(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0025220
(43) 공개일자 2015년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/65 (2006.01) *C12Q 1/70* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0102577
(22) 출원일자 2013년08월28일
심사청구일자 2013년08월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
최연호
서울 성북구 길음로9길 50, 912동 802호 (길음동, 길음뉴타운9단지)
양세은
서울 강남구 언주로108길 17-4, 202호 (역삼동)
(74) 대리인
특허법인다나

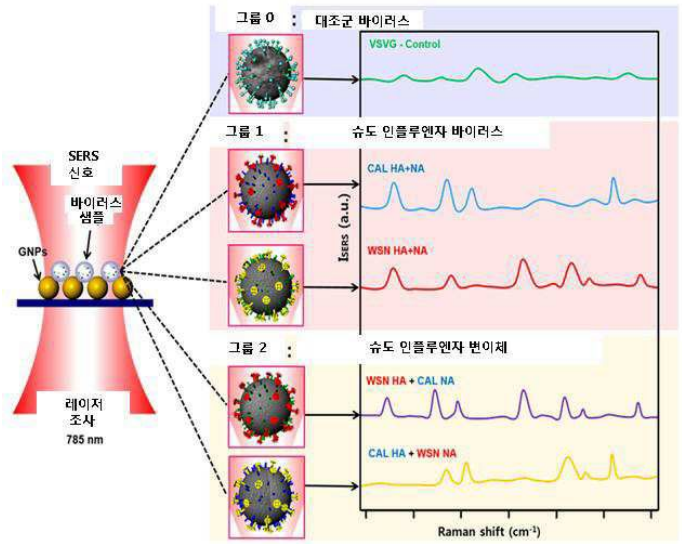
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **표면 증폭 라만 산란 신호를 이용한 인플루엔자 바이러스 검출 방법**

(57) 요 약

본 출원은 표면 증폭 라만 산란 신호를 이용한 인플루엔자 바이러스 검출 방법에 관한 것이다. 본 출원에 따르면 표면 플라즈몬 현상을 이용하여 시료의 표면 증폭 라만 산란 신호를 측정함으로써 인플루엔자 바이러스의 정성 및 정량 분석이 가능하다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010-I-17
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 신종인플루엔자 범 부처 사업단
연구사업명 보건의료연구개발사업
연구과제명 플라즈모닉 기반의 나노인공위성을 이용한 실시간 인플루엔자 검출방법 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2011.05.01 ~ 2013.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

금속 나노구조체가 형성된 기판에 시료를 처리하고 상기 기판에 처리한 시료의 표면 증폭 라만 산란(surface enhanced Raman scattering) 신호를 측정하는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스의 검출 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

인플루엔자 바이러스의 직경은 100㎚ 이상인 인플루엔자 바이러스의 검출 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

시료의 표면 증폭 라만 산란 신호와 미리 구축된 인플루엔자 바이러스의 표면 증폭 라만 산란 신호에 대한 데이터베이스 상의 신호를 비교하는 신호 분석 단계를 추가로 포함하는 인플루엔자 바이러스의 검출 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 바이러스 A 또는 인플루엔자 바이러스 B인 인플루엔자 바이러스의 검출 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

기판은 유리, 플라스틱, 금속, 실리콘, 석영, 알루미나, 산화물 결정 또는 이들의 혼합물인 인플루엔자 바이러스의 검출 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

기판의 두께는 0.05㎜ 내지 1㎜인 인플루엔자 바이러스의 검출 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

금속 나노구조체의 형태는 원기둥, 사각기둥, 삼각기둥, 오각기둥, 육각기둥, 팔각기둥, 구, 반구, 구의 일부분, 타원구, 반타원구, 타원구의 일부분, 사각뿔, 사각뿔대, 삼각뿔, 삼각뿔대, 원뿔, 원뿔대 또는 링인 인플루엔자 바이러스의 검출 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

금속 나노 구조체는 금, 은, 구리, 알루미늄, 백금, 실리콘, 게르마늄 또는 이들의 혼합물인 인플루엔자 바이러스의 검출 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

금속 나노구조체의 직경은 50nm 내지 100nm 인 인플루엔자 바이러스의 검출 방법.

청구항 10

금속 나노구조체가 형성되어 있는 기판;

상기 금속 나노구조체에 광을 입사시키는 광원부; 및

상기 금속 나노구조체에서 표면 증폭 라만 산란 신호를 측정하는 수광부

를 포함하는 인플루엔자 바이러스 검출 센서.

청구항 11

제10항에 있어서,

금속 나노구조체는 금 나노입자인 인플루엔자 바이러스 검출 센서.

청구항 12

제10항에 있어서,

기판은 유리, 플라스틱, 금속, 실리콘, 석영, 알루미나, 산화물 결정 또는 이들의 혼합물인 인플루엔자 바이러스 검출 센서.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 표면 증폭 라만 산란을 이용한 인플루엔자 바이러스의 검출 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 표면 플라즈몬(Surface Plasmon)이란 도체 표면, 이를테면 금속 박막의 표면을 따라 전파하는 자유전자의 양자화된 진동을 의미한다. 이와 같은 표면 플라즈몬은 프리즘과 같은 유전매체(dielectric medium)를 지나 유전매체의 임계각 이상의 각도로 금속 박막에 입사하는 입사광에 의해 여기되어 공명을 일으키는데, 이를 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR)이라 한다. 이러한 표면 플라즈몬 현상이 일어나는 도체 근처에 분자가 존재하는 경우, 분자 고유의 라만 신호가 증폭되므로, 증폭된 표면 라만 산란 신호를 측정함으로써 특정 분자를 검출할 수 있다. 표면 증폭 라만 신호 분석기법은 형광물질과 같은 별도의 표지물질 없이, 광학적 원리를 이용하여 분자들 간의 상호작용을 실시간으로 측정할 수 있다는 장점이 있다.

[0003] 한편, 인플루엔자 바이러스는 오소믹소바이러스에 속하며 음성의 단일가닥 RNA 절편 8개를 게놈으로 갖는 바이러스로서, 바이러스성 호흡기 질환의 주요 원인 병원체이다. 상기 8개의 RNA 절편으로부터 혈구응집 단백질(hemagglutinin; HA), 뉴라미니다제(neuraminidase, NA), 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid protein; NP),

매트릭스 단백질 1 및 2(matrix, M1, M2), 중합효소 단위체 A, B1 및 B2(polymerase subunit A, B1, B2; 각각 PA, PB1, PB2), 및 비구조 단백질 1 및 2(nonstructural protein 1, 2; 각각 NS1, NS2)가 만들어진다. 인플루엔자 바이러스는 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid protein)과 매트릭스 단백질(matrix protein)의 항원성에 따라 A형, B형 및 C형 바이러스로 분류되며, 같은 A형 바이러스는 뉴클레오캡시드 단백질이나 매트릭스 단백질의 항원성이 같다. 이 중 A형은 다시 HA(hemagglutinin) 단백질의 항원 특성에 따라 H1형에서 H15형까지, NA 단백질 항원 특성에 따라 N1형에서 N9형의 아형으로 분류된다.

[0004] 인플루엔자 바이러스 A는 감염된 사람의 기침이나 재채기에 의하여 주로 호흡기를 통하여 빠르게 전파된다. 2009년 인플루엔자 바이러스 A의 일종인 신종 인플루엔자로 인하여, 국내에서 보고된 환자 사례만 763,752명이었으며, 이 중 2370명이 사망한 바 있다. 따라서, 급속한 질병의 확산을 방지하기 위해 인플루엔자 바이러스 A의 감염 여부를 신속하고 경제적으로 확인할 수 있는 방법이 요구된다.

[0005] 인플루엔자 바이러스의 매트릭스 유전자, 헤마글루티닌 유전자 등에 대한 프라이머를 이용하여 인플루엔자 바이러스의 존재 여부의 검출을 통하여, 인플루엔자 바이러스 감염 여부를 진단하는 방법이 보고된 바 있다.

[0006] 그러나, 현재까지 표면 증폭 라만 산란 신호를 이용한 인플루엔자 바이러스 검출 방법에 대해서는 알려진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2009-0087594호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2012-0099816호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 출원의 목적은 표면 증폭 라만 산란 신호를 이용한 인플루엔자 바이러스의 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 출원은 금속 나노구조체가 형성된 기판에 시료를 처리하고 상기 기판에 처리한 시료의 표면 증폭 라만 산란(surface enhanced Raman scattering) 신호를 측정하는 단계를 포함하는 인플루엔자 바이러스의 검출 방법을 제공한다. 표면 플라즈몬 현상이 일어나는 금속 나노구조체 주변에 인플루엔자 바이러스가 존재하는 경우, 바이러스 입자 고유의 라만 산란이 금속 나노구조체의 영향을 받아 증폭하게 되고, 이러한 특성을 이용하여 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있다.

[0010] 표적 인플루엔자 바이러스를 검출하기 위하여 사용되는 금속 나노구조체를 제조하는 방법은 업계에 잘 알려져 있으며, 공지된 방법으로 제한 없이 제조 가능하다. 또한, 제조된 금속 나노구조체를 기판에 효과적으로 결합하기 위해서 금속 나노구조체를 유기 기능성 분자로 개질시킬 수 있다. 상기 유기 기능성 분자는 금속 나노구조체를 안정화시킬 수 있는 유기성 표면안정제 또는 계면활성제 등일 수 있다.

[0011] 예를 들어, 금속 나노구조체를 유기성 표면 안정제 또는 계면활성제로 개질시킬 수 있다. 예를 들어, 표면안정제는 양친매성 화합물일 수 있고, 구체적으로, 폴리비닐알코올(PVA), 폴리에틸렌글리콜 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드, 소듐 도데실 설파이트 및 폴리에틸렌 글라이콜 솔비탄 모노리트 계열 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0012] 계면활성제는 알킬 트라이메틸암모늄 할라이드(alkyl trimethylammonium halide)를 포함하는 양이온 계면활성제; 올레산(oleic acid), 라우르산(lauric acid), 또는 도데실산(dodecylic acid)과 같은 포화 또는 불포화지방산; 트리옥틸포스핀 옥사이드(trioctylphosphine oxide: TOPO), 트리옥틸포스핀(trioctylphosphine:

TOP) 또는 트리부틸포스핀(tributylphosphine)과 같은 트리알킬포스핀; 트리알킬포스핀옥사이드, 올레익아민(oleic amine), 트리옥틸아민(trioctylamine) 또는 옥틸아민(octylamine)과 같은 알킬아민(alkyl amine); 알킬티올(alkyl thiol)을 포함하는 중성 계면활성제; 또는, 소디움 알킬 설페이트(sodium alkyl sulfate) 또는 소디움 알킬 포스페이트(sodium alkyl phosphate)를 포함하는 음이온 계면활성제를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 금속 나노구조체를 기판에 처리 및 건조하여 금속 나노구조체를 기판에 고정시킴으로써 기판상에 금속 나노구조체를 형성할 수 있다. 또한, 본 출원에서는 금속 나노구조체 간의 전자기적 반발력을 줄이고 금속 나노구조체를 응집시키기 위하여 황산구리 용액 또는 염화 마그네슘 용액과 금속 나노구조체를 혼합한 혼합물을 기판에 처리 및 건조하여 응집된 금속 나노구조체를 기판상에 형성할 수도 있다.

[0014] 표면 플라즈몬 공명 현상에 의하여 빛이 물질을 통과할 때 나타나는 고유한 스펙트럼인 라만 신호가 금속 표면에서 수십억 배 증폭되므로, 이렇게 증폭된 스펙트럼, 즉, 표면 증폭 라만 산란 스펙트럼 (surface enhanced Raman scattering; SERS)을 측정하여 표면 플라즈몬 신호를 측정할 수 있다. 금속의 종류에 따라 라만 산란 시호의 증폭의 크기가 달라질 수 있다. 또한, 표면 증폭 라만 산란 스펙트럼은 인플루엔자 바이러스의 종류에 따라서 달라진다.

[0015] 한 구체예에서, 인플루엔자 바이러스의 직경은 100nm 이상일 수 있다. 표면 증폭 라만 산란을 이용하여 특정 물질을 검출 효율을 높이기 위해서는, 분석 대상이 되는 물질이 나노 구조체 주변, 즉 나노 구조체와 나노 구조체 사이에 위치할 수 있어야 한다. 나노 구조체의 직경보다 큰 물질의 경우에는 라만 산란의 증폭이 잘 일어나지 않기 때문에 검출 효율이 떨어지는 문제가 있다. 따라서, 종래의 표면 증폭 라만 산란을 이용한 표적 물질의 검출은 표적 물질의 직경이 1nm 미만인 경우에 국한되어 있었다. 그러나, 본 출원에 따르면 종래 기술의 한계에서 벗어나, 통상적으로 50nm 이상의 직경을 가지는 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있다. 인플루엔자 바이러스 표면에는 특유의 표면 단백질이 존재하고, 금속 나노구조체가 고정된 기판에 인플루엔자 바이러스를 처리하면 이러한 인플루엔자 바이러스에 존재하는 표면 단백질이 금속 나노 구조체 사이에 위치하게 되어 상기 표면 단백질의 증폭된 라만 산란 신호를 검출함으로써 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있다.

[0016] 한 구체예에서, 시료의 표면 증폭 라만 산란 신호와 미리 구축된 인플루엔자 바이러스의 표면 증폭 라만 산란 신호에 대한 데이터베이스 상의 신호를 비교하는 신호 분석 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 설명한 바와 같이, 인플루엔자 바이러스의 종류에 따라서 표면 증폭 라만 산란 스펙트럼의 형태가 달라지므로, 인플루엔자 바이러스 검출을 위해서 미리 데이터베이스를 구축할 수 있다. 본 출원에서, 인플루엔자 바이러스의 표면 증폭 라만 산란 신호에 대한 데이터베이스는 인플루엔자 바이러스의 종류에 따른, 표면 증폭 라만 스펙트럼을 측정한 데이터의 집합을 의미한다. 예를 들어, 시료의 표면 증폭 라만 신호가, 데이터베이스 상의 특정 인플루엔자 바이러스의 표면 증폭 라만 신호와 일치하는 경우, 상기 시료는 특정 인플루엔자 바이러스임을 알 수 있다.

[0017] 본 출원에서 검출하고자 하는 인플루엔자 바이러스의 종류는 제한되지 않는다. 예를 들어, 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 바이러스 A 또는 인플루엔자 바이러스 B일 수 있다.

[0018] 한 구체예에서, 시료는 타액 시료일 수 있다.

[0019] 한 구체예에서, 기판은 유리, 플라스틱, 금속, 실리콘, 석영, 알루미나, 산화물 결정 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 플라스틱은 PMMA, PC, COC 등 일수 있고, 금속은 니켈, 알루미늄, 철, 구리일 수 있으며, 산화물 결정은 SiO_2, TiO_2, Ta_2O_5, Al_2O_2일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 한 구체예에서, 기판의 두께는 0.05mm 내지 1mm일 수 있다. 기판의 두께는 레이저 광을 시료에 효과적으로 조사할 수 있고, 시료의 라만 신호를 충분히 검출할 수 있는 두께이면 된다. 기판의 두께가 너무 두껍거나 얇으면 검출 효율이 떨어질 수 있다.

[0021] 한 구체예에서, 금속 나노구조체의 형태는 원기둥, 사각기둥, 삼각기둥, 오각기둥, 육각기둥, 팔각기둥, 구, 반구, 구의 일부분, 타원구, 반타원구, 타원구의 일부분, 사각뿔, 사각뿔대, 삼각뿔, 삼각뿔대, 원뿔, 원뿔대 또는 링일 수 있다. 금속 나노구조체의 형태와 크기에 따라서 라만 산란 신호의 증폭 정도가 달라지며 이에 따라 측정 감도 또한 달라질 수 있다. 예를 들어, 금속 나노구조체는 금속 나노입자일 수 있다.

[0022] 한 구체예에서, 금속 나노구조체는 금속성 재질이거나 반도체 재질일 수 있다. 예를 들어, 금속 나노구조체는 금, 은, 구리, 알루미늄, 백금, 실리콘, 게르마늄 또는 이들의 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 금속 나노구조체는 금 나노구조체일 수 있다. 금 나노구조체를 사용하는 경우, 라만 산란

신호의 증폭의 정도가 커 검출 효율을 높일 수 있다.

[0023] 한 구체예에서, 금속 나노구조체의 직경은 50nm 내지 100nm 일 수 있다. 예를 들어, 금속 나노구조체의 직경은 80nm일 수 있다.

[0024] 금속 나노입자보다 직경이 큰 바이러스의 경우에도, 상기 바이러스 표면에 금속 나노입자 사이에 위치할 수 있을 정도의 작은 표면 물질이 존재하는 경우, 상기 표면 물질의 표면 증폭 라만 산란 신호를 검출함으로써 상기 바이러스를 검출할 수 있다.

[0025] 본 출원은 또한, 금속 나노구조체가 형성되어 있는 기판; 상기 금속 나노구조체에 광을 입사시키는 광원부; 및 상기 금속 나노구조체에서 표면 증폭 라만 산란 시호를 측정하는 수광부를 포함하는 인플루엔자 바이러스 검출 센서를 제공한다.

[0026] 한 구체예에서, 금속 나노구조체는 금 나노입자(gold nanoparticles; GNPs)일 수 있다.

[0027] 한 구체예에서, 기판은 유리, 플라스틱, 금속, 실리콘, 석영, 알루미나, 산화물 결정 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 출원에 따르면 표면 플라즈몬 현상을 이용하여 시료의 표면 증폭 라만 산란 신호를 측정함으로써 인플루엔자 바이러스의 정성 분석이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 출원에 따른 금속 나노구조체의 표면 플라즈몬 신호 변화 측정을 통하여 인플루엔자 바이러스를 검출하는 원리를 나타낸 모식도이다(대조군으로 VSVG(vesicular stomatitis virus G protein); 그룹 1로 슈도 타입 인플루엔자 CAL HA+NA(California HA+NA) 및 WSN HA+NA(western HA+NA); 그룹 2로 슈도 인플루엔자 변이체 WSN HA + CAL NA 및 CAL HA + WSN NA).

도 2는 다양한 슈도 타입(pseudo type) 바이러스의 표면 증폭 라만 산란 스펙트럼을 보여준다(대조군으로 VSVG(vesicular stomatitis virus G protein), 슈도 타입 인플루엔자 CAL HA+NA(California HA+NA) 및 WSN HA+NA(western HA+NA).

도 3은 변종 인플루엔자 바이러스의 표면 증폭 라만 산란 스펙트럼을 보여준다(슈도 인플루엔자 변이체 WSN HA + CAL NA).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 출원을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 출원을 예시하는 것일 뿐 본 출원의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] **[실시예 1] 표면 플라즈몬 신호 변화를 이용한 인플루엔자 바이러스의 검출**

[0032] 인플루엔자 바이러스의 형상과 표면에 존재하는 지질, 단백질 들의 분광학적 특성 등은 보유하지만 야생형 바이러스의 질병 유발 위험도는 제거된 모조 바이러스인 슈도 타입 바이러스를 구축하여 실험하였다. 실험군으로 인플루엔자 바이러스의 HA(hemagglutinin) 및 NA(neuraminidase); 캘리포니아(california; Cal) 및 서양(western; WSN) 의 발생 지역에 따라 슈도 타입 바이러스를 구축하여 사용하고, 대조군으로 수포성 구내염 바이러스인 VSVG(vesicular stomatitis virus G protein)를 사용하였다.

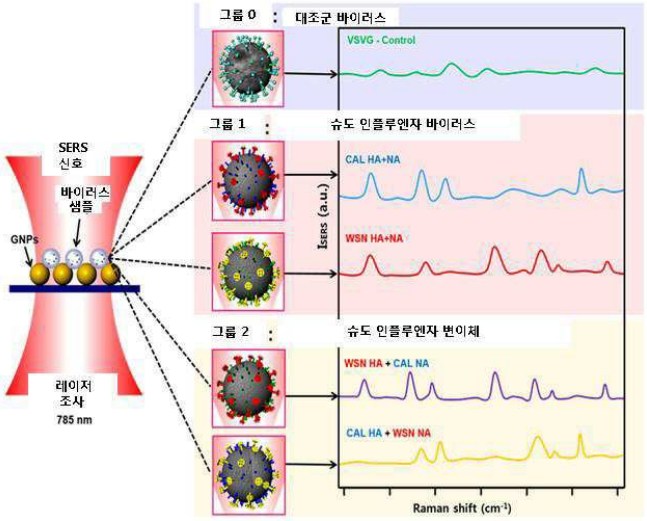
[0033] 80nm 직경의 금 나노입자를 기판으로 사용된 슬라이드 글라스 위에 고정 시키고 금 나노입자의 응집(aggregation)을 위해 10mM의 염으로서 $CuSO_4$를 처리하였다(금 나노입자와 처리한 염의 부피비는 금 나노입자: 염 = 50㎕:1㎕).

[0034] 상기 염 및 금 나노입자가 처리된 기판에 인플루엔자 바이러스 샘플 시료를 처리하여, 금 나노입자와 바이러스

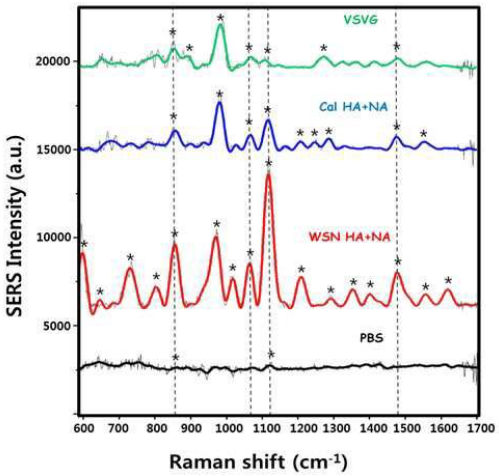
사이에 응집 (aggregation)이 어느 정도 형성되었을 때 785nm 파장의 레이저를 이용하여 바이러스의 증폭된 라만신호를 획득하였다. 그 결과, 처리된 인플루엔자 바이러스 종류에 따라서 증폭된 라만신호가 달라짐을 알 수 있었다 (도 2 및 도 3).

도면

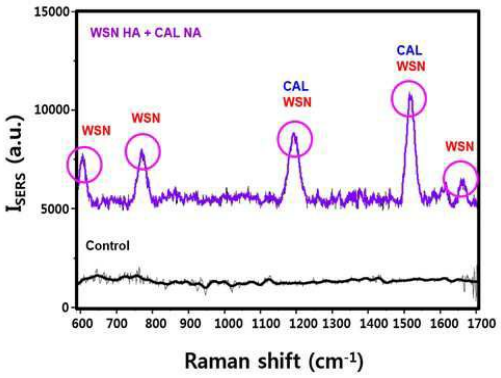
도면1



도면2



도면3


WSN HA + CAL NA
CAL
WSN
CAL
WSN
WSN
WSN
WSN
Control
15000
10000
5000
0
I_{SERS} (a.u.)
600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700
Raman shift (cm^{-1})