



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월04일
(11) 등록번호 10-1516485
(24) 등록일자 2015년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) GOIN 33/48 (2006.01)
GOIN 33/563 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0111769
(22) 출원일자 2013년09월17일
심사청구일자 2013년09월17일
(65) 공개번호 10-2015-0031930
(43) 공개일자 2015년03월25일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110094475 A*
KR1020120132591 A
Electrospun TiO₂ Nanofiber-Based Cell
Capture Assay for Detecting Circulating Tumor
Cells from Colorectal and Gastric Cancer
Patients (Adv. Mater. (2012), Vol. 24, pp
2756-2760.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
조윤경
울산 울주군 범서읍 대리로 15-17, 703동 305호
(우미린2차아파트)
이원석
인천 부평구 영성동로18번길 20, 204동 1404호 (삼산동, 서해그랑블)
비자야썬카라
울산 울주군 언양읍 유니스트길 50, 402-202 (울산과학기술대학교)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 김승오

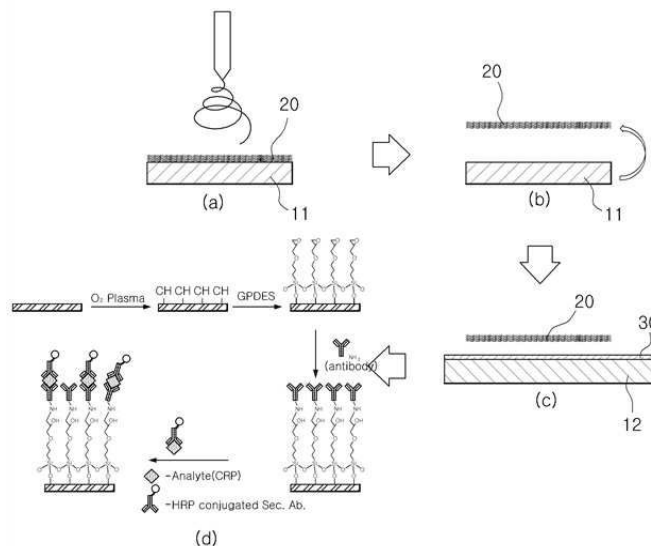
(54) 발명의 명칭 나노섬유를 이용한 면역검사방법

(57) 요약

본 발명은, 항원 항체 반응을 이용한 면역검사방법에 있어서, 전기방사를 통하여 제조된 나노섬유시트를 적용하여 면역검사를 수행하는 나노섬유를 이용한 면역검사방법을 제공한다.

따라서 전기방사에 의해 제조되는 나노섬유는 짧은 시간동안 매우 많은 나노섬유들이 생성되고, 또한 표면에 항(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



원-항체를 고정시키기 위한 복잡한 화학적 반응(chemical reaction)이 필요하지 않으며, 3D구조의 넓은 표면적(surface area)을 갖고 있을 뿐만 아니라, 자유롭게 나노섬유의 직경(diameter)을 조절할 수 있음은 물론 매우 길게 뽑아낼 수 있기 때문에, 공정이 간단하여 제조가 용이하고, 면역검사에 대응되도록 용이하게 직경 및 밀도를 조절할 수 있어 맞춤형 디바이스(Device)제작이 용이하며, 나노섬유는 시트(sheet)형태로 얻어지기 때문에 쉽게 다른 기판으로의 전이 또는 쉽게 원하는 크기로 잘라낼 수 있어 자유롭게 원하는 디바이스 플랫폼에 집적 가능하고, 면역검사 시 매우 높은 감응비를 얻을 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013R1A2A2A05004314
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	후속연구지원(개인)
연구과제명	혈액으로부터 병원균 유전자 검출 전과정이 일체화된 Lab-on-a-disc 개발
기여율	1/2
주관기관	국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단
연구기간	2013.05.01 ~ 2014.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A121994
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	암조기 진단을 위한 혈액순환종양세포 기반 분자진단 칩 개발
기여율	1/2
주관기관	국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단
연구기간	2012.12.01 ~ 2013.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

항원 항체 반응을 이용한 면역검사방법에 있어서,
 전기방사를 통하여 제조된 나노섬유시트를 적용하여 면역검사를 수행하며,
 상기 나노섬유시트는, TiO₂(타이타늄 다이옥사이드) 나노섬유시트이고,
 상기 TiO₂ 나노섬유시트는,
 합성된 TiO₂/PVP 전구체 용액을 실린지에 넣고 일정 전기장 하에서 균일한 속도로 밀어내어 TiO₂/PVP 나노섬유를 뽑아내는 단계; 및
 뽑아낸 상기 TiO₂/PVP 나노섬유를 기관 상에 증착시키는 단계를 포함하며,
 상기 나노섬유시트를 표면 개질하는 단계를 더 포함하고,
 상기 표면 개질하는 방법은,
 산소플라즈마(Oxygen plasma) 처리를 실시하는 단계와,
 에탄올에 들어있는 GPDES((3-glycidoxypropyl)methyldiethoxysilane)에 상기 TiO₂ 나노섬유시트를 담그는 단계와,
 상기 TiO₂ 나노섬유시트를 꺼내어 세정한 뒤 베이킹(Baking)하는 단계와,
 베이킹(Baking) 후 에탄올 용액에 담근 후 초음파처리(sonication)하는 단계와,
 세정 후 건조하는 단계와,
 진공상태에서 건조시키는 단계를 포함하는 나노섬유를 이용한 면역검사 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서,
 상기 TiO₂ 나노섬유시트는,
 합성된 TiO₂/PVP 전구체 용액을 실린지에 넣고 일정 전기장 하에서 균일한 속도로 밀어내어 TiO₂/PVP 나노섬유를 뽑아내는 단계;
 뽑아낸 상기 TiO₂/PVP 나노섬유를 기관 상에 증착시키는 단계; 및
 열분해 공정을 수행하는 단계를 포함하여 형성하는 나노섬유를 이용한 면역검사 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

청구항 1에 있어서,
 표면 개질 후 상기 나노섬유시트 상에 항체를 고정하는 항체고정단계를 더 포함하며,
 상기 항체고정단계는,
 완충용액을 통해 상기 나노섬유시트 상에 코팅할 항체의 농도를 희석시키는 단계와,
 상기 완충용액을 상기 나노섬유시트에 디스펜싱(dispensing)하는 단계와,
 상기 나노섬유시트가 접촉된 기판을 가습챔버 안에 넣어 인큐베이팅(incubating)하는 단계와,
 상기 기판을 세정 후 완충용액에서 인큐베이팅하는 단계를 포함하는 나노섬유를 이용한 면역검사 방법.

청구항 7

청구항 1 또는 청구항 4 또는 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,
 상기 나노섬유시트는 고분자층을 통하여 기판에 집적되며,
 상기 고분자층에 상기 나노섬유시트를 집적하는 방법은,
 기판의 상면에 고분자층을 형성하는 단계와,
 상기 고분자층을 프리 큐어링(Pre-curing)하는 단계와,
 상기 고분자층의 상면에 상기 나노섬유시트를 집적하는 단계와,
 상기 고분자층과 상기 나노섬유시트가 서로 고정되도록 메인 큐어링(Main-curing)하는 단계를 포함하는 나노섬유를 이용한 면역검사 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서,
 상기 고분자층은,
 고분자용액과 경화제를 10 : 1의 중량비로 혼합하고, 상기 고분자용액과 상기 경화제가 혼합된 혼합액을 상기 기판의 상면에 5 μ m 내지 100 μ m의 두께가 되도록 스핀 코팅하여 제조되는 나노섬유를 이용한 면역검사 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서,
 상기 고분자층을 프리 큐어링(Pre-curing)하는 단계는,
 상기 고분자층을 60 $^{\circ}$ C 내지 70 $^{\circ}$ C도에서 9분 내지 11분 동안 경화하는 나노섬유를 이용한 면역검사 방법.

청구항 10

청구항 7에 있어서,
 상기 고분자층과 상기 나노섬유시트가 서로 고정되도록 메인 큐어링(Main-curing)하는 단계는,
 상기 고분자층과 상기 나노섬유시트를 60 $^{\circ}$ C 내지 70 $^{\circ}$ C에서 210분 내지 270분 동안 경화하거나,
 또는 상기 고분자층과 상기 나노섬유시트를 75 $^{\circ}$ C 내지 85 $^{\circ}$ C에서 30분 내지 90분 동안 경화하는 나노섬유를 이용

한 면역검사 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노섬유를 이용한 면역검사방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 높은 표면적을 갖는 나노섬유를 이용하여 높은 감응비를 갖는 나노섬유를 이용한 면역검사방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 면역검사(Immunoassay)는 96-well plate 등 플라스틱 기판을 사용하지만, 나노물질을 사용하면 높은 표면적으로 인하여 매우 높은 감응비(Sensitivity)를 가지게 되어 적은 양의 분석물질(Alyte)도 검출할 수 있는 뛰어난 능력을 갖게 된다. 나노 물질 중에 티타늄옥사이드 (TiO₂)는 항체(Antibody)를 고정화(Immobilization)시키는 표면 개질(Surface modification)이 쉽다는 장점과, 생체 적합성(Biocompatibility), 광화학 안정성(Photochemical stability), 그리고 단백질 변성을 일으키지 않는(Negligible protein denaturation) 장점을 가지고 있을 뿐만 아니라, 제작이 용이하고 제조비용을 저감(Easy and low-cost fabrication)시킬 수 있으며, 재활용 효과(Self-recycling effect ;reusable)을 가지고 있다.

[0003] 한편, 전기방사(Electrospinning)방법으로 제작되는 나노섬유(Nanofiber)들은 평균 100nm의 직경(Diameter)을 가지며, 섬유(Fiber)들이 매우 밀집하여 덩굴모양의 형태를 이루고 있는 구조를 가지고 있기 때문에, 매우 높은 표면적(Surface area)을 갖는다. 이러한 전기방사를 이용한 나노섬유의 제조기술에 대하여 대한민국공개특허 제 10-2012-0117912호에는 전기방사 장치 및 이로부터 제조된 나노섬유가 개시된 바 있다. 따라서 상기한 TiO₂를 나노섬유로 제작하여 면역검사를 수행하면 높은 표면적으로 인하여 상당히 높은 감응비를 얻을 수 있다.

[0004] 그런데, 상기한 TiO₂ 나노섬유는 하소 (Calcination) 공정 후에 매우 쉽게 부서지기(Brittle) 때문에, 핸들링 하기가 매우 어려운 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은, TiO₂ 나노섬유가 안정적으로 집적되도록 하여 공정 시 핸들링을 용이하게 하고, 높은 감응비를 얻을 수 있는 나노섬유를 이용한 면역검사방법을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은, 항원 항체 반응을 이용한 면역검사방법에 있어서, 전기방사를 통하여 제조된 나노섬유시트를 적용하여 면역검사를 수행하는 나노섬유를 이용한 면역검사방법을 제공한다.

[0007] 여기서, 상기 나노섬유시트는, TiO₂(타이타늄 다이옥사이드) 나노섬유시트인 나노섬유를 이용하는 것이 바람직하며, 상기 TiO₂ 나노섬유시트는, 합성된 TiO₂/PVP 전구체 용액을 실린지에 넣고 일정 전기장 하에서 균일한 속도로 밀어내어 TiO₂/PVP 나노섬유를 뽑아내는 단계; 및 뽑아낸 상기 나노섬유를 기판 상에 증착시키는 단계, 열분해 공정을 통해 TiO₂나노섬유시트를 얻는 단계를 포함하며, 상기 나노섬유시트를 표면 개질하는 단계를 더 포함한다.

[0008] 여기서, 상기 표면 개질하는 방법은, 산소플라즈마(Oxygen plasma) 처리를 실시하는 단계와, 에탄올에 들어있는 GPDES ((3-glycidoxypropyl)methyldiethoxysilane)에 상기 TiO₂ 나노섬유시트를 담그는 단계와, 상기 TiO₂ 나노섬유시트를 꺼내어 세정한 뒤 베이킹(Baking)하는 단계와, 베이킹(Baking) 후 에탄올 용액에 담근 후 초음파 처리(sonication)하는 단계와, 세정 후 건조하는 단계와, 진공상태에서 건조시키는 단계와, 표면 개질 후 상기 나노섬유시트 상에 항체를 고정하는 항체고정단계를 더 포함한다.

[0009] 여기서, 상기 항체 고정 단계는, 완충용액(Buffer solution)을 통해 상기 나노섬유시트 상에 코팅할 항체

(Antibody)의 농도(Concentration)를 희석(Dilution) 시키는 단계와, 상기 완충용액을 상기 나노섬유시트에 디스펜싱(Dispensing)하는 단계와, 상기 나노섬유시트가 접촉된 기판을 가습챔버 안에 넣어 인큐베이팅(Incubating)하는 단계와, 상기 기판을 세정 후 완충용액에서 인큐베이팅하는 단계를 포함한다.

[0010] 한편, 상기 나노섬유시트는 고분자층을 통하여 기판에 집적되며, 상기 고분자층에 상기 나노섬유시트를 집적하는 방법은, 기판의 상면에 고분자층을 형성하는 단계; 상기 고분자층을 프리 큐어링(Pre-curing)하는 단계; 상기 고분자층의 상면에 상기 나노섬유시트를 접촉하는 단계; 및 상기 고분자층과 상기 나노섬유시트가 서로 고정되도록 메인 큐어링(Main-curing)하는 단계를 포함한다.

[0011] 여기서, 상기 고분자층은, 고분자용액과 경화제를 10 : 1의 중량비로 혼합하고, 상기 고분자용액과 상기 경화제가 혼합된 혼합액을 상기 기판의 상면에 15 μ m 내지 25 μ m의 두께가 되도록 스핀 코팅하여 제조될 수 있다.

[0012] 또한, 상기 고분자층을 프리 큐어링(Pre-curing)하는 단계는, 상기 고분자층을 60 $^{\circ}$ C 내지 70 $^{\circ}$ C도에서 9분 내지 11분 동안 경화하는 것이 바람직하다.

[0013] 또한, 상기 고분자층과 상기 나노섬유시트가 서로 고정되도록 메인 큐어링(Main-curing)하는 단계는, 상기 고분자층과 상기 나노섬유시트를 60 $^{\circ}$ C 내지 70 $^{\circ}$ C에서 210분 내지 270분 동안 경화하거나, 또는 상기 고분자층과 상기 나노섬유시트를 75 $^{\circ}$ C 내지 85 $^{\circ}$ C에서 30분 내지 90분 동안 경화하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 나노섬유를 이용한 면역검사방법은 다음과 같은 효과를 제공한다.

[0015] 첫째, 전기방사에 의해 제조되는 나노섬유는 짧은 시간동안 매우 많은 나노섬유들이 생성되고, 또한 표면에 항원-항체를 고정시키기 위한 복잡한 화학적 반응(Chemical reaction)이 필요하지 않으며, 3D구조의 넓은 표면적(Surface area)을 갖고 있을 뿐만 아니라, 자유롭게 나노섬유의 직경(Diameter)을 조절할 수 있음은 물론 매우 길게 뽑아낼 수 있기 때문에, 공정이 간단하여 제조가 용이하고, 면역검사에 대응되도록 용이하게 직경 및 밀도를 조절할 수 있어 맞춤형 디바이스(Device)제작이 용이하다.

[0016] 둘째, 기판(bottom substrate)에 씨드(Seed)를 깔거나 박막필름(Thin film)을 스핀-코팅(Spin-coating)하는 과정을 거쳐 제조되기 때문에, 기판과 강한 접착력을 갖게 되어 다른 디바이스 플랫폼으로의 전이(Transfer)가 불가능했던 나노와이어와 나노튜브와는 달리, 나노섬유는 시트(Sheet)형태로 얻어지기 때문에 쉽게 다른 기판으로의 전이 또는 쉽게 원하는 크기로 잘라낼 수 있어 자유롭게 원하는 디바이스 플랫폼에 집적이 가능하다.

[0017] 셋째, TiO₂ 나노섬유시트(TiO₂ nanofiber mats)를 이용하기 때문에, 면역검사 시 매우 높은 감응비를 얻을 수 있다.

[0018] 넷째, PDMS를 이용한 고분자층을 통하여 면역검사 시 TiO₂ 나노섬유시트를 안정적인 상태로 유지할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 나노섬유를 이용한 면역검사방법을 개략적으로 나타내는 구성도이다.

도 2는 도 1의 나노섬유의 표면을 나타내는 확대사진이다.

도 3은 도 1의 고분자층과 나노섬유시트의 구조를 나타내는 SEM사진이다.

도 4 및 도 5는 도 1의 나노섬유를 이용한 면역검사방법의 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[0021] 본 발명의 실시예에 따른 나노섬유를 이용한 면역검사방법은, 전기방사를 통하여 제조된 나노섬유시트를 적용하여 면역검사를 수행하며, 상기 나노섬유시트는, TiO₂(타이타늄 다이옥사이드) 나노섬유시트를 적용한다.

- [0022] 여기서, 상기 TiO₂ 나노섬유시트는, 전기방사를 통하여 제조되며, 상세하게는 합성된 TiO₂/PVP 전구체 용액을 실린지에 넣고 일정 전기장 하에서 균일한 속도로 밀어내어 TiO₂/PVP 나노섬유를 뽑아내고, 이렇게 뽑아낸 상기 나노섬유를 기판 상에 증착시켜 제조한 후 열분해 공정을 통하여 TiO₂ 나노섬유시트를 제작한다..
- [0023] 그런 다음, 상기 나노섬유시트를 표면 개질하는 단계를 거치는데, 이때 상기 표면 개질하는 방법은, 산소플라즈마(Oxygen plasma) 처리를 실시하는 단계와, 에탄올에 들어있는 GPDES에 상기 TiO₂ 나노섬유시트를 담그는 단계와, 상기 TiO₂ 나노섬유시트를 꺼내어 세정한 뒤 베이킹(Baking)하는 단계와, 베이킹(Baking) 후 에탄올 용액에 담근 후 초음파처리(sonication)하는 단계와, 세정 후 건조하는 단계와, 진공상태에서 건조시키는 단계를 포함하여 실시한다.
- [0024] 상기한 바와 같이 표면 개질을 실시한 후에는 상기 나노섬유시트 상에 항체를 고정한다. 상기 나노섬유시트 상에 항체를 고정하는 과정은, 완충용액(Buffer solution)을 통해 상기 나노섬유시트 상에 코팅할 항체(antibody)의 농도(Concentration)를 희석(Dilution)시키는 단계와, 상기 완충용액을 상기 나노섬유시트에 디스펜싱(dispensing)하는 단계와, 상기 나노섬유시트가 접착된 기판을 가슴챔버 안에 넣어 인큐베이팅(Incubating)하는 단계와, 상기 기판을 세정 후 완충용액에서 인큐베이팅하는 단계를 포함한다.
- [0025] 한편, 상기 나노섬유시트는 면역검사 공정 시 부서지는 것을 방지하기 위하여, 기판에 안정적으로 고정되도록 집적시켰으며, 이하에서는 상기 고분자층에 상기 나노섬유시트를 집적하는 방법에 대하여 살펴보기로 한다.
- [0026] 상기 고분자층에 상기 나노섬유시트를 집적하는 방법은, 기판의 상면에 고분자층을 형성하는 단계와, 상기 고분자층을 프리 큐어링(Pre-curing)하는 단계와, 상기 고분자층의 상면에 상기 나노섬유시트를 접착하는 단계 및 상기 고분자층과 상기 나노섬유시트가 서로 고정되도록 메인 큐어링(Main-curing)하는 단계를 포함한다.
- [0027] 여기서, 상기 고분자층은, 고분자용액과 경화제를 10 : 1의 중량비로 혼합하고, 상기 고분자용액과 상기 경화제가 혼합된 혼합액을 상기 기판의 상면에 15 μ m 내지 25 μ m의 두께가 되도록 2500rpm 내지 3500rpm으로 40초 내지 80초 동안 스핀 코팅하여 제조한다. 이때, 상기 혼합액은 스핀 코팅하기 전 데시케이터 챔버 내에서 진공상태로 일정시간동안 보관하여 기포를 없애도록 하는 것이 바람직하다.
- [0028] 상기 고분자용액은 PDMS(Polydimethylsiloxane)용액, 폴리마이드(Polyimide)용액 및 폴리카보네이트(Polycarbonate)용액 등 다양하게 적용 가능하며, 상기 경화제는 상기한 목적을 달성할 수 있다면 공지의 다양한 경화제를 적용할 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 기판은 실리콘기판(Silicon substrate)을 비롯하여, 폴리머기판(Polymer substrate), 유리기판(Glass substrate) 등 집적하고자하는 디바이스 기판 어느 것이든 다양하게 적용할 수 있다.
- [0030] 상기 고분자층을 프리 큐어링(Pre-curing)하는 단계는, 상기한 상태에서 상기 고분자층을 오븐에서 60 $^{\circ}$ C 내지 70 $^{\circ}$ C도에서 5분 내지 30분 동안 경화하는 것이 바람직하다.
- [0031] 여기서, 상기 고분자층은, 프리 큐어링 시 경화도에 따라 상기 나노섬유시트와의 접합성이 결정되는데, 경화시간을 5분으로 짧게 할 경우에는 고분자층이 용액상태로 존재하면서 나노섬유들이 침투해 들어가고, 반면 경화시간을 30분 이상했을 경우에는 나노섬유와의 접합력이 저하되어 나노섬유가 쉽게 분리되기 때문이다. 한편, 상기 고분자층의 프리 큐어링 시 경화시간은 5분 내지 30분으로 하여 실시하되, 9분 내지 11분 동안 실시하는 것이 최적의 실험적인 결과가 도출되었다.
- [0032] 상기 고분자층의 상면에 상기 나노섬유시트를 접착하는 단계는, 프리 큐어링으로(Pre-curing) 경화된 상기 고분자층의 상면에 전기방사로 제작된 상기 나노섬유시트를 전사하여 상기 고분자층에 접착하여 이루어진다.
- [0033] 이렇게, 상기 고분자층에 상기 나노섬유시트가 접합된 후에는, 상기 나노섬유시트가 서로 고정되도록 오븐에서 60 $^{\circ}$ C 내지 70 $^{\circ}$ C에서 210분 내지 270분 동안, 또는 75 $^{\circ}$ C 내지 85 $^{\circ}$ C에서 30분 내지 90분 동안 경화하는 메인 큐어링(Main-curing)하는 단계를 거친다.
- [0034] 상기한 바와 같이, 상기한 나노섬유를 이용한 면역검사방법은, 전기방사(Electrospinning)을 통하여 쉽고 빠르고 저렴하게 제작할 수 있는 TiO₂나노섬유시트를 이용하여 CRP(C-reactive protein)를 검출하는 면역검사로 적용하는 것으로서, 제조가 용이하고 비용을 저감시킬 수 있을 뿐만 아니라, LOD(Limit of detection)가 0.9 pg/ml (3SD)으로 성능면에서도 높은 감응비를 갖고 있으며, 빠르고 정확한 단백질(Protein)검출 및 진단을 수행할 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 나노섬유를 이용한 면역검사방법은, 나노튜브와 나노와이어 같이 일반 기판에 붙어서 제작된다는 것

과 달리 시트형태로 제작되어 쉽게 다른 기관으로의 전이가 용이하고, 쉽게 집적할 수 있어 소자제작에 큰 도움이 될 뿐만 아니라 다양한 어플리케이션으로 적용할 수 있다.

[0036] 1. TiO₂ 나노섬유 제작

[0037] 먼저, TiO₂ 나노섬유제작을 위한 전구체 용액을 합성한다. 용액합성은 다음과 같다. 먼저, TTIP(Titanium tetraisopropoxide, 98%) 1.5g을 에탄올(Anhydrous ethanol, 99.5%) 3ml/아세트산(acetic acid) 3ml속에 넣어 스티어링(Stirring)하여 잘 섞은 뒤에, 3.64g 에탄올에 0.45g의 PVP(Polyvinylpyrrolidone, Mw = 1,300,000)를 섞은 11wt%용액을 섞어 놓은 상기의 용액에 넣어 다시 잘 섞는다.

[0038] 그런 다음 전기방사(Electrospinning)을 통하여 TiO₂/PVP나노섬유를 만드는데, 세부 공정은 합성된 TiO₂/PVP 전구체 용액을 실린지에 넣고 전기방사장치 내에 장착되어 있는 실린지펌프로 15kV (High DC-voltage)의 전기장 하에서 균일한 속도로 밀어주면서(Flow rate : 0.3 ml/h) 실린지 끝에 부착되어 있는 니들(Stainless steel needle)로 나노섬유를 뽑아내고, 기관(Ground substrate)에 나노섬유들이 증착되도록 하여 나노섬유층을 만든다. 이때, 기관은 Si 기관(2 cm x 2 cm)을 사용하였으며, 니들과 기관의 간격은 10cm로 하였다. 그 후 진공상태로(5×10^{-5} torr) 500도에서 3시간 어닐링 공정을 통해 TiO₂/PVP의 고분자층을 열분해(Pyrolysis)하여 아나타제(Anatase)결정성을 가지는 TiO₂ 나노섬유시트를 만든다.

[0039] 2. PDMS 필름(PDMS thin film) 제작

[0040] PDMS 폴리머(Prepolymer)용액과 경화제(Curing agent) 용액을 10:1 중량비율로 섞은 후에, 기포(Bubble)을 없애기 위해 데시케이터 챔버안의 진공상태에서 상기 섞은 용액을 1시간 놔둔다. 그 후 기관(Silicon substrate, Polymer substrate, glass substrate 등)에 3000rpm 으로 60초 동안 스핀코팅 함으로써 두께가 약 20um인 PDMS필름 층을 만든다.

[0041] 그런 다음, 형성된 PDMS층을 65도에서 10분동안 오븐에서 프리큐어링(Pre-curing)을 함으로써 살짝 경화시켜 졸(Sol) 상태를 겔(Gel) 상태로 만든 후, 제작된 TiO₂ 나노섬유시트를 그 위에 전사하여 PDMS층과 접합시킨 뒤, 65도에서 4시간 또는 80도에서 1시간 동안 PDMS를 완전히 경화시킨다. 도 2 및 도 3은 TiO₂ 나노섬유 표면과, TiO₂ 나노섬유시트가 PDMS층 위에 접합되어 고정되어 있는 단면 SEM이미지를 나타낸다.

[0042] 3. 표면 개질(Surface modification for immobilization of antibody and antigen on TiO₂ nanofiber)

[0043] 제작된 TiO₂ 나노섬유에 CRP(C-reactive protein) 의 항체와 항원을 고정시키기 위한 표면 개질공정은(Surface modification)은 다음과 같다. 우선, 산소 플라즈마(Oxygen plasma)를 3분간 처리 한 뒤 에탄올에 10mM로 들어 있는 GPDES((3-glycidoxypropyl)methyldiethoxysilane)에 TiO₂ 나노섬유를 담근 후 2시간 동안 놔둔다.

[0044] 그 후 꺼내서, 에탄올로 세정한 뒤 GPDES 분자(Molecule) 들과 TiO₂나노섬유간의 공유결합을 형성시키기 위하여 110도에서 1시간동안 베이킹(Baking)한 뒤, 에탄올 용액에 담가서 1분 동안 초음파처리(Sonication)를 실시하여 상기 TiO₂나노섬유시트에 물리적으로 또는 바인딩(Binding)되지 않는 GPDES 분자(Molecule)들을 떼어낸 후 다시 에탄올로 세정한다. 그 다음, 질소(Nitrogen)로 블로잉(Blowing)하여 건조시킨 뒤에, 실온(Room temperature)에서 진공오븐에서 진공상태로 건조시킨다.

[0045] 4. 항체 고정화 (Immobilization of antibody on the surface)

[0046] PBS 완충용액(buffer solution; pH 8.3) 을 통해 TiO₂나노섬유위에 코팅할 항체의 농도(Concentration)를 희석(Dilution)시킨 뒤에 5 μ l만큼 마이크로 피펫(Micro pipette)을 이용하여 TiO₂ 나노섬유 위에 떨어뜨려 디스펜싱(Dispensing)시킨다. 그 후, TiO₂나노섬유 기관을 가습챔버(Humidified chamber)안에 넣어 37 $^{\circ}$ C 에서 4시간 동안 인큐베이팅(Incubating)한다.

[0047] 그런 다음, 시편을 0.1% BSA-PBS 완충액을 이용하여 세정한 뒤에 TiO₂ 나노섬유에서 항체가 고정되지 않는 영역을 blocking시키기 위해 1% BSA-PBS 완충액안에 넣어 37 $^{\circ}$ C 에서 1시간 동안 인큐베이팅한다. 그 후 바로 0.1%BSA-PBS용액으로 2번 세정한다. 그 다음, 기관을 0.1% BSA-PBS 완충액에 담가 4 $^{\circ}$ C 에서 사용할 때까지 저장해

둔다.

5. 면역검사(Immunoassay)

CRP 항원(antigen)과 형광을 띄는 2차 항체(Secondary antibody labeled with HRP)가 들어있는 용액의 농도를 PBS (pH 7.4) 완충액 또는 CRP 무혈청(Free serum)용액을 이용하여 조절 한 뒤, 각기 다른 농도를 갖는 20 μ l 의 솔루션을 항체가 고정된 TiO₂나노섬유 용액에 각각 떨어뜨려 디스펜싱 시킨 후, 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 인큐베이션 시킨다.

그 후 시편을 0.1% BSA-PBS 용액으로 플레이트 셰이커(Plate shaker)위에서 120 rpm으로 2분간 2번 세정한다. 그 다음, 세척완충(Washing buffer)용액을 제거한 뒤, 100 μ l 의 화학발광(Chemiluminescent)기질을 CRP가 붙어 있는 TiO₂ 나노섬유 위에 떨어뜨린 뒤, 1분간 셰이킹하면서 인큐베이션 시킨다. 그 후 용액에서 90 μ l 만큼의 용액을 따와서 타겟기판(96-well opaque microplate)에 전이하여 상대적인 빛의 강도를 425nm 의 측정기(Luminometer)를 이용하여 측정한다.

6. 결과(CRP spiked in serum: Calibration curve and LOD)

TiO₂ 나노섬유시트를 이용한 CRP검출에서 LOD 검출한계값(Detection limit)이 0.9 pg/ml (3SD)의 값을 얻을 수 있었으며, 이에 성능면에서도 높은 감응성을 갖고 있음을 알 수 있다(도 4 및 도 5참조).

TiO₂ nano fiber – EtOH modification

	on PDMS flat nanofibers (HD)			Avg	Sdev	CV (%)	S/N ratio
0 (NC)	7882	7444	7620	7649	220	2.88	
1	775000	754600	819424	783008	33146	4.23	102.37
2.5	1.75E+06	1.36E+06	1.54E+06	1550000	195192	12.59	202.65
5	3.97E+06	3.67E+06	3.12E+06	3586667	431084	12.02	468.93
10	7.32E+06	6.46E+06	7.66E+06	7146667	618493	8.65	934.37
25	1.12E+07	1.06E+07	1.01E+07	10636667	575007	5.41	1390.66
100	2.34E+07	1.98E+07	2.00E+07	21066667	2023199	9.60	2754.29

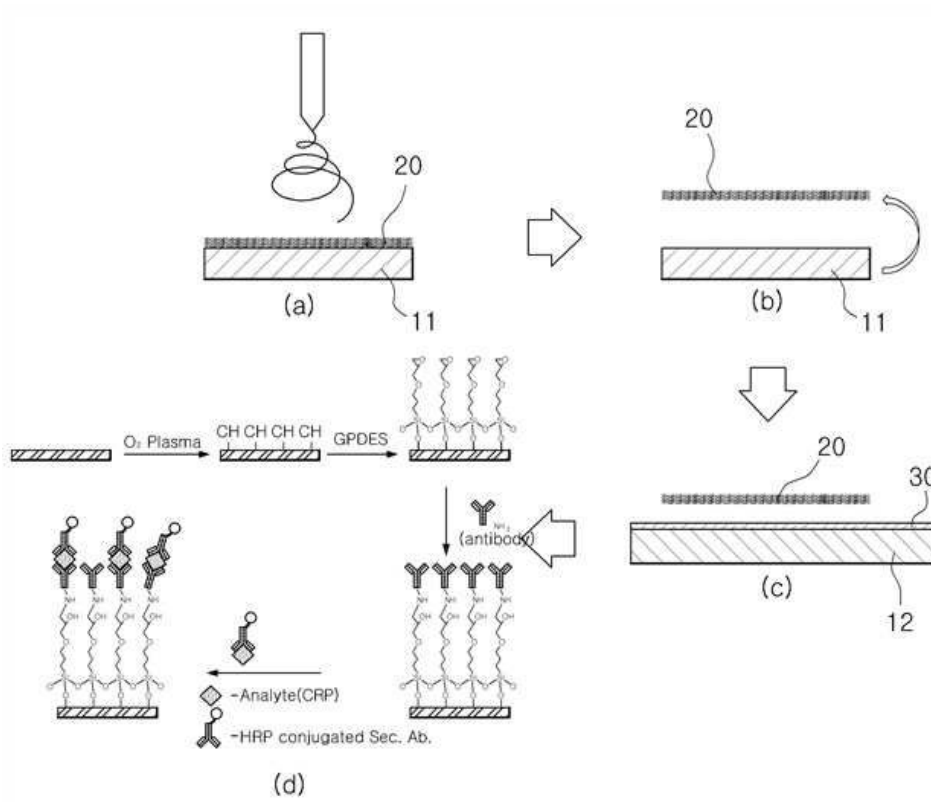
본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 본 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

부호의 설명

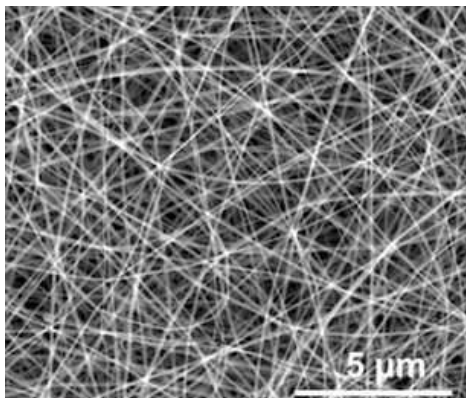
- 11, 12... 기관
- 20... 나노섬유시트
- 30... 고분자층

도면

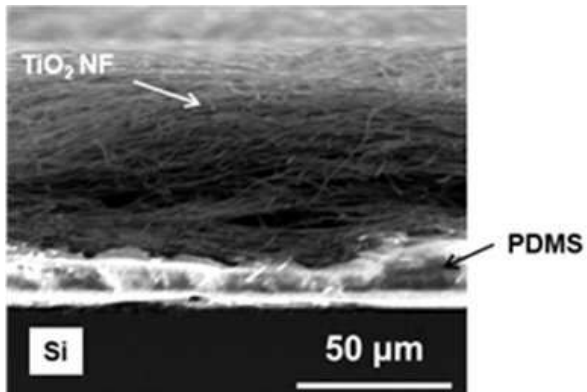
도면1



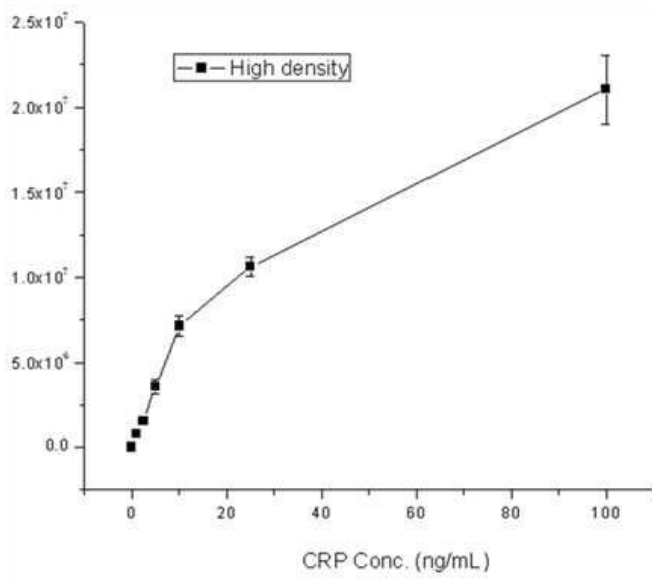
도면2



도면3



도면4



도면5

