



(51) 국제특허분류:

G01N 35/08 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/007096

(22) 국제출원일:

2017년 7월 4일 (04.07.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0084123 2016년 7월 4일 (04.07.2016) KR

(71) 출원인: 부산대학교 산학협력단 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 46241 부산시 금정구 부산대학로63번길 2 (강전동, 부산대학교), Busan (KR).

(72) 발명자: 심윤보 (SHIM, Yoon-Bo); 47515 부산시 연제구 중앙대로 1188, 110동 806호, Busan (KR).

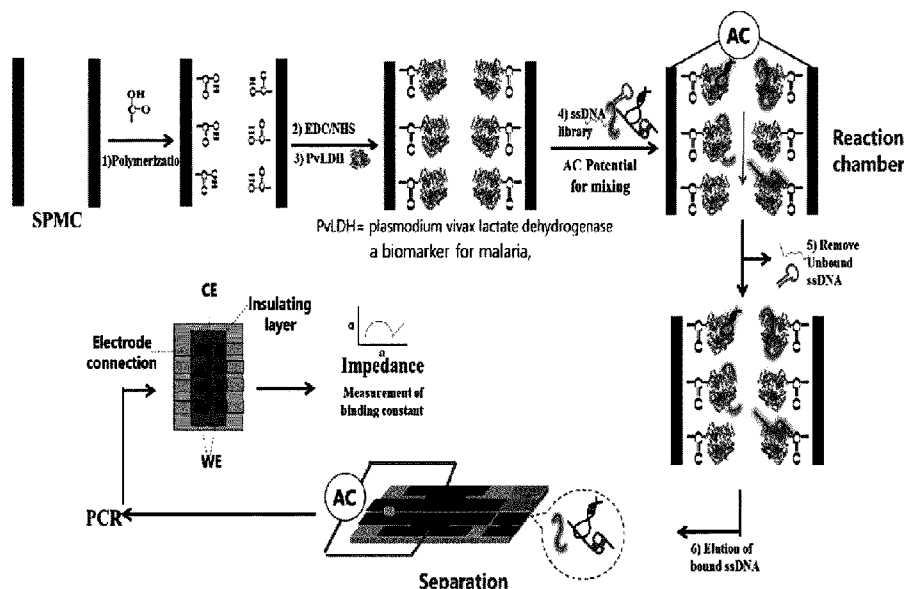
(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로151 이노플렉스1차 601호, Seoul (KR).

(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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: METHOD FOR SELECTING APTAMERS BY USING ALTERNATING CURRENT POTENTIAL MODULATED MICROFLUIDIC CHANNEL

(54) 발명의 명칭: 교류 전위 변조 마이크로플루이드 채널을 이용한 aptamer 선별 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for selecting aptamers by using an alternating current potential modulated microfluidic channel, wherein the method stably fixes, through covalent binding, a target material to be selected to inner walls of a carbon-based microfluidic channel modified with an electroconductive polymer membrane having functional groups, thereby enabling a conventional SELEX method to be dramatically simplified, and changes the fluid flow of a random DNA library into a turbulent flow form having specific waves by applying alternating current to the channel so as to improve the reactivity of the target material and aptamers and enable the aptamers to be selected very quickly and simply.

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 교류 전위 변조 마이크로플루이드 채널을 이용한 압타머 선별 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 작용기를 가지는 전기전도성 고분자 막으로 개질된 탄소 기반의 마이크로플루이드 채널 내벽에 공유결합을 통해 안정하게 선별하고자 하는 표적물질을 고정함으로써 기존의 셀렉스 과정을 획기적으로 간소화할 수 있으며, 또한 채널에 교류 전위를 가함으로써 랜덤 DNA 라이브러리의 유체 흐름이 특정 파동을 가지는 난류 형태로 이동하면서 표적물질과 압타머의 반응성을 향상시켜 매우 빠르고 간편하게 압타머를 선별할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머 선별 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머 선별 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널 내벽을 기능성 작용기를 가지는 전기전도성 고분자로 개질하여 표적물질을 화학적으로 안정하게 고정시키고, 채널 내에 랜덤 DNA 라이브러리를 주입한 후 교류 전압을 인가하여 표적물질과 랜덤 DNA 라이브러리 간의 반응을 유도시켜 표적물질과 선택적으로 높은 친화력을 가지는 압타머를 빠른 시간 내에 효율적으로 선별할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 압타머는 단백질, 지질, 유기 무기화합물과 같은 표적물질에 특이적으로 결합할 수 있는 단일가닥의 DNA나 RNA를 말한다. 이는 고유한 2차 구조를 형성하여 표적 분자에 결합하며, 셀렉스(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment; 'SELEX') 방법을 통해 압타머를 발굴한다.
- [3] SELEX는 무작위로 합성된 핵산 라이브러리(library)로부터 표적물질과 친화력을 가지는 소수의 개체를 시험관 내(in vitro)에서 선별하는 과정을 포함하며, SELEX는 공통적으로 랜덤 라이브러리 합성, 결합 및 분리과정, 그리고 DNA 증폭과정으로 구성된다.
- [4] 오늘날 대표적인 SELEX 방법은 1990년대에 처음으로 개발된 친화크로마토그래피 또는 셀룰로오스필터법으로 최근까지도 광범위하게 사용되고 있다.
- [5] 구체적으로, 친화크로마토그래피 방법은 표적물질이 고정된 칼럼에 랜덤 DNA(또는 RNA) 라이브러리를 흘려주어 표적물질에 특이적으로 결합하는 특정 DNA를 선별하는 것이며, 또한 나이트로셀룰로오스 필터(nitrocellulose membrane)법은 표적물질과 결합한 DNA 복합체만을 필터를 사용하여 걸러낸 후 DNA를 분리하여 얻는 방법이다.
- [6] 상기 SELEX 방법들은 저분자 물질에 대한 압타머를 발굴할 수 있다는 장점을 가지나, 분리 효율이 낮은 단점이 있다. 따라서 압타머 선별 효율을 높이기 위해서 SELEX 과정을 최소 8번에서 20번까지 반복하는 과정이 필요하다. 이러한 반복적인 과정으로 인해, 장기간(~30일)의 시간 소요, 과량의 시약 및 고비용이 요구되며, 저분자 표적 물질의 고정화가 힘들기 때문에, 효율적으로 DNA를 분리하는 데 어려움이 있다.
- [7] 이를 극복하기 위한 대안으로 제시된 모세관 전기영동, 솔-겔, 또는 마그네틱 비즈를 이용한 표적물질 고정화법을 이용한 변형된 셀렉스 방법에 대한 연구가

진행되었다. 다만, 최근에는 보다 효율적인 압타머 선별을 위해 기존의 표적물질 고정화법인 모세관 전기영동, 솔-겔, 또는 마그네틱 비즈에 마이크로플루이딕 채널을 접목한 셀렉스 연구가 진행 중이다.

- [8] 마이크로플루이딕 기반의 SELEX 방법들은 SELEX 과정의 간소화를 통해 SELEX 과정을 5 내지 8번으로 단축시킬 수 있었으며, 압타머의 제작 시일을 단기간 (~7일)으로 줄일 수 있다.

- [9] 그러나 이러한 마이크로플루이딕 디바이스는 폴리디메틸실록세인(polydimethylsiloxane; 'PDMS')을 기반으로 복잡한 제작 과정을 거치므로 제작 시간과 고비용이 요구된다. 또한 표적물질이 고정된 마그네틱 비즈 또는 솔-겔을 마이크로플루이딕 채널 내부에 안정적으로 위치시켜야 하는 번거로움이 있다.

- [10] 따라서, 효율적인 압타머 선별을 위한 전기화학적 교류 전위 변조용 탄소형 마이크로플루이딕 채널 디바이스를 제작하고 이를 기반한 새로운 압타머 선별 방법에 대한 연구 개발이 시급한 상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 전기전도성 단량체가 혼합된 탄소 잉크를 이용하여 탄소 기반의 마이크로플루이딕 채널을 이용함으로써 제작 과정이 간단하며 제작비용도 줄일 수 있는 마이크로플루이딕 디바이스 제조방법을 제공하는 데에 있다.

- [12] 또한, 탄소 기반 마이크로플루이딕 채널 내벽의 작용기(-COOH 또는 -NH₂)를 활성화시킨 채널에 랜덤 DNA 라이브러리를 주입함으로써 채널 내벽의 표적물질 사이를 특정 파동 형태로 통과하여 표적물질과 라이브러리간의 반응성을 현저히 증가시켜 한번의 셀렉스 과정으로 표적물질과 친화력이 높은 압타머를 빠른 시간 내에 선별할 수 있는 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머 선별방법을 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 마이크로플루이딕 채널 내벽을 전기전도성 고분자 막으로 개질하며, 상기 고분자 막에 표적물질을 고정시키며, 교류 전위를 가하여 DNA 라이브러리를 포함한 유체를 흘려주어 표적물질과의 반응을 유도하는 반응 채널; 및 작동전극, 보조전극 및 기준전극으로 구성되며, 표적물질과 반응하는 압타머를 전기화학적으로 선별하는 검출 채널을 포함하는, 교류 전위 변조를 이용한 마이크로플루이딕 디바이스를 제공한다.

- [14] 또한 본 발명은 전기전도성 단량체와 카본이 균일하게 혼합된 잉크를 준비하는 단계; 및 상기 준비된 잉크를 기판 상에 스크린 프린팅하여 탄소 기반의 마이크로유체 채널을 형성시킨 후 커버를 접합하는 단계;를 포함하는, 교류 전위 변조를 이용한 마이크로플루이딕 디바이스 제조방법을 제공한다.

- [15] 또한 본 발명은 전기전도성 단량체와 카본이 균일하게 혼합된 잉크를 준비하는 단계(제1단계); 상기 준비된 잉크를 기판 상에 스크린 프린팅하여 탄소 기반의 마이크로플루이딕 채널을 형성시키는 단계(제2단계); 상기 마이크로플루이딕 채널 내벽에 포함된 전기전도성 단량체를 순환 전류-전압법으로 전해중합하여 전기전도성 고분자 막을 형성한 후 형성된 고분자 막의 작용기를 활성화시키는 단계(제3단계); 상기 작용기가 활성화된 전기전도성 고분자 막 상에 선별하고자 하는 DNA와 결합하는 표적물질을 고정시키는 단계(제4단계); 상기 표적물질이 고정된 마이크로플루이딕 채널 내부에 랜덤 DNA 라이브러리를 주입하고 교류 전위를 인가하여 표적물질과 랜덤 DNA 라이브러리 간의 반응을 유도시키는 단계(제5단계); 상기 반응 후 표적물질과 선택적으로 반응한 특정 DNA를 선별하여 압타머 후보군을 수집하는 단계(제6단계); 및 상기 표적물질로 개질되지 않은 마이크로유체 채널에 교류 전위를 인가하여 압타머 후보군의 분자량에 따라 전기화학적 방법으로 분리하는 단계(제7단계);를 포함하는, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머 선별방법을 제공한다.
- [16] 또한 본 발명은 금 나노입자층 및 전기전도성 고분자 막을 순서대로 전착시킨 전극; 및 상기 전극 상의 활성화된 작용기에 고정시킨 표적물질 검출용 압타머를 포함하는, 표적물질 검출용 센서를 제공한다.

발명의 효과

- [17] 본 발명에 따른 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머 선별방법은 시약 소모량이 매우 적고(~ 수 μL), 교류 전위 변조 기술을 이용함으로써 압타머 선별 과정을 현저하게 간소화할 수 있다.
- [18] 또한, 채널에 교류 전위를 가함으로써 랜덤 DNA 라이브러리의 유체 흐름이 특정 파동을 가지는 난류 형태로 이동하면서 표적물질과 압타머의 반응성을 향상시켜 매우 빠르고 간편하게 압타머를 선별할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 디바이스 제작 모식도이고,
- [20] 도 2는 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 디바이스를 이용한 압타머 선별 모식도이며,
- [21] 도 3은 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널의 제작 단계별 전극 변성에 따른 임피던스 측정 결과이고,
- [22] 도 4는 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널에 대한 PvLDH의 흡착시간(a), 랜덤 DNA 라이브러리 주입하는 시간(b), pH에 따른 표적물질과 랜덤 DNA 라이브러리의 반응(c), 및 온도 조건에 따른 표적물질과 라이브러리의 반응(d)에 대한 최적화 조건 측정 결과이고,
- [23] 도 5는 시간대-전류법을 이용한 선별 압타머 분리 곡선 및 선별된 압타머의 이차 구조이며,
- [24] 도 6은 선별된 LDH1 압타머(a), LDH2 압타머(b), LDH3 압타머(c), LDH4

압타머(d), 및 LDH5 압타머(e)로 개질된 PvLDH 검출 센서를 이용하여 다양한 PvLDH 농도에 대한 검정 곡선이고,

- [25] 도 7은 임피던스를 이용한 LDH1 압타머(a), 및 LDH4 압타머(b)의 해리상수 결정 곡선 그래프, 형광법을 사용한 LDH1 압타머(c) 및 LDH4 압타머(d)의 해리상수 결정 곡선을 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [26] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [27] 본 발명의 발명자들은 작용기를 가지는 전기전도성 고분자 막으로 개질된 탄소 기반의 마이크로플루이딕 채널 내벽에 공유결합을 통해 안정하게 표적물질을 고정함으로써 기존의 셀렉스 과정을 획기적으로 간소화할 수 있으며, PDMS 기반의 마이크로플루이딕 채널의 단점을 극복할 수 있음을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.
- [28] 본 발명은 마이크로플루이딕 채널 내벽을 전기전도성 고분자 막으로 개질하며, 상기 고분자 막에 표적물질을 고정시키며, 교류 전위를 가하여 DNA 라이브러리를 포함한 유체를 흘려주어 표적물질과의 반응을 유도하는 반응 채널; 및 작동전극, 보조전극 및 기준전극으로 구성되며, 표적물질과 반응하는 압타머를 전기화학적으로 선별하는 검출 채널을 포함하는, 교류 전위 변조를 이용한 마이크로플루이딕 디바이스를 제공한다.
- [29] 상기 마이크로플루이딕 채널은 탄소 기반 마이크로플루이딕 채널일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [30] 상기 전기전도성 고분자는
폴리-2,2:5,5-터싸이오 펜-3-벤조산(poly-{2,2:5,5-terthiophene-3-benzoic acid}; pTTBA'),
폴리-5,2-5,2-터싸이오 펜-3-카르복실산(poly-{5,2-5,2-terthiophene-3-carboxylic acid}; 'pTTCA'),
폴리-{4'-([2,2':5',2"-터싸이오 펜]-3')-[1,1'-비페닐]-4-카르복실산(poly-{4'-([2,2':5',2'-terthiophen]-3'-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid; 'TTBPA'), 및
폴리-{4-(2,5-디(터싸이오 펜-2)-1H-피롤-1)벤조산(poly-{4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzoic acid; 'DTPBA')로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [31] 상기 표적물질은 PvLDH (plasmodium vivax lactate dehydrogenase), PfLDH (plasmodium falciparum lactate dehydrogenase), PmLDH (plasmodium malariae lactate dehydrogenase) 및 PoLDH (plasmodium ovale lactate dehydrogenase)로 이루어진 군에서 선택된 말라리아 바이오마커, 아밀로이드-베타 또는 타우단백질에서 선택된 알츠하이머 바이오마커, 후천성 면역결핍 증후군 바이오마커, 알파-시누클레인(α -synuclein), LRRK2(Leucine-rich repeat kinase 2), PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 또는 PARK7(Parkinson disease protein

7)에서 선택된 파킨슨병 바이오마커, CRP(,IL-6(interleukin-6),IL-8(interleukin-8), MCP-1(Monocyte Chemoattractant Protein-1) 또는 IP-10(IFN- γ -Inducible Protein 10)에서 선택된 심혈관질환 바이오마커, Ras 단백질, 프로테인 카이네이즈, C-Myc, N-Myc, C-erb B2 또는 Her2에서 선택된 암질환 바이오마커, 유전병 바이오마커, 및 EM48, BDNF(Brain-derived neurotrophic factor) 또는 α -튜불린(α -tubulin)에서 선택된 헌팅턴무도병 바이오마커로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[32] 또한 본 발명은 전기전도성 단량체와 카본이 균일하게 혼합된 잉크를 준비하는 단계; 및 상기 준비된 잉크를 기판 상에 스크린 프린팅하여 탄소 기반의 마이크로유체 채널을 형성시킨 후 커버를 접합하는 단계;를 포함하는, 교류 전위 변조를 이용한 마이크로플루이딕 디바이스 제조방법을 제공한다.

[33] 상기 전기전도성 단량체는,
2,2:5,5-터싸이오펜-3-벤조산(2,2:5,5-terthiophene-3-benzoic acid; 'TTBA'),
5,2-5,2-터싸이오펜-3-카르복실산(5,2-5,2-terthiophene-3-carboxylic acid; 'TTCA'),
4'-([2,2':5',2"-터싸이오펜]-3')-[1,1'-비페닐]-4-카르복실산(4'-([2,2':5',2"-terthiophen]-3'-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid; 'TTBPA'), 및
4-(2,5-디(터싸이오펜-2)-1H-피롤-1)벤조산(4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl) benzoic acid; 'DTPBA')로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[34] 상기 잉크는, 1 내지 5 중량%의 전기전도성 단량체와 잔부의 카본이 포함될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[35] 상기 스크린 프린팅은, 3 내지 7회 수행할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[36] 또한 본 발명은 전기전도성 단량체와 카본이 균일하게 혼합된 잉크를 준비하는 단계(제1단계); 상기 준비된 잉크를 기판 상에 스크린 프린팅하여 탄소 기반의 마이크로플루이딕 채널을 형성시키는 단계(제2단계); 상기 마이크로플루이딕 채널 내벽에 포함된 전기전도성 단량체를 순환 전류-전압법으로 전해중합하여 전기전도성 고분자 막을 형성한 후 형성된 고분자 막의 작용기를 활성화시키는 단계(제3단계); 상기 작용기가 활성화된 전기전도성 고분자 막 상에 선별하고자 하는 DNA와 결합하는 표적물질을 고정시키는 단계(제4단계); 상기 표적물질이 고정된 마이크로플루이딕 채널 내부에 랜덤 DNA 라이브러리를 주입하고 교류 전위를 인가하여 표적물질과 랜덤 DNA 라이브러리 간의 반응을 유도시키는 단계(제5단계); 상기 반응 후 표적물질과 선택적으로 반응한 특정 DNA를 선별하여 압타머 후보군을 수집하는 단계(제6단계); 및 상기 표적물질로 개질되지 않은 마이크로유체 채널에 교류 전위를 인가하여 압타머 후보군의 분자량에 따라 전기화학적 방법으로 분리하는 단계(제7단계);를 포함하는, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머 선별방법을 제공한다.

[37] 상기 전기전도성 단량체는,

2,2:5,5-터싸이오펜-3-벤조산(2,2:5,5-terthiophene-3-benzoic acid; 'TTBA'),
 5,2-5,2-터싸이오펜-3-카르복실산(5,2-5,2-terthiophene-3-carboxylic acid; 'TTCA'),
 4'-([2,2':5',2"-터싸이오펜]-3')-[1,1'-비페닐]-4-카르복실산(4'-([2,2':5',2"-terthiophen]-3'-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid; 'TTBPA'), 및
 4-(2,5-디(터싸이오펜-2)-1H-피롤-1)벤조산(4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzoic acid; 'DTPBA')로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [38] 상기 잉크는, 1 내지 5 중량%의 전기전도성 단량체와 잔부의 카본이 포함될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [39] 상기 제3단계는, 순환 전류-전압법으로 0.0V 내지 +1.2 V까지 1 내지 3회 주사하여 전해중합 할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [40] 상기 작용기는, 카르복실기 또는 아민기 중 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [41] 상기 표적물질은 PvLDH (plasmodium vivax lactate dehydrogenase), PfLDH (plasmodium falciparum lactate dehydrogenase), PmLDH (plasmodium malariae lactate dehydrogenase) 및 PoLDH (plasmodium ovale lactate dehydrogenase)로 이루어진 군에서 선택된 말라리아 바이오마커, 아밀로이드-베타 또는 타우단백질에서 선택된 알츠하이머 바이오마커, 후천성 면역결핍 증후군 바이오마커, 알파-시누클레인(α -synuclein), LRRK2(Leucine-rich repeat kinase 2), PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 또는 PARK7(Parkinson disease protein 7)에서 선택된 파킨슨병 바이오마커, CRP, IL-6(interleukin-6), IL-8(interleukin-8), MCP-1(Monocyte Chemoattractant Protein-1) 또는 IP-10(IFN- γ -Inducible Protein 10)에서 선택된 심혈관질환 바이오마커, Ras 단백질, 프로테인 카이네이즈, C-Myc, N-Myc, C-erb B2 또는 Her2에서 선택된 암질환 바이오마커, 유전병 바이오마커, 및 EM48, BDNF(Brain-derived neurotrophic factor) 또는 α -튜불린(α -tubulin)에서 선택된 헌팅턴무도병 바이오마커로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [42] 상기 제4단계는, 상기 작용기가 활성화된 전기전도성 고분자 막 상에 표적물질을 8 내지 12시간 동안 반응시켜 고정시킬 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [43] 상기 제5단계는, 상기 표적물질이 고정된 마이크로플루이딕 채널 내부에 랜덤 DNA 라이브러리를 20 내지 40분 동안 주입하고 pH 6.0 내지 8.0, 및 25 내지 40°C 조건에서 표적물질과 랜덤 DNA 라이브러리 간의 반응을 유도시킬 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [44] 상기 제5단계는, 0.0 MHz 내지 1.0 MHz의 주파수에서 0.0 V 내지 3.0 V의 교류 전위를 인가할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [45] 또한 본 발명은 금 나노입자층 및 전기전도성 고분자 막을 순서대로 전착시킨 전극; 및 상기 전극 상의 활성화된 작용기에 고정시킨 표적물질 검출용 압타머를

포함하는, 표적물질 검출용 센서를 제공한다.

[46] 상기 전기전도성 고분자는

폴리-2,2':5,5'-터싸이오펜-3-벤조산(poly-{2,2':5,5'-terthiophene-3-benzoic acid}; pTTBA'),

폴리-5,2-5,2'-터싸이오펜-3-카르복실산(poly-{5,2-5,2'-terthiophene-3-carboxylic acid}; 'pTTCA'),

폴리-{4'-([2,2':5',2"-터싸이오펜]-3')-[1,1'-비페닐]-4-카르복실산(poly-{4'-([2,2':5',2'-terthiophen]-3'-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid; 'TTBPA'), 및

폴리-{4-(2,5-디(터싸이오펜-2)-1H-피롤-1)벤조산(poly-{4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzoic acid; 'DTPBA')로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[47] 상기 압타머는 젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase; 이하 'LDH')인 LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, 및 LDH5로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[48] 상기 표적물질은 PvLDH (plasmodium vivax lactate dehydrogenase), PfLDH (plasmodium falciparum lactate dehydrogenase), PmLDH (plasmodium malariae lactate dehydrogenase) 및 PoLDH (plasmodium ovale lactate dehydrogenase)로 이루어진 군에서 선택된 말라리아 바이오마커, 아밀로이드-베타 또는 타우단백질에서 선택된 알츠하이머 바이오마커, 후천성 면역결핍 증후군 바이오마커, 알파-시누클레인(α -synuclein), LRRK2(Leucine-rich repeat kinase 2), PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 또는 PARK7(Parkinson disease protein 7)에서 선택된 파킨슨병 바이오마커, CRP, IL-6(interleukin-6), IL-8(interleukin-8), MCP-1(Monocyte Chemoattractant Protein-1) 또는 IP-10(IFN- γ -Inducible Protein 10)에서 선택된 심혈관질환 바이오마커, Ras 단백질, 프로테인 카이네이즈, C-Myc, N-Myc, C-erb B2 또는 Her2에서 선택된 암질환 바이오마커, 유전병 바이오마커, 및 EM48, BDNF(Brain-derived neurotrophic factor) 또는 α -튜불린(α -tubulin)에서 선택된 헌팅턴무도병 바이오마커로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[49] 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[50]

[51] <실시예 1> 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널 디바이스 제조

[52] 압타머 선별을 위한 탄소 기반의 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널은 반응부 채널과 검출부 채널로 구성된다. 검출부 채널에는 작동 전극, 기준 전극, 및 상대전극이 포함된다.

[53] 도 1을 참조하면, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 디바이스의 제작은 유리

기관 위에 TTBA 3 중량%가 균일하게 포함된 카본 잉크를 총 5회 스크린 프린팅하여 카본 층(carbon layer)으로 된 채널을 형성시킨 후, 채널 상에 유리 커버를 접합시켜 탄소 기반의 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 디바이스(크기: 76 x 25 mm, 분리 부분: 52 mm, 검출부: 15 mm, 유로 너비: 95.0 μm 인, 유로 높이: 20 μm)를 제작하였다.

[54] 또한, 0.1 M 염산(HCl)과 3차 증류수를 사용하여 채널 내부의 유로를 세척한 후, 진공펌프(도시하지 않음)를 이용하여 유로 내부를 진공 상태로 보관하였다.

[55]

[56] <실시에 2> 본 발명에 따른 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널의 변성 및 이를 이용한 압타머 선별

[57] 도 2는 전기전도성 고분자로 구성된 탄소형 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 디바이스의 변성 과정 및 이를 이용한 압타머 선별 과정을 나타낸 모식도이다.

[58] TTBA가 포함된 탄소형 마이크로채널 내벽을 pTTBA로 고분자화하여 개질하는 단계는 마이크로시린지 펌프를 이용하여 채널 내부에 0.1 M의 PBS 완충액을 주입하고 순환 전류-전압법으로 0.0V 에서 + 1.2 V까지 2회 주사하여 전해중합을 통해 pTTBA 막을 형성시킨 후, 증류수를 사용하여 유로를 세척하였다.

[59] 20 mM의 EDC/NHS 용액을 채널 내부에 주입하여 pTTBA의 작용기인 카르복실기를 활성화 한 후, 말라리아 바이오마커인 1 μM 의 PvLDH를 채널 내부에 주입하여 채널 내벽의 pTTBA 막에 공유결합으로 고정하였다.

[60] 2차원 구조를 형성하고 있는 랜덤 DNA 라이브러리(~1014 random molecules)를 상기 방법으로 개질된 채널 내부에 0.5 $\mu\text{l/min}$ 의 유속으로 60분 동안 주입한 후, 유체 흐름과 수직인 방향으로 교류 전압 발생기를 이용하여 교류 전위를 인가하여 채널 내부에 전계를 형성시켜 PvLDH와 선택적으로 반응한 특정 DNA를 선별하였다.

[61] 인가된 교류 전위는 0.0 MHz ~ 1.0 MHz와 0.0 V ~ 3.0 V에서 시행되었으며, 1.0 MHz, 1.0 V인 조건에서 가장 효과적으로 작용하였다. 이러한 전계는 교류 전위의 크기 및 주파수에 의해 조정되며, 이로 인해 유체 속의 랜덤 DNA들은 일정 파동 형태로 채널 내부를 통과하면서 특정 DNA와 PvLDH간의 반응성을 향상시켰다.

[62] 그 후, PvLDH에 결합하지 않은 DNA 라이브러리는 증류수를 10 $\mu\text{l/min}$ 의 유속으로 주입하여 제거하였다.

[63] 채널 내의 PvLDH에 결합한 선별된 특정 DNA의 압타머 후보군을 분리(elution) 및 수집하기 위해, 95°C의 0.1 M의 PBS 완충액을 1 $\mu\text{l/min}$ 의 유속으로 주입하여 PvLDH에 결합되어 있는 2차 구조의 DNA 서열을 언폴딩(unfolding)시켜 PvLDH로부터 탈기한 후, 채널의 수집부에서 선별된 특정 DNA의 압타머 후보군들을 수집하였다.

[64] 수집된 특정 DNA의 압타머 후보군들을 PvLDH가 개질되지 않은 교류 전위

변조 마이크로플루이딕 채널에 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유속으로 주입하고 교류 전위를 인가하여 수집된 특정 DNA의 압타머 후보군들의 분자량에 따른 분리하고, 채널의 검출부에 1.1 V의 전위를 인가하여 DNA의 구아닌(산화전위: 0.6 V) 및 아데닌(산화전위: 0.9 V)의 전기화학적 신호를 모니터링하여 압타머 후보군들을 종류별로 검출 및 수집하였다.

- [65] 도 5를 참조하면, 시간대-전류법을 이용한 선별 압타머 분리 곡선 및 선별된 압타머의 이차 구조를 나타낸 것으로서, 본 발명을 통해 선별된 PvLDH의 압타머 후보군은 총 다섯 가지인 것으로 확인되었으며, PCR 증폭 및 서열 분석(sequencing)을 통해 상기 압타머들의 서열을 확인하였다.

[66]

- [67] <실험예 1> 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널 내벽의 개질단계 규명

- [68] 본 발명에 따른 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널 내벽의 pTTBA 막으로 개질하는 단계는 임피던스 측정을 통해 확인하였다.

- [69] 도 3을 참조하면, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널 내벽의 개질 단계에 따른 임피던스 변화 스펙트럼을 나타낸 것으로서, 임피던스 측정은 0.1 M의 PBS 완충액에서 수행하였다.

- [70] pTTBA와 pTTBA 막 상에 공유결합으로 결합된 PvLDH('PvLDH/pTTBA')의 Rp 값은 각각 727.32 k Ω 및 1318.02 k Ω 이었다. 상기 얻어진 Rp 값을 통해 PvLDH를 pTTBA 막 상에 공유 결합 시킴으로써 표면 저항이 약 1.8 배 증가한 것을 알 수 있으며, 이를 통해 PvLDH가 pTTBA 막 상에 성공적으로 고정화 되었음을 확인하였다.

- [71] 또한, PvLDH/pTTBA로 개질된 채널 내부에 랜덤 DNA 라이브러리를 주입시켜 반응시킨 후 Rp 값은 2559.29 k Ω 로 증가하였고, 이는 PvLDH에 선택적으로 결합한 압타머 서열들이 존재함을 알 수 있다.

- [72] 또한, 95°C의 0.1 M의 PBS 완충액을 이용하여 PvLDH/pTTBA에 결합된 압타머들을 탈기 후 Rp 값은 1465.79 k Ω 으로 감소하였다.

- [73] 상기 결과를 바탕으로 표적 물질인 PvLDH가 채널 내벽에 성공적으로 개질되었으며 PvLDH에 특이적으로 반응하는 압타머의 선별이 매우 효율적으로 이루어졌음을 확인할 수 있다.

[74]

- [75] <실험예 2> 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머 선별의 최적화 조건 규명

- [76] 탄소형 교류 전위 변조 마이크로 플루이딕 채널 기반의 압타머 선별의 효율을 극대화하기 위해 임피던스를 이용하여 표적물질의 흡착 시간, 라이브러리의 주입 시간, 표적물질과 라이브러리 반응 pH 및 온도 등의 최적화 조건을 규명하였다.

- [77] 도 4(a)를 참조하면, PvLDH의 흡착시간은 10분에서 12시간동안 반응 시킨 후 임피던스 변화 값을 도기한 것으로서, PvLDH의 고정화 시간이 10분에서

8시간까지 증가시킴에 따라 표면 저항이 점차적으로 증가한 후 8시간 이후부터 정류 상태에 도달하였는 바, 표적물질인 PvLDH의 흡착 시간을 8시간으로 선정하였다.

- [78] 도 4(b)를 참조하면, PvLDH가 pTTBA 막 상에 고정된 마이크로플루이딕 채널 내부에 랜덤 DNA 라이브러리를 주입하는 시간에 따른 압타머 선별의 최적화 조건을 나타낸 것으로서, 랜덤 DNA 라이브러리를 5분에서 45분까지 범위에서 주입하여 임피던스를 측정한 결과, 라이브러리를 25분 동안 주입하였을 때, 표면 저항이 정류 상태에 도달하였는 바, 최적의 주입 시간은 25분으로 선정하였다.
- [79] 도 4(c)를 참조하면, PvLDH와 랜덤 DNA 라이브러리 간의 반응 시, pH에 따른 임피던스 변화에 대해 나타낸 것으로서, pH 범위는 6.0 내지 8.0에서 수행하였으며, pH 7.4 조건에서 가장 큰 표면 저항 값을 나타내었는 바, 최적의 pH는 7.4로 선정하였다.
- [80] 도 4(d)를 참조하면, PvLDH와 랜덤 DNA 라이브러리 간의 반응 시, 온도 조건에 따른 임피던스 변화에 대해 나타낸 것으로서, 35°C에서 가장 큰 표면 저항 값을 나타내었는 바, 최적의 온도는 35로 선정하였다.

[81]

[82] <실시예 3> 선별된 압타머를 활용한 PvLDH 검출용 센서 제작 및 적용

[83] 마이크로어레이 전극(Micro array electrodes; 이하 'MAEs') 상에 금 나노입자 및 TTBA를 순서대로 전착한 후, 50°C 진공 오븐에서 건조시켰다. 순환 전압-전류법을 이용하여 전해중합하여 MAEs 전극 표면 상에 pTTBA 막을 형성하였다.

[84] 이후 EDC/NHS를 채널 내부에 주입하여 pTTBA의 작용기인 카르복실기를 활성화 한 후, 아민기를 가지는 5종의 각각의 압타머(LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, 및 LDH5)를 pTTBA 막 상에 공유결합으로 고정시켜 PvLDH 검출용 센서를 제작하였다.

[85]

[86] <실험예 3> 선별된 압타머를 활용한 PvLDH 검출용 센서의 적용

[87] 도 2를 참조하면, 마이크로어레이 전극은 8개의 작업전극(카본)과 하나의 기준전극(실버)으로 2-전극계의 스크린 프린트 전극을 사용하였다.

[88] 도 6을 참조하면, 아민기를 가지는 5종의 선별된 압타머 후보군(LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, 및 LDH5)을 수용체로 적용한 센서를 이용하여 임피던스 방법으로 PvLDH를 농도별로 정량한 검정 곡선을 나타낸 것으로서, 5종의 압타머를 이용한 PvLDH 검출에 대한 선형 범위 및 검출한계는 다음과 같다.

[89] 도 6(a)를 참조하면, LDH1 압타머의 선형 범위 및 검출한계를 나타낸 것으로서, 25 fM ~ 2 pM (R=0.985), 10 pM ~ 125 pM, (R=0.994), 검출한계= 29.17 fM임을 알 수 있다.

[90] 도 6(b)를 참조하면, LDH2 압타머의 선형 범위 및 검출한계를 나타낸 것으로서, 25 fM ~ 100 fM (R=0.998), 400 fM ~ 2 pM (R=0.993), 검출한계= 7.77 fM임을 알

수 있다.

- [91] 도 6(c)를 참조하면, LDH3 압타머의 선형 범위 및 검출한계를 나타낸 것으로서, 25 fM ~ 400 fM (R=0.998), 400 fM ~ 2 pM (R=0.991), 검출한계= 12.59 fM 임을 알 수 있다.
- [92] 도 6(d)를 참조하면, LDH4 압타머의 선형 범위 및 검출한계를 나타낸 것으로서, 25 fM ~ 200 fM (R=0.992), 200 fM ~ 2 pM (R=0.990), 검출한계= 13.07 fM 임을 알 수 있다.
- [93] 도 6(e)를 참조하면, LDH5 압타머의 선형 범위 및 검출한계를 나타낸 것으로서, 200 fM ~ 2 pM (R=0.993), 검출한계= 11.57 fM 임을 알 수 있다.
- [94] 상기 결과를 통해 선별된 5종의 압타머 중 LDH1이 가장 넓은 선형 범위를 가지는 것을 확인할 수 있다.

[95]

[96] <실험예 4> 임피던스 분광법을 이용한 선별된 각 압타머의 해리 상수 결정

- [97] 본 발명에 따라 선별한 압타머 5종과 PvLDH간의 선택성에 대한 성능 평가를 위해 압타머의 해리 상수 (K_d)를 임피던스 분광법을 이용하여 측정하였다. 이를 위해, 금 나노입자, pTTBA 및 PvLDH를 순서대로 전착하여 센서를 제작하였다. 임피던스 분광법을 이용하여 각 압타머의 농도(0 내지 200 nM)에 따른 표면 저항을 측정하였으며, 하기 수학적 식 1을 통해 임피던스 방법으로 압타머의 해리 상수를 계산하였다. 또한, 기존의 형광법을 이용한 해리 상수 값과 비교 평가를 동시에 수행하였다.

[98] [수학적 식 1]

$$[99] \quad \frac{R - R_o}{R_o} = \left(\frac{R - R_o}{R_o} \right)_{\max} \left[\frac{C}{C + K_d} \right]$$

[100]

- [101] 도 7을 참조하면, 임피던스 및 형광법을 사용한 LDH1 압타머와 LDH4 압타머의 해리상수 곡선 그래프를 나타낸 것으로서, 임피던스를 통한 LDH1와 LDH4의 해리 상수는 31.37 ± 3.30 와 78.53 ± 5.12 nM로 결정되었고, 형광법을 이용한 LDH1와 LDH4의 해리 상수는 34.0와 82.8 nM로 결정되었다.

- [102] 결과적으로 상기 두 방법을 통해 계산된 LDH1와 LDH4의 해리 상수 값이 일치하는 결과를 얻었다. 또한, LDH1가 LDH4에 비해 낮은 해리 상수 값을 가짐으로써 PvLDH와 가장 선택성이 높은 것을 알 수 있다. 뿐만 아니라 임피던스를 이용하면 기존의 형광법보다 간편하고 저비용으로 압타머의 해리 상수를 결정할 수 있음을 알 수 있다.

- [103] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

청구범위

- [청구항 1] 마이크로플루이딕 채널 내벽을 전기전도성 고분자 막으로 개질하며, 상기 고분자 막에 표적물질을 고정시키며, 교류 전위를 가하여 DNA 라이브리리를 포함한 유체를 흘려주어 표적물질과의 반응을 유도하는 반응 채널; 및 작동전극, 보조전극 및 기준전극으로 구성되며, 표적물질과 반응하는 압타머를 전기화학적으로 선별하는 검출 채널을 포함하는, 교류 전위 변조를 이용한 마이크로플루이딕 디바이스.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 마이크로플루이딕 채널은 탄소 기반 마이크로플루이딕 채널인 것을 특징으로 하는, 교류 전위 변조를 이용한 마이크로플루이딕 디바이스.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 전기전도성 고분자는 폴리-2,2:5,5-터싸이오펜-3-벤조산(poly-{2,2:5,5-terthiophene-3-benzoic acid}; pTTBA'), 폴리-5,2-5,2-터싸이오펜-3-카르복실산(poly-{5,2-5,2-terthiophene-3-carboxylic acid}; 'pTTCA'), 폴리-{4'-([2,2':5',2"-터싸이오펜]-3')-[1,1'-비페닐]-4-카르복실산(poly-{4'-([2,2':5',2"-terthiophen]-3'-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid; 'TTBPA'), 및 폴리-{4-(2,5-디(터싸이오펜-2)-1H-피롤-1)벤조산(poly-{4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzoic acid; 'DTPBA')로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 교류 전위 변조를 이용한 마이크로플루이딕 디바이스.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 표적물질은 PvLDH(plasmodium vivax lactate dehydrogenase), PfLDH(plasmodium falciparum lactate dehydrogenase), PmLDH(plasmodium malariae lactate dehydrogenase) 및 PoLDH(plasmodium ovale lactate dehydrogenase)로 이루어진 군에서 선택된 말라리아 바이오마커, 아밀로이드-베타 또는 타우단백질에서 선택된 알츠하이머 바이오마커, 후천성 면역결핍 증후군 바이오마커, 알파-시누클레인(α -synuclein), LRRK2(Leucine-rich repeat kinase 2), PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 또는 PARK7(Parkinson disease protein 7)에서 선택된 파킨슨병 바이오마커, CRP(IL-6(interleukin-6), IL-8(interleukin-8), MCP-1(Monocyte Chemoattractant Protein-1) 또는 IP-10(IFN- γ -Inducible Protein 10)에서 선택된 심혈관질환 바이오마커, Ras 단백질, 프로테인 카이네이즈, C-Myc, N-Myc, C-erb B2 또는 Her2에서 선택된 암질환 바이오마커, 유전병 바이오마커, 및 EM48, BDNF(Brain-derived neurotrophic factor) 또는 α -튜불린(α -tubulin)에서 선택된 헌팅턴무도병 바이오마커로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는, 교류 전위 변조를 이용한

- 마이크로플루이딕 디바이스.
- [청구항 5] 전기전도성 단량체와 카본이 균일하게 혼합된 잉크를 준비하는 단계; 및 상기 준비된 잉크를 기판 상에 스크린 프린팅하여 탄소 기반의 마이크로플루이딕 채널을 형성시킨 후 커버를 접합하는 단계;를 포함하는, 교류 전위 변조를 이용한 마이크로플루이딕 디바이스 제조방법.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서, 상기 전기전도성 단량체는, 2,2:5,5-터싸이오펜-3-벤조산(2,2:5,5-terthiophene-3-benzoic acid; 'TTBA'), 5,2-5,2-터싸이오펜-3-카르복실산(5,2-5,2-terthiophene-3-carboxylic acid; 'TTCA'), 4'-([2,2':5',2"-터싸이오펜]-3')-[1,1'-비페닐]-4-카르복실산(4'-([2,2':5',2"-terthiophen]-3'-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid; 'TTBPA'), 및 4-(2,5-디(터싸이오펜-2)-1H-피롤-1)벤조산(4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzoic acid; 'DTPBA')로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 교류 전위 변조를 이용한 마이크로플루이딕 디바이스 제조방법.
- [청구항 7] 청구항 5에 있어서, 상기 잉크는, 1 내지 5 중량%의 전기전도성 단량체와 잔부의 카본이 포함된 것을 특징으로 하는, 교류 전위 변조를 이용한 마이크로플루이딕 디바이스 제조방법.
- [청구항 8] 청구항 5에 있어서, 상기 스크린 프린팅은, 3 내지 7회 수행하는 것을 특징으로 하는, 교류 전위 변조를 이용한 마이크로플루이딕 디바이스 제조방법.
- [청구항 9] 전기전도성 단량체와 카본이 균일하게 혼합된 잉크를 준비하는 단계(제1단계); 상기 준비된 잉크를 기판 상에 스크린 프린팅하여 탄소 기반의 마이크로플루이딕 채널을 형성시키는 단계(제2단계); 상기 마이크로플루이딕 채널 내벽에 포함된 전기전도성 단량체를 순환 전류-전압법으로 전해중합하여 전기전도성 고분자 막을 형성한 후 형성된 고분자 막의 작용기를 활성화시키는 단계(제3단계); 상기 작용기가 활성화된 전기전도성 고분자 막 상에 선별하고자 하는 DNA와 결합하는 표적물질을 고정시키는 단계(제4단계); 상기 표적물질이 고정된 마이크로플루이딕 채널 내부에 랜덤 DNA 라이브러리를 주입하고 교류 전위를 인가하여 표적물질과 랜덤 DNA 라이브러리 간의 반응을 유도시키는 단계(제5단계);

상기 반응 후 표적물질과 선택적으로 반응한 특정 DNA를 선별하여
압타머 후보군을 수집하는 단계(제6단계); 및
상기 표적물질로 개질 되지 않은 마이크로플루이딕 채널에 교류 전위를
인가하여 압타머 후보군의 분자량에 따라 전기화학적 방법으로 분리하는
단계(제7단계);를 포함하는, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을
이용한 압타머 선별방법.

[청구항 10] 청구항 9에 있어서,
상기 전기전도성 단량체는,
2,2:5,5-터싸이오펜-3-벤조산(2,2:5,5-terthiophene-3-benzoic acid; 'TTBA'),
5,2-5,2-터싸이오펜-3-카르복실산(5,2-5,2-terthiophene-3-carboxylic acid;
'TTCA'),
4'-([2,2':5',2"-터싸이오펜]-3')-[1,1'-비페닐]-4-카르복실산(4'-([2,2':5',2"-terthiophen]-3'-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid; 'TTBPA'), 및
4-(2,5-디(터싸이오펜-2)-1H-피롤-1)벤조산(4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzoic acid; 'DTPBA')로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인
것을 특징으로 하는, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한
압타머 선별방법.

[청구항 11] 청구항 9에 있어서,
상기 잉크는,
1 내지 5 중량%의 전기전도성 단량체와 잔부의 카본이 포함된 것을
특징으로 하는, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머
선별방법.

[청구항 12] 청구항 9에 있어서,
상기 제3단계는,
순환 전류-전압법으로 0.0V 내지 + 1.2 V까지 1 내지 3회 주사하여
전해중합하는 것을 특징으로 하는, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕
채널을 이용한 압타머 선별방법.

[청구항 13] 청구항 9에 있어서,
상기 작용기는,
카르복실기 또는 아민기 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 교류 전위
변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머 선별방법.

[청구항 14] 청구항 9에 있어서,
상기 표적물질은 PvLDH(plasmodium vivax lactate dehydrogenase),
PfLDH(plasmodium falciparum lactate dehydrogenase), PmLDH(plasmodium
malariae lactate dehydrogenase) 및 PoLDH(plasmodium ovale lactate
dehydrogenase)로 이루어진 군에서 선택된 말라리아 바이오마커,
아밀로이드-베타 또는 타우단백질에서 선택된 알츠하이머 바이오마커,
후천성 면역결핍 증후군 바이오마커, 알파-시누클레인(α -synuclein),

LRRK2(Leucine-rich repeat kinase 2), PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 또는 PARK7(Parkinson disease protein 7)에서 선택된 파킨슨병 바이오마커, CRP(IL-6(interleukin-6), IL-8(interleukin-8), MCP-1(Monocyte Chemoattractant Protein-1) 또는 IP-10(IFN- γ -Inducible Protein 10)에서 선택된 심혈관질환 바이오마커, Ras 단백질, 프로테인 카이네이즈, C-Myc, N-Myc, C-erb B2 또는 Her2에서 선택된 암질환 바이오마커, 유전병 바이오마커, 및 EM48, BDNF(또는 α -튜불린(α -tubulin)에서 선택된 헌팅턴무도병 바이오마커로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머 선별방법.

[청구항 15] 청구항 9에 있어서,
상기 제4단계는,
상기 작용기가 활성화된 전기전도성 고분자 막 상에 표적물질을 8 내지 12시간 동안 반응시켜 고정시키는 것을 특징으로 하는, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머 선별방법.

[청구항 16] 청구항 9에 있어서,
상기 제5단계는,
상기 표적물질이 고정된 마이크로플루이딕 채널 내부에 랜덤 DNA 라이브러리를 20 내지 40분 동안 주입하고 pH 6.0 내지 8.0, 및 25 내지 40°C 조건에서 표적물질과 랜덤 DNA 라이브러리 간의 반응을 유도시키는 것을 특징으로 하는, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머 선별방법.

[청구항 17] 청구항 9에 있어서,
상기 제5단계는,
0.0 MHz 내지 1.0 MHz의 주파수에서 0.0 V 내지 3.0 V의 교류 전위를 인가하는 것을 특징으로 하는, 교류 전위 변조 마이크로플루이딕 채널을 이용한 압타머 선별방법.

[청구항 18] 금 나노입자층 및 전기전도성 고분자 막을 순서대로 전착시킨 전극; 및
상기 전극 상의 활성화된 작용기에 고정시킨 표적물질 검출용 압타머를 포함하는, 표적물질 검출용 센서.

[청구항 19] 청구항 18에 있어서,
상기 전기전도성 고분자는,
폴리-2,2':5,5'-터싸이오펜-3-벤조산(poly-{2,2':5,5'-terthiophene-3-benzoic acid}; pTTBA'),
폴리-5,2':5,2'-터싸이오펜-3-카르복실산(poly-{5,2':5,2'-terthiophene-3-carboxylic acid}; 'pTTCA'),
폴리-{4'-([2,2':5,2''-터싸이오펜]-3')-[1,1'-비페닐]-4-카르복실산(poly-{4'-([2,2':5,2''-terthiophen]-3'-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid; 'TTBPA'), 및

폴리-{4-(2,5-디(티싸이오펜-2)-1H-피롤-1)벤조산(poly-{4-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)benzoic acid; 'DTPBA')로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 표적물질 검출용 센서.

[청구항 20] 청구항 18에 있어서,

상기 압타머는,

젖산탈수소 효소(Lactate dehydrogenase)인 LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, 및 LDH5로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 표적물질 검출용 센서.

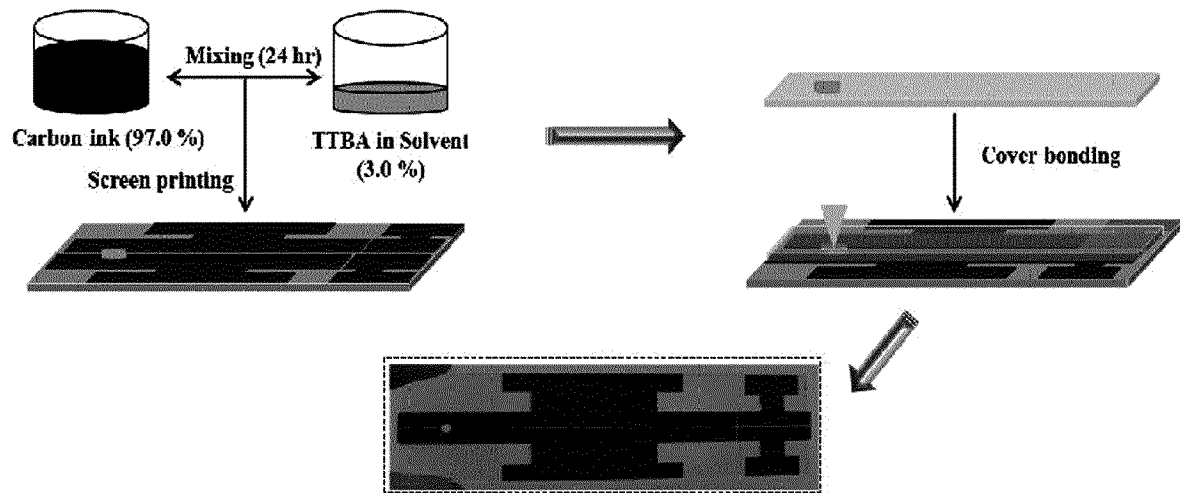
[청구항 21] 청구항 18에 있어서,

상기 표적물질은,

PvLDH(plasmodium vivax lactate dehydrogenase), PfLDH(plasmodium falciparum lactate dehydrogenase), PmLDH(plasmodium malariae lactate dehydrogenase) 및 PoLDH(plasmodium ovale lactate dehydrogenase)로 이루어진 군에서 선택된 말라리아 바이오마커, 아밀로이드-베타 또는 타우단백질에서 선택된 알츠하이머 바이오마커, 후천성 면역결핍 증후군 바이오마커, 알파-시누클레인(α -synuclein), LRRK2(Leucine-rich repeat kinase 2), PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 또는 PARK7(Parkinson disease protein 7)에서 선택된 파킨슨병 바이오마커,

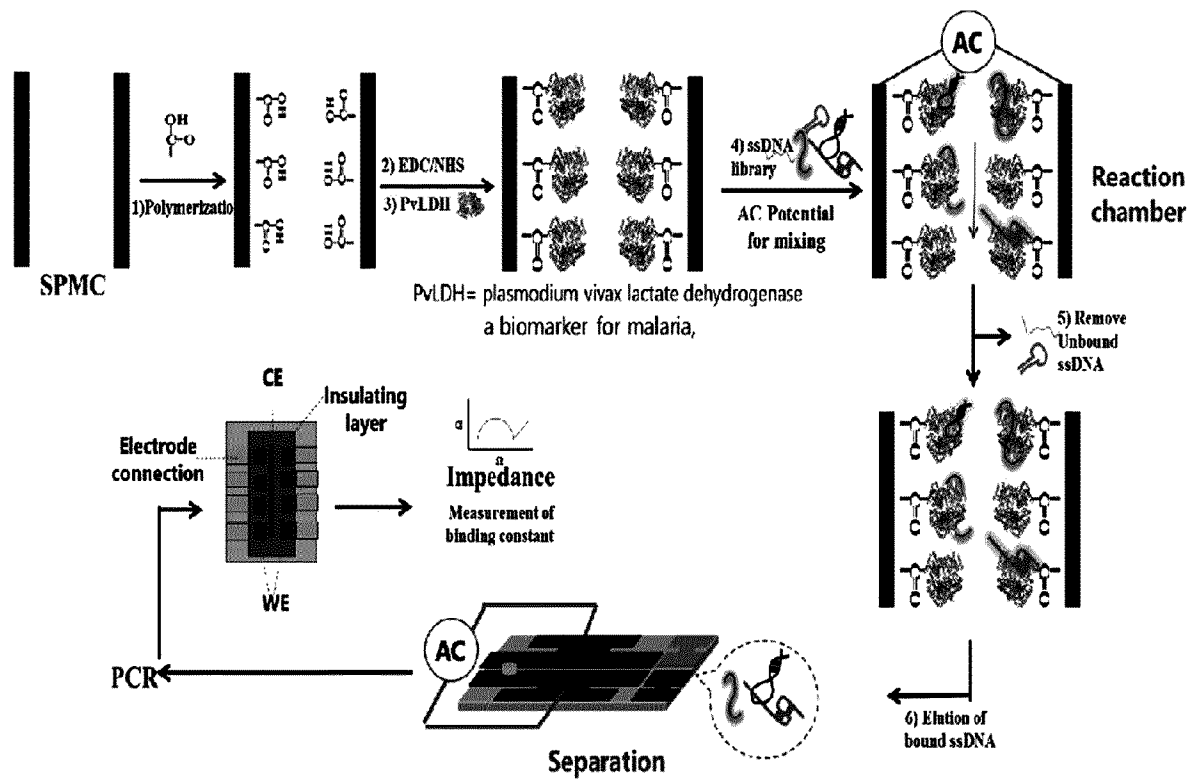
CRP(IL-6(interleukin-6), IL-8(interleukin-8), MCP-1(Monocyte Chemoattractant Protein-1) 또는 IP-10(IFN- γ -Inducible Protein 10)에서 선택된 심혈관질환 바이오마커, Ras 단백질, 프로테인 카이네이즈, C-Myc, N-Myc, C-erb B2 또는 Her2에서 선택된 암질환 바이오마커, 유전병 바이오마커, 및 EM48, BDNF(Brain-derived neurotrophic factor) 또는 α -튜불린(α -tubulin)에서 선택된 헌팅턴무도병 바이오마커로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는, 표적물질 검출용 센서.

[도1]

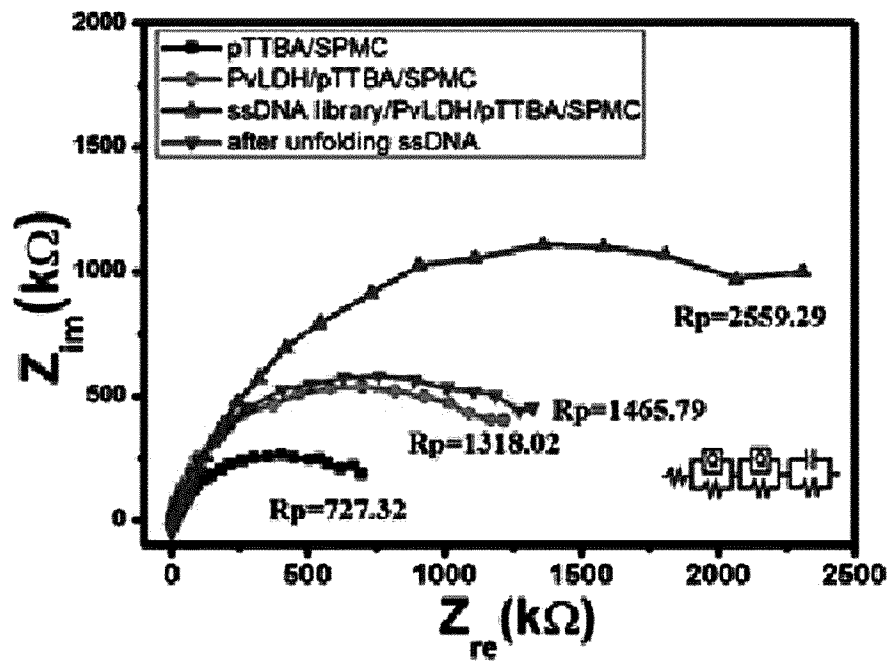


-교류 전원 변조 마이크로제던 나바이스-

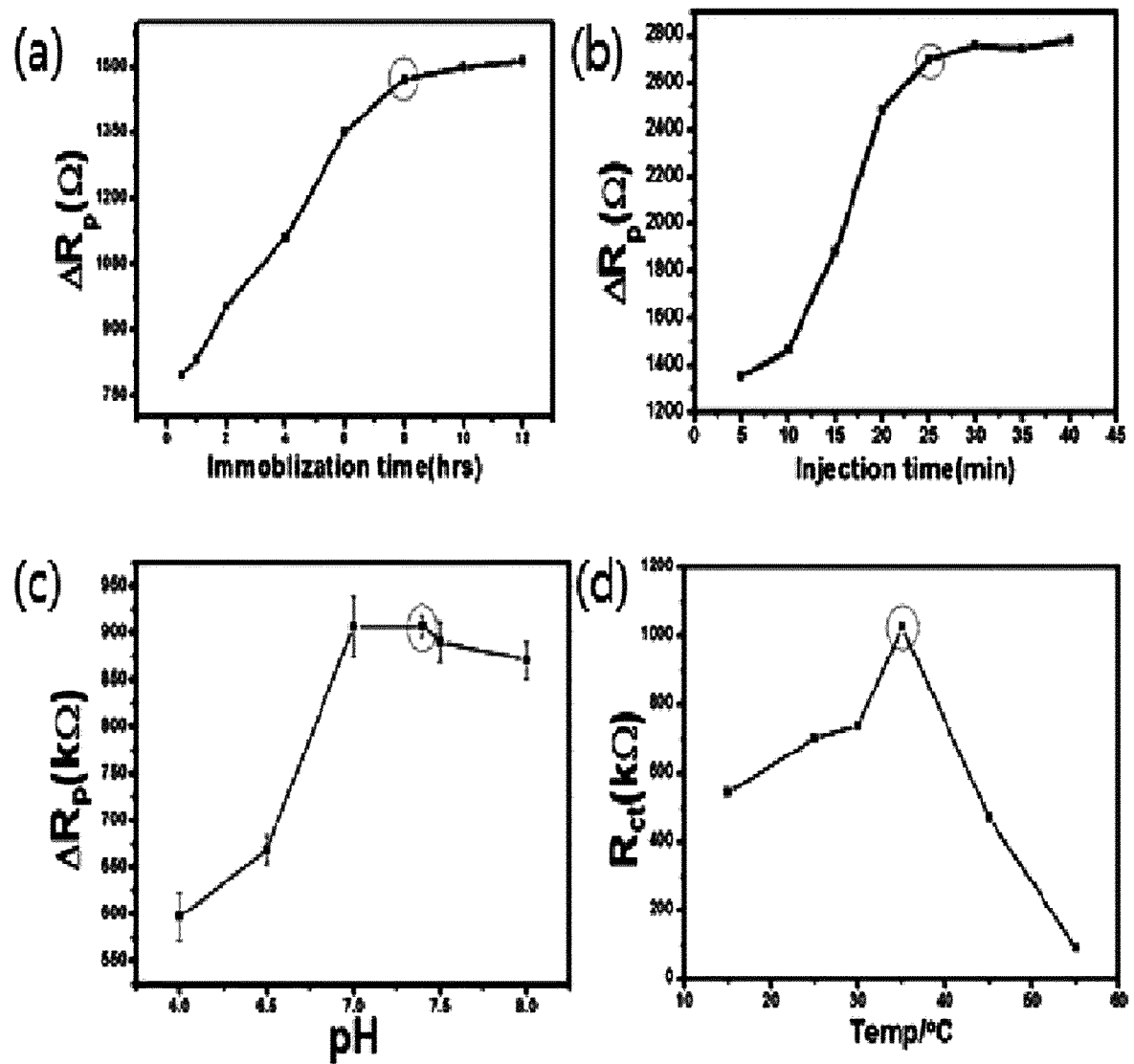
[도2]

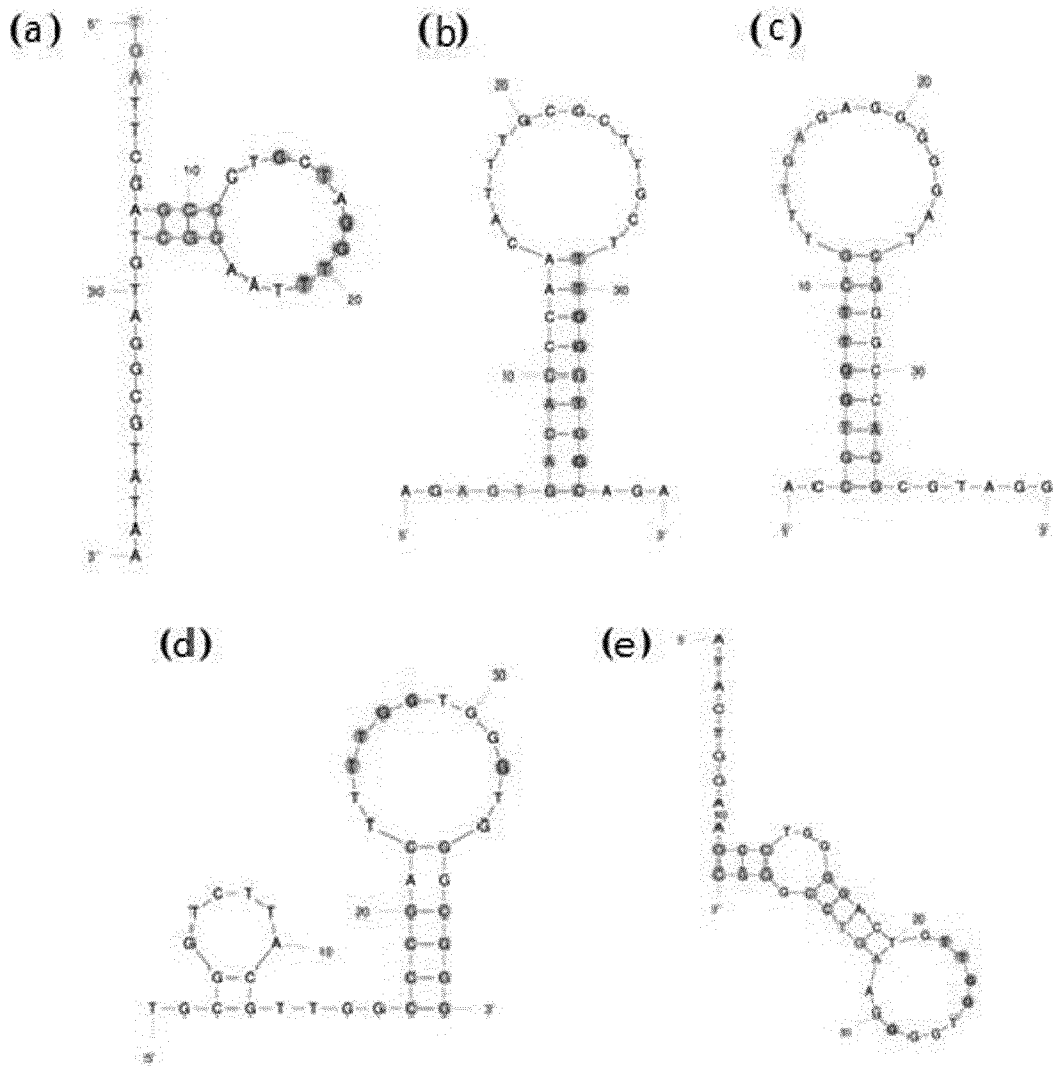


[도3]



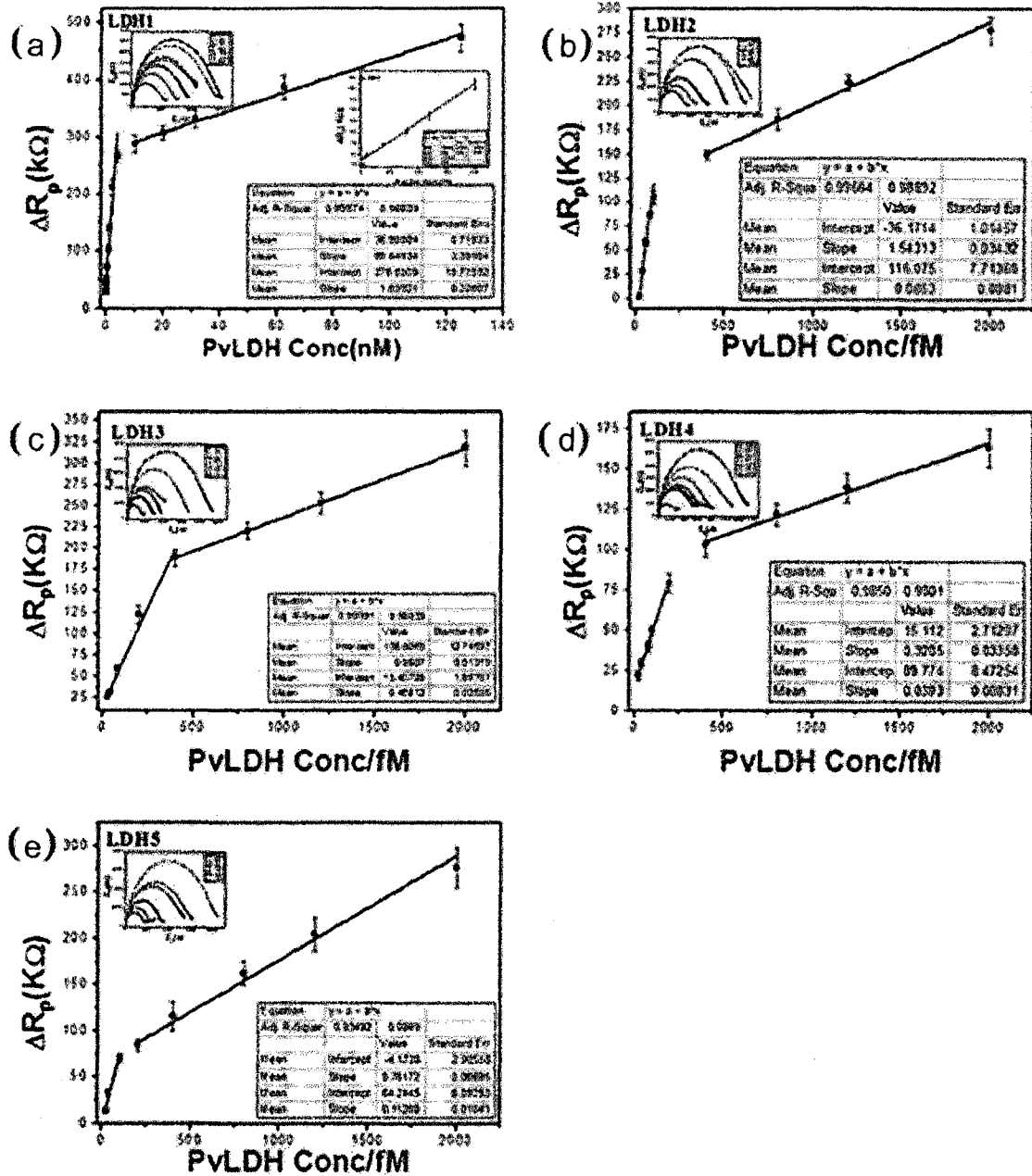
[도4]





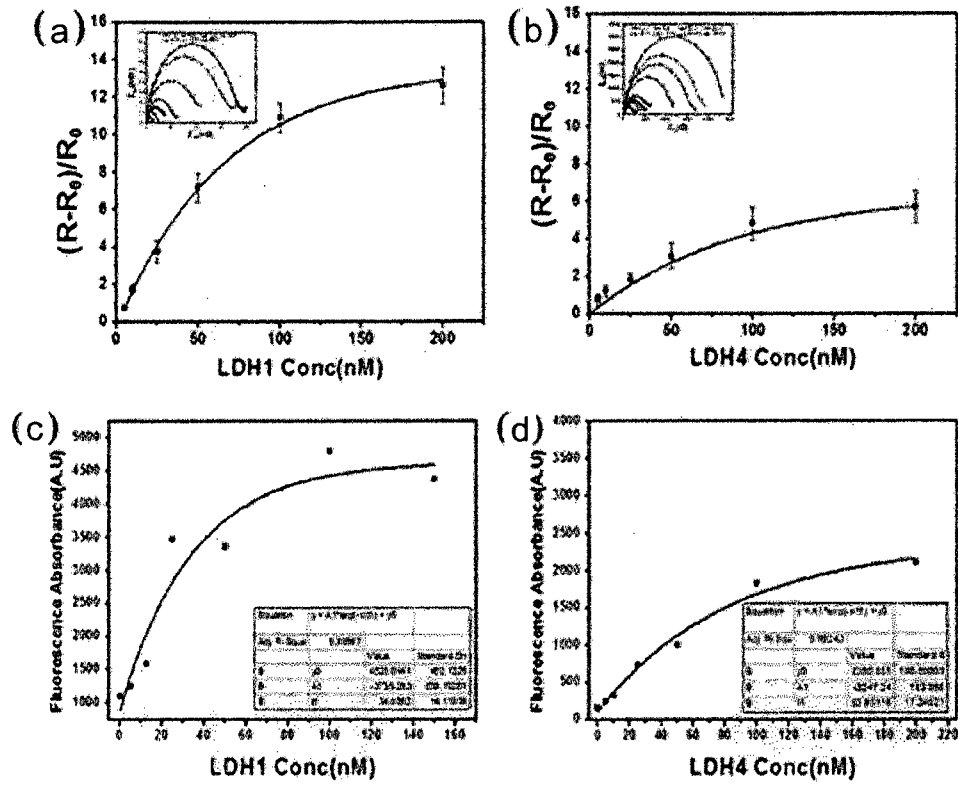
4/5

[도6]



5/5

[도 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/007096

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 35/08(2006.01)i, B01L 3/00(2006.01)i, C12N 15/10(2006.01)i, G01N 33/543(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 35/08; G01N 35/10; G01N 27/30; G01N 33/66; G01N 33/48; G01N 27/26; G01N 27/327; G01N 27/406; C12N 15/115; B01L 3/00; C12N 15/10; G01N 33/543

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 above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: microfluidic device, aptamer, electro conductive polymer, alternating current potential modulation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2011-0081808 A (CORNELL UNIVERSITY et al.) 14 July 2011	1-4
A	See claims 1 and 18.	5-21
Y	KR 10-2014-0012460 A (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 03 February 2014	1-8
	See figure 1; paragraphs [0021]-[0026].	
Y	KR 10-1370724 B1 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 06 March 2014	3,5-8,18-21
	See claim 1.	
Y	KR 10-2011-0128754 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 30 November 2011	18-21
	See claims 1 and 5; abstract.	
A	KR 10-1218987 B1 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY ERICA CAMPUS et al.) 07 January 2013	1-21
	See paragraphs [0013]-[0020].	
A	KIM, Jin Ho, Doctoral Thesis, "A Microfluidic Approach to Selection and Enrichment of Aptamers for Biomolecules and Cells", COLUMBIA UNIVERSITY, MECHANICAL ENGINEERING, 2013, pages 1-127	1-21
	See the entire document.	



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

"T" 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

31 OCTOBER 2017 (31.10.2017)

Date of mailing of the international search report

31 OCTOBER 2017 (31.10.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/007096

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0081808 A	14/07/2011	CN 102186992 A EP 2329045 A1 EP 2329045 A4 JP 2012-500009 A JP 5597633 B2 KR 10-1769743 B1 US 2012-0028811 A1 WO 2010-019969 A1	14/09/2011 08/06/2011 19/09/2012 05/01/2012 01/10/2014 21/08/2017 02/02/2012 18/02/2010
KR 10-2014-0012460 A	03/02/2014	KR 10-1395149 B1	15/05/2014
KR 10-1370724 B1	06/03/2014	KR 10-2013-0087239 A	06/08/2013
KR 10-2011-0128754 A	30/11/2011	WO 2011-149249 A2 WO 2011-149249 A3	01/12/2011 19/04/2012
KR 10-1218987 B1	07/01/2013	KR 10-2011-0126942 A	24/11/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 35/08(2006.01)i, B01L 3/00(2006.01)i, C12N 15/10(2006.01)i, G01N 33/543(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 35/08; G01N 35/10; G01N 27/30; G01N 33/66; G01N 33/48; G01N 27/26; G01N 27/327; G01N 27/406; C12N 15/115; B01L 3/00; C12N 15/10; G01N 33/543

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:마이크로플루이딕 디바이스, 압타머, 전기전도성 고분자, 교류 전위 변조

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2011-0081808 A (코넬 유니버시티 등) 2011.07.14 청구항 1 및 18 참조.	1-4
A		5-21
Y	KR 10-2014-0012460 A (부산대학교 산학협력단) 2014.02.03 도면 1; 단락 [0021]-[0026] 참조.	1-8
Y	KR 10-1370724 B1 (부산대학교 산학협력단) 2014.03.06 청구항 1 참조.	3, 5-8, 18-21
Y	KR 10-2011-0128754 A (한국생명공학연구원) 2011.11.30 청구항 1 및 5; 요약 참조.	18-21
A	KR 10-1218987 B1 (한양대학교 에리카산학협력단 등) 2013.01.07 단락 [0013]-[0020] 참조.	1-21
A	KIM, JIN HO, 박사논문, 'A Microfluidic Approach to Selection and Enrichment of Aptamers for Biomolecules and Cells', COLUMBIA UNIVERSITY, MECHANICAL ENGINEERING, 2013, 페이지 1-127 전체 문헌 참조.	1-21

☐ 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

2017년 10월 31일 (31.10.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 10월 31일 (31.10.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



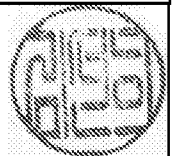
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0081808 A	2011/07/14	CN 102186992 A EP 2329045 A1 EP 2329045 A4 JP 2012-500009 A JP 5597633 B2 KR 10-1769743 B1 US 2012-0028811 A1 WO 2010-019969 A1	2011/09/14 2011/06/08 2012/09/19 2012/01/05 2014/10/01 2017/08/21 2012/02/02 2010/02/18
KR 10-2014-0012460 A	2014/02/03	KR 10-1395149 B1	2014/05/15
KR 10-1370724 B1	2014/03/06	KR 10-2013-0087239 A	2013/08/06
KR 10-2011-0128754 A	2011/11/30	WO 2011-149249 A2 WO 2011-149249 A3	2011/12/01 2012/04/19
KR 10-1218987 B1	2013/01/07	KR 10-2011-0126942 A	2011/11/24