

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 11월 1일 (01.11.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/148017 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/003105
- (22) 국제출원일: 2011년 4월 27일 (27.04.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 피씨엘(주) (PCL, INC.) [KR/KR]; 경기도 수원시 장안구 천천동 성균관대학교 연구 2 동 83421 호, 440-746 Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 곁
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 조민정 (JO, Minjoung) [KR/KR]; 서울특별시 중구 장충동 2 가 193-467 402 호, 100-856 Seoul (KR). 이세람 (LEE, Seram) [KR/KR]; 서울특별시 강동구 둔촌 2 동 프라자아파트 2-207, 134-062 Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young); 서울특별시 강남구 역삼동 648-23 여삼빌딩 11 층, 135-080 Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

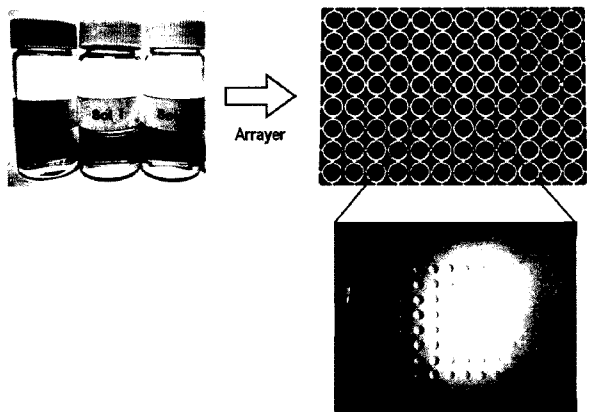
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: SOL-GEL KIT FOR MANUFACTURING A BIOCHIP AND METHOD FOR MANUFACTURING A BIOCHIP BY USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 바이오칩 제조용 졸-겔 키트 및 이를 이용한 바이오 칩의 제조방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a sol-gel kit for manufacturing a biochip and a method for manufacturing a biochip by using same, and more particularly to the method for manufacturing a biochip wherein by mixing a mixed material of certain silicate monomers such as SolB1, SolB2, and SolB3, SolBH, SolBS, and distilled water, and a mixed material of detector biologics sequentially, the gelation time of sol compositions is delayed, leading to stabilized gelation, and by using an arrayer or an instrument such as a pipette, etc. when dispensing a sol mixed material for hand-dispensing, etc., the biochip can be manufactured conveniently. On the other hand, by dispensing the sol compositions, SolBH solution land a buffer solution SolBS, distilled water and a mixed material solution II of detector proteins sequentially on a board without a typical pre-processing procedure such as mixing, the homogenizing biochip is manufactured.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



WO 2012/148017 A1



본 발명은 바이오칩 제조용 졸-겔 키트 및 이를 이용한 바이오 칩의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 바이오 칩을 제조함에 있어서, SolB1, SolB2, SolB3 와 같은 특정 실리케이트 단량체들의 혼합물 및 SolBH, SolBS 및 증류수 와 탐지 생물학적 물질의 혼합물을 순서대로 혼합함으로써 졸 조성물의 겔화 시간을 늦추어 안정화된 겔화 (gelation)을 유도하며, 졸 혼합물을 분주할 때 어레이를 사용하거나 파이펫등의 도구를 이용하여 손으로 분주하는 등 간편하게 바이오칩을 제작할 수 있고 한편으로는, 혼합과 같은 통상적인 전처리과정 없이도, 졸 조성물, SolBH 인 용액 I 과 완충액 SolBS, 증류수 및 탐지단백질의 혼합물인 용액 II 를 순서대로 기판에 분주함으로써 균질한 바이오 칩을 제조하는 방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 바이오칩 제조용 졸-겔 키트 및 이를 이용한 바이오 칩의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 특정 용액들을 순차적으로 혼합하여 제조한 졸 조성물을 이용하거나, 또는, 전처리 과정 없이 이러한 특정 용액을 순차적으로 기판에 직접 분주하여 간단하게 바이오 칩을 제조하는 방법 및 바이오칩 제조용 졸-겔 키트에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 바이오 칩은 새로운 나노테크놀로지(nanotechnology, NT), 바이오테크놀로지(biotechnology, BT), 정보테크놀로지(information technology, IT)가 융합된 기술의 대표적인 예이다. 바이오 칩은 다양한 종류의 생체물질을 고체상 지지체의 표면에 고집적 미세배열(high-density microarray)한 것으로서, 표면에 붙이는 생체물질에 따라서 DNA칩, 단백질 칩, 셀 칩, 뉴론 칩 등 다양한 종류의 칩으로 나뉠 수 있다. 또한, 바이오 칩은 미세유체학 기술과 합쳐져서 LOC(lab-on-a-chip)로 발전하고 있다. 바이오 칩의 세부기술로는 생체물질을 고정시키는 기술, 고체 지지체를 생체물질 친화적으로 만드는 기술, 생체물질을 미세 배열하는 기술, 만들어진 칩 상에서 여러 가지 생체 반응을 실시하는 어세이 기술, 반응 결과를 감지하는 기술, 고정화 대상인 생체물질을 만드는 단백질 공학, 유전자 재조합 기술 등이 있다.
- [4] 단백질 칩은 바이오 칩(biochip)의 한 종류로서, 다양한 종류의 단백질을 단위 면적의 고체상 지지체의 표면에 고집적 미세 배열(intense microarray)한 것이다. 최근, 이미 개발되어 상용화된 DNA 칩의 제작 원리 및 제작 기술 요소를 도입하여 단백질 칩을 제작하려는 노력이 행해지고 있다. 일반적으로, 상용화된 DNA 칩의 대부분은 코팅 물질로 표면을 전처리한 유리판 위에 DNA를 고정화시켜 제작한 것이다. DNA 칩의 제작에 사용되는 방법과 유사한 방법으로 단백질 칩을 제조하는 경우, 즉 코팅 물질로 표면을 전처리한 유리판 위에 단백질을 고정화하여 단백질 칩을 제조하는 경우는 고정되는 표적 단백질의 물리화학적 특성의 차이로 인해 다양한 문제점이 발생되고 있다.
- [5] 초기 단백질 칩은 표면 처리된 유리판 위에 단백질을 그대로 부착시킨 후, 간단한 결합 분석(binding assay)을 수행하는 것이었으나, 고정화된 단백질의 활성 여부에 따라 실제 작동 여부가 좌우되어 본래의 목적을 달성하는데 어려움이 많았다 (MacBeath and Schreiber, Science 289:1760, 2000). 이러한 문제점은 전술한 바와 같이 단백질이 갖는 고유한 물리화학적 특성의 차이로 인하여 발생하는 단백질의 변성(denaturation) 혹은 불활성화, 분해(degradation)

등으로부터 야기되는 것이다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여, DNA와는 구별되는 단백질의 특성에 부합하는 단백질 부착 표면 처리 기술 및 단백질 고정 물질 등에 대한 연구가 이루어지고 있다. 이에 대한 연구는 단백질 칩 표면에 고정 반응을 일으키면서, 동시에 단백질의 활성을 유지하는 방법을 제공하는데 초점이 맞추어진 것으로서, 퍼킨 엘머(PerkinElmer)에 최근 인수된 패커드 바이오사이언스(Packard Bioscience)의 히드로겔(Hydrogel)TM 코팅 슬라이드, 프로링스(Prolinx)의 버사링스(versalinx) 칩, 지오믹스(Zyomyx)의 바이오 칩인 PDC 칩 등을 그 예로 들 수 있다.

- [6] 한편, 졸-겔 공정은 미세 가공을 통해 미세 구조를 만드는데 이용되어 온 기술로서, 특히 무기 물질에 생체 분자들을 화학적으로 부착시키는 대신 온화한 공정을 통해 결합망을 형성하고, 이 결합망 안에 생체 분자들을 공유 결합이 아닌 방법으로 고정화하는데 많이 이용되어 온 기술이다 (Gill I. and Ballesteros A., Trends Biotechnol., 18:282, 2000).
- [7] 나아가, 효소를 비롯한 많은 생체 분자들이 괴상 졸-겔 매트릭스 안에 고정되어 생체 촉매나 바이오센서의 제작에도 이용되고 있으며(Reetz, Adv. Mater., 9:943, 1997), 특히 투명한 광학적 성질 때문에 광학적 발색 검출에도 이용되고 있다 (Edminston, et al., J. Coll. Interf. Sci., 163:395, 1994). 또한, 생체 분자는 졸-겔 반응에 의해 고정화되면 화학적으로 안정화될 뿐 아니라, 열적으로도 매우 안정화된다고 알려져 있다 (Dave, et al., Anal. Chem., 66:1120, 1994).
- [8] 바이오 센서의 경우, 상기 졸-겔 반응은 단순한 고정뿐만 아니라, 고체 지지체 위에 미세 구조를 형성하여 패터닝(patterning)하는 방법으로 이용되고 있다. 이때, 패터닝 방법은 유체역학을 이용하여 액체 상인 졸 상태에서 몰드로 모양을 만들어서 겔화시킨 후, 몰드를 떼내어 패터를 만드는 것이다. 예컨대, 모세관 내 마이크로-모듈링(micro-moduling in-capillaries, MIMIC) 기법(Kim, J. Ferment. Bioeng., 82:239, 1995; Marzolin, Adv. Mater., 10:571, 1998; Schuller, et al., Appl. Optics., 38:5799, 1999)으로 지칭되는 기술은 중시(mesosopic) 실리카를 패터닝하는 기술이다. 상기 기술은 미시 유체 공학의 기본적인 패터닝에 이용될 수 있다.
- [9] 그러나, 단백질의 활성은 pH 등의 여러 인자에 의해 영향을 받기 때문에, 졸-겔 과정에서는 졸 상태에서부터 단백질을 첨가하여 활성을 유지하는 조건을 설정하는 것이 중요하다. 이를 위해, 중성 pH 등 여러 가지 온화한 조건을 이용하여 단백질과 졸을 함께 미리 섞어주어 단백질을 패터닝하는 기술(Kim, et al, Biotechnol. Bioeng., 73:331, 2001)이 발표되고 있지만, 중성 pH에서는 졸-겔 과정이 급격히 진행되어 첨가제의 선택에 따라서 균열이 생기거나 불투명하게 되는 등의 문제점이 있어 왔다. 또한, 단백질과 졸을 함께 미리 섞어주는 전처리과정 등을 거쳐야 하기 때문에 스팟의 농도가 불균일하기 쉬운 문제점도 있어왔다.
- [10] 또한, 졸-겔 공정에 관한 선행 특허들으로써, 생체 물질을 포함한 졸 혼합물을 칩

기재 상에서 겔화 반응시킴으로써, 생체 물질이 겔 매트릭스에 의해 형성된 포어 안에 담지되고 겔 매트릭스로 형성된 스폿에 의해 캡슐화된 상태로, 생체 물질의 반응성을 향상 시키는 졸-겔 바이오칩이 있고, 또는 이러한 졸-겔 공정을 이용한 바이오칩의 제조에 있어서, 고정된 생체 물질의 변형을 막거나, 민감도를 높이는 졸-겔 바이오칩용 졸 조성물의 스크리닝 방법에 관한 특허들이 있으나, 제조 방법이 복잡하며, 졸 조성물의 제작 과정에 있어서 생체 물질의 활성 저하, 파괴 등의 문제점이 발생되어 왔다.

[11]

[12] 이에, 본 발명자들은 졸 조성물의 제조시 생체물질의 활성 저하 및 파괴를 방지하기 위하여 예의 노력한 결과, 특정 실리케이트 단량체 및 첨가제를 특정 순서로 순차적으로 혼합하여 기판에 분주하거나, 이들을 순차적으로 기판에 직접 분주하여 겔화 시키는 경우, 종래 사용되어 오는 제조방법에 비해 겔화 시간을 늦추어 훨씬 균일한 바이오 칩을 제작할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 성분들에 의하여 생체물질의 활성 저하 및 파괴가 방지되어 민감도가 매우 우수한 바이오 칩을 제작할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[13]

[14] 발명의 요약

[15] 본 발명의 주된 목적은 졸겔물질을 키트화 하여 특별한 장비나 기술 없이도 누구나 쉽게 바이오칩을 만들고 분석할 수 있도록 하는데 있다.

[16] 본 발명의 다른 목적은 특정 졸 조성물을 순차적으로 혼합하여 기판에 분주하거나, 이들을 순차적으로 기판에 직접 분주하는 등의 제조 방법을 확립하여, 전처리과정 없이 균일한 바이오 칩을 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오 칩을 이용한 표적 물질의 분석방법을 제공하는데 있다.

[18]

[19] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은, 일 구현예로,

[20] (a) 졸-겔 키트 (SolB 키트) 에서 SolB1, SolB2, SolB3, SolBH, SolBS 로 구성되어 있는 액체를 순차적으로 혼합하여, 탐지 물질 (예를 들어, 단백질) 과 섞은 뒤 기판에 분주하는 제조방법,

[21] (b) 전처리 과정 없이 바이오칩을 제조하기 위해 SolB1, SolB2, SolB3 로 구성된 졸 조성물을 기판 위에 분주하는 단계; SolBH를 분주하는 단계; SolBS, 탐지 단백질 및 증류수를 포함하는 용액을 기판 위에 분주한 후 겔화시키는 단계를 포함하는, 졸 조성물의 겔화를 이용한 바이오 칩의 제조방법을 제공한다.

[22] 이 때, 사용될 수 있는 바이오 칩 제조를 위한 SolB 키트 중 SolB1, SolB2, 및 SolB3로서는,

[23] (i) SolB 1 에서 메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES),

에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐 실리케이트 (Sodium Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제1 실리케이트 단량체;

- [24] (ii) SolB 2 에서 3-아미노트리메톡시실란(3-aminotrimethoxysilane, 3-ATMS), 디글리세릴실란(diglycerylsilane, DGS), 메틸트리메톡시실리케이트(methyltrimethoxysilicate, MTMS), 폴리글리세릴실리케이트(polyglycerylsilicate, PGS), 폴리비닐아세테이트(polyvinylacetate), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 글리세릴 메타크릴레이트(glyceryl metaacrylate), 하이드록시에틸 아크릴레이트(hydroxyethyl acrylate), N,N-디쿠시니미딜카르보네이트(N,N-dicusinimidilcarbonate, DSC), 1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene), 세틸트리메틸암모늄 클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride), 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide), 3-(트리에톡시실릴) 프로필 숙시닉 언하이드라이드(3-(triethoxysilyl) propyl succinic unhydride), N-(3-트리에톡시실릴 프로필)-4-하이드록시 부틸아마이드(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy butylamide, SIT8189.5), N-(트리에톡시실릴 프로필) 글루콘아마이드(N-(triethoxysilyl propyl) gluconamide, SIT8189.0) 50%, 플루로닉 L121(pluronic L121) 및 테트라메틸 암모늄 하이드록시드(tetramethyl ammonium hydroxide)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제2 실리케이트 단량체; 및
- [25] (iii) SolB 3 에서 아미노프로필트리에톡시실란 (aminopropyltriethoxysilane, APTES), 3-글리시독시프로필트리메톡시실란(3glycidoxypropyltrimethoxysilane, GPTMOS), N-트리에톡시실릴프로필-O-폴리에틸렌 옥사이드 우레탄(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane, PEOU), 글리세롤, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 및 PEG8000 로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [26] 구체적으로, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 졸 조성물의 겔화를 이용한 바이오 칩의 제조방법으로서,
- [27] (a) SolB1, SolB2 및 SolB3를 포함하는 졸 조성물에 HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃COOH로 구성된 군에서 선택된 SolBH (용액 I) 를 혼합하는 단계; (b) 완충액인 SolBS 와 증류수를 (a)단계에서 혼합된 용액과 혼합한 다음, -20~4°C에서 안정화시키는 단계; 및 (c) 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질을 포함하는 용액을 (b)단계에서 안정화된 용액과 혼합하여 기판 위에 분주한 후 겔화시키는 단계,
- [28] 이 때,
- [29] (i) 상기 SolB1 은 메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES),

에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐 실리케이트 (Sodium Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제1 실리케이트 단량체이고;

- [30] (ii) 상기 SolB2 는 3-아미노트리메톡시실란(3-aminotrimethoxysilane, 3-ATMS), 디글리세릴실란(diglycerylsilane, DGS), 메틸트리메톡시실리케이트(methyltrimethoxysilicate, MTMS), 폴리글리세릴실리케이트(polyglycerylsilicate, PGS), 폴리비닐아세테이트(polyvinylacetate), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 글리세릴 메타크릴레이트(glyceryl metaacrylate), 하이드록시에틸 아크릴레이트(hydroxyethyl acrylate), N,N-디쿠시니미딜카르보네이트(N,N-dicusinimidilcarbonate, DSC), 1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene), 세틸트리메틸암모늄 클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride), 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide), 3-(트리에톡시실릴) 프로필 숙시닉 언하이드라이드(3-(triethoxysilyl) propyl succinic unhydride), N-(3-트리에톡시실릴 프로필)-4-하이드록시 부틸아마이드(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy butylamide, SIT8189.5), N-(트리에톡시실릴 프로필) 글루콘아마이드(N-(triethoxysilyl propyl) gluconamide, SIT8189.0) 50%, 플루로닉 L121(pluronic L121) 및 테트라메틸 암모늄 하이드록시드(tetramethyl ammonium hydroxide)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제2 실리케이트 단량체이고; 그리고

- [31] (iii) 상기 SolB3 는 아미노프로필트리에톡시실란 (aminopropyltriethoxysilane, APTES), 3-글리시독시프로필트리메톡시실란(3glycidoxypropyltrimethoxysilane, GPTMOS), N-트리에톡시실릴프로필-O-폴리에틸렌 옥사이드 우레탄(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane, PEOU), 글리세롤, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 및 PEG8000으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제인 것을 특징으로 하는 제조방법을 제공한다.

- [32] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는, 졸 조성물의 겔화를 이용한 바이오 칩의 제조방법으로서,

- [33] (a) SolB1, SolB2 및 SolB3 로 구성된 졸 조성물을 기판 위에 분주한 다음, HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃COOH로 구성된 군에서 선택된 SolBH (용액 I) 를 분주하는 단계; 및 (b) 완충액인 SolBS, 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질 및 증류수를 포함하는 용액II를 기판 위에 분주한 후 겔화시키는 단계,

- [34] 이 때,

- [35] (i) 상기 SolB1 은 메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES), 에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐 실리케이트 (Sodium

- Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제1 실리케이트 단량체이고;
- [36] (ii) 상기 SolB2 는 3-아미노트리메톡시실란(3-aminotrimethoxysilane, 3-ATMS), 디글리세릴실란(diglycerylsilane, DGS), 메틸트리메톡시실리케이트(methyltrimethoxysilicate, MTMS), 폴리글리세릴실리케이트(polyglycerylsilicate, PGS), 폴리비닐아세테이트(polyvinylacetate), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 글리세릴 메타크릴레이트(glyceryl metaacrylate), 하이드록시에틸 아크릴레이트(hydroxyethyl acrylate), N,N-디쿠시니미딜카르보네이트(N,N-dicusinimidilcarbonate, DSC), 1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene), 세틸트리메틸암모늄 클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride), 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide), 3-(트리에톡시실릴) 프로필 숙시닉 언하이드라이드(3-(triethoxysilyl) propyl succinic unhydride), N-(3-트리에톡시실릴 프로필)-4-하이드록시 부틸아마이드(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy butylamide, SIT8189.5), N-(트리에톡시실릴 프로필) 글루콘아마이드(N-(triethoxysilyl propyl) gluconamide, SIT8189.0) 50%, 플루로닉 L121(pluronic L121) 및 테트라메틸 암모늄 하이드록시드(tetramethyl ammonium hydroxide)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제2 실리케이트 단량체이고; 그리고
- [37] (iii) 상기 SolB3 는 아미노프로필트리에톡시실란 (aminopropyltriethoxysilane, APTES), 3-글리시독시프로필트리메톡시실란(3glycidoxypropyltrimethoxysilane, GPTMOS), N-트리에톡시실릴프로필-O-폴리에틸렌 옥사이드 우레탄(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane, PEOU), 글리세롤, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 및 PEG8000으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제인 것을 특징으로 하는 제조방법을 제공한다.
- [38] 본 발명은 또한 상기 방법에서 사용되는, (i) 메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES), 에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐 실리케이트 (Sodium Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제1 실리케이트 단량체인 SolB1을 포함하는 제1용기; (ii) 3-아미노트리메톡시실란(3-aminotrimethoxysilane, 3-ATMS), 디글리세릴실란(diglycerylsilane, DGS), 메틸트리메톡시실리케이트(methyltrimethoxysilicate, MTMS),

폴리글리세릴실리케이트(polyglycerylsilicate, PGS),
 폴리비닐아세테이트(polyvinylacetate), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone),
 글리세릴 메타크릴레이트(glyceryl metaacrylate), 하이드록시에틸
 아크릴레이트(hydroxyethyl acrylate),
 N,N-디쿠시니미딜카르보네이트(N,N-dicusinimidilcarbonate, DSC),
 1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene), 세틸트리메틸암모늄
 클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride), 세틸트리메틸암모늄
 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide), 3-(트리에톡시실릴) 프로필 숙시닉
 언하이드라이드(3-(triethoxysily) propyl succinic unhydride), N-(3-트리에톡시실릴
 프로필)-4-하이드록시 부틸아마이드(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy
 butylamide, SIT8189.5), N-(트리에톡시실릴 프로필)
 글루콘아마이드(N-(triethoxysilyl propyl) gluconamide, SIT8189.0) 50%, 플루로닉
 L121(pluronic L121) 및 테트라메틸 암모늄 하이드록시드(tetramethyl ammonium
 hydroxide)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제2 실리케이트 단량체인
 SolB2를 포함하는 제2용기; (iii) 아미노프로필트리에톡실란
 (aminopropyltriethoxysilane, APTES),
 3-글리시독시프로필트리메톡시실란(3-glycidoxypropyltrimethoxysilane,
 GPTMOS), N-트리에톡시실릴프로필-O-폴리에틸렌 옥사이드
 우레탄(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane, PEOU), 글리세롤,
 PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 및 PEG8000으로 구성된 군에서 선택된 1종
 이상의 첨가제 인 SolB3을 포함하는 제3용기; (iv) HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃
 COOH로 구성된 군에서 선택된 SolBH를 포함하는 제4용기; 및 (v) 완충액인
 SolBS를 포함하는 제5용기로 구성되고,

[39] 상기 SolB1, SolB2 및 SolB3를 혼합한 졸 조성물에 HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃
 COOH로 구성된 군에서 선택된 SolBH, 완충액인 SolBS와 증류수, 탐지 하기 위한
 생물학적 물질 순으로 순서대로 혼합함으로써 졸 혼합물이 겔화되는 것을
 특징으로 하는 바이오 칩 제조용 키트를 제공한다.

[40] 본 발명은 또한 상기 방법 및 졸 조성물로 제조한 바이오 칩 및 이를 이용하여
 생체물질인 표적 물질을 분석하는 방법으로써, 상기 방법으로 제조된 바이오
 칩에 상기 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질과
 상호작용가능한 표적 생물학적 물질을 함유하는 시료를 첨가하는 단계를
 포함하는 표적 생물학적 물질의 분석 방법을 제공한다.

[41]

도면의 간단한 설명

[42] 도 1은 본 발명의 졸 조성물(S-Sol), 용액 I 및 용액 II로 제조한 졸 혼합용액을
 어레이어로 분주하여 제작한 바이오 칩을 나타낸 것이다.

[43] 도 2는 5종의 HIV1 항원을 포함한 스왑에서 HIV 환자의 혈청에 대한 반응을

나타난 것이다. ①, ②, ③, ④, 및 ⑤ 은 HIV1 항체 진단을 위한 항원 마커로써 차례로 p24, p31, gp41, gp120, gp160 이다.

[44] 도 3은 연속적으로 희석한 항원을 포함한 스팟에서 연속적으로 희석한 HIV 환자의 혈청에 대한 반응을 나타낸 것이다.

[45] 도 4는 5 종의 HIV1 항원 각각을 포함한 스팟에서 HIV standard 혈청에 대한 반응을 정량화 하여 그래프로 나타낸 것이다. ①, ②, ③, ④, 및 ⑤ 은 HIV1 항체 진단을 위한 항원 마커로써 차례로 p24, p31, gp41, gp120, gp160 이다.

[46] 도 5는 감염 후 날짜별로 채취한 HIV1 환자의 혈청에 대해 본 발명의 바이오 칩과 기존의 진단키트를 이용한 검출 결과를 비교한 표이다.

[47] 도 6은 sciFLEXARRAYER S11를 이용하여 제작한 칩의 Axon GenePix scanner 스캔 사진(A) 및 카메라 이미지 사진(B)이다.

[48] 도 7은 본 발명에 따른 캡슐화 구조 안에 탐지 단백질을 포함하면서 표면에 미세 채널을 가지는 바이오 칩의 형상을 도식화한 것이다.

[49] 도 8은 본 발명에 따른 바이오 칩(오른쪽)과 종래 방법에 따른 바이오 칩(왼쪽)의 균질도를 비교한 사진이다.

[50] 도 9는 본 발명에 따른 줄 혼합물 (A) 와 순서 없이 용액을 혼합하였을 때의 줄 혼합물 (B) 의 균질도 및 겔화되는 속도를 비교한 사진이다.

[51] 도 10은 본 발명에 따른 단백질 칩을 이용하여 특정 단백질을 분석한 결과이다.

[52] 도 11은 본 발명에 따른 단백질 칩을 이용하여 특정 항원을 분석한 결과이다.

[53] 도 12는 본 발명에 따른 단백질 칩을 이용하여 특정 질병에 대한 항체를 분석한 결과이다.

[54] 도 13는 본 발명에 따른 줄겔칩을 이용하여 특정 화합물 (비스페놀 에이) 와 DNA 압타머의 결합을 확인한 결과이다.

[55] 도 14은 본 발명에 따른 줄-겔 바이오 칩을 상용화한 제품의 이미지이다.

[56]

[57] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현에

[58] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.

[59]

[60] 일 관점에서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 줄 조성물의 겔화를 이용한 바이오 칩의 제조방법으로서,

[61] (a) SolB1, SolB2 및 SolB3를 포함하는 줄 조성물에 HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃COOH로 구성된 균에서 선택된 SolBH (용액 I) 를 혼합하는 단계;

[62] (b) 완충액인 SolBS 와 증류수를 (a)단계에서 혼합된 용액과 혼합한 다음, -20~4°C에서 안정화 시키는 단계; 및

[63] (c) 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질을 포함하는 용액을 (b)단계에서 안정화된 용액과 혼합하여 기판 위에 분주한 후 겔화시키는 단계,

[64] 이 때,

[65] (i) 상기 SolB1 은 메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES),

에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐 실리케이트 (Sodium Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS) 메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES), 에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐 실리케이트 (Sodium Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제1 실리케이트 단량체이고;

- [66] (ii) 상기 SolB2 는 메틸트리메톡시실리케이트(methyltrimethoxysilicate, MTMS), 3-아미노트리메톡시실란(3-aminotrimethoxysilane, 3-ATMS), 폴리글리세릴실리케이트(polyglycerylsilicate, PGS), 디글리세릴실란(diglycerylsilane, DGS), 폴리비닐아세테이트(polyvinylacetate), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 글리세릴 메타크릴레이트(glyceryl metaacrylate), 하이드록시에틸 아크릴레이트(hydroxyethyl acrylate), N,N-디쿠시니미딜카르보네이트(N,N-dicusinimidilcarbonate, DSC), 1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene), 세틸트리메틸암모늄 클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride), 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide), 3-(트리에톡시실릴) 프로필 숙시닉 언하이드라이드(3-(triethoxysilyl) propyl succinic unhydride), N-(3-트리에톡시실릴 프로필)-4-하이드록시 부틸아마이드(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy butylamide, SIT8189.5), N-(트리에톡시실릴 프로필) 글루콘아마이드(N-(triethoxysilyl propyl) gluconamide, SIT8189.0) 50%, 플루로닉 L121(pluronic L121) 및 테트라메틸 암모늄 하이드록시드(tetramethyl ammonium hydroxide)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제2 실리케이트 단량체이고; 그리고

- [67] (iii) 상기 SolB3 는 아미노프로필트리에톡시실란 (aminopropyltriethoxysilane, APTES), 3-글리시독시프로필트리메톡시실란(3glycidoxypropyltrimethoxysilane, GPTMOS), N-트리에톡시실릴프로필-O-폴리에틸렌 옥사이드 우레탄(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane, PEOU), 글리세롤, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 및 PEG8000 으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제인 것을 특징으로 하는 제조방법에 관한 것이다.

[68]

- [69] 본 발명에 있어서, 상기 SolBH는 1mM 에서 100mM 인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [70] 본 발명에 있어서, 상기 SolBS은 1mM 에서 100mM 농도 범위의 NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na_3PO_4 로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 용액일 수 있다.

[71]

[72] 졸-겔 법을 이용하여 바이오 칩을 제작하는 종래의 방법에서는, 졸 조성물, 완충액, 및 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질 등을 순서없이 임의로 혼합하여 우선 졸 혼합용액을 만든 후에 진공 처리 등의 후처리를 거쳐 겔화 시키는 방법이 이용되어 왔다. 또한, 졸 조성물과 완충액 및 탐지 단백질을 혼합하는 방법은 볼텍스 (vortex) 나 초음파 진동 (ultrasonic) 을 이용하는 방법 등이 있으며, 졸-겔의 모양을 만드는 방법 또한 기관용 웰 위에 스팟을 형성하거나, 표면을 졸-겔로 코팅하거나 틀에 부어 넣은 뒤 겔화시키는 방법 등이 이용되어 왔다.

[73] 이와 같은 방법은 졸 조성물 혼합용액으로 형성시킨 스팟마다 함유하고 있는 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질의 농도가 일정하지 않을 수 있고, 또한 실시자에 따른 농도 역시 차이가 날 수 있으며, 혼합할 때 오염 가능성이 크며, 샘플에 따라 졸겔 혼합물의 점도가 변화하기도 하므로 스팟의 형성 정도나 모양, 크기에서의 차이가 있을 수 있다. 따라서, 이러한 문제점들을 해결할 수 있는, 균질의 바이오 칩을 제조할 수 있는 방법의 필요성이 존재하여 왔다.

[74] 본 발명의 바이오 칩 제작방법에 따르면, 졸-겔법을 이용하여 간편하면서도 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질이 스팟마다 균일한 농도를 이루고 있어 보다 정확하고 높은 효율로 생물학적 물질의 탐지가 가능하다.

[75] 본 발명의 바이오 칩의 제조방법의 일 태양의 구체적인 설명은 이하와 같다,

[76]

[77] 우선, 제1실리케이트단량체인 SolB1, 제2실리케이트단량체인 SolB2 및 첨가제인 SolB3 를 순서대로 혼합하여 졸 조성물을 제조한다.

[78] 상기 SolB1 은 메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES), 에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐 실리케이트 (Sodium Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 물질을 사용한다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 제1실리케이트 단량체의 성분으로 TEOS를 선택하여 사용하였다.

[79] 그리고, 상기 SolB2 는 3-아미노트리메톡시실란(3-aminotrimethoxysilane, 3-ATMS), 디글리세릴실란(diglycerylsilane, DGS), 메틸트리메톡시실리케이트(methyltrimethoxysilicate, MTMS), 폴리글리세릴실리케이트(polyglycerylsilicate, PGS), 폴리비닐아세테이트(polyvinylacetate), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 글리세릴 메타크릴레이트(glyceryl metaacrylate), 하이드록시에틸 아크릴레이트(hydroxyethyl acrylate), N,N-디쿠시니미딜카르보네이트(N,N-dicucininimidilcarbonate, DSC),

1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene), 세틸트리메틸암모늄 클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride), 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide), 3-(트리에톡시실릴) 프로필 숙시닉 언하이드라이드(3-(triethoxysilyl) propyl succinic unhydride), N-(3-트리에톡시실릴 프로필)-4-하이드록시 부틸아마이드(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy butylamide, SIT8189.5), N-(트리에톡시실릴 프로필) 글루콘아마이드(N-(triethoxysilyl propyl) gluconamide, SIT8189.0) 50%, 플루로닉 L121(pluronic L121) 및 테트라메틸 암모늄 하이드록시드(tetramethyl ammonium hydroxide)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 물질을 사용한다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 제2실리케이트 단량체의 성분으로 DGS를 선택하여 사용하였다.

- [80] 그리고, 상기 SolB3 는 첨가제로서, 아미노프로필트리에톡실란(aminopropyltriethoxysilane, APTES), 3-글리시독시프로필트리메톡시실란(3glycidoxypropyltrimethoxysilane, GPTMOS), N-트리에톡시실릴프로필-O-폴리에틸렌 옥사이드 우레탄(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane, PEOU), 글리세롤, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 및 PEG8000 으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 물질을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 첨가제로서 PEG를 선택하여 사용하였다.
- [81] 상기 제1실리케이트, 제2실리케이트 단량체 및 첨가제는 단량체 내부 생체물질의 성질이나 만들려고 하는 졸겔칩의 모양에 따라 필요에 의해 적절하게 선택하여 사용할 수 있다.
- [82] 본 발명의 바이오 칩 제조용 졸 조성물에서, 제1실리케이트단량체는 졸 조성물 전체 부피 대비 약 2~30 부피%, 상기 제2실리케이트단량체는 약 2~8 부피%, 그리고 첨가제는 약 0~5 부피%로 포함되는 것이 바람직하다. 이 때, 상기 졸 조성물은 흡입 시 유해하므로 통풍이 잘되는 곳에서 제조한다.
- [83] 본 발명의 상기 바이오 칩 제조용 상기 졸 조성물은 겔화시켰을 때, 공극에 의한 미세 채널을 형성하는 것을 특징으로 한다. 즉, 이러한 채널이 분석할 표적 물질과 상호작용을 일으킬 수 있게 되는 수단이 되는 것이다. 특히, 상기 (iii) 구성요소의 첨가제는 겔 내의 채널 크기를 조절하기 위해 이용되는 성분이다.
- [84] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 어레이어 없이 손으로 스팟팅을 수행하거나, 비접촉형 어레이어를 이용하여 수행할 수 있다.
- [85] 본 발명에 있어서, (c) 단계에서 사용되는 기관은, 사용되기 전에 미리 이슬점 이상의 온도로 최적화되고, 여기서, 이슬점 이상의 온도라고 하는 것은 기관에 이슬이 맺히기 시작하는 온도보다 높은 온도를 의미하는 것이며, 습도 조건에 따라 이러한 이슬점은 달라질 수 있으며, 예컨대, 상대 습도 50% 이상에서 대기 온도가 20°C 일 때 8.6°C이고, 통상은 습도 70~80%에서 14~17°C이다.
- [86] 본 발명에 있어서, 상기 기관은 폴리메틸메타크릴레이트

- (polymethylmethacrylate, PMMA), 플라스틱, 실리콘, 유리 등일 수 있다.
- [87] 본 발명에 있어서, 상기 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질은 핵산, 단백질, 펩타이드, 저분자 물질 및 세포로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것일 수 있다.
- [88] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서 혼합된 용액, 졸 혼합물은 온도 $-20\sim 4^{\circ}\text{C}$ 의 조건에서 30분 이상 방치하여 안정화시킬 수 있고, 어레이어에서 졸 조성물을 넣을 용기는 이슬점 이상의 온도, 통상 $14\sim 17^{\circ}\text{C}$ (습도 70~80% 시 이슬점 온도 이상), 분주 환경은 습도 70~80%, 대기 온도 20°C 의 조건을 맞추어 졸겔에 최적화시킬 수 있다.
- [89] 이러한 안정화 및 최적화 과정을 통하여, 졸 조성물의 겔화 되는 속도를 늦추어 스팟 형성을 용이하게 하고 겔화된 후 스팟의 갈라짐을 방지하며 칩 내의 미세 채널이 잘 형성될 수 있도록 할 수 있다.
- [90] 본 발명에 있어서, 상기 졸 조성물과 SolBH와 SolBS의 혼합 용액, 증류수 및 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질은 각각 3: 1: 4 와 1: 2: 8 사이의 범위로 혼합될 수 있고, 상기 SolBH 및 SolBS의 농도는 1mM ~ 100mM 일 수 있다.
- [91] 본 발명에 있어서, 상기 SolBS : 증류수 : 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질의 부피비는 1:2:1 와 2:5:1 사이의 범위이다.
- [92] 본 발명에 있어서, 상기 완충액은 pH 3~8 범위의 소듐 포스페이트 (sodium phosphate)일 수 있다.
- [93] 본 발명에 있어서, 상기 기판은 미리 플라즈마 표면처리 되거나, 에칭되거나, PDMS 나 실리케이트 단량체 또는 고분자 물질로 처리된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [94] 본 발명은 다른 관점에서, 다음 단계를 포함하는, 졸 조성물의 겔화를 이용한 바이오 칩의 제조방법으로서,
- [95] (a) SolB1, SolB2 및 SolB3 로 구성된 졸 조성물을 기판 위에 분주한 다음, HCl, H_2SO_4 , HNO_3 및 CH_3COOH 로 구성된 군에서 선택된 SolBH (용액 I) 를 분주하는 단계; 및
- [96] (b) 완충액인 SolBS, 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질 및 증류수를 포함하는 용액II를 기판 위에 분주한 후 겔화시키는 단계,
- [97] 이 때,
- [98] (i) 상기 SolB1 은 메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES), 에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐 실리케이트 (Sodium Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS) 1종 이상의 제1 실리케이트 단량체이고;
- [99] (ii) 상기 SolB2 는 3-아미노트리메톡시실란(3-aminotrimethoxysilane, 3-ATMS),

디글리세릴실란(diglycerylsilane, DGS),
 메틸트리메톡시실리케이트(methyltrimethoxysilicate, MTMS),
 폴리글리세릴실리케이트(polyglycerylsilicate, PGS),
 폴리비닐아세테이트(polyvinylacetate), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone),
 글리세릴 메타크릴레이트(glyceryl metaacrylate), 하이드록시에틸
 아크릴레이트(hydroxyethyl acrylate),
 N,N-디쿠시니미딜카르보네이트(N,N-dicusinimidilcarbonate, DSC),
 1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene), 세틸트리메틸암모늄
 클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride), 세틸트리메틸암모늄
 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide), 3-(트리에톡시실릴) 프로필 숙시닉
 언하이드라이드(3-(triethoxysilyl) propyl succinic unhydride), N-(3-트리에톡시실릴
 프로필)-4-하이드록시 부틸아마이드(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy
 butylamide, SIT8189.5), N-(트리에톡시실릴 프로필)
 글루콘아마이드(N-(triethoxysilyl propyl) gluconamide, SIT8189.0) 50%, 플루로닉
 L121(pluronic L121) 및 테트라메틸 암모늄 하이드록시드(tetramethyl ammonium
 hydroxide)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제2 실리케이트 단량체이고;
 그리고

- [100] (iii) 상기 SolB3는 아미노프로필트리에톡시실란 (aminopropyltriethoxysilane, APTES), 3-글리시독시프로필트리메톡시실란(3glycidoxypropyltrimethoxysilane, GPTMOS), N-트리에톡시실릴프로필-O-폴리에틸렌 옥사이드
 우레탄(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane, PEOU), 글리세롤, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 및 PEG8000 으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제이고;
- [101] (iv) 상기 SolBH 용액은 1mM 에서 100mM 농도 범위의 HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃COOH로 구성된 군에서 선택된 1 종 이상의 용액이며;
- [102] (v) 상기 SolBS 용액은 1mM 에서 100mM 농도 범위의 NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, 및 Na₃PO₄ 로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 용액인 것을 특징으로 하는 제조방법에 관한 것이다.
- [103] 본 발명에 있어서, (c) 단계에서 사용되는 기관은, 사용되기 전에 미리 이슬점 이상의 온도로 최적화되고, 여기서, 이슬점 이상의 온도라고 하는 것은 기관에 이슬이 맺히기 시작하는 온도보다 높은 온도를 의미하는 것이며, 습도 조건에 따라 이러한 이슬점은 달라질 수 있으며, 예컨대, 상대 습도 50% 이상에서 대기 온도가 20°C 일 때 8.6°C이고, 통상은 습도 70~80%에서 14~17°C이다.
- [104] 이러한 최적화 과정을 통해, 각 용액을 순서대로 분주 시 줄 조성물의 겔화 되는 속도를 늦추어 스팟 형성을 용이하게 하고 겔화된 후 스팟의 갈라짐을 방지하며 칩 내의 미세 채널이 잘 형성될 수 있도록 할 수 있다.
- [105] 본 발명의 방법에 따르면, 줄 조성물의 분주 후 HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃COOH로 구성된 군에서 선택된 용액 I 인 SolBH 를 그 위에 분주한다. 용액 I 은

상기 졸 조성물의 겔화를 유도하기 위한 pH 환경을 조성하는 역할을 한다. 상기 HCl, H₂SO₄, HNO₃ 또는 CH₃COOH의 농도는 5~30mM가 바람직하다. pH 1~3 으로 적정시킨다.

- [106] 마지막으로, 완충액인 SolBS, 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질 및 증류수를 포함하는 용액 II 를 기관 위에 분주하여 겔화시킨다.
- [107] 본 발명에 있어서, 상기 SolBS는 pH 3~8 범위의 소듐 포스페이트 (sodium phosphate)일 수 있다.
- [108] 상기 완충액 및 2차 증류수는 생체물질(예를 들어, 단백질)의 파괴를 방지하는 기능을 가진다. 생체물질은 적정 범위를 벗어난 pH에서는 활성이 저하되거나 파괴되기 쉽고, 졸의 겔화는 pH가 높을수록 천천히, pH가 낮을수록 빨리 진행되므로, 생체물질의 활성 저하 및 파괴를 방지하면서 적정 시간 동안 겔화를 수행할 수 있도록 pH를 적정하는 것이 중요하다. 통상적으로, 생체물질은 pH 5~8의 범위에서 안정적으로 존재하므로, 특히, 상기 용액 I 에 따른 pH 환경이 생체물질의 파괴하는 것을 방지하기 위해서 상기 완충액을 사용한다. 사용할 수 있는 완충액은 특별히 제한되는 것은 아니며, 첨가하는 생체물질에 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 본 발명에서는 pH 3~8 범위의 소듐 포스페이트 (sodium phosphate) 버퍼를 사용하였다. 또한, 용액 II 에 포함되어 있는 “표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질” 또는 “생체물질”이라 함은 검출하고자 하는 대상물질(예, 표적 단백질)과 상호 작용할 수 있는 생체 내의 물질을 지칭하는 것으로, 예를 들어, 핵산, 단백질, 펩타이드, 저분자 물질 또는 세포 등이 될 수 있다. 이러한 탐지 단백질 또는 생체물질을 용액 II 에 포함시키기 위하여 적당한 버퍼(buffer)용액을 사용할 수 있다. 즉, 실시를 위한 생체물질을 버퍼 용액에 넣어 검출을 위한 샘플 용액(sample solution)을 만든다. 예를 들어, 상기 생체물질이 단백질인 경우에는 PBS buffer (phosphate-buffered saline)를 섞어 사용하고, 효소 반응(enzyme reaction)이 있을 때에는 HEPES, NaCl, EDTA 등을 필요에 따라 적절히 농도를 달리하여 섞어 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 대상물질(표적 단백질)로 HIV1 (Human Immunodeficiency virus 1) 환자의 항체를 사용하였고, 상기 탐지 단백질로 상기 HIV 항체에 결합할 수 있는 5 종의 항원 마커를 PBS 버퍼에 섞어 사용하였다.
- [109] 이 때, 상기 용액 II 에서 완충액인 SolBS : 증류수 : 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질의 혼합되는 부피비는 1:2:1 에서 2:5:1 사이의 범위인 것이 바람직하며 가장 바람직하게는 1 : 2 : 1이다. 예를 들어, 용액II 전체중량 기준으로 완충액은 약 20~30 부피%, 증류수는 약 40~60% 부피%, 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질은 20~30 부피%일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 완충액은 10 μ l, 증류수는 20 μ l, 탐지 단백질(표적 단백질과 상호작용하는 생물학적 물질) 등을 포함하는 용액 10 μ l로 혼합하여 사용하였다.
- [110] 본 발명은 상기 졸 조성물, 용액I 및 용액 II를 정확한 양으로 순차적으로

분주함으로써 균질한 바이오 칩을 제작하는 것을 특징으로 한다.

- [111] 본 발명에서 분주되는, 상기 졸 조성물 : 용액 I : 용액 II의 분주량의 비는 3:1:4에서 1:2:8 사이 인 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 3:1:4이다. 예를 들어, 상기 졸 조성물의 분주량은 25~35 μ l가 바람직하고, 약 30 μ l가 가장 바람직하다. 상기 용액 I의 분주량은 5~15 μ l가 바람직하고, 약 10 μ l가 가장 바람직하다. 상기 용액 II의 분주량은 35~45 μ l가 바람직하고, 약 40 μ l가 가장 바람직하다.
- [112] 본 발명에 따른 바이오 칩 제조방법에서 졸 조성물과 용액 I 및 용액 II를 미리 혼합한 뒤 기판에 분주할 때는 비접촉형 어레이어 (non-contact arrayer)를 사용하거나, 파이펫 혹은 다른 도구를 이용하여 직접 손으로 스폿팅 하는 것이 바람직하다.
- [113] 본 발명에 있어서, 상기 제조방법은 전처리 과정이 없는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 전처리 과정은, (i) SolB1, SolB2, SolB3, SolBH, SolBS, 또는 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질을 혼합하는 과정; (ii) 혼합한 후 볼텍싱(vortexing)하는 과정; 및 (iii) 상기 혼합된 용액을 안정화하는 과정으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [114] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 SolB1, SolB2 및 SolB3로 구성된 졸 조성물, SolBH, SolBS 및 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질을 분주 전에 용기에 담아 노즐을 이용하여 빨아올리는 형태로 분주할 수 있다.
- [115] 아울러, 본 발명에 있어서, SolB1, SolB2 및 SolB3로 구성된 졸 조성물, SolBH, SolBS 및 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질을 분주 전에 미리, 분주하는 노즐이 연결되어 있는 대용량 카트리지에 넣어, 한번에 분주하는 양이, 노즐을 이용하여 빨아올리는 형태로 분주하는 것에 비해 100배 이상이어서 대량 생산이 가능하다.
- [116] 전처리 과정 없이 기판 위에 직접 졸 조성물과 용액 I 및 용액 II를 순차적으로 분주하여 칩을 제작할 때는 정확한 양으로 분주해 주는 어레이어(arrayer)를 사용하여 실시될 수 있다. 이 때, 상기 졸 조성물, 용액 I 및 용액 II를 정확한 부피로 분주하는 데 사용될 수 있는 어레이어로는 비접촉형 어레이어(non-contact arrayer)를 사용하는 것이 바람직하다.
- [117] 바이오 칩 상에서 탐지 물질을 정렬(array)시키는 방식에 따라 '접촉형'과 '비접촉형'으로 구분하는데, 접촉형 어레이어는 매우 가는 공간이 속에 있는 핀(pin) 등을 이용해서 탐지 단백질을 칩 표면에 정렬시킨다. 이러한 방법은 탐지 단백질이 포함된 용액이 핀 바깥으로 약간씩 빠져 나와 표면에 직접 접촉되어 정렬되는 방식으로, 짧은 시간에 여러 종류의 탐지 단백질을 정렬시킬 수 있는 장점이 있으나 용액의 부피를 정확하게 조절할 수 없으므로 균일성이 낮아질 수 있다. 반면 비접촉형 어레이어는 가는 관에 탐지 단백질이 포함된 용액을 넣고 칩 표면의 바로 위에 위치 시킨 후 관에 일정한 압력을 가함으로써 직접적인 접촉 없이 표면 위에 정렬시키는 방법이다. 이 방법은 분주되는 용액의 부피를 정확하게 결정하는 것이 가능한 장점이 있다. 따라서 전처리 과정 없이 졸

조성물과 용액 I 및 용액 II 를 순차적으로 분주하여 칩을 제작할 때 각 용액의 분주되는 부피를 비율에 맞게 조절할 수 있으므로 본 발명에서는 이러한 비접촉형 어레이어를 사용하는 것이 바람직하다.

- [118] 상기 졸 조성물; HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃COOH로 구성된 군에서 선택된 용액I; 및 상기 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질, 완충액 및 증류수의 혼합용액인 용액II를, 정확한 부피를 분주해 주는 비접촉형 어레이어를 이용하여 순차적으로 기관용 웰 상에 분주시킬 수 있다. 표면에 분주되어 있는 작은 스팟에 다른 용액이 분주될 때 용액의 표면장력 때문에 전체 용액은 퍼지지 않고 스팟 모양을 형성하게 되는데 용액이 떨어질 때 발생하는 표면 에너지가 진동으로 전환되고 이에 의해 스팟 내에서 물질의 흐름(대류)이 발생하여 두 용액이 잘 섞이게 된다. 이러한 원리를 이용하여 본 발명에서는 전처리 없이 표면에 직접 스팟팅을 통해 졸-겔 칩을 제작하는 자동화 방법을 고안하였다.
- [119] 예를 들어, Scienion AG사의 Microarrayer를 사용할 수 있다. 특히, Scienion AG사의 dew point control technology 를 이용하면, 플레이트 표면에 습기가 응결되어 생기는 농도의 불확실성을 최대한으로 배제할 수 있어 보다 정확한 부피 및 크기의 스팟이 제작 가능하다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 어레이어로 sciFLEXARRAYER S11(Scienion AG, 독일)를 사용하였다.
- [120] 즉, 본 발명에서는 바이오 칩 제작 시에 상기 비접촉형 어레이어를 이용하여 기관에 각각의 용액을 정확한 부피만큼 분주해 주는 것만으로 바이오 칩을 보다 간편하게 만들 수 있고, 종래 방법처럼 졸-겔 모노머(sol-gel monomer), 완충액, 탐지 단백질 샘플 등을 미리 혼합하는 (premixing) 등의 전처리 과정이 필요 없으므로 보다 균질한 바이오 칩 제작이 가능하다.
- [121]
- [122] 한편, 본 발명에서 사용하는 기관은, 졸 조성물이 겔화되었을 때 투명하다는 성질을 이용한 것이기 때문에, 상기 기관용 웰(well) 또는 슬라이드 또한 좋은 투명도를 유지할 수 있는 재료로 만들어진 것이어야 좋다. 예를 들어, 투명성이 매우 좋은 폴리메틸메타크릴레이트 (polymethylmethacrylate, PMMA) 성분과 같은 플라스틱, 실리콘이나 유리 성분으로 제작된 것을 사용할 수 있다.
- [123] 본 발명에 있어서, 상기 기관은 폴리메틸메타크릴레이트 이외에도, 플라스틱, 실리콘, 유리 등에서 선택될 수 있다.
- [124] 또한, 본 발명에서 사용되는 기관은 졸 혼합용액이 겔화되면서 기관에 고정될 수 있도록 표면처리가 되어있어야 한다. 본 발명의 바이오 칩의 중요한 조건 중 한 가지는 졸 혼합용액이 겔화되면서 기관에 강하게 고정되어, 표적 물질이 들어있는 용액과 반응시킬 때 스팟이 떨어지지 않아야 한다는 점이다. 따라서, 상기 바이오 칩을 이용한 표적 물질 분석에 있어서, 표적 물질과 반응시킨 후 강한 세척과정이 필요하고, 따라서, 이러한 물리적 힘을 극복하기 위해서는 스팟의 강한 고정이 필수이며, 이를 위해 표면처리 되지 않은 플라스틱 기관, 플라즈마로 표면처리 된 플라스틱 기관이나 표면처리 되지 않은 유리 기관,

표면처리된 유리 기판 (예컨대, 에칭 (etching) 된 유리 기판 등), 혹은 포러스 구조를 가지는 실리콘 칩 등을 이용하는 것이 바람직하다.

- [125] 본 발명에 있어서, 기판은 미리 플라즈마 표면처리 되거나, 에칭되거나, PDMS 나 실리케이트 단량체 또는 고분자 물질로 처리된 것일 수 있다.
- [126] 본 발명의 바이오 칩 제조방법에 있어서, 어레이어를 사용함에 있어 주의해야 할 사항은 다음과 같다.
- [127] 첫째, DNA 칩과는 달리 상기 바이오 칩은 줄이라는 특수한 재료를 사용하고 시간이 지남에 따라 젤화되는 성질이 있기 때문에 어레이어를 이용하여 분주하는 중간에 줄이 젤화되지 않도록 가능한 한 빠른 시간 안에 분주시키는 것이 매우 중요하다.
- [128] 둘째, 습도와 온도이다. 기판에 스팟이 찍힘과 동시에 주위의 습기 양과 온도에 따라 상기 스팟이 젤화 되는 속도 및 스팟의 활성이 좌우되기 때문에, 초기의 습도와 온도가 매우 중요하다. 그러므로 항상 상기 줄-젤을 이용한 바이오 칩을 제작 시에는 어레이어 주변의 습도와 온도를 사전에 맞춰놓는 것이 매우 중요하다.
- [129] 본 발명에서 바람직한 습도는 약 50% 이상, 또는, 더욱 구체적으로는 70~80%이다. 그리고 바람직한 온도는 약 25°C이하, 더욱 구체적으로는 상온의 범위라고 할 수 있는 10~25°C의 범위이다. 특히, 스팟의 젤화에 있어서 초기의 높은 습도가 중요한 요인이므로, 반드시 arraying 전 습도를 80% 정도로 준비하여야 하고, 또한, 온도가 25°C 이상일 경우에는 줄의 젤화가 빨리 진행되는 경향이 있으므로 최대한 낮은 온도에서 실험하는 것이 좋다.
- [130] 이처럼 사전의 온도, 습도 준비와 빠른 시간 안에 집적시킬 수 있는 프로그램을 준비한 후, 각 용액들을 단계별로 분주하게 된다.
- [131] 본 발명에 있어서, 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질은 핵산, 단백질, 펩타이드, 저분자 물질 또는 세포일 수 있다.
- [132] 본 발명은 또한, 다른 관점에서, 메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES), 에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐 실리케이트 (Sodium Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제1 실리케이트 단량체인 SolB1 을 포함한 제1용기; 3-아미노트리에톡시실란(3-aminotrimethoxysilane, 3-ATMS), 디글리세릴실란(diglycerylsilane, DGS), 메틸트리에톡시실리케이트(methyltrimethoxysilicate, MTMS), 폴리글리세릴실리케이트(polyglycerylsilicate, PGS), 폴리비닐아세테이트(polyvinylacetate), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 글리세릴 메타크릴레이트(glyceryl metaacrylate), 하이드록시에틸 아크릴레이트(hydroxyethyl acrylate),

N,N-디쿠시니미딜카르보네이트(N,N-dicusinimidilcarbonate, DSC), 1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene), 세틸트리메틸암모늄 클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride), 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide), 3-(트리에톡시실릴) 프로필 숙시닉 언하이드라이드(3-(triethoxysily) propyl succinic unhydride), N-(3-트리에톡시실릴 프로필)-4-하이드록시 부틸아마이드(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy butylamide, SIT8189.5), N-(트리에톡시실릴 프로필) 글루콘아마이드(N-(triethoxysilyl propyl) gluconamide, SIT8189.0) 50%, 플루로닉 L121(pluronic L121) 및 테트라메틸 암모늄 하이드록시드(tetramethyl ammonium hydroxide)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제2 실리케이트 단량체인 SolB2 를 포함한 제2용기; 아미노프로필트리에톡실란 (aminopropyltriethoxysilane, APTES), 3-글리시독시프로필트리에톡실란(3glycidoxypropyltrimethoxysilane, GPTMOS), N-트리에톡시실릴프로필-O-폴리에틸렌 옥사이드 우레탄(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane, PEOU), 글리세롤, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 및 PEG8000으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제 인 SolB3 를 포함하는 제3용기; (iv) HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃COOH로 구성된 군에서 선택된 SolBH를 포함하는 제4용기; 및 (v) 완충액인 SolBS를 포함하는 제5용기로 구성되고,

[133] 상기 SolB1, SolB2 및 SolB3를 혼합한 졸 조성물에 HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃COOH로 구성된 군에서 선택된 SolBH, 완충액인 SolBS와 증류수, 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질 순으로 순서대로 혼합함으로써 졸 혼합물이 겔화되는 것을 특징으로 하는 바이오 칩 제조용 키트에 관한 것이다.

[134] 상기 용기는 그 재질에 제한이 없으며, 이러한 키트는 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있으며 이들은 부분적으로 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 용기는, 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 사용설명서를 포함할 수 있다.

[135] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 바이오 칩을 이용하여 표적 생물학적 물질을 분석하는 방법에 관한 것이다.

[136] 구체적으로, 상기 방법으로 제조된 바이오 칩에 상기 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질과 상호작용가능한 표적 생물학적 물질을 함유하는 시료를 첨가하는 단계를 포함하는 표적 생물학적 물질의 분석 방법에 관한 것이다. 여기서, 상기 표적 생물학적 물질은 핵산, 단백질, 펩타이드, 저분자 물질 및 세포로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 표적 생물학적 물질을 탐지할 수 있는 방사성 동위원소 또는 형광염료 혹은 다른

종류의 표지물질로 표지된 단백질, 압타머 등의 생체물질과 추가로 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.

[137] 앞서 설명한 바에 의하여, 표적 생물학적 물질과 반응 시킬 바이오 칩이 준비된 후 실제 표적 생물학적 물질이 들어 있는 용액과 반응시킨다. 반응 용액은 96-웰(well) 타입의 경우 50 ~ 100 μ l의 양이 적절하며, 반응 시간은 1시간으로 한다. 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질과 상호작용하는 표적 생물학적 물질도 역시 생체 내 물질로서, 핵산, 단백질, 펩타이드, 저분자 물질 또는 세포일 수 있다.

[138] 표적 생물학적 물질이 들어있는 반응용액은 스팟 내의 미세 공극구조를 통해 스팟 내로 스며들어 캡슐 구조 안에 고정되어 있는 생물학적 물질과 만나 상호작용을 통해 결합하게 된다 (1st incubation). 상기 반응 후, 스팟 내에서 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질과 결합된 표적 생물학적 물질을 분석하기 위하여, 상기 표적생물학적 물질을 탐지할 수 있도록 표지 인자인 표지 단백질과 반응시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 형광염료(Cy3)가 부착된 표적 단백질에 대한 항체를 사용하였다 (2nd incubation). 이 때 반응시간은 30분으로 하며 반응 용액의 양은 50 ~ 100 μ l로 한다. 위의 1st, 2nd incubation과정은 모두 실온에서 수행한다. 표적 생물학적 물질이 들어 있는 반응 용액이 여러 물질이 섞여 있는 혼합물의 경우에 바이오 칩에 들어 있는 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질과의 비특이적 결합을 방지하기 위하여 1st 인큐베이션 과정 전에 블로킹 (blocking) 과정을 수행할 수 있다. 이 과정에 필요한 블로킹 용액은 skim milk 나 BSA (bovine serum albumin) 혹은 IgG 와 같은 것이 사용될 수 있다.

[139] 상기 1st, 2nd 인큐베이션을 마친 후에는 세척과정(washing)을 거치게 되는데, 세척액의 성분으로는 통상적인 것을 사용할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 0.2% Tween-20 이 포함되어 있는 PBS 버퍼를 사용하였다. 세척기로는 ELISA용 washer를 사용한다 1st 세척공정으로, 4번의 세척을 수행하고 2nd 세척공정으로 4번의 세척을 실시한다. 상기 세척공정을 거친 후 웰에서 용액이 모두 제거 될 때까지 건조시킨다.

[140] 건조과정이 끝난 후 형광염료를 탐지할 수 있는 이미지 스캐너를 통해 반응을 일으킨 웰을 스캔하여 실제 반응여부를 알 수 있고, 이미지를 소프트웨어를 이용하여 진하기 정도를 측정해 봄으로써 어느 정도의 반응을 일으켰는지를 알 수도 있다. 즉, 본 발명의 표적 생물학적 물질을 분석하는 방법은 방사성 동위원소, 형광염료, 발광성물질, 염료 혹은 다른 종류의 표지물질 등으로 표지된 단백질 또는 압타머 등의 생체물질과 추가로 반응시키는 단계를 포함한다. 이 때, 압타머란 높은 친화성으로 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질을 특이적으로 인지할 수 있는 작은 단일가닥 올리고핵산을 일컫는다.

[141]

[142] 본 발명은 또한 상기 제조방법에 의해 제조된 바이오 칩을 포함하는 검출용 키트를 포함한다.

[143] 탐지 생물학적 물질 검출용 키트는 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있으며 이들은 부분적으로 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 용기는, 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 사용설명서를 포함할 수 있다.

[144]

[145] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[146]

[147] 실시예 1: 바이오칩 제조용 각 구성용액의 제조

[148]

[149] 다음 표 1에 예시된 성분들 중 각각 하나씩을 선택한 SolB1 20 μ l, SolB2 6 μ l 및 SolB3 4 μ l를 혼합하여 졸 조성물을 제조하였다. 그리고, 용액 I 으로는 10 μ l의 SolBH를 준비하였다.

[150]

[151] 표 1

각 용액의 성분

구분	성분
SolB 1	메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES), 에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐 실리케이트(Sodium Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS)로 구성된 군에서 선택된 1종의 제1 실리케이트 단량체
SolB 2	3-아미노트리메톡시실란(3-aminotrimethoxysilane, 3-ATMS), 디글리세릴실란(diglycerylsilane, DGS), 메틸트리메톡시실리케이트(methyltrimethoxysilicate, MTMS), 폴리글리세릴실리케이트(polyglycerylsilicate, PGS) 폴리비닐아세테이트(polyvinylacetate), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 글리세릴 메타크릴레이트(glyceryl metaacrylate), 하이드록시에틸 아크릴레이트(hydroxyethyl acrylate), N,N-디쿠시니미딜카르보네이트(N,N-dicusinimidilcarbonate, DSC), 1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene), 세틸트리메틸암모늄 클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride), 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide), 3-(트리에톡시실릴) 프로필 숙시닉 언하이드라이드(3-(triethoxysilyl), propyl succinic unhydride), N-(3-트리에톡시실릴 프로필)-4-하이드록시 부틸아마이드(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy butylamide, SIT8189.5), N-(트리에톡시실릴 프로필) 글루콘아마이드(N-(triethoxysilyl propyl) gluconamide, SIT8189.0) 50%, 플루로닉 L121(pluronic L121) 및 테트라메틸 암모늄 하이드록시드(tetramethyl ammonium hydroxide)로 구성된 군에서 선택된 1종의 제2 실리케이트 단량체
SolB 3	아미노프로필트리에톡시실란 (aminopropyltriethoxysilane, APTES), 3-글리시독시프로필트리메톡시실란(3glycidoxypropyltrimethoxysilane, GPTMOS), N-트리에톡시실릴프로필-O-폴리에틸렌 옥사이드 우레탄(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane, PEOU), 글리세롤, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 및 PEG8000으로 구성된 군에서 선택된 1종의 첨가제
SolB H	HCl, H ₂ SO ₄ , HNO ₃ 및 CH ₃ COOH로 구성된 군에서 선택된 1종

[152]

[153] 다음으로, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na_3PO_4 로 구성된 균에서 선택된 1종 이상의 SolBS $10\mu\text{l}$ 및 2차 증류수(double distilled water, DDW) $20\mu\text{l}$ 를 섞는 한편, HIV1 항체와 상호 작용할 수 있는 5종의 탐지 단백질 (p24, p31, gp41, gp120 및 gp160)약 10~200ng씩을 PBS buffer에 섞어 샘플용액 $10\mu\text{l}$ 를 만들어 이를 상기 혼합물에 첨가한 후, 5초 동안 볼텍싱하고 스피ن-다운하여 용액 II를 제조하였다.

[154]

[155] 표 2

줄 조성물, 용액 I, 용액 II 및 탐지 단백질의 구성 성분

	구성 성분
줄 조성물	SolB1 $20\mu\text{l}$, SolB2 $6\mu\text{l}$ 및 SolB3 $4\mu\text{l}$
용액I	SolBH $10\mu\text{l}$
용액II	SolBS $10\mu\text{l}$ 및 DDW $20\mu\text{l}$ 5종의 HIV1 항원 포함 PBS solution $10\mu\text{l}$

[156]

[157] 실시예 2: 바이오 칩의 제작

[158]

[159] (1) 기관용 웰의 준비

[160] 플라즈마 표면 처리되어 시판되고 있는 PMMA 96-웰 플레이트를 SPL사 (한국)로부터 구입하여 준비하였다.

[161]

[162] (2) 바이오 칩(단백질 칩)의 제작

[163] 단백질 칩을 제작하기 위하여, 스팟팅하기 전에 온도 16°C , 습도 80%로 어레이어를 셋팅하였고, 상기 실시예 1에서 수득된 줄 혼합용액을 넣을 소스 웰(source well)로는 일반 384-웰을 준비하고, 표적 웰(target well)로는 상기 (1)의 PMMA 96-웰 플레이트를 준비하였다. 그리고 설정한 대로 정확한 부피를 분주해주는 sciFLEXARRYER S11(Scienion사, 독일) 어레이어를 준비하였다.

[164] 그 다음, sciFLEXARRYER S11 (Scienion사, 독일) 어레이어의 source plate에, 상기 실시예 1에서의 SolB1 $20\mu\text{l}$, SolB2 $6\mu\text{l}$ 및 SolB3 $4\mu\text{l}$ 를 혼합하여 제조한 줄 조성물 $30\mu\text{l}$, SolBH $10\mu\text{l}$ (용액 I) 및 상기 용액 II $40\mu\text{l}$ 씩 각각 어레이어의 소스 플레이트에 넣어주었다.

[165] 미리 준비한 PMMA 96-웰 플레이트 상에 상기 줄 조성물, 용액 I 및 상기 용액 II을 순서대로 정해진 부피량 만큼을 분주하였다. 분주되는 양이 스팟 당 450pl 이하가 되도록 하였으며, 이 때, 노즐 PDC90(ScienionAG, 독일)을 사용하였다. spotting frequency는 500Hz로 하였다. 형성된 스팟 크기는 약 $300\mu\text{m}$ 정도였다(스팟 당 8 drops).

- [166] 도 6에 532 nm에서 Axon GenePix scanner(Axon사)로 스캔한 사진 A 및 카메라가 장착된 sciFLEXARRAYER에 의한 이미지 사진 B를 도시하였다. 단백질 칩 상의 서로간의 스팟 간격(dot pitch)은 600 μ m였다.
- [167]
- [168] 비교예 1: 종래의 단백질 칩과의 균질도 비교
- [169] 본 발명의 방법에 따른 단백질 칩이 기존에 사용되고 있는 단백질 칩과 비교하여 현저히 우수한 균질도를 가지고 있는지 여부를 확인하였다.
- [170] 우선, 대조군으로 공지되어 있는 기존의 방법에 의하여 단백질 칩을 제작하였다. Silicate monomer, HCl, DW, SP 및 샘플 용액을 순차대로 혼합하여 제조한 후, pin arrayer를 이용하여 source plate에 분주된 혼합용액을 PMMA 96-웰 플레이트에 스팟팅하였다. pin arrayer로는 OnmiGrid Accent Arrayer(Genomic Solutions, 미국)를 사용하였다.
- [171] 그리고, 실시예 1 및 2의 방법으로 제작한 본 발명의 방법에 따라 제작된 단백질 칩의 카메라 이미지 사진(도 6의 B)과, 상기 방법에 따라 제작된 단백질 칩이 현미경에서 관찰되는 상을 디지털 카메라로 찍어 비교하였다.
- [172] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이 본 발명의 특정 졸 조성물의 사용 및; 용액 I, 용액 II와 혼합하는 전처리 공정없이 순차적으로 분주함으로써 제작된 단백질 칩의 경우에는 스팟의 모양 및 크기가 일정하게 배열되어 있으나, 종래 방법에 따른 경우 스팟의 모양이나 크기가 일정하지 않았다. 즉, 본 발명에 따른 단백질 칩이 기존의 단백질 칩보다 그 균일한 정도가 현저히 우수함을 확인할 수 있었다.
- [173]
- [174] 비교예 2: 순서를 다르게 혼합하였을 때의 비교
- [175] 본 발명의 방법에 따른 혼합 순서대로 용액을 혼합하였을 때와 순서를 다르게 혼합하였을 때 졸 혼합물의 차이를 비교하였다.
- [176] 본 발명의 혼합 순서에 따라 SolB1, SolB2 및 SolB3 로 된 졸 조성물에 차례대로 SolBH 와 SolBS 및 증류수와 버퍼 용액을 섞어 혼합물을 준비하였고, 비교를 위해 동일한 용액을 사용하되 SolBH 를 맨 마지막에 섞어 혼합물을 준비하여 두 혼합물의 차이를 디지털 카메라로 찍어 비교하였다.
- [177] 그 결과 도 9 에 나타난 바와 같이 본 발명의 혼합 순서를 지켜 혼합물을 준비하였을 때는 용액이 서로 잘 용해되어 맑고, 오랫동안 겔화가 진행되지 않았으나 (도9의 A), 혼합 순서를 다르게 하여 준비하였을 때는 용액이 잘 녹지 않았고, 겔화도 빨리 진행됨을 확인할 수 있었다 (도 9의 B).
- [178]
- [179] 실시예 3: 단백질 칩을 이용한 HIV 분석 및 진단
- [180]
- [181] 상기 실시예 2에서 제작된 단백질 칩을 10% skim milk 용액을 이용하여 블로킹(blocking) 해준 후, 각 웰에 희석된 HIV 환자의 혈청을 50 μ l씩 넣고, 실온에서

1시간 동안 1차 배양하였다. 1차 배양이 끝난 후, 혈청을 제거하고, ELISA용 세척기를 이용하여 0.2% Tween-20 이 포함된 세척액을 넣고 5 분간 볼텍스 (vortex) 하는 단계를 4회 반복하였다 (1차 세척). 상기 1차 세척 후, Cy3 형광물질로 표지되어 있으며, 인간의 항체를 인지하는 α -Human 항체 (α -Human-Cy3, Jackson ImmunoResearch) 를 희석하여 50 μ l를 넣고, 실온에서 1 시간 동안 2차 배양하였다. 상기 2차 배양 후, α -Human-Cy3를 제거하고, ELISA용 세척기를 이용하여 세척액을 넣고 5분간 볼텍스 하는 단계를 4회 반복하였다 (2차 세척).

- [182] 상기 2차 세척 후, 반응이 종결된 웰을 실온에서 10분 이상 방치하여 건조시키고, 레이저 스캐너인 FUJI FLA-9000 이미지 스캐너로 반응이 일어난 스팟을 스캐닝하였다. 또한, 이미지 분석 프로그램인 ImageQuant TL을 이용하여 반응이 일어난 각 스팟의 형광 신호의 세기를 측정하고 정량화하여 반응이 일어난 정도를 분석하였다.
- [183]
- [184] 도 2에 나타난 바와 같이, 환자 혈청에 따라 5개의 마커들 (p24, p31, gp41, gp120 및 gp160 (Abcam사, Fitzgerald사에서 입수) 이 각각 혈청에 대해 반응을 나타내었으며 항원 마커가 들어가지 않은 음성 대조군 칩은 반응을 나타내지 않았다.
- [185] 도 3은 5종의 항원 중 가장 반응이 잘 일어났던 4종의 항원 (p24, p31, gp41, gp120)과 HIV1 의 O-type 항원 1종을 연속적으로 희석하여 웰에 스팟팅하고, HIV 표준 혈청을 차례로 희석한 것과 반응시킨 결과를 나타낸 것으로, 예상대로 quantification이 정량적으로 이루어 졌음을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 바탕으로, 본 발명에서 제작한 단백질 칩 상에서 항원-항체 반응이 특이적으로 일어난다는 것을 알 수 있다.
- [186] 도 4 는 5종의 항원을 각각 포함하는 스팟에서 HIV1 standard 혈청에 대한 반응을 정량화한 결과를 나타낸 것이다. 도면의 X 축은 표준 혈청을 기존의 ELISA 진단키트로 HIV 를 진단하였을 때 측정된 타이터 (Titer) 를 나타낸 것으로 본 발명의 단백질 칩의 분석 결과와 기존 진단칩으로 분석한 결과가 상관성이 있음을 보였다. X 축의 PRB204-00 은 Bostonbiomedica, Inc. 에서 구매한 환자의 혈청 표준샘플이며 제품명은 Anti-HIV1 mixed titer performance panel 이며 제품 번호는 PRB204(M) 이다. Titer 값은 기존의 진단키트로 측정한 s/co 값으로써 signal to cut-off (양성과 음성의 기준치) ratio 를 나타내는 것이며 1 이상일 때 양성으로 한다. 도면의 Y 축은 스팟의 형광 신호의 세기 (“signal”) 값을 음성 대조군 스팟의 형광 신호의 세기 (“control”) 값으로 나눈 값을 말한다.
- [187] 도 5 는 HIV 감염된 환자에서 날짜 별로 채혈한 seroconversion panel 에 대한 반응을 기존의 진단 키트와 비교한 표이다. 환자의 혈청은 Bostonbiomedica, Inc. 에서 구매한 표준샘플이며 기존의 진단키트를 이용한 검출 결과 또한 표준 샘플과 함께 제공받은 것이다. 이 샘플의 제품명은 Anti-HIV1 seroconversion

panel V 이고, 제품번호는 PRB922 이다.

[188] 감염된지 얼마 되지 않았을 때는 기존의 항체 진단 ELISA 진단키트로 HIV 감염을 검출해 내지 못하였으나 본 발명의 단백질 칩에서는 항원 검출 키트와 마찬가지로 감염 초기부터 양성으로 검출할 수 있음을 알 수 있다.

[189] 따라서 상기 바이오 칩이 기존의 항체 진단 ELISA보다 훨씬 향상된 민감도를 가지고 있다는 것을 알 수 있다.

[190]

[191] 실시예 4: 단백질 칩을 이용한 웨스턴 블롯 방법의 대체

[192]

[193] 웨스턴 블롯과 면역 염색법은 여러 단백질의 혼합물로부터 어떤 특정 단백질을 찾아내는 기법으로써 찾고자 하는 단백질에 대한 항체를 사용하여 항원-항체 반응을 일으킴으로써 특정 단백질의 존재 여부를 밝혀내는 방법이다.

[194] 일반적으로 웨스턴 블롯(western blot)으로 특정 단백질을 찾아내는 과정은, 단백질 혼합물을 SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하여 크기 별로 분리시킨 후 니트로셀룰로오스 또는 나일론 멤브레인에 옮기고, 단백질이 옮겨진 멤브레인에서 항원-항체 반응을 이용하여 특정 항체에 대한 항원을 찾아내는데, 이때 사용하는 항체는 방사성 동위원소로 표지하거나 특정 효소(horseradish peroxidase 등) 또는 형광을 나타내는 색소가 결합되어 있어 찾고자 하는 단백질을 가시화 할 수 있다.

[195] 상기와 같이, 복잡한 단계를 거쳐야 하는 웨스턴 블롯 대신에, 상기 실시예 2에서 제작된 단백질 칩을 이용하여, 단백질 혼합물을 고정화 한 후 형광을 나타내는 색소가 결합되어 있는 항체로 어세이 하여, 쉽고 간편하게 단백질 혼합물 내에서 특정 단백질을 찾아낼 수 있었다.

[196] 또한, 일반적으로 단백질을 전기영동할 때 환원 상태 하에서 실시하므로 단백질이 변성(denature)된 상태에서 항체와 결합을 시키게 되는데, 특정 항체가 단백질의 본래(native) 형태만을 인식한다면, 일반적인 웨스턴 블롯(western blot)으로는 단백질을 찾아낼 수 없게 되는 문제점이 발생되나, 본 발명에 따른 줄-겔 단백질칩은 단백질을 본래 형태로 고정화시킬 수 있으므로 더 유용하다.

[197] 상기 실시예 2에서 제조된 줄-겔 칩을 이용하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[198] (1) p24 단백질의 Native form 및 denature form에 따른 결합 비교 실험

[199] (i) 먼저, Native 형태에만 결합하고, denature 형태에는 결합하지 않는 항체를 이용하여 실험하였다. 그 결과, 웨스턴 블롯에서는 밴드가 보이지 않고, 줄-겔 단백질 칩에서만 양성으로 나타났다.

[200] (ii) 동일한 항원에 대한 항체이지만 denature 형태에 결합하는 항체를 이용하여 웨스턴 블롯과 줄-겔 단백질 칩에 실험한 결과, 모두 양성으로 나타났다.

[201] 따라서, 본 발명에 따른 줄-겔 칩은 denature 및 native 형태 모두를 확인할 수 있는 것으로 나타났다.

[202]

[203] (2) p24 단백질이 발현된 *E. coli crude extract*를 이용한 실험[204] (i) p24 단백질이 발현되어 있는 *E. coli crude extract*를 졸-겔 단백질 칩에 농도별로 (Lysate 1, 2, 3) 고정된 후 발현된 단백질에 대한 항체로 어세이한 결과, 졸-겔 단백질 칩에서 양성으로 나타났다 (도 10).[205] (ii) 특정 단백질이 발현되어 있지 않은 *E. coli crude extract* (N) 를 졸-겔 단백질 칩에 고정된 후 위와 같은 항체로 어세이한 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 졸-겔 단백질 칩에서 음성으로 나타났다 (도 10).

[206]

[207] 도 10에서 N 은 음성대조군으로써 특정 단백질이 발현되어 있지 않은 *E. coli crude extract*를 고정된 것이며, Lysate 1 은 특정 단백질이 0.09ug/ul 의 농도로 발현되어 있는 *E. coli crude extract*, Lysate 2 는 특정 단백질이 0.18ug/ul 의 농도로 발현되어 있는 *E. coli crude extract*, Lysate 3 는 특정 단백질이 0.27ug/ul 의 농도로 발현되어 있는 *E. coli crude extract* 를 고정된 것이다. P 는 양성대조군으로써 Cy3 형광 물질을 고정된 것이다.

[208]

[209] (3) (i) p24 단백질에 대한 항체를 농도별로 졸-겔 단백질 칩에 고정된 후 샌드위치 어세이 방법을 이용하여, p24 단백질이 과발현되어 있는 *E. coli crude extract* 로 어세이 하고 다시 항체를 결합시켜 확인한 결과, 졸-겔 칩에서는 양성으로 나타났다 (도 11).[210] (ii) 탐색하고자 하는 항원에 대한 항체를 농도별로 졸-겔 단백질 칩에 고정된 후 샌드위치 어세이 방법을 이용하여 특정 항원이 발현되지 않은 *E. coli crude extract* 로 어세이 하고 다시 항체를 결합시켜 확인한 결과, 졸-겔 칩에서는 음성으로 나타났다 (도 11).

[211]

[212] 도 11 에서 N 은 음성대조군으로써 항체를 고정하지 않은 칩이며 Ab1 및 Ab2 는 항체를 농도별로 (0.063ug/ul, 0.125ug/ul) 고정된 것이다. P 는 양성 대조군으로써 Cy3 형광 물질을 고정된 것이다.

[213]

[214] (4) (i) 탐색하고자 하는 질병(AIDS)의 항체에 대한 항원 (p24, p31, gp41, gp120 및 gp160)을 졸-겔 단백질 칩에 고정된 후 환자 혈청 등 특정 항체가 포함되어 있는 물질 (양성 혈청) 로 어세이 하여 확인한 결과, 졸-겔 칩에서 양성으로 나타났다 (도 12).

[215] (ii) 탐색하고자 하는 항체에 대한 항원을 졸-겔 칩에 고정된 후 혈청 등 특정 항체가 포함되어 있지 않은 물질 (음성 혈청) 로 어세이 하여 확인한 결과, 졸-겔 칩에서 음성으로 나타났다 (도 12).

[216]

[217] 실시예 5: 화합물과 결합하는 단백질 또는 특정 물질의 탐색

[218]

[219] 도 13에 나타난 바와 같이, 특정 화합물 (비스페놀 에이) 을 실시예 2에서 제작한 졸겔칩에 고정하고, 음성 대조군으로써 화합물을 녹이는데 사용하는 버퍼용액 만을 칩에 고정하였다. 그리고, 형광물질 (cy3) 로 표지되어 있으며 비스페놀 에이와 결합할 수 있는 single strand DNA 압타머 (피씨엘주) 사에서 구입) 를 이용하여 분석하였다.

[220]

[221] 단백질-단백질의 결합은 yeast to hybrid나 Immunoprecipitation (IP) 등으로 확인할 수 있으나 화합물과 단백질의 결합 또는 화합물과 DNA의 결합을 손쉽게 확인할 수 있는 방법은 다양하지 않다. 상기 실험 결과, 실시예 2에서 제작된 단백질칩은 화합물이나 DNA를 비롯한 저분자 물질부터 단백질, 항체에 이르기까지 다양한 종류의 물질을 고정할 수 있으므로, 다양한 물질의 결합을 손쉽게 확인할 수 있다.

[222]

[223] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[224]

산업상 이용가능성

[225] 본 발명에 따른 상기 졸 조성물의 겔화를 이용하여 바이오 칩을 제조하는 경우, SolB1, SolB2 및 SolB3 로 구성되는 졸 조성물과 SolBH, SolBS, DW 와 버퍼 용액을 순서대로 혼합한 뒤 저온 에서 안정화 시킴으로써 졸 조성물의 겔화 시간을 늦추며 안정화된 겔화(gelation)을 유도하여 졸 용액의 분주가 용이하며, 스팟의 활성을 유지할 수 있다. 또한 사전에 혼합 (premixing)하는 전처리 과정 없이 어레이를 이용한 표면 스팟팅만을 이용하여 간편하게 균질한 바이오 칩 제작이 가능하다는 유리한 효과가 있어 유용하다.

청구범위

[청구항 1]

다음 단계를 포함하는, 졸 조성물의 겔화를 이용한 바이오 칩의 제조방법으로서,

(a) SolB1, SolB2 및 SolB3를 포함하는 졸 조성물에 HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃COOH로 구성된 군에서 선택된 SolBH (용액 I)를 혼합하는 단계;

(b) 완충액인 SolBS와 증류수를 (a)단계에서 혼합된 용액과 혼합한 다음, -20~4°C에서 안정화 시키는 단계; 및

(c) 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질을 포함하는 용액을 (b)단계에서 안정화된 용액과 혼합하여 기판 위에 분주한 후 겔화시키는 단계,

이 때,

(i) 상기 SolB1은 메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES), 에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐실리케이트(Sodium Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제1 실리케이트 단량체이고;

(ii) 상기 SolB2는

3-아미노트리메톡시실란(3-aminotrimethoxysilane, 3-ATMS),

디글리세릴실란(diglycerylsilane, DGS),

메틸트리메톡시실리케이트(methyltrimethoxysilicate, MTMS),

폴리글리세릴실리케이트(polyglycerylsilicate, PGS),

폴리비닐아세테이트(polyvinylacetate),

폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 글리세릴

메타크릴레이트(glyceryl metaacrylate), 하이드록시에틸

아크릴레이트(hydroxyethyl acrylate),

N,N-디쿠시니미딜카르보네이트(N,N-dicusinimidilcarbonate, DSC),

1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene), 세틸트리메틸암모늄

클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride),

세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium

bromide), 3-(트리에톡시실릴) 프로필 숙시닉

언하이드라이드(3-(triethoxysilyl) propyl succinic unhydride),

N-(3-트리에톡시실릴 프로필)-4-하이드록시

부틸아마이드(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy butylamide,

SIT8189.5), N-(트리에톡시실릴 프로필)

글루콘아마이드(N-(triethoxysilyl propyl) gluconamide, SIT8189.0) 50%, 플루로닉 L121(pluronic L121) 및 테트라메틸 암모늄 하이드록시드(tetramethyl ammonium hydroxide)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제2 실리케이트 단량체이고; 그리고
 (iii) 상기 SolB3 는 아미노프로필트리에톡실란 (aminopropyltriethoxysilane, APTES), 3-글리시독시프로필트리메톡시실란(3glycidoxypopyltrimethoxysilane, GPTMOS), N-트리에톡시실릴프로필-O-폴리에틸렌 옥사이드 우레탄(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane, PEOU), 글리세롤, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 및 PEG8000으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제인 것을 특징으로 하는 제조방법.

- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 방법은 어레이어 없이 손으로 스팟팅을 수행하거나, 비접촉형 어레이어를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 기판은 폴리메틸메타크릴레이트 (polymethylmethacrylate, PMMA), 플라스틱, 실리콘, 및 유리로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질은 핵산, 단백질, 펩타이드, 저분자 물질 및 세포로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 (a)단계에서 혼합된 용액은 -20~4°C 의 조건에서 30분 이상 방치하여 안정화시키는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 사용되는 기판은, 사용되기 전에 미리 이슬점 이상의 온도로 최적화하고, (c) 단계에서 습도 50% 이상의 조건에서 분주하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 졸 조성물과 SolBH와 SolBS의 혼합 용액, 증류수 및 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질은 각각 3: 1: 4 와 1: 2: 8 사이의 범위로 혼합되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 SolBH 및 SolBS의 농도는 1mM ~ 100mM 인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 SolBS : 증류수 : 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질의 부피비는 1:2:1 와 2:5:1 사이의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 완충액은 pH 3~8 범위의 소듐 포스페이트 (sodium phosphate)인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 11]

제1항에 있어서, 상기 기판은 미리 플라즈마 표면처리 되거나, 에칭되거나, PDMS 나 실리케이트 단량체 또는 고분자 물질로 처리된 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 12]

다음 단계를 포함하는, 졸 조성물의 겔화를 이용한 바이오 칩의 제조방법으로서,

(a) SolB1, SolB2 및 SolB3 로 구성된 졸 조성물을 기판 위에 분주한 다음, HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃COOH로 구성된 균에서 선택된 SolBH (용액 I) 를 분주하는 단계; 및

(b) 완충액인 SolBS, 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질 및 증류수를 포함하는 용액II를 기판 위에 분주한 후 겔화시키는 단계,

이 때,

(i) 상기 SolB1 은 메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES), 에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐 실리케이트 (Sodium Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS)로 구성된 균에서 선택된 1종 이상의 제1 실리케이트 단량체이고;

(ii) 상기 SolB2 는

3-아미노트리메톡시실란(3-aminotrimethoxysilane, 3-ATMS),

디글리세릴실란(diglycerylsilane, DGS),

메틸트리메톡시실리케이트(methyltrimethoxysilicate, MTMS),

폴리글리세릴실리케이트(polyglycerylsilicate, PGS),

폴리비닐아세테이트(polyvinylacetate),

폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 글리세릴

메타크릴레이트(glyceryl metaacrylate), 하이드록시에틸

아크릴레이트(hydroxyethyl acrylate),

N,N-디쿠시니미딜카르보네이트(N,N-dicusinimidilcarbonate, DSC),

1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene), 세틸트리메틸암모늄

클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride),

세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide), 3-(트리에톡시실릴) 프로필 숙시닉

언하이드라이드(3-(triethoxysilyl) propyl succinic unhydride),

N-(3-트리에톡시실릴 프로필)-4-하이드록시

부틸아마이드(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy butylamide,

SIT8189.5), N-(트리에톡시실릴 프로필)

글루콘아마이드(N-(triethoxysilyl propyl) gluconamide, SIT8189.0)

50%, 플루로닉 L121(pluronic L121) 및 테트라메틸 암모늄 하이드록시드(tetramethyl ammonium hydroxide)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제2 실리케이트 단량체이고; 그리고
 (iii) 상기 SolB3 는 아미노프로필트리에톡실란 (aminopropyltriethoxysilane, APTES), 3-글리시독시프로필트리에톡시실란(3glycidoxypyltrimethoxysilane, GPTMOS), N-트리에톡시실릴프로필-O-폴리에틸렌 옥사이드 우레탄(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane, PEOU), 글리세롤, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 및 PEG8000으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제인 것을 특징으로 하는 제조방법.

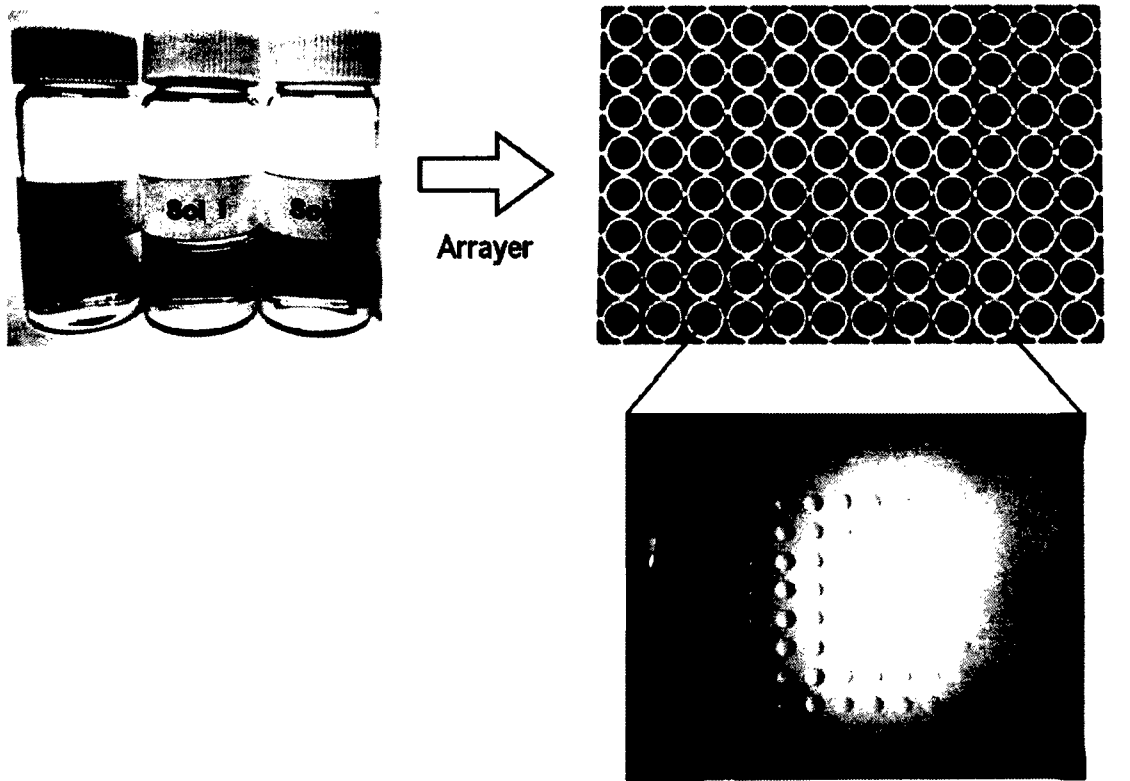
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 방법은 어레이어 없이 손으로 스팟팅을 수행하거나, 비접촉형 어레이어를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제 12 항에 있어서, 상기 방법은 전처리 과정이 없는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 전처리 과정은, (i) SolB1, SolB2, SolB3, SolBH, SolBS, 또는 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질을 혼합하는 과정; (ii) 혼합한 후 볼텍싱(vortexing)하는 과정; 및 (iii) 상기 혼합된 용액을 안정화하는 과정으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 16] 제 12 항에 있어서, 상기 SolB1, SolB2 및 SolB3 로 구성된 졸 조성물, SolBH, SolBS 및 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질을 분주 전에 용기에 담아 노즐을 이용하여 빨아올리는 형태로 분주하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 17] 제12항에 있어서, 상기 SolB1, SolB2 및 SolB3 로 구성된 졸 조성물, SolBH, SolBS 및 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질을 분주 전에 미리, 분주하는 노즐이 연결되어 있는 대용량 카트리지에 넣어, 한번에 분주하는 양이, 노즐을 이용하여 빨아올리는 형태로 분주하는 것에 비해 100배 이상이어서 대량 생산이 가능한 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 18] 제12항에 있어서, 상기 기판은 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA), 플라스틱, 실리콘, 및 유리로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 19] 제12항에 있어서, 상기 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질은 핵산, 단백질, 펩타이드, 저분자 물질 및 세포로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

- [청구항 20] 제12항에 있어서, 상기 기판은 이슬점 이상의 온도로 최적화 되고, 분주는 습도 50% 이상의 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 21] 제12항에 있어서, 상기 졸 조성물, 용액 I 및 용액 II 의 분주량은 각각 3: 1: 4 와 1: 2 :8 사이의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 22] 제12항에 있어서, 상기 SolBH 및 SolBS 의 농도는 1mM ~ 100mM인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 23] 제12항에 있어서, 상기 용액II은 SolBS : 증류수 : 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질의 부피비가 1:2:1 와 2:5:1사이의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 24] 제12항에 있어서, 상기 SolBS 는 pH 3~8 범위의 소듐 포스페이트 (sodium phosphate)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 25] 제12항에 있어서, 상기 기판은 미리 플라즈마 표면처리 되거나, 에칭되거나, PDMS 나 실리케이트 단량체 또는 고분자 물질로 처리된 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 26] (i) 메틸트리에톡시실란(methyltriethoxysilane, MTES), 에틸트리에톡시실란(ethyltriethoxysilane, ETrEOS), 소듐 실리케이트 (Sodium Silicate), 테트라메틸 오르토실리케이트(tetramethyl orthosilicate, TMOS), 테트라에틸 오르토실리케이트(tetraethyl orthosilicate, TEOS) 및 테트라메톡시실리케이트(tetramethoxysilicate, TMS)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제1 실리케이트 단량체인 SolB1을 포함하는 제1용기; (ii) 3-아미노트리메톡시실란(3-aminotrimethoxysilane, 3-ATMS), 디글리세릴실란(diglycerylsilane, DGS), 메틸트리메톡시실리케이트(methyltrimethoxysilicate, MTMS), 폴리글리세릴실리케이트(polyglycerylsilicate, PGS), 폴리비닐아세테이트(polyvinylacetate), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 글리세릴 메타크릴레이트(glyceryl metaacrylate), 하이드록시에틸 아크릴레이트(hydroxyethyl acrylate), N,N-디쿠시니미딜카르보네이트(N,N-dicusinimidilcarbonate, DSC), 1,3,5-트리메틸벤젠(1,3,5-trimethylbenzene), 세틸트리메틸암모늄 클로라이드(cetyltrimethylammonium chloride), 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide), 3-(트리에톡시실릴) 프로필 숙시닉 언하이드라이드(3-(triethoxysily) propyl succinic unhydride), N-(3-트리에톡시실릴 프로필)-4-하이드록시

부틸아마이드(N-(3-triethoxysilyl propyl)-4-hydroxy butylamide, SIT8189.5), N-(트리에톡시실릴 프로필) 글루콘아마이드(N-(triethoxysilyl propyl) gluconamide, SIT8189.0) 50%, 플루로닉 L121(pluronic L121) 및 테트라메틸 암모늄 하이드록시드(tetramethyl ammonium hydroxide)로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 제2 실리케이트 단량체인 SolB2를 포함하는 제2용기; (iii) 아미노프로필트리에톡실란(aminopropyltriethoxysilane, APTES), 3-글리시독시프로필트리메톡시실란(3-glycidoxypropyltrimethoxysilane, GPTMOS), N-트리에톡시실릴프로필-O-폴리에틸렌 옥사이드우레탄(N-triethoxysilylpropyl-O-polyethylene oxide urethane, PEOU), 글리세롤, PEG200, PEG400, PEG600, PEG1350 및 PEG8000으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 첨가제 인 SolB3을 포함하는 제3용기; (iv) HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃COOH로 구성된 군에서 선택된 SolBH를 포함하는 제4용기; 및 (v) 완충액인 SolBS를 포함하는 제5용기로 구성되고, 상기 SolB1, SolB2 및 SolB3를 혼합한 졸 조성물에 HCl, H₂SO₄, HNO₃ 및 CH₃COOH로 구성된 군에서 선택된 SolBH, 완충액인 SolBS와 증류수, 탐지 하기 위한 생물학적 물질 순으로 순서대로 혼합함으로써 졸 혼합물이 겔화되는 것을 특징으로 하는 바이오 칩 제조용 키트.

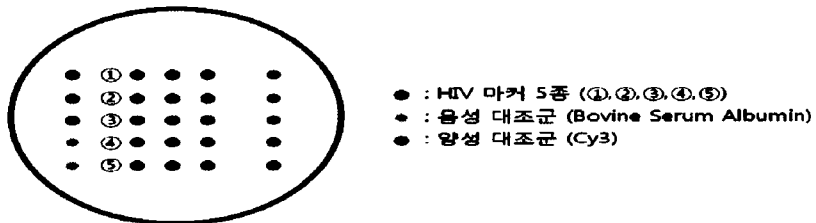
- [청구항 27] 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 바이오 칩에 상기 표적 생물학적 물질과 상호작용하는 생물학적 물질과 상호작용가능한 표적 생물학적 물질을 함유하는 시료를 첨가하는 단계를 포함하는 표적 생물학적 물질의 분석 방법.
- [청구항 28] 제27항에 있어서, 상기 표적 생물학적 물질은 핵산, 단백질, 펩타이드, 저분자 물질 및 세포로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 29] 제27항에 있어서, 상기 표적 생물학적 물질을 탐지할 수 있는 방사성 동위원소, 형광염료, 염료, 또는 발광성 물질로 표지된 단백질, 항체 또는 압타머와 추가로 반응시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[Fig. 1]

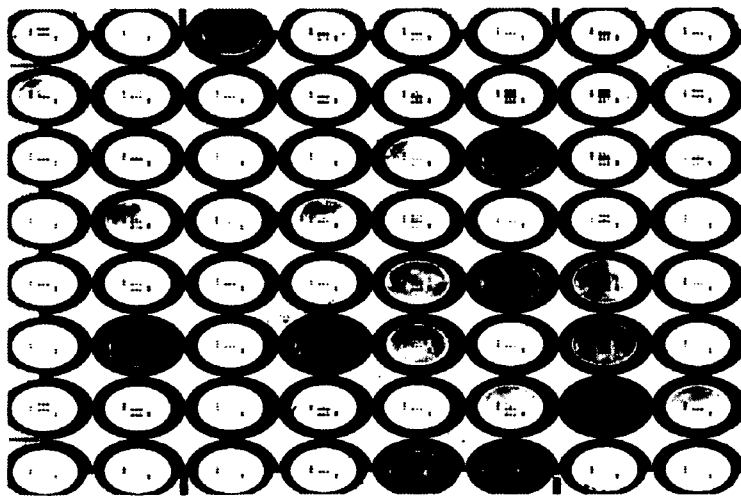


[Fig. 2]

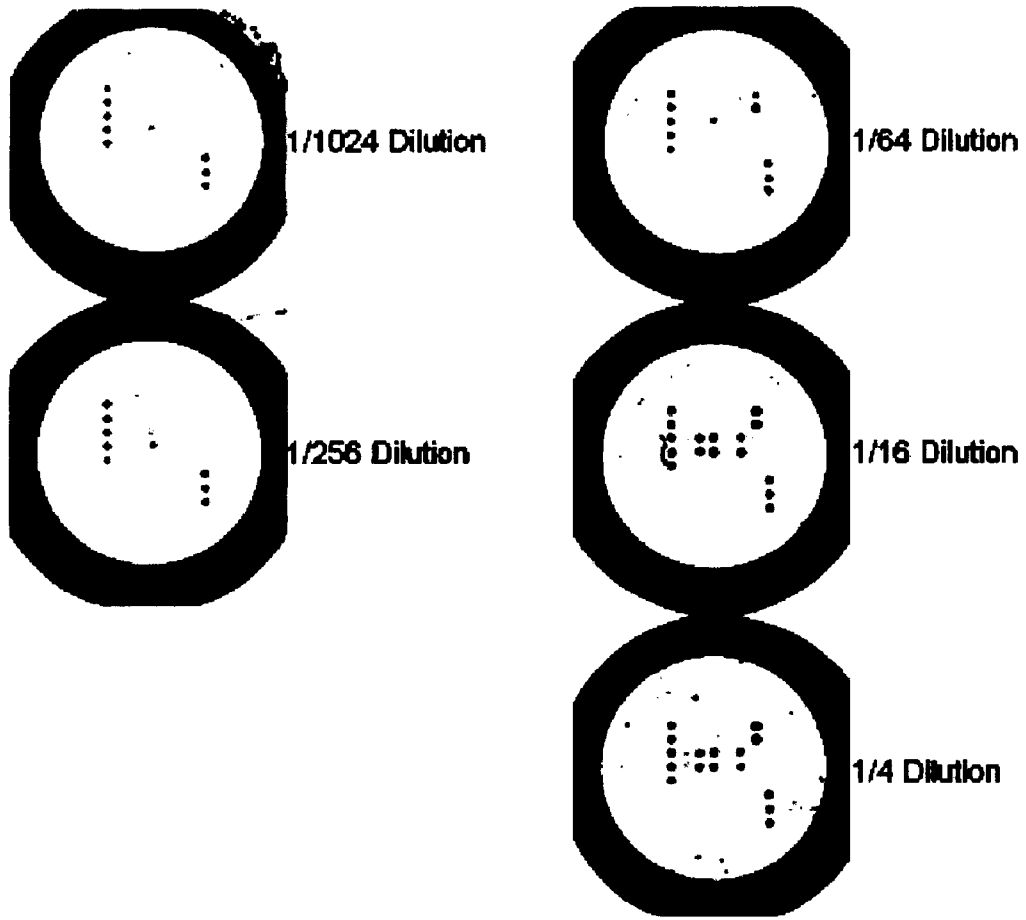
(A)



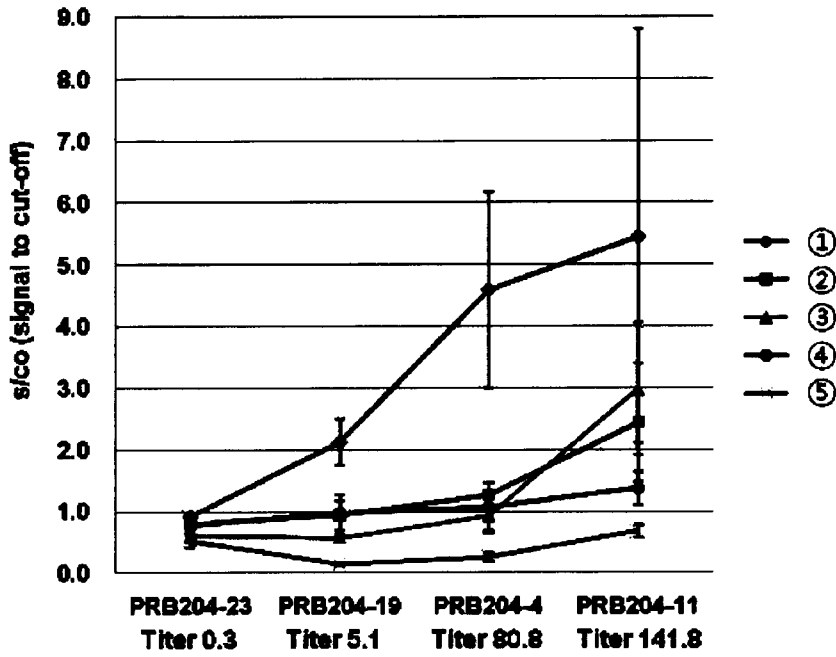
(B)



[Fig. 3]



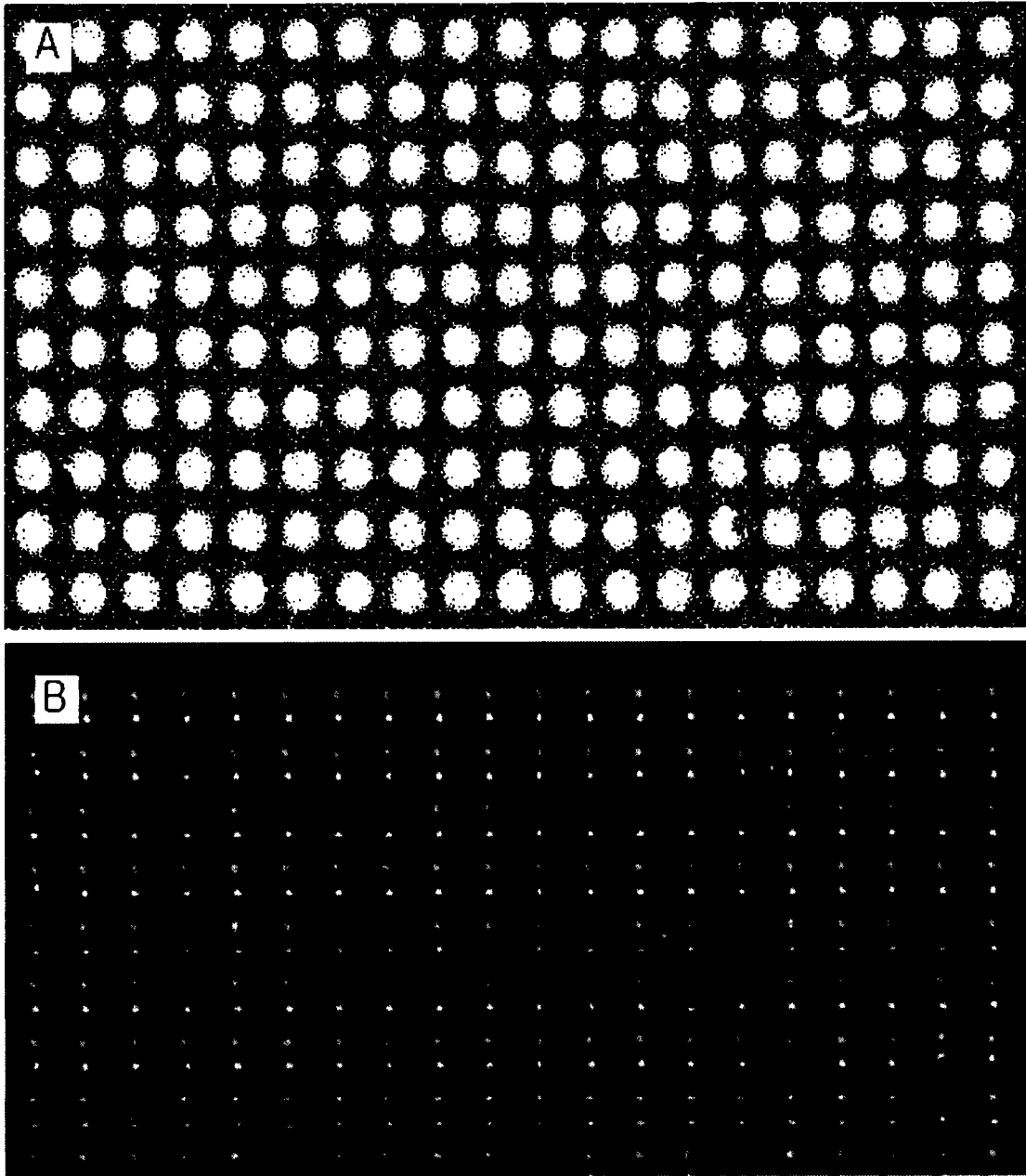
[Fig. 4]



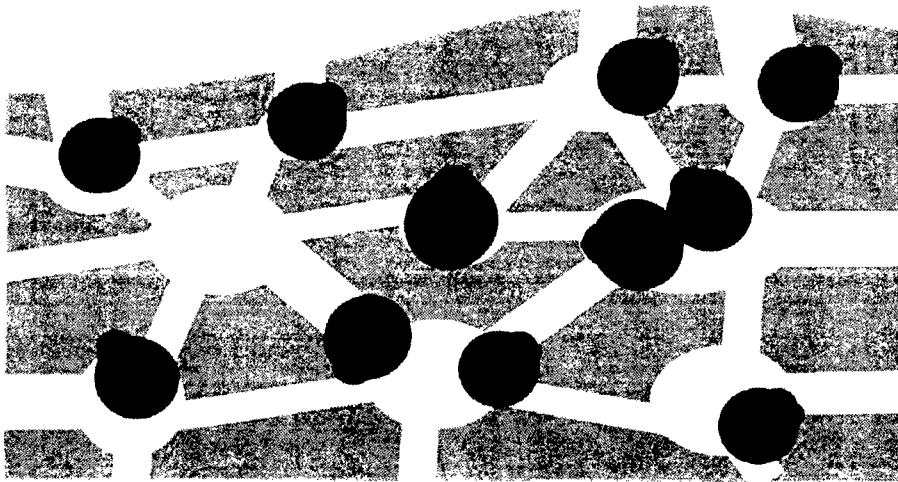
[Fig. 5]

Standard sample		Anti-HIV test	US FDA licensed anti-HIV tests						HIV Ag (MAb)	Western blot
			PCL, Inc.	Abbott	CBC	CPI	Gen.Sys.	Org.Tek.	Syva	Abbott
Member I.D.	Days Since 1st Bleed	Results	Results	Results	Results	Results	Results	Results	Results	Results
PRB922-01	0	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
PRB922-02	4	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
PRB922-03	7	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG
PRB922-04	11	POS	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	POS	POS

[Fig. 6]

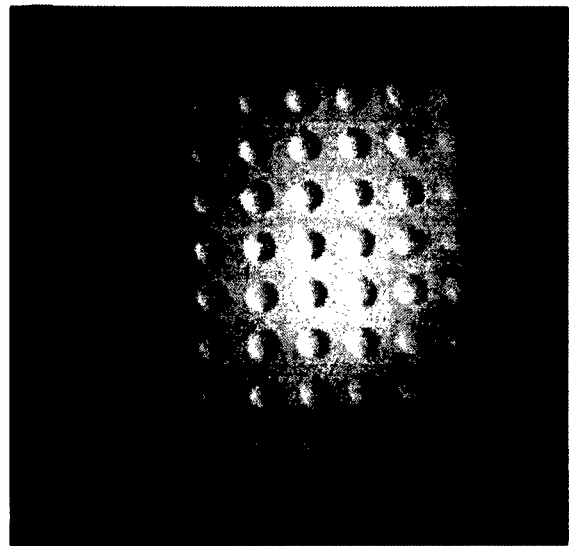
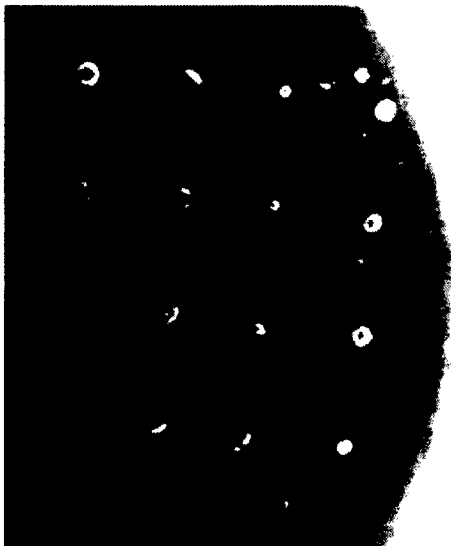


[Fig. 7]



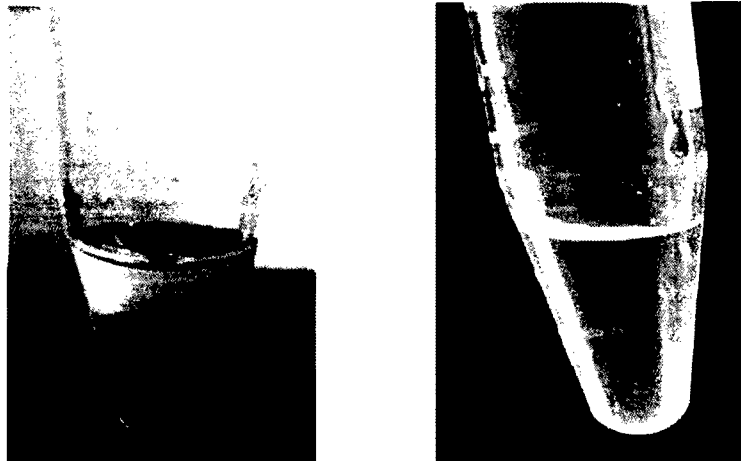
- Proteins Encapsulated
- Interacting Proteins or Antibodies Added from assay

[Fig. 8]

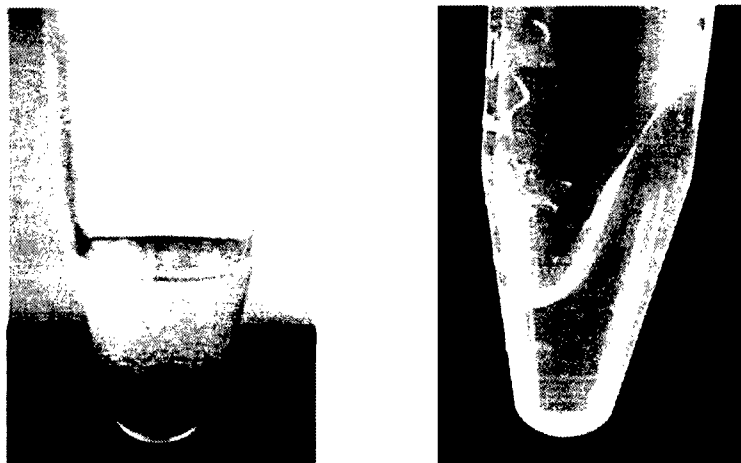


[Fig. 9]

(A)



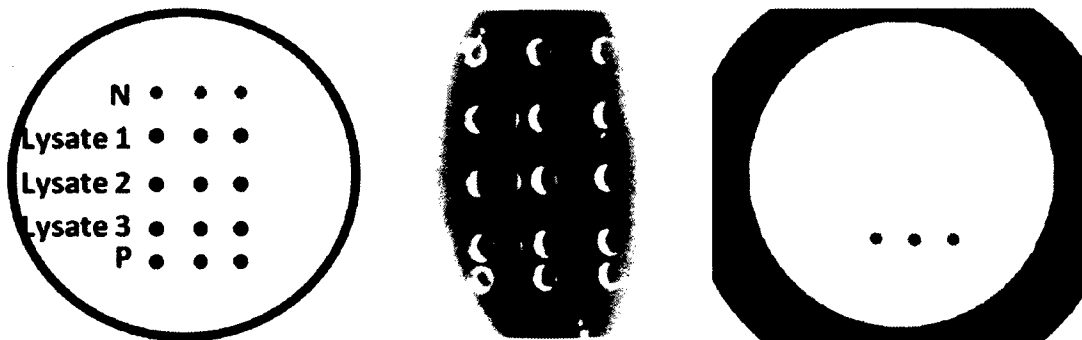
(B)



제조 후 10분

제조 후 3시간

[Fig. 10]

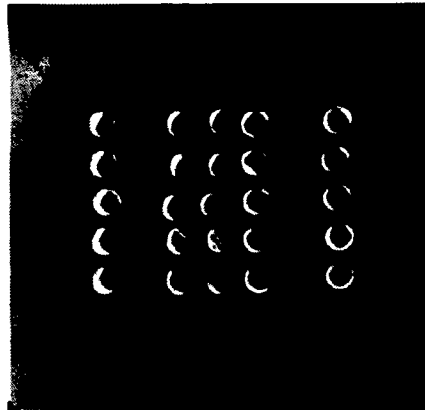
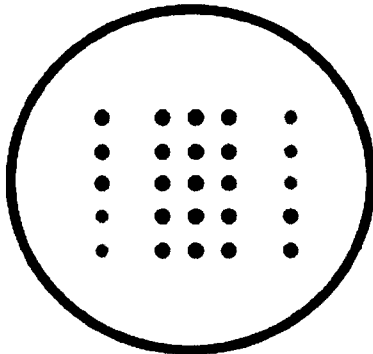


[Fig. 11]



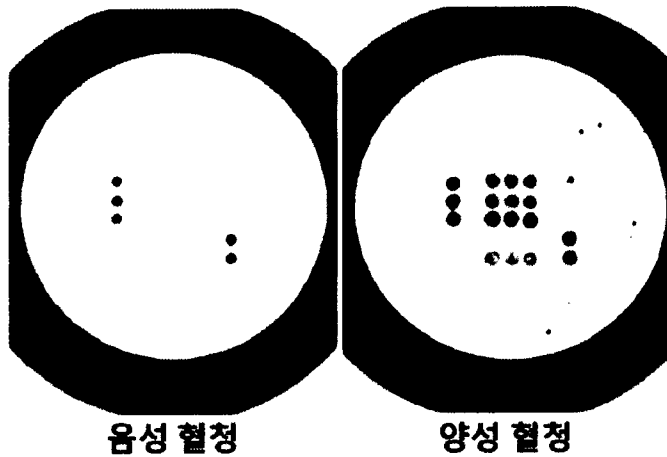
[Fig. 12]

1. 플레이트 준비

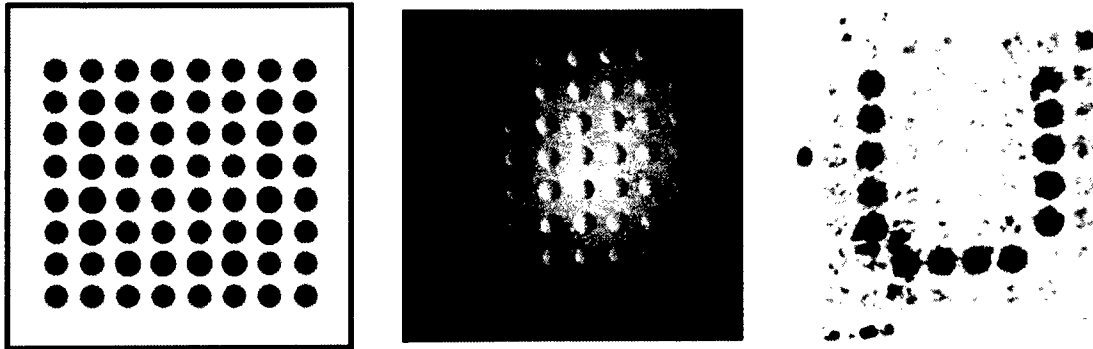


- : 특정 질병 (HIV) 에 대한 5종류의 항원
- : 음성 대조군 (Bovine serum albumin protein)
- : 양성 대조군 (cy3)

2. HIV1 에 감염된 환자의 혈청을 이용하여 어세이한 결과



[Fig. 13]



- : 비스페놀 에이
- : 음성 대조군 (버퍼 용액)

[Fig. 14]

Solution for Binding Assay

SolB™ Complete Kit



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/003105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/48(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/52(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/48; A61K 31/337; C12M 1/00; A61K 9/51; G01N 27/26; G01N 35/02; G01N 33/53; G01N 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as aboveElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: biochip, sol-gel, gelation, composition, stabilizing, substrate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-539215 A (LG CHEM, LTD.) 22 December 2005 See abstract; paragraphs 15-41; claims 9-23.	1-29
A	KR 10-2010-0126994 A (SAMSUNG ELECTRO-MECHANICS CO., LTD.) 03 December 2010 See abstract; paragraphs 20-35; figure 1.	1-29
A	KR 10-2005-0056517 A (SOGANG UNIVERSITY CORPORATION) 16 June 2005 See abstract; page 4, lines 2-17; figures 2-6.	1-29
A	KR 10-2007-0100836 A (CINVENTION AG) 11 October 2007 See abstract; paragraphs 20-39, 84-100.	1-29

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search

19 JANUARY 2012 (19.01.2012)

Date of mailing of the international search report

06 FEBRUARY 2012 (06.02.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/003105

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
JP 2005-539215 A	22.12.2005	AU 2003-260979 A1	30.04.2004
		CN 100412203 C0	20.08.2008
		CN 1681943 A	12.10.2005
		CN 1681943 C0	20.08.2008
		EP 1546406 A1	29.06.2005
		EP 1546406 A4	23.11.2005
		JP 4307380 B2	05.08.2009
		KR 10-0601831 B1	14.07.2006
		KR 10-0663031 B1	28.12.2006
		KR 10-2004-0024510 A	20.03.2004
		KR 10-2006-0061324 A	07.06.2006
		US 2006-0121474 A1	08.06.2006
		WO 2004-024955 A1	25.03.2004
		ZA 200501102 A	28.02.2007
KR 10-2010-0126994 A	03.12.2010	NONE	
KR 10-2005-0056517 A	16.06.2005	NONE	
KR 10-2007-0100836 A	11.10.2007	AU 2006-210267 A1	10.08.2006
		CA 2593043 A1	10.08.2006
		CN 101111225 A	23.01.2008
		CN 101111225 C0	23.01.2008
		EP 1845939 A1	24.10.2007
		JP 2008-528660 A	31.07.2008
		WO 2006-082221 A1	10.08.2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/48(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/52(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
G01N 33/48; A61K 31/337; C12M 1/00; A61K 9/51; G01N 27/26; G01N 35/02; G01N 33/53; G01N 33/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 바이오칩, 줄-겔, 겔화, 조성물, 안정화, 기관

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2005-539215 A (LG CHEM, LTD.) 2005.12.22 요약; 단락 15-41; 청구항 9-23 참조.	1-29
A	KR 10-2010-0126994 A (삼성전기주식회사) 2010.12.03 요약; 단락 20-35; 도 1 참조.	1-29
A	KR 10-2005-0056517 A (학교법인 서강대학교) 2005.06.16 요약; 페이지 4, 라인 2 - 17; 도 2-6 참조.	1-29
A	KR 10-2007-0100836 A (신벤션 아게) 2007.10.11 요약; 단락 20-39, 84-100 참조.	1-29

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일 2012년 01월 19일 (19.01.2012)	국제조사보고서 발송일 2012년 02월 06일 (06.02.2012)
--	--

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 변성철 전화번호 82-42-481-8262
--	-----------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2005-539215 A	2005. 12. 22	AU 2003-260979 A1 CN 100412203 C0 CN 1681943 A CN 1681943 C0 EP 1546406 A1 EP 1546406 A4 JP 4307380 B2 KR 10-0601831 B1 KR 10-0663031 B1 KR 10-2004-0024510 A KR 10-2006-0061324 A US 2006-0121474 A1 WO 2004-024955 A1 ZA 200501102 A	2004. 04. 30 2008. 08. 20 2005. 10. 12 2008. 08. 20 2005. 06. 29 2005. 11. 23 2009. 08. 05 2006. 07. 14 2006. 12. 28 2004. 03. 20 2006. 06. 07 2006. 06. 08 2004. 03. 25 2007. 02. 28
KR 10-2010-0126994 A	2010. 12. 03	없음	
KR 10-2005-0056517 A	2005. 06. 16	없음	
KR 10-2007-0100836 A	2007. 10. 11	AU 2006-210267 A1 CA 2593043 A1 CN 101111225 A CN 101111225 C0 EP 1845939 A1 JP 2008-528660 A WO 2006-082221 A1	2006. 08. 10 2006. 08. 10 2008. 01. 23 2008. 01. 23 2007. 10. 24 2008. 07. 31 2006. 08. 10