



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월07일
(11) 등록번호 10-1293968
(24) 등록일자 2013년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01H 13/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0057409

(22) 출원일자 2012년05월30일

심사청구일자 2012년05월30일

(56) 선행기술조사문헌

JP4308652 B2*

JP2005500855 A

KR1020080052587 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

나성수

서울특별시 영등포구 당산로42길 13 효성아파트
106-802

박진성

서울특별시 동대문구 제기로4나길 34 나섬빌라 3
층 301호 (제기동, 65-4)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 10 항

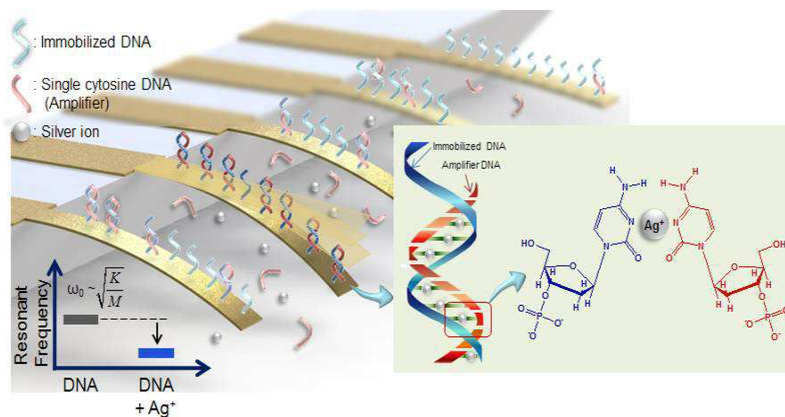
심사관 : 이상호

(54) 발명의 명칭 은 이온 검출용 올리고뉴클레오타이드 고정 마이크로 오실레이터 및 이의 공진을 이용한 은 이온 검출방법

(57) 요약

본 발명은 은 이온 검출용 올리고뉴클레오타이드 고정 마이크로 오실레이터 및 이의 공진을 이용한 은 이온 검출방법에 관한 것으로서, 상기 마이크로-오실레이터 표면에는 말단이 티올화된 시토신으로 구성된 DNA가 부착되어 고정화되어 있는 것을 특징으로 하며, 본 발명에 따르면, 고유의 공진주파수를 갖는 기계적 특성을 이용하여 인체 및 환경에 악영향을 미치는 은 나노물질에 대해서 간단한 방법으로 검출 및 정량화할 수 있으며, 1 nM 이하의 은 나노물질에 대해서도 검출이 가능하여 민감도가 우수할 뿐만 아니라, 은 이온에 대한 선택성이 우수하여 독성 물질을 검출할 수 있는 바이오센서로 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

장규환

서울특별시 성동구 독서당로 191 극동아파트 2동
203호 (옥수동)

최옥

대전광역시 동구 회남로184번길 10 (신하동,
344-7)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110020090

부처명 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 1차원 나노물질의 환경매체내 거동 및 독성 모니터링기술 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.06.30 ~ 2012.06.29

특허청구의 범위

청구항 1

은-이온 검출용 마이크로-오실레이터로서, 상기 마이크로-오실레이터 표면에는 말단이 티올화된 시토신으로 구성된 DNA가 부착되어 고정화되어 있고,

상기 DNA가 부착되어 고정화되는 마이크로-오실레이터의 표면은 크롬(Cr) 및 금(Au)으로 순차적으로 코팅되어 있고, 상기 금(Au)과 상기 DNA의 티올화 말단이 결합하는 것을 특징으로 하는 은-이온 검출용 마이크로-오실레이터.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 DNA가 부착되어 고정된 마이크로-오실레이터 표면의 배면은 알루미늄으로 코팅되어 있는 것을 특징으로 하는 은-이온 검출용 마이크로-오실레이터.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 DNA는 5'-(CCC)_n-HS-3' (1≤n≤20)인 것을 특징으로 하는 은-이온 검출용 마이크로-오실레이터.

청구항 5

- (a) 마이크로-오실레이터 표면에 말단이 티올화된 시토신으로 구성된 DNA를 고정화시키는 단계;
- (b) 상기 마이크로-오실레이터 표면에 은 이온을 포함하는 시료와 반응시키는 단계; 및
- (c) 상기 마이크로-오실레이터의 공진 주파수 변화를 실시간 측정하는 단계;를 포함하는 은-이온 검출방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 은 이온을 포함하는 시료는 질산나트륨 및 시토신 분자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 은-이온 검출방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 공진 주파수의 변화는 시토신 분자 및 포획된 은-이온의 질량에 비례하고, 상기 공진 주파수의 변화는 기준 공진 주파수와 실시간 측정한 공진 주파수의 차이인 것을 특징으로 하는 은-이온 검출방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 기준 공진 주파수는 은-이온을 포함하지 않는 시료 내에서 측정된 마이크로-오실레이터의 공진 주파수인 것을 특징으로 하는 은-이온 검출방법.

청구항 9

제 5 항에 있어서,

상기 (a) 단계 이전에 마이크로-오실레이터의 표면을 기능화시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 은-

이온 검출방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 기능화시키는 단계는 상기 마이크로-오실레이터 표면을 크롬(Cr) 및 금(Au)으로 순차적으로 코팅하고, 배면은 알루미늄으로 코팅하여 기능화시키는 것을 특징으로 하는 은-이온 검출방법.

청구항 11

제 5 항에 있어서,

상기 DNA는 5'-(CCC)_n-HS-3' (1≤n≤20)인 것을 특징으로 하는 은-이온 검출방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 은 이온 검출용 올리고뉴클레오타이드 고정 마이크로 오실레이터의 공진을 이용한 은 이온 검출방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 DNA에 은 이온이 인터칼레이션(intercalation)될 때 증가하는 질량에 의해서 변화되는 공진 주파수의 변화로 은 이온만 선택적으로 고감도로 검출할 수 있는 마이크로 오실레이터 및 이를 이용한 은 이온 검출방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 산업 분야나 과학 분야에서 나노 크기의 재료의 사용이 급증되고 있으며, 이 나노 크기의 재료가 인체와 환경에 미치는 악영향이 보고되고 있다. 대표적인 중금속 나노 물질로는 구리(Copper), 은(Silver), 알루미늄(Aluminum), 아연(Zinc), 카드뮴(Cadmium) 등으로서, 산업 분야나 과학 분야에서 광범위하게 사용되고 있다.

[0003] 특히, 은 나노 물질(AgNPs)은 최근 항균 효과로 각광을 받고 많은 분야에 사용이 급증되었다. 의류, 정수기, 세탁기, 치약 등 인체에 직접적인 영향을 미칠 수 있는 분야에 많이 사용되어 왔다. 또한, 산업적 폐기 및 방사로 부터 환경으로 방출되는 은은 연간 대략 2,500 톤으로 추산되고, 그 중 150 톤은 폐수의 슬러지로 들어가고 80 톤은 표층수로 방출되고 있다. 심지어 은 나노입자는 쉽게 이온화되어 하수도, 강 및 상수도를 포함하여 액체 상태 내로 확산된다.

[0004] 은 이온(Ag⁺)은 박테리아, 바이러스, 조류(algae) 및 곰팡이의 대부분에 고도로 독성이고, 설프하이드릴 효소(sulfhydryl enzymes)가 불활성화되도록 할 수 있으며, 인체 내에도 축적된다. 또한, 최근 연구 결과에 따르면 이러한 나노크기의 물질은 세포 괴사(Cell necrosis), 암, 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머(Alzheimer's disease)와 같은 인체에 심각한 병을 초래하며, 인체뿐만이 아닌 환경에도 악영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 이러한 은 나노 물질(AgNPs)의 위험성을 바탕으로 최근 은 나노 물질(AgNPs)의 검출연구가 활발히 진행되고 있다.

[0005] 기존 은 나노 물질의 대표적인 검출 방법으로는 DNA와 그래핀(Graphene)을 이용한 형광(Fluorescent) 검출방법과 DNA와 전극(Electrode)을 이용한 전기측정(Electrochemical) 검출방법으로서 기계적인 특성이 아닌 전기적인 특성과 화학 특성을 이용하여 은 나노 물질(AgNPs)을 검출하였다.

[0006] 최근에서는 금속 이온과 DNA 염기쌍 사이의 상호작용이 센서 응용 분야에서 현재 상당한 주목을 끌고 있다. 일부 금속 이온들은 천연 또는 합성 DNA 듀플렉스(DNA duplex)에 선택적 결합되어 금속-매개 염기쌍(metal-mediated base pairs)을 형성할 수 있고, DNA-금속 상호작용으로 인하여 연결된 DNA 듀플렉스의 열적 안정성은 증가된다.

[0007] 최근, 은 이온과 시토신-시토신(C-C) mismatch의 특이적 상호작용에 의한 Ag⁺ 센서 개발에 대하여 집중되고 있다. Ag⁺가 2개의 시토신들과 특이적으로 결합할 수 있고, C-C mismatch를 촉진하여 안정한 염기쌍을 형성한다는 것을 발견하고, C-Ag⁺-C 배위 화학을 사용하여 은 이온을 검출하는 형광센서가 개발되었다. [Ono, S. Cao, H. Togashi, M. Tashiro, T. Fujimoto, T. Machinami, S. Oda, Y. Miyake, I. Okamoto, Y. Tanaka, Chemical

Communications, 2008]

[0008] 또한, 인식단위(recognition unit)로서 형광-표지된 올리고뉴클레오타이드를 이용하고, 퀸처(quencher)로서 그래핀 산화물을 이용하여 은 이온을 검출하는 그래핀 산화물-기반 센서(graphene oxide-based sensor)를 보고하였다. [Y. Wen, F. Xing, S. He, S. Song, L. Wang, Y. Long, D. Li, C. Fan, Chemical Communications, 2010, 46, 2596-2598]

[0009] 또한, 형광 분광분석법(fluorescence spectroscopy method)에 기초하여 은 이온을 검출하기 위한 단일벽 탄소 나노튜브(single wall carbon nanotube)를 개발하였다. [C. Zhao, K. Qu, Y. Song, C. Xu, J. Ren, X. Qu, Chemistry European Journal, 2010, 16, 8147-8154]

[0010] 그러나, 상기 보고된 기술들은 높은 가격과 검출한계의 불만족으로 인하여, 고감도, 고신뢰도 및 고선택적이며, 또한 검출에 있어서 경제적인 시스템을 개발하는 것이 요구되고 있다. 또한, 신뢰도나 경제적인 측면에서 한계를 가지고 있는 화학약품이나 전기적인 특성을 이용한 검출방법 외에 기계적 특성을 이용한 검출방법에 대한 개발이 절실히 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 은 이온만 선택적으로 고감도로 검출할 수 있는 마이크로 오실레이터를 제공하고, 상기 마이크로 오실레이터의 공진을 이용한 은 이온 검출방법을 제공하고자 하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 상기 과제에 제한되지 않으며, 본 명세서의 기재로부터 당업자가 명확하게 이해할 수 있는 다른 해결과제도 포함된다고 할 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0014] 은-이온 검출용 마이크로-오실레이터로서, 상기 마이크로-오실레이터 표면에는 말단이 티올화된 시토신으로 구성된 DNA가 부착되어 고정화되어 있는 것을 특징으로 하는 은-이온 검출용 마이크로-오실레이터를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 DNA가 부착되어 고정화되는 마이크로-오실레이터의 표면은 크롬(Cr) 및 금(Au)으로 순차적으로 코팅되어 있고, 상기 금(Au)과 상기 DNA의 티올화 말단이 결합하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 DNA가 부착되어 고정된 마이크로-오실레이터 표면의 배면은 알루미늄으로 코팅되어 있는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 DNA는 5'-(CCC)_n-HS-3' (1≤n≤20)일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0019] (a) 마이크로-오실레이터 표면에 말단이 티올화된 시토신으로 구성된 DNA를 고정화시키는 단계, (b) 상기 마이크로-오실레이터 표면에 은 이온을 포함하는 시료와 반응시키는 단계 및 (c) 상기 마이크로-오실레이터의 공진 주파수 변화를 실시간 측정하는 단계를 포함하는 은-이온 검출방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 은 이온을 포함하는 시료는 질산나트륨 및 시토신 분자를 더 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 공진 주파수의 변화는 시토신 분자 및 포획된 은-이온의 질량에 비례하고, 상기 공진 주파수의 변화는 기준 공진 주파수와 실시간 측정된 공진 주파수의 차이인 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 기준 공진 주파수는 은-이온을 포함하지 않는 시료 내에서 측정된 마이크로-오실레이터의 공진 주파수인 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 (a) 단계 이전에 마이크로-오실레이터의 표면을 기능화시키는 단계를 더 포함할 수 있으며, 그 예로서 상기 기능화시키는 단계는 상기 마이크로-오실레이터 표면을 크롬(Cr) 및 금(Au)으로 순차적으로 코팅하고, 배면은 알루미늄으로 코팅하여 기능화시키는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 DNA는 5'-(CCC)_n-HS-3'(1≤n≤20)일 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따르면, 고유의 공진 주파수를 갖는 기계적 특성을 이용하여 인체 및 환경에 악영향을 미치는 은 나노물질에 대해서 간단한 방법으로 검출 및 정량화할 수 있으며, 1 nM 이하의 은 나노물질에 대해서도 검출이 가능하여 민감도가 우수할 뿐만 아니라, 은 이온에 대한 선택성이 우수하여 독성 물질을 검출할 수 있는 바이오 센서로 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명에 따른 SSNO 기반 은 이온 검출 메카니즘의 개념도로서, 표면에 고정화된 DNA, 증폭기 역할을 하는 단일 시토신 분자 및 은 이온이 특이적으로 시토신-시토신 사이에 인터칼레이션되었을 때 발생하는 공진 주파수의 변화를 보여주는 개념도이다.

도 2는 본 발명에 따른 마이크로-오실레이터 표면상에 시토신으로 구성된 올리고뉴클레오타이드의 고정화를 확인한 광학 현미경 이미지(도 2a, 도 2b) 및 형광 현미경 이미지(도 2c, 도 2d)이다.

도 3은 DNA가 (a) 결합되지 않은 본래 상태의 오실레이터 표면, (b) DNA가 고정화된 오실레이터 표면, (c) 은 이온과 시토신이 결합된 경우의 오실레이터 표면에 대한 탭핑 모드 AFM 이미지 및 (d) 각 상태에서의 입자 크기 이력을 보여주는 그래프이다.(탭핑 모드 상은 7 μm × 7 μm이다)

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 은 이온의 농도(청색 막대)에 따라 본 발명의 은 특이성 DNA 코팅 오실레이터의 정규화된 공진 주파수 이동을 보여주는 그래프이다.(회색 막대는 대조구이며, 와인색의 선은 은 이온 검출에 대한 추세선을 나타낸다.)

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 은 이온의 선택도를 확인한 데이터 그래프로서, 은 이온은 회색막대, 다른 경쟁이온(리튬, 아연, 철, 나트륨)은 녹색막대로 표시한 그래프이다.(농도 100 nM)

도 6은 (a) 상수도(녹색 사각형) 및 100 nM의 은 이온이 용해된 상수도(청색 사각형)에서의 은 이온 특이성 뉴클레오타이드 코팅 오실레이터의 공진 주파수이고, (b) 각 상태에 대한 은 이온 특이성 뉴클레오타이드 코팅 오실레이터의 정규화된 공진 주파수이다.

도 7은 시토신 분자의 첨가를 하지 않은 경우(즉, 증폭기가 없는 경우, 녹색 상자)와 시토신 분자를 첨가한 경우(즉, 증폭기가 있는 경우, 청색 상자)에 본 발명의 은 이온 특이성 뉴클레오타이드 코팅 오실레이터(SSNO)의 공진 주파수 이동 및 탭핑 모드 AFM 이미지이다.

삽입 도면은 각각 시토신 없이 Ag⁺ 결합상태 및 시토신과 함께의 Ag⁺ 결합상태의 정규화된 공진 곡선이다.

도 8은 (a) 은 이온 없는 경우의 물리적 흡착에 대한 대조 실험 결과이고, (b) AT-15 DNA 시퀀스로 수행한 은 특이성 대조 실험결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0028] 본 발명은 은-특이성 뉴클레오타이드 코팅 오실레이터(silver-specific nucleotides coated oscillator, SSNO) 및 이를 통하여 은 이온을 고감도로 검출하는 새로운 검출방법에 관한 것이다.

[0029] 하기 도 1에 본 발명에 따른 SSNO 기반 은 이온 검출 메카니즘의 기본 설계를 나타내었다.

[0030] 본 발명에 따른 은이온 검출방법에서는 은 이온의 비표지 검출을 위하여, 본 발명은 마이크로 오실레이터 표면을 Ag⁺ 결합 시퀀스(Ag⁺ binding sequence), 30-염기 시토신으로 구성된 올리고뉴클레오타이드(30-base C-rich oligonucleotides)를 고정화시켜 관능화시켰다. 특히, 티올-말단 시토신으로 구성된 DNA를 공유결합으로 금 코팅 마이크로 오실레이터에 고정화시켰다.

[0031] 즉, 본 발명에 따른 은-이온 검출용 마이크로-오실레이터(SSNO)는 시토신과 시토신 사이에 은 이온이 인터칼레

이션(시토신- Ag^+ -시토신)이 가능하도록 그 표면을 말단이 티올화된 시토신으로 구성된 DNA로 관능화시켰다.

[0032] 이와 같이, 본 발명에 따른 마이크로-오실레이터 표면에 시토신으로 구성된 올리고뉴클레오타이드의 고정화를 확인하기 위하여, 별도로 플루오레세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC) 태그 시토신으로 구성된 DNA를 사용하여 확인하였으며, 이때 말단은 오실레이터 표면의 금(Au) 표면에 부착을 위하여 티올화시켰다.

[0033] 하기 도 2a 및 도 2b에 나타난 바와 같이, 고정화되지 않은 금 코팅 오실레이터 및 FITC 태그 DNA가 고정화된 금 코팅 오실레이터는 모두 광학 현미경 상에서는 동일한 물성(morphologies)을 나타내었다. 그러나, 하기 도 2c 및 도 2d에 나타난 바와 같이, 형광 현미경 상에서는 마이크로-오실레이터의 표면에 올리고뉴클레오타이드 고정화를 확인할 수 있다.

[0034] 또한, 마이크로-오실레이터의 표면은 크롬(Cr) 및 금(Au)으로 순차적으로 코팅되어 기능화되어 있고, 상기 금(Au)과 상기 DNA의 티올화 말단이 결합하여 그 표면을 관능화시킬 수 있는 것을 특징으로 한다. 그리고, 마이크로-오실레이터의 배면은 알루미늄 코팅(back side aluminum coating)시켜서 레이저 반사의 증가로 인하여 공진 정밀도를 보다 증가시킨 것을 특징으로 한다.

[0035] 상기 티올-말단 은-특이성 뉴클레오타이드는 5'-(CCC)_n-HS-3'(1≤n≤20)일 수 있으며, 구체적인 일 예로서, 5'-CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC-HS-3'일 수 있다.

[0036] 본 발명의 다른 측면은 상기 은-특이성 뉴클레오타이드 코팅 오실레이터의 공진을 이용하여 실시간으로 은 이온을 측정하는 방법으로서, 하기의 단계를 포함한다.

[0037] (a) 마이크로-오실레이터 표면에 말단이 티올화된 시토신으로 구성된 DNA를 고정화시키는 단계,

[0038] (b) 상기 마이크로-오실레이터 표면에 은 이온을 포함하는 시료와 반응시키는 단계,

[0039] (c) 상기 마이크로-오실레이터의 공진 주파수 변화를 실시간 측정하는 단계.

[0040] 본 발명에 따른 은 이온 검출방법에서 상기 은 이온을 포함하는 시료에는 DNA 듀플렉스의 안정성을 향상시키기 위해서 질산나트륨을 추가로 더 포함하고, 은-이온의 감지 효율을 향상시키기 위하여 시토신 단일 분자를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0041] 민감한 은 이온 검출을 위해서는, 질량 증폭 및 뉴클레오타이드 안정성을 위해서는 여러 가지 요소가 요구된다.

[0042] 먼저, 하기 도 7에 나타나 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 단일 시토신 분자는 $\text{C-Ag}^+-\text{C}$ 염기쌍을 형성하고 공진 주파수 이동을 넓힐 수 있는 질량 증폭기(mass amplifier)의 역할을 한다. 더욱이, $\text{C-Ag}^+-\text{C}$ 의 염기쌍은 뉴클레오타이드 안정성을 증가시킨다. 또한, 하기 도 8(a)에 나타나 있는 바와 같이, 시토신-시토신 반발력으로 인하여 단일 시토신 분자가 최대로 적절한 증폭기 역할을 한다. 고정화된 단일 가닥 시토신으로 구성된 DNA는 친수성이어서 물 분자와의 관계에서 뉴클레오타이드가 1차원 구조가 되는 것을 가능하게 하며, 이는 은 이온과 시토신 분자가 쉽게 고정화된 DNA에 접근하는 것을 가능하게 한다. 또한, 하기 도 8(b)에서 보는 바와 같이, 아데닌 및 티민 등과 같은 다른 DNA 시퀀스와 비교하여 본 발명에 따른 시토신으로 구성된 DNA가 특이적 은 이온 검출이 가능하다는 것을 알 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 검출방법은 시료와 반응 후에 일어나는 기계적 특성인 공진 주파수(resonance frequency)의 변

화로 은 이온의 검출을 확인할 수 있는 것을 특징으로 한다. 공진 주파수($\omega_0 = \sqrt{\frac{K}{m}}$)는 DNA에 은 이온이 인터칼레이션되었을 때 증가하는 질량 변화에 의해서 공진 주파수 변화로 측정된다. 또한, 본 발명에서는 은-이온의 감지 효율을 향상시키기 위하여 증폭기 역할을 하는 시토신 단일 분자를 추가로 더 포함하여 공진 주파수의 변화는 시토신 분자 및 포획된 은-이온의 질량에 비례한다.

[0044] 본 발명에 따른 마이크로 오실레이터의 공진 거동 및 공진 주파수 이동의 검출 원리는 다음과 같다.

- [0045] 본 발명에 따른 SSNO 기반 은 이온 검출 시스템은 질량 변화(mass changing)에 의한 공명주파수 이동에 기초하여 은 이온의 검출을 확인한다.
- [0046] 건조 공기 상태에서 작동하는 직사각형의 오실레이터는 탄성의 연속체 모델의 공진 거동(resonance behavior)을 보인다. 마이크로 오실레이터의 공진 주파수 이동이 분자 흡수 및/또는 단백질가수분해 등과 같은 분자 상호작용으로 인한 질량 증가 및/또는 감소에 기여한다는 것은 잘 알려져 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 오실레이터의 두께가 분자층의 두께보다 더 두껍기 때문에, 질량 효과가 공진 거동에 대하여 지배적인 인자이다.
- [0048] 마이크로 오실레이터의 공진 거동은 전통적인 연속체 탄성 모델의 공진 거동을 따른다. 건조한 공기의 상태에서, 그 형태는 하기 [식 1]로 기술된다.
- [0049]
$$\omega_0 = \left(\frac{\alpha}{L}\right)^2 \sqrt{\frac{EI}{\rho_c A}} = \sqrt{\frac{K_c}{M_c}} \quad [\text{식 1}]$$
- [0050] 여기에서, EI , A , L 및 ρ_c 는 각각 오실레이터의 굽힘 강성도(bending rigidity), 단면적, 길이 및 밀도이다.
- [0051] 상기 α 는 $\cos \alpha \cosh \alpha + 1 = 0$ 와 같은 초월 방정식(transcendental equation)을 만족하는 해이다. 초월 방정식의 대표적인 해는 $\alpha_1 = 1.875$ 및 $\alpha_2 = 4.694$ 이다.
- [0052] 또한, M_c 및 K_c 는 각각 오실레이터의 유효 질량 및 유효 강성도(effective stiffness)를 나타낸다. 특히, $M_c = \rho_c A$ 및 $K_c = \alpha^4 EI / L^4$ 로 주어진다. 이 식으로부터, 본 발명에 따른 마이크로 오실레이터의 공진 주파수는 366.7 kHz로 예측되었으며, 실험적으로 공진 주파수의 평균은 334.7 ± 16.3 kHz이다. 여기에서, 본 발명에 따른 마이크로-오실레이터(캔틸레버)의 규격은 $L \times \omega_c \times t_c$ (길이×폭×두께)로서, $L=125 \mu\text{m}$, $\omega_c=40 \mu\text{m}$ 그리고 $t_c=4 \mu\text{m}$ 이다.
- [0053] 이는 본 발명에 따른 오실레이터가 전통적인 연속체 탄성 모델을 만족한다는 것을 의미하며, 마이크로 오실레이터의 두께가 분자층의 두께보다 훨씬 더 크기 때문에, 질량이 상기 공진 주파수를 이동시키는 주요 원인이다.
- [0054] 즉, 본 발명에서 은 이온 및 단일 시토신 분자가 질량 증분의 역할을 하며, 하기 [식 2]와 같이 공진 주파수의 이동이 분자질량과 직접적으로 관련됨을 알 수 있다.
- [0055]
$$\frac{\Delta \omega_0}{\omega_0} = \left(\frac{1}{2}\right) \left(\frac{\Delta M}{M_c}\right) \quad [\text{식 2}]$$
- [0056] 여기에서 $\Delta \omega_0$ 는 건조 공기 중에서 측정된 공진주파수 이동이고, ΔM 은 분자 상호작용을 포함하는 분자의 총질량이다. 이러한 공진 주파수의 이동으로부터, 본 발명에 따른 SSNO는 표적 음 이온을 검출하는 것이 가능하다.
- [0057] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않고, 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.
- [0058] <실시예>
- [0059] 제조예 1. 은-특이성 뉴클레오티드 코팅 오실레이터(SSNO)의 제조
- [0060] (1) 약 42 N/m의 힘상수(force constant)를 갖는 마이크로-오실레이터(TESPA, Bruker, CA)를 이용하였으며, 규격은 $40 \times 41 \times 25 \mu\text{m}^3$ (폭×두께×길이)인 것을 이용하였다. 오실레이터의 배면은 알루미늄 코팅(back side aluminum coating)시켜서 레이저 반사의 증가로 인하여 공진 정밀도를 보다 증가시켰다. 오실레이터의 공진 주파수는 건조한 공기 중에서의 약 300 내지 365 kHz의 범위를 갖는다.
- [0061] 전자-빔 증발기(E-beam evaporator ; Maestech)로 상기 마이크로 오실레이터 상에 크롬(Cr)층 및 금(Au)층을 각각 100 Å 및 200 Å로 증착시켰다. 이후, 상기 에탄올과 탈이온수(distilled water, 밀리포어(Millipore),

Bedford, MA, pH 7.5)로 수 회 세척하고, 완전 건조를 위하여 실온에서 진공 중에서 12 시간 동안 건조시켰다.

[0062] (2) 티올-말단 은-특이성 뉴클레오티드는 5'-CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC-HS-3'(Integrated DNA Technology, CA, USA)를 이용하였다. 상기 뉴클레오티드를 수성 트리-에틸렌디아민테레프탈산 완충액(Tris-EDTA buffer, pH 8)에 용해시켰다. 뉴클레오티드를 상기 오실레이터 상에 부착, 고정화(immobilized)시키기 위하여, 상기 마이크로 오실레이터를 상기 DNA 완충액(50 μ l, 10 μ M) 내에 2 시간 동안 침시켰고, 이에 의해서 상기 DNA는 오실레이터의 금 표면 상에 부착되었다.

[0063] 상기 오실레이터를 탈이온수로 부드럽게 세척한 후, 상기 오실레이터를 완전 건조를 위하여 실온에서 진공 중에서 12 시간 동안 건조시켜 은-특이성 뉴클레오티드 코팅 오실레이터(SSNO)를 제조하였다.

[0064] 제조예 2. 은-특이성 뉴클레오티드 코팅 오실레이터(SSNO)의 제조

[0065] 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 제조하였으며, 다만, 마이크로 오실레이터 상에 FITC(fluorescein isothiocyanate) 태그 DNA를 부착, 고정화시켰다.

[0066] DNA의 시퀀스는 형광 염료를 제외하고는 상기 제조예 1과 동일하고, 구체적으로 5'-56-FAM-CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC-HS-3'이다.

[0067] 실시에 1. 탭핑 모드 원자력 현미경(AFM) 및 주사전자현미경 상(SEM) 분석

[0068] Atomic Force Microscope(원자력 현미경)에는 Contact Mode, Tapping Mode, Phase Image 등의 다양한 측정방법이 있으며, 본 발명에서는 마이크로-오실레이터(캔틸레버)를 이용하여 공진 주파수(Resonance frequency)를 측정할 수 있는 탭핑 모드(Tapping Mode) 원자력 현미경으로 수행하였다.

[0069] 주변온도, 압력 및 공기 중에서 나노드라이브 컨트롤러(Nanodrive controller; Veeco, Santa Barbara, CA, USA)와 함께 인노바(Innova; Veeco, Santa Barbara, CA, USA) 상에서 탭핑 모드 AFM 측정을 수행하였다.

[0070] 정밀하고 재현가능한 탭핑 모드 상의 수득을 위하여 폐쇄-루프 스캐너(closed-loop scanner)를 사용하였으며, 모든 상들을 기록하기 위하여 마이크로-오실레이터(TESPA) 캔틸레버 팁을 사용하였다. 이 캔틸레버의 공진주파수는 320 kHz이고, 팁 반경(tip radius)은 약 10 nm이다.

[0071] 모든 상들의 크기는 1 Hz에서의 스캐닝에 대하여 700 nm $\times$ 700 nm이었다. 모든 상들을 2차원으로 조정하였으며 에스피엠 랩 분석 소프트웨어 V7.00(SPM Lab Analysis software V7.00; Veeco Corp., Santa Barbara, CA, USA)으로 가공하였다. 또한, 나노스코프 분석 소프트웨어 V1.20(Nanoscope analysis software V1.20; Bruker Corp., Santa Barbara, CA, USA)으로 확률 분석을 수행하였다. 또한, 히다치 모델 S-5300 마이크로스코프를 사용하여 주사전자현미경(SEM) 상을 관측하였다.

[0072] 본 발명에서는 SSNO 기반 은 이온 포획에 있어서, 항력(drag force)으로 인하여 시료를 악화시킬 가능성이 있는 접촉 모드(contact mode) 원자력 현미경은 생체분자 샘플(biomolecular sample)에 대하여는 적절하지 않으므로, 명확한 분자 크기의 분포와 구별을 위하여 탭핑-모드 원자력 현미경(tapping-mode atomic force microscopy, AFM)을 사용하였다.

[0073] 하기 도 3에 나타나 있는 바와 같이, 탭핑 모드 AFM은 마이크로-오실레이터의 금(Au) 표면상의 표면 몰포러지의 입자 크기 분포를 제공한다. 도 3b 및 도 3c는 금 표면상에 시토신으로 구성된 올리고뉴클레오티드(10 μ M) 결합에 의한 표면 몰포러지의 변화 및 단일 시토신 분자(10 μ M)를 갖는 Ag⁺(100 nM)의 흡수를 보여준다. 하기 도 3d는 각각 Au 표면 상태, 은-특이성 DNA 결합 상태 및 단일 시토신 분자 결합 상태의 은 이온을 나타내고 있다.

[0074] 입자 크기의 분포는 $f(x) = A \exp[-(x-\mu)^2/(2\sigma^2)]$ 같은 정규 분포를 따르며, 여기에서 $f(x)$ 는 입자 크기 x 에 대한 확률 함수이고, μ 는 입자 크기의 평균값이고, 그리고 σ^2 은 변량(variance)이다.

[0075] 하기 도 3a에 나타난 바와 같이, 금 표면 상태는 작은 입자 크기(3.07 ± 0.8 nm, $\mu^2 \pm \sigma^2$)를 나타내는 반면에 고정화된 시토신으로 구성된 DNA를 갖는 표면은 9.32 ± 1.2 nm의 증가된 입자 크기를 갖는다(하기 도 3b). 이는 상기 은-특이성 뉴클레오티드가 금(Au) 기질에 잘 부착되어 있다는 것을 의미한다. DNA 고정화된 오실레이

터에 Ag^+ 및 시토신 증폭기의 결합 이후, 가장 큰 34.93 ± 1.29 nm의 입자 크기가 관측되었다(하기 도 3c). 이러한 결과로부터, 단일 시토신 분자가 질량 증폭기의 절대적인 역할을 하고 이에 따라서 본 발명에 따른 SSNO 기반 은 이온에 대한 포획 및 검출 능력을 향상시킨다는 것을 알 수 있다.

[0076] 실시예 2. Ag^+ 검출 및 선택성 분석

[0077] 질산은($AgNO_3$)을 탈이온수에 용해시켜서 은 이온 용액을 제조하였으며, 뉴클레오티드가 고정화된 마이크로-오실레이터를 질량 증폭기인 단일 시토신 분자($200 \mu\ell$, $100 \mu M$)를 갖는 상기 은 이온 용액($200 \mu\ell$) 내에 함침시켰다. 또한, DNA의 안정성을 증가시키기 위하여 상기 용액에 $NaNO_3$ ($100 \mu\ell$, 50 mM)를 첨가하였다. 2 시간의 배양 이후, 완전 건조를 위하여 상기 SSNO를 진공 상태에서 12 시간 동안 건조시켰다. SSNO의 검출 선택성을 확인하기 위하여, 질산나트륨(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)), 질산리튬(시그마-알드리치), 질산아연 옥수화물 및 염화철(III)(시그마-알드리치) 등과 같은 4 가지의 금속 이온을 준비하였다. 금속 이온의 모든 농도는 은 이온과 동일한 조건인 100 nM이었다.

[0078] 실시예 3. 일반 상수도에서의 실험

[0079] 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 분석하였으며, 다만 실제 은 이온의 검출 가능성을 확인하기 위하여, 일반적인 상수도를 사용하였다. 용액은 기공 크기(pore size)가 $0.2 \mu m$ (Minisart, Sigma-Aldrich)인 주사기 필터(syringe filter)를 사용하는 것에 의하여 통상의 상수도로부터 침출 여과시켰다. 질산은(100 nM), 단일 시토신 분자($100 \mu M$) 및 질산나트륨(50 mM)을 여과된 상수도 내로 용해시켰다.

[0080] 실시예 4. 시토신 효과, 물리적 흡착 및 다른 DNA 반응성에 대한 대조 실험

[0081] (1) 단일 시토신 효과를 확인하기 위하여, 은-특이성 DNA 고정화 오실레이터를 이용하여 2 개의 서로 다른 용액 내로 투입하였다.

[0082] 하나는 질산나트륨(50 mM)과 함께 질산은($10 \mu M$)을 포함하며, 다른 하나는 질산은($10 \mu M$), 질산나트륨(50 mM) 및 시토신 분자($100 \mu M$)를 포함한다. 그 결과, 하기 도 7에서 알 수 있는 바와 같이, 단일 시토신 분자가 상기 SSNO 공진 주파수를 넓히는 역할을 함을 알 수 있다.

[0083] (2) 물리적 흡착의 가능성을 확인하기 위하여, 동일한 SSNO를 준비하여 단일 시토신 분자($100 \mu M$) 및 질산나트륨(50 mM)을 포함하는 분석 용액 내로 투입하였다. 하기 도 8(a)에서 알 수 있는 바와 같이, 분석 전과 후 사이에서 공진 주파수의 차이는 없었다.

[0084] (3) 본 발명에 따른 DNA의 은-특이성을 확인하기 위하여, 상기 제조예 1에서의 DNA 시퀀스를 아데닌 및 티민으로 변화시켰다. 대조 DNA의 시퀀스 역시 동일한 길이 및 농도($10 \mu M$)로 이루어진 5'-ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT ATA TAT-HS-3' (AT-15)이다.

[0085] AT-15 고정화 오실레이터를 상기 실시예 2의 동일한 농도의 용액(은이온, 질산나트륨 및 시토신 분자)에서 수행하였으나, 그럼에도 불구하고 하기 도 8(b)에서 알 수 있는 바와 같이, 분석 후 공진 주파수의 차이는 없었다. 이는 본 발명에 따른 DNA가 은-특이성 DNA임을 알 수 있다.

[0086] 본 발명에 따른 SSNO에서 은 이온의 포획 및 검출도를 확인하기 위하여 조사하기 위하여, 서로 다른 Ag^+ 농도에 대해서 실험을 수행하였다. 먼저, 포획 감도(capturing sensitivity)를 특정하기 위하여, 캔틸레버(cantilever)의 초기 공진들 중의 이격도(disparity)로 인한 오실레이터의 공진 주파수를 정규화시켰다.

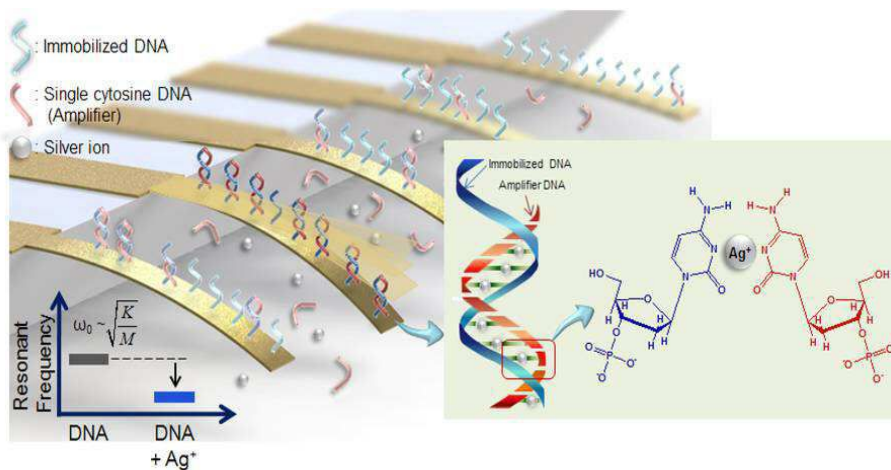
[0087] 정규화된 공진 주파수는 $\omega_s = (\omega_d - \omega_i) / \omega_b \times 100$ 으로 기술되고, 여기에서 ω_d , ω_i 는 은 특이성 DNA 결합 상태,

시토신 분자를 갖는 은이온 결합 상태이고, ω_b 는 미처리된 오실레이터의 공진 주파수이다.

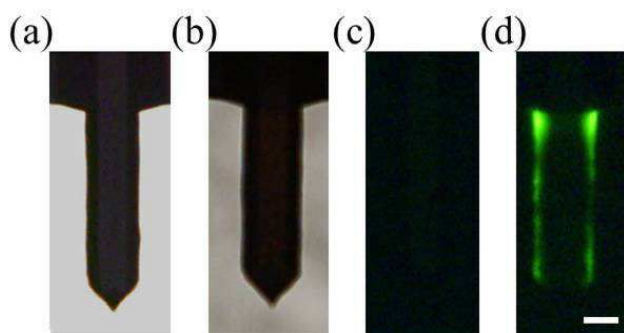
- [0088] 하기 도 4에 나타나 있는 바와 같이, SSNO의 정규화된 공진 주파수 이동은 Ag^+ 농도 쪽으로의 고감도 경향을 보인다. 정규화된 공진 주파수 이동과 10 pM 내지 10 사이의 은 이온의 농도 사이에서 하향 경향이 얻어졌다. 표준편차의 감량(decrement)(10 μ M 내지 10 pM)은 SSNO와 표적이온 사이의 반응이 고농도에서 활발하게 일어난다는 것을 나타낸다.
- [0089] 여기에서, SSNO의 검출한계(limit of detection, LOD)는 대조 샘플(0 nM = 0.045 ± 0.127)의 공진이동 보다 10 배 더 큰 1 nM(0.642 ± 0.072 , $\omega_s \pm$ 표준편차) 이하이다. 특히, SSNO 감지 메커니즘의 검출한계는 형광탐침(fluorescence probe)(10 nM)[A. Ono, S. Cao, H. Togashi, M. Tashiro, T. Fujimoto, T. Machinami, S. Oda, Y. Miyake, I. Okamoto, Y. Tanaka, Chemical Communications, 2008], 그래핀-기반 탐침(20 nM)[Y. Wen, F. Xing, S. He, S. Song, L. Wang, Y. Long, D. Li, C. Fan, Chemical Communications, 2010, 46, 2596-2598] 및 금속 나노입자(5 nM)[G. D. Huy, M. Zhang, P. Zuo, B.-C. Ye, Analyst, 2011, 136, 3289-3294]를 사용하는 이전 논문에서 공개된 기술들의 감도보다 더 나은 감도를 갖는 1 nM 내지 10 pM 사이이다.
- [0090] 본 발명에 따른 SSNO가 Ag^+ 를 선택적으로 검출할 수 있다는 것을 확인하기 위하여 Li^+ , Zn^{2+} , Fe^{3+} 및 Na^+ 등과 같은 대표적인 4 가지 금속이온을 이용하여 은 이온(100 nM)과 동일한 농도로 하여 실험을 수행하였다. 또한, 이들 4가지의 금속염들은 대표적인 1가, 2가 및 3가 이온들이다.
- [0091] 하기 도 5에 나타나 있는 바와 같이, Zn^{2+} 및 Fe^{3+} 등과 같은 일부 다른 간접 금속이온에 대해서 반응성을 나타내는 하나, Ag^+ (녹색 막대)는 뚜렷하게 다른 금속 이온(청색 막대들) 중에서도 쉽게 구분될 수 있는 것으로 보아 은 이온에 대한 선택성이 우수함을 알 수 있다.
- [0092] 또한, 본 발명에 따른 SSNO를 이용하여 실제의 상수도에서 은 이온 검출을 수행하였다. 하기 도 6은 대조 상수도(blank tap water, 녹색 사각형, 도 6a) 및 Ag^+ 용해 상수도(청색 사각형, 도 6a)에서의 시토신으로 구성된 뉴클레오티드 결합 상태 및 은 결합 상태에 대한 공진 주파수를 비교하고 있다.
- [0093] 실제 상수도에서도 오차범위 이하인 공진 주파수 감량이 약간(약 0.13 kHz) 일어나고 있다. 반면에, 은 이온이 용해된 상수도에서는, 공진 주파수가 명백하게 감소함(약 4.05 kHz)을 알 수 있다(도 6b). 이로부터 명백하게 본 발명에 따른 SSNO가 다른 간접적인 금속이온들과 혼재되어 있어도 Ag^+ 를 선택적으로 검출할 수 있음을 알 수 있다.
- [0094] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 샌드위치 방법과 함께 은-특이성 뉴클레오티드로 코팅된 오실레이터(SSNO)를 통하여 대표적인 나노-독성 재료인 은 이온을 민감하게 선택적으로 검출할 수 있다.
- [0095] 특히, SSNO의 유효성은 탭핑 모드 원자력 현미경을 사용한 표면 분석에 의해 관측되었으며, 공진 오실레이터가 이전에 검출방법과 비교하여도 최소 농도인 1 nM 이하의 Ag^+ 를 포획하는 것도 가능하여 민감도 역시 우수함을 알 수 있다. 심지어 실제 상수도에서조차도 다른 간접 이온들 중에서 선택성을 갖는다는 것은 매우 주목할 만하다.

도면

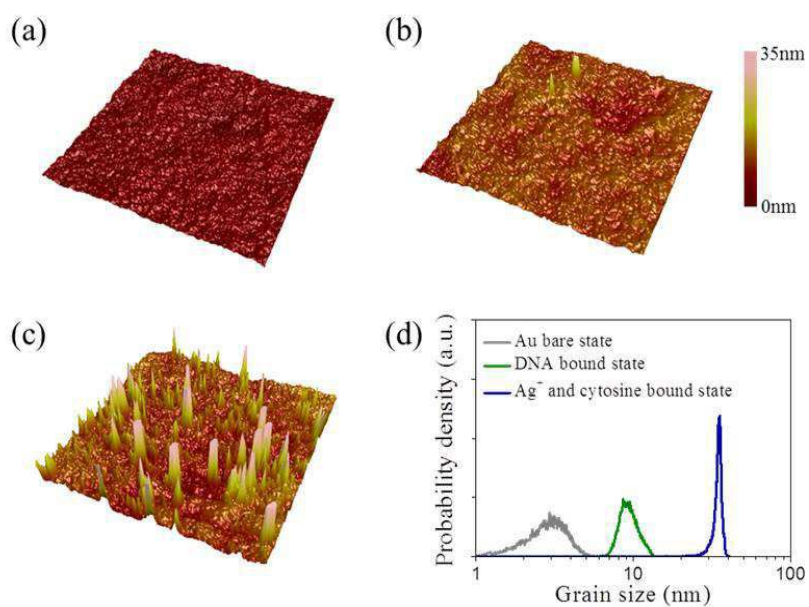
도면1



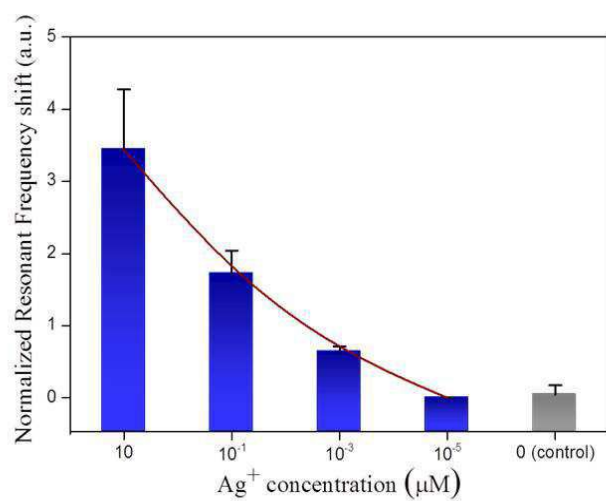
도면2



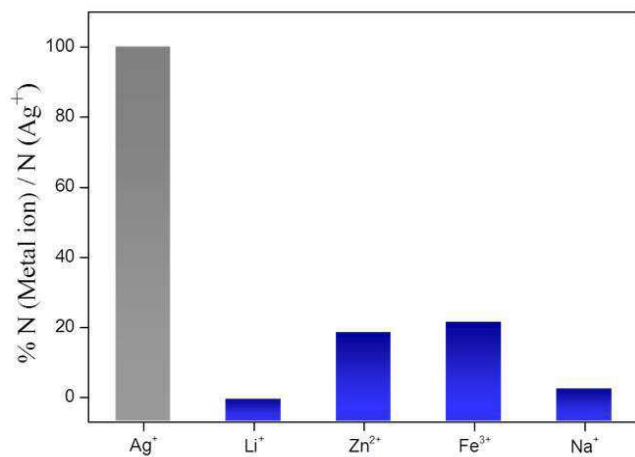
도면3



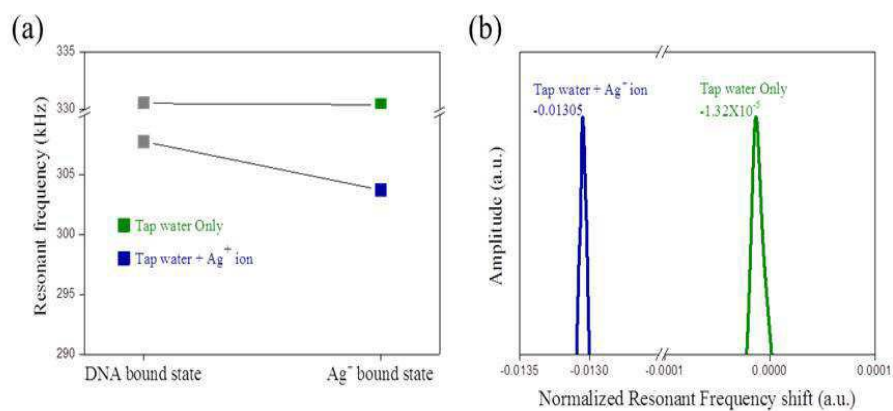
도면4



도면5



도면6



도면7

