



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0039005
(43) 공개일자 2018년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/00 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
G01N 35/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
B01L 3/502753 (2013.01)
G01N 33/6842 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0129821
(22) 출원일자 2017년10월10일
심사청구일자 2017년10월11일
(30) 우선권주장
1020160129545 2016년10월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
조윤경
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
우현경
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
비자야쎌카라
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
유미특허법인

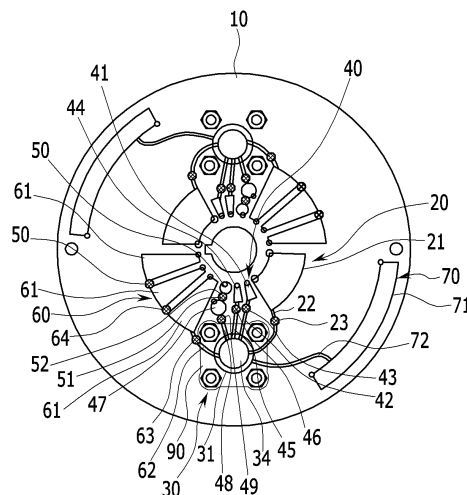
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 나노 입자 검출 장치 및 이를 이용한 나노 입자 검출 방법

(57) 요약

시료로부터 나노 입자를 검출하는 전과정이 일체화되어 보다 간편하게 사용할 수 있도록, 원심력에 의한 유체의 이송이 이루어지는 디스크, 상기 디스크에 형성되어 시료를 수용하는 시료수용부, 상기 시료수용부에 연결되고 이송된 시료를 여과하여 나노 입자를 분리하기 위한 미세 여과막을 구비한 필터부, 상기 필터부에 연결되어 여과막에 분리된 나노 입자 검출을 위한 검출액을 공급하는 공급부, 상기 필터부 출측에 연결되어 여과막을 거친 용액을 수용하는 폐액수용부, 상기 디스크에 형성되어 유체가 이송되는 유로, 및 상기 유로를 선택적으로 개폐하는 밸브를 포함하는 나노 입자 검출 장치를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 35/08 (2013.01)

B01L 2200/0652 (2013.01)

B01L 2200/10 (2013.01)

B01L 2300/0636 (2013.01)

B01L 2300/0681 (2013.01)

B01L 2300/0803 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465012042

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발

연구과제명 암조기 진단을 위한 혈액순환종양세포 기반 분자진단 칩 개발

기 여 율 1/1

주관기관 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01~2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

원심력에 의한 유체의 이송이 이루어지는 디스크,
 상기 디스크에 형성되어 시료를 수용하는 시료수용부,
 상기 시료수용부에 연결되고 이송된 시료를 여과하여 나노 입자를 분리하기 위한 미세 여과막을 구비한 필터부,
 상기 필터부에 연결되어 여과막에 분리된 나노 입자 검출을 위한 검출액을 공급하는 공급부,
 상기 필터부 출측에 연결되어 여과막을 거친 용액을 수용하는 폐액수용부,
 상기 디스크에 형성되어 유체가 이송되는 유로, 및
 상기 유로를 선택적으로 개폐하는 밸브
 를 포함하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
 상기 필터부는 유체 이동방향을 따라 입측공간과 출측공간을 구비하며 입측공간과 출측공간 사이에 상기 여과막이 설치된 필터챔버를 포함하고,
 상기 입측공간은 시료수용부와 연결되어 시료가 유입되고 여과된 나노 입자가 수용되며, 상기 출측공간은 폐액수용부와 연결된 나노 입자 검출 장치.

청구항 3

제 2 항에 있어서,
 상기 여과막은 기공이 1nm 내지 1000nm로 형성된 나노 입자 검출 장치.

청구항 4

제 2 항에 있어서,
 상기 여과막은 폴리카보네이트, 폴리스타이렌, 폴리메틸메타크릴레이트, 사이클릭 올레핀 코폴리머를 포함한 열경화성 플라스틱, 양극산화알루미늄, 니켈, 또는 실리콘 재질로 이루어지는 나노 입자 검출 장치.

청구항 5

제 2 항에 있어서,
 상기 필터부는 입측공간과 출측공간 사이에 적어도 두 개 이상의 여과막이 적층되고, 상기 각 여과막은 유체 이송방향을 따라 기공이 점차적으로 작아지는 나노 입자 검출 장치.

청구항 6

제 2 항에 있어서,
 상기 필터부는 적어도 두 개 이상의 유체 이송 방향을 따라 순차적으로 배치되고, 각 필터부에 구비된 여과막은 기공의 크기가 서로 상이하여, 각각 서로 다른 크기 범위의 나노 입자를 분리하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 필터부는 적어도 두 개 이상이 유체 이송방향을 따라 순차적으로 배치되고, 각 필터부에 구비된 여과막은 유체 이송방향을 따라 기공이 점차적으로 작아지는 나노 입자 검출 장치.

청구항 8

제 2 항에 있어서,

상기 여과막은 상기 디스크의 필터챔버에 착탈가능하게 설치된 나노 입자 검출 장치.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 필터부는 상기 디스크에 착탈가능하게 설치되어 상기 필터챔버를 개폐하는 덮개, 상기 덮개를 디스크에 고정하는 체결부를 더 포함하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 시료수용부는 상기 디스크에 형성되어 시료를 수용하는 시료챔버, 상기 시료챔버와 필터부를 연결하며 디스크의 원심력에 따라 시료가 이송되는 제1 유로, 및 상기 제1 유로를 개폐하는 제1 밸브를 포함하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 시료챔버는 디스크 원심력에 따라 시료를 원심분리하고,

원심력 방향을 따라 디스크의 외측을 향하는 선단에 원심 분리된 시료가 수용되는 침강부가 길게 연장 형성되고,

상기 제1 유로는 디스크의 회전 중심을 향해 상기 시료챔버의 침강부 경계지점에 연결되어 원심분리된 상층액을 필터부로 이송하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 침강부는 디스크의 방사방향에 대해 기울어져 경사지게 형성된 나노 입자 검출 장치.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

상기 침강부는 상기 경계지점에서 원심력 방향을 따라 끝단으로 갈수록 바닥면이 점차적으로 상향 경사지고, 상기 침강부의 끝단에 형성되어 시료에서 원심분리된 불순물이 수용되는 홈부를 더 포함하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 14

제 1 항에 있어서,

상기 시료는 생체입자를 포함하는 혈액, 림프액, 조직액, 오줌, 타액, 뇌척수액 및 객담에서 선택되는 생체시료 또는 나노 입자가 분산된 수용액 또는 이들의 조합인 나노 입자 검출 장치.

청구항 15

제 1 항에 있어서,

상기 시료수용부, 상기 필터부, 상기 공급부 및 상기 폐액수용부는 하나의 유닛을 이루고, 상기 유닛은 디스크의 원주방향을 따라 복수개가 간격을 두고 배치되는 나노 입자 검출 장치.

청구항 16

제 1 항에 있어서,

상기 디스크의 이웃하는 두 구성부를 연결하는 상기 유로는 입구가 출구보다 디스크 중심쪽에 위치하여, 디스크의 원심력 방향을 따라 입구가 일측 챔버의 출측에 연결된 나노 입자 검출 장치.

청구항 17

제 1 항에 있어서,

상기 디스크는 비특이적 항체 부착을 방지할 수 있도록 단백질이나, 고분자, 또는 유기분자로 표면 개질된 나노 입자 검출 장치.

청구항 18

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 공급부는 상기 디스크에 형성되어 나노 입자 검출을 위해 제공되는 항체를 수용하는 항체챔버, 상기 항체 챔버와 필터부를 연결하며 디스크의 원심력에 따라 항체를 필터부로 이송하는 제2 유로, 및 상기 제2 유로를 개폐하는 제2 밸브를 포함하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

상기 공급부는 상기 디스크에 형성되어 나노 입자를 검출하는 항체의 표지를 위해 제공되는 시약이 수용된 시약 챔버, 상기 시약챔버와 필터부를 연결하며 디스크의 원심력에 따라 시약을 필터부로 이송하는 제3 유로, 및 상기 제3 유로를 개폐하는 제3 밸브를 더 포함하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 공급부는 상기 디스크에 형성되어 나노 입자 검출반응을 위해 제공되는 기질액을 수용하는 기질액챔버, 상기 기질액챔버와 필터부를 연결하며 디스크의 원심력에 따라 기질액을 필터부로 이송하는 제4 유로, 및 상기 제 4 유로를 개폐하는 제4 밸브를 더 포함하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

상기 공급부는 공급부는 디스크에 형성되어 나노 입자 검출 반응을 멈추기 위해 제공되는 정지용액(stop solution)을 수용하는 정지용액챔버, 상기 정지용액챔버와 기질액챔버를 연결하는 연결유로, 및 상기 연결유로를 개폐하는 연결밸브를 더 포함하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

상기 공급부는 상기 필터부로 세척액을 이송하여 필터부를 세척하는 세척부를 더 포함하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 23

제 22 항에 있어서,

상기 세척부는 상기 디스크에 형성되어 세척액을 수용하는 세척액챔버, 상기 세척액챔버와 필터부를 연결하며 디스크의 원심력에 따라 세척액을 필터부로 이송하는 제5 유로, 상기 제5 유로를 개폐하는 제5 밸브를 포함하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

상기 세척액챔버는 복수개로 구분되고, 각각의 세척액챔버에 세척액이 구분 수용되고, 각 세척액챔버의 출측 유로에는 세척액을 배출하는 출측 밸브가 설치된 나노 입자 검출 장치.

청구항 25

제 22 항에 있어서,

상기 디스크에 형성되고 상기 필터부에 연결되어 여과막에 의해 분리된 나노 입자가 회수되는 회수챔버, 상기 회수챔버와 필터부를 연결하여 나노 입자를 회수챔버로 이송하는 제7 유로, 상기 제7 유로를 개폐하는 제7 밸브를 더 포함하는 나노 입자 검출 장치.

청구항 26

디스크에 시료를 공급하는 단계,

디스크에 원심력을 가해 시료를 필터부로 이송하고 여과막을 통해 여과하여 나노 입자를 분리하는 단계, 및

디스크에 원심력을 가해 검출액을 필터부로 공급하여 여과막 상의 나노 입자를 검출하는 단계를 포함하는 나노 입자 검출 방법.

청구항 27

제 26 항에 있어서,

상기 나노 입자를 분리하는 단계는, 기공 크기가 서로 상이한 복수의 여과막을 거쳐 서로 다른 크기 범위의 나노 입자를 분리하는 나노 입자 검출 방법.

청구항 28

제 27 항에 있어서,

상기 나노 입자를 분리하는 단계는, 기공이 점차 작아지는 복수의 여과막을 순차적으로 거쳐 서로 다른 크기 범위의 나노 입자를 분리하는 나노 입자 검출 방법.

청구항 29

제 26 항에 있어서,

상기 시료를 필터부로 이송하기 전에, 디스크에 원심력을 가해 시료를 원심 분리하는 정제 단계를 더 포함하는 나노 입자 검출 방법.

청구항 30

제 26 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노 입자를 검출하는 단계는, 디스크에 원심력을 가해 항체를 필터부로 공급하여 나노 입자를 검출하고, 필터부로 시약을 공급하여 나노 입자에 붙은 항체를 표지하는 단계를 포함하는 나노 입자 검출 방법.

청구항 31

제 29 항에 있어서,

상기 디스크에 원심력을 가해 필터부로 세척액을 공급하여 세척하는 단계를 더 포함하는 나노 입자 검출 방법.

청구항 32

제 31 항에 있어서,

상기 세척하는 단계는, 항체를 필터부로 공급한 후 여분의 항체를 세척하여 제거하는 단계, 및 시약을 필터부로 공급하여 항체를 표지한 후 여분의 시약을 세척하여 제거하는 단계를 포함하는 나노 입자 검출 방법.

청구항 33

제 32 항에 있어서,

상기 나노 입자를 검출하는 단계는, 디스크에 원심력을 가해 나노 입자에 기질액을 공급하는 단계를 더 포함하는 나노 입자 검출 방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서,

상기 기질액 공급 후, 나노 입자 검출 용액을 회수하는 단계를 더 포함하는 나노 입자 검출 방법.

청구항 35

제 26 항에 있어서,

상기 나노 입자를 검출하는 단계에서, 분리된 나노 입자에 핵산 추출용 시약을 공급하여 핵산을 추출하는 단계를 더 포함하는 나노 입자 검출 방법.

청구항 36

제 26 항에 있어서,

상기 나노 입자를 검출하는 단계에서, 상기 디스크에서 여과막을 분리하는 단계를 포함하여, 디스크 외부에서 나노 입자를 검출하는 나노 입자 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노 입자 검출 장치 및 이를 이용한 나노 입자 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 예를 들어, 나노 소포체는 세포 활동에서 발생하는 40-120 nm 사이즈의 작은 소포체이다. 나노 소포체는 발생지와 크기에 의해 다른 소포체들과 구분된다. 나노 소포체는 발견 당시에는 세포 부산물로 여겨졌으나 종양의 진행 및 전이, 세포 신호 전달 등의 세포 활동에 기여하는 것으로 그 중요성이 밝혀졌다. 나노 소포체는 신체의 거의 모든 체액에 존재하며 유래된 세포의 유전정보를 포함한다. 이 때문에, 나노 소포체는 암을 포함한 각종 질병의 새로운 마커 뿐만 아니라 새로운 약물전달 시스템으로 주목받고 있다.

[0003] 최근, 나노 소포체를 분리 및 검출하는 방법에 대한 연구가 지속적으로 늘어나고 있다. 나노 소포체를 분리하는 방법들은 밀도, 크기, affinity를 이용한 것으로 크게 분류된다.

[0004] 나노 소포체를 분리 포획한 이후 나노 소포체의 특정 단백질이나 핵산 등을 검출하는 방법으로는 특정 항원의 발현양을 비교하는 단백질 분석과 발생된 세포의 유전정보를 분석하는 핵산 분석이 있다. 기존의 단백질 분석 방법인 96 well plate를 이용한 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)는 plate에 특정 항체 혹은 단백질 특이적으로 나노 소포체를 부착한 후 다른 항체를 사용하여 검출하는 방법이다. 그러나, 종래 방법의 경우 나노 소포체를 부착하는 96 well plate의 표면적에 한계가 있으며 나노 소포체의 특정 부위가 plate에 부착되고 나면 그와 인접한 항체 분석은 어렵다는 한계가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 시료로부터 나노 입자를 검출하는 전과정이 일체화되어 보다 간편하게 사용할 수 있도록 된 나노 입자 검출 장치 및 이를 이용한 나노 입자 검출 방법을 제공한다.

[0006] 복수의 항원에 대한 검출을 수행할 수 있도록 된 나노 입자 검출 장치 및 이를 이용한 나노 입자 검출 방법을 제공한다.

[0007] 보다 정확한 검출과 분석이 가능한 나노 입자 검출 장치 및 이를 이용한 나노 입자 검출 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 구현예의 검출 장치는, 원심력에 의한 유체의 이송이 이루어지는 디스크, 상기 디스크에 형성되어 시료를 수용하는 시료수용부, 상기 시료수용부에 연결되고 이송된 시료를 여과하여 나노 입자를 분리하기 위한 미세 여과막을 구비한 필터부, 상기 필터부에 연결되어 여과막에 분리된 나노 입자 검출을 위한 검출액을 공급하는 공급부, 상기 필터부 출측에 연결되어 여과막을 거친 용액을 수용하는 폐액수용부, 상기 디스크에 형성되어 유체가 이송되는 유로, 및 상기 유로를 선택적으로 개폐하는 밸브를 포함할 수 있다.
- [0009] 상기 시료수용부는 상기 디스크에 형성되어 시료를 수용하는 시료챔버, 상기 시료챔버와 필터부를 연결하며 디스크의 원심력에 따라 시료가 이송되는 제1 유로, 상기 제1 유로를 개폐하는 제1 밸브를 포함할 수 있다.
- [0010] 상기 시료챔버는 디스크 원심력에 따라 시료를 원심분리하고, 원심력 방향을 따라 디스크의 외측을 향하는 선단에 원심 분리된 시료가 수용되는 침강부가 길게 연장 형성되고, 상기 제1 유로는 디스크의 회전 중심을 향해 상기 시료챔버의 침강부 경계지점에 연결되어 원심분리된 상층액을 필터부로 이송할 수 있다.
- [0011] 상기 침강부는 디스크의 방사방향에 대해 기울어져 경사지게 형성될 수 있다.
- [0012] 상기 침강부는 상기 경계지점에서 원심력 방향을 따라 끝단으로 갈수록 바닥면이 점차적으로 상향 경사질 수 있다.
- [0013] 상기 침강부의 끝단에 형성되어 시료에서 원심분리된 불순물이 수용되는 홈부를 더 포함할 수 있다.
- [0014] 상기 시료챔버의 침강부 출측과 상기 폐액수용부와 연결되어 침강된 용액을 이송하는 배출 유로 및 상기 배출 유로를 개폐하는 배출 밸브를 더 포함할 수 있다.
- [0015] 상기 필터부는 유체 이동방향을 따라 입측공간과 출측공간을 구비하며 입측공간과 출측공간 사이에 상기 여과막이 설치된 필터챔버를 포함하고, 상기 입측공간은 시료수용부와 연결되어 시료가 유입되고 여과된 나노 입자가 수용되며, 상기 출측공간은 폐액수용부와 연결될 수 있다.
- [0016] 상기 여과막은 기공이 1nm 내지 1000nm로 형성될 수 있다.
- [0017] 상기 여과막은 폴리카보네이트, 폴리스타이렌, 폴리메틸메타크릴레이트, 사이클릭 올레핀 코폴리머를 포함한 열경화성 플라스틱, 양극산화알루미늄, 니켈, 또는 실리콘 재질로 이루어질 수 있다.
- [0018] 상기 필터부는 입측공간과 출측공간 사이에 적어도 두 개 이상의 여과막이 적층되고, 상기 각 여과막은 유체 이송방향을 따라 기공이 점차적으로 작아질 수 있다.
- [0019] 상기 필터부는 적어도 두 개 이상의 유체 이송 방향을 따라 순차적으로 배치되고 각 필터부에 구비된 여과막은 기공의 크기가 서로 상이하어, 각각 서로 다른 크기 범위의 나노 입자를 분리하는 구조일 수 있다.
- [0020] 상기 필터부는 적어도 두 개 이상이 유체 이송방향을 따라 순차적으로 배치되고, 각 필터부에 구비된 여과막은 유체 이송방향을 따라 기공이 점차적으로 작아질 수 있다.
- [0021] 상기 여과막은 디스크에서 착탈가능하게 설치될 수 있다.
- [0022] 상기 디스크에 착탈가능하게 설치되어 상기 필터챔버를 개폐하는 덮개, 상기 덮개를 디스크에 고정하는 체결부를 더 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 공급부는 상기 디스크에 형성되어 나노 입자 검출을 위해 제공되는 항체를 수용하는 항체챔버, 상기 항체챔버와 필터부를 연결하며 디스크의 원심력에 따라 항체를 필터부로 이송하는 제2 유로, 상기 제2 유로를 개폐하는 제2 밸브를 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 공급부는 상기 디스크에 형성되어 나노 입자를 검출하는 항체의 표지를 위해 제공되는 시약이 수용된 시약챔버, 상기 시약챔버와 필터부를 연결하며 디스크의 원심력에 따라 시약을 필터부로 이송하는 제3 유로, 상기 제3 유로를 개폐하는 제3 밸브를 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 공급부는 상기 디스크에 형성되어 나노 입자 검출반응을 위해 제공되는 기질액을 수용하는 기질액챔버, 상기 기질액챔버와 필터부를 연결하며 디스크의 원심력에 따라 기질액을 필터부로 이송하는 제4 유로, 상기 제4 유로를 개폐하는 제4 밸브를 더 포함할 수 있다.

- [0026] 상기 공급부는 공급부는 디스크에 형성되어 나노 입자 검출 반응을 멈추기 위해 제공되는 정지용액(stop solution)을 수용하는 정지용액챔버, 상기 정지용액챔버와 기질액챔버를 연결하는 연결유로, 및 상기 연결유로를 개폐하는 연결밸브를 포함하여, 정지용액을 기질액챔버를 거쳐 필터챔버로 공급할 수 있다.
- [0027] 상기 공급부는 상기 필터부로 세척액을 이송하여 필터부를 세척하는 세척부를 더 포함할 수 있다.
- [0028] 상기 세척부는 상기 디스크에 형성되어 세척액을 수용하는 세척액챔버, 상기 세척액챔버와 필터부를 연결하며 디스크의 원심력에 따라 세척액을 필터부로 이송하는 제5 유로, 상기 제5 유로를 개폐하는 제5 밸브를 포함할 수 있다.
- [0029] 상기 세척액챔버는 복수개로 구분되고, 각각의 세척액챔버에 세척액이 구분 수용되고, 각 세척액챔버의 출측 유로에는 세척액을 배출하는 출측 밸브가 설치될 수 있다.
- [0030] 상기 폐액수용부는 상기 디스크에 형성되어 폐액이 수용되는 폐액챔버, 상기 폐액챔버와 상기 필터부를 연결하며 디스크의 원심력에 따라 폐액을 폐액챔버로 이송하는 제6 유로를 포함할 수 있다.
- [0031] 상기 디스크에 형성되고 상기 필터부에 연결되어 여과막에 의해 분리된 나노 입자가 회수되는 회수챔버, 상기 회수챔버와 필터부를 연결하여 나노 입자를 회수챔버로 이송하는 제7 유로, 상기 제7 유로를 개폐하는 제7 밸브를 더 포함할 수 있다.
- [0032] 상기 시료는 생체입자를 포함하는 혈액, 림프액, 조직액, 오줌, 타액, 뇌척수액 및 객담에서 선택되는 생체시료 또는 나노 입자가 분산된 수용액 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0033] 상기 시료수용부, 상기 필터부, 상기 공급부 및 상기 폐액수용부는 하나의 유닛을 이루고, 상기 유닛은 디스크의 원주방향을 따라 복수개가 간격을 두고 배치될 수 있다.
- [0034] 이웃하는 두 챔버를 연결하는 유로는 입구가 출구보다 디스크 중심쪽에 위치하여, 디스크의 원심력 방향을 따라 입구가 일측 챔버의 출측에 연결될 수 있다.
- [0035] 상기 디스크는 비특이적 항체 부착을 방지할 수 있도록 단백질이나, 고분자, 또는 유기분자로 표면 개질될 수 있다.
- [0036] 본 구현예의 나노 입자 검출 방법은, 디스크에 시료를 공급하는 단계, 디스크에 원심력을 가해 시료를 필터부로 이송하고 여과막을 통해 여과하여 나노 입자를 분리하는 단계, 디스크에 원심력을 가해 나노 입자 검출을 위한 검출액을 필터부로 공급하여 여과막 상의 나노 입자를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0037] 상기 나노 입자를 검출하는 단계는, 디스크에 원심력을 가해 항체를 필터부로 공급하여 나노 입자를 검출하고, 필터부로 시약을 공급하여 나노 입자에 붙은 항체를 표지하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 시료를 필터부로 이송하기 전에, 디스크에 원심력을 가해 시료를 원심 분리하는 분리 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 나노 입자를 분리하는 단계는, 기공 크기가 서로 상이한 복수의 여과막을 거쳐 서로 다른 크기 범위의 나노 입자를 분리할 수 있다.
- [0040] 상기 나노 입자를 분리하는 단계는, 기공이 점차 작아지는 복수의 여과막을 순차적으로 거쳐 서로 다른 크기 범위의 나노 입자를 분리할 수 있다.
- [0041] 상기 디스크에 원심력을 가해 필터부로 세척액을 공급하여 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0042] 상기 세척하는 단계는, 나노 입자 검출 후 여분의 항체를 세척하여 제거하는 단계, 및 나노 입자를 표지한 후 여분의 시약을 제거하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 나노 입자를 표지한 후 기질액을 공급하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 여과막에서 분리된 나노 입자를 회수하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 나노 입자를 검출하는 단계에서, 분리된 나노 입자에 핵산 추출용 시약을 공급하여 핵산을 추출하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 나노 입자를 검출하는 단계에서, 상기 디스크에서 여과막을 분리하는 단계를 포함하여, 디스크 외부에서 나노 입자 검출이 이루어질 수 있다.

발명의 효과

- [0047] 이와 같이 본 구현예에 의하면, 시료로부터 나노 입자를 검출하는 전 과정을 일체화하여 단일 디스크 내에서 간단히 수행함으로써, 나노 입자 검출에 소요되는 시간과 노력을 최소화할 수 있게 된다. 이에, 전문 인력의 투입을 최소화하면서 나노 입자에 대한 분석과 진단을 보다 용이하게 수행할 수 있다.
- [0048] 나노 입자가 분리된 공간 내에 항체를 공급하여 검출이 이루어짐으로써, 나노 입자의 표면의 모든 항원을 효과적으로 검출할 수 있게 된다. 이에, 단시간 내에서 나노 입자를 검출할 수 있고, 검출을 위한 항체의 효율을 높일 수 있게 된다.
- [0049] 따라서, 나노 소포체의 연구 및 이를 이용한 암을 비롯한 질병을 효과적으로 진단할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

- [0050] 도 1은 본 실시예에 따른 나노 입자 검출 장치를 도시한 개략적인 평면도이다.
- 도 2는 또다른 실시예에 따른 나노 입자 검출 장치를 도시한 개략적인 평면도이다.
- 도 3은 본 실시예에 따른 나노 입자 검출 장치의 시료수용부를 도시한 개략적인 단면도이다.
- 도 4는 본 실시예에 따른 나노 입자 검출 장치의 필터부를 도시한 개략적인 단면도이다.
- 도 5는 또다른 실시예에 따른 나노 입자 검출 장치를 도시한 개략적인 평면도이다.
- 도 6은 본 실시예에 따른 나노 입자 검출 장치의 나노 입자 검출 원리를 설명하기 위한 개략적인 도면이다.
- 도 7은 본 실시예에 따라 나노 입자의 단백질 검출 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 8은 본 실시예에 따른 소변 유래 나노 입자의 단백질 발현량을 종래와 비교하여 나타낸 도면이다.
- 도 9는 본 실시예에 따른 나노 입자의 핵산 검출 결과를 종래와 비교하여 나타낸 도면이다.
- 도 10은 본 실시예에 따라 암 세포 유래 나노 소포체를 혈장에 spike한 샘플로부터 나노 입자를 분리 후 검출한 결과를 종래와 비교하여 나타낸 도면이다.
- 도 11은 본 실시예에 따라 암 세포 유래 나노 소포체를 혈장에 spike한 샘플로부터 스핀 조건에 따라 나노 입자를 분리 후 검출한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 12는 본 실시예에 따라, 암 세포 유래 나노 소포체를 혈장에 spike한 샘플의 부피에 따라 나노 입자를 분리 후 검출한 결과를 종래와 비교하여 나타낸 도면이다.
- 도 13은 본 실시예에 따라 암 환자 혈장과 정상인 혈장 유래 나노 입자의 분리 및 단백질 검출 결과를 종래와 비교하여 나타낸 도면이다.
- 도 14는 본 실시예에 따라 정상인 혈장 유래 나노 입자의 분리 및 핵산 검출 결과를 종래와 비교하여 나타낸 도면이다.
- 도 15는 본 실시예에 따라 단백질 분해 효소 처리 단계를 거친 혈장과 거치지 않은 혈장 유래 나노 입자의 분리 및 핵산 검출 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 16은 도 5의 실시예에 따른 나노 입자 검출 장치의 나노 입자 단백질 검출 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 이하, 첨부한 도면을 참조하여, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예를 설명한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 이해할 수 있는 바와 같이, 후술하는 실시예는 본 발명의 개념과 범위를 벗어나지 않는 한도 내에서 다양한 형태로 변형될 수 있다. 가능한 한 동일하거나 유사한 부분은 도면에서 동일한 도면부호를 사용하여 나타낸다.
- [0052] 이하에서 사용되는 전문용어는 단지 특정 실시예를 언급하기 위한 것이며, 본 발명을 한정하는 것을 의도하지 않는다. 여기서 사용되는 단수 형태들은 문구들이 이와 명백히 반대의 의미를 나타내지 않는 한 복수 형태들도 포함한다. 명세서에서 사용되는 “포함하는”의 의미는 특정 특성, 영역, 정수, 단계, 동작, 요소 및/또는 성분을 구체화하며, 다른 특정 특성, 영역, 정수, 단계, 동작, 요소, 성분 및/또는 군의 존재나 부가를 제외시키

는 것은 아니다.

- [0053] 이하에서 사용되는 기술용어 및 과학용어를 포함하는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 의미와 동일한 의미를 가진다. 사전에 정의된 용어들은 관련기술문헌과 현재 개시된 내용에 부합하는 의미를 가지는 것으로 추가 해석되고, 정의되지 않는 한 이상적이거나 매우 공식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0054] 이하 설명에서, 본 실시예는 시료로부터 나노 소포체를 검출하는 구조를 예로서 설명한다. 나노 소포체는 혈액, 림프액, 조직액, 오줌, 타액, 뇌척수액, 및 객담을 포함하는 생체시료 또는 나노 입자가 분산된 수용액을 포함하여 다양한 시료로부터 포획될 수 있다. 본 실시예는 나노 소포체 검출에 한정되지 않으며, 다양한 나노 입자에 대한 검출에 모두 적용 가능하다.
- [0055] 본 실시예의 검출 장치는, 원심력에 의한 유체의 이송이 이루어지는 디스크, 디스크에 형성되어 시료를 수용하는 시료수용부, 시료수용부에 연결되고 이송된 시료를 여과하여 나노 입자를 분리하기 위한 여과막을 구비한 필터부, 필터부에 연결되어 여과막에 분리된 나노 입자 검출을 위한 검출액을 공급하는 공급부, 필터부 출측에 연결되어 여과막을 거친 용액을 수용하는 폐액수용부, 디스크에 형성되어 유체가 이송되는 유로, 및 유로를 선택적으로 개폐하는 밸브를 포함할 수 있다.
- [0056] 여기서, 검출이란 나노 입자의 특정 항원 존재 유무를 감지하고 확인하는 것, 나노 입자의 핵산을 추출하는 것을 포함하여, 나노 입자의 특정 단백질이나 핵산을 검출하고 분석하는 모든 것을 의미할 수 있다.
- [0057] 디스크(disc)는 장치의 몸체를 이룬다. 디스크는 내부에 각 구성부를 구비한다.
- [0058] 디스크의 형태는 다양하게 변형가능하다. 본 실시예에서, 디스크는 원형의 판 구조물로 이루어질 수 있다. 디스크의 중심은 회전축을 이룬다. 디스크는 외부로부터 제공되는 구동력에 의해 회전축을 중심으로 회전된다. 디스크의 회전에 따라 원심력이 발생되고 내부 유체에 원심력을 가하여 유체를 이송한다.
- [0059] 디스크는 원판 형태의 상판과 하판 두 개의 판 구조물을 접합하여 형성될 수 있다. 디스크는 상판과 하판 두 개의 판 접합 구조 외에 다양한 개수의 판을 접합하여 형성할 수 있다. 예를 들어, 디스크는 상판과 하판 사이에 밸브가 형성된 판 구조물이 더 구비될 수 있다.
- [0060] 상판과 하판의 내면에는 각 구성부와 유로를 형성하기 위해 설정된 형태의 캐비티가 형성될 수 있다. 상판과 하판 사이에 형성되는 공간이 유체를 수용하거나 이송하기 위한 챔버와 유로를 이룬다. 디스크를 이루는 상판과 하판은 유체와 접하는 표면이 생물학적으로 비활성인 소재로 이루어질 수 있다. 또한, 상판과 하판은 광학적 투과성을 구비한 소재로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 상판과 하판은 폴리스타이렌(polystyrene, PS), 폴리 디메틸 실록산(poly dimethyl siloxane, PDMS), 폴리 메틸메타크릴레이트(poly methylmethacrylate, PMMA), 폴리아크릴레이트 (polyacrylate), 폴리카보네이트 (polycarbonate), 폴리실릭 올레핀 (polycyclic olefins), 폴리이미드 (polyimide) 폴리우레탄(polyurethanes) 등의 소재로 형성될 수 있다.
- [0061] 또한, 디스크를 이루는 상판과 하판은 비특이적 항체 부착을 방지할 수 있도록 단백질이나, 고분자, 유기분자 등으로 표면 개질된 구조일 수 있다.
- [0062] 이에, 디스크 내에 시료를 공급하여 유로를 따라 이동하였을 경우, 시료가 디스크와 반응하지 않고 표면에 부착되지 않아, 생물학적 안전성을 확보할 수 있고 항체와의 반응성을 높일 수 있다. 또한, 분리된 나노 입자를 디스크 외부로 배출시키지 않고도 광학 검출기를 통해 상판과 하판을 투과하여 검출할 수 있게 된다.
- [0063] 본 실시예는 하나의 디스크를 이용하여 복수의 서로 상이한 나노 입자를 검출하는 구조일 수 있다. 이를 위해, 나노 입자 검출을 위해 필요한 시료수용부, 필터부, 공급부 및 폐액수용부는 하나의 유닛을 이루고, 이 유닛은 디스크의 원주방향을 따라 복수개가 간격을 두고 배치될 수 있다. 도 1은 예를 들어, 두 개의 유닛이 배치된 구조를 예시하고 있다. 디스크의 크기나 각 유닛의 크기 등에 따라 다양한 개수의 유닛을 하나의 디스크에 구비할 수 있다.
- [0064] 이에, 디스크에 구비된 복수의 유닛에 각각 서로 상이한 시료 또는 검출액을 준비하여 하나의 디스크로 복수의 나노 입자를 동시에 검출할 수 있다.
- [0065] 디스크의 회전중심에서 원심력 방향을 따라 시료수용부와 공급부, 필터부, 및 폐액수용부가 순차적으로 위치한다. 이에, 유체는 시료수용부와 공급부에서 필터부로, 필터부에서 폐액수용부로 흐른다. 따라서, 디스크를 회전시켜 원심력을 가함으로써, 유체를 순차적으로 이동하여 원하는 공정을 수행할 수 있다.

- [0066] 디스크의 각 구성부 사이에 유로가 형성된다. 유로는 이웃하는 구성부의 챔버 사이를 연결한다. 유로는 유체가 유입되는 입구와 유체가 나가는 출구를 구비하며, 입구는 출구보다 디스크의 중심쪽에 위치할 수 있다. 이에, 디스크의 원심력이 가해졌을 때 유체는 상대적으로 디스크 중심쪽에 위치한 입구에서 출구를 따라 보다 원활하게 이동할 수 있게 된다.
- [0067] 유로는 예를 들어, 불순물이 역류하기 어려운 미세유로일 수 있다. 미세유로라 함은, 유로가 유체의 역류를 방지할 수 있는 저항을 갖는 크기로 형성된 유로를 의미할 수 있다. 이에, 예를 들어, 필터부를 거쳐 폐액수용부로 배출된 유체에 포함된 불순물이 유로를 따라 필터부로 다시 역류하는 것을 방지할 수 있게 된다.
- [0068] 또한, 유로는 디스크의 원심력 방향을 따라 입구가 각 구성부의 출측에 연결될 수 있다. 구성부의 출측이라 함은 해당 구성부에서 유체가 유출되는 부분으로 원심력 방향을 따라 디스크의 외측 선단에 근접한 쪽을 의미한다.
- [0069] 이에, 디스크에 원심력이 가해졌을 때, 각 구성부에 수용된 유체는 원심력에 의해 유로의 입구쪽으로 모여 유로를 따라 모두 이동할 수 있게 된다. 따라서, 각 구성부의 챔버에 유체가 잔류하지 않아 유체의 손실을 최소화할 수 있게 된다.
- [0070] 예를 들어, 시료수용부는 출측에 유로가 연결됨에 따라 시료수용부에 수용된 시료를 모두 유로를 통해 필터부로 이동시킬 수 있게 된다. 따라서, 보다 적은 시료나 항체를 이용하여 나노 입자 검출을 효과적으로 수행할 수 있게 된다.
- [0071] 밸브는 유로 일측에 위치하여 유로를 선택적으로 개폐한다. 밸브는 유로를 차단하거나 개방할 수 있는 다양한 구조로 이루어질 수 있다. 밸브는 자체적으로 동력을 가하여 유로를 개폐하거나, 디스크 외부에서 구동력을 받아 유로를 개폐할 수 있다.
- [0072] 밸브가 구동되어 유로가 폐쇄되면 유로로 연결된 구성부 사이의 유체 이송이 차단된다. 필요시 밸브가 구동되어 유로가 개방되면 구성부 간에 유체가 이송되어 필요한 공정이 개시된다.
- [0073] 이와 같이, 본 장치는 디스크 내에 구비된 시료수용부, 공급부, 필터부 및 폐액수용부를 통해 시료에서 나노 입자를 분리하여 검출하는 일련의 과정을 일괄적으로 수행할 수 있게 된다.
- [0074] 이하, 도 1을 참조하여 일 실시예에 따른 나노 입자 검출 장치의 각 구성부에 대해 구체적으로 설명한다.
- [0075] 이하 설명에서, 디스크에 형성되는 각 유로, 밸브, 챔버는 설명의 편의를 위해 그 구성부에 따라 개별적으로 구분하여 지칭한다. 또한, 유로, 밸브, 챔버라고 기재한 경우는 디스크에 형성된 유로, 밸브, 챔버 전체를 지칭할 수 있다.
- [0076] 본 실시예에서, 디스크(10)는 원판 형태의 상판(도 4의 12 참조)과 하판(도 4의 14 참조) 두 개의 판 구조물을 접합하여 형성될 수 있다.
- [0077] 본 실시예의 시료수용부(20)는 디스크(10)에 형성되어 시료를 수용하는 시료챔버(21), 시료챔버(21)와 필터부(30)를 연결하며 디스크(10)의 원심력에 따라 시료가 이송되는 제1 유로(22), 제1 유로(22)를 개폐하는 제1 밸브(23)를 포함할 수 있다.
- [0078] 시료챔버(21)는 디스크(10) 내에 형성되는 내부가 빈 공간으로 이해할 수 있다. 시료챔버(21)는 제1 유로(22)를 통해 필터부(30)와 연결된다. 시료챔버(21)는 일측에 시료를 주입하기 위한 홀이 형성될 수 있다. 시료챔버(21)에 수용된 시료는 디스크(10)의 원심력에 의해 제1 유로(22)를 통해 이동된다. 제1 유로(22) 일측에는 제1 유로(22)를 개폐하기 위한 제1 밸브(23)가 설치된다. 이에, 제1 밸브(23)를 작동시켜 제1 유로(22)를 개방시키게 되면, 시료챔버(21)의 시료가 제1 유로(22)를 따라 필터부(30)로 이동된다.
- [0079] 필터부(30)는 유체 이동방향을 따라 입측공간(32)과 출측공간(33)을 구비하며 입측공간(32)과 출측공간(33) 사이에 상기 여과막(34)이 설치된 필터챔버(31)를 포함할 수 있다. 필터챔버(31)는 디스크(10) 내에 형성되는 내부가 빈 공간으로 여과막(34)을 경계로 입측공간(32)과 출측공간(33)으로 구분될 수 있다. 필터챔버(31)의 입측공간(32)은 시료 등 유체가 유입되는 공간이며, 여과된 나노 입자를 수용하는 공간이다. 입측공간(32)에서 나노 입자의 검출이 이루어진다.
- [0080] 필터챔버(31) 일측에는 원활한 여과가 이루어질 수 있도록 통풍구가 형성될 수 있다. 통풍구는 예를 들어, 상판에 형성될 수 있다. 이에, 시료 여과시 필터챔버(31) 내에 존재하던 공기 등이 디스크(10) 외부로 배출되면서

여과가 보다 원활하게 이루어지게 된다.

- [0081] 입측공간(32)은 제1 유로(22)를 통해 시료수용부(20)의 시료챔버(21)와 연결된다. 출측공간(33)은 폐액수용부(70)와 연결된다. 이에, 입측챔버로 유입된 시료는 여과막(34)을 거쳐 나노 입자가 분리된다. 분리된 나노 입자는 입측공간(32)에 수용되며, 여과막(34)을 통과한 여과액은 출측공간(33)에 연결된 폐액수용부(70)로 배출 처리된다.
- [0082] 본 실시예에서, 필터챔버(31)의 출측공간(33)에는 투과액이 미리 수용될 수 있다.
- [0083] 투과액은 시료에서 나노 입자가 분리된 상태와 동일한 용액, 즉 여과막(34)을 통해 여과되고 나온 여과액과 동일한 용액일 수 있다. 또는 투과액은 분리 대상 입자가 없고 시료나 여과액에 영향을 주지 않는 용액으로, 여과막(34)의 출측면에서 여과막(34) 기공의 모세관 압력을 줄일 수 있는 용액이면 모두 적용 가능하다.
- [0084] 이에, 여과막(34)의 입측공간(32)으로 유입된 시료가 보다 작은 압력하에서도 여과막(34)의 미세한 기공을 용이하게 통과할 수 있게 된다. 따라서, 보다 신속하게 시료를 여과하여 나노 입자를 분리해낼 수 있게 된다.
- [0085] 투과액은 예를 들어, 장치 제조 시 필터챔버(31) 출측공간(33)에 미리 수용시킬 수 있다. 또는, 디스크(10) 하판의 출측공간(33)과 연결되는 별도의 주입구를 형성하여, 장치 제조 후 상기 주입구를 통해 출측공간(33)에 투과액을 주입할 수 있다.
- [0086] 여과막(34)은 표면에 수많은 기공이 형성된 막 구조물이다. 본 실시예에서, 여과막(34)은 시료에 포함된 나노 입자 분리를 위해 기공이 1nm 내지 1000nm로 형성될 수 있다. 여과막(34)은 분리하고자 하는 나노 입자의 종류나 크기에 따라 상기 범위 내에서 적절한 기공 크기로 선택될 수 있다. 여과막(34)의 기공 크기가 상기 범위를 벗어나는 경우 나노 입자의 분리가 이루어지지 않거나 분리 효율이 저하될 수 있다.
- [0087] 여과막(34)은 생체 세포나 무기재료 입자 또는 유기재료 입자 등을 여과할 수 있도록 다양한 소재로 형성될 수 있다. 여과막(34)은 폴리카보네이트, 폴리스타이렌, 폴리메틸메타크릴레이트, 사이클릭 올레핀 코폴리머를 포함한 열경화성 플라스틱, 양극산화알루미늄, 니켈, 실리콘 등의 재질로 형성될 수 있다. 예를 들어, 양극산화알루미늄 재질로 형성된 여과막은 타 재질에 비해 높은 기공도와 비교적 균일한 지름의 기공을 갖는다.
- [0088] 본 실시예의 여과막(34)은 생체 시료에 적용할 수 있도록 생물학적으로 비활성인 소재로 형성될 수 있다. 또한, 여과막(34)은 동시에 광학적 투과성을 구비한 소재로 형성될 수 있다. 이를 통해, 상기 여과막(34)을 디스크(10)로부터 분리하지 않고도 광학 검출기를 이용하여 나노 입자를 검출할 수 있다.
- [0089] 본 장치는 디스크(10) 상에서 나노 입자를 검출하는 구조 외에, 디스크(10)에서 여과막(34)을 분리하여 검출 공정을 수행할 수 있다. 여과막(34) 분리 구조에 대해서는 뒤에서 다시 상세하게 설명한다.
- [0090] 필터부는 하나의 여과막이 구비되거나, 하나의 필터챔버 내에 두 개 이상의 여과막을 구비한 구조일 수 있다. 필터챔버에 두 개 이상의 여과막이 구비된 구조의 경우 입측공간과 출측공간 사이에 복수개의 여과막이 적층되어 배치될 수 있다. 그리고 각 여과막은 유체 이송방향을 따라 즉, 입측공간에서 출측공간을 향해 기공 크기가 점차적으로 작아지는 구조일 수 있다. 예를 들어, 입측공간쪽에 배치된 여과막은 기공 크기가 50nm 이고, 출측공간을 향해 그 아래 적층된 여과막은 기공 크기가 5nm 일 수 있다.
- [0091] 이에, 나노 입자를 포함하는 시료는 먼저 입측공간쪽으로 배치된 기공이 큰 여과막을 통과하면서 일차 입자가 분리되고, 다음 기공이 작은 여과막을 통과하면서 나노 입자가 분리된다. 따라서, 특정 크기 범위의 나노 입자만을 선별하여 분리 포집할 수 있게 된다.
- [0092] 상기한 구조 외에, 필터부는 적어도 두 개 이상이 유체 이송방향을 따라 순차적으로 배치되고, 각 필터부에 구비된 여과막(34)은 유체 이송방향을 따라 기공이 점차적으로 작아지는 구조일 수 있다. 이러한 구조는 도 2에 도시되어 있으며, 뒤에서 다시 설명하도록 한다. 이러한 구조 역시, 나노 입자를 포함하는 시료는 기공이 큰 여과막을 통과하면서 일차 입자가 분리되고, 다음 필터부에서 기공이 작은 여과막을 통과하면서 나노 입자가 분리된다. 따라서, 특정 크기 범위의 나노 입자만을 선별하여 분리 포집할 수 있게 된다.
- [0093] 본 실시예에서, 공급부(40)는 여과막(34)에 분리된 나노 입자 검출을 위한 것으로, 검출액을 필터부(30)로 공급하는 구조일 수 있다. 검출액은 나노 입자 검출을 위한 물질로, 예를 들어 항원에 붙는 항체, 항체 표지를 위한 시약, 반응용 기질액, 핵산 추출 용액, 세척액 등일 수 있다. 검출액은 필터부에서 분리된 나노 입자를 검출하는 데 이용될 수 있는 물질이면 모두 적용가능하다.
- [0094] 이를 위해, 공급부(40)는 디스크(10)에 형성되어 나노 입자 검출을 위해 제공되는 항체를 수용하는 항체챔버

(41), 항체챔버(41)와 필터부(30)를 연결하며 디스크(10)의 원심력에 따라 항체를 필터부(30)로 이송하는 제2 유로(42), 제2 유로(42)를 개폐하는 제2 밸브(43)를 포함할 수 있다.

[0095] 항체챔버(41)는 디스크(10) 내에 형성되는 내부가 빈 공간으로 이해할 수 있다. 항체챔버(41)는 제2 유로(42)를 통해 필터챔버(31)와 연결된다. 항체챔버(41)는 일측에 항체를 주입하기 위한 홀이 형성될 수 있다. 항체챔버(41)에 수용된 항체는 디스크(10)의 원심력에 의해 제2 유로(42)를 통해 이동된다. 제2 유로(42) 일측에는 제2 유로(42)를 개폐하기 위한 제2 밸브(43)가 설치된다. 이에, 제2 밸브(43)를 작동시켜 제2 유로(42)를 개방시키게 되면, 항체챔버(41)의 항체가 제2 유로(42)를 따라 필터챔버(31)로 이동된다.

[0096] 본 실시예에서, 항체는 나노 입자의 바이오마커와 결합하여 바이오마커를 붙잡아 고정하는 1차 검출 항체로, biotin이 붙은 검출 항체(detection antibody)일 수 있다.

[0097] 공급부(40)는 시약 공급을 위해, 디스크(10)에 형성되어 나노 입자를 검출하는 항체의 표지를 위해 제공되는 시약을 수용하는 시약챔버(44), 시약챔버(44)와 필터부(30)를 연결하며 디스크(10)의 원심력에 따라 시약을 필터부(30)로 이송하는 제3 유로(45), 제3 유로(45)를 개폐하는 제3 밸브(46)를 더 포함할 수 있다.

[0098] 시약챔버(44)는 디스크(10) 내에 형성되는 내부가 빈 공간으로 이해할 수 있다. 시약챔버(44)는 제3 유로(45)를 통해 필터챔버(31)와 연결된다. 시약챔버(44)는 일측에 시약을 주입하기 위한 홀이 형성될 수 있다. 시약챔버(44)에 수용된 시약은 디스크(10)의 원심력에 의해 제3 유로(45)를 통해 이동된다. 제3 유로(45) 일측에는 제3 유로(45)를 개폐하기 위한 제3 밸브(46)가 설치된다. 이에, 제3 밸브(46)를 작동시켜 제3 유로(45)를 개방시키게 되면, 시약챔버(44)의 시약이 제3 유로(45)를 따라 필터챔버(31)로 이동된다.

[0099] 본 실시예에서, 시약은 항체에 결합되는 형광이 붙은 2차 검출 항체일 수 있다. 시약은 형광 발광 등 광학신호를 이용하여 바이오마커를 분석 및 정량화할 수 있는 물질이면 모두 적용가능하다. 예를 들어, 시약은 항체 시그널을 증폭시키기 위한 streptavidin-HRP 일 수 있다. 시약을 통해 검출 항체의 신호가 증폭되어 측정에 유리하다.

[0100] 공급부(40)는 상기 디스크(10)에 형성되어 나노 입자 검출반응을 위해 제공되는 기질액을 수용하는 기질액챔버(47), 상기 기질액챔버(47)와 필터부(30)를 연결하며 디스크(10)의 원심력에 따라 기질액을 필터부(30)로 이송하는 제4 유로(48), 상기 제4 유로(48)를 개폐하는 제4 밸브(49)를 더 포함할 수 있다.

[0101] 기질액챔버(47)는 디스크(10) 내에 형성되는 내부가 빈 공간으로 이해할 수 있다. 기질액챔버(47)는 제4 유로(48)를 통해 필터챔버(31)와 연결된다. 기질액챔버(47)는 일측에 기질액을 주입하기 위한 홀이 형성될 수 있다. 기질액챔버(47)에 수용된 기질액은 디스크(10)의 원심력에 의해 제4 유로(48)를 통해 이동된다. 제4 유로(48) 일측에는 제4 유로(48)를 개폐하기 위한 제4 밸브(49)가 설치된다. 이에, 제4 밸브(49)를 작동시켜 제4 유로(48)를 개방시키게 되면, 기질액챔버(47)의 기질액이 제4 유로(48)를 따라 필터챔버(31)로 이동된다.

[0102] 본 실시예에서, 기질액은 TMB(Tetramethylbenzidine) 용액일 수 있다. TMB는 HRP의 기질로 HRP에 의해 구조가 바뀌면서 색상을 나타낸다. TMB(3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine)는 Peroxidase 촉매 작용에 의해 수소 과산화물로 산화될 때 파란색을 띄고 370nm 및 652nm에서 최대 흡광도(OD;Optical density)값을 가지며, 산에 의해 반응을 정지시키면 노란색으로 바뀌며, 450nm에서 최대 OD값을 나타낸다.

[0103] 또한, 공급부(40)는 나노 입자 검출 반응을 멈추기 위해 제공되는 정지용액(stop solution)을 제공하는 구조일 수 있다. 이를 위해, 공급부(40)는 디스크(10)에 형성되어 정지용액을 수용하는 정지용액챔버(50)를 더 구비하며, 정지용액챔버(50)는 연결유로(51)를 통해 기질액챔버(47)에 연결되고, 연결유로(51) 일측에 설치된 연결밸브(52) 구동에 따라 정지용액을 기질액챔버(47)를 거쳐 필터챔버(31)로 공급하는 구조일 수 있다.

[0104] 정지용액은 강산이 포함된 용액일 수 있다. 정지용액은 기질액이 효소에 의해 색을 변화시키는 반응을 정지시킨다.

[0105] 항체챔버(41), 시약챔버(44) 및 기질액챔버(47)와 기질액챔버(47)에 연결되는 정지용액챔버(50)는 디스크(10)의 원심력 방향을 따라 필터챔버(31)보다 디스크(10) 중심쪽에 위치한다. 이에, 원심력이 가해지면 항체챔버(41), 시약챔버(44), 기질액챔버(47) 및 정지용액챔버(50)에 수용되어 있는 유체가 원심력에 의해 유로를 따라 필터챔버(31)로 이송된다. 각 유로 상에 설치된 밸브는 공정 순서에 따라 해당 유로를 개방 또는 폐쇄작동하여 필요한 유체를 필터챔버(31)로 순차 공급한다.

[0106] 또한, 공급부(40)는 보다 효율적이고 정확한 검출을 위해 필터부(30)를 세척하기 위한 세척부(60)를 더 포함할

수 있다.

- [0107] 본 실시예에서, 세척부(60)는 상기 디스크(10)에 형성되어 세척액을 수용하는 세척액챔버(61), 세척액챔버(61)와 필터부(30)를 연결하며 디스크(10)의 원심력에 따라 세척액을 필터부(30)로 이송하는 제5 유로(62), 제5 유로(62)를 개폐하는 제5 밸브(63)를 포함할 수 있다.
- [0108] 세척액챔버(61)는 디스크(10) 내에 형성되는 내부가 빈 공간으로 이해할 수 있다. 세척액챔버(61)는 제5 유로(62)를 통해 필터챔버(31)와 연결된다. 세척액챔버(61)는 일측에 세척액을 주입하기 위한 홀이 형성될 수 있다. 세척액챔버(61)에 수용된 세척액은 디스크(10)의 원심력에 의해 제5 유로(62)를 통해 이동된다. 제5 유로(62) 일측에는 제5 유로(62)를 개폐하기 위한 제5 밸브(63)가 설치된다. 이에, 제5 밸브(63)를 작동시켜 제5 유로(62)를 개방시키게 되면, 세척액챔버(61)의 세척액이 제5 유로(62)를 따라 필터챔버(31)로 이동된다.
- [0109] 세척액은 필터챔버(31)에 잔존하고 있는 여분의 항체나 시약 등을 세척하여 제거하게 된다. 필터챔버(31)로 이동되어 필터챔버(31)의 입측공간(32)을 세척한 후 세척액은 여과막(34)을 통과하여 출측공간(33)으로 이동된 후 출측공간(33)과 연결된 유로를 통해 폐액수용부(70)로 배출된다.
- [0110] 이 과정에서 나노 입자에 결합되지 않은 과량의 항체나 항체에 결합되지 않은 과량이 시약이 필터챔버(31)의 입측공간(32) 내에서 세척되어 세척액과 함께 출측공간(33)으로 제거된다.
- [0111] 본 실시예에서, 세척액챔버(61)는 복수개로 구비되어 세척액이 각 세척액챔버(61)에 구분 수용될 수 있다. 이에, 필요시 복수회에 걸쳐 필터챔버(31) 내부를 세척할 수 있다. 이러한 구조는, 각 세척액챔버(61)의 출측 유로가 제5 유로(62)에 연결되어 제5 유로(62)를 통해 필터챔버(31)로 세척액을 공급할 수 있다. 또한, 도 1에 도시된 바와 같이, 각 세척액챔버(61)의 출측이 서로 연결되며, 이 연결부에 세척액을 배출하는 출측 밸브(64)가 설치될 수 있다. 즉, 각 세척액챔버(61)는 나란하게 배치되고 이웃하는 세척액챔버(61)간에 외측 단부가 서로 연결된다. 이에 필요시 제5 밸브(63)와 각 세척액챔버(61)의 연결부에 설치된 출측밸브(64)를 순차적으로 개방 작동하여 각 세척액챔버(61)의 세척액을 차례로 필터챔버(31)에 공급할 수 있다.
- [0112] 세척액챔버(61)는 공급부(40)의 다른 챔버와 마찬가지로 디스크(10)의 원심력 방향을 따라 필터챔버(31)보다 디스크(10) 중심쪽에 위치한다. 이에, 원심력이 가해지면 세척액챔버(61)에 수요오디어 있는 세척액이 원심력에 의해 유로를 따라 필터챔버(31)로 이송된다.
- [0113] 폐액수용부(70)는 디스크(10)에 형성되어 폐액이 수용되는 폐액챔버(71), 폐액챔버(71)와 필터부(30)를 연결하며 디스크(10)의 원심력에 따라 폐액을 폐액챔버(71)로 이송하는 제6 유로(72)를 포함할 수 있다. 제6 유로(72) 일측에는 제6 유로(72)를 개폐하는 제6 밸브(도 2의 73 참조)가 더 설치될 수 있다.
- [0114] 폐액챔버(71)는 디스크(10) 내에 형성되는 내부가 빈 공간으로 이해할 수 있다. 폐액챔버(71)는 제6 유로(72)를 통해 필터챔버(31)와 연결된다. 필터챔버(31)의 출측공간(33)으로 이동된 폐액은 디스크(10)의 원심력에 의해 제6 유로(72)를 통해 폐액챔버(71)로 이동된다.
- [0115] 폐액챔버(71)는 일측에는 필터챔버(31)의 여과막(34)을 거쳐 폐액이 출측공간(33)으로 원활하게 이동될 수 있도록 통풍구가 형성될 수 있다. 통풍구는 예를 들어, 상판에 형성될 수 있다. 이에, 시료 여과시 필터챔버(31) 출측공간(33)과 폐액챔버(71)에 존재하던 공기 등이 디스크(10) 외부로 배출되면서 여과가 보다 원활하게 이루어지게 된다.
- [0116] 상기한 구조로 되어, 본 장치는 시료 주입 후 나노 소포체 추출 및 검출 전 과정을 하나의 디스크(10)를 통해 일괄적으로 수행된다. 이에, 나노 입자 검출 작업을 보다 간편하게 신속하고 효과적으로 수행할 수 있게 된다.
- [0117] 도 2는 나노 입자 검출 장치의 또 다른 실시예를 도시하고 있다.
- [0118] 도 2에 도시된 실시예 역시 디스크(10)의 형태나 디스크(10) 내에 구비되는 시료수용부(20), 공급부(40), 필터부(30) 및 폐액수용부(70)의 기본 구성은 도 1에 도시된 실시예와 동일하다. 이에, 이하 설명에서 동일한 구성에 대해서는 동일한 도면부호를 사용하며 그 상세한 설명은 생략한다.
- [0119] 도 2에 도시된 바와 같이, 본 실시예의 시료수용부(20)는 시료를 정제하여 불순물을 포함한 비표적물질을 제거하는 구조일 수 있다.
- [0120] 이를 위해, 시료수용부(20)는 디스크(10)에 형성되어 시료를 수용하는 시료챔버(21)가 디스크(10) 원심력에 따라 시료를 원심 분리하는 구조이고, 원심력 방향을 따라 디스크(10)의 외측을 향하는 선단에 원심 분리된 시료가 수용되는 침강부(24)가 길게 연장 형성되고, 제1 유로(22)는 디스크(10)의 회전 중심을 향해 상기 시료챔버

(21)의 침강부(24)의 경계지점에 연결되어 원심분리된 상층액을 필터부(30)로 이송하는 구조일 수 있다. 비표적 물질이란 정제 대상인 나노 입자를 포함하는 용액 이외의 불순물을 의미할 수 있다.

[0121] 시료챔버(21)에 주입된 시료는 디스크(10)의 회전에 따른 원심력에 의해 원심 분리되어 정제된다. 이에 시료는 나노 입자가 포함된 용액과 나노 입자 외 고상의 불순물로 분리된다. 원심력 방향을 따라 고상의 불순물은 이 디스크(10)의 외측 선단쪽으로 밀려나고 디스크(10)의 중심쪽으로 불순물과 분리된 용액이 위치한다.

[0122] 본 실시예에서, 시료챔버(21)는 공간 내에서 나노 입자가 포함된 용액과 불순물 간의 분리가 명확히 나타나도록 원심력 방향을 따라 침강부(24)가 길게 연장 형성된다. 침강부(24)는 불순물이 보다 용이하게 침강될 수 있도록 출측으로 갈수록 폭이 좁아지는 호퍼 형태를 이룰 수 있다. 이에, 원심 분리되어 침강된 불순물과 용액의 분리가 확실하게 이루어져 용액 이외의 비표적물질이 필터챔버(31)로 유입되는 것을 최소화할 수 있게 된다.

[0123] 제1 유로(22)의 입구는 시료챔버(21)의 비표적물질과 용액간의 경계지점에서 디스크(10)의 회전 중심 쪽을 향하는 부분에 연결될 수 있다. 이에, 디스크(10) 회전에 따라 가해지는 원심력에 의해 원심분리된 나노 입자 포함 용액 만이 제1 유로(22)를 통해 필터챔버(31)로 이송될 수 있다. 침강부(24)로 침강된 불순물은 원심력 방향을 따라 제1 유로(22)의 입구 외측에 위치하므로, 불순물은 제1 유로(22)를 통해 이송되지 못한다.

[0124] 이와 같이, 시료를 원심분리하여 정제한 후 필터챔버(31)로 제공함으로써, 여과막(34)을 통한 나노 물질 분리 및 검출 효과를 보다 높일 수 있게 된다.

[0125] 시료챔버(21)의 침강부(24) 출측은 폐액챔버(71)와 연결되어, 시료챔버(21)에서 정제된 불순물을 폐액챔버(71)로 배출하여 처리할 수 있다. 시료챔버(21)의 침강부(24) 출측과 폐액챔버(71) 사이에는 불순물이 이송되는 배출 유로(26)가 형성되고, 배출 유로(26) 일측에는 배출 유로를 개폐하는 배출 밸브(27)가 설치된다.

[0126] 이에, 시료를 원심분리 한 후 표적물질인 용액을 필터챔버(31)로 이송한 후 배출 유로(26)를 개방하여 시료챔버(21)에 잔류하는 비표적물질을 폐액챔버(71)로 배출하여 제거할 수 있다.

[0127] 본 실시예의 시료수용부(20)는 시료 정제 효율을 높이기 위해, 침강부(24)가 디스크(10)의 방사방향에 대해 기울어져 경사지게 형성될 수 있다. 도 2에 도시된 바와 같이, 침강부(24)는 디스크(10)의 방사방향에 대해 어느 한쪽으로 소정 각도(A)로 기울어져 형성된다. 이에, 원심 분리 과정에서 고상의 불순물은 디스크 방사방향에 대해 침강부(24)의 기울어진 경사면을 따라 용이하게 흘러내려가게 되어 침강이 보다 잘 이루어져 분리 효과를 높일 수 있게 된다.

[0128] 또한, 도 3에 도시된 바와 같이, 침강부(24)는 상기 경계지점에서 원심력 방향을 따라 끝단으로 갈수록 바닥면(28)이 점차적으로 상향 경사져 형성되고, 침강부(24)의 끝단에는 시료에서 원심분리된 불순물이 수용되는 홈부(25)를 더 포함할 수 있다. 도 3은 디스크(10)의 폭방향 단면 구조를 나타내고 있다. 도 3에서 y축 방향을 따라 위쪽이 상부이고 아래쪽이 하부이다. 시료챔버(21)의 침강부(24)는 하부 바닥면(28)에서 끝단의 출측으로 갈수록 상향 경사지게 형성된다. 그리고, 침강부(24)의 출측은 수직 방향으로 깊이 파여 깊은 홈부(볼트(91))를 이룬다. 이에, 원심력에 의해 침강부(24) 출측으로 침강된 고상의 불순물이 침강부(24)의 경사진 바닥면을 따라 이동하다 홈부(25)로 떨어져 역류되지 못하게 된다.

[0129] 즉, 홈부(25)는 깊이를 갖는 구멍으로 내주면이 가로막고 있어, 고상의 불순물이 홈부(25)로 떨어지게 되면 원심력이 가해지지 않은 상태에서도 불순물이 홈부(25)에서 빠져나가지 못하게 된다. 따라서, 불순물이 시료챔버(21)의 경계지점으로 역류하는 것을 최소화하여 정제된 시료만을 필터챔버(31)로 공급할 수 있게 된다. 배출 유로는 홈부(25)에 연결되어 이어, 홈부(25)로 떨어진 불순물은 배출유로(26)를 통해 폐액챔버(71)로 배출 처리된다.

[0130] 도 2에 도시된 바와 같이, 본 실시예의 필터부는 두 개의 필터챔버를 구비할 수 있다.

[0131] 두 개의 필터챔버는 유체 이송방향을 따라 순차적으로 배치된다. 각 필터챔버에 구비된 여과막은 유체 이송방향을 따라 기공이 점차적으로 작아지는 구조일 수 있다. 이하 설명의 편의를 위해, 두 개의 필터챔버 중 최종적으로 나노 입자에 대한 검출이 이루어지는 필터챔버(31) 앞에 배치되는 필터챔버를 예비챔버(35)라 한다. 예비챔버는 시료챔버(21)와 필터챔버(31) 사이에 연결된다.

[0132] 예비챔버(35)는 제1 유로(22)를 통해 시료챔버(21)와 연결되며, 필터챔버(31)는 제6 유로(72)를 통해 폐액챔버(71)와 연결된다. 예비챔버(35)와 필터챔버(31) 사이에는 이송유로(36)가 형성된다. 이송유로(36) 일측에는 이송유로를 개폐하는 이송밸브(37)가 설치된다. 이에, 이송밸브(37)를 개방시키게 되면 예비챔버(35)에서 여과된

여과액이 이송유로(36)를 통해 필터챔버(31)로 이동된다.

- [0133] 필터부(30)가 예비챔버와 필터챔버, 두 개의 챔버를 구비함에 따라 시료챔버(21)에서 이송된 나노 입자를 포함하는 시료는 예비챔버(35)의 기공이 큰 여과막(34)을 통과하면서 일차적으로 나노 입자 외 크기가 큰 입자가 분리된다. 그리고 다음 필터챔버(31)에서 기공이 작은 여과막(34)을 통과하면서 최종적으로 나노 입자가 분리된다. 따라서, 특정 크기 범위의 나노 입자만을 선별하여 분리 포집할 수 있게 된다.
- [0134] 공급부(40)는 필터챔버(31)에 연결되어 필터챔버(31)의 입측공간(32)으로 나노 입자 검출에 필요한 유체를 공급한다. 이에, 나노 입자에 대한 검출은 최종적으로 필터챔버(31)에서 이루어질 수 있다.
- [0135] 또한, 본 실시예는, 필터부(30)에서 분리된 나노 입자를 회수하여 필요한 검출 작업을 수행하는 구조일 수 있다. 이를 위해, 본 장치는 디스크(10)에 형성되고 필터부(30)에 연결되어 여과막(34)에 의해 분리된 나노 입자가 회수되는 회수챔버(80), 회수챔버(80)와 필터부(30)를 연결하여 나노 입자를 회수챔버(80)로 이송하는 제7 유로(81), 제7 유로(81)를 개폐하는 제7 밸브(82)를 더 포함할 수 있다.
- [0136] 도 2에 도시된 바와 같이, 회수챔버(80)는 디스크(10) 내에 형성되는 내부가 빈 공간으로 이해할 수 있다. 회수챔버(80)는 제7 유로(81)를 통해 필터챔버(31)와 연결된다. 또한, 회수챔버(80)는 일측에 내부로 핵산 추출을 위한 시약을 주입하기 위한 홀이 형성될 수 있다. 이에, 회수챔버에 형성된 홀을 통해 페놀 성분을 포함하여 핵산 추출용 시약을 주입함으로써, 본 장치를 통해 시료로부터 핵산까지 추출할 수 있게 된다.
- [0137] 도 4에 도시된 바와 같이, 제7 유로(81)는 필터챔버(31)의 입측공간(32)과 회수챔버(80) 사이를 연결한다. 이에, 필터챔버(31)의 입측공간(32) 내에 수용된 나노 입자 포함 유체는 원심력에 의해 제7 유로(81)를 통해 이동된다. 제7 유로(81) 일측에 제7 유로(81)를 개폐하기 위한 제7 밸브(82)가 설치된다. 이에, 제7 밸브(82)를 작동시켜 제7 유로(81)를 개방시키게 되면, 필터챔버(31) 내 입측공간(32)에 머물고 있는 나노 입자 포함 유체가 제7 유로(81)를 따라 회수챔버(80)로 이동된다.
- [0138] 이에, 회수챔버(80)로 이송된 나노 입자 포함 유체에 페놀 성분을 비롯한 핵산 추출용 시약을 주입하여 핵산 추출 작업을 수행할 수 있다.
- [0139] 핵산 추출 작업은 본 장치 외부에서 별도로 수행 가능하다. 이를 위해, 본 실시예의 필터부(30)는 필터챔버(31)에 구비된 여과막(34)을 디스크(10)에서 착탈하는 구조일 수 있다. 이와 같이, 필터챔버(31)에서 여과막(34)을 분리함으로써, 디스크(10) 외측에서 여과막(34)에 걸러진 나노 입자에 대한 핵산 추출 작업을 별도로 수행할 수 있게 된다.
- [0140] 이를 위해, 본 장치는 디스크(10)에 착탈가능하게 설치되어 상기 필터챔버(31)를 개폐하는 덮개(90), 덮개(90)를 디스크(10)에 고정하는 체결부를 더 포함할 수 있다.
- [0141] 도 4에 도시된 바와 같이, 덮개(90)는 디스크(10)의 상판(12)에 착탈가능하게 설치된다. 상판(12)은 필터챔버(31) 형성 공간 상에서 외측으로 개방 형성된다. 덮개(90)는 상판(12)에 설치되어 상판의 일부를 이룬다. 본 실시예에서 체결부는 볼트(91)를 이용한 체결 구조일 수 있다. 체결부는 볼트(91) 이외에 다양한 구조가 적용될 수 있다. 덮개(90)와 이에 대응되는 상판에는 볼트(91) 체결을 위한 체결홀(92)이 형성될 수 있다. 이에, 볼트(91)를 상기 체결홀(92)에 체결함으로써, 상판(12)에 덮개(90)를 착탈가능하게 결합할 수 있다.
- [0142] 도 5는 나노 입자 검출 장치의 또 다른 실시예를 도시하고 있다.
- [0143] 도 5에 도시된 실시예 역시 디스크(10)의 형태나 디스크(10) 내에 구비되는 시료수용부(20), 필터부(30) 및 폐액수용부(70)의 기본 구성은 도 1에 도시된 실시예와 동일하다. 또한, 도시되지는 않았으나, 공급부(도 1의 40 참조)에 대한 구성역시 동일하게 구비될 수 있다. 이에, 이하 설명에서 동일한 구성에 대해서는 동일한 도면부호를 사용하며 그 상세한 설명은 생략한다.
- [0144] 도 5에 도시된 바와 같이, 본 실시예의 필터부(30)는 3 개의 필터챔버를 구비할 수 있다. 필터부는 3 개의 필터챔버 외에 4개 이상의 복수개로 구비될 수 있다.
- [0145] 3 개의 필터챔버는 유체 이송방향을 따라 순차적으로 배치된다. 이하 설명의 편의를 위해, 3 개의 필터챔버는 유체 흐름 방향을 따라 제1 필터챔버(311), 제2 필터챔버(312) 및 제3 필터챔버(313)라 한다. 필터챔버(31)라 함은 3개의 필터챔버 모두를 지칭할 수 있다. 각 필터챔버(31)는 내부에 구비된 여과막(34)의 기공 크기만을 제외하고 그 구조는 동일하다. 제1 필터챔버(311)는 제1 유로(22)를 통해 시료챔버(21)와 연결된다. 제2 필터챔버(312)의 입측 공간은 유로(315)를 통해 제1 필터챔버(311)의 출측공간과 연결된다. 제2 필터챔버(312)의 출측공

간은 별도의 유로(317)를 통해 제3 필터챔버(313)의 입측 공간과 연결된다. 이에, 유체는 시료챔버(21)에서 제1 필터챔버(311), 제2 필터챔버(312) 및 제3 필터챔버(313)를 거치면서 차례로 여과되어 나노 입자가 분리된다. 본 실시예 역시 각 유로(315, 317) 일측에는 별도의 개폐밸브(도시되지 않음)가 설치되어 필요시 각 유로를 선택적으로 개폐할 수 있다.

[0146] 각 필터챔버(31)에 구비된 여과막(34)은 기공의 크기가 서로 상이하여, 각각 서로 다른 크기 범위의 나노 입자를 분리하는 구조일 수 있다. 이에, 하나의 장치를 통해 서로 상이한 크기의 나노 입자를 분리 회수할 수 있게 된다.

[0147] 본 실시예에서, 각 필터챔버(31)에 구비된 여과막은 유체 이송방향을 따라 기공이 점차적으로 작아지는 구조일 수 있다. 본 실시예에서, 3개의 필터챔버(31)는 각각 서로 상이한 기공 크기를 갖는 여과막(34)을 구비하여 서로 상이한 크기의 나노 입자를 분리할 수 있다. 각 필터챔버에 구비되는 여과막의 조합은 다양하게 변형가능하다. 예를 들어, 제1 필터챔버(311)에는 100nm의 기공 크기를 갖는 여과막이 구비되고, 제2 필터챔버(312)에는 50nm의 기공 크기를 갖는 여과막이 구비되고, 제3 필터챔버(313)에는 2nm의 기공 크기를 갖는 여과막이 구비되어 하나의 장치 내에 조합될 수 있다. 따라서, 하나의 장치 내에서 여과막의 조합에 따라 서로 상이한 크기의 나노 입자를 각각의 필터챔버에 분리 회수할 수 있게 된다.

[0148] 본 실시예에 따라, 시료챔버(21)에서 이송된 나노 입자를 포함하는 시료는 제1 필터챔버(311)의 기공이 큰 여과막(34)을 통과하면서 일차적으로 설정된 크기의 나노 입자가 분리된다. 그리고 다음 제2 필터챔버(312)로 이송된 시료는 제2 필터챔버에 구비된 여과막(34)을 통과하면서 이차적으로 설정된 크기의 나노 입자가 분리된다. 그리고 다음 제3 필터챔버(313)로 이송된 시료는 제3 필터챔버에 구비된 여과막을 통과하면서 최종적으로 설정된 크기의 나노 입자가 분리된다. 이에, 특정 크기 범위의 나노 입자만을 각 필터챔버에 선별하여 분리 포집할 수 있게 된다. 따라서, 하나의 디스크 내에서 서로 상이한 크기 분포를 갖는 나노 입자를 구분하여 분리 회수할 수 있게 된다.

[0149] 이하, 본 실시예에 따른 나노 입자 검출 장치를 이용한 나노 입자 검출 과정을 설명하면 다음과 같다. 이하 설명은 도 2에 도시된 실시예의 장치를 참조하여 설명한다.

[0150] 먼저 디스크(10)에 나노 입자 검출을 위한 항체, 시약, 기질액, 세척액, 여과막(34) 등을 탑재하여 준비한다. 준비 상태에서 디스크(10)의 각 유로에 설치된 밸브는 폐쇄작동되어 각 유로를 단려진 상태를 유지할 수 있다.

[0151] 준비가 완료되면 디스크(10)의 시료챔버(21)에 시료를 공급한다. 그리고, 디스크(10)를 회전시켜 원심력을 가한다.

[0152] 원심력에 의해 시료챔버(21)에 공급된 시료는 원심 분리되어 일차적으로 정제된다. 원심분리되어 시료는 불순물이 제거되고 나노 입자를 포함하는 용액만이 필터부(30)로 이송된다. 필터부(30)로 이송된 용액은 디스크(10)의 회전에 따른 원심력에 의해 예비챔버(35)의 여과막(34)을 거치면서 나노 입자 외 크기가 큰 입자가 분리된다.

[0153] 예비챔버(35)의 여과막(34)을 거친 용액은 필터챔버(31)로 이송된다. 그리고 나노 입자는 필터챔버(31)의 여과막(34)을 통해 분리되어 필터챔버(31)의 입측공간(32) 내에서 여과막(34) 상에 잔류하게 된다. 필터챔버(31)의 여과막(34)을 통과한 여과액은 폐액챔버(71)로 배출 처리된다.

[0154] 이와 같이, 여과막(34)을 통해 나노 입자를 분리 포획한 상태에서 필터챔버(31)의 입측공간(32)으로 항체, 시약, 기질액 등을 순차 공급하여 나노 입자를 검출한다.

[0155] 도 6은 본 실시예에 따라, 필터챔버(31)의 여과막(34) 위쪽 입측공간(32) 상에서 분리 포획된 나노 입자에 항체와 시약, 및 기질액이 공급되어 나노 입자를 검출하는 과정을 나타내고 있다.

[0156] 필터챔버(31)로 공급된 항체는 여과막(34) 상의 입측공간(32) 내에서 나노 입자에 붙게 된다. 항체는 공간 상에서 가두어져 고정되지 않은 상태의 나노 입자의 표면에 가서 붙게 되므로 단시간 내에 나노 입자에 전 표면에 항체가 부착될 수 있다. 이와 달리 나노 입자가 어느 표면에 고정된 경우, 나노 입자의 일부 표면에 대해서만 항체가 부착 가능하며, 전 표면에 대해 항체가 부착되지 못한다. 이에, 본 실시예의 경우 단시간 내에 모든 나노 입자의 전 표면에 대한 항원 검출이 가능하게 된다.

[0157] 항체 공급 후 나노 입자에 부착되지 않은 여분의 항체는 세척액을 통해 제거된다. 필터챔버(31)로 세척액을 공급하고 디스크(10)를 회전시키게 되면 나노 입자 부착후 남은 과잉의 항체는 원심력에 의해 세척액과 함께 여과막(34)을 통과하여 제거된다.

- [0158] 세척액으로 입측공간(32)을 세척한 후, 시약을 공급하여 항체를 표지한다. 시약은 나노 입자에 붙은 항체에 결합된다. 시약은 형광이 붙은 2차 검출 항체로, 최종적으로 나노 입자에 붙은 항체 시그널을 증폭시킨다.
- [0159] 시약 공급 후 항체에 부착되지 않은 여분의 시약은 세척액을 통해 제거된다. 필터챔버(31)로 세척액을 공급하고 디스크(10)에 원심력을 가하게 되면 항체에 부착되고 남은 과잉의 시약은 세척액과 함께 여과막(34)을 통과하여 제거된다.
- [0160] 세척액으로 입측공간(32)을 세척한 후에는 입측공간(32)으로 기질액을 공급할 수 있다. 입측공간(32) 내에 반응을 위한 기질액이 공급된 후, 정지용액을 공급한다.
- [0161] 그리고, 정지용액을 포함하여 나노 입자가 표지된 용액을 회수챔버(80)로 이송하여 옵티컬 덴시티(optical density) 등을 측정할 수 있다. 회수챔버(80)로 이송된 용액의 나노 입자는 형광 표지된 상태로, 예를 들어, 형광 신호 기반의 측정법을 이용하여 나노 입자를 검출 및 분석할 수 있다.
- [0162] 본 실시예의 경우, 기존의 나노 소포체를 96 well plate표면에 부착한 이후 검출하는 방식과 달리, 특정 챔버 안에 분리된 나노 소포체를 가둔 상태에서 검출하기 때문에 모든 항원을 단시간 내에 분석할 수 있다. 이와 같이, 본 실시예의 검출 방법은 biotin이 붙은 항체와 시그널을 증폭시키기 위한 streptavidin-HRP를 사용하고 있으며 labeling을 마친 후에 TMB를 주입하여 OD(optical density)를 측정할 수 있다.
- [0163] 또한, 회수챔버(80)로 폐놀을 포함한 핵산 추출용 시약을 주입하여 나노 입자의 핵산 추출 작업을 수행하거나, 디스크(10)의 필터챔버(31)를 개방하여 여과막(34)을 분리한 후 외부에서 핵산 추출과정을 수행할 수 있다.
- [0164] 이와 같이, 하나의 디스크(10) 내에서 시료의 나노 입자 분리와 검출 또는 핵산 추출 작업까지도 일괄적으로 보다 간편하고 용이하게 수행할 수 있다.
- [0165] [실험예]
- [0166] 도 7은 도 2의 실시예에 따른 장치를 이용하여 LNCaP(전립선암 세포주) 세포 배양액과 소변 샘플에서 나노 소포체를 분리 후 검출한 결과를 나타내고 있다.
- [0167] 도 7의 A 그래프는 두 개의 필터챔버에 구비된 여과막의 조합에 따른 나노 소포체 검출 결과를 나타내고 있다. 그래프는 각각 100-600nm, 20-200nm, 및 20-600nm 범위 내의 나노 소포체 회수 결과를 나타내고 있다. 그래프에서 필터 I은 도 2에서 예비챔버를 지칭하고 필터II는 필터챔버를 지칭한다. 실험 결과, 20-600 nm의 범위로 여과막을 조합하였을 때 나노 소포체가 가장 많이 검출되었다.
- [0168] 도 7의 B 그래프는 세포 배양액의 주입 볼륨을 늘릴 수록 나노 소포체의 CD9의 항원 발현량도 증가하는 양상을 보여준다.
- [0169] 도 7의 C 사진은 디스크(disc)에 정상인과 방광암환자의 소변 샘플 400 μ l를 시료로 주입한 후 디스크를 구동하여 최종적으로 나노 소포체를 검출한 OD(optical density) 결과를 나타내고 있다. C 사진에서 N은 정상인에 대한 결과를 나타내며, P는 방광암환자에 대한 결과를 나타낸다. 검출 결과, 본 장치를 통해 방광암환자의 소변 샘플로부터 충분히 나노 소포체를 검출할 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0170] 도 8은 본 실시예에 따른 장치와 종래 장치를 통한 나노 소포체 검출 결과를 비교하여 나타내고 있다.
- [0171] 도 8에서 실시예에 대한 결과는 Exodisc로 표시되어 있으며, 도 2의 실시예에 따른 장치를 이용하여 정상인과 방광암환자의 소변 샘플에서 나노 소포체를 분리 후 검출한 결과를 나타내고 있다.
- [0172] 그리고, 도 8에서 비교예들은 UC와 Exospin으로 표시되어 있으며, 실시예와 비교되는 종래의 기술에 따른 검출 결과를 나타내고 있다. UC로 표시된 그래프는 기존에 많이 이용되는 방법인 초원심분리(UC;ultracentrifugation)를 통해 나노 소포체를 분리하여 96 well plate를 통한 ELISA 검출 방법으로 검출한 결과이다. Exospin으로 표시된 그래프는 상용화키트는 Exospin으로 분리된 나노 소포체를 96 well plate를 통한 ELISA 검출 방법으로 검출한 결과이다. 비교예들 역시 실시예와 동일하게 정상인과 방광암 환자의 소변 샘플에서 나노 소포체를 분리하여 검출하였다. 분리된 나노 소포체는 나노 소포체에서 발현되는 단백질 마커인 CD9와 CD81을 통해 검출하였다.
- [0173] 실험 결과, 실시예에서 방광암환자(n=5)의 소변 샘플에서 분리된 나노 소포체가 정상인(n=5)보다 높은 양상으로 나타남을 확인할 수 있다. 이에, 본 장치를 통해 방광암환자의 소변 샘플로부터 충분히 나노 소포체를 검출할 수 있음을 확인할 수 있다.

- [0174] 또한, 종래 기술에 따른 비교예들과 비교하여, 실시예의 경우 방광암환자에 대한 나노 소포체 검출값이 더 높게 나타남을 확인할 수 있다. 이에, 본 실시예의 나노 입자 검출 효과가 종래와 비교하여 월등히 향상되었음을 알 수 있다.
- [0175] 도 9는 본 실시예에 따른 장치와 종래 장치를 통한 나노 소포체의 핵산 검출 결과를 비교하여 나타내고 있다.
- [0176] 도 9에서 실시예에 대한 결과는 Exodisc로 표시되어 있으며, 도 2의 실시예에 따른 장치를 이용하여 LNCaP(전립선암 세포주) 세포배양액에서 나노 소포체를 분리 후 페놀 성분의 시약을 주입하여 핵산을 추출하고 검출한 결과를 나타내고 있다.
- [0177] 그리고, 도 9에서 비교예들은 UC와 Exospin으로 표시되어 있으며, 실시예와 비교되는 종래의 기술에 따른 검출 결과를 나타내고 있다. UC와 Exospin은 위에서 설명한 바와 동일하다. 비교예들 역시 실시예와 동일하게 LNCaP(전립선암 세포주) 세포배양액에서 나노 소포체를 분리하고, 페놀 성분의 시약을 주입하여 핵산을 추출하고 검출하였다.
- [0178] 도 9의 A 그래프는 bioanalyzer를 이용한 RNA 전기영동 결과를 나타내고 있다. 실험예와 비교예에 의해 분리된 나노 소포체로부터 RNA의 크기와 농도를 분석하였다. 실험 결과, 실시예와 비교예들 모두 같은 크기 양상을 보였으며 나노 소포체와 연관된 250 nt 이하의 많은 RNA가 추출되었다. 또한, RNA 농도 검출 결과에 있어서 본 실시예의 검출 장치를 이용하여 분리한 나노 소포체의 경우 핵산 추출 결과, 비교예들보다 더 높은 RNA 농도를 나타내 검출 효과를 증대할 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0179] 도 9의 B 그래프는 추출한 핵산으로 RT-PCR 을 통해 GAPDH, CD9, PSA, PSMA의 검출 C_T 값을 나타내고 있다.
- [0180] 도 9의 B 그래프에서, GAPDH는 house keeping gene, CD9는 나노소포체 검출 마커, PSA(prostate-specific antigen)는 전립선암 검출에 사용되는 마커, PSMA(prostate-specific membrane antigen)은 전립선암 검출에 사용되는 마커를 나타내고, C_T 는 값이 낮을수록 고농도를 의미한다. 예를 들어, C_T 값이 7 차이나면, 2^7 으로 128배를 의미한다.
- [0181] 도 9의 B 그래프에 나타낸 바와 같이, Real time-PCR 결과, 본 실시예에 따른 검출 장치를 이용한 경우 나노 소포체의 GAPDH, CD9, PSA, PSMA의 mRNA가 비교예인 종래 UC 대비 100배 이상 높은 농도를 나타냄을 확인할 수 있다.
- [0182] 즉, 본 실시예의 경우 비교예인 초원심분리(UC) 대비, GAPDH : 169배, CD9 : 158배, PSA : 111배, PSMA : 208배의 차이가 나는 것을 알 수 있다. 이에, 본 실시예의 경우 종래와 비교예들과 비교하여 검출 효과를 보다 증대시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [0183] 도 9의 C 그래프는 C_T 값을 바탕으로 초원심분리기법인 UC 대비 상대 발현량을 비교하여 나타내고 있다. 실험 결과, 4 가지 유전자 모두 본 실시예의 검출 장치를 이용한 경우, 비교예보다 더 높은 검출량이 나타남을 확인할 수 있다. 이에, 본 실시예의 경우 핵산 검출 효과에 있어서도 종래와 비교하여 월등히 향상되었음을 알 수 있다.
- [0184] 도 9의 D 그래프는 PCR 산물을 전기 영동한 이미지를 나타내고 있다. 도 9의 D 그래프는 C 그래프와 같은 PCR 산물을 전기 영동한 이미지이다.
- [0185] 실험 결과, 4 가지 유전자 모두 본 실시예의 검출 장치를 이용한 경우 비교예들보다 더 높은 검출량이 나타남을 확인할 수 있다.
- [0186] 도 10은 본 실시예에 따른 장치와 종래 장치를 이용하여 나노 소포체를 분리 후 검출한 결과를 나타내고 있다.
- [0187] 본 실험은 LNCaP 세포 유래 나노 소포체를 혈장 100 microliter에 spike하여 이루어졌다. spike 이후의 초기 나노입자수는 $3.98(\pm 0.16)$ E10/mL이고 총 단백질은 $66.45(\pm 0.095)$ mg/mL 이다.
- [0188] 먼저, 실험을 통해 본 실시예에 따른 장치의 여과막 기공 크기와 디스크 회전속도에 대한 최적화 값을 구하였다.
- [0189] 도 10의 A 그래프는 여과막의 기공 크기와 본 실시예에 따른 디스크(disc) 회전 속도 조합에 따른 나노소포체 검출 결과를 나타내고 있다. 그래프는 각각 20nm 3000 rpm (364 G) 및 100 nm, 1000 rpm (40 G) 조합 조건에서의 NTA에 의한 나노 입자 회수 결과를 나타내고 있다. 그래프 내에 파란색 선은, LNCaP 세포 배양액 유래 나노

소포체를 spike 하지 않은 혈장을 대조군으로 하여 나노 소포체를 검출한 결과를 나타낸다. 실험 결과, 종래의 소변 샘플에서 나노 소포체를 분리할 때의 조건인, 20 nm 3000 rpm (364 G) 의 조건으로 나노 입자를 분리하였을 때, 나노 입자가 가장 많이 검출되었다. 하지만, human plasma의 경우 혈액 내에 순수한 나노 소포체 외의 지질 및 단백질 나노 입자가 불순물로 다량 존재하기 때문에, 20 nm 기공을 이용한 경우 검출된 나노 입자의 대부분이 지질 및 단백질 입자로 이루어진 것으로 보인다.

- [0190] 도 10의 B 그래프는 여과막의 기공 크기와 본 실시예에 따른 디스크(disc) 회전 속도 조합에 따른 총 단백질 검출 결과를 나타내고 있다. 그래프는 각각 20 nm 3000 rpm (364 G), 100 nm 3000 rpm (364 G) 및 100 nm 1000 rpm (40G) 조합 조건에서의 BCA에 의한 총 단백질 검출 결과를 나타내고 있다. 실험 결과, 20 nm 3000 rpm (364 G) 의 조건으로 나노 입자를 분리하였을 때, 총 단백질이 가장 많이 검출되었다. 즉, 20nm 의 기공 크기와 300rpm의 회전속도의 경우, NTA를 사용하여 측정하였을 때 나노 입자의 개수가 많은 것으로 나타나나, BCA로 측정한 결과 총 단백질량도 많아서 순도(purity)가 떨어지는 것을 알 수 있다.
- [0191] 상기 실험 결과에 따라, 20 nm 3000 rpm (364 G) 조건의 경우, 100 nm 1000 rpm (40 G) 조건의 경우보다 나노 소포체 분리 순도가 낮은 것을 확인할 수 있다.
- [0192] 도 10의 C 그래프는 본 실시예의 여과막 기공 크기와 디스크(disc) 회전 속도 조합에 따른 분리된 나노 소포체 샘플의 순도를 나타낸다. 실험 결과, 100 nm 1000 rpm (40 G) 의 조건이, 가장 높은 순도로 나노 소포체를 분리함을 확인할 수 있다.
- [0193] 도 10의 D 그래프는 여과막의 기공 크기와 본 실시예에 따른 디스크(disc) 회전 속도 조합에 따른, 암 검출에 사용되는 마커 (EpCAM)와 나노 소포체 검출 마커 (CD81)의 검출 결과를 나타낸다. 실험 결과, 100 nm 1000 rpm (40 G) 조건에서 총 나노 소포체 및 암 세포 유래 나노 소포체가 가장 많이 검출되어, 나노 입자를 많이 잃어버리지 않으면서도 순도가 높은 나노 입자를 회수할 수 있음을 알 수 있다.
- [0194] 도 10의 E 그래프는 본 실시예와 비교예의 나노 소포체 회수율을 나타내고 있다.
- [0195] 도 10의 E 그래프에서 실시예에 대한 결과는 DISC로 표시되어 있고, 여과막의 기공 크기와 디스크 회전 속도에 따라 구분되어 각각 검출 결과를 나타내고 있다. 비교예는 UC(ultracentrifugation)로 표시되어, 실시예와 비교되는 종래의 기술에 따른 검출 결과를 나타내고 있다.
- [0196] 초기 LNCaP 세포유래 나노 소포체는 CD9/CD81 (CD9 capture/CD81 detection) 검출 시에 1.34의 OD값을 나타내었다. 혈장에 나노 소포체를 spike 해서 종래 장치로 실험한 결과, 20 nm 3000 rpm (364 G) 조건에서 1.18의 OD를 나타냈고, 100 nm 1000 rpm (40 G) 조건에서 1.12의 OD값을 나타내었다. 즉, 실험 결과 도 10의 E 그래프에서 나타난 바와 같이, 종래의 나노 소포체 표준 분리 방법인 Ultracentrifuge (UC)로 분리한 경우보다, 본 실시예에 따른 디스크(disc)에서 20 nm 3000 rpm (364 G) 및 100 nm 1000 rpm (40G) 조건으로 분리 한 경우 80% 이상의 우수한 회수율을 보임을 확인하였다.
- [0197] 도 11은 본 실시예에 따른 장치에 100 nm 기공 크기를 가지는 여과막을 이용하여 나노 소포체를 분리 후 검출한 결과를 나타내고 있다.
- [0198] 실험은, LNCaP 세포 유래 나노 소포체를 혈장 100 microliter에 spike하여 이루어졌다. spike 이후의 초기 나노 입자수는 $6.34(\pm 0.12) \times 10^6/\text{mL}$ 이다.
- [0199] 도 11의 그래프는 각각 600 rpm (15 G), 900 rpm (33 G), 1200 rpm (58 G), 1800 rpm (131 G) 및 2400 rpm (233 G)의 디스크(disc) 회전 속도에 따른 나노 소포체 검출 결과를 나타내고 있다.
- [0200] 도 11의 A 그래프는 디스크 회전 속도에 따른 나노 입자의 개수를 나타낸다. 실험 결과, 900 rpm (33 G)에서부터 회전 속도를 증가시킬수록 나노 입자의 개수가 감소하는 양상을 보여준다.
- [0201] 도 11의 B 그래프는 디스크 회전 속도에 따른 총 단백질 양을 나타낸다. 실험 결과, 900 rpm (33G)에서부터 회전 속도를 증가시킬수록 총 단백질 양이 감소하는 양상을 보여준다.
- [0202] 도 11의 C 그래프는 디스크 회전 속도에 따른 나노 소포체 분리 시간 (좌측, Open circles) 및 순도(우측, Closed squares)를 나타낸다. 실험 결과, 600 rpm (15 G)에서부터 회전 속도를 증가시킬수록 나노 소포체 분리 시간이 감소하는 양상을 보여주고, 600 rpm (15 G) 내지 1200 rpm (58 G) 범위에서 높은 순도를 나타내고, 1800 rpm (131 G)에서부터는 순도가 점차 감소하는 양상을 보여준다.
- [0203] 도 11의 D 그래프는 디스크 회전 속도에 따른 나노 소포체 표면의 CD81 항원 발현량을 나타낸다. 실험 결과,

600rpm (15 G) 내지 1200 rpm (58 G) 범위에서 비교적 높은 CD81 항원 발현량을 보이고, 1800 rpm (131 G)에서 부터는 급격히 감소하는 양상을 보여준다.

- [0204] 도 11을 통해 종합적으로 확인해 볼 때, 회전 속도가 900rpm (33 G) 내지 1200 rpm (58 G) 범위에서 우수한 회수율, 순도, 짧은 분리시간을 확보할 수 있음을 확인 할 수 있다.
- [0205] 도 12는 본 실시예와 비교예에 대한 나노 소포체 분리 후 검출 결과를 나타내고 있다.
- [0206] 도 12에서 실시예에 대한 결과는 Disc 로 표시되어 있다. 실시예는 100 nm 기공 크기를 가지는 여과막을 구비한 디스크를 900 rpm (33 G) 조건으로 동작하여 나노 소포체를 분리한 후 검출한 결과를 나타내고 있다. 비교예는 UC(ultracentrifugation)로 표시되어, 실시예와 비교되는 종래의 기술에 따른 검출 결과를 나타내고 있다.
- [0207] 실험은 실시예와 비교예 모두 동일하게 LNCaP 세포 유래 나노 소포체를 혈장에 spike하여 이루어졌다. spike 이후의 초기 나노 입자수는 $6.34(\pm 0.12)$ E10/mL 이다.
- [0208] 도 12의 A 그래프는 검출된 나노 소포체의 개수를 나타내고 있다. 도 12의 A 그래프에 나타난 바와 같이, 실시예의 경우 LNCaP 세포 유래 나노 소포체를 spike한 혈장의 주입부피의 따라 분리한 입자 수가, 5 microliter 내지 200 microliter 범위에서 선형 관계 (linear relationship)로 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이에, 실시예의 경우 비교예인 UC와 비교하여 더 많은 개수로 나노 입자를 분리할 수 있어 보다 우수함을 알 수 있다.
- [0209] 도 12의 B 그래프는 검출된 나노 소포체의 ELISA에 의한 표면 단백질 정량 분석 결과를 나타내고 있다. 도 12의 B 그래프에 나타난 바와 같이, 실시예의 경우 LNCaP 세포 유래 나노 소포체를 spike 한 혈장의 주입부피의 따라 나노 소포체 표면의 CD9/CD81 (CD9 capture/CD81 detection) 발현량이, 5 microliter 내지 200 microliter 범위에서 선형관계로 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이에, 실시예의 경우 비교예인 UC와 비교하여, 더 높은 발현량을 보이는 것을 알 수 있다. 따라서, 본 실시예의 디스크(disc)를 활용하여 혈액 내 나노소포체의 정량 분석이 가능하다.
- [0210] 도 12의 C 그래프는 나노 소포체 유래 RNA를 분리한 결과를 나타내고 있다.
- [0211] 실험은 실시예와 비교예 모두 동일하게 LNCaP 세포 유래 나노 소포체를 혈장 100 microliter에 spike하고, 나노 소포체를 분리한 후 페놀 성분의 시약을 주입하여 나노 소포체 유래 RNA를 추출하여 이루어졌다. Bioanalyzer를 이용하고, 추출한 RNA를 전기영동하여 RNA의 크기와 농도를 분석하였다.
- [0212] 도 12의 C 그래프에 나타난 바와 같이, 실험 결과, 실시예와 비교예들 모두 같은 크기 양상을 보였으며 나노 소포체와 연관된 250 nt 이하의 많은 RNA가 추출되었다. 또한, RNA 농도 검출 결과에 있어서 본 실시예의 검출 장치를 이용하여 분리한 나노 소포체 핵산 추출 결과, 비교예들보다 더 높은 RNA 농도를 나타내 검출 효과를 증대할 수 있음을 확인 할 수 있다. 이와 같이, 나노 소포체 유래 RNA를 분리한 결과에서도 비교예인 UC에서는 RNA 검출이 어려운 반면, 실시예의 디스크를 이용하여 분리한 샘플에서는 Exosomal RNA가 검출됨을 확인할 수 있다.
- [0213] 도 13은 실시예의 조건 별로, 정상인 혈장과 암 환자의 혈장 200 microliter 로부터 분리한 나노 소포체의 검출 결과를 종래와 비교하여 나타낸다. 도 13에서 H는 정상인 혈장, L은 폐암환자의 혈장, S는 위암환자의 혈장을 의미한다.
- [0214] 도 13에서 실시예에 대한 결과는 Disc 로 표시되어 있다. Disc-20은 20nm의 기공 크기를 갖는 여과막을 구비한 디스크를 3000rpm(364 G)으로 회전 구동한 조건에서의 실험 결과를 나타내고, Disc-100은 100nm의 기공 크기를 갖는 여과막을 구비한 디스크를 1200rpm (58 G)으로 회전 구동한 조건에서의 실험 결과를 나타낸다. 비교예는 UC(ultracentrifugation)로 표시되어, 실시예와 비교되는 종래의 기술에 따른 검출 결과를 나타내고 있다.
- [0215] 도 13의 그래프 A는 나노 소포체 분리 방법에 따른 총 단백질량을 나타낸다. 실험 결과, 20 nm 3000 rpm (364 G) 조건으로 실시된 Disc-20 실시예에서 총 단백질량이 가장 높았고, 비교예인 UC 및 Disc-100(100 nm 1200 rpm (58 G))의 경우에는 유사하게 총 단백질량이 낮았다.
- [0216] 도 13의 그래프 B는 나노 소포체 분리 방법에 따른 나노 입자 회수 결과를 나타내고 있다. 실험 결과, 20 nm 3000 rpm (364 G) 조건으로 실시된 Disc-20 실시예에서 가장 많은 양의 나노 입자가 회수가 되었지만, 정상인 샘플과 암환자 샘플간의 나노 입자 개수의 차이를 보이지 않았다. 100 nm 1200 rpm (58 G) 조건으로 실시된 disc-100 실시예에서는 비교예인 UC 보다 많은 양의 나노 입자가 회수되었고, 정상인 샘플과 암환자 샘플간의 나노 입자 개수의 차이를 보였다.
- [0217] 도 13의 그래프 C는 나노 소포체 분리 방법에 따른 나노 입자의 순도를 나타낸다. 실험 결과, 모든 샘플

군에서, 100 nm 1200 rpm (58 G) 조건으로 실시된 disc-100 실시예의 경우 가장 높은 순도를 나타내었다.

- [0218] 도 13의 그래프 D는 나노 소포체 분리 방법에 따른 나노 소포체 표면의 암 검출에 사용되는 마커(EpCAM)의 발현량을 나타낸다. 실험 결과, 비교예인 UC 분리 방법과 비교하였을 때, 실시예인 Disc-20과 Disc-100 모두 전체적으로 높은 항원 발현량이 나타났고, 정상인 환자와 암 환자간의 큰EpCAM 항원 발현량 차이를 보였다.
- [0219] 도 13의 A,B,C,D 그래프에 나타난 바와 같이, 4가지 실험을 통해 환자 혈액 유래 나노 소포체를 총 단백질량(BCA), 총 나노 입자수(NTA), 순도(NTA로 측정된 나노 입자수를 BCA로 측정한 총단백질량으로 나눈 값), ELISA로 분석한 나노 소포체 표면 마커 결과, Disc-100 실시예에서 우수한 결과가 나타남을 확인할 수 있다.
- [0220] 도 14는 본 실시예에 따른 장치와 종래 장치를 통한 나노 소포체 검출 결과의 검출 CT값을 비교하여 나타내고 있다. 실험은, 200 microliter의 정상인 혈장으로부터 분리된 혈액 유래 나노 소포체의 핵산을 추출하고 real-time PCR로 검출하여 이루어졌다.
- [0221] 도 14에서 실시예에 대한 결과는 Exodisc로 표시되어 있으며, 비교예들은 UC와 Exospin으로 표시되어 있고, 실시예와 비교되는 종래의 기술에 따른 검출 결과를 나타내고 있다.
- [0222] 실험결과, 본 실시예에 따른 장치를 사용한 경우, 비교예의 UC 및 Exospin의 경우보다, 나노 소포체 표면 항원 CD81, CD63, CD9의 발현량 및 검출율이 월등히 높았다.
- [0223] 도 15는 본 실시예에 따른 장치를 이용하고, Proteinase K 용액을 이용한 샘플 전처리 단계를 거친 혈장과 전처리 단계를 거치지 않은 혈장으로부터 혈액 유래 나노 소포체의 핵산을 추출하고 real-time PCR (RT-PCR)로 검출한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0224] 실험은 본 실시예에 따른 장치를 이용하여 200 microliter의 정상인 혈장으로부터 분리된 나노 소포체에서 핵산을 추출하여 이루어졌다. 도 15의 그래프는 본 실시예에 따라 추출한 핵산으로 RT-PCR을 통해 GAPDH (House keeping gene), CD9, CD63, CD81 (나노 소포체 검출 마커)의 검출 CT 값을 나타내고 있다.
- [0225] 실험 결과에 나타난 바와 같이, Proteinase K(단백질을 분해하는 효소)을 이용하여 샘플 전처리 과정을 거치는 경우, 처리하지 않은 plasma 샘플에 비해 5배 정도 높은 mRNA 발현량이 나타났다. 즉 혈장 내에 존재하는, 나노 소포체 외의 다른 단백질이 핵산 검출 결과에 영향을 줄 수 있음을 의미하고, Proteinase K를 이용한 샘플 전처리 과정에 의해 핵산 증폭 성능이 개선됨을 확인할 수 있다.
- [0226] 도 16은 도 5의 실시예에 따른 장치를 이용하여 BT474(유방암 세포주) 세포배양액에서 나노소포체를 크기 차이에 따라 분리하고, 각 크기 분포를 가지는 나노소포체 fraction의 표면 단백질을 분석한 그래프이다.
- [0227] 예를 들어, 기공크기 20 nm 및 600 nm를 가지는 2개의 여과막을 사용하는 구조의 경우, 20 nm AAO 필터 위에는 크기가 20nm-600nm 범위의 모든 나노입자의 혼합물이 존재하게 되고, 이 나노입자의 표면 단백질 및 분자특성은 도 7 도 9에 나타난 바와 같다.
- [0228] 이와 같이, 나노 입자를 크기 차이에 의해 분리하여 각 크기 분포를 가지는 나노 입자에 대한 분석을 분리 수행할 수 있다.
- [0229] 본 실험에서는, 도 5의 실시예와 같이 기공크기가 200nm, 100nm, 20nm인 AAO 여과막을 순차적으로 구비한 디스크를 이용하여, 각 여과막에 회수된 나노입자의 크기를 분석하였다. 도 16의 A 그래프는 세 개의 필터챔버에 구비된 여과막의 조합에 따른 나노 소포체 분리 결과를 나타내고 있다. A 그래프에서 on AAO 200nm는 제1 필터챔버의 여과막(200nm)에서 검출된 나노 소포체이며, on AAO 100 nm는 제2 필터챔버의 여과막(100nm)에서 검출된 나노 소포체이며, on AAO 20 nm는 제3 필터챔버의 여과막(20nm)에서 검출된 나노 소포체를 나타낸다. Post-filtration은 제3 필터챔버의 여과막(20nm)를 통과한 이후의 용액을 의미한다.
- [0230] 도 16의 A 그래프에 나타난 바와 같이 AAO 200 nm, AAO 100 nm, AAO 20 nm 모든 필터를 통과해 나온 용액(Post-filtration)에서 각각 평균 255nm, 141nm, 78nm, 10nm의 크기를 가지는 나노입자 용액을 회수할 수 있다.
- [0231] 따라서, 실험 결과, 그래프 A에 나타난 바와 같이, 각 필터챔버의 여과막 상에서 원하는 크기의 나노 소포체가 검출되었다. 이에, 본 장치를 통해 다양한 크기의 나노 소포체를 분리하여 검출할 수 있음을 알 수 있다.
- [0232] 도 16의 B 그래프는 각 필터챔버의 여과막에서 분리된 BT474 유방암 세포 유래 나노 소포체의 검출 결과를 나타내고 있다. 도 16의 B 그래프는 해당 나노 소포체의 EpCAM과 Sialic acid의 표면 단백질을 기준으로

normalize한 것을 나타낸다.

- [0233] 20nm AAO only의 경우, 20nm AAO 여과막을 이용하여 20nm 여과막 위에 회수된 나노소포체를 의미한다. 즉, 3개의 필터챔버를 구비한 실시예의 경우 제1 필터챔버(200nm의 여과막)와 제2 필터챔버(100nm의 여과막)를 거치지 않고 제3 필터챔버(20nm의 여과막)에서 검출된 20nm 이상의 크기를 갖는 나노 소포체를 의미한다. Exofree medium의 경우, 나노 소포체가 없는 순수 배양액을 20nm 여과막을 통과시킨 것을 의미한다.
- [0234] 실험 결과, EPCAM (Epithelial cell adhesion molecule, 암 검출에 사용되는 마커)은 On 20nm AAO에서 발현량이 가장 높게 나타나, 20-100 nm 사이 범위를 갖는 크기가 비교적 작은 나노 소포체 fraction에서 더 많이 검출됨을 알 수 있다. 또한, Sialic acid (암 검출에 사용되는 마커)의 발현량은 On 100nm AAO에서 가장 높게 나타나, 100-200 nm 사이 범위를 갖는 나노 소포체 fraction에서 더 많이 검출됨을 확인할 수 있다.
- [0235] 이에, 본 실시예를 통해 서로 다른 크기 분포를 가지는 나노 소포체 fraction을 선택적으로 회수할 수 있음을 알 수 있다.
- [0236] 이와 같은 실험을 통해, 본 실시예에 따른 검출 장치를 이용하여 나노 입자를 보다 효과적으로 검출할 수 있음을 알 수 있다.
- [0237] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것이 아니고 특허청구 범위와 발명의 상세한 설명 및 첨부한 도면의 범위 안에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고 이 또한 본 발명의 범위에 속하는 것은 당연하다.

부호의 설명

- [0238]
- | | |
|--------------|--------------|
| 10 : 디스크 | 12 : 상판 |
| 14 : 하판 | 20 : 시료수용부 |
| 21 : 시료챔버 | 22 : 제1 유로 |
| 23 : 제1 밸브 | 24 : 침강부 |
| 25 : 홈부 | 30 : 필터부 |
| 31 : 필터챔버 | 311: 제1 필터챔버 |
| 312: 제2 필터챔버 | 313: 제3 필터챔버 |
| 315,317 : 유로 | 32 : 입측공간 |
| 33 : 출측공간 | 34 : 여과막 |
| 35 : 예비챔버 | 36 : 이송유로 |
| 37 : 이송밸브 | 40 : 공급부 |
| 41 : 항체챔버 | 42 : 제2 유로 |
| 43 : 제2 밸브 | 44 : 시약챔버 |
| 45 : 제3 유로 | 46 : 제3 밸브 |
| 47 : 기질액챔버 | 48 : 제4 유로 |
| 49 : 제4 밸브 | 50 : 정지액챔버 |
| 60 : 세척부 | 61 : 세척액챔버 |
| 62 : 제5 유로 | 63 : 제5 밸브 |
| 70 : 폐액수용부 | 71 : 폐액챔버 |
| 72 : 제6 유로 | 73 : 제6 밸브 |
| 80 : 회수챔버 | 81 : 제7 유로 |

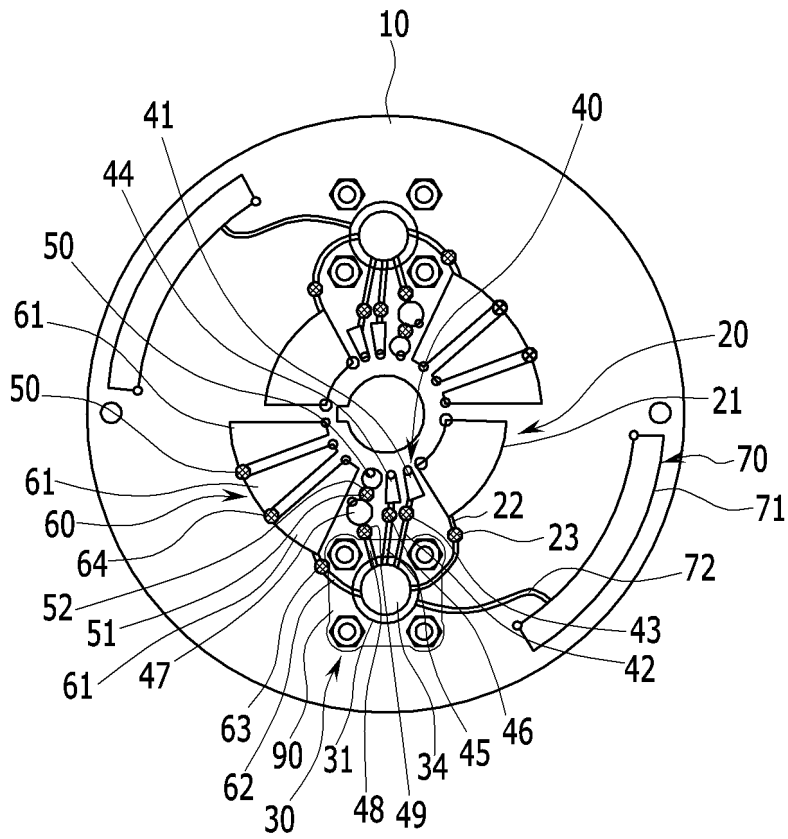
82 : 제7 밸브

90 : 덮개

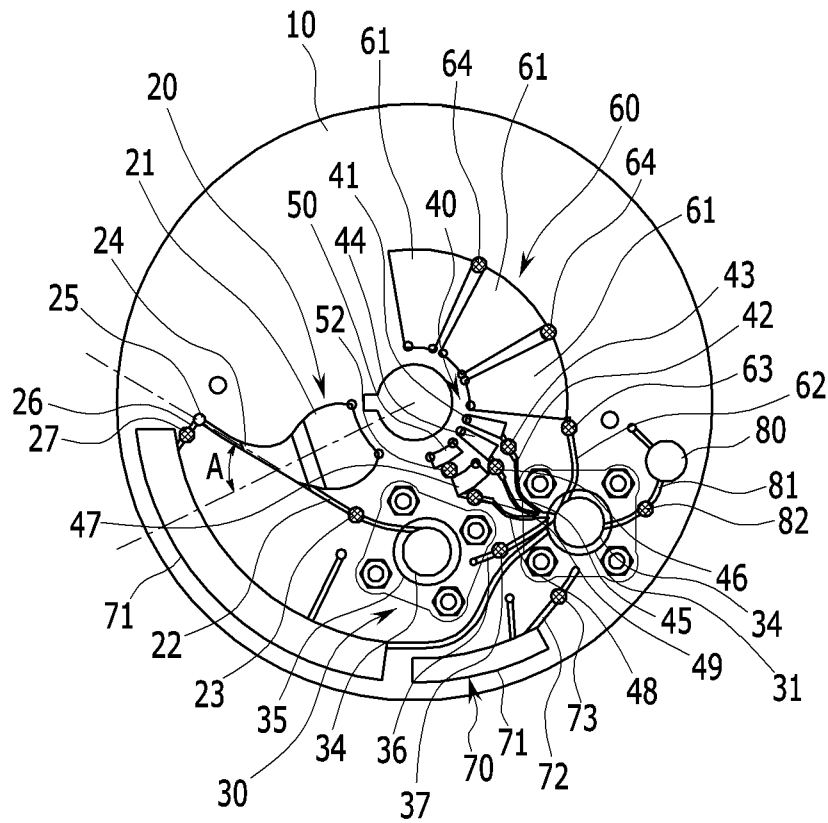
91 : 볼트

도면

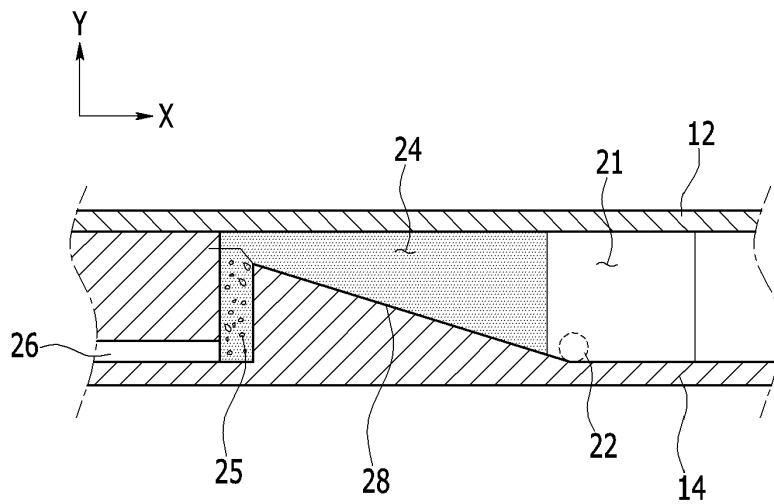
도면1



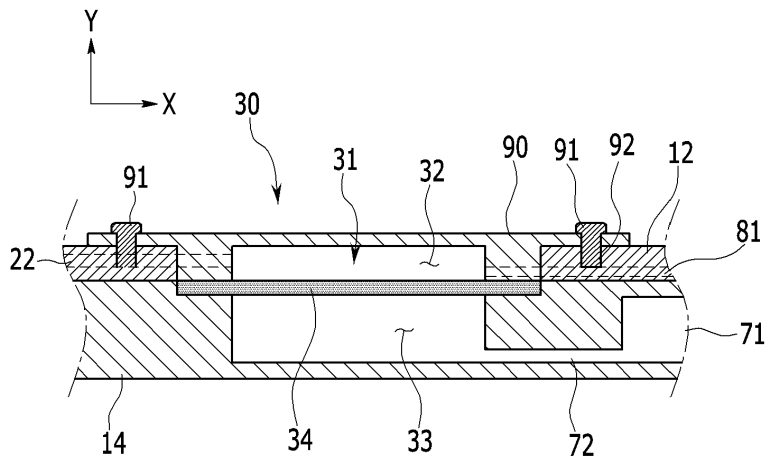
도면2



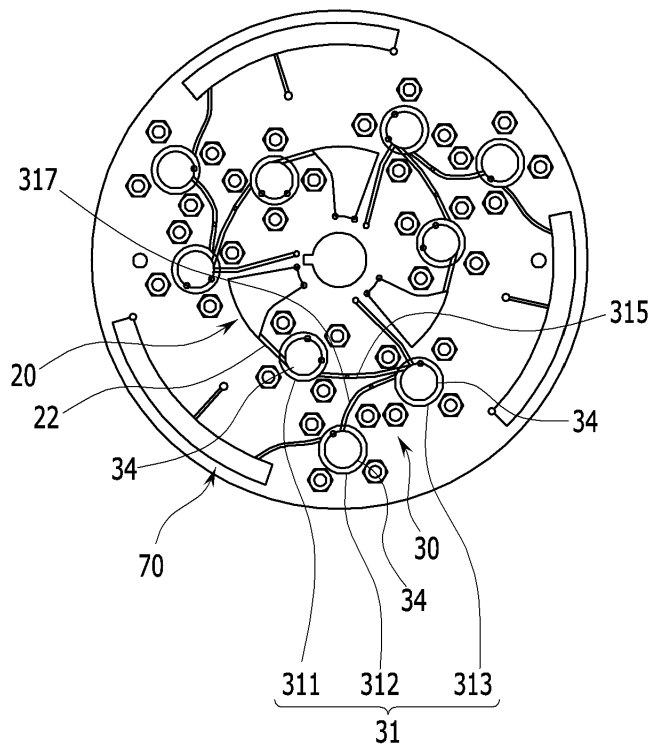
도면3



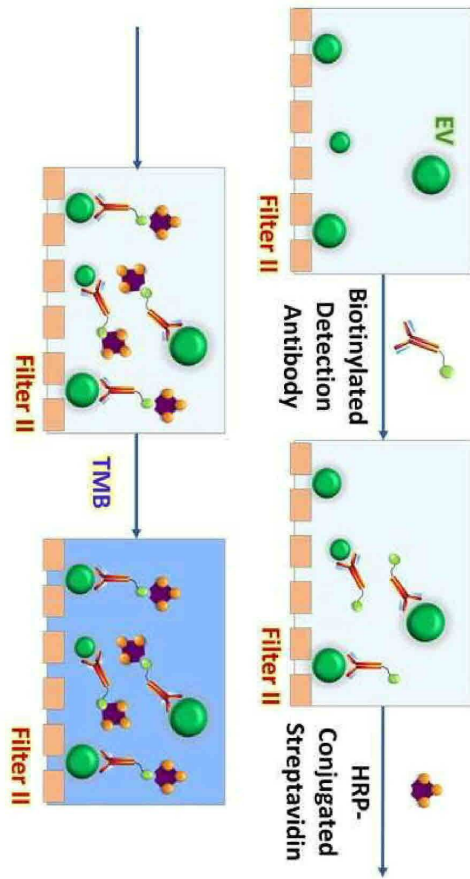
도면4



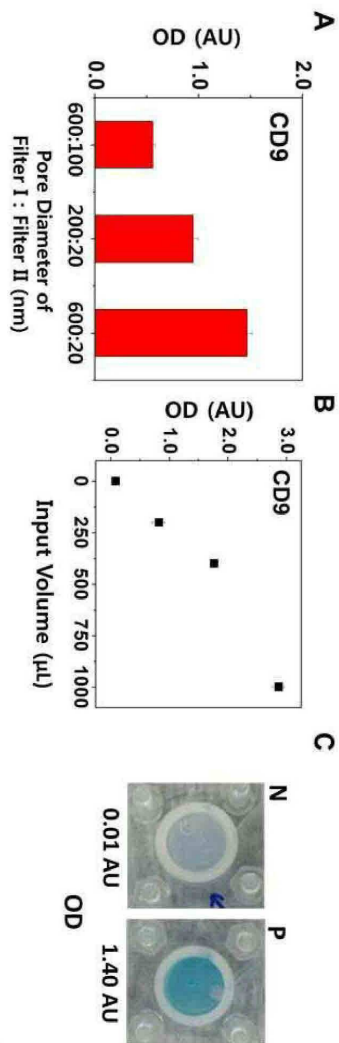
도면5



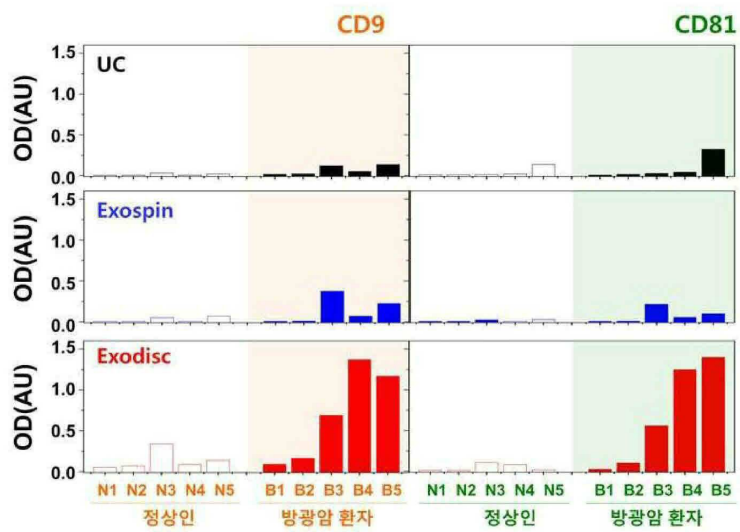
도면6



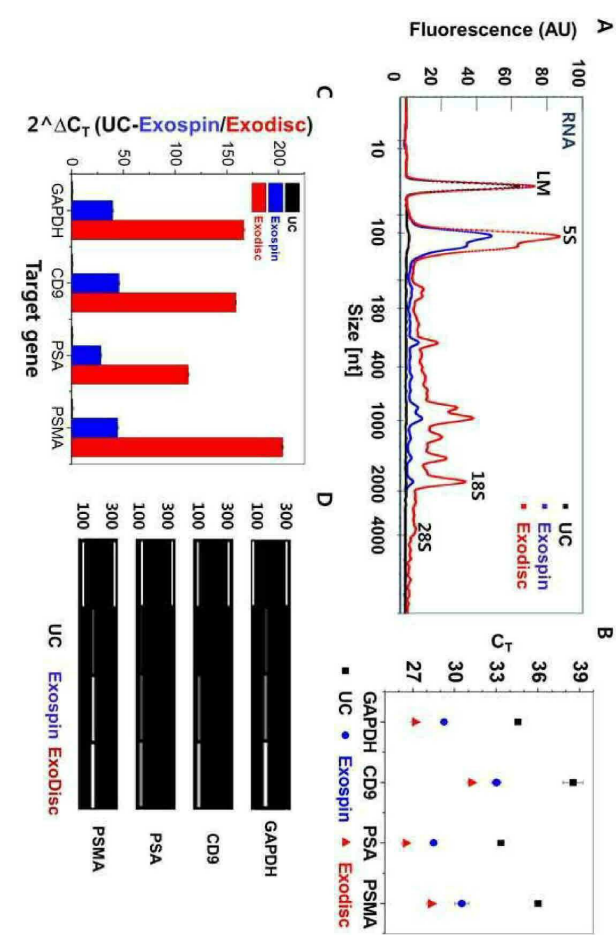
도면7



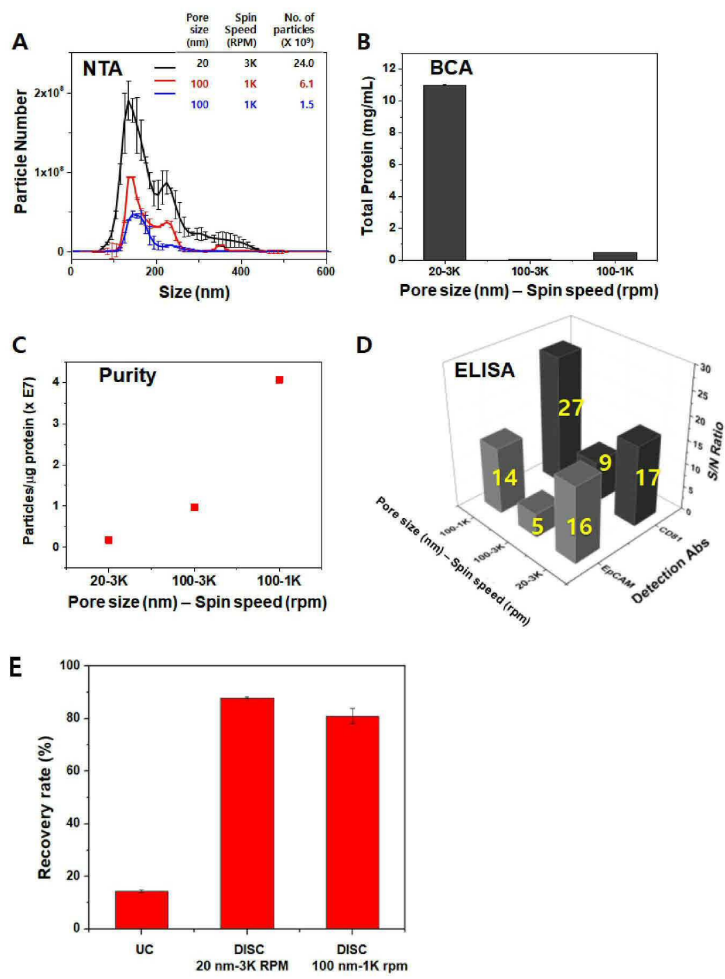
도면8



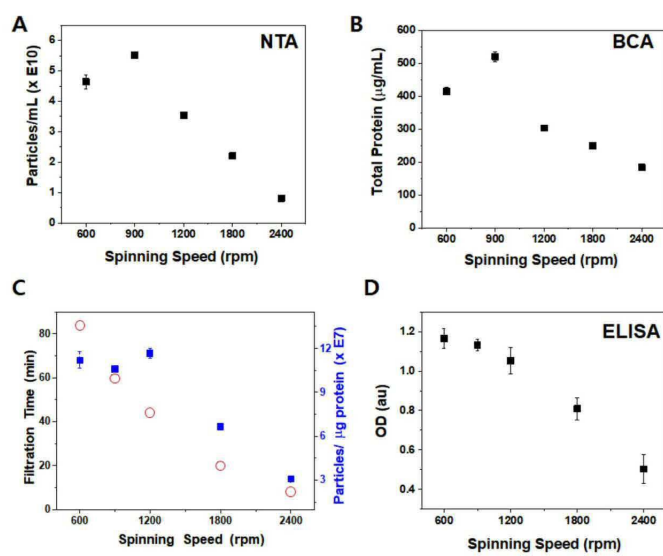
도면9



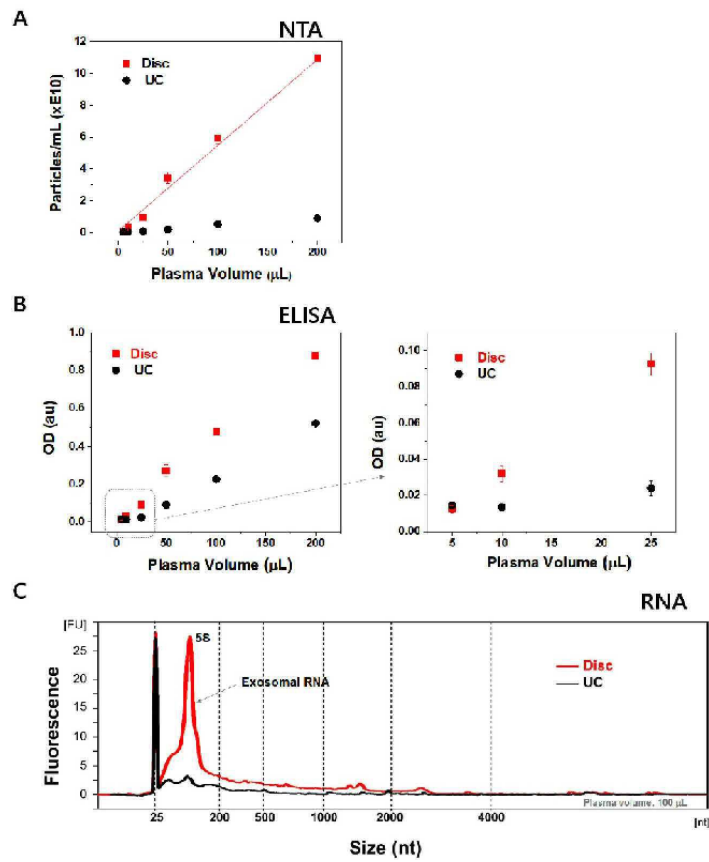
도면10



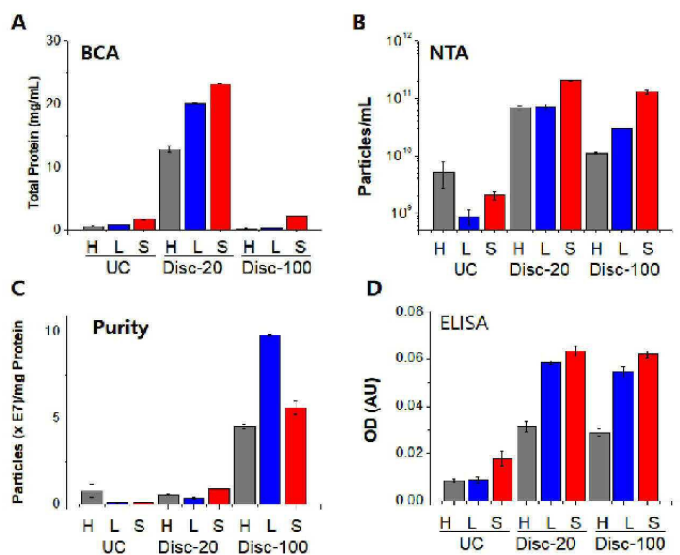
도면11



도면12



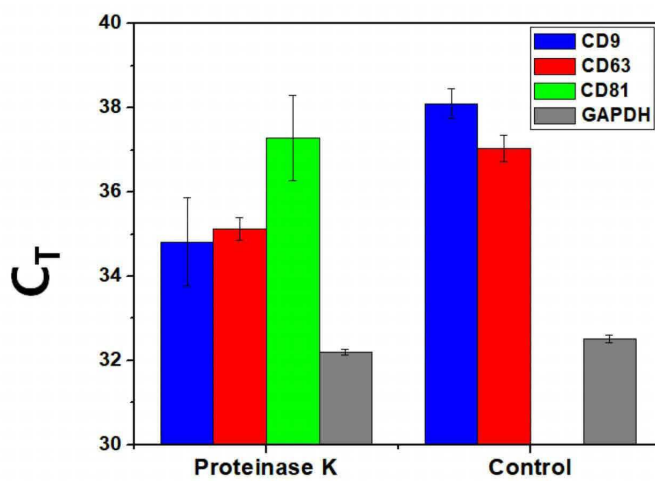
도면13



도면14

	GAPDH	CD81	CD63	CD9
Exodisc	31.54 (±0.13) 4 of 4 detected	35.07 1 of 4 detected	35.46 (±0.89) 4 of 4 detected	36.67 1 of 4 detected
Exospin	35.33 1 of 2 detected	NA Undetected	NA Undetected	NA Undetected
Ultracentrifuge	34.63 1 of 2 detected	NA Undetected	NA Undetected	NA Undetected
NTC	Undetected	Undetected	Undetected	Undetected

도면15



도면16

