

회전각도를 이용한 알부민 농도 측정용 3차원 종이 칩

김동호 · 정성근 · 이창수[†]

충남대학교 응용화학공학과
34134 대전광역시 유성구 대학로 99
(2020년 1월 19일 접수, 2020년 2월 11일 수정본 접수, 2020년 2월 14일 채택)

Angular-based Measurement for Quantitative assay of Albumin in three-dimensional Paper-based analytical Device

Dong-Ho Kim, Seong-Geun Jeong and Chang-Soo Lee[†]

Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Chungnam National University,
99, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34134, Korea
(Received 19 January 2020; Received in revised form 11 February 2020; accepted 14 February 2020)

요 약

본 연구에서는 별도의 이미지 분석 장비를 사용하지 않고 정량적으로 알부민의 농도를 측정할 수 있는 회전각도를 이용한 3차원 종이 칩(3D-PADs)를 제시한다. 변색된 구간의 회전각도를 측정하는 간단한 방법으로 검출을 시연하였다. 3D-PADs는 왁스 프린터를 이용한 인쇄와 라미네이팅 과정을 거쳐 빠르게 제작할 수 있다. 3D-PADs는 샘플의 알부민을 검출하기 위하여 citrate buffer와 tetrabromophenol blue를 흡수시켰다. 3D-PAD의 흡수패드에 샘플 용액을 흡수시키면, 샘플 용액은 형성된 유로를 통하여 수직 및 수평 흐름을 통해 분석 구간으로 흐른다. 변색된 구간의 회전각도는 특정한 알부민의 농도를 나타내며, 알부민 측정의 신뢰할 수 있는 값을 확인할 수 있었다.

Abstract – This study presents an angular-based measurement on three-dimensional paper-based analytical devices (3D-PADs) for quantitative detection of albumin without using an image analyzer. We demonstrate a simple quantitative and straightforward approach based on the angle of the discolored area as detection criteria. 3D-PADs are rapidly fabricated by the wax-printing and laminating process. The 3D-PADs are treated with citrate buffer and tetrabromophenol blue to react with albumin in a sample solution. Dropping sample solution into sample pad in the 3D-PAD, fluid flows toward the assay zone laterally and vertically by capillary action. We find that the change of angle of the discolored area correctly reflects the concentration of albumin and is reliable determinant for the measurement of the albumin concentration. It is the first demonstration of angular-based detection as a simple, inexpensive, and equipment-free approach for point-of-care diagnosis.

Key words: Angular-based measurement, Paper-based analytical devices, Point-of-care diagnosis

1. 서 론

소득의 증가 및 의학기술의 발달로 인하여 인류의 평균 수명이 증가하면서 각종 만성 질병에 대한 관심이 급증하고 있다[1]. 이러한 만성 질병의 하나로는 만성 신부전증이 있으며 국내 만성 신장 질환 환자의 경우 지속적인 증가 추세를 확인할 수 있다[2]. 이러한 신부전증의 경우 심각한 경우 투석 및 장기 이식을 필요로 하며 치료하지 않을 경우 합병증을 동반하여 사망에 이를 수 있다. 따라서

조기 검진 및 지속적인 관리를 요구하는데 이에 가장 간편한 방법은 소변검사를 통한 혈청알부민(serum albumin)의 측정이다. 알부민을 이용한 단백질 측정은 0.3 mg/ml 농도 이상의 경우 미세 단백뇨라고 하며, 3.0 mg/ml 이상의 농도의 경우 단백뇨로 진단한다. 단백질은 정상인의 경우 알부민을 사구체에서 여과하지 않도록 되어 있으나, 신장 질환 등의 이유로 소변에서 알부민이 배출되는 현상이다. 이러한 단백질은 전신부종, 신부전증, 당뇨병 망막증 등 여러 합병증을 진단할 수 있으며, 치료를 하지 않을 경우 투석 또는 장기 이식이 필요할 수 있어 조기 진단 및 관리가 매우 중요하다. 이러한 이유로 인하여 저렴한 가격으로 간편하고 쉽게 단백질의 진단 및 질병의 진행 정도를 확인할 수 있는 진단 기기의 필요성이 증가하고 있으며, 이는 세계보건기구의 현장검사(point-of-care testing, POCT)의 기준 중 저렴함(affordable), 편리성(user-friendly)

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: rhadam@cnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

에 부합한다[3-5]. 이러한 이유로 저렴하고 간편하게 사용할 수 있는 바이오 센서들이 있으며[6-10], 이 중의 하나로써 종이 기반의 진단기기가 발전가능성을 보여주고 있다[11-14].

기존의 소변검사를 통한 단백질 진단기기는 요검사용 시험지(urine dipstick)와 거리기반의 직선형 농도 측정용 종이 칩이 있다. 요검사용 시험지의 경우 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)에 반응하는 tetrabromophenol blue (TBPB)가 흡수 패드에 흡착되어 있어, 소변을 시험지에 적신 후에 흡수 패드의 색 변화를 통하여 질병 진단에 활용한다. 색 변화를 이용하는 분석 방법은 검출하고자 하는 성분에 따라 적당한 화학 시약을 사용하여 발색 반응을 일으킨다. 이렇게 발색된 색상을 관측함으로써 농도를 결정하는 방법을 비색반응법이라고 한다[15,16]. 위의 두가지 방법은 이러한 비색반응법의 하나로써 단백질오차법을 사용한다. 단백질오차법에 사용되는 지시약인 TBPB는 짧은 컨쥬게이션 결합 길이의 구조를 가지고 있다[17-21]. 이 짧은 컨쥬게이션 결합을 따라서 움직이는 파이전자의 에너지에 의하여 흡수하는 빛의 파장이 달라지는데, BSA와 TBPB가 결합하게 될 경우 파이전자의 전자 준위가 낮아져, 보다 긴 파장인 초록색의 파장을 흡수하게 된다. 이를 이용하여 소변에 포함된 BSA의 농도를 측정하는 방법을 단백질오차법이라고 한다[22,23]. 하지만, 해당 색변화를 이용한 농도 측정 방법은 관찰자에 따라 서로 다른 검출 결과가 도출될 수 있다. 따라서 발색된 색상을 통해 객관적이고 정량적으로 검출 대상의 농도를 측정하기 위해서는 정밀한 이미지 분석 장비가 필요하다는 단점이 존재한다. 이러한 문제로 인하여 기존의 요검사용 시험지의 경우, 육안으로 관측하기 위하여 표준물질을 이용하여 측정된 기준색과 비교하는 방법을 통하여 반정량적인 분석을 할 수 있다. 이때, 반정량분석법은 검출 대상의 농도를 특정한 수치로 나타내는 정량 분석과는 다르게 반 정량적으로 표준물질을 이용하여 측정된 기준 농도를 통해 구간을 설정한다. 이 설정된 구간을 이용하여 분석 물질의 검출 대상이 일정 구간 내의 농도 범위에 있음을 지정하는 분석 방법이다[24,25]. 따라서, 반정량분석법인 요검사용 시험지로는 질병의 진행 상황 정도를 정량적으로 확인할 수 없으며, 질병 관리의 측면에서도 환자의 상태를 정량적으로 확인할 수 없다는 단점이 존재한다.

이를 해결하기 위해 제시된 방법 중 하나로는 거리기반의 직선형 농도 측정용 종이 칩이 있다. 거리기반의 농도 측정 방법의 경우 단백질오차법을 이용하여 TBPB와 BSA의 반응을 통한 색 변화를 이용하지만, 단순한 색 변화를 이용하는 반정량적인 분석이 아닌 소혈청알부민에 반응하여 변색된 구간의 거리와 유체의 이동거리를 측정하여 그 비율을 이용하여 질병 진단에 활용한다[26]. 그러나 거리기반의 농도 측정 방법은 고농도 구간의 측정이 불가능하다는 단점을 가지고 있다. 그 이유는 TBPB와 단백질의 반응에 의하여 단백질의 유속이 감소하는 정체현상이 발생하며 이로 인하여 고농도 구간의 측정이 불가능하다. 이러한 고농도 구간의 낮은 검출 해상도는 만성 질환의 관리 측면에서 볼 때 환자에게 추가적인 진단을 요구하는 질병의 악화에 대해 알 수 없다는 문제가 있다. 따라서 만성 질환 환자가 증가하는 현 추세에 적합하지 않다.

그러므로 본 논문에서는 앞에서 언급한 별도의 이미지 분석 장비를 필요로 하는 점과 고농도에서의 검출 해상도가 떨어지는 현상을 해결한 고해상도의 저렴하며 간단한 방법으로 소변 내 알부민의 농도를 측정하여 질병의 진단 및 관리를 할 수 있는 회전각도를 이용하는 곡선형 종이 기반 진단기구를 제시하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료

회전각도를 이용한 고농도 구간의 고해상도의 정량분석이 가능한 종이 기반 진단기구를 제시하기 위하여, 검출 대상으로는 BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 사용하였으며, 검출을 위한 지시약으로는 tetrabromophenol blue (TBPB)를 사용하였다. TBPB는 25% 에탄올에 용해시켜 1 mg/ml TBPB 용액으로 제작하여 냉장고(4 °C)에서 보관하여 사용하였다. BSA는 albumin from bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 증류수(용제)에 용해하여, 0.1~8.0 mg/ml로 농도 별로 용액을 만들어 냉장고(4 °C)에서 보관하여 사용하였다. 또한 TBPB를 이용한 BSA의 검출은 단백질오차법의 원리를 이용하므로 pH 3.0을 유지하기 위해 citric acid buffer solution (CBS)를 제작하여 사용하였다. CBS는 0.1 M citric acid monohydrate와 0.1 M sodium citrate tribasic dehydrate를 82:18 (v/v) 비율로 섞어서 pH 3.0의 용액을 만든 뒤 냉장고(4 °C)에서 보관하여 사용하였다. 종이 칩의 패턴은 Adobe Illustrator CS6를 사용하여 설계하였다. 설계된 패턴은 왁스 프린터(wax printer, Xerox colorqube 8870)를 사용하여 종이(Whatman 3MM chromatography paper)에 인쇄하였다.

2-2. 종이 칩 제작 과정

종이 양면에 왁스 프린터로 앞면과 뒷면에 다른 왁스 패턴(왁스 장애물)을 인쇄하였다. 앞면에는 2.5 mm의 너비를 갖는 155°의 assay zone(분석 구간)과 10 mm 직경의 sample pad(흡수 패드)로 구성되어 있으며, 뒷면에는 흡수 패드, 흡수 패드와 분석 구간을 연결하는 유로, 분석 구간 뒷면 코팅부로 구성되어 있다(Fig. 1(a)). 앞면과 뒷면을 왁스 패턴이 인쇄된 종이를 라미네이터를 이용하여 140 °C에서 가열하였다[26,27]. 종이 상의 왁스는 가열로 인하여 점도가 낮아지고 점도가 낮아진 왁스는 주위로 퍼진다. 녹은 왁스가 종이에 퍼지는 과정은 다음의 Washburn's equation [28,29]에 의하여 설명될 수 있다(식 (1)).

$$L = (\gamma Dt / 4\eta)^{1/2} \quad (1)$$

위 식에서 L 은 점도(η)와 표면장력(γ)를 가진 액체가 시간(t) 동안 평균 직경(D)의 기공을 통과할 수 있는 이동거리를 의미한다. 따라서 가열 횟수 및 가열 온도를 조절하여 원하는 폭을 가진 유로를 제작할 수 있다[30]. 우리는 왁스 패턴이 인쇄된 종이를 0.26 초 동안 라미네이터를 통해 가열하여 종이 양쪽에 왁스 패턴이 인쇄된 경우, 종이의 두께보다 양면의 흡수된 왁스 깊이($H_{h \text{ of front}}, H_{h \text{ of back}}$)가 더 크므로 친유성 왁스 장애물을 형성하고, 한쪽에만 인쇄된 경우 높이가 종이의 두께보다 왁스가 흡수된 높이가 작으므로 낮은 유로가 형성된다(Fig. 2(a),(b)). 이 과정을 통하여 친수성 유체가 흐를 수 있는 3차원 유로를 형성하였다(Fig. 2(c)). 이를 3차원 종이 칩이라고 한다. 3차원 종이 칩의 분석 구간에 20 μ l, pH 3.0 CBS를 흡수시켰다. 그 후 공기 중에 상온에서 1시간 건조하였다. 종이 완전히 건조된 이후 20 μ l, 1.0 mg/ml TBPB 용액을 분석 구간에 흡수시켰다. 그 후 공기 중 상온에서 1시간 건조하였다. 완전히 건조되어 완성된 종이칩은 오염 및 습도에 의한 파손을 막기 위해 밀봉하여 보관하였다.

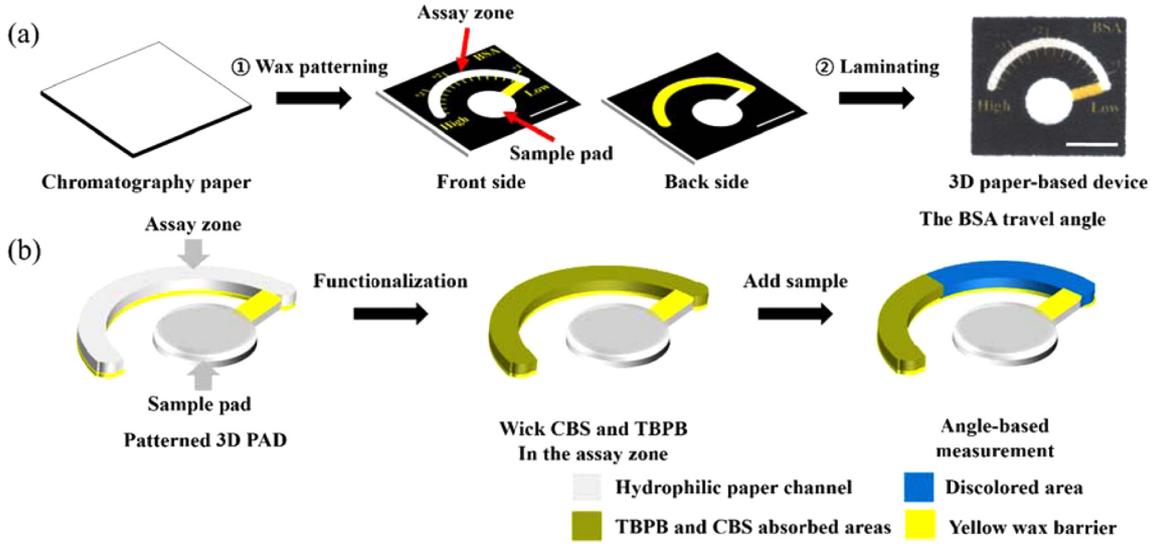


Fig. 1. Fabrication procedure of three-dimensional paper-based analytical devices (3D-PADs). (a) First, sample pad and assay zone on the paper are patterned by double side wax printing. And we perform a laminating process to form a three dimensional fluidic channels. Scale bar indicates 10 mm. (b) The scheme diagram of angular-based measurement. We treat 3D-PADs with wicking of citrate buffer solution (CBS) and tetrabromophenol blue (TBPB) to detect albumin in a sample solution (yellow colored area). When sample solution is dropped on the sample pad, the fluid flows toward the assay zone. The reaction of albumin with TBPB instantly shows a color change from yellow to green.

2-3. 분석 방법

우리는 각기 다른 농도의 BSA 용액을 진단기기의 흡수 패드에 떨어뜨렸다. BSA 용액은 종이에 흡수되고 모세관 현상에 의해 흡수 패드에서 분석 구간으로 이동하고 20분이 지난 후 정지하였다. 분석 구간에는 각 10도에 대하여 노란색으로 각도가 표기되어 있으며, +1, +2, +3의 진단 기준에 대한 각도가 표시되어 있다(Fig. 1(a)). 이때, 기준점(baseline)으로는 흡수 패드 중앙과 분석 구간을 연결하는 유로를 지나는 가상의 선으로 정하였으며, BSA가 이동하며 초록색으로 변색된 구간이 BSA의 이동거리로 정하였다(Fig. 1(b)). 이를 이용하여 BSA가 이동한 구간에 해당하는 눈금을 읽어 회전각도를 구하였다. BSA의 이동거리에 따른 회전각도는 육안으로 측정하였으며, BSA에 의해 변색된 구간과 변색되지 않은 경계선이 직선 형태가 아니므로, 가장 많이 이동한 지점(BSA 이동구간 최대값)을 BSA의 이동 구간으로 정의하여 회전각도를 구하여, 이를 BSA의 농도로 정의하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 직선형 유로와 곡선형 유로에서의 유체 흐름 및 유속

우리는 직선형 유로와 곡선형 유로에서의 유체의 유속 및 이동거리의 차이를 확인하기 위하여 직선형 및 곡선형 유로에 마이크로 파이펫을 사용하여, 흡수 패드에 유체를 떨어뜨리는 방법으로 유속을 측정하였다. 직선형 및 곡선형 유로는 양면 프린팅 방법을 통하여 한쪽에만 인쇄된 경우 높이가 낮은 유로를 형성하며, 양쪽에 인쇄된 경우 종이의 두께보다 왁스가 흡수된 높이가 더 크므로 소수성 왁스 장벽을 형성한다(Fig. 2). 두 유로의 설계는 Fig. 3(a),(b)에서 볼 수 있듯이 흡수 패드와 분석 구간을 연결하는 유로는 동일하게 설계되었으며, 분석 구간의 형태가 직선 및 곡선의 형태로 차이를 갖도록 설계하였다. 이때, 흡수 패드와 분석 구간의 거리, 곡선형 유로의 형태는 흡수 패드와 분석 구간을 나누는 왁스장벽물의 작용을

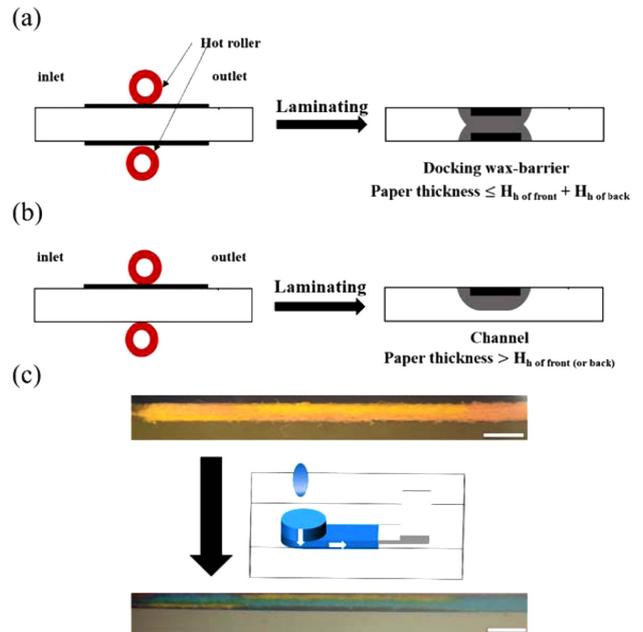


Fig. 2. Formation of three dimensional fluidic channels based on single and double-sided printing and lamination. (a) The docking wax-barrier is formed by laminating the vertical symmetric wax-patterns on both sides. (b) The channel is formed by laminating the vertical asymmetric wax-pattern (H_h of front, H_h of back: Heated height of the wax). (c) The cross-section images show the formation of black docking wax, a sample pad, a lower channel, and an upper channel in a single sheet of paper before and after loading a blue dye solution into the sample pad. (all scale bar size = 1 mm).

고려하여 설계하였다. 각 분석 구간에는 소수성 물질인 TBPB와 산 세기를 조절하기 위해 CBS를 흡수시켜 실험하였다. TBPB와 CBS를 처리 않은 곡선 및 직선형 유로를 지닌 2개의 종이칩의 경우, 양

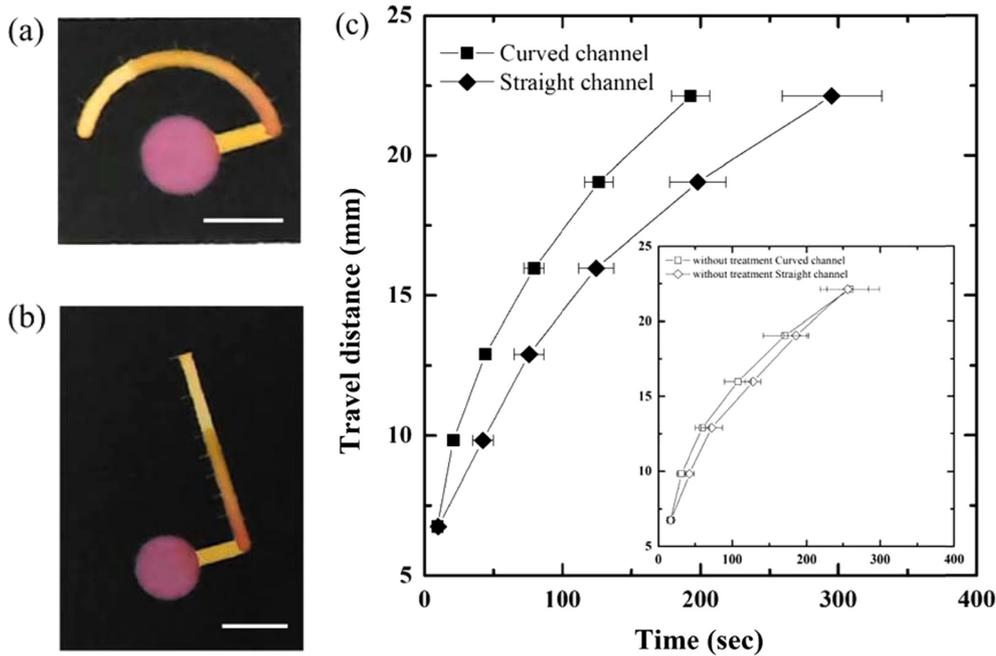


Fig. 3. The comparison of the flow rate between curved and straight channel. The snapshot images of the curve channel (a) and the straight channel (b). Two types of channels have a same size of the sample pad and microfluidic channel to assay zone (all scale bar size = 10 mm). (c) The flow rate of the curved and straight channel. In set: The flow rate of without TBPB and CBS treatment channel. Each value plotted are obtained from the average result ($n = 7$) of travel distance measured. In the case of the curved channel, we measure the angle and convert to length for comparing the straight channel.

쪽 모두 최종 종결지점(22.1 mm)에 도달하는 시간이 약 260초로 비슷하였다. 이 결과는 유속의 차이가 유로의 형태에 영향을 받지 않음을 보여준다(inset of Fig. 3(c)). 하지만, TBPB와 CBS를 흡수시킨 직선형 유로를 지닌 종이칩의 경우, 최종 종결지점에 도착하는 시간이 평균 295.2 초이었으며, 곡선형 유로는 최종 종결 지점에 도착하는 시간이 평균 192.8 초로 직선형 유로에 비하여 대략 100 초 이상 빠르게 도착하였다. 이는 곡선형 유로가 종이칩에서 유속 증가를 시킬 수 있음을 보여주고 있다. 유로의 형태에 의한 종이의 결에 의해 발생한다. 사선으로 디자인 된 직선형 유로의 경우 결에 의하여 유속이 감소하였으며, 곡선형 유로의 경우 결의 흐름에 따라 유속이 증가하였다. 이러한 유속의 차이는 특히, 고농도 샘플의 이동거리 차이를 발생할 것이며, 곡선형 유로에서 더욱 먼 거리를 이동하게 되어, 검출구간을 최대로 늘릴 수 있으므로 기존의 진단 키트가 지닌 고농도 구간의 검출 불가 문제를 해결할 수 있다. 따라서 최종적으로 이 연구에서는 고농도 구간의 측정을 위한 종이 기반의 농도 측정 진단 기기로서 곡선형 유로를 가지며, 중앙에 흡수 패드를 위치하는 형태로 진단 기기를 디자인하였다.

3-2. 각도를 이용한 단백질의 진단

우리는 직선형 유로에 비해 빠른 유속을 갖는 곡선형 유로를 사용하여 각도를 이용한 농도 측정을 확인하기 위하여 단백질 진단의 기준인 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml의 샘플을 흡수 패드에 40 μ l 주입하고 관찰하였다. 그 결과 진단 기준에 해당하는 각 농도에 대하여 각각 17.5, 84.5, 116°의 특정한 회전각도를 측정할 수 있었으며, 제작된 기기에서 8.0 mg/ml까지 측정할 수 있음을 확인하였다(Fig. 4.). 이때, 분석 구간의 각도를 증가시켜 분석 범위를 증가시킬 경우 모세관 현상을 이용하는 종이 기반의 분석 기기의 한계로 인하여 180°

이상의 구간에서 유체가 흐르지 않는 것을 확인하였다. 또한, 곡선형 유로에서도 고농도 구간의 회전각도차이가 저농도 구간에 비하여 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이는 TBPB와 BSA가 반응하여 비색 반응을 일으킬 때, TBPB의 슬론화기와 BSA가 정전기적 결합을 하며 인하여 정체현상이 발생하는 것에 기인한다[31,32]. 이에 의하여 1.0 mg/ml의 농도에 대하여 약 90°의 회전각도를 보여주는 것에 비해 2.0 mg/ml의 농도가 증가한 3.0 mg/ml의 농도에 대하여 22° 정도의 회전각도 증가를 보여주는 것에서 정체현상이 곡선형 유로에서도 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 0.3 mg/ml 이하의 농도에 대해서는 흡수 패드와 분석 구간을 이어주는 연결 구간 이상 BSA가 진행하지 못하여 분석 구간에서 변색이 나타나지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 우리는 이러한 결과를 통하여 단백질의 진단 기준 +1, +2, +3의 농도에 해당하는 각도를 표시하여 설계하였다. 이와 같이 본 진단 기기에서 단백질 진단 기준을 표기하는 방법은 기존의 단백질 진단 방법인 단백질차법에 근거한 반정량적인 진단방법에서 육안으로 판단하기에는 빛의 정도, 판단하는 사람의 기준에 따라 달라지는 결과를 보이는 단점을 해결하기 위해서는 고가의 이미지 분석장비를 필요로 하는 데에 반하여[33-35], 별도의 장비 없이, 육안으로 회전각도를 확인하는 방법으로 +1, +2, +3의 질병 진단을 할 수 있는 간단한 진단 법이다.

3-3. 회전각도를 사용한 BSA의 정량적인 분석

우리는 BSA의 농도 변화와 회전각도의 관계를 알기 위하여 각각 다른 BSA농도(0.1-8.0 mg/ml)를 갖는 샘플을 40 μ l의 양만큼 흡수 패드에 흡수시켰다. 그 후 분석 구간 옆에 표시된 눈금을 사용하여 변색된 구간의 회전각도를 측정하였다. 그 결과 BSA에 의하여 변색된 구간의 회전각도가 각각의 농도에 대하여 각각 특정한 값들

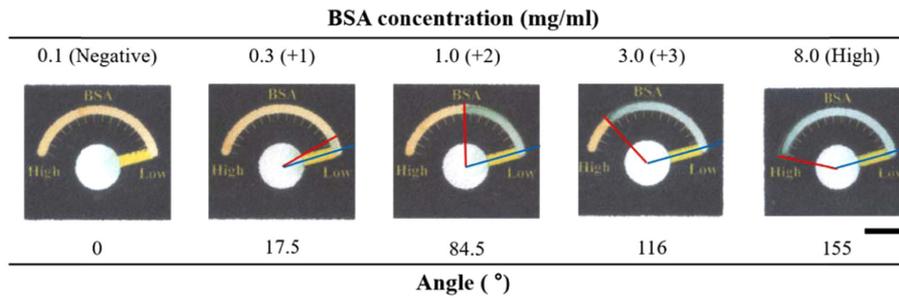


Fig. 4. Snapshot images of angular-based measurement 3D paper-based device after the introduction of a sample solution with different concentrations of BSA (Negative, +1, +2, +3 (0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml), and 8 mg/ml according to urine test criteria). The blue line indicates baseline and the red line indicates the BSA travel angle. The angle of blue colored area shows a relationship with the BSA concentration in the sample solution. (assay time: 20 min, scale bar size = 10 mm).

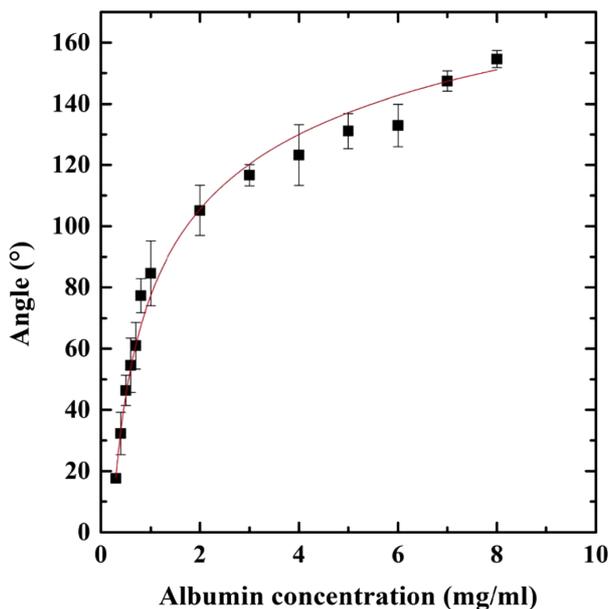


Fig. 5. Quantitative measurement of the change of angle in the 3D-PAD. Angle measured shows the concentration of BSA. Error bars represent standard deviation (n=5).

을 갖는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 제작된 진단기기를 사용하여 육안으로 분석할 수 있는 BSA 최대 농도는 8.0 mg/ml 이며, 이는 실제 당뇨병 환자의 질병 진행 상황을 확인하는 +1 (0.3~1.0 mg/ml), +2 (1.0~3.0 mg/ml), +3 (3.0~20 mg/ml), +4 (20 mg/ml 이상) 까지의 4단계의 기준에서 +1부터 +3에 해당하는 각각의 농도 측정이 가능하기 때문에 +1부터 +3의 진단 범위에 해당하는 환자들의 당뇨병 농도 변화를 정량적으로 측정하는 것이 가능하다. 또한, 기존의 거리기반의 농도 측정 방법에서 고농도 구간(+3, 3.0 mg/ml 이상)의 경우 육안으로 농도를 정량적으로 측정하기에 TBPB와 BSA의 정체현상에 의하여 어려움이 있었으나, 본 논문의 회전각도를 이용한 농도 측정 방법은 고농도 구간에서도 정량적으로 측정할 수 있음을 확인하였다. 이를 통하여 본 종이 칩은 +1, +2, +3의 진단기준에 따라 질병을 진단하는 것에 끝나지 않고, 지속적인 관리 및 치료가 필요한 +3 이상의 만성 신장 질환 환자에게 저렴하고 간편하게 자신의 당뇨병 농도 변화를 정량적으로 알 수 있도록 하여 질병의 관리의 측면에서 장점을 갖는다.

4. 결 론

BSA의 농도가 일정하면 BSA와 TBPB의 반응에 의해 변색된 구간의 회전각도가 항상 일정하다. 그러므로 변색된 구간의 회전각도를 측정하는 방법으로 샘플의 BSA 농도를 측정할 수 있음을 의미한다. 따라서 샘플을 흡수 패드에 흡수시킨 후, BSA에 의해 변색된 구간의 회전각도를 농도로 환산하면 별도의 이미지 분석 장비 없이 육안으로 정량 분석을 할 수 있다. 또한, 기존 직선 유로에서의 거리 기반의 농도 측정 방법의 경우 TBPB와 BSA의 반응에 의한 정체현상이 발생하여 고농도 구간의 측정에 어려움이 존재하였다. 상기의 문제를 해결하기 위하여, 본 연구에서 제시한 곡선형 회전각도 기반의 농도 측정 종이 칩은 곡선형 유로로 인한 유속 증가 효과에 의하여 BSA와 TBPB 반응의 정체 현상을 해결할 수 있었으며, 0.3 mg/ml의 낮은 농도의 단백질을 측정할 수 있었다. 또한, 기존 진단키트에서는 측정하기 어려운 고농도 구간(4.0-8.0 mg/ml)의 단백질을 125-155°의 회전각도 구간에서 99.6%의 높은 신뢰도를 지닌 정량분석을 수행할 수 있었다. 만성 신장 질환 환자의 경우, 식단 및 생활 패턴의 지속적인 관리 및 치료가 불가피하므로 본인의 당뇨병 진행상황을 알기 위하여 수시로 진단해야 하며, 질병 관리의 측면에서 간편한 당뇨병 검출방법이 절실히 필요하다. 따라서, 본 논문에서 규명한 저렴한 종이와 간단한 공정을 통하여 만들어지는 고농도 구간의 고 검출 해상도를 갖는 회전각도 기반의 농도 측정 종이 칩은 별도의 이미지 분석 장치 없이 수시로 환자의 질병상태 및 치료 여부를 관찰할 수 있어, 적은 비용을 질병의 진행상황 및 치료 여부를 정량적으로 확인하고 추가적인 조치의 필요성을 판단할 수 있다. 이는 만성 질환 환자가 증가하고, 고령화 사회에 따라 고령 환자가 증가하는 현 시대에 경제적 문제로 인하여 진단 비용을 감당하기 어려운 여러 계층에게 저가의 진단 방법으로써 만성 질환의 조기 진단 및 관리를 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

감 사

이 논문은 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단-글로벌연구실사업(No. NRF-2015K1A1A2033054)의 지원을 받아 수행된 연구로 이에 감사드립니다.

References

1. Park, Y. and Lee, H., "The Levels of Physical Activity and Its

- Relationships with Depression, Health-related Quality of Life, Sleep Disturbance, and Physiological Indicators in Hemodialysis Patients; *Korean Journal of Adult Nursing*, **27**(6), 718-727 (2015).
- Na, K., "New Oral Agent for Treatment of Anemia in Patient with Chronic Kidney Disease: Prolyl Hydroxylase Inhibitor;" *The Korean Journal of Medicine*, **94**(1), 11-16(2019).
 - Gervais, L., De Rooij, N. and Delamar, E., "Microfluidic Chips for Point of Care Immunodiagnosics;" *Advanced Materials*, **23**(24), H151-H176(2011).
 - Chin, C. D., Linder, V. and Sia, S. K., "Lab-on-a-chip Devices for Global Health: Past Studies and Future Opportunities;" *Lab on a Chip*, **7**(1), 41-57(2007).
 - Peeling, R. W., Holmes, K. K., Mabey, D. and Ronald, A., "Rapid Tests for Sexually Transmitted Infections (STIs): the Way Forward;" *Sexually Transmitted Infections*, **82**(suppl 5), v1-v6(2006).
 - Christwardana, M., Chung, Y., Tannia, D. C. and Kwon, Y., "Effects of the Gold Nanoparticles Including Different Thiol Functional Groups on the Performances of Glucose-oxidase-based Glucose Sensing Devices;" *Korean Journal of Chemical Engineering*, **35**(12), 2421-2429(2018).
 - Park, S. J., Kim, S., Kim, S. H., Park, K. M. and Hwang, B. H., "His-tagged Protein Immobilization on Cationic Ferrite Magnetic Nanoparticles;" *Korean Journal of Chemical Engineering*, **35**(6), 1297-1302(2018).
 - Son, J., Hwang, J., Lee, D., Khan, M. S., Jo, Y., Lee, K., Park, C., Chavan, S., Seo, Y. and Choi, Y., "Strategies for the Optimization of Bead-immunoassays for the Effective Detection of Target Biomolecules;" *Korean Journal of Chemical Engineering*, **35**(3), 805-811(2018).
 - Lee, M., Kim, J.-H. and Koo, H.-J., "Dielectrophoresis for Control of Particle Transport: Theory, Electrode Designs and Applications;" *Korean Chemical Engineering Research*, **57**(2), 149-163 (2019).
 - Heo, N. S., Oh, S. Y., Ryu, M. Y., Baek, S. H., Park, T. J., Choi, C., Huh, Y. S. and Park, J. P., "Affinity Peptide-guided Plasmonic Biosensor for Detection of Norovirus Protein and Human Norovirus;" *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **24**(2), 318-325(2019).
 - Zhou, M., Yang, M. and Zhou, F., "Paper Based Colorimetric Biosensing Platform Utilizing Cross-linked Siloxane as Probe;" *Biosensors and Bioelectronics*, **55**, 39-43(2014).
 - Mu, X., Zhang, L., Chang, S., Cui, W. and Zheng, Z., "Multiplex Microfluidic Paper-based Immunoassay for the Diagnosis of Hepatitis C Virus Infection;" *Analytical Chemistry*, **86**(11), 5338-5344(2014).
 - Hong, W., Jeong, S.-G., Shim, G., Kim, D. Y., Park, S. P. and Lee, C.-S., "Improvement in the Reproducibility of a Paper-based Analytical Device (PAD) Using Stable Covalent Binding between Proteins and Cellulose Paper;" *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **23**(6), 686-692(2018).
 - Maharjan, A., Alkotaini, B. and Kim, B. S., "Fusion of Carbohydrate Binding Modules to Bifunctional Cellulase to Enhance Binding Affinity and Cellulolytic Activity;" *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **23**(1), 79-85(2018).
 - Shin, J.-W., Yoon, J., Shin, M., Choi, J.-W., "Electrochemical Dopamine Biosensor Composed of Silver Encapsulated MoS₂ Hybrid Nanoparticle;" *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **24**(1), 135-144(2019).
 - Hinberg, I. H., Katz, L. and Waddell, L., "Sensitivity of in vitro Diagnostic Dipstick Tests to Urinary Protein;" *Clinical Biochemistry*, **11**(2), 62-64(1978).
 - Bae, E., Park, H.-J., Yoon, J., Kim, Y., Choi, K. and Yi, J., "Bacterial Uptake of Silver Nanoparticles in the Presence of Humic Acid and AgNO₃;" *Korean Journal of Chemical Engineering*, **28**(1), 267-271(2011).
 - Yu, J. H., Jeong, S.-G., Lee, C.-S., Hwang, J.-Y., Kang, K.-T., Kang, H. and Lee, S.-H., "Fabrication of a Paper-based Analytical Device for Multiple Colorimetric Analysis via Inkjet-printing and Paper-cutting;" *BioChip Journal*, **9**(2), 139-143(2015).
 - Kolthoff, I. M. and Elving, P. J., *Treatise on Analytical Chemistry, Part 1* (Vol. 13). John Wiley & Sons(1993).
 - Duy, L. T., Trung, T. Q., Dang, V. Q., Hwang, B.-U., Siddiqui, S., Son, I.-Y., Yoon, S. K., Chung, D. J. and Lee, N.-E., "Flexible Transparent Reduced Graphene Oxide Sensor Coupled with Organic Dye Molecules for Rapid Dual-Mode Ammonia Gas Detection;" *Advanced Functional Materials*, **26**(24), 4329-4338(2016).
 - Samiey, B., Alizadeh, K., Mousavi, M. F. and Alizadeh, N., "Study of Kinetics of Bromophenol Blue Fading in Alcohol-water Binary Mixtures by Sessmortac Model;" *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **26**(3), 384-392(2005).
 - Gohain, B. and Dutta, R. K., "Premicellar and Micelle Formation Behavior of Dye Surfactant Ion Pairs in Aqueous Solutions: Deprotonation of Dye in Ion Pair Micelles;" *Journal of Colloid and Interface Science*, **323**(2), 395-402(2008).
 - Suzuki, Y., "Guidance for Selecting the Measurement Conditions in the Dyebinding Method for Determining Serum Protein: Theoretical Analysis Based on the Chemical Equilibrium of Protein Error;" *Analytical Sciences*, **17**(11), 1263-1268(2001).
 - Lee, C.-S., Lee, S.-H., Kim, Y.-G., Choi, C.-H., Kim, Y.-K. and Kim, B.-G., "Biochemical Reactions on a Microfluidic Chip Based on a Precise Fluidic Handling Method at the Nanoliter Scale;" *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **11**(2), 146(2006).
 - Gyure, W. L., "Comparison of Several Methods for Semiquantitative Determination of Urinary Protein;" *Clinical Chemistry*, **23**(5), 876-879(1977).
 - Jeong, S.-G., Lee, S.-H. and Lee, C.-S., "Diagnostic Paper Chip for Reliable Quantitative Detection of Albumin Using Retention Factor;" *KSBB Journal*, **28**(4), 254-259(2013).
 - Hwang, C., Jeong, S.-G., Park, H.-K., Lee, C.-S. and Kim, Y.-G., "Based Neuraminidase Assay Sensor for Detection of Influenza Viruses;" *Korean Chemical Engineering Research*, **54**(3), 380-386(2016).
 - Jeong, S.-G., Lee, S.-H., Choi, C.-H., Kim, J. and Lee, C.-S., "Toward Instrument-free Digital Measurements: a Three-dimensional Microfluidic Device Fabricated in a Single Sheet of Paper by Double-sided Printing and Lamination;" *Lab on a Chip*, **15**(4), 1188-1194(2015).
 - Washburn, E. W., "Note on a Method of Determining the Distribution of Pore Sizes in a Porous Material;" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **7**(4), 115(1921).
 - Carrilho, E., Martinez, A. W. and Whitesides, G. M., "Understanding Wax Printing: a Simple Micropatterning Process for Paper-based Microfluidics;" *Analytical Chemistry*, **81**(16), 7091-7095

- (2009).
31. Compton, S. J. and Jones, C. G., "Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay," *Analytical Biochemistry*, **151**(2), 369-374(1985).
 32. Cao, W., Jiao, Q., Fu, Y., Chen, L. and Liu, Q., "Mechanism of the Interaction Between Bromophenol Blue and Bovine Serum Albumin," *Spectroscopy Letters - Spectrosc Lett*, **36**, 197-209(2003).
 33. Kong, T., You, J. B., Zhang, B., Nguyen, B., Tarlan, F., Jarvi, K. and Sinton, D., "Accessory-free Quantitative Smartphone Imaging of Colorimetric Paper-based Assays," *Lab on a Chip*, **19**(11), 1991-1999(2019).
 34. Morbioli, G. G., Mazzu-Nascimento, T., Stockton, A. M. and Carrilho, E., "Technical Aspects and Challenges of Colorimetric Detection with Microfluidic Paper-based Analytical Devices (μ PADs) - A Review," *Analytica Chimica Acta*, **970**, 1-22(2017).
 35. Kim, S., Kim, D. and Kim, S., "A Rapid Real-time Quantification in Hybrid Paper-polymer Centrifugal Optical Devices," *Biosensors and Bioelectronics*, **126**, 200-206(2019).