



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월03일

(11) 등록번호 10-2260007

(24) 등록일자 2021년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)
G01N 21/47 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/54386 (2013.01)
B01L 3/502761 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0029124

(22) 출원일자 2019년03월14일

심사청구일자 2019년03월14일

(65) 공개번호 10-2020-0109686

(43) 공개일자 2020년09월23일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020140125536 A*

KR1020180131868 A*

KR1020160148137 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

주철민

경기도 고양시 일산동구 노루목로 80 호수마을3단지아파트 308동 1001호

뉴엔 반 투안

서울특별시 관악구 호암로20길 38, 102호

김의한

서울특별시 서대문구 연희로16길 32(연희동, 백산타운)

(74) 대리인

특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 10 항

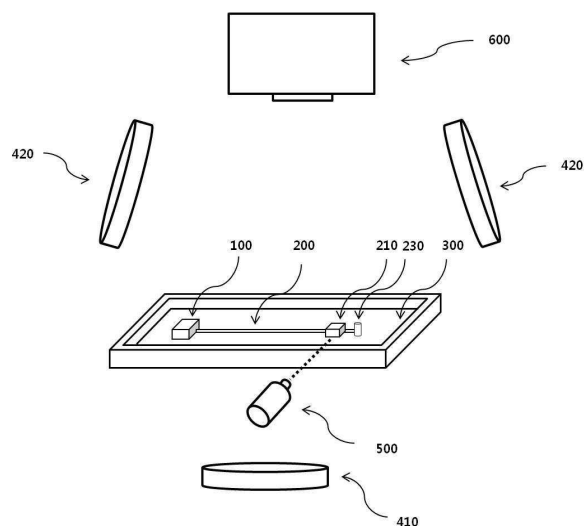
심사관 : 양경식

(54) 발명의 명칭 광산란을 이용한 면역 분석 장치 및 방법

(57) 요약

본 발명은 항원 및 항체의 면역 반응을 분석하는 면역 분석 장치로, 시료가 주입되는 시료 주입구 및 주입된 시료가 흐르며 자성 나노입자의 표면에 항체가 고정된 항체-자성 나노입자 복합체가 위치하는 센싱영역을 연결하는 미세 유체 채널을 포함하는 마이크로칩; 상기 마이크로칩에 이격되어 위치하는 자기장 인가부; 상기 센싱영역을 통과하는 광을 조사하는 광원부; 및 상기 센싱영역에서 산란된 광을 검출하는 산란광 검출부;를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 21/47 (2013.01)

G01N 33/54326 (2013.01)

B01L 2200/0647 (2013.01)

B01L 2400/043 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711048489
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터지원사업
연구과제명	[선도연구센터/ERC]초정밀 광 기계기술 연구센터(4/4,1단계)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

항원 및 항체의 면역 반응을 분석하는 면역 분석 장치로,

시료가 주입되는 시료 주입구 및 주입된 시료가 흐르며 자성 나노입자의 표면에 항체가 고정된 항체-자성 나노입자 복합체가 위치하는 센싱영역을 연결하는 미세 유체 채널을 포함하는 마이크로칩;

상기 마이크로칩에 이격되어 위치하는 자기장 인가부;

상기 센싱영역을 통과하는 광을 조사하는 광원부; 및

상기 센싱영역에서 산란된 광을 검출하는 산란광 검출부;

를 포함하며,

상기 센싱영역은 하부 면에 항원과 특이적으로 결합하는 1차 항체 (Primary antibody)가 고정되고,

상기 자기장 인가부는 하부에 위치하는 제1자기장 인가부 및 상부에 위치하는 제2자기장 인가부를 포함하며,

상기 제1자기장 인가부는 상기 시료에 함유된 항원과 상기 복합체의 항체가 특이적 결합하여 생성된 결합체를 상기 1차 항체에 결합시키고,

상기 제2자기장 인가부는 결합체를 형성하지 못한 복합체를 상기 센싱영역의 하부 면으로부터 제거하며,

상기 제1 및 제2 자기장 인가부의 자기장 세기는 1 내지 1000 lbs이고,

상기 산란광 검출부는 상기 마이크로칩의 상부에 위치하는 면역 분석 장치.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 산란광 검출부는 상기 광원부에 의해 조사된 광이, 상기 시료에 함유된 항원과 상기 복합체의 항체가 특이적 결합하여 생성된 결합체에 의해, 상기 미세 유체 채널 외부로 산란된 광을 검출하는 면역 분석 장치.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 면역 분석 장치는 상기 자기장 인가부를 제어하여 상기 센싱영역에 인가되는 자기장의 방향과 세기를 조절하는 제어부를 더 포함하는 면역 분석 장치.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 항체-자성 나노입자 복합체는 상기 센싱영역의 상부면에 증착되어 있는 것인 면역 분석 장치.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 산란광 검출부는 상기 마이크로칩의 상부에 위치하는 면역 분석 장치.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항체-자성 나노입자의 자성 나노입자는 Fe_3O_4 , Fe_2O_3 , 페라이트, 철, 망간, 니켈, 코발트, 크롬, 코발트, 니켈 및 이의 합금으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인 면역 분석 장치.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 자성 나노입자는 0.1 내지 1 μm 의 평균입경을 가지는 면역 분석 장치.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 마이크로칩은 센싱영역과 이격되어, 분석장치의 정상 작동여부를 판단할 수 있는 참조영역 (Reference zone)을 더 포함하는 면역 분석 장치.

청구항 11

제1항, 제3항, 제4항 및 제6항 내지 제10항에서 선택되는 어느 한 항의 면역 분석 장치를 이용하는 분석 방법으로,

- 1) 마이크로칩의 시료 주입구에 시료를 주입하는 단계;
- 2) 자기장을 인가하는 단계;
- 3) 광을 조사하는 단계;
- 4) 상기 조사된 광의 산란광을 검출하는 단계; 및
- 5) 상기 산란광 검출 신호를 분석하는 단계; 를 포함하는 면역 분석 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 자기장을 인가하는 단계는,

2-1) 제1자기장 인가부 제어를 통해 상기 결합체를 상기 1차 항체에 결합시키는 단계; 및

2-2) 제2자기장 인가부 제어를 통해 결합체를 형성하지 못한 항체-자성 나노입자 복합체를 상기 마이크로칩의 하부 면으로부터 제거하는 단계;

를 포함하는 면역 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 광산란을 이용한 면역 분석 장치 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역 분석법은 시료의 분석 과정에서 항체를 이용하는 기술을 의미하며, 항원-항체의 특이적 결합반응을 이용하는 기술이다. 이때 항체는 표지(labeling)하여 사용하거나 별도의 표지 없이 사용하기도 한다. 주로 단백질의 검출이나 정량을 위하여 사용되었으나, 최근에는 항체 기술의 발전으로 저분자 화합물, 탄수화물, 지질 등의 분석 및 각종 미생물의 분석에도 활용되어, 임상 진단, 약물 전달, 식품 안전 및 환경 감시 등의 분야에서 중요한

역할을 수행한다.

[0003] 면역 분석법의 한 종류로, 측면유동 면역 분석법 (lateral flow immunoassay: LFA)은 나노입자를 이용한 샌드위치 면역분석 기술과 멤브레인을 이용한 시료 유동을 통해 미지 시료 내 표적물질을 검출할 수 있는 분석기술이다. 측면유동 면역 분석법은 가격이 저렴하고 휴대 및 빠른 검출이 용이하고 전문적인 기술 없이 일반인들이 쉽게 이용할 수 있어 널리 이용되고 있지만, 육안 식별 평가에 의존함에 따라 분석 민감도가 우수하지 않고 정량 분석이 어려운 문제점이 있다.

[0004] 한편, 표면 증강 라만 기반 면역 분석법은 라만 리포터 분자 (라만 표지자)의 증폭된 특징적인 표면 증강 라만 분산 (SERS) 스펙트럼 피크의 세기 변화를 측정하여 표적물질을 정량할 수 있는 방법이다. 이러한 방법은 빠르고 민감한 센싱능력 때문에 많은 연구자들로부터 관심을 받고 있지만 실험 조건을 최적화하기가 어렵고, 입자의 형상에 따라 편차가 커서 감도가 떨어지는 문제점이 있다.

[0005] 따라서 정확도 및 민감도가 높은 동시에 간편하고 측정시간이 짧은 면역 분석 장치 및 방법의 제공이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-1926447호
(특허문헌 0002) 한국공개특허공보 제10-1195957호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 광산란을 이용한 면역 분석 장치 및 방법을 제공하는 것으로, 보다 구체적으로, 면역 분석 장치에 광을 조사하고, 검출하고자 하는 항원과 나노입자가 결합함으로써 발생하는 광산란 특성을 이용하여 시료 내에 존재하는 항원을 정확하게 검출할 수 있는 면역 분석 장치 및 분석 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 짧은 시간 내에 정확하게 분석할 수 있는 간편한 면역 분석 장치 및 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 항원 및 항체의 면역 반응을 분석하는 면역 분석 장치로,

[0010] 시료가 주입되는 시료 주입구 및 주입된 시료가 흐르며 자성 나노입자의 표면에 항체가 고정된 항체-자성 나노입자 복합체가 위치하는 센싱영역을 연결하는 미세 유체 채널을 포함하는 마이크로칩;

[0011] 상기 마이크로칩에 이격되어 위치하는 자기장 인가부;

[0012] 상기 센싱영역을 통과하는 광을 조사하는 광원부; 및

[0013] 상기 센싱영역에서 산란된 광을 검출하는 산란광 검출부;

[0014] 를 포함하는 면역 분석 장치를 제공한다.

[0015] 본 발명에 따른 일 실시예에 있어, 상기 자기장 인가부는 하부에 위치하는 제1자기장 인가부 및 상부에 위치하는 제2자기장 인가부를 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명에 따른 일 실시예에 있어, 상기 산란광 검출부는 상기 광원부에 의해 조사된 광이, 상기 시료에 함유된 항원과 상기 복합체의 항체가 특이적 결합하여 생성된 결합체에 의해, 상기 미세 유체 채널 외부로 산란된 광을 검출하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명에 따른 일 실시예에 있어, 상기 면역 분석 장치는 상기 자기장 인가부를 제어하여 상기 센싱영역에 인가되는 자기장의 방향과 세기를 조절하는 제어부를 더 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명에 따른 일 실시예에 있어, 상기 센싱영역은 하부 면에 항원과 특이적으로 결합하는 1차 항체 (Primary

antibody)가 고정된 것일 수 있다.

- [0019] 본 발명에 따른 일 실시예에 있어, 상기 항체-자성 나노입자 복합체는 상기 센싱영역의 상부면에 증착되어 있는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명에 따른 일 실시예에 있어, 상기 산란광 검출부는 상기 마이크로칩의 상부에 위치하는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명에 따른 일 실시예에 있어, 상기 항체-자성 나노입자의 자성 나노입자는 Fe_3O_4 , Fe_2O_3 , 페라이트, 철, 망간, 니켈, 코발트, 크롬, 코발트, 니켈 및 이의 합금으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다.
- [0022] 본 발명에 따른 일 실시예에 있어, 상기 자성 나노입자는 0.1 내지 1 μm 의 평균입경을 가질 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 일 실시예에 있어, 상기 마이크로칩은 센싱영역과 이격되어, 분석장치의 정상 작동여부를 판단할 수 있는 참조영역 (Reference zone)을 더 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명은 또한 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 분석 장치를 이용하는 분석 방법으로,
- [0025] 1) 마이크로칩의 시료 주입구에 시료를 주입하는 단계;
- [0026] 2) 자기장을 인가하는 단계;
- [0027] 3) 광을 조사하는 단계;
- [0028] 4) 상기 조사된 광의 산란광을 검출하는 단계; 및
- [0029] 5) 상기 산란광 검출 신호를 분석하는 단계; 를 포함하는 면역 분석 방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명에 따른 일 실시예에 있어, 상기 자기장을 인가하는 단계는,
- [0031] 2-1) 제1자기장 인가부 제어를 통해 상기 결합체를 상기 1차 항체에 결합시키는 단계; 및
- [0032] 2-2) 제2자기장 인가부 제어를 통해 결합체를 형성하지 못한 항체-자성 나노입자 복합체를 상기 마이크로칩의 하부 면으로부터 제거하는 단계;
- [0033] 를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명에 따른 면역 분석 장치는 시료 내의 표적물질 (항원)을 짧은 시간 내에 정확하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 단순한 구조를 가짐으로써 정확도 및 경제성을 동시에 향상시킬 수 있는 장점이 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 면역 분석 장치는 비교적 간단한 구조를 가지며, 적은 양의 시료를 사용하면서도 신속하고 정확하게 시료 내의 항원 농도를 검출할 수 있는 장점이 있다. 또한 비싼 장비나 염색 물질의 표지없이 항원의 존재 여부 검출 및 항원의 농도의 측정이 가능하여 정확도 및 경제성이 모두 향상된 면역 분석 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 본 발명에 따른 면역 분석 장치의 구조를 도시한 도면이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 면역 분석 장치에 의해 일어나는 광도파 및 광산란을 나타내는 도면이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 면역 분석 장치에 포함되는 마이크로칩의 구조를 나타내는 도면이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 분석 장치의 구조를 도시한 도면이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 분석 장치에 따라 측정된 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 분석 장치에 따라 측정된 산란광의 세기 및 항원 농도의 관계를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 본 명세서에서 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에

서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

- [0037] 본 명세서에서, "또는"의 사용은 달리 언급하지 않는 한 "및/또는"을 의미하며, "-들을 포함하다" 및 이러한 용어의 변형, 예를 들어, "-들을 포함하는" 및 "-을 포함하다"는 다른 부가물, 성분, 정수 또는 단계를 배제하고자 하는 것이 아니다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "약" 및 "대략"은 동등하게 사용된다. 약 또는 대략을 갖거나 갖지 않는 본 명세서에서 사용되는 임의의 숫자는 관련 분야의 당업자에 의해 인지되는 임의의 일반적인 변동을 포함하는 것을 의미한다.
- [0038] 본 발명은 면역 분석 장치 및 방법에 관한 것으로, 표적물질은 본 발명의 면역 분석 장치에 의하여 검출하고자 하는 물질을 의미하는 것으로, 예를 들어, 생체 시료에서 검출하고자 하는 특정 항원, 항체, 핵산, 압타머, 단백질, 펩티드, 세포, 암세포, 종양 마커 등이 포함될 수 있으며, 기타 분석 대상 표적 물질이 포함될 수 있다. 또한, 결합성분은 상기 표적물질과 특이적인 상호작용을 통해 결합할 수 있는 물질을 의미하는 바, 예컨대, 항체, 핵산, 단백질, 펩티드, 종양 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 물질 등이 포함될 수 있다. 바람직하게는, 표적물질은 특정 항원이고, 상기 결합성분은 상기 특정 항원에 특이적인 항체일 수 있다.
- [0039] 이하에서 면역 분석 장치 및 방법의 표적물질은 편의상 항원으로 칭하고, 결합성분은 항체로 칭하여 설명하기로 한다.
- [0040] 본 발명은 항원 및 항체의 면역 반응을 분석하는 면역 분석 장치로,
- [0041] 시료가 주입되는 시료 주입구 및 주입된 시료가 흐르며 자성 나노입자의 표면에 항체가 고정된 항체-자성 나노입자 복합체가 위치하는 센싱영역을 연결하는 미세 유체 채널을 포함하는 마이크로칩;
- [0042] 상기 마이크로칩에 이격되어 위치하는 자기장 인가부;
- [0043] 상기 센싱영역을 통과하는 광을 조사하는 광원부; 및
- [0044] 상기 센싱영역에서 산란된 광을 검출하는 산란광 검출부;
- [0045] 를 포함하는 면역 분석 장치에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명에 따른 면역 분석 장치는 시료 주입구 및 센싱영역이 형성된 미세 유체 채널을 포함하는 마이크로칩, 자기장 인가부, 광원부 및 산란광 검출부를 포함함으로써, 적은 양의 시료를 사용하면서도 신속하고 정확하게 항원 농도를 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 값비싼 장비 없이 단순한 구조를 가지므로, 정확도 및 경제성이 모두 향상되는 장점을 가지고 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 면역 분석 장치의 구조는 도 1을 통해 자세히 설명한다. 도시되는 바와 같이, 상기 면역 분석 장치는 항원 및 항체의 특이적 결합반응이 일어나는 센싱영역 (210), 상기 센싱영역 (210)의 일단에 연결되는 시료 주입구 (100), 상기 센싱영역 (210)의 타단에 연결되는 에어 벤트 (230), 및 상기 시료 주입구 (100), 센싱영역 (210) 및 에어 벤트 (230)를 연결하는 미세 유체 채널 (200)을 포함하는 마이크로칩 (300); 제1자기장 인가부 (410) 및 제2자기장 인가부 (420); 센싱영역을 통과하는 광을 조사하는 광원부 (500); 및 센싱영역에서 산란된 광을 검출하며, 상기 마이크로칩 (300)의 상부에 위치하는 산란광 검출부 (600)을 포함한다.
- [0048] 구체적으로, 상기 센싱영역 (210) 및 에어 벤트 (230)가 미세 유체 채널(200)을 통해 직렬적으로 위치하고, 상기 미세 유체 채널(200)은 시료의 주입을 위해 시료 주입구 (100)와 연결되어 있을 수 있다. 즉, 시료 주입구로 시료가 주입되면, 시료는 미세 유체 채널을 따라 흐르며, 미세 유체 채널을 통해 연결된 센싱영역에 최종적으로 도달할 수 있다.
- [0049] 상기 미세 유체 채널 (200)은 시료 주입구를 통해 주입된 액상의 시료가 흐를 수 있는 것이면 무방하며, 액상의 시료와 접하는 미세 유체 채널 (200)의 표면은 액상 시료의 빠른 유동을 위해 선택적으로 친수성 개질제로 표면 처리될 수도 있다.
- [0050] 더욱 구체적으로, 상기 미세 유체 채널의 폭은 3mm이하, 종계는 0.8 내지 1.5mm일 수 있으며, 높이는 1mm이하, 종계는 0.2 내지 0.6mm일 수 있으나, 이에 제한하지는 않는다. 또한 상기 참조영역 및 센싱영역의 폭은 장축 방향으로 4mm이하, 종계는 2 내지 3.5mm를 가질 수 있으며, 길이는 상기 폭과 동일할 수 있으며 높이는 5mm이하, 종계는 2 내지 4mm일 수 있으나 이에 제한하지는 않는다.
- [0051] 상기 미세 유체 채널 (200)은 상기 마이크로칩 상에 형성되며, 상기 마이크로칩은 유기소재 또는 무기소재인 기

재로부터 형성될 수 있다.

- [0052] 상기 시료 주입구 (100)는 마이크로칩 상에 위치하는 것으로 마이크로칩의 면의 상부 방향으로 개구부를 통해 구성될 수 있거나 마이크로칩의 측부 방향으로 개구부를 통해 구성될 수도 있다.
- [0053] 상기 기체로 사용되는 상기 유기소재 또는 무기소재는 광도파를 위한 별도의 채널을 형성하지 않고서도 광도파 성질을 가질 수 있으며, 입사되는 광이 기체를 통해 상기 센싱영역 (210)으로 광도파될 수 있다. 구체적으로 도 2를 통해 설명한다. 광원부 (500)을 통해 광이 공급되면, 센싱영역 (210) 내부에서 광도파가 일어나고, 항원-항체 결합반응에 의해 센싱영역의 하부에 존재하는 항체-자성 나노입자 복합체의 자성 나노입자 (700)에 의해 광 산란이 발생하며, 광산란되는 강도를 측정하여 항원과 결합된 항체-자성 나노입자 복합체의 농도를 측정하고, 이로부터 최종적으로 항원의 농도를 정량할 수 있다.
- [0054] 상기 광도파 성질을 가지는 기체를 사용함으로써, 광원부에서 조사되는 광이 손실 없이 상기 항체-자성 나노입자 복합체와 시료에 함유된 항원의 결합체에 의해 모두 산란되어 상기 산란광 검출부에 의해 검출될 수 있어, 훨씬 정확하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 소량의 항원을 함유하는 시료에 대해서도 민감하게 반응할 수 있어서 면역 분석 장치의 정확도 및 민감도를 모두 향상시킬 수 있다.
- [0055] 상기 광도파 성질을 가지는 기체는 공기의 굴절율보다 높은 굴절율을 가지는 재료로 이루어지는 것이 바람직하며, 공기의 굴절율보다 높은 굴절율을 가짐에 따라 광원부에서 기체로 조사되는 광이 상기 기체 외부로 소산되지 않고 굴절되어 센싱영역 (210)으로 안정적으로 광도파될 수 있다. 상기와 같은 특성을 가진 기체로서, 유기소재는 고분자 소재일 수 있으며, 무기소재로는 유리, 세라믹 또는 실리콘 등의 재질을 가지는 소재일 수 있다. 높은 굴절율을 가지는 고분자 소재의 일 예로는, 폴리디메틸실록산 (PDMS, polydimethyl siloxanes), 폴리카보네이트 (Polycarbonate), 폴리스타이렌 (Polystyrene), 폴리아미드(Polyimide), 폴리에스터(Polyester) 등의 소재에서 하나 이상을 선택되는 것일 수 있으나 이에 제한하지는 않는다.
- [0056] 상기 마이크로칩 (300)은 도 3와 같이, 상층 (Upper layer) 및 하층 (Bottom layer)으로 이루어질 수 있다. 구체적으로, 상기 마이크로칩의 상층에서, 센싱영역의 상부면에 항체-자성 나노입자 복합체를 증착할 수 있다. 상기 항체-자성 나노입자 복합체는 상기 센싱영역의 상부면에 공지의 방법으로 증착될 수 있으며, 구체적인 일 예로 디스펜서로 상기 상부면에 용액 캐스팅하여 증착될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 마이크로칩의 하층에서, 센싱영역의 하부면에는 항원과 특이적으로 결합하는 1차 항체 (Primary antibody)를 고정화될 수 있다. 상기 1차 항체는 공지의 방법으로 하부면에 고정화될 수 있으며, 구체적인 일 예로 실란화 반응 (Silanization), 공유 결합 또는 물리적인 흡착에 의해 센싱영역의 하부 면에 고정될 수 있으나 이에 제한하지는 않는다. 다음, 항체-자성 나노입자 복합체가 증착된 마이크로칩의 상층과 1차 항체가 고정화된 마이크로칩의 하층을 서로 결합하여 마이크로칩 (300)이 제조될 수 있다.
- [0057] 보다 구체적으로, 상기 상층과 하층이 결합하여 제조된 상기 마이크로칩 (300)은 상하부가 밀폐된 센싱영역 (210)을 형성하며, 상기 센싱영역 (210)은 자성 나노입자의 표면에 항체가 고정된 항체-자성 나노입자 복합체를 포함한다. 시료 주입구를 통해 시료가 공급되면, 상기 시료는 미세 유체 채널을 따라 흘러 센싱영역에 도달하게 되는데 상기 증착된 항체-자성 나노입자 복합체가 시료에 용해되면서 시료에 포함되는 항원과 특이적 결합을 통해 결합체가 센싱영역에서 형성된다.
- [0058] 본 발명의 다른 일 예에 따른 면역 분석 장치에 의해, 상기 센싱영역 (210)의 하부면에는 서로 상이한 여러 종류의 1차 항체 (Primary antibody)가 고정화될 수 있다. 상기 서로 상이한 1차 항체는 복수개 포함할 수 있으며, 2개 이상일 수 있으나 이에 제한받지 않는다. 구체적인 예를 들어, 면역 분석 장치의 센싱영역 하부를 세 구역으로 나누어 각각 서로 다른 세 종류의 1차 항체가 각각 고정화할 수 있다. 이에 따라 측정하고자 하는 특정 항원을 포함하는 시료의 주입시 상기 센싱영역에 존재하는 특정 1차 항체와 결합하여 특정 항원의 유무 및 농도를 측정할 수 있으며, 또한 시료 내에 존재하는 다른 항원의 유무 및 농도의 측정도 동시에 가능하게 된다.
- [0059] 상기 "항체"는 특정 표적 항원에 특이적인 결합을 부여하기에 충분한 정규 면역글로불린 서열 요소를 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 자연에서 생산된 무손상 항체는 일반적으로 "Y-형" 구조로 불리는 서로 회합된 2개의 동일한 중쇄 폴리펩티드(각각 약 50 kD) 및 2개의 동일한 경쇄 폴리펩티드(각각 약 25 kD)로 구성된 약 150 kD의 사합체 작용제이다. 각 중쇄는 적어도 4개의 도메인을 포함하며, Y 구조의 끝에 위치하는 아미노-말단 가변 도메인에 이어 3개의 불변 도메인을 포함하는데, 상기 3개의 불변 도메인은 CH1, CH2, 및 카르복시-말단 CH3로 구성된다.
- [0060] 한편 항체 단편은 무손상 항체의 부분, 예를 들어, 항체의 항원-결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의

에는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 트리아보디; 테트라보디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 예를 들어, 항체 단편은 분리된 단편, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역으로 구성된 "Fv" 단편, 경쇄 및 중쇄 가변 영역이 펩티드 링커에 의해 연결된 재조합 단일쇄 폴리펩티드 분자("ScFv 단백질"), 및 과가변 영역을 모방하는 아미노산 잔기로 구성된 최소 인지 단위를 포함한다. 구체적으로, 항체 단편은 항체와 유사한 친화도로 항원에 결합하거나 항원과의 결합에 대해 항체와 경쟁할 수 있다. 항체의 단편에 결합하는 항원의 예는, 비제한적으로, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, scFv 단편, Fv 단편, dsFv 디아보디, dAb 단편, Fd' 단편, Fd 단편, 및 분리된 상보성 결정 영역(CDR) 영역을 포함할 수 있다. 항체의 항원 결합 단편은 임의의 수단으로 생산될 수 있다. 따라서 본 명세서에 달리 언급하지 않는다면 본 명세서에서 언급되는 항체는 부모 항체뿐만 아니라 항체 단편을 포함하는 개념으로 해석될 수 있다.

- [0061] 상기 항체-자성 나노입자의 자성 나노입자는 Fe₃O₄, Fe₂O₃, 페라이트, 철, 망간, 니켈, 코발트, 크롬, 코발트, 니켈 및 이의 합금으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있으나 이에 제한하지는 않는다. 또한 상기 자성 나노입자는 평균입경 0.1 내지 1 μ m, 종개는 0.1 내지 0.8 μ m, 더욱 종개는 0.1 내지 0.5 μ m를 가질 수 있다. 상기 수치범위에서 항원이 결합되지 아니한 항체-자성 나노입자와의 분리가 외부 자기장의 인가에 의해 용이하게 구현될 수 있다.
- [0062] 상기 자성 나노입자의 평균 크기는 동적 광산란(DLS)에 의해 측정된 것을 의미한다.
- [0063] 상기 자성 나노입자는 후술하는 바와 같이 다관능성 링커와의 화학결합을 위해 표면에 관능기를 포함할 수 있다. 구체적인 일 예로 1차 아민기 또는 카르복실산기가 상기 자성 나노입자의 표면에 수식된 것일 수 있다.
- [0064] 상기 항체-자성 나노입자는 자성 나노입자의 표면과 항체가 공유적으로 또는 비공유적으로 결합될 수 있으며, 바람직하게는 자성 나노입자의 표면과 항체가 다관능성 링커의 도입에 의해 공유적으로 결합되어 제조될 수 있다. 구체적으로, 자성 나노입자의 표면과 화학결합을 형성할 수 있는 제1관능기 및 항체의 특정 치환기와 화학결합할 수 있는 제2관능기를 모두 포함하는 다관능성 링커가 선택될 수 있다. 상기 다관능성 링커의 관능기는 2개 이상 및 4개 이하일 수 있으며, 구체적인 종류로는 카르보디이미드계 화합물 일 수 있으나 이에 제한받지 않는다.
- [0065] 상기 카르보디이미드계 화합물의 비한정적이며 구체적인 예로, 3-(3-다이메틸아미노프로필)-1-에틸 카르보디이미드(3-(3-dimethylaminopropyl)-1-ethyl carbodiimide; EDC)나 그 염산염, 1-[3-(디메틸아미노)프로필]-3-에틸 카르보디이미드 메트아이오다이드(1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethyl carbodiimide methiodide), N-시클로헥실-3-(2-몰피노에틸)카르보디이미드 메토 -p-톨루엔설포네이트(N-cyclohexyl-3-(2-morphinoethyl)carbodiimidemetho-p-toluenesulfonate), 1-에틸 -3-(3-다이메틸아미노프로필) 카르보디이미드 메트아이오다이드 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide methiodide; ETC) 및 디이소프로필카르보디이미드(diisopropylcarbodiimide; DIC))로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0066] 상기 항체-자성 나노입자의 항체는 항원과 특이적으로 결합하는 항체이며, 상기 채널 영역의 하부 면에 결합되어 있는 1차 항체 (Primary antibody)와 동일한 것이 바람직할 수 있다.
- [0067] 상기 광원부 (500)는 빛의 공급원을 말한다. 상기 광원부는 발광 다이오드, 램프 등과 같은 파장 범위를 가지는 빛을 발생하는 공급원을 포함할 수 있으나 이에 제한하지는 않는다. 상기 광원부는 상기 센싱영역을 통과하는 광을 조사하는 부위로, 구체적으로 상기 마이크로칩의 일 측면에 위치할 수 있다.
- [0068] 상기 광원부에서 입사되는 광은 연속광이거나 특정 파장의 레이저일 수 있으며, 레이저의 구체적인 일 예로 632.8nm의 He-Ne 레이저, 488nm의 Ar 레이저, 또는 532nm의 DPSS(diode pumped solid state) 타입 레이저일 수 있으나, 이는 일 예일 뿐 이에 제한받지 않는다.
- [0069] 상기 산란광 검출부 (600)는 상기 광원부에 의해 조사된 광이, 상기 시료에 함유된 항원과 상기 복합체의 항체가 특이적 결합하여 생성된 결합체에 의해, 상기 미세 유체 채널 외부로 산란된 광을 검출하는 것으로, CCD 카메라 또는 일반 핸드폰 카메라로 구성될 수 있으나 이에 제한하지는 않는다.
- [0070] 일반적으로 입자가 분산되어 있는 분산계에서, 입자가 분산되어 유동하는 영역 내의 입자의 농도를 정량 또는 정성적으로 측정하기 위하여 사용되는 방법은 광감쇄(Light Extinction), 광산란(light scattering), 탁도(turbidity)를 측정하는 방법이 있을 수 있다. 그러나 상기 방법들 중 낮은 농도로 존재하는 입자의 농도를 측정하기 위해서는 광산란 방법이 가장 효과적이다. 상기 광산란은 입자가 분산되어 있는 용액 또는 분산액에서 광을 조사할 때 입자에 의한 발생하는 산란 현상을 의미하는 것으로, 광산란(light scattering)을 이용하여 입

자의 농도를 측정할 수 있다.

- [0071] 광산란 특성의 측정시 광산란되는 광의 강도를 측정하여 입자의 농도를 측정하게 되는데, 본 발명에 있어서는, 항원과 결합된 항체-자성 나노입자 복합체의 농도를 측정함으로써 시료 내에 존재하는 항원의 농도를 정량할 수 있다.
- [0072] 상기 산란광 검출부 (600)는 상기 마이크로칩 (300)의 상부에 위치할 수 있으며, 구체적으로 상기 마이크로칩 (300)의 면방향에 대해 90도의 방향으로 마이크로칩 (300)에 대해 이격하여 위치하는 것일 수 있다.
- [0073] 상기 자기장 인가부 (400)는 상기 마이크로칩의 하부에 위치하는 제1자기장 인가부 (410) 및 상부에 위치하는 제2자기장 인가부 (420)를 포함하며, 구체적으로 Helmholtz 코일을 포함하는 전자석 또는 영구자석으로 구성될 수 있으나, 이에 제한하지는 않는다. 상기 자기장 인가부를 제어하여 상기 센싱영역에 인가되는 자기장의 방향과 세기를 조절하는 제어부를 더 포함할 수 있다.
- [0074] 상기 제어부는 상기 마이크로칩 하부에 위치하는 제1자기장 인가부를 제어하여 상기 결합체를 상기 1차 항체에 결합시키고, 상기 마이크로칩 상부에 위치하는 제2자기장 인가부를 제어하여 결합체를 형성하지 못한 항체-자성 나노입자 복합체를 상기 하부 면으로부터 제거할 수 있다. 더욱 구체적으로 제1자기장 인가부의 자기장 세기를 강하게 조절함으로써, 시료 내의 항원과 항체-자성 나노입자 복합체의 결합속도 및 상기 결합체가 센싱영역 하부의 1차 항체와 결합하는 속도를 증가시킬 수 있어, 검출시간을 단축시킬 수 있다. 또한, 제2자기장 인가부에 자기장을 인가함으로써, 상기 결합체를 형성하지 못한 항체-자성 나노입자 복합체를 센싱영역의 하부 면으로부터 제거할 수 있다. 이에 따라 센싱영역 하부 면에는 항체-자성 나노입자 복합체와 항원의 결합체가 1차 항체와 결합된 상태인 최종 반응 결과물만 존재하게 되므로, 노이즈를 줄일 수 있을 뿐만 아니라, 보다 정확하게 시료 내의 항원 농도를 검출할 수 있다.
- [0075] 상기 제1자기장 인가부의 전자기력은 2 내지 1000 lbs, surface field는 3000 내지 10000 가우스, 인가시간은 1 내지 4분일 수 있다. 상기 제2자기장 인가부의 전자기력은 1 내지 800 lbs, surface field는 1000 내지 8000 가우스, 인가시간은 1 내지 4분일 수 있다. 바람직하게 제1자기장의 전자기력은 제2자기장의 전자기력보다 높은 것일 수 있다.
- [0076] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 마이크로칩은 센싱영역과 이격되어, 분석장치의 정상 작동여부를 판단할 수 있는 참조영역 (Reference zone)을 더 포함할 수 있다. 구체적으로, 도 4에서 도시되는 바와 같이, 상기 면역 분석 장치는 항원 및 항체의 특이적 결합반응이 일어나는 센싱영역 (210), 상기 센싱영역 (210)의 일단에 연결되는 참조영역 (220) 및 시료 주입구 (100), 상기 센싱영역 (210)의 타단에 연결되는 에어 벤트 (230), 및 상기 시료 주입구 (100), 참조영역 (220), 센싱영역 (210) 및 에어 벤트 (230)를 연결하는 미세 유체 채널 (200)을 포함하는 마이크로칩 (300); 제1자기장 인가부 (410) 및 제2자기장 인가부 (420); 센싱영역을 통과하는 광을 조사하는 광원부 (500); 및 센싱영역에서 산란된 광을 검출하며, 상기 마이크로칩 (300)의 상부에 위치하는 산란광 검출부 (600)을 포함할 수 있다.
- [0077] 구체적으로, 상기 참조영역은 마이크로칩의 면 방향에 위치하되, 센싱영역과 이격되어 위치하는 영역으로서 센싱영역과 동일하게 상부면에는 항체-자성 나노입자 복합체가 증착되어 있고, 하부 면에는 항원과 상기 복합체의 결합체와 특이적으로 결합할 수 있는 1차 항체가 고정되어 있을 수 있다. 상기 참조영역에는 이미 알고 있는 항원 농도를 포함하는 시료를 주입함으로써, 이에 따른 산란광을 검출하여 분석 장치의 정상 작동여부를 판단할 수 있다.
- [0078] 본 발명은 또한 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 분석 장치를 이용하는 면역 분석 방법을 제공하며,
- [0079] 1) 마이크로칩의 시료 주입구에 시료를 주입하는 단계;
- [0080] 2) 자기장을 인가하는 단계;
- [0081] 3) 광을 조사하는 단계;
- [0082] 4) 상기 조사된 광의 산란광을 검출하는 단계; 및
- [0083] 5) 상기 산란광 검출 신호를 분석하는 단계;
- [0084] 를 포함한다.
- [0085] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 면역 분석 방법의 자기장을 인가하는 단계는 2-1) 제1자기장 인가부 제어를

통해 상기 결합체를 상기 1차 항체에 결합시키는 단계 및 2-2) 제2자기장 인가부 제어를 통해 결합체를 형성하지 못한 항체-자성 나노입자 복합체를 상기 마이크로칩의 하부 면으로부터 제거하는 단계를 포함할 수 있다.

[0086] 구체적으로, 마이크로칩의 일단에 위치하는 시료 주입구에 시료를 주입하면 상기 시료는 미세 유체 채널을 통과하여 센싱영역에 도달하게 된다. 상기 센싱영역의 상부면에는 항체-자성 나노입자 복합체가 증착되어 있으므로, 상기 시료 용액이 센싱영역에 도달하게 되면, 상기 복합체가 시료 용액에 용해되면서 시료 내의 항원과 상기 복합체의 결합반응이 일어나게 된다. 이때 제1자기장을 인가하여 상기 결합체의 형성 및 상기 결합체와 센싱영역 하부 면의 1차항체의 결합반응 속도를 증가시킬 수 있다. 다음, 제1자기장 인가를 멈추고 제2자기장을 인가하여 상기 결합체를 형성하지 못한 복합체를 센싱영역을 포함하는 마이크로칩의 하부 면으로부터 제거할 수 있다. 이에 따라 센싱영역 하부 면에는 항체-자성 나노입자 복합체와 항원의 결합체가 1차 항체와 결합된 상태인 최종 반응 결과물만 존재하게 되므로, 노이즈를 줄일 수 있을 뿐만 아니라, 훨씬 정확하게 시료 내의 항원 농도를 검출할 수 있다.

[0087] 다음, 상기 최종 반응 결과물이 존재하는 센싱영역을 통과하는 광을 조사하여 조사된 광이 상기 시료에 함유된 항원과 상기 복합체의 항체가 특이적으로 결합하여 생성된 결합체에 의해, 상기 미세 유체 채널 외부로 산란된 광을 검출한 후 상기 검출된 산란광 신호를 분석하여 시료 내의 항원 농도를 검출할 수 있다. 구체적으로, 상기 산란광 검출부에 의해 검출된 이미지는 Matlab/Image 프로그램을 통해 흰색 또는 검정색을 나타내는 이미지를 세기 (Intensity)로 변환할 수 있다. 즉 알려진 항원 농도의 표준 시료로부터 산란광의 세기를 측정하고, 상기 항원 농도와 측정된 산란광 세기를 플로팅 (Plotting)하여 표준곡선 (Standard curve)을 얻을 수 있다. 다음, 상기 표준곡선을 통해 농도와 산란광 사이의 관계식을 얻은 후, 상기 관계식을 통하여 미지 시료로부터 측정된 산란광 세기로부터 상기 시료 중의 항원농도를 구할 수 있다. 상기 표준곡선은 정확도를 향상시키기 위하여, 센싱 영역의 서로 다른 최소 3개의 위치에서 각각 산란광을 측정하고 각각의 산란광으로부터 각각의 항원농도를 환산하여 평균값을 구하여 사용할 수 있다.

[0088] 본 발명의 일 실시예에 따른 면역 분석 방법에 의해, 한 번의 측정으로 상이한 여러 종류의 항원을 동시에 검출할 수 있다. 예를 들어, 면역 분석 장치의 센싱영역 하부를 세 구역으로 나누어 각각 서로 다른 세 종류의 1차 항체를 각각 고정화할 수 있다. 이에 따라 특정 항원을 포함하는 시료의 주입시 상기 센싱영역에 존재하는 특정 1차 항체와 결합하여 특정 항원의 유무 및 농도를 측정할 수 있으며, 또한 동시에 다른 항원의 유무 및 농도의 측정도 가능하게 된다.

[0089] 검출 결과는 도 5와 같이 나타날 수 있으며, 각 구역의 항체-자성 나노입자 복합체, 항원 및 1차 항체의 결합체에 의한 빛의 세기로부터 각 항원의 유무 및 농도를 검출할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 면역 분석 방법은 같은 시료 내의 상이한 여러 종류의 항원을 동시에 검출할 수 있는 장점을 가질 수 있다.

[0090] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명하나, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

[0091] 평균입경이 0.2 μ m인 자성입자 철의 표면에 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride)/NHS(N-hydroxysuccinimide) 반응을 통하여 항체가 고정화된 항체-자성 나노입자 복합체를 제조하였다.

[0092] 구체적으로, 항체로는 심근경색 마커 Troponin I에 특이적인 Troponin I antibody 2b를 사용하였으며, 1mg/mL 농도의 Troponin I antibody 2b를 20 μ L를 준비하였다.

[0093] 상기 철 자성입자는 표면에 카르복실산기로 치환된 나노입자를 사용하였으며, PBS 버퍼 내에서 14 mg/mL의 농도가 되도록 준비하였다. 상기 철 자성입자 분산액에 EDC 20 mM, NHS 40 mM이 되도록 투입하고 상온에서 교반한 후, 상기 Troponin I antibody 2b 항체 수용액을 투입한 후 상온에서 6시간 더 교반하였다. 제조된 항체-자성 나노입자 복합체는 PBS 버퍼로 세 번 세척하고 원심분리하여 제조하였다.

[0094] 상기 제조된 항체-자성 나노입자 복합체를 센싱영역에 해당하는 채널의 상부에 디스펜서로 캐스팅하여 상기 항체-자성 나노입자 복합체가 상부에 결합되도록 하였다.

[0095] 한편 하부에는 EDC/NHS(N-hydroxysuccinimide)를 이용하여 상기과 동일한 반응을 통하여 상기과 동일한 항체를 고정화하여, 하부 기판에 고정화된 항체(1차 항체)를 제조하였다. 상기 센싱영역과 연결된 시료 주입구에 항원 농도 50000ng/mL 시료를 1.6 μ L 주입한 후, 제1자기장 인가부를 통해 복합체와 1차 항체를 결합시킨 다음 제1자

기장 인가부를 끄고 제2자기장 인가부를 통해 자력을 인가하였다. 다음 LED광을 조사하여 산란광의 세기를 측정하였다.

[0096] 상기와 동일한 방법으로 농도 5000ng/ml, 500ng/ml, 50ng/ml, 5ng/ml 및 항원을 포함하지 않는 시료 (Negative control; NC)를 각각 측정한 후, 검출된 산란광의 세기와 상기 시료 중의 항원 농도 값을 플로팅 (Plotting)하였으며 그 결과를 도 6에 표시하였다.

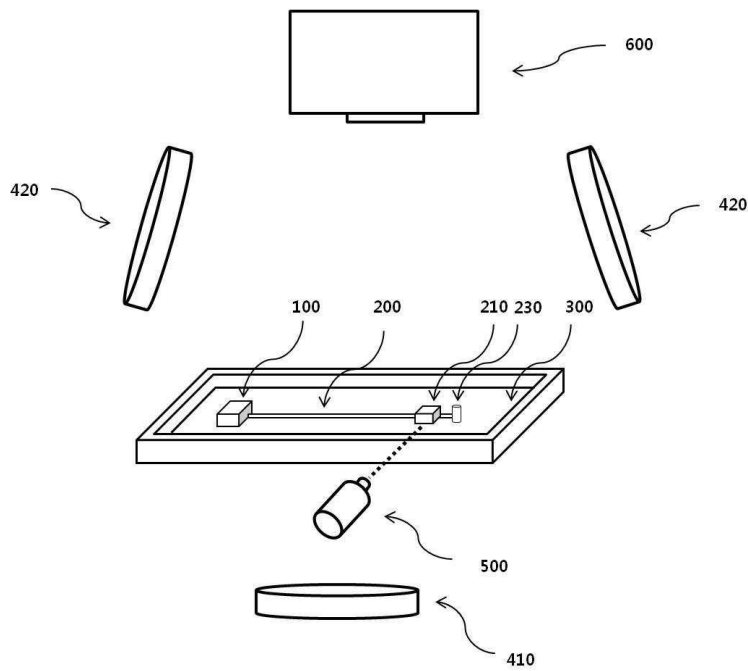
[0097] 도 6에서 볼 수 있듯이, 본 발명에 따른 면역 분석 장치 이용 시 항원 농도와 산란광의 세기는 일정한 관계를 나타내는 것을 알 수 있으며, 특히 저농도의 항원 포함시에도 높은 정확도로 측정가능하다는 것을 알 수 있다.

부호의 설명

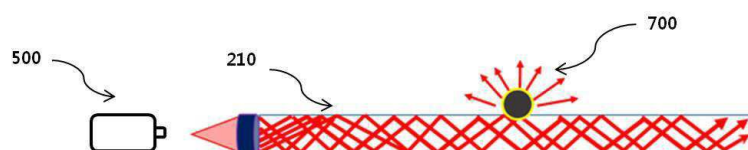
[0098] 100: 시료 주입구, 200: 미세 유체 채널
210: 센싱영역, 220: 참조영역
230: 에어 벤트; 300: 마이크로칩
410 제1자기장 인가부; 420: 제2자기장 인가부
500: 광원부; 600: 산란광 검출부
700: 자성 나노입자

도면

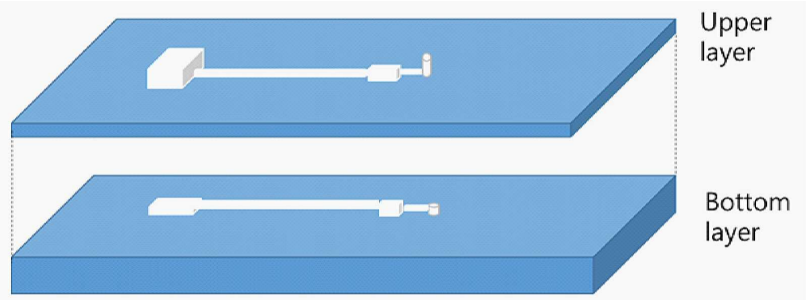
도면1



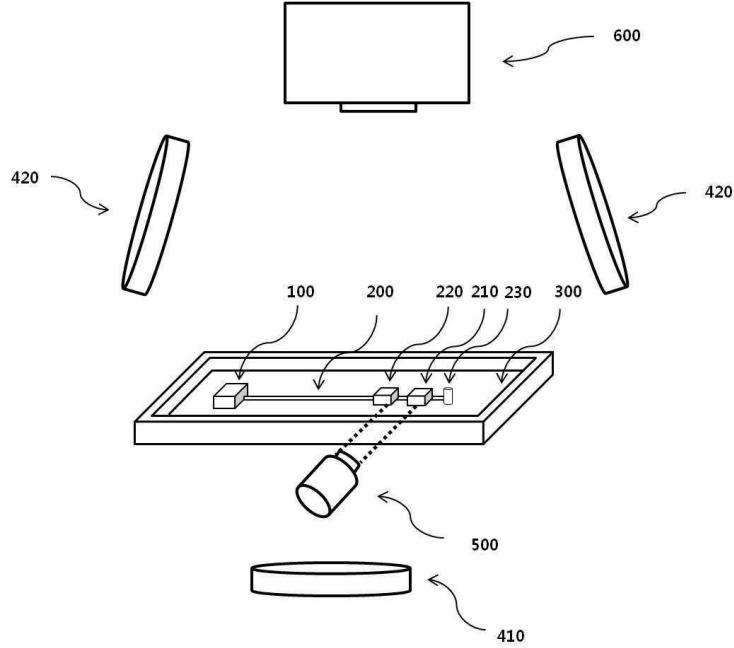
도면2



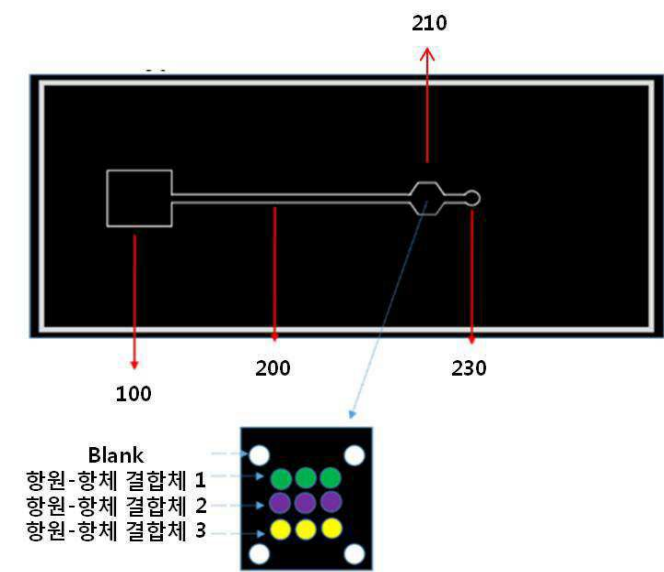
도면3



도면4



도면5



도면6

