



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0004961
(43) 공개일자 2011년01월17일

(51) Int. Cl.

G01N 33/553 (2006.01) B82B 3/00 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0062406

(22) 출원일자 2009년07월09일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

피씨엘 (주)

경기 수원시 장안구 천천동 300 성균관대학교 연구2동 83421

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

이광렬

경기도 남양주시 퇴계원면 강남아파트 103동 603호

이명훈

경기도 수원시 장안구 천천동 성균관대학교 연구2동 83421호

(74) 대리인

이처영

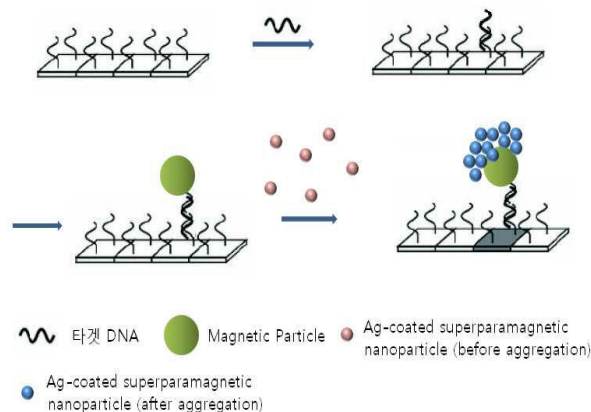
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 초상자성나노입자를 이용한 타겟물질의 표지 및 검출방법

(57) 요약

본 발명은 금속 코팅된 초상자성나노입자를 이용한 타겟물질의 표지 및 검출 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 초상자성나노입자의 자화현상 및 금과 같은 금속의 표면 플라즈몬 공명효과 및 응집(aggregation) 시 가시적인 색변화 현상에 기반하여, 강자성체 입자를 타겟물질에 결합시킨 다음, 금속 코팅된 초상자성나노입자를 가하여 상기 금속 코팅된 초상자성나노입자를 상기 타겟물질에 결합되어 있는 강자성체 입자에 결합시키는 것을 특징으로 하는 타겟물질의 표지 및 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 방법은 종래 SPR을 이용한 검출방법의 효율을 향상시켜 극미량의 생체 물질이나 환경호르몬과 같은 극미량의 화합물도 특이적으로 검출할 수 있게 하며, 또한 별도의 형광현미경이나 분석장치가 없이도 가시적으로 타겟물질의 존재를 검출할 수 있게 하므로, 생물학적 물질의 검출, 의약 발굴 등 다양한 부분에 적용될 수 있어 매우 유용하다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는, 금속 코팅된 초상자성나노입자를 이용한 타겟물질의 표지방법:

- (a) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 결합체가 고정된 강자성체 입자를 타겟물질에 결합시키는 단계; 및
- (b) 금속 코팅된 초상자성나노입자를 가하여, 상기 타겟물질에 결합되어 있는 강자성체 입자에 부착시키는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 타겟물질은 DNA, RNA, 펩티드, 단백질, 항원, 항체, 합텐(hapten), 유기화합물 및 무기화합물로 구성된 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 표지방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 결합체는 DNA, RNA, 펩티드, 단백질, 압타머 및 항체로 구성된 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 표지방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 강자성체 입자의 직경은 5nm~10 μ m인 것을 특징으로 하는 표지방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 금속은 빛 조사 시 표면 플라즈몬 공명을 일으킬 수 있는 금속인 것을 특징으로 하는 표지방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 금속은 Au, Ag, Pt, Pd, Ir, Rh, Ru, Al, Cu, Te, Bi, Pb, Fe, Ce, Mo, Nb, W, Sb, Sn, V, Mn, Ni, Co, Zn 및 Ti로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 금속인 것을 특징으로 하는 표지방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 금속은 Au 또는 Ag인 것임을 특징으로 하는 표지방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 금속 코팅된 초상자성 나노입자는 Au 및 Ag로 이중 코팅된 것임을 특징으로 하는 표지방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 초상자성나노입자는 Iron-Oxide, Iron-Cobalt, Iron-Nickel 및 전이금속으로 구성된 군에서 선택된 금속으로 이루어진 것임을 특징으로 하는 표지방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 초상자성나노입자는 γ - Fe_2O_3 또는 Fe_3O_4 인 것을 특징으로 하는 표지방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 초상자성나노입자의 직경은 5~150nm인 것을 특징으로 하는 표지방법.

청구항 12

타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 결합체가 고정된 강자성체 입자와, 금속 코팅된 초상자성나노입자를 포함하는 타겟물질 표지용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 금속은 빛 조사 시 표면 플라즈몬 공명을 일으킬 수 있는 금속인 것을 특징으로 하는 타겟물질 표지용 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 금속 코팅된 초상자성나노입자는 Au 및 Ag로 이중 코팅된 것임을 특징으로 하는 타겟물질 표지용 조성물.

청구항 15

다음 단계를 포함하는, 금속 코팅된 초상자성 나노입자를 이용한 타겟물질의 검출방법:

- (a) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 결합체가 고정된 고체 지지체에 타겟물질을 포함하는 시료를 가하는 단계;
 - (b) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 결합체가 고정된 강자성체 입자를 상기 고체 지지체에 가하는 단계,
- 이때, 상기 제2결합체는 상기 제1결합체의 타겟물질 결합부위와 다른 부위를 인식하여 타겟물질에 결합하는 것을 특징으로 함;
- (c) 상기 고체 지지체에 금속 코팅된 초상자성나노입자를 가하여 상기 타겟물질에 결합되어 있는 강자성체 입자에 부착시켜 표지시키는 단계; 및
 - (d) 상기 금속 코팅된 초상자성 나노입자들의 강자성체 입자로의 부착에 따른 표면 플라즈몬 공명(SPR) 스펙트럼 또는 가시적인 색의 변화를 측정하거나 전기화학적 시그널을 측정하여 시료 중의 타겟물질의 존재를 검출하는 단계.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 (d) 단계의 SPR 스펙트럼 또는 가시적인 색의 변화 또는 전기화학적 시그널의 측정 전, 미결합된 금속 코팅된 초상자성 나노입자 또는 자기입자를 제거하기 위한 세척을 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 고체 지지체는 SPR 센서인 것을 특징으로 하는 검출방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 제1 결합체 및 제2 결합체는 DNA, RNA, 펩티드, 단백질, 압타머 및 항체로 구성된 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 검출방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 금속은 빛 조사 시 표면 플라즈몬 공명을 일으킬 수 있는 금속인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 금속 코팅된 초상자성 나노입자는 Au 및 Ag로 이중 코팅된 것임을 특징으로 하는 검출방법.

청구항 21

다음을 포함하는, 금속코팅된 초상자성 나노입자를 이용한 타겟물질 검출용 키트:

(a) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 결합체가 고정된 고체 지지체;

(b) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 결합체가 고정된 강자성체 입자,

이때, 상기 제2결합체는 상기 제1결합체의 타겟물질 결합부위와 다른 부위를 인식하여 타겟물질에 결합하는 것을 특징으로 함; 및

(c) 금속 코팅된 초상자성 나노입자.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 고체 지지체는 SPR 센서인 것을 특징으로 하는 타겟물질 검출용 키트.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 제1 결합체 및 제2 결합체는 DNA, RNA, 펩티드, 단백질, 압타머 및 항체로 구성된 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 타겟물질 검출용 기기.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 금속은 빛 조사 시 표면 플라즈몬 공명을 일으킬 수 있는 금속인 것을 특징으로 하는 타겟물질 검출용 키트.

청구항 25

제21항에 있어서, 추가로 광원을 포함하는 것을 특징으로 하는 타겟물질 검출용 키트.

청구항 26

제21항에 있어서, 추가로 분석기를 포함하는 것을 특징으로 하는 타겟물질 검출용 키트.

청구항 27

제21항 내지 제26항 중 어느 한 항의 타겟물질 검출용 키트를 이용하는 것을 특징으로 하는 타겟물질의 검출방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 금속 코팅된 초상자성나노입자를 이용한 타겟물질의 표지 및 검출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생체 분석 과학 및 바이오 엔지니어링에 있어서, 제노믹스 및 프로테오믹스에서의 최근의 연구는 보다 많은 시퀀스 데이터를 생산한다. 따라서, 많은 수의 생체 분자들 및 그것들의 리간드를 동시에 신속하게 스크리닝할 수 있는 새로운 기술들에 대한 수요가 있어 왔다.

[0003] 이에 샘플 내 유전자 발현 양상, 유전자 결합, 단백질 분포, 반응 양상 등을 분석하기 위하여, 바이오 칩과 같은 분석방법이 이용되고 있는데, 샘플에 프로브와 결합할 수 있는 표적 물질이 존재하는지를 알아내기 위하여, 기질 상에 고정된 프로브와 표적 물질의 결합여부를 검출할 수 있는 시스템이 필요하였다.

[0004] 현재 유전자 분석용 DNA 칩은 대부분 샘플 DNA에 형광색소를 라벨링하고, 칩 위의 프로브(probe)와 반응시킨 후 공초점 현미경(confocal microscope)이나 CCD 카메라를 사용하여 칩 표면에 남은 형광 물질을 검출하는 방법을 사용하고 있는데 (미국특허 제 6141096), 이러한 광학적인 검출법은 소형화가 어렵고, 디지털화된 출력을 볼 수 없기 때문에, 전기적인 신호로 결과를 낼 수 있는 새로운 검출법의 개발에 관하여 많은 연구가 진행 중이다.

[0005] 한편, Clinical Micro Sensor를 비롯한 많은 연구 기관들이 산화/환원이 쉬운 금속 화합물을 이용하여 DNA 혼성화(hybridization)를 전기화학적으로 검출하는 방법에 관하여 연구하고 있는데(미국특허 제 6096273, 6090933), 예를 들어 DNA가 혼성화되었을 때, 산화/환원이 쉬운 금속을 포함한 다른 화합물이 같이 착체(complex)를 이루게 되고, 이를 전기화학적으로 검출하는 것이다(Kusakabe, T. et al., *Anal. Chem.*, 70:4670, 1998). 그러나, 전기화학적 방법도 역시 별도의 라벨링이 필요하다는 단점은 있었다. 또한, 최근에는 나노입자(nanoparticle)를 이용하여 DNA를 검출하는 방법에 관한 연구들이 활발히 진행 중인데, 형광라벨링 된 타겟 대신에 Au 나노입자로 표지된 타겟을 사용하여 혼성화를 시킨 후, 은 염색을 하여서 이미지 분석을 하거나 (Mirkin et al., *science*, 289:1757, 2000), 전기적인 검출을 한 연구(Mirkin et al., *science*, 295:1503, 2002)가 대표적인 예라고 볼 수가 있다. 다만, 시료에서 타겟물질의 농도가 너무 낮은 경우, 상기 방법들은 시료 중의 타겟물질의 존재를 검출하는데 적절하지 않았다. 이에 시료 중 농도가 낮은 타겟물질도 효과적으로 검출할 수 있는 향상된 효율을 가지는 표지방법의 개발이 요청되었다.

[0006] 이에, 본 발명자는 시료 중 극미량으로 존재하는 타겟물질도 효과적으로 검출해 낼 수 있으며 별도의 장치 없이도 가시적으로 타겟물질의 존재를 검출할 수 있는 새로운 타겟물질의 표지방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 결합체가 고정된 강자성체 입자를 타겟물질에 결합시킨 다음, 금속 코팅된 초상자성나노입자를 가하여 다수개의 금속코팅된 초상자성나노입자를 결합시킴으로써 극미량의 물질도 효과적으로 검출해 낼 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 극미량의 생체물질이나 화합물의 검출도 가능한 검출효율을 극대화시킬 수 있는 새로운 타겟물질의 표지 및 검출 방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는, 금속 코팅된 초상자성나노입자를 이용한 타겟물질의 표지방법을 제공한다:

[0009] (a) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 결합체가 고정된 강자성체 입자를 타겟물질에 결합시키는 단계; 및

[0010] (b) 금속 코팅된 초상자성나노입자를 가하여, 상기 타겟물질에 결합되어 있는 강자성체 입자에 부착시키는 단계.

[0011] 본 발명은 또한, 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 결합체가 고정된 강자성체 입자와, 금속 코팅된 초상자성나노입자를 포함하는 타겟물질 표지용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는, 금속 코팅된 초상자성 나노입자를 이용한 타겟물질의 검출방법을 제공한다:

[0013] (a) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 결합체가 고정된 고체 지지체에 타겟물질을 포함하는 시료를 가하는 단계;

[0014] (b) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 결합체가 고정된 강자성체 입자를 상기 고체 지지체에 가하는 단계,

[0015] 이때, 상기 제2결합체는 상기 제1결합체의 타겟물질 결합부위와 다른 부위를 인식하여 타겟물질에 결합하는 것을 특징으로 함;

[0016] (c) 상기 고체 지지체에 금속 코팅된 초상자성나노입자를 가하여 상기 타겟물질에 결합되어 있는 강자성체 입자에 부착시켜 표지시키는 단계; 및

[0017] (d) 상기 금속 코팅된 초상자성 나노입자들의 강자성체 입자로의 부착에 따른 표면 플라즈몬 공명 스펙트럼 또는 가시적인 색의 변화를 측정하거나 전기화학적 시그널을 측정하여 시료 중의 타겟물질의 존재를 검출하는 단계.

[0018] 본 발명은 또한, 다음을 포함하는 금속코팅된 초상자성 나노입자를 이용한 타겟물질 검출용 키트를 제공한다:

[0019] (a) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 결합체가 고정된 고체 지지체;

[0020] (b) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 결합체가 고정된 강자성체 입자,

[0021] 이때, 상기 제2결합체는 상기 제1결합체의 타겟물질 결합부위와 다른 부위를 인식하여 타겟물질에 결합하는 것을 특징으로 함; 및

[0022] (c) 금속 코팅된 초상자성 나노입자.

[0023] 본 발명은 또한, 상기 타겟물질 검출용 키트를 이용하는 것을 특징으로 하는 타겟물질의 검출방법을 제공한다.

효 과

[0024] 본 발명은 금속 코팅된 초상자성나노입자를 이용한 타겟물질의 표지 및 검출방법을 제공하는 효과가 있다. 본 발명에 따른 방법은 종래 SPR을 이용한 검출방법의 효율을 향상시켜 극미량의 생체 물질이나 환경호르몬과 같은 극미량의 화합물도 특이적으로 검출할 수 있게 하며, 또한 별도의 형광현미경이나 분석장치가 없이도 가시적으로 타겟물질의 존재를 검출할 수 있게 하므로, 생물학적 물질의 검출, 의약 발굴 등 다양한 부분에 적용될 수

있어 매우 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0025] 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 명명법 은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0026] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.
- [0027] 본원에서 "강자성체 입자"란 자기장에서 영구적으로 자기 쌍극자를 생성하는 임의의 형태의 자기 입자를 포함한다. 이는 자기를 영구적으로 띠는 입자이면, 나노미터에서 마이크로미터 크기에 이르기까지 두루 이용될 수 있다.
- [0028] 본원에서 "초상자성 물질"이란 외부 자기장이 가해지지 않은 상태에서는 열적운동에 의해 자화가 사라지는 반면, 외부 자기장이 가해진 경우 유도되는 자화의 정도가 상자성체에 비해 매우 큰 물질로 임계자장에서는 강자성체와 유사하게 자기포화현상을 나타내는 물질이다. 일반적으로 강자성체가 단자구정도의 크기로 작아지는 경우, 초상자성체로 상전이 되는데, 이러한 단자구의 크기는 물질에 따라 차이가 있으나 대략적으로 수 나노미터에서 수백 나노미터 정도의 지름을 갖는 것으로 보고되고 있다. 이에 본원에서 "초상자성나노입자"는 나노크기로 잘게 부수어지어 초상자성 성질을 가지는 나노입자를 포함한다.
- [0029] 본원에서 "표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR)"이란, 금과 같은 금속에서 나타나는 광전자효과로서 특정 파장의 광이 금속에 조사되면 대부분의 광에너지가 자유전자로 전이되는 공명현상이 일어나게 되고, 그 결과로서 표면파가 생길 때 나타나는 현상을 SPR이라고 부른다. 표면 플라즈몬의 흡수 파장은 금속 종류, 금속 입자의 크기, 코팅여부 및 코팅물질의 유전상수에 따라 파장 전이가 나타나는데, 표면 플라즈몬 흡수 피크의 위치는 잘 알려진 미공명조건(Mie resonance condition)에 의해 예측할 수 있다.
- [0030] 본 발명은 초상자성나노입자의 자화현상 및 금과 같은 금속의 표면 플라즈몬 공명효과 및 응집(aggregation) 시 가시적인 색변화 현상에 기반한 것으로, 본 발명은 일 관점에서, 다음의 단계를 포함하는 금속 코팅된 초상자성 나노입자를 이용한 타겟물질의 표지방법에 관한 것이다:
- [0031] (a) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 결합체가 고정된 강자성체 입자를 타겟물질에 결합시키는 단계; 및
- [0032] (b) 금속 코팅된 초상자성나노입자를 가하고, 자기장을 인가하여 상기 금속 코팅된 초상자성 나노입자를 상기 타겟물질에 결합되어 있는 강자성체 입자에 결합시키는 단계.
- [0033] 본 발명에 있어서, 표지 또는 검출목적이 되는 타겟물질로는 DNA, RNA, 펩티드, 단백질, 항원, 항체, 합텐(hapten), 유기화합물 또는 무기화합물 등을 들 수 있다. 상기 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 결합체로는 DNA, RNA, 펩티드, 단백질, 압타머 및 항체로 구성된 군에서 선택된 것임을 특징으로 할 수 있는데, 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이면 이에 한정되지 않음은 자명할 것이다. 특히, 압타머는 핵산, 단백질 뿐만 아니라, 환경호르몬과 같은 매우 작은 화합물에도 특이적으로 결합할 수 있기 때문에, 이러한 극미량 존재하는 작은 화합물을 표지하기 위해서는 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 결합체로서 압타머를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0034] 이때, 상기 결합체는 강자성체 입자에 고정되어 제공되는데, 이는 공유 또는 비공유 수단에 의하여 강자성체 입자에 고정될 수 있다. 이때, 상기 결합체는 강자성체 입자의 표면에 직접 부착되는 것도 가능하나, 표면 처리 물질로 상기 강자성체 입자의 표면을 처리한 후 이것을 링커로 하여 부착되는 것이 효율 면에서 바람직하다. 이와 같은 표면 처리 물질로는 아미노프로필트리에톡시실란(aminopropyltriethoxysilane; APTES), 글리시독시프로필트리메톡시실란(glycidoxypropyltrimethoxysilane; GPTS), 트리메톡시실란 운데칸산(triethoxysilane undecanoic acid; TETU), 폴리라이신(poly(lysine)), 4-트리메톡시실릴벤즈알데히드(4-trimethoxysilylbenzaldehyde) 등을 들 수 있으나, 이에 국한되지 않는다.
- [0035] 상기 결합체는 강자성체 입자의 표면에 다수로 존재할 수 있으며, 이로 한정되는 것은 아니나 상기 강자성체 입자의 표면에 수 내지 수천개가 존재할 수 있다. 또한, 이는 다양한 길이를 가질 수 있는데, 그 길이는 표적 물질, 결합체의 타입 등에 따라 달라질 수 있으며, 당해 기술이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가지는 자가 주어진 조건에 따른 길이를 쉽게 결정할 수 있음은 자명하다고 할 것이다. 예를 들어, 상기 결합체가 DNA인 경우,

바람직하게는 그 길이는 분석할 타겟물질의 뉴클레오타이드의 최대 25% 또는 10mer 이상의 염기쌍을 가지도록 제작할 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 강자성체 입자는 자기입자 자체; 유기 또는 무기 물질 입자에 의해 자기입자가 일부 또는 전부 코팅된 입자; 또는 자기입자 표면에 유기 또는 무기 물질이 코팅된 입자를 포함하는 형태로 이용될 수 있는 것은 자명하다. 또한, 강자성체 입자로서, 철, 코발트, 니켈 및 그 합금 등을 사용할 수 있는데, 크기는 물질에 따라 다양하기는 하나 바람직하게는 5nm~10 μ m, 더욱 바람직하게는 20~500nm의 직경을 가지는 강자성체입자를 사용한다. 상기에서 강자성체 입자의 크기가 5nm 미만이면 결합을 위한 표면적이 작아져 효율이 작아지고, 10 μ m 초과이면 DNA 칩 등에 적용 시 적합하지 않다.

[0037] 한편, 자기장 인가 시 자화되어 상기 강자성체 입자로 부착되는 초상자성나노입자는 외부자기장이 가해질 경우 자화되는 성질을 갖는 입자로서, Iron-Oxide, Iron-Cobalt, Iron-Nickel 및 전이금속으로 구성된 군에서 선택된 금속입자를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 γ -Fe₂O₃ 또는 Fe₃O₄를 사용할 수 있다. 추가로, 상기 초상자성 나노입자는 바람직하게는 직경 크기가 5nm ~ 150nm인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 초상자성나노입자는 금속으로 코팅된 것을 특징으로 하는데, 금속코팅 막 내에 하나 이상의 초상자성나노입자를 포함할 수 있다. 이때 금속은 빛 조사 시 표면 플라즈몬 공명을 일으킬 수 있는 금속인 것을 특징으로 한다. 즉, Au, Ag, Pt, Pd, Ir, Rh, Ru, Al, Cu, Te, Bi, Pb, Fe, Ce, Mo, Nb, W, Sb, Sn, V, Mn, Ni, Co, Zn 및 Ti로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 금속을 상기 초상자성나노입자의 코팅을 위하여 사용할 수 있다. 이 중, Ag은 가장 예리한 SPR 공명 피크를 보이며, Au는 우수한 안정성을 나타내는데, 본 발명에 따른 표지를 위하여 바람직하다. 특히, 금(Au) 나노입자는 용액중에 분산되었을 때 입자의 사이즈에 따라서 흡수스펙트럼에서 서로 다른 최대 흡수파장을 지닌다. 예를 들면 약 13nm의 지름을 지니는 금 나노입자가 수용액 상태에서 잘 분산되었을 때는 약 530nm의 최대흡수파장을 가지며 용액은 붉은빛을 띠게 된다. 그러나 입자가 모여서 aggregation되었을 때는 최대흡수파장이 장파장으로 이동하게 되고 용액의 색은 푸른 빛을 띠게 된다. 한편, Ag의 경우 동일 크기일 때 Au보다 SPR 신호가 4배 더 크다고 알려져 있으며, aggregation 되는 경우 회색의 어두운 색을 띠게된다.

[0039] 따라서, 타겟물질에 결합체를 이용하여 강자성체 입자를 결합시킨 다음, 상기 금속 코팅된 초상자성나노입자를 가하는 경우, 강자성체 입자로 인하여 초상자성나노입자가 자화되어 상기 타겟물질에 결합된 강자성체 입자로 부착하게 되는데, 이때 바람직하게는 금속코팅된 초상자성나노입자를 다수개 가하여 다수개의 금속 코팅된 초상자성나노입자가 강자성체 입자로 부착되어 결과적으로 금속코팅된 초상자성나노입자로 타겟물질을 표지하게 된다. 이러한 다수개의 금속코팅된 초상자성나노입자의 타겟물질로의 aggregation은 극미량의 생체 물질도 검출해 낼 수 있게 하는 효과가 있다.

[0040] 이때, 상기 초상자성나노입자를 코팅하는 금속은 표면 플라즈몬 공명을 일으킬 수 있는 금속으로, 이의 결합으로 인하여 표면 플라즈몬 공명 스펙트럼의 변화를 가져오게 된다. 따라서, 스펙트럼 분석기를 이용하여 이를 측정할 수 있다. 이때 바람직하게는 다수개의 금(Au) 코팅된 초상자성나노입자를 이용함으로써, 별도의 스펙트럼 분석기 없이도 상기과 같은 금 나노입자의 aggregation에 따른 가시적인 색변화(푸른 빛)을 확인할 수 있다. 또한, 은(Ag)의 경우에도 다수개의 은 나노입자가 aggregation되는 경우 가시적으로 회색빛을 확인할 수 있다. 이때, 더욱 바람직하게는, 표면안정성이 높은 금(Au)로 초상자성나노입자를 코팅한 다음, 가장 예리한 SPR 공명 피크를 나타내는 Ag로 환원하여 Au 및 Ag로 이중 코팅하여 SPR 스펙트럼 분석 효율을 향상시킬 수 있다. 또한, 이러한 이중코팅시 가시적으로도 aggregation에 따른 색변화도 더 진해짐(검은 색)을 확인할 수 있다.

[0041] 한편, 상기 스펙트럼 또는 색 변화 측정 이외에, 전기화학적 시그널을 측정함으로써, 타겟물질의 존재여부를 검출할 수 있다. 본 기술이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 당업자는 금속 코팅된 초상자성 나노입자를 강자성체 입자에 부착시킨 후, 전기화학적 시그널을 측정하기 위하여 통상적으로 알려진 전기화학적 시그널 측정방법을 수행할 수 있는데, 예시적으로 도 2에 나타난 바와 같이, 전극을 포함한 전기화학적 검출장치에서 한 쌍의 전극 사이에 제1 결합체(예: 압타머)를 고정시키고, 이에 타겟물질을 가하여 결합시킨 다음, 역시 제2 결합체(예: 압타머)가 고정된 강자성체 입자를 제2 결합체를 이용하여 상기 타겟물질에 결합시키고, 이에 금속 코팅된 초상자성 나노입자를 가하여 금속코팅된 초상자성 나노입자가 강자성체 입자로 결합하도록 한다. 이 경우, 금속코팅된 초상자성 나노입자의 결합으로 인하여 전극 사이를 흐르지 않던 전류가 초상자성입자를 코팅한 금속, 바람직하게는 금(Au) 입자를 통하여 흐르게 됨으로써 전기적으로 검출할 수 있다. 이외에도 금이나 은 등과 같은 금속 나노입자의 촉매반응을 이용하여 전기화학적인 시그널을 검출할 수 있는 검출장치이면, 본 발명에 따른 검출방법의 수행을 위하여 이용될 수 있음은 자명한 사항일 것이다. 도 3은 금 나노입자의 촉매반응을 이

용하여 전기화학적 시그널을 검출하는 방법을 예시하는 개략도이다.

- [0042] 결국, 상기와 같은 방법으로 표지한 다음, 스펙트럼 분석 또는 가시적인 색변화를 분석함으로써, 타겟물질의 존재를 검출할 수 있는바, 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 다음 단계를 포함하는, 금속 코팅된 초상자성 나노입자를 이용한 타겟물질의 검출방법에 관한 것이다:
- [0043] (a) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 결합체가 고정된 고체 지지체에 타겟물질을 포함하는 시료를 가하는 단계;
- [0044] (b) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 결합체가 고정된 강자성체 입자를 상기 기관에 가하는 단계,
- [0045] 이때, 상기 제2결합체는 상기 제1결합체의 타겟물질 결합부위와 다른 부위를 인식하여 타겟물질에 결합하는 것을 특징으로 함;
- [0046] (c) 상기 기관에 금속 코팅된 초상자성나노입자를 가하여 상기 타겟물질에 결합되어 있는 강자성체 입자에 부착시켜 표지시키는 단계; 및
- [0047] (d) 상기 금속 코팅된 초상자성 나노입자들의 강자성체 입자로의 부착에 따른 표면 플라즈몬 공명 스펙트럼 또는 색 변화를 측정하거나 전기화학적 시그널을 검출하여 시료 중의 타겟물질의 존재를 검출하는 단계.
- [0048] 이때, 바람직하게는 상기 (c) 단계의 표지 후, 세척단계를 추가하여 비부착된 금속 코팅된 초상자성 나노입자 또는 강자성체 입자들을 제거하여야 한다.
- [0049] 타겟물질의 검출을 위하여 타겟물질을 특정위치로 고정하고 표지할 것이 요청되므로, 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제1결합체를 고체 지지체에 고정시켜, 상기 고체 지지체로 시료 중의 타겟물질을 결합시킨다. 또한, 순차적으로 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 결합체가 고정된 강자성체 입자를 가하여, 고체 지지체 상에 결합된 타겟물질에 강자성체 입자가 결합되게 한다. 이때, 상기 제1결합체 및 제2결합체는 DNA, RNA, 펩티드, 단백질, 압타머 및 항체로 구성된 군에서 선택된 것임을 특징으로 할 수 있는데, 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이면 이에 한정되지 않음은 자명할 것이다. 다만, 상기 제2결합체는 상기 제1결합체의 타겟물질 결합부위와 다른 부위를 인식하여 타겟물질에 결합하도록 하여야 한다. 또한, 상기 제1결합체는 상기 제2결합체와 마찬가지로 공유 또는 비공유 수단에 의하여 고체 지지체에 고정될 수 있다.
- [0050] 그 다음, 상기 표지방법과 동일한 방법으로 금속 코팅된 초상자성 나노입자를 가하면, 결과적으로 금속 코팅된 초상자성 나노입자들이 강자성체 입자로 부착되어 타겟물질로 집결되어 나타나는 가시적인 색변화를 측정하여 시료 중 타겟물질이 존재하는지를 검출할 수 있게 한다. 이때, 금속 코팅된 초상자성 나노입자의 결합 후 세척 과정을 거치어 비결합된 입자들은 제거되도록 한다. 도 1은 본 발명에 따른 검출방법의 개략도를 나타낸다. 이때, 상기 (a) 내지 (c) 단계는 동시에 진행될 수 있다. 즉, 제1결합체가 고정된 고체 지지체에 시료; 및 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 결합체가 고정된 강자성체 입자와 금속 코팅된 초상자성나노입자를 포함하는 타겟물질 표지용 조성물;을 동시에 가하여 상기 결합반응 및 자화로 인한 부착이 일어나게 할 수 있다.
- [0051] 한편, 상기 고체 지지체는 적어도 하나의 실질적으로 단단한 표면을 포함하는데, 그 표면 위에 제1 결합체가 고정되는데, 상기 고체 지지체는 실란 또는 실리케이트 지지체, 유리 슬라이드, 비드, 입자, 섬유, 필터 및 막 등을 이용할 수 있는데, 바람직하게는 상기 고체 지지체로 SPR 센서를 이용할 수 있다.
- [0052] "SPR 센서"란 표면 플라즈몬 공명 현상을 이용하여 광학적인 방법으로 기관 상의 금속박막의 표면 근처에서 일어나는 물리, 화학적 변화에 공명각도나 파장의 변화를 감지하는 센서를 말한다. 종래의 알려진 SPR 센서에 종래의 형광표지방법이 아닌 본 발명에 따른 표지방법을 적용하는 경우 검출효율을 현저하게 증가시키게 되는바, 극미량의 생체 시료를 측정하고자 할 때 매우 유용하게 된다.
- [0053] 한편, 본 발명은 다른 관점에서, (a) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 결합체가 고정된 고체 지지체; (b) 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 결합체가 고정된 강자성체 입자, 이때, 상기 제2결합체는 상기 제1결합체의 타겟물질 결합부위와 다른 부위를 인식하여 타겟물질에 결합하는 것을 특징으로 함; 및 (c) 금속 코팅된 초상자성 나노입자를 포함하는 금속코팅된 초상자성 나노입자를 이용한 타겟물질 검출용 키트에 관한 것이다.
- [0054] 이때, 타겟물질에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 결합체가 고정된 강자성체 입자 및 금속 코팅된 초상자성 나노입자는 각각 별도의 용기에 담겨 있거나, 하나의 용기 내에 혼합되어 제공될 수도 있다. 아울러, 고체 지지체는 실란 또는 실리케이트 지지체, 유리 슬라이드, 비드, 입자, 섬유, 필터 및 막 등을 이용할 수 있으며, 바람

직하계는 상기 고체 지지체로 SPR 센서를 사용할 수 있는데, SPR 스펙트럼 분석을 위하여 추가로 광원 또는 스펙트럼 분석기를 포함할 수 있다.

[0055] 이 타겟물질 검출용 키트는 필요에 따라 완충용액 및 검출의 수행과 분석을 위한 용기들을 포함할 수 있는데, 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있으며 이들은 부분적으로 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다.

[0056] 용기는, 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있다. 용기는 또한 주사바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는, 스톱퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 사용설명서를 포함할 수 있다.

[0057] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

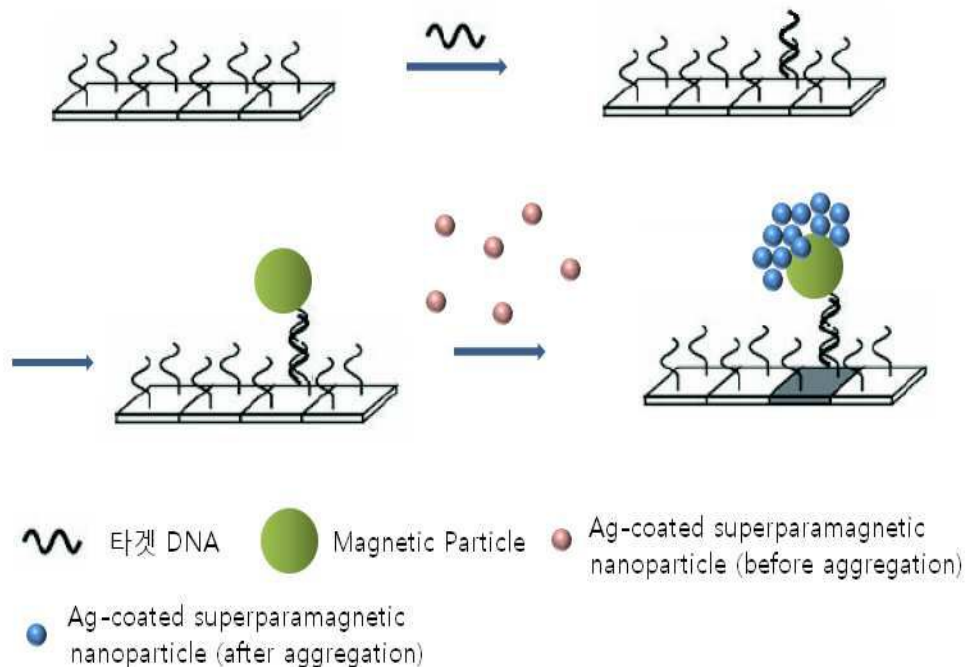
[0058] 도 1은 본 발명에 따른 타겟물질 검출과정의 일 개략도로서, 색 변화 측정에 통한 검출방법에 관한 것이다.

[0059] 도 2는 본 발명에 따른 타겟물질 검출과정의 일 개략도로서, 전기화학적 시그널 검출을 통한 검출방법에 관한 것이다.

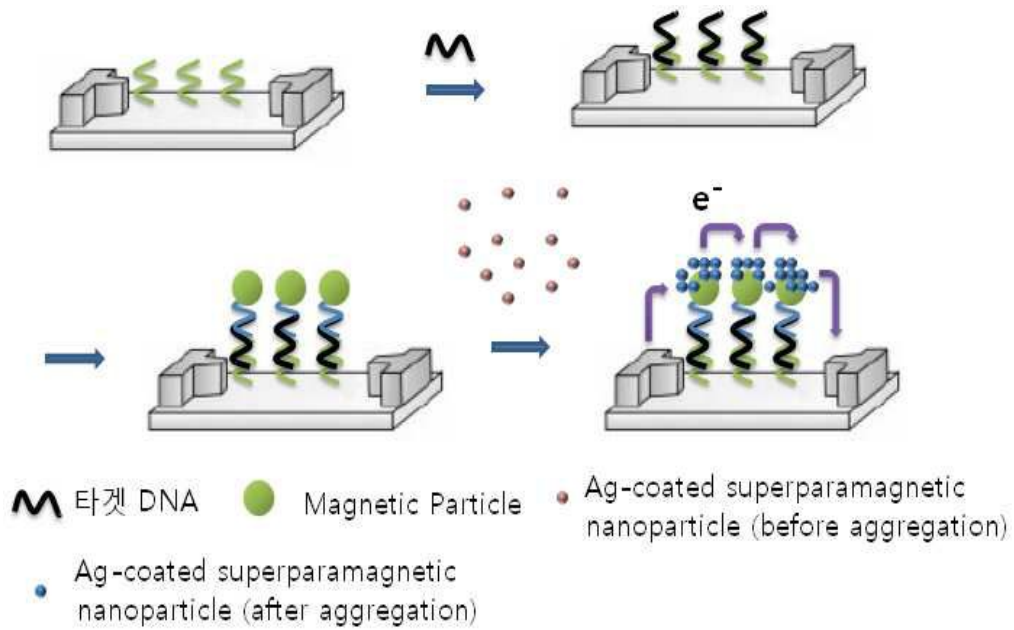
[0060] 도 3은 본 발명에 따른 타겟물질 검출과정의 일 개략도로서, 금 나노입자의 촉매반응을 이용한 전기화학적 시그널 검출을 통한 검출방법에 관한 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

