

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0071336 (43) 공개일자 2011년06월29일
(51) Int. Cl. <i>B82B 1/00</i> (2006.01) <i>B82B 3/00</i> (2006.01) <i>C01G 7/00</i> (2006.01)	(21) 출원번호 10-2009-0127878 (22) 출원일자 2009년12월21일 심사청구일자 2009년12월21일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 이재승 서울특별시 성북구 안암동1가 삼성래미안 아파트103-302 김지영 서울특별시 동대문구 휘경1동 139-20 (74) 대리인 김한

전체 청구항 수 : 총 15 항

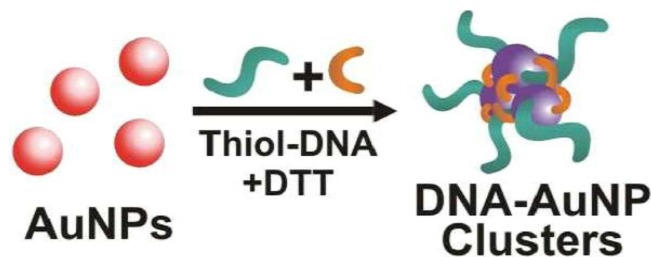
(54) 금 나노입자 클러스터 및 그 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 바이오 센서로 유용하게 이용될 수 있는 금 나노입자 클러스터 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 금 나노입자, 상기 금 나노입자를 상호 결합시키는 가교제, 및 한쪽 말단은 상기 금 나노입자 표면에 결합되고, 표적물질 인지부위는 상기 금 나노입자 클러스터의 외부로 노출되는 리셉터로 구성된 금 나노입자 클러스터, 그 제조방법 및 상기 금 나노입자 클러스터를 이용한 바이오 센서에 관한 것이다.

본 발명의 금 나노입자 클러스터는 가교제와 리셉터의 양을 조절하여 금 나노입자 클러스터의 크기 및 광학 특성을 조절할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0911371/ R0911791

부처명 한국학술진흥재단/ (재)서울특별시시정개발연구원

연구관리전문기관

연구사업명 (이공)일반연구자지원-협동/ 서울형산업기술개발지원사업

연구과제명 비표적인식성 세포내 표적지향 약물전달을 위한 siRNA-자성 금 나노입자의 합성 및
응용/ 유방암 지표물질 진단을 위한 바이오물질-백금나노입자 결합체 합성 및 응용

기여율

주관기관 한국연구재단/ 고려대학교 산학협력단

연구기간 2009년 09월 01일~2010년 08월 31일/ 2009년 09월 01일~2010년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

금 나노입자, 상기 금 나노입자를 상호 결합시키는 가교제, 및 한쪽 말단은 상기 금 나노입자 표면에 결합되고, 표적물질 인지부위는 상기 금 나노입자 클러스터의 외부로 노출되는 리셉터로 구성된 금 나노입자 클러스터.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 가교제는 아민 작용기(-NH₂), thiol(-SH), 및 carboxyl 작용기(-COO-)가 각각 사슬 양단에 위치한 diaminoalkane, dithiol, 및 dicarboxylate 중에서 선택된 일종의 사슬형 유기분자를 포함하는 것인 금 나노입자 클러스터.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 가교제는 디티오쓰레톨(Dithiothretol)인 것인 금 나노입자 클러스터.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 리셉터는 효소기질, 리간드, 아미노산, 펩티드, 단백질, 항체, 핵산, 올리고뉴클레오타이드, 지질, 코팩터 및 탄수화물로 이루어진 군으로부터 선택되는 일 이상인 것인 금 나노입자 클러스터.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 리셉터는 디옥시리보뉴클레오타이드 인 것인 금 나노입자 클러스터.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 리셉터 1 몰당 상기 가교제는 10 몰 내지 40 몰 비로 포함하는 것을 특징으로 하는 금 나노입자 클러스터.

청구항 7

금 나노입자를 제조하는 단계;

상기 금 나노입자, 표적물질과 결합 또는 반응할 수 있는 표적물질 인지부위를 포함하는 리셉터 및 가교제를 혼합하는 단계; 및

염화나트륨 수용액을 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 금 나노입자 클러스터의 제조 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 가교제는 아민 작용기(-NH₂), thiol(-SH), 및 carboxyl 작용기(-COO-)가 각각 사슬 양단에 위치한 diaminoalkane, dithiol, 및 dicarboxylate 중에서 선택된 일 종의 사슬형 유기분자를 포함하는 것인 금 나노입자 클러스터의 제조 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 가교제는 디티오쓰레톨(Dithiothretol)인 것인 금 나노입자 클러스터의 제조 방법.

청구항 10

제 7 항에 있어서,

상기 리셉터는 효소기질, 리간드, 아미노산, 펩티드, 단백질, 항체, 핵산, 올리고뉴클레오타이드, 지질, 코팩터 및 탄수화물로 이루어진 군으로부터 선택되는 일 이상인 것인 금 나노입자 클러스터의 제조 방법.

청구항 11

제 7 항에 있어서,

상기 리셉터는 디옥시리보뉴클레오타이드인 것인 금 나노입자 클러스터의 제조 방법.

청구항 12

제 7 항에 있어서,

상기 염화나트륨 수용액은 0.1 내지 0.2 몰 농도로 첨가되는 것인 금 나노입자 클러스터의 제조 방법.

청구항 13

제 7 항에 있어서,

상기 리셉터 1 몰당 상기 가교제는 10 몰 내지 40 몰 비로 포함하며, 상기 리셉터와 상기 가교제의 몰비에 따라 상기 금 나노입자 클러스터의 크기가 조절되는 것을 특징으로 하는 금 나노입자 클러스터의 제조 방법.

청구항 14

제 1항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 따른 금 나노입자 클러스터를 이용하여, 리셉터의 표적물질 인지 부위와 결합하거나 반응하는 표적물질을 검출하는 바이오 센서.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 리셉터로서 DNA 를 사용하고 표적 물질로서 DNA를 사용한 경우, 리셉터 DNA 와 표적 DNA 는 상보적 결합을 하고, 온도를 T_m 이상으로 가열할 경우 상기 상보적 결합이 해리되어 원래 상태로 복원되는 가역적 반응을 하는 것을 특징으로 하는 바이오 센서.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오 센서로 유용하게 이용될 수 있는 금 나노입자 클러스터 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 금 나노입자, 상기 금 나노입자를 상호 결합시키는 가교제, 및 한쪽 말단은 상기 금 나노입자 표면에 결합되고, 표적물질 인지부위는 상기 금 나노입자 클러스터의 외부로 노출되는 리셉터로 구성된 금 나노입자 클러스터 및 그 제조방법에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 상기 금 나노입자 클러스터를 이용한 바이오 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 금속 나노입자를 이용하여 생체 물질(디옥시리보오스 핵산(DNA), 단백질 등)을 검출하는 방법에 관한 연구는 약 10년 전부터 많은 발전이 이루어지고 있으며, 새로운 플랫폼 기술에 의한 바이오 센서가 개발되고 있다. 금 나노입자는 특이적인 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)에 의한 물질적, 화학적 및 광학적 성질을 나타내며, 이러한 성질은 바이오 분자의 신호 검출에 주로 이용된다.

[0004] 표면 플라즈몬 공명 현상이란 금속 박막 표면에서 일어나는 전자들의 집단적 진동에 의하여 발생한 표면 플라즈몬 파(surface plasmon wave)가 금속과 사이에 인접한 유전물질의 경계 면을 따라 진행하는 표면전자기파로 여기 되어 공명 흡수 효과가 일어나는 현상이다. 이는 금속 표면에서 발생하는 유전체(dielectric constant)의 물리적 변화, 즉 농도, 두께 굴절률 변화를 정밀하게 측정할 수 있기 때문에 나노 수준의 계면 현상을 분석하는 신호 변환 기법의 일환으로 물질을 정량적으로 분석하기 위한 다양한 센서들이 고안되고 있다.

[0005] 특히 이러한 표면 플라즈몬 파가 금속 나노입자에서 발생할 경우 나노입자 표면에서 국소 표면 플라즈몬 파로 나타나며, 이러한 현상에 의하여 나노입자 용액이 가시광선 하에서 특이한 색을 나타내므로, 대상 물질 측정에 의한 표면의 미세한 변화를 색 변화로 쉽게 검출 할 수 있기 때문에 표식자(labeling)없이 바이오 센서 또는 화학 센서로 활용될 것으로 알려지고 있다.

[0006] 금 나노입자를 이용하는 방법은 기존의 형광 물질을 부착시켜 어레이(array)를 형성하는 기술들에 비하여 보다 뛰어난 감도를 가지고 빠르고 용이한 분석을 가능케 하며 높은 재현성을 나타낼 수 있다. 또한, 금 나노입자는 표면에 다양한 유기 분자들과 안정한 결합을 형성할 수 있으며, 생체 물질(올리고뉴클레오티드 및 단백질 등)이 본래의 구조를 유지할 수 있는 높은 생리적인 염 농도에서도 안정한 결합 상태를 유지할 수 있는 등 여러 가지 장점을 가지고 있다.

[0007] 따라서, 상기 금 나노입자를 이용한 바이오 센서가 리셉터로서 생체 물질인 올리고뉴클레오티드(DNA의 절편) 또는 단백질을 이용하는 경우, 올리고뉴클레오티드는 상보적인 염기서열을 가지는 표적 DNA와 강한 수소 결합을 형성할 수 있고, 단백질은 항원-항체 반응을 통하여 표적 단백질과 강한 결합을 형성할 수 있어 특정 표적물질의 검출을 가능하게 한다.

[0008] 그러나, 종래 금 나노입자를 이용한 바이오 센서의 경우, 형성되는 금 나노입자의 크기 조절이 가능하지 않아 바이오 센서로서 기능하기 어렵다는 문제점이 있었다. 따라서, 금 나노입자의 크기를 다양하게 조절할 수 있는 방법 및 이를 활용한 다양한 발색이 가능한 바이오 센서의 개발이 요구되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 금 나노입자 클러스터, 이의 제조방법, 및 이를 이용한 바이오 센서를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예는 금 나노입자, 상기 금 나노입자를 결합시키는 가교제, 및 한쪽 말단은 상기 금 나노입자 표면에 결합되고, 표적물질 인지부위는 상기 금 나노입자 클러스터의 외부로 노출되는 리셉터로 구성된 금 나노입자 클러스터를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명의 다른 일 실시예는 금 나노입자를 제조하는 단계, 상기 금 나노입자, 표적물질과 결합 또는 반응할 수 있는 표적물질 인지부위를 포함하는 리셉터 및 가교제를 혼합하는 단계, 및 염화나트륨 수용액을 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 금 나노입자 클러스터의 제조 방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명의 일 실시예는 상기 금 나노입자 클러스터를 이용하여 상기 리셉터의 표적물질 인지부위와 결합하거나 반응하는 표적물질을 검출하는 바이오 센서를 제공한다.
- [0013] 상술한 목적, 특징들 및 장점은 첨부된 도면과 관련한 다음의 설명을 통하여 보다 분명해 질 것이다. 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 따른 금 나노입자 클러스터는 금 나노입자, 상기 금 나노입자를 상호 결합시키는 가교제, 및 한쪽 말단은 상기 금 나노입자 표면에 결합되고, 표적물질 인지부위는 상기 금 나노입자 클러스터의 외부로 노출되는 리셉터를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 금 나노입자는 여러 가지 유기 분자들과의 친화력이 강하여, 유기 분자와 안정한 결합을 형성할 수 있으며, DNA 또는 단백질과 같은 생체 거대 분자들이 원래의 구조를 유지할 수 있는 높은 생리적인 염 농도 상태에서도 높은 안정성을 갖는다. 따라서, 본 발명에 있어서는 금 나노입자 상호간을 가교제로 결합시키고, 그 표면에 리셉터를 결합시킴으로써 형성되는 금 나노입자 클러스터에 있어서, 상기 금 나노입자 클러스터의 크기를 가교제와 리셉터의 양을 조절함에 따라 조절할 수 있어, 다양한 광학 특성을 나타낼 수 있는 바이오 센서로의 적용이 가능하다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 금 나노입자의 크기는 1 nm 내지 1000 nm임이 바람직하고, 1 nm 내지 500 nm임이 보다 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 금 나노입자 클러스터를 이루는 금 나노입자는 가교제에 의해 서로 결합될 수 있다. 상기 가교제는 아민 작용기(-NH₂), thiol(-SH), 및 carboxyl 작용기(-COO-)가 각각 사슬 양단에 위치한 diaminoalkane, dithiol, 및 dicarboxylate 중에서 선택된 일 종의 사슬형 유기분자를 포함할 수 있으며, 이중에서 thiol 기를 사슬 양단에 포함하는 dithiol 이 바람직하다. dithiol로서는 디티오쓰레톨(Dithiothreitol)이 가장 바람직하다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에서, 리셉터는 표적물질과 결합 또는 반응할 수 있는 표적물질 인지부위를 포함한다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 리셉터와 표적물질과의 결합 또는 반응은 공유결합, 수소결합, 항원-항체 반응 또는 정전기적 인력에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 이러한 리셉터의 비 제한적 예는 효소기질, 리간드, 아미노산, 펩티드, 단백질, 항체, 핵산, 올리고뉴클레오타이드, 지질, 코펙터 및 탄수화물로 이루어진 군으로부터 선택되는 일 이상일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 리셉터는 그 한쪽 말단이 상기 금 나노입자 클러스터 표면에 결합되고, 상기 표적물질 인지부위는 상기 금 나노입자 클러스터 외부로 노출되게 된다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 따른 금 나노입자 클러스터는 리셉터로 디옥시리보뉴클레오타이드(DNA)를 포함할 수 있다.
- [0023] 전술한 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 있어서는, 기본적으로 금 나노입자가 가교제에 의하여 상호 결합되어 클러스터를 형성하고, 그 한쪽 말단이 금 나노입자 클러스터 표면에 결합된 리셉터의 표적 물질 인지부위는 금 나노입자 클러스터의 외부로 노출되게 된다.
- [0024] 본 발명에 따르면, 금 나노입자가 서로 가교제에 의해 결합되어 클러스터를 형성하는데 있어서, 가교제와 리셉터의 비율에 따라 형성되는 클러스터의 크기를 조절함으로써 다양한 광학적 특성을 이용한 신호 증폭 특성을 효율적으로 이용할 수 있다. 본 발명에 있어서 리셉터 1 몰당 가교제는 10몰 내지 40몰 비로 포함하는 것이 금 나노입자 클러스터의 크기 조절 및 발색 효과를 나타내는데 바람직하다. 따라서, 본 발명은 초고감도로 다양한

생체물질을 검출하는데 응용할 수 있으며, 더욱 정량적인 검출 결과를 얻을 수 있는 장점을 갖는다.

- [0025] 또한, 본 발명의 일 실시예에서, 상기 리셉터는 상기 금 나노입자와의 결합을 매개하는 작용기를 더 포함할 수 있다. 상기 작용기의 예는 아민기, 카르복시기, 티올기 및 인산기로 이루어진 군에서 선택되는 일 이상일 수 있다.
- [0026] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 금 나노입자 클러스터의 제조방법은 금 나노입자를 제조하는 단계, 상기 금 나노입자, 표적물질과 결합 또는 반응할 수 있는 표적물질 인지부위를 포함하는 리셉터 및 가교제를 혼합하는 단계, 및 염화나트륨 수용액을 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 금 나노입자 클러스터의 제조방법에 있어서, 상기 리셉터 1 몰당 상기 가교제는 10 몰 내지 40 몰 비로 포함하며, 상기 리셉터와 상기 가교제의 몰비에 따라 상기 금 나노입자 클러스터의 크기가 조절되는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 금 나노입자 클러스터의 제조방법에 있어서, 상기 염화나트륨 수용액은 0.1 내지 0.2 몰 농도로 첨가되는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 금 나노입자는 표면 안정화제가 첨가된 상태 또는 첨가되지 않은 상태로 이용할 수 있다. 또한, 상기 금 나노입자는 유기용매 또는 수용액에 분산시킨 상태로 이용할 수 있으며, 수용액에 분산시킨 상태로 이용하는 것이 바람직하다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에서, 금 나노입자는 여러 가지 유기 분자와의 친화력이 강하여 유기 분자와 안정한 결합을 형성할 수 있는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 표적물질과 결합 또는 반응할 수 있는 표적물질 인지부위를 포함하는 리셉터의 한쪽 말단을 공유결합 또는 정전기적 인력 등에 의하여 금 나노입자 표면에 결합시킬 수 있다.
- [0031] 한편, 본 발명의 일 실시예는 전술한 본 발명에 따른 금 나노입자 클러스터를 이용하여, 리셉터의 표적물질 인지 부위와 결합하거나 반응하는 표적물질을 검출하는 바이오 센서에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명에 따른 바이오 센서는 금 나노입자 클러스터를 이용함으로써 우수한 광학적 특성 및 표적물질에 대한 특이적 결합 특성을 가지므로, 효율적이며 고감도로 다양한 생체물질 등의 표적물질에 대한 다중 검지가 가능하다.
- [0033] 한편, 본 발명의 일 실시예는 전술한 본 발명에 따른 바이오 센서를 이용하는 것을 특징으로 하는, 상기 바이오 센서의 리셉터의 표적물질 인지부위와 결합하거나 반응하는 표적물질의 검출방법에 관한 것이다.
- [0034] 상기 검출은 비색분석법, UV 분광법, 라만 분광법, 광학 현미경법, 전기 센싱법 및 스캐노메트릭법으로 이루어지는 군으로부터 어느 하나 이상을 이용하여 이루어질 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에서, 표적물질은 바이오 센서의 리셉터의 표적물질 인지부위와 반응하거나 결합할 수 있는 물질로서, 생체 물질인 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 효소, 단백질, 핵산, 올리고뉴클레오타이드, 올리고당, 펩티드, 아미노산, 탄수화물, 지질, 세포, 암세포, 암줄기세포, 항원, 압타머 또는 기타 생체유래의 물질이다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에서, 리셉터로서 DNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 이용하는 경우, 표적물질과 리셉터의 표적물질 인지부위와의 결합은 상보적인 수소결합에 의하여 이루어질 수 있다. 또한, 본 발명의 또 다른 실시예에서, 리셉터로서 단백질을 이용할 경우, 표적물질과 리셉터의 표적물질 인지부위와의 결합은 항원-항체 반응을 통해 이루어질 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에서, 리셉터로서 DNA 를 사용하고 표적 물질로서 DNA를 사용한 경우, 리셉터 DNA 와 표적 DNA 는 상보적 결합을 하지만, 온도를 T_m 이상으로 가열할 경우 상보적 결합이 해리되어 원래 상태로 복원되는 가역적 반응을 한다.
- [0038] 이와 같이, 본 발명에 따른 금 나노입자 클러스터를 이용한 바이오 센서를 이용하면 원하는 특정 표적물질을 선택적 및 특이적으로 검출할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 나노입자 클러스터는 표면 플라즈몬 파가 발생하는 금속 나노입자라면 어떠한 금속으로도 제조되는 것이 가능하며, 구체적으로는 본 발명에 따른 금 이외에도 은, 금은 합금 등을 사용하여 나노입자 클러스터로 만들어질 수 있다.

효 과

- [0040] 본 발명에 따른 금 나노입자 클러스터는 제조 과정에서 첨가되는 가교제와 리셉터의 양을 조절함으로써 형성되는 금 나노입자 클러스터의 크기를 조절할 수 있으며, 그에 따라 우수한 광학적 특성을 발휘할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 금 나노입자 클러스터를 이용한 바이오 센서는 표적물질, 특히 표적 생체 물질과 가역적 DNA 상보적 수소 결합에 따라 검출을 효율적으로 수행할 수 있으며, 생체 물질의 검출이 중요한 의학 및 약학 등의 분야에 다양하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0042] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 실시예에 사용된 금 나노입자는 염화금산(HAuCl_4)의 사이트레이트 리덕션(citrate reduction)에 의해 합성되었으며, 티올기가 결합된 데옥시리보뉴클레오티드(DNA)는 Genotech에서 구입하여 티올기를 탈보호하여 사용하였다.
- [0044] <실시예 1> DNA-금 나노입자 클러스터 제조
- [0045] <실시예 1-1> 금 나노입자의 제조
- [0046] 15 nm 크기의 구형 금 나노입자 용액 150 ml를 제조하기 위하여, 전구체 hydrogen tetrachloroaurate(III) trihydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Aldrich)와 환원제 trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mallinckrodt)의 stock solution을 초순수를 용매로 하여 각각 0.254 mM 와 38.8 mM 의 농도로 준비하였다.
- [0047] 준비된 HAuCl_4 의 stock solution, 50 ml을, 환류 냉각기에 연결된 플라스크에서 150°C 로 가열하면서 강하게 교반(stirring)시켰다. 수용액이 끓기 시작하면 준비된 trisodium citrate의 stock solution 38.8 ml를 첨가하였다. 용액의 색깔이 노란색에서 dark red로 변하였으며 색깔이 변한 뒤에 5분간 가열을 계속하였고 이후 상온으로 천천히 냉각시켰다. 제조된 금 나노입자의 TEM 사진을 도 1 에 나타내었으며, 지름은 15 nm 이었다.
- [0048] <실시예 1-2> 모노티올 DNA의 준비
- [0049] 금 나노입자와 결합할 수 있는 각각 5' 말단과 3' 말단에 티올기를 가지는 Genotech에서 구입한 5'-알킬티올 개질된 데옥시뉴클레오티드(5'-HS-A10-ATTATCACT-3')를 Sigma Aldrich에서 구입한 디티오쓰레톨(Dithiothretol) 0.1 M에 가하여 상온에서 2 시간 동안 방치함으로써 탈보호 반응을 진행시켰다.
- [0050] 탈보호된 용액을 NAP-5 Sephadex 컬럼(디옥시 리보오스 핵산(DNA) 등급(grade))에 통과시켜 정제함으로써, 올리고뉴클레오티드 1A: (5'-HS-A₁₀-ATTATCACT-3')를 제조하였으며, 20 μM 로 정제하였다.
- [0051] <실시예 1-3> DNA-금 나노입자 클러스터의 제조
- [0052] 상기 실시예 1-2의 과정을 거쳐 탈보호된 티올기가 결합된 20 μM 디옥시리보오스 핵산 225 μL 와, 가교제로서 디티오쓰레톨(Dithiothretol)을 사용한 경우를 실시예로 하고, 디티오쓰레톨(Dithiothretol)을 사용하지 않은 경우를 비교예로 하였으며, 각각의 경우에 있어서 상기 실시예 1-1에서 제조된 4.0 nM인 15 nm 직경의 금 나노입자 용액 1 ml에 가하여 상온에서 12 시간 이상 진탕 교반하였다.
- [0053] 이후 용액의 조성을 인산염 농도가 10 mM, 도데실술포산 나트륨염의 농도가 약 0.01%가 되도록 조절하였다. 30 분 동안 추가 교반한 후, 최종 염 농도를 0.15 M NaCl 농도가 되도록 조절하였다. 도 2 에 상기 금 나노입자 클러스터가 제조되는 과정의 개략도를 나타내었다.

[0054] 이후 2-3 시간 이상 동안 추가 방치한 후, 용액을 원심 분리하여 상등액을 버리고, 버퍼(0.15 M NaCl, 0.01 % Tween 20, and 10 mM phosphate (pH 7.4)). 용액 1 ml을 가하여 희석하는 과정을 2회 반복하여 수행하였으며, 상기 비교예 및 실시예에 있어서 각각 용액이 나타내는 색깔을 아래 표 1 및 도 3a 에 나타내었다.

표 1

	디티오쓰레톨(Dithiothretol) 농도 (μM)	사용량 (μL)	발색
비교예 1	0	10	Red
실시예 1-3-1	300	10	Purple
실시예 1-3-2	500	10	Violet
실시예 1-3-3	700	10	Blue

[0056] 상기 비교예 및 실시예들에 대해 UV-가시광선 스펙트로미터로 상기 용액의 흡광도를 측정하여, 도 3b에 각각의 비교예 및 실시예에 있어서 가교제와 디옥시리보오스 핵산과의 비율에 따른 흡광도 변화를 나타내었다.

[0057] 도 3b 에 나타난 바와 같이, 디티오쓰레톨(Dithiothretol)을 첨가하지 않은 비교예는 520 nm에서 최대 흡광도를 나타내지만, 디티오쓰레톨(Dithiothretol)의 첨가량이 늘어남에 따라 최대 흡광도를 나타내는 파장이 520 nm에서 700 nm로 이동하면서 파장의 폭이 넓어지는 것을 알 수 있다. 이는 디티오쓰레톨(Dithiothretol)의 첨가량이 늘어남에 따라 금 나노입자의 응집이 많이 일어나게 되면서 나노입자 표면의 유전률의 변화를 유발하여 표면 플라즈몬 흡수조건이 바뀔에 따라 나노입자 용액 자체의 색깔이 변하게 된 것으로 판단되며, 이는 도 2a 에서 보이는 각각의 용액이 나타내는 색깔과도 일치하는 결과이다.

[0058] 또한, 동적광산란법 및 TEM 사진으로 상기 제조된 금 나노입자 클러스터의 모양과 크기를 확인하여 각각 도 4A 및 도 4B 로 나타내었다.

[0059] 상기 도 4A에서 보는 바와 같이, 디티오쓰레톨(Dithiothretol)을 첨가하지 않은 비교예의 경우 동적광산란법에 의한 경우 금 나노입자의 직경이 35 nm로 측정되었으며, 첨가되는 디티오쓰레톨(Dithiothretol)의 양이 증가할수록 금 나노입자의 응집이 많이 일어나게 되면서 직경이 42 nm, 49 nm, 115 nm 로 증가하여, 본 발명에 의한 경우 첨가되는 디티오쓰레톨(Dithiothretol)의 양이 증가함에 따라 생성되는 금 나노입자 클러스터의 크기가 증가함을 알 수 있다.

[0060] <실시예 2> DNA-금 나노입자 클러스터의 가역적인 결합과 해리능 및 온도 안전성 실험

[0061] <실시예 2-1> 모노티올 DNA의 준비

[0062] 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 테옥시뉴클레오타이드 2A: (5'-HS-A10-ATTATCACT-3')를 제조하고, 이와 상보적인 결합을 갖는 테옥시뉴클레오타이드 2B: (5'-HS-A10-AGTGATAAT-3')를 제조하였다.

[0063] <실시예 2-2> 금 나노입자 클러스터의 제조

[0064] 상기 실시예 2-1에서 만들어지는 테옥시뉴클레오타이드 2A, 2B에 대해 상기 실시예 1-2와 동일한 방법으로 첨가되는 디티오쓰레톨(Dithiothretol)의 양을 다르게 하여 3 가지 크기의 금 나노입자 클러스터를 제조하였다.

[0065] <실시예 2-3> DNA-금 나노입자 클러스터 간의 가역적 상보 결합과 해리능

[0066] DNA-금 나노입자 클러스터가 상보적 결합을 갖는 다른 DNA-금 나노입자 클러스터와 혼합되면 Tm(melting temperature)보다 낮은 온도에서는 DNA-금 나노입자 클러스터의 DNA간의 상보적 수소 결합에 의해 금 나노입자 클러스터 집합체(assembly)로 존재하며, Tm(melting temperature)보다 높은 온도에서는 상기 집합된 DNA-금 나노입자 클러스터는 해리되게 된다.

[0067] 상기 실시예 2-2에서 만들어지는 DNA-금 나노입자를 이용하여 DNA-AuNP cluster의 결합과 해리가 온도변화에 따른 가역적인 반응인지를 확인하였다. 상보적 DNA 서열을 갖는 DNA-금 나노입자 클러스터를 서로 혼합하여 색깔의 변화를 관찰하고, 각각의 용액을 가열하면서 색깔의 변화를 관찰하였다.

[0068] 상보적 서열을 갖는 데옥시뉴클레오타이드 2A, 2B를 포함하는 금 나노입자 클러스터가 결합되는 과정을 도 5A에 개략적으로 나타냈으며, 혼합 및 가열에 따라 발색되는 색깔의 변화를 도 5B 및 표 2에 나타내었다. 도 5B에서 U는 혼성화되기 전 각각의 데옥시뉴클레오타이드 2A, 2B를 포함하는 금 나노입자의 상태를 나타내고, H는 혼성화된 상태, M은 T_m 이상의 온도로 가열하여 상보적인 수소 결합이 끊어진 다시 혼성화되지 않은 상태(re-dehybridized)를 나타낸다.

표 2

	디티오쓰레톨 (Dithiothretol)		발색		
	농도 (μ M)	사용량 (μ L)	unhybridized (U)	hybridized (H)	re-dehybridized(M)
비교예 2	0	10	Red	purple	Red
실시예 2-3-1	300	10	Purple	pale violet	Purple
실시예 2-3-2	500	10	Violet	pale blue	Violet
실시예 2-3-3	700	10	Blue	pale indigo	Blue

[0070] 도 5B(1)의 경우는 비교예 2로, 디티오쓰레톨(Dithiothretol)을 첨가하지 않고, 상기 데옥시뉴클레오타이드 2A: (5'-HS-A10-ATTATCACT-3') 및 이와 상보적인 결합을 갖는 데옥시뉴클레오타이드 2B: (5'-HS-A10-AGTGATAAT-3')를 각각 금 나노입자와 혼합한 용액이다. 상기 용액은 red 색을 나타내고(unhybridized(U)), 이들을 T_m보다 낮은 온도 조건에서 혼성화 한 경우에 상기 혼합 용액은 purple을 나타내었다(hybridized(H)). 이를 다시 T_m보다 높은 온도 조건으로 가열하였을 때는 상기 DNA-금 나노입자 클러스터의 집합체는 해리되어 각각의 DNA-금 나노입자 클러스터로 존재하게 되며, 상기 혼합 용액은 다시 red 색으로 변하게 된다(re-dehybridized(M)). 이러한 온도에 따른 가역적인 변화는 피크의 폭으로 보아 매우 민감한 반응임을 알 수 있다.

[0071] 도 5B(2)의 경우는 상기 표 2에서 실시예 2-3-1로 디티오쓰레톨(Dithiothretol) 300 μ M을 첨가하고, 상기 데옥시뉴클레오타이드 2A: (5'-HS-A10-ATTATCACT-3') 및 이와 상보적인 결합을 갖는 데옥시뉴클레오타이드 2B: (5'-HS-A10-AGTGATAAT-3')를 각각 금 나노입자와 혼합한 용액이다.

[0072] 상기 용액은 purple 색을 나타내고(unhybridized(U)), 이들을 T_m보다 낮은 온도 조건에서 혼성화 한 용액은 pale violet을 나타내었다(hybridized(H)). 이를 다시 T_m보다 높은 온도 조건으로 가열하였을 때는 상기 DNA-금 나노입자 클러스터의 집합체는 해리되어 DNA-금 나노입자 클러스터로 존재하게 되며, 상기 혼합용액은 다시 purple 색으로 변하게 된다(re-dehybridized(M)).

[0073] 도 5B(3)의 경우는 상기 표 2에서 실시예 2-3-2로 디티오쓰레톨(Dithiothretol) 500 μ M을 첨가하여, 상기 데옥시뉴클레오타이드 2A: (5'-HS-A10-ATTATCACT-3') 및 이와 상보적인 결합을 갖는 데옥시뉴클레오타이드 2B: (5'-HS-A10-AGTGATAAT-3')를 각각 금 나노입자와 혼합한 용액이다. 상기 용액은 violet 색을 나타내고(unhybridized(U)), 이들을 T_m보다 낮은 온도 조건에서 혼성화 한 용액은 pale blue을 나타내었다(hybridized(H)). 이를 다시 T_m보다 높은 온도 조건으로 가열하였을 때는 상기 DNA-금 나노입자 클러스터의 집합체는 해리되어 각각의 DNA-금 나노입자 클러스터로 존재하게 되며, 상기 혼합용액은 다시 violet 색으로 변하게 된다(re-dehybridized(M)).

[0074] 도 5B(4)의 경우는 상기 표 2에서 실시예 2-3-3로 디티오쓰레톨(Dithiothretol) 700 μ M을 첨가하여, 상기 데옥시뉴클레오타이드 2A: (5'-HS-A10-ATTATCACT-3') 및 이와 상보적인 결합을 갖는 데옥시뉴클레오타이드 2B: (5'-HS-A10-AGTGATAAT-3')를 각각 금 나노입자와 혼합한 용액이다. 상기 혼합 용액은 blue 색을 나타내고(unhybridized(U)), 이들을 T_m보다 낮은 온도 조건에서 혼성화 한 용액은 pale indigo을 나타내었다(hybridized(H)). 이를 다시 T_m보다 높은 온도 조건으로 가열하였을 때는 상기 DNA-금 나노입자 클러스터의 집합체는 해리되어 DNA-금 나노입자 클러스터로 존재하게 되며, 상기 혼합용액은 다시 blue 색으로 변하게 된다

(re-dehybridized(M)).

- [0075] 혼성화된 금 나노입자 클러스터의 녹는점의 변화는 각각의 용액을 25℃에서부터 70 ℃까지 1 ℃/ min의 속도로 가열하면서 260 nm에서의 표면 플라즈몬 피크의 변화(extinction 의 변화)를 측정하여 모니터링 하여 측정하였으며, 이를 도 5B에 나타내었다.
- [0076] 녹는점 이상의 온도로 가열하였을 때 용액은 본래 처음 만들어졌을 때의 색으로 변하였다. 이는 본 발명에 따라 만들어지는 금 나노입자 클러스터가 표적 물질과 상보적 결합을 한 후에도 열을 가하면 본래 금 나노입자 클러스터로 가역적으로 변화하며, FWHM이 2-3 ℃ 정도인 것은 본 발명의 금 나노입자 클러스터의 상보적 결합이 빠른 시간 안에 생성되고 끊어진다는 것, 즉 표적 물질의 검출 성능이 우수하다는 것을 나타낸다.
- [0077] 또한, 본 발명의 나노입자 클러스터가 온도 변화에도 변화하지 않는 안전성을 나타낸다는 것을 보여준다고 할 것이다.
- [0078] <실시예 2-4> DNA-금 나노입자 클러스터의 온도 안전성 실험
- [0079] 상기 실시예 2-2 에서 만들어지는 violet 색깔을 나타내는 금 나노입자 클러스터를 서로 혼합하여 혼성화와 가열 과정을 반복하면서 260 nm에서의 표면 플라즈몬 피크의 변화(extinction의 변화)를 측정하여 모니터링 하여 측정하였으며, 이를 도 6 에 나타내었다.
- [0080] 도 6에서 보는 바와 같이 첫번째 가열 과정에서의 피크의 변화와 열번째 가열 과정에서의 피크의 변화가 거의 동일한 형태를 나타내고 있으며, 이는 본 발명의 금 나노입자 클러스터가 온도 변화에 따른 안전성을 나타낸다는 것을 보여준다고 할 것이다.
- [0081] <실시예 3> 비색 분석(Colorimetric Detection) 실험
- [0082] <실시예 3-1> 모노티올 DNA의 준비
- [0083] 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 테옥시뉴클레오타이드 3A: (5'-HS-A10-ATCCTTATCAATATT-3')와 테옥시뉴클레오타이드 3B: (3'-HS-A10-CTCCCTAATAACAAT-5'), 및 상기 3A 와 3B와 상보적 결합하는 3C: 3'-TAGGAATAGTTATAA-ATTGTTATTAGGGAG-5'를 제조하였다.
- [0084] 테옥시뉴클레오타이드 3A, 3B는 서로 상보적으로 결합하지 않으나, 테옥시뉴클레오타이드 3C 와는 상보적으로 결합한다. 이들 간의 결합 관계를 도 7A 에 나타내었다.
- [0085] <실시예 3-2> 금 나노입자 클러스터의 제조
- [0086] 상기 실시예 2-1에서 만들어지는 올리고뉴클레오타이드 3A, 3B에 대해 결합제로서 디티오쓰레톨(Dithiothreitol) 500 μM을 첨가하여 violet 색깔을 나타내는 금 나노입자 클러스터 450 μL를 제조하였다.
- [0087]
- [0088] <실시예 3-3> 타겟 DNA strand 와의 결합
- [0089] 상기 실시예 3-1에서 제조된 표적 DNA strand를 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 nM 농도로 준비하고, 상기 실시예 3-2에서 제조된 금 나노입자 클러스터와 각각 반응시킨 후 색깔의 변화를 관찰하여 도 7B에 나타내었다.
- [0090] UV-가시광선 스펙트로미터로 상기 용액의 흡광도를 15분마다 2 시간 동안 측정하였다. 도 7C에서 보는 바와 같이 표적 DNA strand와 결합하는 과정에서 최대 피크 파장이 적색 이동(red shift)하였다. 이는 표적 DNA strand와 결합함에 따라 나노입자 클러스터가 응집하면서 나노입자 클러스터의 크기가 커지게 되어 나노입자 표면의 유전율의 변화를 유발하고 국소 표면 플라즈몬 흡수 조건이 바뀌게 된다는 것을 나타내는 것이다.
- [0091] 표적 DNA Strand와 DNA-금 나노입자 클러스터와의 반응 후 타겟 DNA Strand의 농도에 따른 녹는점 변화를 260 nm 파장에서 관찰하여 도 7D에 나타내었으며, 표적 DNA Strand의 농도에 따른 녹는점의 변화를 도 7E에 나타내었다. 표적 DNA strand의 농도가 높을수록 녹는점이 더 높아짐을 알 수 있으며, 이는 표적 DNA Strand의 농도가 높아질수록 본 발명의 금 나노입자 클러스터와의 결합이 많아짐에 따라 금 나노입자 표면의 유전율의 변화를

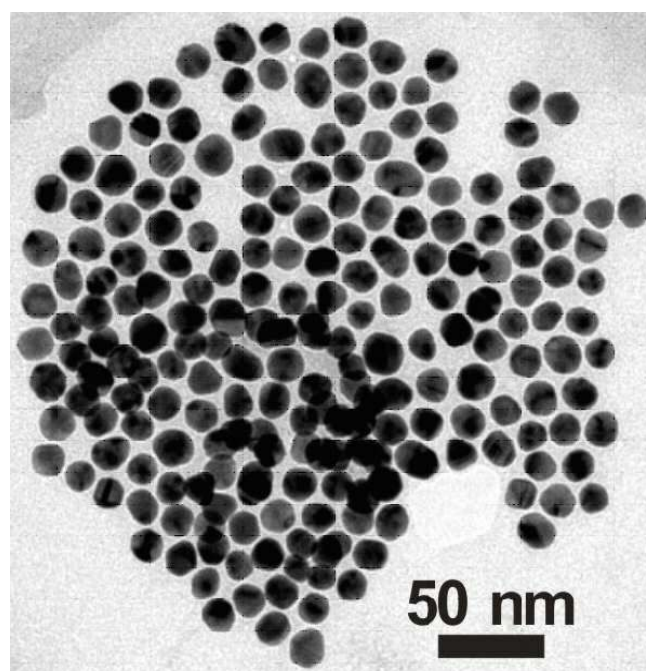
유발하여 표면 플라즈몬 흡수 조건이 바뀌게 됨에 따른 것임을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

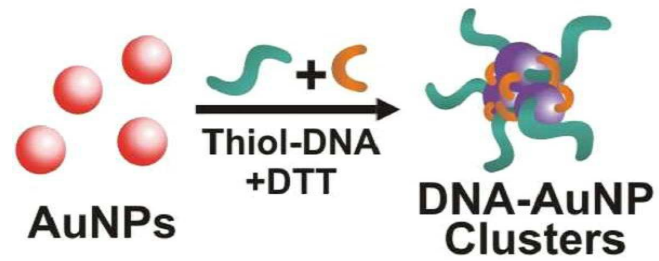
- [0092] 도 1은 실시예 1-1에 의해 제조된 금 나노입자의 TEM 사진이다.
- [0093] 도 2는 본 발명에 따른 DNA-금 나노입자 클러스터의 제조 과정을 간략하게 나타내는 모식도이다.
- [0094] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 의해 디티오쓰레톨(Dithiothreitol)의 첨가량에 따른 DNA-금 나노입자 클러스터의 발색 정도 및 파장에 따른 extinction 을 나타내는 도면이다. 도 3A 및 도 3B에서 Red는 비교예 1, Purple 은 실시예 1-3-1, violet은 실시예 1-3-2, Blue는 실시예 1-3-3을 각각 나타낸다.
- [0095] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 의해 디티오쓰레톨(Dithiothreitol)의 첨가량에 따른 DNA-금 나노입자 클러스터의 동적광산란 스펙트럼 및 TEM 사진을 나타내는 도면이다. 도 4A 에서 Red 는 비교예 1, Purple은 실시예 1-3-1, violet은 실시예 1-3-2, Blue는 실시예 1-3-3을 각각 나타내고, 도 4B(1)은 비교예 1, 도 4B(2)는 실시예 1-3-1, 도 4B(3)은 실시예 1-3-2, 도 4B(4)는 실시예 1-3-3을 나타낸다.
- [0096] 도 5A는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 DNA-금 나노입자 클러스터간의 상보적 결합 및 해리 과정을 모식적으로 나타내는 개략도이고, 도 5B는 그에 따른 색깔의 변화, 녹는점 및 extinction를 나타내는 도면이다. 도 5B에서 Red 는 비교예 2, Purple 은 실시예 2-3-1, violet은 실시예 2-3-2, Blue 는 실시예 2-3-3을 각각 나타낸다.
- [0097] 도 6은 가열 과정을 1회 실시했을 때의 녹는점, extinction과 가열 과정을 10회 실시했을 때의 녹는점, extinction 을 나타내는 도면이다.
- [0098] 도 7A는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 금 나노입자 클러스터들에 대한 비색 분석 실험 과정을 나타내는 모식도, 도 7B는 violet을 나타내는 DNA-금 나노입자 클러스터를 혼성화 과정을 거치기 전(U), 혼성화 과정후(H), 및 녹는점 이상의 온도로 가열한 후(M)에 나타내는 색깔을 나타내는 도면, 도 7C는 표적 DNA strand에 결합하는 과정에서의 extinction 변화를 나타내는 도면, 도 7D와 도 7E는 표적 DNA strand의 농도에 따른 녹는점의 변화를 나타내는 도면이다.

도면

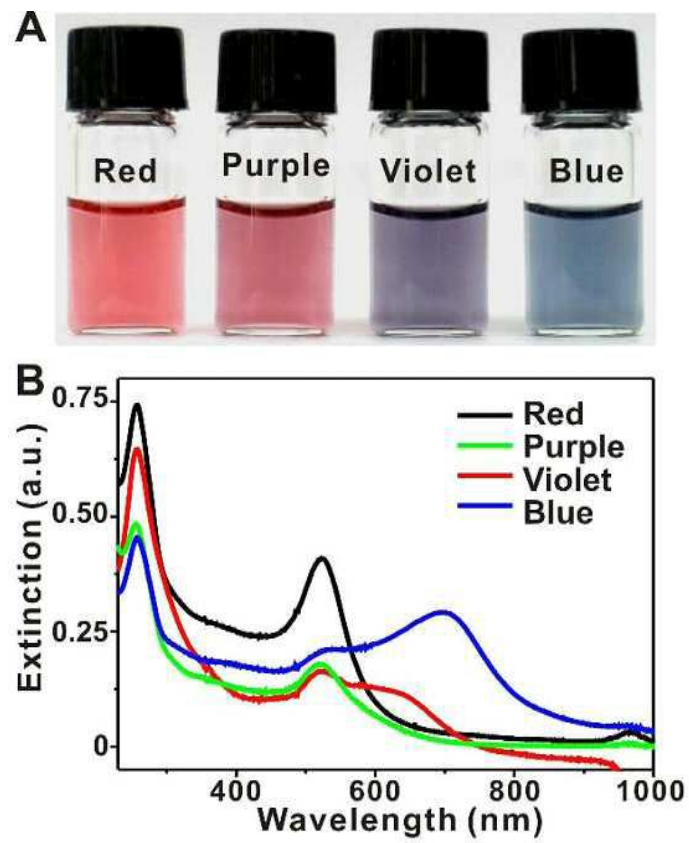
도면1



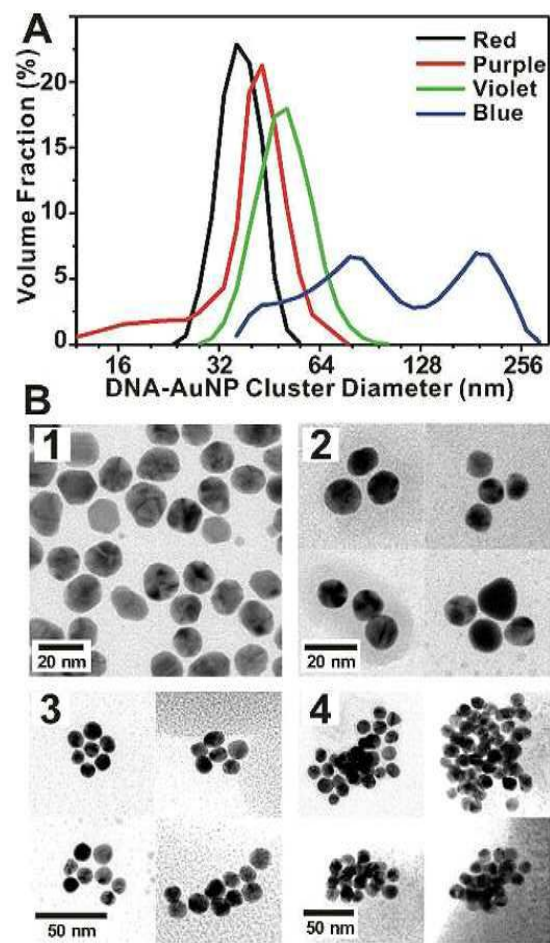
도면2



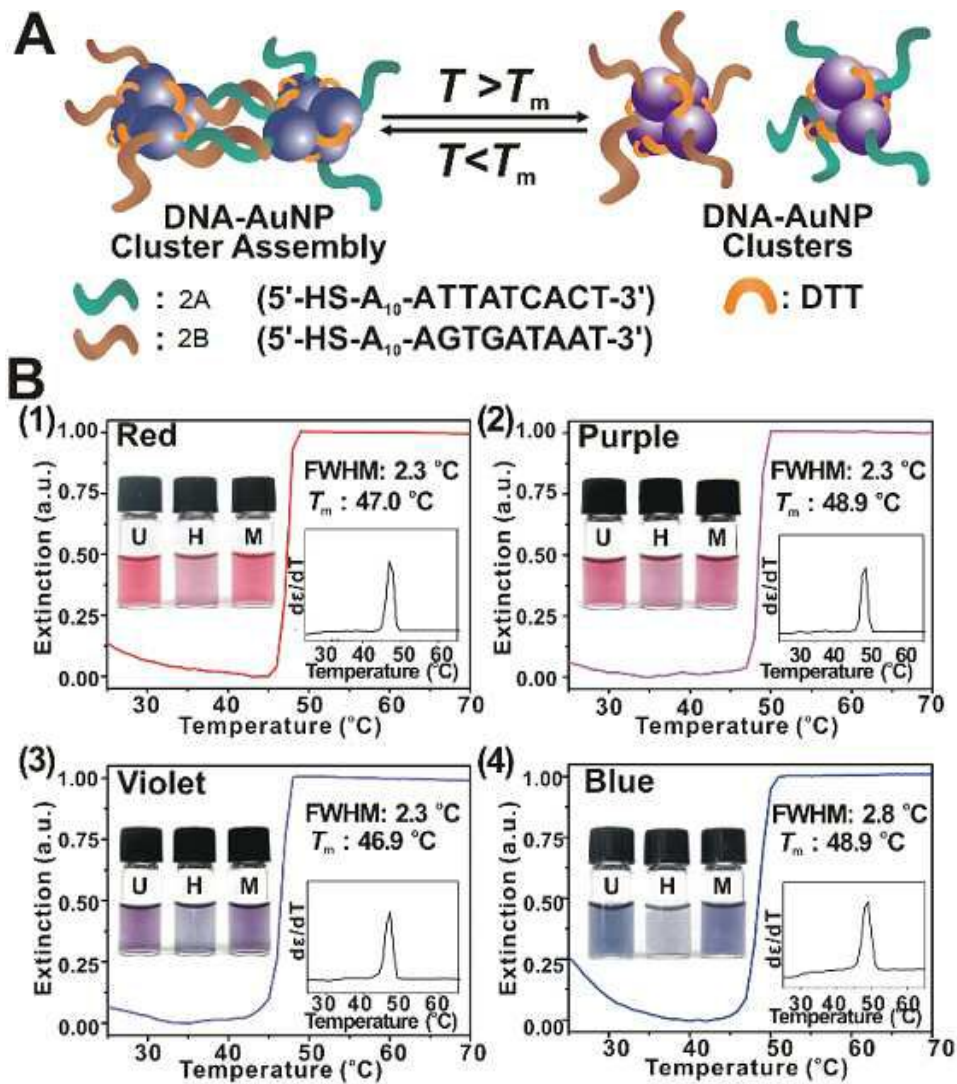
도면3



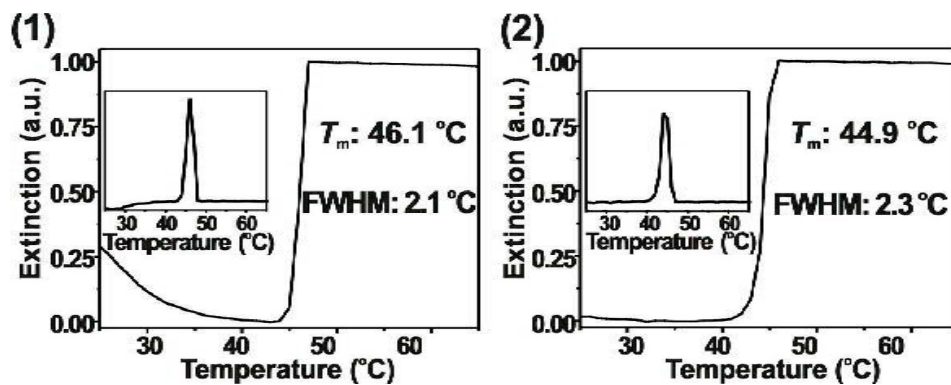
도면4



도면5



도면6



도면7

