



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월10일

(11) 등록번호 10-2132624

(24) 등록일자 2020년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 21/65 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 21/658 (2013.01)

G01N 33/52 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0131975

(22) 출원일자 2018년10월31일

심사청구일자 2018년10월31일

(65) 공개번호 10-2020-0049103

(43) 공개일자 2020년05월08일

(56) 선행기술조사문헌

JP2013527921 A*

KR101813659 B1*

KR1020090083685 A*

KR1020170036968 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

양재문

서울특별시 서대문구 신촌동 연세로 50-1, 연세의료원 에비슨의생명연구센터 ABMRC 408호

김정훈

서울특별시 서대문구 신촌동 연세로 50-1, 연세의료원 에비슨의생명연구센터 ABMRC 408호

(74) 대리인

특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 박준영

(54) 발명의 명칭 라만 분광 기관, 이의 제조 방법, 이를 포함하는 분석 장치 및 분석 방법

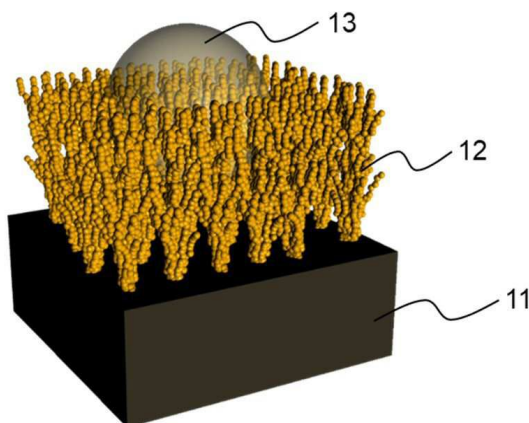
(57) 요약

본 발명은 라만 분광 기관, 이의 제조 방법, 이를 포함하는 분석 장치 및 분석 방법에 관한 것으로서, 상기 라만 분광 기관은 기관, 상기 기관 위에 위치하며, 나노 클러스터 입자들로 이루어진 나노 구조체들을 포함하는 다공성 증착막, 그리고 상기 다공성 증착막 위에 위치하는 리셉터 분자를 포함하며, 상기 나노 구조체들 사이의 간격은 상기 기관과 접하고 있는 하부에서 보다 상기 기관과 접하고 있지 않은 상부에서 더 좁은 것이다.

상기 라만 분광 기관은 나노 입자가 나노 클러스터 입자로 형성된 후 3차원 나노포러스 구조로 증착되기 때문에 라만 산란 신호의 극대화가 가능하고, 이에 따라 표면증강 라만 산란 신호 검출을 통해 분석 대상물을 보다 쉽고 간편하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 3차원 나노포러스 구조의 증착막 표면에 리셉터 분자를 고정화하여 분석 대상물에 대한 검출 효율을 향상시킬 수 있으며, 공정을 단순화할 수 있다.

대표도 - 도1

10



(52) CPC특허분류

G01N 33/587 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S2448674

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 중소기업융복합기술개발사업

연구과제명 3차원 나노포러스 구조 금속막 증착기술과 단백질 표적화 기술을 적용한 SERS기반 압진
단용 바이오칩 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)광림정공

연구기간 2016.12.14 ~ 2018.12.13

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

기관,

상기 기관 위에 위치하며, 나노 클러스터 입자들로 이루어진 나노 구조체들을 포함하는 다공성 증착막, 그리고

상기 다공성 증착막 위에 위치하는 리셉터 분자를 포함하며,

상기 나노 구조체들은 상기 기관과 접하고 있는 하부에서 상기 기관과 접하고 있지 않은 상부 방향으로 여러 갈래로 갈라져 분지된 형상으로,

상기 나노 구조체들 사이의 간격은 상기 기관과 접하고 있는 하부에서 보다 상기 기관과 접하고 있지 않은 상부에서 더 좁은 것인 라만 분광 기관.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 리셉터 분자는 아민기, 티올기 및 카테콜기로 이루어진 군에서 선택되는 관능기로 치환된 압타머이고,

상기 압타머는 상기 관능기에 의하여 상기 나노 구조체들에 부착되는 것인 라만 분광 기관.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 압타머는 HER2(Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)에 특이적으로 결합하는 압타머인 것인 라만 분광 기관.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 라만 분광 기관은 상기 다공성 증착막의 표면, 상기 나노 구조체들의 사이 및 이 둘 모두로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 위치에 물, 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 용매를 더 포함하는 것인 라만 분광 기관.

청구항 6

프로세스 챔버와 클러스터 소스를 구비한 스퍼터링 장치를 이용하여 기관 위에 다공성 증착막을 제조하는 하기 (a) 내지 (d) 단계로 이루어진 단계; 그리고

(a) 상기 클러스터 소스 내에서 플라즈마(plasma)를 형성한 후 핵 형성(nucleation)을 실행하는 단계,

(b) 상기 클러스터 소스 내에서 응축(condensation)을 통한 응집(aggregation) 및 나노 클러스터 입자의 크기를 제어하는 단계,

(c) 상기 클러스터 소스에 마련된 노즐의 개구를 통해 상기 단계 (b)에서 성장된 나노 클러스터 입자를 프로세스 챔버로 배출하는 단계, 및

(d) 상기 프로세스 챔버 내에 인가되는 압력을 제어하여 증착용 기관 상에 나노 클러스터 입자의 합체(coalescence)를 실행하여 나노 구조체들을 상기 기관과 접하고 있는 하부에서 상기 기관과 접하고 있지 않은 상부 방향으로 여러 갈래로 갈라져 분지된 형상으로 성장시키되, 초기 압력을 후기 압력 보다 더 크게

제어하여, 상기 나노 구조체들 사이의 간격이 상기 증착용 기판과 접하고 있는 하부에서 보다 상기 증착용 기판과 접하고 있지 않은 상부에서 더 좁아지도록 상기 나노 구조체들을 성장시키는 단계,

상기 다공성 증착막 위에 리셉터 분자를 부착시키는 단계

를 포함하는 라만 분광 기판의 제조 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 (d) 단계에서의 초기 압력은 10 mTorr 내지 50 mTorr이고, 후기 압력은 0.01 mTorr 내지 10 mTorr인 것인 라만 분광 기판의 제조 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 라만 분광 기판의 제조 방법은 상기 다공성 증착막의 표면, 상기 나노 구조체들의 사이 및 이 둘 모두로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 위치에 물, 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 용매를 처리하는 단계를 더 포함하는 것인 라만 분광 기판의 제조 방법.

청구항 9

제 1 항에 따른 라만 분광 기판,

상기 라만 분광 기판에 빛을 조사하는 광원, 그리고

상기 라만 분광 기판으로부터 반사된 광의 라만 분광을 측정하는 라만 분광기

를 포함하는 분석 장치.

청구항 10

제 1 항에 따른 라만 분광 기판을 분석 대상물을 포함하는 시료에 노출시켜, 상기 라만 분광 기판의 리셉터 분자와 상기 분석 대상물 간의 결합을 유도하는 단계, 그리고

라만 분광법을 이용하여 상기 분석 대상물을 검출 또는 확인하는 단계

를 포함하는 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 라만 분광 기판, 이의 제조 방법, 이를 포함하는 분석 장치 및 분석 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 표면증강 라만 분광법(Surface Enhanced Raman Scattering, 또는 Surface Enhanced Raman Spectroscopy, 이하, 'SERS'라 함)에 사용되는 라만 분광 기판, 이의 제조 방법, 이를 포함하는 분석 장치 및 분석 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 분자의 검출, 확인 및 분석을 위해 사용되는 기법의 하나로서, 예를 들면, 라만 산란(Raman scattering)을 이용한 방법이 있다. 라만 산란이란 입사되는 광자의 에너지($h\nu$)가 분자의 진동 상태를 변화시키면서 다른 주파수의 에너지($h\nu'$)로 산란되는 현상이며, 이때의 산란은 비탄성 산란에 속한다. 이러한 라만 산란은 광자와 상호 작용하여 산란을 유도하는 분자구조에 따라 고유의 광자 에너지 변화 형태를 나타내므로(Raman shift), 분자의 검출, 확인, 정성 분석 및 정량 분석이 가능하다.

[0003] 상기 라만 산란은 본질적으로 신호가 약하여, 분자 검출을 위해서는 고출력의 레이저에 오랜 시간의 노출이 필요하며, 이와 같은 라만 신호를 강화하여 고감도 검출을 하기 위하여 사용되는 기술 중 하나가 표면 증강 라만 산란(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)이다.

[0004] SERS은 금속 나노입자의 표면에 결합 또는 흡착된 화학물질의 라만 스펙트럼을 증폭하여 기존의 라만 분광 분석법에 비하여 감도가 매우 높다. 따라서, SERS을 활용하여 다양한 생화학 물질들을 분석한 연구결과들이 많이 발표되고 있다.

[0005] 대한민국 공개특허 제10-2007-0097177호(2007.10.04)는 중합체로 가교된 금속 입자를 기판상에 코팅하여 분석대상을 포함하는 시료를 상기 금속 입자에 접촉시켜 상기 기판에 여기광을 조사한 후, 그로부터 발생한 산란광의 스펙트럼을 분석하여 시료 중의 분석 대상을 검출하는 방법이 개시되어 있으나, 시료에 여러 물질이 혼합되어 있는 경우 시료와 나노 입자 결합의 선택성이 떨어져 분석 대상을 검출하기 힘들다는 문제점이 있다.

[0006] 대한민국 공개특허 제10-2012-0087051호(2012.08.06)는 생체 표지자(biomarker)와 표면 증강 라만 산란 입자(surface-enhanced Raman scattering dots; SERS dots)를 이용하여 질병을 정확하고 신속하게 판별/진단하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 표면 증강 라만 산란 입자에 화학적/생물학적 태그(tag)를 붙이고 이것과 질병의 생체 표지자를 표적지향적으로 결합시키고, 광학적 이미징(imaging) 기법으로 그 이미지를 획득하여 질병을 진단/판별하는 방법이 개시되어 있으나, SERS 신호를 얻음으로써 질병을 진단하는 데 있어서, 대부분의 SERS 관련 기술과 마찬가지로 생체 표지자를 라만 산란 입자에 결합시키는 방법을 사용하고 있어 진단 과정이 복잡한 문제가 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2007-0097177호(2007.10.04)

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2012-0087051호(2012.08.06)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 나노 입자가 나노 클러스터 입자로 형성된 후 3차원 나노포러스 구조로 증착되기 때문에 라만 산란 신호의 극대화가 가능하고, 이에 따라 표면증강 라만 산란 신호 검출을 통해 분석 대상을 보다 쉽고 간편하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 3차원 나노포러스 구조의 증착막 표면에 리셉터 분자를 고정화하여 분석 대상물에 대한 검출 효율을 향상시킬 수 있으며, 공정을 단순화할 수 있는 라만 분광 기판을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 라만 분광 기판의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 라만 분광 기판을 포함하는 분석 장치를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 라만 분광 기판을 이용하는 분석 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 기판, 상기 기판 위에 위치하며, 나노 클러스터 입자들로 이루어진 나노 구조체들을 포함하는 다공성 증착막, 그리고 상기 다공성 증착막 위에 위치하는 리셉터 분자를 포함하며, 상기 나노 구조체들 사이의 간격은 상기 기판과 접하고 있는 하부에서 보다 상기 기판과 접하고 있지 않은 상부에서 더 좁은 것인 라만 분광 기판을 제공한다.

[0013] 상기 나노 구조체들은 상기 기판과 접하고 있는 하부에서 상기 기판과 접하고 있지 않은 상부 방향으로 여러 갈래로 갈라져 분지된 형상일 수 있다.

[0014] 상기 리셉터 분자는 아민기, 티올기 및 카테콜기로 이루어진 군에서 선택되는 관능기로 치환된 압타머이고, 상기 압타머는 상기 관능기에 의하여 상기 나노 구조체들에 부착될 수 있다.

[0015] 상기 압타머는 HER2(Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)에 특이적으로 결합하는 압타머일 수 있다.

[0016] 상기 라만 분광 기판은 상기 다공성 증착막의 표면, 상기 나노 구조체들의 사이 및 이 둘 모두로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 위치에 물, 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 용매를

더 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 프로세스 챔버와 클러스터 소스를 구비한 스퍼터링 장치를 이용하여 기판 위에 다공성 증착막을 제조하는 하기 (a) 내지 (d) 단계로 이루어진 단계; 그리고 (a) 상기 클러스터 소스 내에서 플라즈마(plasma)를 형성한 후 핵 형성(nucleation)을 실행하는 단계, (b) 상기 클러스터 소스 내에서 응축(condensation)을 통한 응집(aggregation) 및 나노 클러스터 입자의 크기를 제어하는 단계, (c) 상기 클러스터 소스에 마련된 노즐의 개구를 통해 상기 단계 (b)에서 성장된 나노 클러스터 입자를 프로세스 챔버로 배출하는 단계, 및 (d) 상기 프로세스 챔버 내에 인가되는 압력을 제어하여 증착용 기판 상에 나노 클러스터 입자의 합체(coalescence)를 실행하여 나노 구조체들을 성장시키되, 초기 압력을 후기 압력 보다 더 크게 제어하여, 상기 나노 구조체들 사이의 간격이 상기 증착용 기판과 접하고 있는 하부에서 보다 상기 증착용 기판과 접하고 있지 않은 상부에서 더 좁아지도록 상기 나노 구조체들을 성장시키는 단계, 상기 다공성 증착막 위에 리셉터 분자를 부착시키는 단계를 포함하는 라만 분광 기관의 제조 방법을 제공한다.

[0018] 상기 (d) 단계에서의 초기 압력은 10 mTorr 내지 50 mTorr이고, 후기 압력은 0.01 mTorr 내지 10 mTorr일 수 있다.

[0019] 상기 라만 분광 기관의 제조 방법은 상기 다공성 증착막의 표면, 상기 나노 구조체들의 사이 및 이 둘 모두로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 위치에 물, 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 용매를 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 라만 분광 기관, 상기 라만 분광 기관에 빛을 조사하는 광원, 그리고 상기 라만 분광 기관으로부터 반사된 광의 라만 분광을 측정하는 라만 분광기를 포함하는 분석 장치를 제공한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 라만 분광 기관을 분석 대상물을 포함하는 시료에 노출시켜, 상기 라만 분광 기관의 리셉터 분자와 상기 분석 대상물 간의 결합을 유도하는 단계, 그리고 라만 분광법을 이용하여 상기 분석 대상물을 검출 또는 확인하는 단계를 포함하는 분석 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 라만 분광 기관은 나노 입자가 나노 클러스터 입자로 형성된 후 3차원 나노포러스 구조로 증착되기 때문에 라만 산란 신호의 극대화가 가능하고, 이에 따라 표면증강 라만 산란 신호 검출을 통해 분석 대상물을 보다 쉽고 간편하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 3차원 나노포러스 구조의 증착막 표면에 리셉터 분자를 고정화하여 분석 대상물에 대한 검출 효율을 향상시킬 수 있으며, 공정을 단순화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 라만 분광 기관을 개념적으로 도시한 모식도이다.
 도 2는 다공성 증착막의 형성 과정을 설명하기 위한 모식도이다.
 도 3은 본 발명의 분석 방법을 모식적으로 나타낸 도면이다.
 도 4는 본 발명의 실시예 1에서 제조된 기관의 다공도 측정 결과를 나타내는 그래프이다.
 도 5는 본 발명의 실시예 1에서 로다민 6G에 대하여 표면 증강 라만 산란을 측정한 결과이다.
 도 6은 상기 도 5에서 특성 라만 밴드로 여겨지는 피크(B1, B2, B3, B4, B5)에 해당하는 라만 강도만 추출한 그래프이다.
 도 7은 본 발명의 실시예 2에서 anti-HER2 압타머에 대하여 표면 증강 라만 산란을 측정한 결과이다.
 도 8은 상기 도 7에서 특성 라만 밴드로 여겨지는 피크(B1, B2, B3, B4, B5)에 해당하는 라만 강도만 추출한 그래프이다.
 도 9는 본 발명의 실시예 2에서 ECD HER2 단백질에 대하여 표면 증강 라만 산란을 측정한 결과이다.
 도 10은 상기 도 9에서 특성 라만 밴드로 여겨지는 피크(B1, B2, B3, B4)에 해당하는 라만 강도만 추출한 그래프이다.
 도 11은 본 발명의 실시예 3에서 아민기로 치환된 압타머를 부착한 경우에 대하여 표면 증강 라만 산란을 측정

한 결과이다.

도 12는 상기 도 11의 라만 스펙트럼에서 특성 라만 밴드를 히트 맵핑(HEAT mapping) 방식으로 표현한 결과이다.

도 13은 본 발명의 실험예 3에서 티올기로 치환된 압타머를 부착한 경우에 대하여 표면 증강 라만 산란을 측정
한 결과이다.

도 14는 상기 도 13의 라만 스펙트럼에서 특성 라만 밴드를 히트 맵핑(HEAT mapping) 방식으로 표현한
결과이다.

도 15 내지 도 17은 본 발명의 실험예 4에서 기관을 주사전자현미경(Field Emission-Scanning Electron
Microscopy, FE-SEM)을 이용하여 관찰한 결과를 나타내는 사진이다.

도 18 및 도 19는 본 발명의 실험예 5에서 서로 다른 기관에 대하여 압타머 검지시 라만 밴드를 측정
한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 20 내지 도 23은 본 발명의 실험예 6에서 ECD HER2 단백질의 함량을 하기 변화시키며 라만 신호를 측정
한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 24 내지 도 28은 본 발명의 실험예 7에서 알부민(Bovine serum albumin, BSA)의 라만 신호를 측정
한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명의 상기 및 그 밖의 목적과 새로운 특징은 본 명세서의 기술 및 첨부 도면에 의해 더욱 명확하게 될
것이다.
- [0025] 본 발명의 명세서에서 라만 분광법은 표면증강 라만 분광법(Surface enhanced Raman spectroscopy; SERS), 표
면 증강된 공명 라만 분광법(Surface enhanced resonance Raman spectroscopy; SERRS), 하이퍼-라만(Hyper
Raman) 및/또는 간섭성 반스톡스 라만 분광법(coherent anti-Stokes Raman spectroscopy; CARS)을 의미할 수
있고, 이하 설명에서는 표면증강 라만 분광법에 대한 경우를 위주로 설명하나, 본 발명이 이에 한정되는 것은
아니다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 따른 라만 분광 기관은 기관, 상기 기관 위에 위치하며, 나노 클러스터 입자들로 이루어
진 나노 구조체들을 포함하는 다공성 증착막, 그리고 상기 다공성 증착막 위에 위치하는 리셉터 분자를 포함하
다.
- [0027] 상기 기관은 실리콘 기관, 갈륨비소(GaAs) 기관, 유리(Glass) 기관, 석영(Quartz) 기관, 플라스틱 기관 및 폴리
머(Polymer)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 비금속 기관일 수 있고, 또한 통상의 반도체 공정에서 사
용되는 2, 4, 6, 8, 12 인치 등의 대면적 기관일 수 있다.
- [0028] 상기 나노 구조체들은 상기 기관 상에 상기 나노 클러스터 입자들이 증착되어 3 차원 나노 구조로 성장된 것이
다. 상기 나노 클러스터 입자는 나노 입자들이 10 개 내지 20 개가 뭉쳐져서 이루어진 것으로, 상기 나노 입자
는 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu), 백금(Pt), 알루미늄(Al) 등의 금속의 나노 입자일 수 있고, 상기 나노 클러스터
입자의 직경은 100 nm 내지 200 nm일 수 있다. 상기 나노 클러스터 입자의 직경이 상기 범위 내인 경우, 라만
검지시 라만 산란 강도가 가장 강할 수 있다.
- [0029] 상기 나노 구조체들 사이의 간격은 상기 기관과 접하고 있는 하부에서 보다 상기 기관과 접하고 있지 않은 상부
에서 더 좁고, 밀도가 더 높을 수 있고, 구체적으로 상기 나노 구조체들 사이의 간격은 상기 기관과 접하고 있
는 하부에서 상기 기관과 접하고 있지 않은 상부로 갈수록 더 좁아지고, 밀도는 상부로 갈수록 높아지는 것일
수 있다.
- [0030] 상기 나노 구조체들 사이의 간격은 각각의 나노 구조체들 사이에 형성되는 빈 공간의 수평 거리를 의미하며, 상
기 나노 구조체들 사이에 형성되는 빈 공간에 의하여 상기 증착막은 다공성 증착막일 수 있다. 이에 따라, 상기
나노 구조체들 사이의 간격이 하부에서 보다 상부에서 더 좁음에 따라 상기 다공성 증착막의 다공도는 상기 나
노 구조체들의 하부에서 보다 상부에서 더 작을 수 있고, 구체적으로 하부에서 상부로 갈수록 더 작아질 수 있
다.
- [0031] 상기 나노 구조체들 사이의 하부 간격은 10 nm 내지 200 μ m일 수 있고, 구체적으로 100 nm 내지 100 μ m일 수 있

다. 상기 나노 구조체들 사이의 상부 간격은 10 nm 내지 100 μ m일 수 있고, 구체적으로 100 nm 내지 10 μ m일 수 있다. 이때, 상기 나노 구조체들 사이의 하부 간격 범위와 상부 간격 범위가 일부 겹치더라도 하부 간격이 상부 간격에 비하여 더 크다. 상기 나노 구조체들 사이의 하부 간격은 상기 기관과 접하고 있는 상기 나노 구조체들의 최하단 사이의 거리를 의미하고, 상기 나노 구조체들 사이의 상부 간격은 상기 기관과 접하고 있지 않은 상기 나노 구조체들의 최상단 사이의 거리를 의미한다.

[0032] 또한, 상기 다공성 증착막의 하부 다공도는 10 % 내지 85 %일 수 있고, 구체적으로 30 % 내지 80 %일 수 있다. 상기 다공성 증착막의 상부 다공도는 30 % 내지 60 %일 수 있고, 구체적으로 30 % 내지 50 %일 수 있다. 이때, 상기 다공성 증착막의 하부 다공도와 상부 다공도 범위가 일부 겹치더라도 하부 다공도가 상부 다공도에 비하여 더 크다. 상기 다공성 증착막의 하부 다공도는 상기 기관과 접하고 있는 상기 나노 구조체들의 최하단에서의 다공도를 의미하고, 상기 다공성 증착막의 상부 다공도는 상기 기관과 접하고 있지 않은 상기 나노 구조체들의 최상단에서의 다공도를 의미한다.

[0033] 상기 나노 구조체들은 상기 기관과 접하고 있는 하부에서 상기 기관과 접하고 있지 않은 상부 방향으로 여러 갈래로 갈라져 분지된 형상일 수 있다. 구체적으로, 상기 나노 구조체들은 하부에서는 한 가닥의 굵은 기둥 형상이나, 상부로 갈수록 점차 여러 갈래로 갈라져 분지되면서 위로 뻗은 나뭇가지 형상일 수 있다. 상기 나노 구조체들이 이러한 형상을 가짐에 따라 상기 나노 구조체들 사이의 간격은 하부에서 보다 상부에서 더 좁을 수 있고, 상기 다공성 증착막의 다공도는 상기 나노 구조체들의 하부에서 보다 상부에서 더 작을 수 있다.

[0034] 도 1은 상기 라만 분광 기관을 개념적으로 도시한 모식도이다. 상기 도 1을 참조하면, 상기 라만 분광 기관(10)은 상기 기관(11) 위에, 나노 클러스터 입자들로 이루어진 나노 구조체들(12)을 포함한다. 상기 나노 구조체들(12)은 하부에서 상부 방향으로 여러 갈래로 갈라져 위로 뻗은 분지된 형상일 수 있다. 이에 따라, 상기 나노 구조체들(12) 사이의 간격은 하부에서 보다 상부에서 더 좁을 수 있고, 상기 라만 분광 기관(10)의 다공도는 상기 나노 구조체들(12)의 하부에서 보다 상부에서 더 작을 수 있다.

[0035] 상기 라만 분광 기관(10)의 표면 거칠기는 5 nm 내지 100 nm일 수 있고, 구체적으로 20 nm 내지 70 nm일 수 있고, 더욱 구체적으로 50 nm 내지 70 nm일 수 있다. 상기 라만 분광 기관(10)의 표면 거칠기가 5 nm 미만인 경우 표면 거칠기의 부재로 인하여 라만 산란 강도 증감 현상의 부재가 발생할 수 있고, 100 nm를 초과하는 경우 작은 크기의 비표적 검체가 다공성 증착막 속으로 고립되어, 불필요한 라만 스펙트럼이 검지되거나, 다공성 증착막의 공공을 증가로 인하여 다공성 증착막 자체의 접착력이 감소되어 박리되는 문제가 있을 수 있다.

[0036] 한편, 상기 라만 분광 기관(10)은 상기 다공성 증착막 위에 위치하는 상기 리셉터 분자(13)를 포함한다. 본 발명에서 상기 리셉터 분자(13)는 리셉터 분자에만 한정되는 것은 아니고, 표지자 또는 추적자 등을 포함하는 개념이다.

[0037] 상기 리셉터 분자는 항체, RNA, DNA, 압타머, PNA 및 리간드 등과 같이 시료 내 분석 대상물과 선택적인 결합을 유도할 수 있는 물질이 바람직하다. 상기 리셉터 분자가 강한 라만 신호를 가지고 있더라도, 시료 내에 존재하는 라만 피크 중에서 상기 리셉터 분자가 가진 라만 피크와 다른 파장대에서 나타나는 특징적인 라만 피크를 찾아내어 분석 대상물의 존재 여부 및 농도를 분석할 수 있다. 즉, 상기 라만 분광 기관이 상기 리셉터 분자를 포함함에 따라, 분석 대상물에 대한 검출 효율을 향상시킬 수 있으며, 공정을 단순화할 수 있다.

[0038] 또한, 상기 리셉터 분자를 한 종류 이상으로 함으로써 시료 내에서 하나 이상의 분석 대상물을 선택적으로 분석할 수도 있다.

[0039] 상기 리셉터 분자는 아민기, 티올기 및 카테콜기로 이루어진 군에서 선택되는 관능기로 치환될 수 있고, 상기 리셉터 분자는 상기 관능기에 의하여 상기 나노 구조체들에 부착될 수 있다. 상기 아민기, 티올기 및 카테콜기로 이루어진 군에서 선택되는 관능기는 상기 금속 나노 클러스터 입자들과 결합력이 높은 관능기로, 상기 관능기는 상기 리셉터 분자가 상기 나노 구조체들의 결합력을 향상시켜 줄 수 있다.

[0040] 한편, 상기 리셉터 분자는 HER2(Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2)에 특이적으로 결합하는 압타머일 수 있다. 상기 압타머는 암 전이에 관여하는 HER2 단백질에 매우 특이적으로 결합함으로써, 암, 특히 유방 암 전이를 억제하거나 검출이 가능하다.

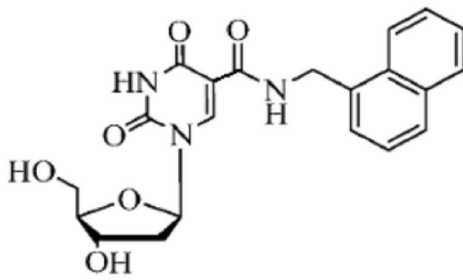
[0041] 상기 HER2 단백질에 특이적으로 결합하는 DNA 압타머는 5'-GAGTGACCGTCTGCCTG-[Core sequence]-CAGCCACACCACCAGCC-3'의 염기서열을 가지며, 여기서 Core Sequence는 아래의 표 1에 나타낸 바와 같다.

표 1

[0042]

No.	클론 번호	코어 시퀀스(core sequence)
1	9-ER-N-A01_A05	A6G66AGAG666GCC6GAG6GCC6CG6AAGGGCG6AACAA (SEQ ID NO: 1)
2	9-ER-N-A02_B05	6AC6GGGCCCG66AGCC6C6GGCGC6CC66CGC666G6GCC (SEQ ID NO: 2)
3	9-ER-N-A03_C05	66A6CAACGCAC6GAGGGCG6CAGC66C66666AGG (SEQ ID NO: 3)
4	9-ER-N-A04_D05	A6G6AGAG666GCC6GAG6GCC6CGCAAGGGCG6AACAG (SEQ ID NO: 4)
5	9-ER-N-A06_E05	6CC6G6CCCG666ACACAAG66AAGGCAGCCG6GGA6A (SEQ ID NO: 5)
6	9-ER-N-B02_F05	G6C6GAACACCGAGA66AGC6GAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 6)
7	9-ER-N-B03_G05	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCAGA (SEQ ID NO: 7)
8	9-ER-N-B04_H05	CGCA66AGA6GAACGCACA6ACCCG66C6GAG6AAAG6 (SEQ ID NO: 8)
9	9-ER-N-B08_A06	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9)
10	9-ER-N-B09_B06	G66AGAC6GAACGCAC6GAGGGCCGAGCC6A6C6GAAGG (SEQ ID NO: 10)
11	9-ER-N-B12_C06	A6G66AGAG666GCC6GAG6GCC6CGCAAGGGCG6AACAA (SEQ ID NO: 11)
12	9-ER-N-C02_D06	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCAGA (SEQ ID NO: 7)
13	9-ER-N-C03_E06	G6C6GAGCA6CGCG666AGCCGAACGC6CGG6GAGG6AGA6 (SEQ ID NO: 12)
14	9-ER-N-C05_F06	6CA6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCAGA (SEQ ID NO: 13)
15	9-ER-N-C06_G06	C6ACACGAA6CAAC6CCCC6CCGCA6AC6GAACA6CACAA (SEQ ID NO: 14)
16	9-ER-N-C08_H06	66AGCAAAA6GCCA6G6GCG6CC6G6CCCGG666ACAGC (SEQ ID NO: 15)
17	9-ER-N-C10_A07	6GA6G6CCCCAAC6CAGC6G6GAA6C6A6GCCCCCGCCA (SEQ ID NO: 16)
18	9-ER-N-D01_B07	C6GAGCGG66AC6ACACCACCG6GAGACC66AG66ACAAA (SEQ ID NO: 17)
19	9-ER-N-D02_C07	A66AGA6GAAAGCGCA66CCAACAACAGA6AA6C6GAGGG (SEQ ID NO: 18)
21	9-ER-N-D04_E07	666GGAG6G6C66ACGG66GGAG6AA6CGAGGA6GGA6GA (SEQ ID NO: 19)
23	9-ER-N-D06_G07	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCAGA (SEQ ID NO: 21)
25	9-ER-N-D09_A08	A6G66AGAG666GCC6GAG6GCC6CGCAAGGGCG6AACAA (SEQ ID NO: 23)
27	9-ER-N-E02_C08	CCG66ACC6ACC6CC6CGACCG6GGG6GCC66AG6CCCA (SEQ ID NO: 20)
29	9-ER-N-E09_E08	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCAGA (SEQ ID NO: 7)
30	9-ER-N-E11_F08	A6G66AGAG666GCC6GAG6GCC6CGCAAGGGCG6AACAG (SEQ ID NO: 26)
31	9-ER-N-E12_G08	6GAGAAGGGC6G6GCC66AC6CAAAA666GGGA6C6GAA (SEQ ID NO: 27)
32	9-ER-N-F01_H08	G66AGAC6GAACGCAC6GAGGGCCGAGCC6A6C6GAAGG (SEQ ID NO: 10)
33	9-ER-N-F02_A09	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9)
34	9-ER-N-F03_B09	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9)
35	9-ER-N-F04_C09	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9)
36	9-ER-N-F05_D09	6CC6GG6A6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCAGA (SEQ ID NO: 28)
37	9-ER-N-F08_E09	6AGA6C6C6GA66AGG6AGAACGCC6AC6C6AACGGCAG (SEQ ID NO: 29)
38	9-ER-N-F09_F09	6GAGAAGGGC6G6GCC66AC6CAAAA666GGGA6C6GAA (SEQ ID NO: 30)
39	9-ER-N-F11_G09	6GAGAAGGGC6G6GCC66AC6CAAAA666GGGA6C6GAA (SEQ ID NO: 31)
40	9-ER-N-G02_H09	A66AGA6GAAAGCGCA66CCAACAACAGA6AA6C6GAGGG (SEQ ID NO: 18)
41	9-ER-N-G03_A10	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9)
42	9-ER-N-G04_B10	CG6CC66GG6GAG666GGG6C6GAGCAGGAGCAG6GAG6 (SEQ ID NO: 32)
43	9-ER-N-G08_C10	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCAGA (SEQ ID NO: 7)
44	9-ER-N-G09_D10	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9)
45	9-ER-N-H01_E10	A66AGA6GAAAGCACA66CCAACAACAGA6AA6C6GAGGG (SEQ ID NO: 33)
46	9-ER-N-H02_F10	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCAGA (SEQ ID NO: 7)
47	9-ER-N-H03_G10	A66AGA6GAAAGCACA66CCAACAACAGA6AA6C6GAGGG (SEQ ID NO: 34)
48	9-ER-N-H04_H10	G66AGAC6GAACGCAC6GAGGGCCGAGCC6A6C6GAAGG (SEQ ID NO: 10)
49	9-ER-N-H08_A11	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCAGA (SEQ ID NO: 7)
50	9-ER-N-H09_B11	A6G66AGAG6C6GCC6GAG6GCC6CGCAAGGGCG6AACAG (SEQ ID NO: 35)

[0043] 6 = NapdU [5-(N-Naphthylcarboxamide)-2'-deoxyuridine]



[0044]

[0045] A = 2'-deoxyAdenosine

[0046] G = 2'-deoxyGuanosine

[0047] C = 2'-deoxyCytidine

[0048] T = 2'-deoxyThymidine(Thymidine)

[0049] 이 중에서도 클론 번호 9-ER-N-B03_G05와 9-ER-N-C02_D06(6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCCAGA, SEQ ID NO: 7)를 사용하는 것이 더욱 바람직한데, 그 이유는 특이적 바이오 마커인 HER2 단백질과의 우수한 결합력 때문이다.

[0050] 이에 따라, 상기 라만 분광 기관은 15 ng/mL(유방암 발현 암 인자 임상 기준치) 수준의 ECD(Extracellular Domain) HER2 단백질(악성 유방암 발현 인자)을 검출할 수 있고, 혈액 내 존재하는 ECD HER2 단백질이 임상 기준치 농도의 아주 작은 혈액 부피(2 μ L)로도 유방암 환자의 예후 관찰에 이용 가능하다.

[0051] 한편, 상기 라만 분광 기관은 상기 다공성 증착막의 표면, 상기 나노 구조체들의 사이 및 이 둘 모두로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 위치에 물, 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 용매를 더 포함할 수 있다. 상기 알코올은 구체적으로 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0052] 상기 용매는 상기 다공성 증착막의 표면 또는 상기 나노 구조체들의 사이에 흡취된 것일 수 있고, 상기 라만 분광 기관이 상기 용매를 더 포함하는 경우 DNA(oligonucleotide)의 구조를 변화시켜 라만 검지가 더 잘 이루어질 수 있도록 한다. 구체적으로, 상기 압타머 등의 리셉터 분자는 DNA 가닥 중 일부분으로 자연 상태에서 염기 서열 간 수소 결합으로 인하여 3 차원 구조(3D structure)를 갖는 것으로 알려져 있다. 이를 헤어핀 구조(hairpin structure)라고 한다. 상기 압타머 등의 리셉터 분자에 상기 용매를 가하면 3 차원 구조를 이루던 압타머의 수소 결합이 끊어지게 되어 선형 구조를 가지게 되면서 라만 검지가 더 잘 이루어질 수 있도록 한다.

[0053] 상용화된 암 진단 방식인 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)는 항원항체반응의 특이성을 이용하는 점에서는 동일하나, 항체를 두 개 이용하며 형광 발색 인자를 합성하는 추가적인 공정(Fluorescence dye labeling)이 있으며, 이 형광발색 인자의 농도로 간접적으로 암을 진단하는 반면, 상기 라만 분광 기관을 이용하면 리셉터 분자와 분석 대상 물질 자체의 라만 스펙트럼을 얻으므로 물질 자체의 유무를 확실하게 판별할 수 있으며, ELISA 방식과 같이 형광 발색 인자를 합성할 필요가 없어 공정을 단순화시킬 수 있다.

[0054] 구체적으로, 상기 라만 분광 기관은 나노 입자가 나노 클러스터 입자로 형성된 후 3차원 나노포러스 구조로 증착되기 때문에 라만 산란 신호의 극대화가 가능하고, 이에 따라 표면증강 라만 산란 신호 검출을 통해 분석 대상물을 보다 쉽고 간편하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 3차원 나노포러스 구조의 증착막 표면에 리셉터 분자를 고정화하여 분석 대상물에 대한 검출 효율을 향상시킬 수 있으며, 공정을 단순화할 수 있다.

[0055] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 라만 분광 기관의 제조 방법은 프로세스 챔버와 클러스터 소스를 구비한 스퍼터링 장치를 이용하여 기관 위에 다공성 증착막을 제조하는 단계, 그리고 상기 다공성 증착막 위에 리셉터 분자를 부착시키는 단계를 포함한다.

[0056] 상기 다공성 증착막을 제조하는 단계는 구체적으로, (a) 상기 클러스터 소스 내에서 플라즈마(plasma)를 형성한 후 핵 형성(nucleation)을 실행하는 단계, (b) 상기 클러스터 소스 내에서 응축(condensation)을 통한 응집(aggregation) 및 나노 클러스터 입자의 크기를 제어하는 단계, (c) 상기 클러스터 소스에 마련된 노즐의 개구를 통해 상기 단계 (b)에서 성장된 나노 클러스터 입자를 프로세스 챔버로 배출하는 단계, 및 (d) 상기 프로세

스 챔버 내에 인가되는 압력을 제어하여 증착용 기관 상에 나노 클러스터 입자의 합체(coalescence)를 실행하여 나노 구조체들을 성장시키되, 초기 압력을 후기 압력 보다 더 크게 제어하여, 상기 나노 구조체들 사이의 간격이 상기 증착용 기관과 접하고 있는 하부에서 보다 상기 증착용 기관과 접하고 있지 않은 상부에서 더 좁아지도록 상기 나노 구조체들을 성장시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0057] 상기 다공성 증착막 형성 메카니즘에 대해 도 2를 참조하여 설명한다. 상기 도 2는 상기 다공성 증착막의 형성 과정을 설명하기 위한 모식도이다. 상기 도 2의 (a)에 도시된 바와 같이, 스퍼터링 장치에서는 상기 클러스터 소스에 마련된 상기 타깃에 의해 상기 클러스터 소스 내에서 플라즈마(plasma)를 형성한 후 핵 형성(nucleation)이 실행되고, 계속해서 도 2의 (b)에 도시된 바와 같이, 상기 클러스터 소스 내에서 응축(condensation)을 통한 응집(aggregation)이 실행된다. 상기 응집에 의해 나노 클러스터 입자가 형성되며, 이때 상기 나노 클러스터 입자의 크기는 상기 클러스터 소스의 거리에 따라 제어 가능하다.

[0058] 이어서, 상기 도 2의 (c)에 도시된 바와 같이 상기 클러스터 소스에 마련된 상기 노즐의 개구를 통하여 상기 형성된 나노 클러스터 입자가 프로세스 챔버로 배출된다. 상기 프로세스 챔버에서는 내부 압력이 수백 mTorr 이하로 제어되어 상기 도 2의 (d)에 도시된 바와 같이, 상기 증착용 기관(120) 상에 나노 클러스터 입자의 합체(coalescence)가 이루어진 3 차원 나노 포러스 구조의 나노 구조체(700)가 형성된다.

[0059] 즉, 상기 증착용 기관(120) 상에 핵을 형성한 후 박막(continuous film) 형성까지 진행하는 일반적인 스퍼터 장치와 달리, 상기 프로세스 챔버 내의 압력 제어에 의해 상기 프로세스 챔버에서의 상기 증착용 기관(120)에는 상기 클러스터 소스에서 배출된 상기 나노 클러스터 입자가 합체 상태인 3 차원 나노 포러스 구조로 증착되고, 박막 형성까지 도달하지 않게 된다.

[0060] 본 발명에서는 상기 증착용 기관(120)에 형성된 나노 포러스 구조의 나노 구조체들(700)이 연속적인 막을 형성하지 못하도록 상기 프로세스 챔버 내의 압력 또는 온도를 제어하여 3 차원 나노 포러스 구조의 다공성 증착막을 형성한다. 즉, 상기 나노 구조체들(700) 사이의 간격은 압력 또는 온도의 조절에 의해 조정 가능하다.

[0061] 이때, 상기 나노 구조체들(700)을 성장시키는 단계에서 초기 압력을 후기 압력 보다 더 크게 제어하여, 상기 나노 구조체들(700) 사이의 간격이 상기 증착용 기관(120)과 접하고 있는 하부에서 보다 상기 증착용 기관(120)과 접하고 있지 않은 상부에서 더 좁아지도록 한다.

[0062] 상기 후기 압력은 0.01 mTorr 내지 10 mTorr일 수 있고, 구체적으로 0.1 mTorr 내지 10 mTorr일 수 있다. 상기 초기 압력은 10 mTorr 내지 50 mTorr일 수 있고, 구체적으로 20 mTorr 내지 40 mTorr일 수 있다. 또한, 상기 압력은 상기 초기 압력부터 상기 후기 압력까지 점차적으로 또는 단계적으로 감소할 수도 있다.

[0063] 상기 초기 압력이 10 mTorr 미만이면 다공성 증착막의 밀도가 너무 낮아지거나 필름 형성이 안 될 수 있고, 이에 따라 라만 감도가 떨어지는 기관이 제조될 수 있으며, 상기 초기 압력이 50 mTorr를 초과하면, 공정 온도가 너무 높아져 결정성이 증가되어 원치 않는 물성의 다공성 증착막이 형성될 수 있다.

[0064] 한편, 상기 나노 구조체들(700) 사이 간격의 미세 제어를 위해 상기 프로세스 챔버에서 상기 증착용 기관(120)을 인출한 후, 상기 증착용 기관(120)에 대해 열처리를 선택적으로 진행할 수 있다. 다만, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 프로세스 챔버 내에서 열처리를 진행할 수도 있다.

[0065] 상기 열처리에 의하여 상기 다공성 증착막에서 상기 나노 입자의 크기 및 나노 구조체들(700) 사이의 간격을 증가시킬 수 있다. 상기 열처리는 100 ℃ 내지 250 ℃에서 진행할 수 있고, 상기 범위 내에서 열처리 온도가 증가할수록 상기 나노 입자의 크기 및 나노 구조체들(700) 사이의 간격이 증가한다.

[0066] 상기 열처리는 금속의 산화를 고려하여 N₂ 분위기 또는 진공에서 열처리를 진행하는 것이 바람직하다.

[0067] 다음으로, 상기 제조된 다공성 증착막 위에 리셉터 분자를 부착시킨다.

[0068] 이때, 상기 다공성 증착막의 나노 클러스터 입자들과 상기 리셉터 분자의 결합력을 높이기 위하여, 상기 리셉터 분자는 아민기, 티올기 및 카테콜기로 이루어진 군에서 선택되는 관능기로 치환될 수 있다.

[0069] 상기 다공성 증착막 위에 상기 리셉터 분자를 부착시키는 방법 및 조건은 드랍코팅(drop-coating) 또는 스핀 코팅법(spin coating) 일 수 있다.

[0070] 선택적으로, 라만 분광 기관의 제조 방법은 상기 다공성 증착막의 표면, 상기 나노 구조체들의 사이 및 이 둘 모두로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 위치에 물, 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되

는 어느 하나의 용매를 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

- [0071] 구체적으로, 상기 용매를 처리하는 단계는 상기 다공성 증착막의 표면 또는 상기 나노 구조체들의 사이에 상기 용매를 스프레이 등의 방법에 의하여 흩뿌리거나, 상기 다공성 증착막을 상기 용매에 침지시켜 이루어질 수 있다.
- [0072] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 분석 장치는 상기 라만 분광 기관, 상기 라만 분광 기관에 빛을 조사하는 광원, 그리고 상기 라만 분광 기관으로부터 반사된 광의 라만 분광을 측정하는 라만 분광기를 포함한다.
- [0073] 상기 광원과 라만 분광기는 통상적으로 사용되는 것을 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 광원은 532 nm 파장에서 주파수 증첩된 Nd:YAG 레이저 또는 365 nm 파장에서의 주파수 증첩된 Ti:사파이어 레이저에 의해 생성된 것일 수 있다. 상기 광원은 펄스 레이저 빔 또는 연속 레이저 빔일 수 있다.
- [0074] 상기 여기 빔은 공초점의 광학기 및 현미경 렌즈를 통과하여 상기 라만 분광 기관 위로 초점이 모아질 수 있다. 상기 분석 대상물로부터의 라만 방출 광은 현미경 렌즈 및 공초점 광학기에 의해 모아지고 스펙트럼 분리를 위해 단색광 장치와 결합될 수 있다. 상기 공초점 광학기는 배경 신호를 감소시키기 위한 다이크로익 필터(dichroic filter), 차단 필터, 공초점 핀홀, 대물렌즈 및 거울을 포함할 수 있다.
- [0075] 라만 방출 신호는 신호를 카운팅하고 디지털화하는 컴퓨터와 인터페이스로 연결된 광다이오드를 포함하는 상기 라만 분광기에 의해 검출될 수 있다. 상기 라만 분광 기관을 이용하면, 상기 라만 분광기는 굳이 고성능의 라만 장비가 아니어도 저 사양의 휴대용 라만 장비를 이용하는 것도 가능하다. 상기 저 사양의 휴대용 라만 장비는 레이저 파워(Laser power)가 0 mW 내지 100 mW일 수 있고, 레이저 파장(excitation wavelength)가 780 nm 내지 790 nm일 수 있고, 상기 레이저 조사 시간은 20 msec 내지 9 sec일 수 있다.
- [0076] 또한, 상기 광원과 상기 라만 분광 기관 사이의 거리는 0 mm 내지 10 mm일 수 있고, 구체적으로 4 mm 내지 8 mm일 수 있다. 상기 광원과 상기 라만 분광 기관 사이의 거리가 4 mm 미만인 경우 광원인 레이저 빔이 퍼져서 초점이 안 맞을 수 있고, 8 mm를 초과하는 경우 광원인 레이저 빔이 다시 퍼져서 초점이 안 맞을 수 있다.
- [0077] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 분석 방법은 상기 라만 분광 기관을 분석 대상을 포함하는 시료에 노출시켜, 상기 라만 분광 기관의 리셉터 분자와 상기 분석 대상물 간의 결합을 유도하는 단계, 그리고 라만 분광법을 이용하여 상기 분석 대상을 검출 또는 확인하는 단계를 포함한다.
- [0078] 상기 시료는 액체 또는 기체일 수 있으며, 상기 시료 내 분석 대상물은 라만 분광을 사용하여 측정될 수 있는 측정 대상 물질을 의미하는 것으로, 상기 리셉터 분자에 대하여 선택적 결합을 할 수 있는 모든 물질을 의미한다. 이때, 상기 리셉터 분자와 시료 내 특정물질의 선택적 결합이란 항원-항체, DNA-DNA, DNA-RNA, PNADNA, PNA-RNA, 금속-배위결합 등과 같은 일반적인 특이적 결합(specific binding)을 모두 포함할 수 있다.
- [0079] 상기 리셉터 분자에 상기 시료를 반응시키면, 상기 시료 내 분석 대상 물질과 상기 리셉터 분자는 선택적으로 결합하게 된다. 라만 분광을 이용하여 상기 리셉터 분자와 결합된 상기 분석 대상 물질이 나타내는 고유한 라만 피크(Raman Peak)의 세기를 측정함으로써, 상기 시료 내 상기 분석 대상 물질의 유무 및 농도를 측정할 수 있다.
- [0080] 도 3은 상기 분석 방법을 모식적으로 나타낸 도면이다. 상기 도 3을 참고하면, 상기 라만 분광 기관(10)에 상기 시료(21)를 가하여, 상기 라만 분광 기관(10)의 리셉터 분자와 상기 분석 대상물 간의 결합을 유도한 후, 상기 라만 분광기(22)를 이용하여 상기 라만 분광 기관(10)에 빛(23)을 조사하고, 상기 라만 분광 기관(10)으로부터 반사된 광의 라만 분광을 측정함으로써, 상기 분석 대상을 검출 또는 확인할 수 있다.
- [0082] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0083] **[제조예 1: 다공성 증착막의 제조]**
- [0084] **(실시예 1)**
- [0085] 하기 표 2에 표시한 조건으로 금(Au) 나노 구조체들을 실리콘 기관 위에 증착시켜 다공성 증착막을 제조하였다.

표 2

[0086]	DC power (W)	압력(mTorr)		소스 온도 (℃)	가스 유량(sccm)		
		클러스터 소스	프로세스 챔버		Ar	He	He ratio
실시예 1	250	380	30	15	84	14	16 %

[0087] 상기 제조된 다공성 증착막의 다공도 측정 결과를 도 4에 나타내었다.

[실험예 1]

[0089] 보통의 라만 장비는 현미경이 포함된 매우 고가의 장비이나, 본 실험에서는 휴대용 라만 장비를 이용하여, 상기 제조된 기관을 이용하여 특정 분자를 측정하는 최적화 조건을 찾아내는 실험을 진행하였다. 구체적으로, 근적외선 영역(785 nm)의 레이저 소스(laser source)로부터 레이저 빔(beam)이 샘플 표면에 주사하는데 주사 거리(Working distance)를 조절하여 측정 최적화를 진행하였다.

[0090] 상기 제조예에서 제조된 기관에 라만용 형광 염료인 로다민 6G(Rhodamine 6G, R6G)를 1 mM 농도로 분주 후 10 μ L의 부피로 드랍 코팅(drop coating)하여 완전 건조시켜 고정화 하였다.

[0091] 상기 로다민 6G가 고정화된 기관에 대하여, 휴대용 라만 장비(IDRaman Mini2.0, Ocean Optics社 제품)를 이용하여, 레이저 파워(laser power) 100 mW, 인테그레이션 시간(integration time) 100 msec에서, 레이저 빔의 샘플로의 주사 거리(working distance)를 각각 1 mm, 3 mm, 5 mm 및 7 mm로 조절하며 라만 신호를 측정하였고, 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0092] 상기 도 5는 상기 로다민 6G에 대하여 표면 증강 라만 산란을 측정한 결과이고, 상기 도 6은 상기 도 5에서 특성 라만 밴드로 여겨지는 피크(B1, B2, B3, B4, B5)에 해당하는 라만 강도만 추출한 그래프이다.

[0093] 상기 도 5 및 도 6을 참고하면, 레이저 빔의 주사 거리(working distance)가 7 mm일 때가 모든 특성 밴드 중에서 가장 강한 라만 신호를 나타내는 것을 알 수 있으므로, 로다민 6G 측정시에는 레이저 빔의 주사 거리를 7 mm로 측정하는 것이 가장 바람직함을 알 수 있다.

[실험예 2]

[0095] 상기 실험예 1에서와 같이, 리셉터 분자로서 클론 번호 9-ER-N-B03_G05인 anti-HER2 압타머(Anti-HER2 aptamer)와 분석 대상물인 ECD HER2 단백질에 대한 측정 최적화 실험을 진행하였다.

[0096] 상기 제조예에서 제조된 기관에 상기 anti-HER2 압타머와 ECD HER2 단백질을 고정화하고, 상기 anti-HER2 압타머와 ECD HER2 단백질이 각각 고정화된 기관에 대하여, 휴대용 라만 장비(IDRaman Mini2.0, Ocean Optics社 제품)를 이용하여, 레이저 파워(laser power) 100 mW, 인테그레이션 시간(integration time) 100 msec에서, 레이저 빔의 주사 거리(working distance, WD)를 각각 1 mm, 3 mm, 5 mm 및 7 mm로 조절하며 라만 신호를 측정하였고, 그 결과를 도 7 내지 도 10에 나타내었다.

[0097] 상기 도 7은 상기 anti-HER2 압타머에 대하여 표면 증강 라만 산란을 측정한 결과이고, 상기 도 8은 상기 도 7에서 특성 라만 밴드로 여겨지는 피크(B1, B2, B3, B4, B5)에 해당하는 라만 강도만 추출한 그래프이다.

[0098] 상기 도 9는 상기 ECD HER2 단백질에 대하여 표면 증강 라만 산란을 측정한 결과이고, 상기 도 10은 상기 도 9에서 특성 라만 밴드로 여겨지는 피크(B1, B2, B3, B4)에 해당하는 라만 강도만 추출한 그래프이다.

[0099] 상기 도 7 내지 도 10을 참고하면, anti-HER2 압타머와 ECD HER2 단백질 같은 생체 재료의 라만 신호는 레이저 빔의 샘플로의 주사 거리(working distance)가 5 mm일 때 라만 신호가 가장 강한 것으로 나타났다.

[0100] 또한, 본 발명의 기관은 상기 압타머, 단백질 마커의 특성 라만 밴드가 다른 것으로부터 분자 특이적 라만 밴드를 잘 나타내는 분자 특이적 라만 신호가 우수한 기관임을 알 수 있다.

[실험예 3]

[0102] 상기 제조예에서 제조된 기관 표면에 클론 번호 9-ER-N-B03_G05인 anti-HER2 압타머를 고정화하여, 단백질 마커인 ECD HER2 단백질을 검지하는 센서를 제작한 후, 휴대용 라만 장비(IDRaman Mini2.0, Ocean Optics社 제품)를 이용하여, 레이저 파워(laser power) 100 mW, 인테그레이션 시간(integration time) 100 msec에서, 레이저 빔의 주사 거리(working distance, WD)를 5 mm로 조절하며 라만 신호를 측정하였고, 그 결과를 도 11 내지 도

14에 나타내었다.

- [0103] 이때, 상기 압타머는 말단을 각각 아민기와 티올기로 치환시킨 후, 기관에 고정화하여 부착력을 비교하였다.
- [0104] 또한, 상기 기관 표면에 각각 증류수, 70 % 에탄올 및 100 % 에탄올을 도포한 후, 라만 신호를 측정하였다.
- [0105] 상기 도 11 및 도 14는 아민기로 치환된 압타머를 부착한 경우에 대하여 표면 증강 라만 산란을 측정한 결과이고, 도 13 및 도 14는 티올기로 치환된 압타머를 부착한 경우에 대하여 표면 증강 라만 산란을 측정한 결과이다.
- [0106] 상기 도 11 내지 도 14에서 hSERS 1201는 압타머를 부착하지 않은 기관에 대한 결과이고, Anti-HER2 Aptamer는 압타머를 부착한 경우에 대한 결과이고, Adding DI water, Adding 70 % EtOH, Adding 100 % EtOH는 압타머를 부착한 후, 각각 증류수, 70 % 에탄올 및 100 % 에탄올을 도포한 경우이다.
- [0107] 또한, 상기 도 12 및 도 14는 각각 상기 도 11 및 도 13의 라만 스펙트럼에서 특성 라만 밴드를 히트 맵핑(HEAT mapping) 방식으로 고안하여 가시적으로 표현한 결과이다.
- [0108] 상기 도 11 및 도 12를 참고하면, 상기 압타머 말단이 아민기로 치환된 압타머의 경우 고정화가 잘 이루어지지 않았으며, 기관 고유의 라만 밴드만 관찰되었다. 다만, 고정화 진행 후 에탄올 처리시 라만 밴드가 변화하는 양상을 보였으나, 아민기로 치환된 압타머의 경우 고정화에 문제가 있음을 나타낸다.
- [0109] 반면, 상기 도 13 및 도 14를 참고하면, 상기 압타머 말단이 티올기로 치환된 압타머의 경우 기관에 부착 후 압타머 고유의 라만 밴드를 나타냄을 알 수 있다. 이 실험 결과로부터 티올기로 치환된 압타머는 고정화가 매우 우수한 것을 알 수 있다.
- [0110] 또한, 상기 에탄올 등의 용매를 처리함으로써 상기 압타머의 3 차원 헤어핀 구조(hairpin structure)에서 수소 결합을 끊어 1 차원 구조로 바꿈으로써 특성 라만 밴드들도 강화되는 것을 확인할 수 있다.
- [0111] **[실험예 4]**
- [0112] 상기 제조예에서 제조된 기관을 주사전자현미경(Field Emission-Scanning Electron Microscopy, FE-SEM)을 이용하여 관찰하였고, 그 결과를 도 15 내지 도 17에 나타내었다. 상기 도 15는 상기 기관을 위에서 관찰한 결과이고, 상기 도 16 및 도 17은 상기 기관의 단면을 관찰한 결과이다.
- [0113] 상기 도 15 내지 도 17을 참고하면, 상기 기관은 나노 클러스터 입자들로 이루어진 나노 구조체들을 포함하며, 상기 나노 구조체들은 상기 기관과 접하고 있는 하부에서 상기 기관과 접하고 있지 않은 상부 방향으로 여러 겹 겹갈라져 분지된 형상임을 알 수 있다. 이에 따라, 상기 나노 구조체들 사이의 간격은 상기 기관과 접하고 있는 하부에서 보다 상기 기관과 접하고 있지 않은 상부에서 더 좁고, 밀도가 더 높은 것을 알 수 있다.
- [0114] 즉, 상기 기관은 표면에 다공도(porosity)가 존재하여 피 분석물을 임베딩(embedding)하는 효과가 있으며, 상기 압타머를 상기 기관 표면과 내부 공극들 사이로 모두 침투시켜 피 분석물의 라만 신호 검지 집적도를 높일 수 있음을 알 수 있다.
- [0115] **[실험예 5]**
- [0116] 서로 다른 날짜, 서로 다른 배치(batch)에서 제작된 서로 다른 기관 샘플인 hSERS 909, hSERS 1177, hSERS 1179를 이용하여 압타머 검지시 라만 밴드를 측정하였고, 그 결과를 도 18에 나타내었다.
- [0117] 또한, 상기 서로 다른 기관 hSERS 909, hSERS 1177, hSERS 1179을 에탄올 및 증류수를 이용하여 후처리한 후 압타머 검지시 라만 밴드를 측정하였고, 그 결과를 도 19에 나타내었다.
- [0118] 상기 도 18 및 도 19를 참고하면, 상기 기관은 압타머 자체의 특성 라만 밴드가 동일하게 관찰되고, 에탄올 및 증류수를 이용하여 후처리시에도 압타머 고유의 라만 밴드가 동일하게 관찰되므로, 재현성이 우수한 기관임을 확인할 수 있다.
- [0119] **[실험예 6]**
- [0120] 상기 실험예 3에서 제조된 기관을 이용하여, ECD HER2 단백질의 함량을 하기 표 3과 같이 변화시키며 라만 신호를 측정하였고, 그 결과를 하기 도 20 내지 도 23에 나타내었다.
- [0121] 상기 도 20 내지 도 23에서, Anti-HER2 aptamer 7 pmole / dual solvent treated(Aptamer/solvent)는 기관에 Anti-HER2 압타머 7 pmole을 고정화 이후에 100% 에탄올 및 증류수의 2 가지 종류의 용매(dual solvent)로 처

리를 한 경우이고, ECD HER2 Protein은 ECD HER2 단백질만을 적용한 경우이고, 샘플 A, B, C, D는 각각 상기 압타머와 상기 단백질의 중량비를 하기 표 3에서와 같이 변화시킨 경우이다.

[0122] 또한, 상기 도 20 및 도 21은 에탄올과 증류수를 이용하여 워싱(Washing)하기 전의 결과이고, 상기 도 22 및 도 23은 에탄올과 증류수를 이용하여 워싱(Washing)한 후의 결과이다.

[0123] 또한, 상기 도 21 및 도 23은 상기 도 20 및 도 22의 라만 스펙트럼에서 특성 라만 밴드를 히트 맵핑(HEAT mapping) 방식으로 고안하여 가시적으로 표현한 결과이다.

표 3

샘플	A	B	C	D
압타머 : 단백질(중량비)	1 : 1	1 : 0.1	1 : 0.01	1 : 0.001
Anti-HER2 압타머 함량	7.06 pmole	7.06 pmole	7.06 pmole	7.06 pmole
ECD HER2 단백질(IV) 함량	7.06 pmole	7.06×10^{-1} pmole	7.06×10^{-2} pmole	7.06×10^{-3} pmole

[0125] 상기 도 20 내지 도 23을 참고하면, 에탄올과 증류수를 이용하여 워싱(Washing)하기 전에는, 870 cm^{-1} 영역의 특성 라만 밴드의 신호의 세기가 ECD HER2 단백질(IV)의 농도에 따라 줄어드는 것을 알 수 있다. 이로써, 상기 기판은 피검사체의 정량적 분석이 가능한 센서로 사용할 수 있음을 알 수 있다.

[실험예 7]

[0127] 상기 실험예 3에서 제조된 기판을 이용하여, 알부민(Bovine serum albumin, BSA)의 검출을 시험하였고, 그 결과를 도 24 내지 도 28에 나타내었다.

[0128] 상기 도 24 내지 도 28에서 Anti-HER2 aptamer 7 pmole(Apt)는 기판에 Anti-HER2 압타머 7 pmole을 고정화한 경우이고, Anti-HER2 aptamer / dual solvent treated(Apt/solvent)는 기판에 Anti-HER2 압타머 7 pmole을 고정화 이후에 100% 에탄올 및 증류수의 2 가지 종류의 용매(dual solvent)로 처리를 한 경우이고, BSA 7 pmole(BSA)는 BSA를 2 μL 도포 후 5 분 동안 건조하여 7 pmole의 BSA를 고정화한 경우이고, BSA / dual solvent treated(BSA/solvent)는 기판에 7 pmole의 BSA를 고정화 이후에 100% 에탄올 및 증류수의 2 가지 종류의 용매(dual solvent)로 처리를 한 경우이고, Anti-HER2 aptamer 7 pmole + BSA 7 pmole(Apt+BSA)은 Anti-HER2 압타머 7 pmole과 BSA 7 pmole을 고정화한 경우이고, Anti-HER2 aptamer 7 pmole + BSA 7 pmole / dual solvent treated(Apt+BSA/solvent)는 Anti-HER2 압타머 7 pmole과 BSA 7 pmole을 고정화 이후에 100% 에탄올 및 증류수의 2 가지 종류의 용매(dual solvent)로 처리를 한 경우이다.

[0129] 상기 도 20 내지 도 23에서, ECD HER2 Protein은 ECD HER2 단백질만을 적용한 경우이고, 샘플 A, B, C, D는 각각 상기 압타머와 상기 단백질의 중량비를 하기 표 3에서와 같이 변화시킨 경우이다.

[0130] 이 중 상기 도 25, 도 26 및 도 28은 Anti-HER2 aptamer / dual solvent treated(Apt/solvent), Anti-HER2 aptamer 7 pmole + BSA 7 pmole(Apt+BSA) 및 Anti-HER2 aptamer 7 pmole + BSA 7 pmole / dual solvent treated(Apt+BSA/solvent)에 대한 결과만을 나타낸 결과이다.

[0131] 또한, 상기 도 27 및 도 28은 각각 상기 도 24 및 도 25의 라만 스펙트럼에서 특성 라만 밴드를 히트 맵핑(HEAT mapping) 방식으로 고안하여 가시적으로 표현한 결과이다.

[0132] 상기 도 24 내지 도 28을 참고하면, 압타머가 없는 기판에 BSA를 2 μL 도포 후 5 분 동안 건조한 후 라만 분광 측정하면, 고분자량의 단백질 시료인 BSA는 침형 형태의 특성 밴드는 관찰하기 어려운 형태의 그래프이나 다른 단백질들과 구분할 수 있는 특성 밴드를 가진다(도 24의 파란색 선). 이 후 100 % 에탄올 처리와 증류수 세척 후 BSA의 고유의 피크(peak)인 1004 cm^{-1} 가 확연히 관찰되었다. 피분석물인 BSA가 워싱(washing) 과정 상에서 기판의 은 나노 구조체 사이로 임베딩(embedding)되는 결과도 확인하였다.

[0133] 또한, anti-HER2 압타머가 있는 기판 위에 BSA 도포시 850 cm^{-1} 내지 950 cm^{-1} 사이에서 BSA의 라만 밴드 관찰할 수 있었다. 에탄올, 증류수로 워싱(washing)하면 850 cm^{-1} 내지 950 cm^{-1} 영역의 BSA의 라만 밴드를 관찰할 수 없으며, 압타머 고유의 밴드만 관찰됨을 확인하였다. 즉, 압타머가 존재하는 기판에서 BSA는 증류수 세척 과정 상에서 씻겨 내려가는 것을 확인하였으며, 비표적 알부민 시료의 비선택성 검증 완료하였다.

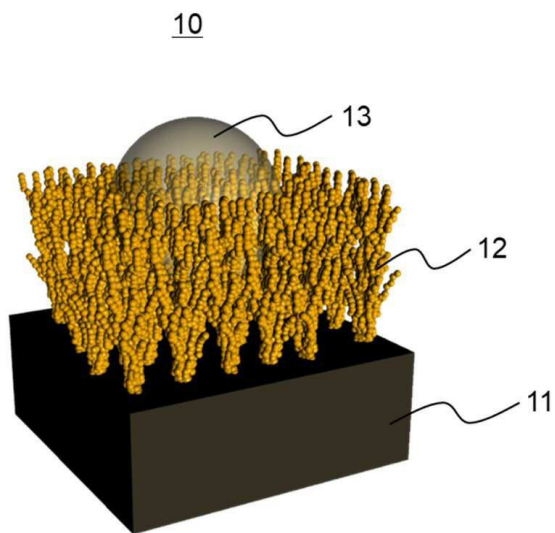
[0135] 이상에서 본 명의 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

부호의 설명

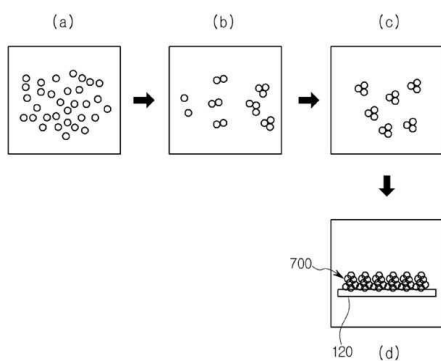
[0136] 10: 라만 분광 기관
11: 기판
12: 나노 구조체들
13: 리셉터 분자
21: 시료
22: 라만 분광기
23: 빛
120: 증착용 기관
700: 나노 구조체들

도면

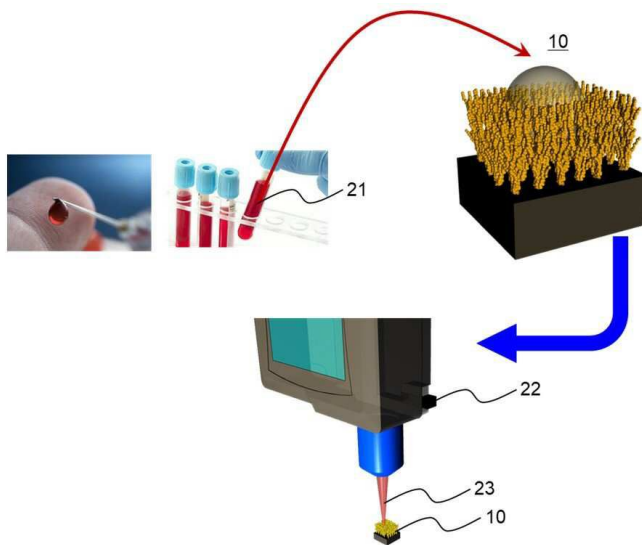
도면1



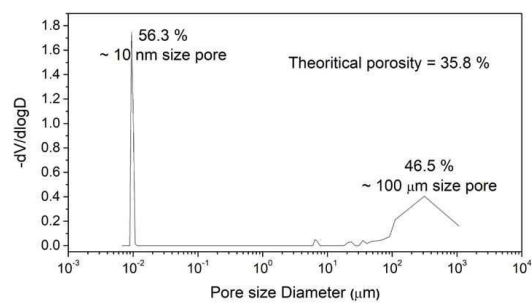
도면2



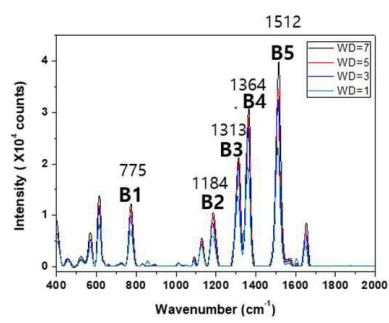
도면3



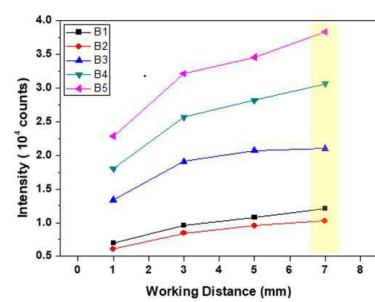
도면4



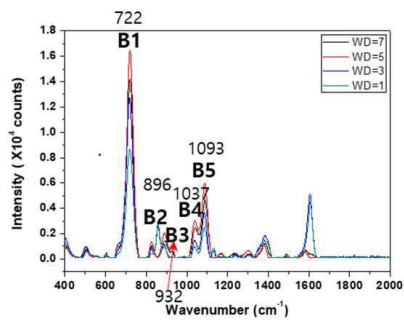
도면5



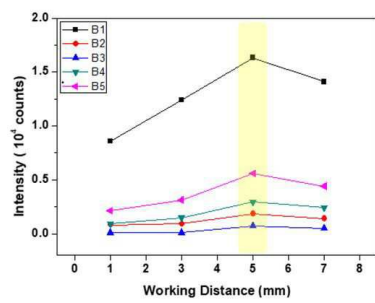
도면6



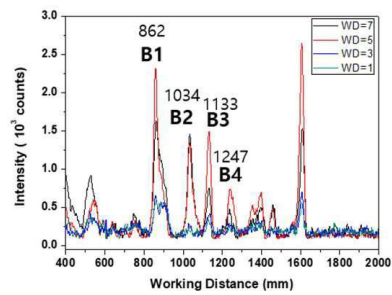
도면7



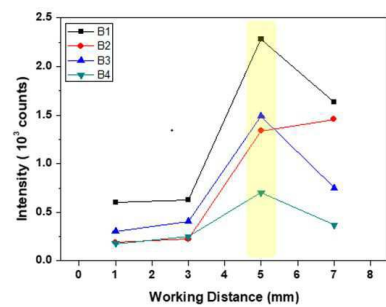
도면8



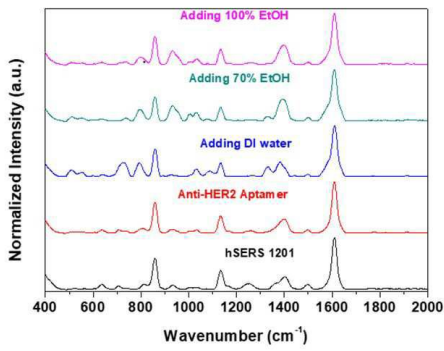
도면9



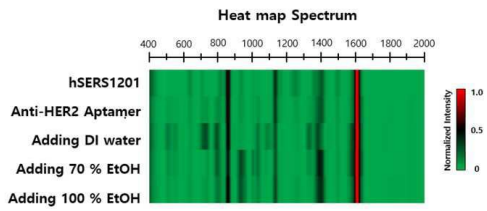
도면10



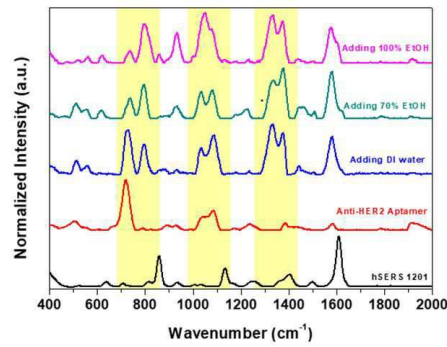
도면11



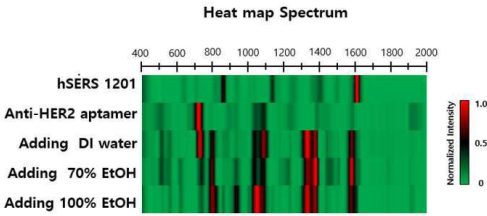
도면12



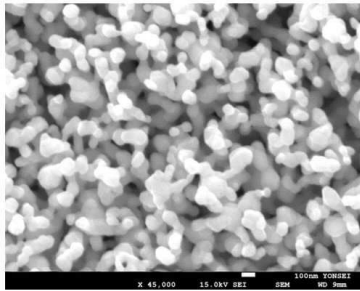
도면13



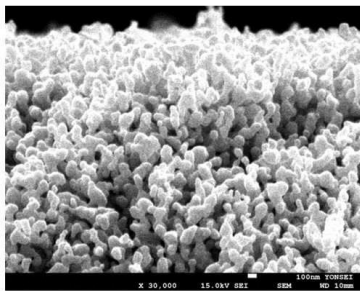
도면14



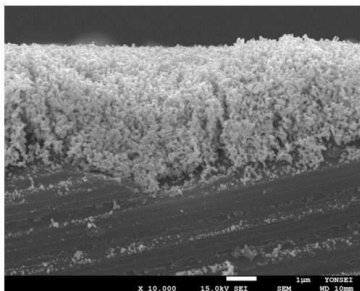
도면15



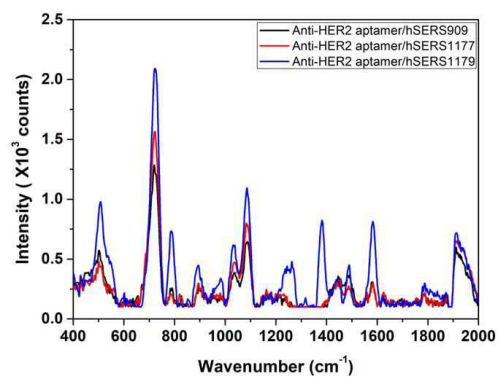
도면16



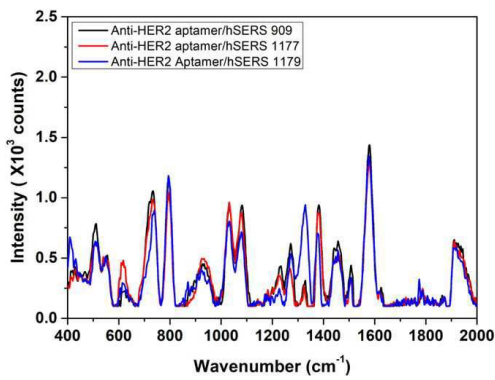
도면17



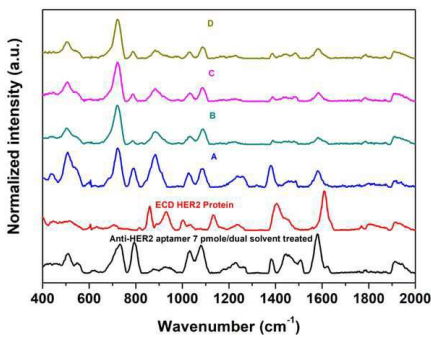
도면18



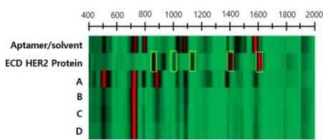
도면19



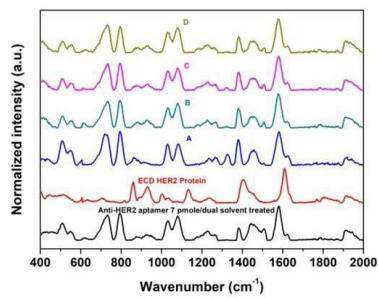
도면20



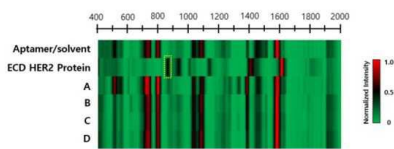
도면21



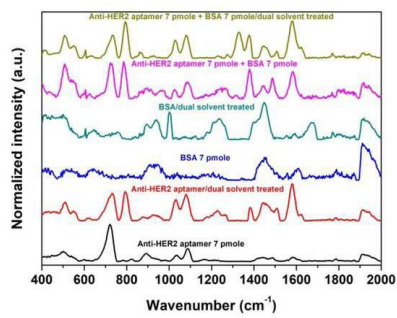
도면22



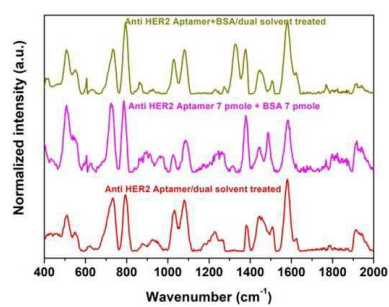
도면23



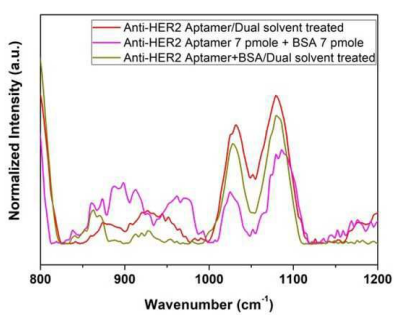
도면24



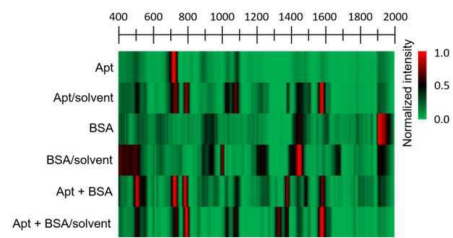
도면25



도면26



도면27



도면28

