(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0022375
(43) 공개일자 2019년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/487 (2006.01) *B01L 3/00* (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01) *G01N 21/552* (2014.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/48721 (2013.01)
B01L 3/502753 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0097998
(22) 출원일자 2018년08월22일
심사청구일자 2018년08월22일
(30) 우선권주장
1020170106303 2017년08월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
강태욱
서울특별시 마포구 창전로 45, 103동 1502호
리 루우크 피.
미국, 캘리포니아 94720, 버클리, 캘리포니아 대학교, 버클리 스탠리홀 408
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최우성

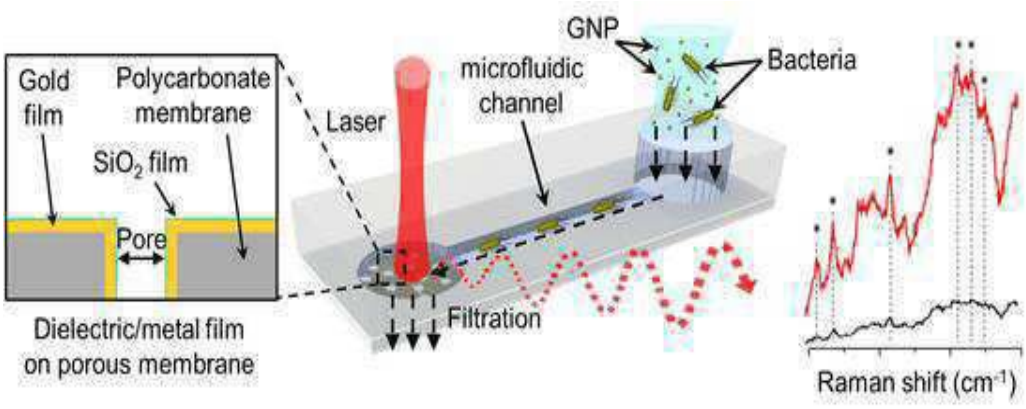
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **병원체의 효과적 농축 및 초고속 표면증강라만산란 검출이 통합된 장치 및 방법**

(57) 요 약

다공성 구조체, 상기 다공성 구조체 표면에 형성된 금속 막 및 상기 금속 막 상에 형성된 유전체 막을 포함하는 병원체 농축 및 검출부를 포함하고, 상기 병원체 농축 및 검출부에 제공된 금속 나노 입자가 부착된 병원체를 표면증강라만산란 신호로 초고속으로 검출하는 병원체 농축 및 검출 장치와 이를 이용하여 병원체를 효과적으로 농축하고 초고속으로 검출하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
B01L 3/502761 (2013.01)
G01N 15/1484 (2013.01)
G01N 21/554 (2013.01)
B01L 2200/0652 (2013.01)
B01L 2200/10 (2013.01)
G01N 2015/149 (2013.01)
(72) 발명자
이종환
미국, 캘리포니아 94706, 알바니, 555 피어스 스트리트, 아파트 739
황금래
서울특별시 강서구 강서로20길 25, 403호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711041003
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 국가간협력기반조성
연구과제명 2차원 나노광학안테나기반 수인성 병원균 초고속 정밀검출 플랫폼개발
기 여 율 25/100
주관기관 서강대학교
연구기간 2016.07.01 ~ 2017.06.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711048837
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기후변화대응기술개발
연구과제명 생물전기화학시스템 및 라만분광법 기반 신개념 고성능 CO 전환 균주 스크리닝 및 C1가스 바이오리파이너리 기술개발
기 여 율 25/100
주관기관 부산대학교
연구기간 2017.03.01 ~ 2017.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711053974
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(미래부)
연구과제명 프로그래밍 기법을 이용한 자기조립체 기반 차세대 플라스모닉 복합 나노구조체 개발 및 응용
기 여 율 25/100
주관기관 서강대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345259503
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 바이오융합기술연구소
기 여 율 25/100
주관기관 서강대학교
연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

다공성 구조체; 상기 다공성 구조체 표면에 형성된 금속 막; 및 상기 금속 막 상에 형성된 유전체 막;을 포함하는 병원체 농축 및 검출부를 포함하는 병원체 농축 및 검출 장치이고,

상기 병원체 농축 및 검출부에 제공된 금속 나노 입자가 부착된 병원체를 표면증강라만산란 신호로 검출하는 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

금속 나노 입자가 병원체에 정전기적 인력 및 수소 결합 중 하나 이상에 의하여 부착된 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 장치는 금속 나노 입자가 부착된 병원체를 병원체 농축 및 검출부에 제공하는 마이크로 플루이드 채널을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 장치는 마이크로 플루이드 채널에 연결된 병원체 저장부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 병원체 저장부는 금속 나노 입자를 함유하는 용액을 포함하는 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

다공성 구조체는 다공성 폴리카보네이트 멤브레인인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

금속 막의 금속은 금, 은, 구리로 이루어지는 그룹에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 병원체 농축

및 검출 장치.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 유전체 막은 SiO_2 막인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 병원체에 부착된 금속 나노 입자는 금, 은, 팔라듐, 구리, 알루미늄으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 금속 또는 둘 이상의 금속의 합금인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 병원체에 부착된 금속 나노 입자 사이즈는 100nm 이하인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 금속 나노 입자는 양전하를 띠도록 표면 처리된 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 병원체는 박테리아인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 박테리아는 E. Coli 또는 Pseudomonas인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 14

제 1 항에 있어서,

기공 사이즈는 100nm 이상이고,

금속 막 두께는 100nm 이하이며,

유전체 막 두께는 5nm 이하인 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 장치.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 장치를 이용하여 병원체를 농축 및 검출하는 방법으로서,

병원체에 금속 나노 입자를 부착하는 단계;

상기 금속 나노 입자가 부착된 병원체를 병원체 농축 및 검출부에 제공하여 여과하는 단계; 및

상기 병원체 농축 및 검출부에 레이저를 조사하여 표면증강라만산란 신호로부터 병원체를 검출하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

병원체와 정전기적 인력 및 수소 결합 중 하나 이상이 작용하는 금속 나노 입자 함유 용액에 병원체를 제공하는 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 방법.

청구항 17

제 15 항에 있어서,

상기 병원체를 검출하는 단계는 검출된 병원체의 농도를 정량화 하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 병원체 농축 및 검출 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 명세서는 병원체 박테리아의 효과적인 농축(enrichment)을 가능케 하면서 또한 표면증강라만산란(Surface-enhanced Raman Scattering, SERS)을 이용하여 병원체 박테리아를 초고속으로 검출할 수 있는 장치 및 방법에 관한 것이다.

[0002] 보다 상세하게는, 예컨대 수인성 병원균이나 식중독균 등과 같은 박테리아를 효과적으로 농축하고 또한 광학적인 방법을 통해 초고속으로 검출할 수 있는 통합 플랫폼으로서 역할을 수행할 수 있는 장치 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 박테리아의 신속검출법(rapid method) 으로서 예컨대 직접형광항체법, ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) 등이 흔히 사용되고 있으며, DNA hybridization과 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 이용한 유전자 검출 방법도 이용되고 있다.

[0004] 이중 PCR 방법이나 DNA 프로브를 이용한 방법은 유해 미생물의 유전자를 직접 검출하는 방법으로 특이적이며 신뢰성이 높은 검출 방법으로 알려져 있다. 그러나 숙련된 기술과 고가의 장비가 필요하므로 적용에 많은 어려움이 있다.

[0005] 한편, 형광(fluorescence; FL) 또는 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance; SPR)을 기초로 한 바이오센서도 병원균 검출을 위해 개발되고 있으나, 신뢰성 및 특이성, 고속 특성에 있어서 여전히 개발의 여지가 크다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국특허출원공개 제2017-36630호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 일측면에서, 높은 신뢰성 및 특이성, 민감도를 가지면서, 효과적으로 병원체를 농축하고 표면증강라만신호로부터 초고속으로 병원체를 검출할 수 있는 병원체의 농축 및 검출 장치 및 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 병원체의 농축과 검출이 동시에 가능한 통합 플랫폼으로서, 다공성 구조체; 상기 다공성 구조체 표면에 형성된 금속(metal) 막; 상기 금속 막 상에 형성된 유전체(dielectric material) 막;을 포함하는 병원체 농축 및 검출부를 포함하는 병원체 농축 및 검출 장치이고, 상기 병원체 농축 및 검출부에 제공된 금속 나노 입자가 부착된 병원체를 표면증강라만산란 신호로 검출하는 초고속 병원체 농축 및 검출 장치를 제공한다.

[0009] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 또한, 상기 장치를 이용하여 병원체를 농축 및 검출하는 방법으로서, 병원체에 금속 나노 입자를 부착하는 단계; 상기 금속 나노 입자가 부착된 병원체를 장치의 병원체 농축 및 검출부에 제공하는 단계; 및 상기 병원체 농축 및 검출부에 레이저를 조사하여 표면증강라만산란 신호로부터 병원체를 검출하는 단계;를 포함하는 초고속 병원체 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 예시적인 구현예들에 따르면, 높은 신뢰성과 특이성을 가지면서 초고속으로 병원체를 검출할 수 있다. 즉, 병원체는 일반적으로 큰 용액에 작은 농도로 분산되어 있기 때문에 많은 양을 처리해야 검출 결과의 신뢰성이 보장된다. 본 발명의 예시적인 구현예들에서는 효과적인 농축과 표면증강라만산란을 이용한 초고속 검출이 가능한 통합 플랫폼을 사용하는 것으로서, 검출 전 여과를 통해 많은 양의 병원체 용액을 검출부에 농축시키기 때문에 신뢰성이 높다.

[0011] 또한, 본 발명의 예시적인 구현예들에 의하면, 병원체 표면에 금속 나노입자를 부착하는 단계와, 여과를 통해 병원체를 농축시키는 단계(금속 나노 입자가 부착된 병원체를 장치의 병원체 검출부에 제공하는 단계) 그리고 레이저를 조사하여 표면증강라만산란 신호를 확보하는 단계가 각각 오래 걸리는 과정이 아니고, 전체적으로 매우 빠른 시간 예컨대 총 10분도 소요되지 않는 시간 내에 초고속 검출이 가능하다고 할 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 예시적인 구현예들에 의하면, 분자의 고유 신호를 측정한다는 표면증강라만산란 검출법을 채용하므로 특이성을 가진다. 아울러, 이러한 장점들 외에도 본 발명의 예시적인 구현예들에 의하면, 검출의 민감도가 우수하다.

[0013] 본 발명의 예시적인 구현예들의 병원체 검출 장치 및 방법은 수인성 병원균 등을 포함하는 다양한 박테리아의 검출에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 예시적인 일 실시예에 있어서, 병원체 농축 및 검출 장치를 이용하여 병원체를 농축하고 표면증강라만신호로부터 검출하는 방법을 나타내는 개략도이다.

도 2는 본 발명의 예시적인 일 실시예에 있어서, 병원체 농축 및 검출 장치를 제조하기 위한 나노 기공 유전체막/금속막 제조 과정을 보여주는 개략도이다.

도 3은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 전자기장 증폭 효과를 알아보기 전산 모사 결과이다.

도 4는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 박테리아 및 각종 나노 입자의 표면 전하를 측정한 그래프이다.

도 5는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 금속 나노 입자를 대장균 표면에 붙인 후 측정한 투과전자현미경 이미지이다.

도 6은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 크기가 30 nm 그리고 50 nm인 GNP (HAHC)와 GNR 다수가 박테

리아 표면에 붙어있는 주사전자현미경 이미지이다.

도 7은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 나노 기공 유전체 막/금속막의 주사 전사 현미경 사진이다.

도 8은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 나노 기공 유전체 막/금속막에 금속 나노 입자가 부착된 대장균이 올라간 모습을 보여주는 주사전자현미경 이미지이다.

도 9는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 대장균, 금속 나노 입자 및 금속 나노 입자가 부착된 대장균의 흡광도 스펙트럼이다.

도 10는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 금속막 위에 유전체 막으로서 증착된 SiO_2 막의 두께에 따른 나노기공 유전체 막/금속막의 반사 스페트럼이다.

도 11는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 나노 기공 금속 막 위에 다양한 두께의 SiO_2 막을 증착하여 에너지분산형 스펙트럼(energy dispersive spectrum)을 측정한 결과이다.

도 12은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 나노 기공 유전체 막/금속막을 이용한 금속 나노 입자가 부착된 대장균의 농도별 라만 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 나노 기공 유전체 막/금속막을 이용한 금속 나노 입자가 부착된 대장균의 표면증강라만산란 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

도 14는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 금속 나노 입자가 부착된 대장균을 나노 기공 유전체/금속막이 도입된 미세유체시스템에 흘려준 후 막 위의 총 4개 지점에서 표면증강라만산란 신호를 측정한 결과를 나타낸다.

도 15는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 금속 나노 입자가 부착된 대장균을 나노 기공 유전체/금속막이 도입된 미세유체시스템에 흘려준 후 막 위의 총 4개 지점에서 표면증강라만산란 신호를 측정한 결과를 내부 기준(PMMA, 미세유체시스템 구성 물질)으로 정규화한(normalized) 그래프를 나타낸다.

도 16은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 나노 기공 유전체 막/금속막을 이용한 대장균 및 녹농균 라만 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

도 17는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 사용한 마이크로 플루이드 채널을 보여주는 예시적인 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명의 예시적인 구현예들을 상세히 설명한다.

[0016] 본 명세서에서 나노란 1000nm 이하를 의미한다.

[0017] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는 미량 존재하는 병원균 예컨대 수계에 존재하는 수인성 병원균이나 식중독균과 같은 박테리아를 유전체 막 및 금속 박막을 가지는 다공성 구조체를 이용하여 농축 및 트랩하고, 박테리아에 금속 나노 입자를 부착하여, 박테리아 표면에 붙어 있는 금속 나노 입자와 다공성 구조체의 금속 박막 사이 및 금속 나노 입자 상호간의 사이에서 강한 전자기장 증폭이 일어나도록 한다.

[0018] 박테리아와 같은 병원체 표면 분자는 약한 라만 신호를 보이지만, 전술한 방법에 의하여 약한 신호인 병원체 표면 분자의 라만 신호를 증폭할 수 있으며, 이와 같이 증폭된 라만 신호의 위치를 분석하여 병원체를 검출할 수 있다. 이에 따라 높은 신뢰도와 특이성, 민감성을 가지고 초고속으로 병원체를 검출할 수 있다.

[0019] 구체적으로, 본 발명의 예시적인 구현예들에 따른 초고속 병원체 농축 및 검출 장치는, 다공성 구조체; 상기 다공성 구조체 표면에 형성된 금속 막; 및 상기 금속 막 상에 형성된 유전체 막;을 포함하는 병원체 농축 및 검출부를 포함하는 병원체 농축 및 검출 장치이다. 상기 병원체 농축 및 검출 장치에서는 병원체 농축 및 검출부의 구조체 표면과 특히 기공에 농축 및 트랩된 금속 나노 입자가 부착된 병원체를 표면증강라만산란 신호로 검출한다.

[0020] 예시적인 일 구현예에서, 병원체에 상기 병원체와 정전기적 인력 및/또는 수소 결합이 작용하는 금속 나노 입자를 정전기적 인력 및/또는 수소 결합을 통하여 부착할 수 있다.

[0021] 상술하면, 금속 나노 입자의 표면 분자와 병원체인 박테리아의 표면 물질(인지질, 단백질 등) 사이에서 정전기적 인력 및/또는 수소 결합이 작용한다.

[0022] 예를 들어, 그람 음성 박테리아(gram-negative bacteria)의 경우 박테리아의 표면에 존재하는 지질 A(lipid A)라는 물질이 음전하를 가지기 때문에 금속 나노 입자의 표면에 양전하를 띠는 물질이 붙어있다면 정전기적 인력이 작용한다.

[0023] 한편, 수소 결합의 경우에는, 지질 A(lipid A)와 일부 표면 단백질들이 수소 결합이 가능한 분자 결합을 가지고 있기 때문에, 마찬가지로, 수소 결합이 가능한 물질이 금속 나노 입자 표면에 있으면 수소 결합이 작용하게 된다.

[0024] 예시적인 일 구현예에서, 금속 나노 입자는 다공성 구조체 표면에 형성되는 금속 막의 금속과 동일한 금속일 수도 있지만, 동일한 금속이 아니어도 되고, 또한 합금이어도 무방하다.

[0025] 비제한적인 예시에서, 이러한 금속 나노 입자로 사용 가능한 금속은 예컨대 금, 은, 팔라듐, 구리, 알루미늄 등이 있으며, 금속의 합금도 사용할 수 있다.

[0026] 또한, 비제한적인 예시에서, 금속 나노 입자의 사이즈는 100 nm 이하일 수 있다.

[0027] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 입자는 병원체에 정전기적 인력 또는 수소 결합을 통해 부착하기 위하여 표면 처리될 수 있다. 예컨대, 금속 나노 입자는 양전하를 띠도록 표면 처리된 것일 수 있다.

[0028] 예시적인 일 구현예에서, 상기 장치는 금속 나노 입자가 부착된 병원체를 상기 병원체 농축 및 검출부에 제공하는 마이크로 플루이드 채널을 더 포함할 수 있다. 마이크로 플루이드 채널을 사용하게 되면, 다량의 샘플을 빠르게 처리할 수 있다. 비제한적인 예시에서, 마이크로 플루이드 채널은 예컨대 도 17에 도시된 바와 같은 사이즈로 구현할 수 있다.

[0029] 예시적인 일 구현예에서, 상기 장치는 상기 마이크로 플루이드 채널에 연결된 병원체 저장부를 더 포함할 수 있다. 상기 병원체 저장부는 금속 나노 입자를 함유하는 용액을 포함할 수 있다. 병원체를 포함하는 시료를 용액에 집어 넣는 방식으로 금속 나노 입자를 병원체에 부착한다.

[0030] 도 1은 본 발명의 예시적인 일 구현예에 있어서, 병원체 농축 및 검출 장치를 이용하여 병원체를 농축하고 검출하는 방법을 나타내는 개략도이다.

[0031] 도 1에 도시된 바와 같이, 금속 나노 입자 용액에 각종 박테리아 등의 병원체를 제공하여 병원체에 금속 나노 입자를 부착한다. 이어서, 마이크로 플루이드 채널(microfluidic channel)을 통해 금속 나노 입자가 부착된 병원체가 병원체 농축 및 검출부로 제공된다.

[0032] 병원체 농축 및 검출부는 나노 기공을 가지는 다공성 구조체; 상기 다공성 구조체 표면에 형성된 금속 막; 및 상기 금속 막 상에 형성된 유전체 막;을 포함한다.

[0033] 상기 병원체 농축 및 검출부는 다공성 구조체를 가지므로 병원체를 효과적으로 농축시킬 뿐만 아니라, 강한 전자기장 증폭을 위해 다공성 구조체의 금속 박막 및 금속 나노 입자 간을 자가 배열시키는 역할을 수행한다. 여기서, 자가 배열이란 배열을 시키기 위해 별도로 가해주는 외부 힘 없이 해당 구성 요소들이 특정 배턴으로 배열되거나 구조체를 형성할 수 있는 것을 말한다.

[0034] 한편, 유전체 막은 금속 나노입자와 금속 막 사이에, 서로의 전자가 통하지 않는 작은 공간을 제공함으로써 사이에 전자기장을 증폭시키는 역할을 한다. 금속 나노입자의 전자 진동(표면플라즈몬)과 금속 막의 전자 진동에 의해 금속 나노입자와 금속 막의 전자가 좁은 공간 안에 모임으로써 전자기장 증폭 효과가 나타난다. 이 사이 공간이 작을수록 좋지만 없을 경우에는 금속 나노입자와 금속 막 사이에 전도가 일어나서 전자가 더 이상 진동하지 않게 되어 전자기장 증폭 효과가 사라지게 된다.

[0035] 상기 병원체 농축 및 검출부에 레이저를 조사하여 나노 기공에 농축/트랩된 금속 나노 입자가 부착된 병원체 박테리아를 표면증강라만산란 신호로 검출할 수 있다.

[0036] 한편, 병원체 박테리아는 금속 나노 입자 용액(도 1에서와 같이 GNP 등 용액)에 담그기만 하면 되며, 별도의 교반 과정을 필요로 하지 않는다.

[0037] 금속 나노 입자 용액에 담긴 병원체 박테리아를 마이크로 플루이드 채널을 통하여 병원체 농축 및 검출부로 보낼 수 있다.

[0038] 상기 병원체 농축 및 검출부에는 다공성 구조체가 있고, 이 다공성 구조체의 구멍 크기는 병원체보다 작기 때문에 용액을 흘려주는 과정에서 병원체는 모두 다공성 구조체(즉, 병원균 농축 및 검출부의 다공성 구조체) 상에

남게 됨으로써, 여과(filtration) 된다.

[0039] 예시적인 일 구현예에서, 다공성 구조체는 다공성 멤브레인이다. 비제한적인 예시에서, 상기 다공성 멤브레인은 다공성 폴리카보네이트 멤브레인일 수 있다.

[0040] 예시적인 일 구현예에서, 다공성 구조체의 표면 상에 형성되는 금속 막(필름)은 특히 한정되지 않지만, 예컨대 금, 은, 구리 등이 사용될 수 있다.

[0041] 예시적인 일 구현예에서, 상기 유전체 막은 예컨대 SiO_2 막을 사용할 수 있다.

[0042] 예시적인 일 구현예에서, 검출 대상인 병원체는 각종 박테리아일 수 있다. 예컨대 E. Coli, Pseudomonas 등일 수 있다.

[0043] 예시적인 일 구현예에서, 기공 사이즈는 100nm 이상일 수 있고, 금속 막 두께는 100nm 이내일 수 있으며, 유전체 막 두께는 5nm 이내일 수 있다. 유전체 막의 두께가 두꺼울수록 전자기장 증폭 효과가 급격히 감소하기 때문에 유전체 막이 5 nm를 초과하는 경우 증폭 효과가 크지 않을 수 있다.

[0044] 한편, 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 상기 장치를 이용하여 병원체를 농축하고 초고속으로 검출하는 방법으로서, 병원체에 금속 나노 입자를 부착하는 단계; 상기 금속 나노 입자가 부착된 병원체를 병원체 농축 및 검출부 특히 나노 기공에 제공하여 농축 및 트랩되도록 하는 단계; 및 상기 나노 기공을 포함하는 병원체 농축 및 검출부에 레이저를 조사하여 표면증강라만산란 신호로부터 병원체를 검출하는 단계;를 포함하는 초고속 병원체 농축 및 검출 방법을 제공한다.

[0045] 예시적인 구현예에서, 상기 병원체를 검출하는 단계는 검출된 병원체의 농도를 정량화 하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 표면증강라만산란 신호로부터 병원체를 검출한 결과를 일정한 기준으로, 예컨대 내부 기준(PMMA, 미세유체시스템 구성 물질)으로 정규화 하는 것을 포함할 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명의 예시적인 구현예들에 따른 구체적인 실시예를 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며 첨부된 특허청구범위 내에서 다양한 형태의 실시예들이 구현될 수 있고, 단지 하기 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 함과 동시에 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 실시를 용이하게 하고자 하는 것임이 이해될 것이다.

[0048] [실시예]

[0049] 도 2는 본 발명의 예시적인 일 실시예에 있어서, 병원체 농축 및 검출 장치를 제조하기 위한 나노 기공 유전체/금속막 제조 과정을 보여주는 개략도이다.

[0050] 도 2에 도시된 바와 같이, 먼저 다공성 멤브레인을 준비한다. 다공성 멤브레인으로서 본 실시예에서는 폴리카보네이트 멤브레인을 사용하였다. 이 멤브레인에서 평균적인 기공 사이즈는 약 400nm이었다.

[0051] 다음으로, 금속 (예컨대 금)을 다공성 멤브레인의 표면(기공 내측 표면에는 금속 막이 형성되지 않아도 무방하다)에 증착하여 금속 막을 형성한다. 본 실시예에서는 금속 막을 약 80nm로 형성하였다.

[0052] 이어서, 금속 막 상에 유전체 막을 얇게 형성하였다(마찬가지로, 기공 내측 표면에는 유전체막이 형성되지 않아도 무방하다). 본 실시예에서는 유전체 막을 약 0.5nm로 형성하였다.

[0053] 금속막이나 유전체 막은 PVD를 사용하여 증착하였다.

[0054] 관련하여, 전술한 바와 같이, 기공 내측에 금속막이나 유전체막이 형성되지 않아도 무방한데, 예컨대 금속 막을 80 nm, 유전체막을 0.5 nm를 증착시킨 경우에 기공의 크기가 3 nm 가량 감소하였다. 따라서, 기공 내측에는 거의 금속막이나 유전체막이 형성되지 않았다고 할 수 있다.

[0055] 한편, 전자기장 증폭 효과를 알아보기 전산 모사를 시행하였다. 도 3은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 전자기장 증폭 효과를 알아보기 전산 모사 결과이다.

[0056] 도 3에서 가장 위 그림은 나노 기공과 유전체 막이 없는 경우이고, 중간 부분 그림은 유전체 막은 있지만, 나노 기공이 없는 경우이고, 맨 아래 부분 그림은 나노 기공과 유전체 막이 모두 있는 경우이다.

[0057] 도 3은 전자기장 증폭 효과에 금속/유전체 막의 영향과 나노 기공의 영향을 보여주는 것으로서, 둘의 복합적인 영향으로 인해 본 발명의 예시적인 구현예들에 따른 병원균 농축 및 검출부에서 전자기장 증폭 효과가 강하다는

것을 보여준다. 강한 전자기장 증폭 효과로 인해 저농도의 경우에도 병원체 검출이 가능하게 된다.

[0058] 한편, 박테리아나 각종 나노 입자를 부착하였다.

[0059] 구체적으로, 금속 나노 입자로서 GNR, GNP(HAHA), GNP(citrate)를 준비하였다. GNR의 경우, 밑면 원의 반지름이 약 5 nm 정도이고, 길이는 약 40 nm이다. GNP(HAHC)와 GNP(citrate)의 경우 지름이 약 20 nm이다.

[0060] 상기 각 금속 나노 입자 수용액(수용액중 금속 나노 입자의 농도는 약 10^{10}-10^{11}개/ml)이 담긴 용기를 준비하였다. 용기는 예컨대, 1.5 ml 크기의 튜브일 수 있다. 또한, 예컨대 5 ml나 10 ml vial을 사용할 수 있으며, 용기 사이즈는 나노 입자가 섞이기에 용기가 너무 크지만 않으면 된다.

[0061] 나노입자 용액 0.9 ml에 0.1 ml의 박테리아를 넣었다. 또한, 비율을 고정한 채 각각 2배로도 실험하였다.

[0062] 도 4는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 박테리아 및 각종 나노 입자의 표면 전하를 측정한 그래프이다. 도 5는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 금속 나노 입자를 대장균 표면에 붙인 후 측정한 투과전자현미경 이미지이다.

[0063] 도 4 및 5는 금속 나노 입자가 정전기적 인력 및 수소 결합으로 박테리아 표면에 부착한다는 것을 보여준다. 대장균과 표면전하가 반대인 GNR(막대형 금 나노입자 - 양전하를 띠는 물질인 CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide)로 표면 처리)과 약한 음전하를 띠는 GNP(HAHC; hydroxylamine Hydrochloride) (citrate로 표면 처리된 금 나노입자의 표면을 HAHC로 개질한 나노입자)의 경우에는 다수의 금속 나노입자가 박테리아 표면에 붙어 있다. 약한 음전하를 띠는 GNP(HAHC)의 경우에는 수소 결합에 의하여 붙는 것이다. 한편, 강한 음전하를 띠는 GNP(citrate)의 경우에는 적은 양의 금속 나노입자가 붙어 있다. 이는 전자현미경 샘플 처리과정 중 샘플을 말리는 과정에서 붙은 것으로 추정된다.

[0064] 도 6은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 크기가 30 nm 그리고 50 nm인 GNP (HAHC)와 GNR 다수가 박테리아 표면에 붙어있는 주사전자현미경 이미지이다. 이를 통하여 다양한 형태의 금속 나노입자가 박테리아 표면에 부착이 가능하다는 것을 확인할 수 있다.

[0065] 참고로, 거의 모든 박테리아는 표면 전하가 음전하를 가지기 때문에 박테리아는 별도로 처리를 필요로 하지 않는다. 정정전기적 인력을 위하여 금속 나노 입자를 양전하로 처리하면 된다. 예컨대, gram-negative bacteria나 gram-positive bacteria의 경우 (gram 분류법으로 대부분의 박테리아가 분류 가능하다. 이 분류는 표면 구조의 차이에 따라 나타나는 특성으로 분류하는 방법이다)에 각각 표면 구조에 큰 차이가 없다. 한편, 수소 결합을 하는 물질은 박테리아 표면에 굉장히 많이 존재한다. 그렇기 때문에 박테리아의 종류를 모르더라도 수소 결합이 작용하도록 하는 것 역시 가능하다.

[0066] 도 7은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 나노 기공 유전체 막/금속막의 주사 전사 현미경 사진이다.

[0067] 도 7은 금속/유전체 막이 형성되더라도 나노 기공에는 큰 변화가 없음을 보여주는 데이터이다.

[0068] 도 8은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 나노 기공 유전체 막/금속막에 금속 나노 입자가 부착된 대장균이 올라간 모습을 보여주는 주사전자현미경 이미지이다.

[0069] 도 8로부터 알 수 있듯이, 금속 나노입자가 박테리아 표면을 덮고 있다는 것을 보여준다.

[0070] 도 9은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 대장균, 금속 나노 입자 및 금속 나노 입자가 부착된 대장균의 흡광도 스펙트럼이다.

[0071] 도 9로부터 알 수 있듯이, 혼합 전 금속 나노입자의 흡광도 스펙트럼에서는 하나의 peak이 관찰되지만 섞어준 후의 용액의 스펙트럼에서는 근적외선 영역 (>700nm)에서 넓은 band가 나타난 것을 확인할 수 있다. 근적외선에서 존재하지 않던 band가 나타난 것을 금속 나노입자간 거리가 가까워졌다는 것을 의미하고, 박테리아 표면에 금속 나노입자가 붙었기 때문에 금속 나노입자간 거리가 가까워져서 일어난 현상이라고 추정할 수 있다. 이는 금속 나노입자가 박테리아 표면에 붙었음을 뒷받침하는 자료이다.

[0072] 도 10는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 금속막 위에 절연막으로서 증착된 SiO_2 막의 두께에 따른 나노기공 절연체 막/금속막의 반사 스펙트럼이다.

[0073] 도 10에서 알 수 있듯이, 금 막이 증착 되었기 때문에 검은색 스펙트럼의 형태가 나타나는 것이며 SiO_2 막이 반사율을 감소시키는 효과가 있는데, 이로 인해 SiO_2 막의 두께가 두꺼울수록 금 막의 반사 스펙트럼의 세기가 감

소한다. 이를 통해 금과 SiO_2 막이 증착되었음을 뒷받침하는 자료이다.

[0074] 또한, 도 11은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 나노 기공 금속 막 위에 다른 두께의 SiO_2막(절연체 막)을 증착한 뒤에 측정한 에너지분산형 스펙트럼(energy dispersive spectrum) 이미지이다. 이를 통해 두께를 달리하는 경우에도 SiO_2 막이 나노 기공 금속 막 위에 고르게 증착되어 있음을 확인할 수 있다.

[0075] 도 12은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 나노 기공 절연체 막/금속막을 이용한 금속 나노 입자가 부착된 대장균의 농도별 라만 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

[0076] 도 12은 본 실시예에서 대장균의 라만 신호가 측정됨을 보여준다.

[0077] 또한, 도 13는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 약 9분간 대장균 용액을 농도별로 금속 나노입자 용액과 섞어준 뒤 나노 기공 유전체/금속막이 도입된 미세유체시스템에 흘려준 후 표면증강라만산란을 통해서 검출한 결과를 나타내는 그래프이다. 이는 전체적으로 매우 빠른 시간 내에 고농도는 물론 저농도의 박테리아도 빠르게 검출할 수 있다는 것을 보여주는 결과이다.

[0078] 도 14는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 100 cells/ml 농도의 대장균 용액을 약 9분간 금속 나노입자 용액과 섞어준 뒤 나노 기공 유전체/금속막이 도입된 미세유체시스템에 흘려준 후 막 위의 총 4개 지점에서 표면증강라만산란 신호를 측정한 결과이다. 막 위의 4개 지점 모두에서 같은 표면증강라만산란 신호가 측정 되었으며, 이를 통해 본 발명에 따른 병원체 농축 및 검출 방법이 재현성이 우수하다는 것을 확인할 수 있다.

[0079] 도 15는 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 약 9분간 대장균 용액을 농도별로 금속 나노입자 용액과 섞어준 뒤 나노 기공 유전체/금속막이 도입된 미세유체시스템에 흘려준 후 표면증강라만산란을 통해서 검출한 결과를 내부 기준(PMMA, 미세유체시스템 구성 물질)으로 정규화한(normalized) 그래프를 나타낸다.

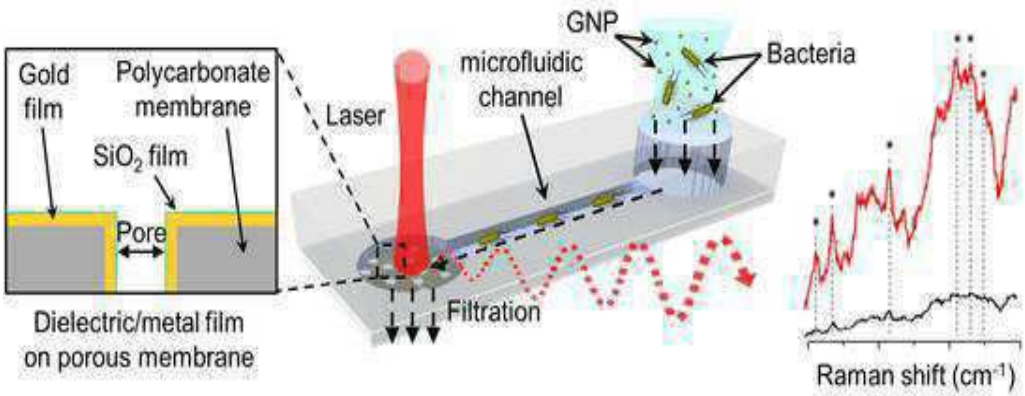
[0080] 도 15는 본 발명의 방법을 통해서 박테리아의 농도를 정량화할 수 있다는 것을 보여준다.

[0081] 도 16은 본 발명의 예시적인 일 실시예에서 있어서, 나노 기공 유전체 막/금속막을 이용한 대장균 및 녹농균 라만 측정 결과를 나타내는 그래프이다. 도 16의 실시예에서는 나노 기공 유전체 막/금속막에 대장균 대신 녹농균을 제공하고 측정 결과를 살펴본 것이다.

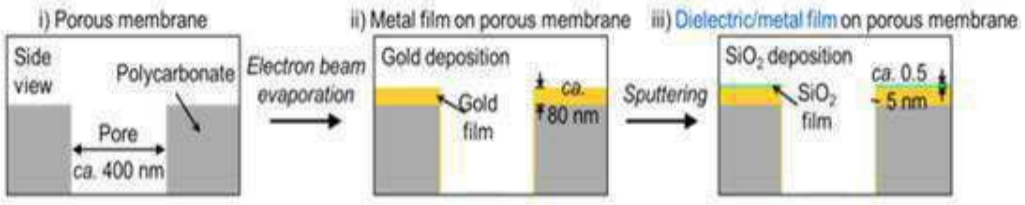
[0082] 도 16은 대장균뿐만 아니라 다른 병원체의 라만 신호 측정이 가능하다는 것을 보여준다.

도면

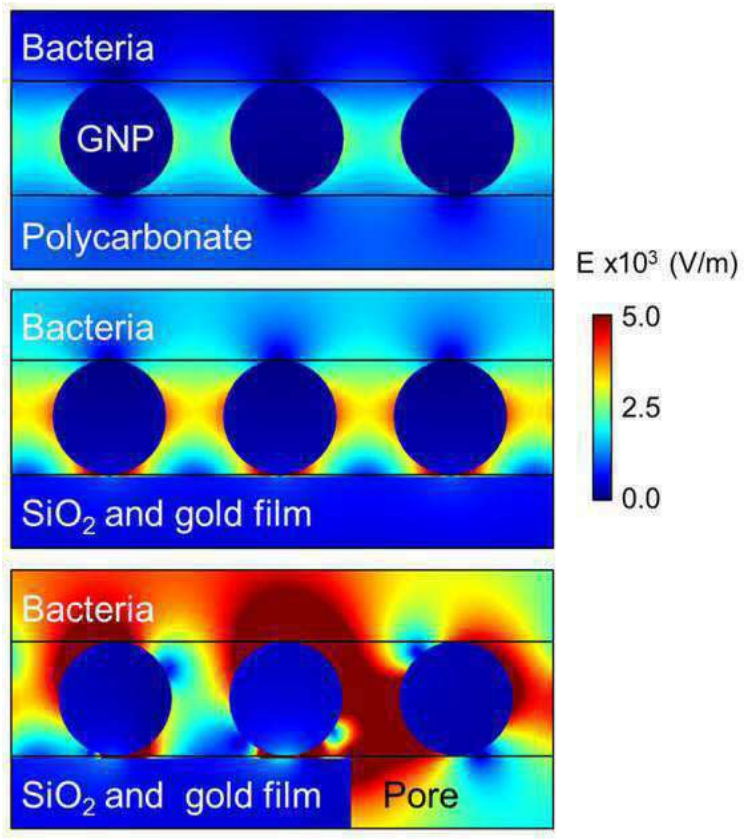
도면1



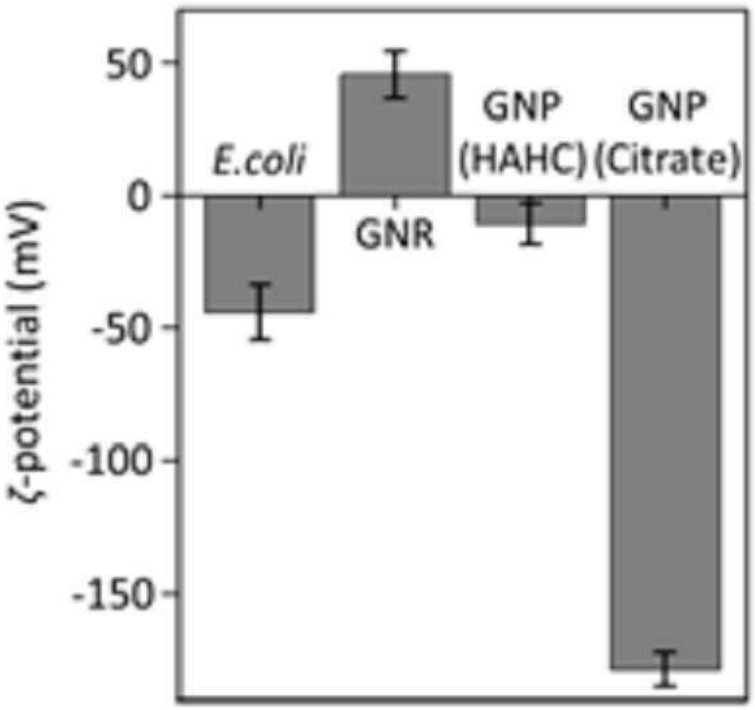
도면2


i) Porous membrane
Side view
Polycarbonate
Pore
ca. 400 nm
Electron beam evaporation
ii) Metal film on porous membrane
Gold deposition
Gold film
ca. 80 nm
Sputtering
iii) Dielectric/metal film on porous membrane
SiO2 deposition
SiO2 film
ca. 0.5 - 5 nm

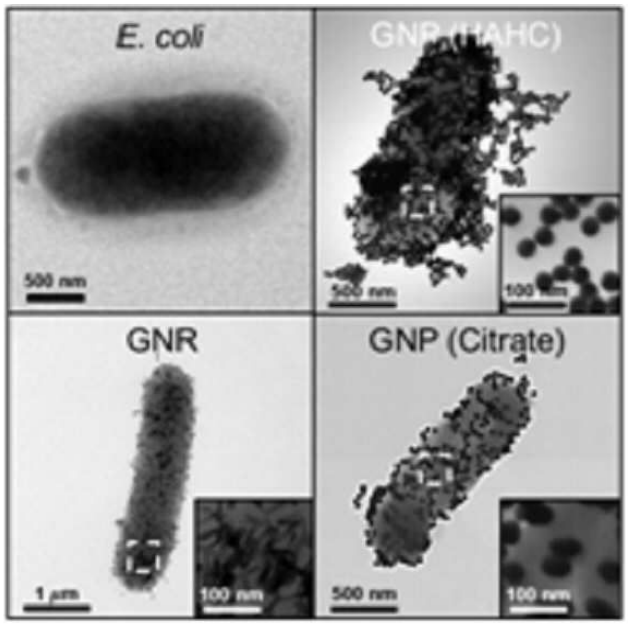
도면3


Bacteria
GNP
Polycarbonate
Bacteria
SiO2 and gold film
Bacteria
SiO2 and gold film
Pore
E x10³ (V/m)
5.0
2.5
0.0

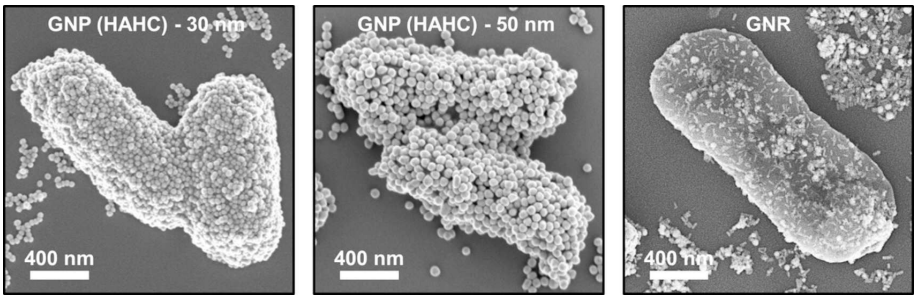
도면4


50
0
-50
-100
-150
ζ-potential (mV)
E.coli
GNR
GNP (HAHC)
GNP (Citrate)

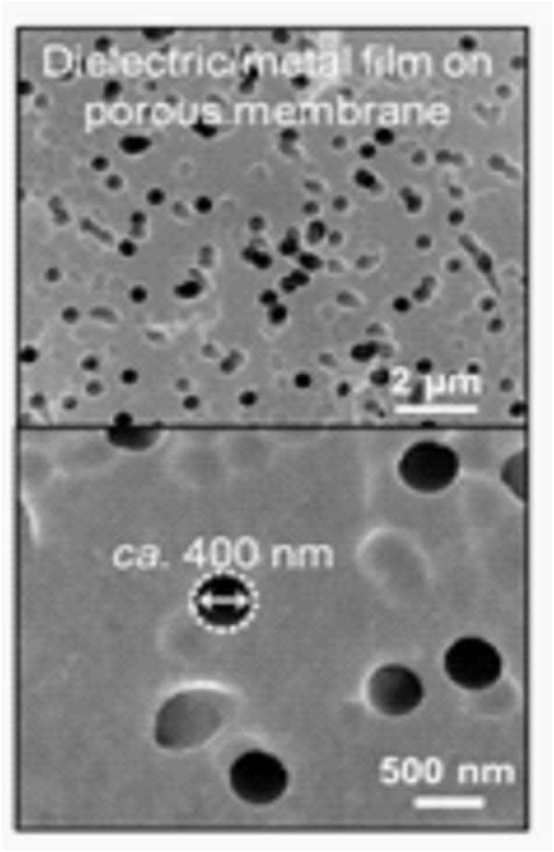
도면5


E. coli
500 nm
GNP (HAHC)
500 nm
100 nm
GNR
1 μm
100 nm
GNP (Citrate)
500 nm
100 nm

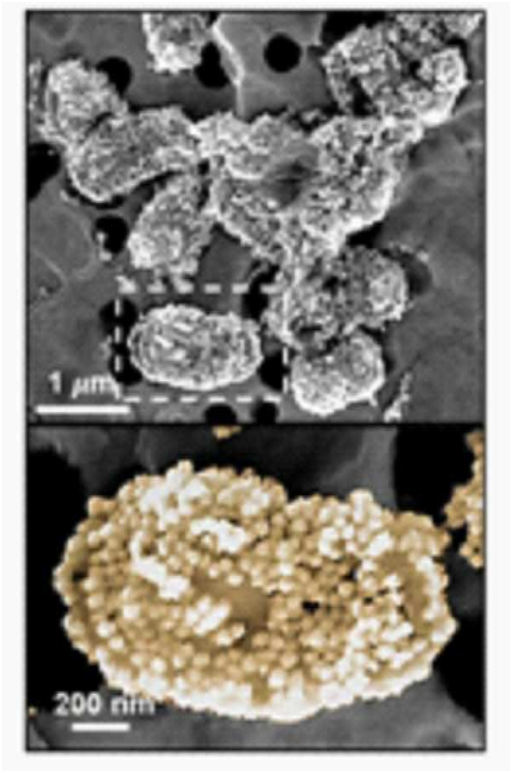
도면6


GNP (HAHC) - 30 nm
400 nm
GNP (HAHC) - 50 nm
400 nm
GNR
400 nm

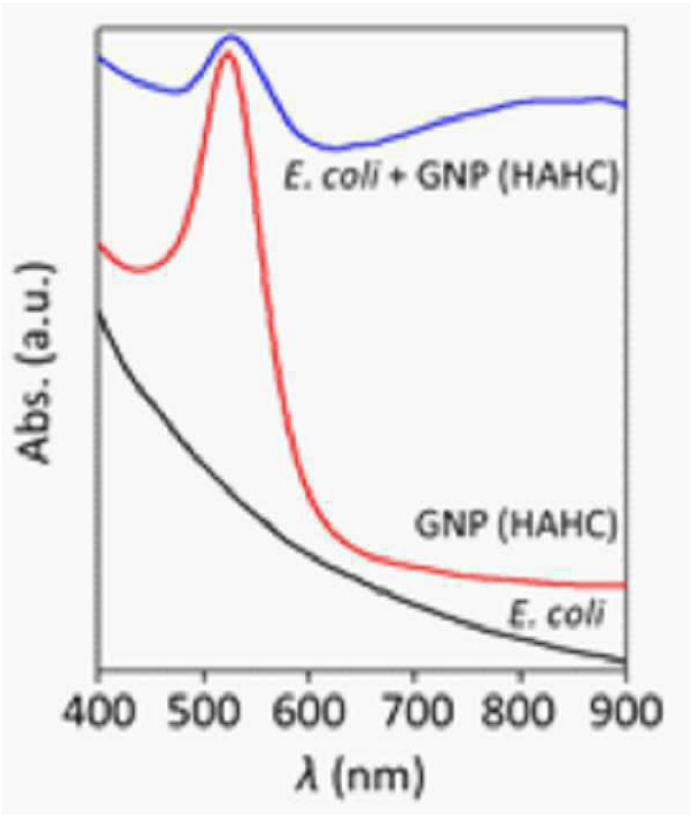
도면7


Dielectric metal film on
porous membrane
2 µm
ca. 400 nm
500 nm

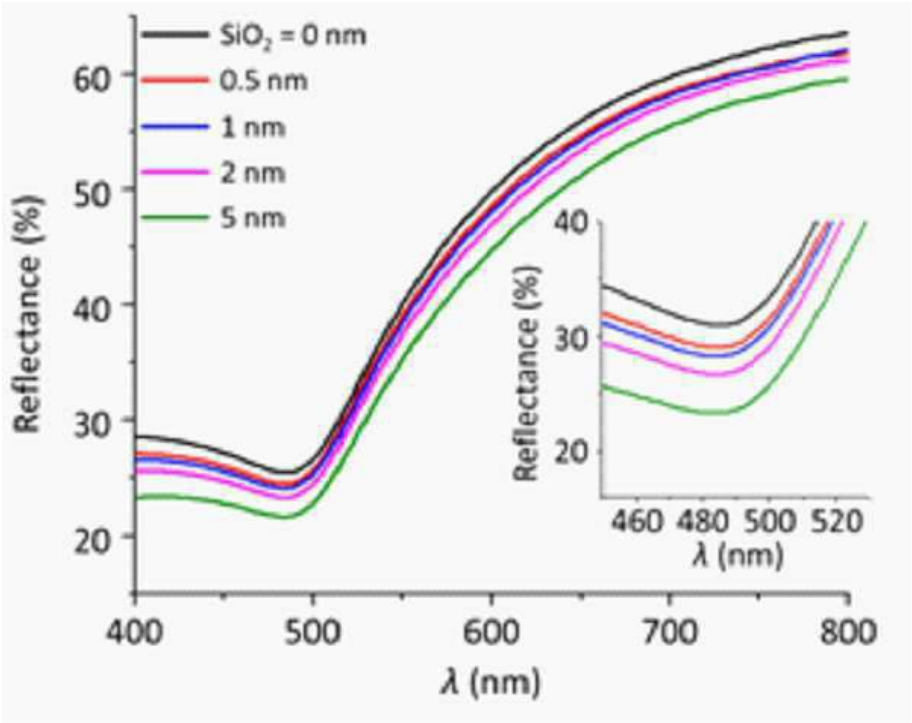
도면8


1 μm
200 nm

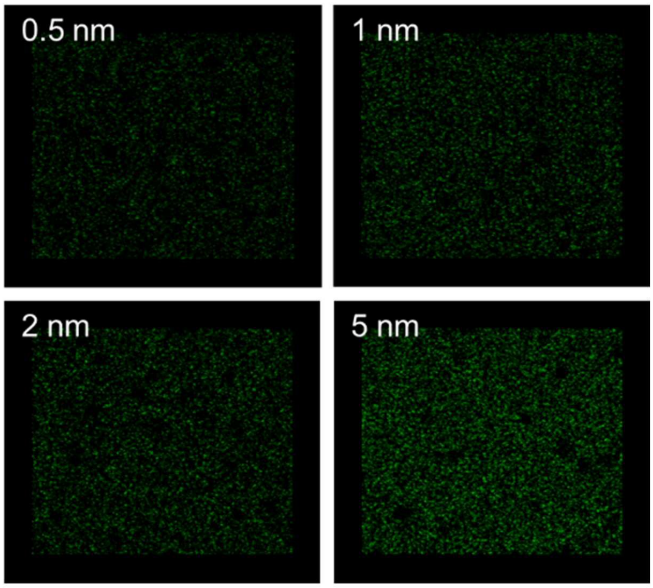
도면9


E. coli + GNP (HAHC)
GNP (HAHC)
E. coli
Abs. (a.u.)
400
500
600
700
800
900
λ (nm)

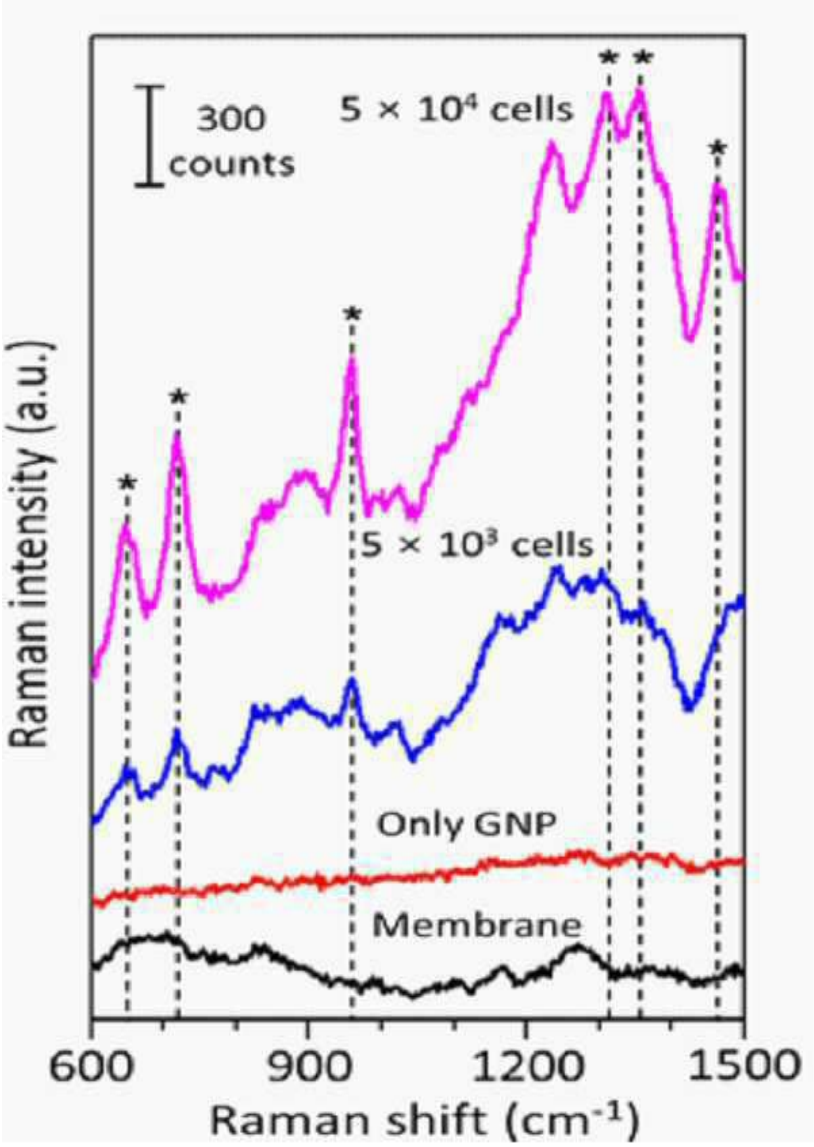
도면10


SiO2 = 0 nm
0.5 nm
1 nm
2 nm
5 nm
Reflectance (%)
λ (nm)
60
50
40
30
20
400
500
600
700
800
Reflectance (%)
λ (nm)
40
30
20
460 480 500 520

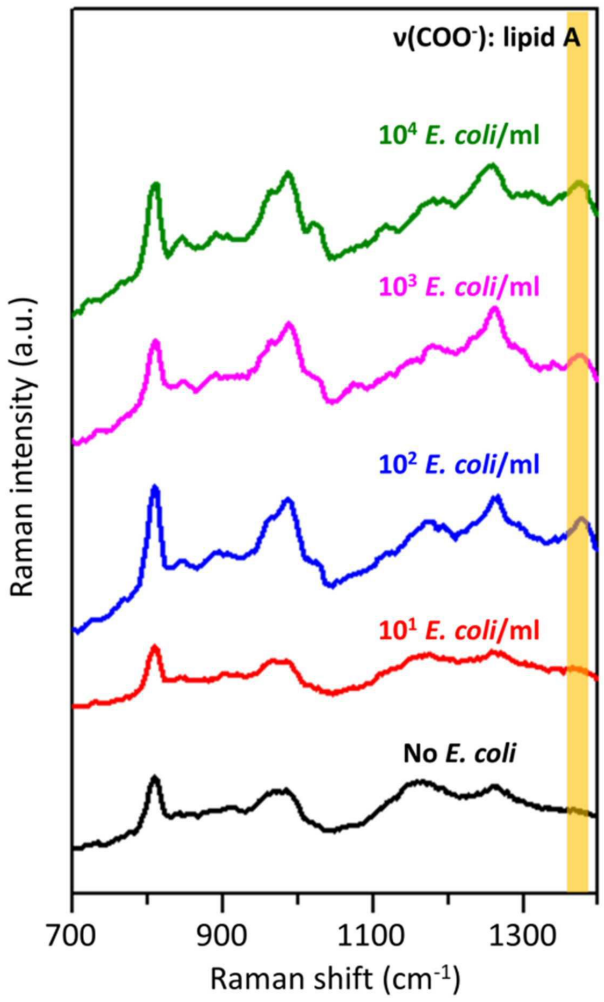
도면11


0.5 nm
1 nm
2 nm
5 nm

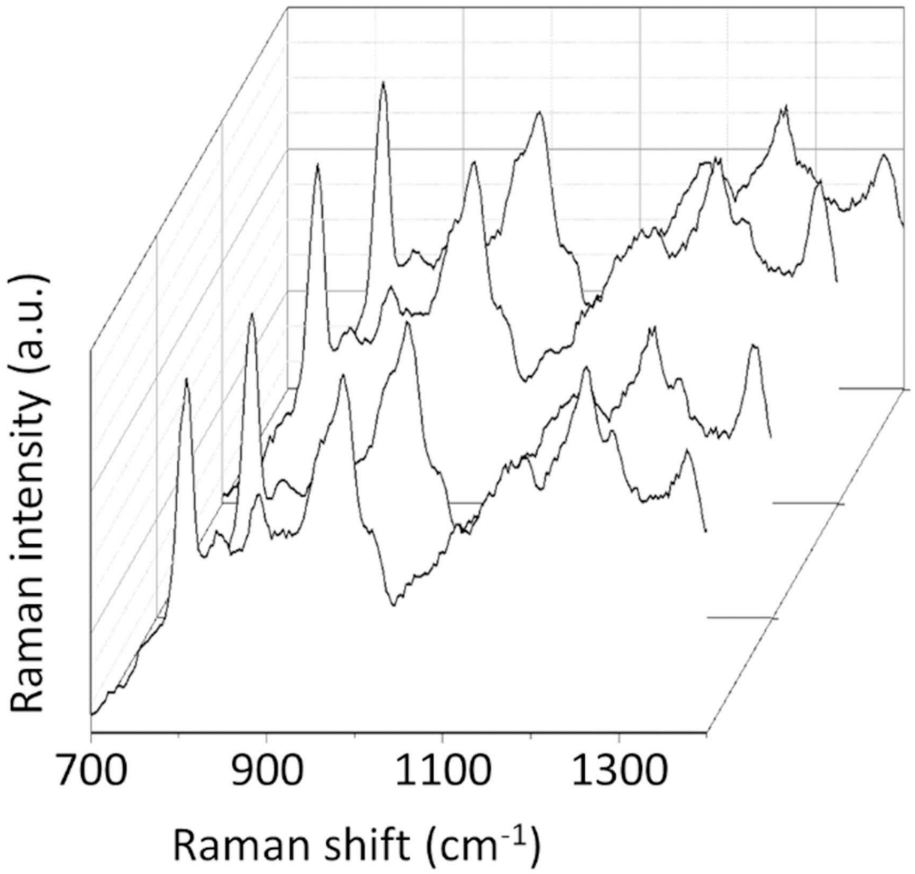
도면12


300
counts
5 × 10⁴ cells
5 × 10³ cells
Only GNP
Membrane
Raman intensity (a.u.)
600
900
1200
1500
Raman shift (cm⁻¹)

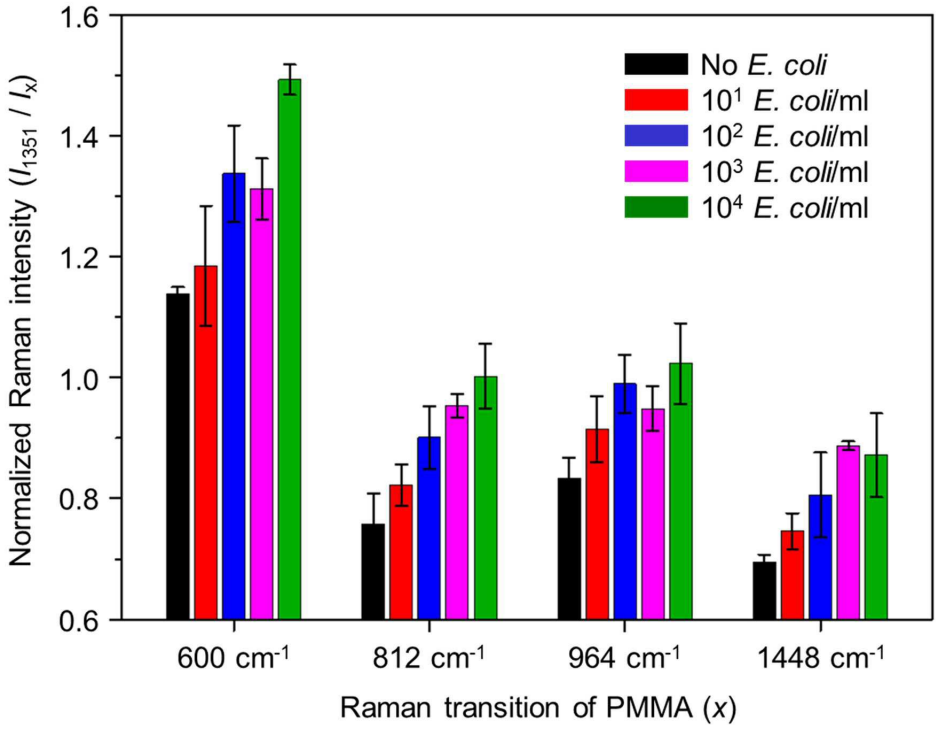
도면13


v(COO-): lipid A
10⁴ E. coli/ml
10³ E. coli/ml
10² E. coli/ml
10¹ E. coli/ml
No E. coli
Raman intensity (a.u.)
700
900
1100
1300
Raman shift (cm-1)

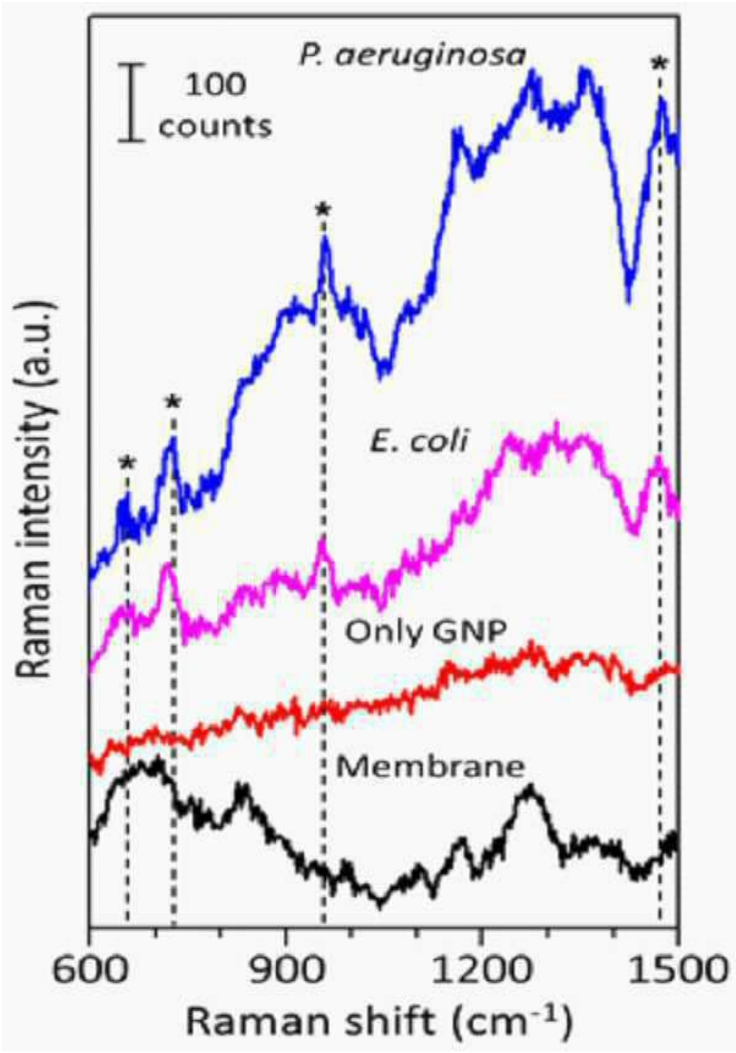
도면14


Raman intensity (a.u.)
700
900
1100
1300
Raman shift (cm-1)

도면15


1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
Normalized Raman intensity (I1351 / Ix)
No E. coli
10¹ E. coli/ml
10² E. coli/ml
10³ E. coli/ml
10⁴ E. coli/ml
600 cm-1
812 cm-1
964 cm-1
1448 cm-1
Raman transition of PMMA (x)

도면16


P. aeruginosa
100
counts
E. coli
Only GNP
Membrane
Raman intensity (a.u.)
600
900
1200
1500
Raman shift (cm-1)

도면17

