



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0032515
(43) 공개일자 2018년03월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) G01N 21/552 (2014.01)
G01N 33/553 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54386 (2013.01)
G01N 21/554 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0122344
(22) 출원일자 2017년09월22일
심사청구일자 2017년09월22일
(30) 우선권주장
1020160121353 2016년09월22일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호
이종욱
서울특별시 구로구 신도림로 87, 105동 201호
김우현
경기도 남양주시 미금로57번길 20, 711동 2002호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 10 항

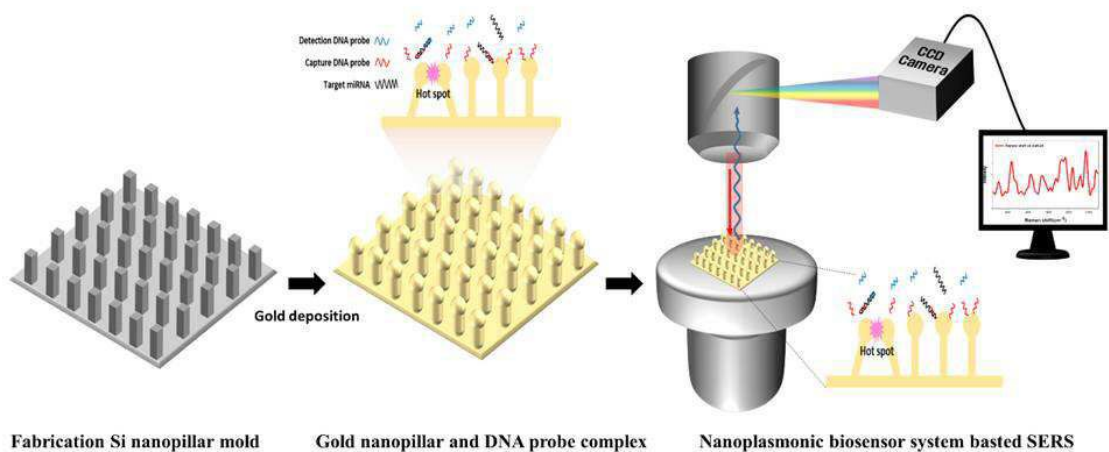
(54) 발명의 명칭 나노 플라즈모닉 바이오센서 및 이를 이용한 발병 표지 인자의 검출방법

(57) 요약

본 발명은 혈액 내에 존재하는 발병 표지 인자를 높은 선택성, 고감도로 다중 비표지 검출할 수 있는 나노 플라즈모닉 바이오센서 및 이를 이용하여 발병 표지 인자를 검출하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 혈액 내에 존재하는 발병 표지 인자인 miRNA를 높은 선택성, 고감도로 다중 비표지 검출할 수 있으며, 따라서 miRNA 관련 질병의 진단 및 임상적 적용에 효과적으로 응용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/553 (2013.01)

G01N 2800/50 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016929347

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 성균관대학교 산학협력단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 진단/치료용 고분자 소재 연구센터

기 여 율 10/100

주관기관 성균관대학교

연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2A1A05005465

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 생물공정의 실시간 모니터링을 위한 나노플라즈몬 검지 플랫폼의 기술 개발

기 여 율 80/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014M1A8A1049278

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 (재)한국이산화탄소포집및처리연구개발센터

연구사업명 거대과학연구개발사업(Korea CCS 2020사업)

연구과제명 생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술

기 여 율 10/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

일면에 다수의 돌기가 서로 이격되어 배열된 기판;

금 입자가 각각의 상기 돌기의 외면을 감싸는 박막 형태로 코팅되어 형성된 다수의 금 나노필라; 및

발병 표지 인자인 마이크로 RNA의 염기서열 중 일부와 상보적으로 결합되는 염기서열을 포함하는 단일가닥 제1 DNA 또는 단일가닥 제1 LNA로 형성되고, 다수의 상기 금 나노필라 중 적어도 어느 하나 이상의 금 나노필라 말단에 결합되는 캡처부;를 포함하는 나노 플라즈모닉 바이오센서.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 마이크로 RNA가 상기 캡처부와 결합되면,

다수의 상기 금 나노필라 중 적어도 2개 이상의 말단이 소정의 위치를 향해 수렴하는 것을 특징으로 하는 나노 플라즈모닉 바이오센서.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 마이크로 RNA가 상기 캡처부와 결합될 때에 라만신호가 1차 증폭되는 것을 특징으로 하는 나노 플라즈모닉 바이오센서.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 마이크로 RNA의 염기서열 중 다른 일부와 상보적으로 결합되는 염기서열을 포함하는 단일가닥 제2 DNA 또는 단일가닥 제2 LNA로 형성되는 검출부;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 나노 플라즈모닉 바이오센서.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 마이크로 RNA가 상기 검출부와 결합될 때에 라만신호가 2차 증폭되는 것을 특징으로 하는 나노 플라즈모닉 바이오센서.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단일가닥 제1 DNA 또는 단일가닥 제1 LNA의 일 말단은 싸이올기로 개질된 것을 특징으로 하는 나노 플라즈모닉 바이오센서.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 기판은 Si로 이루어지고, 상기 돌기는 상기 기판의 일면으로부터 연장 돌출된 것을 특징으로 하는 나노 플라즈모닉 바이오센서.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 기관의 일면이 상기 금 입자로 커버되는 것을 특징으로 하는 나노 플라즈모닉 바이오센서.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 마이크로 RNA는 miR-10b, miR-21 및 miR-373으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 나노 플라즈모닉 바이오센서.

청구항 10

제1항에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서를 이용하여 발병 표지 인자를 검출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈액 내에 존재하는 발병 표지 인자를 높은 선택성, 고감도로 다중 비표지 검출할 수 있는 나노 플라즈모닉 바이오센서 및 이를 이용하여 발병 표지 인자를 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 2012년 약 1400만 건의 새로운 사례와 8.2백만 건의 암 관련 사망으로 인해 환자 사망의 원인이 되는 가장 위험한 질환 중 하나이며, 이 사망률은 향후 20년 동안 약 70% 증가할 것으로 예상된다(Larrea E., Sole C., Manterola L., Goicoechea I., Armesto M., Arestin M., Caffarel M. M., Araujo A. M., Araiz M., Fernandez-Mercado M. and Lawrie C. H., Int. J. 2016, Mol. Sci. 17, 627). 따라서, 선진적이고 효과적인 암 진단의 필요성이 증가하고 있으며, 전술한 통계에 따르면, 초기 단계 및 전이 단계의 탐지는 암의 진단 및 치료를 위한 필수 전제 조건이다. 그러나 암의 초기 단계에서 충분한 양의 샘플을 수집하는 것은 쉽지 않고, 질병의 발병시에 통상적인 바이오마커가 종종 관찰되는바, 효과적인 진단을 위해 생체 정보 및 적합한 바이오마커를 조사하기 위한 연구들이 진행되어 왔다.

[0003] 이 과정에서 전사 과정에서 mRNA와 상보적으로 결합해 세포 내 유전자 발현과정에서 중추적인 조절 인자로 작용하는 마이크로RNA(miRNA)가 새롭게 주목을 끌고 있다. 또한, 이 RNA는 조직과 혈액에서 암 발병 및 종양 단계의 진행을 발현 수준의 차이를 통해 나타내는데(Zhang Z. J. and MA S. L., 2012. ONCOLOGY REPORTS 27, 903-910.), 특히 miRNA는 암세포의 세포 사멸과 괴사뿐 아니라 활성화된 방출로 인해 세포로부터 방출되어 혈청, 혈장, 소변, 타액 등의 생체 유체에 분비될 수 있다는 연구가 보고된바 있다(Cortez M. A., Bueso-Ramos C., Ferdin J., Lopez-Berestein G., Sood A. K., and Calin G. A., 2011, Nature Reviews Clinical Oncology, 8, 467-477.). 순환하는 무세포 miRNA라고 불리는 이 miRNA는 암 세포의 특정 정보를 포함하고 혈장과 혈청에서 높은 안정성을 갖기 때문에 암 진단에 있어 주목할만한 바이오마커로 볼 수 있다. 전이 암세포에서 과발현된 miR-10b는 miR-10b (MIRN10B)의 프로모터에 직접 결합하는 전사 인자 트위스트에 의해 유도되고, homeobox D10을 코딩하는 메신저 RNA의 번역을 조절하며, 결과적으로 잘 알려진 pro-metastatic 유전자 RHOC의 발현을 증가시킨다(Ma L., Teruya-Feldstein J. and Weinberg R. A., 2007. NATURE 449). 교모세포종, 유방암, 폐암 및 만성 림프구성 백혈병을 포함한 암의 전이 상태에서 정상 세포보다 상향 조절되는 여러 miRNA가 조사되었다(Yan L. X., Huang X. F., Shao Q., Huang Y. M., Deng L., Wu Q. L., Zeng Y. X. and Shao J. Y., 2008. RNA 14, 2348-2360.). miR-21은 가장 과발현되고, RAS p21 단백질 활성화제 (RASA1) 유전자를 조절하는 상향조절 된 miRNA 중 하나이다. miR-373의 과발현은 암 세포 이동을 유도하고 암 억제제 (LATS2)의 직접 저해를 통해 종양 유전자에 의해 유도된 p53 경로를 억제하며 부분적으로 발암성 RAS의 세포 형질 전환을 촉진한다. 또한, CD44 표면 당 단백질 발현과 역의 관련이 있는 miR-373은 임상 암 전이 상태에서 상향조절된다(Huang Q., Gumireddy K., Schrier M., Le Sage C., Nagel R., Nair S. Egan D. A., Li A., Huang, G. H., Klein-Szanto A. J., Gimotty P. A., Katsaros D., Coukos G., Zhang L., Pure E. and Agami R., 2008 Nature Cell Biology 10.2, 202-10.). 이러한 연구를 통해 miRNA가 암 진단 및 예후에 중요한 바이오마커로 사용될 수 있다는 사실이 밝혀졌으며, 따라서 혈액 샘플에서 miRNA 발현 수준을 확인하기 위한 고급 검출 시스템의 개발이 연구되고 있다.

[0004] 수년 동안 miRNA 검출 시스템은 다양한 방법으로 개발되었다. 전통적으로 노던 블로팅 및 클로닝은 miRNA 검출을 위한 기본적인 방법이었다(Valoczi A., Hornyik C., Varga N., Burgyan J., Kauppinen S. and Havelde Z., 2004. Nucleic Acids Res. 32(22), e175). 최근에는 RT-PCR과 마이크로어레이(microarray)가 miRNA 검출에 가

장 많이 사용되고 있다. 그러나 RT-PCR과 마이크로어레이는 cDNA 합성과 고가의 물질 및 형광 물질을 필요로 한다(Chen C., Ridzon D. A., Broomer A. J., Zhou Z., Lee D. H., Nguyen J. T., Barbisin M., Xu N. L., Mahuvakar V. R., Andersen M. R., Lao K. Q., Livak K. J. and Guegler K. J., 2005. Nucleic Acids Res. 33(20), e179.). 또한, 이러한 miRNA의 검출 방법은 miRNA가 작은 뉴클레오타이드로 구성되며, 혈액 내 소량 존재한다는 점, 정성적 분석에만 초점을 맞추고 있다는 점에서 한계가 존재한다(Hamidi-Asl E., Palchetti I., Hasheminejad E., and Mascini M., 2013. Talanta 115, 74-83). 이에, 최근에 miRNA in-situ 검출 방법과 정량 실시간 PCR (qRT-PCR)들이 보고되었으나, 전처리 단계를 거쳐야 하며 표적 miRNA를 검출하고 miRNAs의 정량화를 위해 추가 표지가 필요하고, 이들 표지들은 화학적 변형 DNA로 인해 비용이 증가하고 miRNA 검출을 보다 복잡하게 만든다는 문제가 있다(Abell J. L., Garren J. M., Driskell J. D., Tripp R. A., and Zhao Y., 2012. J. Am. Chem. Soc 134, 12889-12892). 또한, 형광 등을 이용하는 방법은 여기 광 또는 환경 인자로부터의 퀀칭 효과에 민감하다는 단점이 있기 때문에 장래 실제 환자 진단에 적용함에 있어 주요 장애로 지적되고 있다.

[0005] 이러한 과제를 해결하기 위해 감도와 선택성이 향상된 새로운 miRNA 검출 방법들이 보고되었다. 그중 프라이머 신장, 등온 지수 증폭 및 롤링 사이클 증폭을 포함한 PCR-free 신호 증폭 기술을 사용하는 방법은 비효율적이고 부정확한 증폭 문제를 해결하였다. 둘째, SPR과 같은 전기적 방법을 사용하는 방법은 금 나노 입자, 양자점, 자성 입자 등이 포함된 나노 물질을 기반으로 한다(Tian T., Wang J. and Zhou X., 2015 Org. Biomol. Chem. 13, 2226-2238). 특히, 표면 증강 라만 산란 (SERS)은 miRNA 검출을 위한 향상된 방법 중 하나로, 이전의 라만 산란보다 10^4 에서 10^9 배의 높은 민감도를 갖는 것으로 알려져있다(Nguyen A. H., Lee J. U. and Sim S. J., 2015. J. Opt. 17, 114022). 금속 표면에서 라만 신호의 향상은 분자 주변의 전자의 진동으로 인해 금속과 분석물 사이의 국부적인 표면 플라즈몬 공명 (LSPRs)에 기인한다(Lee J. U., Nguyen A. H., and Sim S. J., 2015. Biosensors and Bioelectronics 74 341-346). 금속의 경우, 나노 스케일 구조 표면의 플라즈몬 공명 산란은 재현성과 전자기장 (EM)을 현저하게 향상시키는 구조 형태의 견고성에 의존한다(Sharma B., Frontiera R. R., Henry A. I., Ringe E., and Van Duyne R. P., 2012. Materialstoday 15 1-2). 그러나 SERS는 전통적으로 신호 재현성이 낮다는 문제점이 계속적으로 제기되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명에서는 발병 표지 인자인 마이크로 RNA를 높은 선택성, 고감도로 다중 비표지 검출할 수 있는 나노 플라즈모닉 바이오센서 및 이를 이용하여 발병 표지 인자를 검출하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 일면에 다수의 돌기가 서로 이격되어 배열된 기판; 금 입자가 각각의 상기 돌기의 외면을 감싸는 박막 형태로 코팅되어 형성된 다수의 금 나노필라; 및 발병 표지 인자인 마이크로 RNA의 염기서열 중 일부와 상보적으로 결합되는 염기서열을 포함하는 단일가닥 제1 DNA 또는 단일가닥 제1 LNA로 형성되고, 다수의 상기 금 나노필라 중 적어도 어느 하나 이상의 금 나노필라 말단에 결합되는 캡처부;를 포함하는 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제공한다.

[0008] 본 발명에 따르면, 상기 마이크로 RNA가 상기 캡처부와 결합되면, 다수의 상기 금 나노필라 중 적어도 2개 이상의 말단이 소정의 위치를 향해 수렴할 수 있다.

[0009] 또한, 상기 마이크로 RNA가 상기 캡처부와 결합될 때에 라만신호가 1차 증폭될 수 있다.

[0010] 본 발명에 따르면, 상기 마이크로 RNA의 염기서열 중 다른 일부와 상보적으로 결합되는 염기서열을 포함하는 단일가닥 제2 DNA 또는 단일가닥 제2 LNA로 형성되는 검출부;를 더 포함할 수 있다.

[0011] 또한, 상기 마이크로 RNA가 상기 검출부와 결합될 때에 라만신호가 2차 증폭될 수 있다.

[0012] 본 발명에 따르면, 상기 단일가닥 제1 DNA 또는 단일가닥 제1 LNA의 일 말단은 싸이클기로 개질된 것일 수 있다.

[0013] 본 발명에 따르면, 상기 기판은 Si로 이루어지고, 상기 돌기는 상기 기판의 일면으로부터 연장 돌출된 것일 수 있다.

- [0014] 본 발명에 따르면, 상기 기관의 일면이 상기 금 입자로 커버되는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명에 따르면, 상기 마이크로 RNA는 miR-10b, miR-21 및 miR-373으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 나노 플라즈모닉 바이오센서를 이용하여 발병 표지 인자를 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따르면, 혈액 내에 존재하는 발병 표지 인자인 miRNA를 높은 선택성, 고감도로 다중 비표지 검출할 수 있으며, 따라서 miRNA 관련 질병의 진단 및 임상적 적용에 효과적으로 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서의 제조 공정 및 이를 이용하여 발병 표지 인자를 검출하는 개략적인 개념을 도시한 도면이다.
- 도 2의 (A)는 샘플 처리 전의 금 나노필라의 구조를 나타낸 SEM 이미지이고, (B)는 샘플을 처리하여 캡처부와 결합된 금 나노필라의 변형된 구조를 나타낸 SEM 이미지이다.
- 도 3의 (A)는 Bare 금 나노필라, 제1 DNA(캡처 DNA)와 결합된 금 나노필라, 타겟 miR-10b와 혼성화된 제1 DNA(캡처 DNA)와 결합된 금 나노필라, 제2 DNA 및 타겟 miR-10b와 혼성화된 제1 DNA(캡처 DNA)와 결합된 금 나노필라 각각의 라만 신호 변화를 나타낸 것이고, (B)는 제2 DNA 및 타겟 miR-10b와 혼성화된 제1 DNA(캡처 DNA)와 결합된 금 나노필라의 혈청 농도 100nM에서의 라만 스펙트럼, (C)는 제2 DNA 및 타겟 miR-21과 혼성화된 제1 DNA(캡처 DNA)와 결합된 금 나노필라의 혈청 농도 100nM에서의 라만 스펙트럼, (D)는 제2 DNA 및 타겟 miR-373과 혼성화된 제1 DNA(캡처 DNA)와 결합된 금 나노필라의 혈청 농도 100nM에서의 라만 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- 도 4는 피크 2에서 각각 miR-10b, miR-21, miR-373과의 비특이적 결합을 평가하기 위한 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서의 라만 신호 강도를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 환자 모방 혈청을 표본으로 하여, 각 피크에서의 타겟 miR-10b의 농도에 따른 SERS 신호 강도를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 피크 1에서 각각 miR-10b, miR-21, miR-373과의 비특이적 결합을 평가하기 위한 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서의 라만 신호 강도를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 환자 모방 혈청을 표본으로 하여, 각 피크에서의 타겟 miR-21의 농도에 따른 SERS 신호 강도를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 환자 모방 혈청을 표본으로 하여, 각 피크에서의 타겟 miR-373의 농도에 따른 SERS 신호 강도를 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 본 발명에 따라 miR-10b와 상보적인 염기서열을 포함하는 DNA와, LNA를 각각 사용한 경우에 SERS의 강도 및 선형 회귀 그래프를 비교 실험한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 10의 (A)는 본 발명의 실시예에 따라 라만 맵핑법을 수행하는 과정(맵핑 영역 선택, 지문 피크에서 ROI(관심 영역) 할당, 맵핑 영역에서 맵핑 그래프 얻기)을 나타내고, (B)는 지문 피크에서 각 miRNA의 맵핑 그래프를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명은 혈액 내에 존재하는 발병 표지 인자를 높은 선택성, 고감도로 다중 비표지 검출할 수 있는 나노 플라즈모닉 바이오센서 및 이를 이용하여 발병 표지 인자를 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0021] 하기 도 1은 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서의 제조 공정 및 이를 이용하여 발병 표지 인자를 검출하는 개략적인 개념을 도시한 도면이다. 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명은 금 나노필라 말단에 결합되고, 발병 표지 인자인 마이크로 RNA의 염기서열 중 일부와 상보적으로 결합되는 염기서열을 포함하는 단일가닥 제1 DNA(capture DNA) 또는 단일가닥 제1 LNA와의 혼성화를 통해 상기 금 나노필라 중 적어도 2개 이상의 말단이 소정의 위치를 향해 수렴(이하 "head-locked"라고도 칭함)하는 현상에 의해 1차 증폭되는 라만 신호, 상기 마이

크로 RNA의 염기서열 중 다른 일부와 상보적으로 결합되는 염기서열을 포함하는 단일가닥 제2 DNA(detection DNA) 또는 단일가닥 제2 LNA가 상기 제1 DNA 또는 단일가닥 제1 LNA(Locked nucleic acid)와 혼성화된 마이크로 RNA와의 완전한 혼성화를 통해 2차 증폭되는 라만 신호를 이용하여 혈액 내에 존재하는 발병 표지 인자인 miRNA를 높은 선택성, 고감도로 다중 비표지 검출할 수 있는 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제공한다.

[0022] 구체적으로, 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서는 일면에 다수의 돌기가 서로 이격되어 배열된 기판; 금 입자가 각각의 상기 돌기의 외면을 감싸는 박막 형태로 코팅되어 형성된 다수의 금 나노필라; 및 발병 표지 인자인 마이크로 RNA의 염기서열 중 일부와 상보적으로 결합되는 염기서열을 포함하는 단일가닥 제1 DNA 또는 단일가닥 제1 LNA로 형성되고, 다수의 상기 금 나노필라 중 적어도 어느 하나 이상의 금 나노필라 말단에 결합되는 캡처부;를 포함한다.

[0023] 이때, 상기 마이크로 RNA가 상기 캡처부와 결합되면, 다수의 상기 금 나노필라 중 적어도 2개 이상의 말단이 소정의 위치를 향해 수렴(head-flocked)할 수 있으며, 이처럼 상기 마이크로 RNA가 상기 캡처부와 결합될 때에 라만신호가 1차 증폭될 수 있다.

[0024] 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서는 발병 표지 인자인 miRNA를 높은 선택성, 고감도로 다중 비표지 검출하기 위해, 상기 마이크로 RNA의 염기서열 중 다른 일부와 상보적으로 결합되는 염기서열을 포함하는 단일가닥 제2 DNA 또는 단일가닥 제2 LNA로 형성되는 검출부;를 더 포함할 수 있다.

[0025] 이때, 상기 마이크로 RNA가 상기 검출부와 결합되면, 결과적으로 마이크로 RNA, 제1 DNA(또는 제1 LNA) 및 제2 DNA(또는 제2 LNA)가 완전히 혼성화됨으로써 라만신호가 2차적으로 증폭될 수 있다. 이처럼 마이크로 RNA, 제1 DNA(또는 제1 LNA) 및 제2 DNA(또는 제2 LNA)가 완전한 혼성화를 통한 라만신호를 확인함으로써 타겟 마이크로 RNA의 지문 피크를 확인할 수 있으며, 동시에 비특이적 결합에 의한 비혼성화 여부도 함께 확인할 수 있는바, 발병 표지 인자인 마이크로 RNA를 높은 선택성, 고감도로 다중 비표지 검출할 수 있게 된다.

[0026] 상기 단일가닥 제1 DNA의 일 말단은 상기 금 나노필라와 효율적으로 결합하기 위하여 싸이올기로 개질되는 것이 바람직하다.

[0027] 상기 기판은 Si로 이루어지고, 상기 돌기는 상기 기판의 일면으로부터 연장 돌출되는 것이 바람직하다.

[0028] 또한, 상기 기판의 일면은 상기 금 입자로 커버되는 것이 바람직하다.

[0029] 상기 마이크로 RNA는 발병 표지 인자로 사용될 수 있는 것이라면 제한 없이 사용가능하며, 예를 들어 miR-10b, miR-21 및 miR-373으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 나노 플라즈모닉 바이오센서를 이용하여 혈액 내에 존재하는 발병 표지 인자인 miRNA를 검출하는 방법을 제공한다.

[0032] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0034] 재료 및 방법

[0035] 재료

[0036] BOROFLOAT® 33은 Schott (North America)에서 구입하였다. Au pellet Ø 3 × 3h 99.99%는 Sin-woo metal(한국)에서 구입하였다. 사람 혈청, 무수 황산나트륨(Na_2SO_4), 염화나트륨 (NaCl), 트리소듐시트레이트, 염산(HCl, 물에서 37중량 %), 6-머캅토-1-헥산올 (MCH 97 %), 1,4-디티오프테이트(DTT), 에틸 아세테이트 (무수 99.8%)는 Sigma Aldrich(한국)에서 구입하였다. Nuclease-free water Ambion®은 ThermoFisher scientific(한국)에서 구입하였으며, DNA Lobind 1.5mL 튜브는 Eppendorf에서 구입하였다. 모든 용액을 준비하기 위해 초순수 ($18.2 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$)를 사용하였고, 모든 DNA 프로브와 타겟 miRNA 서열은 Bioneer(한국)에서 구입하였다.

[0038] 타겟 miRNA와의 혼성화를 위한 DNA probe의 합성

[0039] miRNA를 합성하고, 이의 상보적인 서열을 miRbase 사이트에서 확인하였다. DNA 프로브는 캡처부와 검출부를 포함하도록 두 가지 다른 부분 즉, 제1 DNA(capture DNA), 제2 DNA(detection DNA)로 나누어 설계하였다. DNA 프로브와 타겟 miRNA가 혼성화되는 단계별로 SERS 신호 변화를 확인함으로써 DNA 프로브의 역할을 분리하였다. 제1 DNA로 형성된 캡처부는 금 나노필라와 결합하여 head-flocked되어 집합 DNA 프로브로서의 역할을 한다. 제2 DNA로 형성된 검출부는 완전한 혼성화를 확인하는 역할을 한다. 다중 검출 수행시 miR-10b, miR-21 및 miR-373에 대한 제2 DNA들 간의 비특이적 결합을 방지하기 위하여 제2 DNA 서열 결정시 G-C 함량비(40-60 %) 및 용융 온도(Tm)를 고려하였으며, 각 miR의 염기서열과 상보적인 서열들에 대하여 제1 DNA와 제2 DNA로 염기서열을 결정할 때, 제2 DNA들 간의 염기서열 3개가 연속하여 겹치지 않도록 설계하였다. Integrated DNA Technologies (IDT)의 OligoAnalyzer® Tool을 사용하여 G-C 함량비, Tm 값, 길이, 셀프다이어 및 각 프로브의 헤더로 다이머를 확인하였다(표 1). 또한, 제1 DNA로 형성된 캡처부를 금 나노필라에 결합 시 이들 간의 효율적인 결합을 위해, Bioneer(한국)의 제1 DNA의 5' 말단을 티올기로 개질하였다.

[0040] 또한, 본 발명에서 사용된 각 miRNA는 miRbase에 존재하는 miRNA 데이터 베이스를 기반으로 아래 표 2에 도시된 염기 서열을 이용하였다. 사용된 제 1, 2 DNA, 제 1, 2 LNA 모두 5' 말단에 싸이올기(-SH)로 활성화될 수 있는 물질들로 개질하였고, LNA의 경우 염기 앞에 '4' 표시하여 LAN 염기임을 명시하였다.

표 1

Probe	Length(nt)	C-G contents(%)	Tm(°C)
miR-10b capture	12	41.7	31.8
miR-10b detection	11	45.5	30.8
miR-21 capture	11	36.4	24.3
miR-21 detection	11	36.4	29.1
miR-373 capture	12	50	37.5
miR-373 detection	11	45.5	34.2

표 2

Type	miRNA	miRNA sequence	Capture probe	Detection probe
DNA	miR-10b	5' UACCCUGUAGAACCGAAUUUG3'	Thiol-5' CACAAATTCGG3'	5' TTCTACAGGGTA3'
	miR-21	5' UAGCUUAUCAGACUGAUGUUG3'	Thiol-5' TCAACATCAGT3'	5' CTGATAAGCTA3'
	miR-373	5' CUCAAAUUGGGGCGCUUCC3'	Thiol-5' GGAAAGCGCCC3'	5' CCATTTTGAGT3'
LNA	miR-10b	5' UACCCUGUAGAACCGAAUUUG3'	5' ThioMC6-D/+CACA+AA+TT+CG+GT3'	5' T+CTAC+AGG+GTA3'

[0044] head-flocked 금 나노필라 구조의 제작

[0045] head-flocked 금 나노필라 제작을 위해 Maskless 반응 이온 플라즈마 에칭 공정을 사용하여 탄성 실리콘 나노필라 몰드를 제작하였다(Wong C. L., Dinish U. S., Schmidt M. S., and Olivo M., 2014. Analytica Chimica Acta 844, 54-60). Maskless 반응성 이온 플라즈마 에칭 (RIE) 공정은 나노필라 형상을 생성하기 위해 필름 마스크 없이 화학 반응성 플라즈마를 사용하는 건식 에칭 방법 중 하나이다 (Schmidt M. S., Hubner J., and Boisen A., 2012. Adv. Mater. 24, 11-18).

[0046] 4 인치 p형 실리콘 웨이퍼가 이용되었고 SF6:O₂ 유량비 1.12, 압반 출력 110W, 챔버 압력 36 mTorr 및 속도 3 nm/s에서 Oxford Instruments (Micro-Nano fab Center, 한국과학기술원)의 Plasma Lab100 장비를 사용하여 에칭을 수행하였다. SERS 스펙트럼에 영향을 주지 않기 위해, Maskless 반응성 이온 플라즈마 에칭 공정 후에 산소 플라즈마에 노출시킴으로써 잔류물을 물리적으로 제거하였다. 탄성 실리콘 나노필라 몰드를 금속화하기 위해 전자빔 증착법을 이용하여 탄성 실리콘 나노 필라에 금을 코팅하였다. 이 공정에서, 탄성 실리콘 나노 필라 구조의 헤드 상에 더 많은 금을 증착시켰다. Head-flocking 은 액체 샘플 처리 동안 관찰되었고 주사 전자 현미경 (SEM)에 의해 확인되었다. 또한, 규산염 유리 (BOROFLOAT® 33)를 사용하여 캐스트 슬라이드 글라스를 제작했다. 이 모형은 AutoCAD 프로그램에 의해 설계되었으며 모형의 개수와 크기를 제어할 수 있으므로 다중 시스템의 기본이 된다. head-flocked 금 나노필라 기판은 타겟 miRNAs의 검출을 위해 캐스트 슬라이드 유리에 로

당하였다.

[0048] 나노 플라즈모닉 바이오센서의 제조, 제1 DNA, 제2 DNA 및 타겟 miRNA의 혼성화

[0049] 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제조하기 위해, 2 연속 티올-다이설파이드 상호 교환 반응에 의한 다이설파이드 결합 형성에서 환원제로 사용되는 디티오프레이톨(DTT)을 사용하여 제1 DNA(캡처 DNA) 프로브에서 티올 그룹을 활성화시켰다. 상기 제1 DNA 프로브는 5' 말단에 이황화물 결합을 가지기 때문에, 이황화 결합을 파괴할 수 있는 DTT가 사용되었다. 제1 DNA 프로브 용액 (1 μ M)을 Na_2SO_4 (30 mM), nuclease-free water pH ~ 7을 포함하는 접합 버퍼에 첨가하였다.

[0050] 다음으로, 전술한 과정에서 제조된 금 나노필라 기판을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12 시간 동안 제1 DNA 프로브 용액에서 인큐베이션 시킨 후 탈 이온수로 세척하고 N_2 를 불어넣었다. 6-Mercapto-1-hexanol (MCH)로 구성된 자기 조립 단분자층은 DNA 가닥이 금 또는 은 표면에 결합할 때 발생하는 비특이적 결합을 막는데 있어 스페이서로서 중요한 역할을 한다 (Frøhling K. B., Alstrøm T. S., Bache M., Schmidt M. S., Schmidt M. N., Larsen J., Jakobsen M. H., and Boisen A., 2016. Vibrational Spectroscopy 86, 331-336). MCH (10 μ M) 용액을 접합 완충액에 첨가하였다. 다음으로 상기 금 나노필라 기판을 실온에서 3 시간 동안 MCH 용액에서 인큐베이션시킨 다음, 2 x SSC, 0.2 % SDS를 포함한 세척 완충액으로 세척하였다.

[0051] 이전 단계 후에, 기판은 DI 수로 완전히 세척하고, N_2 를 불어넣었다. 제1 DNA와 타겟 miRNA 사이의 혼성화를 위해, 타겟 miRNA를 100 aM ~ 1 μ M 농도의 인간 혈청에 첨가하였다. 다음으로, 상기 제1 DNA가 결합된 금 나노필라 기판을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 배양한 후 DI 수를 씻어 낸 후 N_2 건조시켰다. 제2 DNA(detection DNA) 프로브와 miRNA를 혼성화하기 위해, 2x SSC, nuclease free water, 제2 DNA 프로브(1 μ M)로 구성된 hybridization buffer를 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12 시간 동안 준비한 후, 탈 이온수를 씻어내고 N_2 건조시켰다.

[0053] miRNA 검출 및 SERS를 이용한 상대 정량 분석

[0054] 금 나노필라 기판에 제1 DNA를 결합시키고, miRNA 및 제2 DNA를 샘플링한 후, 상기 금 나노필라 칩들을 멀티플렉스 측정용 캐스트 슬라이드 유리에 로딩하였다. 실리콘 겔을 사용하여, head-flocked 금 나노필라 칩을 캐스트 슬라이드 글라스 로딩 영역에 부착시켰다. NOST (Korea)의 Raman 현미경을 이용하여 DNA 프로브와 miRNA의 SERS 신호를 측정하였다. 직립 현미경 (Eclipse Ni-U, Nikon)의 100 배 공기 대물 렌즈 (TU Plan ELWD 100x, Nikon, 0.6 NA, 0.56mm WD)를 이용하여 여기된 레이저 (785nm)를 조사했다. 광 편광 방향은 선형 편광기 (PRM 1 / M, Thorlabs)에 의해 제어되었다. 레이저 강도는 디지털 파워 미터 (PM100, Thorlabs)를 사용하여 10.67 mW로 설정되었다. SERS 측정의 최대 조건을 얻기 위해 노출 시간, 공 초점 슬릿, 누적 수 및 ND 필터 비율 등 다양한 조건을 실험했다. 노출 시간은 0.5 초였다. 공 초점 슬릿 크기는 120 μm 이고, 누적 계수는 30이었다. 그리고 ND 필터 비율은 16 %였다. miRNAs의 라만 신호는 분광기 (Intermetable grating aberration free spectrograph, FEX) 및 CCD 카메라 (Newton 920, Andor Technology)를 사용하여 측정하였고, 데이터 분석은 SpectoLab 2.5 및 Sigmaplot 10 소프트웨어를 이용하여 수행하였다.

[0056] 결과 및 고찰

[0057] 나노 플라즈모닉 바이오센서(head-flocked 금 나노필라 SERS 기판)의 확인

[0058] 여러 miRNA의 다중 검출 및 고감도 검출을 위해, 탄성 실리콘 나노필라 몰드를 사용하여 head-flocked gold nanopillar 구조를 가진 SERS 기판(4mm x 4mm)을 제작하였다(도 1). 제조된 head-flocked 금 나노필라 구조는 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 확인하였다(도 2A). 그 결과, 일정한 봉우리 모양의 Si 나노필라 구조들이 일렬로 배열된 것을 확인하였다. Si 나노필라 구조의 높이는 약 600nm이고 Si 나노필라 간의 간격은 약 200nm이었다. 그러나 샘플 처리의 마지막 과정에서 제 2 DNA 프로브와 혼성화된 head-flocked 금 나노필라 기판의 경우 금 나노필라의 상층(머리)부분이 한 부분에 응집(head-flocked)되어 있는 것을 확인하였다(도 2B). 이 현상은 액체 시료 처리시 생성된 탄성 모세관(elasto-capillary) 힘에 의해 발생하는 것으로, 이 힘은 액체 시료가 나노필라 구조의 일부를 통과할 때 발생한다. 이러한 기작을 통해 head-flocked 금 나노필라 구조를 형성하였고,

이는 결과적으로 플라즈몬 커플링 효과를 일으키는 SERS 핫스팟을 형성하였다. 따라서 SERS의 능동적이고 재현성 있는 나노구조가 성공적으로 제조되었고, cast slide glass를 이용함으로써 miRNA 다중 검출을 위한 기초를 확립하였다.

[0060] miRNA의 신호 전이 및 지문 피크의 특성 규명

[0061] DNA와 RNA는 4가지 종류의 염기로 이루어져 있으며 각각의 염기는 다른 종류의 화학 구조를 가지고 있다. 또한, 레이저 조사시 전자들의 진동수는 DNA 및 RNA 화학 구조에서 외부로 노출된 작용기 및 A-T, C-G와 같은 염기 사이의 이중 및 삼중 수소 결합으로 인한 염기서열의 순서와 염기 구성비율에 따라 변화한다. 이러한 특성 때문에, DNA와 RNA 자체의 화학 구조 및 염기간 결합 라만 신호가 표 3에서 확인되었다. 이 원리를 바탕으로 miRNA의 지문(fingerprint)피크를 확인하고 혼성화 과정을 모니터링하기 위해 신호 측정 단계를 총 4가지 단계로 나누어 실행하였다.

표 3

[0062]

Raman bonds (cm^{-1})	assignments
640	A, G, ring breathing
825	U, T ring breathing
1167	(C_8H , $\text{N}_{10}\text{-H}_{11}$), ($\text{C}_4\text{-N}_9$, $\text{N}_3\text{-C}_4$, $\text{C}_6\text{-N}_{10}$)
1376	CH_3 , C_6H deformation
1521	A, G
1650	T, C and NH_2

[0063] 모든 과정은 인간 혈청에서 수행되었다. 우선, SERS 기관 자체에서 발생하는 background 신호의 유무를 확인하기 위해 아무것도 처리하지 않은 금 나노필라 기관에서의 SERS신호를 확인하였다. 둘째, 금 나노필라에 제1 DNA가 결합된 금 나노필라의 SERS 신호의 변화를 확인하였다. 먼저, 아무것도 처리하지 않은 금 나노필라 구조 자체에서는 눈에 띄는 신호 변화를 나타내지 않았다. 제1 DNA 프로브와 금 나노필라 사이의 결합시, 제1 DNA 프로브는 단일 가닥 DNA 형태(10-12nt)로 존재하고 염기간 결합이 없기 때문에 염기에서 발생하는 자체적인 신호 외에는 신호가 발생되지 않아 큰 신호 세기의 변화가 발생되지 않았다. 그러나, 타겟 miRNA와 제1 DNA 프로브의 혼성화가 발생하면서(head-flocking 현상 발생), 제1 DNA 프로브만 처리했을 때 보다 많은 염기가 head-flocked 금 나노필라 구조 주위에 존재하고 이전 단계에서 존재하지 않았던 염기간 결합이 발생하게 되면서 눈에 띄는 신호 발생 및 신호세기가 증가가 확인되었다. Head-flocked 금 나노필라 구조 주위에 공정 전보다 많은 염기가 존재하였고, 염기와 염기 사이의 결합이 일어났다. 도 3A와 같이, DNA 프로브와 타겟 miRNA의 완전한 혼성화를 관찰하기 위해 제2 DNA 프로브와 타겟 miRNA를 혼성화시키고 그 신호변화를 확인하였다. 그 결과, 이전과 동일한 경향의 SERS 신호가 확인되었고, 신호 세기는 제2 DNA와 타겟 miRNA가 혼성화되기 전의 금 나노필라의 강도보다 10에서 20 배 증폭되었다. 이 결과를 통해 miRNA의 지문 피크가 존재하며, 본 발명에 따른 나노플라즈모닉 바이오센서(head-flocked gold nanopillar DNA 칩)에 의해 혼성화 과정을 모니터링 할 수 있음을 확인하였다. 이러한 과정을 반복하여, 각 miRNA의 지문 피크를 확인하였다. miR-10b는 825 cm^{-1} 와 1167 cm^{-1} 에서(도 3B), miR-21은 640 cm^{-1} 와 1376 cm^{-1} 에서(도 3C), miR-373은 1521 cm^{-1} 와 1650 cm^{-1} 에서(도 3D) 확인되었다. 이 결과를 통해, 본 발명에 따른 나노플라즈모닉 바이오센서가 타겟 miRNA에 대한 비표지 검출과 높은 선택도를 가진다는 것을 확인하였다.

[0064] 추가적으로 표면 증강 라만 산란에서 높은 민감도를 보이는 유전자 프로브로서, LNA(Locked nucleic acid) 프로브를 사용하여(타겟 miRNA는 miR-10b) 실험을 수행하였다. LNA의 경우 기존의 DNA, RNA 보다 강력한 affinity를 보이는 핵산으로서, 화학구조적으로 2'-O와 4'-C 원자들이 메틸렌 브릿지(methylene bridge)로 연결되어있어 Watson-Crick 의 이상적인 결합을 가지고 있다. 도 9의 A를 보면, miR-10b의 LNA와 DNA의 타겟 miRNA 농도별 SERS intensity를 확인하였다. 이를 통해, DNA 프로브 보다 약 4-5배의 증가된 신호 세기 값을 관찰하였다. 또한 DNA보다 100배 낮은 검출 한계를 가지는 것을 확인하였다 (도 9B)

[0066] 타겟 miRNA 사이의 비특이적 결합의 평가

[0067] 다중 검지 바이오 센서에서 큰 이슈 중 하나는 분석 물질 간 발생하는 누화 현상(crosstalk)이다(Porter M. D., Lipert R. J., Siperko L. M., Wang G. and Narayanan R., 2008. Chem. Soc. Rev., 37, 1001-1011). 이러한 현상은 변형된 표지물질 사이에서 발생하는 경우가 많은데, 본 실험에서는 표지자를 쓰지 않기 때문에 이러한 누화 현상이 발생하지는 않지만 이와 비슷한 한계가 존재한다. 실제로, 혈액에는 여러 miRNA가 순환하고 있기 때문에, 불일치 miRNA에 대한 DNA 프로브의 비특이적 결합을 평가하는 것은 필수적이다. 이러한 이유로, 본 발명에서는 비상보적(non-complementary)인 또 다른 miRNA와 DNA 프로브의 혼성화를 진행하고, 각 miRNA에서 지문 피크의 강도를 확인했다. 도 4 (피크 2)와 도 6(피크 1)에 표시된 것처럼 두 개의 3차원 수직 막대그래프가 존재하는데, 피크 1과 피크 2는 miRNA 지문 피크를 0 cm^{-1} 에서 가장 가까운 순서로 정렬하여 얻었으며, 각 그래프는 특정 DNA 프로브와 비교하여 세 개의 표적 miRNA에서 지문 피크 강도를 나타낸다. 각 miRNA에 상보적인 DNA 프로브에서만 지문 피크에서 높은 신호 강도가 확인되었고, 이를 통해 타겟 miRNA에 상보적인 DNA 프로브만이 결합하는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서는 암 바이오 마커의 분석시 높은 선택성과 비표지 다중 검출이 가능함을 확인하였다.

[0069] head-flocked 핫 스팟 구성을 위한 라만 매핑 프로세스

[0070] 본 발명의 SERS 기반 head-flocked 금 나노필라 기질을 이용한 나노 플라즈모닉 바이오센서를 통해, 특정 범위 안에서의 라만 신호를 모니터링 할 수 있는 라만 맵핑 법을 수행하였다. 도 10 A에 나타난 바와 같이, 하나의 간격을 $1\mu\text{m}$ 로 지정하고 X축 Y축 각각 50개의 간격을 지정하여 총 $2500\mu\text{m}^2$ 면적을 2번 맵핑했다. 이 각각의 $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ 의 면적을 하나의 지정된 좌표 영역으로 하여, 각 영역에서 발생한 Raman 신호를 확인하였다. 이중 Raman 신호가 높은 곳과 낮은 곳을 구별하기 위하여, 지점별 신호 세기를 정리하여 상위 10%에 있는 신호 세기 값들에 대한 지점만을 선택적으로 나타내어 Raman 맵핑 그래프로 표현하였다(도 10 B). 이러한 결과를 토대로, 신호의 세기가 강한 지점들을 선별(n=20)하고 그 지점들에서 발생하는 Raman 신호의 세기를 통해 평균값과 표준편차 값을 확인하였다. 이러한 라만 맵핑을 통해 head-flocked 금 나노필라 구조의 형성 위치 및 신호가 강하게 증폭되는 곳을 선별할 수 있었는데, 정량 분석시 오차 범위와 높은 정확도를 줄일 수 있음을 확인하였다.

[0072] 타겟 miRNA의 상대적 정량 분석

[0073] 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서의 감도를 평가하기 위해, 환자 모방 혈청을 표본으로 하여 최적의 조건에서 표적 miRNA 농도에 따른 SERS 신호 강도를 모델 분석 대상으로 삼아 3 가지 표적 miRNA의 상대적 정량 분석을 수행하였다.

[0074] 도 5a에 나타난 바와 같이, 농도 범위는 $1\mu\text{M}$ 내지 100 aM 및 블랭크 (비특이적 결합)로 나타내었다. 또한, 각 농도의 강도를 비특이적인 결합과 비교하여 최소 검출 농도의 신뢰도를 추정했다. 그 결과, 도 5b에 도시된 바와 같이, 타겟 miRNA 농도 및 SERS 신호 강도의 대수는 높은 선형 회귀 관계를 가짐을 확인하였다. 그래프를 통해 선형 회귀 방정식과 결정 계수가 검증되었다. 일반적으로 결정 계수는 통계에서 종속 변수와 독립 변수 간의 상관 관계를 평가하는 데 중요한 요소가 된다. 따라서, 결정 계수의 값이 높을수록 두 변수 사이의 상관 관계의 신뢰도가 높아지는 것을 의미하는데, 도출된 각 target miRNA 별 결정 계수를 보면, miR-10b는 0.974(피크 1), 0.959(피크 2) (도 5B), miR-21은 0.97(피크 1), 0.963(피크 2) (도 7), 그리고 miR-373은 0.984(피크 1), 0.966(피크 2) (도 8)이었다.

[0075] 이를 통해 결정 계수가 0.95에서 0.98사이에 있는 것을 확인하였으며, 이를 통해 본 발명에 따른 나노플라즈모닉 바이오센서가 높은 민감도를 가질 뿐만 아니라 miRNA의 농도와 SERS 신호 강도가 밀접한 관계에 있다는 것을 확인하였다. 또한, 100 aM 에서는 지문 피크가 나타나지 않았으며, 지문 피크에서의 신호 강도가 비특이적 결합에서의 신호세기와 비슷한 것을 확인함으로써 최소 검출 농도의 대략적인 한계를 확인하였다.

[0076] 정확한 검출 한계를 확인하기 위해서, 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서의 최소 검지 농도 값을 다음의 식을 통해 계산하였다($\text{LOD} = (3 \times \delta)/m$, 여기서 δ 는 비특이적 결합의 표준 편차이며, m 은 선형 회귀 방정식의 기울기를 나타낸다) (Gracie K., Correa E., Mabbott S., Dougan J. A., Graham, D. Goodacre R. and Faulds K., 2014, Chem. Sci. 5, 1030-1040). 측정 결과, 검출 한계는 miR-10b에 대해서는 각각 5.46 fM (peak 1), 3.53 fM (peak 2)로, miR-21에 대해서는 각각 3.16 fM (peak 1), 2.08 fM (peak 2)로, miR-373에 대해서는 각

각 1.73 fM(peak 1), 2.16 fM(peak 2)로 계산되었다.

[0077] 이를 통해 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서는 fM 수준의 매우 높은 민감도와 낮은 검출 한계를 가지 는바, 암뿐만 아니라 miRNA 관련 질병의 임상적 적용에 응용될 수 있는 높은 잠재력이 있음을 확인하였다.

[0079] 결론

[0080] 본 발명에서는 miRNA의 비표지 다중 검출에 이용될 수 있는 SERS 기반의 나노 플라즈모닉 바이오 센서를 제공한 다. 본 발명에서는 암의 잠재적 바이오마커 중 하나인 전이와 관련된 3 개의 miRNA (miR-10b, miR-21, miR-373) 를 타겟으로 삼았다. 본 발명에 따른 SERS 기반 나노 플라즈모닉 바이오 센서를 제조하기 위해 먼저 Si 나 노필라 주형을 사용하여 head-flocked 금 나노필라를 제조하고, 다중 검출을 위해 cast slide glass를 이용하였 다. Si 기반의 나노필라 구조는 마스크가 없는 드라이 에칭 공정으로 제작되었다 (Jansen H., de Boer M., Legtenberg R., Elwenspoek M., and Micromech J., 1995. Microengin, 5, 115.). 금은 전자빔 증착 공정을 통 해 제작된 실리콘에 증착되었다 (Diebold E. D., Mack N. H., Doorn S. K., and E. Mazur, 2009. Langmuir 25, 1790.). 샘플 처리 및 건조 후, 금 나노필라 중 적어도 2개 이상의 말단이 소정의 위치를 향해 수렴하는 경향을 보였고, 이러한 경향을 'head-flocking' 효과로 명명하였다. 또한 이러한 현상으로 인하여 금 나노필라, DNA 프 로브 및 miRNA 샘플 사이에 플라즈몬 커플링 효과를 가질 수 있는 나노 미터 갭이 형성되어 핫스팟이 형성됨을 확인하였다.

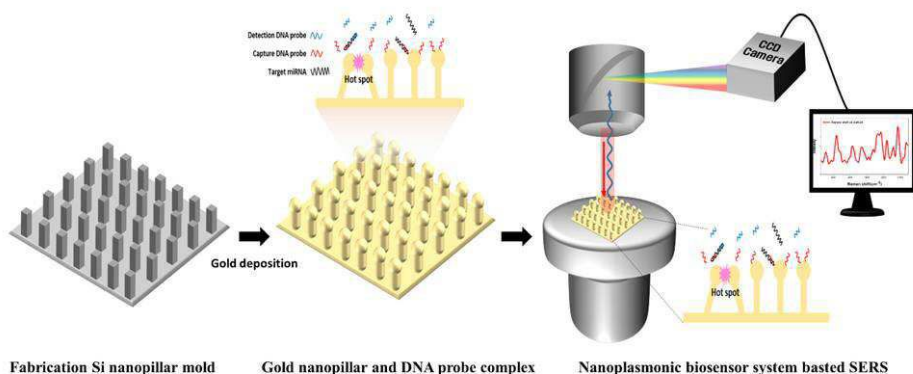
[0081] 또한, 본 발명에서는 miRNA를 선택적으로 다중 검출하기 위해 타겟 miRNA에 상보적인 DNA 프로브를 디자인할 때, 타겟 miRNA를 혼성화하기 위해 head-flocked 된 금 나노필라 구조에 직접적으로 결합하는 캡처부(제1 DNA, capture DNA)와, 혼성화 과정 동안 신호 전이를 확인하기 위한 검출부(제2 DNA, detection DNA) 등 2 가지 유 형으로 나누었다.

[0082] 이 과정을 통해 본 발명에서는 타겟 miRNA 각각의 지문 피크를 높은 선택성으로 확인하였으며, 이를 바탕으로 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오 센서는 신호 전이 단계에 관여하는 다중 miRNA를 검출하여, 농도별 신 호 강도 및 정성 분석을 통한 정량 분석을 가능하게 함을 확인하였다. 또한, miRNA를 정제하기 위한 전처리 과 정이나 qRT-PCR에서의 cDNA 합성없이 실시간으로 miRNA를 검출할 수 있음을 확인하였으며, 낮은 검출한계(miR-10b에 대해 각각 5.46 fM(peak 1), 3.53 fM(peak 2), miR-21에 대해 각각 3.16 fM(peak 1), 2.08 fM(peak 2), miR-373에 대해 각각 1.73 fM(peak 1), 2.16 fM(peak 2)의 LOD) 및 신속한 실시간 검출 등 검출 효율이 크게 향상됨을 확인하였다.

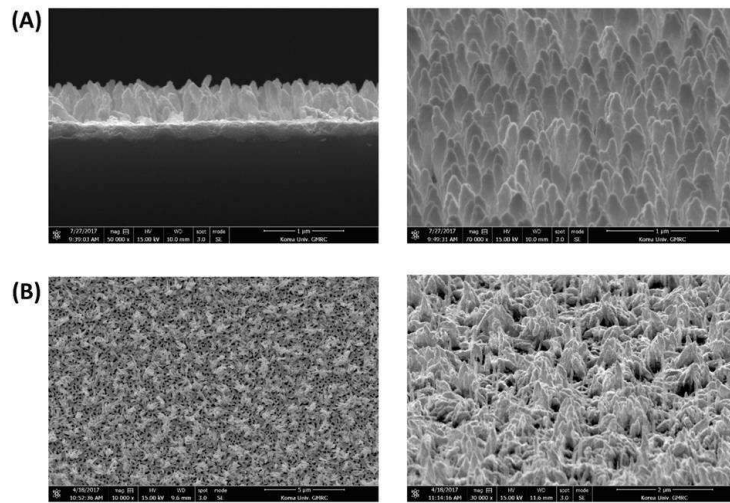
[0083] 결과적으로 본 발명에 따른 나노 플라즈모닉 바이오센서는 혈액 내에 존재하는 발병 표지 인자인 miRNA를 높은 선택성, 고감도로 다중 비표지 검출할 수 있으며, 따라서 miRNA 관련 질병의 진단 및 임상적 적용에 효과적으로 응용될 것으로 기대된다.

도면

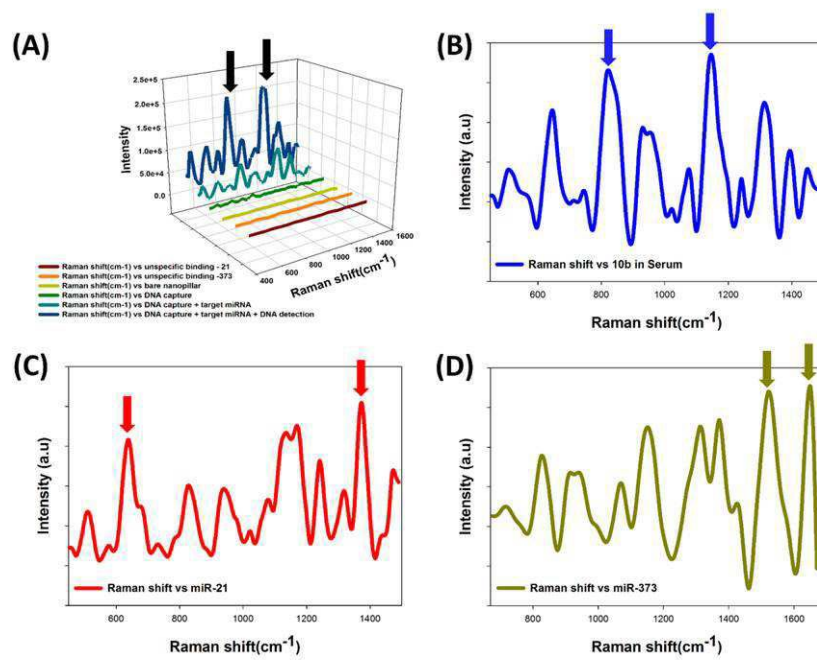
도면1



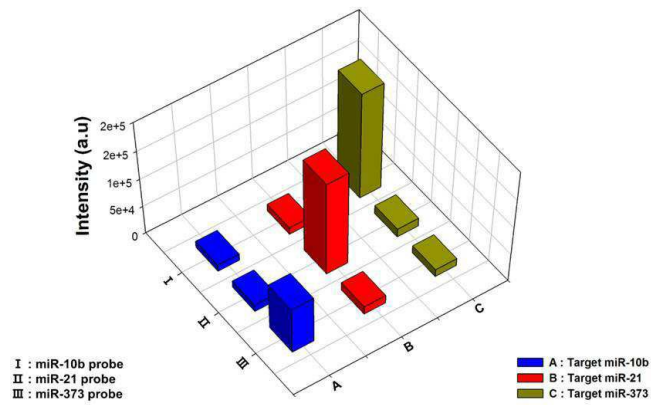
도면2



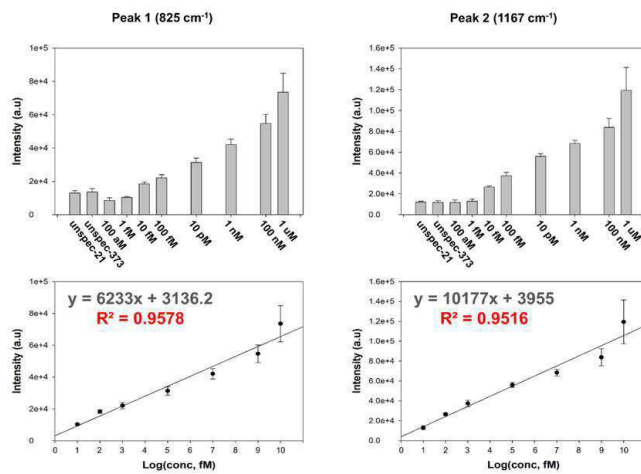
도면3



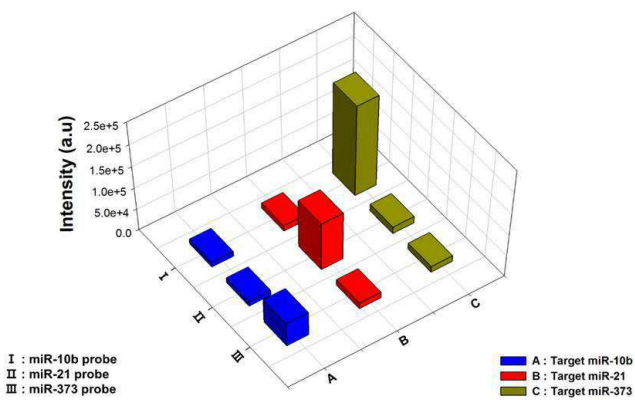
도면4



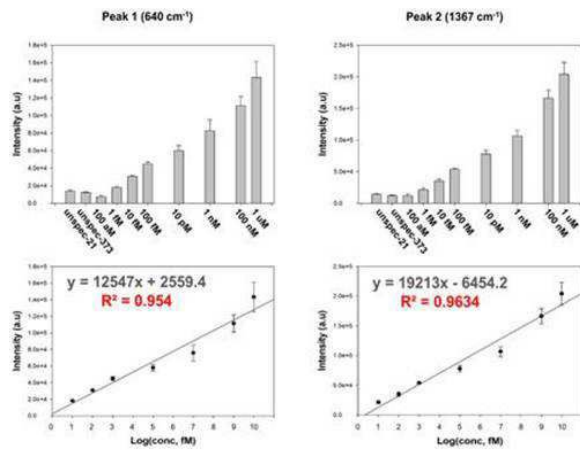
도면5



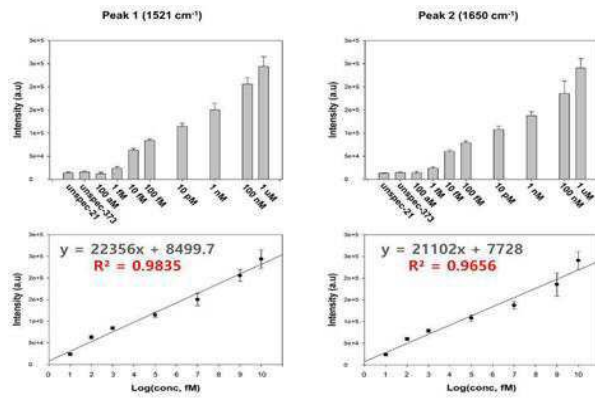
도면6



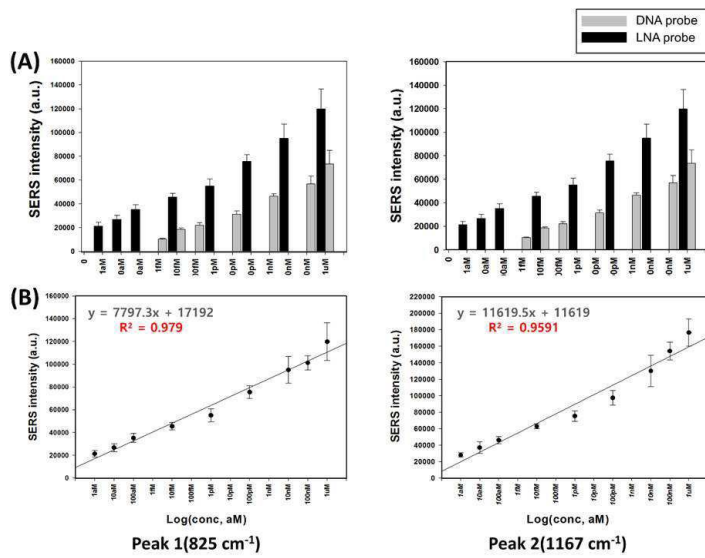
도면7



도면8



도면9



도면10

