수득될 수 있다.

[0047] 본 방법의 일부 구현예에서, 시험 샘플은 복수의 검출 콘주케이트와 혼합되고 그리고 혼합물은 그 뒤에 고정화된 포집 분자를 함유하는 금속성 나노층 표면과 접촉된다. 다른 구현예에서, 시험 샘플은 고정화된 포집 분자를 함유하는 금속성 나노층 표면과 접촉되고 그리고 복수의 검출 콘주케이트는 그 뒤에 부가되었다. 특정 구현예에서, 샘플, 복수의 검출 콘주케이트, 및 고정화된 포집 분자를 함유하는 금속성 나노층 표면은 동시에 접촉된다. 예를 들어, 동시에 양쪽 시약과 샘플의 접촉은 상기 기재된 로터-포맷 검출 장치에서 발생할 수 있다.

[0048] 상기 기재된 임의의 분석물 검출 장치는 본 발명의 검출 방법에서 사용될 수 있다. 따라서, 본원에서 기재된 다양한 금속성 나노층 표면, 포집 분자, 및 검출 콘주케이트는 검출 방법에서 사용에 적합하다. 예를 들어, 본 방법의 일부 구현예에서, 금속성 나노층을 함유하는 표면은 칩, 웰, 큐벳, 또는 비드이다. 본 방법의 특정 구현예에서, 금속성 나노층을 함유하는 표면은 원심 로터와 함께 사용을 위하여 적응된 또는 편입된 큐벳의 벽 및 최하부이다. 이들 및 다른 구현예에서, 표면 상에서 금속성 나노층은 금속성 필름, 예컨대 금 필름이다. 본 방법의 다른 구현예에서, 표면 상에서 금속성 나노층은 표면 상에서 고정화된 복수의 금속성 나노구조체, 예컨대 금 나노구조체를 포함한다.

[0049] 검출 방법의 특정 구현예에서, 검출 콘주케이트는 결합 상태 또는 표적 분석물에 커플링된 복합 금속성 나노구조체를 포함한다. 본원에서 기재된 바와 같이, 복합 금속성 나노구조체는 적어도 2 귀금속 또는 전이 금속을 포함한다. 본 방법의 일부 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 루테늄, 로듐, 오스뮴, 이리듐, 티타늄, 크로뮴, 카드뮴, 아연, 철, 코발트, 및 니켈로부터 선택된 적어도 2종의 금속을 포함한다. 본 방법의 다른 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 카드뮴, 철, 니켈, 및 아연으로부터 선택된 적어도 2종의 금속을 포함한다. 한 특정 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 금 및 은을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 금 및 구리를 포함한다. 추가의 또 다른 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 은 및 구리를 포함한다. 본 발명의 방법에서 사용된 복합 금속성 나노구조체는 수많은 상이한 기하학적 구조체, 예컨대 구형 나노입자, 펴라미드 나노입자, 육각형 나노입자, 나노튜브, 나노쉘, 나노막대, 나노점, 나노섬, 나노와이어, 나노디스크, 나노큐브, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0050] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법에서 사용된 복합 금속성 나노구조체는 제1 금속과 제2 금속의 합금이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에서 사용된 복합 금속성 나노구조체는 제1 금속의 코어 및 제2 금속의 코팅물을 포함한다. 특정 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 은 코어 및 금 코팅물을 포함한다. 다른 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 구리 코어 및 금 코팅물을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 코어는 은이고 코팅물은 구리이다. 일부 구현예에서, 각각의 복합 금속성 나노구조체는 유전체 코어 (예를 들면 이산화규소, 금 황화물, 이산화티타늄, 실리카, 및 폴리스티렌), 제1 금속의 제1 코팅물, 및 제2 금속의 제2 코팅물을 포함한다. 검출 방법

의 한 특정 구현예에서, 코어는 실리카이고, 제1 코팅물 (즉 내부 코팅물)은 은 코팅물이고, 그리고 제2 코팅물은 금 코팅물 (즉 외부 코팅물)이다. 또 다른 구현예에서, 코어는 실리카이고, 제1 코팅물 (즉 내부 코팅물)은 구리 코팅물이고, 그리고 제2 코팅물은 금 코팅물 (즉 외부 코팅물)이다.

[0051] 본 발명의 검출 방법은 표적 분석물의 정성적 또는 정량적 양을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 상기 방법은, 특정 의료 병태를 진단하기 위해 또는 약물 요법의 효능을 평가하기 위해 특히 사용될 수 있는, 샘플에서 표적 분석물의 근사 양 측정에 특히 유용하다. 한 구현예에서, 표적 분석물의 양은 표적 분석물의 공지된 양을 갖는 샘플에 대하여 본원에서 기재된 바와 같이 금속성 나노층 표면으로부터 광학적 신호에서 변화 측정에 의해 특정 분석물에 대하여 표준 곡선 수립; 시험 샘플에 대하여 광학적 신호 변화 결정; 및 표준 곡선에 대하여 수득된 값과 시험 샘플에 대하여 광학적 신호 변화 비교로 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 시약과 제2 시약 사이에서 복합물의 양 측정은 복합물의 공지된 양을 갖는 한 샘플로부터 흡광도 비 및/또는 반응 속도와 시험 샘플로부터 흡광도 비 및/또는 반응 속도 비교, 그렇게 함으로써 시험 샘플에서 복합물의 양 측정을 포함한다. 시험 샘플로부터 수득된 정량적 값은 사전-결정된 역치 값과 비교될 수 있고, 여기에서 상기 사전-결정된 역치 값은 표적 분석물의 한쪽 비정상 또는 정상 수준을 표시한다.

[0052] 본 발명의 검출 방법은 샘플에서 극미량의 표적 분석물의 고 민감성 검출 기술을 제공한다. 작업 예에 의해 증명된 바와 같이, 금 나노층 표면으로부터 플라즈몬 공명-기반된 신호의 증폭은 금 나노구조체 콘주케이트로 달성될 수 있어 이로써 표적 분석물의 나노그램 양은 샘플에서 검출될 수 있다. 따라서, 본 방법의 한 구현예에서, 표적 분석물의 나노그램 양의 존재는 검출된다. 본 발명자들은 금 나노층 표면으로부터 플라즈몬 공명-기반된 신호의 유의미하게 더 큰 증폭이 복합 금속성 나노구조체 콘주케이트로 달성될 수 있음을 놀랍게도 알아내었다. 분석물-특이적 항체에 콘주케이트된 금-코팅된 은 나노구조체의 사용은 표적 분석물의 피토그램 양의 검출을 가능하게 하였고, 이는 금 나노구조체 콘주케이트로 수득된 것과 비교시 민감성에서 1000-배 증가이다. 참고 실시예 3. 따라서, 본 방법의 일부 구현예에서, 표적 분석물의 피코그램 양의 존재는 검출된다. 본 방법의 다른 구현예에서, 표적 분석물의 펩토그램 양의 존재가 검출된다. 더 큰 민감성은 조성물 및/또는 복합 금 속성 나노구조체의 형태 및/또는 금속성 나노층 표면을 변경함으로써 수득될 수 있다.

[0053] 입사광이 금속성 나노구조체에 적용되는 경우, 금속내 전도 대역 전자는 입사 전자기파의 동일한 주파수에서 종합적으로 진동한다. 이를 공명 진동의 결과로서, 나노구조체는 특이적 파장 범위에서 광을 강하게 흡수 및 산란시킨다. 귀금속 또는 전이 금속을 포함하는 금속성 나노구조체에 대하여, 상기 파장 범위는 나노구조체의 특정 조성물에 따라 자외선-가시광선-적외선 스펙트럼이다. 따라서, 본 발명의 방법에서 사용에 적합한 전자기 에너지 적용을 위한 광원은, 아크 램프 및 레이저를 포함하여, 자외선-가시적인 스펙트럼 또는 자외선-가시광선-적외선 스펙트럼 내의 파장 범위를 적용할 수 있는 임의의 공급원을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 광원은 단색화장치가 구비될 수 있어서 이로써 광의 특이적 파장이 금속성 나노층 표면에 적용될 수 있다.

[0054] 금속성 나노층 및 나노구조체의 광학적 특성은 그의 크기, 형태, 및 조성물에 달려 있다. 예를 들어, 고체 금 나노입자는 입자 크기에 따라 흡광도 피크 파장 (λ_{\max}) 약 515 nm 내지 약 560 nm를 갖는다. 30 nm 직경을 갖는 금 구형 나노입자는 입자 직경이 증가함에 따라 더 긴 파장에 대해 시프트하는 λ_{\max} 로 약 520 nm에서 최대로 흡수한다. 은 및 구리 입자는 더 긴 파장에 대해 λ_{\max} 에서 시프트를 야기하는 입자 직경을 증가하면서 자외선/청색 또는 적색 영역 (예를 들면, 약 350 nm 내지 약 500 nm)에서 λ_{\max} 를 갖는다. 금속성 나노막대는 가로 $\lambda_{\max 1}$ 및 세로 $\lambda_{\max 2}$ 를 갖는다. 상이한 금속의 합금은 금속을 포함하는 것의 흡광도 피크 사이의 중간체 범위에서 흡광도 피크를 전형적으로 나타낸다. 예를 들어, 금 및 은의 50/50 합금을 포함하는 나노구조체는 더 긴 파장에 대해 흡광도 피크에서 시프트를 야기하는 금의 양을 증가하면서 약 470 nm의 λ_{\max} 를 나타낸다. 국소 중간 굴절률에서 변화에 대한 LSPR 신호의 민감성은 나노구조체의 형태 또는 기하학의 변화에 의해 수정될 수 있다. 예를 들어, 비구형 입자 (예를 들면 나노프리즘, 나노막대, 나노쉘, 등)은 구형체에 비교시 증가된 LSPR 민감성을 갖는다. 일부 구현예에서, 광학적 특성 (예를 들면 특정 파장에서 흡수/산란)은 검출 콘주케이트에서 이용된 금속성 나노구조체 또는 표면 상에서 증착된 금속성 나노층의 크기, 형태, 또는 조성물 다양화에 의해 특정 적용에 맞춰진다.

[0055] 입사광과 금속성 나노층 표면 사이에서 상호작용은 반사된 광 또는 투과된 광으로서 모니터링될 수 있다. 흡수된 또는 산란된 입사광의 양은 반사 방식에서 흡광도 스펙트럼으로서 또는 투과 방식에서 흡광도 스펙트럼으로서 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 금속성 나노층으로부터 측정된 광학적 신호는 광학적 반사, 흡광도 스펙트럼, 산란 스펙트럼, 및/또는 방출 스펙트럼일 수 있다.

[0056]

결합 상대, 표적 분석물, 및 포집 분자 사이에서 복합물 형성에서 비롯되는 검출 콘주케이트에서 금속성 나노구조체와 금속성 나노층 사이에서 플라즈몬 커플링은 금속성 나노층의 국소화된 표면 플라즈몬 공명 스펙트럼에서 변화를 생산한다. 예를 들어, 상기 변화는 증가된 광학적 소멸, 증가된 광학적 반사, 및/또는 증가된 산란 및/또는 방출 신호를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 샘플에서 표적 분석물의 존재를 나타내는 광학적 신호에서 변화는 시프트, 광학적 산란에서 증가 또는 감소 또는 이를 특징의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 샘플에서 표적 분석물의 존재를 나타내는 광학적 신호에서 변화는 스펙트럼 피크 파장 시프트이다. 한 구현예에서, 광학적 스펙트럼 피크에서 파장 시프트는 200 nm 내지 1200 nm 스펙트럼 윈도우 내의 적색 시프트 (예를 들면, 더 긴 파장에 대한 시프트)일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 광학적 스펙트럼 피크에서 파장 시프트는 200 nm 내지 1200 nm 스펙트럼 윈도우 내의 청색 시프트 (예를 들면, 더 짧은 파장에 대한 시프트)일 수 있다. 광학적 신호에서 변화는 세트 반응 기간 이후 특정 시점에서 측정될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 반응 기간 (예를 들면 속도 결정)에 대하여 광학적 신호에서 변화는 측정될 수 있다. 양쪽 측정의 유형은 표적 분석물의 한쪽 정성적 또는 정량적 분석에 사용될 수 있다.

[0057]

상이한 파장에서 광학적 신호 측정용 및 소멸, 산란, 또는 방출 스펙트럼 획득용 다양한 수단은 당해 기술에 공지되어 있다. 임의의 분광광도법적 또는 측광 기기는 개시된 방법에서 사용에 적합하다. 일부 비-제한 예는 하기를 포함한다: 플레이트 리더, Cobas Fara 분석기, 및 Piccolo xpress[®] 및 Vetscan 분석기 (Abaxis, Inc., Union City, CA), 광섬유 판독기 (예를 들면, LightPathTM S4 (LambdaGen, Menlo Park, CA)), SPR 기기 (예를 들면, GE Healthcare로부터 이용가능한 Biacore 기기), Olympus, Hitachi제 원심 분석기 등.

[0058]

본 발명은 또한 하기를 포함하는 검정 복합물을 포함하고: (i) 결합 상대에 커플링된 복합 금속성 나노구조체를 포함하는 검출 콘주케이트, (ii) 표적 분석물, 및 (iii) 포집 분자가 고정화된 금속성 나노층-코팅된 비드, 여기에서 검출 콘주케이트에서 결합 상대는 표적 분석물 상에서 제1 에피토프에 결합되고 그리고 포집 분자는 표적 분석물 상에서 제2 에피토프에 결합되어, 그렇게 함으로써 검출 콘주케이트, 표적 분석물, 및 포집 분자를 포함하는 복합물을 형성한다. 일부 구현예에서, 검정 복합물은 원심 로터와 함께 사용을 위하여 적응된 큐벳 내에 함유된다. 다른 구현예에서, 검정 복합물은 원심 로터 또는 디스크에서 반응 챔버 내에 함유된다.

[0059]

검정 복합물에서 결합 상대 및 포집 분자는, 합텐 및 다른 소분자, 약물, 호르몬, 생물학적 거대분자 예컨대 항체 또는 이들의 단편 (예를 들면, Fv, Fab, (Fab)₂, 단일 쇄, CDR 등), 항원, 수용체, 리간드, 폴리뉴클레오티드, 앱타며, 폴리펩티드, 다당류, 리포폴리사카라이드, 글리코펩티드, 지질단백질, 또는 핵단백질을 포함하여, 상기 기재된 임의의 유형의 분자일 수 있다. 한 구현예에서, 결합 상대는 항체이고 포집 분자는 상이한 항체이다.

[0060]

금속성 나노층 및 복합 금속성 나노구조체는 상기 상세히 기재된다. 한 구현예에서, 비드 (예를 들면 플라스틱 또는 유리 비드)를 코팅하는 금속성 나노층은 금 나노층이다. 또 다른 구현예에서, 비드를 코팅하는 금속성 나노층은 은 나노층이다. 비드는 바람직하게는 0.5 cm 미만, 그러나 0.1 mm 초과이다. 특정 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 금-코팅된 은 나노구조체이다. 다른 구현예에서, 복합 금속성 나노구조체는 금-코팅된 구리 나노구조체이다. 추가의 다른 구현예에서, 금속성 나노구조체는 은, 구리 이온 또는 이들 이온 양쪽으로 도핑된 금을 포함한다.

[0061]

임의의 유형의 표적 분석물은 본 발명의 방법, 장치, 및 검정 복합물, 특히 질환의 진단에서 유의미한 것을 이용하여 검출될 수 있다. 표적 분석물은, 비제한적으로, 단백질, 효소, 항원, 항체, 펩티드, 핵산 (RNA, DNA, mRNA, miRNA), 호르몬, 당단백질, 다당류, 독소, 바이러스, 바이러스 입자, 약물 분자, 합텐, 또는 화학제품을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 분석물은 인간 및/또는 동물에서 감염성 질환과 관련된 마커 또는 항원이다. 다른 구현예에서, 표적 분석물은 특정 생리적 상태 또는 병태와 관련된 마커 또는 항원이다.

[0062]

특정 구현예에서, 표적 분석물은 병원성 항원이거나 또는 병원성 항원에 대한 항체이다. 예를 들어, 병원성 항원은 하기일 수 있다: 바이러스 항원 (예를 들면, 고양이 백혈병 바이러스, 갯과 파보바이러스, 발 및 입 바이러스, 인플루엔자 바이러스, a형, b형, c형 간염 바이러스, HIV 바이러스, 인간 유두종 바이러스, 앱스타인 바바이러스, 광견병 바이러스, 등), 박테리아 항원 (예를 들면, 애를리치아, 보렐리아, 아나플라즈마, 탄저병, 살모넬라, 바실러스, 등), 진균 항원, 또는 기생충 항원 (예를 들면, 갯과 사상충, 람플편모충, 플라스모디엄 팔시파리, 아프리칸 트라파노소마증, 트라이파노소마 브루세이, 등). 다른 구현예에서, 표적 분석물은 질환-관련 항원이거나 또는 질환-관련 항원에 대한 항체이다. 질환-관련 항원은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 암-관련 항원 또는 마커 (예를 들면, PSA, AFP, CA125, CA15-3, CA19-9, CEA, NY-ESO-1, MUC1, GM3, GD2, ERBB2, 등),

심혈관 질환-관련 항원 또는 마커 (예를 들면, 트로포닌, C-반응성 단백질, 뇌성 나트륨이뇨 펩티드, CKMB, 지방산 결합 단백질, 등,), 대사성-관련 항원 또는 마커 (예를 들면, 갑상선 자극 호르몬, 티록신, 렙틴, 인슐린), 또는 자가면역 질환-관련 항원 또는 마커 (예를 들면, 자가-항체). 특정 구현예에서, 표적 분석물은 염증성 항원 또는 마커 (예를 들면, C-반응성 단백질, MRP14, MRP8, 25F9, 등)이다. 다른 구현예에서, 표적 분석물은 임신-관련 항원 또는 마커 (예를 들면, 태아 항원, 인간 융모성 성선자극호르몬)이다.

[0063] 본 발명은 또한 복합 금속성 나노구조체 제조 방법을 제공한다. 한 구현예에서, 상기 방법은 폴리머와 염화금산의 혼합물을 포함하는 제1 용액 제조 단계, 은 또는 구리 나노구조체를 포함하는 제2 용액 제조 단계, 및 일정 시기 동안 제2 용액으로 제1 용액 인큐베이팅 단계를 포함하고, 여기에서 수득한 혼합물은 금-코팅된 은 나노구조체 또는 금-코팅된 구리 나노구조체를 포함한다. 수득한 혼합물은 바람직하게는 약 515 nm 내지 약 670 nm, 또는 약 520 nm 내지 약 560 nm의 피크 흡광도를 갖는다. 한 구현예에서, 수득한 혼합물은 약 530 nm의 피크 흡광도를 갖는다.

[0064] 제1 용액의 제조에서 사용된 폴리머는 임의의 하나의 폴리비닐파리돈, 폴리비닐 알코올, 폴리아크릴레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌이민, 폴리아스파르트산, 폴리글루탐산, 다양한 검, 젤라틴 또는 임의의 전술을 포함한 혼합된 폴리머일 수 있다. 한 특정 구현예에서, 폴리머는 폴리비닐파리돈이다. 상이한 유형의 코팅된 나노구조체는 폴리머의 분자량 다양화로 수득될 수 있다. 폴리머의 적합한 분자량 범위는 약 5,000 달톤 내지 약 150,000 달톤, 약 10,000 달톤 내지 약 100,000 달톤, 약 20,000 달톤 내지 약 80,000 달톤을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리머는 50,000 달톤 미만의 분자량을 갖는다. 다른 구현예에서, 폴리머는 20,000 달톤 미만의 분자량을 갖는다. 특정 구현예에서, 폴리머는 약 10,000 달톤의 분자량을 갖는다.

[0065] 금 코팅물의 특징은 폴리머 대 염화금산의 농도 비 조정에 의해 제어될 수 있다. 예를 들어, 폴리머 대 염화금산의 농도 비는 약 100:1 내지 약 1:100, 약 2:1 내지 약 5:1, 또는 약 1.5:1 내지 약 8:1이다. 일부 구현예에서, 폴리머 대 염화금산의 농도 비는 1:1이다. 폴리머의 적합한 농도는, 비제한적으로, 물 또는 에탄올에서 약 0.1 % 내지 약 20% wt/습성을 포함한다. 염화금산의 적합한 농도는, 비제한적으로, 약 0.001 M 내지 약 1.0 M, 약 0.010 M 내지 약 0.500 M, 및 약 0.050 M 내지 약 0.100 M을 포함한다.

[0066] 코팅물 효율 및 두께는 또한 코팅물 용액 (즉 제1 용액)의 pH 및 할라이드 함량에 의해 영향받을 수 있다. 특정 구현예에서, 용액의 pH는 약 3 내지 약 14 범위에서 유지된다. 용액의 할라이드 함량은, 일부 구현예에서, 150 mM 미만이다. 다른 구현예에서, 용액의 할라이드 함량은 약 0 내지 약 50 mM의 범위이다.

[0067] 은 및 구리 나노구조체의 용액 제조 방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지된다. 예를 들어, 은 또는 구리 나노구조체를 포함하는 제2 용액은 미국 특허 공개 번호 2012/0101007, 미국 특허 공개 번호 2014/0105982, 또는 미국 특허 공개 번호 2013/0230717에 기재된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있고, 각각의 이들은 이로써 그 전체가 참조로 편입된다. 한 구현예에서, 은 또는 구리 나노구조체를 포함하는 제2 용액은 은 또는 구리 공급원을 환원제와 혼합시킴으로써 제조된다. 적합한 은 공급원은 은 염, 예컨대 은 니트레이트를 포함한다. 적합한 구리 공급원은 구리 (II) 살레이트, 구리 (II) 클로라이드, 구리 (II) 하이드록사이드 및 구리 (II) 니트레이트, 구리 (II) 아세테이트 및 구리 (II) 트리플루오로아세테이트를 포함한다. 나노구조체를 형성하기 위해 은 또는 구리 공급원과 반응될 수 있는 환원제는 글루코오스, 아스코르브산, 나트륨 보로하이드라이드, 및 폴리머의 알칼리성 용액 (예를 들면 pH 7.5 초과) 예컨대 PVP를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 환원제는 아스코르브산이다. 은 나노구조체 또는 구리 나노구조체의 원하는 형태 및 광학적 스펙트럼 피크는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 바와 같이 반응물의 비 또는 농도 조정에 의해 획득될 수 있다. 단지 예로써, 고 농도의 환원제는 오각형- 및 쌍뿔-형상화된 나노구조체를 초래할 수 있고, 반면에 저 농도의 환원제는 신장된 나노와이어 또는 튜브를 초래할 수 있다. 나노구조체의 특정 형태에 따라, 은 또는 구리 나노구조체를 포함하는 제2 용액은 약 550 nm 내지 약 1000 nm, 약 600 nm 내지 약 700 nm, 약 630 nm 내지 약 680 nm, 약 750 nm 내지 약 850 nm, 약 900 nm 내지 약 940 nm, 약 580 nm 내지 약 620 nm, 또는 약 550 nm 내지 약 750 nm의 피크 흡광도를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 은 나노구조체를 포함하는 제2 용액은 약 600 nm (즉 595 nm 내지 605 nm, 포함적인)의 피크 흡광도를 갖는다. 일부 구현예에서, 구리 나노구조체를 포함하는 제2 용액은 약 585 nm (즉 580 nm 내지 590 nm, 포함적인)의 피크 흡광도를 갖는다. 일부 구현예에서 구리 나노구조체를 포함하는 용액의 피크 흡광도는 유사한 크기 및 형태의 은 나노구조체를 포함하는 용액의 피크 흡광도보다 더 크다 (즉 적색-시프트된다).

[0068] 일부 구현예에서, 제2 용액으로 제1 용액의 배양 기간은 적어도 12 시간이다. 다른 구현예에서, 제2 용액으로 제1 용액의 배양 기간은 24 시간 초과, 바람직하게는 48 시간 초과, 더욱 바람직하게는 적어도 72 시간이다. 반응 혼합물의 피크 흡광도에서 변화는 따라서 배양 시간을 조정하기 위해 배양 기간 동안 모니터링될 수 있다.

예를 들어, 더 짧은 파장에 대한, 예를 들어 520 nm 내지 550 nm 영역 피크에서 흡광도의 시프트는 금-코팅된 나노구조체가 안정화되는 것을 표시할 수 있다. 특정 구현예에서, 나트륨 클로라이드 (예를 들면, 0.25-1M)에 대한 수득한 나노구조체의 안정성은 나노구조체의 적절한 코팅물을 표시하기 위해 사용된다.

[0069] 특정 구현예에서, 본 발명은 약 50/mL 초과의 광학적 밀도를 갖는 나노구조체 합성 방법을 제공한다. 한 구현예에서, 상기 방법은 본원에서 기재된 바와 같이 폴리머를 염화금산과 혼합하는 단계, 제1 시기 동안 세트 온도에서 혼합물을 교반하는 단계, 혼합물에 아스코르브산을 부가하는 단계, 및 제2 시기 동안 혼합물을 배양하는 단계를 포함한다. 나노구조체의 크기 및 형태는 폴리머 대 염화금산의 농도 비 및 온도 및 배양 시간에 의해 지시된다. 폴리머 및 염화금산의 농도는 상기 기재된 범위일 수 있다. 온도는 원하는 나노구조체의 크기 및 형태에 기반되어 조정될 수 있지만, 그러나 약 4°C 내지 약 100°C의 범위일 수 있다. 유사하게, 배양 기간 (즉 제1 시기)은 나노구조체의 원하는 특성에 기반되어 조정될 수 있지만, 그러나 약 15 분 내지 1 일 범위일 수 있다.

[0070] 일부 구현예에서, 아스코르브산 (예를 들면 약 1 내지 5 M)의 약 0.1 내지 1 부가 제1 배양 기간 이후 혼합물에 부가된다. 아스코르브산의 부가 이후 제2 배양 기간은 약 1 내지 약 24 시간일 수 있다. 이론에 구속됨이 없이, 아스코르브산의 부가는 생산된 나노구조체의 양의 실질적인 증가를 제공한다.

[0071] 특정 구현예에서, 상기 방법은 추가로 약 1 내지 약 100 부의 금 클로라이드 (예를 들면 약 0.001 M 내지 1M) 또는 은 니트레이트 (예를 들면 약 0.001 M 내지 1M) 또는 다른 금속 (예를 들면 귀금속, 전이 금속, 알칼리 금속, 또는 란탄계열)과 혼합물 부가 또는 도핑을 포함한다. 상기 도핑 단계는 수득한 나노구조체의 공명 세기를 추가로 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 금 클로라이드, 은 니트레이트, 또는 다른 금속은 혼합물에 부가된 다음 아스코르브산이 반응에 부가된다. 다른 구현예에서, 금 클로라이드, 은 니트레이트, 또는 다른 금속은 혼합물에 부가된 다음 아스코르브산이 부가된다. 금속 및 아스코르브산의 부가 순서는 원하는 형태 및 크기로 수득한 나노구조체를 재단하기 위해 조정될 수 있다.

[0072] 본 발명은 제한으로서 해석되지 않아야 하는 하기 추가의 실시예에 의해 추가로 예증된다. 당해 분야의 숙련가는, 본 개시내용에 비추어, 개시되는 특이적 구현예에 많은 변화가 있을 수 있고 그리고 본 발명의 정신 및 범위에서 이탈 없이 비슷한 또는 유사한 결과를 또한 수득할 수 있음을 인식해야 한다.

[0073] 본 개시내용 전반에 걸쳐 참조된 모든 특허 및 비-특허 문서는 본원에서 그 전체가 다목적으로 참고로 편입된다.

[0074] 실시예

실시예 1. 금 나노입자-콘주케이트된 분석물로 LSPR 신호의 증폭

[0076] 분석물 검출 시스템은 금 나노층 필름이 증착된 플라스틱 칩을 제공함으로써 제조되었다. 인간 IgG 단백질 (100 μ g/ml)을 금 나노층 필름에 고정화하여 센서 표면을 창출하였다. 금 나노층 필름에 소 혈청 알부민을 고정화함으로써 콘트롤 센서를 구성하였다. 금 나노층 표면 상에서 광을 빛내고 역으로 표면으로부터 반사된 광을 수집하는 발광 및 광 수집 센서가 구비된 기기 내에 센서 표면의 2 유형을 배치시켰다.

[0077] 자유 단백질 A (10 μ g/ml)를 함유하는 샘플을 2 유형의 센서 표면과 접촉시켰고 그리고 반사율 스펙트럼에서 변화를 측정하였다. 도 1에서 보이는 바와 같이, 고정화된 인간 IgG를 함유하는 센서에 대한 자유 단백질 A의 도입은 피크 파장에서 시프트에 의해 측정된 바와 같이 금 나노층 필름의 반사율 스펙트럼에서 유의미한 가시적인 변화를 생산하지 않는다.

[0078] 1 mM 염산으로 처리에 의해 센서 표면을 재생하였고 그리고 2개의 상이한 농도 (3.5 μ g/ml 및 0.175 μ g/ml)로 콜로이드성 금 나노입자 (CGC)에 콘주케이트된 단백질 A를 함유하는 샘플을 센서 표면과 접촉시켰다. 단백질 A (즉 표적 분석물)을 콜로이드성 금 나노입자에 콘주케이트한 경우 금 나노층 표면의 반사율 스펙트럼에서 변화를 강조하였다. 특이적으로, 3.5 μ g/ml의 단백질 A-CGC는 10 μ g/ml의 비표지된 단백질 A보다 피크 파장에서 더 큰 시프트를 생산하였다. 참고 도 1, 센서 2. 플라즈몬 공명 신호의 증폭은 단백질 A-CGC의 나노그램 농도의 검출을 가능하게 하기 위해 충분히 컸다. 참고 도 1, 센서 3. BSA 센서의 반사율 스펙트럼에서 변화는 센서 표면에 대한 단백질 A 분자의 비-특이적 결합을 나타내고 고정화된 IgG 분자에 대한 단백질 A 분자의 특이적 결합에 의해 유도된 변화보다 유의미하게 더 작다.

[0079] 이 초기 실험의 결과는 금속성 나노층 표면에서 결합 이벤트에 의해 유도된 국소화된 표면 플라즈몬 공명 신호에서 변화의 상당한 증폭이 콜로이드성 금 나노입자에 대한 표적 분석물의 커플링에 의해 달성될 수 있음을 보여준다. 민감성에서 거의 60-배 개선이 검출된 분석물의 나노그램 양으로 관측된다.

[0080] 실시예 2. 샌드위치 검정에서 LSPR 신호의 증폭

본 실시예는 표적 분석물이 금 나노입자에 직접적으로 콘주게이트되지 않는 샌드위치 검정 포맷에서 금 나노입자 콘주게이트로 국소화된 표면 플라즈몬 공명 신호의 증폭이 또한 달성될 수 있는지를 평가하기 위해 설계된 일련의 실험을 기재한다. 금 나노층 칩 표면을 실시예 1에서 기재된 바와 같이 제조하였다. C-반응성 단백질 (CRP) ($100 \mu\text{g/mL}$)에 대한 C7 항체를 칩 표면 상에서 증착된 금 나노층 필름에 고정화시켜 항-CRP 센서를 창출하였다. C7 항체보다 CRP의 상이한, 비-중첩 애피토프를 인식하는, C6 항체는 일부 실험을 위하여 콜로이드성 금 나노입자 (C6-CGC)에 콘주게이트되었거나 또는 다른 실험을 위하여 비표지된 형태로 사용되었다.

제1 일련의 실험에서, CRP의 3개의 상이한 농도 (1 ng/mL , 10 ng/mL , 또는 100 ng/mL)중 하나를 함유하는 샘플 15 내지 20 분 동안 항-CRP 센서로 배양시켰고 그리고 금 나노층의 반사율 스펙트럼에서 변화를 모니터링하였다. 도 2에서 보이는 바와 같이, 센서 표면 상에서 고정화된 C7 항-CRP 항체에 대한 CRP의 결합시 가장 최소 피크 시프트를 관측하였다. 비표지된 C6 항-CRP 항체 ($1 \mu\text{g/mL}$)에 대한 센서 표면의 후속 노출은 유의미한 추가로 피크 시프트를 초래하지 않았다. 참고 도 2. 유사하게, $3 \mu\text{g/mL}$ 의 C6-CGC까지 센서 표면의 후속 노출은 반사율 스펙트럼에서 임의의 추가 변화를 생산하지 않았고, 결합된 CRP 분자가 비표지된 C6 항체로 유사하게 포화되었음을 표시한다. 참고 도 2.

제2 일련의 실험에서, CRP의 3개의 상이한 농도 (1 ng/mL , 10 ng/mL , 또는 100 ng/mL)중 하나를 함유하는 샘플을 15 내지 20 분 동안 항-CRP 센서로 배양시켰다. C6-CGC의 2개의 상이한 농도 ($1 \mu\text{g/mL}$ 및 $3 \mu\text{g/mL}$)를 그 뒤에 도입하였고 그리고 반사율 스펙트럼에서 변화를 측정하였다 (도 3 및 4A). 그 결과는 금 나노입자에 대한 C6 항-CRP 항체의 칸주게이션이 비표지된 C6 항체와 비교시 피크 파장 시프트를 증폭시킴을 보여준다. C6-CGC의 농도 증가는 피크 파장에서 용량-의존적 시프트를 생산한다. 그러나, 1 ng/mL 와 10 ng/mL 사이에서 신호 차이는 작았다 (도 4B).

제3 일련의 실험에서, 신호 개발에 관한 분석물 배양 시간의 효과를 평가하였다. 항-CRP 센서를 0 ng/mL , 10 ng/mL , 또는 100 ng/mL CRP를 함유하는 샘플과 접촉시켰고 그리고 임의의 분석물 배양 시간 또는 세정 없이 $3 \mu\text{g/mL}$ C6-CGC를 즉시 도입하였다. 도 5 및 6에서 보이는 바와 같이, 더 짧은 분석물 배양 시간이 더 작은 피크 파장 시프트를 초래한다.

이들 3 세트의 실험 결과는 LSPR 신호의 증폭이 샌드위치 검정 포맷에서 금 나노입자 콘주게이트로 달성될 수 있음을 보여준다. 검출기 항체가 비표지된 항체와 비교시 콜로이드성 금 입자로 표지된 경우 향상된 신호 시프트가 관측되고, 그렇게 함으로써 분석물의 나노그램 농도의 검출을 허용한다.

[0086] 실시예 3. 금-코팅된 은 나노구조체로 향상된 신호 증폭

결합 상대를 표지하기 위해 사용된 금속의 유형이 LSPR 신호의 증폭에 영향을 미쳤는지를 조사하기 위해, 복합 금속 나노구조체를 제조하였다. 특이적으로, 금-코팅된 은 나노구조체를 아래와 같이 제조하였다. 실온에서 격렬하게 교반하면서 50.0 mL 의 탈이온화된 H_2O , $500.0 \mu\text{L}$ 트리나트륨 시트레이트 (75mM), $200 \mu\text{L} \text{AgNO}_3$ (200mM), 및 $500.0 \mu\text{L} \text{H}_2\text{O}_2$ (27%) 부가에 의해 은 나노구조체를 제조하였다. 밝은 황색까지 색상 변화를 야기하는 수용액 속으로 $500 \mu\text{L}$ 분취량의 NaBH_4 (200mM)을 그 다음 빠르게 주사하였다. 수 분의 기간에 걸쳐 색상은 농황색에서 적색까지 자주색까지 계속해서 변화하였고 마지막으로 청색에서 안정화되었다. UV/Vis 스펙트럼은 용액의 피크 흡광도를 604.5 nm 임을 결정하였다.

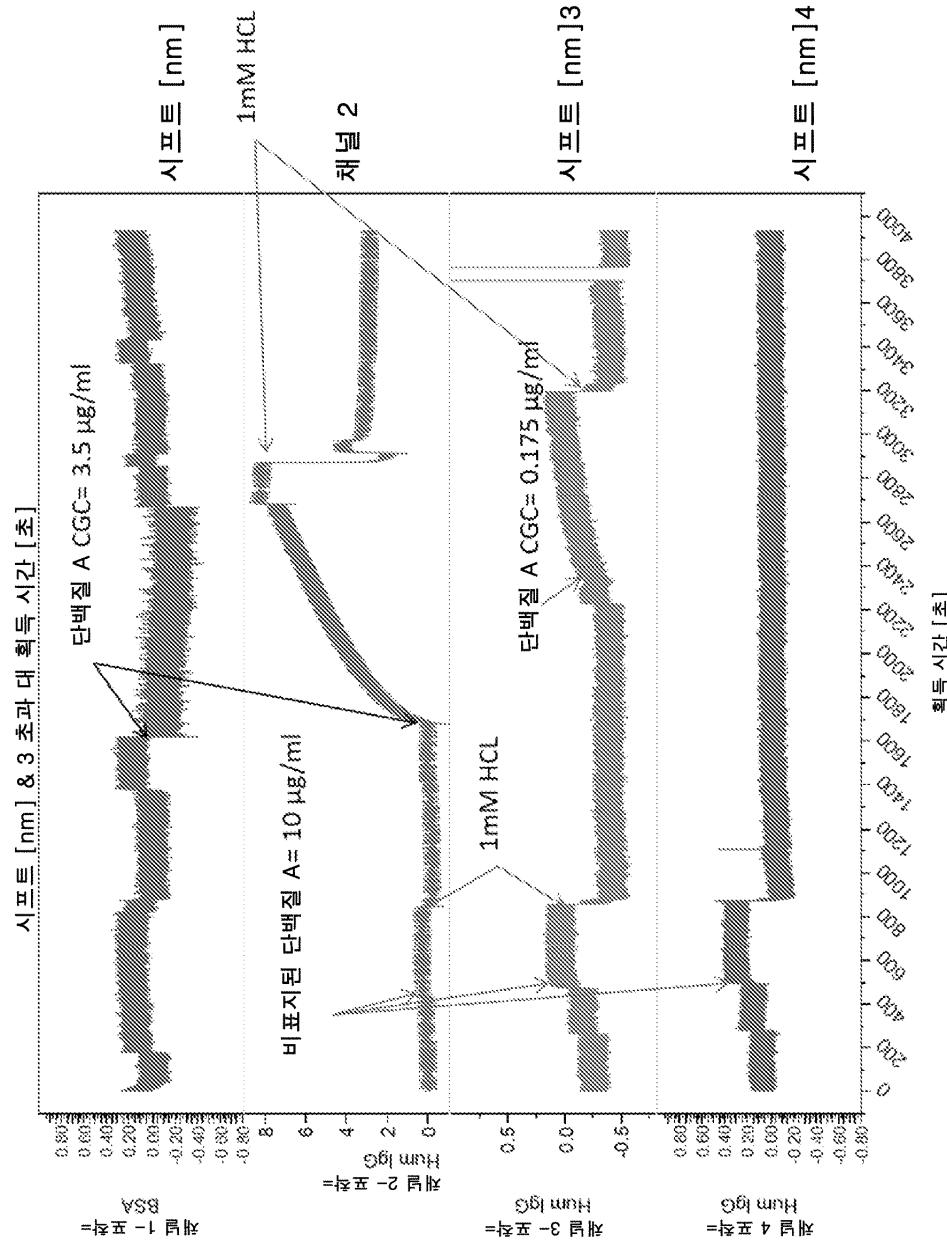
$50 \mu\text{L}$ 의 폴리비닐피롤리돈 (PVP MW ~ $10,000$ 에탄올내 20%)와 $50 \mu\text{l}$ 의 HAuCl_4 (20mM)의 혼합물에 5.0 mL 의 청색 용액을 부가함으로써 금 코팅물을 은 나노구조체에 부가하였다. 72 시간의 배양 시간 이후 샘플은 암적색 색상이 되었고 534.5 nm 에서 피크 흡광도를 가졌다. 나노입자를 $20,000 \text{ rpm}$ 에서 20 분 동안 원심분리에 의해 2 회 세정하였고 2.0 mL 의 탈이온화된 H_2O 에서 재현탁시켰다. 용액은 다흥색 색상, 530.3 nm 에서 흡광도 피크, 및 15.0 OD 유니트의 총 흡광도를 가졌다.

C6 항-CRP 항체에 대한 금-코팅된 은 나노구조체 (Au@AgNPs)의 칸주게이션은 $17.8 \mu\text{g/mL}/\text{OD}$ 까지 최종 항체 농도가 되게 하는 $880.0 \mu\text{L}$ 탈이온화된 H_2O 에 $600.0 \mu\text{L}$ 의 Au@AgNPs 및 $20.0 \mu\text{L}$ C6 항-CRP 항체 (8.0 mg/mL)를 부가시킴으로써 수행되었다. 4°C 에서 2 시간 배양 시간 이후, 샘플을 $30,000\text{g}$ 에서 20 분 동안 원심분리시켰고 PBS내 BSA (10 mg/mL)를 함유하는 1.5 mL 의 블록킹 용액에서 재현탁시켰다. 항-CRP C6 항체에 콘주게이트된 Au@AgNPs 는 추가 사용 때까지 4°C 에서 보관되었다.

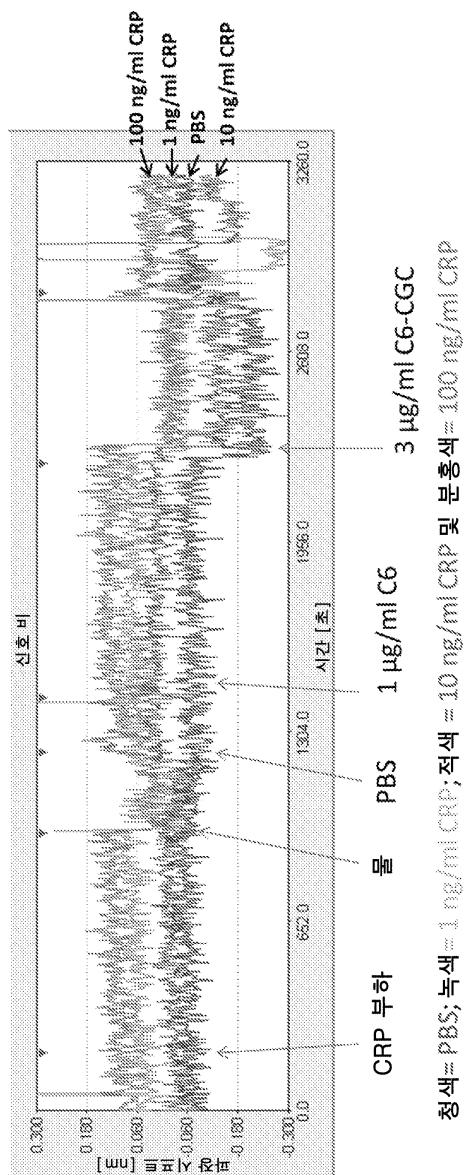
- [0090] 항-CRP 금 나노층 센서는 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조되었고 530nm에서 피크 흡광도를 가졌다. 임의의 고 정화된 항체 없이 금 나노층을 함유하는 콘트롤 센서를 또한 제조하였다. 센서를 100 μ L PBS로 평형화하였다.
- [0091] PBS에서 1.5 OD까지 희석된 Au@AgNPs에 콘주게이트된 100 μ L C6 항-CRP 항체는 1 분 동안 1, 10, 또는 500 pg/mL CRP 항원으로 예비혼합시켰다. 혼합물을 그 다음 항-CRP 또는 콘트롤 센서 표면과 접촉시켰고 그리고 금 나노층 표면의 반사율 스펙트럼에서 변화를 측정하였다. 그 결과는 금-코팅된 은 나노구조체가 센서 표면에 대한 CRP-항체 복합물의 결합에 의해 유도된 피크 파장 시프트를 향상시켰음을 보여준다 (도 7). CRP 항원의 1 pg/mL의 검출은 금-코팅된 은 나노구조체로 가능하였고, 이는 금 나노입자로 수득된 것과 비교시 민감성에서 1000-배 개선이다. 항원의 고 농도에서 결합 부위를 포화시키고 추가 시프트가 발생하지 않는다.
- [0092] 이 실험의 결과는 복합 나노구조체, 예컨대 금-코팅된 은 나노구조체가 분석물 결합 상대를 표지하기 위해 사용된 경우 금속성 나노층 표면으로부터 LSPR 신호의 유의미하게 향상된 증폭이 달성하였음을 증명한다.
- [0093] **실시예 4. 높은 광학적 밀도 나노구조체의 합성**
- [0094] 표시된 순서: 0.1 mL의 1% PVP-10 (1% wt/wt), 0.2 mL의 0.1M 금 클로라이드, 0.1 mL의 5N NaOH, 0.4 mL의 물 및 0.2 mL의 1M 아스코르브산으로 1 mL의 최종 용적에서 하기 시약을 혼합시킴으로써 금 나노입자를 제조하였다. 반응 혼합물을 각 부가 이후 혼합시켰다. 분광 측정은 반응이 실온에서 24 시간 이후 주로 완벽하였음을 표시하였다. 이 프로토콜은 535 nm 부근의 LSPR 피크 및 약 80/mL의 상응하는 광학적 밀도를 나타내는 구형 금 나노입자를 수득하였다. 추가의 금 또는 은으로 계층화는 미리형성된 금 나노입자에 은 니트레이트 또는 금 클로라이드를 부가함으로써 수행된다. 1-2 시간 동안 30,000 g에서 원심분리에 의해 파인의 시약을 제거하였다.
- [0095] 독립된 반응으로, 0.05 mL의 20% PVP (wt/wt)를 0.25 mL 물, 0.1 mL의 5N NaOH, 0.1 mL의 1 M 나트륨 시트레이트, 0.5 mL의 0.1M 금 클로라이드 및 1 mL의 1M 아스코르브산과 혼합시켰다. 이 프로토콜은 ~525 nm에서 LSPR 피크로 약 90/mL의 OD에서 콜로이드성 금 입자의 즉시 형성을 초래하였다. 선형 관련성은 최종 반응 혼합물에서 2.5 mM 금과 25 mM 금 사이의 금의 농도와 최종 OD 사이에서 관측되었다.
- [0096] 특정 방법론, 프로토콜 및 물질이 다양할 수 있음에 따라 개시된 발명이 이들에 제한되지 않음이 이해된다. 본 원에서 사용된 용어가 단지 특정 구현예 기재의 목적을 위한 것이고 첨부된 청구항에 의해 단지 제한될 본 발명의 범위를 제한할 의도가 아님이 또한 이해된다.
- [0097] 당해 분야의 숙련가는 불과 일상적인 실험과정을 이용하여 본원에서 기재된 본 발명의 특이적 구현예에 대한 많은 등가물을 인식할 것이거나, 또는 확인할 수 있다. 상기 등가물은 하기 청구항에 의해 포함되는 의도이다.

도면

도면1

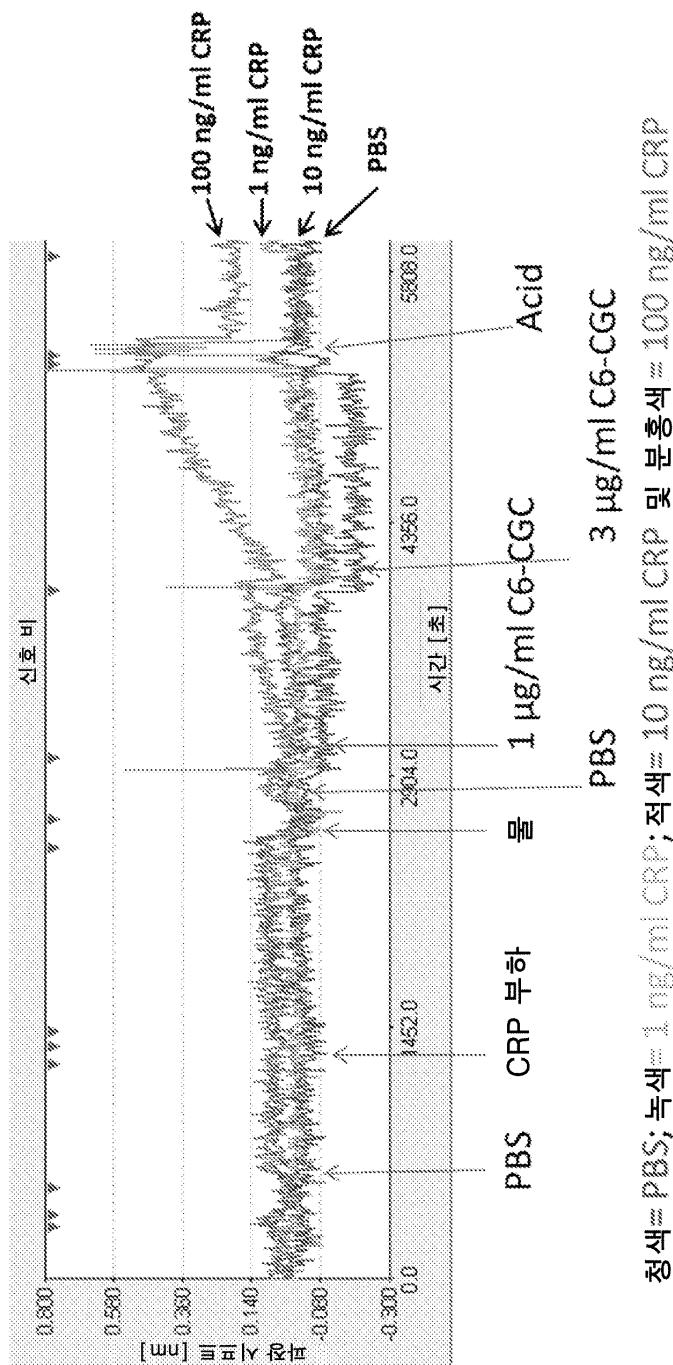


도면2



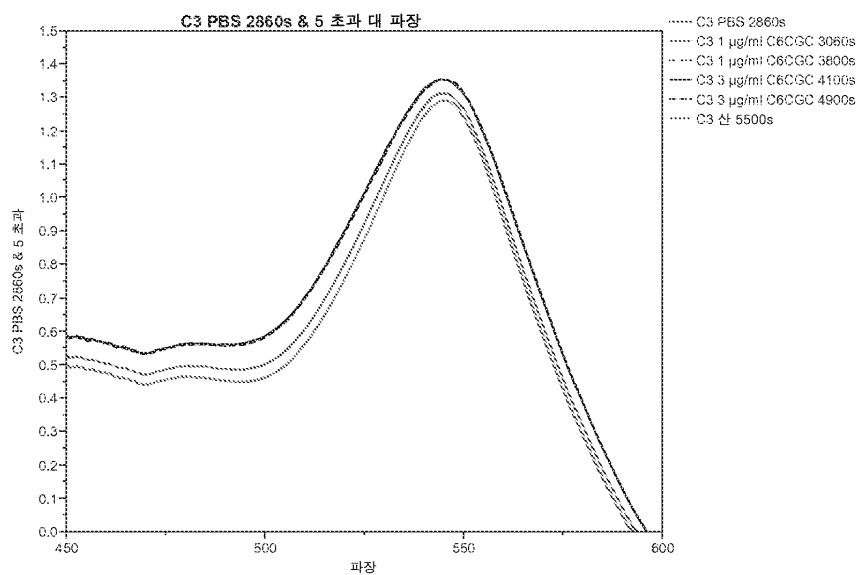
청색 = PBS; 뉴胭 = 1 ng/ml CRP; 적색 = 10 ng/ml CRP 및 분홍색 = 100 ng/ml CRP

도면3

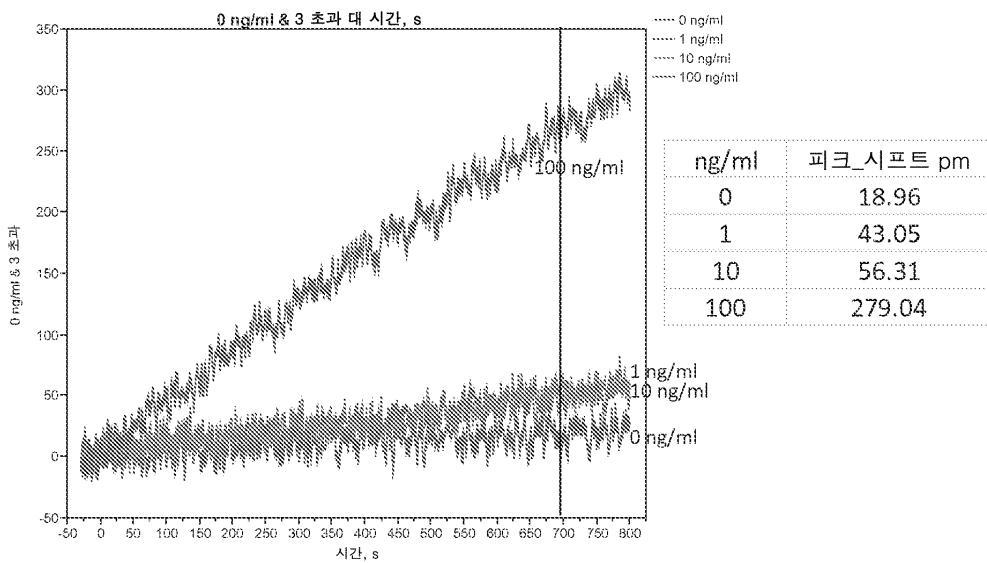


도면4

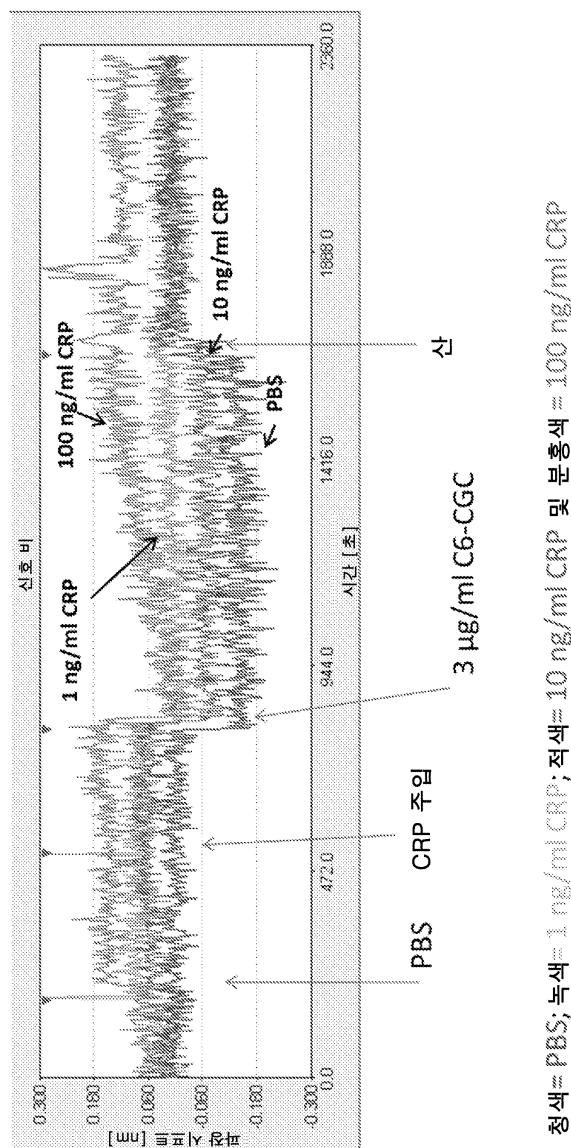
A



B

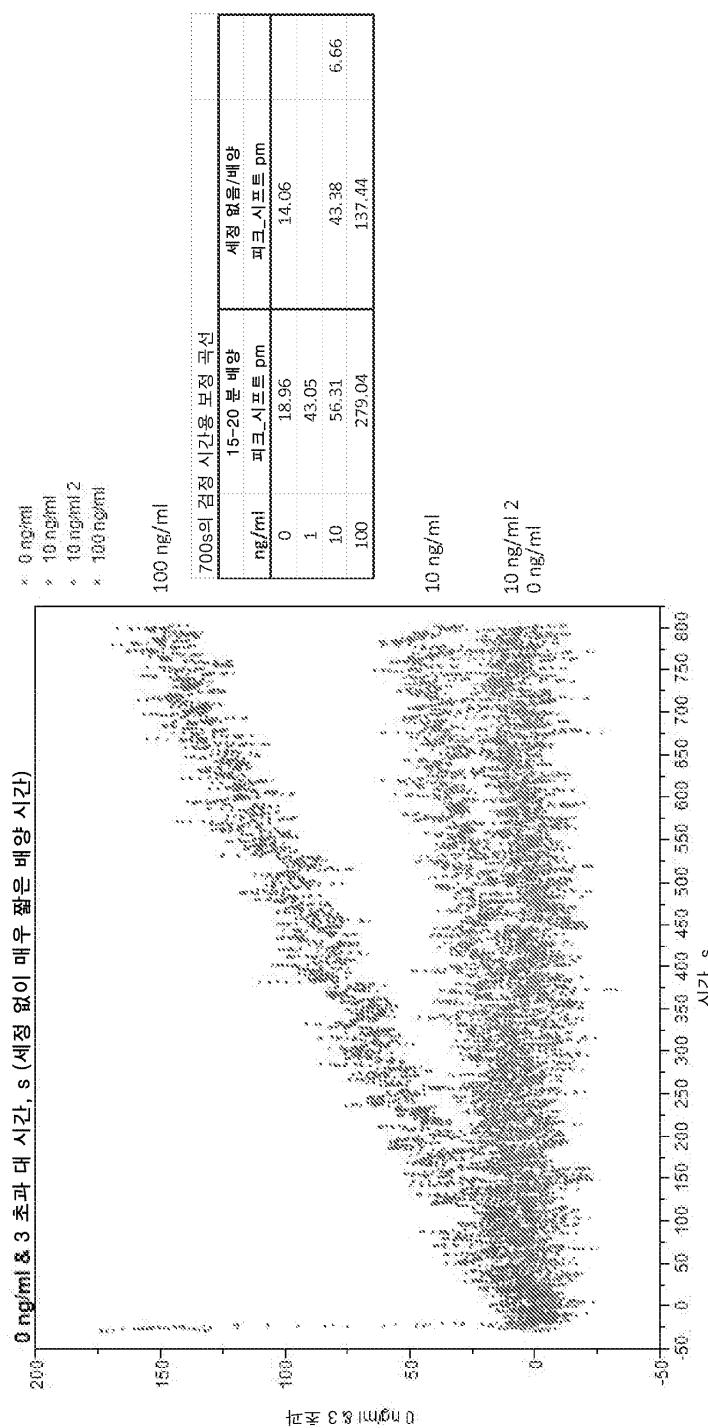


도면5



청색= PBS; 녹색= 1 ng/ml CRP; 적색= 10 ng/ml CRP 및 분홍색= 100 ng/ml CRP

도면6



도면7

