(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0046376
(43) 공개일자 2017년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 35/08 (2006.01) *B01L 3/00* (2006.01)
C12Q 1/02 (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 35/08 (2013.01)
B01L 3/5023 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0146635
(22) 출원일자 2015년10월21일
심사청구일자 2015년10월21일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
김태성
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
이종완
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김민석
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
전용준

전체 청구항 수 : 총 25 항

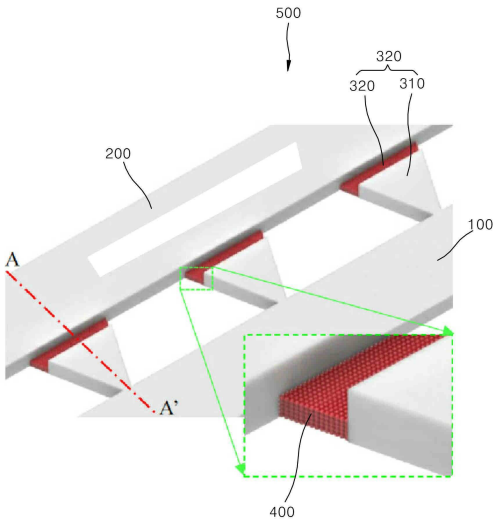
(54) 발명의 명칭 **바이오센서 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 생물입자를 포함하는 액상의 유체가 유동하는 유로가 형성된 마이크로챔버 및 마이크로챔버의 상기 유로 내에 배치되며, 다공성 구조로 이루어져 유체는 통과하고 상기 생물입자는 통과하지 못하여 유로 내에 집적되는 다공성 분리막을 포함하는 바이오센서를 제공한다.

이에 따르면 상기 바이오센서는 다량으로 세포를 집적시킬 수 있음은 물론 분석시간을 크게 단축시킬 수 있고, 높은 처리방식을 가지고 있으며, 민감도 및 반응시간을 향상시킬 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
B01L 3/502746 (2013.01)
B01L 3/502761 (2013.01)
B01L 3/502769 (2013.01)
C12Q 1/02 (2013.01)
B01L 2300/0877 (2013.01)
B01L 2300/0883 (2013.01)
B01L 2400/086 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711016383 (2014R1A2A1A10050431)
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원
연구과제명 나노 패터닝을 위한 “크랙-포토리소그래피” 공정기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단
연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395041213 (PJ011186012015)
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21
연구과제명 초미세유체 플랫폼을 이용한 개량 균주 라이브러리 스크리닝 기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단
연구기간 2015.01.15 ~ 2015.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

생물입자들을 포함하는 액상의 유체가 유동하는 유로가 형성된 마이크로챔버; 및

상기 마이크로챔버의 상기 유로 내에 배치되며, 다공성 구조로 이루어져 상기 유체는 통과하고 상기 생물입자는 통과하지 못하여 상기 유로 내에 상기 생물입자들이 집적되는 다공성 분리막을 포함하는 바이오센서.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 마이크로챔버는,

상기 생물입자들이 포함된 상기 유체를 공급받는 제1유로가 형성된 제1마이크로챔버와, 상기 제1마이크로챔버와 연통되고 상기 제1유로와 연통되는 제2유로가 형성되며 상기 유체를 유출하는 제2마이크로챔버를 포함하는 바이오센서.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 제2유로는, 상기 제1유로의 상기 유체 통과단면적보다 작게 형성되고 상기 다공성 분리막이 위치하는 바이오센서.

청구항 4

청구항 2에 있어서,

상기 마이크로챔버는,

상기 유체의 유동방향에 대하여 상기 제1마이크로챔버에서 상기 제2마이크로챔버로 갈수록 평단면 형상이 점진적으로 넓어지는 바이오센서.

청구항 5

청구항 2에 있어서,

상기 마이크로챔버는,

평단면형상이 삼각 형상으로 형성된 바이오센서.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다공성 분리막은,

모세관압을 발생시키는 다공성 구조로 이루어져 상기 유체는 통과하여 출구측에서 증발(Evaporation)하고 상기 생물입자는 통과하지 못하여 상기 유로 내에 집적되는 바이오센서.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 다공성 분리막은,

미세입자들이 자가조립(Self-assembled)에 의하여 적층 배열되면서 형성된 자가조립 분리막(SAPM; Self-assembled particle membrane)을 포함하는 바이오센서.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 미세입자는

구형(Spherical shape)으로 형성되는 바이오센서.

청구항 9

청구항 7에 있어서,

상기 미세입자는,

200nm 내지 1000nm의 직경을 갖도록 형성되는 바이오센서.

청구항 10

청구항 7에 있어서,

상기 자가조립 분리막은,

10㎛ 내지 30㎛ 범위의 두께로 형성되는 바이오센서.

청구항 11

생물입자들을 포함하는 액상의 유체가 유동하는 제1채널;

상기 제1채널과 연통되어 상기 제1채널로부터 상기 생물입자들이 포함된 상기 유체를 공급받는 제1유로가 형성된 제1마이크로챔버와, 상기 제1마이크로챔버와 연통되고 상기 제1유로와 연통되는 제2유로가 형성된 제2마이크로챔버를 포함하는 마이크로챔버 복수개가 상기 제1채널에 대하여 이격 배열된 마이크로챔버 어레이;

상기 각각의 제2유로와 연통되게 상기 마이크로챔버 어레이와 연결되어, 상기 마이크로챔버 어레이로부터 상기 유체가 유출되는 제2채널; 및

상기 제2유로 내에 배치되며, 다공성 구조로 이루어져 상기 유체는 통과하여 상기 제2채널로 유출되고 상기 생물입자는 통과하지 못하여 상기 제1유로 내에 집적되게 하는 다공성 분리막을 포함하는 바이오센서.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 제2유로는,

상기 제1유로의 상기 유체 통과단면적보다 작게 형성되는 바이오센서.

청구항 13

청구항 10에 있어서,

상기 마이크로챔버는,

상기 유체의 유동방향에 대하여 상기 제1마이크로챔버에서 상기 제2마이크로챔버로 갈수록 평단면 형상이 점진적으로 넓어지는 바이오센서.

청구항 14

청구항 11에 있어서,

상기 마이크로챔버는,

평단면형상이 삼각 형상으로 형성된 바이오센서.

청구항 15

청구항 11 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다공성 분리막은,

모세관압을 발생시키는 다공성 구조로 이루어져 상기 유체는 통과하여 상기 제2채널에서 증발하고 상기 생물입자는 통과하지 못하여 상기 제1유로 내에 집적되는 바이오센서.

청구항 16

청구항 11 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다공성 분리막은,

미세입자들이 자가조립(Self-assembled)에 의하여 적층 배열되면서 형성된 자가조립 분리막(SAPM; Self-assembled particle membrane)을 포함하는 바이오센서.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

상기 미세입자는

구형(Spherical shape)으로 형성되는 바이오센서.

청구항 18

청구항 16에 있어서,

상기 미세입자는,

200nm 내지 1000nm의 직경을 갖도록 형성되는 바이오센서.

청구항 19

청구항 16에 있어서,

상기 자가조립 분리막은,

10㎛ 내지 30㎛ 범위의 두께로 형성되는 바이오센서.

청구항 20

제1유로가 형성된 제1마이크로챔버와, 상기 제1마이크로챔버와 연통되고 상기 제1유로와 연통되는 제2유로가 형성되는 제2마이크로챔버를 포함하는 마이크로챔버를 형성하는 단계;

상기 제2유로 내에서 미세입자들이 자가조립(Self-assembled)에 의하여 적층 배열되면서 자가조립 분리막(SAPM; Self-assembled particle membrane)이 형성되게 하는 자가조립 분리막을 형성하는 단계; 및

상기 마이크로챔버 내로 생물입자를 포함하는 액상 유체를 공급하여, 상기 자가 조립분리막에 의하여 상기 유체는 통과하고 상기 생물입자는 상기 제1유로 내에 집적시키는 단계를 포함하는 바이오센서 제조방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서,

상기 마이크로챔버를 형성하는 단계는,

지지판의 상면으로 상기 마이크로챔버를 형성하기 위한 마이크로챔버 틀몸체를 형성하는 단계와,

상기 마이크로챔버 틀몸체을 경화시키는 단계와,

경화된 상기 마이크로챔버 틀몸체의 하면에 하부판을 부착시키는 단계를 포함하는 바이오센서 제조방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서,

상기 마이크로챔버 틀몸체를 형성하는 단계는,

지지판의 상면으로 상기 제2유로의 높이에 대응하도록 네거티브 포토레지스트를 코팅하여 제1포토레지스트층을 형성하는 단계와,

상기 제1포토레지스트층의 상부로 포토 마스크를 위치시킨 후 상기 제1포토레지스트층으로 UV를 노출시키는 단계와,

상기 제1포토레지스트층의 상면으로 상기 제1유로의 높이에 대응하도록 네거티브 포토레지스트를 코팅하여 제2포토레지스트층을 형성하는 단계와,

상기 제2포토레지스트층의 상부로 포토 마스크를 위치시킨 후 상기 제2포토레지스트층으로 UV를 노출시키는 단계와,

현상액에 침지시켜 상기 UV에 노출되지 않은 상기 제1포토레지스트층과 상기 제2포토레지스트를 제거하는 단계를 포함하는 바이오센서 제조방법.

청구항 23

청구항 20에 있어서,

상기 자가조립 분리막을 형성하는 단계는,

상기 마이크로챔버 내로 미세입자들이 포함된 분리막형성 유체를 이동시키는 단계와,

상기 미세입자들이 상기 제2유로 내에서 자가조립(Self-assembled)에 의하여 적층 배열되면서 상기 자가조립 분리막이 형성되게 하고 상기 분리막형성 유체는 상기 자가조립 분리막을 이루는 상기 미세입자들 사이를 통하여 유출시키는 단계를 포함하는 바이오센서 제조방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서,

상기 자가조립 분리막을 형성하는 단계는,

상기 자가조립 분리막의 형성이 진행되어 상기 자가조립 분리막이 설정된 범위로 형성되면, 상기 제2유로와 연통되는 제2채널에 오일을 채워 상기 자가조립 분리막의 형성을 중지하는 단계를 더 포함하는 바이오센서 제조방법.

청구항 25

청구항 23에 있어서,

상기 자가조립 분리막을 형성하는 단계는,

상기 제2유로와 연통되는 제2채널을 공기로 채워지게 하여 상기 마이크로챔버를 통과한 상기 분리막형성 유체가 증발(Evaporation)하도록 하는 자가조립 분리막의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바이오센서 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 미생물 분석을 위한 분석시간을 단축시킬 수 있는 바이오센서 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 미세 서식 환경들은 신속하게 화학적, 물리적, 생물학적 환경을 칩에다가 높은해상도와 정확성으로 조작함으로써 미생물의 생물학적 반응을 연구할 수 있게 한다. 특히, 살충제를 포함한 미세 서식 환경, 특정 분자들, 또는 다른 미생물 공동체들은 높은 처리량, 비용 효율성, 그리고 노동 효율적인 면에서 여러 배양 환경에서 미생물들의 세포적인 상호작용을 분석하는 실험적인 방법을 제공한다.

[0003] 한편, 박테리아 세포들을 위한 대부분의 미세 서식 환경들은 몇 가지 기능들을 공통적으로 요구한다. 그중 하나

로 첫째, 목표 미생물을 목표지점에 미세유체 장치로 가두어 두거나 집적시킬 필요가 있다. 이는, 원심 장치, 미세장치 래칫 구조물들, 그리고 동전학 등을 포함한 많은 기계장치들과 방법들이 있다. 그러나, 이러한 종래의 접근 방식들은 목표 미생물들을 접적시키거나 모아 놓기 위해 추가적인 실험 과정이 필요할 뿐만 아니라, 목표 세포들이 그들의 운동성과 화학주성 능력에 따라 제한되는 문제점이 있다.

[0004] 둘째, 주요 공급 채널과 마이크로챔버 사이의 소분자들의 쌍방향 이동이 칩에서 미생물 배양하는데 필수조건 이다. 예를 들면, 히드로겔 막이 미세유액 장치와 결합하는 것인데, 그들이 생체 적합성이 있고 그들의 특정한 나노기공 폴리머 매트릭스의 액체 용액으로서 비슷한 확산 조건을 제공하기 때문이다. 그러나, 이는 히드로겔이 이미 설계된 위치에 통합될 수 있음에도 불구하고 기질과의 봉합이 약한 문제가 있으며, 가해진 유압을 제한 할 수 있는 강성이 부족한 문제점들이 있다.

[0005] 셋째, 미생물들은 높은처리율 분석을 위해 분류되어야 하며, 이를 극복하기 위해 많은 방법들이 제안되어 왔다. 예를 들면, 수많은 양의 분류된 목표 샘플들을 빠르고 계속적인 방법으로 제공할 수 있는 점 때문에 입자들(droplets)이 집중적으로 가해진다. 그러나, 이 방법은 신선한 영양을 제공하기 힘들고 높은 처리량 방식의 각 입자들로부터 분비된 항대사 물질들을 제거하는 문제가 있으며, 게다가 입자를 내뿜는 미세유액 장치들은 유액과 오일이 떨어지는 단계를 정밀하게 조작할 필요가 있고 표면 화학물이 조심스럽게 다루어 져야 하는 문제점이 있다.

[0006] 넷째, 장기간 배양과 관찰을 할 수 있어야 하는 점이 매우 중요하고 또한 이러한 것들이 자동화 되어야 한다. 그런데, 이러한 조건은 기기제작, 막통합, 분류, 장기간 배양을 위한 복잡한 공정 등으로 인하여 전술한 기술 조건들과 양립하기 어려운 문제점이 있다.

[0007] 그런데, 상기한 미세서식 환경을 고려한 종래의 바이오센서는 구조가 복잡하고 분석을 위한 시간이 많이 소요되는 문제점이 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2011-0124427호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은, 구조가 간단하고 분석시간을 크게 단축시킬 수 있는 바이오센서 및 이의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명은 생물입자를 포함하는 액상의 유체가 유동하는 유로가 형성된 마이크로챔버 및 상기 마이크로챔버의 상기 유로 내에 배치되며, 다공성 구조로 이루어져 상기 유체는 통과하고 상기 생물입자는 통과하지 못하여 상기 유로 내에 집적되는 다공성 분리막을 포함하는 바이오센서를 제공한다.

[0011] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명은 생물입자를 포함하는 액상의 유체가 유동하는 제1채널, 상기 제1채널과 연통되어 상기 제1채널로부터 상기 미세입자들이 포함된 상기 유체를 공급받는 제1유로가 형성된 제1마이크로챔버와, 상기 제1마이크로챔버와 연통되고 상기 제1유로와 연통되는 제2유로가 형성된 제2마이크로챔버를 포함하는 마이크로챔버 복수개가 상기 제1채널에 대하여 이격 배열된 마이크로챔버 어레이, 상기 각각의 제2유로와 연통되게 상기 마이크로챔버 어레이와 연결되어, 상기 마이크로챔버 어레이로부터 상기 유체가 유출되는 제2채널 및 상기 제2유로 내에 배치되며, 다공성 구조로 이루어져 상기 유체는 통과하여 상기 제2채널로 유출되고 상기 생물입자는 통과하지 못하여 상기 제1유로 내에 집적되게 하는 다공성 분리막을 포함하는 바이오센서를 제공한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명은 제1유로가 형성된 제1마이크로챔버와, 상기 제1마이크로챔버와 연통되고 상기 제1유로와 연통되는 제2유로가 형성되는 제2마이크로챔버를 포함하는 마이크로챔버를 형성하는 단계, 상기 제2유로 내에서 미세입자들이 자가조립(Self-assembled)에 의하여 적층 배열되면서 자가조립 분리막

(SAPM; Self-assembled particle membrane)이 형성되게 하는 자가조립 분리막을 형성하는 단계 및 상기 마이크로챔버 내로 생물입자를 포함하는 액상 유체를 공급하여, 상기 자가조립분리막에 의하여 상기 유체는 통과하고 상기 생물입자는 상기 제1유로 내에 집적시키는 단계를 포함하는 바이오센서 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 바이오센서 및 이의 제조방법은 다음과 같은 효과를 제공한다.

[0014] 첫째, 다량으로 세포를 집적시킬 수 있음은 물론 이에 따른 분석시간을 크게 단축시킬 수 있고, 높은 처리방식을 가지고 있으며, 민감도 및 반응시간 향상을 가져올 수 있다.

[0015] 둘째, 샘플 내부의 용액의 증발을 통해 많은 양의 세포(샘플) 집적이 가능하며, 용액의 증발시간을 조절하여 마이크로챔버 내부에 집적되는 세포의 양도 조절 가능하다.

[0016] 셋째, 초기에 많은 양의 세포가 집적되기 때문에 실험 사직과 동시에 분석이 가능하는 등 분석시간을 상당히 단축시킬 수 있다.

[0017] 넷째, 자가조립 분리막을 통하여 액체의 강제증발로 인한 강한 기체 대류에도 액체 쪽에서는 거품이 일어나지 않기 때문에, 안정적인 기체-액체 인터페이스를 제공할 수 있다.

[0018] 다섯째, 자가조립 분리막은 다른 막들에 비하여 훨씬 조직이 탄탄하기 때문에 증발이나 고압의 유체 유동도 견딜 수 있다.

[0019] 여섯째, 자가조립 분리막을 통하여 세포입자들을 원하는 위치의 마이크로챔버 내에 안내되도록 하고 집적시킬 수 있으며 이를 조절할 수 있다.

[0020] 일곱째, 구조가 간단하고 차지하는 부피가 적어 공간 활용도를 향상시킬 수 있으며, 제조비용을 줄일 수 있어 경제적이다.

[0021] 여덟째, 별도의 장치나 구성없이 미세입자의 자가조립에 의한 자가조립 분리막을 이용하기 때문에 제조가 용이하다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 바이오센서를 나타내는 사시도이다.

도 2는 도 1의 A-A'선에 따른 바이오센서에서 마이크로챔버의 구조를 나타내는 단면도이다.

도 3은 본 발명의 다른 실시예에 따른 바이오센서를 나타내는 평면도이다.

도 4는 본 발명의 실시예에 따른 바이오센서의 제조방법을 나타내는 절차도이다.

도 5는 도 4의 마이크로챔버 틀몸체의 제조과정을 나타내는 단면도이다.

도 6은 도 5의 마이크로 틀몸체를 통한 자가조립 분리막의 형성과정을 나타내는 사시도이다.

도 7은 도 6의 자가조립 분리막 내 분리막형성 유체의 유동 및 미세입자의 자가조립을 나타내는 정단면도이다.

도 8은 도 6의 자가조립 분리막 형성과정의 형광이미지를 나타낸 사진이다.

도 9는 도 4의 자가조립 분리막 형성의 다양한 실시예들을 나타내는 도면이다.

도 10은 도 6의 마이크로챔버 내에 미세입자들이 집적되는 과정을 나타내는 사진 및 그래프이다.

도 11은 도 6의 제1채널에 강제 대류를 발생시킨 후 마이크로챔버 내에 미세입자 및 생물입자들이 집적되는 과정을 나타내는 사진 및 그래프이다.

도 12는 도 11에서 증발을 중단한 후 마이크로챔버 내 생물입자의 집적상태를 나타내는 사진이다.

도 13은 도 6의 마이크로챔버 내 세포수량과 집적시간에 따른 생물입자의 증식결과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

도 14는 도 6의 마이크로챔버 내 생물입자의 초기 수량과 시간경과에 따른 중금속 탐지 결과를 나타내는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[0024] 먼저, 도 1 및 도 2를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오센서(500)는, 제1채널(100)과, 제2채널(200)과, 마이크로챔버(300)와, 상기 마이크로챔버(300) 내에 위치하는 다공성 분리막을 포함한다.

[0025] 상기 제1채널(100)은, 생물입자를 포함하는 유체가 유동하며 상기 마이크로챔버(300)와 연통되어 상기 유체를 공급한다.

[0026] 상기 제2채널(200)은 상기 제1채널(100)과 이격되게 위치하고 상기 마이크로챔버(300)와 연통되어 상기 다공성 분리막을 통과한 상기 유체가 유출 및 증발이 이루어진다. 여기서, 상기 제2채널(200)은 상기 유체의 증발이 용이하게 이루어질 수 있도록 공기로 채워질 수 있으며, 나아가 상기 마이크로챔버(300)보다 압력이 낮은 조건을 갖도록 하여 상기 유체의 증발을 유도할 수 있다.

[0027] 또한, 상기 제1채널(100)의 유체 유동방향과 상기 제2채널(200)의 유체 유동방향은 서로 반대 방향으로 하여, 상기 생물입자의 집적효율을 높이는 것이 바람직하나, 이에 한정하지는 않는다.

[0028] 상기 마이크로챔버(300)는, 생물입자들이 포함된 유체가 유동하는 제1채널(100)과, 상기 제2채널(200) 사이에 각각 연통되게 위치하고, 내부에 형성된 유로를 통하여 생물입자를 포함하는 액상의 유체가 유동하되, 상기 다공성 분리막을 통하여 상기 생물입자가 마이크로 챔버(300) 내에 집적되게 한다. 여기서, 상기 생물입자는 미세분자와 박테리아 세포들을 포함할 수 있다.

[0029] 상세하게, 상기 마이크로챔버(300)는, 상기 제1채널(100)과 연통되는 제1마이크로챔버(310)와, 상기 제2마이크로챔버(320)와 연통되고 상기 제2채널(200)과 연통되는 제2마이크로챔버(320)를 포함한다. 상기 제1마이크로챔버(310)는, 상기 유체의 유동방향의 선단에 위치하며 상기 제1채널(100)로부터 상기 생물입자들이 포함된 상기 유체를 공급받으며 제1유로(311)가 형성되어 있다.

[0030] 상기 제2마이크로챔버(320)는, 상기 제1유로(311)와 연통되며 상기 유체의 유동방향에 대하여 후단에 위치하고, 상기 제1유로(311)의 상기 유체 통과단면적보다 작게 형성되는 제2유로(321)가 형성되어 있다. 여기서, 상기 제2유로(321)는 모세관압을 형성할 수 있도록 좁게 형성되어 있으며, 상기 모세관압을 통하여 상기 유체가 상기 제2채널(200)로 유출되게 한다.

[0031] 한편, 상기 마이크로챔버(300)는, 상기 유체의 유동방향에 대하여 상기 제1마이크로챔버(310)에서 상기 제2마이크로챔버(320)로 갈수록 평단면 형상이 점진적으로 넓어지도록 형성되어 있다. 도면에서, 상기 마이크로챔버(300)는, 평단면형상이 삼각 형상으로 형성되어 있다. 이는 유체의 유속증가 또는 제작상의 필요함 등을 위한 바람직한 실시예로 상기한 목적을 달성할 수 있다면 상기한 삼각형상 이외에도 다른 형상으로도 가능함은 물론이다.

[0032] 상기 다공성 분리막은, 상기 제2마이크로챔버(320)의 상기 제2유로(321) 내에 위치하고, 다공성 구조로 이루어져 상기 유체는 통과하게 하고 상기 생물입자는 통과하지 못하도록 하여 상기 제1유로(311) 내에 상기 생물입자들이 집적되게 한다.

[0033] 상세하게, 상기 다공성 분리막은, 모세관압을 발생시키는 다공성 구조로 이루어져 상기 유체가 통과하여 출구측인 상기 제2채널(200)에서 증발(Evaporation)이 일어나도록 하고, 상기 생물입자는 통과하지 못하여 상기 제1유로(311) 내에 집적되도록 한다.

[0034] 상기 다공성 분리막은, 미세입자(30)들이 자가조립(Self-assembled)에 의하여 적층 배열되면서 형성된 자가조립 분리막(400, SAPM; Self-assembled particle membrane)으로 되어 있다. 한편, 상기 마이크로챔버(300)는 상기한 바와 같이 생물입자를 집적시키는 것은 물론, 미세입자(30)를 포함하는 분리막형성 유체(40)를 유동시켜 상기 자가조립 분리막(400)을 형성할 수 있는데, 상기한 자가조립 분리막 에 대한 상세한 설명은 후술하기로 한다.

[0035] 도 3은 본 발명의 다른 실시예에 따른 바이오센서(500)를 나타내는 도면이다. 도면을 참조하면, 상기 바이오센서(500)는, 일측의 제1주입구(101)와 연통되어 상기 유체가 공급되고 복수개가 병렬로 이격되게 배치되며 각각에는 제1유출구(102)가 형성된 제1채널(100a)들과, 타측의 제2주입구(201)와 연통되며 복수개가 병렬로 이격되게 배치되며 각각에는 제2유출구(202)가 형성된 제2채널(200a)들과, 상기 제1채널(100a)과 상기 제2채널(200a) 사이에 연통되게 배치되는 마이크로챔버 어레이(350)와, 다공성 분리막을 포함한다.

[0036] 상기 제1채널(100a)은, 상기 제1주입구(101)로부터 주입 공급된 생물입자를 포함하는 액상의 유체가 유동하고 상기 마이크로챔버(300a)로 상기 유체를 공급하는 제1채널(100a)유로가 형성되어 있다.

[0037] 상기 제2채널(200a)은, 상기 제2주입구(201)로부터 주입 공급된 유체가 유동하고, 상기 마이크로챔버 어레이(350)와 연결되어, 상기 마이크로챔버 어레이(350)로부터 상기 유체가 유출된다.

[0038] 상기 마이크로챔버 어레이(350)는, 양측이 상기 제1채널(100a)과 상기 제2채널(200a)과 각각 연통되게 연결되어 상기 생물입자를 포함하는 액상의 유체가 유동하며, 상기 마이크로챔버(300a) 복수개가 상기 제1채널(100a)에 대하여 병렬로 이격 배열되어 있다.

[0039] 여기서, 상기 마이크로챔버(300a)는, 상기 제1채널(100a)과 연통되어 상기 제1채널(100a)로부터 상기 미세입자(30)들이 포함된 상기 유체를 공급받는 제1유로(311)가 형성된 제1마이크로챔버(310)와, 상기 제1마이크로챔버(310)와 연통되고 상기 제1유로(311)와 연통되는 제2유로(321)가 형성된 제2마이크로챔버(320)를 포함하며, 이에 대한 상세한 설명은 전술하였으므로 생략하기로 한다.

[0040] 상기 다공성 분리막은 상기 제2유로(321) 내에 배치되며, 다공성 구조로 이루어져 상기 유체는 통과하여 상기 제2채널(200a)로 유출되고 상기 생물입자는 통과하지 못하여 상기 제1유로(311) 내에 집적되게 하는 역할을 하며, 상기 다공성 분리막은 후술되는 자가조립 분리막으로 이루어지며, 이에 대한 상세한 설명은 후술하기로 한다.

[0041] 상기한 바와 같이, 상기 바이오센서(600)는 구조가 간단하여 제조비용을 줄일 수 있음은 물론, 샘플의 부피를 줄일 수 있고, 높은 처리율을 제공할 수 있다.

[0042] 이하에서는 상기 바이오센서(500)의 제조방법에 대하여 살펴보기로 한다.

[0043] 도 4를 참조하면, 상기 바이오센서(500) 제조방법은, 상기 마이크로챔버(300,300a)를 형성하는 단계(S10)와, 자가조립 분리막(400)을 형성하는 단계(S20)와, 생물입자를 집적시키는 단계(S30)를 포함한다.

[0044] 상기 마이크로챔버(300,300a)를 형성하는 단계(S10)는, 지지판(1)의 상면으로 상기 마이크로챔버(300,300a)를 형성하기 위한 마이크로챔버 틀몸체(330)를 형성하는 단계와, 상기 마이크로챔버 틀몸체(330)을 경화시키는 단계와, 경화된 상기 마이크로챔버 틀몸체(330)의 하면에 하부판(2)을 부착시키는 단계를 포함한다.

[0045] 여기서, 상기 마이크로챔버 틀몸체(330)를 형성하는 단계에 대하여 도 5를 참조하여 상세하게 살펴보기로 한다.

[0046] 먼저, 도 5의 (a)에 나타난 바와 같이 지지판(1)의 상면으로 상기 제2유로(321)의 높이에 대응하도록 네거티브 포토레지스트를 코팅하여 제1포토레지스트층(10)을 형성한다.

[0047] 그런 다음, 상기 제1포토레지스트층(10)의 상부로 포토 마스크(3)를 위치시킨 후 상기 제1포토레지스트층(10)으로 UV를 노출시킨다(도 5의 (b)).

[0048] 상기한 UV를 노출한 후에는 상기 제1포토레지스트층(10)의 상면으로 상기 제1유로(311)의 높이에 대응하도록 네거티브 포토레지스트를 코팅하여 제2포토레지스트층(20)을 형성한다(도 5의 (c)).

[0049] 그런 다음, 도 5의 (d)에 나타난 바와 같이 상기 제2포토레지스트층(20)의 상부로 포토 마스크(4)를 위치시킨 후 상기 제2포토레지스트층(20)으로 UV를 노출시킨다.

[0050] 다음으로, 현상액(5)에 침지시켜 상기 UV에 노출되지 않은 상기 제1포토레지스트층(10)과 상기 제2포토레지스트를 제거하고(도 5의 (e)), 표면처리 후 경화한다(도 5의 (f), (g)).

[0051] 그런 다음 하부의 지지판을 제거한 후 하면을 투명유리판과 같은 하부판(2)에 부착시켜(도 5의 (f)), 상기 마이크로챔버(300)를 제조한다.

[0052] 상기 자가조립 분리막(400)을 형성하는 단계(S30)는, 상기한 마이크로챔버 틀몸체(330)를 이용하여 제조한 마이크로챔버(300,300a)의 제2유로(321) 내에서 미세입자(30)들이 자가조립에 의하여 적층 배열되면서 자가조립 분리막(400)이 형성되게 한다.

[0053] 상세하게, 상기 자가조립 분리막(400)은, 상기 마이크로챔버(300,300a) 내로 미세입자(30)들이 포함된 분리막형성 유체(40)를 이동시키고, 상기 미세입자(30)들이 상기 제2유로(321) 내에서 자가조립에 의하여 적층 배열되면서 상기 자가조립 분리막(400)이 형성되게 하고 상기 분리막형성 유체(40)는 상기 자가조립 분리막(400)을 이루는 상기 미세입자(30)들 사이를 통하여 유출시키는 과정을 통하여 형성된다.

[0054] 상기한 바에 따라 마이크로챔버(300,300a) 내 자가조립 분리막(400)이 형성되면, 상기 마이크로챔버(300,300a) 내로 생물입자를 포함하는 액상 유체를 공급하여, 상기 자가조립분리막에 의하여 상기 유체는 통과하고 상기 생물입자는 상기 제1유로(311) 내에 집적한다.

[0055] 도 6을 참조하여 상기 자가조립 분리막(400)의 형성과정을 살펴보면, 먼저 (a)는 미세입자(30)가 포함된 분리막형성 유체(40)가 상기 제2마이크로챔버(320)로 유입된 상태를 나타내고 있다. 이 후 미세입자(30)가 포함된 분리막형성 유체(40)의 유입을 중단한 후 일정 시간이 경과하면 (b)에 나타난 바와 같이 상기 제2마이크로챔버(320)에서 상기 미세입자(30)들이 자가조립하면서 상기 자가조립 분리막(400)이 생성된다.

[0056] 이렇게 자가조립 분리막(400)이 생성되면, 도 7에 나타난 바와 같이 상기 자가조립 분리막(400)의 상기 미세입자(30)들 사이에서 모세관압이 생성되면서 상기 모세관압에 의하여 상기 분리막형성 유체(40)가 출구로 이동하여 증발하고, 시간이 지날수록 상기 미세입자(30)들이 상기 제2마이크로챔버(320) 내에서 집적된다. 이러한 매커니즘은 마란고니 효과(Marangoni effect)에 의하여 설명될 수 있으며, 이에 대한 상세한 설명은 공지된 사항으로 생략하기로 한다.

[0057] 한편, 상기한 매커니즘에 의한 자가조립 분리막(400)은 상기 마이크로챔버 어레이(350)를 포함하는 도 3의 바이오센서(500)를 이용하여 제조되며, 이에 도 3을 참조로 하여 자가조립 분리막(400)의 제조방법에 대하여 살펴보기로 한다.

[0058] 먼저 제2주입구(201)로 미세입자(30)가 포함된 분리막형성 유체(40)를 주입하여 상기 제2채널(200a)로 상기 분리막형성 유체(40)가 유동하게 하고, 상기 마이크로챔버 내로 상기 분리막형성 유체(40)가 공급되게 한다. 여기서, 자가조립 분리막(400)을 형성할 시에는 전술한 바이오센서(500)의 유체 유동과는 반대로 유동하도록 한다.

[0059] 이렇게 상기 마이크로챔버(300,300a) 내로 상기 분리막형성 유체(40)가 유동하면 주로 상기 마이크로챔버(300,300a)의 제2유로(321) 내에서 상기 미세입자(30)들이 자가조립(Self-assembled)에 의하여 적층 배열되면서 자가조립 분리막(400)이 형성된다. 여기서, 상기 미세입자(30)는 작은 통과 단면적을 갖는 상기 제2유로(321)에서 매트릭스 구조로 배열 결합하면서 자가조립하고, 상기 분리막형성 유체(40)는 상기 자가조립 분리막(400)을 이루는 상기 미세입자(30)들 사이의 공극을 통하여 유출된다.

[0060] 한편, 상기 미세입자(30)는 공극형성이 용이하도록 구형(Spherical shape)으로 형성되는것이 바람직하며, 200nm 내지 1000nm의 직경을 갖도록 형성되는 것이 바람직하다.

[0061] 또한, 상기 미세입자(30)는, 인접하는 미세입자(30)와의 사이에 형성되는 공극의 크기가 집적되는 미세입자(30) 집적물의 크기보다 작도록 형성되는 것이 바람직하다.

[0062] 또한, 상기 미세입자(30)는 실리카(Silica), 카르복실화 미세입자(30)(Carboxylated particle) 등을 적용할 수 있다. 나아가 상기 분리막형성 유체(40)는, 취급이 용이한 물을 적용할 수 있으나, 이외 상기 자가조립 분리막(400)의 구조에 영향을 미치는 벤젠(Benzene) 류를 제외한 증발 가능한 유체라면 모두 사용 가능함은 물론이다.

[0063] 한편, 생성되는 상기 자가조립 분리막(400)의 폭 넓이는 사용자의 용도 및 사용목적에 따라 소프트 리소그래피(Soft Lithography) 기술을 이용해 조절이 가능하며, 높이(두께)는 10㎛ 내지 30㎛ 이내, 바람직하게는 5㎛ 내지 30㎛ 이내로 제작하는 것이 바람직하다. 이는, 상기 마이크로챔버(300,300a) 내부의 단차로 인한 유체유입 방지 및 미세입자(30)가 포함된 용액 내부의 수분을 증발시켜 자가조립 분리막(400)의 제작이 용이하기 때문이며, 세부적으로는 만약 상기 자기조립 분리막의 높이가 5㎛ 미만일 경우에는 유체 유동이 원활하지 않고, 30㎛를 초과하게 되면 자가조립 분리막(400)이 생성이 어렵기 때문이다. 여기서, 상기 자가조립 분리막(400)의 최적 높이에 따라 상기 자가조립 분리막(400)이 주로 생성되는 제2마이크로챔버(320)의 높이도 이와 대응하여 형성되는 것이 바람직하다.

[0064] 한편, 상기에서 상기 미세입자(30)들의 집적을 중단하고자 할 시에는, 상기 모세관압을 제어하기 위하여 상기 제4채널에 오일을 채워 상기 분리막형성 유체(40)의 증발을 방지하여 상기 자가조립 분리막(400)의 형성을 중지할 수 있다. 이러한 오일을 통한 자가조립 분리막(400)형성의 제어는, 상기 제1채널(100a)에 공기를 채운 상태가 아닌 오일을 채웠을 경우에도 미세입자(30)가 집적되지 않는 것을 통하여 확인할 수 있다. 한편, 상기 오일은 상기 자가조립 분리막(400)을 통한 상기 유체의 증발을 방지하기 위한 것으로서, 상기한 증발 방지에 대한 목적을 달성할 수 있다면 다양한 구성이 적용될 수 있음은 물론이다.

[0065] 상기한 바와 같이 상기 제2마이크로챔버(320)에서 상기 자가조립 분리막(400)이 형성되면, 블로잉(Blowing) 및 건조(Drying) 과정을 거쳐 마무리한다.

[0066] 이하에서는, 상기 자가조립 분리막의 제조 및 상기 바이오센서의 시험 및 결과에 대하여 살펴보기로 한다.

[0067] (시약과 재료)

[0068] 자가조립 분리막(이하 'SAPM'이라 한다) 형식을 가시화 하고 집적 요소들을 특징짓기 위해서 직경 1μm 직경을 가진 폴리스틸렌 분자를 사용하였다. 로다민 분류 분자들(F-13082, Life Technology Korea LLC, Seoul, Korea) 1mM(ca. 5x109 beads/mL)이 35wt% 에탄올과 증류수 혼합액과 함께 준비되는데, 이는 용제의 증발율을 증가시킴으로써 분자의 자가 조립 시간을 줄일 수 있기 때문이다. 집적 요소 (즉, 100μm, 5x108 beads/mL 에 해당한다)를 특징화 하기 위해 같은 입자 부유 (The same particle suspension)(1mM)가 증류수에 추가적으로 희석된다. 형광입자를 이용하여 SAPM 형식과 집적요소를 특징화 한 후, 입자들과 박테리아 세포들과 같은 집적 샘플들의 구성요소에 형광발광 간섭을 하는 요소를 제거하기 위해 카르복시기와 분류되지않은 직경 1μm의 폴리스틸렌 분자(08226-15, Polyscience Inc., Warrington, PA, USA)가 SAPM 형식에 사용되었다. 불소첨가 오일(FC-40, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 마이크로 챔버 용액의 증발을 막고 마이크로챔버 어레이(350)의 분류를 위해 사용되었다. 폴리다이메틸실록산 (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning Corp., Midland, MI, USA)가 마이크로유체 장치를 제조하기 위해 사용되었다. 베이스와 막 양생제를 10:1 로 혼합한 후 소프트 식각 전에 진공 자에서 30분 동안 가스를 제거하였다.

[0069] (제조와 마이크로유체 장치의 작동)

[0070] 본 미세유체 장치는 도 5의 공정을 이용하여 제조되었다. 먼저, 네거티브 포토레지스트 (SU-8 2010, Microchem Co., Westborough, MA, USA)가 실리콘 웨이퍼(지지판;10μm) 에 회전 코팅된 후 소프트 베이크 한다. 제1포토마스크와 마스트 얼라이너(MA6, SussMicro Tec, Garching, Germany)를 사용하여 UV에 노출한 후, 포토레지스트(SU-8 2050, Microchem Co.)를 두 번째 층 (50μm)으로 형성하기 위하여 추가적으로 회전 코팅한 후 순차적으로 소프트 베이크 한다. 제2 포토마스크와 상기와 같은 마스크 얼라이너를 이용하여 UV에 노출시킨 후, 가공된 실리콘 웨이퍼를 현상액에 침지시켜 노출되지 않은 포토레지스트를 제거하고 마이크로챔버 틀몸체를 제조한다. 그 후, 마이크로챔버 틀몸체의 표면을 3염화 (3,3,3,-trifluoropropyl) 실란 (452807, Sigma-Aldrich)으로 처리하였다. PDMS 용액을 마이크로챔버 틀몸체에 부어서 80℃ 오븐에서 경화시켰다. 복제된 PDMS 장치를 마이크로챔버 틀몸체에서 떼어 내어 산소10sccm 와 10W 의 산소 플라즈마에 1초 동안 노출 하여 표면 처리 후에 (Cute-MP, Femto Science, Gyeonggi-do, Korea)투명 유리판에 부착하였다. 모든 액체는 주사기 펌프를 사용하여 폴리머 관을 통하여 주입되었고, 유동율은 대략 500nL/min 으로 조절되었다.

[0071] (박테리아세포 준비)

[0072] 다른 플라스미드를 가지는 대장균(Escherichia coli)의 몇 가지 종이 사용되었다. pTKU4-2 플라스미드를 번식하는 MG1655 종은 자동력이 있고 계속적으로 초록색 형광 단백질 (GFP)를 짜낸다. pTKU4-65 플라스미드를 번식하는 DH10B 종은 자동력이 없고 계속적으로 빨간 형광 단백질 (RFP)를 짜낸다. pZBRG 플라스미드를 번식하는 MG1655종은 테트라사이클린(Tetracycline) 과 아라비노오스(Arabinose) 가 존재할 때 각각 GFP 와 RFP를 생산하도록 합성 조작되었다. pHK194와 pHK200를 가지고 있는 두 개의 DH5α 종은 미생물 감지 세포로 사용되어 중금속 이온을 감지하는데 사용되었다. pHJ194를 가진 HK621 감지세포는 Pb^{2+} 를 감지하였고 pHK200을 가진 HK622 감지세포는 Cd^{2+}를 감지하였다. 그러므로 이 세포들은 인간의 몸에서 전형적으로 독성을 가지는 중금속을 감지해 내기 위한 미생물 바이오센서의 미생물로서 사용될 수 있다. 실험을 위하여, LB 세균배양액 접시에서 피펫 끝을 이용하여 한 균락을 집어서 LB broth 배지 5mL 와 항생제 5μL (qZVEG 용으로는 클로람페니콜, 나머지 세포들 용으로는 암피실린)를 포함하는 시험 관에 넣었다. 시험관을 12시간 동안 200rpm 으로 회전진동하는 인큐베이터(37℃) 에 넣었다. 600nm (OD600) 에서의 광학농도는 대략 2 (ca, 1.6 x 109 cells/mL) 였다. 세포 자동력을 강화하기 위해서, LB 배지 보다는 항생제를 포함한 TB배지가 사용되었는데, TB매체가 박테리아 세포들의 자동력에서 다양성을 증가시키는 것으로 알려졌기 때문이다. pZBRG/MG1655 로 주기적인 유도 실험을 하기 위해서, 1μM 테트라사클린과 4mM의 아라비노즈가 4% 글리세롤을 포함하는 M9 최소배지에 준비되었다.

[0073] (실험 셋업 과 데이터 분석)

[0074] 박테리아 세포들의 광학밀도를 측정하기 위해 자외선 분광광도계가 사용되었다. CCD 카메라(Clara Interline CCD)가 있는 도립형 형광 현미경은 집적도를 관찰하고 세포의 입자들을 분석하기 위해 사용되었다. 마이크로유체 장치의 온도와 습도를 37℃ 와 60%로 각각 유지하기 위해서 세포 인큐베이션 시스템이 현미경대에 설치되었다. 모든 실험 과정의 이미지들은 이미지 소프트웨어를 이용하여 캡쳐되었다. 캡쳐된 이미지는 Image J (1.45s, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 를 이용하여 정량적으로 분석되었고, 그 후,

Origin 8 소프트웨어 (v8.0951, OriginLab Corp., Northampton, MA, USA)를 이용하여 그래프로 나타내어졌다. 배경 신호의 형광 강도는 모든 정량적 분석에서 제하였다. 전자현미경 이미지 정밀검사는 필요 시 PDMS 장치 표면에 백금 스퍼터링으로 행해졌다.

[0075] (자가조립 분리막의 형성과 통합)

[0076] 도 8은 SAPM의 형광이미지를 나타낸 것으로서, 미세입자들은 시각화를 위해서 형광으로 분류되었다. 상위의 제2채널은 분리막형성 유체로 가득 차 있고 반면 제2채널은 t=0 로 비어있다. 미세입자들은 시간이 흐르면서 마이크로챔버에서 계속 자가조립된다. 자가조립은 제2유로의 좁은 가장자리에서 시작되었고 제2유로가 완전히 채워지기까지 넓은 가장자리를 따라 계속적으로 진행되었다. 자가조립 3시간 이후에, 제2채널의 상단을 공기로 씻어 내리고 나서 SAPM 이 성공적으로 형성되었음을 확인하였다. SAPM 제조 방법을 분류되거나 또는 분류되지 않은 카르복실기 입자를 사용하여 도 9에 나타난 바와 같이 다양한 채널 기하학적 구조에 시험해 보았고 같은 방법이 마이크로챔버 어레이에서 SAPM들을 형성하는데 직접적으로 적용될 수 있음을 확인하였다.

[0077] (미세입자들의 집적)

[0078] 미세 입자들을 가지고 SAPM들을 형성하였으며 형광색으로 분류된 미세 입자들을 가지고 집적 실험을 행하였다. 먼저, 제1유로를 통해서 증류수로 집적 챔버를 채운 후 미세입자를 포함한 용액으로 제1유로를 씻어 내렸다. 도 10은 형광 분류된 입자들이 SAPM 쪽으로 유도되고 인터페이스에 계속 집적되기 때문에 집적기간 동안의 이미지들이 밝고 형광인 것을 보여준다. 이는 물분자들이 SAPM을 통해서 제2채널 (Channel-A)로 증발되기 때문인데, 입자들이 주위 유체를 따라 움직일 수 있게 한다. 도 10의 (a) 와 (b) 에서 나타난 바와 같이, 고온이 되면 미세입자들이 빠르게 집적할 수 있는데, SAPM을 통한 물의 증발이 고온에서 증가하기 때문이다. 도 10의 (c)는 수량화된 집적계수들과 대조 실험을 보여주는데, 약간의 집적은 브라운 운동에 의한 것이고(도 1 및 도 2참조), 입자 집적은 되지 않은 상태이다. 100분 동안의 집적 후에, 집적 계수가 대조 실험에 비해서 7(25℃) 과 12(40℃)에 달했다. 한편, 이 실험에서는 대조실험을 위해 상위 주요 채널에 기름을 넣어서 수분증발을 막았다. 도 10의 (d) 와 (e)는 상기에서 기술한 온도와 같은 온도 조건에서 집적 요소들에 대한 강제 대류의 효과를 보여준다. 강제 대류를 위하여 질소(N_2) 기체를 사용하였고, 입구 압력은 유동속도 5ㅅ10-5 m^3/min 에 해당하는 대략 5kPa 였다. 대량의 입자들이 SAPM 인터페이스에 빠르게 쌓였다. 도 10의 (f) 는 집적 계수가 120 과 110 에 달하는 것을 보여준다. 따라서, 집적 계수는 온도 그리고/또는 대류를 이용하여 2시간 안에 수배에서 백배로 활발하게 조절이 되었다. 이는 마이크로챔버 어레이에서 세포들의 수량성을 조정하는 데 아주 유용하다.

[0079] (박테리아 세포 집적)

[0080] 박테리아 두 종 이 중 한 종은 유동력이 있고 GFP를 생산하도록 조작(MG1655)하고, 다른 종은 유동력이 없고 RFP를 생산하도록 조작(DH10B)하는 것을 반복되었다. 도 10에서 나온 방법과 같은 방법으로 챔버가 배지로 가득 차도록 TB 배지를 제1채널에 놓았다. 다음으로, 제1채널을 세포 정지 용액으로 씻어낸 후 질소 기체를 제2채널을 통해서 주입함으로써 강제 대류를 시켰다. 도 12의 (a)와 3(b)에서 보듯이, 제1채널에 있는 세포들은 시간이 지남에 따라 SAPM 인터페이스 쪽으로 이끌려서 쌓였다. 그러나 증발이 완전히 끝났을 때 최소 형광 신호만 감지되었다 (도 11의 (b)참조). 도 12의 (c)는 집적 계수들의 수치를 보여준다. 박테리아 세포들은 대조실험에 비해 마이크로 챔버에 축적되는 양이 많았다. 그러나 유동적인 박테리아 세포와 비유동적인 박테리아 세포 사이의 차이는 없었는데, 이는 증발로 인한 모세력이 SAPM 사이에 있는 기체와 액체 인터페이스에서 상당히 강하기 때문에 세포 유동력은 무시할 만 하다는 것을 의미한다. 게다가, 이전 입자 집적과 비교했을 때, 집적 계수가 반 밖에 되지 않았다 (예를 들면, 1시간 집적동안 입자 집적시 60, 박테리아 세포 집적시 30). 이는 SAPM 용으로 쓰인 입자들과 크기가 같은 입자들을 사용하였기 때문에 다공성이 집적된 입자들에 의해 영향을 받지 않았기 때문이다. 그러나 박테리아 세포 집적에 있어서는, 다공성이 집적되는 박테리아 세포들에 의해 낮아지는 것 같았다 (대략 길이 2㎛ 와 지름 1 ㎛). 그러므로 줄어든 다공성이 증발률(모세력)을 낮추는 저항기제로 작용하였다. 그러나 집적 계수는 여전히 다른 섬유막으로 만든 장치들에 비해서 높거나 경쟁력이 있었고, 본 마이크로유체 장치가 다목적이고 여러 샘플들을 빠르게 집적시키는데 사용가능 하다는 것을 확인하였다.

[0081] (세포 집적과 케모스테트(Chemostat) 유사 배양)

[0082] 마이크로챔버에서 세포들의 세 가지 초기 수량성을 이용하여 본 마이크로유체 장치에서의 세포 성장을 실험하였는데, 수량성은 세포를 포함한 용액의 광학 농도 (OD600=0.6)를 조절하고 도 12의 (c) 에서의 이전 결과에 따라 집적 시간을 다양화함으로써 쉽게 조절하였다. 도 13의 (a) 에서 나타난바와 같이, 세 가지의 초기 수량, n

i <10, n i=400, n i=40,000, 으로 수 초(5초 이하), 4분, 45분으로 집적 기간을 조정하면서 마이크로챔버에서 집적시켰다. 다음으로, LB 강화 배지를 제2채널로 계속 공급하면서 마이크로챔버 어레이의 분류를 위해 제1채널에 기름을 넣었다. 세포 성장은 세포세부터 형광 강도를 측정함으로써 간접적으로 수량화되었다; 그 정량적인 결과는 도 13의 (b)에 보여진다. 가장 높은 초기 세포 밀도 (즉, n i=40,000)의 경우는 LB 강화 배지가 공급되자마자, 래그 단계 없이 로그 단계를 바로 거치면서 형광 강도가 즉시 증가하였다. 대략 11 시간 동안, 마이크로챔버가 대략 200 OD600 의 세포들로 가득 찼다. 세포 분열을 위한 화학적인 조건은 잘 유지되었지만 마이크로챔버에 빈 공간이 더 이상 없어서 추가적인 세포분열은 물리적으로 힘들었다. 반대로, 낮은 초기 세포 밀도를 가진 부류들에서는 (즉, n i=400, n i <10,), 세포로부터 형광 신호를 감지하기가 어려웠다. 래그 단계가 각각 4시간에서 11 시간 동안 지속되었고 그 후에 양쪽의 성장 커브가 로그 단계를 나타내었다. 게다가, 시간이 지남에 따라 형광 강도의 기울기가 세포들의 초기 수량성에 영향을 받았다; n i=40,000 부류에서는 1798au/h, n i=400 부류에서는 1226au/h, n i <10 부류에서는 1226au/h. 이 결과들에 기초하여, 래그 단계는 필요한 만큼 줄일 수 있다는 것을 확인하였다. 더군다나, 로그 단계의 기울기도 조작될 수 있는데, 미생물 바이오센서의 감광도를 강화시킬 수 있다는 것을 의미한다. 마이크로챔버는 광학 밀도가 분명 200 (1.6ㅅ1011 cells/mL) 을 초과하는 세포들로 가득차 있는 듯 했다. 일반적으로, 이런 높은 OD600 수치는 기존의 집단 급수형 배양에서는 도달하기 힘들다. 중요한 것은 높은 초기 수량성이 래그 단계를 현저히 줄임으로써 칩에 있는 박테리아 세포들을 빨리 분석할 수 있는 가능성을 크게 만든다는 것이다. 그러므로, SAPM은 마이크로유체 바이오반응 장치로서 사용되기에 높은 가능성을 보여준다.

[0083] (미생물 바이오센서 플랫폼에의 적용)

[0084] 본 장치를 도 3의 미생물 바이오센서 플랫폼에도 적용하였다. SAPM들을 마이크로챔버 어레이에 만들었고 그리고 나서 각각 미생물 바이오센서 세포를 집적시켰다. 도 14의 (a) 와 (c)에서 보듯이 n i <10, n i =400, n i =40,000의 세 가지 다른 초기 수량성을 가진 세포들이 동시에 실험되었다. 도 13에서 보여진 세포 성장과 유사한 방법으로, 세포의 초기 수량성이 시간이 지남에 따라 형광 강도의 증가에 현저한 영향을 주었다. 목표 중금속 이온 (즉, 각각 Pb^{2+} 20μM, Cd^{2+} 20μM) 들이 같은 집적에 존재 할 시, 형광 강도의 반응 시간은 세포의 초기 수량성에 높게 의존한다. 높은 초기 수량성을 가지면 더 강하고 빠르게 형광 강도를 낼 수 있다. 흥미롭게도, 마이크로챔버들은 상기 세포들로 가득 찼고 각 세포들은 그들의 최대 발현 수준으로 GFP를 생산해냈다.

[0085] 도 14의 (b) 와 (d)는 칩에서 병렬로 측정이 된 미생물 바이오센서 세포들의 정량화된 형광 반응을 보여주었다. 양쪽의 미생물 바이오센서 세포들은 낮은 초기 수량성을 가진 세포들에 비해 높은 초기 수량성을 가진 세포들에서 더 빠른 반응을 보였다. 초기 수량성과 케모스테트 유사하게 계속적인 배양 환경이 래그 단계를 줄이는 것을 가능하게 했고, 결과적으로 반응 시간 면에서 바이오센서의 기능을 향상시켰다. 예를 들면, 도 14의 (b)에서 보여지듯이, HK621 세포들의 높은 초기 수량성은 목표 중금속 이온이 주입 되자마자, 그 목표 중금속 이온 (Pb^{2+}) 에 in situ 형광 반응을 보였고, 반면, 낮은 초기 수량성은 로그 단계 대략 15 시간이 지나고 나서 형광 반응을 보였다. 반대로, HK622 세포들의 Cd^{2+} 에 대한 형광 반응은 HK621에 비교하여 다른 행태를 보였다 (도 6(d)). Cd^{2+} 이온의 독성에 기인하여 세포성장에 부정적으로 작용하였다. 결과적으로, HK622 세포들은 낮은 초기 수량성들에서는 불안정한 반응을 보이고 로그 단계를 통과하는데 더 많은 시간이 걸린다 (30 시간). 그러나 HK621 과 HK622 모두에서 낮은 수량성 보다는 높은 수량성일 때 각각 HK621의 2156 au/h vs. 1997au/h, HK622의 308au/h vs. 194au/h 로 가파른 경사를 보였다. 특히, 원하는 마이크로챔버 어레이에 세포를 집적시키는 능력이 미생물 바이오센서 세포들의 기울기의 감도를 강화하는데 중요한 역할을 하였고, 이는 SAPM 통합 마이크로유체 장치가 멀티플렉스 미생물 바이오센서 플랫폼으로 사용될 수 있다는 것을 나타내었다. SAPM들을 가진 마이크로챔버 어레이는 다른 마이크로유체 구성요소들과 쉽게 통합이 가능하기 때문에 SAPM 통합 마이크로유체 장치를 멀티플렉스 미생물 바이오센서 플랫폼으로 확장시키는 것이 가능하다 (예, 집적 발전기). 도 3에서 보여지는 것과 같이, 목표 분석에 따라 미세 혼합기를 사용하여 넓은 범위로 집적을 만들어 낼 수 있으며 미생물 바이오센서 세포들은 SAPM들을 이용하여 분류될 수 있기 때문에, 멀티플렉스 미생물 바이오센서 플랫폼을 개발하기가 쉽다.

[0086] 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

[0087] 1... 지지판 2... 하부판

3,4... 포토마스크 5... 현상액

10... 제1포토레지스트층 20... 제2포토레지스트층

30... 미세입자 40... 분리막형성 유체

100,100a... 제1채널 101... 제1주입구

102... 제1유출구 200,200a... 제2채널

201... 제2주입구 202... 제2유출구

300,300a... 마이크로챔버 310... 제1마이크로챔버

311.. 제1유로 320... 제2마이크로챔버

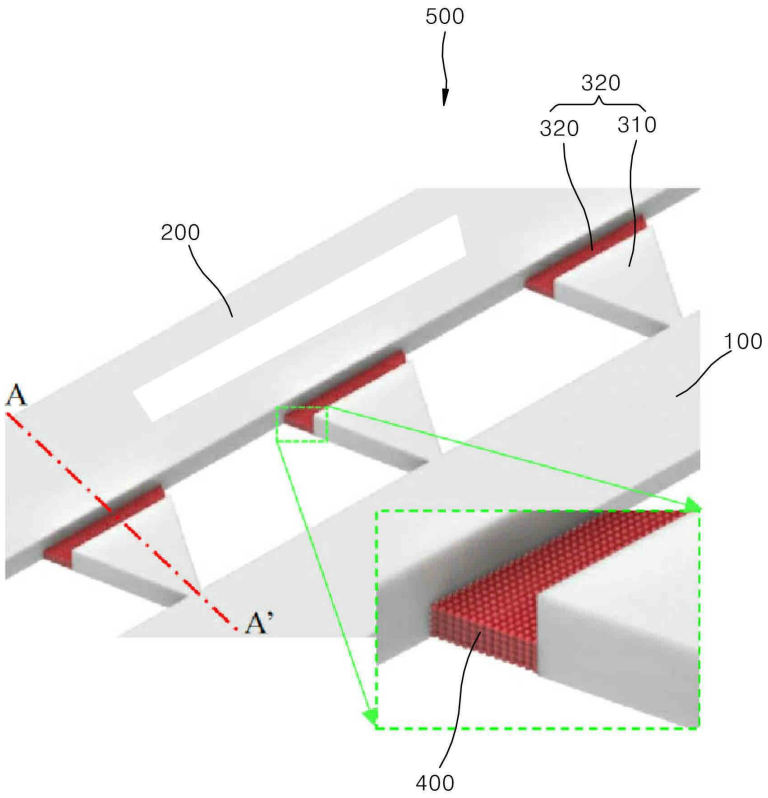
321... 제2유로 330... 마이크로챔버 틀몸체

350... 마이크로챔버 어레이 400... 자가조립 분리막

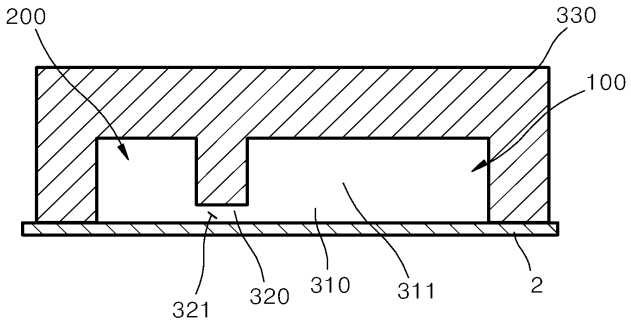
500,600... 바이오센서

도면

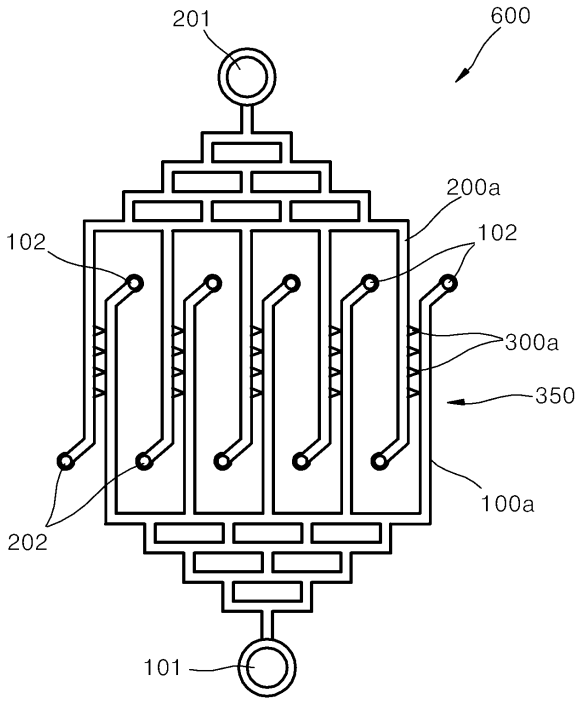
도면1



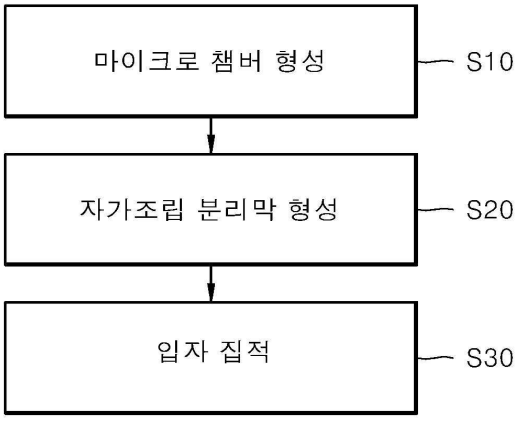
도면2


200
330
100
321
320
310
311
2

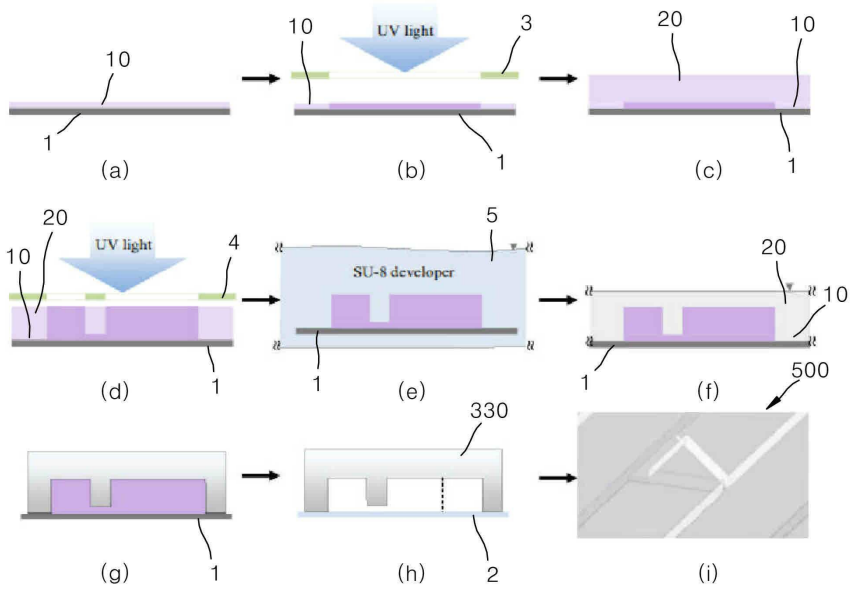
도면3


201
600
200a
102
102
300a
350
100a
202
101

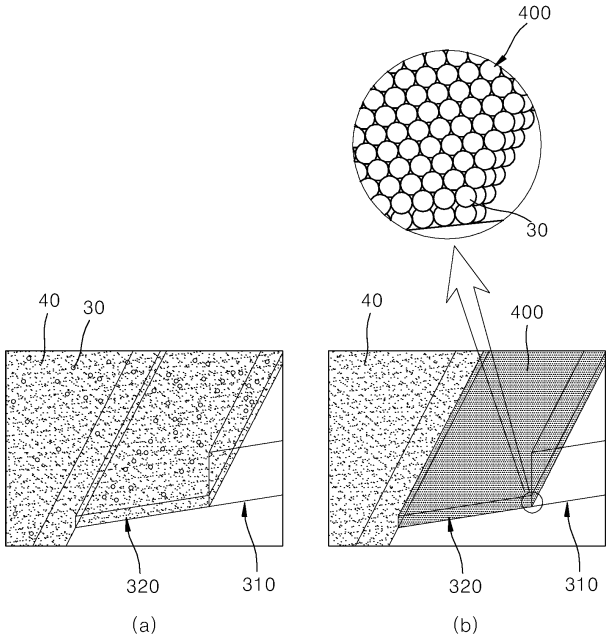
도면4


마이크로 챔버 형성
S10
자가조립 분리막 형성
S20
입자 집적
S30

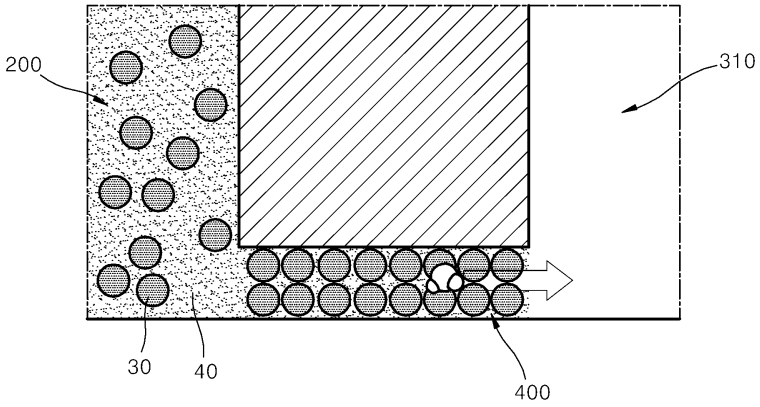
도면5


10
1
(a)
10
UV light
3
1
(b)
20
10
1
(c)
20
10
UV light
4
1
(d)
5
SU-8 developer
1
(e)
20
10
1
(f)
500
330
1
(g)
(h)
2
(i)

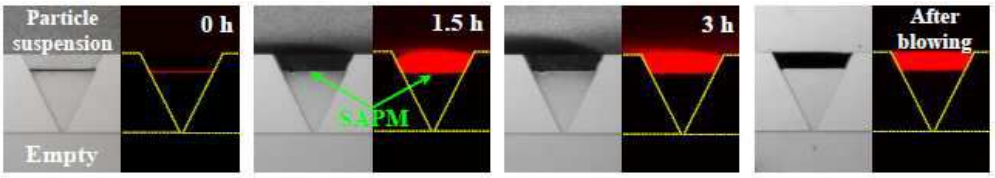
도면6


400
30
40
30
320
310
(a)
40
400
320
310
(b)

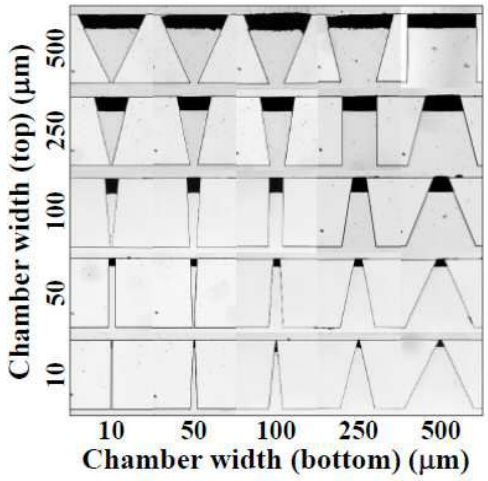
도면7


200
310
30
40
400

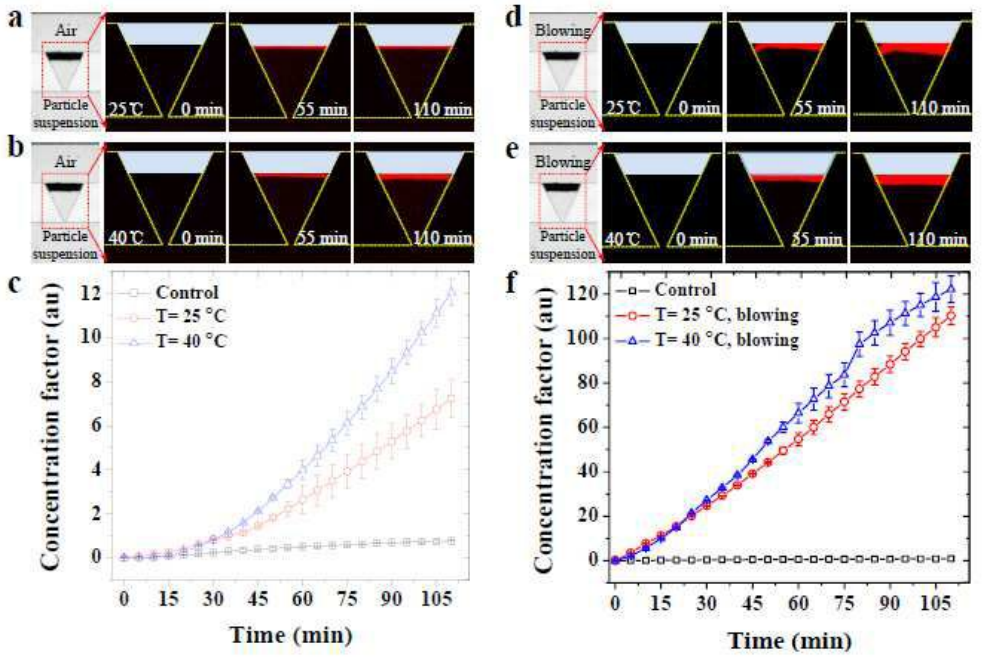
도면8


Particle suspension
0 h
Empty
1.5 h
SAPM
3 h
After blowing

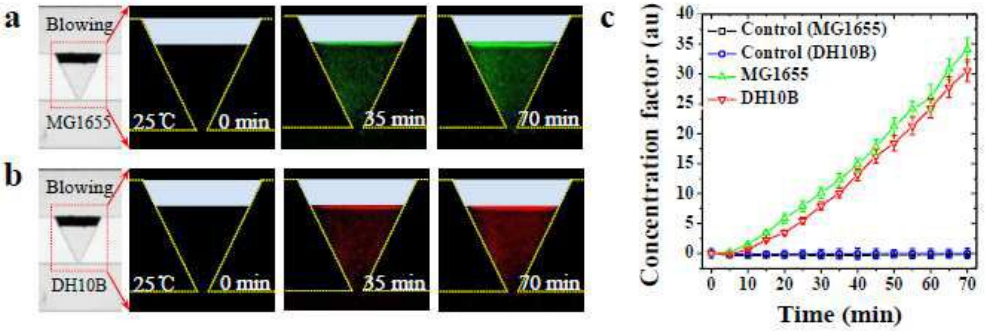
도면9


Chamber width (top) (μm)
500
250
100
50
10
10
50
100
250
500
Chamber width (bottom) (μm)

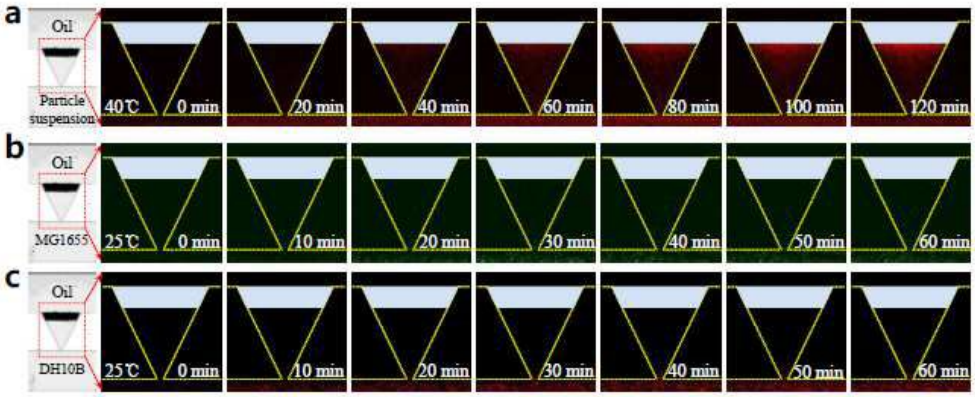
도면10



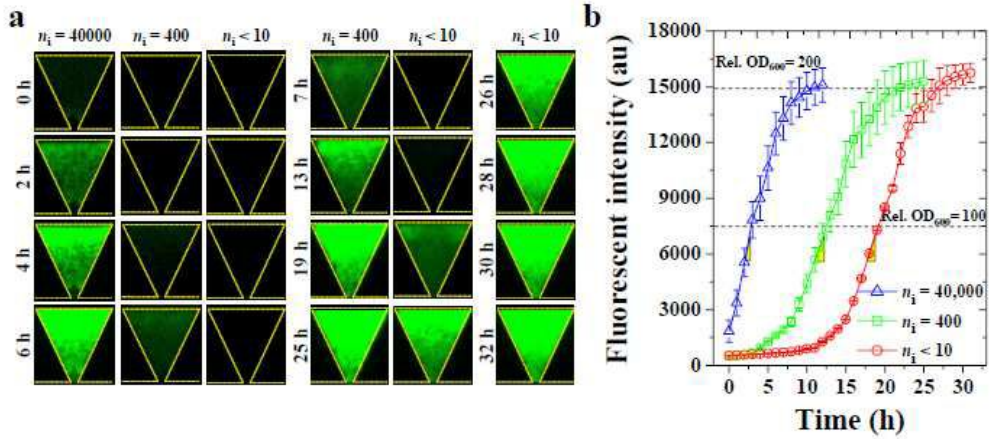
도면11



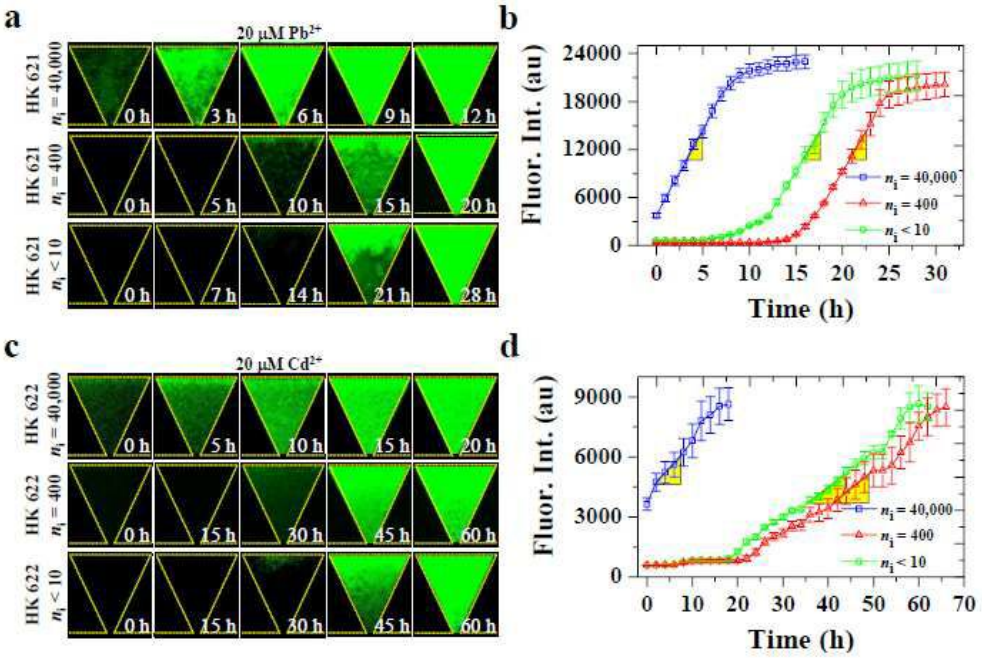
도면12



도면13


a
n_i = 40000
n_i = 400
n_i < 10
n_i = 400
n_i < 10
n_i < 10
0 h
2 h
4 h
6 h
7 h
13 h
19 h
25 h
26 h
28 h
30 h
32 h
b
Fluorescent intensity (au)
Rel. OD600= 200
Rel. OD600= 100
n_i = 40,000
n_i = 400
n_i < 10
Time (h)

도면14


a
20 μM Pb2+
HK 621 ni = 40,000
HK 621 ni = 400
HK 621 ni < 10
b
Fluor. Int. (au)
n_i = 40,000
n_i = 400
n_i < 10
Time (h)
c
20 μM Cd2+
HK 622 ni = 40,000
HK 622 ni = 400
HK 622 ni < 10
d
Fluor. Int. (au)
n_i = 40,000
n_i = 400
n_i < 10
Time (h)