



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월07일
(11) 등록번호 10-2347438
(24) 등록일자 2021년12월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)
B81C 3/00 (2006.01) G01N 27/327 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54386 (2021.08)
B01L 3/502761 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0019465
(22) 출원일자 2020년02월18일
심사청구일자 2020년02월18일
(65) 공개번호 10-2021-0105025
(43) 공개일자 2021년08월26일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170112305 A*
KR1020180065748 A*
Biosensors and Bioelectronics, vol.117,
pp.457-463 (2018.06.23.) 1부.*
KR1020130008395 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
정효일
서울특별시 서초구 잠원로14길 23 롯데캐슬아파트
201동 401호
김준무
서울특별시 구로구 새말로 93 신도림태영타운
104-1601
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 13 항

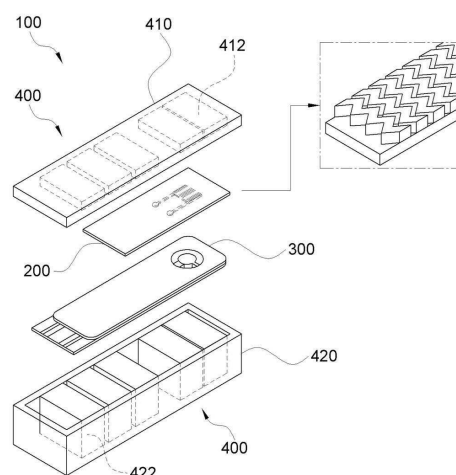
심사관 : 양경식

(54) 발명의 명칭 미세유체 채널이 결합된 전기화학적 바이오센서

(57) 요약

본 발명은 미세유체 채널을 결합한 전기화학적 바이오센서에 관한 것으로, 보다 상세하게는 표면 개질한 전극을 사용함으로써, 센서의 감도를 높이고, 미세유체 채널부 및 전극부의 결합 방식이 비영구적인 것을 특징으로 하여, 압타머 또는 감지항체와 특이적으로 결합하는 표적 물질을 검출 후, 회수할 수 있도록 하여 후단 분석에의 활용이 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B81C 3/001 (2013.01)
G01N 27/3276 (2013.01)
G01N 27/3278 (2013.01)
B01L 2300/0645 (2013.01)
B01L 2300/12 (2013.01)
B81C 2203/038 (2013.01)

케세피케이라바디아일라

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교 A376

(72) 발명자

현경아

경기도 부천시 지봉로143번길 38, 201-1009

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711092979
과제번호	2015M3A9D7067364
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	[Ezbaro] (총괄/1세부)환경호르몬 측정용 바이오센서의 제작 및 모바일 측정기기의

개발 (2/2단계)(2/3)

기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.04.01 ~ 2020.01.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711083025
과제번호	2018R1A2A2A15019814
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	(후속)엑소좀 분석을 위한 바이오칩 및 자동화 시스템(2/3)(2018.3.1~2021.2.28)
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711108540
과제번호	2018R1C1B6002499
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구자지원사업
연구과제명	[통합이지바로] 미세유체 칩 기반 연속적 액적형성 기술을 이용한 단일 순환회소세

포의 분리 및 분석 시스템 개발(3/3)

기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

표적 물질과 결합할 수 있는 압타머 또는 감지항체가 고정화되고, 그래핀 나노플레이트렛 복합체로 표면 개질된 작업 전극을 포함하는 전극부;

미세유체 채널부; 및

상기 전극부 및 미세유체 채널부를 결합시키는 접합부;를 포함하고,

상기 접합부는 상부 커버 및 하부 커버를 포함하되, 상기 상부 커버 및 하부 커버에서 선택되는 어느 하나 이상은 자석을 포함하여 상부 커버 및 하부 커버가 자력을 이용하여 전극부 및 미세유체 채널부를 비영구적으로 결합하여 미세유체 채널부의 유압을 조절하는 것을 특징으로 하는, 전기화학적 바이오센서.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 그래핀 나노플레이트렛 복합체는 그래핀 나노플레이트렛, 및 전이금속 칼코겐 화합물, 티올계 고분자 및 아민계 고분자 중에서 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것인, 전기화학적 바이오센서.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 전극부의 작업 전극의 상단에 금 나노입자가 도포된 것인, 전기화학적 바이오센서.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 미세유체 채널부는 입자 주입부, 입자 이동부, 반응부 및 입자 배출부를 포함하는 전기화학적 바이오센서.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 반응부는 입자 주입부를 통해 들어온 유체가 와류를 형성할 수 있도록 소정 간격으로 이격된 천장부 및 상기 천장부와 연결된 측벽이 형성된 것을 특징으로 하는 전기화학적 바이오센서.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 접합부의 상기 상부 커버 및 하부 커버에서 선택되는 어느 하나 이상은 미세유체 채널부 및 전극부를 내부에 수용하는 수용부를 더 포함하는 것인 전기화학적 바이오센서.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 표적 물질은 엑소좀인, 전기화학적 바이오센서.

청구항 9

제 1항 내지 제 5항, 제 7항 및 제 8항 중 어느 한 항에 따른 바이오센서를 포함하는 엑소좀 검출용 키트.

청구항 10

액상의 분석용 샘플을 제공하는 단계;

상기 분석용 샘플을 제 1항 내지 제 5항, 제 7항 및 제 8항 중 어느 한 항에 따른 전기화학적 바이오센서의 미세유체 채널의 입자 주입부에 주입하는 단계;

상기 미세유체 채널의 반응부에 형성된 와류를 통해 분석용 샘플의 표적 물질이 농축되는 단계;

상기 표적 물질이 상기 반응부에 대향하는 작업 전극에 고정된 압타머 또는 검지항체와 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 단계; 및

상기 복합체에 의하여 생성된 전기화학적 신호를 측정하여 상기 분석용 샘플 내 표적 물질을 분석하는 단계;를 포함하고,

상기 작업 전극은 그래핀 나노플레이트렛, 및 전이금속 칼코겐 화합물, 티올계 고분자 및 아민계 고분자 중에서 선택되는 어느 하나 또는 둘을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 표적 물질 분석 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 분석하는 단계 이후, 상기 표적 물질을 회수하는 단계;를 더 포함하는 표적 물질 분석 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 회수된 표적 물질을 PCR, 시퀀싱, 질량분석(MS), 유전자 분석 및 단백질 분석으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 후단 분석에 이용하는 단계;를 더 포함하는 표적 물질 분석 방법.

청구항 13

제 10항에 있어서,

상기 표적 물질은 엑소좀인 것을 특징으로 하는 표적 물질 분석 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 엑소좀의 농도는 1×10^2 내지 1×10^9 exosome/mL인 표적 물질 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세유체 채널이 결합된 전기화학적 바이오센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 엑소좀은 세포에서 분비되는 30~100 nm 크기의 작은 소포체로서 세포에서 유래된 다양한 종류의 단백질, 유전물질을 포함하고 있고, 이로부터 조직의 상태를 파악할 수 있다. 특히 정상 상태에서는 분비가 잘 되지 않고, 암 등의 질병 상황에서 분비가 증가하게 되는데 암환자의 혈액에서 검출되는 엑소좀은 암의 진행, 전이, 약제 반응의 지표가 되는 약 4500여 종의 단백질, 지방질, 유전 정보를 담고 있어 이러한 질병 진단의 바이오마커로 주목받고 있다. 최근에는 엑소좀에 치료용 단백질을 삽입하여 세포 내로 약물을 전달하는 약물 전달체로서의 기능도 관심을 받고 있어 엑소좀의 검출 및 분석에 대한 요구가 증가하고 있다.

[0003] 엑소좀의 검출을 위해 형광물질 등의 형광측정을 통한 광학적(optical) 방식이나, 표적 물질과의 결합 전후에

나타나는 질량의 차이를 분석하여 측정하는 질량 분석(mass-sensitive) 방식의 센서 및 마이크로 바이오칩을 이용한 방식의 센서가 이용되고 있다. 광학적 방식의 센서는 형광염료를 압타머 분자에 연결하여 서로 다른 파장을 갖는 두 개의 형광염료의 소광(Quenching) 및 FRET 효과를 이용하는 것으로서, 이를 이용하기 위해서는 특정 장비가 필요하므로, 랩온어칩(Lap on a chip)을 구현하기 위한 센서의 소형화와는 거리가 멀다.

[0004] 또한, 기존의 마이크로 바이오칩은 반응 여부를 전기적 신호로 검출하기 위한 유리칩과 시료가 주입되도록 하는 PDMS(Polydimethylsiloxane)칩의 일체화를 위하여 산소 플라즈마로 일정 시간 및 일정 전력으로 처리한 후 접합시키는 공정을 거치고 있는데, 산소 플라즈마에 의한 접합 공정을 통해 센서와 채널은 영구적 결합을 하게 된다. 이는 엑소좀 검출 후 수확이 어려워, 엑소좀을 분리하고 lysis 후 단백질, 유전물질 등을 분리하여 PCR로 검증하는 등 후속 분석이 어려운 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제2018-0135183호(2018.12.20.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하고자 고안된 것으로서, 광학적 장비가 필요 없으며, 표적 물질의 감도 높은 검출을 위하여 표면 개질된 전극을 포함하여 센서의 감도를 높여 넓은 농도범위에서 표적 물질을 검출하여 정량 측정하는 전기화학적 바이오센서를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한 본 발명은 전극과 미세유체 채널의 비영구적 결합 방식을 통한 표적 물질의 후단 분석이 용이한 전기화학적 바이오센서를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한 본 발명은 전극과 미세유체 채널의 비영구적 결합 방식을 통하여 상기 결합의 세기를 조절함으로써 과도한 압력으로부터 유체가 누출되는 종래 문제를 해결하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 표적 물질과 결합할 수 있는 압타머 또는 감지항체가 고정화되고, 그래핀 나노플레이트렛 복합체로 표면 개질된 작업 전극을 포함하는 전극부; 미세유체 채널부; 및 상기 전극부 및 미세유체 채널부를 결합시키는 접합부;를 포함하고, 상기 결합은 비영구적 결합 방식인 것을 특징으로 하는 전기화학적 바이오센서를 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 구현예에 따른 전기화학적 바이오센서에 있어서, 상기 그래핀 나노플레이트렛 복합체는 그래핀 나노플레이트렛; 전이금속 칼코겐 화합물; 및 티올계 고분자 및 아민계 고분자 중에서 어느 하나 또는 둘 이상;을 포함하는 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 전극부의 작업 전극의 상단에 금 나노입자가 도포된 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 미세유체 채널부는 입자 주입부, 입자 이동부, 반응부 및 입자 배출부를 포함하는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 반응부는 입자 주입부를 통해 들어온 유체가 와류를 형성할 수 있도록 소정 간격으로 이격된 천장부 및 상기 천장부와 연결된 측벽이 형성된 것을 특징으로 할 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 접합부의 비영구적 결합 방식은 자력을 이용하여 미세유체 채널부 및 전극부를 결합하는 것일 수 있다. 또한, 상기 접합부는 상부 커버 및 하부 커버를 포함하되, 상기 상부 커버 및 하부 커버에서 선택되는 어느 하나 이상은 미세유체 채널부 및 전극부를 내부에 수용하는 수용부를 더 포함하고, 상기 상부 커버 및 하부 커버에서 선택되는 어느 하나 이상은 자석을 포함하여 상부 커버 및 하부 커버가 자력을 이용하여 결합되는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 표적 물질은 엑소좀일 수 있다.

- [0016] 또한, 본 발명은 상기 기술된 특징을 가지는 전기화학적 바이오센서를 포함하는 엑소좀 검출용 키트를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 액상의 분석용 샘플을 제공하는 단계; 상기 분석용 샘플을 표적 물질 검출용 센서의 미세유체 채널의 입자 주입부에 주입하는 단계; 상기 미세유체 채널의 반응부에 형성된 와류를 통해 분석용 샘플의 표적 물질이 농축되는 단계; 상기 표적 물질이 상기 반응부에 대향하는 작업 전극에 고정된 압타머 또는 검지항체와 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 단계; 상기 복합체에 의하여 생성된 전기화학적 신호를 측정하여 상기 분석용 샘플 내 표적 물질을 분석하는 단계;를 포함하고, 상기 작업 전극은 그래핀 나노플레이트렛, 및 전이금속 칼코겐 화합물, 티올계 고분자 및 아민계 고분자 중에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 표적 물질 분석 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 따른 표적 물질 분석 방법에 있어서, 상기 분석하는 단계 이후, 상기 표적 물질을 회수하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에 따른 표적 물질 분석 방법에 있어서, 상기 회수된 표적 물질을 PCR, 시퀀싱, 질량분석(MS), 유전자 분석 및 단백질 분석으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 후단 분석에 이용하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예에 따른 표적 물질 분석 방법에 있어서, 상기 표적 물질은 엑소좀인 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, 상기 엑소좀의 농도는 1×10^2 내지 1×10^9 exosome/mL일 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 표적 물질을 검출 및 분석하기 위한 전기화학적 바이오센서는 표면 개질되고 금 나노입자가 도포된 전극을 이용하여 센서의 감도를 높이고, 넓은 농도범위에서 표적 물질을 검출하여 정량 측정할 수 있다.
- [0022] 본 발명은 미세유체 채널 및 감도 높은 전극을 결합함으로써, 표적 물질이 시료 내 미량으로 포함된 경우라도, 표적 물질을 농축하여 정확도 높은 정량적 및 정성적 검출이 가능한 전기화학적 바이오센서를 제공한다.
- [0023] 또한, 미세유체채널 및 전극을 비영구적으로 결합함으로써, 표적 물질을 검출한 후에도 표적 물질을 회수하는 것이 가능하며, 이후 표적 물질에 대한 후단 분석에 활용될 수 있다.
- [0024] 뿐만 아니라, 비영구적 결합 방식에 따라 미세유체 채널 및 전극부의 결합 의 세기를 조절함으로써, 과도한 압력으로부터 유체의 누출 방지 효과를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서에 대한 분해 사시도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서의 전극부 및 미세유체 채널부가 결합된 상태를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서의 전극부 및 미세유체 채널부가 분해된 상태를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명에 따라 액상의 분석용 샘플이 주입되어 미세유체 채널부의 반응부 및 전극부의 작업 전극에서 일어나는 반응을 나타낸 모식도이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예에 따라 표면 개질된 전극이 제조되는 과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서를 통하여 엑소좀의 농도별 전기화학적 신호를 확인한 그래프로서, 엑소좀의 농도가 증가함에 따라 전류값이 선형적으로 증가하는 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명에 따른 표면 개질된 전극을 제조하는 과정에서, 표면 처리에 따른 각각의 전기화학적 신호를 나타낸 그래프로서, 표면 처리되지 않은 전극(SPCE; light blue), 그래핀 나노플레이트렛으로 표면 처리된 전극(GNP/SPCE; green), MoS₂로 표면 처리된 전극(MoS₂/SPCE; grey), 그래핀 나노플레이트렛 복합체(GNP/MoS₂/CHT)로 표면 처리된 전극(NC/SPCE; red) 및 그래핀 나노플레이트렛 복합체로 표면 처리 후 금 나노입자로 도포된 전극(GNS/NC/SPCE; blue)의 전류 및 저항의 차이를 CV(cyclic voltammetry) 및 EIS(Electrochemical Impedance Spectroscopy)를 통해 확인한 것이다. 전류는 전극과 전해질 간 전자의 전달 정도를 표현하고, 저항은 반대의 개념으로 전자의 전달을 얼마나 방해하는지를 나타낸다.

도 8은 그래핀 나노플레이트렛, MoS_2 및 그래핀 나노플레이트렛 복합체의 TEM(투과전자현미경) / HRTEM(high-resolution 투과전자현미경) 이미지를 나타낸 것이다.

도 9는 표면 개질이 진행됨에 따라 AFM(원자현미경)을 이용하여 표면 분석을 진행한 결과이다.

도 10은 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서(MiNEA) 및 ELISA를 이용한 엑소좀 검출능 평가 결과를 나타낸 검정곡선(Calibration Curve) 그래프이다.

도 11은 실제 환자의 혈액을 이용하여 본 발명에 따른 시스템 및 ELISA 방법에 의한 엑소좀 정량을 진행하여 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서에 대하여 구체적으로 설명한다. 본 명세서에서 사용되는 용어는 따로 정의하지 않는 경우 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 내용으로 해석되어야 할 것이다. 본 명세서의 도면 및 실시예는 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 쉽게 이해하고 실시하기 위한 것으로 도면 및 실시예에서 발명의 요지를 흐릴 수 있는 내용은 생략될 수 있으며, 본 발명이 도면 및 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 또한 달리 정의되지 않는 한, 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 본 발명이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자 중 하나에 의해 일반적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 가진다. 본원에서 설명에 사용되는 용어는 단지 특정 실시예를 효과적으로 기술하기 위함이고 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0028] 이하에서 어느 하나의 구성요소가 다른 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 당해 구성요소만으로 이루어지는 것으로 한정되어 해석되지 아니하며, 다른 구성요소들을 더 포함할 수 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0029] 본 발명은 표적 물질과 결합할 수 있는 압타머 또는 감지항체가 고정화되고, 그래핀 나노플레이트렛 복합체로 표면 개질된 작업 전극을 포함하는 전극부; 미세유체 채널부; 및 상기 전극부 및 미세유체 채널부를 결합시키는 집합부;를 포함하고, 상기 결합은 비영구적 결합 방식인 것을 특징으로 하는, 전기화학적 바이오센서를 제공한다.
- [0030] 표적 물질을 포함하는 액상의 시료 내에서 전극 전위를 측정하려면 기본적으로 두 개의 전극을 사용하여 두 전극 사이의 전위차를 측정하여야 한다. 전위차를 측정함에 있어서 측정하고자 하는 전극은 작업 전극(working electrode)이다. 여기에 다른 전극을 연결하여 전위차를 측정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 전극부는 작업 전극 외에 기준 전극(reference electrode) 및 상대 전극(counter electrode)으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 더 포함하여 2 전극 시스템 또는 3 전극 시스템으로 구성되는 것일 수 있다. 다만, 본 발명에 있어서, 전류를 측정하는 전극과 전압을 측정하는 전극이 분리된, 작업 전극, 기준 전극 및 상대 전극으로 구성되는 3 전극 시스템을 도입하는 것이 전해질의 저항이 높거나 전류가 센 경우 저항에 의한 오차를 최소화할 수 있어 바람직하다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 작업 전극은 전기화학적으로 관심 있는 반응이 일어나는 전극으로서, 산화반응 또는 환원반응에 따라 음극 또는 양극일 수 있다. 또한, 상기 기준 전극은 기준 전위를 제공하는 전극을 가리키며, 전위차는 기준 전극과 작업 전극 사이에서 나타나는 것을 의미할 수 있다. 상대 전극은 반응에 직접 참여하지 않고, 전위값에 영향을 미치지 않지만 전류가 흐르는 전극을 가리킨다.
- [0032] 전극은 금(Au), 팔라듐, 실리콘(Si), 탄소(C) 전극 등 센서에 사용할 수 있는 것이라면 제한없이 사용 가능하다. 전극을 형성하는 방법으로는 스퍼터링, 스크린프린팅, 잉크젯 인쇄 등 전기화학적 센서에 사용할 수 있는 것은 제한없이 사용 가능하다.
- [0033] 본 발명에 따른 작업 전극은 그래핀 나노플레이트렛 복합체로 표면 개질된 것으로서, 상기 그래핀 나노플레이트렛 복합체는 그래핀 나노플레이트렛, 및 전이금속 칼코겐 화합물, 티올계 고분자 및 아민계 고분자 중에서 어느 하나 또는 둘을 더 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에 따라, 그래핀 나노플레이트렛에 전이금속 칼코겐화합물, 티올계 고분자 및 아민계 고분자 중에서 어느 하나 또는 둘을 더 포함하여 복합체를 형성하는 경우 반데르발스 힘에 의한 그래핀 자체 응집현상을 줄임으로써 전극과의 접촉도를 높여 재료의 기계적 성질 및 전기적 성질이 향상될 수 있다.
- [0034] 전이금속 칼코겐화합물(TMDC: Transition Metal Dichalcogenides)은 전이금속 원소(M) 하나당 칼코겐 원소(X,

주기율표 16족) 두 개가 공유 결합으로 연결되어 MX_2 의 화학식을 가지는 것을 의미한다. 본 발명은 밴드갭이 없는 그래핀 나노플레이트렛에 밴드갭을 가지는 전이금속 칼코겐화합물을 결합한 복합체를 형성하여, 도핑 등을 통한 밴드갭 변화에도 전극의 전기적 특성이 우수하게 유지될 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 전이금속 칼코겐화합물(MX_2)에서 M은 Mo, W, Ti, Tc, Hf, Zr, Re, Pd 및 Pt로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상, X는 S, Se 및 Te 중에서 어느 하나 이상일 수 있다. 즉, 예를 들면, $MoSe_2$, WS_2 , WSe_2 , TiS_2 , $TiSe_2$, $TiTe_2$, HfS_2 , $HfSe_2$, $HfTe_2$, ZrS_2 , $ZrSe_2$, $ZrTe_2$, TcS_2 , $TcSe_2$, $TcTe_2$, ReS_2 , $ReSe_2$, $ReTe_2$, PdS_2 , $PdSe_2$, PtS_2 , $PtSe_2$ 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 어느 하나일 수 있다. 바람직하게는 MoS_2 를 사용하는 것은 높은 전자 전달율, 유연성, 기계적 강도 향상 및 상대적으로 낮은 독성과 넓은 표면적을 확보할 수 있다는 장점이 있어서 좋다.

[0036] 본 발명에 있어서, 그래핀 나노플레이트렛 복합체에 포함될 수 있는 아민계 고분자는 구체적으로 예를 들면, 키토산, 키틴, 폴리아닐린, 폴리라이신, 폴리알릴아민, 폴리에틸렌아민 및 폴리(2-디메틸아미노에틸 메타크릴레이트) (poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate))로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 물에 대해 용해도가 낮은 아민계 고분자가 좋고, 구체적으로 키토산을 사용하는 것이 물에 대해 용해도가 낮고 생체 적합한 특성을 갖고 있으며 그래핀 나노플레이트렛과 MoS_2 구조물이 결합하는데 접착제 역할을 할 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서, 그래핀 나노플레이트렛 복합체에 포함될 수 있는 티올계 고분자는 티올기를 결가지에 포함하는 고분자일 수 있으며, 구체적으로 시스템을 포함하는 폴리아미드계 고분자일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0039] 티올계 고분자 또는 아민계 고분자를 상기 그래핀 나노플레이트렛 복합체에 포함하는 경우 그래핀 나노플레이트렛 및 전이금속 칼코겐 화합물과의 복합체 형성시 바인더로 작용할 수 있으며, 그래핀 나노플레이트렛 복합체로 표면 개질된 작업 전극의 상단에 금 나노입자가 도포되는 경우 금 나노입자와 공유결합을 형성하여 복합체에 안정적으로 금 나노입자가 도포될 수 있다.

[0040] 본 발명의 그래핀 나노플레이트렛 복합체는 그래핀 나노플레이트렛 및 전이금속 칼코겐 화합물은 중량 기준으로 1 : 0.1~5의 함량비로 포함될 수 있다. 바람직하게는 1 : 0.5~3의 함량비로 포함되고, 보다 바람직하게는 1 : 1~2.5의 함량비로 포함되는 것이 센서 표면의 전하이동저항을 낮출 수 있어 좋다.

[0041] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 그래핀 나노플레이트렛 복합체로 표면 개질된 작업 전극은 아민계 고분자 용액을 제조하고, 그래핀 및 전이금속 칼코겐 화합물을 상기 용액에 혼합하여 균일 분산액을 제조한 후, 상기 분산액을 스핀 코팅 또는 액적 코팅(drop coating)을 통하여 제조되는 것일 수 있다.

[0042] 또한, 상기 작업 전극의 상단에는 금 나노입자가 도포될 수 있다. 작업 전극은 금 나노입자가 도포됨으로써, 표적 물질 검출을 위한 압타머 또는 감지항체를 보다 안정적으로 고정하며, 그래핀 나노플레이트렛 복합체로 표면 개질됨에 따라, 산화 환원 반응 결과로 생성된 전자의 전달 속도를 증가시켜 표적 물질의 감도 향상에 시너지 효과가 발휘된다.

[0043] 본 발명에 따르면, 금 나노입자의 도포는 일반적으로 화학기상증착법(CVD), 원자층 증착법(atomic layer deposition), 스퍼터링법(sputtering), 레이저어블레이션법(laser ablation), 전기화학적 용착, 전기방전법(arc-discharge), 플라즈마증착법, 열화학 기상증착법 및 전자빔 기상증착법으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 황산 용액 및 염화금 용액에서 일정 시간 일정 정전위 처리하여 전기화학적 용착을 통한 도포될 수 있다.

[0044] 본 발명의 바람직한 구현 예로서, 상기 전극부의 작업 전극은 그래핀 나노플레이트렛, MoS_2 및 키토산으로 표면 개질되는 것일 수 있다. 이때, 각각의 함량은 중량 기준으로 1 : 0.1 내지 5 : 0.01 내지 1로 포함될 수 있고, 바람직하게는 1 : 0.5 내지 3 : 0.05 내지 0.5로 포함되는 것이 좋다. 보다 바람직하게는 1 : 1 내지 2.5 : 0.08 내지 0.2로 포함되는 것이 높은 환원전류 피크를 나타냄으로써 전극의 민감도가 향상되어 전기화학적 신호로 표적물질을 정량적으로 분석함에 있어 우수한 정확도를 나타낼 수 있어 좋다.

[0045] 또한, 상기 작업 전극의 상단에는 금 나노입자가 도포된 것일 수 있다. 금 나노입자가 도포됨으로써, 표면 개질

된 작업 전극의 검출 한계가 더욱 더 낮아져 고감도의 전극 센서를 구현할 수 있어 좋다. 이때, 금 나노용액은 1×10^{-2} 내지 5×10^{-2} M인 것이 표면 커버리지를 높이는데 유리하다. 보다 좋게는 2×10^{-2} 내지 4×10^{-2} M인 것이 그래핀 나노플레이트렛 복합체와 상호작용이 저해됨이 없이 압타머 또는 감지항체의 고정화에 유리하게 작용할 수 있다. 또한, 그래핀 나노플레이트렛 복합체로 표면 개질된 전극의 경우 금 도포의 표면 커버리지를 현저히 상승시키는 효과를 나타낸다.

[0046] 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서를 구성하는 미세유체 채널부는 입자 주입부, 입자 이동부, 반응부 및 입자 배출부를 포함할 수 있다. 구체적으로, 표적 물질을 포함하는 액상의 분석용 샘플이 입자 주입부를 통해 주입되어, 입자 이동부를 거쳐 반응부로 들어와 작업 전극 내에서 반응이 일어난 후, 입자 배출부를 통하여 빠져나가도록 구성되어 있다.

[0047] 상기 반응부는 입자 주입부를 통해 들어온 유체가 와류를 형성할 수 있도록 소정 간격으로 이격된 천장부 및 상기 천장부와 연결된 측벽이 형성된 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 천장부 및 천장부와 연결된 측벽은 복수 개로서 열을 이룰 수 있고, 유체가 방향을 바꾸어 흐르면서 와류가 형성될 수 있도록 상기 열은 빗살 무늬를 이루는 것일 수 있으나, 와류가 형성될 수 있는 유로 형태이면 족하고, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에 따라 천장부 및 천장부와 연결된 측벽을 가지는 구조 특히, 빗살 무늬에서 꼭지점에 해당하는 부분이 대향하는 유체의 흐름을 양 옆으로 가르는 역할(deflection point)을 하고, 갈라진 유체의 흐름은 이동 중에 반응부 내에서 유체에 수직방향의 속도성분을 만들어 국부적인 미세 와류(micro vortex)를 발생시키고, 분석액 내 존재하는 표적 물질을 혼합함으로써 작업 전극 상에 고정화된 압타머 또는 감지항체와의 유효충돌수를 증가시킨다. 일종의 교반 작용에 의하여 표적 물질과 압타머 또는 감지항체와의 충돌 빈도가 증가하는 것은 유체 내 표적 물질 중 반응에 참여하는 비율이 높아짐에 따라 센서의 검출 민감도를 향상시키는 효과를 나타낼 수 있다.

[0049] 또한, 종래 드롭 캐스트 방식과 같이 유체 내에 부유하는 표적 물질이 전극 표면까지 가라앉아야 반응이 일어난다는 것과 비교하여 반응시간이 보다 단축되므로, 측정에 필요한 시간을 단축시키고 센서 표면에 나타나는 파울링 이슈(fouling issue)를 감소시킬 수 있어 센싱 신호의 질을 향상시키는 효과를 제공할 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 미세유체 채널부는 플라스틱, 실리콘 및 유리 중에서 어느 하나 이상으로 제작될 수 있다. 플라스틱의 구체 예로는 PDMS(polydimethylsiloxane), PMMA(polymethylmethacrylate) 및 폴리스티렌(polystyrene) 등이 예시될 수 있으나, 내구성이 좋고 가벼우면서 가공성이 좋아 성형이 용이한 PDMS로 제조되는 것이 바람직할 수 있다.

[0051] 본 발명에 따른 전극부 및 미세유체 채널부는 접합부에 의하여 결합될 수 있는데, 상기 접합부는 비영구적 결합 방식으로, 일정한 압력을 가하여 전극부 및 미세유체 채널부가 접합되어 고정하는 역할을 한다. 클램프를 이용한 고정방식 이거나 자력을 이용하는 것일 수 있다.

[0052] 보다 구체적으로 상기 접합부는 상부 커버 및 하부 커버를 포함하되, 상부 커버 및 하부 커버에서 선택되는 어느 하나 이상은 미세유체 채널부 및 전극부를 내부에 수용하는 수용부를 더 포함할 수 있다. 상기 수용부를 더 포함함으로써, 미세유체 채널부 및 전극부가 결합된 상태로 고정될 수 있어, 전극부의 작업 전극 및 미세유체 채널부의 반응부가 어긋나지 않고, 대향되어 결합되도록 함으로써, 압타머 또는 감지항체가 표적 물질과 반응이 용이하게 일어나도록 할 수 있다.

[0053] 또한, 상기 상부 커버 및 하부 커버에서 선택되는 어느 하나 이상은 자석을 포함하여 상부 커버 및 하부 커버가 자력을 이용하여 결합되도록 할 수 있다. 구체적으로 예를 들면, 자석이 하나 이상 구비된 상부 커버는 자석에 대하여 인력이 작용하는 재료를 포함하는 하부 커버와의 결합으로 미세유체 채널 및 전극부가 결합될 수 있다. 반대로 자석이 하나 이상 구비된 하부 커버 및 자석에 대하여 인력이 작용하는 재료를 포함하는 상부 커버와 결합하거나, 상부 커버 및 하부 커버 모두 자석을 하나 이상 구비하여 서로 인력이 작용함으로써 미세유체 채널 및 전극부가 결합될 수 있다. 상기 자력으로 인한 인력은 미세유체 채널 및 전극부에 일정한 결합력을 유지할 수 있고, 미세유체 채널로부터 유체가 유출됨을 방지할 수 있을 정도면 충분하다.

[0054] 상기 자력은 미세유체 채널 및 전극부가 밀봉되면서도 과도한 압력으로 인하여 유체가 누출되는 것을 방지하기 위하여 자석의 갯수로 조절될 수 있다.

[0055] 본 발명에 따른 자석을 하나 이상 포함하는 상부 커버 및/또는 하부 커버는 미세유체 채널부 및 전극부를 접합시키기 위하여 미세유체 채널부 및 전극부의 형태에 맞추어 3D 프린팅 방식에 의하여 제조되는 것일 수 있다.

- [0056] 본 발명에 따른 자력을 이용한 집합부의 결합 방식은 종래 산소 플라즈마를 이용한 영구적 결합 방식에 비하여 미세유체 채널에 가해지는 압력을 저하시킴으로써 유체의 샘 방지 효과가 우수하다. 또한, 본 발명에 따른 자력을 이용한 비영구적 결합 방식은 표적 물질의 검출 이후, 미세유체 채널부 및 전극부의 용이한 분리과정을 거쳐 표적 물질을 수확할 수 있어, 표적 물질을 폐기하지 않고 후단 분석에 이용할 수 있는 이점을 제공할 수 있다.
- [0057] 또한, 종래 영구적 결합 방식의 경우 미세유체 채널부의 유체 누출 문제를 고려할 때, 집합이 용이한 유리 기판을 사용해야만 하는 제한이 있었으나, 본 발명에 따른 비영구적 결합 방식은 미세유체 채널부의 재질에 구애받지 않고, 기판의 선택이 자유롭다.
- [0058] 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서의 표적 물질은 단백질, 탄수화물, 지질, 약학제제, 저분자 물질, 유기성 비약학제제 및 세포를 포함한 거대분자 복합체 등을 예로 들 수 있고, 압타머 또는 감지항체의 표적이 되는 물질이라면 제한 없이 이용할 수 있으나, 바람직하게는 엑소좀일 수 있다.
- [0059] 본 발명은 상기 기술한 특징을 가지는 바이오센서를 포함하는 엑소좀 검출용 키트를 제공할 수 있다.
- [0060] 또한, 본 발명은 상기 바이오센서를 활용하여 표적 물질을 분석하는 방법을 제공한다. 이하, 표적 물질을 분석하는 방법은 상술한 본 발명에 따른 바이오센서에 따른 것으로, 상술한 구성들의 특징을 포함하고, 중복된 설명은 생략한다.
- [0061] 구체적으로, 액상의 분석용 샘플을 제공하는 단계; 상기 분석용 샘플을 표적 물질 검출용 센서의 미세유체 채널의 입자 주입부에 주입하는 단계; 상기 미세유체 채널의 반응부에 형성된 와류를 통해 분석용 샘플의 표적 물질이 농축되는 단계; 상기 표적 물질이 상기 반응부에 대항하는 작업 전극에 고정된 압타머 또는 감지항체와 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 단계; 상기 복합체에 의하여 생성된 전기화학적 신호를 측정하여 상기 분석용 샘플 내 표적 물질을 분석하는 단계;를 포함하고, 상기 작업 전극은 그래핀 나노플레이트렛, 및 전이금속 칼코겐 화합물 및 아민계 고분자 중에서 선택되는 어느 하나 또는 둘을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0062] 상기 전기화학적 신호는 압타머 또는 감지항체에 결합된 표지분자를 활용하여 검출될 수 있다. 구체적으로 예를 들어 압타머에 엑소좀이 결합되고, 그 엑소좀에 2차 신호전달 물질이 결합된 압타머가 결합 되어 신호를 발생한다. 2차 신호전달 물질의 예로서 은 나노입자가 있을 수 있다. 은 나노입자는 전류를 전달할 수 있는 물질 중 하나로 표적 물질이 결합한 후 2차 신호전달 물질로서 주입되어, 전류가 발생할 경우 표적 물질이 성공적으로 결합한 것으로 확인할 수 있다. 뿐만 아니라 전기화학적 신호량의 변화를 통하여 표적 물질을 정량적으로 평가하는 것 또한 가능하다.
- [0063] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 분석하는 단계 이후, 표적 물질을 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다. 종래 검출용 센서는 표적 물질을 정성적 또는 정량적으로 검출하는 것에 제한될 수 밖에 없었으나, 본 발명은 전극부와 미세유체 채널부가 비영구적 결합 방식에 의하여 접합하고 있어, 표적 물질의 검출 이후, 전극부와 미세유체 채널부를 분리함으로써, 표적 물질을 회수하는 것이 가능하다.
- [0064] 따라서 본 발명은 상기 회수된 표적 물질을 후단 분석에 이용하는 단계를 더 포함한 표적 물질 분석 방법을 제공할 수 있다. 후단 분석이라 함은 증폭, 서열분석 등일 수 있으며, 구체적으로 예를 들면, PCR, 시퀀싱, 질량분석(MS), 유전자 발현분석, 단백질 분석으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0065] 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서의 표적 물질은 단백질, 탄수화물, 지질, 약학제제, 저분자 물질, 유기성 비약학제제 및 세포를 포함한 거대분자 복합체 등을 예로 들 수 있고, 압타머 또는 감지항체의 표적이 되는 물질이라면 제한 없이 이용할 수 있으나, 바람직하게는 엑소좀일 수 있다.
- [0066] 검출 가능한 엑소좀 농도는 1×10^2 내지 1×10^9 exosome/mL일 수 있다. 이는 넓은 농도범위에서 검출이 가능함을 의미할 수 있고, 반드시 이러한 수치에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 표적 물질과 결합하는 것은 압타머 또는 감지항체이며, 바람직하게는 압타머일 수 있다. 압타머는 화학적 항체라고도 불리는데, 단일 항체와 비교하여 쉽게 구조적 변형이 가능하며, 합성이 용이하고 안정하다. 또한 항체로 검출하기 어려운 small molecule의 측정에 이용될 수 있어 좋다. 압타머는 G-rich group에 의하여 표적 물질을 강하게 고정시키고, 이는 고온 또는 높은 염농도에 의해 구조가 풀리는 성질을 이용하여 표적 물질의 자유로운 결합과 분리가 용이한 이점이 있다.
- [0068] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 압타머는 EpCAM(Epithelial cell adhesion molecules) 압타머일 수 있다.

바람직하게는 엑소솜에 특이적인 친화성을 가지는 압타머일 수 있다.

- [0069] 전극부 특히, 작업 전극에 도포된 금 나노입자에 고정화될 수 있도록 압타머 또는 감지항체에는 소정의 작용기가 부착될 수 있다. 구체적으로 예를 들면, 아민기, 카르복실기, 히드록시기 및 티올기로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 작용기일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 액상의 분석용 시료는 혈액, 소변, 장액 및 타액로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다.
- [0071] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시를 위한 구체적인 내용을 설명한다. 첨부된 도면은 하기의 실시예 및 실험예를 통한 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서 및 이를 이용한 표적 물질 분석 방법에 대한 검증 결과를 나타낸 것이다. 다만, 하기의 실시예 및 실험예를 나타낸 도면은 본 발명을 상세히 설명하기 위한 하나의 참조일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니며, 여러 형태로 구현될 수 있다. 그리고 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지기능에 대하여 이 분야의 기술자에게 자명한 사항으로서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략한다.
- [0072] 도 1은 본 발명에 따른 미세유체 채널부(200), 전극부(300) 및 집합부(400)를 포함하는 전기화학적 바이오센서(100)의 분해 사시도이다. 집합부(400)는 상부 커버(410) 및 하부 커버(420)로 구성되어 있으며, 상부 커버(410) 및 하부 커버(420)는 하나 이상의 자석(412, 422)을 포함하고 있다. 도면에 표시되지 않았으나, 상부 커버 및 하부 커버 내 자석이 배치되지 않은 공간은 미세유체 채널부(200)의 입자 주입부 및 입자 배출구가 형성되어 있는 공간과 대향하는 위치의 공간으로서 외부와 통하는 튜브 등이 설치될 수 있다.
- [0073] 또한, 도시되지 않았으나, 상부 커버(410) 및 하부 커버(420)는 3D 프린팅 방식을 이용하여 미세유체 채널부(200) 및 전극부(300)의 결합이 고정되어 움직일 수 없도록 크기에 상응하는 수용부를 포함하는 구성을 가질 수 있다.
- [0074] 도 2 및 도 3은 각각 본 발명에 따른 미세유체 채널부(200) 및 전극부(300)를 포함하는 전기화학적 바이오센서(100)에 대한 결합 사시도 및 분해 사시도를 나타낸 것이다. 이를 참조하여, 미세유체 채널부(200) 및 전극부(300)에 대하여 상세히 설명한다.
- [0075] 본 발명은 표적 물질이 포함된 유체의 유동을 제어하는 미세유체 채널부(200)와 전극부(300)를 집합하여 전기화학적 바이오센서(100)의 성능을 향상시키는 것을 목적으로 한다. 미세유체 채널부(200)는 전기화학 바이오센서(100)의 작업 전극(320)을 둘러싸는 측벽과 천장부로 이루어진 반응부(210)를 구비하고 있다. 반응부(210)의 천장부는 반응부(210)에서 유동하는 유체에 난류를 일으키는 복수의 빗살 형태의 홈이 열을 이루어 형성되어 있다. 이를 확대하여 도시한 형태는 도 1에 나타나 있다.
- [0076] 또한 미세유체 채널부(200)는 반응부(210)와 연통하는 입자 주입부(230) 및 입자 배출부(240)가 구비되어, 표적 물질을 포함한 유체가 입자 주입부(230)로 주입되어 반응부(210)에서 작업 전극(320)상의 압타머 또는 감지항체와 상호 반응을 일으킨 후 입자 배출부(240)를 통해 빠져나가도록 구성되어 있다.
- [0077] 도 6은 본 발명에 따른 전기화학적 바이오 센서를 이용한 엑소솜 검출능을 분석한 결과로서, Pulse height가 증가할수록 엑소솜의 신호피크가 증가하고 도 6(b)는 엑소솜의 농도에 비례하여 엑소솜의 신호가 높은 선형성($R^2=0.981$)으로 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이를 통하여 1×10^2 내지 1×10^9 exosome/mL 에 이르는 넓은 농도 범위에서 엑소솜의 검출이 가능함을 확인할 수 있다. 또한, 17 exosomes/mL까지 검출이 가능한 결과를 통해, 본 발명에 따른 전기화학적 바이오 센서는 검출 한계(Limit of Detection: LOD)를 낮추고, 크게 향상된 감도를 나타내는 것을 확인할 수 있다.
- [0078] 도 8은 본 발명에서 표면개질에 사용된 MoS_2 -그래핀 나노복합체와 그 구성체의 TEM 사진을 나타낸 것이다. TEM 분석을 통해 나노복합체는 2개 이상의 다른 시트로 구성된 것을 확인할 수 있으며, High-resolution 전자현미경을 이용하여 나노복합체의 구성체인 그래핀 나노플레이트렛 및 MoS_2 의 형태를 확인할 수 있다.
- [0079] 도 9는 도 5에서 진행된 표면 처리 과정을 원자 현미경을 이용해 순차적으로 확인한 것이다. 구체적으로 (I)단계는 금 나노입자/그래핀 나노플레이트렛 복합체/전극(GNS/NC/SPEC)의 표면 상태, (II)단계는 (I)단계에서 압타머가 결합된 상태(Aptamer/GNS/NC/SPEC), (III)단계는 (II)단계에 6-머캅토-1-헥산올(6-mercapto-1-hexanol: MCH)을 처리하여 전극을 부동화(passivation)시킨 상태이며, (IV)단계는 (III)단계 이후, 엑소솜이 결합된 상태를 나타낸다.

- [0080] 도 9는 수직거리(vertical distance: V_D)와 평균 표면 거칠기(average surface roughness: R_A) 측정함으로써 표면 개질 정도를 물리적으로 검증하였음을 나타낸다. 즉, 표면 처리가 단계별로 진행됨에 따라, 수직거리는 순차적으로 증가하고, 표면 거칠기는 물질이 쌓이면서 점점 완만해지는 것을 확인할 수 있는데, 표면 처리가 진행됨에 따라 표면 거칠기 계수가 낮아지면서 전위장벽이 낮아 전극의 감도가 향상됨을 알 수 있다. 이는 본 발명에 따른 표면 개질된 전극이 표적 물질의 검출에 우수한 성능을 보여줄 수 있음을 알 수 있는 결과이다.
- [0081] 도 11은 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서를 이용하여 실제 유방암 환자의 혈액으로부터 엑소좀을 검출하는 실험을 진행하고, 전기적 신호의 세기를 통하여 엑소좀의 정량분석 결과를 ELISA를 이용한 정량분석과 비교하여 나타내었다. 실험 결과 건강한 혈액샘플에 비하여 1-2기 유방암 환자의 경우 엑소좀의 검출량이 약 2배 증가한 것을 확인할 수 있고 3-4기 유방암 환자의 경우 1-2기 환자에 비해 1.5배 증가한 것을 확인할 수 있다. 이를 통하여 암이 진행됨에 따라 엑소좀의 개수가 증가하는 경향을 확인할 수 있다. 또한, ELISA를 통한 정량분석에 비하여, 더 높은 농도로 엑소좀이 검출되는 결과를 볼 때, 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서의 민감도 및 정확도가 현저히 향상된 것을 확인할 수 있다.
- [0082] 실시예 1. 그래핀 나노플레이트렛-MoS₂-키토산 표면개질된 전극(NC/SPCE)의 제조
- [0083] 그래핀 나노플레이트렛(Sigma Aldrich사)과 MoS₂(Graphene-supermarket www.graphene-supermarket.com, USA)의 혼합액을 초음파분산기(sonicator)로 20분간 초음파 처리하고, MoS₂ : 그래핀 나노플레이트렛 : 키토산(CHO)의 비가 2:1:0.1로 되도록 키토산(Sigma Aldrich사)을 첨가하여 다시 20분간 초음파 처리하여, 그래핀 나노플레이트렛 복합체(NC)를 형성하였다. 이후 0.5 M H₂SO₄ 용액으로 SPCE 전극의 표면을 세척하고, 0.1-0.7 V의 전압을 가하였다. 20 μ l의 그래핀 나노플레이트렛 복합체(NC) 용액을 SPEC 전극 표면에 드롭 캐스팅한 후, 1시간 동안 실온에서 건조시켜 그래핀 나노플레이트렛-MoS₂-키토산 표면개질된 전극을 제조하였다.
- [0084] 실시예 2. 금 나노구조-그래핀 나노플레이트렛-MoS₂-키토산 표면개질된 전극(GNS/NC/SPCE)의 제조
- [0085] 실시예 1에 따라 제조된 그래핀 나노플레이트렛 복합체(NC)로 표면개질된 전극을 3×10^{-2} M 염화금(HAuCl₄) 용액에서 120초 동안 -0.2V의 정전위 하에서 처리하여 전기화학적 용착을 통한 방법으로 금 나노입자를 도포하여 금 나노구조-그래핀 나노플레이트렛 복합체 전극(GNS/NC/SPCE)을 제조하였다. 이때, 금이 도포된 표면 커버리지는 62.89%를 나타내었다.
- [0086] 실시예 3. 표면 개질된 전극의 표면에 EpCAM 압타머의 고정화
- [0087] 6.25×10^6 M의 압타머 20.0 μ l를 1.5×10^{-3} M의 TCEP(Tris(2-carboxyethyl)phosphine) 용액 5.0 μ l과 어두운 곳에서 1시간 동안 인큐베이션하여 티올화된 압타머의 이황화 결합을 감소시켰다. 실시예 2에 따라 제조된 금 나노구조-그래핀 나노플레이트렛 복합체로 표면 개질된 전극을 탈이온수로 세척하여 질소 기체를 사용하여 건조시켰다. 이후, 상기 세척된 전극에 이황화 결합이 감소된 압타머 7.0 μ l를 떨어뜨리고 4°C 습한 조건으로 밤새 유지하였다. 상기 전극에 압타머를 고정화한 후, 상기 전극에 1×10^{-3} M MCH(6-머캅토-1-헥산을) 용액 7.0 μ l를 떨어뜨려 1시간 동안 두어 전극을 부동화시켰다. 사용 전 전극을 PBS를 사용하여 세척하고, 4°C 습한 조건으로 유지하였다.
- [0088] 실시예 4. 미세유체채널이 결합된 전기화학적 바이오센서의 제조
- [0089] 미세유체채널은 PDMS 소재를 사용하여 제조하였다. 포토레지스트 재료로서 SU-8 (SU-8 3035, MicroChem Corp., Newton, MA, USA)을 실리콘 웨이퍼에 15초 동안 500 rpm 및 40초 동안 1000 rpm으로 스핀코팅하였다. 이후 65°C 및 95°C 핫플레이트에서 소프트베이크 공정 처리를 하였다. 템플레이트를 노광 처리하여 패턴을 형성하였다. 메인 채널 및 빗살무늬 형태의 채널이 상기 포토레지스트를 이용한 방식으로 제조되었다.
- [0090] 자성을 이용한 결합부는 CAD 프로그램(Solidworks, Dassault Systemes, France)에 따라 디자인되고, 3D 프린터(3DISON MULTI, Rokit, Korea)를 통하여 제작되었다. 실시예 3에 따라 제조된 전극과 상기 제조된 미세유체채널을 자성을 이용한 결합부를 이용하여 결합시켜 본 발명의 일 구현예에 따른 압타머를 고정화한 전기화학적 바이오센서를 제조하였다.
- [0091] 실험예 1. 표면 개질된 전극의 물성 확인

- [0092] 가공되지 않은 탄소전극(bare SPCE), MoS₂/SPCE, 그래핀 나노플레이트렛/SPCE, 그래핀 나노플레이트렛 복합체/SPCE 및 금 나노/그래핀 나노플레이트렛 복합체/SPCE 전극에 대한 순환전압전류법(cyclic voltammetry: CV) 및 전기화학 임피던스 분광법(electrochemical impedance spectroscopy: EIS)의 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0093] 도 7(a)는 금 나노/그래핀 나노플레이트렛 복합체/SPCE 전극에서 가장 큰 환원 피크 분리를 나타내고, 도 7(b)는 금 나노/그래핀 나노플레이트렛 복합체/SPCE 전극에서 전하 이동 저항값(charge transfer resistance)이 가장 크게 측정된 결과를 보여준다. 상기 결과로부터 가공되지 않은 탄소전극(bare SPCE), 그래핀 나노플레이트렛 복합체/SPCE 및 금 나노/그래핀 나노플레이트렛 복합체/SPCE 전극으로 갈수록 CV의 환원 피크 분리 및 EIS의 전하 이동 저항값이 점점 증가하는 결과를 통하여 유효 표면적이 증가하여 전극이 제조되는 단계에 따라 센서의 표면이 잘 형성된 사실을 확인할 수 있다.
- [0094] 실험예 2. 엑소좀 검출 한계 평가
- [0095] 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서를 이용하여 엑소좀 검출 한계 평가를 실시하였다. 엑소좀 농도를 달리하여 전기화학적 신호를 측정한 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 1×10^2 exosomes/ml 내지 1×10^9 exosomes/ml 범위에서 전류 피크를 확인할 수 있었다.
- [0096] 실험예 3. 엑소좀 검출능의 임상 평가
- [0097] 유방암 환자 10명을 실험군으로 하고, 건강한 정상인 3명을 대조군으로 한 엑소좀 검출능의 임상 평가를 진행하였다. 연세대학교 세브란스 병원 IRB의 승인된 프로토콜에 따라 샘플 모집이 이루어졌다. 유방암 환자의 경우 암진행 단계에 따라 1기 3명, 2기 2명, 3기 2명 및 4기 3명의 실험군 및 정상인 3명의 대조군의 혈장 샘플을 채취하였다.
- [0098] 실험군 및 대조군으로부터 혈장 샘플 채취 후, 혈전이 생성되도록 실온에서 15 내지 30분 방치하였다. 그리고 1000-2000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈전을 제거하였고, 상등액을 클린튜브로 옮겨, 엑소좀은 엑소좀 분리제제(Total Exosome Isolation Reagent (from plasma), Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 분리하였다. 얻어진 엑소좀을 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서 및 엑소좀 ELISA 키트(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan)를 통해 엑소좀 검출능을 비교 평가하였다.
- [0099] 두 가지 방법 모두 암이 진행됨에 따라 엑소좀의 검출량이 증가하였으나, ELISA 방법에 비하여 본 발명에 따른 전기화학적 바이오센서에 의한 경우 엑소좀의 검출량이 현저히 많았다. 이는 본 발명의 표면 개질을 통한 전극이 높은 검출 감도를 나타내고, 미세유체 채널을 통한 엑소좀의 정확한 정량이 가능했기 때문인 것으로 보여진다. 또한, 본 발명에 따른 경우 검출 시간이 2시간도 채 걸리지 않았던 것에 비해 ELISA 방법에 의한 경우 5시간이 소요되어 본 발명에 의할 때, 검출 시간이 훨씬 단축될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0100] 뿐만 아니라, 엑소좀 검출에 필요한 샘플의 양 역시 ELISA에 의한 경우 100 μ l가 필요했던 반면, 본 발명에 의한 경우 10 μ l 이하로도 검출이 가능하여, 적은 샘플 양으로도 검출 정확도를 높일 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 도 10 및 도 11에서 확인할 수 있다.
- [0101] 이상, 본 발명의 일 실시예에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상의 범위를 벗어나지 않는 선에서, 구성 요소의 부가, 변경 또는 삭제 등에 의하여 본 발명을 다양하게 수정할 수 있을 것이다.

부호의 설명

- [0102]
- | | |
|------------------|---------------|
| 100: 전기화학적 바이오센서 | 200: 미세유체 채널부 |
| 210: 반응부 | 220: 빗살무늬 유로 |
| 230: 입자 주입부 | 240: 입자 배출부 |
| 250: 입자 이동부 | 300: 전극부 |
| 310: 기관 | 320: 작업 전극 |
| 330: 상대 전극 | 340: 기준 전극 |
| 400: 집합부 | 410: 상부 커버 |

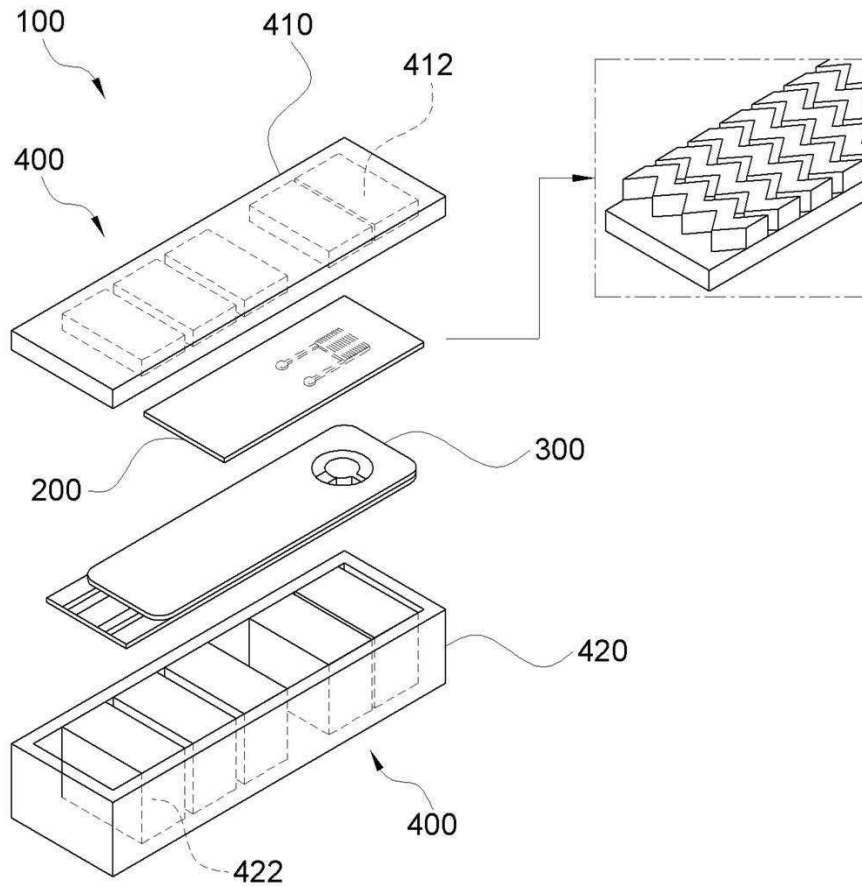
412: 상부 커버 자석

420: 하부 커버

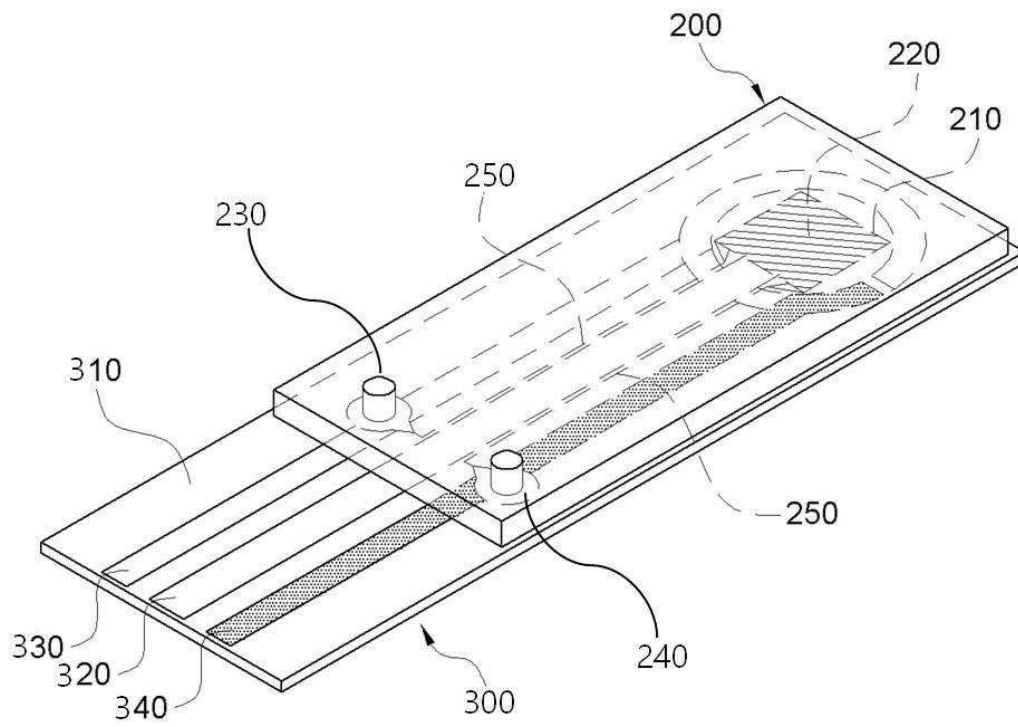
422: 하부 커버 자석

도면

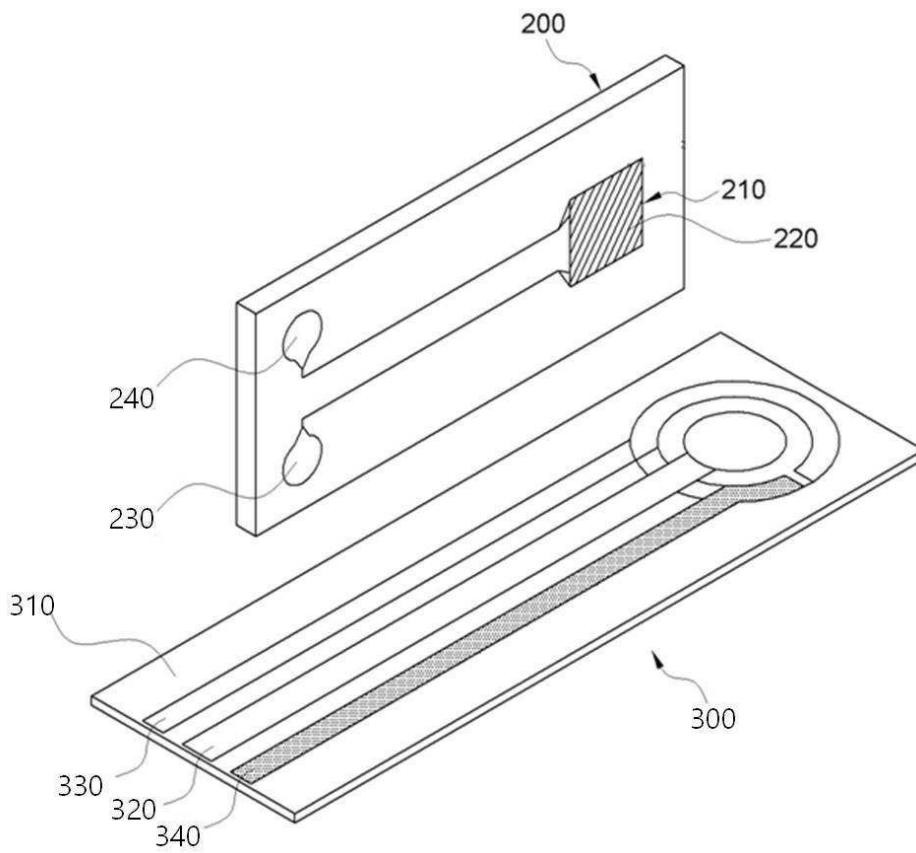
도면1



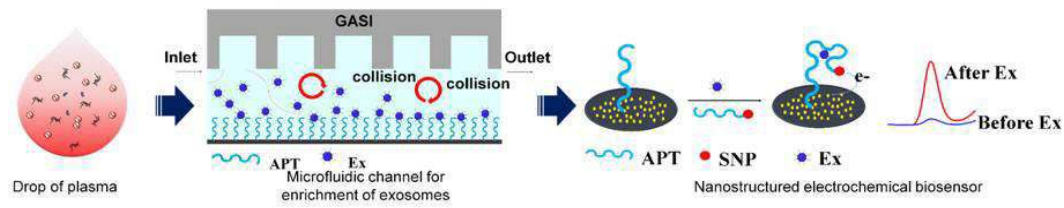
도면2



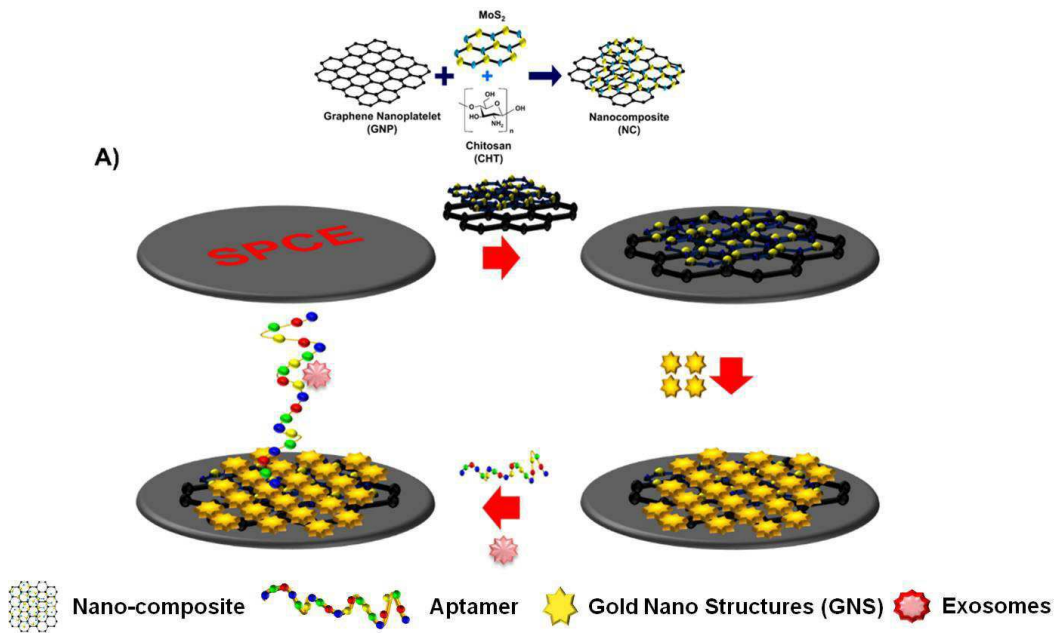
도면3



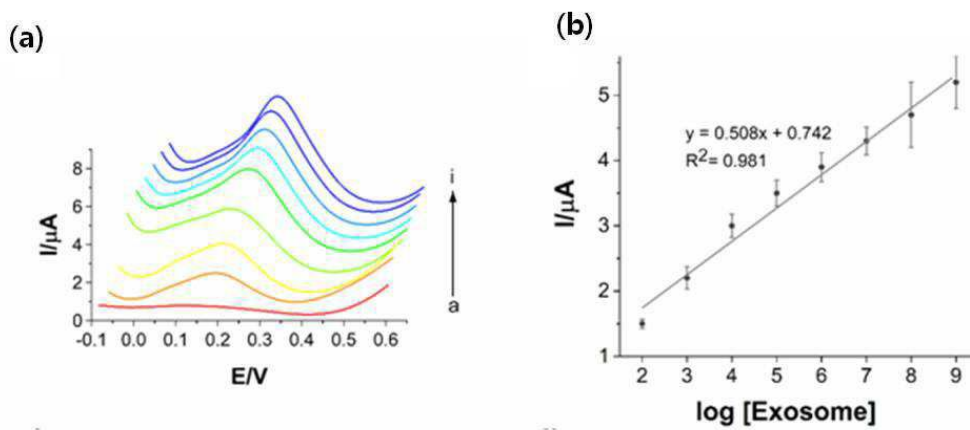
도면4



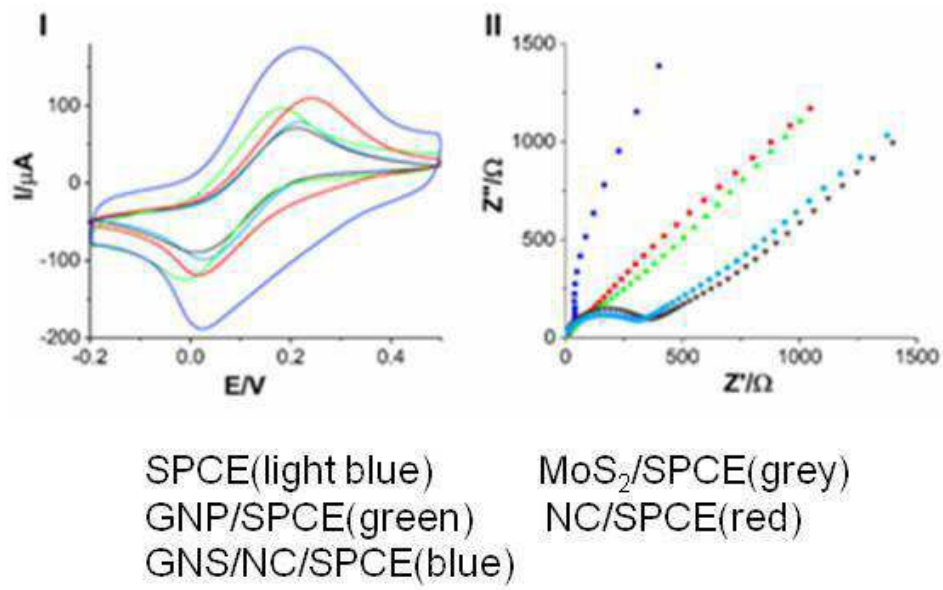
도면5



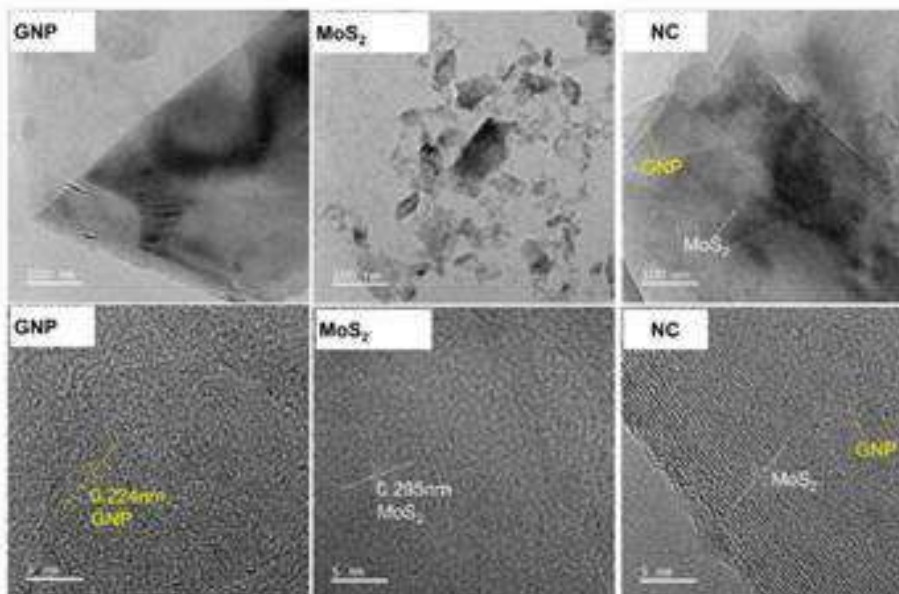
도면6



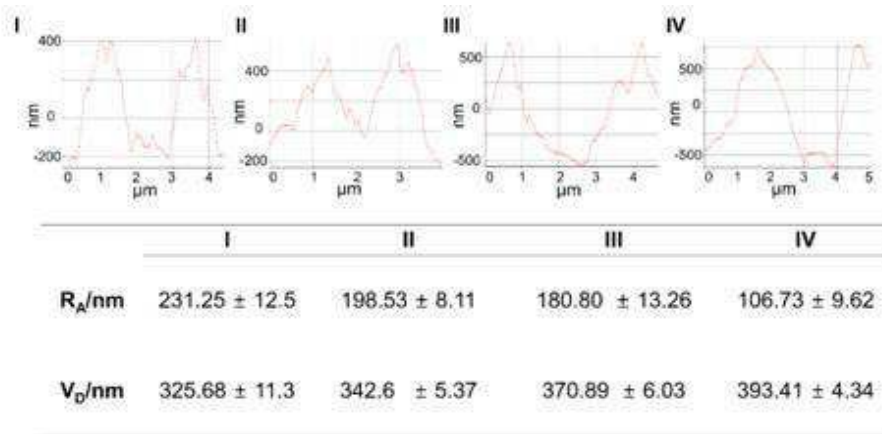
도면7



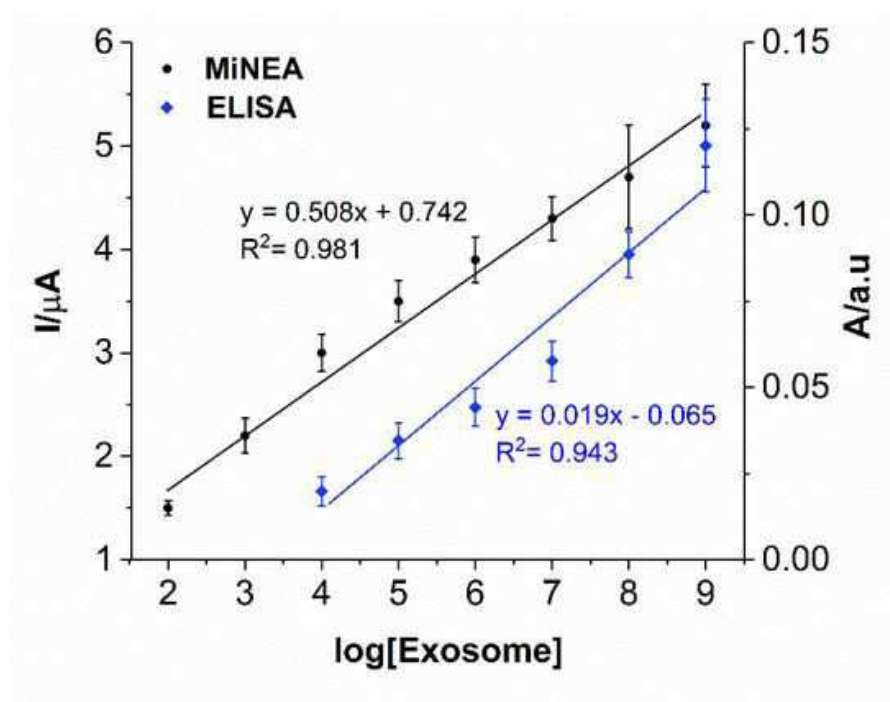
도면8



도면9



도면10



도면11

