

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 5월 26일 (26.05.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/062407 A2

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/53* (2006.01) *B82B 3/00* (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/008094
- (22) 국제출원일: 2010년 11월 16일 (16.11.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2009-0110619 2009년 11월 17일 (17.11.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **강릉원주대학교산학협력단 (KANGNUNG-WONJU NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION GROUP)** [KR/KR]; 강원도 강릉시 강릉대학교로 120 번지, 210-702 Gangwon Province (KR). **주식회사 아모그린텍 (AMOGREENTECH CO., LTD.)** [KR/KR]; 경기도 김포시 통진읍 수참리 185-1, 415-863 Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: **김성일**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **최석정 (CHOI, Suk Jung)** [KR/KR]; 강원도 강릉시 송정동 대림맨션 608 호, 210-140 Gangwon-do (KR). **최병학 (CHOE, Byung Hak)** [KR/KR]; 강원도 강릉시 교동 834 10/9 덕진아파트 1-303 호, 210-100 Gangwon-do (KR). **김성일**
- (74) 대리인: **이재화 (LEE, Jae Hwa)**; 서울시 강남구 역삼 1동 718-10 덕천빌딩 4층, 135-081 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, 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).

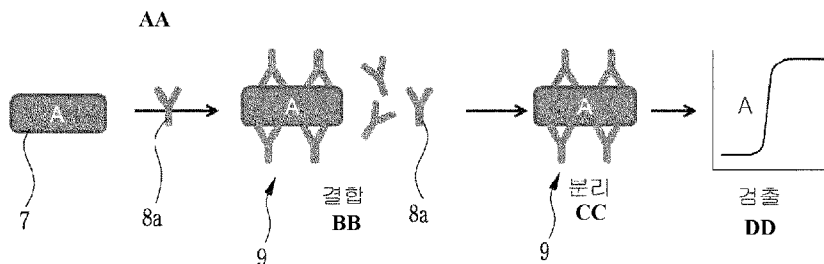
[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR DETECTING ANALYTES

(54) 발명의 명칭 : 분석물질의 검출 방법 및 장치

[Fig. 2]

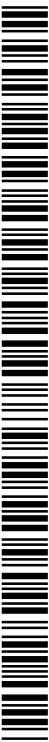
한 종류의 물질 또는 미생물 검출



- AA ... Detection of a substance or microorganism of a single type
- BB ... Binding
- CC ... Isolation
- DD ... Detection

(57) Abstract: The present invention relates to a method and device for detecting analytes, adapted to allow the detection of analyte-receptor complexes, in which an analyte and receptor are bound, after isolating the analyte-receptor complexes from free receptors which are not bound to any analyte. When used, the present invention provides advantages not only in allowing a single sensor chip to detect various substances, but also makes it easy to detect a specific target substance by amplifying signals in samples comprising a mixture of many substances.

(57) 요약서: 본 발명은 분석물질과 수용체가 결합한 분석물질-수용체 복합체를 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체로부터 분리한 후 분석물질-수용체 복합체를 검출할 수 있도록 하는 분석물질의 검출 방법 및 장치에 관한 것이다. 본 발명을 이용할 경우 한 개의 센서 칩으로 여러 물질을 검출할 수 있는 효과가 있을 뿐만 아니라, 많은 물질이 혼합되어 있는 시료에서 특정 대상 물질을 검출하는 것과 신호를 증폭시키는 것이 용이한 장점이 있다.



WO 2011/062407 A2

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 분석물질의 검출 방법 및 장치

기술분야

- [1] 본 발명은 분석물질의 검출 방법 및 장치에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 분석물질과 수용체가 결합한 분석물질-수용체 복합체를 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체로부터 분리한 후 분석물질-수용체 복합체를 검출할 수 있도록 하는 분석물질의 검출 방법 및 장치에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 바이오센서는 신호발생장치(signal transducer)에 인식 물질(sensing material)로 작용하는 수용체(receptor)를 고정시킨 것으로 수용체와 분석물질(analyte) 사이의 특이적이고 강한 상호작용을 통해 분석물질을 매우 민감하게 검출할 수 있는 장점을 가지고 있다. 수용체란 분석물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로서 대표적인 예로는 항체, DNA, 탄수화물 등을 들 수 있다. 이와 같은 바이오센서에서는 서로 다른 분석물질을 검출할 경우 각 분석물질에 대한 수용체를 고정시킨 서로 다른 센서 칩을 사용해야만 한다. 따라서 센서 칩의 개발에 많은 비용이 들고 사용이 번거로운 단점이 있다.
- [3] 또한 식품이나 혈액과 같이 수많은 다른 물질들에 섞여 있는 분석물질을 검출하는 경우에는 다른 물질들의 간섭으로 인하여 정확한 검출이 어려워지는 단점이 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 수용체를 고정시킨 자성 나노입자(magnetic nanoparticle)를 이용하여 분석물질을 다른 물질들로부터 분리하는 전처리 방법들이 이용되고 있다. 그러나 자성 나노입자를 회수할 때 분석물질과 결합한 입자들뿐만 아니라 결합하지 않은 입자들도 함께 회수되기 때문에 분석물질만 검출하기 위해서는 또 다른 수용체를 고정시킨 센서 칩을 사용해야 한다(도 1 참고).
- [4] 좀 더 상세하게 설명하자면 자성 나노입자에 고정된 수용체를 A라고 하면 센서 칩에는 또 다른 수용체 B를 고정시켜야 하며, A와 B 두 수용체는 분석물질의 서로 다른 부위에 결합함으로써 한 수용체의 결합이 다른 수용체의 결합에 영향을 미치지 말아야 한다. 따라서 이러한 검출법을 위해서는 대개 두 종류의 단클론 항체를 사용해야 하기 때문에 많은 노력과 비용이 소요될 뿐만 아니라 앞에서와 마찬가지로 서로 다른 분석물질에 대해서는 서로 다른 센서 칩을 사용해야 하는 단점이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 따라서 본 발명은, 상기와 같은 종래 기술의 한계를 극복하기 위하여 안출된 것으로, 그 목적은 분석물질과 수용체가 결합한 분석물질-수용체 복합체를 분석물질-수용체 복합체는 거르고 분석물질과 결합하지 않은 자유 수용체는

통과시키는 마이크로 필터를 이용하여 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체로부터 분리한 후 분석물질-수용체 복합체를 검출할 수 있도록 하는 분석물질의 검출 방법 및 장치를 제공하는 데 있다.

[6] 본 발명의 다른 목적은 바이오센서에 분리 기능을 추가함으로써 한 종류의 수용체를 고정시킨 한 종류의 센서 칩으로 여러 종류의 분석물질을 검출할 수 있도록 하는 분석물질의 검출 방법 및 장치를 제공하는 데 있다.

[7] 본 발명의 또 다른 목적은 선택성 필터를 갖춘 튜브에서 분석물질과 수용체가 결합한 분석물질-수용체 복합체를 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체로부터 분리한 후 센서 칩을 사용하지 않고 튜브에서 직접 분석물질-수용체 복합체를 검출할 수 있도록 함으로써 편의성과 감도가 향상된 분석물질의 검출 방법 및 장치를 제공하는 데 있다.

[8] 본 발명의 다른 목적은 자성 입자를 이용한 전처리와 분석물질의 검출을 한 튜브에서 이루어지게 함으로써 편리하고 경제성이 높은 분석물질의 검출 방법 및 장치를 제공하는 데 있다.

과제 해결 수단

[9] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 제1특징에 따르면, 본 발명은 분석물질을 함유하는 시료에 수용체를 넣어 수용체와 분석물질의 결합을 유도하여 '상기 분석물질과 결합한 분석물질-수용체 복합체'(이하 간단히, '복합체'라 함)를 형성하는 단계; 상기 복합체를 '상기 분석물질과 결합하지 않은 수용체'(이하 간단히 '자유 수용체'라 함)와 분리하는 단계; 및 상기 자유 수용체로부터 분리된 상기 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법을 제공한다.

[10] 본 발명의 제2특징에 따르면, 본 발명은 상기 복합체를 분리하는 단계에, '상기 복합체는 거르고 상기 자유 수용체는 통과시킬 수 있는 크기의 구멍을 갖는 마이크로 필터'(이하 간단히, '마이크로 필터'라 함)를 구비한 3-방향 밸브를 이용하여 복합체를 거르는 단계; 및 상기 3-방향 밸브의 흐름 방향을 바꿔 상기 복합체를 상기 선택성 필터로부터 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법을 제공한다.

[11] 본 발명의 제3특징에 따르면, 본 발명은 상기 복합체를 분리하는 단계에, 상기 복합체와 상기 자유 수용체의 등전점(isoelectric point)이나 전하의 차이를 이용하여 이온교환필터에 의해 상기 복합체만 선택적으로 흡착시키는 단계; 및 pH 또는 이온세기를 변화시켜서 상기 복합체를 상기 이온교환필터로부터 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법을 제공한다.

[12] 본 발명의 제4특징에 따르면, 본 발명은 분석물질을 함유하는 시료에 수용체가 고정된 형광-자성 나노입자를 넣어 상기 수용체와 분석물질의 결합을 유도하는 단계; 자석을 이용하여 상기 분석물질을 함유하는 시료로부터 상기 형광-자성

나노입자를 회수하는 단계; "상기 회수된 형광-자성 나노입자 중 '상기 분석물질과 결합한 형광-자성 나노입자'(이하 간단히, '결합 나노입자'라 함)는 거르고 '상기 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 형광-자성 나노입자'(이하 간단히, '자유 나노입자'라 함)는 통과시킬 수 있는 크기의 구멍을 갖는 마이크로 필터"(이하 간단히, '마이크로 필터'라 함)를 부착한 튜브로 상기 회수된 복합체를 옮기는 단계; 상기 마이크로 필터에 흡입력을 가하여 상기 자유 나노입자를 튜브로부터 제거하는 단계; 및 상기 마이크로 필터에 남아있는 상기 결합 나노입자로부터 발산되는 형광을 측정하여 상기 분석물질을 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법을 제공한다.

- [13] 본 발명의 제5특징에 따르면, 본 발명은 분석물질을 함유하는 시료와 수용체가 고정된 형광-자성 나노입자를, 마이크로 필터를 부착한 튜브에 넣어 상기 수용체와 상기 분석물질의 결합을 유도하는 단계; 상기 튜브 외부에 설치된 자석에 의한 자기장을 가한 상태에서 형광-자성 나노입자를 튜브 벽에 부착시키는 단계; 상기 튜브 벽에 부착된 형광-자성 나노입자를 제외한 나머지 시료에 흡입력을 가하여 마이크로 필터를 통과시키지 않고 튜브로부터 제거하는 단계; 상기 튜브에 적절한 완충용액을 가하고 그 완충용액에 흡입력을 가하여 마이크로 필터를 통과시키지 않고 완충용액을 튜브로부터 제거함으로써 측정에 영향을 미칠 수 있는 불순물을 제거하는 단계; 상기 자석에 의한 자기장을 제거한 상태에서 상기 튜브 내에 소정량의 완충용액을 넣고 마이크로 필터의 외부에서 흡입력을 가하여 마이크로 필터를 통해 자유 나노입자를 제거하는 단계; 및 상기 마이크로 필터에 남아있는 결합 나노입자로부터 발산되는 형광을 측정하여 상기 분석물질을 검출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법을 제공한다.

- [14] 본 발명의 제6특징에 따르면, 본 발명은 분석물질을 함유하는 시료와 수용체가 고정된 형광-자성 나노입자를, 마이크로 필터를 부착한 튜브에 넣어 상기 수용체와 상기 분석물질의 결합을 유도하는 단계; 하단면에 분리막을 구비한 자석 하우징에 내장된, 관통 관과 형광 측정용 프로브가 삽입되어 있는 관통구멍을 구비한 가동 자석을 이용하여 형광-자성 나노입자를 분리막 하단에 부착시키는 단계; 상기 관통 관을 통하여 분리막 하단에 부착된 형광-자성 나노입자를 제외한 나머지 시료에 흡입력을 가하여 튜브로부터 제거하는 단계; 상기 관통 관으로 완충용액을 공급한 후 다시 흡입력을 가하여 제거하는 과정을 통해 측정에 영향을 미칠 수 있는 불순물을 제거하는 단계; 상기 자석에 의한 자기장을 제거한 상태에서 분리막 하단에 부착된 형광-자성 나노입자를 분리막으로부터 분리시키는 단계; 상기 관통 관으로 소정량의 완충용액을 넣고 마이크로 필터의 외부에서 흡입력을 가하여 마이크로 필터를 통해 자유 나노입자를 제거하는 단계; 및 결합 나노입자로부터 발산되는 형광을 측정하여 상기 분석물질을 검출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법을 제공한다.

- [15] 본 발명의 제7특징에 따르면, 본 발명은 분석물질을 함유하는 시료에 수용체가 고정된 형광-자성 나노입자를 넣어 수용체와 분석물질의 결합을 유도하는 단계; 자석을 이용하여 상기 분석물질을 함유하는 시료로부터 상기 형광-자성 나노입자를 회수하는 단계; 상기 회수된 형광-자성 나노입자를 이온교환 필터를 구비한 튜브로 옮기는 단계; 결합 나노입자와 자유 나노입자의 등전점(isoelectric point)이나 전하의 차이를 이용하여, 상기 결합 나노입자만 이온교환 필터에 선택적으로 흡착시키고 상기 자유 나노입자는 흡착시키지 않는 완충용액('이하 간단히'선택성 완충용액'이라 함) 조건에서, 이온교환 필터에 흡입력을 가하여 이온교환 필터를 통해 자유 나노입자를 제거하는 단계; 및 상기 결합 나노입자로부터 발산되는 형광을 측정하여 상기 분석물질을 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법을 제공한다.
- [16] 본 발명의 제8특징에 따르면, 본 발명은 분석물질을 함유하는 시료와 수용체가 고정된 형광-자성 나노입자를 이온교환 필터를 구비한 튜브로 옮기는 단계; 상기 튜브 외부에 설치된 자석에 의한 자기장을 가한 상태에서 형광-자성 나노입자를 튜브 벽에 부착시키는 단계; 상기 튜브 벽에 부착된 형광-자성 나노입자를 제외한 나머지 시료에 흡입력을 가하여 선택성 필터를 통과시키지 않고 튜브로부터 제거하는 단계; 상기 튜브에 적절한 완충용액을 가하고 그 완충용액에 흡입력을 가하여 선택성 필터를 통과시키지 않고 완충용액을 튜브로부터 제거함으로써 측정에 영향을 미칠 수 있는 불순물을 제거하는 단계; 상기 자석에 의한 자기장을 제거한 상태에서 튜브 내에, 선택성 완충용액을 가하고 이온교환 필터에 흡입력을 가하여 이온교환 필터를 통해 자유 나노입자를 제거하는 단계; 및 상기 결합 나노입자로부터 발산되는 형광을 측정하여 상기 분석물질을 검출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법을 제공한다.
- [17] 본 발명의 제9특징에 따르면, 본 발명은 분석물질을 함유하는 시료와 수용체가 고정된 형광-자성 나노입자를 이온교환 필터를 구비한 튜브로 옮기는 단계; 하단면에 분리막을 구비한 자석 하우징에 내장된, 관통 관과 형광 측정용 프로브가 삽입되어 있는 관통구멍을 구비한 가동 자석을 이용하여 형광-자성 나노입자를 분리막 하단에 부착시키는 단계; 상기 관통 관을 통하여 분리막 하단에 부착된 형광-자성 나노입자를 제외한 나머지 시료에 흡입력을 가하여 튜브로부터 제거하는 단계; 상기 관통 관으로 완충용액을 공급한 후 다시 흡입력을 가하여 제거하는 과정을 통해 측정에 영향을 미칠 수 있는 불순물을 제거하는 단계; 상기 자석에 의한 자기장을 제거한 상태에서 분리막 하단에 부착된 형광-자성 나노입자를 분리막으로부터 분리시키는 단계; 상기 관통 관으로 소정량의 선택성 완충용액을 넣고 이온교환 필터의 외부에서 흡입력을 가하여 이온교환 필터를 통해 자유 나노입자를 제거하는 단계; 및 결합 나노입자로부터 발산되는 형광을 측정하여 상기 분석물질을 검출하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법을 제공한다.

- [18] 본 발명의 제10특징에 따르면, 본 발명은 튜브; 상기 튜브의 하단에 설치되며, '분석물질을 함유하는 시료와 수용체가 고정된 형광-자성 나노입자가 투입되는 경우, 상기 결합 나노입자는 거르고 자유 나노입자는 통과시키는 선택성 필터'(이하 간단히 '선택성 필터'라 함); 상기 튜브의 외부에 설치되어 상기 형광-자성 나노입자를 부착시키기 위한 자석; 및 상기 튜브에 삽입되어 상기 분석물질과 결합하여 필터에 남아있는 형광-자성 나노입자로부터 발산되는 형광을 측정함에 의해 상기 분석물질을 검출하기 위한 형광측정용 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출장치를 제공한다.
- [19] 본 발명의 제11특징에 따르면, 본 발명은 튜브; 상기 튜브의 하단에 설치되는 선택성 필터; 상기 튜브 내부에 설치되며, 하단면에 분리막을 구비한 자석하우징에 내장된, 관통 관과 형광 측정용 프로브가 삽입되어 있는 관통구멍을 구비한 가동 자석을 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출장치를 제공한다.
- [20] 본 발명의 제12특징에 따르면, 본 발명은 상기 복합체와 상기 자유 수용체를 함유하는 시료가 공급될 때 상기 복합체와 상기 자유 수용체의 등전점(isoelectric point)이나 전하의 차이를 이용하여 상기 복합체만 선택적으로 흡착시키고 자유 수용체는 통과시키는 이온교환 필터; 상기 이온교환 필터의 후단에 연결되어 순차적으로 입력되는 상기 자유 수용체와 상기 복합체를 분리시키기 위한 3-방향 밸브; 및 상기 복합체를 검출하기 위한 센서 칩을 포함하며, 상기 3-방향 밸브는, 자유 수용체와 복합체가 공급되는 제1포트와, 자유 수용체를 배출하기 위한 제2포트와, 복합체를 상기 센서 칩으로 배출하는 제3포트를 구비하는 하우징; 및 상기 하우징 내에 회전 가능하게 설치되며, 제1 및 제2 입구와 연결되는 내부통로를 구비하고, 초기상태일 때 상기 제1 및 제2 입구가 상기 제1 및 제2 포트와 정합되고, 회전된 상태일 때 상기 제1 및 제2 입구가 제3 및 제1포트와 정합되는 회전체를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출장치를 제공한다.
- [21] 본 발명의 제13특징에 따르면, 본 발명은 분석물질-수용체 복합체와 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체를 분리시키기 위한 3-방향 밸브; 및 상기 분석물질-수용체 복합체를 검출하기 위한 바이오센서 칩을 포함하며, 상기 3-방향 밸브는, 분석물질-수용체 복합체와 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체를 함유하는 시료가 공급되는 제1포트와, 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체를 배출하기 위한 제2포트와, 상기 분석물질-수용체 복합체를 바이오센서 칩으로 배출하는 제3포트를 구비하는 하우징; 상기 하우징 내에 회전 가능하게 설치되며, 제1 및 제2 입구와 연결되는 내부통로를 구비하고, 초기상태일 때 상기 제1 및 제2 입구가 상기 제1 및 제2 포트와 정합되고, 회전된 상태일 때 상기 제1 및 제2 입구가 제3 및 제1포트와 정합되는 회전체; 및 상기 회전체의 제1 입구와 제2 입구 사이의 내부통로에 설치되어 상기 분석물질-수용체 복합체는 거르고 분석물질과 결합하지 않은 자유로운

수용체는 통과시키는 마이크로 필터를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출장치를 제공한다.

발명의 효과

- [22] 상기한 바와 같이, 본 발명에 의하면 분석물질과 수용체가 결합한 분석물질-수용체 복합체를 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체로부터 분리한 후 분석물질-수용체 복합체를 검출함으로써 분석물질을 직접 검출하는 것과 동일한 효과를 얻을 수 있다.
- [23] 이와 같이 분석물질-수용체 복합체를 검출할 경우 분석물질을 직접 검출하는 것과는 달리 한 종류의 수용체를 고정시킨 한 종류의 센서 칩으로 여러 종류의 분석물질을 검출할 수 있다. 예를 들어, 여러 종류의 분석물질을 검출할 때 각 분석물질에 대한 항체를 염소에서 생성시켜 수용체로 사용할 경우, 염소 항체에 대한 이차항체를 고정시킨 센서 칩으로 여러 종류 분석물질-항체 복합체를 모두 검출함으로써 편의성과 경제성이 향상되는 효과를 얻을 수 있다.
- [24] 또한, 본 발명에 의하면 선택성 필터를 갖춘 튜브에서 분석물질과 수용체가 결합한 분석물질-수용체 복합체를 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체로부터 분리한 후 센서 칩을 사용하지 않고 튜브에서 직접 분석물질-수용체 복합체를 검출할 수 있도록 함으로써 편의성과 감도가 향상되는 효과를 얻을 수 있다.
- [25] 더욱이, 본 발명에 의하면 자성 입자를 이용한 전처리와 분석물질의 검출이 하나의 튜브에서 이루어지게 함으로써 편의성과 경제성이 향상되는 효과를 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 종래방법에 따라 첫 번째 수용체가 결합된 자성 나노입자로 분석물질을 분리하고, 이 복합체를 첫 번째 수용체와 다른 부위를 인식하는 두 번째 수용체가 결합된 센서 칩을 사용하여 분석물질을 검출하는 방법을 설명하기 위한 설명도이다.
- [27] 도 2 및 도 3는 본 발명의 제1실시에 따라 분석물질-수용체 복합체를 분석물질과 결합하지 않은 자유 수용체로부터 분리한 후 분석물질-수용체 복합체를 검출하는 방법을 나타낸 설명도 및 수용체에 대한 이차 수용체가 부착된 센서 칩을 사용하여 분석물질-수용체 복합체를 검출하는 것을 나타낸 설명도이다.
- [28] 도 4은 본 발명의 제2실시에 따라 형광으로 표시된 자성 나노입자에 항체를 고정시킨 입자(fluorescent magnetic nanoparticle-antibody, F-MNP-Ab)를 반응 칩에서 분석물질인 박테리아와 결합시켜 회수하는 전처리를 수행한 후, 다시 필터 튜브에서 박테리아와 결합하지 않은 자유로운 F-MNP-Ab를 제거하고 형광측정에 의해 박테리아를 검출하는 방법을 나타낸 설명도이다.
- [29] 도 5는 본 발명의 제3실시에 따라 하나의 필터 튜브에서 F-MNP-Ab를 이용한

전처리를 수행한 후 자유 F-MNP-Ab를 제거하고 형광을 측정함으로써 박테리아를 검출하는 방법을 나타낸 설명도이다.

[30] 도 6 및 도 7는 본 발명의 제4실시예에 따라 관통 관과 형광측정용 프로브가 부착된 자석을 구비한 하나의 필터 튜브에서 F-MNP-Ab를 이용한 전처리를 수행한 후 자유 F-MNP-Ab를 제거하고 형광을 측정함으로써 박테리아를 검출하는 방법을 나타낸 설명도, 도 8는 본 발명의 제4실시예에 따른 분석물질 분리장치에 대한 변형예를 나타낸 길이방향 단면도이다.

[31] 도 9은 본 발명의 제5실시예에 따라 3-방향 밸브에 부착된 필터로 박테리아-항체 복합체를 거르고 흐름의 방향을 바꿔 박테리아-항체 복합체를 분리한 후, 센서 칩으로 주입하여 분석물질을 검출하는 방법을 나타낸 설명도이다.

[32] 도 10은 본 발명의 제6실시예에 따라 음이온 교환 필터와 3-방향 밸브를 이용하여 분석물질-항체 복합체와 자유 항체를 분리하고 분리된 분석물질-항체 복합체를 센서 칩을 이용하여 검출하는 방법을 나타낸 설명도이다.

[33] 도 11은 본 발명에 따라 마이크로 필터와 흐름의 방향을 바꿀 수 있는 3-방향 밸브가 부착된 바이오센서 시스템을 나타낸 개략 구성도이다.

[34] 도 12는 도 11의 시스템에서 박테리아-항체 복합체와 박테리아에 결합하지 않은 자유로운 항체를 분리한 후 박테리아-항체 복합체를 검출한 실험 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[35] 이하, 본 발명이 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

[36] 본 발명에 따른 분석물질의 검출방법은 하나의 분석물질을 함유하는 시료에 수용체를 넣어 수용체와 분석물질의 결합을 유도한 후 '상기 분석물질과 결합한 분석물질-수용체 복합체'(이하 간단히, '복합체'라 함)를 '상기 분석물질과 결합하지 않은 수용체'(이하 간단히 '자유 수용체'라 함)로부터 분리하여 상기 분리된 복합체를 검출할 수 있도록 한 것에 특징이 있다.

[37] 여기에서 분석물질(analyte)이란 검출 대상이 되는 물질로서 대표적인 예로는 박테리아, 바이러스, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질, 금속 이온, 유기화합물 등을 들 수 있다.

[38] 또한, 여기에서 수용체(receptor)란 분석물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로서 대표적인 예로는 항체 또는 효소를 비롯한 단백질, 펩타이드, 핵산, 탄수화물 등을 들 수 있다.

[39] 도 2 및 도 3는 본 발명의 제1실시예에 따라 복합체를 자유 수용체로부터 분리한 후 복합체를 검출하는 방법을 나타낸 설명도 및 수용체에 대한 이차 수용체가 부착된 센서 칩을 사용하여 복합체를 검출하는 것을 나타낸 설명도이다.

[40] 도 2 및 도 3를 참고하면, 본 발명의 제1실시예에 따른 분석물질 검출방법은

먼저, 분석물질(A; 7)에 수용체(8a)를 가하여 분석물질(A; 7)과 수용체(8a)의 결합을 유도하고, 분석물질-수용체 복합체(9)를 자유 수용체(8a)로부터 분리한 후, 복합체(9)의 수용체(8a)에 대한 이차 수용체(8b)를 고정시킨 센서 칩(6)을 이용하여 검출한다.

- [41] 이 방법은 복합체(9)와 자유 수용체(8a)는 크기, 전하, 등전점 등 여러 가지 특성이 서로 다르기 때문에 그 다른 특성들을 이용하여 선택성 필터(selective filter)를 통해 분리할 수 있다는 점을 이용한다.
- [42] 선택성 필터란 복합체만 선택적으로 거르거나 흡착시켜 복합체를 자유 수용체로부터 분리할 수 있는 필터를 가리키며, 이러한 필터의 예로는 마이크로 필터나 이온교환 필터를 들 수 있다.
- [43] 항체를 수용체로 사용하여 분석물질인 박테리아를 검출하려고 할 경우 박테리아의 크기는 수 마이크로미터의 크기인 반면 항체의 크기는 10 나노미터 이하이기 때문에 0.2-1 마이크로미터 정도의 구멍을 갖는 마이크로 필터를 이용하면 박테리아-항체 복합체만 선택적으로 거르는 것이 가능하다.
- [44] 이와 같이 분리된 박테리아-항체 복합체는 항체를 검출할 수 있는 어떤 방법으로도 검출할 수 있다는 장점이 있다. 예를 들면, 이차항체를 고정시킨 센서 칩으로 검출이 가능한데 이차항체라는 것은, 박테리아에 결합하는 항체를 염소에서 만들었을 경우, 염소의 면역글로불린 G (immunoglobulin G) 단백질에 대한 항체를 가리킨다. 따라서, 여러 가지 박테리아에 대해 각각 염소에서 생성된 항체를 사용한다면 염소 면역글로불린 G에 대한 이차항체를 고정시킨 센서 칩으로 모든 박테리아-항체 복합체를 검출할 수 있다.
- [45] 즉, 상기 제1실시예에서 분석물질(7)이 박테리아이고 수용체(8a)가 항체인 경우, 박테리아와 항체가 결합한 박테리아-항체 복합체를 검출하기 위한 센서 칩(6)은 이차 수용체(8b)로서 이차항체가 고정된 것이 사용된다.
- [46] 그 외에도 항체가 결합할 수 있는 표면을 가진 센서 칩이라면 모두 사용할 수 있다. 그 예로는 단백질 A(protein A)나 단백질 G(protein G)와 같은 단백질을 들 수 있다.
- [47] 뿐만 아니라 항체에 미리 적절한 표지를 붙여놓으면 더욱 단순한 검출방법도 가능하게 된다. 예를 들어, 식품이나 혈청과 같이 많은 물질이 포함되어 있는 시료의 경우 자성 나노입자를 이용하여 박테리아를 분리해내는 것이 필요하기 때문에 자성 나노입자에 형광을 도입하여 도 4에 제시된 것과 같은 방법을 사용할 수 있다. 물론 자성 나노입자에 도입하는 표지는 형광에만 국한되는 것은 아니며 방사성, 발광, 효소 등 고감도의 검출을 가능하게 하는 표지라면 어느 것이라도 적용할 수 있다.
- [48] 도 4은 본 발명의 제2실시예에 따라 '형광으로 표지된 자성 나노입자에 항체를 고정시킨 입자(fluorescent magnetic nanoparticle- antibody)'(이하 'F-MNP-Ab'로 명명한다)를 반응 컵에서 분석물질인 박테리아와 결합시켜 회수하는 전처리를 수행한 후, 다시 필터 튜브에서 박테리아와 결합하지 않은 자유로운

- 형광-항체-자성 나노입자(이하 '자유 F-MNP-Ab'로 명명한다)를 제거하고 형광측정에 의해 박테리아를 검출하는 방법을 나타낸 설명도이다.
- [49] 본 발명의 제2실시에 따른 분석물질 검출방법은 도 4에 도시된 바와 같이, 먼저, 하나의 반응컵(15)에서 F-MNP-Ab(11)를 시료(1)에 넣어 박테리아(10)와 결합시킨다. 그리고 자석 프로브(probe)(13)로 회수하면 박테리아(10)와 결합한 F-MNP-Ab(11)와 자유 F-MNP-Ab(11)가 모두 회수된다. 도 4에서 미설명 부재번호 3은 분석물질 이외의 다른 물질을 나타낸다.
- [50] 이를 구멍 크기가 0.2-1 마이크로미터 정도인 마이크로 필터(19)를 바닥에 부착한 필터 튜브(17)로 옮긴다. 이 튜브(17)의 하단부에 흡입력을 가하여 자유 F-MNP-Ab(11)를 제거한다. 적절한 완충용액을 더하고 다시 흡입력을 가함으로써 자유 F-MNP-Ab(11)를 완전히 제거한다. 마지막으로 적당한 완충용액을 더한 후, 형광 측정 프로브(21)를 사용하여 박테리아와 결합한 상태로 마이크로 필터에 남아있는 F-MNP-Ab에서 발산되는 형광을 측정함에 의해 분석물질을 판단한다.
- [51] 만약, 시료의 상태가 지나치게 혼탁하지 않다면 도 5에서와 같이 모든 과정을 한 개의 튜브에서 수행하는 것도 가능하다.
- [52] 도 5는 본 발명의 제3실시에 따라 하나의 필터 튜브에서 F-MNP-Ab를 이용한 전처리를 수행한 후 자유 F-MNP-Ab를 제거하고 형광을 측정함으로써 박테리아를 검출하는 방법을 나타낸 설명도이다.
- [53] 본 발명의 제3실시에 따른 분석물질 검출방법은 도 5도 5시된 바와 같이, 먼저 시료(1)를 처음부터 필터 튜브(17)에 넣는다. 여기에 F-MNP-Ab(11)를 넣어 박테리아(10)와 결합시키고 튜브(17)의 벽을 둘러싼 자석(23)의 자기장을 가하여 F-MNP-Ab(11)를 회수한다. 튜브 벽을 둘러싼 자석으로 전자석을 사용할 경우에는 전자석의 코일에 전기를 흘려보냄으로써 자기장을 가하고, 영구자석을 사용할 경우에는 자석을 이동시켜 튜브에 접촉시킴으로써 자기장을 가한다.
- [54] 그 후, 상부에서 흡입을 통해 다른 물질들(3)을 포함하는 용액을 제거한다. 완충용액을 더하고 다시 상부에서 흡입하여 씻어준다. 자석(23)의 자기장을 해제하고 하단부에 흡입력을 가하여 자유 F-MNP-Ab(11)를 제거한다. 완충용액을 더하고 다시 흡입력을 가함으로써 자유 F-MNP-Ab(11)를 완전히 제거한다. 마지막으로 적당한 완충용액을 더한 후, 형광측정 프로브(21)를 사용하여 박테리아와 결합한 상태로 마이크로 필터(19)에 남아있는 F-MNP-Ab(11)에서 발산되는 형광을 측정함에 의해 분석물질을 판단한다.
- [55] 또한, 제3실시예와 같이 튜브(17)의 벽을 둘러싼 자석(23)을 사용하여 F-MNP-Ab(11)를 회수하는데 많은 시간이 소요될 수 있기 때문에 회수 시간을 단축하고 과정을 단순화하기 위하여 도 6 내지 도 8에 나타낸 것과 같은 장치를 사용할 수 있다.
- [56] 도 6 및 도 7는 본 발명의 제4실시에 따라 관통 관과 형광측정용 프로브가

부착된 자석을 구비한 하나의 필터 튜브에서 F-MNP-Ab를 이용한 전처리를 수행한 후 자유 F-MNP-Ab를 제거하고 형광을 측정함으로써 박테리아를 검출하는 방법을 나타낸 설명도, 도 8는 본 발명의 제4실시에 따른 분석물질 분리장치에 대한 변형예를 나타낸 길이방향 단면도이다.

- [57] 본 발명의 제4실시에 따른 분석물질 검출방법은 도 6 내지 도 8에 도시된 분석물질 검출장치를 사용하고 있다.
- [58] 제4실시에의 분석물질 검출장치는 튜브(31)의 하단에 분석물질과 결합한 F-MNP-Ab(11)는 거르고 분석물질과 결합하지 않은 자유 F-MNP-Ab(11)는 통과시키는 마이크로 필터(19)가 설치되어 있다.
- [59] 또한, 제4실시에에서는 F-MNP-Ab(11)를 빠르게 회수할 수 있도록 자석 하우징(34)에 내장된 자석(33)이 상기 튜브(31) 내부에 설치되어 있다.
- [60] 상기 자석(33)은, 관통 관(35)과 형광 측정용 프로브(21)가 중앙에 위치한 관통구멍에 삽입되어 있다. 관통 관(35)에는 두 개의 관(36a, 36b)이 3-방향 밸브(36c)를 통해 연결되어 있으며 이 두 개의 관 가운데 하나는 튜브 내부의 용액을 흡입하는데 사용되고 다른 하나는 완충용액을 공급하는데 사용된다. 상기 밸브(36c)의 방향을 전환시킴으로써 자석(33) 내부의 관통 관(35)은 완충용액 공급용 관(36a) 또는 흡입용 관(36b)과 연결되어진다.
- [61] 상기 자석(33)으로는 전자석과 영구자석을 모두 사용할 수 있다. 상기 자석(33)으로 영구자석을 사용할 경우 도 7와 같이 그 영구자석을 자석 하우징(34)의 내부에 상하로 이동 가능하게 내장시키고 자석 하우징(34)의 하단면에 분리막(37)을 구비함으로써 자석을 내렸을 때는 자력을 통해 F-MNP-Ab(11)를 회수하고 자석을 올렸을 때는 F-MNP-Ab(11)를 분리막(37)으로부터 방출하는 것을 가능하게 할 수 있다. 여기에서는 영구자석을 사용하는 것을 예로 들어 설명한다.
- [62] 또한, 본 발명의 제4실시에 따른 분석물질 분리장치는 도 8에 도시된 바와 같이 튜브(31a)와 자석(33)은 각각 하단부로부터 마이크로 필터(19)가 설치된 지점까지 점차적으로 직경이 감소하는 형태로 변형시킴에 의해 F-MNP-Ab(11)와 자석(33) 사이의 접촉면적을 넓혀서 F-MNP-Ab를 더욱 빠르게 회수할 수 있도록 할 뿐만 아니라 용액이 하단부로 흘러내리는 것이 용이하도록 변형시키는 것도 가능하다.
- [63] 본 발명의 제4실시에 따른 분석물질 검출방법은 제3실시에와 동일하게 시료(1)와 F-MNP-Ab(11)를 필터 튜브(31)에 넣어 박테리아(10)와 F-MNP-Ab(11)를 결합시키고, 도 6와 같이 영구자석(33)을 분리막(37) 부분까지 하강시켜 자력에 의해 F-MNP-Ab(11)를 회수한다. 이 단계에서는 회수에 소요되는 시간을 줄이기 위해 자석을 포함하는 자석 하우징(34)이 최대한 필터 튜브(31) 바닥에 가깝게 위치하는 것이 좋다.
- [64] 다음으로 관통 관(35)이 흡입용 관(36b)으로 연결되도록 3-방향 밸브(36c)를 조작함으로써 시료(1)를 흡입하여 다른 물질들(3)을 포함하는 용액을 제거한다.

따라서, 필터 튜브(31) 내부에는 분리막(37)의 하부면에 흡착된 F-MNP-Ab(11)만이 남게 된다.

- [65] 다음으로 관통 관(35)이 완충용액 공급용 관(36a)으로 연결되도록 밸브(36c)를 조작한 후 필터 튜브(31) 내부로 완충용액 공급용 관(36)을 통하여 완충용액을 더하고 다시 흡입용 관(35)으로 흡입함으로써 F-MNP-Ab(11)을 씻어준다. 이 단계에서는 씻는 과정을 원활하게 하기 위해 자석 하우징(34)을 조금 위로 올려주는 것이 바람직하다.
- [66] 이어서, 도 7와 같이 자석 하우징(34) 내부에서 영구자석(33)을 위로 이동시켜서 F-MNP-Ab(11)을 분리막(37)으로부터 분리시킨 후, 마이크로 필터(19)의 하단부에 흡입력을 가하여 박테리아(10)와 결합하지 않은 자유로운 F-MNP-Ab(11)를 제거한다. 그 후, 필터 튜브(31) 내부에 다시 한번 완충용액을 더하고 다시 하단부에 흡입력을 가함으로써 자유로운 F-MNP-Ab(11)를 완전히 제거한다. 마지막으로 적당한 완충용액을 더한 후, 형광측정용 프로브(21)로 박테리아와 결합한 상태로 마이크로 필터(19)에 남아있는 F-MNP-Ab(11)에서 발산되는 형광을 측정함에 의해 분석물질을 판단한다.
- [67] 이와 같이 필터 튜브를 이용하는 방법들은 매우 단순하여 자동화하는 것이 용이할 뿐만 아니라 검출하고자 하는 각 박테리아에 대해 F-MNP-Ab만 개발하면 되기 때문에 경제성도 매우 높게 된다.
- [68] 더욱 정확한 측정을 필요로 하는 경우에는 도 9에 나타낸 것처럼 3-방향 밸브(3-way valve)를 사용하여 박테리아-항체 복합체를 분리한 후 센서 칩으로 검출할 수 있다.
- [69] 도 9은 본 발명의 제5실시예에 따라 3-방향 밸브에 부착된 마이크로 필터로 박테리아-항체 복합체를 거르고 흐름의 방향을 바꿔 박테리아-항체 복합체를 분리한 후, 센서 칩으로 주입하여 분석물질을 검출하는 방법을 나타낸 설명도이다.
- [70] 본 발명의 제5실시예에 사용되는 분석물질의 검출장치는 박테리아와 항체가 결합한 박테리아-항체 복합체(5)와 박테리아와 결합하지 않은 자유로운 항체를 분리시키기 위한 3-방향 밸브(40); 및 상기 박테리아-항체 복합체(5)를 검출하도록 이차항체가 고정된 바이오센서 칩(6)을 포함하고 있다.
- [71] 상기 3-방향 밸브(40)는, 박테리아-항체 복합체(5)와 '박테리아와 결합하지 않은 자유로운 수용체'(이하 간단히 '자유 수용체'라 함)를 함유하는 시료가 공급되는 제1포트(41a)와, 자유 수용체를 배출하기 위한 제2포트(41b)와, 박테리아-항체 복합체(5)를 바이오센서 칩으로 배출하는 제3포트(41c)를 구비하는 하우징(41); 상기 하우징(41) 내에 회전 가능하게 설치되며, 제1 및 제2 입구(43a,43b)와 연결되는 내부통로를 구비하고, 초기상태일 때 상기 제1 및 제2 입구(43a,43b)가 상기 제1 및 제2 포트(41a,41b)와 정합되고, 회전된 상태일 때 상기 제1 및 제2 입구(43a,43b)가 제3 및 제1 포트(41c,41a)와 정합되는 회전체(43); 및 상기 회전체의 제1 입구(43a)와 제2 입구(43b) 사이의 내부통로에 설치되어 상기

박테리아-항체 복합체는 거르고 자유 수용체는 통과시키는 마이크로 필터(45)를 포함하고 있다.

- [72] 도 9을 참고하면, 본 발명의 제5실시예에 따른 분석물질 검출방법은 먼저, 박테리아(10)와 다른 물질(3)을 포함하는 시료에 '자성 나노입자(MNP)에 항체를 결합시킨 입자'(이하 간단히 'MNP-Ab'라 함)(11a)를 넣어 박테리아(10)와 MNP-Ab(11a)의 결합을 유도하여 박테리아-MNP-Ab 복합체(5)를 생성시킨다.
- [73] 이어서, 상기한 방법으로 자석을 이용하여 박테리아-MNP-Ab 복합체(5)와 '박테리아(10)와 결합하지 못한 MNP-Ab'(이하 간단히 '자유 MNP-Ab'라 함)(11a)를 시료로부터 분리하여 회수한다.
- [74] 그 후, 박테리아-MNP-Ab 복합체(5)와 자유 MNP-Ab(11a)를 3-방향 밸브(3-way valve)(40)의 제1포트(41a)에 투입하여 마이크로 필터(45)로 박테리아-MNP-Ab 복합체(5)를 거르고, 자유 MNP-Ab(11a)는 제2포트(41b)를 통하여 배출한다.
- [75] 그 후, 3-방향 밸브(40)의 회전체(43)를 회전시켜서 흐름의 방향을 바꿔 완충용액을 공급하면 박테리아-MNP-Ab 복합체(5)만을 얻을 수 있게 되며 이를 센서 칩(6)으로 주입한다. 이 경우, 센서 칩(6)에서는 이차항체를 고정시켜 박테리아-MNP-Ab(5)를 포획할 수 있다.
- [76] 여기에서 중요한 것은 박테리아(10)와 결합하지 않은 자유 MNP-Ab가 이미 제거되었고 박테리아-MNP-Ab 복합체(5)만 남아 있기 때문에 박테리아에 대한 항체가 아니라 이차항체를 고정시킨 센서 칩을 사용할 수 있다는 점이다. 그 결과, 모든 박테리아를 한 가지 센서 칩(6)으로 검출할 수 있게 되어 편의성과 경제성을 높일 수 있다.
- [77] 박테리아-MNP-Ab의 검출은 표면 플라즈몬 공명 (surface plasmon resonance) 현상을 이용하는 SPR 바이오센서와 피에조 현상을 이용하는 QCM (quartz crystal microbalance)을 비롯하여 모든 방식의 센서 칩에서 이루어질 수 있다. 그리고 더 나아가서 박테리아가 자성 나노입자(MNP)에 고정되어 있기 때문에 거대자기저항(giant magnetoresistance; GMR)을 이용한 센서 칩으로도 박테리아-MNP-Ab(5)의 검출이 가능하다. 또한, 자성 나노입자(MNP)에 형광 특성을 부여하거나 발색반응을 일으키는 효소를 연결시키면 형광 또는 흡광도를 측정하는 방식의 센서 칩에서 검출도 가능하다. 항체를 자성 나노입자에 고정시켜 사용하지 않는 경우에도 항체에 직접 형광 특성을 부여하거나 발색반응을 일으키는 효소를 연결시켜 사용함으로써 동일한 방식의 센서 칩을 사용할 수 있다.
- [78] 이러한 방법으로 단백질과 같은 작은 물질을 검출하려고 하는 경우에는 여러 가지 차이점을 이용할 수 있지만 여기에서는 등전점을 이용하는 방법을 예를 들어 설명한다.
- [79] 등전점이라는 것은 특정 단백질의 순 전하가 0이 되는 pH를 의미하는데 만약 pH가 등전점보다 높아지면 그 단백질은 음의 순 전하를 갖게 되고 pH가 등전점보다 낮아지면 그 단백질은 양의 순 전하를 갖게 된다. 만약, 분석물질의

등전점이 5이고 항체의 등전점이 7이라면 분석물질-항체 복합체의 등전점은 5보다 크고 7보다 작은 값, 예를 들어, 6 근처의 값을 갖게 될 것이다. 따라서, 음이온 교환 필터에 '분석물질과 결합하지 않은 자유로운 항체'(이하 간단히 '자유 항체'라 함)는 결합하지 않고 분석물질-항체 복합체만 결합하는 pH 조건을 찾는 것이 가능하다.

- [80] 도 10은 본 발명의 제6실시에 따라 음이온 교환필터와 3-방향 밸브를 이용하여 분석물질-항체 복합체와 자유 항체를 분리하고 분리된 분석물질-항체 복합체를 센서 칩을 이용하여 검출하는 방법을 나타낸 설명도이다.
- [81] 예를 들어, pH6.5에서 자유 항체는 결합하지 않고 분석물질-항체 복합체만 결합하는 조건이 성립된다면, 먼저 분석물질(7)을 포함하는 시료에 항체(8)를 넣어 분석물질(7)과 항체(8)의 결합을 유도한 후, 이를 pH6.5의 완충용액에서 음이온 교환필터(51)를 통과시킴에 의해 분석물질-항체 복합체만을 음이온 교환필터(51)에 흡착시키고 분석물질(7)과 결합되지 못한 자유 항체(8)는 3-방향 밸브(40)를 통하여 폐기(waste) 방향의 배출구로 배출한다.
- [82] 그 후, 3-방향 밸브(40)의 배출구의 방향을 센서칩(6) 방향으로 전환한 상태에서 pH를 5로 조정된 완충용액을 흘려주면 음이온 교환필터(51)에서 분석물질-항체 복합체가 용출되어 3-방향 밸브(40)를 통하여 센서 칩(6)으로 배출된다. 분리된 분석물질-항체 복합체는 앞에서 기술한 박테리아-항체 복합체의 검출과 동일한 방법으로 검출할 수 있다. 더 나아가서 제5실시에에서 기술한 것과 동일하게 MNP-Ab를 적용할 수도 있기 때문에 전처리와 자성 나노입자를 이용한 고감도 검출이 가능해진다.
- [83] 뿐만 아니라 상기한 도 4 내지 도 5에서 나타낸 필터 튜브를 이용하는 제2 내지 제4 실시예에 따른 방법에서 선택성 필터, 즉 마이크로 필터(19)를 이온 교환 필터로 바꾸고 완충용액의 pH를 조절함으로써 분석물질(7)과 결합한 F-MNP-Ab(11)만 이온교환 필터에 흡착시키고 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 F-MNP-Ab는 제거하는 것도 가능하다.
- [84] 이와 같은 방법은 분석물질-수용체 복합체와 분석물질에 결합하지 않은 자유로운 수용체를 구별하여 선택적으로 거르거나 흡착시킬 수 있는 선택성 필터만 구비된다면 박테리아나 단백질 외에도 핵산, 탄수화물, 유기물질, 중금속 등의 분석물질에 대해서도 적용할 수 있다.
- [85] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 들어 보다 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니라, 본 발명을 구현하는 예시적인 것에 불과하다.
- [86] <실시예 1> 항체-박테리아 복합체만 분리하여 박테리아 검출
- [87] 항체-박테리아 복합체를 박테리아와 결합하지 않은 항체로부터 분리한 후 검출하는 방법을 확인하기 위해 도 11과 같은 QCM을 이용한 바이오센서 시스템을 만들었다.
- [88] 도 11은 본 발명에 따라 마이크로 필터와 흐름의 방향을 바꿀 수 있는 3-방향

밸브가 부착된 바이오센서 시스템을 나타낸 개략 구성도이다.

- [89] 도 11에 도시된 본 발명에 따른 바이오센서 시스템은 완충용액을 흘려주는 펌프(61), 대장균 항체와 대장균을 주입하기 위한 주입밸브(62), 3-방향 밸브(40a), 염소 면역글로블린 G 단백질에 대한 이차항체가 고정된 QCM 센서 칩을 수용하는 셀(63), 및 폐기물 수거병(67)이 도관(68)을 통하여 순차적으로 연결되어 있고, 상기 QCM 센서 칩에는 오실레이터(Oscillator)(64), 주파수 카운터(Frequency counter)(65) 및 검출신호 분석용 컴퓨터(66)가 순차적으로 연결되어 있다.
- [90] 이 시스템의 특징은 주입밸브(62)와 QCM 센서 칩의 셀(63) 사이에 항체-박테리아 복합체를 거를 수 있는 0.5 μm 크기의 구멍을 갖는 마이크로 필터(45)가 있고 세 개의 3-way 밸브(40a)를 이용하여 흐름의 방향을 ①과 ②로 바꿀 수 있다는 점이다.
- [91] 이 실험에서 운반 완충용액은 PBS를 사용하였고 유속은 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 하였다. QCM 센서 칩에는 염소 면역글로블린 G 단백질에 대한 이차항체를 고정시켜 놓았다.
- [92] 먼저, 염소에서 만든 대장균에 대한 항체(anti-E. coli antibody raised in goat) 10 μg 을 주입하고 3-way 밸브(40a)에 대한 흐름의 방향을 ①로 하여 30분간 완충용액을 흘려주었다. 그리고 다시 흐름의 방향을 ②로 바꾸고 주파수 변화를 관찰한 결과 아무런 변화가 없었다. 이는 흐름 ①의 방향에서 항체 단백질이 모두 필터를 통과하여 제거되었기 때문에 셀에 있는 QCM센서 칩에서 대장균에 대한 항체를 검출하지 못했음을 보여준다.
- [93] 다음으로 대장균에 대한 항체 10 μg 에 약 10^5 cfu의 대장균을 섞어 주입한 후 위와 동일한 실험을 하였다. 그 결과 도 12도 12타난 것처럼 주파수 감소가 확인되었다. 즉, 대장균과 결합한 항체는 필터를 통과하지 못하기 때문에 필터에 걸려 있다가 흐름의 방향을 ②로 바꿀 때 QCM센서 칩의 셀(63)로 들어가 센서 칩에서 검출된 것이다.
- [94] 이상의 결과는 적당한 구멍을 갖는 필터를 이용하여 박테리아에 결합한 항체와 결합하지 않은 항체를 분리한 후 박테리아-항체 복합체를 검출할 수 있음을 보여준다.
- [95] 상기한 바와 같이, 본 발명에서는 바이오센서에 분리 기능을 추가함으로써 한 개의 센서 칩으로 여러 종류의 분석물질을 검출할 수 있다.
- 산업상 이용가능성**
- [96] 본 발명은 박테리아, 단백질, 핵산, 유기물질, 중금속과 같은 분석물질을 검출할 수 있는 장치에 적용된다.

청구범위

- [청구항 1] 분석물질을 함유하는 시료에 수용체를 넣어 수용체와 분석물질의 결합을 유도하여 상기 분석물질과 결합한 분석물질-수용체 복합체를 형성하는 단계;
상기 분석물질-수용체 복합체를 상기 분석물질과 결합하지 않은 자유 수용체와 분리하는 단계; 및
상기 자유 수용체로부터 분리된 상기 분석물질-수용체 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 분석물질-수용체 복합체를 분리하는 단계는 상기 분석물질-수용체 복합체는 거르고 상기 자유 수용체는 통과시키는 마이크로 필터를 구비한 3-방향 밸브를 이용하여 복합체를 거르는 단계; 및
상기 3-방향 밸브의 흐름 방향을 바꿔 상기 분석물질-수용체 복합체를 상기 마이크로 필터로부터 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 분석물질-수용체 복합체를 분리하는 단계는 상기 분석물질-수용체 복합체와 상기 자유 수용체의 등전점(isoelectric point)이나 전하의 차이를 이용하여 이온교환필터에 의해 상기 분석물질-수용체 복합체만 선택적으로 흡착시키는 단계; 및
pH 또는 이온세기를 변화시켜서 상기 분석물질-수용체 복합체를 상기 이온교환필터로부터 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 수용체는 형광-자성 나노입자에 고정된 상태로 사용되며,
상기 복합체를 분리하는 단계는
상기 수용체가 고정된 형광-자성 나노입자를 상기 분석물질을 함유하는 시료에 첨가하여 분석물질을 나노입자에 결합시키는 단계;
자석을 이용하여 상기 분석물질을 함유하는 시료로부터 상기 형광-자성 나노입자를 회수하는 단계;
상기 회수된 형광-자성 나노입자 중 분석물질과 결합한 형광-자성 나노입자는 거르고 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 형광-자성 나노입자는 통과시키는 선택성 필터를 부착한 튜브로 상기 회수된 형광-자성 나노입자를 옮기는 단계; 및
상기 필터에 흡입력을 가하여 분석물질과 결합하지 않은 자유로운

형광-자성 나노입자를 튜브로부터 제거하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법.

[청구항 5]

제1항에 있어서, 상기 수용체는 형광-자성 나노입자에 고정된 상태로 사용되며,

상기 분석물질-수용체 복합체를 분리하는 단계는

상기 수용체가 고정된 형광-자성 나노입자와 시료를, 상기 분석물질과 결합한 형광-자성 나노입자는 거르고 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 형광-자성 나노입자는 통과시키는 선택성 필터를 부착한 튜브에 넣어 분석물질을 나노입자에 결합시키는 단계;

상기 튜브 외부에 설치된 자석에 의한 자기장을 인가한 상태에서 형광-자성 나노입자를 튜브 벽에 부착시키는 단계;

상기 튜브 벽에 부착된 형광-자성 나노입자를 제외한 나머지 시료를 선택성 필터를 통과시키지 않고 흡입력을 가하여

튜브로부터 제거하는 단계; 및

상기 자석에 의한 자기장을 제거한 상태에서 튜브 내에 소정량의 완충용액을 넣고 필터의 외부에서 흡입력을 가하여 선택성 필터를 통과시켜 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 형광-자성 나노입자를 제거하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법.

[청구항 6]

제1항에 있어서, 상기 수용체는 형광-자성 나노입자에 고정된 상태로 사용되며,

상기 분석물질-수용체 복합체를 분리하는 단계는

상기 수용체가 고정된 형광-자성 나노입자와 시료를, 상기 분석물질과 결합한 형광-자성 나노입자는 거르고 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 형광-자성 나노입자는 통과시키는 선택성 필터를 부착한 튜브에 넣어 분석물질을 나노입자에 결합시키는 단계;

하단면에 분리막을 구비한 자석 하우징에 내장된, 흡입 및 완충용액 공급용 관과 형광 측정용 프로브가 삽입되어 있는 관통구멍을 구비한 가동 자석을 이용하여 형광-자성 나노입자를 분리막 하단에 부착시키는 단계;

상기 흡입 및 완충용액 공급용 관을 통하여 분리막 하단에 부착된 형광-자성 나노입자를 제외한 나머지 시료를 튜브로부터 제거하는 단계;

상기 흡입 및 완충용액 공급용 관으로 완충용액을 공급한 후 다시 제거하는 과정을 통해 측정에 영향을 미칠 수 있는 불순물을 제거하는 단계;

상기 자석에 의한 자기장을 제거한 상태에서 분리막 하단에 부착된 형광-자성 나노입자를 분리막으로부터 분리시키는 단계; 및

상기 흡입 및 완충용액 공급용 관으로 소정량의 완충용액을 넣고 선택성 필터의 외부에서 흡입력을 가하여 필터를 통과시켜 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 형광-자성 나노입자를 제거하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 복합체로부터 분석물질을 검출하는 단계는 상기 분석물질의 수용체와 결합할 수 있는 이차 수용체를 이용하여 검출하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법.

[청구항 8] 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 필터에 남아있는 형광-나노 입자로부터 발산되는 형광을 측정하여 상기 분석물질을 검출하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법.

[청구항 9] 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분석물질과 결합한 형광-자성 나노입자와 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 형광-자성 나노입자의 크기 차이를 이용하는 마이크로 필터를 선택성 필터로 사용하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법.

[청구항 10] 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분석물질과 결합한 형광-자성 나노입자와 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 형광-자성 나노입자의 등전점 또는 전하의 차이를 이용하는 이온교환필터를 선택성 필터로 사용하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출방법.

[청구항 11] 튜브;
상기 튜브의 하단에 설치되며, 분석물질을 함유하는 시료와 형광-자성 나노입자에 항체가 결합된 복합체로 이루어지는 수용체가 투입되는 경우, 상기 분석물질과 결합한 복합체는 거르고 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 복합체는 통과시키는 선택성 필터;

상기 튜브의 내부 또는 외부에 설치되어 상기 복합체를 선택적으로 튜브 벽에 부착시키기 위한 자석; 및

상기 튜브에 선택적으로 삽입되어 상기 분석물질과 결합하여 필터에 남아있는 복합체로부터 발산되는 형광을 측정함에 의해 상기 분석물질을 판단하기 위한 형광측정용 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출장치.

[청구항 12] 튜브;
상기 튜브의 하단에 설치되며, 분석물질을 함유하는 시료와

형광-자성 나노입자에 항체가 결합된 복합체로 이루어지는 수용체가 투입되는 경우, 상기 분석물질과 결합한 복합체는 거르고 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 복합체는 통과시키는 선택성 필터;

상기 튜브 내부에 설치되며, 형광을 측정하거나 상기 분석물질과 결합한 복합체와 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 복합체를 제외한 나머지 시료를 흡입하거나 완충용액을 공급하기 위한 관통관이 삽입되는 제1관통구멍과 형광측정용 프로브가 삽입되는 제2관통구멍을 구비한 자석이 자석 하우징 내부에 이동 가능하게 내장되고 하단면에 분리막을 구비한 가동 자석; 및

상기 제2관통구멍을 통하여 삽입되어 상기 분석물질과 결합하여 필터에 남아있는 복합체로부터 발산되는 형광을 측정하여 상기 분석물질을 판단하기 위한 형광측정용 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출장치.

[청구항 13]

제12항에 있어서, 상기 튜브와 가동 자석은 각각 하단부로부터 선택성 필터가 설치된 지점까지 점차적으로 직경이 감소하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출장치.

[청구항 14]

분석물질-수용체 복합체와 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체를 함유하는 시료가 공급될 때 상기 분석물질-수용체 복합체와 상기 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체의 등전점(isoelectric point)이나 전하의 차이를 이용하여 분석물질-수용체 복합체만 선택적으로 흡착시키고 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체는 통과시키는 이온 교환필터; 상기 이온 교환필터의 후단에 연결되어 순차적으로 입력되는 상기 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체와 상기 분석물질-수용체 복합체를 분리시키기 위한 3-방향 밸브; 및 상기 분석물질-수용체 복합체를 검출하기 위한 바이오센서 칩을 포함하며,

상기 3-방향 밸브는,

분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체와 분석물질-수용체 복합체가 공급되는 제1포트와, 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체를 배출하기 위한 제2포트와, 상기 분석물질-수용체 복합체를 바이오센서 칩으로 배출하는 제3포트를 구비하는 하우징; 및

상기 하우징 내에 회전 가능하게 설치되며, 제1 및 제2 입구와 연결되는 내부통로를 구비하고, 초기상태일 때 상기 제1 및 제2 입구가 상기 제1 및 제2 포트와 정합되고, 회전된 상태일 때 상기 제1 및 제2 입구가 제3 및 제1포트와 정합되는 회전체를 포함하는

[청구항 15]

것을 특징으로 하는 분석물질의 검출장치.

분석물질-수용체 복합체와 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체를 분리시키기 위한 3-방향 밸브; 및

상기 분석물질-수용체 복합체를 검출하기 위한 바이오센서 칩을 포함하며,

상기 3-방향 밸브는,

분석물질-수용체 복합체와 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체를 함유하는 시료가 공급되는 제1포트와, 분석물질과

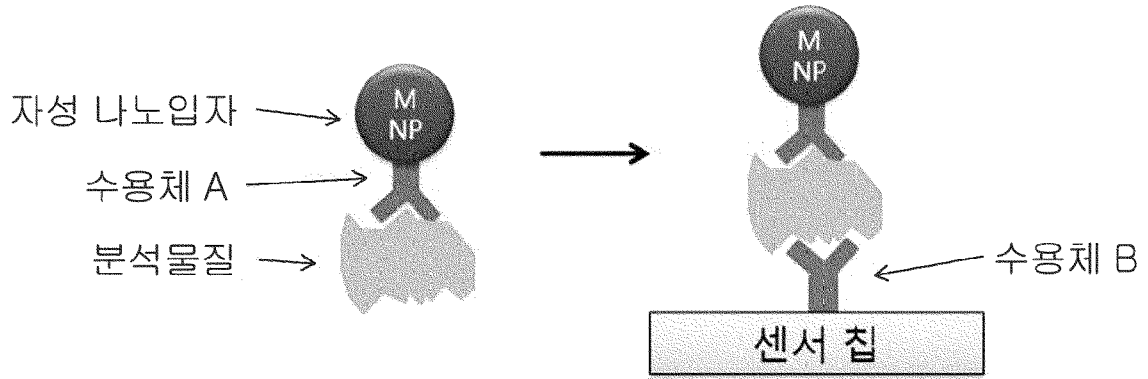
결합하지 않은 자유로운 수용체를 배출하기 위한 제2포트와, 상기 분석물질-수용체 복합체를 바이오센서 칩으로 배출하는

제3포트를 구비하는 하우징;

상기 하우징 내에 회전 가능하게 설치되며, 제1 및 제2 입구와 연결되는 내부통로를 구비하고, 초기상태일 때 상기 제1 및 제2 입구가 상기 제1 및 제2 포트와 정합되고, 회전된 상태일 때 상기 제1 및 제2 입구가 제3 및 제1포트와 정합되는 회전체; 및

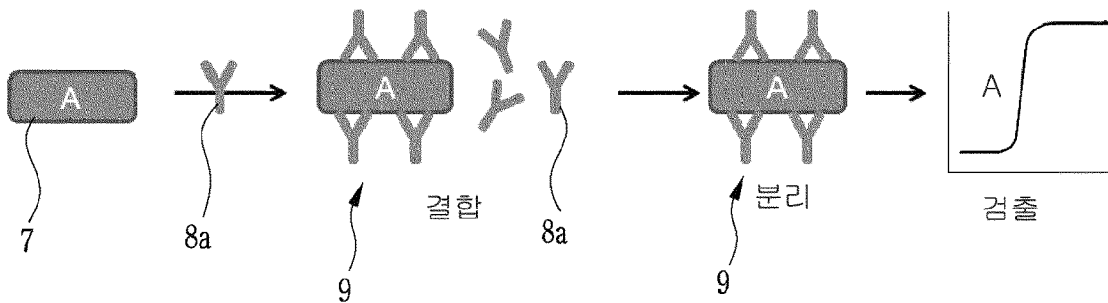
상기 회전체의 제1 입구와 제2 입구 사이의 내부통로에 설치되어 상기 분석물질-수용체 복합체는 거르고 분석물질과 결합하지 않은 자유로운 수용체는 통과시키는 마이크로 필터를 포함하는 것을 특징으로 하는 분석물질의 검출장치.

[Fig. 1]

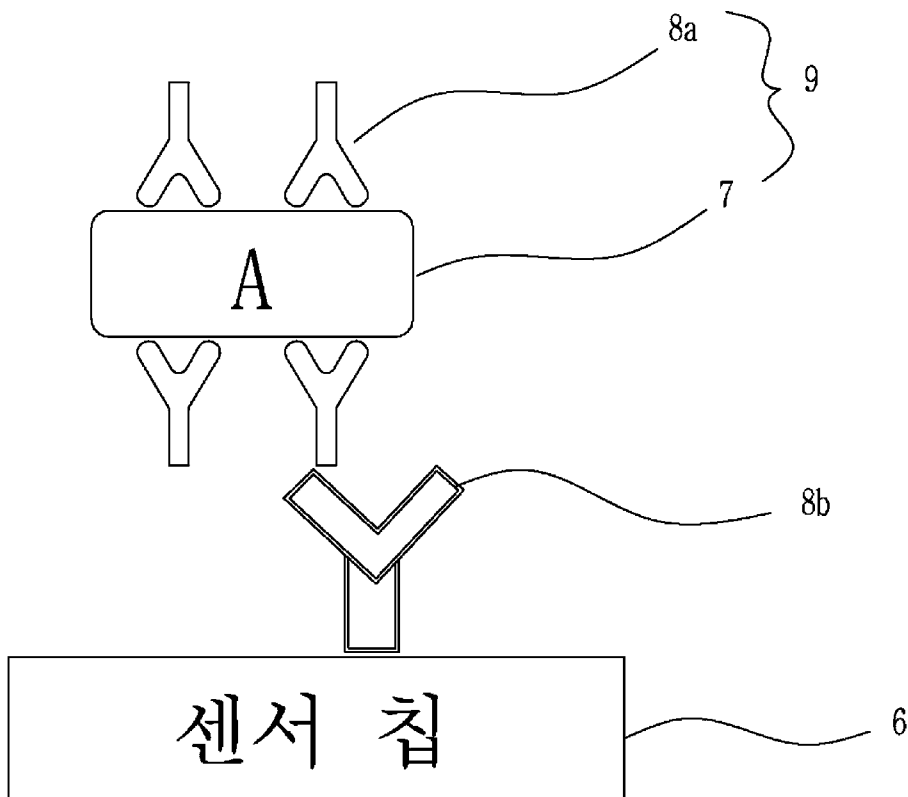


[Fig. 2]

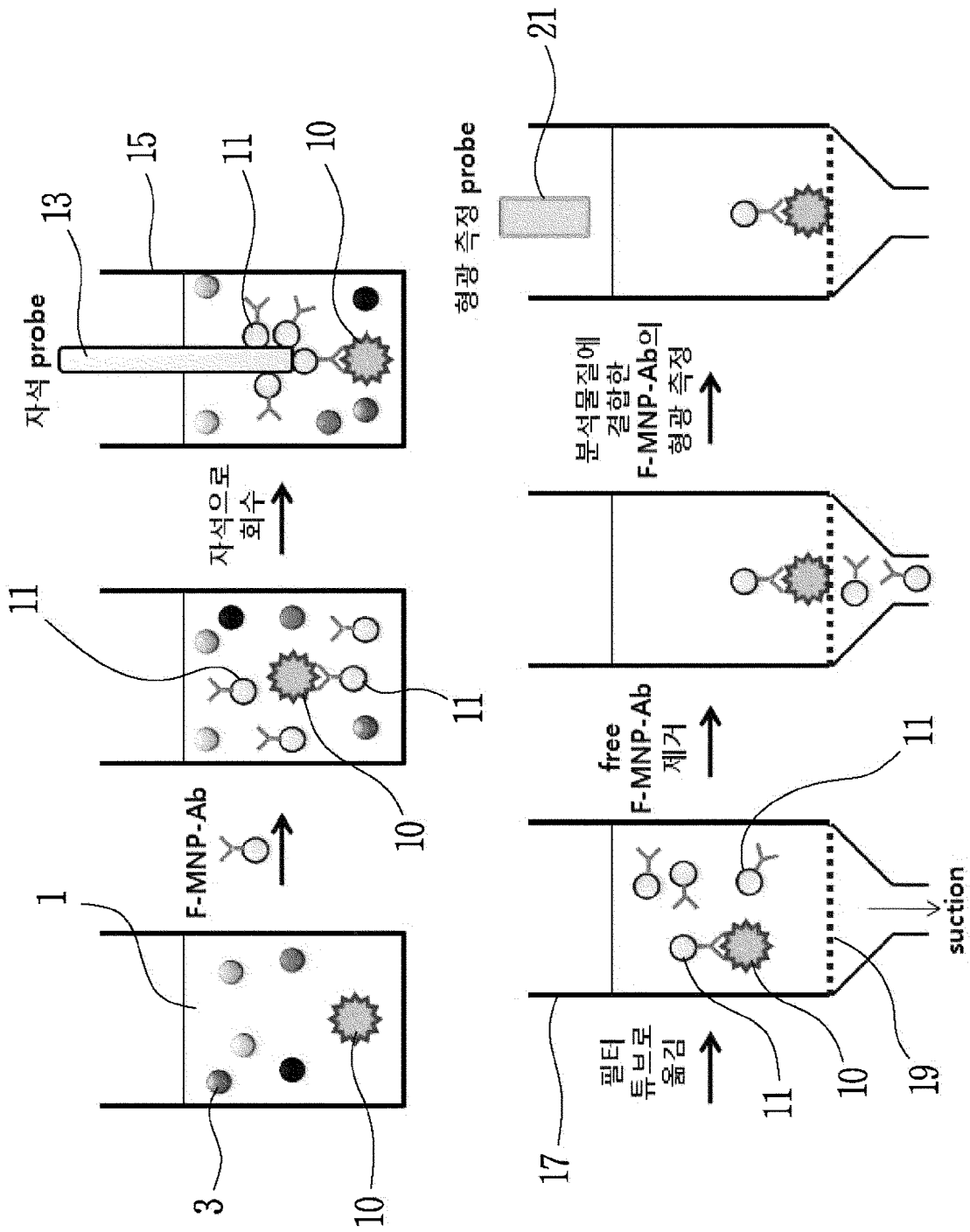
한 종류의 물질 또는 미생물 검출



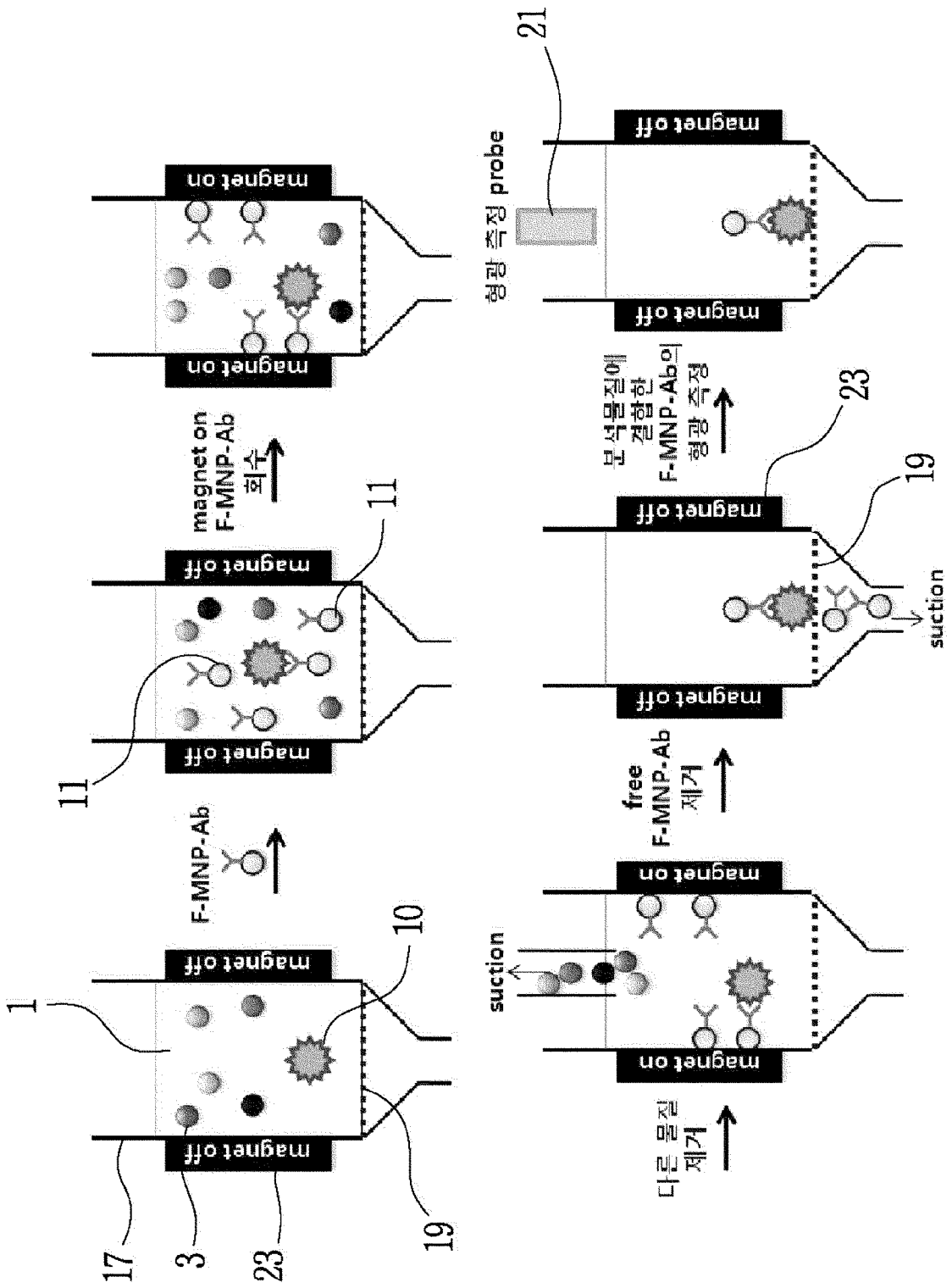
[Fig. 3]



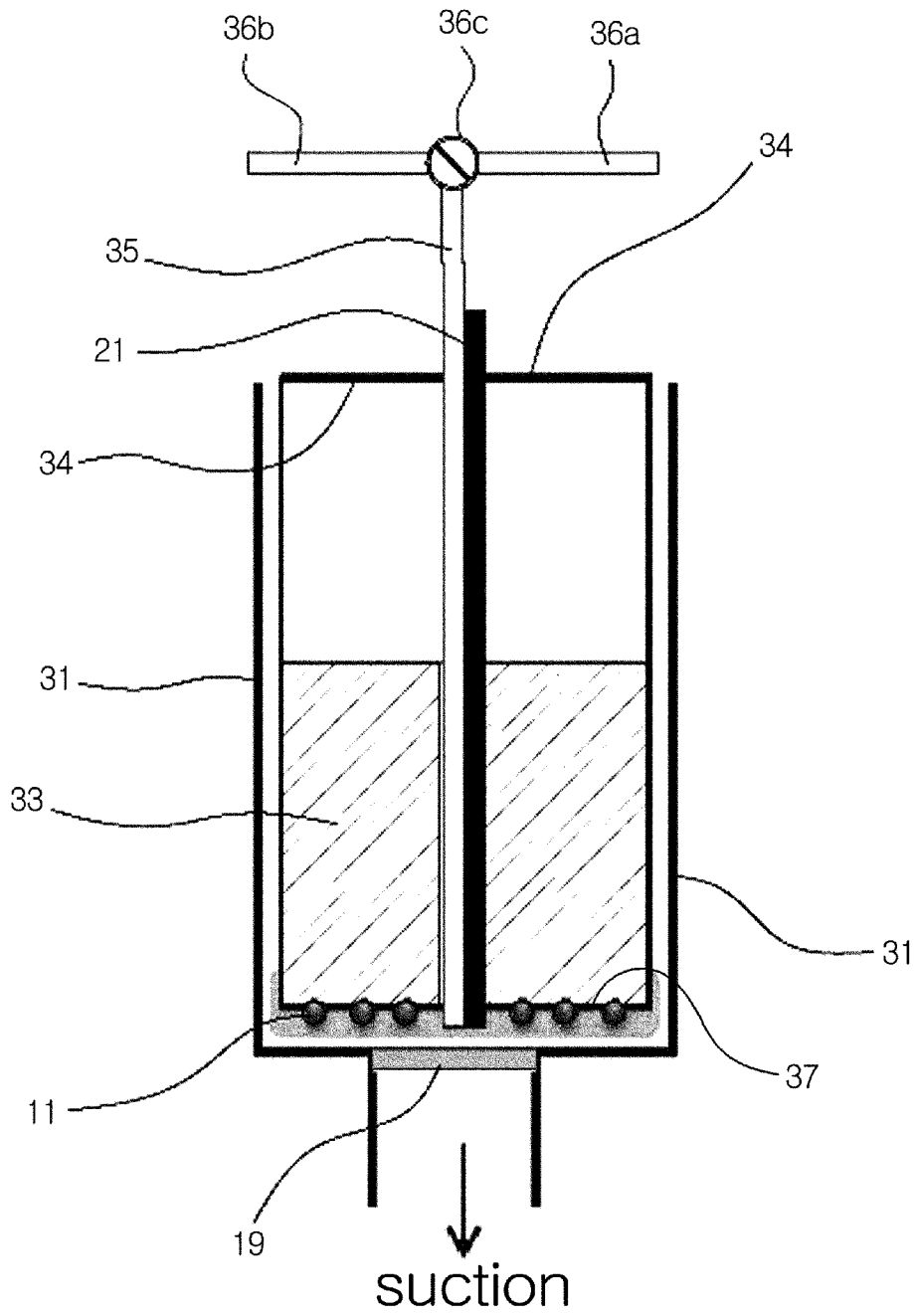
[Fig. 4]



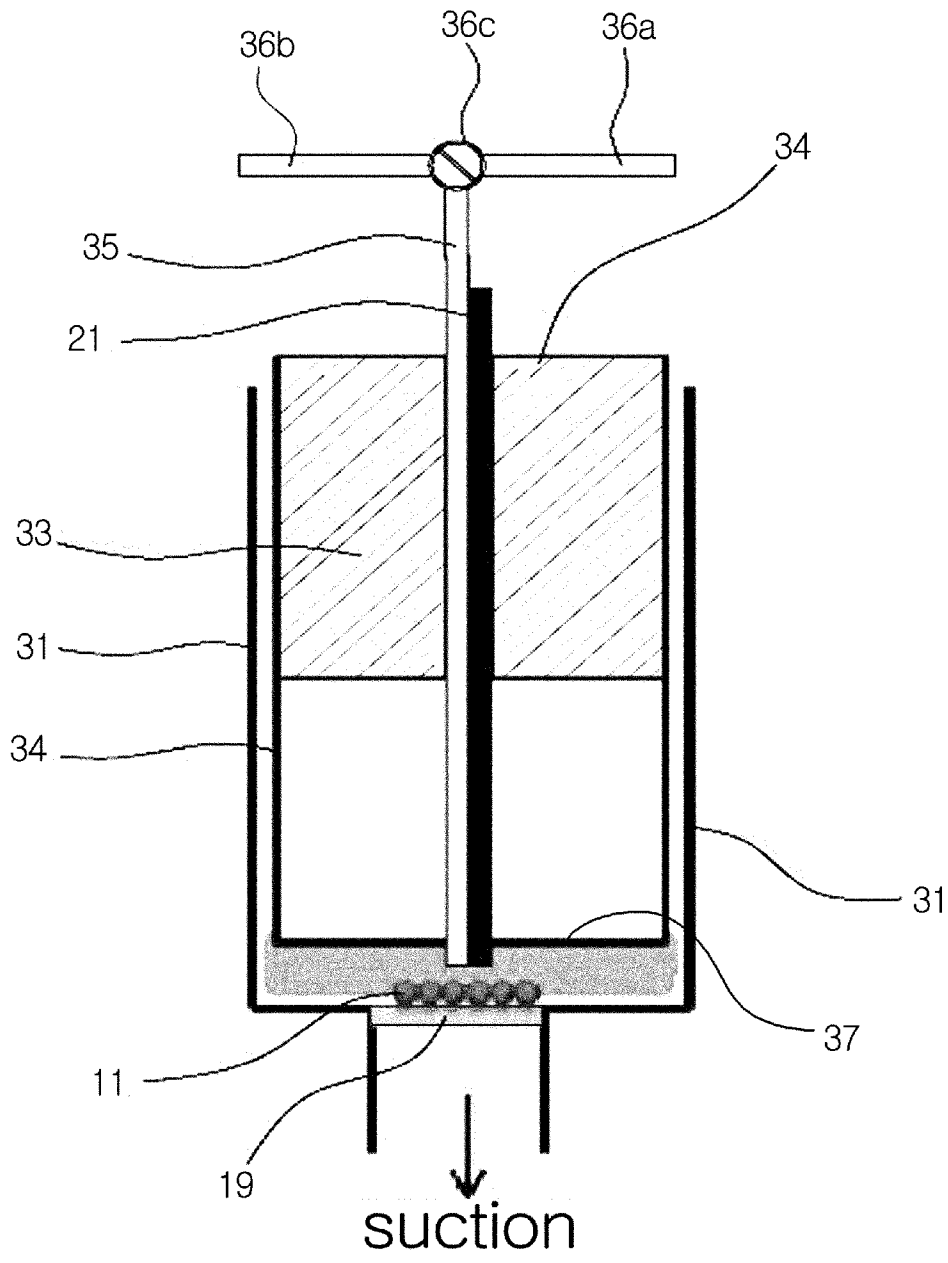
[Fig. 5]



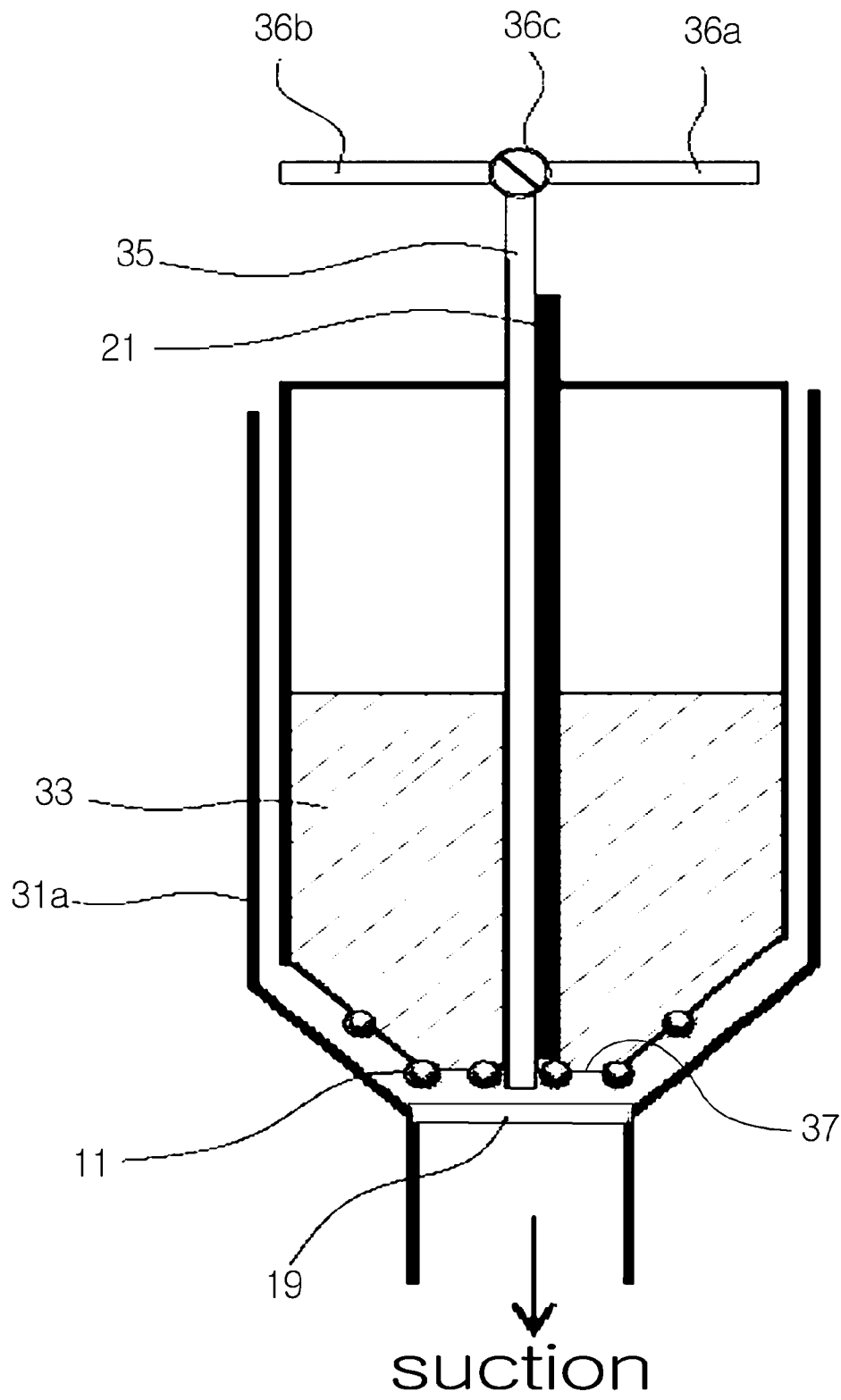
[Fig. 6]



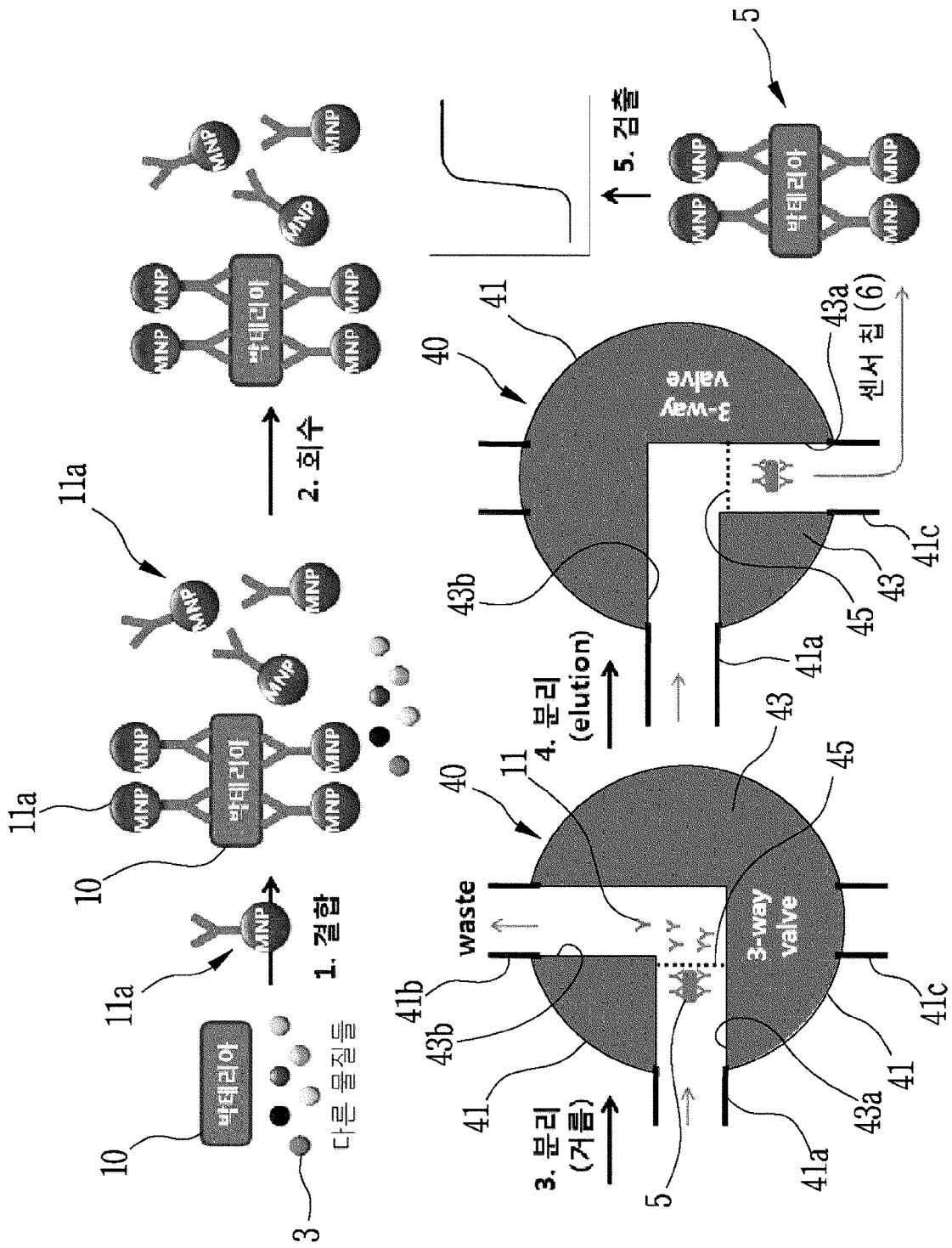
[Fig. 7]



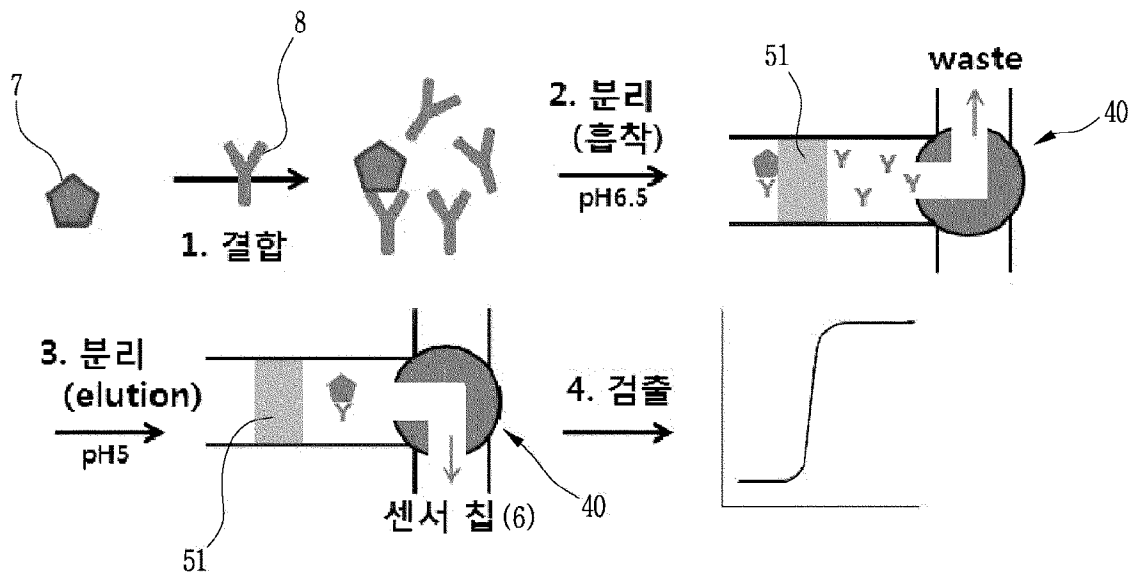
[Fig. 8]



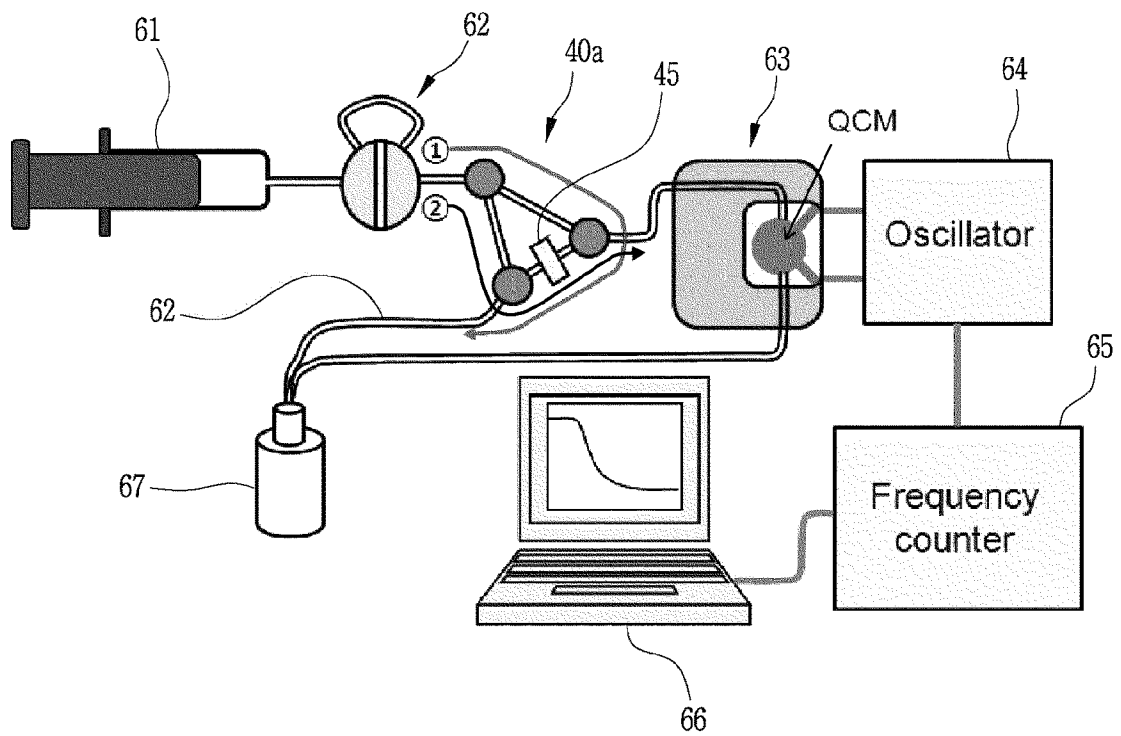
[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]



[Fig. 12]

