



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월10일
(11) 등록번호 10-1416634
(24) 등록일자 2014년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 35/08 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0056493
(22) 출원일자 2013년05월20일
심사청구일자 2013년05월20일
(56) 선행기술조사문헌
JP2005532151 A
KR1020100111097 A
KR100850643 B1

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스
내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
이원구
경기도 수원시 영통구 영통로 498 황골마을1단지
아파트 136동 1402호
김기수
경기도 화성시 동탄문화센터로 38 (반송동, 솔빛
마을서해그랑블아파트) 411동 2502호
(74) 대리인
김정대

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김성길

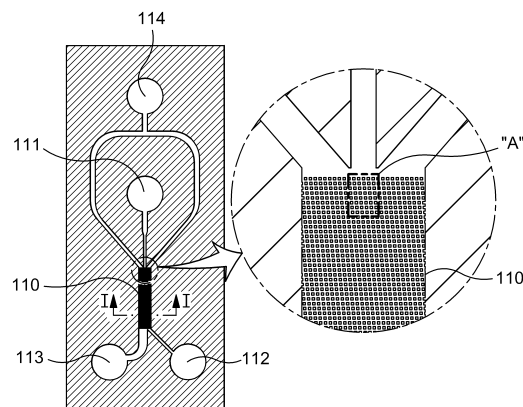
(54) 발명의 명칭 미세유체 칩과 그 제조방법 및 미세유체 분리시스템

(57) 요약

본 발명은: 분리의 대상이 되는 표적 세포(Target Cell)와 상기 표적 세포와 동일한 세포 직경의 비표적 세포(Nontarget Cell)가 혼합되어 있는 세포집단의 유동로를 이루는 미세유체 채널; 그리고 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 세포집단이 유동할 때, 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 표적 세포와 상기 비표적 세포가 서로 다른 방향으로 이동해서 상기 표적 세포가 상기 비표적 세포에서 분리되도록, 상기 미세유체 채널의 내부에 구비되어서 상기 표적 세포의 이동 방향을 전향시키는 복수의 기둥들을 포함하여 구성되는 미세유체 칩과 그 제조방법 및 상기 미세유체 칩을 갖는 미세유체 분리시스템을 개시한다.

본 발명에 따른 미세유체 칩에 따르면, 동일한 크기(세포 직경)의 표적 세포와 비표적 세포가 혼재된 세포집단에서 상기 표적 세포를 분리할 때 자성 인자나 형광 인자 등의 표식인자를 사용하지 않고도 상기 표적 세포를 분리할 수 있으므로, 상기 표적 세포의 오염이 방지될 수 있으며 계속적인 세포 배양이나 개별 세포에 대한 분석 및 연구가 효과적으로 수행될 수 있다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

분리의 대상이 되는 표적 세포(Target Cell)와 상기 표적 세포와 동일한 세포 직경의 비표적 세포(Nontarget Cell)가 혼합되어 있는 세포집단의 유동로를 이루는 미세유체 채널; 그리고

상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 세포집단이 유동할 때, 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 표적 세포와 상기 비표적 세포가 서로 다른 방향으로 이동해서 상기 표적 세포가 상기 비표적 세포에서 분리되도록, 상기 미세유체 채널의 내부에 구비되어서 상기 표적 세포의 이동 방향을 전향시키는 복수의 기둥들을 포함하여 구성되는 미세유체 칩.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 기둥들은;

상기 기둥들의 골격을 이루며, 상기 미세유체 채널의 내부에 서로 나란한 복수의 행을 따라 이격되게 배치되어서 복수의 기둥라인들을 형성하는 기둥 몸체들과,

상기 표적 세포가 상기 기둥들의 표면에서 구르면서 상기 비표적 세포의 이동 방향과는 다른 방향으로 이동하도록, 상기 기둥 몸체들의 표면에 코팅되어서 상기 표적 세포의 표면 인자와 결합하는 리간드를 포함하여 구성됨을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 미세유체 채널의 내부 표면에는 소혈청알부민(BSA)이 코팅되어서 상기 표적 세포와 비표적 세포가 상기 미세유체 채널의 내부 표면에 붙는 것을 방지하는 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 미세유체 채널은, 상기 기둥 몸체들의 일단이 구비되는 기저면과, 상기 기저면과 마주하는 대향면과, 상기 기저면과 대향면의 양측을 막는 벽면들을 포함하여 구성되며; 상기 기둥들은, 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 세포집단이 상기 미세유체 채널의 하류로 이동할 때 상기 표적 세포를 상기 벽면들 중 어느 일측으로 편향되게 이동시키는 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 기둥들은, 상기 비표적 세포를 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 벽면들 중 다른 일측으로 편향되게 이동시키는 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 기둥 몸체들은, 상기 기둥라인들의 행이 바뀔 때 일정 거리씩 시프트(Shift)된 위치에 배치되어서 상기 기둥라인들에 대해 사선 방향으로 구비되는 사선 기둥라인을 형성하는 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 기둥 몸체들은 상기 기둥라인들 각각에 상기 세포 직경의 1.11~3.34배의 간격으로 배치되며, 상기 기둥라

인들의 행이 바뀔 때 상기 세포 직경의 0.5~0.75배씩 시프트된 위치에 배치되는 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 기저면과 상기 대향면 사이의 간격은 최소가 세포 직경의 1.5배이고 최대가 기둥 두께의 8배이며, 상기 기둥 몸체들의 높이는 상기 기저면과 상기 대향면 사이의 간격과 동일한 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 9

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 미세유체 채널의 상류에는 상기 세포집단의 주입을 위한 시료 주입부가 구비되고, 상기 미세유체 채널의 하류에는 상기 기둥들에 의해 상기 세포 집단에서 분리되는 표적 세포의 포집을 위한 제1배출부와 상기 미세유체 채널에 공급되는 상기 세포집단 중에서 상기 제1배출부를 통해 배출되는 부분을 제외한 나머지 유체가 배출되는 제2배출부가 구비되며; 상기 제1배출부는 상기 벽면들 중 어느 일측으로 치우친 위치에 구비되고, 상기 제2배출부는 상기 벽면들 중 다른 일측으로 치우친 위치에 구비되는 것을 특징으로 하는 미세유체 칩.

청구항 10

분리의 대상이 되는 표적 세포(Target Cell)와 상기 표적 세포와 동일한 세포 직경의 비표적 세포(Nontarget Cell)가 혼합되어 있는 세포집단의 유동로를 이루는 미세유체 채널, 상기 세포집단의 주입을 위하여 상기 미세유체 채널의 상류에 구비되는 시료 주입부, 상기 표적 세포의 포집을 위하여 상기 미세유체 채널의 하류에 구비되는 제1배출부, 상기 미세유체 채널에 공급되는 상기 세포집단 중에서 상기 제1배출부를 통해 배출되는 부분을 제외한 나머지 유체의 배출을 위해 상기 미세유체 채널의 하류에 구비되는 제2배출부, 그리고 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 세포집단이 유동할 때, 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 표적 세포와 상기 비표적 세포가 서로 다른 방향으로 이동해서 상기 표적 세포가 상기 비표적 세포에서 분리되도록, 상기 미세유체 채널의 내부에 구비되어서 상기 표적 세포의 이동 방향을 전향시키는 복수의 기둥들을 포함하여 구성되는 미세유체 칩; 그리고

상기 미세유체 칩에 연결되어서 상기 미세유체 칩의 제2배출부에서 배출되는 유체를 상기 미세유체 칩의 시료 주입부에 재공급하는 유체 재공급장치를 포함하여 구성되는 미세유체 분리시스템으로서;

상기 제1배출부는 상기 미세유체 채널의 양측 벽면들 중 어느 일측으로 치우친 위치에 구비되고, 상기 제2배출부는 상기 벽면들 중 다른 일측으로 치우친 위치에 구비되며;

상기 기둥들은, 상기 기둥들의 골격을 이루며, 상기 미세유체 채널의 내부에 서로 나란한 복수의 행을 따라 이격되게 배치되어서 복수의 기둥라인들을 형성하는 기둥 몸체들과, 상기 표적 세포가 상기 기둥들의 표면에서 구르면서 상기 비표적 세포의 이동 방향과는 다른 방향으로 이동하도록, 상기 기둥 몸체들의 표면에 코팅되어서 상기 표적 세포의 표면 인자와 결합하는 리간드를 포함하여 구성됨을 특징으로 하는 미세유체 분리시스템.

청구항 11

분리의 대상이 되는 표적 세포(Target Cell)와 상기 표적 세포와 동일한 세포 직경의 비표적 세포(Nontarget Cell)가 혼합되어 있는 세포집단의 유동로를 이루는 미세유체 채널; 그리고 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 세포집단이 유동할 때, 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 표적 세포와 상기 비표적 세포가 서로 다른 방향으로 이동해서 상기 표적 세포가 상기 비표적 세포에서 분리되도록, 상기 미세유체 채널의 내부에 구비되어서 상기 표적 세포의 이동 방향을 전향시키는 복수의 기둥들을 포함하여 구성되는 미세유체 칩의 제조방법으로서:

상기 기둥들의 골격을 이루는 기둥 몸체들이 구비되며 상기 유동로를 이루는 상기 미세유체 채널을 제조하는 (a)단계;

상기 미세유체 채널의 내부에 구비되는 상기 기둥 몸체들의 표면에 상기 표적 세포의 표면인자와 결합되는 리간드를 코팅하는 (b)단계; 그리고

상기 미세유체 채널의 내부 표면에 소혈정알부민을 코팅하는 (c)단계를 포함하여 이루어지는 미세유체 칩의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (a)단계는;

몰드를 이용해서 상기 기둥 몸체들이 일체로 구비되는 기저면을 포함하는 미세유체 칩의 채널 몸체를 성형하는 (a1)단계와,

상기 유동로가 형성되도록 상기 채널 몸체의 일측에 상기 기저면과 마주하는 대향면을 갖는 커버 몸체를 결합하는 (a2)단계를 포함하여 이루어지는 미세유체 칩의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 시료로 투입되는 유동세포(세포집단)로부터 표적 세포를 분리하는 미세유체 칩 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 크기가 동일한 표적 세포와 비표적 세포가 혼합되어 있는 유동세포로부터 상기 표적 세포를 분리할 수 있는 미세유체 칩과 그 제조방법 및 이를 갖는 미세유체 분리시스템에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일반적으로 생화학 시료에는 이중 이상의 물질이나 세포가 혼재되어 있기 때문에, 원하는 물질 예를 들면 원하는 세포(표적 세포)에 대한 분석이나 연구, 세포 배양 등을 위해서는 상기 표적 세포와 다른 종류의 세포(비표적 세포)가 혼합되어 있는 세포집단에서 상기 표적 세포를 분리하는 것이 중요하며, 상기 표적 세포의 분리를 위하여 미세유체 칩(Microfluidic Chip)이 사용되고 있다.

[0003] 참고로, 일반적인 세포 분석 방법은 세포를 개별적으로 분석하지 않고 세포의 특성을 전체적으로 평균화하는 방식으로 분석하는데, 이러한 방법은 세포의 개별적인 특성에 대한 정보를 알 수 없기 때문에 단일 세포를 분석하고 조작하는 기술이 필요하게 되었으며, 최근에는 마이크로 공정 시스템의 발전으로 적어도 하나의 기능을 단일 칩 내에서 수행 할 수 있는 랩온어칩(Lab-on-a-chip)이 사용되고 있다.

[0004] 상기 랩온어칩은 마이크로 전체 분석 시스템(μ TAS)이라는 개념으로 안드레아스 만즈(Andreas Manz)에 의해 제안되었으며, 최근에는 μ TAS 영역에서 나노리터 또는 피코리터 규모의 용량을 처리하는 기술까지 기술 발전이 급속하게 이루어지고 있다. 이러한 기술의 발전으로 수 밀리미터에서 센티미터까지 크기의 단일 칩 상에서 하나 또는 복수의 기능들이 수행될 수 있는 장치가 개발되었는데 이를 미세유체 칩 또는 랩온어칩이라 하며, 바이오칩(Biochip)의 일종이다.

[0005] 상기 랩온어칩은 샘플 전처리, 화학 반응, 검체 분리, 검체 정제, 검체 감지또는 데이터 분석 등을 수행할 수 있으며, 특히 바이오분야에서는 랩온어칩을 세포를 분석하거나 조작하는 연구를 수행하는 셀온어칩(Cell-on-a-chip)과 생물의 기관(organ)을 모사하여 기계적/물리적 특성을 연구하는 오간온어칩 (Organ-on-a-chip)과 기관들을 모사한 장치를 모두 결합시켜 전체적인 인간의 몸을 모사하고 약물에 대한 반응을 연구하는 휴먼온어칩(Human-on-a-chip)으로 이용하고 있다.

[0006] 이들 중에 셀온어칩은 세포에 대한 정보와 정확한 진단을 위하여 필요하기 때문에 중요한 이슈로 부각되고 있으며, 이에 따라 상기 셀온어칩에 대한 다양한 연구들이 진행되고 있다. 상기 셀온어칩을 이용하여 다양한 방법(기계적, 광학적, 전기적 그리고 자기적 방법 등)으로 세포조작(집속, 포획 그리고 분리 등)을 수행하는 방법들이 연구되고 있는데, 기계적 방법을 제외한 다른 방법은 대부분 레이저나 자석 같은 외부 장치나 구성을 필요로 한다.

[0007] 상기 기계적 방법은 값싼 장치를 만들 수 있고 외부적인 표식인자(형광 인자, 자성 인자), 다시 말해서 세포표면의 차이를 이용한 표식인자가 필요 없다는 장점을 가지고 있으나, 세포들을 크기나 밀도 또는 변형도에 따른 물리적 특성의 차이만을 가지고 분리해야 하므로 세포의 특성 예를 들면 세포의 크기가 같은 세포를 분리하는데에는 어려움이 있으며, 동일 크기의 세포들 즉 세포 직경이 동일한 표적 세포와 비표적 세포가 혼합된 세포집단에서 상기 표적 세포를 선택적으로 분리하기 위해 기존과 같이 형광인자나 자성인자를 사용할 경우 세포오염의 문제가 제기되고 상기 표식인자가 제거된다 하더라도 세포에 악영향을 미치므로, 상기 형광인자나 자성인자에 의해 분리된 세포를 배양하거나 이러한 세포를 대상으로 지속적인 연구를 수행하기 어려운 문제가 있다.

[0008] 예를 들어, 배아줄기세포의 경우 분화된 세포와 분화되지 않은 세포(미분화세포)의 크기, 밀도 및 변형도가 모두 동일하게 때문에 기존의 방법으로는 미분화세포를 분리해내기 어렵고, 표식인자, 예를 들면 자성 인자를 세포 표면에 부착시켜서 자기적으로 밀도와 크기가 같은 세포를 분리하는 방법이 제시되었으나, 상기 자성 인자를 이용하여 세포를 분리하면 세포가 오염되어서 계속적인 세포 배양이나 연구를 수행할 수 없게 되는 등의 문제가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 공개특허공보 제10-2012-0126236호, 2012년 11월 21일 공개
(특허문헌 0002) 등록특허공보 제10-0788458호, 2007년 12월 17일 등록
(특허문헌 0003) 등록특허공보 제10-0846489호, 2008년 7월 9일 등록

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상술한 종래의 문제점을 해결하기 위해 제안된 것으로서, 동일 크기의 비표적 세포와 표적 세포가 혼합되어 있는 세포집단으로부터 상기 표적 세포를 형광 인자나 자성 인자 등의 표식 인자를 사용하지 않고 분리할 수 있는 기능을 갖는 미세유체 칩 및 그 제조방법과 상기 미세유체 칩을 갖는 미세유체 분리시스템을 제공하는 데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상술한 목적의 해결을 위하여, 본 발명은: 분리의 대상이 되는 표적 세포(Target Cell)와 상기 표적 세포와 동일한 세포 직경의 비표적 세포(Nontarget Cell)가 혼합되어 있는 세포집단의 유동로를 이루는 미세유체 채널; 그리고 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 세포집단이 유동할 때, 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 표적 세포와 상기 비표적 세포가 서로 다른 방향으로 이동해서 상기 표적 세포가 상기 비표적 세포에서 분리되도록, 상기 미세유체 채널의 내부에 구비되어서 상기 표적 세포의 이동 방향을 전향시키는 복수의 기둥들을 포함하여 구성되는 미세유체 칩을 제공한다.
- [0012] 상기 기둥들은; 상기 기둥들의 골격을 이루며, 상기 미세유체 채널의 내부에 서로 나란한 복수의 행을 따라 이격되게 배치되어서 복수의 기둥라인들을 형성하는 기둥 몸체들과, 상기 표적 세포가 상기 기둥들의 표면에서 구르면서 상기 비표적 세포의 이동 방향과는 다른 방향으로 이동하도록, 상기 기둥 몸체들의 표면에 코팅되어서 상기 표적 세포의 표면 인자와 결합하는 리간드를 포함하여 구성된다.
- [0013] 그리고, 상기 미세유체 채널의 내부 표면에는 소혈청알부민(BSA)이 코팅되어서 상기 표적 세포와 비표적 세포가 상기 미세유체 채널의 내부 표면에 붙는 것을 방지한다.
- [0014] 상기 미세유체 채널은, 상기 기둥 몸체들의 일단이 구비되는 기저면과, 상기 기저면과 마주하는 대향면과, 상기 기저면과 대향면의 양측을 막는 벽면들을 포함하여 구성되며; 상기 기둥들은; 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 세포집단이 상기 미세유체 채널의 하류로 이동할 때 상기 표적 세포를 상기 벽면들 중 어느 일측으로 편향되게 이동시킨다.
- [0015] 그리고 상기 기둥들은 상기 비표적 세포를 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 벽면들 중 다른 일측으로 편향되게 이동시킨다.
- [0016] 상기 기둥 몸체들은, 상기 기둥라인들의 행이 바뀔 때 일정 거리씩 시프트(Shift)된 위치에 배치되어서 상기 기둥라인들에 대해 사선 방향으로 구비되는 사선 기둥라인들을 형성한다.
- [0017] 상기 기둥 몸체들은, 상기 기둥라인들 각각에 상기 세포 직경의 1.11~3.34배의 간격으로 배치되며, 상기 기둥라인들의 행이 바뀔 때 상기 세포 직경의 0.5~0.75배씩 시프트된 위치에 배치된다.
- [0018] 상기 기저면과 상기 대향면 사이의 간격은 최소가 세포 직경의 1.5배이고 최대가 기둥 두께의 8배이며, 상기 기

등 몸체들의 높이는 상기 기저면과 상기 대향면 사이의 간격과 동일하게 구성된다.

[0019] 상기 미세유체 채널의 상류에는 상기 세포집단의 주입을 위한 시료 주입부가 구비되고, 상기 미세유체 채널의 하류에는 상기 기둥들에 의해 상기 세포 집단에서 분리되는 표적 세포의 포집을 위한 제1배출부와 상기 미세유체 채널에 공급되는 상기 세포집단 중에서 상기 제1배출부를 통해 배출되는 부분을 제외한 나머지가 배출되는 제2배출부가 구비되며; 상기 제1배출부는 상기 벽면들 중 어느 일측으로 치우친 위치에 구비되고, 상기 제2배출부는 상기 벽면들 중 다른 일측으로 치우친 위치에 구비된다.

[0020] 다른 일 형태로서 본 발명은: 상술한 구성을 갖는 미세유체 칩과 유체 재공급장치를 포함하여 구성되는 미세유체 분리시스템을 제공한다. 상기 유체 재공급장치는, 상기 미세유체 칩에 연결되어서 상기 미세유체 칩의 제2배출부에서 배출되는 유체를 상기 미세유체 칩의 시료 주입부에 재공급한다.

[0021] 또 다른 일 형태로서 본 발명은: 분리의 대상이 되는 표적 세포(Target Cell)와 상기 표적 세포와 동일한 세포 직경의 비표적 세포(Nontarget Cell)가 혼합되어 있는 세포집단의 유동로를 이루는 미세유체 채널; 그리고 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 세포집단이 유동할 때, 상기 미세유체 채널의 내부에서 상기 표적 세포와 상기 비표적 세포가 서로 다른 방향으로 이동해서 상기 표적 세포가 상기 비표적 세포에서 분리되도록, 상기 미세유체 채널의 내부에 구비되어서 상기 표적 세포의 이동 방향을 전향시키는 복수의 기둥들을 포함하여 구성되는 미세유체 칩의 제조방법을 제공한다. 상기 미세유체 칩의 제조방법은: 상기 기둥들의 골격을 이루는 기둥 몸체들이 구비되며 상기 유동로를 이루는 상기 미세유체 채널을 제조하는 (a)단계; 상기 미세유체 채널의 내부에 구비되는 상기 기둥 몸체들의 표면에 상기 표적 세포의 표면인자와 결합되는 리간드를 코팅하는 (b)단계; 그리고 상기 미세유체 채널의 내부 표면에 소혈정알부민을 코팅하는 (c)단계를 포함하여 이루어진다.

[0022] 상기 (a)단계는; 몰드를 이용해서 상기 기둥 몸체들이 일체로 구비되는 기저면을 포함하는 미세유체 채널의 채널 몸체를 성형하는 (a1)단계와, 상기 채널 몸체의 일측에 커버 몸체를 결합해서 상기 미세유체 채널의 유동로를 형성하는 (a2)단계를 포함하여 이루어진다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 미세유체 칩 및 이를 갖는 미세유체 분리시스템에 의하면 다음과 같은 효과가 있다.

[0024] 첫째, 본 발명에 따른 미세유체 칩에 따르면, 동일한 크기(세포 직경)의 표적 세포와 비표적 세포가 혼재된 세포집단에서 상기 표적 세포를 분리할 때 자성 인자나 형광 인자 등의 표식인자를 사용하지 않고도 상기 표적 세포를 분리할 수 있으므로, 상기 표적 세포의 오염이 방지될 수 있으며 지속적인 세포 배양이나 개별 세포에 대한 분석 및 연구가 효과적으로 수행될 수 있다.

[0025] 둘째, 본 발명에 따르면 표적 세포의 이동 경로와 롤링 메커니즘을 3차원적으로 관측할 수 있으므로, 리간드와 표적 세포의 결합관계 등의 연구에 도움이 된다.

[0026] 셋째, 본 발명에 따르면, 미세유체 칩에 연결된 유체 재공급장치를 이용하여 세포집단이 복수 회의 분리과정을 거칠 수 있으므로, 표적 세포의 수득율을 높일 수 있고 분리된 표적 세포의 순도가 향상될 수 있다.

[0027] 넷째, 본 발명에 따른 미세유체 칩은 세포에 악영향을 미치지 않고도 표적 세포의 분리가 가능하며, 제조에 큰 어려움이 없으므로 고가의 비용을 들이지 않고도 제조될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본 발명에 따른 미세유체 칩의 일 실시예를 나타낸 사시도이다.

도 2는 도 1에 도시된 미세유체 칩의 단면도이다.

도 3은 도 2의 I-I선에 따른 단면도이다.

도 4는 도 2의 "A" 영역을 확대하여 개략적으로 나타낸 단면도이다.

도 5a와 도 5b는 본 발명에 따른 미세유체 칩의 내부에서 표적 세포의 롤링과정을 개략적으로 설명하기 위한 횡단면도와 종단면도이다.

도 6은 본 발명에 따른 미세유체 칩의 미세유체 채널에서 비표적 세포의 이동을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명에 따른 미세유체 칩의 미세유체 채널에서 표적 세포의 이동을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 8은 본 발명에 따른 미세유체 칩의 미세유체 채널에서 표적 세포와 비표적 세포의 이동 방향을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 9는 본 발명에 따른 미세유체 칩의 제조과정에 대한 일 실시예를 나타낸 플로우 차트이다.

도 10은 본 발명에 따른 미세유체 칩의 채널 몸체를 몰드에서 분리한 상태를 나타낸 사시도이다.

도 11은 본 발명에 따른 미세유체 칩과 상기 미세유체 칩에 연결된 순환 장치를 갖는 미세유체 분리시스템의 일 실시예를 나타낸 사시도이다.

도 12는 도 11에 도시된 미세유체 분리시스템에 의한 세포의 분리 과정을 나타낸 도면이다.

도 13은 도 11에 도시된 미세유체 분리시스템에 의한 세포의 재분리 과정을 나타낸 도면이다.

도 14는 본 발명에 따른 미세유체 칩의 제작을 위해 작성된 도면이다.

도 15는 본 발명의 실험을 위해 제작된 미세유체 칩의 기둥 어레이에 대한 현미경 이미지(사진)이다.

도 16은 본 발명의 실험을 위해 제작된 미세유체 칩의 현미경 이미지이다.

도 17은 본 발명의 실험을 위한 대조군(비표적 세포)의 이동 방향을 관측한 현미경 사진이다.

도 18은 대조군과의 비교를 위한 실험군(표적 세포)의 이동 방향을 관측한 현미경 사진이다.

도 19는 HL-60 세포의 이동 과정(물링)을 관측한 현미경 사진이다.

도 20은 본 발명의 실험을 위한 대조군과 실험군의 이동 각도를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하 상기 목적을 구체적으로 실현할 수 있는 본 발명의 바람직한 실시예가 첨부된 도면을 참조하여 설명된다. 본 실시예를 설명함에 있어서, 동일 구성에 대해서는 동일 명칭 및 부호가 사용되며, 이에 따른 부가적인 설명 및 중복되는 설명은 하기에서 생략된다.
- [0030] 먼저, 도 1 내지 도 4를 참조하여 본 발명에 따른 미세유체 칩의 일 실시예가 설명된다. 여기서, 도 1은 본 발명에 따른 미세유체 칩의 일 실시예를 나타낸 사시도이고, 도 2는 도 1에 도시된 미세유체 칩의 단면도이며, 도 3은 도 2의 I-I선에 따른 단면도이고, 도 4는 도 2의 "A" 영역을 확대하여 개략적으로 나타낸 단면도이다.
- [0031] 도 1 내지 도 4를 참조하면, 본 발명에 따른 미세유체 칩의 일 실시예(100)는, 미세유체 채널(110)과 상기 미세유체 채널의 내부에 배치되는 기둥(120)들을 포함하여 구성된다. 상기 미세유체 채널(110)은 세포집단(시료 세포), 즉 분리/포집의 대상이 되는 표적 세포(1)와 그외의 세포 즉 세포 직경이 동일한 비표적 세포(2)의 유동로를 이루는 구성으로서, 상기 미세유체 채널(110)의 내부에서 상기 표적 세포(1)의 분리가 이루어진다.
- [0032] 본 실시예에 있어서, 상기 미세유체 채널(110)의 상류에는 상기 세포집단을 상기 미세유체 채널(110)의 내부로 공급하기 위한 시료 주입부(111)가 구비되고, 상기 미세유체 채널(110)의 하류에는 상기 표적 세포의 포집을 위한 제1배출부(112)와 상기 비표적 세포의 배출을 위한 제2배출부(113)가 구비된다.
- [0033] 그리고 상기 세포집단의 원활한 유동 및 세포 집속을 위하여, PBS(Phosphate Buffered Saline)나 물 등과 같은 세포 무해성 유체(Biocompatible Fluid)인 시스유체(Sheath Fluid, 버퍼용액)가 상기 표적 세포가 포함된 세포 집단과 함께 상기 미세유체 채널(110)로 공급될 수 있다. 이를 위하여, 상기 미세유체 채널(110)의 상류에는 상기 시스유체의 주입을 위한 시스유체 주입부(114)가 구비되며, 상기 시스유체는 상기 미세유체 채널(110)의 내부로 유입되는 세포집단의 양측에 합류되어서 상기 미세유체 채널(110)의 가장자리(양측 벽면)를 따라 유동하게 된다.
- [0034] 상기 미세유체 채널(110)의 내부에는 상기 기둥(120)들이 구비되며, 상기 기둥(120)들은, 상기 세포집단이 상기 미세유체 채널(110)의 상류에서 하류로 유동할 때 상기 세포집단에서 상기 표적 세포(1)가 분리되도록, 세포 직경이 동일한 상기 표적 세포(1)와 비표적 세포(2)를 서로 다른 방향으로 이동시킨다. 즉, 상기 기둥(120)들은 상기 미세유체 채널(110)의 내부에 구비되어서 상기 표적 세포(1)의 이동방향을 전향시킨다.
- [0035] 도 3 및 4를 참조하여 보다 구체적으로 설명하면, 상기 기둥(120)들은, 상기 미세유체 채널(110)의 내부에 복수의 행(Line)으로 배치되며 상기 기둥(120)들의 골격을 이루는 기둥 몸체(121)들과, 상기 기둥 몸체(121)들의 표면에 코팅되며 상기 표적 세포의 표면 인자와 결합하는 리간드(122, Ligand)를 포함하여 구성된다.

- [0036] 즉, 상기 미세유체 채널(110)의 내부에는 상기 기둥 몸체(121)들이 서로 나란한 복수의 행(상기 유동로를 가로 지르는 방향의 라인)을 따라 이격되게 배치되어서 복수의 기둥 라인(120L)들을 포함하는 기둥 어레이(Post Array), 즉 후술하는 바와 같이 규칙적인 기둥 배치 구조를 형성한다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 미세유체 채널(110)의 내부 표면에는 소혈청알부민(Bovine serum Albumin, 이하 'BSA'라 약칭함)이 코팅되는데, 상기 BSA(115, BSA 코팅층)는 표적 세포와 비표적 세포가 미세유체 채널의 내부 표면에 부착되는 현상을 방지하며, 더 나아가 상기 BSA(115)에 의해 상기 리간드(122)의 코팅여부가 확인될 수 있다.
- [0038] 다시 말해서, 상기 BSA(115)는 세포가 미세유체 채널(110)의 내벽(내부 표면)에 부착되는 것을 방지함으로써 미세유체 채널(110)의 막힘을 방지할 수 있고, 분화되지 않은 배아줄기세포(미분화 배아줄기세포)의 경우 특정 위치에 고착되면 분화가 시작되므로, 상기 미분화 배아줄기세포를 표적 세포로 하는 경우에 더욱 유용하다.
- [0039] 상기 미세유체 채널(110)은, 상기 기둥 몸체(121)들의 일단이 구비되는 기저면(110a)과, 상기 기저면(110a)과 마주하는 대향면(110b)과, 상기 기저면(110a)과 대향면(110b)의 양측을 막는 벽면들(110c, 110d)을 포함하여 구성되는데, 상기 기둥(120)들은 상기 세포집단이 상기 미세유체 채널(110)을 통해 상기 미세유체 채널의 하류로 이동할 때 상기 표적 세포를 상기 벽면들(110c, 110b) 중 어느 일측으로 편향되게 이동시킨다.
- [0040] 다시 말해서, 상기 표적 세포는 상기 기둥(120)들에 의해 상기 벽면들(110c, 110d) 중 어느 하나의 벽면으로 편향되는데, 이에 따라 상기 표적 세포는 상기 기둥(120)들이 형성된 영역을 통과하면서 상기 미세유체 채널(110)의 양측 벽면들(110c, 110d) 중 어느 하나의 벽면(110c)으로 가까워진다.
- [0041] 반면, 상기 비표적 세포는 상기 미세유체 채널(110)의 하류로 이동하면서 상기 기둥(120)들에 의해 상기 벽면들(110c, 110d) 중 다른 하나의 벽면(110d)측으로 편향되는데, 이에 따라 상기 비표적 세포는 상기 기둥(120)들이 형성된 영역을 통과하면서 상기 미세유체 채널(110)의 양측 벽면들(110c, 110d) 중 다른 하나의 벽면(110d)에 가까워진다.
- [0042] 그리고, 상기 기둥 라인(120L)들을 통과하면서 상기 미세유체 채널(110)의 일측 벽면(110c)으로 편향되게 이동하는 표적 세포들은 상기 제1배출부(112)로 유입되고, 상기 제1배출부(112)를 통해 상기 미세유체 채널(110)에서 배출되는 부분을 제외한 나머지는 상기 제2배출부(113)로 유입된다.
- [0043] 보다 구체적으로 설명하면, 상기 기둥 어레이에 의해 분리되는 표적 세포들의 포집을 위하여, 상기 제1배출부(112)는 상기 미세유체 채널(110)의 축선을 기준으로 상기 미세유체 채널의 일측 벽면(110c)으로 치우친 위치에 구비되고, 상기 제2배출부(113)는 상기 미세유체 채널(110)의 축선을 기준으로 상기 미세유체 채널의 타측 벽면(110d)으로 치우친 위치에 구비된다.
- [0044] 도 4를 참조하면, 상기 기둥 몸체(121)들은, 상기 표적 세포의 이동 방향을 전향시키고 더 나아가 상기 비표적 세포의 이동 방향이 상기 표적 세포의 이동 방향과 다르게 되도록, 상기 기둥 라인(120L)들의 행이 바뀔 때 일정 거리(d)씩 시프트(Shift)된 위치에 배치되어서 상기 기둥 라인(120L)들에 대해 사선방향으로 구비되는 사선 기둥 라인(120R)들을 형성한다.
- [0045] 보다 구체적으로 설명하면, 상기 기둥(120)들은, 상기 기둥 라인(120L)들의 행이 바뀔 때마다 세포 직경(표적 세포와 비표적 세포의 크기)의 0.5~0.75배의 거리만큼 시프트(Shift)된 위치에 배치된다. 즉, 상기 기둥 라인들의 행간 시프트 거리(d)가 세포 직경의 0.5~0.75배로 된다. 이때, 상기 행간 시프트 거리(d)가 세포 직경의 0.5배 미만인 되거나 0.75배를 초과하면, 상기 표적 세포와 비표적 세포의 이동 경로가 원치않는 방향이 되고 상기 표적 세포의 분리가 제대로 이루어지기 어렵다.
- [0046] 그리고 하나의 기둥 라인(120L)에 배치되는 기둥(120)들은 상기 세포 직경의 1.11~3.34배의 간격(G, 이하 '기둥간 거리'라 칭함)으로 배치되는 것이 좋은데, 상기 기둥간 거리(G)이 세포 직경의 1.11배 미만이면 세포 통과 및 이동에 어려움이 있고 이로 인해 기둥들 사이가 막히는 문제가 있으며, 세포 직경의 3.34배를 초과하면 표적 세포의 선택적 분리가 어려워지므로, 상술한 범위 내의 간격으로 각각의 기둥 라인에 일렬로 배치된다. 본 실시예에서는 상기 기둥 라인(120L)들 사이의 간격도 상기 세포 직경의 1.11~3.34배인 것을 개시한다.
- [0047] 다음으로, 상기 미세유체 채널(110)의 높이, 즉 상기 기저면(110a)과 대향면(110b)의 간격(H)은 세포 직경의 1.5배 이상인 것이 바람직하며, 최대는 제한이 없으나 상기 미세유체 채널(110)이 붕괴되지 않을 정도이면 충분하고, 상기 미세유체 채널(110)의 최대 높이는 상기 미세유체 채널의 재질에 따라 달라질 수 있다.
- [0048] 보다 구체적으로 설명하면, 상기 미세유체 채널의 높이(H)가 세포 직경의 1.5배 미만인 경우, 상기 표적 세포와

비표적 세포들이 상기 미세유체 채널(110)을 따라 이동할 때 상기 기저면(110a)과 대향면(110b)에 부딪혀서 세포의 이동 경로에 영향을 미치므로, 상기 미세유체 채널의 높이(H)는 세포 직경의 1.5배 이상이 바람직하다. 그리고 상기 미세유체 채널의 재질이 PDMS(Polydimethylsiloxane, 폴리디메틸실록산)인 경우 상기 기둥 두께(원형인 경우 직경)의 8배 이하가 되는 것이 상기 미세유체 채널(110)의 붕괴방지를 위해 바람직하다.

[0049] 그리고, 하나의 행(기둥 라인)에서 배치되어서 상호 이웃하는 기둥들의 중심간 거리(λ , 임의의 기둥의 중심에서 동일한 행에 이웃하게 배치되어 있는 다른 기둥의 중심까지의 거리)는 상기 기둥간 거리(G)에 기둥의 두께를 더한 값으로서, 기둥의 두께는 세포 이동에 큰 영향을 미치지 않으므로 크게 제한되지는 않으나, 상기 기둥의 두께가 상기 기둥간 거리(G)와 동일하게 설정되면, 상호 이웃하는 기둥들의 중심간 거리(λ)는 상기 기둥간 거리(G)의 2배가 된다. 본 발명의 도면에서는 상기 기둥(120)들이 사각 기둥인 구조가 개시되었으나, 원형 기둥이 될 수도 있다.

[0050] 도 5a 및 도 5b를 참조하면, 상기 기둥 몸체(121)들 각각의 표면에는 전술한 바와 같이 상기 리간드(122)가 코팅되어서, 상기 기둥(120)의 표면에 부착되는 표적 세포(1)가 상기 미세유체 채널(110)의 상류에서 하류로 작용하는 세포집단의 유동력(유체의 전단력)에 의해 상기 기둥(120)의 표면에서 롤링(Rolling, 구름)하다가 다음 행의 기둥 라인으로 순차적으로 옮겨가면서 상기 비표적 세포(2)와는 다른 방향으로 이동하게 된다. 즉, 상기 기둥 라인(120L)들을 포함하는 기둥 어레이에 의해 상기 표적 세포(1)와 비표적 세포(2)의 유선이 다르게 조절되어서 상기 표적 세포(1)와 비표적 세포(2)가 서로 다른 방향으로 진행하게 된다.

[0051] 상기 표적 세포(1)의 이동 경로를 전향시키기 위해 상기 기둥 몸체(121)에 적용되는 리간드(122)는, 상기 표적 세포의 표면 인자(1a)와 리셉터-리간드 결합을 하게 된다. 상기 리셉터-리간드 결합은 항원-항체 반응처럼 특이한 상보적 결합을 하기 때문에, 상기 기둥 몸체(121)의 표면에는 상기 표적 세포의 표면 인자(1a)와 리셉터-리간드 결합을 하는 리간드(122)가 코팅되며, 예를 들어 상기 표적 세포(1)가 HL-60 세포인 경우 상기 리간드(122)로 P-selectin이 적용될 수 있다.

[0052] 상기 리셉터-리간드 결합에 의해 상기 기둥(120)들의 표면에 상기 표적 세포(1)가 붙으면, 상기 표적 세포(1)는 유체(유동하는 세포집단)속에서 전단력을 받아서 상기 기둥(120)의 둘레를 롤링한다. 보다 구체적으로 설명하면, 상기 표적 세포(1)는 상기 유체의 전단력과 상기 리셉터-리간드 결합의 합력에 의해 토크(Torque)를 받아서 상기 표적 세포(1)가 붙은 기둥(120)의 둘레를 구르다가 떨어져서 다음 행(기둥 라인)에 배치되어 있는 다른 기둥(120)에 붙어서 구르는 과정을 반복하면서 상기 미세유체 채널(110)의 하류로 이동하게 된다.

[0053] 상기 미세유체 채널(110)의 내부를 유동하는 세포의 유선(세포의 이동 경로)은 상기 기둥(120)들의 배열 구조에 의해 조절될 수 있다. 도 6은 본 발명에 따른 미세유체 칩의 기둥 어레이를 통과하는 비표적 세포(2)의 궤적을 개략적으로 보여준다.

[0054] 도 6을 참조하면, 상기 비표적 세포(2)는 상기 기둥 라인(도 4의 120L, 이하 동일)들, 즉 상기 기둥 어레이를 통과하면서 상기 미세유체 채널(110)의 일측 벽면(도 3의 110c, 이하 동일)에서 멀어지게 된다. 물론, 상기 미세유체 칩(110)의 기둥 몸체(121)들이 상기 리간드(122)로 코팅되지 않은 상태에서는 상기 표적 세포(1)도 상기 비표적 세포(2)와 동일 또는 유사한 이동 형태를 띄게 된다.

[0055] 그리고 도 7을 참조하면, 상기 표적 세포(1)는 상기 기둥 라인(120L)들, 즉 상기 기둥 어레이를 통과하면서 상기 미세유체 채널(110)의 일측 벽면(110c)으로 가까워지고, 이에 따라 상기 표적 세포(1)와 비표적 세포(2)의 분리가 발생된다.

[0056] 도 8은 본 발명에 따른 미세유체 칩의 미세유체 채널 내에서 표적 세포와 비표적 세포의 이동 방향을 개략적으로 나타낸 것으로서, 본 발명에 따르면 상기 표적 세포(1)는 미세유체 채널(110)의 일측 벽면(110c)으로 편향되게 이동하고, 상기 비표적 세포(2)는 상기 미세유체 채널(110)의 타측 벽면(110d)측으로 편향되게 이동함으로써 상기 표적 세포(1)의 비표적 세포(2)의 분리가 보다 확실하게 구현될 수 있으며, 상기 기둥의 행간 시프트 거리(d) 및/또는 기둥간 거리(G)에 의해 상기 표적 세포(1)와 비표적 세포(2)의 이동 각도가 달라질 수 있다.

[0057] 그리고, 상기 미세유체 채널(110)의 길이, 보다 상세하게는 상기 기둥 어레이의 구간이 길어질수록 상기 표적 세포의 비표적 세포의 분리가 보다 확실하게 구현될 수 있음을 추측할 수 있다.

[0058] 다음으로, 도 9 및 도 10을 참조하여, 본 발명에 따른 미세유체 칩의 제조방법에 대한 일 실시예가 설명된다.

[0059] 도 9 및 도 10을 참조하면, 본 발명에 따른 미세유체 칩의 제조방법은, 상기 기둥(120)들의 골격을 이루는 기둥 몸체(121)들이 구비되며 상기 유동로를 이루는 상기 미세유체 채널(110)을 제조하는 단계(S10)와, 상기 미세유

체 채널(110)의 내부에 구비되는 상기 기둥 몸체(121)들의 표면에 상기 표적 세포의 표면인자(1a)와 결합되는 리간드(122)를 코팅하는 단계(S20)와, 상기 미세유체 채널(110)의 내부 표면에 소혈청알부민(115)을 코팅하는 단계(S30)를 포함하여 이루어진다.

- [0060] 그리고, 상기 미세유체 채널을 제조하는 단계(S10)는, 몰드(20)를 이용해서 상기 기둥 몸체(121)들이 일체로 구비되는 기저면(11a))을 포함하는 미세유체 칩의 채널 몸체(100a)를 성형하는 단계(S11)와, 상기 유동로가 형성되도록 상기 채널 몸체(100a)의 일측에 커버 몸체(100b, 도 1 참조)를 결합해서 상기 미세유체 채널(110)을 제조하는 단계(S12)를 포함하여 이루어질 수 있다.
- [0061] 보다 상세하게 설명하면, 상기 채널 몸체(100a)의 성형을 위한 몰드(20)를 제조하고 상기 몰드(20)에 상기 채널 몸체(100a)의 성형재료, 예를 들면 PDMS를 부어서 경화시키면 상기 채널 몸체(100a)가 제조될 수 있다. 본 실시예에서 상기 채널 몸체(100a)는 전술한 기저면(110a)과 양측 벽면(110c, 110d)을 가지며, 상기 기저면(110a)에는 상기 기둥 몸체(121)들이 일체로 성형된 형상이다.
- [0062] 그리고 상기 몰드(20)에는 상기 미세유체 칩의 기둥 몸체(121)들과 채널 몸체(100a)에 대응되는 패턴(P)이 형성되는데, 상기 패턴(P)은 실리콘 웨이퍼(10)상에서 리소그래피(Lithography) 기술로 제조될 수 있다.
- [0063] 예를 들면, 실리콘 웨이퍼(10)에 포토레지스터를 코팅하고 소프트리소그래피(Soft Lithography)를 이용하여 상기 실리콘 웨이퍼(10)상에 패턴(P)을 형성하면 상기 채널 몸체(110a)의 성형을 위한 몰드(20)가 제작될 수 있고, 상기 몰드(20)에 PDMS를 붓고 경화시키는 과정을 거쳐 상기 채널 몸체(110a)가 제조될 수 있다.
- [0064] 한편, 도 11 내지 도 13을 참조하면, 상기 미세유체 칩(100)은 상기 표적 세포(1)의 수득량이 증가될 수 있도록 유체 재공급장치(200)에 연결되어서 미세유체 분리시스템을 구성할 수도 있다.
- [0065] 상기 미세유체 분리시스템은, 전술한 실시예에서 설명된 미세유체 칩(100)과 상기 미세유체 칩(100)에 연결되어서 상기 미세유체 칩의 제2배출부(113)에서 배출되는 세포집단을 상기 미세유체 칩의 시료 주입부(111)에 재공급하는 유체 재공급장치(200)를 포함하여 구성된다.
- [0066] 즉, 상기 유체 재공급장치(200)는 상기 제2배출부(113)를 통해 배출되는 세포들을 다시 상기 미세유체 칩의 시료 주입부(111)로 공급해서 상기 미세유체 채널(1)의 내부에서 분리되지 못한 표적 세포의 재분리과정을 거치게 하는 장치로서, 이에 따라 표적 세포의 수득율이 향상될 수 있다.
- [0067] 보다 구체적으로 설명하면, 상기 유체 재공급장치의 일 실시예는, 상기 시스유체 주입부(114)와 연결되는 제1유체실(210)과, 상기 시료 주입부(111)와 연결되는 제2유체실(220)과, 상기 제1배출부(112)와 연결되는 제3유체실(230)과, 상기 제2배출부(113)와 연결되는 제4유체실(240)을 포함하여 구성된다.
- [0068] 상기 제1유체실(210)에 수용되는 유체는 상기 시스유체 주입부(114)로 공급되고, 상기 제2유체실(220)에 수용되는 유체는 상기 시료 주입부(111)로 공급되며, 상기 제3유체실(230)에는 상기 제1배출부(112)에서 배출되는 유체가 수용되고, 상기 제4유체실(240)에는 상기 제2배출부(113)에서 배출되는 유체가 수용된다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 상기 제1유체실(210)에 수용되는 유체는 시료유체(버퍼용액)이고, 상기 제2유체실(220)에 수용되는 유체는 표적 세포가 포함된 시료, 즉 표적 세포와 비표적 세포가 혼재된 세포집단이다. 그리고 상기 제3유체실(230)에는 상기 미세유체 채널(110)의 내부를 통과하면서 상기 기둥 어레이에 의해 분리된 세포(표적 세포)가 주입되고, 상기 제4유체실(240)에는 상기 제1배출부(112)를 통해 배출되는 유체를 제외한 나머지 유체(Waste Fluid, Waste Cells)가 주입된다.
- [0070] 이를 위하여, 상기 시스유체 주입부(114)와 상기 제1유체실(210)은 제1도관(251)을 통해 연결되고, 상기 시료 주입부(111)와 제2유체실(220)은 제2도관(252)을 통해 연결되며, 상기 제1배출부(112)와 제3유체실(230)은 제3도관(253)을 통해 연결되고, 상기 제2배출부(113)와 제4유체실(240)은 제4도관(254)을 통해 연결된다.
- [0071] 본 발명에서는 상기 표적 세포의 수득율(시료로 제공되는 세포집단에 포함된 표적 세포의 수와 본 발명에 의해 분리되는 표적 세포의 수에 대한 비율)을 높이기 위하여, 상기 제2배출부(113)를 통해 배출되는 유체, 보다 구체적으로는 상기 제4유체실(240)에 수용되는 세포집단이 상기 미세유체 채널 내에서 재분리과정을 거칠 수 있도록 구성된다.
- [0072] 본 실시예에 따르면, 상기 제4유체실(240)에 주입되는 유체는 상기 시료 주입부(111)로 공급되며, 이를 위하여 상기 제4유체실(240)에는 상기 제4유체실(240) 내부의 유체를 상기 시료 주입부(111)로 안내하기 위한 제5도관(255)이 연결된다.

- [0073] 더 나아가, 상기 제4유체실(240)에서 상기 미세유체 칩(100)으로 공급된 후에 상기 미세유체 채널(110)의 내부에서 분리과정을 거쳐서 상기 제2배출부(113)로 배출되는 유체는 상기 제2유체실(220)로 공급되고, 상기 제2유체실에서 다시 상기 시료 주입부(111)로 공급될 수도 있다. 이를 위하여, 상기 제2유체실(220)에는 상기 제2배출부(113)에서 배출되는 유체를 상기 제2유체실(220)로 안내하기 위한 제6도관(256)이 연결된다.
- [0074] 보다 구체적으로 설명하면, 상기 제4도관(254)은 체크밸브(261)에 의해 상기 제4유체실(240)에 연결되며, 상기 제5도관(255)의 일단은 상기 체크밸브(261)에 연결되고 타단은 상기 제2도관(252)에 연결된다. 그리고 상기 체크밸브(261)는 상기 제4도관(254)과 제5도관(255) 중 어느 하나를 선택적으로 개방해서 상기 제4유체실(240)과 개통시킨다.
- [0075] 그리고 상기 제2도관(252)은 별도의 체크밸브(262)에 의해 상기 제2유체실(220)에 연결되며, 상기 제6도관(256)의 일단은 상기 별도의 체크밸브(262)에 연결되고 타단은 상기 제4도관(254)에 연결되어서 상기 제4도관(254)과 연통된다.
- [0076] 그리고 상기 별도의 체크밸브(262)는 상기 제2도관(252)과 제6도관(256) 중 어느 하나를 선택적으로 개방해서 상기 제2유체실(220)을 선택적으로 연통시킨다.
- [0077] 이하에서는, 설명의 편의를 위하여, 상기 제2도관(252)에 설치되는 체크밸브(262)를 제1체크밸브라 칭하고, 상기 제4도관(254)에 설치되는 체크밸브(261)를 제2체크밸브라 칭하며, 도 12 및 도 13을 참조하여 본 발명에 따른 미세유체 분리시스템에 의한 표적 세포의 분리과정과 재분리과정을 설명한다.
- [0078] 먼저, 도 12를 참조하면, 상기 제1유체실(210)의 버퍼용액(시스유체)과 제2유체실(220)의 시료(세포집단)가 각각 제1도관(251)과 제2도관(252)을 통해 상기 시스유체 주입부(114)와 시료 주입부(111)로 공급된다.
- [0079] 상기 시스유체 주입부(114)로 투입되는 버퍼용액은 상기 미세유체 채널(110)의 상류에서 상기 세포집단(유동세포)의 양측에 합류되며, 상기 세포집단은 상기 미세유체 채널(110)의 내부에 구비되어 있는 기둥 라인(120L)들, 즉 기둥 어레이를 통과하게 되고, 이에 따라 상기 세포 집단에 포함되어 있는 표적 세포의 분리가 이루어진다. 이때 상기 제1체크밸브(262)는 상기 제2유체실(220)과 상기 제2도관(252)을 상호 개통시키고, 상기 제6도관(256)은 차단한다.
- [0080] 상기 기둥 어레이에 의해 분리되는 표적 세포는 상기 제1배출부(112)에 연결된 제3도관(253)을 통해 상기 제3유체실(230)로 제공되고, 상기 제2배출부(113)를 통해 배출되는 유체는 상기 제4도관(254)을 통해 상기 제4유체실(240)로 제공된다. 이때 상기 제2체크밸브(261)는 상기 제4유체실(240)과 제4도관(254)을 상호 개통시키고 상기 제5도관(255)은 차단한다.
- [0081] 다음으로, 상기 제2유체실(220)의 세포집단이 모두 상기 미세유체 칩(100)을 통과하게 되면, 상기 유체 재공급장치(200)는 상기 제4유체실(240)의 유체를 상기 시료 주입부(111)로 공급해서 추가적인 세포 분리과정이 수행될 수 있다.
- [0082] 도 13을 참조하면, 상기 제4유체실(240)의 유체가 상기 제5도관(255)을 통해 상기 시료 주입부(111)로 공급되는데, 보다 구체적으로는 상기 제5도관(255)과 제2도관(252)을 경유해서 상기 시료 주입부(111)로 공급된다.
- [0083] 그리고, 상기 제4유체실(240)에서 상기 시료 주입부(111)로 투입되는 유체는, 상기 미세유체 채널(110)의 내부에 구비되어 있는 기둥 라인(120L)들, 즉 기둥 어레이를 통과하게 되고, 이에 따라 상기 유체에 잔존하고 있는 표적 세포의 재분리과정이 이루어진다. 이때 상기 제2체크밸브(261)는 상기 제4유체실(240)과 상기 제5도관(255)을 상호 개통시키고, 상기 제4도관(254)과 상기 제4유체실(240)의 개통은 차단한다.
- [0084] 상기 기둥 어레이에 의해 추가적으로 분리되는 표적 세포는 상기 제1배출부(112)에 연결된 제3도관(253)을 통해 상기 제3유체실(230)로 제공되고, 상기 제2배출부(113)를 통해 배출되는 유체는 상기 제4도관(254)과 제6도관(256)을 통해 상기 제2유체실(220)로 제공된다. 이때 상기 제1체크밸브(262)는 상기 제2유체실(220)과 제6도관(256)을 상호 개통시키고 상기 제2도관(252)과 상기 제2유체실(220)의 개통은 차단한다.
- [0085] 본 발명에 따르면 상술한 표적 세포의 분리과정을 수회 반복함으로써 표적 세포의 수득율을 높일 수 있고, 상기 제3유체실(230)에 포집된 표적 세포의 순도가 향상될 수 있으므로, 세포의 개별적인 특성 분석이 가능하게 된다.
- [0086] 상기 유체 재공급장치는 후술되는 실험예의 정량 주사펌프로 구현될 수 있으며, 상기 제1유체실(210) 내지 제4유체실(240)은 주사기 타입으로 구현될 수 있다.

- [0087]
- [0088] 이하에서는 본 발명에 따른 미세유체 칩의 구체적인 실험예가 설명되나, 본 발명의 범위가 후술되는 실험예에 한정되지 않음은 당연한 것이다.
- [0089] [실험예]
- [0090] 실험을 위해서 유체(시료세포)를 흘려보내주는 정량 주사펌프 PHD2000(Havard Apparatus, USA)와 세포의 이동을 관측하기 위해 도립형광현미경 IX71 (Olympus, Japan)과 CCD 카메라(Casio, Japan)을 사용하였다. 세포의 이동을 관측하기 위해 미세유체 칩을 도립형광현미경 위에 고정하고, 상기 미세유체 칩의 시료 주입부(Sample Inlet)와 버퍼 주입부(시스유체 주입부, Buffer Inlet)와 제1배출부(Selected Cells Outlet)와 제2배출부(Waste Cells Outlet)에 튜브(제1도관 내지 제4도관)를 연결한 후에, 상기 튜브를 상기 주사펌프에 탑재되어 있는 주사기들(제1유체실 내지 제4유체실)과 연결해서 상기 미세유체 칩에 시료세포와 버퍼용액을 공급한다.
- [0091] 그리고 상기 미세유체 칩의 제작을 위한 도면은 상용화된 설계 프로그램인 CAD (Autodesk, USA)을 이용하여 도 14와 같이 작성되었다. 세포의 평균적인 크기가 10~11 μm 인 점을 감안하여 상기 기둥간 거리(G)가 세포 크기의 대략 2배인 20 μm 이고 행간 시프트 거리(d)가 5 μm 이며, 기둥들의 중심간 거리(λ)는 40 μm 인 구조의 미세유체 칩을 설계/제조하여 실험하였다.
- [0092] 시료 주입부(Sample Inlet)에 주입되는 시료, 즉 시료로 주입되는 세포집단을 미세유체 채널(세포 분리 채널)의 내부로 공급하기 위해 상기 기둥 어레이가 형성된 미세유체 채널의 상류에 연결되는 시료 채널은, 세포들이 잘 퍼지지 않도록 200 μm 의 폭을 가지며, 상기 시료 채널의 양측에 대칭되게 구비되어서 상기 미세유체 채널에 버퍼용액(시스유체)을 공급하는 버퍼 채널은 각각 500 μm 로 설계되었다.
- [0093] 또한, 상기 표적 세포가 배출되는 출구보다 비표적 세포가 배출되는 출구를 더 크게 하였다. 본 실험에서는 상기 표적 세포가 배출되는 출구의 폭을 300 μm 로 하고 상기 비표적 세포가 배출되는 출구의 폭을 1000 μm 로 하였다.
- [0094] 상술한 바와 같이 설계된 미세유체 칩은 소프트리소그래피를 이용하여 PDMS (Polydimethylsiloxane)를 이용하여 제작되었다. 보다 구체적으로 설명하면, CAD 도면을 이용하여 패턴 형성을 위한 포토마스크를 만들고, 4" 실리콘 웨이퍼에 감광제(Photo Resister, PR)를 코팅하고 리소그래피, 예를 들면 소프트리소그래피를 이용해서 몰드(Mold)를 제작한다. 그리고 상기 몰드에 PDMS를 붙고 90° C 오븐에서 40분 동안 처리하여 경화시키면, PDMS칩, 즉 상술한 미세유체 칩의 채널 몸체가 성형된다.
- [0095] 다음으로, 상기 몰드에서 상기 PDMS칩을 분리한 후, 펀치를 이용하여 기설정된 위치에 2mm의 지름의 구멍을 형성함으로써 유체의 주입을 위한 두 개의 입구(Buffer Inlet, Sample Inlet)와 유체의 배출을 위한 2개의 출구(Selected Cells Outlet, Waste Cells Outlet)가 만들어진다. 그리고 상기 PDMS칩에는 슬라이드 글라스가 부착되는데 본 실험예에서 상기 슬라이드 글라스가 상기 커버 몸체가 된다.
- [0096] 도 15에는 상술한 방법을 통해 제작된 미세유체 칩의 내부에 구비되어 있는 일부 영역의 기둥 어레이를 촬영한 현미경 이미지를 보여준다. 그리고 도 16은 미세유체 채널의 전체적인 현미경 이미지이다.
- [0097] HL-60 세포의 리간드인 Recombinant Human P-Selectin/CD62P은 R&D Systems(Minnesota, USA)에서 구입할 수 있다. P-selectin 용액의 농도는 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 제작을 하였다. 그리고 제작된 PDMS칩에 주사기를 이용하여 P-selectin 용액을 미세유체 채널에 주입하고 실온에서 3시간 동안 인큐베이션 시켰다. 그리고 3시간 후에 P-selectin 용액이 주입된 미세유체 채널의 내부를 1% 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin, BSA)으로 세척해준다. 실험의 대조군(비교예)으로는 상기 PDMS칩에 1% 소혈청알부민 (Bovine serum albumin, BSA)만으로 세척(리간드가 적용되지 않음)한 미세유체 칩을 준비하였다.
- [0098] HL-60(인간백혈구세포주) 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 그리고 세포의 배지(Media) 구성은 RPMI 1640(With L-glutamine, 25 mMHEPES)에 10% 우태아 혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)과 1% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin.Streptomycin, P/S)을 혼합한 형태로 되어있다. 상술한 배지에서 상기 HL-60 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지한 채 배양되었으며, 3일간 배양한 후 1:3으로 분주하였다. 실험에 사용된 HL-60 세포의 계대배양 횟수는 5에서 20회 사이로 하였다.
- [0099] 그리고, 본 실험에 사용되는 세포는 원심분리기를 이용하여 1300rpm의 속력으로 5분 동안 세포를 가라앉히고,

DPBS(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)로 섞어 세포 농도를 $10^5 \sim 10^6$ cells/mL로 유지하여 준비하였다. 또한 세포의 형광이미지를 얻기 위하여 상기 HL-60 세포에 2mM Ethidium Homodimer-1을 이용하여 HL-60 세포를 염색하고, 상용화된 코드인 Image J 프로그램(프리웨어)을 이용하여 상기 HL-60세포의 평균적인 직경을 측정하였다. 상기 HL-60세포의 평균적인 직경은 $10.678\mu\text{m}$ 로 나타났다.

[0100] 본 실험에서는 비표적 세포의 이동 방향 또는 이동 경로(대조군의 이동 방향/이동 경로)를 알아보기 위하여, 리간드가 적용되지 않은 환경, 즉 리간드가 코팅되지 않은 미세유체 채널의 내부 벽면과 기둥에 세포와의 상호작용을 막기 위한 1% BSA를 코팅한 후 HL-60세포가 이동하는 경로를 관찰하였으며, CCD 카메라를 이용하여 세포의 이동경로를 관찰한 결과 도 17과 같은 경로로 이동하는 것을 확인 할 수 있었다.

[0101] 보다 구체적으로 설명하면, 도 17의 왼쪽에서 유입되는 세포의 이동경로는 오른쪽 아랫방향 (+X, -Y 방향)으로 HL-60 세포가 편향되게 이동하는 것을 볼 수 있었다. 관찰된 HL-60 세포의 평균 이동각도는 -9.47° 로 나타났다. 도 17은 동일한 시간 간격으로 HL-60 세포의 이동경로를 촬영한 것이다. 도 17의 (a) 영역에서 HL-60 세포의 이동간격이 상대적으로 작으며, 이는 (a)지역에서 세포의 속력이 상대적으로 느린 것을 나타내며 그 이유는 X방향에 따르는 기둥과 기둥 사이에서 유체의 속도가 크게 감소되기 때문이다. 이때 상기 HL-60 세포의 주입속도는 $1000\mu\text{L}/\text{min}$ 으로 하였다.

[0102] 다음으로, 표적 세포의 이동방향(실험군의 이동 방향/이동 경로)을 알아보기 위하여 P-selectin 용액을 미세유체 채널의 내부 벽면과 기둥에 코팅한 후 다시 1% BSA로 코팅하고, 상술한 비표적 세포의 이동 방향에 대한 실험과 동일한 방법과 조건으로 HL-60 세포의 이동경로를 관찰하였다. 본 실험의 결과는 도 18과 같이 나타났으며, 도 18의 왼쪽에서 유입되는 HL-60 세포들은 기둥에 리간드가 코팅된 환경에서 전체적으로 오른쪽 위 방향 (+X, +Y 방향)으로 편향되게 이동하는 현상을 확인할 수 있었다.

[0103] 상기 리간드(P-selectin)가 코팅된 환경에서 HL-60 세포의 이동 각도는 5.97° 로 나타났으며, 이러한 결과는 대조군의 실험에서 나타난 세포이동 각도 및 방향과 차이가 있는 것을 볼 수 있다. 보다 자세한 세포의 이동 과정을 관측하기 위하여 촬영 프레임 간격을 줄여서 보다 많은 프레임을 이용하여 세포 이동을 분석하였다. 도 19를 참조하면, HL-60 세포가 기둥에서 롤링(Rolling)에 의해 이동하다가 기둥 가장자리에서 떨어진 후에 그 다음 라인의 기둥에 붙어 롤링하는 것을 볼 수 있으며, 이러한 과정들이 반복되어 HL-60 세포가 기둥이 배열된 사선 방향으로 이동하게 되는 것이다.

[0104] 그리고 상기 세포가 이동하는 경로의 각도 또한 MTrack J를 이용하여 평균이동각도를 측정하였다. 도 20은 대조군(비표적 세포)과 실험군(표적 세포)의 세포 이동 각도에 따른 세포의 수를 나타낸 그래프로써, 대조군과 실험군의 실험 결과에서 세포가 이동하는 경로의 차이가 있음을 알 수 있다. 세포의 평균 이동 각도를 측정한 결과 리간드가 적용된 미세유체 채널에서 세포들은 평균 1.5° 의 각도로 편향되게 이동하고 리간드가 적용되지 않은 미세유체 채널에서의 세포들은 평균 -3.1° 로 이동하는 것이 관찰되었다.

[0105] 상술한 실험에서 확인될 수 있듯이 본 발명에 따르면 비표적 세포와 표적 세포의 크기가 동일한 경우에 상기 표적 세포를 효과적으로 분리할 수 있으며, 기둥의 둘레를 따라 구르는 세포의 롤링 메카니즘을 보다 정확하게 분석할 수 있고, 더 나아가 순도가 높은 표적 세포의 수득이 가능하다.

[0106] 이상과 같이 본 발명에 따른 바람직한 실시 예를 살펴보았으며, 앞서 설명된 실시 예 이외에도 본 발명이 그 취지나 범주에서 벗어남이 없이 다른 특정 형태로 구체화 될 수 있다는 사실은 해당 기술에 통상의 지식을 가진 이들에게는 자명한 것이다.

[0107] 그러므로, 상술된 실시 예는 제한적인 것이 아니라 예시적인 것으로 여겨져야 하고, 이에 따라 본 발명은 상술한 설명에 한정되지 않고 첨부된 청구항의 범주 및 그 동등 범위 내에서 변경될 수도 있다.

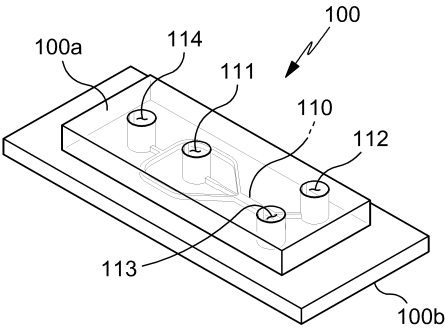
부호의 설명

[0108] 100: 미세유체 칩	110: 미세유체 채널
111: 시료 주입부	112: 제1배출부
113: 제2배출부	114: 시스유체 주입부
115: BSA 코팅층	120: 기둥
121: 기둥 몸체	122: 리간드

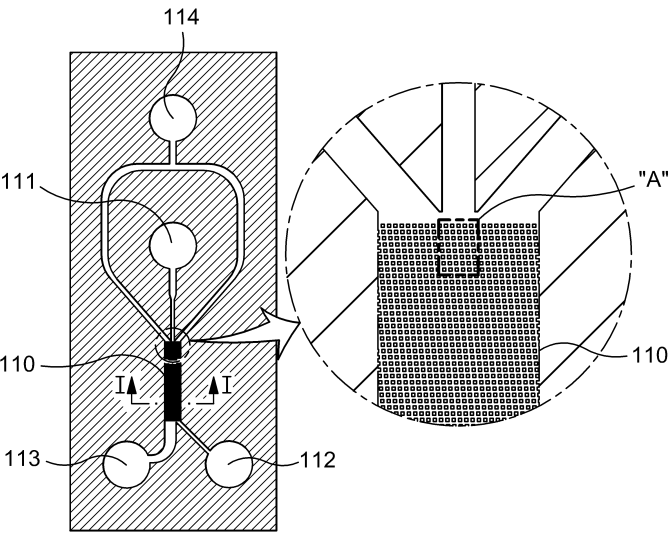
- 200: 유체 공급급장치
- 210: 제1유체실
- 220: 제2유체실
- 230: 제3유체실
- 240: 제4유체실

도면

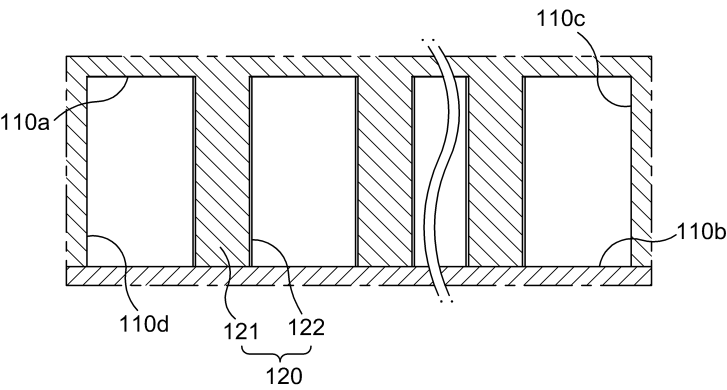
도면1



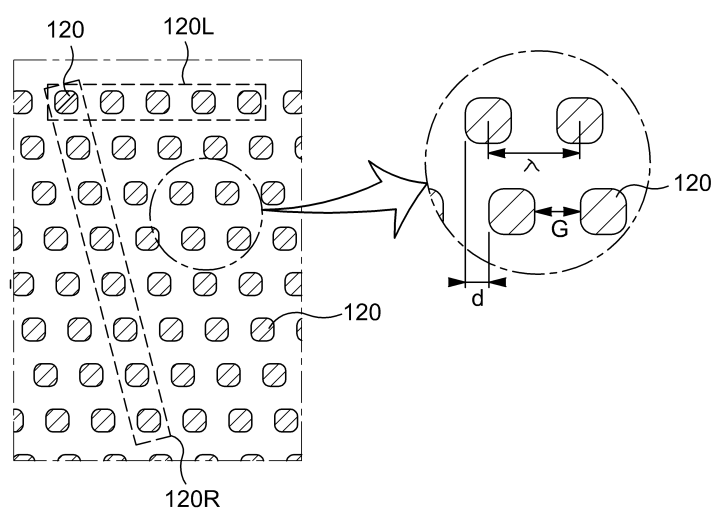
도면2



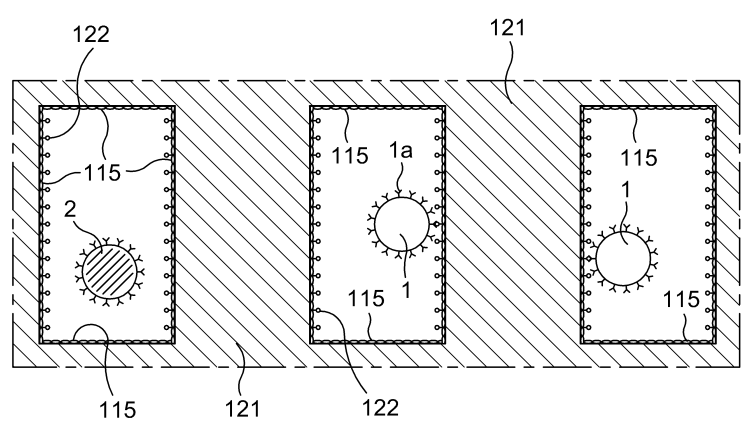
도면3



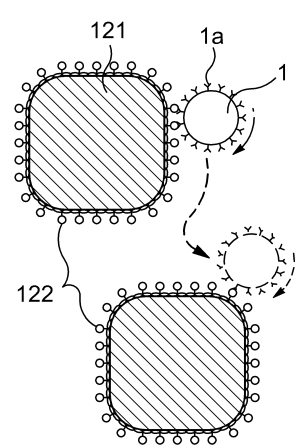
도면4



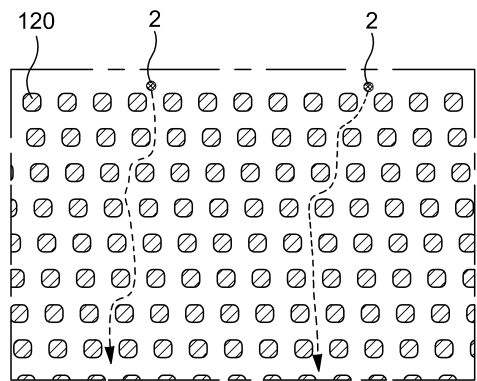
도면5a



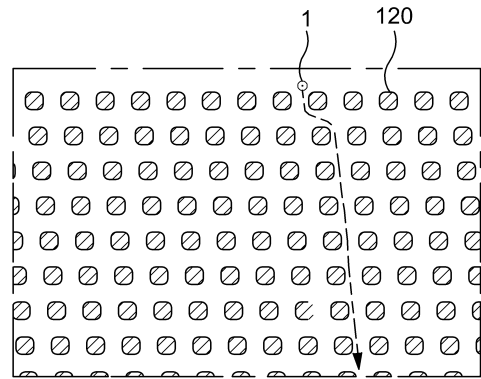
도면5b



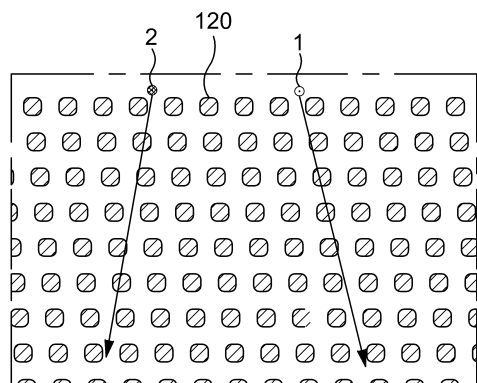
도면6



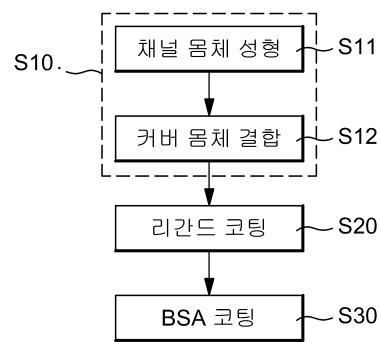
도면7



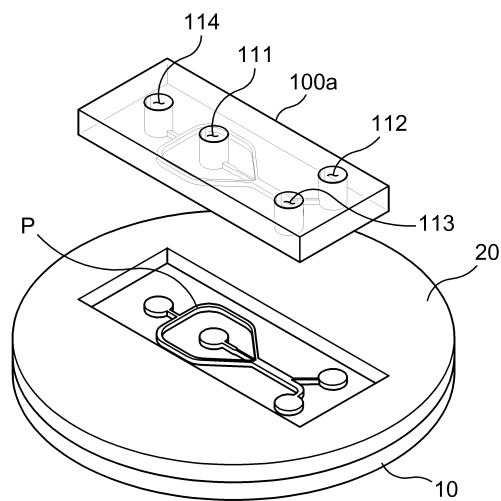
도면8



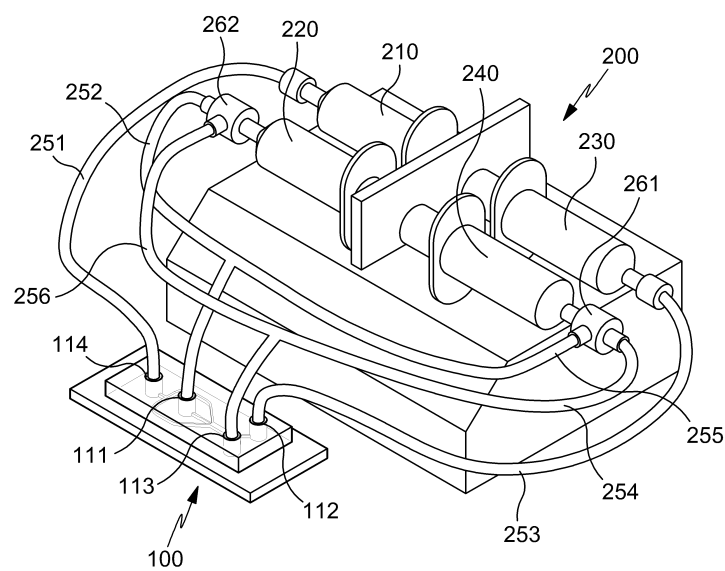
도면9



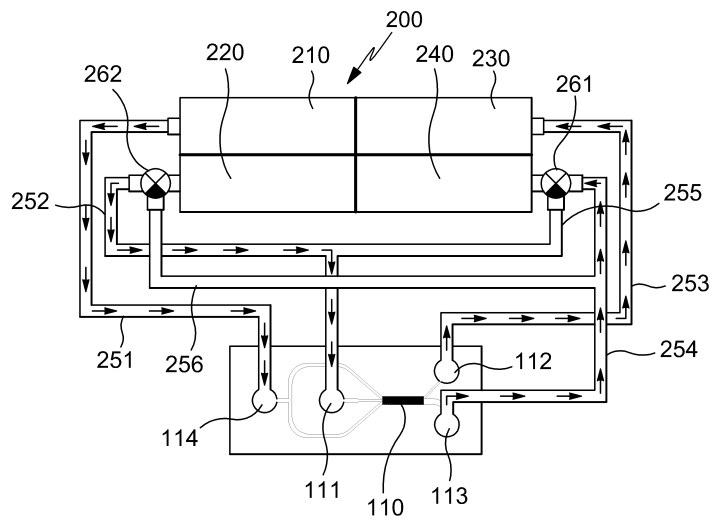
도면10



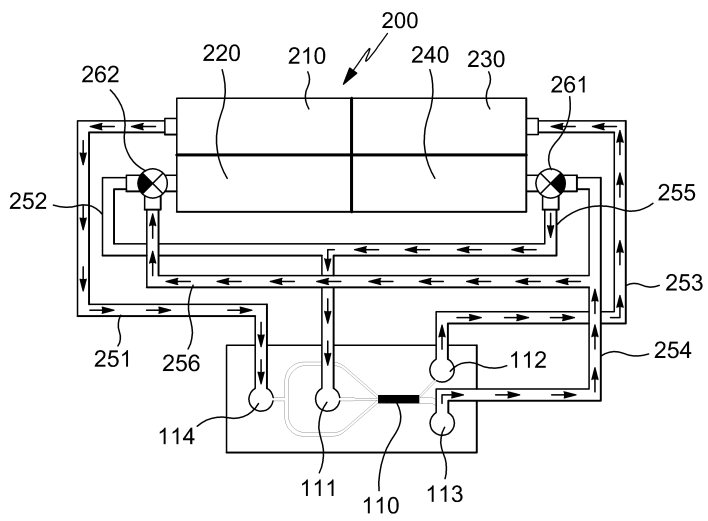
도면11



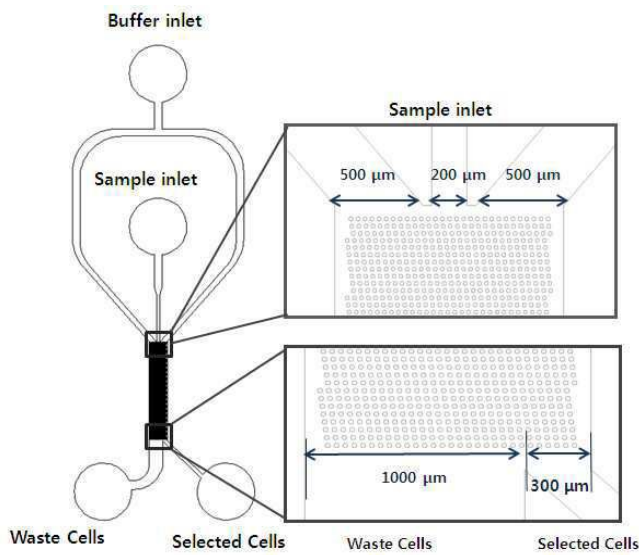
도면12



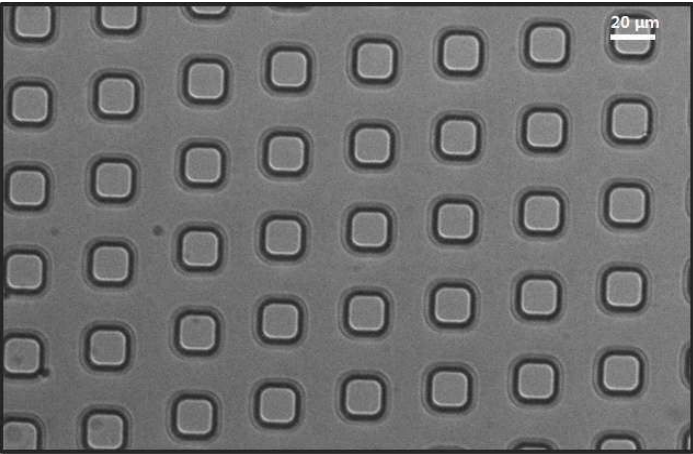
도면13



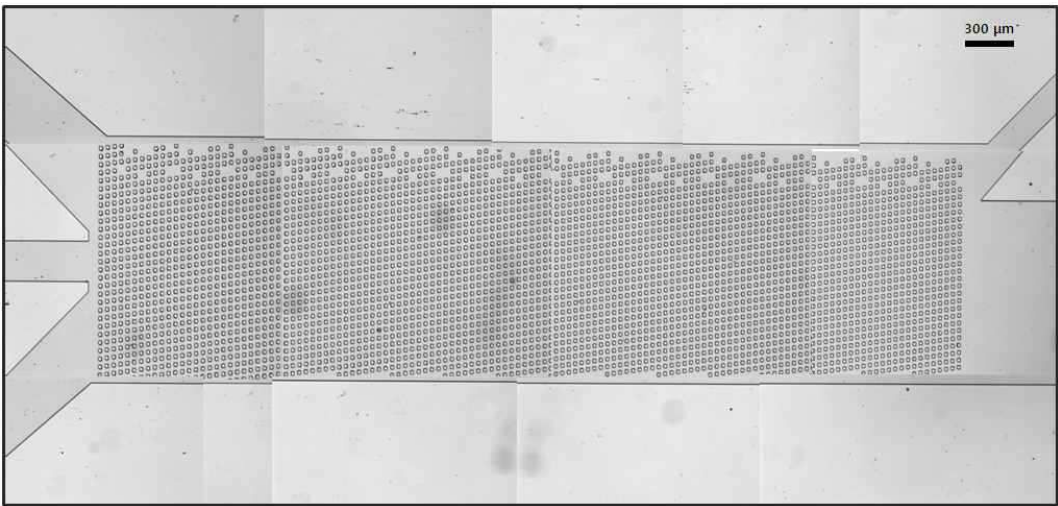
도면14



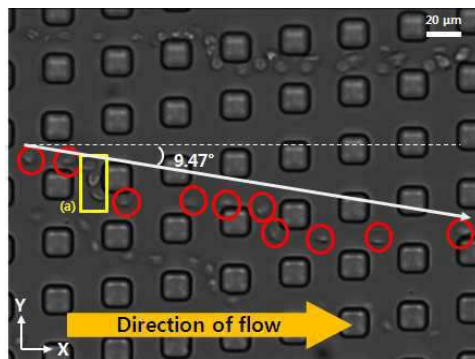
도면15



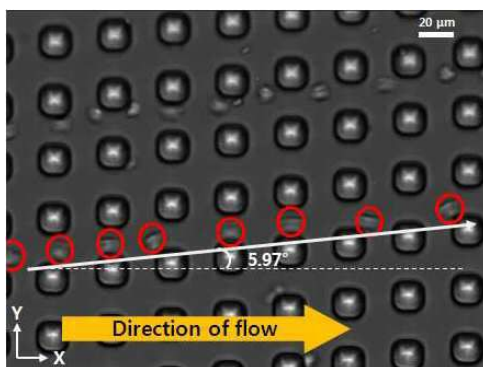
도면16



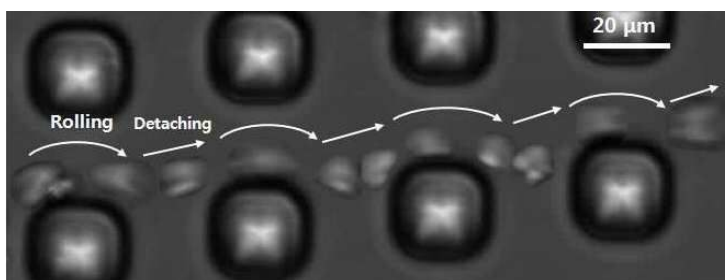
도면17



도면18



도면19



도면20

