

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0089996 (43) 공개일자 2014년07월16일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) B81C 1/00 (2006.01) G01N 35/08 (2006.01) G01N 27/26 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(21) 출원번호 10-2013-0002173	(72) 발명자 박정호 서울특별시 성동구 왕십리로 36 (성수동1가, 건영아파트) 101동 804호	
(22) 출원일자 2013년01월08일 심사청구일자 2013년01월08일	남윤경 대전광역시 서구 둔산북로 215 (둔산동, 가람아파트) 1동 1506호	
	김태현 부산광역시 부산진구 가야공원로 41 (가야동, 가야반도보라빌) 105동 202호	
	(74) 대리인 송경근	

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 유리비드 혼합몰드를 이용한 미세채널 제조방법 및 이 미세채널을 이용한 면역센서

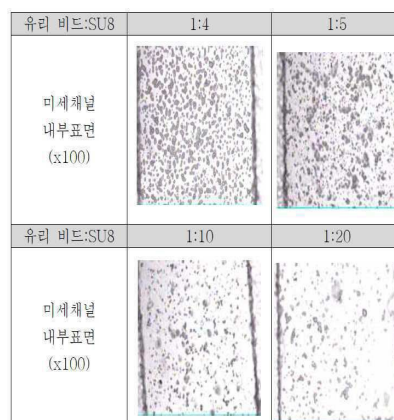
(57) 요약

본 발명은 면역센서용 PDMS 미세채널을 제조하는 방법에 있어서, 몰드의 제조시 기존의 SU8 몰드 대신 유리비드-SU8의 혼합몰드를 사용한 것을 특징으로 한다.

본 발명의 미세채널 제조방법은, SU8대신 유리 비드-SU8 혼합물을 사용하고 웨이퍼에 O₂ 플라즈마 처리를 하는 것 외에는 기존의 SU8 몰드 제작 공정과 동일한 공정으로 진행되고, 미세채널 내부표면의 변형을 위하여 복잡한 공정이 추가되지 않는다는 점에서 유리하다.

또한, 본 발명의 미세채널 제조방법에 의하면, 항체를 효율적으로 고정시키도록 넓은 표면적을 가질 뿐 아니라, 표면의 소수성이 높은 PDMS 미세채널을 얻을 수 있으며, 이러한 미세채널은 그 내부에 단백질 입자를 효과적으로 고정시킬 수 있으므로, 면역센서로서 활용가능성이 높다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 T11200129G0110000000000000

부처명 한국환경산업기술원

연구사업명 글로벌탑 환경기술개발사업

연구과제명 [2차년도-국고] 차세대 상수관망 통합관리시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

감광성 물질과 유리비드의 혼합물을 기재에 코팅하고 혼합몰드를 제조하는 단계와, 상기 혼합몰드에 경화성 고분자를 투입하여 미세채널을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역센서용 미세채널 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기한 감광성 물질은 SU8이고, 상기한 경화성 고분자는 PDMS(Polydimethylsiloxane)인 것을 특징으로 하는, 면역센서용 미세채널 제조방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기한 유리비드의 지름은 9 ~ 13 μm 인 것을 특징으로 하는, 면역센서용 미세채널 제조방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기한 유리비드와 SU8의 혼합비는 부피비로 1:4 내지 1:20 인 것을 특징으로 하는, 면역센서용 미세채널 제조방법.

청구항 5

청구항 2에 있어서, SU8와 유리비드의 혼합물을 기재에 코팅하기 전에, 전처리로서 상기 기재에 산소플라즈마 처리를 하는 것을 특징으로 하는 면역센서용 미세채널 제조방법.

청구항 6

면역센서용 미세채널을 제작하기 위한 몰드로서, 감광성 물질과 유리비드의 혼합물로 구성된 것을 특징으로 하는, 미세채널 제조용 혼합몰드.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 감광성 물질은 SU8이고, 상기 미세채널은 PDMS 미세채널인 것을 특징으로 하는, 미세채널 제조용 혼합몰드.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의하여 제조된 미세채널 및 상기 미세채널의 표면에 고정된 형광표시된 생체분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역센서.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 생체분자는 항체인 것을 특징으로 하는 면역센서.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 전기화학적 면역센서용 미세채널의 내부 표면의 기능화 방법 및 이러한 방법에 의해 제조된 미세채널(microchannel)을 이용한 전기화학적 면역센서에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 전기화학적 면역센서 제작을 위하여 항원·항체 등과 같은 생체 분자를 금전극 표면에 고정하기 위한 보편적 방법으로 자기조립단분자막(Self assembly monolayers, SAMs) 형성이 많이 이용된다. 이 방법은 고체표면에 자발적으로 형성되는 유기 단분자막을 형성하여 분자층들은 그 자체로서 표면의 성질을 변형시키기도 하고, 바이오 물질을 비롯한 여러 가지 기능성 물질과 선택적 결합을 할 수 있는 다양한 형태의 표면을 만들 수 있어 매우 중

요하게 인식되고 있다.

- [0003] 하지만 이 SAMs 자체가 전기 활성 물질들 간의 직접적인 전하이동을 막음으로써 전기신호를 줄이는 전극 파울링(electrode fouling)의 원인이 된다. 이것은 전기화학적 센서의 민감도 저하를 초래하기 때문에 이 문제를 해결하기 위해 Polydimethylsiloxane (PDMS) 채널 내부를 기능화하는 많은 기술들이 시도되었다. 하지만 이런 방법들은 고가의 장비를 이용하거나 바이오 또는 화학물질을 이용한 복잡한 공정을 요구한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2011-0017597호(채널 형성방법) : 특허문헌 1은 PDMS 채널을 형성하는 방법에 있어서, 몰드 표면에, 그 단면이 소정의 가로세로의 비로 되는 복수 개의 홈 형상의 패턴을 소정 간격으로 이격시켜 형성하는 제1 단계, 몰드 표면에 PDMS를 부어 홈 형상의 패턴에 PDMS를 채워, PDMS 몰드를 형성하는 제2 단계, 몰드 표면과 PDMS 몰드를 분리하는 제3 단계를 포함하고, 제3 단계에서는, 복수 개의 홈 형상의 패턴에 의하여 형성된 PDMS 몰드가 반데르 발스힘에 의하여 들러붙어 채널이 형성되는 방법을 개시하며, 홈 형상의 패턴을 만들기 위해 형틀에 조직 격자를 사용한다.
- (특허문헌 0002) 한국공개특허 제2010-10078호(양 벽에 홈이 설치된 미세채널) : 특허문헌 2는 분석화학, 생명공학 분야에 있어서, 미세채널을 이용하여 랩온어칩 또는 미세유동칩 내의 유동을 효과적으로 제어하는 기술과 관련하여, 양 벽에 홈(groove)이 설치된 미세채널을 개시한다.
- (특허문헌 0003) 미국공개특허 제2012-0168010호(MICROFLUIDIC DEVICES) : 특허문헌 3은 미세유동장치의 채널의 내벽에 다층재료를 증착하는 방법으로서, 광원을 조사하여 상기 내벽을 친수성으로 하는 전처리 이후에, 소수성으로 회복되는 단계를 포함하며, PDMS 미세채널 표면의 개질을 위해 채널 내벽에 직접 재료를 증착하는 것을 특징으로 한다.

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) A. Ulman, "Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers", Chem. Rev., 96, 1996
- (비특허문헌 0002) J. Zhou, "Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices", Electrophoresis, 31, 2010
- (비특허문헌 0003) S. J. Kwon et al., "An electrochemical immunosensor using ferrocenyl-tethered dendrimer", Analyst., 131, 2006
- (비특허문헌 0004) Y. Gao et al., "Development of a novel electrokinetically driven microfluidic immunoassay for the detection of Helicobacter pylori", Anal Chim, 543, 2005

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 면역센서 등에 사용되는 PDMS 미세 채널을 제조함에 있어서, 그 내부에 항체와 같은 생체분자를 고정하기 위한 내부 기능화를 위하여 내부 표면을 증가시키는 방법으로서, 기존의 방법들에 비해 보다 간단하면서도 비용이 저렴하고 전기화학적 센서의 민감도 저하를 초래하지 않는 방법을 제공하는 것을 해결과제로 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 감광성 물질과 유리비드의 혼합물을 기재에 코팅하고 혼합몰드를 제조하는 단계와, 상기 혼합몰드에 경화성 고분자를 투입하여 미세채널을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역센서용 미세채널 제조방법을 제공한다.

- [0008] 상기한 방법에 있어서, 상기한 감광성 물질은 바람직하게는 SU8이고, 상기한 경화성 고분자는 바람직하게는

PDMS(Polydimethylsiloxane)이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0009] 상기한 유리비드의 지름은 9 ~ 13 μm 에서 선택되는 것이 바람직하다.
- [0010] 상기한 유리비드와 SU8의 혼합비는 부피비로 1:4 내지 1:20, 바람직하게는 1:4 내지 1:5에서 선택될 수 있다.
- [0011] 상기한 방법에 있어서, SU8와 유리비드의 혼합물을 기체에 코팅하기 전에, 전처리로서 상기 기체에 산소플라즈마 처리를 하는 것이 바람직하다.
- [0012] 본 발명은 또한, 면역센서용 미세채널을 제작하기 위한 몰드로서, 감광성 물질과 유리비드의 혼합물로 구성된 것을 특징으로 하는, 미세채널 제작용 혼합몰드 조성물을 제공한다. 이 때, 상기 감광성 물질은 SU8이고, 상기 미세채널은 PDMS 미세채널인 것이 바람직하다.
- [0013] 본 발명은 또한, 상기한 방법들에 의해 제조된 미세채널 및 상기 미세채널의 표면에 고정된 형광표시된 생체분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역센서를 더욱 제공한다. 이 때, 상기 생체분자는 항체인 것이 바람직하나, 이에 제한되지는 않는다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 사용된 유리 비드는 투명하여 노광 공정 시 방해가 되지 않으며 가격 또한 저렴하고, 또한 기존의 SU8 몰드 제작 공정에서 단순히 SU8 대신 유리비드와 SU8의 혼합물을 이용하기만 하면 되기 때문에 공정이 간단하고 별도의 장비가 필요없다는 장점이 있다.
- [0015] 또한, 본 발명에 의한 방법에 의하면, 위와 같은 간단한 방법에 의하여, PDMS 미세채널 내부의 표면에 요철을 다량 형성하여 내부 표면을 증대시킬 수 있어, 다량의 항체를 고정하는 것이 가능하므로, 면역센서로서의 이용가능성을 높이는 장점이 있다.
- [0016] 또한 본 발명에 의한 방법에 의해 제조된 PDMS 미세채널은 유리 비드의 비율이 증가할수록 미세채널의 내부의 소수성이 강해져서 단백질 입자 흡수에 유리하므로 항체고정효과가 높아 면역센서로 매우 유리하다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 본 발명에 의하여 제작된 미세채널 내부의 광학현미경 관찰 사진으로서, 유리비드와 SU8의 혼합비(부피)에 따라 비교한 사진이다.
- 도 2는 유리비드와 SU8 혼합비(부피)에 따른 채널 내부의 물방울의 접촉각 측정결과(n=5)를 보인 표이다.
- 도 3은 유리비드와 SU8의 혼합비(부피)에 따른 채널 내부의 형광강도(n=5)를 보인 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 1. 유리 비드-SU8 혼합몰드 및 PDMS 미세채널 제작
- [0019] 유리 비드-SU8 혼합몰드를 제작하는 과정은 일반적인 SU8 몰드를 제작하는 과정과 매우 유사하다. 9 μm ~ 13 μm 지름을 갖는 유리 비드 (glass spheres, Sigma-aldrich Co. LLC)와 SU8 (SU8 2035, MICROCHEM)을 유리 비드: SU8 = 1:4, 1:5, 1:10, 1:20의 부피비로 1000 rpm에서 2시간 동안 교반하여 혼합한다.
- [0020] 다만, 일반적인 SU8 몰드 제작방법과의 차이점으로, 유리 비드-SU8 혼합물을 실리콘 웨이퍼에 스핀코팅시, 이 혼합물이 실리콘 웨이퍼에 접촉이 충분히 되도록 하기 위해서는 웨이퍼에 O_2 플라즈마 처리를 실시하는 것이 바람직하기 때문에, 전처리로서, 웨이퍼에 이러한 플라즈마 처리를 하고, 그 위에, 유리 비드-SU8 혼합물을 2500 rpm으로 30초동안 스핀코팅하여 혼합물이 50 μm 두께가 되도록 형성하고 제작할 몰드의 길이가 500 μm 폭이 1 cm가 되도록 패터닝하여 몰드를 완성하였다. 이 때, 노광 공정에서 SU8 몰드 제작 공정과 동일한 시간으로 노광을 할 때에는 유리비드-SU8 혼합몰드의 수율이 낮아져 노광시간을 30% 증가시켜 완성하였다.
- [0021] 제작한 몰드를 페트리디쉬에 고정시키고 PDMS 베이스 용액과 경화제(curing agent) (Sylgard 184, Dow Corning Co.)를 10:1로 혼합한 용액을 약 0.5 cm 두께가 되도록 웨이퍼 위에 부어 주었다. 이어서, PDMS를 부은 페트리디쉬를 70℃ 오븐에서 40분 동안 경화한 후 몰드에서 PDMS를 제거하여 완성하였다.

[0022] PDMS 채널 내부를 광학현미경으로 100배 확대하여 관찰한 결과 채널 내부에 요철이 형성된 것을 확인할 수 있었다(도 1). 또한, 유리 비드의 함량이 높을수록 요철이 증가하여 채널 내부에 표면적이 증가하였음을 확인하였는데, 이는 사용한 유리 비드의 밀도가 1.1 g/mL로 SU8에 비해 밀도가 낮아 유리 비드-SU8 혼합물드를 제작하였을 때 몰드 표면으로 노출된 유리 비드로 인한 현상이다. 몰드의 유리함량이 높을수록 표면에 더 많은 유리 비드가 노출되므로 이 몰드로 만든 채널의 표면에도 많은 요철이 형성된다.

[0023] 2. 제작한 PDMS 미세채널의 특성 평가

[0024] 2-1. 제작한 채널 내부의 접촉각 측정

[0025] 소수성 표면은 단백질 분자의 흡착에 유리한 성질을 가지고 있으므로 제작한 채널 표면의 면역센서로서의 적용 여부 평가를 위해 소수성 정도를 파악하였다.

[0026] 유리비드의 양에 따른 소수성 변화를 파악하기 위하여 유리 비드와 SU8의 부피비가 1:4, 1:5, 1:10, 1:20인 유리 비드-SU8 혼합물드로 제작한 미세채널 내부에 물방울을 떨어뜨리고, 접촉각 분석기(contact angle analyzer, Phoenix 300, SEO)를 이용하여 물방울의 접촉각을 분석하였다. 밀면을 막지 않은 미세채널을 뒤집어 마이크로피펫을 이용하여 15 μ L 크기의 물방울을 미세채널 내부에 떨어뜨려 각 채널당 다섯 지점 이상에서 접촉각을 측정하였다. 측정결과 유리 비드가 유리 비드-SU8 혼합물에서 차지하는 비율이 높아질수록 접촉각이 비례적으로 증가하였다 (도 2).

[0027] 특히 유리 비드:SU8의 부피비가 1:4인 몰드로 제작한 미세채널 내부에서의 접촉각이 일반 PDMS 채널에서의 접촉각 (105°) 보다 10°도 가량 증가한 114.1°로 제작한 미세채널 중 가장 높은 수치를 나타내어 가장 소수성 정도가 큰 것을 확인하였다.

[0028] 2-2 채널 내부의 항체 고정 및 형광강도 측정

[0029] 유리 비드-SU8 혼합물드로 제작한 미세채널의 면역센서 적용 가능성을 관찰하기 위하여 유리 비드 함량에 따른 항체 고정량을 형광현미경을 통하여 확인하였다. 제작한 미세채널 양끝단에 주입구와 유출구를 각각 뚫고 채널을 슬라이드글라스에 부착하여 채널 내부에 형광물질을 관찰할 수 있도록 몰드의 종류별로 5개씩 준비하였다. 형광물질인 FITC가 부착된 e.coli 항체 (Anti-e.coli 0157 antibody (FITC), Abcam)를 주사기 펌프 (KDS200, KD Scientific Inc.)를 이용하여 10 nL/min의 속도로 30 분간 50 ng/mL의 항체를 주입하였다.

[0030] 그 후, PBS(phosphate buffered saline) 완충 용액을 채널 내에 주입하여 채널 표면에 고정되지 않은 항체를 채널 밖으로 제거하였다. 항체를 고정한 미세채널은 형광현미경 (GX71, Olympus Corp.)을 이용하여 관찰 및 촬영하였다.

[0031] 촬영한 이미지는 이미지 분석 프로그램 (i-Solution, IMT echnology)을 이용하여 형광의 강도를 0에서 255사이의 명암도로 표시하고 이 수치를 실제 형광이 검출되는 면적과 곱하여 총 형광강도로 수치화하였다. 도 3의 측정결과로부터 채널을 제작하기 위해 사용한 몰드의 유리 비드 함량이 높아짐에 따라 형광강도가 비례적으로 증가함을 확인하였다 (상관계수=0.96). 이는 유리함량이 가장 높은 1:4 부피비의 몰드로 만든 미세채널 내부에 항체가 가장 많이 고정되어있음을 의미한다.

[0032] 1:4 부피비의 몰드로 만든 미세채널에 항체가 가장 많이 고정된 이유는 이 채널의 표면적이 가장 넓고 표면이 단백질 입자 흡수에 유리한 소수성정도가 가장 높기 때문이다.

[0033] 2-3. 정리

[0034] 이와 같이, 본 발명에 의한 몰드를 이용하여 만든 미세채널의 특성평가는 접촉각 측정과 항체고정을 통한 형광

강도 측정 두가지로 이루어졌다.

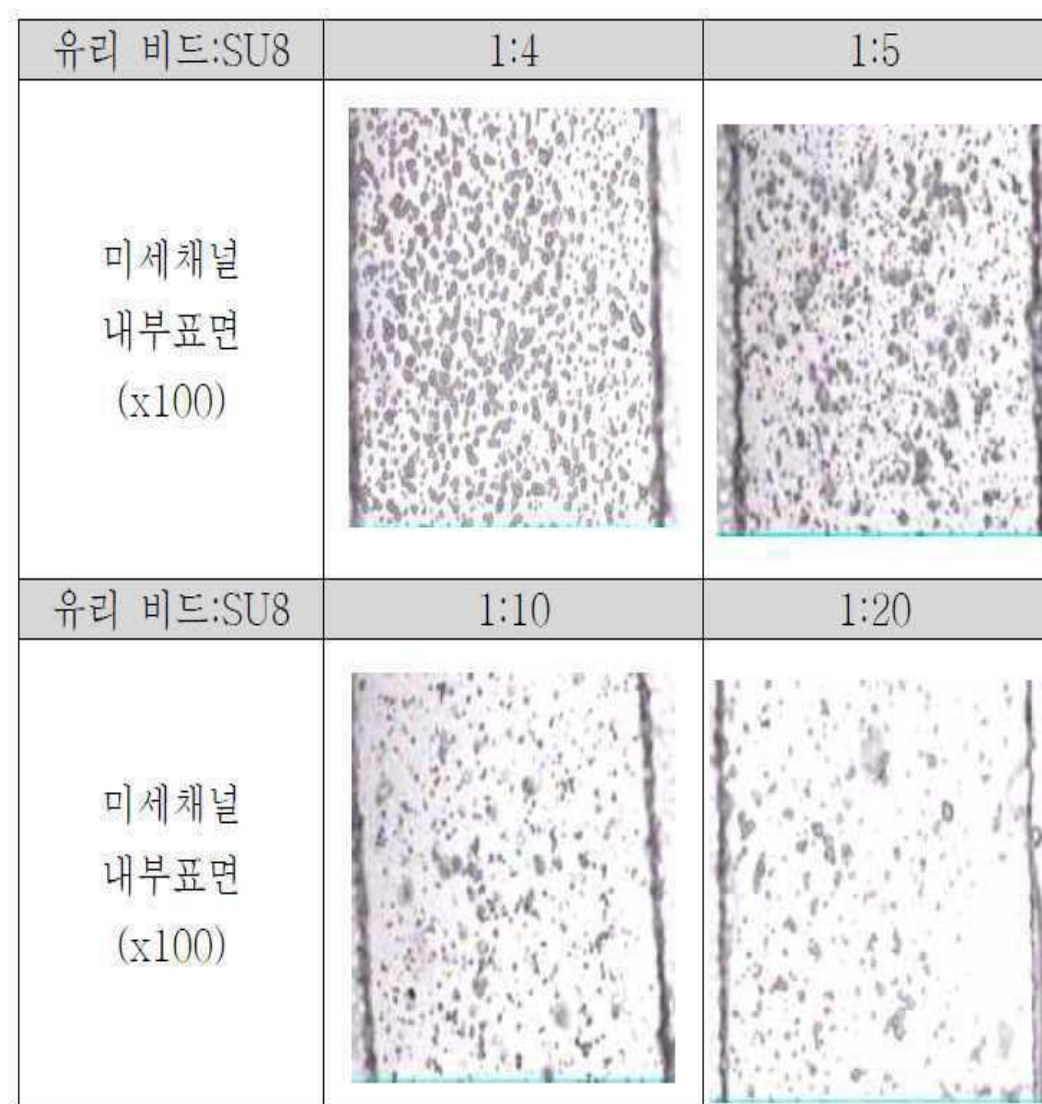
[0035] 첫번째 평가에서, 본 발명의 몰드로 형성된 PDMS 미세채널 내부의 물방울의 접촉각을 측정하여 유리 비드의 비율이 증가할수록 미세채널의 내부의 소수성이 강해짐을 보았다.

[0036] 두번째 평가에서, 채널 내부에 형광물질로서, FITC(Fluorescein isothiocyanate)이 접합된 항체를 유리 비드의 함량이 각기 다른 몰드로 제작한 미세채널 내부에 고정하고 채널 내부를 형광현미경을 이용하여 관찰하여 분석한 결과 유리 비드의 함량이 높아질수록 채널 내부의 상대적 형광강도가 유리비드/SU8의 부피비와 비례하게 증가함을 확인하였다.

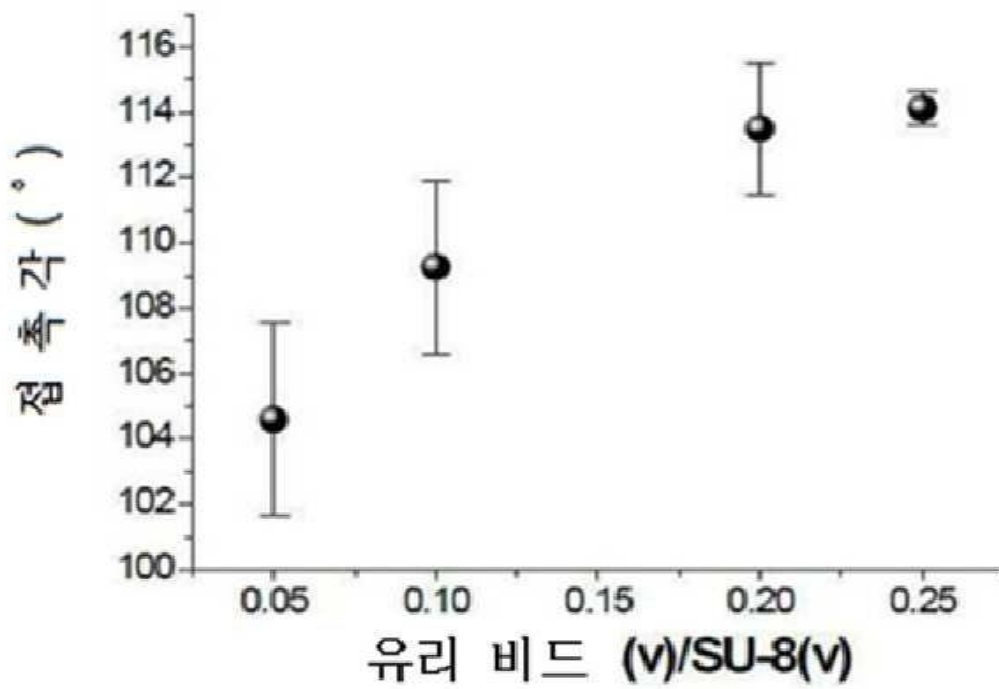
[0037] 제작한 미세채널은 유리 비드로 인해 형성된 요철에 의하여 항체와 같은 단백질 입자의 흡수에 유리한 소수성이 크고, 표면적이 넓은 내부 특성을 가지고 있어 전기화학적 면역센서에 적용하였을 때 전극 파울링 현상을 막아 센서의 민감도를 증대시킬 것으로 기대된다.

도면

도면1



도면2



도면3

