



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0048716
(43) 공개일자 2019년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/49 (2006.01) B01F 11/02 (2006.01)
G01N 33/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/4905 (2013.01)
B01F 11/0283 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0143896
(22) 출원일자 2017년10월31일
심사청구일자 2017년10월31일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임채승
경기도 안양시 동안구 귀인로 294, 302동 804호
(평촌동, 꿈마을건영아파트)
남정훈
서울특별시 구로구 구로동로 148 (구로동)
(뚝섬에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 8 항

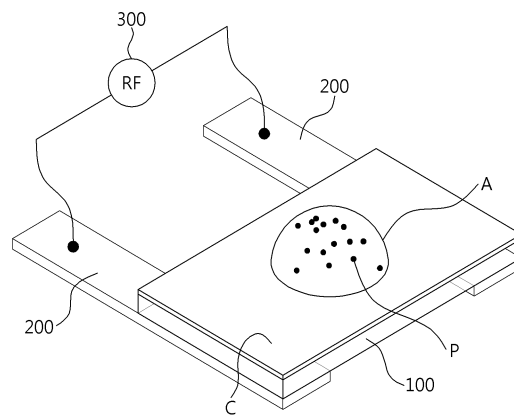
(54) 발명의 명칭 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법

(57) 요약

일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자는, 일면에 칼슘이 제거된 혈액 샘플 및 응고 시약이 로딩되는 압전기판; 및 상기 압전기판에 교류 전압을 인가하여 램-웨이브를 발생시키는 전압 인가부;를 포함하고, 상기 압전기판에 발생된 램-웨이브에 의해 상기 혈액 샘플의 내부 유동이 발생되고 상기 내부 유동에 의해 상기 혈액 샘플 및 상기 응고 시약이 혼합되어 상기 혈액 샘플이 응고될 수 있다.

대표도 - 도1

10



(52) CPC특허분류

G01N 33/86 (2013.01)

B01F 2215/0034 (2013.01)

B01F 2215/0037 (2013.01)

(72) 발명자

최현주

대전광역시 서구 문정로10번길 39, 104동 701호 (탄방동, 개나리아파트)

장웅식

서울특별시 구로구 구로동로 148, 진단검사의학과 (구로동, 고대구로병원)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1C1B1014991

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원

연구과제명 혈중 나노입자의 분리 및 농축을 위한 원천기술개발 및 그 응용

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

일면에 칼슘이 제거된 혈액 샘플 및 응고 시약이 로딩되는 압전기관; 및

상기 압전기관에 교류 전압을 인가하여 램-웨이브를 발생시키는 전압 인가부;

를 포함하고,

상기 압전기관에 발생된 램-웨이브에 의해 상기 혈액 샘플의 내부 유동이 발생되고 상기 내부 유동에 의해 상기 혈액 샘플 및 상기 응고 시약이 혼합되어 상기 혈액 샘플이 응고되는, 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 압전기관 상에 미세입자가 더 로딩되고,

상기 미세입자의 가시적인 거동 평가를 통해 상기 혈액 샘플의 응고 시간이 평가되는, 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 압전기관의 양단에 연결된 전극을 더 포함하고,

상기 전극은 알루미늄 포일 또는 전도성 액체로 마련되어 상기 전압 인가부가 연결되는, 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 압전기관 상에는 상기 칼슘이 제거된 혈액 샘플 및 상기 응고 시약이 로딩되는 적어도 하나의 웰(well)이 형성되는, 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 웰은 어레이 형태로 마련되고,

상기 웰 내에 상이한 혈액 샘플 또는 상이한 응고 시약이 로딩되어 다양한 응고 지표가 획득되는, 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자.

청구항 6

압전기관 상에 칼슘이 제거된 혈액 샘플을 로딩하는 단계;

상기 압전기판에 교류 전압을 인가하는 단계;

상기 혈액 샘플 내에 응고 시약을 추가하는 단계; 및

상기 혈액 샘플의 응고 시간을 측정하는 단계;

를 포함하고,

상기 압전기판에 교류 전압을 인가하는 단계에서,

상기 인가된 교류 전압에 의해 상기 압전기판에 램-웨이브가 발생되어, 상기 혈액 샘플에 내부 유동이 발생되고,

상기 혈액 샘플의 응고 시간을 측정하는 단계에서,

상기 혈액 샘플의 응고 시간은 상기 혈액 샘플의 내부 유동을 측정함으로써 측정되는, 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 압전기판 상에 혈액 샘플을 로딩하는 단계에서,

상기 혈액 샘플 내에 미세입자가 포함되어,

상기 혈액 샘플의 응고 시간을 측정하는 단계에서,

상기 혈액 샘플의 응고 시간은 상기 혈액 샘플 내 미세입자의 유동이 느려지다가 정지되는 시간을 측정함으로써 측정되는, 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 혈액 샘플의 응고 시간을 측정하는 단계에서,

상기 혈액 샘플의 응고 시간은 상기 혈액 샘플의 점성이 증가하다가 최대값에 도달되는 시간이 되는, 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 램-웨이브를 기반으로 하여 혈장과 응고 시약을 빠르게 혼합하여 혈액의 응고 시간을 효과적으로 평가할 수 있는 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈액 응고의 평가 검사는 출혈성 질환을 감별하기 위한 검사를 위해 사용된다.

[0003] 혈액 응고 기전은 다양한 관련 인자들이 연쇄적으로 반응하는 캐스케이드 과정으로 이루어지며, 이 과정에서 칼슘 이온이 중요한 역할을 한다. 따라서 혈액 응고를 평가하기 이전에 항응고제를 이용하여 혈액으로부터 칼슘 이온을 제거하여 응고 기전이 진행되지 않도록 한다. 이후 칼슘 이온을 특정 농도로 재주입하여 혈액 시료와 혼합하면 혈액 응고 기전이 진행되며, 완전히 응고되어 혈전이 생성되기까지의 시간을 '응고시간'으로 평가한다.

[0004] 이외에도 혈액응고를 측정하는 지표로서 프로트롬빈 시간(prothrombin time, PT)과 activated partial thromboplastin time(aPTT)이 널리 사용되고 있다.

[0005] 현재 병원 등에서 혈액응고를 평가하기 위한 기술로서 STA-R Evolution이라는 혈액응고 분석장비가 널리 사용되

고 있다.

- [0006] 최근 간단한 혈액응고 검사를 위해 INRatio 장비가 개발된 바 있다. 이는 휴대 가능한 크기의 소형기기로서, 항응고제를 복용하는 환자들의 혈액 응고 모니터링을 위한 간단한 검사를 위해 현장진단용(point-of-care) 또는 가정용으로 사용할 수 있는 장비이다. 일회용 측정 스트립을 이용하며, 혈액을 한 방울 떨어뜨린 이후 시약과 반응하여 응고 기전을 발생시키며 이때 발생한 혈전으로 인해 증가하는 임피던스를 측정하여 PT를 계산하는 방식이다. 일회용 스트립 사용으로 간편하고, 적은 양의 혈액을 사용하는 등의 장점이 있으나, 최근 실제와 다르게 잘못 측정되어 항응고제 복용량 결정에 오류를 발생시킨다는 보고가 발표된 바 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Amgad R. Rezk, James R. Friend and Leslie Y. Yeo, Lab on a Chip, 14, 1802-1805, 2014

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 일 실시예에 따른 목적은 램-웨이브를 이용하여 미세액적 내에 발생시키는 유동에 의해 혈장과 혈액 응고 시약을 짧은 시간 내에 완전히 혼합시킬 수 있고, 혈장 내에 미세입자를 부유시켜 램-웨이브에 의해 발생하는 내부 유동으로 미세입자를 유동시켜 혈액 응고 과정을 가시화할 수 있는 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 일 실시예에 따른 목적은 압전기관에 별도의 비싸고 복잡한 공정과정 없이 알루미늄 호일의 접착 또는 전도성 유체를 이용하여 전극 그림 등의 방식으로 제작이 가능하여 기존에 사용했던 미세전극 패터닝 방식에 비해 제작 공정이 단순하고 제작 비용이 저렴할 수 있는 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 일 실시예에 따른 목적은 미세액적을 기반으로 혈액 응고를 측정하기 때문에 적은 양의 시료로서 혈액 응고를 평가할 수 있으며, 압전기관 상에 어레이 형태의 웰이 형성되어, 응고 관련 시약을 사용하여 다양한 응고 지표를 측정할 수 있고, 고수율의 병렬 처리를 이룰 수 있어 많은 검체에 대한 분석시간을 단축시킬 수 있는 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 일 실시예에 따른 목적은 혈액응고에 관여하는 주요 단백질인 피브리노겐의 농도의 측정은 물론, PT와 aPTT 외에도 다양한 혈액 응고인자의 문제 여부를 확인할 수 있는 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 일 실시예에 따른 목적은 숙련자 외 일반인도 사용 가능하여 병원 외의 기관 및 가정에서도 원인을 알 수 없는 출혈 및 혈액응고 문제를 보이는 환자의 응고 기전 전체 과정을 평가할 수 있는 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자는, 일면에 칼슘이 제거된 혈액 샘플 및 응고 시약이 로딩되는 압전기관; 및 상기 압전기관에 교류 전압을 인가하여 램-웨이브를 발생시키는 전압 인가부;를 포함하고, 상기 압전기관에 발생된 램-웨이브에 의해 상기 혈액 샘플의 내부 유동이 발생되고 상기 내부 유동에 의해 상기 혈액 샘플 및 상기 응고 시약이 혼합되어 상기 혈액 샘플이 응고될 수 있다.
- [0014] 일 측에 의하면, 상기 압전기관 상에 미세입자가 더 로딩되고, 상기 미세입자의 가시적인 거동 평가를 통해 상기 혈액 샘플의 응고 시간이 평가될 수 있다.
- [0015] 일 측에 의하면, 상기 압전기관의 양단에 연결된 전극을 더 포함하고, 상기 전극은 알루미늄 포일 또는 전도성 액체로 마련되어 상기 전압 인가부가 연결될 수 있다.
- [0016] 일 측에 의하면, 상기 압전기관 상에는 상기 칼슘이 제거된 혈액 샘플 및 상기 응고 시약이 로딩되는 적어도 하나의 웰(well)이 형성될 수 있다.

- [0017] 일 측에 의하면, 상기 웰은 어레이 형태로 마련되고, 상기 웰 내에 상이한 혈액 샘플 또는 상이한 응고 시약이 로딩되어 다양한 응고 지표가 획득될 수 있다.
- [0018] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 방법은, 압전기관 상에 칼슘이 제거된 혈액 샘플을 로딩하는 단계; 상기 압전기관에 교류 전압을 인가하는 단계; 상기 혈액 샘플 내에 응고 시약을 추가하는 단계; 및 상기 혈액 샘플의 응고 시간을 측정하는 단계;를 포함하고, 상기 압전기관에 교류 전압을 인가하는 단계에서, 상기 인가된 교류 전압에 의해 상기 압전기관에 램-웨이브가 발생되어, 상기 혈액 샘플에 내부 유동이 발생되고, 상기 혈액 샘플의 응고 시간을 측정하는 단계에서, 상기 혈액 샘플의 응고 시간은 상기 혈액 샘플의 내부 유동을 측정함으로써 측정될 수 있다.
- [0019] 일 측에 의하면, 상기 압전기관 상에 혈액 샘플을 로딩하는 단계에서, 상기 혈액 샘플 내에 미세입자가 포함되어, 상기 혈액 샘플의 응고 시간을 측정하는 단계에서, 상기 혈액 샘플의 응고 시간은 상기 혈액 샘플 내 미세입자의 유동이 느려지다가 정지되는 시간을 측정함으로써 측정될 수 있다.
- [0020] 일 측에 의하면, 상기 혈액 샘플의 응고 시간을 측정하는 단계에서, 상기 혈액 샘플의 응고 시간은 상기 혈액 샘플의 점성이 증가하다가 최대값에 도달되는 시간이 될 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법에 의하면, 램-웨이브를 이용하여 미세액적 내에 발생시키는 유동에 의해 혈장과 혈액 응고 시약을 짧은 시간 내에 완전히 혼합시킬 수 있고, 혈장 내에 미세입자를 부유시켜 램-웨이브에 의해 발생하는 내부 유동으로 미세입자를 유동시켜 혈액 응고 과정을 가시화할 수 있다.
- [0022] 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법에 의하면, 압전기관에 별도의 비싸고 복잡한 공정과정 없이 알루미늄 호일의 접촉 또는 전도성 유체를 이용하여 전극 그림 등의 방식으로 제작이 가능하여 기존에 사용했던 미세전극 패터닝 방식에 비해 제작 공정이 단순하고 제작 비용이 저렴할 수 있다.
- [0023] 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법에 의하면, 미세액적을 기반으로 혈액 응고를 측정하기 때문에 적은 양의 시료로서 혈액 응고를 평가할 수 있으며, 압전기관 상에 어레이 형태의 웰이 형성되어, 응고 관련 시약을 사용하여 다양한 응고 지표를 측정할 수 있고, 고수율의 병렬 처리를 이룰 수 있어 많은 검체에 대한 분석시간을 단축시킬 수 있다.
- [0024] 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법에 의하면, 혈액응고에 관여하는 주요 단백질인 피브리노겐의 농도의 측정은 물론, PT와 aPTT 외에도 다양한 혈액 응고인자의 문제 여부를 확인할 수 있다.
- [0025] 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법에 의하면, 숙련자 외 일반인도 사용 가능하여 병원 외의 기관 및 가정에서도 원인을 알 수 없는 출혈 및 혈액응고 문제를 보이는 환자의 응고 기전 전체 과정을 평가할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자를 도시한다.
- 도 2는 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 방법을 도시한다.
- 도 3(a) 내지 (c)는 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 과정을 도시한다.
- 도 4는 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자의 예시를 도시한다.
- 도 5는 작동 주파수를 확인할 수 있는 그래프이다.
- 도 6(a) 내지 (c)는 인가 전압에 따른 내부 유동 모습을 나타낸다.
- 도 7(a) 및 (b)는 인가 전압에 따른 내부 유동 속도 및 온도의 변화를 나타내는 그래프이다.
- 도 8은 미세액적 내의 온도를 측정하는 모습을 나타낸다.
- 도 9(a) 내지 (c)는 칼슘 추가로 인한 혈액 응고 측정 결과를 나타낸다.
- 도 10(a) 및 (b)는 칼슘 이온의 농도별 혈액의 응고 기전을 나타낸다.

도 11은 칼슘 이온의 농도에 따른 혈액의 응고 시간을 나타내는 그래프이다.

도 12(a) 내지 (c)는 PT 시약과 혈장의 혼합 과정을 나타낸다.

도 13(a) 및 (b)는 PT 측정 및 상용화 장비의 비교를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하, 실시예들을 예시적인 도면을 통해 상세하게 설명한다. 각 도면의 구성요소들에 참조부호를 부가함에 있어서, 동일한 구성요소들에 대해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 부호를 가지도록 하고 있음에 유의해야 한다. 또한, 실시예를 설명함에 있어, 관련된 공지 구성 또는 기능에 대한 구체적인 설명이 실시예에 대한 이해를 방해한다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략한다.
- [0028] 또한, 실시예의 구성 요소를 설명하는 데 있어서, 제1, 제2, A, B, (a), (b) 등의 용어를 사용할 수 있다. 이러한 용어는 그 구성 요소를 다른 구성 요소와 구별하기 위한 것일 뿐, 그 용어에 의해 해당 구성 요소의 본질이나 차례 또는 순서 등이 한정되지 않는다. 어떤 구성 요소가 다른 구성요소에 "연결", "결합" 또는 "접속"된다고 기재된 경우, 그 구성 요소는 그 다른 구성요소에 직접적으로 연결되거나 접속될 수 있지만, 각 구성 요소 사이에 또 다른 구성 요소가 "연결", "결합" 또는 "접속"될 수도 있다고 이해되어야 할 것이다.
- [0029] 어느 하나의 실시예에 포함된 구성요소와, 공통적인 기능을 포함하는 구성요소는, 다른 실시예에서 동일한 명칭을 사용하여 설명하기로 한다. 반대되는 기재가 없는 이상, 어느 하나의 실시예에 기재한 설명은 다른 실시예에도 적용될 수 있으며, 중복되는 범위에서 구체적인 설명은 생략하기로 한다.
- [0030] 도 1은 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자를 도시하고, 도 2는 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 방법을 도시하고, 도 3(a) 내지 (c)는 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 과정을 도시한다.
- [0031] 도 1을 참조하여, 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자(10)는 압전기관(100), 전극(200) 및 전극전압 인가부(300)를 포함할 수 있다.
- [0032] 상기 압전기관(100)은 전기에너지를 가했을 때 진동과 같은 기계적 에너지로 변환할 수 있도록 압전 물질로 마련된 기관으로서, 상기 압전 물질은 예를 들어 리튬나이오베이트(LiNbO₃) 또는 쿼츠(Quartz)로 될 수 있다.
- [0033] 구체적으로, 전기적 에너지를 가하면 압전기관(100) 자체의 기계적 수축 또는 팽창의 발생으로 기관에 파, 예를 들어 bulk 탄성과의 일종인 램-웨이브(Lamb-wave)가 발생하게 될 수 있다.
- [0034] 이때, 압전기관(100)의 일면 또는 표면에는 칼슘이 제거된 혈장인 혈액 샘플(또는 미세액적; A) 또는 혈액 샘플(A)을 응고시키기 위한 특정 농도의 칼슘 이온 용액(예를 들어, CaCl₂), PT(prothrombin time) 측정 시약 등과 같은 응고 시약이 로딩될 수 있다.
- [0035] 상기 압전기관(100)의 일면 또는 표면에는 파의 발생 시 혈액 샘플(A)의 위치를 고정시킬 수 있도록 소수성 물질로 코팅될 수 있다. 이러한 소수성 코팅(C)에 의해 압전기관(100)의 표면에 칼슘이 제거된 혈액 샘플(A) 또는 응고 시약이 로딩되는 적어도 하나의 웰(well; W)이 형성될 수 있다.
- [0036] 이때, 소수성 물질의 코팅으로 표면에너지를 제어하여 혈액 샘플(A)과 압전기관(100) 사이의 접촉각을 조절함으로써 혈액 샘플(A)에서 램-웨이브에 의한 영향을 최대로 받을 수 있도록 최적화할 수 있다.
- [0037] 또한, 웰(W)이 어레이 형태로 마련되는 경우, 웰(W) 내에 서로 상이한 혈액 샘플(A) 또는 상이한 응고 시약이 로딩됨으로써 다양한 응고 지표가 획득될 수 있다. 특히, 램-웨이브를 이용할 경우, 압전기관(100) 상의 모든 웰(W) 내에서 혈액 샘플(A)의 내부 유동 속도가 동일하다는 점에서 복수 개의 혈액 샘플(A)을 동시에 다중 처리하는 데 바람직할 수 있다.
- [0038] 한편, 압전기관(100)의 표면에 형성된 웰(W)에는 칼슘이 제거된 혈액 샘플(A) 및 혈액 샘플(A)을 응고시키기 위한 응고 시약뿐만 아니라 미세입자(P)가 더 로딩될 수 있다.
- [0039] 상기 미세입자(P)는 혈액 샘플(A)의 응고과정을 가시화하기 위한 것으로서, 혈액 샘플(A) 내에 부유된 미세입자(P)의 거동을 확인함으로써 혈액 샘플(A)의 응고 기전을 확인할 수 있다. 따라서 미세입자(P)는 혈액 샘플(A) 내에 부유되어 혈액 샘플(A)의 응고과정을 가시화할 수 있다면 어느 것이든지 가능하다.
- [0040] 전술된 압전기관(100)에는 전극(200)이 연결 또는 형성될 수 있다.

- [0041] 예를 들어 전극(200)은 알루미늄 포일 또는 전도성 유체로 마련될 수 있다.
- [0042] 구체적으로, 압전기관(100)의 상단 또는 하단에 알루미늄 포일을 접촉시킴으로써 압전기관(100)에 전극(200)이 연결될 수 있다. 또는 압전기관(100)에 전도성 유체로 전극을 그림으로써 압전기관(100)에 전극(200)이 형성될 수 있다.
- [0043] 이와 같이 압전기관(100)에 전극을 형성하기 위해 반도체 식각 공정을 통한 미세전극 패터닝 공정이 필요하지 않으므로, 제작 공정이 단순하고 제작 비용이 저렴하게 될 수 있다.
- [0044] 또한, 전극(200)에는 전압 인가부(300)가 연결될 수 있다.
- [0045] 상기 전압 인가부(300)는 압전기관(100)에 교류 전압을 인가하여 압전기관(100) 자체에 램-웨이브를 발생시킬 수 있다.
- [0046] 이때, 전압 인가부(300)는 압전기관(100)의 두께에 상응하는 작동 주파수를 갖는 교류 전압을 인가하고, 전압 인가부(300)의 제어에 의해 교류 전압의 작동 주파수가 제어되어, 결론적으로 압전기관(100)에 발생하는 램-웨이브가 제어될 수 있다.
- [0047] 전술된 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자(10)를 이용하여 다음과 같이 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 방법이 수행될 수 있다.
- [0048] 도 2를 참조하여, 우선 압전기관 상에 칼슘이 제거된 혈액 샘플을 로딩한다(S10).
- [0049] 도 3(a)를 참조하여, 압전기관(100)에 교류 전압이 인가되지 않은 상태에서, 압전기관(100)의 표면에 혈액 응고 기전에 영향을 주는 칼슘 이온이 제거된 혈액 샘플(A)을 로딩한다.
- [0050] 압전기관(100)의 표면에는 소수성 코팅(C)에 의해 웰(W)이 형성되어 램-웨이브 발생 시 혈액 샘플(A)의 위치를 고정시킬 수 있다.
- [0051] 또한, 혈액 샘플(A)에 혈액 샘플(A)의 응고 과정을 가시화하기 위한 미세입자(P)가 추가될 수 있다. 이에 의해 혈액 샘플(A) 내에 미세입자가 부유될 수 있으며, 압전기관(100)이 투명한 재질로 마련됨으로써 혈액 샘플 내에 부유한 미세입자(P)의 거동을 현미경을 통해 확인할 수 있다.
- [0052] 이어서, 압전기관에 교류 전압을 인가하고(S20), 혈액 샘플 내에 응고 시약을 추가한다(S30).
- [0053] 도 3(b)를 참조하여, 작동주파수를 갖는 교류 전압을 가하여 압전기관(100)의 진동에 의해 램-웨이브가 발생될 수 있으며, 이로 인해 혈액 샘플(A) 내에 부유된 미세입자(P)의 내부 유동을 관찰할 수 있게 된다.
- [0054] 이때, 혈액 샘플 내에 추가된 응고 시약은 특정 농도의 칼슘이온 용액, PT(prothrombin time) 측정 시약 등이 사용될 수 있다.
- [0055] 그런 다음, 혈액 샘플의 응고 시간을 측정한다(S40).
- [0056] 도 3(c)를 참조하여, 램-웨이브 발생에 의한 내부 유동으로 혈액 샘플(A) 및 응고 시약이 혼합될 수 있다. 점차 응고 기전이 진행되면서 혈액 샘플(A)의 점도가 증가되며, 램-웨이브에 의해 내부 유동이 발생할 수 없는 점도까지 증가하게 되면 혈액 샘플(A) 내에 부유된 미세입자(P)의 유동이 정지하게 된다.
- [0057] 이때, 응고 시약 추가 이후 미세입자(P)의 거동이 멈추는 데까지 걸리는 시간을 '응고 시간'이라고 정의할 수 있다.
- [0058] 이와 같이 혈액 샘플(A)의 내부 유동, 특히 혈액 샘플(A) 내에 부유된 미세입자(P)의 거동(예를 들어, 미세입자(P)의 이동속도)을 측정함으로써 혈액 샘플의 응고 시간을 측정할 수 있고, 압전기관(100)에 어레이 형태의 웰(W)이 형성된 경우 혈액 샘플(A) 또는 응고 시약의 차이에 따라 혈액 응고 기전을 평가할 수 있다.
- [0059] 또한, 응고 기전의 진행 중에 미세입자(P)의 유동을 가시화할 수 있기 때문에, 미세입자(P)의 유동속도를 연속적으로 평가하여 응고 과정 역시 분석이 가능하다.
- [0060] 이때, 혈액 응고의 정확한 평가를 위하여 이용하는 혈액 샘플(A)의 부피, 응고 과정 가시화를 위한 미세입자(P)의 크기 및 농도, 응고 시약의 농도, 램-웨이브를 발생시키는 전압 인가부(300)의 작동주파수와 인가전압 등이 최적화될 수 있다.
- [0061] 한편, 혈액 샘플(A)에 혈액 샘플(A)의 응고 과정을 가시화하기 위한 미세입자(P)가 추가되지 않은 경우, 혈액

샘플(A)의 내부 유동, 특히 혈액 샘플(A)의 점성을 측정함으로써 혈액 샘플(A)의 응고 시간을 측정할 수 있다. 구체적으로, 혈액 샘플(A)의 점성이 증가하다가 최대값에 도달되는 시간을 측정함으로써 혈액 샘플(A)의 응고 시간을 측정할 수 있다.

[0062] 또한, 혈액 샘플(A)의 점성을 측정하다가 혈액 샘플(A) 내에 부유된 미세입자(P)의 거동(예를 들어, 미세입자(P)의 이동속도)를 측정하거나, 혈액 샘플(A) 내에 부유된 미세입자(P)의 거동(예를 들어, 미세입자(P)의 이동속도)를 측정하다가 혈액 샘플(A)의 점성을 측정함으로써 혈액 샘플(A)의 응고 시간을 측정할 수 있음은 당연하다.

[0063] 예를 들어, 혈액 샘플(A)에 응고 시약을 추가한 이후, 혈액 샘플(A)의 점성을 측정함으로써 점성이 증가되는 양상을 통해 혈액 샘플(A)의 응고가 진행 중이라는 것을 감지한 후에, 혈액 샘플(A) 내에 부유된 미세입자(P)의 거동(예를 들어, 미세입자(P)의 이동속도)를 측정하여 미세입자(P)가 멈추는 시간을 측정하여 혈액 샘플(A)의 응고 시간을 측정할 수 있다.

[0064] 또는, 혈액 샘플(A)에 응고 시약을 추가한 이후, 혈액 샘플(A) 내에 부유된 미세입자(P)의 거동(예를 들어, 미세입자(P)의 이동속도)를 측정함으로써 거동이 느려지는 양상을 통해 혈액 샘플(A)의 응고가 진행 중이라는 것을 감지한 후에, 혈액 샘플(A)의 점성을 측정하여 점성이 최대값이 되는 시간을 측정하여 혈액 샘플(A)의 응고 시간을 측정할 수 있다.

[0065] 이상 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법에 대하여 설명되었으며, 이하에서는 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자 및 방법과 관련된 다양한 실험 결과에 대하여 설명된다.

[0066] 도 4는 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자의 예시를 도시하고, 도 5는 작동 주파수를 확인할 수 있는 그래프이고, 도 6(a) 내지 (c)는 인가 전압에 따른 내부 유동 모습을 나타내고, 도 7(a) 및 (b)는 인가 전압에 따른 내부 유동 속도 및 온도의 변화를 나타내는 그래프이고, 도 8은 미세액적 내의 온도를 측정하는 모습을 나타내고, 도 9(a) 내지 (c)는 칼슘 추가로 인한 혈액 응고 측정 결과를 나타내고, 도 10(a) 및 (b)는 칼슘 이온의 농도별 혈액의 응고 과정을 나타내고, 도 11은 칼슘 이온의 농도에 따른 혈액의 응고 시간을 나타내는 그래프이고, 도 12(a) 내지 (c)는 PT 시약과 혈장의 혼합 과정을 나타내고, 도 13(a) 및 (b)는 PT 측정 및 상용화 장비의 비교를 나타내는 그래프이다.

[0067] 특히, 도 4를 참조하여, 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자의 예시는 다음과 같이 될 수 있다. 혈액 샘플의 미세액적을 위치시키기 위해 압전기관 상에 소수성 코팅 대신 단면 테이프 기반의 웰(well)을 제작한 후에 압전기관에 붙여 사용하였다. 그리고 압전기관에 램-웨이브를 발생시키기 위하여 압전기관에 전도성 액체를 이용하여 전극을 그려 사용하였다.

[0068] 도 5를 참조하여, 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자의 작동 주파수를 확인한 결과, $f = c/\lambda$ (압전기관의 두께 $T = \lambda/2 = 500\mu\text{m}$)에 의하여 100-200MHz 범위 중 가장 반응성이 큰 199.38MHz를 작동주파수를 사용하기로 결정하였다.

[0069] 도 6(a) 내지 (c)를 참조하여, DI water 미세액적 내에 부유된 $5\mu\text{m}$ 입자의 내부 유동 속도를 확인하였으며, 도 7을 더 참조하여, 전압이 높을수록 내부 유동 속도가 빨라지는 것을 알 수 있다. 또한, 인가전압 $\leq 15\text{V}$ 조건에서는 램-웨이브에 의한 입자의 움직임은 있으나 크게 빨라지지 않고, 이후부터 빨라지는 경향을 보였다.

[0070] 도 7 및 8을 참조하여, 램-웨이브에 의한 미세액적 내의 온도 변화를 열화상 카메라를 이용하여 측정한 결과, 전압이 높을수록 미세액적 내의 온도가 높아지지만 25V 조건까지 40℃를 넘지 않는 것을 확인할 수 있으며, 이후 -37℃가 되는 23V 조건을 실험에 활용하였다.

[0071] 도 9(a) 내지 (c)를 참조하여, 칼슘 추가로 인한 혈액 응고 측정 결과를 확인할 수 있다.

[0072] $3\mu\text{L}$ 의 혈장과 $3\mu\text{L}$ 의 PBS 용액을 혼합한 경우(Negative case), 램-웨이브 발생에 따라서 발생하는 미세액적 내의 내부 유동에 의해서 미세액적 내에 부유된 $5\mu\text{m}$ 형광입자의 내부 유동 속도를 측정하였다. 이 경우, 혈액 응고가 발생하지 않으므로 램-웨이브 발생 70초 동안 입자의 유동이 지속되는 것을 확인하였다.

[0073] 또한, $3\mu\text{L}$ 의 혈장과 응고 시약으로서 $3\mu\text{L}$ 의 칼슘이온 용액(CaCl_2 용액)을 혼합한 경우(positive case), 램-웨이브에 의한 $5\mu\text{m}$ 형광입자의 유동을 통해서 혈액 응고 과정의 진행여부를 평가할 수 있다. 이 경우, 램-웨이브의 작동 이후 50초 경과 후부터 내부 유동 속도가 감소하기 시작하며, 70초 경과 후에는 미세입자의 유동이 정지함을 확인하였다.

- [0074] 도 10(a) 및 (b)를 참조하여, 칼슘 이온의 농도별 혈액의 응고 과정을 확인할 수 있다.
- [0075] 도 10(a)에 도시된 바와 같이, 3 μ l의 혈장과 응고 시약으로서 3 μ l의 칼슘이온 용액(CaCl₂ 용액)을 혼합한 경우(Positive control), 180초 정도에서 내부 유동이 멈춤을 확인하였으며, CaCl₂ 용액의 추가로 인해서 혈액 샘플이 응고되었음을 확인하였다.
- [0076] 반면, 도 10(b)에 도시된 바와 같이, 3 μ l의 혈장과 3 μ l의 PBS 용액을 혼합한 경우(Negative control), 6분간 압전기관에 램-웨이브를 발생시켰음에도, 내부 유동이 멈추지 않는 것을 확인하였다. 즉, 3 μ l의 혈장과 칼슘 이온이 없는 용액을 혼합시킬 경우 혈액 응고가 진행되지 않는다는 것을 알 수 있다.
- [0077] 도 11을 참조하여, CaCl₂ 용액의 농도별 응고 시간을 평가한 결과, Positive control에서는 CaCl₂ 용액을 칼슘 제거 혈장과 1:1 비율로 섞은 후, 램-웨이브를 통해 혼합한 후 혈장 내에 부유된 미세입자의 유동이 혈액 응고에 의해 정지하는 시간을 측정한 것으로, 0-7.5mM 사이 농도에서 급격하게 감소하다가, 이후 25mM 농도까지 크게 변화가 없다는 것을 확인하였다. 또한, 12.5mM $\leq$ Ca²⁺ conc. $\leq$ 25mM 조건에서 응고 시간이 약간 증가하는 것으로 보이지만 거의 표준편차 내의 값을 가진다.
- [0078] 반면, 0mM(Negative control)에서는 혈액 응고가 발생하지 않아 미세입자의 유동이 정지하지 않으며, -400초 정도 동안 가해지는 램-웨이브의 영향으로 미세액적이 건조되는 것을 볼 수 있었다.
- [0079] 도 12(a) 내지 (c)를 참조하여, PT(Prothrombin time) 시약(3 μ l)에 50nm 형광 나노입자가 부유된 칼슘 제거 혈장(1.5 μ l)을 추가하여 압전기관에 로딩한 후에, 램-웨이브 기반 혼합을 확인한 결과, 2초 이내에 모두 균일하게 혼합되는 것을 확인하였다.
- [0080] 도 13(a) 및 (b)는 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자로 측정한 프로트롬빈 시간과 상용화되어 널리 사용되고 있는 STA-R 평가 장비로 측정한 프로트롬빈 시간의 경향을 확인하여, 소자의 유효성을 평가한 결과이다.
- [0081] 특히, 도 13(a)는 혈액 응고 이전에 필수적으로 필요한 혈장 단백질인 피브리노겐의 농도에 따른 프로트롬빈 시간을 측정한 결과이다. 칼슘 제거 혈장의 피브리노겐의 농도를 STA-R 장비를 이용하여 측정한 이후, 혈장에서 피브리노겐이 제거된 혈청을 이용하여 2, 4, 6, 8, 10배 희석하여 이용하였으며, negative control 케이스로서 피브리노겐이 포함되어 있지 않은 혈청을 이용하였다. 도 13(a)에서는 램-웨이브 기반의 혈액 응고 평가 소자와 상용화 장비로 측정한 결과를 농도에 따라 확인할 수 있으며, 절대적인 값은 차이를 보이지만 피브리노겐 농도에 따른 경향은 거의 일치하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0082] 또한, 두 측정 방법에 따른 결과의 상관성을 확인하기 위하여, 도 13(b)와 같이 분석하였다. 이에 따르면 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자의 측정 결과와 상용화 장비의 측정 결과는 일차 선형 비례관계를 가지며, R-squared 값이 0.9432로서 높은 상관성을 갖는 것으로 확인되었다.
- [0083] 이상과 같이 본 발명의 실시예에서는 구체적인 구성 요소 등과 같은 특정 사항들과 한정된 실시예 및 도면에 의해 설명되었으나 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상적인 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 따라서, 본 발명의 사상은 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니 되며, 후술하는 청구범위뿐 아니라 이 청구범위와 균등하거나 등가적 변형이 있는 모든 것들은 본 발명 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

부호의 설명

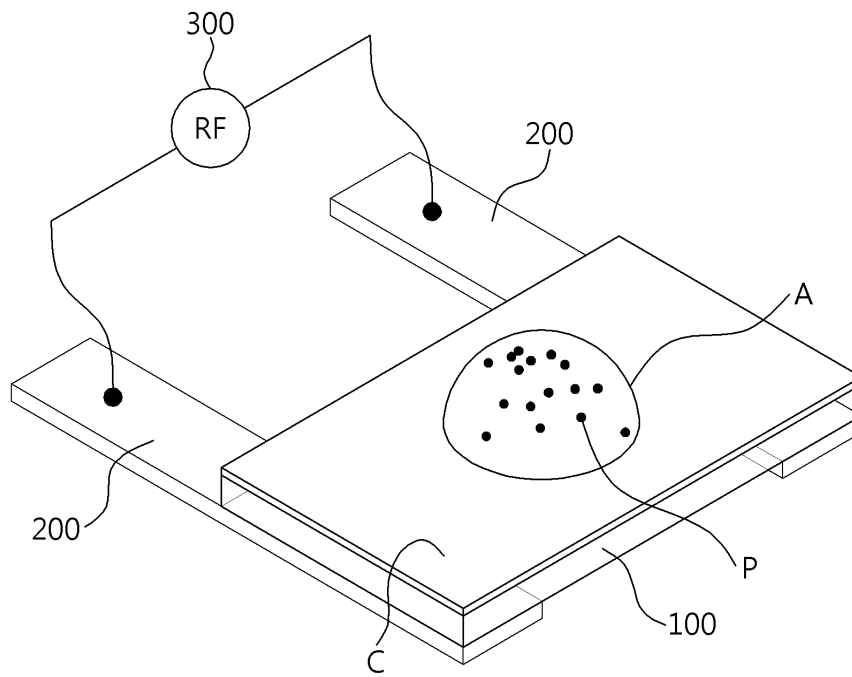
- [0084] 10: 램-웨이브 기반 혈액 응고 평가 소자
- 100: 압전기관
- 200: 전극
- 300: 전압 인가부
- A: 혈액 샘플
- C: 소수성 코팅
- P: 미세입자

W: 웰

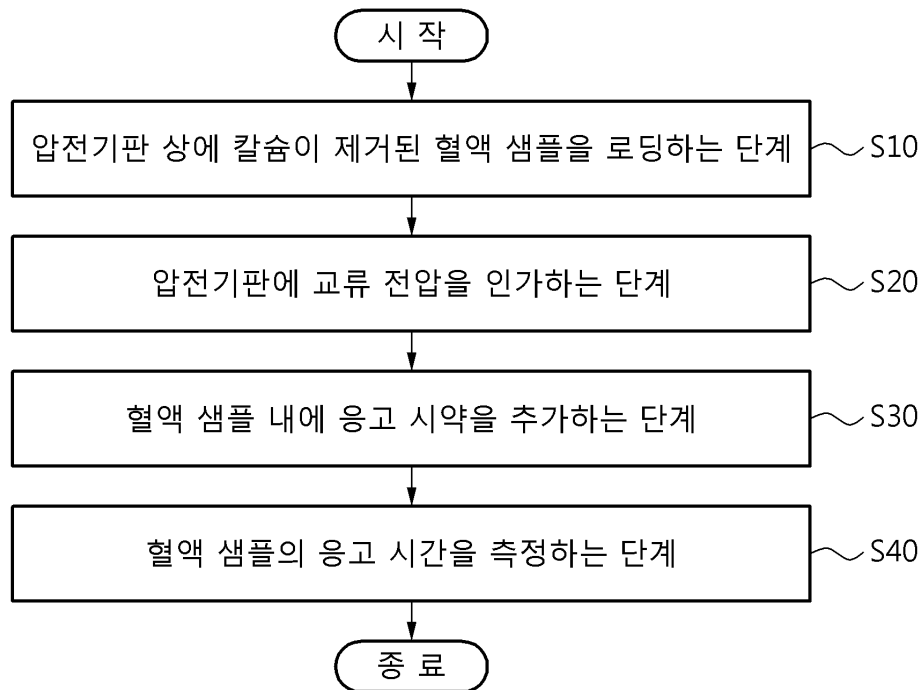
도면

도면1

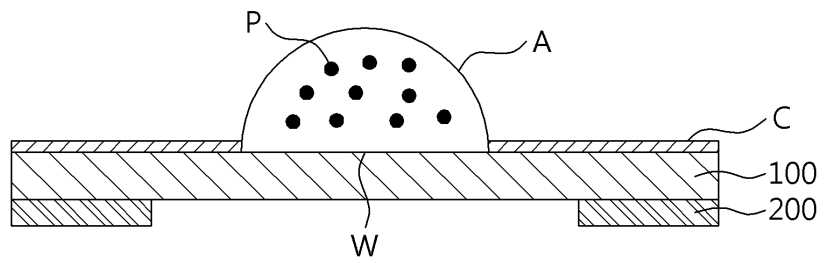
10



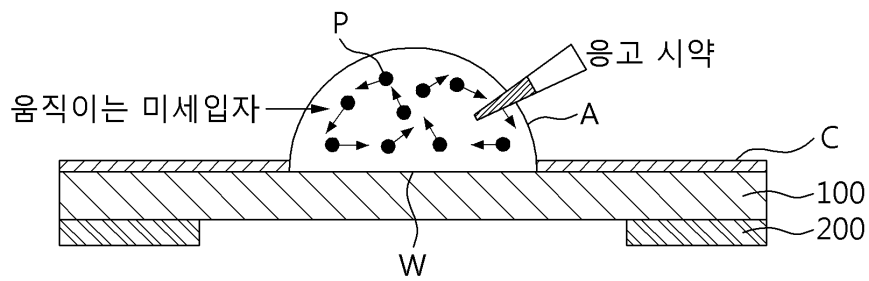
도면2



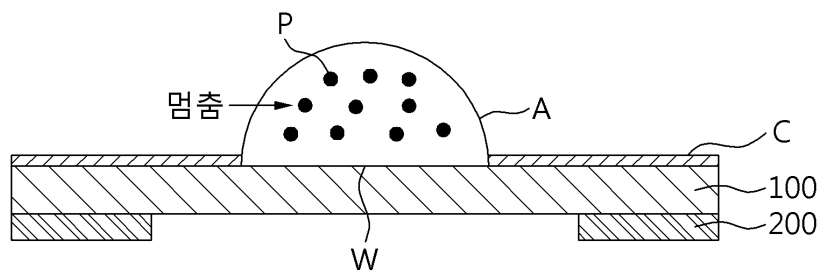
도면3



(a)

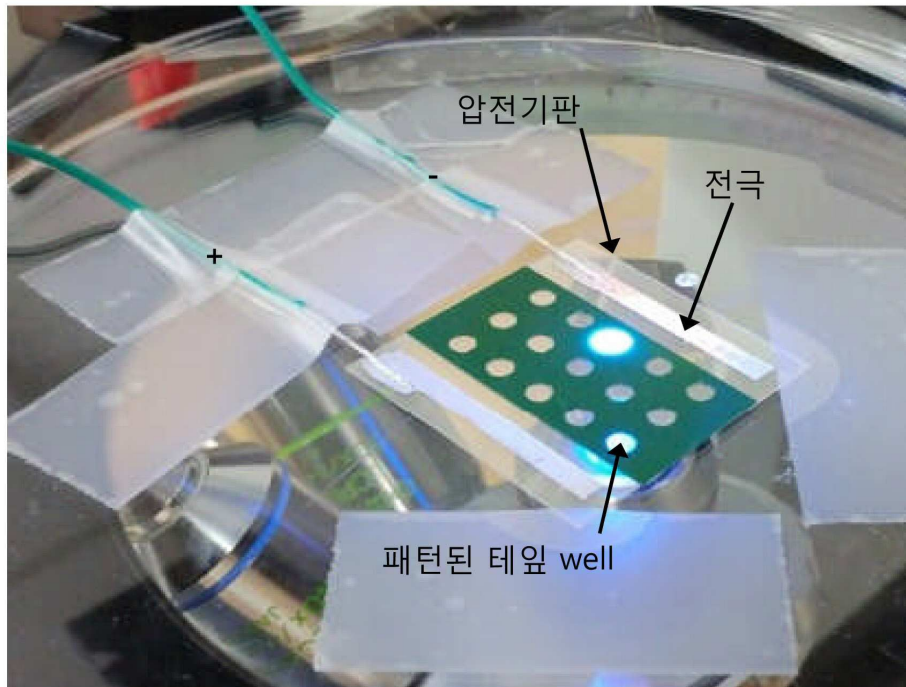


(b)

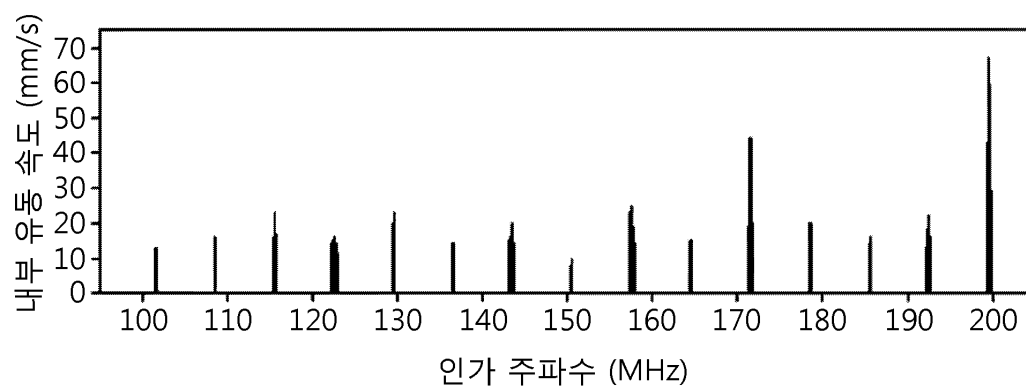


(c)

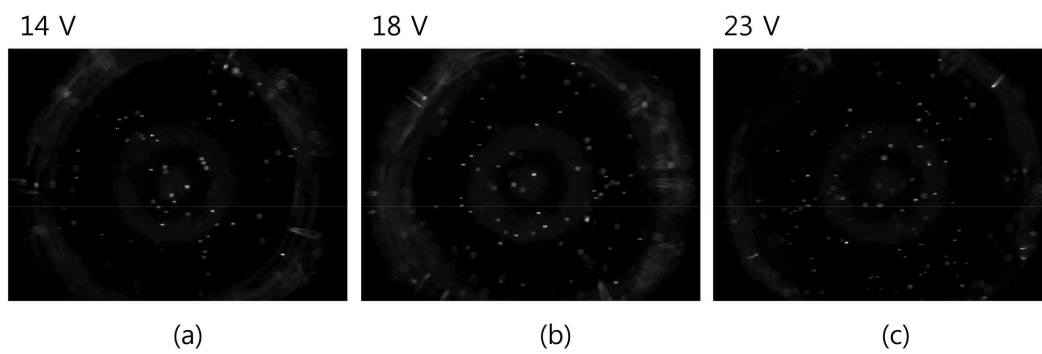
도면4



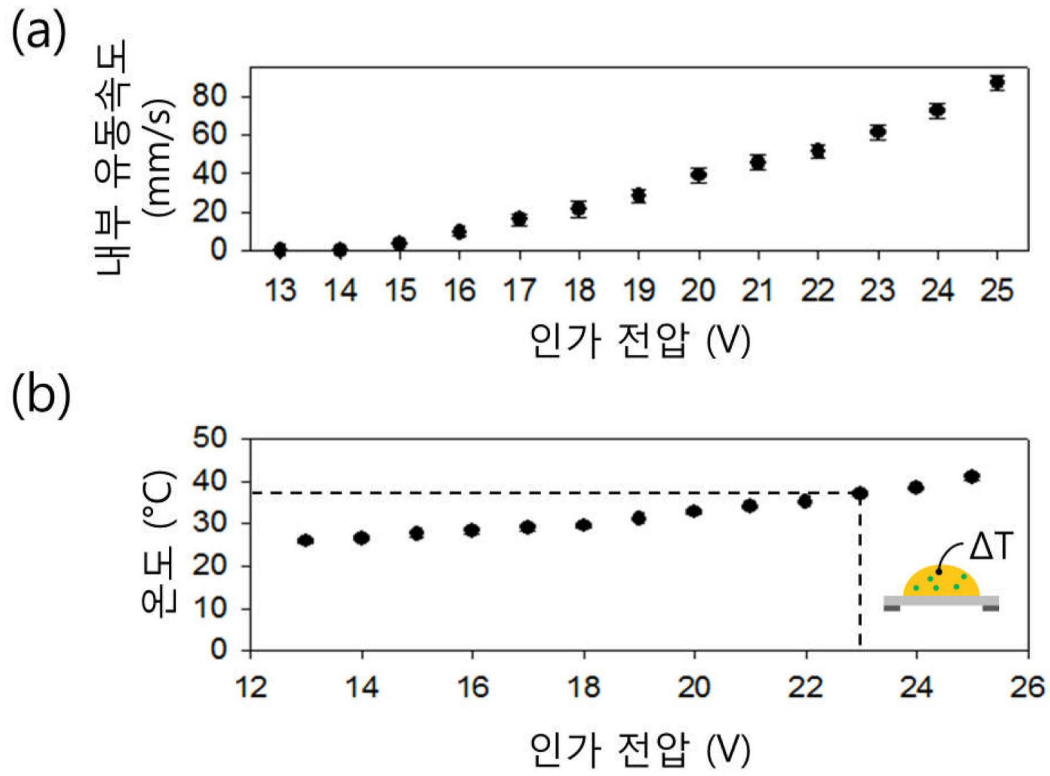
도면5



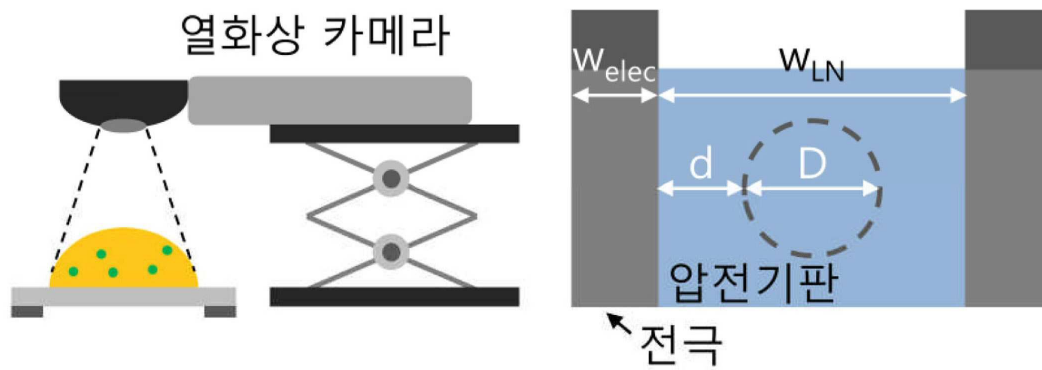
도면6



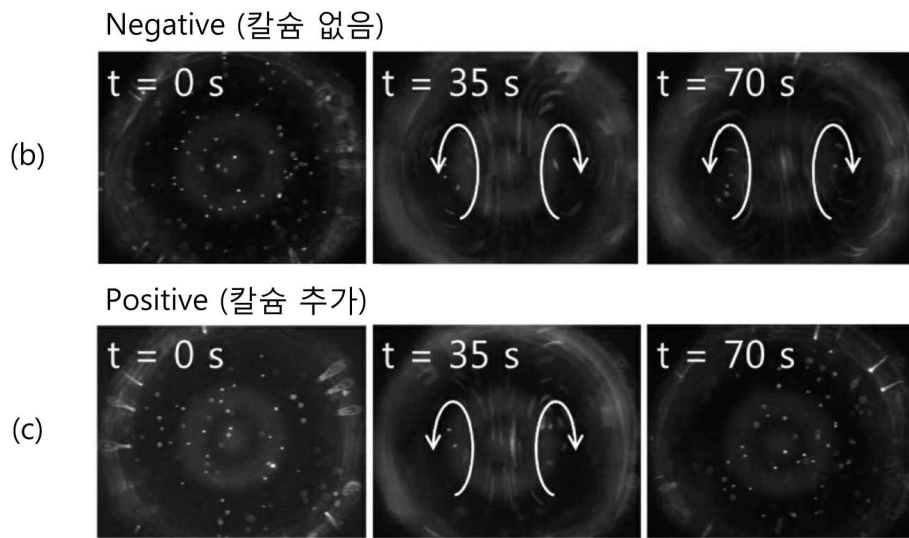
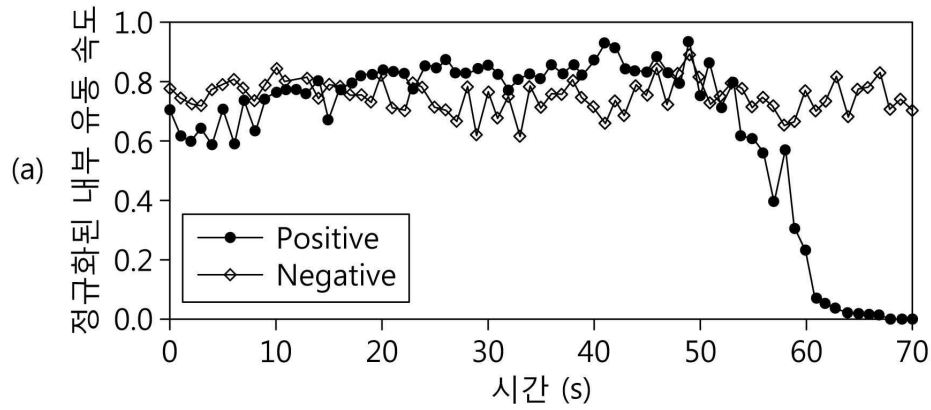
도면7



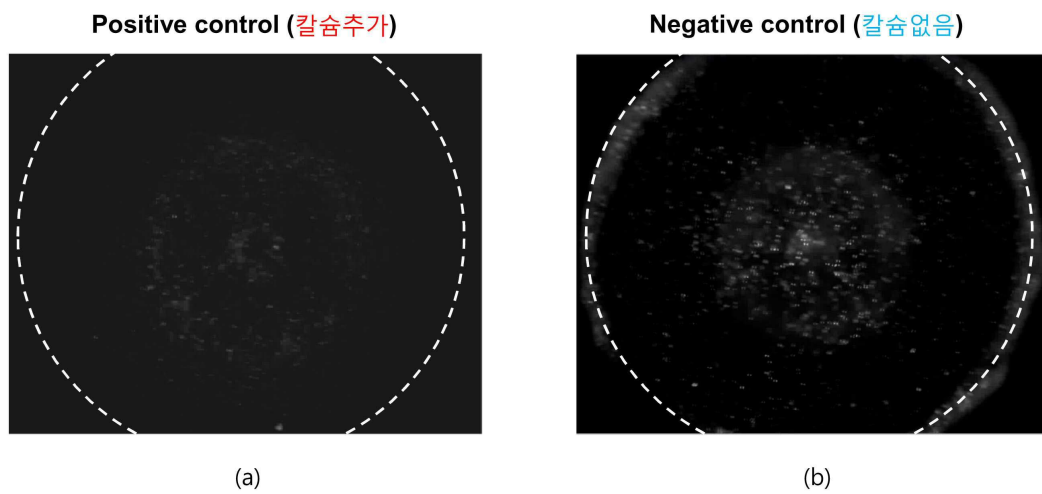
도면8



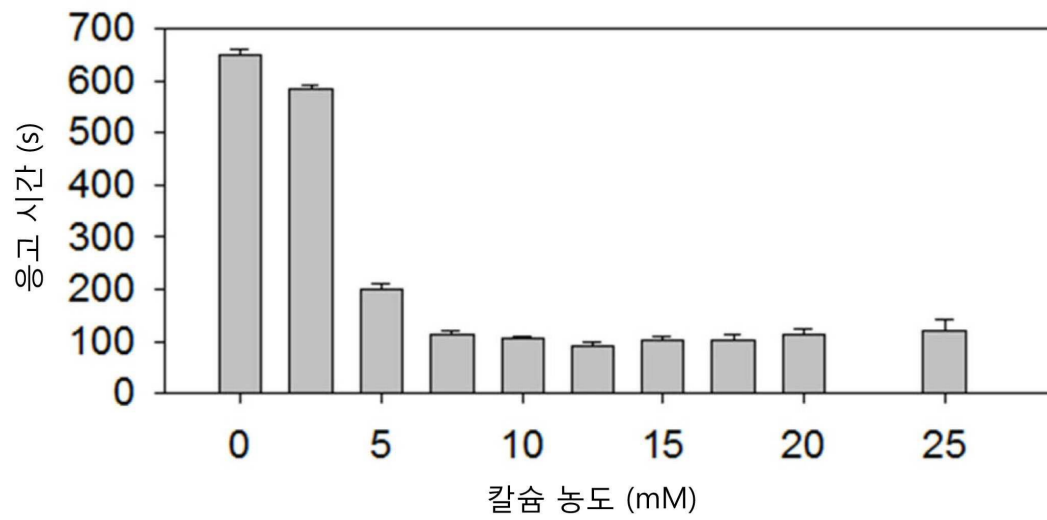
도면9



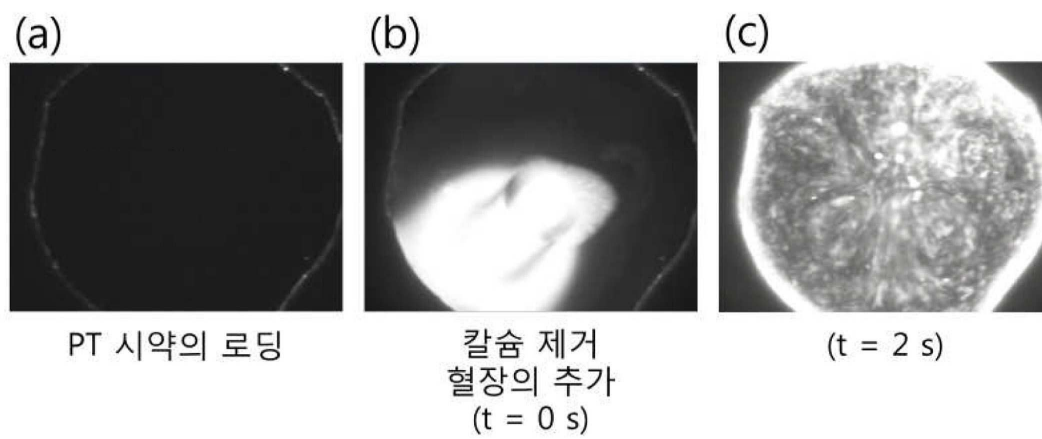
도면10



도면11

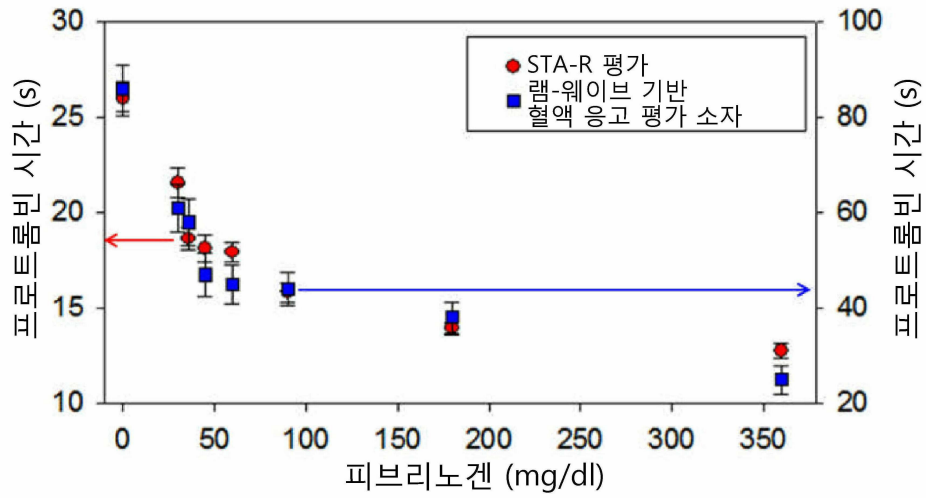


도면12



도면13

(a)



(b)

