



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0135619
(43) 공개일자 2022년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 15/10 (2006.01) G01N 27/02 (2006.01)
G01N 27/327 (2006.01) G01N 33/487 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 15/1031 (2022.02)
G01N 15/1056 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0041550

(22) 출원일자 2021년03월31일

심사청구일자 2021년03월31일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

한창수

서울특별시 용산구 이촌로 347, 16동 203호(서빙고동, 신동아아파트)

(74) 대리인

김연권

전체 청구항 수 : 총 12 항

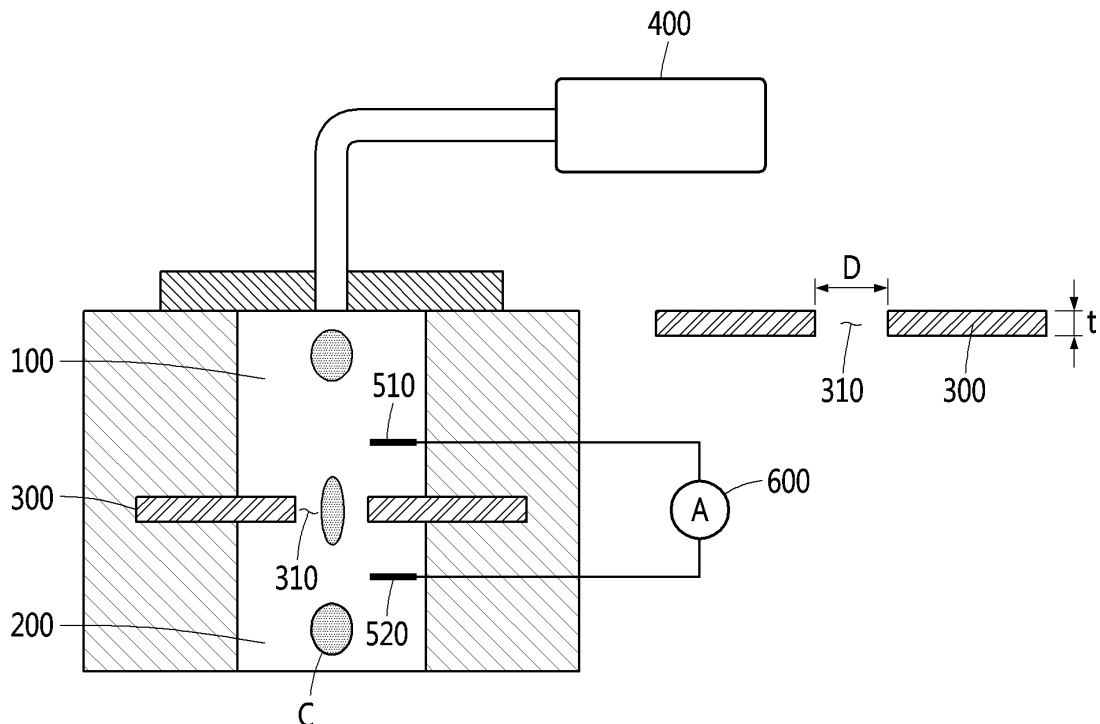
(54) 발명의 명칭 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치

(57) 요약

본 발명은 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, 타겟 세포가 포함된 용액이 수용되는 입구챔버와, 입구챔버의 맞은편에 마련되는 출구챔버와, 입구챔버와 출구챔버 사이에 배치되며, 마이크로 포어가 형성된 포어막과, 입구챔버 또는 출구챔버에 구비되며, 입구챔버의 용액이 출구챔버를 향해 유

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



동되어 마이크로 포어를 통과하도록 입구챔버와 출구챔버 간의 압력차를 발생시키는 압력발생수단 및 포어막의 전후방에 각각 배치되며, 유동되는 용액에 전기적으로 접촉되어 포어막 전후방의 이온전도도 변화를 측정하기 위한 한 쌍의 전극을 포함하며, 마이크로 포어의 지름(D)은 타겟 세포의 지름 보다 크며, 포어막의 두께(t)는 1 μ m 내지 1mm이고 세장비(t/D)는 0.001 내지 5 인 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 압력차에 의해 발생하는 유동장에서 마이크로 크기의 지름의 포어를 통해 세포를 통과시킬 때, 세포가 전단력에 의해 변형되는 특성과 단일 세포에 대한 개수, 크기 및 변형능 등을 측정하여 변형된 세포를 빠르고 정확하게 검출할 수 있다.

(52) CPC특허분류

G01N 27/02 (2021.01)

G01N 27/327 (2021.01)

G01N 33/48707 (2013.01)

B01L 2200/0647 (2013.01)

B01L 2300/0663 (2013.01)

B01L 2400/0475 (2013.01)

G01N 2015/1006 (2013.01)

G01N 2015/1087 (2013.01)

G01N 2015/1093 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

타겟 세포가 포함된 용액이 수용되는 입구챔버;

상기 입구챔버의 맞은편에 마련되는 출구챔버;

상기 입구챔버와 상기 출구챔버 사이에 배치되며, 마이크로 포어가 형성된 포어막;

상기 입구챔버 또는 상기 출구챔버에 구비되며, 입구챔버의 용액이 출구챔버를 향해 유동되어 상기 마이크로 포어를 통과하도록 입구챔버와 출구챔버 간의 압력차를 발생시키는 압력발생수단; 및

상기 포어막의 전후방에 각각 배치되며, 유동되는 상기 용액에 전기적으로 접촉되어 포어막 전후방의 이온전도도 변화를 측정하기 위한 한 쌍의 전극; 을 포함하며,

상기 마이크로 포어의 지름(D)은 상기 타겟 세포의 지름 보다 크며, 상기 포어막의 두께(t)는 1 μ m 내지 1mm이고 세장비(t/D)는 0.001 내지 5 인 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 포어막에 형성된 상기 마이크로 포어의 단면 형상은 원형인 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 포어막에 형성된 상기 마이크로 포어의 단면 형상은, 타원형, 직사각형 및 둥근 사각형 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 마이크로 포어의 단축(DS) 대비 장축(DL)의 길이의 비(DL/DS)가 1.5 이상인 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 한 쌍의 전극을 통해 측정되는 블로킹 전류(blocking current), 저항, 전압, 캐패시턴스 및 임피던스 중 어느 하나 이상의 전기적 특성을 측정하기 위한 측정부;

를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 압력발생수단은, 중력 또는 수두차 원리에 의해 상기 입구챔버와 상기 출구챔버 간의 압력차가 발생되어 상기 용액이 유동되는 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 압력발생수단은, 상기 용액을 가압하는 시린지 펌프 또는 압력 펌프인 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 포어막은, 폴리아미드, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 폴리우레탄, 폴리카보네이트, 아크릴 및 테프론 중 어느 하나 이상을 포함하는 부도체인 폴리머 재질로 이루어진 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 포어막은, Si_3N_4 , HfO_2 , SiO_2 , Mica, h-BN 및 Quartz 중 어느 하나 이상을 포함하는 부도체 성질의 세라믹 재질로 이루어진 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 타겟 세포는, 적혈구, 백혈구, 엑소좀, 바이러스 및 순환종양세포 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 입구챔버와 상기 포어막 사이에 형성되고 입구챔버에 연통되어 상기 타겟 세포가 포함된 용액의 유동을 가이드 하는 입구채널; 및

상기 출구챔버와 상기 포어막 사이에 형성되고 출구챔버에 연통되어 상기 타겟 세포가 포함된 용액의 유동을 가이드 하는 출구채널;

을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 입구챔버는,

상기 포어막을 향해 상기 타겟 세포가 포함된 용액의 유동을 가이드 하는 유동채널; 및

상기 유동채널의 양측에서 합류하여 상기 포어막을 향해 버퍼 용액의 유동을 가이드 하는 버퍼채널; 을 포함하며,

상기 타겟 세포가 포함된 용액의 양측으로 상기 버퍼 용액이 유동되는 것을 특징으로 하는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 단일 세포 분석 장치에 관한 것으로, 특히 적혈구(Red Blood Cell), 백혈구(White Blood Cell) 및 순환종양세포(Circulating Tumor Cell) 등과 같이 마이크로 이상의 지름을 갖는 다수의 세포 내에서 단일 세포의 개수, 크기, 형상 및 변형능(deformability) 등을 분석할 수 있는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

일반적으로 이온 유체 환경에서 마이크로포어 소자는 이온의 통과를 제어하면서 마이크로 포어를 통과하는 물질

들을 분석할 수 있다.

- [0003] 이는 기존의 쿨터 카운터(Coulter counter)의 원리와 유사하지만, 마이크로 포어의 지름(D)에 비해 마이크로 포어가 형성된 포어막의 두께(t)가 매우 얇은 저세장비(low aspect ratio)를 이용해 보다 정밀한 개별 세포의 분석이 가능하다.
- [0004] 예를 들면 적혈구의 경우에 일반적으로 쿨터 카운터 방식을 이용하면 세포의 개수나 크기에 대해 개략적인 결과를 얻을 수 있지만, 세포의 형상에 대해서는 명확히 알아낼 수 없는데, 이는 포어막의 두께(t)가 통과하는 세포에 비해 매우 크기 때문이다.
- [0005] 따라서, 적혈구가 마이크로 포어를 통과하면서 변형을 일으키는 경우에 변형정도를 확인할 수 없게 된다.
- [0006] 한편, 인체의 적혈구는 약 $2\mu\text{m}$ 내지 약 $3\mu\text{m}$ 두께에 지름이 약 $6\mu\text{m}$ 내지 약 $8\mu\text{m}$ 의 원반 형태로 인체를 돌면서 산소를 공급하는 역할을 한다.
- [0007] 특히 적혈구가 좁은 혈관을 지나갈 때는 채널에 맞게 변형되는 특성을 보이는데 이를 변형능(Deformability) 이라고 한다.
- [0008] 이때, 말라리아, 낫적혈구(Sickle cell) 및 유전성 적혈구 이상과 같은 질환에 걸리는 경우 세포가 딱딱해지는 특성이 있으며, 특히 심혈관계에 문제가 있는 환자의 경우에는 적혈구의 변형능이 떨어지면서 혈액의 순환에 문제가 생기는 경향을 보이는 것으로 보고되고 있다.
- [0009] 종래에는 이러한 적혈구의 변형능을 측정하기 위해서 현미경, 주사탐침 현미경(AFM), 세포분석(Cytometry), 분광광도계 및 여과필터 등의 여러 방법들을 활용하였으나, 개별 세포를 하나씩 고속으로 정밀하게 분석하는 기술은 현재 개발되어 있지는 않다.
- [0010] 또한, 종래에는 다수의 적혈구를 광산란 방법으로 측정하거나 채색 및 광학적 측정방법으로 하나씩 확인하는 방식이 주로 사용되고 있는데, 이는 조기 진단이 어렵고, 고가의 장비가 필요하거나 많은 시간이 소요되는 문제가 있었다.
- [0011] 이러한 적혈구의 개별 분석기술은 조기에 관련 질환을 진단하거나 예측하는데 활용될 수 있어서 의학적으로도 매우 중요한 기술이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 한국 등록특허공보 제10-2176130호(2020년 11월 10일 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 본 발명의 과제는, 입구챔버와 출구챔버 간의 압력차를 발생시켜 압력에 의해 일방향으로 유동되는 용액에 포함된 다수의 세포가 채널 내부의 저세장비(low aspect ratio)를 가지는 마이크로 크기 지름의 포어를 통과되면서 측정되는 개별 세포의 크기, 개수, 형상 및 변형능 등을 동시에 신속히 분석할 수 있는 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 과제를 달성하기 위해 안출된 본 발명은, 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치로서, 타겟 세포가 포함된 용액이 수용되는 입구챔버, 상기 입구챔버의 맞은편에 마련되는 출구챔버, 상기 입구챔버와 상기 출구챔버 사이에 배치되며, 마이크로 포어가 형성된 포어막, 상기 입구챔버 또는 상기 출구챔버에 구비되며, 입구챔버의 용액이 출구챔버를 향해 유동되어 상기 마이크로 포어를 통과하도록 입구챔버와 출구챔버 간의 압력차를 발생시키는 압력발생수단 및 상기 포어막의 전후방에 각각 배치되며, 유동되는 상기 용액에 전기적으로 접촉되어 포어막 전후방의 이온전도도 변화를 측정하기 위한 한 쌍의 전극을 포함하며, 상기 마이크로 포어의 지름(D)은 상기 타겟 세포의 지름 보다 크며, 상기 포어막의 두께(t)는 약 $1\mu\text{m}$ 내지 약 1mm 이고 세장비(t/D)는 0.001 내지

5 인 것을 특징으로 한다.

- [0015] 상기 포어막에 형성된 상기 마이크로 포어의 단면 형상은 원형인 것을 특징으로 한다.
- [0016] 상기 포어막에 형성된 상기 마이크로 포어의 단면 형상은, 타원형, 직사각형 및 둥근 사각형 중 어느 하나인 것을 특징으로 한다.
- [0017] 상기 마이크로 포어의 단축(DS) 대비 장축(DL)의 길이의 비(DL/DS)가 1.5 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0018] 상기 한 쌍의 전극을 통해 측정되는 블로킹 전류(blocking current), 저항, 전압, 캐패시턴스 및 임피던스 중 어느 하나 이상의 전기적 특성을 측정하기 위한 측정부를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 상기 압력발생수단은, 중력 또는 수두차 원리에 의해 상기 입구챔버와 상기 출구챔버 간의 압력차가 발생되어 상기 용액이 유동되는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 상기 압력발생수단은, 상기 용액을 가압하는 시린지 펌프 또는 압력 펌프인 것을 특징으로 한다.
- [0021] 상기 포어막은, 폴리이미드, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 폴리우레탄, 폴리카보네이트, 아크릴 및 테프론 중 어느 하나 이상을 포함하는 부도체인 폴리머 재질로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [0022] 상기 포어막은, Si_3N_4 , HfO_2 , SiO_2 , Mica, h-BN 및 Quartz 중 어느 하나 이상을 포함하는 부도체 성질의 세라믹 재질로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [0023] 상기 타겟 세포는, 적혈구, 백혈구, 엑소좀, 바이러스 및 순환종양세포 중 어느 하나인 것을 특징으로 한다.
- [0024] 상기 입구챔버와 상기 포어막 사이에 형성되고 입구챔버에 연통되어 상기 타겟 세포가 포함된 용액의 유동을 가이드 하는 입구채널 및 상기 출구챔버와 상기 포어막 사이에 형성되고 출구챔버에 연통되어 상기 타겟 세포가 포함된 용액의 유동을 가이드 하는 출구채널을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 상기 입구챔버는, 상기 포어막을 향해 상기 타겟 세포가 포함된 용액의 유동을 가이드 하는 유동채널 및 상기 유동채널의 양측에서 합류하여 상기 포어막을 향해 버퍼 용액의 유동을 가이드 하는 버퍼채널을 포함하며, 상기 타겟 세포가 포함된 용액의 양측으로 상기 버퍼 용액이 유동되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명은 입구챔버와 출구챔버 간의 압력차에 의해 유동되는 용액에 포함된 다수의 세포가 채널 내부의 마이크로 포어를 빠르게 통과되면서 개별 세포의 크기, 개수, 형상 및 전단력에 의해 변형되는 변형능 등을 동시에 측정함으로써 세포의 이상 유무를 신속하고 정확히 판별할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치를 나타낸 예시도,
 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치에서 포어의 다양한 단면 형상을 나타낸 예시도,
 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치에서 포어를 통과하는 세포의 변형에 따라 측정되는 블로킹 전류(blocking current) 신호의 변화를 나타낸 그래프,
 도 4는 본 발명의 다른 실시예에 따른 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치를 나타낸 예시도,
 도 5는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치를 나타낸 예시도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명에 따른 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치의 바람직한 실시예에 대해 상세하게 설명한다.
- [0029] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 본문에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 첨부된 도면에 있어서, 대상물들의 크기와 양은 본 발명의 명확성을 기하기 위하여 실제보다 확대 또는 축소하

여 도시한 것이다.

- [0030] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "구비하다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 단계, 기능, 구성요소 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 다른 특징들이나 단계, 기능, 구성요소 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0031] 한편, 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 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.
- [0033] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치를 나타낸 예시도이고, 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치에서 포어의 다양한 단면 형상을 나타낸 예시도이다.
- [0034] 도 1 및 도 2를 참조하여, 본 발명의 바람직한 실시예에 따른 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치는, 입구챔버(100), 출구챔버(200), 포어막(300), 압력발생수단(400), 전극(510, 520) 및 측정부(600)를 포함하는 구성요소로 이루어지며, 이를 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0035] 본 발명은 얇은 두께의 포어막(300)에 형성된 세포의 지름 보다 약간 큰 마이크로 포어(310)를 통해 세포가 통과할 때, 일정 이상의 압력이 세포에 가해지면, 정상 세포는 가늘고 긴 형태를 가지게 되고, 질병이 있는 세포는 변형이 상대적으로 적어 검출장치를 통해 서로 다른 측정결과를 얻을 수 있는 기술적 특징이 있다.
- [0036] 입구챔버(100)는, 타겟 세포(C)가 포함된 용액이 수용된다. 여기서, 타겟 세포(C)는, 적혈구, 백혈구, 엑소좀, 바이러스 및 순환종양세포 중 어느 하나이나, 여기에 국한되지 않고 타 종류의 다양한 생물학적 세포도 포함될 수 있으며, 이하 본 발명에서는 타겟 세포(C)가 적혈구인 것을 일 실시예로 하여 설명한다.
- [0037] 출구챔버(200)는, 입구챔버(100)의 대응하는 반대쪽 맞은편에 마련될 수 있다.
- [0038] 포어막(300)은, 입구챔버(100)와 출구챔버(200) 사이에 배치되며, 포어막(300)을 관통하는 마이크로 포어(310)가 형성된다.
- [0039] 압력발생수단(400)은, 입구챔버(100) 또는 출구챔버(200)에 구비되며, 입구챔버(100)의 용액이 출구챔버(200)를 향해 유동되어 마이크로 포어(310)를 통과하도록 입구챔버(100)와 출구챔버(200) 간의 압력차를 발생시키는 역할을 한다. 여기서, 본 발명의 도면에 도시된 것처럼 압력발생수단(400)이 입구챔버(100)에 구비되는 것을 일 실시예로 하여 설명한다.
- [0040] 전극(510, 520)은, 포어막(300)의 전후방에 각각 배치되며, 유동되는 용액에 전기적으로 접촉되어 포어막(300) 전후방의 이온전도도 변화를 측정하기 위한 역할을 한다.
- [0041] 측정부(600)는, 한 쌍의 전극(510, 520)을 통해 측정되는 블로킹 전류(blocking current), 저항, 전압, 캐패시턴스 및 임피던스 중 어느 하나 이상의 전기적 특성을 측정하기 위한 역할을 한다.
- [0042] 본 발명의 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치에서 마이크로 포어(310)의 지름(D)은, 타겟 세포(C)의 지름 보다 크며, 포어막(300)의 두께(t)는 약 1 μ m 내지 약 1mm이고, 세장비(t/D)는 0.001 내지 5이며, 바람직하게는 2 이하의 저세장비(t/D)인 것을 특징으로 한다.
- [0043] 한편, 세포의 변형을 측정하기 위해서는 용액 내에서 세포가 유동의 전단력(Shear Force)에 의해 변형이 되도록 유도해야 하며, 이를 위해서는 기존의 전기적 방법으로 유동을 일으키는 전기영동 방법이 아닌 압력에 의해 용액의 유동이 발생하도록 해야 한다.
- [0044] 또한, 용액의 점도, 채널 및 마이크로 포어의 지름, 압력의 세기는 가해지는 전단력의 크기를 결정하는 요소들이므로, 각 세포의 특성(강성: rigidity)에 맞게 조절되어야 한다.
- [0045] 그리고, 마이크로 포어(310)는 측정하고자 하는 타겟 세포(C)의 지름에 비해 조금 더 큰 것을 특징으로 하되,

타겟 세포(C)의 지름에 비해 지나치게 크게 되면 이온전도도의 변화를 측정하는 감도가 떨어지게 되고, 타겟 세포(C)의 지름과 비슷하면 마이크로 포어(310) 근처에 부딪히는 문제가 발생하기 때문에 타겟 세포(C)의 지름 보다 1.1배 이상에서 2배 이내에서 제작하는 것이 바람직하며, 이때 마이크로 포어(310) 지름의 크기는 어느 일정 크기로 한정되는 것은 아니다.

[0046] 그리고, 세장비에 대해서는 기존의 콜터 카운터의 원리에 기반한 Resistive pulse sensing(RPS) 장비에서는 세장비가 매우 크기 때문에 세포가 지나갈 때 입구를 통과해서 출구로 빠져나올 때까지 세포의 형상이 변하더라도 이온전도도의 변화가 거의 발생하지 않기 때문에 세포의 형상 변화를 정확히 측정하는 것이 어렵다.

[0047] 그러나, 세장비를 낮추게 되면 기존의 다른 연구에서와 같이 통과하는 물체(세포)의 형상 및 형상 변화를 분석할 수 있게 된다.

[0048] 이는 마이크로 포어(310)의 입구 부분에서 세포가 진입하기 전부터 이온전도도의 변화가 발생하기 시작해서 마이크로 포어(310)를 통과할 때 이온전도도가 가장 낮아지고, 통과한 이후에는 그 변화가 측정되기 때문이다.

[0049] 또한, 압력기반의 유동에 의해 마이크로 포어(310)의 입구 부분에서 형상의 변화가 시작되어 마이크로 포어(310)의 출구로 빠져나오면서 원래 형상으로 복귀하기 때문에 발생한 전단력에 의해 형상이 변화되었는지 여부를 확인할 수 있게 된다. 따라서 세포의 이상으로 변형이 거의 일어나지 않는 형상을 지닌 세포를 찾아낼 수 있다.

[0050] 따라서, 마이크로 포어(310)에서 세장비는 0.001과 같이 낮을수록 바람직하지만, 이는 제작상의 어려움 및 압력에 대한 저항성을 고려해 2 이하인 것이 바람직할 것이다. 부연하면, 마이크로 포어(310)의 지름(D)은 분석하려는 타겟 세포(C)의 지름 보다 2배 이내로 더 크고, 포어막(300)의 두께(t)는 타겟 세포(C)의 지름과 비슷하거나 더 작은 것이 바람직하다.

[0051] 그러나, 세장비가 단지 2 로만 한정되는 것은 아니고, 3 내지 5 이하 에서도 효과가 있을 것으로 판단된다. 다만, 일반적으로 타겟 세포(C)가 늘어나는 최대 세장비가 대략 5정도로 볼 수 있으므로, 마이크로 포어(310)의 세장비가 5보다 더 큰 경우에는 타겟 세포(C)의 변형되는 정도의 측정이 정확하지 않을 수 있기 때문에 마이크로 포어(310)의 세장비는 5이하인 것이 바람직하다.

[0052] 또한, 일반적으로 타겟 세포(C) 가운데 가장 큰 세포가 난자 세포이고, 난자 세포의 크기가 대략 $150\mu\text{m}$ 이므로 마이크로 포어(310)의 직경이 대략 $250\mu\text{m}$ 로 고려하면, 포어막(300)의 두께(t)가 최소값인 $1\mu\text{m}$ 일 때 세장비가 $1/250=0.004$ 정도 이므로, 난자 세포의 안정적인 통과를 위해 지름을 최대 1mm까지 제작할 수 있다고 가정할 때 세장비는 0.001 이상이 되는 것이 바람직하다.

[0053] 한편, 마이크로 포어(310)가 형성된 포어막(300)은, 세장비를 고려할 때 두께가 얇은 것이 유리하지만, 유체의 압력에 의해 구동되는 환경에서 지나치게 얇은 포어막(300)은 쉽게 부러지는 특성이 있으므로, 세포 지름의 크기와 포어막(300)의 세장비를 고려할 때, 포어막(300)의 두께(t)는 챔버 내에서 유동되는 유체의 압력에 따라 결정하는 것이 바람직하다.

[0054] 포어막(300)의 두께(t)가 $1\mu\text{m}$ 미만일 경우, 입구챔버(100)와 출구챔버(200) 사이에서 유동되는 용액의 압력에 의해 포어막(300)이 손상되는 문제가 발생할 수 있으므로, 포어막(300)의 두께(t)는 $1\mu\text{m}$ 이상인 것이 바람직하다.

[0055] 또한, 상술한 바와 같이 일반적으로 타겟 세포(C) 가운데 가장 큰 세포가 난자 세포이고, 난자 세포의 크기가 대략 $150\mu\text{m}$ 이므로, 세장비의 상한값이 5임을 고려할 때, 포어막(300)의 두께(t)가 1mm 이하가 되는 것이 바람직하다.

[0056] 이때, 마이크로 포어(310)의 형상에 대해서는 일반적으로 많이 사용하는 원형의 구조를 사용할 수 있으며, 세포의 형상을 고려해 이보다 지름이 조금 더 큰 유사한 형상이 바람직하다.

[0057] 보다 상세하게는 적혈구의 경우에는 원반형의 형태를 가지고 있지만, 전단력(Shear stress)에 의해 변형되는 타원형 또는 럭비공 형태와 같은 형상을 고려해 이방성을 가지는 형태가 더 바람직하다.

[0058] 특히, 마이크로 포어(310)의 장축(DL)과 단축(DS)의 길이의 비가 다른 형상의 마이크로 포어(310)인 것이 바람직하다. 적혈구의 경우에는 측면 형상의 길이가 약 $8\mu\text{m}$ 일 때 높이가 약 $2\mu\text{m}$ 이므로 이에 맞추어 4:1 정도의 비율로 마이크로 포어(310)의 형상을 제작하고, 적혈구의 크기 보다 마이크로 포어(310)를 조금 더 크게 만들면 이온전도도의 변화를 보다 정밀하게 측정할 수 있게 된다.

- [0059] 예를 들어 마이크로 포어(310)를 직사각형의 형태를 가지도록 하고, 긴변(DL)과 짧은 변(DS)의 길이의 비가 4:1 정도로 적혈구의 크기에 비해 1.1에서 2배 이내로 크게 만들게 되면 딱딱한 이상 적혈구와 변형이 잘되는 정상 적혈구 모두를 측정할 수 있게 된다.
- [0060] 따라서, 변형능이 적은 적혈구의 경우에는 원반형의 모양을 유지하면서 마이크로 포어를 통과하고, 변형능이 큰 적혈구는 길이가 길어지면서 마이크로 포어 근처에서 형상이 바뀌기 때문에 이에 따른 블로킹 전류의 신호는 매우 다르게 얻어지게 된다. 이를 이용해 적혈구의 크기, 모양을 바탕으로 적혈구의 변형능을 판별할 수 있다.
- [0061] 이러한 비는(DL/DS, ratio)는 반드시 4일 필요는 없으며, 변형되는 적혈구의 형상과 측정되는 전기적 변화를 고려하여 적절히 선정될 수 있다. 다만, 적혈구가 변형되는 경우 적혈구 단면의 장축과 단축의 길이의 비율이 1.5 이상이므로, 마이크로 포어(310)의 장축(DL)과 단축(DS)의 길이의 비는 적어도 1.5 이상이 되는 것이 바람직하다.
- [0062] 따라서, 이방성 형상의 마이크로 포어(310)의 장축(DL)과 단축(DS)의 길이가 타겟 세포(C)의 형상과 변형을 고려하여 그 비를 설정하는 것이 바람직하다.
- [0063] 또한, 마이크로 포어(310)의 형상은 원형이 아닌 형태일 때는 직사각형일 필요는 없으며, 타원형과 같은 형상도 바람직하다. 타원형의 형상은 적혈구가 원형의 원반형의 모양일 때와 변형되었을 때 동시에 검출하는 것이 가능하다.
- [0064] 또한, 직사각형과 타원형이 결합된 형상(등근 사각형)도 가능하다. 적혈구의 최소 두께는 유지된다는 점을 고려했을 때 측면은 직선의 형태를 장축 부분은 타원형의 곡선형태를 가지는 것도 가능하다.
- [0065] 부연하면, 원형의 마이크로 포어(310)를 사용하는 것도 가능하지만, 타겟 세포(C)가 변형되었을 때 마이크로 포어(310)의 단면적에 비해 줄어드는 형상을 효과적으로 측정하는데 어려움이 있다.
- [0066] 특히 원반형 모양의 적혈구 세포의 경우에는 원의 지름 방향으로 마이크로 포어(310)의 크기가 비슷하지만, 두께 부분은 마이크로 포어의 단면적을 거의 차지하지 않기 때문에 블로킹 전류가 적게 발생하게 된다. 따라서 이를 해결하기 위해 적혈구의 원반형의 모양과 유사하게 마이크로 포어(310)의 형상을 바꿀 수 있다.
- [0067] 한편, 마이크로 포어(310)를 통해 타겟 세포(C)가 통과하는 것을 측정하기 위해 포어막(300)의 전후에 용액의 유동 방향을 따라 전극(510, 520)이 배치되며, 통상적으로 전극(510, 520)은 Ag/AgCl의 재질을 가진 것을 사용하나, 금, 타이타늄 및 탄소 등의 다른 전도성 소재를 사용할 수 있다.
- [0068] 특히 두 전극(510, 520) 사이에서 타겟 세포(C)가 마이크로 포어(310)를 통과하면서 높은 전도도를 지닌 이온액의 부피를 세포가 차지하면서 측정되는 이온의 전도도가 순간적으로 줄어드기 때문에 마이크로 포어(310) 전후로 전류를 측정하게 될 때 전류강하가 발생하게 되며, 이를 블로킹 전류(Blocking current)라 한다.
- [0069] 이를 측정하기 위해서는 일반적으로 매우 낮은 전압을 바이어스(Bias)로 가한 상태에서 전류를 측정하는 것이 일반적이다.
- [0070] 그러나, 반드시 전류를 측정해야 되는 것은 아니며, 마이크로 포어(310)의 막힘에 따라 변하는 저항이나 전압, 캐패시턴스 및 임피던스 등을 측정할 수도 있다.
- [0071] 한편, 포어막(300)의 재질로는, 부도체 성질을 지니는 폴리머 또는 세라믹 성질을 지니는 물질을 활용할 수 있다.
- [0072] 부연하면, 폴리머로는, 폴리이미드, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 폴리우레탄, 폴리카보네이트, 아크릴 및 테프론 중 어느 하나 또는 하나 이상을 포함할 수 있고, 이와 유사한 다양한 폴리머로 이루어지며, 어느 하나 또는 하나 이상의 특정 재질로 한정 되는 것은 아니고, 마이크로미터(μm) 두께로 제작 가능한 모든 물질이 가능하다.
- [0073] 그리고, 세라믹으로는, Si_3N_4 , HfO_2 , SiO_2 , Mica, h-BN 및 Quartz 중 어느 하나 또는 하나 이상을 포함할 수 있고, 이외에 다른 세라믹 재료도 사용할 수 있으며, 어느 하나 또는 하나 이상의 특정 재질로 한정 되는 것은 아니고, 마이크로미터(μm) 두께로 제작 가능한 모든 물질이 가능하다.
- [0074] 한편, 채널을 통한 용액의 유동을 일으키기 위해 입구챔버(100)와 출구챔버(200) 간의 압력차를 발생시키는 다양한 압력발생수단(400)이 마련될 수 있다.
- [0075] 예를 들어 중력 또는 수두차 원리에 의해 입구챔버(100)와 출구챔버(200) 간의 압력차가 발생되면서 용액이 유

동되는 것이 가능하고, 특히 용액을 가압하는 시린지 펌프 또는 압력 펌프인 경우에는 입구챔버(100) 또는 출구챔버(200)에 배치하여 사용할 수 있다.

- [0077] 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치에서 포어를 통과하는 세포의 변형에 따라 측정되는 블로킹 전류(blocking current) 신호의 변화를 나타낸 그래프이다.
- [0078] 먼저, 도 1에서는, 적혈구와 같은 타겟 세포(C)가 용액과 함께 입구챔버(100)에 들어가고, 입구챔버(100)와 출구챔버(200) 사이에서 압력발생수단(400)에 의해 압력차가 발생하여 용액의 유동이 발생한다.
- [0079] 이때, 두 챔버 사이에 마이크로의 포어(310)가 형성된 포어막(300)이 놓여지고, 유동은 이 포어막(300)을 통과해 지나가게 된다. 이때 가해진 압력 환경에서 타겟 세포(C)는 형상을 변화하게 되며, 특히 챔버나 연결되는 채널에 비해 마이크로 포어(310)의 크기가 매우 작기 때문에 마이크로 포어(310) 주변에서 전단력에 의해 급격하게 형상이 변형된다. 이때 마이크로 포어(310)의 크기는 타겟 세포(C)의 크기 보다는 큰 형태로서 마이크로 포어(310)의 벽면에 부딪히기보다는 마이크로 포어(310) 내부의 유동을 따라 함께 통과하게 된다.
- [0080] 이와 같이 타겟 세포(C)가 변형하면서 마이크로 포어(310)를 통과할 때 포어막(300)의 전후에 배치된 전극(510, 520)을 통해 이온의 전도도 변화를 측정할 수 있다. 이때, 타겟 세포(C)가 변형되지 않으면 마이크로 포어(310)를 보다 많이 차지하면서 짧은 시간에 통과할 것으로 판단되며, 이로 인해 도 3에서와 같이 블로킹 전류가 발생하게 된다.
- [0081] 그런데 도 3(b)와 같이 세포가 변형하게 되면 세포의 길이가 길어지면서 도 3(a)의 세포가 변형되지 않는 경우에 비하여 세포의 통과 시간(td)은 길어지고, 마이크로 포어(310)를 차지하는 부피는 작아지기 때문에 블로킹 전류의 크기(IB)는 줄어드는 경향을 보이게 된다. 이 두 가지를 비교하면 압력에 의해 발생하는 전단력에 의해 변형되는 세포와 변형되지 않는 세포를 구별할 수 있게 된다.
- [0082] 이러한 방법은 말라리아와 같은 질병에 걸렸을 때 적혈구가 딱딱해지면서 세포의 변형능이 떨어지는 상황에서 많은 적혈구 중에 매우 적은 수의 감염된 적혈구를 찾아내는데 효과적으로 활용될 수 있다.
- [0083] 일반적으로 마이크로 포어(310)의 지름을 'D'라고 하면 이 크기는 타겟 세포(C)의 크기에 비해 크게 만드는 것이 바람직하며, 두께 't'는 타겟 세포(C)의 크기와 비슷하거나 작게 만드는 것이 바람직하다.
- [0084] 다만, 포어막(300)의 두께(t)가 타겟 세포(C)의 크기 보다 조금 더 크다고 해도 지름(D) 대비 두께(t)(세장비)가 크지 않은 상황에서는 마이크로 포어(310)의 입구와 출구 부분에서 타겟 세포(C)가 접근했을 때부터 신호 변화가 발생할 수 있기 때문에 포어막(300)의 두께(t)가 반드시 타겟 세포(C)의 크기보다 작을 필요는 없다.
- [0085] 본 발명에서는 타겟 세포(C)의 지름은 한정하지 않으며, 감염된 세포나 이상이 있는 세포의 경우에 그 형상이 원형에 가까운 형상을 지니는 정상 세포와 모양이 다르거나 전단력에 의해 변형되지 않는 것을 특징으로 한다. 특히, 신호를 통해 세포의 변형 정도를 측정함으로써 어느 정도의 변형능을 가지는 지에 대한 상대적 비교평가가 가능할 것이다.
- [0086] 부연하면, 변형되지 않는 타겟 세포(C)의 경우에는 마이크로 포어(310)의 단면적으로 보다 많이 차지하면서 통과 시간(td)이 짧은 특성을 보일 것으로 판단되며, 변형이 되는 타겟 세포(C)의 경우에는 마이크로 포어(310)의 단면적을 적게 차지함에 따라 블로킹 전류가 상대적으로 크기가 더 적게 되고, 대신에 길이는 길어지므로 통과 속도가 같다고 했을 때 더 긴 통과 시간(td)을 보일 것이다.
- [0087] 또한, 변형이 다이내믹(Dynamic) 하게 이루어지지 않더라도 이미 형상이 다른 적혈구의 경우에는 정상적인 적혈구와는 다른 신호를 얻을 것으로 판단되며, 이러한 지표이외에도 블로킹 전류의 형상에 대한 추가적인 정보(신호의 기울기, 대칭성 등)를 이용해 세포를 판별할 수 있다.
- [0089] 도 4는 본 발명의 다른 실시예에 따른 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치를 나타낸 예시도이다.
- [0090] 도 4를 참조하면, 입구챔버(100)와 포어막(300) 사이에 형성되고 입구챔버(100)에 연통되어 타겟 세포(C)가 포함된 용액의 유동을 가이드 하는 입구채널(110) 및 출구챔버(200)와 포어막(300) 사이에 형성되고 출구챔버(200)에 연통되어 타겟 세포(C)가 포함된 용액의 유동을 가이드 하는 출구채널(210)을 더 포함하여 구성될 수 있다.

- [0091] 부연하면, 도 4는, 다른 형태의 실시 예로 많이 사용되는 마이크로 유체칩과 같이 입구챔버(100)와 출구챔버(200) 이외에 마이크로 포어(310)가 중앙에 형성된 포어막(300)의 전후에 챔버들과 연결되는 통로, 즉 입구채널(110) 및 출구채널(210)이 부가된 형태를 구현할 수 있다.
- [0092] 이러한 통로는 입구챔버(100) 및 출구챔버(200)에서 포어막(300)을 연결할 때 채널의 급격한 변화를 지양하고, 타겟 세포(C)가 포어막(300)의 중앙으로 잘 지나갈 수 있도록 하는데 도움이 될 수 있다.
- [0093] 이때, 입구챔버(100)와 출구챔버(200) 사이에 포어막(300)과의 연결을 위한 입구채널(110)과 출구채널(210)과 같은 통로채널을 형성할 수 있으나 반드시 필요한 것은 아니며, 측정의 편의상 각 챔버와 포어막(300) 사이를 연결하는 통로(채널)를 점차 좁아지는 형태로 구성하면 타겟 세포(C)가 마이크로 포어(310)의 중심으로 진입하기가 용이한 측면이 있다.
- [0095] 도 5는 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치를 나타낸 예시도이다.
- [0096] 도 5를 참조하면, 입구챔버(100)는, 포어막(300)을 향해 타겟 세포(C)가 포함된 용액의 유동을 가이드 하는 유동채널(101) 및 유동채널(101)의 양측에서 합류하여 포어막(300)을 향해 버퍼 용액의 유동을 가이드 하는 버퍼채널(102)을 포함하여 구성될 수 있다. 이러한 구성으로 인해 타겟 세포(C)가 포함된 용액의 양측으로 버퍼 용액이 유동되는 것이다.
- [0097] 부연하면, 도 5는, 타겟 세포(C)가 마이크로 포어(310)로 정확히 진입하기 위해 타겟 세포(C)를 유속이 가장 높은 중앙으로 포커싱하기 위한 하나의 실시예를 보여준 것이며, 이러한 포커싱 방법은 기존에 사용되는 다양한 방법을 채용할 수 있다.
- [0098] 일반적으로 입구챔버(100)를 세개로 만들어 유동이 발생하는 채널에서 중앙과 양측면을 나누어 양측면에서는 버퍼 용액이 지나가도록 하고, 중앙에는 타겟 세포(C)를 포함하는 용액을 흘리는 방식을 사용할 수 있다.
- [0100] 이상에서는 본 발명을 바람직한 실시예에 의거하여 설명하였으나, 본 발명의 기술적 사상은 이에 한정되지 아니하고 청구항에 기재된 범위 내에서 변형이나 변경 실시가 가능함은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명백한 것이며, 그러한 변형이나 변경은 첨부된 특허청구범위에 속한다 할 것이다.

산업상 이용가능성

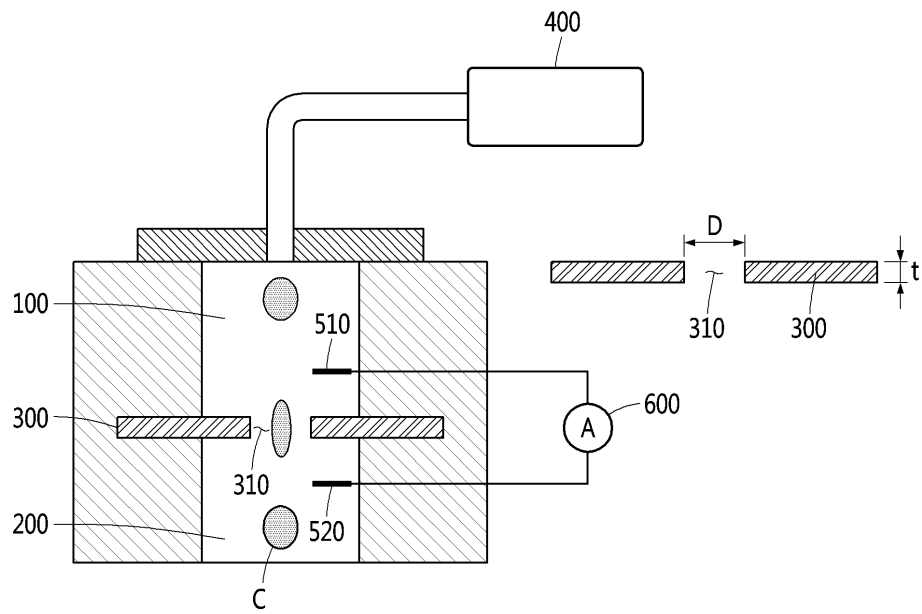
- [0101] 본 발명의 마이크로 포어를 이용한 단일 세포 분석 장치는, 다양한 세포의 변형능 측정을 통해 적혈구 세포의 변형을 빠르게 측정하여, 말라리아 감염, 낫형세포병, 유전성 적혈구 이상 및 심혈관 관련 질환 등의 질병을 조기에 신속히 진단하는 장치로 활용할 수 있다.

부호의 설명

- [0102] 100: 입구챔버 101: 유동채널
102: 버퍼채널 110: 입구채널
200: 출구챔버 210: 출구채널
300: 포어막 310: 포어
400: 압력발생수단 510, 520: 전극
600: 측정부 C: 타겟 세포

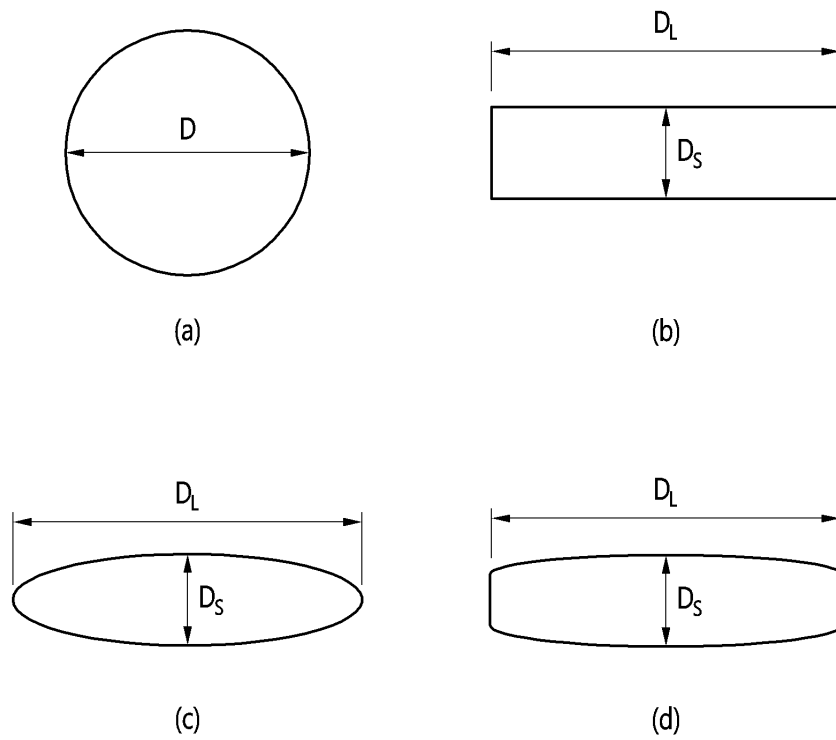
도면

도면1

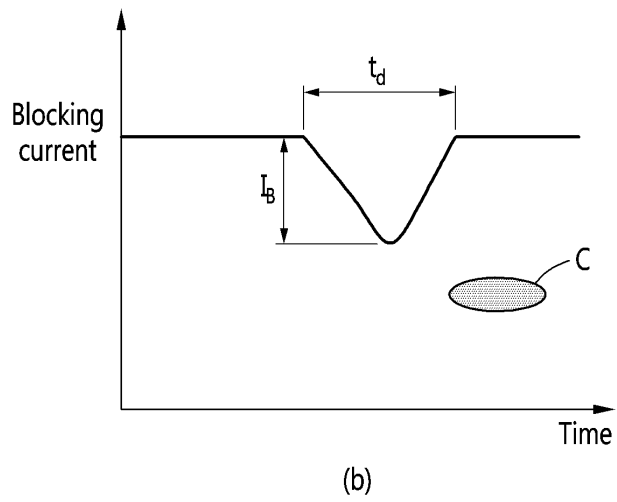
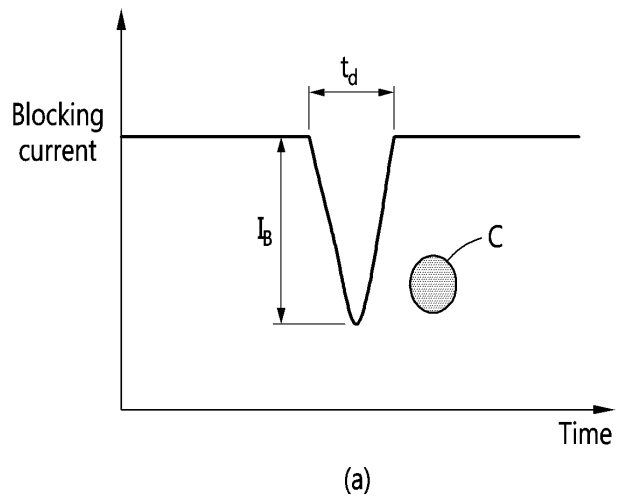


도면2

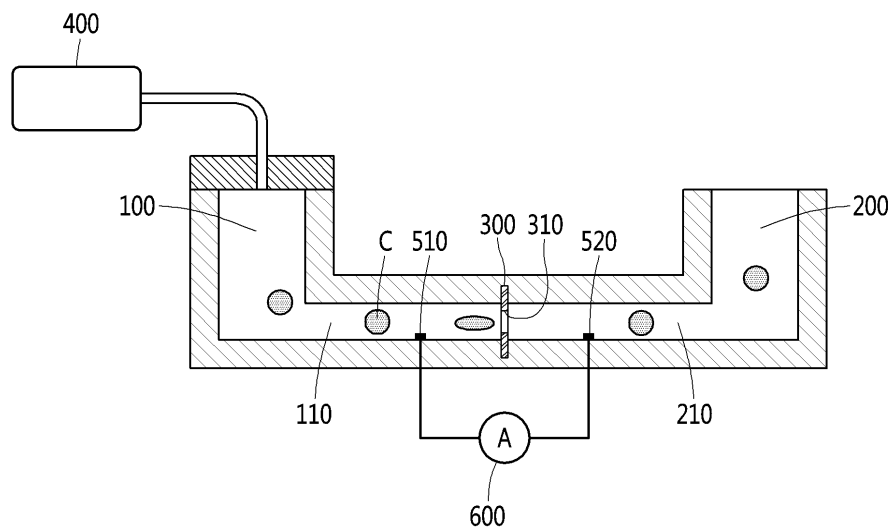
310



도면3



도면4



도면5

