

명세서

발명의 명칭: 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분자 또는 입자의 농도를 보다 용이하게 산출할 수 있는 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 유체 샘플에서 낮은 농도의 분자를 정량화하기 위한 대부분의 최신 기술은 측정 가능한 신호를 제공할 수 있도록 리포터 분자의 수를 늘리는 증폭 방식을 사용한다. 예를 들어, 이미 알려진 방식으로는 항체 기반의 신호를 증폭하기 위한 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA)이 포함된다. 유전자 증폭 기술과 항원-항체 반응 기반의 면역분석 기술을 접목한 면역 PCR 기술도 있다. 면역 PCR 방법은 초 미량 단백질 검출이 가능하지만 복잡한 어세이(assay) 과정을 거쳐야 하며 위양성 신호가 생성될 수도 있다.
- [3] 한국공개특허(KR10-2011-0024846)은 '자성 나노 입자를 이용한 생체분자의 정량적 분석장치 및 방법'에 관한 것으로, 외부 자기장에 의해 자화되고 갭(Gap) 영역에 자속(Flux)을 집중시키는 자속 집중기(Flux Concentrator)와, 샘플용액을 갭 영역에 주입시키는 마이크로 채널과, 자속 집중기 사이의 갭 영역의 기판상에 형성되어 자성 나노 입자에 의한 갭 영역의 자기장 변화를 감지하는 자기센서를 포함하는 센서부를 포함함으로써, 생체분자의 정량분석의 정밀도를 높이는 구성이 개시되어 있다.
- [4] 다만, 종래기술에서는 자성 나노 입자가 갭 영역의 자기장 변화를 유도한다는 점을 이용하여 GMR 센서의 출력전압이 변하고, 출력전압의 변화폭을 통해 자성 나노 입자의 농도를 정량적으로 분석하고, 타겟분자를 정량적으로 분석하고 있는데, 타겟분자가 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 경우에 출력전압의 변화폭이 지나치게 낮아 측정이 불가하기 때문에 타겟분자의 정량 분석의 민감도를 더 높일 필요가 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분자 또는 입자의 농도를 보다 용이하게 산출할 수 있는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [6] 본 발명은 상기 과제를 달성하기 위하여, 표면에 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하는 제1 포획물질이 고정된 미세챔버 배열이 형성된 기판에 상기 분석 대상 물질을 포함하는 유체 시료를 흐르도록 하는 단계; 상기 미세챔버 배열의 각 미세챔버 내의 상기 제1 포획물질에 상기 분석 대상 물질이 결합하는 단계; 상기 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하고, 신호발생물질과 결합하는 제2 포획물질을 상기 기판에 흐르도록 하여 상기 분석 대상 물질과 상기 제2 포획물질을 반응시키는 단계; 상기 신호발생물질을 상기 기판에 흐르도록 하여, 상기 제2 포획물질과 결합하도록 하는 단계; 상기 신호발생물질과 반응하여 형광신호를 발생시키는 기질 용액을 상기 기판에 흐르도록 하는 단계; 상기 기판에 소수성 용매가 흐르도록 하여 상기 미세챔버 내부에 상기 신호발생물질과 기질 용액이 반응하면, 상기 미세챔버 외부에 있는 기질 용액을 제거하는 단계; 및 상기 형광신호가 발생한 미세챔버의 숫자를 카운트하여 검출하는 단계를 포함하는 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질을 검출하기 위한 방법을 제공한다.
- [7] 본 발명의 일 실시 예에 의하면, 상기 미세챔버의 내부는 제1 포획물질이 고정된 친수성이고, 상기 미세챔버의 외부는 소수성인 것이 바람직하다.
- [8] 또한, 상기 미세 챔버를 카운트한 제1 카운트값과 상기 신호 발생 물질과 상기 기질 용액을 혼합으로 인해 신호가 발생한 미세챔버를 인식하여 카운트한 제2 카운트값을 산출하고, 상기 제1 카운트 대비 제2 카운트값의 비율을 계산하여 유체 시료 내 분석 대상물질의 양을 추정할 수 있다.
- [9] 본 발명의 다른 실시 예에 의하면, 미리 농도를 알고 있는 유체 시료의 표준 물질에 대한 농도를 나타낸 캘리브레이션 커브를 생성한 다음, 상기 생성된 캘리브레이션 커브를 이용하여 상기 분석 대상 물질의 농도 계산을 보정하는 것이 바람직하다.
- [10] 본 발명의 또 다른 실시 예에 의하면, 상기 미세 챔버를 카운트한 제1 카운트값과 상기 미세 챔버 영역을 촬영하고, 상기 형광 신호가 발생하는 미세 챔버를 영상 처리를 통해 구분하여 그 숫자를 카운트한 제2 카운트값을 산출하여 유체 시료 내 분석 대상물질의 양을 추정할 수 있다.

발명의 효과

- [11] 본 발명에 따르면, 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분자 또는 입자의 농도를 보다 용이하게 산출할 수 있다.
- [12] 또한 본 발명에 따르면, 미세챔버의 내부는 친수성 용매로 코팅하고, 미세챔버 외부는 소수성 용매로 코팅하여 기판에 소수성 용매를 흘릴 경우 미세챔버 외부

에 있는 기질 용액을 제거할 수 있게 되어 형광신호가 발생하는 미세챔버 검출을 손쉽게 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 본 발명의 제1 실시 예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치의 구성도이다.
- [14] 도 2는 본 발명의 제1 실시예에 따른 분석칩(300)을 보다 상세하게 도시한 것이다.
- [15] 도 3은 본 발명의 제1 실시예에 따라 분석 대상 물질을 검출하는 과정을 개념적으로 도시한 것이다.
- [16] 도 4는 본 발명의 제1 실시예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법의 흐름도이다.
- [17] 도 5는 본 발명의 제2 실시 예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치의 구성도이다.
- [18] 도 6은 본 발명의 제2 실시예에 따른 분석칩(301)을 보다 상세하게 도시한 것이다.
- [19] 도 7은 본 발명의 제2 실시예에 따른 미세입자, 제1 포획물질, 분석 대상 물질, 및 신호 발생 물질의 결합 형태를 도시한 것이다.
- [20] 도 8은 본 발명의 제2 실시예에 따른 검출공간에 배치된 미세챔버에 미세입자가 포획된 상태를 상세히 나타낸 것이다.
- [21] 도 9는 본 발명의 제2 실시예에 따라 분석 대상 물질을 검출하는 과정을 개념적으로 도시한 것이다.
- [22] 도 10과 도 11은 본 발명의 제2 실시예에 따른 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법의 전체리 프로세스가 도시되어 있다.
- [23] 도 12는 본 발명의 제2 실시예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법의 흐름도이다.
- [24] 도 13은 본 발명의 제3 실시 예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치의 구성도이다.
- [25] 도 14는 본 발명의 제3 실시예에 따른 분석칩(302)을 보다 상세하게 도시한 것이다.
- [26] 도 15는 본 발명의 제3 실시예에 따른 마이크로 웰 미세입자를 보다 상세하게 도시한 것이다.
- [27] 도 16은 본 발명의 제3 실시예에 따라 분석 대상 물질을 검출하는 과정을 개념적으로 도시한 것이다.
- [28] 도 17은 본 발명의 제3 실시예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법의 흐름도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [29] 본 발명은 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법에 관한 것으로서, 표면에 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하는 제1 포획물질이 고정된 미세챔버 배열이 형성된 기판에 상기 분석 대상 물질을 포함하는 유체 시료를 흐르도록 하는 단계, 상기 미세챔버 배열의 각 미세챔버 내의 상기 제1 포획물질에 상기 분석 대상 물질이 결합하는 단계, 상기 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하고, 신호발생물질과 결합하는 제2 포획물질을 상기 기판에 흐르도록 하여 상기 분석 대상 물질과 상기 제2 포획물질을 반응시키는 단계, 상기 신호발생물질을 상기 기판에 흐르도록 하여, 상기 제2 포획물질과 결합하도록 하는 단계, 상기 신호발생물질과 반응하여 형광신호를 발생시키는 기질 용액을 상기 기판에 흐르도록 하는 단계, 상기 기판에 소수성 용매가 흐르도록 하여 상기 미세챔버 내부에 상기 신호발생물질과 기질 용액이 반응하면, 상기 미세챔버 외부에 있는 기질 용액을 제거하는 단계, 및 상기 형광신호가 발생한 미세챔버의 숫자를 카운트하여 검출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 실시를 위한 형태

- [30] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있는 바람직한 실시 예를 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시 예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.
- [31] 본 발명이 해결하고자 하는 과제의 해결 방안을 명확하게 하기 위한 발명의 구성을 본 발명의 바람직한 실시 예에 근거하여 첨부 도면을 참조하여 상세히 설명하되, 도면의 구성요소들에 참조번호를 부여함에 있어서 동일 구성요소에 대해서는 비록 다른 도면상에 있더라도 동일 참조번호를 부여하였으며 당해 도면에 대한 설명시 필요한 경우 다른 도면의 구성요소를 인용할 수 있음을 미리 밝혀둔다. 아울러 본 발명의 바람직한 실시 예에 대한 동작 원리를 상세하게 설명함에 있어 본 발명과 관련된 공지 기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명 그리고 그 이외의 제반 사항이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우, 그 상세한 설명을 생략한다.
- [32] 덧붙여, 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 '연결'되어 있다고 할때, 이는 '직접적으로 연결'되어 있는 경우뿐만 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 '간접적으로 연결'되어 있는 경우도 포함한다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 구성요소, 단계, 동작, 또는 소자 외에 하나 이상의 다른 구성요소, 단계, 동작, 또는 소자의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.

[33]

- [34] 도 1은 본 발명의 제1 실시 예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치의 구성도이다.
- [35] 도 1(a)는 본 발명의 제1 실시 예에 따른 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치의 평면도이고, 도 1(b)는 본 발명의 제1 실시 예에 따른 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치의 단면도이다.
- [36] 도 1을 참조하면, 본 발명의 제1 실시 예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치는 카트리지(100)를 포함하여 구성된다.
- [37] 카트리지(100)는 유체시료 챔버(200), 폐기물 챔버(210), 세척액 챔버(230), 제2 포획물질 챔버(240), 신호발생물질 챔버(250), 기질 용액 챔버(260), 및 분석칩(300)을 포함하여 구성된다.
- [38] 카트리지(100)의 상부 표면은 복수의 챔버와 분석칩(300)이 상호 간에 또는 외부 물질로부터 오염되는 것을 방지하기 위하여 공기가 투과하지 않는 필름으로 열융착, UV접착, 초음파 용착, 또는 테일 등을 이용하여 실링되어 있는 것이 바람직하다.
- [39] 유체시료 챔버(200)는 일정량의 유체 시료 샘플을 수용하도록 구성된다. 이러한 유체시료 챔버(200)는 $50\mu\text{l}$ ~ 10mL 범위의 용량을 가지도록 구성될 수 있다. 상기 유체 시료 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 및 뇌척수액 등의 체액을 포함한다.
- [40] 폐기물 챔버(210)는 분석칩(300)에 투입된 유체시료, 세척액, 제2 포획물질, 신호발생물질, 및 기질 용액 등이 배출될 때 발생하는 폐기물을 수용하기 위한 수용 공간을 제공하도록 구성된다. 이러한 폐기물 챔버(210)는 1~ 15mL의 용량을 가지도록 구성될 수 있다. 도 1의 폐기물 챔버(210)는 카트리지(100)에 포함되어 있으나, 카트리지(100) 외부의 별도의 공간에 폐기물 챔버(210)가 구비될 수 있다.
- [41] 세척액 챔버(230)는 분석칩(300)의 미세챔버(30)가 있는 검출공간(330)을 세척하기 위한 세척액을 수용하도록 구성된다. 세척액은 PBS(phosphate buffered saline), TBS(Tris-buffered saline), PBS-T, TBS-T, 또는 초순수 등의 용액일 수 있다.
- [42] 일 실시예로서, 세척액 챔버(230)의 세척액은 주입구(310)에 주입되어 검출공간(330)에 반응 후 남아있는 유체시료, 제2 포획물질, 신호발생물질, 및 기질 용액 등을 세척할 수 있다.
- [43] 제2 포획물질 챔버(240)는 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하고, 신호발생물질과 결합하는 제2 포획물질을 수용하도록 구성된다. 상기 제2 포획물질은 분석 대상 물질과 신호발생물질 각각과 특이적으로 결합하는 특성이 있어, 신호발생물질이 분석 대상 물질에 특이적으로 결합한 상기 제2 포획물질에 결합하여 분석 대상 물질의 양에 비례하는 형광신호를 발생하게 하는 역할을 한다. 예를 들면 상기 제2 포획물질은 2차 항체가 될 수 있으며, 신호발생물질과 미리 결합된 형태로 제공될 수 있다.

- [44] 제2 포획물질이 분석 대상 물질과 결합하고, 복수의 미세챔버(30)에 고정되어 있는 제1 포획물질 역시 분석대상 물질과 결합하므로, 제1 포획물질과 제2 포획물질은 분석 대상 물질과 결합하는 부분이 다른 것이 바람직하다.
- [45] 신호발생물질 챔버(250)는 분석 대상 물질에 결합된 상기 제2 포획물질과 특이적으로 결합하는 신호발생물질을 수용하도록 구성된다. 상기 신호 발생 물질은 예를 들면, 효소가 될 수 있다.
- [46] 상기 신호 발생 물질은 예를 들면 색상원, 형광, 또는 화학 발광의 효소 전구 물질이며 이것은 기질용액과 접촉하면, 검출 가능한 표시제로 변환된다.
- [47] 상기 신호발생물질과 상기 제2 포획물질은 결합된 상태로 제2 포획물질 챔버(240) 또는 신호발생물질 챔버(250) 중 어느 하나에 수용되어 있을 수 있다.
- [48] 상기 신호발생물질은, 기질 용액과 반응하여 형광 신호 등 검출 가능한 표시제를 발생시키는 역할을 하며, 효소 성분은 β -갈락토시다아제, 서양 호스래디시 페록시다아제, 또는 알칼리 포스파타제를 포함할 수 있다.
- [49] 기질 용액 챔버(260)는 상기 신호 발생 물질과 반응하여 신호를 발생시키는 기질 용액을 수용하도록 구성된다. 상기 기질 용액은, 상기 신호발생물질과 반응하여 형광 신호 등 검출 가능한 표시제를 발생시키며 Resorufin β -D-galactopyranoside 등을 포함할 수 있다.
- [50] 분석칩(300)은 주입구(310) 및 검출 공간(330)을 포함하여 구성된다.
- [51] 주입구(310)는 유체시료, 세척액, 제2 포획물질, 신호 발생 물질, 기질 용액 또는 그 혼합용액이 주입된다.
- [52] 주입구(310)는 전혈에서 혈장을 분리하여 공급할 수 있도록 필터를 더 포함할 수 있다. 필터는 전혈 내의 혈구세포를 걸러내고 혈장 성분을 포함하는 유체 시료를 통과시키게 된다. 필터는 생체 세포나 무기 입자 또는 유기 입자 등을 여과할 수 있도록 다양한 크기의 기공이나 다양한 소재로 형성될 수 있다. 본 실시예의 필터는 분석 대상 물질보다 큰 세포 또는 이물질을 걸러낼 수 있는 기공을 갖는 것이 바람직하며, 대략 5 내지 10 μ m 크기의 혈구세포를 걸러낼 수 있는 기공으로 형성되는 것이 바람직하다. 또한, 필터는 생체 시료에 적용할 수 있도록 생물학적으로 비활성인 소재로 형성될 수 있다.
- [53] 주입구(310)에 유체시료를 공급하는 과정에서, 필터 여과 전에 필터의 출력면을 버퍼액으로 적셔 필터 출력면 미리 습윤시킬 수 있다. 따라서, 필터 입력면으로 공급된 전혈의 혈장이 표면저항없이 필터 기공을 통과하여 필터 출력면으로 원활하게 여과될 수 있다.
- [54]
- [55] 검출공간(330)은 복수의 미세 챔버(30)가 배치되어 있으며, 각 미세챔버 내부에 복수의 제1 포획물질이 고정되어 있는 것이 바람직하다.
- [56] 미세 챔버(30)는 분석칩(300)의 검출공간(330)의 한 면에 서로 일정 간격을 두고 배열의 형태로 존재하며 각 미세 챔버의 크기는 서로 동일한 것을 특징으로 한다. 미세 챔버의 숫자는 10,000개 이상인 것이 바람직하며, 그 숫자는 측정하고

자 하는 분석 대상 물질 농도의 범위에 따라 달라질 수 있다. 미세 챔버(30)의 내부 표면에는 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하는 제1 포획물질이 고정화되어 있는 것을 특징으로 한다. 또한 비특이적 반응을 막기 위하여 제1 포획물질이 없는 나머지 표면은 BSA(bovine serum albumin) 등의 블로킹 물질로 코팅되어 있는 것이 바람직하다.

- [57] 주입구(310)를 통해 유체시료가 주입되면, 검출공간(330) 내의 미세 챔버(30)의 내부공간에 고정된 제1 포획물질과 유체시료에 포함된 분석 대상 물질이 결합한다.
- [58] 이후, 주입구(310)를 통해 세척액이 주입되면, 상기 제1 포획물질과 상기 분석 대상 물질의 결합 후 남은 유체시료를 제거하고 세척할 수 있다.
- [59] 한편, 주입구(310)를 통해 분석 대상 물질 및 신호발생물질과 결합하는 제2 포획물질 챔버(240)에 수용된 제2 포획물질을 주입하면, 상기 제1 포획물질에 결합된 분석 대상 물질과 상기 제2 포획물질이 결합하게 되며, 이후 주입구(310)로 주입된 세척액을 통해 남은 제2 포획물질을 제거하고 세척할 수 있다.
- [60] 다음으로, 주입구(310)를 통해 신호발생물질을 주입하면, 상기 신호발생물질과 상기 제2 포획물질이 결합한다.
- [61] 마지막으로, 주입구(310)를 통해 기질 용액을 주입하여 상기 신호발생물질과 상기 기질 용액이 반응하도록 함으로써, 형광신호를 발생시키게 되고, 주입구(310)로 소수성 용매가 흐르도록 하여, 신호발생물질과 반응하고 남은 기질 용액을 제거하게 된다. 상기 소수성 용매는 오일 또는 기체인 것이 바람직하다.
- [62]
- [63] 도 2는 본 발명의 제1 실시예에 따른 분석칩(300)을 보다 상세하게 도시한 것이다.
- [64] 주입구(310)를 통해 유체시료, 세척액, 제2 포획물질, 신호 발생 물질, 기질 용액 또는 그 혼합용액이 순차적으로 주입된다. 상기 제2 포획물질은 형광 신호 등 검출 가능한 표시제를 발생시키는 신호발생물질과 분석 대상 물질을 결합하기 위한 포획물질로서, 신호발생물질과 결합되어 제공될 수 있으며, 제2 포획물질과 신호발생물질이 별도로 제공되는 경우보다 절차를 간소화할 수 있다.
- [65] 주입구(310)에 상기 유체시료, 세척액, 제2 포획물질, 신호 발생 물질, 및 기질 용액 또는 그 혼합용액이 주입되면, 검출공간(330)으로 확산되어 흐르게 되며, 미세 챔버(30)를 흐르게 된다.
- [66] 미세 챔버(30)에는 유체시료에 포함된 분석 대상 물질과 결합하는 제1 포획물질이 고정되어 있는 것이 바람직하다.
- [67]
- [68] 도 3은 본 발명의 제1 실시예에 따라 분석 대상 물질을 검출하는 과정을 개념적으로 도시한 것이다.

- [69] 도 3(a)는 기관하부에 미세챔버(30)가 오목하게 형성되어 있는 것이 도시되어 있고, 미세챔버(30)에 제1 포획물질(40)이 고정되어 있다. 미세챔버(30)의 크기는 $0.5 \sim 15 \mu\text{m}$ 이고, 상기 크기는 광학측정이 가능한 최소한의 크기이다.
- [70] 미세챔버(30)는 검출공간(330)을 따라 바닥면에 서로 $0.5 \mu\text{m}$ 이상의 간격을 두고 배열 형성되고, 최소 10,000개 이상의 미세챔버가 균일한 분포로 배치되도록 설계될 수 있다.
- [71] 미세챔버(30)는 검출공간(330) 바닥면에서 홈 형태로 파여져 형성되어 있으며, 제1 포획물질(40)이 고정되어 분석 대상 물질(50)을 특이적으로 포획한다.
- [72] 본 발명의 일 실시예에서, 미세챔버(30)은 검출공간(330) 바닥면에서 유체 흐름 방향에 대해 수직인 방향으로 형성될 수 있다. 이에, 미세챔버(30)와 유체의 흐름은 직각으로 배치된다. 따라서, 미세챔버(30)에 삽입된 입자가 유체 흐름을 따라 미세챔버(30)에서 쉽게 빠져나오지 못하게 된다.
- [73] 이와 같이, 제1 포획물질(40)은 미세챔버(30) 내에 안정적으로 삽입 고정되어 유체 흐름에 관계없이 검출공간(330) 상에서 균일한 배열 상태를 유지할 수 있게 된다.
- [74] 제1 포획물질이 항체입자인 경우, 항체의 크기는 $10 \sim 50 \text{nm}$ 인 것이 일반적이므로, 미세챔버(30)에는 다수의 항체가 고정되어 있는 것이 바람직하다.
- [75] 도 3(b)에는 미세챔버(30)의 위로 유체시료가 흐르게 되면서 제1 포획물질(40)에 분석 대상 물질(50)이 포획되는 것이 도시되어 있다. 이후 포획되지 않은 분석 대상 물질을 포함한 남은 유체시료는 세척액에 의해 세척되는 것이 바람직하다.
- [76] 도 3(b)에서 알 수 있는 바와 같이 미세챔버(30)에는 다수의 제1 포획물질이 고정되어 있으므로, 하나의 미세챔버(30) 안에 제1 포획물질에 고정되는 분석 대상 물질(50)의 수는 분석 대상 물질의 수와 물질 특성에 따라 미세챔버마다 동일하게 1개의 분석 대상 물질이 고르게 포획되거나 미세챔버마다 포획된 분석 대상 물질의 수가 달라질 수 있다. 일례로 분석 대상 물질의 수가 미세챔버 수의 60% 미만일 경우에는 미세챔버마다 동일하게 1개의 분석 대상 물질의 포획될 확률이 높지만, 분석 대상 물질의 수가 미세챔버 수의 60% 이상일 경우에는 미세챔버마다 포획된 분석 대상 물질의 수는 미세챔버마다 달라질 수 있다. 따라서, 미세챔버마다 포획된 분석 대상 물질의 수가 동일할 경우에는 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호가 발생하는 미세챔버의 수를 계산하여 분석 대상 물질의 수를 추론하는 것이 바람직하고, 미세챔버마다 포획된 분석 대상 물질의 수가 다를 경우에는 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호가 발생하는 미세챔버의 수뿐만 아니라 미세챔버에서 발생하는 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호의 진화기도 함께 계산하여 분석 대상 물질의 수를 추론하는 것이 바람직하다.
- [77] 세척액에 의해 미세챔버(30)에 삽입 고정 또는 포획된 분석 대상 물질 외에 나머지 물질들은 검출공간(330)에서 제거된다. 세척 과정에서 미세챔버에 삽입 고정 또는 포획된 물질들은 세척액의 흐름 방향에 수직방향으로 깊게 형성된 미세챔버(30)에 삽입 고정되어 있어서, 세척액의 흐름에 의해 미세챔버(30)에서 빠져

나가지 않고 고정된 상태를 유지할 수 있다. 이에, 검출공간(330) 내에서 미세챔버(30)에 삽입되어 고정된 제1 포획물질과 결합하여 고정되지 못한 나머지 물질들만이 세척액의 흐름을 따라 검출공간(330)에서 흘러나가 제거된다.

- [78] 도 3(c)는 미세챔버(30)의 위로 제2 포획물질(60)을 흐르게 하면, 분석 대상 물질(50)과 제2 포획물질(60)이 결합하여 반응하는 상태가 도시되어 있다. 이후 남은 제2 포획물질(60)은 세척액에 의해 세척되는 것이 바람직하다.
- [79] 도 3(d)는 미세챔버(30)의 위로 신호발생물질(70)을 흐르게 하면, 신호발생물질(70)과 제2 포획물질(60)이 결합하여 반응하는 것이 도시되어 있다. 이후 남은 신호발생물질(70)은 세척액에 의해 세척되는 것이 바람직하다.
- [80] 도 3(e)는 미세챔버(30)의 위로 기질 용액을 흐르게 하여, 신호발생물질(70)과 기질용액이 반응하여 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호를 발생하는 것이 도시되어 있다. 이후 남은 기질용액은 세척액에 의해 세척되는 것이 바람직하다.
- [81] 도 3(b)에서 하나의 미세챔버(30) 안에 제1 포획물질에 고정되는 분석 대상 물질(50)의 수는 차이가 나므로, 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호가 발생하는 신호발생물질(70)의 갯수도 각 미세챔버마다 차이가 나게 된다.
- [82] 이후, 상기 기관에 소수성 용매가 흐르도록 하여 복수의 미세챔버(30) 외부에 있는 기질 용액을 제거하고, 상기 형광신호가 발생한 미세챔버의 숫자를 카운트하여 검출하게 된다. 복수의 미세챔버(30)의 내부는 친수성 용매로 코팅하고, 복수의 미세챔버(30) 외부는 소수성 용매로 코팅하여 기관에 소수성 용매를 흘릴 경우 복수의 미세챔버(30) 외부에 있는 기질용액을 제거할 수 있게 된다.
- [83] 보다 정확한 유체시료에 포함된 분석 대상 물질을 검출하기 위해 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호의 밝기에 대응하는 분석 대상 물질의 입자의 갯수를 대응시키고, 각 미세 챔버의 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호의 밝기를 고려하여 분석 대상 물질의 입자의 갯수를 카운팅하는 것이 바람직하다.
- [84]
- [85] 도 4는 본 발명의 제1 실시예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법의 흐름도이다.
- [86] 400 단계에서 표면에 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하는 제1 포획물질이 고정된 미세챔버 배열이 형성된 기관에 상기 분석 대상 물질을 포함하는 유체 시료를 흐르도록 한다.
- [87] 410 단계에서 미세챔버(30) 배열의 각 미세챔버 내의 제1 포획물질에 상기 분석 대상 물질이 결합한다.
- [88] 420 단계에서 상기 제1 포획물질과 상기 분석 대상 물질의 결합 후 남은 유체 시료를 제거하고 세척한다.
- [89] 430 단계에서 상기 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하고, 신호발생물질과 결합하는 제2 포획물질을 상기 기관에 흐르도록 하여 상기 분석 대상 물질과 상기 제2 포획물질을 반응시킨다.

- [90] 440 단계에서 상기 분석 대상 물질과 상기 제2 포획물질을 반응시키고 남은 제2 포획물질을 제거하고 세척한다.
- [91] 450 단계에서 상기 신호발생물질을 상기 기관에 흐르도록 하여, 상기 제2 포획 물질과 결합하도록 한다.
- [92] 460 단계에서 상기 신호발생물질과 반응하여 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호를 발생시키는 기질 용액을 상기 기관에 흐르도록 한다.
- [93] 470 단계에서 상기 기관에 소수성 용매가 흐르도록 하여 상기 미세챔버 내부에 상기 신호발생물질과 기질 용액이 결합된 채, 상기 미세챔버 외부에 있는 기질 용액을 제거한다.
- [94] 상기 미세챔버의 내부는 친수성이고, 상기 미세챔버의 외부는 소수성인 것이 바람직하다.
- [95] 480 단계에서 상기 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호가 발생한 미세챔버의 숫자를 카운트하여 검출한다.
- [96]
- [97] 도 5는 본 발명의 제2 실시 예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치의 구성도이다.
- [98] 도 5(a)는 본 발명의 제2 실시 예에 따른 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치의 평면도이고, 도 5(b)는 본 발명의 제2 실시 예에 따른 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치의 단면도이다.
- [99] 도 5를 참조하면, 본 발명의 제2 실시 예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치는 자성장치(150)와 카트리리지(101)를 포함하여 구성된다.
- [100] 자성장치(150)는 반응 챔버(205)에 근접하거나 멀어지는 과정을 통해, 반응 챔버(205) 내의 미세입자의 일 실시예인 자성입자와 잔여 용액 간의 분리가 일어나도록 한다. 이후, 잔여 용액을 제거한 후, 세척액 챔버(231)가 수용하고 있는 세척액을 반응 챔버(205)에 주입하여, 자성 입자들이 위치한 반응 챔버(205)의 벽면을 세척할 수 있다.
- [101] 카트리리지(101)는 유체시료 챔버(201), 반응 챔버(205), 폐기물 챔버(211), 미세입자 챔버(221), 세척액 챔버(231), 제2 포획물질 챔버(241), 신호발생물질 챔버(251), 기질 용액 챔버(261), 및 분석칩(301)을 포함하여 구성된다.
- [102] 카트리리지(101)는 상부 표면은 복수의 챔버와 분석칩(301)이 상호 간에 또는 외부 물질로부터 오염되는 것을 방지하기 위하여 공기가 투과하지 않는 필름으로 열융착, UV접착, 초음파 용착, 또는 테잎 등을 이용하여 실링되어 있는 것이 바람직하다.
- [103] 유체시료 챔버(201)는 일정량의 유체 시료 샘플을 수용하도록 구성된다. 이러한 유체시료 챔버(201)는 50 μ l ~ 10mL 범위의 용량을 가지도록 구성될 수 있다. 상기 유체 시료 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 및 뇌척수액 등의 체액을 포함한다.

- [104] 반응 챔버(205)는 일정량의 유체 시료 샘플과 제1 포획물질이 고정된 미세입자를 수용하여 혼합하도록 구성된다. 이러한 반응 챔버(205)는 50 μ l~15mL 범위의 용량을 가지도록 구성될 수 있다.
- [105] 폐기물 챔버(211)는 분석칩(301)에 투입된 유체시료, 미세입자, 세척액, 제2 포획물질, 신호발생물질, 및 기질 용액 등이 배출될 때 발생하는 폐기물을 수용하기 위한 수용 공간을 제공하도록 구성된다. 이러한 폐기물 챔버(211)는 1~30mL의 용량을 가지도록 구성될 수 있다. 도 5의 폐기물 챔버(211)는 카트리지(101)에 포함되어 있으나, 카트리지 외부의 별도의 공간에 폐기물 챔버(211)가 구비될 수 있다.
- [106] 미세입자 챔버(221)는 제1 포획물질이 고정된 미세입자를 수용하도록 구성되고, 반응 챔버(205)로 상기 미세입자가 주입된다. 상기 미세입자는 폴리머 또는 자성입자가 될 수 있다. 상기 자성입자는 지름 500 nm ~ 10 μ m 사이의 크기를 지니고 있으며, 산화철 등의 자성을 띤 물질을 포함하는 것이 바람직하다. 미세입자는 구형의 자성입자일 수 있고, 도넛형태의 미세입자일 수 있다.
- [107] 미세입자 챔버(221)에 수용된 미세입자는 표면에 분석 대상 물질과 결합하는 제1 포획물질이 결합되어 있는 것이 바람직하다. 상기 제1 포획물질은 항체, 핵산분자, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.
- [108] 세척액 챔버(231)는 반응 챔버(205)의 벽면을 세척하거나 분석칩(301)의 미세 챔버(31)가 있는 검출공간(331)을 세척하기 위한 세척액을 수용하도록 구성된다. 세척액은 PBS(phosphate buffered saline), TBS(Tris-buffered saline), PBS-T, TBS-T, 또는 초순수 등의 용액일 수 있다.
- [109] 일 실시예로서, 세척액 챔버(231)의 세척액은 주입구(311)에 주입되어 검출공간(331)에 반응 후 남아있는 유체시료, 미세입자, 제2 포획물질, 신호발생물질, 및 기질 용액 등을 세척할 수 있다.
- [110] 다른 실시예로서, 자성장치(150)가 반응 챔버(205)와 근접하게 되어 반응 챔버(205) 내의 미세입자의 일 실시예인 자성입자와 잔여 용액 간의 분리가 일어나면, 잔여 용액을 제거한 후, 세척액 챔버(231)가 수용하고 있는 세척액을 반응 챔버(205)에 주입하여, 자성 입자들이 위치한 반응 챔버(205)의 벽면을 세척할 수 있다.
- [111] 제2 포획물질 챔버(241)는 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하고, 신호발생물질과 결합하는 제2 포획물질을 수용하도록 구성된다. 상기 제2 포획물질은 분석 대상 물질과 신호발생물질 각각과 특이적으로 결합하는 특성이 있어, 신호발생물질이 분석 대상 물질에 특이적으로 결합한 상기 제2 포획물질에 결합하여 분석 대상 물질의 양에 비례하는 형광신호를 발생하게 하는 역할을 하는 포획물질로서, 예를 들면 2차 항체가 될 수 있으며, 신호발생물질과 미리 결합된 형태로 제공될 수 있다.

- [112] 제2 포획물질이 분석 대상 물질과 결합하고, 미세입자에 고정되어 있는 제1 포획물질 역시 분석 대상 물질과 결합하므로, 제1 포획물질과 제2 포획물질은 분석 대상 물질과 결합하는 부분이 다른 것이 바람직하다.
- [113] 신호발생물질 챔버(251)는 분석 대상 물질에 결합된 상기 제2 포획물질과 특이적으로 결합하는 신호발생물질을 수용하도록 구성된다. 상기 신호 발생 물질은 예를 들면, 효소가 될 수 있다.
- [114] 상기 신호 발생 물질은 예를 들면 색상원, 형광, 또는 화학 발광의 효소 전구 물질이며 이것은 기질용액과 접촉하면, 검출 가능한 표시제로 변환된다.
- [115] 상기 신호발생물질과 상기 제2 포획물질은 결합된 상태로 제2 포획물질 챔버(241) 또는 신호발생물질 챔버(251) 중 어느 하나에 수용되어 있을 수 있다.
- [116] 상기 신호발생물질은, 기질 용액과 반응하여 형광 신호 등 검출 가능한 표시제를 발생시키는 역할을 하며, 효소 성분은 β -갈락토시다아제, 서양 호스래디시 페록시다아제, 또는 알칼리 포스파타제를 포함할 수 있다.
- [117] 기질 용액 챔버(261)는 상기 신호 발생 물질과 반응하여 신호를 발생시키는 기질 용액을 수용하도록 구성된다. 상기 기질 용액은 상기 신호발생물질과 반응하여 형광 신호 등 검출 가능한 표시제를 발생시키며 Resorufin β -D-galactopyranoside 등을 포함할 수 있다.
- [118]
- [119] 분석칩(301)은 주입구(311) 및 검출 공간(331)을 포함하여 구성된다.
- [120] 반응 챔버(205)에서 일정량의 유체 시료 샘플과 제1 포획물질이 고정된 미세입자를 수용하여 혼합하였기 때문에 미세입자에 고정된 제1 포획물질에 분석 대상 물질이 결합하게 된다.
- [121] 주입구(311)는 유체시료, 미세입자, 세척액, 제2 포획물질, 신호발생물질, 및 기질 용액 또는 혼합용액이 주입된다.
- [122] 주입구(311)는 미세입자와 유체시료의 혼합용액에서 미세입자보다 큰 입자를 분리하여 공급할 수 있도록 필터를 더 포함할 수 있다. 필터는 생체 세포나 무기 입자 또는 유기 입자 등을 여과할 수 있도록 다양한 크기의 기공이나 다양한 소재로 형성될 수 있다. 본 제2 실시예의 필터는 미세입자보다 큰 입자 또는 이물질을 걸러낼 수 있는 기공으로 형성되는 것이 바람직하다. 또한, 필터는 생체 시료에 적용할 수 있도록 생물학적으로 비활성인 소재로 형성될 수 있다.
- [123] 주입구(311)에 유체시료를 공급하는 과정에서, 필터 여과 전에 필터의 출력면을 버퍼액으로 적셔 필터 출력면 미리 습윤시킬 수 있다. 따라서, 필터 입력면으로 공급된 미세입자와 유체시료의 혼합용액이 표면저항없이 필터 기공을 통과하여 필터 출력면으로 원활하게 여과될 수 있다.
- [124] 검출공간(331)은 복수의 미세챔버(31)가 배치되어 있으며, 주입구(311)를 통해 미세입자와 유체시료의 혼합용액이 주입되면, 검출공간(331) 내의 미세챔버(31)의 내부공간에 미세입자가 포획된다. 미세챔버(31)의 아래에 자성체(15)를 배치

함으로써, 미세챔버(31)의 내부공간에 미세입자가 자성입자인 경우 쉽게 포획할 수 있다.

- [125] 미세챔버(31)에 포획된 미세입자는 분석 대상 물질이 제1 포획물질에 의해 포획된 미세입자인 경우와 포획되지 않은 미세입자가 섞여있다. 미세챔버(31)의 크기는 미세입자 지름보다 크고 미세입자 지름의 2배보다는 작은 것이 바람직하다.
- [126] 이후, 주입구(311)를 통해 세척액이 주입되면, 상기 제1 포획물질과 상기 분석 대상 물질의 결합 후 남은 유체 시료를 제거하고 세척할 수 있다.
- [127] 한편, 주입구(311)를 통해 분석 대상 물질 및 신호발생물질과 결합하는 제2 포획물질 챔버(241)에 수용된 제2 포획물질을 주입하면, 상기 제1 포획물질에 결합된 분석 대상 물질과 상기 제2 포획물질이 결합하게 되며, 이후 세척액을 통해 남은 제2 포획물질을 제거하고 세척할 수 있다.
- [128] 다음으로, 주입구(311)를 통해 신호발생물질을 주입하면, 상기 신호발생물질과 상기 제2 포획물질이 결합한다.
- [129] 마지막으로, 주입구(311)를 통해 기질 용액을 주입하여 상기 신호발생물질과 상기 기질 용액이 반응하도록 함으로써, 형광 신호 등 검출 가능한 표시체의 신호를 발생시키게 되고, 주입구(311)로 소수성 용매가 흐르도록 하여, 신호발생물질과 반응하고 남은 기질 용액을 제거하게 된다. 상기 소수성 용매는 오일 또는 기체인 것이 바람직하다.
- [130]
- [131] 도 6은 본 발명의 제2 실시예에 따른 분석칩(301)을 보다 상세하게 도시한 것이다.
- [132] 주입구(311)를 통해 유체시료와 미세입자의 혼합용액, 세척액, 제2 포획물질, 신호발생물질, 및 기질 용액 또는 그 혼합용액이 순차적으로 주입된다. 상기 제2 포획물질은 형광 신호 등 검출 가능한 표시체를 발생시키는 신호발생물질과 분석 대상 물질을 결합하기 위한 포획물질로서, 신호발생물질과 결합되어 제공될 수 있으며, 제2 포획물질과 신호발생물질이 별도로 제공되는 경우보다 절차를 간소화할 수 있다.
- [133] 주입구(311)에 상기 유체시료와 미세입자의 혼합용액, 세척액, 제2 포획물질, 신호발생물질, 및 기질 용액 또는 그 혼합용액이 주입되면, 검출공간(331)으로 확산되어 흐르게 되며, 미세챔버(31)를 흐르게 된다.
- [134] 미세챔버(310)의 크기는 미세입자 지름보다 크고 미세입자 지름의 2배보다는 작은 것이 바람직하다.
- [135]
- [136] 도 7은 본 발명의 제2 실시예에 따른 미세입자, 제1 포획물질, 분석 대상 물질, 및 신호 발생 물질의 결합 형태를 도시한 것이다.
- [137] 도 7(a)를 참조하면, 미세입자(1)에 제1 포획물질(41)이 고정되어 있는 것이 도시되어 있고, 도 7(b)를 참조하면, 제1 포획물질(41)에 분석 대상 물질(51)이 결합

되고, 분석 대상 물질(51)에 제2 포획물질(61)이 결합되어 있으며, 제2 포획물질(61)에 신호 발생 물질(71)이 결합되어 있는 것이 도시되어 있다. 신호 발생 물질(71)에 기질 용액이 반응하면 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호가 발생하게 된다.

[138]

[139] 도 8은 본 발명의 제2 실시예에 따른 검출공간에 배치된 미세챔버에 미세입자가 포획된 상태를 상세히 나타낸 것이다.

[140] 도 8을 참조하면, 미세챔버(31)의 내부공간의 아래에 자성체(15)가 배치되어 자장을 형성하고, 혼합 용액 내의 미세입자(1)의 일례로서, 자성입자를 포획하는 상태를 도시하고 있다.

[141]

[142] 도 9는 본 발명의 제2 실시예에 따라 분석 대상 물질을 검출하는 과정을 개념적으로 도시한 것이다.

[143] 도 9(a)는 제1 포획물질(41)이 고정된 자성입자(1)가 반응챔버(205)에서 유체시료와 혼합되어 반응한 상태에서 주입구(311)로 주입되면, 각 미세챔버(31)에 자성입자(1)가 자성체(15)에 의해 포획된 상태를 도시한 것이다. 자성입자(1)에는 제1 포획물질(41)이 고정되어 있다.

[144] 주입구(311)에서 나오는 혼합 용액이 복수의 미세챔버(31)를 흐르면서 복수의 미세챔버(31) 아래에 배치된 자성체에 의해 각 수용부에 자성입자가 포획된다.

[145] 미세챔버(31)의 크기는 자성입자(1)의 지름보다 크고 자성입자 지름의 2배보다는 작은 것이 바람직하다. 따라서, 미세챔버(31)의 내부공간인 수용부는, 자성입자(1)의 크기보다 크며 1개 이하의 자성입자가 들어갈 수 있는 크기이다.

[146] 미세챔버(31)는 검출공간(331)을 따라 바닥면에 간격을 두고 배열 형성되고, 균일한 분포로 배치되도록 설계될 수 있다.

[147] 본 발명의 일 실시예에서, 미세챔버(31)의 깊이는, $d < h < 2d$ 일 수 있다. 여기서, h = 미세챔버(31)의 깊이이고, d = 미세입자의 직경이다. 미세챔버(31)의 깊이(h)는 미세챔버(31)의 바닥면에서부터 미세챔버(31) 내측 상부 선단까지의 거리이다. 또한, 미세챔버(31)의 폭은, $d < w < 2d$ 일 수 있다. 여기서, w = 미세챔버(30)의 폭이고, d = 미세입자의 직경이다.

[148] 미세챔버(31)의 깊이(h)가 미세입자의 직경(d)보다 작은 경우에는 미세입자 고정 불안하여 검출공간(331)을 따라 흐르는 유체시료의 흐름에 의해 미세입자가 미세챔버(31)에서 빠져나가는 문제가 발생된다. 미세챔버(31)의 깊이(h)가 미세입자의 직경(d)의 두 배를 넘게 되면 두 개 이상의 미세입자가 하나의 챔버에 포획될 확률이 발생하면서 분석 정확도가 하락하는 문제와 미세입자와 검출공간(331)을 세척하기 위한 세척액의 확산이 오래 걸리는 문제가 발생된다.

[149] 또한, 본 발명의 일 실시예에서, 미세챔버(31)은 검출공간(331) 바닥면에서 유체 흐름방향에 대해 수직인 방향으로 형성될 수 있다. 이에, 미세챔버(31)와 유체

의 흐름은 직각으로 배치된다. 따라서, 미세챔버(31)에 삽입된 미세입자가 유체 흐름을 따라 미세챔버(30)에서 쉽게 빠져나오지 못하게 된다.

- [150] 이와 같이, 미세입자는 미세챔버(31) 내에 안정적으로 삽입되어 유체 흐름에 관계없이 검출공간(331) 상에서 균일한 배열 상태를 유지할 수 있게 된다.
- [151] 주입구(311)를 통해 세척액이 주입되면, 제1 포획물질(41)과 분석 대상 물질(51)의 결합 후, 포획되지 않은 분석 대상 물질을 포함한 유체 시료를 제거하고 세척할 수 있다. 자성입자(1)는 자성체에 의해 미세챔버(31)의 각 수용부에 고정되어 있기 때문에 세척되지 않는다.
- [152] 세척액에 의해 미세챔버(31)에 삽입 고정 또는 포획된 자성입자 외에 나머지 물질들은 검출공간(331)에서 제거된다. 세척 과정에서 미세챔버에 삽입 고정 또는 포획된 물질들은 세척액의 흐름 방향에 수직방향으로 깊게 형성된 미세챔버(31)에 삽입되어 있어서, 세척액의 흐름에 의해 미세챔버(31)에서 빠져나가지 않고 고정된 상태를 유지할 수 있다. 이에, 검출공간(331) 내에서 미세챔버(31)에 삽입되어 분석 대상 물질과 결합 고정되지 못한 나머지 물질들만이 세척액의 흐름을 따라 검출공간(331)에서 흘러나가 제거된다.
- [153] 도 9(b)에서 알 수 있는 바와 같이, 주입구(311)를 통해 분석 대상 물질 및 신호 발생물질과 결합하는 제2 포획물질 챔버(241)에 수용된 제2 포획물질(61)을 주입하면, 제1 포획물질(41)에 결합된 분석 대상 물질(51)과 제2 포획물질(61)이 결합하게 되며, 이후 세척액을 통해 남은 제2 포획물질(61)을 제거하고 세척할 수 있다.
- [154] 도 9(c)에서, 주입구(311)를 통해 신호발생물질(71)을 주입하면, 신호발생물질(71)과 제2 포획물질(61)이 결합한다. 이후 남은 신호발생물질(71)은 세척액에 의해 세척되는 것이 바람직하다.
- [155] 도 9(d)에서, 주입구(311)를 통해 기질 용액을 주입하면 신호발생물질(71)과 기질 용액이 반응하여 형광신호 등 검출 가능한 표시제의 신호를 발생시키게 되고, 주입구(311)로 소수성 용매가 흐르도록 하여, 신호발생물질(71)과 반응하고 남은 기질 용액을 제거하게 된다.
- [156] 상기 기관에 소수성 용매가 흐르도록 하여 복수의 미세챔버(31) 외부에 있는 기질 용액을 제거하고, 상기 형광신호 등 검출 가능한 표시제의 신호가 발생한 미세챔버의 숫자를 카운트하여 검출하게 된다. 복수의 미세챔버(31)의 내부는 친수성 용매로 코팅하고, 복수의 미세챔버(30) 외부는 소수성 용매로 코팅하여 기관에 소수성 용매를 흘릴 경우 복수의 미세챔버(31) 외부에 있는 기질용액을 쉽게 제거할 수 있게 된다.
- [157] 보다 정확한 유체시료에 포함된 분석 대상 물질을 검출하기 위해 형광신호 등 검출 가능한 표시제의 신호의 밝기에 대응하는 분석 대상 물질의 입자의 갯수를 대응시키고, 각 미세 챔버의 형광신호 등 검출 가능한 표시제의 신호의 밝기를 고려하여 분석 대상 물질의 입자의 갯수를 카운팅할 수 있다.

- [158] 도 9(d)를 다시 참조하면, 형광신호 등 검출 가능한 표시제의 신호가 발생하는 신호발생물질의 갯수가 각 미세챔버마다 상이하며, 이에 따른 형광신호의 밝기가 다른 것을 확인할 수 있다.
- [159] 따라서, 미세챔버마다 포획된 신호발생물질의 수가 동일할 경우에는 형광 신호가 발생하는 미세챔버의 수를 계산하여 분석 대상 물질의 수를 추론하는 것이 바람직하고, 미세챔버마다 포획된 신호발생물질의 수가 다를 경우에는 형광 신호가 발생하는 미세챔버의 수 뿐만 아니라 미세챔버에서 발생하는 형광 신호의 진하기도 함께 계산하여 분석 대상 물질의 수를 추론하는 것이 바람직하다.
- [160] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 미세입자에 고정된 제1 포획물질과 유체 시료 내 분석 대상물질을 반응 챔버(200) 내에서 반응시키고, 자성장치를 반응 챔버(200)에 근접시켜 상기 미세입자를 유체 시료로부터 분리한 다음, 미세입자와 결합하지 않는 유체 시료를 제거하고 세척할 수 있다.
- [161] 이후, 제1 포획물질에 결합한 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하는 제2 포획물질을 반응 챔버(200)에 주입하고 반응시키고, 제2 포획물질과 특이적으로 결합하는 신호 발생 물질을 반응 챔버(200)에 주입하고 반응시킬 수 있다.
- [162] 다음으로, 상기 신호 발생 물질과 반응하여 신호를 발생시키는 기질 용액을 반응 챔버(205)에 주입하여 혼합하고, 자성체(15)를 이용하여 검출공간(331) 내의 미세 챔버(31)에 상기 혼합된 기질 용액 내의 자성입자를 포획한다.
- [163] 마지막으로, 분석 대상 물질의 입자 검출 장치는 상기 신호 발생 물질과 상기 기질 용액을 혼합으로 인해 신호가 발생한 미세 챔버(31)의 숫자를 카운트하여 검출하는 것이 바람직하다.
- [164]
- [165] 도 10과 도 11은 본 발명의 제2 실시예에 따른 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법의 전체 프로세스가 도시되어 있다.
- [166] 우선, 도 10의 (a)에 도시된 바와 같이, 자성장치 구동부(160)은 자성장치(150)를 이동시켜 반응 챔버(205)에 20분간 접촉시킬 수 있다. 반응챔버(205)에는 일정량의 유체 시료 샘플과 제1 포획물질이 고정된 자성입자를 혼합한 혼합용액(S)을 수용하고 있다.
- [167] 그 결과, 도 10의 (b)에 도시된 바와 같이, 반응 챔버(205)에서는 자성입자(S1)와 잔여 용액(W) 간의 분리가 일어날 수 있다.
- [168] 그 다음, 도 11의 (a)에 도시된 바와 같이, 반응 챔버(205)에서 잔여 용액(W)을 제거하고, 세척액 챔버(231)에 수용된 세척액을 반응 챔버(205)에 주입하여, 자성입자(S1)들이 위치한 반응 챔버(205)의 벽면을 세척할 수 있다. 이후 자성장치 구동부(160)는 자성장치(150)를 다시 이동시켜 자성장치(150)를 반응 챔버(205)에서 이격시킬 수 있다.
- [169] 그 다음, 도 11의 (a)에 도시된 바와 같이, 반응 챔버(205)에는 자성입자(S1)들이 남아있게 되며, 도 11의 (b)에 도시된 바와 같이, 주입구(311)에 주입하기 위해 별도의 버퍼액을 추가한 혼합용액(S2)를 생성하는 것이 바람직하다.

- [170]
- [171] 도 12는 본 발명의 제2 실시예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법의 흐름도이다.
- [172] 1200 단계에서 미세입자에 제1 포획물질을 혼합하여 미세입자에 제1 포획물질이 고정되도록 한다. 상기 제1 포획물질은 항체, 핵산분자, 펩타이드 등을 포함할 수 있다. 상기 미세입자는 자성을 띤 자성입자인 것이 바람직하다.
- [173] 상기 자성입자는 지름 500 nm ~ 10 μ m 사이의 크기를 지니고 있으며, 산화철 등의 자성을 띤 물질을 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명에 일 실시예에 따르면, 상기 혼합은 진동, 초음파, 피펫팅 등의 방법을 사용할 수 있다.
- [174] 1210 단계에서 미세입자에 고정된 제1 포획물질과 유체 시료 내 분석 대상물질을 반응 챔버(200) 내에서 반응시킨다.
- [175] 상기 유체 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 및 뇌척수액 등의 체액을 포함한다.
- [176] 1220 단계에서 자성장치를 반응 챔버(200)에 근접시켜 상기 미세입자를 유체 시료로부터 분리하고, 미세입자와 결합하지 않는 유체 시료를 제거하고 세척한다.
- [177] 상기 미세입자와 결합하지 않는 유체 시료를 제거한 뒤 세척액을 주입하고 상기 미세입자와 혼합한 후, 자성체를 반응 챔버(200)에 근접시켜 자성입자를 세척액으로부터 분리하고, 세척액을 제거함으로써, 미세입자 세척을 수행할 수 있다.
- [178] 1230 단계에서 제1 포획물질에 결합한 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하는 제2 포획물질을 반응 챔버(200)에 주입하고 반응시킨다. 분석 대상 물질과 결합하지 않는 제2 포획물질을 제거하고 세척한다.
- [179] 제2 포획물질이 분석 대상 물질과 결합하고, 미세입자에 고정되어 있는 제1 포획물질 역시 분석 대상 물질과 결합하므로, 제1 포획물질과 제2 포획물질은 분석 대상 물질과 결합하는 부분이 다른 것이 바람직하다.
- [180] 1240 단계에서 제2 포획물질과 특이적으로 결합하는 신호 발생 물질을 반응 챔버(200)에 주입하고 반응시킨다. 제2 포획물질과 결합하지 않는 신호 발생 물질을 제거하고 세척한다. 상기 신호 발생 물질은 예를 들면, 효소가 될 수 있다.
- [181] 상기 신호 발생 물질은 예를 들면 색상원, 형광, 또는 화학 발광의 효소 전구 물질이며 이것은 기질용액과 접촉하면, 검출 가능한 표시제로 변환된다.
- [182] 상기 신호발생물질은, 기질 용액과 반응하여 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호를 발생시키는 역할을 하며, 효소 성분은 β -갈락토시다아제, 서양 호스래디시 페록시다아제, 또는 알칼리 포스파타제를 포함할 수 있다.
- [183] 1230 단계와 1240 단계에서 분석 대상 물질의 입자 검출 장치는 1220 단계와 마찬가지로 방법으로 미세입자를 세척한다.
- [184] 1250 단계에서 분석 대상 물질의 입자 검출 장치는 상기 신호 발생 물질과 반응하여 신호를 발생시키는 기질 용액을 반응 챔버(205)에 주입하여 혼합한다. 반응 챔버(205)에 남아 있는 미세입자를 건조시킨 후 기질 용액과 혼합하는 것이 바람직하다.

- [185] 상기 기질 용액은, 상기 신호발생물질과 반응하여 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호를 발생시키며 Resorufin β -D- galactopyranoside 등을 포함할 수 있다.
- [186] 1260 단계에서 분석 대상 물질의 입자 검출 장치는 상기 혼합된 기질 용액을 주입구(301)에 주입하고, 자성체(15)를 이용하여 검출공간(331) 내의 미세 챔버(31)에 상기 혼합된 기질 용액 내의 자성입자를 포획한다.
- [187] 분석칩(301)의 검출 공간(331)에 배치된 미세챔버(31) 내 물질이 서로 교통하지 않도록 이격하기 위해서 상기 기질 용액과 섞이지 않는 성질을 지닌 유체를 주입할 수 있으며, 상기 유체는 기름 또는 공기 등을 포함하는 것이 바람직하다. 상기 미세 챔버는, 상기 미세입자의 크기보다 크며 1개 이하의 자성입자가 들어갈 수 있는 크기인 것이 바람직하다.
- [188] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 반응챔버(200)에서 미세입자와 제2 포획물질을 반응시키는 대신, 미세입자에 고정된 제1 포획물질이 분석대상물질과 결합한 후, 상기 미세입자를 주입구(311)로 주입하여 각 미세챔버(31)에 미세입자가 포획되도록 할 수 있다.
- [189] 이후 주입구(311)를 통해 분석 대상 물질 및 신호발생물질과 결합하는 제2 포획물질(61)을 주입하면, 제1 포획물질(41)에 결합된 분석 대상 물질(51)과 제2 포획물질(61)이 결합하게 되고, 다음 단계로서, 주입구(311)를 통해 신호발생물질(71)을 주입하면, 신호발생물질(71)과 제2 포획물질(61)이 결합한다.
- [190] 또한, 주입구(311)를 통해 기질 용액을 주입하면 신호발생물질(71)과 기질 용액이 반응하여 형광신호 등 검출 가능한 표시제의 신호를 발생시키게 되고, 주입구(311)로 소수성 용매가 흐르도록 하여, 신호발생물질(71)과 반응하고 남은 기질 용액을 제거할 수 있다.
- [191] 1270 단계에서 분석 대상 물질의 입자 검출 장치는 상기 신호 발생 물질과 상기 기질 용액을 혼합으로 인해 신호가 발생한 미세 챔버(31)의 숫자를 카운트하여 검출한다.
- [192] 일 실시예로서, 상기 자성 입자가 포함된 미세 챔버를 인식하여 카운트한 제1 카운트값과 상기 신호 발생 물질과 상기 기질 용액을 혼합으로 인해 신호가 발생한 미세챔버를 인식하여 카운트한 제2 카운트값을 산출한다.
- [193] 상기 제1 카운트 대비 제2 카운트값의 비율을 계산하여 유체 시료 내 분석 대상 물질의 양을 추정할 수 있다.
- [194] 다른 실시예로서, 현미경 및 디지털 카메라 등을 이용하여 상기 미세 챔버가 다수 포함된 영역을 촬영하고, 상기 자성입자가 들어간 미세 챔버를 영상 처리를 통해 구분하여 그 숫자를 카운트한 제1 카운트값을 산출하고, 상기 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호가 발생하는 미세 챔버를 영상 처리를 통해 구분하여 그 숫자를 카운트한 제2 카운트값을 산출할 수 있다.
- [195] 상기 분석 대상 물질의 입자의 양을 추정하는 일 실시예로서, 상기 자성입자가 들어간 미세 챔버의 숫자 대비 상기 형광 신호가 발생하는 미세 챔버의 숫자의 비율을 계산하여 추정할 수 있으며, 상기 유체 시료 내 분석 대상 물질의 양이 많

을 수록 상기 비율이 높아지고, 분석 대상 물질의 양이 적을수록 상기 비율이 낮아지게 된다.

- [196] 상기 분석 대상 물질의 입자의 양을 추정하는 다른 실시예로서, 카트리지 내 미리 농도를 알고 있는 3개 이상의 표준 물질을 포함하고, 본 발명의 일 실시 예에 따른 분석 대상 물질의 입자검출 장치가 상기 표준 물질에 대해 농도를 나타낸 캘리브레이션 커브를 생성한 다음, 생성된 캘리브레이션 커브를 이용하여 분석 대상 물질의 농도 계산을 보정할 수 있다.
- [197]
- [198] 도 13은 본 발명의 제3 실시 예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치의 구성도이다.
- [199] 도 13(a)는 본 발명의 제3 실시 예에 따른 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치의 평면도이고, 도 13(b)는 본 발명의 제3 실시 예에 따른 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치의 단면도이다.
- [200] 도 13을 참조하면, 본 발명의 제3 실시 예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 장치는 자성장치(152)와 카트리지(102)를 포함하여 구성된다.
- [201] 자성장치(152)는 반응 챔버(206)에 근접하거나 멀어지는 과정을 통해, 반응 챔버(206) 내의 마이크로 웰 미세입자(4)와 잔여 용액 간의 분리가 일어나도록 한다. 이후, 잔여 용액을 제거한 후, 세척액 챔버(232)가 수용하고 있는 세척액을 반응 챔버(206)에 주입하여, 마이크로 웰 미세입자(4)들이 위치한 반응 챔버(206)의 벽면을 세척할 수 있다. 마이크로 웰 미세입자(4)의 하부에는 자성물질이 형성되어 있는 것이 바람직하다.
- [202] 카트리지(102)는 유체시료 챔버(202), 반응 챔버(206), 폐기물 챔버(212), 마이크로 웰 미세입자 챔버(222), 세척액 챔버(232), 제2 포획물질 챔버(242), 신호발생물질 챔버(252), 기질 용액 챔버(262), 및 분석칩(302)을 포함하여 구성된다.
- [203] 카트리지(102)는 복수의 챔버와 분석칩(302)이 오염되는 것을 방지하기 위하여 공기가 투과하지 않는 필름으로 열융착, UV접착, 초음파 용착, 또는 테잎 등을 이용하여 실링되어 있는 것이 바람직하다.
- [204] 유체시료 챔버(202)는 일정량의 유체 시료 샘플을 수용하도록 구성된다. 이러한 유체시료 챔버(202)는 $50\mu\text{l}$ ~ 10mL 범위의 용량을 가지도록 구성될 수 있다. 상기 유체 시료 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 및 뇌척수액 등의 체액을 포함한다.
- [205] 반응 챔버(206)는 일정량의 유체 시료 샘플과 제1 포획물질이 고정된 마이크로 웰 미세입자를 수용하여 혼합하도록 구성된다. 이러한 반응 챔버(206)는 $50\mu\text{l}$ ~ 15mL 범위의 용량을 가지도록 구성될 수 있다.
- [206] 폐기물 챔버(212)는 분석칩(302)에 투입된 유체시료, 마이크로 웰 미세입자, 세척액, 제2 포획물질, 신호발생물질, 및 기질 용액 등이 배출될 때 발생하는 폐기물을 수용하기 위한 수용 공간을 제공하도록 구성된다. 이러한 폐기물 챔버(212)는 1~ 15mL의 용량을 가지도록 구성될 수 있다. 도 13의 폐기물 챔버(212)는 카트

- 리지(102)에 포함되어 있으나, 카트리지 외부의 별도의 공간에 폐기물 챔버(212)가 구비될 수 있다.
- [207] 마이크로 웰 미세입자 챔버(222)는 제1 포획물질이 고정된 마이크로 웰 미세입자를 수용하도록 구성되고, 반응 챔버(206)로 상기 마이크로 웰 미세입자가 주입된다.
- [208] 마이크로 웰 미세입자 챔버(222)에 수용된 마이크로 웰 미세입자는 표면에 분석 대상 물질과 결합하는 제1 포획물질이 결합되어 있는 것이 바람직하다. 상기 제1 포획물질은 항체, 핵산분자, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.
- [209] 세척액 챔버(232)는 반응 챔버(206)의 벽면을 세척하거나 분석칩(302)의 검출공간(332)을 세척하기 위한 세척액을 수용하도록 구성된다. 세척액은 PBS(phosphate buffered saline), TBS(Tris-buffered saline), PBS-T, TBS-T, 또는 초순수 등의 용액일 수 있다.
- [210] 일 실시예로서, 세척액 챔버(232)의 세척액은 주입구(312)에 주입되어 검출공간(332)에 반응 후 남아있는 유체시료, 미세입자, 제2 포획물질, 신호발생물질, 및 기질 용액 등을 세척할 수 있다.
- [211] 다른 실시예로서, 자성장치(152)가 반응 챔버(206)와 근접하게 되어 반응 챔버(206) 내의 마이크로 웰 미세입자와 잔여 용액 간의 분리가 일어나면, 잔여 용액을 제거한 후, 세척액 챔버(232)가 수용하고 있는 세척액을 반응 챔버(206)에 주입하여, 마이크로 웰 미세입자가 위치한 반응 챔버(205)의 벽면을 세척할 수 있다. 이 경우 마이크로 웰 미세입자의 하부에는 자성물질이 형성되어 있는 것이 바람직하다.
- [212] 제2 포획물질 챔버(242)는 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하고, 신호발생물질과 결합하는 제2 포획물질을 수용하도록 구성된다. 상기 제2 포획물질은 분석 대상 물질과 신호발생물질 각각과 특이적으로 결합하는 특성이 있어, 신호발생물질이 분석 대상 물질에 특이적으로 결합한 상기 제2 포획물질에 결합하여 분석 대상 물질의 양에 비례하는 형광신호를 발생하게 하는 역할을 하는 포획물질로서, 예를 들면 2차 항체가 될 수 있으며, 신호발생물질과 미리 결합된 형태로 제공될 수 있다.
- [213] 제2 포획물질이 분석 대상 물질과 결합하고, 마이크로 웰 미세입자에 고정되어 있는 제1 포획물질 역시 분석 대상 물질과 결합하므로, 제1 포획물질과 제2 포획물질은 분석 대상 물질과 결합하는 부분이 다른 것이 바람직하다.
- [214] 신호발생물질 챔버(252)는 분석 대상 물질에 결합된 상기 제2 포획물질과 특이적으로 결합하는 신호발생물질을 수용하도록 구성된다. 상기 신호 발생 물질은 예를 들면, 효소가 될 수 있다.
- [215] 상기 신호 발생 물질은 예를 들면 색상원, 형광, 또는 화학 발광의 효소 전구 물질이며 이것은 기질용액과 접촉하면, 검출 가능한 표시제로 변환된다.
- [216] 상기 신호발생물질과 상기 제2 포획물질은 결합된 상태로 제2 포획물질 챔버(242) 또는 신호발생물질 챔버(252) 중 어느 하나에 수용되어 있을 수 있다.

- [217] 상기 신호발생물질은, 기질 용액과 반응하여 형광 신호 등 검출 가능한 표시제를 발생시키는 역할을 하며, 효소 성분은 β -갈락토시다아제, 서양 호스래디시 페록시다아제, 또는 알칼리 포스파타제를 포함할 수 있다.
- [218] 기질 용액 챔버(262)는 상기 신호 발생 물질과 반응하여 신호를 발생시키는 기질 용액을 수용하도록 구성된다. 상기 기질 용액은, 상기 신호발생물질과 반응하여 형광 신호 등 검출 가능한 표시제를 발생시키며 Resorufin β -D-galactopyranoside 등을 포함할 수 있다.
- [219] 분석칩(302)은 주입구(312) 및 검출 공간(332)을 포함하여 구성된다.
- [220] 반응 챔버(206)에서 일정량의 유체 시료 샘플과 제1 포획물질이 고정된 마이크로 웰 미세입자를 수용하여 혼합하므로, 마이크로 웰 미세입자에 고정된 제1 포획물질에 분석 대상 물질이 결합하게 된다.
- [221] 주입구(312)는 유체시료, 마이크로 웰 미세입자, 세척액, 제2 포획물질, 신호발생물질, 및 기질 용액 또는 혼합용액이 주입된다.
- [222] 주입구(312)는 마이크로 웰 미세입자와 유체시료의 혼합용액에서 마이크로 웰 미세입자보다 큰 입자를 분리하여 공급할 수 있도록 필터를 더 포함할 수 있다. 필터는 생체 세포나 무기 입자 또는 유기 입자 등을 여과할 수 있도록 다양한 크기의 기공이나 다양한 소재로 형성될 수 있다. 본 제3 실시예의 필터는 마이크로 웰 미세입자 보다 큰 입자를 걸러낼 수 있는 기공으로 형성되는 것이 바람직하다. 또한, 필터는 생체 시료에 적용할 수 있도록 생물학적으로 비활성인 소재로 형성될 수 있다.
- [223] 주입구(312)에 유체시료를 공급하는 과정에서, 필터 여과 전에 필터의 출력면을 버퍼액으로 적셔 필터 출력면 미리 습윤시킬 수 있다. 따라서, 필터 입력면으로 공급된 마이크로 웰 미세입자와 유체시료의 혼합용액이 표면저항없이 필터 기공을 통과하여 필터 출력면으로 원활하게 여과될 수 있다.
- [224] 검출공간(332)은 주입구(312)를 통해 마이크로 웰 미세입자와 유체시료의 혼합용액이 주입되면, 검출공간(332) 내의 내부공간에 마이크로 웰 미세입자가 배치된다. 마이크로 웰 미세입자(4)의 아래에 자성체(16)를 배치함으로써, 검출공간(332)의 내부공간에 쉽게 고정할 수 있다.
- [225] 이후, 주입구(312)를 통해 세척액이 주입되면, 검출공간(332)의 내부공간에 고정되지 못한 마이크로 웰 미세입자, 마이크로 웰 미세입자(4)에 고정되지 못한 상기 제1 포획물질, 상기 제1 포획물질과 결합하지 못한 유체시료를 제거하고 세척할 수 있다.
- [226] 한편, 주입구(312)를 통해 분석 대상 물질 및 신호발생물질과 결합하는 제2 포획물질 챔버(242)에 수용된 제2 포획물질을 주입하면, 상기 제1 포획물질에 결합된 분석 대상 물질과 상기 제2 포획물질이 결합하게 되며, 이후 세척액을 통해 남은 제2 포획물질을 제거하고 세척할 수 있다.
- [227] 다음으로, 주입구(312)를 통해 신호발생물질을 주입하면, 상기 신호발생물질과 상기 제2 포획물질이 결합한다.

- [228] 마지막으로, 주입구(312)를 통해 기질 용액을 주입하여 상기 신호발생물질과 상기 기질 용액이 반응하도록 함으로써, 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호를 발생시키게 되고, 주입구(312)로 소수성 용매가 흐르도록 하여, 신호발생물질과 반응하고 남은 기질 용액을 제거하게 된다. 상기 소수성 용매는 오일 또는 기체인 것이 바람직하다.
- [229]
- [230] 도 14는 본 발명의 제3 실시예에 따른 분석칩(302)을 보다 상세하게 도시한 것이다.
- [231] 주입구(312)를 통해 유체시료와 마이크로 웰 미세입자의 혼합용액, 세척액, 제2 포획물질, 신호발생물질, 및 기질 용액 또는 그 혼합용액이 순차적으로 주입된다. 상기 제2 포획물질은 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호를 탐지하기 위한 포획물질로서, 신호발생물질과 결합되어 제공될 수 있으며, 제2 포획물질과 신호발생물질이 별도로 제공되는 경우보다 절차를 간소화할 수 있다.
- [232] 주입구(312)에 상기 유체시료와 마이크로 웰 미세입자(4)의 혼합용액, 세척액, 제2 포획물질, 신호발생물질, 및 기질 용액 또는 그 혼합용액이 주입되면, 검출공간(332)으로 확산되어 흐르게 되며, 검출공간(332)의 일단에 필터(5)가 형성되어 검출공간(332) 내로 마이크로 웰 미세입자(4)들이 모일 수 있도록 한다.
- [233] 도 14에 도시된 바와 같이 마이크로 웰 미세입자(4)는 검출공간(302)에 모여 있게 되며, 마이크로 웰 미세입자(4)의 내부공간에 고정된 제1 포획물질과 유체시료내의 분석대상물질이 결합된 마이크로 웰 미세입자와 결합되지 않은 마이크로 웰 미세입자가 혼재되어 있게 된다.
- [234]
- [235] 도 15는 본 발명의 제3 실시예에 따른 마이크로 웰 미세입자를 보다 상세하게 도시한 것이다.
- [236] 도 15를 참조하면, 마이크로 웰 미세입자(4)는 육각형의 상면을 갖고 있으며, 마이크로 웰 미세입자(4)의 내부공간인 수용부(6)는 일면이 개방되어 있거나, 도넛 형태로 양면이 개방되어 관통한 형태가 될 수 있다.
- [237] 마이크로 웰 미세입자(4)의 수용부(6)는 일면이 막힌 원통형태(도 15(b)) 또는 양면이 열린 원통형태(도 15(c))가 될 수 있다.
- [238] 한편, 마이크로 웰 미세입자(4)의 수용부(6)에는 제1 포획물질이 고정되어 분석대상 물질과 결합할 수 있다.
- [239] 마이크로 웰 미세입자(4)의 내부공간인 수용부(6)와 제1 포획물질은 친수성 용매로 코팅하고, 마이크로 웰 미세입자(4)의 외부공간(7)은 소수성 용매로 코팅하여 기관에 소수성 용매를 흘릴 경우 마이크로 웰 미세입자(4)의 외부공간(7)에 있는 기질 용액을 제거할 수 있게 된다.
- [240] 도 7과 도 15을 비교하면, 도 15는 마이크로 웰 미세입자(4)의 내부공간에 제1 포획물질이 고정되어 있는 반면, 도 7에서는 미세입자에 제1 포획물질이 고정되어 있는 것이 차이점이다.

- [241]
- [242] 도 16은 본 발명의 제3 실시예에 따라 분석 대상 물질을 검출하는 과정을 개념적으로 도시한 것이다.
- [243] 주입구(312)를 통해 유체시료와 마이크로 웰 미세입자(4)의 혼합액, 세척액, 제2 포획물질, 신호 발생 물질, 및 기질 용액 또는 그 혼합용액이 순차적으로 주입된다.
- [244] 도 16(a)는 제1 포획물질(42)이 고정된 마이크로 웰 미세입자(4)가 반응챔버(206)에서 유체시료와 혼합되어 반응한 상태에서 주입구(312)로 주입되면, 각 마이크로 웰 미세입자(4)가 자성체(16)에 의해 배치되어 고정된 상태를 도시한 것이다. 마이크로 웰 미세입자(4)에는 제1 포획물질(42)이 고정되어 분석 대상 물질(52)을 특이적으로 포획한다.
- [245] 유체시료와 마이크로 웰 미세입자(4)의 혼합액은 반응챔버(206)에서 혼합될 수 있다. 마이크로 웰 미세입자(4)의 내부공간은 제1 포획물질이 고정되어 있고, 유체시료 내의 분석 대상 물질이 제1 포획물질과 결합된다.
- [246] 주입구(312)에 상기 유체시료와 마이크로 웰 미세입자(4)의 혼합액이 주입되면, 검출공간(332)으로 확산되어 흐르게 된다. 검출공간(332)을 흐르면서 통과한 유체시료와 마이크로 웰 미세입자(4)의 혼합액이 주입구(312)의 반대편 일단에 형성된 복수의 필터(5)에 의해 가로막히게 되어 검출공간(332)에 모이게 된다.
- [247] 이후, 주입구(312)를 통해 세척액이 주입되면, 상기 제1 포획물질과 상기 분석 대상 물질 간의 결합 또는 상기 제1 포획물질에 의해 포획되지 않은 분석 대상 물질을 포함한 유체 시료를 제거하고 세척할 수 있다.
- [248] 도 16(b)에서 알 수 있는 바와 같이, 주입구(312)를 통해 분석 대상 물질 및 신호 발생물질과 결합하는 제2 포획물질 챔버(242)에 수용된 제2 포획물질(62)을 주입하면, 제1 포획물질(42)에 결합된 분석 대상 물질(52)과 제2 포획물질(62)이 결합하게 되며, 이후 세척액을 통해 남은 제2 포획물질(62)을 제거하고 세척할 수 있다.
- [249] 도 16(c)에서, 주입구(312)를 통해 신호발생물질(72)을 주입하면, 신호발생물질(72)과 제2 포획물질(62)이 결합한다. 이후 남은 신호발생물질(72)은 세척액에 의해 세척되는 것이 바람직하다.
- [250] 도 16(d)에서, 주입구(312)를 통해 기질 용액을 주입하면 신호발생물질(72)과 기질 용액이 반응하여 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호를 발생시키게 되고, 주입구(312)로 소수성 용매가 흐르도록 하여, 신호발생물질(72)과 반응하고 남은 기질 용액을 제거하게 된다.
- [251] 상기 기관에 소수성 용매가 흐르도록 하여 마이크로 웰 미세입자(4) 외부에 있는 기질 용액을 제거하고, 상기 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호가 발생한 마이크로 웰 미세입자(4)의 숫자를 카운트하여 검출하게 된다. 마이크로 웰 미세입자(4)의 내부(6)는 친수성 용매로 코팅하고, 마이크로 웰 미세입자(4) 외부(7)

는 소수성 용매로 코팅하여 기판에 소수성 용매를 흘릴 경우 마이크로 웰 미세입자(4) 외부(7)에 있는 기질용액을 쉽게 제거할 수 있게 된다.

- [252] 보다 정확한 유체시료에 포함된 분석 대상 물질을 검출하기 위해 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호의 밝기에 대응하는 분석 대상 물질의 입자의 갯수를 대응시키고, 각 마이크로 웰 미세입자(4)의 형광신호의 밝기를 고려하여 분석 대상 물질의 입자의 갯수를 카운팅할 수 있다.
- [253] 도 16(d)를 다시 참조하면, 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호가 발생하는 신호발생물질의 갯수가 각 마이크로 웰 미세입자(4)마다 상이하며, 이에 따른 형광신호의 밝기가 다른 것을 확인할 수 있다.
- [254]
- [255] 도 17은 본 발명의 제3 실시예에 따른 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법의 흐름도이다.
- [256] 1700 단계에서 반응챔버(206)에서 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하는 제1 포획물질이 고정된 마이크로 웰 미세입자(4)와 유체 시료를 혼합한다.
- [257] 혼합된 유체시료와 마이크로 웰 미세입자(4)는 주입구(312)로 주입되며, 마이크로 웰 미세입자(4)의 내부공간(6)은 제1 포획물질(42)이 고정되어 있다.
- [258] 1710 단계에서 마이크로 웰 미세입자(4)와 유체시료의 혼합용액을 검출공간(332)에 흘린다. 유체시료 내의 분석 대상 물질(52)이 제1 포획물질(42)과 결합된 상태에서 마이크로 웰 미세입자(4)가 검출공간(332)을 흐르게 된다.
- [259] 1720 단계에서 제1 포획물질(42)과 분석 대상 물질(52)의 결합 후 남은 유체 시료를 제거하고 세척한다.
- [260] 1730 단계에서 분석 대상 물질(52)과 특이적으로 결합하고, 신호발생물질(72)과 결합하는 제2 포획물질(62)을 마이크로 웰 미세입자(4)에 흐르도록 하여 분석 대상 물질(52)과 제2 포획물질(62)을 반응시킨다.
- [261] 1740 단계에서 분석 대상 물질(52)과 제2 포획물질(62)을 반응시키고 남은 제2 포획물질(62)을 제거하고 세척한다.
- [262] 1750 단계에서 신호발생물질(72)을 마이크로 웰 미세입자(4)에 흐르도록 하여, 제2 포획물질(62)과 결합하도록 한다.
- [263] 1760 단계에서 신호발생물질(72)과 반응하여 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호를 발생시키는 기질 용액을 마이크로 웰 미세입자(4)에 흐르도록 한다.
- [264] 1770 단계에서 마이크로 웰 미세입자(4)에 소수성 용매가 흐르도록 하여 마이크로 웰 미세입자(4) 내부에 신호발생물질(72)과 기질 용액이 결합된 채, 마이크로 웰 미세입자(4) 외부에 있는 기질 용액을 제거한다.
- [265] 마이크로 웰 미세입자(4)의 내부(6)는 친수성이고, 마이크로 웰 미세입자(4)의 외부(7)는 소수성인 것이 바람직하다.
- [266] 1780 단계에서 상기 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호가 발생한 마이크로 웰 미세입자(4)의 숫자를 카운트하여 검출한다.

- [267] 일 실시예로서, 상기 마이크로 웰 미세입자(4)를 인식하여 카운트한 제1 카운트값과 상기 신호 발생 물질과 상기 기질 용액을 혼합으로 인해 신호가 발생한 마이크로 웰 미세입자(4)를 인식하여 카운트한 제2 카운트값을 산출한다.
- [268] 상기 제1 카운트 대비 제2 카운트값의 비율을 계산하여 유체 시료 내 분석 대상 물질의 양을 추정할 수 있다.
- [269] 다른 실시예로서, 현미경 및 디지털 카메라 등을 이용하여 상기 마이크로 웰 미세입자(4)가 포함된 영역을 촬영하고, 마이크로 웰 미세입자(4)를 영상 처리를 통해 구분하여 그 숫자를 카운트한 제1 카운트값을 산출하고, 상기 형광 신호가 발생하는 마이크로 웰 미세입자(4)를 영상 처리를 통해 구분하여 그 숫자를 카운트한 제2 카운트값을 산출할 수 있다.
- [270] 상기 분석 대상 물질의 입자의 양을 추정하는 일 실시예로서, 상기 전체 마이크로 웰 미세입자(4)의 숫자 대비 상기 형광 신호 등 검출 가능한 표시제의 신호가 발생하는 미세 챔버(4)의 숫자의 비율을 계산하여 추정할 수 있으며, 상기 유체 시료 내 분석 대상 물질의 양이 많을수록 상기 비율이 높아지고, 분석 대상 물질의 양이 적을수록 상기 비율이 낮아지게 된다.
- [271] 상기 분석 대상 물질의 입자의 양을 추정하는 다른 실시예로서, 카트리지 내 미리 농도를 알고 있는 3개 이상의 표준 물질을 포함하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 분석 대상 물질의 입자검출 장치가 상기 표준 물질에 대해 농도를 나타낸 캘리브레이션 커브를 생성한 다음, 생성된 캘리브레이션 커브를 이용하여 분석 대상 물질의 농도 계산을 보정할 수 있다.
- [272]
- [273] 도 18은 본 발명의 제2 실시예에 따른 미세입자가 들어간 미세 챔버와 형광 신호가 발생하는 미세 챔버가 나타난 도면이다.
- [274] 분석 대상 물질이 결합되지 않은 미세입자가 들어간 미세 챔버는 어두운 셀이고, 형광 신호가 발생하는 미세 챔버는 밝은 셀로 표현된다.
- [275] 분석 대상 물질이 결합되지 않은 미세입자가 들어간 미세 챔버의 숫자와 상기 형광 신호가 발생하는 미세 챔버의 숫자의 비를 계산하기 위해서 셀 갯수를 세는 것 대신 밝은 셀들을 모은 후, 밝은 셀 영역의 면적을 산출하거나 어두운 셀을 모은 후 어두운 셀 영역의 면적을 산출함으로써, 상기 제1 카운트 대비 제2 카운트값의 비율을 계산하여 유체 시료 내 분석 대상물질의 양을 추정할 수 있다.
- [276]
- [277] 제1 포획물질로서 항체로 코팅된 미세한 비드(작은 구슬과 같은 단백질)가 본 발명의 제2 실시예에 따른 미세입자인 경우, 제1 포획물질이 분석 대상 물질을 포획하여 혈청 또는 혈장 샘플에서 원하는 단백질(분석 대상 물질)에 결합된 제2 포획 물질 및 상기 제2 포획 물질에 결합된 효소(신호 발생 물질)에 의해 신호가 발생하는 비드를 "on"비드라고 할 수 있다.

- [278] 본 발명의 제2 실시예에 따라 분석 대상 물질의 농도를 결정하는 경우, 디지털 및 아날로그 분석 체계를 사용하여 효소의 농도(AEB)를 결정하며, 농도는 "on" 비드 (활성화 단백질)의 숫자로 결정되는 것이 바람직하다.
- [279] 혈청 또는 혈장 샘플에서 원하는 단백질(분석 대상 물질)의 농도는 효소(신호 발생 물질)와 비드(미세입자)의 비율이 낮을 때 또는 효소에 의해 신호가 발생하는 비드가 없을 때 포아송 분포를 사용하여 활성 비드의 비율을 효소의 농도(AEB)로 변환하는 방식으로 구할 수 있다.
- [280] 포아송 분포는 평균 사건 수가 알려진 경우 여러 사건이 발생할 가능성을 설명할 수 있다. 만약 예상되는 평균 발생 횟수가 μ 라면 정확한 v 가 발생할 확률은 다음의 수학적 식 1과 같이 나타낼 수 있다(v 는 음이 아닌 정수, $v=0, 1, 2, 3, \dots$)
- [281] [수식1]
- $$P_{\mu}(v) = e^{-\mu} \left(\frac{\mu^v}{v!} \right)$$
- [282] μ 는 비드와 결합된 단백질의 비율과 같고, v 는 비드의 각 하위 집단 (즉, 0, 1, 2, 3 등)이 운반하는 효소 표지 단백질의 수와 같다.
- [283] 본 발명의 제2 실시예에 따르면, 효소의 농도(AEB)와 동일한 μ 를 결정하고 이를 정량적 매개변수로 사용하여 단백질 농도를 결정할 수 있다.
- [284] 하나의 효소와 관련된 비드는 두 개의 효소와 관련된 비드와 구별할 수 없으며, 여기서 하나의 효소와 관련된 비드 집단은 활성화 단계에서 최대 7배의 분포를 갖는 것으로 나타난다. 이러한 광범위한 분포로 인해 $v=0$ 일때 "off" 비드 (비활성화 단백질)의 일부를 확인할 수 있다($P_{\mu}(0)$).
- [285] 수학적 식 1을 사용하여 $P_{\mu}(0)$ 를 결정하고, "off" 비드의 비율이 "on" 비드의 비율을 1에서 뺀 것과 동일하다는 사실을 사용하면, f_{on} ("on"비드의 비율 또는 % 활성)으로부터 $AEB_{digital}$ (디지털로 결정된 AEB)을 결정할 수 있다.
- [286] [수식2]
- $$\mu = AEB_{digital} = -\ln[1 - f_{on}]$$
- [287] 상기 수학적 식 2를 통해 혈장 샘플의 단백질(분석 대상 물질) 농도를 정확하게 측정할 수 있다.
- [288] 포아송 분포를 사용한 농도 정량화는 활성화 비드가 70% 미만에서 잘 측정되지만 활성화 비드의 비율이 약 70%를 초과하면 농도에 따른 AEB의 변화가 감소하여 농도 측정의 부정확성이 커진다는 한계가 있다.
- [289] 이를 극복하기 위해 AEB는 활성화 비드의 평균 형광 강도 값(I_{bead})과 단일 효소(

$$\frac{I_{single}}{I_{single}}$$

)에 의해 생성된 평균 형광 강도로부터 결정될 수 있다. 아날로그 범위 (AEB_{analog})에 있는 배열의 AEB는 수학식 3과 같이 정의된다.

[290] [수식3]

$$AEB_{analog} = \frac{f_{on} \times I_{bead}}{I_{single}}$$

[291]

$$\frac{I_{single}}{I_{single}}$$

의 형광 강도를 결정하기 위해 활성화 비드의 비율에서 수학식 2 및 수학식 3의 AEB 값을 동일하게 하는 것이 바람직하다.

[292] [수식4]

$$\frac{I_{single}}{I_{single}} = \frac{f_{on} \times I_{bead}}{-\ln[1-f_{on}]}, \text{ in arrays where } f_{on} < 0.1$$

[293] 이때, 수학식 4의 기준을 만족하는 "on" 비드 < 0.1의 배열을 선택하는 것이 바람직하다.

[294] 따라서, 효소의 농도(AEB)는 디지털 및 아날로그 범위 모두에 대해 구성될 수 있다.

[295] 도 19는 인산화 타우 181의 농도(pg/mL)와 신호(a.u.)의 관계를 나타내는 그래프이다.

[296] 인산화 타우 181 단백질은 알츠하이머 진단에 사용되는 단백질로서, 본 발명의 분석 대상 물질에 대응하는 단백질이다.

[297] 상기 인산화 타우 181 단백질에 제2 포획물질이 결합하고, 상기 제2 포획물질에 효소(신호발생물질)가 결합한 후, 기질 용액에 의해 신호가 발생하게 되는데 도 19는 인산화 타우 181 단백질의 농도의 신호발생강도의 관계를 나타낸 것이다.

[298] 도 19를 참조하면, 인산화 타우 181 단백질의 농도와 신호발생강도는 비례하는 것을 확인할 수 있다.

[299]

[300] 이상과 같이 본 발명에서는 구체적인 구성 요소 등과 같은 특정 사항들과 한정된 실시 예 및 도면에 의해 설명되었으나 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐, 본 발명은 상기의 실시 예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상적인 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다.

- [301] 따라서, 본 발명의 사상은 설명된 실시 예에 국한되어 정해져서는 아니되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등하거나 등가적 변형이 있는 모든 것들은 본 발명 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 표면에 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하는 제1 포획물질이 고정된 미세챔버 배열이 형성된 기판에 상기 분석 대상 물질을 포함하는 유체 시료를 흐르도록 하는 단계;
상기 미세챔버 배열의 각 미세챔버 내의 상기 제1 포획물질에 상기 분석 대상 물질이 결합하는 단계;
상기 분석 대상 물질과 특이적으로 결합하고, 신호발생물질과 결합하는 제2 포획물질을 상기 기판에 흐르도록 하여 상기 분석 대상 물질과 상기 제2 포획물질을 반응시키는 단계;
상기 신호발생물질을 상기 기판에 흐르도록 하여, 상기 제2 포획물질과 결합하도록 하는 단계;
상기 신호발생물질과 반응하여 형광신호를 발생시키는 기질 용액을 상기 기판에 흐르도록 하는 단계;
상기 기판에 소수성 용매가 흐르도록 하여 상기 미세챔버 내부에 상기 신호발생물질과 기질 용액이 반응하면, 상기 미세챔버 외부에 있는 기질 용액을 제거하는 단계; 및
상기 형광신호가 발생한 미세챔버의 숫자를 카운트하여 검출하는 단계를 포함하는 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질을 검출하기 위한 방법.
- [청구항 2] 제1 항에 있어서,
상기 미세챔버의 내부는 제1 포획물질이 고정된 친수성이고, 상기 미세챔버의 외부는 소수성인 것을 특징으로 하는 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질을 검출하기 위한 방법.
- [청구항 3] 제1 항에 있어서,
상기 미세 챔버를 카운트한 제1 카운트값과 상기 신호 발생 물질과 상기 기질 용액을 혼합으로 인해 신호가 발생한 미세챔버를 인식하여 카운트한 제2 카운트값을 산출하고, 상기 제1 카운값 대비 제2 카운트값의 비율을 계산하여 유체 시료 내 분석 대상물질의 양을 추정하는 것을 특징으로 하는 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법.
- [청구항 4] 제1 항에 있어서,
미리 농도를 알고 있는 유체 시료의 표준 물질에 대한 농도를 나타낸 캘리브레이션 커브를 생성한 다음, 상기 생성된 캘리브레이션 커브를 이용하여 상기 분석 대상 물질의 농도 계산을 보정하는 것을 특징으로 하는 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법.
- [청구항 5] 제1 항에 있어서,

상기 미세 챔버를 카운트한 제1 카운트값과 상기 미세 챔버 영역을 촬영하고, 상기 형광 신호가 발생하는 미세 챔버를 영상 처리를 통해 구분하여 그 숫자를 카운트한 제2 카운트값을 산출하여 유체 시료 내 분석 대상물질의 양을 추정하는 것을 특징으로 하는 유체 시료 내에 극미량으로 존재하는 분석 대상 물질의 입자를 검출하기 위한 방법.