



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0133837
(43) 공개일자 2016년11월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

B01L 3/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

B01L 3/502715 (2013.01)

B01L 3/502761 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0066882

(22) 출원일자 2015년05월13일

심사청구일자 2015년05월13일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

천홍구

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 214동 502호 (신천동, 파크리오)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 10 항

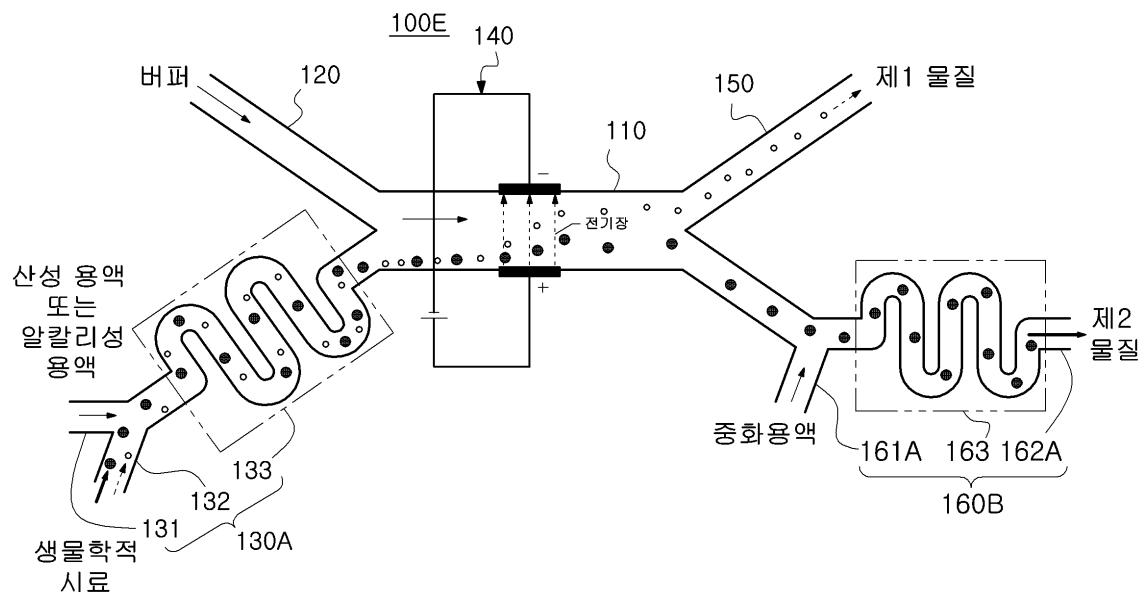
(54) 발명의 명칭 pH 조절 시료를 전기영동법으로 분리하기 위한 미세소포체 분리장치

(57) 요약

본 발명은 미세소포체 분리장치에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 생물학적 시료의 pH를 조절하고 상기 시료에 전기영동을 적용함으로써 연속적으로 시료를 분리하기 위한 미세소포체 분리장치에 관한 것이다.

이를 위해 본 발명은 일방향을 따라 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 혼합된 생물학적 시료와 버퍼가 분리되어 (뒷면에 계속)

대표도 - 도7



나란히 유동하는 유동채널부; 상기 유동채널부 일단에 연결되어 상기 버퍼가 주입되는 제1 경로부; 상기 유동채널부 일단에 연결되어 상기 산성 용액 또는 알칼리성 용액과 상기 생물학적 시료가 주입되는 제2 경로부; 상기 유동채널부를 따라 유동하는 상기 생물학적 시료가 전기영동 유동성에 따라 분리되도록 상기 유동채널부의 상기 일방향과 직교하는 방향으로 전기장을 형성하는 전기장형성부; 상기 전기장형성부의 전기영동 유동성에 따라 분리된 제1 물질이 배출되도록 상기 유동채널부 타단에 연결 형성된 제3 경로부; 및 상기 전기장형성부의 전기영동 유동성에 따라 분리된 제2 물질이 배출되도록 상기 유동채널부 타단에 연결 형성되되, 상기 제2 경로부에서 주입된 상기 산성 용액 또는 상기 알칼리성 용액을 중화시키기 위한 중화 용액이 주입되는 제4 경로부; 를 포함한다.

(52) CPC특허분류

B01L 2200/027 (2013.01)

B01L 2200/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013M3A6A 4046061

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 글로벌프론티어연구개발사업

연구과제명 미세 유체기술을 이용한 타겟 정량화 및 약물효능 검증 시스템 개발

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.10.22 ~ 2019.08.21이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012-00095 56

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망융합기술파이오니어사업

연구과제명 극소볼륨 DNA 리액터(reactor) 개발

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

일방향을 따라 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 혼합된 생물학적 시료와 버퍼가 분리되어 나란히 유동하는 유동 채널부;

상기 유동채널부 일단에 연결되어 상기 버퍼가 주입되는 제1 경로부;

상기 유동채널부 일단에 연결되어 상기 산성 용액 또는 알칼리성 용액과 상기 생물학적 시료가 주입되는 제2 경로부;

상기 유동채널부를 따라 유동하는 상기 생물학적 시료가 전기영동 유동성에 따라 분리되도록 상기 유동채널부의 상기 일방향과 직교하는 방향으로 전기장을 형성하는 전기장형성부;

상기 전기장형성부의 전기영동 유동성에 따라 분리된 제1 물질이 배출되도록 상기 유동채널부 타단에 연결 형성된 제3 경로부; 및

상기 전기장형성부의 전기영동 유동성에 따라 분리된 제2 물질이 배출되도록 상기 유동채널부 타단에 연결 형성된 제4 경로부; 를 포함하는 pH 조절 시료를 전기영동법으로 연속 분리하기 위한 미세소포체 분리장치.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 제2 경로부는

상기 생물학적 시료가 주입되는 시료 주입구; 및

상기 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 주입되는 용액 주입구; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 pH 조절 시료를 전기영동법으로 연속 분리하기 위한 미세소포체 분리장치.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 제2 경로부는

상기 시료 주입구와 상기 용액 주입구 후단에 상기 생물학적 시료와 상기 산성 용액 또는 상기 알칼리성 용액의 혼합을 위해 파형태(波形態)로 형성된 제1 혼합부; 를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 pH 조절 시료를 전기영동법으로 연속 분리하기 위한 미세소포체 분리장치.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 제4 경로부는

상기 제2 물질이 배출되는 시료 배출구; 및

상기 제2 경로부에서 주입된 상기 산성 용액 또는 알칼리성 용액을 중화시키기 위한 중화 용액이 주입되는 중화 용액 주입구; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 pH 조절 시료를 전기영동법으로 연속 분리하기 위한 미세소포체 분리장치.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 제4 경로부는

상기 중화용액 주입구와 상기 시료 배출구 사이에 상기 제2 물질과 상기 중화 용액의 혼합을 위해 파형대(波形態)로 형성된 제2 혼합부; 를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 pH 조절 시료를 전기영동법으로 연속 분리하기 위한 미세소포체 분리장치.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 생물학적 시료는

단백질, 미세소포체 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 pH 조절 시료를 전기영동법으로 연속 분리하기 위한 미세소포체 분리장치.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 유동채널부는

상기 주입되는 버퍼의 유량을 조절하여, 상기 산성 용액 또는 상기 알칼리성 용액이 혼합된 생물학적 시료가 상기 유출채널의 일측 벽면을 따라 상기 버퍼와 분리되어 나란히 유동하는 것을 특징으로 하는 pH 조절 시료를 전기영동법으로 연속 분리하기 위한 미세소포체 분리장치.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 주입되는 버퍼의 유량은

상기 주입되는 상기 산성 용액 또는 상기 알칼리성 용액이 혼합된 생물학적 시료 유량의 1 내지 20배인 것을 특징으로 하는 pH 조절 시료를 전기영동법으로 연속 분리하기 위한 미세소포체 분리장치.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 산성 용액이 혼합된 상기 생물학적 시료는

양(+) 전하를 띄고,

상기 전기장형성부를 통과하면서 양(+) 전하를 띤 상기 생물학적 시료에 포함된 입자들이 상기 일방향과 직교하는 방향으로 형성된 전기장에 의해 유동하면서 전기영동 유동성에 따라 분리되는 것을 특징으로 하는 pH 조절 시료를 전기영동법으로 연속 분리하기 위한 미세소포체 분리장치.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 알칼리성 용액이 혼합된 상기 생물학적 시료는

음(-) 전하를 띄고,

상기 전기장형성부를 통과하면서 음(-) 전하를 띤 상기 생물학적 시료에 포함된 입자들이 상기 일방향과 직교하는 방향으로 형성된 전기장에 의해 유동하면서 전기영동 유동성에 따라 분리되는 것을 특징으로 하는 pH 조절 시료를 전기영동법으로 연속 분리하기 위한 미세소포체 분리장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세소포체 분리장치에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 생물학적 시료에 산성 용액 또는 알칼리성 용액을 혼합하여 양전하 또는 음전하를 띄게 하고, 상기 시료에 전기영동을 적용함으로써 연속적으로 시료를 분리하는 pH 조절 시료를 전기영동법으로 분리하기 위한 미세소포체 분리장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 들어, 바이오 기술에 대한 관심과 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나 기존의 바이오 분석 시스템은 급증하는 바이오 정보를 신속하게 처리하기 어렵다. 이에 따라 생명현상의 규명과 신약개발 및 진단을 위한 생물학적 검출시스템은 미세 유체공학(microfluidics)의 기반 위에서 보다 적은 양으로 빠른 시간에 정확하고 편리하게 시료를 분석하기 위한 미세 종합 분석 시스템(μ -TAS: micro-Total Analysis System)과 랩온어칩(lab-on-a-chip)의 형태로 발전하고 있다. 분석 대상이 되는 대부분의 생화학적 시료는 용액 상태로 존재하기 때문에 액체 시료를 전달하는 기술이 무엇보다도 중요한 요소라고 할 수 있다. 미세 유체 공학은 바로 이러한 미세 유체의 흐름을 조절하는 연구분야로서, 상기 미세 종합 분석시스템과 랩온어칩의 상용화에 기초가 되는 핵심기술을 연구 개발하는 분야이다.

[0003] 상기 미세 종합 분석시스템은 다수의 실험 단계들과 반응을 거치는 화학 및 생물학 실험과 분석을 하나의 실험대 위에 존재하는 하나의 유닛(unit)상에서 종합적으로 구현하는 시스템이다. 이러한 미세 종합 분석 시스템은 시료 채취 영역, 미세 유체 회로, 검출기 및 이들을 제어하는 제어기로 구성된다.

[0004] 또한, 상기 랩온어칩이란 '칩 위의 연구실'이란 의미 그대로 상기 미세 종합 분석시스템의 개념과 기능을 하나의 칩(chip) 상에서 구현한 것을 나타낸다. 따라서, 상기 랩온어칩을 개발하기 위해서는 플라스틱이나 유리, 실리콘 등의 표면에 용액이 흐를 수 있는 미세 채널로 회로를 생성한 후, 시료의 전처리, 분리, 희석, 혼합, 생화학 반응, 검출 등을 하나의 칩에 소형화 및 집적화시킬 수 있어야만 한다.

[0005] 한편, 생체 내 미세소포체(마이크로 베지클)는 여러 종류의 세포들에 존재하거나 세포로부터 분비되는 막 구조의 작은 소포이다. 세포 외로 분비되는 마이크로 베지클은 (1)엑소솜: 식균 기원의 직경 30 내지 100nm의 막성 소포, (2)엑토솜(shedding 마이크로 베지클(shedding microvesicles, SMVs)이라고도 함): 원형질막으로부터 직접 흘러지고 직경 50 내지 1000nm의 큰 막성 소포, (3) 세포자살성 수포(apoptotic blebs): 죽어가는 세포에 의해 유출된 직경 50 내지 5000nm의 소포를 포함한다.

[0006] 상기 생체 내 미세소포체(마이크로 베지클), 예를 들어 엑소솜은 세포에서 분비되는 수십 나노미터 크기의 소포로서, 지질 이중층(lipid bilayer) 또는 지질 단층(lipid monolayer) 내부에 세포질 또는 세포에서 생성되는 단백질과 RNA가 포함되어 있는 구조이다. 엑소솜은 단백질 및 RNA의 교환을 통한 세포 간 의사소통의 수단이다. 그리고 엑소솜은 세포 내 불필요한 물질의 배출기능도 담당하고 있으며, 마이크로RNA(microRNA, miRNA)를 포함하고 있어 암 등의 질병 조기진단과 같은 분자진단에 있어서 유용한 마커로 활용 가능하다. 상기와 같이 생체 내 미세소포체들의 중요성 및 가치가 밝혀지고 있지만 상기 미세소포체들을 수득하는 데는 어려움이 따른다.

[0007] 기존 마이크로 베지클을 분리하는 방법은 마이크로 베지클과 항체를 결합시켜 마이크로 베지클을 면역-캡처하여 분리하는 방법이다. 이러한 방법은 단백질 구조 변화 등에 의한 항체 인식 부위의 마스킹(masking), 마이크로 베지클 이질성(heterogeneity), 단백질 상호 작용 등에 의해 분리 또는 검출 타겟에 따라 편향(bias)이 발생할 수 있다. 분리 또는 검출을 위해 복잡한 프로세스나 고가의 장비가 필요할 수 있고, 시료의 소모량이 높을 수 있다. 따라서, 적은 양의 시료로부터 타겟에 비의존적으로 마이크로 베지클을 효율적으로 분리하는 것이 필요하다.

- [0008] 또한, 기존에 마이크로 베지클 또는 엑소좀을 분리하기 위해서 일반적으로 원심분리법을 많이 사용하였다. 세포나 조직 시료액에 Ficoll 용액 또는 OptiPrep(Nycomed Pharma, Norway)등의 용액을 첨가하여 원심분리함으로써 마이크로 베지클을 수득하고자 하였다. 그러나 이러한 방법은 세포나 조직 시료액에 전처리를 요할 뿐만 아니라 많은 양(부피)의 샘플을 필요로 한다. 또한, 이 방법은 여러 번의 원심분리 과정을 필요로 하며 원심분리를 위한 특별한 시약 및 장치를 필요로 하기 때문에 많은 시간 및 비용이 소요된다. 결과적으로 상기 원심분리를 통해 수득된 마이크로 베지클이 포함된 펠렛에는 마이크로 베지클 이외에도 이와 밀도나 질량이 유사한 미세 단백질 분자, 세포 파편 등 불순물이 많이 포함되어있다. 또한, 상기 불순물들은 마이크로 베지클과 밀도가 크게 다르지 않아 분리가 쉽게 일어나지 않으므로, 즉각적인 대응을 필요로 하는 현장진단 등에 적용이 불가능하다는 단점이 있다. 또한, 장시간의 높은 관성력으로 인해 수득하고자 하는 마이크로 베지클의 손상이 발생할 수 있어 생물학적 반응을 연구함에 있어 근본적인 문제를 야기할 수 있다.
- [0009] 따라서, 생물학적 시료로부터 미세소포체에 손상을 주지 않으면서, 연속적으로 미세소포체를 분리할 수 있는 새로운 시스템의 개발이 필요한 실정이다.
- [0010] 또한, 생물학적 시료에 산성 용액 또는 알칼리성 용액을 혼합하여 상기 생물학적 시료에 임의로 전하를 띄도록 pH를 조절함으로써 전기영동 적용 시 상기 시료를 효율적으로 연속 분리하는 기술도 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제2005-0119128호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 생물학적 시료로부터 미세소포체에 손상을 주지 않으면서 원하는 크기의 미세소포체만을 선택적으로 수득할 수 있는 한편, 상기 시료에 임의로 전하를 띄게 하도록 pH를 조절하여 전기영동 적용 시 더욱 효율적인 분리를 수행하기 위한 pH 조절 시료를 전기영동법으로 연속 분리하기 위한 미세소포체 분리장치를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 이를 위해 본 발명에 따른 pH 조절 시료를 전기영동법으로 연속 분리하기 위한 미세소포체 분리장치는, 일방향을 따라 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 혼합된 생물학적 시료와 버퍼가 분리되어 나란히 유동하는 유동채널부; 상기 유동채널부 일단에 연결되어 상기 버퍼가 주입되는 제1 경로부; 상기 유동채널부 일단에 연결되어 상기 산성 용액 또는 알칼리성 용액과 상기 생물학적 시료가 주입되는 제2 경로부; 상기 유동채널부를 따라 유동하는 상기 생물학적 시료가 전기영동 유동성에 따라 분리되도록 상기 유동채널부의 상기 일방향과 직교하는 방향으로 전기장을 형성하는 전기장형성부; 상기 전기장형성부의 전기영동 유동성에 따라 분리된 제1 물질이 배출되도록 상기 유동채널부 타단에 연결 형성된 제3 경로부; 및 상기 전기장형성부의 전기영동 유동성에 따라 분리된 제2 물질이 배출되도록 상기 유동채널부 타단에 연결 형성되되, 상기 제2 경로부에서 주입된 상기 산성 용액 또는 상기 알칼리성 용액을 중화시키기 위한 중화 용액이 주입되는 제4 경로부; 를 포함한다.
- [0014] 그리고 본 발명의 실시 예에 따른 상기 제2 경로부는 상기 생물학적 시료가 주입되는 시료 주입구; 및 상기 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 주입되는 용액 주입구; 를 포함한다.
- [0015] 또한, 본 발명의 실시 예에 따른 상기 제2 경로부는 상기 시료 주입구와 상기 용액 주입구 후단에 상기 생물학적 시료와 상기 산성 용액 또는 상기 알칼리성 용액의 혼합을 위해 파형태(波形態)로 형성된 제1 혼합부; 를 더 포함한다.
- [0016] 한편, 본 발명의 실시 예에 따른 상기 제4 경로부는 상기 제2 물질이 배출되는 시료 배출구; 및 상기 제2 경로

부에서 주입된 상기 산성 용액 또는 알칼리성 용액을 중화시키기 위한 중화 용액이 주입되는 중화용액 주입구; 를 포함한다.

[0017] 그리고 본 발명의 실시 예에 따른 상기 제4 경로부는 상기 중화용액 주입구와 상기 시료 배출구 사이에 상기 제2 물질과 상기 중화 용액의 혼합을 위해 파형태(波形態)로 형성된 제2 혼합부; 를 더 포함한다.

[0018] 또한, 본 발명의 실시 예에 따른 상기 생물학적 시료는 단백질, 미세소포체 또는 이들의 혼합물이다.

[0019] 한편, 본 발명의 실시 예에 따른 상기 유동채널부는 상기 주입되는 버퍼의 유량을 조절하여, 상기 산성 용액 또는 상기 알칼리성 용액이 혼합된 생물학적 시료가 상기 유출채널의 일측 벽면을 따라 상기 버퍼와 분리되어 나란히 유동한다.

[0020] 그리고 본 발명의 실시 예에 따른 상기 주입되는 버퍼의 유량은 상기 주입되는 상기 산성 용액 또는 상기 알칼리성 용액이 혼합된 생물학적 시료 유량의 1 내지 20배이다.

[0021] 또한, 본 발명의 실시 예에 따른 상기 산성 용액이 혼합된 상기 생물학적 시료는 양(+) 전하를 띄고, 상기 전기장형성부를 통과하면서 양(+) 전하를 띤 상기 생물학적 시료에 포함된 입자들이 상기 일방향과 직교하는 방향으로 형성된 전기장에 의해 유동하면서 전기영동 유동성에 따라 분리된다.

[0022] 한편, 본 발명의 실시 예에 따른 상기 알칼리성 용액이 혼합된 상기 생물학적 시료는 음(-) 전하를 띄고, 상기 전기장형성부를 통과하면서 음(-) 전하를 띤 상기 생물학적 시료에 포함된 입자들이 상기 일방향과 직교하는 방향으로 형성된 전기장에 의해 유동하면서 전기영동 유동성에 따라 분리된다.

[0023] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

[0024] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 발명자가 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합되는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 다양한 실시 예에 따르면, 미세소포체 분리장치는 생물학적 시료로부터 미세소포체에 손상을 주지 않으면서 전기영동 유동성에 따라 다량의 시료를 연속적으로 분리할 수 있는 효과가 있다.

[0026] 그리고 본 발명의 다양한 실시 예에 따르면, 미세소포체 분리장치는 생물학적 시료에 산성 용액 또는 알칼리성 용액을 혼합하여 pH를 조절함으로써 전기영동 적용 시 효율적으로 상기 생물학적 시료를 효율적으로 연속 분리할 수 있는 효과도 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명에 따른 미세소포체 분리장치의 원리를 도시한 예시도.

도 2는 본 발명의 제1 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치를 도시한 개략도.

도 3은 본 발명의 제2 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치를 도시한 개략도.

도 4는 본 발명의 제3 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치를 도시한 개략도.

도 5는 본 발명의 제4 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치를 도시한 개략도.

도 6은 본 발명의 제5 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치를 도시한 개략도.

도 7은 본 발명의 제6 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치를 도시한 개략도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시 예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 명세서에서 각 도면의 구성요소들에 참조번호를 부가함에 있어서,

동일한 구성 요소들에 한해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 번호를 가지도록 하고 있음에 유의하여야 한다. 또한, "제1", "제2" 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하기 위해 사용되는 것으로, 구성요소가 상기 용어들에 의해 제한되는 것은 아니다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.

- [0029] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.
- [0030] 도 1은 본 발명에 따른 미세소포체 분리장치의 원리를 도시한 예시도이다.
- [0031] 도 1에 도시된 바와 같이 본 발명은 전기영동현상을 이용하여 미세소포체 또는 단백질의 전기영동 유동성에 따라 분리하는 장치를 제공한다.
- [0032] 생물학적 시료에 포함되어 있는 단백질 또는 미세소포체 입자는 pH에 따라 전하를 띄게 된다. 구체적으로 전하가 0이 되는 pH 값인 pI(Isoelectric point) 보다 낮은 pH에서는 양전하를 띄고, 높은 pH에서는 음전하를 띄게 된다.
- [0033] 또한, 전기영동은 전기장이 걸린 영역에서 전하를 띤 입자가 이동하는 현상이다. 상기 전기영동은 전하를 띤 입자들이 입자의 크기, 전하량, 버퍼조성 등의 요소에 의해 유동 속도에 차이가 발생한다. 이를 전기영동 유동성(electricphoretic mobility)이라고 하며, 본 발명은 상술한 특징 즉, 전하를 띤 입자들이 전기영동 유동성에 따라 분리되어 유동하는 특성을 이용하여 미세소포체의 연속 분리를 실현한다.
- [0034] 여기서 상기 '미세소포체(마이크로 베지클)'란 여러 종류의 세포들에 존재하거나 세포로부터 분리되는 막 구조의 작은 소포를 의미하는 것으로, 세포 외 소포(extracellular vesicle)를 포함한다. 세포 외로 분리되는 상기 미세소포체는 (1) 엑소솜: 식균 기원의 직경 30 내지 100 nm의 막성 소포, (2) 엑토솜(셰딩 마이크로 베지클(shedding microvesicles, SMVs)이라고도 함): 원형질막으로부터 직접 흘러지고 직경 50 내지 1000 nm의 큰 막성 소포, (3) 세포자살성 수포(apoptotic blebs): 죽어가는 세포에 의해 유출된 직경 50 내지 5000 nm의 소포를 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 목적하여 수득하고자 하는 미세소포체는 바람직하게는 엑소솜(exosome)일 수 있다.
- [0035] 상기 '엑소솜'은 여러 종류의 세포들로부터 분리되는 막 구조의 작은 소포이다. 엑소솜의 직경은 대량 30-1000 nm일 수 있다. 엑소솜은 전자 현미경을 통한 연구에서 원형질막(plasma membrane)으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 구획에서 기원하며 세포 밖으로 방출, 분리된다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면, 그러한 소포들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소솜이라고 부른다. 이러한 엑소솜이 어떤 분자적 기작에 의해 만들어지는지 확실히 밝혀진 바가 없으나, 적혈구뿐만 아니라, B-림프구, T-림프구, 수지상 세포, 혈소판, 대식 세포 등을 포함한 다양한 종류의 면역 세포들과 종양 세포 등도 살아 있는 상태에서 엑소솜을 생산하여 분비한다고 알려져 있다. 엑소솜은 정상 상태, 병적 상태, 또는 이 두 상태 하에서 다수의 다른 세포 유형으로부터 분리되어 방출된다고 알려져 있다.
- [0036] 생물학적 시료에는 단백질을 비롯하여 미세소포체들과 크기가 유사한 입자(particles)들과, 미세소포체를 포함하는 다양한 크기의 소낭(vesicle)들이 혼재하여 있다. 상기 소낭 특히 미세소포체들은 세포 내에서 생성되는 부위가 다름에 따라 소낭을 구성하는 막 구조 지질층(lipid layer)이 단일층(monolayer) 또는 이중층(bilayer)으로 다양하고 소낭의 크기도 다양하게 존재한다.
- [0037] 본 발명의 상기 단백질과 미세소포체가 포함된 생물학적 시료는 목적하는 종류의 미세소포체를 수득할 수 있는 생물 유래 시료를 의미하며 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 체액 또는 세포 배양액을 포함한다. 상기 체액은 소변, 점액, 타액, 눈물, 혈장, 혈청, 뇨, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 또는 그의 조합일 수 있다. 상기 세포 배양액은 세포 배양 후에 세포를 제거시킨 배지(culture medium)를 의미한다. 상기 배지의 조성은 세포로부터 미세소포체를 다량 분리시킬 수 있도록 통상의 기술자가 선택적으로 변경할 수 있으며, 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 컨디션드배지(conditioned media, 무혈청 배지)배양액 또는 혈청일 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 시료의 제조 시, 통상의 기술자가 목적하는 실험 효율에 따라 여과 및 농축 과정이 임의로 추가될 수 있다. 상기 여과 과정은 공지의 여과 방법에 의할 수 있으며, 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 원심분리 또는 마이크로필터를 이용한 여과일 수 있다. 상기 농축 과정은 공지의 농축 방법에 의할 수 있으며, 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 원심분리법을 이용하여 농축할 수 있다.

- [0039] 본 발명의 상기 단백질과 미세소포체가 포함된 생물학적 시료는 바람직하게는 세포 배양 후 배양 배지(culture medium) 또는 혈청 농축액일 수 있다.
- [0040] 다음은 도 2 내지 도 7을 참조하여 본 발명의 다양한 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100, 100A, 100B, 100C, 100D, 및 100E)를 후술한다.
- [0041] 도 2는 본 발명의 제1 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치를 도시한 개략도이고, 도 3은 본 발명의 제2 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치를 도시한 개략도이며, 도 4는 본 발명의 제3 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치를 도시한 개략도이며, 도 5는 본 발명의 제4 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치를 도시한 개략도이며, 도 6은 본 발명의 제5 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치를 도시한 개략도이며, 도 7은 본 발명의 제6 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치를 도시한 개략도이다.
- [0042] 우선 도 2를 참조하면, 본 발명의 제1 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100)는 유동채널부(110), 제1 경로부(120), 제2 경로부(130), 전기장형성부(140), 제3 경로부(150), 및 제4 경로부(160)를 포함한다.
- [0043] 유동채널부(110)는 일방향을 따라 생물학적 시료와 버퍼가 분리되어 나란히 유동한다. 여기서 버퍼는 제1 경로부(120)로 주입되어 유동채널부(110)로 유동하고, 생물학적 시료는 제2 경로부(130)로 주입되어 유동채널부(110)로 유동한다. 여기서 생물학적 시료의 pH를 조절하기 위해 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 제2 경로부(130)로 생물학적 시료와 함께 주입되거나 pH가 기 조절된 생물학적 시료가 주입되는 것이 바람직하다.
- [0044] 이와 같이 제1 경로부(120)와 제2 경로부(130)로부터 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 혼합된 생물학적 시료와 버퍼가 주입되면, 전기장형성부(140)는 유동채널부(110)를 따라 유동하는 생물학적 시료가 전기영동 유동성에 따라 분리되도록 유동채널부(110)의 일방향과 직교하는 방향으로 전기장을 형성한다.
- [0045] 그러면 유동채널부(110)는 전기영동 유동성에 따라 분리된 시료들이 상호 격리되어 유동되도록, 유동채널부(110)의 타단에 제3 경로부(150)와 제4 경로부(160)가 연결된다. 즉, 전기영동 유동성에 따라 분리된 제1 물질은 제3 경로부(150)를 통해 배출되고, 제2 물질은 제4 경로부(160)를 통해 배출된다. 여기서 제4 경로부(160)가 분리 배출하는 제2 물질은 제2 경로부(130)에서 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 혼합된 상태이므로 제2 물질에 중화 용액을 혼합하는 것이 바람직하다. 그리고 상기 생물학적 시료는 단백질, 미세소포체 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하다. 또한, 분리된 시료들을 설명의 편의를 위해 제1 물질 및 제2 물질로 상정하여 제3 경로부(150)와 제4 경로부(160)를 통해 배출되는 것을 상정하였으나 이는 일 예에 불과하고 분리된 시료의 종류에 따라 배출 경로를 더 구비할 수 있는 것이 바람직하다.
- [0046] 상기 유동채널부(110)는 버퍼, 분리하고자 하는 대상인 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 혼합된 생물학적 시료가 분리되어 나란히 유동되는 곳으로, 일방향으로 길게 형성된다. 이때, 상기 버퍼(buffer, 완충용액)는 채널 속을 흐르며 시료 속의 미세소포체를 운반 및 분리하기 때문에 캐리어 버퍼(carrier buffer) 및 분리 액체(partitioning fluid)로서의 역할을 동시에 수행한다.
- [0047] 상기 버퍼는 상기 유동채널부(110) 일단에 연결 구비된 제1 경로부(120)로 주입되며, 상기 생물학적 시료는 상기 유동채널부(110) 일단에 연결 구비된 제2 경로부(130)로 주입된다. 상술한 바와 같이 주입된 상기 버퍼와 생물학적 시료는 유동채널부(140)의 일단에서 만나 일방향을 따라 유동하며, 상술한 바와 같이, 상기 버퍼는 캐리어 버퍼 및 분리 액체로서의 역할을 수행하게 되는데, 상기 생물학적 시료와 분리되어 나란히 유동하게 된다. 이때, 상기 생물학적 시료는 분리효과의 상승을 위해 상기 유동채널부(110)의 일측 벽면을 따라 유동하는 것이 바람직한바, 이는 상기 제1 경로부(120)를 통해 주입되는 버퍼의 유량조절을 통해 제어할 수 있다.
- [0048] 한편, 상기 주입되는 버퍼의 유량은 상기 주입되는 생물학적 시료 유량의 1 내지 20배인 것이 바람직하다. 상기 상한치를 초과하면 시료의 일측 벽면을 따른 유동이 일정치 않아 문제되고, 상기 하한치 미만이면 시료가 제3 및 제4 경로부(150, 160)로 모두 흘러버리는 문제점을 초래할 수 있다.
- [0049] 상기 버퍼는 생물학적 시료 속에 포함된 미세소포체의 지질막 구조에 영향을 주지 않는 것이라면 그 종류가 제한되지 않으며, 이는 당업계에 알려져 있다. 예를 들어 인산완충 식염수(phosphate buffer saline, PBS), 수크로오스를 포함하는 PBS 용액, 글라이신을 포함하는 PBS 용액 등이 사용될 수 있으며 바람직하게는 수크로오스를 포함하는 PBS 용액일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 또한, 상기 생물학적 시료는 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 혼합되어 투입되는 것이 바람직한데, 이는 상기 생물학적 시료가 유동채널부(110)를 따라 전기장형성부(140)를 통과하기 전에 미리 pH를 조절하여 양(+) 전하

또는 음(-) 전하를 띄도록 하기 위함이다. 따라서 생물학적 시료에 산성 용액 또는 알칼리성 용액을 혼합시키는 것은 선택사항일 뿐이므로 두 용액을 선택적으로 주입할 수 있다.

- [0051] 다음은 도 3을 참조하여 본 발명의 제2 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100A)를 후술한다.
- [0052] 도 3을 참조하면 본 발명의 제2 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100A)는 도 2에 도시한 본 발명의 제1 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100)에 비해 제2 경로부(130A)가 용액 주입구(131)와 시료 주입구(132)를 더 구비한다는 차이점이 있다.
- [0053] 도 3을 설명함에 있어 도 2의 설명과 중복되는 설명은 생략하는 한편, 도 2와 동일한 구성요소에 대해서는 동일한 도면번호를 기재하여 설명한다.
- [0054] 우선, 도 3에 도시한 시료 주입구(132)는 제2 경로부(130A)로 생물학적 시료를 주입하고, 용액 주입구(131)는 생물학적 시료의 pH를 조절하기 위한 산성 용액 또는 알칼리성 용액을 주입한다. 이 후 제4 경로부(160)로 배출된 제2 물질은 용액 주입구(131)에서 주입된 산성 용액 또는 알칼리성 용액의 중화를 위해 중화 용액을 혼합하는 후처리 공정이 수행된다.
- [0055] 따라서 도 2에 도시한 본 발명의 제1 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100)는 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 기 혼합된 생물학적 시료를 제2 경로부(130)로 주입함에 반해, 도 3에 도시한 본 발명의 제2 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100A)는 산성 용액 또는 알칼리성 용액을 생물학적 시료에 선택적으로 혼합할 수 있다.
- [0056] 다음은 도 4를 참조하여 본 발명의 제3 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100B)를 후술한다.
- [0057] 도 4를 참조하면 본 발명의 제3 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100B)는 도 3에 도시한 본 발명의 제2 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100A)에 비해 제2 경로부(130B)가 용액 주입구(131)와 시료 주입구(132) 대신에 제1 혼합부(133)를 구비한다는 차이점이 있다.
- [0058] 도 4를 설명함에 있어 도 3의 설명과 중복되는 설명은 생략하는 한편, 도 3과 동일한 구성요소에 대해서는 동일한 도면번호를 기재하여 설명한다.
- [0059] 도 4를 참조하면 본 발명의 제3 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100B)는 제2 경로부(130B)가 생물학적 시료의 pH를 조절하기 위한 산성 용액 또는 알칼리성 용액을 혼합 효율을 높이기 위해 파형태(波形態)로 형성된 제1 혼합부(133)를 구비한다. 따라서 생물학적 시료와 산성 용액 또는 알칼리성 용액은 제1 혼합부(133)를 지그재그(zigzag)로 흐르면서 혼합 효율을 높일 수 있다.
- [0060] 이 후 제4 경로부(160)로 배출된 제2 물질은 제1 혼합부(133)에서 생물학적 시료와 혼합된 산성 용액 또는 알칼리성 용액의 중화를 위한 중화 용액을 혼합하는 후처리 공정이 수행되는 것이 바람직하다.
- [0061] 다음은 도 5를 참조하여 본 발명의 제4 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100C)를 후술한다.
- [0062] 도 5를 참조하면 본 발명의 제4 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100C)는 도 3에 도시한 본 발명의 제2 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100A)에 비해 제4 경로부(160A)가 중화용액 주입구(161A)와 시료 배출구(162A)를 구비한다는 점에서 차이점이 있다.
- [0063] 도 5를 설명함에 있어 도 3의 설명과 중복되는 설명은 생략하는 한편, 도 3과 동일한 구성요소에 대해서는 동일한 도면번호를 기재하여 설명한다.
- [0064] 우선, 도 5를 참조하면 제2 경로부(130)로 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 혼합된 생물학적 시료가 주입되면, 생물학적 시료는 전기장형성부(140)의 전기영동 유동성에 따라 제1 물질과 제2 물질로 분리된다. 이 후 제4 경로부(160A)의 시료 배출구(162A)로 배출되는 제2 물질은 중화용액 주입구(161A)에서 주입된 산성 용액 또는 알칼리성 용액에 의해 중화된다.
- [0065] 따라서 도 5에 도시한 본 발명의 제4 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100C)는 배출되는 제2 물질에 중화용액 주입구(161A)를 통해 중화 용액(산성 용액 또는 알칼리성 용액)을 혼합함으로써 별도의 후처리 공정을 생략할 수 있다.

- [0066] 다음은 도 6을 참조하여 본 발명의 제5 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100D)를 후술한다.
- [0067] 도 6을 참조하면 본 발명의 제5 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100D)는 도 5에 도시한 본 발명의 제4 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100C)에 비해 제4 경로부(160B)가 제2 혼합부(163)를 중화용액 주입구(161A)와 시료 배출구(161B) 사이에 구비한다는 차이점이 있다.
- [0068] 도 6을 설명함에 있어 도 5의 설명과 중복되는 설명은 생략하는 한편, 도 5와 동일한 구성요소에 대해서는 동일한 도면번호를 기재하여 설명한다.
- [0069] 도 6을 참조하면 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 혼합되어 pH가 조절된 생물학적 시료는 전기장형성부(140)에 의해 제1 물질과 제2 물질로 분리된다. 그리고 분리된 제2 물질은 중화용액 주입구(161A)에서 중화 용액(산성 용액 또는 알칼리성 용액)이 주입되어 제2 물질과 혼합된다. 그러면 제2 물질과 중화 용액은 제2 혼합부(163)를 통과하면서 서로 혼합됨으로써 제2 물질은 중화된다.
- [0070] 마지막으로, 도 7을 참조하여 본 발명의 제6 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100E)를 후술한다.
- [0071] 본 발명의 제6 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100E)는 유동채널부(110), 제1 경로부(120), 제2 경로부(130A), 전기장형성부(140), 제3 경로부(150), 및 제4 경로부(160B)를 포함한다.
- [0072] 도 7을 참조하면 본 발명의 제6 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100E)는 도 2 내지 도 6에 도시한 본 발명의 제1 내지 제 5 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100, 100A, 100B, 100C, 및 100D)의 구성요소를 모두 합친 구성인 것이 바람직하다.
- [0073] 따라서 본 발명의 제6 실시 예에 따른 미세소포체 분리장치(100E)의 제2 경로부(130A)는 시료 주입구(132)와 용액 주입구(131) 및 제1 혼합부(133)를 모두 포함함으로써 시료 주입구(132)로 생물학적 시료가 주입되고, 용액 주입구(131)로 산성 용액 또는 알칼리성 용액이 주입되어 제1 혼합부(133)를 유동하면서 혼합된다.
- [0074] 이와 같이 혼합된 생물학적 시료는 전기장형성부(140)에서 제1 물질과 제2 물질로 분리된다. 그리고 분리된 제2 물질은 제4 경로부(160B)로 유동하면서 중화용액 주입구(161A)에서 주입된 중화 용액과 혼합된다. 또한, 제2 물질과 중화 용액의 혼합효율을 높이기 위해 중화용액 주입구(161A) 후단에 제2 혼합부(163)가 더 구비되는 것이 바람직하다. 제2 혼합부(163)는 제1 혼합부(133)와 유사한 형태로 구비되되 예를 들면 파형태(波形態)로 형성됨으로써 혼합효율을 높일 수 있다.
- [0075] 한편, 유동채널부(110)의 일단에 함유하여 일방향을 따라 분리되어 유동하는 버퍼, 산성 용액이 혼합된 생물학적 시료는 양(+) 전하로 대전되어 상기 전기장형성부(140)를 통과하면서, 전기영동 유동성에 따라 분리된다. 상기 전기장형성부(140)는 상기 유동채널부(110)의 일방향과 직교하는 방향으로 전기장을 형성하게 되며, 이로 인해, 상기 생물학적 시료에 포함된 양(+) 전하를 띤 입자들은 전기영동에 의해 이동하게 되며, 전기영동 유동성에 따라 이동하는 거리가 달라진다. 상기 전기영동 유동성은 입자의 크기, 전하량, 버퍼조성 등에 의해 달라질 수 있다.
- [0076] 반대로 생물학적 시료에 알칼리성 용액을 혼합하면 시료는 음(-) 전하로 대전되고 전기장형성부(140)의 방향에 따라 제1 물질과 제2 물질이 서로 다른 경로로 배출하도록 조절할 수 있다.
- [0077] 상기 전기장형성부(140)를 통과하면서 전기영동 유동성에 따라 분리된 생물학적 시료 입자들은 상호 격리되어 유동되도록, 상기 유동채널부(110)의 타단에 연결되는 제3 경로부(150) 또는 제4 경로부(160B)를 통해 유동하여 최종적으로 분리된다.
- [0078] 상기 전기장형성부(140)는 상술한 바와 같이, 유동채널부(110)의 일방향과 직교하는 방향으로 전기장이 형성되도록 전원을 인가하기 위하여, 한 쌍의 전극을 포함할 수 있으며, 상기 전극은 상기 유동채널부의 양측 벽면에 구비될 수 있다.
- [0079] 또한, 본 발명의 제6 실시 예에 따르면, 상기 유동채널부(110) 일단에 연결된 제2 경로부(130A)에는 상기 주입된 산성 용액 또는 알칼리성 용액과 상기 생물학적 시료가 잘 혼합될 수 있도록, 제1 혼합부(133)를 더 포함할 수 있다. 상술한 바와 같이 산성 용액 또는 알칼리성 용액은 생물학적 시료에 포함된 입자들의 pH를 조절하여

양(+) 전하 또는 음(-) 전하를 띠도록 하기 위한 것인바, 상기 제1 혼합부(133)에 의해 시료에 포함된 입자들 대부분이 양(+) 전하 또는 음(-) 전하를 띠도록 하여, 분리효과를 더욱 향상시킬 수 있다. 이때, 상기 제1 혼합부(133)는 혼합효과를 더욱 높이기 위해 도 7에 도시한 바와 같이, 일직선이 아닌 구불구불한 형태로 연결되는 것이 바람직하다.

[0080] 또한, 본 발명의 제6 실시 예에 의하면, 상기 제4 경로부(160B)는 도 7에 도시된 바와 같이 상기 분리된 단백질 또는 미세포체의 pH를 조절하는 용액이 주입되는 중화용액 주입구(161A)를 더 포함할 수 있다. 시료 배출구(162A)를 통해 상기 생물학적 시료가 산성 용액과 혼합된 상태로 pH가 매우 낮은 상태로 주입되거나 알칼리성 용액과 혼합된 상태로 pH가 매우 높은 상태로 주입될 수 있다. 따라서 최종적으로 배출되는 분리 입자의 pH를 조절하여, 원하는 pH를 가진 입자를 수득할 수 있다.

[0081] 이하, 상술한 바와 같이 구성된 미세포체 분리장치(100)를 이용하여 생물학적 시료를 분리하는 과정에 대하여 설명한다.

[0082] 먼저, 유동채널부(110)의 일단에 연결된 제1 경로부(120)를 통해 버퍼가 주입되고, 제2 경로부(130A)를 통해 산성 용액 또는 알칼리성 용액과 혼합된 생물학적 시료, 즉 양 전하 또는 음 전하를 띤 입자들이 포함된 생물학적 시료가 주입된다. 이때, 상기 버퍼의 유량을 조절하여 상기 양 전하를 띤 생물학적 시료가 유동채널부(110)의 일측 벽면을 따라 상기 버퍼와 분리되어 나란히 유동하게 된다.

[0083] 또한, 전기장형성부(140)에 구비된 한 쌍의 전극 사이에 전원이 공급되면, 상기 유동채널부(110)의 일방향과 직교하는 방향으로 전기장이 형성된다.

[0084] 이 상태에서, 상기 유동채널부(110)의 일측 벽면을 따라 유동하는 상기 생물학적 시료가 상기 전기장형성부(140)를 통과하는 과정에서, 형성된 전기장 방향으로 유동하게 되며, 이때, 상술한 입자의 크기, 전하량, 버퍼 조성 등에 의해 달라지는 전기영동 유동성에 따라 이동하는 거리가 달라져서, 서로 분리되며, 상기 전기장형성부(140)를 통과한 상기 분리된 입자들은 상기 유동채널부(110)의 타단에 연결된 제3 경로부(150) 또는 제4 경로부(160B)를 통해 격리되어 유동하면서 최종적으로 분리된다.

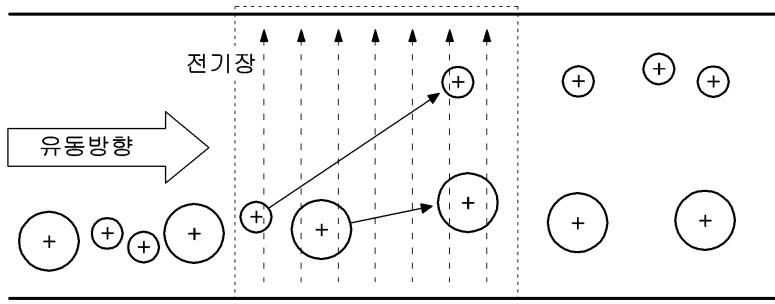
[0085] 이상 본 발명을 구체적인 실시 예 및 실험 예 등을 통하여 상세히 설명하였으나, 이는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명은 이에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상 내에서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 그 변형이나 개량이 가능함이 명백하다.

부호의 설명

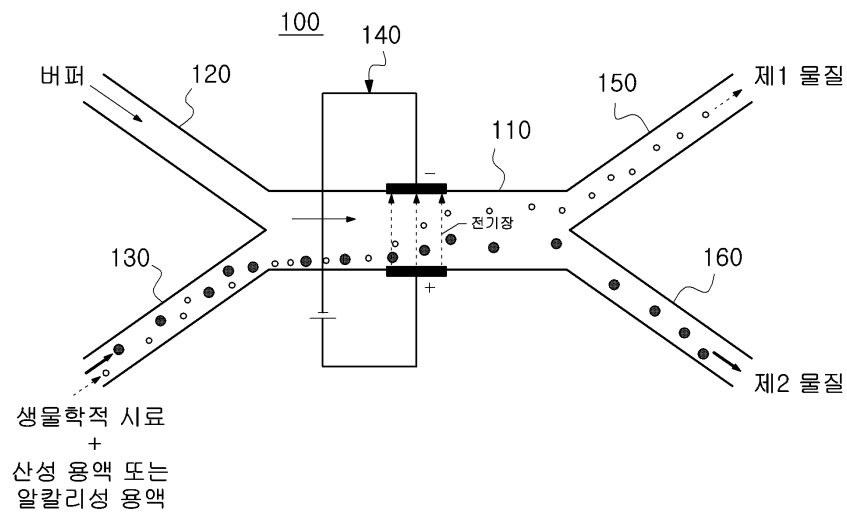
[0086] 100, 100A, 100B, 100C, 100D, 및 100E: 미세포체 분리장치 110: 유동채널부 120, 120A: 제1 경로부
130, 130A, 130B: 제2 경로부 140: 전기장형성부
150: 제3 경로부 160, 160A, 160B: 제4 경로부
131: 용액 주입구 132: 시료 주입구
133: 제1 혼합부 161A: 중화용액 주입구
162A, 161B: 시료 배출구 163: 제2 혼합부

도면

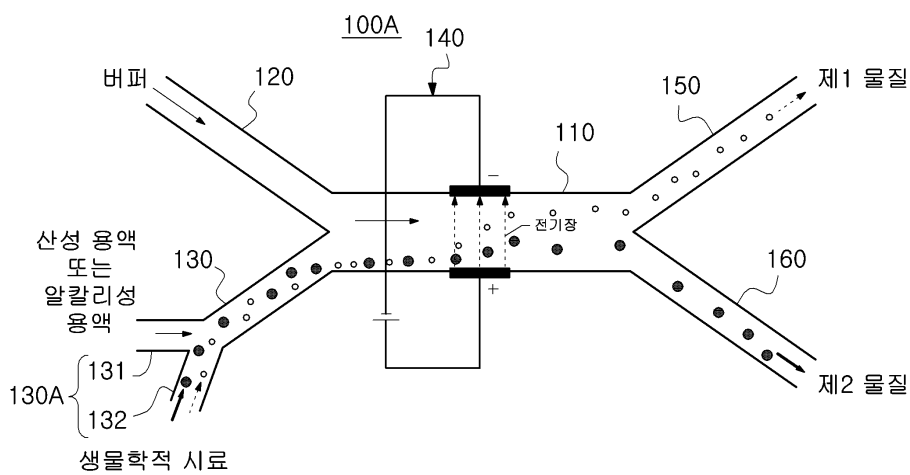
도면1



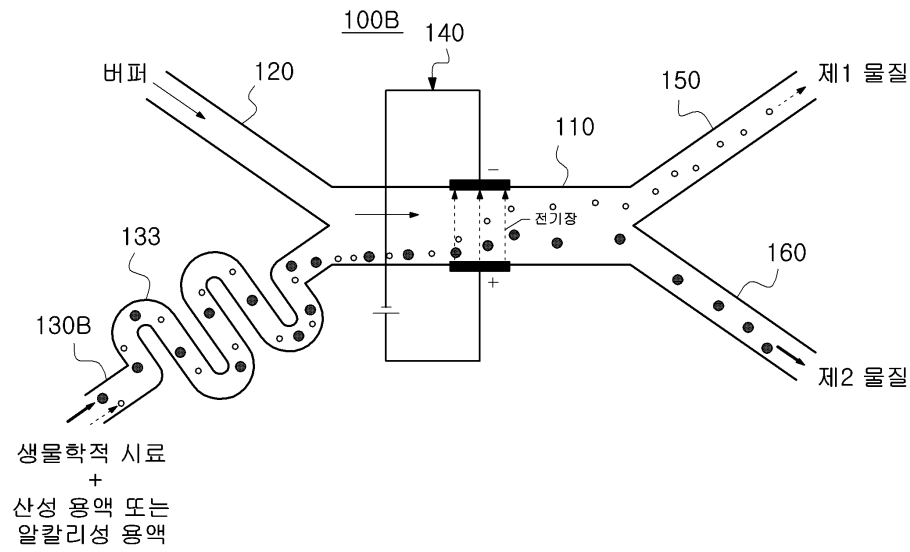
도면2



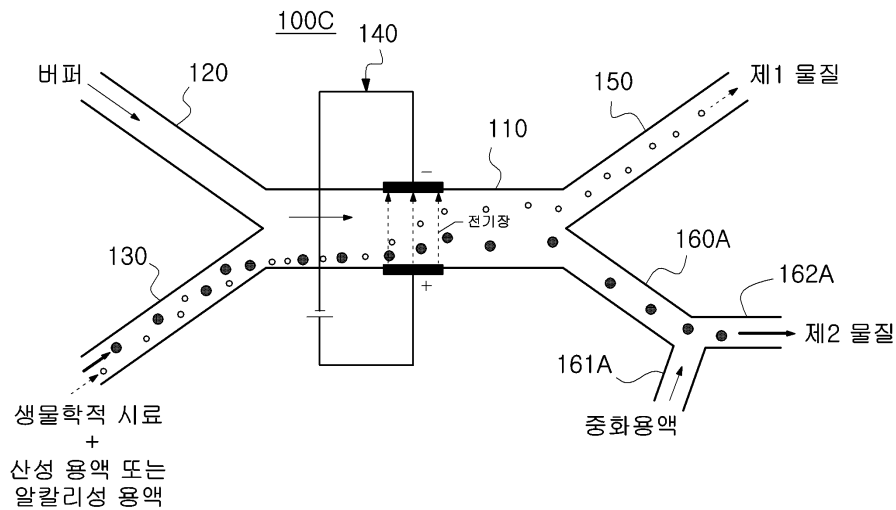
도면3



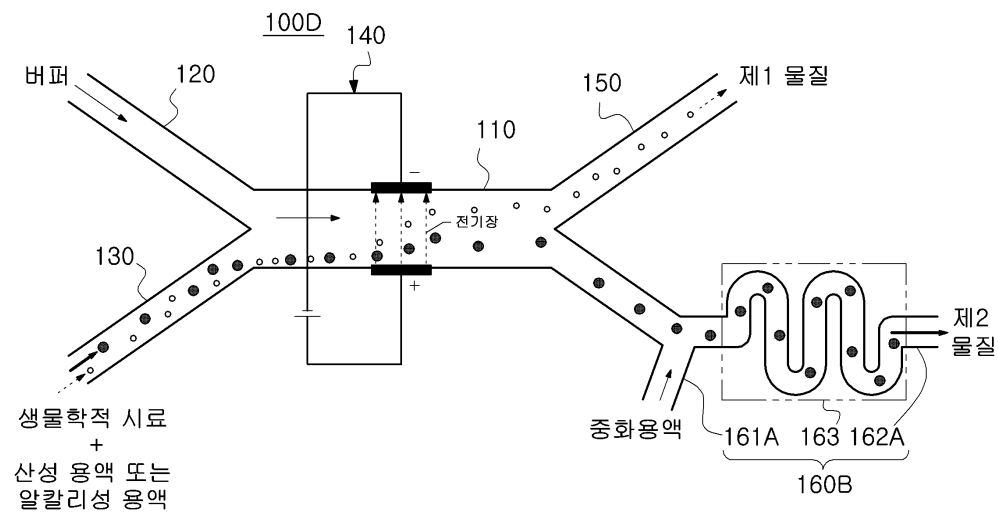
도면4



도면5



도면6



도면7

