



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0069460
(43) 공개일자 2022년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 1/40 (2006.01) G01N 15/00 (2017.01)
G01N 15/02 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
G01N 21/65 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 1/4077 (2013.01)
G01N 15/0205 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0156599
(22) 출원일자 2020년11월20일
심사청구일자 2020년11월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
임현정
경기도 의왕시 덕장로 76, 405동 504호(청계동,
휴먼시아 청계마을)
남정훈
서울특별시 구로구 구로동로 148 (구로동)
(74) 대리인
특허법인 무한

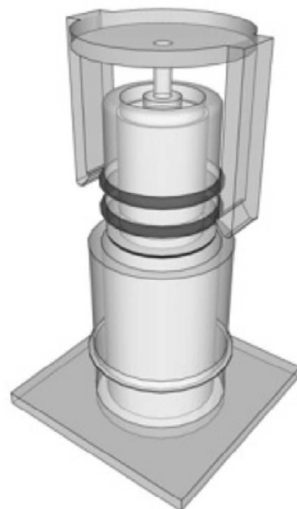
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 미세입자의 분석방법 및 장치

(57) 요약

본 발명은 미세입자의 분석 장치 및 이를 활용한 미세입자의 분석방법에 관한 것으로서, 상기 미세입자의 분석 장치는 필터부, 미세홀, 공기배출홀 및 손잡이부를 포함하는 플런저(plunger); 및 측면 부에 샘플주입홀을 포함하고 상기 플런저가 들어갈 수 있는 크기의 샘플 보관 공간 및 투명한 바닥판을 갖는 샘플 챔버; 를 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 따른 미세입자의 분석 장치 및 분석 방법을 통해, 세포 부유액에서 유체를 제거하여 희박한 농도로 존재하는 대상 세포를 원심분리, 음압 발생기 등 별도의 외부장치 없이 누구나 손쉽게 농축할 수 있으며, 농축 이후 분석물질(세포 등)의 별도 이동과정 없이도 곧바로 현미경 등을 통해 계수가 가능하여 세포의 손실 위험성이나 세포 변성이 없다는 효과를 기대할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 21/6402 (2013.01)

G01N 21/658 (2013.01)

G01N 2001/4016 (2013.01)

G01N 2001/4088 (2013.01)

G01N 2015/0065 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711108599
과제번호	2020R1A2C1014460
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	액체 생검을 위한 혈중 나노 시료 전처리 및 고감도 센서 통합 분석시스템 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

필터부, 미세홀, 공기배출홀 및 손잡이부를 포함하는 플런저(plunger); 및

측면 부에 샘플주입홀을 포함하고 상기 플런저가 들어갈 수 있는 크기의 샘플 보관 공간 및 투명한 바닥판을 갖는 샘플 챔버; 를 포함하는 미세입자 분석 장치에 있어서,

상기 필터부 및 미세홀은 플런저의 하단부에 위치하고, 상기 공기배출홀 및 손잡이부는 플런저의 상단부에 위치하며,

상기 필터부는 미세홀의 아래층에 위치하는 것을 특징으로 하는, 미세입자 분석 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 샘플 챔버는 외벽에 고정턱을 포함하고, 상기 고정턱과 상기 플런저의 손잡이부가 맞닿아 고정될 수 있도록, 상기 플런저의 손잡이부로부터 연결된 고정부를 포함하며, 상기 고정턱이 바닥판으로부터 미세입자의 크기와 같거나 작은 높이까지 필터부가 하강할 수 있도록 위치하는 것을 특징으로 하는, 미세입자 분석 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 샘플 챔버의 내벽과 상기 플런저의 외벽 사이에 2 개 이상의 오링부를 포함하는 것을 특징으로 하는, 미세입자 분석 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 필터부 및 미세홀 사이에 지지부를 포함하고, 상기 지지부는 폴리에스테르, 폴리프로필렌, 또는 카복시메틸 셀룰로오스로 이루어진 부직포, 스펀지 또는 초흡수성 마이크로 화이버(fiber)로 이루어진 것을 특징으로 하는, 미세입자 분석 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 필터부는 10 nm 내지 100 μm 의 기공 크기를 갖도록 홀 가공된 필터를 포함하고, 상기 필터는 폴리카보네이트 또는 폴리에스테르로 이루어진 트랙 에치 멤브레인 필터(track-etched membrane filter) 또는 Si 웨이퍼(wafer)로 가공된 필터인 것을 특징으로 하는, 미세입자 분석 장치.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 미세입자는 마이크로 미세입자, 나노 미세입자, 세포, 박테리아, 세균, 기생충, 세포 유래 나노입자, 하이

드로젤비드, 실리카 비드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 미세입자 분석 장치.

청구항 7

2개 이상의 제1항에 기재된 미세입자 분석 장치 및 상판을 포함하는 다중 병렬 미세입자 분석 장치에 있어서, 상기 2개 이상의 미세입자 분석 장치가 수평으로 병렬 배치되어 있고, 상기 상판은 단일 상판인 것을 특징으로 하는, 다중 병렬 미세입자 분석 장치.

청구항 8

- a) 측면 부에 샘플주입홀을 포함하고 샘플 보관 공간 및 투명한 바닥판을 갖는 샘플 챔버에 미세입자를 포함한 샘플을 주입하는 단계;
 - b) 필터부, 미세홀, 공기배출홀 및 손잡이부를 포함하는 플런저(plunger)를 프레싱(pressing)하여 상기 샘플을 농축시켜 미세입자를 단일층화 및 위치고정화 하는 단계; 및
 - c) 미세입자 분석 장치의 하부에서 광학 또는 형광 이미징 시스템을 통하여 상기 미세입자를 계수하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 미세입자의 분석 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 단계 a)의 샘플 주입단계는 샘플 챔버 측면부에 위치한 샘플주입홀을 통해 주입하는 것을 특징으로 하는, 미세입자의 분석 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 단계 b)의 농축시 공기 또는 샘플 용액이 플런저 하단의 미세홀을 통해 배출되고, 플런저 상단의 공기배출홀을 통해 공기가 배출되는 것을 특징으로 하는, 미세입자의 분석 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 단계 b)의 농축시, 상기 샘플 챔버 외벽의 고정턱과 상기 플런저의 손잡이부로부터 연결된 고정부가 맞닿아 분석 장치의 고정이 되는 것을 특징으로 하는, 미세입자 분석 방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 미세입자는 마이크로 미세입자, 나노 미세입자, 세포, 박테리아, 세균, 기생충, 세포 유래 나노입자, 하이드로젤비드, 실리카 비드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 미세입자 분석 방법.

청구항 13

- a) 미세입자를 포함한 샘플에 상기 미세입자와 결합할 수 있는 항체가 코팅된 나노입자를 혼합하는 단계;
 - b) 측면 부에 샘플주입홀을 포함하고 샘플 보관 공간 및 투명한 바닥판을 갖는 샘플 챔버에 상기 미세입자와 항체 코팅 나노입자를 포함한 샘플을 주입하는 단계;
 - c) 필터부, 미세홀, 공기배출홀 및 손잡이부를 포함하는 플런저(plunger)를 프레스싱(pressing)하여 상기 샘플을 농축시켜 상기 미세입자와 결합된 항체 코팅 나노입자를 단일층화 및 위치고정화 시키는 단계; 및
 - d) 미세입자 분석 장치의 하부에서 레이저를 조사하여 표면증강 라만 분광법(Surface-enhanced Raman spectroscopy; SERS) 신호를 분석하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 미세입자의 표면증강 라만 분광법 분석 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 미세입자는 박테리아 또는 세균인 것을 특징으로 하는, 미세입자의 표면증강 라만 분광법 분석 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 나노입자는 금, 은 및 구리로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 나노입자인 것을 특징으로 하는, 미세입자의 표면증강 라만 분광법 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세입자의 분석방법 및 장치에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 필터부, 미세홀, 공기배출홀 및 손잡이부를 포함하는 플런저(plunger); 및 측면 부에 샘플주입홀을 포함하고 상기 플런저가 들어갈 수 있는 크기의 샘플 보관 공간 및 투명한 바닥판을 갖는 샘플 챔버; 를 포함하는 미세입자 분석 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 생체시료나 대기, 수계, 토양과 같은 주변 환경에는 다양하고 수많은 미세입자가 존재한다. 예를 들어, 대기 환경 내의 미세먼지는 2 내지 10 μm 의 크기를 가지고, 초미세먼지는 2 μm 이하, 토양 환경 내의 기생충 및 충란 수십 μm , 수계 환경 내의 조류 4 내지 100 μm , 미세 플라스틱 5 mm 이하, 생체유체 시료 내의 혈액 세포 2 내지 15 μm , 박테리아 수 μm , 그리고 바이러스는 수십 내지 수백 nm 의 크기를 갖는다.

[0004] 따라서, 이와 같이 다양한 크기의 물리적 특성(크기)을 갖는 미세입자는 대상 시료 내에 극히 희박한 농도로 존재하기 때문에, 분석 이전에 생화학적/생물리적 특성을 기반으로 농축하는 기술이 절대적으로 필요하며, 이러한 농축 방식으로는 원심분리나 압력 발생 및 제어 장치 등의 별도의 외부장치를 통해 농축하는 기술이 사용되고 있다.

[0005] 그러나, 원심분리 등을 통한 농축 기술은 세포 변성 및 손실 가능성 등의 문제점이 존재하는바, 이러한 별도의 외부 장치 없이 누구나 손쉽게 농축 가능한 기술이 요구된다.

[0006] 또한, 농축과 같은 전처리 기술뿐만 아니라 농축 이후 별도의 분석물질의 이동 없이 바로 광학 장치 등을 통해 분석이 가능한 통합 장치의 개발이 필요한 실정이다.

[0007] - 기존에 사용되는 농축 기술 및 한계점

[0008] 1) 토양 매개성 기생충은 사람의 분변 또는 토양, 지하수 등에서 잔류하다가 채소류 등 농산물을 통해 인체로

감염되며, 토양 매개 기생충의 인체 감염 진단을 위하여 생체 시료 내의 기생충의 알, 낭포, 유충을 검출 및 분석을 실시하지만, 배설물 내 낮은 농도로 존재하여 기생충의 농축법 개발이 요구된다.

- [0009] 따라서, 대변을 검체로 이용하여 물이나 식염수에 회석하여 i) 다중 원심분리 또는 ii) 체 여과방식(425, 800, 1500 μm 크기의 포어 이용 [PLOS Neglected Tropical Diseases, 10(4), e0004579, 2016])을 활용하였으나, 회수율이 낮고 관찰을 위해 시료를 다시 옮겨야 하는 등의 한계점이 존재한다.
- [0010] 2) 세포 원심분리기술 중 하나로 사용되는 Cytospin 은 소변이나 척수액과 같이 세포 성분이 적고 점착성이 적은 검사물의 도말에 활용되는 것으로서, 원심력을 이용하여 체액 내의 세포를 슬라이드에 한 곳으로 모아주는 역할을 한다. 그러나, 원심력으로 인한 세포의 변성이나 손실 가능성이 존재하며, 세포 크기와 모양의 미세한 차이로 구분해야 하는 림프구성 질환이나 다소간의 세포 변성이 동반된 검체에 대한 세포 진단에 어려움이 있을 수 있다는 한계점이 존재한다.
- [0011] 3) 백혈구 자동계수기(ADAM-rWBC, 나노엔텍)은 수혈 전, 혈액 팩의 잔존 백혈구(rWBC) 수를 자동으로 측정하는 장비로서, 45 초 내 측정이 완료되며, 별도의 전문 검사자가 필요하지 않고 사용법이 간단한 장치에 해당하나, 희박한 농도로 존재하는 세포를 농축할 수 없다는 단점이 있으며(측정 가능 농도 1-100/ μL), 해당 측정 가능 농도는 유럽 가이드라인 $1 \times 10^6/\text{blood unit}(=3/\mu\text{L})$ 과 미국 가이드라인 $5 \times 10^6/\text{blood unit}(=16/\mu\text{L})$ 을 만족하지만 낮은 농도일 때 측정 정확도가 현저히 낮아지는 것으로 보고되어 있는 실정이다(1/ μL 일 때 50%, 2/ μL 일 때 67%).
- [0012] 4) 미생물 세포 카운터(Quantum TX Microbial Cell counter, 로고스바이오시스템즈)는 영상 분석 기반의 자동 박테리아 카운터로서, 최대 20 장의 형광 염색된 세포 영상을 자동 획득한 후 이를 분석하는 장치에 해당한다. 계수하는 미생물의 크기는 매우 작으며(0.5 내지 1 마이크로미터), 분석 채널의 높이는 이보다 높기 때문에 주입된 미생물들은 랜덤하게 분포가 되어 있고, 이에 대해 광학적인 초점을 맞추기 위해 싸이토스핀과 같은 방식으로, 여전히 분석물질의 분석 이전 단계에서 원심분리기를 이용한다는 한계점이 있으며, 또한 원심분리기는 얇은 분석 채널 내 미생물의 위치 제어만을 위해 활용되므로 농축 효과를 얻을 수 없어 저농도로 존재하는 분석에는 정확도의 한계가 존재한다.
- [0013] 5) 척수액을 대상으로 하는 세포 분석 장치인 Glocyte cerebrospinal Fluid (CSF) sample analyzer 는 대상 세포들을 바닥으로 흡착시킬 수 있는 별도의 음압장치가 필요하며, 음압을 이용하는 장치들의 경우 하나의 음압장치로 다양한 샘플들을 한번에 처리하려면 각 챔버마다 압력센서를 통한 모니터링 및 밸브시스템이 별도로 필요하기 때문에 시스템이 복잡해진다는 문제점이 발생한다.
- [0014] 6) Rapid microbiology Flow Cytometer(BactiFlow) 는 Cell-labelling 을 이용한 Laser excitation 방법으로 실시간 살아있는 특정 생균수를 측정할 수 있는 장비로서, 기존 실험 방법에서 요구되었던 장시간 세포 배양 시간이 필요 없는 신속, 정확한 측정 장비에 해당된다. 다만, 상기 장치 또한 앞서 기술한 바와 같이, 별도의 음압발생 및 제어장치 등을 사용하며, 장치 가격이 고가이고, 크기가 크다는 단점이 존재한다.
- [0015] 7) MAGPIX 시스템(Luminex) 는 형광색으로 코딩되어 있는 미세 크기 자성 입자를 이용하여 다중 항체 분석(한 번에 50 개의 타겟 분석)이 가능한 장비로서, 자석을 통해 모든 입자를 단층에 위치시키고 LED 조사를 통해 CCD 카메라로 분석이 가능한 측정 장비에 해당하나, 검출을 위해 자성 입자를 이용해야하는 한계가 있으며, 장치 가격 또한 고가이며 크기가 크다는 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0017] (특허문헌 0001) (1) U.S. Provisional patent application Serial No. 62233734 (2015)
(특허문헌 0002) (2) Indian patent application Serial No. 3096/MUM/2015 (2015)

비특허문헌

- [0018] (비특허문헌 0001) (1) International Journal of Laboratory Hematology, 1-10, 2017, Automated cell

counts on CSF samples: A multicenter performance evaluation of the GloCyte system

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0019] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 희박한 농도로 존재하는 세포를 별도로 전처리하는 과정의 필요 없이, 무동력으로 세포를 농축 및 분석할 수 있는 기술로서, 원심력에 의해 대상 세포를 계수하고자 하는 영역에 부착시키는 과정에서 세포 변성 및 손실 가능성을 제거하고, 농축 이후 계수를 위해 농축된 대상물을 파이펫팅(pipetting)을 통해 옮기는 과정을 생략할 수 있는 미세입자의 분석장치 및 이를 활용한 미세입자의 분석방법에 관한 본 발명을 완성하였다.
- [0021] 본 발명의 목적은 미세입자의 분석장치 및 이를 활용한 미세입자의 분석방법을 제공하는 것이다.
- [0023] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 필터부, 미세홀, 공기배출홀 및 손잡이부를 포함하는 플런저(plunger); 및 측면부에 샘플주입홀을 포함하고 상기 플런저가 들어갈 수 있는 크기의 샘플 보관 공간 및 투명한 바닥판을 갖는 샘플 챔버; 를 포함하는 미세입자 분석 장치에 있어서, 상기 필터부 및 미세홀은 플런저의 하단부에 위치하고, 상기 공기배출홀 및 손잡이부는 플런저의 상단부에 위치하며, 상기 필터부는 미세홀의 아래층에 위치하는 것을 특징으로 하는, 미세입자 분석 장치가 제공된다.
- [0026] 일 측면에 따르면, 2개 이상의 미세입자 분석 장치 및 상판을 포함하는 다중 병렬 미세입자 분석 장치에 있어서, 상기 2개 이상의 미세입자 분석 장치가 수평으로 병렬 배치되어 있고, 상기 상판은 단일 상판인 것을 특징으로 하는, 다중 병렬 미세입자 분석 장치가 제공된다.
- [0027] 본 발명의 다른 측면에 따르면, a) 측면부에 샘플주입홀을 포함하고 샘플 보관 공간 및 투명한 바닥판을 갖는 샘플 챔버에 미세입자를 포함한 샘플을 주입하는 단계;
- [0028] b) 필터부, 미세홀, 공기배출홀 및 손잡이부를 포함하는 플런저(plunger)를 프레싱(pressing)하여 상기 샘플을 농축시켜 미세입자를 단일층화 및 위치 고정화하는 단계; 및
- [0029] c) 미세입자 분석 장치의 하부에서 광학 또는 형광 이미징 시스템을 통하여 상기 미세입자를 계수하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 미세입자의 분석 방법이 제공된다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, a) 미세입자를 포함한 샘플에 상기 미세입자와 결합할 수 있는 항체가 코팅된 나노입자를 혼합하는 단계;
- [0031] b) 측면부에 샘플주입홀을 포함하고 샘플 보관 공간 및 투명한 바닥판을 갖는 샘플 챔버에 상기 미세입자와 항체 코팅 나노입자를 포함한 샘플을 주입하는 단계;
- [0032] c) 필터부, 미세홀, 공기배출홀 및 손잡이부를 포함하는 플런저(plunger)를 프레싱(pressing)하여 상기 샘플을 농축시켜 상기 미세입자와 결합된 항체 코팅 나노입자를 단일층화 및 위치 고정화시키는 단계; 및
- [0033] d) 미세입자 분석 장치의 하부에서 레이저를 조사하여 표면증강 라만 분광법(Surface-enhanced Raman spectroscopy; SERS) 신호를 분석하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 미세입자의 표면증강 라만 분광법 분석 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명은 미세입자의 분석장치 및 이를 활용한 미세입자의 분석 방법에 관한 것으로, 세포 부유액에서 유체를 제거하여 희박한 농도로 존재하는 대상 세포를 원심분리, 음압 발생기 등 별도의 외부장치 없이 누구나 손쉽게 농축할 수 있으며, 농축 이후 분석물질(세포 등)의 별도 이동과정 없이도 곧바로 현미경 등을 통해 계수가 가능하여 세포의 손실 위험성이나 세포 변성이 없으며, 플런저(plunger)를 프레스싱(pressing)하는 과정에서 대상 세포나 박테리아의 크기에 맞춰 미세입자를 단층화할 수 있는 높이에 맞게 설계한 고정턱에 플런저의 위치를 고정하고 부직포와 같은 재질의 지지물로 미세입자를 압착하여 미세입자, 그 중 특히 박테리아의 브라운 운동 없이 고정하여 관찰할 수 있다는 효과를 기대할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1 은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포농축 및 분석을 위한 미세입자 분석 장치(Cell-pressing 장치)의 3차원 개략도를 나타낸 도면이다.
- 도 2 는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포농축 및 분석을 위한 미세입자 분석 장치(Cell-pressing 장치)의 구성요소를 나타낸 측면 단면도이다.
- 도 3 은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 개념구현용 미세입자 분석 장치(Cell-pressing 장치)를 나타낸 도면이다.
- 도 4 는 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분석 장치(Cell-pressing 장치)를 이용한 농축 실험 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 5 는 본 발명의 일 실시예에 따라 병렬처리를 위한 미세입자 분석 장치(Cell-pressing 장치)의 측면 단면도이다.
- 도 6 은 본 발명의 일 실시예에 따라 미세입자 분석 장치 기반 농축 이후 표면증강 라만 분광법 분석을 나타낸 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예 들에는 다양한 변형이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0040] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0041] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0042] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0043] 또한, 실시예의 구성 요소를 설명하는 데 있어서, 제 1, 제 2, A, B, (a), (b) 등의 용어를 사용할 수 있다. 이러한 용어는 그 구성 요소를 다른 구성 요소와 구별하기 위한 것일 뿐, 그 용어에 의해 해당 구성 요소의 본질

이나 차례 또는 순서 등이 한정되지 않는다.

- [0044] 어느 하나의 실시예에 포함된 구성요소와, 공통적인 기능을 포함하는 구성요소는, 다른 실시예에서 동일한 명칭을 사용하여 설명하기로 한다. 반대되는 기재가 없는 이상, 어느 하나의 실시예에 기재한 설명은 다른 실시예에도 적용될 수 있으며, 중복되는 범위에서 구체적인 설명은 생략하기로 한다.
- [0045] 다음은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분석장치를 도면을 참조하여 설명한 것이다.
- [0046] 도 1 및 도 2 는 세포 농축을 위한 미세입자 분석 장치(cell-pressing 장치) 및 이의 구성 요소에 대해 나타낸 것으로서, 본 발명의 일 측면에 따르면,
- [0047] 필터부, 미세홀, 공기배출홀 및 손잡이부를 포함하는 플런저(plunger); 및
- [0048] 측면 부에 샘플주입홀을 포함하고 상기 플런저가 들어갈 수 있는 크기의 샘플 보관 공간 및 투명한 바닥판을 갖는 샘플 챔버; 를 포함하는 미세입자 분석 장치에 있어서,
- [0049] 상기 필터부 및 미세홀은 플런저의 하단부에 위치하고, 상기 공기배출홀 및 손잡이부는 플런저의 상단부에 위치하며,
- [0050] 상기 필터부는 미세홀의 아래층에 위치하는 것을 특징으로 하는, 미세입자 분석 장치를 제공한다.
- [0052] 상기 샘플주입홀은 미세입자를 포함하는 샘플을 샘플 챔버에 주입하기 용이하게 하기 위해 상기 샘플 챔버의 측면 부에 위치하며, 샘플 주입 이후 샘플주입홀을 막는 막개를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 플런저는 손잡이부를 포함함으로써, 손으로 힘을 가해 압축이 가능한바, 무동력 미세입자 분석 장치를 구현할 수 있다.
- [0053] 또한, 상기 필터부는 저농도로 존재하는 분석물질(미세입자)을 비교적 고농도로 농축하여 분석하기 위한 것으로서, 세포와 같은 미세입자가 필터에 박히게 되는 문제점으로 인해 화이버(fiber) 형태의 필터는 사용할 수 없으며, 필름에 홀가공이 된 형태만이 사용 가능하다. 이 경우, 홀(기공)의 크기는 분석물질(미세입자)의 크기에 따라 다양한 크기의 기공을 갖는 필터가 선택될 수 있으나, 구체적으로는 나노미터에서 마이크로미터 크기의 기공을 갖는 필터를 선택할 수 있고, 보다 구체적으로는 10 nm 내지 100 μ m 의 기공 크기를 갖는 필터인 것이 바람직하다.
- [0054] 아울러, 상기 홀가공이 된 필터의 종류로는, 트랙 에치 멤브레인 필터(track-etched membrane filter) 또는 Si 웨이퍼(wafer)로 가공된 필터인 것일 수 있으며, 상기 트랙 에치 멤브레인 필터(track-etched membrane filter)는 폴리카보네이트 및 폴리에스테르로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상으로 이루어질 수 있다.
- [0055] 상기 바닥판은 분석물질(미세입자)의 농축 및 단층화, 위치 고정 후 광학(비형광) 또는 형광 이미지를 통해 현미경 등으로 분석 및 계수 가능하도록 하기 위하여 투명한 바닥판인 것이 바람직하다.
- [0057] 한편, 본 발명의 일 측면에 따라 제공되는 미세입자 분석 장치는,
- [0058] 상기 샘플 챔버의 외벽에 고정턱을 포함하고,
- [0059] 상기 고정턱과 상기 플런저의 손잡이부가 맞닿아 고정될 수 있도록, 상기 플런저의 손잡이부로부터 연결된 고정부를 포함할 수 있다.
- [0060] 이는, 고농도로 프레스싱(pressing)된 샘플을 분석함에 있어서, 샘플이 단층으로 안정적인 위치 고정을 하기 위한 역할을 하며, 구체적으로는 미세입자 중 크기가 작은 박테리아의 브라운 운동(Brownian motion)으로 인하여 현미경 등에서 가시화가 어렵기 때문에 미세입자의 크기에 맞는 높이로 압착하여 미세입자의 위치 고정을 할 수 있고, 이를 위한 구조로는 고정턱에 고정부가 슬라이딩(sliding)되어 걸릴 수 있는 구조를 가진다.
- [0061] 나아가, 상기 고정턱의 보다 상세한 위치는, 샘플 챔버의 바닥판으로부터 플런저(구체적으로는, 필터부)가 하강하는 지점까지의 높이를 미세입자의 크기가 되도록 설계할 수 있으며, 구체적으로는, 이하에서 기술하는 바와 같이, 지지부의 종류로서 부직포, 스펀지, 초흡수성 마이크로 화이버(fiber) 등을 사용하는 경우, 미세입자의 크기보다 작은 높이까지 플런저를 프레스싱하여도 미세입자가 단층으로 압착되는 것에 문제가 없기 때문에, 고정턱의 위치는, 바닥판으로부터 미세입자의 크기보다 작거나 같은 높이까지 필터부가 하강할 수 있도록, 설계되는 것이 바람직하다. 따라서, 상기와 같은 고정턱의 위치를 조정함으로써 플런저의 높이를 고정할 수 있고, 이를

통해 보다 확실한 미세입자의 단일층화 및 위치고정화를 실현할 수 있다.

- [0063] 또한, 본 발명의 일 측면에 따라 제공되는 미세입자 분석 장치는, 상기 필터부 및 미세홀 사이에 지지부를 포함할 수 있다.
- [0064] 상기 지지부는 플런저를 프레싱(pressing)하여 세포를 농축하는 경우, 미세입자의 선명한 가시화를 위한 단층화 및 세포, 특히 박테리아의 브라운 운동 (Brownian motion)에 의한 움직임이 없도록 하기 위한 압착이 가능하도록 하는 것으로서, 그 종류로는 폴리에스테르, 폴리프로필렌, 또는 카복시메틸 셀룰로오스로 이루어진 부직포, 스펀지 또는 초흡수성 마이크로 화이버(fiber)로 이루어질 수 있으며, 이와 유사한 특성의 화이버(fiber) 등과 같은 구조물을 활용할 수도 있다.
- [0066] 한편, 필터부 및 지지부의 상단에 위치하는 미세홀은 지지물을 지탱해주는 역할과, 플런저를 프레싱하는 경우, 샘플 챔버로부터 공기나 차오르는 샘플 용액이 배출될 수 있도록 하는 역할을 한다.
- [0067] 나아가, 플런저의 상단에 위치하는 공기배출홀은 플런저의 하단에 위치하는 상기 미세홀과 유사하게, 플런저에 샘플이 차오를 때, 플런저 상단으로 공기가 배출될 수 있도록 하는 역할을 한다.
- [0069] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분석 장치는 샘플 챔버의 내벽과 상기 플런저의 외벽 사이에 2 개 이상의 오링부를 포함할 수 있다.
- [0070] 상기 오링부는 프레싱시 샘플 손실을 최소화하기 위하여 설치되는 것으로서, 그 종류로는 고무링이 활용될 수 있고, 플라스틱 모양 자체가 샘플의 손실 방지 역할을 할 수 있도록 설계 및 제작될 수 있다. 상기 샘플의 손실을 최소화하기 위해, 오링부는 2 개 이상인 것이 바람직하며, 플런저를 프레싱할 때(샘플을 농축할 때), 샘플 챔버의 측면에 위치한 샘플주입홀 이하인 부분까지 하강하여, 압력에 의해 상승하는 샘플의 누수를 미연에 방지할 수 있는 것이 바람직하다.
- [0072] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분석 장치에 있어서, 분석 대상인 미세입자는 마이크로 미세입자, 나노 미세입자, 세포, 박테리아, 세균, 기생충, 세포 유래 나노입자, 하이드로젤비드, 실리카 비드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것일 수 있으며, 특히 저농도로 존재할 수 있는 미세입자를 본 발명의 분석 장치를 통해 농축 및 분석하는 경우, 상기 장치의 이점을 더욱 살려서 실현할 수 있는 장점이 있다.
- [0074] 도3 은 본 발명의 일 측면에 따른 미세입자 분석 장치(cell-pressing 장치)를 개념적으로 구현한 예시를 나타내는 것으로, 아크릴 가공을 통해 샘플 챔버 및 현미경을 통한 관찰 및 계수가 가능하도록 하는 투명한 바닥판을 제작하였다. 상용 50 ml 튜브의 하부를 절단하여 아크릴 챔버에 끼워 사용하며, 튜브를 끼운 후에는 누수 방지를 위하여 에폭시 접착제 또는 광경화성 접착제를 통하여 연결부를 밀봉한다. 상용 필터 메이트 제품의 필터 지그 및 필터 누름봉을 이용하고, 농축 대상물의 크기에 적합한 필터를 이용하며, 필터의 앞부분은 농축된 세포를 바닥면으로 누를 수 있도록 하기 위하여 트랙 에치 멤브레인 필터(track-etched membrane filter)(PCTE 멤브레인 필터)를 이용하였다. 필터 누름봉을 튜브 끝까지 누를 경우 필터면이 바닥에 닿도록 제작되어 농축된 세포를 단일 세포 높이 정도로 압착하고, 이를 통해 현미경에서의 관찰과 계수를 용이하게 하였다.
- [0076] 도4 는 본 발명의 일 측면에 따른 미세입자 분석 장치(cell-pressing 장치)를 이용하여 인공입자, 백혈구 및 박테리아의 농축을 수행한 결과는 나타내는 것으로서, 농축 전 초기 시료의 부피는 30 ml 이었으며, 필터 누름봉을 끝까지 밀어 프로세스가 끝난 이후 마지막으로 남은 시료의 양은 $\sim 10 \mu\text{m}$ 높이로서 약 $5 \mu\text{l}$ 를 남기는 것으로 설계하였다. $10 \mu\text{m}$ 입자의 농축을 위하여 기공 $3 \mu\text{m}$ 의 필터 멤브레인을 사용하였고, 농축 전후의 농도가 $1.2 \times 10^4/\text{ml}$ 에서 $3.4 \times 10^6/\text{ml}$ 의 농도로 증가하여 283배 농축되었다. 백혈구 농축의 경우, 기공 $3 \mu\text{m}$ 의 필터 멤브레인을 이용하였고, 농축 전후의 농도가 $3.4 \times 10^4/\text{ml}$ 에서 $3.0 \times 10^7/\text{ml}$ 의 농도로 증가하여 882배 농축되었다. 박테리아의 경우에는 $0.4 \mu\text{m}$ 의 기공을 갖는 필터 멤브레인을 이용하였으며, 농축 전후의 농도가 $1.2 \times$

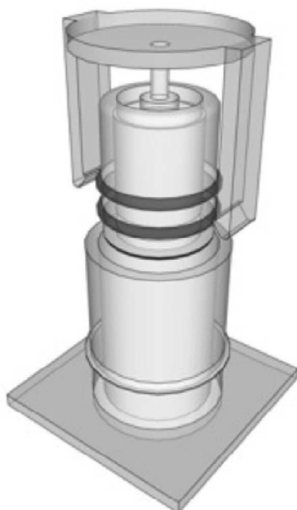
$10^4/\text{ml}$ 에서 $3.1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 농도로 증가하여 약 257배 농축됨을 확인하였다.

- [0077] 도 5 는 본 발명의 일 실시예에 따라, 2개 이상의 미세입자 분석 장치 및 상판을 포함하는 다중 병렬 미세입자 분석 장치에 있어서, 상기 2개 이상의 미세입자 분석 장치가 수평으로 병렬 배치되어 있고, 상기 상판은 단일 상판인 것을 특징으로 하는 다중 병렬 미세입자 분석 장치의 구성 예시를 나타낸 것이다.
- [0078] 본 발명을 통해 개발된 미세입자 분석 장치(cell-pressing 장치)의 경우, 상용화된 96-well plate 와 유사한 형태로 병렬 구성이 가능하여 도 5 에서와 같이 챔버 어레이(chamber array)로 구성할 수 있다. 단일 상판을 이용하여 필터를 동시에 눌러서 처리할 수 있고, 이를 통해 초고수율 처리가 가능하다는 이점이 있다. 따라서, 이를 통해 다중 농축 처리 및 현미경을 통한 카운팅이 가능하며, 향후 다중 병렬처리를 위한 자동화 계수 시스템을 구축할 수 있다.
- [0080] 본 발명의 다른 측면에 따라,
- [0081] a) 측면 부에 샘플주입홀을 포함하고 샘플 보관 공간 및 투명한 바닥판을 갖는 샘플 챔버에 미세입자를 포함한 샘플을 주입하는 단계;
- [0082] b) 필터부, 미세홀, 공기배출홀 및 손잡이부를 포함하는 플런저(plunger)를 프레싱(pressing)하여 상기 샘플을 농축시켜 미세입자를 단일층화 및 위치고정화하는 단계; 및
- [0083] c) 미세입자 분석 장치의 하부에서 광학 또는 형광 이미징 시스템을 통하여 상기 미세입자를 계수하는 단계;
- [0084] 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 미세입자의 분석 방법이 제공된다.
- [0086] 여기서, 상기 단계 a) 의 샘플 주입단계는 샘플 챔버 측면부에 위치한 샘플주입홀을 통해 주입하는 것일 수 있으며, 단계 b) 의 농축시, 공기 또는 샘플 용액이 플런저 하단의 미세홀을 통해 배출되고, 플런저 상단의 공기 배출홀을 통해 공기가 배출될 수 있다.
- [0087] 또한, 상기 단계 b) 의 농축시, 상기 샘플 챔버 외벽에 고정턱과 상기 플런저의 손잡이부로부터 연결된 고정부가 맞닿아 분석 장치가 고정되므로써 이루어지는 것일 수 있으며, 이 경우, 상기 분석 장치의 고정턱의 위치는 앞서 기술한 바와 같이, 분석물질(미세입자)의 크기보다 작거나 같은 높이로 설계되어 있어, 미세입자의 단일층화 및 위치고정화를 보다 확실히 실현할 수 있다.
- [0088] 단계 c) 에서의 광학 이미징 시스템은 현미경의 bright field 를 의미하는 것으로서 비형광 입자를 계수하기 위해 사용되는 것이며, 면역 형광법(immunofluorescence)으로 염색된 세포 또는 비형광 광학으로 관찰하기에 크기가 작은 입자(일례로, 수백 나노 크기 등)는 형광 이미징 시스템으로 관찰할 수 있다.
- [0089] 한편, 상기 분석물질인 미세입자는 마이크로 미세입자, 나노 미세입자, 세포, 박테리아, 세균, 기생충, 세포 유래 나노입자, 하이드로젤비드, 실리카 비드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0091] 본 발명의 또 다른 측면에 따라,
- [0092] a) 미세입자를 포함한 샘플에 상기 미세입자와 결합할 수 있는 항체가 코팅된 나노입자를 혼합하는 단계;
- [0093] b) 측면 부에 샘플주입홀을 포함하고 샘플 보관 공간 및 투명한 바닥판을 갖는 샘플 챔버에 상기 미세입자와 항체 코팅 나노입자를 포함한 샘플을 주입하는 단계;
- [0094] c) 필터부, 미세홀, 공기배출홀 및 손잡이부를 포함하는 플런저(plunger)를 프레싱(pressing)하여 상기 샘플을 농축시켜 상기 미세입자와 결합된 항체 코팅 나노입자를 단일층화 및 위치고정화 시키는 단계; 및
- [0095] d) 미세입자 분석 장치의 하부에서 레이저를 조사하여 표면증강 라만 분광법(Surface-enhanced Raman spectroscopy; SERS) 신호를 분석하는 단계;
- [0096] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세입자의 표면증강 라만 분광법 분석 방법이 제공된다.

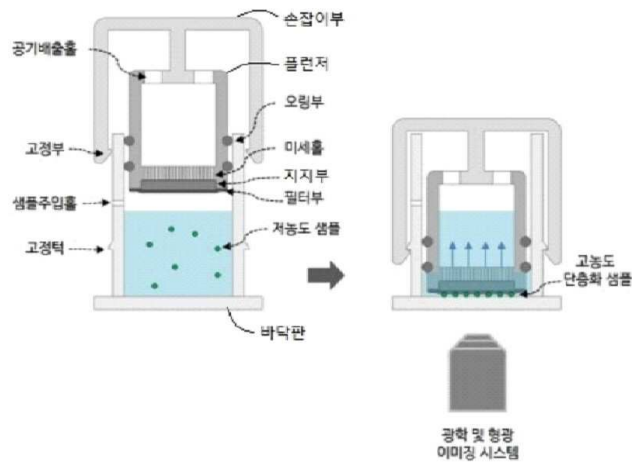
- [0098] 여기서, 상기 미세입자는 박테리아 또는 세균에 해당할 수 있으며, 상기 나노입자는 표면증강 라만 분광법에 사용되는 금속 나노입자에 해당할 수 있으며, 구체적으로는, 금, 은 및 구리로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 나노입자에 해당할 수 있다.
- [0100] 이는 앞서 기술한 미세입자 분석 장치(cell-pressing 장치)를 이용한 농축 기술 기반 표면증강 라만 분광법 분석(SERS) 기술에 해당하는 것으로서, 도 6 에 SERS 분석 개략도에 대해 나타내고 있다.
- [0101] 상기 도 6 에 나타낸 분석 방법은 구체적으로, 먼저 분석/평가하고자 하는 분석물질을 포함한 시료에 분석물질(박테리아나 세균)과 결합할 수 있는 항체가 코팅된 금 나노입자를 혼합하여 반응을 시키고, 분석물질과 항체 코팅 금 나노입자를 포함한 시료를 본 미세입자 분석 장치에 주입하여 농축한다. 이후, 시료 내의 분석물질과 결합된 항체 코팅 나노입자는 농축되고 프레싱을 통해 단일층으로 압착을 실시한다. 그리고, 프레싱한 상태의 장치 하부에서 레이저를 조사하여 SERS 신호의 분석을 바로 실시한다.
- [0102] 이러한 방법을 통해, 본 발명의 일 실시예에 따른 미세입자 분석 장치를 이용한 표면증강 라만 분광법 분석 방법을 실시할 수 있으며, 그 결과, 샘플의 손실 및 별도의 이동 없이, 분석물질을 쉽게 농축 및 분석할 수 있는 장점이 있다.
- [0104] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.
- [0105] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

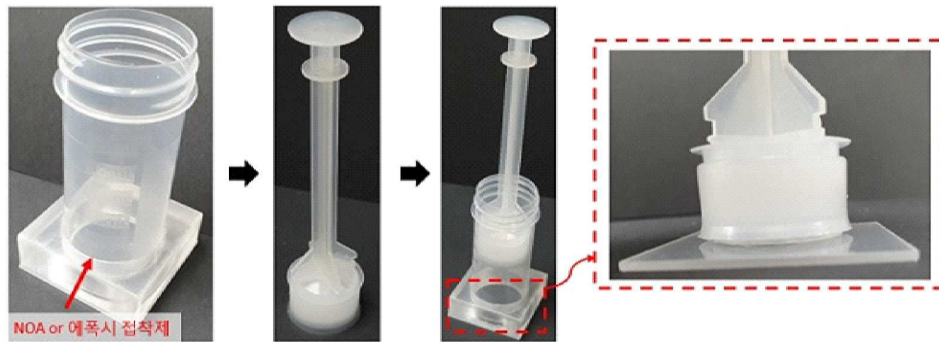
도면1



도면2

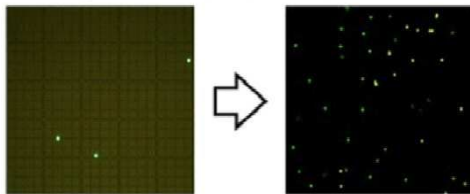


도면3

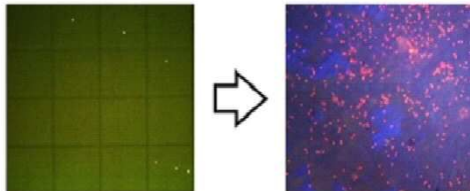


도면4

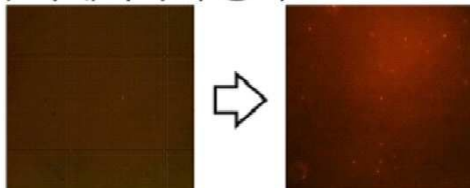
(a) 10 μm 입자의 농축



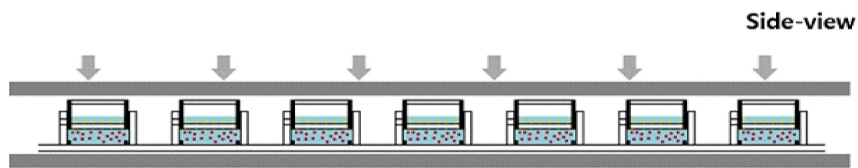
(b) 백혈구의 농축



(c) 박테리아의 농축



도면5



도면6

