



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0088659
(43) 공개일자 2023년06월20일

- | | |
|--|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>B01L 3/00</i> (2023.01) | (71) 출원인
충남대학교산학협력단 |
| (52) CPC특허분류
<i>B01L 3/50273</i> (2013.01)
<i>C12Y 101/03004</i> (2013.01) | (72) 발명자
이창수 |
| (21) 출원번호 10-2023-0074395(분할) | 대전광역시 유성구 대학로 99, 충남대학교 공과대
학 1호관 258호(궁동) |
| (22) 출원일자 2023년06월09일
심사청구일자 2023년06월09일 | 정성근 |
| (62) 원출원 특허 10-2021-0029683 | 대전광역시 유성구 대학로 99, 충남대학교 공과대
학 1호관 258호(궁동) |
| 원출원일자 2021년03월05일
심사청구일자 2021년03월05일 | (74) 대리인
김원준 |

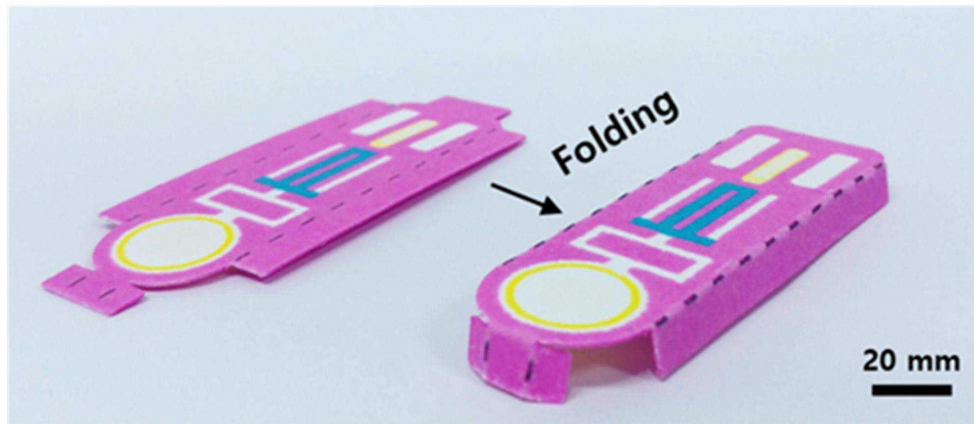
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 외곽 말단에 절첩부를 갖는 종이칩

(57) 요약

본 발명은 유체가 이동하는 채널을 갖는 종이칩에서 바닥면과의 접촉에 의한 유체의 흐름에 대한 간섭을 방지하기 위한 종이칩에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상기 종이칩은 외곽 말단에 접어서 다리로 사용할 수 있는 절첩부를 갖는 것을 특징으로 하는 종이칩에 관한 것이다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류

B01L 2200/0694 (2013.01)

B01L 2300/069 (2013.01)

B01L 2300/0816 (2013.01)

B01L 2300/126 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711108205
과제번호	2015K1A1A2033054
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	Endolysosomal 네트워크의 제어를 통한 고병원성 인플루엔자 진단 및 치료 원천 기술
기 여 율	1/3
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2015.10.01 ~ 2021.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	9991006746
과제번호	202011D10-01
부처명	다부처
과제관리(전문)기관명	(재단)범부처전주기의료기기연구개발사업단
연구사업명	범부처전주기의료기기연구개발사업(R&D)
연구과제명	(주관)병원군 진단 및 약제 내성 동시 검사용 현장 진단 플랫폼 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	충남대학교산학협력단
연구기간	2020.09.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711121382
과제번호	2020M3F6A1110246
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	미래국방혁신기술개발(R&D)
연구과제명	초소형 센서 현장적용을 위한 생물에어로졸 포집/농축 및 다중 전처리기술개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2020.09.21 ~ 2023.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

유체가 이동하는 채널을 갖는 종이칩에서,
상기 종이칩은 외곽 말단에 접어서 다리로 사용할 수 있는 절첩부를 갖는 것을 특징으로 하는 종이칩.

청구항 2

청구항 1에 있어서,
상기 종이칩은 한 장의 종이로 이루어진 종이칩에서 순차적인 반응이 가능하도록 특정 구간의 유속이 조절되는 유속 조절채널을 갖는 것을 특징으로 하는 종이칩.

청구항 3

청구항 2에 있어서,
상기 유속 조절채널에서 글루코스의 산화반응에 의해 유속이 가속되는 것을 특징으로 하는 종이칩.

청구항 4

청구항 2 또는 청구항 3에 있어서,
상기 유속 조절채널이 복수 구간 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 종이칩.

청구항 5

청구항 4에 있어서,
상기 유속 조절채널에서 산화되는 글루코스의 농도 차이에 의해 복수 구간의 유속 조절채널에서 유체의 가속 정도가 상이한 것을 특징으로 하는 종이칩.

청구항 6

청구항 3에 있어서,
상기 유속 조절채널에는 (a) 글루코스 또는 (b) 글루코스 산화효소가 흡착되어 있고,
상기 유속 조절채널의 전단에는 (a)의 경우 글루코스 산화효소, (b)의 경우 글루코스가 흡착되어 있는 것을 특징으로 하는 종이칩.

청구항 7

청구항 3에 있어서,
상기 유속 조절채널에는 (a) 글루코스 또는 (b) 글루코스 산화효소가 흡착되어 있고,
시료패드에 로딩되는 시료 내에 (a')의 경우 글루코스 산화효소, (b')의 경우 글루코스가 포함되어 있는 것을

특징으로 하는 종이칩.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유체가 이동하는 채널을 갖는 종이칩에서 바닥면과의 접촉에 의한 유체의 흐름에 대한 간섭을 방지하기 위한 종이칩에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 감염성 질환의 증가는 빠르고 정확한 질병의 진단을 요한다. 전문화된 실험실에서 복잡한 과정을 수행하지 않고도 시료 용액으로부터 직접적으로 바이오마커를 검출할 수 있는 방법들이 개발되어, 박테리아, 바이러스, 진균 또는 기생충 감염 질환의 진단에 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 아직까지도 대부분의 진단은 순차적인 분석 단계의 수행을 위한 전문가와 값비싼 분석 기기의 사용을 필요로 한다. 이와 더불어 고령화 사회의 진입에 따라 생산 가능 연령층의 상대적인 비율이 감소하고 질병 발생률이 높은 고연령층의 인구가 증가함에 따라 의료용 진단 비용이 심각한 문제로 대두되고 있다. 특히 의료보험 혜택이 제대로 갖추어지지 못한 개발도상국은 개개인의 질병 진단 비용 부담에 더하여 고가의 장비와 숙련된 전문가에 대한 접근이 제한되어 있어 어려움을 겪고 있다. 이러한 문제를 해소하기 위해서는 의료기관이나 가정에서 적은 비용으로 전문적인 인력이나 특수 장치가 없더라도 간단하게 질병을 진단할 수 있는 저가형 진단 장비가 필요하다.

[0003] ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay, 효소결합면역흡착검사)는 시료 중 타겟 물질을 검출하는 가장 널리 사용되는 분석법의 하나이다. ELISA 프로토콜은 수작업 또는 자동화된 로봇 시스템에 의해 수행하는 다중 피펫팅 프로토콜에서 시료의 인큐베이션, 라벨링, 세척, 신호 증폭과 같은 반복적인 실험 단계를 포함한다. 이러한 노동 집약적인 프로토콜을 최소화하기 위하여 빠르고 간단한 진단 형식으로 디스틱이나 측방유동테스트(LFTs, Lateral flow tests)가 대안으로 개발되고 있다. 이러한 방법들은 단순성, 긴밀성, 휴대성의 측면에서 이점이 있으나, 불가피한 기술적 문제인 다단계 생화학반응과 같은 자동화된 순차 분석은 구현되기 어렵다.

[0004] 최근 종이-기반 미세유체 시스템이 유망한 분석 및 진단 플랫폼으로 부상되고 있다. 선도적인 연구 그룹들은 종이 기재에 가용성 설탕 또는 고분자, 이동식 암(arm), 층의 미끄러짐, 전기삼투압 펌프, 적층 및 외부 활성 밸브 등을 사용하여 특정한 순서로 시료와 시약을 검출 영역으로 이동시키는 순차적인 유체 이동의 가능성을 보여주었다. 종이칩에 순차적인 유체 이동 기능을 결합시키면, 자동화된 다단계 방식으로 연속적인 생화학반응을 수행할 수 있다.

[0005] 상기 접근 방식이 종이칩에서 다단계 반응이 가능하게 하지만 여전히 몇가지 제한이 있다. 첫째, 분석에 간섭을 미칠 수 있다. 종이에 화학물질을 추가하면 종이 매트릭스의 다공성과 유체의 유속을 조절하는 투과성이 변한다. 따라서 시료 용액을 로딩하면, 화학물질이 종이 기재에서 녹거나, 영구적으로 매몰되어 유속을 조절할 수 있다. 그러나 설탕을 추가하면 포도당 관련 분석에 간섭을 초래하는 것처럼, 설탕이나 고분자, 계면활성제와 같은 화학물질의 추가는 측정되는 타겟 분석물의 형태를 제한할 수 있다. 둘째, 사용자 개입이 필요하다. 사용자에게 의해 작동되는 이동식 암이나 층의 미끄러짐은 유체 채널을 다른 채널과 연결시키는 것에 의해 복수의 시료와 시약을 동시에 이송할 수 있다. 그러나, 정밀한 분석 결과를 위해서는 수동 작동은 일반 사용자들이 아닌 전문화된 인력에 의해 수행되어야 한다. 셋째, 제조 공정이 복잡해진다. 전기적으로 작동되는 밸브는 유체 채널을 연결하거나 차단하는데 사용될 수 있다. 그러나 밸브를 활성화시키기 위해서는 제어기, 전압공급, 전원 등이 필요하다. 자동화된 작동은 수동으로 작동되는 구조에 비해서는 더 정밀한 조작이 가능하지만, 이러한 부품들은 복잡한 다단계 공정에 의해 적층되고 집적되어야 하므로 제조공정이 복잡하고, 그에 따라 가격이 상승하게 된다. 넷째, 외부 장비를 필요로 한다. 최근의 많은 μ PAD는 다단계 분석의 결과 시약의 색상 변화의 강도를 분석하는 외부 분석기기를 필요로 한다.

[0006] 이러한 문제를 해결하기 위해서는 분석을 방해할 수 있는 추가적인 화합물질이나 외부 장비를 사용하지 않고도 사용자의 개입 없이 순차적으로 유체를 이동시킬 수 있는 종이에서의 유속의 제어 방법을 개발하는 것이 핵심이다. 동시에 자동 순차 유체 이동에 의해 달성되는 다단계 분석을 수행하는 데 사용되는 종이 기반 형식이 간단하고 값싼 방법으로 제조될 수 있어야 하고, 분석 결과를 검출하는 데에도 별도의 장비를 필요로 하지 않아야 한다. 이러한 모든 중요한 요구를 동시에 충족시킬 수 있는 새로운 종이 기반 분석 형식을 만드는 것은 도전할 가치가 있다.

[0007] 본 발명자들은 등록특허 제10-1493051호에서 외부의 장비를 사용하지 않고도 디지털 분석에 의해 타겟 물질을

정량할 수 있는 3차원 종이 기반 미세유체 장치(3D- μ PAD, 3D microfluidic paper based analytical device)를 제안하였다. 상기 등록특허에서는 색이 파랗게 변한 막대의 수를 세는 것에 의해 타겟 물질의 농도를 간단하게 정량할 수 있다. 상기 3D- μ PAD는 한 장의 종이의 양면에 왁스를 패턴으로 인쇄하고 수집조간 열처리하는 것에 의해 간단히 제조할 수 있다.

[0008] 본 발명자들의 다른 특허인 등록특허 제10-1662802호에서는 왁스를 이용하여 채널의 높이를 제어하는 것에 의해 유속을 조절하는 방식을 제안하였다. 상기 특허에서 서로 다른 유동학 특성을 갖는 다른 색의 왁스를 동시에 인쇄하여 높이와 길이가 서로 다른 유로를 한꺼번에 형성할 수 있음을 보여주었으며, 이를 이용하여 자동화된 다단계 디지털 분석을 수행할 수 있는 3D- μ PAD를 제시한 바 있다.

[0009] 이러한 3D- μ PAD는 장비를 사용하지 않고 분석이 가능하며, 제조 시간과 물질의 사용을 감소시켜 제조 공정을 단순화하지만, 화학물질이나 외부 장비를 사용하지 않고도 유속을 조절하여 자동화된 순차 유체 이동을 조절하고, 다단계 반응을 수행할 수 있어 3D- μ PAD는 여전히 많은 관심을 받고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-1662802호
(특허문헌 0002) 등록특허 제10-1493051호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 한 장의 종이로 이루어진 종이칩에서 순차적인 반응이 가능하도록 특정 구간의 유속을 조절할 수 있는 새로운 유속 조절 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 유속 조절 방법이 적용된 유속 조절패널을 갖는 종이칩을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 사용자의 개입이나 별도의 장비 없이도 글루코스의 함량을 간단하게 정량할 수 있는 종이칩을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 진술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 유체가 이동하는 채널을 갖는 종이칩에서, 상기 종이칩은 외곽 말단에 접어서 다리로 사용할 수 있는 절첩부를 갖는 것을 특징으로 하는 종이칩에 관한 것이다.

발명의 효과

[0015] 이상과 같이 본 발명의 유속 조절방법에 의하면 효소반응에 의한 가속 현상을 이용하여 값비싼 원료를 사용하지 않고 간단한 방법에 의해 사용자의 개입이 없이 특정 구간에서 유체의 이동을 선택적으로 가속할 수 있으므로, 순차적인 반응이 가능한 종이칩의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

[0016] 또한 본 발명의 글루코스 함량 분석용 종이칩은 경제적인 대량제작이 가능하고 효소반응에 의한 가속 현상을 이용하여 외부의 검출 기기가 없어도 간단한 방법에 의해 전문적인 훈련없이도 시료 내 글루코스의 농도를 정량적으로 평가할 수 있어 저가형 현장 진단키트로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 일실시예에 의한 종이칩의 모식도.

도 2는 종이칩에서 글루코스 산화반응에 의해 유체의 유속이 가속됨을 보여주는 종이칩의 사진 및 그래프.

도 3은 글루코스 산화반응 주요 산물의 유속 차이를 보여주는 그래프.

도 4는 글루코스 산화반응의 신호증강을 위한 순차 반응식.

도 5는 본 발명의 다른 실시예에 의한 종이칩의 모식도.

도 6은 도 5의 종이칩에 의한 글루코스 정량 결과를 보여주는 사진 및 그래프.

도 7은 폴더블 종이칩의 일례를 보여주는 사진.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.
- [0019] 본 발명은, 유체가 이동하는 채널을 갖는 종이칩에서, 상기 종이칩은 외곽 말단에 접어서 다리로 사용할 수 있는 절첩부를 갖는 것을 특징으로 하는 종이칩에 관한 것이다. 본 발명에서, 상기 종이칩은 다음과 같은 특징을 가질 수 있다.
- [0020] 본 발명은 종이칩에서 글루코스 산화반응에 의한 유체 조성의 변화가 채널 내 유체의 유속을 증가시키는 것을 확인하고, 이를 이용하여 종이칩에서 국부 유속을 조절하고자 하는 것이다. 종이칩은 원료의 수급이 용이하며 롤투를 방식의 대량생산이 가능하고, 무엇보다 저가의 원료를 사용하기 때문에 저가형 진단키트로서 가장 유용한 모델이다. 종이칩을 구성하는 채널의 특정 구간에서 유속을 제어할 수 있으면 종이칩 내에서 복잡한 순차반응이 가능해진다. 글루코스는 물에서 산화반응에 의해 글루코노락톤과 글루코닉산을 생성한다. 글루코스와 글루코노락톤 및 글루코닉산을 각각 동일한 농도로 용해시켜 동일한 형상의 종이칩에서 유속을 측정한 결과, 물과 글루코스 용액의 유속은 거의 동일하였으나, 글루코스 용액에 비해 글루코노락톤 용액과 글루코닉산 용액은 유속이 크게 증가하였다. 이러한 유속의 변화는 글루코노락톤 또는 글루코닉산에 의해 종이칩을 구성하는 셀룰로오스의 기공이 증가하기 때문으로 예상된다.
- [0021] 종이칩에서의 글루코스 산화반응은 예를 들면, 글루코스 산화효소에 의해 매개될 수 있으며, 유속의 증가는 글루코스의 농도와 비례하였다.
- [0022] 따라서, 특정 채널에서의 유속의 증가 정도는 글루코스의 농도에 의해 조절하는 것이 가능하다.
- [0023] 본 발명은 또한 상기 국부 유속 조절 방법을 적용하여 유속이 자동 조절되어 타 채널과 다른 유속을 갖는 유속 조절채널을 갖는 종이칩에 있어서, 상기 유속 조절채널에서 글루코스의 산화반응에 의해 유속이 가속되는 것을 특징으로 하는 종이칩에 관한 것이다. 본 발명의 종이칩에는 유속 조절채널이 복수 구간에 형성될 수 있으며, 상기 유속 조절채널에서 산화되는 글루코스의 농도 차이에 의해 복수 구간의 유속 조절채널에서 유체의 가속 정도를 달리할 수 있다. "복수 구간"이라 함은 두 개 이상의 구간을 의미하는 것으로 그 수를 한정하는 것은 의미가 없을 것이나, 하나의 경로에 복수의 유속 조절채널이 존재한다면 해당 경로의 유속은 당연히 상호 영향을 미치기 때문에 글루코스의 농도 차이로 조절할 수 없을 것이다. 따라서 글루코스의 농도차이로 복수 구간의 유속 조절채널의 가속 정도를 차별화하기 위해서는 해당 구간 사이에 둘 이상의 경로가 존재하여야 함은 당연하다.
- [0024] 상기 종이칩은 시료의 분석 시, 종이칩이 바닥에 놓여 있는 경우에는 바닥면과의 접촉에 의해 유체의 흐름이 간섭을 받을 수 있다. 따라서 본 발명에서는, 간섭을 방지하기 위하여 종이칩은 외곽 말단에 접어서 다리로 사용할 수 있는 절첩부를 갖는다(도 7 참조). 절첩부는 외곽 전체에 형성되어 있을 수도 있고 일부면에 형성되어도 무방하나 종이칩에서의 유체의 측방이동에 영향을 끼치지 않도록 하여야 함은 당연하다.
- [0025] 상기 유속 조절채널에서 글루코스의 산화반응이 일어나도록 하기 위해 상기 유속 조절채널에는 (a) 글루코스 또는 (b) 글루코스 산화효소가 흡착되어 있고, 상기 유속 조절채널의 전단에는 (a)의 경우 글루코스 산화효소, (b)의 경우 글루코스가 흡착된 구조를 가질 수 있다. (a)의 구성을 갖는 종이칩에 시료가 로딩되어 유체가 이동됨에 따라 상기 유속 조절채널의 전단에 흡착된 글루코스 산화효소가 유체와 함께 이동하고, 유속 조절채널에 도달하면 흡착되어 있는 글루코스의 산화반응을 유도하여 유속이 가속되게 된다. (b)의 경우에는 유체의 이동에 따라 전단에 흡착된 글루코스가 유체와 함께 이동하면서, 유속 조절채널에 도달하면 흡착되어 있는 글루코스 산화효소에 의해 산화반응이 일어난다. 본 명세서에서 유속 조절채널의 "전단"이라 함은 유속 조절채널의 바로 앞일 수도 있으나, 어느 정도 거리를 두고 위치하여도 무관하다. 앞서 서술한 바와 같이 전단에 흡착된 물질이 유체와 함께 이동하여 유속 조절채널을 통과할 수 있는 위치면 충분하다.

- [0026] 상기와 같은 본 발명의 종이칩은 종이칩에 흡착되어 있는 글루코스 또는 글루코스 산화효소에 의해 영향을 받지 않는 시료의 분석에 유용하게 사용될 수 있다. 유체의 가속은 종이칩에서 다양하게 응용될 수 있는데, 예를 들면 단순히 측방유동에 의한 종이칩에서의 분석 시간을 단축하는 데 사용할 수 있으며, 혹은 서로 다른 경로의 채널을 다른 유속으로 흐르게 하는 것에 의해 종이칩에서 순차반응을 진행하는데 사용될 수도 있다.
- [0027] 만일 (a') 글루코스 산화효소 또는 (b') 글루코스가 포함된 시료를 대상으로 분석한다면, 종이칩의 상기 유속 조절채널에 (a')의 경우 글루코스, (b')의 경우 글루코스 산화효소만을 흡착시키는 것에 의해 유체의 가속 효과를 얻을 수 있다.
- [0028] 특히 본 발명의 종이칩은 글루코스 또는 글루코스 산화효소의 분석에 사용될 수 있다. 유체의 이동 속도는 소정 시간에 이동한 거리와 비례하기 때문에, 시료내에 글루코스 또는 글루코스 산화효소의 존재 여부를 정성적으로 분석하는 데 사용할 수 있다. 더 나아가 유체의 가속정도는 글루코스의 농도에 의존하기 때문에 시료 로딩 후 소정 시간까지 이동한 유체의 거리를 측정하는 것에 의해 정량적인 분석도 가능하다.
- [0029] 구체적으로 본 발명은 시료가 로딩되는 시료패드; 시료패드와 연결되어 있으며, 글루코스 산화효소가 흡착되어 있는 반응채널; 반응채널을 통과한 유체가 검출되는 검출채널;을 포함하며, 시료 로딩 후 소정 시간동안 이동한 유체의 이동거리에 의해 시료 내 글루코스 함량을 분석하는 것을 특징으로 하는 글루코스 함량 분석용 종이칩을 제공한다. 상기에서는 반응채널에서 유래된 유속의 변화가 충분히 반영되도록 상기 검출채널은 채널의 말단부에서 유체의 이동을 검출하도록 할 수 있으며, 검출채널을 통과한 유체가 흡수되는 흡수패드를 추가의 구성요소로 포함할 수도 있다. 본 발명의 종이칩에서는 시료 내에 글루코스의 함량이 증가할수록 유체의 가속 정도가 증가하므로 동일한 시간 동안 이동한 유체의 이동거리는 시료 내 글루코스의 함량을 반영한다. 따라서 이동 거리에 의해 시료 내 글루코스 함량을 측정할 수 있다. 상기 구성에 의하면 사용자가 소정량의 시료를 시료패드에 로딩한 후 일체의 다른 개입없이 소정 시간 후 유체의 위치를 확인하는 것만으로도 시료 내 글루코스의 양을 계산할 수 있다.
- [0030] 글루코스 양의 확인을 위하여 종이칩의 상기 검출채널에는 유체의 검출위치 측정을 위한 마커가 표시되어 있는 것이 바람직하다. 상기 마커는 예를 들면 특정 간격을 표시하는 눈금이거나, 도 2에 도시된 것과 같은 디지털 닷의 형태일 수도 있다. 또한 상기 마커는 균등 간격일 수도, 혹은 농도를 고려하여 간격이 점차 좁아지거나 넓어지는 형태일 수도 있다. 그 형태와 관계없이 유체의 최종 검출위치의 마커로 확인할 수 있어 별도의 자와 같은 측정도구가 없어도 유체의 이동거리를 수치로 환산할 수 있다.
- [0031] 더욱 편리하게는 상기 종이칩에는 검출위치별 글루코스 농도가 표시되어 있는 것이 바람직하다. 상기 구성에 의해 사용하는 마커를 통하여 확인된 검출위치로부터 특정한 수식에 의한 계산을 하지 않고도 직관적으로 시료 중 글루코스 농도를 도출할 수 있다.
- [0032] 검출영역에서 유체의 식별은 종이칩의 검출영역이 젖은 부분의 경계를 확인하는 것에 의해 이루어질 수 있다. 식별력을 높이기 위해서는 유체의 식별이 용이하도록 유체가 표시되는 것이 바람직하다. 유체의 표시는 간단하게는 예를 들면, 시료 용액에 색상을 나타내는 잉크를 첨가하거나, 혹은 등록특허 10-1662802의 도 4와 같이 종이칩 상의 특정 지점에 잉크를 흡착시켜 검출영역에 도달하는 유체가 색상을 나타내도록 할 수 있다. 혹은 글루코스 산화반응에 의해 생성되는 과산화수소를 이용한 TMB의 색상 변화를 이용할 수 있다. 이를 위하여 본 발명의 종이칩은 상기 반응채널과 검출채널의 사이에, 반응채널에서 분기된 후 검출채널에서 합류하는 제2반응채널과 이동채널을 추가로 포함하고, 상기 제2반응채널에는 금이온이 흡착되어 있고, 상기 검출채널에는 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)가 흡착되어 있는 것을 특징으로 한다. 상기 구성에 의해 도 4에 도시된 바와 같이 글루코스 산화반응(제1반응), 금나노이온 생성반응(제2반응) 및 TMB 산화반응(제3반응)이 순차적으로 진행되어 무색의 TMB가 노란색의 산화 TMB를 생성하므로 유체의 색상이 노란색으로 변하여 이동거리를 보다 정확하게 간단하게 확인할 수 있다.
- [0033] 상기 제2반응채널은 금나노이온 생성반응에 충분한 시간이 주어지도록 상기 이동유로에 비해 상대적으로 지연유로로 구성될 수 있다. 이때 지연유로는 종래 기술의 지연유로 형성방법을 사용하여 구성될 수 있다. 예를 들면 제2반응채널의 길이 또는 넓이를 이동유로와 다르게 하는 것에 의해 지연유로를 구성할 수도 있으며, 실시예와 같이 왁스를 사용하여 높이를 조절하는 것에 의해 지연유로를 구성할 수도 있다.
- [0034] [실시예]
- [0035] 실시예 1 : 종이칩에서 글루코스 산화효소에 의한 유속의 변화 평가

- [0036] 종이칩의 채널에 흡착된 글루코스 산화효소(GOx, Glucose Oxidase)가 글루코스 용액의 유속을 변화시킬 수 있는지 확인하였다.
- [0037] 도 1의 (a)에 도시된 바와 같이 종이칩의 앞면과 뒷면을 디자인하고, 디자인된 색상이 인쇄되도록 왁스 프린트로 양면 인쇄하였다. 양면 인쇄 시 붉은색 디자인 면이 대칭되도록 하였으며, 이후 140℃에서 0.52초간 열처리하여 종이에 왁스를 침투시켜 종이칩을 제조하였다.
- [0038] 도 1의 (b)는 상기 방법에 의해 제조된 종이칩의 유로의 3차원 구조를 보여준다. 도 1의 (b)에서 확인할 수 있듯이, 종이칩은 시료패드, 시료패드와 연결되어 시료 중 글루코스와 채널에 흡착된 GOx의 반응이 일어나는 반응채널, 반응채널로부터 분기되어 유체가 이동되는 이동채널, 반응채널로부터 이동채널과 분기되어 유체가 지연 이동되는 지연채널, 이동채널과 지연채널을 통과한 유체가 합류되어 검출되는 검출채널 및 검출채널을 통과한 유체를 흡수하는 흡수패드로 이루어진다. 검출채널은 유속의 차이를 단순 계수에 의해 디지털 분석이 가능하도록 디자인하였으며, 반응채널에는 1 mg/mL의 글루코스 산화효소(Sigma-Aldrich) 수용액 10 μ l를 미리 흡착시키고 상온에서 건조시켰다.
- [0039] 종이칩을 CCD 카메라로 촬영하면서 시료패드에 0~5 mg/mL 농도의 글루코스 용액 200 μ l를 로딩한 후 유체의 이동을 관측하였다. 도 2의 (a)는 시료 로딩 후 특정 시간의 CCD 측정 결과의 이미지 캡처 사진이다. 또한 관측 결과로부터 반응채널, 이동채널, 지연채널을 통과한 시간을 도 1의 (b)에 표시된 지점에 도달한 시간 t_1 , t_2 , t_3 로 각각 측정하였으며, 검출채널에 도달한 시간은 t_4 로 측정하여 도 2의 (b)와 (c)에 도시하였다.
- [0040] 도 2로부터 글루코스의 농도가 증가할수록 유체의 이동이 빨라지고, 그에 따라 특정 지점에 도달하는 시간이 단축되는 것을 확인할 수 있다. 도 2의 (a)에서 이미지 상에 표시된 검은 선은 유체의 선단 지점을 표시한다. 19.5분의 캡처이미지에서 검출영역을 확대한 (a)의 오른쪽 도면은 용액 내 글루코스 농도에 따라 유체가 검출영역에 도달한 위치가 다르며, 이를 유체로 젖은 디지털닷의 개수로 간단히 계수할 수 있음을 보여준다. 즉, 용액 내 글루코스 농도가 0에서 5.0 mg/mL로 증가함에 따라 디지털 분석 결과는 0에서 4로 증가하여, 용액 내 글루코스 농도를 나안(裸眼)으로 간단히 분석할 수 있다. 구체적으로 글루코스 농도가 증가할수록 반응채널을 통과하는데 소요되는 시간 t_1 은 점차 감소하였다. t_1 이 증가함에 따라 t_2 , t_3 및 t_4 역시 글루코스 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 글루코스 농도가 0일 때와 5 mg/mL의 t_1 의 차이는 1분이 되지 않았으나, t_2 와 t_3 는 약 5분, t_4 는 10분 이상의 차이를 나타내어 점차 그 격차가 증가하였다. 이는 단순히 반응유로에 흡착된 GOx와 시료 중 글루코스의 상호작용에 의해 유속이 변화하는 것이 아니라, 시료 내 조성의 변화가 유속의 변화를 초래하는 것임을 시사한다.
- [0041] **실시예 2 : 유속 변화의 원인 분석**
- [0042] 글루코스는 글루코스 산화효소에 의해 산화되어 당량의 과산화수소와 글루코노락톤을 생성한다. 생성된 글루코노락톤은 물에서 부분적으로 가수분해되어 글루코닉산과 평형상태로 존재한다.
- [0043] 글루코스를 포함한 용액에서 글루코스 산화효소와의 반응에 의한 가속의 주된 원인을 확인하기 위하여 물, 56 μ M 글루코스, 56 μ M 글루코노락톤 및 56 μ M 글루코닉산 용액의 점도를 각각 점도계(Brookfield DV-11+Pro, MA, USA)로 측정하였다. 23℃, 30% 상대습도에서 각 용액의 평균 점도는 0.8 ± 0.2 cP로 거의 동일하였다. 따라서 글루코스 산화 반응동안에는 유의한 점도의 변화가 없음을 확인하였다.
- [0044] 이에, 반응채널을 갖지 않는(글루코스 산화효소를 흡착시키지 않은) 종이칩을 사용하여 상기 각 용액의 로딩 후 검출채널에 도달하는 시간으로 유속을 측정하였다. 도 3은 그 결과를 보여주는 결과로, 글루코닉산 용액이 9분 내에 도달하여 가장 유속이 빨랐으며, 글루코노락톤 용액도 약 9.2분 이내에 도달하였다. 반면 물과 글루코스 용액은 점도는 유사하였음에도 불구하고 각각 10.6분과 10.7분에 도달하여 글루코스 산화반응 후 조성의 변화에 따라 유속의 차이가 발생함을 나타내었다.
- [0045] 이러한 유속의 차이는 종이를 구성하는 셀룰로오스가 글루코닉산 유래의 H^+ 이온에 의해 분해되어, 종이 채널의 공극 직경을 증가하는 것에 기인하는 것으로 사료된다.
- [0046] **실시예 3 : 신호 증강 글루코스 분석 종이칩**
- [0047] 실시예 1과 같이 검출을 위한 별도의 신호 증강이 없더라도 글루코스의 농도를 별도의 장비없이 측정할 수 있으나, 좀 더 선명한 검출이 가능하도록 신호의 증강을 필요로 할 수 있다. 실시예에 기재한 바와 같이 글루코스

산화효소는 글루코스와 반응하여 당량의 과산화수소를 생성한다. 도 4의 순차적인 반응을 이용하면 생성된 과산화수소에 의해 신호를 증폭시킬 수 있다. 구체적으로, 글루코스와 글루코스의 반응에 의해 당량의 과산화수소가 생성되면(제1반응), 생성된 과산화수소의 일부를 이용하여 금이온을 금나노입자(AuNPs)로 환원시킨다(제2반응). 나머지 과산화수소는 환원된 금나노입자의 촉매(nanozyme) 작용에 의해 무색의 TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)를 노란색의 산화 TMB로 산화시킨다(제3반응). 실시예 1에서 확인한 바와 같이 본 종이 칩에서 시료 중 글루코스의 농도가 진해질수록 검출채널에 더 빨리 도달하므로, 시료 로딩으로부터 소정의 시간이 경과 후 관찰하였을 때 검출채널에서 TMB의 산화로 인해 색상이 변한 디지털값의 수는 시료 중 글루코스의 양을 반영한다.

[0048] 다만, 제3반응을 위해서는 제2반응채널에서 금나노입자의 생성에 충분한 반응 시간이 주어져야 하며, 제2반응에 의한 금나노입자가 공급되기 전에 제1반응에 의한 과산화수소가 제3반응채널에 공급되어야 한다.

[0049] 상기와 같은 세 가지 반응이 순차적으로 진행될 수 있도록 4색 왁스를 사용하여 도 5의 (a)에 도시된 바와 같이 디자인된 종이칩의 앞면과 뒷면을 양면 인쇄하였다. 양면 인쇄 시 붉은색 디자인 면이 대칭되도록 하였으며, 이후 140℃에서 0.52초간 열처리하여 종이에 왁스를 침투시켜 종이칩을 제조하였다.

[0050] 도 5의 (b)는 상기 방법에 의해 제조된 종이칩의 유로의 3차원 구조를 보여주는 것으로, 종이칩은 시료패드, 시료패드와 연결되어 시료 중 글루코스와 채널에 흡착된 GOx의 반응이 일어나는 제1반응채널, 반응채널로부터 분기되어 유체가 지연 이동되는 제2반응채널(지연채널), 반응채널로부터 제2반응채널과 분기되어 유체가 이동하는 이동채널, 이동채널과 제2반응채널을 통과한 유체가 합류되는 제3반응채널 및 제3반응채널을 통과한 유체를 흡수하는 흡수패드로 이루어진다. 본 종이칩에서 제3반응채널은 3번째의 순차적인 반응이 일어나는 동시에 검출 결과를 나타내기 때문에 검출채널로서 역할한다. 즉, 도 1의 종이칩에서 반응채널, 지연채널 및 검출채널을 본 종이칩에서는 순차적인 반응을 나타내도록 제1반응채널, 제2반응채널 및 제3반응채널로 각각 칭하였으며, 디자인 형상이 다소 상이하기는 하지만 종이칩을 구성하는 기본적인 채널은 도 1의 종이칩과 동일하다. 종이칩에서의 순차적인 반응을 위하여, 제1반응채널에는 1 mg/mL의 글루코스 산화효소 수용액 8 μ l를, 제2반응채널에는 5 mg/mL의 HAuCl₄ 수용액 14 μ l를, 제3반응채널의 각 디지털값에는 99% TMB 용액 1.5 μ l를 가하고 상온에서 건조시켰다.

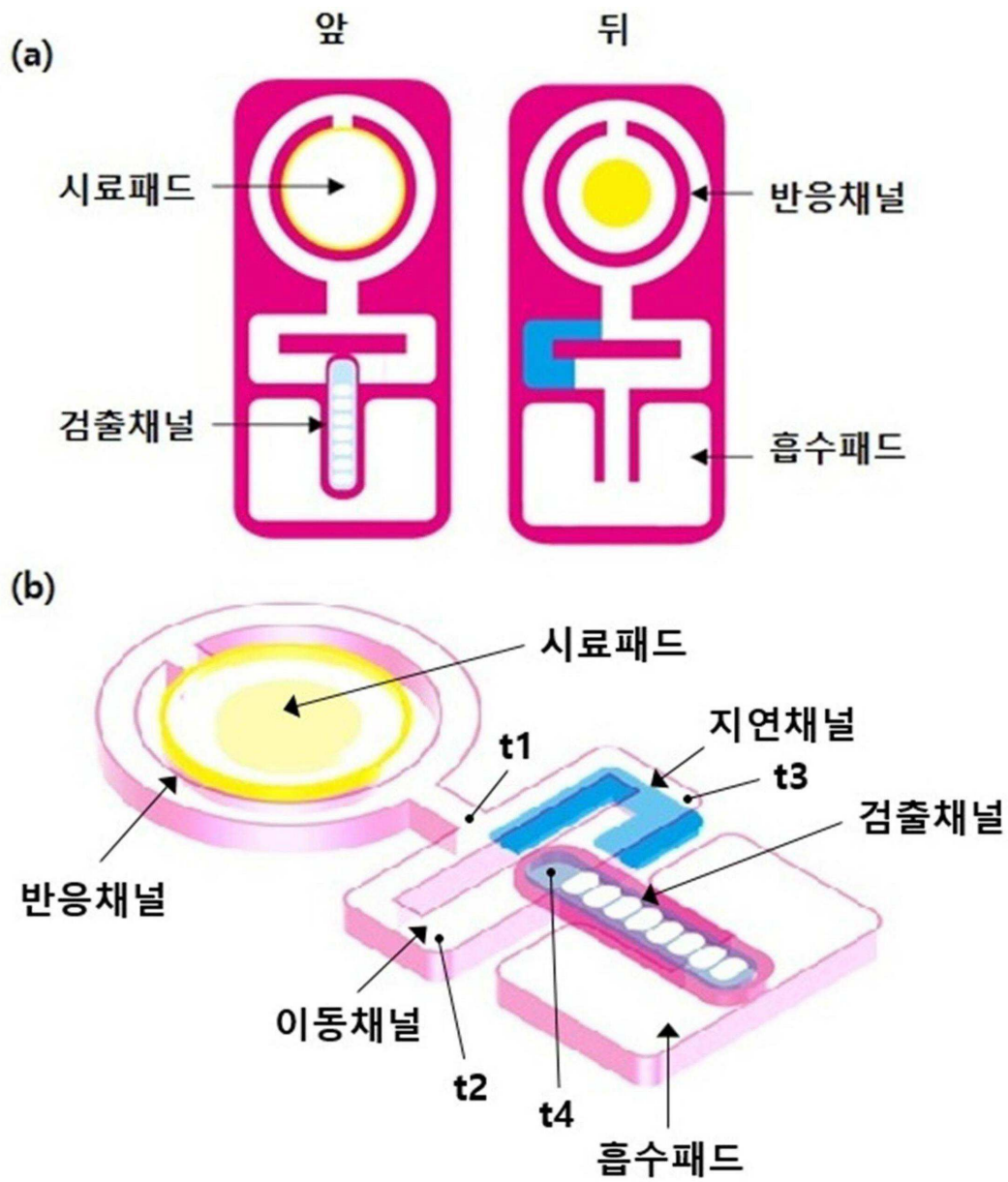
[0051] 시료패드에 글루코스를 포함하는 시료를 가하면, 종이칩의 채널을 따라 차례로 이동하면서 도 4에 기재된 순차적인 반응을 진행하게 된다. 제2반응채널에서의 금나노입자의 생성은 제3반응채널을 EDX가 장착된 SEM 이미지로 분석하여 확인하였다(데이터 미도시). 제2반응채널의 산물인 AuNPs와 제1반응채널의 산물인 과산화수소가 각각 제2반응채널과 이동채널을 따라 검출채널인 제3반응채널로 제 시간에 공급되면, 과산화수소의 존재하에서 AuNPs는 나노자임으로 작용하여 무색의 TMB를 노란색의 산화TMB로 산화시킨다. 따라서 시료 로딩 후 특정 시검출채널의 디지털값에서 노랗게 변한 수는 시료 내 글루코스의 양에 비례할 것이다.

[0052] 이를 확인하기 위하여 도 5의 종이칩 시료패드에 0~10 mg/mL 농도의 글루코스 180 μ l를 로딩하고 검출영역의 노랗게 변한 점을 계수하였다. 도 6은 로딩 20분 후 종이칩의 사진 및 계수 결과 그래프로 실제로 노란 점의 개수가 글루코스 농도에 비례하며, 재현성이 우수함을 보여준다.

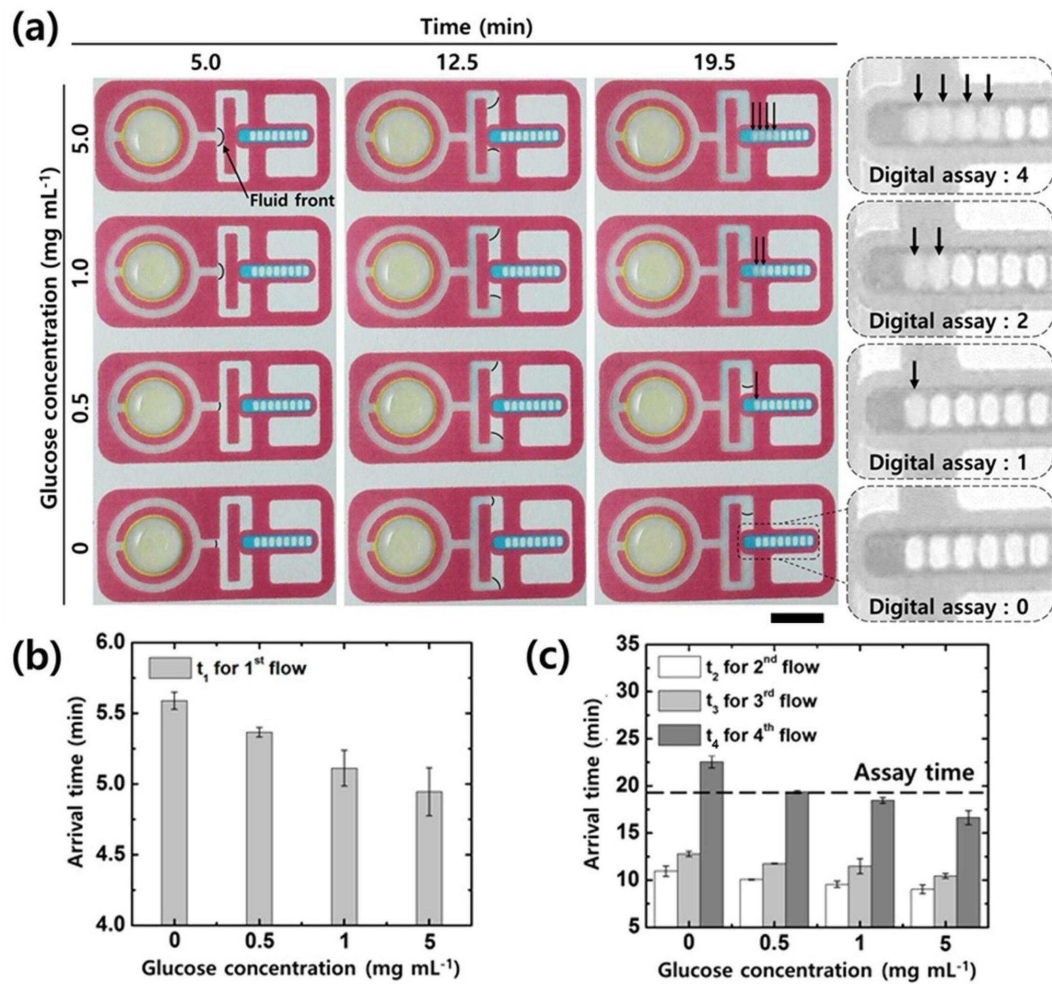
[0053] 상기 실험에서 종이칩들은 바닥면의 접촉에 의한 간섭을 배제하기 위하여 홀더에 위치시킨 상태로 측정하거나, 혹은 도 7과 같은 폴더블 종이칩으로 구성하여 사용하였다.

도면

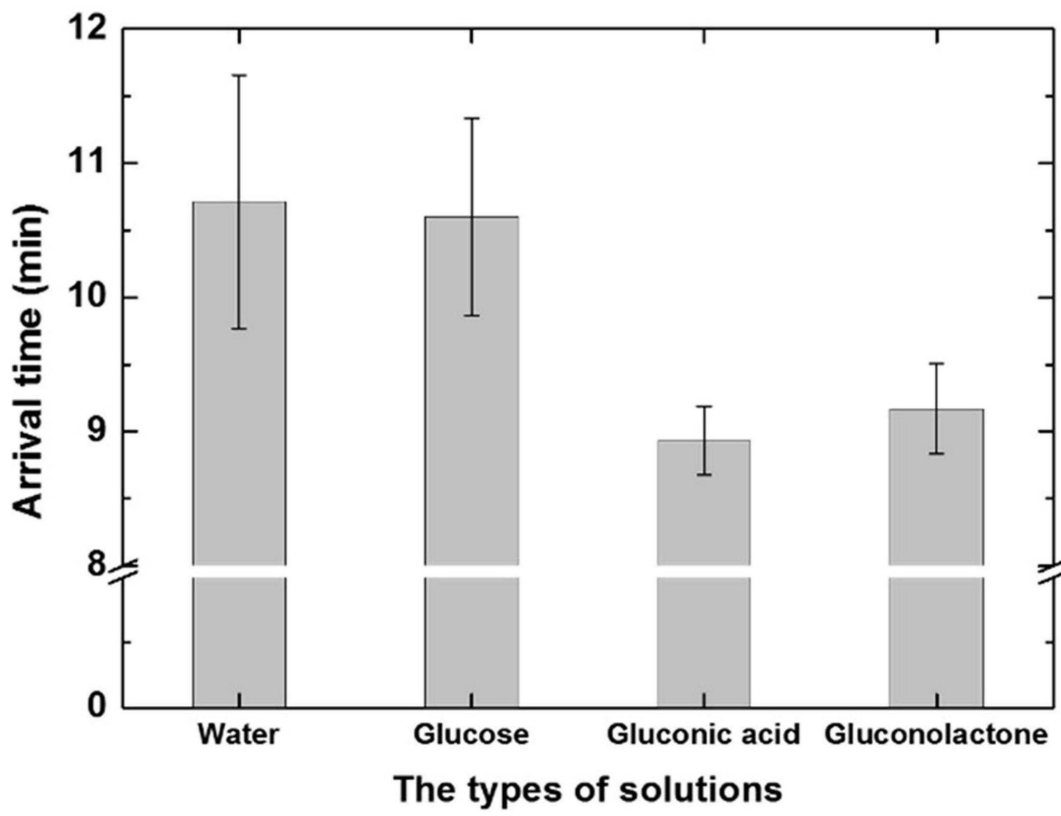
도면1



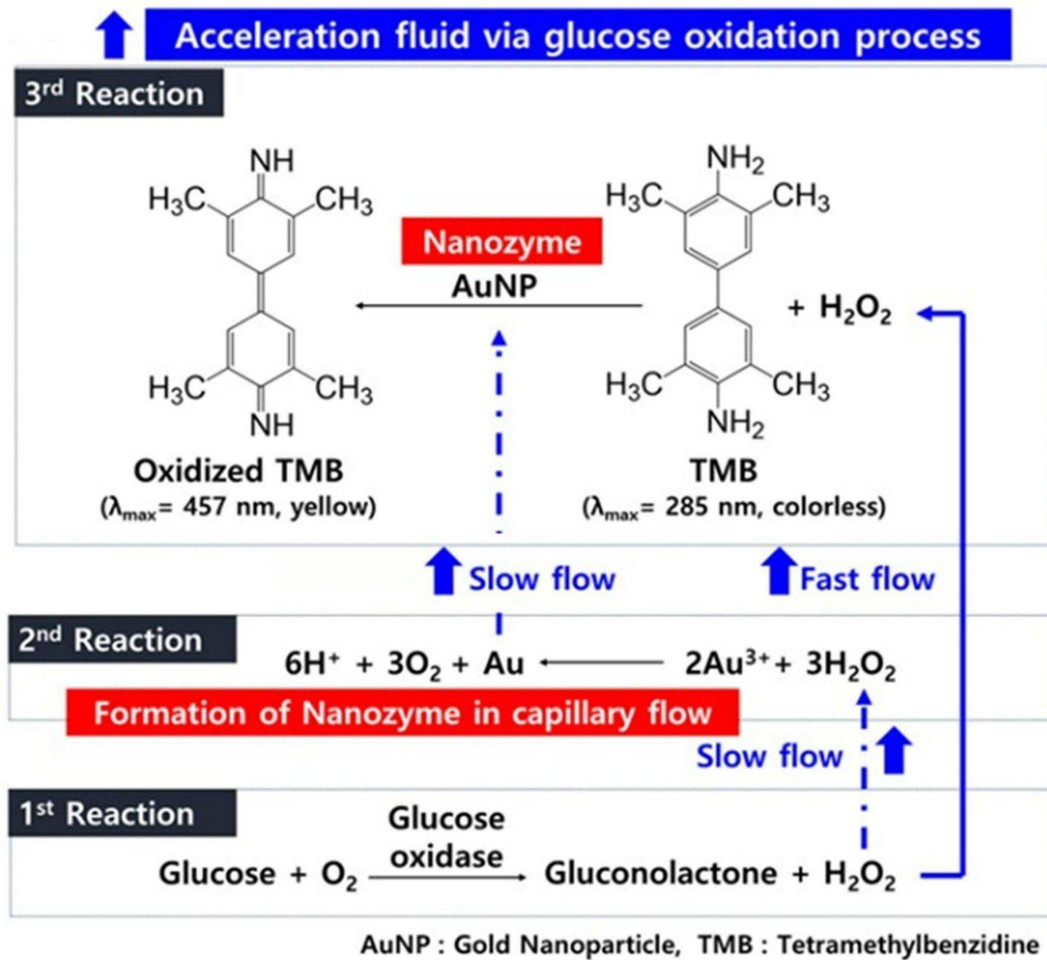
도면2



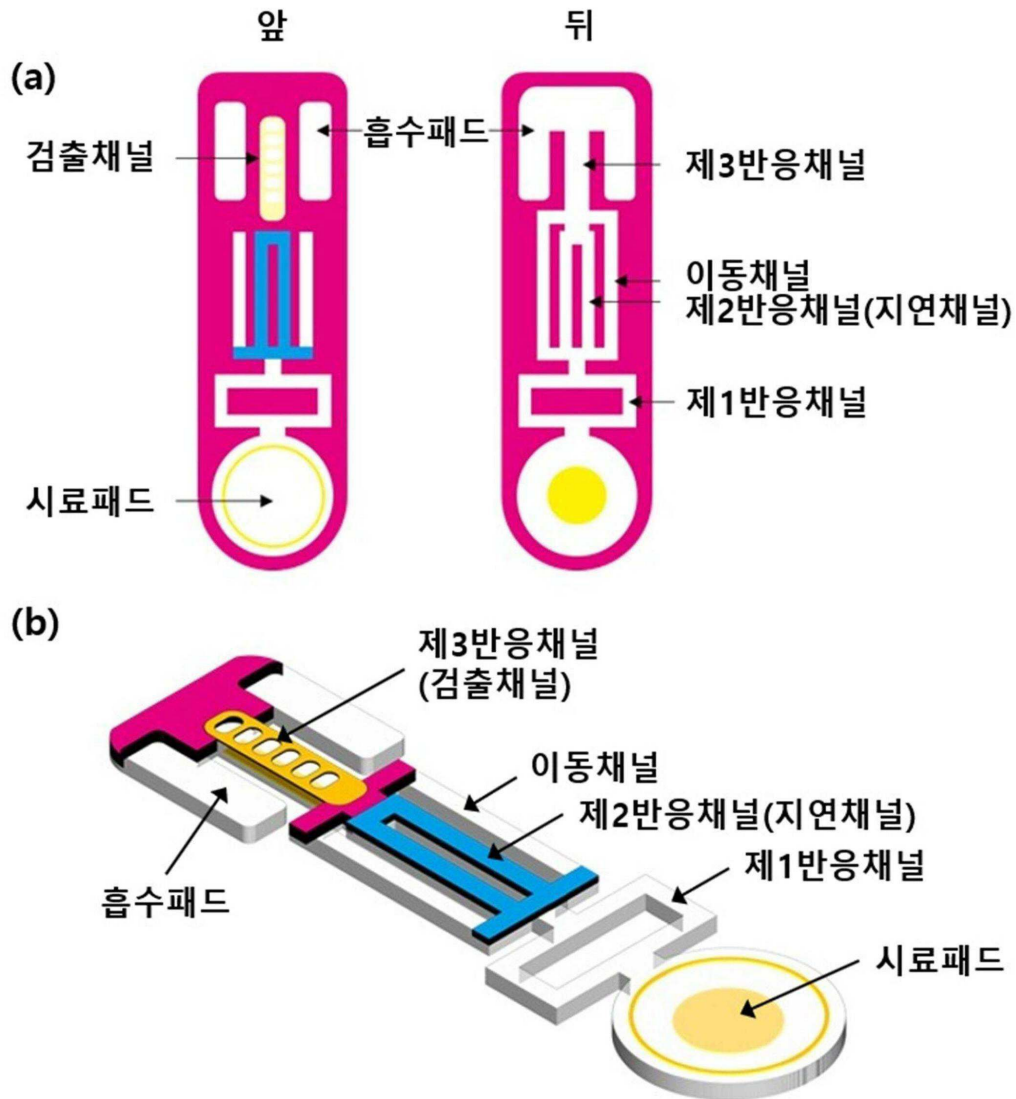
도면3



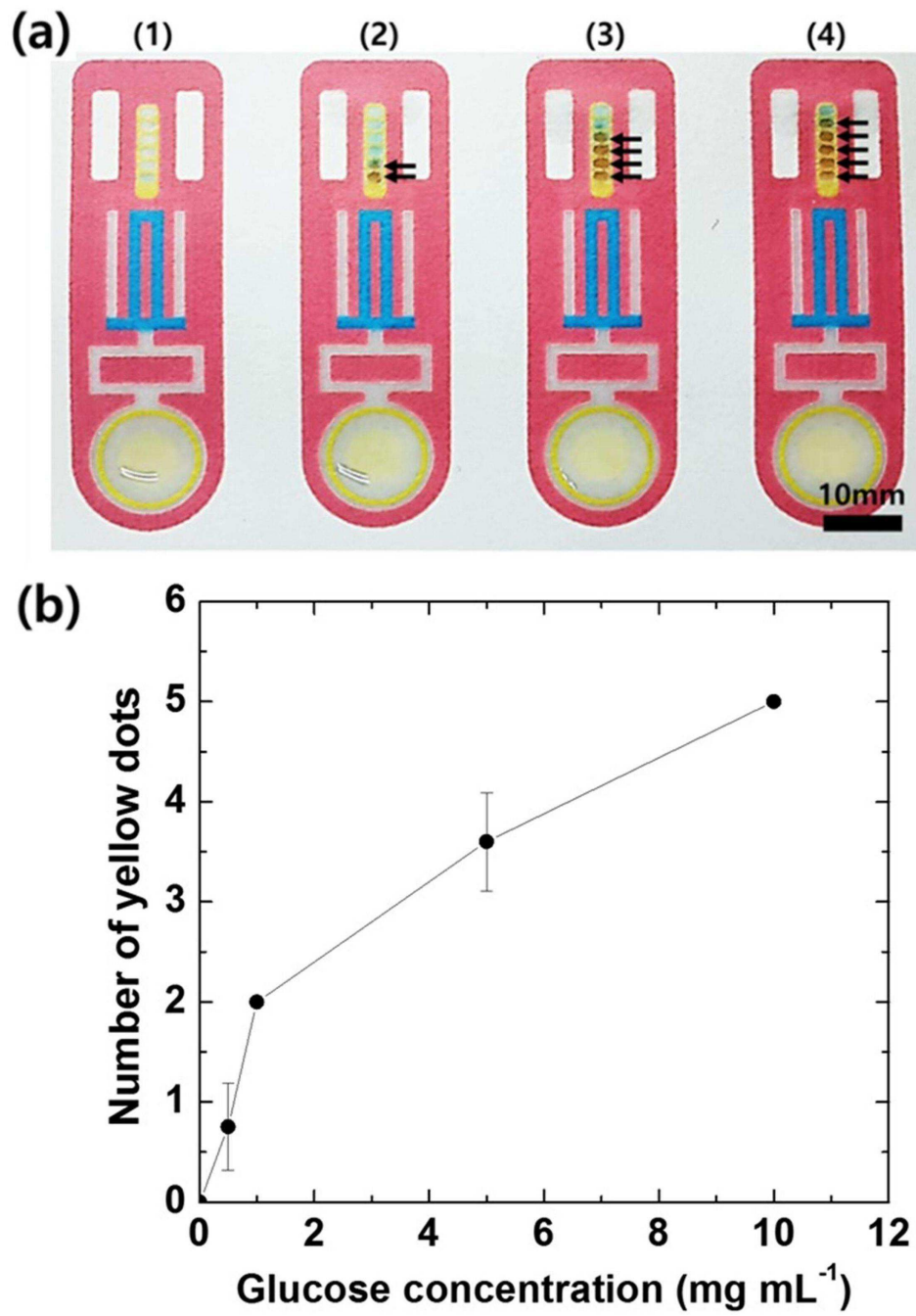
도면4



도면5



도면6



도면7

