



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0136079  
(43) 공개일자 2018년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/68 (2018.01) G01N 21/65 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6816 (2018.05)  
G01N 21/658 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-0074602  
(22) 출원일자 2017년06월14일  
심사청구일자 2017년06월14일

(71) 출원인  
인천대학교 산학협력단  
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)  
송실대학교산학협력단  
서울특별시 동작구 상도로 369 (상도동)  
(72) 발명자  
강동구  
인천광역시 연수구 송도문화로 28번길 81, 더샵그린스퀘어 109-2704  
주상우  
서울특별시 서초구 동광로1길 112  
(74) 대리인  
차준용

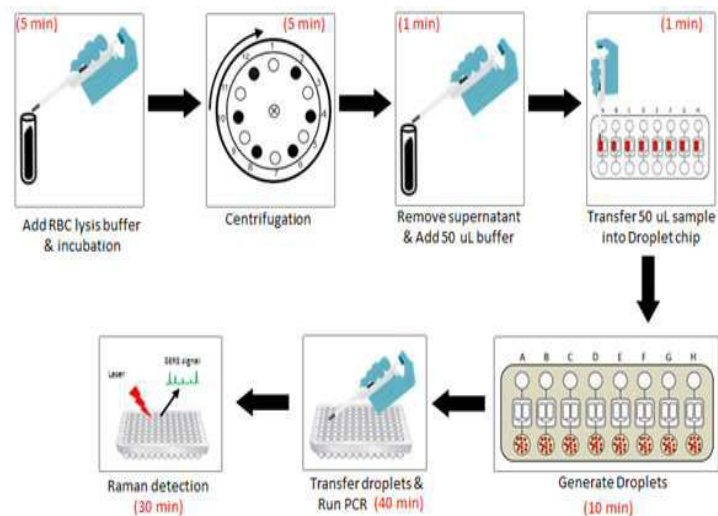
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 표면증강 라만 산란 나노복합체를 이용한 디지털 PCR에 의한 병원균 검출방법

### (57) 요약

본 발명은 표면증강 라만 산란 나노복합체를 이용한 디지털 PCR에 의한 병원균 검출방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 디지털 PCR을 이용하여 증폭된 핵산 절편을 갖는 나노복합체 제조하고, 이를 포함하는 드롭렛에 대하여 표면증강 라만 분광 분석법을 적용함으로써 병원균을 탐지하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*C12Q 2563/137* (2013.01)

*C12Q 2563/155* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- (1) 금속-단백질 코어-셸 나노입자, 프라이머 세트, PCR 반응혼합물 및 라만 프로브를 포함하는 분석시료와 검출하고자 하는 병원균이 포함된 시료를 준비하는 단계;
  - (2) 상기 분석시료, 상기 병원균이 포함된 시료 및 캐리어를 포함하는 반응액으로부터 복수의 드롭렛을 생성하는 단계;
  - (3) 상기 드롭렛에서 디지털 PCR을 통해 병원균의 표적 핵산 서열을 증폭시켜 표면증강 라만 산란 나노복합체를 제조하는 단계; 및
  - (4) 상기 표면증강 라만 산란 나노복합체를 함유하는 드롭렛에 레이저를 조사하여 라만 신호를 측정하는 단계를 포함하는,
- 병원균 검출방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,  
상기 금속-단백질 코어-셸 나노입자는 금-스트렙타비딘 코어-셸 나노입자인,  
병원균 검출방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,  
상기 프라이머 세트는 비오틴(Biotin)으로 표지된 프라이머를 포함하는,  
병원균 검출방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,  
상기 PCR 반응혼합물은 dNTP, DNA 중합효소, 역전사 효소 및 버퍼를 포함하는,  
병원균 검출방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,  
상기 드롭렛의 평균 직경은 0.01 내지 700 $\mu\text{m}$ 인,  
병원균 검출방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 라만 프로브는 로다민 B(Rhodamine B), 페닐이소티오시아네이트(Phenyl isothiocyanate), 페닐아세틸렌(Phenylacetylene), 3,3'-디에틸티아트리카보시아닌 아이오드(3,3'-Diethylthiatricarbocyanine iodide), 크리스탈 바이올렛(Crystal Violet), 4-시아노피리딘(4-Cyanopyridine), 4-머캅토벤조산(4-Mercaptobenzoic acid) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는,

병원균 검출방법.

## 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 드롭렛 내 표면증강 라만 산란 나노복합체는 1 내지 30 ng/ml로 포함되는,

병원균 검출방법.

## 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 레이저의 파장은 400 내지 800nm인,

병원균 검출방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 표면증강 라만 산란 나노복합체를 이용한 디지털 PCR에 의한 병원균 검출방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 디지털 PCR을 이용하여 증폭된 핵산 절편을 갖는 나노복합체 제조하고, 이를 포함하는 드롭렛에 대하여 표면증강 라만 분광 분석법을 적용함으로써 병원균을 탐지하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 중합효소 연쇄 반응, 즉 PCR(Polymerase Chain Reaction)은 핵산을 포함하는 샘플 용액을 반복적으로 가열 및 냉각하여 핵산의 특정 염기 서열을 갖는 부위를 연쇄적으로 복제하여 그 특정 염기 서열 부위를 갖는 핵산을 기하급수적으로 증폭하는 기술로써, 구체적으로 변성(Denaturation), 어닐링(Annealing), 및 신장(Extension) 등의 일련의 온도 효소 반응 단계로 진행될 수 있다. PCR은 생명과학, 유전공학 및 의료 분야 등에서 분석 및 진단 목적으로 널리 사용되고 있다.

[0004] PCR은 최근 디지털 PCR이 도입되면서 3세대로 구분할 수 있다. 앞선 1세대 일반 PCR은 agarose gel 전기영동을 통해 유전자의 정성분석이 가능한 시스템으로, 정량적인 분석은 힘들었다. 이러한 정량적인 부분을 보완하기 위해 개발된 2세대 PCR인 리얼타임(Real-time) PCR은 상대정량분석을 기반으로 Ct value를 통해 유전자 발현의 정량 및 정성분석이 가능한 시스템이다. 하지만 리얼타임 PCR의 경우, 절대정량 분석을 위해서는 표준곡선이 필수이며 PCR의 효율에 따라 결과 값에 편차가 생길 수 있는 단점을 가지고 있다. 이러한 정량분석의 한계를 극복하기 위한 방법으로 디지털 PCR의 개념이 적용되기 시작하였다.

[0005] 디지털 PCR은 샘플을 다수의 구획에 나누어 포획한 후 각 구획에서 개별적으로 반응을 수행하는 방식으로, 표준물질 없이도 검출목표 유전자의 실시간 절대정량이 가능하며, 극소량의 시료만으로도 분석이 가능하며, 리얼타임 PCR에 비하여 많은 양의 시료를 동시에 처리할 수 있다는 장점이 있다.

[0006] 한편, 디지털 PCR 생성물의 검출하기 위해 유기 형광물질을 이용하는 것이 일반적이나, 형광 표지물질들은 종류가 매우 제한적이며, 시간이 지나면서 형광세기가 약해지며, 활성을 시키는 빛의 파장이 매우 좁고 발광되는 빛

의 파장이 매우 넓어서 서로 다른 형광물질 간에 간섭이 있다는 단점이 있다.

[0007] 이러한 문제점을 해결하기 위해, 본 발명자들은 디지털 PCR에 표면증강 라만 산란법(Surface Enhanced Raman Scattering; SERS)을 도입한 방법을 개발함으로써, 신속하고 정확하게 표적 핵산 절편을 검출 및 분석할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은, 디지털 PCR 및 표면증강 라만 분광 분석법을 결합함으로써, 빠른 시간 내에 정확히 여러 종류의 병원균을 탐지할 수 있는 병원균 검출방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0012] 본 발명의 일 측면에 따르면, (1) 금속-단백질 코어-셸 나노입자, 프라이머 세트, PCR 반응혼합물 및 라만 프로브를 포함하는 분석시료와 검출하고자 하는 병원균이 포함된 시료를 준비하는 단계; (2) 상기 분석시료, 상기 병원균이 포함된 시료 및 캐리어를 포함하는 반응액으로부터 복수의 드롭렛을 생성하는 단계; (3) 상기 드롭렛에서 디지털 PCR을 통해 병원균의 표적 핵산 서열을 증폭시켜 표면증강 라만 산란 나노복합체를 제조하는 단계; 및 (4) 상기 표면증강 라만 산란 나노복합체를 함유하는 드롭렛에 레이저를 조사하여 라만 신호를 측정하는 단계를 포함하는 병원균 검출방법을 제공한다.

[0013] 또한, 상기 금속-단백질 코어-셸 나노입자는 금-스트렙타비딘 코어-셸 나노입자일 수 있다.

[0014] 상기 드롭렛 내 표면증강 라만 산란 나노복합체는 1 내지 30 ug/ml로 포함될 수 있다.

### 발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 표면증강 라만 산란 나노복합체를 이용한 디지털 PCR에 의한 병원균 검출방법은 디지털 PCR 수행과 동시에 해당 결과물에 라만 프로브가 도입된 나노복합체를 이용함으로써, 라만 분광 분석을 이용하여 병원균을 탐지할 수 있다.

[0017] 즉, 본 발명에 따른 병원균 검출 방법은 디지털 PCR과 표면증강 라만 분광법을 결합하여 병원균을 탐지함으로써, 미량의 시료만으로도 신속하고 정확하게 병원균을 탐지할 수 있고, 병원균의 종류에 따라 다양한 라만 신호를 검출함으로써 동시에 다양한 유전체를 분석할 수 있는 장점이 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명에 따른 병원균 검출방법의 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 나노복합체를 함유하는 드롭렛이 튜브 안에 집적된 형태 및 이의 2차원적 배열 형태를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 병원균 검출방법이 적용된 장치의 모식도로서, 표면증강 라만 산란 나노복합체를 포함하는 드롭렛이 배열된 디지털 PCR 96-웰 플레이트와 라만 분광 분석 기기가 결합된 장치이다.

도 4는 본 발명에 따른 병원균 검출방법이 적용된 장치를 이용하여 병원균을 검출하는 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 병원균 검출방법이 적용된 장치를 이용하여 병원균을 검출한 결과와 대조군을 나타낸 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하도록 한다.
- [0022] 본 발명의 일 측면은 (1) 금속-단백질 코어-셸 나노입자, 프라이머 세트, PCR 반응혼합물 및 라만 프로브를 포함하는 분석시료와 검출하고자 하는 병원균이 포함된 시료를 준비하는 단계; (2) 상기 분석시료, 상기 병원균이 포함된 시료 및 캐리어를 포함하는 반응액으로부터 복수의 드롭렛을 생성하는 단계; (3) 상기 드롭렛에서 디지털 PCR을 통해 병원균의 표적 핵산 서열을 증폭시켜 표면증강 라만 산란 나노복합체를 제조하는 단계; 및 (4) 상기 표면증강 라만 산란 나노복합체를 함유하는 드롭렛에 레이저를 조사하여 라만 신호를 측정하는 단계를 포함하는 병원균 검출방법을 제공한다. 도 1은 본 발명에 따른 병원균 검출방법의 과정을 개략적으로 나타낸 것으로, 이하 각 단계별 구체적 내용을 설명하도록 한다.
- [0024] 먼저, 금속-단백질 코어-셸 나노입자, 프라이머 세트, PCR 반응혼합물 및 라만 프로브를 포함하는 분석시료와 검출하고자 하는 병원균이 포함된 시료를 준비하는 단계를 제공한다. 본원에서 "분석시료"란, 특정 병원균 등 검체를 포함하는 샘플 시료를 분석(assay)하기 위한 물질이 포함된 시료를 의미한다.
- [0025] 한편, 본원에서 "금속-단백질 코어-셸 나노입자"란, 셸을 형성하는 단백질이 중심에 존재하는 금속 물질을 둘러싼 구조를 갖는 나노입자를 의미한다. 상기 금속-단백질 코어-셸 나노입자에서 상기 단백질은 상기 금속 코어 표면의 일부 또는 전부에 흡착될 수 있다.
- [0026] 상기 금속은 금, 은, 구리, 알루미늄, 백금, 철, 니켈 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 금속 이온 또는 금속 이온의 킬레이트를 사용할 수도 있다. 상기 금속이 단백질로 코팅되는 점 및 이후 상기 나노복합체가 표면증강 라만 분광 분석에 사용되는 점을 고려하면 금인 것이 가장 바람직하다.
- [0027] 또한, 상기 단백질은 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin), BSA(bovine serum albumin), 인슐린 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 이는 금속 코어를 안정화시킬 뿐만 아니라 특정 프라이머와 금속 코어를 연결하는 역할을 한다.
- [0028] 상기 금속-단백질 코어-셸 나노입자는, 먼저 금 전구체를 합성하여 콜로이드 금 용액을 제조하고, 단백질을 버퍼에 용해하여 이를 콜로이드 금 용액에 첨가한 후 아이스에서 0.8 내지 1.5시간 동안 반응시켜 제조할 수 있다.
- [0029] 상기 금 전구체는 사염화금산( $\text{HAuCl}_4$ , Hydrogen tetrachloro aurate(III)), 삼염화금( $\text{AuCl}_3$ , Gold trichloride), 사염화금칼륨( $\text{KAuCl}_4$ , Potassium Tetrachloro aurate), 수산화금( $\text{Au}(\text{OH})_3$ , Gold(III) hydroxide), 산화금( $\text{Au}_2\text{O}_3$ , Gold oxide), 황화금( $\text{Au}_2\text{S}_3$ , Gold sulfide) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나일 수 있다.
- [0030] 또한, 상기 버퍼의 pH는 약 7.0 내지 8.0, 바람직하게는 7.3 내지 7.5이다. 특히, 상기 단백질이 버퍼에 용해된 최종 용액에서의 단백질의 농도는  $0.5 \times 10^{-7}$  내지  $5.5 \times 10^{-7}$  M,  $1.5 \times 10^{-7}$  내지  $4.5 \times 10^{-7}$  M,  $3.0 \times 10^{-7}$  내지  $3.8 \times 10^{-7}$  M인 것이 금속-단백질 코어-셸 나노입자의 수율 측면에서 가장 바람직하다.
- [0031] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 금속-단백질 코어-셸 나노입자는 금-스트렙타비딘 코어-셸 나노입자일 수 있으며, 다음과 같은 방법으로 제조될 수 있다.
- [0032] 먼저, 1 : 3 비율의 과산화수소(30 %)와 진한 황산(98 %)의 혼합물인 "피라냐 (piranha)"솔루션으로 세척하고, 20 mL의 구연산삼나트륨(38.8 mM)을 끓는  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (1mM) 수용액 200 mL에 격렬히 교반시키면서 신속하게 첨가 하였다. 이후, 용액을 실온으로 냉각시키고, 0.45  $\mu\text{m}$ 크기의 혼합 셀룰로오스 에스테르 멤브레인 필터를 통해 여과시킨 후 4  $^{\circ}\text{C}$ 의 어두운 곳에서 보관하여 금 콜로이드 용액을 제조하였다.
- [0033] 이후, 상기 금 콜로이드 용액 500 $\mu\text{L}$ 에 스트렙타비딘 용액 10 $\mu\text{L}$  (pH 7.4의 10mM 인산 버퍼 10mM에 스트렙타비딘 용해, 스트렙타비딘의 최종 농도는  $3.6 \times 10^{-7}$  M)을 첨가하고 아이스 상에 1시간 동안 유지시킴으로써 금-스트렙타비딘 코어-셸 나노입자를 제조할 수 있다.

[0034] 또한, 본원에서 "프라이머"란, 미리 결정된 표적 뉴클레오타이드 서열을 증폭시키기 위해 증폭 방법, 예컨대 중합 효소 연쇄 반응(PCR)에서 사용될 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 전형적인 PCR에서, 하나 이상의 프라이머 세트 (1개의 전방향 프라이머 및 1개의 역방향 프라이머)가 표적 폴리뉴클레오타이드 서열을 증폭시키는데 필요하다. 통상적으로, (+) 가닥 및 (-) 가닥으로 구성된 표적 DNA 서열이 증폭되는 경우, 전방향 프라이머는 반응 조건 하에 (-) 가닥의 3' 말단에 혼성화할 수 있고, 따라서 새로운 (+) 가닥의 중합을 개시시킬 수 있는 올리고뉴클레오타이드인 반면; 역방향 프라이머는 반응 조건 하에 (+) 가닥의 3' 말단에 혼성화할 수 있고, 따라서 새로운 (-) 가닥의 중합을 개시시킬 수 있는 올리고뉴클레오타이드이다. 예로서, 전방향 프라이머는 (+) 가닥의 5' 말단과 서열이 동일할 수 있고, 역방향 프라이머는 (-) 가닥의 5' 말단과 서열이 동일할 수 있다.

[0035] 본 발명의 방법에는 전방향 및 역방향 프라이머의 다중 세트를 사용하는 증폭 반응이 수반된다. 이러한 증폭 반응은 동시에 또는 상이한 시간에 일어날 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 프라이머 세트가 동일한 반응 혼합물 내에 동시에 존재하는 경우, 증폭 반응이 다른 증폭 반응(들)과 동시에 일어날 수 있다. 반면에, 하나 이상의 프라이머 세트가 반응 혼합물 내에서 상이한 시간에 완전하게 되어, 이러한 특정 프라이머 세트를 사용하는 증폭이 또 다른 증폭 반응(들)과 상이한 시간에 일어나는 경우, 증폭 반응들이 연속적으로 일어날 수 있다.

[0036] 상기 프라이머 세트의 일 예시로서, 다음과 같은 서열의 프라이머를 포함할 수 있다.

표 1

|             | Species               | Forward primer           | Reverse primer             |
|-------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|
| 중간분석        | Bacteria<br>(16S RNA) | TGCGGCTGGATCACCTCCTT     | CCGGCTCTCGCCACTACAG        |
|             | Fungi<br>(18S RNA)    | GACTCAACACGGGGAACT       | ATTCTCTGTTGAAGAGCA         |
| Gram<br>(+) | S. aureus             | TCGGTACACGATATTCTTCAC    | ACTCTCGTATGACCAGCTTC       |
|             | S. pneumoniae         | GGAGTAGAATATGGAAATTAATGT | GCTGCATAGGTCTCAGCATTCCAA.  |
|             | E. faecalis           | ATCAAGTACAGTTAGTCT       | ACGATTCAAAGCTAACTG         |
|             | E. faecium            | TAGAGACATTGAATATGCC      | TCGAATGTGCTACAATC          |
| Gram<br>(-) | E. coli               | OATTCGGGGATCCGTCGACC     | TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG       |
|             | P. aeruginosa         | CTGGGTCGAAAGGTGGTTGTTATC | GCGGCTGGTGGCGGTGAGTC       |
|             | K. pneumoniae         | ATTTGAAGAGGTTGCAACGAT    | TTCACCTCTGAAGTTTCTTGTGTTTC |
|             | A. baumannii          | TCTTGGTGGTCACTTGAAGC     | ACTCTTGTGGTTGTGGAGCA       |
| Fungi       | C. albicans           | GCATCGATGAAGAACGCAGC     | TCCTCCGCTTATTGATATGC       |
|             | C. glabrata           | TTATCACACGACTCGACACT     | CCCACATACTGATATGGCCTACAA   |
|             | C. parapsilosis       | GCTGCGGCTTCAACTGATGC     | CTTGGTCACGAGCCTCC          |
|             | A. fumigatus          | CCTTGGCTAGATITGTGGC      | CCAACCTCCCCTCAGCCAAT       |

[0040] 또한, 상기 프라이머 세트는 비오틴(Biotin)으로 표지된 프라이머를 포함할 수 있다. 상기 비오틴은 아비딘 및 스트렙타비딘에 높은 친화력으로 결합되는 작은 비타민 분자이다. 상기 비오틴으로 표지된 프라이머 (biotinized primer)는 통상적으로 커플링에 적합한 활성 그룹을 함유하는 작용기화된 비오틴 시약을 이용하여, 상업적 원료를 이용하거나 종래 일반적으로 사용된 방법에 의해 합성할 수 있다. 예를 들어, 아미노 변형된 프라이머를 비오틴 또는 NHS-SS-비오틴(피어스 케미칼)과 같은 삽입 스페이서 또는 NHS-LS-비오틴(피어스 케미칼) 즉, 비오틴과 말단 N-히드록실숙시니미드 활성된 카르복실기 사이의 11 탄소 스페이서를 함유하는 비오틴 유도체를 함유한 비오틴의 변형된 형태로 처리하여 프라이머를 비오틴으로 표지할 수 있다.

[0041] 특히, 상기 금속-단백질 코어-셸 나노입자와 상기 프라이머는 아비딘-비오틴 결합 또는 스트렙타비딘-비오틴 결합으로 연결될 수 있다. 스트렙타비딘 분자의 셸 층을 갖는 금속-스트렙타비딘 코어-셸 나노입자와 비오틴으로 표지된 프라이머를 반응시킴으로써, 스트렙타비딘-비오틴의 강한 비공유 결합을 이용하여 금속-단백질 코어-셸 나노입자와 프라이머를 연결할 수 있고, 결과적으로 라만 프로브, 병원균의 핵산 절편과 금속-단백질 코어-셸 나노입자를 연결하여 라만 분광 분석에 이용될 수 있는 나노복합체를 제조할 수 있다.

[0042] 또한, 상기 PCR 반응혼합물은 dNTP, DNA 중합효소, 역전사 효소 및 버퍼를 포함할 수 있으며, 이 기술분야의 통

상의 기술자가 PCR 반응에 이용할 수 있는 시약을 모두 포함할 수 있다. 상기 디옥시디뉴클레오시드 삼인산(dNTP)은 PCR 증폭 과정에서 새로운 DNA 분자를 형성하도록 합쳐지는 뉴클레오티드 서브유닛으로, dATP, dTTP, dGTP, 및 dCTP의 혼합물이다.

[0043] 또한, 본 발명에 따른 방법은 DNA 및 RNA 표적 양쪽 모두에 사용될 수 있고, 이때 DNA 중합효소 예를 들어, Taq DNA 중합효소는 DNA 표적에 직접 사용된다. RNA 표적으로는, 역전사 단계가 먼저 수행될 필요가 있기 때문에, 상이한 효소들을 사용하는 역전사 단계에 이은 DNA 증폭 단계에 의해, 또는 역전사 효소 및 DNA 중합효소 기능 양쪽 모두를 보유하는 중합효소를 사용하여 RNA를 증폭시킬 수 있다.

[0044] 또한, 상기 라만 프로브는 라만 활성 유기화합물로서, 로다민 B(Rhodamine B), 페닐이소티오시아네이트(Phenyl isothiocyanate), 페닐아세틸렌(Phenylacetylene), 3,3'-디에틸티아트리카보시아닌 아이오드(3,3'-Diethylthiatricarbocyanine iodide), 크리스탈 바이올렛(Crystal Violet), 4-시아노피리딘(4-Cyanopyridine), 4-머캅토벤조산(4-Mercaptobenzoic acid) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0045] 또한, 상기 병원균이 포함된 시료는 유전체 분석 대상이 되는 병원균이 포함된 시료로서, 환자의 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 점액, 양수, 뇨 등일 수 있고, 동시에 여러 유전체를 검출하기 위하여 다양한 종류의 병원균을 포함할 수 있다.

[0046] 본원에서 "병원균"이란, 분한 양이 존재한다면 그러한 미립자에 노출된 사람에게 잠재적으로 해를 끼치거나 심지어는 사망을 일으킬 수 있는 임의의 공기 중 또는 액체 중의 미립자인 생물학적 체제 또는 독소를 의미하며, 예를 들어 균체, 바이러스, 박테리아 등이 있다.

[0047] 상기 병원균은 예를 들어, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *E. faecium* 등의 그람 양성균, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* 등의 그람 음성균 및 *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *A. fumigatus* 등의 균류일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0048] 이때, 상기 병원균이 포함된 시료에서 세포 용해를 통해 DNA 또는 RNA 절편을 추출하기 위한 방법으로, 효소, 레이저, 초음파, 고전압 등을 활용할 수 있고, 해당 기술 분야에 알려진 모든 세포 용해 기술이 적용될 수 있으며, 바람직하게는 가열 방식으로 병원균의 핵산 절편을 추출할 수 있다.

[0050] 다음으로, 상기 분석시료, 상기 병원균이 포함된 시료(샘플시료) 및 캐리어를 포함하는 반응액으로부터 복수의 드롭렛(droplet)을 생성하는 단계를 제공한다. 본원에서 "드롭렛"이란, 디지털 PCR 방식에 적용되기 위해 표적 핵산 절편을 포함하는 미소유체/유적을 의미한다. 도 2는 본 발명의 나노복합체를 함유하는 드롭렛이 튜브 안에 집적된 형태 및 이의 2차원적 배열 형태를 나타낸 것으로, 복수의 드롭렛을 웰 플레이트에 옮기기 위해 튜브에 집적시킨 상태에 대한 모식도이다.

[0051] 또한, 본원에서 "캐리어"는 수불용성인 임의의 액체 혼합물을 의미하며, 미세액적인 드롭렛을 발생시키기 위한 것으로 식물성 오일 또는 공업용 오일일 수 있으며, 예를 들어, 디지털 PCR 시스템에 이용하기 위해 상업적으로 시판되는 Bio-Rad社의 #1863005 오일일 수 있다.

[0052] 상기 드롭렛은 다양한 방법으로 제조될 수 있으며, 드롭렛 디지털 PCR 방식을 사용하는 경우 PCR 반응 전 단계에서 수용액에 용해된 분석시료와 샘플시료를 먼저 혼합하고, 이를 오일 등의 캐리어와 접촉시켜 제조할 수 있다. 분석시료와 샘플시료의 혼합용액 약 20 내지 40 $\mu$ l로부터 약 10,000 내지 40,000개 정도의 드롭렛이 생성될 수 있다.

[0053] 한편, 분석시료와 샘플시료의 혼합 용액과 캐리어 용액의 접촉 속도 즉, 각 용액이 포함된 챔버로부터의 배출 속도를 조절하여 드롭렛을 제조할 수 있으며, 배출 속도는 약 1: 1 내지 1: 20, 1: 2 내지 1: 15, 1:4 내지 1:6 또는 약 1 : 5의 범위의 비율로 조절되는 것이 바람직하다.

[0054] 상기 드롭렛의 평균 직경은 0.01 내지 700 $\mu$ m, 0.1 내지 650 $\mu$ m, 10 내지 600 $\mu$ m, 100 내지 550 $\mu$ m 또는 200 내지 500 $\mu$ m일 수 있고, 이러한 범위 내로 조절되는 것이 민감도와 정확도 측면에서 바람직하다.

[0056] 다음으로, 상기 드롭렛에서 디지털 PCR을 통해 병원균의 표적 핵산 서열을 증폭시켜 표면증강 라만 산란 나노복합체를 제조하는 단계를 제공한다. 이때, PCR 반응은 종래 기술 분야에 알려진 모든 PCR 기술이 적용될 수 있다. 또한, 미량의 시료만으로도 정확하고 신속한 검출을 위해 본 발명에 따른 검출방법은 앞서 제조한 드롭렛

을 이용하여 디지털 PCR 시스템으로 수행되는 것이 바람직하다. 따라서, 상기 드롭렛에 대하여 디지털 PCR을 수행하여 DNA 또는 RNA 절편을 증폭시키고, 여기에 비오틴이 표지된 프라이머가 결합될 수 있다. 또한, 라만 프로브가 상기 금속-단백질 코어-셸 나노입자의 코어가 노출된 부분의 금속에 부착됨으로써, 상기 드롭렛 내에 표면증강 라만 분광 분석이 가능한 나노복합체가 제조될 수 있어 결과적으로 디지털 PCR 반응과 라만 분광 분석을 결합하여 병원균을 검출할 수 있다.

[0057] 예를 들어, 전술한 방법으로 제조된 복수의 드롭렛이 하나 이상의 웰을 포함하는 기판에 로딩될 수 있고, 상기 기판은 유리, 금속, 금속 산화물, 규소, 세라믹, 중합체 코팅 및 이들의 조합으로부터 선택된 하나의 재질로 이루어질 수 있다. 상기 웰의 표면은 처리된 표면일 수 있으며, 이는 친수성 코팅, 항체, 스트렙타비딘, 아비딘, 올리고뉴클레오타이드 등에 적합한 표면 처리로의 표면 코팅을 포함할 수 있다. 또한, 각각의 웰의 부피는 약 10 내지 100  $\mu\text{m}^3$ 인 것이 바람직하며, 하나의 웰에 대하여 수천 내지 수백만 개의 드롭렛이 첨가될 수 있다.

[0058] 또한, 상기 드롭렛 내 표면증강 라만 산란 나노복합체는 1 내지 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 포함될 수 있다. 따라서, 병원균을 포함하는 샘플 시료가 미량으로 존재하는 경우에도, 라만 프로브가 부착된 나노복합체를 포함하는 드롭렛을 이용하여 정밀하고 신속하게 병원균을 탐지할 수 있어, 특정 질환에 대한 조기진단 및 효과적인 치료를 가능하게 할 수 있다.

[0060] 이후, 상기 표면증강 라만 산란 나노복합체를 함유하는 드롭렛에 레이저를 조사하여 라만 신호를 측정하는 단계를 제공한다. 본 발명에 따른 병원균 검출방법에서 사용되는 라만 분광 장치는 일반적으로 라만 분광 분석에 사용되는 장치 또는 상업적으로 시판되는 라만 분광 장치일 수 있으며 이에 제한되지 않는다.

[0061] 표면 증강 라만 산란법(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)은 금속 나노입자의 표면에 결합 또는 흡착된 화학물질의 라만 스펙트럼을 증폭하여 기존의 라만분광 분석법에 비해서도 감도가 매우 높으며, 표면 선택성이 있는 장점이 있다. 상기 라만 프로브가 이후 병원균의 DNA 절편 등이 연결된 금속-단백질 코어-셸 나노입자의 금속 코어에 고정됨으로써, 본 발명에 따른 나노복합체를 라만 분광 분석에 활용하여 병원균을 고감도의 정밀한 탐지가 가능하다. 구체적으로, 상기 라만 프로브의 도입으로 표적 물질을 구별할 수 있으며, 상기 라만 프로브는 금속-단백질 코어-셸 나노입자와 연결될 수 있어 표적 핵산 절편에 대하여 날카로운 스펙트럼 피크를 발생시킬 수 있다.

[0062] 또한, 상기 레이저의 파장은 400 내지 800nm, 500 내지 700nm 또는 590 내지 670nm인 것이 미량의 샘플시료를 이용한 고감도 탐지에 적합하다. 레이저의 강도는 신호 증강을 조절하는 요인이다.

[0063] 이를 통해, 본 발명에 따른 병원균 검출방법은 미량의 시료만으로도 고속 반응이 가능한 디지털 PCR 시스템과 정밀하고 신속한 분석이 가능한 표면증강 라만 분광법을 동시에 이용하여 다양한 표적 유전체를 고속 및 고감도로 탐지할 수 있는 장점이 있다.

[0065] 한편, 도 3은 본 발명에 따른 병원균 검출방법이 적용된 장치의 모식도로서, 표면증강 라만 산란 나노복합체를 포함하는 드롭렛이 배열된 디지털 PCR 96-웰 플레이트와 라만 분광 분석 기기가 결합된 장치이다. 또한, 도 4는 본 발명에 따른 병원균 검출방법이 적용된 장치를 이용하여 병원균을 검출하는 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

[0066] 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 디지털 PCR 시스템과 라만 분광 기기를 결합하여 정렬된 드롭렛을 빠른 시간 내에 스캔하여 라만 신호를 찾아내고 이를 해석하여 병원균을 탐지할 수 있다. 구체적으로, 상기 분석시료와 상기 병원균이 포함된 시료를 혼합한 후 약 20,000개 정도의 드롭렛을 생성하고, 이를 96-웰 PCR 플레이트로 옮겨 PCR반응을 진행하면 본 발명에 따른 나노복합체가 제조되며, 이를 최종적으로 표면증강 라만 분광 분석을 하여 표적 핵산 절편에 대한 라만 신호를 탐지하여 병원균을 검출할 수 있다.

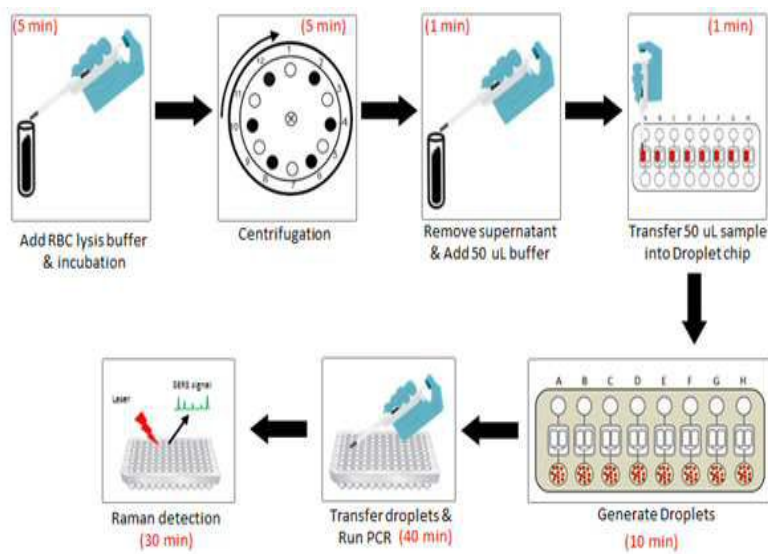
[0068] 도 5는 본 발명에 따른 병원균 검출방법이 적용된 장치를 이용하여 병원균을 검출한 결과와 대조군을 나타낸 그래프이다. 본 발명에 따른 장치를 병원균 검출방법이 적용된 장치를 이용하여 디지털PCR 처리 및 라만프로브 도입이 수행된 입자를 포함하는 드롭렛을 제조하고, 대조군으로 PCR을 거치지 않은 금나노입자와 핵산 절편, 라만프로브가 함유된 드롭렛을 설정하였다.

[0069] 도 5에 나타난 바와 같이, 디지털 PCR(10 cycles)과 라만 프로브를 함께 도입한 경우, 일반 대조군의 드롭렛보다 SERS 신호 강도가 월등히 증가한 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 병원균 검출방법을 이용하면 미량의 시료만으로도 신속하고 정밀하게 병원균의 검출 및 분석이 가능하다.

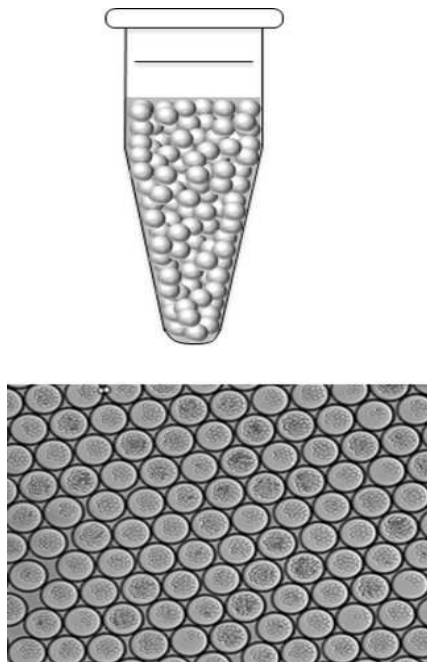
[0071] 이상, 본 발명의 일 실시예에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다 할 것이다.

## 도면

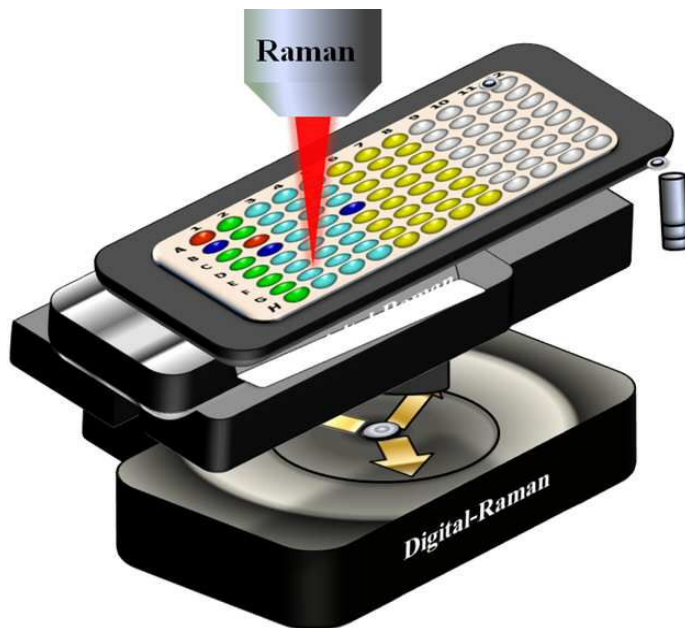
### 도면1



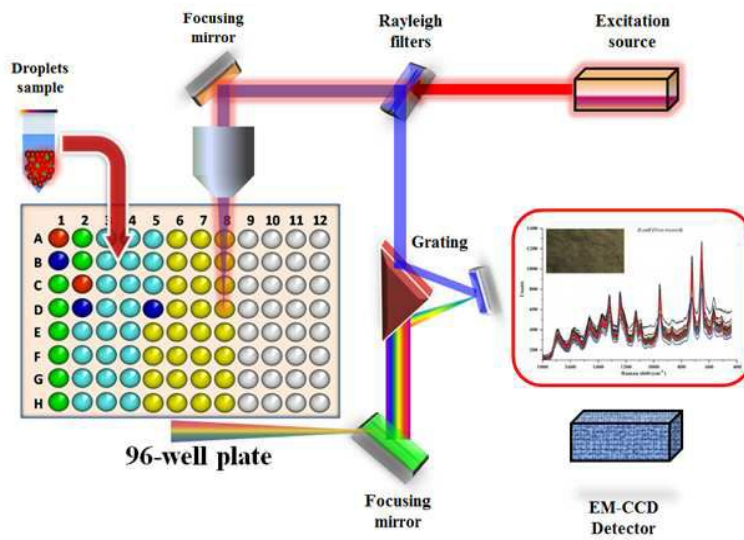
도면2



도면3



도면4



도면5

