

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.
G01N 33/538 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년07월10일
(11) 등록번호 10-0599420
(24) 등록일자 2006년07월04일

(21) 출원번호 10-2004-0028440
(22) 출원일자 2004년04월23일

(65) 공개번호 10-2004-0093048
(43) 공개일자 2004년11월04일

(30) 우선권주장 1020030026227 2003년04월25일 대한민국(KR)

(73) 특허권자 주식회사 바이오디지트
서울특별시 성북구 성북동 안암동5가 1번지 고려대생명과학관

(72) 발명자 백세환
서울특별시 성북구 돈암동 609-1 한신아파트 102동 301호

조정환
인천광역시연수구청학동3-1063/2

김석하
서울특별시노원구상계동56-3홍익빌라가동102호

(74) 대리인 서종완

(56) 선행기술조사문헌
US5753517 A

KR1020030011165 A

* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 장제환

(54) 현장진단용 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템

요약

본 발명은 멤브레인 스트립 크로마토그래피 분석시스템에 면역반응과 효소반응 및 이들을 응용하는 반응들의 순차적인 교차흐름 공정을 도입하여 분석성능을 현저히 개선시킨 의료현장용(point-of-care testing, POCT) 바이오센서에 관한 것으로서,

본 발명의 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템은 시료첨가용 멤브레인 패드(10), 콘จู게이트 축적용 멤브레인 패드(20), 포획용 감응성분이 고정화되어 있는 신호발생용 멤브레인 패드(30), 세로흐름 용액흡수용 멤브레인 패드(40), 신호발생을 위한 기질용액 공급용 멤브레인 패드(50), 가로흐름 용액흡수용 멤브레인 패드(60) 및 기질용액을 포함하며;

신호발생용 멤브레인 패드(30)의 세로방향 양끝에 길이로 패드(40)과 패드(20)이 부분적으로 포개어 고정되고 패드(20)의 끝에 길이로 패드(10)이 부분적으로 포개어 고정되는 세로배열을 갖으면서, 신호발생용 멤브레인 패드(30)의 양 측면에 평행하게 패드(50)과 패드(60)이 부분적으로 포개어 고정되는 가로배열을 포함한다.

대표도

도 1

색인어

교차흐름, 크로마토그래피 분석, 광학 바이오센서, 전기화학 바이오센서, 생체측정, 고감도 탐지

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에서 고안한 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템의 구성성분과 그 배열을 나타내는 모식도이다.

도 2는 본 발명의 주안점인 멤브레인 스트립 면역분석시스템의 교차흐름 크로마토그래피 공정과 이를 이용한 분석물질의 측정원리를 보여주는 모식도이다. 도면에서 A는 시료의 흡수 및 면역반응 진행방향을 나타내며, B는 면역스트립과 가로배열 패드의 연결 공정을 나타내며, C는 효소 기질용액의 공급 공정을 나타내며, D는 신호발생 공정을 나타낸다.

도 3은 교차흐름 크로마토그래피 방법을 이용한 분석 시 가능한 효소기질용액의 다양한 공급방법을 나타내는 모식도이다.

도 4는 교차흐름을 이용한 효소면역분석 시스템에 기초한 본 발명의 발색측정형 광학 바이오센서의 작동원리를 보여주는 모식도이다. 도면에서 A는 시료첨가 및 면역반응 공정을 나타내며, B는 효소반응 및 신호발생 공정을 나타내며, C는 발색 신호의 측정 공정을 나타낸다.

도 5는 교차흐름을 이용한 효소면역분석 시스템을 응용하는 본 발명의 발광측정형 광학 바이오센서의 측정원리를 나타내는 모식도이다. 도면에서 A는 효소반응 및 신호발생 공정을 나타내며, B는 발광신호 측정 공정을 나타낸다.

도 6은 교차흐름을 이용한 효소면역분석 원리를 응용하는 본 발명의 전기전도도 측정형 전기화학 바이오센서의 분석개념을 보여주는 모식도이다. 도면에서 A는 효소반응 및 신호발생 공정을 나타내며, B는 전극부착 공정을 나타내며, C는 전기전도도 신호측정 공정의 예를 나타낸다.

도 7은 교차흐름을 이용한 효소면역분석을 자동 또는 수동으로 할 수 있도록 고안된 멤브레인 스트립 크로마토그래피 분석시스템의 홀더를 나타내는 모식도이다. 도 7a과 도 7b의 B는 홀더의 전체적인 구성을 나타내며, 도 7b의 C와 D는 홀더의 상판과 하판이 결합된 상태에서의 홀더의 단면을 나타낸 것으로서 C는 분석 시 세로흐름이 진행되는 동안 가로 및 세로 배열 패드들의 상대적인 위치를 나타내며, D는 분석 시 가로흐름이 진행되는 동안 가로 및 세로배열 패드들의 상대적인 위치를 나타낸다.

도 8은 본 발명에 따르는 발색측정형 광학 바이오센서에 관한 실시예 6에 있어서, 분석물질(B형 간염 항원)의 농도 변화에 대한 바이오센서의 응답을 도시한 것으로서, A는 골드(gold) 발색신호의 변화, B는 HRP 발색신호의 변화, C는 각각의 색조밀도(optical density) 측정치를 비교 도시하여 나타낸 것이다.

도 9는 실시예 7에서 제조한 발광측정형 멤브레인 스트립을 이용하여 분석물질인 카디악 트로포닌 I(cardiac Troponin I)의 표준용액에 대한 골드(gold) 발색신호와 ARP에 의한 발광신호를 농도에 대하여 비교 도시한 그래프이다.

도 10는 전기화학 바이오센서로의 응용을 예시하기 위하여 실시예 9에서 제조한 전기화학 측정용 멤브레인 스트립을 이용하여 소변 내에 포함된 인간 혈청 알부민의 표준용액에 대한 전기전도도 신호를 도시한 그래프이다.

도 11은 직접측정방식과 간접측정방식에 의한 신호의 변화를 분석물질 농도별로 비교한 것으로서, A 및 B는 각각 직접 및 간접측정방식으로 교차흐름을 이용하는 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템으로 발색신호를 측정된 결과이며, C는 효소면역분석법(ELISA)을 수행하여 발색신호를 측정된 결과이다.

<도면의 주요부분에 대한 부호의 설명>

- 1 : 분석물질
- 10 : 시료첨가용 멤브레인 패드
- 20 : 콘จู게이트 축적용 멤브레인 패드
- 21 : 표지물질
- 22 : 탐지항체
- 30 : 신호발생용 멤브레인 패드
- 31 : 포획항체
- 32 : 탐지항체에 특이한 제2항체
- 33 : 광원
- 34 : 광 탐지기
- 35 : 전기화학 신호측정용 전극
- 40 : 세로흐름 용액흡수용 멤브레인 패드
- 50 : 기질용액 공급용 멤브레인 패드
- 60 : 가로흐름 용액흡수용 멤브레인 패드
- 71 : 홀더 상판
- 72 : 홀더 하판
- 73 : 누름단추
- 74 : 가로배열 패드 고정판
- 75 : 기질용기 파괴침
- 76 : 기질용기
- 77 : 시료투입구
- 78 : 신호탐지창

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 멤브레인 스트립 크로마토그래피 분석시스템에 면역반응과 효소반응 및 이들을 응용하는 반응들의 순차적인 교차흐름 공정을 도입하여 분석성능을 현저히 개선시킨 의료현장용(point-of-care testing, POCT) 바이오센서에 관한 것이다.

신체의 체액(혈액·소변 등)에 저농도로 존재하는 질병지표물질(대사물질·단백질·세포 등)의 측정은 일반적으로 효소반응과 항원-항체 부착과 같은 생물학적 반응을 이용하여 수행된다. 효소와 항체는 그 반응상대물질을 선택적으로 인지하는 반응특이성이 매우 높을 뿐만 아니라 또한 반응효율이 높아 고감도로 분석물질을 측정할 수 있다. 이와 같은 반응특성을 이용하여 진단시스템을 개발함으로써 질병을 일으키는 지표물질을 조기 탐지하고 증세 초기에 적절히 치유될 수 있도록 하는 방안의 강구는 매우 중요하다. 그러나 대부분의 진단시스템들은 시약과 기기의 취급을 요구하기 때문에 그 사용이 실험실 내로 제한되었을 뿐만 아니라 또한 진단수행을 위해 전문지식이 요구되었다.

최근 면역분석의 한 범주로서, 인간의 질병 증세 및 진도에 대한 예측을 가능하게 하는 호르몬, 단백질, 그리고 미생물과 같은 지표물질들에 대해 병원이나 응급실 등 의료현장에서의 검사뿐만 아니라 가정에서조차 자가진단의 필요성이 급격히 요구되고 있다(참고문헌: C. P. Price 등, *Principles and Practice of Immunoassay*, 1997, Page 579-603, Macmillan Reference Ltd., London). 이를 위해 전문지식이나 복잡한 과정이 요구되지 않고 사용이 간편하며 수행시간이 짧은 면역분석시스템의 고안이 필요하다. 이러한 진단 성능은 일반적으로 세공성 멤브레인을 감응단백질(예: 항원 혹은 항체)의 고정화모체로 사용하는 면역 크로마토그래피 방법에 의해 성취될 수 있다(참고문헌: R. Chen 등, 1987, *Clin. Chem.* Vol. 33, Page 1521-1525; M. P. A. Laitinen, 1996, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 11, 1207-1214; S. C. Lou 등, 1993, *Clin. Chem.*, Vol. 39, 619-624; S. H. Paek 등, 1999, *Anal. Lett.*, Vol. 32, 335-360). 분석물질이 포함된 시료를 멤브레인 스트립 하단으로부터 흡수시키면 세공을 통한 모세관현상에 의해 분석물질은 고정화된 감응단백질 층으로 운반되어 고체표면에서 항원과 항체간의 부착반응이 야기되고 비결합된 성분들은 유체흐름에 의해 분리된다. 이와 같은 원리에 기초한 멤브레인 스트립 면역 크로마토그래피 기술은 유체의 측면흐름(lateral flow)을 이용하여 반응성분들의 물질전달을 가속시킴으로써 분석물질의 측정 신속성과 단지 시료 첨가만으로 진단수행이 완료되는 1단계 측정의 간편성을 제공한다.

이러한 자가진단시스템의 수요는 최근 임신과 배란 검사용 자가진단시약 시장규모의 급격한 성장에 잘 반영되고 있고, 더욱이 향후 인터넷을 이용한 원격진단 및 처방 체계의 구축이 예측되므로 성인병 등 정기적 진단이 요구되는 질병에 대한 홈 모니터링 시스템이 보건체계의 핵심적인 요소로써 요구될 전망이다. 그러나 현재의 가정용 검사시약은 대부분 단순한 면역 크로마토그래피 분석과 육안으로 발색 유무를 확인하여 그 정성결과를 판독하는 수준에 머물러 있으므로 고감도 정량을 요구하는 성인병 등 대부분의 질병에 대한 지표물질들(단백질 마커 등)의 분석에 부적합하다. 정량분석에 이용될 수 있는 기존 방법으로써 골드 콘주게이트로부터 발생되는 발색신호는 기존의 광학적 신호변환 수단을 이용하여 색조밀도(optical density)로 전환될 수 있지만(참고문헌: M. P. A. Laitinen, 1996, *Biosens. Bioelectron.*, Vol. 11, 1207-1214) 실험실에서 널리 사용되는 효소면역분석법에 비해 측정민감도가 낮은 단점을 갖는다.

이와 같이 현장진단 시 민감도가 낮은 단점은 형광물질이나 방사선 동위원소와 같이 고감도 표지물질을 이용하여 극복될 수 있다. 실제로 탐지항체를 형광물질로 표지하여 멤브레인 스트립 면역 크로마토그래피 분석을 수행하고 그 정량결과를 형광탐지기로 해독하는 면역분석시스템이 개발되었다(참고문헌: U.S. Patent 5753517). 이 기술은 높은 민감도를 제공할 뿐만 아니라 위해요소가 없기 때문에 최근 응급실 등에서 사용할 수 있는 현장용 면역진단기기들에 응용된 바 있다(참고문헌: U.S. Patent 6271040 B1). 그러나 형광 탐지장비가 상대적으로 너무 고가이고 소지할 수 있을 정도의 소형화가 어렵기 때문에 주로 병원의 임상검사실이나 연구실 등에 제한적으로 사용되고 있는 실정이어서 실험실용 효소면역분석방법과 비교해 볼 때 분석시간이 짧다는 것 외에는 큰 이점이 없다.

부연하면, 실험실용 효소면역분석은 면역반응의 각 공정마다 면역결합체를 미반응물질로부터 분리시키기 위한 세척과정을 필히 요구하고 더욱이 신호발생을 위해 효소반응을 별도로 수행하여야 한다. 따라서, 이러한 다단계의 복잡한 공정은 현장진단 시 이용되기 어려운 문제점이 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은, 비교적 저가의 비용으로 고감도 정량이 가능한 장점을 제공하는 실험실용 효소면역분석 원리를 현장진단에 적용함으로써 현장진단에서 요구하는 신속하고 간편한 분석이 가능할 뿐만 아니라 시료 내 분석물질에 대한 고감도 정량의 임상적 요구도 충족시킬 수 있는 멤브레인 스트립 바이오센서 기술을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 시료첨가용 멤브레인 패드(10), 콘주게이트 축적용 멤브레인 패드(20), 포획용 감응성분이 고정화되어 있는 신호발생용 멤브레인 패드(30), 세로흐름 용액흡수용 멤브레인 패드(40), 신호발생을 위한 기질용액 공급용 멤브레인 패드(50), 가로흐름 용액흡수용 멤브레인 패드(60) 및 기질용액을 포함하며;

신호발생용 멤브레인 패드(30)의 세로방향 양끝에 길이로 패드(40)와 패드(20)이 부분적으로 포개어 고정되고 패드(20)의 끝에 길이로 패드(10)이 부분적으로 포개어 고정되는 세로배열을 갖으면서, 신호발생용 멤브레인 패드(30)의 양 측면에 평행하게 패드(50)과 패드(60)이 부분적으로 포개어 고정되는 가로배열을 포함하는 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템에 관한 것이다.

상기의 세로로 배열된 멤브레인 패드들은 기존의 면역 크로마토그래피 방법에 사용되는 일반적인 것들이며, 다만, 가로로 배열된 멤브레인 패드들만이 상이하다. 이렇게 가로로 배열된 멤브레인 패드들에 의하여 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템 상에서 세로흐름을 이용한 반응(예: 면역반응 등)과 가로흐름을 이용한 반응(예: 효소반응 등)의 순차적인 수행이 가능하게 된다.

본 발명의 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템에서 가로배열 패드들[(50) 및 (60)]은, 세로배열 패드들과 결합된 신호발생용 멤브레인 패드(30) 상에 처음부터 고정되거나, 처음에는 분리된 상태로 구비되었다가 세로흐름반응(예: 면역반응 등)이 완료된 후에 고정됨으로써, 가로흐름반응(예: 효소반응 등)의 수행에 사용된다.

상기에서 세로배열 패드와 가로배열 패드가 분리된 상태로 구비된 경우에, 세로배열 패드들[(10),(20),(30) 및 (40)]을 하나의 틀에 고정시키고 가로배열 패드들[(50) 및 (60)]을 다른 틀에 고정시켜서, 세로흐름반응이 완료된 후에 어느 하나의 틀을 이동시킴으로써 패드들의 상호 고정을 수행할 수 있다.

구체적으로, 본 발명의 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템은 세로배열 패드들[(10), (20), (30) 및 (40)]이 신호탐지창(78)과 기질용기 파괴침(75)이 구비된 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템의 홀더(예: 플라스틱 홀더) 하판(72) 내부에 고정되고, 가로배열 패드들[(50) 및 (60)]이 시료투입구를 구비한 홀더 상판(71) 외부의 누름단추와 연결된 홀더 상판(71) 내부의 가로배열 패드 고정틀(74)에 고정되며, 기질용액을 담고 있는 기질용기가 기질용액 공급용 멤브레인 패드(50)의 상부에 고정되는 형태로 제조될 수 있다(도 7a 및 도 7b).

상기와 같은 시스템은 세로배열 패드들을 통한 세로흐름반응이 완료된 후에, 누름단추(73)의 자동 또는 수동 조작을 통해 가로배열 패드들이 세로배열 패드들에 고정될 때, 홀더 하판(72)에 설치된 기질용기 파괴 침(75)에 의하여 기질용기(76)가 파괴되어 가로흐름반응이 자동으로 진행되는 편리성을 제공한다.

상기의 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템의 작동원리는 다음과 같다. 먼저, 분석물질이 포함되어 있는 시료를 시료투입구(77)에 첨가하면 세로배열 패드들의 모세관을 통한 측면흐름에 의해 포획항체가 고정화된 자리에서 면역반응이 수행되는데 이 때 누름단추(73)에 의해 가로배열 패드들은 상부에 고정되어 세로배열 패드와 접촉이 되지 않은 상태(도 7b, C)로 유지되며, 면역반응 후 누름단추(73)가 자동 또는 수동 조작을 통해 눌러지면 가로흐름 패드 고정판(74)이 수직 하강하여 세로배열 패드 중 신호발생용 멤브레인 패드(30)를 중심으로 가로배열 패드인 (50)과 (60)이 각각 좌우 측면에 고정되고 동시에 기질용기 파괴침(75)에 의해서 효소기질용액을 담고 있는 용기(76)에 구멍이 생기면서 패드 (50)에 기질이 자동으로 공급된다(도 7b, D). 이렇게 공급된 기질은 가로흐름을 형성하게 되므로 미 반응성분들을 세척해 주는 역할과 동시에 면역반응 결합체에 포함된 효소로부터 효소반응에 의해 신호를 발생시킨다. 발생한 신호는 신호탐지 창(78)을 통해 외부로부터 육안 관찰이 가능하며 또한 탐지장비(예: 발색, 발광, 전기화학 탐지기)에 의해서 효소반응으로부터 발생된 신호를 측정할 수 있다.

본 발명의 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템은 전기화학적 측정을 위해 추가적으로 전극을 신호발생용 멤브레인 패드(30) 상에 직접 형성하거나 별도로 제작하여 신호측정시에 결합하는 방식으로 구성될 수 있다.

상기 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템에서, 기질용액은 효소반응을 수행할 때 자동적으로 멤브레인 패드(50) 상에 공급되도록 하기 위해, 시스템의 홀더 상판의 정해진 위치에 고정되는 기질용기에 담겨진 상태로 준비되거나, 수동적인 공급을 위하여 시스템으로부터 분리된 용기에 담겨진 상태로 준비될 수 있다.

상기 패드들에 사용될 수 있는 재료는 각 패드의 목적에 부합되는 것이라면 어떠한 재료라도 이용될 수 있으며 그의 대표적인 예로써는 시료첨가용 멤브레인 패드(10), 콘จู게이트 축적용 멤브레인 패드(20) 및 기질용액 공급용 멤브레인 패드(50)는 유리섬유 멤브레인을, 신호발생용 멤브레인 패드(30)는 니트로셀룰로우스 멤브레인을, 그리고 용액흡수용 멤브레인 패드[(40), (60)]는 셀룰로우스 멤브레인을 사용할 수 있다.

상기에서 콘쥬게이트 축적용 멤브레인 패드(20)는 탐지용 감응성분, 탐지용 감응성분과 표지물질의 콘쥬게이트 및 탐지용 감응성분에 특이하게 반응하는 2차 감응성분과 표지물질의 콘쥬게이트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 건조된 상태로 포함한다.

상기에서 탐지용 감응성분은 분석물질과 특이적으로 반응하는 물질이며 그 예로는 항체, 효소, 수용체, DNA 등을 들 수 있다. 또한, 포획용 감응성분은 분석물질과 특이적으로 반응하거나, 분석물질을 포함하는 결합체에 포함된 어느 성분과 특이적으로 반응하는 물질이며 그 예로는 항체, 효소, 수용체, 또는 DNA 등을 들 수 있다. 따라서 본 발명의 분석원리와 이를 응용한 바이오센서는 항원-항체 반응에 기초한 면역분석시스템을 포함하여 효소반응과 핵산 접합반응을 탐지하는 효소센서 및 유전자 센서의 제작에 적용될 수 있다.

상기의 표지물질은 겨자무 과산화 효소(horseradish peroxidase), 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase), β -갈락토시다아제(β -galactosidase), 알쓰로마이시스 라모서스 과산화 효소(arthromyces ramosus peroxidase), 글루코우즈 옥시데이즈, 유리에이즈, 페니실린 옥시데이즈 및 콜레스테롤 옥시데이즈와 같은 효소; 골드 콜로이드 입자; 그리고 Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} 와 같은 금속이온 혹은 이들의 화합물 등이고 상기의 기질용액은 각 효소에 특이한 발색용 기질성분, 발광용 기질성분(예: 루미놀), 전기화학신호 발생용 기질성분을 포함하거나 실버 화합물 등을 포함하며, 효소-기질 반응 또는 화학반응에 의해 발색, 변색, 발광, 전기전도도 변화, 전류변화 또는 전압변화를 신호로 나타내는 작용을 한다.

표지물질과 기질용액의 선택에 따른 본 발명의 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템의 적용을 예를 들어 설명하면 다음과 같다.

발색측정형 광학 바이오센서는 표지물질로 겨자무 과산화 효소(horseradish peroxidase), 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase), β -갈락토시다아제(β -galactosidase), 또는 알쓰로마이시스 라모서스 과산화 효소(arthromyces ramosus peroxidase)등을 사용할 수 있고, 기질용액은 각 효소에 특이한 발색용 기질성분을 포함하며, 신호발생 시 효소-기질 반응에 의해 육안으로 확인할 수 있는 발색 혹은 변색을 신호로 나타낸다. 또한, 효소 촉매반응의 대안으로 화학반응을 이용할 수도 있으며, 대표적 예로는, 표지물질로 골드콜로이드를 사용하고 기질용액은 실버 아세테이트와 같은 실버화합물을 포함하여, 신호발생 시 골드-실버 간 촉매반응에 의하여 상기와 같은 신호를 나타내는 것을 들 수 있다.

발광측정형 광학 바이오센서는 표지물질로 겨자무 과산화 효소(horseradish peroxidase), 또는 알쓰로마이시스 라모서스 과산화 효소(arthromyces ramosus peroxidase)등을 사용할 수 있고, 기질용액은 각 효소에 특이한 발광용 기질성분인 루미놀을 포함하며, 신호발생 시 효소-기질 반응에 의해 육안으로 확인할 수 있는 발광을 신호로 나타낸다. 또한, 상기에서 표지물질인 효소의 대체물질로서 금속이온 즉, Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} 등, 또는 이들의 화합물을 사용할 수 있다.

전기화학 바이오센서에서는 표지물질로 글루코우즈 옥시데이즈, 유리에이즈, 페니실린 옥시데이즈, 또는 콜레스테롤 옥시데이즈 등을 사용할 수 있고, 기질용액은 각 효소에 특이한 전기화학신호 발생용 기질성분을 포함하며, 신호발생 시 효소-기질 반응에 의해 전기전도도 변화, 전류변화 또는 전압변화를 신호로써 나타낸다.

본 발명의 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템을 구체적으로 면역분석의 예를 들어 설명하면 다음과 같다. 도 1에 나타낸 예를 보면, 유체의 순차적 교차흐름을 이용한 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템은 세로로 상호 연결된 4종류의 다른 멤브레인 스트립들 그 좌우측에 각각 가로방향으로 배열된 기능성 멤브레인 패드들로 구성된다. 세로배열 중 맨 하단에는 시료첨가용 유리섬유 멤브레인 패드(10)가 위치하고 그 상단에는 탐지항체(22)-효소(21) 콘쥬게이트를 건조상태로 함유한 셀룰로우스 멤브레인 패드(20)가 배열된다. 이 콘쥬게이트들은 건조 시 부동상태로 존재하지만 수용액과 접촉하면 즉각 용해되어 액상에서 항원-항체 반응에 참여한다. 그 위쪽으로는 포획항체(31)와 탐지항체 특이 제2항체(32)가 일정지역에 각각 고정화된 니트로셀룰로우스 멤브레인 패드(30)가 위치하며 이곳에서 궁극적으로 분석물질 농도에 비례한 신호와 분석물질 농도에 무관한 보정신호가 독립적으로 발생한다. 가장 상단에는 위에서 열거한 멤브레인 패드들의 세공을 통해 모세관현상에 의한 유체흐름을 지속시키고자 용액흡수용 셀룰로우스 멤브레인 패드(40)가 존재한다. 각 멤브레인 패드들을 부분적으로 포개어 플라스틱 필름 위에 배열한 후 양면테이프로 고정하여 면역스트립을 제조한다. 그리고 면역스트립과는 별도의 기능으로 표지물질인 효소에 대한 기질용액 또는 신호증폭을 위한 수용액을 공급해 주기 위한 기질공급패드(50)가 니트로셀룰로우스 멤브레인 패드(30) 좌측에 위치하고 기질용액의 흐름을 모세관현상에 의해 지속시키고자 기질용액 흡

수용 셀룰로우스 멤브레인 패드(60)가 우측에 위치한다. 이러한 가로배열 패드들은 초기에는 면역스트립 본체와 접촉되어 있지 않아서 면역반응은 단지 면역스트립을 통하여 세로방향으로만 수행되고 그 후 좌우패드를 연결하여 효소반응은 가로방향으로만 진행되도록 설정한다.

멤브레인 스트립 바이오센서 시스템의 동작원리

상기한 바와 같이 구성된 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템을 이용하여 4단계로 이루어진 분석물질의 측정과정을 도 2에 나타내었다. 첫째로, 분석물질이 함유되어 있는 시료(예: 혈액)에 면역스트립의 하단을 담그게 되면 시료가 시료첨가패드를 통하여 시스템 내부로 흡수되고 이 수용액은 모세관현상에 의해 스트립을 따라 세로방향으로 이동한다(도 2, A). 이 수용액이 항체 콘주게이트들이 축적되어 있는 셀룰로우스 패드에 도달하면 즉시 콘주게이트들을 용해시키고 액체상에서 항원(즉, 분석물질)-항체 반응에 의해 1차 면역결합체가 형성된다. 이 면역결합체는 상부의 신호발생패드에 도달하게 되면 고정화된 포획항체와 다시 반응하여 고체표면에 포획되어 샌드위치 면역결합체를 형성하고 미반응 물질은 유체흐름에 의해서 분리된다. 둘째로, 면역스트립과 가로배열 패드들을 연결하는데 이것은 플라스틱 등으로 제작된 패드 고정틀을 이용하여 세로배열 패드 혹은 가로배열 패드를 이동시켜 수행될 수 있다(도 2, B). 셋째로, 효소기질용액을 자동 혹은 수동으로 기질용액 공급패드에 첨가하면 이 용액은 신호발생패드를 통하여 기질용액 흡수패드로 흡수되는 가로흐름이 발생한다(도 2, C). 넷째로, 가로흐름에 의해 샌드위치 면역결합체에 포함된 표지물질인 효소에 기질이 공급되므로 촉매반응에 의해 분석물질 농도에 비례한 신호와 동시에 보정신호가 각각 발생된다(도 2, D). 이 신호는 신호발생원인 효소에 따라 적절한 탐지기(발색측정용, 발광측정용, 전기화학측정용 등)를 이용하면 수치화되어 분석물질의 농도를 출력할 수 있다.

본 발명에서 고안한 '세로-가로 교차흐름을 이용한 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템'의 목적은 전문인에 의한 현장진단용으로 뿐만 아니라 일반인들도 쉽게 자가진단이 가능하도록 면역 크로마토그래피 방법을 이용하고 이것에 효소를 표지물질로 사용하는 신호발생기술과 접목시키는데 있다. 마이크로 웰을 단백질 고정화모체로 사용하는 일반적인 효소면역분석에서는 항원-항체 반응 후 미반응 성분들을 면역결합체로부터 분리시키고 이 결합체에 포함된 표지물질 즉, 효소에 대한 기질을 첨가하여 촉매반응을 수행함으로써 신호를 발생시킨다. 그러나 이와 같은 면역결합체의 분리와 효소로부터의 신호발생은 세로방향의 흐름에만 의존하는 기존의 면역 크로마토그래피 분석시스템에서는 성취하기 어렵다. 만일 면역결합체가 완전히 분리되기 전에 효소기질이 미리 존재하거나 첨가된다면 분석물질의 농도에 무관하게 비특이 신호가 발생되기 때문이다. 그러므로 면역결합체의 분리와 신호발생의 두 공정은 단계별로 완전히 순차적으로 수행되어야 한다. 이러한 요구조건은 본 발명에서 개발한 교차흐름 시스템을 도입함으로써 충족되는데, 이것은 면역스트립 상에서 세로흐름만으로 기질공급을 도저히 순차적으로 구분지어 할 수 없었던 것을 가능하게 해준 획기적인 방법이다. 이 경우 별도의 세척과정이나 시약의 취급이 필요 없도록 자동화가 가능하고 단지 시료를 첨가한 후 단시간(예: 15분) 내에 분석을 완료할 수 있을 뿐만 아니라 효소를 표지물질로 사용하므로 고감도 분석성능을 나타낸다.

효소기질용액의 공급을 위한 다양한 흐름방법을 도 3에 나타내었다. 면역스트립 상의 신호발생패드를 통한 가로흐름(도 3, A) 외에 기질용액 공급패드와 흡수패드를 적절히 배열함으로써 가로대각선 흐름(도 3, B)도 유발시킬 수 있다. 또한, 면역반응을 수행하고 신호발생패드를 제외한 면역스트립의 구성성분들을 제거한 후 기질용액 공급패드와 흡수패드를 세로로 배열하여 기질용액을 세로흐름을 통하여 공급할 수도 있다(도 3, C, D 및 E). 다양한 방법 중 다중 동시 신호발생 및 간편성을 고려하여 가로흐름에 의한 효소기질 공급방법이 선호된다.

본 발명에서 개발한 현장진단용 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템의 장점은 다른 기 개발된 시스템과 비교하여 다음과 같다. 첫째로, 골드 콜로이드와 라텍스 입자 등과 같은 발색용 표지물질과 비교하여 효소는 촉매반응에 의해 신호를 발생하므로 상대적으로 증폭된 신호를 제공한다. 따라서 형광물질을 신호발생원으로 사용하는 바이오센서에서와 같이 분석물질의 고감도 측정이 가능하다. 둘째로, 적절한 효소-기질 반응을 이용할 경우 효소로부터 발생된 신호를 측정하는 탐지기는 형광측정기기에 비해 상대적으로 저렴할 뿐만 아니라 소지가 가능할 정도로 소형화될 수 있다. 셋째로, 분석 시 표지물질로 사용할 수 있는 효소의 종류는 매우 다양하여 위에서 설명한 바와 같이 발색, 광, 전류, 전압, 전기전도도 등 필요에 따라 다른 신호를 발생시킬 수 있다. 이것은 자체 보유하고 있는 신호탐지 장비와 기술에 따라 효소를 선택할 수 있는 융통성을 제공한다.

발색측정형 광학 바이오센서

이상에서 설명한 바와 같은 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템은 그 분석원리의 한 응용으로써 우선 발색신호 측정형 광학 바이오센서의 제작에 이용될 수 있다. 이와 같은 바이오센서는 기존의 마이크로 웰을 단백질 고정화모체로 이용하는 효소면역분석(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)에서와 같이 효소반응을 멤브레인 스트립 상에서 독립적으로 구현함으로써 높은 측정민감도를 나타낼 뿐만 아니라 일반적인 면역 크로마토그래피 분석 시와 동일하게 속성측정에 이용될 수 있다. 발색 측정형 센서는 시료 내 분석물질 농도에 비례하여 멤브레인 상에서 발생하는 발색신호 세기를 광 반사 계

측법(reflectance photometry)으로 측정할 수 있다. 따라서 비교적 민감한 정량 수단으로 기존에 사용되던 형광측정형 시스템과 비교하여 저가일 뿐만 아니라 신호측정을 위해 소형의 신호탐지 장비를 사용할 수 있어 현장진단을 위한 적용이 가능하다.

발색측정형 바이오센서의 분석원리를 도 4에 구체적으로 나타내었다. 위에서 설명된 바와 같이 면역스트립 하단으로부터 분석물질이 함유되어 있는 시료(예: 혈액)를 세로흐름에 의해 흡수하면 분석물질은 탐지항체-효소 콘쥬게이트와 반응하고 그 후 형성된 1차 면역결합체는 신호패드에 고정되어 있는 포획항체에 의해 포획되고 나머지는 유체흐름에 의해 분리된다(도 4, A). 포획된 탐지항체-효소 콘쥬게이트 양은 분석물질 농도에 비례하므로 결국 그에 비례한 신호가 발생된다. 세로흐름에 의해 분리된 과잉의 콘쥬게이트는 상부의 제2항체에 의해 포획된다. 이 자리에서의 신호는 분석물질 농도에 상관없이 항상 일정하게 유지할 수 있으므로 조절신호 혹은 보정신호로 이용될 수 있다. 신호발생을 위해 상기한 바와 같이 가로흐름에 의해 효소기질을 공급하면 멤브레인 상의 포획항체에 의해 포획된 면역결합체를 제외한 남아있는 모든 성분들은 제거되고 이와 동시에 포획된 면역결합체에 포함된 효소에 의해 신호가 발생된다(도 4, B). 멤브레인 스트립 상에 발생된 발색신호 세기는 일정 파장의 광을 조사한 후 발색에 비례하여 감소하는 반사광을 광 탐지기(예: 포토다이오드, 전하결합장치(charge-coupled device) 등)로 감지하여 측정한다(도 4, C).

발색신호 발생을 위해 사용될 수 있는 효소는 일반적인 효소면역분석 시 사용되는 겨자무 과산화 효소(horseradish peroxidase, HRP), 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase), β -갈락토시다아제(β -galactosidase), 알트로마 이시스 라모서스 과산화 효소(arthromyces ramosus peroxidase, ARP)등으로 이 효소들은 촉매반응의 결과로 발색을 나타내며 이와 같은 목적으로 사용될 수 있는 기질이 각 효소마다 다양하다. 예를 들어, HRP를 사용할 경우에는 과산화수소의 존재 하에서 발색용 기질(chromogenic substrate)로써 멤브레인 상에 침착될 수 있는 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine, TMB), 디아미노벤지딘(diaminobenzidine, DAB), 그리고 4-클로로-1-나프톨(4-chloro-1-naphthol, 4C1N) 등을 사용할 수 있다. 각각의 기질은 최적 반응조건이 다르기 때문에 바이오센서의 분석특성 및 요구조건을 고려하여 적절한 기질을 선택할 수 있다.

효소의 표지방법으로 위에서처럼 효소를 직접 탐지항체와 중합하여 사용하는 방법 외에 탐지항체에 특이한 제2항체-효소 콘쥬게이트를 이용하는 간접적인 방법이 있다. 이 경우 면역스트립의 콘쥬게이트 패드 상에 탐지항체와 제2항체-효소 콘쥬게이트를 공간적으로 분리하여 각각 축적시켜 분석시스템을 구성할 수 있다. 분석 시, 효소 콘쥬게이트는 신호발생패드의 일정 자리에 고정화되어 있는 포획항체에 포획된 분석물질과 탐지항체 간 1차 면역결합체를 특이하게 인식하여 반응한다. 이 방법은 다른 분석물질 분석 시 매번 탐지항체를 효소와 중합하는 번거로움을 줄일 수 있는 장점을 제공한다. 또한, 탐지항체를 골드 콜로이드와 중합하여서도 사용할 수 있어서 면역스트립의 콘쥬게이트 패드에 탐지항체-골드 콘쥬게이트와 제2항체-효소 콘쥬게이트를 별도의 공간에 축적하여 사용할 수 있다. 이 방법을 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템에 이용하면, 1차 세로흐름에 의해 포획항체에 의해 포획되는 분석물질과 골드 콘쥬게이트 간 1차 면역결합체의 농도에 비례하여 골드로부터 붉은 발색을 나타내므로 분석의 진도를 육안으로 확인할 수 있는 장점이 있다. 더욱이 골드 콜로이드 표면에 하나 이상의 탐지항체 분자가 부착되어 있을 경우 이 분자 수에 비례하여 제2항체-효소 콘쥬게이트가 결합할 수 있으므로 신호증폭 효과를 제공할 수 있다.

신호발생을 위한 또 다른 방법으로 스트렙타비딘(streptavidin)과 비오틴(biotin) 간의 결합반응을 이용할 수 있으며, 전형적으로 스트렙타비딘을 탐지항체와 중합시키고 비오틴을 효소와 중합시켜 사용한다. 스트렙타비딘과 비오틴 반응은 일반적으로 항원-항체 반응과 비교하여 친화력이 높으므로 제2항체를 사용하는 방법에 비해 신호증폭효과를 얻을 수 있는 장점이 있으나 추가 성분들을 도입해야 하는 부담이 있다. 분석시스템 구성 시 이러한 신호발생방법의 변화는 분석 시 요구하는 분석물질의 측정하한농도, 측정농도 범위, 분석 소요시간, 그리고 경제성 등 요구조건에 따라 선택할 수 있다.

발색신호 측정형 바이오센서의 제작 시 신호발생을 위해 효소 촉매반응의 대안으로써 골드와 실버 간 촉매반응과 같은 화학반응을 이용할 수도 있으며 대표적인 반응성분으로써 골드 콜로이드와 실버 아세테이트를 들 수 있다(참고문헌: Patel N 등, 1992, *Ann. Clin. Biochem.* Vol. 29, Page 282-286, Rocks. BF 등, 1991, *Ann. Clin. Biochem.* Vol. 28, Page 155-159). 기존의 면역 크로마토그래피 방법에서와 같이 탐지항체-골드 콜로이드 콘쥬게이트를 신호발생원으로 사용하여 면역 스트립을 제작하고 우선 1차 세로흐름에 의해 분석물질 농도에 비례하여 골드로부터 발색신호를 발생시킨다. 교차흐름 방법을 이용하여 실버 아세테이트 용액을 2차 가로흐름으로 공급하면 포획항체 자리에 축적된 골드 콜로이드 표면에 실버가 촉매반응하여 침착되므로 발색신호를 현저히 증폭시킨다. 이와 같은 효과는 효소를 신호발생원으로 이용한 분석시스템과 동일한 것으로 생물소재인 효소를 사용하지 않고 단순히 교차흐름 방법을 이용하여 골드로부터의 발색신호를 증폭시킬 수 있는 실버 아세테이트와 같은 화학물질을 순차적으로 공급해줌으로써 비교적 간단히 고감도 분석시스템을 구성할 수 있다. 이와 같은 방법의 도입으로 기존에 골드 발색이 육안으로 확인되지 않아 측정할 수 없었던 저 농도의 분석물질에 대해서도 분석이 가능하다는 장점을 제공한다. 발생된 발색신호는 효소를 이용한 경우와 동일하게 반사광 탐지방법에 의해 측정될 수 있다.

발광측정형 광학 바이오센서

본 발명에서 개발한 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템의 다른 응용으로써 발광측정형 광학 바이오센서의 제작에 이용될 수 있다. 이와 같은 바이오센서는 위에서 제시한 발색측정형 바이오센서와 비교하여 자체에서 발광신호를 발생하는 표지 물질을 이용하므로 광원을 필요로 하지 않고 따라서 탐지기가 더욱 간단해지고 가격이 저렴해진다. 측정원리와 분석시스템의 다양성은 위에서 설명된 발색측정형 바이오센서와 동일하고 단지 분석물질의 농도에 비례한 발광신호를 발생하도록 적절한 표지물질의 선정이 필요하다. 도 5에 구체적으로 나타낸 바와 같이 표지물질로써 효소의 일종인 알쓰로마이시스 라모서스 과산화 효소(arthromyces ramosus peroxidase, ARP)를 사용할 수 있는데 이 효소는 과산화수소의 존재 하에서 루미놀(luminol)과 반응하여 최대흡광도 427 nm에서 측정할 수 있는 빛을 발생한다 (참고문헌: Kim, Pisarev, and Egorov, 1991, Anal. Biochem. Vol. 199, Page 1-6). 이러한 발광신호의 세기는 발색 시 일반적으로 사용하는 HRP로부터의 발광신호와 비교하여 약 500배 정도 더 민감하다. 효소의 대체물질로서 금속이온(Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} 등)을 사용할 수 있는데 이것들은 효소보다 현저히 민감한 발광신호를 발생할 뿐만 아니라 가격이 저렴하지만 단백질에 표지하기 상대적으로 어려운 문제점이 있다 (참고문헌: D. Junsaeck, U. Spohn, 1999, Biosensors & Bioelectronics, Vol. 14, Page 123-129).

효소나 금속이온을 표지물질로 이용하는 발광신호 발생방법을 본 발명의 핵심인 교차흐름 시스템에 적용할 수 있는데 항원-항체 반응을 위해 세로흐름을 진행시킨 후 기질용액을 공급하기 위해 가로흐름을 진행시킨다(도 5, A). 이때 멤브레인 에 고정화되어 있는 항체에 의해 포획된 면역결합체를 제외한 모든 물질들은 세척되며 그와 동시에 포획된 면역결합체에 존재하는 표지물질로부터 신호가 발생된다. 기질용액 조건의 예로써, 효소 ARP를 표지물질로 사용할 경우 기질용액은 루미놀과 과산화수소를 함유하며 그리고 최적 산성도 조건인 pH 8 - 9를 사용한다. 탐지기(포토 멀티플라이어 튜브, 포토다이오드 등)를 신호발생패드에 근접시켜 발생된 광 신호를 측정하되(도 5, B) 잡음을 최소화하기 위해 배경 광으로부터 차단된 상태에서 측정하여야 한다. 광 탐지기에 의해 측정되고 전기신호로 전환된 후 분석물질 농도 대비 신호가 도식된 표준도표에 의해 시료 내 분석물질의 농도가 결정된다.

발광측정형 바이오센서의 제작 시 표지물질의 항체분자 상의 표지방법과 분석시스템 구성방법은 발색측정형 바이오센서의 제작을 위해 위에서 상세히 설명된 방법들과 동일하다.

전기화학 바이오센서

본 발명에서 개발한 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템은 또 다른 응용에 의해 전기화학 바이오센서의 제작에 이용될 수 있다. 이러한 바이오센서는 기질을 분해하여 이온농도, 전하밀도, 전기화학 포텐셜 등의 변화를 유발하는 효소를 표지물질로 이용하며 그 전기화학적 상태변화를 신호로써 측정한다 (참고문헌: M. M Castillo-Ortega 등, 2002, *Sensors and Actuators B*, Vol 85, Page 19-25; Andrea Pizzariello 등, 2001, *Talanta*, Vol 54, Page 763-772). 이와 같은 신호측정을 위한 전기화학 탐지기는 위에서 제시한 두 종류의 광학탐지기와 비교하여 간단하고 소형화가 가능할 뿐만 아니라 가격이 저렴한 장점이 있으나 추가 요구사항으로 전기화학적 측정을 위한 전극이 면역스트립 상에 직접 형성되거나 혹은 별도로 전극을 제작한 후 신호측정 시 면역스트립과 결합되어야 한다(참고문헌: J. H. Kim, S. H. Paek, 2000, *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 14, Page 907-915). 측정원리와 분석시스템의 다양성은 위에서 설명된 광학 바이오센서와 동일하고 단지 분석물질의 농도에 비례한 전기화학 신호를 발생하도록 적절한 표지물질의 선정이 필요하다.

표지물질로써 사용할 수 있는 효소의 종류는 전기화학 측정방법에 따라 다양하다. 예를 들어, 전기전도도 변화를 유도하기 위해 효소의 일종인 유리에이즈(urease)를 사용할 수 있는데 이 효소는 요소를 분해하여 암모늄 이온과 카르보늄 이온을 생성시켜 이온농도를 증가시키므로 분석물질 농도에 비례한 전기전도도 변화가 신호로써 나타난다(도 6 참조). 다른 예로써, 전류변화를 신호로 발생하기 위해 기질을 산화 혹은 환원시키는 효소 즉, 글루코오즈 옥시데이즈(glucose oxidase) 그리고 콜레스테롤 옥시데이즈(cholesterol oxidase) 등을 표지물질로 이용하며 효소반응에 의해 생성 또는 소멸되는 전자 밀도의 증감을 전극을 통하여 전류 변화로써 측정한다. 또 다른 예로써, 전기화학 포텐셜의 변화를 신호로 발생할 수 있는데 이러한 방법의 전형적인 응용은 수소이온 농도(즉, 산성도)를 변화시키는 효소들(글루코오즈 옥시데이즈, 유리에이즈, 페니실린 옥시데이즈 등)을 표지물질로 사용하고 그 효소반응의 결과를 pH 전극을 통하여 측정할 수 있다(참고문헌: Andrea Pizzariello 등, 2001, *Talanta*, Vol 54, Page 763-772). 한편, 표지물질로 유리에이즈를 이용할 경우 이 효소반응으로부터 요소가 분해되어 생성되는 암모늄 이온 혹은 카르보늄 이온에 대한 선택성 막을 전극표면에 설치하여 화학포텐셜의 변화를 전기신호로써 측정할 수도 있다.

전기화학 바이오센서의 분석원리는 위에서 설명된 광학 바이오센서의 경우와 동일한 것으로, 도 6에 예를 들어 나타낸 바와 같이 면역스트립의 하단에 분석물질이 함유되어 있는 시료를 첨가하면 분석물질은 콘쥬게이트 패드 상의 항체-효소 콘쥬게이트와 1차 면역결합체를 형성하고 이것은 신호발생패드 상에 고정화된 포획항체와 샌드위치 면역결합체를 형성한다. 이와 같이 항원-항체 반응을 위한 세로흐름이 정지가 되고 가로흐름을 개시하면 포획된 면역결합체를 제외한 모든 물질들은 제거되고 그와 동시에 포획된 면역결합체에 존재하는 효소와 기질 간의 반응에 의해 전기화학 신호가 발생된다(도 6, A). 이러한 전기화학 신호를 측정하기 위해 이미 멤브레인 상에 존재하거나 별도로 제작된 적절한 전극을 이용하고(도 6, B) 잡음 대비 신호가 최대가 되도록 한다(도 6, C). 또한 전기화학분석 시 전극의 재질과 형태 그리고 크기 등 측정조건 등이 바이오센서의 성능을 조절하므로 센서의 물리화학적 변수들을 잡음 대비 신호 비율에 대해 최적화하여야 한다.

이상에서 설명된 바와 같이 본 발명에서 창안된 교차흐름을 이용한 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템을 이용하면 표지 물질인 효소의 적절한 선택에 따라 다양한 바이오센서를 제작할 수 있다. 과거에는, 멤브레인 스트립을 이용한 분석시스템에서는 표지물질인 효소로부터 신호를 발생하기 위해 효소반응에 필요한 성분들을 공급해주기 위한 방법이 없어서 효과적인 바이오센서의 제작이 어려웠다. 이러한 문제점은 본 발명에서 개발한 교차흐름 방법을 이용하여 해결될 수 있다. 즉, 교차흐름 방법을 이용함으로써 효소기질용액의 공급을 자동으로 간단하게 수행할 수 있게 될 뿐만 아니라 동일한 원리를 응용하여 효소의 선택에 따라 다양한 바이오센서의 제작이 가능하게 되었다. 따라서 민감도는 높으나 시간이 오래 걸리고 수행과정이 복잡하여 일반인들이 사용할 수 없었던 기존의 마이크로 웰을 단백질 고정화모체로 사용하는 효소면역분석(즉, ELISA)을 멤브레인 스트립 상에서 간편하게 수행할 수 있게 되었다. 또한, 표지물질로 형광을 이용함으로써 고가의 탐지기를 요구하던 과거의 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템의 대안으로 본 발명에 따라 다양한 효소를 신호발생원으로 사용할 수 있게 됨으로써 가격이 저렴하고 소형화가 가능한 탐지기를 사용할 수 있게 되었다.

다음의 실시예는 본 발명의 내용을 보다 구체적으로 설명하고 그 유용성을 제시하고자 구체적인 예를 들어 기술한 것이며, 본 발명을 한정하는 것은 결코 아니다.

실시예에 사용된 재료

실시예를 위해 사용된 재료 및 구입처는 다음과 같다. 분석물질로 B형 간염 표면항원(Hepatitis B surface antigen, HBsAg), 그에 대한 복합클론 항체(토끼로부터 생산)와 단일클론 항체(생쥐로부터 생산), 그리고 인간 혈청 알부민에 대한 복합클론 항체(염소로부터 생산)는 엔자임 인터내셔널(Enzyme international, 미국) 사로부터 구입되었다. 카디악 트로포닌 I(Cardiac troponin I)과 그에 대한 항체인 복합클론 항체(염소로부터 생산)와 단일클론 항체(생쥐로부터 생산)는 스펙트랄(Spectral, 미국)사에서 구입되었다. 골드 콜로이드(직경 40 nm, 0.01%)와 카제인(casein, sodium salt 형태, 우유로부터 추출) 그리고 우 혈청 알부민(열쇼크(heat shock) 공정에 의한 정제, 분획(fraction) V; bovine serum albumin, BSA)과 트윈(Tween) 20, 그리고 트리톤(Triton) X-100과 인간혈청 알부민(human serum albumin, HSA)은 시그마(Sigma, 미국) 사로부터 공급되었다. 니트로셀룰로우스 멤브레인(세공크기 12 μ m)과 유리섬유 멤브레인 그리고 셀룰로우스 멤브레인(3MM chromatography grade)은 밀리포어(Millipore, 미국)사와 와트만(Whatman, 미국) 사로부터 각각 구입되었다. 스트렙타비딘(streptavidin, SA), N-숙신이미딜-3-[2-피리디리티오] 프로피오네이트(N-succinimidyl-3-[2-pyridylthio] propionate, SPDP), 숙신이미딜 4-[N-말레이미도메틸] 시클로헥산-1-카복실레이트(succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl] cyclohexane-1-carboxylate, SMCC), 디티오테라이트톨(dithiotheritol, DTT), 그리고 N-히드록시숙신이미딜(NHS)-LC-LC-비오틴(N-Hydroxysuccinimidyl(NHS)-LC-LC-biotin)은 피어스(Pierce, 미국) 사로부터 구입되었다. 효소인 겨자무 과산화 수소(Horseradish peroxidase, HRP)와 알쓰로마이시스 라모서스 과산화 효소(arthromyces ramosus peroxidase, ARP), 그리고 유리에이즈(Urease)는 칼바이오텍(calbiochem, 미국)사에서 구입되었고, 각 효소의 기질인 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine, TMB)과 루미놀(luminol), 그리고 요소(urea)는 각각 모스(moss, 미국)사와 시그마-알드리치(sigma-aldrich, 미국)사에서 구입되었다. 그 외 다른 모든 시약들은 분석용으로 사용되었다.

실시예 1. 항체-콜로이드성 골드(colloidal gold) 콘쥬게이트 합성

콘쥬게이트 합성을 위해 표준방법에 따라 다양한 반응용액의 산성도와 항체농도를 시험하였고 결정된 최적조건하에서 콘쥬게이트를 제조하였다(참고문헌: S. H. Paek 등, 1999, *Anal. Lett.*, Vol. 32, 335-360).

콘쥬게이트의 합성은 실험에 의해 결정된 최적조건하에서 수행되었다. 산성도 9.0으로 조절된 골드 용액 8 mL에 투석에 의해 준비된 100 μ g/mL B형간염 특정 항체용액 0.8 mL을 가한 후 30분간 반응시켰다. 그 후 이 용액에 10 mM 인산염 완충용액(pH 7.4)에 용해시켜 제조된 5% 카제인 용액(Casein-PB) 1 mL을 추가한 후 30분간 반응시켰다. 반응액은 원심분

리기(한일 Mega 17R, 한국)를 이용하여 15,000 rpm에서 45분간 원심분리시킨 후 상등액을 제거하였다. 분리된 골드 침전물에 0.5% 카세인(Casein-PB)을 가하여 콘쥬게이트의 최종부피를 0.2 mL로 조절하였고 사용시까지 4℃에서 보관하였다.

실시예 2. 항체-효소 콘쥬게이트 합성

분석물질 특이항체와 효소 간 중합은 두 단백질의 기능성을 최대한 보존하기 위해 크로스-링커(cross-linker)를 사용하는 화학반응에 의해 수행되었다. 항체를 20배 몰 과잉농도의 SMCC와 4℃에서 4시간 동안 반응시킨 후 과량의 SMCC는 세파텍스 G-15(sephadex G-15) 젤 크로마토그래피에 의해 제거되었고, 이것을 아래와 같이 활성화된 효소와 바로 중합반응 시켰다. 효소의 활성화를 위해, 그 단백질은 5 mM EDTA가 함유된 반응용액에 용해되었고 몰농도가 20배 더 높은 SPDP와 상온에서 1시간 동안 반응되었다. 그 분자 상에 황화수소(sulfhydryl) 반응기를 생성시키기 위해 DTT(최종 10 mM)를 반응 혼합액에 첨가하여 37℃에서 2시간 동안 다시 반응시켰다. 과량의 시약들은 세파텍스 G-15 칼럼을 이용하여 제거되었다. 두 종류의 활성화된 반응물질 즉, 항체와 효소는 그 몰 비가 1:10이 되도록 혼합되었고 4℃에서 밤새 반응되었다. 합성된 항체-효소 콘쥬게이트의 정제는 세파텍스 G-100 젤(1×20 cm)로 구성된 칼럼을 이용하여 수행되었다. 반응혼합물 1 mL를 칼럼 내에 주입하였고 시료가 젤 내로 모두 스며든 뒤 140 mM 염화나트륨(NaCl)이 포함된 10 mM 인산염 완충용액 (PBS)로 세척하였다. 각 유출액 내 단백질은 브래드포드(Bradford) 분석방법에 의해 측정되었고, 콘쥬게이트 합성 및 정제는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE(7% gel) 분석에 의해 확인되었다.

실시예 3. 신호발생 패드(항체 고정화)

신호발생 패드의 재질은 면역 크로마토그래피에서 널리 사용되고 있는 니트로셀룰로우스(NC) 멤브레인을 사용하였으며 제조회사와 세공크기에 의해 고정화 효율이 달라지므로 시험을 통하여 최적의 재질을 선택 사용하였다. 선택된 니트로셀룰로우스 멤브레인(세공크기: 12 μ m, Milipore)을 사용하여 항체를 고정화하였다. 고정화 방법은 물리흡착 방법과 화학적 방법이 있는데 실험을 해 본 결과 제작의 편리성과 재현성을 고려해서 결정이 되었다. 항체고정화는 NC 멤브레인 스트립(7 x 25 mm)의 미리 정해진 지점에 물리흡착 방법에 의해 고정화되었다. 멤브레인 상의 일정지역(하단에서 1 cm 지점)에 PBS로 희석한 1 mg/mL 항체를 마이크로-피펫(micro-pipet)을 이용 1.5 L를 점 형태로 가한 후에 상온에서 1시간 동안 반응시켰다.

항체가 고정화된 스트립은 0.5% 카세인-트리스(casein-tris)용액 내에 담가 1시간 동안 잔여 표면 처리된 후 0.1% 트리톤 X-100(Triton X-100)을 포함하는 100 mM 트리스 완충용액(pH 7.6)으로 3번 세척되었고 실온에서 건조되었다.

신호발생 패드에 항체를 고정화해서 사용하는 방법은 일반적으로 면역크로마토그래피에서 사용하는 방법으로 다음에 제시되는 예시 중에서 발색 측정용 시스템과 전기화학 측정용 시스템에서만 사용하였다. 발광 측정용 시스템에서는 분석물질의 측정 민감도를 고려해서 항원-항체반응보다 반응성이 뛰어난 스트렙타아비딘-비오틴 반응을 이용하기 위해 신호발생 패드에 스트렙타아비딘을 고정화하였다. 자세한 사항은 발광 측정용 시스템에 설명을 하였다.

실시예 4. 신호발생 패드(스트렙타아비딘 고정화)

신호발생 패드의 재질은 항체 고정화방법에서 설명된 것처럼 니트로셀룰로우스(NC) 멤브레인을 사용하였으며 제조회사와 세공크기에 의해 고정화 효율이 달라지므로 시험을 통하여 최적의 재질을 선택 사용하였다. 고정화 방법은 스트렙타아비딘(Streptavidin, SA)이 물리흡착 방법에 의해서는 고정화가 안되는 특성상 화학적 방법을 사용하였다. 멤브레인(0.7×2.5 cm)을 0.5% 글루타르 알데히드(glutaraldehyde, GA) 용액에 담그어 1시간 동안 반응시킨 후 PBS를 이용 3회 세척하였다. 그리고 SA(10 mg/mL)를 하단으로부터 1 cm 지역에 마이크로 디스펜서(micro-dispenser)를 이용하여 1 μ L/strip을 가한 후에 100% 습도가 유지되는 상자 내에 넣어 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. SA가 고정화된 스트립은 0.5% 카세인-트리스(casein-tris) 용액 내에 담가 1시간 동안 잔여 표면 처리된 후 0.1% 트리톤(Triton) X-100을 포함하는 100 mM 트리스 완충용액 (pH 7.6)으로 3번 세척되었고 실온에서 건조되었다.

실시예 5. 발색 측정용 시스템 구성

5-1. 면역스트립 구성

분석물질(HBsAg: B형 간염 표면항원) 농도에 따른 신호를 육안 판별하거나 발색을 측정하는 광학측정용 면역 크로마토그래피 분석시스템은 항체-골드(gold) 콜로이드 콘쥬게이트 또는 항체-HRP 콘쥬게이트, 그리고 항체가 고정화된 멤브레인 스트립을 사용하여 구성되었다. 제조된 면역스트립 시스템(도 1 참조)은 하단으로부터 0.1% (v/v) 트리톤 X100으로 처리

된 유리섬유 멤브레인(7 x 20 mm)과 콘쥬게이트가 건조상태로 축적되어 있는 유리섬유 멤브레인(7 x 5 mm), 그리고 항체가 고정화된 NC 멤브레인(7 x 25 mm)과 흡수패드로 이용될 셀룰로우스 멤브레인(7 x 15 mm)으로 구성되었다. 각 멤브레인 스트립들은 부분적으로 포개어 구성되었으며 양면테이프에 의해 플라스틱 고정틀에 접착되었다.

5-2. 교차흐름 시스템 구성

스트립 상에 포함되어 있는 항체-HRP 콘쥬게이트에 의한 발색신호를 발생하기 위해 HRP의 기질인 과산화수소를 포함하고 있는 TMB용액을 공급하기 위한 유리섬유 멤브레인(10 x 20 mm)과 공급된 기질이 원활하게 흐를 수 있도록 하기 위한 흡수패드인 셀룰로우스 멤브레인(15 x 20 mm)으로 구성되었다. 각 멤브레인은 위에서 설명된 스트립과는 별도로 존재하며 추후에 항체가 고정화된 NC 멤브레인에 각각 접촉이 되어 신호발색을 유도하도록 고안되어져 있다(도 2 참조).

실시 예 6. 광학 측정장치를 이용한 발색 측정용 시스템 농도응답

6-1. 골드(Gold) 발색측정

상기한 바와 같이 제조된 면역스트립을 이용한 분석시스템의 HBsAg 표준용액을 이용한 골드 발색에 의한 농도응답은 발색된 발색신호의 스캐닝 광학측정방법에 의해 구하였다. HBsAg 표준용액은 각 농도별로 150 μ l씩 마이크로웰에 분주되었고, 각 마이크로웰 내에 면역스트립의 하단을 수직으로 담가 위치시킨 후 수용액을 약 15분에 걸쳐 모세관현상에 의해 스트립 내부로 흡수시켜 세로방향으로 흐름을 진행시켰다. 그러면 흡수된 분석물질은 탐지항체-골드 콜로이드 콘쥬게이트와 반응하여 1차 면역결합체를 형성하게 된다. 이렇게 형성된 1차 면역결합체는 신호패드에 고정되어 있는 포획항체에 의해 포획되고 나머지는 유체흐름에 의해 분리된다. 이렇게 해서 항체가 고정화된 영역에서 발색된 신호를 정량적으로 결정하기 위해 스캐너(HP ScanJet 6100C, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, 미국)를 이용하였다. 발색된 스트립을 스캐닝 한 다음 컴퓨터에 내장된 스캐닝 보드와 소프트웨어 (Biomed Instruments, 미국)를 이용하여 멤브레인 이미지를 포착하였다(도 8, A 참조). 포착된 이미지 상의 발색부분은 이미지 분석프로그램 (Multianalyst version 1.1, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, 미국)을 이용하여 발색부분이 모두 포함되도록 선택한 후 발색세기에 비례하는 적분치인 광학밀도(optical density)로 전환되었다(도 8, C, 골드(gold) 발색신호 참조).

측정된 광학밀도를 분석물질의 농도에 대해 도식한 결과로부터 광학밀도는 육안으로 인지된 색조에 비례하였고 분석물질 농도에 대해서도 비례하는 것으로 관찰되었다. 골드 발색을 이용할 경우 측정 민감도는 약 100 ng/mL이었으며 이것은 다음의 HRP 발색신호와 비교되었다.

6-2. HRP 발색측정

상기한 바와 같이 제조된 골드 발색측정용 면역스트립과 동일하게 제조된 분석시스템의 HBsAg 표준용액을 이용한 HRP 발색에 의한 농도응답도 골드 발색측정 방법과 동일한 방법으로 측정되었다. 단지 차이점은 항체-골드 콜로이드 콘쥬게이트와 2차 항체-HRP 콘쥬게이트를 동시에 사용했으며 본 발명의 중요 요소인 교차흐름을 사용하여 신호를 발생시켰다는 데 있다. HBsAg 표준용액은 각 농도별로 150 μ l씩 마이크로웰에 분주되었고, 각 마이크로웰 내에 면역스트립의 하단을 수직으로 담가 위치시킨 후 수용액을 약 15분에 걸쳐 모세관현상에 의해 스트립 내부로 흡수시켜 세로방향으로 흐름을 진행시켰다. 그러면 흡수된 분석물질은 탐지항체-골드 콜로이드 콘쥬게이트와 반응하고 또한 탐지항체에 특이한 2차 항체-HRP 콘쥬게이트와 반응하여 1차 면역결합체를 형성하게 된다. 이렇게 형성된 1차 면역결합체는 신호패드에 고정되어 있는 포획항체에 의해 포획되고 나머지는 유체흐름에 의해 분리된다. 그런 후에 신호패드 좌측과 우측에 기질공급패드와 흡수패드를 위치시킨 다음 HRP에 대한 기질용액인 과산화수소를 포함한 TMB용액을 공급해 가로방향으로 3분에 걸쳐 흐름을 진행시켰다. 멤브레인 상의 포획항체에 의해 포획된 면역결합체를 제외한 남아있는 모든 성분들은 제거되고 이와 동시에 포획된 면역결합체에 포함된 HRP에 의해 파란색의 신호가 발생된다(도 8, B 참조). 이렇게 해서 항체가 고정화된 영역에서 발색된 신호를 정량적으로 결정하기 위해 스캐너(HP ScanJet 6100C, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, 미국)를 이용하였다. 발색된 스트립을 스캐닝 한 다음 컴퓨터에 내장된 스캐닝 보드(board)와 소프트웨어(Biomed Instruments, 미국)를 이용하여 멤브레인 이미지를 포착하였다(도 8, B). 포착된 이미지 상의 발색부분은 이미지 분석프로그램 (Multianalyst version 1.1, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, 미국)을 이용하여 발색부분이 모두 포함되도록 선택한 후 발색세기에 비례하는 적분치인 광학밀도(optical density)로 전환되었다 (도 8, C, HRP 발색신호 참조).

측정된 광학밀도를 분석물질의 농도에 대해 도식한 결과로부터 광학밀도는 육안으로 인지된 색조에 비례하였고 분석물질 농도에 대해서도 비례하는 것으로 관찰되었다. HRP 발색을 이용한 경우의 측정 민감도는 1 ng/mL이었으며 이것은 골드 발색신호보다 약 100배정도 좋은 결과를 보였다(도 8, C 참조).

실시예 7. 발광 측정용 시스템 구성

7-1. 면역스트립 구성

예시로 사용된 분석물질은 심근경색을 조기진단하기 위해 사용되고 있는 카디악 트로포닌 I(cardiac troponin I, cTn I)을 사용하였다. 분석물질 농도에 따른 신호를 육안 판별이나 발광을 측정하는 광학측정용 면역 크로마토그래피 분석시스템은 항체-비오틴 콘주게이트, 항체-골드 콜로이드 콘주게이트 또는 항체-ARP 콘주게이트, 그리고 스트렙타아비딘(streptavidin, SA)이 고정화된 멤브레인 스트립을 사용하여 구성되었다. 제조된 면역스트립 시스템(도 1 참조)은 하단으로부터 0.1% (v/v) 트리톤 X100으로 처리된 유리섬유 멤브레인(7 x 20 mm)과 콘주게이트가 건조상태로 축적되어 있는 유리섬유 멤브레인(7 x 5 mm), 그리고 SA이 고정화된 NC 멤브레인(7 x 25 mm)과 흡수패드로 이용될 셀룰로우스 멤브레인(7 x 15 mm)으로 구성되었다. 각 멤브레인 스트립들은 부분적으로 포개어 구성되었으며 양면테이프에 의해 플라스틱 패드 고정틀에 접착되었다.

7-2. 교차흐름 시스템 구성

스트립 상에 포함되어 있는 항체-ARP 콘주게이트에 의한 발광신호를 발생하기 위해 ARP의 기질인 과산화수소를 포함하고 있는 루미놀(luminol)용액을 공급하기 위한 유리섬유 멤브레인(10 x 20 mm)과 공급된 기질이 원활하게 흐를 수 있도록 하기 위한 흡수패드인 셀룰로우스 멤브레인(15 x 20 mm)으로 구성되었다. 각 멤브레인은 위에서 설명된 스트립과는 별도로 존재하며 추후에 SA이 고정화된 NC 멤브레인에 각각 접촉이 되어 신호발색을 유도하도록 고안되어져 있다(도 2 참조).

실시예 8. 발광 측정용 시스템 농도응답

8-1. 골드(Gold) 발색측정

상기한 바와 같이 제조된 면역스트립을 이용한 분석시스템의 cTn I 표준용액을 이용한 골드 발색에 의한 농도응답은 발생된 발색신호의 스캐닝 광학측정방법에 의해 구하였다. cTn I 표준용액은 각 농도별로 150 μ l씩 마이크로웰에 분주되었고, 각 마이크로웰 내에 면역스트립의 하단을 수직으로 담가 위치시킨 후 수용액을 약 15분에 걸쳐 모세관현상에 의해 스트립 내부로 흡수시켜 세로방향으로 흐름을 진행시켰다. 그러면 흡수된 분석물질은 포획항체-비오틴 콘주게이트와 탐지항체-골드 콜로이드 콘주게이트와 반응하여 분석물질을 중심으로 샌드위치 면역결합체를 형성하게 된다. 이렇게 형성된 샌드위치 면역결합체에는 비오틴 콘주게이트를 포함하고 있기 때문에 신호패드에 고정되어 있는 SA에 의해 포획되고 나머지는 유체흐름에 의해 분리된다. 이렇게 해서 SA이 고정화된 영역에서 발색된 신호를 정량적으로 결정하기 위해 스캐너(HP ScanJet 6100C, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, 미국)를 이용하였다. 발색된 스트립을 스캐닝 한 다음 컴퓨터에 내장된 스캐닝 보드와 소프트웨어 (Biomed Instruments, 미국)를 이용하여 멤브레인 이미지를 포착하였다. 포착된 이미지 상의 발색부분은 이미지 분석프로그램 (Multianalyst version 1.1, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, 미국)을 이용하여 발색부분이 모두 포함되도록 선택한 후 발색세기에 비례하는 적분치인 광학밀도(optical density)로 전환되었다 (도 9 골드(gold) 발색신호 참조).

측정된 광학밀도를 분석물질의 농도에 대해 도식한 결과로부터 광학밀도는 육안으로 인지된 색조에 비례하였고 분석물질 농도에 대해서도 비례하는 것으로 관찰되었다. 골드 발색을 이용할 경우 측정 민감도는 1 ng/mL 이었으며 이것은 다음의 ARP 발광신호와 비교되었다.

8-2. ARP 발광신호 측정

상기한 바와 같이 제조된 골드 발색측정용 면역스트립과 동일하게 제조된 분석시스템의 cTn I 표준용액을 이용한 ARP 발광신호에 의한 농도응답은 항체-골드 콜로이드 콘주게이트 대신 항체-ARP 콘주게이트를 사용했다는 점과 본 발명의 중요 요소인 교차흐름을 사용하여 신호를 발생시켰다는 점에서 골드 발색측정 구별된다. cTn I 표준용액은 각 농도별로 150 μ l씩 마이크로웰에 분주되었고, 각 마이크로웰 내에 면역스트립의 하단을 수직으로 담가 위치시킨 후 수용액을 약 15분에 걸쳐 모세관현상에 의해 스트립 내부로 흡수시켜 세로방향으로 흐름을 진행시켰다. 그러면 흡수된 분석물질은 포획항체-비오틴 콘주게이트와 탐지항체-ARP 콘주게이트와 반응하여 분석물질을 중심으로 샌드위치 면역결합체를 형성하게 된다. 이렇게 형성된 샌드위치 면역결합체에는 비오틴 콘주게이트를 포함하고 있기 때문에 신호패드에 고정되어 있는 SA에 의해 포획되고 나머지는 유체흐름에 의해 분리된다. 그런 후에 신호패드 좌측과 우측에 기질공급패드와 흡수패드를 위치시킨 다음 ARP에 대한 기질용액인 과산화수소를 포함한 루미놀 용액(0.2 M carbonate buffer, pH 9.0)을 공급해 가로방향

으로 3분에 걸쳐 흐름을 진행시켰다. 멤브레인 상의 포획항체에 의해 포획된 면역결합체를 제외한 남아있는 모든 성분들은 제거되고 이와 동시에 포획된 면역결합체에 포함된 ARP에 의해 파란색의 발광신호가 발생된다. 이렇게 해서 SA가 고정화된 영역에서 발광된 신호를 정량적으로 결정하기 위해 광다이오드(Hamamatsu, 일본)와 컴퓨터에 내장된 아날로그-디지털 변환장치(ADCM board, 국내제작)를 이용하였다.

측정된 수치를 분석물질의 농도에 대해 도식한 결과로부터 발광에 의한 전압은 분석물질 농도에 대해서도 비례하는 것으로 측정되었다. ARP 발광신호 측정방식을 이용한 경우의 측정 민감도는 약 0.1 ng/mL 이었으며 이것은 골드 발색신호보다 약 10배정도 좋은 결과를 보였다(도 9 참조).

실시에 9. 전기화학 측정용 시스템 구성

분석물질 농도에 따른 전기화학 신호를 측정하기 위한 면역 크로마토그래피 분석시스템의 구성도 실시예 5와 기본적으로는 동일하게 구성되었다. 전기화학 측정용 시스템의 다른 점은 위에서 설명된 예시처럼 발색이나 발광신호를 발생하는 것이 아니고 전기활성 물질을 발생시켜 그것을 전기적으로 활성화 시켜야 한다는 것이다. 따라서 다른 시스템과는 달리 전극이 추가적으로 요구되어 지며(도 6 참조) 본 예시에서는 앞에서 설명된 것처럼 전기화학 측정방법 중에 전기 전도도 측정용 시스템을 예를 들어 설명하도록 하겠다.

9-1. 면역스트립 구성

분석물질은 당뇨병의 합병증으로 알려져 있는 신장병을 조기진단하기 위해 사용되고 있는 인간혈청 알부민(Human serum albumin, HSA)을 사용하였다. 분석물질 농도에 따른 전도도신호를 측정하는 전기화학측정용 면역 크로마토그래피 분석시스템은 항체-유리에이즈(Urease) 콘주게이트, 그리고 항체가 고정화된 멤브레인 스트립을 사용하여 구성되었다. 제조된 면역스트립 시스템(도 1 참조)은 하단으로부터 0.1% (v/v) 트리톤 X100으로 처리된 유리섬유 멤브레인(7 x 20 mm)과 콘주게이트가 건조상태로 축적되어 있는 유리섬유 멤브레인(7 x 5 mm), 그리고 항체가 고정화된 NC 멤브레인(7 x 25 mm)과 흡수패드로 이용될 셀룰로우스 멤브레인(7 x 15 mm)으로 구성되었다. 각 멤브레인 스트립들은 부분적으로 포개어 구성되었으며 양면테이프에 의해 플라스틱 패드 고정틀에 접착되었다.

9-2. 교차흐름 시스템 구성

교차흐름 시스템은 스트립 상에 포함되어 있는 항체-유리에이즈 콘주게이트에 의한 전도도신호를 발생하기 위해 유리에이즈의 기질인 요소(urea)용액을 공급하기 위한 유리섬유 멤브레인(10 x 20 mm)과 공급된 기질이 원활하게 흐를 수 있도록 하기 위한 흡수패드인 셀룰로우스 멤브레인(15 x 20 mm)으로 구성되었다. 각 멤브레인은 위에서 설명된 스트립과는 별도로 존재하며 추후에 항체가 고정화된 NC 멤브레인에 각각 접촉이 되어 신호발색을 유도하도록 고안되어져 있다(도 2 참조).

실시에 10. 전기화학 측정용 시스템 농도응답

상기한 바와 같이 제조된 면역스트립을 이용한 분석시스템의 HSA 표준용액에 대한 농도응답은 발생된 전기화학신호를 받을 수 있는 전기화학 탐지장치에 의해 측정되었다. HSA 표준용액은 각 농도별로 150 μ L씩 마이크로웰에 분주되었고, 각 마이크로웰 내에 면역스트립의 하단을 수직으로 담가 위치시킨 후 수용액을 약 15분에 걸쳐 모세관현상에 의해 스트립 내부로 흡수시켜 세로방향으로 흐름을 진행시켰다. 그러면 흡수된 분석물질은 탐지항체-유리에이즈 콘주게이트와 반응하여 1차 면역결합체를 형성하게 된다. 이렇게 형성된 1차 면역결합체는 신호패드에 고정되어 있는 포획항체에 의해 포획되고 나머지는 유체흐름에 의해 분리된다. 그런 후에 신호패드 좌측과 우측에 기질공급패드와 흡수패드를 위치시킨 다음 유리에이즈에 대한 기질용액인 요소용액을 공급해 가로방향으로 3분에 걸쳐 흐름을 진행시켰다. 멤브레인 상의 포획항체에 의해 포획된 면역결합체를 제외한 남아있는 모든 성분들은 제거되고 이와 동시에 포획된 면역결합체에 포함된 유리에이즈가 요소를 분해하여 암모늄 이온과 카르보늄 이온을 생성시켜 이온농도를 증가시키므로 분석물질 농도에 비례한 전기전도도 변화가 신호로써 나타난다(도 10 참조). 이렇게 해서 항체가 고정화된 영역에서 발생하는 전기화학 신호 중의 하나인 전도도 신호를 정량적으로 결정하기 위해 디지털 멀티미터(digital multimeter, 일본 HITASI사 제조)를 이용하였다.

측정된 수치를 분석물질의 농도에 대해 도식한 결과로부터 전도도에 의한 전류는 분석물질 농도에 대해서 비례하는 것으로 측정되었으며 측정민감도는 약 1 ng/mL 인 것으로 확인되었다.

실시 예 11. 직접 측정방식과 간접 측정방식을 이용한 신호 측정

효소를 이용하는 면역분석법(ELISA)에는 두 가지 측정방식이 있는데 분석물질에 특이하게 반응하는 특이항체에 직접 효소를 달아 바로 사용하여 신호를 측정하는 직접 측정방식과 신호증폭을 위해 특이항체는 그대로 사용하고 그 특이항체를 포획할 수 있는 2차 항체에 효소를 달아 사용하는 간접 측정방식이 있다.

멤브레인 스트립 기술에 효소를 이용한 신호 증폭 기술을 도입하기 위해 사용된 교차흐름 시스템에 의해 ELISA와 마찬가지로 두 방식 모두를 사용해서 비교를 했으며 기질공급이 원활하게 이루어질 수 있도록 설정하였다. 직접 측정방식은 HBsAg(분석물질)에 대한 특이항체에 직접 효소인 HRP를 달아 사용하는 것이고, 간접 측정방식은 분석물질에 특이한 항체를 인지하는 2차 항체에 HRP를 달아 사용하는 것이다. 위에서 제시된 B형 간염을 예로 들어보면 생쥐에서 생산된 HBsAg을 인지하는 단일클론항체(Mouse Anti-HBsAg Ab)에 직접 HRP를 달아 사용한 경우가 직접 측정방식이며, 생쥐에서 생산된 단일클론 항체를 인지하는 염소에서 생산된 복합클론 항체(Goat Anti-mouse IgG Ab)에 HRP를 달아 사용한 경우를 간접 측정방식이라 할 수 있다. 기본적으로 직접 측정방식을 사용할 경우에는 분석물질이 바뀌게 되면 각 특이항체에 효소를 달아주어야 한다는 단점이 있다. 이에 반해 간접 측정방식을 사용할 경우에는 분석물질이 바뀐다 하더라도 효소-콘주게이트는 바꿀 필요가 없기 때문에 간편하며 또한 항체를 추가적으로 사용하였기 때문에 신호증폭이 된다는 장점을 가지고 있다. 본 예시에서는 이와 같은 두 측정방식을 이용하여 신호발색을 측정하였는데 이것은 예시일 뿐 다른 측정시스템인 발광시스템과 전기화학 시스템 모두에 적용할 수 있는 것이다.

두 측정방식에 대한 비교를 위해, 간접 측정방식은 위에서 설명된 예시 6-2에서와 동일하게 수행하였고, 직접 측정방식에서 콘주게이트 제조는 예시 6-1에 제시된 방법을 이용하였고 단지 HBsAg 특이항체에 골드 대신에 HRP를 직접 달아 사용한 것만이 상이하다. 제조된 면역스트립을 이용한 분석시스템의 HBsAg 표준용액에 대한 농도응답은 위에서 설명된 바와 같이 발생된 발색신호의 스캐닝 광학측정방법에 의해 구하였다.

직접 측정방식과 간접측정 방식에 신호발색의 차이는 ELISA(도 11, C참조)에서와 마찬가지로 간접측정 방식이 약 10배 정도 좋은 것으로 나타났으나(도 11, A 및 B 참조), 시스템의 목적 및 요구조건에 따라 측정 방식은 변화될 수 있다.

발명의 효과

본 발명의 멤브레인 스트립 바이오센서 시스템은 세로방향의 흐름에만 의존하는 기존의 면역 크로마토그래피 분석시스템에서는 성취하기 어려웠던 면역반응과 효소반응의 순차적 공정을 교차흐름 방법을 도입함으로써 획기적으로 가능하게 한다. 따라서, 본 발명을 이용하면 면역 크로마토그래피 분석 시 신호발생을 위해 효소반응과 같은 신호증폭공정을 이용할 수 있기 때문에 상대적으로 저렴하고 소형화된 탐지기를 사용할 수 있을 뿐만 아니라 형광물질을 신호발생원으로 사용하는 바이오센서에서와 같이 분석물질을 고감도로 측정할 수 있다. 더욱이, 본 발명의 분석원리를 응용하면 표지물질로 사용할 수 있는 효소의 종류는 매우 다양하여 발색, 광, 전류, 전압, 전기전도도 등 필요에 따라 다른 신호를 발생하는 바이오센서의 제작이 가능하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

시료첨가용 멤브레인 패드(10), 콘주게이트 축적용 멤브레인 패드(20), 포획용 감응성분이 고정되어 있는 신호발생용 멤브레인 패드(30), 세로흐름 용액흡수용 멤브레인 패드(40), 신호발생을 위한 기질용액 공급용 멤브레인 패드(50), 가로흐름 용액흡수용 멤브레인 패드(60) 및 기질용액을 포함하며;

신호발생용 멤브레인 패드(30)의 세로방향 양끝에 길이로 패드(40)와 패드(20)이 부분적으로 포개어 고정되고 패드(20)의 끝에 길이로 패드(10)이 부분적으로 포개어 고정되는 세로배열을 갖으면서, 신호발생용 멤브레인 패드(30)의 양 측면에 평행하게 패드(50)과 패드(60)이 부분적으로 포개어 고정되는 가로배열을 포함하는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 2.

제1항에 있어서, 가로배열 패드들[(50), (60)]이, 세로배열 패드들과 결합된 신호발생용 멤브레인 패드(30) 상에 처음부터 고정되거나, 처음에는 분리된 상태로 구비되었다가 세로흐름반응이 완료된 후에 고정됨으로써, 가로흐름반응의 수행에 사용되는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 3.

제2항에 있어서, 세로배열 패드들과 가로배열 패드들이 분리된 상태로 구비된 경우에, 세로배열 패드들[(10),(20),(30) 및 (40)]을 하나의 틀에 고정시키고 가로배열 패드들[(50) 및 (60)]을 다른 틀에 고정시켜서, 세로흐름반응이 완료된 후에 어느 하나의 틀을 이동 시킴으로써 패드들을 상호 고정시키는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 4.

제1항에 있어서, 전기화학적 측정을 위해 추가적으로 전극을 신호발생용 멤브레인 패드(30) 상에 직접 형성하거나 별도로 제작하여 신호측정시에 결합하는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 5.

제1항에 있어서, 기질용액은 효소반응을 수행할 때 자동적으로 멤브레인 패드(50) 상에 공급되도록 하기 위하여, 멤브레인 패드(50)의 상부의 정해진 위치에 고정되는 기질용기에 담겨진 상태로 준비되거나, 수동적인 공급을 위하여 장치로부터 분리된 용기에 담겨진 상태로 준비되는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 6.

제1항에 있어서, 시료첨가용 멤브레인 패드(10), 콘쥬게이트 축적용 멤브레인 패드(20) 및 기질용액 공급용 멤브레인 패드(50)는 유리섬유 멤브레인이고, 신호발생용 멤브레인 패드(30)는 니트로셀룰로우스 멤브레인이고, 용액흡수용 멤브레인 패드[(40), (60)]는 셀룰로우스 멤브레인인 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 7.

제1항에 있어서, 콘쥬게이트 축적용 멤브레인 패드(20)가 탐지용 감응성분, 탐지용 감응성분과 표지물질의 콘쥬게이트 및 탐지용 감응성분에 특이하게 반응하는 2차 감응성분과 표지물질의 콘쥬게이트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 건조된 상태로 포함하는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 8.

제7항에 있어서, 탐지용 감응성분이 분석물질과 특이적으로 반응하는 항체, 효소, 수용체, 또는 DNA인 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 9.

제7항에 있어서, 표지물질이 겨자무 과산화 효소(horseradish peroxidase), 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase), β -갈락토시다아제(β -galactosidase), 또는 알쓰로마이시스 라모서스 과산화 효소(arthromyces ramosus peroxidase)이고, 기질용액은 각 효소에 특이한 발색용 기질성분을 포함하며, 신호발생 시 효소-기질 반응에 의해 육안으로 확인할 수 있는 발색 혹은 변색을 신호로 나타내는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 10.

제7항에 있어서, 표지물질은 골드 콜로이드 입자이고 기질용액은 실버 화합물을 포함하며, 신호발생 시 화학 촉매반응에 의해 육안으로 확인할 수 있는 발색 혹은 변색을 신호로써 나타내는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 11.

제7항에 있어서, 표지물질은 겨자무 과산화 효소(horseradish peroxidase), 또는 알쓰로마이시스 라모서스 과산화 효소(arthromyces ramosus peroxidase)이고, 기질용액은 각 효소에 특이한 발광용 기질성분인 루미놀을 포함하며, 신호발생 시 효소-기질 반응에 의해 육안으로 확인할 수 있는 발광을 신호로 나타내는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 12.

제7항에 있어서, 표지물질은 Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , 혹은 이들의 화합물이고, 기질용액은 발광용 기질성분인 루미놀을 포함하며, 신호발생 시 효소-기질 반응에 의해 육안으로 확인할 수 있는 발광을 신호로써 나타내는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 13.

제7항에 있어서, 표지물질은 글루코우즈 옥시데이즈, 유리에이즈, 페니실린 옥시데이즈, 또는 콜레스테롤 옥시데이즈이고, 기질용액은 각 효소에 특이한 전기화학신호 발생용 기질성분을 포함하며, 신호발생 시 효소-기질 반응에 의해 전기전도도 변화, 전류변화 또는 전압변화를 신호로 나타내는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 14.

제1항에 있어서, 포획용 감응성분이 분석물질과 특이적으로 반응하거나, 분석물질을 포함하는 결합체의 어느 성분과 특이적으로 반응하는 항체, 효소, 수용체, 또는 DNA인 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 15.

제1항에 있어서, 시료투입구가 구비된 멤브레인 스트립 바이오센서 장치의 홀더 상판(71), 신호탐지창(78)과 효소기질용기 파괴침(75)이 구비된 멤브레인 스트립 바이오센서 장치의 홀더 하판(72), 누름단추(73), 가로배열 패드 고정틀(74) 및 기질용기(76)를 더 포함하며,

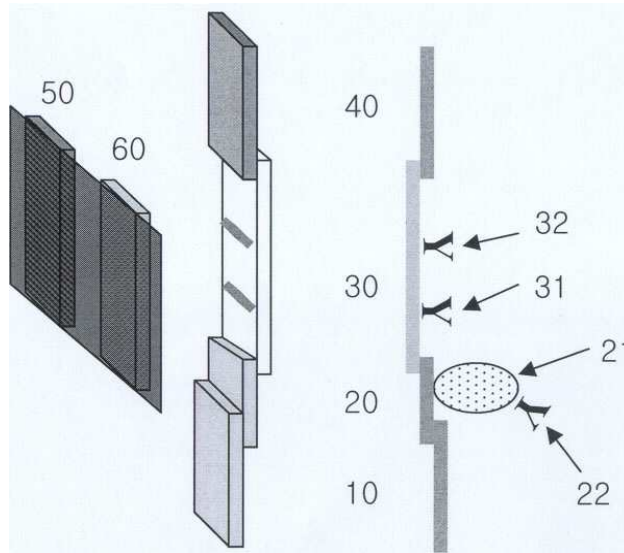
세로배열 패드들[(10), (20), (30) 및 (40)]이 상기의 홀더 하판(72) 내부에 고정되고, 가로배열 패드들[(50) 및 (60)]이 상기의 홀더 상판(71) 외부의 누름단추(73)와 연결된 홀더 상판(71) 내부의 가로배열 패드 고정틀(74)에 고정되며, 기질용액을 담고 있는 기질용기(76)가 기질용액 공급용 멤브레인 패드(50) 상부에 고정되는 형태로 제조되는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

청구항 16.

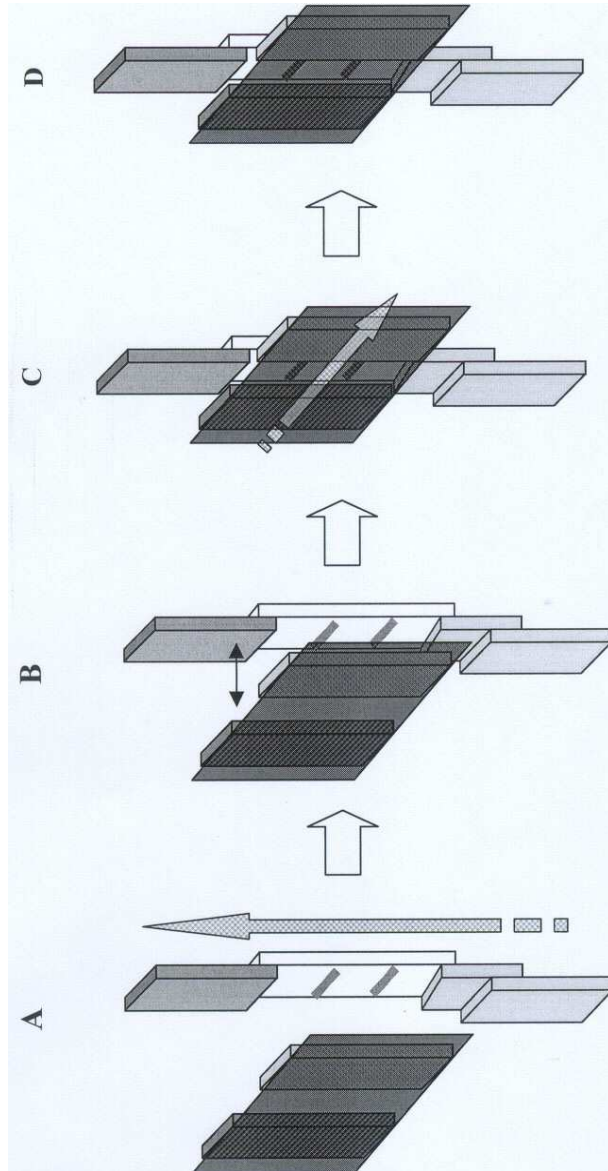
제15항에 있어서, 세로배열 패드들을 통한 세로흐름반응이 완료된 후에, 누름단추(73)의 자동 또는 수동 조작을 통해 가로배열 패드들이 세로배열 패드들에 고정될 때, 홀더 하판(72)에 설치된 기질용기 파괴 침(75)에 의하여 기질용기(76)가 파괴되어 가로흐름반응이 자동으로 진행되는 것을 특징으로 하는 멤브레인 스트립 바이오센서 장치.

도면

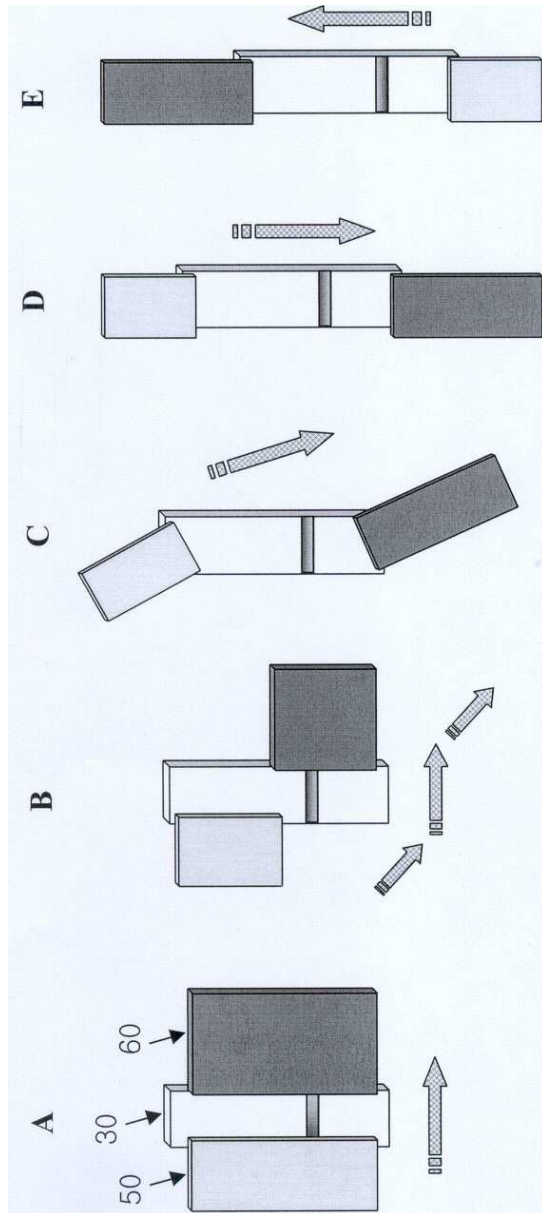
도면1



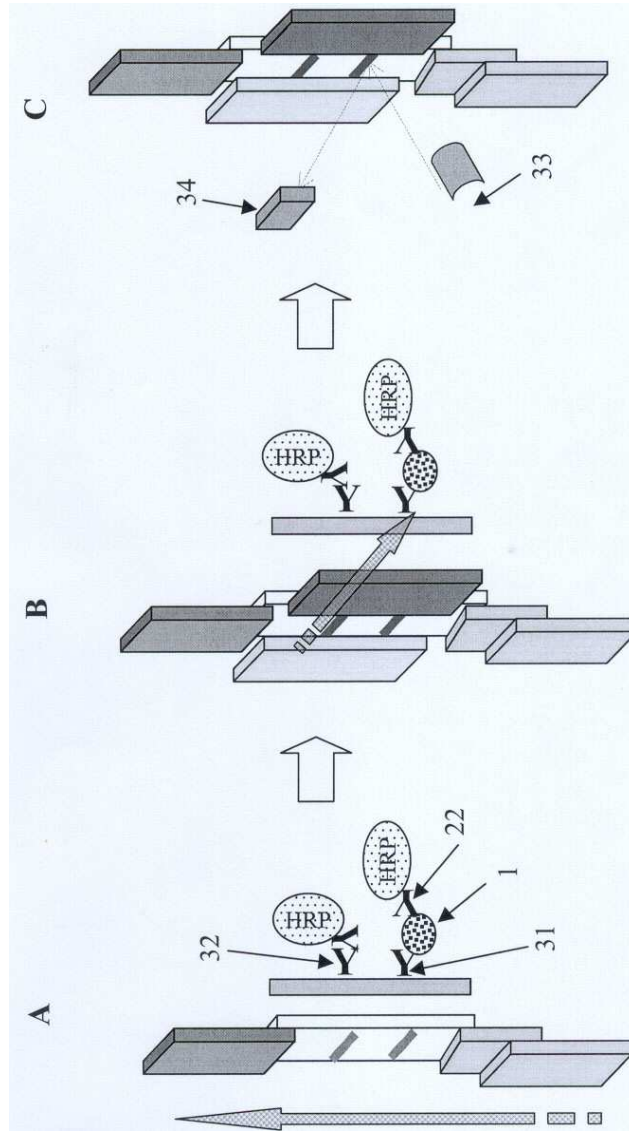
도면2



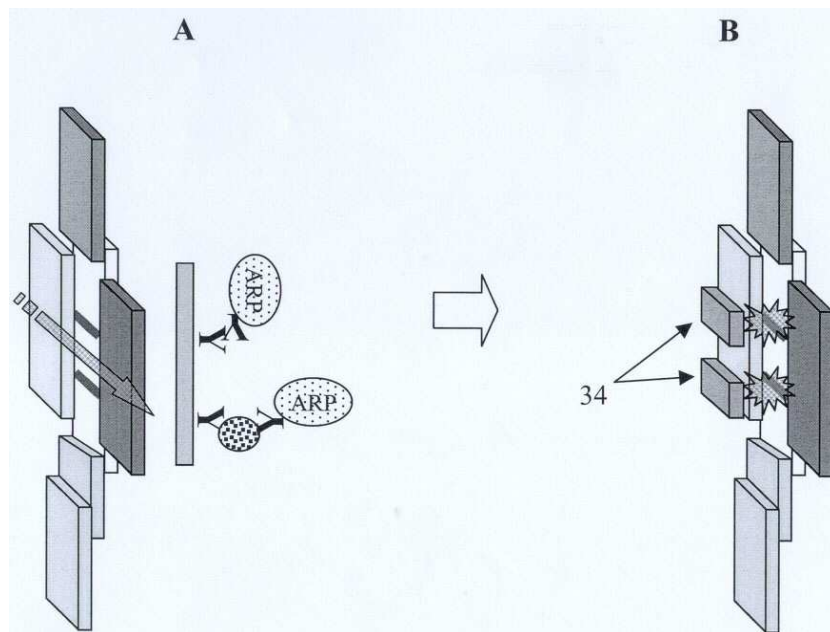
도면3



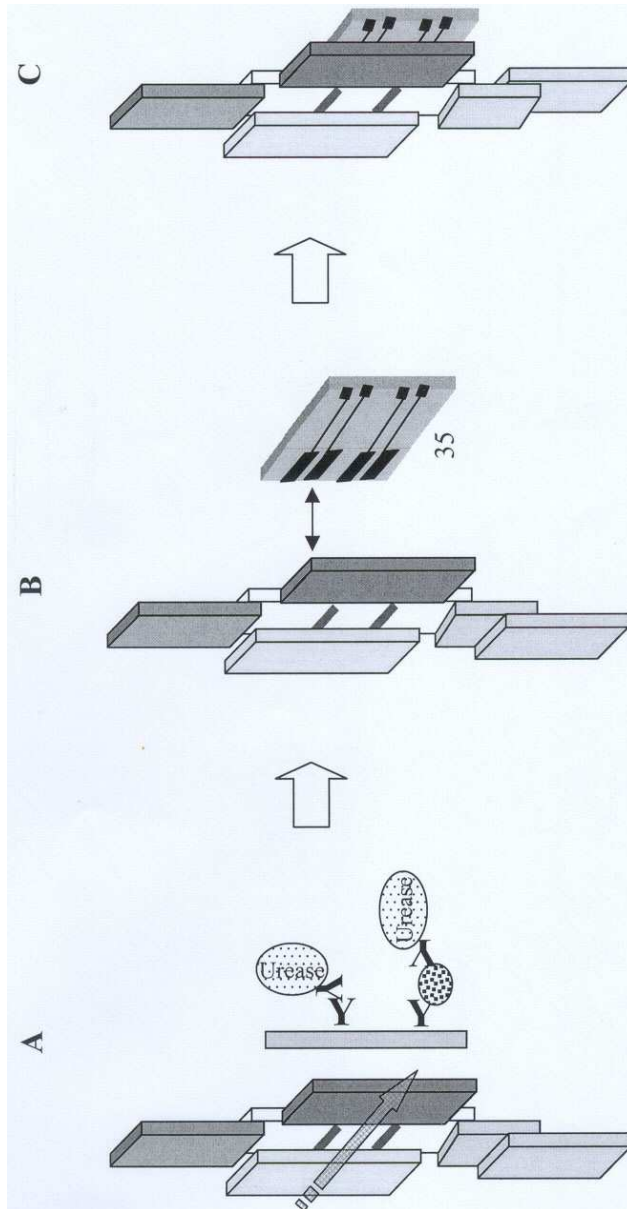
도면4



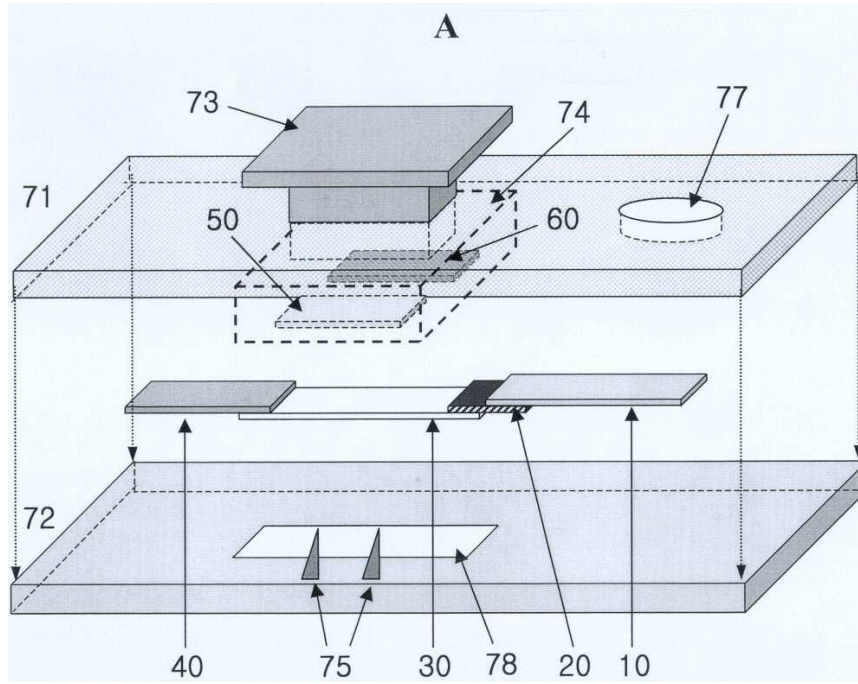
도면5



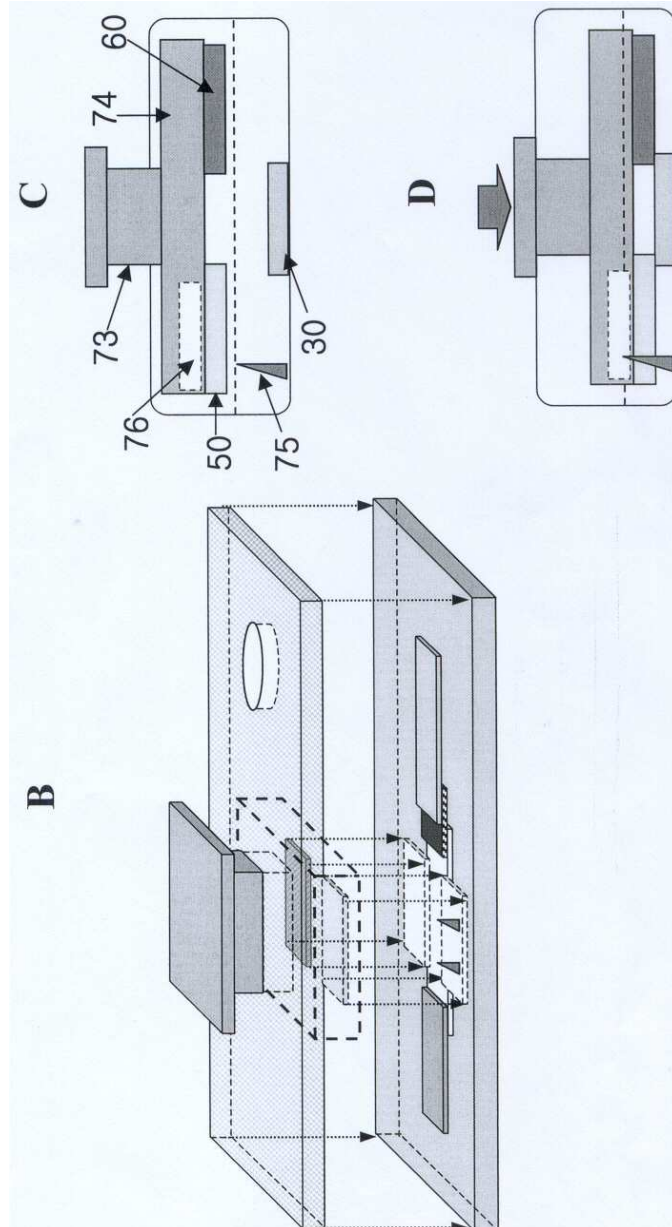
도면6



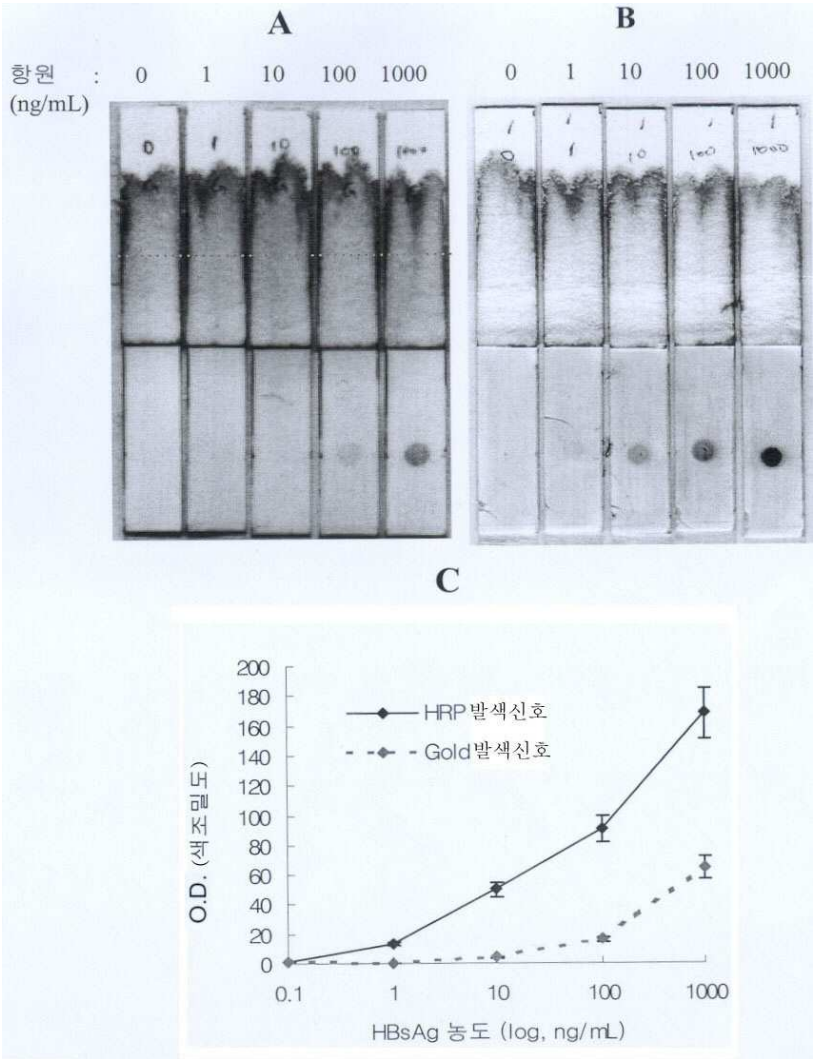
도면7a



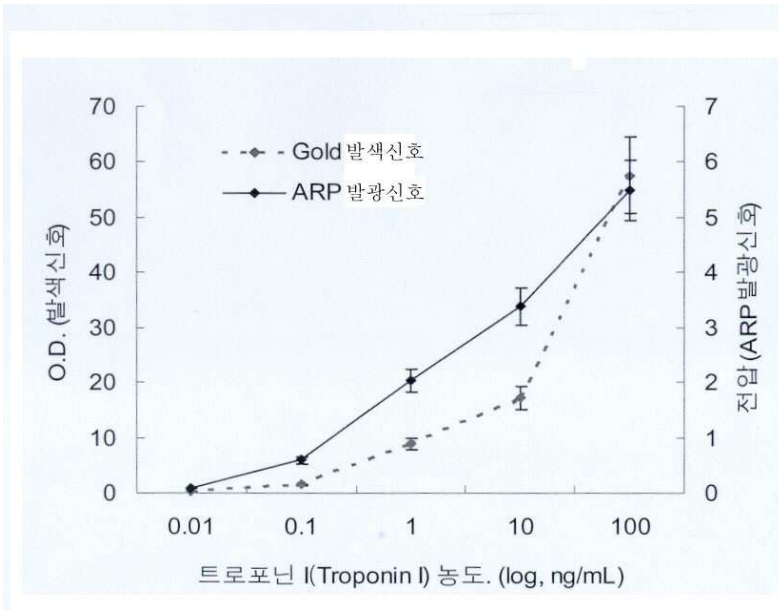
도면7b



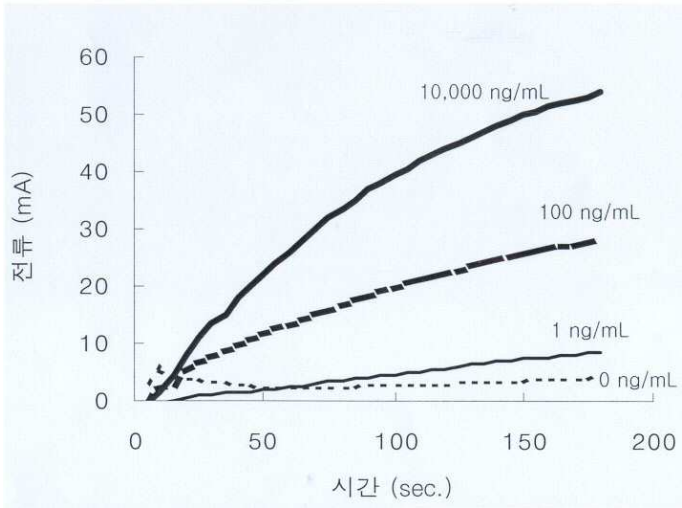
도면8



도면9



도면10



도면11

