(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0087303
(43) 공개일자 2021년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/65 (2006.01) *C12Q 1/68* (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/65 (2013.01)
C12Q 1/68 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-0000409
(22) 출원일자 2020년01월02일
심사청구일자 2020년12월22일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울특별시 용산구 서빙고로 35 용산시티파크1단지아파트 103-603
최진하
서울특별시 성북구 오패산로16가길 40, 꿈의숲푸르지오아파트 115동 801호
(74) 대리인
윤대웅

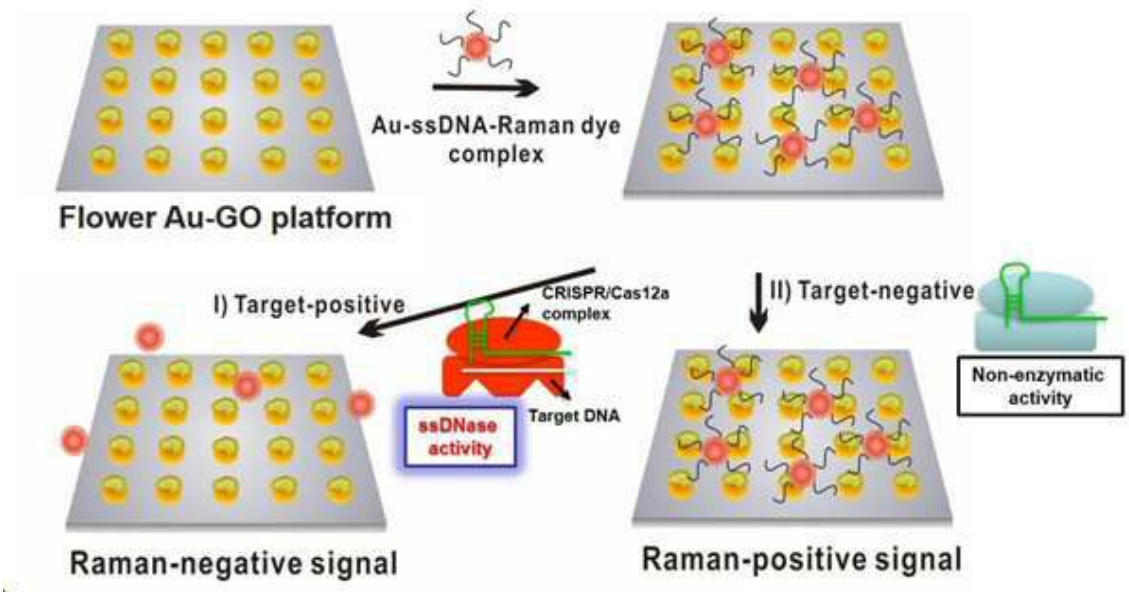
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **CRISPR/Cas12a를 이용한 표면증강 라만산란 기반 표적 DNA 검출용 센서**

(57) 요 약

본 발명에 따른 표적 DNA 검출용 바이오센서는 표면증강 라만산란 활성을 갖는 금 나노입자 복합체 및 금 나노기판을 이용하여 제조됨으로써 라만 신호의 민감도 및 안정성이 우수하다. 본 발명의 바이오센서를 이용하면 단순하고 경제적인 방법으로 펨토몰 농도 수준에서 표적 DNA를 정량적으로 검출할 수 있다. 따라서, 본 발명은 표적 DNA를 신속하고 정확하게 측정할 수 있는 고민감도 플랫폼을 제공하며, 실시간 측정 및 체액 기반의 현장 질병 진단 키트 등으로 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2521/301 (2013.01)
C12Q 2565/632 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 201921038
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 학문후속세대양성사업(리서치펠로우)
연구과제명 덤벨형 패턴/단백질 나노입자 기반의 CRISPR-Cas9 미세유체 칩 개발
기 여 율 34/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 201931073
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 뇌어셈블로이드 기반 생명체 모방 센싱 기능 바이오하이브리드 로봇
기 여 율 33/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1A6A1A03012845
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중점연구소지원사업
연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발
기 여 율 33/100
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

꽃모양의 금 나노구조체가 도입되고 표면에 산화그래핀이 고정화된 금 나노기판;

금 나노입자, 라만(Raman) 표지자 및 분석하고자 하는 단일 가닥 DNA가 연결된 금 나노입자 복합체; 및

표적 DNA를 인식하는 CRIPR RNA(crRNA) 및 Cas12a 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 포함하는 표적 DNA 검출용 바이오센서.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 금 나노입자 복합체는 상기 단일 가닥 DNA 말단의 아미노기($-NH_2$)에 의해 상기 금 나노기판 표면에 고정되는 것인, 표적 DNA 검출용 바이오센서.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 라만(Raman) 표지자는 로다민 B(rhodamine B), 로다민 6G(rhodamine 6G), 시아닌-3(Cyanine-3), 시아닌-5(Cyanine-5), 시아닌-5.5(Cyanine-5.5), 시아닌 7(Cyanine 7), 4-아미노티오페놀(4-aminothiophenol), 4-메틸벤젠티올(4-methylbenzenethiol), 2-나프탈렌티올(2-naphthalenethiol), 로다민-5-(and-6)-이소티오시아네이트(rhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate), 테트라메틸로다민-5-이소티오시아네이트(tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate), FAM 및 TAMRA으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 표적 DNA 검출용 바이오센서.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 바이오센서의 표적 DNA에 대한 검출한계는 1 내지 100 fM(femto-molar)인 것인, 표적 DNA 검출용 바이오센서.

청구항 5

금 나노입자, 라만(Raman) 표지자 및 분석하고자 하는 단일 가닥 DNA를 반응시켜 금 나노입자 복합체를 제조하는 단계;

꽃모양의 금 나노구조체가 도입되고 표면에 산화그래핀이 고정화된 금 나노기판에 상기 금 나노입자 복합체를 고정시키는 단계;

상기 금 나노입자 복합체가 고정화된 상기 금 나노기판과 표적 DNA를 인식하는 CRIPR RNA(crRNA) 및 Cas12a 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 반응시키는 단계; 및

표면증강 라만산란(surface-enhanced Raman scattering, SERS) 신호를 측정하는 단계를 포함하는 표적 DNA의 검출 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CRISPR/Cas12a를 이용한 표면증강 라만분광 기반 표적 DNA 검출용 센서에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 미생물의 면역방어체계에서 유래한 CRISPR/Cas9을 이용하여 인간 유전자를 편집하는 유전자가위 기술이 활발하게 연구되고 있다. 이 기술의 장점은 원하는 유전자를 표적으로 하여 비교적 쉽게 knock-down 하거나 교체

할 수 있다는 점인데, 최근 이를 바이오센서에 응용하는 사례도 나타나고 있다.

[0003] CRISPR 단백질 중 하나인 Cas12a(Cpf-1)은 표적 DNA가 결합하면 DNA의 양쪽 끝부분을 절단하면서, 주위에 있는 단일 DNA 가닥을 무작위로 분해하는 성질을 가지고 있다. 이와 같은 성질을 이용하여, 표적 DNA와 반응하는 Cas12a 주변에 단일 DNA 가닥으로 연결된 quencher-fluorophore를 넣어주어, 표적 DNA의 농도에 따라 DNA 분해 및 형광 방출을 유도하여 DNA를 측정하는 DNA 바이오센서 개발이 진행되었다. 이 CRISPR/Cas12a를 이용한 바이오센서는 민감도가 우수하여 표적 DNA를 aM 수준까지 측정 가능하면서, 원하는 DNA만 측정이 가능하다는 장점이 있다. 그러나, 표적 DNA의 민감한 측정을 위해서는 PCR(polymerase chain reaction) 기법의 한 종류인 RPA(recombinase polymerase amplification) 과정을 통해 표적 DNA를 증폭시키는 과정이 필요하다. 이 과정은 37-42℃의 항온 조건을 통해 작동되며, 이에 따른 시간과 비용이 발생하게 된다. 따라서 RPA 과정을 생략할 수 있는 민감한 센싱 플랫폼을 제작하는 것은 CRISPR/Cas12a을 이용한 표적 DNA 측정에 획기적으로 도움을 줄 수 있을 것으로 예상된다.

[0004] 모든 물질에 빛을 조사하게 되면 빛의 산란 현상이 일어나게 되며, 이 중 조사한 빛과 다른 파장의 빛을 산란하는 현상을 측정하는 것을 라만 분광법이라고 한다. 이를 이용하면 특정 물질을 선택적으로 측정할 수 있지만, 라만 세기가 작아 측정하기가 어렵다는 단점이 있다. 이를 보완하기 위해 표면증강 라만산란(surface-enhanced Raman scattering, SERS)이 바이오센서에 응용되고 있다. 이 기술은 라만 신호를 증폭시키는 기술로, 특정한 금속 물질 혹은 산화 그래핀 표면에 위치한 특정 물질의 라만 신호를 대략 10^{11}배까지 증폭하는 기술이다. 이를 효과적으로 유도하기 위해서는 주로 금, 은, 그래핀, 탄소 나노 튜브 등과 같은 물질들이 사용되는데, 이를 나노 크기로 제작하면 좀 더 큰 SERS 효과를 유도할 수 있다. 이를 이용하여, 특정한 라만 파장을 가지는 라만 표지자를 좀 더 정확하고 민감하게 측정할 수 있으며, 질병과 관련된 생체물질의 민감한 측정이 가능하게 할 수 있다. 따라서 생체물질을 민감하게 측정하기 위해서는 라만 신호의 증폭을 극대화할 수 있는 나노 구조체의 제작이 필수적이라고 할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 표적 DNA를 정량적으로 검출할 수 있는 바이오센서를 개발하고자 연구 노력하였다. 그 결과, 꽃모양의 금 나노구조체가 도입된 금 나노기판과 금 나노입자, 라만 표지자 및 단일 가닥 DNA가 연결된 금 나노입자 복합체를 제조하고, 금 나노기판과 금 나노입자 복합체가 표면의 전자기적 효과로 인해 라만 표지자의 신호를 증폭시키며, 표적 DNA를 인식하는 CRIPR RNA가 단일 가닥 DNA가 반응하여 Cas12a에 의해 단일 가닥 DNA가 분해될 경우, 금 나노입자 복합체가 라만 표지자로부터 멀어져 라만 표지자의 신호가 감소되는 것을 확인하였다. 이를 통해 표면증강 라만산란을 기반으로 라만 표지자 신호를 측정하여 표적 DNA를 신속하고, 안정적으로 검출할 수 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 표적 DNA 검출용 바이오센서를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 표적 DNA 검출용 바이오센서를 이용하여 표적 DNA를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 꽃모양의 금 나노구조체가 도입되고 표면에 산화그래핀이 고정화된 금 나노기판;

[0010] 금 나노입자, 라만(Raman) 표지자 및 분석하고자 하는 단일 가닥 DNA가 연결된 금 나노입자 복합체; 및

[0011] 표적 DNA를 인식하는 CRIPR RNA(crRNA) 및 Cas12a 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 포함하는 표적 DNA 검출용 바이오센서에 관한 것이다.

[0012] 라만분광법(Raman Spectroscopy)은 입사되는 빛의 에너지가 분자체에 가해졌을 때 비탄성 산란이 발생하여 에너지의 변화가 발생하는 현상이다. 그러나, 라만분광법은 신호의 세기가 매우 약하고 재현성이 낮아 분석과 진단의 민감도 및 정확도를 떨어뜨린다는 단점이 있다.

[0013] 표면증강 라만산란(surface-enhanced Raman spectroscopy)이란 금속 나노구조의 주변에 표적 분자가 존재할 경우, 해당 분자의 라만 신호가 크게 증가하는 현상을 말한다. 나노입자의 표면처리를 통해 일반 라만산란에 비해 신호를 증강시킴으로써 기술적으로 단분자를 측정할 수 있는 수준까지 초고감도 소량 검출이 가능하다. 입사된 에너지가 다양한 나노갭을 갖는 금속 나노 구조체로부터 증폭되어 방출되는 국소 표면 플라즈몬 공명(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR) 효과를 활용하여 신호의 세기가 증폭되어 특정 바이오 물질 혹은 화학 분자의 분석과 정량화가 가능하다. 또한, 분자 고유의 라만 신호를 가지고 있어 다중 검출이 가능하고, 라만 신호는 시간에 따라 줄지 않고, 온도 및 습도 등 주위 환경 영향에 민감하지 않다.

[0014] 본 발명에서는 꽃 모양의 금 나노구조체를 금 나노기판 위에 도입하여 표면적 증가와 라만 신호 증폭의 두 가지 효과를 동시에 볼 수 있도록 한 다음, 그 표면에 산화 그래핀을 고정화한 금 나노기판을 제작하였다. 또한, 라만 신호를 효과적으로 증폭시키기 위해 금 나노입자 표면에 라만 표지자를 붙인 다음, 단일 가닥 DNA를 반응시키고 세척한 후 BSA를 포함하는 PBS 용액을 이용하여 보호막을 씌우는 반응(passivation)을 거쳐 금 나노입자 복합체를 제작하였다. 상기 금 나노입자 복합체는 상기 단일 가닥 DNA 말단의 아미노기($-NH_2$)에 의해 상기 금 나노기판 표면에 고정될 수 있다. 상기 금 나노입자 복합체가 상기 금 나노기판에 고정되면, 표면증강 라만산란의 특성에 의해 금 나노입자 복합체의 라만 신호가 증폭된다.

[0015] 상기 금 나노입자 복합체가 고정된 금 나노기판을 표적 DNA를 인식하는 CRIPR RNA 및 Cas12a 엔도뉴클레아제와 반응시키면 상기 단일 가닥 DNA를 인식하는 CRIPR RNA가 결합하고 그에 따라 Cas12a 엔도뉴클레아제에 의해 주변 단일 가닥 DNA가 절단되어 상기 금 나노입자 복합체가 상기 금 나노기판으로부터 멀어지게 됨으로써 라만 신호가 감소하게 된다.

[0016] 본 발명을 이러한 특성을 이용하여 꽃모양의 금 나노구조체가 도입되고 표면에 산화그래핀이 고정화된 금 나노기판; 금 나노입자, 라만 표지자 및 분석하고자 하는 단일 가닥 DNA가 연결된 금 나노입자 복합체; 및 표적 DNA를 인식하는 CRIPR RNA 및 Cas12a 엔도뉴클레아제를 표적 DNA 검출하기 위한 센서로 개발하였다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 라만(Raman) 표지자는 로다민 B(rhodamine B), 로다민 6G(rhodamine 6G), 시아닌-3(Cyanine-3), 시아닌-5(Cyanine-5), 시아닌-5.5(Cyanine-5.5), 시아닌 7(Cyanine 7), 4-아미노티오페놀(4-aminothiophenol), 4-메틸벤젠티올(4-methylbenzenethiol), 2-나프탈렌티올(2-naphthalenethiol), 로다민-5-(and-6)-이소티오시아네이트(rhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate), 테트라메틸로다민-5-이소티오시아네이트(tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate), FAM 및 TAMRA으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 예를 들어, TAMRA 일 수 있다.

[0018] 상기 바이오센서의 표적 DNA에 대한 검출한계는 1 내지 100 fM(femto-molar) 농도일 수 있고, 예를 들어, 10 fM 농도일 수 있다.

[0019] 본 발명의 표적 DNA 검출용 바이오센서는 SERS 방법을 이용함으로써 펨토몰(femto-molar) 농도 수준에서 표적 DNA를 검출 및 정량할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 금 나노입자, 라만 표지자 및 분석하고자 하는 단일 가닥 DNA를 반응시켜 금 나노입자 복합체를 제조하는 단계; 꽃모양의 금 나노구조체가 도입되고 표면에 산화그래핀이 고정화된 금 나노기판에 상기 금 나노입자 복합체를 고정시키는 단계; 상기 금 나노입자 복합체가 고정화된 상기 금 나노기판과 표적 DNA를 인식하는 CRIPR RNA 및 Cas12a 엔도뉴클레아제를 반응시키는 단계; 및 표면증강 라만산란 신호를 측정하는 단계를 포함하는 표적 DNA의 검출 방법에 관한 것이다.

[0022] 본 발명의 표적 DNA의 검출 방법은 상기 표적 DNA 검출용 바이오센서를 이용하여 표적 DNA를 검출하는 방법에 관한 것으로 분석하고자 하는 단일 가닥 DNA를 금 나노입자 및 라만 표지자와 반응시켜 금 나노입자 복합체를 제조하고, 표적 DNA를 인식하는 CRIPR RNA 제조하여 상기 표적 DNA 검출용 바이오센서에 적용함으로써 실시할 수 있다.

[0023] 상기 표적 DNA 검출용 바이오센서에서 나타내는 고유한 라만 피크(Raman Peak)의 세기를 측정함으로써, 표적 DNA의 존재 유무 및 농도 등을 쉽게 분석할 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 표적 DNA 검출용 바이오센서는 표면증강 라만산란 활성을 갖는 금 나노입자 복합체 및 금 나노

기판을 이용하여 제조됨으로써 라만 신호의 민감도 및 안정성이 우수하다. 본 발명의 바이오센서를 이용하면 단순하고 경제적인 방법으로 펨토몰 농도 수준에서 표적 DNA를 정량적으로 검출할 수 있다. 따라서, 본 발명은 표적 DNA를 신속하고 정확하게 측정할 수 있는 고민감도 플랫폼을 제공하며, 실시간 측정 및 체액 기반의 현장 질병 진단 키트 등으로 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 제작된 금-그래핀 나노 기판 및 금 나노 복합체로 구성된 DNA 바이오센서에 대한 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에서 제작된 꽃 모양의 금 나노기판에 대한 SEM 이미지이다.

도 3은 금 나노 복합체와 금-그래핀 나노 기판의 결합을 SEM을 통해 확인한 이미지다.

도 4a-4b는 다양한 종류의 기판에서 라만 스펙트럼과 특정 라만 신호를 측정한 그래프이다.

도 5는 ZIKA viral DNA를 정량적으로 반응시켜 그 SERS 세기를 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0029] **실시예 1: 금-그래핀 나노 기판 제작 확인**

[0030] 본 발명에서는 라만 신호를 효과적으로 증폭하기 위해 금-그래핀 나노 기판을 제작하였다. 금 나노 기판 위에 꽃 모양의 금 나노 구조체 제작을 통해 표면적 증가와 라만 신호 증폭의 두 가지 효과를 동시에 볼 수 있도록 디자인하였다. 꽃 모양의 금 나노 구조체 제작을 위해 기존 금 기판 위에 금과 은 도금액을 1:1 비율로 섞은 다음 동시에 전기화학적으로 증착하였다. 이후에 질산(1 M HNO_3)을 이용하여 금/은 나노기판에서 은을 효과적으로 제거하여 꽃 모양의 나노구조체가 있는 금 나노기판을 제작하였다. 이 나노구조체는 기존 금 기판에 비해 표면적이 넓으며, 울퉁불퉁한 표면 구조로 인해 SERS(surface enhanced Raman scattering) 효과가 우수하다(도 2).

[0031] 금 나노 기판을 제작한 이후에, 화학 반응기를 이용하여 산화 그래핀을 고정화한다. 금과 산화 그래핀에 반응할 수 있는 두 가지의 반응기를 가진 cysteamine 1 mg/ml를 제작된 금 나노 기판에 도포한 후, 4℃ 에서 16시간 이상 반응한다. 이후에 0.01 M PBS(phosphate buffered saline)을 이용하여 세척한 후, 산화 그래핀 1 mg/ml를 상온에서 3시간 반응시킨다. 이후 동일한 과정을 통해 고정화되지 않은 산화 그래핀을 제거한다. Cysteamine의 SH에는 금이 선택적으로 반응하고, NH_2에는 산화그래핀이 반응하기 때문에 금-그래핀 나노 기판을 효과적으로 제작할 수 있다.

[0033] **실시예 2: 금 나노입자-TAMRA-ssDNA 복합체 제작 및 금-그래핀 기판 고정화**

[0034] 라만 신호를 효과적으로 증폭시키기 위해 본 발명에서는 금 나노입자 표면에 라만 표지자를 붙이는 방법을 사용하였다. BBInternational 사에서 판매중인 20 nm 크기의 금 나노 입자 1 ml(7×10^{11})을 1 mg/ml의 SH-TAMRA와 1시간 동안 상온에서 반응하였다. 0.1% BSA(bovine serum albumin), 0.05% Tween 20이 함유된 PBS 용액을 이용하여 세척한 후, 100 μM, 10 μl의 단일 DNA 가닥을 반응시킨다(SH-ssDNA-NH_2). 반응이 끝난 후, 전과 같은 세척 과정을 통해 분리된 금 나노입자는 이후 3% BSA가 함유된 PBS 용액을 이용하여 passivation을 시켜준다(4℃, overnight). 이는 센서의 선택도를 높이는데 필수적인 과정이다. 제작된 금 나노 복합체는 SERS 효과를 통해 TAMRA의 라만신호 증폭 효과를 보이며, 단일 DNA 끝에 붙은 NH_2를 통해 금-그래핀 나노기판에 고정화될 수 있다. 금 나노 복합체를 금-그래핀 나노 기판에 고정화한 후, SEM(scanning electron microscopy) 분석법을 이용하여 산화 그래핀 위에 20 nm 크기의 금 나노 복합체가 고정화된 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[0036] **실시예 3: SERS 효과 확인**

[0037] 금-그래핀 나노 기판에 고정화된 금 나노 복합체는 금 나노입자 표면에 고정화된 TAMRA의 라만 신호 세기가 증폭된 SERS 효과를 기대할 수 있다. 꽃 모양의 금 나노 구조체, 산화 그래핀 및 20 nm 크기의 금 나노입자는 표면 플라즈모닉 효과 및 화학 증폭효과로 인해 hot-spot을 형성하게 되며, hot-spot 안에 TAMRA가 위치하여 증폭된 SERS 신호를 확인할 수 있다.

[0038] 표적 DNA가 CRISPR/Cas12a와 반응하면 단일 DNA 가닥을 분해하여 금 나노 복합체가 떨어져 나가 라만 신호가 급격히 줄어들어 이를 통해 DNA의 농도를 정량적으로 측정할 수 있다.

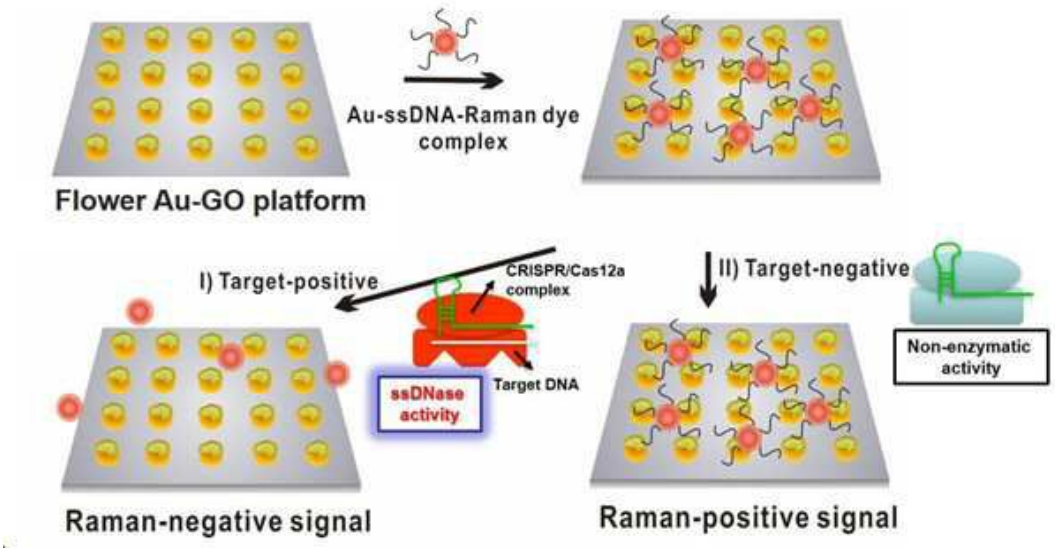
[0039] 본 발명을 통해 제작되는 바이오센서는 CRISPR/Cas12a 반응으로 인해 SERS 신호가 줄어드는 현상을 이용해 DNA의 정량적 측정을 하는 시스템으로써, DNA 반응 전에 SERS 신호 크기가 민감도를 결정하는데 중요한 요소이다. 따라서, 각 경우(금 기판: Bare Au, 금-그래핀 기판: Bare Au+GO, 금 나노 기판: Au nanostructure, 금-그래핀 나노 기판: Au nanostructure+GO, 꽃 모양 금 나노 기판: Porous Au, 꽃 모양 금-그래핀 나노 기판: Porous Au+GO, 꽃 모양 금-그래핀 나노 기판+금 나노 복합체: Porous Au+GO+AuNP) 에 대한 라만 세기를 확인한 결과 꽃 모양의 금-그래핀 나노 기판 및 금 나노 복합체의 SERS 신호가 가장 큰 것으로 확인되었다(도 4a-4b).

[0040] **실시예 4: CRISPR/Cas12a 기반 ZIKA viral DNA 정량적 측정**

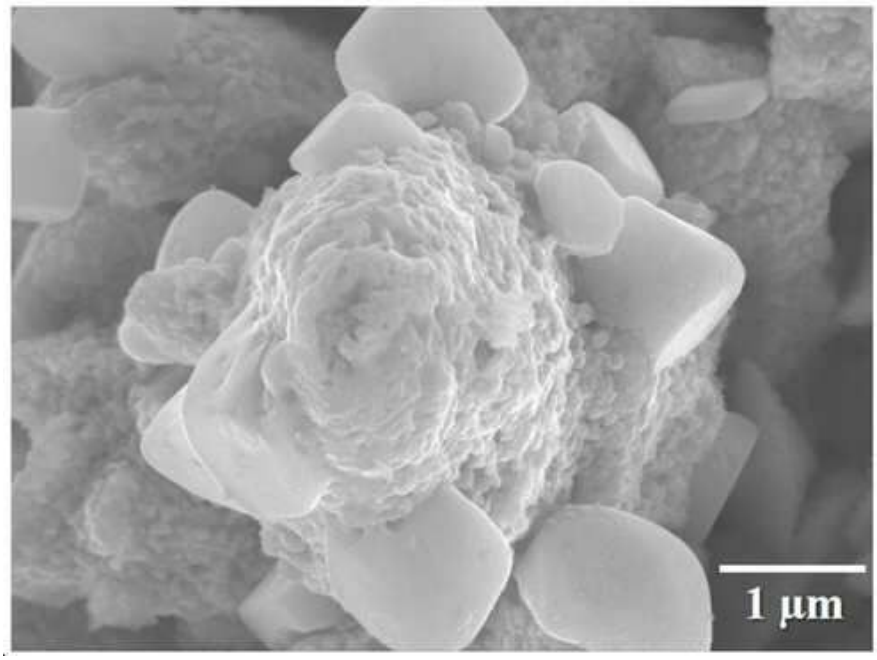
[0041] 제작된 꽃 모양의 금-그래핀 나노 기판-금 나노 복합체는 단일 DNA 가닥으로 연결되어 있다. 따라서 단일 DNA가 분해되면 금 나노 복합체가 금-그래핀 기판 표면에서 떨어져 나와 TAMRA의 SERS 신호가 줄어드는 현상을 유도할 수 있다. CRISPR/Cas12a는 CRISPR RNA와 상보적으로 결합하는 표적 DNA가 있으면 서로 결합하여 CRISPR/Cas12a/DNA 복합체를 형성하게 되고, 이는 주위에 있는 단일 DNA를 무작위로 분해시키는 효소의 특징을 가지게 된다. 이를 이용하여 대표적인 병원성 바이러스 중 하나인 ZIKA의 DNA에 반응할 수 있는 CRISPR RNA를 제작하고, ZIKA viral DNA를 정량적으로 측정하는데 성공하였다(도 5). 본 바이오센서는 ZIKA viral DNA의 농도가 높을수록 라만 신호가 작아지는 형태를 보이며, 라만 신호의 변화 정도로 인해 DNA의 정량적 측정이 가능하다. 표적 DNA와 CRISPR/Cas12a을 기판 위에 한시간 동안 반응하였을 때 대략 10fM의 DNA까지 정량적으로 측정 가능하였으며, 측정 범위는 10 fM-100 nM로 확인하였다. 본 실험 결과를 통해, 금-그래핀 나노 기판-금 나노 복합체 기반의 SERS 바이오센서가 선택적으로 ZIKA virus DNA를 측정할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

도면

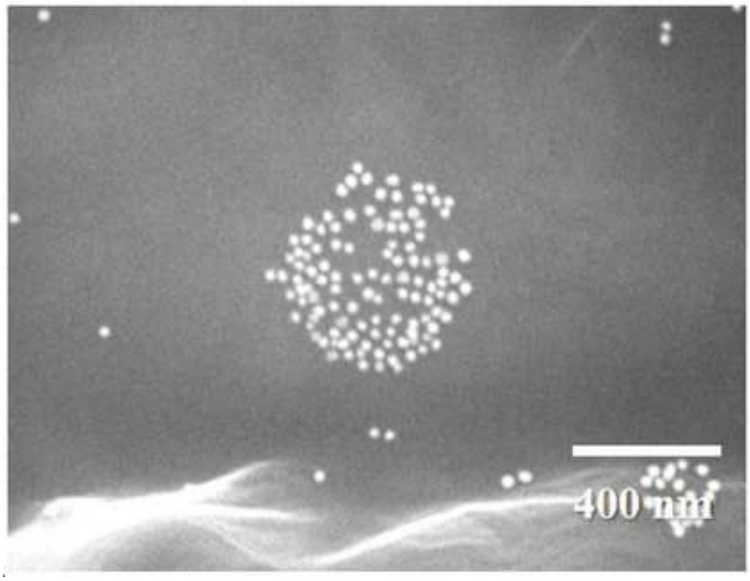
도면1



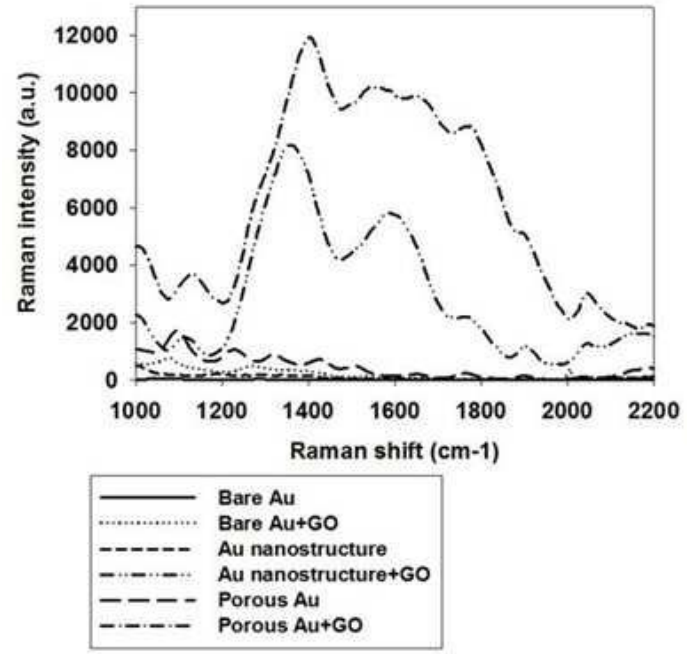
도면2



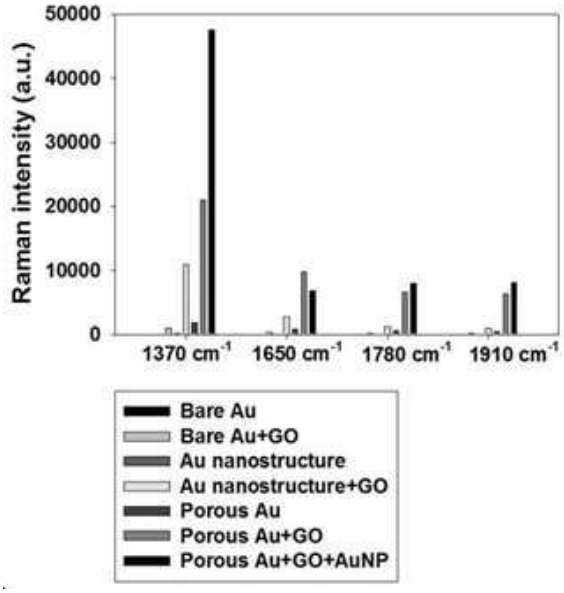
도면3



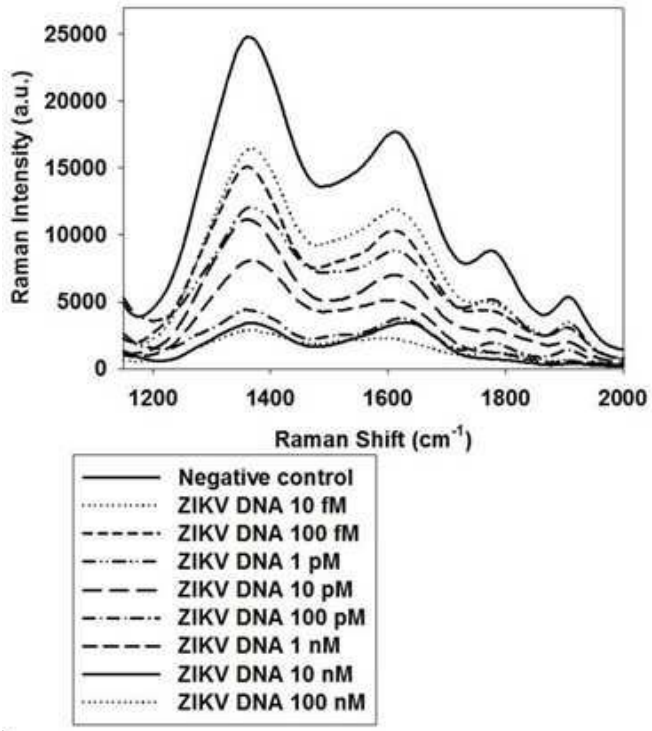
도면4a


Raman intensity (a.u.)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
1000
1200
1400
1600
1800
2000
2200
Raman shift (cm-1)
Bare Au
Bare Au+GO
Au nanostructure
Au nanostructure+GO
Porous Au
Porous Au+GO

도면4b


Raman intensity (a.u.)
50000
40000
30000
20000
10000
0
1370 cm-1
1650 cm-1
1780 cm-1
1910 cm-1
Bare Au
Bare Au+GO
Au nanostructure
Au nanostructure+GO
Porous Au
Porous Au+GO
Porous Au+GO+AuNP

도면5


25000
20000
15000
10000
5000
0
Raman Intensity (a.u.)
1200
1400
1600
1800
2000
Raman Shift (cm-1)
Negative control
ZIKV DNA 10 fM
ZIKV DNA 100 fM
ZIKV DNA 1 pM
ZIKV DNA 10 pM
ZIKV DNA 100 pM
ZIKV DNA 1 nM
ZIKV DNA 10 nM
ZIKV DNA 100 nM