



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월17일
(11) 등록번호 10-1667148
(24) 등록일자 2016년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/00 (2006.01) B01L 7/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
B01L 3/5023 (2013.01)
B01L 3/5027 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0060068
(22) 출원일자 2015년04월28일
심사청구일자 2015년04월28일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020140029825 A
Real-time PCR-based microfluidic array chip
for simultaneous detection of multiple
waterborne pathogens(Naveen Ramalingam,
Sensors and Actuators B, 2010)

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이
화여자대학교)
(72) 발명자
이혁진
서울특별시 마포구 백범로 205, 104동 504호 (신
공덕동, 마포펜트하우스)
장보라
서울특별시 구로구 구일로10길 27, B동 1438호
(구로동)
정일영
세종특별자치시 나리로 38, 705동 2202호 (
한솔동, 첫마을아파트)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 20 항

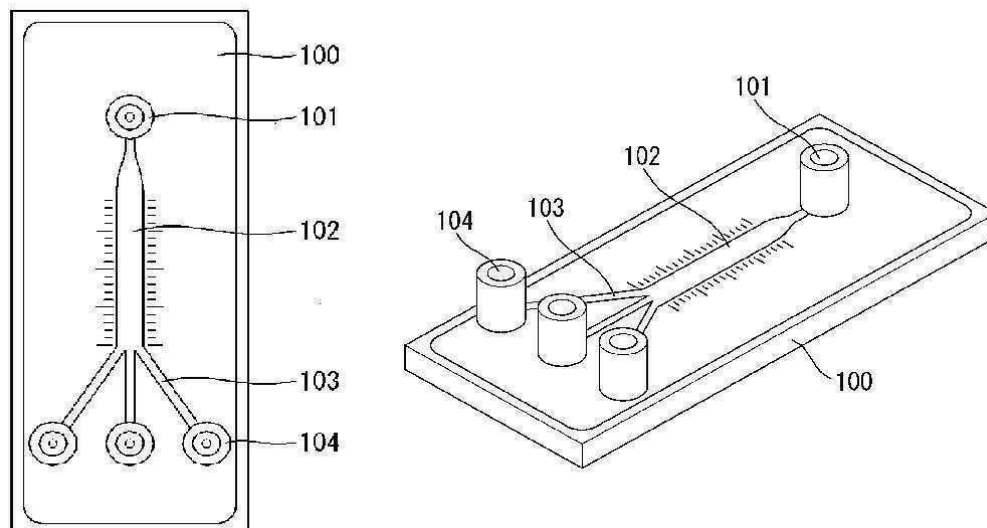
심사관 : 양경식

(54) 발명의 명칭 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치, 이의 제조방법 및 이를 이용한 표적 소분자 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치, 이의 제조방법 및 이를 이용한 표적 소분자 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명은 핵산 증폭을 위하여 온도를 변화시킬 필요가 없고, 외부의 동력 공급이 없어도 표적 소분자를 검출할 수 있다. 따라서 복잡한 장비를 수반할 필요가 없으며, 간단하고 저렴하게 제조가 가능하고, 조작이 간편하며, 휴대가 용이하다. 또한 다양한 소분자의 검출에 이용할 수 있고, 2 이상의 소분자를 동시에 검출하는데 이용할 수 있어, 마약류, 환경호르몬 등 사회적으로 문제가 되는 화합물의 검출에도 널리 이용할 수 있다. 따라서 현장 진단에 매우 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B01L 7/52 (2013.01)

C12Q 1/6834 (2013.01)

B01L 2200/027 (2013.01)

C12Q 2521/101 (2013.01)

C12Q 2521/501 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012K1A1A2A01056092

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 국제협력사업-글로벌개방혁신연구센터

연구과제명 삼차원 DNA 구조체 기반 고효율 siRNA 전달체 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.12.01 ~ 2017.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9C6049834

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 유전 전달물질을 이용한 편도유래 유도만능줄기세포 제작 및 분화조절

기 여 율 1/2

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

기관;

상기 기관 상에 형성된 시료 용액이 외부로부터 유입되는 유입구;

상기 유입구와 연결되어 유입된 시료 용액을 수용하는 제 1 유로;

상기 제 1 유로와 연결된 제 2 유로;

상기 제 2 유로와 연결된 배출구를 포함하는 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치로서,

상기 제 2 유로 표면은 코팅되어 있고;

상기 코팅 상에 프라이머가 고정되고;

상기 고정된 프라이머에는 표적 소분자 검출용 템플레이트가 결합되어 있으며,

상기 표적 소분자 검출용 템플레이트는 상기 프라이머에 상보적으로 결합하는 프라이머 결합부, 상기 프라이머 결합부의 일 말단에 결합된 표적 소분자 검출용 앵타머의 일부분, 및 상기 프라이머 결합부의 다른 말단에 결합된 표적 소분자 검출용 앵타머의 다른 부분을 포함하는,

표적 소분자 검출용 미세 유동 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제 2 유로는 1 내지 20개인 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제 2 유로는 2 내지 20개이며, 제 1 유로의 말단에서 각각의 제 2 유로가 분지되고,

각각의 제 2 유로 상에 고정된 프라이머에 결합된 표적 소분자 검출용 템플레이트는 서로 같거나 다른 소분자에 결합하는, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 코팅은 도파민, 5-하이드록시도파민 염산, 노르에피네프린, 에피네프린, 파이로갈롤아민, DOPA(3,4-Dihydroxyphenylalanine), 카테킨, 탄닌류, 파이로갈롤, 파이로카테콜, 헤파린-카테콜, 키토산-카테콜, 폴리에틸렌글리콜-카테콜, 폴리에틸렌이민-카테콜, 폴리메틸메타크릴레이트-카테콜, 히알루론산-카테콜, 폴리라이신-카테콜 (polylysine-catechol), 및 폴리라이신 (polylysine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 프라이머는 티올(thiol), 아민(amine), 하이드록실(hydroxyl), 카복실(carboxyl), 이소티오시아네이트(isothiocyanate), NHS 에스테르, 알데히드(aldehyde), 에폭시드(epoxide), 카보네이트(Carbonate), HOBT 에스테르, 글루타르알데히드(Glutaraldehyde), 카바메이트(carbamate), 이미다졸 카바메이트(imidazole carbamate), 말레이미드(maleimide), 아지리딘(aziridine), 설펜(sulfone), 비닐설펜(vinylsulfone), 하이드라진(hydrazine), 페닐 아자이드(phenyl azide), 벤조페논(benzophenone), 안트라퀴논(anthraquinone), 및 디엔(Diene) 기로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상으로 말단이 변형된 것인, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 코팅은 5-하이드록시도파민 염산이고, 상기 프라이머는 말단이 티올 또는 아민 기로 변형

된 것인, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 표적 소분자 검출용 템플레이트의 프라이머 결합부는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 포함하는, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 소분자는 분자량이 900 달톤 이하인 유기 화합물로서, 마약류 또는 환경호르몬인, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 마약류는 양귀비, 아편, 또는 코카 잎으로부터 추출되는 알칼로이드 또는 이의 합성품, 엘에스디(LSD), 암페타민(amphetamin), 메탐페타민(metamphetamin), 바르비탈(barbital), 메프로바메이트(meprobamate), 프로포폴(propofol), 및 케타민(ketamine)으로 이루어진 군으로부터 선택된, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 코카 잎으로부터 추출되는 알칼로이드는 코카인인, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 환경호르몬은 다이옥신, 디에틸stil베스트롤(DES), 17-β 에스트라디올, 비스페놀 A, 벤조페논, DDT(dicholoro-diphenyl-trichloroethane), 및 프탈레이트(phtalate)로 이루어진 군으로부터 선택된, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 환경호르몬은 17-β 에스트라디올인, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치.

청구항 13

제1항의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치;

dNTP;

리가아제;

및 등은 핵산 증합효소를 포함하는, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치 키트.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 리가아제는 DNA 리가아제인, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치 키트.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 등은 핵산 증합효소는 phi 29 폴리머라제인, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치 키트.

청구항 16

제13항에 있어서, 디티오프레이톨(DTT) 또는 파이로포스파타제(pyrophosphatase)를 더 포함하는, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치 키트.

청구항 17

제13항에 있어서, 염색 시약, 고염 용액(high salt solution), 또는 형광 시약을 더 포함하는, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치 키트.

청구항 18

다음 단계를 포함하는 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치를 제조하는 방법:

- 1) 기관, 상기 기관 상에 형성된 유입구, 상기 유입구와 연결되어 유입된 시료 용액을 수용하는 제 1 유로, 상기 제 1 유로와 연결된 제 2 유로, 상기 제 2 유로와 연결된 배출구를 포함하는 미세 유동 장치를 제공하는 단계;
- 2) 상기 미세 유동 장치의 제 2 유로 표면을 코팅하는 단계;
- 3) 상기 코팅 상에 프라이머를 고정시키는 단계; 및
- 4) 상기 고정된 프라이머에 표적 소분자 검출용 템플레이트를 결합시키는 단계로서, 상기 표적 소분자 검출용 템플레이트는 상기 프라이머에 상보적으로 결합하는 프라이머 결합부, 상기 프라이머 결합부의 일 말단에 결합된 표적 소분자 검출용 앵타머의 일부분, 및 상기 프라이머 결합부의 다른 말단에 결합된 표적 소분자 검출용 앵타머의 다른 부분을 포함하는 것인, 단계.

청구항 19

다음 단계를 포함하는 제1항의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치를 이용하여 표적 소분자를 검출하는 방법.

- a) 제1항의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치를 제공하는 단계;
- b) 시료 용액을 상기 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치의 유입구로 주입하는 단계; 및
- c) 상기 미세 유동 장치의 제 2 유로에 dNTP, 리가아제, 및 등은 핵산 중합효소를 첨가하는 단계.

청구항 20

제19항에 있어서,

- d) 상기 미세 유동 장치의 유입구에 염색 시약, 고염 용액 또는 형광 시약을 주입하는 단계를 더 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치, 이의 제조방법 및 이를 이용한 표적 소분자 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 소분자(small molecule)란 약 900 달톤(dalton) 이하의 작은 분자량을 갖고, 직경이 10^{-9} m로 작은 유기 화합물을 의미한다. 소분자의 종류는 매우 많은데, 예를 들어 항체의약품을 제외한 약물은 대부분 소분자에 해당하며, 마약류의 화합물, 스테로이드 계열의 환경호르몬 역시 소분자에 해당한다.

[0003] 소분자를 검출하기 위한 다양한 방법들이 연구, 개발되어 왔는데, 그 중의 하나가 앵타머(aptamer)이다. 앵타머란 특정 표적물질에 대해 높은 특이성과 친화도를 갖는 단일가닥 핵산 구조체로서, 특정 표적물질을 검출하는데 유용하게 이용될 수 있다. 앵타머는 약 20 ~ 26 량체 정도의 분자로서 길이가 짧고 변형이 용이하며 안정성이 매우 높은 장점이 있다. 다양한 표적물질에 대한 앵타머가 개발되어 있으며, 소분자를 표적물질로 하는 앵타머들도 다수 개발되어 있다. 예를 들어, 등록번호 10-1263450호는 항생물질인 카나마이신(kanamycin)에 특이적으로 결합하는 앵타머를 개시하고 있다.

[0004] 미세 유동 장치(microfluidic device)란 기관 상에서 미세유체 유로(microfluidic channel)를 통해 각 구성이 연결되어, 시료 용액을 주입하면 검출 신호를 얻을 때까지 필요한 전 공정이 자동화되어 있는 장치를 말한다. 적은 양의 시료에서도 검출이 가능하며, 시약을 적게 사용하고, 전 공정이 자동화되어 있어 편리하다는 장점이 있다.

[0005] 공개번호 10-2014-0032094호는 앵타머와 결합될 수 있는 미세 유동 장치를 개시하고 있다. 그러나 상기 문헌에 공개된 미세 유동 장치는 2층 구조이고 유로의 각도를 조절하여 시료를 흐르게 하므로 제조 공정과 사용 방법이 복잡하다. 또한 시료를 주입하기 위해 펌프를 이용하므로 외부에서 동력을 공급해야 하고, 한 번에 한가지 물질

만을 검출할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 국내등록특허 제10-1263450호(발명의 명칭: 카나마이신에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머)
(특허문헌 0002) 국내공개특허 제10-2014-0032094호(발명의 명칭: 표적 물질 포획이 용이한 미세유동 장치 및 상기 미세유동 장치를 이용한 표적 물질 분리 방법)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치, 이의 제조방법 및 이를 이용한 표적 소분자 검출 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은
- [0009] 기관;
- [0010] 상기 기관 상에 형성된 시료 용액이 외부로부터 유입되는 유입구;
- [0011] 상기 유입구와 연결되어 유입된 시료 용액을 수용하는 제 1 유로;
- [0012] 상기 제 1 유로와 연결된 제 2 유로;
- [0013] 상기 제 2 유로와 연결된 배출구를 포함하는 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치로서,
- [0014] 상기 제 2 유로 표면은 코팅되어 있고;
- [0015] 상기 코팅 상에 프라이머가 고정되고;
- [0016] 상기 고정된 프라이머에는 표적 소분자 검출용 템플레이트가 결합되어 있으며,
- [0017] 상기 표적 소분자 검출용 템플레이트는 상기 프라이머에 상보적으로 결합하는 프라이머 결합부, 상기 프라이머 결합부의 일 말단에 결합된 표적 소분자 검출용 앵타머의 일부분, 및 상기 프라이머 결합부의 다른 말단에 결합된 표적 소분자 검출용 앵타머의 다른 부분을 포함하는,
- [0018] 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 제 2 유로는 1 내지 20개일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 제 2 유로는 2 내지 20개이며, 제 1 유로의 말단에서 각각의 제 2 유로가 분지되고, 각각의 제 2 유로 상에 고정된 프라이머에 결합된 표적 소분자 검출용 템플레이트는 서로 같거나 다른 소분자에 결합하는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 코팅은 5-하이드록시도파민 염산, 노르에피네프린, 에피네프린, 파이로갈롤아민, DOPA(3,4-Dihydroxyphenylalanine), 카테킨, 탄닌류, 파이로갈롤, 파이로카테콜, 헤파린-카테콜, 키토산-카테콜, 폴리에틸렌글리콜-카테콜, 폴리에틸렌이민-카테콜, 폴리메틸메타크릴레이트-카테콜, 히알루론산-카테콜, 폴리라이신-카테콜 (polylysine-catechol), 및 폴리라이신 (polylysine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 프라이머는 티올, 아민, 하이드록실, 카복실, 이소티오시아네이트, NHS 에스테르, 알데히드, 에폭시드, 카보네이트, HOBt 에스테르, 글루타르알데히드, 카바메이트, 이미다졸 카바메이트, 말레이미드, 아지리딘, 설펜, 비닐설펜, 하이드라진, 페닐 아자이드, 벤조페논, 안트라퀴논, 및 디엔 기로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상으로 말단이 변형된 것일 수 있다.

- [0023] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 코팅은 5-하이드록시도파민 염산이고, 상기 프라이머는 티올 또는 아민 기로 말단이 변형된 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 표적 소분자 검출용 템플레이트의 프라이머 결합부는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치로 검출할 수 있는 소분자는, 예를 들어 분자량이 900 달톤 이하인 유기 화합물로서, 마약류 또는 환경호르몬일 수 있다.
- [0026] 상기 마약류는 예컨대 양귀비, 아편, 또는 코카 잎으로부터 추출되는 알칼로이드 또는 이의 합성품, 엘에스디(LSD), 암페타민(amphetamin), 메탐페타민(metamphetamin), 바르비탈(barbital), 메프로바메이트(meprobamate), 프로포폴(propofol), 및 케타민(ketamine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으며, 예를 들어 코카인일 수 있다.
- [0027] 상기 환경호르몬은 다이옥신, 디에틸stil베스트롤(DES), 17-β 에스트라디올, 비스페놀 A, 벤조페논, DDT(dichloro-diphenyl-trichloroethane), 및 프탈레이트(phthalate)로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으며, 예를 들어 17-β 에스트라디올일 수 있다.
- [0028] 또한 본 발명은 상기 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치;
- [0029] dNTP;
- [0030] 리가아제;
- [0031] 및 등은 핵산 중합효소를 포함하는, 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치 키트를 제공한다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 리가아제는 DNA 리가아제, 예컨대 T7 리가아제, 또는 써클리가아제TM(CircLigaseTM)일 수 있다. 또한 상기 등은 핵산 중합효소는 phi 29 폴리머라제일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 키트는 디티오프레이톨(DTT) 또는 파이로포스파타제(pyrophosphatase)를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 또한 상기 키트는 염색 시약, 고염 용액(high salt solution), 또는 형광 시약을 더 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명은 다음 단계를 포함하는 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0036] 1) 기관, 상기 기관 상에 형성된 유입구, 상기 유입구와 연결되어 유입된 시료 용액을 수용하는 제 1 유로, 상기 제 1 유로와 연결된 제 2 유로, 상기 제 2 유로와 연결된 배출구를 포함하는 미세 유동 장치를 제공하는 단계;
- [0037] 2) 상기 미세 유동 장치의 제 2 유로 표면을 코팅하는 단계;
- [0038] 3) 상기 코팅 상에 프라이머를 고정시키는 단계; 및
- [0039] 4) 상기 고정된 프라이머에 표적 소분자 검출용 템플레이트를 결합시키는 단계로서, 상기 표적 소분자 검출용 템플레이트는 상기 프라이머에 상보적으로 결합하는 프라이머 결합부, 상기 프라이머 결합부의 일 말단에 결합된 표적 소분자 검출용 앵타머의 일부분, 및 상기 프라이머 결합부의 다른 말단에 결합된 표적 소분자 검출용 앵타머의 다른 부분을 포함하는 것인, 단계.
- [0040] 또한 본 발명은 다음 단계를 포함하는 제1항의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치를 이용하여 표적 소분자를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0041] a) 제1항의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치를 제공하는 단계;
- [0042] b) 시료 용액을 상기 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치의 유입구로 주입하는 단계; 및
- [0043] c) 상기 미세 유동 장치의 제 2 유로에 dNTP, 리가아제, 및 등은 핵산 중합효소를 첨가하는 단계.
- [0044] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 방법은
- [0045] d) 상기 미세 유동 장치의 유입구에 염색 시약, 고염 용액 또는 형광 시약을 주입하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0046] 본 발명은 핵산 증폭을 위하여 온도를 변화시킬 필요가 없고, 외부의 동력 공급이 없어도 표적 소분자를 검출할 수 있다. 따라서 복잡한 장비를 수반할 필요가 없으며, 간단하고 저렴하게 제조가 가능하고, 조작이 간편하며, 휴대가 용이하다. 또한 다양한 소분자의 검출에 이용할 수 있고, 2 이상의 소분자를 동시에 검출하는데 이용할 수 있어, 마약류, 환경호르몬 등 사회적으로 문제가 되는 화합물의 검출에도 널리 이용할 수 있다. 따라서 현장 진단에 매우 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치의 평면도(좌) 및 사시도(우)이다.

<도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>

100: 기관

101: 유입구

102: 제1유로

103: 제2유로

104: 배출구

도 2는 본 발명의 표적 소분자 검출용 템플레이트의 구조를 나타낸 도이다. 도 2A는 선형 구조를 나타낸 것이며, 도 2B는 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치의 제 2 유로에 고정된 프라이머에 결합되었을 경우의 템플레이트의 형태를 모식적으로 나타낸 것이며, 도 2C는 표적 소분자와 결합한 경우의 형태를 모식적으로 나타낸 것이다.

도 3A는 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치의 제 2 유로에 프라이머가 고정되고, 상기 프라이머에 표적 소분자 검출용 템플레이트가 결합된 모습을 나타낸 모식도이고, 도 3B는 표적 소분자와 결합한 경우의 형태를 나타낸 모식도이며, 도 3C는 리가아제에 의하여 상기 템플레이트가 단힌 형태가 된 모습을 나타낸 모식도이며, 도 3D는 등온 핵산 증합효소에 의하여 단힌 형태의 상기 템플레이트를 주형으로 핵산이 합성되는 모습을 나타낸 모식도이다.

도 4A는 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치에서 시료 용액 내에 가장 왼쪽의 제 2 유로에서 검출되는 표적 물질만이 존재하는 경우를 염색 시약을 이용하여 시료 용액의 흐름을 관찰한 도이며, 도 4B는 도 4A의 결과를 Imager를 이용하여 관찰한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0048] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 도면을 참조하여 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 설명은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 설명에 한정되는 것은 아니며 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 또한, 도면들에 있어서, 구성요소의 폭, 길이, 두께 등은 편의를 위하여 과장되어 표현될 수도 있다. 명세서 전체에 걸쳐서 동일한 참조번호들은 동일한 구성요소들을 나타낸다.

- [0049] 또한, 일 구성요소가 다른 구성요소 위에 있다고 할 때, 이는 다른 구성요소 바로 위에 있는 경우 뿐 아니라, 그 중간에 또 다른 구성요소가 있는 경우도 포함한다.

[0050] 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치의 기본 구조

- [0051] 이하 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치의 기본 구조를 개략적으로 설명한다.

- [0052] 도 1은 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치의 간단한 모식도이다. 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치는 기관(100) 상에 유입구(101) 및 제 1 유로(102)가 기본적으로 존재하며, 제 1 유로에 연결된 제 2 유로(103) 및 제 2 유로에 연결된 배출구(104)가 1개 이상 존재할 수 있다. 도 1 및 4에서는 제 2 유로 및 제 2 유로에 연결된 배출구가 3개 존재하는 경우를 예시적으로 나타내었으며, 제 2 유로 및 배출구의 수는 이보다 증가하거나 감소될 수 있다.

- [0053] 유입구(101)로 시료 용액을 주입하면, 시료 용액은 제 1 유로(102)를 따라 흘러서 제 2 유로(103)로 각각 흘러 들어가도록 설계되어 있다. 각각의 제 2 유로는 코팅물질로 코팅되어 있으며, 코팅 상에 프라이머가 고정되어 있고, 고정된 프라이머에 표적 소분자 검출용 템플레이트가 결합되어 있다. 제 2 유로 끝에는 배출구(104)가 있어, 시료가 배출구를 통해 제 2 유로 밖으로 배출된다.
- [0054] 각각의 제 2 유로에 고정된 프라이머와 표적 소분자 검출용 템플레이트는 서로 같거나 다를 수 있다. 본 발명의 표적 소분자 검출용 템플레이트의 기본 구조에 대한 모식도를 도 2에 나타내었다. 도 2의 A는 상기 템플레이트의 선형 구조이다. 본 발명의 표적 소분자 검출용 템플레이트는 단일가닥(single-stranded) 핵산으로서, 중앙부에는 프라이머에 상보적으로 결합하는 부분(프라이머 결합부)(도면상에 파란색으로 표시)이 존재한다. 프라이머 결합부의 일 말단에는 표적 소분자 검출용 앵타머(aptamer)의 일부분(도면상에 회색으로 표시한 부분)이 결합되어 있고, 다른 말단에는 상기 앵타머의 다른 부분(도면상에 진한 회색으로 표시한 부분)이 결합되어 있다.
- [0055] 앵타머란 특정 표적 물질에 선택적으로 결합하는 단일가닥 핵산으로서, 표적 물질에 결합하면 핵산의 입체 구조가 변화한다. 본 발명에서는 표적 소분자 검출용 앵타머를 절단하여 일부분은 프라이머 결합부의 일 말단에 부착하고, 다른 부분은 프라이머 결합부의 다른 말단에 결합시켜 표적 소분자 검출용 템플레이트를 제조하였다.
- [0056] 본 발명의 미세 유동 장치에서, 상기 템플레이트의 프라이머 결합부는 제 2 유로 상에 고정된 프라이머에 상보적으로 결합되므로, 상기 템플레이트는 도 2의 B에 모식적으로 나타낸 것과 같은 상태로 존재한다. 표적 물질이 존재하는 경우, 도 2의 C와 같이 표적 소분자 검출용 앵타머의 일부분과 다른 부분은 표적물질에 선택적으로 결합하며 입체구조가 변화하여 5' 말단과 3' 말단이 서로 가까워져 그 사이에 작은 틈새인 닉(nick)만을 남기게 된다.
- [0057] 본 발명의 미세 유동 장치에 있어서, 표적 소분자는 임의의 소분자(small molecule)가 될 수 있으며, 그 종류에 제한이 없다. 상기 소분자는 낮은 분자량, 예컨대 900 달톤(dalton) 이하의 분자량을 갖고, 작은 크기, 예를 들어 10^{-9} m의 직경을 갖는 임의의 유기 화합물을 의미한다.
- [0058] 상기 소분자는 상황에 따라 신속한 검출이 요구되는 소분자, 예를 들어 각종 마약류의 화합물이나 환경호르몬 등이 될 수 있다. 상기 마약류란 마약류 관리에 관한 법률에 의해 마약류로 규정된 마약, 향정신성의약품, 및 대마를 의미한다. 상기 마약이란 양귀비, 아편, 또는 코카 잎으로부터 추출되는 알칼로이드, 및 상기 알칼로이드와 동일한 작용을 하는 합성품을 의미한다. 상기 향정신성의약품이란 인간의 중추신경계에 작용하는 것으로서 이를 오용하거나 남용할 경우 인체에 심각한 위해가 있다고 인정되는 의약품으로서, 엘레스디(LSD), 암페타민(amphetamin), 메탐페타민(metamphetamin), 바르비탈(barbital), 메프로바메이트(meprobamate), 프로포폴(propofol), 및 케타민(ketamine) 등이 이에 속한다.
- [0059] 상기 환경호르몬은 내분비계에 혼란을 주어 정상적인 대사기능을 방해하는 외인성 물질로서, 다이옥신, 디에틸스틸베스트롤(DES), 17- β 에스트라디올, 비스페놀 A, 벤조페논, DDT(dichloro-diphenyl-trichloroethane), 및 프탈레이트(phthalate) 등이 이에 속한다.
- [0060] 본 발명의 미세 유동 장치에 있어서, 기판, 제 1 유로, 제 2 유로, 유입구 및 배출구의 재질은 시료 용액과 반응하지 않는 한 제한이 없다. 예를 들어 폴리머(polymer), 유리(glass), 실리콘(silicon), 세라믹(ceramic) 등의 재질을 사용할 수 있다. 그 중에서, 성형의 용이성 및 비용적 측면을 중점적으로 고려한다면 폴리머 재질이 유리하다. 예를 들어 PP(polypropylene), PC(polycarbonate), PE(polyethylene), PET(polyethylene terephthalate), PMMA(polymethylmethacrylate (acrylic)), PS(Polystyrene) 및 COC(cyclic olefin copolymer)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 사용할 수 있다. 그 외에, 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane), 금(Au), 금속 산화물(metal oxide)(TiO_2 , Al_2O_3 , 산화 인듐-주석(Indium-Tin Oxide)) 등의 재질이 될 수 있다.
- [0061] 본 발명의 미세 유동 장치에 있어서, 상기 제 2 유로는 1개 이상일 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 20개, 보다 바람직하게는 2 내지 5개가 될 수 있다. 본 발명에 있어서, 제 2 유로의 수는 검출하고자 하는 표적 물질의 가지수에 따라 달라질 수 있으며, 예를 들어 3가지 물질을 동시에 검출하고자 하는 경우, 대조군을 위한 것까지 포함하여 제 2 유로가 총 4개가 될 수 있다. 그러나 제 2 유로의 수에는 제한이 없다.
- [0062] 본 발명의 미세 유동 장치에 있어서, 상기 제 2 유로의 직경은 1 μm 내지 5 mm의 크기일 수 있고, 다른 일 구체예에서 상기 제 2 유로의 직경은 50 μm 내지 5 mm의 크기일 수 있다. 또한 일 구체예에서 제 2 유로의 직경은 0.25 mm 내지 2 mm의 크기일 수 있고, 다른 일 구체예에서 0.5 mm 내지 1.5 mm의 크기일 수 있다. 그러나 제

2 유로의 직경은 적절히 조절될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0063] 본 발명의 미세 유동 장치에 있어서, 제 2 유로의 코팅은 하이드록시 벤젠류의 모노머 또는 폴리머 코팅이 될 수 있다. 또한 상기 코팅은 일례로 카테콜아민 폴리머 코팅을 포함할 수 있다. 하이드록시 벤젠류의 모노머 또는 폴리머는 뛰어난 표면 특성으로 인해 귀금속들, 금속 산화물들, 세라믹들, 및 합성 폴리머들을 포함한 광범위한 소재에 용이하게 코팅될 수 있다. 상기 하이드록시 벤젠류의 모노머 및 폴리머의 구체적인 예는 비제한적으로 도파민(dopamine), 5-하이드록시도파민 염산(5-hydroxydopamine HCl), 노르에피네프린(norepinephrine), 에피네프린(epinephrine), 파이로갈롤아민(pyrogallol amine), DOPA(3,4-Dihydroxyphenylalanine), 카테킨(catechin), 탄닌류(tannins), 파이로갈롤(pyrogallol), 파이로카테콜(pyrocatechol), 헤파린-카테콜(heparin-catechol), 키토산-카테콜(chitosan-catechol), 폴리에틸렌글리콜-카테콜(poly(ethylene glycol)-catechol), 폴리에틸렌이민-카테콜 (poly(ethyleneimine)-catechol), 폴리메틸메타크릴레이트-카테콜(poly(methyl methacrylate)-catechol), 히알루론산-카테콜(hyaluronic acid-catechol), 폴리라이신-카테콜 (polylysine-catechol), 폴리라이신(polylysine) 등이 될 수 있다. 본 발명의 일 구현예로서, 친수성 물질을 코팅물질로 사용하는 경우 제 2 유로 상에 시료 용액의 흐름을 도울 수 있다.

[0064] 본 발명의 미세 유동 장치에 있어서, 상기 프라이머는 예를 들어 10 내지 40량체(mer) 길이의 임의의 단일가닥 핵산이 될 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 프라이머의 길이 및 서열에는 제한이 없다. 상기 프라이머는 제 2 유로 상의 코팅에 용이하게 고정될 수 있도록 적합한 관능기(functional group)를 가질 수 있다. 예를 들어, 티올(thiol), 아민(amine), 하이드록실(hydroxyl), 카복실(carboxyl), 이소티오시아네이트(isothiocyanate), NHS 에스테르, 알데히드(aldehyde), 에폭시드(epoxide), 카보네이트(Carbonate), HOBt 에스테르, 글루타르알데히드(Glutaraldehyde), 카바메이트(carbamate), 이미다졸 카바메이트(imidazole carbamate), 말레이미드(maleimide), 아지리딘(aziridine), 설펜(sulfone), 비닐설펜(vinylsulfone), 하이드라진(hydrazine), 페닐아자이드(phenyl azide), 벤조페논(benzophenone), 안트라퀴논(anthraquinone), 디엔(Diene) 기 등을 가질 수 있으며, 바람직하게는 티올 기 또는 아민 기를 가질 수 있다. 그러나 관능기의 종류는 이에 제한되지 않으며, 제 2 유로 상의 코팅에 따라 다양한 관능기가 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명의 미세 유동 장치에 있어서, 상기 표적 소분자 검출용 템플레이트는 사용되는 표적 소분자 검출용 앵타머 및 프라이머의 길이에 따라, 안정성 및 회전환 증폭 효율을 고려하여 다양하게 설계할 수 있다. 예를 들어 소분자 검출용 템플레이트는 총 40 내지 160량체 길이의 단일가닥 핵산이 될 수 있다.

[0066] 상기 표적 소분자 검출용 템플레이트에서 프라이머 결합부는 예를 들어 10 내지 40량체 길이가 될 수 있으며, 본 발명에 사용되는 프라이머에 상보적으로 결합하는 임의의 서열을 갖는 단일가닥 핵산이 될 수 있다. 본 발명에 사용될 수 있는 프라이머 결합부의 길이 및 서열에는 제한이 없다.

[0067] 본 발명의 미세 유동 장치에 있어서, 상기 표적 소분자 검출용 템플레이트에서 프라이머 결합부에 결합된 표적 소분자 검출용 앵타머의 일부분과 표적 소분자 검출용 앵타머의 다른 부분은 하나의 표적 소분자 검출용 앵타머를 절단한 것이다. 상기 표적 소분자 검출용 앵타머는 소분자 검출에 이용될 수 있는 임의의 앵타머를 의미하며, 공지된 앵타머가 될 수 있다. 당업자는 반복적인 실험에 의하여 공지의 앵타머를 본 발명의 표적 소분자 검출용 템플레이트에 적용하기에 적절한 지점에서 절단할 수 있다.

[0068] 본 발명의 미세 유동 장치에 있어서, 외부 동력 공급 없이도 모세관 현상에 의하여 시료 용액이 유로를 흐를 수 있다. 그러나 필요에 따라 펌프, 전류 등을 이용하여 외부 동력을 공급하여 용액 흐름을 조절할 수 있으며, 유로의 각도를 조절하여 용액 흐름을 조절할 수도 있다.

[0069] 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치의 제조방법

[0070] 이하에서 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치의 제조방법을 개략적으로 설명한다.

[0071] 1단계 : 미세 유동 장치를 제조하는 단계

[0072] 기관(100) 상에 유입구(101) 및 제 1 유로(102)를 형성시키고, 제 1 유로에 연결된 제 2 유로(103) 및 제 2 유로에 연결된 배출구(104)가 1개 이상 형성시켜서, 도 1에 예시적으로 나타낸 바와 같은 미세 유동 장치를 제조한다.

[0073] 시판되는 미세 유동 장치를 이용하는 것도 가능하다. 예를 들어 ibidi사에서 제조한 1 μ -Slide III³ⁱⁿ¹ uncoated Microscopy Chamber 제품을 이용할 수 있다.

- [0074] **2단계 : 미세 유동 장치의 제 2 유로를 코팅하는 단계**
- [0075] 미세 유동 장치의 각 제 2 유로를 코팅물질로 코팅한다.
- [0076] **3단계 : 미세 유동 장치의 제 2 유로에 프라이머를 부착시키는 단계**
- [0077] 미세 유동 장치의 제 2 유로의 코팅 상에 프라이머를 부착시킨다.
- [0078] 프라이머는 본 발명의 미세 유동 장치에 사용하기에 적절한 형태로 준비할 수 있다. 예를 들어, 필수적인 것은 아니나, DTT(dithiothreitol)를 처리하여 프라이머 내에 생성된 이황화 결합이 모두 제거된 선형(linear form)의 프라이머를 준비할 수 있다. 또한 프라이머 말단을 코팅과의 반응을 용이하게 하는 관능기로 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 티올기 또는 아민기가 프라이머의 일 말단에 결합될 수 있다.
- [0079] 프라이머와 코팅 간의 반응에 의하여 프라이머가 코팅 상에 부착될 수 있다.
- [0080] **4단계 : 미세 유동 장치의 제 2 유로에 표적 소분자 검출용 템플레이트를 고정시키는 단계**
- [0081] 상술한 바와 같이, 도 2의 A와 같은 구조를 갖는 표적 소분자 검출용 템플레이트를 제조한다. 여기서 프라이머 결합부는 상기 3단계에서 제 2 유로에 부착시킨 프라이머에 상보적으로 결합하는 임의의 단일가닥 핵산이 될 수 있다.
- [0082] 상기 표적 소분자 검출용 템플레이트를 제 2 유로에 넣으면 제 2 유로에 고정된 프라이머와 표적 소분자 검출용 템플레이트의 프라이머 결합부 간에 상보적 결합이 일어나, 도 3A에 나타난 바와 같이 표적 소분자 검출용 템플레이트가 결합된다.
- [0083] **표적 소분자 검출용 미세 유동 장치를 이용한 검출방법**
- [0084] 이하에서 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치를 이용한 검출방법을 개략적으로 설명한다.
- [0085] **1단계 : 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치에 시료 용액을 유입시키는 단계**
- [0086] 상술한 바와 같이 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치를 준비하고, 확인하고자 하는 시료 용액을 유입구로 주입한다.
- [0087] 유입구로 주입된 시료 용액은 모세관 현상에 의해 이동하여, 제 1 유로를 따라 제 2 유로로 흘러 들어간다.
- [0088] 시료 용액은 화합물, 즉 소분자가 용해되어 있는 다양한 용액이 될 수 있으며, 예를 들어 수질 오염, 토양 오염 등을 분석하기 위한 물이나 토양 시료의 용액이 될 수 있다. 또한 시료 용액은 생물학적 시료가 될 수 있다. 생물학적 시료의 예로는 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 복수, 낭액 및 소변 등이 있다. 그러나 본 발명에 사용될 수 있는 시료 용액의 종류는 이에 제한되지 않는다.
- [0089] **2단계 : 회전환 증폭 단계**
- [0090] 시료 용액이 각각의 제 2 유로로 흘러들어가면, 제 2 유로에 dNTPs(ATP, GTP, TTP, CTP), 리가아제, 등은 핵산 중합효소, 및 기타 효소의 반응에 필요한 시약, 완충액 등을 첨가한다. 이러한 시약은 효소와 함께 시판되는 것을 이용할 수 있다. 또한 이황화 결합을 끊기 위해 DTT를 더 첨가할 수 있으며, 핵산 중합 반응을 안정적이고 빠르게 진행되도록 하기 위해 파이로포스파타제(pyrophosphatase)를 더 첨가할 수 있다.
- [0091] 시료 용액 내 표적 물질이 존재하는 경우, 표적 소분자 검출용 템플레이트에서 앵타머의 일부분과 앵타머의 다른 부분이 소분자에 결합하면서 입체 구조가 변화하여 양 말단이 서로 가까워져, 그 사이에 작은 틈새, 즉 닉(nick)만이 존재하게 된다. 상기 닉이 인접한 5' 말단과 3' 말단을 연결하는 효소인 리가아제에 의하여 서로 연결되어, 표적 소분자 검출용 템플레이트는 완전히 닫힌 형태(closed form)이 되게 된다(도 3C 참조).
- [0092] 등은 핵산 중합효소는 상기 닫힌 형태의 표적 소분자 검출용 템플레이트를 주형으로 dNTP가 소진되기 전까지 핵산을 무한히 반복하여 복제하는 회전환 증폭(Rolling Circle Replication, RCA)을 한다(도 3D 참조). 복제된 부분은 표적 소분자 검출용 템플레이트에서 떨어져 나가기 때문에, 표적 소분자 검출용 템플레이트의 서열이 반복하여 존재하는 선형(linear) 핵산이 생성된다. 이 선형 핵산에 존재하는 앵타머의 일부분과 앵타머의 다른 부분 각각이 표적 소분자와 결합하고 회전환 증폭 반응이 일어나 길고 엉킨 핵산 덩어리가 생성되며, 이는 제 2 유로의 코팅과 함께 엉겨 큰 하이드로겔 덩어리를 형성한다.
- [0093] 상기 생성된 핵산 덩어리는, 예를 들어 직경 약 0.5 μm 내지 약 50 μm 의 크기를 가질 수 있다. 또한, 본 발명의 일 구체예에서 상기 핵산 덩어리와 코팅이 함께 엉긴 하이드로겔 덩어리는 직경 약 50 μm 내지 5 mm, 예를

들어 직경 약 0.25 mm 내지 2 mm의 크기를 가질 수 있다. 그러나 본 발명에서 생성되는 핵산 덩어리 또는 하이드로겔 덩어리의 크기는 이에 제한되지 않는다.

[0094] 상기 증폭된 핵산 덩어리는 후크(hook) 모양의 둥근 부분과 일정한 길이를 가지는 벨크로(velcro)가 연속된 형태의 영킨 단일가닥이 될 수 있다. 각 가닥의 길이는 0.5 μm 내지 50 μm 크기일 수 있다. 전체적으로, 상기 핵산 덩어리는 둥근 원형과 일정한 길이를 갖는 다리를 가진 삼발이 형태일 수 있다.

[0095] 상기 리가아제는 핵산의 인접한 5' 말단과 3' 말단을 라이게이션으로 연결할 수 있는 한 제한없이 사용할 수 있다. 예를 들어 DNA 리가아제를 사용할 수 있다. 상기 DNA 리가아제는 T7 리가아제, CircLigase™ 등의 효소를 포함한다.

[0096] 상기 등은 핵산 중합효소는 온도를 변화시키지 않고 핵산을 증폭할 수 있는 핵산 중합효소이면 제한없이 사용할 수 있다. 예를 들어 phi 29 폴리머라제를 사용할 수 있다. 본 발명은 등은 핵산 중합효소를 사용하기 때문에 PCR에 사용되는 열 순환기(Thermocycler)와 같은 장치를 이용하여 온도를 조절하지 않고도 핵산 증폭이 일어나도록 할 수 있다. 그러나 필요에 따라 등은 핵산 중합효소가 아닌 핵산 중합효소도 사용할 수 있으며, 이 경우 효소의 성질에 따라 온도를 변화시키는 장치와 함께 사용할 수도 있다.

[0097] 회전환 증폭 반응은 10분 내지 5시간, 예를 들어 3시간 동안 수행할 수 있다. 반응시 온도는 효소를 불활성화시키는 정도의 온도가 아닌 한 별도로 조절할 필요가 없다. 예를 들어 0 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도, 예컨대 20 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$, 예를 들어 30 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 반응을 수행할 수 있다.

[0098] 상기 반응을 수행하는 환경에 따라, 유로 내의 수분이 증발하는 것을 막기 위하여 적절한 조건을 제공할 수 있다. 예를 들어, 밀봉된 조건에서 반응을 수행할 수 있다. 일 예로서, 파라 필름으로 밀봉 한 플라스틱 용기 안에 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치를 넣고, 플라스틱 안을 물에 적신 휴지 및 물로 채울 수 있다.

[0099] 3단계 : 검출 단계

[0100] 생성된 핵산과 코딩이 함께 영킨 하이드로겔 덩어리는 제 2 유로의 배출구를 막게 된다. 점도가 높은 덩어리에 의해 배출구가 막혀 시료 용액이 흐르지 못하는 것은 육안으로 쉽게 확인할 수 있다. 상기 결과를 보고 시료 용액 내에 표적 소분자가 존재함을 알 수 있다.

[0101] 제 2 유로마다 상이한 표적 소분자 검출용 템플레이트를 부착할 수 있기 때문에, 2 이상의 제 2 유로를 갖는 미세 유동 장치를 사용하여 2 이상의 소분자의 존재를 동시에 검출할 수 있다.

[0102] 색상을 나타내는 물질 또는 탁도를 높이는 물질을 유로에 흘려 줌으로써 시료 용액의 흐름을 보다 용이하게 관찰할 수 있다.

[0103] 예를 들어, Gel red™, 트립판 블루 다이(trypene blue dye), 에반스 블루 다이(Evans Blue dye), 헤마톡실린-에오신 염색(hematoxylin-eosin stain), 크리스탈 바이올렛(crystal violet), 메틸렌 블루(methylene blue)와 같은 염색 시약을 적절한 농도로 희석하여 유입구로 유입시킬 수 있다. 그러면 도 4의 A에 예시적으로 나타낸 바와 같이 유로에서 시료 용액의 흐름을 보다 용이하게 관찰할 수 있다. 또한 도 4의 B에 예시적으로 나타낸 바와 같이 Imager(Gel Doc™ EZ(Bio-rad))를 통하여 보다 확실히 관찰할 수 있다.

[0104] 또한 형광 시약을 사용할 수도 있다. 예를 들어, 형광을 나타내는 스트렙타비딘 비드, 예컨대 Streptavidin Fluoresbrite YG Microspheres™과 같은 물질을 적절한 농도로 희석하여 유입구로 유입시켜 시료 용액의 흐름을 관찰할 수도 있다.

[0105] 침전을 증가시켜 탁도를 높이는 물질로서 고염 용액(high salt solution)을 사용할 수 있다. 고염 용액의 예로는 염화마그네슘(MgCl_2) 수용액, 염화암모늄(NH_4Cl) 수용액, 아세트산암모늄(NH_4OAc) 수용액, 염화나트륨(NaCl) 수용액, 황산암모늄($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 수용액, 또는 중성아미노산 용액 등이 있다.

[0106] 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치는 육안으로도 소분자의 존재를 충분히 식별할 수 있으나, 사용 목적에 따라 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명의 필수적 특징을 변경하지 않고 다양한 구체적인 형태로 실시할 수 있다. 이러한 예로, 당업자는 사용 목적에 따라 본 발명의 표적 소분자 검출용 미세 유동 장치의 검출 민감도를 증가시키기 위해 추가로, 전극 사이의 전류, 전압, 전위차, 저항변화 등을 측정하는 전기화학센서, 자외선, 가시광, 형광, 적외선, 라만 등의 다양한 광원을 이용하는 광학센서, 금속, 세라믹, 폴리머 등의 소재를 활용한 나노센서, 또는 효소, 항원, 항체 등의 생체 감지 물질을 이용한 바이오센서를 포함하여 실시

할 수도 있다.

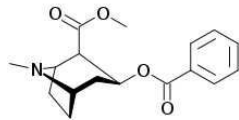
[0107] 실시예

[0108] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 제시한다. 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0109] 실시예 1. 코카인 검출용 미세 유동 장치

[0110] 코카인(cocaine)은 코카 잎에서 추출되는 알칼로이드로서, 하기 화학식을 갖는 소분자이다.

[0111] [화학식 1]



[0113] 코카인은 마약류 관리에 관한 법률에서 마약으로 정의되며, 헤로인, 필로폰과 함께 사회적으로 크게 문제가 되고 있는 대표적인 마약이다. 본 발명에서는 하기와 같이 코카인 검출용 미세 유동 장치 및 이를 이용하여 코카인을 검출하는 방법을 제공한다.

[0114] 1-1. 코카인 검출용 미세 유동 장치의 제조

[0115] ibidi사에서 제조한 1 μ -Slide III³ⁱⁿ¹ uncoated Microscopy Chamber 제품을 구입하여 준비하였다. 상기 제품도 1에 나타난 바와 같은 구조를 갖고 있으며, 본래 세포의 현미경 관찰을 위해 사용하기 위한 목적으로 제조된 것이다. 가격이 저렴하고 본 발명의 미세 유동 장치에 사용하기에 적합한 구조를 갖고 있다고 판단되어 상기 제품을 이용하였다.

[0116] 제 2 유로의 코팅물질로서 5-하이드록시도파민 염산(5-hydroxydopamine HCl)을 사용하였다. 구체적으로, 5-하이드록시도파민 염산(Sigma Aldrich)을 1mg/ml 농도로 10mM Tris 완충액(1M UltraPure 1M Tris-HCl pH 8.0 / Invitrogen)에 녹였다. 그 후 pH를 8로 맞추어 코팅용 조성물을 제조하였다. 상기 코팅용 조성물로 상기 1 μ -Slide III³ⁱⁿ¹ uncoated Microscopy Chamber 제품의 각 제 2 유로를 채웠다. 2시간 후 DDW(Water Purification System / LABOGENE)로 세척(washing) 하였다.

[0117] 또한 상기 제 2 유로의 코팅 상에 부착시킬 프라이머를 준비하였다. 프라이머는 하기 서열을 갖는 Primer-5SS-polyA9 (BIONEER)를 구입하여 사용하였다. 하기 프라이머 서열의 5' 말단은 티올기가 결합되어 있다.

[0118] 5' -Thiol-AAA AAA AAA GGG ACG TCG ATA CTA GCA TGC TA-3' (서열번호 1)

[0119] 상기 프라이머 100pmol과 5M DTT(DL-Dithiothreitol/Sigma Aldrich)를 준비한 후, 100pmol의 프라이머에 5M DTT 5 μ l를 첨가하고, 여기에 총 50 μ l가 되게 DDW(Water Purification System/LABOGENE)를 첨가하여 프라이머 조성물을 제조하였다. DTT에 의해 프라이머 내에 생성되었을 수 있는 이황화 결합이 끊어지도록 4시간 동안 방치한 후, 3K 아미콘 튜브(amicon tube)(Amicon Ultra Centrifugal Filters 3K / MILLIPORE)를 이용하여 132,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 25분에서 1차 원심분리하고, 40 μ l DDW를 첨가하고 2차 원심분리하여 반응 후 남아있는 DTT를 완전히 제거하였다. 상기 DTT가 제거된 프라이머 조성물을 제 2 유로마다 5 μ l씩 넣고 2시간 동안 방치하여 프라이머가 제 2 유로의 코팅 상에 부착되도록 한 후, DDW(Water Purification System / LABOGENE) 세척(washing) 하였다.

[0120] 또한 코카인 검출용 템플레이트를 하기와 같이 제조하였다. 상기 템플레이트에서 프라이머 결합부는 상기 서열번호 1로 표시되는 프라이머와 상보적으로 결합하도록 하기 서열을 갖도록 제조하였다.

[0121] 5' -TA GCA TGC TAG TAT CGA CGT-3' (서열번호 2)

[0122] 또한 Kawano *et al.* (Journal of the American Chemical Society 2011, 133, 8474-8477)에 기재된 바와 같이 코카인 앵타머의 일부분(5' -GGGAGACAAGGAA(C)₃₀)과 코카인 앵타머의 다른 부분(5' -ATCCTCAATGAAGTGGGTCGACA)을 제조하였다. 상기 프라이머 결합부의 양 말단에 상기 코카인 앵타머의 일부분과 다른 부분을 각각 부착하여, 코카인 검출용 템플레이트를 제조하였다.

[0123] 100 μ M 코카인 검출용 템플레이트 0.2 μ l(=20pmole)에 1X PBS(lifetechnologies사의 gibco[®])를 첨가하여 5 μ l의

코카인 검출용 템플레이트 조성물을 제조하여 제 2 유로에 넣었다. 상기 코카인 검출용 템플레이트의 프라이머 결합부와 제 2 유로에 고정된 프라이머 간에 상보적 결합이 일어나도록 2시간 동안 방치한 후 DDW(Water Purification System / LABOGENE) 세척하였다.

[0124] 1-2. 코카인 검출용 미세 유동 장치를 이용한 코카인 검출

[0125] 코카인을 포함하는 용액을 시료 용액으로서 준비하였다. 상기 시료 용액 60 μ l를 단일 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치의 유입구를 통해 제 1 유로에 유입시켰다. 단일 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치의 제 1 유로로 유입된 시료 용액은 모세관 현상에 의하여 제 1 유로를 거쳐 제 2 유로로 이동하였다. 2시간 방치한 후, DDW(Water Purification System/LABOGENE) 세척하였다.

[0126] 상기 제 2 유로에 T7 리가아제 30 μ l, 100mM DTT 0.2 μ l, 25mM dNTP 2 μ l, phi 29 폴리머라제(10 unit/ μ l) 50 μ l, 파이로포스파타제(pyrophosphatase) 1 μ l, 각 효소의 반응 완충액, 및 DDW를 첨가하였다. 제 2 유로 내 안의 수분이 날아가는 것을 방지하기 위해 파라 필름으로 밀봉 한 플라스틱 용기 안에 넣었다. 플라스틱 안은 물에 적신 휴지와 30℃ 물로 채웠다. 그 후 무교반(non-shaking), 30℃, 3시간 조건에 방치하여 코카인 검출용 템플레이트의 Nick의 라이게이션 및 회전환 증폭 반응이 일어나도록 하였다.

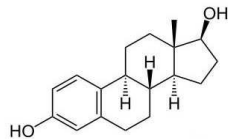
[0127] 코카인 검출용 템플레이트가 증폭되어 제 2 유로를 코팅한 하이드록시도파민 염산과 함께 엉겨 큰 하이드로겔 덩어리를 형성하여 제 2 유로의 배출구를 막음을 육안으로 확인할 수 있다.

[0128] 또한 염색 시약인 Gel red(GelRed™ / Biotium)를 1:10000으로 희석하여 첨가하여, 시료 용액의 흐름을 보다 용이하게 확인할 수 있다.

[0129] 실시예 2. 17 β -에스트라디올 검출용 미세 유동 장치

[0130] 17 β -에스트라디올(17 β -estradiol)은 스테로이드로서, 하기 화학식 2로 표시되는 소분자이다.

[0131] [화학식 2]



[0132] [0133] 외인성 17 β -에스트라디올은 체내에서 분비되는 성호르몬과 유사한 작용을 하여 내분비계를 교란시킴으로써 비정상적인 생리작용을 유발하는 대표적인 환경호르몬이다. 본 발명에서는 하기와 같이 17 β -에스트라디올 검출용 미세 유동 장치 및 이를 이용하여 17 β -에스트라디올을 검출하는 방법을 제공한다.

[0134] 2-1. 17 β -에스트라디올 검출용 미세 유동 장치의 제조

[0135] 본 발명의 17 β -에스트라디올 검출용 미세 유동 장치는 17 β -에스트라디올 검출용 템플레이트의 앵타머 부분을 제외한 나머지 부분은 1-1과 동일한 방법으로 제조할 수 있다.

[0136] 17 β -에스트라디올 검출용 템플레이트는 하기와 같이 제조할 수 있다. 상기 템플레이트에서 프라이머 결합부는 서열번호 1로 표시되는 프라이머와 상보적으로 결합하도록 서열번호 2의 서열을 갖도록 제조하였다.

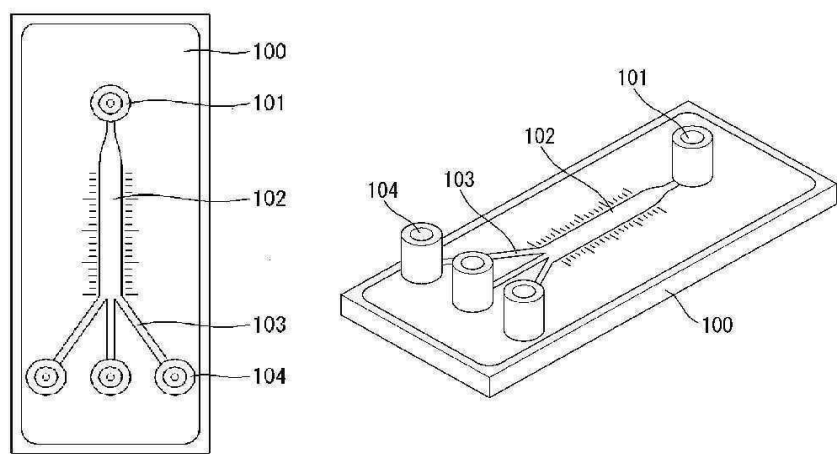
[0137] 또한 Ted J. Langan *et al.* (Electrophoresis 2012, 33, 866-869)에 기재된 바와 같이 5' -GCT-TCC-AGC-TTA-TTG-AAT-TAC-ACG-CAG-AGG-GTA-GCG-GCT-CTG-CGCATT-CAA-TTG-CTG-CGC-GCT-GAA-GCG-CGG-AAG-C-3'의 서열을 갖는 앵타머를 제조하고, 5' 말단에서 21번째 염기와 22번째 염기 사이를 절단하여, 상기 서열에서 밑줄로 표시한 부분까지를 17 β -에스트라디올 앵타머의 일부분으로, 나머지 부분을 17 β -에스트라디올 앵타머의 다른 부분으로 하였다. 상기 프라이머 결합부의 양 말단에 상기 17 β -에스트라디올 앵타머의 일부분과 다른 부분을 각각 부착하여, 17 β -에스트라디올 검출용 템플레이트를 제조하였다.

[0138] 2-2. 17 β -에스트라디올 검출용 미세 유동 장치를 이용한 17 β -에스트라디올 검출

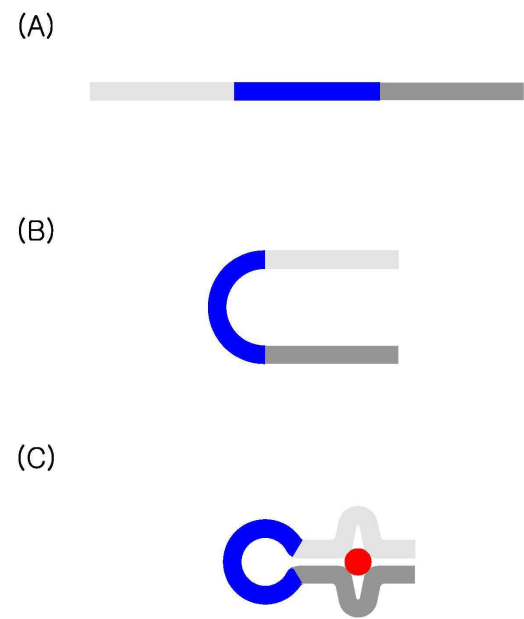
[0139] 17 β -에스트라디올을 포함하는 용액을 시료 용액으로서 준비하였다. 이하 1-2와 동일한 방법으로 17 β -에스트라디올을 검출하였다.

도면

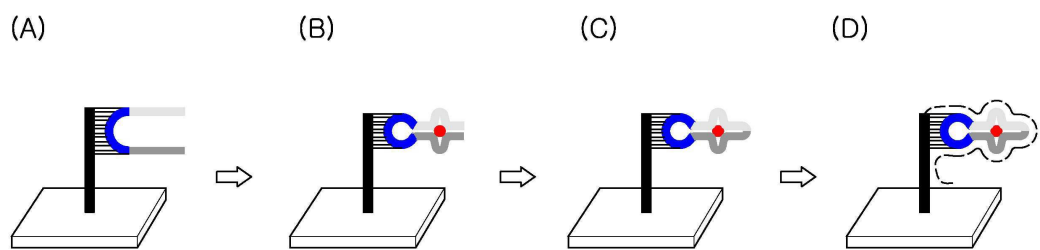
도면1



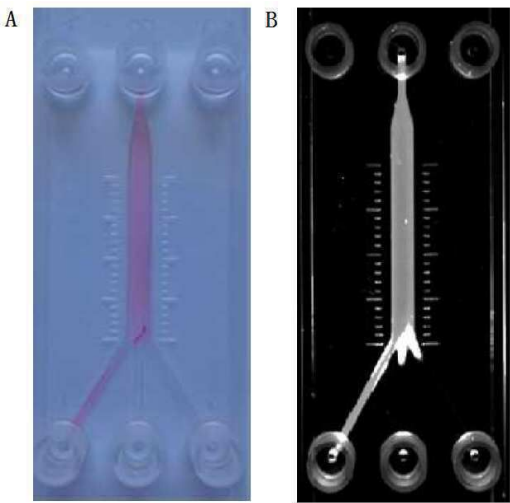
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Microfluidic device for detecting target small molecule, method for preparing the same, and method for detecting target small molecule using the same
- <130> P15-061-EWHA
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 32
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1
- aaaaaaaaag ggacgtcgat actagcatgc ta 32
- <210> 2
- <211
- > 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer binding region of template
- <400> 2
- tagcatgcta gtatcgacgt 20