



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월23일

(11) 등록번호 10-1514894

(24) 등록일자 2015년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/06 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0144892

(22) 출원일자 2013년11월26일

심사청구일자 2013년11월26일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120126459 A

비특허문헌1 (2013.07.)

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

강성호

경기 수원시 영통구 매영로 366, 725동 1901호 (영통동, 살구골7단지아파트)

이승아

경기 화성시 영통로61번길 10, 111동 1301호 (반월동, 신영통현대1차아파트)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 김승오

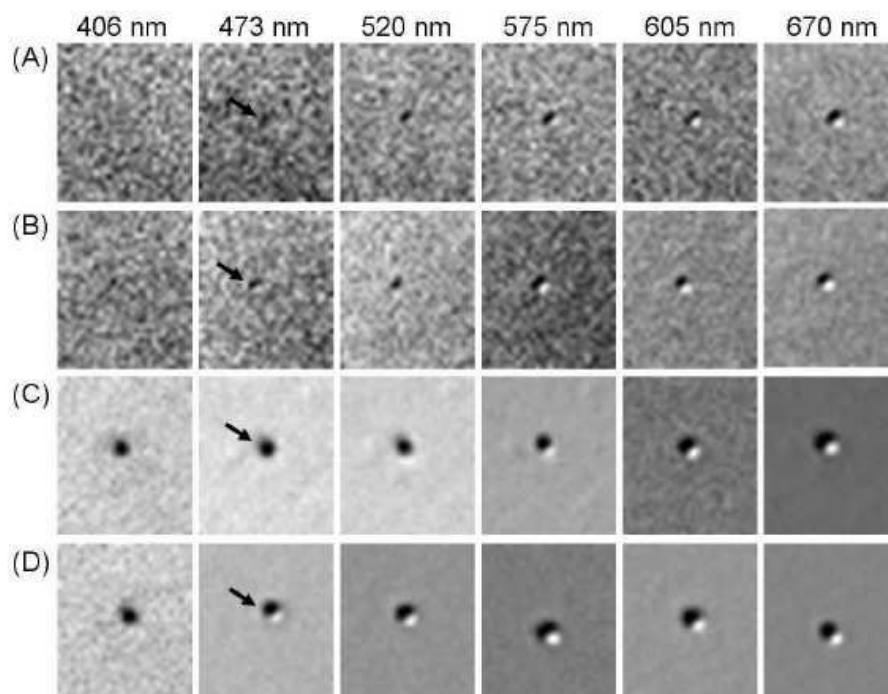
(54) 발명의 명칭 파장-의존성 미분간섭대비 현미경법을 이용한 표적 생체분자의 비형광 검출방법 및 시스템

(57) 요약

본 발명은 표적 생체분자의 비형광 검출방법 및 이를 위한 미분간섭대비 신호 검출용 시스템에 관한 것으로, 구체적으로 서로 중첩되지 않는 흡수 스펙트럼을 갖는 제1금속-나노패턴된 기관을 포함하는 나노 바이오칩과 제2금속을 포함하는 비형광 나노입자로 표지되고 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 검출분자를 이용하여 제2

(뒷면에 계속)

대표도 - 도7



금속을 포함하는 나노입자의 미분간섭대비(differential interference contrast; DIC) 신호를 검출하는 것이 특징인 검출방법 및 이를 위한 미분간섭대비 신호 검출용 시스템에 관한 것이다.

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 흡수 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 위한 분석용 시스템에 대역통과필터를 결합시켜 파장-의존적 분광법을 수행할 수 있으므로, 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.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A2A2A01013466

부처명 교육과학기술부

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 2012.05.01 ~ 2013.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

표적 생체분자의 비형광 검출방법에 있어서,

- (a) 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 포획분자를 포함하는 제1금속-나노패턴된 기판을 포함하는 나노 바이오칩을 분석시료와 반응시키는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계에서 준비한 나노 바이오칩을, 광학적 간섭을 제거하기 위하여 제1금속-나노패턴의 흡수스펙트럼과 중첩되지 않는 흡수 스펙트럼을 갖는 제2금속을 포함하는 비형광 나노입자로 표지되고 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 검출분자와 반응시키는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에 따른 나노 바이오칩으로부터 상기 제2금속을 포함하는 나노입자의 미분간섭대비(differential interference contrast; DIC) 신호를 선택적 대역통과필터(bandpass filter)를 통해 검출하는 단계를 포함하는 것인 검출방법.

청구항 2

표적 생체분자의 비형광 검출방법에 있어서,

- (a) 광학적 간섭을 제거하기 위하여 제1금속-나노패턴의 흡수스펙트럼과 중첩되지 않는 흡수 스펙트럼을 갖는 제2금속을 포함하는 비형광 나노입자로 표지되고 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 검출분자와 분석시료를 반응시키는 단계;
- (b) 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 포획분자를 포함하는 제1금속-나노패턴된 기판을 포함하는 나노 바이오칩을 상기 (a) 단계에서 준비한 분석시료와 반응시키는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에 따른 나노 바이오칩으로부터 상기 제2금속을 포함하는 나노입자의 미분간섭대비 신호를 선택적 대역통과필터를 통해 검출하는 단계를 포함하는 것인 검출방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 미분간섭대비 신호의 검출은 파장-의존적 신호검출에 의해 수행되는 것인 검출방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 표적 생체분자는 DNA, RNA, 항원, 항체, 리간드, 킬레이트, 수용체, 폴리머, 유기화합물, 금속이온 및 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 검출방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 포획분자는 항원, 항체, 리간드, 수용체, 킬레이트, 앵타머, DNA 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 검출방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 검출분자는 항원, 항체, 리간드, 수용체, 킬레이트, 앵타머, DNA 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 검출방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 기판은 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 9

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 기판은 10 nm 내지 1 mm의 두께를 갖는 빛의 투과가 가능한 유리 또는 고분자 재질인 것인 검출방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 나노패턴은 잉크젯 나노프린팅, 전자빔 식각(e-beam lithography) 및 원자힘현미경-디펜나노식각(atomic force microscope-dip pen nanolithography, AFM-DPN)을 포함하는 나노식각(nanolithography) 기술 중 어느 하나에 의해 제조되는 것인 검출방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 나노패턴은 1 내지 500nm 범위의 직경을 갖고, 상기 나노패턴의 간격(pitch)은 10 nm 내지 10 μ m의 범위를 갖는 것인 검출방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서,

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

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 제1금속은 금이고, 제2금속은 은인 것인 검출방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 나노입자는 10 nm 이상 100 nm 이하의 평균 직경을 갖는 것인 검출방법.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서,

표적 생체분자의 정량분석을 위하여,

기저 농도로 표준 생체분자를 포함하는 일련의 표준시료에 대해 DIC 신호를 검출하여 농도에 따른 DIC 신호의 검정곡선을 작성하는 단계; 및

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

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 일련의 표준시료 및 미지시료의 DIC 측정에 사용되는 나노 바이오칩은 동일한 크기의 금속-나노패턴된 바이오칩을 사용하는 것이 특징인 검출방법.

청구항 17

제15항에 있어서,

나노입자의 플라즈몬 공명산란 신호를 검출하는 단계를 추가로 포함하는 것인 검출방법.

청구항 18

제1항 또는 제2항에 따른 나노 바이오칩을 이용한 표적 생체분자 검출을 위한 미분간섭대비 신호 검출용 시스템으로서,

수직으로 일정 간격 이격되어 차례로 배열된,

광원; 편광기; 제1 울러스턴 프리즘(Wollaston prism); 집광기(condenser); 금속 패턴 상에 고정된, 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 포획분자를 포함하는 제1금속-나노패턴된 기판을 포함하는 나노 바이오칩; 대물렌즈; 제2 울러스턴 프리즘(Wollaston prism); 선택적 대역통과필터; 및 검출부를 포함하는, 시스템.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

제18항에 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.

발명의 설명

기술 분야

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

배경 기술

[0002] 생체분자의 상호작용 검출을 위한 고체기질 위에서의 분석법인 어레이 기술은 질병이나 치료를 목적으로 하는 연구를 위해 오늘날 크게 관심을 받고 있다. 생체분자의 프로파일(profile)의 스크리닝을 위한 마이크로-어레이의 이용은 특정 생체분자의 동정이나 약물개발과 같은 산업적인 기준이 되어왔다. 하지만, 마이크로-어레이는 상대적으로 많은 시료의 양과 긴 반응시간을 요구할 뿐만 아니라 검출 감도에 한계가 있다. 나노-어레이는 이러한 문제점을 극복하여 분석결과와 정확도를 높일 수 있을 뿐만 아니라 고속대량스크리닝(high-throughput screening, HTS)을 위해 개발되기 시작했다. 20세기에 들어서면서 나노-어레이칩은 나노식각기술을 이용하여 기존의 마이크로-어레이의 스폿 크기를 나노미터 크기로 줄이거나, 탄소나노튜브를 이용한 탄소나노튜브 나노전극 어레이를 제조하기에 이르렀다. 최근에는 플라즈몬 나노어레이 바이오칩이 개발됨으로써, 형광염료나 효소의 사용이라는 복잡한 절차없이 비형광 검출이 가능하게 되었다(IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines 131, 425-426, 2011; Talanta 104, 32-38, 2013). 그러나 나노바이오칩 상에서 분광학적 방해없이 특정 생체분자를 고감도로 선택적으로 검출할 수 있는 비형광 검출방법은 여전히 확립되지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명자들은 금속 나노 바이오칩을 이용하여 미량의 표적 생체분자를 비형광 검출방법에 의해 정량분석할 수 있는 방법을 찾고자 연구 노력한 결과, 바이오칩 상에 형성된 금속 나노패턴과 흡수 스펙트럼이 중첩되지 않는 금속 나노입자를 표지한 검출분자를 이용하고, 2개의 울러스턴 프리즘과 선택적 대역통과필터 등을 구비한 현미경을 이용하여 미분간섭대비 신호를 검출하는 동시에 상기 금속 나노입자의 플라즈몬 공명산란 세기를 측정함으로써 미량의 표적 생체분자를 정량분석할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명은 표적 생체분자의 비형광 검출방법에 있어서, (a) 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 포획분자를 포함하는 제1금속-나노패턴된 기판을 포함하는 나노 바이오칩을 분석시료와 반응시키는 단계; (b) 상기 (a) 단계에서 준비한 나노 바이오칩을 제2금속을 포함하는 비형광 나노입자로 표지되고 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 검출분자와 반응시키는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에 따른 나노 바이오칩으로부터 상기 제2금속을 포함하는 나노입자의 미분간섭대비(differential interference contrast; DIC) 신호를 검출하는 단계를 포함하는 것인 검출방법을 제공한다.

[0005] 또한, 본 발명은 표적 생체분자의 비형광 검출방법에 있어서, (a) 제2금속을 포함하는 비형광 나노입자로 표지되고 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 검출분자와 분석시료를 반응시키는 단계; (b) 상기 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 포획분자를 포함하는 제1금속-나노패턴된 기판을 포함하는 나노 바이오칩을 상기

(a) 단계에서 준비한 분석시료와 반응시키는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에 따른 나노 바이오칩으로부터 상기 제2금속을 포함하는 나노입자의 미분간섭대비 신호를 검출하는 단계를 포함하는 것인 검출방법을 제공한다.

[0006] 나아가, 본 발명은 상기 나노 바이오칩을 이용한 표적 생체분자 검출을 위한 미분간섭대비 신호 검출용 시스템으로서, 수직으로 일정 간격 이격되어 차례로 배열된, 광원; 편광기; 제1 울러스턴 프리즘(Wollaston prism); 금속 패턴 상에 고정된, 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 포획분자를 포함하는 제1금속-나노패턴된 기관을 포함하는 나노 바이오칩; 대물렌즈; 제2 울러스턴 프리즘(Wollaston prism); 및 검출부를 포함하는, 시스템을 제공한다.

[0007] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0008] 본 발명에 따른 검출방법은 상기 제2금속을 포함하는 비형광 나노입자를 검출함에 있어서, 제1금속-나노패턴의 광학적 간섭을 최소화하기 위하여, 상기 제2금속을 포함하는 비형광 나노입자와 제1금속-나노패턴의 흡수 스펙트럼이 서로 중첩되지 않는 것이 특징이다. 그러므로 미분간섭대비 신호를 각각 다른 파장에서 검출함으로써 상기 나노입자의 선택적인 검출이 가능하다.

[0009] 따라서, 본 발명에 따른 표적 생체분자의 비형광 검출을 위한 미분간섭대비 신호의 검출은 파장-의존적 신호검출을 위해 선택적 대역통과필터(bandpass filter)를 통해 수행되는 것이 바람직하다.

[0010] 본 발명의 용어, "나노 바이오칩"은 나노기술을 접목하여 제조한 바이오칩을 의미하며, 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 나노바이오칩은 바람직하게는 금속으로 나노패턴화된 바이오칩일 수 있다. 본 발명의 나노바이오칩은 다른 파장에서 파장-의존 선택적으로 흡수하는 성질을 갖는 금속 나노입자가 결합된 검출분자와 표적분자를 사이에 두고 결합될 수 있다.

[0011] 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.

[0012] 본 발명의 용어, "미분간섭대비(differential interference contrast; DIC)"는 염색되지 않은 투명한 시료에서 대비를 향상시키기 위해 사용되는 광학현미경조명기법(optical microscopy illumination technique)이다. DIC는 시료의 광학적 경로 길이에 대한 정보를 얻기 위한 간섭법의 원리에 의하며, 이에 따라 이외의 방법으로는 보이지 않는 형태를 가시화한다. 생성되는 이미지는 회색 바탕에 흑백으로 나타난다. 이러한 이미지는 밝은 회절 광륜(bright diffraction halo)이 없는 것을 제외하고 위상차현미경(phase contrast microscopy)에 의해 얻어지는 것과 유사하다. DIC는 편광된 광원을 시료 평면에서 공간적으로 대체(전단)되고(displaced or sheared) 관찰 전에 재결합되는(recombined) 2개의 직각으로 편광된 서로 규칙적인 부분으로 분리함으로써 작동한다. 재결합시 두 부분의 간섭은 굴절률(refractive index) 또는 기하학적 경로 길이(geometric path length)에 의해 발생하는 그들의 광학적 경로차(optical path difference)에 감응한다.

[0013] 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.

[0014] 본 발명의 용어, "생체분자"는 생체 내에서 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, 유기화합물, 금속이온 및 폴리펩티드일 수 있다. 본 발명의 용어, "표적 생체분자"는 본 발명

의 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.

[0015] 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. 바람직하게는, 본 발명에서 포획분자 또는 검출분자는 단백질, 유전자, 지질, 효소, 앵타머(aptamer) 및 리간드 중 어느 하나일 수 있다. 더욱 바람직하게는 상기 포획분자 또는 검출분자는 항체일 수 있다.

[0016] 바람직하게, 상기 포획분자는 항원, 항체, 리간드, 수용체, 킬레이트, 앵타머, DNA 및 이들의 조합일 수 있으며, 상기 검출분자 또한 항원, 항체, 리간드, 수용체, 킬레이트, 앵타머, DNA 및 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명에 따른 검출방법에 사용되는 나노 바이오칩용 기판은 유리(glass), 용융 실리카(fused silica), 석영(quartz), 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane; PDMS), 폴리메틸메타크릴레이트(poly(methyl methacrylate); PMMA) 중 어느 하나로 이루어진 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 기판은 10 nm 내지 1 mm의 두께를 갖는 빛의 투과가 가능한 유리 또는 고분자 재질일 수 있다.

[0018] 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 μ m일 수 있으며, 바람직하게는 10 nm 내지 10 μ m일 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. 바람직하게는, 상기 나노패턴은 금속으로 나노패턴화된 것일 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, 앵타머 등의 포획분자를 연결하기에 용이하다. 이에 따라, 본 발명의 나노패턴은 더욱 바람직하게는, 티올기(-SH)를 이용한 공유결합이 용이한 금 나노패턴일 수 있다.

[0019] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명에서는 나노바이오칩에 금으로 나노패턴화하였다. 구체적으로는, 금 나노패턴은 10 nm^2 유리 기질 위에 전자빔식각기술(electron beam nanolithography)을 통해 국가나노종합센터(Daejeon, South Korea)에서 공정하였다. 나노어레이는 전자빔증착을 통해 100 nm와 500 nm 직경을 갖는 금 스폿을 10 μ m 간격으로 4 x 5 나노배열을 하여 사용하였다(도 2).

[0020] 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 평균 직경을 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.

- [0021] 바람직하게, 상기 나노 바이오칩 상에 패턴화하는 제1금속 또는 검출분자에 표시하는 나노입자를 구성하는 제2금속은 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt) 또는 팔라듐(Pd)으로부터 선택되는 것일 수 있다. 보다 바람직하게는 제1금속으로 금을, 제2금속으로는 은을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명에 따른 검출방법에서는 서로 흡수 스펙트럼이 중첩되지 않도록 제1금속-나노패턴된 기관과 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 등이 있다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명에서는 은나노입자에 항체를 결합하였다. 구체적으로는 은나노입자 (SNPs)는 에탄올에 녹인 MUA와 MCH 용액을 SNPs 용액과 섞어 10분 동안 초음파분해 (sonication)를 통해 분산시키고, SNP 표면에 MUA-MCH가 자가조립단층 (self-assembled monolayer, SAM)을 형성하도록 약 2시간 반응시켰다. 상기 SNPs를 항체와 결합시키기 위해 우선 EDC와 Sulfo-NHS 용액을 추가하여 활성화시켰다. 이에 검출항체 (detection antibody: cTnI clone 16A11) 용액에 활성화된 SNPs를 추가하고 반응시켰다. 최종적으로 결합되지 않은 항체를 제거하여, SNP-항체를 제작하였다.
- [0024] 상기 본 발명에 따른 검출방법을 이용하여 표적 생체분자의 정량분석이 가능하다. 구체적으로 전술한 표적 생체분자의 검출방법을 이용하여, 기지 농도로 표준 생체분자를 포함하는 일련의 표준시료에 대해 DIC 신호를 검출하여 농도에 따른 DIC 신호의 검정곡선을 작성하는 단계; 및 미지의 시료에 대해 측정된 DIC 신호를 상기 표준시료로부터 작성한 검정곡선에 대입하여 농도를 유추하는 단계를 추가로 수행함으로써 미지 시료 중의 표적 생체분자를 정량분석할 수 있다.
- [0025] 이때, 상기 일련의 표준시료 및 미지시료의 DIC 측정에 사용되는 나노 바이오칩은 동일한 크기의 금속-나노패턴된 바이오칩을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0026] 또한, 나노입자의 플라즈몬 공명산란 신호를 검출하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 500 nm 직경의 금-나노패턴된 나노 바이오칩 상에 85 aM 내지 10 fM 범위의 농도를 달리한 일련의 시료를 이용하여 DIC 신호를 측정하고 이를 농도에 대해 플롯하여 동일한 크기의 금-나노패턴 상에서 선형의 비례관계를 나타내는 것을 확인하였다(도 10).
- [0028] 본 발명에 따른 표적 생체분자의 비형광 검출은 상기 나노 바이오칩을 이용한 표적 생체분자 검출을 위한 미분간섭대비 신호 검출용 시스템을 이용하여 달성될 수 있다.
- [0029] 바람직하게, 상기 나노 바이오칩을 이용한 표적 생체분자 검출을 위한 미분간섭대비 신호 검출용 시스템은 수직으로 일정 간격 이격되어 차례로 배열된, 광원; 편광기; 제1 울러스턴 프리즘(Wollaston prism); 금속 패턴 상에 고정된, 표적 생체분자에 특이적으로 결합하는 포획분자를 포함하는 제1금속-나노패턴된 기관을 포함하는 나노 바이오칩; 대물렌즈; 제2 울러스턴 프리즘(Wollaston prism); 및 검출부를 포함하는, 시스템일 수 있다.
- [0030] 상기 본 발명에 따른 나노 바이오칩을 이용한 표적 생체분자 검출을 위한 미분간섭대비 신호 검출용 시스템은 당업계에서 통상적으로 사용되는 현미경을 기반으로 편광기, 제1 및 제2 울러스턴 프리즘 및 검출부 등을 추가로 장착하여 구성할 수 있다. 또는 각 광학적 구성요소를 적절한 위치에 배열함으로써 자체적으로 제작할 수도 있다. 현미경을 기반으로 하는 경우, 상기 현미경은, 빛의 경로에 따라 상기 구성요소를 차례로 배열하는 한, 정립형 또는 도립형 모두를 제한없이 사용할 수 있다.
- [0031] 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 발명

에서는 가시광선 영역에서의 흡수 및 산란을 이용하므로, 백색광을 제공하는 할로겐 램프를 광원으로 사용할 수 있다. 따라서, 상용화되는 현미경을 사용하는 경우 현미경 자체의 광원을 이용할 수 있으므로, 별도의 광원을 필요로 하지 않는다.

[0032] 본 발명의 용어, "편광기(polarizer)"는 특정 편광(polarization)의 빛을 통과시키고 다른 편광의 파장(wave)은 차단하는 광학적 필터(optical filter)이다. 상기 편광기는 한정되지 않은(undefined) 또는 혼합된(mixed) 편광의 빛을 잘 정의된(defined) 편광을 갖는 빛으로 전환시킬 수 있다. 편광기의 일반적인 형태로는 선형 편광기(linear polarizer) 및 원형 편광기(circular polarizer)가 있다.

[0033] 본 발명의 용어, "울러스턴 프리즘(wollaston prism)"은 윌리엄 하이드 울러스턴에 의해 고안된, 편광된 빛을 조작하는 광학적 장치이다. 상기 울러스턴 프리즘은 임의로 편광되거나(randomly polarized) 비편광된(unpolarized) 빛을 2개의 직교하는 선형으로 편광된 방출빔(orthogonal linearly polarized outgoing beam)으로 분리한다. 울러스턴 프리즘은 2개의 직교하는 방해석 프리즘(calcite prism)으로 구성되며, 수직인 광학축(perpendicular optic axes)을 갖는 2개의 직각삼각형(right triangle) 프리즘을 바닥을 서로 접착시켜 형성된다. 방출빔은 프리즘으로부터 분기되어(diverge) 프리즘의 쐐기각(wedge angle)과 파장에 의해 결정되는 발산각(angle of divergence)을 갖는 2개의 편광된 빛을 형성한다. 상용되는 프리즘은 일반적으로 15 내지 45°의 발산각을 갖는다.

[0034] 상기 검출용 시스템의 각 구성요소는 광원으로부터 검출부까지 차례로 일렬로 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 나노 바이오칩을 이용한 표적 생체분자 검출을 위한 미분간섭대비 신호 검출용 시스템은 제1 울러스턴 프리즘과 나노 바이오칩 사이에 집광기(condenser)를 추가로 포함할 수 있다.

[0036] 또한, 상기 검출부에 앞서 파장-의존적 신호검출을 위해 선택적 대역통과필터를 추가로 포함하는 것이 바람직하다.

[0037] 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.

[0038] 민감한 검출을 위해서는 검출하고자 하는 물질 예컨대, 본 발명에 있어서 제2금속을 포함하는 나노입자의 최대 플라스몬 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.

[0039] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 각각 100 nm 또는 500 nm 직경의 금-나노패턴된 기판과 80 nm 직경의 은 나노입자를 사용하였다. 이때, 금-나노패턴은 약 650 nm의 최대 흡수파장을, 은 나노입자는 약 456 nm의 최대 흡수파장을 가지므로, 은 나노입자로부터의 플라스몬 공명산란을 선택적으로 검출하기 위해서는 456 nm 대의 20 nm 또는 10 nm 대역통과필터를 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명의 용어, "검출부"는 상기 파장-의존성 미분간섭대비 현미경에 연결 설치되어 현미경으로부터 제공되는 신호를 감지하여 데이터화할 수 있는 장치를 포함한다. 예컨대, 상기 파장-의존성 미분간섭대비 현미경에 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. 본 발명에 따른 나노 바이오칩을 이용한 표적 생체분자 검출을 위한 미분간섭대비 신호 검출용 시스템에 사용될 수 있는 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) 등이 있다.

[0041]

본 발명의 구체적인 실시예에서는 일반적으로 실험실에서 사용하는 정립형 현미경을 기본으로 사용하여 미분간섭대비 신호 검출용 시스템을 구축하였다. 상기 본 발명의 일구체예에 따른 시스템의 구성을 도 1에 개략적으로 나타내었다.

발명의 효과

[0042]

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 흡수 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 위한 분석용 시스템에 대역통과필터를 결합시켜 파장-의존적 분광법을 수행할 수 있으므로, 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

[0043]

도 1은 본 발명에 따른 생물시료의 비형광 검출을 위한 금-나노패턴된 바이오 칩 및 정립형(upright type) 미분간섭대비(differential interference contrast; DIC) 현미경 및 이를 이용한 시료분석 원리를 개략적으로 나타낸 도이다. 좌측은 정립형 DIC 현미경 구조 및 빛의 경로차를, 중앙 및 우측은 금 패턴 상에 시료 반응시와 미반응시 산란 및 산란 파장 이동을 나타낸 도이다. HL, 할로젠 램프; P, 편광기; WP, 울러스턴 프리즘(Wollaston prism); C, 집광기(condenser); GNC, 금-나노패턴된 칩; O, 대물렌즈; A, 분석기; F, 필터 큐브; CCD, 전하결합소자(charge-coupled device); SNP, 은 나노입자.

도 2는 본 발명에 따른 100 nm 및 500 nm 직경으로 금-나노패턴된 칩의 SEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명에 따른 100 nm 및 500 nm 직경으로 금-나노패턴된 칩의 미분간섭대비 및 SEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 4는 검출항체에 결합시킨 80 nm 직경의 은 나노입자의 (A) SEM 이미지 및 (B) 나노입자의 크기에 따른 동적광산란(dynamic light scattering) 세기를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명에 따른 금-나노패턴된 칩 상에 은 나노입자-항체 분자의 샌드위치 면역반응 전/후의 AFM 이미지 및 단면 프로파일(cross-sectional profile)을 나타낸 도이다. (A) 및 (B)는 각각 100 nm 직경으로 금-나노패턴된 칩 상에서 면역반응 전과 후, (C) 및 (D)는 각각 500 nm 직경으로 금-나노패턴된 칩 상에서 면역반응 전과 후의 이미지이다.

도 6은 본 발명에 따른 (A) 100 nm 및 (B) 500 nm 직경으로 금-나노패턴된 칩 상에 은 나노입자가 결합된 항체를 반응시킨 후의 AFM 이미지 및 단면 프로파일을 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명에 따른 금-나노패턴된 칩 상에 은 나노입자-항체 분자의 샌드위치 면역반응 전/후의 각기 다른 파장에서의 파장-의존성 미분간섭대비 이미지를 나타낸 도이다. (A) 및 (B)는 각각 100 nm 직경으로 금-나노패턴된 칩 상에서 면역반응 전과 후, (C) 및 (D)는 각각 500 nm 직경으로 금-나노패턴된 칩 상에서 면역반응 전과 후의 이미지이다.

도 8은 본 발명에 따른 금-나노패턴된 칩의 공명산란 스펙트럼 및 검출 항체에 표지된 직경 80 nm 은 나노입자의 흡수 스펙트럼을 나타낸 도이다. (A) 및 (B)는 각각 100 nm 및 500 nm 직경의 금-나노패턴된 칩의 공명산란 스펙트럼, (C)는 상기 금-나노패턴된 칩에 결합된 항체에 표지된 직경 80 nm 은 나노입자의 흡수 스펙트럼이다.

도 9는 도 7에 화살표로 표시한 파장-의존성 미분간섭대비 이미지에 대한 미분간섭대비 감도를 나타낸 도이다. (A) 및 (B)는 각각 100 nm 직경으로 금-나노패턴된 칩 상에서 면역반응 전과 후, (C) 및 (D)는 각각 500 nm 직경으로 금-나노패턴된 칩 상에서 면역반응 전과 후의 결과이다.

도 10은 본 발명에 따른 500 nm 직경으로 금-나노패턴된 칩 상에서 면역반응시킨 85 aM 내지 10 fM 농도의 표준 항원(cTnI)을 이용하여 작성한 농도 의존적 미분간섭대비 감도의 검정곡선을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0045] 금-나노패턴된 나노 바이오칩의 제조

[0046] 전자빔식각기술(electron beam nanolithography)을 이용하여 국가나노종합센터(대전, 한국)에서 10 mm^2 면적의 유리 기판 상에 나노미터 수준의 금-나노패턴을 형성하였다. 전자빔증착을 통해 100 nm 및 500 nm 직경을 갖는 금 스폿을 10 μm 간격으로 4×5 형태의 나노어레이를 형성하였다(도 2). 모든 칩은 침적(deposition)에 앞서 아세톤(순도 99.5%)으로 30초, 이소프로필 알콜(순도 99.9%)로 30초 및 피라나 용액(Piranha solution, $\text{H}_2\text{SO}_4:30\% \text{ H}_2\text{O}_2=1:1$)으로 세척하였다. 각 단계 사이에는 고순도의 물로 세척하였으며, 최종 세척된 칩은 질소가스로 건조시킨 후 건조기에 보관하였다.

[0047] 은 나노입자가 결합된 항체의 제조

[0048] 은 나노입자(silver nanoparticle; SNPs, 1.10×10^9 입자/ mL)는 BBI 라이프 사이언스(Cardiff, UK)로부터 구입하였다. 상기 은 나노입자를 면역분석을 위한 비형광 탐침으로 사용하기 위하여 검출항체(단클론 마우스 항-심장 트로포닌 I 항체; monoclonal mouse anti-cardiac troponin I antibody, clone 16A11)에 결합시켰다. SNP와 항체의 결합과정은 하기와 같다: 11-머캅토운데칸산(11-mercaptoundecanoic acid; MUA, 95%)과 6-머캅토-1-헥산올(6-mercapto-1-hexanol; MCH, 97%)을 에탄올에 녹여 각각의 농도가 10 mM과 30 mM이 되도록 제조한 후, SNP를 첨가하였다. 10분 동안 초음파처리(sonication)를 통해 분산시키고, 약 2시간 30분 동안 반응시켜 SNP 표면에 MUA-MCH 자가조립단층(self-assembled monolayer; SAM)을 형성하도록 하였다. 이후, 4°C에서 12,000rpm으로 90분 동안 원심분리하여 고순도 증류수로 2번 세척하였다. 50 mM MES(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)와 0.1 M NaCl 용액(pH 6.0)에 SNPs-MUA-MCH 침전물을 다시 용해시켰다.

[0049] 항체와 SNPs를 결합시키기 위해서 EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)와 술포-NHS(sulfo-N-Hydroxysuccinimide)를 이용하였다. 40 μg EDC(2 mg/ mL in 50 mM MES, pH 6.0)와 196 μg 술포-NHS(2 mg/ mL in $1 \times \text{PBS}$, pH 7.4)를 SNPs-MUA-MCH 용액에 첨가하였다. 30 내지 40분 동안 실온에서 교반한 후, SNPs-MUA-MCH-NHS 용액을 4°C에서 17,000rpm으로 30분 동안 원심분리하여 세척하고, PBS에 다시 용해시켰다. 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 검출항체(detection antibody, cTnI clone 16A11) 용액 1 mL에 활성화한 SNPs를 첨가하고 4시간 동안 상온에서 교반시켜 반응시키고 12시간 동안 4°C에 보관하였다. 10 mM Tris(pH 7.5)와 1 M 글라이신 용액 200 mL을 첨가하여 15분 동안 반응시켜 과량의 반응하지 않은 히드록실아민(hydroxylamine)을 소광시켰다. 마지막으로 4°C에서 17,000rpm으로 90분 동안 원심분리하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. SNP-항체는 PBS에 용해시켜 4°C에 보관하였다.

[0050] 금-나노패턴된 바이오 칩 상에서의 샌드위치 면역반응 분석

[0051] 상술한 바와 같이 제조한 금-나노패턴된 칩을 DMSO(dimethyl sulfoxide, 99.5%, Sigma-Aldrich)에 녹인 4 mg/mL DSP(dithiobis succinimidyl propionate)에 약 30분 동안 담겼다. 이어서 DMSO 용액으로 세척한 후 증류수로 다시 세척하였다. 칩 상에 패터닝된 금 표면을 활성화하기 위하여 0.1 mg/mL 단백질 A/G(Pierce)와 약 1시간 동안 반응시켰다. 반응하지 않은 숙신이미드기는 10 mM Tris(pH 7.5)와 1 M 글라이신으로 약 30분 동안 처리하여 차단(blocking)하였다. 상기 칩을 StabilGuard로 30분 동안 처리하여 안정화하고 증류수로 간단히 세척하였

다. 샌드위치 면역반응을 위한 포획항체(capture antibody, anti-cTnI, clone 19C7) 20 μ l와 1시간 동안 반응시키고, 1 $\times$ PBS(pH 7.4)로 세척하였다. 표적항원(target antigen, cTnI standard protein)를 다양한 농도로 희석하여 준비한 표준시료와 1시간 동안 반응시켰다. 1 $\times$ PBS로 세척 후, SNPs-항체 용액 20 μ l과 약 2시간 동안 반응시킨 후, 관찰하였다. SNPs와 결합한 항체는 분자의 크기를 고려하여 단독 항체분자와 반응시키는 경우보다 반응시간을 증가시켰다. 모든 반응 단계 사이에는 실온에서 교반하면서 1 $\times$ PBS로 세척하는 단계를 추가로 실시하였다.

[0052]

파장-의존성 미분간섭대비 현미경의 구성

[0053]

파장-의존성 미분간섭대비 현미경 시스템(wavelength-dependent differential interference contrast microscopy)의 모식도를 도 1(좌측)에 나타내었다. 금-나노패턴된 바이오 칩 상에서 SNPs-cTnI 항체는 일반적으로 사용되는 정립형 올림푸스 BX51 현미경(upright microscope, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)에 광원(HL)과 관찰하고자 하는 금-나노패턴된 칩 사이에 차례로 편광기(P)와 울러스턴 프리즘(W1)을 추가로 장착하고, 대물렌즈(O) 이후에 또 하나의 울러스턴 프리즘(W2)을 장착하여 파장-의존성 미분간섭대비 측정이 가능하게 하였다. 광원으로는 100W 할로겐 램프를 사용하였으며, 대물렌즈로는 개구수(numerical aperture; NA)를 0.6-1.3까지 조절가능한 100 $\times$ 오일타입 렌즈를 이용하였다. 금-나노패턴된 칩 상의 SNPs-cTnI 항체의 미분간섭대비 신호는 전자증폭 냉각 전하결합장치(electron multiplying cooled charge-coupled device; EM-CCD) 카메라(512 $\times$ 512, QuantEM 512SC, Photometrics, AZ, USA)를 이용하여 수집하였다. 데이터 수집 및 분석에는 MetaMorph 7.0(Universal Imaging Co., Downingtown)과 METLAB 소프트웨어를 이용하였다.

[0054]

도 2 내지 10은 전술한 실시예에 따른 결과로서, 도 4는 검출항체에 결합시킨 80 nm 직경의 은 나노입자의 SEM 이미지와 동적광산란(dynamic light scattering)을 측정한 결과이다. 공급처에서 제공한 은 나노입자의 평균 크기(즉, 80 $\pm$ 5 nm) 값에 대해 본 발명자가 측정한 데이터에서는 26.3 $\pm$ 1.6 nm와 85.0 $\pm$ 1.4 nm 크기를 나타내었다.

[0055]

금-나노패턴된 칩은 100 nm와 500 nm 스팟 크기로 배열되었으며, 각각 14.5 nm와 30.5 nm의 금/크롬 두께를 갖는다(도 5A 및 5C). 금-나노패턴된 칩 상에 85 aM cTnI 단백질 항원과 80 nm 직경의 은 나노입자-검출항체 분자의 반응 후 기질에서의 단차는 각각 76.9 nm 및 80.4 nm 증가하였으며, 이는 AFM을 이용하여 측정하였다(도 5B 및 5D). 두개의 금 스팟의 반응 전/후의 단차가 상이한 경우가 있는데 이는 상기 기술한 바와 같이 검출항체에 결합시킨 은 나노입자의 크기가 균일하지 못하거나 2분자체 또는 다분자체를 형성한 결과로 유추할 수 있었다(도 6). 하지만 상이한 단차를 보일지라도, 금-나노패턴된 칩 상의 반응 전/후의 단차가 있는 것으로 보아 샌드위치 면역반응이 일어났음을 확인할 수 있었다.

[0056]

미분간섭대비 현미경은 아래와 같은 식으로 설명할 수 있다.

$$\Psi_b = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta_b$$

[0057]

[0058]

이때, Ψ_b 는 편향지연(bias retardation; 도 또는 라디안), Δ_b 는 길이, λ 는 빛의 파장을 나타낸다(Optics Express, 16, 19462-19479, 2008).

[0059]

상기 수식에 의하면, Ψ_b 는 파장에 따라 변하므로 특정한 파장에서 고유의 DIC 이미지를 얻을 수 있다. 본 발명에 따른 파장-의존성 미분간섭대비 현미경에서 편광기, 분석기, 제1 울러스턴 프리즘(WP1)은 특정한 위치에 고정시켰으며, 제2 울러스턴 프리즘(WP2)은 조절이 가능하도록 고안하였다. 그러나, 다양한 파장에 따른 금-나노패턴된 칩의 미분간섭대비 영상 수집 시에는 단지 파장-의존성에 대한 DIC를 관찰하기 위하여 모든 DIC 장치의 구성요소를 고정하였다.

[0060]

도 7에는 85 aM cTnI 단백질에 대한 면역반응 전/후의 파장 변화(406 nm 내지 670 nm)에 따른 DIC를 나타내었다. 금 스팟은 670 nm 파장에서 명/암 대비가 뚜렷한 영상을 나타내었다(도 7A 및 7C). 빛의 파장이 감소함에 따라, 이러한 대비는 500 nm 금 스팟에서는 어두운 면만 검출되었으며, 100 nm 금 스팟에서는 육안 식별

이 불가능해짐을 확인하였다. 100 nm 금-나노패턴 칩에서, DIC는 473 nm 파장에서 면역반응 전에는 식별이 불가능했던 것이 반응 후 식별 가능하게 되었다(도 7A 및 7B). 500 nm 금-나노패턴 칩의 경우, 면역반응 전의 금 나노스팟은 강한 어두운 면만이 관찰되었으나, 반응 후 명/암 대비가 공존하였다(도 7C 및 7D). 이는 도 8에 나타난 스펙트럼에서와 같이 귀금속인 금(최대 흡수파장 ~650 nm)과 은(최대 흡수파장 ~456 nm)이 고유의 흡수 스펙트럼을 가지고 있기 때문에 나타나는 결과로써, 파장-의존성 미분간섭대비 장치를 이용한 빛의 경로차가 서로 상이한 2종의 귀금속 나노재질(금 대 은)의 높은 대비 차이에 의한 비형광 샌드위치 면역분석법의 가능성을 증명하였다. 도 9는 도 7에 화살표 표시된 파장-의존성 미분간섭대비 이미지에 대한 100 nm (A, B)와 500 nm (C, D) 금-나노패턴된 칩 상에서 은나노입자-항체 분자의 샌드위치 면역반응 전(왼쪽)/후(오른쪽)의 미분간섭대비 감도를 나타낸 것이다.

[0061]

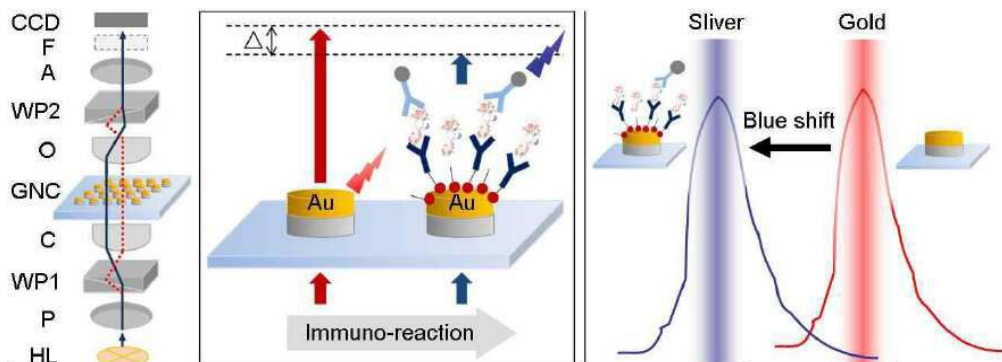
선택성 파장-의존 미분간섭대비 비형광 검출장치를 이용한 cTnI 단백질을 정량분석이 가능하였다. 특히, 포획항체와 항원의 반응에 있어서 비특이적 결합이나 입체적 방해 줄이기 위해 칩 표면 기질에 포획항체의 균일한 배열을 위한 방법으로 단백질 A/G를 이용하여 면역센서의 감도를 증진시켰다. 금-나노패턴된 칩은 파장-의존성 미분간섭대비 시스템을 이용하여 나노입자가 결합된 검출항체에 의해 낮은 검출한계(85 aM cTnI)에서 높은 감도로 비형광 검출이 가능하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, 500 nm 금-나노패턴 칩 상에 85 aM 내지 10 fM의 농도 범위에서 상당히 상관계수가 높은 선형 검정곡선을 얻을 수 있었으며, 이는 정량분석이 가능하며, 더 나아가 높은 감도가 요구되는 임상진단에 적용 가능하다는 것을 증명하는 바이다.

[0062]

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.

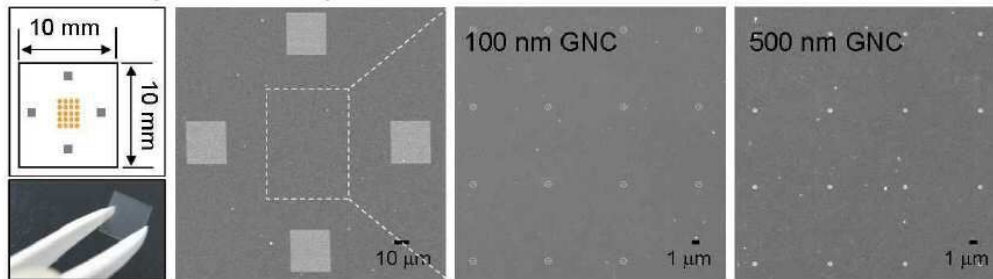
도면

도면1

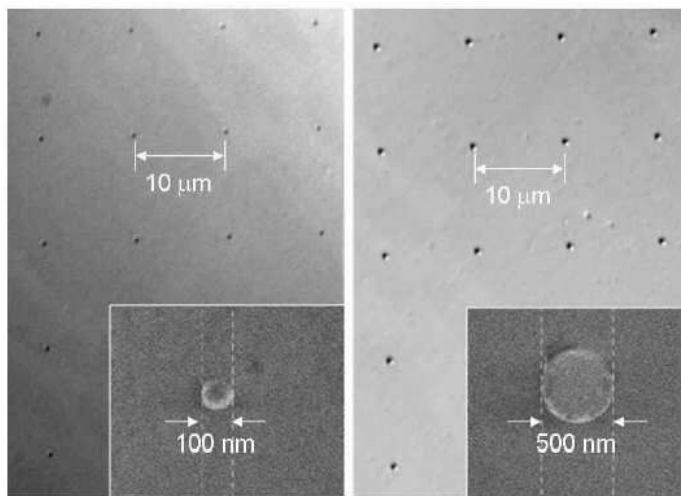


도면2

Gold-nanopatterned chip

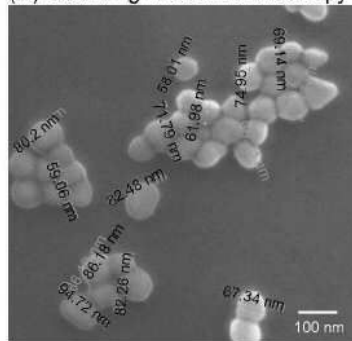


도면3

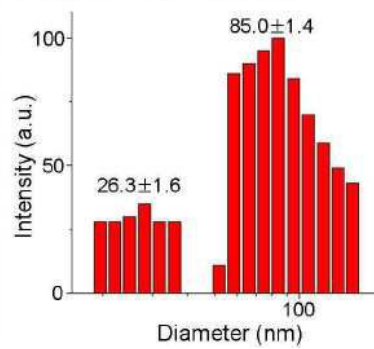


도면4

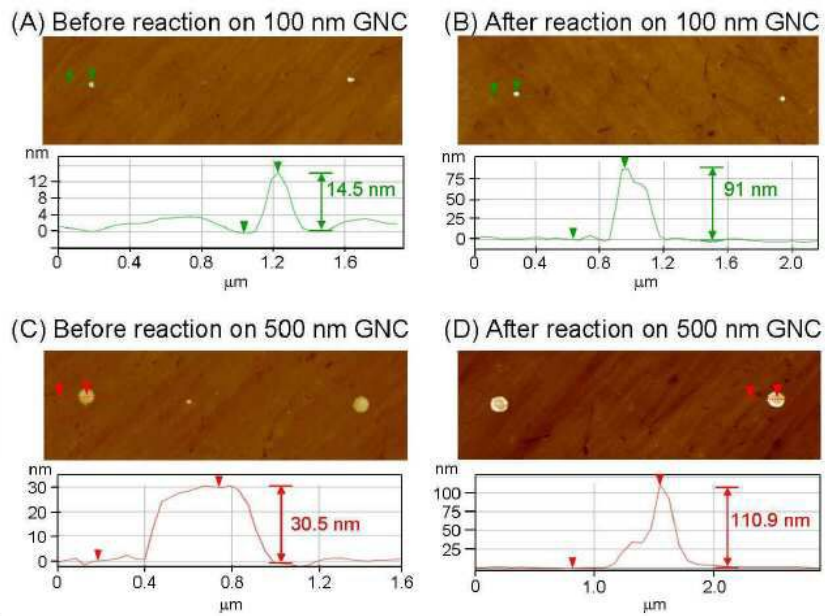
(A) Scanning electron microscopy



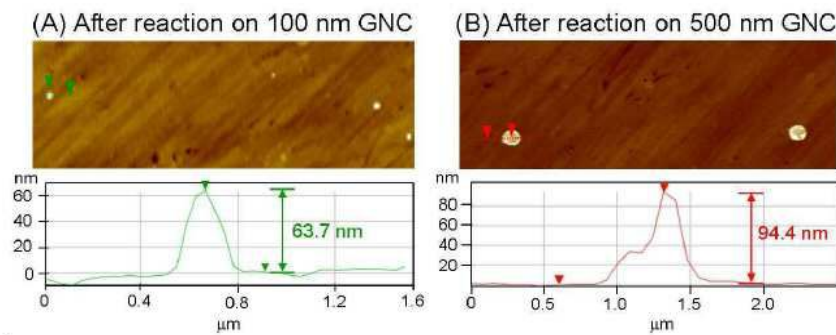
(B) Dynamic light scattering



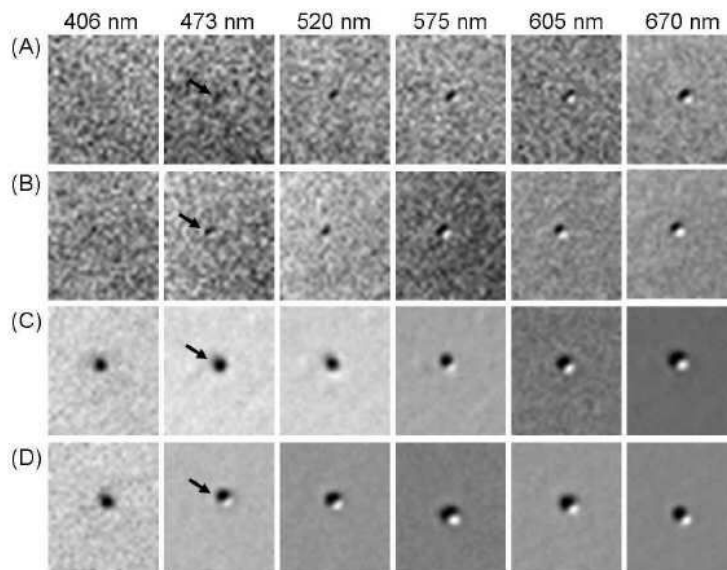
도면5



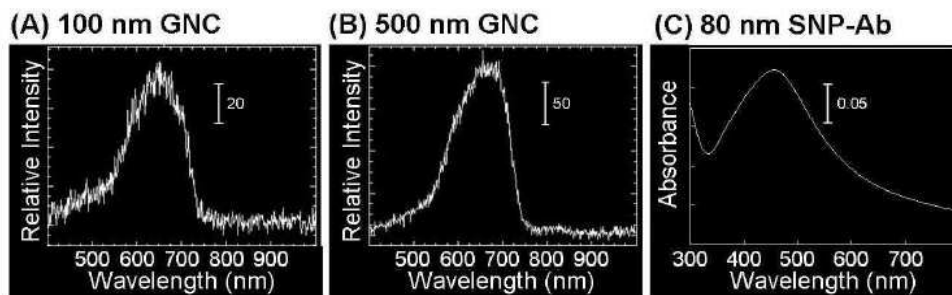
도면6



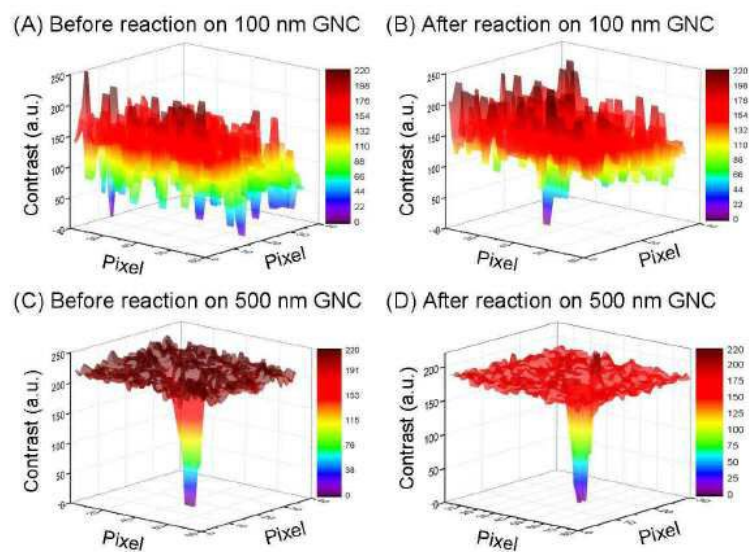
도면7



도면8



도면9



도면10

