(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0071332
(43) 공개일자 2024년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/65 (2006.01) *G01J 3/44* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) *B82Y 15/00* (2017.01)
B82Y 40/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/658 (2013.01)
G01J 3/4412 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0157166
(22) 출원일자 2023년11월14일
심사청구일자 2023년11월14일
(30) 우선권주장
1020220153004 2022년11월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
강태욱
서울특별시 양천구 목동중앙로 143, 101동 406호
라주아
서울특별시 중랑구 동일로144길 48, 405호
(74) 대리인
최우성

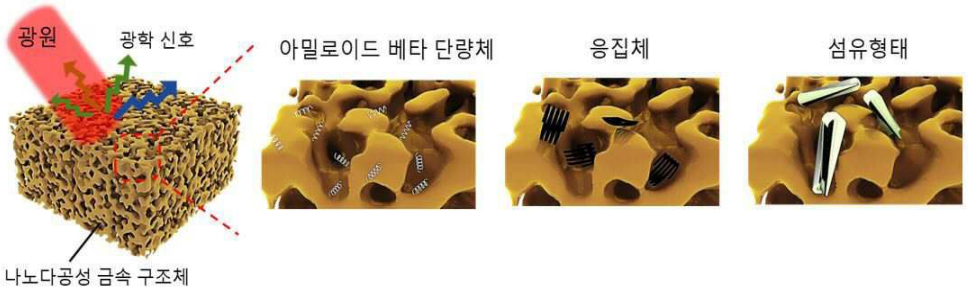
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **뇌 질환 바이오마커 검출용 나노다공성 구조체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 명세서에서는 뇌 질환 바이오마커 검출용 나노다공성 구조체 및 이의 제조방법이 개시된다. 일 측면에서 본 명세서에 개시된 나노다공성 금속 구조체는 광학 분광 기법을 이용하여 알츠하이머 병을 포함한 뇌 질환 바이오마커를 고감도로 검출할 수 있으며, 상기 검출을 통해 병기를 확인하고 뇌 질환의 조기 진단과 질병의 중증도, 질병의 경과 및 예후를 판단하여 뇌 질환에 대한 조기 치료와 관리가 가능하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
B82Y 15/00 (2013.01)
B82Y 40/00 (2013.01)
G01N 2333/4709 (2013.01)
G01N 2800/2821 (2013.01)
G01N 2800/2835 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711154939
과제번호 2020R1A2C3012167
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 플라스모닉 메타물질 대면적 고속전사 프린팅 공정기반 집적소자 제작 및 분자 검출 응용
기 여 율 25/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345347005
과제번호 2016R1A6A1A03012845
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중점연구소지원사업
연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711195451
과제번호 2021M3H4A4079630
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 나노소재기술개발
연구과제명 나노 입자 프린팅 기술을 이용한 고감도 다중 바이오마커 검출 및 기계학습을 통한 pattern 분석 기반의 폐암진단 기술개발
기 여 율 25/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2023.02.01 ~ 2024.01.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

1종 이상의 금속을 포함하는 뇌 질환 바이오마커 검출용 3차원 나노다공성 구조체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 나노다공성 구조체는 대상으로부터 얻은 시료에서 뇌 질환 바이오마커를 검출하는, 3차원 나노다공성 구조체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 나노다공성 구조체는 표면증강라만분광법을 이용하여 뇌 질환 바이오마커를 검출하는, 3차원 나노다공성 구조체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 금속은 Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Al, Zn 및 Fe로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상인, 3차원 나노다공성 구조체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 나노다공성 구조체는 2종 이상의 금속의 합금을 포함하는, 3차원 나노다공성 구조체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 나노다공성 구조체는 5 내지 100㎚ 크기의 기공을 포함하는, 3차원 나노다공성 구조체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 뇌 질환 바이오마커는 아밀로이드 베타인, 3차원 나노다공성 구조체.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 아밀로이드 베타는 아밀로이드 베타 1-42인, 3차원 나노다공성 구조체.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 뇌 질환은 알츠하이머 병 또는 파킨슨 병인, 3차원 나노다공성 구조체.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 나노다공성 구조체는 10nm 이상 크기의 뇌 질환 바이오마커를 검출하는, 3차원 나노다공성 구조체.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 나노다공성 구조체는 1 fM 이상 농도의 뇌 질환 바이오마커를 검출하는, 3차원 나노다공성 구조체.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 나노다공성 구조체는 상기 뇌 질환 바이오마커 분자의 구조적 변화를 측정하는, 3차원 나노다공성 구조체.

청구항 13

대상으로부터 얻은 시료에서 제1항 내지 12항 중 어느 한 항의 나노다공성 구조체를 이용하여 뇌 질환 바이오마커를 검출하는 방법.

청구항 14

대상으로부터 얻은 시료에서 제1항 내지 12항 중 어느 한 항의 나노다공성 구조체를 이용하여 뇌 질환 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는 뇌 질환 예측 또는 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 뇌 질환 바이오마커가 검출되는 경우 뇌 질환이 발병되었거나 발병될 것으로 예측 또는 진단하는, 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 검출된 뇌 질환 바이오마커 분자의 구조가 모노머(monomer)에서 올리고머(oligomer), 프로토피브릴(protofibril), 플라크(plaque) 형태로 변화할수록 뇌 질환의 중증도가 높은 것으로 예측 또는 진단하는, 방법.

청구항 17

다음 단계를 포함하는 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 3차원 나노다공성 구조체 제조방법:

(a) 서로 다른 2종 이상의 금속 박막을 교차하여 기판 위에 반복 증착하는 단계;

(b) 열처리를 통해 금속 합금을 형성하는 단계; 및

(c) 식각(에칭, etching)을 통해 나노다공성 구조를 형성하는 단계.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 상기 금속은 Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Al, Zn 및 Fe로 구성된 군에서 선택된, 방법.

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 상기 금속은 부착층(adhesion layer)으로 Ti, Cr 및 Ni로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 금속을 포함하는, 방법.

청구항 20

제17항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 서로 다른 2종 이상의 금속 박막을 교차하여 기판 위에 4회 내지 12회 증착하는, 방법.

청구항 21

제17항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 증착하는 각 금속 박막의 두께는 4 ~ 100nm 인, 방법.

청구항 22

제17항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 증착하는 2종의 금속의 두께 비율은 1:0.25 내지 1:4인, 방법.

청구항 23

제17항에 있어서,

상기 (b)단계에서 400℃ 내지 1000℃ 온도로 열처리를 통해 금속 합금을 형성하는, 방법.

청구항 24

제17항에 있어서,

상기 (c)단계에서 산 용액에 1분 내지 360분동안 담금으로써 금속을 식각시켜 제거하는, 방법.

청구항 25

제17항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 식각되는 금속의 종류는 Ag, Al, Cu, Ni 및 Zn로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 명세서에서는 뇌 질환 바이오마커 검출용 나노다공성 구조체 및 이의 제조방법이 개시된다.

배 경 기 술

[0003] 퇴행성 신경질환은 신경계의 한 부분 혹은 여러 부분에서 서서히 또는 끊임없이 신경세포의 사멸이 진행되어 발생하는 병을 말한다. 이러한 퇴행성 신경질환 중 하나인 알츠하이머 병(Alzheimer's disease)은 뇌에서 발생하는 퇴행성 뇌 질환으로, 주로 인지기능 장애로 인해 치매의 원인이 된다. 알츠하이머 병의 병리적 징후는 환자의 뇌에서 아밀로이드 베타 1-42(Amyloid beta 1-42)에 의해 타우(tau) 단백질과 아밀로이드 베타 펩타이드의 응집체인 신경 섬유 엉킴과 아밀로이드 플라크(plaque)가 축적되는 것을 특징으로 한다. 최근 많은 연구에서 아밀로이드 전구 단백질이 분해되어 아밀로이드 베타 1-42가 형성되며 이로 인해 신경에 독성을 유발시켜 알츠하이머 병의 주요 원인으로 보고되고 있으며, 병리학적인 표지 물질로 이용되고 있다.

[0004] 아밀로이드 베타 1-40은 독성이 거의 없는데 반해, 아밀로이드 베타 1-42는 독성이 매우 크다. 아밀로이드 베타 1-42 펩타이드의 역할은 현재까지 불분명하지만, 병리학적으로 응집체가 알츠하이머병과 연관이 있다고 알려져 있으며, 아밀로이드 베타 1-42 펩타이드의 응집이 시작되어 올리고머(oligomer)를 거쳐 아밀로이드 섬유화가 진행되어 뇌 신경 세포에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 따라서 아밀로이드 베타 1-42 펩타이드를 조기에 발견한다면 증상 완화 및 경과 둔화가 가능하기 때문에 조기 진단의 중요성이 인정된다.

[0005] 이러한, 아밀로이드 베타 1-42를 검출하는 대표적인 방법은 아밀로이드 PET CT(양전자방출단층촬영) 검사를 통해 뇌에 아밀로이드 베타의 응집 정도를 영상으로 확인할 수 있다. 하지만, PET CT 검사는 아밀로이드 베타와 결합할 수 있는 표지 분자를 환자에게 주입하여 검사를 진행하며, 아밀로이드 베타 응집체가 뇌 신경에 침착되어야 판독이 가능하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 목적은 뇌 질환 바이오마커 검출용 3차원 나노다공성 구조체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 3차원 나노다공성 구조체를 이용하여 뇌 질환 바이오마커를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 3차원 나노다공성 구조체를 이용하여 뇌 질환 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는 뇌 질환 예측 또는 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 일 측면에서 1종 이상의 금속을 포함하는 뇌 질환 바이오마커 검출용 3차원 나노다공성 구조체를 제공한다.

[0012] 예시적인 일 구현예에서, 본 발명은 상기 3차원 나노다공성 구조체는 표면증강라만분광법을 이용하여 뇌 질환 바이오마커를 검출할 수 있다.

[0013] 본 발명은 다른 측면에서 대상으로부터 얻은 시료에서 상기 나노다공성 구조체를 이용하여 뇌 질환 바이오마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또 다른 측면에서 대상으로부터 얻은 시료에서 상기 나노다공성 구조체를 이용하여 뇌 질환 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는 뇌 질환 예측 또는 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또 다른 측면에서 서로 다른 2종류의 금속 박막을 교차하여 기판 위에 반복 증착하는 단계; 열처리를 통해 금속 합금을 형성하는 단계; 및 식각(에칭, etching)을 통해 나노다공성 구조를 형성하는 단계를 포함하는 상기 나노다공성 구조체 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 일 측면에서 본 명세서에 개시된 3차원 나노다공성 구조체는 광학 분광 기법을 이용하여 알츠하이머 병을 포함한 뇌 질환 바이오마커를 고감도로 검출할 수 있으며, 상기 검출을 통해 병기를 확인하고 뇌 질환의 조기 진단과 질병의 중증도, 질병의 경과 및 예후를 판단하여 뇌 질환에 대한 조기 치료와 관리가 가능하다.

[0018] 다른 측면에서 본 명세서에 개시된 3차원 나노다공성 구조체는 나노 크기의 기공이 밀집된 형태의 3차원 형태를 기반으로 뇌 질환 바이오마커(예컨대, 아밀로이드 베타)를 효과적으로 갇히게(trap) 하여 기존 1차원 또는 2차원 구조를 갖는 나노 구조체에 비해 감도가 우수하다.

[0019] 또 다른 측면에서 본 명세서에 개시된 3차원 나노다공성 구조체를 이용하면 아밀로이드 베타 응집체가 뇌 신경에 침착되어야 판독이 가능한 PET CT 검사와 달리 극미량의 아밀로이드 베타의 응집체 형성 단계에서 아밀로이드 베타 펩타이드를 검출할 수 있다. 즉, 아밀로이드 베타 펩타이드가 뇌 신경에 영향을 미치기 전에 진단이 가능하고, 아밀로이드 베타의 응집체가 형성되어 뇌에 침착되기 전에 상기 아밀로이드 베타 펩타이드를 제거하거나 조기 관리가 가능하다.

[0020] 또 다른 측면에서 본 명세서에 개시된 3차원 나노다공성 구조체 표면의 전기장을 이용하여 분자의 광학 신호를 증폭시킬 수 있는 광학 분광 기법인 표면증강라만분광법을 통해 추가적인 표지 분자 없이 아밀로이드 베타를 검출할 수 있다.

[0021] 또 다른 측면에서 본 명세서에 개시된 나노다공성 구조체를 이용하면 아밀로이드 베타 1-42 펩타이드가 구조적 변화를 일으키면서 섬유화가 100 nm 이상으로 크기가 커짐에도 불구하고 라만 신호가 크게 영향을 받지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명에 개시된 나노다공성 금속 구조체의 예시적인 일 구현예를 이용한 아밀로이드 베타의 광학 신호 검출의 개략도이다. 상기 나노다공성 금속 구조체는 나노 크기의 기공이 밀집된 형태의 3차원 형태를 가지며, 시간에 따라 응집 형태가 변화하는 아밀로이드 베타를 검출할 수 있다.

도 2는 본 발명에 개시된 나노다공성 금속 구조체의 구조 형성 과정에 대한 개략도이다. 구체적으로, 금속 3종(Ti, Au, 및 Ag) 박막을 증착을 하고, 열처리를 통한 Au과 Ag의 합금 공정과 Ag 식각(에칭, etching) 공정을 통해 최종적으로 나노다공성 금속 구조를 형성한다.

도 3은 도 2에서 보여준 개략도를 통해 형성된 각 단계에 해당하는 표면 형태를 보여주는 주사전자현미경 측정 결과이다. 도 3가는 6 nm Au와 12 nm Ag 박막 교차하여 총 8번 증착한 경우에 해당하는 표면 형태이며, 도 3나는 도 3가를 900 ℃에서 15분 진행하여 Au와 Ag 합금 박막을 형성한 경우에 해당하는 표면 형태이다. 도 3다는 합금 박막 형성 후, 질산을 이용한 은 식각 공정을 15분 진행했을 때 형성되는 나노다공성 금속 구조체의 표면 형태를 보여준다.

도 4는 도 2에서 보여준 Ag 식각 공정의 시간(dealloying time)을 1분에서 180분까지 조절하였을 때 해당하는 표면 형태를 보여주는 주사전자현미경 측정 결과이다.

도 5는 도 4에서 보여준 Ag 식각 공정의 시간(dealloying time)을 1분에서 180분까지 조절하였을 때 해당하는 (가) 남아있는 Au 원소의 농도, (나) pore 크기, (다) ligament 크기에 관한 것이다.

도 6은 도 4에서 보여준 Ag 식각 공정의 시간(dealloying time)을 1분에서 180분까지 조절하였을 때 해당하는 (가) 나노다공성 금속 구조체의 흡광도 스펙트라, (나) 파장 785 nm에서의 흡광도 수치 비교에 관한 것이다.

도 7은 도 4에서 보여준 Ag 식각 공정의 시간(dealloying time)을 1분에서 180분까지 조절하였을 때 해당하는 나노다공성 금속 구조체의 접촉각에 관한 것이다.

도 8은 Ag 식각 공정의 시간(dealloying time)을 15분(after dealloying)과 합금 전(before alloying)에 대한 X선 광전자 분광법(XPS, X-ray photoelectron spectroscopy)으로 측정한 XPS 스펙트라에 관한 것이다.

도 9는 도 8에서 보여준 XPS 스펙트라를 통해 나노다공성 금속 구조체 표면에서의 전하를 나타내는 분자의 흡착에 대한 예상 모식도이다.

도 10은 도 4에서 보여준 Ag 식각 공정의 시간(dealloying time)을 1분에서 180분까지 조절하였을 때 해당하는 (가) 음전하를 나타내는 methyl orange의 0.1 mM 농도에 대한 표면증강라만산란 스펙트라, (나) Raman transition 1148 cm^{-1}에서의 라만 신호 세기 비교, (다) methyl orange를 이용한 검출하한농도 비교에 관한 것이다.

도 11은 도9에서 보여주는 나노다공성 금속 구조체와 전하를 나타내는 분자와의 상호작용을 비교하기 위해, 표면증강라만분광법으로 (가) 음전하를 나타내는 분자로 MO, (나) 양전하를 나타내는 분자로 rhodamine 6G(R6G), (다) 중성분자로 에탄올(EtOH)를 측정한 결과이다.

도 12는 Ag 식각 공정의 시간(dealloying time)을 15분으로 제작한 나노다공성 금속 구조체의 분자 종류에 대한 SERS enhancement factor(EF) 비교에 관한 것이다. 도 12에서 Methyl orange (MO)은 negatively charged molecule, Rhodamine 6G (R6G)은 positively charged molecule, Ethanol은 neutral molecule을 나타낸다.

도 13은 본 발명에 개시된 나노다공성 금속 구조체의 예시적인 일 구현예에서 아밀로이드 베타를 표면증강라만 분광법을 기반으로 측정한 결과이다.

도 14는 본 발명에 개시된 나노다공성 금속 구조체의 예시적인 일 구현예에서 아밀로이드 베타를 측정한 가장 낮은 농도인 1 fM에서 시간에 대한 아밀로이드 베타의 라만 신호의 변화를 표면증강라만분광법을 기반으로 측정한 결과이다. 도 14가는 아밀로이드 베타의 배양 시간에 따른 라만 신호 검출을 보여주며, 도 14나와 도 14다는 아밀로이드 베타의 구조적 변화가 발생했을 때 나타나는 라만 신호의 차이를 보여준다.

도 15는 도 14에서 나노다공성 금속 구조체에서 측정한 아밀로이드 베타의 형태를 보여주는 주사전자현미경 측정 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025] 본 명세서에서 나노란 1000 nm 이하를 의미한다.

[0026] 본 발명은 일 관점에서 1종 이상의 금속을 포함하는 뇌 질환 바이오마커 검출용 3차원 나노다공성 구조체에 관한 것이다.

[0027] 예시적인 일 구현예에서, 상기 3차원 나노다공성 구조체는 대상으로부터 얻은 시료에서 뇌 질환 바이오마커를 검출할 수 있다.

[0028] 예시적인 일 구현예에서, 상기 3차원 나노다공성 구조체는 표면증강라만분광법을 이용하여 뇌 질환 바이오마커를 검출할 수 있다.

[0029] 예시적인 일 구현예에서, 상기 3차원 나노다공성 구조체는 표면의 전기장에 의해 분자의 광학 신호를 증폭시킬 수 있는 광학 분광 기법을 이용하여 추가적인 표지 분자 없이 뇌 질환 바이오마커 및 이의 구조적 변화를 고감도로 검출할 수 있다.

[0030] 예시적인 일 구현예에서, 상기 광학 분광 기법은 표면증강라만분광법으로 상기 바이오마커 및 이의 구조적 변화를 라만 신호를 통해 확인할 수 있다.

[0031] 예시적인 일 구현예에서, 상기 3차원 나노다공성 구조체는 1차원 또는 2차원 나노 구조체에 비해 상기 바이오마커 분자가 접근할 수 있는 전기장 증폭 영역(hotspot)이 많다(표면적 차이). 따라서, 10 nm 이상의 크기를 갖는 바이오마커 분자는 상기 3차원 나노다공성 구조체 표면의 전기장에 영향을 받을 수 있다.

[0032] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속은 Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Al, Zn 및 Fe로 구성된 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0033] 예시적인 일 구현예에서, 상기 3차원 나노다공성 구조체는 합금(예컨대, Au 및 Ag 합금)을 포함할 수 있다. 단일 금속을 포함하는 나노다공성 구조체보다 합금을 포함하는 나노다공성 구조체가 더 강하게 바이오마커 분자를 끌어당길(인력) 수 있다.

[0034] 예시적인 일 구현예에서, 상기 3차원 나노다공성 구조체는 5 내지 100nm 크기(지름)의 기공을 포함할 수 있다.

[0035] 예시적인 일 구현예에서, 상기 뇌 질환 바이오마커는 아밀로이드 베타일 수 있다.

[0036] 예시적인 일 구현예에서, 상기 아밀로이드 베타는 아밀로이드 베타 1-42일 수 있다.

[0037] 예시적일 일 구현예에서, 상기 뇌 질환은 퇴행성 뇌 질환일 수 있다.

[0038] 예시적인 일 구현예에서, 상기 뇌 질환은 알츠하이머 병 또는 파킨슨 병일 수 있다.

[0039] 예시적인 일 구현예에서, 상기 3차원 나노다공성 구조체의 지름은 10nm 이상 크기(지름)의 뇌 질환 바이오마커를 검출할 수 있다.

[0040] 예시적인 일 구현예에서, 상기 3차원 나노다공성 구조체는 1 fM 이상 농도의 뇌 질환 바이오마커를 검출할 수 있다.

[0041] 예시적인 일 구현예에서, 상기 3차원 나노다공성 구조체는 상기 뇌 질환 바이오마커 분자의 구조적 변화를 측정할 수 있다.

[0042] 본 발명은 다른 관점에서 대상으로부터 얻은 시료에서 상기 3차원 나노다공성 구조체를 이용하여 뇌 질환 바이오마커를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0043] 본 발명은 또 다른 관점에서 대상으로부터 얻은 시료에서 상기 3차원 나노다공성 구조체를 이용하여 뇌 질환 바이오마커를 검출하는 단계를 포함하는 뇌 질환 예측 또는 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

[0044] 예시적인 일 구현예에서, 상기 뇌 질환 바이오마커가 검출되는 경우 뇌 질환이 발병되었거나 발병될 것으로 예측 또는 진단할 수 있다.

[0045] 예시적인 일 구현예에서, 상기 검출된 뇌 질환 바이오마커 분자의 구조가 모노머(monomer)에서 올리고머(oligomer), 프로토피브릴(protofibril), 플라크(plaque) 형태로 변화할수록 뇌 질환의 중증도가 높은 것으로 예측 또는 진단할 수 있다.

[0046] 본 발명은 또 다른 관점에서 다음 단계를 포함하는 상기 3차원 나노다공성 구조체 제조방법에 관한 것이다.

[0047] (a) 서로 다른 2종 이상의 금속 박막을 교차하여 기판 위에 반복 증착하는 단계; (b) 열처리를 통해 금속 합금을 형성하는 단계; 및

[0048] (c) 식각(에칭, etching)을 통해 나노다공성 구조를 형성하는 단계.

[0049] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (a) 단계에서 상기 금속은 Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Al, Zn 및 Fe로 구성된 군에서 선택할 수 있다.

[0050] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (a) 단계에서 상기 금속은 부착층(adhesion layer)으로 Ti, Cr 및 Ni로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 금속을 포함할 수 있다.

[0051] 예시적인 일 구현예에서, 상기 부착층에 포함된 금속은 Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Al, Zn 및 Fe 금속보다 녹는점이 높기 때문에 상기 Au, Ag, Cu, Pt, Pd, Al, Zn 및 Fe 금속과 합금을 형성하지 않는다.

[0052] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (a) 단계에서 서로 다른 2종 이상의 금속 박막을 교차하여 기판 위에 4회 내지 12회, 바람직하게는 6회 내지 10회, 더 바람직하게는 8회 증착할 수 있다.

[0053] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (a) 단계에서 증착하는 각 금속 박막의 두께는 4 ~ 100nm 일 수 있다. 예컨대, 6 nm Au와 12 nm Ag 박막을 교차하여 기판 위에 반복 증착하 수 있다.

[0054] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (a) 단계에서 증착하는 2종의 금속의 두께 비율은 1:0.25 내지 1:4일 수 있으며, 더 상세하게는 1:0.25 이상, 1:0.3 이상, 1:0.5 이상이면서, 1:4 이하, 1:3 이하 또는 1:2 이하일 수 있다.

[0055] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (b)단계에서 400℃ 내지 1000℃ 온도로 열처리를 통해 금속 합금을 형성할 수 있다.

[0056] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (c)단계에서 산 용액에 1분 내지 360분동안 담금으로써 금속을 식각시켜 제거할 수 있다. 상기 나노다공성 구조체의 식각 공정 시간과 산 종류에 의해 나노기공의 크기를 조절할 수 있다.

[0057] 예시적인 일 구현예에서, 상기 산은 질산일 수 있다.

[0058] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (c) 단계에서 식각되는 금속의 종류는 Ag, Al, Cu, Ni 및 Zn로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0060] **[실시예]**

[0061] **실험예 1. 실험 재료**

[0062] 실시예에서 사용된 methyl orange(MO)(85%), rhodamine 6G(R6G)(99%) 및 아밀로이드 베타 1-42(Aβ, ≥95.0%)는 Sigma-Aldrich(세인트루이스, 미국)에서 구입하였고, 헥산(95%) 및 질산(65%)은 덕산 약품(한국)에서 구입하였다. 또한, 에탄올(EtOH)은 EMD Millipore Corporation(독일)에서, Ti, Au, Ag은 태원과학(한국)에서 구입하였다.

[0064] **실험예 2. 나노다공성 금속 구조체 제조**

[0065] 도2는 나노다공성 금속 구조체를 형성하는 과정에 대한 모식도를 보여준다. 구체적으로 나노다공성 금속 구조체 형성을 위해 기판 위에 부착층(adhesion layer)으로 티타늄(Ti)을 사용하였으며, 구조체 형성을 위하여 금(Au) 및 은(Ag) 박막을 사용하였다. 티타늄(Ti), 금(Au) 및 은(Ag) 박막을 교차 증착 후, 열처리 공정을 통해 Au 및 Ag의 합금 박막을 형성시킴으로써 나노다공성 금속 구조체를 만들기 위한 기반 형태를 형성하였다. 여기서, 부착층(adhesion layer)에 사용한 금속(Ti)의 경우, Au와 Ag보다 녹는 점이 높기 때문에, Au와 Ag와 혼합되어 합금을 형성하지 않는다. 구체적으로, 6 nm Au와 12 nm Ag 박막 교차하여 총 8번 증착하였으며, 900 ℃에서 15분 진행하여 Au와 Ag 합금 박막을 형성하였고, 상기 합금 박막을 질산 용액에 15분동안 담금으로써 Ag을 식각시켜 제거하는 탈성분 부식(dealloying) 과정으로 나노다공성 금속 구조체를 제작하였다.

[0067] **실험예 3. 나노다공성 금속 구조체의 표면 형태 분석**

[0068] 도2에서 보여준 각 과정에서 나노다공성 금속 구조체의 표면 형태를 분석하기 위해 주사전자현미경 측정 결과를 확인하였다. (가) 티타늄, 금, 은을 교차 증착한 직후, (나) 900 ℃에서 15분 진행한 후의 Au와 Ag 합금 박막, (다) 상기 합금 박막을 질산 용액에 15분동안 담금으로써 Ag를 제거한 후에 해당하는 나노다공성 금속 구조체에 해당하는 표면 형태를 확인하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 최종적으로 제조된 나노다공성 금속 구조체의 표면 형태는 기공을 포함하여 표면적이 효과적으로 증가된 형태인 것을 확인하였다.

[0069] 또한, Ag를 제거하여 나노다공성 구조를 형성하는 단계에서 질산 용액으로 Ag 식각 공정의 시간(dealloying time)을 1분에서 180분까지 변화시키면서 나노다공성 금속 구조체의 표면 형태를 확인한 결과, 도 4 및 도 5에 나타난 바와 같이 Au와 Ag 합금의 dealloying 시간에 따라 Ag가 해리되어 제거되는 양이 달라지며, 이때 Au와 Ag 원자의 재배치로 인하여 형성되는 나노다공성 금속 구조체의 최종 pore와 ligament 크기가 달라진다. Ag가 제거되는 양이 증가함에 따라 Au의 원자 농도가 증가하며, dealloying 시간 30분 이후에는 Ag가 완전하게 제거된 것으로 확인하였다. 마찬가지로 나노다공성 금속 구조체의 pore와 ligament의 크기가 dealloying 시간 30분까지는 증가하다가 그 이후에는 유지되는 경향을 보여준다.

[0071] **실험예 4. 나노다공성 금속 구조체의 광 흡수율 및 접촉각 분석**

[0072] 도6에 나타난 바와 같이 Ag를 제거하는 전과 제거 후 시간(dealloying time)을 1분에서 180분까지 변화시키면서 광 흡수율을 비교한 결과, Ag 제거 전에는 거의 광흡수가 일어나지 않았으나, Ag 제거 후 광흡수가 효과적으로 증가함을 확인하였다.

[0073] 나노다공성 금속 구조체의 접촉각을 측정하였다. 10 uL의 물을 구조체 표면에 떨어뜨려 접촉각을 측정한 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 dealloying 시간에 따라 접촉각이 달라지는 것을 확인하였다. 30분 이하의 경우, 접촉각이 낮은 것을 볼 수 있으며, 이는 나노다공성 금속 구조체의 표면이 친수성인 것을 나타낸다. 30분 이상에서는 접촉각이 증가하는 것을 보여주며, 표면 성질이 30분 이하보다 상대적으로 친수성이 낮아지는 것을 나타낸다. 이는 실시예 나노다공성 금속 구조체의 잔존하는 Ag의 함량에 영향을 받는 것으로 예상할 수 있다.

[0074] 15분 동안 dealloying을 진행한 나노다공성 금속 구조체와 합금이 아닌 금속 박막의 X-ray photoelectron spectroscopy(XPS)를 측정하였다. 실시예 나노다공성 금속 구조체의 경우, 단일 금속 형태가 아닌 5 at.% Ag와 약 95 at.% Au로 구성된 Au 및 Ag 합금 형태임을 알 수 있다(도 5). 이는 금속 박막에 비해 합금일 경우, Au와 Ag 사이의 일함수(또는 전기음성도) 차이에 의해 전자 이동이 발생할 수 있으며, 이를 XPS 결과를 통해 확인할 수 있다. 나노다공성 금속 구조체와 합금을 진행하지 않은 금속 박막과 비교했을 때, 나노다공성 금속 구조체의 Au $4f_{7/2}$ 피크의 결합 에너지(binding energy)가 금속 박막보다 높은 것을 알 수 있다. 이는 Au에서 Ag로 전자가 이동으로 Au가 산화된 상태로, Au의 표면이 양전하를 나타내고 있는 것을 의미한다. 따라서, 실시예 나노다공성 금속 구조체의 경우, 음전하를 나타내는 분자를 더 쉽게 접근시킬 수 있는 표면 성질을 가지고 있다. 이는 도 8에서 보여준 dealloying 시간에 따른 접촉각 변화와도 관계가 있는 것을 확인할 수 있다. Dealloying 시간 30분 미만에서는 친수성 표면임을 확인할 수 있으며, 30분 이상에서는 Ag가 완전히 제거된 것을 도 5(가)에서 확인할 수 있다. 그렇기 때문에 접촉각이 증가한 것을 보여준다.

[0076] **실험예 5. 표면증강라만산란법**

[0077] 비교예. 금 나노입자 단층막

[0078] 직경 60 nm의 구형 금 나노입자를 사용하여 물-공기 계면에 금 나노입자를 배열하기 위해, 금 나노입자 수용액 4 mL에 n-헥산 3 mL를 첨가하여 물-오일 계면을 형성한 후, 금 나노입자 수용액에 에탄올 3 mL을 주입하고, n-헥산을 모두 증발시킨 후, 물-공기 계면에 형성되어 있는 금 나노입자 단층막을 고체 기판으로 전이시켰다.

[0079] 표면증강라만산란법에 있어서 최대 라만 신호 세기를 나타내는 dealloying 조건을 확인하기 위해 도 4에서 보여준 각 dealloying 시간으로 제작한 나노다공성 금속 구조체를 표면증강라만산란법으로 methyl orange(MO)를 측정하였다. 구체적으로, 도 10(가) 표면증강라만 스펙트라, (나) MO를 나타내는 Raman shift 중 하나인 1148 cm^{-1}에서 라만 세기를 비교, (다) 최대 라만 신호 세기가 나타나는 조건(dealloying 15분 진행)으로 제작한 나노다공성 금속 구조체의 MO를 이용하여 검출하한농도를 비교하였다. 본 실시예에 있어서 나노다공성 금속 구조체의 분자 검출 성능을 평가하기 위해서 물과 공기 계면에 자가 배열된 구형의 금 나노입자 단층막(Au NPs layer, 비

교예)과 나노다공성 금속 구조체를 표면증강라만분광법으로 MO를 검출할 수 있는 최저 농도를 비교하였다. 표면증강라만산란법으로 라만 신호 세기를 비교하기 위해서 파장 785 nm를 사용하였다.

[0080] 그 결과, 도 10(가)와 (나)는 각 dealloying 시간으로 제작한 나노다공성 금속 구조체 중에서 15분으로 제작한 구조체의 라만 신호 세기가 가장 높은 것을 보여준다. 이는 나노다공성 금속 구조체의 광 흡수율(도 6)에서의 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있다. 해당 dealloying 조건은 15분으로 pore의 크기가 약 15 nm, Au의 농도는 약 95 at.%임을 확인할 수 있다. (다)에서 보여준 것과 같이 금 나노입자 단층막과 비교했을 때, MO의 검출하한 농도가 0.1 mM(금 나노입자 단층막)에서 12 pM(나노다공성 금속 구조체)까지 낮아진 것을 보여준다. 비교예로 기존에 활용되는 형태로 금 나노입자 단층막은 직경 60 nm의 구형 입자를 이용하여 자기 조립 후에 입자와 입자 사이에 형성된 사이 공간이 나노다공성 금속 구조체의 pore 크기와 비슷하게 제작하였다.

[0081] 도 11은 도 9에서 보여주는 나노다공성 금속 구조체와 전하를 나타내는 분자와의 상호작용을 비교하기 위해, 표면증강라만분광법으로 (가) 음전하를 나타내는 분자로 MO, (나) 양전하를 나타내는 분자로 rhodamine 6G(R6G), (다) 중성분자로 에탄올(EtOH)를 측정한 결과이다. 나노다공성 금속 구조체의 표면이 양전하를 나타내는 것으로 예상하였기 때문에, 실제 전하를 나타내는 분자들을 표면증강라만산란법을 측정함으로써 평가하였다. 측정 결과 음전하를 나타내는 분자인 MO에서 가장 낮은 검출하한농도를 보여준다.

[0082] 도12는 도11에서 보여준 결과로부터 얻은 각 분자에 대한 표면증강라만 산란 신호 증폭(EF)을 보여준다. 마찬가지로 음전하를 나타내는 분자인 MO에서 가장 높은 신호 증폭을 보여주고 있다. 상기 결과들로부터, 나노다공성 금속 구조체의 경우, 음전하를 나타내는 분자에 대해서 분자 신호에 대한 감도가 높은 것을 확인하였다.

[0084] **실험예 6. 나노다공성 금속 구조체에서 아밀로이드 베타 검출 및 구조적 변화 확인**

[0085] 실시예 2에서 제조된 나노다공성 금속 구조체에서 음전하를 나타내는 아밀로이드 베타를 표면증강라만분광법을 기반으로 측정하였다. 표면증강라만분광법은 표지물질 없이 분자의 신호 검출과 분자 구조에 대한 특징적인 광학 신호를 얻을 수 있는 방법이다.

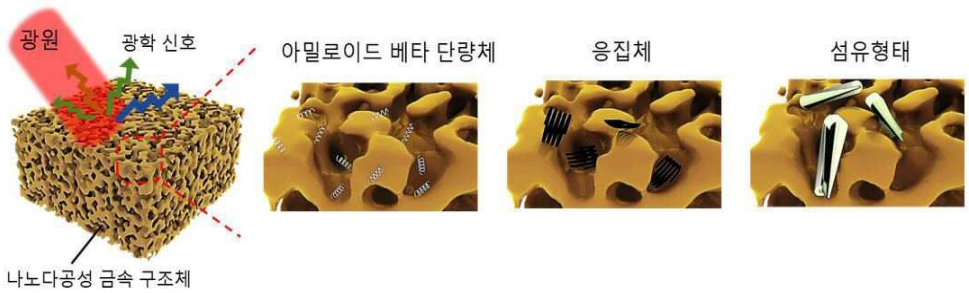
[0086] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이 나노다공성 금속 구조체를 이용하여 아밀로이드 베타의 구조적 변화가 발생하지 않는 시간 범위에서 아밀로이드 베타의 농도 변화에 대한 라만 신호를 1 fM까지 확인할 수 있었다.

[0087] 아밀로이드 베타는 시간에 따라 자발적인 응집체에 의해 구조적 변화가 발생한다. 이를 표면증강라만분광법을 이용하여 아밀로이드 베타의 구조적 변화를 라만 신호로 확인하기 위해서 아밀로이드 베타 용액을 일정 시간 동안 배양하였다. 나노다공성 금속 구조체에서 1 fM에 해당하는 아밀로이드 베타의 라만 신호 변화를 표면증강라만분광법을 기반으로 측정하였다.

[0088] 그 결과, 나노다공성 금속 구조체에 아밀로이드 베타를 처리하였을 때 도 14에 나타난 바와 같이 아밀로이드 베타의 배양 시간이 증가함에 따라 라만 신호가 높은 강도로 검출되었으며, 아밀로이드 베타의 구조적 변화가 있음을 확인하였다. 또한, 도 15에 나타난 바와 같이 아밀로이드 베타의 배양 시간이 증가함에 따라 나노다공성 금속 구조체에 위치한 아밀로이드 베타의 길이가 길어지는 것을 확인하였다.

도면

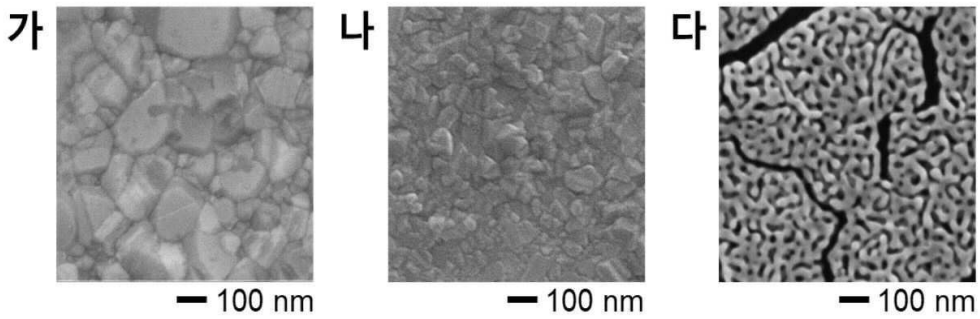
도면1



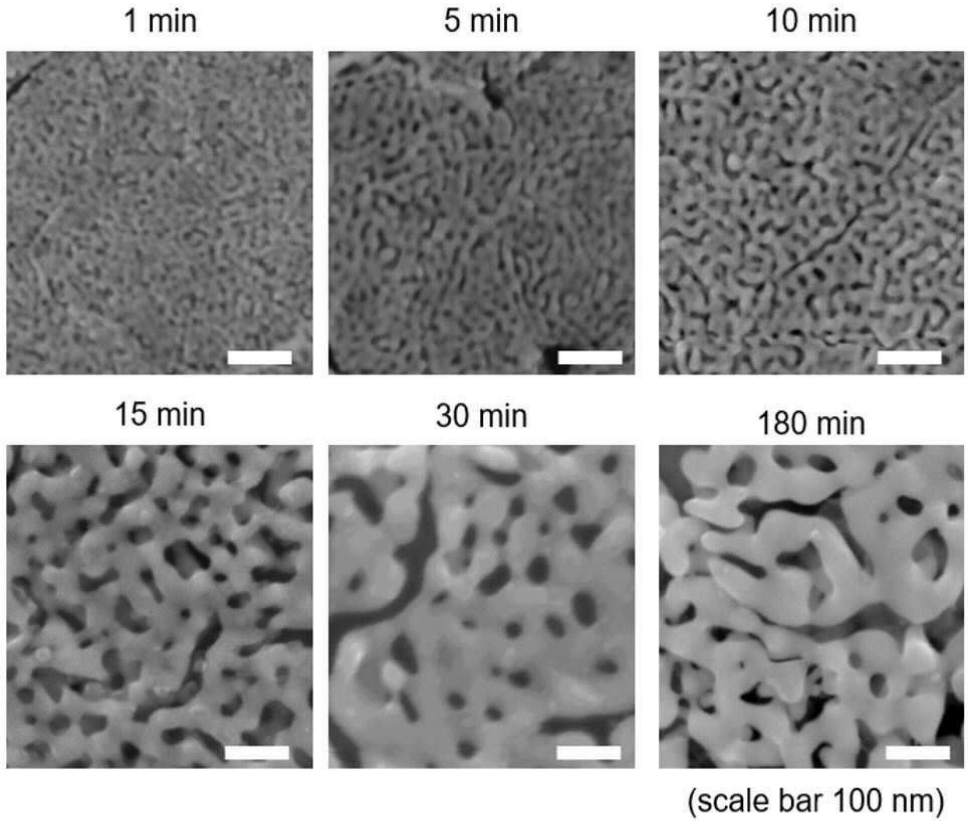
도면2


Ti/Au/Ag 증착
열처리
Ag 식각

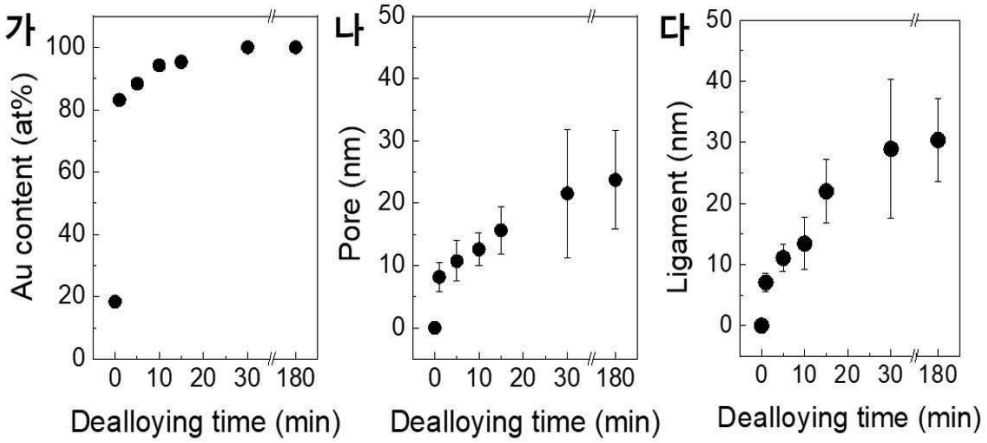
도면3


가
100 nm
나
100 nm
다
100 nm

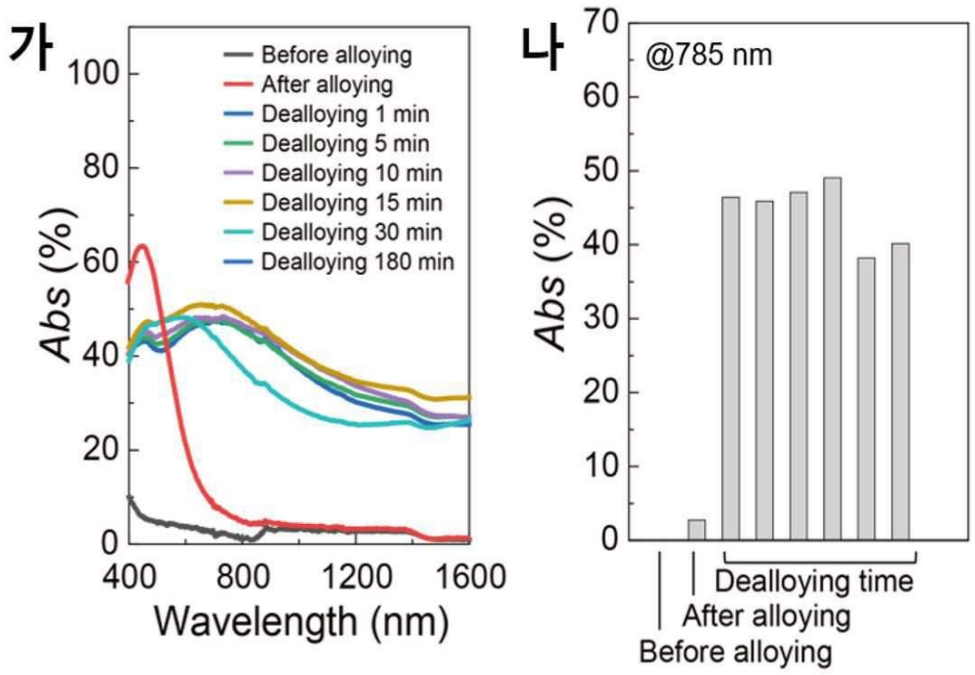
도면4


1 min
5 min
10 min
15 min
30 min
180 min
(scale bar 100 nm)

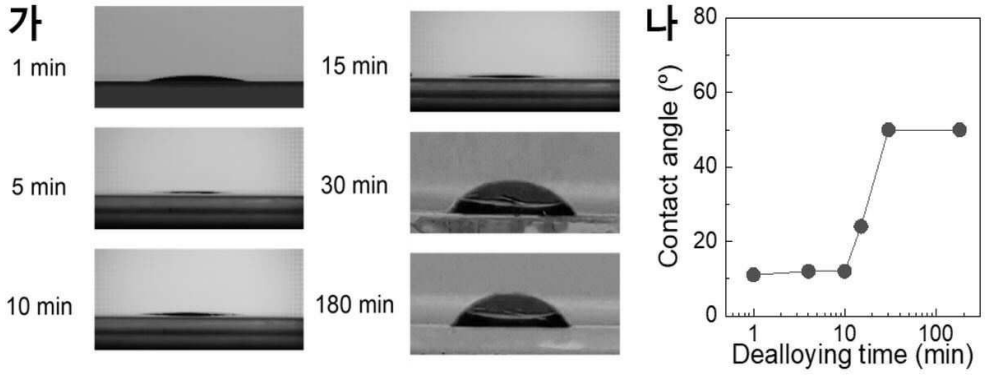
도면5


가
Au content (at%)
Dealloying time (min)
나
Pore (nm)
Dealloying time (min)
다
Ligament (nm)
Dealloying time (min)

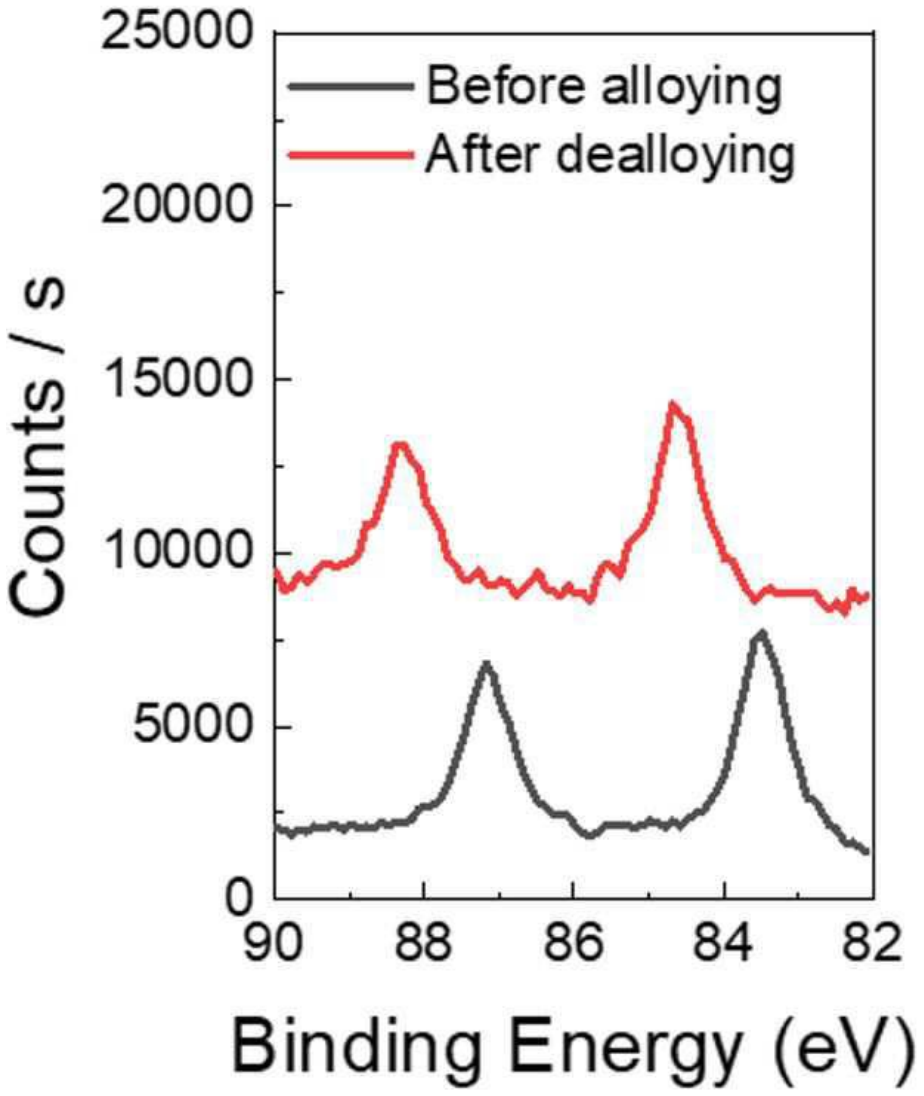
도면6


가
Before alloying
After alloying
Dealloying 1 min
Dealloying 5 min
Dealloying 10 min
Dealloying 15 min
Dealloying 30 min
Dealloying 180 min
Abs (%)
Wavelength (nm)
나
@785 nm
Abs (%)
Dealloying time
After alloying
Before alloying

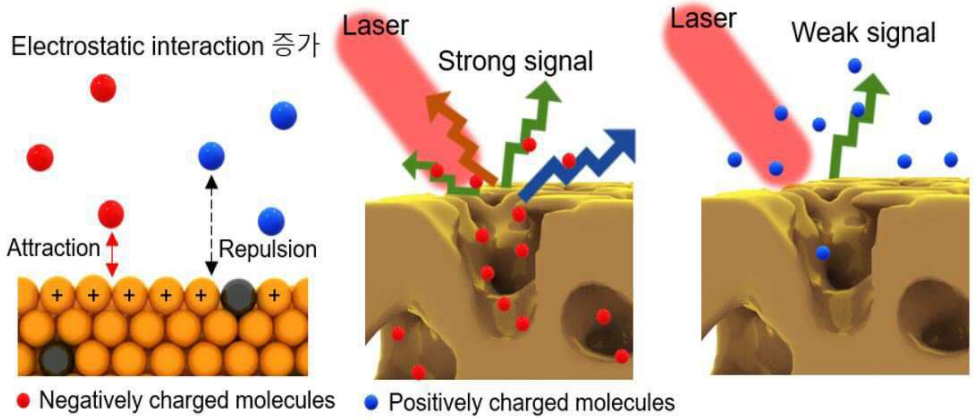
도면7


가
1 min
15 min
5 min
30 min
10 min
180 min
나
Contact angle (°)
Dealloying time (min)

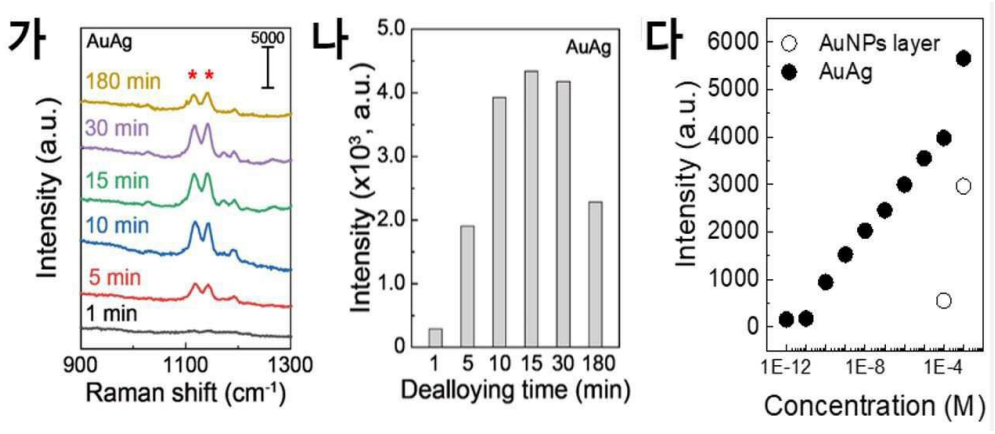
도면8


25000
20000
15000
10000
5000
0
Counts / s
Before alloying
After dealloying
90
88
86
84
82
Binding Energy (eV)

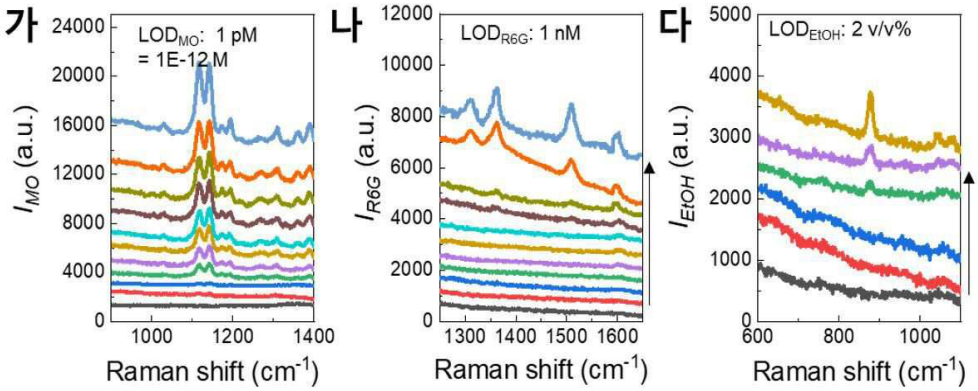
도면9


Electrostatic interaction 증가
Attraction
Repulsion
Negatively charged molecules
Laser
Strong signal
Positively charged molecules
Laser
Weak signal

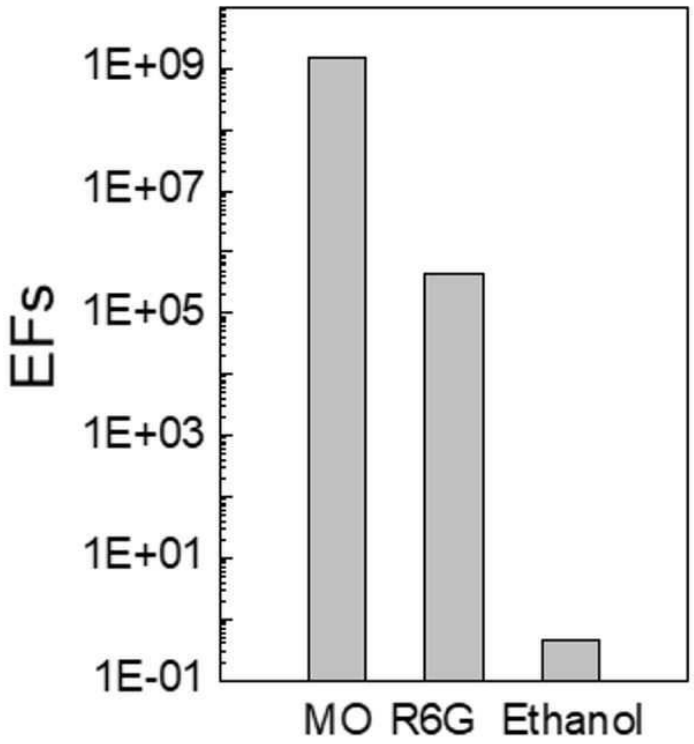
도면10


가
AuAg
5000
180 min
30 min
15 min
10 min
5 min
1 min
Intensity (a.u.)
900
1100
1300
Raman shift (cm-1)
나
AuAg
Intensity (x10³, a.u.)
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0
1
5
10
15
30
180
Dealloying time (min)
다
AuNPs layer
AuAg
Intensity (a.u.)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
1E-12
1E-8
1E-4
Concentration (M)

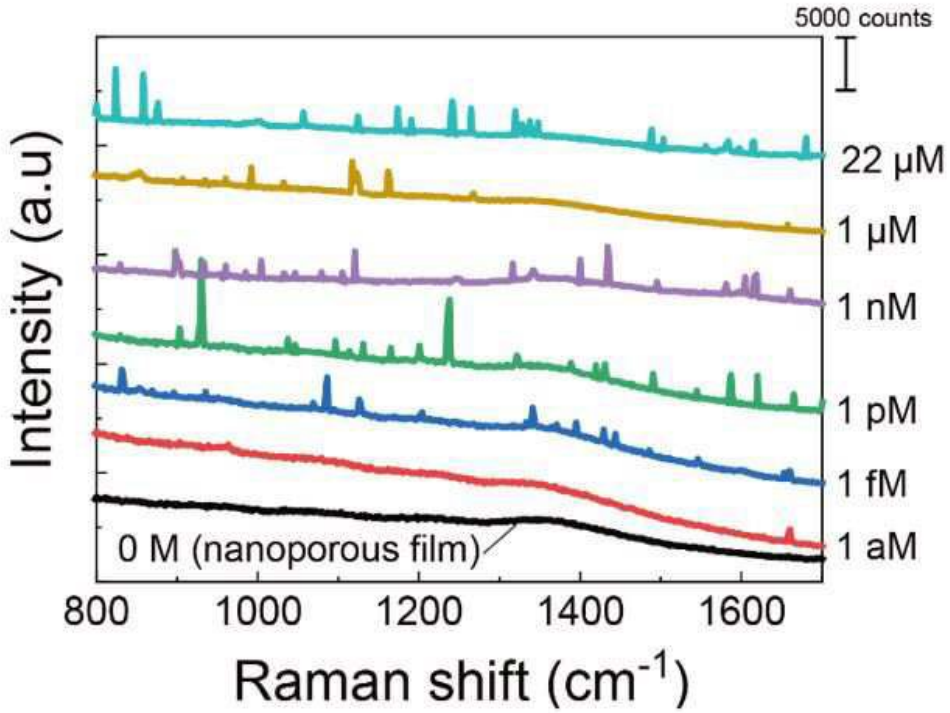
도면11


가
LODMO: 1 pM
= 1E-12 M
IMO (a.u.)
24000
20000
16000
12000
8000
4000
0
1000
1200
1400
Raman shift (cm-1)
나
LODR6G: 1 nM
IR6G (a.u.)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
1300
1400
1500
1600
Raman shift (cm-1)
다
LODEtOH: 2 v/v%
IEtOH (a.u.)
5000
4000
3000
2000
1000
0
600
800
1000
Raman shift (cm-1)

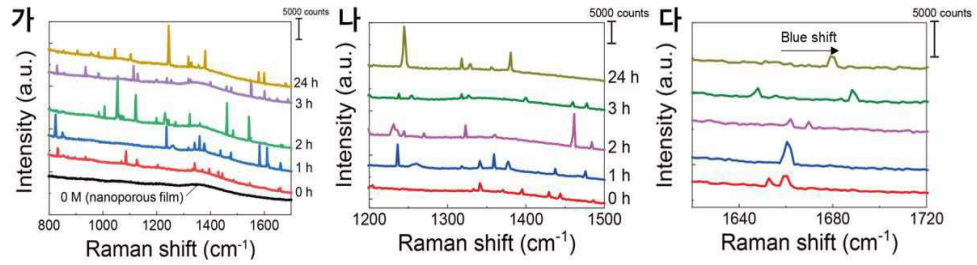
도면12


EFs
1E+09
1E+07
1E+05
1E+03
1E+01
1E-01
MO
R6G
Ethanol

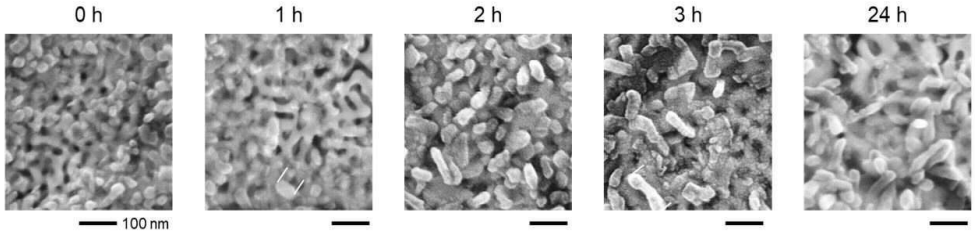
도면13


5000 counts
22 μM
1 μM
1 nM
1 pM
1 fM
1 aM
0 M (nanoporous film)
Intensity (a.u)
800
1000
1200
1400
1600
Raman shift (cm-1)

도면14


가
5000 counts
Intensity (a.u.)
24 h
3 h
2 h
1 h
0 h
0 M (nanoporous film)
800
1000
1200
1400
1600
Raman shift (cm-1)
나
5000 counts
Intensity (a.u.)
24 h
3 h
2 h
1 h
0 h
1200
1300
1400
1500
Raman shift (cm-1)
다
5000 counts
Blue shift
Intensity (a.u.)
1640
1680
1720
Raman shift (cm-1)

도면15


0 h
1 h
2 h
3 h
24 h
100 nm