



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0081354
(43) 공개일자 2018년07월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/12 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 1/12 (2013.01)
C12M 29/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0002491
(22) 출원일자 2017년01월06일
심사청구일자 2017년01월06일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
천홍구
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교안암캠퍼스 하나과학관 466호 (안암동5가)
박진혁
서울특별시 동대문구 약령시로3길 42, 201호(제기동)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 엑소좀을 포함하는 생체분자 연속 분리용 장치 및 이를 이용한 분리방법

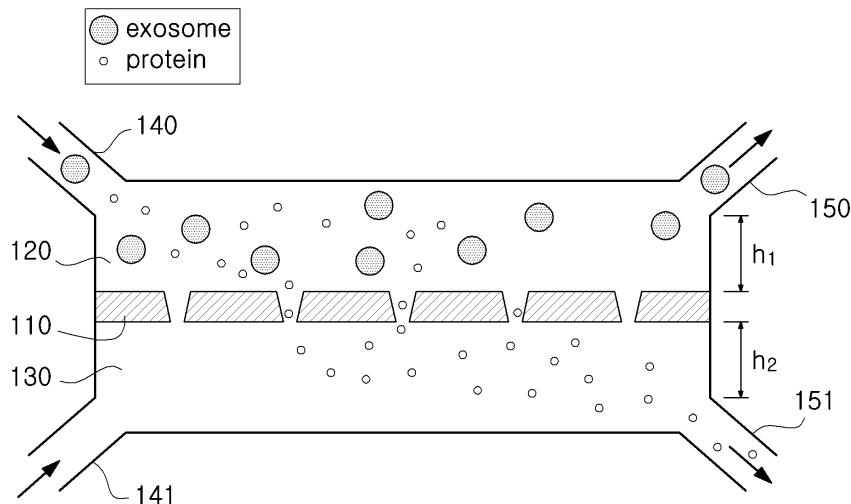
(57) 요약

본 발명은 엑소좀을 포함하는 생체분자 연속 분리용 장치 및 이를 이용한 분리방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 엑소좀과 같은 분리가 어려운 생체 내 미세소포체를 연속적으로 분리할 수 있는 엑소좀을 포함하는 생체분자 연속 분리용 장치를 제공하는 것이다.

본 발명의 여러 구현예에 따르면, 엑소좀과 같은 분리가 어려운 생체 내 미세소포체의 시료 외에 버퍼용액을 추가로 주입하여, 상기 버퍼용액의 흐름을 이용함으로써, 장치 내 나노 다공성막의 막힘현상 없이 연속적인 시료의 분리 가능한 효과를 나타낸다.

즉, 본 발명에 따른 생체분자 연속 분리용 장치 및 이를 이용한 분리방법은 분리하고자 하는 시료의 손상을 최소화하면서 단시간 내에 원하는 크기의 시료를 선택적이고 고효율로 분리해낼 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 1/40 (2013.01)

G01N 2001/4088 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

나노 다공성막;

상기 나노 다공성막의 일측에 형성되는 제1 공간부;

상기 나노 다공성막의 타측에 형성되는 제2 공간부;

상기 제1 공간부에 형성되어 엑소좀을 포함하는 제1 용액이 주입되는 제1 유입구;

상기 제1 유입구와 이격되게 배치되고 제1 공간부에 형성되는 제1 배출구;

상기 제2 공간부에 형성되어 제2 용액이 주입되는 제2 유입구; 및

상기 제2 유입구와 이격되게 배치되고 제2 공간부에 형성되는 제2 배출구;를 포함하는 엑소좀을 포함하는 생체 분자의 연속 분리용 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 공간부 및 제2 공간부의 폭과 길이의 비는 1 : 1 내지 2인 것을 특징으로 하는 엑소좀을 포함하는 생체 분자의 연속 분리용 장치.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 폭은 20 내지 30 mm이고,

상기 길이는 20 내지 50 mm인 것을 특징으로 하는 엑소좀을 포함하는 생체 분자의 연속 분리용 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제1 유입구 및 제1 배출구는 상기 제1 공간부의 양측 말단에 위치하고,

상기 제2 유입구 및 제2 배출구는 상기 제2 공간부의 양측 말단에 위치하는 것을 특징으로 하는 엑소좀을 포함하는 생체 분자의 연속 분리용 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 나노 다공성 막에는 직경이 10 내지 300 nm인 기공이 다수 포함된 것을 특징으로 하는 엑소좀을 포함하는 생체 분자의 연속 분리용 장치.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 나노 다공성막의 기공의 수는 0.2×10^9 내지 $2.0 \times 10^9/\text{cm}^2$ 인 것을 특징으로 하는 엑소솜을 포함하는 생체 분자의 연속 분리용 장치.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 기공의 직경은 제1 공간부에 접하는 직경과 제2 공간부를 접하는 직경의 크기가 서로 다른 것을 특징으로 하는 엑소솜을 포함하는 생체분자의 연속 분리용 장치.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 기공은 제1 공간부에 접하는 직경이 제2 공간부를 접하는 직경보다 큰 것을 특징으로 하는 엑소솜을 포함하는 생체분자의 연속 분리용 장치.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 나노 다공성막의 두께는 100 내지 500 nm인 것을 특징으로 하는 엑소솜을 포함하는 생체분자의 연속 분리용 장치.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 생체분자의 연속 분리용 장치를 이용한 생체분자의 분리방법에 있어서,

상기 제1 용액에 생체분자가 함유된 액체를 공급하고,

상기 제2 용액에 생체분자가 포함되지 않는 액체를 공급하는 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 생체분자는 엑소솜인 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 엑소솜은 10 내지 300 nm 크기인 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 제1 용액과 제2 용액의 주입 속도는 서로 동일한 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 제1 용액과 제2 용액의 주입 속도는 서로 다른 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 제1 용액과 제2 용액의 주입 속도는 주기적 또는 간헐적으로 차이를 나타내는 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 제1 용액의 주입 속도에 비하여 상기 제2 용액의 주입 속도가 큰 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법.

청구항 17

제10항에 있어서,

상기 제1 용액과 제2 용액의 주입 속도는 각각 0.05 ml/min 내지 0.2 ml/min 이고,

상기 제2 용액의 주입 속도는 제1 용액의 주입속도에 2-10배 인 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법.

청구항 18

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 생체분자의 연속 분리용 장치를 2개 이용하는 생체분자의 분리방법에 있어서,

제1 장치의 나노 다공상막의 기공 크기는 100 내지 300 nm이고,

제2 장치의 나노 다공상막의 기공 크기는 10 내지 100 nm인 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

세포막을 파쇄한 후 세포막의 파쇄액을 제1 장치에 통과시키고,

상기 제1 장치의 제1 배출구를 통해 배출된 배출액을 제2 장치의 제1 유입구로 주입시켜 분리하는 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 엑소좀을 포함하는 생체분자 연속 분리용 장치 및 이를 이용한 분리방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 엑소좀과 같은 분리가 어려운 생체 내 미세세포체를 연속적으로 분리할 수 있는 엑소좀을 포함하는 생체분

[0001]

자 연속 분리용 장치를 제공하는 것이다.

배경 기술

- [0002] 현재에 급증하는 바이오 정보는 기존의 실험실 분석 시스템으로는 그 신속한 처리가 어려운 실정이다. 이러한 추세에 따라 생명현상의 규명과 신약 개발 및 진단을 위한 생물학적 검출시스템은 미세 유체공학(microfluidics)의 기반 위에서 보다 적은 양으로 빠른 시간에 정확하고 편리하게 시료를 분석하기 위한 미세 종합 분석 시스템(μ -TAS : micro-Total Analysis System)과 랩온어칩(lab-on-a-chip)의 형태로 발전하고 있다. 분석의 대상이 되는 대부분의 생화학적 시료는 용액 상태로 존재하기 때문에 액체 시료를 전달하는 기술이 무엇보다도 중요한 요소라고 할 수 있다. 미세 유체 공학은 바로 이러한 미세 유체의 흐름을 조절하는 연구 분야로서, 상기 미세 종합 분석시스템과 랩온어칩의 상용화에 기초가 되는 핵심기술을 연구 개발하는 분야이다.
- [0003] 상기 미세 종합 분석시스템은 다수의 실험 단계들과 반응을 거치는 화학 및 생물학 실험과 분석을, 하나의 실험 대 위에 존재하는 하나의 유니트(unit)상에서 종합적으로 구현하는 시스템이다. 이러한 미세 종합 분석 시스템은 시료 채취 영역, 미세 유체 회로, 검출기 및 이들을 제어하는 제어기로 구성된다.
- [0004] 또한, 상기 랩온어칩이란 '칩 위의 연구실'이란 의미 그대로 상기 미세 종합분석시스템의 개념과 기능을 하나의 칩(chip) 상에서 구현한 것을 나타낸다. 따라서, 상기 랩온어칩을 개발하기 위해서는 플라스틱이나 유리, 실리콘 등의 표면에 용액이 흐를 수 있는 미세 채널로 회로를 생성한 후, 시료의 전처리, 분리, 희석, 혼합, 생화학 반응, 검출 등을 하나의 칩에 소형화 및 집적화시킬 수 있어야만 한다.
- [0005] 한편, 생체 내 미세소포체(마이크로베지클)는 여러 종류의 세포들에 존재하거나 세포로부터 분비되는 막 구조의 작은 소포이다. 세포 외로 분비되는 마이크로 베지클은 (i)엑소솜: 식균 기원의 직경 30 내지 100 nm의 막성 소포, (ii)엑토솜(shedding 마이크로베지클(shedding microvesicles, SMVs)이라고도 함): 원형질막으로부터 직접 흘러지고 직경 50 내지 1000 nm의 큰 막성 소포, (iii)세포자살성 수포(apoptotic blebs): 죽어가는 세포에 의해 유출된 직경 50 내지 5000 nm의 소포를 포함한다.
- [0006] 상기 생체 내 미세소포체(마이크로베지클), 예를 들어 엑소솜은 세포에서 분비되는 수십 나노미터 크기의 소포로서, 지질 이중층(lipid bilayer) 또는 지질 단층(lipid monolayer) 내부에 세포질 또는 세포에서 생성되는 단백질과 RNA가 포함되어 있는 구조이다. 엑소솜은 단백질 및 RNA의 교환을 통한 세포 간 의사소통의 수단이며, 세포내 불필요한 물질의 배출기능도 담당하고 있으며, 마이크로 RNA(microRNA, miRNA)를 포함하고 있어 암 등의 질병 조기진단과 같은 분자진단에 있어서 유용한 마커로 활용 가능하다. 상기와 같이 생체 내 미세소포체들의 중요성 및 가치가 밝혀지고 있지만, 상기 미세소포체들을 수득하는 데는 어려움이 따른다.
- [0007] 기존 마이크로베지클을 분리하는 방법은 마이크로베지클과 항체를 결합시켜 마이크로베지클을 면역-캡처하여 분리하는 방법이다. 이러한 방법은 단백질 구조 변화 등에 의한 항체 인식 부위의 마스킹(masking), 마이크로베지클 이질성(heterogeneity), 단백질 상호 작용 등에 의해 분리 또는 검출 타겟에 따라 편향(bias)이 발생할 수 있다. 분리 또는 검출을 위해 복잡한 프로세스나 고가의 장비가 필요할 수 있고, 시료의 소모량이 높을 수 있다.
- [0008] 또한, 엑소솜과 같은 생체 내 미세소포체들에 있어서 소용량의 분리는 미세유체칩으로도 가능하나, 상기 미세유체칩은 대용량의 분리가 어려우며 압력 등으로 인하여 분리막이 훼손될 수 있어 엑소솜을 분리하기에는 부적합한 단점을 갖는다.
- [0009] 따라서, 분리막의 손상없이 대용량의 미세소포체를 분리할 수 있는 장치에 대한 연구가 절실한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001)
- (비특허문헌 0002) Hollinshead et al., Vaccinia virus intracellular mature virions contain only one lipid membrane, J Virol. 1999 February; 73(2): 1503-1517.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 따라서, 종래의 문제점을 해결하기 위한 본 발명의 목적은 엑소좀과 같은 생체 내 미세소포체 시료를 다량으로 분리하기 위한 것으로서, 장치 내 압력을 가하지 않고 시료를 분산시킨 상태에서 막힘현상 없이 연속적으로 분리가 가능한 생체분자의 연속 분리용 장치 및 이를 이용한 분리방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 대표적인 일 측면에 따르면,
- [0013] 나노 다공성막;
- [0014] 상기 나노 다공성막의 일측에 형성되는 제1 공간부;
- [0015] 상기 나노 다공성막의 타측에 형성되는 제2 공간부;
- [0016] 상기 제1 공간부에 형성되어 제1 용액이 주입되는 제1 유입구;
- [0017] 상기 제1 유입구와 이격되게 배치되고 제1 공간부에 형성되는 제1 배출구;
- [0018] 상기 제2 공간부에 형성되어 제2 용액이 주입되는 제2 유입구; 및
- [0019] 상기 제2 유입구와 이격되게 배치되고 제2 공간부에 형성되는 제2 배출구;를 포함하는 엑소좀을 포함하는 생체 분자의 연속 분리용 장치에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 생체분자의 연속 분리용 장치를 이용한 생체분자의 분리방법에 있어서,
- [0021] 상기 제1 용액에 생체분자가 함유된 액체를 공급하고,
- [0022] 상기 제2 용액에 생체분자가 포함되지 않는 액체를 공급하는 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 생체분자의 연속 분리용 장치를 2개 이용하는 생체분자의 분리방법에 있어서,
- [0024] 제1 장치의 나노 다공성막의 기공 크기는 100 내지 300 nm이고,
- [0025] 제2 장치의 나노 다공성막의 기공 크기는 10 내지 100 nm인 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명의 여러 구현예에 따르면, 엑소좀과 같은 분리가 어려운 생체 내 미세소포체의 시료 외에 버퍼용액을 추가로 주입하여, 상기 버퍼용액의 흐름을 이용함으로써, 장치 내 나노 다공성막의 막힘현상 없이 연속적인 시료의 분리 가능한 효과를 나타낸다.
- [0027] 즉, 본 발명에 따른 생체분자 연속 분리용 장치 및 이를 이용한 분리방법은 분리하고자 하는 시료의 손상을 최소화하면서 단시간 내에 원하는 크기의 시료를 선택적이고 고효율로 분리해낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 생체분자의 연속 분리용 장치의 개략적인 구성도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 생체분자의 연속 분리용 장치 중에서 나노 다공성막의 단면을 나타낸 단면

도이다.

도 3은 본 발명의 다른 구현예에 따른 생체분자의 연속 분리용 장치 중에서 나노 다공성막을 SEM(Scanning electron microscope)으로 분석하여 기공의 크기를 나타낸 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.
- [0030] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 엑소솜을 포함하는 생체분자의 연속 분리용 장치를 나타낸 것으로서,
- [0031] 상기 생체분자의 연속 분리용 장치(100)는
- [0032] 나노 다공성막(110);
- [0033] 상기 나노 다공성막(110)의 일측에 형성되는 제1 공간부(120);
- [0034] 상기 나노 다공성막(110)의 타측에 형성되는 제2 공간부(130);
- [0035] 상기 제1 공간부(120)에 형성되어 제1 용액이 주입되는 제1 유입구(140);
- [0036] 상기 제1 유입구(140)와 이격되게 배치되고 제1 공간부(120)에 형성되는 제1 배출구(150);
- [0037] 상기 제2 공간부(130)에 형성되어 제2 용액이 주입되는 제2 유입구(141); 및
- [0038] 상기 제2 유입구(141)와 이격되게 배치되고 제2 공간부(130)에 형성되는 제2 배출구(151);를 포함한다.
- [0039] 종래의 초원심분리기(ultracentrifuge)는 시료가 들어있는 튜브를 초고속으로 회전시킴으로써, 강한 중력장을 발생시켜 침강되는 물질의 속도를 높여 시료를 분리하였다. 그러나, 이러한 방법은 강한 압력으로 인하여 분리막 또는 시료를 손상시킬 수 있어 엑소솜과 같은 생체 내 미세소포체 포함하는 생체분자 시료를 분리하기에는 한계가 있다.
- [0040] 따라서, 본 발명에서는 종래와 같이 압력을 가하여 분리하는 방법이 아닌, 시료를 장치 내에서 분산(diffusion)시켜 분리함으로써, 분리막 또는 시료의 손상없이 연속적으로 수분 이내에 분리가 가능한 생체분자의 연속 분리용 장치를 제공하는 것을 특징으로 한다.
- [0041] 상기 나노 다공성막(110)은 엑소솜을 포함하는 생체분자 시료를 크기별로 분리하기 위한 분리막의 역할을 한다.
- [0042] 상기 나노 다공성막(110)에는 직경이 10 내지 300 nm인 기공이 다수 포함된 것이 바람직한데, 더욱 바람직하게는 30 내지 200 nm의 크기를 갖는 것이다.
- [0043] 상기 나노 다공성막(110)의 기공의 수는 0.2×10^9 내지 $2.0 \times 10^9/\text{cm}^2$ 이다.
- [0044] 이와 관련하여, 도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 상기 나노 다공성막(110)을 확대하여 기공의 단면을 나타낸 도면이고, 도 3은 상기 나노 다공성막(110)을 SEM(Scanning electron microscope)으로 분석하여 기공의 크기를 확인할 수 있는 이미지이다.
- [0045] 먼저, 상기 도 2의 (a)에서 보는 바와 같이, 상기 기공의 직경은 제1 공간부에 접하는 직경(D1)과 제2 공간부를 접하는 직경(D2)의 크기가 서로 다른 것이 바람직하다.
- [0046] 더욱 바람직하게는, 상기 기공은 제1 공간부에 접하는 직경(D1)이 제2 공간부를 접하는 직경(D2)보다 큰 것이며, 더욱 더 바람직하게는 더욱 바람직하게는 도 2의 (b)에서 보는 바와 같이, 상기 D1에서 D2 방향으로 일정 높이 만큼 길이가 줄어들다가, 다시 일정 높이부터 D2 까지의 길이가 일정하게 유지된 형상을 갖는 것인데, 이러한 형상의 기공을 갖는 나노 다공성막(110)을 사용했을 때, 제1 용액내의 작은 생체분자들은 나노다공성막을 통해 제2 용액으로의 확산효율이 높아지고, 제2 용액으로 확산된 생체분자가 다시 제1 용액으로의 역확산효율은 낮아지는 것을 확인하였다. 확산은 생체분자의 직접적인 운동에 의해 생겨나는 현상이므로, 제1 용액과 접하는 나노다공성막의 면적은 넓어서 생체분자가 통과할 확률이 높은 반면 제2 용액과 접하는 나노다공성막의 면적은 좁기 때문에 생체분자가 다시 제1 용액으로 이동할 확률은 현저히 적어지기 때문이다.
- [0047] 상기 D1, D2의 직경 크기는 상기 D1의 크기가 D2보다 큰 것이면 충분하기 때문에 그 수치가 제한되는 것은 아니나, 더욱 바람직하게는 상기 D1은 1 내지 100 nm이고, 상기 D2는 1 내지 60 nm인 것이다. 또한, 상술한 바와 같이, 상기 기공의 D1은 수득하고자 하는 생체분자, 예를 들어 엑소솜의 크기에 따라 조절할 수 있으며, 더욱 더

바람직하게는 5 내지 85 nm일 수 있다.

- [0048] 상기 나노 다공성막(110)은 100 내지 500 nm의 두께를 갖는 것이 바람직한데, 이러한 두께 범위는 종래보다 현저하게 얇은 두께를 갖는 것으로서, 본 발명에서는 별도의 압력을 가하지 않고 시료를 장치 내에 분산시키는 것만으로 분리가 가능함에 따라 구현 가능한 것이다.
- [0049] 상기 생체분자 시료의 분리효율을 높이기 위해서는 상기 제1 공간부(120) 및 제2 공간부(130)의 폭과 길이의 비는 1 : 1 내지 2인 것이 바람직하다.
- [0050] 더욱 바람직하게는 상기 폭은 20 내지 30 mm이고, 상기 길이는 20 내지 50 mm인 것으로, 상기 범위를 벗어나는 경우에는 용액의 흐름이 가운데로 집중되어 생체분자 교환이 효율적이지 못하게 되고, 장치의 크기의 증가로 인한 유량 감소는 제2 용액에서 제1 용액으로의 역확산의 가능성을 증가시켜 분리 효율의 저하가 우려되어 바람직하지 않다.
- [0051] 더욱 더 바람직하게는, 상기 제2 공간부(130)의 높이(h_2)가 제1 공간부(120)의 높이(h_1)보다 큰 것이 바람직하다. 이는 상기 생체분자의 평형 이동과 관련된 것으로, 제2 공간부(130)의 높이(h_2)가 제1 공간부(120)의 높이(h_1)보다 클수록, 제2 공간부(130)로 유입되는 생체분자(예를 들어, 기공의 크기보다 작은 생체분자)의 양이 많아지게 되며, 최종적으로 생체분자들의 이동이 평형 상태에 도달하면, 제1 공간부(120)와 제2 공간부(130)로 유입된 각각의 생체분자의 양은 제1 공간부(120)와 제2 공간부(130)의 높이비율과 같다.
- [0052] 상기 제1 공간부(120)의 높이(h_1)에 의해서 분리효율이 크게 영향을 받기 때문에, 상기 제1 공간부(120)와 제2 공간부(130)의 부피비는 1 : 1 이상이면 특별히 이에 제한되지 않는다. 다만, 1 : 1 미만이면 상기 다공성 분리막을 통해 분리된 생체분자가 유입되는 제2 공간부(130)의 공간이 충분히 확보되지 않으므로, 분리되어야 할 생체분자가 제1 공간부(120)에 잔류하기 때문에 효율이 감소하게 되는 문제가 발생할 수 있다. 따라서, 상기 제1 공간부(120)와 제2 공간부(130)의 부피비는 1 : 1 이상의 범위에서 분리하고자 하는 생체분자 시료의 양에 따라 적절히 선택하는 것이 가장 바람직하다.
- [0053] 따라서, 제1 공간부(120)의 높이(h_1)는 특별히 이에 제한되지 않으나, 10 내지 1000 μm 인 것이 바람직하다. 구체적으로 제1 공간부(120)의 높이(h_1)가 1000 μm 를 초과할 경우 제2 공간부(130)까지 브라운 운동으로 움직여야 할 거리가 급격히 늘어나게 되므로 분리 효율이 현저하게 떨어지게 된다.
- [0054] 상기 제1 유입구(140) 및 제1 배출구(150)는 상기 제1 공간부(120)의 양측 말단에 위치하고, 상기 제2 유입구(141) 및 제2 배출구(151)는 상기 제2 공간부(130)의 양측 말단에 위치하는 것이 바람직하다.
- [0055] 상기 제1 유입구(140)는 제1 용액이 주입되는 곳으로, 상기 제1 용액은 생체분자가 함유된 액체이다.
- [0056] 또한, 상기 제2 유입구(141)는 제2 용액이 주입되는 곳으로, 상기 제2 용액은 생체분자가 포함되지 않는 액체인 것으로서, 나노 다공성막(110)의 막힘현상을 억제하는 역할을 한다.
- [0057] 즉, 제1 유입구(140)로부터 주입되는 제1 용액의 시료가 상기 나노 다공성막(110)의 기공을 막지 않도록 상기 나노 다공성막(110)의 하부에 형성된 제2 공간부(130)의 제2 유입구(141)를 통해 제2 용액을 주입함으로써, 상기 제2 용액이 나노 다공성막(110)의 기공을 막고 있는 시료입자를 밀어낼 수 있도록 하는 것이 본 발명의 주요 특징부라 할 수 있다.
- [0058] 상기 제1 유입구(140)로부터 주입되는 제1 용액은 상기 제1 유입구(140)에서 제1 배출구(150) 방향으로의 흐름성을 갖고, 제2 유입구(141)로부터 주입되는 제2 용액은 상기 제2 유입구(141)에서 제2 배출구(151) 방향으로의 흐름성을 갖는 것이 바람직하다.
- [0059] 이러한 흐름성은 장치 내에 압력을 가하지 않고 시료와 버퍼용액이 제1, 2 유입구(140, 141)로 각각 주입되는 유량의 속도에 따라 자연스럽게 형성되는 것으로서, 본 발명에서는 나노 다공성막(110)을 손상시키지 않고 분리가 가능하여 얇은 두께를 갖는 나노 다공성막(110)을 사용하더라도 연속적인 분리가 가능하게 하는 것이다.
- [0060] 따라서, 상기 제1 유입구(140)를 통해 제1 공간부(120)로 유입된 제1 용액은 흐름성에 따라 흐르면서 나노 다공성막(110)의 기공보다 크기가 작은 시료는 제2 공간부(130)로 하강하게 되고, 상기 기공보다 크기가 큰 시료는 상기 흐름성에 따라 제1 배출구(150)를 통해 배출된다.

- [0061] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 생체분자의 연속 분리용 장치를 이용한 생체분자의 분리방법으로서, 상기 제1 용액에 생체분자가 함유된 액체를 공급하고, 상기 제2 용액에 생체분자가 포함되지 않는 액체를 공급하는 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법을 제공한다.
- [0062] 상기 생체분자는 엑소좀인 것이 바람직하다. 여기서 엑소좀이란, 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소포이다. 상기 엑소좀의 직경은 10 내지 300 nm일 수 있다. 엑소좀은 전자 현미경을 통한 연구에서 원형 질막(plasma membrane)으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포내 특정 구획에서 기원하며 세포밖으로 방출, 분비된다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면, 그러한 소포들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소좀이라고 부른다. 이러한 엑소좀이 어떤 분자적 기작에 의해 만들어지는지 확실히 밝혀진 바가 없으나, 적혈구뿐만 아니라, B-림프구, T-림프구, 수지상 세포, 혈 소관, 대식 세포 등을 포함한 다양한 종류의 면역 세포들과 종양 세포 등도 살아 있는 상태에서 엑소좀을 생산하여 분비한다고 알려져 있다. 엑소좀은 정상 상태, 병적 상태, 또는 이 두 상태 하에서 다수의 다른 세포 유형으로부터 분리되어 방출된다고 알려져 있다.
- [0063] 상기 제1 용액과 제2 용액의 주입 속도는 서로 동일하거나, 또는 서로 다른 것이 바람직하다.
- [0064] 더욱 바람직하게는 상기 제1 용액과 제2 용액의 주입 속도는 주기적 또는 간헐적으로 차이를 나타내는 것으로, 상기 제1 용액의 주입 속도에 비하여 상기 제2 용액의 주입 속도가 큰 것이다.
- [0065] 구체적으로, 상기 제1 용액의 주입 속도는 제작한 나노다공성 막의 면적과 관련되며, 나노다공성 막 면적(cm^2)당 0.05 ml/min 내지 0.2 ml/min 이고, 상기 제2 용액의 주입 속도는 제1 용액의 주입속도에 2-10 배 인 것이 바람직하다. 제1 용액의 주입속도가 상기 범위보다 높은 경우에는 제1 용액의 생체분자가 제2 용액으로 분산되어 나가기에 충분한 시간을 제공하지 못할 수 있으며, 제2 용액의 주입 속도가 상기 범위보다 낮은 경우에는 제1 용액에서 제2 용액으로 분산되어 나간 생체분자의 농도가 포화상태에 이르러 분리 효율이 떨어지는 것이 우려되어 바람직하지 않다.
- [0066] 즉, 상기 제1 용액과 제2 용액의 주입 속도를 조절함으로써 분리효율을 향상시킬 수 있으며, 앞서 상술한 바와 같이, 별도의 압력을 가하지 않고도, 시료를 장치 내에서 분산(diffusion)시켜 분리함으로써, 분리막 또는 시료의 손상없이 연속적으로 수분 이내에 분리가 가능한 효과를 나타낸다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 생체분자의 연속 분리용 장치를 2개 이용하는 생체분자의 분리방법에 관한 것으로, 제1 장치의 나노 다공성막의 기공 크기는 100 내지 300 nm이고, 제2 장치의 나노 다공성막의 기공 크기는 10 내지 100 nm인 것을 특징으로 하는 생체분자의 분리방법을 제공한다.
- [0068] 상기 분리방법은 세포막을 파쇄한 후 세포막의 파쇄액을 제1 장치에 통과시키고, 상기 제1 장치의 제1 배출구를 통해 배출된 배출액을 제2 장치의 제1 유입구로 주입시켜 분리하는 것이 바람직하다.
- [0069] 즉, 2개의 장치를 이용한 생체분자의 분리방법은 크기가 서로 다른 2종 이상의 시료를 분리할 경우, 상대적으로 기공이 큰 나노 다공성막을 이용하여 1차로 시료를 분리한 후, 상대적으로 기공이 작은 나노 다공성막을 이용하여 상기 1차 분리된 시료를 재투입하여 2차로 분리하는 것이다.
- [0070] 즉, 본 발명에서 분리하고자 하는 생체분자 시료는 각기 다른 크기의 입자로 이루어져 있으므로, 필요에 따라 크기가 서로 다른 나노 다공성막을 이용하여 연속적으로 분리할 수도 있다.
- [0071] 이로써, 본 발명에 따른 생체분자의 연속 분리방법은 장치 내에 별도의 압력을 가하지 않고, 시료를 주입하고 장치 내에 분산시키는 단순한 공정을 통해 수분 이내로 크기별 시료의 분리가 가능할 뿐만 아니라 고효율의 분리가 가능하다.

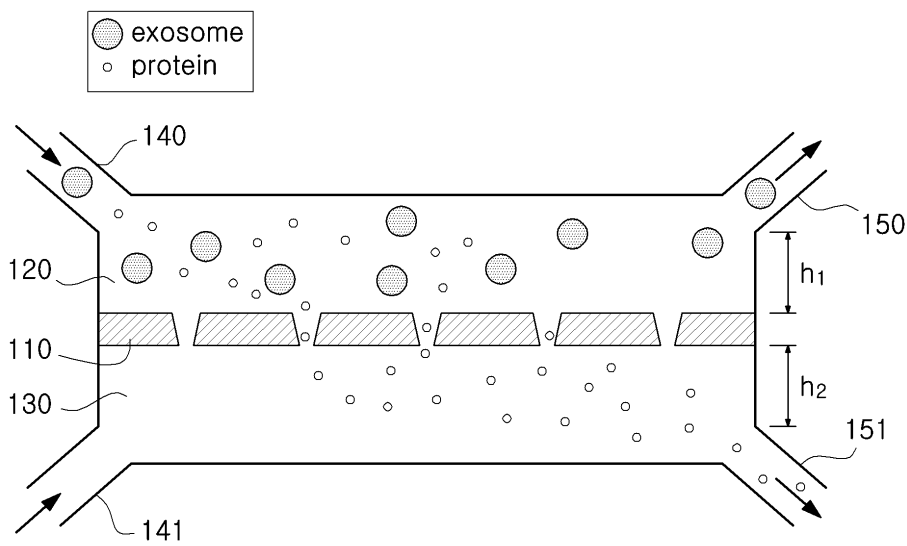
부호의 설명

- [0072] 110: 나노 다공성막
120: 제1 공간부
130: 제2 공간부

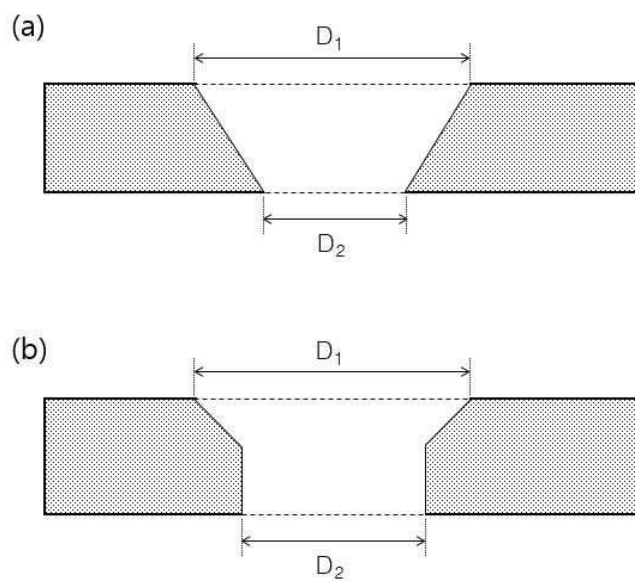
- 140: 제1 유입구
 141: 제2 유입구
 150: 제1 배출구
 151: 제2 배출구
 D1: 기공의 일단
 D2: 기공의 타단
 h1: 제1 공간부의 높이
 h2: 제2 공간부의 높이

도면

도면1



도면2



도면3

