

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 4월 2일 (02.04.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/046717 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/005504
- (22) 국제출원일: 2014년 6월 23일 (23.06.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0116105 2013년 9월 30일 (30.09.2013) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 136-701 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 나성수 (NA, Sung Soo); 150-755 서울시 영등포구 당산로 42길 13 효성아파트 106동 802호, Seoul (KR). 장규환 (JANG, Kue-Whan); 133-766 서울시 성동구 독서당로 191 극동아파트 2동 203호, Seoul (KR). 박진성 (PARK, Jin Sung); 130-860 서울시 동대문구 제기로 4나길 34 나섬빌라 3층 301호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 137-130 서울시 서초구 바우피로 225 한마음빌딩 4층, Seoul (KR).

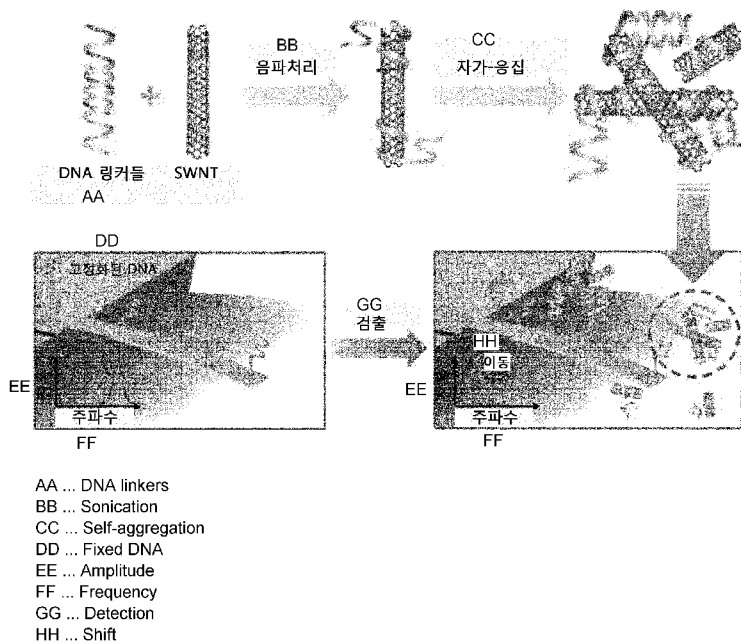
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: SENSOR FOR DETECTING SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES IN RIVER SYSTEMS, AND DETECTION METHOD FOR SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES IN RIVER SYSTEMS USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 수계 중 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서 및 이를 이용한 이를 이용한 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 검출방법



AA ... DNA linkers
BB ... Sonication
CC ... Self-aggregation
DD ... Fixed DNA
EE ... Amplitude
FF ... Frequency
GG ... Detection
HH ... Shift

(57) Abstract: The present invention relates to a sensor for detecting single-walled carbon nanotubes using a resonator to which DNA is fixed, and the present invention relates to a method of detecting single-walled carbon nanotubes with a high degree of sensitivity in river systems by using the sensor. More specifically, the present invention relates to a sensor for detecting single-walled carbon nanotubes in river systems, the sensor comprising: a first DNA sequence and a second DNA sequence comprising mutually complementary sequences, able to bind to the outer wall of a single-walled carbon nanotube in a river system; a third DNA sequence comprising a sequence complementary to the first DNA sequence; and a microresonator onto the surface of which the third DNA sequence is fixed and which exhibits the phenomenon of resonance frequency shifting following an increase in mass due to hybridization of the third DNA sequence and the first DNA sequence, and the present invention relates to a single-walled carbon nanotube detection method using the sensor. The present invention can provide an outstanding means whereby it is possible to detect single-walled carbon nanotubes in river systems with an outstanding degree of sensitivity, and hence it is possible to analyse the toxic effects of SWNTs on the environ-

ment and the human body.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

**공개:**

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 DNA가 고정된 공진기를 이용한 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서 및 이를 이용하여 수계 중에서 고감도로 단일벽 탄소나노튜브를 검출하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 외벽에 결합될 수 있으며, 서로 상보적인 서열을 포함하는 제 1 DNA 서열 및 제 2 DNA 서열; 상기 제 1 DNA 서열과 상보적인 서열을 포함하는 제 3 DNA 서열; 및 표면에 상기 제 3 DNA 서열이 고정되며, 상기 제 3 DNA 서열과 상기 제 1 DNA 서열의 혼성화로 인하여 질량이 증가함에 따라 공진 주파수 이동 현상을 나타내는 마이크로 공진기를 포함하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서 및 이를 이용한 단일벽 탄소나노튜브 검출방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 우수한 감도로 수계 중에서 단일벽 탄소나노튜브를 검출할 수 있으며, 따라서 SWNT가 환경 및 인체에 미치는 독성을 분석할 수 있는 우수한 수단을 제공할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 수계 중 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서 및 이를 이용한 이를 이용한 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 검출방법 기술분야

- [1] 본 발명은 DNA가 고정된 공진기를 이용한 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서 및 이를 이용하여 수계 중에서 고감도로 단일벽 탄소나노튜브를 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근에, 나노물질의 사용은 연구 목적으로부터 상업적 목적에 이르기까지 급격한 성장을 이룬 바 있으며, 태양광 스크린, 테니스 라켓, 고체 윤활제 및 세제에 이르기까지 다양한 상업적 제품들의 성능을 향상시키기 위해서 나노물질들이 사용되고 있다. 이러한 나노물질들 중에서도 단일벽 탄소나노튜브 (single-walled carbon nanotube; SWNT)는 가장 널리 사용되는 나노물질들 중의 하나이다. SWNT는 독특한 특성들을 갖는 바, 높은 탄성계수를 지니면서도 나노미터 크기의 직경을 갖고, 화학적으로 안정하며, 높은 열전도성 및 전기전도성을 보유하고, 표면 흡착물질에 대해서 높은 감도를 갖는다 (V. Sgobba and D. M. Guldi, Chem. Soc. Rev., 2009, 38, 165-184).
- [3] 따라서, SWNT는 마이크로전자기기 (Q. Cao and J. A. Rogers, Adv. Mater., 2009, 21, 29-53), 복합체 재료 (T.-W. Chou, L. Gao, E. T. Thostenson, Z. Zhang and J.-H. Byun, Compos. Sci. Technol., 2010, 70, 1-19), 에너지 저장장치 (A. Izadi-Najafabadi, S. Yasuda, K. Kobashi, T. Yamada, D. N. Futaba, H. Hatori, M. Yumura, S. Iijima and K. Hata, Adv. Mater., 2010, 22, E235-E241), 바이오 센서 (A. Star, E. Tu, J. Niemann, J.-C. P. Gabriel, C. S. Joiner and C. Valcke, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2006, 103, 921-926), 치료장치 (K. Welsher, Z. Liu, S. P. Sherlock, J. T. Robinson, Z. Chen, D. Daranciang and H. Dai, Nat. Nanotechnol., 2009, 4, 773-780) 등에 폭넓게 응용되고 있다.
- [4] SWNT를 산업적 및 상업적 제품에 사용하기 위해서는, 그것이 인체 및 환경에 미치는 독성이 먼저 분석되어야 한다 (C.-w. Lam, J. T. James, R. McCluskey, S. Arepalli and R. L. Hunter, Crit. Rev. Toxicol., 2006, 36, 189-217). 탄소나노튜브의 생산량이 매년 증가하고 있기 때문에, SWNT의 생산량 역시 증가할 것으로 예상되며 (M. F. L. De Volder, S. H. Tawfick, R. H. Baughman and A. J. Hart, Science, 2013, 339, 535-539), 그 환경 수계에 대한 오염 정도 역시 산업 폐수의 형태로 증가할 것으로 예상된다. 더 나아가, SWNT는 생물학적으로 가장 난분해성인 물질들 중의 하나로 알려져 있으며, 따라서 환경에 축적되고, 먹이 사슬을 따라서 인체 건강에 악영향을 미칠 것으로 예상되고 있다 (M. R. Wiesner, G. V. Lowry, P. Alvarez, D. Dionysiou and P. Biswas, Environ. Sci. Technol., 2006,

40, 4336-4345).

- [5] 최근에 생체내 및 생체외에서 SWNT의 독성에 대한 연구들이 보고된 바 있다 (C.-W. Lam, J. T. James, R. McCluskey and R. L. Hunter, *Toxicol. Sci.*, 2004, 77, 126-134.; S. K. Manna, S. Sarkar, J. Barr, K. Wise, E. V. Barrera, O. Jejelowo, A. C. Rice-Ficht and G. T. Ramesh, *Nano Lett.*, 2005, 5, 1676-1684; J. K. Folkmann, L. Risom, N. R. Jacobsen, H. Wallin, S. Loft and P. Moller, *Environ. Health Perspect.*, 2009, 117, 703-708; L. Murr, K. Garza, K. Soto, A. Carrasco, T. Powell, D. Ramirez, P. Guerrero, D. Lopez and J. Venzor, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2005, 2, 31-42; K. Donaldson, R. Aitken, L. Tran, V. Stone, R. Duffin, G. Forrest and A. Alexander, *Toxicol. Sci.*, 2006, 92, 5-22). Lam 등은 마우스를 SWNT에 노출시킨 경우에, 고용량으로 투여된 군에서, 폐에 조직간 염증 (interstitial inflammation)이 빈번하게 관찰됨을 보고한 바 있으며, Manna 등은 A549 및 H1299 폐 상피 세포주에서 세포 생존성이 감소하는 점을 보고한 바 있고, Folkmann 등은 쥐들을 SWNT에 경구노출시키게 되면 SWNT의 산화력으로 인해서 활성 산소종의 생산이 증가한다는 점을 보고한 바 있다.
- [6] 따라서, 수계 오염에 있어서 나노물질들의 독성을 분석하기 위해서는 고감도 검출방법이 필요하다고 하겠다. 이러한 독성 나노물질들의 검출을 위해서 다양한 방법들이 제안된 바 있는데, 예를 들어, 원자 흡수 스펙트로스코피 (M. Ghaedi, F. Ahmadi and A. Shokrollahi, *J. Hazard. Mater.*, 2007, 142, 272-278), 형광분석 기반의 광학적 방법들 (Y. Wen, F. Xing, S. He, S. Song, L. Wang, Y. Long, D. Li and C. Fan, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 2596-2598), 표면 플라즈몬 공진 (T. Kang, S. Hong, J. Moon, S. Oh and J. Yi, *Chem. Commun.*, 2005, 3721-3723), 표면-강화 라만 산란법 (J. Yin, T. Wu, J. Song, Q. Zhang, S. Liu, R. Xu and H. Duan, *Chem. Mater.*, 2011, 23, 4756-4764), 전기화학적 방법들 (Z. Lin, X. Li and H.-B. Kraatz, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 6896-6901) 및 공진기를 사용한 방법 (J. Park, W. Choi, K. Jang and S. Na, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 41, 471-476)을 들 수 있다. 그러나, 상기 방법들을 사용하여 많은 나노물질들이 선택적으로 검출되었지만, SWNT를 수계 중에서 선택적으로 검출하기 위한 방법에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 따라서, 본 발명에서는 우수한 감도로 수계 중에서 단일벽 탄소나노튜브를 검출할 수 있는 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서 및 이를 이용하여 수계 중에서 고감도로 단일벽 탄소나노튜브를 검출하는 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명은 상기 첫 번째 과제를 달성하기 위해서,
 [9] 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 외벽에 결합될 수 있으며, 서로 상보적인

- 서열을 포함하는 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열;
- [10] 상기 제1 DNA 서열과 상보적인 서열을 포함하는 제3 DNA 서열; 및
- [11] 표면에 상기 제3 DNA 서열이 고정되며, 상기 제3 DNA 서열과 상기 제1 DNA 서열의 혼성화로 인하여 질량이 증가함에 따라 공진 주파수 이동 현상을 나타내는 마이크로 공진기를 포함하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서를 제공한다.
- [12] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열은 그 서열 중에 폴리타민 도메인을 포함하는 DNA 서열일 수 있다.
- [13] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열은 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 DNA 서열일 수 있다.
- [14] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 제3 DNA 서열은 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열의 상기 폴리타민 도메인이 아미노기로 치환된 DNA 서열일 수 있다.
- [15] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 제3 DNA 서열은 서열번호 3의 DNA 서열로 표시되고, 5' 말단에 아민 관능기를 포함하는 DNA 서열일 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 마이크로 공진기의 표면은 카르복시기로 관능화된 것일 수 있다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 두 번째 과제를 달성하기 위해서,
- [18] 단일벽 탄소나노튜브를 포함하는 액상 시료에, 서로 상보적인 서열을 포함하는 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열을 첨가하는 단계;
- [19] 마이크로 공진기의 표면 상에 상기 제1 DNA 서열과 상보적인 서열을 포함하는 제3 DNA 서열을 고정하는 단계;
- [20] 상기 마이크로 공진기의 표면을 상기 액상 시료에 담그어 상기 제1 DNA 서열과 상기 제3 DNA 서열의 혼성화를 유도하는 단계; 및
- [21] 상기 혼성화로 인한 질량 증가에 따른 상기 마이크로 공진기의 공진 주파수 이동현상을 분석하는 단계를 포함하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 검출방법을 제공한다.
- [22] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열은 그 서열 중에 폴리타민 도메인을 포함하는 DNA 서열일 수 있다.
- [23] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열은 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 DNA 서열일 수 있다.
- [24] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 제3 DNA 서열은 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열의 상기 폴리타민 도메인이 아미노기로 치환된 DNA 서열일 수 있다.
- [25] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 제3 DNA 서열은 서열번호 3의 DNA 서열로 표시되고, 5' 말단에 아민 관능기를 포함하는 DNA 서열일 수 있다.
- [26] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 마이크로 공진기의 표면에 상기 제3 DNA 서열을 고정하는 단계는, 상기 마이크로 공진기의 표면을 카르복시기로

관능화시킨 다음, 상기 카르복시기와 상기 제3 DNA 서열의 아미노기 사이에서 아미드 결합을 형성함으로써 수행될 수 있다.

[27] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 액상 시료에 상기 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열을 첨가하는 단계에 있어서, 상기 제1 DNA 서열을 상기 제2 DNA 서열보다 10% 과량으로 첨가해 줄 수 있다.

[28] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 공진 주파수 이동 (ω_{nfs})은 하기 식으로 표시될 수 있다:

$$[29] \quad \omega_{nfs} = (\omega_d - \omega_c) / \omega_d \times 100$$

[30] 상기 식에서, ω_d 는 제3 DNA를 마이크로 공진기의 표면 상에 고정화시킨 후 측정되는 공진 주파수이고, ω_c 는 상기 제1 DNA 서열과 상기 제3 DNA 서열의 혼성화 이후에 측정되는 공진 주파수이다.

발명의 효과

[31] 본 발명에 따르면, 우수한 감도로 수계 중에서 단일벽 탄소나노튜브를 검출할 수 있으며, 따라서 SWNT가 환경 및 인체에 미치는 독성을 분석할 수 있는 우수한 수단을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[32] 도 1은 본 발명에 따른 센서를 사용하여 수계 중 SWNT를 검출하는 개략적인 과정을 도시한 도면이다.

[33] 도 2는 자가가교결합된 SWNT가 검출된 공진기의 정규화된 공진 주파수 이동을 도시한 그래프로서, 각 샘플의 SWNT 농도는 10^6 , 10^4 , 10^2 , 5×10^1 , 10^1 , 5×10^0 및 10^0 ng/ml 였으며 (청색 그래프, 대조군은 회색 그래프), 각각의 농도에 대해서, 5개 다른 공진기의 정규화된 공진 주파수 이동을 측정하였다.

[34] 도 3은 자가가교결합된 SWNT가 검출된 공진기의 정규화된 공진 주파수 이동을 도시한 그래프로서, 각 샘플의 농도는 $10 \mu\text{g/ml}$, 100 ng/ml , 10 ng/ml 였으며 (청색 그래프, 대조군은 회색 그래프), 각각의 농도에 대해서, 5개 다른 공진기의 정규화된 공진 주파수 이동을 측정하였다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[35] 이하, 도면 및 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

[36] 본 발명에서는 자가가교결합된 SWNT (self-crosslinked SWNT; SCLS) 컨쥬게이션 및 DNA 고정화된 공진기를 사용한 고감도 SWNT 검출 센서 및 이를 이용한 SWNT 검출방법을 제공한다. 본 발명에서는 SCLS들을 컨쥬게이션시키기 위해서 2개의 다른 DNA 서열들을 사용하였으며, 여기에서 이러한 2개의 서열들은 혼성화에 의해서 SWNT의 측벽 및 각각의 DNA에 결합하도록 고안되어 있다. 이러한 방식에 의해서, 상기 DNA 서열들은 SWNT들 사이에서 링커로 작용하여 자가응집을 유도하며, 상기 2개의 DNA 서열들 중 하나는 공진기 상의 DNA에 혼성화하므로, 결과적으로, SCLS들은 공진기에 결합하여 공진 주파수 이동을 야기하게 된다

- [37] 특히, 종래의 단일 SWNT를 검출하는 방법에 비해서 본 발명에서와 같이 SCLS를 검출하는 방법이 갖는 장점은 SWNT 자가응집 및 부착된 DNA 링커들에 의해서 질량 증폭이 유도된다는 점이다. 이러한 장점을 이용하여, 본 발명에서는 SWNT들을 고감도로 검출할 수 있었던 바, 예를 들어 하기 실시예로부터 볼 수 있는 바와 같이, 완충용액 중에서는 10 ng/ml의 검출한계 (limits of detection; LOD), 그리고 실제 수돗물 중에서는 100 ng/ml의 검출한계로 검출할 수 있었으며, 이는 인간 HEK293 세포들에서 관찰되는 독성 수준의 1/250에 해당하는 수치이다 (D. Cui, F. Tian, C. S. Ozkan, M. Wang and H. Gao, *Toxicol. Lett.*, 2005, 155, 73-85).
- [38] 구체적으로, 본 발명에 따른 센서는, 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 외벽에 결합될 수 있으며, 서로 상보적인 서열을 포함하는 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열; 상기 제1 DNA 서열과 상보적인 서열을 포함하는 제3 DNA 서열; 및 표면에 상기 제3 DNA 서열이 고정되며, 상기 제3 DNA 서열과 상기 제1 DNA 서열의 혼성화로 인하여 질량이 증가함에 따라 공진 주파수 이동 현상을 나타내는 마이크로 공진기를 포함한다.
- [39] 도 1에는 본 발명에 따른 센서를 사용하여 수계 중 SWNT를 검출하는 개략적인 과정을 도시하였으며, 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 센서는, 서로 상보적인 서열을 포함함으로써 상호 간에 혼성화 (hybridization)가 가능한 DNA 링커들로서 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열을 포함한다.
- [40] 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열은 그 서열 중에 폴리티민 도메인을 포함하는 DNA 서열일 수 있는데, 이러한 폴리티민 도메인은 π - π 상호작용에 의해서 SWNT의 측벽을 둘러싸서, SWNT 표면 상에 강하게 흡착하는 것으로 보고된 바 있다 (H. T. Maune, S.-p. Han, R. D. Barish, M. Bockrath, I. I. A. Goddard, W. K. RothemundPaul and E. Winfree, *Nat. Nanotechnol.*, 2010, 5, 61-66). 구체적인 예로서, 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열은 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 DNA 서열일 수 있다. 상기 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열이 상호 간에 혼성화되면, 그들은 양 말단이 SWNT 측벽에 결합한 상태로 링커로 기능하게 되고, 티민 염기들이 SWNT 주위를 둘러싸게 되면서, SCLS를 컨쥬게이션시킬 수 있었다.
- [41] 한편, 본 발명에 따른 센서는 또한 상기 제1 DNA 서열과 혼성화되어 질량 증가에 따른 공진 주파수 이동을 야기하게 되는 제3 DNA 서열을 포함하는데, 상기 제3 DNA 서열은 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열의 상기 폴리티민 도메인이 아미노기로 치환된 DNA 서열일 수 있고, 구체적인 예로서, 상기 제3 DNA 서열은 서열번호 3의 DNA 서열로 표시되고, 5' 말단에 아민 관능기를 포함하는 DNA 서열일 수 있다.
- [42] 따라서, 상기 제3 DNA 서열은 마이크로 공진기의 표면에 고정되는데, 구체적으로는, 상기 제3 DNA 서열을 마이크로 공진기 상에 고정시키기 위해서, 공진기의 표면 상에 카르복실기를 관능화한 다음, 제3 DNA 서열 중에 존재하는

아미노기와 상기 카르복실기와의 아미드 결합에 의해서 상기 제3 DNA 서열을 마이크로 공진기의 표면 상에 고정시킬 수 있다. 공진기 상에 제3 DNA 서열이 고정되었는지의 여부는 제3 DNA 서열에 플루오레세인 이소시아네이트 표지자를 부착시켜서 확인할 수 있다.

[43] 한편, 본 발명은 또한, 단일벽 탄소나노튜브를 포함하는 액상 시료에, 서로 상보적인 서열을 포함하는 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열을 첨가하는 단계; 마이크로 공진기의 표면 상에 상기 제1 DNA 서열과 상보적인 서열을 포함하는 제3 DNA 서열을 고정하는 단계; 상기 마이크로 공진기의 표면을 상기 액상 시료에 담그어 상기 제1 DNA 서열과 상기 제3 DNA 서열의 혼성화를 유도하는 단계; 및 상기 혼성화로 인한 질량 증가에 따른 상기 마이크로 공진기의 공진 주파수 이동현상을 분석하는 단계를 포함하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 검출방법을 제공한다.

[44] 상기 제1 DNA 서열, 제2 DNA 서열 및 제3 DNA 서열은 전술한 바와 같으며, 다만, 상기 액상 시료에 상기 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열을 첨가하는 단계에 있어서는, 상기 제1 DNA 서열을 상기 제2 DNA 서열보다 10% 과량으로 첨가해 줄 수 있는데, 이는 여분의 제1 DNA 서열이 상기 제3 DNA 서열과 혼성화를 이룰 수 있도록 하기 위함이다.

[45] 상기 제1 DNA 서열과 상기 제3 DNA 서열의 혼성화로 인해서 야기되는 공진 주파수 이동 (ω_{nfs})은 하기 식으로 표시될 수 있으며:

$$[46] \quad \omega_{nfs} = (\omega_d - \omega_c) / \omega_d \times 100$$

[47] 상기 식에서, ω_d 는 제3 DNA를 마이크로 공진기의 표면 상에 고정화시킨 후 측정되는 공진 주파수이고, ω_c 는 상기 제1 DNA 서열과 상기 제3 DNA 서열의 혼성화 이후에 측정되는 공진 주파수이다.

발명의 실시를 위한 형태

[48] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[49] 실시예

[50] SWNT 검출을 위해서, 도 1에 도시된 바와 같이, DNA 링커들 및 DNA-고정된 공진기를 사용하여 SCLS를 제조하였다. 구체적으로, 각각 11-DNA 및 12-DNA로 명명된 2개의 DNA 링커들을 제조하였으며, 전자의 서열은 (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GTT GCG AGG TCT TGC CGA CA-3')으로 표시되고, 후자의 서열은 (5'-TTT TTT TTC GTT GTC GGC AAG ACC TCG CAA C-3')으로 표시된다. 11-DNA 및 12-DNA의 일부는 폴리티민 뉴클레오티드로 구성되며, π - π 상호작용에 의해서 SWNT의 측벽을 둘러싼다. 관련하여, 종래문헌에는 긴 폴리티민 도메인들이 SWNT 표면 상에 강하게 흡착하는 것으로 보고된 바 있다 (H. T. Maune, S.-p. Han, R. D. Barish, M. Bockrath, I. I. A.

Goddard, W. K. Rothemund Paul and E. Winfree, Nat. Nanotechnol., 2010, 5, 61-66). 서열의 나머지 부분들은 DNA 혼성화 (hybridization)에 의해서 서로 결합할 수 있도록 제조하였으며, 이러한 DNA들이 혼성화되면, 그들은 양 말단이 SWNT 측벽에 결합한 상태로 링커로 기능하게 되고, 티민 염기들이 SWNT 주위를 둘러싸게 되면서, SCLS를 컨쥬게이션시킬 수 있었다.

[51] 한편, c-DNA (5'/NH₂/TGT CGG CAA GAC CTC GCA AC-3')로 명명된 DNA를 공진기 상에 고정시킨 다음, 이를 11-DNA와 혼성화시켰다. c-DNA는 12-DNA와 유사하지만, 전자는 폴리티민 염기 대신에 아미노기를 포함한다는 차이점이 있다. 11-DNA가 12-DNA 및 c-DNA와 혼성화됨에 따라서, 11-DNA를 12-DNA보다는 10% 과량으로 첨가하여 주었으며, 여분의 11-DNA가 c-DNA에 혼성화되도록 하였다.

[52] 다음 단계로서, c-DNA-고정화된 공진기 (CDR)를 SCLS 용액에 담그어 주어 SCLS가 DNA 혼성화에 의해서 CDR에 결합하고, CDR 상의 질량이 증가하도록 하였다. 공지된 탄성 연속 모델 (elastic continuum model) (T. Braun, V. Barwich, M. K. Ghatkesar, A. H. Bredekamp, C. Gerber, M. Hegner and H. P. Lang, Phys. Rev. E, 2005, 72, 031907)에 따르면, 공진기 주파수의 이동은 질량 변화에 기인한다. SWNT 검출을 확인하기 위해서, 본 발명에서는 정규화된 공진 주파수 이동 (normalized resonant frequency shift; NRFS)을 얻었으며, 이를 $\omega_{nfs} = (\omega_d - \omega_c)/\omega_d \times 100$ 으로 표시하였고; 여기에서, ω_d 및 ω_c 는 각각 c-DNA 고정화 및 SCLS 검출 이후의 공진 주파수들이다. 따라서, NRFS를 분석함으로써, SWNT들을 검출할 수 있었고, 이러한 방법은 무표지로서, 샌드위치 분석이 요구되지 않는 간편한 검출 과정을 갖는다는 장점이 있다.

[53] c-DNA를 공진기 상에 고정시키기 위해서, 공진기의 표면 상에 카르복실기를 관능화하였고, 아미드 결합에 의해서 상기 카르복실기에 아민-관능화된 c-DNA를 고정하였다. 공진기 상에 c-DNA가 고정되었는지 여부는 c-DNA를 플루오레세인 이소시아네이트 표지자를 부착시킴으로써 확인하였고, c-DNA는 공진기 상에 고르게 고정하였다.

[54] SCLS의 모폴로지는 원자력 마이크로스코피 (atomic force microscopy; AFM)를 사용하여 분석하였다. AFM 영상은 전형적인 SCLS의 모폴로지를 확인시켜 주었는데, 이는 나무가지 모양의 구조로서 단일 SCLS 중의 SWNT의 평균 개수는 4.00 ± 1.68 이었다. 이러한 결과는, SCLS 컨쥬게이션이 질량 증폭을 야기하였으며, 그 정도는 SWNT 개수 증가 및 SCLS 중의 DNA 링커들의 첨가로 인해서, 단일 SWNT의 질량에 비해서 최소한 4배 정도 더 큰 것이었다. 더 나아가, SWNT의 개수를 증가시킴으로써 감도를 더욱 증가시킬 수 있다.

[55] 한편, CDR의 포획 감도를 분석하기 위해서 다양한 농도 조건 하에서 SWNT들을 제조하였다. 구체적으로, 1 mg/ml, 10 μ g/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml 및 1 ng/ml의 농도로 제조하였으며, 이들은 가교결합 이전의 SWNT의 농도들이다. 감도를 분석하기 위해서, 전술한 바와 같은

NRFS를 사용하였으며, 대조군으로서, SWNT 없이 11-DNA 및 12-DNA만을 함유하는 용액을 제조하였다. 대조군은 0.031 ± 0.01 a.u.의 NRFS를 보유하였다 (도 2). 또한, 각각의 SWNT 농도들에 대해서 하기와 같은 NRFS 수치들을 얻었다: 1.31 ± 0.14 (1 mg/ml), 0.74 ± 0.23 (10 μ g/ml), 0.36 ± 0.17 (100 ng/ml), 0.31 ± 0.19 (50 ng/ml), 0.18 ± 0.08 (10 ng/ml), 0.061 ± 0.038 (5 ng/ml) 및 0.035 ± 0.024 (1 ng/ml) a.u. 상기와 같이, NRFS 수치들은 SWNT의 농도에 매우 민감하게 대응되었다. 특히, 1 ng/ml 농도의 평균 NRFS는 대조군 NRFS와 단지 0.0004%의 차이값만을 나타내었다. 이와는 달리, 10 ng/ml의 NRFS는 대조군의 NRFS에 비해서 대략 6배 정도였으며, 따라서 LOD와의 관계에서 민감도는 SWNT의 10 ng/ml라는 결론을 얻었다. 100 ng/ml 및 50 ng/ml의 NRFS 수치는 단지 0.05 a.u. 만큼의 차이를 나타내었으며, 이는 대조군의 수치에 필적하는 것인 반면에, 100 ng/ml, 10 ng/ml 및 1 ng/ml의 NRFS 수치는 구별이 가능한 수준이었다. 따라서, 본 발명에 따른 센서의 감도는 10 정도로서, 이는 본 발명자들이 기존에 보고한 종래기술에 따른 방법에 비해서 10배 더 우수한 수준이다 (J. Park, W. Choi, K. Jang and S. Na, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 41, 471-476).

- [56] 상기 LOD 결과는 매우 의미있는 것인데, 이는 본 발명에 따른 LOD가 인간 HEK293 세포들에서 관찰되는 SWNT 독성 농도 (25 μ g/ml)에 비해서 1/1000 수준으로 작은 값이기 때문이다 (D. Cui, F. Tian, C. S. Ozkan, M. Wang and H. Gao, *Toxicol. Lett.*, 2005, 155, 73-85). 따라서, 본 발명에 따른 CDR은 매우 감도 높게 SWNT들을 검출할 수 있으며, 액상에서 그들을 조기에 검출할 수 있는 가능성을 열어준다.
- [57] 실제 샘플에서 본 발명에 따른 공진기의 감도를 평가하기 위해서, 실제 수도물에서 SWNT 검출 실험을 수행하였다 (Korea University, Seoul, Korea). 도 3은 실제 수도물에서 10 μ g/ml, 100 ng/ml 및 10 ng/ml 농도인 CDR의 NRFS 수치들을 나타낸 것이다. 대조군은 0.027 ± 0.012 a.u.의 NRFS 수치를 갖는다. 실제 수도물에서 CDR의 NRFS 수치들은 0.31 ± 0.07 , 0.15 ± 0.04 및 0.053 ± 0.012 , a.u.였다. 실제 수도물에서 CDR의 전반적인 감도는 감소하였으며, NRFS는 완충용액 중에서의 감도에 비해서 대략 절반이었다. 이러한 감도 감소는 아마도 수도물 중의 금속 이온들과 DNA가 상호작용하기 때문에 야기된 것으로 추측된다. 상기 상호작용은 DNA가 SWNT의 측벽에 부착하는 것과 DNA 혼성화를 방해한다 (A. Ono, H. Torigoe, Y. Tanaka and I. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 5855-5866).
- [58] 또한, 본 발명에서는 금속 이온들 (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Na^{+} 및 Zn^{2+})이 CDR과 비특이적으로 결합함으로써 야기되는 NRFS를 관찰하였으며, 그 결과 이러한 NRFS들이 무시할만한 수준이라는 것을 알 수 있었다. 실제 수도물에서 CDR의 LOD는 대략 100 ng/ml였다. 그럼에도 불구하고, 이러한 CDR의 검출한계는 전술한 SWNT 독성 농도에 비해서 여전히 1/100 수준이다. 그러므로, 본 발명에 따른 CDR은 감도 높게 SWNT들을 검출할 수 있으며, 실제 샘플들에서도

SWNT들을 조기에 검출할 수 있는 가능성을 보여준다.

산업상 이용가능성

- [59] 종합하면, 본 발명에서는 최초로 SCLS 컨쥬게이션 및 CDR로부터 매우 높은 감도로 SWNT를 검출할 수 있는 방법을 제공한다. 본 발명에서 이러한 높은 감도를 달성할 수 있는 이유는, DNA 혼성화에 의해서 CDR 상에 SCLS들을 포획하고, SCLS들이 자가 질량증폭됨으로써, 샌드위치 분석을 수행할 필요없이 무표지의 간편한 검출 과정을 달성하게 되기 때문이다. LOD는 10 ng/ml 수준이었으며, 이러한 수준은 종래기술에서 전혀 보고된 바 없는 우수한 결과이다. 더 나아가, 본 발명은 실제 수도물에서 SWNT들을 100 ng/ml의 농도로 검출할 수 있었는데, 이는 종래 보고된 SWNT 독성 농도의 1/100 - 1/1000 수준으로서, 매우 감도 높은 수치이다. 따라서, 본 발명에 따른 검출센서 및 검출방법은 SWNT가 환경 및 인체에 미치는 독성을 분석할 수 있는 우수한 수단을 제공한다.

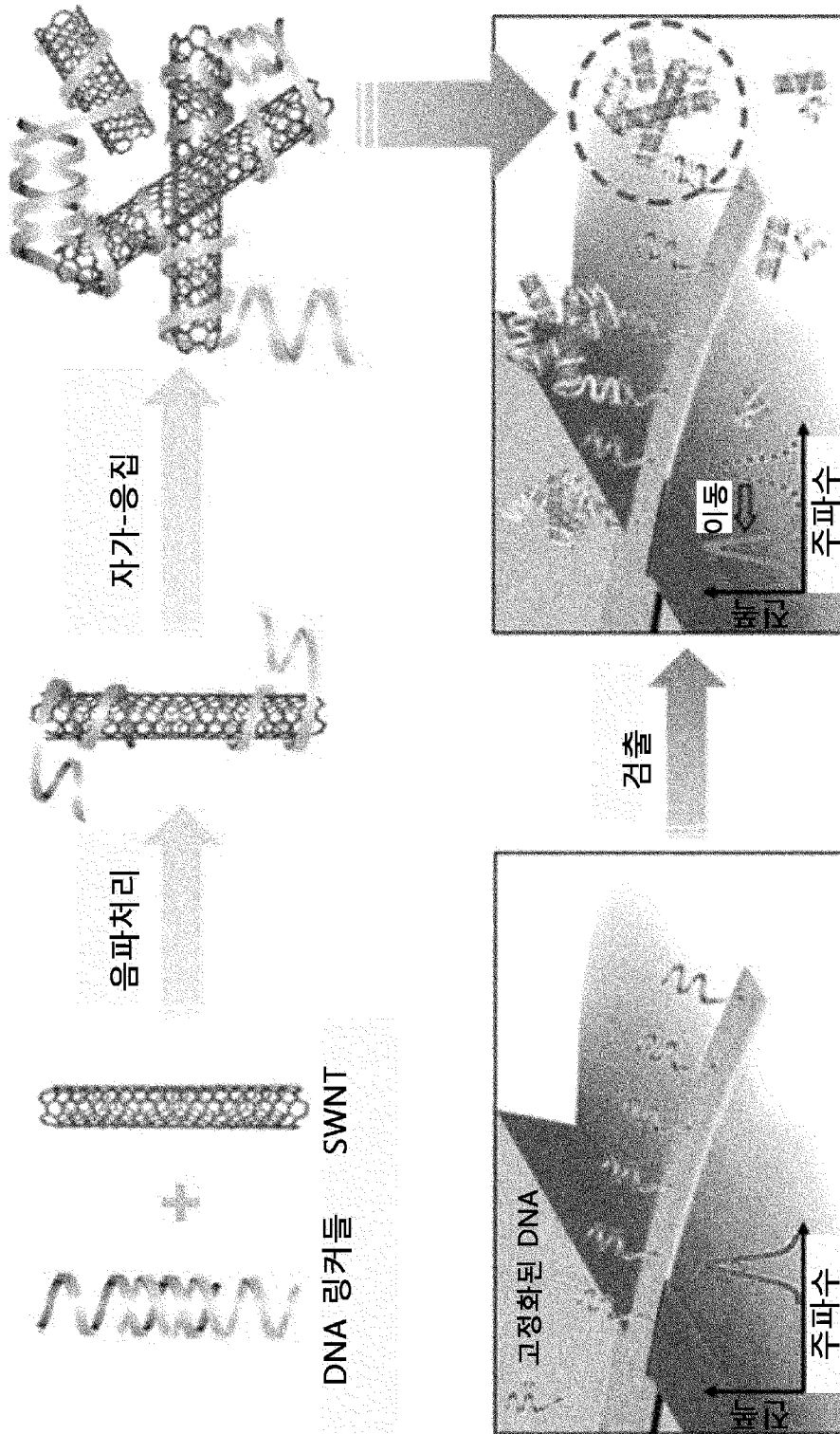
[60]

청구범위

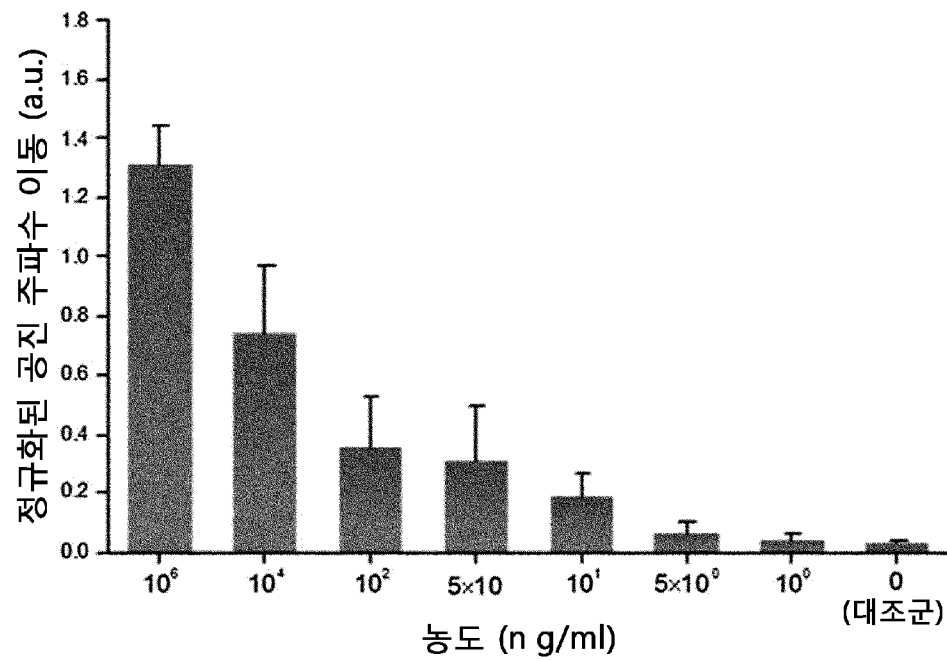
- [청구항 1] 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 외벽에 결합될 수 있으며, 서로 상보적인 서열을 포함하는 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열; 상기 제1 DNA 서열과 상보적인 서열을 포함하는 제3 DNA 서열; 및
표면에 상기 제3 DNA 서열이 고정되며, 상기 제3 DNA 서열과 상기 제1 DNA 서열의 혼성화로 인하여 질량이 증가함에 따라 공진 주파수 이동 현상을 나타내는 마이크로 공진기를 포함하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열은 그 서열 중에 폴리티민 도메인을 포함하는 DNA 서열인 것을 특징으로 하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열은 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 DNA 서열인 것을 특징으로 하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 제3 DNA 서열은 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열의 상기 폴리티민 도메인이 아미노기로 치환된 DNA 서열인 것을 특징으로 하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 제3 DNA 서열은 서열번호 3의 DNA 서열로 표시되고, 5' 말단에 아민 관능기를 포함하는 DNA 서열인 것을 특징으로 하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 마이크로 공진기의 표면은 카르복시기로 관능화된 것을 특징으로 하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브 검출용 센서.
- [청구항 7] 단일벽 탄소나노튜브를 포함하는 액상 시료에, 서로 상보적인 서열을 포함하는 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열을 첨가하는 단계;
마이크로 공진기의 표면 상에 상기 제1 DNA 서열과 상보적인 서열을 포함하는 제3 DNA 서열을 고정하는 단계;
상기 마이크로 공진기의 표면을 상기 액상 시료에 담그어 상기 제1 DNA 서열과 상기 제3 DNA 서열의 혼성화를 유도하는 단계; 및
상기 혼성화로 인한 질량 증가에 따른 상기 마이크로 공진기의 공진 주파수 이동현상을 분석하는 단계를 포함하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 검출방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열은 그 서열 중에 폴리티민 도메인을 포함하는 DNA 서열인 것을

- 특징으로 하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 검출방법.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열은 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 DNA 서열인 것을 특징으로 하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 검출방법.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 제3 DNA 서열은 상기 제1 DNA 서열 및 상기 제2 DNA 서열의 상기 폴리머 도메인이 아미노기로 치환된 DNA 서열인 것을 특징으로 하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 검출방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 제3 DNA 서열은 서열번호 3의 DNA 서열로 표시되고, 5' 말단에 아민 관능기를 포함하는 DNA 서열인 것을 특징으로 하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 검출방법.
- [청구항 12] 제7항에 있어서, 상기 마이크로 공진기의 표면에 상기 제3 DNA 서열을 고정하는 단계는, 상기 마이크로 공진기의 표면을 카르복시기로 관능화시킨 다음, 상기 카르복시기와 상기 제3 DNA 서열의 아미노기 사이에서 아미드 결합을 형성함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 검출방법.
- [청구항 13] 제7항에 있어서, 상기 액상 시료에 상기 제1 DNA 서열 및 제2 DNA 서열을 첨가하는 단계에 있어서, 상기 제1 DNA 서열을 상기 제2 DNA 서열보다 10% 과량으로 첨가해 주는 것을 특징으로 하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 검출방법.
- [청구항 14] 제7항에 있어서, 상기 공진 주파수 이동 (ω_{nfs})은 하기 식으로 표시되는 것을 특징으로 하는 수계 중 단일벽 탄소나노튜브의 검출방법:
- $$\omega_{nfs} = (\omega_d - \omega_c) / \omega_d \times 100$$
- 상기 식에서, ω_d 는 제3 DNA를 마이크로 공진기의 표면 상에 고정화시킨 후 측정되는 공진 주파수이고, ω_c 는 상기 제1 DNA 서열과 상기 제3 DNA 서열의 혼성화 이후에 측정되는 공진 주파수이다.

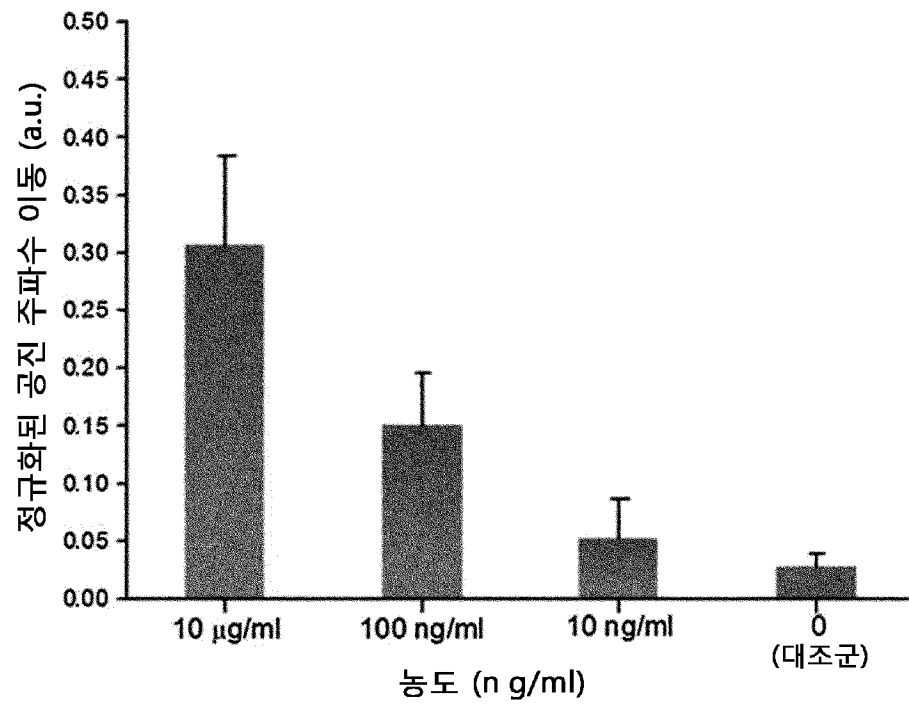
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/005504**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/68; C12N 13/00; C12N 11/14; C12Q 1/56; G01H 13/00; C12N 15/11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

NCBI PubMed, eKOMPASS (KIPO internal), 'single-walled carbon nanotube, SWNT, DNA, detection, sensor, toxicity, resonance, etc.'

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JANG, K. et al., "Highly sensitive detection of self-aggregated single-walled carbonnanotubes using a DNA-immobilized resonator" Chem. Commun. (Camb), Vol. 49, No. 77, pp. 8635-8637 (17 July 2013) - See the entire main text. Especially abstract; figure 1; pages 8635-8636.	1-14
X	JANG, Kue Whan et al., "Single-walled carbon nanotube detection using DNA connectors and DNA functionalized micro-cantilever" 2013 Journal of Spring Conference of CAE and Applied Mechanics in KSME, pp. 355-366 (23 May 2013) - See the entire main text. Especially introduction; figure 1.	1,7
A	KR 10-1293968 B1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 07 August 2013	2-6,8-14
A	- See the entire main text. Especially claim 1.	1-14
A	KR 10-2011-0037415 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 13 April 2011 - See the entire main text. Especially claims 1, 3, 10.	1-14
A	KR 10-2011-0055930 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 26 May 2011 - See the entire main text. Especially claim 1.	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 SEPTEMBER 2014 (24.09.2014)

Date of mailing of the international search report

24 SEPTEMBER 2014 (24.09.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/005504

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1293968 B1	07/08/2013	US 2013-0323850 A1	05/12/2013
KR 10-2011-0037415 A	13/04/2011	NONE	
KR 10-2011-0055930 A	26/05/2011	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; C12N 13/00; C12N 11/14; C12Q 1/56; G01H 13/00; C12N 15/11

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

NCBI PubMed, eKOMPASS (KIPO internal), 'single-walled carbon nanotube, SWNT, DNA, detection, sensor, toxicity, resonance, etc.'

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JANG, K. 외, 'Highly sensitive detection of self-aggregated single-walled carbonnanotubes using a DNA-immobilized resonator' Chem. Commun. (Camb), Vol. 49, No. 77, pp. 8635-8637 (2013-07-17) - 본문 전체 참조. 특히 초록; 도 1; pp. 8635-8636.	1-14
X	장규환 외, 'DNA 연결기와 DNA로 부착된 마이크로 캔틸리버를 이용한 단일벽탄소 나노튜브 검출' 2013년도 대한기계학회 CAE 및 응용역학 부문 춘계 학술발표대회 논문집, pp. 355-366 (2013-05-23) - 본문 전체 참조. 특히 서론; 도 1.	1, 7
A		2-6, 8-14
A	KR 10-1293968 B1 (고려대학교 산학협력단) 2013-08-07 - 본문 전체 참조. 특히 청구항 1.	1-14
A	KR 10-2011-0037415 A (고려대학교 산학협력단) 2011-04-13 - 본문 전체 참조. 특히 청구항 1, 3, 10.	1-14
A	KR 10-2011-0055930 A (한국과학기술연구원) 2011-05-26 - 본문 전체 참조. 특히 청구항 1.	1-14

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 09월 24일 (24.09.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 09월 24일 (24.09.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이준혁

전화번호 +82-42-481-8115



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1293968 B1	2013/08/07	US 2013-0323850 A1	2013/12/05
KR 10-2011-0037415 A	2011/04/13	없음	
KR 10-2011-0055930 A	2011/05/26	없음	