



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0110376
(43) 공개일자 2015년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C01B 31/02 (2006.01)
G01N 33/08 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/561 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/68 (2013.01)
C01B 31/022 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0038167
(22) 출원일자 2015년03월19일
심사청구일자 2015년03월19일
(30) 우선권주장
1020140032202 2014년03월19일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
신관우
서울특별시 강남구 선릉로 221 (도곡동, 도곡렉슬 아파트) 402동 1201호
이주미
서울 종로구 세검정로7길 63-3
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

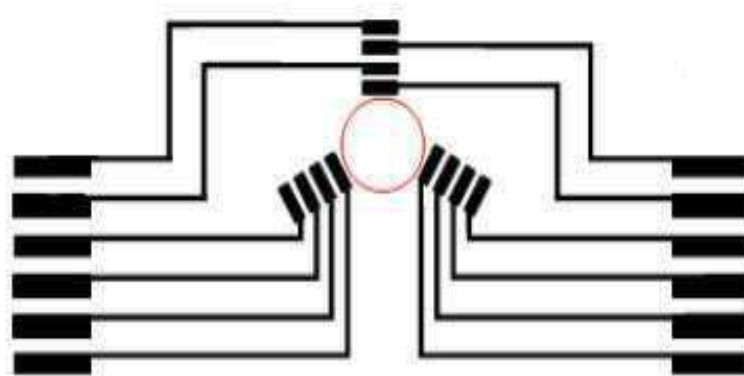
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 면역분석용 미세유동 칩

(57) 요약

본 발명은 면역분석용 미세유동 칩에 관한 것으로, 상기 면역분석용 미세유동 칩은 (a) 전도성 잉크(conductive ink) 및 잉크젯 프린팅을 이용하여 전극 도면이 인쇄된 제1부위(a first region); 및 (b) (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체가 고정되어 있으며, 항원-항체 면역반응이 발생하는 제2부위(a second region)를 포함한다. 상기 제1부위는 분석시료, 블로킹(blocking) 완충액, 항체, 기질 및 세척완충액으로 구성된 군으로부터 선택되는 유체(fluid)가 접촉되고, 상기 제1부위는 제2부위와 맞닿아(in contact) 있으며, 상기 제1부위에 접촉된 유체는 전기습윤법(electrowetting)에 의해 제2부위로 이동한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/08 (2013.01)

G01N 33/53 (2013.01)

G01N 33/561 (2013.01)

(72) 발명자

권오선

경기도 성남시 분당구 내정로 165번길 35 (수내동, 양지마을한양아파트 510동1008호)

고효진

제주 제주시 연화로 16, 104동 305호 (노형동, 해오름아파트)

김용준

경기 광주시 문화로 12-19

김영기

경기도 성남시 분당구 탄천로 35, 505동 904호

최재학

대전 유성구 유성대로783번길 38, 106동 202호 (장대동, 월드컵패밀리타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-00177539

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구지원사업

연구과제명 인공세포 구조 및 기능 모사 연구

기 여 율 3/10

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2016.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013M2A2A6043677

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 방사선융합기술개발

연구과제명 방사선 기반 바이오시료 검출용 모듈형디지털 종이 유체칩 기술 개발

기 여 율 5/10

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.07.16 ~ 2016.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2010265

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업> 일반연구자지원사업> 기본연구지원사업

연구과제명 단백질 결정화 및 구조분석용 전기습윤구동식 디지털 미세액체 종이칩 개발

기 여 율 2/10

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 분석시료의 면역분석용 미세유동 칩:

(a) 전도성 잉크(conductive ink) 및 잉크젯 프린팅을 이용하여 전극 도면이 인쇄된 제1부위(a first region); 상기 제1부위는 분석시료, 블로킹(blocking) 완충액, 항체, 기질 및 세척완충액으로 구성된 군으로부터 선택되는 유체(fluid)가 접촉되고,

(b) (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체가 고정되어 있으며, 항원-항체 면역반응이 발생하는 제2부위(a second region); 상기 제1부위는 제2부위와 맞닿아(in contact) 있으며, 상기 제1부위에 접촉된 유체는 전기습윤법(electrowetting)에 의해 제2부위로 이동한다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 제1부위는 인쇄된 전극을 포함하는 활성영역(active zone)을 포함하는 것을 특징으로 하는 면역분석용 미세유동 칩.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 활성영역은 분석시료, 블로킹 완충액, 항체, 기질 및 세척완충액으로 구성된 군으로부터 선택되는 유체가 접촉되는 것을 특징으로 하는 면역분석용 미세유동 칩.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 활성영역은 유체가 이동하기 위한 평행하는 복수의 전극을 포함하고, 상기 유체는 평행하는 복수의 전극에 대하여 수직 방향으로 제2부위를 향해 이동하는 것을 특징으로 하는 면역분석용 미세유동 칩.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 전극은 전기가 인가되어 유체가 제2부위로 이동하는 것을 특징으로 하는 면역분석용 미세유동 칩.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 전도성 잉크는 금속 잉크, 세라믹 잉크 또는 분자 잉크인 것을 특징으로 하는 면역분석용 미세유동 칩.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 세라믹 잉크는 탄소나노튜브(CNT) 잉크인 것을 특징으로 하는 면역분석용 미세유동 칩.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 제1부위 또는 제2부위는 종이 또는 필름인 것을 특징으로 하는 면역분석용 미세유동 칩.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 제1부위는 상기 전극 도면 상에 절연층을 형성하기 위하여 추가적으로 절연체를 증착시키는 것을 특징으로 하는 면역분석용 미세유동 칩.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 절연체는 유리, 자기(porcelain) 또는 폴리머 조성물인 것을 특징으로 하는 면역분석용 미세유동 칩.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 폴리머 조성물은 파릴렌인 것을 특징으로 하는 면역분석용 미세유동 칩.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 상기 제1부위는 전극 도면 상에 추가적으로 보강제를 코팅하는 것을 특징으로 하는 미세유동 칩.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 보강제는 폴리테트라플루오로에틸렌인 것을 특징으로 하는 미세유동 칩.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 제2부위는 상단에 여과막을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 미세유동 칩.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 막은 여과막은 유리 여과막인 것을 특징으로 하는 미세유동 칩.

청구항 16

제 1 항에 있어서, 상기 제2부위는 하단에 스페이스(spacer) 및 흡착패드를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 미세유동 칩.

청구항 17

상기 제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 면역분석용 미세유동 칩을 포함하는 진단키트.

청구항 18

다음의 단계를 포함하는 면역분석 방법:

(a) 상기 제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 면역분석용 미세유동 칩의 제2부위에 (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체를 고정하는 단계;

(b) 상기 제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 면역분석용 미세유동 칩의 상기 제1부위에 분석시료, 블로킹(blocking) 완충액, 항체, 기질 및 세척완충액으로 구성된 군으로부터 선택되는 유체(fluid)를 접촉하여, 상기 단계 (a)의 (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체에 대한 항원-항체 면역반응을 발생시키는 단계; 및

(c) 상기 항원-항체 면역반응을 검출하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 면역분석용 미세유동 칩에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

기존의 디지털 마이크로유체칩(Microfluidics Chip; 미세유동 칩)은 유리나 실리콘 기판 위에서 포토리소그래피(photolithography)와 에칭(etching) 등의 복잡한 제작과정을 거치며(R. B. Fair, *Microfluid Nanofluid*, 3:245281(2007)), 이때 사용되는 장비와 화학 물질들은 고가일 뿐만 아니라 인체와 환경에 매우 유해하다. 대부분의 디지털 마이크로유체칩은 폐쇄 시스템(closed system)으로(Robert J. Linhardt et al., *J. AM. CHEM. SOC.*, 131:11041-11048(2009)) 칩 위에서의 여러 가지 반응 뒤에 결과물 분석을 위해서는 커버 플레이트(cover plate)를 제거해야 하는 단점이 있었다. 개방 칩 시스템(open chip system)(Abdelgawad, Park, and Wheeler *J. Appl. Phys.*, 105:094506 (2009)) 역시 제작 과정에서는 전극 패턴을 제작하는 과정에서 기존의 방법들을 사용하기 때문에 같은 문제점들이 발생한다.

[0003]

전기습윤법(Electrowetting)으로 유체의 움직임을 전기로 제어할 수 있으며, 이를 이용한 것이 디지털 마이크로유체칩이다. 전기습윤현상이란 쉽게 말해 전기로 표면장력이 바뀌는 현상이다. 이 현상은 1870년 가브리엘 리프만(Gabriel Lippmann, 1845~1921)에 의해 처음 발견되었다. 유리관에 물을 담으면 유리관 벽은 중심부보다 물의 높이가 더 높는데 이는 물과 유리관 벽 사이의 표면장력 때문이다. 그런데 유리관 대신 금속관을 쓰고 전기를 걸면 벽을 따라 올라오는 물의 높이가 더 높아진다. 전기로 표면장력이 더욱 세졌기 때문이다. 리프만은 이를 ‘전기모세관’ 현상이라고 불렀지만 그 뒤로 1백 년간 이 기술은 별다른 빛을 보지 못했다. 전기모세관 현상은 1V 이하의 낮은 전압에서만 일어났고, 이보다 높은 전압을 걸면 물이 산소와 수소로 분해되어 버렸다. 이후 1990년 높은 전압으로도 표면장력을 제어할 수 있는 전기습윤현상이 발견되었다. 프랑수아 브루노 버지(Bruno Berge) 박사는 금속관을 얇은 절연체로 씌운 뒤 그 위에 물을 한 방울 떨어뜨렸다. 다음에 금속관과 물방울에 전기를 걸자 전압이 높아질수록 물방울이 얇게 퍼졌다. 이 방법을 쓰자 수십 V의 높은 전압에서도 물방울의 모양을 바꾸는 것이 가능해졌다.

[0004]

탄소나노튜브(carbon nanotube, CNT)란, 탄소 6개로 이루어진 육각형들이 서로 연결되어 관 모양을 이루고 있는 신소재로서, 1991년 일본전기회사(NEC) 부설 연구소의 이치마 스미오[飯島澄男] 박사가 전기방전법을 사용하여 흑연의 음극상에 형성시킨 탄소덩어리를 분석하는 과정에서 발견하였다. 형태는 탄소 6개로 이루어진 육각형 모양이 서로 연결되어 관 모양을 이루고 있다. 관의 지름이 수-수십 나노미터에 불과하여 탄소나노튜브라고 일컬어지게 되었다. 나노미터는 10억 분의 1 m로 보통 머리카락의 10만 분의 1 굵기이다. 탄소나노튜브는 전기 전도도가 구리와 비슷하고, 열전도율은 자연계에서 가장 뛰어난 다이아몬드와 같으며, 강도는 철강보다 100배나 뛰어나다. 탄소섬유는 1%만 변형시켜도 끊어지는 반면 탄소나노튜브는 15%가 변형되어도 견딜 수 있다. 이 물질이 발견된 이후 과학자들은 합성과 응용에 심혈을 기울여왔는데, 반도체와 평판 디스플레이, 배터리, 초강력 섬유, 생체 센서, 텔레비전 브라운관 등 탄소나노튜브를 이용한 장치가 수없이 개발되고 있다.

[0005]

ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay; 효소면역정량법)은 가장 널리 이용되는 면역정량법 중 하나로, 시

료 내 존재하는 대상 단백질을 검출하는 분석법으로, 대상 단백질의 검출은 항원-항체 반응에 의해 가능하게 된다. 항체나 항원이 고체상에 흡착(immunosorbent)되어 있는 원리를 이용한 것으로, 종래 기술에서는 상기 고체상으로 폴리스티렌(polystyrene) 소재의 마이크로티터 플레이트(microtiter plate)가 이용되고 있다. ELISA는 항체의 활용 방법에 따라 직접(direct) ELISA, 간접(indirect) ELISA 및 샌드위치 ELISA로 나눌 수 있다. 현재, 다양한 바이러스, 기생충 및 미생물을 검출하는데 ELISA를 이용한 진단기술이 이용되고 있다.

[0006] 적정기술(Appropriate Technology)은 특정한 지역에서 효율적으로 원하는 결과를 얻을 수 있는 가장 단순한 수준의 기술을 의미한다. 적정기술은 저렴한 가격, 단순한 조작성, 소규모 적용가능성, 창의성 및 환경보존의 특징을 갖는다. 예컨대, 수자원이 오염되어 있는 개발도상국 및 제3국에 살고 있는 사람들의 식수 공급을 위해 만들어진 휴대용 정수 빨대 ‘라이프스트로우(Life straw)’ 및 자동차 부품을 이용하고 자동차 배터리를 전원으로 활용할 수 있는 저가 인큐베이터 ‘네오뉴처(NeoNuture)’가 대표적인 적정기술에 해당한다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 종래의 고비용 및 시간 소모가 큰 면역분석 방법을 대체할 수 있는 제작 및 사용이 용이하고 비용이 적게 들 뿐 아니라, 적정기술로 이용될 수 있는 면역분석용 미세유동 칩을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 전도성 잉크(conductive ink) 및 잉크젯 프린팅을 이용하여 전극 도면을 인쇄한 제1부위 및 (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체가 고정되어 있으며, 항원-항체 면역반응이 발생하는 제2부위로 구성된 면역분석용 미세유동 칩을 개발하였다. 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩은 저비용의 시간 소모가 적은 면역분석방법으로, 종래의 면역분석방법과 비교하여 경제적이고 신속하게 분석시료 내 검출대상을 분석할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 면역분석용 미세유동 칩을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 면역분석 방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, (a) 전도성 잉크(conductive ink) 및 잉크젯 프린팅을 이용하여 전극 도면이 인쇄된 제1부위(a first region); 상기 제1부위는 분석시료, 블로킹(blocking) 완충액, 항체, 기질 및 세척완충액으로 구성된 군으로부터 선택되는 유체(fluid)가 접촉되고, (b) (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체가 고정되어 있으며, 항원-항체 면역반응이 발생하는 제2부위(a second region); 상기 제1부위는 제2부위와 맞닿아(in contact) 있으며, 상기 제1부위에 접촉된 유체는 전기습윤법(electrowetting)에 의해 제2부위로 이동하는 면역분석용 미세유동 칩을 제공한다.

[0013] 본 발명자들은 종래의 고비용 및 시간 소모가 큰 면역분석 방법을 대체할 수 있는 제작 및 사용이 용이하고 비용이 적게 들 뿐 아니라, 적정기술로 이용될 수 있는 면역분석용 미세유동 칩을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 전도성 잉크 및 잉크젯 프린팅을 이용하여 전극 도면을 인쇄한 제1부위 및 (i) 분석시료 내 검출대상 항

원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체가 고정되어 있으며, 항원-항체 면역반응이 발생하는 제2부위로 구성된 면역분석용 미세유동 칩을 개발하였다. 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩은 저비용의 시간 소모가 적은 면역분석방법으로, 종래의 면역분석방법과 비교하여 경제적이고 신속하게 분석시료 내 검출대상을 분석할 수 있음을 확인하였다.

[0014] 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩의 주요한 특징은 전도성 잉크 및 잉크젯 프린팅을 이용하여 전극 도면이 인쇄된 제1부위 및 (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체가 고정된 제2부위로, 상기 제2부위에 고정된 (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대하여 상기 제1부위에 접촉된 분석시료, 블로킹 완충액, 항체, 기질 및 세척완충액으로 구성된 군으로부터 선택되는 유체가 전 기습윤법에 의해 제2부위로 이동하여 항원-항체 면역반응이 발생시켜 이를 검출하는 것이다.

[0015] 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩은 전도성 잉크(conductive ink) 및 잉크젯 프린팅을 이용하여 전극 도면이 인쇄된 제1부위를 포함한다.

[0016] 본 발명에서 사용되는 잉크젯 프린팅(inkjet printing)은 컴퓨터의 대표적인 출력 장치인 프린터 장치 중 압전 헤드(piezo electric head)를 사용하는 프린터로, 용지 상에 잉크를 분사함으로써 문자를 형성한다. 즉, 전하(轉荷)한 잉크 입자를 발산시켜 이것을 글자형과 글자 위치에 따라 제어된 전압을 가한 편향판(偏向板)에 따라 편향시키면서 지면(紙面)에 쳐서 붙여 인자(印字)하는 방식의 프린터이다. 잉크는 처음에 잉크 헤드에 주입되어 있고 수정 발진기 작용에 따라 입자 모양으로 발사되어 점차로 지면에 쳐서 붙여져 도트 매트릭스 자형이 표현된다.

[0017] 본 발명의 명세서에서 용어 “전도성 잉크(conductive ink)”는 분말 또는 조각상태의 은 및 탄소와 같은 전도성 물질을 포함하고 있으며, 종이 또는 필름 등과 같은 다양한 고체 기판(substrate)상에 그려지거나 프린트될 수 있는 물질들을 포함하는 잉크를 의미한다. 전도성 잉크는 예컨대 금속 잉크(예컨대 금, 은, 동, 니켈, 금, 플라티늄, 구리 및 팔라듐), 세라믹 잉크(예컨대, 금속산화물 및 탄소소(또는 탄소나노튜브)) 및 분자 잉크(예컨대, 특수 유기물 및 고분자 재료)를 포함하며, 이에 한정되지 않는다.

[0018] 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 전도성 잉크(conductive ink)는 전극으로 사용되기 위해 일정량 이상의 전도도가 요구되며, 일 구현예에 따르면, 상기 전도성 잉크는 탄소나노튜브(CNT)이다. 상기 탄소나노튜브는 알루미늄과 구리와 같이 비교적 전기전도성이나 비저항이 우수한 금속 물질 보다 더 우수한 전기적 성질을 가진다. 따라서 이러한 탄소나노튜브를 도전성 물질로 이용할 경우, 전기적 저항을 줄일 수 있고 열전도도 역시 우수하여 인쇄회로기판 내부의 열을 효과적으로 외부로 방출할 수 있는 장점이 있다.

[0019] 상기 탄소나노튜브는 예컨대, 단일벽 탄소나노튜브, 이중벽 탄소나노튜브, 다중벽 탄소나노튜브 및 다발형탄소나노튜브를 포함하고, 일 구현예에 따르면, 다중벽 탄소나노튜브 이다. 상기 다중벽 탄소나노튜브 전극은 일반 A4 용지 위에서 1 kΩ/sq (square)의 저항을, 사진 인쇄용지 위에서 200 Ω/sq의 저항 값을 나타낸다.

[0020] 상기 전도성 잉크는 적합한 용매, 전도성 물질, 접착증진제(adhesive improver), 환원제 또는 커플링제(coupling agent) 등을 사용하여 제작할 수 있다. 상기 용매는 글리시딜 에테르류, 글리콜 에테르류, 식물성 기름, 알파-테르피네올 또는 NMP(N-메틸-2-피롤리돈pyrrolidone)를 사용할 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 접착증진제는 아크릴계 수지 또는 비닐계 수지를 사용할 수 있으며, 비닐계 수지를 이용하는 경우 실란(silane) 화합물을 포함하는 혼합물을 사용할 수 있다. 상기 환원제는 전도성 물질이 산화될 때 이를 환원시킴으로써 전기 도전성이 떨어지는 것을 방지하는 역할을 하며, 예컨대 히드라진계 환원제 또는 알데하이드계 환원제를 포함한다. 상기 히드라진계 환원제는 히드라진, 히드라진 수화물, 히드라진 설페이트, 히드라진 카보네이트 및 히드라진 하이드로클로라이드를 포함하고, 알데하이드계 환원제는 포름알데하이드, 아세트알데하이드, 프로피온 알데하이드를 포함하며 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 다양한 CNT 전극 패턴을 잉크젯 프린터로 인쇄하기 위해 다중벽(multiwall) CNT에 분산제를 넣고 볼밀링(ball milling) 작업을 통해 물에 고르게 분산된 CNT 잉크를 만들 수 있다. 포토샵 또는 CAD 등과 같은 프로그램을 이용하여 전극 도면을 그리고 원하는 모양의 전극 도면을 일반 A4용지 또는 사진 인쇄용지에 인쇄한다.

- [0022] 본 발명의 제1부위는 인쇄된 전극을 포함하는 활성영역(active zone)을 포함한다. 상기 활성영역은 분석시료, 블로킹(blocking) 완충액, 항체, 기질 및 세척완충액으로 구성된 군으로부터 선택되는 유체가 접촉되는 영역을 의미한다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 활성영역은 유체가 이동하기 위한 평행하는 복수의 전극을 포함하고, 상기 유체는 평행하는 복수의 전극에 대하여 수직 방향으로 제2부위를 향해 이동한다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 활성영역의 복수의 전극에 전기를 인가하여 전기습윤법을 통해 유체를 제2부위로 이동시킨다. 상기 전기습윤법으로 물방울의 움직임을 전기로 제어하는 기술로, 고체 및 전해액(electrolyte)의 인가된(applied) 전위차에 의해 고체-전해액 연결각을 변화시키는 기술이다. 상기 전기습윤법에 대한 원리는 당해 분야에 공지되어 있다(Chang, H.C., Yeo, L. (2009). Electrokinetically Driven Microfluidics and Nanofluidics. Cambridge University Press; Kirby, B.J. (2010). Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices.. Cambridge University Press. ISBN 978-0-521-11903-0; A Model of Electrowetting, Reversed Electrowetting and Contact Angle Saturation. Dan Klarman, David Andelman, Michael Urbakh 및 Experimental Validation of the Invariance of Electrowetting Contact Angle Saturation).
- [0025] 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩은 제1부위의 인쇄된 전극을 포함하는 활성영역(active zone) 및 제2부위의 (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체가 고정된 시험영역(test zone)을 단일 또는 다수 포함한다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 목적하는 검출대상에 따라 적용되는 유체의 수에 대응하는 수의 활성영역 및/또는 시험영역을 포함한다.
- [0027] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 다양한 유체를 적용할 수 있는 단일 활성영역 및/또는 시험영역을 포함한다.
- [0028] 상기에 대한 일 예를 도 6a 및 6b에 나타낸다.
- [0029] 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩은 (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체가 고정되어 있으며, 항원-항체 면역반응이 발생하는 제2부위를 포함한다. 상기 제2부위는 제1부위와 맞닿아(in contact) 있으며, 전기습윤법에 의해 상기 제1부위에 접촉된 유체가 제2부위로 이동한다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 제2부위는,
- [0031] (i) 분석시료 내 검출대상 항원이 고정되어 있으며, 상기 제1부위의 활성영역을 통해 상기 항원에 대한 항체를 이동시키고, 세척완충액 및 기질을 적용하여 상기 분석시료 내 검출대상 항원을 검출한다(Direct ELISA).
- [0032] (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원이 고정되어 있으며, 상기 제1부위의 활성영역을 통해 분석시료를 이동시키고, 2차 항체, 세척완충액 및 기질을 적용하여 상기 분석시료 내 검출대상 항체를 검출한다(Indirect ELISA).
- [0033] (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체가 고정되어 있으며, 상기 제1부위의 활성영역을 통해 분석시료를 이동시키고, 1차 항체, 세척완충액, 2차 항체, 세척완충액, 및 기질을 적용하여 상기 분석시료 내 검출대상 항원을 검출한다(Sandwich ELISA).
- [0034] 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩은 (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체가 고정되어 있는 제2부위를 갖는다.
- [0035] 상기 분석시료는 특정 단백질, 혈액, 혈청, 혈장, 소변, 복수를 포함하는 체액, 조직 추출액 및 세포 추출액을 포함하며 이에 한정되지 않는다.
- [0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제2부위는 항원-항체 면역반응이 발생한다.
- [0037] 본 발명에서 "항체"란 항원에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 제1부위에 고정된 항원에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항

체를 모두 포함한다.

- [0038] 항체를 생성하는 것은 당업계에서 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 다클론 항체는 상기의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 제조 가능하다. 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) *European Journal of Immunology* 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628, 1991; Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.
- [0039] 또한 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0040] 본 발명에서 "항원"이란 항체에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항원은 제2부위에 접촉된 항체에 대해 특이적으로 결합하는 항원을 의미한다.
- [0041] 상기 항원 및 항체는 단백질, 박테리아 또는 바이러스에 대한 항원 및 항체이다. 예컨대, 상기 단백질은, HCG(Human Chorionic Gonadotropin), FSH(Follicle-stimulating Hormone), LH(Luteinizing hormone) 및 BNP(Brain Natriuretic Peptide)를 포함하며 이에 한정되지 않는다. 상기 박테리아는 이스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*), 예르세니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 신젤라 플렉스네리(*Shigella flexnerii*), 프레포넬라 덴티콜라(*Treponema denticola*), 비브리도 콜레라(*Vibrio cholerae*), 비브리오 볼리피커스(*Vibrio vulnificus*), 비브리오 파라헤몰라이티커스(*Vibrio parahaemolyticus*), 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumoniae*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스탕필로코커스 에피데르미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코커스 아가락티아(*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 스트렙토코커스 피오제네스(*Streptococcus pyogenes*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 보데텔라 브론치세프티카(*Bordetella bronchiseptica*), 보데텔라 퍼투시스(*Bordetella pertussis*), 보데텔라 파라페르투시스(*Bordetella parapertussis*), 헬리코박터 헤파티커스(*Helicobacter hepaticus*), 헬리코박터 피로리(*Helicobacter pylori*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 랄스토니아 솔라나시럼(*Ralstonia solanacearum*), 산토모나스 캄페스트리스(*Xanthomonas campestris*), 슈도모나스 시린개(*Pseudomonas syringae*), 파스튜렐라 물토시다(*Pasteurella multocida*), 브루셀라 멜리텐시스(*Brucella melitensis*), 브루셀라 수이스(*Brucella suis*), 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 톡소플라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 리스테리아 모노사이토지네스(*Listeria monocytogenes*), 프로피오니박테리움 아크네(*Propionibacterium acnes*), 해모필러스 듀크레이(*Haemophilus ducreyi*), 해모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*), 네이세리아 고노로에(*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 모락셀라 카타랄리스(*Moraxella catarrhalis*), 아그루박테리움 튜메페이스엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 헬리코박터 종(*Helicobacter spp.*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 파라튜버쿨로시스(*Mycobacterium paratuberculosis*), 마이코박테리움 레프래(*Mycobacterium leprae*), 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*), 콕시엘라 벌네티(*Coxiella burnetii*), 레기오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*), 가드넬라 바기날리스(*Gardnerella vaginalis*), 플라즈모디움 팔시파럼(*Plasmodium falciparum*), 플라즈모디움 오발(*Plasmodium ovale*), 지아디아 람블리아(*Giardia lamblia*) 또는 플라즈모디움 요엘리(*Plasmodium yoelii*)이며, 이에 한정되지 않는다. 상기 바이러스는 SARS(Severe Acute Respiratory Syndrome), 코로나바이러스(SARS coronavirus), 호흡기 세포융합 바이러스(Respiratory Syncytial Virus), A형 간염 바이러스(Hepatitis A virus), B형 간염 바이러스(Hepatitis B virus), C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus), 루벨라 바이러스(Rubella virus), 헤르페스 바이러스(Herpes Simplex Virus), 인플루엔자 바이러스(Influenza virus), 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus), 파필로마 바이러스(papilloma virus), 뎅기 바이러스(Dengue virus), 수족구병 바이러스(Foot and Mouth Disease virus), 웨스트나일 바이러스(West Nile virus), 조류독감 바이러스(Avian influenza virus), 로타 바이러스(rotavirjs), 파라믹소바이러스(paramyxovirus) 또는 면역결핍 바이러스(Human immunodeficiency virus)이며, 이에 한정되지 않는다.

- [0042] 본 발명의 상기 제2부위의 항원-항체 면역반응에 의한 항원-항체 복합체 형성의 검출 또는 측정은 형성된 항원-항체 복합체를 직접적으로 검출하여 실시할 수 있으나, 바람직하게는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 이용하여 실시한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 검출항체에는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있거나 친화성 물질이 결합되어 있다. 상기 레이블은 효소(예컨대, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스래디쉬 퍼옥시다아제, β -글루코시다아제 및 사이토크롬 P₄₅₀), 방사능물질(예컨대, C¹⁴, I¹²⁵, P³² 및 S³⁵), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 검출항체에 결합하는 레이블로서 발색반응을 촉매하는 효소가 이용되는 경우에는, 효소반응에 이용되는 기질을 본 발명의 측정 시스템에 첨가하여 반응 생성물을 측정하여, 항원-항체 복합체를 검출할 수 있다. 예를 들어, 레이블로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용될 수 있고, 호스래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시제닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), TMB(3,3,5,5-tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) 및 σ -페닐렌디아민(OPD)과 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 면역분석용 미세유동 칩의 제1부위에 접촉되는 유체 중 항체는 발색반응을 촉매하는 효소가 결합되어 있다.
- [0045] 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩의 특징 중 하나는 취급 및 절단이 용이한 고상 기판을 사용하여 다양한 전자도면을 용이하게 얻을 수 있다. 상기 제1부위는 당업계에서 이용되는 다양한 고상 기판을 이용할 수 있으며, 예컨대 취급이 용이한 종이(예: 일반 A4 용지, 사진 인화용지), 필름(예: OHP 필름) 또는 플라스틱 시트를 포함하며, 일 구현예에 따르면, 상기 제1부위는 종이 또는 필름이며, 다른 구현예에 따르면 상기 제1부위는 종이이다.
- [0046] 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩의 (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체가 고정되는 제2부위는 당업계에서 이용되는 다양한 고상 기판을 이용할 수 있으며, 예컨대 취급이 용이한 종이(예: 일반 A4 용지, 사진 인화용지), 필름(예: OHP 필름) 또는 플라스틱 시트를 포함하며, 일 구현예에 따르면, 상기 제2부위는 종이 또는 필름이며, 다른 구현예에 따르면 상기 제2부위는 종이이다.
- [0047] 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩의 제1부위는 상기 전극 도면 상에 절연층을 형성하기 위하여 추가적으로 절연체를 증착시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0048] 상기 절연체는 유리, 자기(porcelain) 또는 폴리머 조성물을 사용할 수 있으며, 다른 구현예에 따르면, 폴리머 조성물이다. 절연체로서 폴리머 조성물을 사용하는 경우 파릴렌을 사용할 수 있으며, 예컨대 파릴렌 N, 파릴렌 C, 파릴렌 D, 파릴렌 F를 사용할 수 있으며, 특정 구현예에 따르면, 파릴렌 C이다.
- [0049] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 전극 도면 상에 추가적으로 보강 재료를 코팅하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 코팅은 스펠 코팅, 스프레이 코팅 또는 프린팅에 의하여 복수의 칩들 표면의 적어도 일부 영역에 형성될 수 있다. 또한 상기 코팅은 물리적 기상 증착법(physical vapor deposition), 화학적 기상 증착법(chemical vapor deposition) 또는 도금(electroplating)에 의하여 복수의 칩들 표면의 적어도 일부 영역에 형성될 수 있다.
- [0050] 상기 보강 재료는 본 발명의 미세유동 칩을 사용하는 과정 중 열, 압력 등에 견딜 수 있도록 하는 기능을 하며, 당업계에 공지된 다양한 물질을 사용할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 폴리테트라플루오로에틸렌이다.
- [0051] 본 발명의 상기 분석시료는 혈액, 혈장, 혈청, 림프, 타액, 소변, 분변, 안구액, 정액, 복수 또는 양막액이다.
- [0052] 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩의 제2부위는 상단에 유체의 유동성을 증가시키기 위해 여과막을 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0053] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 여과막은 유리 여과막인 것을 특징으로 한다.
- [0054] 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩의 제2부위는 하단에 스페이서(spacer) 및 흡착패드를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0055] 상기 스페이서는 상기 미세유동 칩의 제2부위와 흡착패드 사이의 공간(gap)을 위해 포함된다. 상기 스페이서는 테이프, 종이, 필름 또는 부직포로 제조될 수 있으며 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 스페이서는 테이프이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 스페이서는 양면 테이프이다.
- [0056] 상기 흡착패드는 세척 완충액과 같은 많은 양의 유체를 적용한 경우에 이의 제거를 위해 포함된다. 상기 흡착패드는 섬유 패드, 거즈(gauze) 스폰지 또는 솜 등의 액체를 흡수할 수 있는 모든 것으로 제조될 수 있으며 한정되지 않는다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 흡착패드는 섬유 패드이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 흡착패드는 셀룰로우스 섬유 패드이다.
- [0057] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 면역분석용 미세유동 칩을 포함하는 진단 키트를 제공한다.
- [0058] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 진단 키트는 항체-항원 반응에 의해 분석시료 내 검출대상을 검출한다.
- [0059] 본 발명의 또다른 양태에 따르면, (a) 상기 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 면역분석용 미세유동 칩의 제2부위에 (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체를 고정하는 단계; (b) 상기 제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 면역분석용 미세유동 칩의 상기 제1부위에 분석시료, 블로킹(blocking) 완충액, 항체, 기질 및 세척완충액으로 구성된 군으로부터 선택되는 유체(fluid)를 접촉하여, 상기 단계 (a)의 (i) 분석시료 내 검출대상 항원, (ii) 분석시료 내 검출대상 항체에 대한 항원, 또는 (iii) 분석시료 내 검출대상 항원에 대한 항체에 대한 항원-항체 면역반응을 발생시키는 단계; 및 (c) 상기 항원-항체 면역반응을 검출하는 단계를 포함하는 면역분석 방법을 제공한다.
- [0060] 본 발명의 면역분석 방법은 상기 면역분석용 미세유동 칩을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0061] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0062] (a) 본 발명은 면역분석용 미세유동 칩을 제공하는 데 있다.
- [0063] (b) 기존에 사용되는 칩의 경우, 대부분 기질이 유리이나, 본 발명은 기질로서 종이를 활용하여 용이하게 절단이 가능하고 절단을 통해 시험영역(test zone)에 사용되는 여과지와 용이하게 조립이 가능하다.
- [0064] (c) 본 발명의 면역분석용 미세유동 칩은 자동화 프로그램을 이용해서 샘플의 이동 시간 및 위치를 제어할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0065] 도 1은 CNT(Carbon Nano Tube) 잉크로 인쇄한 종이 칩 도면을 보여준다.
- 도 2는 나열된 전극 위에서의 물방울의 움직임을 모식적으로 나타낸다.
- 도 3은 종이 칩 상에 위치한 항-래빗 IgG 항체, 세척용 완충액 및 발색시약(BCIP/NBT)을 나타낸다.
- 도 4는 다양한 농도의 래빗 IgG를 고정한 시험영역(test zone)의 발색반응을 보여준다.
- 도 5는 래빗 IgG 농도의존적 발색반응을 Image J로 측정하여 그래프로 나타낸다.
- 도 6a 및 6b는 다양한 유체를 적용할 수 있는 단일 활성영역 및/또는 시험영역을 포함하는 미세유동 칩의 예시를 보여준다.

도 7은 전자패턴이 인쇄된 종이 칩을 나타낸다. 검은색부분은 탄소나노튜브 잉크에 의해 프린팅된 부분이고, 검정색 부분이 크게 설계한 이유는 그 부분에 구멍을 만들게 되는데 액적이 홀(hole)로 잘 들어가기 위해서 전압을 가할 필요가 있기 때문에 위와 같이 설계하였다.

도 8은 종이 칩의 시험영역에 유리여과 막 및 흡수패드를 부착한 모식도 및 이미지를 보여준다.

도 9는 종이 칩에 추가적으로 부착한 흡수패드의 반응 용액의 양에 따른 흡수 여부를 모식도로 나타낸다.

도 10은 본 발명의 종이 칩을 활용한 임신진단테스트의 민감도를 확인한 결과 및 사용된 종이 칩을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0067] 실시예 1: 종이 칩 제조

[0068] 탄소나노튜브(CNT) 잉크의 제작

[0069] 전극 패턴을 인쇄하기 위해 CNT(Carbon Nano Tube)를 이용하여 잉크를 제작하였고, 종이 위에 인쇄한 후 전극으로 사용하였다. 상기 CNT 전극을 잉크젯 프린터로 인쇄하기 위해 먼저 다중벽(multiwall) CNT에 분산제를 넣고 볼밀링(ball milling) 작업을 통해 물에 고르게 분산된 CNT 잉크를 제조하였다. 전극으로 사용하기 위해서는 일정량 이상의 전도도가 요구되는데, 본 발명에서는 CNT 전극은 일반 A4 용지 위에서 1 k Ω /sq의 저항을, 사진 인화용지 위에서 200 Ω /sq의 저항 값을 얻어 전극으로 사용하기에 충분한 전도도를 보였다.

[0070] 탄소나노튜브(CNT) 잉크를 이용한 디지털 마이크로 유체 종이 칩 제작

[0071] 디지털 마이크로 유체 종이 칩의 제작에 사용할 전극 패턴을 제작하기 위하여 포토샵이나 CAD 등과 같은 프로그램을 이용하여 도면을 그리고, 원하는 모양의 전극을 일반 A4용지 또는 사진 인화용지에 잉크젯 프린터 및 상기 CNT 잉크를 이용하여 수십 μ m 해상도로 인쇄하였다(도 1).

[0072] 이후, 인쇄된 도면에서 시험영역(test zone)에 구멍을 뚫고, 그 위에 절연층을 씌우기 위해 파릴렌 C(parylene C)를 증착시키고 테플론(Teflon) AF1600을 스핀코팅(spin coating)해주었다. 상기 파릴렌 C 및 테플론이 증착된 종이 칩의 전극 패턴 상에 물방울을 떨어뜨리고 전압(V)을 걸어준 경우, 도 2에서와 같이 칩 표면에서 물방울의 움직임을 조절할 수 있음을 확인하였다.

[0073] 실시예 2: ELISA

[0074] 실험방법

[0075] 래빗 IgG(I5006 및 I8140, Sigma aldrich)를 PBS(Phosphate buffered saline)를 이용하여 다양한 농도(0, 7.6, 13, 37 및 77 fmol)로 희석하였다. 여과지(filter paper, Whatman No.1)로 제조한 직경 6 mm의 시험영역 상에 래빗 IgG를 3 μ l 떨어뜨렸다. 상온에서 10분 동안 반응하여 종이 상에 래빗 IgG를 고정시켰다. 시험영역에 블로킹 완충액(Blocking buffer; 0.05% (v/v) Tween and 5% BSA in PBS) 3 μ l씩 떨어뜨려 상온에서 10분 동안 반응하였다.

[0076] 종이 칩의 시험영역 위치에 래빗 IgG가 고정되고 블로킹된 여과지를 위치하였다. 각 샘플[항-래빗 IgG 항체(A9919, Sigma aldrich), 세척용 완충액(79383, Sigma aldrich) 및 BCIP/NBT(B5655, Sigma aldrich)]을 상기 실시예 1에서 제조한 종이칩의 각자의 위치에 떨어뜨렸다.

[0077] ALP(alkaline phosphatase)가 결합되어 있는 항-래빗 IgG 샘플을 시험영역으로 이동시켰다. 종이 칩에 위치한 항-래빗 IgG 항체는 전기습윤법에 의해 제 2부위(시험영역)로 이동시키고, 이어서 유체 즉, 항-래빗 IgG가 제 2부위 만나는 순간 종이(filter paper)안의 섬유질 모세관으로 항-래빗 유체가 종이 전체부분으로 옮겨가게 된다. 1분 후, 결합하지 못한 항-래빗 IgG를 제거하기 위해 세척용 완충액(PBS)을 시험영역으로 이동시켰다

(도 3). 기질 반응 용액인 BCIP/NBP를 시험영역으로 이동시키고, 상온에서 7분 동안 반응시켜 색깔 변화를 유도하였다(도 3). 각 처리 과정의 시약 부피 및 반응 시간을 표 1에 나타내었다.

표 1

처리	부피(μ l)	시간(분)
1) 항원 고정	3	10
2) 블로킹(blocking)	3	10
3) 항원-항체 반응	3	1
4) 신호 증폭	3	7
합계	12	28

사진을 찍은 후, Image J 프로그램을 이용하여 발색 강도를 측정하였다(도 4).

특이성 및 민감성

시험영역 상에 래빗 IgG(0, 7.6, 13, 37 및 77 fmol)을 고정시킨 후, 블로킹을 하였다. 다음, ALP가 결합되어 있는 항-고트 샘플을 반응하도록 시험영역으로 이동시켰다. 1분 후, 결합하지 않은 항체를 제거하기 위해 세척 완충액을 시험영역으로 보냈다. 색 변화를 유도하기 위해 기질 용액을 이동시켰다.

종이 칩의 민감성을 측정하기 위해 다음의 방법을 실시하였다:

(1) 래빗 IgG를 PBS를 이용하여 1:100로 희석하였다(항원의 농도 같은 상태로 유지, 1차 항체 농도를 조절해서 측정).

(2) Whatman No.1 여과지를 사용하여 만든 시험 영역 위에 희석한 IgG를 3 μ l 떨어뜨린다. 이때, 여과지는 펀치를 이용하여 직경 6 mm 원을 제조하였다.

(3) 상온에서 10분 동안 반응하여 종이에 래빗 IgG를 고정시켰다.

(4) 시험영역에 블로킹 완충액 3 μ l씩 떨어뜨려 상온에서 10분 동안 반응하였다.

(5) 종이 칩에 시험영역으로 사용되는 여과지를 조립하였다.

(6) 각 샘플을 움직이기 전에 먼저 항원을 고정시키고 블로킹을 한 다음, 각각의 샘플을 각자의 위치에 떨어뜨렸다. 각각의 샘플은 항-고트 IgG in rabbit (ALP 결합 항체)(0, 7.6, 13, 37 및 77 fmol), 항-래빗 IgG in goat(ALP 없음), 세척 완충액 및 기질 반응 용액이다.

(7) 각각의 샘플(항-고트 IgG, 항-래빗 IgG, 세척 완충액 및 BCIP/NBP)을 각자의 위치에 로딩하였다.

(8) ALP가 결합되어 있지 않는 항-래빗 IgG 샘플을 시험영역으로 이동시켰다

(9) 3분 후, 결합하지 못한 항-래빗 IgG를 제거하기 위해 세척 완충액(PBS)을 시험영역으로 이동시켰다.

(10) ALP가 결합되어 있는 항-고트 IgG 샘플을 시험영역으로 이동시켰다.

(11) 2분 후, 결합하지 못한 항-고트 IgG를 제거하기 위해 세척 완충액(PBS)을 시험영역으로 이동시켰다.

(13) 기질 반응 용액인 BCIP/NBP를 시험영역으로 이동시켜, 상온에서 7분간 반응 후 색깔 변화를 유도하였다.

(14) 휴대폰을 이용하여 사진을 찍은 후, Image J 프로그램을 이용하여 발색 된 색의 강도를 측정하였다.

결과

종이 칩 위에서 항원-항체 반응을 하기 위해, 샘플의 이동 영역 및 시험영역(test zone)으로 구분하였다. 시험영역으로 사용하기 위해서는 반응 후 시료의 제거가 용이해야 되는데, 본 발명에서 종이 칩은 종이로 만들어졌기 때문에 모세관 현상을 이용하여 쉽게 샘플을 제거할 수 있다.

항원-항체 반응에 사용된 용액은 반응 순서에 따라 이동하여, 시험영역에서 반응하였다. 마지막으로 기질 반응 용액이 시험영역으로 이동하면 항원 농도에 따른 발색 정도를 구분할 수 있었다.

[0099]

특이성 및 민감성

[0100]

기질 용액을 통해 색의 변화는 미비하며, 그 변화는 백그라운드 색과 일치하였다. (실제로 항원이 고정되어있지 않고 블로킹만 할 경우에도 색이 미세하게 나타나는데 이는 종이의 특성상 ALP가 결합되어있는 항체를 완벽하게 제거하지 못하기 때문이다.) 이 결과는 항-레빗에만 반응하다는 것을 알 수 있다.

[0101]

또한, 대조군의 표준편차를 얻어 검출가능 최저농도인 56 fmol/zone을 결정하였다.

[0102]

실시예 3: 임신진단테스트 적용

[0103]

실험재료

[0104]

항-hCG 항체(ab400) 및 HRP 결합된 항-hCG 항체(ab30451)는 abcam사로부터 구매하였고, BSA (Bovine serum albumin, A7906) 및 hCG 키트(SE120063)는 sigma사로부터 구매하였다. Tween 20(p1754) 및 TMB(T0440)는 sigma사로부터 구매하였고, PBS 완충액(10010-023 PBS pH 7.4 1×)은 gibco사로부터 구매하였다.

[0105]

실험방법

[0106]

전자패턴이 인쇄된 종으로 제조된 칩에 구멍(시험영역)을 낸 후, 액체 상태의 샘플이 잘 흡착될 수 있도록 유리 필터 멤브레인을 구멍에 삽입하였다(도 7). 또한 시험 영역과 흡수패드 사이에 공백을 주어 작은 양의 샘플의 경우 시험영역에 머물고, 많은 양의 세척 완충액의 경우 흡수패드를 터치해서 시험영역으로부터 제거가 가능할 수 있도록 고안하였다(도 8 및 9). 공백을 주기 위해 양면테이프를 사용하였다. 제조된 종이칩을 임신진단 테스트로서의 적용성을 알아보았다.

[0107]

(1) hCG를 PBS를 이용하여 다양한 농도로 희석한다.

[0108]

(2) Whatman No.1 여과지를 왁스 프린터를 이용하여 시험영역을 제조하였다. 상기 왁스 프린터는 고체 프린터(solid printer)로, 일반적인 잉크젯 프린터에 들어가는 액체타입의 잉크 대신 고체타입의 왁스가 들어가 열을 가해 액체 상태로 만들어 프린팅하게 된다(<http://www.xeroxprinters.co.kr/product/solidprinter.asp>).

[0109]

(3) 0.1% (w/v) 키토산(448877, sigma)을 0.5% 아세트산에 용해하여 시험영역(직경 6 mm의 여과지)에 4 μ l 떨어뜨렸다.

[0110]

(4) 글루타르알데하이드 0.25%를 포함하는 PBS 20 μ l를 떨어뜨려 키토산을 가교(crosslinking)시켰다. 상기 키토산의 처리는 항체를 화학적으로 고정시키기 위해서 실시하였다. 키토산의 -NH 및 -OH에 항체의 카르복실기가 결합하여 고정된 항체는 세척과정에서 덜 손실된다.

[0111]

(5) 초순수 20 μ l를 이용하여 3회 세척한 후, 건조시켰다.

[0112]

(6) 종이 칩의 시험영역의 위치에 시험영역으로 사용되는 여과지를 조립하였다. 각각의 샘플(항-hCG 항체, hCG, HRP 결합된 항-hCG 항체, 블로킹 완충액(BSA in PBS), 세척 완충액(PBS) 및 기질 반응용액(TMB))을 이동 영역의 각 위치에 떨어뜨렸다.

[0113]

(7) 시험영역이 마르면 전자 패턴 상에 위치시키고 항-hCG 항체 6 μ l의 이동 영역에 전압을 인가하여 시험영역으로 이동시켜 상온에서 30분 동안 고정시켰다.

[0114]

(8) 시험영역에 5% BSA를 포함하는 0.025% Pluronic L64 블로킹(Blocking) 완충액 3 μ l씩 이동 영역에 전압을 인가하여 시험영역으로 이동시켜 상온에서 5분 동안 반응시켰다.

[0115]

(9) 결합하지 못한 항-hCG 항체 및 BSA를 제거하기 위해 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS 10 μ l를 이동 영역에 전압을 인가하여 시험영역으로 이동시켜 세 번 세척하였다.

[0116]

(10) 다양한 농도로 희석한 hCG를 3 μ l씩을 이동 영역에 전압을 인가하여 시험영역으로 이동시켜 5분 동안 반응시켰다.

[0117]

(11) 결합하지 못한 hCG를 제거하기 위해 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS 10 μ l를 이동 영역에 전압을 인가하여 시험영역에서 세 번 세척하였다.

- [0118] (12) HRP 결합된 항-hCG 항체를 1000배 희석한 후, 시험영역에 3 μ l을 이동 영역에 전압을 인가하여 시험영역으로 이동시켜 상온에서 5분 동안 반응시켰다.
- [0119] (13) 결합하지 못한 HRP 결합된 항-hCG 항체를 제거하기 위해 0.05% Tween 20을 포함하는 PBS 10 μ l를 이동 영역에 전압을 인가하여 시험영역으로 이동시켜 3회 세척하였다.
- [0120] (14) 기질 반응 용액인 TMB를 시험 영역에 3 μ l을 이동 영역에 전압을 인가하여 시험영역으로 이동시켜 상온에서 10분 동안 반응시켜 색깔 변화를 유도하였다.
- [0121] (15) 휴대폰을 이용하여 사진을 찍은 후, Image J 프로그램을 이용하여 발색 된 색의 강도를 측정하였다.

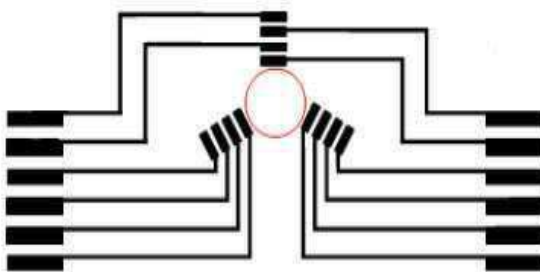
[0122] 실험 결과

- [0123] 항원-항체 반응에 사용된 용액은 반응 순서에 따라 이동하여, 시험영역에서 반응하였다. 마지막으로 기질 반응 용액이 시험영역으로 이동하면 항원농도에 따른 발색 정도를 구분할 수 있었다. hCG 농도에 따른 발색 강도를 그래프로 나타내면 선형라인을 얻을 수 있으며 이로부터 검출한계(Limit of Detection; LOD) 5.81743 mIU/ml을 구할 수 있었다(도 10).

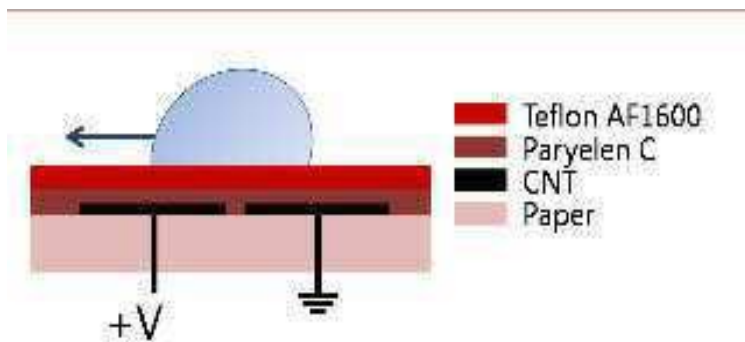
- [0124] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

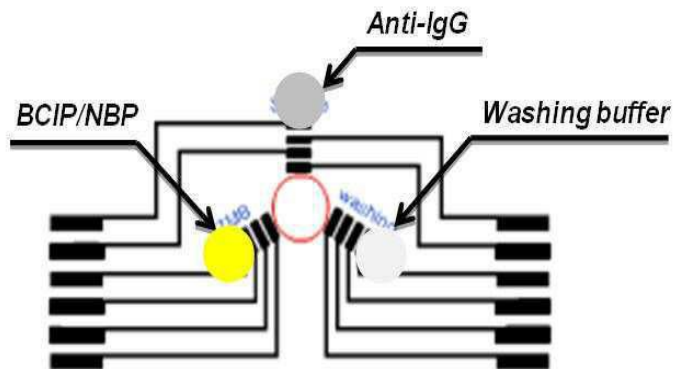
도면1



도면2



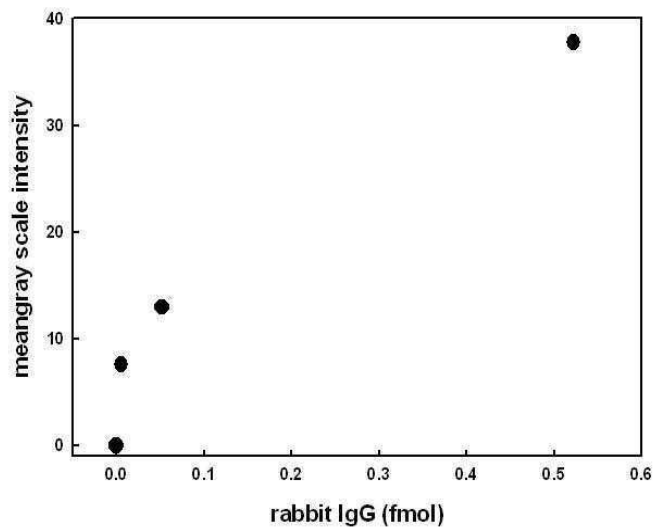
도면3



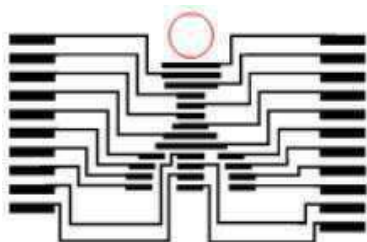
도면4



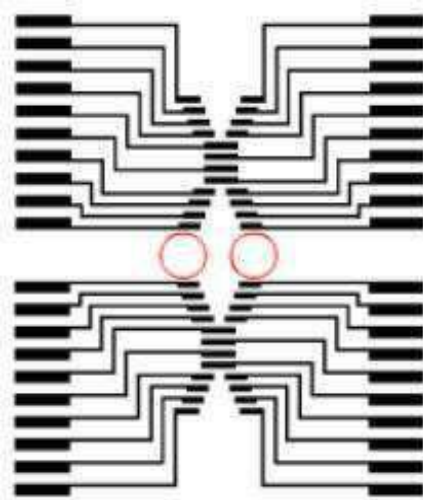
도면5



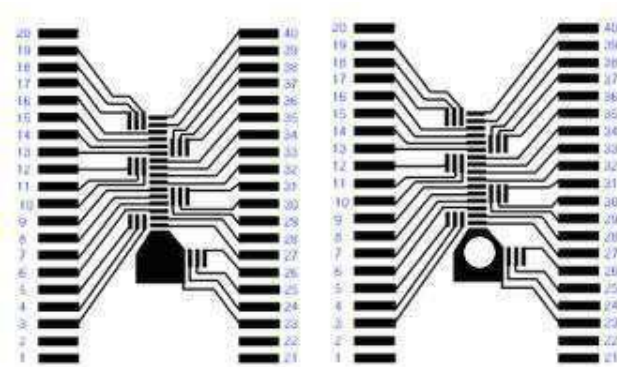
도면6a



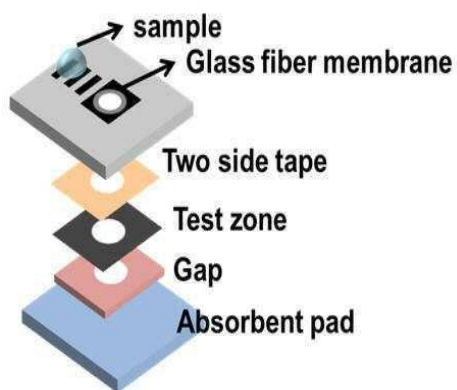
도면6b



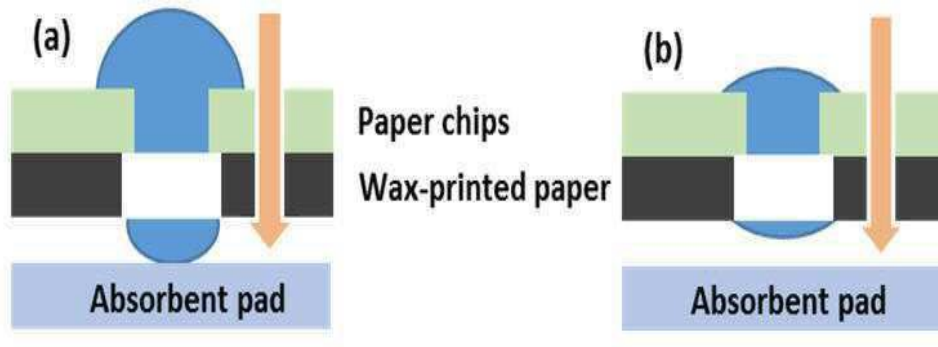
도면7



도면8



도면9



도면10

