(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0112441
(43) 공개일자 2014년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/34 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0029109
(22) 출원일자 2014년03월12일
심사청구일자 2014년03월12일
(30) 우선권주장
1020130026810 2013년03월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
신세현
서울특별시 서초구 방배로 270 신삼호아파트 바동 406호
한창수
서울특별시 노원구 중계로 184 107동 1202호
장대호
경기도 안산시 단원구 광덕동로 26 푸르지오1차 101동 606호
(74) 대리인
특허법인다나

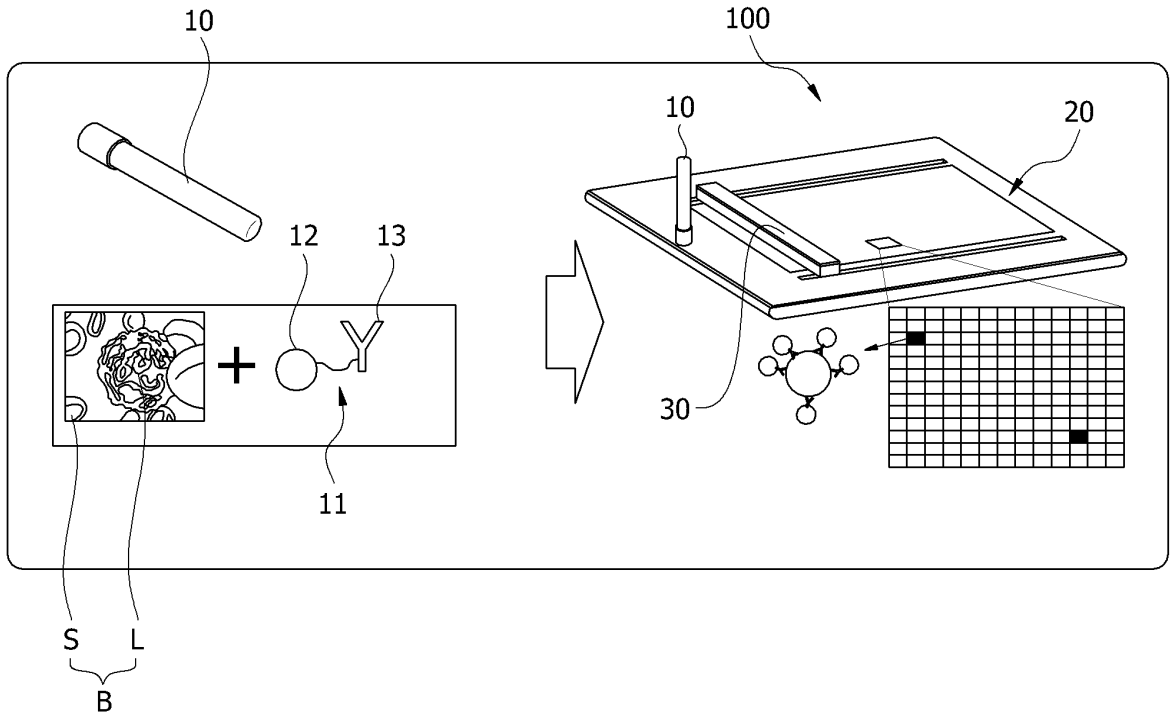
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치와 방법**

(57) 요 약

본 발명은 혈중 희소세포를 검출 및 계수하는 장치 및 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 장치는 혈액샘플 채혈관, 측정 키트 및 검출기 등으로 구성되며, 샘플 채혈관에서는 표적항체와 표지물질이 결합된 복합물질과 혈액이 분산 혼합되고, 측정키트에서는 혈액이 주입되어 개별 세포가 각각의 미세 트랩 구조물에 포획되며, 검출기에서는 항원-항체반응이 일어나 세포표면에 표지물질이 부착되어 빛을 발산하는 마이크로 트랩 구조물의 개수를 계수할 수 있다. 이와 같은 본 발명에 의하면, 임상현장에서 일반 혈액 검사를 통해 특정 희소 세포의 개수를 손쉽고 간편하게 검출 및 계수할 수 있으며, 다량의 샘플의 검사도 가능한 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

혈액 샘플을 채집하고, 표적항체와 표지물질이 결합된 복합물질을 수용하는 샘플 채집부;

혈액 샘플과 복합물질의 혼합물이 주입되도록 샘플 채집부와 연결되고, 혈중 세포를 개별적으로 포획(trapping)하는 측정 키트; 및

측정 키트에서 포획된 혈중 세포 중에서, 표적항체와 항원-항체반응이 발생한 희소 세포를 검출 및 계수하는 검출기를 포함하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

표적항체는 혈중 희소 세포를 특이적으로 인지하여 결합할 수 있는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

표지물질은 형광 물질; 양자점(Quantum Dot); 양자점이 집적되어 있는 마이크로 사이즈의 비드; 금속 나노입자 중에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

샘플 채집부에 채집된 혈액 샘플은 복합물질의 분산액과 교반되는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

측정 키트는 마이크로 크기의 간극을 가진 두 개의 평판을 구비함으로써, 모세관 현상에 의해 혈액 샘플을 이동시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 6

제5항에 있어서,

평판은 단단한 판형 구조 또는 유연한 필름형 구조로 제작될 수 있는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 7

제5항에 있어서,

측정 키트의 일단에는 혈액 샘플이 주입되는 주입구가 형성되며, 타단에는 외부와 연통하여 공기가 통과되는

개구부가 형성된 모세관이 구비되는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 8

제7항에 있어서,

모세관의 개구부에는 유동 구동 메커니즘이 연결되어 혈액 샘플을 측정 키트에 주입 및 유동시키는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 9

제5항에 있어서,

두 개의 평판 중 적어도 하나에는 혈중 세포가 개별적으로 포획되도록 요철부가 구비되는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수장치.

청구항 10

제9항에 있어서,

요철부에는 계단 형태의 단차가 형성되어 작은 세포가 하부에 포획되고, 큰 세포가 그 상부에 포획되는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 11

제3항에 있어서,

검출기는 형광물질, 양자점, 양자점이 집적되어 있는 마이크로 사이즈의 비드 중 1종 이상을 여기시킬 수 있는 광원; 여기된 형광을 측정하는 이미지 센서; 특정 파장대의 광을 통과시키는 형광필터를 구비함으로써, 광을 발산하는 혈중 세포의 위치와 개수를 검출하는 형광 스캔장치인 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 12

제11항에 있어서,

광원은 머큐리 램프, 레이저 다이오드(LD), 레이저 발광 다이오드(LED) 중에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 13

제11항에 있어서,

이미지 센서는 포토 다이오드 어레이, CCD(Charge Coupled Device) 어레이, CMOS(Complementary Metal Oxide Semiconductor) 어레이 중에서 선택되는 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 14

제11항에 있어서,

이미지 센서에는 줌(Zoom) 렌즈가 장착되어 광학적으로 확대된 이미지를 획득할 수 있는 것을 특징으로 하는

혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 15

제11항에 있어서,

광원과 이미지 센서는 연속으로 결합되어 있는 형태로 설치되는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 16

제3항에 있어서,

검출기는 금속 나노입자의 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance) 현상을 발생시킬 수 있는 광학장치, 마이크로 크기의 프리즘 어레이(Prism Array), 나노 크기의 그레이팅 어레이(Grating Array) 중에서 선택되는 1종 이상을 구비함으로써, 표면 플라즈몬 공명 현상이 발생되는 혈중 세포의 위치와 개수를 검출하는 표면 플라즈몬 공명 이미징 스캔 장치인 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 17

제16항에 있어서,

표면 플라즈몬 공명 이미징 스캔 장치는 평행광을 측정 키트로 입사시키는 광원; 및 측정 키트로부터 반사되는 광을 측정하는 카메라를 구비하는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 18

제16항에 있어서,

측정 키트는 마이크로 크기의 프리즘 어레이 또는 나노 크기의 그레이팅 어레이와 일체화되어 있는 것을 특징으로 하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 19

제1항에 있어서,

검출기에 연결되고, 측정 키트의 스캐닝을 위해 검출기의 이동을 안내하는 이동 레일;

검출 후 샘플 채취를 위한 이동형 채집 장치; 및

이동형 채집 장치에 연결되고, 이동형 채집 장치의 이동을 안내하는 2축 이동 레일을 추가로 포함하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치.

청구항 20

제1항의 장치를 이용하고,

샘플 채집부로 혈액 샘플을 채집하는 단계;

채집된 혈액 샘플을 표적항체와 표지물질이 결합된 복합물질과 혼합되도록 교반하는 단계;

혈액 샘플과 복합물의 혼합물을 측정 키트에 주입하여 혈중 세포를 개별적으로 포획하는 단계; 및

측정 키트에서 포획된 혈중 세포 중에서, 표적항체와 항원-항체반응이 발생한 희소 세포를 검출기를 이용하여

검출 및 계수하는 단계를 포함하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈액 내 존재하는 희소 세포를 검출하고 계수하는 장치 및 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 순환혈관 내피세포(CEC)와 같은 혈중 희소세포를 간단한 표적항체와 표지물질이 결합된 복합물질 그리고 마이크로 간극의 평판을 이용하여 희소세포를 검출하고 계수하는 장치 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 혈액 내부에는 적혈구, 백혈구, 혈소판과 같이 기존에 알려진 혈구 들에 비하여 개체수가 매우 적지만, 질환의 전이에 중요한 역할을 하거나 바이오 마커로 사용할 수 있는 극소수의 세포가 존재하는 것으로 알려져 있는데, 이를 희소 세포 (Rare cells)라고 한다.

[0003] 대표적인 희소세포로는 CTC(Circulating Tumor Cell, 혈중 암세포)가 있으며, 수십억 개의 혈구 세포 중 한두 개가 존재하는 것으로 알려져 있다. CTC가 많을 경우, 암을 보유하고 있는 것으로 판정할 수 있는 매우 결정적인 단서를 혈액 검사에서 진단할 수 있기 때문에, 이에 대한 혈액검사 방법이 다양하게 개발되고 있다.

[0004] 최근에는 CEC(Circulating Endothelial Cell, 혈중 혈관내피세포)가 심장 마비 등과 같은 심혈관 질환의 조기 진단에 바이오마커로 사용될 수 있다는 임상논문 및 관련 기술들이 보고됨에 따라, CTC 유사 또는 관련 기술이 급격히 발달하고 있는 추세이다.

[0005] 실례로, 2012년도 3월 Science Translational Medicine에 발표된 "Characterization of circulating endothelial cells in acute myocardial infarction"에 따르면, 심장혈관 질환군이 건강군에 비하여 CEC를 5배 정도 많은 수량으로 가진다고 밝혀졌고, 이러한 CEC 수가 일정 수 이상으로 많아지면, 2주 이내 심장마비 등과 같은 질환이 올 수 있음을 사전에 조기 진단할 수도 있다고 보고하였다.

[0006] CTC 또는 CEC 등과 같은 세포의 특징은 혈중에 존재하기는 하나, 그 수량이 매우 극소량이어서 일반 기술로는 분리 또는 검출하기가 매우 어렵지만, 암과 심혈관 질환과 같은 인류사망 원인의 핵심 질환 두 개가 모두 관여하고 있는 희소세포라는 점에서 매우 중요한 희소세포인 것이다. 검출 기술은 어려울 수 있지만, 환자의 입장에서는 소량의 혈액(7.5 ml)만을 제공하면, 암 검사 및 심혈관 질환의 검사를 받을 수 있다는 점에서, 매우 혁신적이고 시장이 기다리는 기술이기도 하다.

[0007] 현재 알려진 CTC 또는 CEC 검출방법은 매우 높은 선택도(selectivity)를 갖는 항원-항체 반응을 이용하여 희소세포를 검출하는 방법이다. 즉, 특정 희소세포의 항원에 반응하여 부착할 수 있는 항체를 자성을 띠는 나노입자의 표면에 코팅하고 이를 혈액 샘플과 혼합 교반하면, 혈액 내 존재하는 특정 희소세포에 나노입자가 부착되며, 이를 자력을 이용하여 강하게 고정시킨 후, 나머지 세포를 씻어내면 특정 희소세포만을 분리할 수 있게 된다. 이렇게 분리된 희소세포는 검증을 위하여 염색(Staining) 기법을 이용해서 현미경 등을 통하여 확인할 수 있으며, 개별적인 세포 개체수를 계수할 수 있다.

[0008] 그러나, 이러한 종래의 방법들은 전처리 및 후처리 등의 별도 공정을 요구하고 있으며, 이러한 공정에 매우 오랜 시간이 소요되는 불편함이 있다. 또한, 이러한 공정을 다루기 위해서는 숙련된 검사자가 반드시 필요하다는 점 등으로 인하여, 임상 현장에서 사용하기란 매우 어려운 형편이다. 따라서, 임상현장에서 실시간으로 사용할 수 있도록 검사가 좀 더 간편하고 빠르며, 의료인이 쉽게 검사할 수 있도록 정량화되고 객관화된 측정 장치와 방법이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 상술한 바와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 일정량의 혈액으로부터 극소수로 존재하는 희소세포를 신속하고 정확하게 검출 및 계수할 수 있는 장치와 방법을 제공하는 것이

다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 상술한 목적을 달성하기 위해, 혈액 샘플을 채집하고, 표적항체와 표지물질이 결합된 복합물질을 수용하는 샘플 채집부; 혈액 샘플과 복합물질의 혼합물이 주입되도록 샘플 채집부와 연결되고, 혈중 세포를 개별적으로 포획(trapping)하는 측정 키트; 및 측정 키트에서 포획된 혈중 세포 중에서, 표적항체와 항원-항체반응이 발생한 희소 세포를 검출 및 계수하는 검출기를 포함하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명에서 표적항체는 혈중 희소 세포를 특이적으로 인지하여 결합할 수 있다.

[0012] 본 발명에서 표지물질은 형광 물질; 양자점(Quantum Dot); 양자점이 집적되어 있는 마이크로 사이즈의 비드; 금속 나노입자 중에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명에서 샘플 채집부에 채집된 혈액 샘플은 복합물질의 분산액과 교반될 수 있다.

[0014] 본 발명에서 측정 키트는 마이크로 크기의 간극을 가진 두 개의 평판을 구비함으로써, 모세관 현상에 의해 혈액 샘플을 이동시킬 수 있다.

[0015] 본 발명에서 평판은 단단한 판형 구조 또는 유연한 필름형 구조로 제작될 수 있다.

[0016] 본 발명에서 측정 키트의 일단에는 혈액 샘플이 주입되는 주입구가 형성되며, 타단에는 외부와 연통하여 공기가 통과되는 개구부가 형성된 모세관이 구비될 수 있다.

[0017] 본 발명에서 모세관의 개구부에는 유동 구동 메커니즘이 연결되어 혈액 샘플을 측정 키트에 주입 및 유동시킬 수 있다.

[0018] 본 발명에서 두 개의 평판 중 적어도 하나에는 혈중 세포가 개별적으로 포획되도록 요철부가 구비될 수 있다.

[0019] 본 발명에서 요철부에는 계단 형태의 단차가 형성되어 작은 세포가 하부에 포획되고, 큰 세포가 그 상부에 포획될 수 있다.

[0020] 본 발명에서 검출기는 형광물질, 양자점, 양자점이 집적되어 있는 마이크로 사이즈의 비드 중 1종 이상을 여기시킬 수 있는 광원; 여기된 형광을 측정하는 이미지 센서; 특정 파장대의 광을 통과시키는 형광필터를 구비함으로써, 광을 발산하는 혈중 세포의 위치와 개수를 검출하는 형광 스캔장치일 수 있다.

[0021] 본 발명에서 광원은 머큐리 램프, 레이저 다이오드(LD), 레이저 발광 다이오드(LED) 중에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명에서 이미지 센서는 포토 다이오드 어레이, CCD(Charge Coupled Device) 어레이, CMOS(Complementary Metal Oxide Semiconductor) 어레이 중에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명에서 이미지 센서에는 줌(Zoom) 렌즈가 장착되어 광학적으로 확대된 이미지를 획득할 수 있다.

[0024] 본 발명에서 광원과 이미지 센서는 연속으로 결합되어 있는 형태로 설치될 수 있다.

[0025] 본 발명에서 검출기는 금속 나노입자의 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance) 현상을 발생시킬 수 있는 광학장치, 마이크로 크기의 프리즘 어레이(Prism Array), 나노 크기의 그레이팅 어레이(Grating Array) 중에서 선택되는 1종 이상을 구비함으로써, 표면 플라즈몬 공명 현상이 발생되는 혈중 세포의 위치와 개수를 검출하는 표면 플라즈몬 공명 이미징 스캔 장치일 수 있다.

[0026] 본 발명에서 표면 플라즈몬 공명 이미징 스캔 장치는 평행광을 측정 키트로 입사시키는 광원; 및 측정 키트로부터 반사되는 광을 측정하는 카메라를 구비할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 측정 키트는 마이크로 크기의 프리즘 어레이 또는 나노 크기의 그레이팅 어레이와 일체화될 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 장치는 검출기에 연결되고, 측정 키트의 스캐닝을 위해 검출기의 이동을 안내하는 이동 레일; 검출 후 샘플 채취를 위한 이동형 채집 장치; 및 이동형 채집 장치에 연결되고, 이동형 채집 장치의 이동을 안내하는 2축 이동 레일을 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 상술한 장치를 이용하고, 샘플 채집부로 혈액 샘플을 채집하는 단계; 채집된 혈액 샘플을 표적항체와 표지물질이 결합된 복합물질과 혼합되도록 교반하는 단계; 혈액 샘플과 복합물의 혼합물을 측정 키트에 주입하여 혈중 세포를 개별적으로 포획하는 단계; 및 측정 키트에서 포획된 혈중 세포 중에서, 표적항체와 항원-항체반응이 발생한 희소 세포를 검출기를 이용하여 검출 및 계수하는 단계를 포함하는 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0030] 본 발명에 따르면, 일회용으로 사용이 가능한 혈액 채혈관에서 표적항체와 표지물질이 결합된 복합물질 및 혈액이 혼합된 후, 측정 키트 평판에 주입되면서 발광하는 마이크로 트랩의 개수를 검사함으로써, 빠르고 쉽고 간편하게 희소세포를 검출 및 계수할 수 있을 뿐 아니라, 일반 의료인이 간단한 작동법으로도 객관화되고 표준화된 검출 및 계수가 가능하다. 특히 하나의 검사에 소요되는 시간이 짧아 대량의 검사도 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명에 따른 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치와 방법을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 측정 키트의 평면도이다.

도 3은 본 발명에 따라 요철구조를 갖는 측정 키트에서 세포가 포획되는 메커니즘을 나타낸 단면도이다.

도 4는 본 발명에 따라 계단 형태의 요철구조를 갖는 측정 키트에서 세포가 포획되는 메커니즘을 나타낸 단면도이다.

도 5는 본 발명에 따른 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치의 평면도이다.

도 6은 본 발명에 따른 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치의 정면도이다.

도 7은 본 발명에 따른 검출기 중 형광 스캔 장치의 구성도이다.

도 8은 본 발명에 따른 검출기 중 표면 플라즈몬 공명 이미징 스캔 장치의 구성도이다.

도 9는 본 발명에 따른 표면 플라즈몬 공명 이미징 방법에 사용되는 마이크로 크기의 프리즘 어레이 또는 나노 크기의 그레이팅 어레이가 측정 키트와 일체화된 것을 도시한 사시도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 첨부 도면을 참조하여 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0033] 도 1은 본 발명에 따른 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치와 방법을 개략적으로 나타낸 것으로, 본 발명에 따른 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치(100)는 희소세포 진단 시스템으로서, 샘플 채집부(10), 측정 키트(20), 검출기(30) 등을 구비할 수 있다.

[0034] 샘플 채집부(10)는 혈액 샘플을 채집하고, 또한 복합물질(11)을 수용하는 역할을 한다. 즉, 혈액 샘플이 로딩되는 곳이다.

[0035] 샘플 채집부(10)는 관 형태로 이루어질 수 있고, 마개를 구비할 수 있다. 바람직하게는, 샘플 채집부(10)는 일반적으로 널리 사용되는 7.5 ml 부피의 혈액 채혈관의 구조를 가질 수 있다.

[0036] 혈액 샘플은 다수의 혈중 세포(B)를 포함하고, 혈중 세포(B)는 크게 구분하여 적혈구 등의 작은 세포(S) 그리고 백혈구와 희소세포 등의 큰 세포(L)를 포함할 수 있다.

[0037] 복합물질(11)은 표지물질(12)과 표적항체(13)가 결합된 형태일 수 있다. 표지물질(12)과 표적항체(13)는 링커(Lingker)를 통해 화학적으로 결합되거나, 물리적으로 결합될 수 있다. 링커로는 특별히 제한되지 않고 통상적인 링커를 사용할 수 있으며, 예를 들어 펩티드 링커, 히드라진 링커, 디설파이드 링커 등을 사용할 수 있다.

[0038] 복합물질(11)은 복합물질(11)을 포함하는 용액, 바람직하게는 복합물질(11)이 분산매에 분산되어 있는 분산액 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 복합물질 분산액은 복합물질(11) 등의 분산질, 물 등의 분산매, 계면활성

제 등의 분산제 등을 포함할 수 있다.

[0039] 표지물질(12)로는 1) 형광물질, 2) 양자점, 3) 양자점이 집적되어 있는 마이크로 사이즈의 비드(Bead), 4) 금속 나노입자 중에서 1종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.

[0040] 형광물질로는 특별히 제한되지 않고 통상적인 형광물질을 사용할 수 있으며, 예를 들어 플루오레세인(fluorescein), 이소티오시아네이트(isothiocyanate), 로다민(rhodamine), 피코에리트린(phycoerythrin), 피코시아닌(phycocyanin), 알로피코시아닌(allophycocyanin), 프탈데히드(phthaldehyde), 플루오레스사민(fluorescamine) 등을 사용할 수 있다. 형광물질의 크기는 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 1 내지 900 nm, 바람직하게는 10 내지 500 nm, 더욱 바람직하게는 30 내지 300 nm일 수 있다.

[0041] 양자점은 중심입자와 이 중심입자의 표면에 결합된 리간드를 포함할 수 있다. 중심입자를 형성하는 물질의 예로서는, CdS, CdSe, CdTe, ZnS, ZnSe, ZnTe, HgS, HgSe, HgTe과 같은 II-VI족 화합물 반도체 나노결정, GaN, GaP, GaAs, InP, InAs와 같은 III-V족 화합물 반도체 나노결정 또는 이들의 혼합물 등을 들 수 있다. 중심입자는 코어/쉘 구조를 가질 수 있고, 중심입자의 코어 및 쉘(Shell) 각각은 위에서 예시한 화합물들을 포함할 수 있다. 예시한 화합물들은 각각 단독으로 또는 2 이상이 조합되어 코어나 쉘에 포함될 수 있다. 예를 들어, 중심입자는 CdSe를 포함하는 코어 및 ZnS를 포함하는 쉘을 갖는 CdSe-ZnS(코어/쉘) 구조를 가질 수 있다. 리간드는 서로 인접한 중심입자들이 쉽게 서로 응집되어 소광되는 것을 방지할 수 있다. 또한, 리간드는 중심입자와 결합하여 중심입자가 소수성을 갖도록 할 수 있다. 리간드의 예로서는, 탄소수 6 내지 30의 알킬기를 갖는 아민계 화합물이나 카르복시산 화합물 등을 들 수 있다. 리간드의 또 다른 예로서, 탄소수 6 내지 30의 알케닐기를 갖는 아민계 화합물이나 카르복시산 화합물 등을 들 수 있다. 양자점의 크기는 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 1 내지 900 nm, 바람직하게는 10 내지 500 nm, 더욱 바람직하게는 30 내지 300 nm일 수 있다.

[0042] 양자점이 집적되어 있는 마이크로 사이즈의 비드는 다수의 양자점이 집적된 양자점 집적체를 둘러싸는 캡슐 구조일 수 있다. 캡슐은 젤라틴, 셀룰로오스계 화합물 등을 사용하여 제조할 수 있다. 마이크로 비드의 크기는 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 0.1 내지 900 ㎛, 바람직하게는 0.5 내지 500 ㎛, 더욱 바람직하게는 1 내지 100 ㎛일 수 있다.

[0043] 금속 나노입자를 구성하는 금속으로는 특별히 제한되지 않고 통상적인 금속을 모두 사용할 수 있으며, 예를 들어 금, 은, 동, 철, 백금, 텅스텐, 티타늄, 주석, 니켈, 크롬, 코발트, 아연, 이리듐 등을 사용할 수 있다. 또한, 금속 산화물이나 금속 염 등을 사용하거나, 합금을 사용할 수도 있다. 금속 나노입자의 크기는 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 1 내지 900 nm, 바람직하게는 10 내지 500 nm, 더욱 바람직하게는 30 내지 300 nm일 수 있다.

[0044] 표적항체(13)로는 CTC, CEC 등과 같은 혈중 희소 세포를 특이적으로 인지하여 결합할 수 있는 항체를 사용할 수 있다. 예를 들어, Anti-EpCAM 항체를 사용할 수 있다.

[0045] 샘플 채집부(10)에 일정량의 혈액 샘플이 채집된 후, 혈액 샘플은 내부에 있는 복합물질 분산액과 혼합되도록 교반될 수 있다. 교반은 손으로 흔드는 수동적인 방법으로 수행할 수 있고, 또한 교반기 등을 이용하는 자동적인 방법으로 수행할 수도 있다. 혈액 샘플과 복합물질 분산액의 혼합 순서는 특별히 제한되지 않으며, 샘플 채집부(10)에 혈액 샘플을 먼저 넣거나, 복합물질 분산액을 먼저 넣을 수도 있다. 교반 과정에서 특정 혈중 희소세포가 존재한다면, 그 세포막 주변에 항원-항체 반응을 통하여 표지물질(12)과 표적항체(13)이 결합된 복합물질(11)이 다량으로 부착될 수 있다.

[0046] 도 1의 우측 하부를 보면, 세포 계수(Cell Counting)를 위한 스캐닝 이미지가 예시되어 있는데, 여기서 다수의 격자 중 흑색 부위는 복합물질이 결합되어 있는 하이브리드 희소세포(Hybridized RC)를 나타낸 것이다.

[0047] 도 2는 본 발명에 따른 측정 키트의 평면도로서, 측정 키트(20)는 평판(21, 22), 주입구(23), 모세관(24), 요철구조(25, 26, 27, 28) 등을 구비할 수 있다.

[0048] 측정 키트(20)는 혈중 세포를 개별적으로 포획(trapping)하는 역할을 한다. 측정 키트(20)는 혈액 샘플과 복합물질(11)의 혼합물이 주입되도록 샘플 채집부(10)와 연결될 수 있다. 이를 위해, 측정 키트(20)의 일단에는 혈액 샘플이 주입되는 주입구(23)가 형성될 수 있다. 주입구(23)는 예를 들어 바늘(Needle) 형태로 구성되거나, 바늘 구조를 포함할 수 있다. 예를 들어, 샘플 채집부(10)를 거꾸로 세운 후에, 샘플 채집부(10)의 마개를 바늘 형태의 주입구(23) 또는 주입구(23)의 바늘 구조에 꽂으면, 샘플 채집부(10)와 측정 키트(20)가 연결

되면서, 샘플 채집부(10)에서 교반된 혈액 샘플과 복합물질의 혼합물이 측정 키트(20)에 주입될 수 있다.

[0049] 측정 키트(20)는 세포 스프레딩(Cell Spreading)을 위한 마이크로 유동 시트(Microfluidic Sheet)로 구성될 수 있다. 바람직하게는, 측정 키트(20)는 마이크로 크기의 간극을 가진 두 개의 평판(21, 22)을 구비함으로써, 모세관 현상에 의해 혈액 샘플을 이동시킬 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니고, 측정 키트(20)는 하나의 평판으로 구성될 수도 있으며, 또한 3개 이상의 평판으로 구성될 수도 있다. 두 평판(21, 22) 사이의 간극은 예를 들어 1 내지 500 ㎛, 바람직하게는 5 내지 100 ㎛, 더욱 바람직하게는 10 내지 50 ㎛일 수 있다.

[0050] 평판(21, 22)은 단단한 판형 구조 또는 유연한 필름형 구조로 제작될 수 있다. 평판(21, 22)은 금속, 플라스틱, 유리, 세라믹 등으로 이루어질 수 있으며, 검출이 용이하도록 바람직하게는 투명하게 제작할 수 있다. 평판(21, 22)의 두께는 예를 들어 1 ㎛ 내지 10 ㎜, 바람직하게는 10 ㎛ 내지 5 ㎜, 더욱 바람직하게는 50 ㎛ 내지 3 ㎜일 수 있다.

[0051] 두 평판(21, 22)이 일정한 간격을 두고 평행하게 배치되면, 두 평판(21, 22) 사이의 테두리 부분, 즉 두 평판(21, 22) 사이의 좌우 측면 및 전후면은 개방될 수 있는데, 이 개방 부분은 밀봉재료 등을 이용하여 밀봉될 수 있다. 또한, 개방 부위 없이 측정 키트(20)를 매우 얇은 육면체 형태의 일체화된 구조물로 제작할 수도 있다. 물론, 주입구(23) 및 모세관(24)은 별도로 형성할 수 있다.

[0052] 모세관(24)은 측정 키트(20)의 두 평판(21, 22) 사이에서 혈액 샘플과 복합물질의 혼합물이 잘 흐르도록 하는 역할을 할 수 있다. 이를 위해, 모세관(24)은 측정 키트(20)의 타단, 예를 들어 주입구(23)의 반대편에 형성될 수 있다. 모세관(24)은 외부와 연통하여 공기가 통과되는 개구부를 구비할 수 있다. 개구부는 예를 들어 모세관(24)의 말단에 형성될 수 있다. 모세관(24)의 직경은 바람직하게는 공기만 통과할 수 있도록, 예를 들어 0.01 내지 100 ㎛, 바람직하게는 0.1 내지 50 ㎛, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 20 ㎛일 수 있다.

[0053] 모세관(24)의 말단 개구부에는 유동 구동 메커니즘이 연결되어 혈액 샘플을 적당한 속도로 측정 키트(20)에 주입시킬 수 있고, 또한 혈액 샘플을 측정 키트(20) 내부에서 유동시킬 수 있다. 유동 구동 메커니즘은 예를 들어 진공펌프를 포함할 수 있다. 예를 들어, 진공펌프를 이용하여 측정 키트(20) 내부에 진공을 가했다가 정지했다가 하면, 혈액 샘플 유동이 전진했다가 후진(역류)할 수 있어 전체적으로 혈액 샘플이 골고루 퍼지는 효과를 가져올 수 있다. 또한, 진공펌프의 압력을 조절함으로써, 혈액 샘플의 주입 속도 및 유동 속도를 조절할 수 있다.

[0054] 도 3은 본 발명에 따라 요철구조를 갖는 측정 키트에서 세포가 포획되는 메커니즘을 나타낸 단면도로서, 두 개의 평판(21, 22) 중 적어도 하나에는 혈중 세포(B)가 개별적으로 포획(trapping)되도록 요철부(25, 26)가 구비될 수 있다. 도면에는 요철부(25, 26)가 하부 평판(22)에 형성되었지만, 이에 제한되지 않고, 요철부(25, 26)가 상부 평판(21)에 형성될 수 있으며, 또한 양쪽 평판(21, 22) 모두에 형성될 수도 있다.

[0055] 요철부(25, 26)는 요부(25) 및 철부(26)로 구성되고, 바람직하게는, 마이크로 단위의 미세 구조로 형성될 수 있다. 요철부(25, 26)의 개수는 특별히 제한되지 않고 측정 키트(20)의 크기에 따라 달라지며, 바람직하게는 10개 이상, 더욱 바람직하게는 100개 이상일 수 있다. 많게는 만개 이상, 십만개 이상, 백만개 이상도 가능하다.

[0056] 요철부(25, 26)의 폭, 길이, 높이(깊이)는 각각 독립적으로 예를 들어 0.1 내지 200 ㎛, 바람직하게는 0.5 내지 70 ㎛, 더욱 바람직하게는 1 내지 30 ㎛일 수 있다.

[0057] 도면에는 혈액 샘플의 이동 방향이 화살표로 표시되어 있고, 혈중 세포(B)는 요부(25)에 포획되어 있는 것을 확인할 수 있다.

[0058] 한편, 유동구동 메커니즘은 요철부(25, 26)의 트랩에 혈중 세포(B)가 개별적으로 포획되도록, 두 평판(21, 22) 사이에서 혈액 샘플의 유동을 전방으로 유동 또는 후방으로의 역류 등을 반복적으로 유도함으로써, 하나의 세포(B)가 하나의 요철부(25, 26)에 포획되도록 할 수 있다.

[0059] 도 4는 본 발명에 따라 계단 형태의 요철구조를 갖는 측정 키트에서 세포가 포획되는 메커니즘을 나타낸 단면도로서, 요철부(25, 26, 27, 28)에는 계단 형태의 단차가 형성되어 작은 세포(S)가 하부에 포획되고, 큰 세포

(L)가 그 상부에 포획될 수 있다.

[0060] 계단 형태의 요철구조는 도시된 바와 같이, 큰 요부(25)의 저면 하부에 작은 요부(27)가 추가로 형성된 구조일 수 있다. 또한, 큰 철부(26)의 상부 양 측면이 깎여서 작은 철부(28)가 형성되거나, 큰 철부(26)의 하부 양 측면으로부터 작은 철부(28)가 돌출된 구조일 수 있다.

[0061] 이와 같이, 요철부(25, 26, 27, 28)는 단차가 형성되도록 계단 형태로 구성함으로써, 도면에 도시된 바와 같이, 적혈구와 같은 작은 세포(S)는 하부인 작은 요부(27)에 포획되고, 백혈구와 희소세포 등과 같은 큰 세포(L)는 바로 위인 큰 요부(25)에 포획될 수 있다.

[0062] 또한, 요철부(25, 26, 27, 28)는 포획된 세포(S, L)가 외부 유동에 의하여 빠져나가지 못하도록 그 깊이(높이)와 너비(폭) 등을 최적으로 형성할 수 있다. 적혈구의 크기는 1 내지 8 ㎛ 정도이고, 백혈구의 크기는 12 내지 25 ㎛ 정도이므로, 작은 요부(27)의 폭과 깊이는 1 내지 10 ㎛ 정도로 구성할 수 있고, 큰 요부(25)의 폭과 깊이는 11 내지 30 ㎛ 정도로 구성할 수 있다. 이와 같이, 측정 키트(20)에서는 혈액 샘플이 주입되어 개별 세포(B)가 각각의 미세 트랩 구조물에 포획될 수 있다.

[0063] 한편, 요철부(25, 26, 27, 28)에 포획된 세포 중에서 복합물질(11)과 반응하여 광을 발산하거나 표면 플라즈몬 공명 현상이 발생하는 세포의 개수를 확인할 수 있도록, 측정 키트(20)는 장치(100)의 받침대 등에 장착될 수 있다.

[0064] 도 5는 본 발명에 따른 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치의 평면도이고, 도 6은 정면도로서, 혈중 희소 세포의 검출 및 계수 장치(100)는 샘플 채집부(10), 측정 키트(20), 검출기(30) 이외에 이동 레일(34), 이동형 채집 장치(40), 2축 이동 레일(41) 등을 구비할 수 있다.

[0065] 검출기(30)는 측정 키트(20)에서 포획된 혈중 세포(B) 중에서, 표적항체(13)와 항원-항체반응이 발생한 희소세포를 검출 및 계수하는 역할을 한다. 검출기(30)는 광학적 방법으로 혈중 세포의 위치와 개수를 검출할 수 있다. 검출기(30)는 예를 들어 초정밀 CCD 센서 어레이를 구비하고, 측정 키트(20)를 스캐닝(scanning)하여 광을 발산하는 세포의 위치와 개수를 검사할 수 있다. 검출기(30)는 표지물질(12)의 종류에 따라 형광 스캔장치 또는 표면 플라즈몬 공명 이미징 스캔장치로 구성할 수 있으며, 이에 대해서는 후술하기로 한다.

[0066] 이동 레일(34)은 측정 키트(20)의 스캐닝을 위해 검출기(30)의 이동을 안내하는 역할을 한다. 이를 위해, 이동 레일(34)의 일단은 장치(100)의 받침대 등에 장착되고, 타단은 검출기(30)에 연결될 수 있다. 검출기(30)는 이동 레일(34)을 따라 도면의 상하 방향으로 이동할 수 있다. 검출기(30)는 이동 레일(34)을 따라 이동 가능하도록 바퀴나 롤러 등을 구비할 수도 있다. 이동 레일(34)은 고정되어 움직이지 않을 수 있다. 검출기(30)의 이동은 손으로 움직이는 수동적인 이동 또는 모터 등을 이용한 자동적인 이동일 수 있다.

[0067] 이동형 채집 장치(40)는 검출 후 샘플을 채취하는 역할을 한다. 채집 장치(40)는 예를 들어 주사기 등과 같은 형태로 구성할 수 있다. 주사기를 이용할 경우 측정 키트(20)의 상부 평판(21)을 뚫어서 샘플을 채취할 수 있다. 채집 장치(40)도 수동적으로 이동시키거나 모터 등을 이용하여 자동적으로 이동시킬 수 있다.

[0068] 2축 이동 레일(41)은 이동형 채집 장치(40)의 이동을 안내하는 역할을 한다. 2축 이동 레일(41)은 도면에 예시된 바와 같이, 수직 레일과 수평 레일로 구성될 수 있고, 두 레일의 교차점에 채집 장치(40)가 장착될 수 있다. 이동형 채집 장치(40)는 2축 이동 레일(41)을 따라 도면의 상하 방향 및 좌우 방향으로 이동할 수 있다. 2축 이동 레일(41)은 장치(100)의 받침대 등에 고정되지 않고 자체적으로 이동하게 설치될 수 있으며, 이동형 채집 장치(40)와 함께 이동할 수 있다.

[0069] 검출기(30)의 스캐닝이 종료되면, 희소 세포의 검출 위치를 어드레싱하여 이동형 채집장치(40)가 2축 이동 레일(41)을 따라 목표 위치로 이동한 후 희소 세포를 채집할 수 있다. 채집된 샘플은 2차 정밀 분석용 시료로 사용될 수 있다.

[0070] 도 7은 본 발명에 따른 검출기 중 형광 스캔 장치의 구성도로서, 표지물질(12)이 1) 형광물질, 2) 양자점, 3) 양자점이 집적되어 있는 마이크로 사이즈의 비드(Bead) 중 1종 이상일 경우, 검출기(30)는 형광 스캔장치로 구성될 수 있다.

[0071] 형광 스캔장치(30)는 형광물질, 양자점, 양자점이 집적되어 있는 마이크로 사이즈의 비드 중 1종 이상을 여기

시킬 수 있는 광원(31); 여기된 형광을 측정할 수 있는 이미지 센서(32); 특정 파장대의 광을 통과시킬 수 있는 형광필터(33)를 구비함으로써, 광을 발산하는 혈중 세포의 위치와 개수를 검출할 수 있다.

[0072] 광원(31)은 머큐리 램프, 레이저 다이오드(LD), 레이저 발광 다이오드(LED) 중에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0073] 이미지 센서(32)는 포토 다이오드 어레이, CCD(Charge Coupled Device) 어레이, CMOS(Complementary Metal Oxide Semiconductor) 어레이 중에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0074] 이미지 센서(32)에는 줌(Zoom) 렌즈가 장착되어 광학적으로 확대된 이미지를 획득할 수 있다.

[0075] 광원(31)과 이미지 센서(32)는 연속으로 결합되어 있는 형태로 설치될 수 있다.

[0076] 형광필터(33)가 통과시킬 수 있는 광의 파장대역은 사용되는 형광물질 또는 양자점의 종류에 따라 달라질 수 있다.

[0077] 검출 과정을 마친 측정 키트(20)에 대해, 별도의 현미경 등의 광학장치를 이용하여 발광하는 지점에서의 세포 모습을 확인할 수 있다.

[0078] 도 8은 본 발명에 따른 검출기 중 표면 플라즈몬 공명 이미징 스캔 장치의 구성도로서, 표지물질(12)이 금속 나노입자일 경우, 검출기(30)는 표면 플라즈몬 공명 이미징 스캔 장치(50)로 구성할 수 있다.

[0079] 표면 플라즈몬 공명 이미징 스캔 장치(50)는 금속 나노입자의 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance) 현상을 발생시킬 수 있는 광학장치, 마이크로 크기의 프리즘 어레이(Prism Array), 나노 크기의 그레이팅 어레이(Grating Array) 중에서 선택되는 1종 이상을 구비함으로써, 표면 플라즈몬 공명 현상이 발생되는 혈중 세포의 위치와 개수를 검출할 수 있다.

[0080] 표면 플라즈몬 공명 이미징 스캔 장치(50)는 도면에 도시된 바와 같이, 평행광(53)을 측정 키트(20)로 입사시키는 광원(51); 및 측정 키트(20)로부터 반사되는 반사광(54)을 측정하는 카메라(52)를 구비할 수 있다.

[0081] 이와 같이, 표면 플라즈몬 공명 이미징 스캔 장치(50)는 평행광(53)을 측정 키트(20)로 입사시키고 반사되는 광(54)을 카메라(52)로 측정할 수 있다. 금속 나노입자가 혈중 희소세포에 다량으로 부착되고, 그 위치에 특정 입사각으로 광이 들어오면, 그 위치만 광이 흡수되어 측정키트(20)의 다른 부위와 반사광량이 차이가 발생되며, 이러한 차이를 이용하여 검출할 수 있다. 예를 들어, 400 내지 900 nm 파장의 광이 10 내지 80도의 각도로 입사될 수 있다. 바람직하게는, 600 내지 800 nm 파장의 광이 30 내지 70도의 각도로 입사될 수 있다.

[0082] 도 9는 본 발명에 따른 표면 플라즈몬 공명 이미징 방법에 사용되는 마이크로 크기의 프리즘 어레이 또는 나노 크기의 그레이팅 어레이가 측정 키트와 일체화된 것을 도시한 사시도로서, 측정 키트(20)는 표면 플라즈몬 공명 현상이 발생될 수 있는 조건을 만들기 위해, 마이크로 크기의 프리즘 어레이(60) 또는 나노 크기의 그레이팅 어레이와 일체화될 수 있다.

[0083] 프리즘 어레이(60) 또는 그레이팅 어레이는 측정 키트(20)의 외표면과 일체화되는데, 구체적으로 상부 평판(21) 또는 하부 평판(22)의 외표면과 접착, 용접, 사출, 압출 등의 방법을 통해 일체화될 수 있다.

[0084] 프리즘 어레이(60) 또는 그레이팅 어레이의 형상은 도시된 바와 같이, 그 단면이 삼각형인 것이 바람직하나, 필요에 따라 원형, 타원형, 다각형 등으로 변경할 수 있다.

[0085] 프리즘 어레이(60)의 크기는 예를 들어 1 ㎛ 내지 1 ㎜, 바람직하게는 10 내지 500 ㎛, 더욱 바람직하게는 100 내지 200 ㎛일 수 있다. 그레이팅 어레이의 크기는 예를 들어 1 nm 내지 10 ㎛, 바람직하게는 10 nm 내지 3 ㎛, 더욱 바람직하게는 100 nm 내지 1 ㎛일 수 있다.

부호의 설명

[0086] 10: 샘플 채집부

11: 복합물질

12: 표지물질

13: 표적항체

20: 측정 키트

21, 22: 평판

23: 주입구

24: 모세관

25, 26, 27, 28: 요철부

30: 검출기(형광 스캔장치)

31: 광원

32: 이미지 센서

33: 형광필터

34: 이동 레일

40: 이동형 채집장치

41: 2축 이동레일

50: 표면 플라즈몬 공명 이미징 스캔 장치

51: 광원

52: 카메라

53: 평행광

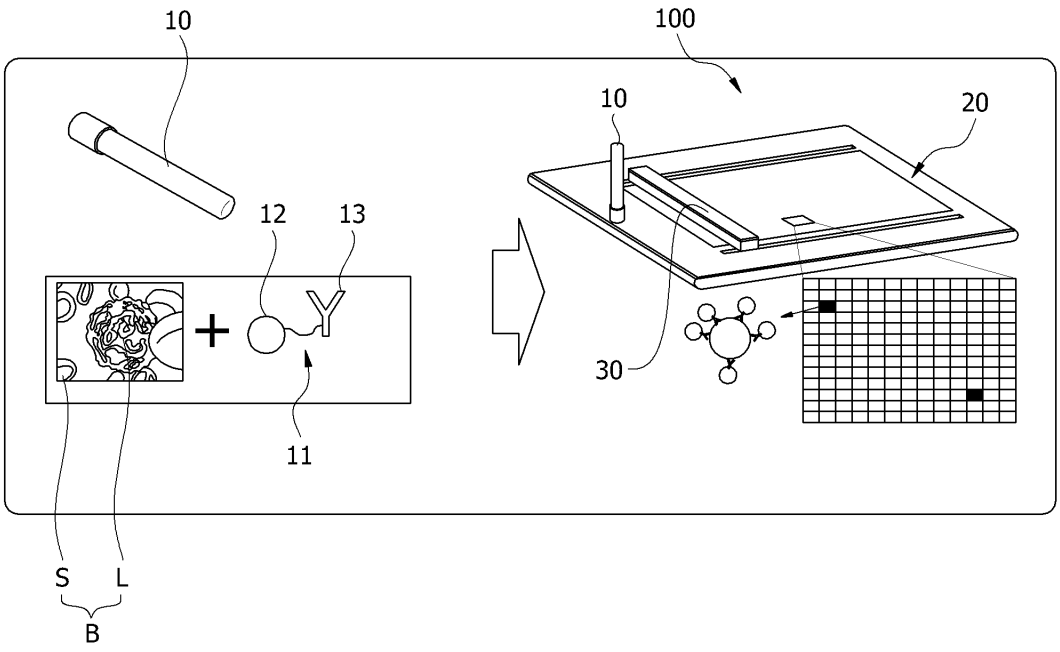
54: 반사광

60: 프리즘 어레이(그레이팅 어레이)

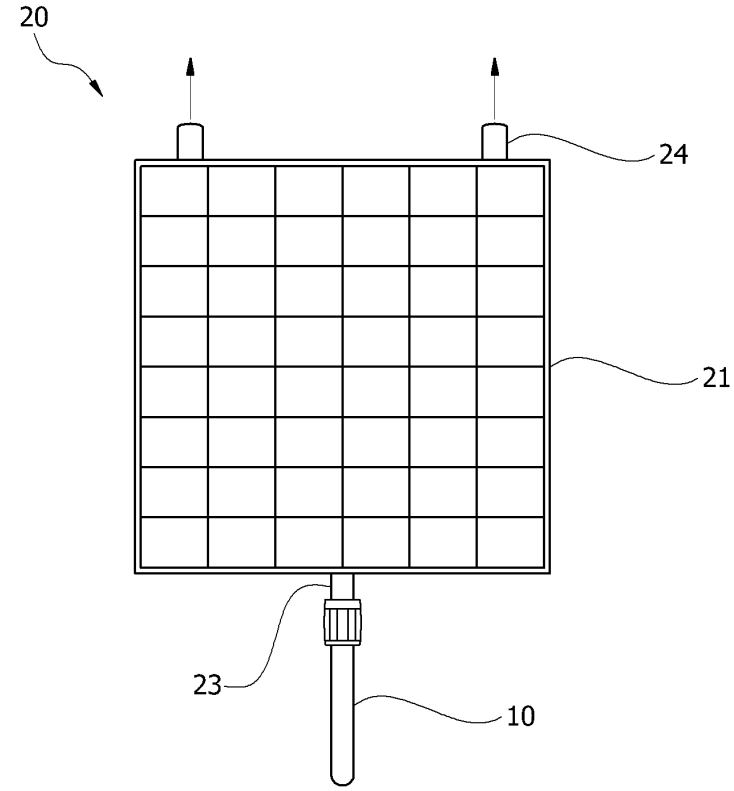
100: 희소세포 검출/계수장치(희소세포 진단시스템)

도면

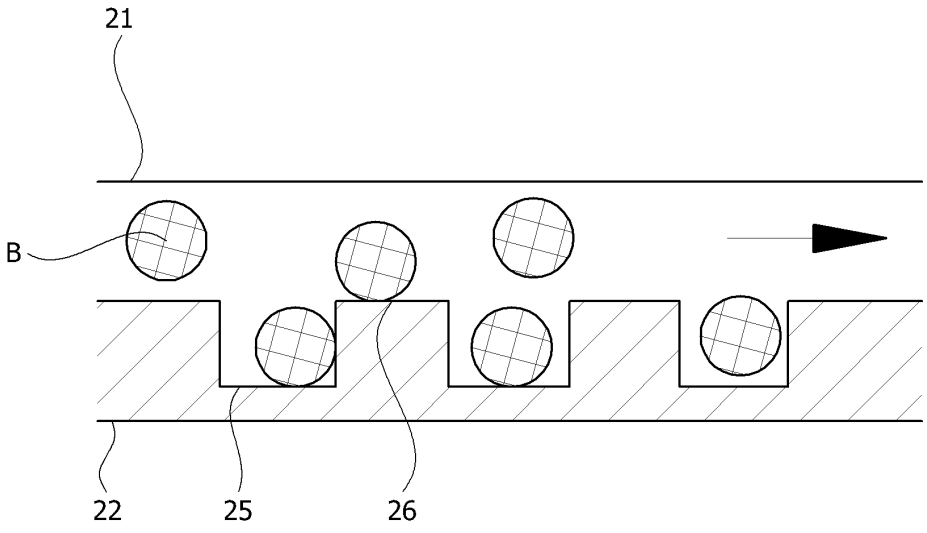
도면1



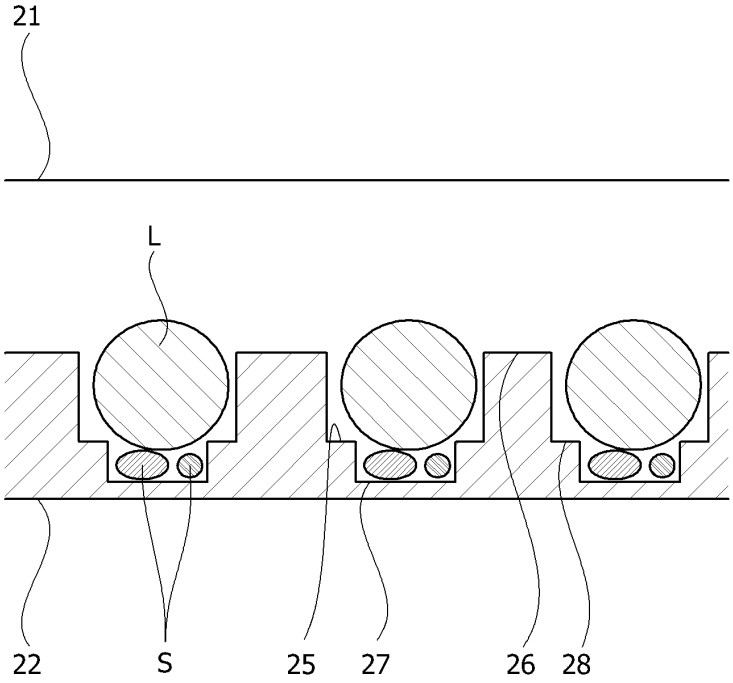
도면2



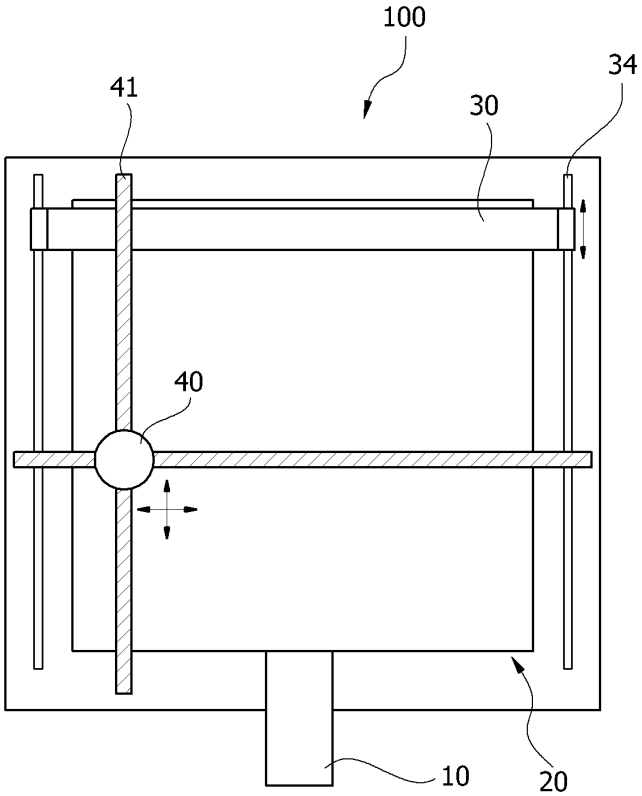
도면3



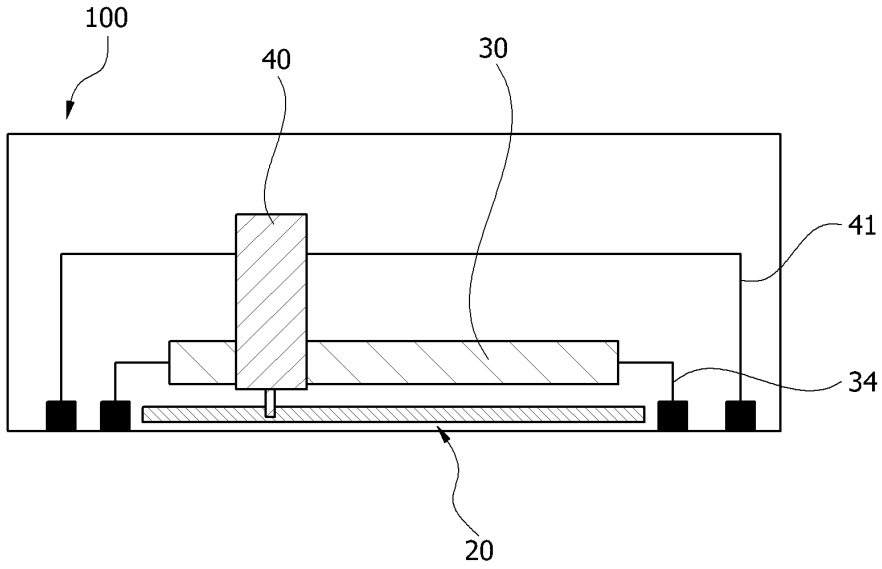
도면4



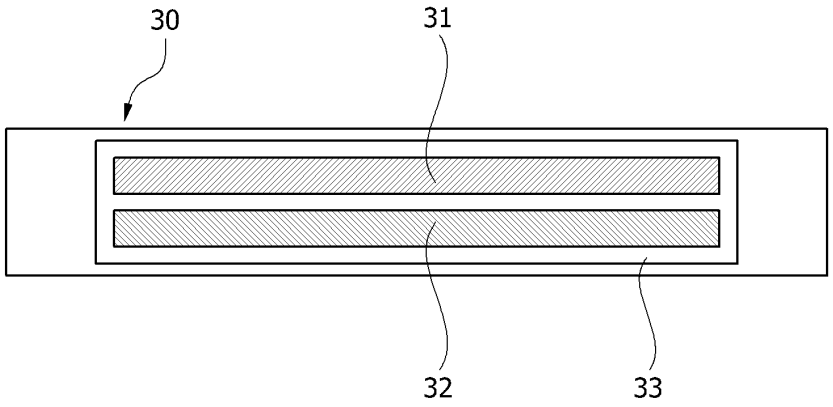
도면5



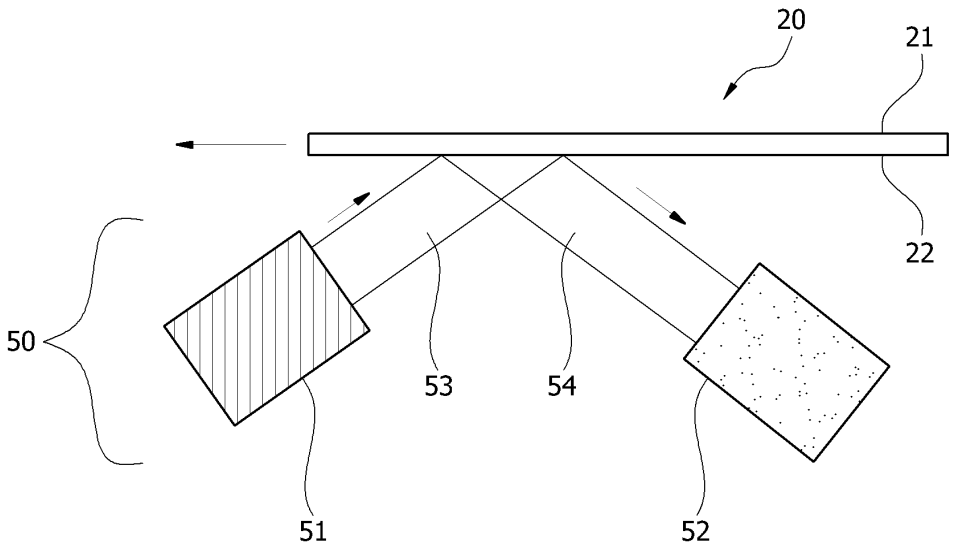
도면6



도면7



도면8



도면9

