

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0069718 (43) 공개일자 2016년06월17일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>G01N 33/573</i> (2006.01) <i>G01N 21/25</i> (2006.01) <i>G01N 33/569</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-0175653 (22) 출원일자 2014년12월09일 심사청구일자 2014년12월09일	(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동) (72) 발명자 전태준 경기도 용인시 기흥구 한보라2로 93 화성파크드림 아파트 305동 1801호 김석재 서울특별시 양천구 신정로 290, 303동 604호 (신정동, 신트리3단지아파트) (뒷면에 계속) (74) 대리인 김순웅

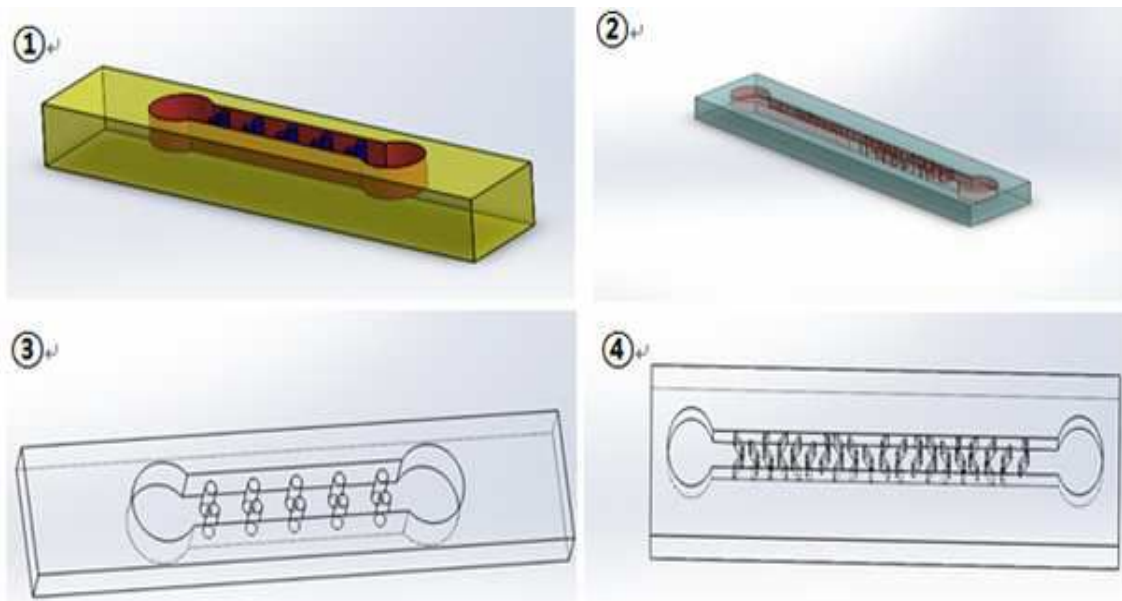
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **병원균의 검출 및 사멸의 동시 수행이 가능한 바이오센서 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 병원균-특이적 효소가 결합된 변색물질을 이용한 바이오센서 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 바이오센서는 병원균-특이적 효소가 결합된 변색물질을 이용함으로써, 병원균의 검출 및 사멸을 동시 수행할 수 있고, 상기 바이오센서를 이용하는 경우, 별도의 분석장비 없이도 색변이를 통한 단순하고 경제적인 방법으로 우수한 병원균 검출 효과를 나타낸다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

장희수

인천광역시 연수구 솔샘로 98, 2동 401호 (청학동,
안보빌라)

김선민

인천광역시 남동구 장승남로 82 현대아파트 101동
1402호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012-0009575

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망융합기술파이오니어사업

연구과제명 생체채널기반 분자/이온 이송 시스템 기술

기 여 율 50/100

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ007995

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 국립농업과학원

연구사업명 바이오그린21연구사업

연구과제명 최신 나노/애플타머 기술을 이용한 GMO 검정방법 개발

기 여 율 50/100

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

마이크로채널이 형성된 기판; 상기 마이크로채널에 결합된 외부자극에 감응하는 변색물질; 및 상기 변색물질에 결합된 병원균-특이적 효소;를 포함하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 마이크로채널은 평균 폭이 100 내지 1000 μm 이고, 평균 깊이가 100 내지 500 μm 인 것을 특징으로 하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 마이크로채널은 원형, 타원형, 직사각형, 정사각형 또는 다각형의 구조물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 기판은 PDMS(polydimethylsiloxane), PMMA(Poly methyl methacrylate), PVC(poly vinyl chloride), PC(poly carbonate), PVA(poly vinyl acrylate), PTFE(polytetrafluoroethylene), 실리콘(silicone), PUR(polyurethane), PE(polyethylene) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 재질인 것을 특징으로 하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 외부자극은 온도, 압력, 광(light), pH, 습도, 용매, 전기장, 자기장, 스트레스(stress) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 변색물질은 폴리디아세틸렌(PDA) 소포 또는 금 나노입자(GNP)인 것을 특징으로 하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 병원균-특이적 효소는 리소스타틴, 베타 글루쿠론디아제, 글루카나제, 글루술라제, 리소자임, 리티카제, 만나나제, 뮤타놀리신, 자이몰라제, 셀룰라제, 펙톨리아제, 스트렙토리신 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 용해 효소인 것을 특징으로 하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서.

청구항 8

제 1항에 있어서,

병원균은 물리적, 화학적 또는 생물학적 상호작용에 의해 상기 병원균-특이적 효소와 결합하는 것을 특징으로 하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 병원균은 포도상구균(staphylococcus), 대장균(Escherichia coli), 폐렴 간균(Klebsiella pneumoniae), 녹농균(Pseudomonas aeruginosa), 세라티아균(Serratia marcescens), 폐렴 연쇄 구균(Streptococcus pneumoniae), 헤모필루스 인플루엔자균(Haemophilus influenzae), 엔테로박터 클로아카에균(Enterobacter cloacae), 엔테로코커스 페칼리스균(Enterococcus faecalis), 살모넬라균(Salmonella), 캄필로박터(Campylobacter) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서.

청구항 10

(1) 마이크로채널이 형성된 기판을 제조하는 단계;

(2) 상기 마이크로채널에 외부자극에 감응하는 변색물질을 결합하는 단계; 및

(3) 상기 변색물질에 병원균-특이적 효소를 결합하는 단계;를 포함하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서의 제조방법.

청구항 11

제 8항에 있어서,

상기 마이크로채널은 평균 폭이 100 내지 1000 μm 이고, 평균 깊이가 100 내지 500 μm 인 것을 특징으로 하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서의 제조방법.

청구항 12

제 1항 내지 제 9항중 어느 한 항의 바이오센서의 마이크로채널에 병원균을 포함하는 유체를 가한 후, 색변이를 탐지하는 단계를 포함하는, 병원균의 검출 및 사멸 방법.

청구항 13

제 10항에 있어서,

상기 방법은 병원균의 검출 및 사멸을 동시에 수행할 수 있는 것을 특징으로 하는, 병원균의 검출 및 사멸 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마이크로 유체시스템 및 외부자극에 감응하는 변색물질을 이용한 병원균의 검출 및 사멸의 동시수행을 위한 바이오센서 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바이오센서는 생체인지 물질과의 결합에 의한 반응을 신호로 변환시키며, 특정한 물질에 대해 빠른 검사가 가능한 센서를 가리킨다. 이는 생물학적 개념의 효소-기질 복합체와 같은 원리로 하나의 리간드는 상기 리간드에 대한 특이 성분을 가지는 한 가지 물질에 대해서만 반응성을 보이며, 그 반응성 정도를 측정한다는 원리이다. 소형화된 바이오센서는 인체손상을 극소화하여 무통 인체진단을 가능하게 하며, 단일 세포를 직접 분석할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 또한 높은 안정성, 빠른 응답시간, 고감도, 높은 선택성 등 동작특성이 향상된 바이오센서는 인체진단의 연속측정을 가능하게 하며 단분자 단위의 분석을 수행할 수 있게 한다.

[0003] 폴리디아세틸렌(polydiacetylene, PDA) 소포(vesicle)는 외부 교란, 예컨대 열, pH, 물리적 또는 화학적 자극, 또는 용매 등에 의해 청색에서 적색으로 변색하는 양색 발현능을 보이는 물질이다. 나아가, 적색의 폴리디아세틸렌 소포는 형광을 발현하는 성질까지 가지고 있어, 이러한 성질을 이용하여 각종 센서로서 개발되어 왔다. 예를 들어, 폴리디아세틸렌 센서는 인플루엔자 바이러스, 콜레라 독성물질, 대장균, 울리고뉴클레오티드, 리포폴리사카라이드, 항체 및 항원 등 많은 다른 생물학적으로 관련된 흥미있는 분자들의 검출에 이용되어 왔다. 마

이크로 유체 시스템은 화학적, 생화학 및 생물학적 분석과 합성을 수행하는 개선된 방법을 제공해 왔다. 이러한 마이크로 유체 시스템은 칩 기반(chip-based) 마이크로 화학 분석 시스템에서 다단, 다중 화학 조작의 수행을 가능케 하였으며, 특히 화학적 및 생물학적 시료를 처리 및 분석할 수 있는 통상의 마이크로 유체 제어 요소를 포함하는 것이 일반적이다. 통상, 당업계에서 마이크로 유체(microfluidic)라는 용어는 채널로 연결된 처리 노드 갖는 시스템 또는 장치를 일컫는 것으로, 여기서 채널은 약 1.0 μm 내지 약 500 μm 범위의 단면적 치수를 갖는다. 당업계에서, 이러한 단면적 치수를 갖는 채널을 마이크로채널이라고 일컫는다. 최근에 이러한 마이크로유체 시스템은 세포 진단 테스트, 의약 개발, 기초 생물학 또는 화장품(cosmetology)과 같은 많은 분야에 응용되고 있다.

[0004] 따라서, 이러한 마이크로유체 시스템을 이용한 병원균의 검출 및 사멸의 동시수행을 위한 변색물질 기반의 바이오센서에 대한 연구의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KR 10-2008-0047683

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 변색물질 기반의 바이오센서에 대해 탐색하던 중, 마이크로유체 시스템 및 병원균-특이적 효소가 결합된 변색물질을 이용하는 경우, 병원균의 검출 및 사멸을 동시수행할 수 있는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명은 마이크로 유체시스템 및 외부자극에 감응하는 변색물질을 이용한 바이오센서 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서,

[0009] 본 발명은

[0010] 마이크로채널이 형성된 기관; 상기 마이크로채널에 결합된 외부자극에 감응하는 변색물질; 및 상기 변색물질에 결합된 병원균-특이적 효소;를 포함하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은

[0012] (1) 마이크로채널이 형성된 기관을 제조하는 단계;

[0013] (2) 상기 마이크로채널에 외부자극에 감응하는 변색물질을 결합하는 단계; 및

[0014] (3) 상기 변색물질에 병원균-특이적 효소를 결합하는 단계;를 포함하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서의 제조방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은

[0016] 상기 바이오센서의 마이크로채널에 병원균을 포함하는 유체를 가한 후, 색 변이를 탐지하는 단계를 포함하는, 바이오센서를 이용한 병원균의 검출 및 사멸 방법을 제공한다.

[0017] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명은, 마이크로채널이 형성된 기관; 상기 마이크로채널에 결합된 외부자극에 감응하는 변색물질; 및 상기 변색물질에 결합된 병원균-특이적 효소;를 포함하는, 병원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은, (1) 마이크로채널이 형성된 기관을 제조하는 단계; (2) 상기 마이크로채널에 외부자극에 감응하는 변색물질을 결합하는 단계; 및 (3) 상기 변색물질에 병원균-특이적 효소를 결합하는 단계;를 포함하는, 병

원균의 검출 및 사멸을 위한 바이오센서의 제조방법을 제공한다.

- [0020] 상기 마이크로채널은 병원균을 포함하는 유체가 흐를 수 있도록 기관 위에 패터닝된 채널로서, 평균 폭이 100 내지 1000 μm 이고, 평균 깊이가 100 내지 500 μm 인 것이 바람직하고, 평균 폭이 300 내지 600 μm 이고, 평균 깊이가 200 내지 300 μm 인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 마이크로채널은 0.1mm 내지 10mm의 폭을 갖는 의료용 튜브(medical tubing), 필터 등에 적용이 가능하며 내부 지름에 제한 받지 않는다.
- [0021] 상기 마이크로채널은 표면 위에 다양한 구조물을 가질 수 있다. 원형, 타원형, 직사각형, 정사각형 또는 다각형(삼각형, 사각형, 오각형, 육각형 등)의 구조물을 가질 수 있으며, 그 형태에 제한 받지 않는다. 본 발명에 따르면 이러한 구조물들은 병원균-특이적 효소와 병원균간의 반응을 증가시켜 병원균의 사멸율을 향상시킬 수 있다.
- [0022] 상기 기관은 고분자 또는 실리콘 재질일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 어떠한 재질로 이루어져 있어도 마이크로유체 시스템을 제조할 수 있다. 일 예로, PDMS(polydimethylsiloxane), PMMA(Poly methyl methacrylate), PVC(poly vinyl chloride), PC(poly carbonate), PVA(poly vinyl acrylate), PTFE(polytetrafluoroethylene), 실리콘(silicone), PUR(polyurethane), PE(polyethylene) 등을 사용할 수 있으며, PDMS인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 외부자극은 변색물질로 하여금 자극에 감응하여 색변이를 일으키게 하는 것으로 예로, 온도, 압력, 광(light), pH, 습도, 용매, 전기장, 자기장, 스트레스(stress) 등 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 변색물질은 폴리디아세틸렌(PDA) 소포 또는 금 나노입자(GNP)일 수 있고, 폴리디아세틸렌(PDA) 소포인 것이 바람직하다.
- [0025] 상기 폴리디아세틸렌(PDA) 소포는 디아세틸렌 계열의 지질로 구성된 소포 형태의 구조체로, 지질의 꼬리 부분에 두 개의 3중 결합을 가지고 있어, 가교를 통해 색변이하는 특성을 가진다. 청색의 폴리디아세틸렌 소포는 온도, pH, 용매, 물리적 자극, 화학적 자극 등과 같은 외부 환경의 변화에 의해 약 540 nm에서 최대 흡수 파장을 지니는 붉은색으로 전이가 일어나면서 적색의 폴리디아세틸렌 형광체가 된다.
- [0026] 상기 병원균-특이적 효소는 검출 및 사멸하고자 하는 병원균과 특이적으로 결합할 수 있는 효소로서, 일 예로, 리소스타핀, 베타 글루쿠론디아제, 글루카나제, 글루솔라제, 리소자임, 리티카제, 만나나제, 뮤타놀리신, 자이몰라제, 셀룰라제, 펙톨리아제, 스트렙토리신 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 용해 효소인 것이 바람직하고, 리소스타핀인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 병원균은 상기 병원균-특이적 효소와 선택적으로 결합하는 미생물, 세균 또는 바이러스 등으로 물리적, 화학적 또는 생물학적 상호작용에 의해 상기 병원균-특이적 효소와 결합할 수 있는 병원균이라면 제한 없이 검출될 수 있다. 즉 병원균은 포도상구균(staphylococcus), 대장균(Escherichia coli), 폐렴 간균(Klebsiella pneumoniae), 녹농균(Pseudomonas aeruginosa), 세라티아균(Serratia marcescens), 폐렴 연쇄 구균(Streptococcus pneumoniae), 헤모필루스 인플루엔자균(Haemophilus influenzae), 엔테로박터 클로아카에균(Enterobacter cloacae), 엔테로코커스 페칼리스균(Enterococcus faecalis), 살모넬라균(Salmonella), 캄필로박터(Campylobacter) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 또한, 본 발명은
- [0029] 상기 바이오센서의 마이크로채널에 병원균을 포함하는 유체를 가한 후, 색 변이를 탐지하는 단계를 포함하는, 바이오센서를 이용한 병원균의 검출 및 사멸 방법을 제공한다.
- [0030] 상기 방법은 병원균의 검출 및 사멸을 동시에 수행할 수 있다.
- [0031] 상기 마이크로채널에 병원균을 포함하는 유체를 가할 경우, 상기 병원균은 마이크로채널에 존재하는 PDA소포에 결합된 병원균-특이적 효소와 결합하여 사멸하고, 이와 동시에 상기 PDA 소포는 청색에서 적색으로 변색함으로써 육안으로 병원균을 검출할 수 있다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명에 따른 바이오센서는 마이크로유체 시스템 및 병원균-특이적 효소가 결합된 변색물질을 이용함으로써, 병원균의 검출 및 사멸을 동시수행할 수 있고, 상기 바이오센서를 이용하는 경우, 별도의 분석장비 없이도 색변

이를 통한 단순하고 경제적인 방법으로 우수한 병원균 검출 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 실시예 1-1에 따른 마이크로채널이 형성된 기판의 모형도를 나타내는 도이다.
- 도 2는 실시예 1-2에 따른 마이크로채널에 폴리디아세틸렌(PDA) 소포의 결합과정을 나타내는 도이다.
- 도 3은 마이크로유체시스템 및 PDA 소포를 이용한 바이오센서의 개념도를 나타내는 도이다.
- 도 4는 실시예 1-1에 따른 (a) 원형 및 (b) 직사각형의 구조물이 형성된 마이크로채널의 광학현미경 결과를 나타내는 도이다.
- 도 5는 실시예 1-2에 따른 마이크로채널에 결합된 PDA 소포의 형광현미경 결과를 나타내는 도이다.
- 도 6은 마이크로채널에 가하는 병원균 용액의 유속에 따른 병원균의 사멸율을 나타내는 도이다.
- 도 7은 바이오센서의 PDA 소포에 결합된 병원체-특이적 효소에 병원균 용액을 가한 경우 및 병원체-특이 효소용액에 병원균 용액을 가한 경우의 병원균의 사멸율을 비교한 도이다.
- 도 8은 바이오센서의 마이크로채널에 형성된 구조물의 갯수에 따른 (a) 병원균의 사멸율 및 (b) PDA 소포의 색변이를 나타내는 도이다.
- 도 9는 바이오센서의 (a) 마이크로채널에 형성된 구조물의 각도 및 병원균 용액의 유속에 따른 병원균의 사멸율 및 (b) PDA 소포의 색변이를 나타내는 도이다.
- 도 10은 바이오센서의 병원균-특이성을 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0035] 실시예 1. 바이오센서의 제조

[0036] 1-1. 마이크로채널이 형성된 기판의 제조

- [0037] 마이크로유체 시스템을 소프트리소그래피(soft lithography) 공정을 이용하여 제조하였다. 먼저, 기판으로는 PDMS(polydimethylsiloxane)을 이용하였고, 상기 기판에 소프트리소그래피 공정을 이용하여 폭 500 μm 및 깊이 300 μm 의 마이크로채널을 형성하였다. 또한, 상기 마이크로채널 위에 유체가 흐르는 방향에 대해 다양한 각도 (30°, 45° 및 60°)를 갖는 원형, 타원형 및 직사각형 기둥(pillar)의 구조물을 형성하였다.

- [0038] 상기 실시예 1-1에 따른 마이크로채널이 형성된 기판의 모형도를 도 1에 나타내었다.

[0039] 1-2. 마이크로채널에 PDA 소포의 결합

- [0040] 상기 실시예 1-1에서 제조한 마이크로채널이 형성된 기판에 폴리디아세틸렌(PDA) 소포를 결합하였다. 먼저, 상기 마이크로채널이 형성된 기판을 산소 플라즈마로 처리하여 표면 개질하였고, APTES(3-Aminopropyltriethoxysilane)을 가하여 아민 작용기를 형성하였다.

- [0041] 또한, PDA 소포의 제조를 위해, TCDA(10,12-Tricosadiynoic acid)를 GFS 케미컬(Columbus, OH, USA)에서 구매하고, DMPC(1,2-dimyristoyl phosphatidylcholine)를 아반티 폴라 리퀴드(Alabaster, AL, USA)에서 구매하고, 클로로포름을 플루카(Buchs, 스위스)에서 구매하였다. 또한, HEPES는 시그마-알드리치 (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 3차증류수에 5 mM만큼 녹인 후 pH 7.5로 맞추어 사용하였다. 폴리디아세틸렌(PDA) 소포는 공지된 방법에 따라 제조하였다(Su Y-l et al. (2004) Biointerfaces 38(1-2):29-33). 먼저, 두 종류의 지질 단량체, TCDA와 DMPC를 바이알에서 최종 농도 2 mM에 맞추어 8:2 몰 비율로 클로로포름에 용해하였다. 그 후, 아르곤 기체 스트림으로 클로로포름을 날려서 제거하고, 남아있는 용매를 완전히 제거하기 위해 진공 상태에서 하룻밤 동안 정치하였다. 최종 2mM 지질 농도에 맞춰 HEPES 용액(5 mM, pH 7.5)을 가한 후, 이 용액을 80℃의 수조에서 1 시간 동안 가열한 뒤 15분 동안 초음파처리(probesonicator, Sonics & Materials, INC, VCX 500)하였다. 초음

파처리 후, 지질 응집물을 제거하기 위해 0.8 μ m 시린지 필터를 이용하여 용액을 여과하고, 지질 멤브레인의 결정화를 위해 4℃에서 냉장 보관하여 하룻밤 동안 정치하였다. 365 nm 파장의 UV (Vilber Lourmat, VL-4.LC)를 조사함으로써 배열된 디아세틸렌 단량체는 1,4-첨가(1,4-addition)에 의한 중합을 이루게 되고 청색의 PDA 소포 용액을 얻었다.

[0042] 그 후, 상기 마이크로채널이 형성된 기판에 상기 폴리디아세틸렌(PDA) 소포를 공지된 방법에 따라 EDC/NHS 짝지음반응(coupled reaction)을 이용하여 결합시켰다(Lim M-C et al. (2011) Anal Bioanal Chem 400:777-785).

[0043] 상기 실시예 1-2에 따른 마이크로채널에 폴리디아세틸렌(PDA) 소포의 결합과정을 도 2에 나타내었다.

[0044] **1-3. PDA 소포에 병원균-특이적 효소의 결합**

[0045] 상기 실시예 1-2에서 제조한 마이크로채널에 부착된 PDA 소포와 병원균-특이적 효소를 결합하기 위해, 리소스타핀(lysozyme)을 시그마-알드리치(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. 또한, 폴리디아세틸렌(PDA) 소포 표면에 리소스타핀 효소의 결합은 공지된 방법에 따라 EDC/NHS 짝지음반응(coupled reaction)을 이용하여 진행하였다(Lim M-C et al. (2011) Anal Bioanal Chem 400:777-785). 그 후, 365 nm 파장의 UV를 조사함으로써 PDA 소포는 중합체를 형성하고 청색으로 바뀌었다.

[0046] 본 발명의 마이크로유체시스템 및 PDA 소포를 이용한 바이오센서의 개념도를 도 3에 나타내었다.

[0047] **실험예 1. 구조물이 형성된 마이크로채널의 형태 관찰**

[0048] 상기 실시예 1-1에 따른 (a) 원형 및 (b) 직사각형의 구조물이 형성된 마이크로채널을 광학현미경을 이용하여 관찰하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0049] 도 4에 나타난 바와 같이, 구조물의 형태에 따라 (a) 원형 또는 (b) 직사각형의 기둥(pillar)이 마이크로채널에 형성되었음을 알 수 있다. 상기 구조물들은 병원균 용액이 마이크로채널을 통과할 때, 병원균의 사멸을 증가시킬 것으로 생각된다.

[0050] **실험예 2. 마이크로채널에 결합된 PDA 소포의 형태 관찰**

[0051] 상기 실시예 1-2에 따른 마이크로채널에 결합된 PDA 소포에 365 nm 파장의 UV를 조사한 후, NaOH를 가함으로써 청색의 PDA 소포로부터 적색의 PDA 소포로 변이시켰고, 이의 형광현미경 결과를 도 5에 나타내었다.

[0052] 도 5에 나타난 바와 같이, 마이크로채널에 적색의 PDA 소포가 결합되어 있는 것을 확인할 수 있다.

[0053] **실험예 3. 병원균 용액의 유속에 따른 병원균의 검출 및 사멸 측정**

[0054] 상기 실시예 1에 따른 바이오센서의 마이크로채널에 병원균인 포도상구균(staphylococcus) 용액을 가한 후, 병원균의 사멸율을 약 600 nm 파장의 흡광도를 이용하여 측정하였다.

[0055] 먼저, 구조물이 없는 마이크로채널에 포도상구균(staphylococcus) 용액을 유속을 달리하여 가한 후 사멸율을 측정하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0056] 도 6에 나타난 바와 같이, 포도상구균 용액의 유속이 감소할수록 포도상구균의 사멸율이 증가하는 것을 알 수 있다. 이 결과는 포도상구균 용액의 유속이 느려질수록 PDA 소포에 결합된 리소스타핀과 포도상구균의 반응시간이 길어지므로 리소스타핀이 포도상구균을 분해하는 시간이 증가하기 때문이다.

[0057] 상기 실시예 1에 따른 바이오센서의 PDA 소포에 결합된 리소스타핀 효소에 포도상구균 용액을 가한 경우 및 리소스타핀 효소용액에 포도상구균 용액을 가한 경우에 대해 병원균의 사멸율을 비교하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0058] 도 7에 나타난 바와 같이, 마이크로채널에 있는 PDA 소포에 결합된 리소스타핀 효소에 포도상구균 용액을 가한 경우가 리소스타핀 효소용액에 포도상구균 용액을 가한 경우에 비해 더 높은 포도상구균의 사멸율을 나타내었다.

[0059] **실험예 4. 마이크로채널에 형성된 구조물에 따른 병원균의 검출 및 사멸 측정**

[0060] 상기 실시예 1에 따른 바이오센서의 마이크로채널에 형성된 구조물의 갯수에 따른 포도상구균의 사멸율을 약 600 nm 파장의 흡광도를 이용하여 측정하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0061] 도 8의 (a)에 나타난 바와 같이, 마이크로채널에 구조물이 없는 경우에 비해 구조물이 존재하는 경우, 더 높은 포도상구균의 사멸율을 나타내는 것을 알 수 있고, 구조물의 갯수가 증가함에 따라 포도상구균의 사멸율이 더욱 증가하는 것을 알 수 있다. 또한, 도 8의 (b)에 나타난 바와 같이, 마이크로채널에 형성된 구조물의 갯수가 증가함에 따라 PDA 소포가 더욱 적색으로 변이한 것을 알 수 있다. 이 결과는 마이크로채널에 형성된 구조물이 리소스타핀과 포도상구균의 반응시간을 증가시킴으로써 포도상구균의 검출 및 사멸 시간을 더욱 증가시켰기 때문이다.

[0062] 상기 실시예 1에 따른 바이오센서의 마이크로채널에 형성된 구조물의 각도 및 포도상구균(staphylococcus) 용액의 유속에 따른 포도상구균의 사멸율을 측정하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0063] 도 9에 나타난 바와 같이, 유체의 흐르는 방향에 대해 구조물의 각도가 30°, 45° 및 60°로 점점 더 기울어진 경우, 포도상구균의 사멸율이 더욱 증가하고, 포도상구균 용액의 유속이 감소할수록 사멸율이 더욱 증가하는 것을 알 수 있다. 이 결과는 마이크로채널에 형성된 구조물이 유체의 흐름을 더욱 방해할 경우 리소스타핀과 포도상구균의 반응시간을 더욱 증가시켜 포도상구균의 검출 및 사멸을 더욱 증가시켰기 때문이다.

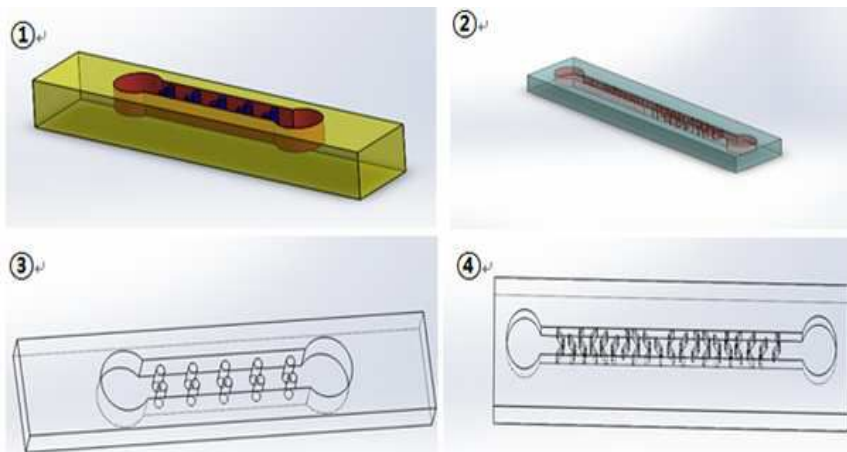
[0064] **실험예 5. 병원균-특이적 효소에 따른 병원균의 검출 및 사멸 측정**

[0065] 상기 실시예 1에 따른 바이오센서의 병원균-특이성을 확인하기 위해, 포도상구균(staphylococcus) 대신 대장균(E.coli) 용액을 가한 후 사멸율을 측정하였고, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

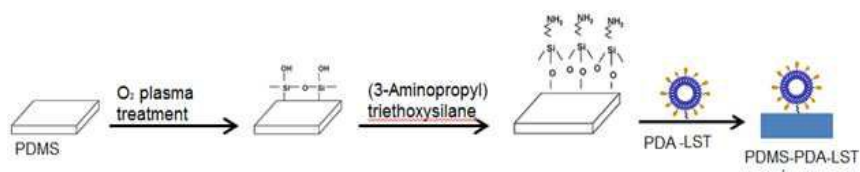
[0066] 도 10에 나타난 바와 같이, 실시예 1에 따른 바이오센서에 의해 대장균은 사멸되지 않는 것을 알 수 있다. 이 결과는 PDA 소포에 결합된 리소스타핀이 대장균과는 반응하지 않기 때문이다. 이 결과로부터 본 발명의 바이오센서가 병원체-특이적인 것을 알 수 있다.

도면

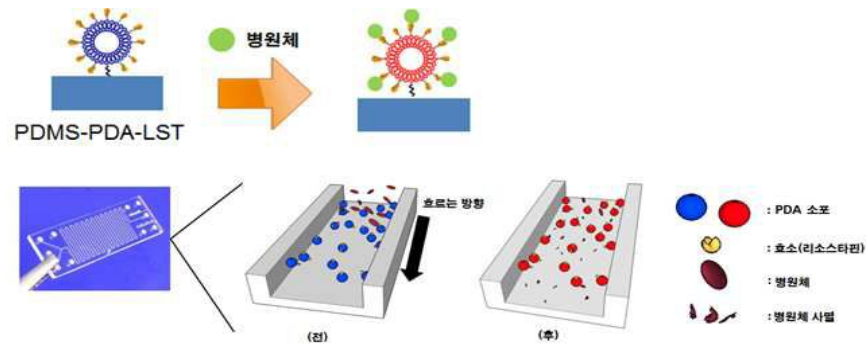
도면1



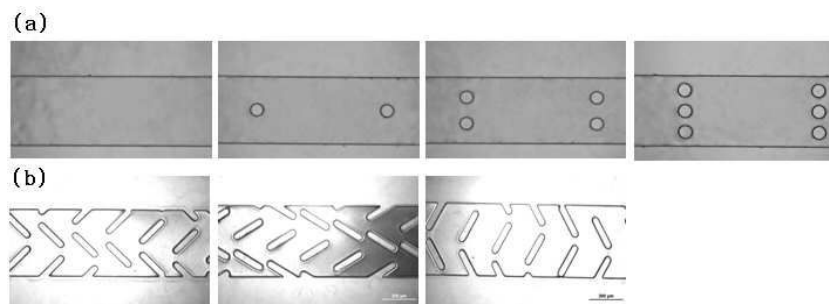
도면2



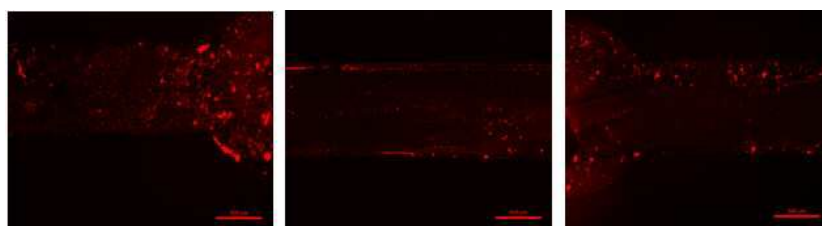
도면3



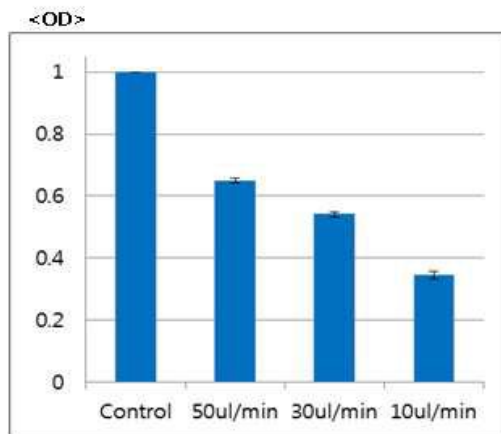
도면4



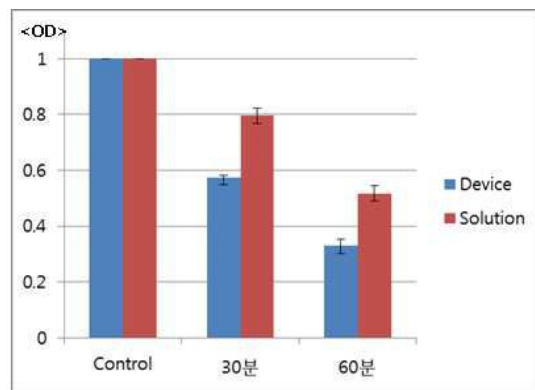
도면5



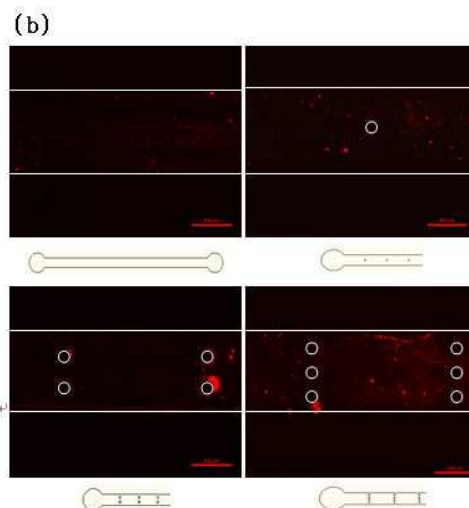
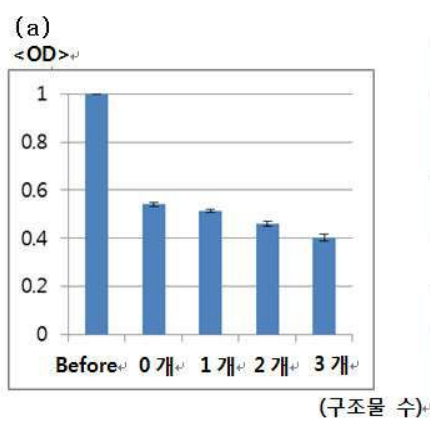
도면6



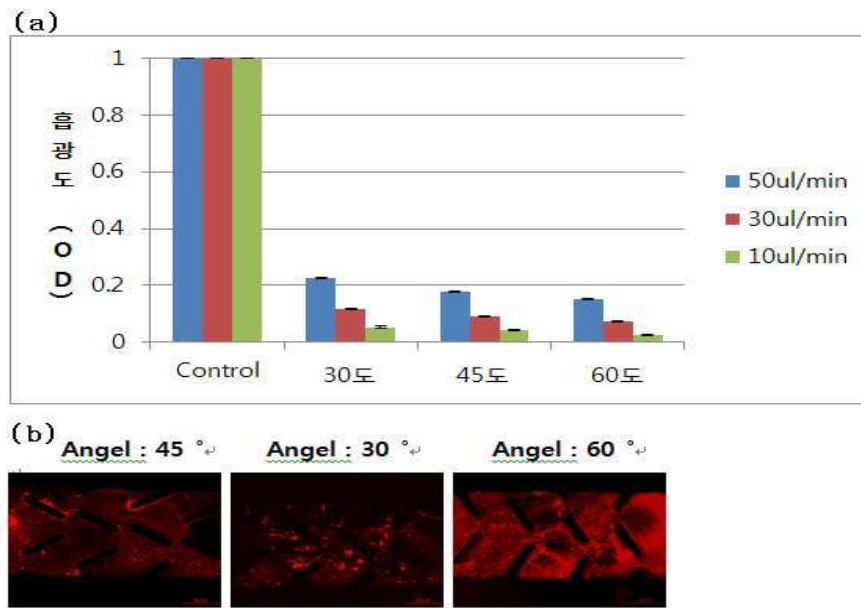
도면7



도면8



도면9



도면10

