(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0120032
(43) 공개일자 2013년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 3/02 (2006.01) *C12M 1/18* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0042983
(22) 출원일자 2012년04월25일
심사청구일자 2012년04월25일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 효자동 산31 포항공과대학교내
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김동표
경상북도 포항시 남구 청암로 77, 4동 904호(포항공과대학교, 교수아파트)
유영재
대전광역시 서구 둔산남로 127, 104동 1403호(둔산동, 목련아파트)
박혜선
대전광역시 대덕구 동춘당로23번길 4, 1005호(송촌동, 흥진로얄아파트)
(74) 대리인
위병갑

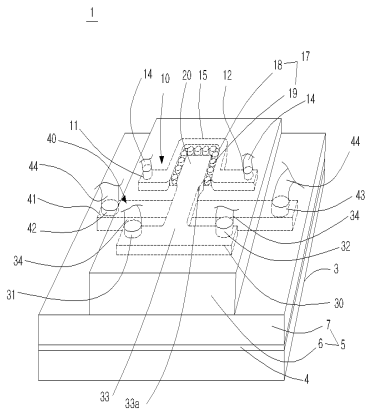
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **세포 배양 및 응용연구를 위한 미세 관류 소자 및 그 제조방법**

(57) 요 약

세포 또는 생체 조직의 성장과 생리활성 물질에 대한 생리활성을 관찰하는 데 사용되는 미세 관류 소자 및 그 제조방법이 개시된다. 미세 관류 소자는, 외부로부터 세포 배양액을 공급하는 세포 배양액 도관, 세포 배양액 도관과 연결되고 세포 배양액 도관으로부터 공급되는 세포 배양액에 의해 세포를 배양하는 세포 배양부, 세포 배양부와 연결되고 세포 배양부에 세포를 주입하는 세포 주입 도관, 및 세포 배양부와 세포 주입 도관을 분리하도록 세포 주입 도관을 개폐하는 개폐부를 포함하는 것을 특징으로 한다. 미세 관류 소자의 제조방법은, 세포 배양액을 공급하는 세포 배양액 도관, 세포 배양액 도관으로부터 공급되는 세포 배양액에 의해 세포를 배양하는 세포 배양부, 및 세포 배양부에 세포를 주입하는 세포 주입 도관이 내부에 형성된 세포 배양층을 준비하는 단계; 세포 주입 도관을 개폐하는 개폐부가 내부에 형성된 도관 개폐층을 준비하는 단계; 및 세포 배양층과 도관 개폐층을 접합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

외부로부터 세포 배양액을 공급하는 세포 배양액 도관;

상기 세포 배양액 도관과 연결되고 상기 세포 배양액 도관으로부터 공급되는 상기 세포 배양액에 의해 세포를 배양하는 세포 배양부;

상기 세포 배양부와 연결되고 상기 세포 배양부에 세포를 주입하는 세포 주입 도관; 및

상기 세포 배양부와 상기 세포 주입 도관을 분리하도록 상기 세포 주입 도관을 개폐하는 개폐부를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 세포 배양액 도관과 상기 세포 배양부 사이를 연결하고 상기 세포 배양액과 액상의 생체활성 조절물질은 자유로이 통과할 수 있지만 상기 세포는 통과할 수 없는 연결 틈을 포함하는 틈새부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 연결 틈은 1 ~ 100 ㎛ 범위의 높이를 가지도록 형성되는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 틈새부는 상기 연결 틈 내에 일정 간격을 두고 배치된 복수 개의 지지기둥을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 개폐부는 상기 세포 배양부와 연결되는 상기 세포 주입 도관의 부분에 배치되어 상기 세포 주입 도관을 통한 세포 흐름을 차단하거나 개방하는 개폐밸브를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 개폐밸브는 상기 세포 주입 도관의 상기 부분에 인접하게 배치되고 외부로부터 공급되는 공기압에 의해 팽창하거나 수축하여 상기 세포 주입 도관을 통한 세포 흐름을 차단하거나 개방하는 공기밸브 채널과, 상기 세포 주입 도관의 상기 부분에 인접하게 배치되고 상기 세포 주입 도관을 변형을 유발하는 압전소자와, 상기 세포 주입 도관의 상기 부분에 배치되고 상기 세포 주입 도관을 개폐하는 솔레노이드 밸브 중에서 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자.

청구항 7

지지층;

상기 지지층 위에 배치되고, 세포 배양액을 공급하는 세포 배양액 도관, 상기 세포 배양액 도관으로부터 공급되는 상기 세포 배양액에 의해 세포를 배양하는 세포 배양부, 및 상기 세포 배양부에 세포를 주입하는 세포 주입 도관이 내부에 형성된 세포 배양층과, 상기 세포 주입 도관을 개폐하는 개폐부가 내부에 형성된 도관 개폐층을 포함하는 관류 배양층; 및

상기 관류 배양층을 상기 지지층에 접합하는 접합층을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 지지층은 유리기판 또는 투명한 플라스틱 기판을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 세포 배양층은 상기 세포 배양액 도관과 상기 세포 배양부 사이를 연결하고 상기 세포 배양액과 액상의 생체활성 조절물질은 자유로이 통과할 수 있지만 세포는 통과할 수 없는 연결 틈을 포함하는 틈새부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 틈새부는 상기 연결 틈 내에 일정 간격을 두고 배치된 복수 개의 지지기둥을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 세포 배양층, 상기 도관 개폐층, 및 상기 접합층은 탄성 고분자 재료로 형성되는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자.

청구항 12

세포 배양액을 공급하는 세포 배양액 도관, 상기 세포 배양액 도관으로부터 공급되는 세포 배양액에 의해 세포를 배양하는 세포 배양부, 및 상기 세포 배양부에 세포를 주입하는 세포 주입 도관이 내부에 형성된 세포 배양층을 준비하는 단계;

상기 세포 주입 도관을 개폐하는 개폐부가 내부에 형성된 도관 개폐층을 준비하는 단계; 및

상기 세포 배양층과 상기 도관 개폐층을 접합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자의 제조방법.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 세포 배양층은 상기 세포 배양액 도관과 상기 세포 배양부 사이를 연결하고 상기 세포 배양액과 액상의 생체활성 조절물질은 자유로이 통과할 수 있지만 상기 세포는 통과할 수 없는 연결 틈을 포함하는 틈새부를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자의 제조방법.

청구항 14

제 12항에 있어서,

상기 접합된 세포 배양층과 도관 개폐층을 지지층 상에 접합시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 관류 소자의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포 또는 생체 조직의 성장과 생리활성 물질에 대한 생리활성을 관찰하는 데 사용되는 미세 관류 소자 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 관류 배양기는 세포 또는 생체 조직(이하, '세포'라함)의 성장과 생리활성 물질에 대한 생리활성을 관찰하는 데 사용되는 기기로서, 일반적으로, 세포를 일정한 지지층에 부착시키거나 끈이나 그물 등의 물리적 방법으로 일정 공간에 가두는 세포 배양부, 및 세포 배양부에 배양액을 계속적으로 흘려주는 배양액 공급부를 구비한다. 이러한 관류 배양기는 생리활성 물질과 신약개발을 위해 사용된다.

[0003] 하지만, 생리활성 물질과 신약개발을 위해 일반적인 관류 배양기를 사용하면, 요구되는 생리활성 물질 또는 신약 후보 물질의 양과 세포 배양 규모가 대단히 커진다. 이러한 단점을 보완하기 위해 세포 배양 규모를 마이크로미터 수준으로 낮추는 세포칩(cell chip)에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 세포칩은 접착성 세포의 특성을 이용하여 세포 배양부의 바닥을 세포가 붙을 수 있는 수백 마이크로미터 두께의 물질로 개질하거나 부유성 세포가 부착될 수 있는 알긴산염, 한천, 생체친화성 고분자 방울을 이용한다.

[0004] 최근, 유체를 미세 도관으로 흐르게 하는 미세 유체기술을 세포칩에 접목하는 세포배양 연구도 활발히 진행되고 있다. 미세 유체기술은 미세 식각기술을 이용하여 미세 도관을 금속, 실리콘 및 유리 등의 재료로 여러 가지 모양으로 만들어 배양액 등과 같은 유체의 혼합, 입자 흐름의 조절, 미세방울의 조절 등을 가능하게 한다. 또한, 폴리메틸메타아크릴레이트(polymethylmethaacrylate)나 폴리디메틸실록산(polydimethylsiloxane; PDMS) 등의 고분자 재료는 낮은 공정비용과 단순 제작공정으로 원하는 미세 세포칩의 제작을 가능하게 한다.

[0005] 미세 유체기술을 이용한 세포배양 관련 기술로는 간세포를 배양하는 M.Y. Zhang 등의 논문 “Microfluidic environment for high density hepatocyte culture” (Biomed Microdevices, 2008, 10p:117-121), 접착성 세포를 배양하는 P.J. Lee 등의 논문 “Nanoliter scale microbioreactor array for quantitative cell biology” (Biotechnology and Bioengineering, 2006, 94p:5-14), 동물세포 배양에 필요한 환경 요인을 조절할 수 있는 소자를 접목하는 국내 공개특허공보 제10-2009-0059448호의 “휴대용 소형 동물 세포 배양기 및 그 제조방법”, 다른 높이의 배양 공간에 서로 다른 종류의 세포들을 함께 배양하는 국내 공개특허공보 제10-2011-0068170호의 “바이오 칩의 미세환경 내에서 세포를 공배양하는 방법”, 미세구술을 세포 배양기에 넣어 세포 자극체로 사용하는 국내 공개특허공보 제10-2009-0083679호의 “자극체를 이용한 세포 배양기 및 세포 배양 방법”, 세포를 배양하면서 기계적인 자극을 인가할 수 있는 국내 공개특허공보 제10-2010-0067298호의 “세포자극기, 세포자극 및 배양장치, 세포자극 및 배양시스템”, 부유성 세포를 피코리터의 미세우물에 넣어 키우는 미국 공개특허 US2009/0111141호의 “Method and device for studying floating, living cells” 등이 있다.

[0006] 그러나, 대부분의 종래 기술은 접착성 세포의 배양에 한정되어 있으며, 배양액의 흐름으로 인해 세포에 큰 전단 스트레스가 가해지는 문제점이 있다. 또한, 관류 배양을 응용한 미세 배양기의 경우, 세포 주입 도관과 세포 배양부가 분리되지 않으므로, 세포 배양을 위한 별도 공간이 확보되지 않을 뿐 아니라 세포 배양부의 부피 정의도 불가능하다. 따라서, 생리활성 물질의 영향을 확인하는 실험 시는 세포 배양부에 공급되는 생리활성 물질의 정확한 농도를 알 수 없고, 세포 배양액의 조성 변화에 따른 세포의 반응을 확인하는 실험 시는 세포 배양부의 미세 환경을 빠르게 변화시킬 수 없는 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 창안된 것으로, 세포 주입 도관과 세포 배양부를 독립적으로 분리할 수 있고 필요에 따라 세포 배양부에 대한 세포의 출입을 통제할 수 있는 미세 관류 소자 및 그 제조방법을 제공하는 데 그 목적이 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 세포 배양액 도관과 세포 배양부 사이를, 배양액과 액상의 생체활성 조절물질은 자유로이 통과할 수 있지만 세포는 통과할 수 없도록 구성하여 접착성 세포는 물론 부유성 세포도 배양할 수 있게 한 미세 관류 소자 및 그 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상술한 바와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위한 일 실시 양상에 따르면, 미세 관류 소자는, 외부로부터 세포 배양액을 공급하는 세포 배양액 도관, 세포 배양액 도관과 연결되고 세포 배양액 도관으로부터 공급되는 세포 배양액에 의해 세포를 배양하는 세포 배양부, 세포 배양부와 연결되고 세포 배양부에 세포를 주입하는 세포 주입 도관, 및 세포 배양부와 세포 주입 도관을 분리하도록 세포 주입 도관을 개폐하는 개폐부를 포함하는 것을

특징으로 한다.

[0010] 본 발명의 미세 관류 소자는, 세포 배양액 도관과 세포 배양부 사이를 연결하고 세포 배양액과 액상의 생체활성 조절물질은 자유로이 통과할 수 있지만 세포는 통과할 수 없는 연결 틈을 포함하는 틈새부를 더 포함할 수 있다. 이때, 연결 틈은 배양하고자 하는 세포의 크기에 따라 1 ~ 100 ㎛ 범위의 높이를 가지도록 형성될 수 있다.

[0011] 틈새부는 연결 틈이 변형 등에 의해 짓눌려 폐쇄되지 않도록 연결 틈 내에 일정 간격을 두고 배치된 복수 개의 지지기둥을 더 포함할 수 있다. 이때, 지지기둥은 원기둥 형태, 삼각 기둥 형태, 사각기둥 형태, 또는 다각형 기둥 형태로 형성될 수 있다. 또한, 지지기둥 사이의 간격은 정밀 노광기술을 이용하여 1 ~ 50 ㎛의 범위로 형성될 수 있다. 즉, 지지기둥 사이의 간격은 연결 틈이 변형 등에 의해 짓눌려 폐쇄되지 않도록 하기 위해 세포의 크기가 커서 연결 틈의 높이가 높은 경우에는 5 ~ 50 ㎛의 범위로 넓게 형성되고, 반대로 세포의 크기가 작아 미세 틈의 높이가 낮은 경우에는 1 ~ 5 ㎛의 범위로 좁게 형성될 수 있다.

[0012] 개폐부는 세포 배양부와 연결되는 세포 주입 도관의 부분에 배치되어 세포 주입 도관을 통한 세포 흐름을 차단하거나 개방하는 개폐밸브를 포함할 수 있다. 이때, 개폐밸브는 세포 주입 도관의 상기 부분에 인접하게 배치되고 외부로부터 공급되는 공기압에 의해 팽창하거나 수축하여 세포 주입 도관을 통한 세포 흐름을 차단하거나 개방하는 공기밸브 채널, 세포 주입 도관의 상기 부분에 인접하게 배치되고 세포 주입 도관을 변형을 유발하는 압전소자, 또는 세포 주입 도관의 상기 부분에 배치되고 세포 주입 도관을 개폐하는 솔레노이드 밸브를 포함할 수 있다. 이때, 공기밸브 채널은 0.2 ~ 0.5 MPa 범위의 공기압에 견딜 수 있도록 형성된다.

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시 양상에 따르면, 미세 관류 소자는, 지지층; 지지층 위에 배치되고, 세포 배양액을 공급하는 세포 배양액 도관, 세포 배양액 도관으로부터 공급되는 세포 배양액에 의해 세포를 배양하는 세포 배양부, 및 세포 배양부에 세포를 주입하는 세포 주입 도관이 내부에 형성된 세포 배양층과, 세포 주입 도관을 개폐하는 개폐부가 내부에 형성된 도관 개폐층을 포함하는 관류배양층; 및 관류 배양층을 지지층에 접합하는 접합층을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 지지층은 유리기판 또는 투명한 플라스틱 기판을 포함할 수 있다.

[0015] 세포 배양층은 세포 배양액 도관과 세포 배양부 사이를 연결하고 세포 배양액과 액상의 생체활성 조절물질은 자유로이 통과할 수 있지만 세포는 통과할 수 없는 연결 틈을 포함하는 틈새부를 더 포함할 수 있다. 이때, 틈새부는 연결 틈이 변형 등에 의해 짓눌려 폐쇄되지 않도록 연결 틈 내에 일정 간격을 두고 배치된 복수 개의 지지기둥을 더 포함할 수 있다.

[0016] 개폐부는 세포 배양부와 세포 주입 도관 사이에 배치되어 세포 주입 도관을 통한 세포 흐름을 차단하거나 개방하는 개폐밸브를 포함할 수 있다.

[0017] 또한, 세포 배양층, 도관 개폐층, 및 접합층은 탄성 고분자 재료, 예를 들면, PDMS로 형성될 수 있다.

[0018] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시 양상에 따르면, 미세 관류 소자의 제조방법은, 세포 배양액을 공급하는 세포 배양액 도관, 세포 배양액 도관으로부터 공급되는 세포 배양액에 의해 세포를 배양하는 세포 배양부, 및 세포 배양부에 세포를 주입하는 세포 주입 도관이 내부에 형성된 세포 배양층을 준비하는 단계; 세포 주입 도관을 개폐하는 개폐부가 내부에 형성된 도관 개폐층을 준비하는 단계; 및 세포 배양층과 도관 개폐층을 접합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0019] 세포 배양층을 준비하는 단계는 세포 배양액 도관, 세포 배양부, 및 세포 주입 도관에 대응하는 문양을 갖는 제1 주형을 제작하는 단계, 탄성 고분자 재료, 예를 들면, PDMS를 사용하여 제1 주형에 의해 세포 배양층을 형성하는 단계, 및 형성된 세포 배양층을 일정 시간 방치하여 반 경화시킨 후 세포 배양층의 세포 배양액 도관과 세포 주입 도관을 각각 외부의 세포 배양액 소스와 세포 소스에 연결하기 위한 연결관을 고정하는 입구 및 출구들을 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 이때, 제 1주형은, 세포 배양액 도관과 세포 배양부 사이를 연결하고 세포 배양액과 액상의 생체활성 조절물질은 자유로이 통과할 수 있지만 세포는 통과할 수 없는 연결 틈을 포함하는 틈새부에 대응하는 문양을 더 포함할 수 있다.

[0020] 도관 개폐층을 준비하는 단계는 공기압에 의해 팽창하거나 수축하여 세포 주입 도관을 통한 세포 흐름을 차단하거나 개방하는 개폐부의 공기밸브 채널에 대응하는 문양을 갖는 제2 주형을 제작하는 단계, PDMS를 사용하여 제2 주형에 의해 도관 개폐층을 형성하는 단계, 및 형성된 도관 개폐층을 일정 시간 방치하여 반 경화시킨 후 도관 개폐층의 개폐부의 공기밸브 채널을 외부의 압축공기 소스와 배출제어부와 연결하기 위한 연결관을 고정하

는 입구 및 출구를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0021] 세포 배양층과 도관 개폐층을 접합하는 단계는 세포 배양층과 도관 개폐층을 서로 겹쳐 놓은 후 일정 온도로 가열하여 완전 경화시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 미세 관류 소자의 제조방법은 접합된 세포 배양층과 도관 개폐층을 지지층 상에 접합시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 지지층에 접합시키는 단계는 지지층 상에 얇은 PDMS층을 올려 놓은 후 제1 온도로 가열하여 PDMS층을 반 경화시키는 단계, 접합된 세포 배양층과 도관 개폐층을 반 경화된 PDMS층이 있는 지지층 상에 올려 놓은 후 제2 온도로 가열하여 완전 경화시키는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0023] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 미세 관류 소자는 세포 주입 도관과 세포 배양부를 독립적으로 분리할 수 있고 필요에 따라 세포 배양부에 대한 세포의 출입을 통제할 수 있는 개폐부를 구비하므로, 세포 배양을 위한 별도 공간의 확보가 가능할 뿐 아니라 세포 배양부의 부피 정의도 가능하다. 따라서, 적은 양의 시약을 사용하여 세포의 반응성을 확인할 수 있고, 그 결과, 새로운 생리활성 저해제나 활성화제의 탐색이 더 용이해 진다. 또한, 생리활성 물질의 영향을 확인하는 실험 시는 세포 배양부에 공급되는 생리활성 물질의 정확한 농도를 쉽게 알 수 있고, 세포 배양액의 조성 변화에 따른 세포의 반응을 확인하는 실험 시는 세포 배양부의 미세 환경을 빠르게 변화시킬 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명에 따른 미세 관류 소자는 세포 배양액 도관과 세포 배양부 사이에 세포 배양액과 액상의 생체활성 조절물질은 자유로이 통과할 수 있지만 세포는 통과할 수 없도록 하는 연결 틈을 포함하는 틈새부를 배치하므로, 세포 배양부에서 배양되는 세포가 세포 배양액 또는 액상의 생체활성 조절물질과 함께 세포 배양부로부터 세포 배양액 도관으로 빠져나가는 것을 방지할 수 있고, 이에 따라, 접착성 세포 외에도 부유성 세포까지 미세 배양이 가능하다. 또한, 세포 배양부로 유입되는 배양액의 흐름이 틈새부에 의해 어느 정도 억제되므로, 배양액의 흐름으로 인해 세포에 큰 전단 스트레스가 가해지는 종래의 문제점이 해소될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세 관류 소자를 도시하는 사시도,

도 2는 도 1에 도시된 미세 관류 소자의 주요 구성부분을 예시하는 부분 평면도,

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 실제로 제작된 미세 관류 소자의 주요 구성부분을 예시하는 주사전자현미경 사진,

도 4는 도 1에 도시된 미세 관류 소자의 세포 배양층을 예시하는 사시도,

도 5는 도 1에 도시된 미세 관류 소자의 도관 개폐층을 예시하는 사시도,

도 6은 도 1에 도시된 미세 관류 소자의 관류 배양층을 예시하는 사시도,

도 7은 도 1에 도시된 미세 관류 소자의 지지층을 예시하는 사시도,

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 미세 관류 소자의 제조프로세스를 예시하는 흐름도,

도 9는 본 발명의 따라 실제로 제작된 미세 관류 소자의 일 예의 구조를 예시하는 도면,

도 10는 본 발명의 따라 실제로 제작된 미세 관류 소자의 다른 예를 예시하는 현미경 사진,

도 11은 본 발명의 미세 관류 소자를 이용하여 단세포 녹조류 클라미도모나스(Chlamydomonas)를 배양한 결과를 예시하는 사진,

도 12는 본 발명의 미세 관류 소자의 세포 배양액 도관에 형광물질 용액을 흘려주었을 때 시간에 따른 세포 배양부로의 형광물질의 이동을 보여주는 그래프, 및

도 13은 본 발명의 미세 관류 소자에 단세포 녹조류 두날리엘라(Dunaliella)를 세포 배양부에 넣고 세포 배양액 도관에 고장액을 흘렸을 때 세포의 반응을 보여주는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명의 양호한 실시예에 따른 미세 관류 소자 및 그 제조방법을 첨부 도면을 참조하여 보다 상세하게

설명하고자 한다.

[0027] 도 1 및 도 2는 각각 본 발명의 일 실시예에 따른 미세 관류 소자를 사시도 및 평면도로 예시한다.

[0028] 도 1 및 도 2를 참조하면, 미세 관류 소자(1)는 세포(또는 생체 조직)의 성장과 생리활성 물질에 대한 생리활성을 관찰하는 데 사용되는 미세 관류 배양기로서, 세포 배양액 도관(10), 세포 배양부(20), 세포 주입 도관(30), 및 개폐부(40)를 포함한다.

[0029] 세포 배양액 도관(10)은 외부의 세포 배양액 소스(도시하지 않음)로부터 생체활성 조절물질를 포함하는 세포 배양액을 유입시켜 세포 배양부(20)로 공급한다.

[0030] 이를 위해, 세포 배양액 도관(10)은 배양액 도관 입구(11) 및 배양액 도관 출구(12)에 연결된 고무관과 같은 배양액 도관 연결관들(14)을 통해 세포 배양액 소스의 입구와 출구에 연결된다. 본 실시예에서, 배양액 도관 입구(11)와 배양액 도관 출구(12)는 0.1 ㎜ 내지 0.5 ㎜의 직경을 가지도록 형성된다.

[0031] 또한, 세포 배양액 도관(10)은 세포 배양부(20) 둘레에서는 세포 배양부(20)를 감싸는 형태로 형성된 굴곡부(15)를 갖는다.

[0032] 이러한 세포 배양액 도관(10)은 세포 배양부(20) 둘레에 위치한 굴곡부(15)와 그 외의 부분에서 각각 10 ~ 500 ㎛ 범위의 폭으로 형성될 수 있다.

[0033] 본 실시예에서, 굴곡부(15)에서는 약 50 ㎛의 폭으로 형성되고 그외 부분에서는 약 100 ㎛의 폭으로 형성된다. 여기서, 굴곡부(15)의 폭이 다른 부분 보다 좁게 형성하는 이유는 세포 배양액 도관(10)이 굴곡부(15)에서 후술하는 틈새부(17)을 통해 세포 배양부(20)와 연결되기 때문에, 세포 배양액이 굴곡부(15)를 통과할 때 다른 부분과 거의 동등한 속도로 굴곡부(15)를 통과할 수 있도록 하기 위해서이다. 또한, 세포 배양액이 세포 배양부(20)와 연결된 굴곡부(15)를 신속히 통과하도록 하고자 할 경우, 굴곡부(15)의 유입부쪽 폭을 줄이고 배출부쪽 폭을 늘리는 것에 의해 굴곡부(15)의 유입부와 배출부 사이의 압력차를 유도하여 세포 배양액이 굴곡부(15)를 신속히 통과하도록 할 수 있다.

[0034] 세포 배양부(20)는 틈새부(17)를 통해 세포 배양액 도관(10)과 연결되고, 세포 배양액 도관(10)으로부터 틈새부(17)를 통해 공급되는 생체활성 조절물질를 포함하는 세포 배양액에 의해 세포를 배양한다. 세포 배양부(20)는 접착성 세포 외에도, 임상연구에서 많이 사용하는 동물성 세포나 식물성 세포, 적당한 크기의 단세포 광합성(algae)나 작은 크기의 미세 조류(microalgae), 곰팡이, 원생생물, 박테리아 등과 같은 부유성 세포를 주입하여 배양할 수 있다.

[0035] 이러한 세포 배양부(20)는 배양하고자 하는 세포의 크기와 목적에 따라 높이, 크기, 및 모양을 조절할 수 있다. 즉, 세포 배양부(20)는 사각형, 원형, 타원형, 삼각형 등의 다양한 형태로 형성되고, 폭은 10~1000 ㎛, 높이는 5 ~ 100 ㎛의 범위를 가지도록 형성될 수 있다. 본 실시예에서, 세포 배양부(20)는 모서리부가 라운드진 사각형 형태로 형성되고, 폭과 높이는 각각 약 120 ㎛와 약 25 ㎛로 형성된다.

[0036] 틈새부(17)는 세포 배양액 도관(10)과 세포 배양부(20) 사이를 연결하는 연결 틈(18)을 포함한다. 연결 틈(18)은 세포 배양액과 액상의 생체활성 조절물질은 자유로이 통과할 수 있지만 세포는 통과할 수 없도록 형성된다. 이를 위해, 연결 틈(18)은 배양하고자 하는 세포의 크기에 따라 1 ~ 100 ㎛ 범위의 높이를 가지도록 형성될 수 있다. 예를 들면, 해양 단세포 녹조류인 두날리엘라 또는 클라미도모나스를 배양하는 경우, 연결 틈(18)은 약 2 ㎛의 높이를 가지도록 형성될 수 있다.

[0037] 틈새부(17)는 연결 틈(18)이 변형 등에 의해 짓눌려 폐쇄되지 않도록 연결 틈(18) 내에 일정 간격을 두고 배치된 복수 개의 미세 지지기둥(19)을 더 포함할 수 있다. 미세 지지기둥(19)은 원기둥, 사각기둥, 다각형 기둥 등의 다양한 형태로 형성될 수 있다. 또한, 미세 지지기둥(19) 사이의 간격은 배양하고자 하는 세포의 크기에 따라 정밀 노광기술을 이용하여 1 ~ 50 ㎛의 범위로 형성될 수 있다. 예를 들면, 미세 지지기둥(19) 사이의 간격은 연결 틈(18)이 변형 등에 의해 짓눌려 폐쇄되지 않도록 하기 위해 세포의 크기가 커서 연결 틈(18)의 높이가 높게 설계되는 경우에는 5 ~ 50 ㎛의 범위로 넓게 형성되고, 반대로 세포의 크기가 작아 미세 틈의 높이가 낮게 설계되는 경우에는 1 ~ 5 ㎛의 범위로 좁게 형성될 수 있다.

[0038] 본 실시예에서, 미세 지지기둥(19)은 원기둥 형태로 형성되고, 약 10 ㎛의 간격를 가지도록 형성된다.

[0039] 세포주입 도관(30)은 세포 배양부(20)와 연결되어 세포 배양부(20)에 세포를 주입한다. 이를 위해, 세포주입 도관(30)은 세포주입 도관 입구(31) 및 세포주입 도관 출구(32)에 연결된 고무관과 같은 세포주입 도관 연결관들

(34)을 통해 세포 소스(도시하지 않음)의 입구와 출구에 연결된다. 본 실시예에서, 세포주입 도관 입구(31)와 세포주입 도관 출구(32)는 세포 배양액 도관(10)의 배양액 도관 입구(11) 및 배양액 도관 출구(12)와 마찬가지로, 0.1 ㎜ 내지 0.5 ㎜의 직경을 가지도록 형성된다.

[0040] 세포 주입 도관(30)은 주입하는 세포의 크기에 따라 10 ~ 500 ㎛ 범위의 폭을 가지도록 형성될 수 있다. 본 실시예에서, 세포 주입 도관(30)은 약 100 ㎛의 폭을 가지도록 형성된다.

[0041] 또한, 세포 주입 도관(30)은 장시간 사용에 따른 파손 없이 개폐부(40)의 동작이 원활히 이루어지도록 세포 배양부(20)와 만나는 분기부(33)의 끝단(33a)에서 곡면으로 라운드지게 형성될 수 있다.

[0042] 이와 같은 구성된 세포 배양액 도관(10), 세포 배양부(20), 틈새부(17) 및 세포 주입 도관(30)은 세포 배양층(6) 내부에 배치된다. 세포 배양층(6)은 도 4 및 도 8과 관련하여 후술하는 바와 같이, PDMS와 같은 얇은 탄성 고분자 재료에 의해 내부에 세포 배양액 도관(10), 세포 배양부(20), 틈새부(17) 및 세포 주입 도관(30)을 내장하도록 형성된다. 도 3은 실제로 제작된 세포 배양층(6)을 찍은 주사전자현미경 사진을 예시한다.

[0043] 개폐부(40)는 세포 배양부(20)에 연결되는 세포 주입 도관(30)의 분기부(33)에 배치되어 세포 주입 도관(30)을 통한 세포 흐름을 차단하거나 개방하는 개폐밸브(41)를 포함할 수 있다.

[0044] 개폐밸브(41)는 세포 주입 도관(30)의 분기부(33) 아래에서 분기부(33)와 인접하게 배치된 공기밸브 채널로 구성될 수 있다. 공기밸브 채널은 공급되는 공기압에 의해 팽창하거나 수축하여 세포 주입 도관(30)의 분기부(33)을 변형하는 것에 의해 세포 주입 도관(30)을 통한 세포 흐름을 차단하거나 개방한다. 이를 위해, 공기밸브 채널은 채널 입구(42) 및 채널 출구(43)에 연결된 고무관과 같은 세포주입 도관 연결관들(44)을 통해 외부의 압축공기 소스(도시하지 않음)의 출구와 공기밸브 채널 내의 압축공기의 배출을 제어할 수 있는 배출 제어부(도시하지 않음)와 연결된다. 여기서, 배출 제어부는, 필요에 따라 공기밸브 채널 내의 압축공기의 배출량을 제어할 수 있는 유압 또는 유량제어밸브일 수 있다. 또한, 공기밸브 채널은 공기밸브 채널이 내장되는 후술하는 도관 개폐층(7)의 두께에 따라 다르지만, 0.2 ~ 0.5 MPa 범위의 공기압에 견딜 수 있도록 형성된다.

[0045] 본 실시예에서, 채널 입구(42)와 채널 출구(43)는 세포 배양액 도관(10)의 배양액 도관 입구(11) 및 배양액 도관 출구(12)와 마찬가지로, 0.1 ㎜ 내지 0.5 ㎜의 직경을 가지도록 형성된다.

[0046] 공기밸브 채널은 세포 주입 도관(30)의 분기부(33)를 압축 또는 수축시킬 수 있도록 세포 주입 도관(30)의 폭에 대응하는 10 ~ 500 ㎛ 범위의 폭을 가지도록 형성될 수 있다. 본 실시예에서, 공기밸브 채널은 약 100 ㎛의 폭을 가지도록 형성된다.

[0047] 이와 같은 구성된 개폐밸브(41)는 도관 개폐층(7) 내에 배치된다. 도관 개폐층(7)은 도 5 및 도 8과 관련하여 후술하는 바와 같이, PDMS와 같은 얇은 탄성 고분자 재료에 의해 내부에 도관 개폐층(7)을 내장하도록 형성된다.

[0048] 도 6에 도시된 바와 같이, 도관 개폐층(7)과 세포 배양층(6)은 함께 접합되어 관류 배양층(5)를 형성한다. 도관 개폐층(7)과 세포 배양층(6)은 모두 탄성 고분자 재료로 형성되므로, 서로 겹쳐 놓은 후 일정 온도, 예를 들면 130℃로 가열하여 완전 경화시키는 것에 의해 서로 접합된다.

[0049] 이와 같이 형성된 관류 배양층(5)은 접합층(4)에 의해 지지층(3) 상에 접합되어 지지된다. 지지층(3)은 현미경 슬라이드의 덮개 유리 (cover slip) 또는 슬라이드 유리 (slide glass)와 같은 약 0.01 ㎜ - 1.5 ㎜의 두께를 갖는 유리기판, 또는 아크릴, 폴리스타이렌, 폴리카아보네이트, 폴리설포네이트 등과 같은 재질의 투명한 플라스틱 기판으로 구성되고, 접합층(4)은 PDMS로 형성될 수 있다.

[0050] 관류 배양층(5)과 지지층(3)은 도 7에 도시한 바와 같이 지지층(3) 상에 PDMS로 형성된 접합층(4)을 올려 놓은 후 제1 일정 온도, 예를 들면 70℃로 가열하여 반 경화상태로 만든 다음, 관류 배양층(5)을 접합층(4)에 올려 놓고 제2 일정 온도, 예를 들면 130℃로 가열하여 완전 경화시키는 것에 의해 서로 접합될 수 있다.

[0051] 이상에서, 개폐부(40)의 개폐밸브(41)는 공기밸브 채널로 구성된 것으로 예시 및 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되지 않는다. 예를 들면, 개폐밸브(41)는 세포 주입 도관(30)의 분기부(33) 아래에서 분기부(33)와 인접하게 배치되어 세포 주입 도관(30)을 변형을 유발하여 세포 주입 도관(30)을 통한 세포 유출입을 제어하는 압전소자(도시하지 않음), 또는 세포 주입 도관의 분기부(33)에 배치되어 세포 주입 도관(30)을 통한 세포 유출입을 제어하는 솔레노이드 밸브(도시하지 않음)를 포함할 수 있다.

[0052] 또한, 개폐밸브(41)는 세포 주입 도관(30)의 분기부(33) 아래에 배치된 것으로 예시 및 설명하였지만, 세포 주

입 도관(30)의 분기부(33) 위에 배치될 수 있다. 이 경우, 내부에 개폐밸브(41)가 내장된 도관 개폐층(7)은 세포 배양층(6) 위에 배치된다.

[0053] 이상과 같이 구성된 본 발명의 일 실시예에 따른 미세 관류 소자(1)는 세포 주입 도관(30)과 세포 배양부(20)를 독립적으로 분리할 수 있고 필요에 따라 세포 배양부(20)에 대한 세포의 출입을 통제할 수 있는 개폐부(40)를 구비하므로, 세포 배양을 위한 별도 공간의 확보가 가능할 뿐 아니라 세포 배양부의 부피 정의도 가능하다. 따라서, 적은 양의 시약을 사용하여 세포의 반응성을 확인할 수 있고, 그 결과, 새로운 생리활성 저해제나 활성화제의 탐색이 더 용이해 진다. 또한, 생리활성 물질의 영향을 확인하는 실험 시는 세포 배양부(20)에 공급되는 생리활성 물질의 정확한 농도를 쉽게 알 수 있고, 세포 배양액의 조성 변화에 따른 세포의 반응을 확인하는 실험 시는 세포 배양부(20)의 미세 환경을 빠르게 변화시킬 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명의 미세 관류 소자(1)는 세포 배양액 도관(10)과 세포 배양부(20) 사이에 세포 배양액과 액상의 생체활성 조절물질은 자유로이 통과할 수 있지만 세포는 통과할 수 없도록 하는 연결 틈(18)을 포함하는 틈새부(17)를 배치하므로, 세포 배양부(20)에서 배양되는 세포가 배양액 또는 액상의 생체활성 조절물질과 함께 세포 배양부(20)로부터 세포 배양액 도관(10)으로 빠져나가는 것을 방지할 수 있고, 이에 따라, 접착성 세포 외에도 부유성 세포까지 미세 배양이 가능하다. 또한, 세포 배양부(20)로 유입되는 배양액의 흐름이 틈새부(17)에 의해 어느 정도 억제되므로, 배양액의 흐름으로 인해 세포에 전단 스트레스가 가해지는 문제점이 해소될 수 있다.

[0055] 다음으로, 이상과 같이 구성된 본 발명의 미세 관류 소자(1)의 제조방법을 도 4 내지 도 8을 참조하여 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0056] 먼저, 도 4에 도시된 바와 같이, 세포 배양액 도관(10), 세포 배양부(20), 틈새부(17), 및 세포 주입 도관(30)이 내부에 형성된 세포 배양층(6)이 준비된다(S1).

[0057] 보다 상세히 설명하면, 세포 배양층(6)은 다음의 단계로 형성된다. 먼저, 유연광석판기술(soft photolithography)을 사용하여 실리콘 기판으로 세포 배양액 도관(10), 세포 배양부(20), 틈새부(17), 및 세포 주입 도관(30)에 대응하는 문양을 가지는 제1 주형(도시하지 않음)이 제작된다. 이때, 제1 주형은 유연광석판기술을 이용하는 대신, 미세 절삭가공 기술을 이용하여 제작할 수도 있다. 유연광석판기술을 이용할 경우, 세포 주입 도관(30)과 세포 배양부(20)이 만나는 분기부(33)의 끝단(33a)의 곡면 부분의 주형은 다른 부분 보다 유리화 온도가 상대적으로 낮은 광감제를 사용하여 제작할 수 있다. 이어서, 탄성 고분자 재료, 예를 들면, PDMS를 사용하여 제1 주형에 의해 내부에 세포 배양액 도관(10), 세포 배양부(20), 틈새부(17), 및 세포 주입 도관(30)을 가지는 세포 배양층(6)이 성형 형성된다. 형성된 세포 배양층(6)을 일정 시간 방치하여 반 경화시킨 후, 세포 배양층(60)의 세포 배양액 도관(10)과 세포 주입 도관(30)을 각각 외부의 세포 배양액 소스와 세포 소스에 연결하기 위한 연결관들(14, 34)을 고정하는 입구 및 출구들(11, 12; 31, 32)이 주사 바늘 등과 같은 천공기로 뚫는 것에 의해 세포 배양액 도관(10)과 세포 주입 도관(30)의 양단부의 상응하는 위치에 각각 형성된다.

[0058] 다음으로, 도 5에 도시된 바와 같이, 세포 주입 도관(30)을 개폐하는 개폐부(17)가 내부에 형성된 도관 개폐층(7)이 준비된다(S2).

[0059] 보다 상세히 설명하면, 도관 개폐층(7)은 다음의 단계로 형성된다. 먼저, 세포 배양층(6)과 마찬가지로, 유연광석판기술을 사용하여 실리콘 기판으로 개폐밸브(41)에 대응하는 문양을 가지는 제2 주형(도시하지 않음)이 제작된다. 이어서, 탄성 고분자 재료, 예를 들면, PDMS를 사용하여 제2 주형에 의해 내부에 개폐밸브(41)를 가지는 도관 개폐층(7)이 성형 형성된다. 그 다음, 형성된 도관 개폐층(7)을 일정 시간 방치하여 반 경화시킨 후 개폐밸브(41)의 공기밸브 채널을 외부의 압축공기 소스와 배출제어부와 연결하기 위한 연결관(44)을 고정하는 입구 및 출구(42, 43)가 주사 바늘 등과 같은 천공기로 뚫는 것에 의해 형성된다.

[0060] 그 다음, 도 6에 도시된 바와 같이, 준비된 세포 배양층(6)과 도관 개폐층(7)은 서로 접합되어 관류 배양층(5)이 형성된다(S3). 이때, 도관 개폐층(7)과 세포 배양층(6)은 서로 겹쳐 놓은 후 일정 온도, 예를 들면 130℃로 가열하여 완전 경화시키는 것에 의해 서로 접합된다.

[0061] 관류 배양층(5)은 접합층(4)에 의해 지지층(3) 상에 접합된다(S4). 보다 상세히 설명하면, 관류 배양층(5)과 지지층(3)은 도 7에 도시된 바와 같이 지지층(3) 상에 PDMS로 형성된 접합층(4)을 올려 놓은 후 제1 일정 온도, 예를 들면 70℃로 가열하여 반 경화상태로 만든 다음, 관류 배양층(5)을 접합층(4)에 올려 놓고 제2 일정 온도, 예를 들면 130℃로 가열하여 완전 경화시키는 것에 의해 서로 접합된다.

[0062] 본 출원인은 본 발명의 미세 관류 소자(1)의 제조방법을 사용하여 미세 관류 소자(1)를 다음과 같이 실제로 제

작하였다.

[0063] [예 1]

[0064] 미세 관류 소자는 유리기판 위에 각 미세도관을 갖는 PDMS 층을 접착하여 제작하였다. 먼저, 광식각법으로 실리콘 기판으로 도 1 및 도 2에 도시된 세포 배양액 도관(10), 세포 배양부(20), 지지기둥(19)이 없는 연결 틈(18), 세포 주입 도관(30) 및 세포 배양액 도관(10)의 분기부(33)에 대응하는 문양을 가지는 주형을 만들었다. 즉, SU8-2 감광제로 실리콘 기판에 2 ㎛ 높이의 연결 틈(18)에 대응하는 문양을 만들고, 그 위에 희석된 SU8-50 감광제로 약 25 ㎛ 높이의 세포 배양액 도관(10), 세포 배양부(20), 및 세포 주입 도관(30)에 대응하는 문양을 제작하였다. 다시, 그 위에 세포 배양액 도관(10)의 분기부(33)를 AZ4650 감광제로 제작하였다. 이와 같은 다층 문양 구조를 갖는 실리콘 기판을 약 135℃에서 열처리하여 직각 모양의 AZ4650 문양을 곡면으로 바꾸었다. 따라서, 세포 배양액 도관(10), 세포 배양부(20), 지지기둥(19)이 없는 연결 틈(19), 세포 주입 도관(30) 및 세포 배양액 도관(10)의 분기부(33)의 문양을 찍어낼 수 있는 한 개의 실리콘 기판 주형을 완성하였다. 다른 한 개의 실리콘 기판으로 도 1 및 도 2에 도시된 개폐부(40)를 위한 주형을 높이 약 10 ㎛로 제작하였다. 10:1로 섞은 미합중국 다우 코닝사(Dow Corning, USA) 제품의 PDMS를 이용하여 첫 번째 주형에 의해 약 5 ㎜의 PDMS 세포 배양층을 만들었다. 중간정도 경화시킨 후, 22G 주사바늘로 각 도관에 고무관을 연결할 수 있도록 입구 및 출구용 구멍을 뚫었다. 개폐부(40)를 위한 주형에 의해서는 20:1로 섞은 미합중국 다우 코닝사 제품의 PDMS를 이용하여 약 25 ㎛의 PDMS 도관 개폐층을 만들었다. 마찬가지로, 중간정도 경화시킨 후, PDMS 도관 개폐층에 주사바늘로 고무관과 연결할 구멍을 뚫었다. PDMS 도관 개폐층에 첫 번째 만든 5 ㎜ PDMS 세포 배양층을 올려놓고 130 ℃에서 완전히 경화시켜 접착하여 PDMS 관류 배양층을 형성하였다. 이 PDMS 관류 배양층을 반쯤 경화된 얇은 PDMS 층이 있는 유리기판 위에 올려놓고 다시 130℃로 가열하여 완전히 경화시켰다. 각 구멍에 고무관을 연결하여 도 9에 도시된 것과 같은 지지기둥이 없는 미세 관류 소자를 완성하였다.

[0065] [예 2]

[0066] 도 1 및 도 2의 세포 배양액 도관(10), 세포 배양부(20), 틈새부(17)의 연결틈(18)/지지기둥(19), 세포 주입 도관(30) 및 세포 배양액 도관(10)의 분기부(33)의 문양을 찍어내는 실리콘 기판 주형에 PDMS를 부어 굳힌 다음, PDMS 세포 배양층을 떼어 금 박막을 입힌 다음, 주사전자현미경으로 세부 구조를 확인하였다(도 10 참조). 지지기둥(19)은 볼록한 낮은 원주로 만들어 졌다. 지지기둥(19) 사이의 공간은 연결 틈(18)이 되었다. 이 연결 틈(18)의 깊이는 약 2 ㎛이며 세포 배양액 도관(10)과 세포 배양부(20)를 물리적으로 연결하는 통로가 된다. 개폐부(40)와 세포 주입 도관(30)이 겹치는 세포 주입 도관(30)의 분기부(33)는 세포 배양부(20)의 입구이며, 곡면으로 제작하였다.

[0067] 또한, 본 출원인은 본 발명의 미세 관류 소자(1)를 사용하여 다음과 같이 실제로 세포를 배양하는 실험믈 하였다.

[0068] [실험예 1]

[0069] 상기 예 1에 따라 미세 관류 소자를 제작하고, 이 미세 관류 소자에 단세포 녹조류 클라미도모나스를 주입하고 그 성장을 관찰하였다. TAP 배지(D.S. Gorman과 R.P. Levine (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 1665-1669)로 클라미도모나스를 배양하였다. 개폐밸브의 공기밸브 채널에 약 0.1 MPa의 압력을 가하여, 세포 주입 도관과 세포 배양부의 연결을 차단한 다음, 공기밸브 채널에 고무관으로 연결된 1 mL 주사기를 이용하여 클라미도모나스를 세포 주입 도관으로 주입하였다. 그 외의 공간은 세포 배양액 도관에 TAP 배지를 주입하였다. 공기밸브 채널의 압력을 완화하여 세포 주입 도관을 열어 일정수의 클라미도모나스 세포를 세포 배양부에 주입하고, 다시 공기밸브 채널에 압력을 가하여 세포 주입 도관을 닫았다. 세포 배양액 도관에 TAP 배지를 1㎕/min의 유속으로 흘려주며, 클라미도모나스를 배양하였다. 일정 시간 간격으로 사진을 찍어 그 성장정도를 확인하였다. 도 11에 도시된 바와 같이, 처음 40시간 동안 클라미도모나스 세포수는 크게 늘지 않았으나, 그 후 60 시간에는 배양된 세포에 의해 미세 배양부 공간의 반 정도를 채웠다. 마지막으로 80 시간 후에는 세포 배양부는 클라미도모나스로 꽉 찼다. 세포 배양액 도관으로부터 새로운 배지가 연결 틈(도 1의 18)을 통해 계속 세포 배양부로 유입되므로 클라미도모나스 세포의 성장에 필요한 영양분이 충분히 공급되었다.

[0070] [실험예 2]

[0071] 세포 배양액 도관을 제외한 부분을 상기 예 1에 따라 미세 관류 소자를 제작하고, 세포 배양액 도관으로부터 세포 배양부로 물질의 이동 속도를 조사하였다(도 12 참조). 미세 관류 소자는 이동 속도를 빠르게 하기 위해 세포 배양부 둘레에 비대칭적 세포 배양액 도관을 배치하여, 세포 배양액 도관의 굴곡부의 유입부와 유출부 사이

에 압력차가 생기도록 하였다. 즉, 유입부의 폭을 30 ㎛로 하고 유출부의 너비를 90 ㎛로 제작하였다. 전 공간을 증류수로 채운 다음, 개폐부의 공기밸브 채널에 0.1 MPa의 기압을 가하여 세포 배양부와 세포 주입 도관 사이를 차단하고, 주사기를 이용하여, 도 12에 삽입된 그림의 왼쪽에서 오른쪽으로 증류수를 1 μL/min의 유속으로 주입하였다. 일정시간 경과 후 주입액을 형광물질 플루오르세인(fluorescein)이 든 증류수로 교체하고, 형광현미경사진을 일정시간 간격으로 찍었다. 저장한 형광사진의 배양액 도관부와 세포 미세 배양부의 형광세기를 시간에 따라 도 12의 그래프로 나타냈다. 두 부분의 시간에 따른 형광세기는 큰 차이가 없었다. 따라서, 이 미세 관류 소자를 사용하면, 세포 배양액 도관에 주입되는 배양액 조성을 바꾸는 것에 의해 세포 배양부의 조성을 시간 지체 없이 바로 조절할 수 있음이 확인되었다.

[0072] [실험예 3]

[0073] 상기 예 1에 따라 미세 관류 소자를 제작하고, 세포 배양액 조성에 따른 세포 미세 배양부에 주입한 세포의 반응을 조사하였다. 인공해수 배지(C.S. Weldy와 M. Huesemann (2008) J. Undergrad. Res. 115-122)로 해양 단세포 녹조류인 두날리엘라를 배양하였다. 개폐부의 공기밸브 채널에 약 0.1 MPa의 압력을 가하여, 세포 주입 도관과 세포 배양부의 연결을 차단한 다음, 세포 주입 도관에 고무관으로 연결된 1 mL 주사기를 이용하여 두날리엘라를 세포 주입 도관에 주입하였다. 그 외의 공간은 세포 배양액 도관를 통하여 인공해수 배지를 주사기로 주입하였다. 공기밸브 채널의 압력을 완화하여 세포 주입 도관을 열어 일정수의 두날리엘라 세포를 세포 배양부에 주입하고, 다시 공기밸브 채널에 압력을 가하여 공기밸브 채널을 닫았다. 세포 배양액 도관에 인공해수 배지를 0.5 μL/min의 유속으로 흘려주며, 두날리엘라를 배양하였다. 세포 배양액의 조성 변화에 따른 세포의 반응을 관찰하기 위하여 일정 시간 간격으로 사진을 찍었다. 일정 시간 경과후 4 M 염화나트륨을 함유하는 인공해수 배지를 세포 배양액 도관에 흘려주면서 세포의 반응을 관찰하였다. 세포 배양액 도관의 배양액이 등장액에서 고장액으로 바뀌면서, 두날리엘라 세포의 한쪽 끝은 녹색의 작은 구로 변하고, 다른 반대편은 옅은 색을 띄면서 뾰족하게 바뀌어, 전체 모양은 발아하는 씨앗모양이 되었다. 이러한 변화는 도 13에 도시된 바와 같이 2분 사이에 관찰되었으며, 세포 배양액 도관의 염류 농도가 고장액 주입에 따라 높아지면서 세포 미세 배양부의 염류 농도가 높아지고, 이에 따라, 두날리엘라 세포의 탈수 현상으로 생겼다.

[0074] 이상에서, 본 발명은 원리를 예시하기 위한 실시예와 관련하여 설명하고 도시하였으나, 본 발명은 그와 같이 도시되고 설명된 구성 및 작용으로 한정되지 않는다. 또, 첨부된 특허청구범위의 사상 및 범주를 벗어 나지 않고 본 발명에 대한 다양한 변경과 수정이 가능함은 당업자들에게는 잘 이해될 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명에 대한 모든 적절한 변경 및 수정과 균등물들도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 간주 되어야 할 것이다.

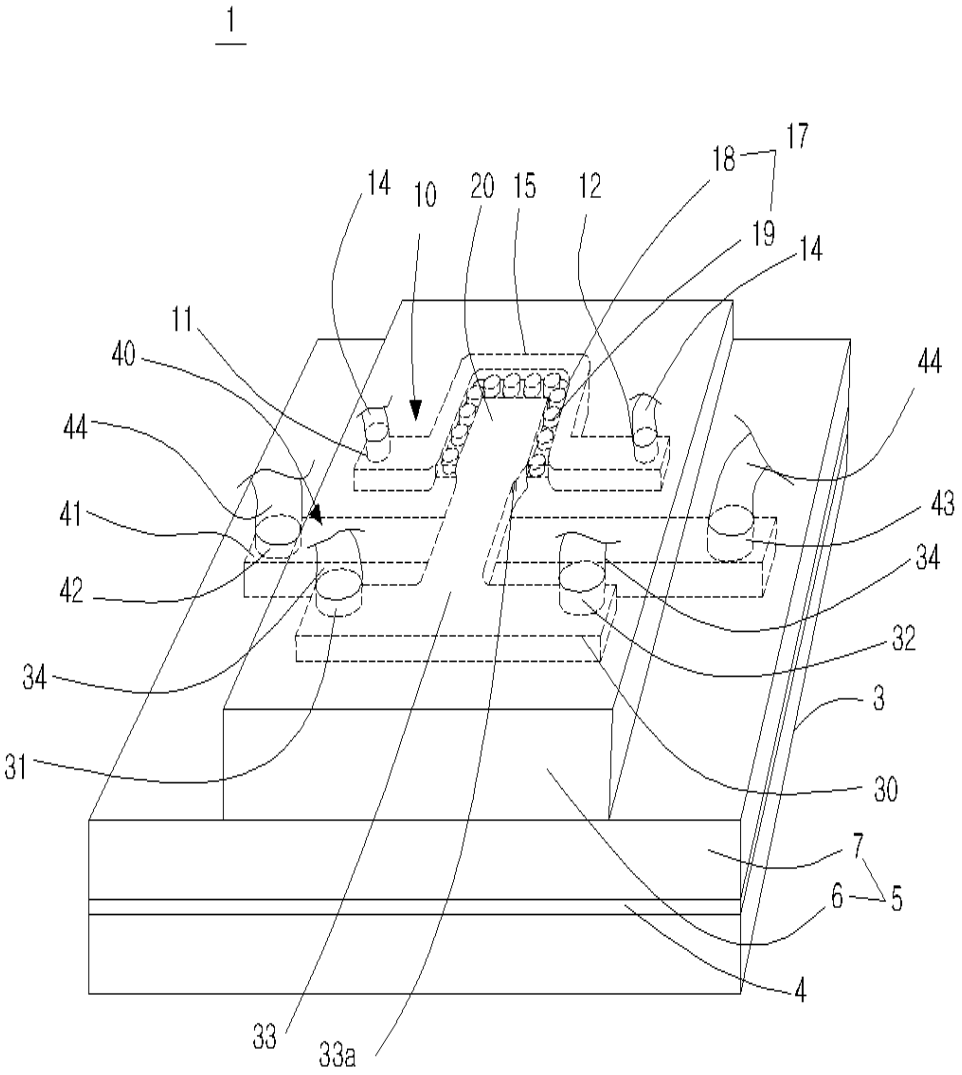
부호의 설명

[0075]

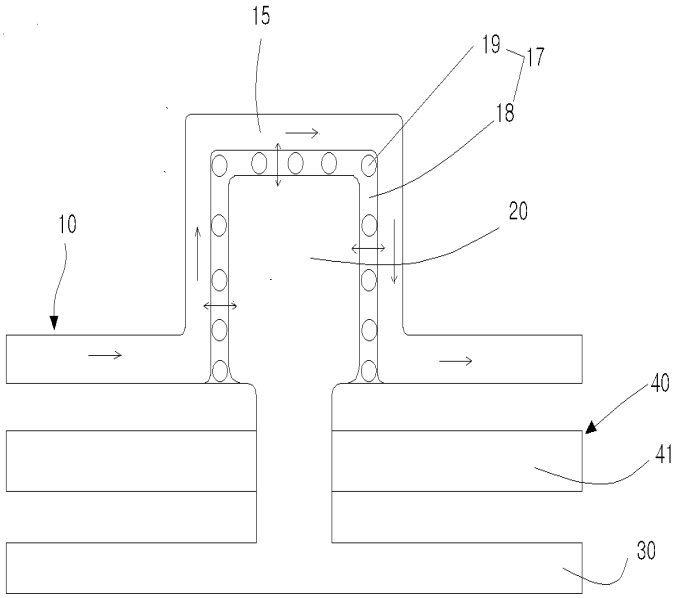
1: 관류 배양 소자
3: 지지층
4: 접합층
5: 관류 배양층
6: 세포 배양층
7: 도관 개폐층
10: 세포 배양액 도관
17: 틈새부
18: 연결 틈
19: 지지기둥
20: 세포 배양부
30: 세포 주입 도관
40: 개폐부
41: 개폐밸브

도면

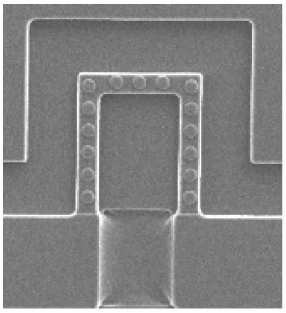
도면1


1
14
10
20
15
12
18
17
19
14
11
40
44
44
41
43
42
34
34
32
3
31
30
7
6
5
4
33
33a

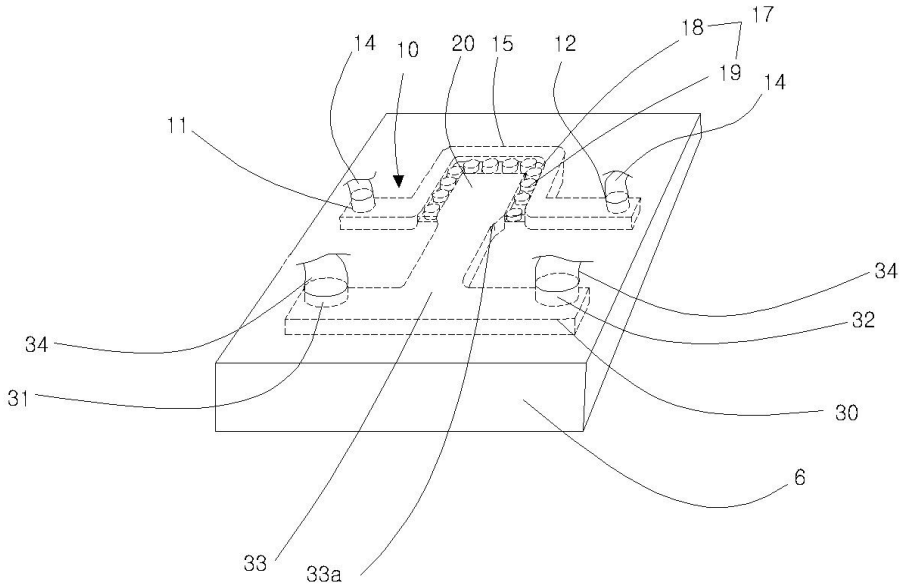
도면2



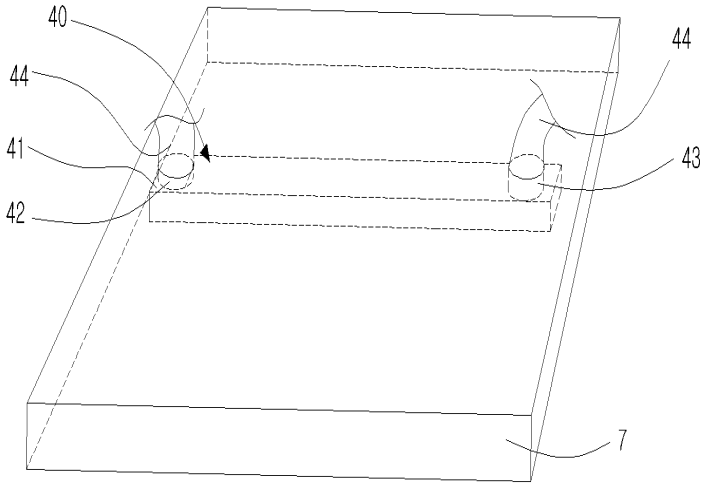
도면3



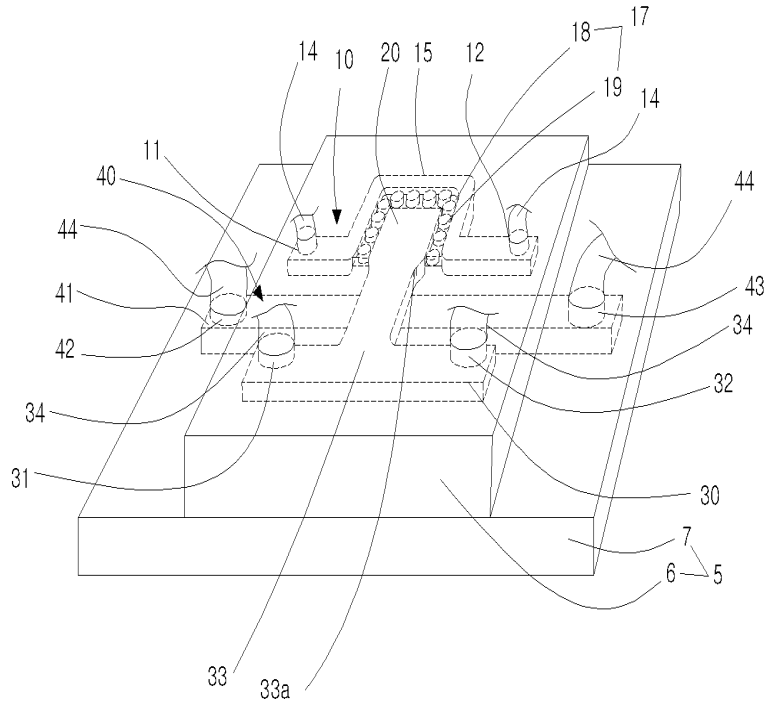
도면4



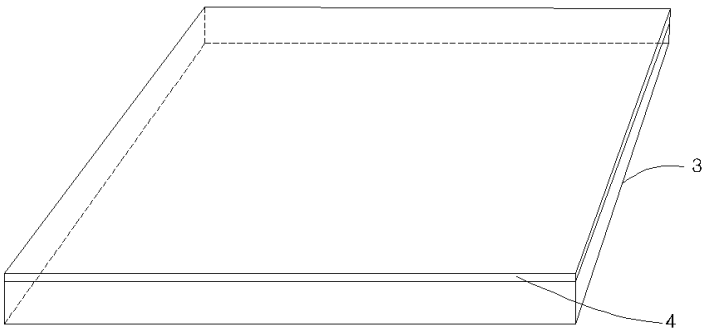
도면5



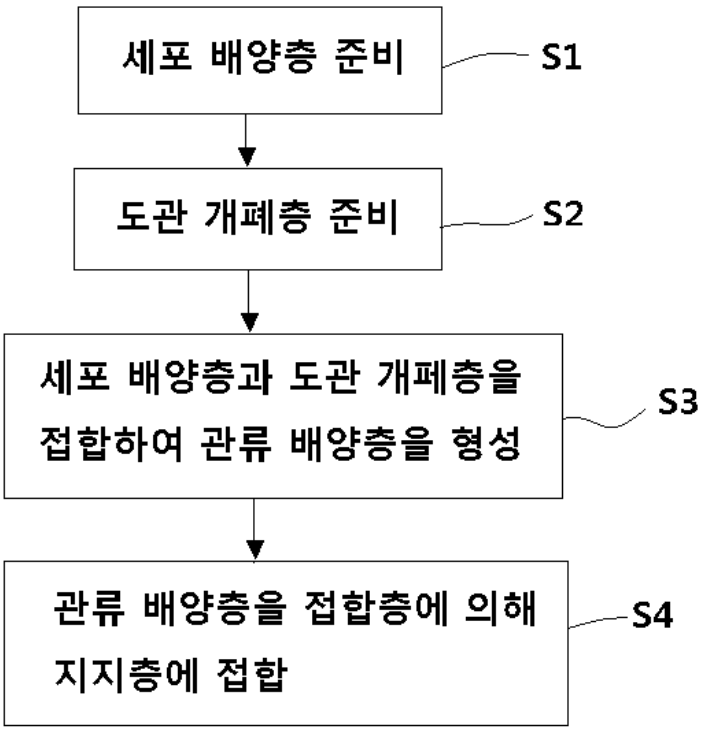
도면6


14
10
20
15
12
18
17
19
14
11
40
44
44
41
43
42
34
34
32
31
30
7
6
5
33
33a

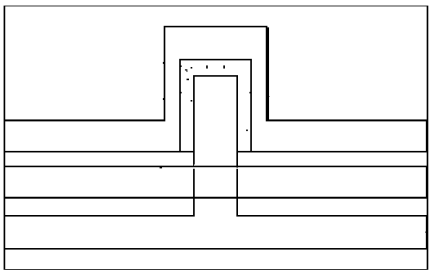
도면7


3
4

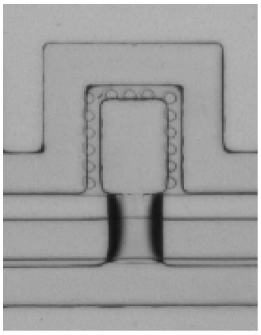
도면8


세포 배양층 준비
S1
도관 개폐층 준비
S2
세포 배양층과 도관 개폐층을 접합하여 관류 배양층을 형성
S3
관류 배양층을 접합층에 의해 지지층에 접합
S4

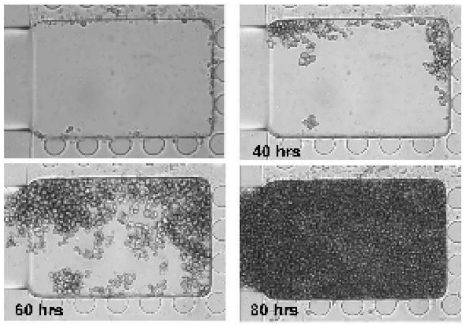
도면9



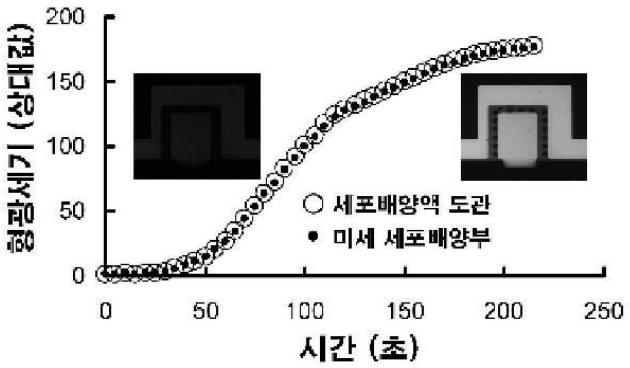
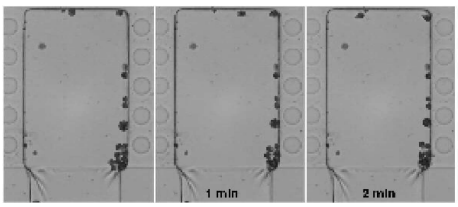
도면10



도면11



도면12



도면13