



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0048381

(43) 공개일자 2015년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)

G01N 35/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0128329

(22) 출원일자 2013년10월28일

심사청구일자 2013년10월28일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

백세환

서울 광진구 아차산로 552, 10동 503호 (광장동, 극동아파트)

(74) 대리인

한양특허법인

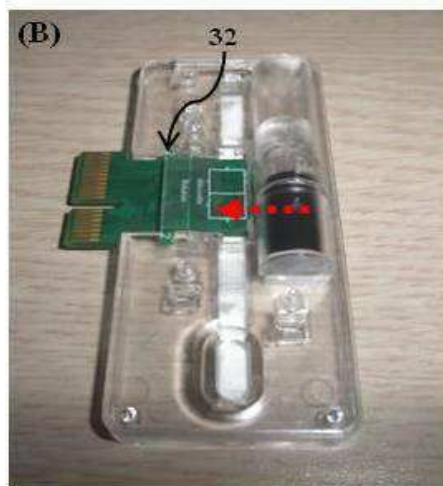
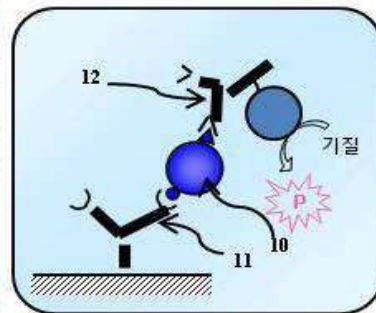
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 휴대용 바이오센서

(57) 요약

본 발명은 분석물질의 포획 인식 소재가 고정된 세공성 고정화 모체를 포함하는 유체채널이 신호탐지센서와 접촉해 있으며, 상기 신호탐지센서는 분석물질과 포획 인식 소재가 반응하여 발생하는 광 신호를 측정하는 렌즈가 없는 상보성 금속 산화막 반도체 이미지 센서(CIS)인 것을 특징으로 하는 휴대용 바이오센서에 관한 것이다.

대표도 - 도1b



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

분석물질의 포획 인식 소재가 고정된 세공성 고정화 모체를 포함하는 유체채널은 신호탐지센서와 접촉해 있으며, 상기 신호탐지센서는 분석물질과 포획 인식 소재가 반응하여 발생하는 광 신호를 측정하는 렌즈가 없는 상보성 금속 산화막 반도체 이미지 센서(CIS)인 것을 특징으로 하는 휴대용 바이오센서.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 포획 인식 소재는 분석물질 또는 분석물질의 결합체와 반응하는 항체, 효소, 수용체, 핵산, 압타머, 펩타이드 및 분자인쇄 인공막으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 휴대용 바이오센서.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 유체채널은 시료 첨가부(31)를 기준으로 시료첨가패드(33a), 중합체패드(33b), 신호발생패드(33c) 및 시료흡수패드(33d) 순으로 정렬되어 있으며, 인접한 패드들은 부분적으로 겹쳐져 있고, 분석 물질은 유체채널의 세로 방향으로 유입되고, 기질용액은 유체채널의 가로 방향으로 유입되는 것을 특징으로 하는 휴대용 바이오센서.

#### 청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 신호발생패드(33c)는 컨트롤 라인(21a) 및 분석라인(21b)으로 이루어진 것을 특징으로 하는 휴대용 바이오센서.

#### 청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 신호발생패드(33c)의 컨트롤 라인(21a) 및 분석라인(21b) 위에 렌즈가 없는 상보성 금속 산화막 반도체 이미지 센서(CIS)가 각각 위치해 있는 것을 특징으로 하는 휴대용 바이오센서.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 렌즈가 없는 상보성 금속 산화막 반도체 이미지 센서(CIS)는 인쇄회로기판 위에 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 휴대용 바이오센서.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 광 신호는 발광, 형광 및 발색이며, 상기 광 신호를 측정하는 신호탐지 센서로는 CIS 이외에, 렌즈가 없는 전하결합소자(CCD), 포토다이오드 또는 포토 멀티플라이어 튜브를 사용하는 것을 특징으로 하는 휴대용 바이오센서.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 광 신호는 아날로그-디지털 변환기, 중앙연산장치, 동기역학 랜덤액세스 메모리, 휘발성 메모리(NAND 또는 NOR), 보안 디지털 카드 및 액정 표시장치 유닛이 조립된 신호 측정기를 사용하여 전기 신호로 변환되는 것을 특징으로 하는 휴대용 바이오센서.

#### 청구항 9

- (1)포획 인식 소재가 고정된 세공성 고정화 모체를 포함하는 유체채널의 시료 첨가부(31)에 분석물질을 주입하는 단계;
- (2)상기 유체채널에서 분석물질과 포획 인식 소재가 반응하여 광 신호가 발생하는 단계; 및
- (3)청구항 1의 휴대용 바이오센서로 상기 광 신호를 측정하여 분석물질을 검출하는 단계를 포함하는 분석물질

검출방법.

## 청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 (1)단계를 수행하기 이전에 분석물질의 포획 인식소재가 고정된 자성비드를 사용하여 분석물질이 포함된 시료를 자성 농축하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질 검출방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 휴대용 바이오센서에 관한 것으로, 신호 측정기로 렌즈가 없는 상보성 금속 산화막 반도체 이미지 센서(Complementary metal-oxide-semiconductor(CMOS) image sensor, CIS)를 사용하여 광 신호가 발생하는 부분에 위치시켜 카메라의 초점거리에 의한 공간을 절약하여 소형화가 가능한 포켓 크기의 휴대용 바이오센서에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 면역분석은 항원-항체 결합 반응을 기반으로 하는 분석방법으로 주로 유기물질들을 분석대상으로 하여 이를 정량하는 방법으로 반세기 이상 발전되어 왔다. 초기에는 항원-항체 반응을 액상에서 진행시켰지만, 점차 고상에서 수행할 수 있도록 개선하였으며, 이러한 개선은 96웰 마이크로타이터 플레이트가 가장 대중적으로 보급되고 또한 많은 수의 분석실험에서 좀 더 쉽게 항원-항체 부착결합체를 분리하려는 시도에 의해 이루어졌다.

[0003] 항원-항체 결합체를 추적하기 위하여, 수많은 신호 발생원들이 사용되었으며, 그 중에서도 비교적 적용하기 쉬운 효소를 가장 많이 사용하였다. 이러한 분석 형태를 ‘효소면역분석법’(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)이라 명명하였으며, 다양한 시료를 동시에 측정하는 일이 가능하게 되었다. 하지만 여전히 단계별 분석과정이 필요하고, 시간과 노동력, 전문가 수준의 지식 및 신호 측정을 위한 실험실 수준의 기기가 필요하다는 문제점이 발생하였다. 따라서, 그에 대한 대안으로 신속하면서도 단일 단계만으로 분석이 가능한 다공성 막 형태의 고체 매트릭스에 콜로이드 골드를 신호 발생에 이용하는 면역 크로마토그래피 분석방법이 소개되었으며, 최근에는 미세유체 흐름을 기반으로 하는 분석방법도 사용되고 있다.

[0004] 또한, 효소면역분석법의 현장 진단용 기술로서, 면역 크로마토그래피를 기반으로 하는 새로운 형태의 면역분석 방법인 ELISA-on-a-chip(EOC)이 개발되었다. 이는 낮은 농도의 분석물질에 대해서도 분석이 가능할 뿐만 아니라, 실험실 밖 환경에서도 사용할 수 있다. 그러나 현재 사용하고 있는 EOC는 발생되는 색이나 발광 신호를 측정할 수 있는 카메라 형태의 측정기가 필요하며, 이러한 측정기는 비교적 크기가 커서 휴대하기 어려운 단점이 있다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2004-0093048호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 유체채널에서 분석 물질과 인식 소재의 반응으로 신호가 발생하는 위치에 렌즈가 없는 상보성 금속 산화막 반도체 이미지 센서(CIS)를 위치시켜 휴대가 용이한 크기의 휴대용 바이오센서를 제조하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0008] 본 발명은 분석물질의 포획 인식 소재가 고정된 세공성 고정화 모체를 포함하는 유체채널은 신호탐지센서와 접촉해 있으며, 상기 신호탐지센서는 분석물질과 포획 인식 소재가 반응하여 발생하는 광 신호를 측정하는 렌즈가

없는 상보성 금속 산화막 반도체 이미지 센서(CIS)인 것을 특징으로 하는 휴대용 바이오센서를 제공한다.

- [0009] 또한, 본 발명은 (1)포획 인식 소재가 고정된 세공성 고정화 모체를 포함하는 유체채널의 시료 첨가부(31)에 분석물질을 주입하는 단계;
- [0010] (2)상기 유체채널에서 분석물질과 포획 인식 소재가 반응하여 광 신호가 발생하는 단계; 및
- [0011] (3)상기 휴대용 바이오센서로 상기 광 신호를 측정하여 분석물질을 검출하는 단계를 포함하는 분석물질 검출방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0012] 본 발명의 휴대용 바이오센서는 유체채널의 광 신호가 발생하는 부위에 신호탐지센서로 렌즈가 없는 상보성 금속 산화막 반도체 이미지 센서(CIS)를 인접시켜 크기를 소형화할 수 있어 휴대가 용이한 장점을 지니고 있다.
- [0013] 또한, 발광 신호의 탐지 시간이 약 30초 정도로 짧아 신속한 측정이 가능하며, 비용이 저렴한 장점을 지니고 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명의 휴대용 바이오센서의 측정 단계를 나타낸 사진으로 도 1a는 유체채널에 공급된 시료가 세로 방향으로 흐르는 것을 나타낸 사진 및 시료, 포획항체 및 효소가 중합된 탐지항체의 반응을 나타낸 모식도이고, 도 1b는 효소 기질액이 가로 방향으로 흐르는 것을 나타낸 사진 및 효소와 기질이 반응하여 발광 신호가 발생하는 것을 나타낸 모식도이고, 도 1c는 발생된 발광 신호를 측정하는 측정기의 사진이다.
- 도 2a는 렌즈가 없는 상보성 금속 산화막 반도체 이미지 센서(CIS)와 유체채널이 결합한 구조를 나타낸 모식도이고, 도 2b는 PCB위에 CIS를 배치한 것을 나타낸 모식도이고, 도 2c는 CIS에 의해 측정된 컨트롤 신호 및 분석 신호 부분의 이미지를 나타낸 사진이다.
- 도 3은 암조건에서 발광 신호를 측정하기 위한 휴대용 바이오센서를 나타낸 사진이다.
- 도 4a는 HRP 효소 농도에 따른 발광 신호를 나타낸 사진이고, 도 4b는 HRP 효소 농도에 따른 발색 측정 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5a는 살모넬라 균의 농도에 따른 화학 발광 신호를 CIS로 측정한 이미지이고, 도 5b는 살모넬라 균의 농도에 따른 화학 발광 신호를 cooled-CCD로 측정한 이미지이고, 도 5c는 살모넬라 균의 농도에 따른 발색 신호를 측정한 이미지이다.
- 도 6a는 살모넬라 균에 대한 CIS의 농도 응답을 나타낸 그래프이고, 도 6b는 신호탐지센서로 CIS, cooled-CCD 및 웹 카메라로 측정한 살모넬라 균의 농도에 따른 발광 및 발색 신호를 수치화하여 나타낸 그래프이다.
- 도 7a는 자성 농축 모듈과 결합한 휴대용 바이오센서의 사진이고, 도 7b는 자성으로 균을 농축하는 사진이고, 도 7c는 자성 비드 표면에 농축된 균을 용출하는 사진이다.
- 도 8a는 분석 물질을 자성 농축을 실시 및 자성 농축을 미실시 하였을 때, 살모넬라 균의 농도에 따른 발광 신호를 나타낸 그래프이고, 도 8b는 자성 농축을 미실시한 분석 물질의 살모넬라 균의 농도에 따른 발광 신호를 logit-log 변환하여 자성 농축 효율을 측정한 그래프이다.
- 도 9는 자성 농축 실시 및 자성 농축 미실시한 분석 물질의 배양 시간에 따른 산출된 균의 농도를 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 본 발명을 보다 자세히 설명한다.
- [0016] 본 발명은 분석물질의 포획 인식 소재가 고정된 세공성 고정화 모체를 포함하는 유체채널이 신호탐지센서와 접촉해 있으며, 상기 신호탐지센서는 분석물질과 포획 인식 소재가 반응하여 발생하는 광 신호를 측정하는 렌즈가 없는 상보성 금속 산화막 반도체 이미지 센서(CIS)인 것을 특징으로 하는 휴대용 바이오센서에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명의 휴대용 바이오센서는 유체채널에서 광 신호가 발생하는 부분에 광 탐지 센서를 인접시켜 효율적인 광

자 전달이 가능하며, 렌즈가 없는 CIS를 사용하여 카메라의 초점거리에 의한 공간을 절약할 수 있어 소형화가 가능하다. 따라서, 본 발명의 휴대용 바이오센서는 주머니 크기로 제작할 수 있어 휴대가 용이하므로 의료현장에서 질병을 진단할 수 있으며, 카페테리아의 위생 모니터링, 음식이나 식수에 있는 독소, 농약, 유해물질 및 식품첨가제를 실험실이 아닌 현장에서 바로 측정할 수 있다.

[0018] 상기 유체채널은 셀룰로즈 막에 기반한 면역 분석 플랫폼인 ELISA-on-a-chip(EOC)형태의 교차흐름 기반 면역 크로마토그래피 장치로 신속하게 면역 분석이 가능한 휴대용 장치이다. 상기 유체채널(EOC)은 효소를 표식자로 하여 항원-항체 반응을 이용하여 항원 또는 항체를 측정하는 방법으로 낮은 농도의 분석 물질에 대해서도 민감하게 분석할 수 있으며, 세로와 가로 방향으로 채널을 교차하도록 하여 분석 시간을 단축시킬 수 있다.

[0019] 상기 세공성 고정화 모체는 유리섬유 멤브레인, 니트로셀룰로우스(nitrocellulose; NC) 멤브레인, 셀룰로우스 멤브레인, 나일론 멤브레인 및 폴리비닐리덴 디플로오라이드 멤브레인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이 사용된다.

[0020] 또한, 유체채널에 고정된 포획 인식 소재는 분석물질 또는 분석물질의 결합체와 반응하는 항체, 효소, 수용체, 핵산, 압타머, 펩타이드 및 분자인쇄 인공막으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이다.

[0021] 상기 유체채널은 네 가지의 멤브레인 패드로 구성되어 있다. 유체채널의 시료 첨가부(31)를 기준으로 시료첨가패드(33a), 중합체패드(33b), 신호발생패드(33c) 및 시료흡수패드(33d) 순으로 정렬되어 있으며, 인접한 패드들은 부분적으로 겹쳐있다. 상기 중합체패드(33b)에는 분석물질을 탐지할 수 있는 인식 소재를 고정시켰다. 또한, 신호발생패드(33c)에는 분석 라인(21b)과 컨트롤 라인(21a)이 있으며, 상기 분석 라인(21b)에는 분석물질 포획용 인식 소재, 컨트롤 라인(21a)에는 효소와 결합한 탐지 항체에 대한 제2 인식 소재를 고정시켜 분석물질의 농도와 관계없이 컨트롤 라인(21a)에 항상 일정한 발광 신호를 발생할 수 있게 하였다.

[0022] 상기 중합체패드(33b)에는 효소와 결합한 탐지 항체를 건조시켜 사용하며, 상기 효소와 결합한 탐지 항체를 사용할 경우 효소가 기질 용액과 반응하여 신호 발생원으로 작용하여 분석 성능을 개선할 수 있게 한다.

[0023] 본 발명의 신호탐지센서로 사용된 CIS는 인쇄회로기판(PCB) 위에 장착하여 고정시켰으며, 상기 유체채널의 광 신호가 발생하는 신호발생패드(33c)의 분석 라인(21b) 및 컨트롤 라인(21a)에 각각 위치시켜 광 신호를 측정할 수 있게 하였다.

[0024] 상기 광 신호는 발광, 형광 및 발색이며, 상기 광 신호를 측정하는 신호탐지 센서로는 CIS 이외에, 렌즈가 없는 전하결합소자(CCD), 포토다이오드, 또는 포토 멀티플라이어 튜브를 사용할 수 있다.

[0025] 상기와 같은 구조를 지니는 본 발명의 휴대용 바이오센서는 하기와 같은 과정으로 물질을 검출할 수 있다.

[0026] (1)포획 인식 소재가 고정된 세공성 고정화 모체를 포함하는 유체채널의 시료 첨가부(31)에 분석물질을 주입하는 단계;

[0027] (2)상기 유체채널에서 분석물질과 포획 인식 소재가 반응하여 광 신호가 발생하는 단계; 및

[0028] (3)상기 휴대용 바이오센서로 상기 광 신호를 측정하여 분석물질을 검출하는 단계를 거쳐 분석물질을 검출한다.

[0029] 보다 자세하게, 분석 물질을 유체채널의 시료 첨가부(31)에 주입하면, 모세관 현상에 의해 분석 물질은 유체채널의 세로 방향으로 흐르게 되며, 상기 분석 물질은 유체채널의 중합체패드(33b)에 건조된 효소와 결합한 인식 소재에 의해 탐지된다. 그 후 탐지된 분석 물질이 신호발생패드(33c)로 유입되고, 신호발생패드(33c)에 고정된 포획 인식 소재에 의해 포획이 된다. 이 때 신호 발생을 위해 광 기질 용액을 신호발생패드(33c)에 가로 방향으로 주입하여 교차시키면, 상기 기질 용액과 중합체패드(33b)에 고정된 인식 소재와 결합한 효소가 반응 하여 광 신호를 발생하며, 상기 광 신호는 CIS에 의해 측정된다. 이 때 신호의 측정은 어두운 조건에서 실시한다. 측정된 광 신호는 신호 측정기에 의해 전기 신호로 변환되어 분석 물질을 측정할 수 있다.

[0030] 상기 광 신호를 전기 신호로 변환하는 신호 측정기는 아날로그-디지털 변환기, 중앙연산장치, 동기역학 랜덤 액세스 메모리, 휘발성 메모리(NAND 또는 NOR), 보안 디지털 카드 및 액정 표시장치 유닛이 조립된 것이다.

[0031] 또한, 분석물질을 시료첨가부(31)로 주입하기 전에 분석물질의 포획 인식 소재가 고정된 자성비드를 사용하여 자성 농축 기술을 군 탐지에 적용할 경우 본 발명의 휴대용 바이오센서의 측정 민감도를 향상시킬 수 있다. 자성비드는 자성 영역 내에서 군을 자성으로 분리하는 자성 분리 구획과 멤브레인 패드를 이용하여 수분이 포함된 배양액을 흡수하는 배양액 흡수 구획 및 본 발명의 휴대용 바이오센서를 통해 면역 분석을 진행하는 면역 분석 구획으로 구성되었다.

[0032] 자석(56)을 분리 튜브(55) 상방에 위치시킨 후, 인식소재가 중합된 면역 자성비드를 균이 혼재되어 있는 시료에 넣어 반응시키고, 상기 용액을 시료 주입구에 주입한다. 이때 액체는 3-방향마개(51)의 조절에 의해 분리 튜브(55)를 따라 배양액 흡수패드(53)로 이동하며, 용액 내에 존재하는 자성비드와 결합된 균은 자석에 의해 튜브 내에 잔여한다. 튜브 내에 자성비드와 결합되어 잔여한 균은 소량의 산성 용액을 첨가하여 반응시키면 분리가 되고, 분리된 균은 3-방향마개(51)를 조절하여 분석 구획에 위치된 휴대용 바이오센서의 시료 첨가부(31)로 이동된다. 이때 농축된 균 시료는 시료첨가패드(33)에 건조시켜 축적시킨 염기성 시약과 반응하여 면역 분석이 가능한 pH로 중화되고, 상기 기재된 휴대용 바이오센서의 분석과정과 동일한 방법으로 분석 물질을 분석한다.

[0033] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험에는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 실시예에 제한되는 것은 아니다. 또한, 하기 실시예에서는 살모넬라 균의 측정을 예시로 들었다.

[0034] **<휴대용 바이오센서 제조 및 이를 이용한 살모넬라 균 검출>**

[0035] **실시예 1. 휴대용 바이오센서 제조**

[0036] **(1)인식소재(효소와 탐지항체)의 결합**

[0037] **1-1.크로스팅커 방법**

[0038] 100 mM 인산염 완충액(pH 7.4)에 140 mM 염화나트륨(100 mM 인산완충식염수, PBS), 10 mM DTT(dithiotheritol, 피어스) 및 5 mM EDTA를 첨가한 혼합 용액으로 항 살모넬라균 탐지항체(0.5 mg/mL, 100 mL)를 용해시킨 후 37℃에서 1시간 동안 반응시켜 설프하이드릴(-SH) 그룹을 활성화 시켰다. 과량의 시약들은 세파텍스 G-15 젤 컬럼을 이용하여 제거하였다.

[0039] HRP(25 mg/mL, 56.8 mL)는 본 실시예에서 효소로 사용되며, 메일이미드 그룹을 제공할 수 있도록 활성화시키기 위해 30배의 물 비율을 100 mM PBS에 녹인 숙시니미딜4-(N-메일이미도메틸)싸이클로헥산-1-카르보시레이트(SMCC, 피어스)를 사용해 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 과량의 시약들은 젤 컬럼을 이용하여 분리하였다. 활성화된 항 살모넬라균 탐지항체는 10배의 물 비율로 활성화된 HRP와 실온에서 2시간 동안 반응하여 결합시켰다. 상기 결합된 HRP-항 살모넬라균 탐지항체의 중합체는 상기 중합체와 동일한 부피의 글리세롤과 혼합하여 4℃에서 보관하였다.

[0040] **1-2. 직접연결 방법**

[0041] HRP(5 mg/mL)를 100 mM 아세테이트 완충용액(pH 5.5)에 용해시키고 소듐 페리오데이트(최종 10 mM)와 실온에서 20분 동안 반응시켜 HRP를 활성화시켰다. 과량의 시약과 버퍼 용액의 교체는 G-15 컬럼에 100 mM 카보네이트 완충용액(pH 9.5)를 매개로 하여 수행되었다. 5배의 물 비율로 활성화된 HRP를 항 살모넬라균 탐지항체와 4℃에서 3시간 동안 반응시킨 뒤, 소듐 보로하이드라이드(최종 2 mM)를 넣어 추가로 15분 동안 반응시켰다. 그 후 바로 1 M 인산염 완충용액(pH 7.0)를 적정하여 HRP-항 살모넬라균 탐지항체의 중합체를 중화시켰고, 10 mM PBS가 포함된 용액을 투석하여 글리세롤 농도가 50% 되도록 혼합하여 4℃에서 보관하였다.

[0042] **(2)유체채널(EOC) 준비**

[0043] 네 가지의 멤브레인 패드를 다음과 같이 정렬시켰다. 시료 첨가부(31)를 기준으로 시료첨가패드(33a, 글라스 멤브레인 4 x 17 mm; Grade 319), 중합체 패드(33b, 글라스 멤브레인 4 x 10 mm; PT-R5), 신호발생패드(33c, NC 멤브레인 4 x 25 mm; 90CNPH-N-SS40), 시료흡수패드(33d, 셀룰로우스 멤브레인 4 x 15 mm; 17CHR)순으로 정렬시켰으며, 인접한 패드들은 부분적으로 겹치게 정렬시켰다.

[0044] 시료첨가패드(33a)는 1% 카제인-PBS에 0.5% 트윈-20(패드 당 30 mL)를 넣은 용액을 흡수시켜 60℃에서 1시간 동안 건조하여 준비하였다.

[0045] 중합체패드(33b)는 100 mM PBS(pH 7.4) 용액에 5% 카제인, 5 mM 아스코르빈산, 0.5% 트윈-20 및 20% 트리할로

우스(13.8 mL)를 혼합하고, 상기 혼합 용액에 상기 실시예 1에서 제조한 HRP-항 살모넬라균 탐지항체의 중합체(0.2 mL; final 0.1 mg/mL)를 넣어 패드에 흡수시켰다.

[0046] 신호가 발생하는 신호발생패드(33c)는 항 살모넬라균 포획 항체(1 mg/mL 3% 트리할로우스가 들어간 100 mM 인산 염완충용액)를 분석 라인(21b)에, 염소유래 항 토끼 면역글로불린(0.05 mg/mL)을 컨트롤 라인(21a)에 각각 아래 쪽에서 6 및 11 mm에 떨어진 곳에 미세분주기를 이용하여 1.5 mL/cm 속도로 도포하였다(BioJet3000, 바이오다트, 어바인, 캘리포니아). 신호발생패드(33c)는 37℃에서 1시간 동안 건조시킨 뒤 플라스틱 봉지에 건조제와 함께 넣어 보관하였다.

[0047] 상기 네 가지의 패드는 폭 4 mm 멤브레인 스트립 형식으로 플라스틱 필름 위에 양면 테이프를 이용하여 조립하였다. 검은색 테이프를 신호발생패드(33c)의 뒤에 붙여 각 발광 신호가 상호 간섭하지 않도록 처리하였다.

### [0048] (3)CIS 모듈 제조

[0049] 유체채널에서 발생된 발광 신호를 측정하기 위한 신호탐지센서로 두 개의 CIS를(3.0 x 3.0 mm, 1.3 메가 픽셀 어레이) 인쇄회로기판(PCB) 위에 올려 일회용 모듈을 제조하였다.

[0050] CIS 모듈에는 광자의 센싱, 전류의 순환 및 신호를 측정기로 전달하는 세 가지 기능적인 부분이 있다. 두 개의 CIS는 모듈과 EOC가 조립될 때 각각 신호발생패드(33c)의 분석 라인(21b)과 컨트롤 라인(21a) 위에 정렬되었다.

[0051] 전기 배선은 디자인에 따라 작은 공간에 집적화가 이루어지도록 CIS 칩셋과 아웃풋 터미널 패드 사이에 밀도 있게 분배하였다. PCB의 전선 패터닝은 금도금으로 이루어졌고 보드에 안정하게 고정되었다. PCB의 위와 아래에 있는 배선 층간 결합 구멍 연결 회로는 비전도 물질인 실크로 코팅되어 CIS의 성능을 안정적으로 상승시켰다. 칩셋에서 연장된 전선은 에폭시로 코팅하여 수분이 포함된 환경에서 보호되었다.

### [0052] (4)CIS 및 EOC의 결합

[0053] EOC 플라스틱 카트리지(32 x 76 x 8 mm)는 상판과 하판의 두 개의 플레이트로 이루어져 있고, 조립을 하면 세로 흐름 채널에 유체채널(EOC)이 장착되고, 가로 흐름 채널에 기질 용액이 탱크로부터 신호발생패드(33c)를 가로질러 가로흐름 흡수패드로 흐르도록 구성 하였다. 상판에는 신호를 모니터링 할 수 있는 창과 샘플을 주입할 수 있는 구멍도 포함되어 있다. 또한, 상판에는 컴퓨터로 조정되는 에칭 기계를 이용하여 CIS 모듈을 신호발생패드(33c)에 근접하게 끼울 수 있도록 패터를 새겼다. 제조된 EOC-CIS 휴대용 바이오센서는 건조제와 함께 실온에서 보관되었다.

### [0054] (5)신호 측정기 조립

[0055] 광신호를 전기신호로 변환하기 위하여 CIS 모듈과 연결 가능한 신호측정기를 제조하였다.

[0056] 아날로그-디지털 변환기, 중앙연산장치, 동기역학 랜덤액세스 메모리, 2개의 휘발성 메모리(NAND or NOR), 보안 디지털 카드 및 액정 표시장치 유닛들을 한 장치 내에 조립하였다. 신호생성 과정으로 CIS에서 받아들이는 광자는 포토다이오드에 의해 전자로 변환되고 증폭기를 통하여 전압으로 변환된다. 상기 전압은 아날로그-디지털 변환기를 통하여 디지털 데이터로 바뀌고 이는 다시 개인 컴퓨터의 중앙연산장치를 이용하여 수학적으로 계산하는데 이용되었다. 처리된 값들은 일시적으로 동기역학 랜덤액세스 메모리에 저장되었다가 생성된 광 이미지와 함께 외부의 보안 디지털카드에 저장되었다. 측정된 데이터는 중앙연산장치의 펌웨어에 의해 별도의 메모리에 설치되어 있는 표준 곡선에 일치하도록 분석물질의 농도로 변환되었다. 실행 명령의 선택은 측정기 맨 위 패널에 있는 터치 인풋 장치에 의해 조정될 수 있다.

### [0057] 실험예 1.CIS의 분석성능 확인

[0058] CIS의 분석 성능을 확인하기 위하여 CIS에 직접 분석 시료를 주입하여 분석 성능과 측정 한계를 확인하였다.

[0059] HRP를 카제인-PBS용액에 각 농도별(0, 10, 50, 100fmol/mL, 1, 10pmol/mL)로 희석하여 측정기에 연결된 CIS 모듈에 1 µL를 주입하였다. 그 후 HRP용 화학발광 기질 용액 1 mL를 즉시 첨가하고 HRP의 농도별로 발생하는 발

광 신호를 암 조건에서 측정하였다. 약 2분 후에 포착된 각 신호 이미지들을 개인 컴퓨터에 보관하여 결과를 확인하였다.

[0060] 또한, 마이크로타이터 플레이트에서 발색기질인 용해성TMB(200  $\mu$ L)를 사용하여 HRP의 농도에 따른 색 신호를 관찰하였다. 상기 반응은 15분 동안 진행하였고, 2M 황산용액(50  $\mu$ L)를 첨가한 뒤 색 신호를 450nm의 흡광도로 측정하였다.

[0061] CIS에 포착된 이미지를 통하여 효소(HRP)의 농도에 따라 생성되는 발광 신호가 비례적으로 증가한다는 사실을 확인하였고(도 4a), 효소의 탐지 한계점은 50fmol/mL로 관찰되었다. 상기 발광 신호는 분석 라인(21b)에서 발생하였으며, 효소를 포함하지 않은 컨트롤 라인(21a)에서는 신호가 발생되지 않았다.

[0062] 발색 기질인 TMB를 사용한 마이크로타이터 플레이트를 이용한 분석 방법에서도 효소 농도에 따라 발색 신호가 비례하게 증가하는 결과(도 4b)를 보였으므로, CIS를 이용한 발광 신호 측정은 신뢰성이 높다고 할 수 있다.

## [0063] 실험예 2. 신호탐지센서 종류(CIS, coole-CCD 및 웹카메라)에 따른 살모넬라균 검출

[0064] 각각 다른 농도의 살모넬라 균(*Salmonella typhimurium*(*S. typhimurium*); KCCM 11806)이 포함된 시료(100  $\mu$ L)를 유체채널(EOC)에 주입하고 세로 흐름을 15분 동안 진행하여 면역반응을 완료시켰다. 가로 흐름을 위한 가로 흡수패드는 신호가 발생하는 신호발생패드(33c) 옆에 중첩시켜 붙이고, 화학발광용 기질을 포함하는 기질용액(150 mL)을 공급해 주었다.

[0065] 살모넬라균의 농도에 따른 신호의 세기를 신호탐지센서인 CIS 및 cooled-CCD를 사용하여 측정하였으며, 포착된 이미지는 광학밀도로 정량하고, 농도 응답 곡선으로 나타내었다.

[0066] 또한, 발색신호를 이용하여 살모넬라 균에 대한 면역분석을 실시하였다. 카제인-PBS-트윈-20(100  $\mu$ L)에 연속적으로 희석한 살모넬라 균이 혼합된 표준시료를 준비한 후, 유체채널(EOC)에 주입하여 세로 흐름을 15분 동안 진행하였고, 가로 흐름 흡수패드를 신호발생패드(33c) 옆에 일부 중첩되도록 위치시킨 뒤 TMB-M이 포함된 HRP 기질(150  $\mu$ L)을 기질 주입구에 주입하였다. 가로 흐름을 10분간 진행한 뒤, 발색신호가 신호발생패드(33c)에서 발생하면 웹 카메라로 이미지를 포착하였고, 유체채널의 중앙 라인을 따라 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여 정량하였다.

[0067] 상기 신호탐지센서인 CIS, cooled-CCD 및 웹 카메라의 분석 성능을 관찰한 결과 CIS를 사용한 본 발명의 휴대용 바이오센서는  $4.22 \times 10^3$  CFU/mL의 측정 민감도를 보였으며, cooled-CCD는 CIS보다 약 1.7배 높은  $2.54 \times 10^3$  CFU/mL의 더 높은 측정 민감도를 보였다. 또한, 웹 카메라를 사용한 발색 신호는  $4.75 \times 10^3$  CFU/mL로 CIS와 비슷한 측정 민감도를 보였다(도 5 및 도 6).

[0068] cooled-CCD의 측정 민감도는 가장 높지만 cooled-CCD에는 쿨링 시스템이 설치되어 있어 크기가 크므로 휴대하기 용이하지 않아 본 발명의 목적에 적합하지 않았다. 반면에, CIS는 쿨링 시스템이 없어 광 포착 효율이 떨어질 수 있는 문제점이 있으나, 유체채널의 신호발생패드(33c)와 CIS를 밀착시켜 광 신호의 손실을 최소화하여 광 전자 포착 효율을 극대화시켜 상기와 같은 문제점을 해결하여 측정 민감도를 높일 수 있었다. 발색 신호의 경우 효소 기질 용액 첨가 후 발색이 누적되어 색신호가 포화되는 시점까지 기다렸다가 반응을 시켜야 하므로 측정을 신속하게 하지 못하는 문제점이 있어 신호탐지센서가 필요하지 않는 분석 방법에 더욱 적합하다고 할 수 있다.

## [0069] <자성 농축 모듈 및 휴대용 바이오센서를 이용한 살모넬라 균 검출>

### [0070] 실시예 2.

#### [0071] (1)자성 농축 모듈 제조

[0072] 자성 농축 모듈은 자성이 분리되는 구획, 시료 용액이 흡수되는 구획, 타겟 물질을 분석하는 구획으로 나누어진다. 기기의 주 몸체 부위는 육면체 형상(45 x 100 x 65 mm)으로 플라스틱과 아크릴 재질로 만들어졌고, 3층의 기능적인 배열로 디자인하였다. 아래쪽에서부터 EOC 기반 분석구획과 시료 흡수구획 그리고 자성분리구획이 위치하였다. 자성분리를 위하여 타이콘 튜브(2 mm 내측 반지름을 갖고 1 mm 두께를 지님; 세인트-고바인, 프랑스)를 사인곡선 형태(20 x 40 mm)로 패턴을 새긴 직사각형 채널(4 mm 반지름)에 위치시켜 고정하였다. 또한, 대체 가능한 튜브를 준비하여 재사용이 간편하도록 하였다. 해당 평면 위에는 자석이 위치할 수 있도록 하여 자성

비드가 튜브를 통해 이동할 때 포획되도록 하였다. 튜브의 양쪽 끝은 아크릴의 바깥쪽으로 나와 각각 흡수패드와 분석기기 쪽으로 연결되었으며, 각각의 입구와 출구 역할을 3-방향마개에 의해 수동으로 조절되도록 하였다. 용액의 흡수는 셀룰로오즈 멤브레인 뭉치를 마개의 한쪽 끝에 접촉하도록 지지대를 설치하여 흡수가 용이하도록 하였다.

## (2)자성비드 및 항체의 중합

자성 비드(30 mg/mL 중 33.5  $\mu$ L)를 PBS(1 mL)와 혼합한 후 자석을 이용하여 자성분리를 실시하였고, PBS 14  $\mu$ L에 항 살모넬라균 항체(20  $\mu$ g)를 첨가한 용액과 반응시켰다. 3 M 암모늄 황산염(10  $\mu$ L)을 혼합물에 넣어 주고, 37°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 반응하지 않고 남아있는 용액을 자석으로 분리해 낸 뒤 자성 비드의 표면을 카제인-PBS로 37°C에서 1시간 동안 블로킹시켰다. 동일한 방법으로 분리해준 뒤, 자성비드-항체 중합체를 0.1 mL 의 카제인-PBS(10 mg/mL 자성비드)와 혼합하고 4°C에서 보관하였다.

## (3)자성 분리 과정

살모넬라균 시료를 농축하기 위해 균배양 용액 10 mL를 자성비드-항체 중합체 (100  $\mu$ L)와 실온에서 15분간 반응시켰다. 혼합물은 주사기로 옮겨 자성 농축 모듈의 시료 주입구에 연결하였고 중력에 의해 용액이 흘러 들어가게 하였다. 자성비드들은 자성 필드 내에서 분리가 되게 하고 자성비드가 분리된 수용액들은 배양액 흡수패드로 흡수되도록 하였다. 해당 과정이 끝난 후, 0.1 M 글리신완충용액(pH 1.7, 54  $\mu$ L)을 튜브에 공급하였고 10분간 반응시킨 후 균을 자성비드에서 떼어내었다. 자성비드에서 떨어진 균은 3-방향마개를 통해 시료 주입구로 들어간 뒤, 1 M 트리스-염화수소(pH 8.5, 46  $\mu$ L)와 혼합되어 중화된 후 EOC로 분석되었다.

## 실험예 3. 자성 농축 수율 측정

자성 농축을 실시하였을 때, 농축되는 균의 수율을 측정하고자 하였다. 살모넬라 균의 농도에 따른 CIS 발광 신호를 측정하여 농도응답곡선 그래프를 얻었다(도 8a). 상기 농도 응답 곡선 그래프를 logit-log 변환을 통해 회귀 직선으로 변환(도 8b)하였으며, 상기 회귀 직선은 높은 상관계수( $R^2=0.970$ )를 지닌 것으로 관찰되었다.

상기 회귀 직선을 사용하여 자성 농축 수율을 결정하기 위하여  $4.0 \times 10^2$  CFU/mL의 낮은 농도의 살모넬라 균을 포함한 시료를 자성 농축 모듈을 통해 농축시켰으며, 상기 농축된 시료를 본 발명의 휴대용 바이오센서를 사용하여 측정하였다. 얻어진 신호 값을 logit-log 변환 후 상기 회귀 직선에 대입하여 값을 산출한 결과, 시료 내에  $3.0 \times 10^4$  CFU/mL의 살모넬라 균이 존재한다는 것을 알 수 있었다.

따라서, 상기 결과를 통하여 자성 농축을 통해 시료가 75배로 농축되는 것을 알 수 있었다.

## 실험예 4. 자성 농축에 따른 측정 민감도

자성 농축이 된 시료를 사용하여 본 발명의 휴대용 바이오센서로 발광 신호를 측정하였다. 시료 내의 살모넬라 균의 농도를 다르게 하여 각각의 발광 신호를 측정하여 농도 응답 곡선 그래프(도 8a)로 나타내었다.

자성 농축을 실시하지 않은 시료의 발광 신호와 비교하였을 때, 자성 농축을 실시한 경우에는  $1.1 \times 10^2$  CFU/mL로 측정 민감도가 측정 되었으며, 자성 농축을 실시하지 않은 경우에는  $7.2 \times 10^3$  CFU/mL로 측정 민감도가 측정되었다. 따라서, 자성 농축을 실시한 경우 약 67배 가량 측정 한계치가 향상된다는 것을 확인할 수 있었다.

## < 휴대용 바이오센서를 이용한 실제 시료의 살모넬라 균 검출>

### 실시예 3.

시중에서 구매한 가지미를 실제 시료로 사용하였다. 살모넬라 균은 식중독 균으로 극소량일지라도 음식물에 포함되는 것이 허용되지 않기 때문에, 실제 시료 내에 극소량의 살모넬라 균이 오염된 가상의 실험 조건을 설정하

여 실험을 수행하였다.

[0087] 10g의 생선 근육을 90mL의 선택 배지에 섞어 10분간 갈아주었다. 상기 시료에 3.3CFU의 살모넬라균을 접종하였고, 연속적으로 흔들리는 37℃ 인큐베이터 내에서 배양하였다.

[0088] **실험예 5. 실제 시료를 이용한 자성 농축 유무에 따른 살모넬라 균 검출**

[0089] 상기 실시예 3에서 배양한 실제 시료를 3시간 간격으로 배양액을 획득하여 본 발명의 휴대용 바이오센서로 살모넬라 균의 면역을 측정하였다. 또한, 동일한 방법으로 3시간 간격으로 배양액을 획득한 뒤 자성 농축을 실시하여 본 발명의 휴대용 바이오센서로 살모넬라 균에 대한 면역분석을 수행하였다.

[0090] 자성 농축을 실시한 경우 살모넬라 균 접종 후 6시간이 경과된 시점에서 살모넬라 균을 검출할 수 있었고, 자성 농축을 실시하지 않은 경우 3시간이 지연된 9시간이 경과된 시점에서 살모넬라 균을 검출할 수 있었다(도 9).

[0091] 따라서, 자성 농축을 실시하는 경우 균 검출에 있어서 비교적 짧은 시간 내에 균의 존재 여부를 알아낼 수 있어 식품 등의 유통 여부를 결정할 수 있다.

**부호의 설명**

[0092] 4 : EOC 리더기

10 : 시료

11 : 포획항체

12 : 효소가 중합된 탐지항체

13 : 효소

20 : 이미지센서 모듈

21 : CIS 모듈

21a : 컨트롤 라인

21b : 분석 라인

22 : 메인보드

23 : 암실

30 : EOC 카트리지

31 : 시료첨가부

32 : 기질흡수패드

33 : 유체채널

33a : 시료첨가패드

33b : 중합체패드

33c : 신호발생패드

33d : 시료흡수패드

50 : 시료주입구

51 : 3-방향마개

52 : 농축액 회수구

53 : 배양액 흡수패드

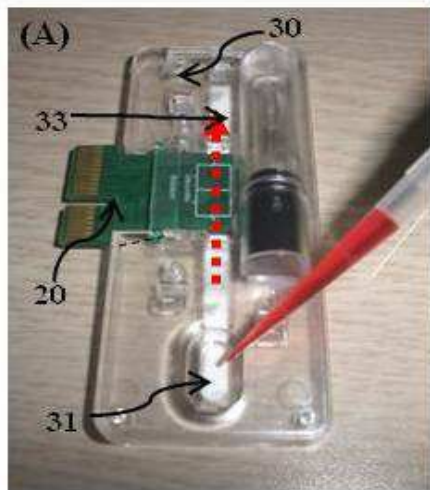
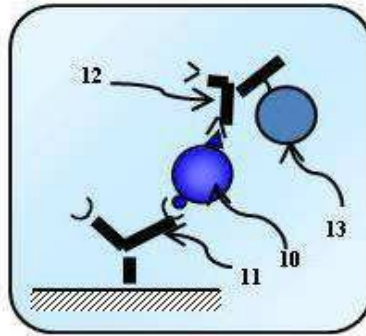
54 : 시료주입기

55 : 교체 가능한 분리튜브

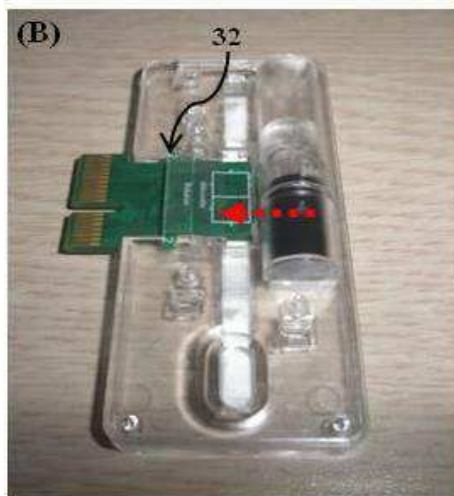
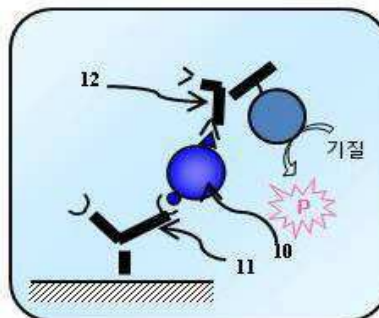
56 : 자석

도면

도면1a



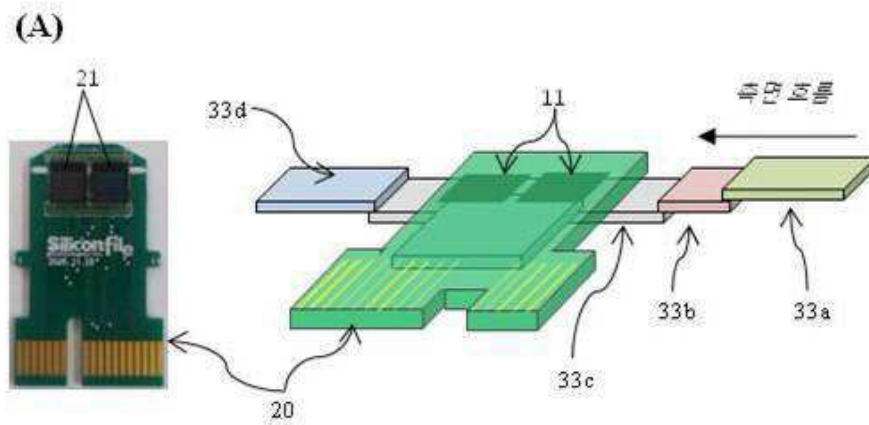
도면1b



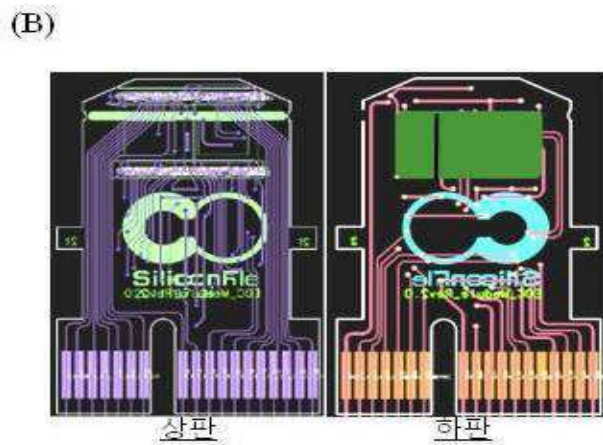
도면1c



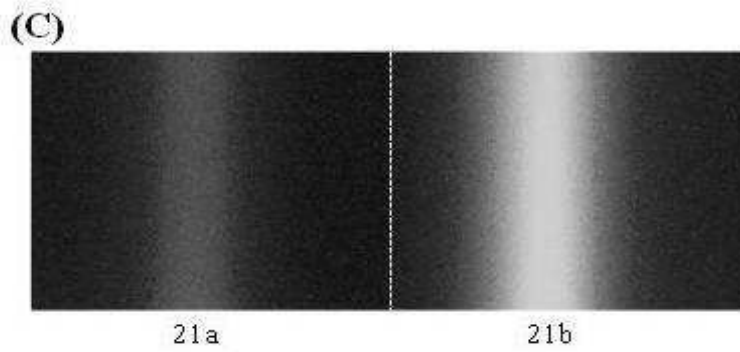
도면2a



도면2b



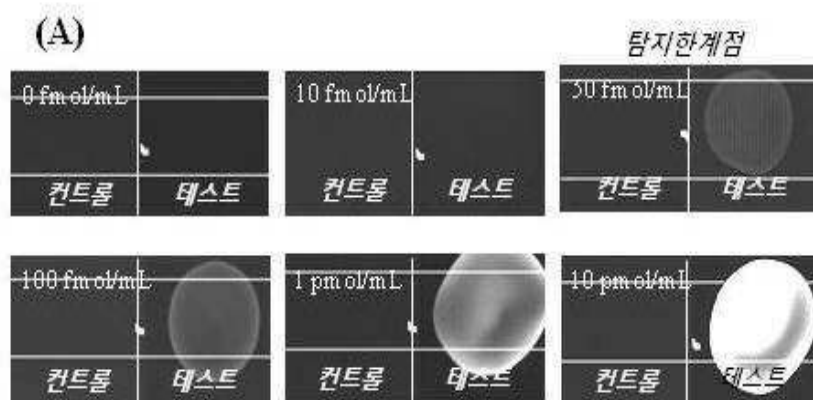
도면2c



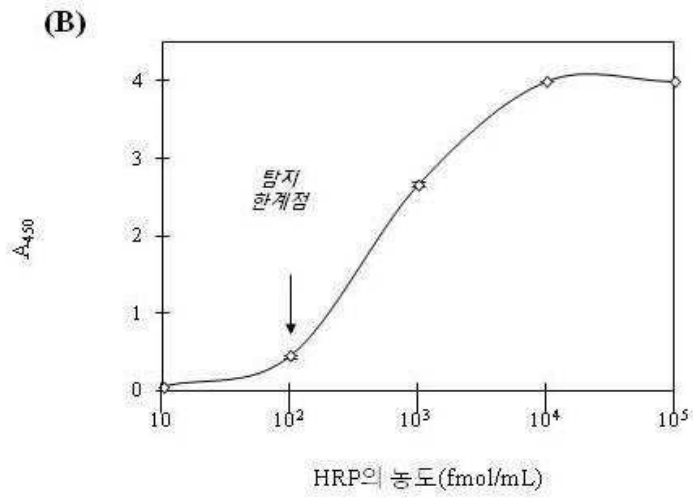
도면3



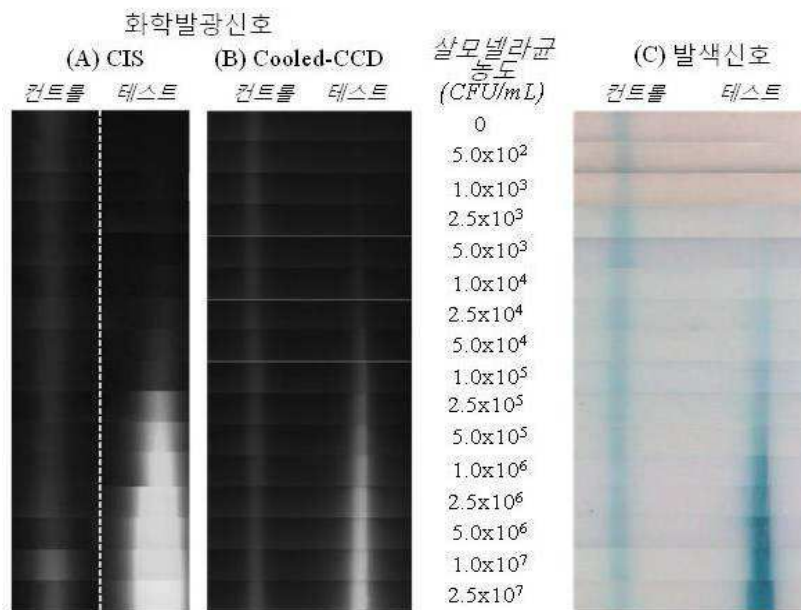
도면4a



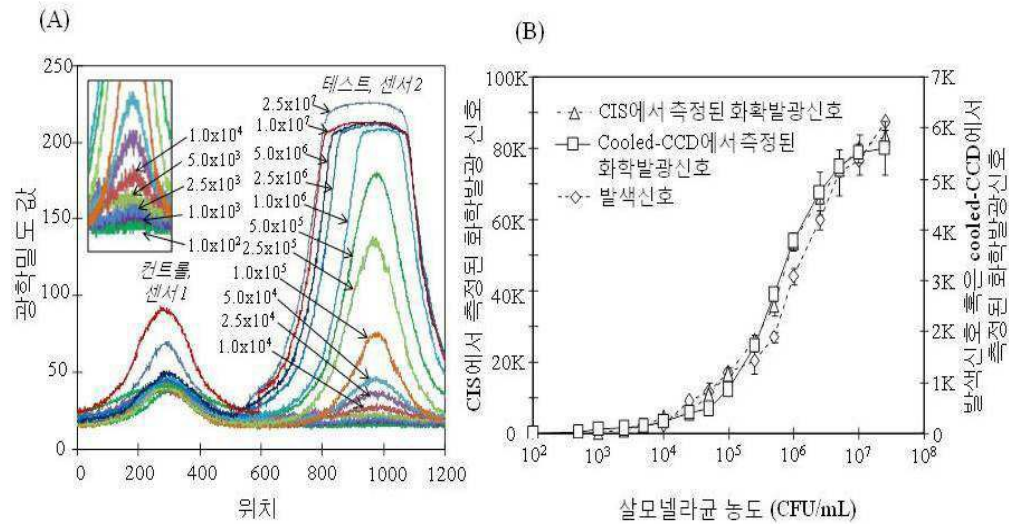
도면4b



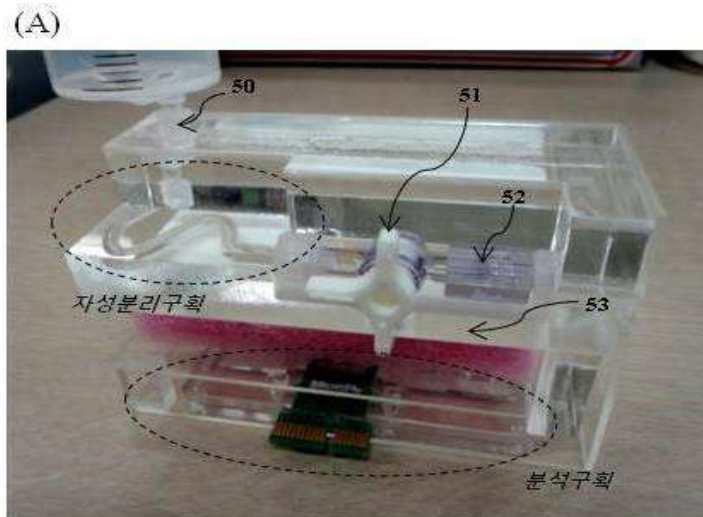
도면5



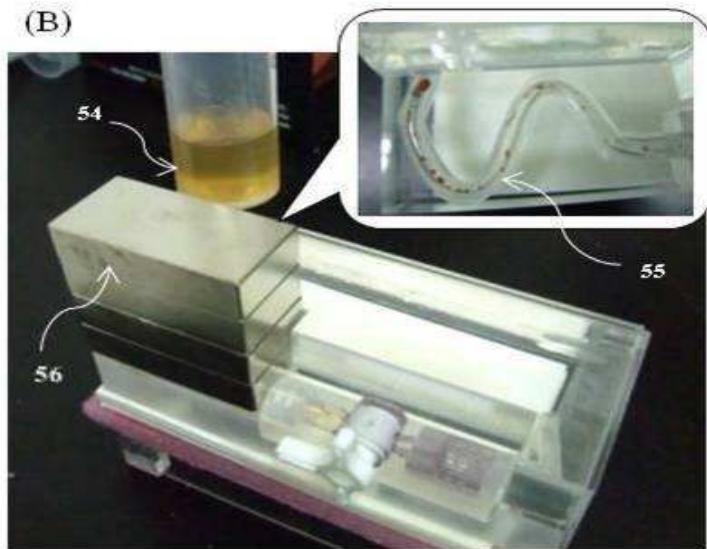
도면6



도면7a



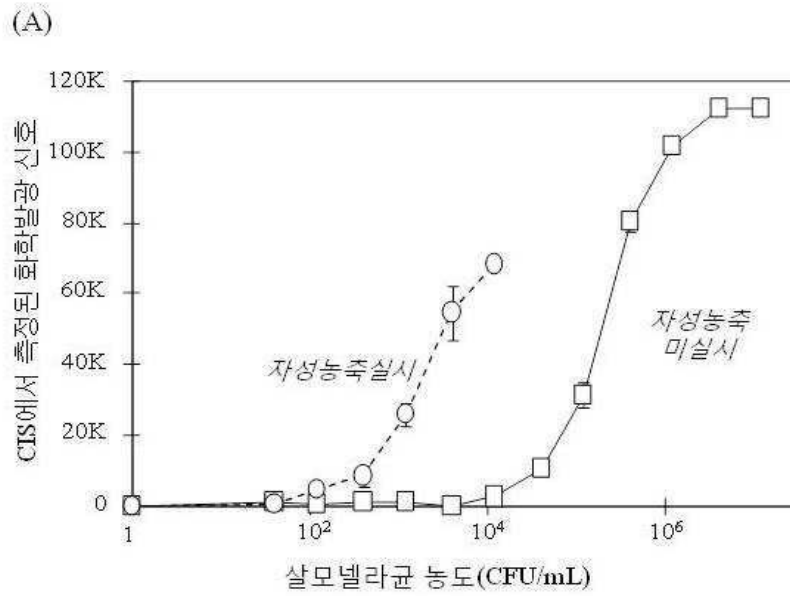
도면7b



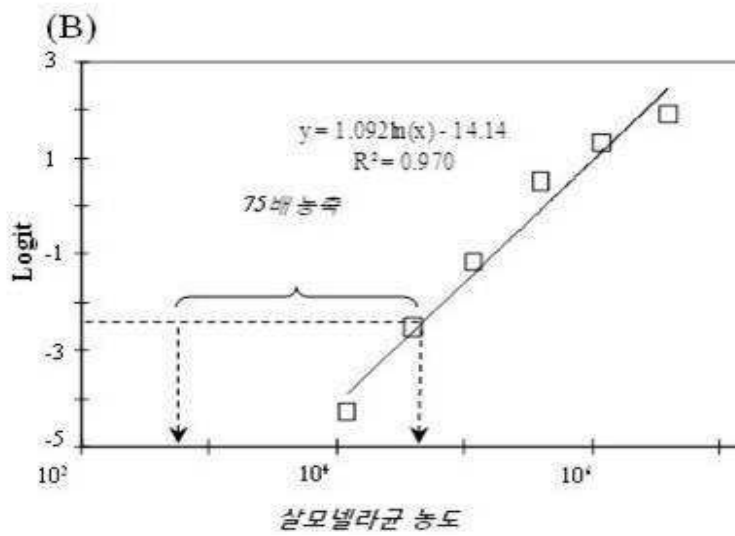
도면7c



도면8a



도면8b



도면9

