



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0159040
(43) 공개일자 2022년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/00 (2006.01) B01L 7/00 (2006.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
(52) CPC특허분류
B01L 3/502784 (2013.01)
B01L 7/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0066852
(22) 출원일자 2021년05월25일
심사청구일자 2022년03월30일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
정봉근
서울특별시 마포구 백범로 35, 서강대학교 R관 618호
서원호
서울특별시 마포구 독막로31길 17, 101호
최지욱
서울특별시 마포구 백범로 35, 서강대학교 RA관 405호
(74) 대리인
윤대웅

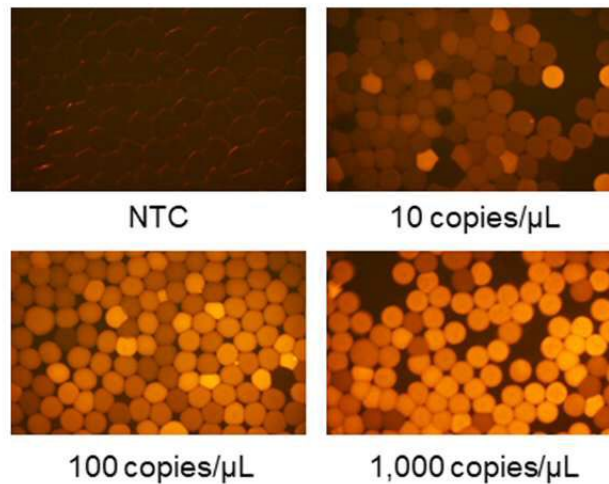
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 미세 액적 기반 디지털 재조합효소-중합효소 등온증폭용 마이크로칩 및 이를 이용한 등온증폭 방법

(57) 요약

본 발명은 미세 액적 기반 디지털 재조합효소-중합효소 등온증폭용 마이크로칩 및 이를 이용한 등온증폭방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 마이크로칩은 낮은 오차율과 높은 정확도로 재조합효소-중합효소 증폭 반응을 진행할 수 있어, 다양한 질병 진단 분야와 융합되어 폭 넓게 이용될 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

C12Q 1/686 (2018.05)
B01L 2200/0663 (2013.01)
B01L 2300/0861 (2013.01)
B01L 2300/0883 (2013.01)
C12Q 2527/101 (2019.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711110045
과제번호	2019R1A2C2008863
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	다기능성 나노입자 및 3차원 마이크로칩 시스템을 이용한 신경재생 연구
기 여 율	40/100
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129031
과제번호	2019M3A9H2031820
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	만능줄기세포 기반 쿡팔오가노이드 정밀 분화 분석 및 고효율 약물 독성/효능 평가

용 오가노이드칩 기술 개발

기 여 율	30/100
과제수행기관명	중앙대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345312114
과제번호	2016R1A6A1A03012845
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	서강대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

유상물질이 주입되는 제1주입구, 및 상기 제1주입구를 통해 주입된 유상물질이 유동하는 제1유로를 포함하는 제1채널;

상기 제1유로와 연통하는 분기유로를 하나 이상 포함하는 분기채널;

제1수상물질이 주입되는 제2주입구, 및 상기 제2주입구를 통해 주입된 상기 제1수상물질이 유동하는 제2유로를 포함하는 제2채널;

제2수상물질이 주입되는 제3주입구, 및 상기 제3주입구를 통해 주입된 상기 제2수상물질이 유동하는 제3유로를 포함하는 제3채널;

상기 제2유로 및 상기 제3유로가 합쳐지는 합류채널, 상기 합류채널과 상기 분기채널의 분기유로가 합쳐지는 합류부, 및 상기 합류채널의 직경보다 작은 직경을 갖는 집합채널을 포함하는 집합영역; 및

상기 집합채널의 최소직경보다 큰 최소직경을 갖고 미세액적이 형성되는 제4유로, 및 형성된 미세액적이 배출되는 배출구를 포함하는 제4채널;

을 포함하는, 마이크로칩.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1유로, 상기 제2유로 및 상기 제3유로 중 선택된 하나 이상은 하나 이상의 변곡부를 포함하여 굴곡지게 배치되는 것인, 마이크로칩.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 분기채널은 분기유로를 둘 이상 포함하는 것인, 마이크로칩.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 분기유로는 상기 분기유로가 꺾이는 절곡부를 하나 이상 포함하는 것인, 마이크로칩.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 유상물질은 계면활성제를 담지한 미네랄 오일을 포함하는 것인, 마이크로칩.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 제1수상물질은 DNA, 프라이머, 프로브 및 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것인, 마이크로칩.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 제2수상물질은 마그네슘 이온용액을 포함하는 것인, 마이크로칩.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 집합채널 및 상기 합류채널의 최소직경의 비는 1:2인 것인, 마이크로칩.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 집합채널 및 상기 제4유로의 최소직경의 비는 1:3인 것인, 마이크로칩.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 제2채널 및 상기 제3채널은 상기 분기채널로 형성된 수상 채널영역내에 포함되는 것인, 마이크로칩.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 마이크로칩은 폴리디메틸실록산 (polydimethylsiloxane; PDMS)을 포함하는 것인, 마이크로칩.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 합류채널, 상기 합류부 및 상기 접합채널은 선형으로 나란히 배치되는 것인, 마이크로칩.

청구항 13

제2항에 있어서,

상기 제1유로, 상기 제2유로 및 상기 제3유로 중 선택된 하나 이상은 셋 이상의 변곡부를 포함하는 것인, 마이크로칩.

청구항 14

제4항에 있어서, 상기 분기유로는 둘 이상의 절곡부를 포함하는 것인, 마이크로칩.

청구항 15

다음 단계를 포함하는 등온증폭 반응 방법:

유상물질, 제1수상물질 및 제2수상물질을 마이크로칩에 주입하는 주입 단계;

상기 마이크로칩 상에서 상기 유상물질, 상기 제1수상물질 및 상기 제2수상물질을 혼합하여 미세액적을 형성하는 액적 형성 단계; 및

상기 미세액적을 수득하고 특정 온도로 가열하여 등온증폭 반응을 일으키는 반응 단계,

를 포함하고, 상기 마이크로 칩은

상기 유상물질이 주입되는 제1주입구, 및 상기 제1주입구를 통해 주입된 상기 유상물질이 유동하는 제1유로를 포함하는 제1채널;

상기 제1유로와 연통하는 분기유로를 하나 이상 포함하는 분기채널;

상기 제1수상물질이 주입되는 제2주입구, 및 상기 제2주입구를 통해 주입된 제1수상물질이 유동하는 제2유로를 포함하는 제2채널;

상기 제2수상물질이 주입되는 제3주입구, 및 제3주입구를 통해 주입된 제2수상물질이 유동하는 제3유로를 포함하는 제3채널;

상기 제2유로 및 상기 제3유로가 합쳐지는 합류채널, 상기 합류채널과 상기 분기채널의 분기유로가 합쳐지는 합류부, 및 상기 합류채널의 직경보다 작은 직경을 갖는 접합채널을 포함하는 접합영역; 및

상기 접합채널의 최소직경보다 큰 최소직경을 갖고 미세액적이 형성되는 제4유로, 및 형성된 미세액적이 배출되는 배출구를 포함하는 제4채널;

을 포함하는 것임.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세 액적 기반 디지털 재조합효소-중합효소 등온증폭용 마이크로칩 및 이를 이용한 등온증폭 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 칩내에 설계된 미세 유로를 통해 높은 효율로 미세액적을 형성하고, 이를 통해

기존 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction; PCR)과 같은 고감도로 신속한 분자진단을 수행할 수 있는 마이크로칩에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 마이크로 유체 칩은 미세 유체 채널 (마이크로 채널, 나노 채널 등)을 포함하고 있는 칩을 의미한다. 마이크로 유체 칩은 소량의 유체를 사용하는 것만으로도 각종 진단 및 분석에 사용될 수 있으며, 랩온어칩 (lab-on-a-chip)이라 불리기도 한다. 구체적으로, 마이크로 유체 칩은 미세 유체 공학을 이용하여 제조되며 미소 단위 (마이크로미터, 나노미터)의 크기를 갖는 채널을 통해 세포 분석, 나노 입자 합성, 분자 진단 등에 활용될 수 있다.
- [0003] 그 중 분자 진단의 일종인 디지털 중합효소연쇄반응 (Digital polymerase chain reaction; dPCR)은 중합효소연쇄반응 (Polymerase chain reaction; PCR)의 3세대 격으로서, 암, 백혈병, 각종 호흡기 질환 등 다양한 질병의 진단을 위해 사용되고 있다. 기존 1세대 PCR이나 2세대 실시간 PCR과 달리, dPCR은 표준물질이나 대조 물질 없이 절대 정량 분석을 수행할 수 있으며, 높은 정확도와 민감도를 나타내기 때문에 차세대 진단 시스템으로 주목받고 있다.
- [0004] 한편, 최근에는 전통적인 PCR 방법에서 요구되는 변성(denaturation)-결합(annealing)-연장(elongation) 과정을 위한 온도 조절이 필요 없는 등온증폭 (isothermal amplification) 기술이 주목받고 있다. 핵산 염기서열 기반 증폭(Nucleic acid sequence-based amplification; NASBA), 루프-매개 등온 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP), 헬리카제-의존형 증폭 기술(helicase-dependent amplification; HDA), 재조합효소-중합효소 증폭법(recombinase polymerase amplification; RPA) 등 다양한 방식의 등온증폭 기술들로 인해 빠르고 간편하게 감염체를 검출할 수 있게 되었다.
- [0005] DNA 분석 시스템의 소형화를 달성한 마이크로 칩을 이용하면 극미량의 시료만으로도 유전자 분석이 가능하며 표적 DNA 상의 여러 군데의 염기서열을 동시에 규명할 수 있어 저렴할 뿐만 아니라 신속하게 유전 정보를 제공할 수 있고, 또한 방대한 양의 유전 정보를 단시간 내에 동시에 분석할 수 있을 뿐만 아니라 유전자간의 상호 연관성까지 규명할 수 있다.
- [0006] 하지만, 기존의 재조합효소-중합효소 등온증폭법의 반응 부피는 수십 마이크로리터로 설계되었으며, 이러한 점은 위양성 및 위음성이 단일 분자에서만 발생해도 시료 전체에 영향을 끼치게 되어 분석 결과에 오류를 가져다 줄 수 있는 취약한 단점을 가지고 있다. 이에, 독립적인 분석이 가능하여 위양성과 위음성이 발생하더라도 정밀한 시료 분석을 시도할 수 있는 마이크로 칩의 개발이 시급한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이에 본 발명자들은 복수의 채널을 포함하고 높은 효율로 미세액적을 형성할 수 있는 마이크로칩을 제작하였으며, 본 발명에 따른 마이크로칩은 낮은 오차율과 높은 정확도로 재조합효소-중합효소 증폭 반응을 진행할 수 있음을 확인하였다.
- [0008] 이에, 본 발명의 목적은 마이크로칩을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 등온증폭 반응 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 마이크로칩의 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 미세 액적 기반 디지털 재조합효소-중합효소 등온증폭을 위한 마이크로칩 및 이를 이용한 등온증폭 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 마이크로칩은 낮은 오차율과 높은 정확도로 재조합효소-중합효소 증폭 반응을 진행할 수 있다.
- [0012] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0014] 본 발명의 일 양태는, 유상물질이 주입되는 제1주입구, 및 제1주입구를 통해 주입된 유상물질이 유동하는 제1유

로를 포함하는 제1채널; 제1유로와 연통하는 분기유로를 하나 이상 포함하는 분기채널; 제1수상물질이 주입되는 제2주입구, 및 제2주입구를 통해 주입된 제1수상물질이 유동하는 제2유로를 포함하는 제2채널; 제2수상물질이 주입되는 제3주입구, 및 제3주입구를 통해 주입된 제2수상물질이 유동하는 제3유로를 포함하는 제3채널; 제2유로 및 제3유로가 합쳐지는 합류채널, 합류채널과 분기채널의 분기유로가 합쳐지는 합류부, 및 합류채널의 직경보다 작은 직경을 갖는 집합채널을 포함하는 집합영역; 및 집합채널의 최소직경보다 큰 최소직경을 갖고 미세액적이 형성되는 제4유로, 및 형성된 미세액적이 배출되는 배출구를 포함하는 제4채널; 을 포함하는, 마이크로칩이다.

- [0015] 본 명세서 상의 용어 "등온증폭반응 (isothermal amplification)"은 반응 온도를 변화시킬 필요 없이, 단일 온도(상온 또는 65 °C 이하의 고온)에서 표적 유전 물질의 증폭이 가능하므로 고가의 온도조절장치를 필요로 하지 않으며 일반적 PCR에서는 구현이 어려운 현장진단에 용이하다는 장점이 있다. 등온증폭반응의 종류로는 전사-매개 증폭 (transcription mediated amplification; TMA), 핵산 염기서열 기반 증폭 (nucleic acid sequence-based amplification; NASBA), 사슬 치환 증폭법 (strand displacement amplification; SDA), 롤링 서클 증폭 (rolling circle amplification; RCA), 루프-매개 등온 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP), 등온 다중 치환 증폭 (isothermal multiple displacement amplification; IMDA), 헬리카제-의존형 증폭 기술 (helicase-dependent amplification; HDA), 재조합효소-중합효소 증폭법 (recombinase polymerase amplification; RPA), 단일 프라이머 등온 증폭 (single primer isothermal amplification; SPIA) 등이 있다.
- [0016] 등온증폭반응 수행시 미세액적을 이용하는 경우에 얻을 수 있는 여러가지 이점이 존재한다. 예를 들어, 종래의 방법과 같이 미세액적을 형성하지 않고 등온증폭반응을 수행하는 경우, 위양성 및 위음성이 단일 분자에서만 발생하는 경우에도 시료전체의 영향을 끼치게 되어, 분석 결과 데이터의 신뢰성이 낮아지는 취약점이 존재한다. 반면, 본 발명의 마이크로칩을 이용하여 미세액적을 형성한 후 등온증폭반응을 수행하는 경우, 한 번의 등온증폭반응에서 생성된 각각의 미세액적에 대한 신호를 독립적으로 분석할 수 있고, 위양성 및 위음성이 발생하는 경우에도 정밀한 시료분석이 가능하여 분석결과의 신뢰성을 향상시킬 수 있다. 실제 본 발명자들이 설계한 마이크로칩을 통해 미세액적을 생성한 후 등온증폭반응을 수행한 결과 최소 10 copies/ μ L부터 최대 1000 copies/ μ L까지 검출이 가능하였으며, 모든 농도의 샘플에서 높은 정확도(CV < 5%) 및 높은 선형도($R^2 = 0.9997$)가 나타나는 것이 확인되었다 (도 9 내지 10 참조).
- [0017] 본 발명에 있어서 제1주입구에는 유상물질이 주입될 수 있다.
- [0018] 유상물질은 미세액적의 생성을 위해 활용될 수 있다. 유상물질은 계면활성제 및 오일을 포함하는 것일 수 있다. 계면활성제는 EM90, Triton X-100, Span 80 중 선택된 하나 이상, 오일은 미네랄 오일 또는 불소화 오일 (fluorinated oil)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에서, 제1유로, 제2유로 및 제3유로 중 선택된 하나 이상은 하나 이상의 변곡부를 포함하여 굴곡지게 배치되는 것일 수 있다.
- [0020] 제1유로, 제2유로 및 제3유로 중 하나 이상은 변곡부를 포함함에 따라 S자 형상, 지그재그 형상 또는 구불구불한 형상으로 형성되는 것일 수 있다. 그리고, 이에 따라 제1유로, 제2유로 및 제3유로는 각각의 유로에 진입한 유체가 역류하여 제1주입구, 제2주입구 또는 제3주입구로 진입하는 것을 방지할 수 있으며, 이때, 변곡부를 더 많이 포함되는 경우 역류를 효과적으로 방지할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에서, 제2유로 및 제3유로 중 선택된 하나 이상은 셋 이상의 변곡부를 포함하는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에서, 분기채널은 분기유로를 둘 이상 포함하는 것일 수 있다. 분기채널이 분기유로를 둘 이상 포함되고, 둘 이상의 분기유로가 합류부에서 합쳐짐에 따라 분기채널을 수상물질이 주입되는 수상 채널 영역의 둘레를 형성할 수 있다.
- [0023] 예를 들어, 도 1 내지 도 2와 같이 두개의 분기채널이 각각 두개의 절곡부를 포함하면서 꺾이고, 합류부에서 두개의 분기채널이 만나게 되면서 각각의 분기채널은 사각형의 수상채널 영역을 형성할 수 있다. 수상채널 영역에는 제1수상물질과 제2수상물질이 주입 및 유동되는 제2채널 및 제3채널이 배치될 수 있고, 이를 통해 마이크로칩의 전체 면적 및 부피를 줄여 소형화된 마이크로칩을 구현할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에서, 분기유로는 분기유로가 꺾이는 절곡부를 하나 이상 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예에서, 분기유로는 둘 이상의 절곡부를 포함하는 것일 수 있다.

- [0026] 분기유로는 절곡부를 포함함에 따라 하나 이상의 부분에서 꺾일 수 있고, 이에 따라, 분기유로가 선형으로 배치되지 않게되면서 마이크로칩의 크기 및 부피가 과도하게 커지는 것을 방지할 수 있고, 마이크로칩의 크기를 소형화할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에서, 제1수상물질은 DNA, 프라이머, 프로브 및 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 명세서상의 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기 (free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산서열로 상보적인 템플레이트 (template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 단일-가닥의 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응 (즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시작 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.
- [0029] 본 명세서상의 용어 "프로브 (probe)"란 유전자 또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA (single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA (double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 보다 용이한 검출을 위해 라벨링 될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에서, 제2수상물질은 마그네슘 이온용액을 포함하는 것일 수 있다. 제2수상물질은 재조합효소-중합효소 등온증폭의 작동을 위한 트리거 (trigger)로 활용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에서, 접합채널의 최소직경은 합류채널의 최소 직경보다 작을 수 있다. 접합채널의 최소직경은 미세 액적의 크기를 결정하기 위해 설계될 수 있으며, 예를 들어, 접합채널 및 합류채널의 최소직경의 비는 1:1.5 내지 1:5, 1:2 내지 1:4, 1:2.5 내지 1:4, 1:2.5 내지 1:3.5, 1:1.5 내지 1:2.5, 1:1.7 내지 1:2.3 또는 1:1.8 내지 1:2.2 일 수 있고, 구체적으로 1:2일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에서, 접합채널 및 합류채널의 최소직경의 비는 1:2인 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 구현예에서, 접합채널의 최소직경은 제4유로의 최소 직경보다 작을 수 있으며, 예를 들어, 접합채널 및 제4유로의 최소직경의 비는 1:1.5 내지 1:6, 1:2 내지 1:5.5, 1:2 내지 1:5, 1:2 내지 1:4.5, 1:2 내지 1:4, 1: 2.5 내지 1:3.5, 또는 1:2.8 내지 1:3.2 일 수 있고, 구체적으로 1:3일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 일 구현예에서, 접합채널 및 제4유로의 최소직경의 비는 1:3인 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서 마이크로 유체 칩의 재질은 폴리디메틸실록산 (polydimethylsiloxane, PDMS) 및 탄화수소 화합물로 구성된 아이소프렌 (isoprene)계 폴리머 탄성체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종일 수 있으며, 예를 들어, 폴리디메틸실록산일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 일 구현예에서, 합류채널, 합류부 및 접합채널은 선형으로 나란히 배치되는 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 각각 제2주입구 및 제3주입구를 통해 주입된 제1수상물질과 제2수상물질이 합류채널에서 합류될 수 있고, 합류채널과 선형으로 배치되는 합류부로 운반되어 합류부에서 분기유로를 통해 운반된 유상물질과 혼합될 수 있다. 그리고, 유상물질, 제1수상물질 및 제2수상물질은 합류부에서 혼합되어 합류채널보다 작은 직경을 갖는 접합채널에 진입하게 되면서 제4유로 내에서 미세액적이 형성될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 다른 양태는, 다음 단계를 포함하는 등온증폭 반응 방법이다:
- [0039] 유상물질, 제1수상물질 및 제2수상물질을 마이크로칩에 주입하는 주입 단계;
- [0040] 마이크로칩 상에서 유상물질, 제1수상물질 및 제2수상물질을 혼합하고 미세액적을 형성하는 액적 형성 단계; 및
- [0041] 미세액적을 수득하고 특정 온도로 가열하여 등온증폭 반응을 일으키는 반응 단계.
- [0042] 본 발명에 따른 등온증폭 반응 방법에서, 마이크로칩은 유상물질이 주입되는 제1주입구, 및 제1주입구를 통해 주입된 유상물질이 유동하는 제1유로를 포함하는 제1채널; 상기 제1유로와 연통하는 분기유로를 하나 이상 포함하는 분기채널; 제1수상물질이 주입되는 제2주입구, 및 제2주입구를 통해 주입된 제1수상물질이 유동하는 제2유로를 포함하는 제2채널; 제2수상물질이 주입되는 제3주입구, 및 제3주입구를 통해 주입된 제2수상물질이 유동하는 제3유로를 포함하는 제3채널; 제2유로 및 제3유로가 합쳐지는 합류채널, 합류채널과 분기채널의 분기유로가 합쳐지는 합류부, 및 합류채널의 직경보다 작은 직경을 갖는 접합채널을 포함하는 접합영역; 및 접합채널의 최

소직경보다 큰 최소직경을 갖고 미세액적이 형성되는 제4유로, 및 형성된 미세액적이 배출되는 배출구를 포함하는 제4채널; 을 포함하는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 구현예에서, 반응 단계는 37 °C 내지 42 °C에서 수행되는 것일 수 있다.

[0044] 본 발명의 일 구현예에서, 반응 단계는 30 분 이내로 수행될 수 있는 것일 수 있으며, 구체적으로는, 20분 이내로 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0045] 본 발명은 미세 액적 기반 디지털 재조합효소-중합효소 등온증폭용 마이크로칩 및 이를 이용한 등온증폭방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 마이크로칩은 낮은 오차율과 높은 정확도로 재조합효소-중합효소 증폭 반응을 진행할 수 있어, 다양한 질병 진단 분야와 융합되어 폭 넓게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로칩의 사시도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로칩의 상면도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로칩의 접합영역을 확대하여 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로칩에서 형광 염료 및 증류수를 이용하여 미세액적을 생성한 결과를 나타내는 형광현미경 사진이다 (스케일바: 200 μm).

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로칩의 미세액적 혼합 성능을 분석한 결과를 나타내는 형광 이미지이다 (스케일바: 50 μm)

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로칩에 형광 염료 및 증류수를 통해 생성한 미세 액적의 형광 이미지이다 (스케일바: 200 μm).

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로칩에 형광 염료 및 증류수를 이용하여 생성한 미세 액적의 형광 세기 히스토그램 그래프이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 코로나 바이러스 DNA를 활용한 재조합효소-중합효소 등온증폭 전기영동 결과를 나타낸 사진이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로칩을 활용한 디지털 재조합효소-중합효소 등온증폭 형광 현미경 이미지이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로칩을 활용한 디지털 재조합효소-중합효소 등온증폭 분석결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명의 바람직한 실시 예의 상세한 설명은 첨부된 도면들을 참조하여 설명할 것이다. 하기에서 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 것이다.

[0048] 본 발명의 개념에 따른 실시 예는 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있으므로 특정 실시 예들을 도면에 예시하고 본 명세서 또는 출원에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명의 개념에 따른 실시 예를 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0049] 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 "연결되어" 있다거나 "접속되어" 있다고 언급된 때에는, 그 다른 구성요소에 직접적으로 연결되어 있거나 또는 접속되어 있을 수도 있지만, 중간에 다른 구성요소가 존재할 수도 있다고 이해되어야 할 것이다.

[0050] 반면에, 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 "직접 연결되어" 있다거나 "직접 접속되어" 있다고 언급된 때에는, 중간에 다른 구성요소가 존재하지 않는 것으로 이해되어야 할 것이다. 구성요소들 간의 관계를 설명하는 다른 표현들, 즉 "~사이에"와 "바로 ~사이에" 또는 "~에 이웃하는"과 "~에 직접 이웃하는" 등도 마찬가지로 해석되어

야 한다.

- [0052] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로칩의 사시도이고, 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로칩의 상면도이고, 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로칩의 접합영역을 확대하여 나타낸 도면이다.
- [0053] 도 1 내지 도 2를 참조하면, 일 실시예에 따른 등온증폭 반응용 마이크로칩(1000)은 제1채널(100), 분기채널(200), 제2채널(300), 제3채널(400), 접합영역(500) 및 제4채널(600)을 포함할 수 있다.
- [0054] 일 실시예에 따른 마이크로칩(1000)의 재질은 폴리디메틸실록산 (polydimethylsiloxane; PDMS) 및 탄화수소 화합물로 구성된 아이소프렌 (isoprene)계 폴리머 탄성체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종일 수 있으며, 예를 들어, 폴리디메틸실록산일 수 있다.
- [0055] 제1채널은 유상물질이 주입되는 제1주입구 및 제1주입구를 통해 주입된 유상물질이 유동하는 제1유로를 포함할 수 있다.
- [0056] 유상물질은 제1채널(100)의 제1주입구(110)를 통해 마이크로칩(1000) 내부로 주입될 수 있으며, 제1주입구(110)에 주입된 후 제1유로(120)를 따라 각각의 분기채널(200)의 분기유로(210, 220)로 운반될 수 있다.
- [0057] 한편, 도 1 내지 도 2에는 제1주입구(110)가 원형으로 나타나 있으나, 유상물질이 유입될 수 있는 형상이면, 이에 한정되지 않고 자유롭게 설계될 수 있다.
- [0058] 유상물질은 계면활성제 및 오일을 포함하는 것일 수 있다. 계면활성제는 EM90, Triton X-100, Span 80 중 선택된 하나 이상, 오일은 미네랄 오일 또는 불소화 오일 (fluorinated oil)일 수 있다.
- [0059] 유상물질은 계면활성제를 담지한 미네랄 오일을 포함할 수 있고, 미네랄 오일을 포함하는 유상물질은 제1채널(100)과 분기유로(210, 220)로 운반되고, 합류부(510)에서 수상물질과 혼합될 수 있고, 제4유로(620) 내에서 미세액적을 생성하는데 활용될 수 있다.
- [0060] 제1유로(120)는 하나 이상의 변곡부(125)를 포함할 수 있다.
- [0061] 제1유로(120)는 변곡부(125)를 포함함에 따라 S자 형상, 지그재그 형상 또는 구불구불한 형상으로 형성되는 것일 수 있다. 그리고, 이에 따라 제1유로(120)는 유로에 진입한 유체가 역류하여 제1주입구(110)로 진입하는 것을 방지할 수 있으며, 이때, 변곡부(125)를 더 많이 포함되는 경우 역류를 효과적으로 방지할 수 있다.
- [0062] 분기채널(200)은 하나 이상의 분기유로(210, 220)를 포함할 수 있고, 분기유로(210, 220)는 제1유로(120)와 연결될 수 있고, 합류부(520)를 통해 제2유로(320), 제3유로(420) 및 제4유로(620)와 연결될 수 있다.
- [0063] 분기유로(210, 220)는 마이크로칩(1000)에 하나 이상 포함될 수 있으며, 예를 들어, 도 1 내지 도 2와 같이 두 개의 분기유로(210, 220)가 분기채널(200)에 포함될 수 있고, 이를 통해, 제1유로(120)를 따라 운반된 유상물질을 혼합부(520)를 향해 두 갈래로 운반할 수 있다.
- [0064] 분기유로(210, 220)는 분기유로(210, 220)가 꺾이는 부분인 절곡부(215(a), 215(b), 225(a), 225(b))를 하나 이상 포함할 수 있다.
- [0065] 분기유로(210, 220)가 절곡부(215(a), 215(b), 225(a), 225(b))를 하나 이상 포함함에 따라 분기유로(210, 220)가 꺾인 형태로 마이크로칩(1000)내에 배치될 수 있어 마이크로칩의 공간을 효율적으로 사용할 수 있으며, 이를 통해, 마이크로칩(1000)의 전체 면적이 과도하게 커지지 않을 수 있다.
- [0066] 예를 들어, 분기유로(210, 220)는 도 1 내지 도 2와 같이 각각 두 개의 절곡부(215(a), 215(b), 225(a), 225(b))를 포함할 수 있고, 각각의 절곡부(215(a), 215(b), 225(a), 225(b))는 분기유로(210, 220)가 직각으로 꺾이도록 하는 것일 수 있다. 이때, 각각의 분기유로(210, 220)는 두 군데의 절곡부(215(a), 215(b), 225(a), 225(b))를 포함에 따라 분기유로(210, 220)의 둘레 안쪽에 제2채널(300) 및 제3채널(400)이 배치되도록 사각형으로 형성된 수상채널영역(350)을 형성할 수 있다.
- [0067] 제2채널(300)은 제1수상물질이 주입되는 제2주입구(310) 및 제2주입구(310)를 통해 주입된 제1수상물질이 유동하는 제2유로(320)를 포함할 수 있다.
- [0068] 한편, 도 1 내지 도 2에는 제2주입구(310)가 원형으로 나타나 있으나, 수상물질이 유입될 수 있는 형상이면, 이에 한정되지 않고 자유롭게 설계될 수 있다.

- [0069] 제1수상물질은 제2채널(300)의 제2주입구(310)를 통해 마이크로칩(1000) 내부로 주입될 수 있고, 제1수상물질은 제2주입구(310)에 주입된 후 제2유로(320)를 따라 제2유로(320) 및 제3유로(420)가 합쳐지는 합류채널(510)로 운반될 수 있다.
- [0070] 제1수상물질은 등온증폭 반응의 반응의 대상이 되는 시료를 포함할 수 있다. 예를 들어, 제1수상물질은 DNA, 프라이머, 프로브 및 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0071] 제2유로(320)는 하나 이상의 변곡부(325)를 포함할 수 있다.
- [0072] 제2유로(320)는 변곡부(325)를 포함함에 따라 S자 형상, 지그재그 형상 또는 구불구불한 형상으로 형성되는 것일 수 있다. 그리고, 이에 따라 제2유로(320)는 유로에 진입한 유체가 역류하여 제2주입구(310)로 진입하는 것을 방지할 수 있으며, 이때, 변곡부(325)를 더 많이 포함되는 경우 역류를 효과적으로 방지할 수 있다.
- [0073] 제3채널(400)은 제2수상물질이 주입되는 제3주입구(410) 및 제3주입구(410)를 통해 주입된 제2수상물질이 유동하는 제3유로(420)를 포함할 수 있다.
- [0074] 한편, 도 1 내지 도 2에는 제3주입구(410)가 원형으로 나타나 있으나, 수상물질이 유입될 수 있는 형상이면, 이에 한정되지 않고 자유롭게 설계될 수 있다.
- [0075] 제2수상물질은 제3채널(400)의 제3주입구(410)를 통해 마이크로칩(1000) 내부로 주입될 수 있고, 제2수상물질은 제3주입구(410)에 주입된 후 제3유로(420)를 따라 제2유로(320) 및 제3유로(420)가 합쳐지는 합류채널(510)로 운반될 수 있다.
- [0076] 제2수상물질은 마그네슘 이온용액을 포함할 수 있고, 제2수상물질은 재조합효소-중합효소 등온증폭의 작동을 위한 트리거 (trigger)로 활용될 수 있다.
- [0077] 제3유로(420)는 하나 이상의 변곡부(425)를 포함할 수 있다.
- [0078] 제3유로(420)는 하나 이상의 변곡부(425)를 포함함에 따라 S자 형상, 지그재그 형상 또는 구불구불한 형상으로 형성되는 것일 수 있다. 그리고, 이에 따라 제3유로(420)는 유로에 진입한 유체가 역류하여 제3주입구로 진입하는 것을 방지할 수 있으며, 이때, 변곡부(425)를 더 많이 포함되는 경우 역류를 효과적으로 방지할 수 있다.
- [0079] 접합영역(500)은 제2유로(320) 및 제3유로(420)가 합쳐지는 합류채널(510), 합류채널(510)과 분기채널(200)의 분기유로(210, 220)가 합쳐지는 합류부(520), 및 합류채널(510)의 직경보다 작은 직경을 갖는 접합채널(530)을 포함할 수 있다.
- [0080] 합류채널(510)은 제2유로(320) 및 제3유로(420)와 연통할 수 있으며, 이에 따라, 제2유로(320)를 통해 운반된 제1수상물질과 제3유로(420)를 통해 운반된 제2수상물질이 합류채널(510)에서 합쳐져 합류부(520)를 향해 운반될 수 있다.
- [0081] 합류부(520)는 분기유로(210, 220) 및 합류채널(510)과 연통될 수 있고, 분기유로(510, 520)를 통해 운반된 유상물질, 합류채널(510)을 통해 운반된 제1수상물질 및 제2수상물질을 접합채널(530)을 향해 운반할 수 있다.
- [0082] 접합채널(530)은 합류부(520) 및 제4유로(620)와 연통될 수 있고, 합류부(520)에서 운반된 제1수상물질, 제2수상물질 및 유상물질이 혼합된 용액을 제4유로(620)로 운반하고, 혼합된 용액이 제4유로(620)에 진입하는 순간 미세액적을 형성하도록 할 수 있다.
- [0083] 이때, 유상물질과 제1수상물질 및 제2수상물질이 합류부(520)에서 접촉하게 되면, 유상물질, 제1수상물질 및 제2수상물질의 표면 극성차이로 인해 계면을 형성하게 된다. 그리고, 생성된 계면의 곡률이 증가하면서 계면의 표면장력이 낮아지게 되고, 일정 수준 이하로 표면장력이 떨어지면, 수상물질이 표면에너지를 안정화시키기 위해 구(sphere) 형태의 액적으로 변하게된다.
- [0084] 합류채널(510), 합류부(520), 접합채널(530) 및 제4유로(620)는 선형으로 나란하게 배치될 수 있다. 따라서, 제2유로(320) 및 제3유로(420)로 운반된 제1수상물질 및 제2수상물질이 합류채널(510)로 운반되고 합류부(520)에서 유상물질과 합쳐지면서 그대로 접합채널(530) 및 제4유로(620)로 자연스럽게 유동할 수 있다.
- [0085] 제4채널(600)은 접합채널(530)의 최소직경보다 큰 최소직경을 갖고 미세액적이 형성되는 제4유로(620) 및 형성된 미세액적이 배출되는 배출구(610)를 포함할 수 있다.
- [0086] 제4유로(620)는 접합채널(530)의 혼합된 용액이 제4유로(620)에 진입하면서 생성된 미세액적을 배출구(610)를

통해 운반할 수 있고, 사용자는 운반된 미세액적을 배출구(610)를 통해서 수득할 수 있다.

[0087] 도 3을 참조하면, 제2채널(320), 제3채널(420)의 최소직경은 합류채널(510)의 최소직경과 동일할 수 있다. 예를 들어, 제2채널(320), 제3채널(420) 및 합류채널(510)의 최소직경은 200 μm 일 수 있다.

[0088] 접합채널(530)의 최소직경(d_3)은 합류채널(510)의 최소직경(d_1)보다 작을 수 있다. 예를 들어, 접합채널(530) 및 합류채널(510)의 최소직경의 비($d_3:d_1$)는 1:1.5 내지 1:5, 1:2 내지 1:4, 1:2.5 내지 1:4, 1:2.5 내지 1:3.5, 1:1.5 내지 1:2.5, 1:1.7 내지 1:2.3 또는 1:1.8 내지 1:2.2 일 수 있고, 구체적으로, 1:2일 수 있다.

[0089] 제4유로(620)의 최소직경(d_4)은 접합채널(530)의 최소직경(d_3)보다 클 수 있다. 예를 들어, 접합채널(530) 및 제4유로(620)의 최소직경의 비($d_3:d_4$)는 1:1.5 내지 1:6, 1:2 내지 1:5.5, 1:2 내지 1:5, 1:2 내지 1:4.5, 1:2 내지 1:4, 1:2.5 내지 1:3.5, 또는 1:2.8 내지 1:3.2 일 수 있고, 구체적으로 1:3일 수 있다.

[0090] 접합채널(530)의 최소직경(d_3)이 제4유로(620)의 최소직경(d_4)보다 작은 경우, 미세액적 생성시 넥킹 (necking)이 원활하게 이뤄지며, 이에 따라, 유체의 흐름에 따른 미세액적의 생성이 원활해지며 미세액적의 생성되는 효율이 증가될 수 있다.

[0091] 구체적으로, 합류채널(510)의 최소직경은 200 μm , 접합채널(530)의 최소직경은 100 μm , 제4유로(620)의 최소직경은 300 μm 일 수 있고, 합류채널(510), 접합채널(530) 및 제4유로(620)의 최소직경($d_1:d_3:d_4$)의 비는 2:1:3일 수 있다.

[0093] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0095] 실시예 1: 등온증폭 반응용 마이크로칩의 제작

[0096] 미세 액적 생성을 위해 미세유체칩 디자인을 고안하였다.

[0097] 실리콘 웨이퍼에 포토레지스트를 코팅 한 후 캐드 공정으로 제작한 포토 마스크를 썬웨이 자외선을 조사시켰다. 기본 틀의 높이는 100 μm 으로 형성하고, 완성된 틀 위에 폴리디메틸실록산을 균혀서 마이크로칩을 생산하였다. 이 때 균은 폴리디메틸실록산에 입구를 만들기 위해 입구 부분의 캐드 도면은 큰 원형으로 만들었다. 폴리디메틸실록산이 완전히 굳은 후에는 원하는 부분을 잘라내어 칩으로 만들 준비를 하였다. 뜯어낸 폴리디메틸실록산에 유리 판을 위에 덮고 플라즈마 처리를 해 칩을 완성시켰다. 완성된 칩에 유체를 넣기 위해 입구 부분의 큰 원 부분 중 아무 곳이나 송곳 등으로 구멍을 뚫어 유상물질이 주입되는 주입구 (제1주입구) 한 곳과, 수상물질이 주입되는 주입구 두 곳 (제2주입구 및 제3주입구)을 형성하였다.

[0099] 실시예 2: 미세액적의 혼합성능 확인

[0100] 미세액적의 혼합성능을 분석하기 위해 시린지 펌프 (Syringe Pump)를 이용하여, 제1주입구를 통해 계면활성제를 담지한 미네랄 오일을, 제2주입구 및 제3주입구에는 각각 FITC 수용액과 Di-water를 주입하였다.

[0101] 실험 결과, 도 4 내지 7에서 확인할 수 있듯이, 미세유체칩 내부에서 미세액적 생성과 동시에 유상물질인 미네랄 오일과, 수상물질인 FITC 수용액 및 Di-water가 혼합되는 것을 형광현미경을 통해 확인하였다. 미세 액적 내부에서 빠른 시간(36ms) 내에 혼합이 90% 이상 진행되는 것을 확인하였으며, 생성된 미세액적을 형광현미경을 통해 관찰한 결과, 미세 액적의 형광이 균일하게 분포되어 있는 것을 확인하였다. 또한, 미세 액적 채널을 통해 얻은 미세액적의 형광 세기를 분석한 결과, 높은 균일도 (CV: 1.57%)를 나타내어 두 용액이 고르게 혼합된 것을 확인하였다.

[0103] 실시예 3: 재조합효소-중합효소 증폭반응

[0104] 재조합효소-중합효소 증폭법 시약의 작동을 확인하기 위해, 마이크로칩에 유상물질 및 타겟 DNA가 포함된 시료와 마그네슘을 주입하고, 미세액적을 형성한 후에 미세액적을 수득하여 39도에서 20분간의 등온증폭 반응을 수

행하였다. 등온증폭 반응 후 전기영동 기술을 통해 생성물에 대한 분석을 진행하였다. 전기영동 이미지 분석 결과, 타겟 DNA가 포함되지 않은 샘플에서는 생성물이 나타나지 않은 반면, 타겟 DNA가 포함된 샘플에서는 생성물이 나타나는 것을 확인하였다. 이를 통해 거짓 양성 (False positive) 및 거짓 음성 (False negative) 반응이 일어나지 않았으며, 높은 특이도 및 민감도(10 copies/ μ L)를 가지는 것을 확인하였다.

[0105] 실험 결과, 도 8 내지 10에서 확인할 수 있듯이, 코로나 바이러스 DNA 물질을 활용하여 실험하였을 때, 최소 10 copies/ μ L부터 최대 1000 copies/ μ L까지 검출이 가능한 것을 확인하였다. 또한, 모든 농도의 샘플에서 높은 정확도(CV < 5%) 및 높은 선형도($R^2 = 0.9997$)가 나타나는 것을 확인하였다.

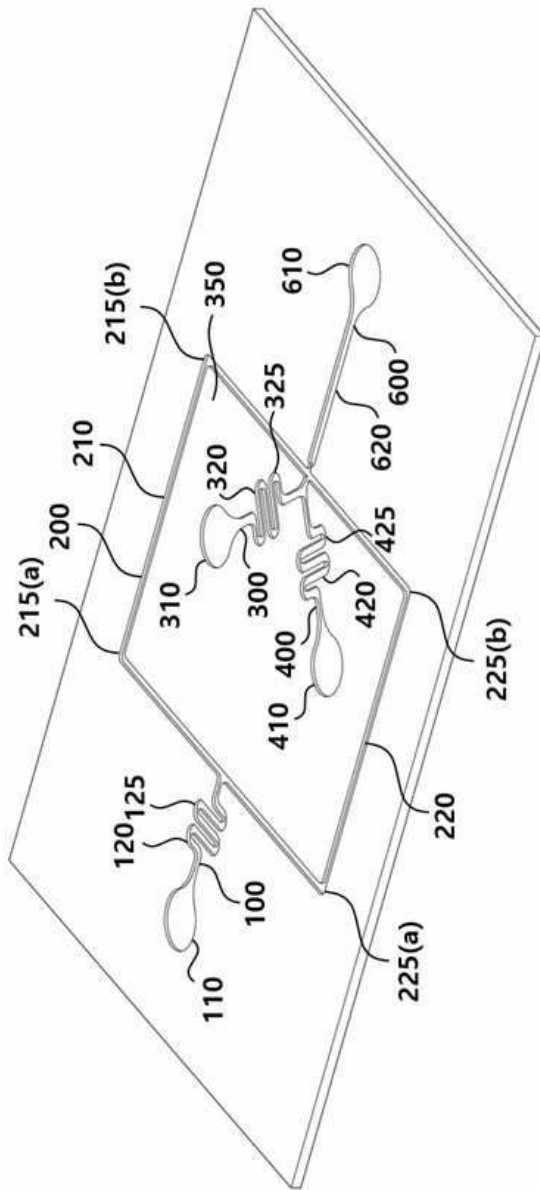
[0107] 이상에서 설명한 본 발명은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능하므로 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 의해 한정되는 것은 아니다.

부호의 설명

[0108] 100: 제1채널
110: 제1주입구
120: 제1유로
200: 분기채널
210, 220: 분기유로
300: 제2채널
310: 제2주입구
320: 제2유로
400: 제3채널
410: 제3주입구
420: 제3유로
500: 집합영역
510: 합류채널
520: 합류부
530: 집합채널
600: 제4채널
610: 배출구
620: 제4유로

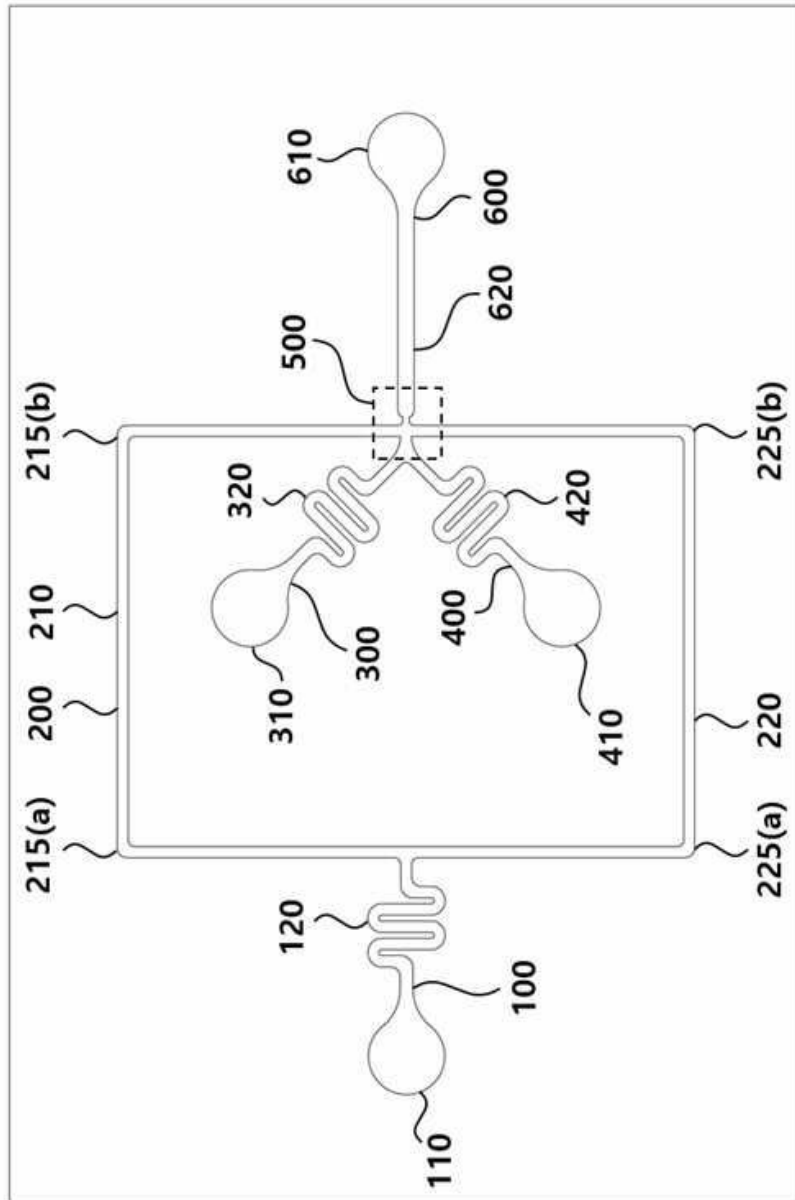
도면
도면1

1000

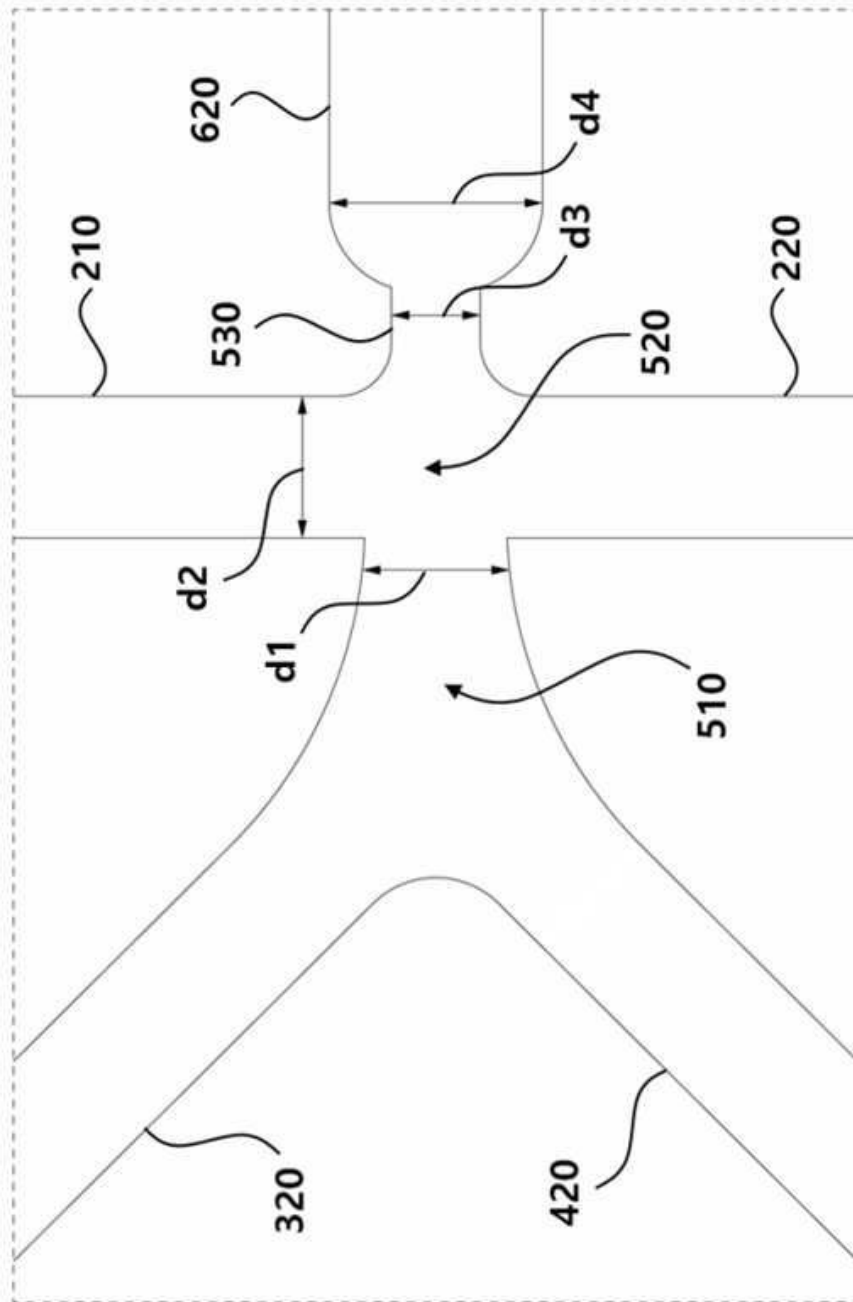


도면2

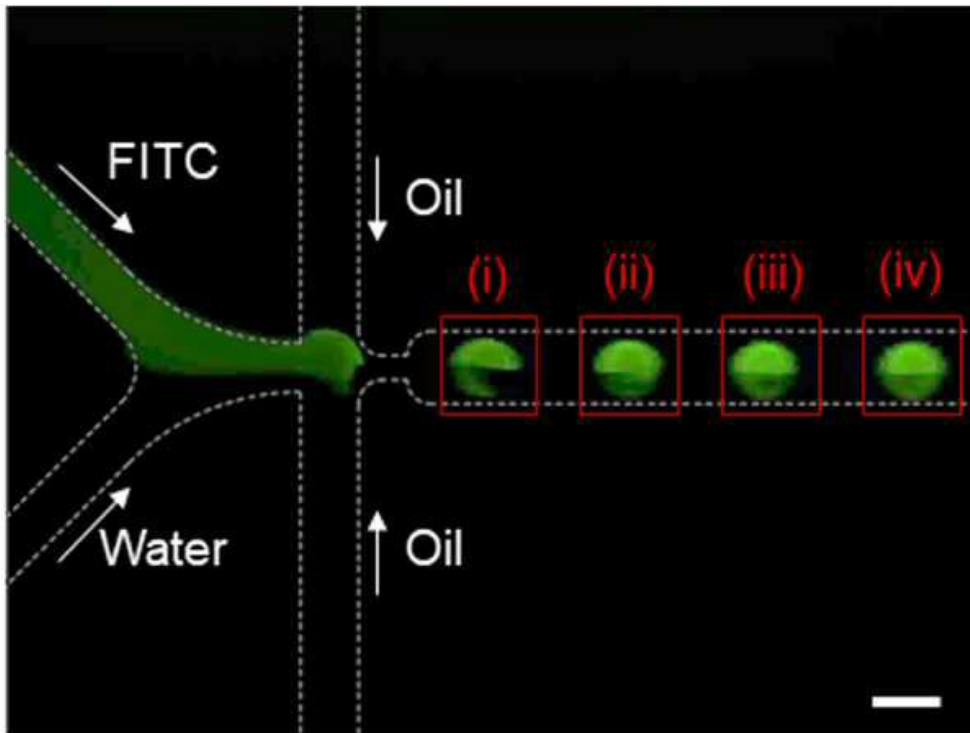
1000



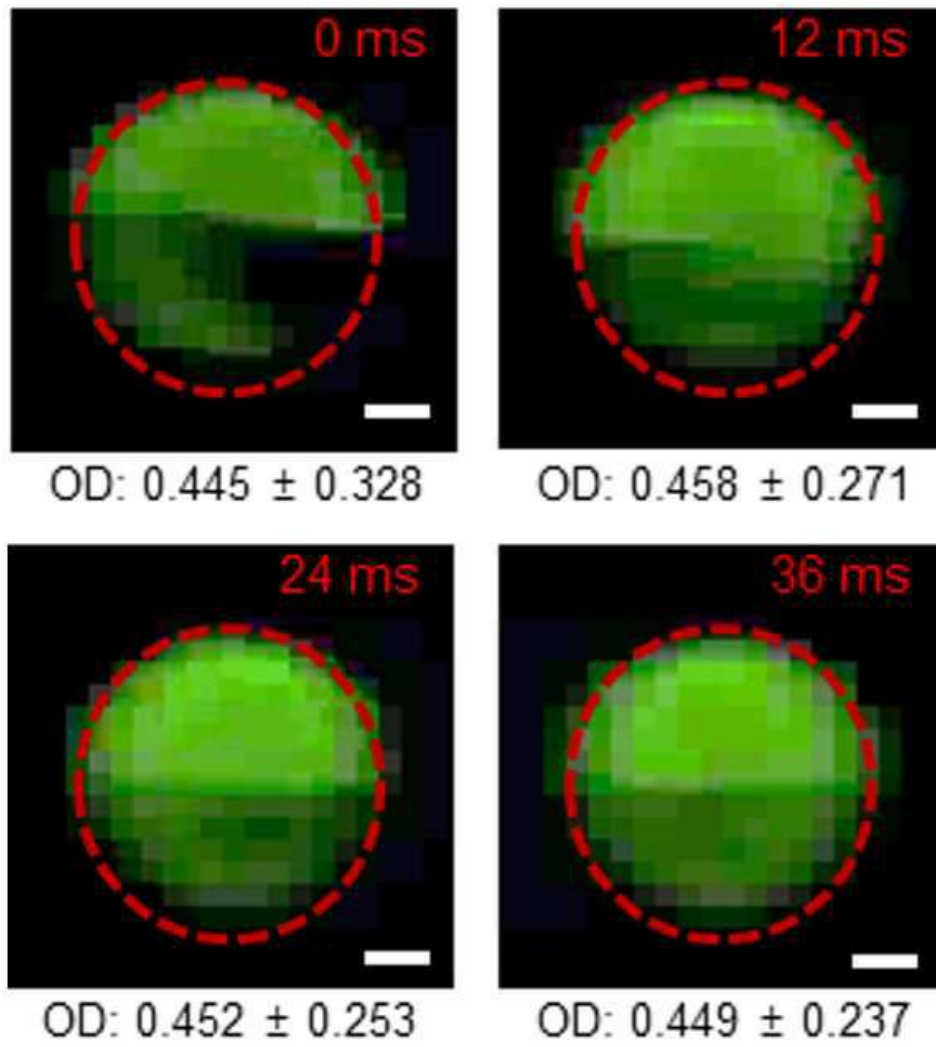
도면3



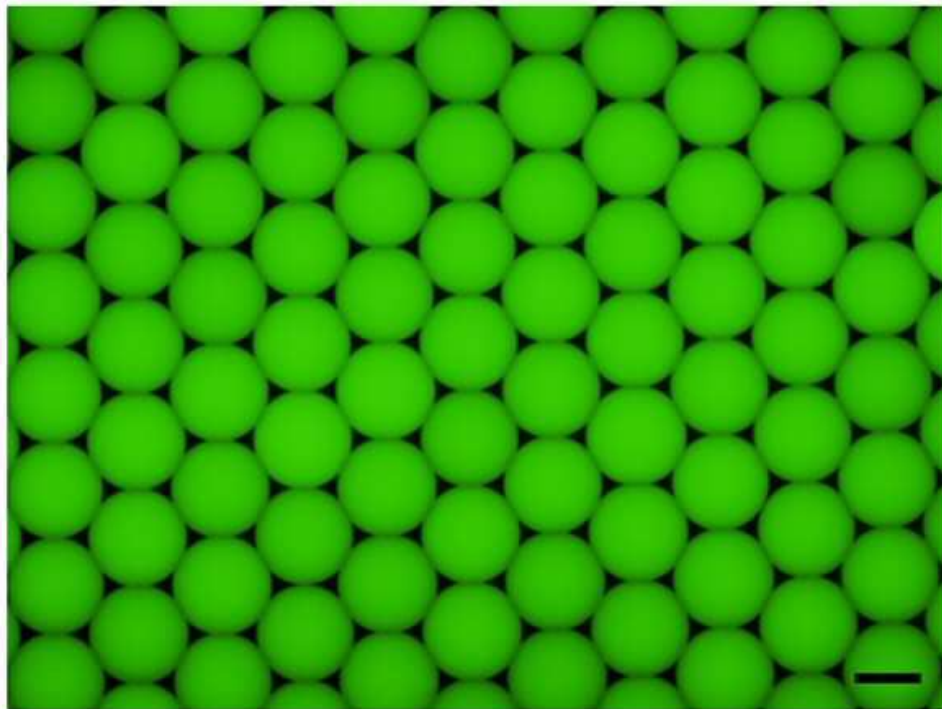
도면4



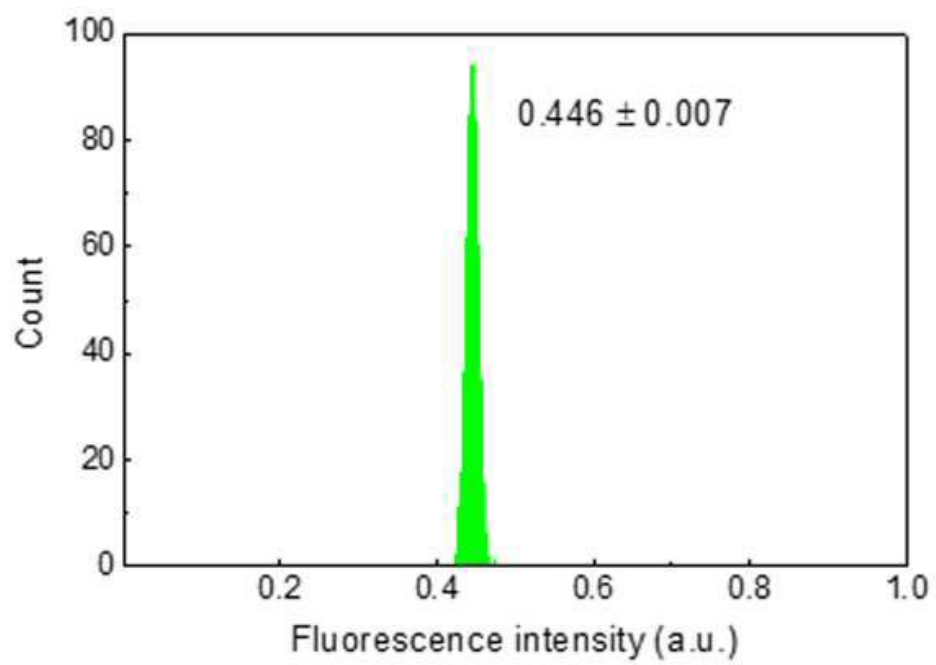
도면5



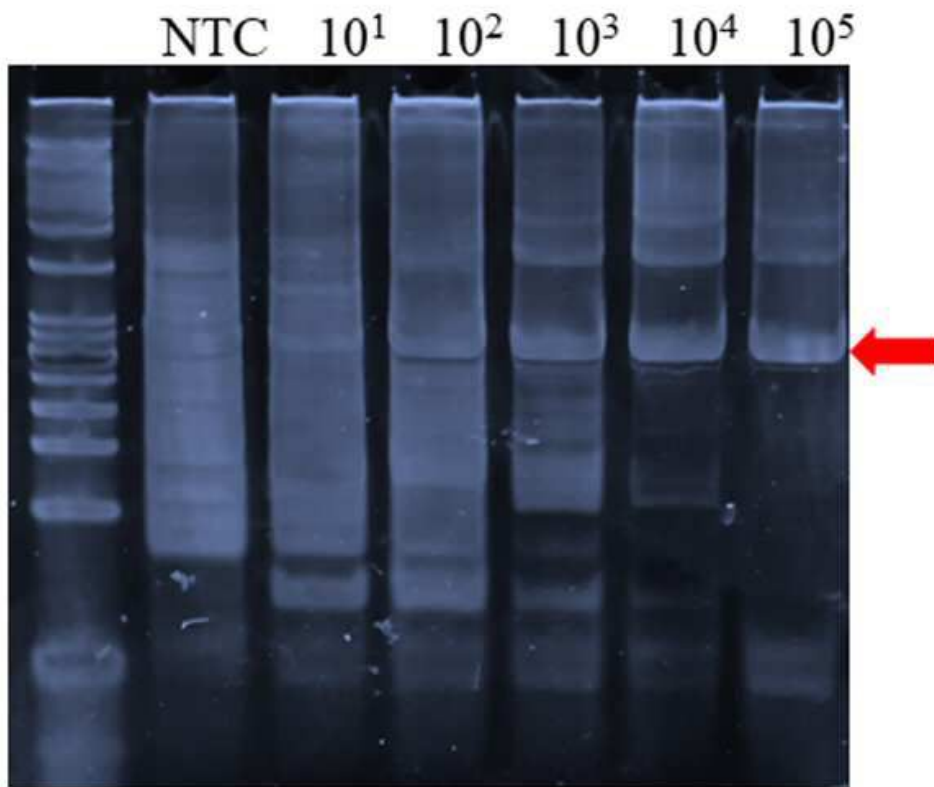
도면6



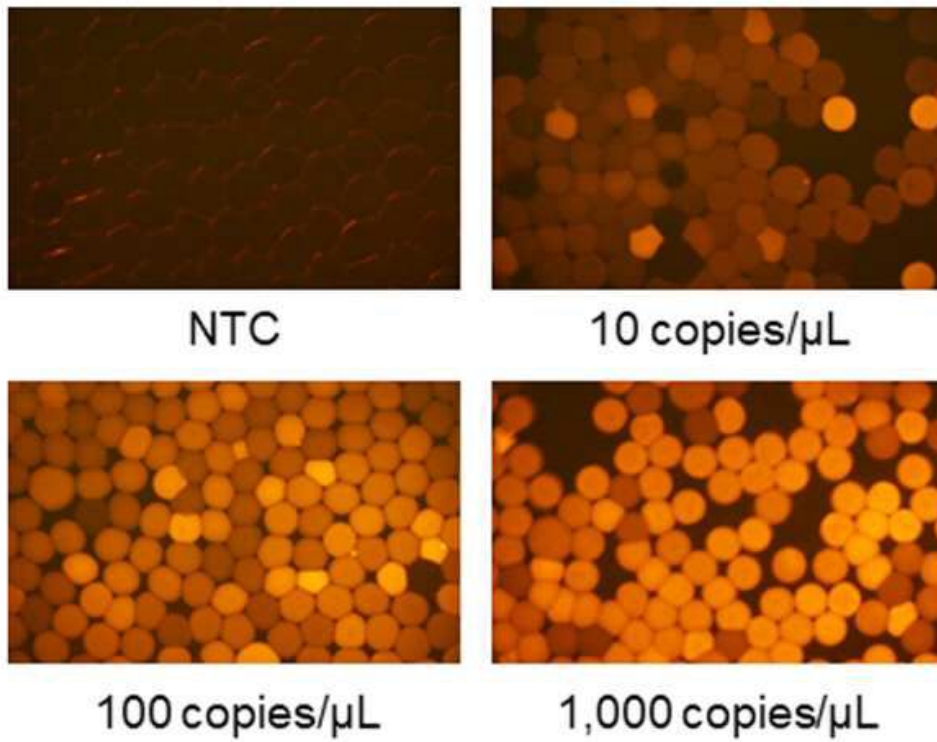
도면7



도면8



도면9



도면10

