



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0097531
(43) 공개일자 2020년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 21/77 (2006.01) G01N 21/59 (2006.01)

G01N 29/02 (2006.01) G01N 33/49 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 21/77 (2013.01)

G01N 21/59 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0015026

(22) 출원일자 2019년02월08일

심사청구일자 2019년02월08일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

임채승

경기도 안양시 동안구 귀인로 294, 302동 804호 (평촌동, 꿈마을건영아파트)

남정훈

서울특별시 구로구 구로동로 148 (구로동)

장웅식

서울특별시 구로구 구로동로 148, 진단검사의학과 (구로동, 고대구로병원)

(74) 대리인

특허법인 무한

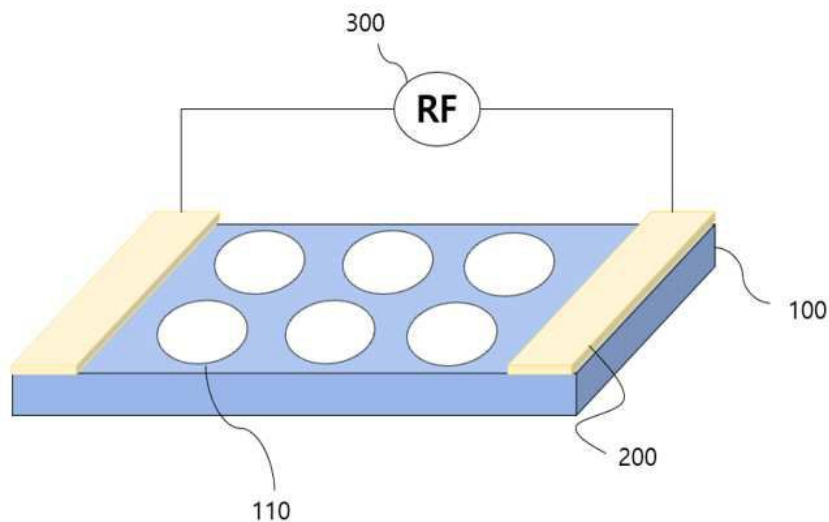
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 램-웨이브 기반 검체 분석방법 및 검체 분석용 소자

(57) 요약

압전기관 상에 검체 및 분석용 시약을 로딩하는 단계; 상기 압전기관에 교류 전압을 인가하는 단계; 및 광 투과량 변화량을 측정하는 단계; 를 포함하는 램-웨이브(Lamb-wave) 기반 혈액 분석방법으로, 상기 교류 전압 인가시, 상기 검체 및 분석용 시약은 압전기관에 발생하는 램-웨이브에 의해 혼합 및 응집되고, 상기 혼합 및 응집된 혼합물의 광 투과량 변화량을 실시간으로 측정하여 검체를 판별하는, 램-웨이브 기반 검체 분석방법 및 분석용 소자를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 29/02 (2013.01)

G01N 33/49 (2019.01)

G01N 2021/7783 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C1512

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 임상연구인프라조성사업

연구과제명 체외진단용기기 분야 의료기기 중개임상시험 지원센터

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 의무산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2021.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

압전기관 상에 검체 및 분석용 시약을 로딩하는 단계;

상기 압전기관에 교류 전압을 인가하는 단계; 및

광 투과량 변화량을 측정하는 단계;

를 포함하는 램-웨이브(Lamb-wave) 기반 혈액 분석방법으로,

상기 교류 전압 인가시, 상기 검체 및 분석용 시약은 압전기관에 발생하는 램-웨이브에 의해 혼합 및 응집되고,

상기 혼합 및 응집된 혼합물의 광 투과량 변화량을 실시간으로 측정하여 검체를 판별하는, 램-웨이브 기반 검체 분석방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 측정된 광 투과량 변화량을 이용하여 응집반응의 강도를 수치화하여 정량적으로 평가하는 단계;

를 더 포함하는, 램-웨이브 기반 검체 분석방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 압전기관은 소수성 물질로 코팅된, 램-웨이브 기반 검체 분석방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 분석용 시약은, 항A시약, 항B시약, 항D시약 및 항체선별용 혈구 중 적어도 하나를 포함하는, 램-웨이브 기반 검체 분석방법.

청구항 5

검체 및 분석용 시약이 로딩되는 압전기관;

상기 압전기관 상의 양단에 구비되는 전극; 및

상기 전극에 교류 전압을 인가하여 상기 압전기관에 램-웨이브(Lamb-wave)를 발생시키는 전압 인가부;

를 포함하고,

상기 램 웨이브에 의해 혼합되는 상기 검체 및 분석용 시약의 혼합물로부터 측정되는 광 투과량 변화량 측정값을 이용하여 응집강도가 정량적으로 평가되는,

램-웨이브 기반 검체 분석용 소자.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 압전기관은, 소수성 물질로 코팅된, 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 혼합물은, 미세액적인, 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 전극은, 알루미늄 포일 또는 전도성 액체인, 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 압전기관 상에는 상기 검체 및 분석용 시약이 로딩되는 적어도 하나의 웰이 구비된, 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 분석용 시약은, 항A시약, 항B시약, 항D시약 및 항체선편용 혈구 중 적어도 하나를 포함하는, 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 압전기관 상에 검체 및 분석용 시약을 로딩하는 단계, 상기 압전기관에 교류 전압을 인가하는 단계 및 광 투과량 변화량을 측정하는 단계를 포함하는 램-웨이브(Lamb-wave) 기반 혈액 분석방법으로, 상기 교류 전압 인가시, 상기 검체 및 분석용 시약은 압전기관에 발생하는 램-웨이브에 의해 혼합 및 응집되고, 상기 혼합 및 응집된 혼합물의 광 투과량 변화량을 실시간으로 측정하여 검체를 판별하는, 램-웨이브 기반 검체 분석방법 및 검체 분석용 소자에 관한 것으로, 보다 상세하게는 광 투과량 변화량을 통해 응집반응을 평가함으로써, 간단하면서도 신속 정확한 검체 판별이 가능한 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 정확한 혈액형 분석은 안전한 수혈 및 장기이식을 위한 결정적인 요소이며 혈액형 분석은 장기 이식 또는 법의학의 유전학적 정보에 매우 중요한 역할을 한다. ABO 부적합 수혈의 경우, 급성 수혈 부작용이 일어나게 되며 그 증상의 정도는 경미한 용혈부터 혈관 허탈, 신부전, 과중성 혈관내 응고증까지 다양하고 심지어는 사망을 초래하기도 한다. 비예기항체 선별검사 또한 치명적인 수혈 부작용을 예방하기 위해 안정성을 높이기 위한 수혈 전 검사의 중요한 필수 항목이다. 혈액형의 분석은 적혈구 표면의 항원(응집원)과 혈장 속의 항체(응집소)들을 분석용 시약과의 응집을 통한 응집반응의 강도에 따라 그 정도를 나타내며 이를 평가지표로 함이 일반적이다.

[0003] 혈액형 분석을 하기 위해서 주로 슬라이드 법 또는 시험관 법 등을 이용하여 혈액의 응집을 관찰하는 방법이 주로 이용되고 있으나, 이러한 방법은 다양한 원인에 의하여 항원이 약화된 경우에는, 응집반응강도가 약하므로 현미경 관찰을 병행해야 하는 번거로움이 있고, 정량적으로 산출되는 값이 없다보니 객관적인 판단이 어렵기 때문에 두 명의 숙련된 검사자가 이중으로 검사를 실시해야 한다. 이러한 한계점을 보완하기 자동화 장비 기술을 이용한 미세 원주 응집법(Sephadex G100 gel, Glass Beads 등)이나 적혈구 세포막에 작은 자성체 입자들을 붙여 응집현상을 확인하는 방법 등이 고안되었다.

[0004] 그러나, 자동화기기는 높은 특이도와 민감도 및 효율성으로 객관적인 결과 판독에 용이하고 적은 검사 인력이 필요한 반면에 장비가 크고 시약의 단가가 높으며 유통기간이 비교적 짧은 단점이 있다. 또한 검체당 검사 시간이 숙련된 전문가들의 기준법보다 오래 걸리고, 미세 원주응집법의 경우, 혈액형 분석 전용 원심 분리기가 필요한 번거로움 또한 존재한다(Korean J Hematol Vol. 42, No. 4, December, 2007).

[0005] 최근에는, 혈액과 같은 검체를 보다 간단한 방법으로 분석하기 위해 표면 탄성파를 이용한 미세 액적 및 입자제어 기술에 관한 연구가 큰 주목을 받고 있다. 이 기술은 다른 기술과의 통합이 쉽고, 설계가 복잡하지 않으며,

미세입자의 다양한 물리적인 특성들을 이용할 수 있다. 표면 탄성파를 생성하기 위해서는 전기적-기계적인 에너지가 상호 변환될 수 있는 압전 물질이 사용된다. 따라서, 압전 물질에 전기적인 에너지를 가하면 이 물질은 기계적으로 수축 혹은 팽창이 일어날 수 있고, 그 반대로 기계적으로 수축 및 팽창되게 하였을 때 전기적인 에너지가 발생하게 된다. 상기 압전물질의 표면에 전극을 원하는 원하는 형태로 패터닝을 할 수 있고, 상기 전극에 상응하는 주파수와 함께 교류 전압을 인가하면 압전 물질의 표면을 진행하는 표면 탄성파를 발생시킬 수 있다. 이러한 원리로, 미세유동 채널이나 챔버를 지닌 표면 탄성파 기반 미세액적 소자는 크게 부유된 입자들을 유동시키거나 채우기 위한 채널과 표면 탄성파를 생성 및 제어하기 위하여 미세전극이 패터닝된 압전기판을 접합함으로써 구현한다.

[0006] 그러나, 미세전극패턴이 완성된 압전기판과 미세유동 채널을 접합하는 과정에서 미세전극과 채널의 정확한 배열 접합을 위해 산소 플라즈마를 처리한 후 화학적인 접합과정이 정확한 배열을 위한 배치를 위해 지연될 수 있도록 에탄올을 뿌리고 고배율 현미경을 이용하여 접합과정을 진행하게 되는데 그 과정에서 전문가의 숙련도가 요구되며, 정확한 접합을 위한 추가 시약이 요구된다. 즉, 이는 미세유동 채널 내부에 표면 탄성파를 적용하기 위해서는 평행하거나 설계된 각도를 맞추어 정확한 접합 공정이 필요하지만, 접합 공정자의 숙련도 및 별도의 접합공정을 위한 장비가 요구되고, 채널이나 전극의 크기가 작고 평행하게 배열해야 할 구간이 길수록 정확한 접합공정을 진행하기가 어려운 문제점이 있다.

[0007] 더욱이, 표면 탄성파를 발생시키는 전극과 제어되는 입자의 이동 거리(변위), 제어되는 입자의 경로, 경로의 각도 등을 정확히 설계안대로 정렬하지 못하면 소기의 목표(Bio Target 물질의 검출, 진단 등)를 달성하기 어렵다. 또한, 한번 형성된 전극에 대한 조정 및 재가공이 어려워 원하는 성능이 나오지 않는 경우라도 전극패턴을 조정할 수 없는 문제점이 있다. 그럼에도 불구하고, 표면탄성파를 기반의 혈액응고특성을 평가하기 위한 소자가 개발이 되어 임상에 이용하고자 하는 움직임이 있었으나(Sascha Meyer dos Santos, Anita Zom, Zeno Guttenberg, Bettina Picard-Willems, Christina Klaffling, Karen Nelson, Ute Klinkhardt and Sebastian Harder, Biomicrofluidics, 7(5), 056502, 2013), 미세전극이 패터닝된 압전기판을 제작하는 과정은 전극으로 활용될 금속을 증착하는 공정 및 패터닝하는 과정에는 추가적인 습식 및 건식 식각과 같은 복잡한 공정 및 고가의 장비를 필요로 하고, 그 과정에서 환경오염 물질이나 독성이 발생할 우려가 있으며, 다수의 검체시료를 병렬 처리할 때 액적의 내부 유동을 균일하게 제어할 수 없는 분석적 한계가 있었다(Moll J, Meyer dos Santos S, Hils B, Dornuf F, Meyer dos Santos IR, Singer OC, Ferreiros N, Labocha S, Blücher A, Harder S, Krozer V., International Journal of Clinical Pharmacology, 54(3), 177-184, 2016).

[0008] 또한, 종래에는 혈액과 같은 분석용 장치를 이용한 기술은, 부피가 크고 가격이 비싼 장치를 주로 이용하였다. 이러한 장치는 분석에 많은 양의 혈액이 요구되고, 장치에 숙련된 숙련자에 의해서만 측정이 가능한 제약이 존재했다. 또, 급박한 상황에서 현장 진단용으로 사용할 수 있도록 개발된 소형 혈액형 분석 장치로는 종이를 기반으로 평가하는 혈액형 분석법이 있는데, 이러한 분석법은 항원과 항체의 응집반응을 수치화하여 정량적으로 측정하는 것에는 한계점이 있다. 또한, 측정을 위해 임피던스와 전기적인 측정법을 사용한 방식 또한 보고된 바가 있지만, 이와 같은 측정법은 높은 민감도의 장점에도 불구하고, 다루기가 까다로우며 전극을 패터닝하기 위한 복잡한 공정이 요구되는 단점이 있어 활용에 한계가 있다. 또한, 이러한 검체 분석용 장치는 혈액형 분석의 경우, 응집 반응이 완료되는 시점에 측정이 가능하므로, 응집 진행 중의 분석은 불가능한 문제점이 있다. 따라서, 신속정확한 현장진단을 위해서는 전술한 문제점을 해결할 수 있는 기술의 개발이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2008-7024545호, “액체 샘플의 흐름 특성의 변화를 모니터링하기 위한 방법 및 장치”, (공개일: 2008.12.16)

(특허문헌 0002) 미국등록특허 제6046051호, “Method and device for measuring blood coagulation or lysis by viscosity changes”, (공고일: 2000.04.04)

(특허문헌 0003) 한국공개특허 제2017-0115157호, “임피던스를 이용한 유전자 분석용 비표지 전기적 센서 및 이를 이용한 랩온어칩 시스템”, (공개일: 2017.10.17)

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Sascha Meyer dos Santos, Anita Zom, Zeno Guttenberg, Bettina Picard-Willems, Christina Klaffling, Karen Nelson, Ute Klinkhardt and Sebastian Harder, Biomicrofluidics, 7(5), 056502, 2013
- (비특허문헌 0002) Moll J, Meyer dos Santos S, Hils B, Dornuf F, Meyer dos Santos IR, Singer OC, Ferreiros N, Labocha S, Blucher A, Harder S, Krozer V., International Journal of Clinical Pharmacology, 54(3), 177-184, 2016
- (비특허문헌 0003) Amgad R. Rezk, James R. Friend and Leslie Y. Yeo, Lab on a Chip, 14, 1802-1805, 2014
- (비특허문헌 0004) Ghulam Destgeer, Byunghang Ha, Jinsoo Park and Hyung Jin Sung, Analytical Chemistry, 88, 3976-3981, 2016
- (비특허문헌 0005) Amgad R. Rezk and Leslie Y. Yeo, Journal of Microelectronics, Electronic Components and Materials, 46(4), 176-182, 2016

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 압전기관 상에 검체 및 분석용 시약을 로딩하는 단계, 상기 압전기관에 교류 전압을 인가하는 단계 및 광 투과량 변화량을 측정하는 단계를 포함하는 램-웨이브(Lamb-wave) 기반 혈액 분석방법으로, 상기 교류 전압 인가시, 상기 검체 및 분석용 시약은 압전기관에 발생하는 램-웨이브에 의해 혼합 및 응집되고, 상기 혼합 및 응집된 혼합물의 광 투과량 변화량을 실시간으로 측정하여 검체를 판별하는, 램-웨이브 기반 검체 분석 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 검체 및 분석용 시약이 로딩되는 압전기관, 상기 압전기관 상의 양단에 구비되는 전극 및 상기 전극에 교류 전압을 인가하여 상기 압전기관에 램-웨이브(Lamb-wave)를 발생시키는 전압 인가부를 포함하고, 상기 램 웨이브에 의해 혼합되는 상기 검체 및 분석용 시약의 혼합물로부터 측정되는 광 투과량 변화량 측정값을 이용하여 응집강도가 정량적으로 평가되는, 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자를 제공하는 것이다.
- [0013] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 압전기관 상에 검체 및 분석용 시약을 로딩하는 단계; 상기 압전기관에 교류 전압을 인가하는 단계; 및 광 투과량 변화량을 측정하는 단계를 포함하는 램-웨이브(Lamb-wave) 기반 혈액 분석방법으로, 상기 교류 전압 인가시, 상기 검체 및 분석용 시약은 압전기관에 발생하는 램-웨이브에 의해 혼합 및 응집되고, 상기 혼합 및 응집된 혼합물의 광 투과량 변화량을 실시간으로 측정하여 검체를 판별하는, 램-웨이브 기반 검체 분석방법이 제공된다.
- [0015] 일 측에 따르면, 램-웨이브 기반 검체 분석방법은, 상기 측정된 광 투과량 변화량을 이용하여 응집반응의 강도를 수치화하여 정량적으로 평가하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0016] 일 측에 따르면, 상기 압전기관은 소수성 물질로 코팅된 것일 수 있다.
- [0017] 일 측에 따르면, 상기 분석용 시약은, 항A시약, 항B시약, 항D시약 및 항체선별용 혈구 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 검체 및 분석용 시약이 로딩되는 압전기관; 상기 압전기관 상의 양단에 구비되는 전극; 및 상기 전극에 교류 전압을 인가하여 상기 압전기관에 램-웨이브(Lamb-wave)를 발생시키는 전압 인가부;를 포함하고, 상기 램 웨이브에 의해 혼합되는 상기 검체 및 분석용 시약의 혼합물로부터 측정되는 광 투과량 변화량 측정값을 이용하여 응집강도가 정량적으로 평가되는, 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자가 제공된

다.

- [0019] 일 측에 따르면, 상기 압전기관은 소수성 물질로 코팅된 것일 수 있다.
- [0020] 일 측에 따르면, 상기 혼합물은, 미세액적일 수 있다.
- [0021] 일 측에 따르면, 상기 전극은 알루미늄 포일 또는 전도성 액체일 수 있다.
- [0022] 일 측에 따르면, 상기 압전기관 상에는 상기 검체 및 분석용 시약이 로딩되는 적어도 하나의 웰이 구비될 수 있다.
- [0023] 일 측에 따르면, 상기 분석용 시약은 항체선편용 혈구를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명은 램-웨이브를 이용하여 동시에 여러 개의 검체를 분석용 시약과 혼합하여 분석할 수 있다. 구체적으로, 본 발명을 이용하면 응집반응이 일어나는 동안, 광 투과량 변화량을 실시간으로 측정하여 응집반응의 강도를 수치화하여 정량적으로 나타낼 수 있으며, 이를 통해 신속하고 정확한 검체분석이 가능한 효과가 있다. 또, 별도의 복잡한 전극 패터닝 공정없이 알루미늄 호일 또는 전도성 액체 등을 이용하여 간편하게 압전기관에 램-웨이브를 발생시킬 수 있으므로, 현장진단용으로 효과적인 이용이 가능하다. 더욱이, 램-웨이브를 이용하면 기존의 유사기술인 표면탄성파를 이용하는 방식에 비해 고수율의 병렬처리가 가능하므로 많은 양의 검체를 분석하는 시간을 단축할 수 있는 장점이 있다.
- [0025] 그러나 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자를 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자를 이용한 혈액형 분석 및 항체선편검사를 예시적으로 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈액검체의 응집반응 중 광 투과량 변화량의 측정 원리 및 측정 결과 그래프를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 검체의 응집과 비응집의 광 투과량 변화량 비교 및 응집반응강도를 정량적으로 나타낸 결과를 도시한 것이다.
- 도 5는 기존의 항체선편검사와 본 발명을 이용한 항체선편검사를 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 램-웨이브 기반의 다중-웰 소자를 다중 분석가능한 이미지 분석 시스템을 개략적으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0028] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0029] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

- [0030] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 압전기관 상에 검체 및 분석용 시약을 로딩하는 단계; 상기 압전기관에 교류 전압을 인가하는 단계; 및 광 투과량 변화량을 측정하는 단계를 포함하는 램-웨이브(Lamb-wave) 기반 혈액 분석방법으로, 상기 교류 전압 인가시, 상기 검체 및 분석용 시약은 압전기관에 발생하는 램-웨이브에 의해 혼합 및 응집되고, 상기 혼합 및 응집된 혼합물의 광 투과량 변화량을 실시간으로 측정하여 검체를 판별하는, 램-웨이브 기반 검체 분석방법이 제공된다.
- [0032] 상기 분석은 본 발명의 다른 일 실시예에 따른, 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자를 이용할 수도 있다.
- [0033] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 검체 및 분석용 시약이 로딩되는 압전기관; 상기 압전기관 상의 양단에 구비되는 전극; 및 상기 전극에 교류 전압을 인가하여 상기 압전기관에 램-웨이브(Lamb-wave)를 발생시키는 전압 인가부;를 포함하고, 상기 램 웨이브에 의해 혼합되는 상기 검체 및 분석용 시약의 혼합물로부터 측정되는 광 투과량 변화량 측정값을 이용하여 응집강도가 정량적으로 평가되는, 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자가 제공된다.
- [0034] 상기 압전기관은 전기에너지를 가했을 때 진동과 같은 기계적 에너지로 변환할 수 있는 압전물질로 이루어진 기관으로서, 상기 압전물질은 예컨대 리튬나이오베이트(Lithium Niobate, LiNbO₃), 리튬탄탈레이트 (Lithium Tantalite, LiTaO₃) 또는 퀴츠(Quartz)일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 명세서에서 용어 압전물질이란 전기적 에너지와 기계적 에너지를 상호 변환할 수 있는 물질을 일컫는 용어로서, 기계적인 압력을 가하면 전압이 발생하고, 전압을 가하면 기계적인 변형이 발생하는 압전효과를 일으킬 수 있는 물질을 의미한다. 따라서, 전기적인 에너지를 가하면 압전물질로 형성된 압전기관의 기계적 수축 또는 팽창의 발생으로 벌크탄성과, 표면탄성과 등이 발생할 수 있다. 구체적으로는, 로딩된 검체와 분석용 시약의 혼합 및 응집을 가시적으로 확인하기 위해 투명한 압전기관을 이용함이 바람직하다.
- [0036] 상기 램-웨이브는 플레이트 웨이브(Plate Wave)라고도 불리는 종파를 사용하는 탄성파의 일종으로, 판의 두께, 주파수 및 입사각 등에 따라 다양한 모드로 기관을 통해 진행하는 능력이 있는 파를 의미한다. 벌크탄성파로 분류되기도 하나, 벌크탄성파와는 달리 별도의 압전소자나 복잡한 미세전극 패터닝과정을 필요로 하지 않는 장점이 있는 파동이다. 이러한 램-웨이브 기반의 소자는, 압전기관 자체에 발생하는 파 또는 파가 발생하는 압전기관 상에 위치한 커버그라스 등의 표면을 따라 발생하는 파를 이용하게 된다. 램-웨이브 기반의 유체 및 입자 제어 기술은 비싸고 복잡한 미세전극 패터닝 공정이 불필요한 장점이 있어 많은 관심을 받는 기술로, 미세액적 내의 유동 발생을 통한 혼합, 미세액적의 젯팅 및 미세액적 내에 부유된 미세입자의 패터닝과 농축 등에 이용될 수도 있다. 또한, 이에 기초하여 생화학적 연구 또는 임상 진단 등에 활용한 예로 혈액 응고가 있으며 비슷한 방식으로 항원-항체결합반응으로 응집이 유도되는 혈액형 분석법에도 활용이 가능하다.
- [0037] 상기 압전기관은 작동 주파수에 해당하는 교류전압을 인가시에 압전기관 자체의 기계적 수축 또는 팽창의 발생으로 기관에 파동이 발생할 수 있으며, 압전물질의 에너지 변환을 통하여 램-웨이브(Lamb-wave)가 발생할 수 있다. 구체적으로는, 본 발명의 압전기관은, 소수성 물질로 코팅됨이 바람직하다.
- [0038] 상기 검체는 생체유래의 검체, 환경 유래의 검체, 금속, 화학물질, 의약품 일 수 있고, 이 때 생체는, 예컨대 인간, 비인간 동물, 식물일 수 있고, 상기 비인간 동물은, 예컨대 인간을 제외한 포유류, 어패류 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 생체 유래의 검체는 예컨대 뇨, 혈액, 모발, 땀, 타액, 침, 눈물, 척수액 등일 수 있으며, 이 경우, 혈액검체는 예컨대 적혈구, 전혈, 혈청, 혈장 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 환경 유래의 검체는 예컨대 식품, 물, 토양, 대기, 공기 등일 수 있으며, 이 때, 상기 식품은, 예컨대 농산물 식품, 수산물 식품 또는 가공식품 등일 수 있고, 상기 물은 예컨대, 음료수, 지하수, 하천수, 해수, 생활 배수 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 금속은, 예컨대 Bi(비스무트), Hg(수은), Cd(카드뮴), Pd(팔라듐), Zn(아연), Tl(탈륨), Ag(은), Pb(납)과 같은 중금속 등일 수 있고, 상기 화학물질은, 예컨대 시약, 농약 또는 화장품 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는 상기 검체 및 분석용시약이 혼합된 혼합물은 유체 형태임이 바람직하고, 더 구체적으로는 미세액적의 형태임이 더욱 바람직하다.
- [0039] 상기 분석용 시약은, 검체의 종류 또는 분석방법에 따라 상이할 수 있으므로, 당업계에 통상적으로 이용되는 분석용 시약 중 특별히 제약을 두지는 않으나, 혈액형의 분석 또는 항체선별검사의 경우, 혈액응집반응을 유도하

는 시약, 예컨대, 혈액 샘플을 응집시키기 위한 특정 농도의 칼슘 이온 용액(예를 들어, CaCl_2), PT(prothrombin time) 측정 시약 등과 같은 응집용 시약을 이용함이 바람직하고, 구체적으로는 항체선별용 혈구를 포함하는 것임이 더욱 바람직하다.

[0040] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자를 개략적으로 나타낸 것으로, 도 1을 참고하면, 본 발명의 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자는, 압전기관(100)에 전압인가부(300)가 연결된 구조로, 상기 압전기관(100)상에는 다층의 웰(110)이 구비되어 있고, 상기 압전기관(100) 양단에는 전극(200)이 형성되어 있음을 확인할 수 있다. 이 때, 상기 전극(200)은 알루미늄 포일 또는 전도성 액체일 수 있으며, 상기 전극(200)이 알루미늄 포일인 경우, 상기 압전기관(100) 양단에 접하도록 형성될 수 있고, 상기 전극(200)이 전도성 액체인 경우, 상기 압전기관(100) 양단에 필요한 형태로 그리거나 도포하여 형성할 수 있다. 상기 전압인가부(300)는 상기 전극(200)에 교류 전압을 인가하여 상기 압전기관(100)에 램-웨이브를 발생시킨다. 이 때, 상기 압전기관(100)은 소수성 물질로 코팅된 것일 수 있으며, 상기 코팅에 의해 웰(110)에 로딩되는 검체 및 분석용 시약이 고정될 수 있다.

[0041] 일 경우로, 상기와 같이 구성되는 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자는 광 투과량 변화량을 측정하기 위한 광원 조사부, 광원 집광부 또는 광원 측정부를 더 포함할 수도 있으나, 상기 광원 조사부, 광원 집광부 또는 광원 측정부 중 어느 하나가 반드시 소자에 포함되어야 하는 것은 아니며, 광원 또는 광원 조사용 외부 장치를 추가로 이용하는 것일 수 있다.

[0042] 다른 일 경우로, 상기와 같이 구성되는 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자는 광 투과량 변화량을 측정하기 위해 광 투과량 변화량 측정부를 추가로 포함할 수 있다. 이 때, 상기 광 투과량 변화량 측정부는 광원을 조사하는 광원 조사부와 조사되는 광원을 집광하여 응집된 검체로 유도하는 집광부가 포함된 것일 수 있다. 추가로, 상기 광 투과량 변화량 측정부는 광량을 검출하는 광원 검출부 및 상기 광원 검출부에 의해 검출된 광원량에 기초하여 상기 피검체의 광 투과량 변화량을 산출하는 연산장치가 더 구비된 것일 수 있으나, 특별히 한정되는 것은 아니다.

[0043] 위와 같이 구성되는 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자를 이용한 검체 분석방법은 구체적으로 후술하는 바와 같다.

[0044] 먼저 분석하고자 하는 검체 및 분석용 시약을 압전기관 상에 로딩한다. 구체적으로는 압전기관 상에 적어도 하나의 웰(well)이 구비되어 있어, 상기 웰(well)에 검체 및 분석용 시약을 로딩함이 바람직하며, 상기 웰(well)은 응집반응이 일어나는 동안 광 투과량을 실시간으로 측정하기 위해 투명한 재질로 제작됨이 바람직하다. 더 구체적으로는, 상기 웰(well)을 제외한 압전기관의 표면은 소수성 물질로 코팅되어, 압전기관 상에서 검체의 위치를 고정시킬 수 있다. 이러한 소수성 물질의 코팅을 통해 표면에너지가 제어하여 미세액적과 압전기관 사이의 접촉각을 조절함으로써 램-웨이브에 의한 영향을 최대로 받을 수 있도록 최적화 할 수도 있다. 그러나, 본 발명의 압전기관은 상기 소수성 물질의 코팅으로 제한되는 것은 아니며, 전술한 효과와 동일한 효과를 위해 도 3의 (a)에 도시된 바와 같이 단면 테이프 기반의 웰을 제작하는 등의 다양한 방법이 이용될 수도 있다.

[0045] 상기 압전기관 상에 검체 및 분석용 시약의 로딩이 완료되면, 압전기관에 작동 주파수를 갖는 교류 전압을 인가하여 램-웨이브를 발생시킨다. 이 때, 압전기관은 교류 전압을 인가하기 위해 전극이 구비됨이 바람직하다. 구체적으로는, 압전기관에 알루미늄 포일 또는 전도성 액체를 이용하여 전극을 연결 또는 형성할 수 있다. 가령, 압전기관의 양단에 알루미늄 포일을 접합시키거나, 전도성 페인트와 같은 전도성 액체로 그림을 그려 압전기관 상에 전극을 간단히 구비할 수도 있다. 이러한 전극의 구비는, 반도체 식각 공정을 통한 미세전극 패터닝 공정을 요하지 않으므로, 제작 공정이 단순하고, 제작비용이 저렴해 경제적일 수 있다.

[0046] 상기 전도성 액체는 예컨대 은(Ag), 백금(Pt), 금(Au), 마그네슘(Mg), 알루미늄(Al), 아연(Zn), 철(Fe), 구리(Cu), 니켈(Ni) 및 납(Pd)의 금속입자; 무기 및 고분자 전해질; 인듐(In), 주석(Sn), 아연(Zn), 갈륨(Ga), 세륨(Ce), 카드뮴(Cd), 마그네슘(Mg), 베릴륨(Be), 은(Ag), 몰리브덴(Mo), 바나듐(V), 구리(Cu), 이리듐(Ir), 로듐(Rh), 루테튬(Ru), 텅스텐(W), 코발트(Co), 니켈(Ni), 망간(Mn), 알루미늄(Al), 및 란탄(La) 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 전도성 산화물 또는 이들의 합금; 및 탄소나노튜브, 탄소분말, 그래핀 및 흑연의 탄소물질일 수 있다.

[0047] 위와 같이 구비된 전극에는, 전압 인가부가 연결될 수 있다. 상기 전압 인가부에 교류 전압을 인가하여 압전기관 자체에 램-웨이브가 발생할 수 있다. 구체적으로는, 상기 전압 인가부는 압전기관의 두께에 상응하는 작동 주파수를 갖는 교류 전압을 인가하고, 전압 인가부의 제어에 의해 교류 전압의 작동 주파수가 제어되어, 결과적

으로 압전기관에 발생되는 램-웨이브가 제어될 수 있다.

- [0048] 전술한 바와 같이 압전기관 상에 램-웨이브가 발생하게 되면, 앞서 로딩한 검체 및 분석용시약이 빠르게 혼합되어 응집된다. 일례로, 혈액형 분석 및 항체선별검사의 경우, 도 2에 예시적으로 도시한 바와 같이 응집반응이 일어날 수 있다. 도 2는 본 발명의 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자를 이용한 혈액형 분석 및 항체선별검사를 예시적으로 나타낸 것으로, 도 2의 (a)를 보면, 양 전극사이에는 4개의 웰이 구비되어 있다. 이러한 구성을 이용하여 혈액형 분석 및 항체선별검사를 진행하는 경우, 도 2의 (b)와 같이 혈액의 응집을 유도하기 위해 분석용 시약과 응집원(적혈구 부유액) 또는 응집소(혈장)를 램-웨이브를 이용하여 혼합 및 응집함으로써 혈액형을 판별하거나 비예기항체의 존재 유무를 확인할 수 있다. 상기 응집반응은 압전기관에 로딩된 검체 및 분석용 시약이 미세액적의 형태로 고정된 뒤, 램-웨이브가 발생되면 상기 미세액적 내부에서 유동이 일어나 단시간에 미세액적 내에 존재하는 물질이 빠르게 혼합되어 유도된다.
- [0049] 도 2의 (c)는 램-웨이브에 의한 응집반응을 개략적으로 나타낸 것으로, 구체적으로는 도 2의 (a)에 도시된 웰(well)을 A에서 A'로 자른 단면을 확대한 것이다. 도 2의 (c)에 도시된 바와 같이, 작동주파수를 갖는 교류 전압을 인가하여 압전기관의 진동을 유발하여 램-웨이브를 발생시키게 되면, 이로 인해, 검체와 상기 검체와의 응집을 유도하는 분석용 시약이 혼합되고, 혼합된 미세액적 내부의 유동이 발생함으로써 항원-항체반응을 통하여 응집반응이 시작된다. 이러한 혈액형 분석용 시약으로는 적혈구 표면의 A항원과 응집반응을 일으키는 항A, B항원과 응집반응을 일으키는 항B, D항원의 유무를 판별하는 항D 시약이 있으며, 이들 시약이 검체와 반응을 일으켜 응집반응을 평가할 수 있다.
- [0050] 또한, 항체선별검사의 경우 항체선별용 혈구 1, 2를 이용하여 혈장과 반응시켜 응집과 비응집을 판단하여 비예기 항체의 존재 유무를 선별할 수도 있다. 이러한 현상은 하나의 웰이 구비된 경우만이 아니라, 압전기관 상에 미세액적이 위치할 수 있는 모든 웰에서 동시에 동일한 조건에서 작용할 수 있으므로, 도 1에 도시한 구성과 같이 다중-웰(Multi-well)이 구비된 조건에서는 다중 분석이 가능하다.
- [0051] 일 측에 따르면, 램-웨이브 기반 검체 분석방법은, 상기 측정된 광 투과량 변화량을 이용하여 응집반응의 강도를 수치화하여 정량적으로 평가하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0052] 전술한 바와 같이 검체와 분석용 시약이 포함된 미세액적 내부에서 반응이 시작되면, 반응이 진행되는 동안 응집되는 정도를 응집반응강도라고 한다. 이 때, 상기 미세액적에 광원을 조사하면, 응집반응강도가 높아질수록 광 투과량이 증가하는 것을 관찰할 수 있다. 응집반응과정이 진행되는 동안의 실시간 광 투과량 및 광 투과량 변화량은 광량센서 혹은 이와 유사한 광 측정장비를 활용하여 측정할 수 있다. 가령, 광량센서를 이용하는 경우, 검체가 포함된 액적을 통과하는 광 투과량의 세기를 센서의 광량 측정부에서 수신하면 시간에 따른 광 투과량의 세기를 저장하는 방법으로 실시간의 광 투과량 변화량을 측정할 수 있다. 광 투과량 측정은 특별히 그 방법에 제한이 있는 것은 아니며, 공지된 방법 예컨대, 특허공개번호 제2007-0001865호에 개시된 레이저 등의 광원을 통한 광 조사 및 CCD 센서 또는 포토 다이오드 센서 등의 광량센서를 통한 광량측정 방법을 이용할 수도 있다.
- [0053] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 혈액검체의 응집반응이 일어나는 동안의 광 투과량 변화량의 측정 원리 및 광 투과량 측정 결과를 나타낸 것으로, 도 3의 (b)는 전술한 도 3의 (a)와 같이 구성된 본 발명의 소자를 이용하여 혈액검체의 응집반응동안 광 투과량 측정하는 원리를 개략적으로 나타낸 것이다. 도 3의 (b)에 도시된 그래프를 보면, A구간은 검체인 혈액을 웰에 로딩하는 구간으로, 이 구간에서 램-웨이브가 발생하여 로딩된 시료에 포함된 혈액과 분석용 시약이 혼합된다. 이후, B구간에서는 혈액 내의 적혈구와 분석용 시약 간의 항원-항체 반응이 일어나 적혈구의 응집이 시작되고, 혼합액의 응집에 의해 액적 내에 빛이 투과할 수 있는 빈 공간이 많아 지면서 광량센서에서 읽을 수 있는 광 투과량이 증가하게 된다. 도 3의 (b)에서 아래에 도시한 그림 A, B는 각각 위쪽의 그래프의 A구간 및 B구간에서의 로딩된 시료의 혼합 및 응집상태를 개략적으로 나타낸 것으로, A구간에서는 시료 내에 존재하는 적혈구가 응집되지 않아 광원을 조사하더라도 투과되는 양이 적은 반면, B구간에서는 시료 내의 적혈구가 분석용 시약과 반응하여 응집반응이 일어남으로써, A 구간에 비해 조사된 광원이 투과되는 양이 증가한 것을 확인할 수 있다.
- [0054] 위와 같이 광량센서를 통해 획득된 광 투과량의 측정값은 표준화 과정을 거쳐 정량할 수 있다. 측정된 값은 이미지 센서의 성능 혹은 이미지 분석 코드 등에 따라 광 투과량의 절대값이 다를 수 있기 때문에 표준화 과정이 수반될 필요가 있으며, 표준화 과정은 프로그래밍에 의한 것일 수 있다.
- [0055] 위와 같이 실시간 광 투과량의 측정을 통해 혈액과 같은 검체를 분석할 경우, 응집과정이 진행되는 동안에도 응

집양상을 실시간으로 분석할 수 있는 장점이 있다. 구체적으로는, 도 3의 (c)와 같이 실험 결과 반응이 종료된 후의 최종 광 투과량 변화량이 동일한 2개의 샘플이 있는 경우, 2개의 샘플은 최종적으로 응집되는 양이 동일한 것을 알 수 있다. 그러나, 도 3의 (c)에서 ㄱ)의 그래프가 ㄴ)의 그래프에 비해 초기 광 투과량의 증가율, 즉 기울기가 크게 나타나고 있으므로, ㄱ)샘플의 응집강도가 ㄴ)샘플보다 센 것으로 평가할 수 있다. 이러한 방법으로, 광 투과량의 변화량과 최종 포화상태에 도달한 광 투과량을 함께 평가한다면, 혈액형 판별과 같이 검체를 판별하기 위한 항원-항체 반응의 응집강도를 민감하게 분석할 수 있어, 기본 검사에서 오판하기 쉬운 아형검사에도 활용이 가능하다.

[0056] 이 때, 본 발명의 명세서에서 언급하고 있는 아형검사는 혈액형의 결정에 영향을 주는 적혈구막의 항원의 수가 정상보다 적은지를 확인하는 검사를 의미한다. 가령, 사람 혈액형 A항원에는 평균보다 항A항체와의 반응이 약한 항원이 존재할 수 있는데, 상기와 같은 항원이 A형 아형을 의미한다. 아형은 전술한 바와 같이 B형과 O형도 존재할 수 있고, 대체로 유전적인 요인에 의해 생성되는 것일 수 있다.

[0057] 즉, 광 투과량 변화량을 측정함으로써 응집반응강도를 확인할 수 있고, 이를 수치적으로 정량화함으로써 분석결과를 객관적으로 평가할 수 있다. 응집반응강도를 정량화하기 위해, 응집이 완료된 시점의 광 투과량 변화량을 측정하여 응집반응강도의 평가지표로 이용하였다. 도 3의 (d)는 광 투과량 변화량을 측정하여 표준화한 것으로, 구체적으로는 상기 표준화는 하기의 수식 1에 의한 것이다.

[0058] [수식 1]

[0059]
$$\text{Normalized contrast variation (NCV)} = \frac{\text{Contrast} - \text{Contrast}_{\min}}{\text{Contrast}_{\max} - \text{Contrast}_{\min}}$$

[0060] 이를 통해, 검체의 응집반응강도를 수치화된 값으로 정량적으로 평가할 수 있으며, 짧은 시간내에 응집의 유무를 객관적으로 확인하여 혈액형을 판별하거나 항체의 유무를 확인할 수 있다. 또, 응집되는 과정에서 광 투과량이 수치화되어 그래프로 나타나기 때문에 응집이 완료되는 시점만이 아니라, 응집이 시작되고 완료되기까지 실시간으로 모니터링이 가능하므로, 응집양상의 분석도 가능하다. 아울러, 혈액형 분석 및 항체선별검사시에는, 응집반응의 정확한 평가를 위해 분석에 이용되는 혈액 검체 또는 혈장의 부피, 항체(혈장) 또는 항원(혈구)의 농도, 램-웨이브를 발생시키는 작동주파수와 인가되는 전압 등은 필요에 따라 최적화될 수 있다.

[0061] 또한, 기술적인 측면에 있어서, 본 발명의 방법을 이용하면 기관에 발생하는 램-웨이브 파를 전기적으로 조절함으로써 미세액적 내의 유동속도를 민감하게 조절할 수 있다. 이를 이용하면 반응이 진행되는 동안의 광 투과량 변화량이 시약에 대한 응집반응인지, 단순히 약하게 반응하는 검체가 겹쳐진 것인지 분석하는 경우 유용하게 이용될 수 있다.

[0062] 일 측에 따르면, 상기 분석용 시약은, 항A시약, 항B시약, 항D시약 및 항체선별용 혈구 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 그러나, 분석용 시약은 용도에 따라 적절히 선택되는 것이고, 분석에 필요한 것으로 공지된 통상의 것이면 특별히 제한되지 않는다.

[0063] 보다 구체적인 설명은 이하의 실시예를 통해 후술하도록 한다.

[0065] 실시예 1. 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자의 제작

[0066] 전술한 내용에 기초하여, 도 3의 (a)와 같이 다중-웰(multi-well)을 이용한 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자를 직접 제작하였다. 제작된 소자의 압전기관에 사용된 압전물질은 리튬나이오베이트(LiNbO3)고, 전극은 전도성 액체인 실버페이스트(ELCOAT, CANS)를 이용하여 기관에 그려 사용하였다. 도 3의 (a)에 도시된 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자는 혈액형 분석 및 항체선별검사용으로 제작된 다중 분석이 가능한 검출용 소자로, 혈액샘플이 포함된 미세액적을 고정시키기 위해 압전기관에 소수성 표면을 코팅하는 대신, 이와 동일한 효과를 갖도록 단면 테이프 기반의 웰을 압전기관에 붙여 제작하였다. 도 3의 (a)에 도시된 바와 같이, 투명한 압전기관에 불투명한 단면테이프를 붙이고, 상기 단면테이프에는 일정한 간격으로 원형의 웰(well) 부분은 투명하게 보이도록 제작하여 응집반응에 따른 광 투과량의 변화를 측정하기 용이하도록 하였다.

[0068] 실시예 2. 혈액형 분석 및 항체선별검사

- [0069] 실시예 1과 같이 제작된 램-웨이브 기반 검체 분석용 소자를 이용하여 혈액형 분석 및 항체선별검사를 진행하였다.
- [0070] 본 실험을 진행하기 위해서, 먼저 항응고제 처리된 혈액을 25초간 원심분리하여 상층액을 분리 제거한 후 농축 적혈구를 준비하고, 혈구의 농도에 따른 혈액의 응집반응 강도 및 혈액형 판별을 위한 최적의 농도를 찾기 위해 0.1, 1, 3, 5, 10, 20, 30%의 농도 조건으로 부유시켜 적혈구 부유액을 준비하였다. 또한, 혈액형 분석을 수행하기 위한 혈액형 분석용 항체시약으로 시판되는 항A 및 항 B를 구입하여 사용하였다(Novaclone™ Anti-A, B Murine monoclonal, REF 5175, Dominion biologicals limited, Nova Scotia, Canada). 기관에 구비된 각 웰에는 적혈구 부유액 4μl와 혈액형 분석용 항체 시약 1μl를 떨어뜨려 사용하였다. 이후, 램-웨이브를 발생시키기 위해 23V의 전압에서 작동 주파수 225.82MHz를 갖는 AC전압(RF signal)을 신호 발생기 (Signal Generators, 8657B, Hewlett Packard, Palo Alto, USA)를 이용하여 DC전원공급기(DC Power Supply, IPS-18B10, VuPOWER, Daejeon, Korea)가 연결된 증폭기(Amplifier, ZHL-12W, Mini-circuits, New York, USA)를 통해 전극에 인가하였다. 전체 평가시간을 90초로 하여 광 투과량의 변화량을 관찰함으로써, 검체와 분석용 시약이 완전히 혼합되어 응집이 진행되었다.
- [0072] 실시예 3. 광 투과량 변화량 측정 및 표준화
- [0074] 혈액형 분석용 시약을 0.9%의 생리식염수로 희석하여 검체가 상기 시약에 의해 응집되면서 발생하는 응집반응강도에 따른 값을 램-웨이브 평가지표인 광 투과량 변화량을 표준화하였다. 도 4는 검체의 응집과 비응집의 광 투과량 변화량을 비교하고 응집반응강도를 정량적으로 나타낸 결과를 나타낸 것이다.
- [0075] 도 4의 (a)는 실시예 2와 같이 혈액형 분석 및 항체선별검사의 응집반응이 진행되는 과정을 예시적으로 도시한 것으로, 혈액검체가 포함된 시료 및 진술한 분석용 시약을 이용하여 검체의 응집과 비응집의 반응을 비교한 결과를 나타낸 것이다. 도 4의 (a)를 보면, 타입 A(Type A)의 경우 반응이 진행되는 100초(s)동안 응집으로 인해 광원이 투과되어 밝게 나타나는 부분이 확연히 나타나는 반면, 타입 B(Type B)는 100초(s)동안 아무런 변화가 없음이 확인되었다. 이와 같이 시각적으로도 응집의 유무를 판별할 수는 있었으나, 이러한 정성적인 분석은 응집반응이 약하게 일어나는 경우에는 정확도가 떨어지기 쉽다. 따라서, 도 4의 (a)의 타입 A(Type A) 및 타입 B(Type B)를 광 투과량 변화량을 측정하여 이를 표준화하여 응집반응강도를 정량화하였다. 도 4의 (b)는 이를 실시한 실험을 통해 광 투과량을 이용하여 각 미세액적의 결과를 정량화한 것이다. 도 4의 (b)의 그래프는 도 4의 (a)와 같이 실험을 통해 실시간으로 측정된 광 투과량을 이용하여 타입A 및 타입B의 광 투과량 변화량을 정량한 결과를 나타낸 것으로, 그래프의 x축은 시간을, y축은 광 변화량(Contrast variation)을 의미한다. 그래프를 보면, 타입A의 경우에는, 램-웨이브 발생 이후 항A항체와 반응하여 응집반응이 나타남으로써 투과되는 광량이 증가하는 양상이 나타나는 반면, 타입 B의 경우에는, 항-A항체와 항원-항체 반응이 나타나지 않으므로, 100초 동안 측정되는 광 투과량의 변화가 나타나지 않음을 확인할 수 있다.
- [0076] 혈액형 분석을 위해, 램-웨이브 기반에 적합한 적혈구 부유액 농도를 확인하여 10 내지 20%의 조건의 농도로 맞추어 혈액형 분석용 시약과 1:4의 비율로 램-웨이브를 작동시켜 혼합하여 반응을 확인하였다. 항체선별검사도 이와 마찬가지로 항체선별용 혈구 1 및 2의 농도를 각각 10 내지 20%로 제조하여 항체선별용 혈구 1μl: 환자의 혈장 4μl의 1:4의 비율로 응집되는지의 유무에 따라 비예기항체의 유무를 선별하였다. 상기 혼합된 비율은 항체 선별의 민감도와 정확도를 높이기 위하여 최적화할 필요가 있다.
- [0077] 도 4의 (c)는 상기 표준화된 값을 그래프로 나타낸 것으로, 본 발명의 응집반응 강도에 따른 측정결과를 검증된 기존 방법의 측정결과와 비교함으로써 본 발명의 소자의 성능을 확인한 것이다.
- [0078] 도 4의 (c)의 그래프 x축의 응집레벨(Agglutination Level)은 기존 방법을 통해 육안으로 평가하던 검증된 응집반응의 강도(4+, 3+, 2+, 1+, w)를 나타낸 것으로, 혈액 검체가 포함된 시료는 헤마토크릿(hematocrit, Ht, Hct) 10%로 조절하고, 정의된 희석농도로 시약의 농도를 조절하여 재현하였다. 여기서, 상기 희석농도는 분석용 시약의 농도에 따라 약한 응집을 임의로 유도하여 반응강도를 기존의 평가지표와 상응하도록 정의된 것이다. 본 발명에서는 도 4의 (d)와 같이 혈액형 분석용 시약의 농도를 0.9% 식염수에 혼합하여 임의로 조절한 비율로 정의되는 희석농도를 이용하여 분석용 시약을 준비하였다. 그리고, 도 4의 (c)의 그래프 y축의 NCV(Normalized Contrast Variation)는 측정된 광 투과량을 표준화한 값으로, 상기 수식 1에 의해 산출되었다. 이 때, 상기 헤마토크릿 시료에서 모두 응집된 상태를 100%, 램-웨이브에 의해 혼합된 후 모두 분산된 상태를 0%로 설정했다.

도 4의 (c)를 보면, 각 시약마다 전체적인 반응강도 수준이 상이하게 나타났으며, 반응강도와 표준화된 광 투과량 변화량 값이 상관관계가 있으며, 응집반응강도가 낮아질수록 광 투과량 변화량의 값이 떨어지는 것을 확인할 수 있다.

[0079] 전술한 방법으로 도 4의 (c)와 같은 표준화된 값을 산출하기 위해 측정된 광 투과량의 값을 상기 수식 1에 적용하는 과정은 다음과 같다.

[0080] 일례로, 헤마토크릿 10%로 맞춘 혈액 검체가 포함된 시료를 이용했을 때, 모두 응집된 상태의 광 투과량, 즉 광 투과량의 최대값($contrast_{max}$)은 120.5, 모두 분산된 초기 상태의 광 투과량, 즉 광 투과량의 최소값($contrast_{min}$)은 13.9로 측정되었다. 항A 혈액 검체가 포함된 시료가 4+인 경우, 측정되는 광 투과량($contrast$)는 62.5로 측정되었다. 이를 수식을 통해 계산하면 하기의 수식 2와 같이 계산될 수 있다.

[0081] [수식 2]

$$[0082] \quad NCV = \frac{Contrast - Contrast_{min}}{Contrast_{Max} - Contrast_{min}} = \frac{62.5 - 13.9}{120.5 - 13.9} = 0.456$$

[0083] 위와 같은 방법으로, 각 시약에서 혼합 및 응집반응의 결과를 통해, 본 발명의 소자를 이용한 응집강도의 분석 가능성, 아형 분석의 활용 가능성을 확인하였다.

[0085] 실시예 4. 종래의 항체선별검사와 본 발명을 이용한 항체선별검사의 비교

[0086] 기존의 공지된 방법과 본 발명의 방법을 각각 이용하여 항체선별검사를 진행하였다. 항체선별검사를 진행하기 위해서는 항체선별용 혈구 1 및 2의 농도를 각각 10 내지 20%로 제조하여 항체선별용 혈구 1 μ l: 환자의 혈장 4 μ l의 비율로 로딩하여 램-웨이브가 발생한 이후에 응집 유무에 따라 비예기항체의 유무를 선별할 수 있다. 비예기항체는 검사를 수행하지 않고 존재유무를 확인할 수 없는 ABO식 이외의 혈액형에 대한 항체를 의미한다. 상기 비예기항체는 ABO식 혈액형의 항체만큼의 급격한 부작용을 나타내지는 않지만, 상황에 따라 위험한 수혈부작용이 발생할 수 있는 점에서, 수혈시 비예기항체의 존재유무가 확인될 필요가 있다.

[0087] 도 5의 (a)는 동일한 검체를 종래의 방법을 이용한 항체선별검사와 본 발명의 램-웨이브 기반 검체 분석방법을 이용한 항체선별검사를 비교하여 그 결과를 나타낸 것이다. 도 5의 (a)의 왼쪽은 종래의 방법을 이용한 경우의 항체선별검사 결과를 나타낸 것으로, 원심분리기를 이용하여 응집이 완료된 시점의 결과만을 확인할 수 있던 반면, 도 5의 (a)의 오른쪽은 본 발명의 방법을 이용한 항체선별검사 결과를 나타낸 것으로, 응집이 일어나는 과정과 완료된 시점의 정량적인 값을 원심분리기 없이 확인이 가능하였으나, 두 검사 결과값은 동일한 것으로 확인되었다.

[0088] 즉, 본 발명의 소자를 이용하면 ABO식 혈액형뿐만 아니라 비예기항체 또한 응집반응을 통해 확인할 수 있음을 검증하였다.

[0090] 실시예 5. 다중 검체 분석

[0091] 본 발명의 소자를 이용하여, 여러 검체를 동시에 분석하여 그 효과를 검증하였다.

[0092] 도 5의 (b)는 본 발명의 램-웨이브 기반 분자진단용 소자를 이용하여 다중 웰에 여러 검체를 로딩하여 동시에 동일한 조건으로 다중 분석한 결과를 나타낸 것이다. 도 5의 (b)는, 왼쪽 열의 웰에는 항A 시약, 가운데 열에는 항B 시약, 오른쪽 열에는 항D 시약을 로딩하였고, 위쪽의 행과 아래쪽 행에는 각각 다른 종류의 검체를 로딩하여 2 종류의 검체를 동시에 분석하였다. 그 결과, 위쪽 행의 3개의 웰 중 항A, 항D에는 응집반응이 일어나고, 항B에 대해서는 응집반응이 일어나지 않아, 검체가 Rh⁺A형 혈액임을 확인하였다. 또, 아래쪽 행의 3개의 웰 중 항B, 항D에는 응집반응이 일어나고, 항A에 대해서는 응집반응이 일어나지 않아, 검체가 Rh⁺B형 혈액임을 확인하였다.

[0093] 위와 같은 방법을 이용하면, 방대한 종류의 검체 또한 동시에 분석할 수 있다. 가령, 도 6과 같은 이미지 분석 시스템에 램-웨이브 기반의 다중-웰 소자를 장치에 삽입한 뒤 각각의 웰이 위치하는 영역의 구역별 광 투과량을 측정함으로써 동시에 다중분석이 가능한 자동화 시스템을 구축할 수 있다.

[0094] 도 5의 (b)에서 육안으로 확인된 결과를 정량적인 수치로 확인하기 위해, 다중분석을 통해 표준화된 광 투과량 변화량(Normalized Contrast Variation, NCV)을 측정하였으며, 하기의 표 1과 같았다.

표 1

NCV	Anti-A 항체	Anti-B 항체	Anti-D 항체
A형, Rh(+)	1	0.16	1
B형, Rh(+)	0.19	1	1

[0095]

[0096] 상기 표 1을 보면, A형 혈액-항A 항체, B형 혈액-항B 항체의 경우에는 모두 응집되어 NCV 값은 1을 가지고, A형 혈액-항B항체, B형 혈액-항A항체의 경우에는 응집되지 않으며 혈액 검체의 시료 내부 세포는 분산된 상태로 NCV 값이 0.2 미만의 값을 가지는 것을 확인할 수 있다.

[0097] 즉, 본 발명을 이용하면 여러 시료를 웰에 로딩하여, 동시에 응집반응강도를 평가할 수 있어 분석시간이 짧아지면서도, 객관적인 평가가 가능함을 확인하였다.

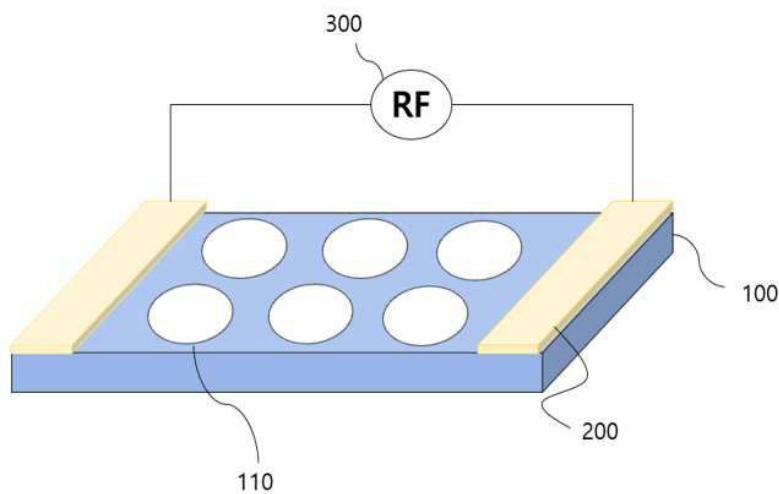
[0098] 따라서, 상기의 실시예 1 내지 5를 통해 확인한 바와 같이, 본 발명을 이용하면, 종래보다 간단한 방법으로 정량적으로 응집반응을 확인할 수 있으므로, 신속정확한 검체의 분석이 가능함이 검증되었다.

[0099] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

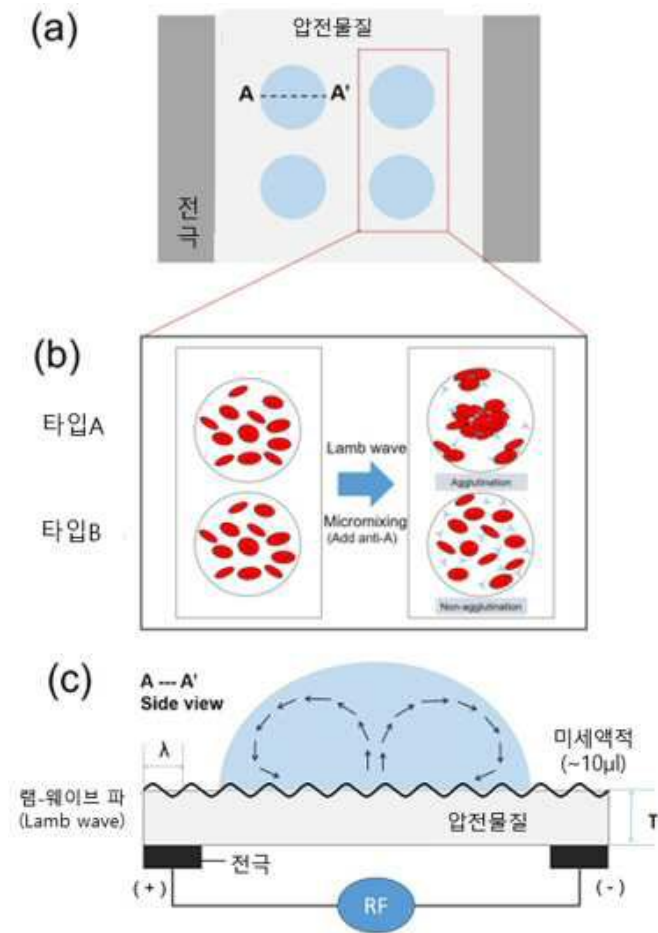
[0100] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

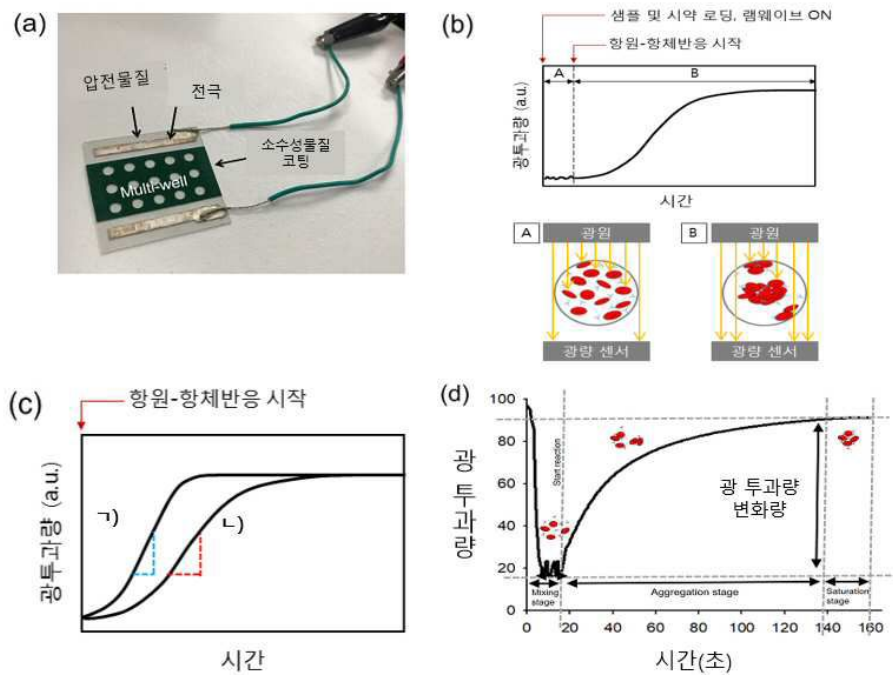
도면1



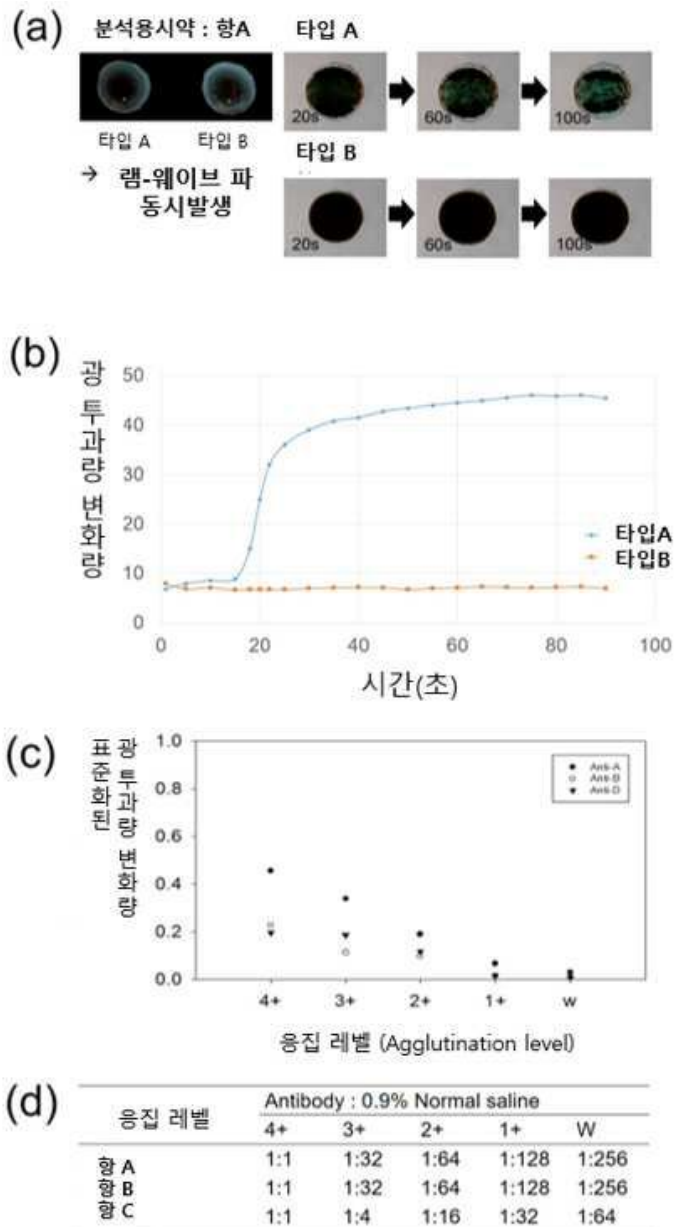
도면2



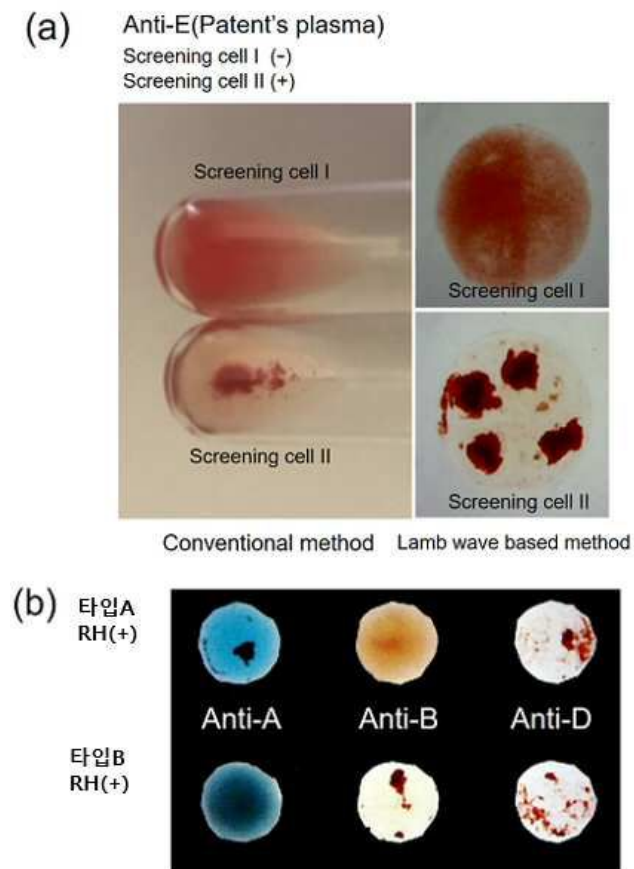
도면3



도면4



도면5



도면6

