



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년06월20일
(11) 등록번호 10-1631940
(24) 등록일자 2016년06월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5008 (2013.01)
B01L 3/5027 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0098151
(22) 출원일자 2015년07월10일
심사청구일자 2015년07월10일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110018798 A
KR1020140128547 A
KR1020110064549 A

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이창수
대전광역시 서구 둔산로 223, 6동 601호(둔산동, 청솔아파트)
정성근
충청남도 서산시 명륜1로 8 삼익참드림아파트 704호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

전체 청구항 수 : 총 9 항

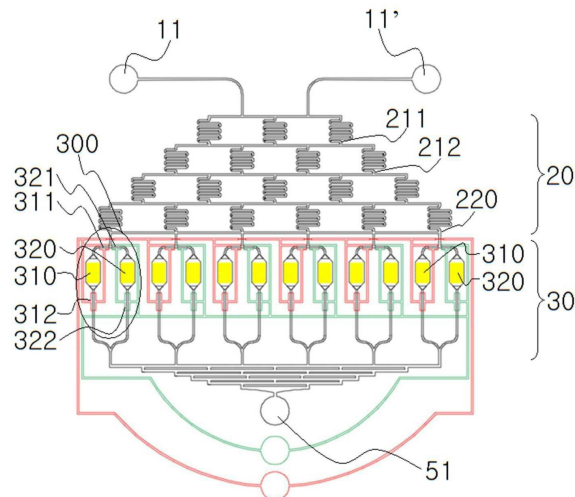
심사관 : 기광용

(54) 발명의 명칭 이중 세포의 시료감응성 동시 측정을 위한 미세유체칩

(57) 요약

본 발명은 동일 조건에서 이중세포의 시료감응성을 간단한 방법에 의해 동시에 측정할 수 있는 미세유체칩과 상기 미세유체칩을 이용한 이중세포의 시료감응성 측정방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 두 개 이상의 유체 주입구; 상기 주입구로 주입된 각 유체를 서로 다른 농도구배를 갖는 복수개의 미세채널로 분리하는 구배형성영역; 상단에 세포배양챔버 상단 밸브가 각각 설치된 복수개의 세포배양챔버로 이루어진 챔버세트가 상기 구배형성영역의 복수개의 최하단의 미세채널마다 연결되어 있는 세포배양영역; 및 상기 세포배양영역의 세포배양챔버에 연결되는 배출구;를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중세포의 시료감응성 동시 측정을 위한 미세유체칩과 상기 미세유체칩을 이용한 이중세포의 시료감응성 측정방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B01L 3/502738 (2013.01)

G01N 33/5011 (2013.01)

B01L 2200/0647 (2013.01)

(72) 발명자

마티아스 피터

스위스 취리히 오토-스턴-웨그 3 8093 HPM G 8 생
물학과

이성식

충남 태안군 원북면 나루터길 319-51

명세서

청구범위

청구항 1

두 개 이상의 유체 주입구;

상기 주입구로 주입된 각 유체를 서로 다른 농도구배를 갖는 복수개의 미세채널로 분리하는 구배형성영역;

상단에 세포배양챔버 상단 밸브가 각각 설치된 복수개의 세포배양챔버가 병렬로 형성된 챔버세트가 상기 구배형성영역의 최하단의 미세채널마다 연결되어 있는 세포배양영역; 및

상기 세포배양영역의 각 세포배양챔버에 연결되는 배출구;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중세포의 시료감응성 동시 측정을 위한 미세유체칩.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 각 세포배양챔버 하단에 세포배양챔버 하단 밸브가 추가로 설치되어 있는 것을 특징으로 하는 이중세포의 시료감응성 동시 측정을 위한 미세유체칩.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 챔버세트에는 바이패스용 유로가 추가로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 이중세포의 시료감응성 동시 측정을 위한 미세유체칩.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 바이패스용 유로로의 유체의 유입을 개폐할 수 있는 바이패스용 유로 밸브가 추가로 설치된 것을 특징으로 하는 이중세포의 시료감응성 동시 측정을 위한 미세유체칩.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 구배형성영역의 미세채널과 연결되는 세포 주입구를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 이중세포의 시료감응성 동시 측정을 위한 미세유체칩.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 유체 주입구와 구배형성영역의 경계에 유체 주입구 밸브가, 상기 세포 주입구와 구배형성영역의 경계에 세포 주입구 밸브가 추가로 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 이중세포의 시료감응성 동시 측정을 위한 미세유체칩.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 세포배양챔버는 단일세포층이 부착될 수 있도록 시료감응성을 측정하고자하는 세포의 크기에 따라 트래퍼(trapper)의 높이가 결정되는 것을 특징으로 하는 이중세포의 시료감응성 동시 측정을 위한 미세유체칩.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 의한 미세유체칩을 이용한 이중세포의 시료감응성 동시 측정방법에 관한 것으로서,

- (A) 각 챔버세트 당 하나씩의 세포배양챔버의 상단 밸브를 제외한 모든 세포배양챔버 상단 밸브를 잠그고 유체 주입구 중 하나에 세포를 주입하는 단계;
 - (B) (A)의 과정을 순차적으로 반복하여 챔버세트 내 각각의 세포배양챔버에 서로 다른 이중 세포를 주입하는 단계;
 - (C) 상기 모든 세포배양챔버 상단 밸브를 열고, 상기 두 개 이상의 유체 주입구에 서로 농도가 다른 시료를 주입하여 구배형성영역을 통과시켜 농도구배가 형성된 시료에 이중세포들을 동시에 노출시키는 단계;
 - (D) 상기 세포배양챔버에 농도구배가 형성된 시료가 처리되면, 세포배양챔버 상단 밸브를 잠그고 세포를 배양하는 단계; 및
 - (E) 상기 세포배양영역의 세포배양챔버를 관측하여 시료감응성을 측정하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중세포의 시료감응성 동시 측정 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 (D)단계의 세포배양영역의 관측은 실시간으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 이중세포의 시료감응성 측정 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 동일 조건에서 이중세포의 시료감응성을 간단한 방법에 의해 동시에 측정할 수 있는 미세유체칩과 상기 미세유체칩을 이용한 이중세포의 시료감응성 측정방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 여러 가지 환경 위해 물질이나, 신약, 천연물이 함유하는 유효물질이 세포에 미치는 영향을 파악하기 위해서는 다양한 농도에서 해당 물질로 세포를 자극하고, 자극에 의한 세포의 반응을 측정하게 된다. 이와 같은 세포의 시료감응성 측정을 위해서 종래 기술에서는 세포를 포함하는 배지가 포함된 웰-플레이트에 시료를 농도별로 가하여 세포의 반응을 측정하였다(도 7). 이러한 웰-플레이트를 이용한 방법에 의하면, 세포를 포함하는 배지 위에 시료를 가하면 배지의 상층부에서 하층부 바닥에 존재하는 세포까지 확산되어 도달하는 데 소정 시간이 소요된다. 따라서 실제로 연구자가 원하는 특정 농도에 해당하는 자극을 세포에 주는 시간과 주입 시간이 차이가 나므로 정확한 자극 시간을 알 수 없다. 또한 확산에 의해 세포는 저농도부터 서서히 자극을 받게 되므로 엄밀한 의미에서는 특정 농도에서의 자극에 대한 세포 반응을 보기 어렵다.

- [0003] 최근에는 농도구배가 형성되는 미세유체칩을 사용하여 세포의 시료감응성을 측정하는 장치가 활발히 연구되고 있다. 미세유체칩은 제약, 생물공학, 의학 등의 분야에서 시간을 크게 절감시킬 수 있어 효율적이며, 실험에 요구되는 시료의 양이 매우 적어 경제적이고, 결과에 있어서도 정확도와 신뢰성을 높일 수 있다.
- [0004] 미세유체칩의 미세유로는 낮은 레이놀즈 수(Reynolds number)를 갖기 때문에 유로 내에서 층류(laminar flow)를 형성하므로, 이를 이용하여 농도구배를 형성시킬 수 있다(도 8). 이를 이용하여, 세포가 위치한 배양구간 내에 농도구배가 형성된 상태로 시료를 주입하고 세포에 미치는 영향을 측정하는 것에 의해 세포의 시료감응성을 효율적으로 측정할 수 있다. 본 발명자들은 이러한 원리를 이용한 생물막의 시료 감응성 측정 방법 및 장치에 대하여 등록특허 제1210590호로 등록받은 바 있다. 등록특허 제1038484호, 공개특허 제10-2014-0128547호에도 상기 원리를 이용한 세포 분석방법이 기재되어 있다.
- [0005] 경우에 따라, 동일한 시료에 대해 이중세포 간 시료감응성의 차이를 관측할 필요가 있다. 예를 들면, 항암제 후보물질에 대해 암세포와 정상세포의 시료감응성의 차이, 항암제 후보물질에 대한 다양한 종류의 암세포의 시료감응성의 차이, 항균제에 대한 세균의 변이체간의 시료감응성의 차이, 동일 환경물질에 대한 서로 다른 조직 세포에서의 시료감응성의 차이 등의 평가는 의학분야에서 아주 중요한 시험 과제이다. 종래기술에서 이중세포의 동일시료에 대한 시료감응성 측정은 동일한 구조를 갖는 농도구배 형성 미세유체칩 2개를 사용하여 각각의 세포에 대한 시료감응성을 측정하여 비교할 수밖에 없었다. 그러나 디자인이 동일한 농도구배 형성 미세유체칩이라 할지라도, 제조 공정 중의 오차나 공정 중 먼지의 유입이나 플라즈마 처리 공정의 차이에 의한 유로의 소수성 차이로 인해 농도구배 형성이 동일하게 이루어지기 어렵다. 설사 미세유체칩 자체가 완벽히 동일하다고 하더라도 외부 펌프(기계적 마찰)에 의한 압력 차이, 실험 환경의 차이 등으로 인해 서로 동일한 실험 조건을 구현하는 것은 거의 불가능하다.
- [0006] 이에 더하여 상기와 같은 유체흐름을 기반으로 한 미세유체칩은 지속적인 유체의 흐름을 유지하여야만 농도구배를 유지할 수 있기 때문에, 다음과 같은 문제가 내재되어 있다. 첫째, 배양구간 내의 세포는 시료의 흐름에 지속적으로 노출되기 때문에 시료가 축적되어 실제 농도보다 국부적으로 높은 농도 환경에 처하게 된다. 따라서 원하는 농도에서의 시료감응성을 정확하게 측정하기 어렵다. 둘째, 지속적인 유체의 흐름에 의해 세포는 항력(drag force)을 받게 되며, 또한 유로의 가장자리에는 전단응력(shear stress)이 유로의 중앙에 비해 크게 작용하기 때문에 세포의 반응이 특정 시료농도에 의한 반응인지 항력 또는 전단응력에 대한 반응인지 구별하기 어렵다. 셋째, 배양구간에서의 시료의 농도구배는 세포가 포함되어 있는 경우와 포함되어 있지 않은 경우가 서로 상이하며, 배양구간의 초입과 말미에서의 농도구배가 상이할 수 있으므로 세포에 자극이 가해지는 정확한 농도를 알기 어렵다.

[0007]

선행기술문헌

특허문헌

[0008]

- (특허문헌 0001) 등록특허 제1210590호
(특허문헌 0002) 등록특허 제1038484호
(특허문헌 0003) 공개특허 제10-2014-0128547호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009]

본 발명은 종래기술에 의한 웰-플레이트와 미세유체칩의 한계를 극복하기 위하여, 이중세포에 대한 시료감응성을 동일한 조건에서 동시에 측정할 수 있는 미세유체칩을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010]

또한 본 발명은 종래기술에 의한 유체흐름을 기반으로 한 미세유체칩의 문제점을 해소하여 항력과 전단응력의 영향을 받지 않으며, 정확한 시료 농도에 대한 세포의 시료감응성을 측정할 수 있는 미세유체칩을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0011]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 미세유체칩을 이용한 이중세포의 시료감응성을 동시에 측정하는 방법을 제공하

는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 두 개 이상의 유체 주입구; 상기 주입구로 주입된 각 유체를 서로 다른 농도구배를 갖는 복수개의 미세채널로 분리하는 구배형성영역; 상단에 세포배양챔버 상단 밸브가 각각 설치된 복수개의 세포배양챔버로 이루어진 챔버세트가 상기 구배형성영역의 복수개의 최하단의 미세채널마다 연결되어 있는 세포배양영역; 및 상기 세포배양영역의 각 세포배양챔버에 연결되는 배출구;를 포함하는 것을 특징으로 하는 이중세포의 시료감응성 동시 측정을 위한 미세유체칩에 관한 것이다.
- [0013] 또한 본 발명은 전술한 미세유체칩을 이용한 이중세포의 시료감응성 동시 측정 방법에 관한 것으로서, (A) 각 챔버세트 당 하나씩의 세포배양챔버의 상단 밸브를 제외한 모든 세포배양챔버 상단 밸브를 잠그고 유체 주입구 중 하나에 세포를 주입하는 단계; (B) (A)의 과정을 순차적으로 반복하여 챔버세트 내 각각의 세포배양챔버에 서로 다른 이중 세포를 주입하는 단계; (C) 상기 모든 세포배양챔버 상단 밸브를 열고, 상기 두 개 이상의 유체 주입구에 서로 농도가 다른 시료를 주입하여 구배형성영역을 통과시켜 농도구배가 형성된 시료에 이중세포들을 동시에 노출시키는 단계; (D) 상기 세포배양챔버에 농도구배가 형성된 시료가 처리되면, 세포배양챔버 상단 밸브를 잠그고 세포를 배양하는 단계; 및 (E) 상기 세포배양영역의 세포배양챔버를 관측하여 시료감응성을 측정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0014] 이상과 같이 본 발명에 의하면 하나의 미세유체칩에서 이중세포의 시료감응성을 동시에 측정할 수 있으므로, 농도구배, 온도, 펌프의 영향 등이 동일한 조건에서의 시료감응성을 실시간으로 측정할 수 있다.
- [0015] 또한 본 발명의 미세유체칩은 농도구배를 유지하기 위하여 유체흐름을 유지할 필요가 없으므로 세포가 항력과 전단응력의 영향을 받지 않아, 정확한 시료 농도에 대한 세포의 시료감응성을 측정할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 본 발명의 일실시예에 의한 미세유체칩의 설계도.
- 도 2는 도 1의 미세유체칩에서 챔버세트 중의 각 세포배양챔버에 유체가 선택적으로 주입되는 것을 보여주는 광학현미경 이미지.
- 도 3은 바이패스용 유로 밸브를 포함하는 바이패스용 유로가 추가된 본 발명의 일실시예에 의한 미세유체칩의 설계도.
- 도 4는 세포 주입구의 위치를 예시적으로 나타낸 미세유체칩의 설계도.
- 도 5는 세포 주입구 밸브 및 유체 주입구 밸브가 추가된 본 발명의 일실시예에 의한 미세유체칩의 설계도.
- 도 6은 세포배양챔버의 확대도 및, 세포배양챔버에 설치된 트래퍼의 평면도 및 단면도.
- 도 7은 종래기술에 의한 웰-플레이트 방법에 의한 세포의 시료감응성 측정방법을 보여주는 모식도.
- 도 8은 종래기술에 의한 미세유체칩에서의 농도구배를 보여주는 모식도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면은 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.

- [0018] 본 발명에 의한 이중세포의 시료감응성 동시 측정을 위한 미세유체칩의 기본적인 구조는 도 1과 같다. 즉, 두 개 이상의 유체 주입구(11, 11'...), 상기 주입구로 주입된 각 유체를 서로 다른 농도구배를 갖는 복수개의 미세채널로 분리하는 구배형성영역(20), 세포가 배양되며 상기 구배형성영역을 통과한 시료가 서로 다른 농도로 유입되어 세포의 시료감응성을 측정할 수 있는 세포배양영역(30); 및 상기 세포배양영역을 통과한 유체가 배출되는 배출구(51)를 포함한다.
- [0019] 상기 세포배양영역은 상기 구배형성영역의 최하단의 미세채널(220)에 연결된 챔버세트(300)들로 이루어지는데, 상기 챔버세트는 복수개의 세포배양챔버(310, 320...)와 상기 각 세포배양챔버의 상단에 설치된 세포배양챔버 상단 밸브(311, 321...)를 포함한다. 세포배양챔버 상단 밸브(311, 321...)를 닫는 것에 의해 세포배양챔버(310, 320...)로의 유체의 유입이 차단됨과 동시에 세포배양챔버(310, 320...)에서 배출구(51)로의 유체의 흐름 또한 멈추게 된다. 보다 확실히 세포배양챔버(310, 320...)로부터의 유체의 유출을 제어하기 위하여 본 발명의 미세유체칩은 세포배양챔버(310, 320...)의 하단에 세포배양챔버 하단 밸브(312, 322...)를 추가로 포함할 수도 있다. 여기서 "상단"과 "하단"이라 함은 유체의 흐름을 기준으로 한 것으로, 유체가 흘러들어오는 방향을 "상단", 유체가 흘러나가는 방향을 "하단"이라 한다. 즉, "상단"과 "하단"의 밸브는 각 세포배양챔버에 대하여 유체의 유입과 허용하거나 차단할 수 있는 밸브를 의미한다. 또한 상기 밸브들은 각 세포배양챔버에 대해서만 독립적으로 작용할 수 있도록 설치되어야 함은 당연하다. 즉, 유로의 합류지점이 있는 경우, 세포배양챔버의 "상단"의 밸브는 유로의 합류지점 이후에 설치되어야 다른 유로로의 유체의 흐름을 방지하지 않고 세포배양챔버로의 흐름만을 제어할 수 있다. 반대로, 세포배양챔버의 "하단"의 밸브는 유로의 합류지점 전에 설치되어야 다른 유로로의 유체의 흐름을 방지하지 않고 세포배양챔버로의 흐름만을 제어할 수 있음은 당연하다.
- [0020] 본 발명에서 "세포"라 함은 박테리아와 같은 단세포 생물 그 자체는 물론, 다세포 생물의 조직 세포를 포함한다.
- [0021] 도 1에서는 유체 주입구가 두 개이고, 챔버세트 내 세포배양챔버가 2개인 미세유체칩을 도시하였으나, 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 유체 주입구와 세포배양챔버의 수는 2개 이상이면 족하며, 그 상한을 설정하는 것은 의미가 없다. 유체 주입구와 세포배양챔버의 수가 증가할수록 유체의 농도구배를 복잡하게 실현할 수 있고, 동시에 분석할 수 있는 세포의 종류가 증가하여 기능적으로는 우수할 수 있다. 예를 들어 유체 주입구가 좌측, 중앙, 우측에 각각 설치되어 있고 세 개의 주입구로 주입된 유체가 구배형성영역에서 농도구배가 형성된 미세유체칩을 사용하면, 좌측에는 시료 A를 중앙에는 용매를 우측에는 시료 B를 동시에 주입하는 것에 의해 시료 A와 B에 대한 이중세포의 시료감응성을 동시에 측정할 수 있다. 다만, 유체 주입구와 세포배양챔버의 수의 증가는 미세유체칩의 구조를 복잡하게 하고, 집적이 어려워지므로 이론적으로는 수의 상한이 무의미하다 하더라도 실질적으로는 유체 주입구와 세포배양챔버의 수는 각각 2~4개인 것이 바람직하다.
- [0022] 도 1을 참조하여 본 발명의 미세유체칩을 이용한 이중세포의 시료감응성 동시 측정방법을 설명한다.
- [0023] 먼저, 각 챔버세트 당 하나의 세포배양챔버 상단 밸브를 제외한 모든 세포배양챔버 상단 밸브를 잠그고 유체 주입구 중 하나에 세포를 주입한다. 이때, 세포배양챔버 하단 밸브가 존재한다면, 세포배양챔버 상단 밸브가 열린 세포배양챔버의 세포배양챔버 하단 밸브는 열어주어야 세포의 주입이 가능함은 당연하다. 세포배양챔버 하단 밸브를 추가로 갖는 두 개의 세포배양챔버로 이루어진 챔버세트를 포함한 도 1을 참조하면, 먼저 세포배양챔버 상단 밸브 311과 세포배양챔버 하단 밸브 312를 제외한 321과 322를 잠근 상태에서 유체 주입구(11)을 통해 세포를 주입한다. 유체 주입구(11)로 주입된 세포는 구배형성영역(21)을 통과한 후, 세포배양영역(31)의 챔버세트(300) 중 311과 312만이 열려있기 때문에 세포배양챔버 310에만 세포가 주입되어 부착되게 된다. 세포배양챔버 310에의 세포의 주입이 완료되면, 밸브 311과 312는 잠그고 321과 322를 열어준 상태에서 다시 유체 주입구 11 또는 11'를 통하여 다른 세포를 주입한다. 상기 과정에 의해 세포배양챔버 310과 320에는 서로 다른 세포가 혼합되지 않은 상태로 주입될 수 있다. 도 2의 좌측과 우측은 도 1의 구조를 갖는 미세유체칩에서 세포배양챔버 310과 320에 각각 유체를 주입하고 이를 광학현미경으로 관측한 이미지의 챔버세트 하나에 대한 확대사진으로, 세포배양챔버 상단 밸브(311, 321)의 선택적인 개폐에 의해 세포배양챔버 310 또는 320에 선택적으로 유체를 주입할 수 있음을 보여준다. 챔버세트 내 세포배양챔버 수가 3개 이상이라면, 동일한 과정을 반복하여 모든 챔버세트 내 세포배양챔버에 서로 다른 이중세포들을 주입시킬 수 있다.
- [0024] 세포배양챔버에 주입된 세포들은 세포배양챔버에 부착된 그대로 사용될 수도 있으며, 혹은 부착된 세포를 배양

하여 생물막을 형성하도록 한 후 시료감응성을 측정할 수도 있다.

[0025] 이후, 상기 챔버세트(300) 중 모든 세포배양챔버 상단 밸브(311, 321) 및 세포배양챔버 하단 밸브(312, 322)를 열어준 상태로, 상기 유체 주입구 11, 11'에 서로 농도가 다른 시료를 동시에 주입하면 구배형성영역을 통과하면서 미세채널(211, 212...220)에 농도구배가 형성된다. 구배형성영역의 최하단의 미세채널을 통과한 유체는 챔버세트(300) 내의 세포배양챔버로 주입되게 되는데, 시료가 주입되면 바로 세포배양챔버 상단 밸브(311, 321)와 세포배양챔버 하단 밸브(312, 322)를 모두 잠가준다. 실제 세포배양챔버는 그 부피가 매우 작기 때문에 세포가 시료의 흐름에 영향을 받는 시간은 1~2초 정도로 매우 짧아, 실질적으로 유체의 영향을 거의 받지 않는다. 또한, 동일한 미세유체칩을 사용하기 때문에 유체의 영향을 받는 시간 역시 오차없이 동일하게 조절할 수 있다. 이때, 구배형성영역의 최하단의 미세채널(220)에는 각각의 미세채널마다 하나의 챔버세트(300)가 연결되어 있으므로, 하나의 챔버세트(300) 내의 세포배양챔버에는 동일한 농도의 시료가 주입되게 되므로 이종세포를 동일한 농도구배의 시료에 노출될 수 있도록 할 수 있다. 이후, 세포배양영역의 세포배양챔버를 관측하면 시료 감응성을 측정할 수 있다.

[0026] 본 발명의 방법에 있어서, 세포의 시료감응성 측정은 세포배양영역을 실시간으로 관측하는 것에 의해 이루어질 수 있다. 실시간 관측은 가장 단순하게는 광학현미경을 사용한 측정으로 이루어질 수 있으며, 세포가 표지되어 있는 경우에는 표지 방법에 따라 선택된 검출방법에 의해 이루어질 수도 있다. 세포의 표지는 형광염료, 자기 입자, 방사선 동위원소 또는 양자점과 같이 통상의 바이오 분야에서 사용하는 표지물질을 사용할 수 있으며, 이는 당업자라면 사용하는 세포의 종류와 적절한 검출 방법에 의해 적절히 선택할 수 있을 것이다. 실시간 관측에 의하면, 시료의 자극 시점부터 배양 시간에 따른 세포의 영향을 시간에 따라 동시에 관측할 수 있다. 또는 필요에 따라서는, 세포배양챔버 내의 세포를 미세유체칩의 밖으로 배출시킨 후 배출된 시료를 분석할 수도 있다. 도 1에서는 배출구가 하나인 미세유체칩을 도시하였으나, 시료를 배출시킨 후 분석하기 위해서는 세포배양챔버 당 별개의 배출구를 갖도록 미세유체칩을 디자인하여 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명의 미세유체칩의 챔버세트에는 바이패스용 유로(350)가 추가로 포함되는 것이 더욱 바람직하다. 상기 바이패스용 유로에는 바이패스용 유로의 유체의 흐름을 조절할 수 있는 바이패스용 유로 밸브(351)가 추가로 포함될 수 있다. 상기 바이패스용 유로 밸브(351)는 다른 유로에의 흐름은 방해하지 않고, 바이패스용 유로의 유체의 흐름만을 차단 또는 허용할 수 있는 방법으로 설치되어야 한다. 도 3에 바이패스용 유로(350)와 바이패스용 유로 밸브(351)가 포함된 미세유체칩과 챔버세트의 확대도를 도시하였다. 유체 주입구(11, 11')를 통하여 세포를 주입하고 난 후 유체 주입구와 세포배양챔버 사이의 유로에는 여전히 세포 주입을 위해 사용한 액이 잔류하게 된다. 이 상태에서 세포배양영역의 모든 밸브를 열고 유체 주입구(11, 11')를 통하여 시료를 주입하면, 먼저 유로에 남아있던 잔류액이 먼저 세포배양챔버를 통과하고 이후 농도구배가 형성된 시료가 세포배양챔버를 통과하게 된다. 따라서 세포 혼입의 문제와 더불어 짧은 시간이지만 농도구배가 형성된 시료의 지연 자극에 따른 문제가 발생한다. 바이패스용 유로(350)가 추가로 포함된 경우, 세포와 세포의 주입 사이에 바이패스용 유로 밸브(351)를 제외한 챔버세트의 다른 밸브(311, 312, 321, 322)는 모두 잠근 채 배양액만을 흘려보내 유로를 세척하는 과정을 추가하면 세포의 혼입에 따른 문제를 해소할 수 있다. 또한 세포의 주입이 완료된 후에도, 먼저 바이패스용 유로 밸브(351)를 제외한 챔버세트의 다른 밸브(311, 312, 321, 322)는 모두 잠근 채 유체 주입구(11, 11')를 통해 서로 다른 농도의 시료를 동시에 주입하여 먼저 구배형성영역의 미세채널에 농도구배를 안정적으로 형성시킬 수 있다. 이 후, 세포배양챔버의 상단과 하단에 설치된 밸브(311, 312, 321, 322)를 열어주면 농도구배가 형성된 시료의 지연 자극에 따른 문제없이 보다 정밀한 시료감응성 측정이 가능하게 된다. 도 3에서는 바이패스용 유로 밸브(351)를 바이패스 유로 당 한 쌍씩 설치하였으나, 이는 편의에 의한 것일 뿐 하나의 유로 당 하나의 밸브만 설치하여도 무방하다.

[0028] 본 발명의 미세유체칩은 상기 구배형성영역(21)의 미세채널(211)과 연결되는 세포 주입구(41)를 추가로 포함할 수 있다. 세포 주입구는 도 4의 A와 같이 구배형성영역의 상단에 위치할 수도 있으나, B처럼 구배형성영역의 상단이 아니더라도 세포배양영역으로 세포를 주입시킬 수 있도록 구배형성영역의 미세채널과 연결되어 있다면 그 위치에 제한을 받는 것은 아니다. 그러나, 구배형성영역의 미세채널에 연결되어 있다고 하더라도 C와 같이 최하단의 미세채널 중 하나에만 연결되어 있다면 다른 미세채널과 연결된 세포배양영역으로는 세포주입이 불가능하거나, 혹은 균일하게 주입될 수 없으므로 적절하지 못하다. 바이패스용 유로(220)가 별도로 존재하지 않는 경우에는, 특히 세포 주입구가 세포배양영역과 가능한 한 가까이 위치하는 것이 바람직하다. 여기서 "가능한

한 가까이"는 단순히 물리적 위치를 의미하는 것이 아니라, 세포 주입구를 통해 주입된 세포가 세포배양영역에 도달하기까지의 유로의 길이가 짧은 것을 의미한다.

[0029] 세포 주입구가 별도로 형성되어 있는 미세유체칩에서는 상기 유체 주입구와 구배형성영역의 경계와 상기 세포 주입구와 구배형성영역의 경계에 도 5와 같이 밸브가 추가로 형성되어 있는 것이 더욱 바람직하다. 상기 밸브들에 의해 세포 주입구(41)를 통해 세포를 주입하는 경우에는 세포가 주입되는 세포 주입구(41)의 세포 주입구 밸브(42, 43)만을 열고, 유체주입구 밸브(12, 12')와 다른 세포 주입구(41')와 연결된 세포 주입구 밸브(42')는 잠근 채 세포를 주입한다. 반대로 유체 주입구(11, 11')를 통해 시료를 주입하는 경우에는 유체 주입구 밸브(12, 12')는 열고, 세포 주입구 밸브(43)는 잠근 채 시료를 주입하는 것에 의해 필요하지 않은 방향으로의 유체의 역류를 방지할 수 있다.

[0030] 상기 밸브들은 공기압에 의해 개폐가 조절되는 막밸브를 사용할 수 있다. 미세유체칩에서의 막밸브의 구조나 형성방법은 종래기술에 의해 잘 알려져 있으므로 이에 대한 상세한 설명은 생략한다.

[0031] 본 발명의 미세유체칩에서 상기 세포배양챔버는 도 6에 도시된 바와 같이 단일세포층이 부착될 수 있도록 트래퍼(trapper)의 구조를 가질 수 있다. 세포의 형태와 크기는 생물의 종류에 따라, 또한 같은 생물이라도 조직이나 기관의 종류에 따라 다양하므로 본 발명의 미세유체칩을 사용하여 시료감응성을 측정하고자 하는 세포의 크기에 따라 단일세포층을 부착시킬 수 있도록 상기 트래퍼의 높이를 결정하는 것이 바람직하다. 즉 트래퍼의 높이를 시료감응성을 측정하고자 하는 세포의 크기보다 크고 세포 크기의 2배보다 작게 설정하는 것에 의해 단일세포층을 형성시킬 수 있다. 도 6에는 약 $3\mu\text{m}$ 정도 크기의 세포에 대한 트래퍼를 도시하였다.

[0032] 상기의 설명에서는 본 발명의 미세유체칩을 이중세포의 시료감응성 분석에 적용하여 설명하였으나, 반드시 이중세포의 시료감응성 분석에만 적용되는 것은 아니다. 모든 세포배양영역에 동일한 세포를 주입한 후 시료감응성을 측정하면, 단일 실험에 의해 세포의 시료감응성을 반복 측정한 것과 동일한 효과를 얻을 수 있으므로, 재현성 실험에도 이용될 수 있음은 당연하다.

[0033] 본 발명의 미세유체칩은 실리콘, 유리, 금속, 세라믹 및 고분자와 같은 여러 종류의 재질을 사용하여 습식식각, 건식식각, 리소그래피(lithography), 몰딩, 밀링, 터닝, 드릴링, 펀칭, 레이저미세가공과 같은 미세가공기술을 사용하여 제작할 수 있다. 미세가공기술은 널리 알려진 방법으로 본 명세서에서는 상세한 설명은 생략한다.

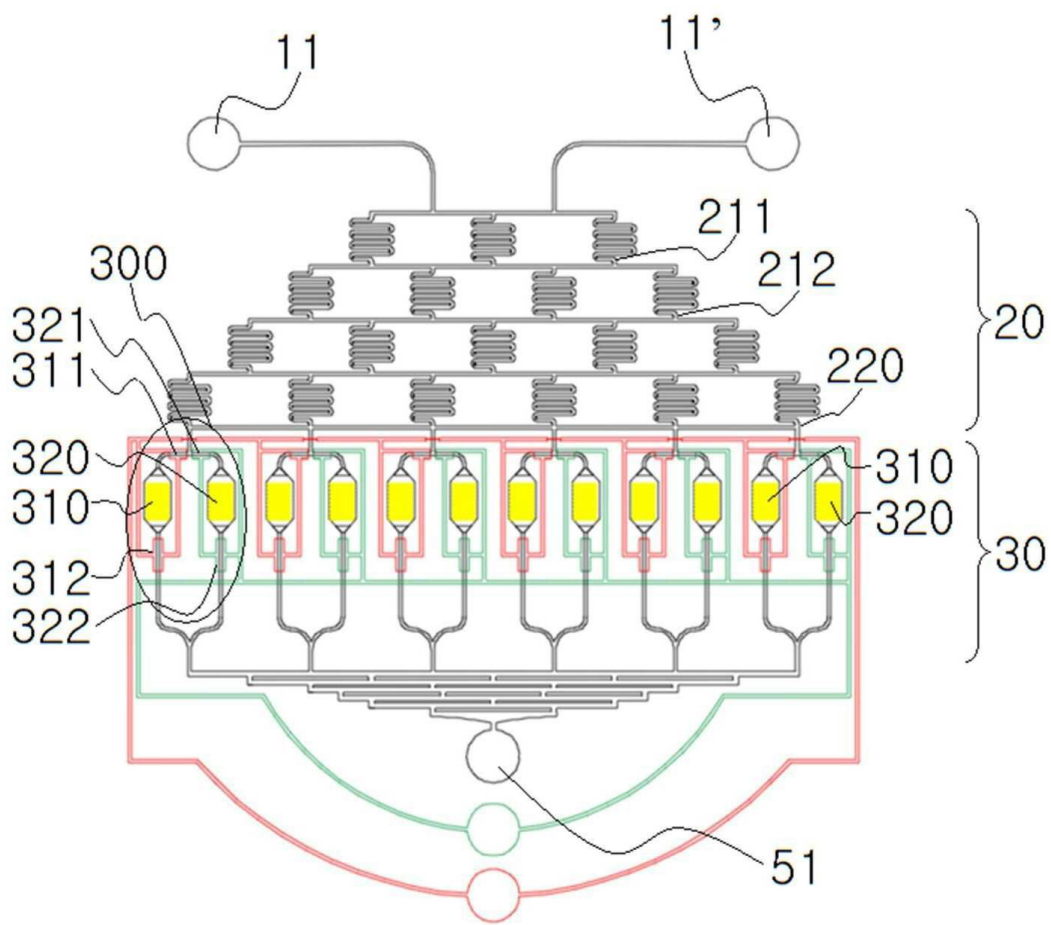
부호의 설명

[0034]

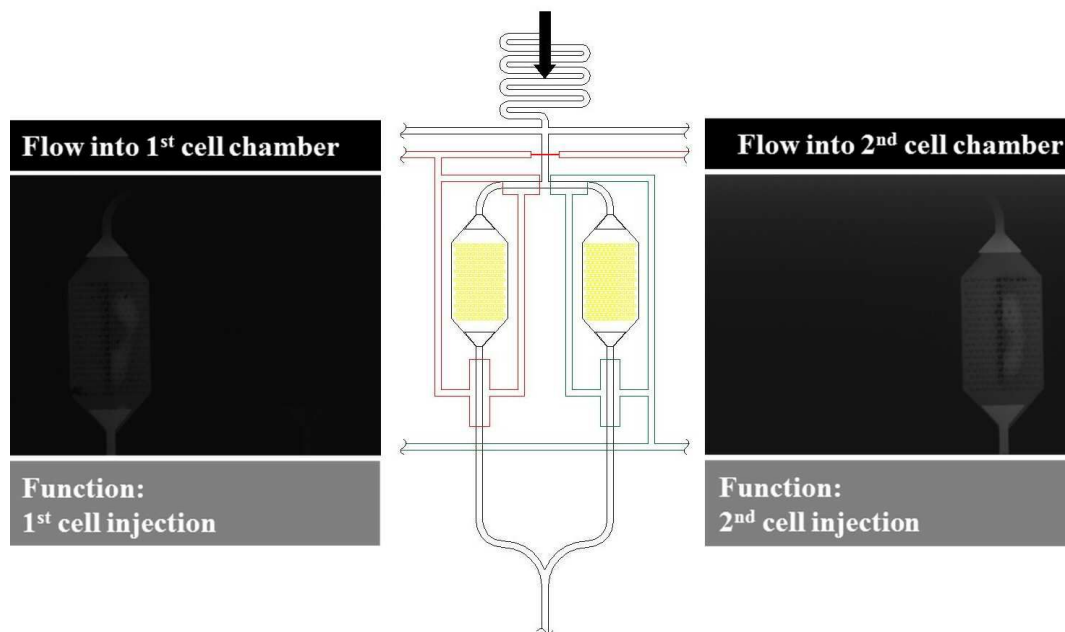
11, 11'	유체 주입구	12, 12'	유체주입구 밸브
20	구배형성영역		
211, 212	구배형성영역의 미세채널		
220	구배형성영역의 최하단의 미세채널		
30	세포배양영역		
300	챔버세트	310, 320	세포배양챔버
311, 321	세포배양챔버 상단 밸브		
312, 322	세포배양챔버 하단 밸브		
350	바이패스용 유로		
351	바이패스용 유로 밸브		
41, 41'	세포 주입구	42, 42', 43	세포주입구 밸브
51	배출구		

도면

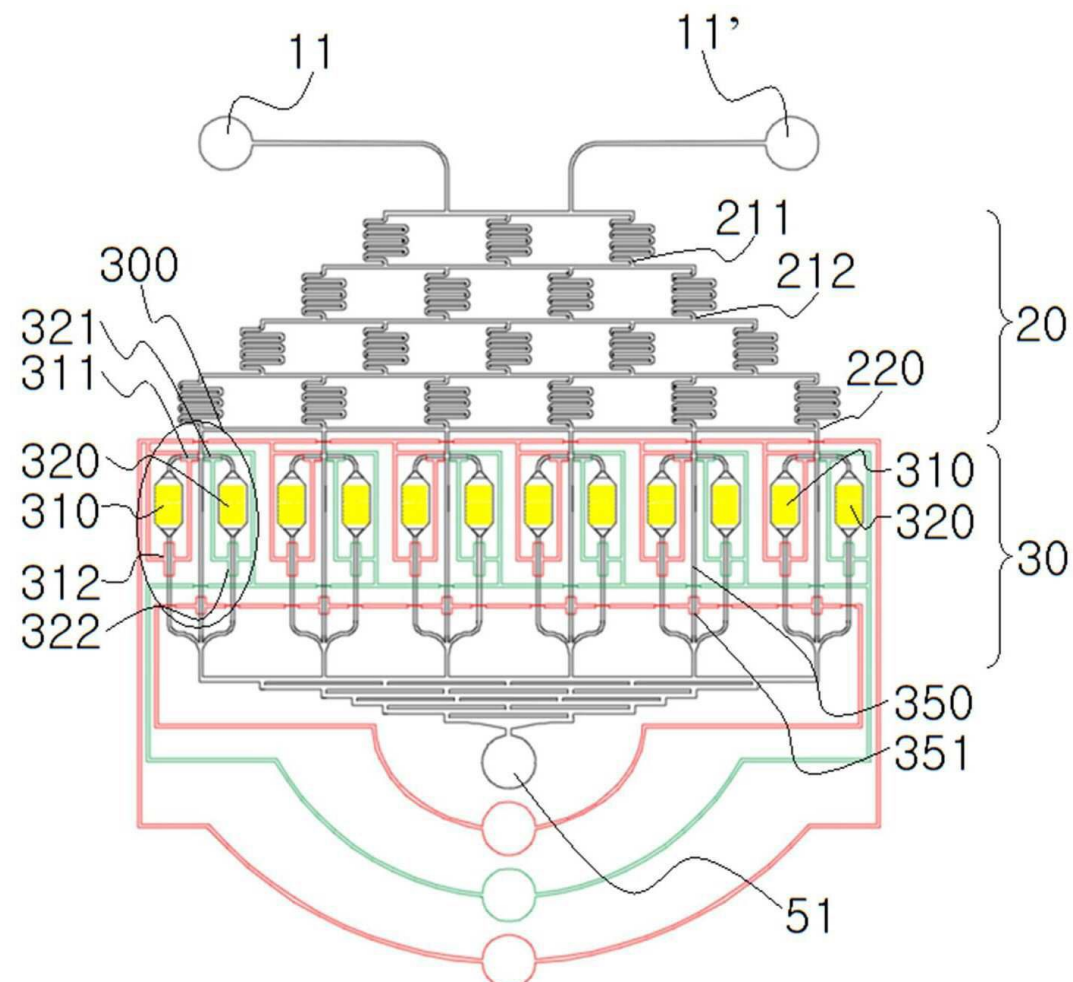
도면1



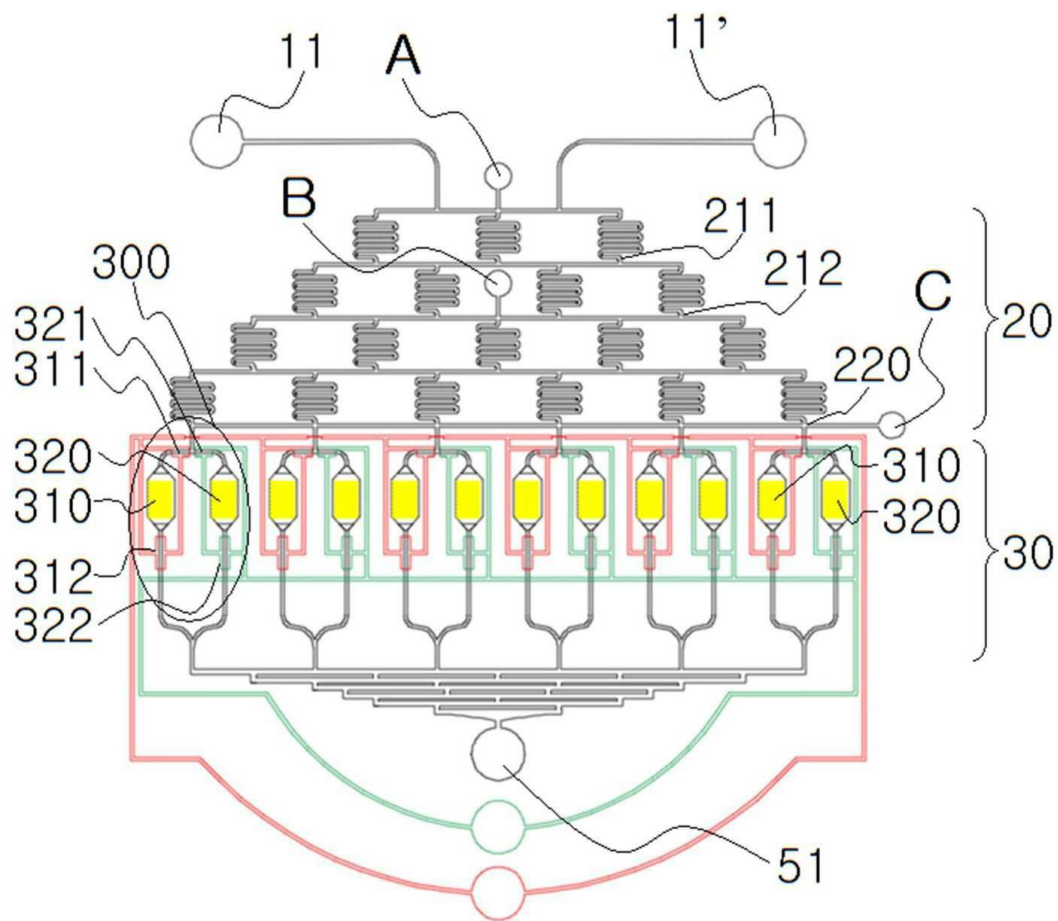
도면2



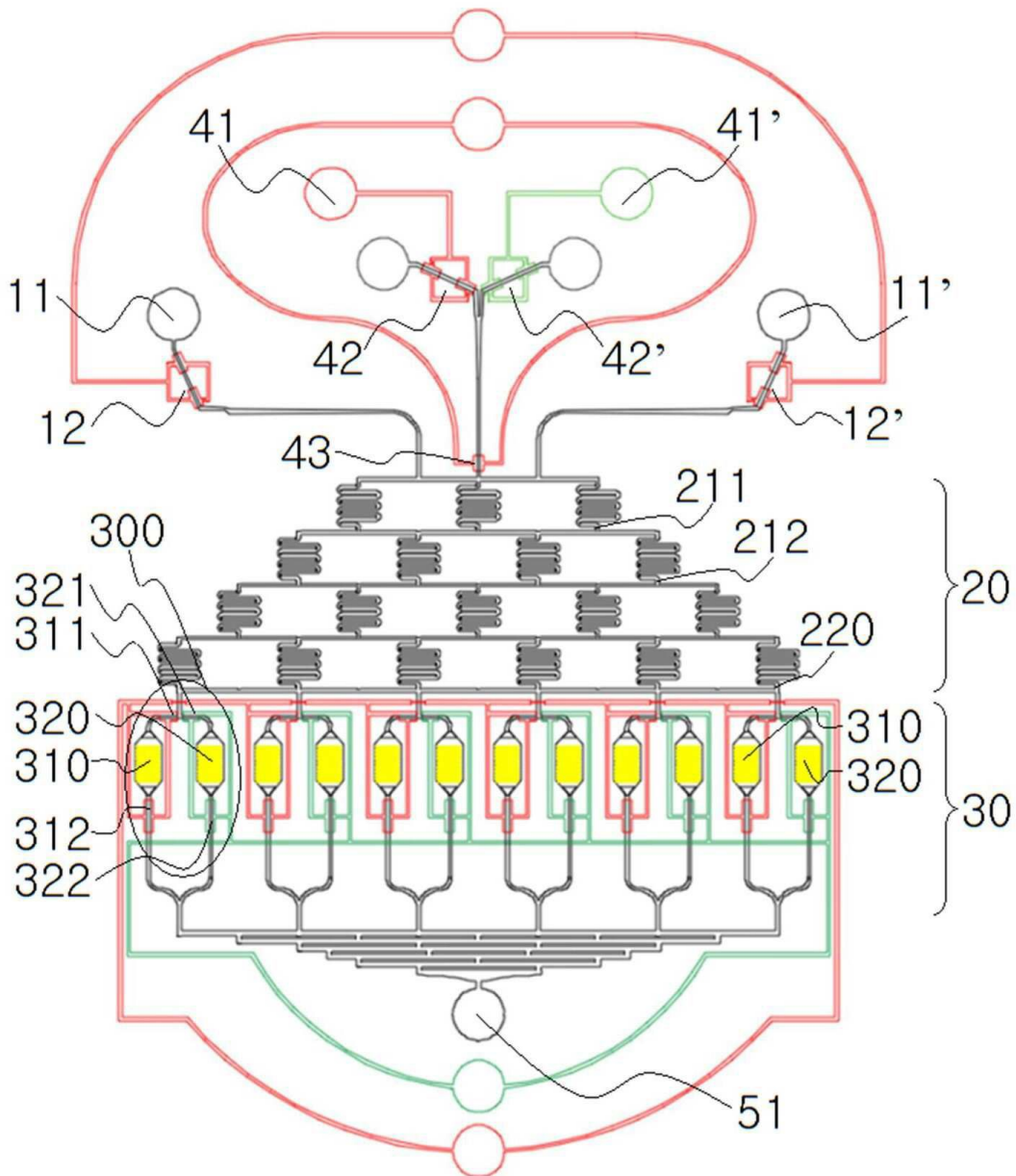
도면3



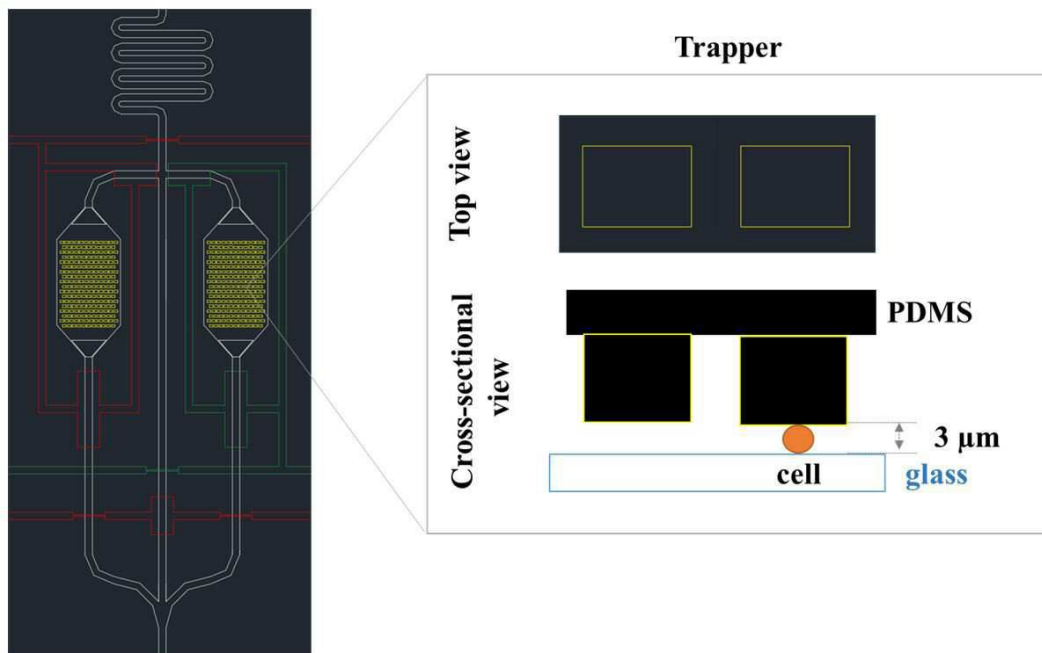
도면4



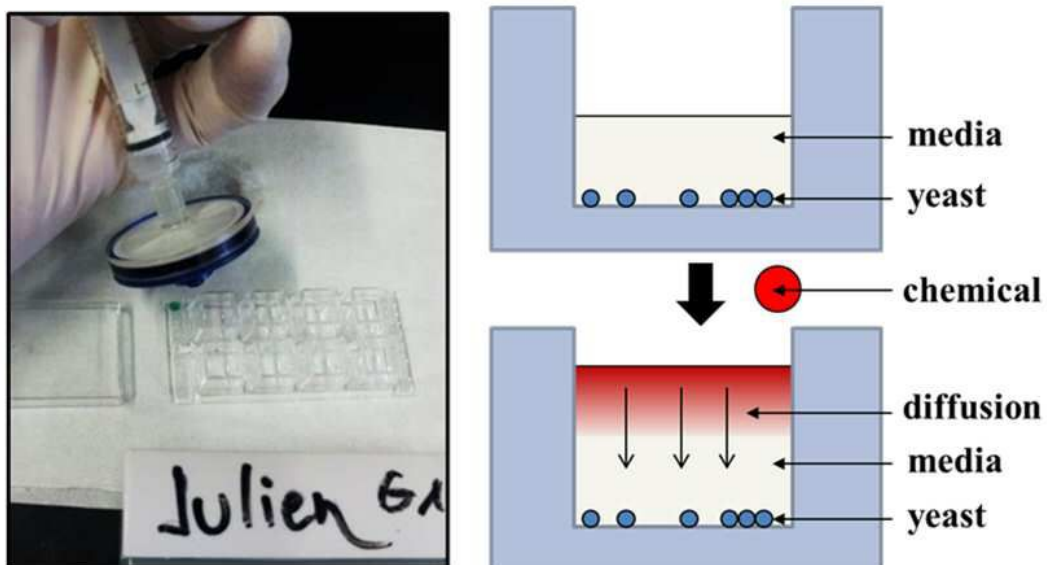
도면5



도면6



도면7



도면8

