

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0041395 (43) 공개일자 2016년04월18일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>G01N 21/552</i> (2014.01) <i>B82B 1/00</i> (2006.01) <i>G01N 21/39</i> (2006.01) <i>G01N 33/483</i> (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(21) 출원번호	10-2014-0135156	(72) 발명자
(22) 출원일자	2014년10월07일	최연호 서울특별시 성북구 길음로9길 50, 912동 802호 (길음동, 길음뉴타운9단지아파트)
심사청구일자	2014년10월07일	홍순우 서울특별시 강북구 도봉로61길 54-6 (미아동)
		심은 서울특별시 성북구 월곡로 5, 에이파크 빌딩 원룸 301호 (종암동)
		(74) 대리인 이처영, 장제환

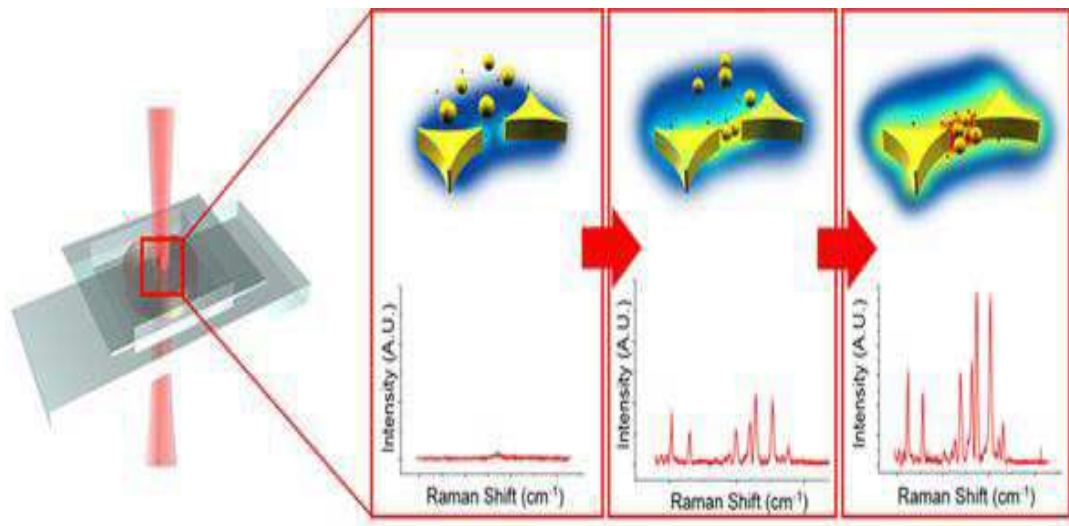
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 자가 배열 핫 스팟 형성을 이용한 동시 포획 및 탐지 방법

(57) 요약

본 발명은 자가 배열 핫 스팟 형성을 이용한 동시 포획 및 탐지 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 레이저 조사로 플라즈모닉 포획을 유도하여 자가 배열 핫 스팟이 형성됨과 동시에 표면 증폭 라만 산란 신호를 탐지하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 자가 배열 핫 스팟 형성을 이용한 동시 포획 및 탐지 방법은 나노 구조체 제작의 전처리 과정이 간단하며, 특히 신호를 측정할 수 있는 핫 스팟을 찾는 어려움 없이 특정부위에 자가 배열 핫 스팟 형성으로 인해, 저비용 및 고효율의 비표지 생분자 탐지 시스템으로 유용하다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013M3A9C6050124

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오, 의료기술개발사업

연구과제명 나노기술 기반의 선택적 역분화 인자 전달을 통한 역분화 줄기세포 제작 및 기전연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 표적 바이오 물질의 동시 포획 및 탐지 방법:

- (a) 패턴화되어 있는 나노 구조체와 표적 바이오 물질을 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 나노 구조체의 특정 부위에 레이저를 조사하여 플라즈모닉 포획을 유도하는 단계; 및
- (c) 상기 플라즈모닉 포획에 의해 형성된 자가 배열 핫 스팟에 의해 증폭된 표면 증폭 라만 산란(SRES) 신호를 측정하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 나노 구조체의 패턴은 나노 스피어 리소그래피를 이용한 보타이 패턴인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 나노 구조체간 거리는 1~100 nm인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 표적 바이오 물질은 금 나노입자와 혼합하여 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, (b) 단계의 레이저 조사는 약 785nm인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, (c) 단계의 핫 스팟 형성의 시간은 100분 이내인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 패턴화되어 있는 나노구조체는 다음 단계를 통하여 제조하는 것을 특징으로 하는 방법:

- (i) 기판 상에 고분자 비드를 단일 레이어로 패터닝 하는 단계;
- (ii) 상기 기판에 금속을 증착시킨 다음, 용매에 침지시켜 고분자 비드를 용해시켜 기판 상에 금속 패턴을 형성하는 단계; 및
- (iii) 상기 (ii) 단계에서 형성된 금속 패턴을 thiol(-SH)작용기가 포함된 용액으로 표면 처리하여 기판상에 금속의 자가 배열 단일 레이어를 형성시키는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 고분자 비드는 폴리스티렌 또는 실리카 비드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 기판은 유리인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 금속은 금인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, (ii) 단계는 전자빔을 이용하여 약 30nm 두께로 증착하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, (ii) 단계의 용매는 톨루엔, 아세톤, 벤젠, 페놀 및 에테르로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제7항에 있어서, (iii) 단계의 thio(-SH)작용기가 포함된 용액은 MPTMS((3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane) 또는 DMOT(3,7-dimethylcatnaethiol)인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자가 배열 핫 스팟 형성을 이용한 동시 포획 및 탐지 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 레이저 조사로 플라즈몬 포획을 유도하여 자가 배열 핫 스팟이 형성됨과 동시에 표면 증폭 라만 산란 신호를 탐지하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생체 기전이나 생체 물질을 탐지하는 데 있어서 나노 단위까지 그 탐지능을 확장하기 위해 많은 연구가 이어지고 있으며, 그 중 하나로써 최근에 표면 플라즈몬 공명을 이용하는 국소 표면 플라즈몬 공명(LSPR)이나 표면 증폭 라만 분광법(SERS)이 기존의 형광분광법 등의 기술이 가지는 광학 한계를 극복할 수 있다는 점에서 주목받고 있다(Choi *et al.*, *IEEE Journal of*, 18(3):1110-1121, 2012).

[0003] 생분자 탐지 방법으로 가장 보편적으로 이용되는 형광표지 방법은 분석과정에서 표적분자에 형광 표지 등의 복잡한 전처리 과정이 필요하고, 크기가 작은 생분자 탐지에 적용하는데 한계가 있다. 또한, 표지한 형광물질이 시간이 지남에 따라 광표백되는 문제점이 있다(Malknai *et al.*, *PLoS ONE*, 6(4):18586, 2011). 이 문제를 극복하기 위한 표면 플라즈몬 공명 기반의 센서는 고해상도, 고감도 탐지를 위해 고가의 기판 제작 및 전문적인 기술의 숙련이 필요하다는 단점이 있다(Lin *et al.*, *Nanotechnology*, 22:185308, 2011).

[0004] 플라즈몬 기반의 센서는 얼마나 생체물질의 신호를 증폭시킬 수 있는지에 따라 그 성능이 좌우된다. 기판 위에 형성된 금속 나노구조체의 끝이 표출할 수록(KR 10-2012-0053324), 나노 구조체간의 거리가 좁을 수록 신호의 증폭은 더 커진다. 따라서, 신호 세기를 증폭시키는 방법으로 끝이 뾰족한 나노 구조체 간의 거리를 좁히고자

다수의 연구가 이루어져 왔으나(Kinkhabwala *et al.*, *Nature Photonics*, 3:654-657, 2009), 기관 제작 공정 자체의 비용이 많이 들고 신호를 측정할 수 있는 핫 스팟을 찾는 데 어려움이 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 측정하고자 하는 특정 부위에 핫 스팟을 형성시켜 신호를 고감도로 탐지할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 패터화된 나노 구조체와 플라즈모닉 포획을 융합함으로써 자가 배열 핫 스팟 형성과 동시에 표면 증폭 라만 산란(SERS) 신호가 증폭되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 패터화된 나노 구조체를 이용하여 표적 물질의 플라즈모닉 포획을 유도하고, 이에 의해 형성된 자가 배열 핫 스팟을 통해 증폭된 표면 증폭 라만 산란(SRES) 신호를 탐지하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 패터화되어 있는 나노 구조체와 표적 바이오 물질을 접촉시키는 단계; (b) 상기 나노 구조체의 특정 부위에 레이저를 조사하여 플라즈모닉 포획을 유도하는 단계; 및 (c) 상기 플라즈모닉 포획에 의해 형성된 자가 배열 핫 스팟에 의해 증폭된 표면 증폭 라만 산란(SRES) 신호를 측정하는 단계를 포함하는 표적 바이오 물질의 동시 포획 및 탐지 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 자가 배열 핫 스팟 형성을 이용한 동시 포획 및 탐지 방법은 나노 구조체 제작의 전처리 과정이 간단하며, 특히 신호를 측정할 수 있는 핫 스팟을 찾는 어려움 없이 특정부위에 자가 배열 핫 스팟 형성으로 인해, 저비용 및 고효율의 비표지 생분자 탐지 시스템으로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 나노 스피어 리소그래피를 이용한 나노 구조체 제작을 나타낸 것이다.
 도 2는 자가 배열 핫 스팟의 모식도이다.
 도 3은 나노 구조체 끝에 형성된 강력한 전기장을 나타낸 것이다(a: 시뮬레이션, b: 단일 나노 보타이 구조체, c: 전기장 높이 표현).
 도 4는 증폭된 전기장에 의해 포획의 힘이 발생하는 것을 확인한 것이다.
 도 5는 수치적 해석을 통한 포획된 금 나노 입자의 개수에 따른 증폭된 전기장 구배를 나타낸 것이다.
 도 6은 시간에 따른 금 나노 입자의 플라즈모닉 포획을 나타낸 것이다.
 도 7은 수치적 해석을 통한 포획된 금 나노 입자의 개수에 따른 수치적 포획의 힘 증가를 나타낸 것이다.
 도 8은 자가 배열 핫 스팟 형성에 따른 R6G의 표면 증폭 라만 산란(SERS) 신호의 시간 의존적 증가를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [0011] 본 발명에서는 표적 바이오 물질과 금 나노 콜로이드 용액의 혼합물을 핫 스팟 형성이 가능한 보타이 패턴의 나노 구조체의 기관 위에서 785nm 레이저로 플라즈모닉을 동시 포획하였다. 이후, 자가 배열된 핫 스팟을 확인하고, 증폭된 표면 증폭 라만 산란(SRES) 신호를 측정하였다.
- [0012] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 (a) 패턴화되어 있는 나노 구조체와 표적 바이오 물질을 접촉시키는 단계; (b) 상기 나노 구조체의 특정 부위에 레이저를 조사하여 플라즈모닉 포획을 유도하는 단계; 및 (c) 상기 플라즈모닉 포획에 의해 형성된 자가 배열 핫 스팟에 의해 증폭된 표면 증폭 라만 산란(SRES) 신호를 측정하는 단계를 포함하는 표적 바이오 물질의 동시 포획 및 탐지 방법에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 상기 나노 구조체의 패턴은 보타이 패턴인 것을 특징으로 할 수 있으나, 표면 증폭 라만 산란(SRES) 신호를 증폭시킬 수 있는 패턴이라면 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 나노 구조체간 거리는 1~100nm인 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 10nm 이내인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 상기 표적 바이오 물질은 금 나노입자 입자와 혼합하여 사용하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 레이저 조사는 약 785nm인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 핫 스팟 형성의 시간은 100분 이내인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 45분 내지 100분인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명에서 "플라즈모닉 포획(plasmonic trapping)"은 금이나 은으로 이루어진 나노 구조체를 이용하여 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance) 현상을 발생시키고 이를 통해 당기는 힘을 고도로 증폭시켜 포획하는 방법을 말한다. "표면 플라즈몬 공명"이란 금속 나노 입자 표면과 유전체 사이에 빛이 입사되면 빛이 가지는 특정 에너지의 전자기장과의 공명으로 인하여, 금속 표면의 자유 전자들이 집단적으로 진동하는 현상을 의미하며, "당기는 힘"이란 고도로 집중된 빛을 유전체에 입사시키게 되면 이것이 밀어내는 힘(repulsive force)와 당기는 힘(attractive force)을 발생시키게 된다. "플라즈모닉 포획"은 유전체뿐만 아니라 금속과 생체물질을 포획하는데 다양하게 쓰이고 있으며, 본 발명에서는 플라즈모닉 포획을 이용하여 금 나노 입자와 생체물질을 동시에 포획하여 자가 배열 핫 스팟 만들고, 이를 통해 포획과 탐지가 연쇄적으로 증폭되어 동시에 일어날 수 있게 하였다.
- [0017] 본 발명에서 "표면 증폭 라만 산란(Surface Enhanced Raman Spectroscopy)"은 빛이 물질에 입사할 때 발생하는 고유한 라만 신호를 나노 구조체의 표면에서 증폭하여 얻는 것을 의미한다. 물질마다 가지는 특이적인 라만 스펙트럼은 생체물질을 정성적으로 측정하는데 최근 많이 이용되고 있으며, 기존의 바이오센서로 많이 쓰이는 형광 표지 법에 비해 비표지, 고감도로 생체 물질을 측정할 수 있는 장점이 있다.
- [0018] 본 발명에서는 상기 동시 포획 및 탐지를 위해 보타이 패턴으로 패턴화되어 있는 나노 구조체를 제작하였다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 패턴화되어 있는 나노구조체는(i) 기관 상에 고분자 비드를 단일 레이어로 패터닝 하는 단계; (ii) 상기 기관에 금속을 증착시킨 다음, 용매에 침지시켜 고분자 비드를 용해시켜 기관 상에 금속 패턴을 형성하는 단계; 및 (iii) 상기 (ii) 단계에서 형성된 금속 패턴을 thiol(-SH)작용기가 포함된 용액으로 표면 처리하여 기관상에 금속의 자가 배열 단일 레이어를 형성시키는 단계를 통하여 제조하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 고분자 비드는 폴리스티렌 또는 실리카 비드인 것이 바람직 하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 기관은 유리인 것이 바람직하며, 상기 금속은 금인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 증착은 전자빔을 이용하여 약 30nm 두께로 증착하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 용매는 톨루엔, 아세톤, 벤젠, 페놀 및 에테르인 것이 바람직하나, 유기용매라면 제한 없이 사용할 수 있다. 또한, 상기 thiol(-SH)작용기가 포함된 용액은 MPTMS((3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane) 또는 DMOT(3,7-dimethylcatnaethiol)인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에서는 폴리스티렌 비드를 단일 레이어로 패터닝하여 금속을 증착시킨 후, 폴리스티렌 비드를 용해시킴으로써 보타이 패턴의 핫 스팟 형성 나노 구조체를 제작할 수 있으며, MPTMS 용액으로 표면 처리하여 금 나노 입자를 영구적으로 고정시킬 수 있다. 따라서, 자가 배열 핫 스팟 형성으로 증폭된 신호의 세기를 안정적으로

유지시킬 수 있어, 재현성 뿐만 아니라 고감도, 고해상도의 보장이 가능하다.

[0024] [실시예]

[0025] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0026] 실시예 1: 나노 스피어 리소그래피를 이용한 나노 구조체의 제작

[0027] 자가 배열 핫 스팟이 형성될 기판을 제작하기 위해 직경이 500 nm인 폴리스티렌 비드를 슬라이드 글라스에 단일 레이어로 패터닝하고, E-Beam evaporator를 이용하여 금을 30 nm 두께로 증착시켰다. 증착시킨 보타이 패턴이 있는 폴리스티렌 비드를 톨루엔 용액에 넣어서 녹이고, 1mM의 (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane(MPTMS) 용액(톨루엔 용매)에 24시간 동안 넣어서 표면에 자가 배열 단일 레이어가 형성되게 제작하였다(도 1).

[0028] 실시예 2: 플라즈모닉 포획의 유도 및 자가 배열 핫 스팟 형성에 따른 SERS 신호 탐지

[0029] 실시예 1에서 제작한 나노 구조체를 가지는 기판 상에, 직경이 50 nm인 금 나노 입자 콜로이드 용액을 탐지하고자 하는 시료(R6G)와 섞어서 보타이 패턴이 있는 기판 위에 올려놓고 파장이 785 nm인 레이저를 시료가 있는 곳에 조사하여, 분석하고자 하는 생체 물질의 플라즈모닉 포획을 유도하였다. 자가 배열된 핫 스팟을 확인하고, 시간에 따른 정량적인 SERS 증폭 신호를 측정하였다(도 8).

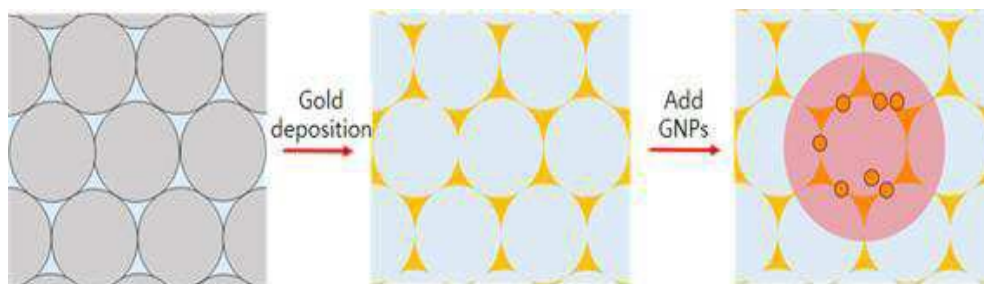
[0030] 그 결과, 도 6에 나타난 것과 같이 시간에 따른 금 나노 입자의 플라즈모닉 포획이 증가되는 것을 확인하였다. 또한, 포획된 금 나노 입자의 개수에 따른 전기장 구배의 증폭(도 5) 및 포획의 힘 증가(도 4, 7)가 관찰되었다.

[0031] 나노 구조체의 리소그래피만을 이용하였을 때에는 구조체간 거리가 100 nm 정도로, SERS 신호의 증폭 정도가 크지 않으나, 플라즈모닉 포획을 통하여 구조체간 거리가 시간이 지남에 따라 매우 좁아졌으며, 이로 인해 R6G의 SERS 신호가 시간 의존적으로 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 2). 이는 금 나노 입자와 생체 물질이, 구조체간의 표면 플라즈몬 현상으로 인해 발생하는 전기장 구배에 힘으로 작용하여, 이들의 합력이 보타이 패턴 방향으로 형성되어 SERS 신호를 높일 수 있다는 것을 보여준다.

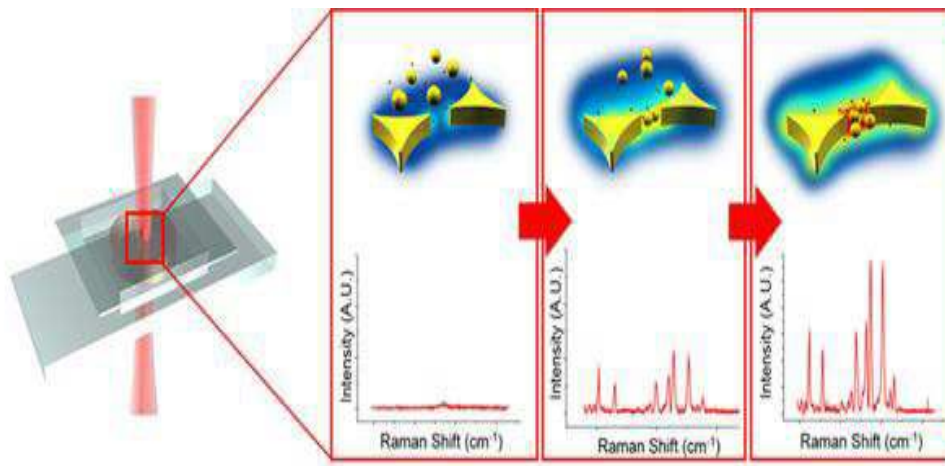
[0032] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점을 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

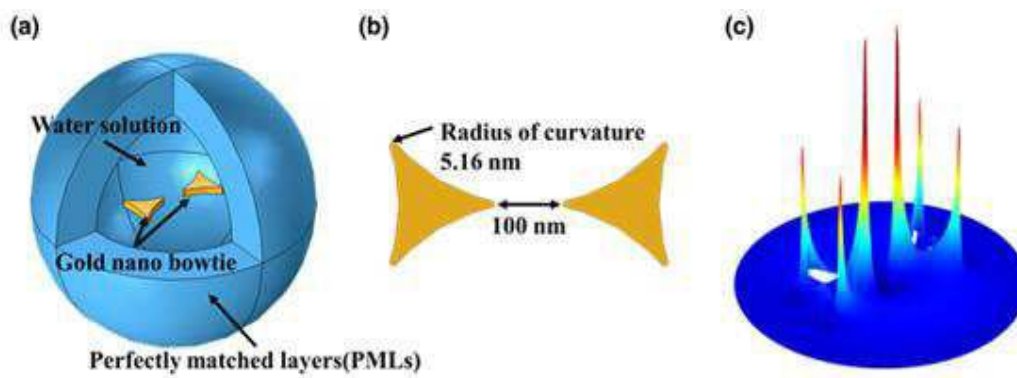
도면1



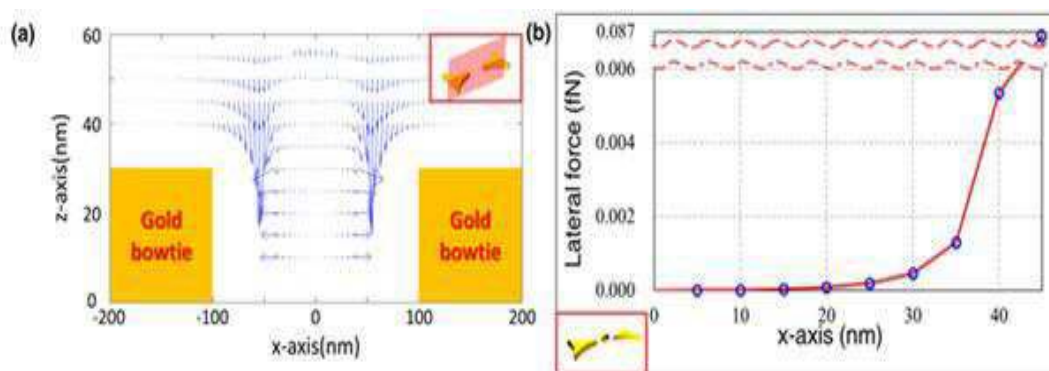
도면2



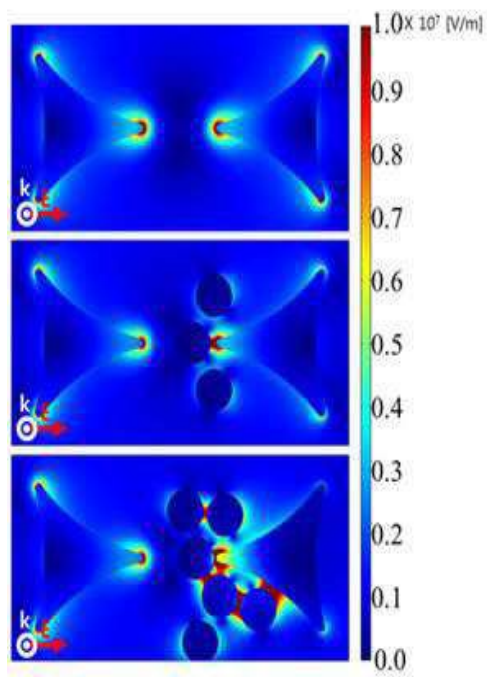
도면3



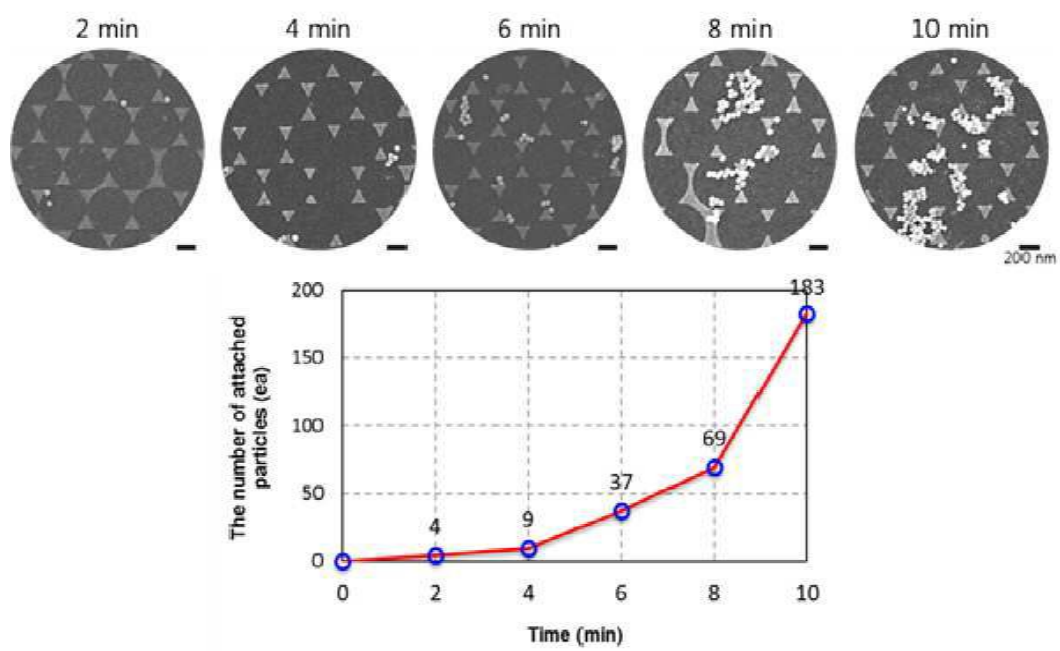
도면4



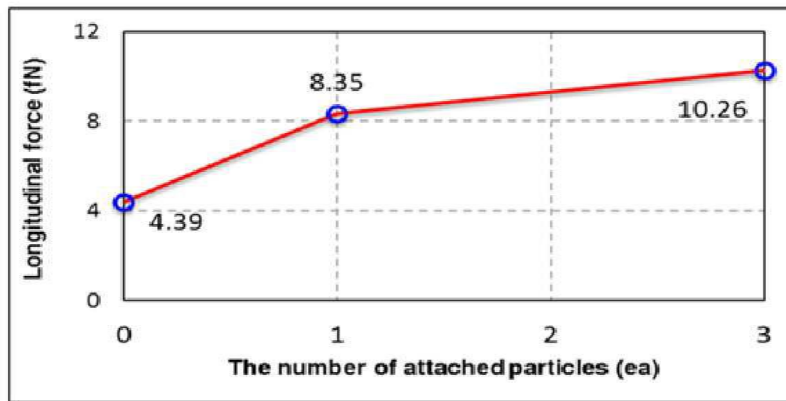
도면5



도면6



도면7



도면8

