



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월20일
(11) 등록번호 10-1745897
(24) 등록일자 2017년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/64 (2006.01) G01N 21/47 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/6402 (2013.01)
G01N 21/47 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0111465
(22) 출원일자 2016년08월31일
심사청구일자 2016년08월31일
(56) 선행기술조사문헌
KR101514894 B1
KR1020120124904 A
KR1020160019581 A
KR1020140127463 A

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
강성호
경기도 수원시 영통구 매영로 366, 725동 1901호 (영통동, 현대아파트)
이승아
경기도 화성시 영통로61번길 10, 111동 1301호 (반월동, 신영통현대1차아파트)
(74) 대리인
노철호

전체 청구항 수 : 총 19 항

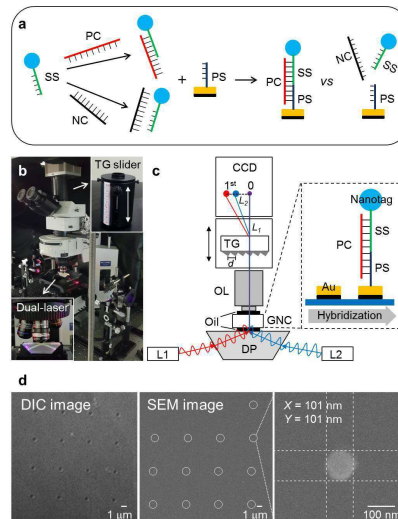
심사관 : 김명갑

(54) 발명의 명칭 전반사산란을 이용한 바이러스의 정량 스크리닝 방법

(57) 요약

본 개시 내용에서는 인플루엔자 바이러스와 같은 바이러스 유전자에 대하여 특이적인 프로브를 함유하고 플라즈몬 나노금속 산란 특성을 갖고 서로 중첩되지 않는 흡수스펙트럼을 갖는 적어도 2가지 금속을 구비한 검출 플랫폼 상에서 바이러스 유전자에 대한 증폭 과정 없이 단일 분자 수준에서 직접 검출함과 동시에 이를 효과적이고 정확하게 정량화할 수 있는 질병진단 스크리닝 방법 및 검출 시스템이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2021/4702 (2013.01)

G01N 2333/11 (2013.01)

G01N 2333/115 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

질병 관련 표적 바이러스의 비증폭 및 비형광 검출방식을 통하여 정량 스크리닝하는 방법으로서,

- 상기 표적 바이러스에 특이적으로 결합하는 프로브 올리고머가 제1 금속-나노패턴화된 기재에 고정된 포획 나노패드, 및 제2 금속 함유 나노입자가 상기 표적 바이러스에 특이적으로 결합하는 검출 올리고머와 결합된 검출 태그를 포함하는 플랫폼을 제공하는 단계, 여기서 제1 금속 및 제2 금속은 서로 흡수스펙트럼이 중첩되지 않도록 선택됨;
- 분석 샘플 내 표적 바이러스를 검출 태그의 검출 올리고머 및 포획 나노패드의 프로브 올리고머와 혼성화 반응시키는 단계;
- 광원으로부터 조사된 광을 전반사시켜 소산장을 형성하고, 상기 소산장에 의하여 검출 태그 및 상기 포획 나노패드로부터 발생하는 전반사산란 신호를 생성하는 단계; 및
- 상기 생성된 전반사산란 신호를 투과격자미러(TG)로 통과시켜 제1 금속으로부터 기인하는 산란 신호 및 제2 금속으로부터 기인하는 산란 신호로 분할함으로써 비분산(non-dispersed) 또는 0차의 분광학적 영상(spectral image), 그리고 분산된(dispersed) 또는 1차 이상의 분광학적 영상을 생성하여 수집하는 단계;

를 포함하며,

여기서, 가우시안 맞춤에 의한 데이터 처리를 통하여 상기 분할된 산란 신호 각각에 대한 중심 위치 정보 또는 차수 간의 간격을 측정하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 d)는 분석 샘플 내 표적 바이러스를 검출 태그의 검출 올리고머와 1차 혼성화 반응시키는 단계, 그리고 상기 포획 나노패드의 프로브 올리고머와 상기 1차 혼성화 반응 생성물을 반응시키는 2차 혼성화 반응 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 플랫폼의 제1 금속-나노패턴은 투과격자미러를 통과한 제1 및 제2 금속으로부터 발생된 전반사 산란 신호의 비분산된 또는 0차 분광학적 영상과 분산된 또는 1차 이상의 분광학적 영상이 중첩되지 않도록 배열되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 전반사산란을 유발하기 위한 소산장 형성을 위하여 포획 나노패드의 하부에 장착된 프리즘을 통하여 광원을 조사하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 비분산된 또는 0차 분광학적 영상 및 상기 분산된 또는 1차 이상의 분광학적 영상이 단일 샷으로 수집되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 광원은 단일 파장의 광원인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 가우시안 맞춤에 의한 데이터 처리를 통하여 분할된 산란 신호 각각에 대한 중심 위치 정보 또는 차수 간의 간격을 측정함으로써 분광학적 영상의 픽셀 간의 거리를 산출하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 표적 바이러스는 아데노바이러스 7; PRRSV; 인플루엔자 바이러스; 연어 빈혈(salmon anaemia) 바이러스; 돼지 콜레라 바이러스(classical swine fever); C형 간염 바이러스; E형 간염 바이러스; 아프리카 돼지 콜레라(African swine fever) 바이러스; 푸말라(Puumala) 바이러스; 전염성 기관지염 바이러스; 전달성 위창자염(transmissible gastroenteritis); 사스 코로나바이러스(SARS CoV); 프라버그(Mraburg) 바이러스; 에볼라 바이러스; 웨스트나일 바이러스; 황열병 바이러스; 진드기 매개 뇌염 바이러스; 소 하리증(bovine diarrhea) 바이러스; 개 파보바이러스(parvovirus); 콕사키(Coxsackie) B3; 콕사키 B5; 조류 레오바이러스(reovirus); 로타바이러스(rotavirus); 쉴리키 삼림열(Semliki forest) 바이러스; 또는 돼지 제2형 썬코(circo type 2) 바이러스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 표적 바이러스는 인플루엔자 바이러스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제2항에 있어서, 상기 1차 혼성화 반응 및 상기 2차 혼성화 반응 각각은 50 내지 80℃ 범위에서 선정되는 온도, 그리고 20 내지 120분 범위에서 선정되는 반응 시간 조건 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 제1 금속은 금(Au)이고, 상기 제2 금속은 은(Ag)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 포획 나노패드의 나노패턴은 티올기(-SH)를 이용하여 공유결합이 용이하도록 처리된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 제1 금속-나노패턴화된 기재에 프로브 올리고머를 고정화하기 위하여, 제1 금속 나노패턴의 표면을 프로브 올리고머를 함유하는 완충 용액과 화학적 흡착 반응시키고, 상기 표적 바이러스와의 혼성화 반응에 앞서 비특이적 결합을 억제하기 위하여 블로킹하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 블로킹하는 단계는 머캅토핵산올을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 검출 태그의 검출 올리고머와 표적 바이러스 간의 혼성화 반응 전에 검출 태그의 제2 금속 나노입자의 표면을 개질하는 단계를 더 포함하며, 상기 표면을 개질하는 단계는 알칸티올($\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{X}$) 단일층을 형성하는 것을 특징으로 하는 방법:

여기서, X는 $-\text{COOH}$ 또는 $-\text{OH}$ 이고, n은 1 내지 15임.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 알칸티올 단일층을 형성하는 것은 화학식 $[\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}]$ (n은 1 내지 15)으로 표시되는 머캅토카르복산을 사용하거나, 또는 머캅토알코올을 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 개질된 제2 금속 함유 나노입자는 EDC 및 NHSS를 이용하여 활성화된 후에 상기 검출 올리고머와 반응하여 검출 태그를 형성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제9항에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스는 H7N9 바이러스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

질병 관련 표적 바이러스의 비증폭 및 비형광 방식을 통하여 단일 샷으로 정량 스크리닝하기 위한 검출 시스템으로서,

단일 파장의 레이저 광원;

상기 광원으로부터 조사된 입사광을 전반사시켜 소산장을 형성하도록 구성된 도브 프리즘;

제1 금속-나노패턴화된 기재 상에 표적 바이러스에 특이적으로 결합하는 프로브 올리고머가 고정된 포획 나노패드, 및 제2 금속 함유 나노입자가 표적 바이러스에 특이적으로 결합하는 검출 올리고머와 결합된 검출 태그를 포함하는 플랫폼, 여기서 제1 금속 및 제2 금속은 서로 흡수스펙트럼이 중첩되지 않도록 선택되며, 상기 포획 나노패드는 상기 도브 프리즘 상의 소산장 영역에 위치하도록 배열되며, 상기 포획 나노패드의 프로브 올리고머 및 상기 검출 태그의 검출 올리고머가 표적 바이러스와 혼성화 반응되어 결합할 경우, 제1 금속 및 제2 금속으로부터 유래되는 전반사산란 신호를 생성함;

상기 포획 나노패드 상측에 이격되어 상기 전반사 산란 신호를 수집하도록 배열된 대물렌즈; 및

상기 대물렌즈 상측에 배치되어 상기 수집된 전반사산란 신호를 제1 금속으로부터 유래하는 산란 신호 및 제2 금속으로부터 유래하는 산란 신호로 분할하는 투과격자미러; 및

가우스 맞춤에 의한 데이터 처리를 통하여 상기 분할된 산란 신호 각각에 대한 중심 위치 정보 또는 차수 간의 간격을 측정하여 이를 이미지화하는 영상화 처리부를 포함하는 검출부;

를 포함하는 검출 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시 내용은 전반사산란을 이용한 바이러스(바이러스성 유전자)의 정량 스크리닝 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 개시 내용은 인플루엔자 바이러스와 같은 바이러스 유전자에 대하여 특이적인 프로브를 함유하고 플라즈몬 나노금속 산란 특성을 갖고 서로 중첩되지 않는 흡수스펙트럼을 갖는 적어도 2가지 금속을 구비한 검출 플랫폼을 이용하여 바이러스 유전자에 대한 증폭 과정 없이 단일 분자 수준에서 직접 검출함과 동시에 이를 효과적이고 정확하게 정량화할 수 있는 질병진단 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 나노기술을 이용하여 바이오칩과 같은 진단 분야에 적용하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이와 같이, 나노기술을 접목함에 따라 바이오칩의 소형화, 감도 증진, 간단한 시료 전처리 및 종래 기술에서는 구현하기 곤란한 스마트 기능 등을 수행할 수 있게 됨으로써 기존의 마이크로 수준에서의 바이오 진단 기술에서 시료량, 반응시간, 노동력, 현장 진단, 검출 한계 등과 관련하여 제기된 다양한 문제점들을 극복할 수 있는 돌파구를 마련할 수 있게 되었다.

[0003] 이러한 나노기반의 기술을 바이러스, 특히 신종 플루와 같은 인플루엔자 바이러스의 진단 분야에 적용하고자 시도 중에 있다.

[0004] 인플루엔자 바이러스는 세계적으로 공중위생에 대한 심각한 위협을 야기하고 있으며, 최근 고병원성 조류 H5N1 변종의 인간에 대한 전염 가능성에 따른 문제점이 제기되고 있고, 전 세계에 걸쳐 급속도로 확산된 유행성 신종 A/H1N1의 출현으로 인하여 이에 대한 우려는 증가하고 있는 실정이다. 특히, 신종 인플루엔자 바이러스가 발견되고 인간 간 전염 가능성이 높아짐에 따라 보다 신속하고 정밀한 인플루엔자 바이러스의 검출 또는 진단 방법이 요구되고 있다.

[0005] 또한, 인플루엔자 바이러스의 높은 전염성 등을 고려할 때, 극미량의 샘플에 대하여도 정확한 진단을 할 수 있는 방안이 요구된다.

[0006] 종래에 인플루엔자 바이러스의 의심환자의 진단(또는 확진)을 위한 보편적인 검사 방식으로 인플루엔자 바이러스 신속항원(influenza virus rapid antigen)법이 알려져 있다. 현재 시판되고 있는 Quidel사의 Sofia POCT

제품이 자동화검사 시스템으로서 높은 민감도를 달성할 수 있는 것으로 평가되고 있다. 다른 제품으로서 ClearView사 및 Veritor사 제품이 알려져 있으나, 면봉(Swab) 검체만을 사용하는 단점이 있다. 특히, Clearview사 및 SD사의 Bioline 제품은 민감도가 높지 않아 실제 환자에게 큰 도움이 되지 못하는 문제점이 존재한다(Eurosurveillance, Volume 18, Issue 21, 23 May 2013). 이 때문에, 신종 플루의 확진과 같은 인플루엔자 바이러스의 진단을 위한 특이적 검사법으로 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(real time polymerase chain reaction; RT-PCR) 기법이 주로 이용되고 있다.

- [0007] 이와 관련하여, 임상자들은 일반적으로 효소중합연쇄반응(PCR)과 같은 유전자(DNA) 증폭기를 이용하여 질병을 진단하고 있다. 이 기술은 현재 보편적으로 널리 사용되고 있을 뿐만 아니라 비교적 높은 효율을 갖고 있는 것으로 평가된다. 그러나, 위양성, 위음성 검출, 그리고 시간 및 시료의 소모가 많다는 단점을 가지고 있다. 또한, 특이성, 낮은 임상적 감도, 그리고 낮은 정확성에 따른 기술적 한계가 존재한다.
- [0008] 이외에도, 리가아제 중합연쇄반응(Ligase chain reaction; LCR), 리가아제 검출반응(Ligase detection reaction; LDR) 등도 알려져 있으나, 이들 모두 증폭 반응을 수반함에 따라 PCR과 유사하게 표적 핵산이 기하급수적 방식으로 증폭되므로 상술한 문제점을 내포하고 있다.
- [0009] 따라서, 증폭과정을 배제한 단일분자 분광법 (single-molecule spectroscopy)의 검출 프로토콜을 개발할 필요성이 꾸준히 제기되었다.
- [0010] 유전자 검출을 위한 비증폭(amplification-free) 검출법으로는 형광, 광자결장 배열, 전기화학법, 플라즈몬 나노입자를 이용한 암시야(dark-field) 센서, 압전식 센서(piezoelectric plate sensor)가 보고되었다. 최근 Mayr 그룹은 마이크로 유체형 칩을 제작하여 펨토몰(fM = 10⁻¹⁵ M) 수준으로 비증폭 유전자 검출에 성공한 바 있다. 그러나 여전히 개선된 단일분자 수준의 유전자 정량화 기술이 요구되는 실정이다.
- [0011] 전술한 바와 같이 유전자의 증폭 과정 없이 단일 분자 수준에서 직접 검출하기 위하여 형광표지를 결합한 후에 형광분광법을 이용하여 분석하는 방법이 알려져 있으나, 시간에 따른 형광신호의 변동(time-dependent fluctuations), 광안정성(photostability), 깜빡임(photoblinking) 및 광표백(photobleaching)과 같은 현상으로 인하여 장시간 검출이 곤란한 문제점을 가지고 있어, 이의 대안으로서 비형광(fluorescence-free) 검출 방법에 대한 관심이 증가하고 있다(V. Espina *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 2004, 290: 121-133).
- [0012] 이에 대하여, 본 발명자들은 파장-의존성 미분간섭대비 현미경법을 이용한 표적 생체분자의 비형광 검출방법(국내특허번호 제1514894호), 파장-의존성 플라즈몬 공명산란을 이용한 나노바이오칩 키트 및 이를 이용한 생체분자의 검출방법(국내특허번호 제1470730호) 등과 같이 비증폭 및 비형광 검출 방법을 개발한 바 있다. 구체적으로, 파장-의존성 미분간섭효과 검출법은 빛의 편광성과 간섭성을 이용하여 무색투명한 세포나 금속표면의 단차 등을 관찰할 수 있는 현미경법으로, 편광소자와 웰스턴 프리즘(Wollaston prism)에 의하여 빛을 분산시켜 샘플면에 투과시켜 샘플에 생긴 광로차의 미분수치를 시료 상면에 대비(contrast)로 변화시켜 시료의 이미지를 얻는 방법이다.
- [0013] 더 나아가, 본 발명자들은 적어도 2개의 금속을 이용한 나노태그/나노프로브(nanotag/nanoprobe) 플랫폼을 기반으로 하되, 전반사(total internal reflection; TIR) 현상을 이용하여 바이오칩 표면에서 형성된 소산장(evanescent field)에 의한 산란 신호를 선택적 대역통과필터를 통하여 검출하는 방법을 제시한 바 있다.
- [0014] 그러나, 전반사 산란에 의하여 수집된 신호 또는 영상으로부터 나노 프로브(제1 금속) 및 나노 태그(제2 금속) 각각으로부터 유래되는 신호 또는 영상을 정확하게 구별하는 것은 용이한 작업이 아니다. 전술한 종래기술에서 사용된 대역통과필터는 특정 범위 내의 주파수(또는 파장)만을 통과시키고 상기 범위 이외의 주파수(또는 파장)는 차단 또는 약화시키는 기능을 하기는 하나, 제1 금속 및 제2 금속 각각으로부터 유래하는 신호를 스크린 상에 단일 샷으로 수집하기 곤란하다. 특히, 상술한 2가지 금속의 산란 신호로부터 정확하게 바이러스를 검출하는 것 이외에도, 이를 정량화할 목적으로 데이터 처리 과정에서 픽셀 간의 거리를 정확하게 계산하기 위하여는 산란 신호의 중심 위치 정보를 정확하게 확인할 필요가 있으나, 앞서 언급된 종래기술에 의하여는 효과적인 구현이 곤란하다.
- [0015] 따라서, 바이러스 유전자의 증폭 과정 없이 보다 정밀한 분광학적 영상을 통하여 바이러스를 효과적으로 검출함과 동시에 이를 정량화하기 위한 스크리닝 방안에 대한 요구가 증대되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 따라서, 본 개시 내용에서는 바이러스성 유전자에 대하여 특이적으로 반응하는 올리고머를 함유하고 플라즈몬 나노금속 산란의 특성을 갖는 적어도 2가지 금속을 구비한 플랫폼을 이용하여 바이러스 유전자의 증폭 과정 없이 전반사에 의한 소산장으로부터 생성되는 산란 신호를 정확하게 직접 검출하고, 또한 이를 동시 정량화함으로써 극미량의 질병관련 바이러스 유전자에 대하여도 고감도 검출 및 동시 정량화를 달성할 수 있는 스크리닝법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 개시 내용의 일 면에 따르면,

[0018] 질병 관련 표적 바이러스의 비증폭 및 비형광 검출방식을 통하여 정량 스크리닝하는 방법으로서,

[0019] a) 상기 표적 바이러스에 특이적으로 결합하는 프로브 올리고머가 제1 금속-나노패턴화된 기재에 고정된 포획 나노패드, 및 제2 금속 함유 나노입자가 상기 표적 바이러스에 특이적으로 결합하는 검출 올리고머와 결합된 검출 태그를 포함하는 플랫폼을 제공하는 단계, 여기서 제1 금속 및 제2 금속은 서로 흡수스펙트럼이 중첩되지 않도록 선택됨;

[0020] b) 분석 샘플 내 표적 바이러스를 검출 태그의 검출 올리고머 및 포획 나노패드의 프로브 올리고머와 혼성화 반응시키는 단계;

[0021] c) 광원으로부터 조사된 광을 전반사시켜 소산장을 형성하고, 상기 소산장에 의하여 검출 태그 및 상기 포획 나노패드로부터 발생하는 전반사산란 신호를 생성하는 단계; 및

[0022] d) 상기 생성된 전반사산란 신호를 투과격자미러(TR)로 통과시켜 제1 금속으로부터 기인하는 산란 신호 및 제2 금속으로부터 기인하는 산란 신호로 분할함으로써 비분산(non-dispersed) 또는 0차의 분광학적 영상(spectral image), 그리고 분산된(dispersed) 또는 1차 이상의 분광학적 영상을 생성하여 수집하는 단계;

[0023] 를 포함하며,

[0024] 여기서, 가우시안 맞춤에 의한 데이터 처리를 통하여 상기 분할된 산란 신호 각각에 대한 중심 위치 정보 또는 차수 간의 간격을 측정하는 방법이 제공된다.

[0025] 예시적 구체예에 따르면, 상기 단계 d)는 분석 샘플 내 표적 바이러스를 검출 태그의 검출 올리고머와 1차 반응시키고, 포획 나노패드의 프로브 올리고머와 상기 1차 반응 생성물을 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0026] 예시적 구체예에 따르면, 상기 플랫폼의 제1 금속-나노패턴은 투과격자미러를 통과한 제1 및 제2 금속으로부터 발생한 전반사 산란 신호의 비분산된 또는 0차 분광학적 영상과 분산된 또는 1차 이상의 분광학적 영상이 중첩되지 않도록 배열될 수 있다.

[0027] 예시적 구체예에 있어서, 상기 비분산된 또는 0차 분광학적 영상 및 상기 분산된 또는 1차 이상의 분광학적 영상이 단일 샷으로 수집될 수 있다.

[0028] 예시적 구체예에 따르면, 데이터 처리 시 분할된 산란 신호 각각에 대한 중심 위치 정보 또는 차수 간의 간격을 측정함으로써 분광학적 영상의 픽셀 간의 거리를 산출할 수 있다.

[0029] 예시적 구체예에 따르면, 상기 광원은 단일 파장의 광원일 수 있다.

[0030] 예시적 구체예에 있어서, 표적 바이러스는 인플루엔자 바이러스, 예를 들면 특정 타입의 인플루엔자 바이러스일 수 있다.

[0031] 본 개시 내용의 다른 면에 따르면,

[0032] 질병 관련 표적 바이러스의 비증폭 및 비형광 방식을 통하여 단일 샷으로 정량 스크리닝하기 위한 검출 시스템으로서,

[0033] 단일 파장의 레이저 광원;

[0034] 상기 광원으로부터 조사된 입사광을 전반사시켜 소산장을 형성하도록 구성된 도브 프리즘;

[0035] 제1 금속-나노패턴화된 기재 상에 표적 바이러스에 특이적으로 결합하는 프로브 올리고머가 고정된 포획 나노패

드, 및 제2 금속 함유 나노입자가 표적 바이러스에 특이적으로 결합하는 검출 올리고머와 결합된 검출 태그를 포함하는 플랫폼, 여기서 제1 금속 및 제2 금속은 서로 흡수스펙트럼이 중첩되지 않도록 선택되며, 상기 포획 나노패드는 상기 도브 프리즘 상의 소산장 영역에 위치하며, 상기 포획 나노패드의 프로브 올리고머 및 상기 검출 태그의 검출 올리고머가 표적 바이러스와 혼성화 반응되어 결합할 경우, 제1 금속 및 제2 금속으로부터 유래되는 전반사산란 신호를 생성함;

- [0036] 상기 포획 나노패드 상측에 이격되어 상기 전반사 산란 신호를 수집하도록 배열된 대물렌즈; 및
- [0037] 상기 대물렌즈 상측에 배치되어 상기 수집된 전반사산란 신호를 제1 금속으로부터 기인하는 산란 신호 및 제2 금속으로부터 기인하는 산란 신호로 분할(분산)하는 투과격자미러; 및
- [0038] 가우스 맞춤에 의한 데이터 처리를 통하여 상기 분할된 산란 신호 각각에 대한 중심 위치 정보 또는 차수 간의 간격을 측정하여 이를 이미지화하는 영상화 처리부를 포함하는 검출부;
- [0039] 를 포함하는 검출 시스템이 제공된다.

발명의 효과

- [0040] 본 개시 내용에 따르면, 투과격자미러(TG)를 이용하여 플라즈몬 공명산란 흡수스펙트럼이 상이한 적어도 2종의 금속 간의 분광학적 영상(0차 및 1차 이상의 영상)을 스크린 상에 단일 샷으로 수집할 수 있다. 그 결과, 비분산(0차) 영상에서 구별하기 곤란한 2가지 산란 신호를 방해 효과 없이 효과적으로 구별할 수 있어 최적의 바탕선-대-신호비(S/N)를 얻을 수 있기 때문에 획기적으로 검출감도를 증가시킬 수 있다.
- [0041] 더욱이, 투과격자미러(TG)로부터 분할된 산란 신호(또는 영상)를 가우시안 맞춤에 의한 데이터 처리에 의하여 분할된 산란 신호 각각에 대한 중심 위치 정보 또는 차수 간의 간격을 측정함으로써 보다 정확한 정량 스크리닝을 달성할 수 있다. 상술한 검출 또는 분석 특성을 통하여 단일분자 카운팅, 신속한 스크리닝, 및 넓은 직선의 정량곡선(검정곡선) 범위에서 샘플의 전처리를 최소화할 수 있어, 정량 분석이 요구되는 극미량의 질병관련 바이러스형 유전자를 신속하고 높은 재현성의 비증폭 방식으로 진단할 수 있는 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1a는 본 개시 내용의 일 구체예에 따라, 투과격자미러가 장착된 전반사 산란 검출시스템 및 비증폭 및 비형광 질병관련 바이러스 유전자의 진단을 위한 플랫폼을 이용하여 포획 나노패드 상에서 바이러스성 유전자의 이중 혼성화(dual hybridization) 과정을 개략적으로 도시하는 모식도이고;
- 도 1b 및 도 1c는 각각 본 개시 내용의 일 구체예에 따라, 플라즈몬 공명 산란광을 검출할 수 있는 고감도 CCD 카메라가 장착된 정립형(upright type) 현미경 검출 장치에 파장이 다른 2개의 광원, 투과격자미러(TG) 및 대물렌즈가 구비된 비형광 검출용 프리즘형 전반사산란 정립형 현미경 사진 및 구성도이고;
- 도 1d는 기재(유리 기재) 상에 배열된 100 nm 사이즈의 금(Au) 나노패턴의 미분간섭효과(differential interference contrast, DIC) 영상 및 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM) 영상이고;
- 도 2a 및 도 2b는 각각 실시예 2에 따라 전반사 산란용 나노태그로 사용된 은(Ag) 나노입자 및 검출 올리고머가 결합된 은(Ag) 나노 입자에 대한 투과형 전자현미경(transmission electron microscope, TEM) 이미지 및 이의 UV-VIS 흡수 스펙트럼이고;
- 도 3은 실시예 2에 있어서 (a) 20 nm 은(Ag) 나노 입자, (b) 최종 단계에서 원심분리된 샘플, (c) 원심분리 단계를 배제한 샘플, 및 (d) 올리고머 결합 단계마다 원심분리를 수행한 샘플 각각에 대한 제타 전위와 샘플의 색상을 나타내는 도면이고;
- 도 4는 실시예 2에 있어서 (a) 금(Au)-나노패드, (b) 프로브 올리고머가 결합된 금(Au)-나노패드, (c) 프로브 올리고머 및 MCH가 결합된 금(Au)-나노패드, 및 (d) MCH만 존재하는 금(Au)-나노패드 각각에 대한 수접촉각을 나타내는 도면이고;
- 도 5는 실시예 2에 있어서 (a) 이중가닥 DNA가 결합된 20 nm 전반사산란 은(Ag) 나노 태그 및 (b) 단일가닥 DNA가 결합된 20 nm 전반사산란 은(Ag) 나노태그의 FT-IR 스펙트럼이고;
- 도 6은 실시예 2에 있어서 금(Au)-나노패드 상에 H7N9 바이러스성 유전자의 혼성화 반응 후, (a) 투과격자미러(TG)가 장착되지 않은 전반사산란 검출 시스템으로부터 얻은 산란 영상, (b) 투과격자미러(TG)가 장착된 전반사

산란 검출 시스템으로부터 얻은 산란 영상. (c) 금(Au)-나노패드와 이중가닥 DNA가 결합된 나노태그의 0차 및 1차 사이의 거리를 상대적 감도를 통하여 나타낸 그래프, 그리고 (d) 정확한 거리 측정을 위하여 가우시안 맞춤을 적용하여 나타낸 그래프이고;

도 7은 실시예 2에 있어서 671 nm 광원 및 405 nm 광원의 조사 하에 금(Au)-나노패드 상에서 (a) 표적 유전자의 혼성화 전, 그리고 (b) 표적 유전자의 혼성화 후의 분광학적 영상이고; 그리고

도 8은 실시예 2에 있어서 (a) 405 nm 광원 조사 시 표적 유전자의 다양한 농도에 따른 산란 신호의 정량곡선 그래프, 그리고 (b) 특이성 조사를 위하여 표적 샘플이 존재하지 않은 과정(blank control), 비상보적 염기서열을 갖는 표적 샘플(H5N1) 및 상보적 염기서열을 갖는 표적 샘플(H7N9) 각각의 산란신호를 도표화한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 본 발명은 하기의 설명에 의하여 모두 달성될 수 있다. 하기의 설명은 본 발명의 바람직한 구체예를 기술하는 것으로 이해되어야 하며, 본 발명이 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 본 명세서에서 사용되는 용어는 하기와 같이 정의될 수 있다.
- [0045] "바이오칩"은 나노기술을 접목하여 제조한 나노 바이오칩을 의미할 수 있는 바, 이때 "나노기술"은 종래의 바이오칩에 비하여 칩 자체의 크기 또는 구성요소를 소형화하거나 감도를 향상시키거나, 또는 종래기술에 의하여는 불가능한 스마트 기능을 가능케 할 수 있다. 본 명세서의 전체적인 기재 취지 상, 바이오칩은, 예를 들면 금속 이 나노패턴화된 바이오칩으로서 표적 바이러스 또는 유전 물질의 개재(매개) 하에 서로 상이한 파장에서 산란 특성을 갖는 적어도 2종의 금속 나노 구조가 결합된 형태로 이해될 수도 있다.
- [0046] "비형광 검출(fluorescence-free detection)"은 일반적으로 형광 이외의 수단을 이용한 검출 방법을 의미할 수 있는 바, 대표적으로 흡수, 산란 등을 이용한 검출방법을 포함할 수 있다.
- [0047] "전반사 산란(total internal reflection scattering; TIRS)"은 서로 상이한 굴절률을 갖는 2개의 매질(제1 매질 및 제2 매질)이 접한 시스템에서 제1 매질을 통하여 특정 각으로 빛이 입사하는 경우, 계면에서 매질 간의 굴절률 차이에 의하여 입사 광이 제2 매질로 투과되지 못하고 모두 제1 매질로 다시 반사되는 현상을 의미할 수 있다. 즉, 계면에서 다른 면의 굴절률이 더 낮고, 입사각이 임계각보다 크다면, 광은 통과하지 못하고 전체 반사가 형성된다. 이때, 계면에서 소정의 폭으로 소산장(evanescent field)이 형성되는 바, 해당 범위에 존재하는 광학활성 물질 즉, 산란을 유발하는 물질에 의하여 산란되는 광을 검출할 수 있다. 이처럼, 소산장 층(EFL) 가까이에 위치할 때, 산란 강도(scattering intensity)는 계면으로부터 입자까지의 거리에 의존하게 된다. 산란 강도는 하기 수학식 1로 나타낼 수 있다.
- [0048] [수학식 1]
- [0049]
$$I(h) = I_0 \exp(-\beta h)$$
- [0050] 여기서, h 는 입자-표면 간의 거리, I_0 은 h 가 0일 때 측정된 산란 강도, 그리고 β 는 감쇠지수(decay index)이다.
- [0051] 상기 수학식 1에 나타낸 바와 같이, 소산장의 강도는 입사광의 강도에 의존하며, 거리에 따라 지수적으로 감쇠된다.
- [0052] "분석 샘플"은 본 개시 내용에서 제시된 나노바이오칩 또는 검출 플랫폼에 적용 가능한 한, 특별히 한정되는 것은 아니나, 다만 나노바이오칩에 균등하게 처리할 수 있는 액상 샘플일 수 있다. 특히, 표적 바이러스형 유전자를 함유할 수 있는 임의의 물질 또는 성분일 수 있으며, 더 나아가 생체가 노출되거나 생체에 의하여 처리되는 각종 물질과 생체에서 분리된 물질일 수도 있다. 생체에서 분리된 물질 또는 성분의 예로서, 혈액, 소변, 콧물, 세포, 추출된 DNA, RNA, 단백질 등일 수 있다.
- [0053] "바이러스"는 박테리아보다 덜 진화되고 생물과 무생물의 중간단계에 위치하는 미세 감염체를 의미할 수 있다. 바이러스는 단독으로는 생존능력이 없으므로 다른 살아있는 세포 내에서만 복제 가능하다. 구체적으로, "바이러스"는 아데노바이러스 7, PRRSV, 사람, 조류, 돼지, 말, 소와 개 인플루엔자를 비롯한 인플루엔자, 연어 빈혈(salmon anaemia) 바이러스, 돼지 콜레라 바이러스(classical swine fever), C형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, 아프리카 돼지 콜레라(African swine fever) 바이러스, 푸말라(Puumala) 바이러스, 전염성 기관지염 바이러스, 전달성 위창자염(transmissible gastroenteritis), 사스 코로나바이러스(SARS CoV), 므라버그(Mraburg)

바이러스, 에볼라 바이러스, 웨스트나일 바이러스, 황열병 바이러스, 진드기 매개 뇌염 바이러스, 소 하리증(bovine diarrhea) 바이러스, 개 파보바이러스(parvovirus), 콕사키(Coxsackie) B3, 콕사키 B5, 조류 레오바이러스(reovirus), 로타바이러스(rotavirus), 쉼리키 삼림열(Semliki forest) 바이러스, 돼지 제2형 써코(circo type 2) 바이러스 등을 의미할 수 있다.

[0054] "인플루엔자 바이러스"는 일반적으로 상기도 점막에 침입하여 호흡기 질환을 일으키는 인플루엔자의 병원체를 의미할 수 있다. 인플루엔자 바이러스는 보체 결합 항원의 차이에 따라 A-B-C 3가지 형태로 구분되며, 유행할 때마다 혈구 응집 항원이 변이하여 광범위한 유행을 나타낸다. A형의 NA에는 N1-N2의 2종, 그리고 HA에는 HA0-HA1-HA2-HA3의 4종이 존재한다. A형은 말-돼지-새에 감염하며 새로운 아형은 동물 바이러스와의 조환형이며, 그 밖에 동일 아형내 점변이가 있다. B형 및 C형은 일반적으로 인체 이외에는 감염되지 않으며 닭의 적혈구를 응집하는 성질을 갖고 있다. 또한, 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A-B-C 뿐만 아니라, 이사바이러스 및 토고바이러스를 포함할 수 있고, 특히 조류 인플루엔자 및 돼지 인플루엔자도 포함하는 것으로 이해될 수 있다.

[0055] "나노패턴"은 나노미터 단위의 반복된 패턴을 의미할 수 있다. 일 구체예에 따르면, 나노패턴은, 예를 들면 약 0.1 내지 1000 nm, 보다 구체적으로는 약 1 내지 500 nm의 직경을 가질 수 있다. 또한, 나노패턴의 간격(pitch)은, 예를 들면 약 1 nm 내지 100 μ m, 보다 구체적으로 약 10 nm 내지 약 10 μ m 범위일 수 있다.

[0056] 예시적 구체예에 있어서, 나노패턴은 금속으로 나노패턴화된 것으로, 예를 들면 가로 배열된 형태로 형성될 수 있다. 이를 위하여, 잉크젯 나노프린팅, 전자빔 식각(e-beam lithography), 원자힘현미경-디펜나노식각(atomic force microscope-dip pen nanolithography, AFM-DPN) 등의 나노식각(nanolithography) 기술 중 하나를 선택하여 제조할 수 있다.

[0057] "나노입자"는 협의로는 예를 들면 약 1 내지 200 nm, 구체적으로 약 10 내지 100 nm 범위의 사이즈 또는 평균 직경을 갖는 입자를 의미할 수 있으나, 경우에 따라서는 마이크로 사이즈의 입자 등을 포함하는 것으로 이해될 수 있다. 특히, 본 개시 내용의 취지 하에서 플라즈몬 공명산란을 일으킬 수 있는 임의의 사이즈를 갖는 입자 역시 포함하는 개념으로 이해될 수 있다. 예시적 구체예에 있어서, 나노입자는 금속 재질일 수 있는데, 특히 나노 영역에서는 입자 사이즈에 따라 색상이 변화할 수 있다. 또한, 나노입자는 표적 바이러스 또는 유전물질과 특이적으로 반응하는 검출 올리고머와 결합할 수 있다.

[0058] "올리고머"는 비교적 적은 개수의 동일 서브유닛(즉, 프로토머)을 함유하는 다량체(multimer) 단백질을 의미할 수 있다.

[0059] "표적 유전물질"은 수개, 수백 개, 수천 개 또는 수백만 개의 뉴클레오티드로 이루어질 수 있으며, 또한 DNA, RNA 등의 절편(fragment)도 해당될 수 있다. 이러한 표적 유전물질(또는 이의 절편)의 염기 서열은 검출 올리고머 및 프로브 올리고머의 염기 서열과 상보적 관계를 갖고 있어 혼성화될 수 있다.

[0060] "상보적"이라는 용어는 뉴클레오티드 또는 핵산 사이의 염기쌍을 혼성화할 수 있는 것을 의미하며, 통상 A와 T (또는 U), 또는 C와 G이다.

[0061] "프로브"라는 용어는 표적 핵산의 존재, 부재 및/또는 양을 평가하기 위하여, 표적 핵산 내에 함유된 특정 염기 서열과 상보적인 염기 서열을 포함하고 있으며, 적절한 조건 하에서 혼성화될 수 있는 것을 의미한다.

[0062] "포획"은, 예를 들면 금속 나노패턴 상에 고정되는 것을 의미할 수 있는 바, 구체적으로 분석하고자 하는 표적 바이러스 또는 바이러스성 유전물질과 특이적으로 상호작용하여 분석 샘플 중 표적 바이러스 또는 바이러스성 유전물질을 프로브 올리고머가 고정된 금속 나노패턴 기재(기질) 상에 고정하여 검출할 수 있도록 한다.

[0063] "프로브 올리고머" 및 "검출 올리고머"는 표적 바이러스 또는 유전물질과 특이적으로 결합할 수 있는 올리고머를 의미할 수 있다. 이때, 프로브 올리고머 및 검출 올리고머는 서로 같거나 상이할 수 있다.

[0064] "혼성화"는 이중사슬 핵산의 변성으로 만들어진 단일사슬의 핵산이, 상보적인 염기서열을 가진 또 다른 종류의 핵산과의 상호작용에 의하여 이중가닥 핵산을 생성하는 것을 의미할 수 있다. 혼성화에 관한 일반적인 사항은 당업자에게 알려져 있는 바, 예를 들면 미국특허번호 제4,647,529호 등의 다수 문헌에 기술되어 있으며, 상기 문헌은 본 발명의 참고자료로서 포함된다.

[0065] "광원(light source)"은 광학적 분석을 위한 광을 공급하는 소스로서, 광의로는 원하는 분석 특성에 따라 X-선, 자외선(UV) 또는 가시광선과 같이 특정 파장 영역의 광을 일정한 강도로 제공할 수 있는 것으로 이해될 수 있다. 광원으로서 단일파장 또는 다중파장 광원을 사용할 수 있다. 다만, 광원의 구체적인 예로서 프리즘으로 입사되는 광의 각도를 용이하게 조절하기 위하여 특정 파장(단일 파장)의 레이저를 광원으로 사용하는 것이 유

리할 수 있다.

- [0066] "투과격자미러(transmission grating mirror, TG)"는 샘플을 통과하는 광이 격자에 의하여 0차(zero-order), 1차(first-order), 2차(secondary-order) 등으로 산란광을 분해(분산)시켜 영상화할 수 있도록 하는 광학 장치를 의미할 수 있다.
- [0067] "검출부"는 샘플로부터 유래하는 전반사산란 신호를 감지하여 데이터화 및/또는 영상화할 수 있는 장치를 의미할 수 있다. 현미경으로부터 제공되는 영상을 처리할 수 있도록 현미경에 연결되어 구비되고, 또한 영상처리를 위한 프로그램을 구비한 컴퓨터 또는 마이크로프로세서를 구비한 영상처리부를 포함할 수 있다. 예를 들면, 전반사산란 시스템에 연결 설치되어 현미경으로부터 제공되는 영상을 처리하여 원하는 영상으로 출력할 수 있고, 당업계의 통상적으로 사용되는 영상처리부라면 특정 종류로 한정되는 것은 아니다.
- [0068] 진술한 바와 같이, 본 명세서에서는 분광학적 분해능(spectral resolution)을 기반으로 하여, 극미량의 질병 바이러스 또는 유전자에 대하여도 PCR과 같은 증폭과정 없이 단일 샷 방식으로 정량 스크리닝하는 방법, 및 투과격자미러를 구비한 비형광 전반사산란 검출시스템을 이용하여 인플루엔자 바이러스와 같은 바이러스성 유전자를 비증폭 및 비형광 방식으로 진단할 수 있는 방법을 제공한다. 이를 위하여, 서로 흡수 스펙트럼이 중첩되지 않고, 바람직하게는 플라즈몬 산란 특성을 갖는 적어도 2종의 금속 나노 구조를 선택한다.
- [0069] 구체적으로, 상이한 흡수파장을 갖는 적어도 2종의 금속 나노구조(또는 입자)를 포함하는 플랫폼을 이용하여 비분산(0차) 영상에서 구별이 곤란한 적어도 2종의 금속의 전반사산란 신호를 분산(예를 들면, 1차) 영상을 통하여 구별함으로써 기재(기질)로 사용한 금속 나노입자의 산란신호의 방해 효과를 제거하고, 또한 검출 태그로 이용한 금속 나노입자의 산란신호만을 선택적으로 수집하여 검출 감도를 증가시킴으로써 단일분자 수준의 스크리닝이 가능하다.
- [0070] 도 1a는 본 개시 내용의 일 구체예에 따라, 투과격자미러가 장착된 전반사 산란 검출시스템 및 비증폭 및 비형광 질병관련 바이러스 유전자의 진단을 위한 플랫폼을 이용하여 포획 나노패드 상에서 바이러스성 유전자의 이중 혼성화(dual hybridization) 과정을 예시한다. 이하에서는 주로 제1 금속을 금(Au)으로 특정하는 한편, 제2 금속을 은(Ag)으로 특정하고 있으나, 이는 설명의 편의를 위한 것으로서 예시적의 의미로 이해되어야 한다.
- [0071] 상기 도시된 과정에서, 먼저 검출 올리고머로서 표적 바이러스(예를 들면, H7N9 바이러스)에 대하여 특이적으로 결합할 수 있는 단일 사슬 DNA(ssDNA)를 사용하고, 이는 은(Ag)-나노입자(제2 금속 나노입자)와 결합하여 검출 태그를 형성한다. 상기과 같이 형성된 검출 태그는 분석 샘플 내에 함유된 표적 바이러스(PC; 예를 들면 H5N1 바이러스)와 접촉하게 되고, 이중 PC와 혼성화 반응을 통하여 특이적으로 결합된다.
- [0072] 이와 별도로, 제1 금속으로서 금(Au)이 나노패턴화된 기재 상에 상기 표적 바이러스에 특이적으로 결합하는 프로브 올리고머가 고정된 포획 나노패드 또는 바이오칩이 제공된다.
- [0073] 예시적 구체예에 따르면, 포획 나노패드 또는 바이오칩에서 사용 가능한 기재의 경우, 예를 들면 실리콘, 글라스(glass), 용융 실리카(fused silica), 석영(quartz), 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane; PDMS) 또는 폴리메틸메타크릴레이트(poly(methyl methacrylate); PMMA)와 같은 광 투과성 고상 구조물 재질일 수 있다. 이때, 기재의 두께는, 예를 들면 약 10 nm 내지 1 mm, 구체적으로 약 100 nm 내지 500 μ m, 보다 구체적으로 약 1 내지 100 μ m의 범위일 수 있으나, 이는 예시적인 의미로 이해되어야 한다.
- [0074] 일 구체예에 따르면, 제1 금속 및 제2 금속으로서 서로 흡수 스펙트럼이 중첩되지 않고, 더 나아가 플라즈몬 산란 특성을 나타낼 수 있는 적어도 2종의 금속을 조합하여 사용할 수 있고, 이때 다양한 종류의 금속을 사용할 수 있다.
- [0075] 이와 관련하여, 제1 금속 및 제2 금속은, 구체적으로 각각 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt), 팔라듐(Pd) 및 이의 조합으로부터 선택될 수 있다. 다만, 도시된 구체예의 경우, 예시적으로 제1 금속 및 제2 금속으로서 각각 금(Au) 및 은(Ag)을 선택한 것이다. 또한, 제1 금속을 포함하는 나노 패턴, 및/또는 제2 금속을 포함하는 나노입자의 형태는 각각 구형, 별형(star-shaped), 네모형, 세모형 등일 수 있으며, 보다 구체적으로는 구형일 수 있다.
- [0076] 이와 관련하여, 금속 나노구조의 산란광 흡수 스펙트럼은 통상적으로 금속의 종류뿐만 아니라 구조의 크기 또는 형태에 따라서도 변화하므로 이를 모두 조합하여 나노 프로브 형성을 위한 기재(기질), 그리고 검출 올리고머에 결합하여 나노 태그로 각각 이용할 금속을 크기, 형태 및/또는 재질을 적절히 선택할 수 있다. 예를 들면, 금속 나노패턴의 모양에 따라서도 플라즈몬 공명이 달라질 수 있으므로 다양한 모양에 따른 패턴을 이용할 수 있는 바, 구체적으로 원형 또는 사각형의 금속 나노패턴일 수 있다.

- [0077] 예시적 구체예에 따르면, 포획 나노패드에 있어서 금속으로 나노패턴화할 경우에는 금속 특성에 따라 특정 화학 반응이나 결합이 용이할 수 있는데, 특히 항체, 앵타머 등의 포획 분자를 연결(고정)하기 용이하다. 예시적으로, 포획 나노패드의 나노패턴은 티올기(-SH)를 이용하여 공유결합이 용이하도록 처리된 금(Au)-나노패턴일 수 있다.
- [0078] 예시적 구체예에 있어서, 제1 금속-나노패턴화된 기재에 프로브 올리고머를 고정화하기 위하여 제1 금속 나노패턴의 표면을 프로브 올리고머를 함유하는 완충 용액(예를 들면, 인산칼륨염 완충용액)과 화학적 흡착 반응시키고, 후술하는 표적 바이러스와의 혼성화 반응에 앞서 비특이적 결합을 억제하기 위하여, 블로킹하는 과정을 수반할 수 있다. 이때, 블로킹을 위하여 예를 들면 머캅토헥산올(구체적으로, 6-mercapto-1-hexanol)을 이용할 수 있다.
- [0079] 또한, 혼성화 반응 전에 검출 태그의 제2 금속 나노입자의 표면을 개질할 수도 있다. 이러한 표면 처리 방법의 대표적인 예로서 알칸티올($\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{X}$) 단일층을 형성하는 것으로(여기서, n 은 1 내지 15), 알칸티올의 말단 위치에 존재하는 관능기 X에 의하여 분자 수준에서 금속 표면 구조를 변경하여 계면 특성을 조절할 수 있다. 보다 구체적으로, 카르복시기-말단 알칸티올 단일층을 형성하는 방식으로 개질할 수 있다. 이를 위하여, 카르복시기-함유 화합물로서 화학식 $[\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}]$ (n 은 1 내지 15)으로 표시되는 머캅토타르본산(mercapto carbonic acid) 등을 사용할 수 있고(즉, X가 -COOH임), 또한 알칸티올-함유 화합물로서, 예를 들면 머캅토타알코올, 구체적으로 머캅토헥산올(보다 구체적으로, 6-mercapto-1-hexanol)을 사용할 수 있다(즉, X가 -OH임). 이와 같이 개질된 금속 나노입자는, 예를 들면 EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) 및 NHSS(N-hydroxysulfosuccinimide)를 이용하여 활성화할 수 있으며, 이후 검출 올리고머와 반응시켜 검출 태그를 형성할 수 있다.
- [0080] 전술한 바와 같이, 검출 태그와 표적 바이러스(PC) 간의 1차 혼성화 반응 생성물은 포획 나노패드와 접촉하여 2차 혼성화 반응하게 되는 바, 그 결과 표적 바이러스는 이중 혼성화 반응을 통하여 제1 금속(Au)의 나노패턴 및 제2 금속(Ag)의 나노입자와 결합된 상태에 있게 된다. 반면, NC의 경우에는 포획 나노패드 및 검출 태그 모두와 결합되지 않은 상태로 존재한다.
- [0081] 예시적 구체예에 있어서, 1차 및 2차 혼성화 반응은 분석 샘플 내 표적 바이러스와 검출 올리고머, 그리고 1차 혼성화 반응 생성물과 프로브 올리고머 간의 혼성화 반응에 적합한 조건에서 수행되는 한, 특정 조건으로 한정되는 것은 아니다. 다만, 예를 들면 약 50 내지 80℃(구체적으로 약 60 내지 70℃)의 조절된 온도 범위, 그리고 예를 들면 약 20 내지 120분(구체적으로 약 30 내지 90분)의 반응 시간 범위 내에서 적절히 선택될 수 있다.
- [0082] 이처럼, 분석 샘플 내에 표적 바이러스(또는 바이러스성 유전물질)이 존재할 경우, 제2 금속 함유 나노입자(비형광 나노입자)와 결합된(표지된) 검출 올리고머와 특이적으로 결합하게 되는데, 이때 제2 금속 함유 나노입자는 전반사산란에 의하여 포획 나노패드의 제1 금속 함유 나노패턴과는 상이한 파장에서 전반사산란 신호를 발생하게 된다.
- [0083] 상기와 같이 포획 나노패드 및 검출 태그와 결합된 표적 바이러스는 전반사산란 검출 시스템을 통하여 비증폭 및 비형광 방식의 검출 및 정량화 스크리닝 과정(표적 바이러스의 유무, 함량 등)을 거치게 된다.
- [0084] 도 1b 및 도 1c는 각각 본 개시 내용의 일 구체예에 따라, 플라즈몬 공명 산란광을 검출할 수 있는 고감도 CCD 카메라가 장착된 정립형(upright type) 현미경 검출 장치에 파장이 상이한 2개의 광원(레이저), 투과격자미러 및 대물렌즈가 구비된 비형광 검출용 프리즘형 전반사산란 정립형 현미경 사진 및 구성도이다.
- [0085] 상기 검출 시스템의 경우, 광 경로를 따라 구성 요소들을 순차적으로 배열하는 방식의 정립형 현미경을 기본으로 하고 있으나, 도립형 현미경을 사용할 수도 있다. 예시적 구체예에 있어서, 검출 시스템은 당업계에서 통상적으로 사용되는 현미경을 기반으로, 광원, 전반사산란을 유도하는 프리즘, 개구수 조절 가능한 대물렌즈, 투과격자미러(TG) 등의 광학 부재 및 가우시안 맞춤 기능이 제공된 검출부를 적절한 위치에 배열하여 구성할 수 있다.
- [0086] 검출 시스템을 구성하는 부재들(구체적으로, 프리즘으로부터 검출부까지의 부재들)은 순차적으로 접촉되어 있거나 이격된 형태로 배열될 수 있으며, 이때 각각의 부재 간의 간격은 렌즈 및/또는 집광기의 초점거리, 프리즘의 확산각(divergence angle), 빔 편차각(beam deviation angle) 등의 광학적 인자(factor)를 고려하여 최적의 신호를 제공할 수 있는 위치에 배치되는 것이 유리하다. 따라서, 각각의 부재가 이격되어 있는 경우, 반드시 동

일한 간격으로 배치되는 것을 의미하지는 않는다.

- [0087] 도시된 구체예에 따르면, 2개의 레이저 광원 각각으로부터 방출된 광이 프리즘으로 소정 각도로 입사된다. 이와 관련하여, 전반사 산란을 유발하여 소산장을 형성하기 위하여 포획 나노패드 또는 바이오칩에서 사용 가능한 기재의 하부에 프리즘을 장착할 수 있다.
- [0088] 이때, 광원은 금속 나노입자에 조사될 경우, 플라즈몬 공명산란을 일으키는 바, 금속 나노입자의 특성에 따라 특정한 파장 영역의 광을 일정한 강도로 제공할 수 있다. 예시적 구체예에 따르면, 단파장의 광을 조사하는 레이저를 사용할 수 있다. 선택적으로, 광원 앞에 적어도 하나의 미러 또는 미러조절기(mirror manipulator)를 구비하여 광의 입사각을 조절할 수 있도록 구성될 수 있다.
- [0089] 이때, 프리즘은 광이 입사되는 제1 면(도시된 예에서는 2개의 광원에 대응하여 2개의 제1 면이 형성됨) 및 입사광이 전반사되어 소산장을 형성하도록 형성된 제2 면을 포함한다. 이러한 타입의 프리즘의 대표적인 예로서 도브 프리즘(dove prism; DP)을 들 수 있다. 도브 프리즘은 평행 광의 방향을 변경하는 않으나, 상하로 뒤집힌 상을 형성하는 프리즘으로 알려져 있다.
- [0090] 택일적 구체예에 따르면, 프리즘 대신에 전반사형 대물렌즈를 사용할 수 있으며, 이 경우 후술하는 별도의 대물렌즈를 생략할 수도 있을 것이다.
- [0091] 일 구체예에 있어서, 표적 바이러스 또는 표적 유전자는 구체적으로 인플루엔자 바이러스일 수 있는 바, 표적 바이러스의 개재 하에서 검출 태그와 샌드위치 방식으로 결합된 포획 나노패드(바이오칩)는 전반사에 의하여 형성된 소산장 영역(또는 이의 부근)에 위치함에 따라 전반사산란 신호를 생성한다.
- [0092] 구체적으로, 제2 금속 함유 나노입자(비형광 나노입자)가 포획 나노패드의 제1 금속의 전반사 산란신호와 상이한 파장에서 제2 금속의 전반사산란 신호를 발생시키게 된다. 도시된 구체예에 따르면, 선택적으로 광 굴절 현상을 최소화하기 위하여 글라스 슬라이드와 유사한 굴절률을 갖는 오일 층을 포획 나노패드(예를 들면, 금 나노바이오칩(GNC))의 상면 및 하면 각각에 도포(형성)할 수 있다.
- [0093] 이와 같이 생성된 2종의 금속으로부터 생성된 전반사산란 신호는 포획 나노패드(바이오칩)의 상층에 소정 간격으로 이격된 대물렌즈(objective lens; OL)를 통하여 수집된다. 예시적 구체예에 따르면, 대물렌즈는 개구수(numerical aperture, NA)를 조절할 수 있도록 구성되어 샘플에 조사되는 광의 양을 조절할 수 있다. 이때, 대물렌즈의 개구 수는, 예를 들면 0.6 내지 1.3 범위일 수 있다.
- [0094] 예시적 구체예에 따르면, 검출 시스템은 프리즘과 포획 나노패드(또는 바이오칩) 사이에 선택적으로 회전 스테이지를 포함할 수 있다. 회전 스테이지는 분석 샘플이 위치한 채물대를 360° 회전시킬 수 있는 구성요소이며, 1° 간격으로 원하는 방향으로 회전할 수 있고, 비대칭금속에 대하여 다양한 각도(0 내지 360°)에서 다른 방향의 편광을 검출할 수 있기 때문에 비대칭금속의 성질 또는 특성을 용이하게 분석할 수 있게 하는 부재에 해당된다.
- [0095] 본 구체예에 따르면, 전반사산란 검출 시스템은 대물렌즈를 통과한 전반사산란(플라즈몬 공명 산란) 신호는 광학조절장치인 투과격자미러(TG)를 통과하도록 구성된다. 투과격자는 특정 파장을 갖는 단색 광(monochromatic light)의 빔이 격자 수직면에 대하여 소정 각도로 격자 상에 입사되고 회절 차수(m)에 대응하는 복수개의 상호 구별되는 경로를 따라 회절된다. 이때, 도면에서 d는 격자의 그루브 간의 간격(spacing)을 의미한다.
- [0096] 이와 같이, 대물렌즈와 검출부 사이에 투과격자미러를 개재하는 방식으로 전반사산란 및 투과격자미러를 조합함으로써 2종의 금속으로부터 유래하는 전반사산란 신호를 하나의 스크린으로 동시에 수집할 수 있을 뿐만 아니라, 분산된 영상(1차 이상)을 통해 2종의 금속으로부터 발생하는 전반사산란신호를 간편하게 구별할 수 있다. 즉, 투과격자미러를 투과한 전반사산란 신호는 단일 스크린 상에 분광학적 영상(spectral imaging) 또는 분산된 영상인 1차 영상($n = +1$), 그리고 본래 영상 또는 비분산된 영상(투과격자미러의 부존재 하에서의 영상과 동일한 영상)인 0차 영상($n = 0$)으로 분할(분산)된다.
- [0097] 일 구체예에 따르면, 투과격자미러에 의하여 분할된 전반사산란신호는 검출부에 의하여 영상화된다. 검출부는, 예를 들면 광다이오드 배열(photodiode arrays, PDA), 전하주입장치(charge-injection device, CID), 전하결합장치(charge-couple device, CCD) 및 디지털 단렌즈 반사식 사진기(digital single lens reflex)를 포함할 수 있다. 도면에서 L_1 은 투과격자미러와 검출부(예를 들면, CCD) 간의 거리, 그리고 L_2 는 0차 영상과 1차 영상 간의 변위 거리를 의미한다.

- [0098] 한편, 전술한 분할된 산란 신호의 중심 위치 정보를 수집하여 데이터 처리 시 픽셀 간의 거리를 정확하게 계산함으로써 고해상도 영상을 얻는 것이 바람직한 바, 이를 위하여 본 구체예에서는 가우시안 맞춤법(Gaussian fitting)을 적용한다. 즉, 이중가닥 DNA의 개재(매개) 하에 제1 금속-나노패드와 결합된 나노태그의 0차 및 1차 이상의 영상 간의 거리를 상대적 감도로 도시한 그래프에 대하여 정확한 차수 거리 측정을 위하여 가우시안 맞춤법을 적용한다.
- [0099] 이와 같이 분할된 전반사산란 신호에 대한 데이터 영상 처리법으로 가우시안 맞춤법을 적용시킬 경우, 2종의 금속 각각으로부터 유래하는 전반사산란 신호의 중심 위치를 찾을 수 있고, 차수 간의 간격 계산의 오차를 유의미한 수준으로 저감할 수 있다. 그 결과, 단일과장 광원을 이용하는 전반사산란 측정법뿐만 아니라, 다중과장 광원을 사용하는 다양한 검출 장치를 사용하는 경우에도 분산된(1차 이상) 분광학적 영상의 중심 위치를 용이하게 찾을 수 있는 장점을 제공한다.
- [0100] 이처럼, 본 구체예에 따른 샘플 내 바이러스의 정량 스크리닝 방법의 주된 특징은 하기와 같다.
- [0101] 1) 전반사산란 검출 시스템을 통하여 비형광 방식으로 검출할 수 있기 때문에 종래기술에 따른 형광 검출의 기술적 한계를 극복할 수 있는 바, 특히 광학장치인 투과격자미러(TG)를 도입함으로써 과장이 다른 기재(기질) 및 검출 태그로부터 생성된 2종의 금속 산란 신호를 단일 샷 방식으로 스크리닝할 수 있기 때문에 상이한 2종의 금속 산란 신호의 중첩 또는 방해 효과를 제거할 수 있다.
- [0102] 2) 제1 금속(포획) 나노패드가 배열된 기재(기질)에서 질병 유전자, 특히 바이러스성 유전자에 대한 혼성화 스크리닝을 통하여 정확한 정량분석을 수행할 수 있다.
- [0103] 3) 기재(기질)로 이용한 금속 산란신호의 영향 없이 검출 태그 내 금속의 산란 신호만을 수집하고, 단일 과장의 광원을 사용하여 검출 감도를 높일 수 있기 때문에 정량 분석 효율을 증가시킬 수 있다.
- [0104] 4) 데이터 처리에 있어서 픽셀간의 거리를 정확하게 계산하기 위하여 산란신호의 중심 위치 정보를 수집 방법으로서 가우시안 맞춤법을 적용한다.
- [0105] 전술한 복수의 기술적 특징을 조합함으로써 극미량의 샘플을 이용한 질병 진단 시 증폭 과정을 요하는 종래기술과 달리 비증폭 및 비형광 방식을 통하여 수요가 증가하고 있는 바이러스성 유전 물질(특히, 인플루엔자 바이러스)에 대한 진단 분석을 단일분자 수준에서 효과적으로 수행할 수 있다.
- [0106] 본 발명은 하기의 실시예에 의하여 보다 명확히 이해될 수 있으며, 하기의 실시예는 본 발명의 예시 목적에 불과하며 발명의 영역을 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0107] **실시예**
- [0108] 본 실시예에서 사용된 물질은 하기와 같다.
- [0109] - 11-머캅토운데칸 산(11-mercaptopundecanoic acid(MUA), 95%), 6-머캅토-1-헥산올(6-mercapto-1-hexanol(MCH), 97%), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노-프로필)카보디이미드 하이드로클로라이드(1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide hydrochloride(EDC)), 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide(DMSO), 99.5%), 2-(모로프조리노)에탄설포산(2-(morphozlino)ethanesulfonic acid(MES)), 글리신(glycine), 에틸렌디아민 테트라아세트산(ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA)), 시트르산 나트륨(sodium citrate tribasic dehydrate), 및 20-nm 은 나노입자(silver nanoparticles(SNPs; TIRS nanotag, 4.5 × 10¹¹ particles/mL)는 시그마-알드리치 (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하였다.
- [0110] - 설포-NHS(N-hydroxysulfosuccinimide, NHSS), tris-HCl는 J.T. Baker사에서 구입하였다.
- [0111] - 제1 인산칼륨(Potassium phosphate monobasic(KH₂PO₄)) 및 염화나트륨(sodiumchloride(NaCl))은 Junsei에서 구입하였다.
- [0112] - 제2 인산칼륨(Potassium phosphate dibasic(K₂HPO₄))은 Samchun Pure Chemical사에서 구입하였다.
- [0113] - 디티오프레이톨(Dithiothreitol(DTT)) 용액은 Biosolution사에서 구입하였다.
- [0114] 염기 서열은 Bioneer사를 통하여 하기와 같이 설계하였다.
- [0115] - 프로브 올리고머(H7N9): 5'-GCT ATT CCA ATG-T10-SH-3'
- [0116] - 검출 올리고머(H7N9): 5'-NH₂-T10-AAT CCT AGG TTT-3'

[0117] - 표적 올리고머(H7N9): 5'-CAT TGG AAT AGC AAA CCT AGG ATT-3'

[0118] - 표적 올리고머(H5N1; H7N9에 대한 비상보적 올리고머): 5'-AGA CCC AAA GTA AAC GGG CAA-3'.

[0119] 실시예 1

[0120] 검출 플랫폼의 제작

[0121] 가. 금(Au) 나노패드 제작

[0122] 금(Au) 나노패드가 배열된 기체는 10 mm² 유리 기재 상에 전자빔 식각기술 (electron beam nanolithography)을 적용하여 한국 나노기술원(수원, 한국)에서 프로세싱하였다. 이때, 전자빔 증착을 통하여 100 nm 직경을 갖는 금(Au) 나노패드를 5 μm 간격으로 4 × 4 나노배열하였다 (Analyst, 2013, 138, 3478-3482).

[0123] 나. 은(Ag) 나노입자와 검출 올리고머의 결합

[0124] 20 nm 은(Ag) 나노입자의 검출 올리고머의 결합 반응은 하기와 같다.

[0125] 10 mM MUA 및 30 mM MCH가 용해되어 있는 에탄올을 20 nm 나노입자 용액에 첨가하고, 10분 정도 초음파 분해한 후에 상온에서 2시간 30분 정도 반응시켰다. 나노입자 표면에 MUA-MCH를 결합시킨 후 0.31 mmol EDC를 추가하여 15분 동안 반응시킨 후, 77.2 nmol NHSS를 첨가하여 30분 동안 추가적으로 반응시켰다. 74 pM 아민기를 갖는 검출 올리고머를 첨가하여 15시간 동안 상온 방치하여 반응시켰다. 12000 rpm 조건에서 90분 동안 원심분리한 후, 상층액을 제거하였으며, 10 mM Tri-HCl 및 0.1 mM EDTA(pH 8.0, TE) 용액에 희석하여 사용하였다.

[0126] 다. 금(Au) 나노패드에 프로브 올리고머의 고정화

[0127] 티올기를 갖는 프로브 올리고머 및 MCH를 함유하는 1M 인산칼륨 완충용액(potassium phosphate buffer; pH 7.0) 용액을 깨끗하게 세척된 금(Au) 나노패드 상에 담가 15시간 동안 상온에서 화학적 흡착반응시켰다. 반응을 거친 금(Au) 나노패드는 10 mM NaCl 및 5 mM Tris(pH 7.4)로 5초 정도 세척하였다. 혼성화 반응 전, 1 mM MCH 용액으로 1시간 동안 반응시켜 블로킹시켜 금(Au) 나노패드 상에 고정될 표적 올리고머 이외의 비특이적 결합을 억제하도록 하였다.

[0128] 라. 샌드위치 혼성화 반응

[0129] - 1차 혼성화 반응

[0130] 혼성화 반응을 위한 완충용액(1xSSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate, pH 7.0)에 존재하는 20 nm 은(Ag) 나노입자와 결합된 검출 올리고머와 표적 유전자를 65℃에서 30분 동안 반응시켜 1차 혼성화 반응을 수행하였다.

[0131] - 2차 혼성화 반응

[0132] 프로브 올리고머가 고정된 금(Au) 나노패드 상에 1차 혼성화 반응 생성물을 접촉시켜 65 ℃ 및 1 시간의 반응 조건 하에서 2차 혼성화 반응을 수행하였다. 반응 후, 금 나노패드를 고순도 물로 세척하여 결합되지 않은 올리고머를 제거한 다음, 검출 및 정량 스크리닝 실험에 사용하였다.

[0133] 실시예 2

[0134] 투과격자미러(TG)가 구비된 검출시스템을 이용한 검출 및 정량 스크리닝

[0135]

[0136] 도 1b에 도시된 투과격자미러(TG)가 구비된 전반사산란 검출 시스템(detection system)을 이용하여 실시예 1에서 수득한 샌드위치 혼성화 반응 생성물에 대한 검출 및 정량 스크리닝 실험을 수행하였다. 특히, 정립형 올림푸스 BX51 현미경(Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 기반으로 하는 비형광 전반사산란 방식을 금(Au) 나노패드 상에서 혼성화된 극미량의 비증폭 유전자에 대한 질병진단 스크리닝에 적용하였다.

[0137] 광원으로서 은(Ag) 나노입자에 대하여는 p-편광을 갖는 30 mW 출력의 405nm 레이저(SOL-405-LM-020T, Shanghai laser century Co., Ltd., China), 그리고 금(Au) 나노패드에 대하여는 30 mW 출력의 고상(solid-state) 671nm 레이저 (SDL-671-040T, Shanghai laser century Co., Ltd.) 2대를 사용하였다.

[0138] 투과격자미러(TG)로서 70 그루브/mm의 제품(Edmund Optics Inc., Barrington, NJ, USA)을 사용하였으며, EMCCD 카메라 앞에 장착하여 2차 혼성화 반응 생성물의 은(Ag) 나노태그 및 금(Au) 나노패드로부터 유래된 분산된 전

반사산란 신호를 수집하였다. 이때, 카메라와 투과격자미러 간의 거리는 23 mm에서 85 mm까지 조절 가능하도록 홀더를 제작하여 장착하였으며, 모든 영상은 본래 영상 (zero-order, 0차)과 분산 영상(first-order, 1차)이 중첩되지 않도록 카메라로부터 85 mm 이격된 위치에 투과격자미러를 고정하여 테스트를 수행하였다.

- [0139] 전반사산란 신호는 개구수를 0.6에서 1.3까지 조절 가능한 대물렌즈(UPLANFLN, $\times 100$)를 이용하여 얻었다.
- [0140] 혼성화 반응 생성물에 대한 전반사산란 영상은 전자결합소자(512 $\times$ 512 pixel imaging array, QuantEM 512SC, Photometrics, AZ, USA) 카메라를 통하여 수집하였다. 이때, 셔터 조절을 통하여 노출 시간은 50 ms로 맞추었다. 또한, 영상은 MetaMorph 7.5 소프트웨어를 이용하여 수집 및 분석하였다.
- [0141] 투과격자미러(TG)를 거쳐 획득한 분광학적 영상(0차 및 1차)은 Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)의 ThunderSTORM plug-in을 통하여 가우시안 맞춤(Gaussian fitting)함으로써 중심 위치(center localization)에 관한 정보를 얻었다.
- [0142] DNA 혼성화는 전술한 바와 같이 20 nm 은(Ag) 나노입자 (SNP, 나노태그), 검출 올리고머(SS), 표적 바이러스(PC, H7N9) 및 프로브 올리고머(PS)를 금(Au) 나노패드 배열 상에 반응시켜 수행한 것이다. 이때, 표적 바이러스(H7N9)의 염기서열 중 절반은 검출 올리고머와 혼성화 반응이 이루어지고, 나머지 절반은 프로브 올리고머와 혼성화 반응이 이루어지도록 설계하였다. 대조군 실험을 위하여 비상보적 표적 샘플(NC, H5N1)은 혼성화가 이루어지지 않도록 설계하였다. 샌드위치 혼성화된 금(Au) 나노패드(나노바이오칩)는 도 1b 및 도 1c에 도시된 투과격자미러-전반사산란(TG-TIRS) 영상 시스템을 이용하여 스크리닝하였다. 스크리닝 결과를 도 2 내지 8에 나타내었다.
- [0143] 도 2a는 검출 올리고머를 결합시킨 20 nm 직경의 은(Ag) 나노입자 및 순수 은(Ag) 나노입자의 TEM 이미지이다. 상기 도면에 나타난 바와 같이, 검출 올리고머가 결합된 은(Ag) 나노입자의 표면은 흐릿한 얇은 층의 껍질(shell)이 생성되어 있음을 알 수 있다.
- [0144] 도 2b는 수용액 상에 존재하는 검출 올리고머 및 20 nm 나노입자의 UV-Vis 스펙트럼이다. 상기 도면에 따르면, 검출 올리고머가 결합된 은(Ag) 나노입자는 395 nm의 흡수파장을 갖고 있는 초기 순수한 은(Ag) 나노입자와 달리 10 nm 적색이동 (red-shift)되어 405 nm에서 최대 흡수파장을 나타내었다. 또한, 은(Ag) 나노입자는 검출 올리고머와의 혼성화 반응 후, 260 nm 근처에서 검출 올리고머의 스펙트럼을 확인함으로써 나노입자에 올리고머가 결합(검출 태그)되었음을 확인할 수 있다.
- [0145] 도 3은 (a) 20 nm 은(Ag) 나노 입자, (b) 최종 단계에서 원심분리된 샘플, (c) 원심분리 단계를 배제한 샘플, 및 (d) 올리고머 결합 단계마다 원심분리를 수행한 샘플 각각에 대한 제타 전위와 샘플의 색상을 나타낸다.
- [0146] 일반적으로, 나노입자 및 검출 올리고머의 제타 전위(zeta potential)는 음 전하를 갖는다. 이는 구연산 완충용액(citrate buffer)에 존재하는 나노입자의 표면에 카르복시 이온이 존재하기 때문이다.
- [0147] 이와 관련하여, 도 3에 따르면, 원심분리 및 세척 단계 후 제타 전위값의 변화가 -38.4 ± 1.7 mV에서 -50.6 ± 8.3 mV로 강한 음 전하를 띄는 것을 확인할 수 있다. 이로부터 검출 올리고머가 결합된 은(Ag) 나노입자가 보다 안정하다는 점을 확인하였다.
- [0148] 한편, 금(Au) 나노패드 상에 티올기를 갖는 프로브 올리고머를 반응시킨 후, 접촉각을 측정하여 고정화 여부를 확인하여 도 4에 나타내었다.
- [0149] 도면에 나타난 바와 같이, 프로브 올리고머와의 반응 전 금(Au) 나노패드의 접촉각(a)은 57.8° 이었다. 상기 측정된 각이 상대적으로 친수성을 나타낸다고 할 때, 프로브 올리고머와 반응한 금(Au) 나노패드의 접촉각(b)은 42.6° 으로서 보다 높은 친수성을 갖고 있음을 알 수 있다. 이와 함께, 블로킹 용액으로서 MCH와 접촉된 금(Au) 나노패드의 접촉각(c)은 47.9° 이었다. 반면, 프로브 올리고머와 반응하지 않고 MCH만 접촉한 금(Au)-나노패드의 접촉각(d)은 68.6° 로서 프로브 올리고머가 고정금(Au)-나노패드의 접촉각과는 구별됨을 알 수 있다. 따라서, 금(Au)-나노패드 상에 프로브 올리고머가 성공적으로 고정화되었음을 확인할 수 있다.
- [0150] 표적 올리고머와 검출 올리고머 간의 혼성화 반응 여부는 FT-IR 스펙트럼을 통하여 확인하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0151] 상기 도면에 따르면, 이중가닥 DNA가 결합된 20 nm 전반사산란 은(Ag) 나노 태그(a)의 경우, 혼성화 반응에 의하여 1655 cm^{-1} 파장에서 피크가 나타났으나, 혼성화 반응이 일어나지 않은 은(Ag) 나노 태그(b)는 혼성화 반응에 따른 특징적인 피크가 나타나지 않음을 알 수 있다. 이처럼, 이중 나선 구조의 DNA 분자로부터 기인하는 스

펙트럼으로서 표적 올리고머와 검출 올리고머 간의 혼성화 반응이 일어났음을 확인할 수 있었다.

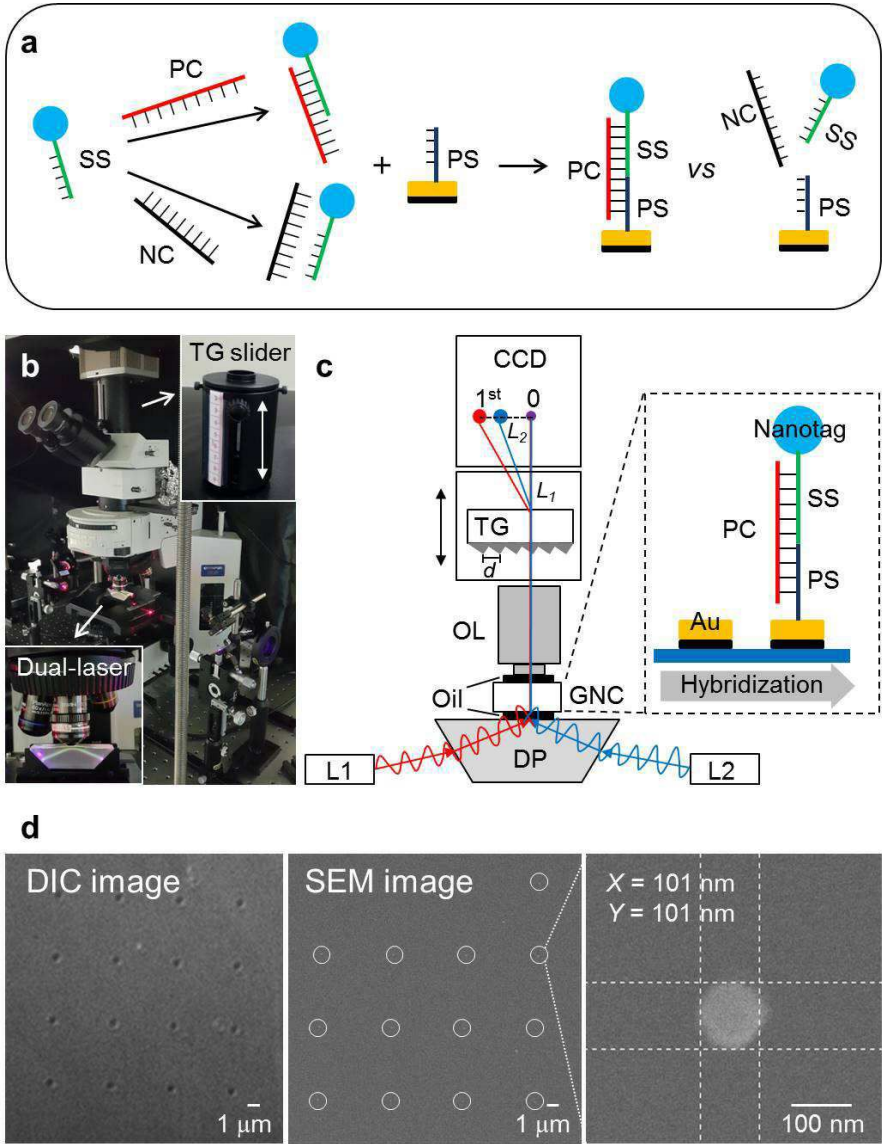
- [0152] 도 6은 본 실시예에서 금(Au)-나노패드 상에서 H7N9 바이러스성 유전자의 혼성화 반응을 수행한 후에 (a) 투과격자미러(TG)가 장착되지 않은 전반사산란 시스템으로부터 얻은 산란 영상, (b) 투과격자미러(TG)가 장착된 전반사산란 시스템으로부터 얻은 산란 영상, (c) 금(Au)-나노패드와 이중가닥 DNA가 결합된 나노태그의 0차 및 1차 사이의 거리를 상대적 감도를 통하여 나타낸 그래프, 그리고 (d) 정확한 거리 측정을 위하여 가우시안 맞춤을 적용한 그래프를 나타낸다.
- [0153] 도 6a에 따르면, 투과격자미러(TG)가 장착 없이 전반사산란(TIRS)에 의하여 수집된 영상은 금(Au)-나노패드와 은(Ag)-함유 검출 태그로부터 유래하는 신호를 구별하기 곤란하다. 반면, 도 6b에 나타난 바와 같이, 투과격자미러-전반사산란의 조합(TG-TIRS)을 통하여 2가지 금속으로부터 유래된 산란 신호를 동시에 단일 스크린에서 수집할 수 있고, 더 나아가 분산 영상(1차)을 통하여 2가지 금속의 산란신호를 간단히 구별할 수 있다.
- [0154] 한편, 투과격자미러(TG)를 투과한 산란 신호는 단일 스크린에 분광학적 영상 (spectral imaging)인 1차 영상($n = +1$) 및 본래 영상(투과격자미러를 거치지 않은 영상과 동일한 영상)인 0차 영상($n = 0$)으로 분할(분리 또는 분산)된다.
- [0155] 도 3c에서 영역(ii) 및 영역(iii)에서 나타난 나노패드(yellow circle)와 검출 태그(green circle)의 1차 영상 간의 중첩 현상을 피하기 위하여 투과격자미러(TG)를 비스듬히 장착하였다. 이후, 가우시안 맞춤 (Gaussian fitting)을 적용하여 각각의 금속으로부터 유래하는 산란 신호의 중심 위치를 확인하였으며, x-방향의 중첩없이 0차 영상 및 1차 영상의 거리를 계산하였다(도 6d). 나노패드(yellow circle)와 검출 태그 간 0차 영상 및 1차 영상의 거리는 각각 248.4 ± 0.1 및 149.0 ± 0.4 픽셀이었다. 따라서, 상기 검출 시스템의 분광학적 분해능 (spectral resolution)은 2.7 nm/pixel 이었다.
- [0156] 도 7은 본 실시예에서 671 nm 및 405 nm 광원의 조사 하에 금(Au)-나노패드 상에서 (a) 표적 유전자의 혼성화 전, 그리고 (b) 표적 유전자의 혼성화 후의 분광학적 영상이다.
- [0157] 도 7a의 경우, 투과격자미러(TG)를 카메라로부터 85 mm 이격된 위치에 장착한 검출 시스템을 이용하여 표적 유전자와의 혼성화 반응 전 405 nm 및 671 nm 광원에 의하여 조사된 금(Au)-나노패드의 영상이다. 671 nm 레이저가 조사되는 경우, 금(Au)-나노패드의 0차 영상 및 1차 영상은 영역 (i) 및 영역 (ii)에서 나타났다. 그러나, 405 nm 광원을 조사할 경우, 금(Au)-나노패드의 0차 영상 및 1차 영상은 관찰되지 않았다(영역 (iii) 및 영역 iv).
- [0158] 상기 관찰 결과에서 주목할 점은 혼성화 반응 후 금(Au)-나노패드 영상으로 도 7b의 영역 (iv)에서 나타난 바와 같이, 기재(기질)로 사용된 금(Au)-나노패드로부터 발생된 산란 신호의 간섭없이 검출 태그-DNA의 산란 신호를 얻을 수 있다는 것이다.
- [0159] 더욱이, 혼성화 반응 후 금(Au)-나노패드에 405 nm 빛이 조사된 경우, 감도 측면에서도 0차 영상(도 7b의 영역 (iii))에서 얻은 산란 신호에 비하여 1차 영상(도 7b의 영역 (iv))에서 수집된 산란 신호가 10배 가량 높게 나타났다. 이는 투과격자미러(TG)의 사용으로 인하여 기재(기질)의 간섭 현상 없이 개별적인 단분자 또는 단입자를 극미량 수준에서 검출할 수 있음을 뒷받침한다.
- [0160] 본 실시예에서 사용된 검출 시스템을 이용하여 405 nm 광원 조사 시 다양한 농도의 표적 유전자(H7N9 바이러스성 유전자)에 대한 혼성화 반응을 통하여 정량 임상 스크리닝 테스트를 수행하였으며, 그 결과로서 표적 유전자(DNA)의 다양한 농도 대 감도의 선형곡선($74 \text{ zM to } 7.4 \text{ fM}$, $R = 0.9928$)을 도 8a에 나타내었다.
- [0161] H7N9 바이러스성 유전자의 경우, 증폭 과정을 거친 후 검출 또는 분석하는 것이 일반적이다. 그러나, 본 실시예에서와 같이 투과격자미러-전반사산란(TG-TIRS)의 조합을 이용한 검출 시스템은 혼성화된 금(Au)-나노패드의 스크리닝 테스트 결과, 비증폭 혼성화 검출 및 정량 분석에 효과적인 시스템이라는 점을 확인할 수 있다.
- [0162] 또한, 표적 유전자의 부존재 하에서 반응된 금(Au)-나노패드(blank control), 그리고 H7N9 표적 유전자 대신에 프로브 올리고머 및 검출 올리고머에 비상보적인 바이러스성 유전자로서 다른 형태의 인플루엔자 바이러스 DNA(H5N1)를 동일 과정으로 수행하여 특이성 여부를 확인하였다. 이와 함께, 상보적 염기서열을 갖는 표적 샘플(H7N9)의 산란 신호를 나타내었다.
- [0163] 도 8b에 따르면, 대조군의 경우, 표적 샘플인 H7N9 표적 유전자를 적용한 경우에 비하여 약 6배 정도 낮은 산란 감도를 나타내었다. 따라서, 본 개시 내용에서 제공된 검출 플랫폼은 바이러스성 유전자에 효과적으로 적용 가

능함을 확인할 수 있다.

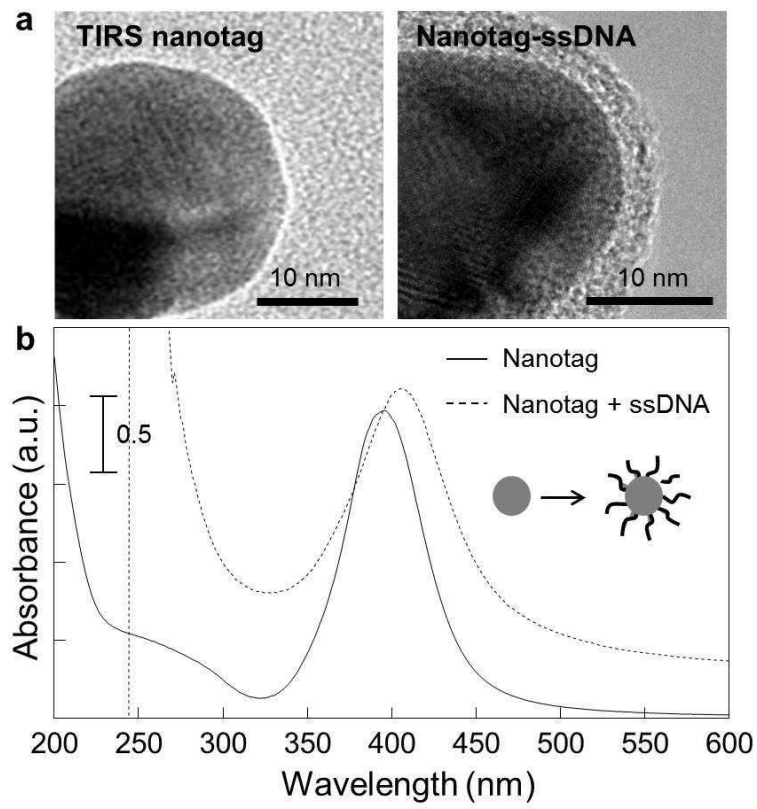
[0164] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 이용될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면

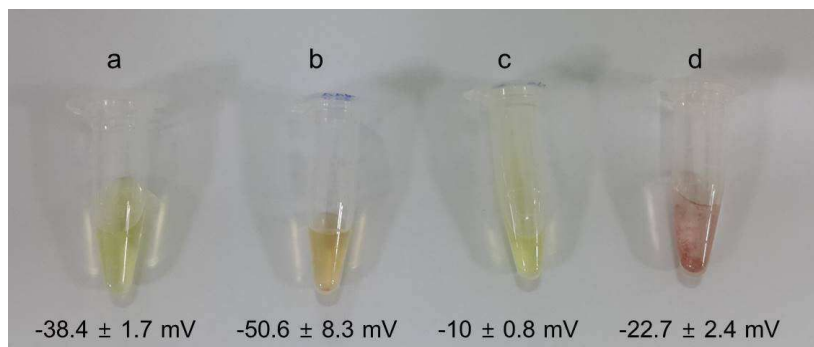
도면1



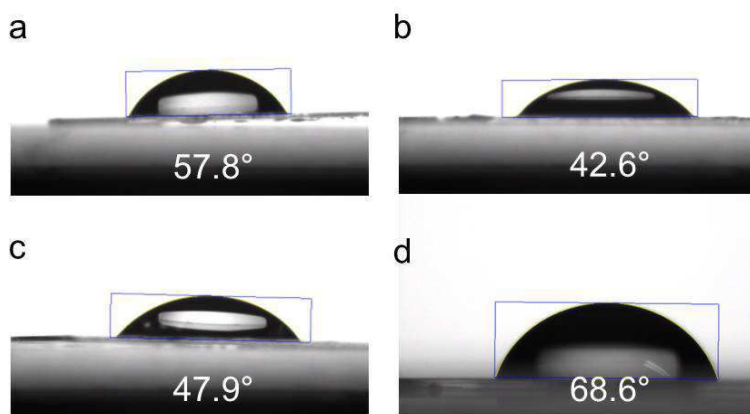
도면2



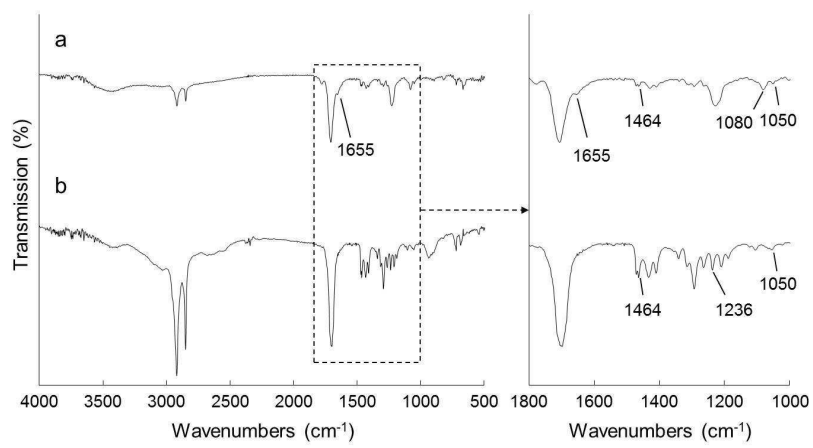
도면3



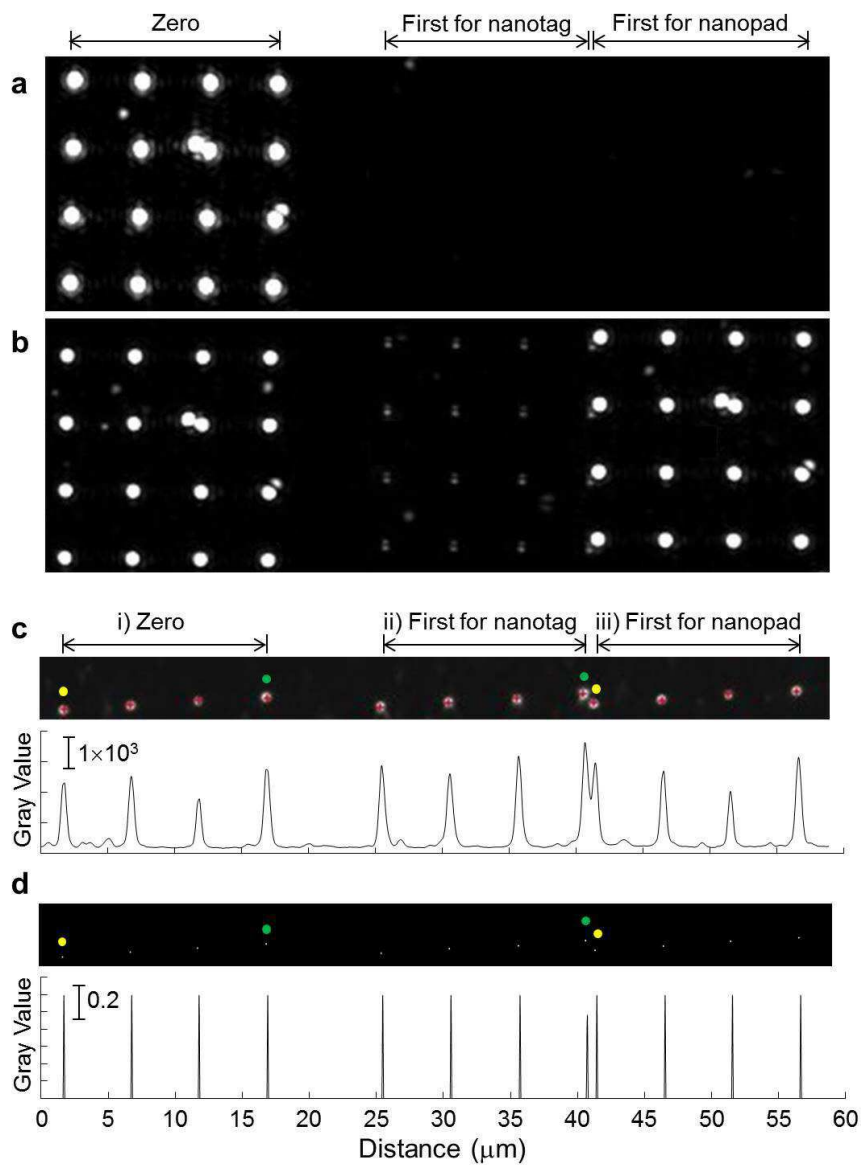
도면4



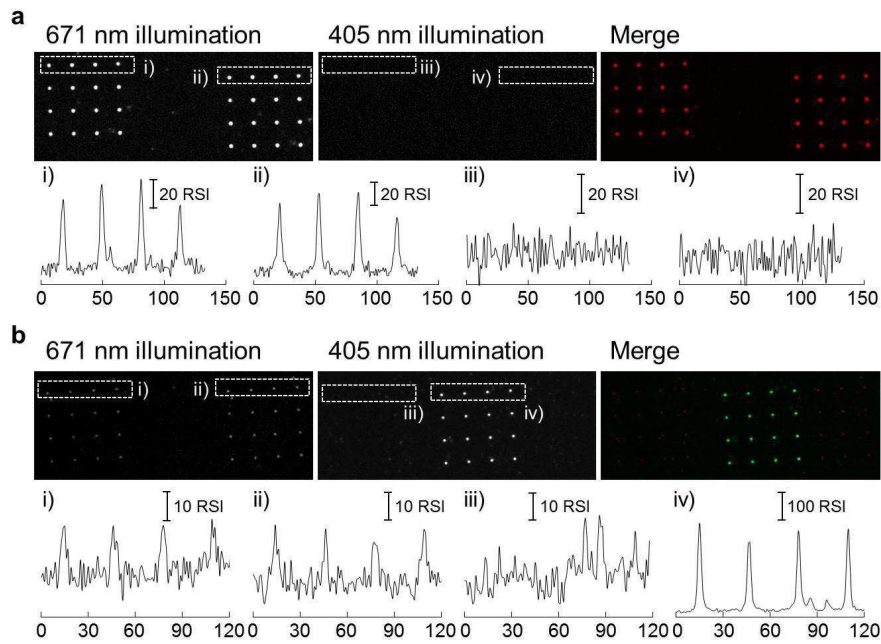
도면5



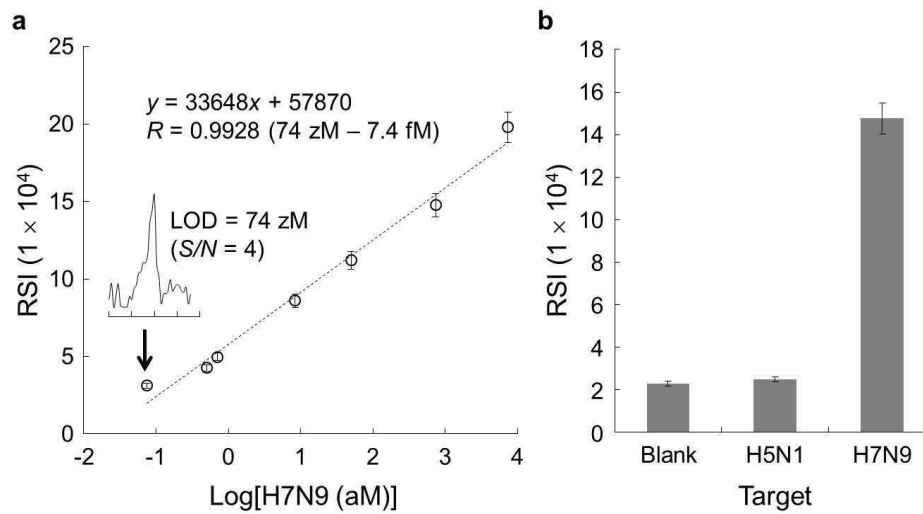
도면6



도면7



도면8



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1 제13행

【변경전】

투과격자미러(TR)

【변경후】

투과격자미러(TG)