



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0069187
(43) 공개일자 2019년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 35/08 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) G01N 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 35/085 (2013.01)
B01L 3/502761 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0169637
(22) 출원일자 2017년12월11일
심사청구일자 2018년10월10일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박찬필
대전광역시 서구 도안동로 183, 1506동 304호 (도안동, 도안아이파크아파트)
이주용
대전광역시 유성구 어은로 57, 102동 905호(어은동, 한빛아파트)
함성진
경기도 오산시 양산로 460, 116동 601호(양산동, 세마이편한세상)
(74) 대리인
김원준

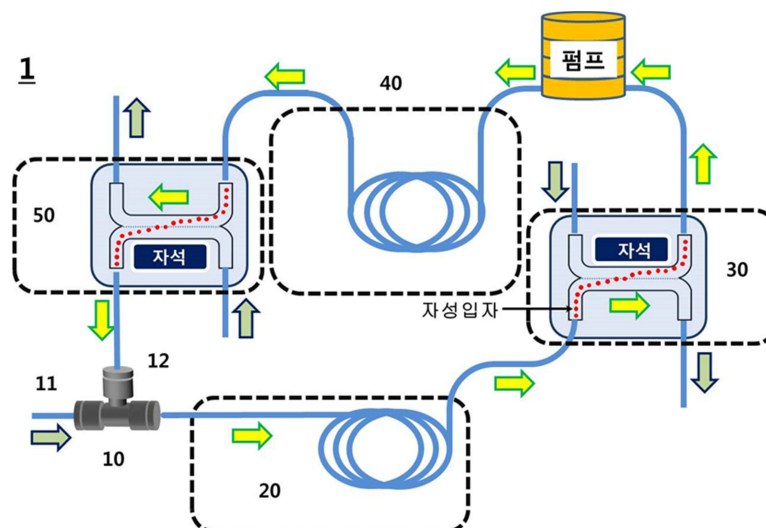
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 자성나노입자를 이용한 생체분자 추출을 위한 연속 순환형 미세유체소자

(57) 요약

본 발명은 프로브가 연결된 자성나노입자를 회수하여 재사용하는 것에 의해 소량의 자성나노입자에 연결된 프로브를 사용하여 시료로부터 연속적으로 생체분자를 추출할 수 있는 연속 순환형 미세유체소자와 이를 이용한 생체분자 추출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 시료가 주입되는 제1주입구, 하기 제2분리부를 통과한 자성나노입자를 포함한 용액이 주입되는 제2주입구 및 하기 결합유로와 연통된 출구를 가지는 T-정선; 상기 T-정선의 출구를 통해 주입된 시료 중의 타겟 생체분자와 상기 자성나노입자가 결합체를 형성하는 결합유로; 상기 결합체가 분리 배출되는 제1분리부; 상기 결합체를 타겟 생체분자와 자성나노입자로 해체하기 위한 해체유로; 상기 해체된 타겟 생체분자가 분리배출되는 제2분리부;를 포함하는 것을 특징으로 하는 자성나노입자를 이용한 생체분자 추출을 위한 연속 순환형 미세유체소자와 이를 이용한 생체분자 추출방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/54326 (2013.01)
 G01N 35/00029 (2013.01)
 G01N 35/0098 (2013.01)
 B01L 2200/0652 (2013.01)
 B01L 2300/0861 (2013.01)
 B01L 2300/18 (2013.01)
 G01N 2035/00158 (2013.01)
 G01N 2035/00237 (2013.01)
 G01N 2035/00564 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-1077-01
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단
 연구사업명 2015년 충남대학교 자체연구과제 지원 사업
 연구과제명 미세화학반응기를 이용한 광화학 반응 연구
 기 여 율 1/4
 주관기관 충남대학교
 연구기간 2015.09.01 ~ 2016.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A2A01007915
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 개인연구지원사업(중견연구)
 연구과제명 미세화학반응기 기반 신규 에너지원 연구
 기 여 율 1/4
 주관기관 충남대학교
 연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016-2160-02
 부처명 한국연구재단
 연구관리전문기관 충남대학교
 연구사업명 원천기술개발사업
 연구과제명 극미량 인체 시료 연령추정기술 개발연구
 기 여 율 1/4
 주관기관 충남대학교
 연구기간 2017.04.01 ~ 2018.01.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 T37415
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국기초과학지원연구원
 연구사업명 자체연구사업(Seed형 NAP)
 연구과제명 대사증후군 극복을 위한 에너지대사 분석기술개발
 기 여 율 1/4
 주관기관 한국기초과학지원연구원
 연구기간 2016.05.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

타겟 생체분자 특이결합 프로브가 연결된 자성나노입자를 이용하여 시료로부터 타겟 생체분자를 추출하기 위한 연속 순환형 미세유체소자로서,

시료가 주입되는 제1주입구, 하기 제2분리부를 통과한 자성나노입자를 포함한 용액이 주입되는 제2주입구 및 하기 결합유로와 연통된 출구를 가지는 T-정선;

상기 T-정선의 출구를 통해 주입된 시료 중의 타겟 생체분자와 상기 자성나노입자가 결합체를 형성하는 결합유로;

두 개의 주입구와 두 개의 배출구를 가지고 길이방향 일측에 자기장이 형성되어 있으며, 상기 자기장이 형성된 측 주입구로는 보충용액이, 다른 측 주입구로는 결합유로를 통과한 용액이 주입되어 이들 혼합액이 유동하는 동안 상기 결합체가 상기 자기장에 반응하여 경로를 변경하여 보충용액과 함께 상기 자기장이 형성된 측 배출구로, 나머지 폐기용액은 다른 배출구로 분리 배출되는 제1분리부;

상기 제1분리부의 자기장이 형성된 배출구와 연통되어 있으며, 유입된 용액 중의 결합체를 타겟 생체분자와 자성나노입자로 해체하기 위한 해체유로;

두 개의 주입구와 두 개의 배출구를 가지고 길이방향 일측에 자기장이 형성되어 있으며, 상기 자기장이 형성된 측 주입구로는 보충용액이, 다른 측 주입구로는 상기 해체유로를 통과한 용액이 주입되며 이들 혼합액이 유동하는 동안 해체된 자성나노입자가 상기 자기장에 반응하여 경로를 변경하여 보충용액과 함께 상기 자기장이 형성된 측 배출구로, 나머지 타겟 생체분자가 함유된 목적용액은 다른 배출구로 분리 배출되는 제2분리부;

포함하는 것을 특징으로 하는 자성나노입자를 이용한 생체분자 추출을 위한 연속 순환형 미세유체소자.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 결합유로와 해체유로 중 적어도 한 곳의 온도를 제어할 수 있는 것을 특징으로 하는 생체분자 추출을 위한 연속 순환형 미세유체소자.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 제1분리부의 자기장이 형성된 측 배출구와 해체유로 사이에 해체반응을 위한 시료가 주입되는 제3주입구가 추가로 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 자성나노입자를 이용한 생체분자 추출을 위한 연속 순환형 미세유체소자.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 T-정선과 제1주입구 사이에 제4주입구가 추가로 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 생체분자 추출을 위한 연속 순환형 미세유체소자.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

제2분리부와 T-정선 사이에,

두 개의 주입구와 두 개의 배출구를 가지고 길이방향 일측에 자기장이 형성되어 있으며, 상기 자기장이 형성된 측 주입구로는 세척용액이, 다른 측 주입구로는 제2분리부를 통과한 자성나노입자를 포함한 용액이 주입되며 이들 혼합액이 유동하는 동안 자성나노입자가 상기 자기장에 반응하여 경로를 변경하여 세척용액과 함께 상기 자기장이 형성된 측 배출구로 배출되어 상기 제2주입구로 주입되며, 나머지 용액은 다른 배출구로 분리 배출되는 세척부;

를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 자성나노입자를 이용한 생체분자 추출을 위한 연속 순환형 미세유체소자.

청구항 6

제 1 항의 연속 순환형 미세유체소자를 사용한 생체분자 추출방법에 관한 것으로,

(A) 제1분리부와 제2분리부의 자기장이 형성된 측 주입구를 통하여 보충용액을 투입하는 단계;

(B) 미세유체소자의 전체 유로에 유체가 채워질 때까지 제1주입구를 통하여 상기 프로브가 연결된 자성나노입자가 포함된 용액을 주입한 후 유체를 순환시켜, 흐름을 안정화시키는 단계; 및

(C) 제1주입구로 시료용액을 투입하고 제2분리부의 자기장이 형성되지 않은 측의 배출구로 배출되는 타겟 생체분자를 수득하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 생체분자 추출방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 (B) 단계에서,

상기 결합유로와 상기 해체유로의 온도를 각각 결합반응과 해체반응의 온도로 안정화하는 것을 특징으로 하는 생체분자 추출방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서,

연속 순환형 미세유체소자의 배출구와 해체유로 사이에 제3주입구가 추가로 형성되어 있으며,

상기 (B) 단계에서 제3주입구로 해체반응을 위한 반응시료를 투입하는 것을 특징으로 하는 생체분자 추출방법.

청구항 9

제 6 항에 있어서,

연속 순환형 미세유체소자의 T-정선과 제1주입구 사이에 제4주입구가 추가로 형성되어 있으며,

상기 프로브가 연결된 자성나노입자의 활성 저하가 관측되면, 상기 제4주입구를 통하여 상기 프로브가 연결된 자성나노입자를 보충하는 것을 특징으로 하는 생체분자 추출방법.

청구항 10

제 6 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

연속 순환형 미세유체소자에 상기 세척부가 추가로 형성되어 있으며,

상기 (A) 단계에서 세척부에는 세척용액을 투입하는 것을 특징으로 하는 생체분자 추출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 프로브가 연결된 자성나노입자를 회수하여 재사용하는 것에 의해 소량의 자성나노입자에 연결된 프로브를 사용하여 시료로부터 연속적으로 생체분자를 추출할 수 있는 연속 순환형 미세유체소자와 이를 이용한 생체분자 추출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간 유전체 프로젝트가 완료되고 포스트게놈 시대가 도래함에 따라 DNA나 RNA와 같은 핵산이나 단백질과 같은 생체물질의 분석이 생명현상의 규명을 위한 연구 뿐 아니라, 신약개발, 각종 질병의 진단, 친자확인을 비롯한 다양한 분야에서 이용되고 있다.

[0003] 이러한 생체분자들은 단백질이나 핵산 이외에도 지질, 당류 등 여러 가지 물질들이 공존하고 생체 시료 내에 극미량으로 존재하기 때문에, 타겟 생체물질을 검출하기 위해서는 높은 감도의 검출기를 사용하여야 하고, 이에 더하여 타겟 물질을 추출(농축)하는 과정이 필요하다. 생체물질을 포함하는 시료는 직접 인체로부터 채취하거나(질병의 진단이나, 친자확인 등의 경우), 주변 환경으로부터 채취하게 되는데(범죄현장의 감식, 식재료에서의 바이러스의 검출 등), 범죄현장의 검체와 같이 시료량 자체가 제한적인 경우 뿐 아니라 인체에서 직접 채취하는 경우에도 불편을 최소화할 수 있도록 최소량의 검체만을 채취하는 것이 바람직하다. 생체물질을 추출하는 과정은 이와 같이 미량의 시료를 다루어야 할 뿐 아니라 공정이 어렵고 복잡하여 전문인력이 필요하며, 오랜 시간과 반복적인 노동을 필요로 한다. 따라서 보다 단순하면서도 빠른 시간 안에 생체분자를 추출할 수 있는 방법에 대한 필요성이 강력히 대두되고 있다.

[0004] 최근 미세가공기술의 발달로 미세유체장비에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으며, 이를 이용한 정밀화학제품들이 Novartis, Merck, Degussa 등의 대형 화학회사들에 의해 상용화되고 있다. 수십~수백 마이크로미터의 너비와 깊이를 갖는 미세유로가 형성된 미세유체장비는 물질의 확산, 열전달 속도가 매우 빠르고 미세유로에 의해 단위 부피 당 활성 면적이 매우 넓어 월등히 균일한 온도 및 압력 구배에서 매우 적은 양의 촉매 및 반응물질을 이용하여 높은 수율로 원하는 생성물을 얻을 수 있다는 장점이 있어, 미세반응기로서 유용하게 사용될 수 있다. 또한 미량의 시료를 사용하여 수 μm^3 정도의 칩 위에서 분리와 정제 농축 등의 전처리 과정, 운송, 반응, 분석과 같은 일련의 과정을 거치므로, 현장 분석 및 진단과 같은 분야에서도 적은 양의 시료로 전자동분석을 실시할 수 있도록 하여 실험의 정확성과 효율을 향상시켜 신속한 현장 분석과 진단이 가능하도록 한다.

[0005] 미세유체장비의 장점과 생체분자의 분석 요구가 맞물리면서, 미세유체장비를 생체물질의 분석에 이용하고자 하는 시도들이 있어왔다. 자기영동 기반의 생체분자 분석은 타겟 생체분자와 특이적으로 결합하는 프로브가 연결된 자성나노입자와 시료를 반응시키고 자기장을 인가하면 타겟 생체분자를 간편하게 분리할 수 있으므로 생체분자의 검출 및 분석에 간편하게 사용할 수 있는 방법 중 하나이다. 이에 자기영동기반의 미세유체장비를 활용한 생체분자의 분석방법에 대해서도 많은 연구가 이루어져 왔다(등록특허 10-0952194, 등록특허 10-0695743, 공개특허 10-2017-0054431). 상기 방법들은 미세유체장비 내에서 자성나노입자와 생체분자를 결합시킨 후, 자성나노입자에 부착된 생체분자를 회수하는 것을 특징으로 한다. 상기 장비들을 사용하면 회수된 생체분자가 부착된 자성나노입자를 후처리하는 것에 의해 생체분자 자체를 추출하는 것도 가능하다. 그러나, 생체분자 분석을 위해 사용되는 자성나노입자나 프로브는 매우 고가이고, 생체분자 자체의 추출을 위해서는 다시 전문적인 인력에 의한 수동적인 후처리 과정이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 등록특허 10-0952194
(특허문헌 0002) 등록특허 10-0695743
(특허문헌 0003) 공개특허 10-2017-0054431

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제를 해소하기 위하여, 프로브가 연결된 자성나노입자를 최소량으로 사용하여, 자동화된 공정에 따라 간편하고 경제적으로 타겟 생체분자를 추출할 수 있는 장비를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 또한 본 발명은 상기 장비를 사용한 생체분자의 추출방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 타겟 생체분자 특이결합 프로브가 연결된 자성나노입자를 이용하여 시료로부터 타겟 생체분자를 추출하기 위한 연속 순환형 미세유체소자로서,
- [0010] 시료가 주입되는 제1주입구, 하기 제2분리부를 통과한 자성나노입자를 포함한 용액이 주입되는 제2주입구 및 하기 결합유로와 연통된 출구를 가지는 T-정선;
- [0011] 상기 T-정선의 출구를 통해 주입된 시료 중의 타겟 생체분자와 상기 자성나노입자가 결합체를 형성하는 결합유로;
- [0012] 두 개의 주입구와 두 개의 배출구를 가지고 길이방향 일측에 자기장이 형성되어 있으며, 상기 자기장이 형성된 측 주입구로는 보충용액이, 다른 측 주입구로는 결합유로를 통과한 용액이 주입되어 이들 혼합액이 유동하는 동안 상기 결합체가 상기 자기장에 반응하여 경로를 변경하여 보충용액과 함께 상기 자기장이 형성된 측 배출구로, 나머지 폐기용액은 다른 배출구로 분리 배출되는 제1분리부;
- [0013] 상기 제1분리부의 자기장이 형성된 배출구와 연통되어 있으며, 유입된 용액 중의 결합체를 타겟 생체분자와 자성나노입자로 해체하기 위한 해체유로;
- [0014] 두 개의 주입구와 두 개의 배출구를 가지고 길이방향 일측에 자기장이 형성되어 있으며, 상기 자기장이 형성된 측 주입구로는 보충용액이, 다른 측 주입구로는 상기 해체유로를 통과한 용액이 주입되며 이들 혼합액이 유동하는 동안 해체된 자성나노입자가 상기 자기장에 반응하여 경로를 변경하여 보충용액과 함께 상기 자기장이 형성된 측 배출구로, 나머지 타겟 생체분자가 함유된 목적용액은 다른 배출구로 분리 배출되는 제2분리부를;
- [0015] 포함하는 것을 특징으로 하는 자성나노입자를 이용한 생체분자 추출을 위한 연속 순환형 미세유체소자에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0016] 이상과 같이 본 발명의 미세유체소자는 연속 순환형 반응시스템이 적용되어, 표준화된 공정에 의해 타겟 생체분자의 추출을 자동화시킬 수 있어, 전문인력의 과도한 시간과 노력의 투입에 의한 비효율성을 제거할 수 있다.
- [0017] 또한 본 발명의 미세유체소자에 의하면 소량의 프로브가 연결된 자성나노입자를 사용하고도 효율적으로 타겟 생체분자를 추출할 수 있으므로 타겟 생체분자의 추출에 소요되는 비용을 크게 절감할 수 있다.
- [0018] 따라서 본 발명의 미세유체소자와 이를 이용한 생체분자의 분석방법은 생체분자의 추출을 요하는 신약개발, 질병의 진단, 환경분석, 품종분석 등의 다양한 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명의 미세유체소자의 구성을 보여주는 모식도.

도 2는 제1분리부의 모식도와, 제1분리부에서 유체의 흐름을 보여주는 현미경 이미지.

도 3은 본 발명의 실시예에서 사용된 프로브가 연결된 자성나노입자의 제조방법.

도 4는 본 발명의 일실시예에 의한 미세유체소자를 사용한 타겟 생체물질의 분리효능을 보여주는 전기영동 이미지.

도 5는 반응시간의 경과에 따른 자성나노입자의 활성 저하 및 자성나노입자의 보충에 의한 분리효능 증가를 보여주는 전기영동 이미지.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.
- [0021] 전술한 바와 같이 본 발명의 미세유체소자(1)는 타겟 생체분자 특이결합 프로브가 연결된 자성나노입자를 이용하여 시료로부터 타겟 생체분자를 추출하기 위한 연속 순환형 미세유체소자로서, 시료와 프로브가 연결된 자성나노입자가 공급되는 T-정선(10), 상기 자성나노입자와 시료 중의 타겟 생체분자가 특이적으로 결합하는 결합유로(20), 생체분자가 결합된 자성나노입자와 타겟 생체분자를 제외한 폐기용액이 분리되는 제1분리부(30), 생체분자가 결합된 자성나노입자가 생체분자와 자성나노입자로 해체되는 해체유로(40) 및 해체된 자성나노입자와 생체분자를 분리하는 제2분리부(50)로 이루어지며, 제2분리부에서 분리된 자성나노입자는 회수되어 상기 T-정선을 통하여 다시 공급되는 것에 의해 생체분자의 추출에 재사용되는 것을 특징으로 하는 자성나노입자를 이용한 생체분자 추출을 위한 연속 순환형 미세유체소자이다. 본 발명의 미세유체소자의 유로에 시료나 보충용액을 주입하거나, 유로 내의 유체를 순환시키는 것은 통상의 미세유체장치에서 사용되는 것과 같이 시린지 펌프나 연동 펌프 등을 사용할 수 있으며, 펌프의 위치나 종류, 개수 등은 미세유체장치 분야의 당업자라면 적절히 배치하여 사용할 수 있을 것이므로 기재 생략한다. 또한 각 구성요소별로 별도의 펌프를 구비하지 않더라도 예를 들어 순환유로에 하나의 유동펌프를 설치하는 것에 의해 유체의 순환이 가능하므로 각 구성요소로 유체의 주입이 가능함은 당연하다.
- [0022] 타겟 생체분자로는 핵산과 단백질을 예로 들 수 있으며, 핵산 또는 단백질에 특이적으로 결합하는 프로브 및 이를 자성나노입자에 도입하는 방법에 대해서는 많은 연구가 이루어진 공지 기술이며, 본 발명은 이를 이용하여 타겟 생체분자를 분리하는 연속 순환형 미세유체소자를 제공하는 것에 목적이 있으므로 타겟 생체분자나 프로브, 자성나노입자에 대해서는 자세한 설명을 생략한다. 즉, 본 발명은 타겟 생체분자에 대해 이와 특이적으로 반응하는 프로브와 연결된 자성나노입자를 이용하여 상기 타겟 생체분자를 자동화된 방법으로 간편하고 경제적으로 추출하는 방법에 관한 것이므로, 타겟 생체분자의 종류가 무엇이든, 이와 특이적으로 결합하는 프로브와 연결된 자성나노입자만 준비가 가능하다면 본 발명의 미세유체소자를 이용하여 생체분자를 추출하는 것이 가능하다.
- [0023] 별도로 도시하지는 않았으나, 본 명세서에서 각 주입구와 배출구에는 밸브가 형성되어 있어, 주입 또는 배출이 이루어지지 않을 때에는 유체의 출입을 차단할 수 있다.
- [0024] 도 1은 본 발명의 일실시예에 의한 미세유체소자의 모식도로, 이하에서 미세유체소자의 각 구성과 이를 이용한 생체분자의 추출방법을 상세하게 설명한다.
- [0025] 상기 T-정선(10)은 외부와 연통되어 시료가 주입되는 제1주입구(11)와, 하기 제2분리부(50)를 통과한 자성나노입자를 포함한 용액이 주입되는 제2주입구(12) 및 하기 결합유로와 연통된 출구를 가지며, T-정선을 통하여 결합유로로 연장되는 유로와 제2주입구에서 연장되는 유로가 순환되는 유로를 구성한다. 제1주입구는 시료의 주입이 필요하지 않은 경우에는, 외부와 연통을 차단할 수 있다.
- [0026] 상기 T 정선의 제1주입구를 통해 주입된 시료는 T-정선의 출구를 통하여 결합유로(20)에서 타겟 생체분자와 특이적으로 결합하는 프로브가 연결된 자성나노입자와 혼합되며, 생체분자와 프로브의 특이결합에 의해 결합체를 생성한다. 이때, 본 결합유로에는 결합체의 형성에 유리한 온도를 제공할 수 있도록 유로의 온도를 제어할 수 있는 것이 바람직하다.
- [0027] 제1분리부(30)는 결합체를 포함하는 용액으로부터 결합체와 나머지 폐기용액을 분리하는 부분이다. 이를 위해

여 제1분리부는 두 개의 주입구와 두 개의 배출구를 가지며, 길이방향 일측에 자기장이 형성되어 있다. 여기서 일측에 자기장이 형성되어 있다는 것은 유로의 횡단면을 따라 자기장 구배가 형성되어 있음을 의미한다. 본 분리부에서 자기장이 형성된 반대측 주입구로 결합유로를 통과한 용액이 주입되고 다른측 주입구로 보충용액이 주입되면, 분리유로에는 유로의 자기장측으로는 보충용액이, 자기장 반대측으로는 결합유로를 통과한 용액의 층류가 형성된다. 도 2는 제1분리부의 모식도(a)와, 자기장 형성 반대측의 주입구로 검은 점으로 표시되는 자성나노입자를 함유하는 용액이 주입되고, 자기장 형성 측의 주입구로 층류수를 주입하였을 때의 두 개의 주입구의 합류부분(A) 및 두 개의 배출구의 분류부분(B)의 현미경 이미지 사진((b)~(d))이다. 층류 형성을 명확하게 확인할 수 있도록 자성나노입자를 포함하는 용액에는 붉은 잉크를 섞어 주입하였다. 도 2의 (b)는 합류부분의 현미경 이미지로 각각의 주입구로 주입된 용액이 혼합되지 않고 층류를 형성하는 것을 보여준다. 도 2의 (c)와 (d)는 각각 자기장이 꺼있을 때와 인가있을 때의 배출구의 현미경 이미지로, 배출구까지 층류가 유지되며 자기장이 인가되지 않는 경우에는 자성나노물질이 층류를 따라 주입구와 같은 측의 배출구로 배출되지만, 자기장이 인가되면 자성나노물질이 자기장에 반응하여 경로를 변경하여 자기장 쪽으로 이동하므로 주입구의 반대측으로 보충용액과 함께 배출됨을 보여준다.

[0028] 상기와 같이 결합유로(20)를 통과하여 제1분리부(30)로 유입된 용액은 자성나노입자와 생체분자가 결합된 결합체만이 보충용액과 함께 자기장이 형성된 측 배출구로 배출되며, 나머지 폐기용액은 다른 배출구로 분리 배출되게 된다.

[0029] 제1분리부(30)에서 분리 배출된 결합체는 해체유로(40)에서 자성나노입자와 타겟 생체분자로 해체된다. 결합체의 해체를 위하여 해체유로는 해체반응에 유리한 조건을 제공할 수 있어야 한다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드를 타겟 생체물질로 하고, 상기 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 서열을 갖는 프로브가 자성나노입자와 결합체를 생성한다면, 상기 해체유로는 denaturation이 효과적으로 일어날 수 있도록 해체유로의 온도를 조절할 수 있다. 이를 위하여 본 발명의 미세유체소자는 해체유로의 온도를 제어할 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 해체유로의 온도제어는 단순히 해체유로를 일정한 온도가 유지되는 수조에 담그거나, 혹은 해체유로 주변에 온도조절용 유로를 형성하는 방법에 의해 이루어질 수 있다.

[0030] 또는 상기 제1분리부의 자기장이 형성된 측 배출구와 해체유로 사이에 제3주입구를 추가로 형성하여 해체반응을 위한 시료를 주입할 수 있다. 예를 들어, 해체반응에 승온이 필요하다면, 미리 가열한 용매를 제3주입구를 통하여 주입하면 미세유로는 열전달이 빠르기 때문에 해체반응을 효율적으로 유도할 수 있다. 만일, 해체반응에 다른 시약이 필요하다면(예를 들어, pH 조절 등), 역시 상기 제3주입구를 통하여 해체반응을 위한 시료를 주입할 수 있다. 이 경우, 해체유로는 제3주입구를 통하여 주입된 시료와 생체분자가 결합된 자성입자를 포함하는 용액의 혼합이 효과적으로 일어날 수 있도록 하는 구조를 가질 수 있다. 미세유로에서의 혼합유로에 대한 구성은 당업계에서 널리 알려져 있으므로, 이에 대한 상세한 설명은 생략한다.

[0031] 해체유로(40)를 통과하며 용액 중의 결합체가 타겟 생체분자와 프로브가 연결된 자성나노입자로 다시 해체된 후, 제2분리부(50)를 통과하면 해체된 자성나노입자가 포함된 보충용액은 자기장이 형성된 측 배출구로, 타겟 생체분자가 함유된 목적용액은 다른 배출구로 분리 배출된다. 이들이 분리배출되는 원리는 제1분리부(30)와 동일하므로 이에 대한 설명은 생략한다.

[0032] 제2분리부(50)에서 분리된 타겟 생체분자가 함유된 목적용액은 자기장이 형성된 반대측 배출구로 분리배출되어 타겟 생체분자를 회수할 수 있으며, 프로브가 연결된 자성나노입자는 회수되어 T-정선의 제2주입구로 주입되어 반응에 재사용된다.

[0033] 상기 미세유체소자를 사용하면 반응에 사용된 자성나노입자를 자동으로 회수하여 재사용하므로 소량의 자성나노입자만을 사용하여 자동화된 시스템으로 생체분자를 편리하게 추출할 수 있다. 이를 위한 생체분자 추출방법은 예를 들어, (A) 제1분리부와 제2분리부의 자기장이 형성된 측 주입구를 통하여 보충용액을 투입하는 단계; (B) 미세유체소자의 전체 유로에 유체가 채워질 때까지 제1주입구를 통하여 상기 프로브가 연결된 자성나노입자가 포함된 용액을 주입한 후 유체를 순환시켜, 흐름을 안정화시키는 단계; 및 (C) 제1주입구로 시료용액을 투입하고 제2분리부의 자기장이 형성되지 않은 측의 배출구로 배출되는 타겟 생체분자를 수득하는 단계:를 포함하여 이루어질 수 있다.

[0034] 이때, 만일 프로브와 생체분자 간 특이반응에 최적의 온도가 있다면, 시료의 주입전인 상기 (B) 단계에서 미리 결합유로와 해체유로의 온도를 각각 결합반응과 해체반응의 온도로 안정화시키는 것이 바람직하다. 혹은 해체반응을 위한 시료가 주입되는 제3주입구가 추가로 형성되어 있다면, 마찬가지로 상기 (B) 단계에서 제3주입구로 해체반응을 위한 반응시료를 투입하여 안정화시키는 것이 바람직하다.

- [0035] 보충용액으로는 프로브와 생체나노입자의 결합 또는 해체반응 및 타겟 생체분자에 영향을 미치지 않는 것을 사용하는 것이 바람직하며, 예를 들면 시료의 용매로 사용된 완충액이나 증류수를 사용할 수 있다.
- [0036] 도 1의 미세유체소자를 사용하여 293T 세포에서 얻은 미토콘드리아 DNA로부터 TGGTATTTTCGTCTGGGGGGTATG 서열의 프로브와 특이적으로 결합하는 타겟 DNA를 추출하였다. 검출을 위하여 프로브의 말단에는 Cy5 다이로 표지하였으며, 본 실험에 사용한 자성나노입자의 제조방법 및 구조는 도 3과 같다. 도 2에서는 자성나노입자에 하나의 프로브가 연결된 것으로 도시되어 있으나, 이는 구조를 간단히 나타내기 위한 것으로 다수의 프로브가 연결되어 있음은 당연하다. 미토콘드리아 DNA 추출은 통상의 추출방법을 사용하였다(Meta Gene, 11(2017), 141-146, http://www.abnova.com/protocol_pdf/KA0895.pdf).
- [0037] 보충용액은 증류수를 시린지 펌프를 사용하여 제1분리부와 제2분리부에 각각 20 μ l/분의 속도로 주입하였으며, 증류수에 분산된 도 3의 자성나노입자 100 μ g 또는 200 μ g을 제1주입구를 통하여 미세유체소자에 주입하고, marprene tube (id : 250 μ m, Watson-Marlow)가 장착된 연동 펌프를 활용하여 20 μ l/min의 속도로 시스템을 순환시켰다. 약 10분간 흐름을 안정화시킨 후, 타겟 생체분자를 포함한 미토콘드리아 DNA 시료를 제1주입구를 통하여 5 μ l/min의 속도로 연속적으로 주입하였다. 30분간 연속적으로 반응을 시행한 후, 5분간 제1분리부의 배출구 및 제2분리부의 배출구로 배출되는 용액을 수집하였다. 수집된 용액을 프로브와 동일한 서열의 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하여 시료 중 타겟 생체분자를 검출하였다. 해체유로의 온도는 외부의 수조를 사용하여 80℃로 유지하였다. 도 4는 그 결과를 보여주는 전기영동 이미지로, DNA는 미토콘드리아 DNA 시료, 1은 100 μ g 자성나노입자를 사용한 제2분리구의 시료, 2는 100 μ g 자성나노입자를 사용한 제1분리구의 시료, 3은 200 μ g 자성나노입자를 사용한 제2분리구의 시료, 4는 프로브가 연결되지 않은 자성나노입자를 사용한 제2분리구의 시료를 나타낸다. 도 4에서 1과 3의 제2분리구의 시료에서 타겟 서열의 생체분자가 추출된 것을 확인할 수 있으며, 제1분리구의 배출구로 배출된 시료는 타겟 생체분자가 포함되지 않은 것을 보여준다. 또한 프로브가 연결되지 않은 경우에는 제2분리구로 타겟 생체분자가 분리되지 않았다.
- [0038] 본 발명에서 프로브가 연결된 자성나노입자는 타겟 생체분자와 결합하여 불순물로부터 타겟 생체분자를 분리한 후 해체되어 반복적으로 재사용되는데, 반복 사용에 따라 활성도가 떨어질 수 있다. 따라서 반복 사용 시의 활성이 저하된 자성나노입자의 회수와 새로운 자성나노입자의 보충을 위하여 상기 T-정선과 제1주입구 사이에 제4주입구가 추가로 형성되어 있는 것이 바람직하다. 연속 반응에 의해 상기 프로브가 연결된 자성나노입자의 활성 저하가 관측되면, 반응을 중단하지 않고도 상기 제4주입구를 통하여 활성이 높은 자성나노입자를 보충하여 연속 반응을 진행할 수 있다. 이때, 자성나노입자를 계속적으로 보충하기만 하면, 미세유체의 유로에 자성나노입자의 농도가 너무 높아져 유체의 흐름에 영향을 미칠 수 있으므로, 새로운 자성나노입자의 주입 전에 제4주입구를 배출구로 사용하여 활성이 저하된 자성나노입자를 회수할 수 있다.
- [0039] 도 5는 상기 도 4의 장비를 사용한 타겟 생체분자의 추출에서, 200 μ g의 자성나노입자를 사용하여 시스템을 가동 후 각각 2시간마다 제2분리부에서 배출되는 용액을 5분간 수득한 후 PCR에 의해 타겟 생체분자를 증폭시킨 결과를 보여주는 전기영동 이미지와 이를 이미지 J 프로그램을 사용하여 정량한 그래프이다. 시간의 경과에 따라 자성나노입자의 활성이 저하되어 생체분자의 추출 성능이 저하되는 것을 관측할 수 있었으며, 8시간 후에는 자성나노입자 50 μ g을 추가하여 10시간에는 추출성능이 회복된 것을 확인할 수 있다. 따라서 사용되는 자성나노입자의 시료에 따라 적절한 간격으로 자성나노입자를 회수하고 재투입하는 것에 의해 효율 저하없이 효율적으로 생체분자를 회수하는 것이 가능함을 시사하였다.
- [0040] 프로브가 연결된 자성나노입자는, 시료 중에 포함되어 있던 불순물에 의한 오염 또는 독성에 의해 활성이 저하될 수 있으며, 자성나노입자가 반복 사용됨에 따라 미량의 오염물질이 지속적으로 축적될 수 있다. 이러한 문제를 해소하기 위하여, 본 발명의 미세유체소자의 제2분리부와 T-정선 사이에, 두 개의 주입구와 두 개의 배출구를 가지고 길이방향 일측에 자기장이 형성되어 있으며, 상기 자기장이 형성된 측 주입구로는 세척용액이, 다른 측 주입구로는 제2분리부를 통과한 자성나노입자를 포함한 용액이 주입되며 이들 혼합액이 유동하는 동안 자성나노입자가 상기 자기장에 반응하여 경로를 변경하여 세척용액과 함께 상기 자기장이 형성된 측 배출구로 배출되어 상기 제2주입구로 주입되며, 나머지 용액은 다른 배출구로 분리 배출되는 세척부;를 추가로 포함할 수 있다. 상기 세척부에 의하면 자성나노입자가 세척 과정을 거쳐 반응에 재사용되게 되므로, 재사용으로 인한 오염의 문제를 줄일 수 있고, 활성 저하 역시 지연시킬 수 있다. 세척부가 포함되어 있는 경우, 세척용액은 상기 (A) 단계에서 보충용액의 투입 시 함께 투입되는 것이 바람직하다.

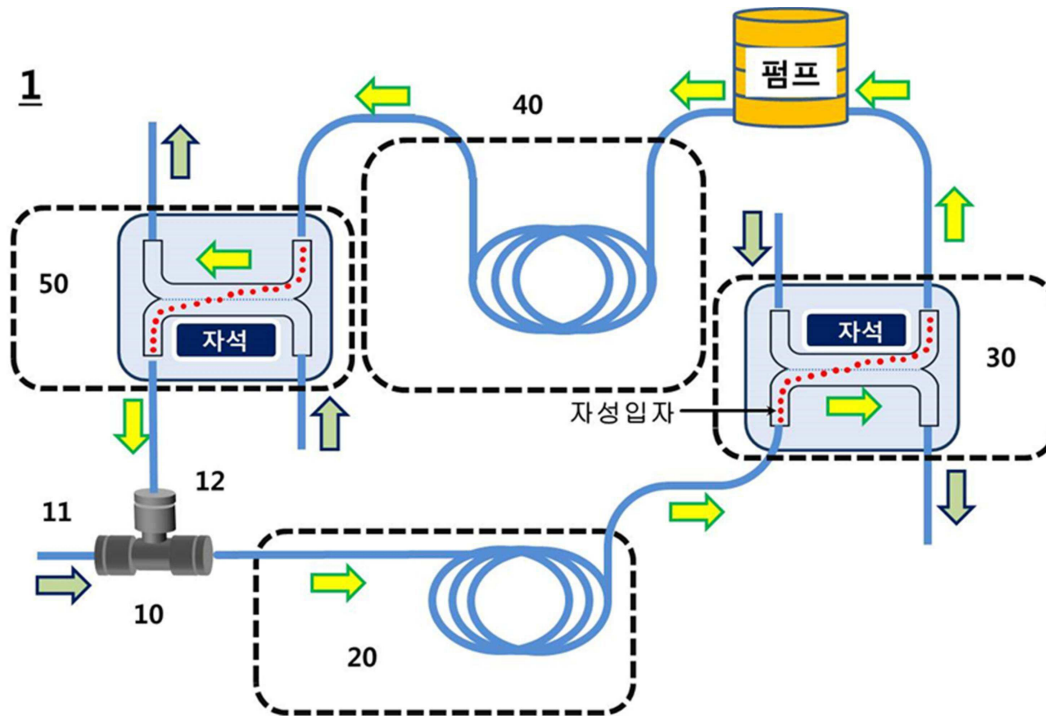
부호의 설명

[0041]

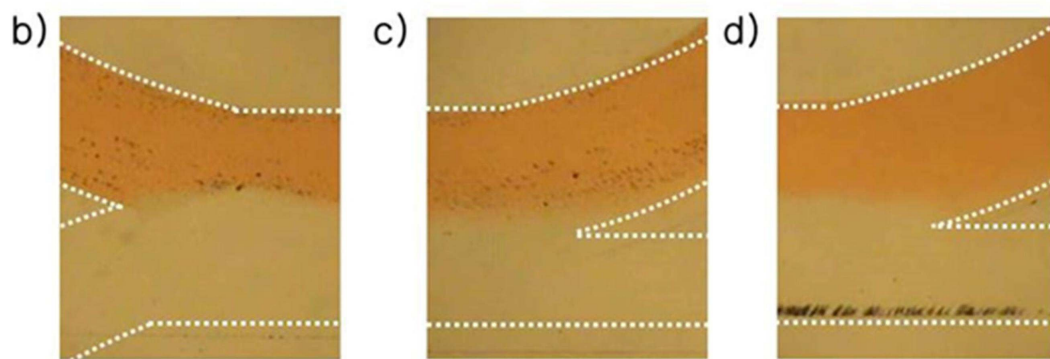
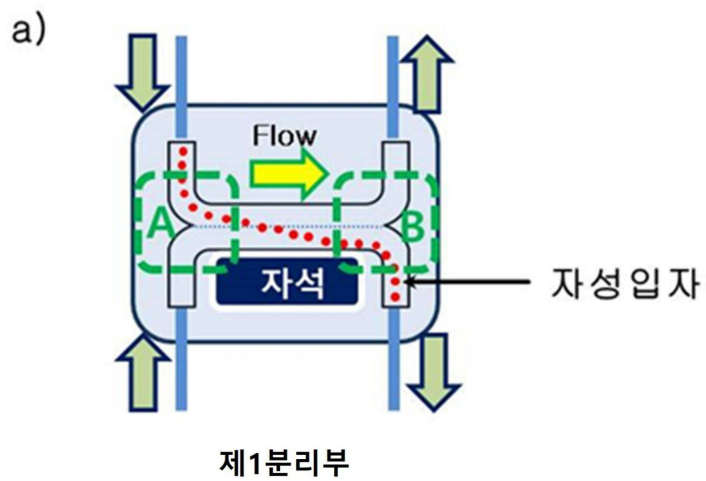
- 1 : 미세유체소자
 10 : T-정션
 11 : 제1주입구 12 : 제2주입구
 20 : 결합유로 30 : 제1분리부
 40 : 해체유로 50 : 제2분리부

도면

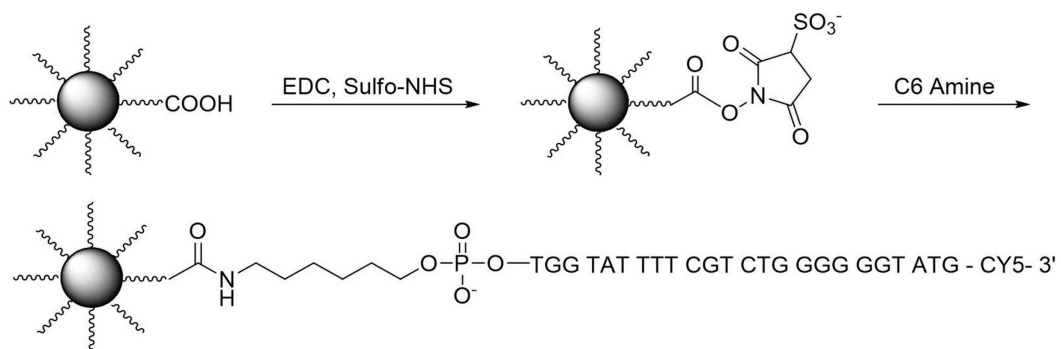
도면1



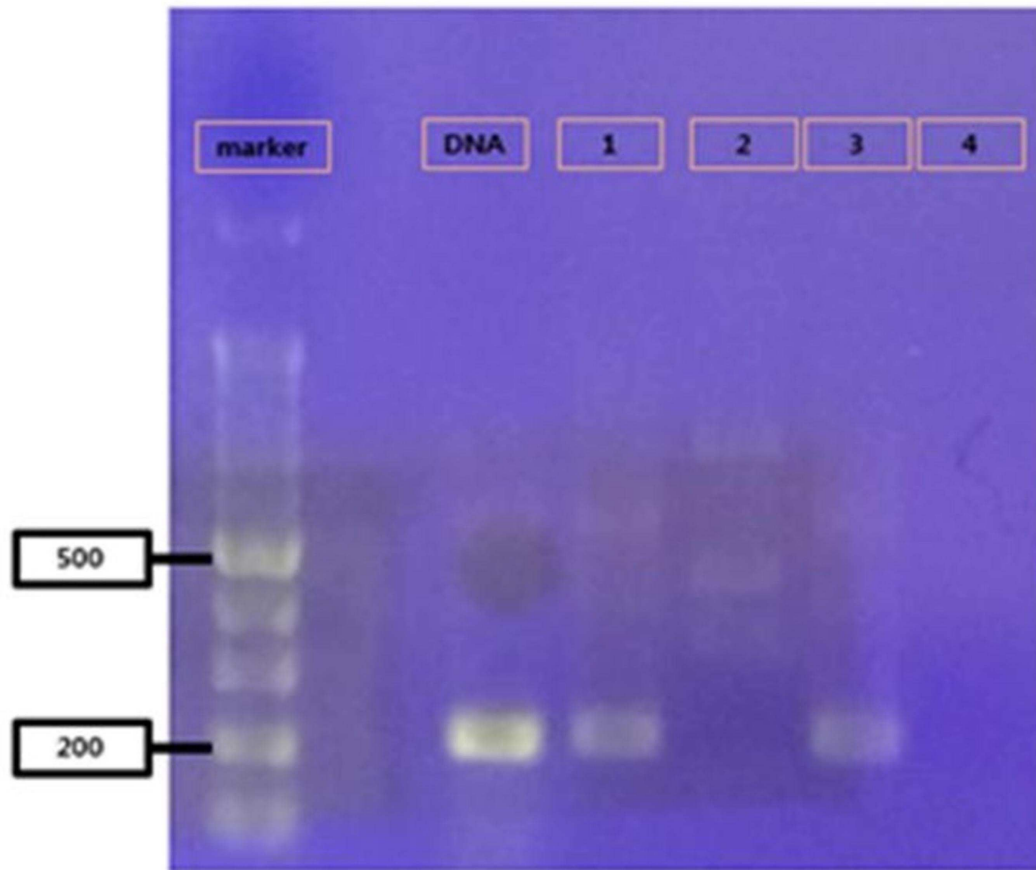
도면2



도면3



도면4



도면5

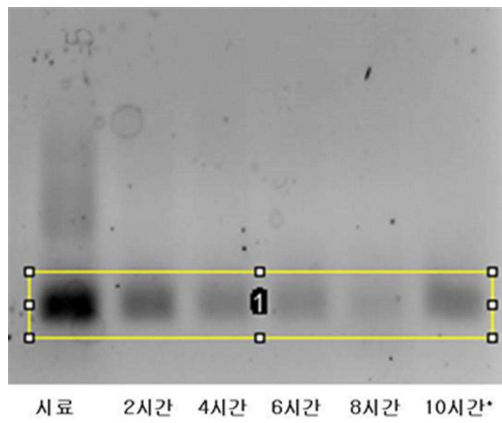


Image J

