(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년04월10일
(11) 등록번호 10-1383830
(24) 등록일자 2014년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/48 (2006.01) *G01N 33/483* (2006.01)
C12Q 1/66 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0011993
(22) 출원일자 2013년02월01일
심사청구일자 2013년02월01일
(56) 선행기술조사문헌
[논문1] NANOTECHNOLOGY (2012)
WO2011153962 A1
[논문2] ACSNANO (2011)
[논문3] NANOLETTER (2009)

(73) 특허권자
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울 용산구 서빙고로 35, 103동 603호 (한강로3가, 용산시티파크1단지아파트)
최지현
인천 부평구 부일로113번길 11, 101동 709호 (부개동, 대동아파트)
김경준
경기 성남시 분당구 중앙공원로 20, 428동 2603호 (서현동, 현대아파트)
(74) 대리인
양부현

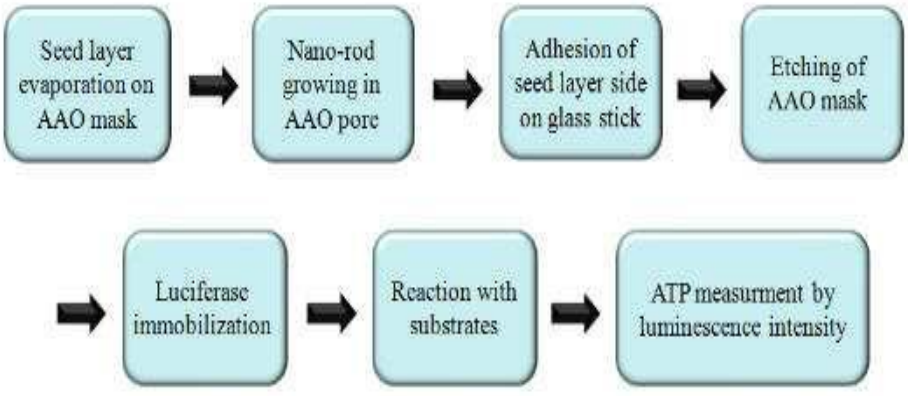
전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 김민석

(54) 발명의 명칭 **ATP 검출용 센서**

(57) 요 약

본 발명은 (a) 기판; (b) 상기 기판 상에 나노 패턴을 갖는 Au/Ag 이중층; 및 (c) 상기 나노 패턴에 고정된 루시퍼라제(luciferase)를 포함하는 ATP(Adenosine Triphosphate) 검출용 센서를 제공한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 ATP 검출용 센서는 사용이 용이하고 우수한 재현성을 갖으며, 기계적 강도 및 형태를 유지할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2008-H01-026
부처명 지식경제부
연구사업명 전략기술인력양성사업
연구과제명 융합바이오인력양성사업
기 여 율 1/2
주관기관 서강대학교
연구기간 2008.09.01 ~ 2013.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012-0000163
부처명 교육과학기술부
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 나노 신경줄기세포 전자칩 기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 서강대학교
연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 기판; (b) 상기 기판 상에 나노 패턴의 표면을 갖는 Au층을 포함하는 Au/Ag 이중층; 및 (c) 상기 나노 패턴에 고정된 루시퍼라제(luciferase)를 포함하는 ATP(Adenosine Triphosphate) 검출용 센서.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 기판은 금속, 금속 옥사이드, 유리, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO_2 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스인 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 Au/Ag 이중층은 Au 층 및 Ag 층이 증착된 이중층 형태인 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 나노 패턴은 나노브러쉬(nanobrush), 나노메쉬(nanomesh), 나노튜브(nanotube), 나노리본(nanoribbon), 나노폼(nanofoam) 또는 나노월(nanowall)인 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 나노 패턴은 나노브러쉬 패턴인 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 나노 패턴은 AAO(Anodic Aluminum Oxide)를 Au/Ag 이중층의 Au 면에 증착하여 Au 전기도금을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 Au/Ag 이중층은 1 ㎚ 내지 100 ㎚ 두께의 Au 층 및 0.1 ㎛ 내지 10 ㎛의 Ag 층으로 구성되는 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 루시퍼라제는 상기 나노 패턴에 아민기를 통해 고정되는 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 ATP(Adenosine Triphosphate) 검출용 센서의 제조방법:

(a) 양극산화알루미늄(Anodic Aluminum Oxide)을 Au/Ag 이중층의 Au 면에 증착하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)의 결과물을 금(Au) 전기도금하여 나노 패턴을 제조하는 단계;

(c) 상기 단계 (b)의 결과물을 PDMS(Polydimethylsiloxane)를 이용하여 기판 상에 고정하는 단계;

(d) 상기 단계 (c)의 결과물의 양극산화알루미늄을 에칭(etching)하는 단계; 및

(e) 상기 나노 패턴에 루시퍼라제를 고정하는 단계.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 Au/Ag 이중층은 Au 층 및 Ag 층이 증착된 이중층 형태인 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서의 제조방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 Au/Ag 이중층은 1 ㎚ 내지 100 ㎚ 두께의 Au 층 및 0.1 ㎛ 내지 10 ㎛의 Ag 층으로 구성되는 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서의 제조방법.

청구항 12

제 9 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 나노 패턴은 나노브러쉬(nanobrush), 나노메쉬(nanomesh), 나노튜브(nanotube), 나노리본(nanoribbon), 나노폼(nanofoam) 또는 나노월(nanowall)인 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서의 제조방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 나노 패턴은 나노브러쉬 패턴인 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서의 제조방법.

청구항 14

제 9 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 기판은 금속, 금속 옥사이드, 유리, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO_2 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스인 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서의 제조방법.

청구항 15

제 9 항에 있어서, 상기 단계 (e)의 루시퍼라제는 상기 나노 패턴에 아민기를 통해 고정되는 것을 특징으로 하는 ATP 검출용 센서의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 ATP 검출용 센서에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이오센서는 효소 반응, DNA 결합 또는 항원-항체 상호작용과 같은 생물학적 기작에 의해 특정 분석물질을 검

출하는 디바이스이다(1-4). 바이오센서는 바이오수용기(bioreceptor) 및 변환기(transducer)로 구성된다. 바이오수용기는 분석물질과 특이적인 생물학적 반응을 일으키는 생체분자이고, 변환기는 생물학적 신호를 전기적 신호로 전하는 매개체이다.

[0003] 다양한 방식의 바이오 센싱 방법이 있다. 대표적인 바이오 센싱 방법은 PCR, ELISA 등으로, 이러한 방법은 높은 특이성 및 민감성을 갖는 장점이 있다. 그러나, 이러한 방법은 복잡한 과정, 많은 시약, 긴 소요시간 및 비 라벨-프리와 같은 단점을 갖는다.

[0004] 바이오센서는 진단, 약물 품질관리, 생물학적 무기 검출 및 수 처리와 같은 다양한 분야에 적용될 수 있다. 이러한 분야에서, 혈중 병원체, 수중 박테리아 또는 시료 내 항원과 같은 목적하는 분석물질은 바이오센서의 생물학적 수용기에 의해 포획되고 생물학적 신호를 생성한다. 이 신호는 변환기에 의해 전기적 신호로 변환된다.

[0005] 바이오센서의 중요성은 점점 커지고 있으며, 바이오센서 시장도 적용 분자의 확대에 따라 증가하는 추세이다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 우수한 재현성 및 용이성을 갖는 ATP(Adenosine Triphosphate) 검출용 센서를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 나노패턴을 갖는 Au/Ag 이중층을 기판에 고정하고 상기 나노패턴에 발광 효소를 고정하여 ATP 검출용 센서를 제조하는 경우, 기계적 강도와 형태를 유지하는 ATP 검출용 센서로 최대 3회까지 최고 활성을 나타내는 재현성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 ATP 검출용 센서를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 ATP 검출용 센서의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 기판; (b) 상기 기판 상에 나노 패턴을 갖는 Au/Ag 이중층; 및 (c) 상기 나노 패턴에 고정된 루시퍼라제(luciferase)를 포함하는 ATP(Adenosine Triphosphate) 검출용 센서를 제공한다.

[0012] 본 발명자들은 우수한 재현성 및 용이성을 갖는 ATP(Adenosine Triphosphate) 검출용 센서를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 나노패턴을 갖는 Au/Ag 이중층을 기판에 고정하고 상기 나노패턴에 발광 효소를 고정하여 ATP 검출용 센서를 제조하는 경우, 기계적 강도와 형태를 유지하는 ATP 검출용 센서로 최대 3회까지 최고 활성을 나타내는 재현성을 확인하였다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 기판은 유리, 금속, 금속 옥사이드, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO_2 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 기판은 유리, 금속 또는 금속 옥사이드이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 기판은 유리이다.

[0014] 본 발명의 특징 중 하나는 상기 기판 상에 나노 패턴을 갖는 Au/Ag 이중층을 갖는 것이다.

[0015] 본 명세서에서 용어 '나노 패턴을 갖는 Au/Ag 이중층' 은 Au 층 및 Ag 층이 증착된 이중층 형태로, Au 층 표면에 나노 패턴을 갖는다. 상기 나노 패턴의 크기 및 모양은 균일 또는 불균일할 수 있으며, 미세한 엠보싱 구조를 형성하여 기판 표면적을 극대화할 수 있는 것이라면 그 모양 및 크기에 제한 없이 사용될 수 있다. 상기 나노패턴의 직경은 1 ㎚ 내지 500 ㎛일 수 있으며, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 나노패턴의 직경은 50 ㎚ 내지 900 ㎚이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 나노패턴의 직경은 50 ㎚ 내지 500 ㎚이다. 나노패턴의 직경이 지나치게 큰 경우 기판 상부의 표면적을 극대화 효과가 줄어들게 되므로 바람직하지 않다. 상기 나노 패턴은 수 ㎛의 엠보싱 구조를 갖는 그레이 바운더리구조 또한 가질 수 있으며, 이 경우 나노 패턴이 이중으로 형성되어 표면적 극대화 효과가 가중된다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 나노 패턴은 나노브러쉬(nanobrush), 나노메쉬(nanomesh), 나노튜브(nanotube), 나노리본(nanoribbon), 나노폼(nanofoam) 또는 나노월(nanowall)이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 나노 패턴은 나노브러쉬, 나노메쉬 또는 나노튜브이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 나노 패턴은 나노브러쉬이다.

[0017] 상기 '나노 패턴을 갖는 Au/Ag 이중층' 은 AAO(Anodic Aluminum Oxide)를 Au/Ag 이중층의 Au 면에 증착하여 Au 전기도금을 통해 제조할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 Au/Ag 이중층은 1 ㎚ 내지 100 ㎚ 두께의 Au 층 및 0.1 ㎛ 내지 10 ㎛의 Ag 층으로 구성되고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 Au/Ag 이중층은 3 ㎚ 내지 60 ㎚ 두께의 Au 층 및 0.3 ㎛ 내지 6 ㎛의 Ag 층으로 구성되고, 본 발명의 특정 구현예에 상기 Au/Ag 이중층은 6 ㎚ 내지 30 ㎚ 두께의 Au 층 및 0.6 ㎛ 내지 3 ㎛의 Ag 층으로 구성된다.

[0019] 본 발명의 주요한 특징 중 하나는 상기 Au/Ag 이중층의 나노패턴에 고정된 루시퍼라제를 갖는 것이다.

[0020] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 나노 패턴에 루시퍼라제를 고정하기 위해, 기판을 알코올에 용해된 10 mM MHS 용액에서 밤새 반응하고, EDC 및 NHS 수용액에 담그는 반응을 통해 아민기를 생성하여 루시퍼라제를 고정한다. 상기 루시퍼라제는 나노 패턴의 모든 면에 고정될 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 ATP(Adenosine Triphosphate) 검출용 센서의 제조방법을 제공한다:

[0022] (a) 양극산화알루미늄(Anodic Aluminum Oxide)에 Au/Ag 이중층의 Au 면에 증착하는 단계;

[0023] (b) 상기 단계 (a)의 결과물을 금(Au) 전기도금하여 나노 패턴을 제조하는 단계;

[0024] (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 PDMS(Polydimethylsiloxane)를 이용하여 기판 상에 고정하는 단계;

[0025] (d) 상기 단계 (c)의 결과물의 양극산화알루미늄을 에칭(etching)하는 단계; 및

[0026] (e) 상기 나노 패턴에 루시퍼라제를 고정하는 단계.

[0027] 본 발명의 ATP 검출용 센서의 제조방법은 상기 ATP 검출용 센서와 유사하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0029] (a) 본 발명은 ATP(Adenosine Triphosphate) 검출용 센서 및 그의 제조방법을 제공한다.

[0030] (b) 본 발명은 사용이 용이하고 우수한 재현성을 갖는 ATP 검출용 센서를 제공한다.

[0031] (c) 본 발명은 기계적 강도 및 형태를 유지할 수 있는 ATP 검출용 센서를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 발명의 ATP 검출용 센서의 제조과정을 도표로 나타낸다.

도 2는 ATP 검출용 센서의 나노 패턴을 제조하는 과정을 나타낸다.

도 3은 ATP 검출용 센서의 나노 패턴을 갖는 Au/Ag 이중층을 기판에 고정하는 과정을 나타낸다.

도 4는 ATP 검출용 센서의 나노 패턴을 갖는 Au/Ag 이중층에 루시퍼라제를 고정하는 과정을 나타낸다.

도 5는 ATP 검출용 센서에 ATP를 접촉하여 발광을 측정하는 과정을 나타낸다.

도 6은 금 전기도금 시 전하와 나노브러쉬의 높이의 관계를 나타낸다. 도 6a는 내지 도 6f는 각각 , 0.1 C, 0.2 C, 0.3 C, 0.4 C 및 0.5 C(coulomb)에 대한 나노브러쉬의 SEM 이미지를 나타낸다.

도 7은 금 전기도금 시 전하와 나노브러쉬의 높이의 관계를 나타낸다. 전하가 증가할수록 나노브러쉬의 길이가 증가하는 정적 상관관계를 갖는다.

도 8은 0.3 C의 전하에 대한 에칭 후의 나노브러쉬의 SEM 이미지를 나타낸다.

도 9는 나노브러쉬의 로드의 평균 길이 및 로드 간의 평균 거리를 나타낸 그래프이다.

도 10은 루시퍼라제를 나노브러쉬에 고정화한 후 SERS 스펙트라를 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 11은 ATP 검출용 센서에 ATP를 접촉하여 측정한 발광 스펙트라를 나타낸다.

도 12는 ATP 농도에 대한 발광 정도를 나타낸 그래프이다.

도 13은 ATP 검출용 센서의 재현성을 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0034] **실시예**

[0035] **실험재료**

[0036] 초파리(*Photinus pyralis*)의 루시퍼라제(luciferase), ATP(Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate), D-루시페린, HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 완충액 및 6-MHA(6-mercaptohexanoic acid)는 시그마-알드리치사(미국)로부터 구매하였다. AAO(Anopore Aluminum Oxide)는 왓맨사(독일)로부터 구매하였다. EDC(1-Ethyl-3[3-dimethyl aminopropyl] carbodiimide) 및 NHS(N-hydroxysuccinimide)는 썰모사(미국)로부터 구매하였다.

[0037] **실험방법**

[0038] 전반적인 실험 과정을 도 1에 나타내었다.

[0039] *나노브러쉬 막대의 제조*

[0040] 나노브러쉬 패턴을 제조하기 위해, AAO 마스크의 한 측면에 Au/Ag 씨드층을 증착하였다. 상기 씨드층은 작동 전극이며, Au로 전기도금하였다(도 2). 전기도금 후에, AAO를 탈이온수 및 알코올로 세척하였다.

[0041] 나노브러쉬 막대를 제조하기 위해, 긴 유리 막대를 준비하고 이를 1% 트리톤-X, 알코올 및 탈이온수로 각 15분씩 세척하였다. 상기 유리 막대의 한 측면에 AAO의 씨드층면을 PDMS로 부착하고 70℃에서 5시간동안 큐어링(curing)하였다. 큐어링 후에, AAO 마스크를 3M NaOH 수용액에 최소 4시간동안 정치하여 에칭하였다. 에칭 후에 나노브러쉬 막대를 알코올 및 탈이온수로 세척하였다(도 3).

[0042] *루시퍼라제 고정화*

[0043] 나노브러쉬 패턴에 루시퍼라제를 고정하기 위해, 나노브러쉬 막대를 알코올에 용해된 10 mM MHS 용액에서 밤새 반응하였다. 반응 후, 나노브러쉬 막대를 알코올 및 탈이온수로 세척하였다. 나노브러쉬 패턴을 250 mM EDC(N-ethyl-N′-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide) 및 250 mM NHS(N-hydroxysuccinimide) 수용액에 30 분 동안 담궜다. 각각의 나노브러쉬 패턴을 탈이온수로 세척하였다. 그 후, 100 ㎕의 30 ㎍/㎖ 루시퍼라제 솔루션을 포함하는 0.25 mM HEPES 완충액(pH 7.3)에 담궈 2시간 동안 반응하였다(도 4).

[0044] *ATP 측정*

[0045] 기질을 포함하는 마이크로큐벳에 나노브러쉬 막대를 넣어 ATP를 측정하였다. 15 mM MgCl2, 600 μM 루시페린 및 다양한 농도의 ATP를 25 mM HEPES 완충액에 용해하고 이를 마이크로큐벳에 넣어 발광을 생성하였다(도 5).

[0046] **결과**

[0047] *나노브러쉬 패턴*

[0048] 전기적 전하를 인가하였을때 금(Au) 나노브러쉬의 높이는 정적 상관관계를 갖는다. 금 나노브러쉬의 높이는 1 쿨롬(coulomb) 당 11 ㎛ 증가하였다(도 6 및 도 7).

[0049] 도 8은 0.3 C의 전기적 전하로 제조된 AAO 에칭 나노브러쉬 패턴의 SEM(Scanning Electron Microscope) 이미지를 나타낸다.

[0050] 노드의 평균 높이 및 노드 간의 평균 거리는 각각 150 ㎚ 및 110 ㎚이다(도 9).

[0051] *루시퍼라제 고정화*

[0052] 루시퍼라제의 고정화를 확인하기 위해, SERS*(Surface-Enhanced Raman Scattering)* 및 발광분석법을 실시하였다. 고정화한 후, 1200 ㎚ 및 1600 ㎚의 파장에서 새로운 SERS 피크가 생성된 것을 확인하였다(도 10). 이러한 결과는 루시퍼라제가 잘 고정화되었음을 의미한다.

[0053] 100 μM의 ATP 농도에서 발광 분석법을 실시하였다. 나노브러쉬 막대를 큐벳에 넣고 발광 강도를 분석하였다. 이것으로 루시퍼라제가 잘 고정화되었고, 고정된 루시퍼라제가 활성을 가짐을 확인하였다(도 11).

[0054] *ATP 측정*

[0055] 다양한 농도의 ATP를 적용하여 발광 강도를 측정하였다. 발광의 강도를 555 ㎚에서 측정하였다(도 12). 결과적으로, ATP 농도와 발광 강도 간에 정적 상관관계를 나타내었다(R^2=0.9899).

[0056] *재사용 가능성*

[0057] 루시퍼라제-고정 나노브러쉬 막대를 재사용하여 재사용 가능성을 분석하였다. 최대 3 차례까지 최고 루시퍼라제 활성을 나타내어 재사용이 가능하였다. 3 차례를 초과하는 경우, 루시퍼라제의 활성이 감소하였다(도 13).

[0058] **결론**

[0059] 본 발명은 루시퍼라제-고정 나노브러쉬 스틱을 이용하여 ATP 농도를 측정하였다. 검출 범위는 1 nM 내지 100 μM이고, R_2 값은 0.9899이다. ATP 농도와 발광 강도 간의 정적 상관관계는 휴대용 ATP 센서 칩으로 개발할 수 있는 가능성을 말한다. 또한, 효소 고정 및 재사용 가능성에 대한 실험을 통해 유의한 결과를 보여주었다. 이러한 결과는 중요한 결론을 의미한다. 첫째, ATP 발광 반응은 루시퍼라제-고정 나노브러쉬 막태를 제거함

으로써 조절할 수 있으며, 이는 산업 또는 연구 분야에서 다른 효소 반응에 대한 디바이스로 적용할 수 있음을 의미한다. 둘째, 루시퍼라제-고정 나노브러쉬 막대는 액체 내에 용해된 자유 루시퍼라제와 비교하여 재사용함으로써 ATP 검출의 비용을 절감할 수 있다. 세번째, SERS 실험을 통해 조사한 나노브러쉬 패턴의 광학 활성은 SERS 또는 LSPR과 같은 광학 센싱 방법에 적용할 수 있다.

[0060] **참고문헌**

[0061] [1] Mamas I. Prodromidis, et al, *Electroanalysis*, 14, 241-261 (2002)

[0062] [2] Audrey Sassolas, et al, *Chem. Rev.*, 108, 109-139 (2008)

[0063] [3] Dirk Saerens, et al, *Sensors*, 8, 4669-4686 (2008)

[0064] [4] James P. Chambers, et al, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 10, 1-12 (2009)

[0065] [5] F. Watzinger, et al, *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 254-298 (2006)

[0066] [6] Monika Gut-Winiarska, et al, *Journal of Virological Methods*, 88, 63-71 (2003)

[0067] [7] C'esar Ribeiro, et al, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7, 1085-1090 (2008)

[0068] [8] Baoshan He, et al, *African Journal of Microbiology Research*, 3, 575-580 (2009)

[0069] [9] Moon Il Kim, et al, *Biotechnology & Bioengineering*, 96, 210-218 (2007)

[0070] [10] Chun Xiang Li, et al, *Chinese Chemical Letters*, 16, 1357-1360 (2005)

[0071] [11] Abida Anwar, et al, *World Applied Sciences Journal*, 7, 1281-1286 (2009)

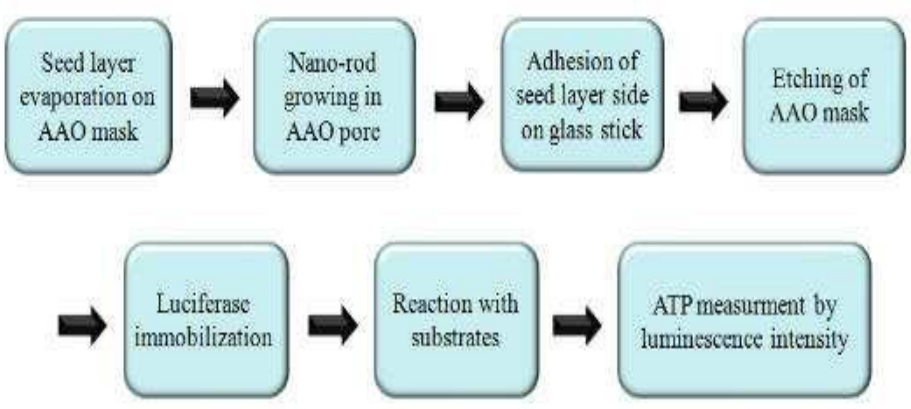
[0072] [12] Yanpin Lu, et al, *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 98, 641-654 (2002)

[0073] [13] Gupta MN., et al, *Thermostabilization of proteins*, 14, 1-11 (1991)

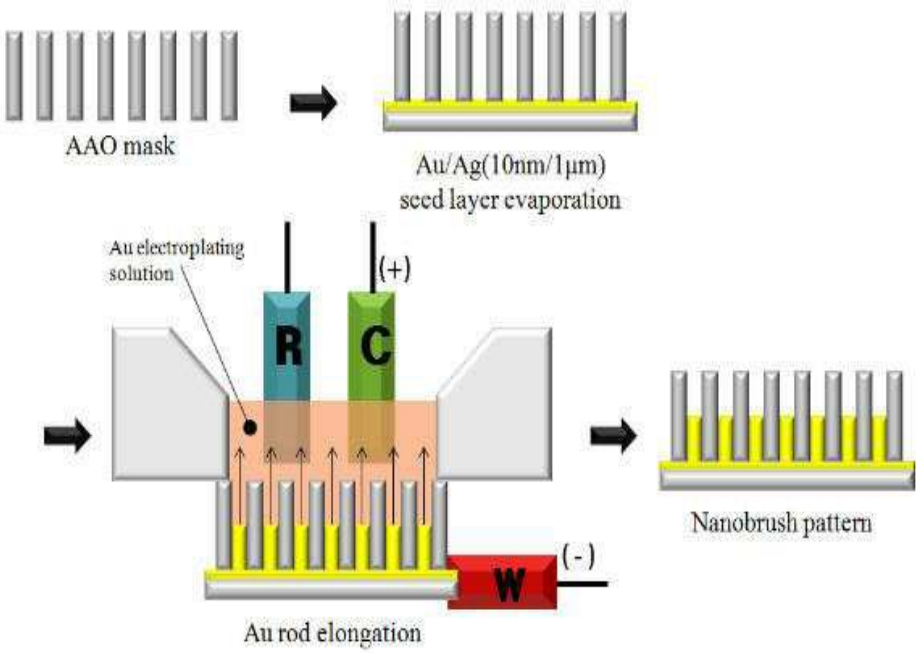
[0074] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

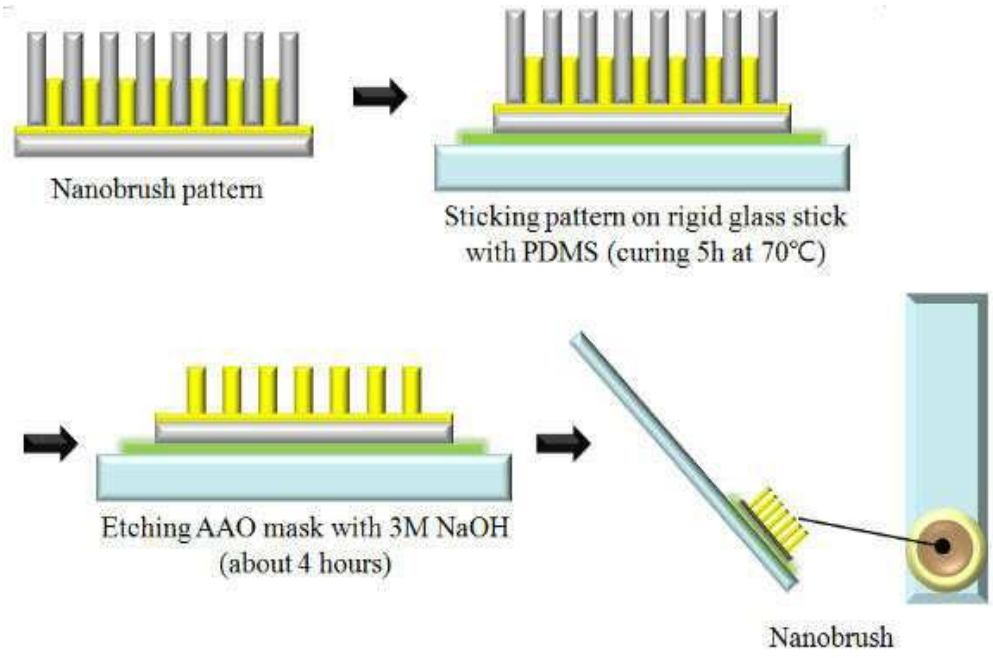
도면1



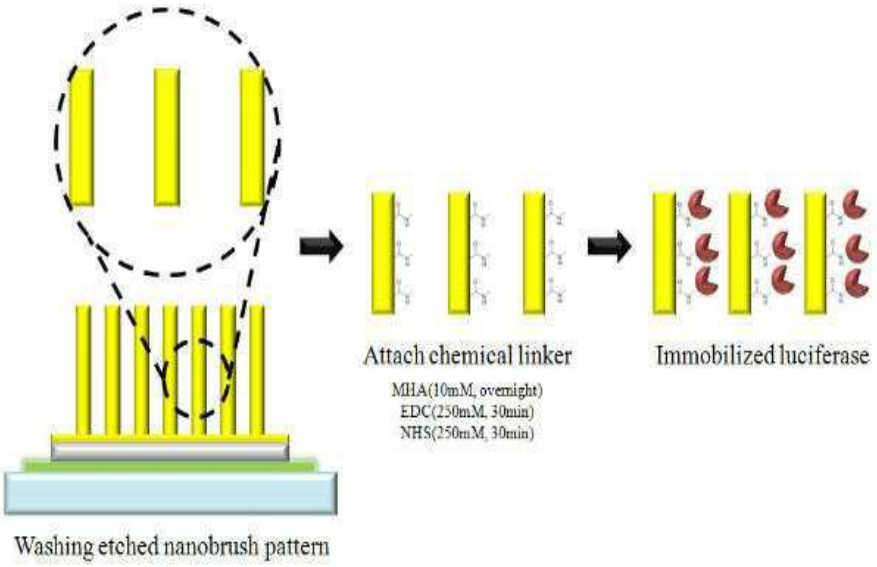
도면2


AAO mask
Au/Ag(10nm/1μm)
seed layer evaporation
Au electroplating
solution
(+)
R
C
(-)
W
Au rod elongation
Nanobrush pattern

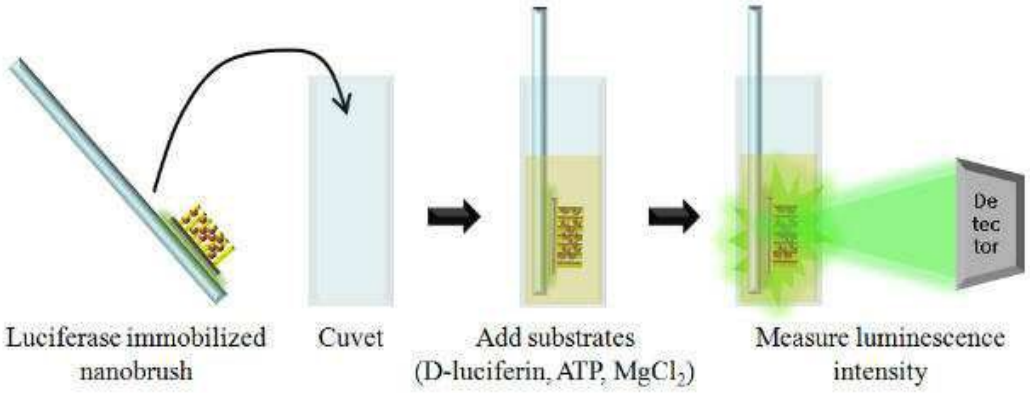
도면3


Nanobrush pattern
Sticking pattern on rigid glass stick
with PDMS (curing 5h at 70°C)
Etching AAO mask with 3M NaOH
(about 4 hours)
Nanobrush

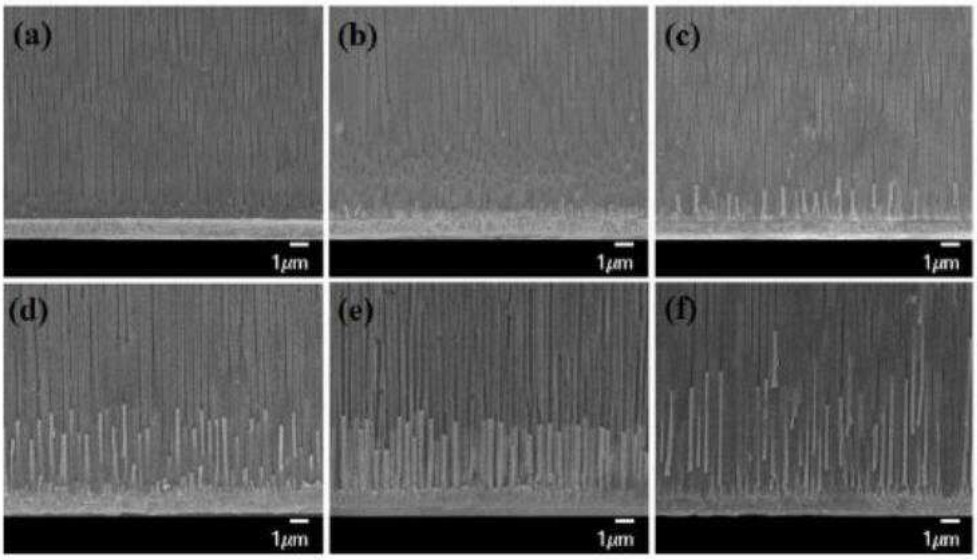
도면4


Attach chemical linker
MHA(10mM, overnight)
EDC(250mM, 30min)
NHS(250mM, 30min)
Immobilized luciferase
Washing etched nanobrush pattern

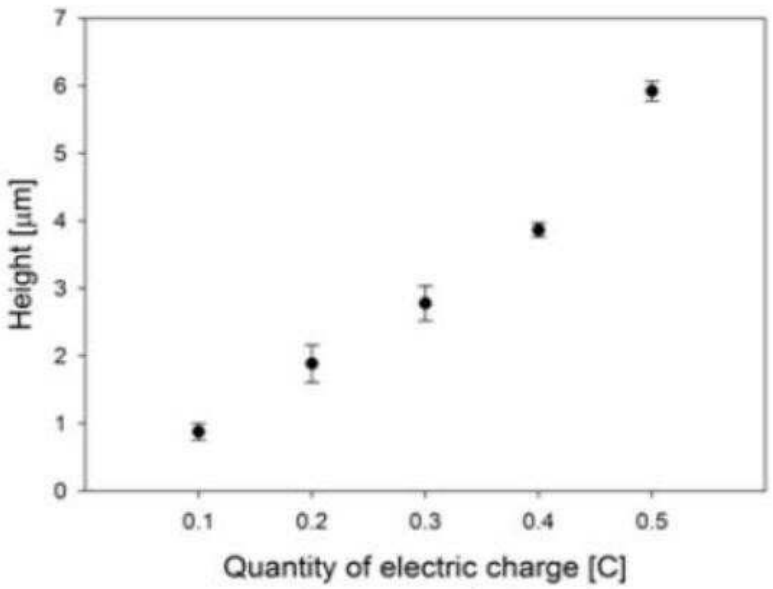
도면5


De
tec
tor
Luciferase immobilized nanobrush
Cuvet
Add substrates (D-luciferin, ATP, $MgCl_2$)
Measure luminescence intensity

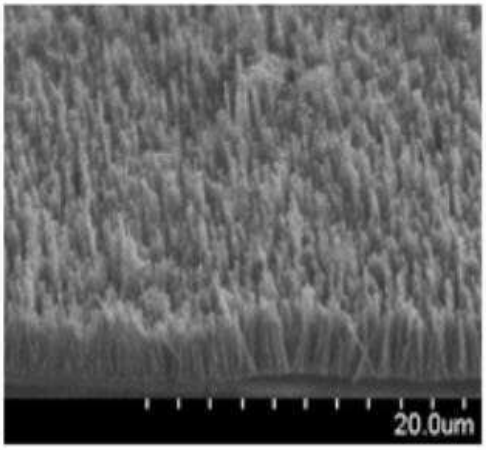
도면6


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
1μm

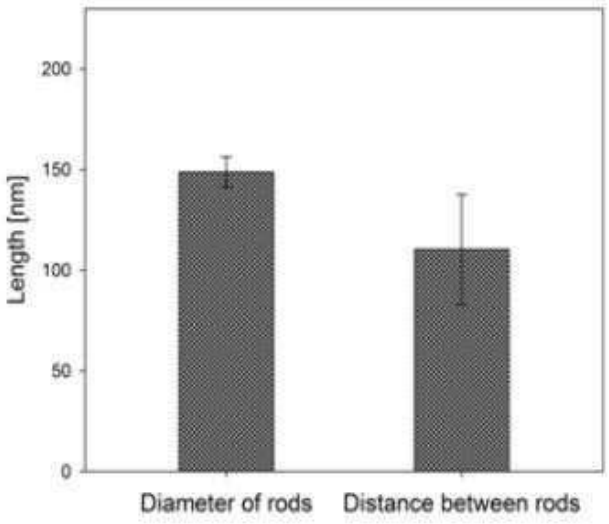
도면7


Height [μm]
0
1
2
3
4
5
6
7
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
Quantity of electric charge [C]

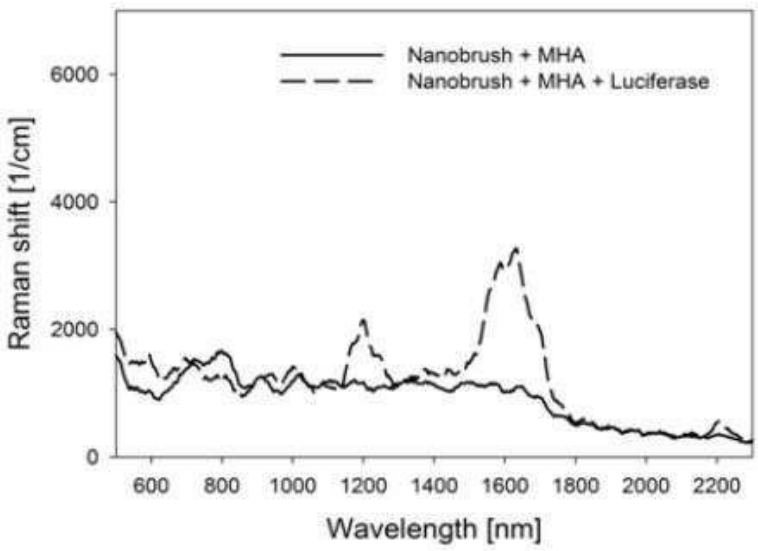
도면8


20.0um

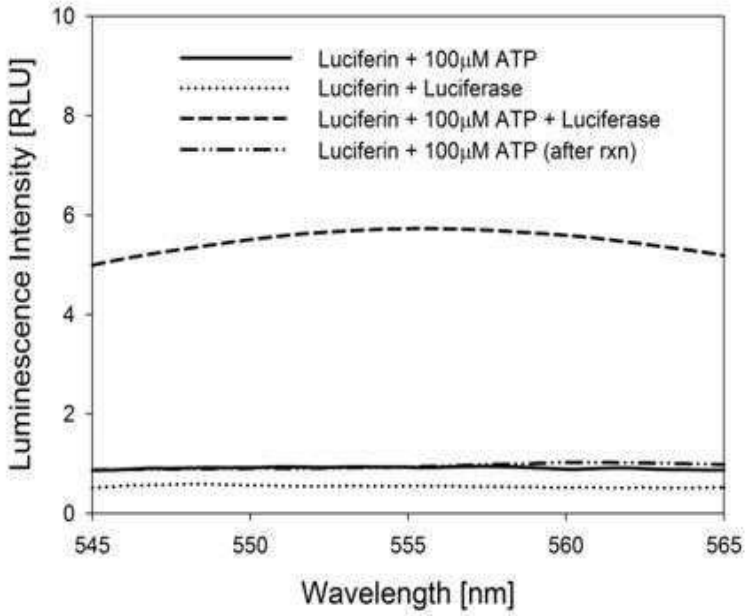
도면9


200
150
100
50
0
Length [nm]
Diameter of rods
Distance between rods

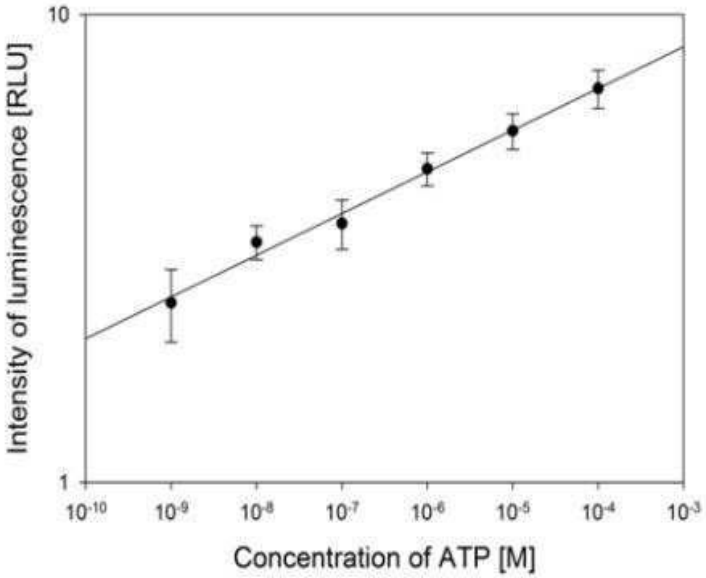
도면10


Nanobrush + MHA
Nanobrush + MHA + Luciferase
6000
4000
2000
0
Raman shift [1/cm]
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
2200
Wavelength [nm]

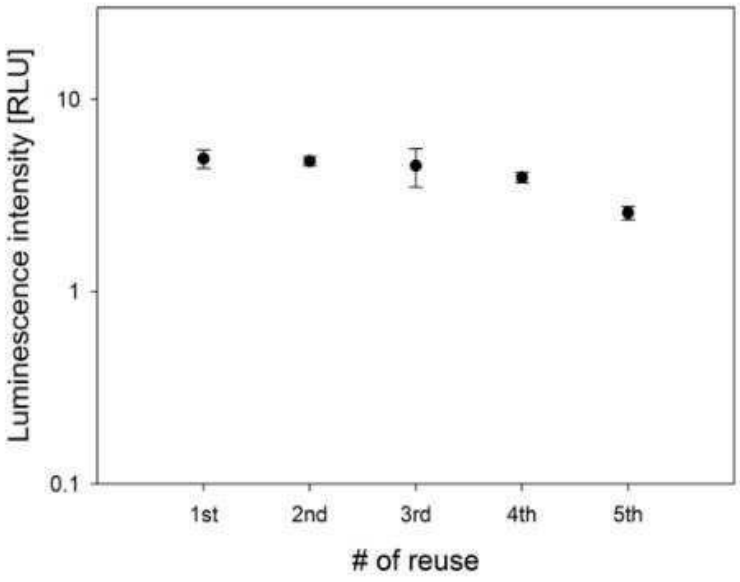
도면11


Luciferin + 100μM ATP
Luciferin + Luciferase
Luciferin + 100μM ATP + Luciferase
Luciferin + 100μM ATP (after rxn)
Luminescence Intensity [RLU]
Wavelength [nm]
10
8
6
4
2
0
545
550
555
560
565

도면12


Intensity of luminescence [RLU]
Concentration of ATP [M]
10
1
10-10
10-9
10-8
10-7
10-6
10-5
10-4
10-3

도면13


Luminescence intensity [RLU]
10
1
0.1
1st
2nd
3rd
4th
5th
# of reuse