(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0140914
(43) 공개일자 2020년12월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*G01N 33/543* (2006.01) *G01N 21/65* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*G01N 33/54346* (2013.01)
*G01N 21/658* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7033816
(22) 출원일자(국제) 2019년05월02일
심사청구일자 2020년11월24일
(85) 번역문제출일자 2020년11월24일
(86) 국제출원번호 PCT/KR2019/005250
(87) 국제공개번호 WO 2019/212248
국제공개일자 2019년11월07일
(30) 우선권주장
1020180050838 2018년05월02일 대한민국(KR)

(71) 출원인
**고려대학교 산학협력단**
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
**심상준**
서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
**전명진**
경기도 수원시 영통구 영통로 498, 128동 1004호 (영통동, 황골마을주공1단지아파트)
**마홍의**
서울특별시 성북구 고려대로7길 24 (안암동2가)
(74) 대리인
**이처영, 장제환**

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **박테리오파지 기반 SERS 활성 금 나노헤일로 구조체 및 제조방법**

*(57) 요 약*

본 발명은 박테리오파지 기반의 금 나노헤일로 구조체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 박테리오파지 MS2를 기반으로 하여 금 나노입자를 규칙적으로 배열한 SERS-활성 금 나노헤일로 구조체 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 금 나노헤일로 구조체는 금 나노입자 사이의 핫 스팟의 규칙적인 배열로 일관성 있는 SERS 신호를 형성할 수 있으며, 이를 이용하여 SERS 기반의 검지 시스템을 개발하는데 유용하게 사용할 수 있다.

(52) CPC특허분류
*G01N 33/54353* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711070882
과제번호 2016R1A2A1A05005465
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 (이공)중견연구자지원_도약연구
연구과제명 생물공정의 실시간 고속 모니터링을 위한 나노 플라즈몬 검지 플랫폼 기술 개발
기 여 율 8/10
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2018.04.01 ~ 2019.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711073343
과제번호 2014M1A8A1049278
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 거대과학연구개발사업(Korea CCS 2020사업)
연구과제명 생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술
기 여 율 1/10
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2018.04.01 ~ 2019.01.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711065973
과제번호 2017R1A5A1070259
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 진단/치료용 고분자소재 연구센터
기 여 율 1/10
과제수행기관명 성균관대학교(자연과학캠퍼스)
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

에 아민 작용기가 배열된 박테리오파지에 카르복실기 및 티올기를 함유하는 링커를 통해 금 나노입자가 결합되어 있는 금 나노헤일로 구조체.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 금 나노헤일로 구조체는 표면 증강 라만 산란(SERS)의 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 금 나노헤일로 구조체.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 박테리오파지는 MS2인 것을 특징으로 하는 금 나노헤일로 구조체.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 링커는 (2S)-1-[(2S)-2-메틸-3-설파닐프로파노일]피롤리딘-2-카르복실산((2S)-1-[(2S)-2-methyl-3-sulfanylpropanoyl]pyrrolidine-2-carboxylic acid, captopril)인 것을 특징으로 하는 금 나노헤일로 구조체.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 금 나노입자의 크기는 1~100nm인 것을 특징으로 하는 금 나노헤일로 구조체.

### 청구항 6

다음 단계를 포함하는 금 나노헤일로 구조체의 제조방법:

(a) 카르복실기 및 티올기를 함유하는 링커의 카르복실기를 활성화 시키는 단계;

(b) 상기 링커의 티올기와 금 나노입자를 결합시키는 단계; 및

(c) 상기 금 나노입자-링커의 카르복실기를 박테리오파지 표면의 아민기와 반응시키는 단계.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 (a) 단계는 N-히드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS) 및 N-에틸-N'-(다이메틸아미노프로필)카르보다이이미드(N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC)를 처리하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

### 청구항 8

제6항에 있어서, 상기 링커는 (2S)-1-[(2S)-2-메틸-3-설파닐프로파노일]피롤리딘-2-카르복실산((2S)-1-[(2S)-2-methyl-3-sulfanylpropanoyl]pyrrolidine-2-carboxylic acid, captopril)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

### 청구항 9

제6항에 있어서, 상기 박테리오파지는 MS2인 것을 특징으로 하는 제조방법.

### 청구항 10

제6항에 있어서, 상기 금 나노입자의 크기는 1~100nm인 것을 특징으로 하는 제조방법.

### 청구항 11

제1항의 금 나노헤일로 구조체를 포함하는 표적물질 검지용 SERS 조성물.

## 발명의 설명

## 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 박테리오파지를 골격으로 한 표면 증강 라만 산란(SERS)의 활성을 가지는 금 나노헤일로 구조체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 박테리오파지 MS2를 골격으로 하여, 링커로 복수개의 금 나노입자가 박테리오파지에 일정간격으로 균일하게 결합되어 있는 금 나노헤일로 구조체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0002] 표면 증강 라만 산란(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS) 기술은 최근 높은 민감성과 검지 대상에 대한 특이성으로 인해 검지 분야에서 주목을 받고 있다. 금속 표면에서 발생하는 전자의 진동과 금속 표면 주변에 존재하는 분석물의 전기적 상호작용은 분석물 분자가 가진 고유의 라만 산란 스펙트럼을 크게 증폭시킨다. 이러한 SERS 기반의 센서에서, 신호의 민감성과 안정성을 결정하는 가장 큰 요인은 분석물에서 발생하는 신호를 증폭하는 역할을 하는 금속 기질로서, 나노 스케일의 금속 구조의 표면에서 일어나는 국부적인 플라즈몬 공명 현상(LSPR)은 신호의 강도와 안정성을 향상시킨다 (A.H. Nguyen et al., 2015, Journal of Optics, 17, 114022).

[0003] SERS의 기질로 흔히 사용되는 것은 금 또는 은 나노입자를 염 등을 이용하여 응집한 응집물로, 나노입자 사이에 다수의 핫 스팟(hot-spot)을 형성하여 라만 신호를 크게 증폭할 수 있다 (B. Sharma et al., 2013, MRS Bulletin, 38, 615-624). 나노스피어, 나노로드, 나노스타, 나노와이어 등의 다양한 형상의 나노입자들이 이러한 SERS 기질에 응용되었으며, 이러한 방식으로 제조된 기질은 분석물 분자의 라만 신호를 109배 이상 증폭시킬 수 있다. 그러나 이러한 응집물을 기반으로 한 SERS 활성

[0004] 기질은 그 구조를 재현하는 것이 불가능하며, 이로 인한 낮은 신호 재현성이 지속적으로 지적되고 있다 (H. Liu et al., 2011, Scientific Reports, 1, 112).

[0005] 한편, 박테리오파지 MS2의 외피단백질은 약 28 nm 크기의 정20면체 구조로, 180개의 동일한 단백질이 결합한 구조를 가지고 있다. MS2 외피단백질은 내부의 RNA에 의해 규칙적이고 균일한 구조로 자가조립되며, 바깥 표면 전체에 걸쳐 총 360개의 개질 가능한 아민 작용기가 규칙적으로 배열되어 있다. MS2의 전체 구조는 물리적, 화학적으로 매우 안정하여, 표면 개질을 통해 펩티드, 고분자, DNA 압타머 등 다양한 물질을 표면에 고정하여 전달하는 전달체로 응용되고 있는 실정이다(S.L. Capehart et al., 2013, Journal of American Chemical Society, 135, 3011-3016).

[0006] 이에, 본 발명자들은 기존 SERS 기질의 단점재현성이 높은 SERS기질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 박테리오파지 MS2의 표면에 카르복실기 및 티올기를 가지는 링커로 금 나노입자를 균일하게 결합시킬 경우, 균일한 모양의 나노헤일로 구조체가 제조될 뿐만 아니라, SERS 신호 증폭 강도 역시 향상되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

[0008] **발명의 요약**

[0009] 본 발명의 목적은 박테리오파지 기반의 금 나노헤일로 구조체를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 박테리오파지 기반의 금 나노헤일로 구조체의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또다른 목적은 박테리오파지 기반의 금 나노헤일로 구조체의 용도를 제공하는데 있다.

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 표면에 아민 작용기가 배열된 박테리오파지에 카르복실기 및 티올기를 함유하는 링커를 통해 금 나노입자가 결합되어 있는 금 나노헤일로 구조체를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, (a) 링커의 카르복실기를 활성화 시키는 단계; (b) 상기 링커의 티올기와 금 나노입자를 결합시키는 단계; 및 (c) 상기 금 나노입자-링커의 카르복실기를 박테리오파지 표면의 아민기와 반응시키는 단계를 포함하는 금 나노헤일로 구조체의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 금 나노헤일로 구조체를 포함하는 표적물질 검지용 SERS 조성물을 제공한다.

## 도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명에 따른 금 나노헤일로 구조체의 제작 과정을 간략하게 도시한 도면이다.

도 2의 (A)는 음성 염색된 박테리오파지 MS2, (B)는 5 nm 금 나노입자, (C)는 제작된 금 나노헤일로 구조체의 TEM 이미지이다.

도 3의 (A)는 DLS를 통해 분석한 5nm 금 나노입자와 금 나노헤일로 구조체, MS2 파지의 크기 분포이고, (B)는 금 나노헤일로 구조체의 제작 과정에서의 UV-Vis 흡광 스펙트럼의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 5nm 금 나노입자에 캅토프릴 링커가 결합했을 때와 MS2 파지가 결합하여 금 나노헤일로 구조체를 이루었을 때 각각 발생하는 FT-IR 스펙트럼의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5는 malachite green 라만 염료의 라만 스펙트럼과, 금 나노헤일로 구조에 의해 신호 증폭된 라만 스펙트럼을 비교한 그래프이다.

도 6의 (A)는 3회에 걸쳐 측정된 금 나노헤일로 구조체에 의해 신호 증폭된 malachite green의 라만 스펙트럼을 비교한 그래프이고, (B)는 (A)의 스펙트럼 중 주요한 5개의 피크의 신호 강도의 평균 및 표준 편차를 나타낸 그래프이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0016] **발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예**

[0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0018] 본 발명에서는 박테리오파지 기반 금 나노헤일로 구조체의 SERS 활성을 확인하고자 하였다.

[0019] 본 발명자들은 일정한 간격을 가지는 금 나노입자 복합체를 제조하기 위하여 다양한 종류의 박테리오 파지의 표면에 링커를 이용하여 금 나노입자 복합체를 제조하였으나, 금 나노헤일로 구조는 박테리오파지 MS2에서만 가능한 것을 확인하였다.

[0020] 이는 다양한 종류의 박테리오파지가 서로 다른 구조를 가진 캡시드 단백질을 포함하고 있으며, 일정간격으로 아민기가 표출된 파지는 MS2 밖에 없기 때문이다.

[0021] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 박테리오파지 MS2의 표면의 아민기에 N-히드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS) 및 N-에틸-N'-(다이메틸아미노프로필)카르보다이이미드(N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC)를 처리하여 활성화된 카르복실 기 및 티올기를 함유하는 캅토프릴(captopril)의 티올기와 결합한 금 나노입자를 상기 캅토프릴의 카르복실기를 통해 배열하여, 박테리오파지 기반의 금 나노헤일로 구조체를 제조하였다(도 1).

[0022] 그 결과, 단순 금 나노입자에 비하여 금 나노헤일로 구조체의 SERS 신호 증폭효과가 뛰어남을 확인하였으며(도 5), 또한 한 종류의 분석물에 대하여 여러 차례의 측정에서 우수한 신호의 재현성을 확인하였다(도 6).

[0023] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 (a) 표면에 아민 작용기가 배열된 박테리오파지; (b) 카르복실기 및 티올기를 함유하는 링커; 및 (c) 금 나노입자를 포함하는 금 나노헤일로 구조체에 관한 것이다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 금 나노헤일로 구조체는 표면 증강 라만 산란(SERS) 활성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 박테리오파지는 MS2인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 상기 링커는 (2S)-1-[(2S)-2-메틸-3-설파닐프로파노일]피롤리딘-2-카로복실산((2S)-1-[(2S)-2-methyl-3-sulfanylpropanoyl]pyrrolidine-2-carboxylic acid, captopril) 인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 금 나노입자의 크기는 1~100nm인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 링커의 카르복실기를 활성화 시키는 단계; (b) 상기 링커의 티올기와 금 나노입자를 결합시키는 단계; 및 (c) 상기 금 나노입자-링커의 카르복실기를 박테리오파지 표면의 아민기와 반응시키

는 단계를 포함하는 금 나노헤일로 구조체의 제조방법에 관한 것이다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 N-히드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS) 및 N-에틸-N'-(다이메틸아미노프로필)카르보다이이미드(N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC)를 처리하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 박테리오파지는 MS2인 것을 특징으로 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 링커는 카르복실기 및 티올기를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 링커는 (2S)-1-[(2S)-2-메틸-3-설파닐프로파노일]피롤리딘-2-카로복실산((2S)-1-[(2S)-2-methyl-3-sulfanylpropanoyl]pyrrolidine-2-carboxylic acid, captopril)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 금 나노입자의 크기는 1~100nm인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명은 또 다른 관점에서 박테리오파지 기반의 금 나노헤일로 구조체의 용도에 관한 것이다.

[0035] 즉, 본 발명은 상기 금 나노헤일로 구조체를 포함하는 표적물질 검지용 SERS 조성물에 관한 것이다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 표적물질은 천연 화합물, 합성 화합물, DNA, RNA, 펩티드, 효소, 리간드 및 단백질로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에서 제조한 금 나노헤일로 구조체는 일정한 간격으로 핫 스팟을 형성할 수 있기 때문에 재현 가능한 SERS 신호를 생성할 수 있으며, 그 효율 또한 매우 뛰어나다. 예를 들어, 본 발명의 SERS 기질에 2차 항체를 고정화시킨 다음, 혈청에 특정항원과 결합하는 항체를 결합시킨 다음, 상기 2차 항체가 고정된 SERS 기질을 반응시키면, 높은 정확도와 민감도로 특정 항원을 검출할 수 있다.

[0038] 또는 본원 발명의 금 나노헤일로 구조체에 직접적으로 특정 항원을 검출하는 항체를 고정화 시킨 다음, 혈청에 주입한 뒤, SERS 염료를 이용하여 직접적으로 SERS 신호를 측정할 수 있다.

[0039] 이 때, SERS 염료는 ATP, R6G, 또는 TAMRA 라만 염료를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 상기와 같은 특정 항원은 예를 들어, 패혈증에 관한 바이오마커일 수 있으며, 상기 바이오마커는 프로칼시토닌(procalcitonin, PCT), C-반응성 단백질 (C-reactive protein, CRP) 및 골수 세포에서 발현되는 용해성 트리거링 리셉터-1 (Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, sTREM-1)일 수 있다.

[0041] 패혈증은 병원체 감염뿐만 아니라 감염으로 인한 염증 반응으로도 일어날 수 있으며(Reinhart et al., 25:609-634, 2012; Rittirsch et al., 8:776-787, 2008; Rascher et al., 59:251-258, 2014), 특히, 급성 복합 장기 부전을 일으킬 수 있기 때문에, 즉각적인 치료를 위해 조기에 정확한 진단을 필요로 한다.

[0042] 병원체의 직접적인 검출 과정에서, 혈액 배양 방식의 단점으로는 많은 시간 소모와, 30%에 불과한 낮은 민감도, 그리고 감염되는 박테리아의 약 30%는 배양이 불가능하다는 점이다(Calandra et al., 22:1538-1548, 2005). 다중 검지 실시간 PCR 기법을 이용한 혈류 내 병원체의 검진은 박테리아의 DNA가 혈액 내에 존재하지 않는 환자에 대해 위음성 (false negative)의 결과를 낼 위험이 있어, 패혈증 특이적인 바이오마커 분자의 검지가 고려되어 왔다.

[0043] 그러나, 단 한 종류의 특이적인 바이오마커만을 이용한 특이적이고 민감한 검지 방법은 아직 확립되지 않았다. 이에 대한 대안은 임상적으로 의미 있는 일군의 바이오마커들을 이용하는 것이다(Gibot et al.,186:65-71, 2008). 상기 세 종류의 바이오마커인 C-반응성 단백질, 프로칼시토닌, sTREM-1은 패혈증의 바이오마커로서 승인되었다(Zachariah et al., 36:1507-1512, 2008).

[0044] 본 발명은 또한, 상기 금 나노헤일로 구조체를 이용하여 표적물질을 검지하는 SERS 방법에 관한 것이다.

[0045] 본 발명은 또한, 상기 금 나노헤일로 구조체의 SERS 기반 표적물질 검지 용도에 관한 것이다.

[0046] 본 발명은 또한, 상기 금 나노헤일로 구조체를 포함하는 조성물의 SERS 기반 표적물질 검지의 사용에 관한 것이다.

[0047] 실시예

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0049] <실험방법>

[0050] 1. 화합물, 배지 및 균주

[0051] LB (Miller) 배지, N-히드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS), N-에틸-N'-(다이메틸아미노프로필)카르보다이이미드(N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC), 폴리에틸렌글리콜-8000(PEG-8000), 염화소듐(NaCl), 다이메틸 설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO), 캅토프릴(captopril), 포스포텅스텐산(phosphotungstic acid, PTA)은 Sigma-Aldrich에서 구매하였다. 수크로오스(sucrose)는 Amresco에서 구매하였다. PBS buffer는 Lonza에서 구매하였다. 5 nm 금 나노스피어는 BBI solutions에서 구매하였다.

[0052] 대장균(ATCC-15597)과 박테리오파지 MS2 (ATCC-15597-B1)은 ATCC에서 분양을 받았다.

[0053] 실시예 1. 박테리오파지 MS2의 배양

[0054] MS2 파지는 기존의 문헌에 따라 대장균에서 배양하였다 (J.M. Hooker et al., 2004, Journal of American Chemical Society, 126, 3718-3719). 24시간 동안 배양한 대장균-파지 현탁액은 4℃에서 30분 동안 5,000 ×g로 원심 분리하여 MS2 파지가 포함된 상층액을 분리하였다. 분리한 MS2 현탁액에 PEG-8000과 NaCl을 첨가하여, 최종 농도가 각각 9 %와 5.8% (w/v)이 되도록 하였다. 용액은 4℃에서 약 16시간 동안 보관하여 MS2 파지가 침전되도록 하였다. 침전된 MS2 파지를 4℃에서 1시간 동안 10,000 ×g로 원심 분리하였다. 분리한 MS2 파지를 원심분리 필터(Spin-X UF Concentrators 100K MWCO, Corning)를 이용하여 여과하였고, PBS buffer 용액에 보관하였다.

[0055] MS2 파지의 농도는 UV-Visible 분광광도계(UV-3600, Shimadzu)에서 260 nm 파장의 흡광도를 이용하여 측정하였으며, 실험에서는 약 1012pfu/mL의 농도로 보관 및 사용하였다.

[0056] 실시예 2. 금 나노헤일로 구조의 제작

[0057] 캅토프릴은 카르복실기와 티올기의 두 가지 작용기를 가지고 있는 분자로, 고혈압의 치료를 위해 사용되고 있는 물질이다. 본 발명에서는 향후의 의료 분야의 응용을 위해 캅토프릴을 금 나노입자와 MS2 파지를 연결하는 링커로 이용하였다. 캅토프릴은 DMSO에 60 mM 농도로 준비하였다. 캅토프릴 스톡 용액은 -20℃에서 보관하였다.

[0058] 캅토프릴의 카르복실기와 MS2 파지 상의 아민기를 연결하기 위해, 캅토프릴을 NHS-EDC 처리하였다. NHS와 EDC를 각각 DMSO 상에 120 mM 농도로 용해시키고, 이를 캅토프릴 스톡 용액과 부피비로 1:1로 혼합하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 5 nm 금 나노입자 용액 1.6 mL에 이 용액을 10 μL 첨가하였고, 30분 동안 반응시켜 캅토프릴의 티올기를 금 나노입자에 결합시켰다.

[0059] 캅토프릴로 표면 개질된 금 나노입자는 4℃에서 5분간 12,000 ×g로 원심분리하여 반응하지 않은 컵토프릴과 NHS, EDC를 제거하였다. 금 나노입자는 다시 1.6 mL의 증류수에 분산시켰으며, 1 mL MS2 파지 현탁액과 혼합하여 상온에서 24시간 동안 반응시켜 나노헤일로 구조를 제작하였다.

[0060] 제작한 나노헤일로 구조체는 밀도 구배 원심분리(density-gradient centrifugation)를 이용하여 분리하였다. 30%, 40%, 50% 농도의 수크로오스 수용액을 준비하고, 15 mL Falcon tube에 2 mL씩 첨가하여 밀도에 따른 층이 지도록 만들었다. 그 위에 제작한 나노헤일로 구조 용액을 2 mL 첨가하였고, 4℃에서 15분 동안 5,000 ×g로 원심분리하여 반응하지 않은 금 나노입자와 나노헤일로 구조체를 분리하였다. 분리된 나노헤일로 구조체는 증류수를 이용하여 3회 세척하였다.

[0061] 실시예3. 금 나노헤일로 구조의 분석

[0062] 5 nm 금 나노입자와 MS2 파지, 나노헤일로 구조체는 동적 광산란법(dynamic light scattering)과 UV-Vis 분광법, FT-IR, TEM을 통해 분석하였다. 동적 광산란법은 나노 크기의 입자의 크기별 분포를 확인하기 위한 방법으로, Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical)을 이용하였다. 5 nm 금 나노입자와 나노헤일로 구조체의 400-800 nm 파장대의 스펙트럼을 UV-Vis 분광광도계 (UV-3600, Shimadzu)를 이용하여 기록하였다.

[0063] FT-IR은 MS2 파지와 캅토프릴 링커, 금 나노입자의 결합 형성을 확인하기 위한 것으로, Cary 630 FTIR Spectrometer (Agilent Technologies)를 이용하여 650-4000 cm-1범위에서 기록하였다.

[0064] 금 나노입자와 MS2 파지, 나노헤일로 구조체의 TEM 이미지는 TECNAI 20 전자현미경 (FEI)를 이용하여 확인하였다. MS2 파지의 TEM 이미지를 얻기 위해 음성 염색(negative staining) 처리하였다. MS2 파지 현탁액 5 μL를 copper-coated TEM grid (Ted Pella) 상에 떨어뜨리고, 1분 후 증류수로 세척하였다. 그 후 TEM grid 상에 1% PTA 수용액을 5 μL 떨어뜨려 MS2 파지를 1분 간 염색한 후, 증류수로 다시 세척하고 여과지로 닦아내었다.

[0065] 그 결과, 도 2 및 도 3에 개시된 바와 같이 박테리오파지 표면에 금 나노입자가 균일하게 배열되어 일정한 크기와 형태를 가지는 나노헤일로 구조를 형성하였음을 확인하였으며, 또한 도 4에 개시된 바와 같이 이러한 구조의 형성이 캅토프릴 링커에 의한 것임을 확인할 수 있다.

[0066] 실시예 4. 금 나노헤일로 구조의 라만 신호 증폭 효과 분석

[0067] 금 나노헤일로 구조체의 라만 신호 증폭 효과는 FEX spectroscopy 시스템 (NOST)을 이용하여 확인하였다. 금 나노헤일로 구조체는 유리 슬라이드 (Brain Research Laboratories) 상에 떨어뜨려 건조시켰다. 라만 신호를 분석할 분석물로는 라만 염료의 일종인 malachite green을 사용하였다. $10^{-6}$M농도의 malachite green oxalate (Sigma-Aldrich) 수용액을 유리 슬라이드에 건조시킨 나노헤일로 구조체 상에 떨어뜨려 건조시켰다.

[0068] 건조시킨 샘플에는 직립 현미경 (Eclipse Ni-U, Nikon)의 100배 대물 렌즈 (TU Plan ELWD 100x, Nikon, 0.6 NA, 0.56mm WD)를 이용하여 785 nm 파장의 레이저를 조사하였다. 레이저의 편광 방향은 선형 편광기 (PRM 1 / M, Thorlabs)에 의해 제어되었다. 분석물에서 발생한 라만 스펙트럼은 FEX spectroscopy 시스템과 CCD 카메라 (Newton 920, Andor Technology)를 이용하여 측정하였다.

[0069] 대조군으로써, 나노헤일로 구조체가 없는 상태에서 $10^{-2}$M 농도의 malachite green 염료를 유리 기판 상에 떨어뜨린 시료의 라만 스펙트럼을 측정하였으며, 두 스펙트럼의 신호 강도를 비교하여 신호 증강 효과를 확인하였다. SERS의 신호 증강 효과를 나타내는 척도인 enhancement factor는 하기 수식 1로 계산하였다.

[0070] 수식 1 $$EF = \frac{I_{SERS}}{M_{SERS}/A_{SERS}} \times \frac{M_{Raman}/A_{Raman}}{I_{Raman}}$$

[0071] 여기에서 I는 스펙트럼 상에서 특정한 피크의 강도, M은 분석물의 농도, A는 건조된 이후 분석물이 차지하는 면적을 의미하며, 아랫첨자 SERS는 신호 증강된 스펙트럼, Raman은 신호 증강 효과를 받지 않은 스펙트럼을 의미한다.

[0072] 그 결과, 도 5에 개시된 바와 같이 금 나노헤일로 구조체가 분석물의 라만 스펙트럼을 크게 증폭시켰음을 확인할 수 있다. 또한, 1178 $cm^{-1}$ 위치의 피크에 대한 enhancement factor를 계산하면 산술적으로 $4.1\times10^{7}$ 배의 신호 증폭 효과가 나타났음을 확인할 수 있다.

[0073] 또한, 나노헤일로 구조로 인한 신호 증강 효과의 재현성을 확인하기 위하여 3회에 걸쳐 동일한 과정을 거쳐 나노헤일로 구조를 제작하여 동일한 방식으로 라만 스펙트럼을 측정하였으며, 분석물인 malachite green의 라만 스펙트럼에서 주요한 피크들의 강도를 비교하였다.

[0074] 그 결과, 도 6에 개시된 바와 같이 금 나노헤일로의 구조체로 인한 SERS 신호 강도가 3회의 측정에서 모두 거의 동일하게 나왔음을 확인할 수 있으며, 특히 대표로 선정된 5개의 피크(1177, 1298, 1372, 1397, 1593 $cm^{-1}$)에서 신호 강도가 표준 편차 7% 이내에서 일관되게 나타남을 확인할 수 있다.

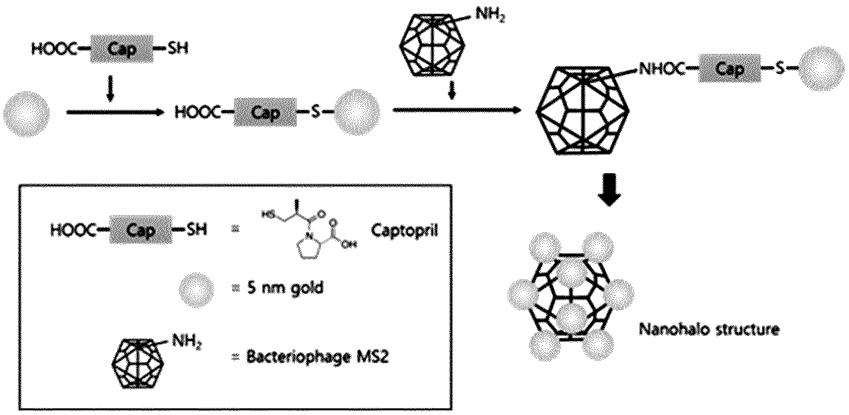
[0075] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## *산업상 이용가능성*

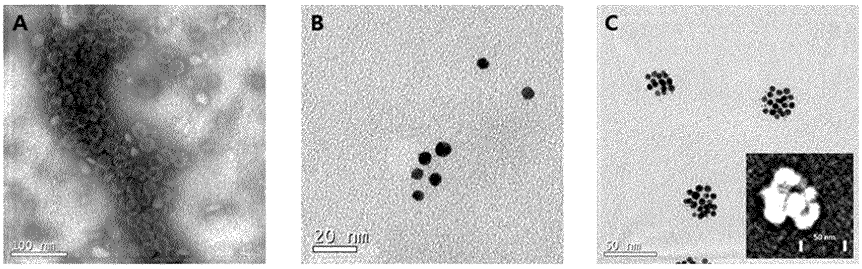
[0076] 본 발명에 따른 금 나노헤일로 구조체는 구조체 상의 규칙적인 핫 스팟의 생성으로 일관성 있는 SERS 신호를 생성할 수 있으며, 이를 기반으로 하여 SERS 기반 진단키트 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

도면

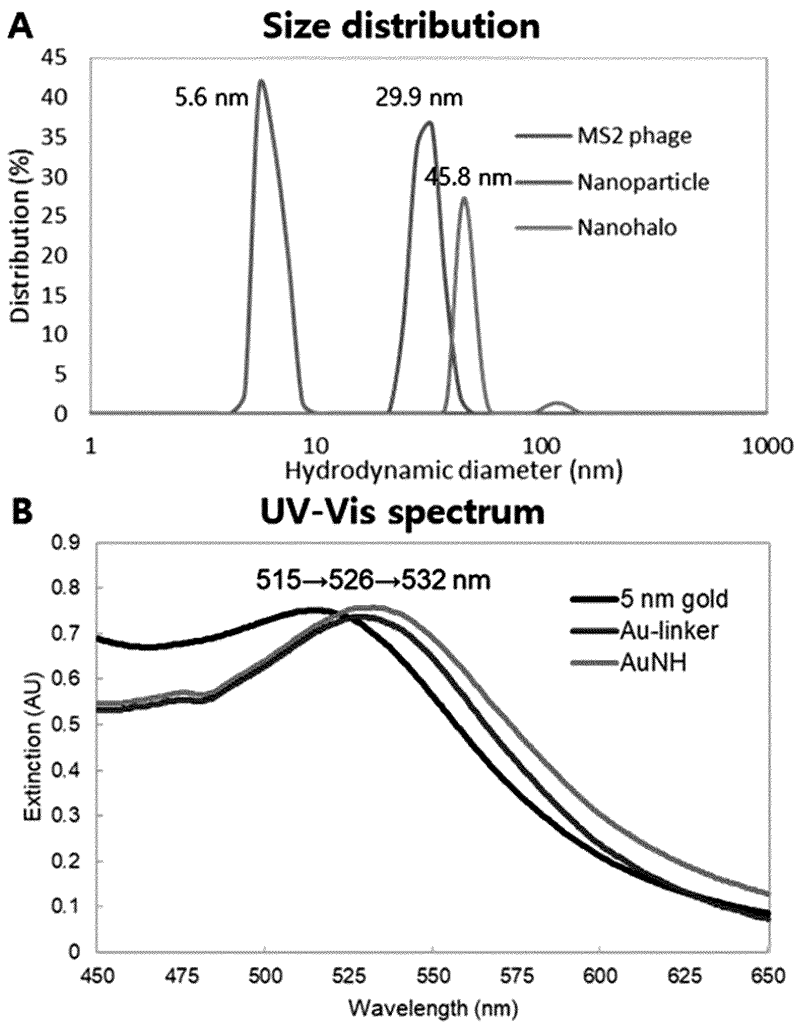
도면1


HOOC— Cap —SH
HOOC— Cap —S—
NH2
NHOC— Cap —S—
HOOC— Cap —SH = Captopril
= 5 nm gold
NH2 = Bacteriophage MS2
Nanohalo structure

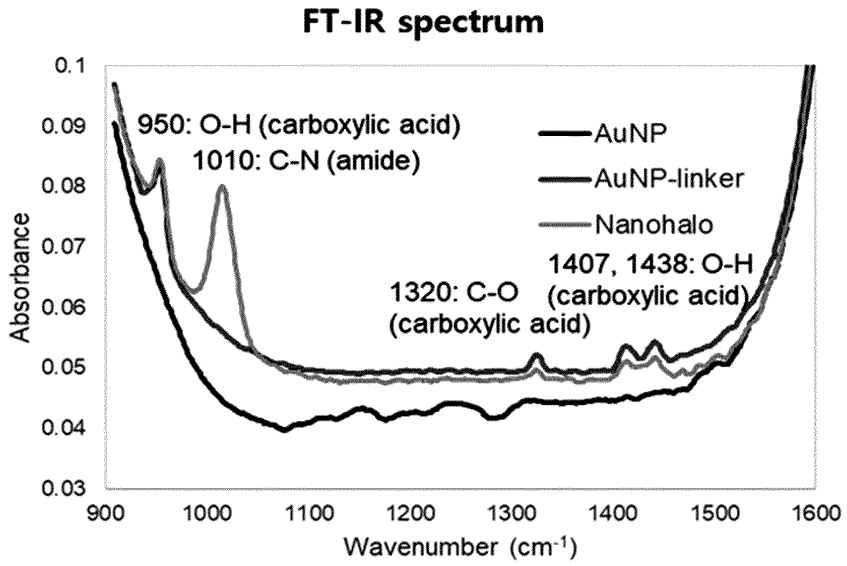
도면2


A
B
C
20 nm
20 nm
50 nm

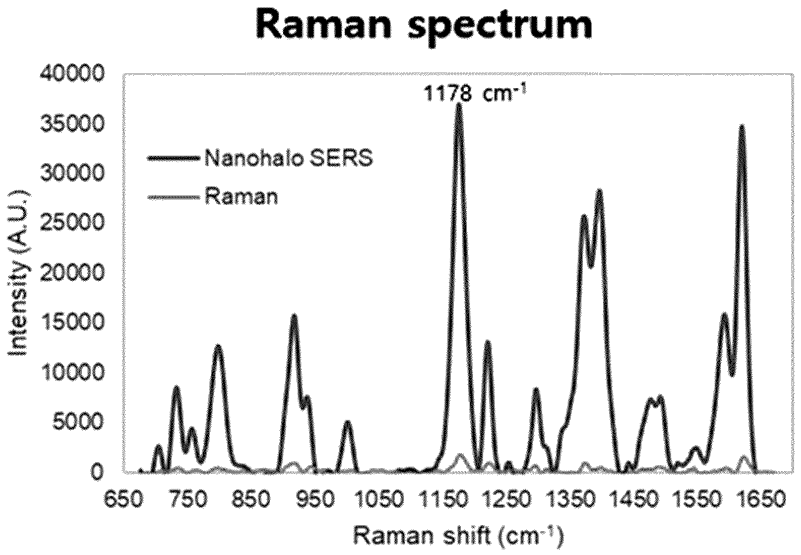
도면3


A
Size distribution
5.6 nm
29.9 nm
45.8 nm
MS2 phage
Nanoparticle
Nanohalo
Distribution (%)
Hydrodynamic diameter (nm)
B
UV-Vis spectrum
515→526→532 nm
5 nm gold
Au-linker
AuNH
Extinction (AU)
Wavelength (nm)

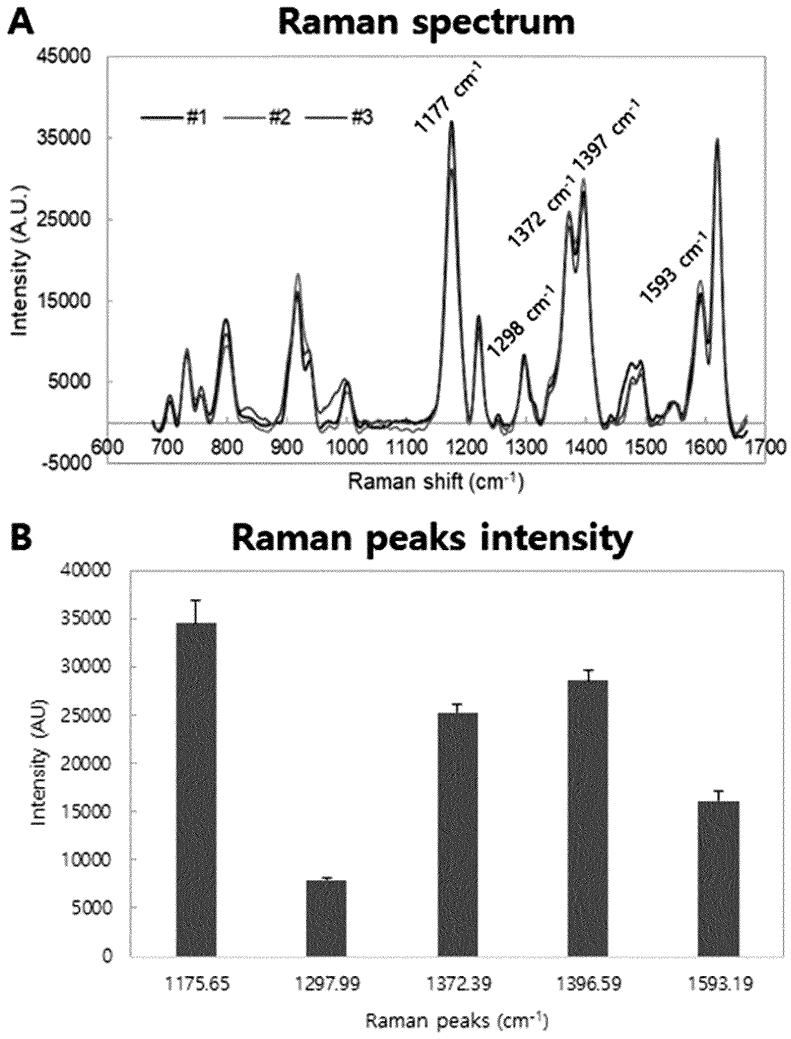
도면4


FT-IR spectrum
950: O-H (carboxylic acid)
1010: C-N (amide)
AuNP
AuNP-linker
Nanohalo
1407, 1438: O-H (carboxylic acid)
1320: C-O (carboxylic acid)
Absorbance
Wavenumber (cm-1)

도면5


Raman spectrum
1178 cm-1
Nanohalo SERS
Raman
Intensity (A.U.)
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
650 750 850 950 1050 1150 1250 1350 1450 1550 1650
Raman shift (cm-1)

도면6


A
Raman spectrum
#1 #2 #3
1177 cm-1
1372 cm-1
1397 cm-1
1298 cm-1
1593 cm-1
Intensity (A.U.)
45000
35000
25000
15000
5000
-5000
600 700 800 900 1000 1100 1200 1300 1400 1500 1600 1700
Raman shift (cm-1)
B
Raman peaks intensity
Intensity (AU)
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
1175.65
1297.99
1372.39
1396.59
1593.19
Raman peaks (cm-1)