(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0144776
(43) 공개일자 2020년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/30 (2006.01) *C12Q 1/02* (2017.01)
G01N 27/416 (2006.01) *G01N 33/483* (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01) *G01N 33/49* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 27/30 (2013.01)
C12Q 1/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0072850
(22) 출원일자 2019년06월19일
심사청구일자 2020년07월21일

(71) 출원인
한양대학교 산학협력단
서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
장진호
서울특별시 성동구 왕십리로 222
이지혜
서울특별시 성동구 왕십리로 222
송재우
서울특별시 서대문구 연세로 50-1
(74) 대리인
홍성욱, 심경식

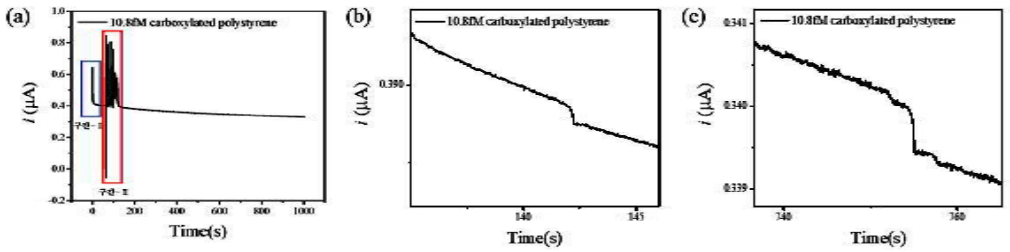
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **세포의 크기 및 농도 측정 및 분석 방법**

(57) 요 약

본 발명은 전기화학셀의 전류 변화를 측정하는 세포 분석 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 세포 분석 방법을 이용하는 경우 혈소판 등 모양이 일정하지 않은 작은 세포의 빠르고 정확한 분석이 가능하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 27/4166 (2013.01)
G01N 33/4833 (2013.01)
G01N 33/48735 (2013.01)
G01N 33/49 (2019.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017M3A9G8084539
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(재)한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업 / 바이오·의료기술개발사업 / 바이오융합원천기술개발
연구과제명	새로운 유세포 혈구분석 데이터 기반의 멀티레벨 질환진단모델 개발연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한양대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

작동전극, 상대전극, 기준전극을 담지한 전기화학셀에 전처리한 세포를 주입하고 불활성 가스를 주입하는 단계; 및

상기 전기화학셀의 전류 변화를 측정하는 단계를 포함하는 세포 분석 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포는 혈소판인 것을 특징으로 하는, 세포 분석 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 전기화학셀 내의 세포가 상기 작동전극의 표면에 충돌 또는 흡착함으로써 발생하는 전류의 세기 변화를 통하여 세포의 크기 및 농도를 분석하는 것을 특징으로 하는, 세포 분석 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 작동전극은 탄소 섬유, 인듐 산화주석, 불소도핑 산화주석, 보론도핑 다이아몬드, 금, 은, 백금, 구리 및 니켈로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 세포 분석 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 작동전극은 상기 전기화학셀 중에 1개, 또는 전극 표면의 최대대각선 길이가 상이한 2개 이상이 포함된 것을 특징으로 하는, 세포 분석 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 작동전극은 원형인 것을 특징으로 하는, 세포 분석 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 전처리는 글루타알데하이드 및 파라포름알데하이드를 혈소판에 처리하는 것을 특징으로 하는, 세포 분석 방법.

청구항 8

상대전극, 기준전극 및 전극 표면의 최대 대각선 길이가 1 내지 500 ㎛인 작동전극을 포함하는 반응기; 및 산화환원종을 포함하는 반응 용액을 포함하는 세포 분석 키트로서,

상기 반응기 내의 혈소판 세포가 상기 작동전극의 표면에 충돌 또는 흡착함으로써 발생하는 전류의 세기 변화를 통하여 세포의 크기 및 농도를 측정하는 세포 분석 키트.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 세포는 혈소판인 것을 특징으로 하는, 세포 분석 키트.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 반응 용액은 산화환원종으로서 페로시안화(ferrocyanide) 이온, 페리시안화(ferricyanide) 이온, 육아민화루테늄(Ru) 이온, 하이드로퀴논(hydronquinone), 아스코르브산(ascorbic acid) 및 도파민(dopamine)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 세포 분석 키트.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 반응 용액 중 산화환원종의 농도는 100 내지 400mM인 것을 특징으로 하는, 세포 분석 키트.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 반응 용액은 산화환원종으로서 페로센메탄올(ferrocenemethanol), 페로센(ferrocene), 페로센다이메탄올(ferrocenedimethanol), α-메틸페로센메탄올, 페로센카복시산(ferrocene carboxylic acid), 페로센다이카복시산(ferrocene dicarboxylic acid) 및 페로센알데하이드(ferrocene aldehyde)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 세포 분석 키트.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 반응 용액 중 산화환원종의 농도는 100 mM 내지 400 mM인 것을 특징으로 하는, 세포 분석 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 전기화학 셀의 전류 변화를 측정하는 세포 분석 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 확률적 입자 충돌법을 이용하여 입자를 분석하는 경우 입자의 특성, 예컨대, 크기, 농도, 확산계수, 표면 전하 및 수명에 대한 중요한 정보를 빠르고 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있어서 많은 연구자들이 확률적 입자 충돌법을 이용한 입자 분석방법에 주목하고 있다.

[0003] 또한, 최근 연구 결과에 의하면 확률적 입자 충돌 기반 기술을 이용하여 생체 분자를 포함한 연질 입자도 분석이 가능하다.

[0004] 하지만, 종래의 확률적 입자 충돌 기반 기술을 이용하여 소형 연질 입자를 측정하는 경우 측정의 정확도가 떨어지는 문제가 있었다.

[0005] 한편, 생체 분자 또는 유세포는 전자 현미경을 이용해 분석하는 방법이 일반적으로 사용되고 있고, 구체적으로 주사 전자 현미경 (scanning electron microscopy, SEM)과 투과 전자 현미경 (transmitted electron microscopy, TEM)을 이용한다.

[0006] 하지만, 전자 현미경을 이용하여 생체 분자 또는 유세포를 분석하는 경우 분석을 위한 준비 과정 및 측정 시간

이 많이 소요되고, 분석 장비가 고가이기 때문에 한 번의 분석에 드는 비용이 크고 장비가 큰 관계로 휴대할 수 없다는 단점이 있다.

[0007] 또한, 생체 분자 또는 유세포를 직접 관측하고 모니터링하여 그것의 크기, 단위 부피당 개수 (농도), 그리고 확산 계수를 측정하는 입자 추적 분석법 (particle tracking analysis, NTA)이 알려져 있지만, 이 기술을 사용하는 경우 입자 크기가 큰 경우 정확한 측정이 어렵고 장비의 휴대성이 떨어진다는 단점이 존재한다.

[0008] 따라서, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위해서 전기화학 셀의 전류 변화를 측정하는 세포 분석을 이용하여 모양이 일정하지 않고 작은 세포를 빠르고 정확하게 분석이 가능한 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 작동전극, 상대전극, 기준전극을 담지한 전기화학 셀에 전처리한 세포를 주입하고 불활성 가스를 주입하는 단계; 및

[0010] 상기 전기화학 셀의 전류 변화를 측정하는 단계를 포함하는 세포 분석 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상대전극, 기준전극 및 전극 표면의 최대 대각선 길이가 1 내지 500 ㎛인 작동전극을 포함하는 반응기; 및 산화환원종을 포함하는 반응 용액을 포함하는 세포 분석 키트로서,

[0012] 상기 반응기 내의 혈소판 세포가 상기 작동전극의 표면에 충돌 또는 흡착함으로써 발생하는 전류의 세기 변화를 통하여 세포의 크기 및 농도를 측정하는 세포 분석 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 작동전극, 상대전극, 기준전극을 담지한 전기화학 셀에 전처리한 세포를 주입하고 불활성 가스를 주입하는 단계; 및

[0014] 상기 전기화학 셀의 전류 변화를 측정하는 단계를 포함하는 세포 분석 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상대전극, 기준전극 및 전극 표면의 최대 대각선 길이가 1 내지 500 ㎛인 작동전극을 포함하는 반응기; 및 산화환원종을 포함하는 반응 용액을 포함하는 세포 분석 키트로서,

[0016] 상기 반응기 내의 혈소판 세포가 상기 작동전극의 표면에 충돌 또는 흡착함으로써 발생하는 전류의 세기 변화를 통하여 세포의 크기 및 농도를 측정하는 세포 분석 키트를 제공한다.

[0018] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 전처리한 혈소판을 전기화학 셀에 주입하고 시간대전류법으로 전류를 측정하여 전류의 감소량을 통해 혈소판의 크기 및 농도를 측정하였다.

[0020] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은 작동전극, 상대전극, 기준전극을 담지한 전기화학 셀에 전처리한 세포를 주입하고 불활성 가스를 주입하는 단계; 및 상기 전기화학 셀의 전류 변화를 측정하는 단계를 포함하는 세포 분석 방법을 제공한다.

[0023] 상기 전기화학 셀은 반응기, 작동전극, 기준전극, 상대전극 및 반응용액을 포함할 수 있다.

[0024] 상기 반응기는 본 발명에서 활용하는 사건인 작동전극과 시료 중의 단일입자 간의 충돌이 발생하는 곳으로, 검출대상인 단일 세포가 일정 기간 동안 반응기 내의 반응 용액 중에 저장되면서 작동전극과 충돌을 일으키는 공간을 제공한다. 상기 반응기의 형상은 원통, 플레이트, 정육면체, 직육면체, 정다면체, 다각기둥, 구일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 원통, 다각기둥인 것이 바람직하다. 상기 반응기의 크기에는 제한이 없다.

[0025] 작동전극은 전극 반응에 직접 참가하여 반응을 일으키는 전극을 의미하며, 본 발명에서 사용되는 작동전극은 반응 용액 중의 산화환원종이 산화 반응을 일으키는 전극, 구체적으로 백금초소형전극을 의미한다. 본 발명의 일

실시예에 따르면, 상기 초소형전극은 탄소 섬유, 인듐 산화주석, 불소도핑 산화주석, 보론도핑 다이아몬드, 금, 은, 백금, 구리, 니켈 등 금속 및 비금속 전도성 물질로 구성될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 작동전극 표면의 형상은 원형, 타원형, 삼각형, 사각형, 오각형 등 다각형, 또는 비정형일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 원형인 것이 바람직하다. 이는 원형이 전극 중심으로부터 전극 가장자리까지의 최대거리가 일정한 것에 기인한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 작동전극은 초소형전극으로 이루어질 수 있으며, 전극 표면의 최대 직경이 1 내지 500㎛인 것이 바람직하다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 작동전극의 크기는 생체 분자 또는 모양이 일정하지 않고 작은 세포의 충돌에 따른 전류 변화, 구체적으로는 계단 전류를 명백히 생산하기 위하여 최적화되어야 한다. 바람직하게는, 작동전극의 표면의 최대대각선 길이 대 분석물의 최대길이의 비는 대략 20보다 작아야 한다. 즉, 작동전극 및 분석물이 원형인 경우, 작동전극의 직경 대 분석물의 직경의 비는 대략 20보다 작아야 한다. 예를 들어, 대략 2 ㎛ 내외의 직경을 갖는 혈소판(Platelet rich plasma)를 검출하기 위하여는, 작동전극의 직경은 2 내지 30 ㎛, 바람직하게는 5 ㎛일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 반응기에 장착되는 작동전극은 1개, 또는 작동전극의 표면의 최대대각선 길이가 상이한 2개 이상일 수 있으며, 작동전극의 최대대각선 길이를 달리 하는 2개 이상의 작동전극을 장착함으로써 상이한 크기를 갖는 생체 분자 또는 모양이 일정하지 않고 작은 세포의 존재 여부 또는 그의 농도를 동시에 검출할 수 있다.

[0027] 기준전극은 전위 측정 시 단극전위가 일정하여 기준이 될 수 있는 전극을 의미한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 기준전극은 은(Ag)으로 이루어질 수 있으며, 구체적으로 Ag/AgCl(1M KCl)일 수 있다.

[0028] 상대전극은 작동전극 또는 기준전극과 짝지어 전극반응을 일으키는 전극을 의미한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 상대전극은 백금(Pt), 금(Au) 산화이리듐(IrO2) 등으로 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 활성전극의 면적보다 5배 이상 큰 면적을 가지는 다양한 형태의 전극일 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상대전극 및 기준전극은 작동전극의 형상 및 크기와 동일하거나 다르게 형성될 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 작동전극, 상대전극 및/또는 기준전극이 반응기 내에 장착되는 위치에는 제한이 없으나, 반응기 벽에 부착되는 것보다는 반응기 벽과 이격되어 장착된 것이 바람직하다. 또한, 기준전극과 작동전극 간의 거리에는 제한이 없으나, 1 cm 이내에 배치되는 것이 바람직하다.

[0031] 세 전극은 연속적인 전해질 수용액 속에 담겨있어 전기적으로 연결되어 있어야 하며, 각 전극이 오염되는 것을 방지하기 위하여 분리막을 통해 전해질로 연결되어 사용하는 것도 가능하다.

[0032] 반응 용액은 전극 반응을 수행하기 위한 각종 이온 등 물질을 제공하는 역할을 하며, 배양 배지 및 산화환원종을 포함할 수 있다. 상기 용액 중의 배양 배지는 검출 대상인 생체 분자 또는 모양이 일정하지 않고 작은 세포 각각에 대하여, 당 분야의 통상의 기술자의 상식에 따라 적절한 구성 및 농도로 포함될 수 있다. 나아가, 본 발명의 반응기 내부의 조건은 검출대상인 생체분자 또는 모양이 일정하지 않고 작은 세포의 생존 및 증식에 알맞은 조건, 예컨대 온도 또는 반응 시간을 결정할 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 반응 용액은 산화환원종으로서 페로시안화(ferrocyanide) 이온, 페리시안화(ferricyanide) 이온, 육아민화 루테늄(ruthenium, Ru) 이온, 하이드로퀴논(hydronquinone), 아스코르브산(ascorbic acid), 도파민(dopamine), 페로센메탄올(ferrocenemethanol), 페로센(ferrocene), 페로센다이메탄올(ferrocenedimethanol), α-메틸페로센메탄올, 페로센카복시산(ferrocene carboxylic acid), 페로센다이카복시산(ferrocene dicarboxylic acid), 페로센알데하이드(ferrocene aldehyde) 등으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 산화환원종이 페로시안화 이온, 페리시안화 이온, 육아민화 루테늄 이온, 하이드로퀴논, 아스코르브산 및 도파민으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 경우 산화환원종의 농도가 낮을수록 신호와 노이즈가 구분되지 않으므로 상기 반응 용액 중 산화환원종의 농도는 100 내지 400 mM, 바람직하게는 200 내지 400 mM의 값을 가질 수 있으며, 상기 산화환원종이 페로센메탄올, 페로센, 페로센다이메탄올, α-메틸페로센메탄올, 페로센카복시산, 페로센다이카복시산 및 페로센알데하이드로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 경우, 상기 반응 용액 중 산화환원종의 농도는 100 내지 400 mM, 바람직하게는 200 내지 400 mM의 값을 가질 수 있다.

[0034] 상기 산화환원종의 농도는 작동전극에서 검출하고자 하는 대상 물질의 종류 및 크기에 따라 적절히 선택될 수 있다. 일반적으로, 개별 분석 물질 신호는 산화환원종의 농도에 비례하여 증가하는 경향을 가지며, 개별 신호가 커질 경우 기기의 잡음 전류로부터 검출 신호를 구분하기 수월해진다. 그러나, 산화환원종의 농도는 산화환원종

의 용해도에 의하여 최대 농도에 제한을 받고, 바이오 분자의 경우 삼투현상 등에 따라 분석 물질이 변형될 수 있으므로, 허용 최대농도가 제한된다. 상기 산화환원종이 이온성일 경우, 산화환원종의 농도가 증가하면 이온세기가 증가하게 되므로, 높은 이온세기에서는 분석 물질의 뭉침, 침전현상이 일어날 수 있으므로 지양해야 한다. 상기 산화환원종이 중성 전하를 가지는 경우, 이온 세기를 적정한 수준으로 조절하기 위하여 안정한 염, 구체적으로 염화나트륨, 질산칼륨, 염화칼륨 등을 10 ㎜ 이하의 농도로 첨가할 수 있다. 적절한 이온 세기는 안정적인 대기 전류를 보여준다. 위의 변수들을 고려하여 분석 물질의 종류에 따라 적절한 산화환원종의 농도를 선택하여야 하며, 바람직하게는 2 내지 100 ㎜의 값이 적절하다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서 용액 내에 존재하는 산소를 제거 하고, 대류를 일으켜주어 주입해준 샘플이 잘 섞이도록 하기 위해서 입자 시료를 주입한 후 아르곤 가스를 10 초 동안 주입할 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 사용되는 용어 "모양이 일정하지 않고 작은 세포"는 세포막이 일반적인 세포와 다르게 정형화되어 있지 않아서 세포의 모양이 일정하지 않고, 세포의 크기는 1.9 ㎛ 내지 3.0 ㎛ 정도로 다양하다.

[0037] 상기 모양이 일정하지 않고 작은 세포는 혈소판 일 수 있고, 그 크기는 1.9 ㎛ 내지 3.0 ㎛ 정도로 다양하다. 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 명세서에서 사용되는 용어 "시료"는 생체 분자 또는 모양이 일정하지 않고 작은 세포를 함유할 수 있는 것이라면 어떠한 유형도 가능하다. 예를 들어, 상기 시료는 생물학적 시료, 식품 시료, 물 시료, 예컨대 폐수, 담수 또는 해수 시료, 토양 시료, 슬러지 시료 또는 공기 시료일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 시료는 본 발명에 따른 반응기에 투입되기 전에 정제 또는 농축되지 않은 상태로 사용할 수 있으며, 시료에 따라 입자가 지나치게 큰 경우, 예를 들어 수 십 혹은 수 백 ㎛ 이상의 크기를 가지는 입자가 포함되어 있는 경우, 적절한 필터를 여과함으로써 큰 입자를 제거할 수 있다.

[0039] 본 발명에서, 확률적 입자 전극 충돌법을 이용한 생체 분자 또는 모양이 일정하지 않고 작은 세포의 검출은 1) 전기영동적 이동 및 2) 전기활성화 영역의 차단이라는 두 순차적 전략에 따라 수행된다. 용액 중의 산화환원종인 페로시안화 이온이 작동전극 표면에서 산화되는 경우, 정상 상태 전류 흐름에 의하여 작동전극 표면 근처의 양의 전기장이 발생하므로, 음으로 하전된 생체 분자 또는 세포는 전기영동적 이동을 통하여 작동전극 표면으로 끌려간다. 전류 수준은 충돌 사건이 일어날 때까지 방사상 확산에 의하여 유지된다. 생체 분자 또는 세포가 작동전극 표면에 충돌하여 부착되면, 산화환원종의 흐름이 부착된 생체 분자 또는 세포에 의하여 차단되기 때문에, 정상 상태 전류의 수준은 즉시 감소된다.

[0040] 본 발명은 생체 분자 또는 모양이 일정하지 않고 작은 세포를 확률적 입자 전극 충돌법을 이용하여 분석하기 위해서 전처리 하는 것을 특징으로 하고, 구체적으로 상기 전처리는 글루타알데하이드 및 파라포름알데하이드를 혈소판에 처리하는 것을 의미할 수 있고, 상기 글루타알데하이드의 농도는 1 내지 5%(v/v), 1 내지 4%(v/v), 2 내지 5%(v/v), 2 내지 4%(v/v), 또는 2 내지 3%(v/v)일 수 있고, 상기 파라포름알데하이드의 농도는 1 내지 5%(v/v), 1 내지 4%(v/v), 2 내지 5%(v/v), 2 내지 4%(v/v), 또는 2 내지 3%(v/v)일 수 있다.

[0042] 본 발명은 상대전극, 기준전극 및 전극 표면의 최대 대각선 길이가 1 내지 500 ㎛인 작동전극을 포함하는 반응기; 및 산화환원종을 포함하는 반응 용액을 포함하는 세포 분석 키트로서,

[0043] 상기 반응기 내의 혈소판 세포가 상기 작동전극의 표면에 충돌 또는 흡착함으로써 발생하는 전류의 세기 변화를 통하여 세포의 크기 및 농도를 측정하는 세포 분석 키트를 제공한다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 키트는 상기 반응기의 일측 상부에 형성되고 시료가 유입되는 유입유로; 및 상기 반응기의 타측 하부에 형성되고 시료가 배출되는 배출유로를 추가로 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 키트는 상기 작동전극에서의 시간의 흐름에 따른 전류의 세기 변화를 표시하는 표시부를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0046] 본 발명은 작동전극, 상대전극, 기준전극을 담지한 전기화학셀에 전처리한 세포를 주입하고 불활성 가스를 주입하는 단계; 및 상기 전기화학셀의 전류 변화를 측정하는 단계를 포함하는 세포 분석 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 세포 분석 방법을 이용하는 경우 혈소판 등 세포의 모양이 일정하지 않고 작은 세포를 빠르고 정확하게 분석이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 polystyrene(PS) 비드를 전기화학 셀에 주입한 후 시간대전류법으로 1000 초 동안 류의 변화를 측정한 결과이다.

도 2는 PS 입자가 전극에 충돌해서 발생하는 확률적 전류 감소 빈도수 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 3은 PS 입자들의 크기를 TEM으로 분석한 결과이다.

도 4는 혈소판을 전기화학 셀에 주입한 후 시간대전류법으로 1000초 동안 류의 변화를 측정한 결과이다.

도 5은 3개의 세트에서 혈소판 입자가 전극에 충돌해서 발생하는 확률적 전류 감소 빈도수 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 6은 혈소판 입자들의 크기를 TEM으로 분석한 결과이다.

도 7은 혈소판의 확률적 입자 전극 충돌에 의한 전류의 흐름 감소를 이용하여 샘플에 존재하는 혈소판의 농도를 측정한 결과이다.

도 8은 3개의 세트에서 혈소판의 전처리 조건 별 확률적 입자 전극 충돌에 의한 전류의 흐름 감소를 이용하여 샘플에 존재하는 혈소판의 농도를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 본 발명을 참고예 및 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 참고예 및 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

[0050] **실시예 1. 확률적 입자 전극 충돌에 의한 전류의 흐름 감소**

[0051] 1 M 황산용액에 작동전극, 상대전극, 기준전극을 담지한 전기화학셀을 구성하였다. 상기 작동전극은 백금 UME (백금초소형전극, 원형 전극 반지름: 5 um)이고, 상대전극은 백금 전선이고, 기준전극은 1 M KCl 수용액에 담지된 Ag/AgCl이다.

[0052] 상기 전기화학셀을 CHI600e를 사용하는 일정전위기와 연결하고 순환 전류전압법을 20 사이클 수행하여 백금초소형전극의 표면이 부산물 없이 깨끗한 상태가 되도록 하였다. 상기 전극들을 증류수로 세척하고 세척한 전극들을 0.4 M $Fe(CN)_6^{4-}$ 수용액에 담그고, 상기 전기화학셀에 0.6 V를 인가하고 60초가 되었을 때 polystyrene(PS) 비드(bead)(spherotech, Cat No: CP-05-10)를 주입하고 아르곤 가스를 10 초 동안 주입한 후 시간대전류법으로 1000 초 동안 입자 분산된 용액의 전류를 측정하였다.

[0053] 한편, 상기 0.4M의 $Fe(CN)_6^{4-}$ 수용액은 하기와 같은 방법으로 제작된다. 대략 1.69g의 페로시안화칼륨을 저울로 측정하고, 10 mL의 3차 증류수가 담긴 바이알에 담는다. 상기 바이알을 초음파세척기에 넣은 후 20 내지 30분 가량 세척하여 완전히 용해된 0.4M의 $Fe(CN)_6^{4-}$ 수용액을 얻었다.

[0054] 그 결과, 이미 크기를 알고 있는 PS 입자를 일정 농도가 되도록 전기화학 셀에 주입(도 1a의 구간-I)한 경우 주입에 따라 발생한 대류 현상에 의해 심한 전류 변동이 발생하나, 180초 이후 안정적인 전류가 흐르는 것을 확인(도 1a의 구간-Ⅱ)할 수 있었고, 도 1a의 구간-Ⅱ를 확대한 도 1 b-c에서는 갑작스런 전류 감소를 확인할 수 있었고, 이러한 전류 감소는 확률적으로 관측되었다.

[0055] 실험결과 관찰된 갑작스런 전류 감소는 PS 입자가 전극에 충돌하여 $Fe(CN)_6^{4-}$가 산화될 수 있는 전극 면적이 감소했기 때문에 발생한 것이다[(1) Quinn *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 8360-8361, (2) Bard *et al.*, *J. Phys. Chem. B* 2013, 117, 4371-4380.].

[0056] 상기 결과를 바탕으로, 일정 범위의 갑작스런 전류 감소량(i_{drop})을 갖는 PS 입자가 전극에 충돌해서 발생하는 확률적 전류 감소 빈도수 다이어그램(도 2a)을 나타냈다. 도 2a에서 x축은 확률적인 입자의 충돌에 의해 발생하는 갑작스런 전류 감소량의 크기를 나타내고, y축은 특정한 전류 감소량을 가지고 충돌하는 입자의 수를 나타낸다.

[0057] 또한, 도 1의 결과를 하기에 나타난 수학적 수식을 사용하여 입자의 반지름으로 변환시켜 그 결과를 도 2b 로 나타내었다.

[0058] 구체적으로, 도 2a의 i_{drop}으로부터 PS 입자 반지름(r_p)을 하기의 수학식을 통해 구할 수 있다[Boika *et al. Electrochim. Acta* 2017, 236, 252-259.].

[0059] [수학식 1]

[0060] $$i_{drop,1}/i_{drop,2} = (r_{p,1}/r_{p,2})^2$$

[0062] 또한, 분석에 사용한 PS 입자들의 크기를 TEM(JEOL, JEM-2010)으로 분석하여 도 3에 나타냈다.

[0064] **실시예 2. 혈소판의 전처리**

[0065] 확률적 입자 전극 충돌에 의한 전류의 흐름 감소를 이용하여 혈소판의 크기 및 농도를 측정하기 위해서 하기와 같은 방법으로 혈소판을 전처리 하였다.

[0066] 구체적으로, 혈액응고를 막기 위해 혈액에 10.9 mM(최종농도)의 sodium citrate를 첨가한 상태에서 원심분리(250G x 15 분)를 하여 혈소판(혈소판부혈장, platelet rich plasma)을 분리하고, 2%(v/v) 글루타알데하이드(Glutaraldehyde) 및 2%(v/v) 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 포함하는 인삼염(phosphate buffer)을 혈소판 부피의 세배가 되도록 첨가하여 혈소판을 희석하였다.

[0068] **비교예 1. 혈소판의 전처리**

[0069] 혈소판의 전처리 조건에 따른 확률적 입자 전극 충돌 현상을 이용한 혈소판의 크기 및 농도 측정의 정확도를 분석하기 위해서 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0070] 구체적으로, 실시예 2와 같은 방법으로 혈소판 입자를 전처리 하되 원심분리하여 얻은 혈소판에 대해서 추가적으로 원심분리(1900G x 10 분)하여 혈소판을 침사로 가라앉히고 상층 혈장(platelet poor plasma)을 제거한 뒤 혈소판 부피와 동일한 양의 4% (v/v) 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 포함하는 인삼염을 첨가하여 혈소판을 재부유시켰다.

[0072] **실시예 3. 혈소판의 확률적 입자 전극 충돌에 의한 전류의 흐름 감소**

[0073] 실시예 1과 같은 방법으로 혈소판 입자의 확률적 입자 전극 충돌에 의한 전류의 흐름 감소를 확인하되, 전기화학셀에 0.6 V를 인가하고 시간이 60초가 되었을 때 polystyrene(PS) 비드(bead) 대신 모양이 변하지 않도록 실시예 2와 같은 방법으로 전처리한 1.0 fM 혈소판 (platelet rich plasma)을 주입하고 아르곤 가스를 10 초 동안 주입한 후, 시간대전류법으로 1000 초 동안 입자 분산된 용액의 전류를 측정하였다.

[0074] 그 결과 도 4에 나타난 것과 같이 200초 내지 1000초 영역에서 혈소판의 확률적 입자 전극 충돌에 의해서 갑작스럽게 전류의 흐름이 감소했다.

[0075] 상기 결과를 바탕으로, 일정 범위의 갑작스런 전류 감소량(i_{drop})을 갖는 혈소판 입자가 전극에 충돌해서 발생하는 확률적 전류 감소 빈도수 다이어그램(도 5)을 나타냈다.

[0076] 또한, 분석에 사용한 혈소판 입자들의 크기를 TEM(JEOL, JEM-2010)으로 분석하여 도 6에 나타냈다.

[0078] **실시예 4. 혈소판의 확률적 입자 전극 충돌을 이용한 혈소판 농도 측정**

[0079] 혈소판의 확률적 입자 전극 충돌에 의한 전류의 흐름 감소를 이용하여 샘플에 존재하는 혈소판의 농도를 빠르게 측정하였다.

[0080] 구체적으로, 혈소판의 농도를 알고 있는 실시예 2 또는 비교예 1과 같은 방법으로 전처리한 혈소판 용액을 실시

예 3과 같은 방법으로 확률적 입자 전극 충돌시킨 후 유세포 분석 장비 (ADVIA®2120i)을 이용하여 혈소판 입자의 전극 충돌빈도 수를 측정하여 도 7에 나타냈다.

[0081] 도 7의 결과를 분석하여 용액중 혈소판 농도와 확률적 입자 전극 충돌시 혈소판 입자의 전극 충돌빈도 수는 하기 수학식 2와 같은 함수관계가 있음을 확인하였다.

[0082] [수학식 2]

[0083] $y = 10.85x$ (x: 고정된 혈소판 농도 (fM), y: 충돌 빈도수)

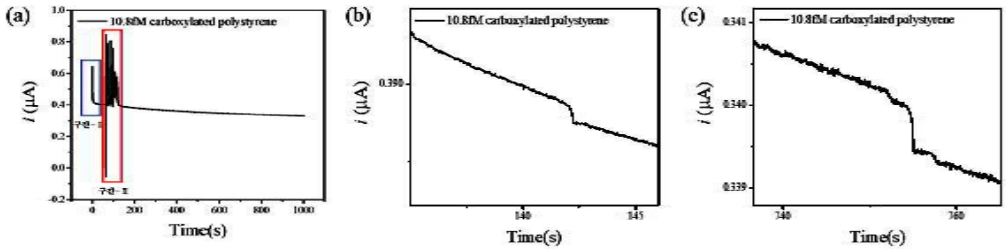
[0085] **실험예 1. 혈소판의 전처리 조건에 따른 확률적 입자 전극 충돌을 이용한 혈소판 농도 측정**

[0086] 혈소판의 전처리 조건에 따른 확률적 입자 전극 충돌을 이용한 혈소판 농도 측정의 정확도를 비교 분석하였다.

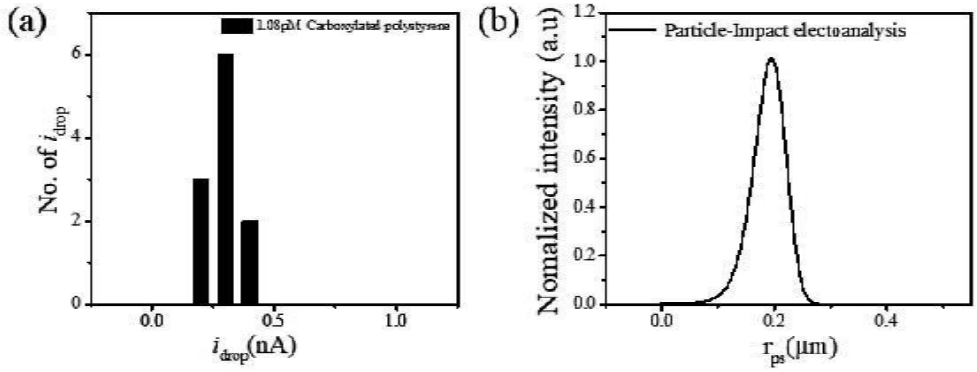
[0087] 실시예 3과 같은 방법으로 실험을 수행한 결과 도 5(실험예 2와 같은 방법으로 전처리) 및 도 8(비교예 1과 같은 방법으로 전처리)에 나타난 것과 같이 파라포름알데하이드만으로 전처리한 경우 혈소판의 고정화가 효과적으로 되지 않아 혈소판이 활성화 되지 않았지만, 글루타알데하이드 및 파라포름알데하이드를 사용하여 전처리한 경우 혈소판의 고정화가 효과적으로 되어 혈소판이 활성화 되었음을 확인할 수 있었다.

도면

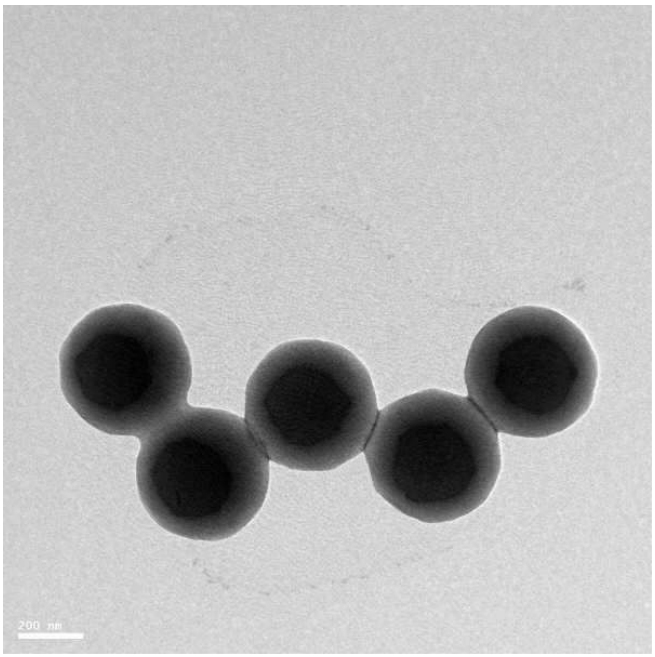
도면1



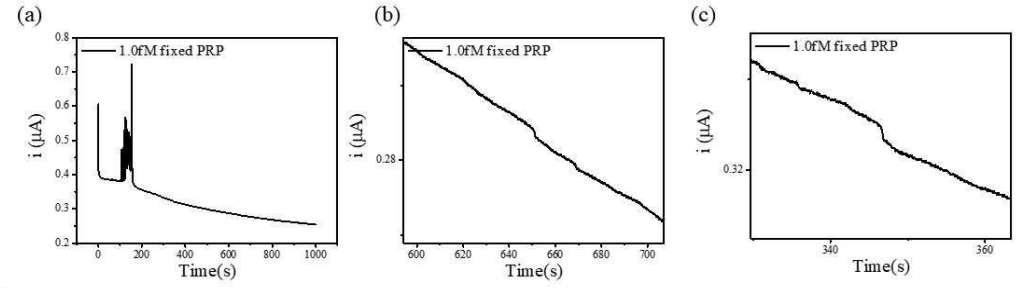
도면2



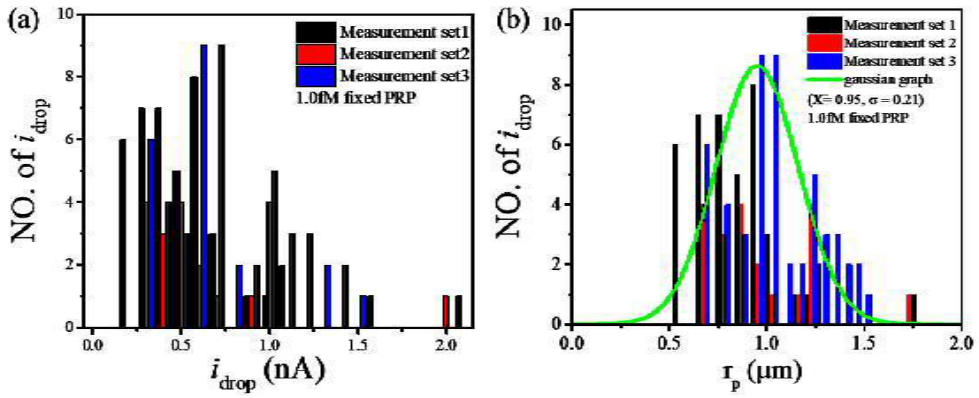
도면3


200 nm

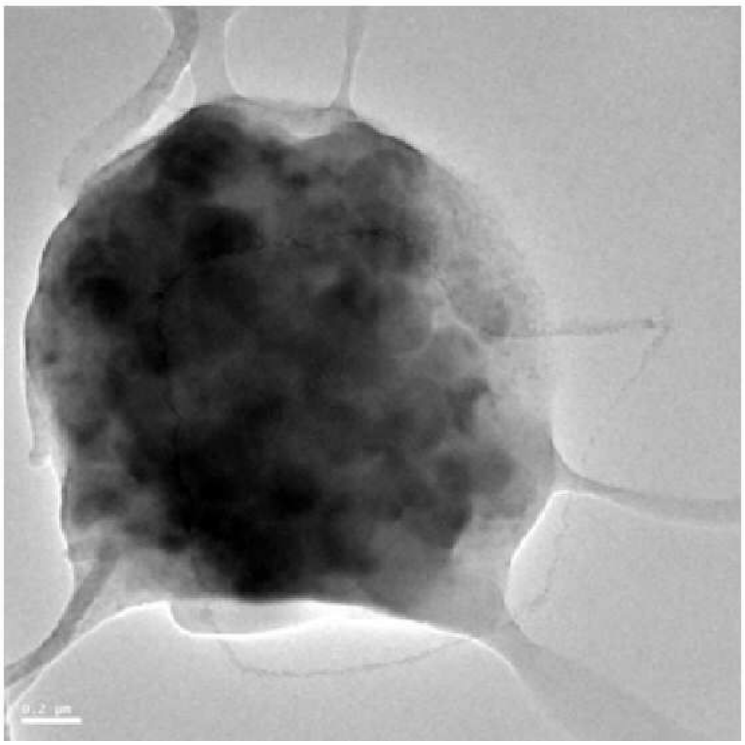
도면4


(a)
1.0fM fixed PRP
i (μA)
Time(s)
(b)
1.0fM fixed PRP
i (μA)
Time(s)
(c)
1.0fM fixed PRP
i (μA)
Time(s)

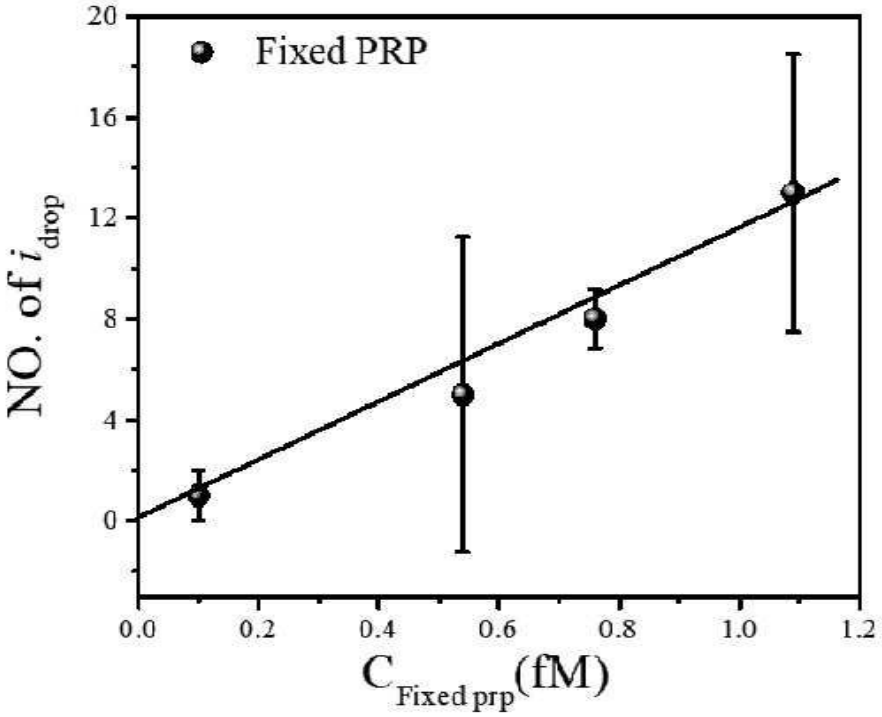
도면5


(a)
Measurement set1
Measurement set2
Measurement set3
1.0fM fixed PRP
NO. of i_{drop}
i_{drop} (nA)
(b)
Measurement set 1
Measurement set 2
Measurement set 3
gaussian graph
(X= 0.95, σ = 0.21)
1.0fM fixed PRP
NO. of i_{drop}
r_p (μm)

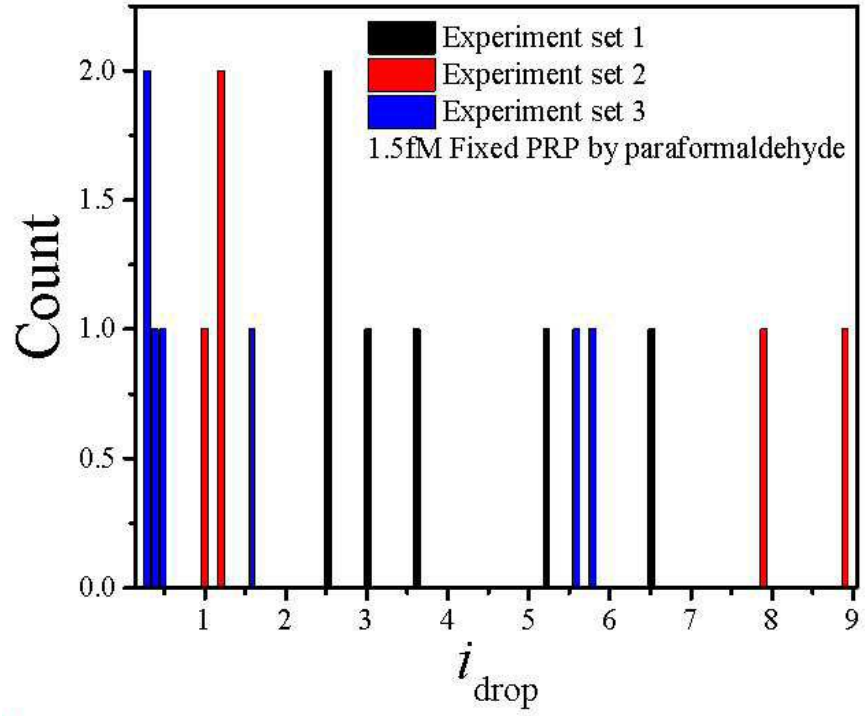
도면6



도면7


Fixed PRP
NO. of i_{drop}
$C_{Fixed\ prp}$(fM)
0
4
8
12
16
20
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2

도면8


Experiment set 1
Experiment set 2
Experiment set 3
1.5fM Fixed PRP by paraformaldehyde
Count
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
i drop