(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0019581
(43) 공개일자 2016년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 21/47* (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0103509
(22) 출원일자 2014년08월11일
심사청구일자 2014년08월11일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
강성호
경기도 수원시 영통구 매영로 366, 725동 1901호 (영통동, 살구골현대아파트)
이승아
경기 화성시 영통로61번길 10, 111동 1301호 (반월동, 신영통현대아파트)
박근영
경기도 용인시 기흥구 흥덕1로79번길 7, 115동 1504호(흥덕 휴먼시아)
(74) 대리인
손민

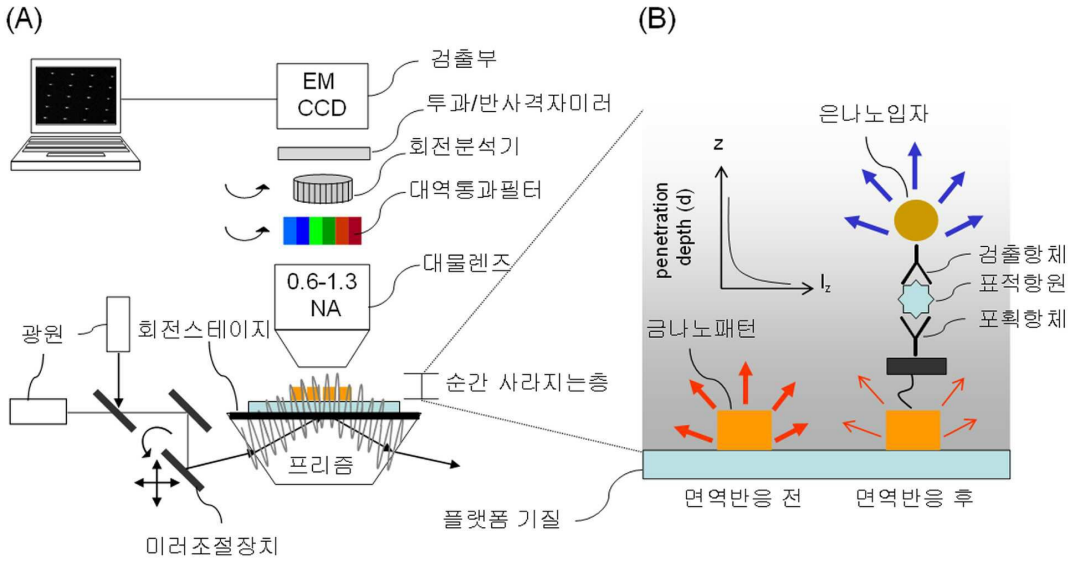
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **전반사 산란을 이용한 표적 생체분자의 비형광 검출 방법 및 그 시스템**

(57) 요 약

본 발명은 표적 생체분자의 비형광 검출방법 및 이를 위한 전반사 산란 신호 검출용 시스템에 관한 것으로, 구체적으로 서로 중첩되지 않는 산란 스펙트럼을 갖는 제1금속-나노패턴된 기판을 포함하는 나노 바이오칩과 제2금속 함유 비형광 나노입자로 표지되고 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 검출분자를 이용하여 상기 제1금속-나노패턴 및 제2금속 함유 나노입자로부터의 산란신호를 검출하는 것이 특징인 검출방법 및 이를 위한 전반사 산란 신호 검출용 시스템에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012R1A2A2A01013466
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원
연구과제명 살아있는 세포 내 비-형광 나노입자들의 파장-의존 선택적 광학 이미징 기술
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

표적 생체분자의 비형광 검출방법에 있어서,

상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 포획분자가 고정된 제1금속-나노패턴된 기판을 포함하는 바이오칩을 준비하는 제1단계;

분석시료를 제2금속 함유 비형광 나노입자로 표지하는 제2단계;

상기 바이오칩을 분석시료와 반응시키는 제3단계; 및

제3단계 이후 상기 바이오칩으로부터 상기 제2금속 함유 나노입자의 전반사 산란(total internal reflection scattering; TIRS) 신호를 검출하는 제4단계를 포함하는 것인 검출방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

제2금속 함유 비형광 나노입자는 분석시료 중의 표적 생체분자에 직접 표지되거나 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 검출분자에 결합되어 이를 통해 표지되는 것인 검출방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

전반사 산란을 유발하기 위한 소산장(evanescent field) 형성을 위해 기판의 하부에 장착된 프리즘 또는 전반사형 대물렌즈를 통해 광원을 조사하는 것인 검출방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제2금속 함유 비형광 나노입자의 산란 스펙트럼은, 광학적 간섭을 제거하기 위하여, 제1금속-나노패턴의 산란 스펙트럼과 중첩되지 않는 것이 특징인 검출방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 산란 신호의 검출은 선택적 대역통과필터(bandpass filter)를 통해 수행되는 것인 검출방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 표적 생체분자, 포획분자 및 검출분자는 각각 독립적으로 DNA, RNA, 앱타머, 항원, 항체, 리간드, 킬레이트, 수용체, 폴리머, 화합물, 지질, 세포, 금속이온 및 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택되며, 표적 생체분자는 독립적으로 포획분자 및 검출분자와 특이적으로 결합하는 것인 검출방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 기판은 실리콘, 유리(glass), 용융 실리카(fused silica), 석영(quartz), 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane; PDMS), 폴리메틸메타크릴레이트(poly(methyl methacrylate); PMMA)로 구성된 군으로부터 선택되는 투명한 고체인 것인 검출방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 기판은 10 nm 내지 1 mm의 두께를 갖는 빛의 투과가 가능한 것인 검출방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제1금속 또는 제2금속은 각각 독립적으로 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt) 및 팔라듐(Pd)으로 이루어진 군에서 선택된 것인 검출방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

표적 생체분자의 정량분석을 위하여,

기지 농도로 표준 생체분자를 포함하는 일련의 표준시료에 대해 전반사 산란 신호를 검출하여 작성된, 농도에 따른 전반사 산란 신호의 검정곡선을 준비하는 단계; 및

미지의 시료에 대해 측정된 전반사 산란 신호를 상기 표준시료로부터 작성한 검정곡선에 대입하여 농도를 유추하는 단계를 추가로 포함하는 검출방법.

청구항 11

전반사 산란을 이용한 표적 생체분자의 비형광 검출을 위한 시스템으로서,

광원;

제1면을 통해 소정의 각도로 입사된 상기 광원으로부터 조사된 빛이 제2면에서 전반사되면서 제2면에서 소산장을 형성하는 프리즘 또는 전반사형 대물렌즈;

분석하고자 하는 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 포획분자가 고정된 제1금속-나노패턴을 포함하여, 상기 프리즘 또는 전반사형 대물렌즈로부터 형성된 소산장에 의해 상기 제1금속-나노패턴으로부터 제1산란신호를 발생하는 바이오칩;

상기 바이오칩의 상부에 소정의 간격으로 이격되어 위치하여 바이오칩으로부터 발생된 산란신호를 수집하는 대물렌즈; 및

상기 수집된 신호를 분석하는 검출부를 구비한, 시스템.

청구항 12

제11항에 있어서,

분석시료 및 제2금속 함유 비형광 나노입자로 표지되고 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 검출분자를 상기 바이오칩에 가하기 전과 후 신호 변화를 측정하여 분석시료 중 표적 생체분자의 유무 또는 함량을 결정하는 것인 시스템.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 분석시료 중 표적 생체분자 존재시 이를 통해 제2금속 함유 비형광 나노입자로 표지된 검출분자가 특이적으로 결합하고, 상기 제2금속 함유 비형광 나노입자가 제1산란신호와 상이한 파장에서 제2산란신호를 발생시키므로 제2산란신호의 유무, 세기 또는 둘 모두를 분석하여 분석시료 중 표적 생체분자를 정성 또는 정량 분석하는 것인 시스템.

청구항 14

제11항에 있어서,

광원으로부터의 빛은, 각도를 조절하기 위하여 선택적으로 구비된, 하나 이상의 미러 및 미러조절장치에 의해 소정의 각도로 프리즘을 통해 조사되는 것인 시스템.

청구항 15

제11항에 있어서,

전반사형 대물렌즈를 사용하는 경우 산란신호를 수집하기 위하여 별도의 대물렌즈를 포함하지 않는 것인 시스템.

청구항 16

제11항에 있어서,

프리즘과 바이오칩 사이에 회전스테이지를 추가로 포함하는 것인 시스템.

청구항 17

제11항에 있어서,

상기 검출부는 현미경으로부터 제공되는 영상을 처리할 수 있도록 현미경에 연결되어 구비된 영상처리부를 포함하는 것인 시스템.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 검출부는 광다이오드 배열(photodiode arrays, PDA), 전하주입장치(charge-injection device, CID), 전하결합장치(charge-couple device, CCD) 및 디지털 단렌즈 반사식 사진기(digital single lens reflex)로 구성된 군으로부터 선택되는 검출기를 포함하는 것인 시스템.

청구항 19

제11항에 있어서,

대물렌즈와 영상처리부 사이에 대역통과필터, 회전분석기 또는 둘 모두를 차례로 구비한 것인 시스템.

청구항 20

제11항에 있어서,

현미경에 광원, 바이오칩, 프리즘 및 영상처리부와 선택적으로 회전스테이지를 장착하여 구성한 것인 시스템.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 전반사 산란을 이용한 표적 생체분자의 비형광 검출방법 및 시스템에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 단일분자(single-molecule) 또는 단일입자(single-particle) 수준에서의 검출을 위하여 형광표지(fluorescent-tag) 물질을 결합시키고 형광분광법을 이용하여 분석하는 방법은 생물리로부터 양자광학장치까지 폭 넓은 연구 분야에서 이용되고 있는 중요한 기술 중 하나이다(X. Michalet *et al.*, *Science*, 2005, 307: 538-544). 상기 형광분광법을 이용한 검출은 신호를 증폭하여 단일분자 또는 단일입자까지 검출할 수 있는 충분한 감도를 제공할 수 있으나, 시간에 따른 형광신호의 변동(time-dependent fluctuations), 광안정성(photostability), 깜빡임(photoblinking) 및 광표백(photobleaching)과 같은 문제점을 가지고 있다(W. E. Moerner and M. Orrit, *Science*, 1999, 283: 1670-1676). 따라서, 이와 같은 문제점을 극복하기 위한 비형광(fluorescence-free) 검출방법에 대한 관심이 증가하고 있다(V. Espina *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 2004, 290: 121-133). 형광검출을 대신할 수 있는 금속입자 또는 바이러스와 같은 나노 스케일의 물질이나 단일분자의 검출을 위한 방법으로 소광검출법 등이 개발되고 있으며, 최근에는 표면플라즈몬공명(*J. Biomed. Nanotechnol.*, 2014, 10: 1123-1129), 표면증강라만산란(*J. Alloy Compd.*, 2011, 509: 2016-2020), 간섭측정반사율(*J. Biomed. Nanotechnol.*, 2014, 10: 767-774), 비색법(*Nucleic Acids Res.*, 2005, 33: e17), 화학발광법(*Anal. Chem.*, 2013, 85: 7413-7418), 전기화학적 방법(*Appl. Surf. Sci.*, 2012, 263: 104-110)과 같은 비형광적 검출방법이 다양하게 시도되고 있다. 아울러, 본 발명자들은 선행연구를 통해 증강된-암시야 현미경법을 이용한 나노 바이오칩 상의 생체분자의 비형광검출에 대해 보고한 바 있다(*Chem. Comm.*, 2013, 49: 8335-8337). 그러나, 이와 같은 방법은 분석물질에 의한 산란뿐만 아니라 검출 경로 상에 있는 먼지나 벌크 시료 내의 다른 입자에 의해 산란되는 빛까지도 관찰되는 단점이 있다.

[0003] 한편 전반사(total internal reflection; TIR)는 전파되는 빛의 파동이 임계각보다 큰 입사각으로 조사될 때, 매질 경계면에서 일어나는 현상으로, 현 매질의 굴절률이 접하고 있는 다른 매질의 굴절률보다 낮고 입사각이 임계각보다 크면, 빛의 파동은 상기 타 매질로 투과되지 못하고 계면에서 모두 반사되며 반사되는 면의 반대쪽에는 순간 사라지는 층인 소산장층(evanescent field layer; EFL)이라고 하는 전자기장층(electromagnetic field layer)이 형성된다. 상기 EFL 영역에 속한 광학활성입자는 산란을 유발하고, 경계면으로부터 입자까지의 거리에 의존하는 산란세기(scattering intensity)로 측정 가능한 파동을 산란시킨다. 이때, 산란되는 빛의 세기는 하기 수식으로 나타난다:

[0004] $$I(h)=I_0\exp(-bh)$$,

[0005] 여기서, h는 입자-표면 간의 거리, I_0은 h가 0일 때 측정된 산란세기, b는 감쇠지수(decay index)이다.

[0006] 금속 나노입자 또는 나노구조물은 나노 수준의 도광(light guiding), 조작(manipulation) 및 단일분자 수준의 생체물질의 검출 가능성과 파장보다 작은 개구(aperture)를 통한 증강된 광학적 투과성을 가지므로, 회절한계 이하의 높은 분해능을 갖는 광학영상을 포함한 많은 분야에 적용되고 있다. 이외에도 우수한 광학성질, 큰 흡수 횡단면과 산란, 높은 광안정성 및 뛰어난 생체적합성 등의 장점을 갖는다. 특히, 금이나 은과 같은 귀금속은 플라즈몬 특성으로 인해 광학센서로서 높은 관심을 받고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 금속-나노패턴된 바이오칩과 금속 나노입자를 이용하여 미량의 표적 생체분자를 비형광 검출방법에 의해 분석할 수 있는 방법을 찾고자 연구 노력한 결과, 바이오칩 상에 형성된 금속-나노패턴과 중첩되지 않는 산란 스펙트럼을 갖는 금속 나노입자로 검출분자를 표지하고, 적절한 프리즘을 이용하여 전반사에 의해 상기 바이오칩 표면에서 형성되는 소산장에 의한 산란을 검출함으로써, 벌크 시료 중의 다른 입자로부터의 간섭을 배제할 수 있으므로 보다 향상된 민감도로 검출이 가능함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 하나의 양태로서, 본 발명은 표적 생체분자의 비형광 검출방법에 있어서, 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 포획분자가 고정된 제1금속-나노패턴된 기판을 포함하는 바이오칩을 준비하는 제1단계; 분석시료를 제2금속 함유 비형광 나노입자로 표지하는 제2단계; 상기 바이오칩을 분석시료와 반응시키는 제3단계; 및 제3단계 이후 상기 바이오칩으로부터 상기 제2금속 함유 나노입자의 전반사 산란(total internal reflection scattering; TIRS) 신호를 검출하는 제4단계를 포함하는 것인 검출방법을 제공한다.

[0009] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 전반사 산란을 이용한 표적 생체분자의 비형광 검출을 위한 시스템으로서, 광원; 제1면을 통해 소정의 각도로 입사된 상기 광원으로부터 조사된 빛이 제2면에서 전반사되면서 제2면에서 소산장을 형성하는 프리즘 또는 전반사형 대물렌즈; 분석하고자 하는 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 포획분자가 고정된 제1금속-나노패턴을 포함하여, 상기 프리즘 또는 전반사형 대물렌즈로부터 형성된 소산장에 의해 상기 제1금속-나노패턴으로부터 제1산란신호를 발생하는 바이오칩; 상기 바이오칩의 상부에 소정의 간격으로 이격되어 위치하여 바이오칩으로부터 발생된 산란신호를 수집하는 대물렌즈; 및 상기 수집된 신호를 분석하는 검출부를 구비한, 시스템을 제공한다.

[0010] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0011] 본 발명에 따른 검출방법은 산란 신호를 형성할 수 있는 제1금속-나노패턴된 기판 및 제2금속을 포함하는 나노입자로 표지된 검출분자를 이용하되, 전반사에 의해 형성되는 바이오칩의 표면의 소정의 거리 이내에서만 형성되는 소산장에 의한 산란을 검출함으로써 검출 경로 상에 존재하는 먼지나 벌크 시료에 의한 신호를 배제함으로써 신호-대-잡음비를 현저히 개선한 것이 특징이다.

[0012] 바람직하게, 본 발명에 따른 검출방법은 상기 제2금속을 포함하는 비형광 나노입자를 검출함에 있어서, 기판 상에 형성된 제1금속-나노패턴에 의한 광학적 간섭을 최소화하기 위하여, 상기 바이오칩의 제1금속-나노패턴에 의한 산란 스펙트럼과 제2금속을 포함하는 나노입자에 의한 산란 스펙트럼이 중첩되지 않도록 금속의 종류, 패턴이나 입자의 모양 및/또는 크기를 조합하여 선택함으로써 각기 다른 산란 스펙트럼을 갖도록 조절할 수 있다.

[0013] 바람직하게, 전반사 산란을 유발하기 위한 소산장(evanescent field) 형성을 위해 기판의 하부에 장착된 프리즘 또는 전반사형 대물렌즈를 통해 광원을 조사할 수 있다. 프리즘 또는 전반사형 대물렌즈를 통해 적절한 각도로 입사된 빛은 프리즘 또는 전반사형 대물렌즈와 바이오칩이 접한 계면에서 전반사되면서 소산장을 형성할 수 있

다.

[0014] 상기 제2금속 함유 비형광 나노입자의 산란 스펙트럼은, 광학적 간섭을 제거하기 위하여, 제1금속-나노패턴의 산란 스펙트럼과 중첩되지 않는 것이 특징이다. 본 발명에 따른 검출방법에 있어서, 제1금속-나노패턴과 제2금속 함유 비형광 나노입자 모두 바이오칩 표면에 형성된 소산장을 산란시킬 수 있으며, 이때, 제1금속-나노패턴은 그 표면에 표적 생체분자에 대한 포획분자가 고정되어 있어 이로부터의 신호는 표적 생체분자의 결합 가능한 자리를 표지할 수 있다. 나아가, 복수의 나노패턴을 포함하는 어레이의 각 패턴에 각기 다른 표적 생체분자에 대한 포획분자를 고정한 경우 단회 시료 적용에 의해 다중 표적 생체분자를 동시에 분석할 수 있는 것이 특징이다. 한편, 제2금속 함유 비형광 나노입자는 표적 생체분자에 특이적으로 결합할 수 있는 검출분자에 표지되어 있으므로 상기 표적 생체분자가 포획되어 있는 자리에 이를 통해 결합할 수 있으므로, 제2금속 함유 비형광 나노입자의 산란신호 유무와 세기를 측정함으로써 분석시료 중의 표적 생체분자의 유무 및 함량을 분석할 수 있다. 아울러 전술한 바와 같이 상기 제1금속-나노패턴 및 제2금속 함유 나노입자는 서로 다른 산란 스펙트럼을 가지므로 이들을 동시에 분석하여 제1금속-나노패턴의 신호로부터 결합자리에 대한 정보를, 제2금속 함유 나노입자의 신호로부터 상기 패턴에 결합된 표적 생체분자에 대한 정보를 획득할 수 있다. 따라서, 본 발명의 분석방법을 이용하여 다중 표적 생체분자를 동시에 검출하는 경우에도 개별 나노패턴 상에 서로 다른 표적 생체분자에 대한 포획분자를 결합시켜 각 표적 생체분자가 결합 가능한 위치를 표지할 수 있으므로, 각 검출분자에 별도의 표지를 할 필요 없이 동일한 나노입자를 사용하여도 이들 신호를 조합하여 분석함으로써 다중 표적 생체분자에 대한 동시 분석이 가능한 장점을 가질 수 있다.

[0015] 따라서, 본 발명에 따른 표적 생체분자의 비형광 검출을 위한 전반사 산란 신호의 검출은 선택적 대역통과필터(bandpass filter)를 통해 수행되는 것이 바람직하다.

[0016] 바람직하게, 상기 제2단계 및 제3단계는 차례로 또는 역순으로 수행될 수 있다. 예컨대, 분석시료를 제2금속 함유 비형광 나노입자로 표지한 후 바이오칩과 반응시키거나, 분석시료를 바이오칩과 반응시킨 후 바이오칩에 결합된 분석시료를 제2금속 함유 비형광 나노입자로 표지할 수 있다.

[0017] 이때, 제2금속 함유 비형광 나노입자는 분석시료 중의 표적 생체분자에 직접 표지되거나 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 검출분자에 결합되어 이를 통해 표지될 수 있다.

[0018] 바람직하게, 본 발명의 분석방법에 사용하는 "바이오칩"은 나노기술을 접목하여 제조한 나노 바이오칩일 수 있다. 나노기술이란 기존 바이오칩에 사용되었던 기술에 비하여 칩 자체의 크기나 구성요소를 소형화하거나 감도를 향상시키거나, 기존 기술로 불가능하였던 스마트 기능을 수행할 수 있도록 하는 칩을 말한다. 본 발명에서 바이오칩은 바람직하게는 금속으로 나노패턴화된 바이오칩일 수 있다. 본 발명의 금속-나노패턴화된 바이오칩은 이와 다른 파장에서 산란 성질을 갖는 금속 나노입자가 결합된 검출분자와 표적분자를 사이에 두고 결합될 수 있다.

[0019] 본 발명의 용어, "비형광 검출(fluorescence-free detection)"은 형광 이외의 수단을 이용한 검출방법을 총칭하는 것으로, 대표적으로 흡수, 산란 등을 이용한 검출방법을 포함한다. 형광은 현재 널리 사용되고 있는 검출방법이나, 민감도 및/또는 안정성이 낮고, 광표백이나 소광현상으로 인해 장시간 검출이 어렵다는 단점으로 인해, 이를 대체할 수 있는 검출방법의 필요성이 크게 대두되고 있다.

[0020] 용어, "전반사 산란(total internal reflection scattering; TIRS)"은 각기 다른 굴절률을 갖는 2개 매질(제1매질 및 제2매질)이 접한 시스템에서 제1매질을 통해 특정한 각으로 빛이 입사하는 경우 계면에서 매질 간의 굴절률 차이에 의해 입사된 빛이 제2의 매질로 투과되지 못하고 전부 제1매질로 다시 반사되는 현상이 전반사가 나타나며, 이때, 계면에서 소정의 폭으로 형성되는 소산장(evanescent field)을 해당 범위에 존재하는 광학활성 물질 즉, 산란을 유발하는 물질에 의해 산란되는 빛을 검출하는 광학기법을 의미한다. 상기 소산장의 세기는 입사광의 세기에 의존하며, 거리에 따라 지수적으로 감소한다.

[0021] 본 발명에서 "분석시료"는 본 발명의 나노 바이오칩에 처리할 수 있는 시료라면 제한없이 포함하며, 특히 나노 바이오칩에 균등하게 처리할 수 있는 액상 시료일 수 있다. 본 발명에서 분석시료는 표적 생체분자를 포함할 수

있는 모든 물질일 수 있으며, 특히 생체가 노출되거나 생체에 처리되는 각종 물질들과 생체에서 분리된 물질들일 수 있다. 상기 생체에서 분리된 물질들은 구체적으로는, 혈액, 소변, 콧물, 세포, 추출된 DNA, RNA, 단백질 등일 수 있다.

[0022] 본 발명의 용어, "생체분자"는 생체 내외에서 발견될 수 있는 물질로서, 생체에 특정 반응을 일으키거나 특정 상태나 반응에 의해 발생하는 모든 물질을 말한다. 상기 생체분자는 DNA, RNA, 항원, 항체, 리간드, 킬레이트, 수용체, 폴리머, 화합물, 금속이온 및 폴리펩티드일 수 있다. 본 발명의 용어, "표적 생체분자"는 본 발명의 검출방법으로 존재 또는 함량을 확인하고자 하는 대상 물질을 의미하며, 구체적으로는 상기 포획분자 및 검출분자와 특이적 상호반응을 하는 물질을 의미한다. 역으로 말하면, 분석하고자 하는 표적 생체분자에 대해 특이적으로 상호작용하는 분자를 포획분자 및 검출분자로 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어, "포획분자"는 본 발명의 검출방법에 있어서 나노 바이오칩의 금속 나노패턴 상에 고정된 분자를 의미하며, 분석하고자 하는 표적 생체분자와 특이적으로 상호작용하여 분석시료 중 표적 생체물질을 포획분자가 고정된 위치에 고정시켜 검출 가능하도록 한다. 따라서, 상기 포획분자는 상기 표적 생체분자와 결합할 수 있는 모든 종류의 분자를 의미한다. 또한, 본 발명에서 금속 나노입자로 표지되는 "검출분자" 또한 상기 포획분자와 마찬가지로 표적 생체분자와 결합할 수 있는 모든 종류의 분자를 의미한다.

[0024] 바람직하게, 상기 표적 생체분자, 포획분자 및 검출분자는 DNA, RNA, 앱타머(aptamer), 항원, 항체, 리간드, 킬레이트, 수용체, 폴리머, 화합물, 지질, 세포, 금속이온 또는 폴리펩티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 바람직하게, 표적 생체분자는 독립적으로 포획분자 및 검출분자와 특이적으로 결합할 수 있다. 역으로, 검출하고자하는 표적 생체분자가 특이적으로 결합하는 물질을 포획분자 및 검출분자로 사용할 수 있다. 상기 포획분자 및 검출분자는 서로 같거나 상이할 수 있다. 예컨대, 표적 생체분자가 항원인 경우 이에 특이적인 항체를 포획분자 및/또는 검출분자로 선택하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 경쟁적인 반응을 배제하기 위하여 앱타머와 항체와 같이 상이한 물질을 조합하여 사용할 수도 있다.

[0025] 본 발명에 따른 검출방법에 사용되는 바이오칩용 기판은 실리콘, 유리(glass), 용융 실리카(fused silica), 석영(quartz), 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane; PDMS) 또는 폴리메틸메타크릴레이트(poly(methyl methacrylate); PMMA)와 같은 투명한 고체로 이루어진 것일 수 있다. 상기 기판은 10 nm 내지 1 ㎜의 두께를 갖는 빛의 투과가 가능한 재질인 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명에서 용어, "나노패턴"은 나노미터 단위의 반복된 패턴을 의미한다. 구체적으로 본 발명에서 나노패턴은 바람직하게는 0.1 내지 1000nm의 직경을 가질 수 있으며, 더욱 바람직하게는 1 내지 500nm의 직경을 가질 수 있다. 상기 나노패턴의 간격(pitch)은 1 nm 내지 100 ㎛일 수 있으며, 바람직하게는 10 nm 내지 10 ㎛일 수 있다. 또한, 본 발명의 나노패턴은 가로 배열될 수 있다. 바람직하게는, 상기 나노패턴은 잉크젯 나노프린팅, 전자빔 식각(e-beam lithography) 및 원자힘현미경-디펜나노식각(atomic force microscope-dip pen nanolithography, AFM-DPN) 등의 나노식각(nanolithography) 기술 중 어느 하나에 의해 제조되는 것을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명에서 용어, "나노입자"는 넓게는 작은 크기의 입자를 의미하며, 이때, 상기 나노입자는 그 크기가 한정되는 것이 아니라, 상기 나노입자보다 큰 입자, 즉 마이크로입자 등을 포함할 수 있으며, 특정 플라즈몬 공명산란을 일으킬 수 있는 입자라면 어떠한 크기라도 무방하다. 바람직하게는 금속으로 이루어진 나노입자일 수 있다. 나노 영역에서는 입자의 크기에 따라 색깔이 변화한다. 따라서, 일률적인 크기를 갖는 나노입자를 제조하고 실용화하는 것이 나노입자 분야의 중요한 문제라고 할 수 있다. 본 발명에서 나노입자는 바람직하게는 1 내지 200 nm의 평균직경을 갖는 것일 수 있다. 보다 바람직하게는 10 내지 100 nm의 평균 직경을 갖는 것일 수 있다. 또한, 나노 영역에서는 입자의 형태에 따라 색깔이 변화한다. 따라서, 플라즈몬 공명산란을 일으킬 수 있는 입자라면 어떠한 형태라도 무방하다. 바람직하게는 본 발명의 나노입자는 표적 생체분자와 특이적으로 반응하는 검출분자와 결합할 수 있다.

[0028] 바람직하게는, 상기 나노패턴은 금속으로 나노패턴화된 것일 수 있다. 바람직하게, 상기 제1금속 또는 제2금속

은 각각 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt) 및 팔라듐(Pd)일 수 있다. 또한, 상기 나노패턴의 형태에는 제한을 두지 않는다. 금속 나노패턴의 모양에 따라서도 플라즈몬 공명이 달라질 수 있으므로 다양한 모양에 따른 패턴을 이용하는 것이 가능하다. 바람직하게는 원형 또는 사각형의 금속 나노패턴일 수 있다. 바이오칩을 금속으로 나노패턴화할 경우에는 금속의 특성에 따라 특정 화학 반응이나 결합이 용이할 수 있으며, 특히, 항체, 앱타머 등의 포획분자를 연결하기에 용이하다. 이에 따라, 본 발명의 나노패턴은 더욱 바람직하게는, 티올기(-SH)를 이용한 공유결합이 용이한 금 나노패턴일 수 있다. 이때, 제2금속 함유 나노입자로는 은 나노입자를 사용할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 검출방법에서는 서로 흡수 스펙트럼이 중첩되지 않도록 제1금속-나노패턴된 기판과 제2금속을 포함하는 비형광 나노입자를 선택하는 것이 특징이다. 전술한 바와 같이, 금속 나노구조물의 흡수 스펙트럼은 일반적으로 금속의 종류뿐만 아니라 구조물의 크기 및/또는 형태에 따라 변화하므로 이를 모두 조합하여 제1금속 및 제2금속의 종류와 패턴 및 입자의 크기와 형태를 선택할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 나노패턴 및/또는 나노입자의 비제한적인 형태는 원형(또는 구형), 별형(star-shaped), 사각형, 세모형, 오각형 및 막대형 등이 있다.

[0030] 상기 본 발명에 따른 검출방법을 이용하여 표적 생체분자의 정량분석이 가능하다. 구체적으로 전술한 표적 생체분자의 검출방법을 이용하여, 기지 농도로 표준 생체분자를 포함하는 일련의 표준시료에 대해 전반사 산란 신호를 검출하여 작성된, 농도에 따른 전반사 산란 신호의 검정곡선을 준비하는 단계; 및 미지의 시료에 대해 측정된 전반사 산란 신호를 상기 표준시료로부터 작성한 검정곡선에 대입하여 농도를 유추하는 단계를 추가로 수행함으로써 미지 시료 중의 표적 생체분자를 정량할 수 있다.

[0031] 이때, 상기 일련의 표준시료 및 미지시료의 전반사 산란 측정에 사용되는 나노 바이오칩은 동일한 크기의 금속-나노패턴된 바이오칩을 사용하는 것이 바람직하다.

[0032] 본 발명에 따른 표적 생체분자의 비형광 검출은 상기 바이오칩을 이용한 표적 생체분자 검출을 위한 전반사 산란 신호 검출을 위한 시스템을 이용하여 달성할 수 있다.

[0033] 바람직하게, 상기 전반사 산란을 이용한 표적 생체분자의 비형광 검출을 위한 시스템은 광원; 제1면을 통해 소정의 각도로 입사된 상기 광원으로부터 조사된 빛이 제2면에서 전반사되면서 제2면에서 소산장을 형성하는 프리즘 또는 전반사형 대물렌즈; 분석하고자 하는 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 포획분자가 고정된 제1금속-나노패턴을 포함하여, 상기 프리즘 또는 전반사형 대물렌즈로부터 형성된 소산장에 의해 상기 제1금속-나노패턴으로부터 제1산란신호를 발생하는 바이오칩; 상기 바이오칩의 상부에 소정의 간격으로 이격되어 위치하여 바이오칩으로부터 발생된 산란신호를 수집하는 대물렌즈; 및 상기 수집된 신호를 분석하는 검출부를 구비한, 시스템일 수 있다.

[0034] 상기 검출용 시스템의 각 구성요소는 프리즘 또는 전반사형 대물렌즈로부터 검출부까지 차례로 일렬로 접촉 또는 이격되어 배열되며, 이때 각 구성요소 간의 간격은 렌즈 및/또는 집광기의 초점거리, 프리즘의 확산각(divergence angle) 및 빔 편차각(beam deviation angle) 등 각 구성요소의 광학적 인자(factor)를 고려하여 최상의 신호를 제공할 수 있는 특정한 위치에 고정되는 것이 바람직하다. 따라서, 상기 일정 간격으로 이격된다는 것은 각 구성요소가 동일한 간격으로 배치됨을 의미하지는 않는다.

[0035] 바람직하게, 상기 표적 생체분자의 비형광 검출을 위한 시스템은 분석시료 및 제2금속 함유 비형광 나노입자로 표지되고 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 검출분자를 상기 바이오칩에 가하기 전과 후 신호 변화를 측정하여 분석시료 중 표적 생체분자의 유무 또는 함량을 결정할 수 있다.

[0036] 보다 바람직하게, 상기 분석시료 중 표적 생체분자 존재시 이를 통해 제2금속 함유 비형광 나노입자로 표지된 검출분자가 특이적으로 결합하고, 상기 제2금속 함유 비형광 나노입자가 제1산란신호와 상이한 파장에서 제2산란신호를 발생시키므로 제2산란신호의 유무, 세기 또는 둘 모두를 분석하여 분석시료 중 표적 생체분자를 정성 또는 정량 분석할 수 있는 시스템이다.

[0037] 본 발명의 용어, "광원(light source)"은 광학적 분석을 위한 빛을 제공하는 원천으로서, 원하는 분석의 종류에 따라 X-선, UV, 가시광선 등 특정한 파장 영역의 빛을 일정한 세기로 제공할 수 있는 장치를 의미한다. 본 발명에서는 가시광선 영역에서의 흡수 및 산란을 이용하므로, 백색광을 제공하는 할로겐 램프를 광원으로 사용할 수 있다. 따라서, 상용화되는 현미경을 사용하는 경우 현미경 자체의 광원을 이용할 수도 있다. 또는 프리즘 또는 전반사형 대물렌즈에 입사되는 빛의 각도 조절을 용이하게 하기 위하여 별도의 광원, 예컨대, 특정 파장의 레이저를 이용할 수 있다. 바람직하게, 광원으로부터의 빛은, 각도를 조절하기 위하여 선택적으로 구비된, 하나 이상의 미러 및 미러조절장치에 의해 소정의 각도로 프리즘을 통해 조사될 수 있다.

[0038] 프리즘을 대신하여 전반사형 대물렌즈를 사용하는 경우 산란신호를 수집하기 위하여 구비되는 별도의 대물렌즈의 사용을 배제할 수 있다.

[0039] 바람직하게, 본 발명의 시스템은 프리즘과 바이오칩 사이에 회전스테이지를 추가로 포함할 수 있다.

[0040] 상기 회전스테이지는 분석시료를 위치시킨 재물대를 360° 회전시킬 수 있는 구성요소로써 1° 간격으로 원하는 방향으로 회전이 가능하며 비대칭금속에 대해 다양한 각도(0 내지 360°)에서 다른 방향의 편광빛을 검출할 수 있으므로, 비대칭금속의 성질이나 특성을 용이하게 분석할 수 있게 하는 요소이다.

[0041] 본 발명의 용어, "검출부"는 시료로부터 제공되는 신호를 감지하여 데이터화할 수 있는 장치를 의미하는 것으로, 바람직하게 상기 검출부는 현미경으로부터 제공되는 영상을 처리할 수 있도록 현미경에 연결되어 구비된 영상처리부를 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 전반사 산란 시스템에 연결 설치되어 현미경으로부터 제공되는 영상을 처리하여 수요자가 원하는 영상으로 출력하기 위한 것으로서, 이러한 목적을 갖는 당 업계의 통상적인 영상처리부라면 특별히 한정되지 않는다. 이와 같이, 상기 검출부는 영상처리를 위한 프로그램을 구비한 컴퓨터 또는 마이크로프로세서를 포함하는 영상처리부를 포함할 수 있다. 상기 검출부의 비제한적인 예는 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 포함한다.

[0042] 또한, 본 발명의 시스템은 대물렌즈와 영상처리부 사이에 대역통과필터, 회전분석기 또는 둘 모두를 차례로 구비할 수 있다.

[0043] 본 발명의 용어, "대역통과필터(bandpass filter)"는 특정 범위 내의 주파수(또는 파장)만을 통과시키고 상기 범위 외의 주파수(또는 파장)는 차단 또는 약화시키는 장치를 일컫는다. 본 발명에서는 특히 광학적 대역통과필터(optical bandpass filter)를 지칭한다.

[0044] 민감한 검출을 위해서는 검출하고자 하는 물질 예컨대, 본 발명에 있어서 제2금속을 포함하는 나노입자의 최대 플라즈몬 공명산란 파장으로부터 ±10 nm 범위의 빛을 통과시킬 수 있는 대역통과필터 즉, 20 nm 대역통과필터를 선택하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 10 nm 대역통과필터를 선택할 수 있다.

[0045] 본 발명의 시스템은 상용되는 현미경에 광원, 바이오칩, 프리즘 및 영상처리부와 선택적으로 회전스테이지를 장착하여 구성할 수 있다. 보다 바람직하게는, 대역통과필터, 회전분석기 또는 둘 모두를 더 포함하여 구성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 일반적으로 실험실에서 사용하는 정립형 현미경을 기본으로 사용하되 바이오칩 하단에 별도로 프리즘을 장착하고 외부 광원과 일련의 미러와 미러조절장치를 구비하여 프리즘에 입사되는 빛의 각도를 조절할 수 있도록 하여 전반사에 의해 바이오칩 표면에서 소산장이 형성될 수 있도록 하였다. 상기 본 발명의 일 구체예에 따른 시스템의 구성을 도 1에 개략적으로 나타내었다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 포획분자가 결합된 금속-나노패턴된 나노 바이오칩과 금속 나노입자를 포함하는 검출분자를 이용하는 표적 생체분자의 비형광 검출방법은 광학적 간섭을 최소화하기 위하여 상기 금속-나노패턴과 금속 나노입자의

산란 스펙트럼이 중첩되지 않도록 고안함으로써 표적 생체분자를 통해 결합된 금속 나노입자의 신호-대-잡음비(signal-to-noise ratio; S/N)를 향상시켜 검출한계를 낮춤으로써 나노크기의 패턴 상에서 미량의 시료를 효율적으로 검출할 수 있다. 또한 이를 전반사에 의해 바이오칩의 표면에서만 형성되는 소산장에 의해 발생하는 산란을 검출하므로 산란광의 검출 경로에 존재하는 벌크 시료 중의 비특이적인 입자에 의한 신호를 배제할 수 있으므로 보다 선택적이며 민감한 검출이 가능하므로, 분석의 정확도 및 신뢰도를 향상시킬 수 있다. 따라서, 고감도 검출 및 정확도가 중요시되는 유전자, 단백질, 세포 등과 같은 특정 생체시료의 분석에서 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 본 발명에 따른 플라즈몬 공명산란 신호 감지 및 분석을 위한 광학 조절 장치를 구비한 전반사-산란 검출시스템 및 이를 이용한 비형광-단일입자 나노 바이오칩 검출에 의한 시료 분석 원리를 개략적으로 나타낸 도이다. (A)는 플라즈몬 공명산란 신호를 검출할 수 있는 고감도 CCD 카메라가 장착된 정립형 현미경 (B)는 금-나노패턴된 바이오칩 상에 은-나노입자가 결합된 항체를 이용한 샌드위치 면역반응 및 소산장층(evanescent field layer; EFL) 내에서 면역반응 전과 후의 제1금속(금-나노패턴)과 제2금속(항체에 결합된 은-나노입자)에 의한 선택적 산란 특성을 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명에 따른 은-나노입자(실선)와 은-나노입자 결합된 항체와의 결합체(점선)의 UV-VIS 흡수 스펙트럼 및 투과전자현미경(tranmisstion electron microscope; TEM) 이미지를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명에 따른 500 nm 직경으로 금-나노패턴된 바이오칩 상에서 은-나노입자로 표지된 항체와 샌드위치 면역반응 후 원자력현미경(atomic force microscope; AFM) 이미지를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명에 따른 금-나노패턴된 바이오칩에 405 nm 및 671 nm 2개 파장의 광원으로 조사하고 다른 개구수(각각 0.6 NA 및 1.3 NA)의 대물렌즈와 406 nm 및 670 nm 대역통과필터를 이용하여 측정한 전반사 산란 이미지를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명에 따른 시스템으로부터 405 nm 및 671 nm 2개 파장의 광원으로부터 조사된 빛의 입사각에 따른 산란된 빛의 세기 및 전반사 산란 이미지를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명에 따른 시스템에 의해 405 nm 및 671 nm 2개 파장의 광원으로 조사하여 500 nm 직경의 금-나노패턴된 바이오칩으로부터 측정된 산란신호의 회전분석기 각 변화에 따른 (a 및 b) 산란모양 및 (c) 산란세기 변화를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명에 따른 500 nm 직경의 금-나노패턴된 바이오칩 상에서 포획항체, 표적항원 및 검출항체의 샌드위치 면역반응을 수행하기 전과 후의 406 nm와 670 nm 대역통과필터 사용에 따라 측정된 플라즈몬 공명산란 영상을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0050] **제조예 1: 시료 분석용 플랫폼의 제작**

[0051] **1.1. 시료 준비**

[0052] 11-머캅토운데칸산(11-mercaptoundecanoic 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), 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO, 99.5%), 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol), 2-(몰포리노)에탄설폰산(2-(morpholino)ethanesulfonic acid; MES), 글리신(glycine), O-[2-(3-머캅토프로피오닐아미노)에틸]-O-메틸폴리에틸렌글리콜(O-[2-(3-mercaptopropionyl amino)ethyl]-O-methylpolyethylene glycol; HS-PEG, 5 kDa), 인산완충염용액(phosphate buffered saline;

PBS)은 시그마-알드리치(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. N-히드록시설포석신이미드(N-hydroxysulfosuccinimide; 설포-NHS; NHSS), 디티오비스(석신이미딜프로피오네이트)(dithiobis(succinimidylpropionate); DSP), ProteinA/G는 Pierce(Rockford, IL, USA)로부터 구입하였다. 트리스(염기)(Tris(base))는 Mallinckrodt Baker, Inc.(Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입하였다. StabilGuard는 SurModics(Eden Prairie, MN, USA)로부터 구입하였다. 20 nm 은 나노입자(SNP, 7.0×10^{10} 입자/㎖)는 BBI Life Sciences(Cardiff, UK)로부터 구입하였다. 단일클론 항-심장 트로포닌 I 항체(monoclonal mouse anti-cardiac troponin I antibody, clone 19C7 및 16A11)와 표준 인간 심장 트로포닌 I(human cardiac troponin I; cTnI, clone 8T53)은 HyTest(Turku, Finland)로부터 구입하였다. 1×PBS(pH 7.4; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4, 1.4 mM KH_2PO_4)와 50 mM MES 완충용액은 0.2-μm 멤브레인 필터를 이용하여 여과하였고, UV-B(G15TE, 280-315 nm, Philips, The Netherlands) 램프를 이용하여 광표백(photobleaching)하였다.

[0053] **1.2. 금-나노패턴칩의 제조**

[0054] 전자빔식각기술(electron beam nanolithography)을 이용하여 국가나노종합팹센터(대전, 한국)에서 10 mm^2 면적의 유리 기판 상에 나노미터 수준의 금-나노패턴을 형성하였다. 전자빔증착을 통해 500 nm 직경을 갖는 금 스팟을 10 ㎛ 간격으로 4×5 형태의 나노어레이를 형성하였다. 모든 칩은 침적(deposition)에 앞서 아세톤(순도 99.5%)으로 30초, 이소프로필 알콜(순도 99.9%)로 30초 및 피라나 용액(Piranha solution, H_2SO_4:30% H_2O_2=1:1)으로 세척하였다. 각 단계 사이에는 고순도의 물로 세척하였으며, 최종 세척된 칩은 질소가스로 건조시킨 후 건조기에 보관하였다.

[0055] **실시예 1: 전반사-산란 검출시스템**

[0056] 도 1에는 본 발명에 따른 전반사 산란(total internal reflection scatter; TIRS) 검출 시스템 및 이를 이용한 생체분자 분석원리를 개략적으로 나타내었다.

[0057] 본 발명은 상용화된 정립형 올림푸스 BX51 현미경(Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 기본으로 하여 비형광 TIRS 시스템을 구축하고 이를 금-나노패턴된 바이오칩 상에서의 샌드위치 면역분석에 최초로 적용하였다.

[0058] TIR 광원은 p-편광을 가진 20 nm 직경의 은 나노입자 조사를 위한 20 mW 출력의 405 nm 레이저(SOL-405-LM-020T, shanghai laser century Co., Ltd., China)와 금-나노패턴 스팟을 조사하기 위한 30 mW 출력의 solid-state 671 nm 레이저(SDL-671-040T, shanghai laser century Co., Ltd.) 두 대를 사용하였다. 금-나노패턴된 바이오칩 위에 반응된 항체 결합된 은 나노입자와 순수한 금-스팟의 산란 감도와 형태를 관찰하기 위해 TIRS 검출 시스템에 다양한 광학조절 장치를 병용하였다. 본 발명에 사용한 광학조절 장치들은 아래와 같다: 산란 신호는 개구수 0.6-1.3(UPLANFLN, ×100)의 대물렌즈를 이용하여 얻었다. 파장의 선택적인 검출을 위하여 406/15 nm, 473/10 nm, 520/15 nm, 575/15 nm, 605/10 nm, 그리고 670/30 nm의 흡수파장을 가지는 대역통과필터를 이용하였다. 고정된 프리즘과 360도 회전분석기를 이용하여 다양한 파장에서 산란을 측정하였다. 또한, 금속으로부터 산란되는 신호에 대한 최대 감도를 도출하기 위하여 TIRS 검출 시스템에서 추가로 도입된 미러조절기를 사용하여 조사되는 빛의 입사각을 실질적으로 조정함으로써 최적화하였다. 이미 앞서 보고된 과정 (Talanta, 2013, 104, 32-38)에 따른 금-나노패턴된 바이오칩 상에서 cTnI의 샌드위치 면역반응을 수행한 후 전자결합소자(512 × 512 pixel imaging array, QuantEM 512SC, Photometrics, AZ, USA) 카메라를 이용하여 TIRS 영상을 수집하였다. 셔터 조절을 통해 노출시간을 100 ms로 맞추었다. 산란 감도는 동일한 영역의 바탕잡음 감도와 선택된 신호 감도의 차이를 계산하였다. MetaMorph 7.1 소프트웨어를 이용하여 영상을 수집 및 분석하였다.

[0059] 도 2 내지 8은 전술한 실시예에 따른 결과로서, 도 2는 검출항체에 결합시킨 20 nm 직경의 은나노입자와 검출항체와 결합 전의 은나노입자의 TEM 이미지이다. 검출항체가 결합된 은나노입자는 399 nm의 흡수파장을 갖던 본래 순수한 은나노입자에 비해 9 nm 적색이동(red shift)되어 408 nm에서 최대 흡수파장을 보였다.

[0060] 금-나노패턴은, 30.5 nm의 금/크롬 두께를 가지며, 500 nm 스팟 크기로 기판 상에 배열되었다. 금-나노패턴된 바이오칩 상에 85 aM cTnI 단백질 항원과 20 nm 직경의 은나노입자-검출항체 분자의 반응 후 기질에서의 단차는

51 nm 증가하였으며, AFM을 이용하여 이를 확인하였다(도 3). 두 개의 금-스팟의 반응 전/후의 단차가 상이한 경우가 있는데 이는 상기 기술한 바와 같이 검출항체에 결합시킨 은나노입자의 크기가 균일하지 못하거나 2분자체 또는 다분자체를 형성한 결과로 유추할 수 있었다. 하지만 상이한 단차를 보일지라도, 금-나노패턴된 바이오칩 상의 반응 전/후의 단차가 있는 것으로부터 샌드위치 면역반응이 일어났음을 확인하였다.

[0061] 도 2에 나타난 스펙트럼에서와 같이 귀금속인 은(최대 흡수파장 ~408 nm)과 금(최대 흡수파장 ~670 nm)이 고유의 흡수스펙트럼(Chem. Comm., 2013, 49, 8335-8337)을 가지고 있기 때문에 파장-의존성 전반사산란 검출시스템을 이용한 상이한 2종의 귀금속 나노재질(예, 금과 은)의 높은 산란신호 대비 차이에 의한 비형광 샌드위치 면역분석법의 가능성을 증명하였다.

[0062] 대물렌즈의 개구수의 변화는 500 nm 금스팟의 산란 감도와 산란 형태에 영향을 미쳤다(도 4). 높은 개구수(1.3 NA) 대물렌즈는 빛을 더 많이 모으며, 일반적으로 회절 패턴을 가지는 높은 산란신호를 생성한다. 1.3 NA 대물렌즈가 405 nm 대역통과필터가 장착된 TIRS 현미경에 사용되었을 때, 500 nm 금-나노패턴칩에 반응시킨 은나노입자-항체의 산란 신호는 405 nm 광원에 의해 조사되어 0.6 NA 대물렌즈에 비해 1.8배 높게 나타났다. 671 nm 대역통과필터를 포함하는 TIRS 현미경에서, 은 나노입자-항체 반응 전 500 nm 금-나노스팟은 671 nm에 의해 조사되었을 때, 1.3 NA 대물렌즈가 18.5배 더 높게 나타났다. 높은 개구수의 대물렌즈를 사용한 산란 이미지는 표면 플라즈몬 파동이 퍼지는 방향(propagation direction)에 의해 발생하는 그림자(shadow)로 인해 덤벨형(dumbbell-shaped)으로 나타났다.

[0063] 광원의 입사각을 최적화하기 위하여, 광원이 시료를 조사할 때 미러조절기를 이용하여 전반사 입사각을 각각 71.3도와 74.2도로 조절하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 입사각을 74.2도에서 71.3도로 조절했을 때, 671 nm 광원에 의해 조사되어 산란된 금-나노스팟의 산란 감도는 290배 증가하였으며, 405 nm 광원에 의해 조사되어 산란된 금-나노스팟의 산란 감도에 비해 8.3배 증가하였다. 또한, 신호-대-잡음비는 각각 2.1배와 7.9배 증가하였다. 이로부터, 광원의 최적의 입사각 조건이 71.3도임을 도출하였다.

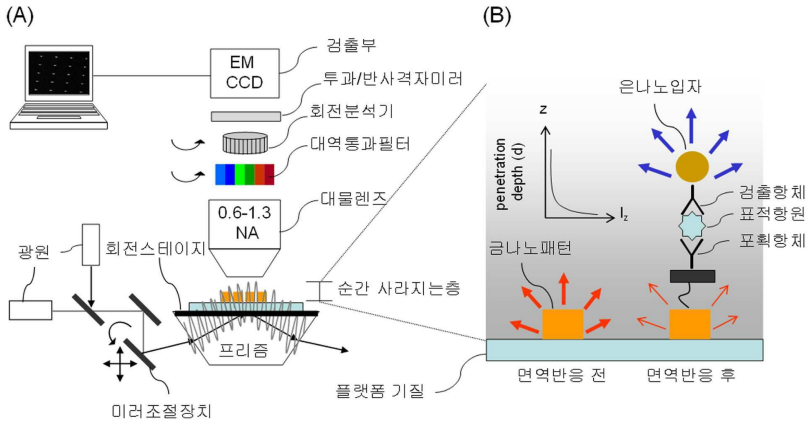
[0064] 분석시료의 대비(contrast)는 시료를 통한 편광된 빛의 회전으로부터 유발되었다. 이를 확인하기 위하여 회전분석기(각의 변화)에 의해 금-스팟에 대한 산란 형태(모양)를 확인하고 그 결과를 도 6에 나타내었다. 분석기를 405 nm와 671 nm 조사에 대해 0도에서 360도 사이에 30도 간격으로 회전시켰다. 금-나노패턴칩의 가장 높은 산란 감도는 분석기의 90도 각에서 달성되었으며, 이때, 산란 형태는 덤벨형을 나타내었다.

[0065] 금-나노패턴된 바이오칩 상에서의 단백질 면역반응 전/후에 대한 두 금속에 의해 산란된 빛의 감도를 측정하고, 그 결과를 도 7에 나타내었다. 금-나노패턴된 바이오칩(black circle)의 산란감도는 408 nm 흡수파장을 가지는 20 nm 은 나노입자-항체의 영향으로 671 nm 레이저에 의해 조사될 때, 670 nm 대역통과필터에서 은나노입자-항체(white circle)와 샌드위치 반응 후 금-나노패턴된 바이오칩보다 3.3배 더 높은 값을 나타내었다. 반면에, 금-나노패턴칩의 산란감도(black circle)는 405 nm 레이저에 의해 조사될 때 20 nm 은나노입자-항체로 반응시킨 금-나노패턴칩보다 406 nm 대역통과필터에서 6.5배 산란감도가 감소하였다. 이러한 결과는 금 나노패턴과 은 나노입자가 대략 35 nm의 거리 내에 유지되고 있어 두 금속의 플라즈몬 공명산란의 상호 영향에 기인함을 나타내는 것이다.

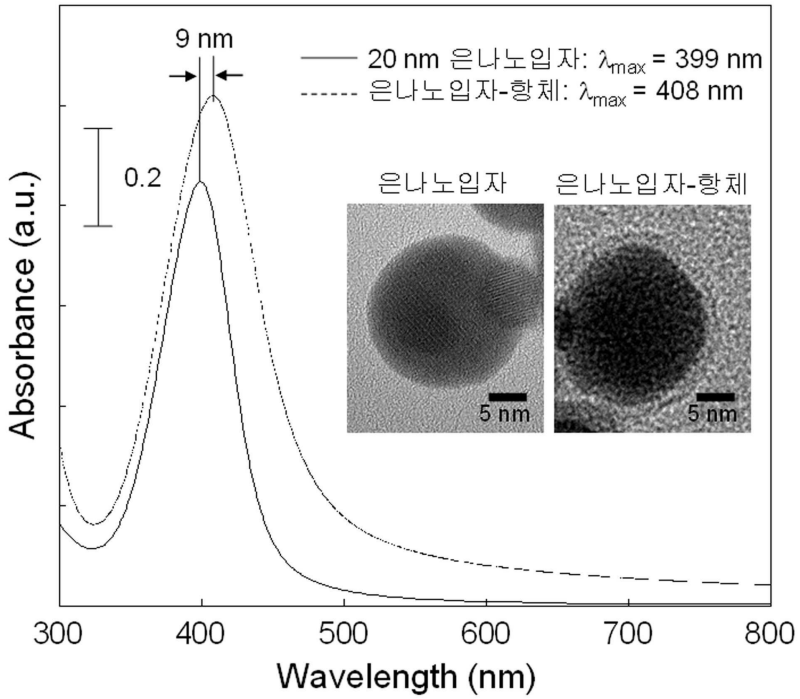
[0066] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

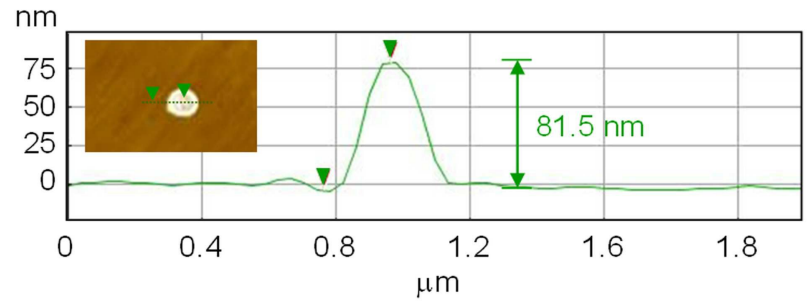
도면1


(A)
(B)
EM CCD
검출부
투과/반사격자미러
회전분석기
대역통과필터
대물렌즈
0.6-1.3 NA
광원
회전스테이지
순간 사라지는층
프리즘
미러조절장치
플랫폼 기질
은나노입자
penetration depth (d)
z
I_z
검출항체
표적항원
포획항체
금나노패턴
면역반응 전
면역반응 후

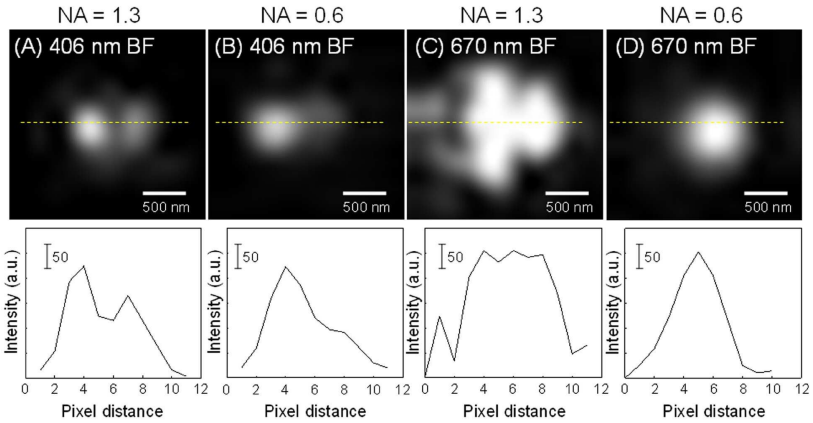
도면2


9 nm
0.2
20 nm 은나노입자: λ_{max} = 399 nm
은나노입자-항체: λ_{max} = 408 nm
은나노입자
은나노입자-항체
5 nm
5 nm
Absorbance (a.u.)
300
400
500
600
700
800
Wavelength (nm)

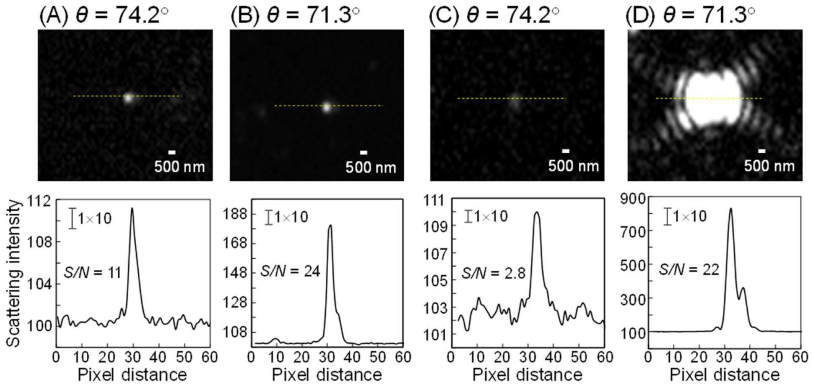
도면3


nm
75
50
25
0
81.5 nm
0
0.4
0.8
1.2
1.6
1.8
μm

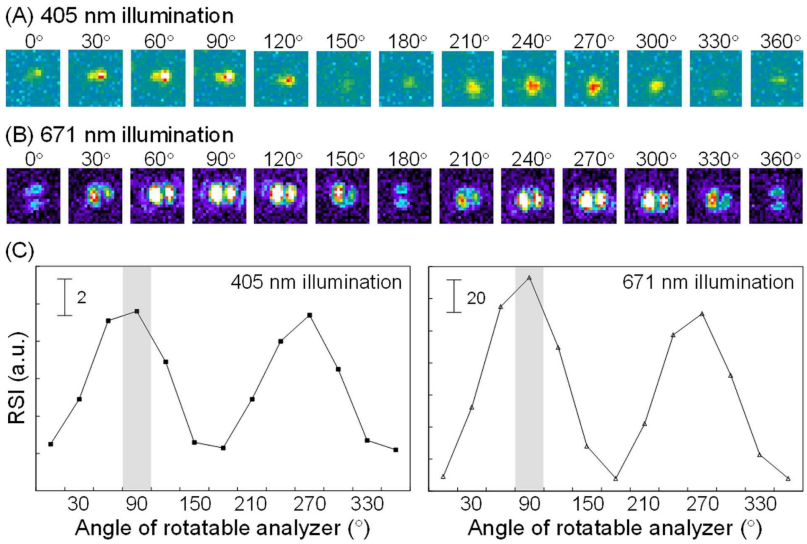
도면4


NA = 1.3
NA = 0.6
NA = 1.3
NA = 0.6
(A) 406 nm BF
(B) 406 nm BF
(C) 670 nm BF
(D) 670 nm BF
500 nm
Intensity (a.u.)
50
Pixel distance

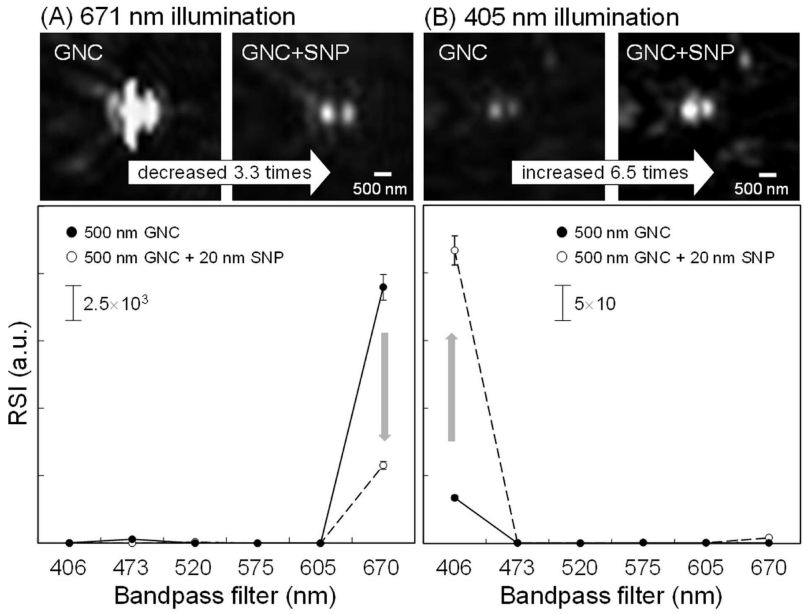
도면5


(A) θ = 74.2°
(B) θ = 71.3°
(C) θ = 74.2°
(D) θ = 71.3°
500 nm
Scattering intensity
1×10
S/N = 11
S/N = 24
S/N = 2.8
S/N = 22
Pixel distance

도면6


(A) 405 nm illumination
0° 30° 60° 90° 120° 150° 180° 210° 240° 270° 300° 330° 360°
(B) 671 nm illumination
0° 30° 60° 90° 120° 150° 180° 210° 240° 270° 300° 330° 360°
(C)
405 nm illumination
671 nm illumination
RSI (a.u.)
2
20
30 90 150 210 270 330
Angle of rotatable analyzer (°)

도면7


(A) 671 nm illumination
(B) 405 nm illumination
GNC
GNC+SNP
decreased 3.3 times
increased 6.5 times
500 nm
500 nm GNC
500 nm GNC + 20 nm SNP
2.5×10³
5×10
RSI (a.u.)
406 473 520 575 605 670
Bandpass filter (nm)